

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0045239
(43) 공개일자 2024년04월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 39/464401 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7006389
(22) 출원일자(국제) 2022년08월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/039694
(87) 국제공개번호 WO 2023/015027
국제공개일자 2023년02월09일
(30) 우선권주장
63/230,161 2021년08월06일 미국(US)

- (71) 출원인
안야디, 엘엘씨
미국, 텔라웨어 19801, 윌밍턴, 스위트 7602, 노스 오렌지 스트리트 1201
- (72) 발명자
길리그, 마크 앤드류
미국, 코네티컷 06111, 뉴잉턴, 윌버 드라이브 48
오리, 라치트
미국, 메릴랜드 21043, 엘리코트 시티, 하이 캐슬 로드 8059
- (74) 대리인
특허법인정진

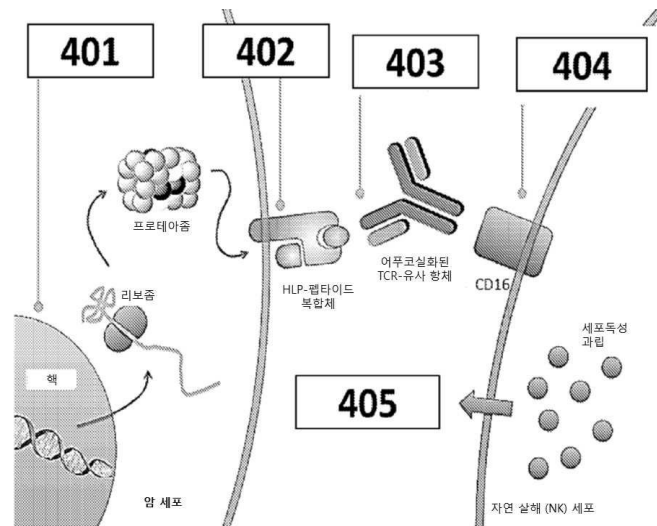
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **개인 맞춤형 암 면역치료제 제조방법**

(57) 요약

본 개시의 발명은 종양 관련 네오에피토프를 표적으로 하는 개인 맞춤형 암 면역요법을 생성하는데 유용한 방법 및 조성물을 포함한다. 또한, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2833 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/32 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암 치료용 조성물로서, 상기 조성물은,

- a. 하나 이상의 종양 특이적 에피토프에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및
 - b. 유효량의 2개 이상의 세포독성 면역 효과기 세포(cytotoxic immune effector cell),
- 를 포함하는, 암 치료용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

- a. 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 적어도 하나는 효과기 세포의 Fc-감마 수용체와 결합(engage)할 수 있으며;
 - b. 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 적어도 하나는 이중특이적이며 면역 세포 에피토프에 결합(bind)하는,
- 암 치료용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

- a. Fc-감마 수용체 발현 효과기 세포가 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 감마-델타 T 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
 - b. 면역 세포 에피토프가 T 세포, B 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 면역 세포에 의해 발현되는,
- 암 치료용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

종양 특이적 에피토프가 네오에피토프인, 암 치료용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 개인 맞춤형 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화된 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 완전히 인간인, 암 치료용 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 어푸코실화된(afucosylated) 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

종양 특이적 에피토프가 네오에피토프/HLA 복합체인, 암 치료용 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

a. 세포독성 면역 효과기 세포 중 적어도 하나가 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 감마-델타 T 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 Fc-감마 수용체 발현 효과기 세포이고;

b. 세포독성 면역 효과기 세포 중 적어도 하나가 T 세포, B 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

면역 효과기 세포가 조사된(irradiated) 것인, 조성물.

청구항 12

암 치료용 조성물로서, 상기 조성물은,

a. 하나 이상의 종양 특이적 에피토프에 특이적으로 결합하는 유효량의 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

b. 유효량의 하나 이상의 세포독성 면역 효과기 세포,

를 포함하는, 암 치료용 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

종양 특이적 에피토프가 네오에피토프인, 암 치료용 조성물.

청구항 14

청구항 12에 있어서,

상기 조성물은 개인 맞춤형 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 15

청구항 12에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화된 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 16

청구항 12에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 완전히 인간인, 암 치료용 조성물.

청구항 17

청구항 12에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 어푸코실화된 것인, 암 치료용 조성물.

청구항 18

청구항 12에 있어서,

항체 또는 이의 항원 결합 단편이 이중특이적인, 암 치료용 조성물.

청구항 19

청구항 12에 있어서,

종양 특이적 에피토프가 네오에피토프/HLA 복합체인, 암 치료용 조성물.

청구항 20

청구항 12에 있어서,

세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 감마-델타 T 세포, 감마-델타 T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 Fc-감마 수용체 발현 효과기 세포인, 암 치료용 조성물.

청구항 21

청구항 12에 있어서,

세포독성 면역 효과기 세포가 조사된 것인, 암 치료용 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 따라 2021년 8월 6일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제63/230,161호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문은 참조로 본 명세서에 통합된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 환자별로 개인 맞춤화될 수 있는 개인 맞춤형(personalized) 암 면역치료제(immunotherapy)를 생산하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 질병에 걸린 세포 표면의 네오에피토프를 표적으로 하는 항체에 관한 것이며, 이 항체는 면역 세포와 협력하여 작용한다.

배경 기술

[0005] **발명의 배경**

[0006] 암 면역요법은 암을 치료하기 위해 면역 세포, 면역체계 관련 분자 또는 면역화 방법을 사용하는 것이다. 면역 요법 접근법의 예로는 체크포인트 차단, 단클론 항체를 이용한 표적 요법, 입양 세포 요법, 및 암 항원을 이용한 치료 면역화가 있다. 체크포인트 차단 항체(예를 들어, 이필리무맙, 펌브롤리주맙)는 자연 항암 면역 반응을 강화하거나 회복시키면서, 표적 항체 치료법은 특정 표면 분자(예를 들어, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 특이적인 세툽시맙)를 과발현하는 암세포에 대한 세포독성 반응을 유도하기 위한 것이다. 세포 치료법에는 자가 또는 동종 면역 세포(예를 들어, T 세포, 자연 살해(NK) 세포)의 체외 확장 및 투여뿐만 아니라, CD19와 같은 세포 표면 분자에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포 조작이 포함된다. 치료 면역화 관련 분야에서는 암세포 표면의 HLA 분자에 의해 종종 제시되는("네오에피토프(neoepitope)" 펩타이드로서) 돌연변이로부터 발생하는 "신생항원(neoantigens)"에 기반한 전략을 개발하기 위한 연구가 진행 중이다.

[0007] 이상적인 암 치료법은 정상 세포에는 영향을 주지 않고 암세포만 특별히 파괴하여 효능은 높이고 독성은 낮거나 없어야 한다. 불행하게도 이는 실현되지 않은 비전으로 남아 있다. 면역 세포의 비특이적 활성화로 인해 체크포인트 차단은 종종 부작용을 초래한다. 대부분의 CAR-T 세포 치료법은 가장 일반적으로 선택되는 표적 항원을 기반으로 암세포와 정상 세포를 모두 표적으로 삼기 때문에 진정한 암 특이성이 부족하다. 네오에피토프 면역화의 이론적 이점은 진정한 암 특이성이지만, 이 접근법으로는 아직 상당한 임상적 성공을 거두지 못했다. 광범위하게 말하면, 지금까지의 면역요법 접근법은 특이성 부족, 높은 독성, 효능 부족, 생성 문제, 또는 전술한 것들의

조합으로 인해 어려움을 겪어 왔다.

[0008] 따라서, 가능하다면, 정상 세포에 영향을 주지 않고 최소한의 부작용을 유발하는 효과적인 암 특이적 치료법이 해당 분야에 요구된다. 본 발명은 이러한 요구를 해결한다.

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

[0010] 이하에서는 본 발명의 기본적인 이해를 제공하기 위해 본 발명의 양태에 대한 간략한 요약을 제시한다. 이 요약은 본 발명에 대한 광범위한 개요는 아니다. 이는 본 발명의 주요/핵심 요소를 식별하거나 본 발명의 범위를 기술하려는 의도가 아니다. 이의 유일한 목적은 나중에 제시될 보다 상세한 설명에 대한 서문으로서 단순화된 형태로 본 발명의 일부 개념을 제시하는 것이다.

[0011] 본 발명의 특정 실시형태에서, 종양 특이적 에피토프-HLA 복합체에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 및 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포(cytotoxic immune effector cell)를 포함하는 암 치료용 조성물이 제공되고, 여기서 조성물은 [a] 종양 특이적 에피토프가 HLA(인간 백혈구 항원) 시스템에 제시되는 환자 특이적 네오에피토프이고, [b] 세포독성 면역 효과기 세포가 세포 표면의 Fc-감마(Fc γ) 수용체를 통해 항체(또는 항체들, 또는 항체 단편)와 결합(engage)할 수 있고, 이어서 ADCC(항체 의존성 세포 매개 세포독성) 또는 ADCP(항체 의존성 세포 매개 식세포작용)를 유도하는 것을 전제로 개인 맞춤화되며, 세포 유형은 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0012] 특정 실시형태에서, 다음 단계를 포함하는 암 치료용 조성물의 제조 방법이 제공된다: 종양 표본을 대상체로부터 획득하고 시퀀싱을 통해 종양에서 발현되는 종양 특이적 유전적 돌연변이를 확인하는 단계, 확인된 종양 특이적 유전적 돌연변이를 기반으로 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계, HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 동물을 면역화하는 단계, 면역화된 비인간 동물로부터 네오에피토프 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 B 세포를 분리하는 단계, 네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계, 유효량의 네오에피토프 특이적 항체 또는 항체 단편을 생산하는 단계, 및 [a] 종양 특이적 에피토프-HLA 복합체에 특이적으로 결합하는 유효량의 항체(또는 항체 또는 항체 단편)와, [b] 세포 표면의 Fc-감마(Fc γ) 수용체를 통해 항체(또는 항체 또는 항체 단편)와 결합할 수 있고 후속적으로 ADCC(항체 의존성 세포 매개 세포독성) 또는 ADCP(항체 의존성 세포 매개 식세포작용)를 유도할 수 있는 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포를 조합하는 단계를 포함하고, NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0013] 한 양태에서, 본 발명은 암 치료용 조성물을 포함하며, 상기 조성물은 다음을 포함한다:

[0014] a. 하나 이상의 종양 특이적 에피토프에 특이적으로 결합하는(bind) 하나 이상의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 및

[0015] b. 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포.

[0016] 특정 실시형태에서, 조성물은 개인 맞춤화된다.

[0017] 특정 실시형태에서, 종양 특이적 에피토프는 네오에피토프이다.

[0018] 특정 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다.

[0019] 특정 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 완전히 인간이다.

[0020] 특정 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어푸코실화된(afucosylated) 것이다.

[0021] 특정 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이중특이적이다.

[0022] 특정 실시형태에서, 종양 특이적 에피토프는 네오에피토프/HLA 복합체이다.

[0023] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형이다.

[0024] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 조사된(irradiated) 것이다.

[0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암 치료용 조성물을 제조하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:

- [0026] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 유전적 돌연변이를 확인하는 단계,
- [0027] b. 확인된 종양 특이적 유전적 돌연변이를 기반으로 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0028] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 동물을 면역화시키는 단계,
- [0029] d. HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하거나 이의 항원 결합 단편 생성을 촉진하는 면역화된 비인간 동물로부터 B 세포를 분리하는 단계,
- [0030] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0031] f. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하는 단계, 및
- [0032] g. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포와 조합하는 단계.
- [0033] 특정 실시형태에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱이다.
- [0034] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 인간화된다.
- [0035] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 완전 인간 항체를 생산한다.
- [0036] 특정 실시형태에서, 비인간 인간화 동물은 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0037] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 특이적 항체는 비동물 방법을 통해 생성된다.
- [0038] 특정 실시형태에서, 비동물 방법은 파지 디스플레이이다.
- [0039] 특정 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어푸코실화된 것이다.
- [0040] 특정 실시형태에서, 항체의 이소형은 ADCC 또는 ADCP를 지원한다.
- [0041] 특정 실시형태에서, 항체의 이소형은 ADCC 또는 ADCP를 지원하지 않는 이소형으로부터 ADCC 또는 ADCP를 지원하는 이소형으로 추가로 변형된다.
- [0042] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 복합체는 단량체 복합체, 이량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란-연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0043] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형이다.
- [0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암 치료용 조성물을 생산하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0045] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 유전적 돌연변이를 확인하는 단계,
- [0046] b. 확인된 종양 특이적 유전적 돌연변이를 기반으로 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0047] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 동물을 면역화시키는 단계,
- [0048] d. HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하거나 이의 항원 결합 단편 생성을 촉진하는 면역화된 비인간 동물로부터 B 세포를 분리하는 단계,
- [0049] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0050] f. HLA/네오에피토프 특이적 항체로부터 항원 결합 도메인을 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 단계, 및
- [0051] g. 세포독성 면역 효과기 세포에서 CAR을 발현시키는 단계.
- [0052] 특정 실시형태에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱이다.
- [0053] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 인간화된다.
- [0054] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 완전 인간 항체를 생산한다.

- [0055] 특정 실시형태에서, 비인간 인간화 동물은 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0056] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 특이적 항체는 비동물 방법을 통해 생성된다.
- [0057] 특정 실시형태에서, 비동물 방법은 파지 디스플레이이다.
- [0058] 특정 실시형태에서, CAR을 생성하는 것은 항체의 항원-결합 도메인에 기초하여 scFv를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0059] 특정 실시형태에서, CAR은 막형단 도메인, 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인을 추가로 포함한다.
- [0060] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 복합체는 단량체 복합체, 오량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란-연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0061] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, T 세포, NK T 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형이다.
- [0062] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포이다.
- [0063] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 CD8⁺ T 세포이다.
- [0064] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0065] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 신생에피토프를 확인하는 단계,
- [0066] b. 확인된 종양 특이적 네오에피토프로부터 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0067] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 포유동물을 면역화시키는 단계,
- [0068] d. 면역화된 비인간 포유동물로부터 HLA/네오에피토프 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 B 세포를 분리하는 단계,
- [0069] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0070] f. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하는 단계,
- [0071] g. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체와 유효량의 세포독성 면역 효과 세포를 대상체에게 투여하여 암을 치료하는 단계.
- [0072] 특정 실시형태에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱이다.
- [0073] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 인간화된다.
- [0074] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 완전 인간 항체를 생산한다.
- [0075] 특정 실시형태에서, 비인간 인간화 동물은 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0076] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 특이적 항체는 비동물 방법을 통해 생성된다.
- [0077] 특정 실시형태에서, 비동물 방법은 파지 디스플레이이다.
- [0078] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 특이적 항체는 어푸코실화된 것이다.
- [0079] 특정 실시형태에서, 항체의 이소형은 ADCC 또는 ADCP를 지원한다.
- [0080] 특정 실시형태에서, 항체의 이소형은 ADCC 또는 ADCP를 지지하지 않는 이소형으로부터 ADCC 또는 ADCP를 지원하는 이소형으로 추가로 변형된다.
- [0081] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 복합체는 단량체 복합체, 오량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란-연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0082] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포 또는 이들

의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형이다.

- [0083] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0084] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 신생에피토프를 확인하는 단계,
- [0085] b. 확인된 종양 특이적 네오에피토프로부터 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0086] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 포유동물을 면역화시키는 단계,
- [0087] d. 면역화된 비인간 포유동물로부터 HLA/네오에피토프 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 B 세포를 분리하는 단계,
- [0088] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0089] f. HLA/네오에피토프 특이적 항체로부터 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 단계,
- [0090] g. 세포독성 면역 효과기 세포에서 CAR을 발현시키는 단계, 및
- [0091] h. 대상체에게 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포를 투여하여, 암을 치료하는 단계.
- [0092] 특정 실시형태에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱이다.
- [0093] 특정 실시형태에서, 비인간 동물은 인간화된다.
- [0094] 특정 실시형태에서, 비인간 인간화 동물은 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0095] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 특이적 항체는 비동물 방법을 통해 생성된다.
- [0096] 특정 실시형태에서, 비동물 방법은 파지 디스플레이이다.
- [0097] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 복합체는 단량체 복합체, 이량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란-연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0098] 특정 실시형태에서, CAR을 생성하는 것은 항체의 항원-결합 도메인에 기초하여 scFv를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0099] 특정 실시형태에서, CAR은 막횡단 도메인, 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인을 추가로 포함한다.
- [0100] 특정 실시형태에서, HLA/네오에피토프 복합체는 단량체 복합체, 이량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란-연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0101] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, T 세포, NK T 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형이다.
- [0102] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포이다.
- [0103] 특정 실시형태에서, 세포독성 면역 효과기 세포는 CD8⁺ T 세포이다.

도면의 간단한 설명

- [0104] 본 발명의 특정 실시형태에 대한 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 예시적인 실시형태가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

도 1은 제안된 개인 맞춤형 암 면역요법이 제조되는 공정의 단순화된 플로우 차트이다.

도 2는 본 발명의 작용 메커니즘이다. 도 2에는 효과기 면역 세포 표면의 CD16이 CD16, CD32 또는 CD64를 포함 하되 이에 국한되지 않는 Fc-감마 수용체인 시나리오가 제시되어 있다. 도 2 범례는 다음과 같다: 201 돌연변이는 비자기 아미노산 서열의 번역을 초래함, 202 항원 가공 경로는 HLA 분자에 네오에피토프의 제시를 유도함. 203 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 항체는 높은 특이도로 암세포에 결합함, 204 효과기

세포 상의 CD16 Fc γ RIII)는 Fc 영역에 높은 친화도로 결합하여, 세포독성 효과기 기능을 활성화함, 205 세포독성 활성은 암세포의 특이적 사멸을 유도함.

도 3은 바람직한 실시형태에서 제안된 개인 맞춤형 암 면역요법이 제조되는 과정의 단순화된 플로우 차트이다.

도 4는 바람직한 실시형태에서 제안된 면역요법의 작용 메커니즘이다. 도 4의 범례는 다음과 같다: 401 프레임 시프트 돌연변이는 비-자기 아미노산 서열의 번역을 초래함, 402 항원 가공 경로는 HLA 분자에 네오에피토프의 제시를 유도함, 403 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 항체는 높은 특이성으로 암세포에 결합함, 404 NK 세포 상의 CD16(Fc γ RIII)은 어푸코실화된 Fc 영역에 높은 친화력으로 결합하여, 세포독성 효과기 기능을 활성화함, 405 세포독성 과립의 탈과립 및/또는 사이토카인의 분비는 암 세포의 특이적인 사멸을 유도함.

도 5는 바람직한 실시형태에서 제안된 개인 맞춤형 암 면역요법이 제조 및 투여되는 과정의 상세한 플로우 차트이다. 도 5의 범례는 다음과 같다: 502 혈액 샘플, 504 종양 샘플, 506 차세대 DNA 시퀀싱, 508 RNA 시퀀싱, 510 종양에서 발현된 프레임시프트 돌연변이 식별, 512 HLA 일배체형을 기반으로 프레임시프트 유래 고친화성 네오에피토프 예측, 514 HLA 네오에피토프 사랑체 생산, 516 HLA-네오에피토프 사랑체로 OmniRats 면역화, 518 HLA-네오에피토프 사랑체로 OmniRats를 두 번째로 면역화, 520 비장 및 림프절의 B 세포 농축, 522 HLA-네오에피토프 사랑체로 B 세포 염색, 524 네오에피토프 특이적 B 세포의 단일 세포 분류, 526 ELISA에 의한 Ab:Ag 테스트, 528 RT-PCR 및 양성에 대한 시퀀싱, 530 인간 항체 벡터로 (인간) 가변 영역 서열 클로닝, 532 생산자 세포주를 사용하여 후보 항-네오에피토프 항체의 소규모 시험 배치 생산, 534 환자 종양 세포의 단일 세포 현탁액 생성, 536 냉동보존, 538 환자의 종양 세포 해동, 540 ELISA에 의한 후보 항네오에피토프 항체로 종양 세포 염색, 542 세포 독성 강화 배치에서 NK 세포주(CD16을 발현함) 배양, 544 어푸코실화된 항체를 생산하도록 조작된 생산자 세포를 사용하여, 성공적인 항체의 대규모 GMP 생산, 546 성공적인 종양 결합 HLA-네오에피토프 특이적 항체를 선택, 548 NK 세포 조사, 550 NK 세포 주입, 552 항체 주입.

도 6은 SNV-유래 네오에피토프가 표적화되는 실시형태의 상세한 플로우 차트이다. 도 6 범례는 다음과 같다: 601 종양에서 발현된 프레임시프트 돌연변이 확인, 602 HLA 일배체형을 기반으로 프레임시프트 유래 고친화성 네오에피토프 예측, 603 ELISA에 의한 Ab:Ag 결합 테스트, 604 후보 항-네오에피토프 항체로 종양 세포 염색, 605 성공적인 종양 결합 HLA-네오에피토프 특이적 항체가 선택됨.

도 7은 SNV-유래 네오에피토프가 표적화되는 실시형태의 작용 메커니즘이다. 도 7의 범례는 다음과 같다: 701 SNV 돌연변이는 단일 아미노산 변화를 포함하는 아미노산 서열의 번역을 초래함, 702 항원 가공 경로는 HLA 분자에 네오에피토프의 제시를 유도함, 703 네오에피토프-HLA에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 항체 복합체는 높은 특이성으로 암세포에 결합함, 704 NK 세포의 CD16(Fc γ RIII)은 세포독성 효과기 기능을 활성화하는 어푸코실화된 Fc 영역에 높은 친화력으로 결합함, 705 세포독성 과립의 탈과립, 및/또는 사이토카인의 분비는 암 세포의 특이적 사멸을 유도함.

도 8은 HLA-네오에피토프 복합체의 단량체, 또는 사랑체 이외의 다른 다량체가 면역화 및/또는 시험을 위해 사용되는 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 8의 범례는 다음과 같다: 801 HLA-네오에피토프 단량체 또는 다량체 생성, 802 HLA-네오에피토프 단량체 또는 다량체로 OmniRats 면역화, 803 HLA-네오에피토프 단량체 또는 다량체로 OmniRats를 두 번째로 면역화, 804 HLA-네오에피토프 단량체 또는 다량체로 B 세포 염색.

도 9는 TCR-유사 항체가, 예를 들어, 이중특이성, 또는 효과기 기능을 최적화하기 위한 변형된 Fc 영역과 같이, 몇몇 방식으로 조작되는 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 9의 범례는 다음과 같다: 901 항체는 이중특이적이고/이거나 변형된 Fc 영역을 갖도록 조작됨.

도 10은 TCR-유사 항체가, 예를 들어, 이중특이성, 또는 효과기 기능을 최적화하기 위한 변형된 Fc 영역과 같이, 몇몇 방식으로 조작되는 실시형태의 작용 메커니즘이다. 도 9의 범례는 다음과 같다: 1001 프레임시프트 돌연변이는 비자기 아미노산 서열의 번역을 초래함, 1002 항원 가공 경로는 HLA 분자에 네오에피토프의 제시를 유도함, 1003 네오에피토프에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 및/또는 이중특이적 항체 HLA 복합체는 높은 특이도로 암세포에 결합함, 1004 NK 세포의 CD16(Fc γ RIII)은 조작된 Fc 영역에 높은 친화도로 결합하여, 세포독성 효과기 기능을 활성화함, 1005 세포독성 과립의 탈과립 및/또는 사이토카인 분비는 암 세포의 특이적 사멸을 유도함.

도 11은 대식세포, 호중구, 단핵구 또는 수지상 세포와 같은 다양한 세포 유형이 환자에게 투여되는 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 11의 범례는 다음과 같다: 1101 세포독성 강화 배치에서 대식세포, 호중구, 단핵구

또는 수지상 세포를 배양함, 1102 세포에 방사선을 조사함(불멸화 세포주인 경우에만 필요함).

도 12는 대식세포, 호중구, 단핵구 또는 수지상 세포와 같은 다양한 세포 유형이 환자에게 투여되는 실시형태의 작용 메커니즘이다. 도 12의 범례는 다음과 같다: 1201 프레임시프트 돌연변이는 비자기 아미노산 서열의 번역을 초래함, 1202 항원 가공 경로는 HLA 분자에 네오에피토프의 제시로 이어짐, 1203 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 항체는 높은 특이성으로 암 세포에 결합함, 1204 효과기 세포의 CD16(Fc γ RIII) 또는 CD32(Fc γ RII)는 어푸코실화된 Fc 영역에 높은 친화도로 결합하여, 세포독성 효과기 기능(ADCC 또는 ADP)을 활성화함, 1205 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 또는 다른 세포독성 메커니즘.

도 13은 환자에게 투여된 세포가 유전적으로 조작된 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 13의 범례는 다음과 같다: 1301은 유전적으로 조작된 세포독성 효과기 세포(예를 들어, 특정 유전자 녹아웃), 1302 조작된 세포에 방사선 조사.

도 14는 환자에게 투여된 세포가 유전적으로 조작된 실시형태의 작용 메커니즘이다. 도 14의 범례는 다음과 같다: 1401 프레임시프트 돌연변이는 비-자가 아미노산 서열의 번역을 초래함, 1402 항원 가공 경로는 HLA 분자 상의 네오에피토프의 제시를 유도함. 1403 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 개인 맞춤형 TCR 유사 항체는 높은 특이성으로 암 세포에 결합함, 1404 조작된 효과기 세포의 Fc γ 수용체는 어푸코실화된 Fc 영역에 높은 친화도로 결합하여, 세포독성 효과기 기능을 활성화함, 1405 세포독성 과립의 탈과립 및/또는 사이토카인의 분비는 암 세포의 특이적인 사멸을 유도함.

도 15는 환자에게 투여된 NK 세포가 자가 세포이거나, 대안적으로 혈액 공여자 또는 제대혈로부터의 동종 세포인 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 15의 범례는 다음과 같다: 1501 자가 유래 NK 세포 또는 제대혈 또는 기증자 혈액에서 유래한 동종 NK 세포를, 세포독성 강화 배지에서 배양.

도 16은 투여된 세포독성 효과기 세포가 CAR 구축물을 발현하고, 네오에피토프 특이성이 항체가 아닌 CAR의 scFv 부분에 의해 부여되는 실시형태의 상세한 플로우차트이다. 도 16에는 네오에피토프-HLA 복합체에 대해 생성된 TCR 유사 항체의 투여를 포함하는 옵션이 제시되어 있다. 도 16 범례는 다음과 같다: 1601 성공적인 종양 결합 HLA-네오에피토프 특이적 항체는 scFv 서열로 전환되어 CAR 구축물로 클로닝되고, 1602 세포독성 효과기 세포는 CAR 구축물로 형질도입되고, 1603 CAR-발현 효과기 세포가 주입됨.

도 17은 투여된 세포독성 효과기 세포가 CAR 구축물을 발현하고, 네오에피토프 특이성이 항체가 아닌 CAR의 scFv 부분에 의해 부여되는 실시형태의 작용 기전이다. 도 17에는 네오에피토프-HLA 복합체에 대해 생성된 TCR 유사 항체의 투여를 포함하는 옵션이 제시되어 있다. 도 17 범례는 다음과 같다: 1701 프레임시프트 돌연변이로 인해 비자기 아미노산 서열이 번역됨, 1702 항원 가공 경로가 HLA 분자에 네오에피토프를 제시함, 1703 개인 맞춤형 TCR 유사 단일 사슬 가변 단편(scFv) 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 키메라 항원 수용체(CAR)에 통합되어 높은 특이성으로 암세포에 결합함, 1704 세포독성 효과기 세포는 네오에피토프 특이적 CAR, 세포독성 과립의 탈과립 및/또는 사이토카인 분비를 발현하도록 조작되어, 암 세포의 특이적 사멸을 야기함.

도 18은 유세포 분석을 위한 게이팅 전략을 보여준다. 유세포 측정법을 사용하여 표적 세포에 대한 NK 세포의 세포 독성 활성을 평가하기 위해 다음의 게이팅 전략을 사용하였다: 효과기 세포와 표적 세포를 모두 포획하는 대형 전방 산란/측면 산란 게이트를 사용하여 잔해물을 제거했다. CFSE 염색에 기반하여 표적(EL4) 세포와 효과기(NK) 세포를 구별했다. 표적 세포의 세포사멸과 사멸은, 각각, 포스파티딜세린의 어넥신(Annexin) V 염색과 DNA의 SYTOX 블루 염색을 사용하여 정량화했다. NK 세포의 탈과립화, 즉 세포독성 활성은 CD107a에 대한 항체를 사용하여 정량화했다. 여러 개의 다른 공동배양물에 대한 대표 도트 플롯이 데모를 위해 제시되어 있다.

도 19A-19B는 표적 세포에 의해 제시된 네오에피토프에 대해 유도된 TCR 유사 항체를 통한 표적 세포의 NK 세포 사멸에서 ADCC 매개 부스트를 보여준다. EL4 세포를 SIINFEKL 펩티드와 함께 배양하여 이 특정 펩티드로 세포 표면 MHC 분자(H2K^b)를 로딩했다. 도 19A: 항-SIINFEKL-H2K^b IgG2a 항체의 존재 또는 부재하의 단일배양(monoculture)으로 4시간 경과 후, EL4 세포를 SYTOX 블루로 염색하여 죽은 세포를 정량화했다. 도 19B: A에서와 같이 동일한 실험 중점이 나타나 있으나, 공동배양(co-culture) 실험 그룹에는 그렇지 않다. 새로 분리한 1차 마우스 NK 세포를 3가지 다른 효과기:표적 비율로 첨가하고, 항체 유무에 관계없이 4시간 동안 공동배양했다. EL4 단일배양물에서 항체(NK 세포 없이)의 통계적으로 유의한 직접적인 세포독성 효과가 나타났기 때문에, 항체의 존재 또는 부재 하의 NK 세포의 자연 세포독성[도 19A]과 ADCC 세포독성[도 19B]의 합을 정확하게 정량하고 비교하기 위해, 이 (항체 단독에 의한) 세포독성 기여도를 항체 존재 하의 실험 그룹의 공동배양 결과에서 뺐다. 항체의 존재와 항체의 부재 하에 정량화한 측정된 세포독성(γ 축을 따라) 간의 차이는 주어진

E:T 비율에 대한 ADCC 메커니즘 자체의 정량화를 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=3). 통계는 독립표본(unpaired) t-검정으로 인한 p-값을 나타낸다. * p<0.05; **p<0.01

도 20은 젖산염 탈수소효소(LDH)의 방출이 유세포 분석법으로 정량화한 죽은 세포 염색을 확증시킴을 보여준다. 4시간 인큐베이션 후, 도 19에 기술된 항체가 존재 또는 부재시의 공동배양물(및 단일배양물)로부터의 상청액을 LDH 효소 활성에 대한 비색 검정을 이용하여 LDH의 존재에 대해 정량화했다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=3). 통계는 독립표본 t-검정으로 인한 p-값을 나타낸다. * p<0.05; **p<0.01.

도 21A-21B는 괴사보다는 세포자멸사에 의해 더 많이 발생하는 TCR-유사 항체를 통한 ADCC를 도시하며, ADCC-세포자멸사 및 ADCC-괴사는 E:T 비율의 증가에 의해 증가된다. 도 19에 나타난 데이터를 어넥신-V 염색에 기초하여 추가로 분석하여 다음과 같이 정량화했다: [도 21A] 세포자멸을 통한 표적 세포 사멸(어넥신-V 음성 염색). SIINFEKL 펩타이드-로딩된 EL4 세포를 이전 도면에서와 같이 항-SIINFEKL-H2K^b IgG2a 항체와 함께 또는 없이 배양했다. 동일한 실험에서 세포를 또한 어넥신-V로 염색하여 세포자멸이 진행되는 세포를 정량화했다. 죽은 세포에 대한 SYTOX 염색과 세포자멸사성 세포에 대한 어넥신-V 염색을 결합함으로써 ADCC에 의해 매개되는 표적 세포 사멸의 증가와 관련하여 후기 세포자멸사(도 21A)와 괴사(도 21B)를 구별하는 것이 가능했다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=3). 통계는 짝이 없는 t-검정으로 인한 p-값을 나타낸다. * p<0.05; **p<0.01.

도 22는 CD107a 염색에 의해 측정된 바와 같이 항체 존재 하에 NK 세포의 탈과립화가 증가함을 예시한다. SIINFEKL 펩타이드-로딩된 EL4 세포를 이전 도면에서와 같이 항-SIINFEKL-H2K^b IgG2a 항체와 함께 또는 없이 배양했다. 동일한 실험에서 세포는 CD107a에 대한 항체를 사용하여 4시간 동안 배양하는 동안에도 염색되었다. CD107a는 NK 세포에 의한 탈과립의 지표이며, 이는 NK 세포가 표적 세포 살해를 유도하기 위해 사용하는 메커니즘이다. NK 세포를 또한 단독으로 배양하여(NK 단일배양) 임의의 표적 세포가 없는 상태에서 CD107a 염색의 기준 수준을 확립했다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=3). 통계는 독립표본 t-검정으로 인한 p-값을 나타낸다. *** p<0.001; ****p<0.0001.

도 23A-23B는 SIINFEKL 펄스 EL4 세포에 특이적으로 결합하는 항-SIINFEKL-H2K^b 항체를 도시한다. 도 18-22에 해당하는 실험과 별개의 실험에서, EL4 세포를 SIINFEKL 펩티드와 함께 인큐베이션하여 세포 표면 MHC 분자를 로딩하거나, 또는 어떠한 펩티드 없이 유사한 조건에서 배양했다. 그런 다음 펩타이드-펄스된 세포 및 펄스되지 않은 세포를 모두 항-SIINFEKL-H2K^b 항체의 존재 또는 부재 하에서 인큐베이션했다. 이들 4개의 실험 그룹 모두 유세포 분석법을 통한 분석을 위해 마우스 IgG에 특이적인 PE 결합 2차 항체로 후속적으로 염색했다. 4가지 조건 각각에 대해 4번의 반복실험을 이용했다.

도 24는 AML에서 일반적으로 발견되는 "공개(public)" 프레임시프트 유래 신생항원에 대한 여러 신규 TCR 유사 항체를 생성하는 플로우차트를 보여주는 다이어그램이다. 범례는 다음과 같다: 2401 HLA-네오에피토프 복합체 생성, 2402 OmniRats를 HLA-네오에피토프 복합체로 번역화, 2403 OmniRats를 HLA-네오에피토프 복합체로 두 번 째로 번역화, 2404 비장 및 림프절로부터 B 세포를 농축, 2405 HLA-네오에피토프 복합체로 B 세포를 염색, 2406 네오에피토프 특이적 B 세포의 단일 세포 분류, 2407 RT-PCR 및 시퀀싱, 2408 인간 항체 백터로의 (인간) 가변 영역 서열을 클로닝, 2409 CHO 세포를 형질감염시키고 후보 항체의 테스트 배치를 생성, 2410 ELISA에 의한 Ab:Ag 결합 테스트, 2411 자가 NK 세포, 2412 동종 NK 세포(예를 들어, 공여자 유래 제대혈 유래, iPSC 유래), 2413 조사된 NK 세포주.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 상세한 설명

[0106] 정의:

[0107] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 설명된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 테스트를 위한 실행에 사용될 수 있지만, 선호되는 재료 및 방법이 여기에 설명되어 있다. 본 발명을 기술하고 청구함에 있어서, 다음의 용어가 사용될 것이다. 또한, 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하기 위한 것이며 제한하려는 의도가 아니라는 점을 이해해야 한다.

[0108] 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 여기에서

사용된다. 예를 들어, "요소(an element)"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

- [0109] 본 명세서에서 양, 시간적 지속 시간 등의 측정 가능한 값을 언급할 때 사용된 "약(about)"은 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미하며, 그러한 변동은 개시된 방법을 수행하는데 적절하기 때문이다.
- [0110] 본 명세서에 사용된 항원 결합 단편은 $F(ab')_2$ 단편, Fab 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 단일-도메인 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는 동족 항원과의 결합을 촉진하는 항체의 일부를 의미한다.
- [0111] 본 명세서에서 면역글로불린-인간화는 내인성 면역글로불린 유전자가 더 이상 발현되지 않고 대신 인간 면역글로불린 유전자가 발현되도록 유전자 변형된 동물을 의미한다. 이들 동물은 "인간화(humanized)" 항체가 아닌 "완전 인간(fully human)" 항체를 생산한다.
- [0112] 본 명세서에 사용된 신생항원은 체세포 돌연변이의 결과로 돌연변이가 걸려진 세포에 의해 생산된 정상 단백질과 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 변화를 포함하는 단백질을 의미한다.
- [0113] 본 명세서에 사용된 네오에피토프는 신생항원으로부터 유래되고 변화된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 함유하는 세포 표면 MHC 분자에 존재하는 펩티드를 의미한다.
- [0114] 본 명세서에 사용된 개인 맞춤화(personalized)란 각 환자에 대해 개별적으로 개발된 것을 의미한다.
- [0115] 인간 환자를 치료하기 위해 신생항원-HLA(인간 백혈구 항원) 복합체가 본 발명에서 언급되었지만, 신생항원-MHC(주요 조직적합성 복합체)의 관련성 또한 내포되어 있다(예를 들어, 비인간 대상체를 치료하기 위한 것).
- [0116] 범위: 본 개시 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지의 편의와 간결성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되지 않아야 한다는 점을 이해해야 한다. 따라서, 범위에 대한 기술은 가능한 모든 하위 범위뿐만 아니라 그 범위 내의 개별 수치도 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1부터 6까지의 범위에 대한 기술은 1부터 3까지, 1부터 4까지, 1부터 5까지, 2부터 4까지, 2부터 6까지, 3부터 6까지 등의 하위 범위를 비롯하여, 해당 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0117] 설명:
- [0118] 본 명세서에 기술된 발명은 (각 환자의 암에 특이적인) 종양 특이적 네오에피토프-HLA 복합체에 대한 단클론 항체를 사용하여 Fc 감마(Fc γ) 수용체 발현 세포독성 효과기 세포(내인성으로 도입되고/되거나 세포 주입에 의해 외인성으로 도입됨)를 유도하여 매우 특이적 방식으로 암성 세포를 죽이는 개인 맞춤형 암 면역요법에 대한 새로운 접근 방식이다. 본 발명은 환자 자신의 면역체계에서 자연적인 항신생항원 T 세포 반응에 대한 보다 전통적인 의존성보다는, Fc γ 수용체 발현 세포독성 효과기 세포에 의한 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)을 활용하여 환자의 종양 특이적 신생항원을 표적화하는 것을 포함한다. 본 발명은 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는 몇 가지 별개의 개념을 독특하게 결합하고 활용함으로써 기존 면역요법 접근법의 한계와 과제를 극복한다: (1) 네오에피토프-HLA 복합체 표적화, (2) 세포독성 효과기 면역 세포와 결합된 특정 항원에 대한 단일클론 항체, (3) 내인성 면역 세포가 제공하는 ADCC(또는 ADCP 또는 ADCC와 ADCP의 조합)의 특정 메커니즘 또는 입양 세포 치료. 항체는 환자별로 또는 환자 그룹이 공유하는 네오에피토프를 기반으로 암세포의 HLA 분자에 의해 나타나는 돌연변이 펩타이드에 대해 개발될 수 있다(이러한 HLA-펩타이드 복합체는 일반적으로 T 세포 수용체(TCR)의 표적이 되며, 따라서 항체는 "TCR 유사(TCR-like)"이다)(Dahan, R. & Reiter, Y. (2012) *Expert Rev. Mol. Med.* 14, e6). 주입된 Fc γ 수용체 발현 세포독성 효과기 세포(예를 들어, CD16을 발현하는 NK 세포, CD32를 발현하는 대식세포)는 이러한 TCR-유사 항체에 의해, 주로 ADCC 또는 ADCP(또는 ADCC와 ADCP 모두)의 메커니즘을 활용하여, 각 특정 환자의 암 세포를 특이적으로 공격하도록 지시받게 된다. 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 실시형태를 나타낼 수 있는 다음 실시예에서 실시가능하게 상세히 기재되어 있다.
- [0119] 도 1은 본 발명의 실시형태를 도식적으로 나타낸 것이다. 수술이나 생검 후 새로 분리된 종양 조직부터 시작하여 종양 조직과 정상 조직(혈액)의 DNA 서열을 비교하여 돌연변이를 식별할 수 있다. Illumina 및/또는 Ion Torrent와 같은 차세대 시퀀싱 플랫폼은 개별적으로 또는 결합하여 사용할 수 있으며 - 서로 다른 두 플랫폼을 사용하여 시퀀싱하고 두 플랫폼 모두에서 검출된 돌연변이만 사용함으로써 식별된 돌연변이에 대한 신뢰도가 높다(Sherafat, et al. (2020) *BMC Bioinformatics* 21: 498). HLA 분자와 결합된 돌연변이 펩타이드를 사용하여

래트를 면역시킬 수 있다. 네오에피토프-HLA 복합체에 특이적인 TCR-유사 항체를 생산하는 래트 B 세포를 분리할 수 있고, 항체가 종양 세포에 결합하는지 테스트할 수 있다(Ouisse, (2017) *BMC Biotechnol.* 17, 3). 종양 특이적 결합에 대해 양성 반응을 보이는 항체는 생산자 세포(예를 들어, CHO, HEK-293)에 의해 더 많은 양으로 생산될 수 있다. 종양 특이적 돌연변이를 표적으로 하는 생성된 단클론 항체는 단독으로 또는 Fc γ 수용체 발현 세포독성 효과기 세포의 주입과 함께 환자에게 투여될 수 있다.

[0120] 종양 특이적 네오에피토프를 표적으로 하는 TCR 유사 항체가 Fc-감마 수용체 발현 세포독성 효과기 세포와 함께 투여될 수 있기 때문에 주입된 세포의 세포독성 작용은 종양 세포에 특이적으로 작용한다. 본 발명의 이 실시형태의 메커니즘은 도 2에 도시되어 있다.

[0121] 바람직한 실시형태인 한 실시형태에서, TCR-유사 항체에 의해 표적화된 네오에피토프의 특정 카테고리는 프레임시프트를 초래하는 삽입/결실(InDel) 돌연변이로부터 유래된 것이다. 프레임시프트 돌연변이로 인해 발생하는 네오에피토프는 완전히 이질적이며; 단일 뉴클레오타이드 변이체(SNV) 돌연변이에서 발생하는 네오에피토프와는 달리, 연관된 "자기(self)" 대응 에피토프가 없다. 따라서, 프레임시프트 유래 네오에피토프를 표적화함으로써, 일반적으로 제시되는 "자기" 에피토프와의 항체 교차반응의 위험을 피할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 면역 글로불린-인간화 래트("OmniRats")는 네오에피토프 특이적 B 세포를 생성하기 위한 면역화에 사용된다. 이는 "완전 인간" 항체의 생산을 야기하여, 환자의 부작용 위험을 최소화한다. 바람직한 실시형태에서, 환자에게 전달될 최종 항체는 어푸코실화된 항체를 생성하도록 조작된 생산자 세포에 의해 생성되며, 이는 효과기 세포에 의한 세포독성 활성 강화를 야기한다. 바람직한 실시형태에서, 효과기 세포는 세포독성 활성을 향상시키기 위해 배지에서 배양되고 환자에게 투여되기 전에 방사선 조사된, 자연살해(NK) 세포이다. 도 3에서, 바람직한 실시형태의 이들 양태가 도 1에 도시된 동일한 플로우차트에 통합되어 있다.

[0122] 본 발명의 이러한 바람직한 실시형태는 서로 다른 연구 방법과 독특하고 최적의 치료 접근법-돌연변이 펩타이드 네오에피토프, 단클론 항체를 사용한 표적 치료법, 입양 NK 세포 치료법-의 가장 유망한 측면을 세포 치료법과 협력하여 작용하도록 하고, 전체적으로 더 효과적이고 독성이 더 적은 개인 맞춤형 항체를 이용한 새로운 접근법과 결합하려는 의도이다.

[0123] 도 3에 도시된 바람직한 실시형태인, 한 실시형태의 작용 기전은 도 4에 도시되어 있다. 특정 암 유형(예를 들어, 신장 세포 암종)은 평균적으로 높은 수의 InDel 돌연변이를 갖는 경향이 있으며 - 따라서 고-InDel 암은 단백질 코딩 유전자에서 프레임시프트를 가질 가능성이 가장 높다(Bailey, et al.(2018) *Cell* 173: 371-385.e18)(Turajlic, et al. (2017) *Lancet Oncol.* 18: 1009-1021). 프레임시프트는 종종 완전히 새로운 아미노산의 확장된 서열을 생성하며 - 즉, 이들은 정상적인 인간 세포에서 볼 수 있는 아미노산 서열과 다르다. 이러한 새로운 서열이 항원 가공(예를 들어, 프로테아솜 분해)과 세포 표면 HLA 분자에 제시를 거치면, 이들은 HLA가 제시하는 "자가" 에피토프와 완전히 다른 진정한 암 특이적 에피토프("네오에피토프")를 구성하게 되며, 그리하여 치료의 개인 맞춤화를 위한 독특한 표적을 제시한다(Linnebacher, et al. (2001) *Int. J. Cancer.* 93: 6-11.). 바람직한 실시형태에서, 고-InDel 암 유형은 면역요법의 주요 후보이고, 프레임시프트 유래 네오에피토프는 단클론 TCR-유사 항체 개발을 위한 바람직한 표적이다. 이는 SNV 유래 네오에피토프와 달리, 프레임시프트 유래 네오에피토프에는 정상 세포에 의해 제시될 수 있는 유사한 "자기" 펩타이드 대응 서열이 결여되어 있다는 사실에 기인하며; 따라서 프레임시프트-유래 네오에피토프는 정상 세포에는 영향을 주지 않으면서 암세포에 대한 더 높은 특이성을 지닌 직접 요법의 가능성을 제공한다. 항체의 가변 영역은 네오에피토프-HLA 복합체와 결합하고, 불변 영역(즉, Fc 영역)은 CD16, CD32, CD64와 같은 Fc 수용체와 결합할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, Fc 영역은 어푸코실화되어 있으며, 이는 어푸코실화된 항체를 생성하도록 조작된 생산자 세포에 의해 생성된다. (이 변형은 효과기 세포에 의한 세포독성 활성을 크게 증가시킨다.) 주입된 NK 세포 표면의 CD16 분자는 사이토카인 분비 및/또는 세포독성 과립의 방출로 구성된 세포독성 활성을 유발하여 종양 세포를 죽인다. 바람직한 실시형태에서 세포독성 활성은 항체 의존성 세포독성(ADCC)이다.

[0124] 개인 맞춤형 치료 프로토콜을 생성하는 과정의 일련의 단계는 아래에 요약되어 있다. 도 5에 상세한 플로우차트가 제시되어 있다. 도 5의 범례는 다음과 같다: 502 혈액 샘플, 504 종양 샘플, 506 차세대 DNA 시퀀싱, 508 RNA 시퀀싱, 510 종양에서 발현된 프레임시프트 돌연변이 식별, 512 프레임시프트 예측 HLA 일배체형에 기초한 유도된 고친화성 네오에피토프, 514 HLA 네오에피토프 사랑체 생산, 516 HLA-네오에피토프 사랑체로 OmniRats 면역화, 518 HLA-네오에피토프 사랑체로 OmniRats를 두 번째로 면역화, 520 비장 및 림프절로부터 B 세포 농축, 522 B HLA-네오에피토프 사랑체가 있는 세포를 염색, 524 네오에피토프 특이적 B 세포의 단일 세포 분류, 526 ELISA에 의한 Ab:Ag 테스트, 528 RT-PCR 및 양성의 시퀀싱, 530 인간 항체 백터로의 (인간) 가변 영역 서열 클로닝, 532 생산자 세포주를 사용하여 후보 항-네오에피토프 항체의 소규모 시험 배치 생산, 534 환자의 종양 세

포의 단일 세포 현탁액 생성, 536 냉동보존, 538 환자의 종양 세포 해동, 540 ELISA에 의한 후보 항-네오에피토프 항체로 종양 세포 염색, 542 세포독성 강화 배지에서 NK 세포주(CD16 발현) 배양, 544 어푸코실화된 항체를 생산하도록 조작된 생산자 세포를 사용하여 성공적인 항체의 대규모 GMP 생산, 546 성공적인 종양 결합 HLA-네오에피토프 특이적 항체 선택, 548 NK 세포 조사, 550 NK 세포 주입, 552 항체 주입.

- [0125] (1) 원발 종양의 외과적 절제 또는 생검, 단일 세포 현탁액으로 분리 및 냉동 보존(8 단계에서 사용).
- [0126] (2) 프레임시프트를 초래하는 발현된 종양 특이적 InDel 돌연변이를 확인하기 위한 혈액 및 종양 조직의 시퀀싱. Illumina 및/또는 Ion Torrent와 같은 차세대 시퀀싱 플랫폼을 개별적으로 사용하거나 결합하여 사용할 수 있다.
- [0127] (3) 환자의 HLA 클래스 I 분자에 대해 높은 친화성을 갖는 네오에피토프의 알고리즘 예측. 예를 들어, 오픈 소스 NetMHC 예측 알고리즘은 인공 신경망을 사용하여 12개 HLA-A 및 -B 상위 유형 모두에 대한 HLA 클래스 I 에피토프를 정확하게 예측한다.
- [0128] (4) HLA-네오에피토프 사량체의 생산(단계 5 및 6의 경우). 여러 회사(예를 들어, GenScript, JPT)가 개인 맞춤형 펩타이드를 합성한다. 여러 회사(예를 들어, MBL International, ProImmune)에서는 개인 맞춤형 HLA-펩타이드 사량체를 생산하거나 키트를 제공한다.
- [0129] (5) TCR-유사 네오에피토프 특이성을 갖는 B 세포를 생성하기 위해 면역글로불린-인간화 래트("OmniRats")를 HLA-네오에피토프 사량체로 면역화. 완전 프로인트 아주번트(Complete Freund's Adjuvant)에 포함된 100 µg HLA-펩타이드 복합체와 16일 후 PBS에 포함된 100 µg HLA-펩타이드 복합체의 예방접종 프로토콜은 래트에서 2차 예방접종 7-5일 후에 고친화도 항-HLA-펩타이드 항체를 생성하는 것으로 나타났다.
- [0130] (6) HLA-네오에피토프 특이적 래트 B 세포의 분리(사량체 염색 및 세포 분류 사용) 및 항체 유전자(중쇄 및 경쇄)의 시퀀싱.
- [0131] (7) ELISA를 사용하여 HLA-네오에피토프 복합체에 대한 후보 항체의 결합에 대한 초기 테스트(개인 맞춤형 ELISA용 키트는 시판 중이다).
- [0132] (8) 인간 항체 플라스미드 백본(예를 들어, InvivoGen 등 여러 회사에서 시판)으로의 성공적인 항체 가변 서열 클로닝, 생산자 세포(예를 들어, CHO, HEK-293)의 형질감염, 및 테스트할 여러 후보 항-네오에피토프 항체의 소규모 생산.
- [0133] (9) 냉동보존된 종양 세포의 해동, 및 종양 특이적 결합을 테스트하기 위해 후보 항체로 염색.
- [0134] (10) 어푸코실화된(ADCC 최적화) 항체를 생산하도록 조작된 생산자 세포를 사용하여 종양 세포 결합 항체의 대규모 생산(GMP).
- [0135] (11) 환자에게 투여되는 치료: 항네오에피토프 TCR 유사 항체 주입과 함께 NK 세포(세포독성 활성을 최대화하는 조건에서 성장) 주입.
- [0136] 본 발명의 다른 실시형태를 구성하는 바람직한 실시형태에 대한 여러 잠재적인 수정이 있다. 한 실시형태에서, SNV-유래 네오에피토프는 종양에서 확인된다. 이러한 네오에피토프는 단 하나의 아미노산 잔기만 다른 "자기" 대응 에피토프를 갖고 있어 정상 조직에 대한 TCR 유사 항체의 교차 반응 가능성을 높이는 반면, 이 문제는 과정에 추가적인 특이성 테스트를 추가함으로써 극복된다(도 6 및 7 참조). 또한, 다른 유형의 돌연변이(예를 들어, 전좌), 기능 장애가 있는 RNA 스플라이싱, 또는 종양 특이적인 기타 메커니즘으로 인해 발생하는 네오에피토프는 이 치료법의 후보 표적이 된다.
- [0137] 또 다른 실시형태에서, 클래스 I 이외의 HLA 클래스(예를 들어, HLA 클래스 II)에 의해 제시되는 네오에피토프는 요법의 표적을 구성한다.
- [0138] 다른 실시형태에서, HLA 제시 네오에피토프 펩티드 대신에, 치료법에 의해 표적으로 삼는 종양 특이적 분자는 돌연변이된 세포 표면 분자(예를 들어, 수용체, 부착 분자)이며, 여기서 돌연변이는, 항체에 의해 돌연변이되지 않은 대응물과 구별될 수 있는 정도로, 분자의 일부 세포의 조직의 구조에 실질적인 종양-특이적 변화를 일으켰다.
- [0139] 본 발명의 실시형태에는 모든 종류/근원의 돌연변이, 예를 들어 체세포 돌연변이, 패신저 돌연변이 등이 포함된다.

- [0140] 또 다른 실시형태에서, 치료법의 중앙 특이적 분자 표적은 아미노산 서열 자체의 변화가 아니라, 대신 글리코실화 패턴 및 아세틸화를 포함하지만 이에 국한되지 않는 번역 후 변형의 변화이다. 번역 후 변형과 함께 아미노산 서열 변화의 조합으로 인해 발생하는 신생항원이 포함된다.
- [0141] 다른 실시형태에서, 래트를 면역화하는데 사용되는 HLA-에피토프 복합체, 및/또는 특정 래트 B 세포를 분리하는데 사용되는 HLA-에피토프 복합체 및/또는 항체 결합을 테스트하는 데 사용되는 HLA-에피토프 복합체는, 사랑채 대신에 단량체성, 오량체성, 또는 텍스트란-연결된 것이다(도 8 참조).
- [0142] 다른 실시형태에서, 면역화된 래트는 OmniRats 이외의 래트 계통이다.
- [0143] 또 다른 실시형태에서, 면역화된 동물은 래트, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어를 포함하지만 이에 제한되지 않는 래트 이외의 동물이다.
- [0144] 또 다른 실시형태에서, 중앙 특이적 항체는 과지 디스플레이 라이브러리의 사용 및 항체 코딩 핵산(예를 들어, DNA)의 환자로의 주입에 의한 항체 유전자 전달을 포함하나 이에 국한되지 않는, 동물을 면역화하고 항원 특이적 B 세포를 분류하는 것 이외의 수단에 의해 생성된다.
- [0145] 다른 실시형태에서, TCR-유사 항체는 바람직한 실시형태와 다르게 조작되거나 생산된다. ADCC 활성을 증가시키는 수단으로 단순히 어푸코실화를 사용하는 대신, 항체의 Fc 영역은 다른 방식으로 변경될 수 있다(예를 들어, 항체 구조 내의 이황화 결합 엔지니어링; Hagihara, Y. and Saerens, D., (2014). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(11), pp.2016-2023.). 동시에, 가변 영역은 또한 다양한 방식으로 조작될 수 있으며, 예를 들어 항체는 이중특이적일 수 있고(도 9 및 10 참조), 여기서 이중특이적 항체는 2개의 별개의 네오에피토프에 대해 지시될 수 있거나 네오에피토프 및 정규 에피토프(즉, 네오에피토프가 아닌 에피토프)의 조합에 대해 지시될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체는 항암 약물, 즉 항체-약물 접합체와 같은 약물에 접합될 수 있다. 다른 실시형태에는 항체를 변형/조작하는 방법(예를 들어, 분자 방법)이 포함된다.
- [0146] 또 다른 실시형태에서, 치료에 사용되는 네오에피토프 특이적 항체는 단클론성 대신 다클론성이다.
- [0147] 또 다른 실시형태에서, 네오에피토프 특이적 항체는 완전 항체가 아니고, 대신 F(ab')₂ 단편, Fab 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 단일-도메인 항체를 포함하나 이에 국한되지 않는 항원 결합 단편이다.
- [0148] 본 발명의 특정 실시형태에서, NK 세포 이외의 세포 유형은 네오에피토프 표적화 항체와 협력하여 활용될 수 있다(내인성 또는 외인성 투여). 치료법은 TCR 유사 항체의 Fc 영역과 효과기 세포 표면의 Fcγ 수용체 사이의 상호 작용에 따라 달라진다. Fcγ 수용체 CD16, CD32 및 CD64 중 하나 또는 이들의 조합을 발현하는 대식세포, 단핵구, 호중구 및 수지상 세포와 같은 선천성 면역 체계의 세포를 포함하나 이에 국한되지 않는 특정 세포 유형; 이들 세포 유형은 치료에서 효과기 세포 역할을 할 수도 있다(도 11 및 12 참조). 이들 대안적 실시형태에는 이들 세포 유형, 예를 들어 기억 NK 세포의 하위세트 또는 하위집단을 사용하는 옵션이 내포되어 있다.
- [0149] 특정 실시형태에서, 선천성 면역계의 세포 이외의 세포 유형이 (네오에피토프 표적화 항체와 협력하여) 사용될 수 있으며, 예를 들어 Fcγ 수용체를 발현하는 것으로 또한 알려진 다음 세포 유형이 있다: 활성화된 T 세포, 내피 세포, 소교세포 세포, 파골세포, 및 간질(mesangial) 세포.
- [0150] 본 발명의 특정 실시형태에서, 표적 질병 세포는 자가면역 질환을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암 이외의 질병(들)과 관련하여 네오에피토프를 나타낼 수 있다.
- [0151] Fcγ 수용체가 IgG 항체의 불변 영역에 결합하기 때문에 치료에 사용되는 네오에피토프 특이적 항체가 이소형 IgG일 것이라는 것이 이 상세한 설명에 암시되어 있다. 치료용으로 선택되는 IgG의 특정 하위 클래스(예를 들어, IgG1, IgG3 등)는 의도된 작용 메커니즘(예를 들어, ADCC, ADCP)과 치료에 사용되는 세포 유형에 따라 달라진다. 여러 가지 다른 이소형 또는 이소형 하위 클래스가 특정 치료법에서 개별적으로 사용되거나 결합될 수 있다.
- [0152] 또 다른 실시형태에서, 항체의 이소형(또는 서브클래스)은 불활성 또는 바람직하지 않은 이소형(또는 서브클래스)에서 원하는 특성을 갖는 것으로 전환된다.
- [0153] 본 발명의 특정 실시형태에서, 다음 시나리오가 포함된다: 동일한 항체 및 심지어 동일한 효과기 세포(예를 들어, 단핵구)가 ADCC 및 ADCP 둘 다를 유도할 수 있다(Strohl, W. and Strohl, L., 2012. 8-Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. *Thera Antibody Eng*, 9, pp.163-196.). 또한 동일한 표적에 대한 서로 다른 항체는 ADCC 및 ADCP를 포함한 다양한 메커니즘을 유도할 수 있다(Cleary, K.L., Chan, H.C.,

James, S., Glennie, M.J. and Cragg, M.S., 2017. Antibody distance from the cell membrane regulates antibody effector mechanisms. The Journal of Immunology, 198(10), pp.3999-4011). 추가적으로, 다양한 항체 아이소타입은 ADCC 및 ADCP 메커니즘을 다르게 유발하고 유도할 수 있다(Tipton, T.R., Roghanian, A., Oldham, R.J., Carter, M.J., Cox, K.L., Mockridge, C.I., French, R.R., Dahal, L.N., Duriez, P.J., Hargreaves, P.G. and Cragg, M.S., 2015. Antigenic modulation limits the effector cell mechanisms employed by type I anti-CD20 monoclonal antibodies. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 125(12), pp.1901-1909.).

- [0154] 본 발명의 특정 실시형태에서, 항체 세트(항체 라이브러리로부터인지 여부에 관계없이)는 주어진 네오에피토프에 대해 생성될 수 있다.
- [0155] 다른 실시형태에서, 주입된 효과기 세포는 유전적으로 조작된다. 이러한 조작에는 특정 유전자의 녹아웃 또는 녹다운, 특정 유전자의 과발현 또는 외인성 유전자의 발현이 포함되지만 이에 국한되지는 않다(도 13 및 14 참조).
- [0156] 다른 실시형태에서, 주입된 효과기 세포는 여러 잠재적인 공급원 중 하나로부터 획득된다. NK 세포는 동종 기증자, 제대혈 또는 환자 자신의 혈액에서 공급될 수 있다. 대안적으로, CD16을 발현하고 환자에게 투여하기 전에 방사선을 조사한다면 여러 NK 세포주를 잠재적으로 사용할 수 있다(도 15 참조).
- [0157] 다른 실시형태에서, 전체 항체의 생산은 상응하는 scFv 서열의 생산으로 대체되고, 이어서 키메라 항원 수용체(CAR) 구축물로 클로닝된다. 이어서, 주입 전에 CAR 구축물을 발현하도록 효과기 세포를 조작한다. 이러한 실시형태에서, 네오에피토프에 대한 TCR-유사 항체의 투여는 CAR 효과기 세포와 조합하여 사용될 수 있거나, TCR-유사 항체는 막 결합 CAR에 의해 제공되는 항원 특이성과 함께 치료 프로토콜의 일부가 아닐 수 있다(도 16 및 17 참조). 도 16 및 17에는 네오에피토프-HLA 복합체에 대해 생성된 TCR 유사 항체의 투여를 포함하는 옵션이 내포되어 있다.
- [0158] 본 발명의 특정 실시형태는 ADCC 또는 ADCP, 예를 들어 CDC(보체 의존성 세포독성)와 독립적인 항체의 치료 메커니즘을 활용할 수 있다.
- [0159] 본 발명의 특정 실시형태는 시간이 지남에 따라 환자의 신체에서 나타나는 더 새로운 네오에피토프, 예를 들어 암 전이 과정 동안 다른 종양에 나타나는 다른 네오에피토프에 대해 생성된 하나 이상의 항체로 동일한 환자를 치료하는 것을 포함한다.
- [0160] 본 상세한 설명 섹션에 기재된 각각의 실시형태는 또한 2명 이상의 환자 사이에 공유되는 돌연변이 및 생성된 네오에피토프("공개 신생항원" 및 "공개 신생에피토프"라고도 함)에 적용 가능하다.
- [0161] 예시적인 사용 방법: 본 발명은 잠재적으로 생검 또는 수술 샘플을 얻을 수 있는 임의의 암의 치료에 사용될 수 있다. 가장 유망한 치료 후보는 평균적으로 높은 수의 InDel 돌연변이를 포함하는 암이다. InDel 돌연변이로 인해 발생하는 프레임시프트 유래 네오에피토프는 "자기" 에피토프와의 교차 반응성이 부족한 성공적인 종양 특이적 항체의 생산을 가능하게 할 가능성이 가장 높다. 따라서, 한 일련의 실시형태는 고-InDel 암 및 이와 연관된 프레임이동-유래 네오에피토프에 초점을 맞춘다. 그러나, 특정 실시형태는 다른 유형의 돌연변이, 예를 들어 단일 뉴클레오타이드 변이체(SNV)도 표적화한다.
- [0162] 한 일련의 실시형태는 신장암, 흑색종, 방광요로상피암종, 폐선암종, 자궁암육종, 자궁체부 자궁내막암종, 유방암, 두경부암, 및 위선암종을 포함하나 이로만 국한되지 않는, 높은 수의 InDels를 포함하는 경향이 있는 암에 초점을 맞춘다.
- [0163] 대신 SNV를 표적으로 하는 실시형태의 경우, 엑솜에 SNV 돌연변이가 발현된 모든 암이 이 면역요법의 후보가 될 수 있다. 여기에는 대다수의 암이 포함될 것이다.
- [0164] 개요: 본 발명은 환자 자신의 면역 체계로부터 자연적인 항신생항원 T 세포 반응에 대한 보다 전통적인 의존성 보다는, Fcγ 수용체 발현 세포독성 효과기 세포에 의한 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)을 활용하여 환자의 종양 특이적 신생항원을 표적화하는 것을 포함한다. 따라서, 기존의 면역요법 접근법과 비교하여 본 발명에는 주요한 차이점이 있다:
- [0165] ● 단일클론항체를 사용하는 다른 표적치료제와 달리 본 발명은 종양세포에만 결합하는 항체를 생성한다. 기존 표적단일클론항체 치료제는 세포 표면 분자, 예컨대 CD20(예를 들어, 리툭시맵), EGFR(예를 들어, 세툽시맵), HER2(예를 들어, 트라스투주맵), 및 기타 여러 가지를 표적으로 삼는 치료법이다. 많은 경우 표적 항원이 암세

포에서 과발현되지만, 암세포에서만 독점적으로 발현되는 경우는 없다. 암세포의 돌연변이로 인해 발생하는 네오에피토프는 암세포에만 존재하며, 이러한 네오에피토프에 특이적인 TCR 유사 항체는 암세포에만 높은 친화력으로 결합한다.

[0166] ● 본 발명은 다른 NK 세포 기반(또는 대식세포 기반, 호중구 기반) 면역치료제와 달리 종양 특이성이 높은 방식으로 주입된 세포를 암세포에 표적화한다. 수많은 세포 기반 치료법이 임상시험 중이다. 이러한 접근법 중 어느 것도 매우 구체적인 방식으로 효과기 세포를 암세포에 표적화하는 것에 기반을 두고 있지 않다. 본 발명은 암세포에만 결합하는 가교로서 항체를 사용하여 암세포에 대한 효과기 세포를 표적화하므로 훨씬 더 높은 수준의 효과기 특이성이 달성된다.

[0167] ● 네오에피토프의 높은 종양 특이성을 활용하려는 다른 시도와 달리, 본 발명은, 환자의 자연적인 T 세포 면역 반응에 의존하지 않는다. 다른 그룹의 연구 노력은, 환자별로, 치료 면역화를 개발하는 것을 목표로 했으며, 이는 암세포에 의해 나타나는 네오에피토프에 대한 T 세포 반응을 시작(또는 "활성화")하기 위한 것이다. 이러한 노력은 여러 가지 어려움에 부딪혔으며 상당한 임상적 성공을 거두지 못했다. 본 발명은 환자의 T 세포 반응에 의존하지 않는 방식으로 암세포를 표적으로 삼아 이러한 문제를 피한다. 대신, 외부에서 생성된(즉, 외부에서 배양되고, 유전자 변형되며, 확장 및 활성화된) 효과기 세포와 결합된 외부 생성 항체를 사용하여 네오에피토프를 표적으로 삼는다. 네오에피토프 및 신생항원을 사용하는 면역화 기반 치료 노력과 대조적으로, 네오에피토프의 항체 인식뿐만 아니라 ADCC 또는 ADCP(또는 ADCC와 ADCP의 조합)의 선천적 면역 효과 세포 기능에 의존한다는 점을 고려하면, 본 발명은 치료 결과를 더욱 예측 가능하고 표적화하게 만든다.

[0168] ● 일부 다른 그룹의 작업과 달리, 본 발명은 특정 네오에피토프에 중점을 두지 않으므로 이미 알려진 모든 네오에피토프 또는 미래에 발견될 네오에피토프에 (예를 들어, 개인 맞춤형 방식으로) 적용될 수 있다.

[0169] ● 네오에피토프를 표적으로 하는 형질전환 TCR 또는 CAR을 생성하는 일부 그룹의 작업과 달리, 본 발명은 환자별로 더욱 쉽게 개발되어 진정으로 개인 맞춤형 치료법을 생산할 수 있다. 또한 절묘한(exquisite) 암을 활용하려는 다른 연구 개발 그룹도 있다. 네오에피토프의 특이성으로 인해 형질전환 네오에피토프 특이적 TCR 및/또는 네오에피토프 특이적 CAR이 개발되었다. 이들 각각의 경우에, 네오에피토프의 항체 기반 인식에 의존성이 없을 때 세포독성 효과기 세포(NK 세포이든 다른 것이든)는 네오에피토프 특이적 구축물로 형질도입될 필요가 있다. 대조적으로, 본 발명은 Fc-감마 수용체(예를 들어, ADCC 및 ADCP에 대해 각각 CD16 및 CD32 수용체)를 통해 ADCC 또는 ADCP를 지원할 수 있는 면역 효과기 세포의 ADCC 또는 ADCP 메커니즘을 구체적으로 활용하면서, 네오에피토프의 항체 기반 인식에 의존한다. 개인 맞춤형은 개인 맞춤형 유전적으로 변형된 면역 효과기 세포보다는 개인 맞춤형 항체의 생성에 의존하기 때문에, 본 발명은 또한 개인 맞춤형 치료법의 생성에서 더 나은 효율성을 제공한다. 본 발명은 [a] 더욱 시간 효율적이고 자원 효율적인 항체 기반 개인 맞춤 치료와, [b] 정상 세포에 비해 암세포를 더욱 선택적으로 표적으로 삼는 항체와 함께 작용하는 면역 효과 세포의 효과의 독특한 조합을 제공하며 - 이는 - 입양적으로(adoptively) 전달된 면역 효과기 세포를 표적 암세포에 연결하는 항체에 의한 네오에피토프-HLA 복합체의 표적화에 의해 달성된다.

[0170] 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 언급된 특징 및 구성요소 중 일부 또는 전부를 사용하여 본 발명의 개인 맞춤형 암 면역요법이 제공될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 위에서 설명된 실시형태는 임의의 단일 설명보다 더 큰 범위를 가질 수 있는 단일의 더 넓은 발명의 특정 예라는 것도 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 설명에 많은 변경이 이루어질 수 있다.

[0171] 실험 실시예

[0172] 이제 본 발명은 다음 실시예를 참조하여 설명된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명은 이들 실시예에 제한되지 않고, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백한 모든 변형을 포함한다.

[0173] 실시예 1: 네오에피토프에 대한 항체는 ADCC(항체 의존성 세포 매개 세포독성)의 자연 살해(NK) 세포 메커니즘을 유도하여 네오에피토프를 제시하는 표적 세포를 사멸시킨다.

[0174] 네오에피토프는 암 면역요법에 대한 매력적인 표적을 구성하지만(Brennick et al. (2017) *Immunotherapy*, 9(4), pp.361-371), 네오에피토프에 대한 항체 치료제를 생성하기 위해 본 명세서에 개시된 신규 방법은 주로 암 표면의 네오에피토프에 대한 다리 역할을 하는 항체, 즉 ADCC 및 ADCP 메커니즘[항체 의존성 세포매개 세포독성 및 항체 의존성 세포매개 식세포작용]을 활용하는 선천성 면역 체계의 세포에 의해 나타나는 두 가지 특정 세포 메커니즘에 중점을 두고 있다(Goges et al. (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), p.8947). 개념 증명 또는 원리 증명으로서, 이 실험 연구는 네오에피토프에 대해 생성된 TCR 유사 항체

가 특정 네오에피토프를 제시하는 표적 세포를 향한 자연 살해(NK) 효과기 세포의 ADCC 세포독성 활성을 유도할 수 있음을 보여준다. 아래에 요약된 실험 데이터에서, 모델 펩티드 에피토프 SIINFEKL은 "모델 네오에피토프" 또는 "대리 네오에피토프" 역할을 했다. 즉, 개념 증명 실험의 목적을 위해, 대리 네오에피토프 SIINFEKL에 대한 항체 매개 NK 세포 반응은 질병 세포(예컨대, 암 세포)의 네오에피토프, 특히 프레임시프트 돌연변이로부터 유래되어 완전히 새로운 또는 외래 펩타이드 서열을 생성하는 네오에피토프에 대한 구상된 항체 매개 NK 세포 반응과 기계적으로 동등한 것으로 간주된다.

[0175] 실험 방법: 항-SIINFEKL-H2K^b 항체(클론 25.D1-16)는 시판되는 "TCR-유사 항체"(즉, TCR과 매우 유사하게 펩타이드-MHC 복합체에 결합함)이다. 이 항체는 SIINFEKL-H2K^b 복합체(모델 신생항원 또는 네오에피토프를 나타내는 SIINFEKL과 함께)를 검출하는데 그 용법이 잘 확립되어 있어 예비 개념 증명 실험을 위해 선택했다. 그러나, 이 마우스 항체의 아이소타입은 IgG1(ADCC 활성을 유도하지 않음)이기 때문에 이러한 실험에서는 아이소타입을 ADCC 활성 마우스 IgG2a 아이소타입으로 전환해야 했다. 본래 25.D1-16 항체의 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 영역 서열을 Invivogen(San Diego, CA)에서 구입가능한 마우스 IgG2a 플라스미드(pTRIOZ-mIgG2a)에 클로닝하여 IgG2a로의 전환을 수행했다. 플라스미드의 생산 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서의 항체 단백질의 후속 재조합 발현을 Azenta(Chelmsford, MA)를 통해 진행했다. 단백질 A 아가로스를 사용하여 단백질 정제를 수행했다.

[0176] 항-SIINFEKL-H2K^b TCR-유사 항체를 통해 마우스 NK 세포에 의한 ADCC 유도를 테스트하기 위해 1차 마우스 NK 효과기 세포 및 EL4 표적 세포(H2K^b를 발현하는 비부착성 C57BL/6 마우스 세포주)를 사용하여 4시간 동안 3가지 다른 효과기:표적(E:T) 비율로 공동배양을 설정했다. 공동배양 설정 전에, 생존율이 95%를 초과하는 EL4 세포를 0.25 μM의 염색 농도에서, (효과기와 표적을 구별하는 명확한 수단 제공하기 위해) CFSE(CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester) 염색으로 표지하고, 25 μM SIINFEKL 펩타이드와 함께 37°C에서 1시간 동안 15분마다 가볍게 교반하면서 인큐베이션(즉, "펄싱")했다. 이러한 CFSE 염색, SIINFEKL 펄스 EL4 세포를 둥근 바닥 96웰 플레이트에 웰당 50,000개 세포로 플레이팅했다. 정제된 항-SIINFEKL-H2K^b IgG2a 항체를 최종 농도 3.5 μg/mL로 첨가하여 ADCC를 유도하거나 "천연" 세포 독성을 테스트하기 위해 첨가하지 않았다. 한편, StemCell Technologies(캐나다 밴쿠버)의 면역자기 음성 선택 키트를 사용하여 5마리의 마우스 비장으로부터 NK 세포를 농축했다. 1차 NK 세포를 웰에 첨가하여 0.5:1, 1.5:1 및 5:1의 E:T 비율을 달성했다. 또한, 표적(EL4 세포)과 효과기(NK 세포) 모두에 대해 단일배양 웰을 셋팅했다. CD107a에 대한 피코에리트린(PE) 접합 항체를 모든 웰에 포함시켰다. 플레이트를 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 SYTOX 블루 죽은 세포 염색, 알로피코시아닌(Allophycocyanin; APC) 컨쥬게이션된 어넥신 V, 및 APC/Fire™750-컨쥬게이션된 항-NKp46 항체로 염색했다. 데이터를 Bio-Rad ZE5 유세포 분석기(Univ of CT)로 수집했다. 분석에 사용된 게이팅 전략은 도 18에 제시되어 있다.

[0177] 이 게이팅 전략(도 18)을 기반으로 결과 섹션에 설명된 대로 유세포 분석 기반 실험 결과가 생성되었다. 또한, 4시간 공배양이 끝난 후 세포 배양 상청액 샘플을 수집하고 Abcam(Cambridge, UK)의 키트를 사용하여 젖산탈수소효소(LDH) 활성에 대해 분석했다.

[0178] 주요 결과: 마우스 이소형 IgG2a를 갖는 항-SIINFEKL-H2K^b 항체는 도 19에 요약된 결과에 의해 명확하게 확립된 바와 같이 ADCC 메커니즘을 통해 마우스 NK 세포가 SIINFEKL 펄스 EL4 세포를 사멸하도록 유도한다. 도 19B는 NK 세포독성 활성을 보여준다. 세 가지 E:T 비율 모두에서 항체가 존재하면 증가한다. E:T 비율이 증가함에 따라, 점점 더 중요해지는 표적 세포 사멸의 증가는 첨가된 TCR 유사 항체에 의해 매개되는 ADCC 활성을 나타낸다. 0.5:1의 매우 낮은 E:T 비율에서, ADCC는 항체가 없을 때 NK 세포의 배경 "자연적" 세포독성 활성에 비해 표적 세포 사멸을 10.4% 증가시키는 데 기여했다. 1.5:1과 5:1의 높은 비율에서, ADCC 기여도는 각각 17.7%와 38.1%로 더 높았으며 두 경우 모두 통계적으로 유의했다. 중요하게도, 이러한 공동배양 ADCC 값은 도 19A에 나타난 바와 같이 펩티드 펄스된 EL4 세포에 대한 항체의 직접적인 세포독성 효과를 뺀 후 계산했다.

[0179] 세포 사멸을 측정하는 유세포 분석 기반 방법 외에도 비색 효소 기반 분석을 사용하여 결과를 확증했다. 세포가 죽을 때만 배양 배지로 방출되는 세포질 효소인 젖산탈수소효소(LDH)는 4시간 배양이 끝난 후 모든 단일 배양 및 공동 배양의 상청액 샘플에서 정량화되었다. 유세포분석 결과와 완전히 일치하여, TCR 유사 항체를 첨가하면 E:T 비율 의존 방식으로 NK 세포의 세포독성 활성이 증가했다(도 20). 가장 낮은 비율에서 LDH 방출은 유의미한 수준에 도달하지 못한 채 상승 추세를 보였다. 1.5:1과 5:1의 더 높은 비율에서 ADCC 활성으로 인한 세포 사멸의 증가는 각각 54.2%와 80%였으며 두 경우 모두 통계적으로 유의했다. 이 분석에서는 항체가 첨가된 단일배양

웰에서 LDH가 더 적게 검출되었기 때문에 직접적인 세포독성 효과의 기여도를 뺄 필요가 없었다.

- [0180] 도 20은 유세포 분석(도 2)을 통해 관찰된 표적 세포 사멸 정량화에 대한 추가 확증(LDH 정량화를 통해)을 제공한다. 또한 유세포 분석을 통해 관찰된 E:T 비율 증가에 따른 항체 유도 ADCC 세포독성의 증가(도 2)가 LDH 정량화(도 20)를 통해 재확인되었으며, 이로써 E:T 비율 증가에 따른 항체 유도 ADCC 세포독성의 증가를 다시 한번 확인했다.
- [0181] 도 21은 도 2에서 관찰된 ADCC 정량화가 세포사멸사 기반 ADCC 세포독성(도 21A) 및 비-세포사멸사인 괴사 기반 ADCC 세포독성(도 21B) 둘 모두의 누적된 결과임을 입증한다. 추가로, 도 19B에서 관찰된 바와 같이 E:T 비율 증가에 따른 항체-유도 ADCC 세포독성의 증가는 ADCC-세포사멸사 및 ADCC-괴사 둘 다에도 적용되며, 여기서 항체-유도 ADCC-세포사멸사는 E:T 비율이 증가함에 따라 증가되고(도 21A, 각각 18.8%, 26.0% 및 49.8% 부스팅됨) 항체-유도 ADCC 괴사 또한 E:T 비율이 증가함에 따라 증가한다(도 21B, 최고 비율의 경우 20.9%까지 부스팅됨). 도 19에서와 같이, 이들 값을, 이들 특정 세포 사멸 메커니즘 각각에 대해 펩타이드-펄스된 EL4 세포에 대한 항체의 직접적인 효과를 뺀 후 계산했다.
- [0182] 도 22는 질병 세포를 표적으로 하는 선천적 면역 기능의 중심인 NK 세포의 탈과립 과정이 (펩타이드-MHC 복합체에 대한 TCR 유사 항체에 의해) NK 세포의 ADCC 메커니즘의 항체 기반 유도 동안 강화된다는 것을 명확하게 입증하며, 이는 SIINFEKL-H2K^b 복합체를 표시하는 표적 세포에 대해 지시된다. 이 측정 기준에 따르면 항체의 존재로 인한 NK 세포 세포독성 활성의 증가는 세 가지 E:T 비율 모두에서 각각 35.3, 39.2, 및 18.2 증가하여 매우 유의했다.
- [0183] 도 23에 나타난 실험 결과는 ADCC 유도의 보완적 실험(도 18-22에 나타냄)에서 얻은 결과가 항-SIINFEKL-H2K^b 항체에 의한 표적 EL4 세포 표면의 SIINFEKL-H2K^b 복합체의 특이적 결합에 기초하며, 이 항체 결합은 도 19-21에 나타난 ADCC 정량화의 근간임을 입증한다.
- [0184] 표적 EL4 세포 표면의 SIINFEKL-H2K^b 복합체에 결합하는 항-SIINFEKL-H2K^b 항체에 의한 NK 세포 ADCC 유도의 관찰은 표적 세포 사멸을 정량화하는 서로 다른 방법 사이에서 일치하였고[유세포 분석을 통한 SYTOX 염색(도 19) 및 LDH 분석(도 20)], ADCC 기반 세포독성에 대한 기본 메커니즘(세포사멸 및 괴사) 모두에 대해서도 마찬가지로였다(도 21).
- [0185] 종합적으로, SIINFEKL을 "대리 네오에피토프"로 사용하여, 도 18-23에 요약제시한 실험 결과는 네오에피토프에 대한 TCR 유사 항체가 네오에피토프를 제시하는 표적 세포에 대해 선택적으로 NK 세포 세포독성의 ADCC 메커니즘을 유도할 수 있다는 개념 증명을 확립시킨다.
- [0186] NK 세포 치료법에 대한 고찰, 결론 및 시사점: 도 19 및 20에 요약된 바와 같이, 항체 및 효과기 세포 모두의 존재 하에 효과기 NK 세포에 의해 표적 세포에서 상당히 높은 세포독성이 유도되었으며, 이는 ADCC(항체 의존성 세포 매개 세포 독성) 메커니즘의 측정 가능한 발현을 보여준다. 추가적으로, 표적 세포의 ADCC 사멸이 용량 의존적으로 증가하며, 효과기:표적(E:T) 비율이 높을수록 ADCC 사멸이 더 높아진다. 즉, 데이터는 네오에피토프를 제시하는 질병에 걸린 세포의 NK 세포 사멸을 목적으로 네오에피토프에 대한 항체가 생성되어 NK 세포에 대한 ADCC 메커니즘을 유도할 수 있음을 제시한다.
- [0187] 이러한 실험 결과의 생물학적 중요성은 다음의 개념 증명 또는 원리 증명의 실험적 입증 및 확립이다: 모델 신생항원(즉, SIINFEKL-H2K^b 복합체)에 대해 특이적으로 생성된 TCR-유사 항체 복합체는 신생항원을 표시하는 표적 세포에 대한 자연 살해(NK) 효과기 세포 세포독성의 ADCC 메커니즘을 유도할 수 있다. 이 실험적 증명은 암 치료를 위한 새로운 치료법을 생성하는데 있어 본 발명이 제공하는 이점의 예를 보여준다.
- [0188] 질병 세포에 나타나고 건강한 세포에는 나타나지 않는 네오에피토프를 표적화함으로써, 건강한 세포에 대한 독성을 최소화하거나 피하면서 암세포와 같은 질병 세포를 표적으로 하는 높은 특이성 (de Sousa et al. (2021) *Frontiers in Immunology*, p.1938).
- [0189] 개별 환자의 수준 또는 네오에피토프를 공유하는 환자 그룹 사이에서 나타나는 네오에피토프를 특이적으로 표적으로 하는 항체의 생성에 기초한 치료법의 개인 맞춤화(Saini et al, (2017) *Annals of Oncology*, 28, pp.xii3-xii10).
- [0190] ● 네오에피토프 발현이 개별 환자 내 종양마다 다른 경우 개별 종양 수준에서도 개인 맞춤화가 촉진된다.

- [0191] ● 치료를 생성하기 위한 시간 효율성, 자원 효율성, 치료 옵션 또는 효능의 효율성 측면에서 치료 개인 맞춤화의 효율성은 아래에 자세히 설명되어 있다:
- [0192] ○ 세포 치료가 개인 맞춤화의 기초가 되는 것이 아니라, 항체가 본 발명의 여러 실시형태에서 개인 맞춤화의 기초가 된다. 항체는 세포 치료에 비해 생성 및 사용 측면에서 더 큰 효율성을 제공하며, 예를 들어, 생산 속도가 더 빠르고 저렴하다.
- [0193] ○ 항체는 단일 항체(단일 네오에피토프에 대한) 또는 2개 이상의 항체의 조합(2개 이상의 서로 다른 에피토프에 대한)으로 환자에게 투여되어 치료 효율성을 제공할 수 있다.
- [0194] ○ 본 발명의 일부 실시형태에서는 외인성 세포 치료 없이 환자 신체의 내인성 면역 세포에 의존하여 환자에게 항체 투여만 필요로 한다는 점을 감안할 때, 외인성 추가 세포 치료, 즉 입양 세포 치료는 선택 사항이며 필수 사항은 아닙니다.
- [0195] ○ 본 발명의 실시형태는 치료 효율성을 제공한다. 외인성 세포 치료가 네오에피토프 표적 항체 치료와 함께 투여되는 경우 선택할 수 있는 세포 범위가 있다(예를 들어, NK 세포, 대식세포, 호중구 등). 추가로, 하나 이상의 유형의 세포 요법이 생물학적 효과의 시너지 효과를 목적으로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 질병과 싸우기 위해 ADCC 메커니즘(NK 세포의 CD16을 통해)과 ADCP 메커니즘(대식세포의 CD32를 통해)을 모두 유도하기 위해 외인성 대식세포와 결합된 외인성 NK 세포가 투여된다.
- [0196] ○ 치료 과정에서 질병 발현의 추가 돌연변이에 반응하여 새로운 항체가 계속 생성될 수 있다(예를 들어, 암이 전이됨에 따라 다른 네오에피토프가 나타나는 시나리오에서). 치료 유연성에 대한 이러한 기회는 항체 생성과 세포 치료 생성에 내재된 자원 효율성으로 인해 제공된다. 즉, 치료법은 질병에 대해 적응할 수 있다.
- [0197] 요약하면, 이 섹션에 요약제시된 실험 결과는 본 발명이 병든 세포의 네오에피토프를 선택적으로 표적화하는 항체를 생성하고 ADCC, ADCP, 또는 ADCC와 ADCP의 조합의 세포 메커니즘을 활용함으로써 개인화된 치료법을 생성하는 새로운 프로세스를 생성한다는 증거를 제공한다.
- [0198] 계획된 실험
- [0199] 본 명세서에 개시된 실험에는 특정 펩티드-MHC 복합체(이 경우 "대리 네오에피토프" 역할을 하는 모델 항원)에 특이적인 TCR-유사 항체가 NK 세포에 의해 ADCC 활성을 유도할 수 있음을 입증한다. 추가 실험에서는 [a] 이 ADCC 활성이 생체 내에서 항종양 활성을 유도한다는 것을 입증하고, [b] 상세한 설명에 기술된 방법을 사용하여 인간의 알려진 네오에피토프에 대해 새로운 TCR 유사 항체가 생성될 수 있음을 입증하고, [c] 새로운 항-네오에피토프 TCR 유사 항체가 ADCC 활성을 유도함을 입증할 계획이다.
- [0200] 계획된 실험 전략 및 방법론:
- [0201] 생체 내에서 항-SIINFEKL-H2K^b IgG2a 항체에 의해 유도된 ADCC 활성으로 인한 항종양 활성 테스트: 시험관 내에서 ADCC 유도의 입증은 마우스 종양 세포주 EL4를 사용하고, 이때 EL4 세포를 SIINFEKL 펩타이드로 처리하거나 "펄싱"하였다(참조: 실시예 1). 또 다른 세포주인 E.G7은 EL4에서 유래하지만 EL4 세포와는 달리 E.G7은 닭 계란 오브알부민(OVA)으로 안정적으로 형질감염되고, OVA가 아미노산 서열 SIINFEKL을 갖는다는 점을 고려하면, 따라서 E.G7 세포는 SIINFEKL 펩타이드에 대한 별도의 노출 없이도 세포 표면 H2K^b 분자에 "대리" 네오에피토프 SIINFEKL을 제시한다. 이들 종양 세포주 모두 C57BL/6 마우스에서 종양을 형성한다. 즉, 피내 이식은 시간이 지남에 따라 모니터링할 수 있는 진행성 종양 성장을 유도한다. 항-SIINFEKL 항체(클론 25-D1.16)의 이소형 전환 IgG2a 버전을 사용하는 계획된 실험에서, 마우스에 [a] EL4 종양(이때 EL4 세포는 SIINFEKL 펩티드에 노출되지 않았음(음성 대조군)), 또는 [b] E.G7 종양(표면에 항체 표적이 있음)이 이식될 것이고, 다양한 용량의 항체로 마우스를 치료한다. 일부 실험에서는, 인간의 NK 세포 면역요법 모델로서 ADCC 기반 항종양 활성에 사용할 수 있는 NK 세포의 수를 늘리기 위해 1차 NK 세포(다른 C57BL/6 마우스에서 갓 분리한)의 입양 전달이 동시에 수행될 것이다. 중점에는 시간 경과에 따른 종양 크기의 변화와 마우스 생존이 포함된다.
- [0202] 인간에서 알려진 "일반(public)" 네오에피토프에 대한 새로운 항네오에피토프 항체 생성: 초기 항체 개발 노력은 간략한 대체 판독 프레임 번역을 초대하는 NPM1에서 4개 염기쌍 삽입으로 인해 발생하는 HLA-A*02:01 결합 네오에피토프(아미노산 서열 CLAVEEVSL)에 초점을 맞출 것이다(Van der Lee, et al. (2019) J. Clin. Invest. 129(2):774-85). 이 프레임시프트 돌연변이는 AML 환자의 30%에서 발견되어 "공개" 신생항원이 된다. 또한 HLA-A*02:01은 매우 널리 퍼진 HLA 대립유전자이다. 프로젝트의 첫 번째 단계는 다음과 같은 목표가 있다: (1) AML

에서 흔히 발견되는 이 "공개" 프레임시프트 유래 신생항원에 대해 여러 가지 새로운 TCR 유사 항체를 생성하고, (2) 후보 항체를 시험관 내에서 테스트하여 AML 세포에 대한 인간 NK 세포의 ADCC 활성을 유도하는 이들의 능력을 평가한다. 최고 성능의 후보 항체(약 3-5개의 서로 다른 항체)는 프로젝트의 두 번째 단계에서 전임상 테스트를 위한 최종 후보 목록을 구성할 것이다.

[0203] 첫 번째 목표를 추구하기 위해, 도 24에서 회색으로 강조 표시된 단계를 따른다. 첫 번째 단계에서는 "공개" 네오에피토프 펩타이드 CLAVEEVSL을 합성한다. 중요한 것은 이 펩타이드의 실제 제시된 형태가 N 말단 시스테인 잔기의 시스테인화를 포함하는 것으로 나타났다는 것이다(Van der Lee 2019). 따라서, 이러한 실험을 위해 합성된 펩타이드도 시스테인화(cysteinylation)될 필요가 있다. 펩타이드 합성 후, 재조합 HLA-A*02:01 및 베타-2-마이크로글로불린($\beta 2m$) 단백질을 사용하는 HLA-펩타이드 복합체가 생성된다. 비오틴화 또는 형광단 접합이 없는 단량체 복합체는 동물을 면역시키고 ELISA를 수행할 목적으로 생산되며(아래 설명); 또한, 형광단이 결합된 HLA-펩타이드 사량체가 형광 활성화 세포 분류를 위해 생산될 것이다.

[0204] HLA-펩티드 복합체(즉, "TCR-유사" 항체)에 특이적인 고친화도 항체의 신속한 생성을 위한 프로토콜이 2017년에 공개되었다(Ouisse, et al. (2017) *BMC Biotechnol.* 17(1):3). 이 프로토콜은 천연 래트 항체 유전자 대신 인간 항체 유전자로 유전자 조작된 쥐인 OmniRats를 활용한다. 이들 래트를 항원으로 면역시키면 생성된 항체는 완전한 인간 서열을 갖게 된다. OmniRats는 HLA-A*02:01-CLAVEEVSL 복합체(비접합 단량체)로 16일 간격으로 2회 면역화된다. 두 번째 면역화 5일 후 비장과 림프절을 채취하여 단일 세포 현탁액으로 분리한다.

[0205] 면역자기 음성 선택 키트를 해리된 림프 조직에 존재하는 대부분의 T 세포와 기타 세포를 제거하여 B 세포를 증강하는데 사용한다. 90% 이상의 B 세포로 구성된 생성된 세포 현탁액을 다음 단계인 형광 활성화 세포 분류를 위해 준비한다. 이 단계의 목적은 B 세포 수용체가 HLA-A*02:01-CLAVEEVSL 복합체에 특이적으로 결합하는 개별 B 세포를 분리하는 것이다. 세포는 래트 IgG(B 세포 선택) 및 T 세포 수용체(T 세포 제외) 및 여러 형광 표지된 HLA-펩티드 사량체 복합체에 대한 항체로 염색된다. Ref #에 표시된 대로 특정 HLA-펩타이드 복합체에 특이성을 갖는 B 세포는 다음의 염색 및 게이팅 전략을 이용하여 성공적으로 분리된다: (1) 세포를 관심 HLA-펩타이드의 사량체로 염색하지만, 두 개의 서로 다른 형광단을 사용한다. 예를 들어, 세포는 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)에 접합된 사량체로 염색되고 동시에 피코에리트린(PE)에 접합된 동일한 사량체로 염색된다. 한편, 세포는 또한 다른 형광단(예를 들어, APC)에 접합된 관련 없는 HLA-펩타이드 복합체의 또 다른 사량체로 염색된다. (2) 세포 분류 중에, 관심 있는 사량체(이 경우, FITC 및 PE)와 관련된 두 형광단 모두에 대해 양성인 B 세포, 즉 이중 양성 세포를 선택하도록 게이트를 설정한다. 이러한 이중 양성 세포의 경우 관련 없는 사량체(이 경우, APC)와 관련된 형광단에 대해 음성인 세포를 선택하도록 추가 게이트를 설정한다. 관심 있는 사량체의 포지티브 선택을 위해 두 개의 서로 다른 형광단을 사용하면 형광단에 특정한 B 세포가 제외되고; 한편, 관련 없는 사량체의 네거티브 게이트는 (HLA 분자와 관련된 항원 펩타이드가 아닌) HLA 분자 자체에 특이적인 B 세포를 제외시키고 $\beta 2m$ 에 특이적인 B 세포도 제외시킨다. 결과적으로 수집된 개별 B 세포의 수는 적지만(100개 미만), 그 중 일부는 면역화에 사용되는 HLA-펩타이드 복합체에 대해 높은 특이성과 높은 친화도를 나타낸다(~12%).

[0206] 개별 단일 B 세포는 별도의 PCR 튜브로 분류될 것이다. cDNA로의 역전사 및 인간 중쇄 및 경쇄 유전자의 PCR 기반 증폭 후, DNA 시퀀싱을 수행하여 가변 영역의 고유한 서열을 얻을 수 있다. 가변 영역 서열은 IgG1 이소형의 인간 항체를 코딩하는 진핵 발현 벡터 내로 클로닝될 것이다. CHO 세포는 항-HLA-네오에피토프 항체를 생성하기 위해 일시적으로 형질감염될 것이다. 형질감염된 CHO 세포 배양물로부터 상층액을 수집하고, 인간 IgG 분리 키트를 사용하여 항체 정제를 수행할 것이다. 20-80개의 B 세포 클론이 단일 면역화된 OmniRat로부터 분리될 것으로 예상된다. 따라서 단일 동물을 사용하여 이 과정을 수행하면 2-9개의 완전 인간 CLAVEEVSL 특이적 후보 항체가 생성될 것으로 예상된다. 이 과정에는 항원 특이성을 테스트할 30-50개의 후보 항체를 생산하기 위해 많은 OmniRat 면역화가 필요하다.

[0207] 후보 항체의 특이성을 테스트하기 위해, 동물을 면역화하는 데 사용된 것과 동일한 HLA-A*02:01-CLAVEEVSL 복합체(단량체)가 사용될 것이다. 표준 ELISA 플레이트를 사용하면 웰이 이러한 HLA-펩타이드 복합체 또는 관련 없는 HLA-펩타이드 복합체로 코팅될 것이다. 각 항체는 이러한 HLA-펩타이드 복합체에 대한 결합 여부를 개별적으로 테스트될 것이다. HLA-A*02:01-CLAVEEVSL에 대한 약한 결합만 보이거나 관련 없는 복합체에 대한 배경보다 훨씬 더 큰 결합을 보이는 것은 폐기될 것이다. HLA-A*02:01-CLAVEEVSL에 강력하게 결합하지만 관련 없는 HLA-펩타이드 복합체에는 결합하지 않는 항체는 ADCC 분석에서 추가 테스트를 위한 후보 항체로 유지될 것이다(두 번째 목표).

- [0208] 새로운 항-네오에피토프 TCR 유사 항체의 ADCC 활성 테스트:
- [0209] 두 번째 목적을 추구하기 위해, 이러한 항-네오에피토프 "TCR 유사" 후보 항체가 NK 세포 세포 독성의 ADCC 메커니즘을 유도하는 능력을 테스트하는 실험이 시험관 내에서 수행될 것이다. 예비 실험에서 SIINFEKL-H2K^b 복합체("대리 네오에피토프" 역할을 하는 모델 항원)에 특이적인 TCR 유사 항체가 NK 세포에 의해 ADCC 활성을 유도할 수 있음이 입증되었다.
- [0210] 후보 항-HLA-A*02:01-CLAVEEVSL 항체의 시험은 본 명세서에 개시된 예비 실험과 유사한 실험 설계를 따를 것이다. 그러나 세포주를 표적 세포로 사용하는 대신 AML 환자로부터 유래한 암세포를 사용할 것이다. 이 암세포는 대학 교육 병원, 예를 들어, UConn Health 또는 미네소타 대학교에서 입수할 수 있다. 후보 항체는 HLA-A*02:01에 제시된 네오에피토프에 특이적이므로 대부분의 AML 샘플은 해당 HLA 대립유전자를 보유한 환자로부터 채취될 것이다. 그러나 해당 대립유전자가 결여된 소수의 AML 샘플도 음성 대조군 역할을 하기 위해 획득될 것이다. AML 샘플은 NPM1에 특정 4개 염기쌍 삽입이 있는지 테스트하기 위해 Sanger 시퀀싱을 거치게 된다. 이는 샘플의 30%에 존재해야 하며, 이로 인해 HLA-A*02:01에 "공개" 네오에피토프 CLAVEEVSL의 제시가 유도된다. HLA-A*02:01에 대해 양성이고 올바른 돌연변이를 보유한 모든 샘플은 ADCC 실험에 사용하기 위해 선택될 것이다. 그러나, 음성 대조군 역할을 할 올바른 돌연변이가 결여된 일부 HLA-A*02:01 양성 샘플도 선택될 것이다.
- [0211] ADCC 분석의 효과기 세포의 경우 건강한 기증자의 1차 인간 NK 세포가 사용될 것이다. 신선한 버피 코트는 Research Blood Components(매사추세츠주 워터타운)에서 조달하고 PBMC는 밀도 구배 원심분리를 사용하여 얻을 수 있다. NK 세포는 면역자기 음성 선택을 사용하여 농축될 것이다.
- [0212] 각 후보 항체는 HLA-A*02:01 대립유전자가 있거나 없거나, CLAVEEVSL을 제시하는 프레임시프트 돌연변이가 있거나 없는 AML 세포에 대해 NK 세포에 의한 ADCC를 유도하는 능력에 대해 테스트될 것이다. 구체적으로, 각 실험에는 올바른 대립유전자와 올바른 돌연변이를 보유한 적어도 4개의 AML 샘플, 올바른 대립유전자가 결여된 적어도 1개의 AML 샘플, 올바른 돌연변이가 결여된 적어도 1개의 AML 샘플이 포함될 것이다. 각 항체에 대해 공동배양은 다중 효과기:표적 비율(예를 들어, 1:1, 4:1 및 10:1)과 다중 항체 농도(예를 들어, 0 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.2 µg/mL, 2 µg/mL)로 설정될 것이다. 아이소타입 대조 항체도 음성 대조로 포함될 것이다. 공동배양은 4-6시간 동안 진행될 것이다. 효과기(NK) 세포가 없는 AML 세포의 배양은 유사하게 처리되어 이러한 조건 하에서 이들 AML 세포의 기준선 사멸을 확립할 것이다. AML 세포의 사멸은 막 불투과성 핵 염색(예를 들어, 요오드화 프로피듐)과 세포사멸 마커(예를 들어, Annexin V)로 염색한 후 유동 세포측정법을 사용하여 정량화될 것이다. 각 그룹마다 4번의 기술 복제가 수행될 것이다.
- [0213] 항체가 첨가되지 않은 경우에도 표적 AML 세포에 대한 어느 정도의 세포독성 활성이 이러한 분석에서 관찰될 것으로 예상된다. 이는 NK 세포 인식 및 살해의 비항원 특이적 메커니즘 때문이다. ADCC를 테스트할 때, 중요 판독값은 NK 세포 매개 사멸이 항체 존재 시 이 기준선 이상으로 강화된다. (1) AML 샘플이 "공개" 네오에피토프 CLAVEEVSL을 나타내는 NPM1 프레임시프트 돌연변이를 포함하고 (2) AML 샘플이 HLA-A*02:01를 발현하는 경우에만 항체 존재 시 사멸(ADCC 활성) 증가가 예상된다. 가장 큰 ADCC 활성을 유도하는 3-5개 항체는 향후 동물 실험을 위해 선택될 것이다.
- [0214] 열거된 실시형태
- [0215] 다음의 열거된 실시형태가 제공되며, 그 번호는 중요성 수준을 지정하는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0216] 실시형태 1은 암 치료용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 다음을 포함한다:
- [0217] a. 하나 이상의 중양 특이적 에피토프에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 및
- [0218] b. 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포.
- [0219] 실시형태 2는 조성물이 개인 맞춤형인 것인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0220] 실시형태 3은 중양 특이적 에피토프가 네오에피토프인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0221] 실시형태 4는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화된 것인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0222] 실시형태 5는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 완전한 인간인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.

- [0223] 실시형태 6은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어푸코실화된 것인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0224] 실시형태 7은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 이중특이적인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0225] 실시형태 8은 종양 특이적 에피토프가 네오에피토프/HLA 복합체인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0226] 실시형태 9는 세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0227] 실시형태 10은 세포독성 면역 효과기 세포가 조사된 것인, 실시형태 1의 조성물을 제공한다.
- [0228] 실시형태 11은 암 치료용 조성물을 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0229] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 유전적 돌연변이를 확인하는 단계,
- [0230] b. 확인된 종양 특이적 유전적 돌연변이를 기반으로 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0231] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 동물을 면역화시키는 단계,
- [0232] d. HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하거나 이의 항원 결합 단편 생성을 촉진하는 면역화된 비인간 동물로부터 B 세포를 분리하는 단계,
- [0233] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0234] f. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하는 단계, 및
- [0235] g. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포와 조합하는 단계.
- [0236] 실시형태 12는 서열분석이 차세대 시퀀싱인, 실시형태 11의 방법을 제공한다.
- [0237] 실시형태 13은 비인간 동물이 인간화되는, 실시형태 11의 방법을 제공한다.
- [0238] 실시형태 14는 비인간 동물이 완전 인간 항체를 생산하는, 실시형태 11의 방법을 제공한다.
- [0239] 실시형태 15는 비인간 인간화 동물이 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 실시형태 13의 방법을 제공한다.
- [0240] 실시형태 16은 HLA/네오에피토프 특이적 항체가 비동물 방법을 통해 생성되는 것인, 실시형태 11의 조성물을 제공한다.
- [0241] 실시형태 17은 비동물 방법이 파지 디스플레이인, 실시형태 16의 조성물을 제공한다.
- [0242] 실시형태 18은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 어푸코실화된 것인, 실시형태 11의 조성물을 제공한다.
- [0243] 실시형태 19는 항체의 아이소타입이 ADCC 또는 ADCP를 지원하는, 실시형태 11의 조성물을 제공한다.
- [0244] 실시형태 20은 항체의 아이소타입이 ADCC 또는 ADCP를 지원하지 않는 아이소타입으로부터 ADCC 또는 ADCP를 지원하는 아이소타입으로 추가로 변형되는, 실시형태 11의 조성물을 제공한다.
- [0245] 실시형태 21은 HLA/네오에피토프 복합체가 단량체 복합체, 이량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란 연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 실시형태 11의 방법을 제공한다.
- [0246] 실시형태 22는 세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형인, 실시형태 11의 방법을 제공한다.
- [0247] 실시형태 23은 암 치료용 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0248] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 유전적 돌연변이를 확인하는 단계,
- [0249] b. 확인된 종양 특이적 유전적 돌연변이를 기반으로 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0250] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 동물을 면역화시키는 단계,
- [0251] d. HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하거나 이의 항원 결합 단편 생성을 촉진하는 면역화된 비인간 동물로부터 B 세포를 분리하는 단계,

- [0252] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0253] f. HLA/네오에피토프 특이적 항체로부터 항원 결합 도메인을 포함하는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 단계, 및
- [0254] g. 세포독성 면역 효과기 세포에서 CAR을 발현시키는 단계.
- [0255] 실시형태 24는 서열분석이 차세대 시퀀싱인, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0256] 실시형태 25는 비인간 동물이 인간화되는, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0257] 실시형태 26은 비인간 동물이 완전 인간 항체를 생산하는, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0258] 실시형태 27은 비인간 인간화 동물이 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 실시형태 23의 방법을 제공한다. .
- [0259] 실시형태 28은 HLA/네오에피토프 특이적 항체가 비동물 방법을 통해 생성되는, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0260] 실시형태 29는 비동물 방법이 파지 디스플레이인, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0261] 실시형태 30은 CAR을 생성하는 단계가 항체의 항원 결합 도메인을 기반으로 scFv를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 실시형태 23의 조성물을 제공한다.
- [0262] 실시형태 31은 CAR이 막횡단 도메인, 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인을 추가로 포함하는, 실시형태 23의 조성물을 제공한다.
- [0263] 실시형태 32는 HLA/네오에피토프 복합체가 단량체 복합체, 올량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란 연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0264] 실시형태 33은 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, T 세포, NK T 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형인, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0265] 실시형태 34는 세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포인, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0266] 실시형태 35는 세포독성 면역 효과기 세포가 CD8+ T 세포인, 실시형태 23의 방법을 제공한다.
- [0267] 실시형태 36은 암의 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0268] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 신생에피토프를 확인하는 단계,
- [0269] b. 확인된 종양 특이적 네오에피토프로부터 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0270] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 포유동물을 면역화시키는 단계,
- [0271] d. 면역화된 비인간 포유동물로부터 HLA/네오에피토프 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 B 세포를 분리하는 단계,
- [0272] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0273] f. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체를 생산하는 단계, 및
- [0274] g. 유효량의 HLA/네오에피토프 특이적 항체와 유효량의 세포독성 면역 효과 세포를 대상체에게 투여하여 암을 치료하는 단계.
- [0275] 실시형태 37는 시퀀싱은 차세대 시퀀싱인, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0276] 실시형태 38은 비인간 동물이 인간화되는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0277] 실시형태 39는 비인간 동물이 완전 인간 항체를 생산하는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0278] 실시형태 40은 비인간 인간화 동물이 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹에서 선택되는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0279] 실시형태 41은 HLA/네오에피토프 특이적 항체가 비동물 방법을 통해 생성되는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0280] 실시형태 42는 비동물 방법이 파지 디스플레이인, 실시형태 36의 방법을 제공한다.

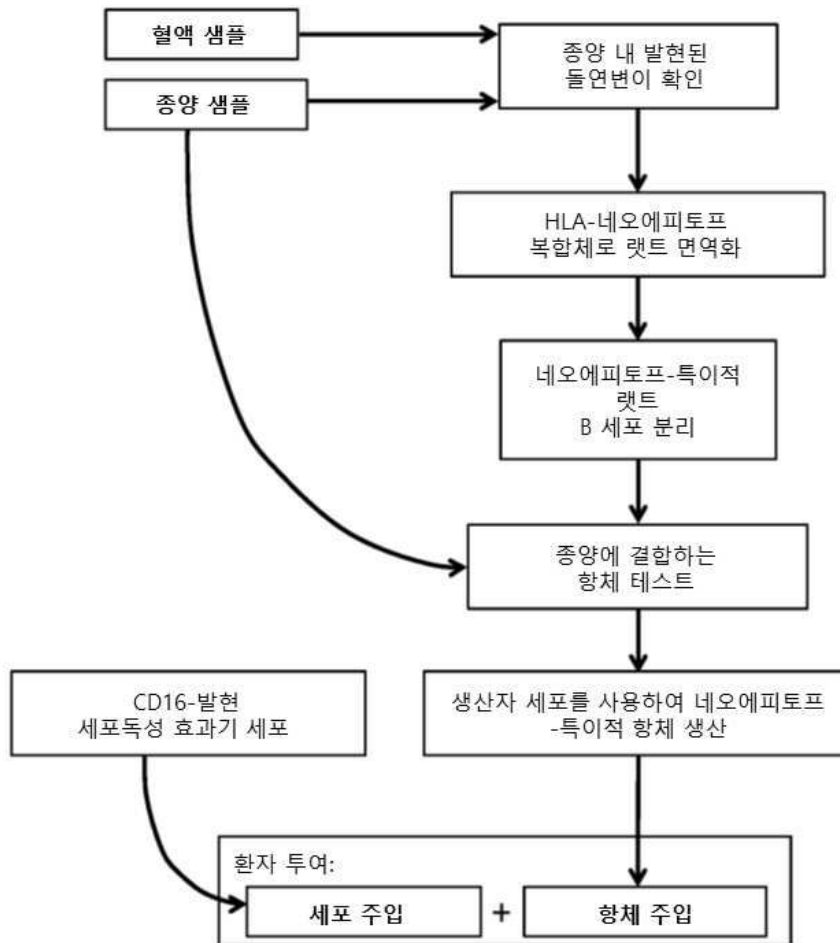
- [0281] 실시형태 43은 HLA/네오에피토프 특이적 항체가 어푸코실화된 것인, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0282] 실시형태 44는 항체의 이소타입이 ADCC 또는 ADCP를 지원하는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0283] 실시형태 45는 항체의 아이소타입이 ADCC 또는 ADCP를 지지하지 않는 아이소타입으로부터 ADCC 또는 ADCP를 지원하는 아이소타입으로 추가로 변형되는, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0284] 실시형태 46은 HLA/네오에피토프 복합체가 단량체 복합체, 오량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란 연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0285] 실시형태 47은 세포독성 면역 효과기 세포는 NK 세포, 대식세포, 단핵구, 호중구, 수지상 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형인, 실시형태 36의 방법을 제공한다.
- [0286] 실시형태 48은 암의 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0287] a. 대상체로부터 종양 표본을 수득하고 시퀀싱을 통해 종양에 의해 발현되는 종양 특이적 신생에피토프를 확인하는 단계,
- [0288] b. 확인된 종양 특이적 네오에피토프로부터 HLA/네오에피토프 복합체를 생성하는 단계,
- [0289] c. HLA/네오에피토프 복합체로 비인간 포유동물을 면역화시키는 단계,
- [0290] d. 면역화된 비인간 포유동물로부터 HLA/네오에피토프 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 B 세포를 분리하는 단계,
- [0291] e. HLA/네오에피토프 특이적 항체가 종양에 결합하는지 검증하는 단계,
- [0292] f. HLA/네오에피토프 특이적 항체로부터 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 단계,
- [0293] g. 세포독성 면역 효과기 세포에서 CAR을 발현시키는 단계, 및
- [0294] h. 유효량의 세포독성 면역 효과기 세포를 대상체에게 투여하여 암을 치료하는 단계.
- [0295] 실시형태 49는 시퀀싱은 차세대 시퀀싱인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0296] 실시형태 50은 비인간 동물이 인간화되는, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0297] 실시형태 51은 비인간 동물이 완전 인간 항체를 생산하는, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0298] 실시형태 52는 비인간 인간화 동물이 래트, 마우스, 토끼, 당나귀, 염소, 낙타, 라마, 알파카, 및 상어로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 실시형태 48의 방법을 제공한다. .
- [0299] 실시형태 53은 HLA/네오에피토프 특이적 항체가 비동물 방법을 통해 생성되는, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0300] 실시형태 54는 비동물 방법이 파지 디스플레이인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0301] 실시형태 55는 HLA/네오에피토프 복합체가 단량체 복합체, 오량체 복합체, 사량체 복합체, 텍스트란 연결 복합체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0302] 실시형태 56은 CAR을 생성하는 단계가 항체의 항원 결합 도메인을 기반으로 scFv를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 실시형태 48의 조성물을 제공한다.
- [0303] 실시형태 57은 CAR이 막횡단 도메인, 신호전달 도메인 및 공동자극 도메인을 추가로 포함하는 실시형태 48의 조성물을 제공한다.
- [0304] 실시형태 58은 세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포, T 세포, NK T 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 세포 유형인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0305] 실시형태 59는 세포독성 면역 효과기 세포가 NK 세포인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0306] 실시형태 60은 세포독성 면역 효과기 세포가 CD8+ T 세포인, 실시형태 48의 방법을 제공한다.
- [0307] 다른 실시형태
- [0308] 본 명세서의 변수 정의에 포함된 요소 목록의 설명에는 나열된 요소의 단일 요소 또는 조합(또는 하위 조합)으

로서의 변수 정의가 포함된다. 본 명세서의 실시형태에 대한 설명에는 해당 실시예가 임의의 단일 실시예로서 또는 임의의 다른 실시형태 또는 그 부분과 결합된 형태로 포함된다.

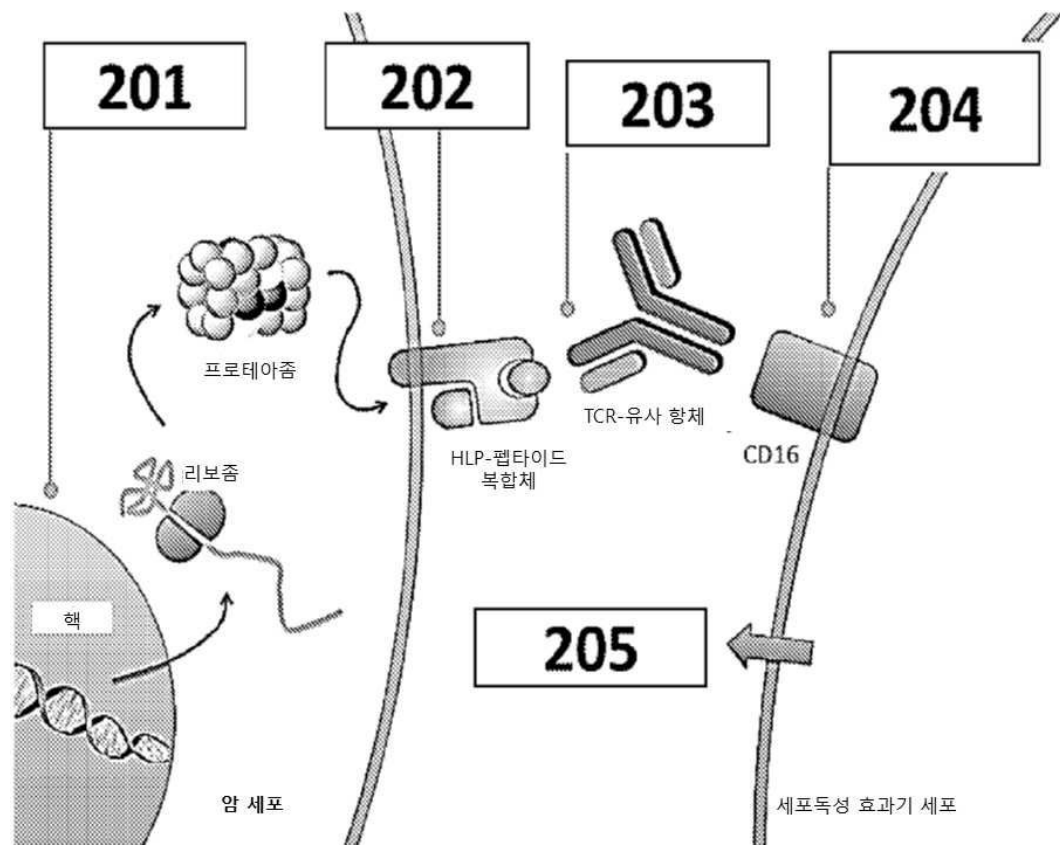
[0309] 본 명세서에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다. 본 발명 5가 특정 실시형태를 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 다른 실시형태 및 변형이 당업자에 의해 고안될 수 있다는 것이 명백하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 실시형태 및 동등한 변형을 포함하여 해석되도록 의도된 것이다.

도면

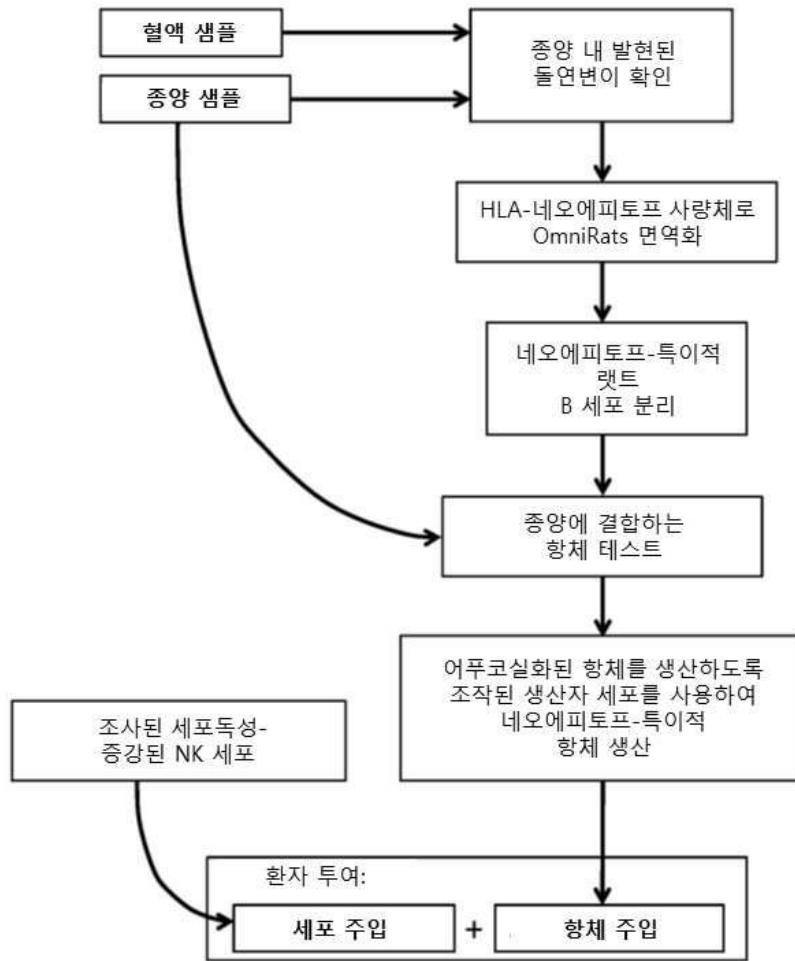
도면1



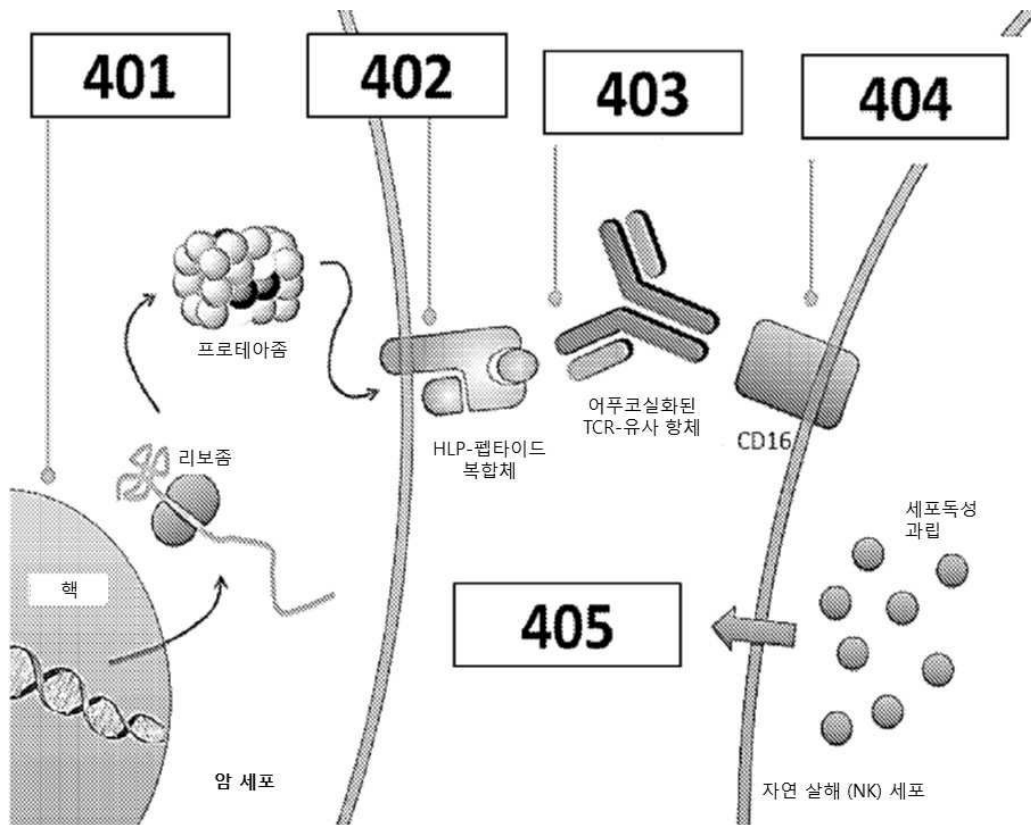
도면2



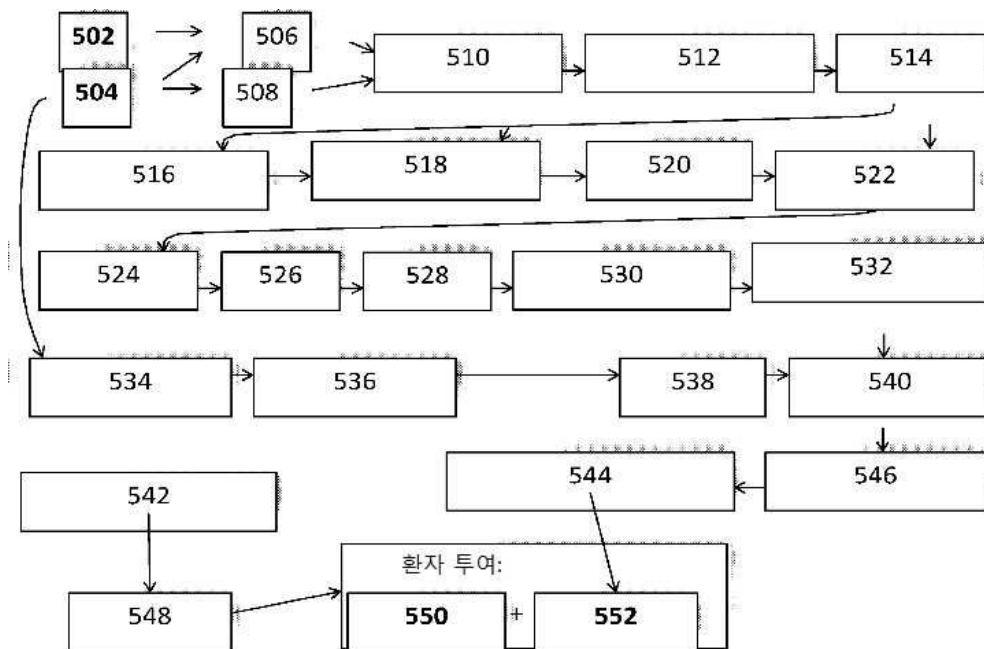
도면3



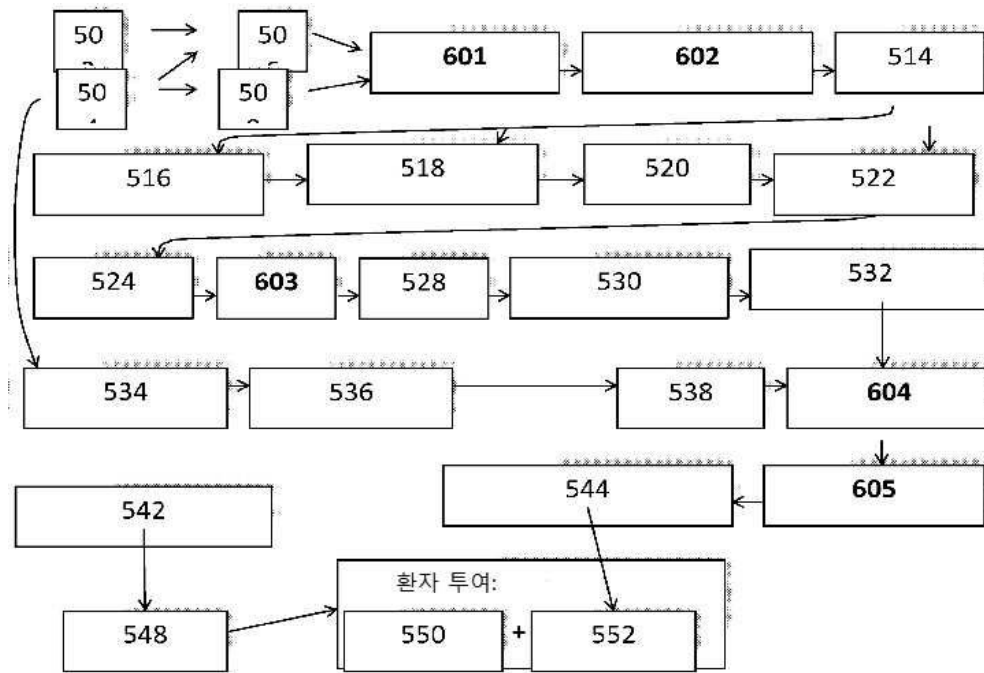
도면4



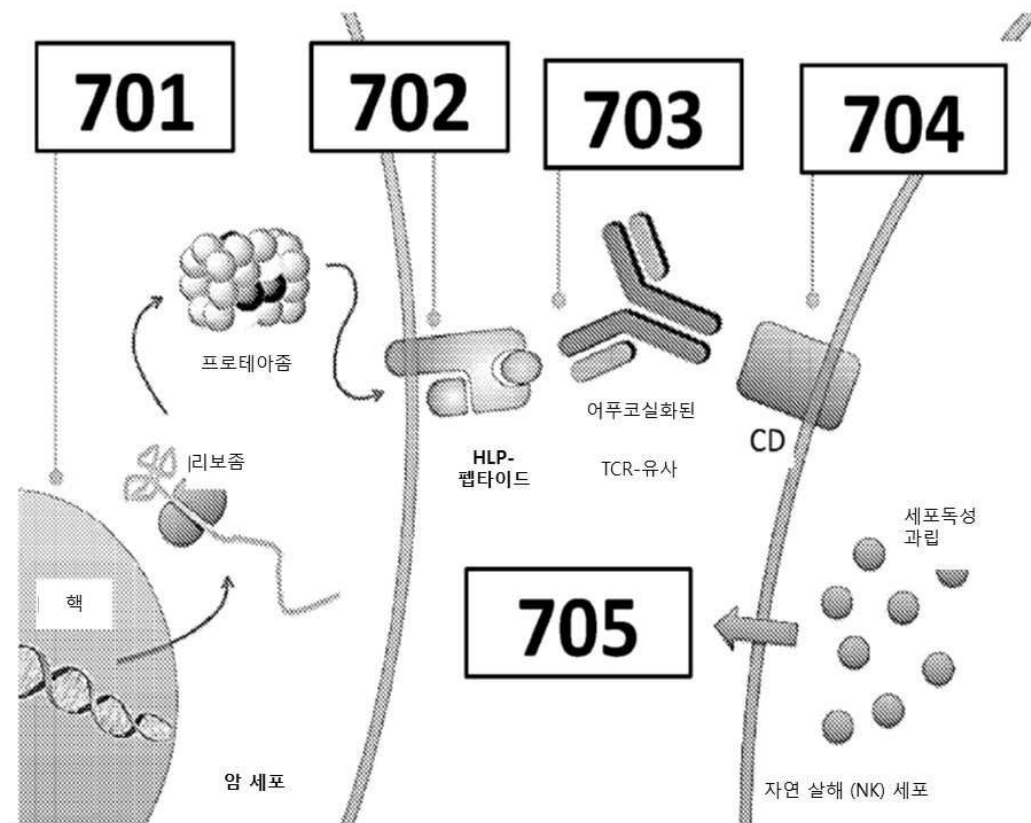
도면5



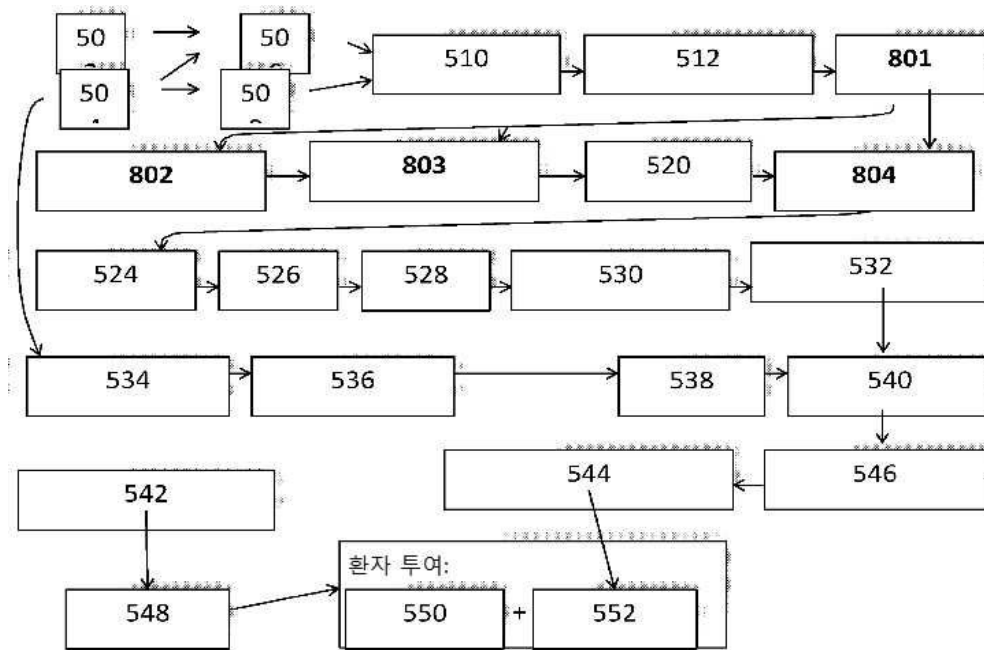
도면6



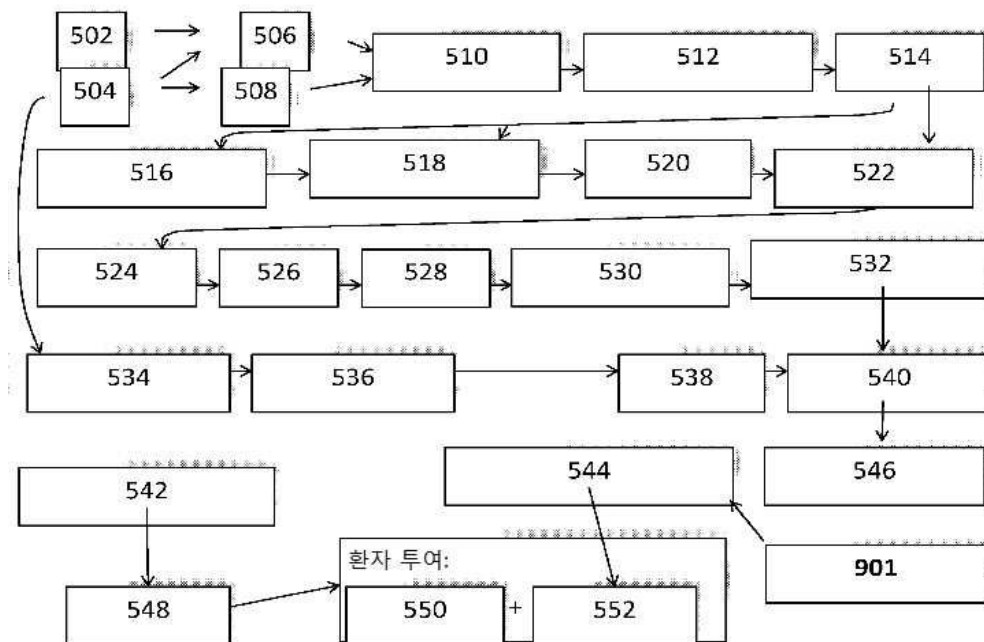
도면7



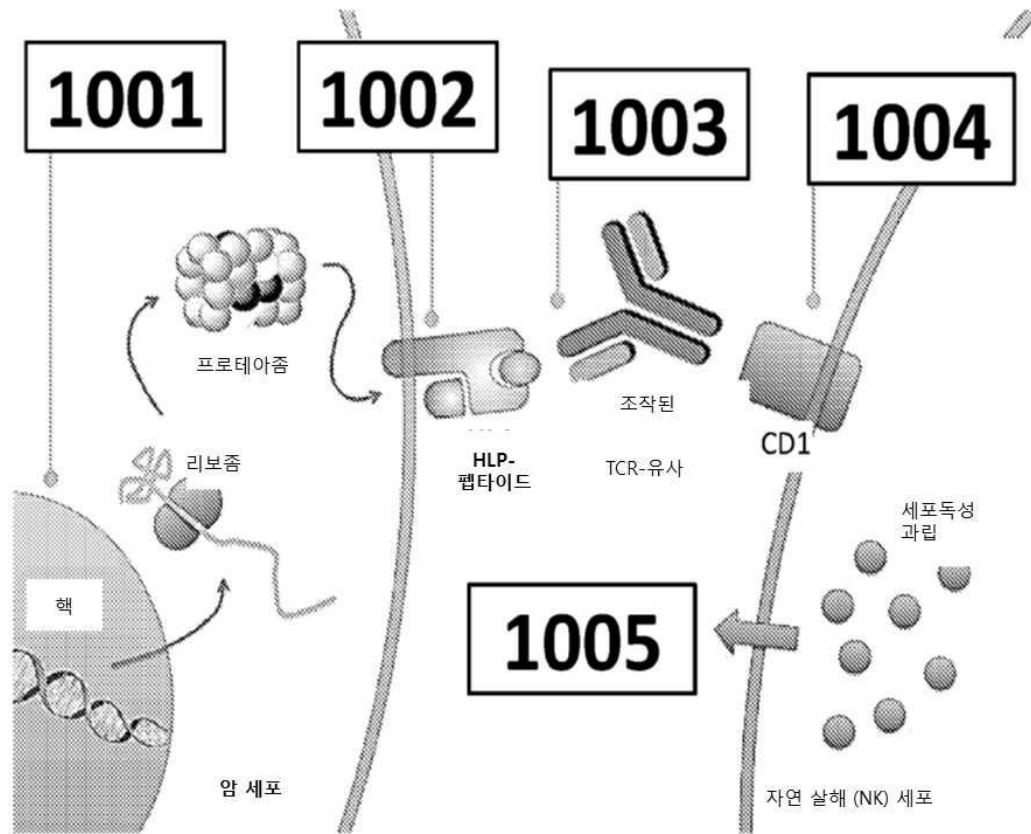
도면8



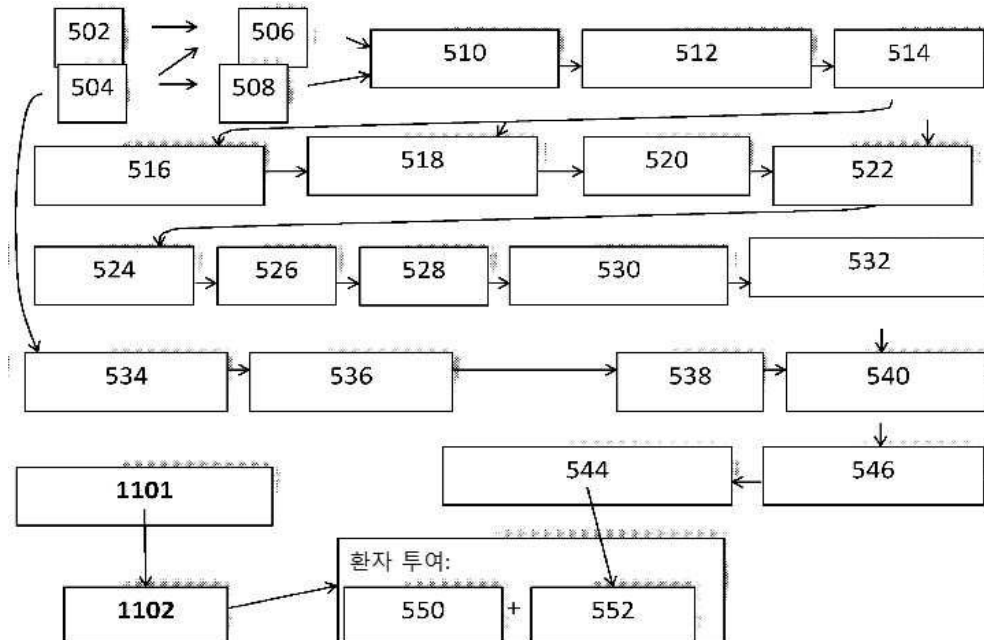
도면9



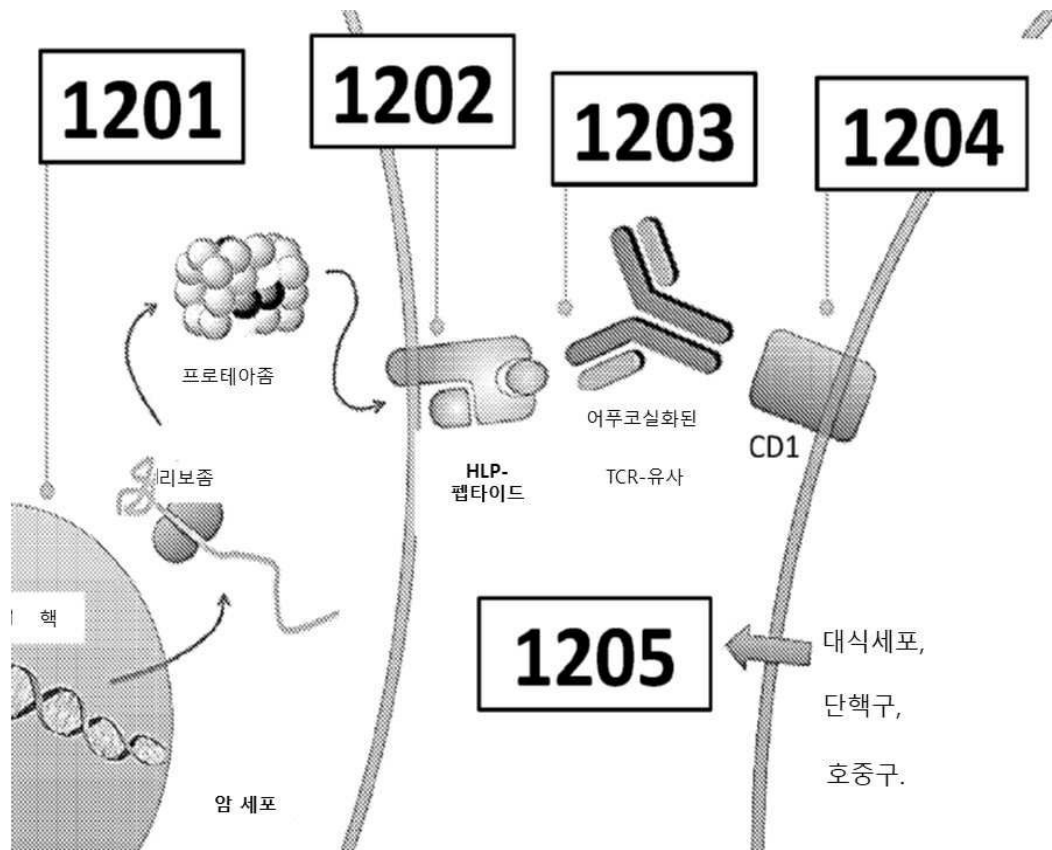
도면10



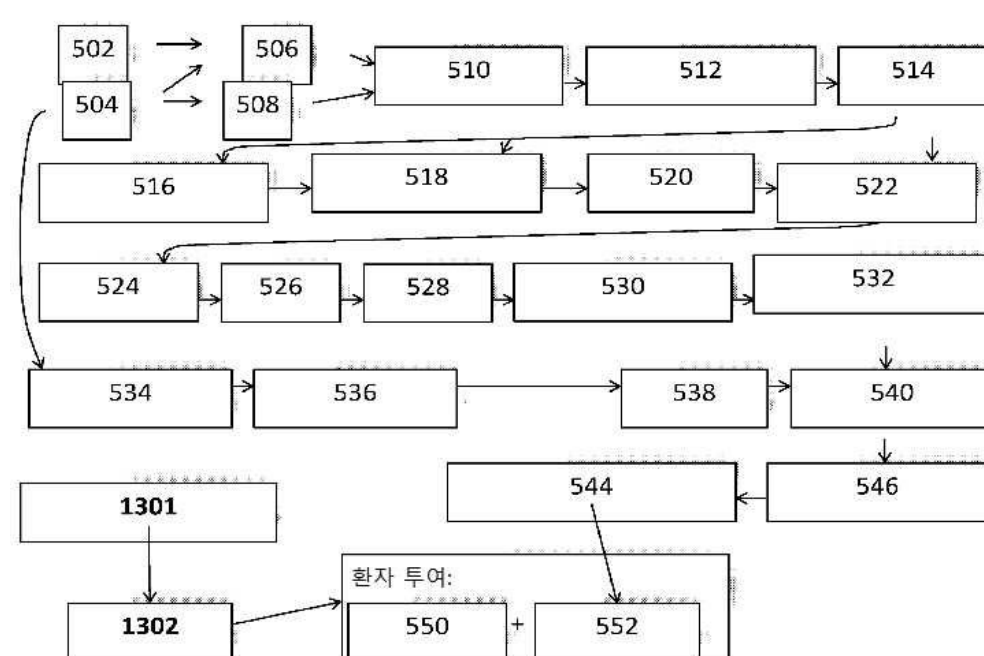
도면11



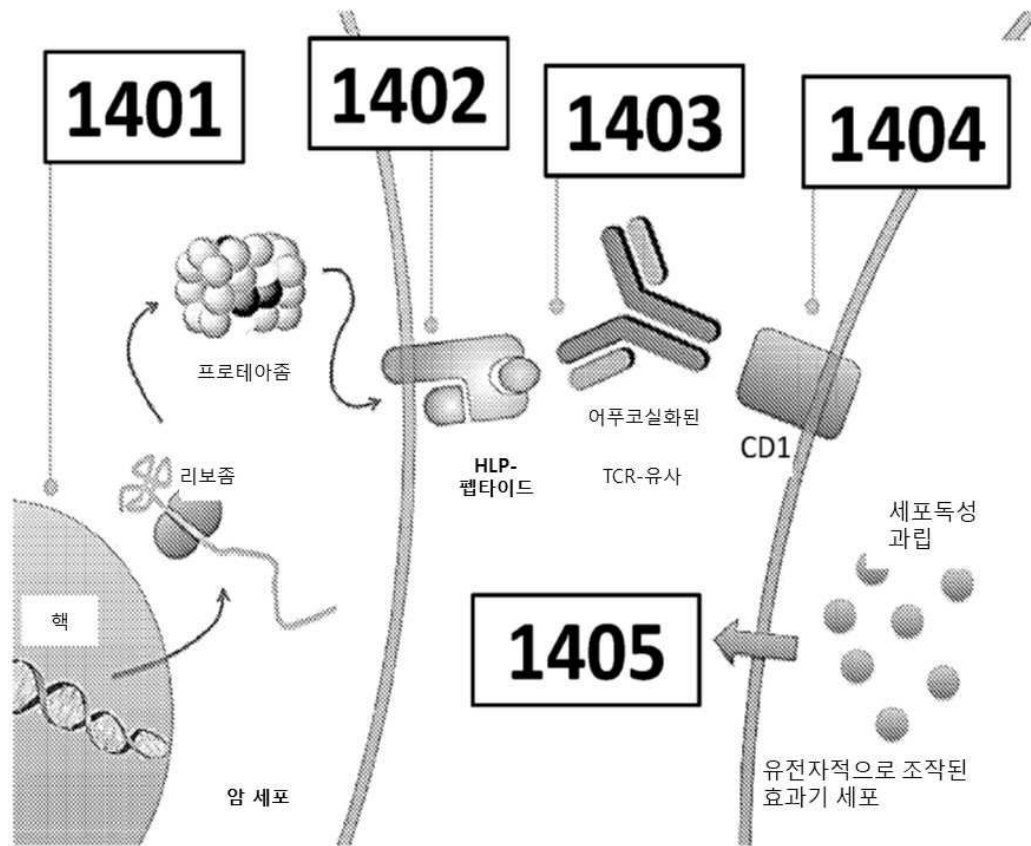
도면12



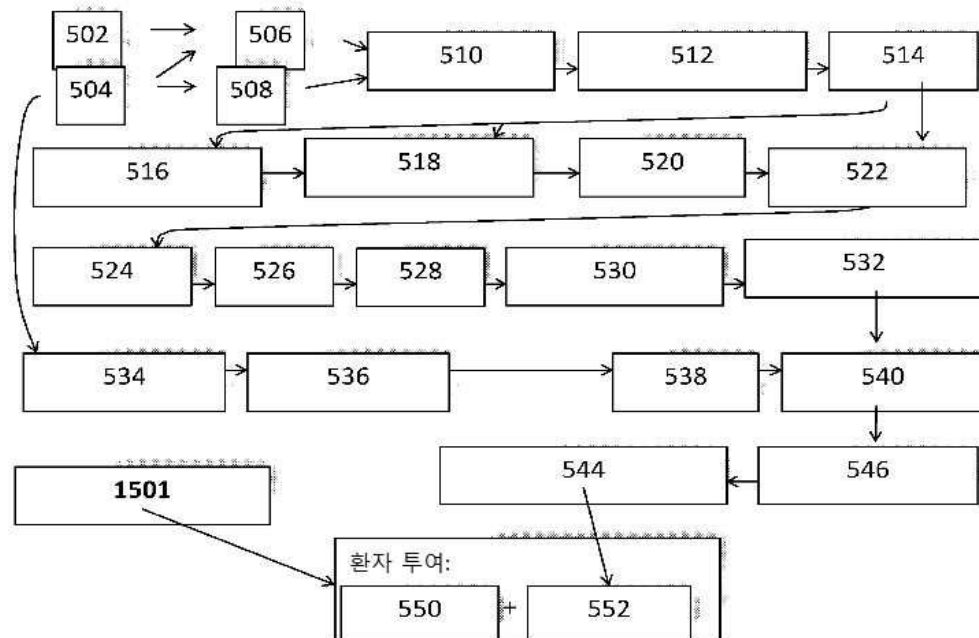
도면13



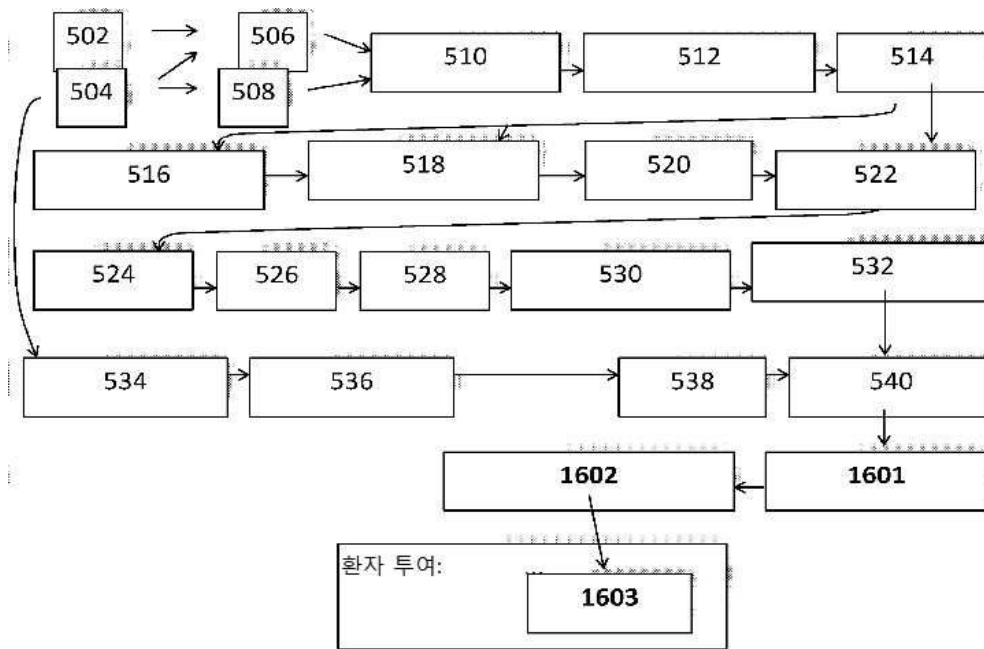
도면14



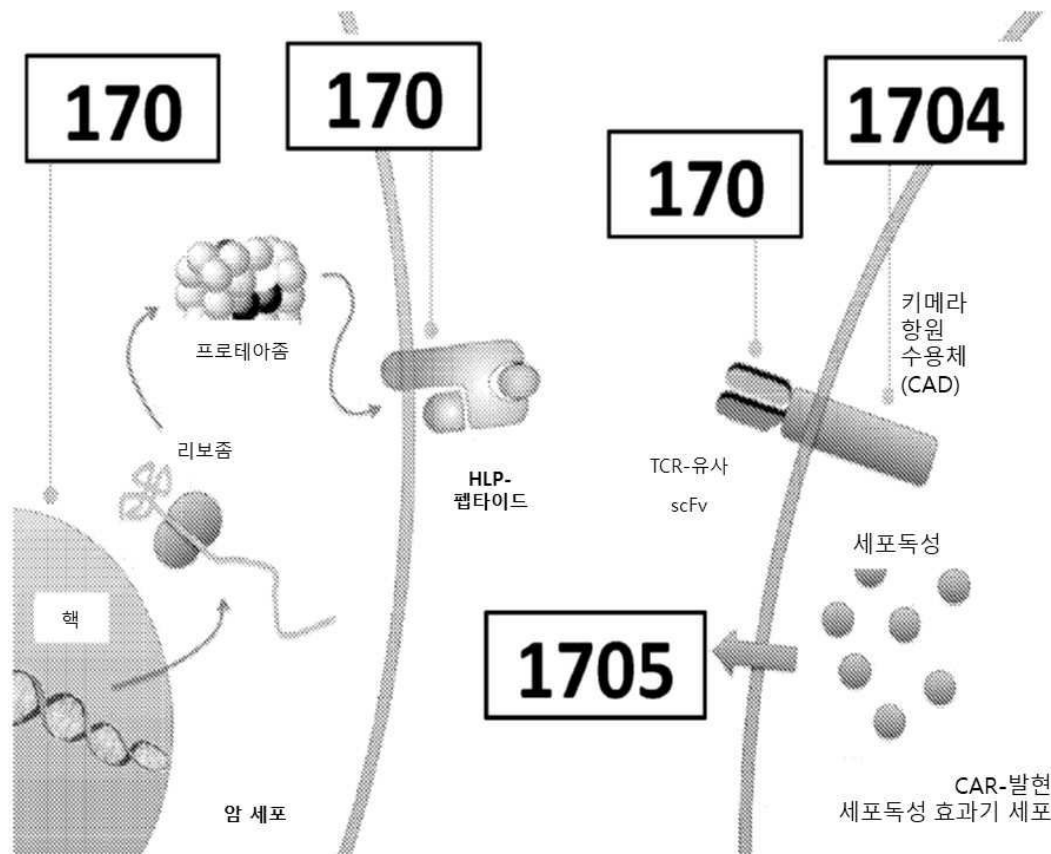
도면15



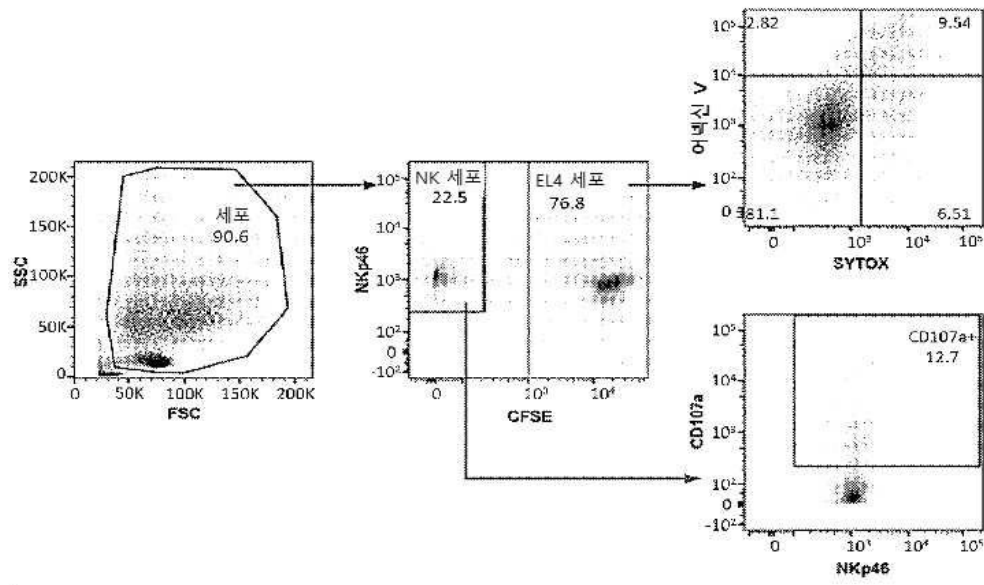
도면16



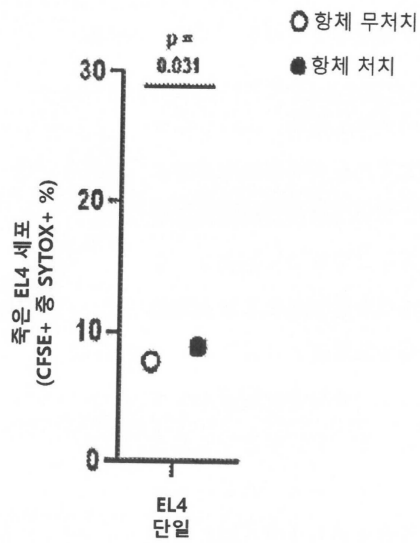
도면17



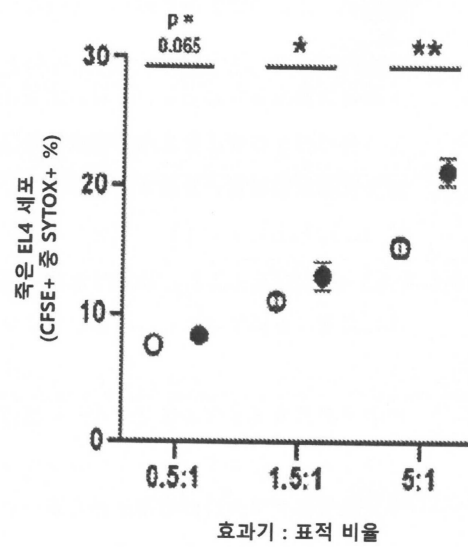
도면18



도면19

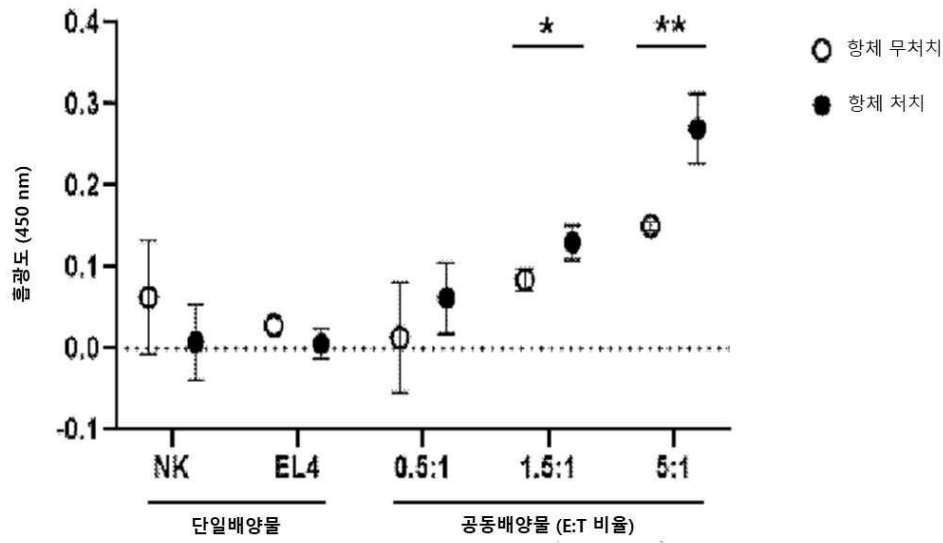


도 19A

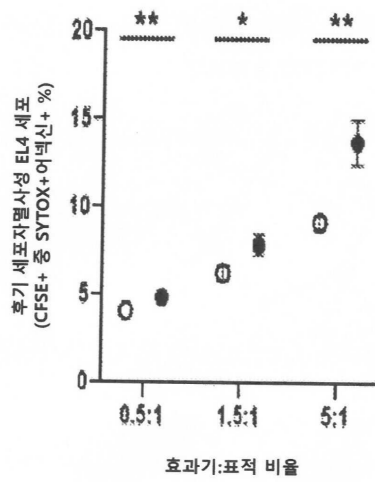


도 19B

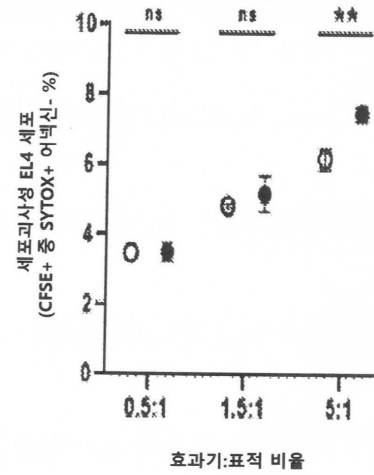
도면20



도면21

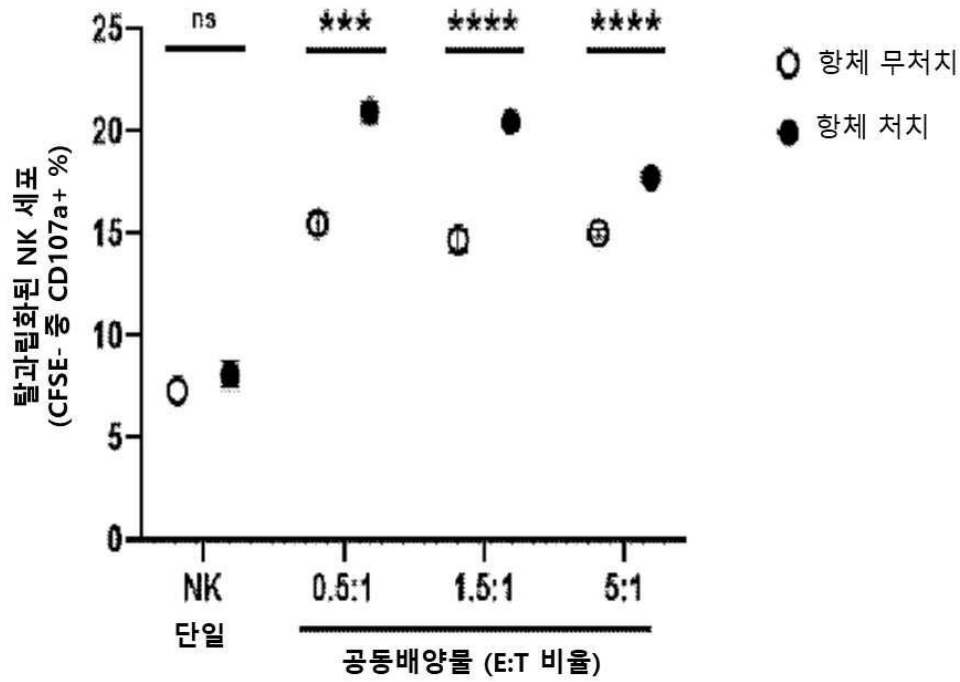


도 21A

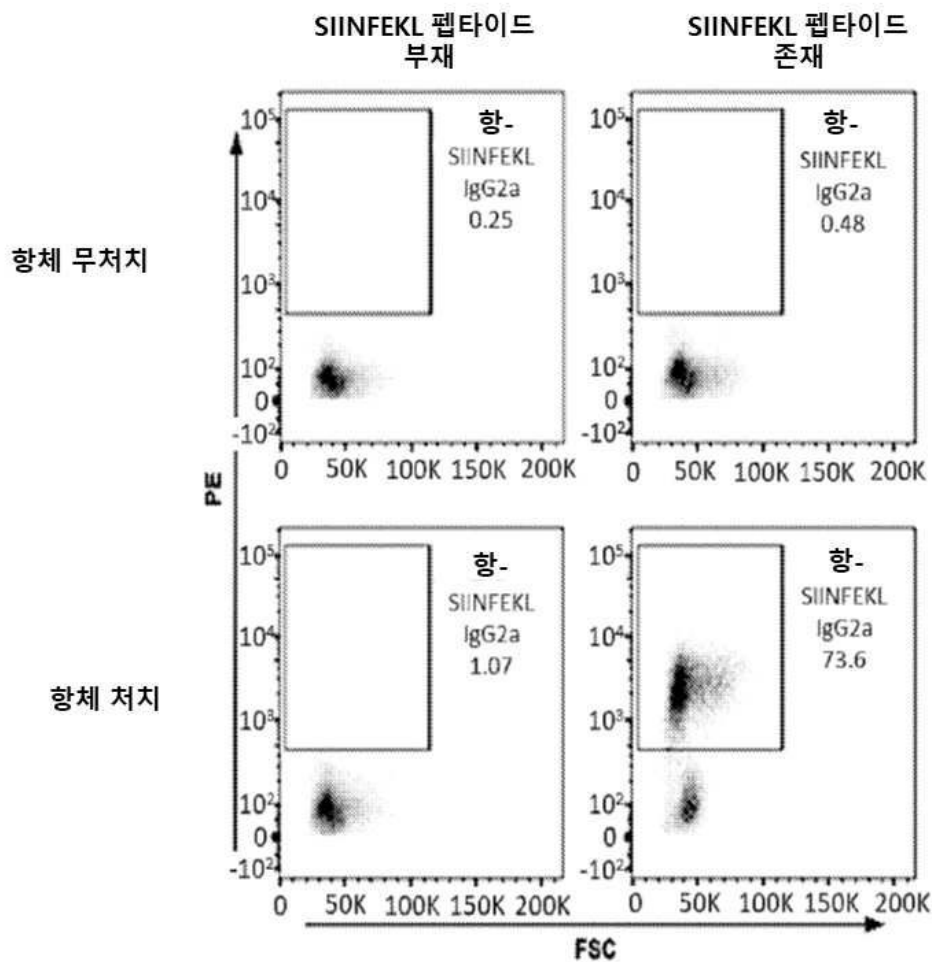


도 21B

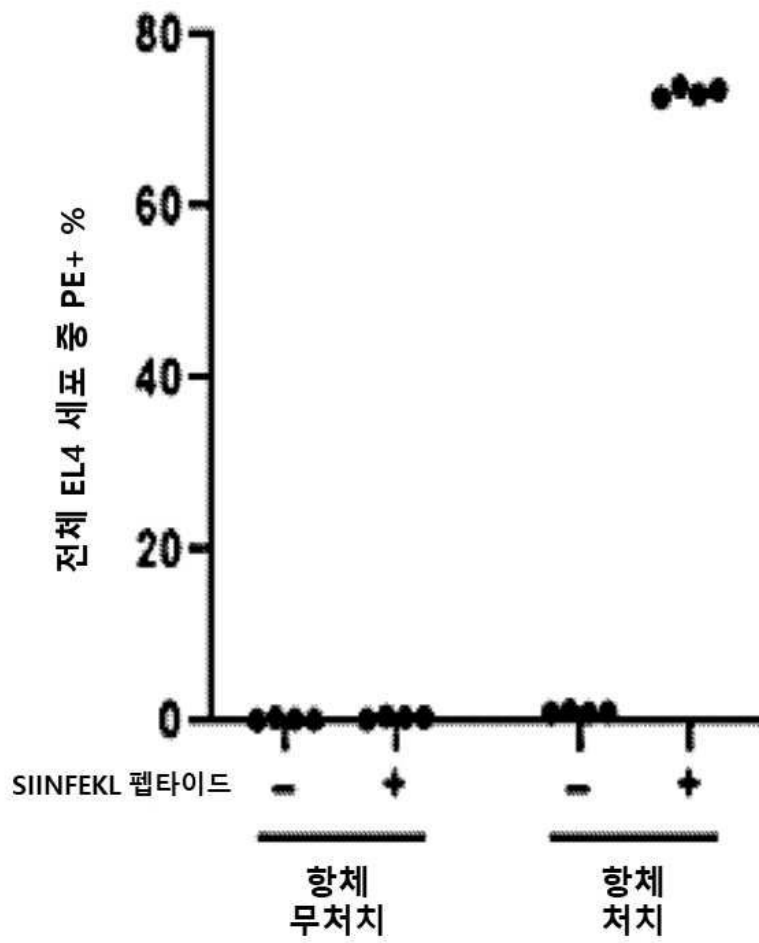
도면22



도면23a



도면23b



도면24

