(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113607
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7022788(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년06월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7001211
원출원일자(국제) 2018년06월21일
심사청구일자 2021년06월18일
(85) 번역문제출일자 2024년07월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/066668
(87) 국제공개번호 WO 2018/234506
국제공개일자 2018년12월27일
(30) 우선권주장
17305760.5 2017년06월21일
유럽특허청(EPO)(EP)
18305496.4 2018년04월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
트랜스진
프랑스, 에프-67400 일키르치 그라펜스타덴, 블러바드 곤디어 디 '안데르나치, 파르크 디 '이노베이션
(72) 발명자
벤자마 카이드르
프랑스, 67400 일키리크-그라펜스타덴, 케 드 일, 24
실베스트르 나탈리
프랑스, 67120 에르거셈, 뤼 데 아이리스, 6
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **개인 맞춤형 백신**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신, 또는 이러한 재조합 폭스바이러스 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 조성물 뿐만 아니라, 이를 필요로 하는 암성 대상체를 치료하기 위한 상기 개인 맞춤형 암 백신의 용도에 관한 것이다. 구체적인 실시양태

(뒷면에 계속)

대 표 도

MVATG19022



MVATG19023



는 a) 종양 샘플 및 비-종양 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계, b) 표적 영역, 바람직하게는 게놈의 전체 코딩 영역 (엑솜)을 선택하는 단계, c) 상기 추출된 DNA로부터 상기 표적 영역 (예컨대, 엑솜)을 서열분석하는 단계, 및 d) 상기 종양 및 비-종양 샘플로부터 수득된 DNA 서열을 비교함으로써 하나 이상의 종양 특이적 돌연변이(들)를 확인하는 단계를 포함하는 확인 단계를 포함하는 상기 백신 또는 조성물을 제공하는 방법에 관한 것이다. 실시양태는 또한 이러한 개인 맞춤형 암 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법 또는 그의 재발을 예방하는 방법을 포함한다. 본 방법은 개인 맞춤형 면역요법 분야에서, 구체적으로 T 세포 면역 반응을 자극시키는 데 있어 매우 특별한 관심의 대상이 된다.

(52) CPC특허분류
A61K 2039/5254 (2013.01)
A61K 2039/5256 (2013.01)
A61K 2039/585 (2013.01)
A61K 2039/70 (2013.01)
C12N 2710/24043 (2013.01)

(72) 발명자
마르샹 장-밥티스트
프랑스, 67210 오베르네, 1에이 뤼 데 오 파투라지스
그렐리에르 베누와
프랑스, 67100 스트라스부르그, 24 뤼 데 로스

명 세 서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 신생펩티드(들)(neopeptide(s))을 코딩하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신으로서,

· 수 개의 신생펩티드가 재조합 폭스바이러스에 의해 2 내지 15개의 신생펩티드의 하나 이상의 융합물(들) 형태로 발현되고,

· 상기 융합물이 어떠한 TM 세그먼트도 함유하지 않고 0.1 이하의 친수도(hydropathy) 점수를 보이며, 여기서, 친수도 점수는 상기 신생펩티드에 대해 결정된 소수성 점수를 신생펩티드 내에 존재하는 잔기 개수로 나눔으로써 계산되고, 상기 신생펩티드의 소수성 점수는 신생펩티드에 포함된 각 아미노산 잔기의 소수성/친수성 값의 합으로 결정되며, 각 아미노산 잔기의 소수성/친수성 값은 하기와 같고: 이소류신 (I): 4.5, 발린 (V): 4.2, 류신 (L): 3.8, 페닐알라닌 (F): 2.8, 시스테인 (C): 2.5, 메티오닌 (M): 1.9, 알라닌: (A) 1.8, 글리신 (G): -0.4, 트레오닌 (T): -0.7, 세린 (S): -0.8, 트립토판 (W): -0.9, 티로신 (Y): -1.3, 프롤린 (P): -1.6, 히스티딘 (H): -3.2, 글루탐산 (E): -3.5, 글루타민 (Q): -3.5, 아스파르트산 (D): -3.5, 아스파라긴 (N): -3.5, 리신 (K): -3.9, 및 아르기닌 (R): -4.5,

· 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 상기 하나 이상의 신생펩티드(들)가 각각 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이를 포함하며,

· 상기 신생펩티드들 중 적어도 80%가 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이를 포함하고,

· 상기 하나 이상의 신생펩티드(들)이 각각 16 내지 90개의 아미노산 잔기 길이인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 폭스바이러스가 백시니아 바이러스 또는 슈도카우폭스(pseudocowpox) 바이러스(PCPV)인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 재조합 백시니아 바이러스가 변형된 바이러스 앙카라(MVA) 바이러스인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 종양 특이적 돌연변이가 비-자가-발현 종양 특이적 돌연변이이고, 신생펩티드가 대상체의 건강한 세포에서 발현되는 또 다른 단백질의 일부가 아닌, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 5

제4항에 있어서,

a) 상기 신생펩티드 중 적어도 90%가 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이를 포함하거나;

b) 상기 신생펩티드 중 적어도 80%가 미스센스 돌연변이를 포함하는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 6

제1항에 있어서, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 신생펩티드 중 적어도 60%가 18 내지 29개의 잔기 길이인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 7

제5항에 있어서, 미스센스 돌연변이를 포함하는 상기 신생펩티드가 18 내지 29개의 잔기 길이이고, 프레임시프

트 돌연변이를 포함하는 상기 신생펩티드가 30 내지 80개의 아미노산 잔기 길이인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 8

제5항에 있어서, 미스센스 돌연변이를 갖는 신생펩티드 중 적어도 80%가 신생펩티드 길이에 따라,

· 신생펩티드 가운데에,

· 2개의 중앙 위치 중 하나에, 또는

· 정확한 중앙 위치의 양측에서 2 내지 5개의 아미노산만큼의 임의 위치에 치환된 아미노산을 보유하는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 9

제7항에 있어서, 미스센스 돌연변이를 갖는 신생펩티드 중 적어도 80%가 신생펩티드 길이에 따라,

· 신생펩티드 가운데에,

· 2개의 중앙 위치 중 하나에, 또는

· 정확한 중앙 위치의 양측에서 2 내지 5개의 아미노산만큼의 임의 위치에 치환된 아미노산을 보유하는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 융합물이 음의 값의 소수성 점수를 갖는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 11

제1항에 있어서, 재조합 폭스바이러스가 2 또는 3개의 융합물을 코딩하며, 여기서:

· 각 융합물은 5 내지 10개의 신생펩티드를 포함하고;

· 각 융합물은 제1 신생펩티드의 N-말단에, 그리고 각 신생펩티드 사이에 링커를 포함하며;

· 각 융합물은 상기 융합물의 N 말단에 신호 펩티드를 포함하고; 그리고

· 각 융합물은

○ 음의 값인 전체 소수성 점수 및/또는 0.1 이하인 전체 친수도 점수를 보이고,

○ 어떠한 잠재적 TM 세그먼트도 포함하지 않는,

개인 맞춤형 암 백신.

청구항 12

제11항에 있어서, 각 융합물은 상기 융합물의 C-말단에 태그를 더 포함하는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 1 내지 3개의 카세트를 포함하는 재조합 MVA로서, 각각의 카세트가 p11k7.5, pH5R, p7.5K, 및 pB2R로 이루어진 군으로부터 선택되는 백시니아 프로모터의 전사 제어하에, 5 내지 10개의 신생펩티드의 융합물의 발현을 위한 것인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 재조합 바이러스가 2 내지 3개의 카세트를 포함하는 재조합 MVA로서, 각각의 카세트가 p11k7.5, pH5R, p7.5K, 및 pB2R로 이루어진 군으로부터 선택되는 백시니아 프로모터의 전사 제어하에, 5 내지 10개의 신생펩티드의 융합물의 발현을 위한 것인, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 재조합 폭스바이러스가 하나 이상의 치료 유전자를 추가로 코딩하는, 개인 맞춤형 암 백

신.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 치료 유전자는 자살 유전자 및 면역자극성 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 개인 맞춤형 암 백신.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 개인 맞춤형 암 백신의 치료 유효량 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 약제학적 조성물로서, 대상체에서 암을 치료하거나 암의 재발을 예방하는 데 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 개별 용량을 위한 상기 치료 유효량이 $5x10^7$pfu 내지 10^9pfu를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 암이 고형 종양인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 고형 종양이

a) 뇌암, 배아성 종양(embryonal tumor), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 중추 신경계 비정형 유기형/간상 종양(central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumor), 두개인두종(craniopharyngioma), 뇌실막세포종(ependymoma), 신경교종(glioma), 교모세포종(glioblastoma), 및 두부경부암;

b) 폐암; 또는

c) 난소암으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 폐암이

a) NSCLC; 또는

b) 폐의 선암종(adenocarcinoma), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 및 대세포 암종(large cell carcinoma)인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 조성물이

a) 환자에게 정맥내, 피하, 근육내, 또는 종양내 주사에 의해 투여되거나;

b) 암 치료에서 유용성을 갖는 하나 이상의 추가의 항암 요법/요법들과 함께 투여되는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 신생펩티드(들)(neopeptide(s))를 코딩하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신, 또는 이러한 재조합 폭스바이러스 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 조성물 뿐만 아니라, 이를 필요로 하는 암성 대상체를 치료하기 위한 상기 개인 맞춤형 암 백신의 용도에 관한 것이다. 구체적인 실시양태는 a) 종양 샘플 및 비-종양 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계, b) 표적 영역, 바람직하게는 게놈의 전체 코딩 영역 (엑솜)을 선택하는 단계, c) 상기 추출된 DNA로부터 상기 표적 영역 (예컨대, 엑솜)을 서열분석하는 단계, 및 d) 상기 종양 및 비-종양 샘플로부터 수득된 DNA 서열을 비교함으로써 하나 이상의 종양 특이적 돌연변이(들)를 확인하는 단계를 포함하는, 확인 단계를 포함하는 상기 백신 또는 조성물을 제공하는 방법에 관한 것이다. 실시양태는 또한 이러한 개인 맞춤형 암 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는

방법 또는 그의 재발을 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명은 개인 맞춤형 면역요법 분야에서, 구체적으로 T 세포 면역 반응을 자극시키는 데 있어 매우 특별한 관심의 대상이 된다.

배 경 기 술

[0002] 지난 수십년 동안, 종양 항원에 대한 선천적 및 특이적 면역 반응을 자극시키고자 하는 것을 목표로 하여, 종양 항원을 발현하는 다수의 치료 백신이 생성되어 왔다. 그러나, 가장 흔히 확인되는 종양 연관 항원 (예컨대, MUC-1, WT1, PSA, CEA)은 종양에서 선택적으로 과발현되지만, 비-종양 세포에서 잔류성 발현을 보일 수 있다. 따라서, 이러한 전통적인 접근법의 효능은 상기 "자가" 항원에 대한 자가-내성에 의해 제한될 것으로 예상된다.

[0003] 더욱이, 집단내 모두에게 동일한 암 항원을 전달하는 전통적 패러다임은 질환 위험 및 면역 반응에서의 개별 가변성을 무시하는 것이다. 중요하게는, 인간은 백신에 대해 상이하게 반응하고, 숙주의 면역 반응은 집단 내에서도 다양하다는 것은 무시될 수 없다 (Relman, 2008, J Infect Dis. 198(1):4-5; Plotkin, 2008, Clin Infect Dis.47(3):401-9). 최근, 임상 진료소에서 면역 체크포인트 차단제 도입을 통해, 일부 치료가 일부 환자에서는 효과적이지만, 그 나머지 환자에서는 그렇지 않다는 것이 실제로 의료인들에게 명백화되었다.

[0004] 면역학, 유전학, 분자 생물학 및 생물정보학의 진보가 더 많은 개인 맞춤형 접근법의 발판이 되었다. 현재는 게놈 서열분석 분야에서의 기술의 획기적 발전 (예컨대, 차세대 서열분석 (NGS))을 통해서 전례 없는 속도와 비용으로 종양의 전체 게놈 또는 엑솜 (게놈의 코딩 영역)을 서열분석할 수 있게 되었다. 종양의 분자적 특징 규명을 통해서 발암 및 암 세포 증식 프로세스 동안, 높은 증식률, 결핍성 수복 기전 및 클론 선택의 결과로서 돌연변이가 발생한다는 것이 입증되었다. 종양 게놈 내 돌연변이 축적은 일반적으로 암성 조직에 특이적인 비정상적 단백질 종의 발현을 유도한다. 이는 신생항원으로 지칭된다. 가장 흔한 종양-연관 항원과 달리, 종양 신생항원은 정상 세포가 아닌, 오직 종양 세포에만 존재하며, 흉선에서 그의 항원-특이적 T 세포의 결실을 유도하지 않는다. 따라서, 자가-단백질에 대한 자가-내성 및 자가면역 반응의 위험 부담 없이, 강력한 면역 반응을 유도할 것으로 예상된다. 그러므로, 비록 통상적인 치료에 종양 신생항원을 채용하기 위해서는 다수의 과학적 및 기술적 도전과제를 극복해야 하지만, 종양 신생항원은 특이적으로 종양에 대해 적합화된 치료 백신을 디자인하는 데 있어 이상적인 표적이 될 수 있다. 특히 대부분의 암 돌연변이는 추계학적(stochastic) 현상의 결과이며, 각 환자에 대해 특이적이다.

[0005] 적절한 백신 플랫폼을 선택하는 것이 임상 환경에서 그의 성공을 위한 주된 인자가 된다. 현재, 박테리아 (예컨대, 애드백시스(Advaxis)에 의해 개발된 리스테리아(Listeria)-기반 ADXS-Neo 백신; WO2016/207859; WO2016/191545), 바이러스 벡터 (예컨대, 이뮨 디자인(Immune Design)의 렌티바이러스 시스템 ZVex), 핵산 백신 (예컨대, 바이온테크(Biontech)에 의해 개발된 나노입자에 캡슐화된 산성 mRNA 기반 백신; Kreiter et al., 2015, Nature 520 692-6; WO2012/159754, 백시바디(Vaccibody)에 의해 개발된 백신 복합체를 코딩하는 DNA) 및 애주번트화된 펩티드 (WO2016/187508)를 비롯한, 신생항원에 대한 백신 개발을 위한 여러 기술적 플랫폼이 구상되고 있다. 펩티드 백신의 대표적인 예로는 예컨대, 현재 NEON 테라퓨틱스(NEON Therapeutics)에 의해 개발된, 방광암, 교아세포종 및 비소세포 폐암 (NSCLC)에서 니볼루맙(Nivolumab)과 함께 조합되는 폴리ICLC (폴리이노신-폴리시티딜 산)-안정화된 펩티드; 아게누스(Agenus)에 의해 개발된 gp96 (96 kDa 열 충격 단백질)-애주번트화된 종양 신생항원; 및 코네티컷 대학교 의과 대학(University of Connecticut School of Medicine)의 리포솜-캡슐화된 펩티드를 포함한다. 또 다른 최근의 대안은 환자에게로의 투여 전, 시험관내에서의 항원에의 노출 후, 수지상 세포 (DC)의 벡터로서의 사용이다. DC는 펩티드로 또는 종양 용해물로 펄싱된다 (예컨대, 덴드레온(Dendreon)에 의해 상업화된, 활성화된 DC 백신 시푸류셀-T(Sipuleucel-T, 엑소사이트 테라퓨틱스(Exocyte Therapeutics)에 의해 개발된, 환자 종양 엑솜이 로딩된 DC; 온코테라퓨틱스 사이언스(OncoTherapeutics Science) 및 텔라 인크.(Tella Inc.)에 의해 개발된 DC 백신).

[0006] 그럼에도 불구하고, 본 분야에서의 대부분의 계획은 그 약속을 이행하기 이전에 주요 도전 과제를 충족시켜야 한다. 종양 돌연변이 확인, 상기 돌연변이를 도입하는 신생펩티드의 디자인, 개인 맞춤형 백신의 제조 및 시험이 질환 진행과 동반되기 때문에, 환자의 침상에 임상적으로 충분한 양을 즉각적으로 확실하게 전달하기 위해서는 다른 주제들 중에서도 성공적인 번역은 효과적인 제조 프로세스 달성에 종속된다.

[0007] 따라서, 각 환자의 종양에 대한 신생항원을 확인하고, 약물 제조를 위해 확립된 표준을 이용하여 상응하는 개인 맞춤형 요법을 제조할 수 있게 하는 능률적이고 시간 집약적인 프로세스 개발이 요구된다.

[0008] 재조합 MVA (변형된 바이러스 앙카라)는 기존의 시도들에서 암 백신 개발을 위한 효과적인 벡터로서의 역할을 해 왔다 (Acres and Bonnefoy, 2008, Expert Review of Vaccines 7, 889-93). 백시니아 기반 백신은 단일요법

으로서, 또는 화학요법, 방사선요법 또는 면역 체크포인트 억제제와 함께 조합하여 주어졌을 때, 결과를 달성하였다 (Farsaci et al., 2011, In Cancer Vaccines: From Research to Clinical Practice, Ed Bot; CRC Press, pp56-77; WO2015/175340; WO2015/175334). 예를 들어, MUC1 종양 연관 항원, 및 인간 인터루킨 2 (IL-2)를 코딩하는 MVA 기반 암 백신인 TG4010 (또는 그의 연구명 MVATG9931)은 진행형 전이성 NSCLC에서 제1선의 표준 치료 화학요법과의 조합시 효능이 입증되었다 (Quoix et al., 2011, The Lancet Oncology 12(12): 1125-33). 예방적 처치의 RMA-MUC1 모델에서 MVATG9931에 의한 항원 특이적 종양 제어는 명백하게 MUC1 및 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포의 일시적인 데 노보(*de novo*) 발현에 의존한다. 다른 폭스바이러스, 및 특히 백시니아 바이러스 및 계두 바이러스 또한 항암 벡터로서 사용되어 왔다 (Gulley et al., 2008, Clin Cancer Res 14(10): 3060-9).

[0009] 그러나, 암 신생항원에 대해 강력한 면역 반응을 유도할 수 있는 MVA 또는 다른 폭스바이러스의 능력은 시험된 바 없으며, 여전히 확립되어야 하는 상태이다. 추가로, 재조합 MVA를 제조하는 공지된 프로세스는 상동성 재조합에 의존하는데, 이는 효율이 낮고, 따라서 꽤 장시간이 소요된다.

[0010] 그러나, 본 발명자들은 실제로 재조합 MVA가 수개의 암 신생항원에 대하여 면역 반응을 유도할 수 있고, 수개의 신생펩티드를 코딩하는 개인 맞춤형 MVA가 신속하게 생성될 수 있다는 것을 발견하게 되었다.

[0011] 본 개시내용은 항-종양 신생펩티드의 융합물을 발현하는 MVA 기반 암 백신 뿐만 아니라, 재조합 MVA의 생성을 최대화시킬 수 있도록 구체적으로 디자인된 제조 프로세스를 제공하고, 확장성 및 상기 프로세스의 완료 시간을 개선시킴으로써 상기 언급된 요구사항들을 충족시킨다.

[0012] 이러한 기술상의 문제는 본 청구범위에서 정의된 바와 같은 실시양태의 제공에 의해서 해결된다.

[0013] 본 발명의 다른 및 추가 측면, 특징 및 장점은 본 발명의 바람직한 실시양태에 관한 하기의 설명으로부터 자명해질 것이다. 본 실시양태는 개시 목적으로 제공되는 것이다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신에 관한 것이다.

[0015] 한 측면에서, 재조합 폭스바이러스는 백시니아 바이러스, 바람직하게, 복제 결함 백시니아 바이러스 예컨대, MVA이다.

[0016] 또 다른 측면에서, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 상기 하나 이상의 신생펩티드(들)는 각각 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이를 포함하며, 바람직하게는, 상기 신생펩티드 중 적어도 60%는 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이를 포함한다. 소망하게는, 하나 이상의 신생펩티드(들)의 길이는 16 내지 90개의 아미노산 잔기, 바람직하게, 17 내지 85개의 아미노산 잔기, 및 바람직하게, 18 내지 80개의 아미노산 잔기 길이이다. 바람직한 실시양태에서, 미스센스 돌연변이를 포함하는 신생펩티드의 길이는 18 내지 29개의 잔기 길이이고, 프레임시프트 돌연변이를 포함하는 신생펩티드의 길이는 30 내지 80개의 잔기 길이이다. 미스센스 돌연변이를 갖는 신생펩티드 중 적어도 80%는 중앙 위치에 치환된 아미노산을 보유한다. 바람직한 실시양태에서, 수개의 신생펩티드, 및 바람직하게는 모든 신생펩티드는 재조합 폭스바이러스에 의해 하나 이상의 융합물(들) 형태로 발현된다. 재조합 폭스바이러스는 바람직하게는, 자살 유전자 및 면역자극성 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료 유전자를 추가로 코딩할 수 있다.

[0017] 추가 측면에서, 본 발명은 또한 개인 맞춤형 암 백신에 의해 코딩되는 데 적합한 하나 이상의 신생펩티드(들)를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 하나 이상의 신생펩티드(들)는 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이(들)를 포함하는 것인 단계를 포함하는, 상기 개인 맞춤형 암을 제조하는 방법을 제공한다. 바람직한 방법은 하기의 하위 단계 a) 내지 d): a) 종양 샘플 및 비-종양 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계, b) 표적 영역, 바람직하게, 게놈의 전체 코딩 영역 (엑솜)을 선택하는 단계, c) 상기 추출된 DNA로부터 상기 표적 영역 (예컨대, 엑솜)을 서열분석하는 단계, 및 d) 상기 종양 및 비-종양 샘플로부터 수득된 DNA 서열을 비교함으로써 하나 이상의 종양 특이적 돌연변이(들)를 확인하는 단계를 포함하는 확인 단계를 포함한다. 이러한 방법은 하기 추가의 하위 단계 e) 내지 g): e) 잠재적 신생펩티드(들)를 mRNA 전사 수준에서든, 또는 단백질 번역 수준에서든, 종양에서의 그의 발현 수준에 의해 순위화하는 단계; f) 비-자가-발현 종양 특이적 돌연변이(들)를 선택하는 단계; g) 상기 신생펩티드(들)에 포함된 신생에피토프(들)의 면역 잠재능을 예측하는 단계 중 적어도 하나의 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 확인 단계에 추가로, 본 방법은 또한 상기 재조합 폭스바이러스를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게, 재조합 폭스바이러스의 게놈에 삽입되는 상기 신생펩티드 코딩 핵산 분자(들)는 대상체에서의 발현을 허용하는 적합한 조절 요소의 제어하에 하나 이상의 발현 카세트(들)에 정렬된다. 바람직하게, 재조합 폭스바이러스를 생성하는 상기 단계는 신생펩티드 코딩 핵산 분자(들) 또는 발현 카세트(들)에 대해 선택되는 삽입 부위에 클로닝된 형광성 리포터 유전자를 포함하는 모체 폭스바이러스를 사용한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 재조합 폭스바이러스를 생성하는 상기 단계는 상기 형광성 리포터 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 이중 가닥 파단을 생성할 수 있는 엔도뉴클레아제에 의한 절단 단계로서, 여기서, 그러나, 상기 엔도뉴클레아제는 폭스바이러스 게놈은 절단하지 않는 것인 단계를 포함한다. 상기 방법은 또한 적합한 생산자 세포에서 적합한 규모로 증폭시키는 단계, 세포 배양물로부터 생산된 재조합 폭스바이러스를 회수하는 단계, 및 회수된 재조합 폭스바이러스를 정제하는 임의적 단계를 포함하는, 제조 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 또 다른 추가의 측면에서, 개인 맞춤형 암 백신은 대상체에서의 암 치료 또는 그의 재발 예방을 위해 이를 필요로 하는 대상체에서의 용도를 위한 것이다. 상기 암은 바람직하게, 고형 종양, 및 특히, 뇌암 또는 폐암이다. 바람직한 실시양태에서, 개인 맞춤형 암 백신은 암 치료에서 유용성을 갖는, 하나 이상의 추가의 항암 요법/요법들과 함께 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0020] **도 1**은 MVATG19022 및 MVATG19023에 의해 코딩된 발현 카세트의 디자인을 도시한 것이다. "GS"는 10개의 아미노산 링커를, "Flag"는 Flag 태그를 나타내고, "SR"은 광견병(rabies) 당단백질로부터 수득된 신호 펩티드에 대한 두문자이다. FCU1, b-Gal, E16HPV16, E76HPV16 및 MCU1은 상기 항원으로부터 수득된 27개의 아미노산 길이의 펩티드를 나타낸다.

도 2a-e는 전체 항원, 각각 MUC1 (MVA-MUC1), FCU1 (MVA-FCU1), b-갈락토시다제 (MVA-bGal), HPV-16 E7 (MVA-E7HPV16) 및 HPV-16 E1 (MVA-E1HPV16)을 코딩하는 MVA와 비교하여, 펩티드 코딩 MVATG19022 및 MVATG19023 벡터로 C57bl/6 마우스 (군당 마우스 5마리)를 면역화한 이후의 ELISpot을 도시한 것이다. 각각의 발현된 항원/펩티드에 대해 특이적인 펩티드 (각각 FCU1-특이적 EG15 (a), MUC1-특이적 L15L3 (b), E7-특이적 R9F (c), E1-특이적 I8L (d) 및 b-Gal-특이적 I8V 5E)) 또는 비관련 펩티드 (대조군 "CTRL")로 자극시켰다.

도 3은 MVATG19030에 의해 발현된 제1 및 제2 CT26 펜타토프 융합물의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

도 4는 MVATG19030 및 MVATG19038 벡터로 Balb/c 마우스 (군당 마우스 5마리)를 면역화한 이후의 ELISpot을 도시한 것이다. CT26-MUC1 세포 프라이밍 존재하에 또는 부재하에, 10개의 돌연변이화된 CT26 펩티드의 풀로, 또는 CT26 야생형 펩티드 (즉, 종양 특이적 돌연변이를 포함하지 않는 것)의 풀로 자극시킨 후, IFNɣ 반응을 평가하였다.

도 5는 CT26-MUC1 세포로 프라이밍되거나, 또는 그렇지 않은 마우스 모델 둘 모두에서 MVATG19030 및 MVATG19038로 (또는 음성 대조군으로서 바이러스 제제 완충제 S08로) Balb/c 마우스를 면역화한 이후의, CT26 돌연변이화된 펩티드 (EH27m) 및 비-돌연변이화된 CT26 펩티드 (PE27wt)에 대하여 발생된 IFNɣ 반응을 도시한 것이다. 배양 배지를 이용한 자극은 음성 대조군으로서 수행된 것이다.

도 6은 CT26-MUC1 세포로 프라이밍되거나, 또는 그렇지 않은 마우스 모델 둘 모두에서 MVATG19030 및 MVATG19038로 (또는 음성 대조군으로서 바이러스 제제 완충제 S08로) Balb/c 마우스를 면역화한 이후의, CT26 돌연변이화된 펩티드 (EH27m) 및 비-돌연변이화된 CT26 펩티드 (PE27wt)에 대하여 발생된 IFNɣ 반응을 도시한 것이다. IFNɣ 반응은 항-마우스 MHCII 항체의 존재 (+ 항-MHCII)하에, 또는 부재하에서 평가된다. 배양 배지를 이용한 자극은 음성 대조군으로서 수행된 것이다.

도 7은 GSG, GTS 또는 GAS 링커를 코딩하는 9개의 뉴클레오티드의 축퇴 뉴클레오티드 서열을 도시한 것이다.

도 8은 상기 구축물 (1, 2 또는 3)이 보유하는 융합 카세트의 번호에 따라 명시된 플라스미드에 의한 CEF 세포의 형질감염 이후의 백색 플라크의 회수율(%), 및 PCR에 의해 확인된 재조합 (mCherry neg 및 mCherry 양성) 또는 모체 (즉, 재조합이 아닌) 바이러스의 개수, 각 융합물에 포함된 신생펩티드의 개수 (Nb neo), TM 세그먼트의 존재 여부 (TM), 각 융합물에 대하여 산출된 친수도(hydropathy) 점수 (Hydro), 및 각 구축물에 대한 링커의 존재 및 그 길이를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] **일반적 정의**

[0022] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[0023] "하나"("a" 및 "an")라는 용어는 문맥상 달리 명확하게 명시되지 않는 한, 관사의 문법상의 객체가 "하나" 또는 "1개 초과" (즉, 2, 3, 4, 5개 등을 비롯한, 적어도 하나)라는 것을 지칭한다.

[0024] "및/또는"이라는 용어는 본원에서 사용되는 경우에는 언제나 "및," "또는" 및 "상기 용어에 의해 연결된 요소의 모든 또는 임의의 다른 조합"의 의미를 포함한다.

[0025] 본원에서 사용되는 바, "~와 같은(such as)," "예컨대(e.g.)"라는 용어는 예시 목적의 것이며, 따라서, 비제한적인 것이다.

[0026] 본원에서 사용되는 "약" 또는 "대략"이라는 용어는 본원에서 주어진 값 또는 범위는 결정적이지 않으며, 상기 값 또는 범위를 측정하기 위해 사용된 장치 또는 방법에 대한 고유한 오차 변동, 또는 시험된 대상체 사이에 존재하는 변동을 포함하도록 하기 위해, 주어진 값 또는 범위의 10% 내로, 바람직하게, 8% 내로, 및 더욱 바람직하게, 5% 내로 달라질 수 있다는 것을 나타내는 것이다.

[0027] 본원에서 사용되는 바, "포함하는(comprising)"이라는 용어 (및 포함하는이라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(comprises)"), "갖는"이라는 용어 (및 갖는이라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "갖는다(have)" 및 "갖는다(has)"), "포함하는(including)"이라는 용어 (및 포함하는이라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "포함하다(includes)" 및 "포함하다(include)"), 또는 "함유하는"이라는 용어 (및 함유하는이라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "함유하다(contains)" 및 "함유하다(contain)")는 생성물, 조성물 및 방법을 정의하는 데 사용될 때, 제한을 두지 않는 개방형이며, 추가의, 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제시키지 않는다. "본질적으로 ~로 구성된"은 임의의 본질적으로 중요한 다른 성분 또는 단계를 배제시키는 것을 의미한다. "~로 구성된"은 미량 성분을 초과하는 다른 성분 또는 단계를 배제시키는 것을 의미한다.

[0028] "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 이는 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 적어도 9개의 아미노산을 포함하는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형, 분지형 또는 시클릭일 수 있고, 자연적으로 발생된 것 및/또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개재되어 있을 수 있다. 폴리펩티드에 포함되는 아미노산의 최대 개수에는 제한이 없다. 일반적인 의미로서, 상기 용어는 (전형적으로 당업계에서 펩티드로서 지칭되는) 단쇄 중합체 및 (전형적으로 당업계에서 폴리펩티드 또는 단백질로서 지칭되는) 더 긴 장쇄 중합체, 둘 모두를 지칭한다. 상기 용어는 다른 것 중에서도 천연 폴리펩티드, 변형된 폴리펩티드 (이는 또한, 유도체, 유사체, 변이체 또는 돌연변이체로도 지칭된다), 폴리펩티드 단편, 폴리펩티드 다량체 (예컨대, 이량체) 재조합 폴리펩티드, 융합 폴리펩티드를 포함한다.

[0029] 본 발명의 맥락에서, "핵산," "핵산 분자," "폴리뉴클레오티드," "핵산 서열" 및 "뉴클레오티드 서열"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되고, 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 또는 혼합된 폴리리보-폴리데옥시리보뉴클레오티드인, 적어도 9개의 뉴클레오티드 잔기의 중합체를 정의한다. 이들 용어는 그의 단일 또는 이중 가닥, 선형 또는 환형, 천연 또는 합성, 비변형된 또는 변형된 버전 (예컨대, 유전적으로 변형된 폴리뉴클레오티드; 최적화된 폴리뉴클레오티드), 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드, 키메라 혼합물 (예컨대, RNA-DNA 하이브리드)을 포함한다. 예시적인 DNA 핵산으로는 제한 없이, 상보성 DNA (cDNA), 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 벡터, 바이러스 DNA (예컨대, 바이러스 게놈, 바이러스 벡터), 올리고뉴클레오티드, 프로브, 프라이머, 코딩 DNA, 비-코딩 DNA, 또는 그의 임의의 단편 등을 포함한다. 예시적인 RNA 핵산으로는 제한 없이, 메신저 RNA (mRNA), 전구체 메신저 RNA (프리-mRNA), 코딩 RNA, 비-코딩 RNA 등을 포함한다. 본원에 기술된 핵산 서열은 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동화된 DNA 합성기 (예컨대, 바이오서치(Biosearch), 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 등으로부터 상업적으로 이용가능한 것)를 사용하여 합성될 수 있거나, 또는 당업계에 널리 공지된 분자 생물학 기술 (예컨대, 클로닝, PCR 등)을 이용하여 자연적으로 발생된 공급원 (예컨대, 게놈, cDNA 등) 또는 인공 공급원 (예컨대, 상업적으로 이용가능한 라이브러리, 플라스미드 등)으로부터 수득될 수 있다.

[0030] 본 발명의 맥락에서, 동일성(%)은 비교하고자 하는 서열의 전역에 걸친 최적의 정렬에 기초하여, 즉, 서열 전체 길이에 걸쳐 그 전체가 취득된 서열의 최적의 정렬에 기초하여 당업자에게 널리 공지된 임의의 알고리즘, 예컨대, 니들만(Needleman) 및 운쉬(Wunsch) (1970)의 알고리즘을 사용하여 측정된다. 상기 서열 비교는 "갭 오픈" 파라미터 = 10, "갭 연장" 파라미터 = 0.5, "블로섬 62(Blosum 62)" 행렬, "엔드 갭 패널티" 파라미터 = 거짓,

"엔드 갭 오픈" 파라미터 = 10, "엔드 갭 연장" 파라미터 = 0.5를 이용함으로써 당업자에게 널리 공지된 임의의 소프트웨어, 예를 들어, 니들(Needle) 소프트웨어를 이용하여 수행될 수 있다. 니들 소프트웨어는 예를 들어, https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/에서 이용가능하다.

[0031] "바이러스," "바이러스 입자," "바이러스 벡터" 및 비리온"라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있는 야생형 바이러스 게놈의 적어도 하나의 요소를 포함하는 비히클을 의미하는 것으로서 광범위하게 이해되어야 한다. 상기 용어는 바이러스 게놈 및 바이러스 입자를 포함한다.

[0032] "~로부터 수득된," "기원하는" 또는 "기원하다"라는 용어는 성분 (예컨대, 신생에피토프, 신생펩티드, 신생항원, 핵산 분자, 바이러스 등)의 원 공급원, 또는 샘플 (예컨대, 대상체 또는 대상체 군)의 원 공급원을 식별하기 위해 사용되지만, 예를 들어, 화학적 합성 또는 재조합 수단이 될 수 있는 성분/샘플의 제조 방법을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0033] 본원에서 사용되는 바, "단리된"이라는 용어는 성분 (예컨대, 폴리펩티드, 핵산 분자, 벡터 등)이 그의 천연 환경으로부터 제거되었다는 것 (즉, 자연상에서 천연적으로 그와 함께 회합되어 있거나, 또는 발견되는 적어도 하나의 다른 성분(들)으로부터 분리되어 있다는 것)을 지칭하는 것이다. 더욱 구체적으로, 상기 용어는 성분이 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제되어 있다는 것을 지칭하는 것이다. 예를 들어, 핵산 분자가 자연상에서는 보통 그와 함께 회합되어 있는 서열로부터 분리되어 있을 때 (예컨대, 염색체 또는 게놈으로부터 해리되어 있을 때), 이는 단리되어 있는 것이지만, (예컨대, 재조합 벡터 내에서) 이종성 서열과 회합되어 있을 수 있다. 합성 성분은 본래 단리되어 있는 것이다.

[0034] "대상체"라는 용어는 일반적으로 본원에 개시된 생성물 또는 방법이 그에 대해 요구되거나, 또는 도움이 될 수 있는 척추동물 유기체를 지칭한다. 전형적으로, 유기체는 포유동물, 특히, 애완 동물, 농장 동물, 스포츠용 동물, 및 영장류 (인간 및 비-인간)로 구성된 군으로부터 선택되는 포유동물이다. "대상체" 및 "환자"라는 용어는 인간 유기체를 지칭할 경우에 상호교환적으로 사용될 수 있고, 이는 남성 및 여성 뿐만 아니라, 태아, 신생아, 영아, 청소년, 성인 및 노인을 포함한다.

[0035] 본원에서 사용되는 바, "종양"이라는 용어는 "암," "악성종양," "신생물"이라는 용어 중 임의의 것과 상호교환적으로 사용될 수 있고, 비제어된 세포 성장 및 확산으로부터 초래되는 임의의 질환 또는 병리학적 상태를 포함한다. 이들 용어는 임의 유형의 조직, 기관 또는 세포, 임의의 병기(예컨대, 병변 전증(prelesion)부터 병기 IV기까지)의 악성종양을 포함하는 것으로 의도된다. 전형적으로, 종양, 특히, 악성 종양은 정상 조직과 비교하였을 때, 구조적 조직화 및 기능적 조정의 부분적 또는 완전한 결여를 나타내며, 일반적으로 주변 조직을 침범하고/거나 (확산), 먼 부위로 전이되는 성향을 보인다. 본 발명은 바람직하게, 본원에 기술된 바와 같은 고형 종양 치료를 위해 디자인된다.

[0036] "신생물성 세포," "암 세포" 또는 "종양 세포"는 세포를 비정상적인 (즉, 증가된) 속도로 분열하는 세포를 지칭하는 것으로서, 이는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, "치료"(treatment)라는 용어 (및 치료라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "치료하는" 및 "치료하다" 등)는 예방적 처치(prophylaxis) 및/또는 요법(therapy)을 지칭한다. 전형적으로, ≪예방적 처치≫란, 적어도 하나의 임상적 또는 생화학적 증상 (종양 크기, 연관된 바이오마커의 발현 수준, 병기 진행...)의 발병을 막거나, 지연시키거나, 또는 그의 최초 발생 또는 재발의 중증도를 감소시키기 위한 예방을 지칭하는 반면, 요법은 본 발명에 따라 치료받은 대상체에서 병리학적 상태가 적어도 하나의 임상적 또는 생화학적 증상 (종양 크기, 연관된 바이오마커의 발현 수준...)을 개선시키거나, 표적화된 병리학적 상태, 그의 증상(들), 또는 병리학적 상태에 대해 2차적인 상태의 진행을 저속화, 또는 제어하고자 하는 목적하에 있는 것을 지칭한다.

[0038] 본원에서 사용되는 바, "투여하는"이라는 용어 (또는 투여라는 용어의 임의의 형태, 예컨대, "투여된" 등)는 본원에 기술된 방식에 따라 성분 (예컨대, 적어도 신생펩티드-코딩 폭스바이러스)을 대상체에게 전달하는 것을 지칭한다.

[0039] ***개인 맞춤형 암 백신***

[0040] 제1 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 암 백신을 특징화하기 위해 본원에서 적용되는 바, "개인 맞춤형 "은 개별 수준 (특정 대상체), 또는 하위집단 수준 (공통된 특징을 공유하는, 예컨대, 특정 질환, 특정 표현형 특징을 갖거나, 동일한 약물을 복용

하거나, 또는 예컨대, 면역계에서 동일한 결핍증을 보이는 사람들의 소집단)을 지칭한다.

[0042] ***폭스바이러스***

[0043] 본원에서 사용되는 바, "폭스바이러스"라는 용어는 폭스비리다에(*Poxviridae*) 과에 속하는 바이러스를 지칭하며, 바람직하게는 척추동물 숙주에 대한 코르도폭스비리나에(*Chordopoxvirinae*) 아과의 경우, 예컨대, 오르토폭스바이러스(*Orthopoxvirus*) 속, 카프리폭스바이러스(*Capripoxvirus*) 속, 아비폭스바이러스(*Avipoxvirus*) 속, 파라폭스바이러스(*Parapoxvirus*) 속, 레포리폭스바이러스(*Leporipoxvirus*) 속 및 수이폭스바이러스(*Suipoxvirus*) 속과 같은 수개의 속을 포함한다. 본 발명과 관련하여, 오르토폭스바이러스 뿐만 아니라, 카나리폭스바이러스 (예컨대, ALVAC) 및 조류폭스바이러스 (예컨대, FP9 벡터)를 비롯한 아비폭스바이러스가 바람직하다. 바람직한 실시양태에서, 암 백신은 오르토폭스바이러스 속 및 더욱더 바람직하게, 백시니아 바이러스(VV) 종에 속하는 폭스바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명과 관련하여, 제한 없이, 웨스턴 리저브(Western Reserve: WR), 코펜하겐(Copenhagen: Cop), 리스터(Lister), LIVP, 와이어스(Wyeth), 타슈켄트(Tashkent), 티안 탄(Tian Tan), 브라이튼(Brighton), 앙카라(Ankara), MVA (변형된 백시니아 바이러스 앙카라), LC16M8, LC16M0 균주 등을 포함하는, 임의의 백시니아 바이러스 균주가 사용될 수 있으며, WR, 코펜하겐, 와이어스 및 MVA 백시니아 바이러스가 특히 바람직하다. 각종 폭스비리다에의 게놈 서열은 당업계의 전문화된 데이터뱅크, 예컨대, 진뱅크(Genbank)에서 이용가능하다 (예컨대, 수탁 번호 NC_006998, M35027, NC_005309, U94848은 WR, 코펜하겐, 카나리폭스바이러스 및 MVA 게놈의 서열을 제공한다).

[0044] 또 다른 적절한 실시양태는 파라폭스바이러스 속에 속하는 폭스바이러스 벡터를 포함하는 암 백신에 관한 것이다. 폭스비리다에 과의 다른 구성원들과 같이, 파라폭스바이러스는 다양한 종류의 포유동물 및 인간을 비롯한 척추동물을 감염시킬 수 있는, 타원형의 기하구조를 갖는, 비교적 크고, 외피를 보유한 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 파라폭스바이러스는 다른 폭스바이러스와 구별되는 고유한 나선형 코트를 갖는다. 이러한 속은, 서로 형태상, 구조상 및/또는 유전적으로 차이가 있을 수 있는, 파라폭스바이러스 오비스(*Parapoxvirus ovis*) (ORFV), 슈도카우폭스(pseudocowpox) 바이러스 (PCPV) 및 소 유행성 구내염 바이러스 및 그의 상이한 균주 (예컨대, ORFV 01701, NZ2, NZ7 및 OV-SA00 균주 및 소 유행성 구내염 바이러스 BV-AR02 균주)를 비롯한, 일련의 상이한 종을 포함한다. 본 발명과 관련하여, PCPV 종이 바람직하다. PCPV는 전형적으로 130-150 킬로베이스의, 선형 및 이중 가닥 DNA 세그먼트인 게놈을 갖는다.

[0045] 본 발명과 관련하여, 야생형 균주 뿐만 아니라, 그의 임의의 유도체 (즉, 예컨대, 바이러스 게놈에 인접(contiguous)해 있거나, 또는 바이러스 게놈 내에 존재하지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드(들)의 말단절단, 결실, 치환, 및/또는 삽입에 의해, 야생형 균주와 비교하여 변형된 것인 폭스바이러스)를 사용할 수 있다. 변형(들)은 내인성 바이러스 유전자 (예컨대, 코딩 및/또는 조절 서열) 내에서 및/또는 유전자간 영역 내에서 있을 수 있다. 추가로, 변형(들)은 침묵 변형이거나, 또는 침묵 변형이 아닐 수 있다 (예컨대, 변형된 바이러스 유전자 생성물을 생성하는 것). 변형(들)은 통상의 분자 생물학 기술을 이용하여 당업자에게 공지된 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명은 종양 용해성 (예컨대, 종양 세포에서 더욱 잘 또는 선택적으로 복제되도록 조작)일 뿐만 아니라, 복제 결함 폭스바이러스를 포함한다.

[0046] 바람직하게, 본 발명에 의해 포함되는 변형은 그러한 변형이 없는 바이러스와 비교하였을 때, 예를 들어, 바이러스의 병독성, 독성, 병원성, 또는 복제에 영향을 준다. 바이러스 유전자를 변경시키는 것을 목적으로 하는 예시적인 변형은 바람직하게, DNA 대사, 숙주 병독성 또는 IFN 경로에 관여한다 (예컨대, Guse et al., 2011, Expert Opinion Biol. Ther.11(5):595-608 참조). 파괴되는 데 특히 적합한 유전자는 티미딘 키나제 (TK)-코딩 유전자 (유전자좌 J2R; 진뱅크 수탁 번호 AAA48082)이다. TK 효소는 데옥시리보뉴클레오티드의 합성에 관여한다. 정상 세포는 일반적으로 뉴클레오티드 농도가 낮기 때문에, 상기 세포에서는 바이러스 복제를 위해서는 TK가 요구되는 반면, 뉴클레오티드 농도가 높은 분열 세포에서는 TK가 불필요하다. 추가로, TK 유전자의 불활성화는 종양 세포에 대한 선택성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 그에 대해 대안적으로, 또는 그와 조합하여, 본원에서의 사용을 위한 폭스바이러스는 바이러스 리보뉴클레오티드 리덕타제를 코딩하는 두 유전자 중 적어도 하나 또는 그 둘 모두를 변경시킴으로써 변형될 수 있다. 바이러스 효소는, 각각 I4L 및 F4L 유전자좌에 의해 코딩되는 R1 및 R2로 디자인된 2개의 이종성 서브유닛으로 구성된 것인 서브유닛 구조가 포유동물 효소와 유사하다. I4L 및 F4L 유전자에 대한 서열 및 각종 폭스바이러스의 게놈에서의 그의 위치는 공개 데이터베이스에서 이용가능하다. 다른 적합한 변형으로는 데옥시우리딘 트리포스파타제 (F2L), 바이러스 헤마글루티닌 (A56R); 세린 프로테아제 억제제 (B13R/B14R) 및 보체 4b 결합 단백질 (C3L)을 변경시키는 것을 포함한다. 본원에서 사용된 유전자 명명법은 코펜하겐 백시니아 균주의 것이다. 본원에서는 또한 달리 명시되지 않는 한, 다른 폭스비리다에의 상동성 유전자에 대해 사용되며, 코펜하겐과 다른 백시니아 균주 사이의 일치되는 사항은

당업자에게 이용가능하다. 예시적인 목적으로, TK, TK- 및 F2L 및 TK- 및 I4L 결함 백시니아 바이러스 (VV)는 문헌에 기술되어 있다 (예컨대, WO2009/065547 및 WO2009/065546 참조).

[0047] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 암 백신에 포함되는 폭스바이러스는 복제 결함 폭스바이러스, 및 바람직하게, 복제 결함 백시니아 바이러스로서, 이는 상기 바이러스가 인간 세포에서는 유의적인 정도로까지는 복제가 불가능하다는 것을 의미한다. 폭스바이러스 벡터는 바이러스 복제에 결정적인 영역의 부분적 또는 전체 결실 또는 불활성화에 의해 복제 결함이 될 수 있고, 복제 기능의 손상 또는 결함은 통상적인 수단에 의해, 예컨대, 비-허용(non-permissive) 세포에서의 DNA 합성 및/또는 바이러스 역가를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0048] 본 발명과 관련하여 사용하기에 특히 적절한 폭스바이러스 벡터는 MVA인데, 그 이유는 비-약독화된 폭스바이러스와 비교하였을 때, MVA의 고도로 약독화된 표현형 (Mayr et al., 1975, Infection 3: 6-14; Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-51), 및 감염시 발생되는 더욱 현저한 IFN-타입 1 반응 때문이다. 예시 목적으로, MVA는 닭 배아 섬유모세포에서의 연속 계대접종을 통해 생성되었다. 그의 게놈의 서열 분석 결과, 그의 게놈의 변경을 통해 그의 모체 바이러스인 장요막 백시니아 바이러스 앙카라의 병원성이 상실된 것으로 나타났다 (Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365-96 및 진뱅크 수탁 번호 U94848). MVA는 십만 초과의 개체에서 천연두 백신 접종을 위해 안전하게 및 효과적으로 사용되어 왔다. 닭 배아 세포에서는 아니지만, 인간 세포에서의 바이러스의 복제 잠재능은 또한 결함성을 띤다. 당업계에서는 특히, 난 기반 제조 프로세스에서 대량의 바이러스를 제조하는 데 다양한 세포 시스템이 이용가능하다 (예컨대, WO2007/147528).

[0049] "재조합"이라는 용어는 본원에서 이하 기술되는 바와 같이, 폭스바이러스가 그의 게놈에 삽입된 적어도 하나의 외인성 핵산 분자 (예컨대, 신생펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자)를 포함한다는 것을 지칭하는 것이다.

[0050] ***신생펩티드의 유형 및 개수***

[0051] 명확하게 하기 위해, "항원"이란, 일반적으로 CD4+ (예컨대, Th1, Th2 및/또는 Th17) 및/또는 CD8+ T 세포 반응 (예컨대, CTL 반응)을 비롯한, 상기 항원에 대한 체액성 또는 특이적 T 세포 반응 (또는 그 둘 모두)을 일으킬 수 있는 물질 (예컨대, 폴리펩티드)을 지칭한다. 본원에 기술된 바와 같이 생체내에서 (동물 또는 인간) 또는 시험관내에서 (예컨대, 생물학적 샘플에서) 항원의 면역원성 성질을 평가하는 데 매우 다양한 직접 또는 간접 생물학적 검정법이 당업계에서 이용가능하다.

[0052] 항원이 면역계에 의해 검출될 수 있도록 하기 위해서, 항원은 프로세싱되고, 상기 프로세싱은 항원의 펩티드로의 단편화, 펩티드와 MHC (주요 조직적합성 복합체; 인간에서는 HLA "인간 백혈구 항원")의 회합, 및 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 T 세포에 의해 인식될 수 있는 장소인 세포 표면에서의 펩티드-MHC 복합체 제시를 요구한다. 이러한 항원 유래 펩티드는 최소의 면역 결정기 (즉, 에피토프)를 포함한다. 2가지 유형의 MHC 분자: MHC 부류 I 및 MHC 부류 II가 존재한다. MHC 부류 I 분자는 포유동물 대상체의 모든 유핵 세포 표면에 존재하고, 펩티드/MHC 부류 I 복합체는 $CD8^+$ CTL 활성화를 일으킨다. 그에 반해, MHC 부류 II 분자는 보통 오직 전문화된 항원 제시 세포, 예컨대, 수지상 세포, 단핵 식세포, 일부 내피 세포, 흉선 상피 세포, 및 B 세포의 표면에만 존재하고, MHC 부류 II 분자를 통한 펩티드 제시는 CD4+ T 세포 반응을 일반적으로 유도한다. MHC 부류 I 분자를 통한 제시를 위한 에피토프는 일반적으로 적어도 8개의 아미노산 길이, 바람직하게, 8, 9 또는 10개의 아미노산 길이인 반면, MHC-부류 II 에피토프는 일반적으로 더 길다 (예컨대, 적어도 13개의 아미노산 잔기 (Rock et al., 2010, J. Immunol. 184(1): 9-15)). MHC 부류 I 및 부류 II 결합에 대한 인실리코 예측을 위한 예측 알고리즘이 당업계에 다수 존재한다 (예컨대, Nielsen et al., 2010, Immunology 130(3): 319-28 참조). 예시 목적으로, SVMHC, NetMHCII, Tepitope/propped, syfpeithi, Epitollkit 등을 예로 들 수 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 바, "신생항원"이라는 용어는 암 세포에서 발암 과정 동안 출현한 항원을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 신생항원은 상응하는 야생형 항원과 관련하여 아미노산 잔기(들)의 하나 이상의 비-침묵 돌연변이(들)를 포함한다. 전형적으로, 비-침묵 돌연변이는 뉴클레오티드 수준에서 발생하고, 아미노산 수준에서의 변화로 번역된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 신생항원은 환자로부터 수득된 암 세포 또는 조직에서는 발견되지만, 환자 또는 건강한 개체로부터 수득된 정상적인 세포 또는 조직 샘플에서는 발견되지 않는다.

[0054] "신생펩티드"라는 용어는 신생에피토프 뿐만 아니라, 신생에피토프의 한쪽 또는 양측 모두에 측접(flank)하는 서열(들)을 포함하는 신생항원의 단편을 지칭한다. 측접하는 서열은 신생에피토프의 유래 기점이 된 신생항원의 것이다. 따라서, 신생펩티드는 MHC 분자에 의해 제시되는 신생에피토프 그 자체보다는 길이가 더욱 긴 신생항원의 단편에 상응한다. 따라서, 신생펩티드에는 신생에피토프가 존재하고, 이는 그의 보통의 환경에서 자연

적으로 존재하는, 측면하는 서열(들)에 의해 (한쪽 또는 양측 모두에서) 둘러싸여 있다. 신생펩티드가 또 다른 자가 단백질에도 존재하는 드문 경우를 제외하면, 대부분의 경우, 신생펩티드는 비-자가 성질의 것이 될 것이다 (그리고, 그러한 것으로 선택될 수 있다 (하기 참조)). 이러한 비-자가 성질에 기인하여, 이러한 신생펩티드(들)는 종양 특이적 T 림프구에 의해 인식될 것으로 예상된다.

[0055] 본원에서 사용되는 바, "신생에피토프"라는 용어는 MHC-의존 T 세포 인식에 기여하고 (또는 대상체의 세포의 표면에서 MHC 분자에 의해 제시되고), 본원에 기술된 방식에 따라 상기 신생항원에서 확인되는 비-침묵 돌연변이(들) 중 적어도 하나를 포함하는 신생항원의 최소 면역 결정기를 지칭한다.

[0056] "돌연변이"라는 용어는 시험 서열과 참조 서열 사이의 적어도 하나의 서열 차이에 관한 것이다.

[0057] 한 실시양태에서, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 하나 이상의 신생펩티드(들)는 각각 환자의 종양에 대해 특이적이고, 본원에 기술된 돌연변이 세트로부터 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이를 포함한다. 본 발명과 관련하여, "종양 특이적 돌연변이"는 신생물성 형질전환 및/또는 암 세포의 진행에 따라 생성되는 돌연변이에 관한 것이다. 전형적으로, 종양 특이적 돌연변이는 바람직하게, 암 세포 (예컨대, 종양 샘플)에 함유되어 있는 DNA에는 존재하지만, 비-암성 세포 (예컨대, 비-종양 샘플)에 함유되어 있는 DNA에는 존재하지 않는다. 뉴클레오티드 수준에서 발생하기는 하지만, 본 발명과 관련하여, 종양 특이적 돌연변이는 비-침묵 돌연변이이고, 아미노산 수준에서의 변화로 번역된다.

[0058] 미스센스 돌연변이, 결실, 삽입, 프레임시프트 돌연변이, 및 스플라이싱 부위에서의 돌연변이를 비롯한, 여러 유형의 종양 특이적 돌연변이가 본 발명에 포함된다. "미스센스" 돌연변이는 코딩된 아미노산 서열에 영향을 주는 특정 코돈 내에서의 한 뉴클레오티드의 또 다른 뉴클레오티드로의 치환으로부터 발생하며, 이로써, 한 아미노산 변화를 일으킨다. 단백질 서열에 영향을 주는 또 다른 방식은 핵산 분자에서 뉴클레오티드의 개수를 변화시키는 하나 이상의 뉴클레오티드(들) (예컨대, DNA 조각)의 삽입 또는 결실이다. 삽입 및 결실 돌연변이는 리딩 프레임의 변화 (소위 프레임시프트 돌연변이)를 초래할 수 있지만, 반드시 그러한 것은 아니다 (예컨대, 3개의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실은 코돈의 부가 또는 억제를 초래할 것이다). 돌연변이가 뉴클레오티드 서열에서 조기에 발생한다면, 폴리펩티드 거의 전체가 변이될 수 있다. 프레임시프트 돌연변이는 또한 정지 신호로 번역되는 정지 코돈 생성을 초래할 수 있고, 이어서, 생성된 단백질은 말단절단될 것이다 (데 노보 생성된 정지 코돈 하류에 있는 그의 일부분은 결실). 미스센스 돌연변이는 또한 mRNA의 스플라이싱 부위에 위치할 수 있고, 이는 비정상적인 스플라이싱 및 이에 따른 비정상적인 단백질 서열을 유도할 수 있다. "스플라이싱"이라는 용어는 초기 전구체 메신저 RNA (프리-mRNA) 전사체의 편집에 관한 것이다. 스플라이싱 후, 인트론은 제거되고, 엑손은 함께 연결된다 (라이게이션된다). "스플라이싱 부위"라는 용어는 인트론 인식을 위해, 및 스플라이싱 반응의 정확성을 위해 중요한, 인트론 단부에 위치하는 짧은 보존 서열에 관한 것이다.

[0059] 본 발명은 모든 단백질 부류, 예컨대, 효소, 수용체, 전사 인자 등으로부터 기원하는 신생펩티드를 포함한다. 비록 임의 유형의 돌연변이가 존재할 수 있지만, 종양 특이적 돌연변이는 바람직하게는 미스센스 또는 프레임시프트이다. 이롭게는, 본원에서 사용하기 위한 신생펩티드 중 적어도 60%, 바람직하게, 적어도 65%, 바람직하게, 적어도 70%, 더욱 바람직하게, 적어도 75%, 적어도 80% (예컨대, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91% 등), 적어도 85% (예컨대, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91% 등), 적어도 90% (예컨대, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 심지어 100%), 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%는 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이를 포함한다. 미스센스 및 프레임시프트 돌연변이 중에서는, 미스센스 돌연변이가 더 빈도가 높다. 특정 실시양태에서, 본원에서 사용하기 위한 신생펩티드 중 적어도 60%, 바람직하게 적어도 65%, 바람직하게, 적어도 70%, 더욱 바람직하게, 적어도 75% 및 더욱더 바람직하게, 적어도 80% (예컨대, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91% 등), 적어도 85% (예컨대, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91% 등), 적어도 90% (예컨대, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 심지어 100%), 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%는 미스센스 돌연변이를 포함한다. 그러나, 프레임시프트 돌연변이가 확인된다면, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 신생펩티드(들) 중 하나 이상의 것이 프레임시프트 돌연변이를 포함하는 것 또한 바람직하다. 예를 들어, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 10개의 신생펩티드에 대해, 바람직하게, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 심지어 10개의 신생펩티드는 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이이고, 더욱 바람직하게, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 심지어 10개의 신생펩티드는 미스센스 돌연변이이다. 유사하게, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 30개의 신생펩티드에 대해, 바람직하게, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25,

적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29 또는 심지어 30개의 신생펩티드는 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이이고, 더욱 바람직하게, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29 또는 심지어 30개의 신생펩티드는 미스센스 돌연변이이다. 당업자는 상기의 예들을 다른 개수의 신생펩티드를 코딩하는 폭스바이러스에 맞도록 쉽게 적합화시킬 수 있을 것이다.

[0060] 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 신생펩티드의 길이는 일반적으로 13개의 아미노산 잔기 내지 약 151개의 아미노산 잔기로 포함되지만, 그 길이는 물론 신생펩티드마다 달라질 수 있다. 이롭게는, 본원에서 사용하기 위한 신생펩티드(들)는 각각 그 길이가 15 내지 101개의 아미노산 잔기 길이, 소망하게는 16 내지 90개의 아미노산 잔기 길이, 바람직하게, 17 내지 85개의 아미노산 잔기 길이, 및 더욱 바람직하게, 18 내지 80개의 아미노산 잔기 길이이다. 이롭게는, 본원에서 사용하기 위한 적어도 70%의 신생펩티드는 홀수의 아미노산을 갖는데, 그 이유는 단일 미스센스 돌연변이의 경우, 돌연변이화된 아미노산 양측에 동일한 개수의 측접하는 아미노산을 가지면서, 신생펩티드 중앙에 상기 돌연변이를 삽입시킬 수 있기 때문이다. 물론, 신생펩티드의 길이 또한 돌연변이 유형에 의존할 수 있다. 제한하는 것이 아닌, 예시 목적으로, 미스센스 돌연변이를 포함하는 신생펩티드는 바람직하게, 그 길이가 18 내지 29개의 잔기 길이인 반면, 프레임시프트 돌연변이를 갖는 것은 바람직하게, 그 길이가 30 내지 80개의 아미노산 잔기 길이이다. 본 발명과 관련하여, 본 발명의 폭스바이러스 암 백신에 의해 코딩되는 신생펩티드 중 적어도 60%, 바람직하게, 적어도 70% 및 더욱 바람직하게, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%는 바람직하게, 그 길이가 18 내지 29개의 잔기 길이이다. 19, 21, 26, 27 또는 29개의 잔기의 개별 신생펩티드가 특히 바람직하다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폭스바이러스 암 백신에 의해 코딩되는 신생펩티드 중 적어도 60%, 바람직하게, 적어도 70% 및 더욱 바람직하게, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%는 미스센스 돌연변이를 포함하고, 그 길이가 18 내지 29개의 잔기 길이, 특히, 19, 21, 26, 27 또는 29개의 잔기 길이이다.

[0061] 돌연변이 위치와 관련하여, 본 발명은 신생펩티드 내의 임의의 위치를 고려한다. 그러나, 미스센스 돌연변이의 경우에는 중앙 위치가 특히 바람직하다. "중앙 위치"란, 신생펩티드 길이에 따라, 돌연변이화된 아미노산이 정확하게 신생펩티드 가운데에(신생펩티드가 홀수의 아미노산을 갖는 경우), 또는 2개의 중앙 위치 중 하나에(신생펩티드가 짝수의 아미노산을 갖는 경우), 또는 정확한 중앙 위치의 양측에서 2 내지 5개의 아미노산만큼의 임의 위치에 위치하고 있다는 것을 의미한다. 소망하게는, 미스센스 돌연변이를 갖는 적어도 80%, 바람직하게, 적어도 85%, 더욱 바람직하게, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%의 신생펩티드는 상기 정의된 바와 같이 중앙 위치에 치환된 아미노산을 보유한다. 19, 21, 27 또는 29개의 아미노산 (더욱더 바람직하게, 27 또는 29개의 아미노산)의 신생펩티드가 정확한 중앙 위치에 (예컨대, 19량체 신생펩티드의 경우 10번 위치에, 21량체 신생펩티드의 경우 11번 위치에, 27량체 신생펩티드의 경우 14번 위치에, 및 29량체 신생펩티드의 경우 15번 위치에) 미스센스 돌연변이를 보유하는 것이 특히 바람직하다.

[0062] 그러나, 신생펩티드 중 적어도 일부에서는, 특히 프레임시프트 돌연변이인 경우, 또는 미스센스 돌연변이가 신생항원의 N 또는 C-말단에 또는 그에 가깝게 존재할 때에는, 돌연변이가 N-말단 또는 C-말단에 가깝게 위치할 수 있다.

[0063] 일부 실시양태는 또한 재조합 폭스바이러스에 의해 신생펩티드를 하나 이상의 융합물(들) 형태로 발현하는 것을 고려한다. 본원에서 사용되는 바, "융합물"이라는 용어는 2개 이상의 신생펩티드가 단일 폴리펩티드 쇄로 조합된 것을 지칭한다. 융합은 직접 (즉, 그 사이에 어떤 추가의 아미노산 잔기도 없이), 또는 신생펩티드의 접근 가능성을 개선시키는 링커를 통해 있을 수 있다. 따라서, 개별적으로 발현되는 일련의 고유 신생펩티드 이외에도, 본 발명은 또한 융합물(들) 형태의 수개의 신생펩티드 및 개별적으로 일부 다른 것을 발현하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 대안적으로, 폭스바이러스 벡터에 의해 발현되는 모든 신생펩티드는 하나 이상의 융합물(들)로 클러스터링된다.

[0064] 어떤 실시양태는 ER (소포체)을 통한 프로세싱 및/또는 분비를 증진시키기 위해 코딩된 신생에피토프(들) (또는 그의 융합물)의 N-말단에의 신호 펩티드의 존재를 고려한다. 간략하면, 신호 펩티드는 일반적으로 15 내지 35개의 본질적으로 소수성인 아미노산을 포함하고, 번역 개시를 위한 코돈 하류의 폴리펩티드의 N-말단에 삽입되고, 이어서, 특이적 ER-위치하는 엔도펩티다제에 의해 제거되고, 이로써, 성숙한 폴리펩티드를 제공한다. 막 고정 또한 코딩된 신생펩티드 (또는 그의 융합물)의 MHC 부류 I 및/또는 MHC 부류 II 제시를 개선시키기 위해

막 고정 서열을 추가로 도입함으로써 사용될 수 있다. 막통과 펩티드는 속성상 고도로 소수성이며, 이는 세포막 내 폴리펩티드를 고정시키는 역할을 한다. 이는 바람직하게는 폴리펩티드의 C-말단부 내에, 바람직하게 정지 코돈의 바로 상류에 삽입된다. 적절한 막통과 및/또는 신호 펩티드는 당업계에 공지되어 있다. 이는 세포 또는 바이러스 폴리펩티드, 예컨대, 면역글로불린, 조직 플라스미노겐 활성인자, 인슐린, 광견병(rabies) 당단백질, HIV 바이러스 외피 당단백질 또는 홍역(measles) 바이러스 F 단백질의 것으로부터 수득될 수 있거나, 또는 합성일 수 있다. 바람직한 신호 펩티드 및 막 고정 서열은 WO2008/138649에 기술되어 있고, 광견병 또는 홍역 F 당단백질로부터 기원하는 것이 바람직하다. 재조합 폭스바이러스에서 1 초과의 신호 펩티드 및/또는 막통과 서열을 사용하고자 하는 경우, 제조 프로세스를 저하시킬 수 있는 상동성 재조합 이벤트를 제한하기 위해, 상이한 기원의 것을 선택할 수 있거나, 또는 고도의 서열 동일성 (예컨대, 75% 초과)을 보이는 상동성 서열을 축퇴시킬 수 있다.

[0065] 이전 실시양태에 대해 대안적으로, 또는 그와 조합하여, 본 발명은 특히 신생펩티드 융합물 중 (스페이서로도 또한 명명되는) 하나 이상의 링커(들)의 존재를 고려한다. 전형적으로, 링커는 아미노산 잔기, 예컨대, 글리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 알라닌 및/또는 프롤린으로 구성된 1 내지 30개의 아미노산 길이의 펩티드이다. 본 발명과 관련하여 바람직한 링커는 2 내지 15개의 아미노산을 포함하고, 바람직하게는, 3, 5, 또는 10개의 아미노산, 주로 글리신 및 세린 (예컨대, GSG, GSGSG (서열 번호: 66), SGSGS (서열 번호: 67), GSGSGSGSGS (서열 번호: 68)) 또는 글리신, 세린 및 트레오닌 (예컨대, GSTSG (서열 번호: 69), SGTGS (서열 번호: 70)) 또는 글리신, 세린, 및 트레오닌 및/또는 알라닌 (예컨대, GAS, GTS)을 포함한다. 3개의 아미노산의 바람직한 링커는 특히 서열 GSG, GAS, 및 GTS의 링커를 포함한다. 두 융합된 신생펩티드 사이에 링커를 포함해야 하는지 여부를 사정하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0066] 바람직한 실시양태에서, 신생펩티드는 각 펩티드 사이의 (예컨대, 신생펩티드 1과 신생펩티드 2 사이, 신생펩티드 2와 신생펩티드 3 사이 등) 및 임의적으로, 제1 신생펩티드의 N 말단 및/또는 마지막 신생펩티드의 C 말단의 링커와 함께 융합물(들)로 배열된다. 한 구축물 내에서 여러 링커가 사용되는 경우, 핵산 수준에서의 동일성(%)을 (예컨대, 77% 미만의 동일성, 소망하게는, 75% 미만, 70% 미만, 바람직하게, 60% 미만, 50% 미만 및 더욱 더 바람직하게, 10개의 아미노산의 링커의 경우, 35% 미만으로) 감소시키고, 이로써, 제조 프로세스 동안의 재조합 이벤트를 제한하기 위해, 아미노산 서열 또는 코돈 핵산 서열을 변경시킬 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 한 재조합 폭스바이러스에 포함된 링커 핵산 서열은, 임의의 두 링커 사이에 동일한 핵산 서열 부분이 최대 8개의 인접한(contiguous) 뉴클레오티드 (예컨대, 바람직하게, 최대 7개, 및 더욱 바람직하게, 최대 6개의 인접한 뉴클레오티드)가 되도록 감소되고, 이로써, 상기 기술된 바와 같이 핵산 서열 동일성을 감소시키는 데 기여하고, 그에 따라 제조 프로세스 동안의 소망하지 않는 재조합 이벤트를 제한하도록 (아미노산 서열 또는 코돈 핵산 서열을 변이시킴으로써) 디자인된다. 실시예 섹션에 예시되어 있는 바와 같이, 2 내지 5개의 아미노산 잔기 (예컨대, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산)의 짧은 링커는 특히 재조합 폭스바이러스가 10개 이상의 신생펩티드를 코딩할 때 이롭다. 본 발명과 관련하여, 3개의 아미노산 링커, 예컨대, GSG, GAS 및/또는 GTS는 신생펩티드를 서로 분리시키는 데 특히 바람직하다. 3개의 아미노산 링커를 코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열은 본원에 기술된 바와 같이 개별적으로, 또는 신생펩티드 융합물(들)과 함께 조합하여 사용되는 것으로 도 7에 제시되어 있다. 예시 목적으로, 15개의 GSG-코딩 뉴클레오티드 서열을 생성하고, 동일하거나 유사한 서열의 스트레치 사이에 발생할 수 있는 재조합 폭스바이러스에서의 상동성 재조합의 위험을 감소시키기 위하여 코돈 축퇴성 (G의 경우, 4개의 코돈 가능 및 S의 경우, 6개 가능)을 이용함으로써 축퇴시켰다. 같은 방식으로, GTS 및 GAS 링커를 코딩하는 10 및 5개의 축퇴 뉴클레오티드 서열이 각각 도 7에 제시되어 있다.

[0067] 본 발명의 어떤 실시양태는 신생펩티드 (또는 그의 융합물(들))의 발현 검출, 또는 이러한 신생펩티드 또는 그의 융합물을 발현하는 감염된 숙주 세포의 검출을 촉진시키기 위해 태그의 존재를 고려한다. 태그 펩티드는 항-태그 항체를 이용하여 면역검출 검정법에 의해 검출될 수 있다. 본 발명과 관련하여, 제한 없이, PK 태그, FLAG 태그 (DYKDDDK; 서열 번호: 6), MYC 태그 (EQKLISEEDL 서열 번호: 11), 폴리히스티딘 태그 (일반적으로, 5 내지 10개의 히스티딘 잔기의 스트레치), HA 태그 (YPYDVPDYA; 서열 번호: 18), HSV 태그 (QPELAPEDPED; 서열 번호: 19) 및 VSV 태그 (YTDIEMNRLGK; 서열 번호: 20)를 포함하는, 매우 다양한 태그 펩티드가 사용될 수 있다. 태그 펩티드는 독립적으로 신생펩티드 또는 그의 융합물의 N-말단에 (태그-폴리펩티드), 또는 대안적으로, 그의 C-말단에 (폴리펩티드-태그), 또는 대안적으로, 내부에 위치할 수 있다.

[0068] 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩될 수 있는 신생펩티드의 개수는 선택된 발현 유형 (개별 발현, 본원에서 후술하는 바와 같은 짧은 또는 큰 융합물로의 발현) 및 폭스바이러스의 유형에 따라 제한하는 것은 아니다. 예시 목적으로, 1 내지 50개의 신생펩티드, 더욱 바람직하게, 5 내지 45개 및 더욱더 바람직하게, 6 내지 35개가 재

조합 폭스바이러스에 의해 발현될 수 있고, 10 내지 30개의 신생펩티드가 바람직하다.

[0069] 바람직한 실시양태에서, 수개의 신생펩티드, 및 바람직하게, 모든 신생펩티드는 재조합 폭스바이러스에 의해 하나 이상의 융합물(들) 형태로 발현된다. 바람직하게, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 폭스바이러스는 2개 이상의 신생펩티드의 1 내지 5개의 융합물, 바람직하게, 2개 이상의 신생펩티드의 1 내지 4개의 융합물, 및 더욱 바람직하게, 2개 이상의 신생펩티드의 1 내지 3개의 융합물, 특히 바람직하게는 2개 이상의 신생펩티드의 2 또는 3개의 융합물을 코딩한다. 더욱 바람직하게, 각 융합물은 2 내지 15개의 신생펩티드, 바람직하게, 3 내지 12개의 신생펩티드, 더욱 바람직하게, 4 내지 11개의 신생펩티드, 및 더욱더 바람직하게, 5 내지 10개의 신생펩티드 (예컨대, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)를 포함한다. 신생펩티드의 개수는 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 융합물마다 달라질 수 있다. 그러나, 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 폭스바이러스는 5 내지 10개의 신생펩티드의 2 또는 3개의 융합물을 코딩한다.

[0070] 본 발명과 관련하여, 각 융합물은 다른 것(들)과 상이하게 디자인될 수 있고, 예컨대, 펩티드 신호, 링커, 태그 등과 같은 요소의 존재, 및/또는 서열, 및/또는 개수, 및/또는 위치에 의해 서로 구별될 수 있다. 그러나, 바람직한 실시양태에 따라, 각 융합물은 a) 그의 N 말단에 신호 펩티드, b) 제1 신생펩티드의 N-말단, 각 신생펩티드 사이, 및 마지막 신생펩티드의 C-말단에 링커, 및 c) 그의 C-말단에 태그를 포함한다.

[0071] ***신생펩티드 및 그의 융합물(들) 중 TM (막통과) 세그먼트(들)의 존재 예측***

[0072] 한 실시양태에서, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩된 하나 이상의 신생에피토프(들) 또는 그의 융합물(들)의 아미노산 서열은 어떠한 잠재적 막통과 세그먼트도 포함하지 않는다. TM 세그먼트는 대략 20개의 잔기 (예컨대, 18 내지 30개의 잔기, 바람직하게, 19 내지 21개의 잔기)의 짧은 소수성 알파 헬릭스로서 정의될 수 있다. 주어진 서열 (예컨대, 특정 신생펩티드 또는 신생펩티드의 융합물)이 TM 세그먼트를 포함 또는 포함하지 않을 확률을 예측하는 데, 예컨대, TMHMM (막통과 은닉 마르코프 모형(Transmembrane Hidden Markov Model; Krogh et al., 2001, J. Mol. Biol. 305: 567-80) 및 DAS (밀집 정렬 표면(Dense Alignment Surface))와 같은 수개의 예측 도구가 사용될 수 있다. 예를 들어, DAS-TM 필터 알고리즘은 잠재적 막통과 세그먼트의 위치가 수득될 수 있는 질의에 대해 고정밀 소수성 프로파일을 제공한다.

[0073] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 폭스바이러스에 의해 코딩되는 신생펩티드 중 적어도 80% (예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 및 심지어 100%)는 잠재적 TM 세그먼트(들) (펩티드내 TM)를 포함하지 않는다. 이와 관련하여, TM 세그먼트를 포함할 것으로 예측되는 신생펩티드는 바람직하게는 선택되지 않는다.

[0074] 더욱더 바람직하게, TM 세그먼트의 존재 예측은 또한 각 신생펩티드 융합물에도 적용된다. 이는 실제로 TM 세그먼트는 2개의 특정 신생펩티드의 접합에 의해 생성될 수 있는 것으로 관찰되었다 (펩티드간 TM). 이러한 경우, 융합물에서 신생펩티드의 순서를 변형시키는 것이 TM의 존재를 제거하는 옵션이 된다. 예를 들어, TM 세그먼트가 신생펩티드 2의 N-말단에서의 신생펩티드 1의 융합으로부터 생성된다면, 신생펩티드를 역위시키는 것 (신생펩티드 1의 N-말단에서의 신생펩티드 2의 융합)이 TM 세그먼트를 가질 수 있는 위험을 제거할 수 있다. 또 다른 옵션은 2개의 융합된 신생펩티드 사이에 적절한 링커를 부가하는 것일 수 있다.

[0075] ***신생펩티드 및 그의 융합물(들)의 소수성 및 친수도 점수 예측***

[0076] 한 실시양태에서, 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩된 하나 이상의 신생에피토프(들) 또는 그의 융합물(들)의 아미노산 서열은 속성상 친수성이다. 주어진 서열의 친수성 또는 소수성인 성질은 당업계에서 이용가능한 다수의 방법 및 알고리즘에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 특정 서열의 소수성 점수 및/또는 친수도 점수를 산출하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 예를 들어, 상기 점수는 카이트-두리틀(Kyte-Doolittle) 방법 (Kyte and Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-32) 또는 임의의 다른 적합한 방법 (예컨대, 다수의 다른 것들 중에서도 특히 Rose et al., 1993, Ann. Rev. Biomol. Struc. 22: 381-415; Kallol et al., 2003, J. Chromat. 1000: 637-55; Sweet et al., 1983, J. Mol. Biol. 171: 479-88), 또는 알고리즘 (예컨대, ExPAsy 프로트 스케일 프로테인(ExPAsy Prot Scale Protein); 콜로라도 주 또는 월드 오브 바이오인포매틱스(World of Bioinformatics)에 의해 개발된 단백질 소수성 플롯(Protein Hydrophobicity Plots) 등)을 사용하여 결정될 수 있다. 일반적인 방식으로, 주어진 서열의 소수성 점수는 하기 표 1에 요약되어 있는 각 아미노산 잔기의 소수성/친수성 값의 합에 의해 결정된다.

표 1

아미노산	1 문자 코드	소수성/친수성 값
이소류신	I	4.5
발린	V	4.2
류신	L	3.8
페닐알라닌	F	2.8
시스테인	C	2.5
메티오닌	M	1.9
알라닌	A	1.8
글리신	G	-0.4
트레오닌	T	-0.7
세린	S	-0.8
트립토판	W	-0.9
티로신	Y	-1.3
프롤린	P	-1.6
히스티딘	H	-3.2
글루탐산	E	-3.5
글루타민	Q	-3.5
아스파르트산	D	-3.5
아스파라긴	N	-3.5
리신	K	-3.9
아르기닌	R	-4.5

[0077]

[0078] 표 1에 예시되어 있는 바와 같이, I, V, L, F, C, M 및 A 아미노산은 이들 잔기의 소수성 성질과 상관관계가 있는 양의 소수성 점수 (예컨대, I의 경우, 4.5)를 나타내는 반면, G, T, S, W, Y, P, H, E, Q, D, N, K 및 R은 그의 친수성 성질과 상관관계가 있는 음의 값의 소수성 점수 (예컨대, R의 경우, -4.5)를 나타낸다.

[0079] 주어진 신생펩티드의 소수성 점수는 상기 신생펩티드에 포함된 각 아미노산 잔기의 소수성/친수성 값의 합으로 결정되고, 친수도 점수는 상기 신생펩티드에 대해 결정된 소수성 점수를 이 펩티드에 존재하는 잔기 개수로 나눔으로써 산출된다. 주어진 신생펩티드 융합물의 소수성 점수는 상기 융합물에 포함된 각 신생펩티드에 대하여 결정된 소수성 점수의 합에 상응한다. 주어진 신생펩티드 융합물의 친수도 점수는 상기 신생펩티드 융합물에 대해 결정된 소수성 점수를 이 신생펩티드 융합물에 존재하는 잔기 개수로 나눔으로써 산출된다.

[0080] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 신생펩티드 중 적어도 60%는 음의 값의 소수성 점수 및/또는 0.1 이하의 친수도 점수 (예컨대, 0.1, 0.09, 0.08 등 또는 심지어 음의 값의 점수, 예컨대, -0.019, -1.5 등)를 나타낸다. 같은 방식으로, 본원에서 사용하기 위한

재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 각 융합물은 바람직하게, 음의 값의 소수성 점수 및/또는 0.1 이하의 친수도 점수를 갖는다. "적어도 60%"는 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 및 심지어 100%를 포함한다.

[0081] 예시 목적으로, 서열 GQSLPMTHSLKLSKTNRTLFLLGVTKY (서열 번호: 58)의 신생펩티드는 음의 값의 소수성 점수 -3.6 (G의 경우, -0.4, Q의 경우, -3.5, S의 경우, -0.8, L의 경우, +3.8 등), 및 친수도 점수 -0.13 (-3.6/29)을 갖는다. 따라서, 이 펩티드는 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 재조합 폭스바이러스에 의해 발현되는 데 적합할 것이다. 그에 반해, 신생펩티드 GLMGIVVGTVFIIRGLRSVGASRHQGL (서열 번호: 59)은 양의 소수성 점수 (23.3)를 갖고, 친수도 점수 0.86을 갖는다. 따라서, 이 펩티드는 상기 융합물에 포함되는 다른 신생펩티드가 융합물의 전체 점수를 본원에 기술된 적절한 임계값으로 하락시킬 수 있도록 상쇄시키지 않는다면, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 재조합 폭스바이러스에 의한 발현에는 적절하지 않다.

[0082] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신에 포함되는 재조합 폭스바이러스는 2 또는 3개의 융합물을 코딩하며, 여기서,

[0083] · 각 융합물은 5 내지 10개의 신생펩티드를 포함하고; 상기 융합물의 제1 신생펩티드의 N-말단에 및 각 신생펩티드 사이에 링커, 바람직하게, 3개의 아미노산 길이의 링커 (예컨대, 도 7에 도시된 것들 중 하나 이상의 것)를 갖고;

[0084] · 각 융합물은 상기 융합물의 N-말단에 신호 펩티드를 포함하고;

[0085] · 각 융합물은 임의적으로 상기 융합물의 C-말단에 태그 서열을 포함하고;

[0086] · 각 융합물은

[0087] ○ 음의 값인 전체 소수성 점수 및/또는 0.1 이하인 전체 친수도 점수를 보이고,

[0088] ○ 어떠한 잠재적 TM 세그먼트도 포함하지 않는다.

[0089] ***개인 맞춤형 암 백신에 의해 코딩되는 신생항원 및 신생펩티드의 확인***

[0090] 개인 맞춤형 암 백신 개발을 위해서는 환자별로 신생펩티드의 확인 및 선택이 요구된다.

[0091] 따라서, 본 발명은 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 데 적합한 하나 이상의 신생펩티드(들)를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 신생펩티드는 각각 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 것인 단계를 포함하는, 개인 맞춤형 암 백신을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0092] 이러한 목적을 위해, 종양 생물학적 샘플은 치료하고자 하는 대상체로부터 수득되고, 그 뿐만 아니라, 비-종양 생물학적 샘플도 그러하다. 본원에서 사용되는 바, "생물학적 샘플"이라는 용어는 생체내에서 채취 또는 수집될 수 있는, 대상체로부터 수득된 샘플을 지칭한다. 본 발명과 관련하여, 대상체로부터 채취 또는 수집된 생물학적 샘플(들)은 DNA를 함유하고, 바람직하게는 또한 mRNA 또는 단백질도 함유한다.

[0093] 한 실시양태에서, 생물학적 샘플은 체액으로부터, 또는 조직 샘플로부터 수득된다. 예시적인 체액 샘플으로는 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 대변, 뇌 척수액 및 기관지액 뿐만 아니라, 그의 임의의 유도체 (예컨대, 부분적으로 정제된 혈액, PBMC)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 조직 샘플은 임의의 기원 또는 세포 유형으로부터의, 포유동물로부터 단리된 기관, 조직, 분획 및 세포 (예컨대, 샘플은 경구, 위장관, 피부, 폐, 두부 조직 등 포함)일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 조직 샘플은 예컨대, 세포 용해물, 세포 배양물, 조직, 신선한 냉동 조직, 세포학적 물질 (예컨대, 자궁경부 스미어, 질 스왑, 기관지 브러싱, 흉수, 대장내시경 검사 물질 등), 외과적 종양 제거 이후 수득된 조직 뿐만 아니라, 조직 생검을 포함한다. 본 발명과 관련하여, 생물학적 샘플은 현탁액 또는 용액 중에 존재할 수 있거나, 고체 지지체 (예컨대, 슬라이드, 비드, 칩 또는 나노입자)에 고정되어 있을 수도 있다. 본 발명은 또한 "정제된" 또는 반"정제된" 생물학적 샘플, 예컨대, 단리된 RNA, cDNA, 단리된 단백질 등을 포함한다.

[0094] 하나의 그리고 바람직한 실시양태에서, 종양 샘플은 바람직하게는 20% 초과의 종양 세포를 포함하는 종양 생검이다. 해리된 조직 표본, 예컨대 미세 니들 흡인물 또는 신선한 고형 종양 (효소적으로 분해될 수 있다) 또는 생검의 마이크로톰 절편을 포함하나 이에 제한되지 않는, 임의의 방식으로 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 종양 샘플은 세포학적 물질 (예컨대, 자궁경부 또는 질 스왑)이다.

[0095] 추가의 또 다른 실시양태에서, 비-종양 샘플은 생물학적 체액 (예컨대, PBMC 단리가 수행된, 또는 수행되지 않

은 혈액), 세포학적 물질 (예컨대, 협측 스왑), 생검 (예컨대, 건강한 조직의 생검) 또는 비-종양 세포를 함유하는 외과 수술상의 적출물 조각으로부터 수득된다. 비-종양 샘플은 동일한 환자로부터, 또는 건강한 참조 대상체 또는 대상체 군으로부터 채취 또는 수집될 수 있다.

[0096] 종양 및 비-종양 샘플이 동일한 샘플링으로부터 기원하는 경우, 당업자는 종양 세포를 비종양 세포로부터 인식하고, 분리하는 방법을 알고 있다(예컨대, 면역조직법에 의해).

[0097] 한 실시양태에서, 확인 단계는

[0098] a) 상기 종양 샘플 및 상기 비-종양 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계,

[0099] b) 표적 영역, 바람직하게는 게놈의 전체 코딩 영역 (엑솜)을 선택하는 단계,

[0100] c) 상기 추출된 DNA로부터 상기 표적 영역 (예컨대, 엑솜)을 서열분석하는 단계, 및

[0101] d) 상기 종양 및 비-종양 샘플로부터 수득된 DNA 서열을 비교함으로써 하나 이상의 종양 특이적 돌연변이(들)를 확인하는 단계를 포함한다.

[0102] "엑솜"이라는 용어는 엑손(즉, 전사시, RNA 스플라이싱에 의한 인트론 제거 후, mRNA 내에 그대로 남아있는 서열)에 의해 형성된 게놈의 일부분을 지칭한다. 예시 목적으로, 인간 게놈의 엑솜은 전체 게놈의 약 1%에 상응하는, 약 180,000개의 엑손으로 구성된다. 엑솜 서열분석 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다 (Anderson and Schrijver, 2010, Genes 1(1): 38-69). 일반적으로, 방법은 먼저, 어레이 기반 하이브리드화 (애질런트 테크놀러지즈(Agilent technologies)로부터 상업적으로 이용가능), 또는 액체 기반 하이브리드화 (로슈(Roche)로부터 님블겐(NimbleGen)으로서 상업적으로 이용가능; Bainbridge et al., 2010, Genome Biol.11:R62)를 이용하는 코딩 서열의 표적화된 포획; 포획 단계 후 서열분석 단계가 수행되는 (Ng S.B. et al, 2009, Nature 461: 272-6) 2 단계 접근법을 포함한다. 다른 것들 중에서도 특히 파이로시퀀싱(pyrosequencing) (로슈 454로서 상업적으로 이용가능), 염료 시퀀싱 (일루미나(Illumina)를 통해 상업적으로 이용가능), 디지털 시퀀싱 (이온토렌트 시퀀싱(IonTorrent sequencing)으로서 상업적으로 이용가능)을 비롯한, 다수의 기술적 접근법이 DNA 서열의 서열분석을 위해 상업적으로 이용가능하다.

[0103] 종양 특이적 돌연변이를 확인하는 단계는 의무적이지만, 개인 맞춤형 재조합 폭스바이러스에 의해 코딩되는 최적의 신생펩티드를 선택하고/거나, 이를 적합한 신생펩티드 융합물로 조합하기 위해 추가의 임의적인 여과를 사용할 수 있다. 실제로, 다수의 종양 특이적 돌연변이가 형질전환 및 암 진행 동안 축적될 수 있고, 일부는 그의 암에 대해 치료받고 있는 대상체의 면역계를 자극시키는 데 있어 더 우수한 잠재능을 가질 수 있다. 추가의 여과가 사용될 때, 확인 단계는 바람직하게, 상기 기술된 하위 단계 a) 내지 d) 이외에도, 하기 추가의 하위 단계 e) 내지 i) 중 적어도 하나의 단계를 포함한다:

[0104] e) 잠재적 신생펩티드(들)를 mRNA 전사 수준에서든, 또는 단백질 번역 수준에서든, 종양에서의 그의 발현 수준 (또는 상응하는 신생항원의 발현 수준)에 의해 순위화하는 단계;

[0105] f) 비-자가-발현 종양 특이적 돌연변이(들)를 선택하는 단계;

[0106] g) 인실리코 예측에 의해, 또는 면역원성 생물학적 검사에 의해, 신생펩티드(들)에 포함된 신생에피토프(들)의 면역 잠재능을 예측하는 단계;

[0107] h) 신생에피토프 그 자체 중의 (펩티드내 TM), 및/또는 여러 신생펩티드를 포함하는 신생펩티드 융합물 중의 (융합물 부위, 즉, 제1 신생펩티드의 C-말단 및 제2 신생펩티드의 N-말단, 및 임의적으로, 제1 및 제2 신생펩티드 사이의 링커를 포함하는 부위에서의 펩티드간 TM) 잠재적 TM 세그먼트(들)의 존재를 예측하는 단계;

[0108] i) 잠재적 신생펩티드(들) 및/또는 신생펩티드 융합물(들)을 그의 소수성 정도에 의해 순위화하는 단계, 및 특히, 신생펩티드(들) 및/또는 신생펩티드 융합물(들)이 전체 소수성 점수가 음의 값이고/거나, 전체 친수도 점수가 0.1 이하를 나타내도록 상기 신생펩티드(들) 및/또는 신생펩티드 융합물(들)을 선택하는 단계.

[0109] 상기 언급된 바와 같이, 추가의 하위 단계 e) 내지 i) 중 적어도 하나가 확인 단계에 존재할 수 있다. 추가의 하위 단계 e) 내지 i) 중 수개의 단계가 존재할 수 있다. 특히, 바람직한 실시양태에서, 확인 단계는 추가로 상기 기술된 하위 단계 a) 내지 d) 이외에도, 상기의 하위 단계 e) 및 f) (이들 하위 단계는 하기에서 더욱 상세하게 기술된다), 및 임의적으로

[0110] · 하위 단계 g) (하기에서 더욱 상세하게 기술된다),

[0111] · 하위 단계 h) (하기에서 더욱 상세하게 기술된다),

[0112] · 하위 단계 i) (하기에서 더욱 상세하게 기술된다), 또는

[0113] · 하위 단계 g), h) 및 i)의 임의의 조합 (예컨대, 하위 단계 g) 및 h), 하위 단계 g) 및 i), 하위 단계 h) 및 i), 또는 하위 단계 g), h) 및 i)) 또한 포함한다.

[0114] 하위 단계 e): 신생항원을 종양에서의 그의 발현 수준에 의해 순위화함으로써 추가의 여과가 부가될 수 있다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 확인 단계는 종양에서 적어도 발현되는, 및 바람직하게, 고도로 발현되는 신생펩티드를 선택하는 하위 단계 e)를 추가로 포함한다. 발현은 mRNA 또는 단백질 수준에서 검출 또는 정량화될 수 있다. 한 실시양태에서, 신생펩티드는 이것이 종양에서 적어도 전사되는지, 및 바람직하게, 고도로 전사되는지에 대한 검출, 즉, RNA 종양 샘플에서 발견되고, (번역되었을 때) ORF에 존재하는 발현된 종양 특이적 돌연변이인지에 대한 검출에 기초하여 선택될 수 있다; (RefSeq 전사체 또는 진뱅크). 예시 목적으로, 상기 발현된 종양 특이적 돌연변이(들)는 환자로부터 수득된 상기 종양 생물학적 샘플로부터 추출된 RNA, 즉, 트랜스크립톰으로부터 생성된 상보적 DNA (cDNA)를 서열분석함으로써 전형적으로 확인된다. 본원에서 사용되는 바, 트랜스크립톰이란, 유기체에 의해 발현되는 전 범위의 메신저 RNA (mRNA)를 지칭한다. 트랜스크립톰 서열분석 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예컨대, Chu and Corey, 2012, Nucleic Acid Ther. 22: 271-4; Wang et al., 2009, Nat Rev Genet. 10(1): 57-63). 바람직하게, 돌연변이화된 신생항원을 코딩하는 mRNA는 종양 샘플로부터 추출된 RNA에서 풍부하게 발현된다. 신생펩티드 선택을 위한 발현의 바람직한 절대값을 제공할 수는 없지만, 선택은 오히려 상대적인 것이며, 잠재적 신생펩티드 발현은 우선 순위에 의해 검출/정량화되고, 순위화된다. 당업자는 치료하고자 하는 대상체의 종양에서의 다양한 후보 신생펩티드의 발현 수준을 비교하고, 이를 발현 수준이 감소되는 순서로 순위화하는 방법을 알고 있으며, 여기서, 고도로 발현되는 신생펩티드가 먼저 순위화되고, 목록 마지막에는 비-발현 신생펩티드까지로 순위화된다.

[0115] mRNA 발현에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 신생펩티드의 선택은 널리 기술된 프로테오믹 기술, 예컨대, 웨스턴 블롯, 면역검정법, 질량 분석법을 사용하여 종양 특이적 돌연변이로부터 생성된 펩티드의 발현 수준에 기초하여 수행될 수 있다. 여기서 또한, 선택은 오히려 상대적인 것이며, 잠재적 신생펩티드 발현은 우선 순위에 의해 검출/정량화되고, 순위화된다. 이 또한 당업자에게는 용이한 것이다.

[0116] 하위 단계 f): 하위 단계 e)에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 추가의 여과가 또한, 대상체 프로테옴에 존재하지 않는 신생펩티드를 의미하는 것인 비-자가 신생펩티드의 선택 단계를 포함함으로써 부가될 수 있다. 실제로, 종양 특이적 돌연변이의 존재는 동일한 펩티드가 대상체의 건강한 세포에서 발현되는 상응하는 야생형 단백질에는 확실히 존재하지 않도록 하지만, 하위 단계 f)는 동일한 펩티드가 대상체의 건강한 세포에서 발현되는 또 다른 단백질의 일부가 아님을 체크하는 것을 목표로 한다. 예시 목적으로, 돌연변이화된 것으로 확인된 폴리펩티드를 복수의 최소 면역 결정기 (예컨대, 1개의 아미노산만큼 중복되는 9량체)로 나누고, blastp (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-10)를 이용하여 숙주에서 발현되는 단백질에 상응하는 숙주의 프로테옴 (예컨대, 인간 대상체인 경우, 인간 프로테옴)에 대해 정렬한다. 이어서, 숙주 단백질과 공유되지 않는 돌연변이화된 에피토프를 선택한다. 다시 말해, 자가면역 문제, 및 면역 반응을 감소시킬 수 있는 자가-펩티드에 대한 면역 내성의 위험을 피하기 위해 자가-에피토프 (즉, 프로테옴에 존재하는 것)를 제거한다. 앞서 언급된 바와 같이, 하위 단계 f)는 하위 단계 e)와 함께 조합될 수 있고, 이로써, (고도로) 발현된 비-자가 신생펩티드를 선택할 수 있다.

[0117] 하위 단계 g): 하위 단계 e), 하위 단계 f) 및 하위 단계 e) 및 f)의 조합에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 추가의 여과가 또한 선택된 신생펩티드의 면역 잠재능을 예측함으로써 부가될 수 있다. 면역 잠재능에 의한 선택은 인실리코 예측 및/또는 생분석 접근법을 이용함으로써 (예컨대, 면역원성 생물학적 검사에 의해) 수행될 수 있다. 인실리코 예측기는 머신 러닝 알고리즘, 예컨대, 인공 신경망 (ANN) 또는 서포트 벡터 머신 (SVM)을 이용하여 구축되고, 고도의 면역원성을 띠는 서열을 확인하도록 훈련된다. 이어서, 알고리즘을 이용하여 에피토프를 그의 잠재적 제시의 인덱스로서 HLA 부류 I 및/또는 부류 II 단백질에 대한 그의 친화성에 대해 분류한다. 예시 목적으로, 상기 추가의 임의적 단계는 훈련 알고리즘, 예컨대, seq2HLA (Boegel et al., 2015, Methods Mol Biol 1310: 247-51), NetMHCIIpan (Andreatta et al., 2015, Immunogenetics 67(11-12): 641-50) 및 IEDB 합의 결합 예측을 이용하여, HLA 타이핑 및 MHC 부류 II의 예측 단계 (돌연변이화된 항원을 복수의 펩티드/에피토프 (일반적으로, 1개의 아미노산만큼 중복되는, 부류 I 결합의 경우 8-10량체, 및 부류 II 결합의 경우 10-20량체)로 나누는 단계)를 포함할 수 있다. 예시 목적으로, 바람직하게는 점수가 낮은 돌연변이화된 펩티드가 선택된다. 다시 말해, 이러한 펩티드는 더 우수한 MHC 부류 결합 점수를 갖고, 이로써, T 세

포 반응을 발생시킬 수 있는 가능성이 더 클 것으로 예측된다.

[0118] 면역 잠재능의 인실리코 예측에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 면역원성 신생펩티드는 당업계에 널리 공지되어 있는 적절한 생분석 검사, 예컨대, 질량 분석법, 시토카인 방출 검정법 (예컨대, 적절한 동물 모델에서의 IFNγ ELIspot), MHC 제한 돌연변이를 확인하기 위한 MHC 부류 I 또는 부류 II 결합 검정법, 유세포 분석법, 면역형광염색, 조직화학법 등에 의해 확인될 수 있다.

[0119] 상기 언급된 바와 같이, 하위 단계 g)는 바람직하게, 하위 단계 e), 하위 단계 f) 또는 하위 단계 e) 및 f), 둘 모두, 더욱 바람직하게, 하위 단계 e) 및 f), 둘 모두와 함께 조합될 수 있고, 이로써, (고도로) 발현된 비-자가 및 면역원성 신생펩티드를 선택할 수 있다.

[0120] 하위 단계 h): 하위 단계 e), 하위 단계 f), 또는 하위 단계 g) 또는 그의 임의의 조합 (예컨대, 하위 단계 e) 및 f) 또는 하위 단계 f) 및 g) 또는 하위 단계 e) 및 g), 또는 하위 단계 e), f) 및 g))에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 추가의 여과가 또한, 선택된 신생펩티드 (펩티드내 TM) 중, 또는 생성된 신생펩티드 융합물(들) (펩티드간 TM) 중 잠재적 TM 세그먼트의 존재를 예측함으로써 부가될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 선택된 신생펩티드 뿐만 아니라, 생성된 신생펩티드 융합물(들)은 재조합 폭스바이러스의 생성 및 신생에피토프의 면역계에의 적절한 제시를 촉진시키기 위해서는 TM 세그먼트를 포함하지 않는 것이 바람직하다. 상기 언급된 바와 같이, 주어진 펩티드 중 TM 세그먼트의 존재를 예측하는 데에는 수개의 예측 도구, 예컨대, TMHMM (Krogh et al., 2001, J. Mol. Biol. 305: 567-80) 및 DAS (밀집 정렬 표면)가 사용될 수 있다. 두 신생펩티드의 접합부의 펩티드간 TM을 예측하는 경우, 신생펩티드를 역위시키는 것이 TM의 존재를 제거하기 위한 옵션이 될 수 있다. 또 다른 옵션은 두 신생펩티드 사이에 적절한 링커를 부가하는 것이 될 것이다.

[0121] 하위 단계 i): 하위 단계 e), 하위 단계 f), 하위 단계 g) 또는 하위 단계 h) 또는 그의 임의의 조합 (예컨대, 하위 단계 e) 및 f) 또는 하위 단계 f) 및 g) 또는 하위 단계 e) 및 g), 하위 단계 g) 및 h) 또는 하위 단계 e), f) 및 g) 또는 하위 단계 e), f), g) 및 h))에 대해 대안적으로, 또는 그와 함께 조합하여, 추가의 여과가 또한 신생펩티드(들) 및/또는 신생펩티드 융합물(들)을 그의 소수성 또는 친수성 정도에 따라 순위화함으로써 부가될 수 있다. 실제로, 신생펩티드 융합물(들)은 소수성 아미노산 잔기의 하나 이상의 짧은 스트레치(들)의 존재를 허용할 수 있지만, 생성된 신생펩티드 융합물이 확실히 음의 값인 전체 소수성 점수 및/또는 0.1 미만인 전체 친수도 점수를 갖도록 하기 위해서는 선택된 신생펩티드 중 적어도 60%는 상기 기술된 바와 같이 속성상 친수성인 것이 바람직하다. 이러한 예측은 당업계에 공지된 통상의 방법 및 알고리즘, 예컨대, 상기 언급된 것 (예컨대, Kyte and Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-32 또는 ExPAsy 프로트 스케일 프로테인 알고리즘)에 의해 수행될 수 있다.

[0122] ***재조합 폭스바이러스의 생성***

[0123] 확인 단계 이외에도, 본 발명에 따른 개인 맞춤형 암 백신을 제조하는 방법은 재조합 폭스바이러스의 생성 단계를 포함할 수 있다. 전형적으로, 이러한 단계는 본원에 기술된 바와 같은 선택된 신생펩티드(들)를 코딩하는 합성 핵산 생성 (예컨대, 임의적으로 펩티드 신호, 링커, 태그 등과 함께 하나 이상의 융합물(들)로 배열), 신생펩티드-발현 재조합 폭스바이러스의 생성, 및 상기 재조합 폭스바이러스 제조를 포함한다.

[0124] 합성 핵산 분자(들)의 생성

[0125] 핵산 분자(들)는 선택된 신생펩티드(들)를 코딩하도록 디자인되고, 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같이, 임의적으로, 링커, 태그 및 펩티드 신호와 함께 하나 이상의 융합물(들)로 배열된다. 바람직하게, (예컨대, 중복 합성 올리고뉴클레오티드로부터의 어셈블리 또는 합성 유전자의 직접적인 합성과 같은) 자동화된 프로세스로 화학적 합성에 의해 생성된다.

[0126] 특정 실시양태에서, 특정 대상체에서 높은 수준으로 발현될 수 있도록 핵산 서열(들)을 최적화하는 것이 이로울 수 있다. 간략하면, 핵산 분자(들)는 발현 개선을 목표로 하여 코돈 최적화, 주어진 숙주 유기체에 대한 비-최적의 코돈의 비-선택 및/또는 발현에 부정적인 영향을 줄 것으로 예상되는 AT 또는 GC가 풍부한 서열 스트레치의 제거를 통해 디자인될 수 있다. 서열 TTTTTNT는 폭스바이러스 조기 전사 종결 신호이기 때문에, 상기 서열 또한 피하고 있다.

[0127] 합성 핵산 분자(들)의 발현

[0128] 본 발명에 따라, 재조합 폭스바이러스의 게놈에 삽입되는 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들)는 적합한 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 본 발명과 관련하여, 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들)는 하나 이상의 발현 카세트(들)

에 배열될 수 있다. 전형적으로, "발현 카세트"는 대상체에서의 발현을 허용하는 적합한 조절 요소의 제어하에 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0129] 본원에서 사용되는 바, "조절 요소"라는 용어는 복제, 중복, 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성 및/또는 수송 프로세스를 비롯한, 신생펩티드(들)의 발현을 허용하거나, 그에 기여하거나, 또는 조정하는 임의의 요소를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, "작동가능하게 연결된"이란, 연결된 요소들이 그의 의도된 목적을 위해 협력하여 작용할 수 있도록 배열되어 있다는 것을 의미한다.

[0130] 조절 요소의 선정은 신생펩티드 그 자체, 폭스바이러스 그 자체, 치료하고자 하는 대상체, 원하는 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 프로모터가 특히 중요하다. 본 발명과 관련하여, 이는 다수의 세포 유형에서 발현을 지시하는 구성적인 것 또는 특정 세포 또는 세포 유형에 특이적인 것(예컨대, 종양 특이적 조절 서열), 또는 특정 이벤트 또는 외인성 인자에 대한 반응으로 (예컨대, 온도, 영양 첨가제, 호르몬 등에 의해) 또는 바이러스 주기의 단계 (예컨대, 후기 또는 조기)에 따라 조절되는 것일 수 있다. 바이러스 생산을 최적화시키고, 발현된 폴리펩티드(들)의 잠재적 독성을 피하기 위해, 특정 이벤트 또는 외인성 인자에 대한 반응으로 생산 단계 동안 억제되는 프로모터를 사용할 수도 있다. 프로모터 이외에, 조절 요소가 전사의 적절한 개시, 조절 및/또는 종결 (예컨대, 폴리A 전사 종결 서열), mRNA 수송, 프로세싱 및 안정성, 번역 (예컨대, 개시인자 Met, 3 부분(tripartite) 리더 서열, IRES 리보솜 결합 부위, 신호 펩티드 등)을 위한 추가의 요소를 추가로 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0131] 백시니아 바이러스 프로모터는 특히 재조합 폭스바이러스에서의 발현에 적합하다. 대표적인 예로는 제한 없이, 백시니아 7.5K, H5R, 11K7.5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28), TK, p28, p11, B2R, A35R 및 K1L 프로모터, 합성 프로모터, 예컨대, Chakrabarti et al. (1997), Biotechniques 23: 1094-7; Hammond et al, 1997, J. Virol Methods 66: 135-8; 및 Kumar and Boyle, 1990, Virology 179: 151-8에 기술된 것 뿐만 아니라, 조기/후기 키메라 프로모터를 포함한다.

[0132] 재조합 폭스바이러스가 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 수개의 발현 카세트를 포함할 때, 발현은 동일한 또는 상이한 조절 요소 (예컨대, 프로모터)에 의해 제어될 수 있다. 바람직하게, 재조합 폭스바이러스는 1 내지 5개의 발현 카세트(들), 더욱 바람직하게, 각각이 본원에 기술된 바와 같은 신생펩티드 융합물의 발현을 위한 것을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태는 p11k7.5, pH5R 및 pB2R로 구성된 군으로부터 선택되는 백시니아 프로모터의 전사 제어하에, 각각의 것이 5 내지 10개의 신생펩티드의 융합물의 발현을 위한 것인 1 내지 3개의 카세트를 포함하는 재조합 MVA에 관한 것이다.

[0133] 대안적 실시양태에서, 발현 카세트의 개수가 재조합 폭스바이러스의 구축을 복잡하게 만든다면 (예를 들어, 3개 초과), 고유한 재조합 폭스바이러스를 더 많이 포함하는 시스템을 통해 진행할 수 있으며, 이는 개인 맞춤형 암 백신이 신생펩티드를 발현하는 재조합 폭스바이러스를 1개 초과로 (예컨대, 2 또는 3개) 포함한다는 것을 의미하는 것이다.

[0134] 재조합 폭스바이러스의 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들)의 삽입

[0135] 본원에서 사용하기 위한 하나 이상의 신생펩티드(들)를 코딩하는 핵산 분자(들) 또는 발현 카세트(들)가 모체 폭스바이러스의 게놈 내로 삽입되고, 이로써 상기 재조합 폭스바이러스가 생성된다. 신생펩티드-코딩 핵산 서열(들)/발현 카세트(들)는 폭스바이러스 게놈 내의 임의의 위치에, 예컨대, 바이러스 유전자 내에, 유전자간 영역에, 비필수 유전자 또는 영역에 또는 바이러스 서열 대신으로 삽입될 수 있다. 비필수 유전자좌에의 폭스바이러스 게놈 내 삽입이 바람직하다. 코펜하겐 및 웨스턴 리저브 백시니아 바이러스에서의 삽입을 위해서는 티미딘 키나제 유전자 및 MVA 벡터에서의 삽입을 위해서는 결실 II 또는 III이 특히 적절하다 (WO97/02355; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72: 1031-8). 바람직하게, 폭스바이러스가 MVA일 때, 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들) 또는 발현 카세트(들)의 삽입은 MVA의 결실 III 내에서 이루어진다. 재조합 폭스바이러스가 상기 기술된 바와 같이 수개의 카세트를 포함할 때, 이는 바이러스 게놈에서 동일한 또는 상이한 위치에 삽입될 수 있다. 모든 발현 카세트가 동일한 위치에, 특히, 재조합 백시니아 바이러스의 경우 TK 유전자좌에, 및 재조합 MVA의 경우 결실 III에 삽입되는 것이 바람직하다.

[0136] 재조합 폭스바이러스의 구축을 위한 일반적인 조건은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, WO2007/147528; WO2010/130753; WO03/008533; US 6,998,252; US 5,972,597 및 US 6,440,422 참조). 전형적으로, 삽입되는 핵산 분자(들)/발현 카세트(들)는, 모체 게놈 중 삽입 부위 양측 모두에 존재하는 것과 상동성인 (예컨대, 90-100% 동일한) 폭스바이러스 서열의 스트레치에 상응하는 2개의 재조합 아암에 의해 둘러싸여 있는 전달 플라스

미드에서 클로닝된다. 재조합 아암의 길이는 전달 플라스미드 내에서 달라질 수 있다. 소망하게는, 재조합 아암은 각각 적어도 150 bp, 바람직하게, 적어도 200 bp, 더욱 바람직하게, 적어도 300 bp, 더욱더 바람직하게, 300 내지 600 bp를 포함하고, 특히 바람직하게는 350 내지 500 bp (예컨대, 대략 350 bp 또는 500 bp) 또는 300 내지 400 bp의 상동성 폭스바이러스 서열을 포함한다. 모체 폭스바이러스는 "폭스바이러스"라는 용어와 관련하여 상기 기술된 바와 같은 야생형 폭스바이러스 또는 변형된 것 (예컨대, 약독화된, 종양 특이적인 것 등)일 수 있다. 이어서, 삽입은 허용 세포(permissive cell)의 선형화된 전달 플라스미드에 의한 형질감염 및 모체 폭스바이러스에 의한 감염을 필요로 하면서, 모체 게놈 및 선형화된 전달 플라스미드, 둘 모두에 존재하는 상동성 서열의 스트레치 사이의 상동성 재조합에 의해 수행된다.

[0137] 본 발명의 방법의 어떤 실시양태에서, 재조합 폭스바이러스를 생성하는 단계는 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들)/발현 카세트(들)에 대해 선택되는 삽입 부위에 클로닝된 리포터 유전자, 및 특히, 형광성 리포터 유전자를 포함하는 모체 폭스바이러스의 사용을 포함한다. 바람직하게, 리포터 유전자는 허용 세포 내에서의 그의 발현을 허용하는 프로모터, 예컨대, 백시니아 프로모터의 전사 제어하에 배치된다. 본 실시양태는 모체 폭스바이러스와 비교하여 재조합 폭스바이러스의 선택을 촉진시킨다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 형광성 리포터의 대표적인 예로는 제한 없이, GFP (녹색 형광성 단백질), eGFP (증강된 녹색 형광성 단백질), AmCyan 1 형광성 단백질 및 mCherry를 포함한다. 예를 들어, mCherry (587 nm 및 610 nm에서 피크 흡수/방출을 갖는, 디스코소마(*Discosoma*) 버섯으로부터 기원하는 단량체 형광성 단백질)에 의존할 때, mCherry-코딩 서열 대신 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들) 또는 발현 카세트(들)가 삽입된 재조합 바이러스는 백색 플라크를 생성하겠지만, 그에 반해, mCherry 발현 카세트를 보유하는 모체 바이러스는 적색 플라크를 생성하게 될 것이다. 재조합 폭스바이러스의 선택은 직접적인 시각화에 의해 이루어지거나 (백색 플라크), 또는 예컨대, APC (알로피코시아닌(Allophycocyanin))-태그부착된 항-백시니아 바이러스 항체로 표지한 후 수행되는 FACS와 같은 분류 수단에 의해 촉진될 수 있다. 수많은 항-백시니아 항체가 상업적 공급처로부터 이용가능하다. 일반적으로, 50 내지 100개의 모체에 대하여 1개의 재조합체가 수득되고, 삽입 단계부터 재조합 폭스바이러스 생성까지의 전체 프로세스는 5 내지 6주 소요된다.

[0138] 본 발명의 바람직한 실시양태는 상동성 재조합 효능을 적어도 10배만큼 증가시키고, 재조합 폭스바이러스를 생성하는 데 필요한 시간을 적어도 1.5배 단축시킬 수 있게 하는 재조합 폭스바이러스를 생성하는 단계에 관한 것이다. 상기 기술된 프로세스에서와 같이, 폭스바이러스 게놈 내로 삽입되는 핵산(들) 또는 발현 카세트(들)는 재조합 아암에 의해 둘러싸여 있는 전달 플라스미드 단계로 클로닝되고, 모체 바이러스는 적합한 프로모터의 제어하에 삽입 부위에 클로닝된 리포터 유전자 (예컨대, 형광성 리포터)를 포함한다. 바람직하게, 상기 모체 바이러스는 폭스바이러스 프로모터의 제어하에 결실 III 내로 삽입되어 있는 리포터 유전자 (특히, mCherry 유전자)를 포함하는 MVA이다. 그러나, 재조합 폭스바이러스를 생성하는 단계는 리포터 (예컨대, mCherry) 뉴클레오티드 서열에서 적어도 하나의 이중 가닥 파단을 생성할 수 있는 엔도뉴클레아제에 의한 추가의 절단 단계로서, 그러나, 여기서, 상기 엔도뉴클레아제는 폭스바이러스 게놈은 절단하지 않는 것인 단계를 포함한다. 적합한 엔도뉴클레아제는 바람직하게, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성인자 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 규칙적인 간격을 갖는 짧은 회문구조 반복단위의 배열(clustered regularly interspaced short palindromic repeat: CRISPR)/Cas9 뉴클레아제 및 형광성 리포터 유전자내 고유 절단을 갖는 제한 효소로 구성된 군으로부터 선택된다. 바이러스 편집을 위해, 핵 국재화 신호 없이 Cas9를 코딩하는 플라스미드 뿐만 아니라, 적합한 가이드 RNA의 사용을 필요로 하는 CRISPR/CAS9 시스템을 사용하는 것은 당업계에 기술되어 있다 (Yuan et al., 2015, J. Virol 89, 5176-9; Yuan et al., 2016, Viruses 8, 72, doi:10.3390). 이러한 고려 사항에서, 모체 바이러스에 의한 감염 이외에도, 허용 세포는 전달 플라스미드, Cas9 발현 플라스미드 및 가이드 RNA (예컨대, mCherry-표적화된 가이드 RNA)를 코딩하는 하나 이상의 플라스미드(들)로 형질감염될 수 있다. 이어서, 재조합 폭스바이러스의 선택은 시각적으로 (재조합에 상응하는 것은 백색 플라크인 반면, 모체에 상응하는 유색 플라크이고, 그 색상은 리포터 유전자에 의존하는 것인 플라크의 직접적인 단리), 또는 통상의 분류 수단 (임의적으로, 상기 기술된 바와 같이 적절한 항체를 이용한 표지 단계 이후 수행되는 FACS)을 사용하여 수행된다. 상기 프로세스의 경우, 1 내지 10개의 모체에 대하여 1개의 재조합체가 수득되고, 삽입 단계부터 재조합 폭스바이러스 생성까지의 전체 프로세스는 대략 3-4주 소요된다. 바람직한 실시양태에서, 재조합 폭스바이러스를 생성하는 단계는 최대 4주, 바람직하게, 최대 3주 소요되며, 모체 대비 재조합의 비는 2 (1개 대비 2개) 내지 0.1 (10개 대비 1개), 바람직하게, 2 (1개 대비 2개) 내지 0.05 (20개 대비 1개)를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 재조합/모체 비는 1 이상이고, 특히, 2개의 재조합 아암이 대략 350 bp 길이일 때, 그러하다.

[0139] 특히 바람직한 실시양태는, p11k7.5, p7.5K, pH5R 및 pB2R로 구성된 군으로부터 선택되는, 바람직하게, p11k7.5, pH5R 및 pB2R로 구성된 군으로부터 선택되는 백시니아 프로모터의 전사 제어하에 배치된 것으로서 (바

람직하게, 각 융합물은 상이한 프로모터의 전사 제어하에 있다), 각각이 5 내지 10개의 신생펩티드의 융합물을 코딩하는 것인, 백시니아 TK 유전자좌 또는 MVA 결실 III 내에 삽입된, 1 내지 3개의 발현 카세트를 포함하는 재조합 폭스바이러스 (예컨대, 백시니아 바이러스, 및 더욱 바람직하게, MVA)가 생성될 수 있도록 하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 재조합 폭스바이러스를 포함하는 개인 맞춤형 암 백신에 관한 것이다.

[0140] ***재조합 폭스바이러스 제조***

[0141] 일단 생성되고 나면, 본원에서 사용하기 위한 재조합 폭스바이러스를 종래 기술을 사용하여 제조/증폭시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 상기 재조합 폭스바이러스를 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 제조 단계는 적합한 생산자 세포에서 적합한 규모로 증폭시키는 단계, 생산된 재조합 폭스바이러스를 세포 배양물로부터 회수하는 단계, 및 회수된 재조합 폭스바이러스를 정제하는 임의적 단계를 포함한다.

[0142] 증폭 단계는 생산자 (예컨대, 허용) 숙주 세포의 배양, 배양된 생산자 숙주 세포의 감염, 및 재조합 폭스바이러스 (예컨대, 감염성 바이러스 입자)가 생산될 수 있도록 허용하는 적합한 조건하에서의 감염된 숙주 세포의 배양을 포함한다.

[0143] 생산자 세포 선정은 증폭시키고자 하는 재조합 폭스바이러스의 유형에 의존한다. MVA는 엄격하게 숙주 제한적이고, 전형적으로는 1차 조류 세포 (예컨대, 수정란으로부터 수득된 닭 배아로부터 제조된 닭 배아 섬유모세포 (CEF)) 또는 불멸화된 조류 세포주인, 조류 세포에서 증폭된다. MVA 제조를 위해 적합한 조류 세포주의 대표적인 예로는 제한 없이, 오리 TERT 유전자로 불멸화된 카이리나 모스카타(*Cairina moschata*) (예컨대, WO2007/077256, WO2009/004016, WO2010/130756 및 WO2012/001075 참조); 바이러스 및/또는 세포 유전자의 조합으로 불멸화된 조류 세포주 (예컨대, WO2005/042728 참조); 자발적으로 불멸화된 세포 (예컨대, US5,879,924에 개시된 닭 DF1 세포주); 또는 성장 인자 및 피더 층으로부터의 점진적 단절에 의해, 배아 세포로부터 유래된 불멸화된 세포 (예컨대, WO2005/007840 및 WO2008/129058에 개시된 Ebx 닭 세포주, 예컨대, Olivier et al., 2010, mAbs 2(4): 405-15에 기술된 Eb66)를 포함한다.

[0144] 조류 1차 세포 (예컨대, CEF) 및 조류 세포주 이외에도, 다른 백시니아 바이러스 또는 다른 폭스바이러스 균주의 경우, 인간 세포주, 예컨대, HeLa (ATCC-CRM-CCL-2™ 또는 ATCC-CCL-2.2™), MRC-5, HEK-293; 햄스터 세포주, 예컨대, BHK-21 (ATCC CCL-10), 및 베로(Vero) 세포를 비롯한, 다수의 다른 비-조류 세포주가 제조를 위해 이용가능하다. 바람직한 실시양태에서, 비-MVA 백시니아 바이러스는 HeLa 세포에서 증식된다 (예컨대, WO2010/130753 참조).

[0145] 생산자 세포는 바람직하게 동물 또는 인간 기원의 생성물이 없는 화학적으로 정의된 배지를 사용하여, 동물 또는 인간 유래 생성물 무함유 배지 중에서 배양된다. 특히, 성장 인자가 존재할 수 있지만, 이는 바람직하게는 재조합적으로 제조되고, 동물 물질로부터 정제되지 않는다. 적절한 동물 물질 무함유 배지(animal-free medium)는 선택된 생산자 세포에 의존하여 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 이러한 배지는 상업적으로 이용가능하다. 특히, CEF가 생산자 세포로 사용될 때, 이는 VP-SFM 세포 배양 배지 (인비트로겐(Invitrogen))에서 배양될 수 있다. 생산자 세포는 바람직하게, 30℃ 내지 38℃에 포함된 온도에서 (더욱 바람직하게, 약 37℃에서) 감염 전 1 내지 8일 동안 (바람직하게, CEF의 경우, 1 내지 5일 동안, 및 불멸화된 세포의 경우, 2 내지 7일 동안) 배양된다. 필요할 경우, 세포의 총 개수를 증가시키기 위해 1 내지 8일의 수회에 걸친 계대접종이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 원하는 바이러스 양을 수득하기 위해서, 백색 플라크 단리 후, 재조합 신생에피토프 발현 폭스바이러스 (예컨대, MVA)의 증폭은 플라스크에 옮겨지기 이전에, 먼저 6 내지 12웰 세포 배양 플라크에서 수행될 수 있다.

[0146] 재조합 폭스바이러스에 의한 생산자 세포 감염은 생산자 세포의 생산적 감염을 허용하는 적절한 조건하에 (특히, 적절한 다중 감염도 (MOI)를 이용하여) 이루어진다. 폭스바이러스의 증폭을 위한 사용에 적합한 MOI는 전형적으로 0.001 내지 1 (더욱 바람직하게, 약 0.05)이다. 감염 단계는 또한 바람직하게 동물 또는 인간 기원의 생성물이 없는 화학적으로 정의된 배지를 사용하여, 동물 또는 인간 유래 생성물 무함유 배지 (이는 생산자 세포의 배양을 위해 사용된 배지와 동일하거나, 또는 상이할 수 있다) 중에서 수행된다. 감염 단계는 일반적으로 1 내지 6일, 더욱 바람직하게, 2 내지 4일, 및 가장 바람직하게, 약 72시간 동안 진행된다.

[0147] 이어서, 감염된 생산자 세포는, 자손 바이러스 벡터 (예컨대, 감염성 바이러스 입자)가 생산될 때까지, 당업자에게 널리 공지된 적절한 조건하에서 배양된다. 감염된 생산자 세포의 배양 또한 바람직하게는 30℃ 내지 37℃의 온도에서 1 내지 5일 동안 (동물 또는 인간 기원의 생성물이 없는 화학적으로 정의된 배지를 사용하여) 동물

또는 인간 유래 생성물 무함유 배지 (이는 생산자 세포의 배양을 위해 및/또는 감염 단계를 위해 사용된 배지와 동일하거나, 또는 상이할 수 있다) 중에서 수행된다.

[0148] 폭스바이러스 입자는 배양물 상청액 및/또는 생산자 세포로부터 수집될 수 있다. 세포 배양물 상청액 및 생산자 세포를 따로따로 풀링하거나, 또는 수집할 수 있다. 생산자 세포로부터의 (및 임의적으로는 또한 배양물 상청액으로부터의) 회수는 벡터가 유리될 수 있도록 하기 위해 생산자 세포 막을 파쇄시킬 수 있는 단계를 필요로 할 수 있다. 냉동/해동, 저장성(hypotonic) 용해, 초음파처리, 미세유동화 또는 고속 균질화를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 기술이 당업자에게 이용가능하다. 바람직한 실시양태에 따라, 생산된 재조합 폭스바이러스를 회수하는 단계는, 바람직하게, 고속 균질화기를 이용하여 생산자 세포 막을 파쇄시키는 용해 단계를 포함한다. 고속 균질화기는 실버손 머신즈 인크.(Silverson Machines Inc.: 미국 이스트 롱메도우), 또는 이카-라보테크니크 (Ika-Labotechnik: 독일 슈타우펜)로부터 상업적으로 이용가능하다. 특히 바람직한 실시양태에 따라, 상기 고속 균질화기는 SILVERSON L4R이다.

[0149] 이어서, 폭스바이러스 입자는 당업계에 널리 공지된 정제 단계를 이용하여 추가로 정제될 수 있다. 정화, 효소적 처리 (예컨대, 엔도뉴클레아제, 프로테아제 등), 크로마토그래피 및 여과 단계를 비롯한, 다양한 정제 단계가 구상될 수 있다. 적절한 방법은 당업계에 기술되어 있다 (예컨대, WO2007/147528; WO2008/138533, WO2009/100521, WO2010/130753, WO2013/022764). 바람직한 실시양태에서, 정제 단계는, 바이러스를 다른 생체분자로부터 분리시키고/거나, 바이러스 현탁액을 농축시키고/거나, 탈염시키는 데 사용될 수 있는 접선 유동 여과 (TFF) 단계를 포함한다. 여과시키고자 하는 부피에 의존하여, 제한 없이, 다른 것들 중에서도 특히 스펙트럼랩즈(Spectrumlabs), 팔 코포레이션(Pall Corp), 펜도테크(PendoTech) 및 뉴 펠리콘(New Pellicon)을 비롯한, 각종의 TFF 시스템 및 장치가 당업계에서 이용가능하다.

[0150] 바람직한 실시양태에서, 상기 제조 단계는 (종양 샘플의 기원이 되는) 환자의 시험 및 치료에 적합한 용량으로 분배되는 개인 맞춤형 암 백신을 위해 적어도 10^9 pfu, 소망하게는 적어도 $5x10^9$ pfu, 및 바람직하게, 대략 10^{10} pfu 이상을 제조하는 것에 도달하게 된다.

[0151] ***무장된(armed) 재조합 폭스바이러스***

[0152] 본 발명의 어떤 실시양태는 또한 신생펩티드-코딩 핵산 분자(들) 이외에도, 예컨대, 항-종양 반응 증강을 위해 바이러스 게놈에 삽입된 추가의 치료 유전자(들)를 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 수많은 치료 유전자, 특히, 바이러스의 항-종양 효능을 상승시키거나, 숙주의 면역을 강화시킬 수 있는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자가 구상될 수 있다. 이는 인간 기원의 것 또는 인간 기원이 아닌 것 (예컨대, 박테리아, 효모 또는 바이러스 기원인 것)일 수 있고, 천연 유전자, 그의 단편, 또는 기능성 유사체 (천연 유전자로부터 하나 이상의 뉴클레오티드의 돌연변이, 결실, 치환 및/또는 부가에 의해 수득된 것)일 수 있다. 상기 유사체는 바람직하게, 천연 유전자의 핵산 서열과 적어도 70%, 이롭게는, 적어도 80%, 바람직하게, 적어도 90%, 및 가장 바람직하게, 적어도 95%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 바람직한 치료 유전자는 자살 및 면역자극성 유전자로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0153] 면역자극성 치료 유전자

[0154] 면역자극성 치료 유전자는 특이적 또는 비-특이적 방식으로 면역계 또는 이펙터 세포를 자극시킬 수 있는 폴리펩티드를 코딩한다. 본 발명과 관련하여 적합한 면역자극성 단백질의 예로는 제한 없이 시토카인, 특히 바람직하게는, 인터루킨 (예컨대, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-24), 케모카인 (예컨대, CXCL10, CXCL9, CXCL11), 인터페론 (예컨대, IFNɣ, IFN알파), 종양 괴사 인자 (TNF), 콜로니 자극 인자 (예컨대, GM-CSF, G-CSF, M-CSF...), APC (항원 제시 세포)-노출된 단백질 (예컨대, B7.1, B7.2 등), 성장 인자 (형질전환 성장 인자 TGF, 섬유모세포 성장 인자 FGF, 혈관 내피 성장 인자 VEGF 등), 부류 I 또는 II의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 성분, 아폽토시스 유도제 또는 억제제 (예컨대, Bax, Bcl2, BcIX...), 세포분열 억제제 (p21, p16, Rb...), 면역독소, 면역 회피 기전의 차단제, 예컨대, 면역 체크포인트 억제제 (상기 억제제는 차단 펩티드, 항체 또는 관련된 생물학적 종, 예컨대, 단일 도메인 항체 또는 항체 단편일 수 있음), cGAS 등을 포함한다.

[0155] 자살 유전자

[0156] "자살 유전자"라는 용어는 약물 전구체를 세포독성 약물로 전환시킬 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자를 지칭한다. 적합한 자살 유전자의 대표적인 예로는 티미딘 키나제 (TK), 티미딜레이트 키나제, 시토신 데아미나제 (CD아제) 및 우라실 포스포리보실 트랜스퍼라제 (UPRT아제)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0157] CD아제 및 UPRT아제는 원핵생물 및 하등 진핵생물에 존재한다 (그러나, 포유동물에는 존재하지 않는다). CD아제는 외인성 시토신이 가수분해 탈아미노화에 의해 우라실로 형질전환되는 피리미딘 대사 경로에 관여한다. CD아제는 또한 시토신의 유사체, 즉, 5-플루오로시토신 (5-FC) 프로드럭을 탈아미노화시켜, UPRT아제에 의해 5-플루오로-UMP (5-FUMP)로 전환되었을 때, 고도의 세포독성을 띠는 5-플루오로우라실 (5-FU)을 형성한다. 유전자 서열 및 코딩된 효소는 예컨대, 전문 데이터 뱅크 (SWISSPROT EMBL, 진뱅크, 메들라인(Medline) 등)에서 공개적으로 이용가능하다. 효모 UPRT아제 및 CD아제, 특히, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 의해 코딩된 것 (FUR1 유전자; Kern et al., 1990, Gene 88: 149-57)이 특히 바람직하다. S. 세레비시아에(*S. cerevisia*) CD아제, 및 UPRT아제의 처음 35개의 잔기가 결실된, 말단절단된 UPRT아제의 융합물을 코딩하는 FCU1 자살 유전자 (FCY1::FUR1[Delta] 105 융합물) (아미노산 서열은 WO2009/065546의 서열 식별자 서열 번호: 1에 기술되어 있다)가 특히 관심의 대상이 된다.

[0158] 본원에서 사용하기 위한 치료 유전자는 독립적으로 당업자에게 공지된 다수의 방법 (예컨대, 클로닝, PCR 증폭, DNA 셔플링, 화학적 합성)에 의해 및 임의의 이용가능한 공급원 (예컨대, 당업계에 기술된 생물학적 물질, 예컨대, cDNA, 게놈 라이브러리, 바이러스 게놈 또는 이를 포함하는 것으로 공지된 임의의 선행 기술의 벡터)으로부터 당업자가 이용가능한 서열 데이터 및 본원에 제공된 서열 정보를 이용하여 생성될 수 있고, 이어서, 신생에피토프-코딩 핵산 분자(들)와 동일한 위치에 (예컨대, MVA의 결실 III에), 또는 또 다른 위치에 통상의 분자 생물학 기술에 의해서 재조합 폭스바이러스에 적합하게 삽입될 수 있다.

[0159] ***약제학적 조성물***

[0160] 한 실시양태에서, 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신은 치료 유효량의, 본원에 기술된 (또는 본원에 기술된 방법에 따라 수득된) 재조합 폭스바이러스 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 조성물 형태이다.

[0161] "약제학적으로 허용되는 비히클"이라는 용어는 포유동물 및 특히, 인간 대상체에서의 투여와 적합성을 띠는, 임의의 모든 담체, 용매, 희석제, 부형제, 애주번트, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 흡수제 등을 포함하는 것으로 의도된다.

[0162] "치료 유효량"은 본 발명에 따라 치료받은 대상체에서 하기에서 언급되는 것 중 적어도 하나를 포함하는 대상체의 임상 상태를 관찰가능하게 개선시키는 데 필요한 재조합 폭스바이러스의 양에 상응한다.

[0163] 이러한 치료 유효량은 폭스바이러스의 특징 (바이러스 유형, 생체이용성 및 용량), 질환의 중증도 및 과정 (예를 들어, 암 등급), 대상체 본인 (연령, 성별, 임상 병력, 일반적인 건강 상태 등), 바이러스 제제 중 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제의 성질, 및 치료 방식 (투여 경로, 투여 빈도, 공동 투여되는 약제 타입 등)을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 폭스바이러스의 적절한 투여량은 의사에 의해 관련된 환경을 고려하여, 예를 들어, 바이러스 투여에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고, 그에 따라 투여량을 조정함으로써 통상적으로 결정되고, 적합화될 수 있다 (추가의 가이던스를 위해, Remington,; The Science and Practice of Pharmacy; Gennaro ed., Pharmaceutical Press, London, UK; 예컨대, 22nd Edition 또는 후속 발행판 참조).

[0164] 예시 목적으로, 개별 용량으로 적합한 치료 유효량은 사용되는 폭스바이러스 및 정량적 기술에 따라 대략 10^5 내지 대략 10^{13} vp (바이러스 입자), iu (감염 단위) 또는 pfu (플라크 형성 단위)로 달라질 수 있다. 일반 가이던스로서, 대략 10^6 pfu 내지 대략 10^{11} pfu, 더욱 바람직하게, 대략 10^7 pfu 내지 대략 $5x10^9$ pfu인 개별 용량이 본 발명과 관련하여 특히 적절하고; 더욱더 바람직하게, 대략 $5x10^7$ pfu 내지 대략 10^9 pfu인 용량 (예컨대, $5x10^7$ 내지 $6x10^8$, $6x10^7$ 내지 $5x10^8$, $7x10^7$ 내지 $4x10^8$, $8x10^7$ 내지 $3x10^8$, $9x10^7$ 내지 $2x10^8$ pfu)이 인간 용도로는 편리하고, 재조합 폭스바이러스의 대략 10^8을 포함하는 개별 용량이 바람직하다. 개별 용량은 국부 투여(들), 예컨대, 종양내 주사인 경우에는 2 내지 20배 감량될 수 있다. 샘플에 존재하는 바이러스의 양은 통상적인 적정 기술에 의해, 예컨대, 허용 세포 (예컨대, BHK-21 또는 CEF)의 감염 후 플라크 개수를 계수하여, 면역염색하여 (예컨대, 항-바이러스 항체 이용; Caroll et al., 1997, Virology 238: 198-211), A260 흡광도 (vp 역가)를 측정하여, 정량적 면역형광 (iu 역가)에 의해, 또는 특이적 바이러스 프라이머 및 프로브를 이용하여 qPCR에 의해 측정될 수 있다.

[0165] 본 발명과 관련하여, 냉동 (예컨대, -70℃, -20℃), 냉장 (예컨대, 4℃) 또는 주변 (예컨대, 20-25℃) 온도에서의 제조 및 장기간 보관 (즉, 적어도 6개월 동안) 조건하에서의 바이러스 안정성을 보장하기 위해 액체이거나

또는 냉동 건조된, 다양한 제제가 구상될 수 있다. 재조합 폭스바이러스는 이롭게는 인간용 또는 동물용으로 적절한 희석제 중에 배치된다. 적합한 희석제의 대표적인 예로는 멸균수, 생리 식염수 (예컨대, 염화나트륨), 링거액, 글루코스, 트레할로스 또는 사카로스 용액, 행크스 용액, 및 다른 생리 균형 염 수용액을 포함한다.

[0166] 소망하게는, 개인 맞춤형 암 백신 조성물은 인간용으로 적합하게 완충처리된다. 완충제, 예컨대, TRIS (트리스(히드록시메틸)메틸아민), TRIS-HCl (트리스(히드록시메틸)메틸아민-HCl), HEPES (4-2-히드록시에틸-1-피페라진에탄술폰산), 포스페이트 완충제 (예컨대, PBS; Na_2HPO_4 및 KH_2PO_4의 혼합물; Na_2HPO_4 및 NaH_2PO_4의 혼합물), TEA (트리에탄올아민), EPPS (N-(2-히드록시에틸)-피페라진-N'-3-프로판술폰산), TRICINE (N-[트리스(히드록시메틸)-메틸]-글리신) 및 중탄산염 완충제가 생리적 pH 또는 약간 염기성인 pH (예컨대, 대략 pH 7 내지 대략 pH 9)를 유지시키는 데 특히 적절하다. 완충제 (예컨대, TRIS-HCl)는 바람직하게, 10 내지 50 mM의 농도로 존재한다.

[0167] 삼투압을 확실히 적절하게 하기 위해 1가 염 또한 포함하는 것도 유익할 수 있다. 이러한 1가 염은 특히 NaCl 및 KCl로부터 선택될 수 있고, 바람직하게, 상기 1가 염은 특히, 10 내지 500 mM 농도의 NaCl이다.

[0168] 필요할 경우, 암 백신 조성물은 또한 저온에서의 보관을 촉진시키기 위해 동결보호제 또한 포함할 수 있다. 적합한 동결보호제로는 제한 없이, 예를 들어, 0.5 내지 20% (중량 g/부피 L, w/v로 지칭) 및 바람직하게, 5 내지 15% (w/v)으로 다양한 농도의, 바람직하게는 약 10%의 수크로스, 트레할로스, 말토스, 락토스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함한다. 동결건조된 제제의 경우, 진공 건조 및 냉동 건조 단계 동안 재조합 폭스바이러스를 보호하기 위해서는 고분자량의 중합체, 예컨대, 덱스트란 또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이 존재하는 것이 특히 적합하다 (예컨대, WO03/053463; WO2006/0850082; WO2007/056847; WO2008/114021, WO2014/053571 참조).

[0169] 예시 목적으로, NaCl 및/또는 당을 포함하는 완충처리된 제제는 특히 폭스바이러스의 보존을 위해 적합하다 (예컨대, 사카로스 5% (W/V), 글루탐산나트륨 10 mM, 및 NaCl 50 mM을 포함하는 트리스 10 mM pH 8; 또는 글리세롤 (10%) 및 NaCl을 포함하는 포스페이트 완충처리된 염수).

[0170] ***치료적 용도 및 치료 방법***

[0171] 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신은 특히 암 치료, 및 특히, 전이성 암 및 재발 위험이 높은 암 치료에 적합하다. 그러므로, 본 발명은 또한 대상체에서 암 치료를 위한, 또는 그의 재발을 예방하기 위한 개인 맞춤형 암 백신 (예컨대, 폭스바이러스 조성물) 및 상기 치료 목적의 개인 맞춤형 암 백신의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 암 치료용 또는 그의 재발 예방용의 약제 제조를 위한 본원에 기술된 개인 맞춤형 암 백신 또는 그의 조성물에 관한 것이다.

[0172] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 데, 또는 그의 재발을 예방하는 데 충분한 양으로 상기 대상체에게 개인 맞춤형 암 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.

[0173] 본 발명과 관련하여 치료될 수 있는 암의 대표적인 예로는 골암, 간암, 췌장암, 위암, 결장암, 식도암, 구인두암, 폐암, 두부경부암, 피부암, 흑색종, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 유방암, 직장암, 항문 부위 암, 전립선암, 림프종, 내분비계 암, 갑상선암, 연조직 육종, 만성 또는 급성 백혈병, 방광암, 신장암, 중추 신경계 (CNS) 암, 신경교종 등을 포함한다. 본 발명은 특히 고형 종양 치료에 적절하다. 본 발명은 또한 전이성 고형암, 또는 높은 재발 위험과 연관된 암을 비롯한, 진행암 치료에 특히 유용하다. 본원에 기술된 방식에 따라 치료되는 데 바람직한 암으로는 뇌암, 예컨대, 예를 들어, 성상세포종(astrocytoma), 배아성 종양(embryonal tumor), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 중추 신경계 비정형 유기형/간상 종양(central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumor), 두개인두종(craniopharyngioma), 뇌실막세포종(ependymoma), 신경교종(glioma) 및 교모세포종(glioblastoma) 뿐만 아니라, 두부경부암을 포함한다. 본원에 기술된 방식에 따른 치료를 위한 다른 유형의 암은 폐암, 및 특히, NSCLC이고, 선암종(adenocarcinoma), 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma) 및 대세포 암종(large cell carcinoma)이 특히 바람직하다. 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신으로 치료되는 데 적합한 또 다른 암은 난소암이다.

[0174] 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신의 용도 또는 그의 사용 방법에 의해 제공되는 유익한 효과는 기준선 상태와 비교하여, 또는 본원에 기술된 방식에 따라 치료되지 않았다면 예상되는 상태와 비교하여, 관찰가능한 임상 상태의 개선으로 입증될 수 있다. 임상 상태의 개선은 전형적으로 의사, 또는 다른 숙련된 건강관리 직원에 의해 임의의 관련된 임상 측정에 의해 쉽게 사정될 수 있다. 본 발명과 관련하여, 치료적 이익은 (투여 중단 후 1 또는 2개월 동안) 일시적일 수 있거나, (수개월 또는 수년 동안) 지속적일 수 있다. 임상 상태의 자연적인 과

정은 대상체마다 상당히 달라질 수 있는바, 치료적 이익은 치료받는 각 대상체에서 관찰되지만, 유의적인 수의 대상체에서 관찰되어야 할 필요는 없다 (예컨대, 두 군 사이의 통계학상 유의적인 차이는 당업계에 공지되어 있는 임의의 통계학적 검정, 예컨대, 터키(Tukey) 파라미터 검정, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정, 맨 및 휘트니(Mann and Whitney)에 따른 U 검정, 스튜던츠 t 검정, 윌콕슨(Wilcoxon) 검정 등에 의해 결정될 수 있다).

[0175] 특정 실시양태에서, 상기 치료적 이익은 본 발명에 따라 치료받은 대상체에서의 하기: 종양 성장, 증식, 및 전이의 억제 또는 저속화, 종양 침윤 (종양 세포의 이웃 조직에의 확산)을 예방 또는 지연, 종양 병변 개수 감소; 종양 크기 축소, 전이 개수 또는 범위 감소, 전체 생존율 (OS) 연장, 무진행 생존 (PFS) 증가, 관해 기간 증가, 질환 상태 안정화 (즉, 비악화), 질환 재발 예방, 또 다른 치료 및 특히 또 다른 면역요법에 대하여 더욱 우수한 반응 제공, 삶의 질 개선 및/또는 항-종양 반응 (예컨대, 비-특이적 (선천성) 및/또는 특이적, 예컨대, 세포독성 T 세포 반응) 유도 중 하나 이상의 것과 상관관계를 가질 수 있다

[0176] 예컨대, 혈액 검사, 생물학적 체액 및 생검 분석 뿐만 아니라, 의료 영상 기술과 같이, 임상적 이익을 사정하는데 적절한 측정이 의료 실험실 및 병원에서 통상적으로 수행되며, 다수의 키트가 상업적으로 이용가능하다. 이는 투여 이전에 (기준선), 및 치료 동안 다양한 시점에, 및 치료 중단 후에 수행될 수 있다.

[0177] 개인 맞춤형 암 백신 또는 그의 조성물의 투여

[0178] 통상의 투여 경로들 중 임의의 것이 적용가능하며, 비경구적 경로가 바람직하다. 비경구적 경로는 주사 또는 주입 투여용으로 의도되며, 전신 뿐만 아니라, 국소 경로를 포함한다. 특히 적합한 투여 경로로는 제한 없이, 정맥내 (정맥 내로), 혈관내 (혈관 내로), 동맥내 (동맥 내로), 진피내 (진피 내로), 피하 (피부하), 근육내 (근육 내로), 복강내 (복막 내로), 뇌내 (뇌 내로) 및 종양내 (종양 또는 그에 가까운 부위 내로) 경로 뿐만 아니라, 난절법을 포함한다. 주입은 전형적으로 정맥내 경로 또는 종양내로 (큰 종양에서) 이루어진다. 점막 투여 또한 본 발명에 의해 고려되고, 제한 없이, 경구/소화관, 비내, 기관내, 비인두, 폐내, 질내 또는 직장내 경로를 포함한다. 국소 투여는 피부 또는 조직의 표면에 직접 적용된다 (예컨대, 점안제; 점이제 등). 치료하고자 하는 종양이 기도 및 폐에 있는 경우에는 특히 흡입 또한 구상될 수 있다. 개인 맞춤형 암 백신 또는 그의 조성물은 바람직하게, 환자에게 정맥내, 피하, 근육내 또는 종양내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0179] 투여는 표준 니들 및 시린지, 또는 전달을 촉진 또는 개선시킬 수 있는 당업계에서 이용가능한 임의의 장치, 예를 들어, 카테터, 전기 시린지, 쿼드라퓨즈(Quadrafuse) 주사 니들, 니들이 없는 주사 장치 (예컨대, 바이오젝터(Biojector) TM 장치), 주입 펌프, 스프레이 등을 비롯한 장치를 이용할 수 있다. 근육내 투여를 촉진시키는데 전기천공 또한 실행될 수 있다. 국소 투여는 또한 경피 수단 (예컨대, 패치, 마이크로니들 등)을 사용하여 수행될 수 있다.

[0180] 개인 맞춤형 암 백신은 단일 용량으로 또는 더욱 바람직하게, 장기간에 걸쳐 다회 용량으로 투여될 수 있다. 본 발명과 관련하여, 휴지기 이후에 반복되는 순차적 투여 사이클을 통해 진행될 수 있다. 각 바이러스 투여 사이의 간격은 수시간 내지 6개월 (예컨대, 24h, 48h, 72h, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 등)일 수 있다. 간격은 또한 규칙적일 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수 있다. 용량은 상기 기술된 범위 내에서 각 투여시마다 달라질 수 있다. 예시 목적으로, 바람직한 치료 계획은 임상적 이익이 관찰될 때까지는 대략 1 또는 2주 간격으로 및 그 이후 매 1 내지 6개월마다 10^7 내지 $5x10^9$ pfu의 재조합 MVA를 1 내지 10회 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회) 투여하는 것을 포함한다.

[0181] 조합 요법

[0182] 본원에 기술된 방법 및 치료적 용도의 추가 실시양태에서, 개인 맞춤형 암 백신은 상기 언급된 암 치료에서 유용성을 갖는 하나 이상의 추가의 항암 요법/요법들과 함께 투여될 수 있다. 특히, 추가의 항암 요법/요법들은 수술, 방사선요법, 화학요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 독소 요법, 면역요법 및 시토카인 요법으로 구성된 군으로부터 선택된다. 이러한 추가의 항암 요법/요법들은 표준 관행에 따라 본 발명의 개인 맞춤형 암 백신 이전, 이후, 또는 본질적으로 그와 동시에, 또는 그 사이 사이에 산재된 방식으로 대상체에게 수행된다.

[0183] 구체적인 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 수술과 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 개인 맞춤형 암 백신은 종양의 부분적 또는 국소적인 외과적 적출 이후에 (예컨대, 예를 들어, 절제된 구역 내 국부 적용에 의해) 투여될 수 있다.

[0184] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 방사선요법과 함께 사용될 수 있다. 당업자는 적절한 방사선 요법

프로토콜 및 파라미터를 쉽게 공식화할 수 있다 (예를 들어, Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co 참조; 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 적절한 적합화 및 변형 이용). 암 치료에서 사용될 수 있는 방사선의 유형은 당업계에 널리 공지되어 있고, 전자 빔, 선형 가속기로부터의, 또는 방사성 선원, 예컨대, 코발트 또는 세슘으로부터의 고에너지 광자, 양성자, 및 중성자를 포함한다. 방사성 동위 원소에 대한 조사량 범위는 매우 다양하고, 이는 방사성 동위 원소의 반감기, 방사선 방출 강도 및 유형, 및 신생물성 세포에 의한 흡수에 의존한다. 연장된 기간 (3 내지 6주) 동안의 규칙적인 X선 선량, 또는 높은 단일 용량이 본 발명에 의해 고려된다.

[0185] 본 발명의 어떤 실시양태에서, 개인 맞춤형 암 백신은 암 치료를 위해 현재 이용가능한 화학요법과 함께 사용될 수 있다. 적합한 화학요법제의 대표적인 예로는 제한 없이, 알킬화제, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, parp 억제제, 백금 유도체, 티로신 키나제 수용체의 억제제, 시클로포스파미드, 항대사물질, DNA 손상제 및 항유사분열제를 포함한다.

[0186] 추가 실시양태에서, 개인 맞춤형 암 백신은 면역치료제, 예컨대, 항-신생물성 항체 뿐만 아니라, siRNA 및 안티센스 폴리뉴클레오티드와 함께 사용될 수 있다. 대표적인 예로는 다른 것들 중에서도 특히, 특정 면역 체크포인트를 차단하는 모노클로날 항체, 예컨대, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-LAG3 등 (예컨대, 이필리무맙, 트레멜리무맙, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 피딜리주맙, AMP-224MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559 등), 표피 성장 인자 수용체를 차단하는 모노클로날 항체 (특히, 세툭시맙, 파니투무맙, 잘루투무맙, 니모투주맙, 마투주맙, 트라스투주맙 (허셉틴(Herceptin)™) 등) 및 혈관 내피 성장 인자를 차단하는 모노클로날 항체 (특히, 베바시주맙 및 라니비주맙)를 포함한다.

[0187] 추가 실시양태에서, 개인 맞춤형 암 백신은 애주번트와 함께 사용될 수 있다. 적합한 애주번트의 대표적인 예로는 제한 없이, TLR3 리간드 (Claudepierre et al., 2014, J. Virol. 88(10): 5242-55), TLR9 리간드 (예컨대, CpG, 예컨대, ODN1826 (Fend et al., 2014, Cancer Immunol. Res. 2, 1163-74) 및 리테니모드 (Litenimod) (Li28) (Carpentier et al., 2003, Frontiers in Bioscience 8, e115-127; Carpentier et al., 2006, Neuro-Oncology 8(1): 60-6; EP 1 162 982; US 7,700,569 및 US 7,108,844) 및 PDE5 억제제, 예컨대, 실데나필 (US 5,250,534, US 6,469,012 및 EP 463 756)을 포함한다.

[0188] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 치료받지 않는 대상체와 비교하여 치료받은 대상체에서 생존 기간을 예컨대, 적어도 3개월만큼 연장시킨다. 대안적으로, 본 발명의 방법은 상기 종양에 대한 T 세포 반응 (CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 반응)을 발생시킨다.

[0189] 개인 맞춤형 암 백신 및 하나 이상의 추가의 항암 요법의 투여는 수분 내지 수주 범위의 간격을 두고 수행될 수 있다. 예를 들어, 대상체에게 재조합 폭스바이러스 및 추가의 항암 요법을 순차적으로, 또는 그 사이 사이에 산재된 방식으로 제공될 수 있지만, 동일한 기간 내에 상기 두 용법을 병용 투여하는 것 또한 고려된다. 치료 과정은 의사에 의해 통상적으로 결정될 수 있고, 다양한 프로토콜이 본 발명에 의해 포함된다. 예를 들어, 수술 및 화학요법/방사선요법 이후에 개인 맞춤형 암 백신의 1 내지 10회 투여가 수행될 수 있다. 추가로, 치료 과정 이후에, 치료 주기(들) 반복 이전에 항암 치료를 수행하지 않는 기간이 존재하는 것이 고려된다.

[0190] 상기 인용된 특허, 공개문헌, 및 데이터베이스 엔트리의 개시내용은 모두 그 전문이 본원에서 참조로 구체적으로 포함된다. 본 발명의 다른 특징, 목적, 및 이점은 설명 및 도면으로부터, 및 청구범위로부터 자명해질 것이다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 입증하기 위해 도입된 것이다. 그러나, 본 개시내용에 비추어 볼 때, 당업자는 개시된 구체적인 실시양태가 본 발명의 정신 및 범주로부터 벗어남 없이, 변형될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0191] **실시예**

[0192] **물질 및 방법**

[0193] Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY 또는 후속 발행판)에 상세하게 설명된 일반 유전 공학 및 분자 클로닝 기술에 따라, 또는 시판용 키트 사용시, 제조사의 권고 내용에 따라 하기 기술되는 구축물을 수행한다. PCR 증폭 기술은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press에 의해 발행된 PCR protocols-A guide to methods and applications, 1990 참조).

[0194] 재조합 MVA 생성

[0195] 신생에피토프의 상이한 융합물을 코딩하는 합성 유전자 및 백시니아 프로모터를 진아트(Geneart: 독일 레겐스부르크)에 의해 합성하였다. 서열을 인간 코돈 사용에 최적화시키고, ATG 출발 코돈 앞에 코작(Kozak) 서열(ACC)을 부가하였다. 추가로, 폭스바이러스 벡터에서의 발현에 유해한 TTTTTNT, GGGGG, CCCCC인 일부 모티브는 배제시켰다.

[0196] *다중에피토프 구축물: MVATG19022 및 MVATG19023 생성*

[0197] MVATG19022는 5개의 상이한 항원: FCU1, b-gal, MUC1, HPV-16 E7 및 HPV-16 E1로부터 기원하는 5개의 펩티드의 융합물을 코딩하는 발현 카세트를 함유한다. 모든 펩티드는 C57bl/6 T 세포 에피토프를 포함하는 27량체이다. 더욱 구체적으로, 펜타토프 융합물은 5'에서 3'으로 FCU1 펩티드 (서열 번호: 1), b-Gal 펩티드 (서열 번호: 2), HPV-16 E1 펩티드 (서열 번호: 3), HPV-16 E7 펩티드 (서열 번호: 4) 및 MUC1 펩티드 (서열 번호: 5)를 포함하며, 융합 폴리펩티드의 최적의 프로세싱 및 에피토프 제시를 위해 융합물의 N-말단에, 펩티드 사이에 및 마지막 펩티드 뒤에 10량체 GS 링커가 존재한다. 검출을 촉진시키기 위해, 융합물의 C-말단에 태그 서열, Flag 태그 (DYKDDDDK; 서열 번호: 6)를 부가하였다. 펜타토프 융합물 (서열 번호: 7)을 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 제어하에 배치시켰다.

[0198] MVATG19023은, 광견병 당단백질로부터 수득된 신호 펩티드 (서열 번호: 9)가 N-말단에 부가되어 있는, 동일한 펜타토프 융합물을 코딩하는 발현 카세트를 함유한다. 변형된 펜타토프 융합물 (서열 번호: 10)을 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 제어하에 배치시켰다.

[0199] 각 펜타토프 융합물에 상응하고, 백시니아 전달 플라스미드와 상동성인 약 30 bp 서열로 둘러싸여진 DNA 단편을 합성 방법에 의해 생성하였다. *Not*I 및 *Bgl*II에 의해 절단된 백시니아 전달 플라스미드 pTG18626에 진아트® 스트링즈™(GeneArt® Strings™) DNA 단편을 인-퓨전(In-Fusion) 클로닝(인-퓨전 HD 클로닝 키트, 클론테크(Clontech))에 의해 삽입하여 각각 pTG19022 및 pTG19023을 수득하였다.

[0200] MVA 전달 플라스미드, pTG18626은 전달하고자 하는 뉴클레오티드 서열이 MVA 게놈의 결실 III에서 상동성 재조합에 의해 삽입될 수 있도록 디자인된 것이다. 이는 MVA 결실 III를 둘러싸는 측접하는 서열 (BRG3 및 BRD3)이 클로닝된, 플라스미드 pUC18로부터 기원한 것이다 (Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847).

[0201] 상동성 재조합은 그의 결실 III 내로 mCherry 형광성 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 모체 MVA (MVA mCherry)를 사용하여 수행되었다. MVA mCherry의 이점은 초기의 출발 MVA mCherry 바이러스 (모체 바이러스)에 의해 감염된 것으로부터 발현 카세트를 성공적으로 통합시킨 재조합 바이러스에 의해 감염되는 세포를 분화시킨다는 점이다. 실제로, 결실 III 내에 발현 카세트가 성공적으로 재조합되고, 바이러스 플라크가 백색으로 보이는 경우, mCherry 유전자를 제거한다.

[0202] 백시니아 바이러스에서는 재조합이 비교적 빈번한 이벤트이지만, 재조합 플라크 중 단 1-5%만이 삽입된 DNA를 함유한다. 그러므로, 상동성 재조합의 효능을 증가시키기 위해, 엔도뉴클레아제에 의해 절단하는 추가 단계를 첨가하였다. 예를 들어, CRISPR-CAS9 시스템을 사용하여 구체적으로 MVA 중 mCherry 유전자에서 이중가닥 파단을 생성하고, 이로써, 재조합 MVA 선택 효율을 증가시킬 수 있다 (예컨대, 바이러스 플라크 중 일반적으로 10-50%가 발현 카세트를 함유한다). MVA가 세포질에서 복제된다면, mCherry 서열에 특이적인 gRNA를 함유하는 pgRNA와 함께, Yuan et al. (2015, J. Virol. doi:10.1128)에 기술된 바와 같이, NLS (핵 국재화 신호)가 없는 Cas9 효소 (pCas9 플라스미드)를 제공하도록 권고된다.

[0203] 1차 닭 배아 섬유모세포 (CEF)에서의 상동성 재조합에 의해 MVATG19022 생성을 수행하였다. CEF를 11 또는 12일된 SPF 부화란 (찰스 리버(Charles River))으로부터 단리시키고, 글루타민 4 mM으로 보충되고, 최종 농도 40 mg/L로 젠타마이신을 함유하는 배양 배지 중에서 배양하였다. CEF를 MVA 감염 이전에 24 또는 48 h 동안 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 10^8 CEF 세포를, 2 mM L-글루타민으로 보충되고, 최종 농도 40 mg/L로 젠타마이신을 함유하는 또 다른 배양 배지 중에서 2시간 동안 모체 mCherry-코딩 MVA를 이용하여 MOI 0.02로 감염시켰다. 감염된 세포를 트립신으로 처리하고, 10^7 세포를 (아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucelofector) 기술에 따라) 2 ㎍의 pTG19022로 뉴클레오펙션에 의해 형질감염시키고, 필요에 따라 pCAS9 및 pgRNA로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 6-웰 플레이트로 옮기고, 37℃에서 2일 동안 인큐베이션시켰다. 감염 및 형질감염된 세포를 수거하고, 플라크 단리를 위해 사용하였다. 연속 희석액을 사용하여 실온에서 30분 동안 CEF 단층을 감염시켰다. 60 mm 배양 디쉬에 플레이팅된 2 x 10^7 세포 CEF를 500 ㎕의 각 희석액으로 감염시켰다. 30분 후, 1% 아가로스를 함

유하는 5 ml 배양 배지 층을 단층 세포 상에 오버레이시켰다. 이어서, 배양 디쉬를 5% CO_2 대기하에 37℃에서 96 h 동안 인큐베이션시켰다. 1% 아가로스 및 0.008% 뉴트럴 레드를 함유하는 배양 배지의 새로운 층 (5 mL)을 중첩시켜 현미경 검사에 의한 플라크 검출을 촉진시켰다. 선택된 백색 플라크를 채취하고, 500 ㎕의 PBS에 넣고, -20℃에서 냉동시켰다. 냉동된 플라크를 이용하여 6-웰 세포 배양 플레이트에서 실온에서 30분 동안 CEF 단층 세포를 감염시킴으로써 바이러스 증폭을 수행하였다. 30분 후, 2 ml의 배양 배지를 첨가하고, 감염된 세포를 5% CO_2 대기하에 37℃에서 인큐베이션시켰다. 72 h 후, 디쉬의 전체 내용물을 수거하였다 (증폭 1). 임의적으로, F175 플라스크에서 제2의 증폭 단계를 수행할 수 있다. 이러한 경우, 100 ㎕의 증폭된 플라크를 10 mL의 PBS 중에 희석시키고, 이를 이용하여 실온에서 30분 동안 2개의 배양 플라스크 (약 $7x10^7$ 세포를 함유하는 F175) 중의 신선한 CEF를 감염시켰다. 20 mL의 배양 배지를 첨가하고, 감염된 세포를 5% CO_2 대기하에 37℃에서 72h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 증폭 2를 수거하였다. 모체 MVA에 의한 발현 카세트의 존재 및 오염의 부재를 PCR에 의해 확인하였다. 이 모든 프로세스는 단 3주만에 수행될 수 있었다.

[0204] MVATG19022 또한 수개의 F500 플라스크를 이용하여 임상전 실험을 위해 대규모로 제조할 수 있다. 먼저, CEF를 글루타민 4 mM으로 보충되고, 최종 농도 40 mg/L로 젠타마이신을 함유하는 적합한 배지 중에서 배양하고, 감염 전 48h 동안 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 상기 기술된 바와 같이 증폭 2 벌크로 감염시켰다. 5% CO_2 하에 37℃ 이하 (예컨대, 34-35℃)에서 72h 내지 96h 동안 바이러스 증폭을 수행하였다. 이어서, 감염된 세포 및 배지를 펠릿화하고, 냉동시켰다. 하이 스피드(High Speed) 균질화기 (SILVERSON L4R)를 이용하여 조 수확물을 파쇄시키고, 그에 대해 (예컨대, WO2007/147528에 기술된 바와 같이) 정제 프로세스를 수행하였다. 간략하면, 용해된 바이러스 제제를 여과에 의해 정화시키고, 접선 유동 여과 (TFF) 단계에 의해 정제시킬 수 있다. 정제된 바이러스를 적합한 바이러스 제제화 완충제 (예컨대, 5% (w/v) 사카로스, 50 mM NaCl, 10 mM 트리스/HCl, 10 mM 글루탐산나트륨, pH 8) 중에 재현탁시켰다.

[0205] 상기 기술된 바와 같이, 상동성 재조합에 의해 CEF에서 MVATG19023 바이러스 생성을 수행하고, 제조하였다.

[0206] *CT26 신생펩티드 구축물: MVATG19030 및 MVATG19038 생성*

[0207] MVATG19030은 각각의 것이, 서열이 Kreiter et al. (2015, Nature, 520: 692-6)에 기술되어 있는 5개의 CT26 신생펩티드의 융합물 (펜타토프)을 코딩하는 것인 2개의 발현 카세트를 함유한다. 펜타토프의 검출을 촉진시키기 위해, 각 펜타토프의 C-말단에 태그 서열을 각각, 펜타토프 1의 경우에는 Flag 태그 (DYKDDDDK; 서열 번호: 6), 및 펜타토프 2의 경우에는 c-myc 태그 (EQKLISEEDL; 서열 번호: 11)를 부가하였다. 태그부착된 펜타토프 1 (서열 번호: 12)은 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 제어하에 배치시킨 반면, 태그부착된 펜타토프 2 (서열 번호: 13)는 pH5R 프로모터 (서열 번호: 14)의 제어하에 배치시켰다.

[0208] MVATG19038은, 광견병 당단백질의 신호 펩티드 (서열 번호: 9)가 펜타토프 1의 N-말단에 부가되어 있고, 홍역 F 당단백질의 신호 펩티드 (서열 번호: 15)가 펜타토프 2의 N-말단에 부가되어 있는 것인, 동일한 펜타토프 융합물을 코딩하는 2개의 발현 카세트를 함유한다. 변형된 펜타토프 1 (서열 번호: 16)은 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 제어하에 배치시킨 반면, 변형된 펜타토프 2 (서열 번호: 17)는 pH5R 프로모터 (서열 번호: 14)의 제어하에 배치시켰다.

[0209] 적합한 제한 부위에 의해 분리되어 있는 2개의 발현 카세트에 상응하고, 백시니아 전달 플라스미드와 상동성인 약 30 bp 서열로 둘러싸여진 DNA 단편을 합성 방법에 의해 생성하였다. *SnaB*1에 의한 제한 후, *Not*I 및 *Bgl*II에 의해 분해된 백시니아 전달 플라스미드 pTG18626에 단편을 인-퓨전 클로닝(인-퓨전 HD 클로닝 키트, 클론테크)에 의해 삽입하여 각각 pTG19030 및 pTG19038을 수득하였다.

[0210] 상기 기술된 바와 같이, 상동성 재조합에 의해 CEF에서 MVATG19030 및 MVATG19038 바이러스 생성을 수행하였다.

[0211] *인간 신생펩티드 구축물: MVATG19111 생성*

[0212] MVATG19111은 7개의 신생펩티드 (헵타토프)를 함유하는 제1 융합물; 6개의 신생펩티드 (헥사토프)를 함유하는 제2 융합물, 및 5개의 신생펩티드 (펜타토프)를 함유하는 제3 융합물인, 3개의 융합물에 배치되어 있는 총 18개의 인간 신생펩티드를 코딩하는 3개의 발현 카세트를 함유한다. 18개의 코딩된 신생펩티드들 대부분 29개의 아미노산으로 구성되었고, 중앙 위치에 돌연변이를 포함하였으며, 단, 그 중 4개는 예외이며, 이는 각각, 그의 N-말단에 위치하는 돌연변이를 갖는 19개의 아미노산 신생펩티드 (NP1), 그의 C-말단에 위치하는 돌연변이를 갖는 21개의 아미노산을 함유하는 신생펩티드 (NP18), 본원에 정의된 바와 같이, 중앙 위치에 돌연변이를 갖되, C-말

단 측접 서열에 3개의 아미노산 결실을 포함하는 26개의 아미노산을 함유하는 신생펩티드 (NP10), 및 프레임시프트 돌연변이로부터 생성된 76개의 아미노산의 신생펩티드 (NP15). 각 융합물에서, 신생펩티드는 융합 폴리펩티드의 최적의 프로세싱 및 에피토프 제시를 위해 5-아미노산 링커에 의해 분리되었다. 4개의 상이한 링커: GSGSG, SGSGS, GSTSG 및 SGTGS가 사용되었다. 폭스바이러스 제조 프로세스 동안의 반복을 막고, 재조합 이벤트를 제한하기 위해 링커 서열 코돈을 축퇴시켰다.

[0213] 펩티드 융합물의 검출을 촉진시키기 위해, 각 융합물의 C-말단에 태그 서열을 각각, 헵타토프의 경우에는 HA 태그 (YPYDVPDYA; 서열 번호: 18), 헥사토프의 경우에는 HSV 태그 (QPELAPEDPED; 서열 번호: 19), 및 펜타토프의 경우에는 VSV 태그 (YTDIEMNRLGK; 서열 번호: 20)를 부가하였다. ER을 통한 프로세싱을 증진시키기 위해 신호 펩티드를 각 신생펩티드 융합물의 N-말단에 부가하였다. 광견병 당단백질로부터 수득된 신호 펩티드 (서열 번호: 9)를 헵타토프 및 펜타토프의 N-말단에 부가하였고, 홍역 F 당단백질로부터 수득된 신호 펩티드 (서열 번호: 15)는 헥사토프의 N-말단에 부가하였다.

[0214] 다양한 프로모터를 사용하여 신생펩티드 융합물의 발현을 제어하였는데, 이는 각각 pH5R 프로모터 (서열 번호: 14)는 헵타토프의 발현을, pB2R 프로모터 (서열 번호: 21)는 헥사토프의 발현을, 및 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)는 펜타토프의 발현을 구동시켰다.

[0215] 적합한 제한 부위에 의해 분리되어 있는 3개의 발현 카세트에 상응하고, 백시니아 전달 플라스미드와 상동성인 약 350 bp 서열로 둘러싸여진 DNA 단편을 합성 방법에 의해 생성하여 pTG19111을 수득하였다.

[0216] 상기 기술된 바와 같이, 상동성 재조합에 의해 CEF에서 MVATG19111 바이러스 생성을 수행하였다.

[0217] *인간 신생펩티드 구축물: pTG19247 생성*

[0218] 각각이 10개의 신생펩티드를 코딩하는 3개의 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 구축물 pTG19247을 생성하였다. 30개의 신생펩티드의 풀을 그의 예측 면역원성에 기초하여 공개적으로 이용가능한 환자 데이터세트 (연구 PRJEB3132, 인간 폐 선암종 샘플 및 그의 정상적인 상대물의 엑솜 서열분석)로부터 선택하였다. 예시 목적으로, 아미노산 서열은 서열 번호: 60, 61 및 62에 제공되어 있다. 각 카세트는 (광견병 및 홍역 F 당단백질로부터 수득된) 신호 서열을 포함하고, 각각 pH5R, pB2R 및 p11k7.5 프로모터의 제어하에 배치되어 있다. 융합물의 구축을 촉진시키기 위해, 선택된 신생펩티드 사이에 링커를 포함시키지 않았다. 상기 개시된 프로세스에 따라 상동성 재조합에 의해 CEF에서 상응하는 바이러스 생성을 수행하였다. 그러나, 5% 미만의 낮은 비율로 백색 플라크가 수득되었고, 백색 플라크의 PCR 분석 결과, 신생펩티드 융합물을 보유하는 재조합 MVA의 생성은 부재하는 것으로 나타났다 (백색 플라크는 가능하게는 mCherry 서열에서의 돌연변이로부터 생성된다).

[0219] 신생펩티드 발현 및 웨스턴 블롯 분석

[0220] 4 x 10^6 CEF 세포를 6-웰 플레이트 중에서 신생펩티드 융합물을 코딩하는 다양한 MVA를 이용하여 MOI 0.2로 감염시켰다. MVATGN33.1 공 벡터를 음성 대조군으로서 사용하였다. 24시간 후, 배지를 폐기하고, 세포를 300 ㎕/디쉬의, β-메르캅토에탄올(5% V:V)을 함유하는 트리스-글리신-SDS 2 X 완충제 (참조 번호: LC2676; 노벡스(Novex))로 용해시켰다. 이어서, 용해물을 초음파처리하고, 95℃에서 5 min 동안 가열하였다. 크라이테리언 프리캐스트(Criterion Precast) 겔 시스템 (바이오래드(Biorad))를 사용하여 프리캐스트된 4-15% 크라이테리언 겔에서 20 ㎕의 세포 용해물을 전기영동시켰다. 전기영동 후, PVDF 막 (트랜스-블롯® 터보TM 트랜스퍼 시스템 (Trans-blot® TurboTM Transfer System) (#170-4155, 바이오래드)) 위로 단백질을 옮겨 놓았다. HRP-항-TAG 항체를 이용하여 면역검출을 수행하였다. 하기 항체: 모노클로날 항-FLAG M2, HRP 항체 (시그마(Sigma), A8592), HA Tag 모노클로날 항체, HRP (써모피셔(Thermofisher), 26183-HRP), VSV-G Tag 폴리클로날 항체, HRP (써모피셔, PA1-26564), 염소 폴리클로날 항-HSV 태그 항체, HRP (압캠(Abcam), 19392), 이들 각각의 1/2000 희석액을 막에 적용시켰고, 모노클로날 항-cMyc, HRP 항체 (노벡스 46-0709)의 1/5000 희석액을 사용하였다. 아머샴(Amersham) ECL 프라임 웨스턴 블롯팅 시약 (GE 헬쓰케어(GE Healthcare), RPN2236)을 사용하였을 때, 면역-복합체가 나타났고, 바이로-래드로부터의 몰레큘러 이미저 케미DOC™ XRS(Molecular Imager ChemiDOC™ XRS)를 이용하여 분석하였다.

[0221] ELISpot 검정법

[0222] *플레이트 제조*

[0223] 플레이트 (밀리포어(Millipore), MSIPS4W10)를 에탄올 35% (15 ㎕/웰)로 1분 동안 전처리하고, 멸균수 (200 ㎕

/웰)로 5회 세척하였다. 웰을 100 ㎕의 15 ㎍/ml 항-마우스 IFNɣ 항체 (맙테크(Mabtech), AN18, 3321-3-1000; PBS 중 희석)로 코팅하고, +4℃에서 밤새도록 또는 주말 동안 인큐베이션시켰다. 실험 당일, 플레이트를 멸균 PBS (200 ㎕/웰)로 5회에 걸쳐 세척하고, 37℃에서 적어도 1 h 동안 완전 배지 (CM) 200 ㎕/웰로 포화시켰다.

[0224] *샘플 제조*

[0225] 신선한 비장 림프구를 이용하여 생체외 Elispot을 수행하였다. 각 실험을 위해, 각 군의 5마리의 동물로부터 비장을 수집하고 풀링시켰다. 비장을 4 mL의 완전 배지 (CM: RPMI 10% FCS 또는 X-비보(X-Vivo) (마우스가 종양을 보유하는 경우)) 중에 수집한 후, 6-웰 플레이트에서 70 ㎛ 세포 스트레이너를 통해 시린지 플런저로 분쇄시켰다. 수득된 비장세포 현탁액을 CM 중에서 2배로 희석시키고, 4 mL의 림포라이트(Lympholyte)®-M 분리 세포 배지 (씨더레인(Cedarlane), 참조 번호: CL5035) 위에 놓고, 실온에서 20분 동안 1500 g로 원심분리시켰다. 간기 함유 림프구를 수집하고, 10 mL의 RPMI1640 배지 중에서 2회 세척하였다 (실온에서 5분 동안 400 g로 원심분리). 림프구를 2 mL의 RBC 용해 완충제 (BD 파름라이즈(BD PharmLyse), BD 바이오사이언스(BD BioScience), 참조 번호 555899) 중에 재현탁시키고, 실온에서 5 내지 15분 동안 인큐베이션시켜 적혈구 (RBC)를 용해시켰다. CM중에서 1회 세척한 후 (실온에서 5분 동안 400 g로 원심분리), 림프구를 1 mL의 CM 중에 재현탁시키고, 벡크만 쿨터(Beckman Coulter)의 ≪ Z2 쿨터 입자 계수 및 크기 분석기 ≫를 이용하여 계수하였다. CM을 이용하여 세포 농도를 1 x 10^7 세포/mL로 조정하였다.

[0226] *검정법*

[0227] 먼저, 플레이트를 비워 포화 배지를 제거하고, 모든 웰에 50 ㎕ CM을 첨가하였다. CM 중 4 ㎍/mL인 50 ㎕의 각 펩티드 또는 펩티드 풀(즉, 풀의 경우, 각 펩티드의 농도는 0.4 ㎍/mL), 또는 50 ㎕의 CM (음성 대조군)을 관련 웰 내로 첨가하였다 (사전 정의된 피펫팅 계획에 따라 수행; 각 조건은 4중으로 시험하였다). 양성 대조군으로서, 50 ㎕의 20 ㎍/mL의 콘카나발린 A(Concanavalin A) (ConA)를 첨가하였다. 다음으로, 100 ㎕의 각 림프구 현탁액 (1 x 10^6 세포)을 웰에 첨가하고 (단, 예외적으로, T8V 웰에는 오직 3 x 10^5 세포만을 첨가), 플레이트를 5% CO_2 하에 37℃에서 18 h 내지 20 h 동안 인큐베이션시켰다.

[0228] 플레이트를 비워 세포를 제거하고, 플레이트를 PBS (200 ㎕/웰)로 5회 세척하고, 100 ㎕ 비오티닐화된 항-마우스 IFNɣ 모노클로날 항체 (맙테크, R4-6A2, 3321-6-1000; PBS 0.5% FCS 중 최종 농도 1 ㎍/mL)를 모든 웰에 분배하였다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시킨 후, PBS로 5회 세척하고, 엑스트라비딘-알칼리성 포스파타제(Extravidin-Phosphatase alkaline) (시그마, E236, PBS 0.5% FCS 중 1/5000e)를 각 웰에 첨가하였다 (100 ㎕/웰). 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, PBS로 5회 세척하고, 100 ㎕의 BCIP/NBT 기질 용액 (BCIP/NBT 태블릿, 시그마, B5655; 0.45 μM 여과)을 각 웰에 분배하였다. 양성 웰에서 뚜렷한 스폿이 관찰될 때까지 (약 5 내지 10분 후), 플레이트를 암실에서 실온에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 비우고, 수돗물로 철저히 세척하여 발색을 정지시켰다. 플레이트를 건조될 때까지 (적어도 1 h) 실온에서 뚜껑 없이 암실에 그대로 두었다.

[0229] *데이터 획득*

[0230] ELISpot 판독기 (CTL 이뮤노스폿(CTL Immunospot) 판독기, S5UV)를 이용하여 스폿을 계수하였다. ELISpot 판독기에 의해 제공되는 계수가 사진의 실제와 확실히 매칭될 수 있도록 하기 위해 각 웰에 대해 품질 관리를 수행하였다. 각각 4중으로 반복 수행된 실험에 대한 1 x 10^6 비장 림프구당 스폿 형성 단위 (sfu)의 평균 개수로서 결과를 표시하였다. Moodie et al. (2006, J. Immunol Methods 315: 121-32) 및 Moodie et al. (2010, Cancer Immunol Immunother doi 10.1007/s00262-010-0875-4)에 기술된 바와 같이 양성 결과(positivity)를 결정하였다.

[0231] **실시예 1: 다중펩티드 구축물을 이용한 면역화**

[0232] ***벡터 구축 및 제조***

[0233] 도 1에 도시된 바와 같이, 융합 폴리펩티드의 최적의 프로세싱 및 에피토프 제시를 위해 10-아미노산 GS 링커에 의해 서로 분리되어 있는, 다양한 항원으로부터 기원하는 5개의 펩티드의 융합물의 발현을 위해, 2개의 MVA 구축물, MVATG19022 및 MVATG19023을 생성하였다. 각 펩티드는 27량체이고, 검증된(validated) C57bl/6 T 세포 에피토프를 포함한다. 펜타토프 코딩 서열은 p11k7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 제어하에 배치되어 있고, 카

세트는 MVA 게놈의 결실 III 내로 삽입되어 있다. 더욱 구체적으로, 펜타토프 융합물은 5'에서 3'으로 FCU1 유래 펩티드 (서열 번호: 1), b-Gal 유래 펩티드 (서열 번호: 2), HPV-16 E1 유래 펩티드 (서열 번호: 3), HPV-16 E7 유래 펩티드 (서열 번호: 4) 및 MUC1 유래 펩티드 (서열 번호: 5)를 포함하며, FCU1 펩티드 앞에, 펩티드 사이에 및 MUC1 펩티드 뒤에 10량체 GS 링커가 존재한다. 발현 평가를 촉진시키기 위해 Flag 태그 (서열 번호: 6)가 C-말단에 존재한다. 추가로, MVATG19023은 그의 N-말단에 신호 펩티드가 존재한다는 점에서 MVATG19022와 구별된다. 예시 목적으로, 펜타토프 융합물은 MVATG19022의 경우, 서열 번호: 7에 기재된 아미노산 서열, 및 (신호 펩티드를 포함하는) MVATG19023의 경우, 서열 번호: 10에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0234] ***펩티드 발현 평가***

[0235] 발현 카세트에 포함된 태그 Flag 펩티드에 대한 항체를 사용하여, 각 벡터로 감염된 CEF에서 웨스턴 블롯에 의해 펩티드 융합물의 발현을 평가하였다. 간략하면, CEF를 MVATG19022 또는 MVATG19023을 이용하여, 또는 공 (즉, 비-재조합) MVA (음성 대조군으로서 TGN33.1)를 이용하여 MOI 0.2로 감염시키거나, 또는 감염시키지 않았다 (모의 대조군). 24h 후 세포를 수거하고, SDS-PAGE에 의해 세포 용해물을 분석하였다. 발현 생성물의 면역검출은 항-Flag 항체를 이용하여 검출하였다. 그 결과, MVATG19022 (19.7 kDa) 및 MVATG19023 (22.2 kDa)에 의해 지시된 펜타토프 융합물에 대하여 예상되는 크기에 상응하는 밴드가 검출된 것으로 나타났다. 예상대로, 공 MVA 또는 모의 완충제로 감염된 세포로부터 수득된 세포 용해물에서는 어떤 밴드도 검출되지 않았다.

[0236] 추가로, MVATG19022로 감염된 세포에서 검출된 것과 비교하였을 때, MVATG19023으로 감염된 것에서 수득된 밴드의 강도가 더 강한 것으로 입증된 바와 같이, 카세트가 펩티드 신호를 구비하였을 때, 더 높은 발현 수준이 관찰되었다.

[0237] ***면역원성 평가***

[0238] C57bl/6 마우스에서 ELIspot IFNɣ에 의해 상기 두 펜타토프-발현 벡터의 T 세포 반응을 발생시킬 수 있는 능력에 대해 시험하고, 전장의 항원을 코딩하는 MVA 벡터, 각각 MVATG9931 (MUC-1), MVATG15637 (FCU-1), MVATG18124 (β-갈락토시다제), MVATG8042 (HPV-16 E7) 및 MVATG17409 (HPV-16 E1)에 의해 발생된 반응과 비교하였다.

[0239] 더욱 구체적으로, MVATG9931 (그의 임상 명칭은 TG4010)은 MUC1 종양-연관 항원 및 인간 인터루킨 2 (IL-2)를 코딩하는 재조합 MVA이다. 진행형 전이성 비소세포 폐암 (NSCLC)에서 제1선의 표준 치료 화학요법과 조합된 TG4010은 2개의 상이한 무작위 대조군 2b상 임상 시험에서 효능을 보였다 (Quoix et al., 2011, The Lancet Oncol 12(12): 1125-33). MVATG15637은 프로드럭 플루오로시토신 (5-FC)을 세포독성 5-플루오로우라실 (5-FU) 및 5-플루오로우리딘-5'-모노포스페이트 (5-FUMP)로 각각 변환시키는 효모 CD아제 및 UPRT아제 효소를 발현하는 효모 기원의 *FCU1*을 코딩하는 재조합 MVA이다 (Husseini et al., 2017, Ann Oncol 28(1): 169-74). MVATG18124는 폭스바이러스 프로모터 pH5R의 제어하에 베타-갈락토시다제 항원을 코딩하는 박테리아 LacZ 유전자를 함유한다. MVATG8042 (그의 임상 명칭은 TG4001)는 돌연변이-불활성화된 인간 유두종 바이러스 (HPV) 16 E6 및 E7 종양단백질 및 인간 인터루킨-2를 코딩한다 (WO99/03885). MVATG17409는 천연 폴리펩티드의 복제 기능을 제거하도록 변형된 HPV-16 E1 항원을 코딩한다 (WO2008/092854).

[0240] 간략하면, 군당 5마리씩 C57bl/6 마우스에 상응하는 MVA를 1주 간격으로 2회에 걸쳐 (0일째 및 7일째) 피하로 주사하였다. 매회 주사를 위해, 2.5 x 10^7 pfu의 MVA (하기 완충제 중 100 ㎕: 트리스 10 mM [트리스(히드록시메틸)아미노메탄/HCl], 사카로스 5% (W/V), 글루탐산나트륨 10 mM, 염화나트륨 50 mM, pH 8)를 동물 옆구리에 투여하였다. 마지막 주사 후 1주 경과하였을 때 (14일째), 경부 탈구에 의해 마우스를 모두 희생시켰다. 림프구 단리를 위해 비장을 수집하고, 물질 및 방법에 기술되어 있는 바와 같이, Elispot (시토카인-특이적 효소 결합 면역스폿) 검정법에 의해 IFNɣ 생산 T 세포를 정량화하였다. 각각의 발현된 항원/펩티드에 대해 특이적인 하기 펩티드를 이용하여 자극을 수행하였다

[0241] I8L (HPV16 E1): IAYKYAQL (서열 번호: 50)

[0242] I8V (b-갈락토시다제):_ICPMYARV (서열 번호: 51)

[0243] R9F (E7 HPV16):_RAHYNIVTF (서열 번호: 52)

[0244] L15L-3 (MUC1): LSYTNPAVAATSANL (서열 번호: 53), 및

[0245] EG-15 (FCU-1): EKYHAAFPEVRIVTG (서열 번호: 54)

[0246] 및 대조군으로서:

[0247] T8V (MVA에 특이적): TSYKFESV (양성 대조군) (서열 번호: 55)

[0248] K9i-3 (RMA, 비관련): KNGENAQAI (서열 번호: 56)

[0249] G15H (PyMT, 비관련): GICLMLFILIKRSRH (서열 번호: 57)

[0250] 도 2a-e에 도시되어 있는 바와 같이, MVATG19022 및 MVATG19023에 의해 발현된 5개의 에피토프 중 4개에 대해 강력한 세포 반응이 검출되었다 (기술 배경상의 문제가 MUC-1 반응의 해석을 방해한다). 항-E1 반응을 제외하면, MVATG19023은 MVATG19022보다 더욱 우수한 반응을 제공하는 경향을 띤다. 펩티드 융합물을 소포체로 어드레싱하게 되면, 가능하게는 발현된 융합물을 세포 프로테아솜에 의한 분해로부터 보호할 수 있고, DC와 같은 전문 항원 제시 세포에 의해 포식되는 감염된 세포에의 이의 축적을 촉진시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

[0251] 중요하게는, MVATG19023으로 면역화시킨 후에 유도된 IFNγ 반응은 그 수준이 전장의 항원에 의해 제공된 반응에 필적하고, 항 E7 반응의 경우에는 더욱더 우수하다 (도 2c). 그러므로, MVA 백본에의 펩티드의 병치를 통해 본 반응을 감소시키는 면역우성 현상은 관찰되지 않으면서, 다양화된 면역 반응을 발생시킬 수 있다.

[0252] **실시예 2: CT26 신생펩티드 구축물을 이용한 면역화**

[0253] ***CT26 신생펩티드의 선택***

[0254] 예컨대 낮은 MHC 부류 I 결합 점수, CD8+ T 세포 에피토프 존재 (Kreiter et al., 2015, Nature 520 (7549): 692-6) 및 각 CT26 종양 세포주의 게놈 중의 단일 잔기 돌연변이의 존재와 같은, 당업계에 공지되어 있는 다양한 기준에 기초하여 MVA 구축물로의 발현을 위해 10개의 CT26 돌연변이화된 신생펩티드를 선택하였다 (아미노산 서열은 서열 번호: 22-31에 제시되어 있다). 각 신생펩티드는 27량체이고, 중앙 위치 (14번 위치)에 돌연변이를 포함하고, 최적의 프로세싱 및 에피토프 제시를 위해 10-아미노산 GS 링커에 의해 하기의 것으로부터 분리되어 있는 것이다.

[0255] ***벡터 구축 및 제조***

[0256] 2개의 MVA 구축물, MVATG19030 및 MVATG19038을 각각 두 융합물 (펜타토프)에 배열된 상기 기술된 CT26 신생펩티드의 발현을 위해 생성하였다. 제1 펜타토프 융합물은 p11K7.5 프로모터 (서열 번호: 8)의 전사 제어하에 배치되어 있고, 제2의 것은 pH5R (서열 번호: 14)의 제어하에 배치되어 있다. Flag 태그 (서열 번호: 6)는 제1 펜타토프 융합물의 C-말단에 존재하고, c-MYC 태그 (서열 번호: 11)는 제2 융합물의 단부에 존재한다. MVATG19038은 제1 펜타토프 융합물의 N-말단에 광견병 당단백질로부터 기원하는 신호 펩티드 (서열 번호: 9)가 존재하고, 제2 펜타토프 융합물의 N-말단에 홍역 F 당단백질로부터 기원하는 신호 펩티드 (서열 번호: 15)가 존재한다는 점에서 MVATG19030과 구별된다. 2개의 신생펩티드 융합물 카세트를 MVA 게놈의 결실 III 내로 삽입하였다. MVATG19030에서, 제1 및 제2 펜타토프 융합물은 각각 서열 번호: 12 및 서열 번호: 13에 기재되어 있는 바와 같은 (또는 도 3에 도시되어 있는 바와 같은) 아미노산 서열을 포함하는 반면, MVATG19038은 서열 번호: 16 및 서열 번호: 17에 기재되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0257] ***CT26 신생펩티드 발현 평가***

[0258] MVATG19030 및 MVATG19038로 감염된 CEF에서 웨스턴 블롯에 의해 CT26 신생펩티드 융합물의 발현을 평가하였다. 간략하면, CEF를 MVATG19030 또는 MVATG19038을 이용하여, 또는 공 (즉, 비-재조합) MVA (음성 대조군으로서 TGN33.1)를 이용하여 MOI 0.2로 감염시키거나, 또는 감염시키지 않았다 (모의 대조군). 24h 후 세포를 수거하고, SDS-PAGE에 의해 세포 용해물을 분석하였다. 발현 생성물의 면역검출은 발현 카세트에 포함된 Flag 및 c-MYC 태그에 대한 항체를 이용하여 검출하였다. 비-특이적 밴드는 항-MYC 항체로 강조표시되었지만, 이는 음성 대조군에도 존재하였다. 배경이 무엇이든지, MVATG19030 (두 펜타토프 모두 20.6 kDa) 및 MVATG19038 (제1 펜타토프의 경우, 23.1 kDa 및 제2 펜타토프의 경우, 23.5kDa)에 의해 지시된 신생펩티드 융합물에 대하여 예상되는 크기에 상응하는 두 항체 모두로 펜타토프가 검출되었다. 예상대로, (비록 배경 밴드가 상기 언급된 바와 같이 항-cMYC로 처리된 샘플에는 존재하였지만) 공 MVA 또는 모의 완충제로 감염된 세포로부터 수득된 세포 용해물에서는 어떤 특이적인 밴드도 검출되지 않았다.

[0259] 그러므로, 본 연구를 통해 감염된 세포에서의 두 신생펩티드 융합물의 발현이 확인된다. 실시예 1에서와 같이, 펩티드 신호의 존재가 발현에 긍정적인 영향을 주었고, MVATG19030으로 감염된 세포에서 검출된 것과 비교하였을 때, MVATG19038로 감염된 것에서 수득된 밴드의 강도가 더 강한 것으로 입증된 바와 같이, 펩티드 신호가 구

비된 신생펩티드 융합물의 수준이 더 높은 것으로 관찰되었다.

[0260] ***면역원성 평가***

[0261] Balb/c 마우스의 CT26 종양 모델에서 ELIspot IFNɣ에 의해 MVATG19030 및 MVATG19038의, 코딩된 CT26 신생펩티드에 대한 T 세포 반응을 발생시킬 수 있는 능력에 대해 시험하였다. 동물을 군당 5마리씩 처리하였다. Balb/c 마우스 중 절반은 0일째 종양 CT-26 MUC1 세포 (100 $\mu\ell$ 중 2 x 10^5 세포)를 이용하여 꼬리 정맥에 정맥내로 주사한 반면 (군 1-5), 동물 중 나머지 절반 (군 6-11)은 비처리 상태 그대로 두었다. MVA 주사는 2일 및 9일째에 100 $\mu\ell$의 앞서 기술된 바이러스 제제 완충제 중 1 x 10^7 pfu로 정맥내 경로를 통해 수행하였다. 마우스를 마지막 MVA 면역화 후 1주 경과하였을 때 (16일째) 희생시켰다. 림프구 단리를 위해 비장을 수집하고, 물질 및 방법에 상세하게 설명되어 있는 바와 같이 처리하였다. 돌연변이화된 CT26 신생펩티드 (서열 번호: 22 내지 31) 또는 그의 비-돌연변이화된 동족체 (서열 번호: 32 내지 41에 기술되어 있는 야생형 펩티드)를 이용하거나, 또는 돌연변이화된 CD8+ CT26 펩티드 (서열 번호: 42 내지 45에 기술되어 있는 것) 또는 야생형 CD8+ CT26 펩티드 (서열 번호: 46 내지 49에 기술되어 있는 것)를 이용하여 자극을 수행하였다. 취급하는 샘플의 개수를 감소시키기 위해 야생형 CT26 펩티드를 풀링한 반면, 돌연변이화된 CT26 펩티드는 개별적으로, 또는 펩티드 풀에서 사용하였다.

[0262] 도 4에 도시된 바와 같이, MVATG19030 및 MVATG19038 벡터를 이용한 면역화, 및 10개의 돌연변이화된 CT26 펩티드가 모인 풀을 이용한 자극 이후, 주사된 벡터 및 동물 모델 (CT26-MUC1 세포로 프라이밍되거나, 또는 그렇지 않은 동물)이 무엇이든, 높은 IFNɣ 반응이 발생하였다. 그에 반해, 10개의 야생형 CT26 펩티드의 풀을 이용한 자극 뿐만 아니라, 배지인 음성 대조군을 이용한 자극도 IFNɣ를 생산시키지 못한다.

[0263] 도 5는 CT26-MUC1 세포로 프라이밍되거나, 또는 그렇지 않은 마우스 모델 둘 모두에서 MVATG19030 및 MVATG19038을 이용한 면역화한 이후의, 돌연변이화된 펩티드 중 하나 (EH27m; 서열 번호: 30)에 대하여 발생된 IFNɣ 반응을 도시한 것이다. (프라이밍되거나, 또는 그렇지 않은 경우인) 두 경우 모두, 30 내지 60개의 스폿으로 다양한 반응이 발생한 반면, 그에 반해, 야생형 펩티드 (PE27WT 서열 번호: 37)를 이용한 자극은 IFNɣ 생산을 일으키지 못한다 (< 5개 스폿). 주목할 점은 신호 펩티드가 구비된 MVA 벡터 (MVATG19038) 이용시에 발생된 반응이, 융합물이 신호 펩티드를 도입하지 않은 것인 MVATG19030으로 수득된 반응보다 약간 더 높다는 것이다. 여기서 또한, 배지인 음성 대조군을 이용한 경우, 어떤 반응도 검출되지 않는다 (< 5개의 스폿).

[0264] 추가로, 도 6에 제시된 바와 같이, 돌연변이화된 펩티드 (EH27m)에 대한 반응은 항-마우스 MHCII 항체를 이용한 차단 이후에 억제되며, 이는 상기 반응이 CD4+-타입이라는 것을 시사하는 것일 수 있다.

[0265] 결론적으로, 본 결과는 인간 항암 요법을 위한 개인 맞춤형 암 백신의 실현가능성을 뒷받침하는 것이다.

[0266] **실시예 3: 인간 신생펩티드 구축물**

[0267] ***신생펩티드의 확인 및 선택***

[0268] 종양 특이적 체세포 돌연변이를 확인하기 위해 페어드-엔드(paired-end) 모드로 (2x150 bp) NSCLC를 앓는 환자의 종양 및 생식세포 계열 샘플의 전체 엑솜 서열분석 (WES)을 수행하였다. 정보를 위해, 서열분석 시설에 의해 FASTQ로 명명되는 표준 파일 포맷으로 원시 데이터가 제공된다. 각각의 서열분석 실행은 짧은 리드 서열 및 1 베이스당의 품질 점수인 Phred 점수를 제공하는 FASTQ 파일 생성으로 이어진다. 이는 염기 콜링 단계 동안의 예측 오류 확률에 기초한다 (Cock *et al.*, 2010, Nucl. Acid Res. 38(6): 1767-71). 페어드-엔드 서열분석에서, 각각이 라이브러리 단편의 단부에 상응하는 두 FASTQ 파일이 생성된다. 따라서, 생성된 파일은 품질 여과 단계 동안 페어드 상태 그대로 유지되어야 하고, 즉, 한쌍의 두 리드는 필터를 통과했어야 한다. 상기 여과 단계 동안 사정되는 기준은 주로 Phred 점수, 특히, 서열의 3' 단부에서의 것에 기초하는데, 이는 변이체 콜링 단계에 대해 정확한 정보를 유지하기 위하여 트리밍을 종종 필요로 한다 (Edgar and Flyvbjerg, 2015, Bioinformatics 31(21): 3476-82).

[0269] 이어서, 짧은 리드를 참조 게놈에 대해 정렬한다 (Li *et al.*, 2009, Bioinformatics 25(16): 2078-79). 이러한 맵핑 단계 후, 변이체 콜링 알고리즘을 이용하여 다양한 구조 변이, 예컨대, 단일-뉴클레오티드 변이체 (침묵 및 비-침묵 미스센스 돌연변이를 포함하는 SNV) 또는 참조 게놈과 환자 서열 사이의 작은 삽입 및 결실 (indels) (Danecek P. *et al.*, 2011, Bioinformatics 27(15): 2156-58; Nielsen *et al.*, 2011, Nature Reviews Genetics 12(6): 443-51)을 검출한다. 종양 및 대조군 조직으로부터의 샘플을 동시에 프로세싱하여 종양 특이적 돌연변이를 검출한다.

[0270] 이어서, 17량체의 돌연변이가 중앙에 위치하는 펩티드를 디자인하기 위해 가능할 경우, 돌연변이의 위치에 따라 단백질 수준에서 돌연변이를 평가한다. 이어서, 종양 트랜스크립톰으로부터의 데이터를 이용하여 이들 후보 펩티드를 발현 수준에서 평가한다 (Hundal et al., 2016, Genome Medecine 8(1): 11). 신생항원의 발현을 평가하기 위해 종양 트랜스크립톰을 RNA-Seq에 의해 페어드-엔드 모드 (2x150 bp)로 측정하였다. RNA-Seq 감수성에 기인하여, 리드 범위 심도가 3x 초과에 도달하였을 때, 유전자는 발현된 것으로 간주되었다. 백만 개당 맵핑된 리드의 총 개수 중 라이브러리 크기에 의해 조정된 특정 전사체에 대해 맵핑된 리드의 개수를 계수함으로써 맵핑 후 정량화 단계를 시작한다 (Wang et al., 2009, Nature Reviews Genetics 10(1): 57-63).

[0271] 따라서, 적어도 하나의 종양 특이적 돌연변이를 보유하는 (18개의 고유 유전자에 상응하는) 총 20개의 전사체가 확인되었다. 이에 기초하여, 18개의 종양 특이적 돌연변이를 선택하고, 18개의 신생펩티드를 디자인하였다.

[0272] 18개의 신생펩티드는 하기 **표 2**에 기술된 특징을 갖는다:

표 2

NSCLC를 앓는 환자에 대해 선택된 18개의 신생펩티드의 특징

신생펩티드	비-침묵 종양-특이적 돌연변이 유형	크기 (아미노산)	돌연변이 위치
NP1	미스센스	19	4
NP2	미스센스	29	15
NP3	미스센스	29	15
NP4	미스센스	29	15
NP5	미스센스	29	15
NP6	미스센스	29	15
NP7	미스센스	29	15
NP8	미스센스	29	15
NP9	미스센스	29	15
NP10	미스센스	26	15
NP11	미스센스	29	15
NP12	미스센스	29	15
NP13	미스센스	29	15
NP14	미스센스	29	15
NP15	프레임시프트	76	15-76
NP16	미스센스	29	15
NP17	미스센스	29	15
NP18	미스센스	21	15

[0273]

[0274] 선택된 18개의 신생펩티드 중:

[0275] · 이들 모두는 19 내지 76개의 크기를 갖는다.

[0276] · 17/18 (94%)은 미스센스 돌연변이에 기초하여 야생형 펩티드의 1개의 아미노산 변이를 초래하고, 1/18 (6%)은 프레임시프트 돌연변이를 갖는다.

[0277] 미스센스 보유 돌연변이화된 신생펩티드 중에서:

[0278] ○ 이들은 19 내지 29개의 아미노산의 크기를 갖고,

[0279] ○ 15/17 (88%)은 본원에 정의된 바와 같이 중앙에 위치하는 돌연변이를 갖고,

[0280] ○ 14/17 (83%)은 29개의 아미노산의 크기 및 중앙에 위치하는 돌연변이를 갖는다.

[0281] ***벡터 구축 및 제조***

[0282] 정보원으로서 상응하는 유전자의 유니프로트(Uniprot) 설명을 이용하여 각 펩티드에 대한 막통과 도메인 및 신호 펩티드 검색을 수행하였다. 신생펩티드 중 어느 것도 그의 각 단백질에서 막통과 또는 신호펩티드의 일부로서 알려져 있지 않았다. 유니프로트를 이용하여, 상기 펩티드와 연관된 공지된 기능을 검색하였다. 펩티드는 공지된 도메인 밖에 있거나, 또는 너무 짧아서 기능성 도메인을 형성하지 못했다. 7개의 신생펩티드 (헵타토프), 6개의 신생펩티드 (헥사토프) 및 5개의 신생펩티드 (펜타토프)를 함유하는 3개의 발현 카세트를 하기 규칙에 따라 디자인하였다:

[0283] · 신생항원 N-말단에 위치하는 미스센스 돌연변이를 포함하는 19량체 신생펩티드 NP1은 헵타토프 발현 카세트의 N 말단에 위치하였다.

[0284] · 같은 방식으로, 천연적으로 신생항원 C-말단에 위치하는 신생펩티드 NP18은 펜타토프를 코딩하는 발현 카세트의 C-말단에 위치하였다.

[0285] · 신생펩티드 NP10은 이황화 결합 형성에의 잠재적 관여에 기인하는 마지막 3개의 잔기가 단축되어 있었고, 어떤 폴딩도 선호하지 않고, 헥사토프 카세트 가운데에 배치되어 있었다.

[0286] · 마지막으로, 신생펩티드 NP13은 지니어스(Geneious) 소프트웨어에 의해 잠재적 막통과 나선을 형성할 수 있을 것으로 예측되었고, 따라서 헥사토프를 코딩하는 카세트의 말단에 배치되었다.

[0287] 신생펩티드는 융합 폴리펩티드의 최적의 프로세싱 및 에피토프 제시를 위해 5-아미노산 스페이서에 의해 분리되었다. 4개의 상이한 스페이서: GSGSG, SGSGS, GSTSG 및 SGTGS가 사용되었다. 상이한 링커 사이의 뉴클레오티드 동일성(%)을 감소시켜 본 구축에서 사용되는 17개의 링커 사이의 상동성 재조합의 위험을 감소시키기 위해 아미노산 서열 뿐만 아니라, 코돈 서열도 다르게 하였다. 신호 펩티드를 신생펩티드의 각 융합물의 N-말단에 융합시켜 폴리펩티드를 RE로 어드레싱하였다. 광견병 당단백질로부터 수득된 신호 펩티드는 헵타토프 및 펜타토프의 N-말단에 부가하였고, 홍역 F 당단백질 유래의 신호 펩티드는 헥사토프의 N-말단에 부가하였다.

[0288] 이들 3개의 카세트의 발현을 검출하기 위해, 바이러스 기원으로부터의 태그 (즉, 헵타토프, 헥사토프 및 펜타토프에 대하여 각각 HA (서열 번호: 18), HSV (서열 번호: 19) 및 VSV (서열 번호: 20) 태그)를 각 구축물의 C-말단에 부가하였다.

[0289] 3개의 신생펩티드 융합물 카세트를 MVA 게놈의 결실 III 내로 삽입하여 MVATG19111을 수득하였다. 더욱 구체적으로, 제1 카세트는 255개의 잔기의 헵타토프 융합물을 코딩하고, 제2 카세트는 239개의 잔기의 헥사토프 융합물을 코딩하고, 제3 카세트는 243개의 잔기의 펜타토프 융합물을 코딩한다. MVATG19111을 물질 및 방법에 기술되어 있는 바와 같은 프로세스를 통해 CEF에서 상동성 재조합에 의해 제조하였다. 이러한 최적화된 프로토콜을 통해 단 3주만에 재조합 MVA를 생성하고, 한주 추가시 정제된 벌크를 제조할 수 있었다.

[0290] ***발현 평가***

[0291] MVATG19111로 감염된 CEF에서 웨스턴 블롯에 의해 환자의 신생펩티드 융합물의 발현을 평가하였다. 간략하면, CEF를 MVATG19111을 이용하여, 또는 공 (즉, 비-재조합) MVA (음성 대조군으로서 TGN33.1)를 이용하여 MOI 0.2로 감염시키거나, 또는 감염시키지 않았다 (모의 대조군). 24h 후 세포를 수거하고, SDS-PAGE에 의해 세포 용해물을 분석하였다. 발현 생성물의 면역검출은 발현 카세트에 포함된 HA, HSV 및 VSV 태그에 대한 항체를 이용하여 검출하였다. 그 결과, MVATG19111에 의해 지시된 각 신생펩티드 융합물에 대하여 특정 밴드가 검출된 것으로 나타났다. 밴드의 겉보기 크기는 각 융합물에 대한 예상 크기보다 약간 더 컸다: 헵타토프의 경우, 약 38 kDa (예상 크기: 28.2 kDa), 헥사토프의 경우, 약 30 kDa (예상 크기: 25.5 kDa), 및 펜타토프의 경우, 약 36 kDa (예상 크기: 25.9 kDa). 차이는 번역 후 변형에 기인할 수 있다. 예상대로, 공 MVA 또는 모의 완충제로 감염된 세포로부터 수득된 세포 용해물에서는 어떤 밴드도 검출되지 않았다.

[0292] ***면역원성 평가***

[0293] 디자인에 의해, MVATG19111은 종양 특이적 돌연변이로부터의 인간 항원을 표적화한다. 그러므로, 이 백신의 면역원성을 평가하기 위해서는 인간화 뮤린 모델 사용이 요구된다. 인간 림프구 항원 (HLA)-A2.1 트랜스제닉 마우스 (HHD) 뮤린 모델은 인간 HLA A02*01 일배체형(haplotype)에 특이적인 면역 반응을 발생시킬 수 있는 가능성을 제공한다 (Firat et al. 1999, European Journal of Immunology 29(10): 3112-21). 추가로, 뮤린 HLA 분

자의 발현은 이 마우스에서는 파괴되어, 뮤린 특이적 면역 반응의 발생이 방지된다. HHD 마우스를 사용하여 백신의 면역원성을 평가하였다. 마우스는 1일 및 7일째 정맥내 주사에 의해 200 ㎕의 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS) 중 1.10^{7} pfu의 MVATG19111 백신 또는 MVA TGN33.1을 받았다. D14에 동물을 희생시키고, 비장세포를 수집하고, 분석시까지 냉동시켰다. IFN-γ ELISpot으로 IFN-γ 생산 세포의 개수를 측정하였다.

[0294] 간략하면, MVATG19111 또는 대조군 바이러스 MVATGN33.1로 백신접종을 받은 마우스로부터의 비장의 단일 세포 현탁액을 200 ㎕ 완전 배지 중 $5x10^{5}$ 세포/웰로 ELISPOT 플레이트 상에서 상이한 자극 조건하에 48시간 동안 배양하였다. 자극 조건은 양성 대조군 (MVA 펩티드 믹스), 음성 대조군 (5 ㎍/ml의 비관련 펩티드), 개별 펩티드, 또는 각각이 백신에서 발현된 항원 중 하나와 관련이 있는 것인 18개의 펩티드 풀 중 하나 (5 ㎍/ml의 중복 20량체 펩티드), 또는 비-돌연변이화된 인간 단백질에 상응하는 중복 펩티드를 포함하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 비색 방법을 이용하여 IFN-γ 생산 세포를 검출하고, 상업적으로 이용가능한 자동 소프트웨어를 이용하여 스폿을 계수하였다. 면역 반응은 스폿 개수가 분석 배경과 통계학적으로 상이할 때, 양성인 것으로 간주되었다.

[0295] MVATG19111 백신을 받은 동물에서, 18개의 조건 중 7개에서 양성 면역 반응이 나타났다. 더욱 구체적으로, 4개 조건은 모든 동물에서 고도의 면역원성을 보이고, 검출가능한 T 세포 반응을 유도한 반면, 나머지 3개는 오직 일부 동물에서만 면역원성을 보였다. 면역원성에서의 차이는 검정법 감도 또는 면역 표현형의 가변성과 관련이 있을 수 있다. 반응은 돌연변이화된 단백질로 제한되었고, 백신은 비-돌연변이화된 단백질에 대해서는 면역화를 유도하지 못했다. 대조군 바이러스 MVATGN33.1을 받은 대조군 동물에서는 어떤 반응도 관찰되지 않았다.

[0296] 추가로, 반응성 T 세포의 표현형을 특징화하기 위해, 앞서 기술된 바와 같이 (Puliaev et al., 2004, J. Immunol. 173(2): 910-9) 항-부류 II MHC의 존재하에서 또는 CD8 세포 고갈 후, 항-CD8 고갈 비드를 사용하여 고도로 면역원성인 펩티드에 대해 ELISPOT를 수행하였다. 반응은 CD8 고갈 및 MHC II 차단 후, 둘 모두에서 관찰되었고, 이는 MVATG19111이 부류 I (CD8) 및 부류 II (CD4) 매개 반응, 둘 모두를 유도할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0297] ***제조 및 치료적 용도***

[0298] 제조된 MVATG19111 벌크는 종양이 수득된 환자에게 투여하기 전 -80 또는 -20℃에서 보관되는 대략 10^{8} pfu의 개별 용량으로 분배될 수 있다.

[0299] **실시예 4: 신생에피토프 융합물에서 링커의 역할**

[0300] ***4.1 면역원성에 링커가 미치는 효과***

[0301] 먼저, 실시예 1에 기술된 MVATG19023 벡터로부터 출발하여, 링커의 길이 및 서열을 달리하면서 링커의 효과를 연구하였다. MVATG19023은 (융합물의 N-말단에서 C-말단 순으로) FCU1, β-갈락토시다제, HPV-16 E1, HPV-16 E7 및 MUC1로부터 기원하는 5개의 항원성 펩티드의 융합물을 코딩한다. 각 펩티드는 27량체이고, 27량체 중앙에 배치된, 검증된 C57bl/6 (b 일배체형) T 세포 에피토프를 포함하였으며, 단, Muc1의 경우, 에피토프는 항원의 마지막 15개의 C-말단 잔기에 상응한다 (하기 **표 3** 참조). 10개의 잔기 길이 (5x GS)의 링커가 각 펩티드의 N 및 C 말단에 존재하였고, 그 뿐만 아니라, 광견병 신호 펩티드가 융합물 N-말단에, 및 Flag 태그가 그의 C-말단에 존재하였다. 융합물은 p11k7.5 프로모터의 제어하에 배치되고, MVA의 결실 III에 삽입되었다.

표 3

각 27량체의 1차 구조 (여기서, 코딩된 에피토프는 (굵은체, 이탤릭체 및 밑줄체로) 강조표시되어 있다)

항원	27량체 서열 (*에피토프*)	에피토프 명칭
FCU1	CSKEGI***EKYHAAFPEVRIVTG***ALDRGL (서열 번호: 1)	EG-15 (서열 번호: 54)
β-gal	GGADTTATDI***ICPMYARV***DEDQPFPAV (서열 번호: 2)	I8V (서열 번호: 51)
E1 HPV16	YDNDIVDDSE***IAYKYAQL***ADTNSNASA (서열 번호: 3)	I8L (서열 번호: 50)
E7 HPV16	GPAGQAEPD***RAHYNIVTF***CCKCDSTLR (서열 번호: 4)	R9F (서열 번호: 52)
MUC1	YEKVSAGNGGSS***LSYTNPAVAATSANL***(서열 번호: 5)	L15L-3 (서열 번호: 53)

[0302]

[0303] MVATG19023에서, 동일한 10개의 잔기 링커가 각 에피토프 앞 및 뒤에 존재하였다. 발생할 수 있고, 부분적 또는 전체 카세트 결실을 유도할 수 있는 상동성 재조합 이벤트를 피하기 위해, 유전자 코드 축퇴성을 이용함으로써 각 링커 DNA 서열을 축퇴시키는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 이러한 서열 축퇴는 링커의 개수, 성질 및 길이에 의해 제한된다. 벡터화되는 에피토프의 개수가 클 경우 (예컨대, 10개 이상), 유전자 코드는 5x GS 링커를 이용하여 상동성 재조합을 막을 수 있을 정도로 충분한 DNA 다양성을 생성할 수 있게 하지 못한다. 따라서, 세린 (GAS 또는 GTS) 이외의 잔기인 더 작은 링커 (GSG)를 사용할 수 있고, 궁극적으로는 링커를 전혀 사용하지 않을 수 있는 가능성에 대해 조사하였다. CEP에서 바이러스를 생산하였다. 정화 후, 접선 유동 여과 (TFF)에 의해 바이러스를 정제하였다. 이로써, 하기 **표 4**에 예시된 MVATG190158, MVATG190159 및 MVATG190157이 생성된다.

표 4

본 연구에서 생성된 재조합 MVA의 특징

MVA	신호 펩티드	링커
MVATG19023	광견병	GSGSGSGSGS
MVATG19157	광견병	부재
MVATG19158	광견병	GSG
MVATG19159	광견병	GAS 또는 GTS

[0304]

[0305] 상기 3개의 구축물에 의해 유도된 면역원성을 ELISPOT에 의해 평가하고, 앞서 기술된 바와 동일한 면역화 조건에서 MVATG19023에 의해 제공된 것과 비교하였다.

[0306] ELISPOT 결과, 면역 반응은 MVATG19023, MVATG19158, MVATG19159 및 MVATG19157의 경우, 5개 중 4개의 에피토프 (L15L3, I8L, I8V 및 R9F)에 대해 거의 유사한 반면, EG15에 대한 반응은 10 잔기 링커를 함유하는 MVATG19023의 경우에 약간 더 높은 경향을 보인 것으로 나타났다.

[0307] 이러한 결과는 발현시키고자 하는 다양한 항원성 펩티드의 N 및 C 말단에의 링커의 존재, 성질, 길이가 상기 펩티드의 면역원성에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 것이다.

[0308] ***4.2 링커가 재조합 폭스바이러스 생성에 미치는 효과***

[0309] 링커의 존재 또는 부재 또한 (실시예 3에 기술된) pTG19111 벡터와 관련하여재조합 폭스바이러스를 생성할 수 있는 구축물의 능력에 대해 시험하였다. pTG19111과 동일한 신생펩티드 융합물을 포함하되, 어떤 링커도 포함하지 않는 추가의 플라스미드를 생성하였고, 이를 통해 pTG19264를 수득하였다. 본원에 기술된 바와 같은 형질

감염된 CEF 세포에서 링커 부재인 것 (pTG19264)과 5aa 링커 (pTG19111) 구축물을 재조합 MVA 바이러스 획득에 대해 비교하였고, 백색 플라크는 잠재적 재조합 MVA를 입증하는 것이고, 적색 플라크는 모체 (비재조합) 바이러스를 입증하는 것이다.

[0310] 하기 **표 5**에 제시된 바와 같이, 비록 두 구축물 모두 백색 플라크의 획득을 유도하였지만, 그럼에도 불구하고 그 비율은 링커를 함유하는 pTG19111 벡터의 경우에 더 높았다.

표 5

링커 존재 또는 부재가 생성에 미치는 효과

구축물					링커	백색 플라크(%)
	융합물	1	2	3		
TG19111	신생펩티드 개수	7	6	5	5 aa	21.7%
TG19264	신생펩티드 개수	7	6	5	부재	1.5%

[0311]

[0312] 모두 종합해 보면, 상기 결과들은 링커의 부재가, 비록 CEF 세포에서 생성되는 백색 플라크의 비율, 및 이로써, 재조합 MVA 생성을 음성적으로 변경시키기는 하지만, 면역원성에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 나타낸다. 그러므로, 필요할 경우, 벡터 구축물의 디자인을 촉진시키고, 이로써 유해한 상동성 재조합 이벤트의 위험을 감소시키기 위해서, 특히 10개 초과의 신생펩티드의 발현이 고려되지만 생성되는 재조합 폭스바이러스의 비율을 감소시킬 위험이 있는 구축물에서는 링커가 생략될 수 있다.

[0313] **실시예 5: 소수성 분석**

[0314] ***5.1 TM 세그먼트의 예측***

[0315] pTG19247 플라스미드와 관련하여 내부(intra) 또는 사이(inter)의 TM 세그먼트의 존재를 시험하였다. 상기 언급된 바와 같이, pTG19247은 각 융합물의 N-말단에 위치하는 신호 서열과 함께, 각각이 인간 폐 선암종으로부터 기원하는 10개의 신생펩티드 (그의 아미노산 서열은 서열 번호: 60, 61 및 62에 기재되어 있다)를 코딩하는 것인 3개의 발현 카세트를 보유한다 (연구 PRJEB3132). 구축을 촉진시키기 위해, 선택된 신생펩티드 사이에 링커를 포함하지 않았다. CEF에서 상기 개시된 프로세스에 따라 상동성 재조합에 의해 상응하는 MVA의 생성을 검정하고, 적색 플라크 대비 백색 플라크의 개수를 넘버링하였다. 5% 미만의 낮은 비율로 백색 플라크가 수득되었고, 백색 플라크의 PCR 분석 결과, 신생펩티드 융합물을 보유하는 재조합 MVA는 부재하는 것으로 나타났다.

[0316] TMHMM 예측 알고리즘을 이용하여 각 신생펩티드 융합물에서의 TM 서열의 예측을 수행하였다. 융합물 1에서의 TM 서열은 예측할 수 없었다. 그러나, 융합물 2에서는 각각 신생펩티드 1과 신생펩티드 2의 접합부 및 신생펩티드 7 및 신생펩티드 8의 접합부에서의 2개의 잠재적 펩티드간 TM 세그먼트가 확인되었다. 한편, 융합물 3에서, 더욱 구체적으로, 신생펩티드 2, 4 및 5 내에서 3개의 펩티드내 TM 세그먼트가 확인되었다.

[0317] 이어서, pTG19247과 동일한 신생펩티드 융합물 1, 신생펩티드 1 및 2 뿐만 아니라, 신생펩티드 7 및 8도 역위되어 있어 이들 펩티드간 TM 세그먼트의 억제를 허용하는 것인, 서열 번호: 63에 예시된 바와 같은 융합물 2 (따라서, 이 새 융합물 2는 N에서 C 순서로 신생펩티드 2, 신생펩티드 1, 신생펩티드 3, 신생펩티드 4, 신생펩티드 6, 신생펩티드 8, 신생펩티드 7, 신생펩티드 9 및 신생펩티드 10을 포함한다), 및 신생펩티드 2, 4 및 5가 제거되어 있는 것인, 서열 번호: 64에 예시된 바와 같은 융합물 3을 포함하는, pTG19258로 명명되는, TM이 없는 구축물을 생성하였다. 추가로, pTG19247에서 융합물 3을 구동시키는 데 사용되는 프로모터 p11K7.5는 pTG19258에서 p7.5K 프로모터에 의해 대체되었다. CEF 세포 형질감염시, 백색 플라크가 더 높은 비율로 수득되었다. 그러나, 20개의 백색 플라크의 단리 및 증폭 후에는 단 6개의 백색 플라크만이 남게 되었고, PCR 분석 결과, 모두가 mCherry가 돌연변이화된 모체 바이러스에 상응하는 것으로 나타났다 (그 중 어느 것도 재조합 바이러스에 상

응하지 않는다).

[0318] 각 신생펩티드 및 융합물의 소수성 및 친수도 점수를 결정함으로써 소수성의 영향을 추가로 조사하였다.

[0319] *5.2 소수성 분석*

[0320] 카이트 및 두리틀 방법을 이용하여 구축물 MVATG19111, pTG19247 및 pTG19258에 의해 코딩되는 모든 신생펩티드의 소수성 및 친수도 점수를 결정하는 소수성 분석을 수행하였다. MVATG19111에 의해 코딩된 3개의 융합물에 대한 결과는 하기 **표 6**에 기록되어 있다.

표 6

MVATG19111이 보유하는 각 신생펩티드 및 그의 융합물에 대하여 검출된 소수성 점수 및 친수도 점수

신생펩티드	소수성 점수	친수도 점수
NP1	-10.3	-0.51
NP2	-8.8	-0.30
NP3	-1.1	-0.038
NP4	-24.5	-0.845
NP5	-61.3	-2.114
NP6	-38.8	-1.338
NP7	-6.2	-0.214
전체 융합물 1	-151	-0.778
전체 융합물 1 + 링커	-170.3	-0.76
NP8	-12.8	-0.44
NP9	-31.1	-1.07
NP10	-9.6	-0.33
NP11	-32.2	-1.11
NP12	**14.5**	**0.5**
NP13	-2.7	-0.104
전체 융합물 2	-73.9	-0.42
전체 융합물 2 + 링커	-92	-0.45
NP14	-20	-0.690
NP15	-8.7	-0.3
NP16	-27.2	-0.938
NP17	-3.7	-0.176
NP18	-4.4	-0.058
전체 융합물 3	-64	-0.34
전체 융합물 3 + 링커	-79.5	-0.38

[0321]

[0322] 본 결과는 MVATG19111에 의해 코딩된 18개의 신생펩티드 중 17개가 만족스러운 소수성 점수 및 친수도 점수 (각각 음의 값 및 0.1 미만인 값)를 나타낸다는 것을 보여주는 것이다. 제2 융합물에 포함된 신생펩티드 12만이 오직 점수가 양의 값이었는데, 이는 이 특정 펩티드의 소수성 성질을 반영하는 것이다. 그럼에도 불구하고, 융합물 2는 음의 값인 그의 소수성 점수 (-74) 및 친수도 값 (-0.42)에 의해 반영되는 바와 같이, 여전히 친수성

그대로 유지되었다.

[0323] pTG19247 및 pTG19258에 의해 코딩된 신생펩티드 및 융합물에 대해 동일한 예측 연구를 수행하였고, 그 점수는 각각 하기 **표 7** 및 **8**에 기록되어 있다.

표 7

pTG19247이 보유하는 각 신생펩티드 및 그의 융합물에 대하여 검출된 소수성 점수 및 친수도 점수

신생펩티드	소수성 점수	친수도 점수
NP1 융합물 1	-7.7	-0.28
NP2 융합물 1	-15.2	-0.56
NP3 융합물 1	-22.3	-0.82
NP4 융합물 1	**3**	**0.11**
NP5 융합물 1	**7.3**	**0.27**
NP6 융합물 1	-19.6	-0.72
NP7 융합물 1	-24.6	-0.91
NP8 융합물 1	-18.1	-0.67
NP9 융합물 1	**23.1**	**0.85**
NP10 융합물 1	-24.7	-0.91.
전체 융합물 1	-98.8	-0. 36
NP1 융합물 2	-3.6	-0.13
NP2 융합물 2	**23.3**	**0.86**
NP3 융합물 2	-11.2	-0.41
NP4 융합물 2	**18.2**	**0.67**
NP5 융합물 2	**0.3**	**0.011**
NP6 융합물 2	-28.4	-1.05
NP7 융합물 2	-3.2	-0.119
NP8 융합물 2	-8.3	-0.346
NP9 융합물 2	-23.0	-0.85
NP10 융합물 2	**15.6**	**0.578**
전체 융합물 2	-20.3	-0.076
NP1 융합물 3	-1.9	-0.07
NP2 융합물 3	**46.4**	**1.72**
NP3 융합물 3	**1.2**	**0.044**
NP4 융합물 3	**21**	**0.778**
NP5 융합물 3	**37.6**	**1.393**
NP6 융합물 3	**14.2**	**0.526**
NP7 융합물 3	**4.9**	**0.181**
NP8 융합물 3	-13.0	-0.48
NP9 융합물 3	-13.2	-0.49
NP10 융합물 3	**36.3**	**1.34**
전체 융합물 3	**133.5**	**0.494**

[0324]

[0325] 양의 값인 소수성 점수 (133.5) 및 친수도 점수 (0.494)로 입증되는 바와 같이, 본 결과는 융합물 3의 고도로 소수성인 성질을 강조한다.

[0326] 상기 기술된 pTG19247의 TM 결실 버전에 상응하는 pTG19258과 관련하여 동일한 연구를 수행하였다. 융합물 1 및 2의 소수성 점수 및 친수도 점수는 표 7에 기록된 것과 동일하다 (두 벡터 모두 동일한 융합물을 보유하고, 융합물 2는 동일한 신생펩티드를 포함하되, pTG19258에서는 펩티드간 TM-세그먼트를 제거하기 위해 신생펩티드

1과 2, 및 7과 8이 순서가 역전되어 있다). **표 8**은 pTG19258의 융합물 3 (그의 pTG19247 상대물 대비 TM 함유 신생펩티드 2, 4 및 5가 결실된, 7개의 신생펩티드의 융합물)에 대한 소수성 점수 및 친수도 점수를 제공한다.

표 8

pTG19258이 보유하는 각 신생펩티드 및 융합물 3에 대하여 검출된 소수성 점수 및 친수도 점수

신생펩티드	소수성 점수	친수도 점수
NP1	-1.9	-0.07
NP3	**1.2**	**0.044**
NP6	**14.2**	**0.526**
NP7	**4.9**	**0.181**
NP8	-13.0	-0.48
NP9	-13.2	-0.49
NP10	**36.3**	**1.34**
전체 융합물 3	**28.5**	**0.151**

[0327]

[0328] 고도로 소수성이고, TM을 함유하는 신생펩티드 2, 4 및 5가 제거되기는 하였지만, pTG19258 융합물 3의 전체 점수화는 소수성 성질을 갖는 것으로 해석된다.

[0329] 그러므로, 추가의 구축물을 각각 생성하였다:

[0330] · 융합물 3이 결실된 버전의 pTG19258 (pTG19288로 명명).

[0331] · 제1 신생펩티드의 N 말단에 및 3개의 융합물에 포함된 각 신생펩티드 사이에 3개의 아미노산 링커를 포함하는 버전의 pTG19258 (pTG19267).

[0332] · pTG19267에서 제3 융합물이 제거된 것 (pTG19293).

[0333] · pTG19258에서의 제3 융합물이, 공개된 폐 선암종 데이터 뱅크로부터 선택되고 친수성이 예측되는(음의 값인 친수도 점수) 10개의 다른 신생펩티드를 함유하는 또 다른 융합물로 대체되고, 링커가 없거나 (pTG19290; 서열번호: 65), 또는 각 신생펩티드의 N 및 C 말단에 3개의 아미노산 링커를 가지는 것 (pTG19291).

[0334] · pTG19291에서 융합물 1이 제거된 것 (pTG19298).

[0335] 본원에 기술된 바와 같은 상기의 새로운 플라스미드 구축물에 의해 형질감염된 CEF 세포에서 재조합 MVA 바이러스의 획득을 검정하고, 모체 플라스미드 pTG19258과 비교하였다. 적색 플라크는 모체 (비재조합) 바이러스와 상관관계가 있고, 백색 플라크는 잠재적 재조합 MVA를 나타내는 인디케이션이다. 그러나, 비재조합 바이러스 (즉, 모체)와 재조합 바이러스 (mCherry 음성 또는 mCherry 양성, 후자의 것은 모체에 의한 재조합 플라크의 오염을 반영하는 것이다)를 구별하기 위하여 백색 및 적색 플라크 패널에 대한 추가의 PCR 분석이 요구된다. 결과는 도 8에 요약되어 있다.

[0336] 도 8에 제시되어 있는 바와 같이, pTG19258은 어떠한 재조합 MVA 바이러스의 생성도 유도하지 못했다. 비록 백색 플라크가 생성되기는 하였지만, TM이 없는 세그먼트를 본 구축물에서 확인할 수 있음에도 불구하고, PCR 분석에 의해서는 융합물을 보유하는 바이러스를 검출할 수 없었다 (그럼에도 불구하고, 융합물 3 점수는 양의 값을 갖는데, 이는 그의 소수성인 성질을 반영하는 것이다). 백색 플라크는 mCherry 마커 유전자에서 돌연변이화된 모체 바이러스에 기인하는 것이었다.

[0337] 각 융합물 카세트에서 신생펩티드 사이에의 링커 부가를 통해 융합물 3의 소수성 특징을 감소시킬 수 있었다 (친수도 점수는 0.151에서 0.08로, 값이 0.1 미만으로 감소되었다). 이러한 변형은 PCR 분석으로 확인되는 7개의 재조합 바이러스를 제공하는 CEF 세포에서 더 높은 비율의 백색 플라크 (13.3%)가 생성되었다는 것으로 해석되었다.

[0338] pTG19258에서 소수성 융합물 3을 10개의 친수성 신생펩티드 (친수도 점수 -0.52)로 만들어진 또 다른 융합물로 대체하는 것 또한 신생펩티드 융합물에 링커가 존재 (pTG19291)하든, 또는 부재 (pTG19290)하든 간에 재조합 MVA 바이러스 생성을 위해서는 유익하였고, 이로서 각각 7 및 6개의 재조합 바이러스가 생성되었다.

[0339] 각각 소수성에 대한 점수가 음의 값인 10개의 신생펩티드의 융합물을 단 2개만 남도록 융합물을 제거함으로써 백색 플라크의 비율은 16%로 증가하고, 재조합 바이러스의 회수도 증강되었다 (PCR에 의해 10 및 11개의 재조합체 확인).

[0340] 모두 종합해 보면, 상기 결과들은 하기에서 요약되는 바와 같이, 신생펩티드 융합물의 최적의 디자인을 알려주는 것이다:

[0341] (펩티드내 또는 펩티드간) 잠재적 TM-세그먼트의 제거;

[0342] (소수성에 대한 점수가 음의 값인) 더욱 친수성인 신생펩티드 선택 또는 (소수성에 대한 점수가 음의 값인) 소수성 신생펩티드의 개수를 예컨대, 40% 미만으로 감소;

[0343] 융합물(들)로 신생펩티드 배열;

[0344] 각 융합물의 N-말단에 신호 펩티드의 존재 권고;

[0345] 신생펩티드 사이 및 제1 신생펩티드의 N-말단에 3개의 아미노산 링커 (예컨대, 도 7에 예시되어 있는 것과 같은 GTS, GSG 또는 GAS)의 존재;

[0346] 6 내지 10개의 신생펩티드의 1 내지 3개의 융합물의 바이러스 게놈에의 도입.

[0347] **참고 문헌**

Acres and Bonnefoy, 2008, Expert Review of Vaccines 7, 889-93;
Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-10;
Anderson and Schrijver, 2010, Genes 1(1): 38–69;
Andreatta et al., 2015, Immunogenetics 67(11-12): 641-50;
Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365-96;
Bainbridge et al., 2010, Genome Biol.11:R62;
Boegel et al., 2015, Methods Mol Biol 1310: 247-51;
Caroll et al., 1997, Virology 238: 198-211;
Carpentier et al., 2003, Frontiers in Bioscience 8, e115-127;
Carpentier et al., 2006, Neuro-Oncology 8(1): 60-6;
Chakrabarti et al. 1997, Biotechniques 23: 1094-7;
Chu and Corey, 2012, Nucleic Acid Ther. 22: 271–4;
Claudepierre et al., 2014, J. Virol. 88(10): 5242-55 ;
Cock *et al.*, 2010, Nucl. Acid Res. 38(6): 1767-71;
Danecek P. *et al.*, 2011, Bioinformatics 27(15): 2156-58;
Edgar and Flyvbjerg, 2015, Bioinformatics 31(21): 3476-82;
EP 1 162 982;
EP 463 756;
Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28;
Farsaci et al., 2011, In Cancer Vaccines: From Research to Clinical Practice, Ed Bot; CRC Press, pp56-77;
Fend et al., 2014, Cancer Immunol. Res. 2, 1163-74;
Firat et al. 1999, European Journal of Immunology 29(10): 3112-21;
Gulley et al., 2008, Clin Cancer Res 14(10): 3060-9;
Guse et al., 2011, Expert Opinion Biol. Ther.11(5):595-608;
Hammond et al, 1997, J. Virol Methods 66: 135-8;
Hundal et al., 2016, Genome Medecine 8(1): 11;
Husseini et al., 2017, Ann Oncol 28(1): 169-74 ;
Kallol et al., 2003, J. Chromat. 1000: 637-55;
Kern et al., 1990, Gene 88: 149-57;
Kreiter et al. 2015, Nature, 520: 692-6 ;
Krogh et al., 2001, J. Mol. Biol. 305: 567-80;
Kumar and Boyle, 1990, Virology 179: 151-8;
Kyte and Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-32;

[0348]

Li *et al.*, 2009, Bioinformatics 25(16): 2078-79;
Maniatis et al. 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY;
Mayr et al., 1975, Infection 3: 6-14;
Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72: 1031-8;
Moodie et al. 2006, J. Immunol Methods 315: 121-32;
Moodie et al. 2010, Cancer Immunol Immunother doi 10.1007/s00262-010-0875-4;
Ng S.B. et al, 2009, Nature 461: 272–6 ;
Nielsen et al., 2010, Immunology 130(3): 319-28;
Nielsen *et al.*, 2011, Nature Reviews Genetics 12(6): 443-51;
Olivier et al., 2010, mAbs 2(4): 405-15;
Plotkin, 2008, Clin Infect Dis.47(3):401–9;
Quoix et al., 2011, The Lancet Oncology 12(12): 1125-33;
Relman, 2008, J Infect Dis. 198(1):4–5;
Rock et al., 2010, J. Immunol. 184(1): 9-15;
Rose et al., 1993, Ann. Rev. Biomol. Struc. 22: 381-415;
Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-51;
Sweet et al., 1983, J. Mol. Biol. 171: 479-88;
US 5,250,534;
US 5,972,597;
US 6,440,422;
US 6,469,012;
US 6,998,252;
US 7,108,844;
US 7,700,569;
US 5,879,924;
Wang et al., 2009, Nature Reviews Genetics 10(1): 57-63;
WO03/008533;
WO03/053463;
WO2005/007840;
WO2005/042728;
WO2006/0850082;
WO2007/056847;
WO2007/077256;
WO2007/147528;
WO2008/092854;

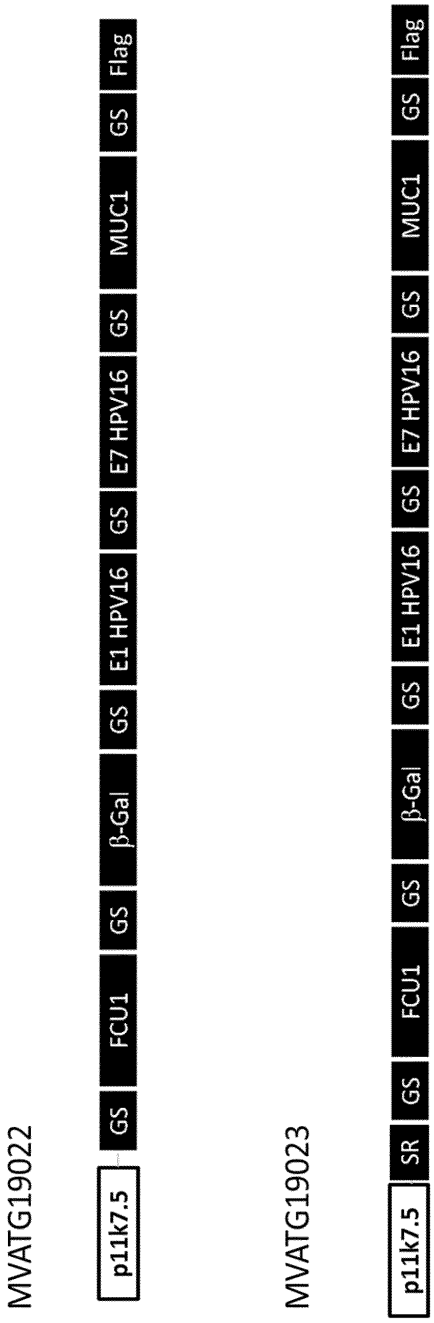
[0349]

WO2008/114021;
WO2008/129058;
WO2008/138533,
WO2009/004016;
WO2009/065546;
WO2009/065547;
WO2009/100521;
WO2010/130753;
WO2010/130756;
WO2012/001075;
WO2012/159754;
WO2013/022764;
WO2014/053571;
WO2015/175334;
WO2015/175340;
WO2016/187508;
WO2016/191545;
WO2016/207859;
WO97/02355;
WO99/03885;
Yuan et al., 2015, J. Virol 89, 5176-9, doi:10.1128;
Yuan et al., 2016, Viruses 8, 72, doi:10.3390 ;

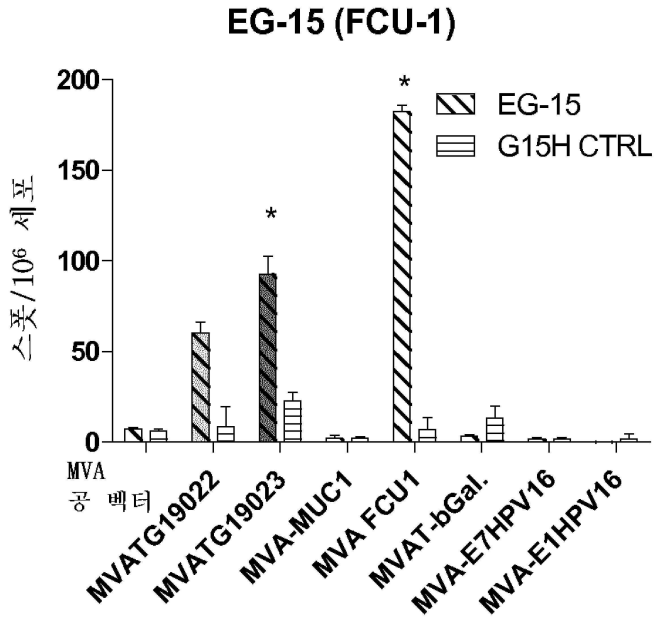
[0350]

도면

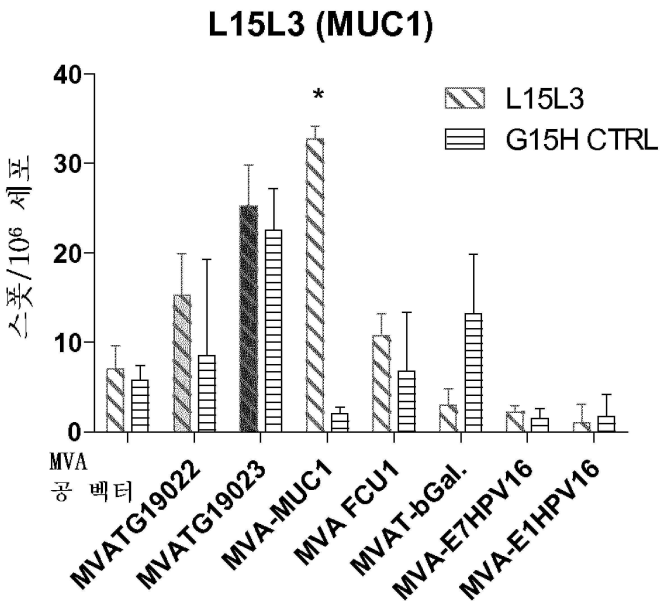
도면1


MVATG19022
p11k7.5
GS
FCU1
GS
β-Gal
GS
E1 HPV16
GS
E7 HPV16
GS
MUC1
GS
Flag
MVATG19023
p11k7.5
SR
GS
FCU1
GS
β-Gal
GS
E1 HPV16
GS
E7 HPV16
GS
MUC1
GS
Flag

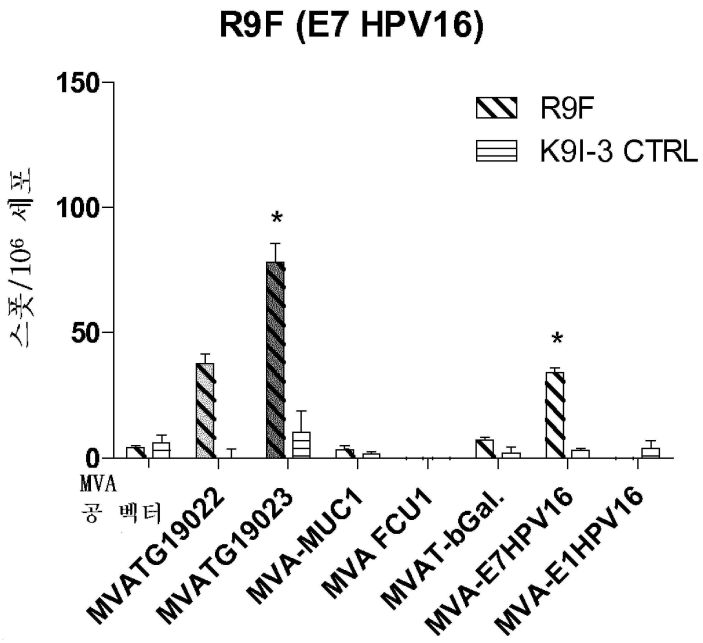
도면2a


EG-15 (FCU-1)
200
150
100
50
0
스폿/10⁶ 세포
EG-15
G15H CTRL
*
*
MVA
공 벡터
MVATG19022
MVATG19023
MVA-MUC1
MVA FCU1
MVAT-bGal.
MVA-E7HPV16
MVA-E1HPV16

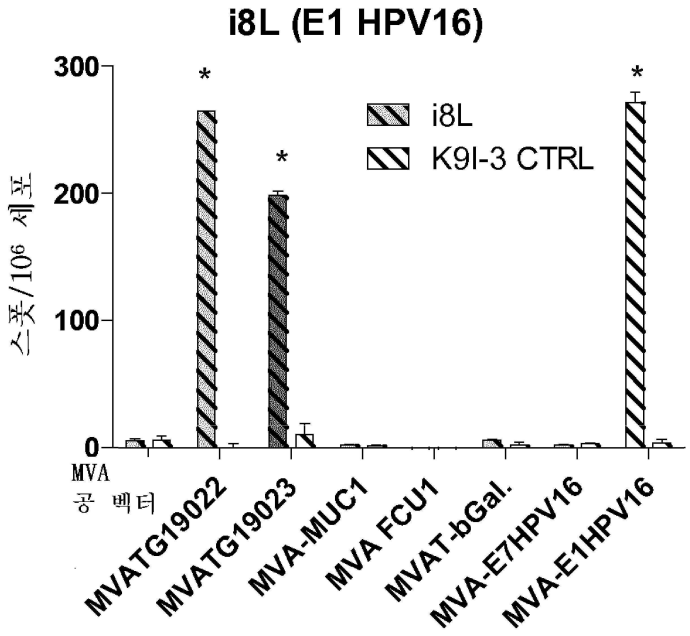
도면2b


L15L3 (MUC1)
40
30
20
10
0
스폿/10⁶ 세포
L15L3
G15H CTRL
*
MVA
공 벡터
MVATG19022
MVATG19023
MVA-MUC1
MVA FCU1
MVAT-bGal.
MVA-E7HPV16
MVA-E1HPV16

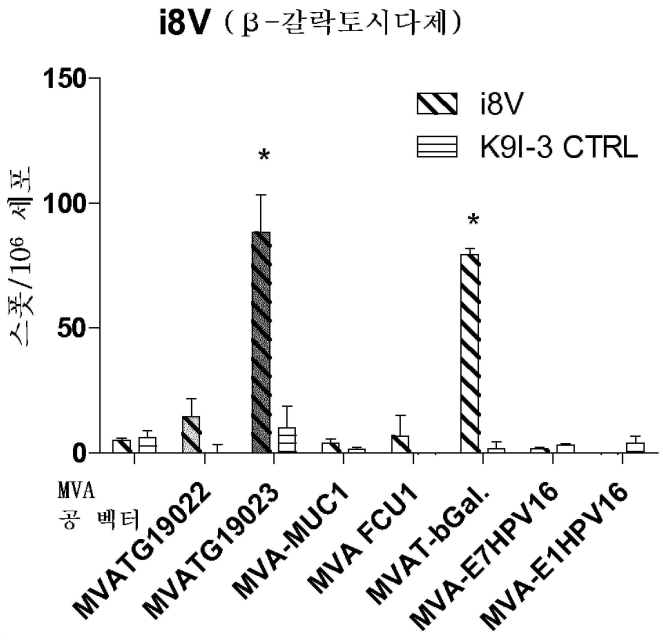
도면2c


R9F (E7 HPV16)
R9F
K9I-3 CTRL
스폿/10⁶ 세포
150
100
50
0
*
*
MVA
공 벡터
MVATG19022
MVATG19023
MVA-MUC1
MVA FCU1
MVAT-bGal.
MVA-E7HPV16
MVA-E1HPV16

도면2d


i8L (E1 HPV16)
i8L
K9I-3 CTRL
스폿/10⁶ 세포
300
200
100
0
*
*
*
MVA
공 벡터
MVATG19022
MVATG19023
MVA-MUC1
MVA FCU1
MVAT-bGal.
MVA-E7HPV16
MVA-E1HPV16

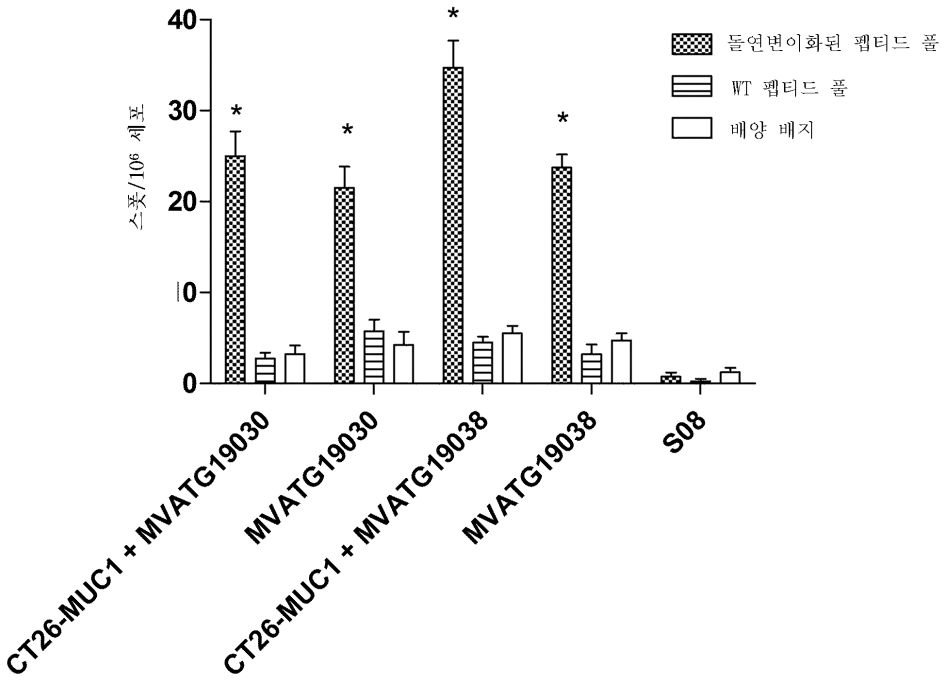
도면2e


i8V (β-갈락토시다제)
i8V
K9I-3 CTRL
스폿/10⁶ 세포
150
100
50
0
*
*
MVA
공 벡터
MVATG19022
MVATG19023
MVA-MUC1
MVA FCU1
MVAT-bGal.
MVA-E7HPV16
MVA-E1HPV16

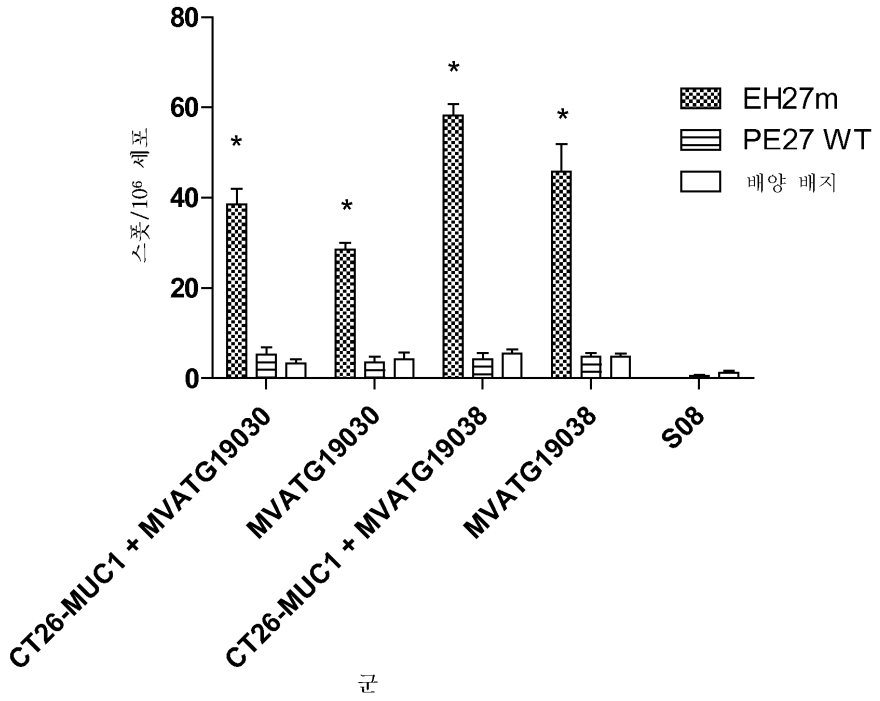
도면3

펩타도프 1
MGSGSGSGSGSYRGANLHLEETLAGFWARLLERLFKQLGSGSGSGSGSGYISRVTAGKDSYIALVDKNIMGYIASGSGSGSGSGSAGTQCEYWASRALDSEHSIGSMI
QLPQGSGSGSGSGSESEGDPCLRSSDCIDEFCCARHFWTKICKGSGSGSGSGSVTSIPSVSNALNWKEFSFIQSTLGYVAGSGSGSGSGSDYKDDDDK
펩타도프 2
MGSGSGSGSGSPLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPPTEGSGSGSGSVILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPPGSGSGSGSDKPLRRNNSYTSYIMAICGMPLDSF
RAGSGSGSGSGSEVIQTSKYYMRDVIAIESAWLLELAPHGSGSGSGSEHIHRAGGLFVADAIQVGFGRIGKHFWGSGSGSGSS EQKLISEEDL

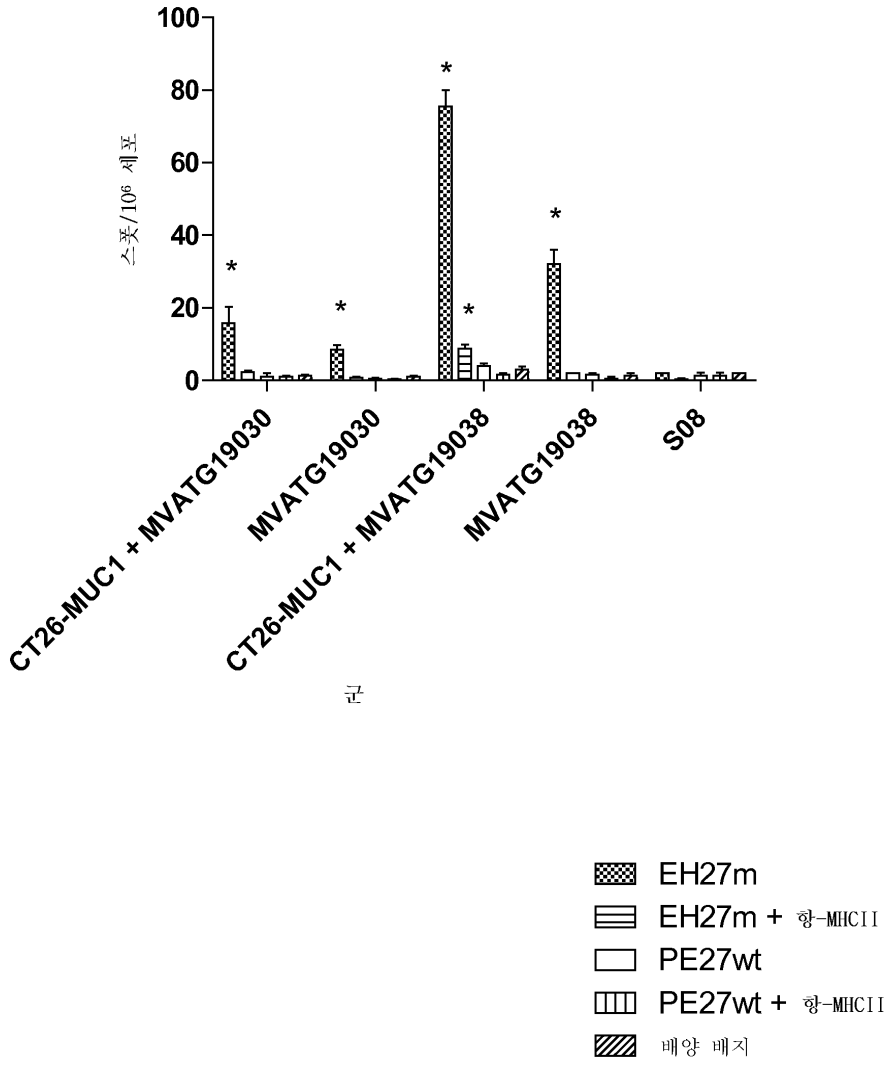
도면4


40
30
20
0
스폿/10⁶ 세포
*
돌연변이화된 펩티드 풀
WT 펩티드 풀
배양 배지
CT26-MUC1 + MVATG19030
MVATG19030
CT26-MUC1 + MVATG19038
MVATG19038
S08

도면5


80
60
40
20
0
스폿/10⁶ 세포
*
EH27m
PE27 WT
배양 배지
CT26-MUC1 + MVATG19030
MVATG19030
CT26-MUC1 + MVATG19038
MVATG19038
S08
군

도면6


100
80
60
40
20
0
스폿/10⁶ 세포
*
CT26-MUC1 + MVATG19030
MVATG19030
CT26-MUC1 + MVATG19038
MVATG19038
S08
군
EH27m
EH27m + 항-MHCII
PE27wt
PE27wt + 항-MHCII
배양 배지

도면7

GSG (Gly-Ser-Gly)

GSG_1 : GGAAGCGGT
GSG_2 : GGATCTGGT
GSG_3 : GGATCGGGA
GSG_4 : GGTAGTGGC
GSG_5 : GGTTCTGGG
GSG_6 : GGTTCCGGT
GSG_7 : GGTTCGGGT
GSG_8 : GGCTCAGGA
GSG_9 : GGCTCTGGA
GSG_10 : GGCAGCGGA
GSG_11 : GGCAGTGGT
GSG_12 : GGGAGTGGG
GSG_13 : GGGTCTGGC
GSG_14 : GGGTCAGGG
GSG_15 : GGGTCCGGA

GTS (Gly-Thr-Ser)

GTS_2 : GGAACTTCG
GTS_3 : GGAACGTCC
GTS_4 : GGTACAAGT
GTS_5 : GGTACGAGC
GTS_6 : GGTACCTCT
GTS_7 : GGTACTAGT
GTS_8 : GGGACCAGT
GTS_10 : GGGACTTCA
GTS_11 : GGCACCAGC
GTS_12 : GGCACGTCG

GAS (Gly-Ala-Ser)

GAS_1 : GGTGCGAGC
GAS_3 : GGAGCGTCC
GAS_4 : GGAGCCTCG
GAS_6 : GGTGCATCA
GAS_7 : GGTGCTTCT

도면8

MVA	카세트				링커	백색 플라크(%)	PCR		
		1	2	3			재조합 mCherry neg	재조합 mCherry pos	모체
TG19258	Nb neo	10	10	7	부재	4.9	0	0	13
	TM	0	0	0					
	Hydro	-0.36	-0.08	**0.151**					
TG19267	Nb neo	10	10	7	3aa	13.3	**5**	**2**	2
	TM	0	0	0					
	Hydro	-0.39	-0.09	**0.08**					
TG19290	Nb neo	10	10	10 신생	부재	3.8	**3**	**3**	0
	TM	0	0	0					
	Hydro	-0.36	-0.08	-0.52					
TG19291	Nb neo	10	10	10 신생	3aa	4.7	**3**	**4**	0
	TM	0	0	0					
	Hydro	-0.39	-0.09	-0.52					
TG19293	Nb neo	10	10	-	3aa	16	**1**	**9**	0
	TM	0	0	-					
	Hydro	-0.39	-0.09	-					
TG19298	Nb neo	-	10	10 신생	3aa	16.3	**8**	**3**	0
	TM	-	0	0					
	Hydro	-	-0.09	-0.52					

서 열 목 록

<110> TRANSGENE SA

<120> Personalized vaccine

<130> B374744PCTD38479

<150> EP 17305760.5

<151> 2017-06-21

<150> EP 18305496.4

<151> 2018-04-23

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> FCU1 peptide

<400> 1

Cys Ser Lys Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val

1 5 10 15

Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu

20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide obtained from beta galatosidase antigen

<400> 2

Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys Pro Met Tyr Ala

1 5 10 15

Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val

20 25

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide obtained from HPV-16 E1 antigen

<400> 3

Tyr Asp Asn Asp Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys Tyr Ala

1 5 10 15

Gln Leu Ala Asp Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala

20 25

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide obtained from HPV-16 E7 antigen

<400> 4

Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val
1 5 10 15

Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg
20 25

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> peptide obtained from MUC1 antigen

<400> 5

Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr
1 5 10 15

Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
20 25

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Flag tag

<400> 6

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 7

<211> 204

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion of 5 peptides expressed by MVATG19022

<400> 7

Met Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Cys Ser Lys Glu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly

20 25 30

Ala Leu Asp Arg Gly Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

35 40 45

Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys Pro Met Tyr Ala

50 55 60

Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val Gly Ser Gly Ser Gly

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Asn Asp Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile

85 90 95

Ala Tyr Lys Tyr Ala Gln Leu Ala Asp Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala

100 105 110

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Ala Gly Gln Ala

115 120 125

Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys

130 135 140

Asp Ser Thr Leu Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Tyr

145 150 155 160

Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn

165 170 175

Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser

180 185 190

Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

195 200

<210> 8

<211> 112

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> fragment of vaccinia promoter p11k7.5

<400> 8

ataaaaatat agtagaattt cattttgttt ttttctatgc tataaatagg atccgataaa 60

gtgaaaaata attctaattt attgcacggt aaggaagtag aatcataaag aa 112

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fragment of rabbies glycoprotein (signal peptide)

<400> 9

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu

1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile

20

<210> 10

<211> 226

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion of 5 peptides encoded by MVATG19023 (+ signal peptide)

<400> 10

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu

1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

20 25 30

Ser Cys Ser Lys Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu

35 40 45

Val Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Gly Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile

65 70 75 80

Ile Cys Pro Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala

85 90 95

Val Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Asn Asp Ile

100 105 110

Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys Tyr Ala Gln Leu Ala Asp Thr

115 120 125

Asn Ser Asn Ala Ser Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

130 135 140

Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val

145 150 155 160

Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Gly Ser Gly Ser Gly

165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser

180 185 190

Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

195 200 205

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

210 215 220

Asp Lys

225

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> cMYC tag

<400> 11

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 204

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion of 5 CT26 neopeptides (pentatope 1)

<400> 12

Met Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Arg Gly Ala Asn

1 5 10 15

Leu His Leu Glu Glu Thr Leu Ala Gly Phe Trp Ala Arg Leu Leu Glu

20 25 30

Arg Leu Phe Lys Gln Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Arg Val Thr Ala Gly Lys Asp Ser Tyr Ile Ala Leu
50 55 60

Val Asp Lys Asn Ile Met Gly Tyr Ile Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Ala Gly Thr Gln Cys Glu Tyr Trp Ala Ser Arg
85 90 95
Ala Leu Asp Ser Glu His Ser Ile Gly Ser Met Ile Gln Leu Pro Gln
100 105 110
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gly Asp Pro Cys Leu
115 120 125

Arg Ser Ser Asp Cys Ile Asp Glu Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp
130 135 140
Thr Lys Ile Cys Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val
145 150 155 160
Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Lys Glu Phe Ser
165 170 175
Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser
180 185 190

Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
195 200

<210> 13
<211> 206
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> fusion of 5 CT26 neopeptides (pentatope 2) encoded by MVATG19030
<400> 13
Met Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Pro Leu Leu Pro Phe
1 5 10 15
Tyr Pro Pro Asp Glu Ala Leu Glu Ile Gly Leu Glu Leu Asn Ser Ser

20 25 30

Ala Leu Pro Pro Thr Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
35 40 45
Val Ile Leu Pro Gln Ala Pro Ser Gly Pro Ser Tyr Ala Thr Tyr Leu
50 55 60
Gln Pro Ala Gln Ala Gln Met Leu Thr Pro Pro Gly Ser Gly Ser Gly
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Pro Leu Arg Arg Asn Asn Ser Tyr Thr
85 90 95

Ser Tyr Ile Met Ala Ile Cys Gly Met Pro Leu Asp Ser Phe Arg Ala
100 105 110
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Val Ile Gln Thr Ser
115 120 125
Lys Tyr Tyr Met Arg Asp Val Ile Ala Ile Glu Ser Ala Trp Leu Leu
130 135 140
Glu Leu Ala Pro His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu
145 150 155 160

His Ile His Arg Ala Gly Gly Leu Phe Val Ala Asp Ala Ile Gln Val
165 170 175
Gly Phe Gly Arg Ile Gly Lys His Phe Trp Gly Ser Gly Ser Gly Ser
180 185 190
Gly Ser Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
195 200 205

<210> 14
<211> 114
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220><223> fragment of vaccinia promoter pH5R
<400> 14
tttattctat acttaaaaaa tgaaaataaa tacaaaggtt cttgagggtt gtgttaaatt 60

gaaagcgaga ataatcata aattatttca ttatcgcgat atccgttaag tttg 114

<210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fragment of measles F glycoprotein (signal peptide)

<400> 15

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu

1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly

20 25

<210> 16

<211> 226

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion of 5 CT26 neopeptides encoded by MVATG19038 (pentatope 1)

<400> 16

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu

1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

20 25 30

Ser Tyr Arg Gly Ala Asn Leu His Leu Glu Glu Thr Leu Ala Gly Phe

35 40 45

Trp Ala Arg Leu Leu Glu Arg Leu Phe Lys Gln Leu Gly Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Tyr Ile Ser Arg Val Thr Ala Gly Lys

65 70 75 80

Asp Ser Tyr Ile Ala Leu Val Asp Lys Asn Ile Met Gly Tyr Ile Ala

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala Gly Thr Gln Cys

100 105 110

Glu Tyr Trp Ala Ser Arg Ala Leu Asp Ser Glu His Ser Ile Gly Ser

115 120 125

Met Ile Gln Leu Pro Gln Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

130 135 140

Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Asp Glu Phe Cys

145 150 155 160

Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Gly Ser Gly Ser Gly

165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu

180 185 190

Asn Trp Lys Glu Phe Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala

195 200 205

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

210 215 220

Asp Lys

225

<210> 17

<211> 232

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion of 5 CT26 neopeptides encoded by MVATG19038 (pentatope 2)

<400> 17

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu

1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Ser Gly Ser Gly

20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Pro Leu Leu Pro Phe Tyr Pro Pro Asp Glu Ala

35 40 45

Leu Glu Ile Gly Leu Glu Leu Asn Ser Ser Ala Leu Pro Pro Thr Glu

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ile Leu Pro Gln Ala

65 70 75 80

Pro Ser Gly Pro Ser Tyr Ala Thr Tyr Leu Gln Pro Ala Gln Ala Gln

85 90 95

Met Leu Thr Pro Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp

100 105 110

Lys Pro Leu Arg Arg Asn Asn Ser Tyr Thr Ser Tyr Ile Met Ala Ile

115 120 125

Cys Gly Met Pro Leu Asp Ser Phe Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser

130 135 140

Gly Ser Gly Ser Glu Val Ile Gln Thr Ser Lys Tyr Tyr Met Arg Asp

145 150 155 160

Val Ile Ala Ile Glu Ser Ala Trp Leu Leu Glu Leu Ala Pro His Gly

165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu His Ile His Arg Ala Gly

180 185 190

Gly Leu Phe Val Ala Asp Ala Ile Gln Val Gly Phe Gly Arg Ile Gly

195 200 205

Lys His Phe Trp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu Gln

210 215 220

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

225 230

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> HA tag

<400> 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220

><223> HSV tag

<400> 19

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> VSV tag

<400> 20

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 100

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> fragment of vaccinia pB2R promoter

<400> 21

tatattatta agtgtggtgt ttggtcgatg taaaattttt gtcgataaaa attaaaaaat 60

aacttaattt attattgatc tcgtgtgtac aaccgaaatc 100

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 peptide 1

<400> 22

Tyr Arg Gly Ala Asn Leu His Leu Glu Glu Thr Leu Ala Gly Phe Trp

1 5 10 15

Ala Arg Leu Leu Glu Arg Leu Phe Lys Gln Leu

20 25

<210> 23

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 peptide 2

<400> 23

Gly Tyr Ile Ser Arg Val Thr Ala Gly Lys Asp Ser Tyr Ile Ala Leu
1 5 10 15
Val Asp Lys Asn Ile Met Gly Tyr Ile Ala Ser
20 25

<210> 24
<211> 27
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> CT26 peptide 3
<400> 24

Ala Gly Thr Gln Cys Glu Tyr Trp Ala Ser Arg Ala Leu Asp Ser Glu
1 5 10 15
His Ser Ile Gly Ser Met Ile Gln Leu Pro Gln
20 25

<210> 25
<211> 27
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> CT26 neopeptide 4
<400> 25

Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Asp Glu Phe Cys
1 5 10 15
Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys
20 25

<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> CT26 neopeptide 5
<400> 26

Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Lys Glu Phe

1 5 10 15

Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala
20 25

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 neopeptide 6

<400> 27

Pro Leu Leu Pro Phe Tyr Pro Pro Asp Glu Ala Leu Glu Ile Gly Leu
1 5 10 15

Glu Leu Asn Ser Ser Ala Leu Pro Pro Thr Glu
20 25

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 neopeptide 7

<400> 28

Val Ile Leu Pro Gln Ala Pro Ser Gly Pro Ser Tyr Ala Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Pro Ala Gln Ala Gln Met Leu Thr Pro Pro
20 25

<210> 29

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 neopeptide 8

<400> 29

Asp Lys Pro Leu Arg Arg Asn Asn Ser Tyr Thr Ser Tyr Ile Met Ala
1 5 10 15

Ile Cys Gly Met Pro Leu Asp Ser Phe Arg Ala

20 25

<210> 30

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 neopeptide 9

<400> 30

Glu Val Ile Gln Thr Ser Lys Tyr Tyr Met Arg Asp Val Ile Ala Ile

1 5 10 15

Glu Ser Ala Trp Leu Leu Glu Leu Ala Pro His

20 25

<210> 31

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CT26 neopeptide 10

<400> 31

Glu His Ile His Arg Ala Gly Gly Leu Phe Val Ala Asp Ala Ile Gln

1 5 10 15

Val Gly Phe Gly Arg Ile Gly Lys His Phe Trp

20 25

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 1

<400> 32

Tyr Arg Gly Ala Asn Leu His Leu Glu Glu Thr Leu Ala Glu Phe Trp

1 5 10 15

Ala Arg Leu Leu Glu Arg Leu Phe Lys Gln Leu

20 25

<210> 33

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 2

<400> 33

Gly Tyr Ile Ser Arg Val Thr Ala Gly Lys Asp Ser Tyr Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Asp Lys Asn Ile Met Gly Tyr Ile Ala Ser

20 25

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 3

<400> 34

Ala Gly Thr Gln Cys Glu Tyr Trp Ala Ser Arg Ala Leu Gly Ser Glu

1 5 10 15

His Ser Ile Gly Ser Met Ile Gln Leu Pro Gln

20 25

<210> 35

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 4

<400> 35

Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Asp Gly Phe Cys

1 5 10 15

Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys

20 25

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 5

<400> 36

Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala Leu Asn Trp Arg Glu Phe

1 5 10 15

Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val Ala

20 25

<210> 37

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 6

<400> 37

Pro Leu Leu Pro Phe Tyr Pro Pro Asp Glu Ala Leu Glu Thr Gly Leu

1 5 10 15

Glu Leu Asn Ser Ser Ala Leu Pro Pro Thr Glu

20 25

<210> 38

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 7

<400> 38

Val Ile Leu Pro Gln Ala Pro Ser Gly Pro Ser Tyr Ala Ile Tyr Leu

1 5 10 15

Gln Pro Ala Gln Ala Gln Met Leu Thr Pro Pro

20 25

<210> 39

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 8

<400> 39

Asp Lys Pro Leu Arg Arg Asn Asn Ser Tyr Thr Ser Tyr Thr Met Ala

1 5 10 15

Ile Cys Gly Met Pro Leu Asp Ser Phe Arg Ala

20 25

<210> 40

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 9

<400> 40

Glu Val Ile Gln Thr Ser Lys Tyr Tyr Met Arg Asp Val Thr Ala Ile

1 5 10 15

Glu Ser Ala Trp Leu Leu Glu Leu Ala Pro His

20 25

<210> 41

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> non mutated CT26 peptide 10

<400> 41

Glu His Ile His Arg Ala Gly Gly Leu Phe Val Ala Asp Glu Ile Gln

1 5 10 15

Val Gly Phe Gly Arg Ile Gly Lys His Phe Trp

20 25

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7M1

<400> 42

Pro Ser Tyr Ala Thr Tyr Leu Gln Pro

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7M2

<400> 43

Tyr Ala Thr Tyr Leu Gln Pro Ala Gln

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7M3

<400> 44

Thr Tyr Leu Gln Pro Ala Gln Ala Gln

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 2M

<400> 45

Ile Ala Leu Val Asp Lys Asn Ile Met

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7WT1

<400> 46

Pro Ser Tyr Ala Ile Tyr Leu Gln Pro

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7WT2

<400> 47

Tyr Ala Ile Tyr Leu Gln Pro Ala Gln

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT26 epitope 7WT3

<400> 48

Ile Tyr Leu Gln Pro Ala Gln Ala Gln

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> CD8 CT? epitope 2 WT

<400> 49

Leu Ala Leu Val Asp Lys Asn Ile Met

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 50

Ile Ala Tyr Lys Tyr Ala Gln Leu

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 51

Ile Cys Pro Met Tyr Ala Arg Val

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 52

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1 5

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 53

Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 54

Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> stimulating peptide

<400> 55

Thr Ser Tyr Lys Phe Glu Ser Val

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> irrelevant peptide

<400> 56

Lys Asn Gly Glu Asn Ala Gln Ala Ile

1 5

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> irrelevant peptide

<400> 57

Gly Ile Cys Leu Met Leu Phe Ile Leu Ile Lys Arg Ser Arg His

1 5 10 15

<210> 58

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> example of a lung adenocarcinoma neopeptide which dispays negative hydrobobicity and hydropathy scores

<400> 58

Gly Gln Ser Leu Pro Met Thr His Ser Leu Lys Leu Ser Lys Thr Asn

1 5 10 15

Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Val Thr Lys Tyr

20 25

<210> 59

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Example of a lung adenocarcinoma neopeptide which dispaly

positive hydrophobicity and hydropathy scores

<400> 59

Gly Leu Met Gly Ile Val Val Gly Thr Val Phe Ile Ile Arg Gly Leu
1 5 10 15

Arg Ser Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Leu
20 25

<210> 60

<211> 270

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> fusion 1 of ten neopeptides encoded by pTG19247

<400> 60

Lys Glu His Gly Thr His Gln Gln Leu Leu Ala Gln Lys Val Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Ser Met Val Ser Val Gln Ala Gly Thr Lys Ala Trp Glu Ser Trp
20 25 30

Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu Met Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val
35 40 45

Val Leu Lys Asn Glu Met Asp Val Ser Lys Glu Asn Glu Asn Ser Met
50 55 60

Val Pro Gln Arg Ala Pro Val Gly Ser Leu Ser Val Lys Asn Lys Ala
65 70 75 80

His Gln Met Lys Ala Arg Leu Thr Gln Glu Leu Gln Gln Ala Asn Asn
85 90 95

Met His Asn Val Leu Gln Ala Glu Leu Asp Lys Leu His Leu His Tyr
100 105 110

Pro Ile Glu Arg Gly Leu Val Thr Gly Cys Asp Asp Met Glu Lys Leu
115 120 125

Trp Lys His Leu Phe Glu Arg Ala Val Pro Tyr Met Ala Lys Phe Val
130 135 140

Ile Phe Ala Lys Ile Asn Asp Pro Arg Glu Gly Arg Leu Arg Cys Tyr
145 150 155 160
Cys Met Lys Thr Val Val Val Met Leu Gln Asn Val Val Pro Ala Lys
165 170 175
Val Ser Leu Val Cys Val Val Lys Pro Asp Glu Phe Trp Ser Gly Val
180 185 190
Lys Val Ser Val Tyr Ala Val Pro Asp Lys Met Asn Gln Ala Asp Tyr
195 200 205

Ala Leu Asp Ala Ala Val Thr Leu Trp Asn Asn Gly Arg Asn His Leu
210 215 220
Ile Phe Asn Leu Tyr Phe Gly Thr Trp Pro Asp Tyr Thr Glu Asp Val
225 230 235 240
Gly Phe Asp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
245 250 255
His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu
260 265 270

<210> 61
<211> 267
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> fusion 2 of 10 neopeptides encoded by pTG19247
<400> 61
Gly Gln Ser Leu Pro Met Thr His Ser Leu Lys Leu Ser Lys Thr Asn
1 5 10 15
Arg Thr Leu Phe Leu Leu Gly Val Thr Lys Tyr Gly Leu Met Gly Ile
20 25 30
Val Val Gly Thr Val Phe Ile Ile Arg Gly Leu Arg Ser Val Gly Ala
35 40 45

Ser Arg His Gln Gly Leu Trp Tyr Val Arg Met Asn Arg Arg Arg Leu
50 55 60
Lys Gly Glu Thr Gly Met Glu Asp Cys Val Met Ala Leu Glu Thr Leu
65 70 75 80

Phe Thr Ala Ile Pro Leu Glu Ile Phe Ile Val Thr Met Glu Asn Asp
85 90 95
Phe Pro Gly Gly Val Ile Gly Lys Ile His Ala Thr Gly Arg Gly Arg
100 105 110

Ser Lys Leu Lys Ser Gly Ile Gly Ala Leu Val Leu Pro Gly Val Ser
115 120 125
Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn His Gln Arg Glu Asn Ser Gly His Arg
130 135 140
Arg Asp Gln Ile Thr Glu Lys Asp Ala Ala Leu Cys Val Leu Ile Asp
145 150 155 160
Glu Met His Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Val
165 170 175

Leu Lys Leu Ile Tyr Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Gly Trp Met
180 185 190
Tyr Gly Thr Val Gln Arg Thr Gly Arg Thr Arg Met Leu Pro Ala Asn
195 200 205
Tyr Val Glu Ala Ile Glu Glu Trp Glu Cys Leu Asp Ser Ala Gln Gln
210 215 220
Arg Leu His Arg Asp Val Met Leu Glu Asn Tyr Gly Asn Leu Phe Ser
225 230 235 240

Leu Phe Thr Val Ser Pro Thr Leu Tyr Phe Leu His Ser Val Ser Leu
245 250 255
Pro Ala Leu Asp Leu Lys Pro Gly Glu Gly Ala
260 265

<210> 62
<211> 270
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> fusion 3 of 10 neopeptides encoded by pTG19247
<400> 62
Val Val Gly Trp Arg Ser Gly Val Glu Lys Asp Leu Asp Lys Val Leu
1 5 10 15

Gln Thr His Ser Val Phe Val Asn Val Ser Lys Lys Gly Ile Arg Thr

20 25 30

Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser Phe Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly

35 40 45

Leu Leu Leu Phe Leu Val Glu Ala Thr Asn Ala Ser Val Phe Lys Tyr

50 55 60

Tyr Ile His Gly Leu Ser Asp Leu Ile Asp Cys Cys Asp Leu Gly Tyr

65 70 75 80

His Ser Ile Phe Tyr Leu Leu Lys Ile Ala Asn Phe Ser Asn Leu Ile

85 90 95

Phe Leu His Leu Lys Arg Arg Val Lys Ser Val Ile Val His His Arg

100 105 110

Ile Val Gly Cys Ser Leu Ala Val Ile Cys Gly Val Leu Tyr Gly Ser

115 120 125

Thr Phe Val Pro Ile Ile Tyr Phe Leu Val Ile Ala Leu Lys Asn Ala

130 135 140

Val Glu Ile Tyr Val Trp Ala Pro Lys Pro Tyr His Lys Phe Met Ala

145 150 155 160

Phe Lys Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys

165 170 175

Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Leu Leu Gln

180 185 190

Ile Ser Asn Trp Phe Ile Asn Ala Arg Arg Cys Ile Leu Pro Asp Met

195 200 205

Leu Gln Gln Arg Arg Asn Asp Pro Thr Ile Ser Leu Ser Gly Cys Ala

210 215 220

Val Gln Met Phe Leu Ser Leu Ala Met Gly Thr Thr Glu Cys Val Leu

225 230 235 240

Leu Gly Met Gln Ile Leu Ser Lys Leu Leu Leu Asp Leu Ser Cys Glu

245 250 255

Phe Ser Leu Leu Lys Ser Glu Cys His Arg Val Lys Met Gln

260 265 270

<210> 63

<211> 267

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> no TM fusion 2 with inversion of neopeptides 1 and 2 and 7 and 8

<400> 63

Gly Leu Met Gly Ile Val Val Gly Thr Val Phe Ile Ile Arg Gly Leu
1 5 10 15

Arg Ser Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Leu Gly Gln Ser Leu Pro
20 25 30

Met Thr His Ser Leu Lys Leu Ser Lys Thr Asn Arg Thr Leu Phe Leu
35 40 45

Leu Gly Val Thr Lys Tyr Trp Tyr Val Arg Met Asn Arg Arg Arg Leu

50 55 60

Lys Gly Glu Thr Gly Met Glu Asp Cys Val Met Ala Leu Glu Thr Leu
65 70 75 80

Phe Thr Ala Ile Pro Leu Glu Ile Phe Ile Val Thr Met Glu Asn Asp
85 90 95

Phe Pro Gly Gly Val Ile Gly Lys Ile His Ala Thr Gly Arg Gly Arg
100 105 110

Ser Lys Leu Lys Ser Gly Ile Gly Ala Leu Val Leu Pro Gly Val Ser

115 120 125

Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn His Gln Arg Glu Asn Ser Gly His Arg
130 135 140

Arg Asp Gln Ile Thr Glu Lys Asp Ala Ala Leu Cys Val Leu Ile Asp
145 150 155 160

Glu Met Gly Trp Met Tyr Gly Thr Val Gln Arg Thr Gly Arg Thr Arg
165 170 175

Met Leu Pro Ala Asn Tyr Val Glu Ala Ile His Asn Tyr Met Tyr Trp

180 185 190

Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Val Leu Lys Leu Ile Tyr Tyr Ser Val
195 200 205

Gly Ala Gly Ile Thr Glu Glu Trp Glu Cys Leu Asp Ser Ala Gln Gln
210 215 220

Arg Leu His Arg Asp Val Met Leu Glu Asn Tyr Gly Asn Leu Phe Ser
225 230 235 240

Leu Phe Thr Val Ser Pro Thr Leu Tyr Phe Leu His Ser Val Ser Leu

245 250 255

Pro Ala Leu Asp Leu Lys Pro Gly Glu Gly Ala
260 265

<210> 64

<211> 189

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> no TM fusion 3 by suppression of neopeptides 2, 4 and 5

<400> 64

Val Val Gly Trp Arg Ser Gly Val Glu Lys Asp Leu Asp Lys Val Leu
1 5 10 15

Gln Thr His Ser Val Phe Val Asn Val Ser Lys Glu Ala Thr Asn Ala
20 25 30

Ser Val Phe Lys Tyr Tyr Ile His Gly Leu Ser Asp Leu Ile Asp Cys
35 40 45

Cys Asp Leu Gly Tyr His Phe Leu Val Ile Ala Leu Lys Asn Ala Val
50 55 60

Glu Ile Tyr Val Trp Ala Pro Lys Pro Tyr His Lys Phe Met Ala Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Lys Leu
85 90 95

Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Leu Leu Gln Ile
100 105 110

Ser Asn Trp Phe Ile Asn Ala Arg Arg Cys Ile Leu Pro Asp Met Leu
115 120 125

Gln Gln Arg Arg Asn Asp Pro Thr Ile Ser Leu Ser Gly Cys Ala Val
130 135 140
Gln Met Phe Leu Ser Leu Ala Met Gly Thr Thr Glu Cys Val Leu Leu
145 150 155 160

Gly Met Gln Ile Leu Ser Lys Leu Leu Leu Asp Leu Ser Cys Glu Phe
165 170 175
Ser Leu Leu Lys Ser Glu Cys His Arg Val Lys Met Gln
180 185

<210> 65
<211> 270
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> fusion 3 encoded by pTG19290
<400> 65
Ser Ser Thr Ile Met Asp Val Asp Ser Thr Ile Ser Ser Trp Arg Ser
1 5 10 15
Thr Pro Ala Met Met Asn Gly Gln Gly Ser Thr Lys Ser Lys Lys Val

20 25 30
Ser Asp Ile Lys Glu Glu Val Leu Ser Ala Ala Cys His Pro Val Gln
35 40 45
His Ser Lys Val Glu Tyr Tyr His Ile Glu Val Met Lys Lys Lys Met
50 55 60
Tyr Ile Phe Trp Gly Lys Met Ser Arg Arg Thr Leu Leu Pro Ile Pro
65 70 75 80
Thr Ser Trp Tyr Leu Glu Asn Ile Tyr Pro Asp Ser Gln Ile Thr Arg

85 90 95
Arg Tyr Tyr Ser Leu Gly Glu Ile Arg Asn Val Glu Ser Pro Phe Asn
100 105 110
Val Val Ala Trp His Gly Asn Tyr Thr Leu Tyr Lys Tyr Asn Leu Lys
115 120 125
Asn Phe Met Val Ile Asn Ser Asp Tyr Glu Leu Ala Glu Val His Lys
130 135 140

Ala Leu Leu Asp Asn Lys Asn Lys Val Leu Glu Val Lys Lys Pro Pro

145 150 155 160

Arg Phe Glu Lys Gly Pro Leu Pro Gly Glu Asp Trp Thr Ile Phe Lys

165 170 175

Tyr Asn His Ser Thr Tyr Gln Pro Val Leu Leu Thr Glu Asp Arg Trp

180 185 190

Val Arg Asn Gln Ala Asn Leu Asp Lys Glu His Val Pro Leu Leu Lys

195 200 205

Ile Glu Glu Pro Pro Ser Thr Ala Leu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp

210 215 220

Asp Thr Ile His Met Trp Asn Ala Ile Met Thr Phe Tyr Ser Ala Leu

225 230 235 240

Ile Asp Leu Ser Thr Val Glu Lys His Cys Gly Lys Val Pro Tyr Pro

245 250 255

Leu Ser Tyr Val Pro Ala Val Leu Ser Glu Leu Thr Asp Gln

260 265 270

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker 5aa

<400> 66

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker of 5aa

<400> 67

Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker of 10aa

<400> 68

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker of 5aa

<400> 69

Gly Ser Thr Ser Gly

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> linker of 5 aa

<400> 70

Ser Gly Thr Gly Ser

1 5