



개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발 시 고려사항 가이드라인(민원인 안내서)

(Considerations on the Development of Personalized
Neoantigen Coded Therapy Products)

2023. 11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 세포유전자치료제과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

개인 맞춤형 신생항원 유전자치료제 개발 시 고려사항 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유: _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2023년 11월 10 일

담당자
확 인(부서장)

백 정 희
최 미 라

이 안내서는 개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발 시 고려사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2023년 7월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ '민원인 안내서'란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정 규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 식품의약품안전처의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 가이드라인에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3534

팩스번호: 043-719-3530

제 · 개정 이력서

개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발 시 고려사항 가이드라인

제 · 개정번호	승인일자	주요 내용
안내서-1318-01	2023.11.	「개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발 시 고려사항 가이드라인」 제정

목 차

1. 서론	1
2. 법적 근거	3
3. 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 품질평가 시 고려사항	
3.1 일반정보	4
3.2 제조	4
1) 종양조직의 획득	6
2) 종양 돌연변이의 검출	7
3) 신생항원의 선별	8
4) 신생항원의 디자인 및 전달	11
3.3 특성분석	13
3.4 원료 및 완제의약품 관리	13
3.5 안정성	14
4. 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 비임상시험 시 고려사항	
4.1 효력시험	15
4.2 독성시험	15
5. 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 임상시험 시 고려사항	16
참고문헌	17

I. 서론

신생항원(Neoantigen)은 암세포의 DNA에 특정 돌연변이가 발생하여 정상적인 세포에서는 발현되지 않고, 암세포에서만 선별적으로 발현하는 새로운 단백질을 의미한다. 염기서열의 변이가 단백질 서열의 변화를 초래하는 비동의 돌연변이(non-synonymous mutation)¹⁾에 의해 주로 발생하며, 정상 세포에서도 일부 발현하는 종양 관련 항원과는 달리 오직 암세포에서만 발현하는 특징이 있다.

기존의 항암 화학요법제, 면역항암제 및 항암 유전자치료제가 범용적 표적을 인지하여 치료하기 때문에 환자의 면역체계와 암세포가 해당 표적에 반응을 해야 치료효과를 보이는 데 반해 개인 맞춤형 항암치료제는 환자 개인의 신생항원을 활용하기 때문에 기존 치료법으로 해결되지 않은 환자에게 새로운 치료 기회를 제공할 수 있어 최근 분자생물학, 생물정보학 등 관련 기술의 발달과 더불어 새로운 항암 치료의 패러다임으로 주목받고 있다. 특히, 차세대 시퀀싱 (Next Generation Sequencing) 기술 및 그에 따른 데이터분석 기술의 발달로 환자마다 특이적으로 생성되는 종양 특이적 돌연변이를 이전보다 손쉽게 밝혀낼 수 있게 되었으며, 또한 주조직적합복합체 I/II(Major HistoCompatibility Class I/II, MHC class I/II)²⁾ 결합 알고리즘 등이 개발되어 종양 특이적 돌연변이 중에서 면역원성 네오에피토프(Neoepitope)³⁾를 예측할 수 있게 되었다. 이러한 기술발달을 토대로 합성 펩타이드나 mRNA, DNA, 수지상세포 등의 형태로 개인 맞춤형 항암치료제를 만들기 위한 임상시험이 활발히 진행되고 있다.

신생항원을 기반으로 하는 항암치료제는 몇 가지 장점이 있다. 첫째, 신생항원은 종양세포에만 특이적으로 발현하며 정상 세포에서는 발현되지 않는다. 따라서, 신생항원에 의해 활성이 유도된 T 세포는 정상세포 사멸을 최소화하며 종양세포를 제거할 수 있다. 둘째, 신생항원은 체세포 돌연변이를 통해 파생된 새로운 항원 결정기(epitope 또는 antigenic determinant)이기 때문에 흉선의 중추 면역 관용(central immune tolerance)⁴⁾ 기전에 노출되지 않고 자가면역을 일으키지 않아

1) 단백질 아미노산 서열에 변화를 일으키는 돌연변이

2) 주조직적합복합체 I/II(Major HistoCompatibility Class I/II, MHC class I/II) : T 세포에 항원을 제시하기 위한 세포 표면 단백질로 Class I은 모든 세포에서 발현되며 Class II는 특화된 항원제시세포에서만 발현된다. HLA는 인체에 대하여 사용하는 용어이다.

3) 네오에피토프(neoepitope) : 종양 특이적 돌연변이로부터 기원하여 MHC에 결합하는 펩타이드

잠재적으로 높은 면역원성을 갖는다. 셋째, 신생항원으로 활성화된 T 세포는 치료 후에도 기억 T 세포로 분화가 유도되어 오랜 시간 체내에 잔류하여 암재발에 억제 효과를 보일 수 있다.

그러나, 이러한 개인 맞춤형 신생항원 치료제가 암환자에 보편적으로 적용되기 위해서는 아직은 개인별 치료제 제조로 인한 높은 비용, 제작에 소요되는 긴 시간, 신생항원 예측의 불확실성 등을 극복할 수 있는 기술적 발전이 더 필요하다. 특히, 환자 개개인의 신생항원 발굴·선별 시의 복잡한 알고리즘 및 개인별 치료제를 각각 제조해야 되는 어려움 등은 신속한 상용화에 걸림돌이 될 수 있다. 또한, 기존의 의약품과는 다르게 최종 제품뿐만 아니라, 검체 채취에서 신생항원 선별, 우선순위를 고려한 신생항원 치료제의 설계 및 생산에 이르기까지 관리해야 하는 어려움이 있다. 이에, 개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발자가 참고할 수 있는 가이드라인을 선제적으로 마련하고자 하였다.

4) 중추 면역 관용(central immune tolerance) : 흉선에서 자가항원에 반응하는 T 세포가 제거되는 과정

II. 법적근거

현재 개인맞춤형 신생항원 치료제는 펩타이드, mRNA, DNA, 수지상세포 등의 형태로 개발되고 있다. 이번 가이드라인에서는 생물의약품 중 첨단바이오의약품에 해당하는 DNA, mRNA, 수지상세포 기반 개인맞춤형 신생항원 치료제(이하 DNA 등 기반 개인맞춤형 신생항원 치료제)를 주 대상으로 하여 기술하였다. 다만 다른 형태의 개인맞춤형 신생항원 치료제도 이 가이드라인을 참고할 수 있다.

본 가이드라인에서 설명하는 첨단바이오의약품에 해당하는 개인 맞춤형 신생항원 치료제는 「첨단재생바이오법」 제23조제2항 및 제27조제1항에 따라 첨단바이오의약품을 판매하기 위해서는 품목허가를 받아야 하며, 품목허가 시 심사자료는 「첨단바이오의약품의 품목허가·심사 규정」 제6조(국제공통기술문서의 작성)에 따라 국제공통기술문서(Common Technical Document, CTD) 양식으로 작성하여야 하며 제제의 형태에 따라 제14조(세포치료제의 품질평가 자료 요건) 또는 제15조(유전자치료제의 품질평가 자료 요건)와 제17조(비임상시험 자료 심사기준)에 적합하여야 한다.

본 가이드라인은 개인 맞춤형 신생항원 치료제에 대하여, 종양 조직 및 정상 조직으로부터 채취한 검체로부터 염기서열을 분석하고, 분석된 염기서열로부터 돌연변이를 확인하여 신생항원을 선별하고, 선별된 신생항원 염기서열을 바탕으로 항암 치료제를 제조시, 제조 단계 및 비임상 및 임상시험을 실시할 때 고려해야 할 사항을 개괄적으로 제시하는 데 그 목적이 있다.

Ⅲ. 품질평가 시 고려사항

신생항원을 암호화하는 물질, 즉 항원전달 물질에 따라 「mRNA 기반 유전자 치료제의 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」, 「플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인(민원인 안내서)」 또는 「유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」을 참고하여 제품에 대한 기본적인 품질관리를 수행할 수 있다. 신생항원의 유전정보 자체를 직접 전달하는 방식이 아닌, 개인별 신생항원으로 감작된 수지상 세포 등을 제제로 개발 시에는 「임상시험용 세포치료제·유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」를 참고할 수 있다.

3.1. 일반 정보

개발하고자 하는 제품의 국제일반명칭(INN: International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances), 코드명, 일반명칭 등을 제시한다.

신생항원을 암호화하는 유전자치료제의 형태로 개발할 경우에는 벡터 유전체의 종류, 크기, 분자량, 구조 모식도, 모든 구성요소의 참조서열(공개 데이터베이스와 등록번호)·기능·도입목적, 각 구성요소가 표시된 염기서열을 기술한다. 구성요소 중 참조서열과 일부 서열에 차이가 있는 경우(예. 코돈최적화, 돌연변이 등) 해당 내용을 상세히 기술하고 타당성을 제시해야 한다. 각각의 구성요소들은 치료제의 활성이나 제조에 필요한 것이어야 하며 선택마커를 사용했을 경우 그 타당성을 제시해야 한다. 최종 제품 내에 항생제내성유전자가 포함되는 것은 가능한 한 피해야 하며, 불가피하게 사용해야 한다면 타당한 근거를 제시해야 한다.

또한, 개발·제조하고자 하는 치료제의 물리화학적 특성과 작용기전, 생물학적 활성등의 일반적 특성을 설명해야 하며, 이 외의 일반 정보와 관련한 사항에 대해서는 상기 언급한 기존의 가이드라인들을 참고할 수 있다.

3.2. 제조

이 가이드라인에서는 개인 맞춤형 치료제의 항암활성을 유도하는 핵심 요소로

볼 수 있는 신생항원 서열의 선별과정시 고려사항에 대하여 중점적으로 제시하고자 한다.

신생항원 서열의 선별과정 이외의 제조 공정·원료관리·공정 밸리데이션 및 평가·제조공정 개발에 대한 상세한 내용은 「유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」 및 「임상시험용 세포치료제·유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」을 참고할 수 있다.

플라스미드 또는 mRNA 기반 유전자치료제의 경우, 제조공정 일관성 등을 위하여 E. coli 세포은행을 구축하여 제조하는 것이 일반적이다. 그러나 개인별로 다른 염기서열을 갖게 되는 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 경우, 개인별로 세포은행을 다르게 제조·구축해야 하는 점을 고려하여 세포은행 시험항목 중 일부만을 선택·선별하여 관리하는 것을 적용할 수 있다. 바이러스벡터 기반 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 경우에도 개인별 바이러스 은행을 제조, 구축할 필요가 있으며 이 경우, 초기의 배치들에서 일관된 품질특성 결과를 확인하면 이후 배치들의 바이러스 은행은 특성분석 시험 항목 중 일부 시험 항목만 선별하여 선택적으로 적용할 수 있다. 특히 mRNA 기반 유전자치료제의 경우, IVT(in vitro transcription) 출발물질인 주형 DNA 단계에서 품질관리가 충분히 이뤄진다는 전제하에 세포은행의 구축없이 주형 DNA를 만들어 mRNA 유전자치료제 제조에 사용하는 것을 고려할 수 있다.

CAR-T 치료제와 같이 유전자가 도입·변형된 세포를 주성분으로 하는 개인 맞춤형 신생항원 유전자치료제의 경우에도 유전자 도입·변형을 위해 사용된 벡터의 특성, 제조, 품질관리에 대해 충분한 제조 및 품질관리 자료를 제출해야 한다.

암세포는 체세포 돌연변이의 축적을 특징으로 하기에 종양을 보유하고 있는 환자에서 자가 T 세포에 의해 인식되는 암 특이적 네오에피토프를 생성할 수 있다. 이 네오에피토프는 중추 면역 관용에 영향을 받지 않고, 건강한 정상 조직에서는 발현되지 않기 때문에 암 치료에 적절한 표적이거나, 대다수의 암 돌연변이는 개별 환자마다 다르다. 최근에는 염기서열 데이터로부터 돌연변이의 식별, T 세포가 인식할 가능성이 있는 돌연변이의 우선 순위 지정, 여러 암 돌연변이로 구성된 환자를 위한 맞춤형 치료제 설계를 위한 여러 대규모 계산 알고리즘 및 인공지능/기계학습 도구가 개발 중이다. 특히 다양한 *in silico* 분석기술들이 MHC 각 대립

유전자에 결합할 수 있는 돌연변이 펩타이드를 선별하고, 해당 돌연변이가 얼마나 발현하는지, 종양 내에 얼마나 분포하는지, 자기 단백질과의 유사성은 얼마나 되는지를 평가하여 개별 환자에 대한 고유한 맞춤형 항암치료제 신생항원 후보군을 선택할 수 있는 계산을 제공하고 있어 이들 프로그램·알고리즘의 적절성에 대해서도 각 개발자가 충분히 인지하고 선택해야 할 것이다.

개인 맞춤형 신생항원 치료제의 제조부터 투여까지의 과정을 크게 구분해 보면, 종양 조직의 획득, 환자 개인별 특이 종양 돌연변이의 검출, 면역원성이 높을 것으로 예측되는 신생항원의 선별, 신생항원 치료제의 제조 및 체내 전달 순으로 진행된다. 현재까지 보고된 기술과 이론을 바탕으로 본 장에서는 각 단계별 고려사항을 다음과 같이 제시하였으며, 품질평가자료 중 ‘제조’ 항에 각 단계에 대한 구체적인 내용을 포함하여 임상시험 및 품목허가를 위한 신청자료를 마련할 필요가 있다.

1) 종양 조직의 획득

암 조직의 특성상, 동일한 종양 부위에서라도 다양한 분자생물학적 특성을 나타낼 수 있으며, 환자의 전이성 병변에서 확인된 신생항원 후보 돌연변이는 원발암 또는 다른 전이성 병변의 신생항원 돌연변이와 다를 수 있다. 따라서, 이러한 종양의 이질성(heterogeneity) 및 최초 암조직과 전이된 암조직간의 차이 등으로 인해 단일 구역의 샘플만을 채취하는 것은 전체 종양의 돌연변이를 대표하기 어려울 수 있다. 필요시, 종양 돌연변이의 검출을 위해서 접근가능한 여러 부위에서 환자 종양을 대표할 수 있도록 다중 영역 코어 생검을 시행할 수도 있다. 그러나, 실제 임상에서 환자로부터 다수의 암조직을 생검하는 것은 현실적이지 않기에 최근에는 덜 침습적인 방법을 사용하여 환자의 종양 조직을 얻을 시 발생할 수 있는 위험성을 감소시킬 수 있도록 액상 생검(liquid biopsy)에서 순환하는 종양유래 DNA (circulating tumor DNA)를 분석하는 방법이 제안되고 있으나, 암 돌연변이를 검출하고 식별하기에는 기술적 발전이 좀 더 필요하다고 보고 있다.

임상에서 조직을 채취시, 생검 조직 자체가 양적으로 충분한 암 세포를 포함할 수 있도록 주의를 기울여야 하며, 대조군으로 사용할 정상 조직 역시, 대표성을 고려하여 채취되어야 한다.

암조직 및 정상조직 검체의 수집 및 보관 조건은 염기서열 분석 데이터에 영향

을 미칠 수 있어 주의를 기울여야 한다. 검체수집 단계에 대한 표준작업지침서를 갖추고 수집 및 보관 과정을 밸리데이션하여 결과의 신뢰성을 확보해야 할 필요가 있다. 채취 후, 시퀀싱 전까지 냉동 보관 등 적절히 관리할 경우, 최적의 분석 데이터를 제공할 것이나, 보관·운송 등에 있어 부가적인 노력이 필요하다. 포르말린 또는 파라핀으로 고정된 검체는 고정 과정 자체가 시퀀싱에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 염기서열 분석대상 검체는 신중히 선택할 필요가 있다.

2) 종양 돌연변이의 검출

일반적으로 전체 유전체의 약 1%에 해당하는 유전체의 단백질 코딩 영역만 시퀀싱하는 전장 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing)을 이용해 종양 조직의 DNA와 정상 조직의 DNA 정보를 비교해 개인별 특이적인 종양 돌연변이를 찾아내게 된다. 단일 뉴클레오타이드 변이(single-nucleotide variants), 결실(deletion), 전좌(translocation), 역위(inversion), 삽입(insertion) 등의 염기서열 돌연변이들은 단백질내 아미노산 서열의 변화를 일으킬 수 있어야 한다. 일반적으로 단일 아미노산 변화보다 결실, 전좌, 역위 및 삽입 등에 의해 신규 또는 대규모 돌연변이가 발생한 단백질이 높은 항원성을 지닐 가능성이 높다. 이와 같은 대규모 변이는 전장 엑솜 시퀀싱으로는 검출이 안되는 경우도 있으므로, 전체 유전체 수준에서의 고해상도 시퀀싱을 활용한 분석도 필요할 수 있다.

돌연변이 검출시에는 시퀀싱 또는 검체 준비과정에서의 오류나 단순한 체세포 변이(somatic variants)를 정확하게 구별해 낼 수 있어야 한다. 이를 위하여 분석 소프트웨어 및 DB의 신뢰도 검증 즉 분석적 성능에 대한 평가가 필요하며, 이는 참조 검체로 수행한 시퀀싱 시험의 분석결과를 제시함으로써 증명할 수 있다.

돌연변이 검출을 위한 여러 소프트웨어 도구가 존재하나, 완벽한 분석 소프트웨어는 없으므로, 다수의 프로그램에서 공통적으로 검출되는 돌연변이를 기반으로 하는 접근 방식을 사용하기도 한다. 특히 종양으로부터 유래한 검체는 건강한 세포의 혼입 등의 이유로 높은 이질성을 나타낼 수 있고, 종양 내 및 종양 간 이질성도 있으므로, 이러한 것들을 고려하여 적절한 해결책을 마련해야 한다. 즉, 단일 환자에서 여러 검체를 분석하거나 여러 데이터 분석 방법을 통합하여 판정하는 등의 복합적인 접근 방식을 적용할 필요가 있다.

또한, DNA 메틸화나 히스톤 단백질의 번역 후 변형 등은 신생항원의 발현을 조절할 수 있기 때문에 신생항원 선정의 범위를 넓히기 위해서는 후성 유전학적 분석 자료도 참고할 수 있다.

신뢰성 있는 데이터 확보를 위하여, 앞서 언급한 바와 같이 종양 조직 및 정상 조직은 적절히 채취/보관되어야 하며, DNA 추출 과정 역시 검증된 방법으로 수행되어야 한다. 분석대상 검체의 품질 및 분석된 염기서열을 적용하는 데이터베이스의 품질 및 신뢰도 역시 돌연변이 검출에 있어서 중요한 요소이다. 완건성이 있는 돌연변이 서열 분석을 위하여 앞서 언급한 바 대로, 동일한 종양 조직으로부터 다수의 검체를 여러 번 분석하는 등의 작업이 요구될 수도 있다.

3) 신생항원의 선별

암 백신의 궁극적인 목적은 새로운 신생항원 특이 T 세포를 프라이밍 하거나, 미리 형성된 T 세포를 활성화하여 암 면역 주기를 다시 점화하여 종양세포가 완전히 제거 될 때까지 지속적인 항 종양 면역 반응을 촉진하는 것이다.

따라서, 돌연변이를 정확하게 식별하고 생물학적 지식에 근거하여 후보군을 선택하는 것은 개별화된 신생항원 치료제의 안전성과 효능을 좌우하는 가장 중요한 요소이다. 특히, MHC에 대한 제한과 면역 관용으로 인해 모든 돌연변이가 신생항원을 형성하는 것이 아니기 때문에 면역원성이 높은 신생항원을 예측하고 이를 선정하는 과정은 신생항원 항암치료제 생산에 가장 핵심적인 단계라고 볼 수 있다. 이를 위하여 개발자들은 해당 돌연변이의 발현 여부 및 발현량을 검증하고, MHC와의 결합친화도를 예측하여 임상적으로 효과적인 신생항원을 선별할 수 있어야 한다.

1) 돌연변이의 발현량 2) 네오에피토프의 MHC와의 결합 친화도 및 결합 안정성, 3) T 세포 인지에 관련된 특성(자기항원(self-antigen)과의 불일치성 또는 병원체 항원과의 유사성과 T세포 수용체와의 결합력) 등에 기반하여 네오에피토프 후보가 T 세포를 활성화시키는 능력을 알고리즘으로 구현하여 각 신생항원 후보들의 순위를 매길 수 있다. 그러나, 각 신생항원 후보들에게 가중치를 부여하는 방법은 확립되지 않았으며, 면역원성을 정확하게 예측하는 데이터세트도 아직 없으며, 현존하는 데이터 세트는 구축 주체별로 다양하고 표준화되어 있지 않으므로 각 개발자들은 선택한 데이터세트에 대하여 그 타당성을 최대한 제시하여야 한다.

신생항원의 세포내 발현도는 종양 조직에서 추출된 RNA에서 RNA 시퀀싱(RNA-seq) 등의 분석 방법으로 평가할 수 있다. 일반적으로 발현량 분석은 종양 조직에서만 수행되며, 돌연변이의 종양 특이성은 엑솜 시퀀싱으로 확인할 수 있다.

MHC에 의한 항원 제시 과정은 MHC와의 결합뿐만 아니라, 항원 제시 세포 세포질 내에서, 돌연변이 단백질이 여러 펩타이드로 분해되고 세포질 내 소포체(endoplasmic reticulum)로 이동하는 등의 과정이 중요하며, 따라서 이를 예측하기 위한 알고리즘을 사용할 수 있다.

신생항원과 MHC와의 결합력은 신생항원을 예측하고 선정하기 위한 또 다른 주요 요소이다. 동일한 돌연변이가 MHC-I 및 MHC-II 모두에 의해 제시될 수 있으며, T 세포 활성화를 위해서는 항원:MHC-I 복합체만으로는 충분하지 않으므로, 개인 맞춤형 신생항원 치료제는 MHC-I과 II에 모두 결합할 것으로 예상되는 신생항원을 조합하는 것이 적절하다. MHC-II는 MHC-I 보다 덜 엄격한 서열 및 길이 요건을 가지므로 돌연변이 펩타이드가 MHC-II에 나타날 가능성 및 항원:MHC-II 복합체의 다양성이 더 높다. 종양에서 확고한 수준으로 발현되고 MHC-I 또는 MHC-II에 대해 충분히 높은 친화도를 갖는 네오에피토프를 제공하는 신생항원은 항원의 효과적인 교차 제시를 통해 naive T 세포⁵⁾의 프라이밍에 더 적합하다. 실제 실험을 통해 얻은 결합 친화력 데이터 및 MHC와 결합한 펩타이드를 용출하여 질량분석법으로 아미노산 서열 정보를 얻은 데이터 등을 활용한 MHC와 신생항원간 결합 예측 알고리즘을 참고할 수 있다. 이러한 방법은 각 MHC 대립 유전자별로도 네오에피토프의 결합예측이 가능한 것으로 알려져 있다.

항원:MHC 복합체는 결국 T 세포 표면에서 발현되는 TCR(T Cell Receptor)에 의해 인지되어 결합되어야 T 세포를 프라이밍하게 된다. 따라서, 항원:MHC 복합체와 TCR 간의 결합 여부 예측을 위해 구조 예측 분석, 인공 지능 분석 등이 활용되고 있으나, 아직 충분한 예측력을 보이지 않는 것으로 알려졌다. 또한 항원:MHC 복합체의 안정성이 높을수록 T 세포에 의해 인식될 가능성이 높으므로, 면역원성 예측에 있어서 항원과 MHC간의 결합 친화정보보다 항원:MHC 자체의 안정성이 더 중요한 것으로 제안되기도 한다. 따라서, 후보 신생항원들에 대해서 MHC-I 및 MHC-II

5) naive T 세포(naive T cell) : 분화와 성숙과정을 거쳤으나 아직 항원과 접촉한 적이 없는 T 세포로 후에 항원제시세포로부터 제시된 MHC-항원 복합체와 결합하게 되면 effector T 세포로 활성화되는 세포

와의 결합력 뿐만 아니라, 결합된 항원:MHC 복합체의 안정성에 대해서도 평가할 수 있다.

신생항원을 인지하는 T 세포가 흉선에서 중추 면역 관용으로 제거되지 않기 위해서는 자기항원과는 유사성이 낮아야 하고 병원체 유래 즉 비자기(non-self) 항원과는 유사성이 높은 것이 유리하다. 자기항원과의 유사성을 확인하기 위해서는 BLAST에서 인체 DNA 서열과의 일치도를 분석하는 것이 일반적이다. 또한 항원 펩타이드의 구조적 유사성을 분석하여 비교할 수도 있다. 병원체 항원과 유사성을 갖는 신생항원의 경우, 앞서 언급한 바와 같이 이미 확립된 메모리 T 세포에 의하여 인식되어 교차 면역반응을 유도할 수 있다. 병원체 유래 항원과의 유사도를 예측하기 위해서는 흔한 병원체에 대해 반응하는 T 세포에 대한 교차반응(cross-reactivity)이 나타날 가능성을 분석하여 알 수 있다.

위에서 언급한 방법 이외에도 돌연변이의 클론성(mutation clonality), 이형 접합성의 상실(loss of heterozygosity, LOH) 등이 신생항원의 질을 평가하는 데 활용되고 있다. 특히 필수 유전자가 대립 allele에서 손실되고 남아있는 allele에서 신생항원을 만들 경우, 종양 세포는 신생항원이 없어졌을 경우 생존할 수 없으므로 남아있는 유전자 allele는 생존에 필수적이다. 따라서 LOH가 된 필수 유전자의 돌연 변이는 신생항원의 우수한 표적이 될 수 있다. LOH는 차세대염기서열 분석이나 마이크로어레이 데이터 등으로 예측이 가능하며, 그간 연구에 의해 1,600~2,500개 유전자가 세포 생존에 필수적인 것으로 알려졌으며, 신생항원 후보의 우선순위 결정시 참고할 수 있다.

개발자는 신생항원 선별 전략의 타당성에 대한 근거자료를 확보하여야 하며, 이는 각 신생항원들과 MHC간의 결합력, 항원:MHC 복합체와 TCR간의 결합력, 항원:MHC 복합체의 안정성, 자기항원과의 유사도 등에 대한 in silico 분석을 포함한 실험적 분석 방법 등으로 제시될 수 있다.

덧붙여, 신생항원 투여시 발생할 수 있는 미예측 부작용을 방지하기 위해서는 세포내 발현도와 HLA 결합도가 높은 후보 신생항원 또는 그 유사한 서열을 갖는 단백질(펩타이드)이 다른 주요 정상 장기나 조직에서는 발현되지 않는 것을 확인할 필요가 있을 수 있다.

4) 신생항원의 디자인 및 전달

개인 맞춤형 신생항원의 전달을 위한 제제로는 현재 합성 펩타이드, DNA, mRNA, 바이러스 벡터 및 수지상 세포 등이 사용되고 있다. 합성 펩타이드는 15-30개의 아미노산으로 구성되어 있으며 일반적으로 면역 증강제와 함께 사용된다. mRNA 기반 유전자치료제는 최근 리포솜 제형화를 통해 유용성이 증명되었다. DNA는 합성이 용이하고 생산 비용이 저렴한 장점을 갖고 있으나, DNA를 핵 내로 전달하는데 어려움이 있다. 바이러스 벡터는 생산 및 관리의 어려움과 바이러스 자체의 면역반응이 단점이지만 안정적으로 유전자를 세포 내로 도입할 수 있는 장점이 있다. 종양 조직 채취부터 신생항원 의약품 제조까지 소요되는 시간과 경비 등을 고려하여 각 개발자가 최적화된 제제를 선택하여 개발해야 한다.

신생항원을 전달하기 위해서는, 전달 기술 제제에 맞춘 제조공정과 이 제제로 전달된 개별 네오에피토프 후보 세트를 선택해야 한다. 현재까지는 개인 맞춤형 치료제별로 MHC에 의해 제시될 수 있는 네오에피토프로 2~34개의 돌연변이의 조합을 사용한 임상 연구가 보고된 바 있다. 제제에 따라, 환자당 수십 개의 네오에피토프를 투여할 수 있으므로, 각 네오에피토프의 상이한 상보적 카테고리, 예를 들어 MHC-I 또는 MHC-II에의 결합 여부, 원발성 암 유래 돌연변이 또는 전이성 부위 유래 하위 돌연변이 등의 형태로 설계될 수 있다. 이렇게 상보적인 특성을 고려하여 네오에피토프의 조합을 선택할 경우, 추후 임상에서의 실패할 가능성을 낮출 수 있을 것으로 판단된다.

가장 자주 사용되는 신생항원 제제는 poly(I:C)를 면역증강제로 함께 사용하는 15~30 개 아미노산 길이의 펩타이드 조합과, 다수의 네오에피토프 서열을 암호화하는 mRNA 제형이다. 그러나 이 외에도 앞서 언급한 바와 같이 다양한 면역증강제와 함께 바이러스 벡터나 DNA를 적용할 수도 있다. 이 경우, 각 제제마다 함께 투여하는 면역증강제의 필요성이나 접종 일정(초기 프라이밍 후 부스트 요구 사항 및 빈도 등)은 개별적으로 결정해야 한다. 또한 신생항원에 의한 면역 유도능을 향상하기 위해 DNA 또는 mRNA 기반의 신생항원 치료제 디자인에 면역증강제로서 기능하는 다양한 분자면역학적 인자를 포함시켜 신생항원과 동시적으로 발현되도록 할 수 있다. 이러한 인자를 사용하는 경우에는 각 인자들의 선택 근거와 타당성을 제시하여야 한다.

각 제제의 제조공정은 제조 속도·확장성(scalability)·제조 비용 등에 영향을 미칠 것이며, 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 신속하고 성공적인 상용화를 위해서는 각 개인별 완제의약품을 동시에 여러 로트를 생산할 수 있도록 대규모의 고도로 병렬화된 제조공정을 고안하는 것이 필요하다. 이는 기존의 의약품 개발에서 추구하는 제조공정의 스케일업의 대량화 패러다임과는 매우 다른 접근법이라고 볼 수 있으며, 생산공정의 전자전산화 및 자동화 등의 제조 인프라 구축을 고려해야 할 것이다.

3.3. 특성 분석

신생항원 선별시 사용한 전략과, 신생항원을 탑재한 또는 신생항원으로 감작된 제제의 제조공정에 대하여 적절성을 증명할 수 있는 시험이 포함되어야 하며, 다수의 배치에 대하여 다양하게 시험하여 각 환자마다 다른 서열에 근거하여 제조되는 신생항원 치료제에 대하여도 선별 전략과 제조공정의 적절성을 외삽할 수 있는 수준의 데이터를 확보해야 할 것이다. 즉, 다수의 배치 생산을 통해 1) 제품의 중요 품질특성 선정 및 각 특성의 허용기준을 설정하고 2) 공정인자별 위해 진단 및 제품의 설계 공간 도출 등 품질의 대표성을 보일 수 있는 자료를 확보할 필요가 있다. 특히 신생항원 선별 전략과 이후 각 제제별 맞춤형 제조공정에 대하여, 유효성과 제조 일관성을 증명할 수 있도록 다수의 배치들에 대한 분석자료가 필요하다.

신생항원 치료제에 의해 유도된 면역반응을 평가하기 위해서는 ELISPOT, 세포 내 사이토카인 염색 및 pMHC-multimer 염색⁶⁾ 등의 시험을 활용할 수 있다. 이를 통해 개인 맞춤형 신생항원 치료제로부터 유도된 다클론성 T 세포에 대하여 면역 반응의 크기, 표현형 등 유용한 정보를 얻을 수 있다. 특정 항원에 반응하는 T 세포에 대하여 클론 수준에서 분석하기 위해서는 단일 세포 RNA 시퀀싱(scRNA-seq) 또는 TCR-seq(전체 TCR 시퀀싱(TCR-Seq) 또는 단일 세포 TCR 시퀀싱(scTCR-Seq))을 활용할 수 있다.

3.4. 원료 및 완제의약품 관리

환자마다 신생항원의 염기서열이 다르기 때문에 제조 공정 중, 다른 배치와 명확히 구분하여 제조·품질관리해야 할 것이다. 특히 신생항원 유전정보를 탑재하는 제제일 경우, 품질관리 시험 중 ‘확인’시험으로 전체 염기서열 및/또는 신생항원 유전정보 시퀀스를 포함한 유전자변형 부위의 염기서열을 분석하는 것이 타당하며, 또한 품질시험 및 특성 분석의 하나로, 암호화되어 있는 신생항원 유전정보가 단백질 수준에서 제대로 발현되는지 확인하는 시험이 필요하다.

각 원료 및 완제의약품의 품질관리를 위해서는 앞서 언급한 「mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」, 「플라스미드 DNA 기반

6) 특정 항원:MHC 복합체와 결합할 수 있는 T 세포의 유무를 확인할 수 있는 시험법

치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인(민원인 안내서)», 「유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」 및 「임상시험용 세포치료제·유전자치료제 품질평가 가이드라인(민원인 안내서)」을 각 제조공정과 제제에 맞게 참고할 수 있다.

개인별로 제조되는 배치마다 물리화학적 구조가 달라지는 점을 고려하여, 앞서 ‘3.2 제조’ 항에서 제시한 신생항원 선별 전략의 주요 내용을 원료의약품 별규의 ‘정의’ 및/또는 ‘분자식/구조식’ 항에 구체적으로 기재한다.

최종 제품의 제형화시 사용하는 첨가제로 국내 사용례가 없는 새로운 첨가제를 사용하거나 새로운 투여 경로를 사용되는 첨가제에 대해서는 안전성을 입증할 수 있어야 한다.

3.5. 안정성

안정성시험은 「의약품등의 안정성시험기준(식약처 고시)», 「생물의약품의 안정성 시험 가이드라인(민원인 안내서)」에 따라 수행한다. 상세사항은 「생물의약품 안정성 시험기준 질의응답집(민원인 안내서)」을 참고할 수 있다.

각 배치별로 구조가 달라질 수 밖에 없는 개인 맞춤형 신생항원 치료제의 특성상 제품의 사용기간 설정을 위하여 매 배치마다 안정성시험을 수행할 수는 없으므로 다수의 배치들에 대한 안정성시험 결과를 통하여 사용(유효)기간을 설정할 수 밖에 없다. 따라서 사용(유효)기간 설정을 위해 안정성시험을 수행하는 배치는 다른 임상 시험용의약품 배치들의 품질을 대표할 수 있어야 하며, 안정성 시험에 포함된 대표 배치 선정과 배치 수에 대한 타당성이 제시되어야 한다.

해동하거나 희석하는 등의 조작을 거쳐 투여되는 제품의 경우 조작조건의 타당성을 입증할 수 있도록 사용 중 안정성 평가자료를 제출해야 한다.

IV. 비임상시험 시 고려사항

개인 맞춤형 신생항원 치료제의 비임상시험은 전달 물질에 따라 원칙적으로 「유전자 치료제 비임상시험 평가 가이드라인(민원인 안내서)」 또는 「암치료를 위한 수지상 세포치료제 평가 시 고려사항(민원인 안내서)」에 따라 수행한다.

다만, 개인 맞춤형으로 환자마다 신생항원 치료제가 다르므로 비임상시험에 사용하는 배치는 신생항원 치료제의 안전성과 유효성을 평가하기에 가장 적절한 배치(이하 대표배치라 한다.)를 이용하여 수행하여야 하며 대표배치 선정에 대한 타당성이 제시되어야 한다.

4.1. 효력시험

원칙적으로 종양크기의 감소나 *in vivo* 면역반응 입증하는 자료제출은 권고사항이고 필수적인 것은 아니나, *in vivo* 전달의 유효성은 대표배치에서 검증되어야 한다. 신생항원 선별 전략 및 전달 제제의 유효성을 확인하기 위해 환자의 암 조직 또는 혈액, 또는 기증된 정상 혈액을 이용한 *in vitro* 면역유도 실험 또는 HLA transgenic mice를 이용한 *in vivo* 면역반응 유도 실험 등의 방법을 활용할 수 있다. 또한, 치료제를 투여하고자 하는 암종과 유사한 마우스 종양 세포주를 선별해 인간과 동일한 전략으로 신생항원 선별 후, 동일한 제조공정을 통해 제제를 만들어 이를 동계 종양 마우스 모델에 투여해 종양 크기와 면역반응, 독성 발생여부를 평가할 수 있다. 면역결핍 마우스에 환자 종양 조직이 이식된 환자 유래 이종이식 마우스 모델(Patient derived xenografts, PDX 모델)에 해당 환자의 신생항원 치료제로 자극한 인간 T 세포를 투여하여 항종양 효과 및 안전성을 확인하는 방법도 있다.

4.2. 독성시험

단회 및/또는 반복투여 독성시험의 경우에도 대표배치를 이용한 시험 수행이 필요하다. 그 외의 독성시험은 치료제의 특성에 따라 제출여부가 결정되므로 개발자들은 자신의 제품에 대한 과학적인 특성을 잘 파악하여 시험 수행에 대한 타당성을 마련하는 것이 매우 중요하다. 제품의 특성상 독성시험기준을 준수하여 독성시험을

실시하는 것이 적합하지 않은 경우, 효력시험 등 약리시험에 안전성 관찰항목을 포함하여 함께 수행할 수 있다.

V. 임상시험 시 고려사항

개인 맞춤형 신생항원 치료제는 검체 채취부터 치료제를 제조하여 투여하는데 까지 소요되는 시간이 다른 치료제에 비해 길다. 특히 전이 또는 재발된 환자의 경우 치료제 투여 시기는 치료 결과에 미치는 가장 중요한 요소이다. 따라서, 어떠한 환자를 대상으로 하는지에 따라 신생항원 탐색 및 선별 과정, 신생항원 전달체 선택 및 제조 등을 포함하는 전체 제조 시간을 중요하게 고려해야 한다.

신생항원에 의한 충분한 면역원성을 유도하기 위해 투여 경로, 투여 횟수 및 투여 간격, 면역 증강제나 면역 항암제와 같은 부스터 치료제 접종 등이 적절하게 설계되어야 한다. 용량설정 근거로써 중개연구를 고려할 수 있다. 또한 신생항원에 적합한 면역학적 환경을 조성하기 위해 치료제 투여 전에는 GM-CSF 등의 보조치료제 투여, 치료제 접종 시 또는 투여 후 면역항암제와의 병용 등이 고려될 수 있다.

또한, 투여 후 재발시 추가적인 DNA 분석 및 재접종 실시 여부에 대한 고려도 포함되어야 한다. 분석 변수로는 종양 크기 변화, 무진행 생존 기간 등과 같은 전통적인 종말점(endpoint)외에도 투여 후 면역반응 등도 고려되어야 한다.

개인 맞춤형 항암치료제의 임상시험 설계 시, 초기 및 후기 임상시험 시 고려사항, 평가변수 설정 등에 대하여 「암 치료용 치료제 임상시험 계획 평가 가이드라인 (민원인 안내서)」를 참고할 수 있다.

[참고문헌]

1. Blass, Eryn, and Patrick A. Ott. "Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines." *Nature Reviews Clinical Oncology* 18.4 (2021): 215–229.
2. Castle, John C., et al. "Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination in B16 Melanoma: T-cell-Druggable Mutanome." *Cancer research* 72.5 (2012): 1081–1091.
3. Fritah, Hajer Guiren, et al. "The current clinical landscape of personalized cancer vaccines." *Cancer Treatment Reviews* (2022): 102383.
4. Hu, Zhuting, et al. "Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma." *Nature medicine* 27.3 (2021): 515–525.
5. Kreiter, Sebastian, et al. "Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer." *Nature* 520.7549 (2015): 692–696.
6. Lang, Franziska, et al. "Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines." *Nature Reviews Drug Discovery* 21.4 (2022): 261–282.
7. Li, L., S. P. Goedegebuure, and William E. Gillanders. "Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines." *Annals of Oncology* 28 (2017): xii11–xii17.
8. Ott, Patrick A., et al. "An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma." *Nature* 547.7662 (2017): 217–221.
9. Sahin, Ugur, et al. "Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer." *Nature* 547.7662 (2017): 222–226.
10. Shetty, Keerthi, and Patrick A. Ott. "Personal neoantigen vaccines for the treatment of cancer." *Annual Review of Cancer Biology* 5 (2021): 259–276.
11. Wells, Daniel K., et al. "Key parameters of tumor epitope immunogenicity revealed through a consortium approach improve neoantigen prediction." *Cell* 183.3 (2020): 818–834.
12. Zhang, Xiuli, et al. "Breast Cancer Neoantigens Can Induce CD8+ T-Cell Responses and Antitumor Immunity." *Breast Cancer Neoantigens Can Induce Antitumor Immunity.* *Cancer immunology research* 5.7 (2017): 516–523.
13. Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines (FDA, 2010)
14. 플라스미드 DNA 기반 치료제의 품질 및 비임상시험 평가 가이드라인(식약처, 2022.6.)
15. mRNA 기반 유전자치료제의 품질평가 가이드라인(식약처, 2022.8.)
16. 임상시험용 세포치료제 유전자치료제 품질평가 가이드라인(식약처, 2022.4.)
17. 유전자치료제 비임상시험 평가 가이드라인(식약처, 2021.10.)
18. 암치료를 위한 수지상 세포치료제 평가 시 고려사항(식약처, 2017.6.)
19. 암 치료용 치료제 임상시험 계획 평가 가이드라인(식약처, 2020.)

개인 맞춤형 신생항원 치료제 개발 시 고려사항 가이드라인 (민원인 안내서)

발행일	2023년 11월
발행인	박윤주
편집위원장	최영주
편집위원	최미라 백대현 강진욱 최경숙 박정연 백정희 정은용 전설희 이가영 박동현 유혜선 이재린 안난영 홍영기 이주영
도움주신 분	식품의약품안전평가원 의료제품연구부 첨단바이오융복합연구과 유종만(차의과학대학) 전문가 자문협의체(강태진(레나임), 권희충(젠셀메드), 김학균(국립암센터), 백순명(테라젠바이오), 양주성(에스티팜), 염선분(한국유전자세포치료학회), 윤채욱(한양대학교), 조대연(펜타메딕스))
발행처	식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원