(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099144
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 31/505* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2023.05)
A61K 31/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7010182
(22) 출원일자(국제) 2022년09월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/076678
(87) 국제공개번호 WO 2023/044492
국제공개일자 2023년03월23일
(30) 우선권주장
63/245,663 2021년09월17일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
그릿스톤 바이오, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 300, 호튼 스트리트 5959
(72) 발명자
루소, 라파엘
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 300, 호튼 스트리트 5959, 그릿스톤 바이오, 인코포레이티드 사내
퍼거슨, 앤드류
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 300, 호튼 스트리트 5959, 그릿스톤 바이오, 인코포레이티드 사내
주스, 카린
미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 300, 호튼 스트리트 5959, 그릿스톤 바이오, 인코포레이티드 사내
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

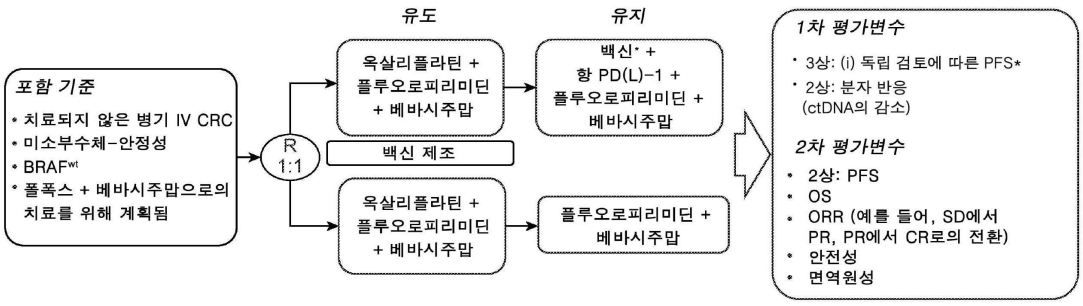
전체 청구항 수 : 총 98 항

(54) 발명의 명칭 **신생항원 보조 및 유지 요법**

(57) 요 약

항원-인코딩 핵산 서열 및/또는 항원 펩티드를 포함하는 조성물이 본원에 개시된다. 또한, 이종유래 프라임/부스트 백신접종 전략을 위한 벡터 및 방법을 포함하여, 백신으로서 조성물의 사용을 포함하는 조성물과 연관된 뉴클레오티드, 세포, 및 방법이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(30) 우선권주장
63/281,027 2021년11월18일 미국(US)
63/320,685 2022년03월16일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하고 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 프라이밍 용량으로 투여되고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하나 이상의 부스팅 용량으로 투여되고, 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 및 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 유지 요법으로 투여되는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 유지 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하며, 임의로 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 3

대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하고 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 프라이밍 용량으로 투여되고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하나 이상의 부스팅 용량으로 투여되고, 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 및 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 보조 요법으로 투여되는, 방법.

청구항 4

제4항에 있어서, 보조 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하며, 임의로 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 5

대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 (1) 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물 또는 (2) 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 또는 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 보조 요법으로 투여되고, 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 보조 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하고, 임의로 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 하나 이상의 부스팅 용량이 투여되는, 방법.

청구항 7

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조합 요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 8

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조합 요법은 플루오로피리미딘 및 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 9

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조합 요법은 플루오로피리미딘, 베바시주맙, 및 면역 관문 억제제 요법을 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역 관문 억제제는 (1) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, (2) 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및/또는 (3) 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 면역 관문 억제제 요법은 프라이밍 용량 및 제1 부스팅 용량 만으로 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙을 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 이필리무맙은 30 mg의 용량으로 피하 투여되는, 방법.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 관문 억제제 요법은 4주마다(Q4W)의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙 또는 니볼루맙을 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 아테졸리주맙은 1680 mg의 용량으로 정맥내 투여되거나 니볼루맙은 480 mg의 용량으로 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 17

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 관문 억제제 요법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함하며, 임의로 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 18

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 관문 억제제 요법은 적어도 13회의 투여를 포함하며, 임의로 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 이전에 종양 및/또는 암성 조직을 제거하기 위한 수술, 화학요법, 면역요법(예를 들어, 면역 관문 억제제 요법), 방사선 요법, 또는 이의 조합을 받은, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 선행 화학요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및/또는 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 선행 화학요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및 베바시주맙을 포함하는, 방법.

청구항 22

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 선행 화학요법은 유지 요법의 투여 전 최대 24주 동안 투여되는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 결장직장암(CRC)을 갖는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, CRC는 병기 IV, 미소부수체-안정성, 및 $BRAF^{wt}$로 분류되는, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, CRC는 병기 II 또는 III으로 분류되는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 ctDNA 양성으로 분류되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 2회 이상의 부스팅 용량이 투여되는, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8회의 부스팅 용량이 투여되는, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 부스팅 용량으로 추가로 투여되는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, ChAdV-기반 부스팅 용량은 단일 부스팅 용량으로만 투여되는, 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 140일차 또는 약 140일차에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 32

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 20주차 또는 약 20주차에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 33

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 5개월차 또는 약 5개월차에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 34

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 140일차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 35

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 20주차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 36

제29항 또는 제30항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 5개월차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 근육내(IM), 피내(ID), 피하(SC), 또는 정맥내(IV)로 투여되는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 (IM)으로 투여되는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, IM 투여는 별도의(separate) 주사 부위에서 투여되는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 별도의 주사 부위는 대향 삼각근에 있는, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 별도의 주사 부위는 각 측부의 둔근 또는 대퇴직근 부위에 있는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 근육내(IM), 피내(ID), 피하(SC), 또는 정맥내(IV)로 투여되는, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 28일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4주(Q4W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 한 달 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 56일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 8주(Q8W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2개월 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 28일차 및 84일차 또는 약 28일차 및 약 84일차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 4주차 및 12주차 또는 약 4주차 및 약 12주차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 1개월차 및 3개월차 또는 약 1개월차 및 약 3개월차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4회의 부스팅 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 28, 84, 224, 및 308일차 또는 약 28, 84, 224, 및 308일차에 투여되는, 방법.

청구항 55

제53항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 4, 12, 32, 및 44주차 또는 약 4, 12, 32, 및 44주차에 투여되는, 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 1, 3, 8, 및 11개월차 또는 약 1, 3, 8, 및 11개월차에 투여되는, 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 (IM)으로 투여되는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, IM 투여는 별도의 주사 부위에서 투여되는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 별도의 주사 부위는 대향 삼각근에 있는, 방법.

청구항 60

제58항에 있어서, 별도의 주사 부위는 각 측부의 둔근 또는 대퇴직근 부위에 있는, 방법.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 부스팅 용량의 주사 부위는 프라이밍 용량의 주사 부

위에 가능한 한 가까운, 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 HLA-일배체형을 결정하거나 결정했던 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응을 자극하는 단계는 분자 반응을 자극하는 것을 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 분자 반응은 ctDNA의 감소를 포함하는, 방법 또는 조성물.

청구항 65

제64항에 있어서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 감소인, 방법 또는 조성물.

청구항 66

제64항에 있어서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 30% 감소인, 방법 또는 조성물.

청구항 67

제64항에 있어서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 50% 감소인, 방법 또는 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 대상체-특이적 신생항원-인코딩 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 20개의 대상체-특이적 신생항원-인코딩 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하기를 포함하는, 방법:

(A) 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템으로서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 하나 이상의 벡터를 포함하며, 하나 이상의 벡터는 하기를 포함하는, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템:

(a) RNA 알파바이러스 백본으로서, RNA 알파바이러스 백본은

(i) 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열, 및

(ii) 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함하는, RNA 알파바이러스 백본; 및

(b) 카세트로서, 카세트는

(i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열:

a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열,

b. 임의로 5' 링커 서열, 및

c. 임의로 3' 링커 서열;

(ii) 임의로, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열; 및

(iii) 임의로, 적어도 하나의 제2 폴리(A) 서열로서, 제2 폴리(A) 서열은 알파바이러스에 대해 천연 폴리(A) 서열 또는 외인성 폴리(A) 서열인, 적어도 하나의 제2 폴리(A) 서열을 포함하는, 카세트, 및

(B) 지질-나노입자(LNP)로서, LNP는 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템을 캡슐화하는, 지질-나노입자(LNP).

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트는 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트와 동일한, 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 용량에 대한 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트는 동일한, 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 뉴클레오티드 7544 및 11175가 결여된 것을 제외하고 서열번호: 3 또는 서열번호: 5의 서열을 포함하는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스를 포함하는 알파바이러스 백본을 포함하는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, RNA 알파바이러스 백본은 서열번호: 6 또는 서열번호: 7에 제시된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 카세트는 위치 7544에 삽입되어 서열번호: 3 또는 서열번호: 5의 서열에 제시된 바와 같이 염기쌍 7544와 11175 사이의 결실을 대체하는, 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV 벡터는

(a) ChAdV 백본으로서, ChAdV 백본은

(i) 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열, 및

(ii) 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함하는, ChAdV 백본; 및

(b) 카세트로서, 카세트는

(i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열:

a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열,

b. 임의로 5' 링커 서열, 및

c. 임의로 3' 링커 서열을 포함하는, 카세트

를 포함하며;

여기서 카세트는 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열 및 적어도 하나의 폴리(A) 서열에 작동가능하게 연결되는, 방법.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV68 벡터 백본을 포함하며, ChAdV68 벡터 백본은 (1) E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403, (2) E3 결실에

상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825, 및 임의로 (3) ChAdV68의 부분적으로 결실된 E4 유전자에 상응하는 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642가 결여된 것을 제외하고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하는, 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 카세트는 E1 영역, E3 영역, 및/또는 카세트의 혼입을 가능하게 하는 임의의 결실된 AdV 영역에서 ChAdV 백본에 삽입되는, 방법.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자에 대한 증가된 결합 친화도를 갖도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는, 방법.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자에 대한 증가된 결합 안정성을 갖도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는, 방법.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자 상에 제시될 가능성이 증가되도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는, 방법.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 변경은 점 돌연변이, 프레임시프트 돌연변이, 비-프레임시프트 돌연변이, 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 스플라이스 변이, 게놈 재배열, 또는 프로테아좀-생성 스플라이싱된 항원을 포함하는, 방법.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 암을 갖는 것으로 알려지거나 의심되는 대상체에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 에피토프를 인코딩하는, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 암은 폐암, 흑색종, 유방암, 난소암, 전립선암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 방광암, 뇌암, B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 림프구성 백혈병, 비소세포 폐암, 및 소세포 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 2-10, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 임의로 각 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하는, 방법.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산

서열을 포함하며, 임의로 각 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하는, 방법.

청구항 88

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 카세트는 카세트에서 인접한 서열에 의해 형성된 접합 에피토프 서열을 포함하며, 적어도 하나 또는 각 접합 에피토프 서열은 MHC에 대해 500 nM 초과의 친화도를 갖고/갖거나 각 접합 에피토프 서열은 비-자가인, 방법.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 카세트는 번역된 야생형 핵산 서열을 포함하는 비치료적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 에피토프 핵산 서열을 인코딩하지 않으며, 비치료적 에피토프는 대상체의 MHC 대립유전자 상에 나타날 것으로 예측되는, 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 비치료적인 예측된 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 에피토프 서열은 카세트에서 인접한 서열에 의해 형성된 접합 에피토프 서열인, 방법.

청구항 92

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 예측은 비치료적 에피토프의 서열을 제시 모델에 입력함으로써 생성된 제시 가능성을 기반으로 하는, 방법.

청구항 93

제1항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 제형화되는, 방법.

청구항 94

제1항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나 이상은 대상체의 종양으로부터 유래되는, 방법.

청구항 95

제1항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열은 대상체의 종양으로부터 유래되는, 방법.

청구항 96

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나 이상은 대상체의 종양으로부터 유래되지 않는, 방법.

청구항 97

제1항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열은 대상체의 종양으로부터 유래되지 않는, 방법.

청구항 98

제1항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 서열번호: 57-29,364로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2021년 9월 17일에 출원된 미국 가출원 제63/245,663호, 2021년 11월 18일에 출원된 미국 가출원 제63/281,027호, 및 2022년 3월 16일에 출원된 미국 가출원 제63/320,685호의 이익을 주장하며, 이는 모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그 전체가 참고로 포함된다. XXX에 생성된 상기 ASCII 사본의 이름은 XXX이고 크기는 ###,### 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 종양-특이적 항원에 기반한 치료용 백신은 차세대 맞춤형 암 면역요법으로서 큰 가능성을 가지고 있다.[1-3] 예를 들어, 비소세포 폐암(NSCLC) 및 흑색종과 같이 돌연변이 부담이 높은 암은 상대적으로 신생항원 생성 가능성이 상대적으로 더 높기 때문에 이러한 요법의 특히 매력적인 대상이다.[4,5] 초기 증거에 따르면 신생항원-기반 백신 접종은 T 세포 반응을 유도할 수 있고[6] 신생항원 표적 세포-요법은 특정 상황에서 선택된 환자의 종양 퇴행을 유발할 수 있다.[7]

[0006] 신생항원 백신 설계에 대한 한가지 질문은 대상체 종양에 존재하는 많은 코딩 돌연변이 중 어느 것이 "최상의" 치료적 신생 항원, 예를 들어 항-종양 면역을 유도하고 종양 관해를 유발할 수 있는 항원을 생성할 수 있는지에 대한 문제이다.

[0007] 초기 방법은 차세대 시퀀싱, RNA 유전자 발현, 및 후보 신생항원 펩티드의 MHC 결합 친화도의 예측을 사용하여 돌연변이-기반 분석을 포함하는 것으로 제안되었다[8]. 그러나, 이들 제안된 방법은 유전자 발현 및 MHC 결합 외에 많은 단계(예를 들어, TAP 수송, 프로테아좀 절단, 및/또는 TCR 인식)를 함유하는 에피토프 생성 공정 전체를 모델링하는 데 실패할 수 있다[9]. 결과적으로, 기존의 방법들은 감소된 낮은 양성 예측도(PPV)를 겪을 가능성이 있다.

[0008] 실제로, 다중의 군에 의해 수행된 종양 세포에 의해 제시된 펩티드의 분석은 유전자 발현 및 MHC 결합 친화도를 사용하여 제시될 것으로 예측되는 펩티드의 <5%이 종양 표면 MHC 상에서 발견될 수 있음을 제시하였다[10,11]. 결합 예측과 MHC 제시 사이의 이러한 낮은 상관관계는 돌연변이의 수 단독에 비해 관문 억제제 반응에 대한 결합-제한된 신생항원의 예측 정확도 개선의 결여에 대한 최근 관찰에 의해 추가로 강화되었다[12].

[0009] 기존의 제시 예측 방법의 낮은 양성 예측도(PPV)는 신생항원-기반 백신 설계에 문제를 제시한다. 낮은 PPV의 예측을 사용하여 백신을 설계하는 경우, 대부분의 환자는 치료적 신생항원을 수용할 가능성이 낮고 여전히 하나 초과를 수용할 가능성이 보다 적다(심지어 제시된 모든 펩티드가 면역원성이라고 가정함). 따라서, 현재의 방법을 사용한 신생항원 백신접종은 종양을 갖는 상당한 수의 대상체에서 성공할 가능성이 낮다.

[0010] 추가적으로, 이전의 접근법은 *시스*-작용성 돌연변이만을 사용하여 후보 신생항원을 생성하였고, 다중의 종양 유형에서 발생하고 많은 유전자의 비정상적인 스플라이싱을 초래하는 스플라이싱 인자에서의 돌연변이[13], 및 프로테아제 절단 부위를 생성하거나 제거하는 돌연변이를 포함하는 neo-ORF의 추가 공급원을 고려하는 것을 크게 간과하였다.

[0011] 최종적으로, 종양 게놈 및 전사체 분석에 대한 표준 접근법은 라이브러리 구축, 엑솜 및 전사체 포획, 시퀀싱, 또는 데이터 분석에서 준최적 조건으로 인해 후보 신생항원을 야기하는 체세포 돌연변이를 놓칠 수 있다. 마찬가지로, 표준 종양 분석 접근법은 우연히 서열 아티팩트 또는 생식계열 다형성을 신생항원으로 촉진하여, 각각 백신 용량의 비효율적인 사용 또는 자가-면역 위험을 초래할 수 있다.

[0012] 현재의 신생항원 예측 방법의 과제에 더하여, 인간에서 신생항원 전달에 사용될 수 있는 이용가능한 벡터 시스

템에 대한 특정 과제 또한 존재하며, 이들 중 다수는 인간으로부터 유래된다. 예를 들어, 많은 인간은 이전의 자연적 노출의 결과로 인간 바이러스에 대한 기존 면역성을 가지고 있으며, 이 면역성은 암 치료를 위한 신생항원 전달을 위해 재조합 인간 바이러스를 사용하는 데 주요 장애물이 될 수 있다.

[0013] 또한, 암을 갖는 환자에서 공유되는 항원의 표적화는 돌연변이를 갖는 신생항원뿐만 아니라 돌연변이를 갖지 않는 종양 항원(예를 들어, 부적절하게 발현되는 종양 항원) 둘 모두의 표적화를 포함하는 백신 전략으로서 큰 가능성을 갖는다. 공유 항원 백신 전략의 과제는 적어도 상기 논의된 것들을 포함한다.

발명의 내용

[0014] **요약**

[0015] 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하고 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 프라이밍 용량으로 투여되고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하나 이상의 부스팅 용량으로 투여되고, 여기서 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 여기서 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 및 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 유지 요법으로 투여된다.

[0016] 일부 측면에서, 유지 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하며, 임의로 여기서 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함한다.

[0017] 또한, 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하고 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 프라이밍 용량으로 투여되고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하나 이상의 부스팅 용량으로 투여되고, 여기서 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 여기서 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 및 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 보조 요법으로 투여된다.

[0018] 일부 측면에서, 보조 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하며, 임의로 여기서 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함한다.

[0019] 또한, 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (1) 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물 또는 (2) 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 또는 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템은 보조 요법으로 투여되고, 여기서 발현 시스템은 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩하고, 여기서 보조 요법은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합 요법을 포함하고, 임의로 여기서 화학요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함한다.

[0020] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 하나 이상의 부스팅 용량이 투여된다.

[0021] 일부 측면에서, 조합 요법은 플루오로피리미딘 및/또는 베바시주맙을 포함한다. 일부 측면에서, 조합 요법은 플루오로피리미딘 및 베바시주맙을 포함한다. 일부 측면에서, 조합 요법은 플루오로피리미딘, 베바시주맙, 및 면역 관문 억제제 요법을 포함한다. 일부 측면에서, 면역 관문 억제제는 (1) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, (2) 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및/또는 (3) 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 측면에서, 면역 관문 억제제 요법은 프라이밍 용량 및 제1 부스팅 용량 만으로 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙을 포함한다. 일부 측면에서, 이필리무맙은 30 mg의 용량으로 피하 투여된다. 일부 측면에서, 면역 관문 억제제 요법은 4주마다(Q4W)의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙 또는 니볼루맙을 포함한다. 일부 측면에서, 아테졸리주맙은 1680 mg의 용량으로 정맥내 투여된다. 일부 측면에서, 니볼루맙은 480 mg의 용량으로 정맥내 투여된다.

[0022] 일부 측면에서, 면역 관문 억제제 요법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함한다. 일부 측면에서, 면역 관문 억제제 요법은 적어도 13회의 투여를 포

함한다. 일부 측면에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 적어도 13회의 투여를 포함한다.

[0023] 일부 측면에서, 대상체는 이전에 종양 및/또는 암성 조직을 제거하기 위한 수술, 화학요법, 면역요법(예를 들어, 면역 관문 억제제 요법), 방사선 요법, 또는 이의 조합을 받았다. 일부 측면에서, 선행 화학요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및/또는 베바시주맙을 포함한다. 일부 측면에서, 선행 화학요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및 베바시주맙을 포함한다. 일부 측면에서, 선행 화학요법은 유지 요법의 투여 전 최대 24주 동안 투여된다.

[0024] 상기 청구항 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 대상체는 결장직장암(CRC)을 갖는다. 일부 측면에서, CRC는 병기 IV, 미소부수체-안정성, 및 $BRAF^{wt}$로 분류된다. 일부 측면에서, CRC는 병기 II 또는 III으로 분류된다.

[0025] 일부 측면에서, 대상체는 ctDNA 양성으로 분류된다.

[0026] 일부 측면에서, 2회 이상의 부스팅 용량이 투여된다. 일부 측면에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8회의 부스팅 용량이 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 부스팅 용량으로 추가로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 부스팅 용량은 단일 부스팅 용량으로만 투여된다.

[0027] 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 140일차 또는 약 140일차에 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 20주차 또는 약 20주차에 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 5개월차 또는 약 5개월차에 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 140일차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 20주차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 5개월차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여된다.

[0028] 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 근육내(IM), 피내(ID), 피하(SC), 또는 정맥내(IV)로 투여된다. 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 (IM)으로 투여된다. 일부 측면에서, IM 투여는 별도의(separate) 주사 부위에서 투여된다. 일부 측면에서, 별도의 주사 부위는 대향 삼각근에 있다. 일부 측면에서, 별도의 주사 부위는 각 측부의 둔근 또는 대퇴직근 부위에 있다.

[0029] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 근육내(IM), 피내(ID), 피하(SC), 또는 정맥내(IV)로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 (IM)으로 투여된다.

[0030] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 28일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4주(Q4W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 한 달 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 56일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 8주(Q8W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2개월 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여된다.

[0031] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 28일차 및 84일차 또는 약 28일차 및 약 84일차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 4주차 및 12주차 또는 약 4주차 및 약 12주차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 1개월차 및 3개월차 또는 약 1개월차 및 약 3개월차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여된다.

[0032] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4회의 부스팅 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 28, 84, 224, 및 308일차 또는 약 28, 84, 224, 및 308일차에 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 4, 12, 32, 및 44주차 또는 약 4, 12, 32, 및

44주차에 투여된다. 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 1, 3, 8, 및 11개월차 또는 약 1, 3, 8, 및 11개월차에 투여된다.

[0033] 일부 측면에서, 상기 방법은 대상체의 HLA-일배체형을 결정하거나 결정했던 것을 추가로 포함한다.

[0034] 일부 측면에서, 면역 반응을 자극하는 단계는 분자 반응을 자극하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 분자 반응은 ctDNA의 감소를 포함한다.

[0035] 일부 측면에서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 감소이다. 일부 측면에서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 30% 감소이다. 일부 측면에서, ctDNA의 감소는 ctDNA의 적어도 50% 감소이다.

[0036] 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 대상체-특이적 신생항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 20개의 대상체-특이적 신생항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다.

[0037] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하기를 포함한다: (A) 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템으로서, 여기서 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 하나 이상의 벡터를 포함하며, 여기서 하나 이상의 벡터는 하기를 포함하는, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템: (a) RNA 알파바이러스 백본으로서, 여기서 RNA 알파바이러스 백본은 (i) 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열, 및 (ii) 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함하는, RNA 알파바이러스 백본; 및 (b) 카세트로서, 여기서 카세트는 (i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열: a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열, b. 임의로 5' 링커 서열, 및 c. 임의로 3' 링커 서열; (ii) 임의로, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열; 및 (iii) 임의로, 적어도 하나의 제2 폴리(A) 서열로서, 여기서 제2 폴리(A) 서열은 알파바이러스에 대해 천연 폴리(A) 서열 또는 외인성 폴리(A) 서열인, 적어도 하나의 제2 폴리(A) 서열을 포함하는, 카세트, 및 (B) 지질-나노입자(LNP)로서, 여기서 LNP는 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템을 캡슐화하는, 지질-나노입자(LNP).

[0038] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 하기를 포함한다: (A) 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템으로서, 여기서 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 하나 이상의 벡터를 포함하며, 여기서 하나 이상의 벡터는 하기를 포함하는, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템: (a) RNA 알파바이러스 백본으로서, 여기서 RNA 알파바이러스 백본은 서열번호: 6에 제시된 핵산 서열을 포함하고, 여기서 RNA 알파바이러스 백본 서열은 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열 및 폴리(A) 서열을 포함하고, 여기서 26S 프로모터 서열은 RNA 알파바이러스 백본에 대해 내인성이고, 여기서 폴리(A) 서열은 RNA 알파바이러스 백본에 대해 내인성인, RNA 알파바이러스 백본; 및 (b) 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열과 폴리(A) 서열 사이에 통합된 카세트로서, 여기서 카세트는 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되고, 여기서 카세트는 a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열, b. 임의로 5' 링커 서열, 및 c. 임의로 3' 링커 서열을 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하는, 카세트; 및 (B) 지질-나노입자(LNP)로서, 여기서 LNP는 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템을 캡슐화하는, 지질-나노입자(LNP).

[0039] 일부 측면에서, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물에서 카세트의 각 요소의 정렬된 서열은 5'에서 3'으로 P_a-($L5_b$-N_c-$L3_d$)$_X$-($G5_e$-U_f)$_Y$-$G3_g$를 포함하는 식으로 기술되며, 여기서 P는 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 a = 0 또는 1이고, N은 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 c = 1이고, L5는 5' 링커 서열을 포함하고, 여기서 b = 0 또는 1이고, L3은 3' 링커 서열을 포함하고, 여기서 d = 0 또는 1이고, G5는 GPGPG 아미노산 링커를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 e = 0 또는 1이고, G3은 GPGPG 아미노산 링커를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 g = 0 또는 1이고, U는 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 f = 1, X = 1 내지 400이고, 여기서 각각의 X에 대해 상응하는 Nc는 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열이고, Y = 0, 1, 또는 2이고, 여기서 각각의 Y에 대해 상응하는 U_f는 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 각각의 X에 대해 상응하는 N_c는 별개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 각각의 Y에 대해 상응하는 U_f는 별개의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에

서, a= 0, b = 1, d = 1, e = 1, g = 1, h = 1, X = 20, Y = 2이고, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 RNA 알파바이러스 백본에 의해 제공된 단일 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열이고, 적어도 하나의 폴리아데닐화 폴리(A) 서열은 RNA 알파바이러스 백본에 의해 제공되는 적어도 100개의 연속적인 A 뉴클레오티드의 폴리(A) 서열이고, 카세트는 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열과 폴리(A) 서열 사이에 통합되며, 여기서 카세트는 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열 및 폴리(A) 서열에 작동가능하게 연결되고, 각각의 N은 7-15개 아미노산 길이인 MHC 클래스 I 에피토프를 인코딩하고, L5는 MHC I 에피토프의 천연 N-말단 아미노산 서열을 인코딩하는 천연 5' 링커 서열이고, 여기서 5' 링커 서열은 적어도 3개의 아미노산 길이인 펩티드를 인코딩하고, L3은 MHC I 에피토프의 천연 C-말단 아미노산 서열을 인코딩하는 천연 3' 링커 서열이고, 여기서 3' 링커 서열은 적어도 3개의 아미노산 길이인 펩티드를 인코딩하고, U는 각각의 PADRE 클래스 II 서열 및 파상풍 톡소이드 MHC 클래스 II 서열이고, RNA 알파바이러스 백본은 서열번호: 6에 제시된 서열이고, 각각의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열은 길이가 13 내지 25개의 아미노산인 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0040] 일부 측면에서, LNP는 이온화 가능한 아미노 지질, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, PEG-기반 코트 지질, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 지질을 포함한다. 일부 측면에서, LNP는 이온화 가능한 아미노 지질, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-기반 코트 지질을 포함한다. 일부 측면에서, 이온화 가능한 아미노 지질은 MC3-유사(디리놀레일메틸-4-디메틸아미노부티레이트) 분자를 포함한다. 일부 측면에서, LNP-캡슐화된 발현 시스템은 약 100 nm의 직경을 갖는다.

[0041] 일부 측면에서, 카세트는 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열과 적어도 하나의 폴리(A) 서열 사이에 통합된다.

[0042] 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 카세트에 작동 가능하게 연결된다.

[0043] 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 하나 이상의 +-가닥 RNA 벡터를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 +-가닥 RNA 벡터는 5' 7-메틸구아노신(m7g) 캡을 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 +-가닥 RNA 벡터는 시험관내 전사에 의해 생성된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 포유동물 세포 내에서 자가-복제된다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 아우라 바이러스, 포트 모건 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 로스 리버 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스 또는 마야로 바이러스의 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 베네수엘라 말 뇌염 바이러스의 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 아우라 바이러스, 포트 모건 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 로스 리버 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스 또는 마야로 바이러스의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 적어도 비구조 단백질-매개 증폭을 위한 서열, 26S 프로모터 서열, 폴리(A) 서열, 비구조 단백질 1(nsP1) 유전자, nsP2 유전자, nsP3 유전자 및 nsP4 유전자를 포함한다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 아우라 바이러스, 포트 모건 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 로스 리버 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스 또는 마야로 바이러스의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 적어도 비구조 단백질-매개 증폭을 위한 서열, 26S 프로모터 서열, 및 폴리(A) 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 비구조적 단백질-매개 증폭을 위한 서열은 알파바이러스 5'UTR, 51-nt CSE, 24-nt CSE, 26S 서브게놈 프로모터 서열, 19-nt CSE, 알파바이러스 3'UTR, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 구조적 비리온 단백질 캡시드, E2 및 E1을 인코딩하지 않는다. 일부 측면에서, 카세트는 아우라 바이러스, 포트 모건 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 로스 리버 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스, 신드비스 바이러스, 또는 마야로 바이러스의 뉴클레오티드 서열 내의 구조적 비리온 단백질 대신에 삽입된다. 일부 측면에서, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스는 서열번호: 3 또는 서열번호: 5의 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스는 염기쌍 7544와 11175 사이의 결실을 추가로 포함하는 서열번호: 3 또는 서열번호: 5의 서열을 포함한다. 일부 측면에서, RNA 알파바이러스 백본은 서열번호: 6 또는 서열번호: 7에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 카세트는 서열번호: 3 또는 서열번호: 5의 서열에 제시된 염기쌍 7544와 11175 사이의 결실을 대체하기 위해 위치 7544에 삽입된다. 일부 측면에서, 카세트의 삽입은 nsP1-4 유전자 및 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 폴리시스트론 RNA의 전사를 제공하며, 여기서 nsP1-4 유전자 및 적어도 하나의 핵산 서열은 분리된(separate) 열린 해독틀에 있다.

[0044] 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 RNA 알파바이러스 백본에 의해 인코딩되는 천연 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 외인성 RNA 프로모터이다. 일부 측면에서, 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열은 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열이다. 일부 측면에서, 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열은 다중의 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 각각

의 26S 프로모터 뉴클레오티드 서열은 분리된 열린 해독틀 중 하나 이상의 전사를 제공한다.

[0045] 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 각각 크기가 적어도 300 nt이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 각각 크기가 적어도 1 kb이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 크기가 각각 2 kb이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 각각 크기가 5 kb 미만이다.

[0046] 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 2개 이상의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 서로 직접적으로 연결된다. 일부 측면에서, 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 링커를 인코딩하는 핵산 서열을 갖는 별개의 항원-인코딩 핵산 서열에 연결된다. 일부 측면에서, 링커는 2개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열 또는 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열에 연결한다. 일부 측면에서, 링커는 (1) 길이가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 잔기인 연속적인 글리신 잔기; (2) 길이가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 잔기인 연속적인 알라닌 잔기; (3) 2개의 아르기닌 잔기(RR); (4) 알라닌, 알라닌, 티로신(AAY); (5) 포유동물 프로테아좀에 의해 효율적으로 처리되는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 잔기 길이의 공통 서열; 및 (6) 기원의 동족 단백질로부터 유래된 항원에 플랭킹하고 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 2-20개 아미노산 잔기 길이인 하나 이상의 천연 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 링커는 2개의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열 또는 MHC 클래스 II 서열을 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열에 연결한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 GPGPG를 포함한다.

[0047] 일부 측면에서, 항원-인코딩 핵산 서열은 항원-인코딩 핵산 서열의 발현, 안정성, 세포 트래피킹, 처리 및 제시, 및/또는 면역원성을 향상시키는 분리된 또는 인접 서열에 작동 가능하게 또는 직접적으로 연결된다. 일부 측면에서, 분리된 또는 인접 서열은 유비퀴틴 서열, 프로테아좀 표적화를 증가시키도록 변형된 유비퀴틴 서열(예를 들어, 유비퀴틴 서열은 위치 76에서 Gly에서 Ala로의 치환을 함유), 면역글로불린 신호 서열(예를 들어, IgK), 주요 조직적합성 클래스 I 서열, 리소좀-연관 막 단백질(LAMP)-1, 인간 수지상 세포 리소좀-연관 막 단백질, 및 주요 조직적합성 클래스 II 서열 중 적어도 하나를 포함하며; 임의로 여기서 프로테아좀 표적화를 증가시키기 위해 변형된 유비퀴틴 서열은 A76이다.

[0048] 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 2-10, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 임의로 여기서 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 임의로 여기서 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 2-400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 항원-인코딩 핵산 서열 중 적어도 2개는 세포 표면 상에서 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 에피토프 서열 또는 이의 일부를 인코딩한다. 일부 측면에서, MHC 클래스 I 에피토프 중 적어도 2개는 종양 세포 표면 상에서 MHC 클래스 I에 의해 제시된다.

[0049] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 적어도 하나의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 8 내지 35개의 아미노산 길이, 임의로 9-17, 9-25, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 아미노산 길이인 폴리펩티드 서열을 인코딩한다.

[0050] 일부 측면에서, 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재하고 인코딩된 에피토프 서열을 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 12-20, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 20-40개의 아미노산 길이인 폴리펩티드 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재하고, 여기서 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열은 적어도 하나의 보편적인 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 임의로 여기서 적어도 하나의 보편적인

서열은 파상풍 톡소이드 및 PADRE 중 적어도 하나를 포함한다.

[0051] 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열 또는 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열은 유도성이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열 또는 제2 프로모터 뉴클레오티드 서열은 비-유도성이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 알파바이러스에 천연인 폴리(A) 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 적어도 하나의 핵산 서열 중 적어도 하나에 작동 가능하게 연결된다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 또는 적어도 90개의 연속적인 A 뉴클레오티드이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 적어도 100개의 연속적인 A 뉴클레오티드이다.

[0052] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열은 하기의 단계를 수행함으로써 선택된다: (a) 종양으로부터 엑솜, 전사체, 또는 전체 게놈 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터 중 적어도 하나를 수득하는 단계로서, 여기서 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터가 사용되어 각 에피토프 세트의 펩티드 서열을 나타내는 데이터를 수득하는, 단계; (b) 각 에피토프의 펩티드 서열을 제시 모델에 입력하여 종양의 종양 세포 표면 상에서 MHC 대립유전자 중 하나 이상에 의해 각각의 에피토프가 제시되는 수치적 가능성 세트를 생성하는 단계로서, 수치적 가능성 세트는 적어도 수신된 질량 분석 데이터에 기반하여 확인된, 단계; 및 (c) 수치적 가능성 세트를 기반으로 에피토프 세트의 서브세트를 선택하여 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 생성하는 데 사용되는 선택된 에피토프 세트를 생성하는 단계. 일부 측면에서, 각각의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열은 하기의 단계를 수행함으로써 선택된다: (a) 종양으로부터 엑솜, 전사체, 또는 전체 게놈 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터 중 적어도 하나를 수득하는 단계로서, 여기서 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터가 사용되어 각 에피토프 세트의 펩티드 서열을 나타내는 데이터를 수득하는, 단계; (b) 각 에피토프의 펩티드 서열을 제시 모델에 입력하여 종양의 종양 세포 표면 상에서 MHC 대립유전자 중 하나 이상에 의해 각각의 에피토프가 제시되는 수치적 가능성 세트를 생성하는 단계로서, 수치적 가능성 세트는 적어도 수신된 질량 분석 데이터에 기반하여 확인된, 단계; 및 (c) 수치적 가능성 세트를 기반으로 에피토프 세트의 서브세트를 선택하여 적어도 20개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 생성하는 데 사용되는 선택된 에피토프 세트를 생성하는 단계. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트의 수는 2-20개이다. 일부 측면에서, 제시 모델은 (a) 펩티드 서열의 특정 위치에서 특정 아미노산과 MHC 대립유전자의 특정 쌍의 존재; 및 (b) 특정 위치에 특정 아미노산을 포함하는 이러한 펩티드 서열의 쌍의 MHC 대립유전자 중 특정 하나에 의해 종양 세포 표면 상에 제시될 가능성 사이의 의존성을 나타낸다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 종양 세포 표면 상에 제시될 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 대상체에서 종양-특이적 면역 반응을 유도할 수 있는 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 전문 항원 제시 세포(APC)에 의해 미경험 T 세포에 제시될 수 있는 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 APC는 수지상 세포(DC)이다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 중추 또는 말초 관용을 통해 억제될 가능성이 감소된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 대상체에서 정상 조직에 대한 자가면역 반응을 유도할 수 있는 가능성이 감소된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 엑솜 또는 전사체 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터는 종양 세포에 대한 시퀀싱을 수행함으로써 수득된다. 일부 측면에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱(NGS) 또는 임의의 대규모 병렬 시퀀싱 접근법이다.

[0053] 일부 측면에서, ChAdV 벡터는: (a) ChAdV 백본으로서, 여기서 ChAdV 백본은: (i) 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열, 및 (ii) 적어도 하나의 폴리아데닐화(폴리(A)) 서열을 포함하는, ChAdV 백본; 및 (b) 카세트로서, 여기서 카세트는: (i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열: a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열, b. 임의로 5' 링커 서열, 및 c. 임의로 3' 링커 서열을 포함하는, 카세트를 포함하고; 여기서 카세트는 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열 및 적어도 하나의 폴리(A) 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0054] 일부 측면에서, ChAdV 벡터는 (a) ChAdV 백본으로서, 여기서 ChAdV 백본은 (i) 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하는 변형된 ChAdV68 서열로서, 여기서 뉴클레오티드 2 내지 36,518은 하기가 결실된, 변형된 ChAdV68 서열: (1) E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577

내지 3403; (2) E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825; 및 임의로 (3) 부분 E4 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642; (ii) CMV 프로모터 뉴클레오티드 서열; 및 (iii) SV40 폴리아데닐화 (폴리(A)) 서열을 포함하는, ChAdV 백본; 및 (b) 카세트로서, 여기서 카세트는 (i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열: a. 인코딩된 에피토프 서열이 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 임의로 포함하는 에피토프-인코딩 핵산 서열, b. 임의로 5' 링커 서열, 및 c. 임의로 3' 링커 서열을 포함하는, 카세트를 포함하고; 여기서 카세트는 E1 결실 내에 삽입되고 카세트는 CMV 프로모터 뉴클레오티드 서열 및 SV40 폴리(A) 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0055] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 세포 표면 상의 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 것으로 알려지거나 의심되는 에피토프를 인코딩하며, 임의로 여기서 세포 표면은 종양 세포 표면 또는 감염된 세포 표면이고, 임의로 여기서 세포는 대상체의 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 폐암, 흑색종, 유방암, 난소암, 전립선암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 뇌암, B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 림프구성 백혈병, 비소세포 폐암, 및 소세포 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양 세포이거나, 여기서 세포는 병원균 감염 세포, 바이러스 감염 세포, 박테리아 감염 세포, 진균 감염 세포, 및 기생충 감염 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 감염된 세포이다. 일부 측면에서, 바이러스 감염 세포는 HIV 감염 세포이다.

[0056] 일부 측면에서, ChAdv-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물에서 카세트의 각 요소의 정렬된 서열은 5'에서 3'으로 P_a-($L5_b$-N_c-$L3_d$)$_X$-($G5_e$-U_f)$_Y$-$G3_g$를 포함하는 식으로 기술되며, 여기서 P는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열 중 적어도 하나에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터 서열을 포함하고, 여기서 a = 1이고, N은 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 c = 1이고, L5는 5' 링커 서열을 포함하고, 여기서 b = 0 또는 1이고, L3은 3' 링커 서열을 포함하고, 여기서 d = 0 또는 1이고, G5는 GPGPG 아미노산 링커를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 e = 0 또는 1이고, G3은 GPGPG 아미노산 링커를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 g = 0 또는 1이고, U는 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나를 포함하고, 여기서 f = 1, X = 1 내지 400이고, 여기서 각각의 X에 대해 상응하는 Nc는 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열이고, Y = 0, 1, 또는 2이고, 여기서 각각의 Y에 대해 상응하는 U_f는 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 각각의 X에 대해 상응하는 N_c는 별개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 각각의 Y에 대해 상응하는 U_f는 별개의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이다. 일부 측면에서, b = 1, d = 1, e = 1, g = 1, h = 1, X = 10, Y = 2이고, P는 CMV 프로모터 서열이고, 각각의 N은 7-15개 아미노산 길이인 MHC 클래스 I 에피토프를 인코딩하고, L5는 MHC I 에피토프의 천연 N-말단 아미노산 서열을 인코딩하는 천연 5' 링커 서열이고, 여기서 5' 링커 서열은 적어도 3개의 아미노산 길이인 펩티드를 인코딩하고, L3은 MHC I 에피토프의 천연 C-말단 아미노산 서열을 인코딩하는 천연 3' 링커 서열이고, 여기서 3' 링커 서열은 적어도 3개의 아미노산 길이인 펩티드를 인코딩하고, U는 각각의 PADRE 클래스 II 서열 및 파상풍 톡소이드 MHC 클래스 II 서열이고, ChAdv 벡터는 E1(nt 577 내지 3403) 결실 및 E3(nt 27,125-31,825) 결실을 갖는 서열번호: 1의 서열을 포함하는 변형된 ChAdV68 서열을 포함하고, 신생항원 카세트는 E1 결실 내에 삽입되고, 각각의 MHC 클래스 I 항원-인코딩 핵산 서열은 25개의 아미노산 길이인 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0057] 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV68 벡터 백본을 포함하며, 여기서 ChAdV68 벡터 백본은 (1) E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403, (2) E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825, 및 임의로 (3) ChAdV68의 부분적으로 결실된 E4 유전자에 상응하는 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642가 결여된 것을 제외하고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함한다.

[0058] 일부 측면에서, 카세트는 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열과 적어도 하나의 폴리(A) 서열 사이에 통합된다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 카세트에 작동가능하게 연결된다.

[0059] 일부 측면에서, ChAdV 백본은 ChAdV68 벡터 백본을 포함한다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열을 포함한다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 ChAdV68 게놈과 관련하여 또는 서열번호: 1에 제시된 서열과 관련하여 아데노바이러스 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자에서 기능적 결실을 포함하며, 임의로 여기서 아데노바이러스 백본

또는 변형된 ChAdV68 서열은 아데노바이러스 게놈과 관련하여 또는 서열번호: 1에 제시된 서열과 관련하여 (1) E1A 및 E1B; 또는 (2) E1A, E1B, 및 E3에서 완전히 결실되거나 기능적으로 결실되고, 임의로 여기서 E1 유전자는 서열번호: 1에 제시된 서열과 관련하여 적어도 뉴클레오티드 577 내지 3403의 E1 결실을 통해 기능적으로 결실되고, 임의로 여기서 E3 유전자는 서열번호: 1에 제시된 서열과 관련하여 적어도 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825의 E3 결실을 통해 기능적으로 결실된다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 ChAdV68 게놈과 관련하여 또는 서열번호: 1에 제시된 서열과 관련하여 하나 이상의 유전자 또는 조절 서열을 포함하며, 임의로 여기서 하나 이상의 유전자 또는 조절 서열은 침팬지 아데노바이러스 역 말단 반복부(ITR), E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0060] 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 부분적으로 결실된 E4 유전자를 포함한다. 일부 측면에서, 부분적으로 결실된 E4 유전자는 하기를 포함한다: A. 서열번호: 1에 제시되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642가 결여된 E4 유전자 서열; B. 서열번호: 1에 제시되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,916 내지 34,942, 뉴클레오티드 34,952 내지 35,305, 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,302 내지 35,642가 결여된 E4 유전자 서열로서, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하는, E4 유전자 서열; 및 C. 서열번호: 1에 제시되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,980 내지 36,516이 결여된 E4 유전자 서열로서, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하는, E4 유전자 서열, D. 서열번호: 1에 제시되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,979 내지 35,642가 결여된 E4 유전자 서열로서, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하는, E4 유전자 서열, E. E4Orf2의 적어도 부분 결실의 E4 결실, 완전히 결실된 E4Orf3, 및 E4Orf4의 적어도 부분 결실, F. E4Orf2의 적어도 부분 결실의 E4 결실, E4Orf3의 적어도 부분 결실, 및 E4Orf4의 적어도 부분 결실, G. E4Orf1의 적어도 부분 결실의 E4 결실, 완전히 결실된 E4Orf2, 및 E4Orf3의 적어도 부분 결실, 또는 H. E4Orf2의 적어도 부분 결실의 E4 결실 및 E4Orf3의 적어도 부분 결실. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하며, 여기서 뉴클레오티드 2 내지 36,518은 하기가 결여되고: (1) E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403, (2) E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825, 및 (3) 부분 E4 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642; 임의로 여기서 항원 카세트는 E1 결실 내에 삽입된다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 29369에 제시된 서열을 포함하며, 임의로 여기서 항원 카세트는 E1 결실 내에 삽입된다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하며, 여기서 뉴클레오티드 2 내지 36,518은 하기가 결여된다: A. E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403; B. E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825; C. 부분적 E4 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642; D. 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 456 내지 3014; E. 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,816 내지 31,333; F. 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 3957 내지 10346; G. 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 21787 내지 23370; H. 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 33486 내지 36193; 또는 이의 조합. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함하며, 여기서 뉴클레오티드 2 내지 36,518은 하기가 결여된다: (1) E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403 및 (2) E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825.

[0061] 일부 측면에서, 서열이 서열번호: 1에 제시된 서열의 침팬지 아데노바이러스 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자에서 완전히 결실되거나 기능적으로 결실된 것을 제외하고, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열을 포함하며, 임의로 여기서 서열은 서열번호: 1에 제시된 서열의 (1) E1A 및 E1B; (2) E1A, E1B, 및 E3; 또는 (3) E1A, E1B, E3, 및 E4에서 완전히 결실되거나 기능적으로 결실된다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터는 서열번호: 1의 서열로부터 수득한 유전자 또는 조절 서열을 포함하며, 임의로 여기서 유전자는 서열번호: 1에 제시된 서열의 침팬지 아데노바이러스 역 말단 반복부(ITR), E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 염기쌍 번호 577과 3403 사이 또는 염기쌍 456과 3014 사이에 하나 이상의 결실을 포함하며, 임의로 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 염기쌍 27,125와 31,825 사이 또는 염기쌍 27,816과 31,333 사이에 하나 이상의 결실을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, ChAdV68 벡터 백본은 서열번호: 1에 제시된 서열의 염기쌍 번호 3957과 10346, 염기쌍 번호 21787과 23370, 및 염기쌍 번호 33486과 36193 사이에 하나 이상의 결실을 포함한다.

[0062] 일부 측면에서, 카세트는 E1 영역, E3 영역, 및/또는 카세트의 혼입을 가능하게 하는 임의의 결실된 AdV 영역에서 ChAdV 백본에 삽입된다. 일부 측면에서, ChAdV 백본은 제1 세대, 제2 세대, 또는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터 중 하나로부터 생성된다.

[0063] 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 CMV, SV40, EF-1, RSV, PGK, HSA, MCK, 및 EBV 프로모터 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 CMV 프로모터 서열이다.

[0064] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 적어도 하나는 발현되고 번역될 때 대상체의 세포 상에 MHC 클래스 I에 의해 제시될 수 있는 에피토프를 인코딩한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 적어도 하나는 발현되고 번역될 때 대상체의 세포 상에 MHC 클래스 II에 의해 제시될 수 있는 에피토프를 인코딩한다.

[0065] 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 2개 이상의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 서로 직접적으로 연결된다.

[0066] 일부 측면에서, 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 링커를 인코딩하는 핵산 서열을 갖는 별개의 항원-인코딩 핵산 서열에 연결된다. 일부 측면에서, 링커는 2개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열 또는 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열에 연결한다. 일부 측면에서, 링커는 (1) 길이가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 잔기인 연속적인 글리신 잔기; (2) 길이가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 잔기인 연속적인 알라닌 잔기; (3) 2개의 아르기닌 잔기(RR); (4) 알라닌, 알라닌, 티로신(AAY); (5) 포유동물 프로테아좀에 의해 효율적으로 처리되는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 잔기 길이의 공통 서열; 및 (6) 기원의 동족 단백질로부터 유래된 항원에 플랭킹하고 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 2-20개 아미노산 잔기 길이인 하나 이상의 천연 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 링커는 2개의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열 또는 MHC 클래스 II 서열을 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열에 연결한다. 일부 측면에서, 링커는 서열 GPGPG를 포함한다.

[0067] 일부 측면에서, 항원-인코딩 핵산 서열은 항원-인코딩 핵산 서열의 발현, 안정성, 세포 트래피킹, 처리 및 제시, 및/또는 면역원성을 향상시키는 분리된 또는 인접 서열에 작동 가능하게 또는 직접적으로 연결된다. 일부 측면에서, 분리된 또는 인접 서열은 유비퀴틴 서열, 프로테아좀 표적화를 증가시키도록 변형된 유비퀴틴 서열(예를 들어, 유비퀴틴 서열은 위치 76에서 Gly에서 Ala로의 치환을 함유), 면역글로불린 신호 서열(예를 들어, IgK), 주요 조직적합성 클래스 I 서열, 리소좀-연관 막 단백질(LAMP)-1, 인간 수지상 세포 리소좀-연관 막 단백질, 및 주요 조직적합성 클래스 II 서열 중 적어도 하나를 포함하며; 임의로 여기서 프로테아좀 표적화를 증가시키기 위해 변형된 유비퀴틴 서열은 A76이다.

[0068] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자에 대한 증가된 결합 친화도를 갖도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자에 대한 증가된 결합 안정성을 갖도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 인코딩된 에피토프가 번역된 상응하는 야생형 핵산 서열에 비해 이의 상응하는 MHC 대립유전자 상에 제시될 가능성이 증가되도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 변경은 점 돌연변이, 프레임시프트 돌연변이, 비-프레임시프트 돌연변이, 결실 돌연변이, 삽입 돌연변이, 스플라이스 변이, 게놈 재배열, 또는 프로테아좀-생성 스플라이싱된 항원을 포함한다.

[0069] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 암을 갖는 것으로 알려지거나 의심되는 대상체에서 발현되는 것으로 알려지거나 의심되는 에피토프를 인코딩한다. 일부 측면에서, 암은 고형 종양을 포함한다. 일부 측면에서, 암은 폐암, 흑색종, 유방암, 난소암, 전립선암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 방광암, 뇌암, B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 림프구성 백혈병, 비소세포 폐암, 및 소세포 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0070] 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 2-10, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 임의로 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 임의로 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 별개의 항원-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서,

적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 11-20, 15-20, 11-100, 11-200, 11-300, 11-400, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 최대 400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열은 적어도 2-400개의 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 항원-인코딩 핵산 서열 중 적어도 2개는 세포 표면 상에서 MHC 클래스 I에 의해 제시되는 에피토프 서열 또는 이의 일부를 인코딩한다. 일부 측면에서, MHC 클래스 I 에피토프 중 적어도 2개는 종양 세포 표면 상에서 MHC 클래스 I에 의해 제시된다.

[0071] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 적어도 하나의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 8 내지 35개의 아미노산 길이, 임의로 9-17, 9-25, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개의 아미노산 길이의 폴리펩티드 서열을 인코딩한다.

[0072] 일부 측면에서, 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재하고 인코딩된 에피토프 서열을 야생형 핵산 서열에 의해 인코딩된 상응하는 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 각 항원-인코딩 핵산 서열은 12-20, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는 20-40개의 아미노산 길이인 폴리펩티드 서열을 인코딩한다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 존재하고, 여기서 적어도 하나의 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열은 적어도 하나의 보편적인 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 임의로 여기서 적어도 하나의 보편적인 서열은 파상풍 톡소이드 및 PADRE 중 적어도 하나를 포함한다.

[0073] 일부 측면에서, 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 유도성이다. 일부 측면에서, 여기서 적어도 하나의 프로모터 뉴클레오티드 서열은 비-유도성이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 소 성장 호르몬(BGH) SV40 폴리A 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 또는 적어도 90개의 연속적인 A 뉴클레오티드이다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 폴리(A) 서열은 적어도 100개의 연속적인 A 뉴클레오티드이다.

[0074] 일부 측면에서, 카세트는 인트론 서열, 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE) 서열, 내부 리보솜 진입 서열(IRES) 서열, 2A 자가 절단 펩티드 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 푸린 절단 부위를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열 중 적어도 하나에 작동 가능하게 연결된 mRNA의 핵 수출, 안정성 또는 번역 효율을 향상시키는 것으로 알려진 5' 또는 3' 비-인코딩 영역의 서열 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 카세트는 녹색 형광 단백질(GFP), GFP 변이체, 분비된 알칼리성 포스파타제, 루시퍼라제, 루시페라제 변이체, 또는 검출가능한 펩티드 또는 에피토프를 포함하나 이에 제한되지 않는 리포터 유전자를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 검출가능한 펩티드 또는 에피토프는 HA 태그, 플래그(Flag) 태그, His-태그 또는 V5 태그로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 일부 측면에서, 하나 이상의 벡터는 적어도 하나의 면역 조절제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 면역 조절제는 항-CTLA4 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항-OX-40 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 측면에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 특이성 또는 다중 특이성으로 함께 연결된 단일 도메인 항체(sdAb)(예를 들어, 낙타류 항체 도메인), 또는 전장 단일-사슬 항체(예를 들어, 가요성 링커에 의해 연결된 중쇄 및 경쇄가 있는 전장 IgG)이다. 일부 측면에서, 항체의 중쇄 및 경쇄 서열은 2A 또는 IRES와 같은 자가-절단 서열에 분리된 인접 서열이거나; 또는 항체의 중쇄 및 경쇄 서열은 연속적인 글리신 잔기와 같은 가요성 링커에 의해 연결된다. 일부 측면에서, 면역 조절제는 사이토카인이다. 일부 측면에서, 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, 또는 IL-21 또는 이들 각각의 변이체 중 적어도 하나이다.

[0076] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열은 하기의 단계를 수행함으로써 선택된다: (a) 종양으로부터 엑솜, 전사체, 또는 전체 게놈 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터 중 적어도 하나를 수득하는 단계로서, 여기서 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터가 사용되어 각 에피토프 세트의 펩티드 서열을 나타내는 데이터를 수득하는, 단계; (b) 각 에피토프의 펩티드 서열을 제시 모델에 입력하여 종양의 종양 세포 표면 상에서 MHC 대립유전자 중 하나 이상에

의해 각각의 에피토프가 제시되는 수치적 가능성 세트를 생성하는 단계로서, 수치적 가능성 세트는 적어도 수신된 질량 분석 데이터에 기반하여 확인된, 단계; 및 (c) 수치적 가능성 세트를 기반으로 에피토프 세트의 서브세트를 선택하여 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 생성하는 데 사용되는 선택된 에피토프 세트를 생성하는 단계. 일부 측면에서, 각각의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열은 하기의 단계를 수행함으로써 선택된다: (a) 종양으로부터 엑솜, 전사체, 또는 전체 게놈 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터 중 적어도 하나를 수득하는 단계로서, 여기서 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터가 사용되어 각 에피토프 세트의 펩티드 서열을 나타내는 데이터를 수득하는, 단계; (b) 각 에피토프의 펩티드 서열을 제시 모델에 입력하여 종양의 종양 세포 표면 상에서 MHC 대립유전자 중 하나 이상에 의해 각각의 에피토프가 제시되는 수치적 가능성 세트를 생성하는 단계로서, 수치적 가능성 세트는 적어도 수신된 질량 분석 데이터에 기반하여 확인된, 단계; 및 (c) 수치적 가능성 세트를 기반으로 에피토프 세트의 서브세트를 선택하여 적어도 20개의 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 생성하는 데 사용되는 선택된 에피토프 세트를 생성하는 단계. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트의 수는 2-20개이다. 일부 측면에서, 제시 모델은 (a) 펩티드 서열의 특정 위치에서 특정 아미노산과 MHC 대립유전자의 특정 쌍의 존재; 및 (b) 특정 위치에 특정 아미노산을 포함하는 이러한 펩티드 서열의 쌍의 MHC 대립유전자 중 특정 하나에 의해 종양 세포 표면 상에 제시될 가능성 사이의 의존성을 나타낸다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 종양 세포 표면 상에 제시될 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 대상체에서 종양-특이적 면역 반응을 유도할 수 있는 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 전문 항원 제시 세포(APC)에 의해 미경험 T 세포에 제시될 수 있는 가능성이 증가된 에피토프를 선택하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 APC는 수지상 세포(DC)이다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 중추 또는 말초 관용을 통해 억제될 가능성이 감소된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 선택된 에피토프 세트를 선택하는 것은 제시 모델을 기반으로 선택되지 않은 에피토프에 비해 대상체에서 정상 조직에 대한 자가면역 반응을 유도할 수 있는 가능성이 감소된 에피토프를 선택하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 엑솜 또는 전사체 뉴클레오티드 시퀀싱 데이터는 종양 조직에 대한 시퀀싱을 수행함으로써 수득된다. 일부 측면에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱(NGS) 또는 대규모 임의의 대규모 병렬 시퀀싱 접근법이다.

[0077] 일부 측면에서, 카세트는 카세트에서 인접한 서열에 의해 형성된 접합 에피토프 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 적어도 하나 또는 각 접합 에피토프 서열은 MHC에 대해 500 nM 초과의 친화도를 갖는다. 일부 측면에서, 각 접합 에피토프 서열은 비-자가이다.

[0078] 일부 측면에서, 카세트는 번역된 야생형 핵산 서열을 포함하는 비치료적 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 에피토프 핵산 서열을 인코딩하지 않으며, 여기서 비치료적 에피토프는 대상체의 MHC 대립유전자 상에 나타날 것으로 예측된다. 일부 측면에서, 비치료적인 예측된 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 에피토프 서열은 카세트에서 인접한 서열에 의해 형성된 접합 에피토프 서열이다. 일부 측면에서, 예측은 비치료적 에피토프의 서열을 제시 모델에 입력함으로써 생성된 제시 가능성을 기반으로 한다. 일부 측면에서, 카세트에서 항원-인코딩 핵산 서열의 순서는 (a) 항원-인코딩 핵산 서열의 상이한 순서에 상응하는 후보 카세트 서열 세트를 생성하는 단계; (b) 각각의 후보 카세트 서열에 대해, 후보 카세트 서열 내의 비치료적 에피토프의 제시를 기반으로 제시 점수를 결정하는 단계; 및 (c) 백신에 대한 카세트 서열로서 미리결정된 임계값 미만의 제시 점수와 연관된 후보 카세트 서열을 선택하는 단계를 포함하는 일련의 단계에 의해 결정된다.

[0079] 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0080] 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나 이상은 대상체의 종양으로부터 유래된다. 일부 측면에서, 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열은 대상체의 종양으로부터 유래된다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열 중 하나 이상은 대상체의 종양으로부터 유래되지 않는다. 일부 측면에서, 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열은 대상체의 종양으로부터 유래되지 않는다. 일부 측면에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열은 서열번호: 57-29,364로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프를 포함한다.

[0081] 일부 측면에서, ChAdV-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트는 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트와 동일하다. 일부 측면에서, 각각의 용량에 대한 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물의 카세트는 동일하다.

도면의 간단한 설명

[0082] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 측면, 및 이점은 하기 설명, 및 첨부 도면과 관련하여 보다 잘 이해될 것이다:

도면(도) 1은 유지 요법 임상적 전략을 예시하는 개략도를 제시한다.

도 2는 보조 요법 임상적 전략을 예시하는 개략도를 제시한다.

도 3은 임상적 유지 요법 투여 레지멘을 제시한다. STS = 연구 치료 단계. VPS = 백신 생산 단계. SOC = 표준 치료

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] **I. 정의**

[0084] 일반적으로, 청구범위 및 명세서에 사용된 용어는 당업자에 의해 이해되는 평이한 의미를 갖는 것으로 해석되도록 의도된다. 추가 명확성을 제공하기 위해 특정 용어가 아래에 정의되어 있다. 일반 의미와 제공된 정의가 상충하는 경우 제공된 정의를 사용된다.

[0085] 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 면역 반응을 자극하는 물질이다. 항원은 신생항원일 수 있다. 항원은 특정 집단, 예를 들어 암 환자의 특정 집단에서 발견되는 항원인 "공유 항원"일 수 있다.

[0086] 본원에 사용된 용어 "신생항원"은, 예를 들어 종양 세포에서의 돌연변이 또는 종양 세포에 특이적인 번역 후 변형을 통해 상응하는 야생형 항원과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 갖는 항원이다. 신생항원은 폴리펩티드 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 돌연변이는 프레임시프트 또는 비-프레임시프트 인델, 미스센스 또는 넌센스 치환, 스플라이스 부위 변경, 게놈 재배열 또는 유전자 융합, 또는 neoORF를 발생시키는 임의의 게놈 또는 발현 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이는 또한 스플라이스 변이체를 포함할 수 있다. 종양 세포에 특이적인 번역 후 변형에는 비정상적인 인산화가 포함될 수 있다. 종양 세포에 특이적인 번역 후 변형에는 프로테아좀-생성 스플라이싱된 항원도 포함될 수 있다. Liepe et al., A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides; Science. 2016 Oct 21;354(6310):354-358을 참조한다. 예시적인 공유 신생항원은 표 A 및 AACR GENIE 결과(서열번호: 10,755-29,357)에 제시되며, 각 항원에 대한 상응하는 HLA 대립유전자(들)도 제시된다. 이러한 공유 신생항원은 투여를 통해 대상체에서 면역 반응을 유도하는데 유용하다. 대상체는 다양한 진단 방법, 예를 들어 하기에 추가로 기술된 환자 선택 방법의 사용을 통해 투여를 위해 확인될 수 있다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "종양 항원"은 대상체의 종양 세포 또는 조직에 존재하지만 대상체의 상응하는 정상 세포 또는 조직에는 존재하지 않는 항원이거나, 정상 세포 또는 조직과 비교하여 종양세포 또는 암 조직에서 발현이 변경된 것으로 알려졌거나 발견된 폴리펩티드로부터 유래된다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "항원-기반 백신"은 하나 이상의 항원, 예를 들어 다수의 항원을 기반으로 하는 백신 조성물이다. 백신은 뉴클레오티드-기반(예를 들어, 바이러스 기반, RNA 기반 또는 DNA 기반), 단백질-기반(예를 들어, 펩티드 기반) 또는 이의 조합일 수 있다.

[0089] 본원에 사용된 용어 "후보 항원"은 항원을 나타낼 수 있는 서열을 발생시키는 돌연변이 또는 기타 이상이다.

[0090] 본원에서 사용되는 용어 "코딩 영역"은 단백질을 인코딩하는 유전자의 일부(들)이다.

[0091] 본원에서 사용되는 용어 "코딩 돌연변이"는 코딩 영역에서 발생하는 돌연변이이다.

[0092] 본원에서 사용되는 용어 "ORF"는 열린 해독틀을 의미한다.

[0093] 본원에서 사용되는 용어 "NEO-ORF"는 돌연변이 또는 스플라이싱과 같은 다른 이상으로부터 발생하는 종양-특이적 ORF이다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "미스센스 돌연변이"는 하나의 아미노산에서 다른 아미노산으로의 치환을 야기하는 돌연변이이다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "넌센스 돌연변이"는 아미노산에서 정지 코돈으로의 치환을 유발하거나 표준 개시 코돈의 제거를 유발하는 돌연변이이다.

[0096] 본원에서 사용되는 용어 "프레임시프트 돌연변이"는 단백질의 프레임에 변화를 일으키는 돌연변이이다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "인델"은 하나 이상의 핵산의 삽입 또는 결실이다.

[0098] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 본원에 사용된 퍼센트 "동일성"이라는 용어는 하기 기술된 서열 비교 알고리즘(예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자에게 이용가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 사용하여 또는 육안 검사에 의해 측정된 바와 같이, 최대 일치를 위해 비교 및 정렬될 때 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 특정 퍼센트를 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 의미한다. 적용에 따라, 퍼센트 "동일성"은 비교되는 서열의 영역에 걸쳐, 예를 들어 기능적 도메인에 걸쳐 존재할 수 있거나, 대안적으로 비교될 2개의 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0099] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 테스트 서열이 비교되는 참조 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때 컴퓨터에 테스트 및 참조 서열을 입력하고 필요에 따라 서열 좌표를 지정하고 서열 알고리즘 프로그램 매개변수를 지정한다. 이어서 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 매개변수를 기반으로 참조 서열에 대한 테스트 서열(들)에 대한 서열 동일성 백분율을 계산한다. 대안적으로, 서열 유사성 또는 비유사성은 특정 뉴클레오티드, 또는 번역된 서열의 경우, 선택된 서열 위치(예를 들어, 서열 모티프)의 아미노산의 결합된 존재 또는 부재에 의해 확립될 수 있다.

[0100] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들어 국소 상동성 알고리즘에 의해(Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)), 상동성 정렬 알고리즘에 의해(Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), 유사성 탐색 방법으로(Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), 이러한 알고리즘의 전산화된 구현에 의해(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis), 또는 육안 검사(Ausubel et al., infra)로 수행될 수 있다.

[0101] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 한 예는 BLAST 알고리즘이다(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 사용할 수 있다.

[0102] 본원에서 사용되는 용어 "논스톱 또는 리드-스루(read-through)"는 천연 정지 코돈의 제거를 야기하는 돌연변이이다.

[0103] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체 또는 T 세포 수용체에 의해 전형적으로 결합되는 항원의 특정 부분이다.

[0104] 본원에 사용된 용어 "면역원성"은, 예를 들어 T 세포, B 세포 또는 둘 모두를 통해 면역 반응을 자극하는 능력이다.

[0105] 본원에서 사용되는 용어 "HLA 결합 친화도" "MHC 결합 친화도"는 특정 항원과 특정 MHC 대립유전자 사이의 결합 친화도를 의미한다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 "베이트(bait)"는 샘플로부터 DNA 또는 RNA의 특정 서열을 강화하는 데 사용되는 핵산 프로브이다.

[0107] 본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 대상체의 핵산과 대조군으로 사용되는 참조 인간 게놈 간의 차이이다.

[0108] 본원에서 사용되는 용어 "변이체 호출(variant call)"은 일반적으로 시퀀싱으로부터 변이체의 존재를 알고리즘적으로 결정하는 것이다.

[0109] 본원에서 사용되는 용어 "다형성"은 생식계열 변이체, 즉 대상체의 모든 DNA 함유 세포에서 발견되는 변이체이다.

[0110] 본원에서 사용되는 용어 "체세포 변이체"는 대상체의 비-생식계열 세포에서 발생하는 변이체이다.

[0111] 본원에서 사용되는 용어 "대립유전자"는 유전자의 버전 또는 유전자 서열의 버전 또는 단백질의 버전이다.

[0112] 본원에서 사용되는 용어 "HLA 유형"은 HLA 유전자 대립유전자의 보체이다.

[0113] 본원에서 사용되는 용어 "넌센스-매개 붕괴" 또는 "NMD"는 미성숙 정지 코돈으로 인한 세포에 의한 mRNA의 분해이다.

[0114] 본원에서 사용되는 용어 "줄기 돌연변이(truncal mutation)"는 종양 발생 초기에 발생하고 종양 세포의 상당 부분에 존재하는 돌연변이이다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "서브클로날 돌연변이"는 종양 발달에서 나중에 발생하고 종양 세포의 서브세트에만 존재하는 돌연변이이다.

[0116] 본원에서 사용되는 용어 "엑솜"은 단백질을 인코딩하는 게놈의 서브세트이다. 엑솜은 게놈의 집합적 엑손일 수 있다.

[0117] 본원에서 사용되는 용어 "로지스틱 회귀"는 종속 변수가 1과 동일한 확률의 로짓이 종속 변수의 선형 함수로 모델링되는 통계로부터의 이진 데이터에 대한 회귀 모델이다.

[0118] 본원에서 사용되는 용어 "신경망"은 일반적으로 확률적 경사 하강법 및 역전파를 통해 트레이닝되는 요소별 비선형성이 뒤따르는 다중 계층의 선형 변환으로 이루어진 분류 또는 회귀를 위한 기계 학습 모델이다.

[0119] 본원에서 사용되는 용어 "프로테옴"은 세포, 세포 군 또는 대상체에 의해 발현 및/또는 번역되는 모든 단백질 세트이다.

[0120] 본원에서 사용되는 용어 "펩티돔"은 세포 표면 상에서 MHC-I 또는 MHC-II에 의해 제시되는 모든 펩티드 세트이다. 펩티돔은 세포의 특성 또는 세포 집합체를 의미할 수 있다(예를 들어, 종양을 구성하는 모든 세포의 펩티돔의 결합을 의미하는 종양 펩티돔).

[0121] 본원에서 사용되는 "ELISpot"이라는 용어는 효소-결합 면역흡착 스팟 검정법을 의미하며, 이는 인간 및 동물에서 면역 반응을 모니터링하기 위한 일반적인 방법이다.

[0122] 본원에서 사용되는 용어 "덱스트라머"는 유동 세포측정법에서 항원-특이적 T-세포 염색에 사용되는 덱스트란-기반 펩티드-MHC 멀티머이다.

[0123] 본원에서 사용되는 용어 "관용 또는 면역 관용"은 하나 이상의 항원, 예를 들어 자기-항원에 대한 면역 무반응 상태이다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "중추 관용"은 자가-반응성 T 세포 클론을 결실시키거나 자가-반응성 T 세포 클론을 촉진하여 면역억제 조절 T 세포(Treg)로 분화시킴으로써 흉선에서 영향을 받는 관용성이다.

[0125] 본원에서 사용되는 용어 "말초 관용"은 중추 관용에서 살아남는 자가-반응성 T 세포를 하향조절하거나 애너자이징(anergizing)함으로써 이들 T 세포를 Treg로 분화하도록 촉진함으로써 말초에서 영향을 받는 관용이다.

[0126] 용어 "샘플"은 정맥 천자, 배설, 사정, 마사지, 생검, 바늘 흡인, 세척 샘플, 스크래핑, 외과적 절개, 또는 개입 또는 당업계에 알려진 다른 수단을 포함하는 수단에 의해 대상체로부터 채취한 단일 세포 또는 다중 세포 또는 세포 단편 또는 체액 분취액을 포함할 수 있다.

[0127] 용어 "대상체"는 세포, 조직 또는 유기체, 인간 또는 비인간, 생체내, 생체외 또는 시험관내, 남성 또는 여성을 포함한다. 대상체라는 용어는 인간을 포함한 포유동물을 포함한다.

[0128] 용어 "포유동물"은 인간 및 인간이 아닌 것 모두를 포괄하고 인간, 인간이 아닌 영장류, 개, 고양이, 쥐, 소, 말 및 돼지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0129] "임상적 인자"라는 용어는 대상체의 상태, 예를 들어 질환 활성도 또는 중증도의 척도를 의미한다. "임상적 인자"는 비-샘플 마커 및/또는 이에 제한되지 않는 연령 및 성별과 같은 대상체의 기타 특성을 포함하여 대상체의 건강 상태에 대한 모든 마커를 포함한다. 임상적 인자는 점수, 값 또는 결정된 조건 하에서 대상체 또는 대상체로부터의 샘플(또는 샘플 집단)의 평가에서 얻을 수 있는 일련의 값일 수 있다. 임상적 인자는 또한 마커 및/또는 유전자 발현 대리물과 같은 다른 매개변수에 의해 예측될 수 있다. 임상적 인자에는 종양 유형, 종양 서브유형, 및 흡연 이력이 포함될 수 있다.

[0130] "종양으로부터 유래된 항원-인코딩 핵산 서열"이라는 용어는 종양으로부터, 예를 들어 RT-PCR을 통해 수득된 핵산 서열; 또는 종양을 시퀀싱한 다음 시퀀싱 데이터를 사용하여, 예를 들어 당업계에 알려진 다양한 합성 또는 PCR-기반 방법을 통해 핵산 서열을 합성함으로써 얻은 서열 데이터을 지칭한다. 유래된 서열은 종양으로부터 수득한 상응하는 천연 핵산 서열과 동일한 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 서열-최적화된 핵산 서열 변이체(예를 들어, 코돈-최적화된 및/또는 발현을 위해 최적화된 것)와 같은 핵산 서열 변이체를 포함할 수 있다.

[0131] 용어 "알파바이러스"는 토가바이러스과(*Togaviridae*) 과의 구성원을 말하며 포지티브-센스 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 알파바이러스는 일반적으로 신드비스, 로스 리버, 마야로, 치쿤구니야 및 셈리키 포레스트 바이러스와 같은 구세계 또는 동부 말 뇌염, 아우라, 포트 모건 또는 베네수엘라 말 뇌염 및 그 유래 변종 TC-83과 같은

신세계로 분류된다. 알파바이러스는 일반적으로 자가-복제 RNA 바이러스이다.

[0132] 용어 "알파바이러스 백본"은 바이러스 게놈의 자가-복제를 가능하게 하는 알파바이러스의 최소 서열(들)을 지칭한다. 최소 서열은 비구조 단백질-매개 증폭을 위한 보존된 서열, 비구조 단백질 1(nsP1) 유전자, nsP2 유전자, nsP3 유전자, nsP4 유전자 및 폴리A 서열뿐만 아니라 서브게놈(예를 들어, 26S) 프로모터 요소를 포함하는 서브게놈 바이러스 RNA의 발현을 위한 서열을 포함할 수 있다.

[0133] 용어 "비구조 단백질-매개 증폭을 위한 서열"은 당업자에게 잘 알려진 알파바이러스 보존 서열 요소(CSE)를 포함한다. CSE에는 알파바이러스 5' UTR, 51-nt CSE, 24-nt CSE, 서브게놈 프로모터 서열(예를 들어, 26S 서브게놈 프로모터 서열), 19-nt CSE 및 알파바이러스 3' UTR이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0134] 용어 "RNA 중합효소"는 DNA 주형으로부터 RNA 폴리뉴클레오티드의 생산을 촉매하는 중합효소를 포함한다. RNA 중합효소는 T3, T7 및 SP6을 포함하는 박테리오파지 유래 중합효소를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0135] 용어 "지질"은 소수성 및/또는 양친매성 분자를 포함한다. 지질은 양이온, 음이온 또는 중성일 수 있다. 지질은 합성 또는 천연 유래일 수 있으며 경우에 따라 생분해성이다. 지질은 콜레스테롤, 인지질, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 접합체(PEG화된 지질)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 지질 접합체, 왁스, 오일, 글리세리드, 지방 및 지용성 비타민을 포함할 수 있다. 지질은 또한 디리놀레일메틸-4-디메틸아미노부티레이트(MC3) 및 MC3-유사 분자를 포함할 수 있다.

[0136] 용어 "지질 나노입자" 또는 "LNP"는 리포솜이라고도 하는 수성 내부를 둘러싸는 지질 함유 막을 사용하여 형성된 소포형 구조를 포함한다. 지질 나노입자는 계면활성제에 의해 안정화된 고체 지질 코어를 갖는 지질-기반 조성물을 포함한다. 코어 지질은 지방산, 아실글리세롤, 왁스 및 이들 계면활성제의 혼합물일 수 있다. 인지질, 스핑고미엘린, 담즙염(나트륨 타우로콜레이트) 및 스테롤(콜레스테롤)과 같은 생물학적 막 지질이 안정제로 활용될 수 있다. 지질 나노입자는 하나 이상의 양이온성, 음이온성 또는 중성 지질의 정의된 비율을 포함하지만 이에 제한되지 않는 상이한 지질 분자의 정의된 비율을 사용하여 형성될 수 있다. 지질 나노입자는 외부 막 껍질 내에서 분자를 캡슐화할 수 있고 이어서 표적 세포와 접촉하여 캡슐화된 분자를 숙주 세포 세포질로 전달할 수 있다. 지질 나노입자는 표면을 포함하여 비-지질 분자로 변형되거나 기능화될 수 있다. 지질 나노입자는 단일-층(unilamellar) 또는 다중-층(multilamellar)일 수 있다. 지질 나노입자는 핵산과 복합체화될 수 있다. 단층 지질 나노입자는 핵산과 복합체를 형성할 수 있으며, 여기서 핵산은 수성 내부에 있다. 다층 지질 나노입자는 핵산과 복합체를 형성할 수 있으며, 여기서 핵산은 수성 내부에 있거나 사이에 끼어 있다.

[0137] 용어 "약제학적 유효량"은 백신의 이점, 즉, 일부 측정가능한 면역의 수준을 제공하기 위해 충분한 수준의 단백질, 단백질 발현, 및/또는 세포-신호전달 활성(예를 들어, 보조제-매개된 활성화)을 갖는 세포를 제공하기 위한 투여 경로에서 유효한 백신 성분(예컨대, 펩티드, 조작된 벡터, 및/또는 보조제)의 양이다.

[0138] 약어: MHC: 주요 조직 적합성 복합체; HLA: 인간 백혈구 항원 또는 인간 MHC 유전자좌; NGS: 차세대 시퀀싱; PPV: 양성 예측값; TSNA: 종양-특이적 신생항원; FFPE: 포르말린-고정, 파라핀-포매; NMD: 넌센스-매개 붕괴; NSCLC: 비소세포 폐암; DC: 수지상 세포.

[0139] 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나", 및 "그"는 문맥이 달리 명시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다는 점에 유의해야 한다.

[0140] 특이적으로 언급되지 않거나 달리 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에 사용된 용어 "약"은 당업계의 정상적인 허용 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 내로 이해된다. 약은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다. 문맥상 달리 명확하지 않은 한, 여기에 제공된 모든 수치는 약이라는 용어로 수정된다.

[0141] 본원에서 직접 정의되지 않은 임의의 용어는 본 발명의 기술 내에서 이해되는 바와 같이 이들과 일반적으로 연관된 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 특정 용어는 본 발명의 측면의 조성물, 장치, 방법 등 및 이들을 제조하거나 사용하는 방법을 설명함에 있어서 실무자에게 추가 지침을 제공하기 위해 본원에서 논의된다. 동일한 내용이 하나 초과의 방식으로 언급될 수 있음을 인식할 것이다. 결과적으로 여기에서 논의된 용어 중 하나 이상에 대체 언어 및 동의어가 사용될 수 있다. 용어가 여기에서 설명되거나 논의되는지 여부는 중요하지 않다. 일부 동의어 또는 대체 가능한 방법, 자료 등이 제공된다. 명시적으로 언급되지 않는 한, 하나 또는 몇 개의 동의어 또는 등가물에 대한 설명은 다른 동의어 또는 등가물의 사용을 배제하지 않는다. 용어의 예를 포함하는 예의 사용은 단지 설명을 위한 것이며 본 발명의 측면의 범위 및 의미를 제한하지 않는다.

[0142] 명세서 본문 내에서 인용된 모든 참고문헌, 발행된 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다.

[0143] **II. 항원 확인**

[0144] 종양 및 정상 엑솜 및 전사체의 NGS 분석을 위한 연구 방법이 설명되었고 항원 확인 공간에 적용되었다.[6,14,15] 임상적 환경에서 항원 확인을 위한 더 큰 민감도 및 특이성을 위한 특정 최적화를 고려할 수 있다. 이러한 최적화는 실험실 공정과 관련된 영역과 NGS 데이터 분석과 관련된 영역의 두 영역으로 그룹화할 수 있다. 설명된 연구 방법은 감염성 질환 유기체, 대상체의 감염 또는 대상체의 감염된 세포에서 항원을 확인하는 것과 같은 다른 환경에서 항원을 확인하는 데에도 적용될 수 있다. 최적화의 예는 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 각각 본원에 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 참조로 포함되는 미국 특허 제10,055,540호, 미국 출원 공개 제US20200010849A1호, 미국 출원 제16/606,577호, 및 국제 특허 출원 공개 WO2020181240A1, WO/2018/195357 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있다.

[0145] 공유 항원(예를 들어, 신생항원)을 확인하는 방법은 수지상 세포와 같은 전문 항원 제시 세포를 포함하는 종양 또는 면역 세포의 세포 표면 상에 제시될 가능성이 있고/있거나, 면역원성일 가능성이 있는 대상체의 종양으로부터의 항원을 확인하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 이러한 한 방법은 대상체의 종양 세포로부터 엑솜, 전사체, 또는 전체 게놈 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 및/또는 발현 데이터 중 적어도 하나를 수득하는 단계로서, 여기서 종양 뉴클레오티드 시퀀싱 및/또는 발현 데이터를 사용하여 각각의 항원 세트(예를 들어, 각각의 신생항원의 펩티드 서열이 상응하는 야생형 펩티드 서열과 구별되도록 하는 적어도 하나의 변경을 포함하는 신생항원의 경우, 또는 펩티드가 정상 세포 또는 조직과 비교하여 종양 세포 또는 암성 조직에서 변경된 발현을 갖는 것으로 알려지거나 발견된 임의의 폴리펩티드로부터 유래되는 돌연변이가 없는 공유 항원의 경우)의 펩티드 서열을 나타내는 데이터를 수득하는, 단계; 각 항원의 펩티드 서열을 하나 이상의 제시 모델에 입력하여 각각의 항원이 대상체의 종양 세포 또는 종양에 제시된 세포의 종양 세포 표면 상의 하나 이상의 MHC 대립유전자에 의해 제시되는 일련의 수치적 가능성을 생성하는 단계로서, 수치적 가능성 세트는 적어도 수신된 질량 분석 데이터에 기반하여 확인되는, 단계; 및 선택된 항원 세트를 생성하기 위해 수치적 가능성 세트에 기반하여 항원 세트의 서브세트를 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0146] **III. 신생항원에서 종양 특이적 돌연변이의 확인**

[0147] 또한 특정 돌연변이(예를 들어, 암 세포에 존재하는 변이체 또는 대립유전자)를 확인하기 위한 방법이 본원에 개시되어 있다. 특히, 이들 돌연변이는 암을 앓는 대상체의 암세포의 게놈, 전사체, 프로테옴 또는 엑솜에 존재할 수 있지만 대상체의 정상 조직에는 존재할 수 없다. 공유 신생항원을 포함하여 종양에 특이적인 신생항원을 확인하기 위한 특정 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 각각 본원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함되는 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1, 및 국제 특허 출원 공개 WO/2018/195357 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있다. 종양에 특이적인 공유 신생항원의 예는 모든 목적을 위해 전문이 참조로 본원에 포함되는 국제 특허 출원 공보 WO2019226941A1에 더 상세히 설명되어 있다.

[0148] 종양에서의 유전적 돌연변이는 종양에서 독점적으로 단백질의 아미노산 서열의 변화를 초래한다면 종양의 면역학적 표적화에 유용한 것으로 간주될 수 있다. 유용한 돌연변이는 하기를 포함한다: (1) 단백질에서 상이한 아미노산으로 이어지는 비-동의적(non-synonymous) 돌연변이; (2) 종결 코돈이 변형되거나 결실되어 C-말단에서 새로운 종양-특이적 서열을 갖는 더 긴 단백질의 번역을 유도하는 리드-스루 돌연변이(read-through mutations); (3) 성숙한 mRNA에 인트론을 포함을 야기하여 독특한 종양-특이적 단백질 서열을 만드는 스플라이스 부위 돌연변이; (4) 2개의 단백질의 접합부에서 종양-특이적 서열을 갖는 키메라 단백질을 발생시키는 염색체 재배열(즉, 유전자 융합); (5) 새로운 종양-특이적 단백질 서열을 가진 새로운 열린 해독틀을 야기하는 프레임시프트 돌연변이 또는 결실. 돌연변이는 또한 비-프레임시프트 인델, 미스센스 또는 넌센스 치환, 스플라이스 부위 변경, 게놈 재배열 또는 유전자 융합, 또는 neoORF를 발생시키는 임의의 게놈 또는 발현 변경 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0149] 예를 들어, 종양 세포에서 스플라이스-부위, 프레임시프트, 리드스루 또는 유전자 융합 돌연변이로부터 발생하는 돌연변이를 갖는 펩티드 또는 돌연변이된 폴리펩티드는 종양 대 정상 세포에서 DNA, RNA 또는 단백질을 시퀀싱함으로써 확인할 수 있다.

[0150] 또한 돌연변이는 이전에 확인된 종양 특이적 돌연변이를 포함할 수 있다. 알려진 종양 돌연변이는 암의 체세포 돌연변이 카탈로그(COSMIC) 데이터베이스에서 찾을 수 있다.

[0151] 대상체의 DNA 또는 RNA에서 특정 돌연변이 또는 대립유전자의 존재를 검출하기 위해 다양한 방법이 이용가능하다. 이 분야의 발전으로 정확하고 쉬우며 저렴한 대규모 SNP 유전형분석이 가능해졌다. 예를 들어, 동적 대립유전자-특이적 혼성화(DASH), 마이크로플레이트 어레이 대각선 겔 전기영동(MADGE), 파이로시퀀싱, 올리고뉴클레오티드-특이적 결찰, 탁만(TaqMan) 시스템 및 아피메트릭스(Affymetrix) SNP 칩과 같은 다양한 DNA "칩" 기술을 포함한 여러 기술이 설명되었다. 이들 방법은 전형적으로 PCR에 의한 표적 유전자 영역의 증폭을 활용한다. 또 다른 방법은 침습적 절단에 이어 질량 분석 또는 고정된 패드락 프로브(immobilized padlock probe) 및 롤링-서클 증폭에 의한 작은 신호 분자의 생성을 기반으로 한다. 특정 돌연변이를 검출하기 위한 당업계에 알려진 여러 방법이 아래에 요약되어 있다.

[0152] PCR 기반 검출 수단은 다수의 마커를 동시에 다중 증폭하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 크기가 겹치지 않고 동시에 분석될 수 있는 PCR 산물을 생성하기 위해 PCR 프라이머를 선택하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 차별적으로 표지되어 각각 차별적으로 검출될 수 있는 프라이머로 상이한 마커를 증폭하는 것이 가능하다. 물론 혼성화 기반 검출 수단은 샘플에서 여러 PCR 산물의 차등 검출을 가능하게 한다. 다수의 마커의 다중 분석을 가능하게 하는 다른 기술이 당업계에 알려져 있다.

[0153] 게놈 DNA 또는 세포 RNA에서 단일 뉴클레오티드 다형성의 분석을 용이하게 하기 위해 여러 방법이 개발되었다. 예를 들어, Mundy, C. R. (미국 특허 제4,656,127호)에 개시된 바와 같이 특수화된 엑소뉴클레아제-저항성 뉴클레오티드를 사용하여 단일 염기 다형성을 검출할 수 있다. 이 방법에 따르면, 다형성 부위의 바로 3'에 있는 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머가 특정 동물 또는 인간으로부터 수득한 표적 분자에 혼성화하는 것이 허용된다. 표적 분자의 다형성 부위가 존재하는 특정 엑소뉴클레아제-저항성 뉴클레오티드 유도체에 상보적인 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 그 유도체는 혼성화된 프라이머의 끝에 혼입될 것이다. 이러한 혼입은 프라이머가 엑소뉴클레아제에 저항성이 있게 하여 검출을 허용한다. 샘플의 엑소뉴클레아제-저항성 유도체의 정체가 알려져 있기 때문에, 프라이머가 엑소뉴클레아제에 저항성이 있다는 발견은 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드(들)가 반응에서 사용된 뉴클레오티드 유도체의 다형성 부위에 상보적임을 나타낸다. 이 방법은 많은 양의 외부 서열 데이터를 결정할 필요가 없다는 장점이 있다.

[0154] 용액-기반 방법은 다형성 부위의 뉴클레오티드 정체를 결정하는 데 사용될 수 있다. Cohen, D. et al.(프랑스 특허 2,650,840; PCT 출원 제WO91/02087호). 먼디(Mundy)의 미국 특허 4,656,127의 방법에서는 다형성 부위의 바로 3'에 있는 대립유전자 서열에 상보적인 프라이머를 사용한다. 이 방법은 다형성 부위의 뉴클레오티드에 상보적인 경우 프라이머의 말단에 혼입될 표지된 디데옥시뉴클레오티드 유도체를 사용하여 상응 부위의 뉴클레오티드의 정체를 결정한다.

[0155] 유전자 비트 분석(Genetic Bit Analysis) 또는 GBA로 알려진 대안적인 방법은 Goelet, P. et al. (PCT 출원 제92/15712호)에 의해 기술된다. 고렛 등의 방법은 표지된 종결자 및 다형성 부위의 3' 서열에 상보적인 프라이머의 혼합물을 사용한다. 따라서 혼입되는 표지된 종결자는 평가되는 표적 분자의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오티드에 의해 결정되고 상보적이다. 코헨 등(프랑스 특허 2,650,840; PCT 출원 제WO91/02087호)의 방법과는 대조적으로, 고렛 등의 방법은 프라이머 또는 표적 분자가 고체 상에 고정되는 이종(heterogeneous) 상 검정일 수 있다.

[0156] DNA의 다형성 부위를 검정하기 위한 몇 가지 프라이머-안내 뉴클레오티드 혼입 절차가 문헌에 기술되었다(Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C., et al., Genomics 8:684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (미국) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)). 이러한 방법은 다형성 부위에서 염기를 구별하기 위해 표지된 데옥시뉴클레오티드의 혼입을 활용한다는 점에서 GBA와 다르다. 이러한 형식에서, 신호는 혼입된 데옥시뉴클레오티드의 수에 비례하기 때문에, 동일한 뉴클레오티드의 런에서 발생하는 다형성은 런의 길이에 비례하는 신호를 초래할 수 있다(Syvanen, A.-C., et al., Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59 (1993)).

[0157] 많은 구상이 병렬로 수백만 개의 개별 DNA 또는 RNA 분자로부터 직접 서열 정보를 수득한다. 합성에 의한 실시간 단일 분자 시퀀싱 기술은 시퀀싱되는 주형에 상보적인 초기 DNA 가닥에 혼입되는 형광 뉴클레오티드의 검출에 의존한다. 한 방법에서, 길이가 30-50 염기인 올리고뉴클레오티드는 유리 커버 슬립에 대한 5' 단부에 공유 결합으로 고정된다. 이 고정된 가닥은 두 가지 기능을 수행한다. 첫째, 주형이 표면-결합 올리고뉴클레오티드에 상보적인 포획 테일로 이루어진 경우 표적 주형 가닥에 대한 포획 부위 역할을 한다. 이들은 또한 서열 판독의

기초를 형성하는 주형 지정 프라이머 확장을 위한 프라이머 역할을 한다. 포획 프라이머는 염료를 제거하기 위한 염료-링커의 합성, 검출 및 화학적 절단의 여러 주기를 사용하여 서열 결정을 위한 고정 위치 부위로 기능한다. 각 주기에는 중합효소/표지된 뉴클레오티드 혼합물 첨가, 헹굼, 이미징 및 염료 절단이 포함된다. 대안적인 방법에서, 중합효소는 형광 공여체 분자로 변형되고 유리 슬라이드에 고정되며, 각 뉴클레오티드는 감마-포스페이트에 부착된 수용체 형광 모이어티로 색상-인코딩된다. 이 시스템은 뉴클레오티드가 새로운 사슬에 혼입될 때 형광-태그된 중합효소 및 형광으로 변형된 뉴클레오티드 사이의 상호 작용을 검출한다. 다른 합성에 의한 시퀀싱 기술도 존재한다.

[0158] 임의의 적합한 합성에 의한 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 돌연변이를 확인할 수 있다. 위에서 설명한 대로, 합성에 의한 시퀀싱 플랫폼은 현재 4가지 주요 시퀀싱 플랫폼을 현재 사용할 수 있다: 게놈 시퀀서(the Genome Sequencers from Roche/454 Life Sciences), 1G 분석기(the 1G Analyzer from Illumina/Solexa, the SOLiD system from Applied BioSystems), 및 헬리스코프 시스템(the Heliscope system from Helicos Biosciences). 합성에 의한 시퀀싱 플랫폼은 또한 퍼시픽 바이오사이언스(Pacific BioSciences) 및 비지겐 바이오테크놀로지스(VisiGen Biotechnologies)에 의해 기술되었다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱되는 다수의 핵산 분자는 지지체(예를 들어, 고체 지지체)에 결합된다. 지지체에 핵산을 고정하기 위해 포획 서열/보편적인 프라이밍 부위를 주형의 3' 및/또는 5' 단부에 추가할 수 있다. 핵산은 포획 서열을 지지체에 공유 부착된 상보적 서열에 혼성화함으로써 지지체에 결합될 수 있다. 포획 서열(보편적인 포획 서열이라고도 지칭)은 이중으로 보편적인 프라이머 역할을 할 수 있는 지지체에 부착된 서열에 상보적인 핵산 서열이다.

[0159] 포획 서열에 대한 대안으로서, 커플링 쌍의 구성원(예를 들어, 항체/항원, 수용체/리간드, 또는 예를 들어 미국 특허 출원 제2006/0252077호에 기술된 바와 같은 아비딘-비오틴 쌍)은 커플링 쌍의 각각의 제2 구성원으로 코팅된 표면 상에 포획될 각각의 단편에 연결될 수 있다.

[0160] 포획 후, 서열은 합성에 의한 주형-의존성 시퀀싱을 포함하는, 예를 들어 실시예 및 미국 특허 번호 7,283,337에 기술된 단일 분자 검출/시퀀싱에 의해 분석될 수 있다. 합성에 의한 시퀀싱에서, 표면-결합 분자는 중합효소의 존재 하에 다수의 표지된 뉴클레오티드 트리포스페이트에 노출된다. 주형의 서열은 성장 사슬의 3' 단부에 혼입된 표지된 뉴클레오티드의 순서에 의해 결정된다. 이는 실시간으로 수행하거나 단계별 반복 모드로 수행할 수 있다. 실시간 분석을 위해, 각 뉴클레오티드에 대한 서로 다른 광학 표지를 혼입할 수 있으며 혼입된 뉴클레오티드의 자극을 위해 다중 레이저를 활용할 수 있다.

[0161] 시퀀싱은 또한 다른 대규모 병렬 시퀀싱 또는 차세대 시퀀싱(NGS) 기술 및 플랫폼을 포함할 수 있다. 대규모 병렬 시퀀싱 기술 및 플랫폼의 추가 예로는 Illumina HiSeq 또는 MiSeq, Thermo PGM 또는 Proton, Pac Bio RS II 또는 Sequel, Qiagen의 Gene Reader 및 Oxford Nanopore MinION이 있다. 추가 유사한 현재 대규모 병렬 시퀀싱 기술은 물론 이러한 기술의 미래 세대를 사용할 수 있다.

[0162] 임의의 세포 유형 또는 조직을 활용하여 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 핵산 샘플을 얻을 수 있다. 예를 들어, DNA 또는 RNA 샘플은 종양 또는 체액, 예를 들어 알려진 기술(예를 들어, 정맥 천자)로 얻은 혈액 또는 타액에서 얻을 수 있다. 대안적으로, 핵산 테스트는 건조한 샘플(예를 들어, 모발 또는 피부)에서 수행될 수 있다. 또한, 시퀀싱을 위해 종양으로부터 샘플을 얻을 수 있고 정상 조직이 종양과 동일한 조직 유형인 시퀀싱을 위해 정상 조직으로부터 또 다른 샘플을 얻을 수 있다. 시퀀싱을 위해 종양으로부터 샘플을 얻을 수 있고 정상 조직이 종양에 비해 별개의 조직 유형인 시퀀싱을 위해 정상 조직으로부터 또 다른 샘플을 얻을 수 있다.

[0163] 종양은 폐암, 흑색종, 유방암, 난소암, 전립선암, 신장암, 위암, 결장암, 고환암, 두경부암, 췌장암, 뇌암, B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 T 세포 림프구성 백혈병, 비소 세포 폐암 및 소세포 폐암 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0164] 대안적으로, 종양 세포 상의 MHC 단백질에 결합된 돌연변이 펩티드의 존재를 확인하거나 검증하기 위해 단백질 질량분석법을 사용할 수 있다. 펩티드는 종양 세포 또는 종양에서 면역침전된 HLA 분자에서 산으로 용출된 다음 질량분석법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0165] **IV. 항원**

[0166] 항원은 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항원은 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 RNA 서열일 수 있다. 따라서 백신에 유용한 항원은 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 공유 신생항원은 표 A (서열번호: 10,755-21,015 참조) 및 AACR GENIE 결과 (서열번호: 21,016-29,357 참조)에 제시된다. 공유 항원은 표 1.2에 제시된다(서열번호: 57-10,754 참조).

[0167] 본원에 개시된 방법에 의해 확인된 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 분리된 펩티드, 알려진 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 펩티드, 및 본원에 개시된 방법에 의해 확인된 돌연변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편이 개시된다. 신생항원 펩티드는 신생항원이 관련 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(예를 들어, DNA 또는 RNA)을 포함하는 코딩 서열의 맥락에서 기술될 수 있다.

[0168] 정상 세포 또는 조직과 비교하여 종양 세포 또는 암성 조직에서 발현이 변경된 것으로 알려졌거나 발견된 임의의 폴리펩티드, 예를 들어, 정상 세포 또는 조직에 비해 종양 세포 또는 암 조직에서 비정상적으로 발현된 것으로 알려졌거나 발견된 임의의 폴리펩티드로부터 유래된 펩티드가 본원에 또한 기술된다. 항원성 펩티드가 유도될 수 있는 적합한 폴리펩티드는, 예를 들어 COSMIC 데이터베이스에서 찾을 수 있다. COSMIC은 인간 암의 체세포 돌연변이에 대한 포괄적인 정보를 선별한다. 펩티드는 종양 특이적 돌연변이를 함유한다. 종양 항원(예를 들어, 공유 종양 항원 및 종양 신생항원)은 이로 제한되지 않으나 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 제17/058,128호에 기술된 것을 포함할 수 있다. 항원 펩티드는 항원이 관련된 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(예를 들어, DNA 또는 RNA)을 포함하는 코딩 서열의 맥락에서 기술될 수 있다. 수지상 세포와 같은 전문적인 항원 제시 세포를 포함하여, 종양 세포 또는 면역 세포와 같은 세포의 세포 표면 상에 제시될 것으로 예측되는 항원이 선택될 수 있다. 면역원성으로 예측되는 항원이 선택될 수 있다.

[0169] 항원 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드는 1000 nM 미만의 IC50 값을 갖는 MHC와의 결합 친화도, MHC 클래스 I 펩티드의 경우 길이 8-15, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산, 프로테아좀 절단을 촉진하는 펩티드 내부 또는 근처에 서열 모티프의 존재, 및 TAP 수송을 촉진하는 서열 모티프의 존재 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. MHC 클래스 II 펩티드의 경우 길이는 6-30, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산이고, 세포외 또는 리소좀 프로테아제(예를 들어, 카텝신) 또는 HLA-DM 촉매된 HLA 결합에 의한 절단을 촉진하는 펩티드 내부 또는 근처에 서열 모티프가 존재한다.

[0170] 하나 이상의 항원이 종양의 표면 상에 제시될 수 있다.

[0171] 하나 이상의 항원은, 예를 들어 대상체에서 T 세포 반응 및/또는 B 세포 반응을 자극할 수 있는 종양이 있는 대상체에서 면역원성일 수 있다. 하나 이상의 항원은 하나 이상의 항원을 인식하는 항체(예를 들어, 종양을 인식하는 항체)의 생성과 같은 B 세포 반응을 자극할 수 있다. 항체는 선형 폴리펩티드 서열을 인식하거나 2차 및 3차 구조를 인식할 수 있다. 따라서, B 세포 항원은 전장 단백질, 단백질 서브유닛, 단백질 도메인, 또는 2차 및 3차 구조를 가질 것으로 알려져 있거나 예측되는 임의의 폴리펩티드 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는 선형 폴리펩티드 서열 또는 2차 및 3차 구조를 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 종양에 대한 B 세포 반응을 자극할 수 있는 항원은 종양 세포의 표면 상에서 발견되는 항원일 수 있다. 종양에 대한 B 세포 반응을 유발할 수 있는 항원은 종양에서 발현되는 세포내 신생항원일 수 있다.

[0172] 하나 이상의 항원은 T 세포 반응을 자극할 수 있는 항원(예를 들어, 예측된 T 세포 에피토프 서열을 포함하는 펩티드) 및 B 세포 반응을 자극할 수 있는 별개의 항원(예를 들어, 전장 단백질, 단백질 서브유닛, 단백질 도메인)의 조합을 포함할 수 있다.

[0173] 대상체에서 자가면역 반응을 자극하는 하나 이상의 항원은 대상체에 대한 백신 생성과 관련하여 고려에서 제외될 수 있다.

[0174] 적어도 하나의 항원성 펩티드 분자(예를 들어, 에피토프 서열)의 크기는 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39, 약 40, 약 41, 약 42, 약 43, 약 44, 약 45, 약 46, 약 47, 약 48, 약 49, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100, 약 110, 약 120개 이상의 아미노 분자 잔기, 및 그 안에서 유도가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서 항원성 펩티드 분자는 50개 이하의 아미노산이다.

[0175] 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 MHC 클래스 I의 경우 길이가 15개 이하이고 일반적으로 약 8개 내지 약 11개 잔기, 특히 9개 또는 10개 잔기로 구성되고; MHC 클래스 II의 경우 6-30개 잔기를 포함한다.

[0176] 원하는 경우, 더 긴 펩티드가 여러 방식으로 설계될 수 있다. 한 경우에, HLA 대립유전자에 대한 펩티드의 제시 가능성이 예측되거나 알려져 있을 때, 더 긴 펩티드는 다음 중 하나로 구성될 수 있다: (1) 각각의 상응하는 유전자 생성물의 N- 및 C-말단을 향해 2-5개 아미노산의 확장을 갖는 개별 제시 펩티드; (2) 각각에 대해 확장된 서열을 갖는 제시된 펩티드의 일부 또는 전부의 연속. 또 다른 경우, 시퀀싱에서 긴(>10개 잔기) 네오에피토프

서열이 종양에서 존재(예를 들어, 새로운 펩티드 서열을 유도하는 프레임시프트, 리드-스루 또는 인트론 포함으로 인해)하는 것으로 밝혀지면, 더 긴 펩티드는 다음으로 이루어진다: (3) 새로운 종양-특이적 아미노산의 전체 스트레치 -- 따라서 가장 강력한 HLA 제시 짧은 펩티드의 컴퓨터 또는 시험관내 테스트-기반 선택에 대한 필요성 우회. 두 경우 모두, 더 긴 펩티드를 사용하면 환자 세포에 의한 내인성 처리가 가능하고 보다 효과적인 항원 제시 및 T 세포 반응 자극으로 이어질 수 있다. 더 긴 펩티드는 또한 종양에서 발현되는 것들과 같은 펩티드의 전장 단백질, 단백질 서브유닛, 단백질 도메인, 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 더 긴 펩티드(예를 들어, 전장 단백질, 단백질 서브유닛 또는 단백질 도메인) 및 이의 조합이 B 세포 반응을 자극하기 위해 포함될 수 있다.

[0177] 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 HLA 단백질 상에 제시될 수 있다. 일부 측면에서 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 야생형 펩티드보다 더 큰 친화도로 HLA 단백질에 제시된다. 일부 측면에서, 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드는 적어도 5000 nM 미만, 적어도 1000 nM 미만, 적어도 500 nM 미만, 적어도 250 nM 미만, 적어도 200 nM 미만, 적어도 150nM 미만, 적어도 100nM 미만, 적어도 50nM 미만 또는 그 미만의 IC50을 가질 수 있다.

[0178] 일부 측면에서, 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 대상체에게 투여될 때 자가면역 반응을 유도하지 않고/않거나 면역학적 내성을 유발하지 않는다.

[0179] 또한, 적어도 2개 이상의 항원성 펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 2개의 별개의 펩티드를 함유한다. 적어도 2개의 별개의 펩티드가 동일한 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 별개의 폴리펩티드는 펩티드가 길이, 아미노산 서열, 또는 둘 다에 따라 변한다는 것을 의미한다. 펩티드는 종양-특이적 돌연변이를 포함할 수 있다. 종양-특이적 펩티드는 종양 특이적 돌연변이를 함유한다고 알려졌거나 발혀진 임의의 폴리펩티드, 또는 정상 세포 또는 조직과 비교하여 종양 세포 또는 암조직에서 변경된 발현을 갖는 것으로 알려져 있거나 발견된 임의의 폴리펩티드로부터 유래된 펩티드, 예를 들어 정상 세포 또는 조직과 비교하여 종양 세포 또는 암 조직에서 비정상적으로 발현되는 것으로 알려졌거나 발견된 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 펩티드는 감염성 질환 유기체에 대해 연관이 있는 것으로 알려졌거나 의심되는 임의의 폴리펩티드, 또는 정상 세포 또는 조직과 비교하여 감염된 세포에서 변경된 발현을 갖는 것으로 알려져 있거나 발견된 임의의 폴리펩티드로부터 유래된 펩티드일 수 있다(예를 들어, 감염성 질환 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 또는 숙주 세포에 제한된 발현을 갖는 감염성 질환 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드). 항원성 펩티드가 유래될 수 있는 적합한 폴리펩티드는, 예를 들어 COSMIC 데이터베이스 또는 AACR 유전체학 증거 종양 정보 교환(Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange)(GENIE) 데이터베이스에서 찾을 수 있다. COSMIC은 인간 암의 체세포 돌연변이에 대한 포괄적인 정보를 정리한다. AACR GENIE는 임상 등급의 암 게놈 데이터를 수만 명의 암 환자로부터 얻은 임상 결과와 집계하고 연결한다. 일부 측면에서 종양 특이적 돌연변이는 특정 암 유형에 대한 동인(driver) 돌연변이이다.

[0180] 원하는 활성 또는 특성을 갖는 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 특정 원하는 속성, 예를 들어 개선된 약리학적 특성을 제공하도록 변형될 수 있으며, 반면 원하는 MHC 분자에 결합하고 적절한 T 세포를 활성화시키기 위해 비변형된 펩티드의 생물학적 활성을 증가시키거나 적어도 실질적으로 모두 유지한다. 예를 들어, 항원성 펩티드 및 폴리펩티드는 보존적 또는 비보존적 치환과 같은 다양한 변화에 적용될 수 있으며, 이러한 변화는 개선된 MHC 결합, 안정성 또는 제시와 같은 사용상의 특정 이점을 제공할 수 있다. 보존적 치환은 아미노산 잔기를 생물학적 및/또는 화학적으로 유사한 다른 것으로, 예를 들어 하나의 소수성 잔기를 다른 것으로, 또는 하나의 극성 잔기를 다른 것으로 대체하는 것을 의미한다. 치환은 Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 및 Phe, Tyr와 같은 조합을 포함한다. 단일 아미노산 치환의 효과는 D-아미노산을 사용하여 조사할 수도 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 문헌에 기술된 잘 알려진 합성 방법을 사용하여 만들 수 있다(Merrifield, Science 232:341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979); and Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce), 2d Ed. (1984)).

[0181] 다양한 아미노산 모방체 또는 비천연 아미노산을 사용한 펩티드 및 폴리펩티드의 변형은 생체내 펩티드 및 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는데 특히 유용할 수 있다. 안정성은 여러 가지 방법으로 검정할 수 있다. 예를 들어, 펩티다제 및 인간 혈장 및 혈청과 같은 다양한 생물학적 배지를 사용하여 안정성을 테스트했다(Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab Pharmacokin. 11:291-302 (1986)). 펩티드의 반감기는 25% 인간 혈청(v/v) 검정을 사용하여 편리하게 결정할 수 있다. 프로토콜은 일반적으로 다음과 같다. 풀링된 인간 혈청(유형 AB, 비-열 비활성화)은 사용 전에 원심분리에 의해 탈지된다. 그런 다음 혈청을 RPMI 조직 배양 배지로 25%로 희석하고 펩티드 안정성을 테스트하는 데 사용한다. 소정의 시간 간격으로 소량의 반응 용액을 제거하고 6% 트리클로로아세트산

수용액 또는 에탄올에 첨가한다. 탁한 반응 샘플을 15분 동안 냉각(4℃)한 다음 회전시켜 침전된 혈청 단백질을 펠릿화한다. 펩티드의 존재는 그 다음 안정성-특이적 크로마토그래피 조건을 사용하여 역상 HPLC에 의해 결정된다.

[0182] 펩티드 및 폴리펩티드는 개선된 혈청 반감기 이외의 원하는 속성을 제공하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, CTL 활성을 자극하는 펩티드의 능력은 T 헬퍼 세포 반응을 자극할 수 있는 적어도 하나의 에피토프를 함유하는 서열에 대한 연결에 의해 향상될 수 있다. 면역원성 펩티드/T 헬퍼 접합체는 스페이서 분자에 의해 연결될 수 있다. 스페이서는 일반적으로 생리학적 조건에서 실질적으로 전하를 띠지 않는 아미노산 또는 아미노산 모방체와 같은 비교적 작은 중성 분자로 이루어진다. 스페이서는 전형적으로, 예를 들어 Ala, Gly, 또는 비극성 아미노산 또는 중성 극성 아미노산의 다른 중성 스페이서로부터 선택된다. 임의로 존재하는 스페이서는 동일한 잔기로 구성될 필요가 없고 따라서 헤테로- 또는 호모-올리고머일 수 있음이 이해될 것이다. 존재하는 경우, 스페이서는 일반적으로 적어도 1개 또는 2개의 잔기, 보다 일반적으로 3개 내지 6개의 잔기일 것이다. 대안적으로, 펩티드는 스페이서 없이 T 헬퍼 펩티드에 연결될 수 있다.

[0183] 항원성 펩티드는 펩티드의 아미노 또는 카복시 말단에서 직접적으로 또는 스페이서를 통해 T 헬퍼 펩티드에 연결될 수 있다. 항원성 펩티드 또는 T 헬퍼 펩티드의 아미노 말단은 아실화될 수 있다. 예시적인 T 헬퍼 펩티드는 파상풍 톡소이드 830-843, 인플루엔자 307-319, 말라리아 환포자소체 382-398 및 378-389를 포함한다.

[0184] 단백질 또는 펩티드는 표준 분자 생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현, 천연 소스로부터 단백질 또는 펩티드의 분리, 또는 단백질 또는 펩티드의 화학적 합성을 포함하는 당업자에게 알려진 임의의 기술에 의해 제조될 수 있다. 다양한 유전자에 상응하는 뉴클레오티드 및 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 서열은 이전에 개시되었으며, 당해 분야의 숙련가에게 알려진 컴퓨터화된 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 그러한 데이터베이스 중 하나는 국립 보건원(National Institutes of Health) 웹사이트에 있는 국립 생명 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)의 Genbank 및 진펩트(GenPept) 데이터베이스이다. 알려진 유전자에 대한 코딩 영역은 본원에 개시된 기술을 사용하여 또는 당업자에게 알려진 바와 같이 증폭 및/또는 발현될 수 있다. 대안적으로, 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드의 다양한 상업적 제제가 당업자에게 알려져 있다.

[0185] 추가 측면에서, 항원은 항원성 펩티드 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA(예를 들어, mRNA), 단일-가닥 및/또는 이중-가닥, 또는 천연 또는 안정화된 형태의 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 포스포로티에이트 백본을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 조합이며 인트론을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 전사, 번역, 전사후 처리 및/또는 RNA 안정성의 개선을 통해 발현을 개선하도록 서열-최적화될 수 있다. 예를 들어, 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 코돈-최적화될 수 있다. 본원에서 "코돈-최적화"는 주어진 유기체의 코돈 편향과 관련하여 자주 사용되지 않는 코돈을 자주 사용되는 동의(synonymous) 코돈으로 대체하는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드 서열은 전사 후 처리를 개선하도록 최적화될 수 있으며, 예를 들어 스플라이싱 모티프(예를 들어, 표준 및/또는 비밀/비표준 스플라이스 공여체, 분지 및/또는 수용체 서열)의 제거 및/또는 편향 선호된 스플라이싱 이벤트에 대한 외인성 스플라이싱 모티프(예를 들어, 스플라이스 공여체, 분지 및/또는 수용체 서열)의 도입을 통해 의도하지 않은 스플라이싱을 줄이기 위해 최적화될 수 있다. 외인성 인트론 서열은 SV40(예를 들어, SV40 미니-인트론)에서 유래되고 면역글로불린(예를 들어, 인간 β-글로빈 유전자)에서 유래된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 외인성 인트론 서열은 프로모터/인핸서 서열 및 항원(들) 서열 사이에 혼입될 수 있다. 발현 벡터에 사용하기 위한 외인성 인트론 서열은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함되는 문헌에 기술되어 있다(Callendret et al., Virology. 2007 Jul 5; 363(2): 288-302). 폴리뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 RNA 불안정성 모티프(예를 들어, AU-풍부 요소 및 3' UTR 모티프) 및/또는 반복적인 뉴클레오티드 서열의 제거를 통해 전사체 안정성을 개선하도록 최적화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 비밀 전사 개시자 및/또는 종결자의 제거를 통해 정확한 전사를 개선하도록 최적화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 비밀 AUG 개시 코돈, 미성숙 폴리A 서열 및/또는 2차 구조 모티프의 제거를 통해 번역 및 번역 정확도를 개선하도록 최적화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열은 구성 수송 요소(CTE), RNA 수송 요소(RTE) 또는 우드척 전사후 조절 요소(WPRE)의 첨가를 통해 전사체의 핵 수출을 개선하도록 최적화될 수 있다. 발현 벡터에 사용하기 위한 핵 수출 신호는 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함되는 문헌에 기술되어 있다(Callendret et al., Virology. 2007 Jul 5; 363(2): 288-302). 폴리뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 주어진 유기체의 평균 GC 함량을 반영하기 위해 GC 함량과 관련하여 최적화될 수 있다. 서열 최적화는 전사, 번역, 전사 후 처리 및/또는 RNA 안정성과 같은 하나 이상의 서열 특성의 균형을 맞출 수 있다. 서열 최적화는 전사, 번역, 전사 후 처리 및 RNA 안정성 각각의 균형을 유지하는 최적의 서열을 생성할 수 있다. 서열

최적화 알고리즘은 진아트(GeneArt)(Thermo Fisher), 코돈 최적화 툴(Codon Optimization Tool)(IDT), 쿨 툴(Cool Tool)(University of Singapore), SGI-DNA(La Jolla California)와 같은 당업자에게 알려져 있다. 항원-인코딩 단백질의 하나 이상의 영역은 별도로 서열 최적화될 수 있다.

[0186] 또 다른 측면은 폴리펩티드 또는 이의 일부를 발현할 수 있는 발현 벡터를 제공한다. 상이한 세포 유형에 대한 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있고 과도한 실험 없이 선택될 수 있다. 일반적으로 DNA는 플라스미드와 같은 발현 벡터에 적절한 방향과 발현을 위한 정확한 해독틀로 삽입된다. 필요한 경우, DNA는 원하는 숙주에 의해 인식되는 적절한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있지만, 이러한 제어는 일반적으로 발현 벡터에서 이용가능하다. 그런 다음 벡터는 표준 기술을 통해 숙주에 도입된다. 지침은 문헌에서 찾을 수 있다(Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y).

[0187] **V. 백신 조성물**

[0188] 또한 특이적 면역 반응, 예를 들어 종양-특이적 면역 반응을 일으킬 수 있는 면역원성 조성물, 예를 들어 백신 조성물이 본원에 개시된다. 백신 조성물은 전형적으로, 예를 들어 본원에 기술된 방법 또는 표 A, 표 1.2, 또는 AACR GENIE 결과에 제시된 방법을 사용하여 선택된 하나 또는 다수의 항원을 포함한다. 백신 조성물은 또한 백신으로 지칭될 수 있다.

[0189] 백신은 1 내지 30개의 펩티드, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 상이한 펩티드, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 상이한 펩티드, 또는 12, 13 또는 14 상이한 펩티드를 함유할 수 있다. 펩티드는 번역 후 변형을 포함할 수 있다. 백신은 1 내지 100개 이상의 뉴클레오티드 서열, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 이상의 상이한 뉴클레오티드 서열, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13, 또는 14개의 상이한 뉴클레오티드 서열, 또는 12, 13 또는 14개의 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 백신에는 1 내지 30개의 항원 서열, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 이상의 상이한 항원 서열, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 상이한 항원 서열, 또는 12, 13 또는 14개의 상이한 항원 서열이 포함될 수 있다.

[0190] 백신은 1 내지 30개의 항원-인코딩 핵산 서열, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 이상의 상이한 항원-인코딩 핵산 서열, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 또는 14개의 상이한 항원-인코딩 핵산 서열, 또는 12, 13 또는 14개의 상이한 항원-인코딩 핵산 서열을 포함할 수 있다. 항원-인코딩 핵산 서열은 "항원 카세트"의 항원-인코딩 부분을 지칭할 수 있다. 항원 카세트의 특징이 본원에 설명되어 있다. 항원-인코딩 핵산 서열은 하나 이상의 에피토프-인코딩 핵산 서열(예를 들어, 연접된 T 세포 에피토프를 인코딩하는 항원-인코딩 핵산 서열)을 함유할 수 있다.

[0191] 백신은 1 내지 30개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 이상의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13, 또는 14개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열, 또는 12, 13 또는 14개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 함유할 수 있다. 에피토프-인코딩 핵산 서열은 연접된 T 세포 에피토프를 인코딩하는 항원-인코딩 핵산 서열에서 각각의 T 세포 에피토프와 같은 개별 에피토프 서열에 대한 서열을 지칭할 수 있다.

[0192] 백신은 에피토프-인코딩 핵산 서열의 적어도 2회의 반복을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "반복"(또는

"되풀이"와 상호교환가능하다)은 항원-인코딩 핵산 서열내에서 동일한 핵산 에피토프-인코딩 핵산 서열(본원에 기술된 임의의 5' 링커 서열 및/또는 임의의 3' 링커 서열 포함)의 2회 이상의 반복을 의미한다. 한 예에서, 카세트의 항원-인코딩 핵산 서열 부분은 에피토프-인코딩 핵산 서열의 적어도 2회의 반복을 인코딩한다. 추가의 비제한적 예에서, 카세트의 항원-인코딩 핵산 서열 부분은 하나 초과의 별개의 에피토프를 인코딩하고, 별개의 에피토프 중 적어도 하나는 별개의 에피토프를 인코딩하는 핵산 서열의 적어도 2회의 반복에 의해 인코딩된다(즉, 적어도 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열). 예시적인 비제한적 예에서, 항원-인코딩 핵산 서열은 에피토프-인코딩 핵산 서열 에피토프-인코딩 서열 A(E_A), 에피토프-인코딩 서열 B(E_B) 및 에피토프-인코딩 서열 C(E_C)에 의해 인코딩된 에피토프 A, B 및 C를 인코딩하고, 별개의 에피토프의 적어도 하나의 반복을 갖는 예시적인 항원-인코딩 핵산 서열은 하기식에 의해 예시되지만 이에 제한되지는 않는다:

[0193] - 하나의 별개의 에피토프의 반복(에피토프 A의 반복):

[0194] E_A-E_B-E_C-E_A; 또는

[0195] E_A-E_A-E_B-E_C

[0196] - 다중 별개의 에피토프의 반복(에피토프 A, B 및 C의 반복):

[0197] E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C; 또는

[0198] E_A-E_A-E_B-E_B-E_C-E_C

[0199] - 다중 별개의 에피토프의 다중 반복(에피토프 A, B 및 C의 반복):

[0200] E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C; 또는

[0201] E_A-E_A-E_A-E_B-E_B-E_B-E_C-E_C-E_C

[0202] 상기 예는 제한적이지 않으며, 별개의 에피토프의 적어도 하나의 반복을 갖는 항원-인코딩 핵산 서열은 임의의 순서 또는 빈도로 별개의 에피토프 각각을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 순서와 빈도는 식 E_A-E_B-E_C-E_C-E_A-E_B-E_A-E_C-E_A-E_C-E_C-E_B에 의한, 예를 들어 에피토프 A, B 및 C가 있는 예에서 별개의 에피토프의 무작위 배열일 수 있다.

[0203] 또한 본원은 5'에서 3'으로 하기식으로 기술된 적어도 하나의 항원-인코딩 핵산 서열을 갖는 항원-인코딩 카세트를 제공한다:

[0204] $(E_x\text{-}(E^N{}_n)_y)_z$

[0205] 여기서, E는 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 나타내고,

[0206] n은 분리된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열의 수를 나타내고 0을 포함하는 임의의 정수이고,

[0207] E^N은 각각의 상응하는 n에 대한 분리된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 나타내고,

[0208] z의 각 반복에 대해 x = 0 또는 1, 각 n에 대해 y = 0 또는 1, x 또는 y 중 적어도 하나는 = 1, 및 z = 2 또는 그 이상이고, 여기서 항원-인코딩 핵산 서열은 E, 주어진 E^N 또는 이의 조합의 2회 이상의 반복을 포함한다.

[0209] 각각의 E 또는 E^N은 독립적으로 본원에 기술된 임의의 에피토프-인코딩 핵산 서열(예를 들어, 감염성 질환 T 세포 에피토프 및/또는 신생항원 에피토프를 인코딩하는 펩티드)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 각각의 E 또는 E^N은 식 ($L5_b$-N_c-$L3_d$)에 의해 5'에서 3'으로 기술된 뉴클레오티드 서열을 독립적으로 포함할 수 있으며, 여기서 N은 각 E 또는 E^N과 연관된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 c = 1이고, L5는 5' 링커 서열을 포함하고, 여기서 b= 0 또는 1이고, L3은 3' 링커 서열을 포함하고, 여기서 d= 0 또는 1이다. 사용될 수 있는 에피토프 및 링커는 본원에 추가로 기술되어 있다.

[0210] 에피토프-인코딩 핵산 서열(임의의 5' 링커 서열 및/또는 임의의 3' 링커 서열 포함)의 반복은 서로 선형으로

직접 연결될 수 있다(예를 들어, 위에 예시된 바와 같이 E_A-E_A-…). 에피토프-인코딩 핵산 서열의 반복은 하나 이상의 추가 뉴클레오티드 서열에 의해 분리될 수 있다. 일반적으로, 에피토프-인코딩 핵산 서열의 반복은 본원에 기술된 조성물에 적용가능한 임의의 크기의 뉴클레오티드 서열에 의해 분리될 수 있다. 한 예에서, 에피토프-인코딩 핵산 서열의 반복은 분리된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열(예를 들어, 상기 예시된 바와 같이 E_A-E_B-E_C-E_A…)에 의해 분리될 수 있다. 반복이 단일 분리된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열에 의해 분리되고 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열(임의로 5' 링커 서열 및/또는 임의로 3' 링커 서열 포함)이 25개 아미노산 길이의 펩티드를 인코딩하는 예에서, 반복은 E_A-E_B-E_A...로 표시되는 항원-인코딩 핵산과 같이 75개 뉴클레오티드로 분리될 수 있고, E_A는 75개 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 예시적인 실시예에서, 25량체 항원 Trp1 (VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ [서열번호: 86]) 및 Trp2 (TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT [서열번호: 87])의 VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDTVTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT (서열번호: 85) 서열 인코딩 반복을 갖는 항원-인코딩 핵산에서, Trp1의 반복부는 25량체 Trp2에 의해 분리되고, 따라서 Trp1 에피토프-인코딩 핵산 서열의 반복부는 75개 뉴클레오티드 Trp2 에피토프-인코딩 핵산 서열로 분리된다. 반복이 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 분리된 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열에 의해 분리되는 예에서, 각각의 에피토프-인코딩 핵산 서열(임의의 5' 링커 서열 및/또는 또는 임의의 3' 링커 서열 포함)은 25개 아미노산 길이의 펩티드를 인코딩하며, 반복은 각각 150, 225, 300, 375, 450, 525, 600 또는 675개의 뉴클레오티드로 분리될 수 있다.

[0211] 일부 경우에, 추가 항원 및/또는 에피토프를 인코딩하는 카세트의 항원 또는 에피토프는 인코딩된 다른 것들에 비해 면역우성 에피토프일 수 있다. 면역우성은 일반적으로 단 하나 또는 소수의 특이적 면역원성 펩티드에 대한 면역 반응의 왜곡이다. 면역우성은 면역 모니터링 프로토콜의 일부로 평가될 수 있다. 예를 들어, 인코딩된 항원에 대한 T 세포 및/또는 B 세포 반응을 평가함으로써 면역우성이 평가될 수 있다.

[0212] 일부 경우에, 면역우성 에피토프를 함유하는 백신 조성물을 기피하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 면역우성 에피토프를 인코딩하는 백신 카세트의 설계를 기피하는 것이 바람직할 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 추가 에피토프와 함께 면역우성 에피토프를 투여 및/또는 인코딩하는 것은 잠재적으로 추가 에피토프에 대한 백신 효능을 궁극적으로 감소시키는 것을 포함하여 추가 에피토프에 대한 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 예시적인 비-제한적 예로서, TP53-연관 네오에피토프를 포함하는 백신 조성물은 면역 반응, 예를 들어 백신 조성물 내의 다른 항원 또는 에피토프에 대한 면역 반응에 부정적인 영향을 미치는 TP53-연관 네오에피토프 쪽으로 왜곡된 T 세포 반응을 가질 수 있다.

[0213] 한 실시양태에서, 펩티드 및/또는 폴리펩티드가 상이한 MHC 클래스 I 분자 및/또는 상이한 MHC 클래스 II분자와 같은 상이한 MHC 분자와 관련될 수 있도록 상이한 펩티드 및/또는 폴리펩티드 또는 이를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 선택된다. 일부 측면에서, 하나의 백신 조성물은 가장 빈번하게 발생하는 MHC 클래스 I 분자 및/또는 상이한 MHC 클래스 II 분자와 관련될 수 있는 펩티드 및/또는 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 따라서, 백신 조성물은 적어도 2개의 바람직한, 적어도 3개의 바람직한, 또는 적어도 4개의 바람직한 MHC 클래스 I 분자 및/또는 상이한 MHC 클래스 II 분자와 관련될 수 있는 상이한 단편을 포함할 수 있다.

[0214] 백신 조성물은 특이적 세포독성 T-세포 반응 및/또는 특이적 헬퍼 T-세포 반응을 자극할 수 있다. 백신 조성물은 특이적 세포독성 T-세포 반응 및 특이적 헬퍼 T-세포 반응을 자극할 수 있다.

[0215] 백신 조성물은 특이적 B-세포 반응(예를 들어, 항체 반응)을 자극할 수 있다.

[0216] 백신 조성물은 특이적 세포독성 T-세포 반응, 특이적 헬퍼 T-세포 반응, 및/또는 특이적 B-세포 반응을 자극할 수 있다. 백신 조성물은 특이적 세포독성 T-세포 반응, 및 특이적 B-세포 반응을 자극할 수 있다. 백신 조성물은 특이적 헬퍼 T-세포 반응, 및 특이적 B-세포 반응을 자극할 수 있다. 백신 조성물은 특이적 세포독성 T-세포 반응, 특이적 헬퍼 T-세포 반응, 및 특이적 B-세포 반응을 자극할 수 있다.

[0217] 백신 조성물은 보조제 및/또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 유용한 보조제 및 담체의 예는 하기에 제공된다. 조성물은 예를 들어, T-세포에 펩티드를 제시할 수 있는 수지상 세포(DC)와 같은 단백질 또는 항원-제시 세포와 같은 담체와 연관될 수 있다.

[0218] 보조제는 백신 조성물로의 이의 혼합이 항원에 대한 면역 반응을 증가시키거나 달리 변형시키는 임의의 물질이다. 담체는 항원이 회합될 수 있는 스캐폴드 구조, 예를 들어 폴리펩티드 또는 다당류일 수 있다. 임의로, 보조제는 공유적으로 또는 비공유적으로 접합된다.

[0219] 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는 보조제의 능력은 일반적으로 면역-매개 반응의 상당하거나 실질적인 증가 또는 질환 증상의 감소에 의해 나타난다. 예를 들어, 체액성 면역의 증가는 전형적으로 항원에 대해 증가된 항체 역가의 상당한 증가에 의해 나타나고, T-세포 활성의 증가는 전형적으로 증가된 세포 증식, 또는 세포 세포독성 또는 사이토카인 분비로 나타난다. 보조제는 또한, 예를 들어 주로 체액성 또는 Th 반응을 주로 세포성 또는 Th 반응으로 변경함으로써 면역 반응을 변경할 수 있다.

[0220] 적합한 보조제는 1018 ISS, 명반, 알루미늄 염, 앰플리백스(Amplivax), AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드(Imiquimod), 이뮤팩트(ImuFact) IMP321, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, 쥬브이뮨(JuvImmune), 리포백(LipoVac), MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타니드(Montanide) IMS 1312, 몬타니드 ISA 206, 몬타니드 ISA 50V, 몬타니드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel 벡터 시스템, PLG 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 비로솜(Virosomes) 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys, 사포닌, 마이코박테리아 추출물 및 합성 박테리아 세포벽 모방체에서 유래된 아퀼라(Aquila's) QS21 스티뮬론(Aquila Biotech, Worcester, Mass., 미국), 및 리비 데톡스(Ribi's Detox), 퀼(Quil) 또는 슈퍼포스(Superfos)와 같은 기타 독점 보조제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 불완전 프로인트 또는 GM-CSF와 같은 보조제가 유용하다. 수지상 세포 및 이의 제조에 특이적인 여러 면역학적 보조제(예를 들어, MF59)는 이전에 기술된 바 있다(Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). 또한 사이토카인을 사용할 수 있다. 여러 사이토카인은 수지상 세포가 림프 조직(예를 들어, TNF-알파)으로 이동하는 데 영향을 미치도록 직접적으로 연결되어 수지상 세포가 T-림프구(예를 들어, GM-CSF, IL-1 및 IL-4) (전체가 본원에 참조로 특이적으로 포함되는 미국특허 5,849,589)에 대한 효율적인 항원-제시 세포로 성숙하는 것을 가속화하고 면역보조제(예를 들어, IL-12)로서 작용한다(Gabrilovich D I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

[0221] CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 또한 백신 환경에서 보조제의 효과를 향상시키는 것으로 보고되었다. RNA 결합 TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9와 같은 다른 TLR 결합 분자가 또한 사용될 수 있다.

[0222] 유용한 보조제의 다른 예에는 화학적으로 변형된 CpG(예를 들어, CpR, Idera), 폴리(I:C)(예를 들어, 폴리 i:CI2U), 비-CpG 박테리아 DNA 또는 RNA뿐만 아니라 면역활성 작은 분자 및 사이클로포스파미드, 수니티닙, 베바시주맙, 셀레브렉스, NCX-4016, 실데나필, 타다라필, 바르데나필, 소라페닙, XL-999, CP-547632, 파조파닙, ZD2171, AZD2171, 이필리무맙, 트레멜리무맙 및 SC58175와 같은 항체를 포함하지만 이로 제한되지 않으며, 치료적으로 및/또는 보조제로서 작용할 수 있다. 보조제 및 첨가제의 양 및 농도는 과도한 실험 없이 숙련된 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 추가 보조제는 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 사그라모스팀)와 같은 집락-자극 인자를 포함한다.

[0223] 백신 조성물은 하나 초과의 상이한 보조제를 포함할 수 있다. 또한, 치료 조성물은 상기 중 임의의 것 또는 이의 조합을 포함하는 임의의 보조제 물질을 포함할 수 있다. 백신 및 보조제가 함께 또는 임의의 적절한 순서로 별도로 투여될 수 있음이 또한 고려된다.

[0224] 담체(또는 부형제)는 보조제와 독립적으로 존재할 수 있다. 담체의 기능은, 예를 들어 특정 돌연변이체의 분자량을 증가시키거나, 활성 또는 면역원성을 증가시키거나, 안정성을 부여하거나, 생물학적 활성을 증가시키거나, 혈청 반감기를 증가시키는 것일 수 있다. 또한, 담체는 펩티드를 T 세포에 제시하는 데 도움이 될 수 있다. 담체는 당업자에게 알려진 임의의 적합한 담체, 예를 들어 단백질 또는 항원 제시 세포일 수 있다. 담체 단백질은 키홀 림펫 헤모시아닌, 트랜스페린과 같은 혈청 단백질, 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로글로불린 또는 오브알부민, 면역글로불린, 또는 호르몬, 예컨대 인슐린 또는 팔미트산일 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 인간의 면역화를 위해, 담체는 일반적으로 인간에게 허용되고 안전한 생리학적으로 허용되는 담체이다. 그러나 파상풍 톡소이드 및/또는 디프테리아 톡소이드가 적합한 담체이다. 대안적으로, 담체는 덱스트란, 예를 들어 세파로스일 수 있다.

[0225] 세포독성 T-세포(CTL)는 온전한 외래 항원 자체보다는 MHC 분자에 결합된 펩티드 형태의 항원을 인식한다. MHC 분자 자체는 항원 제시 세포의 세포 표면에 위치한다. 따라서, 펩티드 항원, MHC 분자 및 APC의 삼량체 복합체가 존재하는 경우, CTL의 활성화가 가능하다. 상응하게, 펩티드가 CTL의 활성화를 위해 사용될뿐만 아니라 추가로 각각의 MHC 분자와 함께 APC가 첨가되는 경우, 면역 반응을 향상시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서 백신 조성물은 적어도 하나의 항원 제시 세포를 추가로 함유한다.

[0226] 항원은 또한 백시니아, 계두, 자가-복제 알파바이러스, 마라바바이러스, 아데노바이러스(예를 들어, Tatsis et al., Adenoviruses, *Molecular Therapy* (2004) 10, 616−629 참조) 또는 2세대, 3세대 또는 하이브리드 2세대

/3세대 렌티바이러스 및 특정 세포 유형 또는 수용체를 표적화 하도록 설계된 모든 세대의 재조합 렌티바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 렌티바이러스와 같은 바이러스 벡터-기반 백신 플랫폼에 포함될 수 있다(예를 들어, Hu et al., Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, *Immunol Rev.* (2011) 239(1): 45-61, Sakuma et al., Lentiviral vectors: basic to translational, *Biochem J.* (2012) 443(3):603-18, Cooper et al., Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, *Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690, Zufferey et al., Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, *J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880)). 위에서 언급한 바이러스 벡터-기반 백신 플랫폼의 패키징 능력에 따라, 이 접근법은 하나 이상의 항원 펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 전달할 수 있다. 서열은 돌연변이되지 않은 서열에 의해 플랭킹될 수 있거나, 링커에 의해 분리될 수 있거나, 세포내 구획을 표적화하는 하나 이상의 서열이 선행될 수 있다(예를 들어, Gros et al., Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, *Nat Med.* (2016) 22 (4):433-8, Stronen et al., Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, *Science.* (2016) 352 (6291):1337-41, Lu et al., Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, *Clin Cancer Res.* (2014) 20(13):3401-10). 숙주에 도입되면, 감염된 세포는 항원을 발현하고, 이에 의해 펩티드(들)에 대한 숙주 면역(예를 들어, CTL) 반응을 자극한다. 면역화 프로토콜에 유용한 백시니아 벡터 및 방법은, 예를 들어 미국 특허 4,722,848에 기술되어 있다. 또 다른 벡터는 BCG(Bacille Calmette Guerin)이다. BCG 벡터는 문헌에 기술되어 있다(Nature 351:456-460 (1991)). 항원의 치료적 투여 또는 면역화에 유용한 매우 다양한 다른 백신 벡터, 예를 들어 살모넬라 타이피 벡터 등은 본원의 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

[0227] **V.A. 항원 카세트**

[0228] 하나 이상의 항원의 선택, "항원 카세트"의 클로닝 및 구성 및 바이러스 벡터로의 삽입에 사용되는 방법은 본원에 제공된 교시가 주어진 당업계의 기술 범위 내에 있다. "항원 카세트" 또는 "카세트"는 선택된 항원 또는 다수의 항원(예를 들어, 항원-인코딩 핵산 서열) 및 항원(들)을 전사하고 전사된 생성물을 발현하는 데 필요한 다른 조절 요소의 조합을 의미한다. 선택된 항원 또는 다수의 항원은 별개의 에피토프 서열을 지칭할 수 있으며, 예를 들어 카세트에서 항원-인코딩 핵산 서열은 에피토프가 전사되고 발현되도록 에피토프-인코딩 핵산 서열(또는 다수의 에피토프-인코딩 핵산 서열)을 인코딩할 수 있다. 항원 또는 다수의 항원은 전사를 허용하는 방식으로 조절 구성요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이러한 구성요소는 바이러스 벡터로 형질주입된 세포에서 항원(들)의 발현을 구동할 수 있는 통상적인 조절 요소를 포함한다. 따라서 항원 카세트는 또한 항원(들)에 연결되고 다른 임의의 조절 요소와 함께 재조합 벡터의 선택된 바이러스 서열 내에 위치하는 선택된 프로모터를 함유할 수 있다. 카세트는 표 A 및/또는 AACR GENIE 결과에 제시된 하나 이상의 신생항원, 및/또는 표 1.2에 제시된 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0229] 카세트는 별도의 프로모터에 각각 독립적으로 작동 가능하게 연결되고 및/또는 2A 리보솜 스키핑 서열 요소(예를 들어, E2A, P2A, F2A, 또는 T2A 서열) 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열 요소와 같은 다른 멀티시스트론 시스템을 사용하여 함께 연결되는 다중 항원-인코딩 핵산 서열을 함유하는 카세트와 같은 하나 이상의 항원-인코딩 핵산 서열을 가질 수 있다. 링커는 또한 TEV 또는 푸린 절단 부위와 같은 절단 부위를 가질 수 있다. 절단 부위가 있는 링커는 멀티시스트론 시스템과 같은 다른 요소와 조합하여 사용할 수 있다. 비제한적인 예시적인 예에서, 푸린 프로테아제 절단 부위는 푸린 프로테아제 절단 부위가 번역 후 2A 서열의 제거를 용이하게 하도록 구성되도록 2A 리보솜 스키핑 서열 요소와 함께 사용될 수 있다. 하나 초과의 항원-인코딩 핵산 서열을 함유하는 카세트에서, 각각의 항원-인코딩 핵산 서열은 하나 이상의 에피토프-인코딩 핵산 서열(예를 들어, 연접된 T 세포 에피토프를 인코딩하는 항원-인코딩 핵산 서열)을 함유할 수 있다.

[0230] 유용한 프로모터는 구성적 프로모터 또는 조절된(유도성) 프로모터일 수 있으며, 이는 발현될 항원(들)의 양을 제어할 수 있게 한다. 예를 들어, 바람직한 프로모터는 거대세포바이러스 즉시 초기 프로모터/인핸서의 프로모터이다(Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)). 또 다른 바람직한 프로모터는 라우스 육종 바이러스 LTR 프로모터/인핸서를 포함한다. 또 다른 프로모터/인핸서 서열은 닭 세포질 베타-액틴 프로모터이다(T. A. Kost et al, Nucl. Acids Res., 11(23):8287 (1983)). 다른 적합하거나 바람직한 프로모터는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0231] 항원 카세트는 또한 전사체(폴리(A), 폴리-A 또는 pA)의 효율적인 폴리아데닐화를 위한 신호를 제공하는 서열 및 기능적 스플라이스 공여체 및 수용체 부위를 갖는 인트론을 포함하는 바이러스 벡터 서열에 이종유래

(heterologous)인 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 예시적인 벡터에 사용되는 일반적인 폴리-A 서열은 파포바바이러스 SV-40에서 유래된 것이다. 폴리-A 서열은 일반적으로 항원-기반 서열 다음에 및 바이러스 벡터 서열 전에 카세트에 삽입될 수 있다. 일반적인 인트론 서열도 SV-40에서 유래될 수 있으며 SV-40 T 인트론 서열로 지칭된다. 항원 카세트는 또한 프로모터/인핸서 서열 및 항원(들) 사이에 위치한 이러한 인트론을 함유할 수 있다. 이들 및 기타 공통 벡터 요소의 선택은 통상적이고[Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual.", 2d edit., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989) 및 그 안에 인용된 참고 문헌 참조] 많은 이러한 서열은 Genbank뿐만 아니라 상업적 및 산업적 소스로부터 입수가능하다.

[0232] 항원 카세트는 하나 이상의 항원을 가질 수 있다. 예를 들어, 주어진 카세트는 1-10, 1-20, 1-30, 10-20, 15-25, 15-20, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의 항원을 포함할 수 있다. 항원은 서로 직접 연결될 수 있다. 항원은 또한 링커로 서로 연결될 수 있다. 항원은 N에서 C 또는 C에서 N을 포함하여 서로에 대해 임의의 방향일 수 있다.

[0233] 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 선택할 수 있는 다른 것 중에서, 항원 카세트는 VEE 백본의 결실된 구조 단백질 또는 ChAd-기반 벡터의 E1 유전자 영역 결실 또는 E3 유전자 영역 결실 부위에서와 같은 바이러스 벡터에서 임의의 선택된 결실 부위에 위치할 수 있다.

[0234] 항원 카세트는 각 요소의 정렬된 서열을 설명하기 위해 5'에서 3'로 다음식을 사용하여 기술될 수 있다:

[0235] $(P_a\text{-}(L5_b\text{-}N_c\text{-}L3_d)_X)_Z\text{-}(P2_h\text{-}(G5_e\text{-}U_f)_Y)_W\text{-}G3_g$

[0236] 여기서 P 및 P2는 프로모터 뉴클레오티드 서열을 포함하고, N은 MHC 클래스 I 에피토프-인코딩 핵산 서열을 포함하고, L5는 5' 링커 서열을 포함하고, L3은 3' 링커 서열을 포함하고, G5는 아미노산 링커를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, G3은 아미노산 링커를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 중 하나를 포함하고, U는 MHC 클래스 II 항원-인코딩 핵산 서열을 포함하고, 여기서 각각의 X에 대해 상응하는 Nc는 에피토프 인코딩 핵산 서열이고, 여기서 각각의 Y에 대해 상응하는 Uf는 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열(예를 들어, 보편적인 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열)이다. 보편적인 서열은 파상풍 톡소이드 및 PADRE 중 적어도 하나를 포함한다. 보편적인 서열은 파상풍 독소 펩티드를 포함할 수 있다. 보편적인 서열은 PADRE 펩티드를 포함할 수 있다. 보편적인 서열은 파상풍 톡소이드 및 PADRE 펩티드를 포함할 수 있다. 구성 및 정렬된 서열은 존재하는 요소의 수를 선택하여 추가로 정의할 수 있으며, 예를 들어 a = 0 또는 1, b = 0 또는 1, c = 1, d = 0 또는 1, e = 0 또는 1, f = 1, g = 0 또는 1, h = 0 또는 1, X = 1 내지 400, Y = 0, 1, 2, 3, 4 또는 5, Z = 1 내지 400, W = 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0237] 한 예에서, 존재하는 요소는 a = 0, b = 1, d = 1, e = 1, g = 1, h = 0, X = 10, Y = 2, Z = 1, 및 W = 1을 포함하고, 추가 프로모터가 존재하지 않는 경우(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본과 같은 벡터 백본에 의해 제공된 프로모터 뉴클레오티드 서열만이 존재), 10개의 MHC 클래스 I 에피토프가 존재하고, 각각에 N에 대해 5' 링커가 존재하고, 각각의 N에 대해 3' 링커가 존재하고, 2개의 MHC 클래스 II 에피토프가 존재하고, 2개의 MHC 클래스 II 에피토프를 연결하는 링커가 존재하고, 2개의 MHC 클래스 II 에피토프의 5' 단부를 최종 MHC 클래스 I 에피토프의 3' 링커에 연결하는 링커가 존재하고 및 2개의 MHC 클래스 II 에피토프의 3' 단부를 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 연결하는 링커가 존재한다. 항원 카세트의 3' 단부를 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 연결하는 예는 3' 19-nt CSE와 같은 벡터 백본에 의해 제공되는 3' UTR 요소에 직접 연결하는 것을 포함한다. 항원 카세트의 5' 단부를 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 연결하는 예는 서브게놈 프로모터 서열(예를 들어, 26S 서브게놈 프로모터 서열), 알파바이러스 5' UTR, 51-nt CSE 또는 24-nt CSE와 같은 벡터 백본의 프로모터 또는 5' UTR 요소에 직접 연결하는 것을 포함한다.

[0238] 다른 예는 하기를 포함한다: 여기서 a = 1은 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 의해 제공되는 프로모터 뉴클레오티드 서열 이외의 프로모터가 존재하는 것을 설명하고; 여기서 a = 1이고 Z는 1보다 큰 경우, 여기서 벡터 백본에 의해 제공되는 프로모터 뉴클레오티드 서열 이외의 다중 프로모터가 각각 존재하여 1개 이상의 별개의 MHC 클래스 I 에피토프 인코딩 핵산 서열의 발현을 구동하고; 여기서 h = 1은 별도의 프로모터가 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열의 발현을 구동하기 위해 존재하는 것을 설명하고; 및 여기서 g = 0은, 존재하는 경우 MHC 클래스 II 에피토프-인코딩 핵산 서열이 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 직접 연결됨을 설명한다.

[0239] 다른 예는 존재하는 각각의 MHC 클래스 I 에피토프는 5' 링커, 3' 링커, 둘 다 갖거나 또는 둘 다를 가질 수 없는 경우를 포함한다. 하나 초과의 MHC 클래스 I 에피토프가 동일한 항원 카세트에 존재하는 예에서, 일부 MHC

클래스 I 에피토프는 5' 링커 및 3' 링커를 모두 가질 수 있는 반면, 다른 MHC 클래스 I 에피토프는 5' 링커, 3' 링커 중 하나, 또는 둘 다 가질 수 없다. 하나 초과의 MHC 클래스 I 에피토프가 동일한 항원 카세트에 존재하는 다른 예에서, 일부 MHC 클래스 I 에피토프는 5' 링커 또는 3' 링커를 가질 수 있는 반면, 다른 MHC 클래스 I 에피토프는 5' 링커, 3' 링커를 갖거나, 또는 둘 다를 가질 수 없다.

[0240] 하나 초과의 MHC 클래스 II 에피토프가 동일한 항원 카세트에 존재하는 예에서, 일부 MHC 클래스 II 에피토프는 5' 링커 및 3' 링커를 모두 가질 수 있는 반면, 다른 MHC 클래스 II 에피토프는 5' 링커, 3' 링커를 갖거나 또는 둘 다 가질 수 없다. 하나 초과의 MHC 클래스 II 에피토프가 동일한 항원 카세트에 존재하는 다른 예에서, 일부 MHC 클래스 II 에피토프는 5' 링커 또는 3' 링커를 가질 수 있는 반면, 다른 MHC 클래스 II 에피토프는 5' 링커, 3' 링커를 갖거나, 또는 둘 다 가질 수 없다.

[0241] 다른 예는 존재하는 각각의 항원이 5' 링커, 3' 링커, 둘 다 없거나 또는 둘 모두를 가질 수 있는 경우를 포함한다. 하나 초과의 항원이 동일한 항원 카세트에 존재하는 예에서, 일부 항원은 5' 링커 및 3' 링커를 둘 다 가질 수 있는 반면, 다른 항원은 5' 링커, 3' 링커 또는 둘 다 갖지 않을 수 있다. 하나 초과의 항원이 동일한 항원 카세트에 존재하는 다른 예에서, 일부 항원은 5' 링커 또는 3' 링커를 가질 수 있는 반면, 다른 항원은 5' 링커, 3' 링커 또는 둘 다 갖지 않을 수 있다.

[0242] 프로모터 뉴클레오티드 서열 P 및/또는 P2는 RNA 알파바이러스 백본과 같은 벡터 백본에 의해 제공되는 프로모터 뉴클레오티드 서열과 동일할 수 있다. 예를 들어, 벡터 백본, Pn 및 P2에 의해 제공되는 프로모터 서열은 각각 서브게놈 프로모터 서열(예를 들어, 26S 서브게놈 프로모터 서열) 또는 CMV 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터 뉴클레오티드 서열 P 및/또는 P2는 벡터 백본(예를 들어, RNA 알파바이러스 백본)에 의해 제공되는 프로모터 뉴클레오티드 서열과 상이할 수 있을뿐만 아니라 서로 상이할 수 있다.

[0243] 5' 링커 L5는 천연 서열 또는 비-천연 서열일 수 있다. 비-천연 서열은 AAY, RR 및 DPP를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 3' 링커 L3은 또한 천연 서열 또는 비-천연 서열일 수 있다. 추가로, L5 및 L3은 둘 다 천연 서열일 수 있고, 둘 다 비-천연 서열이거나, 하나는 천연이고 다른 하나는 비-천연일 수 있다. 각각의 X에 대해 아미노산 링커는 길이가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 이상의 아미노산일 수 있다. 각각의 X에 대해, 아미노산 링커는 또한 길이가 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 적어도 27개, 적어도 28개, 적어도 29개, 또는 적어도 30개 아미노산일 수 있다.

[0244] 각각의 Y에 대해 아미노산 링커 G5는 길이가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 이상의 아미노산일 수 있다. 각각의 Y에 대해, 아미노산 링커는 또한 길이가 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 적어도 27개, 적어도 28개, 적어도 29개, 또는 적어도 30개 아미노산일 수 있다.

[0245] 아미노산 링커 G3은 길이가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 이상의 아미노산일 수 있다. G3은 또한 길이가 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 적어도 27개, 적어도 28개, 적어도 29개, 또는 적

어도 30개 아미노산일 수 있다.

[0246] 각각의 X에 대해, 각각의 N은 MHC 클래스 I 에피토프, MHC 클래스 II 에피토프, B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프/항원, 또는 이의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해, N은 MHC 클래스 I 에피토프, MHC 클래스 II 에피토프, 및 B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프/항원의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해, N은 MHC 클래스 I 에피토프 및 MHC 클래스 II 에피토프의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해 N은 MHC 클래스 I 에피토프 및 B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프/항원의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해 N은 MHC 클래스 II 에피토프 및 B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프/항원의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해 N은 MHC 클래스 II 에피토프를 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해 N은 B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프/항원의 조합을 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해, 각각의 N은 7-15개 아미노산 길이의 MHC 클래스 I 에피토프를 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해, 각각의 N은 또한 아미노산 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개인 MHC 클래스 I 에피토프를 인코딩할 수 있다. 각각의 X에 대해 각각의 N은 아미노산 길이가 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 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 적어도 30개인 MHC 클래스 I 에피토프를 인코딩할 수도 있다.

[0247] 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다(예를 들어, 면역원성 폴리펩티드를 인코딩하는 2개의 별개의 감염성 질환 또는 종양 유래 핵산 서열을 인코딩한다). 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 700개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0248] 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개 뉴클레오티드일 수 있다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개 뉴클레오티드일 수 있고 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다(예를 들어, 면역원성 폴리펩티드를 인코딩하는 2개의 별개의 감염성 질환 또는 종양 유래 핵산 서열을 인코딩한다). 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개 뉴클레오티드일 수 있고 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-700개의 뉴클레오티드일 수 있고 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 항원을 포함한다.

[0249] 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200 또는 100개 뉴클레오티드 이하일 수 있다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200 또는 100개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200, 또는 100개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200, 또는 100개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200, 또는 100개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 600, 500, 400, 300, 200 또는 100개 이하의 뉴클레오티드일 수 있고 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 항원을 포함한다.

[0250] 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-600, 375-500, 또는 375-400개 뉴클레오티드일 수 있다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-600, 375-500, 또는 375-400개 뉴클레오티드일 수 있고 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-600, 375-500, 또는 375-400 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 2개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-600, 375-500, 또는 375-400 뉴클레오티드일 수 있고 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가

375-600, 375-500, 또는 375-400 뉴클레오티드일 수 있고 적어도 3개의 별개의 에피토프-인코딩 핵산 서열을 인코딩한다. 하나 이상의 항원을 인코딩하는 카세트는 길이가 375-600, 375-500, 또는 375-400개 뉴클레오티드일 수 있고 1-10, 1-5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 항원을 포함한다.

[0251] 일부 예에서, 추가 항원 및/또는 에피토프를 인코딩하는 카세트의 항원 또는 에피토프는 인코딩된 다른 것들에 비해 면역우성 에피토프일 수 있다. 면역우성은 일반적으로 단 하나 또는 소수의 특이적 면역원성 펩티드에 대한 면역 반응의 왜곡이다. 면역우성은 면역 모니터링 프로토콜의 일부로 평가될 수 있다. 예를 들어, 인코딩된 항원에 대한 T 세포 및/또는 B 세포 반응을 평가함으로써 면역우성이 평가될 수 있다.

[0252] 면역우성은 하나 이상의 다른 항원에 대한 면역 반응에 대한 면역우성 항원의 존재의 영향으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 면역우성 항원 및 이의 각각의 면역 반응(예를 들어, 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프)은 면역우성 항원이 없을 때의 면역 반응에 비해 다른 항원의 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 이러한 감소는 면역우성 항원의 존재 하에서의 면역 반응이 치료적으로 효과적인 반응으로 간주되지 않도록 하는 것일 수 있다. 예를 들어, MHC 클래스 I 에피토프는 일반적으로 다른 항원에 대한 T 세포 반응이 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프의 부재에서 유발된 반응과 비교하여 더 이상 치료적으로 효과적인 반응으로 간주되지 않는 경우 면역우성인 것으로 간주된다. 면역 반응은 면역우성 항원의 부재에서 유발된 반응과 비교하여 검출 한계 이하 또는 검출 한계 근처로 감소될 수 있다. 예를 들어, MHC 클래스 I 에피토프는 일반적으로 다른 항원에 대한 T 세포 반응이 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프의 부재에서 유발된 반응과 비교하여 검출 한계 이하인 경우 면역우성인 것으로 간주된다. 일반적으로, 면역우성의 평가는 면역 반응을 자극할 수 있는 두 항원 사이, 예를 들어, 각각의 에피토프를 제시하는 것으로 알려지거나 예측되는 동족 MHC 대립유전자를 소유하는 대상체에게 투여된 백신 조성물의 두 T 세포 에피토프 사이에서 이루어진다. 면역우성은 의심되는 면역우성 항원의 존재 및 부재 하에 다른 항원에 대한 상대적인 면역 반응을 평가함으로써 평가될 수 있다.

[0253] 면역우성은 2개 이상의 항원 사이의 면역 반응의 상대적인 차이로 평가될 수 있다. 면역우성은 동일한 카세트에 인코딩된 다른 항원에 비해 특정 항원의 5배, 10배, 20배, 30배, 40배 또는 50배 면역 반응을 의미할 수 있다. 면역우성은 동일한 카세트에 인코딩된 다른 항원에 비해 특정 항원의 100배, 200배, 300배, 400배 또는 500배 면역 반응을 의미할 수 있다. 면역우성은 동일한 카세트에 인코딩된 다른 항원에 비해 특정 항원의 1000배, 2000배, 3000배, 4000배 또는 5000배 면역 반응을 의미할 수 있다. 면역우성은 동일한 카세트에 인코딩된 다른 항원에 비해 특정 항원의 10,000배 면역 반응을 의미할 수 있다.

[0254] 일부 경우에, 면역우성 에피토프를 함유하는 백신 조성물을 기피하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 면역우성 에피토프를 인코딩하는 백신 카세트의 설계를 피하는 것이 바람직할 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 추가 에피토프와 함께 면역우성 에피토프를 투여 및/또는 인코딩하는 것은 잠재적으로 추가 에피토프에 대한 백신 효능을 궁극적으로 감소시키는 것을 포함하여 추가 에피토프에 대한 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 예시적인 비-제한적 예로서, TP53-연관 네오에피토프를 포함하는 백신 조성물은 면역 반응, 예를 들어 백신 조성물 내의 다른 항원 또는 에피토프(예를 들어, 백신 조성물의 하나 이상의 KRAS-연관 네오에피토프, 예를 들어 서열번호: 75-82에 제시된 KRAS-연관 네오에피토프 중 임의의 것)에 대한 면역 반응에 부정적인 영향(예를 들어, 면역 반응이 치료적으로 효과적인 반응이 아닌 경우 및/또는 검출 한계 이하로 면역 반응을 감소시키고)을 미치는 TP53-연관 네오에피토프 쪽으로 왜곡된 T 세포 반응을 가질 수 있다. 따라서, 백신 조성물은 면역우성 에피토프를 인코딩하지 않도록 백신 카세트(예를 들어, (신생)항원-인코딩 카세트)를 설계하는 것과 같이, 면역우성 에피토프를 함유하지 않도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 카세트는 다른 에피토프가 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프의 부재하에 투여될 때의 면역 반응에 비해 대상체에게 백신 조성물로 투여될 때 카세트에서 인코딩된 또 다른 에피토프에 대한 면역 반응을 감소시키는 에피토프를 인코딩하지 않는다. 다른 예에서, 카세트는 다른 에피토프가 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프의 부재하에 투여될 때의 면역 반응에 비해 대상체에게 백신 조성물로 투여될 때 카세트에서 인코딩된 다른 에피토프에 대한 면역 반응을 검출 한계 미만으로 감소시키는 에피토프를 인코딩하지 않는다. 또 다른 예에서, 카세트는 다른 에피토프가 면역우성 MHC 클래스 I 에피토프의 부재하에 투여될 때의 면역 반응에 비해 대상체에게 백신 조성물로 투여될 때 카세트에서 인코딩된 또 다른 에피토프에 대한 면역 반응을 감소시키는 에피토프를 인코딩하지 않으며, 여기서 면역 반응은 치료적으로 효과적인 반응이 아니다. 또 다른 예에서, 카세트는 각 항원이 대상체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 대상체에게 투여된 백신 조성물에서 동일한 카세트에서 인코딩된 다른 에피토프에 비해 5배, 10배, 20배, 30배, 40배 또는 50배 이상의 면역 반응을 자극하는 에피토프를 인코딩하지 않는다. 또 다른 예에서, 카세트는 각 항원이 대상체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 대상체에게 투여된 백신 조성물에서 동일한 카세트에서 인코딩된 다른 에피토프에 비해 100배, 200배, 300배, 400배 또는 500배 이상의 면역 반응을 자극하는 에피토프를 인코딩하지 않는다. 또 다른 예

에서, 카세트는 각 항원이 대상체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 대상체에게 투여된 백신 조성물에서 동일한 카세트에서 인코딩된 다른 에피토프에 비해 1000배, 2000배, 3000배, 4000배 또는 5000배 이상의 면역 반응을 자극하는 에피토프를 인코딩하지 않는다. 또 다른 예에서, 카세트는 각 항원이 대상체에서 면역 반응을 자극할 수 있는 대상체에게 투여된 백신 조성물에서 동일한 카세트에서 인코딩된 다른 에피토프에 비해 10,000배 이상의 면역 반응을 초래하는 에피토프를 인코딩하지 않는다.

[0255] **V.B. 면역 조절제**

[0256] 본원에 기술된 C68 벡터 또는 본원에 기술된 알파바이러스 벡터와 같은 본원에 기술된 벡터는 적어도 하나의 항원을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있고, 동일하거나 분리된 벡터는 적어도 하나의 면역 조절제를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 면역 조절제는 면역 관문 분자에 결합하고 그 활성을 차단하는 결합 분자(예를 들어, scFv와 같은 항체)를 포함할 수 있다. 면역 조절제는 IL-2, IL-7, IL-12(IL-12 p35, p40, p70 및/또는 p70-융합 구성물 포함), IL-15 또는 IL-21과 같은 사이토카인을 포함할 수 있다. 면역 조절제는 변형된 사이토카인(예를 들어, pegIL-2)을 포함할 수 있다. 벡터는 항원 카세트 및 면역 조절제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있다.

[0257] 차단 또는 억제를 위해 표적화될 수 있는 예시적인 면역 관문 분자에는 CTLA-4, 4-1BB(CD137), 4-1BBL(CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4(CD2 분자 계열에 속하며 모든 NK, γδ 및 기억 CD8+(αβ) T 세포 상에서 발현), CD160(BY55라고도 한다) 및 CGEN-15049가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 면역 관문 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160, 및 CGEN-15049 중 하나 이상에 결합하여 이들의 활성을 차단하거나 억제하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 기타 결합 단백질을 포함한다. 예시적인 면역 관문 억제제에는 트레멜리무맙(CTLA-4 차단 항체), 항-OX40, PD-L1 단일클론 항체(항-B7-H1; MEDI4736), 이필리무맙, MK-3475(PD-1 차단제), 니볼루맙(항-PD1 항체), 세미플리맙(항-PD1 항체), CT-011(항-PD1 항체), BY55 단일클론 항체, AMP224(항-PDL1 항체), BMS-936559(항-PDL1 항체), MPLDL3280A/아테졸리주맙(항-PDL1 항체), MSB0010718C(항-PDL1 항체) 및 여보이/이필리무맙(항-CTLA-4 관문 억제제)를 포함한다. 항체-인코딩 서열은 상응 분야의 통상적인 기술을 사용하여 C68과 같은 벡터 내로 조작될 수 있다. 예시적인 방법은 모든 목적을 위해 참조로 본원에 포함된 Fang et al., Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol.* 2005 May;23(5):584-90. Epub 2005 Apr 17에 기술되어 있다.

[0258] **V.C. 백신 설계 및 제조에 대한 추가 고려 사항**

[0259] **V.C.1. 모든 종양 서브클론을 커버하는 펩티드 세트의 결정**

[0260] **서브클론**

[0261] 모든 또는 대부분의 서브클론에 의해 제시되는 것을 의미하는 줄기 펩티드는 백신에 포함시키기 위해 우선 순위를 지정할 수 있다.[53] 임의로, 높은 확률로 제시될 것으로 예측되고 면역원성인 줄기 펩티드가 없는 경우, 또는 높은 확률로 제시될 것으로 예측되고 면역원성인 줄기 펩티드의 수가 충분히 작아서 백신에 추가 비-줄기 펩티드가 포함될 수 있는 경우, 추가로 펩티드는 종양 서브클론의 수와 정체성을 추정하고 백신에 의해 커버되는 종양 서브클론의 수를 최대화하기 위해 펩티드를 선택함으로써 우선순위를 지정할 수 있다.[54]

[0262] **V.C.2. 항원 우선순위지정**

[0263] 위의 모든 항원 필터가 적용된 후, 백신 기술이 지원할 수 있는 것보다 더 많은 후보 항원이 백신 포함에 여전히 이용가능할 수 있다. 또한, 항원 분석의 다양한 측면에 대한 불확실성이 남아 있을 수 있으며 후보 백신 항원의 서로 다른 특성 간에 트레이드오프가 존재할 수 있다. 따라서, 선택 과정의 각 단계에서 미리 결정된 필터 대신에, 적어도 다음 축이 있는 공간에 후보 항원을 배치하고 통합 접근 방식을 사용하여 선택을 최적화하는 통합 다차원 모델을 고려할 수 있다.

[0264] 1. 자가-면역 또는 내성의 위험(생식계열의 위험)(일반적으로 자가-면역의 위험이 낮은 것이 바람직하다)

[0265] 2. 시퀀싱 아티팩트의 확률(일반적으로 아티팩트의 낮은 확률이 바람직하다)

[0266] 3. 면역원성의 확률(일반적으로 면역원성의 확률이 높을수록 바람직하다)

[0267] 4. 제시 확률(일반적으로 제시 확률이 높을수록 바람직하다)

[0268] 5. 유전자 발현(일반적으로 더 높은 발현이 바람직하다)

[0269] 6. HLA 유전자의 적용범위(항원 세트의 제시에 수반된 더 많은 수의 HLA 분자는 HLA 분자의 하향조절 또는 돌연변이를 통해 종양이 면역 공격을 피할 확률을 낮출 수 있다)

[0270] 7. HLA 클래스의 적용범위(HLA-I 및 HLA-II를 모두 포함하면 치료 반응 확률이 증가하고 종양 도피 확률이 감소할 수 있다)

[0271] 추가로, 임의로, 항원은 환자의 종양의 전부 또는 일부에서 손실되거나 비활성화된 HLA 대립유전자에 의해 제시될 것으로 예측되는 경우 백신접종에서 우선순위를 낮출 수 있다(예를 들어, 제외될 수 있다). HLA 대립유전자 손실은 체세포 돌연변이, 이형접합의 손실 또는 유전자좌의 동형접합 결실에 의해 발생할 수 있다. HLA 대립유전자 체세포 돌연변이의 검출 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Shukla et al., 2015). 체세포 LOH 및 동형접합 결실(HLA 유전자좌 포함)의 검출 방법도 마찬가지로 잘 설명되어 있다(Carter et al., 2012; McGranahan et al., 2017; Van Loo et al., 2010). 또한 질량 분석 데이터가 예측된 항원이 예측된 HLA 대립 유전자에 의해 제시되지 않는다는 것을 나타내는 경우 항원의 우선 순위를 낮출 수 있다.

[0272] **V.D. 알파바이러스**

[0273] **V.D.1. 알파바이러스 생물학**

[0274] 알파바이러스는 토가비리과(*Togaviridae*)과의 구성원이며 포지티브-센스 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 구성원은 일반적으로 신드비스, 로스 리버, 마야로, 치쿤구니야 및 셈리키 포레스트 바이러스와 같은 구세계 또는 동부 말 뇌염, 아우라, 포트 모건 또는 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 및 이의 파생 균주 TC-83(Strauss Microbrial Review 1994)와 같은 신세계로 분류된다. 천연 알파바이러스 게놈의 길이는 일반적으로 약 12 kb이며, 처음 2/3는 바이러스 게놈의 자가-복제를 위한 RNA 복제 복합체를 형성하는 비-구조 단백질(nsP)을 인코딩하는 유전자를 함유하고 마지막 3분의 1은 비리온 생산을 위한 구조 단백질을 인코딩하는 서브게놈 발현 카세트를 함유한다(Frolov RNA 2001).

[0275] 알파바이러스의 모델 수명주기는 몇 가지 별개의 단계를 수반한다(Strauss Microbrial Review 1994, Jose Future Microbiol 2009). 숙주 세포에 바이러스가 부착된 후, 비리온은 세포내이입 구획 내의 막과 융합하여 결국 게놈 RNA를 세포질로 방출한다. 플러스-가닥 방향이고 5' 메틸구아닐레이트 캡 및 3' 폴리A 테일을 포함하는 게놈 RNA는 복제 복합체를 형성하는 비-구조 단백질 nsP1-4를 생성하도록 번역된다. 감염 초기에 플러스-가닥은 복합체에 의해 마이너스-가닥 주형으로 복제된다. 현재 모델에서, 복제 복합체는 감염이 진행됨에 따라 추가 처리되며, 생성된 처리된 복합체는 전장의 포지티브-가닥 게놈 RNA와 구조 유전자를 함유하는 26S 서브게놈 포지티브-가닥 RNA로 마이너스-가닥의 전사로 전환된다. 알파바이러스의 여러 보존 서열 요소(CSE)는 다음을 포함한 다양한 RNA 복제 단계에서 잠재적으로 역할을 하는 것으로 확인되었다; 마이너스-가닥 주형에서 플러스-가닥 RNA 복제에서 5' UTR의 보체, 게놈 주형에서 마이너스-가닥 합성 복제에서 51-nt CSE, 마이너스 -가닥의 서브게놈 RNA 전사에서 nsP 및 26S RNA 사이의 접합 영역에 있는 24-nt CSE, 및 플러스-가닥 주형에서 마이너스-가닥 합성에 있는 3'19-nt CSE.

[0276] 다양한 RNA 종의 복제 후, 바이러스 입자는 일반적으로 바이러스의 자연적 수명 주기에서 조립된다. 26S RNA는 번역되고 생성된 단백질은 캡시드 단백질, 당단백질 E1 및 E2, 및 두 개의 작은 폴리펩티드 E3 및 6K를 포함하는 구조적 단백질을 생산하기 위해 추가 처리된다(Strauss 1994). 바이러스 RNA의 캡시드화(Encapsidation)는 일반적으로 게놈 RNA에만 특이적인 캡시드 단백질이 패키징된 후 발생하며, 비리온 조립 및 막 표면의 출아가 뒤따른다.

[0277] **V.D.2. 전달 벡터로서의 알파바이러스**

[0278] 알파바이러스(알파바이러스 서열, 특징 및 기타 요소 포함)를 사용하여 알파바이러스-기반 전달 벡터(알파바이러스 벡터, 알파바이러스 바이러스 벡터, 알파바이러스 백신 벡터, 자가-복제 RNA(srRNA) 벡터, 자가-증폭 mRNA(SAM) 벡터, 또는 samRNA 벡터라고도 한다)를 생성할 수 있다. 알파바이러스는 이전에 발현 벡터 시스템으로 사용하도록 조작되었다(Pushko 1997, Rheme 2004). 알파바이러스는 특히 이종유래 항원 발현이 요구될 수 있는 백신 환경에서 몇 가지 이점을 제공한다. 숙주 세포질에서 자가-복제하는 능력으로 인해, 알파바이러스 벡터는 일반적으로 높은 수준의 이종유래 항원 생산을 초래하는 세포 내에서 높은 카피 수의 발현 카세트를 생산할 수 있다. 또한, 벡터는 일반적으로 일시적이어서 생물학적 안전성이 향상되고 벡터에 대한 면역학적 내성의 유

도가 감소한다. 일반 대중은 또한 인간 아데노바이러스와 같은 다른 표준 바이러스 벡터와 비교하여 알파바이러스 벡터에 대한 기존 면역성이 부족하다. 알파바이러스 기반 벡터는 또한 일반적으로 감염된 세포에 대한 세포독성 반응을 초래한다. 세포독성은 발현된 이종유래 항원에 대한 면역 반응을 적절하게 자극하는 백신 환경에서 어느 정도 중요할 수 있다. 그러나 원하는 세포독성의 정도는 균형을 이루는 작용이 될 수 있으므로 VEE의 TC-83 균주를 포함하여 여러 약독화된 알파바이러스가 개발되었다. 따라서, 본원에 기술된 항원 발현 벡터의 예는 높은 수준의 항원 발현을 가능하게 하고, 항원에 대한 강력한 면역 반응을 자극하고, 벡터 자체에 대한 면역 반응을 자극하지 않고, 안전한 방식으로 사용될 수 있는 알파바이러스 백본을 활용할 수 있다. 더욱이, 항원 발현 카세트는 VEE 또는 이의 약독화된 유도체 TC-83으로부터 유래된 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터가 사용하는 알파바이러스 서열의 최적화를 통해 면역 반응의 상이한 수준을 자극하도록 설계될 수 있다.

[0279] 알파바이러스 서열을 사용하여 여러 발현 벡터 설계 전략이 조작되었다(Pushko 1997). 한 전략에서, 알파바이러스 벡터 설계는 구조 단백질 유전자의 다운스트림에 26S 프로모터 서열 요소의 제2 카피를 삽입한 다음 이종유래 유전자를 삽입하는 것을 포함한다(Frolov 1993). 따라서, 천연 비-구조 및 구조 단백질이외에, 이종유래 단백질을 발현하는 추가 서브게놈 RNA가 생성된다. 이 시스템에는 감염성 비리온 생산을 위한 모든 요소가 존재하므로 비-감염 세포에서 발현 벡터의 반복적인 감염이 발생할 수 있다.

[0280] 다른 발현 벡터 설계는 헬퍼 바이러스 시스템을 사용한다(Pushko 1997). 이 전략에서 구조 단백질은 이종유래 유전자로 대체된다. 따라서, 여전히 온전한 비-구조적 유전자에 의해 매개되는 바이러스 RNA의 자가-복제 후, 26S 서브게놈 RNA는 이종유래 단백질의 발현을 제공한다. 전통적으로, 구조 단백질을 발현하는 추가 벡터는 감염성 바이러스를 생산하기 위해 세포주의 동시-형질주입과 같이 트랜스(*in trans*)로 공급된다. 시스템은 USPN 8,093,021에 상세히 설명되어 있으며, 이는 모든 목적을 위해 전체가 참조로 본원에 포함된다. 헬퍼 벡터 시스템은 감염성 입자 형성 가능성을 제한하는 이점을 제공하여 생물학적 안전성을 향상시킨다. 또한, 헬퍼 벡터 시스템은 전체 벡터 길이를 줄여 잠재적으로 복제 및 발현 효율을 향상시킨다. 따라서, 본원에 기술된 항원 발현 벡터의 예는 구조 단백질이 항원 카세트로 대체된 알파바이러스 백본을 활용할 수 있으며, 생성된 벡터는 생물학적 안전성 문제를 감소시키는 동시에 전체 발현 벡터 크기의 감소로 인한 효율적인 발현을 촉진한다.

[0281] **V.D.3. 시험관내 알파바이러스 생산**

[0282] 알파바이러스 전달 벡터는 일반적으로 포지티브-센스 RNA 폴리뉴클레오티드이다. RNA 생산을 위한 당업계에 잘 알려진 편리한 기술은 시험관내 전사 IVT이다. 이 기술에서, 원하는 벡터의 DNA 주형은 클로닝, 제한 분해, 결찰, 유전자 합성(예를 들어, 화학적 및/또는 효소적 합성) 및 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 표준 분자 생물학 기술을 포함하는 당업자에게 잘 알려진 기술에 의해 먼저 생성된다. DNA 주형은 RNA로 전사되기를 원하는 서열의 5' 단부에 RNA 중합효소 프로모터를 함유한다. 프로모터는 T3, T7, 또는 SP6과 같은 박테리오파지 중합효소 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 그런 다음 DNA 주형을 적절한 RNA 중합효소 효소, 완충제 및 뉴클레오티드(NTP)와 함께 인큐베이션한다. 생성된 RNA 폴리뉴클레오티드는 7-메틸구아노신 또는 관련 구조와 같은 5' 캡 구조의 추가, 및 임의로 폴리아데닐레이트(폴리A) 테일을 포함하도록 3' 단부를 변형하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가로 변형될 수 있다. 그 다음, RNA는 페놀-클로로포름 추출 또는 컬럼 정제(예를 들어, 크로마토그래피-기반 정제)와 같은 분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 정제될 수 있다.

[0283] **V.D.4. 지질 나노입자를 통한 전달**

[0284] 백신 벡터 설계에서 고려해야 할 중요한 측면은 벡터 자체에 대한 면역성이다(Riley 2017). 이것은 특정 인간 아데노바이러스 시스템과 같이 벡터 자체에 대한 기존 면역의 형태이거나 백신 투여 후 벡터에 대한 면역이 발달하는 형태일 수 있다. 후자는 분리된 프라이밍 및 부스팅 용량과 같이 동일한 백신의 다중 투여가 수행되거나 동일한 백신 벡터 시스템을 사용하여 다른 항원 카세트를 전달하는 경우 중요한 고려 사항이다.

[0285] 알파바이러스 벡터의 경우, 표준 전달 방법은 캡시드, E1 및 E2 단백질을 트랜스(*in trans*)로 제공하여 감염성 바이러스 입자를 생성하는 이전에 논의된 헬퍼 바이러스 시스템이다. 그러나 E1 및 E2 단백질이 종종 항체를 중화시키는 주요 표적이라는 점에 유의하는 것이 중요하다(Strauss 1994). 따라서, 감염성 입자가 중화 항체에 의해 표적화되는 경우, 표적 세포에 관심 항원을 전달하기 위해 알파바이러스 벡터를 사용하는 효능이 감소될 수 있다.

[0286] 바이러스 입자 매개 유전자 전달에 대한 대안은 발현 벡터를 전달하기 위해 나노물질을 사용하는 것이다(Riley 2017). 나노물질 비히클은 중요하게는 비-면역원성 물질로 만들어질 수 있으며 일반적으로 전달 벡터 자체에 대한 면역을 유발하는 것을 피할 수 있다. 이러한 물질은 지질, 무기 나노물질 및 기타 중합체 물질을 포함할 수

있지만 이에 제한되지는 않는다. 지질은 양이온성, 음이온성 또는 중성일 수 있다. 물질은 합성 또는 천연 유래일 수 있으며 어떤 경우에는 생분해성일 수 있다. 지질은 지방, 콜레스테롤, 인지질, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 접합체(PEG화 지질), 왁스, 오일, 글리세라이드 및 지방 가용성 비타민을 포함하나 이에 제한되지 않는 지질 접합체를 포함할 수 있다.

[0287] 지질 나노입자(LNP)는 막 및 소포 유사 구조의 형성을 가능하게 하는 지질의 양친매성 특성으로 인해 매력적인 전달 시스템이다(Riley 2017). 일반적으로 이러한 소포는 표적 세포의 막으로 흡수되고 핵산을 세포질 내로 방출함으로써 발현 벡터를 전달한다. 또한, 특정 세포 유형의 표적화를 용이하게 하기 위해 LNP를 추가로 변형하거나 기능화할 수 있다. LNP 설계에서 또 다른 고려 사항은 표적화 효율성과 세포 독성 간의 균형이다. 지질 조성물은 일반적으로 양이온성, 중성, 음이온성 및 양친매성 지질의 정의된 혼합물을 포함한다. 일부 예에서, 특정 지질은 LNP 응집을 방지하고, 지질 산화를 방지하고, 또는 추가 모이어티의 부착을 용이하게 하는 기능적 화학기를 제공하기 위해 포함된다. 지질 조성은 전체 LNP 크기와 안정성에 영향을 줄 수 있다. 한 예에서, 지질 조성물은 디리놀레일메틸-4-디메틸아미노부티레이트(MC3) 또는 MC3-유사 분자를 포함한다. MC3 및 MC3-유사 지질 조성물은 PEG 또는 PEG-접합 지질, 스테롤, 또는 중성 지질과 같은 하나 이상의 다른 지질을 포함하도록 제형화될 수 있다.

[0288] 혈청에 직접 노출된 발현 벡터와 같은 핵산 벡터는 혈청 뉴클레아제에 의한 핵산의 분해 또는 유리 핵산에 의한 면역계의 표적외 자극을 포함하여 몇 가지 바람직하지 않은 결과를 가질 수 있다. 따라서 알파바이러스 벡터의 캡슐화는 잠재적인 표적외 영향을 피하면서 분해를 방지하는 데 사용할 수 있다. 특정 예에서, 알파바이러스 벡터는 LNP의 수성 내부와 같은 전달 비히클 내에서 완전히 캡슐화된다. LNP 내의 알파바이러스 벡터의 캡슐화는 미세유체 액적 생성 장치에서 수행되는 미세유체 혼합 및 액적 생성과 같은 당업자에게 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 이러한 장치에는 표준 T-접합 장치 또는 흐름-초점(flow-focusing) 장치가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 한 예에서, MC3 또는 MC3-유사 함유 조성물과 같은 원하는 지질 제형은 알파바이러스 전달 벡터 및 다른 원하는 제제와 병행하여 액적 생성 장치에 제공되어 전달 벡터 및 원하는 제제가 MC3 또는 MC3-유사 기반 LNP의 내부에 완전히 캡슐화되도록 한다. 한 예에서, 액적 생성 장치는 생성된 LNP의 크기 범위 및 크기 분포를 제어할 수 있다. 예를 들어, LNP는 직경이 1 내지 1000 나노미터, 예를 들어 1, 10, 50, 100, 500, 또는 1000 나노미터 범위의 크기를 가질 수 있다. 액적 생성 후, 발현 벡터를 캡슐화하는 전달 비히클은 투여를 위해 제조하기 위해 추가로 처리되거나 변형될 수 있다.

[0289] **V.E. 침팬지 아데노바이러스(ChAd)**

[0290] **V.E.1. 침팬지 아데노바이러스로 바이러스 전달**

[0291] 하나 이상의 항원을 전달하기 위한 백신 조성물(예를 들어, 항원 카세트를 통해 그리고 표 A 및/또는 AACR GENIE 결과에 제시된 하나 이상의 신생항원, 및/또는 표 1.2에 제시된 하나 이상의 항원을 포함하는)은 침팬지 기원의 아데노바이러스 뉴클레오티드 서열, 다양한 신규 벡터 및 침팬지 아데노바이러스 유전자를 발현하는 세포주를 제공함으로써 생성될 수 있다. 침팬지 C68 아데노바이러스(본원에서 ChAdV68이라고도 지칭)의 뉴클레오티드 서열은 항원 전달용 백신 조성물에 사용될 수 있다(서열번호: 1 참조). C68 아데노바이러스 유래 벡터의 사용은 USPN 6,083,716에 더 상세히 설명되어 있으며, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. ChAdV68-기반 벡터 및 전달 시스템은 미국 출원 공개번호 US20200197500A1 및 국제 특허 출원 공개 WO2020243719A1에 기술되어 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0292] 추가 측면에서, C68과 같은 침팬지 아데노바이러스의 DNA 서열 및 이의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 항원 카세트를 포함하는 재조합 아데노바이러스가 본원에 제공된다. 재조합 바이러스는 포유동물, 바람직하게는 인간 세포를 감염시킬 수 있고 세포에서 항원 카세트 생성물을 발현할 수 있다. 이 벡터에서 천연 침팬지 E1 유전자 및/또는 E3 유전자 및/또는 E4 유전자가 결실될 수 있다. 항원 카세트는 이러한 유전자 결실 부위에 삽입될 수 있다. 항원 카세트는 프라이밍된 면역 반응이 요구되는 항원을 포함할 수 있다.

[0293] 또 다른 측면에서, C68과 같은 침팬지 아데노바이러스로 감염된 포유동물 세포가 본원에 제공된다.

[0294] 또 다른 측면에서, 침팬지 아데노바이러스 유전자(예를 들어, C68로부터의) 또는 이의 기능적 단편을 발현하는 신규한 포유동물 세포주가 제공된다.

[0295] 또 다른 측면에서, 본원에서는 항원 카세트를 발현하도록 조작된 C68과 같은 침팬지 아데노바이러스의 유효량을 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 포유동물 세포 내로 항원 카세트를 전달하는 방법을 제공한다.

[0296] 또 다른 측면은 포유동물 숙주에서 암을 치료하기 위해 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 면

역 반응이 표적화되는 종양으로부터 하나 이상의 항원을 인코딩하는 항원 카세트를 포함하는, C68과 같은 재조합 침팬지 아데노바이러스의 유효량을 숙주에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0297] 또 다른 측면은 대상체의 질환을 치료 또는 예방하기 위해 포유동물 숙주에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 상기 방법은, 예컨대 면역 반응이 표적화되는 질환으로부터의 하나 이상의 항원을 인코딩하는 항원 카세트를 포함하는, C68과 같은 재조합 침팬지 아데노바이러스의 유효량을 숙주에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0298] 서열번호: 1의 서열로부터 수득된 침팬지 아데노바이러스 유전자를 발현하는 비-유인종 포유동물 세포가 또한 개시된다. 유전자는 서열번호: 1의 아데노바이러스 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 및 L5로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0299] 서열번호: 1의 서열로부터 수득된 유전자를 포함하는 침팬지 아데노바이러스 DNA 서열을 포함하는 핵산 분자가 또한 개시된다. 유전자는 서열번호: 1의 상기 침팬지 아데노바이러스 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 측면에서 핵산 분자는 서열번호: 1을 포함한다. 일부 측면에서 핵산 분자는 서열번호: 1의 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자가 결여된 서열번호: 1을 포함한다.

[0300] 또한, 서열번호: 1로부터 수득된 침팬지 아데노바이러스 DNA 서열 및 이종유래 숙주 세포에서 카세트의 발현을 지시하는 하나 이상의 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 항원 카세트를 포함하는 벡터가 개시되며, 여기서 임의로 침팬지 아데노바이러스 DNA 서열은 복제 및 비리온 캡시드화에 필요한 적어도 시스(시스-)-요소, 항원 카세트 및 조절 서열을 플랭킹하는 시스-요소를 포함한다. 일부 측면에서, 침팬지 아데노바이러스 DNA 서열은 서열번호: 1의 E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자를 포함한다. 일부측면에서, 벡터는 E1A 및/또는 E1B 유전자가 결여될 수 있다.

[0301] 또한 결실되거나 부분적으로 결실된 E4orf2 영역 및 결실되거나 부분적으로 결실된 E4orf3 영역, 및 임의로 결실되거나 부분적으로 결실된 E4orf4 영역을 포함하는 부분적으로 결실된 E4 유전자를 포함하는 아데노바이러스 벡터가 본원에 개시된다. 부분적으로 결실된 E4는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642의 E4 결실을 포함할 수 있고, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함한다. 부분적으로 결실된 E4는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,916 내지 34,942의 적어도 부분 결실, 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,952 내지 35,305의 적어도 부분 결실, 및 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,302 내지 35,642의 적어도 부분 결실의 E4 결실을 포함하고, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함한다. 부분적으로 결실된 E4는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,980 내지 36,516의 E4 결실을 포함할 수 있고, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함한다. 부분적으로 결실된 E4는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,979 내지 36,642의 E4 결실을 포함할 수 있고, 여기서 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 2 내지 36,518을 포함한다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf2의 적어도 부분적인 결실, 완전히 결실된 E4Orf3, 및 E4Orf4의 적어도 부분적인 결실의 E4 결실을 포함할 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf2의 적어도 부분적인 결실, E4Orf3의 적어도 부분적인 결실, 및 E4Orf4의 적어도 부분적인 결실의 E4 결실을 포함할 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf1의 적어도 부분적인 결실, 완전히 결실된 E4Orf2, 및 E4Orf3의 적어도 부분적인 결실의 E4 결실을 포함할 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf2의 적어도 부분적인 결실 및 E4Orf3의 적어도 부분적인 결실의 E4 결실을 포함할 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf1의 시작 부위와 E4Orf5의 시작 부위 사이의 E4 결실을 포함할 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf1의 시작 부위에 인접한 E4 결실일 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf2의 시작 부위에 인접한 E4 결실일 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf3의 시작 부위에 인접한 E4 결실일 수 있다. 부분적으로 결실된 E4는 E4Orf4의 시작 부위에 인접한 E4 결실일 수 있다. E4 결실은 적어도 50, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 600, 적어도 700, 적어도 800, 적어도 900, 적어도 1000, 적어도 1100, 적어도 1200, 적어도 1300, 적어도 1400, 적어도 1500, 적어도 1600, 적어도 1700, 적어도 1800, 적어도 1900, 또는 적어도 2000개의 뉴클레오티드일 수 있다. E4 결실은 적어도 700개의 뉴클레오티드일 수 있다. E4 결실은 적어도 1500개의 뉴클레오티드일 수 있다. E4 결실은 50 이하, 100 이하, 200 이하, 300 이하, 400 이하, 500 이하, 600 이하, 700 이하, 800 이하, 900 이하, 1000 이하, 1100 이하, 1200 이하, 1300 이하, 1400 이하, 1500 이하, 1600 이하, 1700 이하, 1800 이하, 1900 이하, 또는 2000 이하의 뉴클레오티드일 수 있다. E4 결실은 750개 이하의 뉴클레오티드일 수 있다. E4 결실은 1550개 이상의 뉴클레오티드 이하일 수 있다.

[0302] 부분적으로 결실된 E4 유전자는 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642가 결여된 서열번호: 1에 제시된 E4 유전자 서열일 수 있다. 부분적으로 결실된 E4 유전자는 서열번호: 1에 제시된 E4 유전자 서열이 결여되고 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,916 내지 34,942, 뉴클레오티드 34,952 내지 35,305 및 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,302 내지 35,642가 결여된 서열번호: 1에 제시된 E4 유전자 서열일 수 있다. 부분적으로 결실된 E4 유전자는 서열번호: 1에 제시된 E4 유전자 서열일 수 있고 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,980 내지 36,516이 결여되어 있다. 부분적으로 결실된 E4 유전자는 서열번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 E4 유전자 서열일 수 있고 서열번호: 1에 제시된 뉴클레오티드 서열의 적어도 뉴클레오티드 34,979 내지 35,642가 결여되어 있다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 카세트를 가질 수 있고, 여기서 카세트는 적어도 하나의 페이로드 핵산 서열을 포함하고, 카세트는 적어도 하나의 페이로드 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터 서열을 포함한다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 서열번호: 1에 제시된 ChAdV68 서열의 하나 이상의 유전자 또는 조절 서열을 가질 수 있으며, 임의로 여기서 하나 이상의 유전자 또는 조절 서열은 서열번호: 1에 제시된 서열의 적어도 하나의 침팬지 아데노바이러스 역 말단 반복부(ITR), E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, 및 L5 유전자를 포함한다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 2 내지 34,915를 가질 수 있고, 여기서 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 2 내지 34,915의 3'이고, 임의로 뉴클레오티드 2 내지 34,915에는 E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403이 추가로 결여되어 있고 및/또는 E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825가 결여된다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518을 가질 수 있고, 여기서 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518의 5'이다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 2 내지 34,915를 가질 수 있고, 여기서 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 2 내지 34,915의 3'이고, 뉴클레오티드 2 내지 34,915에는 추가로 E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403 및 E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825가 결여되어 있다. 부분적으로 결실된 E4 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 2 내지 34,915를 가질 수 있고, 여기서 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 2 내지 34,915의 3'이고, 뉴클레오티드 2 내지 34,915에는 추가로 E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403이 결여되고 E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825가 결여되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518을 갖고, 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518의 5'이다.

[0303] 부분적으로 결실된 E4 유전자는 적어도 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 34,916 내지 35,642, 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 2 내지 34,915가 결여된 서열번호: 1에 제시된 E4 유전자 서열일 수 있고, 여기서 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 2 내지 34,915의 3'이고, 뉴클레오티드 2 내지 34,915는 E1 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 577 내지 3403이 추가로 결여되고, E3 결실에 상응하는 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 27,125 내지 31,825가 결여되고, 서열번호: 1에 제시된 서열의 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518을 가지고, 부분적으로 결실된 E4 유전자는 뉴클레오티드 35,643 내지 36,518의 5'이다.

[0304] 또한, 항원 카세트를 발현하도록 조작된 C68 벡터와 같은 본원에 개시된 벡터로 형질주입된 숙주 세포가 본원에 개시된다. 또한, 본원에 개시된 벡터를 세포 내로 도입함으로써 내부에 도입된 선택된 유전자를 발현하는 인간 세포가 본원에 개시된다.

[0305] 또한, 항원 카세트를 발현하도록 조작된 ChAd 벡터 또는 자가-증폭 RNA 벡터와 같은 본원에 개시된 벡터의 유효량을 포유동물 세포에 도입하는 것을 포함하여, 항원 카세트를 포유동물 세포에 전달하는 방법이 본원에 개시되어 있다.

[0306] 또한, 본원에 개시된 벡터를 포유동물 세포에 도입하고, 적합한 조건 하에 세포를 배양하고, 항원을 생산하는 것을 포함하여, 항원을 생산하는 방법이 본원에 개시되어 있다.

[0307] **V.E.2. E1-발현 상보성 세포주**

[0308] 본원에 기술된 임의의 유전자에서 결실된 재조합 침팬지 아데노바이러스(Ad)를 생성하기 위해, 바이러스의 복제 및 감염성에 필수적인 경우 결실된 유전자 영역의 기능은 헬퍼 바이러스 또는 세포주, 즉, 상보성 또는 패키징

세포주에 의해 재조합 바이러스에 공급될 수 있다. 예를 들어, 복제-결함 침팬지 아데노바이러스 벡터를 생성하기 위해, 인간 또는 침팬지 아데노바이러스의 E1 유전자 생성물을 발현하는 세포주가 사용될 수 있고; 이러한 세포주는 HEK293 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 침팬지 E1 유전자 생성물을 발현하는 세포주의 생성을 위한 프로토콜(USPN 6,083,716의 실시예 3 및 4)은 임의의 선택된 침팬지 아데노바이러스 유전자를 발현하는 세포주를 생성하기 위해 따를 수 있다.

[0309] AAV 증대 검정은 침팬지 아데노바이러스 E1-발현 세포주를 확인하는 데 사용될 수 있다. 이 검정은, 예를 들어 다른 종의 다른 특성화되지 않은 아데노바이러스의 E1 유전자를 사용하여 만든 세포주에서 E1 기능을 확인하는 데 유용하다. 그 검정은 USPN 6,083,716의 실시예 4B에 설명되어 있다.

[0310] 선택된 침팬지 아데노바이러스 유전자, 예를 들어 E1은 선택된 모 세포주에서의 발현을 위한 프로모터의 전사 제어 하에 있을 수 있다. 이러한 목적을 위해 유도성 또는 구성적 프로모터를 사용할 수 있다. 유도성 프로모터 중에는 아연에 의해 유도되는 양 메탈로티오닌 프로모터 또는 글루코코르티코이드, 특히 덱사메타손에 의해 유도되는 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터가 포함된다. 본원에 참조로 포함된 국제 특허 출원 WO95/13392에서 확인된 것과 같은 다른 유도성 프로모터도 패키징 세포주의 생산에 사용될 수 있다. 침팬지 아데노바이러스 유전자의 발현을 제어하는 구성적 프로모터가 또한 사용될 수 있다.

[0311] 임의의 원하는 C68 유전자를 발현하는 신규 세포주의 생성을 위해 모 세포를 선택할 수 있다. 제한 없이, 이러한 모 세포주는 HeLa[ATCC 수탁 번호 CCL 2], A549[ATCC 수탁 번호 CCL 185], KB[CCL 17], 디트로이트[예를 들어, 디트로이트 510, CCL 72] 및 WI-38[CCL 75] 세포일 수 있다. 다른 적절한 모 세포주는 다른 출처에서 얻을 수 있다. 모 세포주는 CHO, HEK293 또는 이의 변이체, 911, HeLa, A549, LP-293, PER.C6 또는 AE1-2a를 포함할 수 있다.

[0312] E1-발현 세포주는 재조합 침팬지 아데노바이러스 E1 결실 벡터의 생성에 유용할 수 있다. 하나 이상의 다른 침팬지 아데노바이러스 유전자 생성물을 발현하는 본질적으로 동일한 절차를 사용하여 이루어진 세포주는 그러한 생성물을 인코딩하는 유전자에서 결실된 재조합 침팬지 아데노바이러스 벡터의 생성에 유용하다. 또한, 다른 인간 Ad E1 유전자 생성물을 발현하는 세포주는 침팬지 재조합 Ad를 생성하는 데에도 유용하다.

[0313] **V.E.3. 벡터로서의 재조합 바이러스 입자**

[0314] 본원에 개시된 조성물은 하나 이상의 항원을 세포에 전달하는 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 이러한 벡터는 C68과 같은 침팬지 아데노바이러스 DNA 서열 및 카세트의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 항원 카세트를 포함한다. C68 벡터는 감염된 포유동물 세포에서 카세트를 발현할 수 있다. C68 벡터는 하나 이상의 바이러스 유전자에서 기능적으로 결실될 수 있다. 항원 카세트는 프로모터와 같은 하나 이상의 조절 서열의 제어 하에 하나 이상의 항원을 포함한다. 임의의 헬퍼 바이러스 및/또는 패키징 세포주는 결실된 아데노바이러스 유전자의 필요한 생성물을 침팬지 바이러스 벡터에 공급할 수 있다.

[0315] "기능적으로 결실된"이라는 용어는 충분한 양의 유전자 영역이, 예를 들어 돌연변이 또는 변형에 의해 제거되거나 달리 변경되어 유전자 영역이 유전자 발현의 하나 이상의 기능적 생성물을 더 이상 생성할 수 없음을 의미한다. 기능적 결실을 초래할 수 있는 돌연변이 또는 변형에는 미성숙 정지 코돈의 도입 및 정규 및 비정규 개시 코돈의 제거와 같은 넌센스 돌연변이, mRNA 스플라이싱 또는 기타 전사 처리를 변경하는 돌연변이, 또는 이의 조합이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 원하는 경우 전체 유전자 영역이 제거될 수 있다.

[0316] 서열 결실, 삽입 및 기타 돌연변이를 포함하는 본원에 개시된 벡터를 형성하는 핵산 서열의 변형은 표준 분자생물학적 기술을 사용하여 생성될 수 있고 본 발명의 범위 내에 있다.

[0317] **V.E.4. 바이러스 플라스미드 벡터의 구성**

[0318] 본 발명에 유용한 침팬지 아데노바이러스 C68 벡터는 재조합 결함 아데노바이러스, 즉 E1a 또는 E1b 유전자에서 기능적으로 결실된 침팬지 아데노바이러스 서열을 포함하고, 임의로 다른 돌연변이, 예를 들어 온도-민감성 돌연변이 또는 다른 유전자에서 결실을 보유한다. 이들 침팬지 서열은 또한 다른 아데노바이러스 및/또는 아데노-연관 바이러스 서열로부터 하이브리드 벡터를 형성하는 데 유용할 것으로 예상된다. 인간 아데노바이러스로부터 제조된 상동성 아데노바이러스 벡터는 공개된 문헌에 기술되어 있다(위에서 인용되고 본원에 참고로 포함된 Kozarsky I 및 II, 및 미국 특허 번호 5,240,846).

[0319] 항원 카세트를 인간(또는 다른 포유동물) 세포로 전달하기 위한 유용한 침팬지 아데노바이러스 C68 벡터의 구성에서, 다양한 아데노바이러스 핵산 서열이 벡터에 사용될 수 있다. 최소 침팬지 C68 아데노바이러스 서열을 포

함하는 벡터는 감염성 재조합 바이러스 입자를 생성하기 위해 헬퍼 바이러스와 함께 사용될 수 있다. 헬퍼 바이러스는 최소 침팬지 아데노바이러스 벡터의 바이러스 감염성 및 증식에 필요한 필수 유전자 생성물을 제공한다. 다른 기능의 바이러스 벡터에서 침팬지 아데노바이러스 유전자의 하나 이상의 선택된 결실만 이루어진 경우, 결실된 유전자 생성물은 트랜스로 결실된 유전자 기능을 제공하는 선택된 패키징 세포주에서 바이러스를 증식시켜 바이러스 벡터 생산 공정에 공급될 수 있다.

[0320] **V.E.5. 재조합 최소 아데노바이러스**

[0321] 최소 침팬지 Ad C68 바이러스는 복제 및 비리온 캡시드화에 필요한 아데노바이러스 시스-요소만을 함유하는 바이러스 입자이다. 즉, 벡터는 아데노바이러스의 시스-작용 5' 및 3' 역 말단 반복부(ITR) 서열(복제 기점으로 기능) 및 천연 5' 패키징/인핸서 도메인(E1 프로모터에 대한 Ad 게놈 및 인핸서 요소 선형 패키징에 필요한 서열을 함유)을 함유한다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 출원 WO96/13597에서 "최소" 인간 Ad 벡터의 제조에 대한 기술이 설명되어 있다.

[0322] **V.E.6. 기타 결함 아데노바이러스**

[0323] 재조합 복제-결함 아데노바이러스는 또한 최소 침팬지 아데노바이러스 서열보다 많은 것을 함유할 수 있다. 이들 다른 Ad 벡터는 바이러스의 유전자 영역의 다양한 부분의 결실, 및 헬퍼 바이러스 및/또는 패키징 세포주의 임의의 사용에 의해 형성된 감염성 바이러스 입자를 특징으로 할 수 있다.

[0324] 한 예로서, 적절한 벡터는 정상적인 생물학적 기능을 제거하기 위해 C68 아데노바이러스 즉시 초기 유전자 E1a 및 지연된 초기 유전자 E1b의 전부 또는 충분한 부분을 결실시킴으로써 형성될 수 있다. 복제-결함 E1-결실된 바이러스는 상응하는 유전자 생성물을 트랜스로 제공하는 기능성 아데노바이러스 E1a 및 E1b 유전자를 함유하는 침팬지 아데노바이러스-형질전환된 상보성 세포주에서 증식할 때 감염성 바이러스를 복제하고 생산할 수 있다. 알려진 아데노바이러스 서열에 대한 상동성에 기반하여, 당해 분야의 인간 재조합 E1-결실된 아데노바이러스에 대해 사실인 것처럼, 생성된 재조합 침팬지 아데노바이러스는 많은 세포 유형을 감염시킬 수 있고 항원(들)을 발현할 수 있지만, 침팬지 E1 영역 DNA를 가지고 있지 않은 대부분의 세포에서는 세포가 매우 높은 감염 다중도로 감염되지 않는 한 복제할 수 없는 것으로 예상된다.

[0325] 또 다른 예로서, C68 아데노바이러스 지연 초기 유전자 E3의 전부 또는 일부는 재조합 바이러스의 일부를 형성하는 침팬지 아데노바이러스 서열로부터 제거될 수 있다.

[0326] E4 유전자가 결실된 침팬지 아데노바이러스 C68 벡터도 구성될 수 있다. 또 다른 벡터는 지연된 초기 유전자 E2a에 결실을 함유할 수 있다.

[0327] 침팬지 C68 아데노바이러스 게놈의 후기 유전자 L1 내지 L5 중 어느 것에서도 결실이 이루어질 수 있다. 유사하게, 중간 유전자 IX 및 IVa2의 결실은 일부 목적에 유용할 수 있다. 다른 구조적 또는 비구조적 아데노바이러스 유전자에서 다른 결실이 이루어질 수 있다.

[0328] 상기 논의된 결실은 개별적으로 사용될 수 있으며, 즉, 아데노바이러스 서열은 E1의 결실만을 함유할 수 있다. 대안적으로, 그들의 생물학적 활성을 파괴하거나 감소시키는데 효과적인 전체 유전자 또는 이의 부분의 결실은 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 예시적인 벡터에서, 아데노바이러스 C68 서열은 E3 결실과 함께 또는 없이, E1 유전자 및 E4 유전자 결실, 또는 E1, E2a 및 E3 유전자 결실, 또는 E1 및 E3 유전자 결실, 또는 E1, E2a 및 E4 유전자의 결실 등을 가질 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 이러한 결실은 원하는 결과를 달성하기 위해 온도-민감성 돌연변이와 같은 다른 돌연변이와 조합하여 사용될 수 있다.

[0329] 항원(들)을 포함하는 카세트는 임의로 침팬지 C68 Ad 바이러스의 임의의 결실된 영역에 삽입된다. 대안적으로, 카세트는 원하는 경우 상응 영역의 기능을 방해하기 위해 기존 유전자 영역에 삽입될 수 있다.

[0330] **V.E.7. 헬퍼 바이러스**

[0331] 항원 카세트를 운반하기 위해 사용된 바이러스 벡터의 침팬지 아데노바이러스 유전자 함량에 따라, 카세트를 함유하는 감염성 재조합 바이러스 입자를 생성하기에 충분한 침팬지 아데노바이러스 유전자 서열을 제공하기 위해 헬퍼 아데노바이러스 또는 비-복제 바이러스 단편이 사용될 수 있다.

[0332] 유용한 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스 벡터 구성물에 존재하지 않거나 및/또는 벡터가 형질주입된 패키징 세포주에 의해 발현되지 않는 선택된 아데노바이러스 유전자 서열을 함유한다. 헬퍼 바이러스는 복제-결함이 있을 수 있으며 위에서 설명한 서열 외에도 다양한 아데노바이러스 유전자를 함유한다. 헬퍼 바이러스는 본원에 기술

된 E1-발현 세포주와 조합하여 사용될 수 있다.

[0333] C68의 경우, "헬퍼" 바이러스는 SspI를 갖는 C68 게놈의 C 말단 단부를 클리핑하여 형성된 단편일 수 있으며, 이는 바이러스의 좌측 단부로부터 약 1300 bp를 제거한다. 이 클리핑된 바이러스는 플라스미드 DNA와 함께 E1-발현 세포주로 공동-형질주입되어 플라스미드에서 C68 서열과 상동 재조합에 의해 재조합 바이러스를 형성한다.

[0334] 헬퍼 바이러스는 또한 문헌에 기술된 바와 같이 다중-양이온 접합체로 형성될 수 있다(Wu et al, J. Biol. Chem., 264:16985-16987 (1989); K. J. Fisher and J. M. Wilson, Biochem. J., 299:49 (Apr. 1, 1994)). 헬퍼 바이러스는 임의로 리포터 유전자를 함유할 수 있다. 다수의 그러한 리포터 유전자가 당업계에 알려져 있다. 아데노바이러스 벡터 상의 항원 카세트와 다른 헬퍼 바이러스 상의 리포터 유전자의 존재는 Ad 벡터 및 헬퍼 바이러스 모두를 독립적으로 모니터링할 수 있게 한다. 이 제2 리포터는 정제 시 생성된 재조합 바이러스 및 헬퍼 바이러스를 분리하는 데 사용된다.

[0335] **V.E.8. 바이러스 입자의 조립 및 세포주의 감염**

[0336] 아데노바이러스, 항원 카세트 및 기타 벡터 요소의 선택된 DNA 서열을 다양한 중간 플라스미드 및 셔틀 벡터로 조립하고 플라스미드 및 벡터를 사용하여 재조합 바이러스 입자를 생성하는 것은 모두 통상적인 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 이러한 기술에는 시험관내 재조합 기술(예를 들어, 깁슨(Gibson) 어셈블리)에서, cDNA의 통상적인 클로닝 기술, 아데노바이러스 게놈의 중첩 올리고뉴클레오티드 서열의 사용, 중합효소 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오티드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법이 포함된다. 표준 형질주입 및 공동-형질주입 기술, 예를 들어 CaPO4 침전 기술 또는 리포펙타민과 같은 리포솜-매개 형질주입 방법이 사용된다. 사용되는 다른 통상적인 방법에는 바이러스 게놈의 상동 재조합, 한천 오버레이에서 바이러스의 플라크, 신호 생성 측정 방법 등이 포함된다.

[0337] 예를 들어, 원하는 항원 카세트-함유 바이러스 벡터의 구성 및 조립 후, 벡터는 헬퍼 바이러스의 존재 하에 시험관내에서 패키징 세포주로 형질주입될 수 있다. 헬퍼 및 벡터 서열 사이에 상동 재조합이 일어나서 벡터에서 아데노바이러스-항원 서열이 복제되고 비리온 캡시드로 패키징되어 재조합 바이러스 벡터 입자가 생성된다.

[0338] 생성된 재조합 침팬지 C68 아데노바이러스는 항원 카세트를 선택된 세포로 전달하는 데 유용하다. 패키징 세포주에서 성장한 재조합 바이러스를 사용한 생체내 실험에서, E1-결실된 재조합 침팬지 아데노바이러스는 비-침팬지, 바람직하게는 인간, 세포로 카세트를 운반하는 데 유용함을 보여준다.

[0339] **V.E.9. 재조합 바이러스 벡터의 사용**

[0340] 항원 카세트를 함유하는 생성된 재조합 침팬지 C68 아데노바이러스(상기 기술된 바와 같이 아데노바이러스 벡터 및 헬퍼 바이러스 또는 아데노바이러스 벡터 및 패키징 세포주의 협력에 의해 생성)는 따라서 항원(들)을 생체내 또는 생체외에서 대상체에게 전달할 수 있는 효율적인 유전자 전달 비히클을 제공한다.

[0341] 상기 기술된 재조합 벡터는 공개된 유전자 치료 방법에 따라 인간에게 투여된다. 항원 카세트를 보유하는 침팬지 바이러스 벡터는 바람직하게는 생물학적으로 적합한 용액 또는 약제학적으로 허용되는 전달 비히클에 현탁되어 환자에게 투여될 수 있다. 적합한 비히클에는 멸균 식염수가 포함된다. 다른 수성 및 비-수성 등장 멸균 주사 용액 및 약제학적으로 허용가능한 담체로 알려져 있고 당업자에게 잘 알려진 수성 및 비-수성 멸균 현탁액이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0342] 침팬지 아데노바이러스 벡터는 인간 세포를 형질도입하고 충분한 수준의 항원 전달 및 발현을 제공하여 과도한 유해 없이 또는 의학적으로 허용되는 생리학적 효과와 함께 치료적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 투여되며, 이는 의료 부문에서 당업자에 의해 결정될 수 있다. 통상적이고 약제학적으로 허용되는 투여 경로는 간, 비강내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 경구 및 기타 비경구 투여 경로로의 직접 전달을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 원하는 경우 투여 경로를 조합할 수 있다.

[0343] 바이러스 벡터의 투여량은 주로 치료되는 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 요인에 의존할 것이며, 따라서 환자마다 다를 수 있다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추기 위해 조정될 것이며 이러한 투여량은 재조합 벡터가 사용되는 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다. 항원(들)의 발현 수준은 투여량 투여의 빈도를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다.

[0344] 재조합 복제 결함 아데노바이러스는 "약제학적 유효량", 즉 원하는 세포를 형질주입시키고 선택된 유전자의 충분한 발현 수준을 제공하기 위한 투여 경로에서 백신접종 혜택, 즉 측정가능한 수준의 보호 면역을 제공하기 위해 효과적인 재조합 아데노바이러스의 양으로 투여될 수 있다. 항원 카세트를 포함하는 C68 벡터는 보조제와 함

께 공동-투여될 수 있다. 보조제는 특히 보조제가 단백질인 경우 벡터와 분리되거나(예를 들어, 명반) 벡터 내에서 인코딩될 수 있다. 보조제는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0345] 통상적이고 약제학상 허용되는 투여 경로는 비강내, 근육내, 기관내, 피하, 피내, 직장, 경구 및 기타 비경구 투여 경로를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 투여 경로는 원하는 경우 조합되거나 면역원 또는 질환에 따라 조정될 수 있다. 예를 들어, 광견병 예방에서는 피하, 기관 내 및 비강 경로가 선호된다. 투여 경로는 주로 치료되는 질환의 특성에 따라 달라진다.

[0346] 항원(들)에 대한 면역 수준을 모니터링하여 부스터에 대한 필요성이 있는 경우 이를 결정할 수 있다. 혈청 내 항체 역가 평가 후, 예를 들어 임의의 부스터 면역이 필요할 수 있다.

[0347] **VI. 치료 및 제조 방법**

[0348] 또한, 본원에 개시된 방법을 사용하여 확인된 다수의 항원과 같은 하나 이상의 항원을 대상체에게 투여함으로써, 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 자극하고, 종양에 대해 백신을 접종하고, 대상체에서 암의 증상을 치료 및/또는 완화하는 방법이 제공된다.

[0349] 일부 측면에서, 대상체는 암 진단을 받았거나 암 발병 위험이 있다. 대상체는 이전에 종양 및/또는 암성 조직을 제거하기 위한 수술, 화학요법, 면역요법(예를 들어, 면역 관문 억제제 요법), 방사선 요법, 또는 이의 조합을 받은 것과 같이 암에 대해 이전에 치료되었을 수 있다. 대상체는 인간, 개, 고양이, 말 또는 종양 특이적 면역 반응이 필요한 임의의 동물일 수 있다. 종양은 유방, 난소, 전립선, 폐, 신장, 위, 결장, 고환, 두경부, 췌장, 뇌, 흑색종과 같은 임의의 고형 종양 및 조직 기관의 종양 및 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, T 세포 림프구성 백혈병 및 B 세포 림프종을 포함하여 림프종 및 백혈병과 같은 혈액 종양일 수 있다.

[0350] 항원은 CTL 반응을 자극하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 항원은 T 세포 반응 반응을 자극하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 항원은 B 세포 반응 반응을 자극하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 항원은 T 세포 반응 반응 및 B 세포 반응 모두를 자극하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

[0351] 항원은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 치료제는, 예를 들어 화학치료제, 방사선, 또는 면역요법이다. 특정 암에 대한 임의의 적합한 치료적 치료가 투여될 수 있다. 치료적 유효량의 치료제가 투여될 수 있다. 단독으로는 치료적 유효량으로 일반적으로 간주되지 않지만 본원에 기술된 임의의 백신 조성물과 공동-투여될 때 유리한 특성을 입증하는 치료제가 투여될 수 있다.

[0352] 또한, 대상체는 관문 억제제와 같은 항-면역억제제/면역자극제를 추가로 투여받을 수 있다. 예를 들어, 대상체는 항-CTLA 항체 또는 항-PD-1 또는 항-PD-L1을 추가로 투여받을 수 있다. 항체에 의한 CTLA-4 또는 PD-L1의 차단은 환자의 암 세포에 대한 면역 반응을 향상시킬 수 있다. 특히, CTLA-4 차단은 백신 접종 프로토콜을 따를 때 효과적인 것으로 나타났다.

[0353] 백신 조성물에 포함될 각 항원의 최적량 및 최적 투여 레지멘이 결정될 수 있다. 예를 들어, 항원 또는 이의 변이체는 정맥내(i.v.) 주사, 피하(s.c.) 주사, 피내(i.d.) 주사, 복강내(i.p.) 주사, 근육내(i.m.) 주사를 위해 제조될 수 있다. 주사 방법에는 s.c., i.d., i.p., i.m. 및 i.v.가 포함된다. DNA 또는 RNA 주사 방법에는 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.가 포함된다. 백신 조성물의 다른 투여 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0354] 백신은 조성물에 존재하는 항원의 선택, 수 및/또는 양이 조직, 암, 및/또는 환자-특이적이도록 편집될 수 있다. 예를 들어, 펩티드의 정확한 선택은 주어진 조직에서 모 단백질의 발현 패턴에 의해 안내되거나 환자의 돌연변이 상태에 의해 안내될 수 있다. 선택은 특이적 암 유형, 질환 병태, 초기 치료 레지멘, 환자의 면역 상태, 및 물론 환자의 HLA-일배체형에 따라 달라질 수 있다. 또한 백신은 특정 환자의 개인적 필요에 따라 개별화된 구성요소를 포함할 수 있다. 예에는 특정 환자의 항원 발현에 따라 항원 선택을 변경하거나 1차 치료 또는 치료 계획에 따른 2차 치료에 대한 조정이 포함된다.

[0355] 다양한 진단 방법, 예를 들어 하기에 추가로 설명되는 환자 선택 방법을 사용하여 항원 백신의 투여를 위해 환자를 확인할 수 있다. 환자 선택은 하나 이상의 유전자의 돌연변이 또는 발현 패턴을 확인하는 것을 수반할 수 있다. 어떤 경우에는 환자 선택에 환자의 일배체형 확인이 수반된다. 다양한 환자 선택 방법은 병렬로 수행될 수 있고, 예를 들어 시퀀싱 진단은 환자의 돌연변이 및 일배체형을 모두 확인할 수 있다. 다양한 환자 선택 방법은 순차적으로 수행될 수 있고, 예를 들어 하나의 진단 테스트는 돌연변이를 확인하고 별도의 진단 테스트는 환자의 일배체형을 확인하며, 여기서 각 테스트는 동일하거나(예를 들어, 고처리량 시퀀싱) 또는 상이한(예를

들어, 하나는 높은 처리량 시퀀싱 및 다른 하나는 생거 시퀀싱) 진단 방법일 수 있다.

[0356] 암에 대한 백신으로 사용되는 조성물의 경우, 정상 조직에서 다량으로 발현되는 유사한 정상 자가-펩티드를 갖는 항원은 회피하거나 본원에 기술된 조성물에 소량으로 존재할 수 있다. 반면에, 환자의 종양이 특정 항원을 다량으로 발현하는 것으로 알려진 경우, 이 암의 치료를 위한 각각의 약제학적 조성물은 다량으로 존재할 수 있고/있거나 이 특정 항원 또는 이 항원의 경로에 특이적인 하나 초과의 항원이 포함될 수 있다.

[0357] 항원을 포함하는 조성물은 이미 암을 앓고 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 종양 항원에 대한 효과적인 CTL 반응을 자극하는 것과 같은 면역 반응을 자극하고 증상 및/또는 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지시키에 충분한 양으로 대상체에게 투여된다. 면역 반응은 종양 크기 또는 부피의 감소를 포함할 수 있다. 종양 크기 또는 부피의 감소는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 감소를 포함할 수 있다. 종양 크기 또는 부피의 감소는 적어도 15% 감소를 포함할 수 있다. 종양 크기 또는 부피의 감소는 적어도 20% 감소를 포함할 수 있다. 면역 반응은 종양 크기 또는 부피의 안정화를 포함할 수 있다. 면역 반응은 (예를 들어, 임상 연구에서 제시된 기준에 의해 평가되는 바와 같이) 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 또는 안정성 질환(SD)과 같은 대상체의 질환의 개선을 초래할 수 있다. 이를 달성하기에 적절한 양은 "치료적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 양은, 예를 들어, 조성, 투여 방식, 치료되는 질환의 단계 및 중증도, 환자의 체중 및 일반적인 건강 상태, 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 조성물은 일반적으로 심각한 질환 상태, 즉 생명을 위협하거나 잠재적으로 생명을 위협하는 상황에서, 특히 암이 전이된 경우에 사용될 수 있음을 염두에 두어야 한다. 그러한 경우에, 외래 물질의 최소화 및 항원의 상대적인 비독성 특성의 관점에서, 이러한 조성물의 실질적인 과량을 투여하는 것이 치료 의사에 의해 가능하고 바람직하다고 느낄 수 있다.

[0358] 치료적 사용을 위해, 투여는 종양의 검출 또는 외과적 제거에서 시작할 수 있다. 이것은 적어도 증상이 실질적으로 경감될 때까지 및 그 후 일정 기간 동안, 또는 면역이 제공되는 것으로 간주될 때까지(예를 들어, 기억 B 세포 또는 T 세포 집단, 또는 항원 특이적 B 세포 또는 항체가 생성될 때까지) 부스팅 용량이 뒤따를 수 있다.

[0359] 항원을 포함하는 조성물(예를 들어, 본원에 기술된 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 또는 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물 중 임의의 것)은 1차 요법을 이미 수용한 대상체에게 보조 요법으로 투여될 수 있다. 항원을 포함하는 조성물은 1차 요법 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일, 또는 1차 요법 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 이상 이후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 항원을 포함하는 조성물은 종양 및/또는 암성 조직을 제거하기 위한 수술 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일, 또는 수술 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 이상 이후를 포함하여 수술 후 보조 요법으로 투여될 수 있다.

[0360] 항원을 포함하는 조성물(예를 들어, 본원에 기술된 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템 또는 침팬지 아데노바이러스(ChAdV)-기반 발현 시스템의 전달을 위한 조성물 중 임의의 것)은 1차 요법 후에 대상체의 암이 관해(예를 들어, 완전 관해)인 경우와 같이 1차 요법을 이미 수용한 대상체에게 유지 요법으로 투여될 수 있다.

[0361] 1차 요법은 종양 및/또는 암성 조직을 제거하기 위한 수술, 화학요법, 면역요법(예를 들어, 면역 관문 억제제 요법), 방사선 요법, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 1차 요법은 수술을 포함할 수 있다. 1차 요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및/또는 베바시주맙과 같은 화학요법을 포함할 수 있다. 1차 요법은 옥살리플라틴, 플루오로피리미딘, 및 베바시주맙의 조합 요법을 포함할 수 있다.

[0362] 항원을 포함하는 조성물은 화학요법, 면역 관문 억제제 요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합과의 조합으로 투여되는 것과 같이, 추가 요법과의 조합 요법으로서 보조 요법 또는 유지 요법으로 투여될 수 있다. 조합 요법은 플루오로피리미딘, 베바시주맙, 및/또는 면역 관문 억제제 요법을 포함할 수 있다. 조합 요법은 플루오로피리미딘 및 베바시주맙을 포함할 수 있다. 조합 요법은 플루오로피리미딘, 베바시주맙, 및 면역 관문 억제제 요법(예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체)을 포함할 수 있다.

[0363] 면역 관문 억제제는 (1) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, (2) 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및/또는 (3) 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 프라이밍 용량 및 제1 부스팅 용량 만으로 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 항-CTLA-4 항체 이필리무맙을 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 30 mg의 용량으로 피하 투여되는 이필리무맙을 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 4주마다의(Q4W) 항-PD-L1 항체 또는

이의 항원-결합 단편의 투여를 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 항-PD-L1 항체 아테졸리주맙 또는 니볼루맙을 포함할 수 있다. 아테졸리주맙은 1680 mg의 용량으로 정맥내 투여될 수 있다. 니볼루맙은 480 mg의 용량으로 정맥내 투여된다.

[0364] 면역 관문 억제제 요법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 별도 투여, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 별도 투여를 약 28일마다(또는 4주마다 및/또는 매월) 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13회의 투여를 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여를, 예를 들어 약 28일마다(또는 4주마다 및/또는 매월) 포함할 수 있다. 면역 관문 억제제 요법은 적어도 13회의 별도 투여를, 예를 들어 약 28일마다(또는 4주마다 및/또는 매월) 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 적어도 13회의 투여를, 예를 들어 약 28일마다(또는 4주마다 및/또는 매월) 포함한다.

[0365] ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 20주차에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 5개월차에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 140일차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 20주차에 또는 그 후에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 5개월차에 또는 그 이후에 부스팅 용량으로 투여될 수 있다.

[0366] 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 28일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4주(Q4W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 한 달 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 56일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 8주(Q8W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2개월 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다.

[0367] 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 28일차 및 84일차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 4주차 및 12주차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 1개월차 및 3개월차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다.

[0368] 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 28, 84, 224, 및 308일차에 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 4, 12, 32, 및 44주차에 투여될 수 있다. 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 1, 3, 8, 및 11개월차에 투여될 수 있다.

[0369] ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 28일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4주(Q4W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 한 달 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 56일 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은

ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 8주(Q8W) 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 2개월 간격으로 적어도 2회 이상의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다.

[0370] ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 28일차 및 84일차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 4주차 및 12주차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 1개월차 및 3개월차에 적어도 2회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다.

[0371] ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 적어도 4회의 부스팅 용량으로 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 28, 84, 224, 및 308일차에 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 4, 12, 32, 및 44주차에 투여될 수 있다. ChAdV-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량 후 약 140일차에 또는 그 이후에(또는 20주차 및/또는 5개월차) 부스팅 용량으로 투여될 수 있고, 자가-복제 알파바이러스-기반 발현 시스템은 ChAdV-기반 발현 시스템의 프라이밍 용량에 대해 약 1, 3, 8, 및 11개월차에 투여될 수 있다.

[0372] 치료적 치료를 위한 약제학적 조성물(예를 들어, 백신 조성물)은 비경구, 국소, 비강, 경구 또는 국부 투여를 위한 것이다. 약제학적 조성물은 비경구적으로, 예를 들어 정맥내로, 피하로, 피내로, 또는 근육내로 투여될 수 있다. 조성물은 종양에 대한 국소 면역 반응을 자극하기 위해 외과적 절제 부위에 투여될 수 있다. 조성물은 대상체의 특정 조직, 기관, 및/또는 세포를 표적화하기 위해 투여될 수 있다. 본원에는 항원의 용액을 포함하는 비경구 투여용 조성물 및 백신 조성물이 허용되는 담체, 예를 들어 수성 담체에 용해되거나 현탁되어 있는 조성물이 기술되어 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 물, 완충수, 0.9% 식염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 그대로 사용하기 위해 포장되거나 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 조합된다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 긴장성 조절제, 습윤제 등과 같은 생리학적 조건을 비슷하게 하는 데 필요한 약제학상 허용되는 보조 물질, 예를 들어 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다.

[0373] 항원은 또한 림프 조직과 같은 특정 세포 조직을 표적화하는 리포솜을 통해 투여될 수 있다. 리포솜은 또한 반감기를 증가시키는 데 유용하다. 리포솜은 에멀젼, 발포체, 미셀, 불용성 단일층, 액정, 인지질 분산액, 라멜라층 등을 포함한다. 이러한 제제에서 전달될 항원은 단독으로 또는 예를 들어, CD45 항원에 결합하는 단일클론 항체와 같은 림프성 세포 사이에 널리 퍼져 있는 수용체에 결합하는 분자와 함께 또는 다른 치료 또는 면역원성 조성물과 함께 혼입될 수 있다. 따라서, 원하는 항원으로 채워진 리포솜은 림프 세포의 부위로 유도될 수 있고, 여기서 리포솜은 선택된 치료/면역원성 조성물을 전달한다. 리포솜은 일반적으로 중성 및 음으로 하전된 인지질과 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함하는 표준 소포-형성 지질로부터 형성될 수 있다. 지질의 선택은 일반적으로, 예를 들어 리포솜 크기, 산 불안정성 및 혈류에서 리포솜의 안정성을 고려하여 안내된다. 예를 들어, 문헌에 기술된 바와 같이 리포솜을 제조하기 위해 다양한 방법을 사용할 수 있다(Szoka 등, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9; 467 (1980), 미국 특허 번호 4,235,871, 4,501,728, 4,501,728, 4,837,028, 및 5,019,369).

[0374] 면역 세포를 표적화하기 위해, 리포솜에 혼입될 리간드는, 예를 들어 원하는 면역계 세포의 세포 표면 결정인자에 특이적인 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 리포솜 현탁액은 특히 투여 방식, 전달되는 펩티드 및 치

료되는 질환의 단계에 따라 달라지는 용량으로 정맥내, 국부적으로, 국소적으로 등으로 투여될 수 있다.

[0375] 치료 또는 면역화 목적을 위해, 펩티드 및 임의로 본원에 기술된 펩티드 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산이 또한 환자에게 투여될 수 있다. 핵산을 환자에게 전달하기 위해 다수의 방법이 편리하게 사용된다. 예를 들어, 핵산은 "네이키드(naked) DNA"로 직접 전달될 수 있다. 이러한 접근법은 문헌에 기술되어 있다(Wolff 등, Science 247: 1465-1468 (1990); 미국 특허 번호 5,580,859 및 5,589,466). 핵산은 또한, 예를 들어 미국 특허 5,204,253에 기술된 바와 같이 탄도 전달을 사용하여 투여할 수도 있다. DNA만으로 이루어진 입자를 투여할 수 있다. 대안적으로, DNA는 금 입자와 같은 입자에 부착될 수 있다. 핵산 서열을 전달하기 위한 접근법은 전기천공이 있거나 없는 바이러스 벡터, mRNA 벡터 및 DNA 벡터를 포함할 수 있다.

[0376] 핵산은 또한 양이온성 지질과 같은 양이온성 화합물과 복합되어 전달될 수 있다. 지질-매개 유전자 전달 방법은 문헌에 기술되어 있다(9618372 WO AWO 96/18372; 9324640 WOAWO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682-691 (1988); 미국 특허 번호 5,279,833 Rose 미국 특허 번호 5,279,833; 9106309WOAWO 91/06309; 및 Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414 (1987)).

[0377] 항원은 또한 백시니아, 계두, 자가-복제 알파바이러스, 마라바바이러스, 아데노바이러스(Tatsis et al., Adenoviruses, *Molecular Therapy* (2004) 10, 616—629) 또는 2세대, 3세대 또는 하이브리드 2세대/3세대 렌티바이러스 및 특정 세포 유형 또는 수용체를 표적화하도록 설계된 임의의 세대의 재조합 렌티바이러스(Hu et al., Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, *Immunol Rev.* (2011) 239(1): 45-61, Sakuma et al., Lentiviral vectors: basic to translational, *Biochem J.* (2012) 443(3):603-18, Cooper et al., Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, *Nucl. Acids Res.* (2015) 43 (1): 682-690, Zufferey et al., Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, *J. Virol.* (1998) 72 (12): 9873-9880)를 포함하나 이에 제한되지 않는 렌티바이러스와 같은 바이러스 벡터 기반-백신 플랫폼에 포함될 수 있다. 위에서 언급한 바이러스 벡터-기반 백신 플랫폼의 패키징 능력에 따라, 이 접근법은 하나 이상의 항원 펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 전달할 수 있다. 서열은 돌연변이되지 않은 서열에 의해 플랭킹될 수 있거나, 링커에 의해 분리될 수 있거나, 세포하 구획을 표적화하는 하나 이상의 서열이 선행될 수 있다(Gros et al., Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, *Nat Med.* (2016) 22 (4):433-8, Stronen et al., Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, *Science.* (2016) 352 (6291):1337-41, Lu et al., Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, *Clin Cancer Res.* (2014) 20(13):3401-10). 숙주에 도입되면, 감염된 세포는 항원을 발현하고, 이에 의해 펩티드(들)에 대한 숙주 면역(예를 들어, CTL) 반응을 자극한다. 면역화 프로토콜에 유용한 백시니아 벡터 및 방법은, 예를 들어 미국 특허 4,722,848에 기술되어 있다. 또 다른 벡터는 BCG(바실러스 칼메트-게랭)이다. BCG 벡터는 문헌에 기술되어 있다(Stover 등, Nature 351:456-460 (1991)). 항원의 치료적 투여 또는 면역화에 유용한 매우 다양한 다른 백신 벡터, 예를 들어 살모넬라 타이피 벡터 등은 본원의 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

[0378] 핵산을 투여하는 수단은 하나 또는 다중 에피토프를 인코딩하는 미니유전자 구성물을 사용한다. 인간 세포에서의 발현을 위해 선택된 CTL 에피토프(미니유전자)를 인코딩하는 DNA 서열을 생성하기 위해, 에피토프의 아미노산 서열은 역 번역된다. 인간 코돈 사용 표는 각 아미노산에 대한 코돈 선택을 안내하는 데 사용된다. 이러한 에피토프-인코딩 DNA 서열은 직접 연결되어 연속적인 폴리펩티드 서열을 생성한다. 발현 및/또는 면역원성을 최적화하기 위해, 추가 요소를 미니유전자 설계에 혼입할 수 있다. 역 번역될 수 있고 미니유전자 서열에 포함될 수 있는 아미노산 서열의 예는 헬퍼 T 림프구, 에피토프, 리더(신호) 서열 및 소포체 보유 신호를 포함한다. 또한, CTL 에피토프의 MHC 제시는 CTL 에피토프에 인접한 합성(예를 들어, 폴리-알라닌) 또는 자연-발생 플랭킹 서열을 포함함으로써 개선될 수 있다. 미니유전자 서열은 미니유전자의 플러스 및 마이너스 가닥을 인코딩하는 올리고뉴클레오티드를 조립함으로써 DNA로 전환된다. 중첩 올리고뉴클레오티드(30-100 염기 길이)는 잘 알려진 기술을 사용하여 적절한 조건에서 합성, 인산화, 정제 및 어닐링된다. 올리고뉴클레오티드의 끝은 T4 DNA 리가제를 사용하여 연결된다. CTL 에피토프 폴리펩티드를 인코딩하는 이 합성 미니유전자는 원하는 발현 벡터로 클로닝될 수 있다.

[0379] 정제된 플라스미드 DNA는 다양한 제형을 사용하여 주사용으로 제조할 수 있다. 이들 중 가장 간단한 것은 멸균 인산염-완충 식염수(PBS)에서 동결건조된 DNA를 재구성하는 것이다. 다양한 방법이 설명되었으며 새로운 기술을 사용할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 핵산은 양이온성 지질과 함께 편리하게 제형화된다. 또한 당지질,

융합성 리포솜, 펩티드 및 집합적으로 보호, 상호작용, 비-응축(PINC)이라고 하는 화합물도 정제된 플라스미드 DNA와 복합체를 형성하여 안정성, 근육내 분산 또는 특정 장기 또는 세포 유형으로의 트래픽킹과 같은 변수에 영향을 미칠 수 있다.

[0380] 본원에 개시된 방법의 단계를 수행하고, 다수의 항원 또는 다수의 항원의 서브세트를 포함하는 백신, 예를 들어 종양 백신을 생산하는 것을 포함하는 백신, 예를 들어 종양 백신을 제조하는 방법이 또한 개시된다.

[0381] 본원에 개시된 항원은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항원 또는 벡터(예를 들어, 하나 이상의 항원을 인코딩하는 적어도 하나의 서열을 포함하는 벡터)를 생산하는 방법은 항원 또는 벡터를 발현하기에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 숙주 세포는 항원 또는 벡터를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 항원 또는 벡터를 정제하는 것을 포함한다. 표준 정제 방법에는 크로마토그래피 기술, 전기영동, 면역학, 침전, 투석, 여과, 농축 및 크로마토포커싱 기술이 포함된다.

[0382] 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, NSO 세포, 효모 또는 HEK293 세포를 포함할 수 있다. 숙주 세포는 본원에 개시된 항원 또는 벡터를 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 형질전환될 수 있으며, 임의로 분리된 폴리뉴클레오티드는 항원 또는 벡터을 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA일 수 있다.

[0383] **VII. 항원 사용 및 투여**

[0384] 백신접종 프로토콜을 사용하여 대상체에게 하나 이상의 항원을 투여할 수 있다. 사용될 수 있는 백신접종 방법, 프로토콜 및 일정은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된 국제 출원 공개 WO2021092095에 기술된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0385] 프라이밍 백신은 C68(예를 들어, 서열번호: 1 또는 2에 제시된 서열) 또는 samRNA(예를 들어, 서열번호: 3 또는 4에 제시된 서열)를 기반으로 할 수 있다. 부스팅 백신은 C68(예를 들어, 서열번호: 1 또는 2에 제시된 서열) 또는 samRNA(예를 들어, 서열번호: 3 또는 4에 제시된 서열)를 기반으로 할 수 있다.

[0386] 프라임/부스트 전략의 각 벡터는 일반적으로 항원을 포함하는 카세트를 포함한다. 카세트는 일반적으로 각 항원 또는 AAY와 같은 다른 비-천연 스페이서 서열을 둘러싸는 천연 서열과 같은 스페이서에 의해 분리된 약 1-50개의 항원을 포함할 수 있다. 카세트는 약 20개의 신생항원, 예를 들어 20명의 대상체 및/또는 종양-특이적 항원을 포함할 수 있다. 카세트는 또한 파상풍 톡소이드 항원 및 PADRE 항원과 같은 MHC II 항원을 포함할 수 있으며, 이는 보편적 클래스 II 항원으로 간주될 수 있다. 카세트는 또한 유비퀴틴 표적화 서열과 같은 표적화 서열을 포함할 수 있다. 또한, 각 백신 용량은 면역 조절제와 함께(예를 들어, 동시에, 전에 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다. 각 백신 용량은 관문 억제제(CPI)와 함께(예를 들어, 동시에, 전에 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다. CPI는 항체 또는 이의 항원-결합 부분과 같은 CTLA4, PD1 및/또는 PDL1을 억제하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 항체에는 아테졸리주맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 세미플리맙, 트레멜리무맙 또는 더발루맙이 포함될 수 있다. 각 백신 용량은 IL-2, IL-7, IL-12(IL-12 p35, p40, p70 및/또는 p70-융합 구성물), IL-15, 또는 IL-21과 같은 사이토카인과 함께(예를 들어, 동시에, 전 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다. 각각의 백신 용량은 변형된 사이토카인(예를 들어, pegIL-2)과 함께(예를 들어, 동시에, 전 또는 후에) 대상체에게 투여될 수 있다.

[0387] 프라이밍 백신은 대상체에게 (예를 들어, 근육내로) 주사될 수 있다. 용량당 양측 주사를 사용할 수 있다. 예를 들어, ChAdV68(C68)의 하나 이상의 주사(예를 들어, 총 용량 $1x10^{12}$ 바이러스 입자)가 사용될 수 있거나; 0.001 내지 1 ug RNA, 특히 0.1 또는 1 ug 범위로부터 선택된 낮은 백신 용량에서 samRNA 백터의 하나 이상의 주사가 사용될 수 있거나; 1 내지 1000 ug RNA, 특히 30 μg, 100 μg, 또는 300 μg RNA의 범위로부터 선택된 높은 백신 용량에서 SAM의 하나 이상의 주사가 사용될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 1×10^{12} 이하의 바이러스 입자가 투여될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 3×10^{11} 이하의 바이러스 입자가 투여될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 적어도 1×10^{11}의 바이러스 입자가 투여될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 1×10^{11} 내지 1×10^{12}, 3×10^{11} 내지 1×10^{12}, 또는 1×10^{11} 내지 3×10^{11}의 바이러스 입자가 투여될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 1×10^{11}, 3×10^{11}, 또는 1×10^{12}의 바이러스 입자가 투여될 수 있다. ChAdV68 프라이밍의 경우, 바이러스 입자는 5

$\times 10^{11}$ vp/mL의 농도일 수 있다.

[0388] 백신 부스트(부스팅 백신)는 프라임 백신접종 후에 (예를 들어, 근육내로) 주사될 수 있다. 부스팅 백신은 프라임 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10주마다, 예를 들어 4주마다 및/또는 8주마다 투여될 수 있다. 용량 당 양측 주사를 사용할 수 있다. 예를 들어, ChAdV68(C68)의 1회의 이상 주사(예를 들어, 총 용량 $1x10^{12}$ 바이러스 입자)가 사용될 수 있거나; 0.001 내지 1 ug RNA, 특히 0.1 또는 1 ug 범위로부터 선택된 낮은 백신 용량에서 samRNA 벡터의 하나 이상의 주사가 사용될 수 있거나; 1 내지 100 μg RNA, 특히 10 또는 100 ug 범위로부터 선택된 높은 백신 용량에서 SAM의 하나 이상의 주사가 사용될 수 있다. 10-30 μg, 10-100 μg, 10-300 μg, 30-100 μg, 30-300 μg, 또는 100-300 μg 사이의 RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 10-500 μg, 10-1000 μg, 30-500 μg, 30-1000 μg, 또는 500-1000 μg 사이의 RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 적어도 400 μg, 적어도 500 μg, 적어도 600 μg, 적어도 700 μg, 적어도 800 μg, 적어도 900 μg, 적어도 1000 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 10 μg, 30 μg, 100 μg, 또는 300 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 300 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 100 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 30 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 10 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 적어도 300 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 적어도 100 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 적어도 30 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 적어도 10 μg RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다. 300 μg 이하의 RNA의 SAM 부스트가 투여될 수 있다.

[0389] 항-CTLA-4(예를 들어, 트레멜리무맙)가 또한 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-CTLA4는 동일한 림프절로의 배수를 보장하기 위해 근육내 백신 주사(ChAdV68 프라임 또는 samRNA 저용량) 부위 근처에 피하 투여될 수 있다. 트레멜리무맙은 CTLA-4의 선택적 인간 IgG2 mAb 억제제이다. 표적 항-CTLA-4(트레멜리무맙) 피하 용량은 전형적으로 70-75 mg(특히 75 mg)이며, 용량 범위는, 예를 들어 1-100 mg 또는 5-420 mg이다.

[0390] 특정 예에서 항-PD-L1 항체, 예컨대 더발루맙(MEDI 4736)이 사용될 수 있다. 더발루맙은 PD-1 및 CD80에 대한 PD-L1 결합을 차단하는 선택적 고친화성 인간 IgG1 mAb이다. 더발루맙은 일반적으로 4주마다 20 mg/kg i.v.로 투여된다.

[0391] 면역 모니터링은 백신 투여 전, 투여 중 및/또는 투여 후에 수행될 수 있다. 이러한 모니터링은 다른 매개변수 중에서 안전성과 효능에 대한 정보를 줄 수 있다.

[0392] 면역 모니터링을 수행하기 위해, PBMC가 일반적으로 사용된다. PBMC는 프라임 백신접종 전 및 프라임 백신접종 후(예를 들어, 4주 및 8주)로 분리할 수 있다. PBMC는 부스터 백신접종 직전과 각 부스터 백신접종 후(예를 들어, 4주 및 8주) 수확할 수 있다.

[0393] T 세포 반응 및 B 세포 반응과 같은 면역 반응은 면역 모니터링 프로토콜의 일부로 평가될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응을 자극하는 본원에 기술된 백신 조성물의 능력이 모니터링 및/또는 평가될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "면역 반응을 자극하다"는 면역 반응의 개시(예를 들어, 미경험 대상체에서 면역 반응의 개시를 자극하는 프라이밍 백신) 또는 면역 반응의 향상(예를 들어, 프라이밍 백신에 의해 개시되는 기존 면역 반응과 같이 항원에 대한 기존 면역 반응을 갖는 대상체에서 면역 반응의 향상을 자극하는 부스팅 백신)과 같은 면역 반응에서 임의의 증가를 지칭한다. T 세포 반응은 ELISpot, 세포내 사이토카인 염색, 사이토카인 분비 및 세포 표면 포획, T 세포 증식, MHC 다량체 염색 또는 세포독성 검정과 같은 당업계에 알려진 하나 이상의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 백신에 인코딩된 에피토프에 대한 T 세포 반응은 ELISpot 검정을 사용하여 IFN-감마와 같은 사이토카인의 유도를 측정함으로써 PBMC에서 모니터링할 수 있다. 백신에 인코딩된 에피토프에 대한 특정 CD4 또는 CD8 T 세포 반응은 유세포 분석을 사용하여 IFN-감마와 같이 세포내 또는 세포외에서 포획된 사이토카인의 유도를 측정함으로써 PBMC에서 모니터링할 수 있다. 백신에 인코딩된 에피토프에 대한 특정 CD4 또는 CD8 T 세포 반응은 MHC 다량체 염색을 사용하여 에피토프/MHC 클래스 I 복합체에 특이적인 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포 집단을 측정함으로써 PBMC로부터 모니터링할 수 있다. 백신에 인코딩된 에피토프에 대한 특정 CD4 또는 CD8 T 세포 반응은 3H-티미딘, 브로모데옥시우리딘 및 카복시플루오레세인-디아세테이트-숙신이미딜에스테르(CFSE) 혼입 후 T 세포 집단의 생체외 확장을 측정하여 PBMC에서 모니터링할 수 있다. 백신에 인코딩된 에피토프에 특이적인 PBMC-유래 T 세포의 항원 인식 능력 및 용해 활성은 크롬 방출 검정 또는 대체 비색 세포독성 검정에 의해 기능적으로 평가될 수 있다.

[0394] B 세포 반응은 B 세포 분화(예를 들어, 형질 세포로의 분화), B 세포 또는 형질 세포 증식, B 세포 또는 형질 세포 활성화(예를 들어, CD80 또는 CD86과 같은 공동자극성 마커의 상향조절), 항체 클래스 전환, 및/또는 항체

생산를 결정하는 데 사용되는 검정(예를 들어, ELISA)과 같은 당업계에 알려진 하나 이상의 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 항체는 또한 기능에 대해 평가될 수 있다.

[0395] 본원에 기술된 임의의 백신 조성물의 투여 후 대상체의 질환 상태를 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 질환 상태는 대상체로부터 분리된 무세포 DNA(cfDNA)를 사용하여 모니터링할 수 있다 (또한, 순환 종양 DNA "ctDNA"로 지칭됨). 또한, 백신 요법의 효능은 대상체로부터 분리된 cfDNA를 사용하여 모니터링할 수 있다. cfDNA 모니터링에는 다음 단계가 포함될 수 있다: a. 대상체로부터 cfDNA를 분리하거나 분리했던 단계; b. 분리된 cfDNA를 시퀀싱하거나 시퀀싱했던 단계; c. 대상체의 야생형 생식선 핵산 서열에 비해 cfDNA에서 하나 이상의 돌연변이의 빈도를 결정하거나 결정했던 단계, d. 단계 (c)로부터 대상체의 질환 상태를 평가하거나 평가하는 단계. 상기 방법은 또한 상기 단계 (c)에 이어서, d. 주어진 대상체에 대해 단계 (a)-(c)의 하나 초과의 반복을 수행하고 하나 초과의 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이의 빈도를 비교하는 단계; 및 f. 단계 (d)로부터 대상체의 질환 상태를 평가하거나 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 백신 조성물의 투여 전에 수행되는 단계 (a)-(c)의 제1 반복 및 백신 조성물의 투여 이후 단계 (a)-(c)의 제2 반복이 수행되는 것과 같이, 하나 초과의 반복이 상이한 시점에서 수행될 수 있다. 단계 (c)는: 하나 초과의 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이의 빈도, 또는 제1 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이의 빈도와 제2 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이의 빈도를 비교하는 것을 포함할 수 있다. 후속 반복 또는 제2 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이 빈도의 증가는 질환 진행으로 평가될 수 있다. 후속 반복 또는 제2 반복에서 결정된 하나 이상의 돌연변이 빈도의 감소는 반응으로 평가될 수 있다. 일부 측면에서, 반응은 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)이다. 치료는 cfDNA에서 하나 이상의 돌연변이 빈도의 평가가 대상체가 질환을 가지고 있음을 나타내는 경우와 같은 평가 단계 후에 대상체에게 투여될 수 있다. cfDNA 분리 단계는 원심분리를 사용하여 세포 또는 세포 파편에서 cfDNA를 분리할 수 있다. cfDNA는 혈장 층, 버피 코트 및 적혈구를 분리하는 것과 같이 전혈에서 분리할 수 있다. cfDNA 시퀀싱은 차세대 시퀀싱(NGS), 생어(Sanger) 시퀀싱, 듀플렉스 시퀀싱, 전체-엑솜 시퀀싱, 전체-게놈 시퀀싱, 드 노보 시퀀싱, 단계적 시퀀싱, 표적 앰플리콘 시퀀싱, 샷건 시퀀싱 또는 이의 조합을 사용할 수 있으며, 시퀀싱 전에 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드 영역에 대한 cfDNA(예를 들어, 하나 이상의 돌연변이, 코딩 영역 및/또는 종양 엑솜 폴리뉴클레오티드를 인코딩하는 것으로 알려져 있거나 의심되는 폴리뉴클레오티드)를 농축하는 것을 포함할 수 있다. cfDNA를 농축하는 것은 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드 영역에 변형(예를 들어, 비오티닐화)될 수 있는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 프로브를 혼성화하는 것을 포함할 수 있다. 일반적으로 임의의 수의 돌연변이를 동시에 또는 병렬로 모니터링할 수 있다.

[0396] 치료에 대한 반응(즉, 치료적 반응)은, 예를 들어 Zhang *et al. Cancer Discov.* 2020;10:1842-1853, Parikh *et al. Clin Cancer Res.* 2020; 26:1877-1885, 및 Vega *et al. JCO Precision Oncology* 2022; 6:e2100372에 기술된 바와 같은 신생항원 ctDNA(예를 들어, 변이체 대립유전자 빈도 "VAF") 또는, 예를 들어 Palmer *et al. Nat. Med.* 2022;28:1619-1629 및 Chabon *et al. Nature* 2020; 580(7802): 245-251에 기술된 바와 같은 신생항원 돌연변이된 반수체 게놈 등가물 (돌연변이된 hGE)를 모니터링함에 의해 방사선 평가 및/또는 분자 반응에 의해 결정될 수 있다. 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 감소, 예를 들어 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥20%, ≥30%, ≥40%, ≥50%, ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥90%, 또는 ≥95% 감소로 정의될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA≥30% 감소로 정의된다. 일부 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥30% 감소로 정의되며, 여기서 ctDNA의 감소는 치료 24개월, 18개월, 12개월, 또는 6개월까지 발생한다. 일부 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥30% 감소로 정의되며, 여기서 ctDNA의 감소는 치료 12주, 8주, 4주, 또는 2주까지 발생한다. 다른 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥50% 감소로 정의되며, 여기서 ctDNA의 감소는 치료 24개월, 18개월, 12개월, 또는 6개월까지 발생한다. 다른 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥50% 감소로 정의된다. 일부 실시양태에서, 분자 반응은 기준선 ctDNA에 비해 ctDNA의 ≥50% 감소로 정의되며, 여기서 ctDNA의 감소는 치료 12주, 8주, 4주, 또는 2주까지 발생한다. 분자 반응은 치료의 초기 동안 방사선 안정성 질환(SD) 및/또는 방사선 진행성 질환(progressive disease)(PD)을 갖는 환자에서 관찰될 수 있다.

[0397] **VIII. 항원 확인**

[0398] **VIII.A. 항원 후보 확인**

[0399] 종양 및 정상 엑솜 및 전사체의 NGS 분석을 위한 연구 방법이 설명되었고 항원 확인 공간에 적용되었다.[6,14,15] 임상적 환경에서 항원 확인을 위한 더 큰 민감도 및 특이성을 위한 특정 최적화를 고려할 수 있다. 이러한 최적화는 실험실 공정과 관련된 영역 및 NGS 데이터 분석과 관련된 영역의 두 영역으로 그룹화할 수 있다. 최적화의

예는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 방법은 각각 본원에 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 참조로 포함되는 국제 특허 출원 공개 WO/2017/106638, WO/2018/195357, 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있다.

[0400] **VIII.B. HLA 펩티드의 분리 및 검출**

[0401] HLA-펩티드 분자의 분리는 조직 샘플(55-58)의 용해 및 가용화 후에 고전적인 면역침전(IP) 방법을 사용하여 수행되었다. HLA 특이적 IP에 대해 정화된(clarified) 용해물을 사용했다.

[0402] 항체가 HLA 분자에 특이적인 비드에 커플링된 항체를 사용하여 면역침전을 수행하였다. 범-클래스 I HLA 면역침전의 경우, 범-클래스 I CR 항체가 사용되며 클래스 II HLA - DR의 경우, HLA-DR 항체가 사용된다. 항체는 밤새 배양하는 동안 NHS-세파로스 비드에 공유적으로 부착된다. 공유 부착 후, 비드를 세척하고 IP를 위해 분취했다. (59, 60) 면역침전은 비드에 공유적으로 부착되지 않은 항체로 수행할 수도 있다. 일반적으로 이것은 항체를 컬럼에 고정하기 위해 단백질 A 및/또는 단백질 G로 코팅된 세파로스 또는 자기 비드를 사용하여 수행된다. MHC/펩티드 복합체를 임의로 풍부하게 하는 데 사용할 수 있는 일부 항체는 아래에 나열되어 있다.

[0403]

항체 명칭	특이성
W6/32	클래스 I HLA-A, B, C
L243	클래스 II – HLA-DR
Tu36	클래스 II – HLA-DR
LN3	클래스 II – HLA-DR
Tu39	클래스 II – HLA-DR, DP, DQ
SPVL3	클래스 II – HLA - DQ
B7/21	클래스 II – HLA - DP

[0404] 면역침전을 위해 정화된 조직 용해물을 항체 비드에 첨가한다. 면역 침전 후, 비드는 용해물에서 제거되고 용해물은 추가 IP를 포함한 추가 실험을 위해 저장된다. IP 비드를 세척하여 비-특이적 결합을 제거하고 HLA/펩티드 복합체는 표준 기술을 사용하여 비드에서 용출된다. 단백질 성분은 분자량 스핀 컬럼 또는 C18 분획법을 사용하여 펩티드에서 제거된다. 생성된 펩티드는 스피드백(SpeedVac) 증발에 의해 건조되고 어떤 경우에는 MS 분석 전에 -20C에서 저장된다. HLA IP는 또한 필터 하부를 함유하는 플레이트를 사용하여 96웰 플레이트 포맷에서 수행될 수 있다. 플레이트의 사용은 다중 IP가 동시에 수행될 수 있도록 한다.

[0405] 건조된 펩티드는 역상 크로마토그래피에 적합한 HPLC 완충액에서 재구성되고 퓨전 루모스(Fusion Lumos) 질량분석기(Thermo)에서 구배 용출을 위해 C-18 미세모세관 HPLC 컬럼에 로딩된다. 펩티드 질량/전하(m/z)의 MS1 스펙트럼을 오비트랩(Orbitrap) 검출기에서 고 분해능으로 수집한 다음 MS2 저 분해능 스캔을 선택한 이온의 HCD 단편화 후 이온 트랩 검출기에서 수집했다. 또한 MS2 스펙트럼은 CID 또는 ETD 단편화 방법 또는 세 가지 기술의 조합을 사용하여 펩티드의 더 큰 아미노산 범위를 얻을 수 있다. MS2 스펙트럼은 오비트랩 검출기에서 병렬 반응 모니터링으로 알려진 표적 방법을 사용하여 고분해능 질량 정확도로 측정할 수도 있다. 표적 PRM에서, 특정 펩티드 전구체 이온은 오비트랩 검출기에서 분리되고 생성된 모든 HCD 단편화 이온은 펩티드 피크의 용리를 가로질러 스캔된다. 이를 통해 공동 주사된 안정한 동위원소 표지 펩티드 표준의 존재 하에서 내인성 펩티드의 펩티드 확인 및 정량화를 모두 수행할 수 있다.

[0406] 각 분석으로부터의 MS2 스펙트럼은 코미트(Comet)(61, 62)를 사용하여 단백질 데이터베이스에 대해 검색되고 펩티드 확인은 퍼콜레이터(Percolator)(63-65)를 사용하여 점수화된다. 추가 시퀀싱은 PEAKS 스튜디오(Bioinformatics Solutions Inc.)를 사용하여 수행되며 스펙트럼 일치 및 새로운 시퀀싱(97)을 포함하여 다른 검색 엔진 또는 시퀀싱 방법을 사용할 수 있다.

[0407] **VIII.B.1. 포괄적인 HLA 펩티드 시퀀싱을 지원하는 MS 검출 한계 연구.**

[0408] 펩티드 YVYVADVAAK(서열번호: 29364)를 사용하여 LC 컬럼에 로딩된 상이한 양의 펩티드를 사용하여 검출 한계가 무엇인지를 결정하였다. 테스트된 펩티드의 양은 1 pmol, 100 fmol, 10 fmol, 1 fmol 및 100 amol이다. (표 1) 이러한 결과는 검출의 최저 한계(LoD)가 애토몰(attomol) 범위(10^{-18})에 있고, 동적 범위가 5배의 크기에 걸쳐 있으며, 신호 대 잡음비가 낮은 펨토몰(femtomol) 범위(10^{-15})에서 시퀀싱에 충분해 보인다.

[0409] 표 1

펩티드 m/z	컬럼에 로딩됨	1e9세포에서의 카피/세포
566.830	1 pmol	600
562.823	100 fmol	60
559.816	10 fmol	6
556.810	1 fmol	0.6
553.802	100 amol	0.06

[0410]

[0411] IX. 제시 모델

[0412] 제시 모델은 환자에서 펩티드 제시의 가능성을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 제시 모델이 당업자에게, 예를 들어 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1 및 US20110293637, 및 국제 특허출원 공개 WO/2018/195357, WO/2018/208856 및 WO2016187508에 알려져 있으며, 각각은 본 원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.

[0413] X. 트레이닝 모듈

[0414] 트레이닝 모듈은 펩티드 서열이 펩티드 서열과 연관된 MHC 대립유전자에 의해 제시될 것인지의 가능성을 생성하는 트레이닝 데이터 세트에 기반으로 하나 이상의 제시 모델을 구성하는 데 사용될 수 있다. 다양한 트레이닝 모듈이 당업자에게, 예를 들어 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1, 및 국제 특허출원 공개 WO/2018/195357 및 WO/2018/208856에 알려져 있으며, 각각은 본원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 트레이닝 모듈은 대립유전자 별로 펩티드의 제시 가능성을 예측하기 위한 제시 모델을 구성할 수 있다. 트레이닝 모듈은 또한 두 개 이상의 MHC 대립유전자가 존재하는 다중-대립유전자 설정에서 펩티드의 제시 가능성을 예측하기 위해 제시 모델을 구성할 수 있다.

[0415] XI. 예측 모듈

[0416] 예측 모듈은 제시 모델을 사용하여 서열 데이터를 수신하고 서열 데이터에서 후보 항원을 선택하는 데 사용될 수 있다. 특이적으로, 서열 데이터는 환자의 종양 조직 세포로부터 추출된 DNA 서열, RNA 서열 및/또는 단백질 서열일 수 있다. 예측 모듈은 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 부분을 확인하기 위해 환자의 정상 조직 세포로부터 추출된 서열 데이터와 환자의 종양 조직 세포로부터 추출된 서열 데이터를 비교함으로써 돌연변이된 펩티드 서열인 후보 신생항원을 확인할 수 있다. 예측 모듈은 부적절하게 발현된 후보 항원을 확인하기 위해 환자의 정상 조직 세포에서 추출한 서열 데이터와 환자의 종양 조직 세포에서 추출한 서열 데이터를 비교하여 정상 세포 또는 조직에 비해 종양 세포 또는 암 조직에서 발현이 변경된 후보 항원을 확인할 수 있다.

[0417] 제시 모듈은 펩티드 서열의 제시 가능성을 추정하기 위해 처리된 펩티드 서열에 하나 이상의 제시 모델을 적용할 수 있다. 특이적으로, 예측 모듈은 제시 모델을 후보 항원에 적용함으로써 종양 HLA 분자 상에 제시될 가능성이 있는 하나 이상의 후보 항원 펩티드 서열을 선택할 수 있다. 한 구현에서, 제시 모듈은 미리 결정된 임계값을 초과하는 추정된 제시 가능성을 갖는 후보 항원 서열을 선택한다. 다른 구현에서, 제시 모델은 가장 높은 추정 제시 가능성을 갖는 N 후보 항원 서열을 선택한다(여기서, N은 일반적으로 백신에서 전달될 수 있는 에피토프의 최대 수이다). 주어진 환자에 대해 선택된 후보 항원을 포함하는 백신을 환자에게 주사하여 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0418] XI.B. 카세트 설계 모듈

[0419] XI.B.1 개요

[0420] 카세트 설계 모듈은 환자에게 주사하기 위해 선택된 후보 펩티드에 기반으로 백신 카세트 서열을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 카세트 설계 모듈은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1, 및 국제 특허출원 공개 WO/2018/195357 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있으며, 각각은 본원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.

[0421] 한 세트의 치료적 에피토프는 미리 결정된 임계값을 초과하는 제시 가능성과 연관된 예측 모듈에 의해 결정된 선택된 펩티드를 기반으로 생성될 수 있으며, 여기서 제시 가능성은 제시 모델에 의해 결정된다. 그러나 다른 실시양태에서 치료적 에피토프 세트는, 예를 들어 환자의 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 대립유전자에 대한 결합 친화도 또는 예측된 결합 친화도, 환자의 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 대립유전자에 대한 결합 안정성 또는 예측된 결합 안정성, 무작위 샘플링 등을 기반으로 (단독으로 또는 조합하여) 다수의 방법 중 임의의 하나 이상을 기반으로 생성될 수 있음이 이해된다.

[0422] 치료적 에피토프는 선택된 펩티드 자체에 상응할 수 있다. 치료적 에피토프는 또한 선택된 펩티드 이외에 C- 및/또는 N-말단 플랭킹 서열을 포함할 수 있다. N- 및 C-말단 플랭킹 서열은 이의 공급원 단백질과 관련하여 치료적 백신 에피토프의 천연 N- 및 C-말단 플랭킹 서열일 수 있다. 치료적 에피토프는 고정-길이 에피토프를 나타낼 수 있다. 치료적 에피토프는 가변-길이 에피토프를 나타낼 수 있으며, 여기서 에피토프의 길이는, 예를 들어 C- 또는 N-플랭킹 서열의 길이에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, C-말단 플랭킹 서열 및 N-말단 플랭킹 서열은 각각 2-5개 잔기의 다양한 길이를 가질 수 있어서, 에피토프에 대해 16개의 가능한 선택이 가능하다.

[0423] 카세트 설계 모듈은 또한 카세트에서 한 쌍의 치료적 에피토프 사이의 접합부에 걸쳐 있는 접합부 에피토프의 제시를 고려하여 카세트 서열을 생성할 수 있다. 접합부 에피토프는 카세트에서 치료적 에피토프와 카세트의 링커 서열을 연결하는 공정으로 인해 카세트에서 발생하는 새로운 비-자기이지만 관련없는 에피토프 서열이다. 접합부 에피토프의 새로운 서열은 카세트 자체의 치료적 에피토프와 다르다.

[0424] 카세트 설계 모듈은 접합부 에피토프가 환자에게 제시될 가능성을 감소시키는 카세트 서열을 생성할 수 있다. 특이적으로, 카세트가 환자에게 주사될 때 접합 에피토프는 환자의 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 대립유전자에 의해 제시될 가능성이 있으며 각각 CD8 또는 CD4 T-세포 반응을 자극한다. 접합 에피토프에 반응하는 T-세포는 치료 효과가 없고 항원 경쟁에 의해 카세트에서 선택된 치료 에피토프에 대한 면역 반응을 감소시킬 수 있기 때문에, 이러한 반응은 종종 바람직하지 않다.[76]

[0425] 카세트 설계 모듈은 하나 이상의 후보 카세트를 통해 반복할 수 있고, 그 카세트 서열과 연관된 접합부 에피토프의 제시 점수가 수치 임계값 미만인 카세트 서열을 결정할 수 있다. 접합 에피토프 제시 점수는 카세트 내의 접합 에피토프의 제시 가능성과 연관된 양이며, 접합 에피토프 제시 점수의 값이 높을수록 카세트의 접합 에피토프가 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 또는 둘 모두에 의해 제시될 가능성이 더 높다는 것을 나타낸다.

[0426] 한 실시양태에서, 카세트 설계 모듈은 후보 카세트 서열 중에서 가장 낮은 접합 에피토프 제시 점수와 연관된 카세트 서열을 결정할 수 있다.

[0427] 카세트 설계 모듈은 하나 이상의 후보 카세트 서열을 통해 반복하고, 후보 카세트에 대한 접합부 에피토프 제시 점수를 결정하고, 임계값 미만의 접합부 에피토프 제시 점수와 연관된 최적의 카세트 서열을 확인할 수 있다.

[0428] 카세트 설계 모듈은 하나 이상의 후보 카세트 서열을 추가로 검사하여 후보 카세트 서열 내의 임의의 접합 에피토프가 백신이 설계되고 있는 주어진 환자에 대한 자가-에피토프인지 확인할 수 있다. 이를 달성하기 위해, 카세트 설계 모듈은 BLAST와 같은 알려진 데이터베이스에 대해 접합 에피토프를 확인한다. 한 실시양태에서, 카세트 설계 모듈은 접합 자가-에피토프를 피하는 카세트를 설계하도록 구성될 수 있다.

[0429] 카세트 설계 모듈은 가장 작은 접합부 에피토프 제시 점수를 갖는 서열을 선택하기 위해 무차별 대입 접근법을 수행하고 모든 또는 대부분의 가능한 후보 카세트 서열을 통해 반복할 수 있다. 그러나 이러한 후보 카세트의 수는 백신의 용량이 증가함에 따라 엄청나게 커질 수 있다. 예를 들어, 20개 에피토프의 백신 용량에 대해, 카세트 설계 모듈은 가장 낮은 접합 에피토프 제시 점수를 가진 카세트를 결정하기 위해 약 10^{18}개의 가능한 후보 카세트를 통해 반복해야 한다. 이 결정은 (필요한 계산 처리 자원 측면에서) 계산적으로 부담이 될 수 있으며 카세트 설계 모듈이 환자를 위한 백신을 생성하기 위해 합당한 시간 내에 완료하는 데 때때로 다루기 어려울 수 있다. 더욱이, 각각의 후보 카세트에 대한 가능한 접합 에피토프를 설명하는 것은 훨씬 더 부담스러울 수 있다. 따라서, 카세트 설계 모듈은 무차별 대입 방식에 대한 후보 카세트 서열의 수보다 상당히 적은 수의 후보 카세트 서열을 통해 반복하는 방식에 기반하여 카세트 서열을 선택할 수 있다.

[0430] 카세트 설계 모듈은 무작위로 또는 적어도 유사-무작위로 생성된 후보 카세트의 서브세트를 생성할 수 있고, 미리 결정된 임계값 미만의 접합 에피토프 제시 점수와 연관된 후보 카세트를 카세트 서열로 선택할 수 있다. 추가로, 카세트 설계 모듈은 가장 낮은 접합 에피토프 제시 스코어를 갖는 서브세트로부터 카세트 서열로서 후보 카세트를 선택할 수 있다. 예를 들어, 카세트 설계 모듈은 20개의 선택된 에피토프 세트에 대해 약 100만 후보

카세트의 서브세트를 생성하고 접합 에피토프 제시 점수가 가장 작은 후보 카세트를 선택할 수 있다. 무작위 카세트 서열의 서브세트를 생성하고 서브세트 중에서 접합 에피토프 제시 점수가 낮은 카세트 서열을 선택하는 것이 무차별 대입 접근 방식에 비해 차선일 수 있지만 계산 자원이 훨씬 적게 필요하므로 기술적으로 구현이 가능하다. 또한, 이 보다 효율적인 기술과 달리 무차별 대입 방법을 수행하면 접합 에피토프 표시 점수가 미미하거나 심지어 무시할 수 있을 정도로 향상될 수 있으므로 자원 할당 관점에서 볼 때 가치가 없다. 카세트 설계 모듈은 카세트에 대한 에피토프 서열을 비대칭 여행하는 세일즈맨 문제(TSP)로 공식화하여 개선된 카세트 구성을 결정할 수 있다. 노드 목록과 각 노드 쌍 사이의 거리가 주어지면 TSP는 각 노드를 정확히 한 번 방문하고 원래 노드로 돌아가기 위해 가장 짧은 총 거리와 연관된 노드 순서를 결정한다. 예를 들어 도시 A, B, C가 서로 알려진 거리가 있는 경우 TSP의 해결책은 각 도시를 정확히 한 번 방문하기 위해 이동한 총 거리가 가능한 경로 중에서 가장 작은 도시의 폐쇄 순서를 생성한다. TSP의 비대칭 버전은 한 쌍의 노드 사이의 거리가 비대칭일 때 최적의 노드 순서를 결정한다. 예를 들어 노드 A에서 노드 B로 이동하는 "거리"는 노드 B에서 노드 A로 이동하는 "거리"와 다를 수 있다. 비대칭 TSP를 사용하여 개선된 최적의 카세트를 해결함으로써 카세트 설계 모듈은 카세트의 에피토프 사이의 접합부에 걸쳐 감소된 제시 점수를 초래하는 카세트 서열을 찾을 수 있다. 비대칭 TSP의 해결책은 카세트의 접합부에서 접합부 에피토프 제시 점수를 최소화하기 위해 카세트에서 에피토프가 연결되어야 하는 순서에 상응하는 치료적 에피토프의 서열을 나타낸다. 이 접근법을 통해 결정된 카세트 서열은 특히 생성된 후보 카세트 서열의 수가 많을 때 무작위 샘플링 접근법보다 잠재적으로 훨씬 적은 계산 자원을 필요로 하면서 접합 에피토프의 제시가 상당히 적은 서열을 생성할 수 있다. 카세트 설계를 최적화하기 위한 상이한 연산 접근법 및 비교의 예시적인 예는 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1, 및 국제 특허 출원 공개 WO/2018/195357 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있으며, 각각은 본원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.

[0431] **XI.B.2 공유 항원 백신 서열 선택**

[0432] 공유 항원 백신에 포함하기 위한 공유 항원 서열 및 이러한 백신으로 치료하기에 적절한 환자는 본원에 제공된 상세한 개시내용을 사용하여 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 표: A, 1.2, 추가 MS 검증된 신생항원, 또는 AACR GENIE 결과가 서열 선택에 사용될 수 있다. 특정 경우에서, 특정 돌연변이 및 HLA 대립유전자 조합이 바람직할 수 있고(예를 들어, 각각이 대상체 내에 존재함을 나타내는 주어진 대상체로부터 이용가능한 시퀀싱 데이터에 기반함), 이어서 백신에 포함하기 위한 표 A, 추가 MS 검증된 신생항원, 또는 AACR GENIE 결과를 사용하여 함께 조합해 사용되어 공유 신생항원 서열을 확인할 수 있다.

[0433] **XIII. 예시 컴퓨터**

[0434] 본원에 설명된 계산 방법을 위해 컴퓨터를 사용할 수 있다. 당업자는 컴퓨터가 상이한 아키텍처를 가질 수 있음을 인지할 것이다. 컴퓨터의 예는 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 미국 특허 10,055,540, 미국 출원공개 US20200010849A1, 및 국제 특허출원 공개 WO/2017/106638, WO/2018/195357, 및 WO/2018/208856에 상세히 기술되어 있으며, 각각은 본원에 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.

[0435] **XIV. 보조 및 유지 요법에서 신생항원 백신의 임상적 평가**

[0436] 네오에피토프 카세트를 인코딩하는 맞춤형 암 백신(전체에 걸쳐 기술됨)은 진행암(advanced cancer)을 갖는 환자에서 면역 관문 차단과 조합하여 투여된다. 이종유래 프라임/부스트 백신 레지멘은 (1) 프라임 백신접종으로서 사용되는 ChAdV 및 (2) ChAdV 벡터에 이어 부스트 백신접종에 사용되는 LNP에서 제형화되는 SAM을 수반한다. ChAdV 및 SAM 벡터 둘 모두는 각 대상체에 특이적인 동일한 맞춤형 네오에피토프 카세트를 인코딩하며, 이는 또한 2개의 보편적인 CD4 T-세포 에피토프 (PADRE 및 파상풍 톡소이드)를 인코딩한다. 대상체 포함의 경우, 종양을 전체-엑솜 및 전사체 시퀀싱에 사용하여 체세포 돌연변이를 검출하고, 혈액을 HLA 형분석에 사용한다.

[0437] ChAdV 벡터는 서브그룹 E 아데노바이러스인 침팬지 아데노바이러스 68 (C68, 68/SAdV-25, 원래 Pan 9로 지정됨)에 기반한 복제-결함 E1, E3, E4 열린 해독틀 2-4 (ORF2-4) 결실 아데노바이러스 벡터이다[ChAdV68-엠프티-E4 결실; E1 결실(577 내지 3403), E3 결실(27,125-31,825), 및 ORF2-4에 걸쳐있는 부분 E4 결실(34,916 내지 35,642)을 갖는 서열번호 :1을 나타내는 서열번호: 29365 참조]. ChAdV 벡터를 5×10^{11} vp/mL의 용액에서 제형화하고 1.0 mL를 대향 삼각근(삼각근이 바람직함, 각 측부의 둔근[배측 또는 복측] 또는 대퇴직근이 사용될 수 있음)의 각각의 2개의 양측 백신 주사 부위에서 IM 주사한다.

[0438] SAM 벡터(GRT-R902)는 알파바이러스로부터 유래된 것이다. SAM 벡터는 RNA 증폭에 필요한 5' 및 3' RNA 서열 및 바이러스 단백질을 인코딩하지만 구조 단백질은 인코딩하지 않는다. SAM 벡터를 이온화 가능한 아미노 지질, 포

스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-기반 코트 지질의 4개의 지질로 구성되는 LNP에서 제형화하여 SAM을 캡슐화하고 LNP를 형성한다. SAM 벡터는 ChAdV 벡터에 사용되는 것과 동일한 신생항원 발현 카세트를 함유한다. SAM 벡터를 1 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 대향 삼각근(삼각근이 바람직함, 각 측부의 둔근[배측 또는 복측] 또는 대퇴직근이 사용될 수 있음)에서 각각의 2개의 양측 백신 주사 부위에서 IM 주사하였다. 부스트 백신접종 부위는 프라임 백신접종 부위에 가능한 한 가깝다. 주사 부피는 투여될 용량에 기준한다. 용량 수준 양은 SAM 벡터의 양을 명시적으로 지칭하고, 즉 LNP와 같은 다른 성분을 지칭하지 않는다. LNP:SAM의 비는 대략 24:1이다.

[0439] 이필리무맙은 세포독성 T-림프구 연관 항원 4(CTLA-4)에 결합하는 인간 단일클론 IgG1 항체이다. 이필리무맙을 5 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 각각의 양측 백신접종 부위에서 근접방향으로(~2 cm 이내) SC 주사한다. 이필리무맙의 SC 경로는 승인된 IV 투여 경로와 구별된다. 이필리무맙을 하기 나열된 2가지 방법 중 하나로 30 mg의 용량으로 투여한다:

[0440] 1. 각각의 양측 백신접종 부위에서 백신 배액 LN에 근접한 4회 1.5 mL(7.5 mg) 주사(즉, 각 삼각근, 복측 둔근, 배측 둔근, 또는 대퇴직근[삼각근이 바람직하지만, 임상 부위 및 환자 선호도에 따라 다름]의 각 양측 부위에서 백신접종 부위 아래에서 1.5 mL 및 백신접종 부위 위에서 1.5 mL).

[0441] 2. 각각의 양측 백신접종 부위에서 백신 배액 LN에 근접한 6회 1 mL(5 mg) 주사(즉, 각 삼각근, 복측 둔근, 배측 둔근, 또는 대퇴직근[삼각근이 바람직하지만, 임상 부위 및 환자 선호도에 따라 다름]의 각 양측 부위에서 백신접종 부위 아래에서 1 mL, 백신접종 부위의 측부에서 1 mL, 및 백신접종 부위 위에서 1 mL).

[0442] 니볼루맙은 PD-1 및 이의 리간드, PD-L1 및 PD-L2의 상호작용을 차단하는 인간 단일클론 IgG4 항체이다. 니볼루맙을 10 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 0.2-마이크론 내지 1.2-마이크론의 기공 크기, 저-단백질 결합 인라인 필터를 통한 IV 주입으로 프로토콜-특이적 용량으로 투여한다. 이를 IV 푸쉬 또는 볼루스 주사로 투여하지 않는다. 용량이 고정된 경우(예를 들어, 240 mg 플랫 용량), 니볼루맙 주사를 160 mL의 총 주입 부피를 초과하지 않도록 희석되거나 희석되지 않은 채로 주입할 수 있다. 니볼루맙 주입 후 즉시 희석제로 씻어 내려 라인을 제거한다. 니볼루맙을 동일한 날 이필리무맙과 또는 이필리무맙 없이 각 백신접종(즉, 각각의 SAM 또는 ChAdV 백신) 후에 투여한다. 니볼루맙의 용량 및 경로는 미국 식품의약국의 승인된 용량 및 경로에 기준한다. 참여자가 치료를 얼마나 잘 용인하는지에 따라 니볼루맙의 용량을 중단(interrupted), 지연, 또는 중단(discontinued)할 수 있다. 투여 방문을 건너뛰지 않고 지연만 한다. 조사자 및 스폰서가 니볼루맙의 부재 하에 SAM 벡터를 사용한 치료가 환자의 최고의 이익이라고 여기지 않는 한, 백신접종은 니볼루맙의 부재 하에 발생하지 않는다. 아테졸리주맙 또는 세미플리맙을 니볼루맙 대신, 예를 들어 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 결정된 제조자의 지시 및/또는 적절한 투여에 따라 투여할 수 있다. 다른 PD1 및/또는 PD-L1 관문 억제제를 대안적으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 아테졸리주맙을 4주마다 1회 1680 mg의 용량으로 정맥내 주입을 통해 투여할 수 있다.

[0443] 2상 연구를 수행하여 순환 종양(ct)DNA의 변화에 의해 평가되는 바와 같이 플루오로피리미딘/베바시주맙 대 플루오로피리미딘/베바시주맙 단독 외에 관문 억제제와 조합하여 GRT-C901/GRT-R902를 사용한 유지 요법의 임상적 활성을 특성화한다. 3상 연구를 수행하여 무진행 생존에 의해 평가되는 바와 같은 레지멘의 임상 효능을 입증한다. 비-동의적 데옥시리보핵산(DNA) 돌연변이를 보유하는 종양은 종양 세포 표면 상에 인간 백혈구 항원(HLA)의 맥락에서 비-자가 항원으로서 이들 돌연변이를 함유하는 펩티드를 제시할 수 있다. 돌연변이된 펩티드의 분획은 종양 세포를 독점적으로 표적화하는 T-세포 반응을 생성할 수 있는 신생항원을 초래한다. 이들 돌연변이의 민감한 검출은 각 환자의 종양에 대해 고유한 신생항원의 확인이 이들 신생항원을 표적화하는 맞춤형 암 백신에 포함될 수 있게 한다. 이 백신 레지멘은 이종유래 프라임/부스트 접근법(먼저 GRT-C901에 이어 GRT-R902)으로 2개의 백신 벡터를 사용하여 면역 반응을 자극한다. 연구는 플루오로피리미딘/베바시주맙 외에 관문 억제제와 조합해 이 환자-특이적 면역요법의 항종양 활성을 탐구한다. 연구 아암은 **표 2**에 제시된다. 유지 및 보조 요법을 예시하는 개략도가 각각 **도 1** 및 **도 2**에 제시된다.

[0444] 연구에는 2개의 단계가 있다. 백신 생산 단계에서는, 환자가 폴폭스/bev 유도 요법을 수용하는 동안, 종양 생검 및 Gritstone의 EDGE™ 신생항원 예측 모델을 사용하여 신생항원 예측을 수행한다. 백신군(vaccine arm)으로 무작위화된 환자의 경우, 상위 20개의 예측된 신생항원이 백신 벡터에 포함된다. 옥살리플라틴을 완료한 후, 환자는 연구 치료 단계로 진입할 것이다. 대조군(control arm)의 환자는 유지 요법을 지속할 것인 반면, 백신군의 환자는 백신 레지멘을 유지 요법에 추가할 것이다. 백신 레지멘은 GRT-C901/GRT-R902뿐만 아니라 SC 이필리무맙(30mg) 및 IV 아테졸리주맙(1680mg)으로 이루어진다. 치료의 첫 1년 동안, 6회의 백신접종이 발생할 것이다. 이필리무맙은 제1 용량의 GRT-C901 및 GRT-R902와 SC 투여될 것이다. 아테졸리주맙은 최대 2년 동안 4주마다 투여될 것이다.

[0445] 포함 기준:

[0446] - 베바시주맙과의 조합으로 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 사용한 전이성 환경(metastatic setting)에서 1주기 이하의 1차 치료를 계획하거나 수용한 조직학적으로 확인된 전이성 결장직장암(CRC)을 갖는 환자

[0447] - RECIST v1.1에 따른 측정가능하고 절제 불가능한 질환

[0448] - 포르말린-고정 파라핀 포매(FFPE) 종양 시편의 가용성.

[0449] - 12 내지 17세 환자의 경우, 동부협력 종양학회(ECOG) 전신수행 능력평가의 0 또는 1 또는 이에 상응한다

[0450] - 환자는 조사자의 의견으로 적절한 장기 기능을 갖는다

[0451] - 가임기 여성(WCBP)이 임신 검사를 받을 의사가 있어야 하고, 연구 치료 기간 동안 및 마지막 조사용 연구 치료 후 5개월 동안 적어도 1회의 매우 효과적인 피임법 사용에 동의한다

[0452] 배제 기준:

[0453] - 높은 미소부수체 불안정성 질환을 갖는 환자

[0454] - 환자는 <1의 비-동의적 돌연변이/메가베이스의 알려진 종양 돌연변이 부담을 갖는다

[0455] - 알려진 DNA 중합효소 엡실론 돌연변이

[0456] - 알려진 BRAFV600E 돌연변이를 갖는 환자

[0457] - IM 주사 또는 채혈 후 출혈 장애 또는 유의한 멍 또는 출혈의 병력

[0458] - 연구 치료 시 예상되는 면역 억제

[0459] - 동종이계 조직/고형 장기 이식의 병력

[0460] - 자가면역 질환 또는 면역 결핍의 활성 또는 이의 병력

[0461] - 증상을 보이거나 활발하게 진행 중인 중추신경계(CNS) 전이 또는 암종 수막염을 갖거나, 전뇌 방사선 치료를 받은 환자

[0462] - 잠재적으로 치유 요법을 받은 신생물 제외 2년 이내 기타 암의 병력

[0463] - 조사자의 판단에 따라 환자를 현재 연구에 부적절하게 만들 수 있는 임의의 중증 동시발생 비암(non-cancer) 질환

[0464] - 활성 결핵 또는 최근(<2주) 임상적으로 유의한 감염, 활성 B형 간염 또는 C형 간염의 증거, 또는 HIV에 대한 알려진 양성 검사의 병력

[0465] - 치료를 위해 전신 스테로이드를 필요로 하는 폐렴의 병력(이전 해결된 조사야 내(in-field) 방사선 폐렴은 제외)

[0466] - 지난 3개월 이내 또는 연구 치료 전 심근 경색, 불안정성 협심증, 중대한 제어되지 않는 부정맥, 심근염의 병력, 또는 울혈성 심부전

[0467] - 임신 중이거나, 임신 계획 중이거나, 수유 중

표 2: 아암 및 중재

아암	지정된 중재
시험군: 백신군 플루오로피리미딘/옥살리플라틴/베바시주맙 표준 치료로 최대 24주 유도 요법을 수용하고 백신 생산 스크리닝을 받은 후, 환자는 GRT-C901/GRT-R902와 이필리무맙을 총 6회 투여받게 되며, GRT-C901 및 GRT-R902의 제1 용량과만 병용투여된다. 모든 환자는 표준 치료에 따라 플루오로피리미딘 및 베바시주맙의 유지 요법 외에 아테졸리주맙을 수용할 것이다.	**약물: GRT-C901** 환자-특이적 신생항원 암 백신이 프라임 및 단일 부스트로 근육내(IM) 주사를 통해 투여된다. **약물: GRT-R902** 환자-특이적 신생항원 암 백신 부스트가 IM 주사를 통해 투여된다. **약물: 아테졸리주맙** 아테졸리주맙은 4주마다 1회 1680 mg의 용량으로 정맥내 주입을 통해 투여된다. 기타 명칭: Tecentriq **약물: 이필리무맙** 이필리무맙은 30 mg의 용량으로 GRT-C901 및 GRT-R902의 제1 용량과 피하 주사를 통해 투여된다. 기타 명칭: Yervoy **약물: 플루오로피리미딘** 플루오로피리미딘은 표준 치료에 따른 유지 요법으로 투여된다. **약물: 베바시주맙** 베바시주맙은 표준 치료에 따른 유지 요법으로 투여된다. 기타 명칭: Avastin **약물: 옥살리플라틴** 옥살리플라틴은 표준 치료에 따른 유도 요법으로 투여된다. 기타 명칭: Eloxatin
활성 비교군: 대조군 플루오로피리미딘/옥살리플라틴/베바시주맙 표준치료로 최대 24주 유도요법을 수용하고 백신 생산 스크리닝을 받은 후, 환자는 표준 치료에 따라 플루오로피리미딘 및 베바시주맙의 유지요법을 수용할 것이다.	**약물: 플루오로피리미딘** 플루오로피리미딘은 표준 치료에 따른 유지 요법으로 투여된다. **약물: 베바시주맙** 베바시주맙은 표준 치료에 따른 유지 요법으로 투여된다. 기타 명칭: Eloxatin

[0468]

[0469] **XV. 결장암을 갖는 환자에 대한 면역 관문 차단과 조합된 신생항원 백신의 임상적 평가**

[0470] 비-동의적 데옥시리보핵산(DNA) 돌연변이를 보유하는 종양은 종양 세포 표면 상의 인간 백혈구 항원(HLA)의 맥락에서 비-자가 항원으로서 이들 돌연변이를 함유하는 펩티드를 제시한다. 돌연변이된 펩티드의 분획은 종양 세포를 독점적으로 표적화하는 T-세포 반응을 생성할 수 있는 신생항원을 초래한다. 이들 돌연변이의 민감한 검출은 각 환자의 종양에 대해 고유한 신생항원의 확인이 이들 신생항원을 표적화하는 맞춤형 암 백신에 포함될 수 있게 한다.

[0471] 면역 반응을 자극하기 위해 이종유래 프라임/부스트 접근법(프라임으로 GRT-C901 그리고 부스트로 GRT-R902)으로 2개의 백신 벡터를 사용한 백신 레지멘이 평가된다. 연구는 관문 억제제와 조합하여 이 환자 특이적 면역요법의 항종양 활성을 탐구한다. 연구는 분자 반응에 기반한 관문 억제제와 조합하여, 통상적으로 GRANITE으로 지칭되는 백신 레지멘(GRT-C901/GRT-R902)을 사용한 보조 요법의 항종양 활성을 평가하고 특성화하고, 외과적 절제 후 순환 종양 데옥시리보핵산(ctDNA) 양성인 결장암을 갖는 환자에서 관문 차단과 조합하여 GRT-C901/GRT-R902의 안전성 및 내약성을 평가한다.

[0472] 네오에피토프 카세트를 인코딩하는 맞춤형 암 백신(전체에 걸쳐 기술됨)은 진행암을 갖는 환자에서 면역 관문

차단과 조합하여 투여된다. 이종유래 프라임/부스트 백신 레지멘은 (1) 프라임 백신접종으로 사용되는 ChAdV 및 (2) ChAdV 벡터에 이어 부스트 백신접종에 사용되는 LNP에서 제형화된 SAM을 수반한다. ChAdV 및 SAM 벡터 둘 모두는 각 대상체에 특이적인 동일한 맞춤형 네오에피토프 카세트를 인코딩하며, 이는 또한 2개의 보편적인 CD4 T-세포 에피토프(PADRE 및 파상풍 톡소이드)를 인코딩한다. 대상체 포함의 경우, 종양을 전체-엑솜 및 전사체 시퀀싱에 사용하여 체세포 돌연변이를 검출하고, 혈액을 HLA 형분석에 사용한다.

[0473] ChAdV 벡터는 서브그룹 E 아데노바이러스인 침팬지 아데노바이러스 68(C68, 68/SAdV-25, 원래 Pan 9로 지정됨)에 기반한 복제-결함 E1, E3, E4 열린 해독틀 2-4(ORF2-4) 결실 아데노바이러스 벡터이다[ChAdV68-엠프티-E4 결실; E1 결실(577 내지 3403), E3 결실(27,125-31,825), 및 ORF2-4에 걸쳐있는 부분 E4 결실(34,916 내지 35,642)을 갖는 서열번호 :1을 나타내는 서열번호: 29365 참조]. ChAdV 벡터를 5×10^{11} vp/mL의 용액에서 제형화하고 1.0 mL를 대향 삼각근(삼각근이 바람직함, 각 측부의 둔근[배측 또는 복측] 또는 대퇴직근이 사용될 수 있음)의 각각의 2개의 양측 백신 주사 부위에서 IM 주사한다.

[0474] SAM 벡터(GRT-R902)는 알파바이러스로부터 유래된 것이다. SAM 벡터는 RNA 증폭에 필요한 5' 및 3' RNA 서열 및 바이러스 단백질을 인코딩하지만 구조 단백질은 인코딩하지 않는다. SAM 벡터를 이온화 가능한 아미노 지질, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-기반 코트 지질의 4개의 지질로 구성되는 LNP에서 제형화하여 SAM을 캡슐화하고 LNP를 형성한다. SAM 벡터는 ChAdV 벡터에 사용되는 것과 동일한 신생항원 발현 카세트를 함유한다. SAM 벡터를 1 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 대향 삼각근(삼각근이 바람직함, 각 측부의 둔근[배측 또는 복측] 또는 대퇴직근이 사용될 수 있음)에서 각각의 2개의 양측 백신 주사 부위에서 IM 주사하였다. 부스트 백신접종 부위는 프라임 백신접종 부위에 가능한 한 가깝다. 주사 부피는 투여될 용량에 기준한다. 용량 수준 양은 SAM 벡터의 양을 명시적으로 지칭하고, 즉 LNP와 같은 다른 성분을 지칭하지 않는다. LNP:SAM의 비는 대략 24:1이다.

[0475] 이필리무맙은 세포독성 T-림프구 연관 항원 4(CTLA-4)에 결합하는 인간 단일클론 IgG1 항체이다. 이필리무맙을 5 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 각각의 양측 백신접종 부위에서 근접방향으로(~2 cm 이내) SC 주사한다. 이필리무맙의 SC 경로는 승인된 IV 투여 경로와 구별된다. 이필리무맙을 하기 나열된 2가지 방법 중 하나로 30 mg의 용량으로 투여한다:

[0476] 1. 각각의 양측 백신접종 부위에서 백신 배액 LN에 근접한 4회 1.5 mL(7.5 mg) 주사(즉, 각 삼각근, 복측 둔근, 배측 둔근, 또는 대퇴직근[삼각근이 바람직하지만, 임상 부위 및 환자 선호도에 따라 다름]의 각 양측 부위에서 백신접종 부위 아래에서 1.5 mL 및 백신접종 부위 위에서 1.5 mL).

[0477] 2. 각각의 양측 백신접종 부위에서 백신 배액 LN에 근접한 6회 1 mL(5 mg) 주사(즉, 각 삼각근, 복측 둔근, 배측 둔근, 또는 대퇴직근[삼각근이 바람직하지만, 임상 부위 및 환자 선호도에 따라 다름]의 각 양측 부위에서 백신접종 부위 아래에서 1 mL, 백신접종 부위의 측부에서 1 mL, 및 백신접종 부위 위에서 1 mL).

[0478] 니볼루맙은 PD-1 및 이의 리간드, PD-L1 및 PD-L2의 상호작용을 차단하는 인간 단일클론 IgG4 항체이다. 니볼루맙을 10 mg/mL의 용액에서 제형화하고, 0.2-마이크론 내지 1.2-마이크론의 기공 크기, 저-단백질 결합 인라인 필터를 통한 IV 주사로 프로토콜-특이적 용량으로 투여한다. 이를 IV 푸쉬 또는 볼루스 주사로 투여하지 않는다. 용량이 고정된 경우(예를 들어, 240 mg 플랫 용량), 니볼루맙 주사를 160 mL의 총 주입 부피를 초과하지 않도록 희석되거나 희석되지 않은 채로 주입할 수 있다. 니볼루맙 주입 후 즉시 희석제로 씻어 내려 라인을 제거한다. 니볼루맙을 동일한 날 이필리무맙과 또는 이필리무맙 없이 각 백신접종(즉, 각각의 SAM 또는 ChAdV 백신) 후에 투여한다. 니볼루맙의 용량 및 경로는 미국 식품의약국의 승인된 용량 및 경로에 기준한다. 참여자가 치료를 얼마나 잘 용인하는지에 따라 니볼루맙의 용량을 중단(interrupted), 지연, 또는 중단(discontinued)할 수 있다. 투여 방문을 건너뛰지 않고 지연만 한다. 조사자 및 스폰서가 니볼루맙의 부재 하에 SAM 벡터를 사용한 치료가 환자의 최고의 이익이라고 여기지 않는 한, 백신접종은 니볼루맙의 부재 하에 발생하지 않는다. 아테졸리주맙 또는 세미플리맙을 니볼루맙 대신, 예를 들어 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 결정된 제조자의 지시 및/또는 적절한 투여에 따라 투여할 수 있다. 다른 PD1 및/또는 PD-L1 관문 억제제를 대안적으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 아테졸리주맙은 4주마다 1회 1680 mg의 용량으로 정맥내 주입을 통해 투여될 수 있다.

[0479] 2상 연구를 수행하여 관문 억제제와 조합하여 GRT-C901/GRT-R902를 사용한 보조 화학요법의 임상적 활성을 특성화한다. 연구 아암은 **표 3**에 제시된다.

[0480] 통상적인 화학요법을 수용한 CRC, 위암, 또는 폐암을 갖는 환자는 **표 3**에 제시된 바와 같이 1/2상 최초 인체(first-in-human) 연구에서 치료되었다. 백신 레지멘은 니볼루맙(IV 480 mg Q4W) 및 이필리무맙(SC 30 mg)과 조합하여 20개의 환자-특이적 신생항원을 함유하는 자가-증폭 mRNA 벡터 및 순차적인 침팬지 아데노바이러스를

포함하였고, 표 3을 참조한다.

[0481] 치료된 29명의 환자 중 13명이 CRC를 가졌었다. RECIST v1.1에 따라 13명 중 6명은 안정성 질환(SD)을 가졌고 7명은 진행성 질환(PD)을 가졌다. 6명의 환자가 ctDNA의 ≥-30% 감소로 정의된 분자 반응(MR)을 달성하였다. 분자 반응을 갖는 환자는 MR을 갖지 않는 환자에 비해 전체 생존기간(OS)이 연장되었다(**표 4** 참조). 분자 반응을 갖는 환자는 1차 종양 위치, 간 전이, KRAS 돌연변이를 확증하지 않았고, 보다 높은 종양 돌연변이 부담(TMB), PD-L1, 또는 염증이 유발된 T 세포 유전자 발현 프로파일(GEP)이 풍부하지 않았고, 유사한 기준선 ctDNA 값을 가졌다(p-값 = 0.18)(**표 4** 참조).

[0482] **표 4 - CRC 대상체에서 임상적 반응**

[0483]

	전체 생존기간 (개월 단위 중간값)	원발성 종양 위치	간 병변	중간값 TMB (메가베이스 당 돌연변이, 범위)	PD-L1	RNA 서열에 기반한 염증이 유발된 T 세포 GEP(z-점수)	기준선 ctDNA (평균 VAF, 범위)	RECIST v1.1 에 따른 SD
MR (n=6)	중간값: NR 12 개월: 67%	결장: 2 직장: 3 둘 모두: 1	4	2.9 (2.1-6.6)	<1%: 4 NE: 2	IFNg: -0.18 (-0.44–2.69) CD8A: 635 (390–1113) CXCL9: 100 (12–4402)	3.2% (0.2–10.4)	5
MR 없음 (n=7)	중간값: 7.8 12 개월: 0%	결장: 5 직장: 1 둘 모두: 1	6	3.6 (2.5-17.6)	<1%: 5 NE: 2	IFNg: -0.32 (-0.56–0.46) CD8A: 582 (241–1901) CXCL9: 176 (25–436)	6.4% (0.0–17.4)	1

[0484] 1차 평가 지표:

[0485] 1. 순환 종양 데옥시리보핵산(ctDNA)에서 기준선으로부터 ≥50% 감소를 갖는 환자의 백분율[기간: 기준선 및 최대 ~24개월]

[0486] 2. 미국 국립 암 연구소(NCI) 공통 용어를 사용한 이상 사례(AE), 면역 관련 AE, 치료 관련 AE, 중대한 AE, 사망을 초래하는 AE, 용량 지연을 초래하는 AE, 및 연구 치료의 중단을 초래하는 AE의 발병률[기간: 마지막 연구 치료 후 최대 ~100일(최대 62주)]

[0487] 2차 평가 지표:

[0488] 3. 조사자에 의해 평가 시 고형 종양 반응 평가 기준(RECIST) v1.1에 따른 무재발 생존기간(RFS) [기간: 무작위화 시점부터 동일한 암의 첫 재발, 또는 사망까지(최대 ~72개월)]

[0489] 4. 무질환 생존기간(DFS) [기간: 무작위화 시점부터 임의의 암의 첫 재발, 또는 사망까지(최대 ~72개월)]

[0490] 5. 전체 생존기간(OS) [기간: 최대 ~72개월]

[0491] 6. 중합효소 연쇄 반응(PCR)-기반 검정을 통해 평가 시 기준선에서 ctDNA를 갖는 환자의 검출불가능한 ctDNA로의 전환 [기간: 기준선 및 최대 ~24개월]

[0492] 7. ctDNA의 분자 반응의 최장 지속 기간은 기준선으로부터 감소한다 [기간: 기준선 및 최대 ~24개월]

[0493] 8. 백신 제조의 성공; 백신 생산을 보장하기 위해 확인된 충분한 신생항원을 갖는 환자의 수에 의해 측정된 백신 제조 성공. [기간: 연구 약물 투여 1일차 전 최대 28일]

[0494] 9. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용한 T-세포 반응 [기간: 최대 ~24개월]

[0495] 백신 생산 단계에 대한 포함 기준:

[0496] - 하기의 기준 중 임의의 것을 충족시키는 것으로 정의된 고위험 병기 II 결장암을 포함하는 고위험 병기 II 또는 병기 III 결장암을 갖는 환자: T4 종양, 등급≥3, 장 폐쇄 또는 천공을 갖는 임상 표현, 혈관 또는 림프관 또는 신경 침윤의 조직학적 징후, 및 <12개의 검진된 결절

[0497] - 환자는 ctDNA의 존재에 기반하여 보조 화학요법(ACT)을 개시하기 전에 미세 잔존 질환(MRD)의 증거를 갖는다

[0498] - 환자는 대략 <6주의 ACT를 수용하였다.

[0499] - 절제 시 음수 마진(R0) 병리

[0500] - 포르말린 고정, 파라민 포매(FFPE) 종양 시편의 가용성

[0501] - 12 내지 17세 환자의 경우, 동부협력 종양학회(ECOG) 전신수행 능력평가의 0 내지 1 또는 이에 상응한다

[0502] - 환자가 항응고 요법을 수용하지 않는 한, 환자는 말초 백혈구(WBC) 수≥3000/mm^3, 절대 림프구 수(ALC)≥800/mm^3, 절대 호중구 수(ANC)≥1500/mm^3, 혈소판≥100,000/mm^3, 헤모글로빈≥9 g/dL, 알부민≥3 g/dL, Cockcroft-Gault 공식을 사용한 계산된 크레아티닌 청소율>50 mL/분, 알라닌 아미노전이효소(ALT) 및 아스파테이트 아미노전이효소(AST)≤3 × 정상 상한(ULN), 총 혈청 빌리루빈≤1.5 × ULN 또는 직접 빌리루빈≤1 × ULN, 국제 정상화 비율(INR), 프로트롬빈 시간(PT), 또는 부분 트롬보플라스틴 시간(PTT)≤1.5 × ULN으로 정의된 바와 같은 적절한 기관 기능을 가지며, 이 경우 PT 및 PTT가 항응고제의 의도된 용도의 치료적 범위 내에 있고 암태아성 항원 수준이 ≤1.5 × ULN인 경우 환자가 적격이다.

[0503] - 가임기 여성(WCBP)이 임신 검사를 받을 의사가 있어야 하고, 연구 치료 기간 동안 및 마지막 조사용 연구 치료 후 5개월 동안 적어도 1회의 매우 효과적인 피임법 사용에 동의한다

[0504] 연구 치료 단계에 대한 포함 기준:

[0505] - 고위험 병기 II 또는 병기 III 미소부수체 안정성(MSS)-결장암을 확진받고 이의 종양을 외과적으로 절제하였고, 표준 ACT를 완료하였고 방사선 사진술로 질환의 증거가 없고, ACT 후 ctDNA의 검출에 기반한 MRD의 증거가 있음

[0506] - 12-17세 환자의 경우, ECOG 전신수행 능력평가의 0 내지 1 또는 이에 상응한다

[0507] - 말초 WBC 수≥2000/mm^3, ALC≥500/mm^3, ANC≥1000/mm^3, 혈소판≥75,000/mm^3, 헤모글로빈≥9 g/dL, 알부민≥3 g/dL, Cockcroft-Gault 공식을 사용한 계산된 크레아티닌 청소율>40 mL/분, ALT 및 AST≤3 × ULN, 총 혈청 빌리루빈≤1.5 × ULN 또는 직접 빌리루빈≤1 × ULN, 및 INR, PT, 또는 PTT≤1.5 × ULN의 적절한 기관 기능을 갖는다

[0508] - WCBP의 경우, 임신 검사를 받을 의사가 있어야 하고, 연구 치료 기간 동안 및 마지막 조사용 연구 치료 후 5개월 동안 적어도 1회의 매우 효과적인 피임법 사용에 동의한다

[0509] - 남성이면서 WCBP와 성생활을 하는 경우, 연구 치료 기간 동안 및 마지막 조사용 연구 치료 후 5개월 동안 라텍스 콘돔과 같은 매우 효과적인 피임법을 사용하고, 파트너의 매우 효과적인 피임법 사용에 동의한다

[0510] 백신 생산 단계에 대한 배제 기준:

[0511] - 높은 미소부수체 불안정성(MSI) 질환을 갖는 환자

[0512] - <1의 비-동의적 돌연변이/메가베이스의 알려진 종양 돌연변이 부담(TMB)을 갖는 환자

[0513] - 알려진 DNA 중합효소 엡실론 돌연변이를 갖는 환자

[0514] - 지난 6개월 이내에 침팬지 아데노바이러스(ChAd)에 노출된 것으로 알려졌으며, 향후 6개월 이내에 ChAd-기반 백신을 수용할 계획이고/이거나, 예방접종에 대한 임의의 병력 또는 아나필락시스 반응

[0515] - 근육 내(IM) 주사 또는 채혈 후 출혈 장애 또는 유의한 멍 또는 출혈의 병력

[0516] - 연구 치료 시 예상되는 면역 억제

[0517] - 환자는 항-세포독성 T 림프구-연관 항원(CTLA-4), 항-프로그래밍된 세포 사멸-1 수용체(PD-1), 항-프로그래밍된 사멸 리간드-1(PD-L1), 또는 T-세포 공동-자극 또는 관문 경로를 특이적으로 표적화하는 임의의 다른 항체 또는 약물로 이루어지는 사전 요법을 수용하였다

[0518] - 동종이계 조직/고형 장기 이식의 병력

[0519] - 자가면역 질환 또는 면역 결핍의 활성 또는 이의 병력

[0520] - 2년 내 기타 암 병력

[0521] - CD4+ T 세포 수가 ≤200세포/마이크로리터인 경우, 활성 결핵 또는 최근(<2주) 임상적으로 유의한 감염, 또는

활성 B형 간염 또는 C형 간염의 증거 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 대한 알려진 양성 검사의 병력

[0522] - 치료를 위해 전신 스테로이드를 필요로 하는 폐렴의 병력(이전 해결된 조사야 내 방사선 폐렴은 제외)

[0523] - 3개월 이내 또는 연구 치료 전 심근 경색, 불안정성 협심증, 중대한 제어되지 않는 부정맥, 심근염의 병력, 또는 울혈성 심부전

[0524] - 임신 중이거나, 임신 계획 중이거나, 수유 중

[0525] 연구 처리 단계에 대한 배제 기준:

[0526] - 환자는 조사용 제품 및/또는 기타 항암 요법으로 치료를 수용하고 있다.

[0527] - 지난 6개월 이내에 ChAd에 노출된 것으로 알려졌으며, 향후 6개월 이내에 ChAd-기반 백신을 수용할 계획이고/이거나, 예방접종에 대한 임의의 병력 또는 아나필락시스 반응

[0528] - 전신 코르티코스테로이드 또는 기타 면역억제 약제를 사용한 동시발생, 최근(≤4주) 또는 예상된 치료로 인한 면역억제 또는 저감마 글로불린혈증, 또는 방사선 노출과 같은 상태

[0529] - 이전의 암 요법으로 유도된 AE로부터 회복되지 않은 환자

[0530] - 임의의 중증 동시발생 비암 질환

[0531] - CD4+ T-세포 수가 ≤200 세포/마이크로리터인 경우, 활성 결핵 또는 최근(<2주) 임상적으로 유의한 감염, 활성 B형 간염 또는 C형 간염의 증거, 또는 HIV에 대한 알려진 양성 검사의 병력

[0532] - 치료를 위해 전신 스테로이드를 필요로 하는 폐렴의 병력

[0533] - 연구 치료 개시 전 6개월 이내 심근 경색, 불안정성 협심증, 중대한 제어되지 않는 부정맥, 심근염의 병력, 또는 울혈성 심부전(뉴욕 심장 학회[NYHA] 등급 3 및 4).

[0534] - 임신 중이거나, 임신 계획 중이거나, 수유 중

표 3: 아암 및 중재	
아암	지정된 중재
시험군: GRT-C901/ GRT-R902 백신군 외과적 절제 후, 환자는 12-24주 동안 보조 화학요법을 수용하며, 그 동안 신생항원 예측, 무작위화, 및 백신 제조를 거친다. 연구 치료 스크리닝 후, 환자는 총 6회 용량의 GRT-C901/GRT-R902, 2회 용량의 이필리무맙, 및 13회 용량의 아테졸리주맙 또는 니볼루맙을 수용한다. 연구 방문은 ~28일마다 발생한다.	**약물: GRT-C901** 개별화된 신생항원 암 백신이 방문 1에서 그리고 방문 6에서 부스트로 근육내(IM) 주사를 통해 투여된다. **약물: GRT-R902** 개별화된 신생항원 암 백신이 방문 2, 4, 9, 및 12에서 IM 주사를 통해 투여된다. **약물: 아테졸리주맙 또는 니볼루맙** 1680 mg 아테졸리주맙 또는 480 mg 니볼루맙의 용량이 방문 1-13에서 정맥내(IV) 주입을 통해 4주마다(Q4W) 1회 투여된다. **약물: 이필리무맙** 30 mg의 용량이 방문 1에서 GRT-C901 및 방문 2에서 GRT-R902의 제1 용량과만 피하(SC) 주사를 통해 투여된다. 기타 명칭: Yervoy **약물: 보조 화학요법** 표준 치료에 따라 투여된다. **약물: 베바시주맙** 베바시주맙은 표준 치료에 따른 유지 요법으로 투여된다. 기타 명칭: Avastin **약물: 옥살리플라틴** 옥살리플라틴은 표준 치료에 따른 유도 요법으로 투여된다. 기타 명칭: Eloxatin
활성 비교군: 대조군 외과적 절제 후, 환자는 12-24주 동안 보조 화학요법을 수용할 것이며, 그 동안 신생항원 예측 및 무작위화를 거칠 것이다. 연구 방문은 12주마다 발생한다.	**약물: 보조 화학요법** 표준 치료에 따라 투여된다.

[0535]

[0536] 본 발명이 바람직한 실시양태 및 다양한 대안적인 실시양태를 참조하여 특히 제시되고 기술되었지만, 다양한 형태의 변화 및 세부사항이 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 그 안에서 이루어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0537] **서열**

[0538] **표 A**

[0539] 서열 목록, 서열번호: 10,755-21,015를 참조한다. 명확성을 위해, EDGE 점수가 >0.001인 HLA 대립유전자를 갖는 주어진 HLA 대립유전자 펩티드와 연관되는 것으로 예측되는 각 펩티드에는 고유한 서열번호가 지정된다. 각각의 상기 서열 식별자는 펩티드의 아미노산 서열, HLA 아형, 펩티드에 상응하는 유전자명, 펩티드와 회합된 돌연변이, 및 펩티드:HLA 쌍의 유병률이 0.1% 초과("1"로 표기됨) 또는 0.1% 미만("0"으로 표기됨)이었는지 여부와 연관된다.

[0540] 표 A는 2021년 9월 17일 출원된 미국 가출원 제63/245,663호에 그 전체가 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0541] **AACR GENIE 결과**

[0542] 서열 목록, 서열번호: 21,016-29,357을 참조한다. 명확성을 위해, EDGE 점수가 >0.001이고 유병률이 >0.1%인 HLA 대립유전자를 갖는 주어진 HLA 대립유전자 펩티드와 연관되는 것으로 예측되는 각 펩티드에는 고유한 서열번호가 지정된다. 각각의 상기 서열 식별자는 펩티드에 상응하는 돌연변이 및 유전자명, HLA 아형, 및 펩티드의

아미노산 서열과 연관된다. AACR Genie 결과는 2021년 9월 17일 출원된 미국 가출원 제63/245,663호에 그 전체가 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0543] **추가 MS 검증된 신생항원 (서열번호: 29513-29519)**

서열번호	유전자	돌연변이	HLA 클래스 I 아형	제한된 펩티드
29513	CTNNB1	S37Y 점 돌연변이	HLA-A*02:01	YLDSGIHYGA
29514	CHD4	CHD4_K73fs	HLA-B*08:01	TVRAATIL
29515	CTNNB1	CTNNB1_S45P	A*11:01	TTAPPLSGK
29516	CTNNB1	CTNNB1_T41A	A*11:01	ATAPSLSGK
29517	KRAS	KRAS_G12V	A*03:01	VVGAVGVGK
29518	KRAS	KRAS_Q61R	A*01:01	ILDTAGREEY
29519	TP53	TP53_R213L	A*02:01	YLDDRNTFL

[0544]

[0545] **표 1.2**

[0546] 서열 목록, 서열번호: 57-10,754를 참조한다. 암 사례의 적어도 0.98%에서 적어도 10 TPM 수준에서 발현되는 유전자와 연관된 예측된 공유 항원. 각각의 상기 서열 식별자는 유전자 명칭, 펩티드의 아미노산 서열, Ensembl ID, 및 상응하는 HLA 대립유전자(들)과 연관된다.

[0547] **특정 서열**

[0548] 본원에 지칭된 벡터, 카세트, 및 항체는 하기에 기술되고 서열번호로 지칭된다.

트레멜리무맙 VL (서열번호:16)
트레멜리무맙 VH (서열번호:17)
트레멜리무맙 VH CDR1 (서열번호:18)
트레멜리무맙 VH CDR2 (서열번호:19)
트레멜리무맙 VH CDR3 (서열번호:20)
트레멜리무맙 VL CDR1 (서열번호:21)
트레멜리무맙 VL CDR2 (서열번호:22)
트레멜리무맙 VL CDR3 (서열번호:23)
더발루맙 (MEDI4736) VL (서열번호:24)
MEDI4736 VH (서열번호:25)
MEDI4736 VH CDR1 (서열번호:26)
MEDI4736 VH CDR2 (서열번호:27)
MEDI4736 VH CDR3 (서열번호:28)
MEDI4736 VL CDR1 (서열번호:29)
MEDI4736 VL CDR2 (서열번호:30)
MEDI4736 VL CDR3 (서열번호:31)
UbA76-25량체PDTT 뉴클레오티드(서열번호:32)
UbA76-25량체PDTT 폴리펩티드 (서열번호:33)
MAG-25량체PDTT 뉴클레오티드(서열번호:34)
MAG-25량체PDTT 폴리펩티드 (서열번호:35)
Ub7625량체PDTT_없음SFL 뉴클레오티드(서열번호:36)
Ub7625량체PDTT_없음SFL 폴리펩티드 (서열번호:37)
ChAdV68.5WTnt.MAG25량체 (서열번호:2); E1 (nt 577 - 3403) 및 E3 (nt 27,125- 31,825) 서열이 결실된 AC_000011.1; 5개 위치에서 치환된 상응하는 ATCC VR-594 뉴클레오티드 ; 삭제된 E1 대신에 삽입된 CMV 프로모터/인핸서의 제어 하에 있는 모델 신생항원 카세트; 카세트의 SV40 폴리A 3'
베네수엘라 말 뇌염 바이러스 [VEE] (서열번호:3) GenBank: L01442.2
VEE-MAG25량체 (서열번호:4); MAG-25량체PDTT 뉴클레오티드(염기 30-1755) 함유
베네수엘라 말 뇌염 바이러스 균주 TC-83 [TC-83](서열번호:5) GenBank: L01443.1

[0549]

```
ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACAT
CGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAG
CAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAAC
GGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAG
CACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAAC
TAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGC
CGCCGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCT
ACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCA
AGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACT
TGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATA
GGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTT
GAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGA
GGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACT
ATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTC
AGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGG
GAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACT
GGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTC
AACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCAT
TTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATA
GACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCG
GATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAA
CACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACC
TCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCG
ATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTT
```

[0550]

ACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAG
TGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAG
GGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCA
GGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACC
TGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCC
CAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGT
CACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGA
GAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAA
GTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGT
GCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCA
GTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGC
AGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAA
CAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTC
CACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAA
AAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTA
AGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGG
CAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTAC
AAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGG
AGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCC
TGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTG
GAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGC
CGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAAC
GGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGG
ACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGT
CGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCT
CGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCAT
AAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGA
GTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCC
GTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTT
AGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACC
ATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCAT
CTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCA
TTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACG
GAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATC
AACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGG
TGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACC
TGGCGGAGGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAA
GTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCA
ACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGT
CAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAG
ATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATA
TACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAG
GAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGA
AGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGG
GACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAG
GCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCG
TCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCA
GAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCC
GAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGC
CTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATC
GGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAG
GACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGAT
GGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATC
CTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAG
CTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTG
GCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAA
CACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAAT
AGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGA
GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTT
CGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGC

[0551]

ATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGA
GATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAAT
CCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTA
GACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCT
GCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGC
CTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGC
GCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAG
AACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAAT
TGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATAT
TGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAAT
TAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCA
ATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAG
AACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCA
CCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGG
CTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATC
GCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGG
TGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCA
CTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACACA
GTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCAT
TCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCAC
CTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAG
GGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTT
AAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAG
AGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGA
AACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCT
ACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCA
AGATGTTCCCGTTCCAGCCAATGTATCCGATGCAGCCAATGCCCTATCGCAACCCGTTCGCGGCCCCG
CGCAGGCCCTGGTTCCCCAGAACCGACCCTTTTCTGGCGATGCAGGTGCAGGAATTAACCCGCTCGAT
GGCTAACCTGACGTTCAAGCAACGCCGGGACGCGCCACCTGAGGGGCCATCCGCTAAGAAACCGAAG
AAGGAGGCCTCGCAAAAACAGAAAGGGGGAGGCCAAGGGAAGAAGAAGAAGAACCAAGGGAAGAA
GAAGGCTAAGACAGGGCCGCCTAATCCGAAGGCACAGAATGGAAACAAGAAGAAGACCAACAAGAA
ACCAGGCAAGAGACAGCGCATGGTCATGAAATTGGAATCTGACAAGACGTTCCCAATCATGTTGGAA
GGGAAGATAAACGGCTACGCTTGTGTGGTCGGAGGGAAGTTATTCAGGCCGATGCATGTGGAAGGCA
AGATCGACAACGACGTTCTGGCCGCGCTTAAGACGAAGAAAGCATCCAAATACGATCTTGAGTATGC
AGATGTGCCACAGAACATGCGGGCCGATACATTCAAATACACCCATGAGAAACCCCAAGGCTATTAC
AGCTGGCATCATGGAGCAGTCCAATATGAAAATGGGCGTTTCACGGTGCCGAAAGGAGTTGGGGCCA
AGGGAGACAGCGGACGACCCATTCTGGATAACCAGGGACGGGTGGTCGCTATTGTGCTGGGAGGTGT
GAATGAAGGATCTAGGACAGCCCTTTCAGTCGTCATGTGGAACGAGAAGGGAGTTACCGTGAAGTAT
ACTCCGGAGAACTGCGAGCAATGGTCACTAGTGACCACCATGTGTCTGCTCGCCAATGTGACGTTCCC
ATGTGCTCAACCACCAATTTGCTACGACAGAAAACCAGCAGAGACTTTGGCCATGCTCAGCGTTAACG
TTGACAACCCGGGCTACGATGAGCTGCTGGAAGCAGCTGTTAAGTGCCCCGGAAGGAAAAGGAGATC
CACCGAGGAGCTGTTTAATGAGTATAAGCTAACGCGCCCTTACATGGCCAGATGCATCAGATGTGCA
GTTGGGAGCTGCCATAGTCCAATAGCAATCGAGGCAGTAAAGAGCGACGGGCACGACGGTTATGTTA
GACTTCAGACTTCCTCGCAGTATGGCCTGGATTCCTCCGGCAACTTAAAGGGCAGGACCATGCGGTAT
GACATGCACGGGACCATTAAAGAGATACCACTACATCAAGTGTCACTCTATACATCTCGCCCGTGTCA
CATTGTGGATGGGCACGGTTATTTCCTGCTTGCCAGGTGCCCGGCAGGGGACTCCATCACCATGGAAT
TTAAGAAAGATTCCGTCAGACACTCCTGCTCGGTGCCGTATGAAGTGAAATTTAATCCTGTAGGCAGA
GAACTCTATACTCATCCCCCAGAACACGGAGTAGAGCAAGCGTGCCAAGTCTACGCACATGATGCAC
AGAACAGAGGAGCTTATGTCGAGATGCACCTCCCGGGCTCAGAAGTGGACAGCAGTTTGGTTTCCTTG
AGCGGCAGTTCAGTCACCGTGACACCTCCTGATGGGACTAGCGCCCTGGTGGAATGCGAGTGTGGCG
GCACAAAGATCTCCGAGACCATCAACAAGACAAAACAGTTCAGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGT
GCAGAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGTGGGTGTATAATTCTGACAAACTGCCCAAAGCAGCGGG
AGCCACCTTAAAAGGAAAACTGCATGTCCCATTCTTGCTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGCCTCTAG
CACCAGAACCTATGATAACCTTCGGTTTCAGATCAGTGTCACTGAAACTGCACCCTAAGAATCCCACA
TATCTAATCACCCGCCAACTTGCTGATGAGCCTCACTACACGCACGAGCTCATATCTGAACCAGCTGT
TAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGGTGGGAGTTTGTATGGGGAAACCACCCGCCGAAAAGGTTT
TGGGCACAGGAAACAGCACCCGGAAATCCACATGGGCTACCGCACGAGGTGATAACTCATTATTACC
ACAGATACCCTATGTCCACCATCCTGGGTTTGTCAATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTTGCAG
CGTCTACCTGGCTGTTTTGCAGATCTAGAGTTGCGTGCCTAACTCCTTACCGGCTAACACCTAACGCTA

GGATACCATTTTGTCTGGCTGTGCTTTGCTGCGCCCGCACTGCCCGGGCCGAGACCACCTGGGAGTCC
TTGGATCACCTATGGAACAATAACCAACAGATGTTCTGGATTCAATTGCTGATCCCTCTGGCCGCCTT
GATCGTAGTGACTCGCCTGCTCAGGTGCGTGTGCTGTGTCGTGCCTTTTTTAGTCATGGCCGGCGCCGC
AGGCGCCGGCGCCTACGAGCACGCGACCACGATGCCGAGCCAAGCGGGAATCTCGTATAACACTATA
GTCAACAGAGCAGGCTACGCACCACTCCCTATCAGCATAACACCAACAAAGATCAAGCTGATACCTA
CAGTGAACTTGGAGTACGTCACCTGCCACTACAAAACAGGAATGGATTCACCAGCCATCAAATGCTG
CGGATCTCAGGAATGCACTCCAACTTACAGGCCTGATGAACAGTGCAAAGTCTTCACAGGGGTTTACC
CGTTCATGTGGGGTGGTGCATATTGCTTTTGCGACACTGAGAACACCCAAGTCAGCAAGGCCTACGTA
ATGAAATCTGACGACTGCCTTGCGGATCATGCTGAAGCATATAAAGCGCACACAGCCTCAGTGCAGG
CGTTCCTCAACATCACAGTGGGAGAAACACTCTATTGTGACTACCGTGTATGTGAATGGAGAAACTCCT
GTGAATTTCAATGGGGTCAAAATAACTGCAGGTCCGCTTTCCACAGCTTGGACACCCTTTGATCGCAA
AATCGTGCAGTATGCCGGGGAGATCTATAATTATGATTTTCCTGAGTATGGGGCAGGACAACCAGGA
GCATTTGGAGATATACAATCCAGAACAGTCTCAAGCTCTGATCTGTATGCCAATACCAACCTAGTGCT
GCAGAGACCCAAAGCAGGAGCGATCCACGTGCCATACACTCAGGCACCTTCGGGTTTTGAGCAATGG
AAGAAAGATAAAGCTCCATCATTGAAATTTACCGCCCCTTTCGGATGCGAAATATATACAAACCCCAT
TCGCGCCGAAAACTGTGCTGTAGGGTCAATTCCATTAGCCTTTGACATTCCCGACGCCTTGTTCACCA
GGGTGTCAGAAACACCGACACTTTCAGCGGCCGAATGCACTCTTAACGAGTGCGTGTATTCTTCCGAC
TTTGGTGGGATCGCCACGGTCAAGTACTCGGCCAGCAAGTCAGGCAAGTGCGCAGTCCATGTGCCATC
AGGGACTGCTACCCTAAAAGAAGCAGCAGTCGAGCTAACCGAGCAAGGGTCGGCGACTATCCATTTC
TCGACCGCAAATATCCACCCGGAGTTCAGGCTCCAAATATGCACATCATATGTTACGTGCAAAGGTGA
TTGTCACCCCCCGAAAGACCATATTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGG
TGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGC
TTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGCA
ATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTTTC
TTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTC

VEE 전달 벡터 (서열번호:6); 뉴클레오티드 7544-11175가 결실된 VEE 게놈 [제거된 알파바이러스 구조 단백질]

ATGggcggcgcatgagagaagcccagaccaattacctacccaaaATGGagaaagttcacgttgacatcgaggaagacagcccattcctcagagctttgcagcg
gagcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgaccatgctaatgccagagcgttttcgcatctggcttcaaaactgatcgaaacggaggtggacc
catccgacacgatccttgacattggaagtgcgcccgcccgcagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatctgtccgatgagatgtgcggaagatccggacagattgt
ataagtatgcaactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgataaggaattggacaagaaaatgaaggagctcgccgccgtcatgagcgaccctgacctggaaa
ctgagactatgtgcctccacgacgacgagtcgtgtcgctacgaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcggttgacggaccgacaagtctctatcaccaagc
caataagggagttagagtcgcctactggataggctttgacaccacccctttttatgtttaagaacttggctggagcatatccatcatactctaccaactgggccgacgaaacc
gtgttaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgtagagggatgtccattcttagaaagaagtatttgaaaccatccaacaatgttctatt
ctctgttggctcgaccatctaccacgagaagagggacttactgaggagctggcacctgccgtctgtatttcacttacgtggcaagcaaaattacacatgtcggtgtgagac
tatagttagttgcgacgggtacgtcgttaaaagaataggctatcagtccaggcctgtatgggaagccttcaggctatgctgctacgatgcaccgcgagggattcttgtgctg
caaagtgacagacacattgaacggggagagggtctctttttcccgtgtgcacgtatgtgccagctacattgtgtgaccaaatgactggcatactggcaacagatgtcagtg
cggacgacgcgcaaaaactgctggttgggctcaaccagcgtatagtcgtcaacggtcgcacccagagaaacaccaataccatgaaaaattacctttgcccgtagtggc
ccaggcatttgctaggtggcaaaggaatataaggaagatcaagaagatgaaaggccactaggactacgagatagacagttagtcatgggtgttgttgggctttttaga
aggcacaagataacatctatttataagcgcccggatacccaaaccatcatcaaagtgaacagcgatttccactcattcgtgctgcccaggataggcagtaacacattgga
gatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgttagaggagcacaaggagccgtcacctctcattaccgccgaggacgtacaagaagctaagtgcgcagccgatgag
gctaaggaggtgcgtgaagccgaggagttgcgcgcagctctaccaccttggcagctgatgttgaggagcccactctggaagccgatgtcgacttgatgttacaagag
gctgggccggctcagtggagacacctcgtggcttgataaaggttaccagctacgctggcgaggacaagatcggctcttacgctgtgctttctccgcaggctgtactca
agagtgaaaaattatcttgcatccacccctctcgctgaacaagtcatagtgataacacactctggccgaaaagggcgttatgccgtggaaccatacatggtaaagtagtg
gtgccagagggacatgcaataccgtccaggactttcaagctctgagtgaaagtgccaccattgtgtacaacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccatattgc
cacacatggaggagcgctgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgagcacgacggcgaatacctgtacgacatcgacaggaaacagtgcgtca
agaaagaactagtcactgggctagggctcacaggcgagctggtggatcctcccttccatgaattcgcctacgagagtctgagaacacgaccagccgctccttaccaagt
accaaccatagggggtgtatggcgtgccaggatcaggcaagtctggcatcattaaaagcgcagtcaccaaaaaagatctagtggtgagcgccaagaaagaaaactgtg
cagaaattataagggacgtcaagaaaatgaaagggctggacgtcaatgccagaactgtggactcagtgctcttgaatggatgcaaacaccccgtagagaccctgtatat
tgacgaagcttttgcttgtcatgcaggtactctcagagcgctcatagccattataagacctaaaaaggcagtgctctgcggggatcccaaacagtgcggttttttaacatga
tgtgcctgaaagtgcattttaaccacgagatttgcacacaagtcttccacaaaagcatctctcgccgttgcactaaatctgtgacttcggtcgtctcaaccttgttttacgacaa
aaaaatgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattgacactaccggcagtaccaaacctaagcaggacgatctcattctcacttgtttcagagggtgggtga
agcagttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaagggctgacccgtaaaggtgtgtatgccgttcggtacaaggtgaatgaaaatcc
tctgtacgcacccacctcagaacatgtgaacgtcctactgacccgcacggaggaccgcatcgtgtggaaaacactagccggcgacccatggataaaacactgactgc
caagtaccctgggaatttcactgccacgatagaggagtggcaagcagagcatgatgccatcatgaggcacatcttggagagaccggaccctaccgacgtcttccagaa
taaggcaaacgtgtgttgggccaaggctttagtgccggtgctgaagaccgctggcatagacatgaccactgaacaatggaacactgtggattatttttgaaacggacaaa
gctcactcagcagagatagtattgaaccaactatgcgtgaggttctttggactcgatctggactccggtctatttttctgcacccactgttccgttatccattaggaataatcact
gggataactccccgtcgcctaacatgtacgggctgaataaagaagtggtccgtcagctctctcgcaggtacccacaactgcctcgggcagttgccactggaagagtcta
tgacatgaacactggtacactgcgcaattatgatccgcgcataaacctagtacctgtaaacagaagactgcctcatgctttagtcctccaccataatgaacacccacagag
tgacttttcttcattcgtcagcaaattgaagggcagaactgtcctggtggtcggggaaaagttgtccgtcccaggcaaaatggttgactggttgtcagaccggccctgagc

[0552]

taccttcagagctcggctggatttaggcatcccaggtgatgtgcccaaatatgacataatatttgttaatgtgaggaccccatataaataccatcactatcagcagtgtgaag accatgccattaagcttagcatgttgaccaagaaagcttgtctgcatctgaatcccggcggaacctgtgtcagcatagggttatggtttacgctgacagggccagcgaaagc atcattggtgctatagcgcggcagttcaagttttcccgggtatgcaaaccgaaatcctcacttgaagagacggaagttctgtttgtattcattgggtacgatcgcaaggccc gtacgcacaatccttacaagctttcatcaaccttgaccaacatttatacaggttccagactccacgaagccggatgtgcaccctcatatcatgtggtgcgaggggatatttgc cacggccaccgaaggagtgattataaatgctgctaacagcaaaggacaacctggcggaggggtgtgcggagcgctgtataagaaattcccggaaagcttcgatttaca gccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggtcaaaggtgcagctaaacatatcattcatgccgtaggaccaaacttcaacaaagtttcggaggttgaaggtgacaaaca gttggcagaggcttatgagtccatcgctaagattgtcaacgataacaattacaagtcagtagcgattccactgttgtccaccggcatcttttccgggaacaaagatcgacta acccaatcattgaaccatttgctgacagctttagacaccactgatgcagatgtagccatatactgcagggacaagaaatgggaaatgactctcaaggaagcagtggctag gagagaagcagtggaggagatatgcatatccgacgactcttcagtgacagaacctgatgcagagctggtgagggtgcatccgaagagttctttggctggaaggaagg gctacagcacaagcgatggcaaaacttctcatatttggaagggaccaagtttcaccaggcggccaaggatatagcagaaattaatgccatgtggcccgttgcaacgga ggccaatgagcaggtatgcatgtatatcctcggagaaagcatgagcagtattaggtcgaaatgccccgtcgaagagtcggaagcctccacaccacctagcacgctgcc ttgcttgtgcatccatgccatgactccagaaagagtacagcgcctaaaagcctcacgtccagaacaaattactgtgtgctcatcctttccattgccgaagtatagaatcactg gtgtgcagaagatccaatgctcccagcctatattgttctcaccgaaagtgcctgcgtatattcatccaaggaagtatctcgtggaaacaccaccggtagacgagactccg gagccatcggcagagaaccaatccacagagggacacctgaacaaccaccacttataaccgaggatgagaccaggactagaacgcctgagccgatcatcatcgaag aggaagaagaggatagcataagtttgctgtcagatggcccgacccaccaggtgctgcaagtcgaggcagacattcacgggccgccctctgtatctagctcatcctggtc cattcctcatgcatccgacttgatgtggacagtttatccatacttgacaccctggagggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaactcttacttcgc aaagagtatggagtttctggcgcgaccggtgcctgcgcctcgaacagtattcaggaacctccacatcccgctccgcgcacaagaacaccgtcacttgcacccagcag ggcctgctcgagaaccagcctagtttccaccccgccaggcgtgaatagggtgatcactagagaggagctcgaggcgcttaccccgtcacgcactcctagcaggtcgg tctcgagaaccagcctggtctccaacccgccaggcgtaaatagggtgattacaagagaggagtttgaggcgttcgtagcacaacaacaatgacggtttgatgcgggtg catacatcttttcctccgacaccggtcaagggcatttacaacaaaaatcagtaaggcaaacggtgctatccgaagtggtgttggagaggaccgaattggagatttcgtatg ccccgcgcctcgaccaagaaaaagaagaattactacgcaagaaattacagttaaatcccacacctgctaacagaagcagataccagtccaggaaggtggagaacatg aaagccataacagctagacgtattctgcaaggcctagggcattatttgaaggcagaaggaaaagtggagtgctaccgaaccctgcatcctgttcctttgtattcatctagtg tgaaccgtgccttttcaagccccaaggtcgcagtggaagcctgtaacgccatgttgaaagagaactttccgactgtggcttcttactgtattattccagagtacgatgcctat ttggacatggttgacggagcttcatgctgcttagacactgccagtttttgccctgcaaagctgcgcagctttccaaagaaacactcctatttggaacccacaatacgatcgg cagtgccttcagcgatccagaacacgctccagaacgtcctggcagctgccacaaaaagaaattgcaatgtcacgcaaatgagagaattgcccgtattggattcggcgg cctttaatgtggaatgcttcaagaaatatgcgtgtaataatgaatattgggaaacgtttaaagaaaaccccatcaggcttactgaagaaaacgtggtaaattacattaccaaa ttaaaaggaccaaaagctgctgctctttttgcgaagacacataatttgaatatgttgcaggacatacccaatggacaggtttgtaatggacttaaagagagacgtgaaagtga ctccaggaacaaaacatactgaagaacggcccaaggtacaggtgatccaggctgccgatccgctagcaacagcgtatctgtgcggaatccaccgagagctggttagg agattaaatgcggtcctgcttccgaacattcatacactgtttgatatgtcggctgaagactttgacgctattatagccgagcacttccagcctggggattgtgttctggaaact gacatcgcgtcgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgttaatgattctggaagacttaggtgtggacgcagagctgttgacgctgattgaggcgg ctttcggcgaaatttcatcaatacatttgcccactaaaactaaatttaaattcggagccatgatgaaatctggaatgttcctcacactgtttgtgaacacagtcattaacattgta atcgcaagcagagtgttgagagaacggctaaccggatcaccatgtgcagcattcattggagatgacaatatcgtgaaaggagtcaaatcggacaaattaatggcagaca ggtgcgccacctggttgaatatggaagtcaagattatagatgctgtggtgggcgagaaagcgccttatttctgtggagggtttattttgtgtgactccgtgaccggcacagc gtgccgtgtggcagacccccctaaaaaggctgtttaagcttggcaaacctctggcagcagacgatgaacatgatgatgacaggagaagggcattgcatgaagagtcaac acgctggaaccgagtgggtattctttcagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggtatgaaaccgtaggaacttccatcatagttatggccatgactactctagctagcag tgttaaatcattcagctacctgagaggggcccctataactctctacggcTAAcctgaatggactacgacgtatcacgcccaaacatttacagccgcggtgtcaaaaacc gcgtggacgtggttaacatccctgctgggaggatcagccgtaattattataattggcttggtgctggctactattgtggccatgtacgtgctgaccaaccagaaacataatt gaatacagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcgcggcgattggcatgccgccttaaaatttttattttattttttctttttctttccgaatcggattttgttttaatatttc AAAA

[0554]

TTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATA
GACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCG
GATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAA
CACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACC
TCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCG
ATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTT
ACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAG
TGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAG
GGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCA
GGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACC
TGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCC
CAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGT
CACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGA
GAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAA
GTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGT
GCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCA
GTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGC
AGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAA
CAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTC
CACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAA
AAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTA
AGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGG
CAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTAC
AAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGG
AGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCC
TGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTG
GAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGC
CGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAAC
GGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGG
ACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGT
CGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCT
CGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCAT
AAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGA
GTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCC
GTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTT
AGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACC
ATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCAT
CTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCA
TTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACG
GAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATC
AACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGG
TGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACC
TGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAA
GTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCA
ACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGT
CAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAG
ATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATA
TACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAG
GAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGA
AGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGG
GACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAG
GCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCG
TCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCA
GAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCC
GAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGC
CTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATC
GGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAG
GACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGAT
GGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATC

[0555]

CTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAG
CTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTG
GCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAA
CACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAAT
AGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGA
GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTT
CGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGC
ATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGA
GATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAAT
CCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTA
GACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCT
GCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGC
CTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG
CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGC
GCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAG
AACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAAT
TGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATAT
TGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAAT
TAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCA
ATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAG
AACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCA
CCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGG
CTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATC
GCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGG
TGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCA
CTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACACA
GTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCAT
TCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCAC
CTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAG
GGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTT
AAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAG
AGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGA
AACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCT
ACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCA
AGATGTTCCCGTTCCAGCCAATGTATCCGATGCAGCCAATGCCCTATCGCAACCCGTTCGCGGCCCCG
CGCAGGCCCTGGTTCCCCAGAACCGACCCTTTTCTGGCGATGCAGGTGCAGGAATTAACCCGCTCGAT
GGCTAACCTGACGTTCAAGCAACGCCGGGACGCGCCACCTGAGGGGCCATCCGCTAAGAAACCGAAG
AAGGAGGCCTCGCAAAAACAGAAAGGGGGAGGCCAAGGGAAGAAGAAGAAGAACCAAGGGAAGAA
GAAGGCTAAGACAGGGCCGCCTAATCCGAAGGCACAGAATGGAAACAAGAAGAAGACCAACAAGAA
ACCAGGCAAGAGACAGCGCATGGTCATGAAATTGGAATCTGACAAGACGTTCCCAATCATGTTGGAA
GGGAAGATAAACGGCTACGCTTGTGTGGTCGGAGGGAAGTTATTCAGGCCGATGCATGTGGAAGGCA
AGATCGACAACGACGTTCTGGCCGCGCTTAAGACGAAGAAAGCATCCAAATACGATCTTGAGTATGC
AGATGTGCCACAGAACATGCGGGCCGATACATTCAAATACACCCATGAGAAACCCCAAGGCTATTAC
AGCTGGCATCATGGAGCAGTCCAATATGAAAATGGGCGTTTCACGGTGCCGAAAGGAGTTGGGGCCA
AGGGAGACAGCGGACGACCCATTCTGGATAACCAGGGACGGGTGGTCGCTATTGTGCTGGGAGGTGT
GAATGAAGGATCTAGGACAGCCCTTTCAGTCGTCATGTGGAACGAGAAGGGAGTTACCGTGAAGTAT
ACTCCGGAGAACTGCGAGCAATGGTCACTAGTGACCACCATGTGTCTGCTCGCCAATGTGACGTTCCC
ATGTGCTCAACCACCAATTTGCTACGACAGAAAACCAGCAGAGACTTTGGCCATGCTCAGCGTTAACG
TTGACAACCCGGGCTACGATGAGCTGCTGGAAGCAGCTGTTAAGTGCCCCGGAAGGAAAAGGAGATC
CACCGAGGAGCTGTTTAATGAGTATAAGCTAACGCGCCCTTACATGGCCAGATGCATCAGATGTGCA
GTTGGGAGCTGCCATAGTCCAATAGCAATCGAGGCAGTAAAGAGCGACGGGCACGACGGTTATGTTA
GACTTCAGACTTCCTCGCAGTATGGCCTGGATTCCTCCGGCAACTTAAAGGGCAGGACCATGCGGTAT
GACATGCACGGGACCATTAAAGAGATACCACTACATCAAGTGTCACTCTATACATCTCGCCCGTGTCA
CATTGTGGATGGGCACGGTTATTTCCTGCTTGCCAGGTGCCCGGCAGGGGACTCCATCACCATGGAAT
TTAAGAAAGATTCCGTCAGACACTCCTGCTCGGTGCCGTATGAAGTGAAATTTAATCCTGTAGGCAGA
GAACTCTATACTCATCCCCCAGAACACGGAGTAGAGCAAGCGTGCCAAGTCTACGCACATGATGCAC
AGAACAGAGGAGCTTATGTCGAGATGCACCTCCCGGGCTCAGAAGTGGACAGCAGTTTGGTTTCCTTG
AGCGGCAGTTCAGTCACCGTGACACCTCCTGATGGGACTAGCGCCCTGGTGGAATGCGAGTGTGGCG
GCACAAAGATCTCCGAGACCATCAACAAGACAAAACAGTTCAGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGT
GCAGAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGTGGGTGTATAATTCTGACAAACTGCCCAAAGCAGCGGG

AGCCACCTTAAAAGGAAAACTGCATGTCCCATTCTTGCTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGCCTCTAG
CACCAGAACCTATGATAACCTTCGGTTTCAGATCAGTGTCACTGAAACTGCACCCTAAGAATCCCACA
TATCTAATCACCCGCCAACTTGCTGATGAGCCTCACTACACGCACGAGCTCATATCTGAACCAGCTGT
TAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGGTGGGAGTTTGTATGGGGAAACCACCCGCCGAAAAGGTTT
TGGGCACAGGAAACAGCACCCGGAAATCCACATGGGCTACCGCACGAGGTGATAACTCATTATTACC
ACAGATACCCTATGTCCACCATCCTGGGTTTGTCAATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTTGCAG
CGTCTACCTGGCTGTTTTGCAGATCTAGAGTTGCGTGCCTAACTCCTTACCGGCTAACACCTAACGCTA
GGATACCATTTTGTCTGGCTGTGCTTTGCTGCGCCCGCACTGCCCGGGCCGAGACCACCTGGGAGTCC
TTGGATCACCTATGGAACAATAACCAACAGATGTTCTGGATTCAATTGCTGATCCCTCTGGCCGCCTT
GATCGTAGTGACTCGCCTGCTCAGGTGCGTGTGCTGTGTCGTGCCTTTTTTAGTCATGGCCGGCGCCGC
AGGCGCCGGCGCCTACGAGCACGCGACCACGATGCCGAGCCAAGCGGGAATCTCGTATAACACTATA
GTCAACAGAGCAGGCTACGCACCACTCCCTATCAGCATAACACCAACAAAGATCAAGCTGATACCTA
CAGTGAACTTGGAGTACGTCACCTGCCACTACAAAACAGGAATGGATTCACCAGCCATCAAATGCTG
CGGATCTCAGGAATGCACTCCAACTTACAGGCCTGATGAACAGTGCAAAGTCTTCACAGGGGTTTACC
CGTTCATGTGGGGTGGTGCATATTGCTTTTGCGACACTGAGAACACCCAAGTCAGCAAGGCCTACGTA
ATGAAATCTGACGACTGCCTTGCGGATCATGCTGAAGCATATAAAGCGCACACAGCCTCAGTGCAGG
CGTTCCTCAACATCACAGTGGGAGAAACACTCTATTGTGACTACCGTGTATGTGAATGGAGAAACTCCT
GTGAATTTCAATGGGGTCAAAATAACTGCAGGTCCGCTTTCCACAGCTTGGACACCCTTTGATCGCAA
AATCGTGCAGTATGCCGGGGAGATCTATAATTATGATTTTCCTGAGTATGGGGCAGGACAACCAGGA
GCATTTGGAGATATACAATCCAGAACAGTCTCAAGCTCTGATCTGTATGCCAATACCAACCTAGTGCT
GCAGAGACCCAAAGCAGGAGCGATCCACGTGCCATACACTCAGGCACCTTCGGGTTTTGAGCAATGG
AAGAAAGATAAAGCTCCATCATTGAAATTTACCGCCCCTTTCGGATGCGAAATATATACAAACCCCAT
TCGCGCCGAAAACTGTGCTGTAGGGTCAATTCCATTAGCCTTTGACATTCCCGACGCCTTGTTCACCA
GGGTGTCAGAAACACCGACACTTTCAGCGGCCGAATGCACTCTTAACGAGTGCGTGTATTCTTCCGAC
TTTGGTGGGATCGCCACGGTCAAGTACTCGGCCAGCAAGTCAGGCAAGTGCGCAGTCCATGTGCCATC
AGGGACTGCTACCCTAAAAGAAGCAGCAGTCGAGCTAACCGAGCAAGGGTCGGCGACTATCCATTTC
TCGACCGCAAATATCCACCCGGAGTTCAGGCTCCAAATATGCACATCATATGTTACGTGCAAAGGTGA
TTGTCACCCCCCGAAAGACCATATTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGG
TGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGC
TTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGCA
ATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTTTC
TTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTC

VEE 생산 벡터 (서열번호:8); 뉴클레오티드 7544-11175가 걸실, 플러스 5' T7-프로모터, 플러스 3' 제한 부위를 갖는 VEE 게놈

TAATACGACTCACTATAGGATGggcggcgcatgagagaagcccagaccaattacctacccaaaATGGagaaagttcacgttgacatcgagga
agacagcccattcctcagagctttgcagcggagcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgaccatgctaatgccagagcgttttcgcatctgg
cttcaaaactgatcgaaacggaggtggacccatccgacacgatccttgacattggaagtgcgcccgcccgcagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatctgtccga
tgagatgtgcggaagatccggacagattgtataagtatgcaactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgataaggaattggacaagaaaatgaaggagctcg
ccgccgtcatgagcgaccctgacctggaaactgagactatgtgcctccacgacgacgagtcgtgtcgctacgaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcggt
tgacggaccgacaagtctctatcaccaagccaataagggagttagagtcgcctactggataggctttgacacaccacccttttatgtttaagaacttggctggagcatatcca
tcatactctaccaactgggccgacgaaaccgtgttaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgtagagggatgtccattcttagaaa
gaagtatttgaaaccatccaacaatgttctattctctgttggctcgaccatctaccacgagaagagggacttactgaggagctggcacctgccgtctgtatttcacttacgtg
gcaagcaaaattacacatgtcggtgtgagactatagttagttgcgacgggtacgtcgttaaaagaatagctatcagtccaggcctgtatgggaagccttcaggctatgctg
ctacgatgcaccgcgagggattcttgtgctgcaaagtgacagacacattgaacggggagagggtctcttttcccgtgtgcacgtatgtgccagctacattgtgtgaccaa
atgactggcatactggcaacagatgtcagtgcggacgacgcgcaaaaactgctggttgggctcaaccagcgtatagtcgtcaacggtcgcacccagagaaacacaa
taccatgaaaaattacctttgcccgtagtggcccaggcatttgctaggtgggcaaaggaatataaggaagatcaagaagatgaaaggccactaggactacgagataga
cagttagtcatggggtgttgttgggcttttagaaggcacaagataacatctatttataagcgcccggatacccaaaccatcatcaaagtgaacagcgatttccactcattcgt
gctgcccaggataggcagtaacacattggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgttagaggagcacaaggagccgtcacctctcattaccgccgaggac
gtacaagaagctaagtgcgcagccgatgaggctaaggaggtgcgtgaagccgaggagttgcgcgcagctctaccacctttggcagctgatgttgaggagcccactct
ggaagccgatgtcgacttgatgttacaagaggctggggccggctcagtggagacacctcgtggcttgataaaggttaccagctacgctggcgaggacaagatcggctc
ttacgctgtgctttctccgcaggctgtactcaagagtgaaaaattatcttgcatccaccctctcgctgaacaagtcatagtgataacacactctggccgaaaagggcgttatg
ccgtggaaccatacgatggtaaagtagtggtgccagagggacatgcaatacccgtccaggactttcaagctctgagtgaaagtgccaccattgtgtacaacgaacgtga
gttcgtaaacaggtacctgcaccatattgccacacatggaggagcgctgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgagcacgacggcgaatacct
gtacgacatcgacaggaaacagtgcgtcaagaaagaactagtcactgggctagggctcacaggcgagctggtggatcctcccttccatgaattcgcctacgagagtct
gagaacacgaccagccgctccttaccaagtaccaaccataggggtgtatggcgtgccaggatcaggcaagtctggcatcattaaaagcgcagtcaccaaaaaagatct
agtggtgagcgccaagaaagaaaactgtgcagaaattataaggacgtcaagaaaatgaaagggctggacgtcaatgccagaactgtggactcagtgctcttgaatgg
atgcaaacaccccgtagagaccctgtatattgacgaagctttgcttgtcatgcaggtactctcagagcgctcatagccattataagacctaaaaaggcagtgctctgcgg
ggatcccaaacagtgcggttttttaacatgatgtgcctgaaagtgcattttaaccacgagatttgcacacaagtcttccacaaaagcatctctcgccgttgcactaaatctgt
gacttcggtcgtctcaaccttgttttacgacaaaaaaatgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattgacactaccggcagtaccaaacctaagcaggacg
atctcattctcacttgtttcagagggtgggtgaagcagttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaagggctgacccgtaaaggtgtgt

[0556]

[0557]

atgccgttcggtacaaggtgaatgaaaatcctctgtacgcacccacctcagaacatgtgaacgtcctactgacccgcacggaggaccgcatcgtgtggaaaacactagc cggcgacccatggataaaaacactgactgccaagtaccctgggaatttcactgccacgatagaggagtggcaagcagagcatgatgccatcatgaggcacatcttgga gagaccggaccctaccgacgtcttccagaataaggcaaacgtgtgttgggccaaggctttagtgccggtgctgaagaccgctggcatagacatgaccactgaacaatg gaacactgtggattattttgaaacggacaaagctcactcagcagagatagtattgaaccaactatgcgtgaggttctttggactcgatctggactccggtctatttttctgcac ccactgttccgttatccattaggaataatcactgggataactccccgtcgcctaacatgtacgggctgaataaagaagtggtccgtcagctctctcgcaggtacccacaact gcctcgggcagttgccactggaagagtctatgacatgaacactggtacactgcgcaattatgatccgcgcataaacctagtacctgtaaacagaagactgcctcatgctttt agtcctccaccataatgaacacccacagagtgacttttcttcattcgtcagcaaattgaagggcagaactgtcctggtggtcggggaaaagttgtccgtcccaggcaaaat ggttgactggttgtcagaccggcctgaggctaccttcagagctcggctggatttaggcatcccaggtgatgtgcccaaatatgacataatatttgttaatgtgaggacccca tataaataccatcactatcagcagtgtgaagaccatgccattaagcttagcatgttgaccaagaaagcttgtctgcatctgaatcccggcggaacctgtgtcagcataggtt atggttacgctgacagggccagcgaaagcatcattggtgctatagcgcggcagttcaagttttcccgggtatgcaaaccgaaatcctcacttgaagagacggaagttctg tttgtattcattgggtacgatcgcaaggcccgtacgcacaatcctacaagctttcatcaaccttgaccaacatttatacaggttccagactccacgaagccggatgtgcacc ctcatatcatgtggtgcgaggggatattgccacggccaccgaaggagtgattataaatgctgctaacagcaaaggacaacctggcggaggggtgtgcggagcgctgta taagaaattcccggaaagcttcgatttacagccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggtcaaaggtgcagctaaacatatcattcatgccgtaggaccaaacttcaaca aagtttcggaggttgaaggtgacaaacagttggcagaggcttatgagtccatcgctaagattgtcaacgataacaatacaagtcagtagcgattccactgttgtccaccg gcatcttttccgggaacaaagatcgactaacccaatcattgaaccatttgctgacagctttagacaccactgatgcagatgtagccatatactgcagggacaagaaatggg aaatgactctcaaggaagcagtggctaggagagaagcagtggaggagatatgcatatccgacgactcttcagtgacagaacctgatgcagagctggtgagggtgcat ccgaagagttctttggctggaaggaagggctacagcacaagcgatggcaaaacttctcatatttggaagggaccaagtttcaccaggcggccaaggatatagcagaa attaatgccatgtggcccgttgcaacggaggccaatgagcaggtatgcatgtatatcctcggagaaagcatgagcagtattaggtcgaaatgccccgtcgaagagtcgg aagcctccacaccacctagcacgctgccttgcttgtgcatccatgccatgactccagaaagagtacagcgcctaaaagcctcacgtccagaacaaattactgtgtgctca tcctttccattgccgaagtatagaatcactggtgtgcagaagatccaatgctcccagcctatattgttctcaccgaaagtgcctgcgtatattcatccaaggaagtatctcgtg gaaacaccaccggtagacgagactccggagccatcggcagagaaccaatccacagaggggacacctgaacaaccaccacttataaccgaggatgagaccaggact agaacgcctgagccgatcatcatcgaagaggaagaagaggatagcataagtttgctgtcagatggcccgacccaccaggtgctgcaagtcgaggcagacattcacgg gccgccctctgtatctagctcatcctggtccattcctcatgcatccgactttgatgtggacagtttatccatacttgacaccctggagggagctagcgtgaccagcggggca acgtcagccgagactaactcttacttcgcaaagagtatggagtttctggcgcgaccggtgcctgcgcctcgaacagtattcaggaaccctccacatcccgctccgcgca caagaacaccgtcacttgcacccagcagggcctgctcgagaaccagcctagtttccacccccgccaggcgtgaatagggtgatcactagagaggagctcgaggcgctt accccgtcacgcactcctagcaggtcggtctcgagaaccagcctggtctccaacccgccaggcgtaaatagggtgattacaagagaggagtttgaggcgttcgtagca caacaacaatgacggtttgatgcgggtgcatacatcttttcctccgacaccggtcaagggcatttacaacaaaaatcagtaaggcaaacggtgctatccgaagtggtgttg gagaggaccgaattggagatttcgtatgccccgcgcctcgaccaagaaaaagaagaattactacgcaagaaattacagttaaatcccacacctgctaacagaagcagat accagtccaggaaggtggagaacatgaaagccataacagctagacgtattctgcaaggcctagggcattatttgaaggcagaaggaaaagtggagtgctaccgaacc ctgcatcctgttcctttgtattcatctagtgtgaaccgtgccttttcaagccccaaggtcgcagtggaagcctgtaacgccatgttgaaagagaactttccgactgtggcttctt actgtattattccagagtacgatgcctatttggacatggttgacggagcttcatgctgcttagacactgccagttttgccctgcaaagctgcgcagctttccaaagaaacact cctatttggaacccacaatacgatcggcagtgccttcagcgatccagaacacgctccagaacgtcctggcagctgccacaaaaagaaattgcaatgtcacgcaaatgag agaattgcccgtattggattcggcggccttaatgtggaatgcttcaagaaatatgcgtgtaataatgaatattgggaaacgtttaaagaaaacccccatcaggcttactgaag aaaacgtggtaaattacattaccaaatttaaaaggaccaaaagctgctgctctttttgcgaagacacataatttgaatatgttgcaggacataccaatggacaggtttgtaatg gacttaaagagagacgtgaaagtgactccaggaacaaaacatactgaagaacggcccaaggtacaggtgatccaggctgccgatccgctagcaacagcgtatctgtg cggaatccaccgagagctggttaggagattaaatgcggtcctgcttccgaacattcatacactgtttgatatgtcggctgaagactttgacgctattatagccgagcacttcc agcctggggattgtgttctggaaactgacatcgcgtcgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgttaatgattctggaagacttaggtgtggacgca gagctgttgacgctgattgaggcggctttcggcgaaatttcatcaatacatttgcccactaaaactaaatttaaattcggagccatgatgaaatctggaatgttcctcacactg tttgtgaacacagtcattaacattgtaatcgcaagcagagtgttgagagaacggctaaccggatcaccatgtgcagcattcattggagatgacaatatcgtgaaaggagtc aaatcggacaaattaatggcagacaggtgcgccacctggttgaatatggaagtcaagattatagatgctgtggtgggcgagaaagcgccttatttctgtggagggtttattt tgtgtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagacccccctaaaaaggctgtttaagcttggcaaacctctggcagcagacgatgaacatgatgatgacagga gaagggcattgcatgaagagtcaacacgctggaaccgagtgggtattctttcagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggtatgaaaccgtaggaacttccatcatagtt atggccatgactactctagctagcagtgttaaatcattcagctacctgagaggggcccctataactctctacggcTAAcctgaatggactacgacgtatcacgcccaaa catttacagccgcggtgtcaaaaaccgcgtggacgtggttaacatcccctgctgggaggatcagccgtaattattataattggcttggtgctggctactattgtggccatgta cgtgctgaccaaccagaaacataattgaatacagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcgcggcgattggcatgccgccttaaaatttttattttattttttctttttctttt tccgaatcggattttgttttttaatatttcAAA

[0558]

GAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGA
GGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACT
ATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTC
AGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGG
GAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACT
GGCAACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTC
AACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCAT
TTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATA
GACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCG
GATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAA
CACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACC
TCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAA
GCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCG
ATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTT
ACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAG
TGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAG
GGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCA
GGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACC
TGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCC
CAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGT
CACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTGA
GAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAA
GTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGT
GCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCA
GTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGC
AGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAA
CAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTC
CACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAA
AAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTA
AGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGG
CAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTAC
AAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGG
AGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCC
TGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTG
GAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGC
CGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAAC
GGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGG
ACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGT
CGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCT
CGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCAT
AAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGA
GTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCC
GTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTT
AGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACC
ATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCAT
CTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCA
TTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACG
GAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATC
AACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGG
TGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACC
TGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAA
GTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCA
ACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGT
CAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAG
ATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATA
TACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAG
GAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGA
AGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGG
GACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAG
GCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCG

[0559]

TCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCA GAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCC GAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGC CTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATC GGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAG GACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGAT GGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATC CTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAG CTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTG GCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAA CACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAAT AGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGA GAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTT CGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGC ATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGA GATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAAT CCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTA GACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCT GCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGC CTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATG CCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCTGC GCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAG AACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAAT TGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATAT TGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAAT TAAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCA ATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAG AACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCA CCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGG CTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACATC GCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGG TGTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCA CTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACACA GTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCAT TCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCAC CTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAG GGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTT AAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAG AGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGA AACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCT ACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACGTATCACGCCCAAAC ATTTACAGCCGCGGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTA ATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAA TTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAAT TTTTATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
VEE-UbAAY (서열번호:14); 삽입된 MHC 클래스 I 마우스 종양 에피토프 SIINFEKL(서열번호:29362) 및 AH1-A5를 갖는 VEE 전달 벡터
VEE- 루시페라제 (서열번호:15); 7545에서 루시페라제 유전자가 삽입된 VEE 전달 벡터
(유비퀴틴 서열번호:38)>UbG76 0-228
유비퀴틴 A76 (서열번호:39)>UbA76 0-228
HLA-A2 (MHC 클래스 I) 신호펩티드 (서열번호:40)>MHC 신호펩티드 0-78
HLA-A2 (MHC 클래스 I) 막 관통도메인 (서열번호:41)>HLA A2 TM 도메인 0-201
IgK 리더서열 (서열번호:42)>IgK 리더서열 0-60
인간 DC-Lamp (서열번호:43)> 인간 DCLAMP 0-3178
마우스 LAMP1 (서열번호:44)> 마우스 Lamp1 0-1858
인간 Lamp1 cDNA (서열번호:45)>인간 Lamp1 0-2339
과상풍 톡소이드 핵산 서열 (서열번호:46)

파상풍 톡소이드 아미노산 서열 (서열번호:47)
PADRE 뉴클레오티드 서열 (서열번호:48)
PADRE 아미노산 서열(서열번호:49)
WPRE (서열번호:50)>WPRE 0-593
IRES (서열번호:51)>eGFP_IRES_SEAP_ 삽입 1746-2335
GFP (서열번호:52)
SEAP (서열번호:53)
반딧불이 루시페라제(서열번호:54)
FMDV 2A (서열번호:55)
이필리무맙 중쇄 (서열번호: 29520)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
이필리무맙 경쇄 (서열번호: 29521)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
니볼루맙 중쇄 (서열번호: 29522)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRF TISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK
니볼루맙 경쇄 (서열번호: 29523)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ChAdV68-엠프티-E4결실 (서열번호: 29365)
CATCTTCAATAATATACCTCAAACTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGG AGGAAGGGCGGTGATTGGTCGAGGGATGAGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGAC GTGGTTGCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAGTTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTT GAACACGGAAATACTCAATTTTCCCGCGCTCTCTGACAGGAAATGAGGTGTTTCTGGGCGGATGCAAG TGAAAACGGGCCATTTTCGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAATCTGAGTAATTTCGCGTTTAT GGCAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTACCG TGTTTTTCACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGC CAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCTC CTCCGCGCCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGTAGGGataaGGTAGCGAGTGAGTAGTGTTCTGGGG CGGGGGAGGACCTGCATGAGGGCCAGAATAACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCAGCATG AGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTCAGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCCTCCTGGGC GGGAGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCA ACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGTTGGACGCAGCTGCCGCCGCAGCTGCTGCATCTGC CGCCAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGT TCCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGTTGCTGCTGATGGCCCAGCTCGAGGCCTT GACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTT GCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACA GAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCAC CCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGT CCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTTGTAAATCACCCAGTCA TAGCAGGGGCGCAGGGCATGGTGTTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCC CTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCAT CTTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGA

[0560]

[0561]

CCACCAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAA
GAATTTGGCGACGCCTTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCGATGGGCC
CGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTCGGACACATCATAGTTGTGGTCCTGGGTGAG
GTCATCATAGGCCATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCG
ATCCCGGGGGCGTAGTTCCCCTCACAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTGAGCTCGGAGGGGGGGATCAT
GTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAA
GTTCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAGATGACCCCGATGACCGGCTGCAGG
TGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGC
GCACGTGCATGTTCTCGCGCACCAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCCAGGGATAGGAGCTCCTGG
AGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTCGGCCATGGGCATTTTGGAGAGGGTTTGTTGCAA
GAGTTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTT
TCGCGGGTTGGGACGGCTGCGGGAGTAGGGCACCAGACGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGG
TCCTTCCAGGGTCGCAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTG
GGCGCTTGCGAGGGTGCGCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCG
CGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGG
AGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGG
CGAGGAAGACGGACTCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCAC
GAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACCAGTTTCCCGCCGTTCTTTTTGATGCGTTTCT
TACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACC
GACTTTATGGGCCGGTCCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGA
GACGAAAGCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTCGTTGTCCACC
AGCGGGTCCACCTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGG
CTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGTGCGGGTCCCTGC
TCGTCCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTCTCGAA
GGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGC
CGGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATCTTTTTGTTGTCGAGC
TTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAGAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTT
TTTCCTTGTCGGCGCGCTCCTTGGCGGCGATGTTGAGCTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATT
CGGGGAAGACGGTGGTCAGCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAGCCCCGATTATGCAGGGTGAT
GAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCATTAGTCCAGCAGAGGCGTCCGCCCTTGC
GCGAGCAGAAGGGGGGCAGGGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCGGCATCGATGGTGAAGA
TGCCGGGCAGGAGGTCGGGGTCAAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGCAGCTTGCCA
TTCGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGATGGGTAAGC
GCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGG
GGTAGCAGCGCCCCCCGCGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGGGCGAGGAG
CCCCGGGCCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGGAAAATGGCATGC
GAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGCAGTCCGACCGAGTCGC
GGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACTAGGACGTCCAGAGC
GCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGTCCCTTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTT
GAGAAGGAACTCTTCGCGGTCCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAG
AGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTGTAGGCGCAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTA
GGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAAGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGG
AACTGGTGCTTGAAGTCGATATCGTCGCAGCCCCCCTGCTCCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTT
GTAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAGAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAG
TTGCGAGTGATGCGGAAAGGTTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGA
TCTCGTCGAAGCCGTTGATGTTGTGGCCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGACGGCCCTTGACG
TGGGGCAGTTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGCCCGTGCTGCTCGAGCGC
CCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTG
CAGACGGTCCCGGTACTGACGGAACTGCTGCCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAG
GTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGATCCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGA
GCCGGTCGTCCCCGGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCAT
CCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGG
AAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGAC
GGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGC
ACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTGACGAGGAATTTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGC
CTGCATCTCGTGCTGTACTACGTCGTGGTGGTCGGCCTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCT
GACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGC
GCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTCAGTGGGCAGCGGCGGCGCG
CGGTTGACTTGCAGGAGTTTTTCCAGGGCGCGCGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCC
ATTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGCAGGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGTGACCACCGTCCCCCGTTTCT

[0562]

TCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCG
CCGGGCGGCAGGGGCGGCTCGGGGCCCGGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGTCGGCGCCGCGCGCG
GGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCGGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCCTGGA
TCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATC
AATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGG
CGATCTCGGTCATGAACTGCTCGATCTCCTCCTCTTGAAGGTCTCCGCGGCCGGCGCGCTCCACGGTG
GCCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGA
CGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCgGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTC
CACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATG
TGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCT
CCAAACGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGAC
GGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGGCC
CCCGGGAGTTCCTCCACTTCCTCTTCTTCCTCCTCCACTAACATCTCTTCTACTTCCTCCTCAGGCGGCA
GTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGCAGACGGTCGATGAAGCGCTCGA
TGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGCATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCCGTCCTCGCGGGGCCGCAGCGTG
AAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGACGA
TGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCT
GAAAACCGCTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTG
GCGGGTCATGTTGGTTGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCT
GAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGCTGGATGCGCAGACGGTCG
GCCATGCCCCAGGCGTGGTCCTGACACCTGGCCAGGTCCTTGTAGTAGTCCTGCATGAGCCGCTCCAC
GGGCACCTCCTCCTCGCCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTGGGGCTGGACG
AGCGCCAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCTTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGA
AGTCATCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGAC
GGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGC
GTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCG
GCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCG
GTGGTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAAC
TCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCG
TGAGGCGCGCGCAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTCAGCGGCTCGACTCCGT
GGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCGAATCTCGAATCAGGCTGG
AGCCGCAGCTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCCTCCAGGATACGG
AGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTTTTGGAGGCCGGATGAGACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGAC
CGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGA
GGCCGGCCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCAGC
CGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCTCTTTTGTTTTGTTTGTTTTTGCCAGATGCATCCCGTACTG
CGGCAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCC
GCCCCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGAGTTATGAT
CACCAGCTGGCCTTGGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACC
CGCGCGTGCAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCCAAGCAGAACCTGTTCAGAGACAG
GAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGG
CCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCC
CGCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAG
CAACTTCCAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGACCCTGGGC
CTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGCAGAACCCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGC
AGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAAGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCAC
CGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGC
GGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTTTGGGCAAGTACTACGC
TAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATG
CGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACC
GTGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGCGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCATAGTCTGCAGCGGGC
CCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCC
AGCCGCCGGGCCTTGGAGGCGGCGGCAGGACCCTACGTAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAG
GAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGCAACAACAACAGCCACC
TCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGA
CCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAGCCCCA
GGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCCGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCCACGCACGAGAAG
GTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGT
ACAACGCGCTGCTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCAT
GGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCC

[0563]

ATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACA
CCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCCGG
GCCGGACTACTTCTTCCAGACCAGTCGCCAGGGCTTGCAGACCGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGA
ACTTGCAGGGCCTGTGGGGCGTGCAGGCCCCGGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTCGAGCCTGCTGAC
GCCGAACTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACT
CGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGAC
CTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAACCTGGAAGCCACC
CTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTCGCAGAAGATCCCGCCCCAGTACGCGCTCAGCACCGAGGAGG
AGCGCATCCTGCGTTACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCCAG
CGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCCGTTCATC
AATAAACTGATGGACTACTTGCATCGGGCGGCCGCCATGAACTCTGACTATTTCACCAACGCCATCCT
GAATCCCCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACCCCAATGAC
GGGTTCCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTTCTCCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCCTT
GTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCCCGTCCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCG
GCGGTGCCCGAGGCCGCCAGTCCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATCCGCAGCAGCGA
GCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAAGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGA
CCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAAAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGG
AAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCCCGGGCGTCGCAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGC
GCCGCCCGTAAACGCCGGTGGCACGACAGGCAGCGGGGACAGATGTGGGACGATGAGGACTCCGCC
GACGACAGCAGCGTGTTGGACTTGGGTGGGAGTGGTAACCCGTTCGCTCACCTGCGCCCCCGTATCGG
GCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTCACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTC
GTTTCTTCTCTGTTGTTGTTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGGAGGGTCCTCCTCCCTCGT
ACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGT
GCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCACCCTTGT
ACGATACCACCCGGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCCTCGCTGAACTACCAGAA
CGACCACAGCAACTTCCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCACCCCCACGGAGGCCAGCACC
CAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGCCAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACA
TGCCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTCTCCCGCAAGAC
CCCCAATGGGGTGACAGTGACAGAGGATTATGATGGTAGTCAGGATGAGCTGAAGTATGAATGGGTG
GAATTTGAGCTGCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCAT
CGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTGCTGGAGAGCGACATCGGCGTGAAGTTCGAC
ACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACG
AGGCTTTCCATCCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGC
AACCTGCTGGGCATTCGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAAGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGG
AGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGATGCAGCAGC
TGAAGCAACTGCAGCCGTAGCTACCGCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAAGCGCCGCA
GCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTCAGCCGGTGGAGAAGGAT
AGCAAGAACAGGAGCTACAACGTACTACCGGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTAG
CCTACAACTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTCACCACCTCGGACGTCACC
TGCGGCGTGGAGCAAGTCTACTGGTCGCTGCCCGACATGATGCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCAC
GCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCA
ACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTCACCTCGCTTACGCACGTCTTCAACCGCTTC
CCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCCGCGCCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCCTGC
TCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTTACTG
ACGCCAGACGCCGCACCTGCCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCCTCTCG
AGCCGCACCTTCTAAATGTCCATTCTCATCTCGCCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGCGCC
CAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTC
CGCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCGGTCGCGCACCACCGTCGACGACGTGATCGACC
AGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCGCCGCGCCCGTCTCCACCGTGGACGCCGTCATC
GACAGCGTGGTGGCcGACGCGCGCCGGTACGCCCGCGCCAAGAGCCGGCGGCGGCGCATCGCCCGGC
GGCACCGGAGCACCCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACG
CAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACG
CGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGG
GTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCGCACCCGCCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTC
ACTTCGCGATGTTGATGTGTCCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGC
TCCAGGTCATCGCGCCTGAGATCTACGGCCCTGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAAT
CAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGAAAGTGATGTGGACGGATTGGTGGAGTTTGTGCG
CGAGTTCGCCCCCCGGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAGGTGCAACCGGTGCTGAGACCCGGC
ACCACCGTGGTCTTCACGCCCGGCGAGCGCTCCGGCACCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTA
CGGGGATGATGATATTCTGGAGCAGGCGGCCGAGCGCCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGC

CGTTCCGCACCGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCCACGCCGAGCCTCA
AGCCCGTGACCTTGCAGCAGGTGCTGCCGACCGCGGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGA
GGATCTGTACCCCACCATGCAGCTGATGGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACC
ATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCC
TGGGCGTGCAGACCGTGGACATCAAGATTCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGAT
CAAGCCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGTCGAAGA
CCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCAACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCC
CACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACCAGCAGCCGCCGCCGCAAGACCACC
ACTCGCCGCCGCCGTCGCCGCACCGCCGCTGCAACCACCCCTGCCGCCCTGGTGCGGAGAGTGTACCG
CCGCGGCCGCGCACCTCTGACCCTGCCGCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAAACTTTCG
CCtGCTTTGCAGATCAATGGCCCTCACATGCCGCCTTCGCGTTCCCATTACGGGCTACCGAGGAAGAA
AACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCACCGGCGGCGGCGCGCCAT
CAGCAAGCGGTTGGGGGGAGGCTTCCTGCCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCG
ATCCCCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACACTTGGAAACATCTT
GTAATAAACCaATGGACTCTGACGCTCCTGGTCCTGTGATGTGTTTTCGTAGACAGATGGAAGACATC
AATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCAC
CAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTCGGGTCC
ACGCTTAAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTG
AAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGGACC
TGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGT
GGAGATGCCGCAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCC
CGATGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACT
GGGTCTGCCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAAGCCCGCG
ACCCTGGACTTGCCTCCTCCCCAGCCTTCCCGCCCCTCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCC
GTGGCCCGCGCGCGACCCGGGGGCACCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCA
TCGTGGGTCTGGGAGTGCAGAGTGTGAAGCGCCGCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTT
GCTTGTCTGTGTGTGTATGTATTATGTCGCCGCCGCCGCTGTCCACCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCG
CGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGG
ACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCA
GTCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGCGCCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCA
GCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTAC
ACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCT
GGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGTCTGGCCCCCAAGGGAGCA
CCCAACACTTGTCAGTGGACATATAAAGCCGATGGTGAAACTGCCACAGAAAAAACCTATACATATG
GAAATGCACCCGTGCAGGGCATTAACATCACAAAAGATGGTATTCAACTTGGAACTGACACCGATGA
TCAGCCAATCTACGCAGATAAAACCTATCAGCCTGAACCTCAAGTGGGTGATGCTGAATGGCATGAC
ATCACTGGTACTGATGAAAAGTATGGAGGCAGAGCTCTTAAGCCTGATACCAAAATGAAGCCTTGTT
ATGGTTCTTTTGCCAAGCCTACTAATAAAGAAGGAGGTCAGGCAAATGTGAAAACAGGAACAGGCAC
TACTAAAGAATATGACATAGACATGGCTTTCTTTGACAACAGAAGTGCGGCTGCTGCTGGCCTAGCTC
CAGAAATTGTTTTGTATACTGAAAATGTGGATTTGGAAACTCCAGATACCCATATTGTATACAAAGCA
GGCACAGATGACAGCAGCTCTTCTATTAATTTGGGTCAGCAAGCCATGCCCAACAGACCTAACTACAT
TGGTTTCAGAGACAACTTTATCGGGCTCATGTACTACAACAGCACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCCG
GTCAGGCTTCTCAGCTGAATGCTGTGGTTGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCCTACCAGCTC
TTGCTTGACTCTCTGGGTGACAGAACCCGGTATTTCAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGCTATGA
TCCTGATGTGCGCATTATTGAAAATCATGGTGTGGAGGATGAACTTCCCAACTATTGTTTCCCTCTGGA
TGCTGTTGGCAGAACAGATACTTATCAGGGAATTAAGGCTAATGGAACTGATCAAACCACATGGACC
AAAGATGACAGTGTCAATGATGCTAATGAGATAGGCAAGGGTAATCCATTCGCCATGGAAATCAACA
TCCAAGCCAACCTGTGGAGGAACTTCCTCTACGCCAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCTTACAAG
TACACGCCGGCCAATGTTACCCTGCCCACCAACACCAACACCTACGATTACATGAACGGCCGGGTGGT
GGCGCCCTCGCTGGTGGACTCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGATCCCATGGACAACG
TGAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGCGGGGCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGC
TACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGG
GTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACG
ACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTCACCAGCATCAACCTCTACGCCACCTTCTTCCCCATG
GCGCACAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACG
ACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCCATCTCCATC
CCCTCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGTCCTTCACGCGTCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTC
GCTGGGCTCCGGGTTCGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTA
CCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTCAGCTGGCCCGGCAACGACC
GGCTCCTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGCTACAACGTGGCCCA

[0564]

[0565]

GTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCT
TCTACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGC
CAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTCACCCTGGCCTACCAGCACAACAACT
CGGGCTTCGTCGGCTACCTCGCGCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCCGCCAACTACCCCTAC
CCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTCACCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGT
GGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTC
TATGCCAACTCCGCCCACGCGCTAGACATGAATTTCGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCT
CTATGTTGTCTTCGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACCAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCG
TCTACCTGCGCACCCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAGCTCTTGCTTCTTGCAAGCCATGGC
CGCGGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCCTG
GGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACAC
GGCCGGCCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGC
TACCTCTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGG
CCTGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAGACC
GTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCCTGCGGGCTCTTCTGCTGCATGTTCCTGCACGCCTTCGTGCACTG
GCCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTC
CAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACCAGGAGGCGCTCTACCGCTTCCTCAACTCCCA
CTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAATCAAG
ACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTAAATGTCTTTAATAAACAGCACTTTCATGTTACACATGCATCTGA
GATGATTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCTGCCGGGTCTCGGCATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTT
GCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAACTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGG
AAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGTTGCAGGGCGCCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGA
AATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTGCGCGCGGGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACAC
CATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCAGCACCGTCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCCT
CGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGC
TTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTA
CATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGA
CCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCGCACCCGGCGTCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTC
GTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCCAGCGGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGGTCGGGGTTCT
CCTTCAGCGCGCGCTGCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGG
TGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGCTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCG
GTGCACTCCCAGTTCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAAGCCCTGCAGGAAGCGGCCCA
TCATGGTGGTCAGGGTCTTGTTGCTAGTGAAGGTCAGCGGAATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTAC
AGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGCTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGT
CTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATACCCTTCTCCCAGGCCGAGACGATGG
GCAGGCTCATAGGGTTCTTCACCATCATCTTAGCGCTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCGTCC
AGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGC
CGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTTCGTCCTCGCTGTCCTGGCTGACGTCCTGCAGGACCACATGCTT
GGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGCGGCGGCGGAGATGTTGGAGATGGCGAGGGGGAGCGC
GAGTTCTCGCTCACCACTACTATCTCTTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTC
TTCGGGGGCAGAGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCC
TTCCGCGTTCGGGGGGTGCGCTCCCGGCGGCGCTCTGACTGACTTCCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCT
CCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCCACCGCCGA
CGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCCAGCCCCGCCACCTCCGACGCG
GCCGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGG
AGCACGAGGAGGAGCTGGCAGTGCGCTTTTCACAAGAAGAGATACACCAAGAACAGCCAGAGCAGG
AAGCAGAGAATGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGACGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGG
GGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGATGCGCTGCTCGACCG
CACCGAGGTGCCCCTCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGTTGAACCTCTTCTCGCCGCGCG
TGCCCCCCAAGCGCCAGCCCAATGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCGGTCTTC
GCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCG
CGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTTTTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCCTACCTGATATCGCCT
CCTTGGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCT
GCAAGGAGAAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCG
GCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGCCCCCCA
AAGTCATGAGCGCGGTCATGGACCAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGG
CATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCCT
AATGCTAGTCCCCAGAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAACTCATGATGGCCGTGGTCCTGGTGACCGTGG
AGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGAACCTGCA
CTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGG

[0566]

TCTCCTACATGGGCATCTTGCACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGG
GGAGGCCCGGCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCA
TGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAGAAGAA
CCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGCACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATTTTCC
CCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAA
CTTTCGCTCTTTCATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTT
CGTGCCGCTGACCTTCCGCGAGTGCCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCA
ACTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTCAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTG
CCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGA
TCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCCAGCGAAGGCGAGGGTTCAGCCGCCAAGGGGGGTCTGAA
ACTCACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCGTGCCCGAGGACTACCATCCCTTCG
AGATCAGGTTCTACGAGGACCAATCCCATCCGCCCAAGGCCGAGCTGTCGGCCTGCGTCATCACCCAG
GGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCC
GCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCCAGGATGCCCCGAG
GAAACAAGAAGCTGAAAGTGGAGCTGCCGCCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCA
GTCAGGCAGAGGAGGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGC
AAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGA
CCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGATACCATCTCCGCTCCGGGTCGGGGTCCCG
CTCGACCACACAGTAGATGGGACGAGACCGGACGATTCCCGAACCCCACCACCCAGACCGGTAAGAA
GGAGCGGCAGGGATACAAGTCCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGCAGGCCTGC
GGGGGCAACATCTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACTTTCCCCGCAACAT
CTTGCATTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGAAAAA
GACCAGCAGAAAACCAGCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGC
GAACGAGCCGGCGCAAACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTTCCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGC
AGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAACTGAAAGTCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTG
TCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGT
ACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCAGTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTC
ACCTGTGCCCTTCGCCCTAGCCGCCTCCACCCATCATCATGAGCAAAGAGATTCCCACGCCTTACATG
TGGAGCTACCAGCCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGTGCCGCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATT
GGCTCAGCGCCGGGCCCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCCACCGAAACCAGATACT
CCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCC
TGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCCAGGCCGAAGTCCA
GCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAA
AGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGTCTGCG
ACCTGACGGAGTCTTCCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCCTTCACGCCTCGTCAGGCCGTCCTGACTTT
GGAGAGTTCGTCCTCGCAGCCCCGCTCGGGTGGCATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTTCACTCCCT
CGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTCGACGCCA
TCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGAAACTAATCACCCCCTTATCCAGTGAAATAAAGATCATATTGA
TGATGATTTTACAGAAATAAAAAATAATCATTTGATTTGAAATAAAGATACAATCATATTGATGATTTGAG
TTTAACAAAAAAATAAAGAATCACTTACTTGAAATCTGATACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGCCAACAC
CACTTCACTCCCCTCTTCCCAGCTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAACTTCCTCCACACGCTGAA
GGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGTCCGG
GTGGATGATGACTTCGACCCCGTCTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACCGTGCCCTTCATCAACCC
CCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCCAAGAGAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGT
CACCACCAAGAACGGGGAAATCACCCTCAAGCTGGGAGAGGGGGTGGACCTCGATTCCTCGGGAAAACTC
ATCTCCAACACGGCCACCAAGGCCGCCGCCCCTCTCAGTTTTTCCAACAACACCATTTCCCTTAACATGGAT
CACCCCTTTTACACTAAAGATGGAAAATTATCCTTACAAGTTTCTCCACCATTAAATATACTGAGAACAAG
CATTCTAAACACACTAGCTTTAGGTTTTGGATCAGGTTTAGGACTCCGTGGCTCTGCCTTGGCAGTACAGTT
AGTCTCTCCACTTACATTTGATACTGATGGAAACATAAAGCTTACCTTAGACAGAGGTTTGCATGTTACAAC
AGGAGATGCAATTGAAAGCAACATAAGCTGGGCTAAAGGTTTAAAATTTGAAGATGGAGCCATAGCAACC
AACATTGGAAATGGGTTAGAGTTTGGAAGCAGTAGTACAGAAACAGGTGTTGATGATGCTTACCCAATCCA
AGTTAAACTTGGATCTGGCCTTAGCTTTGACAGTACAGGAGCCATAATGGCTGGTAACAAAGAAGACGATA
AACTCACTTTGTGGACAACACCTGATCCATCACCAAACTGTCAAATACTCGCAGAAAATGATGCAAAACTA
ACACTTTGCTTGACTAAATGTGGTAGTCAAATACTGGCCACTGTGTCAGTCTTAGTTGTAGGAAGTGGAAA
CCTAAACCCCATTACTGGCACCGTAAGCAGTGCTCAGGTGTTTCTACGTTTTGATGCAAACGGTGTTCTTTT
AACAGAACATTCTACACTAAAAAAATACTGGGGGTATAGGCAGGGAGATAGCATAGATGGCACTCCATAT
ACCAATGCTGTAGGATTCATGCCCAATTTAAAAGCTTATCCAAAGTCACAAAGTTCTACTACTAAAAATAA
TATAGTAGGGCAAGTATACATGAATGGAGATGTTTCAAAACCTATGCTTCTCACTATAACCCTCAATGGTA
CTGATGACAGCAACAGTACATATTCAATGTCATTTTCATACACCTGGACTAATGGAAGCTATGTTGGAGCA
ACATTTGGGGCTAACTCTTATACCTTCTCATACATCGCCCAAGAATGAACACTGTATCCCACCCTGCATGCC
AACCCTTCCCACCCCACTCTGTGGAACAAACTCTGAAACACAAAATAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTG
ATTCAACAGTTTTACAGGATTCGAGCAGTTATTTTTCCTCCACCCTCCCAGGACATGGAATACACCACCCTC

[0567]

TCCCCCCGCACAGCCTTGAACATCTGAATGCCATTGGTGATGGACATGCTTTTGGTCTCCACGTTCCACACA
GTTTCAGAGCGAGCCAGTCTCGGGTCGGTCAGGGAGATGAAACCCTCCGGGCACTCCCGCATCTGCACCTC
ACAGCTCAACAGCTGAGGATTGTCCTCGGTGGTCGGGATCACGGTTATCTGGAAGAAGCAGAAGAGCGGC
GGTGGGAATCATAGTCCGCGAACGGGATCGGCCGGTGGTGTCGCATCAGGCCCCGCAGCAGTCGCTGCCG
CCGCCGCTCCGTCAAGCTGCTGCTCAGGGGGTCCGGGTCCAGGGACTCCCTCAGCATGATGCCCACGGCCC
TCAGCATCAGTCGTCTGGTGCGGCGGGCGCAGCAGCGCATGCGGATCTCGCTCAGGTCGCTGCAGTACGTG
CAACACAGAACCACCAGGTTGTTCAACAGTCCATAGTTCAACACGCTCCAGCCGAAACTCATCGCGGGAA
GGATGCTACCCACGTGGCCGTCGTACCAGATCCTCAGGTAAATCAAGTGGTGCCCCCTCCAGAACACGCTG
CCCACGTACATGATCTCCTTGGGCATGTGGCGGTTCACCACCTCCCGGTACCACATCACCCTCTGGTTGAAC
ATGCAGCCCCGGATGATCCTGCGGAACCACAGGGCCAGCACCGCCCCGCCCGCCATGCAGCGAAGAGACC
CCGGGTCCCGGCAATGGCAATGGAGGACCCACCGCTCGTACCCGTGGATCATCTGGGAGCTGAACAAGTCT
ATGTTGGCACAGCACAGGCATATGCTCATGCATCTCTTCAGCACTCTCAACTCCTCGGGGGTCAAAACCAT
ATCCCAGGGCACGGGGAACTCTTGCAGGACAGCGAACCCCGCAGAACAGGGCAATCCTCGCACAGAACTT
ACATTGTGCATGGACAGGGTATCGCAATCAGGCAGCACCGGGTGATCCTCCACCAGAGAAGCGCGGGTCT
CGGTCTCCTCACAGCGTGGTAAGGGGGCCGGCCGATACGGGTGATGGCGGGACGCGGCTGATCGTGTTCG
CGACCGTGTCATGATGCAGTTGCTTTCGGACATTTTCGTACTTGCTGTAGCAGAACCTGGTCCGGGCGCTGC
ACACCGATCGCCGGCGGCGGTCTCGGCGCTTGGAACGCTCGGTGTTGAAATTGTAAAACAGCCACTCTCTC
AGACCGTGCAGCAGATCTAGGGCCTCAGGAGTGATGAAGATCCCATCATGCCTGATGGCTCTGATCACATC
GACCACCGTGGAATGGGCCAGACCCAGCCAGATGATGCAATTTTGTTGGGTTTCGGTGACGGCGAGCCTCG
GGAACAACGATGAAGTAAATGCAAGCGGTGCGTTCCAGCATGGTTAGTTAGCTGATCTGTAGAAAAAACA
AAAATGAACATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCGTTCTCTCCAGCACCAGGCAGGC
CACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAAAAATTGTCGCTATGATTGAAAACCATCACAGAGAGACGTTCCC
GGTGGCCGGCGTGAATGATTCGACAAGATGAATACACCCCCGGAACATTGGCGTCCGCGAGTGAAAAAAA
GCGCCCGAGGAAGCAATAAGGCACTACAATGCTCAGTCTCAAGTCCAGCAAAGCGATGCCATGCGGATGA
AGCACAAAATTCTCAGGTGCGTACAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGATCC
CTCCAGGTACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCAGCAGCACACAACAGGCGCAAGAGT
CAGAGAAAGGCTGAGCTCTAACCTGTCCACCCGCTCTCTGCTCAATATATAGCCCAGATCTACACTGACGT
AAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAATAATCACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACA
CACTCAAAAAAATACGCGCACTTCCTCAAACGCCCAAAACTGCCGTCATTTCCGGGTTCCCACGCTACGTC
ATCAAAACACGACTTTCAAATTCCGTCGACCGTTAAAAACGTCACCCGCCCCGCCCCTAACGGTCGCCCGT
CTCTCAGCCAATCAGCGCCCCGCATCCCCAAATTCAAACACCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGT
TTGAGGTATATTATTGATGATG

[0568] **참고문헌**

1. Desrichard, A., Snyder, A. & Chan, T. A. Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3175

2. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348,** 69–74 (2015).

3. Gubin, M. M., Artyomov, M. N., Mardis, E. R. & Schreiber, R. D. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **125,** 3413–3421 (2015).

4. Rizvi, N. A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348,** 124–128 (2015).

5. Snyder, A. *et al.* Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371,** 2189–2199 (2014).

6. Carreno, B. M. *et al.* Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science* **348,** 803–808 (2015).

7. Tran, E. *et al.* Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **344,** 641–645 (2014).

8. Hacohen, N. & Wu, C. J.-Y. United States Patent Application: 20110293637 - COMPOSITIONS AND METHODS OF IDENTIFYING TUMOR SPECIFIC NEOANTIGENS. (A1). at <http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20110293637.PGNR.>

9. Lundegaard, C., Hoof, I., Lund, O. & Nielsen, M. State of the art and challenges in sequence based T-cell epitope prediction. *Immunome Res.* **6 Suppl 2,** S3 (2010).

10. Yadav, M. *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515,** 572–576 (2014).

11. Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J. & Mann, M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14,** 658–673 (2015).

12. Van Allen, E. M. *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* **350,** 207–211 (2015).

13. Yoshida, K. & Ogawa, S. Splicing factor mutations and cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5,** 445–459 (2014).

14. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511,** 543–550 (2014).

15. Rajasagi, M. *et al.* Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **124,** 453–462 (2014).

16. Downing, S. R. *et al.* United States Patent Application: 0120208706 - OPTIMIZATION OF MULTIGENE ANALYSIS OF TUMOR SAMPLES. (A1). at <http://appft1.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=20120208706.PGNR.>

17. Target Capture for NextGen Sequencing - IDT. at <http://www.idtdna.com/pages/products/nextgen/target-capture>

18. Shukla, S. A. *et al.* Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat. Biotechnol.* **33,** 1152–1158 (2015).

19. Cieslik, M. *et al.* The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing. *Genome Res.* **25,** 1372–1381 (2015).

[0569]

20. Bodini, M. *et al.* The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations. *Blood* **125,** 600–605 (2015).
21. Saunders, C. T. *et al.* Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **28,** 1811–1817 (2012).
22. Cibulskis, K. *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* **31,** 213–219 (2013).
23. Wilkerson, M. D. *et al.* Integrated RNA and DNA sequencing improves mutation detection in low purity tumors. *Nucleic Acids Res.* **42,** e107 (2014).
24. Mose, L. E., Wilkerson, M. D., Hayes, D. N., Perou, C. M. & Parker, J. S. ABRA: improved coding indel detection via assembly-based realignment. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30,** 2813–2815 (2014).
25. Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25,** 2865–2871 (2009).
26. Lam, H. Y. K. *et al.* Nucleotide-resolution analysis of structural variants using BreakSeq and a breakpoint library. *Nat. Biotechnol.* **28,** 47–55 (2010).
27. Frampton, G. M. *et al.* Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **31,** 1023–1031 (2013).
28. Boegel, S. *et al.* HLA typing from RNA-Seq sequence reads. *Genome Med.* **4,** 102 (2012).
29. Liu, C. *et al.* ATHLATES: accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing. *Nucleic Acids Res.* **41,** e142 (2013).
30. Mayor, N. P. *et al.* HLA Typing for the Next Generation. *PloS One* **10,** e0127153 (2015).
31. Roy, C. K., Olson, S., Graveley, B. R., Zamore, P. D. & Moore, M. J. Assessing long-distance RNA sequence connectivity via RNA-templated DNA-DNA ligation. *eLife* **4,** (2015).
32. Song, L. & Florea, L. CLASS: constrained transcript assembly of RNA-seq reads. *BMC Bioinformatics* **14 Suppl 5,** S14 (2013).
33. Maretty, L., Sibbesen, J. A. & Krogh, A. Bayesian transcriptome assembly. *Genome Biol.* **15,** 501 (2014).
34. Pertea, M. *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* **33,** 290–295 (2015).
35. Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C. & Pachter, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinforma. Oxf. Engl.* (2011). doi:10.1093/bioinformatics/btr355
36. Vitting-Seerup, K., Porse, B. T., Sandelin, A. & Waage, J. spliceR: an R package for classification of alternative splicing and prediction of coding potential from RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **15,** 81 (2014).
37. Rivas, M. A. *et al.* Human genomics. Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science* **348,** 666–669 (2015).
38. Skelly, D. A., Johansson, M., Madeoy, J., Wakefield, J. & Akey, J. M. A powerful and flexible statistical framework for testing hypotheses of allele-specific gene expression from RNA-seq data. *Genome Res.* **21,** 1728–1737 (2011).
39. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **31,** 166–169 (2015).
40. Furney, S. J. *et al.* SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* (2013). doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0330
41. Zhou, Q. *et al.* A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes. *Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2930

[0570]

42. Maguire, S. L. *et al.* SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *J. Pathol.* **235,** 571–580 (2015).

43. Carithers, L. J. *et al.* A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreservation Biobanking* **13,** 311–319 (2015).

44. Xu, G. *et al.* RNA CoMPASS: a dual approach for pathogen and host transcriptome analysis of RNA-seq datasets. *PloS One* **9,** e89445 (2014).

45. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinforma. Oxf. Engl.* (2015). doi:10.1093/bioinformatics/btv639

46. Jørgensen, K. W., Rasmussen, M., Buus, S. & Nielsen, M. NetMHCstab - predicting stability of peptide-MHC-I complexes; impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery. *Immunology* **141,** 18–26 (2014).

47. Larsen, M. V. *et al.* An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur. J. Immunol.* **35,** 2295–2303 (2005).

48. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. & Keşmir, C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics* **57,** 33–41 (2005).

49. Boisvert, F.-M. *et al.* A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **11,** M111.011429–M111.011429 (2012).

50. Duan, F. *et al.* Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J. Exp. Med.* **211,** 2231–2248 (2014).

51. Janeway's Immunobiology: 9780815345312: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com. at <http://www.amazon.com/Janeways-Immunobiology-Kenneth-Murphy/dp/0815345313>

52. Calis, J. J. A. *et al.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLoS Comput. Biol.* **9,** e1003266 (2013).

53. Zhang, J. *et al.* Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* **346,** 256–259 (2014)

54. Walter, M. J. *et al.* Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1090–1098 (2012).

55. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. Science 1992. 255: 1261-1263.

56. Zarling AL, Polefrone JM, Evans AM, Mikesh LM, Shabanowitz J, Lewis ST, Engelhard VH, Hunt DF. Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 3;103(40):14889-94.

57. Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. Mol Cell Proteomics. 2015 Mar;14(3):658-73. doi: 10.1074/mcp.M114.042812.

58. Abelin JG, Trantham PD, Penny SA, Patterson AM, Ward ST, Hildebrand WH, Cobbold M, Bai DL, Shabanowitz J, Hunt DF. Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry. Nat Protoc. 2015 Sep;10(9):1308-18. doi: 10.1038/nprot.2015.086. Epub 2015 Aug 6

59. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell. 1978 May;14(1):9-20.

60. Goldman JM, Hibbin J, Kearney L, Orchard K, Th'ng KH. HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells. Br J Haematol. 1982 Nov;52(3):411-20.

[0571]

61. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. Proteomics. 2013 Jan;13(1):22-4. doi: 10.1002/pmic.201200439. Epub 2012 Dec 4.

62. Eng JK, Hoopmann MR, Jahan TA, Egertson JD, Noble WS, MacCoss MJ. A deeper look into Comet--implementation and features. J Am Soc Mass Spectrom. 2015 Nov;26(11):1865-74. doi: 10.1007/s13361-015-1179-x. Epub 2015 Jun 27.

63. Lukas Käll, Jesse Canterbury, Jason Weston, William Stafford Noble and Michael J. MacCoss. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nature Methods 4:923 – 925, November 2007

64. Lukas Käll, John D. Storey, Michael J. MacCoss and William Stafford Noble. Assigning confidence measures to peptides identified by tandem mass spectrometry. Journal of Proteome Research, 7(1):29-34, January 2008

65. Lukas Käll, John D. Storey and William Stafford Noble. Nonparametric estimation of posterior error probabilities associated with peptides identified by tandem mass spectrometry. Bioinformatics, 24(16):i42-i48, August 2008

66. Kinney RM, BJ Johnson , VL Brown , DW Trent. Nucleotide Sequence of the 26 S mRNA of the Virulent Trinidad Donkey Strain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Deduced Sequence of the Encoded Structural Proteins. Virology 152 (2), 400-413. 1986 Jul 30.

67. Jill E Slansky, Frédérique M Rattis, Lisa F Boyd, Tarek Fahmy, Elizabeth M Jaffee, Jonathan P Schneck, David H Margulies, Drew M Pardoll. Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex. Immunity, Volume 13, Issue 4, 1 October 2000, Pages 529-538.

68. A Y Huang, P H Gulden, A S Woods, M C Thomas, C D Tong, W Wang, V H Engelhard, G Pasternack, R Cotter, D Hunt, D M Pardoll, and E M Jaffee. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. Proc Natl Acad Sci U S A.; 93(18): 9730–9735, 1996 Sep 3.

69. JOHNSON, BARBARA J. B., RICHARD M. KINNEY, CRYSTLE L. KOST AND DENNIS W. TRENT. Molecular Determinants of Alphavirus Neurovirulence: Nucleotide and Deduced Protein Sequence Changes during Attenuation of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. J Gen Virol 67:1951-1960, 1986.

70. Aarnoudse, C.A., Krüse, M., Konopitzky, R., Brouwenstijn, N., and Schrier, P.I. (2002). TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. Int J Cancer 99, 7–13.

71. Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H.M., Kubo, R.T., and Sette, A. (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. Immunity 1, 751–761.

72. Banu, N., Chia, A., Ho, Z.Z., Garcia, A.T., Paravasivam, K., Grotenbreg, G.M., Bertoletti, A., and Gehring, A.J. (2014). Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections. Scientific Reports 4, 4166.

73. Cornet, S., Miconnet, I., Menez, J., Lemonnier, F., and Kosmatopoulos, K. (2006). Optimal organization of a polypeptide-based candidate cancer vaccine composed of cryptic tumor peptides with enhanced immunogenicity. Vaccine 24, 2102–2109.

74. Depla, E., van der Aa, A., Livingston, B.D., Crimi, C., Allosery, K., de Brabandere, V., Krakover, J., Murthy, S., Huang, M., Power, S., et al. (2008). Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. Journal of Virology 82, 435–450.

75. Ishioka, G.Y., Fikes, J., Hermanson, G., Livingston, B., Crimi, C., Qin, M., del Guercio, M.F., Oseroff, C., Dahlberg, C., Alexander, J., et al. (1999). Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. J Immunol 162, 3915–3925.

[0572]

76. Janetzki, S., Price, L., Schroeder, H., Britten, C.M., Welters, M.J.P., and Hoos, A. (2015). Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. Nat Protoc 10, 1098–1115.

77. Lyons, G.E., Moore, T., Brasic, N., Li, M., Roszkowski, J.J., and Nishimura, M.I. (2006). Influence of human CD8 on antigen recognition by T-cell receptor-transduced cells. Cancer Res 66, 11455–11461.

78. Nagai, K., Ochi, T., Fujiwara, H., An, J., Shirakata, T., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., Melenhorst, J.J., Gostick, E., et al. (2012). Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity. Blood 119, 368–376.

79. Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. Eur J Immunol 19, 2237–2242.

80. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A., and Chesnut, R.W. (1991). Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. J Exp Med 173, 1007–1015.

81. Yachi, P.P., Ampudia, J., Zal, T., and Gascoigne, N.R.J. (2006). Altered peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction--a role for CD8 in distinguishing antigen quality. Immunity 25, 203–211.

82. Pushko P, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. Virology. 1997 Dec 22;239(2):389-401.

83. Strauss, JH and E G Strauss. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol Rev. 1994 Sep; 58(3): 491–562.

84. Rhême C, Ehrengruber MU, Grandgirard D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. Exp Physiol. 2005 Jan;90(1):45-52. Epub 2004 Nov 12.

85. Riley, Michael K. II, and Wilfred Vermerris. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. Nanomaterials 2017, 7(5), 94.

86. Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. RNA. 2001 Nov;7(11):1638-51.

87. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. Future Microbiol. 2009 Sep;4(7):837-56.

88. Bo Li and C. olin N. Dewey. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a referenfe genome. BMC Bioinformatics, 12:323, August 2011

89. Hillary Pearson, Tariq Daouda, Diana Paola Granados, Chantal Durette, Eric Bonneil, Mathieu Courcelles, Anja Rodenbrock, Jean-Philippe Laverdure, Caroline Côté, Sylvie Mader, Sébastien Lemieux, Pierre Thibault, and Claude Perreault. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. The Journal of Clinical Investigation, 2016,

90. Juliane Liepe, Fabio Marino, John Sidney, Anita Jeko, Daniel E. Bunting, Alessandro Sette, Peter M. Kloetzel, Michael P. H. Stumpf, Albert J. R. Heck, Michele Mishto. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. Science, 21, October 2016.

91. Mommen GP., Marino, F., Meiring HD., Poelen, MC., van Gaans-van den Brink, JA., Mohammed S., Heck AJ., and van Els CA. Sampling From the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) Ligandome Proceeds Via High Specificity. Mol Cell Proteomics 15(4): 1412-1423, April 2016.

92. Sebastian Kreiter, Mathias Vormehr, Niels van de Roemer, Mustafa Diken, Martin Löwer, Jan Diekmann, Sebastian Boegel, Barbara Schrörs, Fulvia Vascotto, John C. Castle, Arbel D. Tadmor, Stephen P. Schoenberger, Christoph Huber, Özlem Türeci, and Ugur

[0573]

Sahin. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to caner. Nature 520, 692-696, April 2015.

93. Tran E., Turcotte S., Gros A., Robbins P.F., Lu Y.C., Dudley M.E., Wunderlich J.R., Somerville R.P., Hogan K., Hinrichs C.S., Parkhurst M.R., Yang J.C., Rosenberg S.A. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science 344(6184) 641-645, May 2014.

94. Andreatta M., Karosiene E., Rasmussen M., Stryhn A., Buus S., Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. Immunogenetics 67(11-12) 641-650, November 2015.

95. Nielsen, M., Lund, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC Bioinformatics 10:296, September 2009.

96. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. BMC Bioinformatics 8:238, July 2007.

97. Zhang, J., et al. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. Molecular & Cellular Proteomics. 11(4):1-8. 1/2/2012.

98. Jensen, Kamilla Kjaergaard, et al. “Improved Methods for Prediting Peptide Binding Affinity to MHC Class II Molecules.” Immunology, 2018, doi:10.1111/imm.12889.

99. Carter, S.L., Cibulskis, K., Helman, E., McKenna, A., Shen, H., Zack, T., Laird, P.W., Onofrio, R.C., Winckler, W., Weir, B.A., et al. (2012). Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. Nat. Biotechnol. 30, 413–421

100. McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C.T., Rowan, A.J., Watkins, T.B.K., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Veeriah, S., Van Loo, P., Herrero, J., et al. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. Cell 171, 1259–1271.e11.

101. Shukla, S.A., Rooney, M.S., Rajasagi, M., Tiao, G., Dixon, P.M., Lawrence, M.S., Stevens, J., Lane, W.J., Dellagatta, J.L., Steelman, S., et al. (2015). Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. Nat. Biotechnol. 33, 1152–1158.

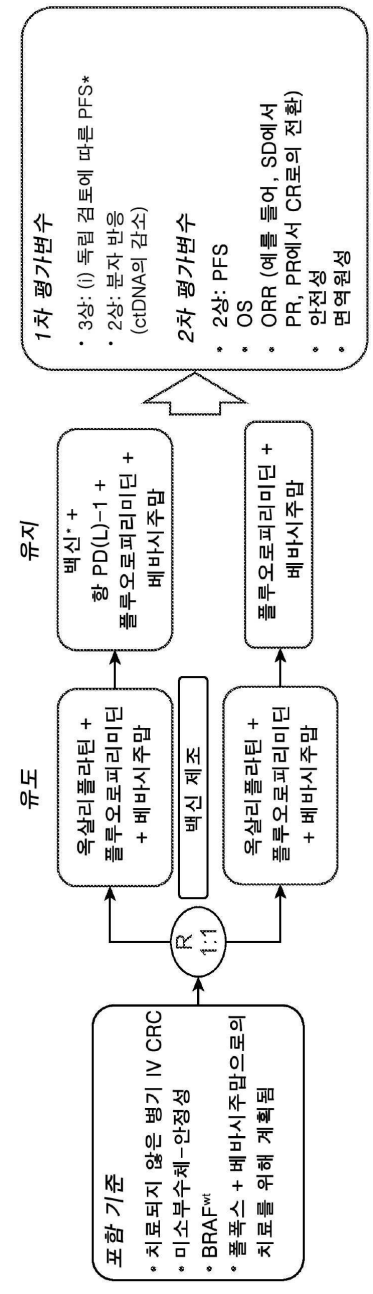
102. Van Loo, P., Nordgard, S.H., Lingjærde, O.C., Russnes, H.G., Rye, I.H., Sun, W., Weigman, V.J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 16910–16915.

103. Van Loo, P., Nordgard, S.H., Lingjærde, O.C., Russnes, H.G., Rye, I.H., Sun, W., Weigman, V.J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., et al. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 16910–16915.

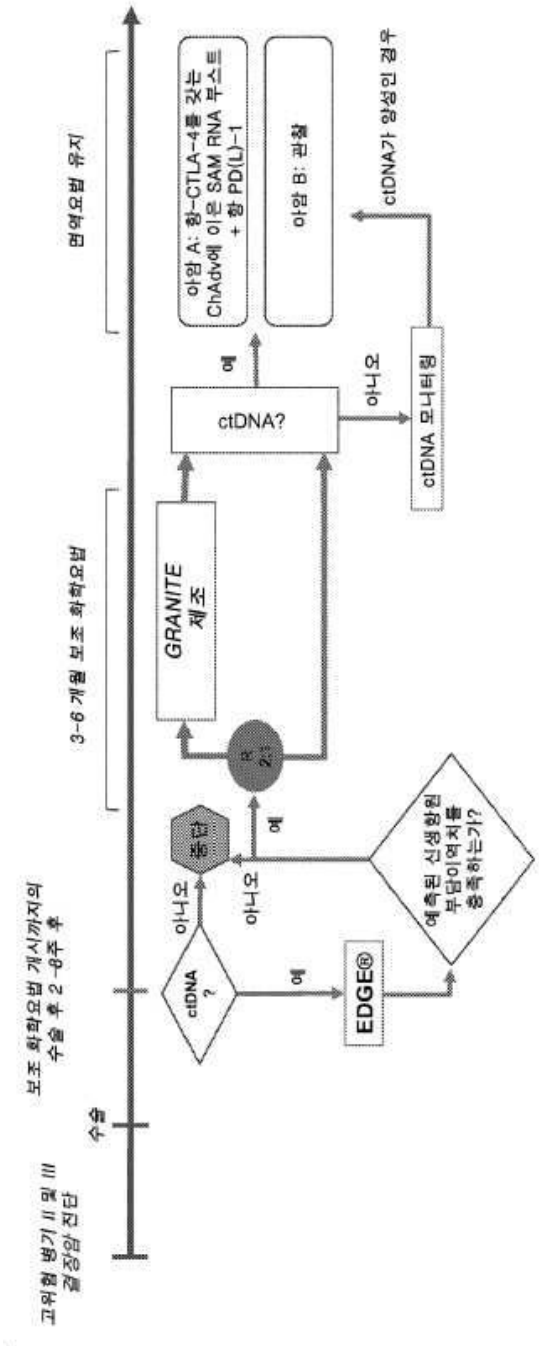
[0574]

도면

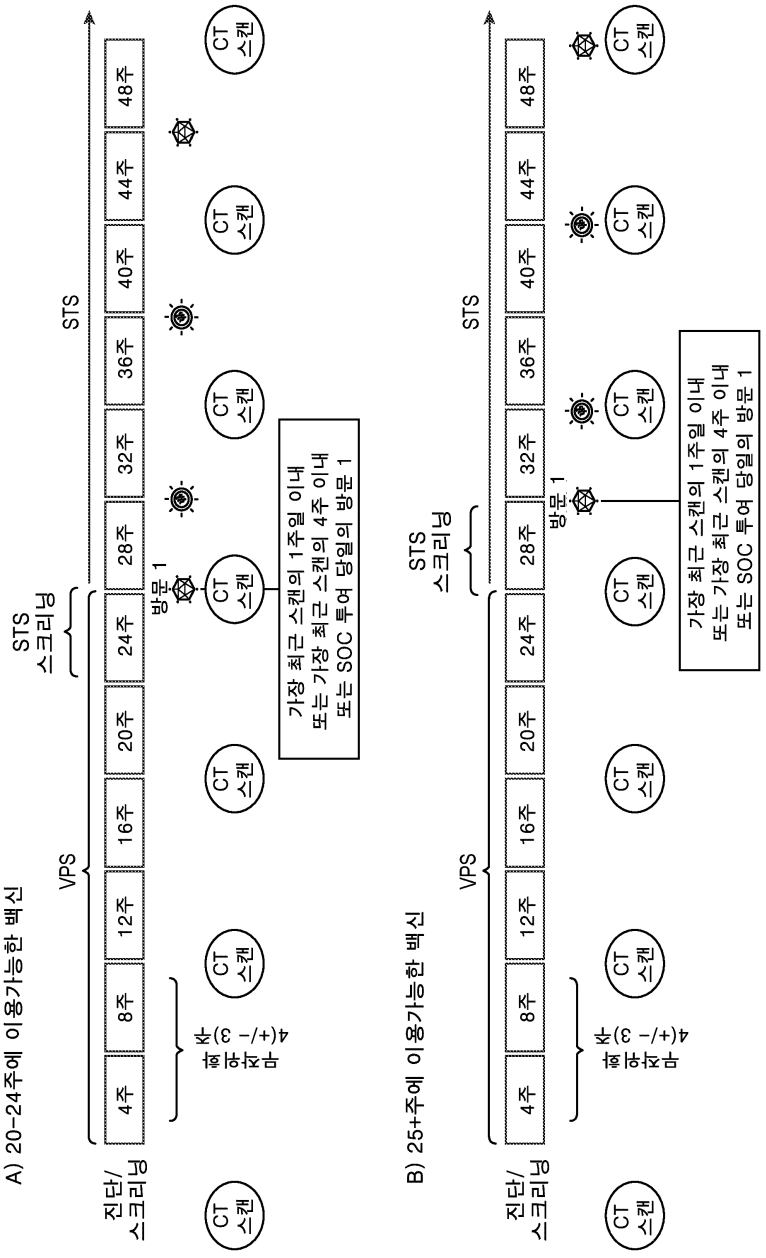
도면1


포함 기준
• 치료되지 않은 병기 IV CRC
• 미소부수체-안정성
• BRAFwt
• 폴폭스 + 베바시주맙으로의 치료를 위해 계획됨
R 1:1
유도
옥살리플라틴 + 플루오로피리미딘 + 베바시주맙
백신 제조
옥살리플라틴 + 플루오로피리미딘 + 베바시주맙
유지
백신* + 항 PD(L)-1 + 플루오로피리미딘 + 베바시주맙
플루오로피리미딘 + 베바시주맙
1차 평가변수
• 3상: (i) 독립 검토에 따른 PFS*
• 2상: 분자 반응 (ctDNA의 감소)
2차 평가변수
• 2상: PFS
• OS
• ORR (예를 들어, SD에서 PR, PR에서 CR로의 전환)
• 안전성
• 면역원성

도면2


고위험 병기 II 및 III
결장암 진단
수술
보조 화학요법 개시까지의
수술 후 2 -6주 후
3-6 개월 보조 화학요법
면역요법 유지
ctDNA ?
아니오
예
EDGE®
종단
아니오
예
예측된 신생항원
부담이력치를
충족하는가?
R
2:1
GRANITE
제조
ctDNA?
예
아암 A: 항-CTLA-4를 갖는
ChAdv에 이은 SAM RNA 부스트
+ 항 PD(L)-1
아암 B: 관찰
아니오
ctDNA 모니터링
ctDNA가 양성인 경우

도면3


A) 20-24주에 이용가능한 백신
진단/
스크리닝
VPS
STS
스크리닝
STS
4주
8주
12주
16주
20주
24주
28주
32주
36주
40주
44주
48주
무작위화
4(+/- 3)주
방문 1
CT
스캔
가장 최근 스캔의 1주일 이내
또는 가장 최근 스캔의 4주 이내
또는 SOC 투여 당일의 방문 1
B) 25+주에 이용가능한 백신
진단/
스크리닝
VPS
STS
스크리닝
STS
4주
8주
12주
16주
20주
24주
28주
32주
36주
40주
44주
48주
무작위화
4(+/- 3)주
방문 1
CT
스캔
가장 최근 스캔의 1주일 이내
또는 가장 최근 스캔의 4주 이내
또는 SOC 투여 당일의 방문 1

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.