(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0029673
(43) 공개일자 2023년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1037 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7045521
(22) 출원일자(국제) 2021년05월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/034131
(87) 국제공개번호 WO 2021/242793
국제공개일자 2021년12월02일
(30) 우선권주장
63/030,056 2020년05월26일 미국(US)

(71) 출원인
디오니스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 매사추세츠 01742 콩코드 피.오. 박스 667
(72) 발명자
프리츠, 에드워드, 에프.
미국 매사추세츠 01742 콩코드 미놋 로드 74
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

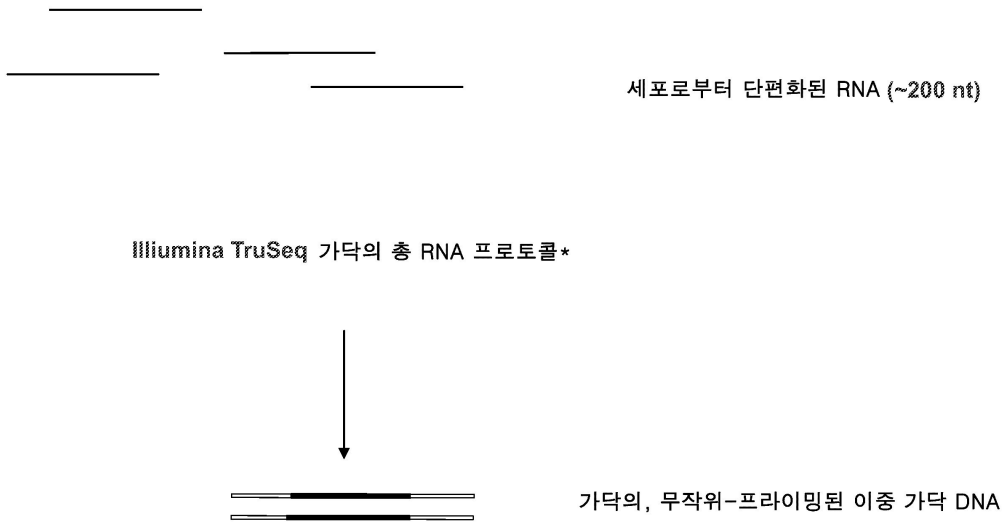
전체 청구항 수 : 총 140 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 인공 미니-프로테옴 라이브러리**

(57) 요 약

본원은 핵산 인공 미니-프로테옴 라이브러리, 및 이러한 라이브러리를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/1062 (2013.01)
C12N 15/1096 (2013.01)
C12N 15/81 (2013.01)
C40B 40/08 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서,

(a) RNA 전사물의 집단을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서:

RNA 전사물의 집단에서의 RNA 전사물 각각은 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 종양으로부터의 cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하며;

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고,

여기서 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(b) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(c) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

RNA 전사물의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서,

(a) RNA 전사물의 집단을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서:

RNA 전사물의 집단에서의 RNA 전사물 각각은 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열;

(iii) 종양으로부터의 cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및

(iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하며,

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고,

여기서 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(b) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에

공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(c) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 RNA 전사물의 집단이 다음에 의해 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합되는, 방법:

(a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 단계이되, 여기서:

스플린트 폴리뉴클레오티드 각각이 3'에서 5' 순서로,

(I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및

(II) 링커-표적 서열을 포함하고,

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각이 5'에서 3' 순서로,

(1) 링커-표적 서열에 상보적인 서열; 및

(2) 퓨로마이신 분자을 포함하며,

여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 상보적인 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 혼성화하는, 단계;

(b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서,

(i) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dT 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dA 서열이거나;

(ii) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dA 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dT 서열인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체가 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제함으로써 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 분리되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체에 대해 RT-PCR 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편 서열의 증폭된 DNA 카피를 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 증폭 산물을 클로닝 벡터에 삽입하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

RNA 발현 작제물의 라이브러리에 대해 전사 반응을 수행함으로써 단계 (a) 이전에 RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계를 추가로 포함하되, 여기서 각각의 RNA 발현 작제물이

(i) 전사 프로모터;

(ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(iii) cDNA 단편 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열; 및

(iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

각각의 RNA 발현 작제물이 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 cDNA 단편 서열의 라이브러리가 엑솜-함유 cDNA 단편에 대해 강화되는, 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 cDNA 단편 서열의 라이브러리가 미스매치-함유 cDNA 단편 서열에 대해 강화되는, 방법.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 번역 개시 부위가 샤인-달가노 서열을 포함하는, 방법.

청구항 13

종양으로부터의 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계;

(b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(c) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(d) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계;

(e) RNA 전사물의 집단을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(g) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

종양으로부터의 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계;

(b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(c) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; 및 (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(d) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열;

(iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및

(iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계:

(e) RNA 전사물의 집단을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에

공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(g) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 RNA 전사물의 집단이 다음에 의해 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합되는, 방법:

(a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 단계이되, 여기서:

스플린트 폴리뉴클레오티드 각각이 3'에서 5' 순서로,

(I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및

(II) 링커-표적 서열을 포함하고,

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각이 5'에서 3' 순서로,

(1) 링커-표적 서열에 상보적인 서열; 및

(2) 퓨로마이신 분자를 포함하며,

여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 상보적인 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 혼성화하는, 단계;

(b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서,

(i) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dT 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dA 서열이거나;

(ii) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dA 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dT 서열인, 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)가 cDNA 단편의 집단을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (b)가 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플로부터 세포성 RNA 단편의 집단을 제조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 샘플이 종양 샘플, 정상 조직 샘플, 질환의 조직 샘플, 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 샘플이 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 또는 종양 샘플인, 방법.

청구항 22

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편의 집단에서의 세포성 RNA 단편이 150 내지 250 nt의 길이인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편의 집단에서의 세포성 RNA 단편이 약 200 nt의 길이인, 방법.

청구항 25

제13항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 번역 개시 부위가 샤인-달가노 서열을 포함하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체가 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제함으로써 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 분리되는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리에 대해 RT-PCR 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 증폭 산물을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 증폭 산물을 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서,

상기 증폭 산물을 벡터에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 벡터가 클로닝 벡터인, 방법.

청구항 31

제29항에 있어서,

상기 벡터가 발현 벡터인, 방법.

청구항 32

제29항에 있어서,

상기 벡터가 백신-코딩 벡터인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 34

제32항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 효모에 삽입하고, 효모가 백신 코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 35

제32항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 36

제29항에 있어서,

상기 벡터를 포유동물 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 포유동물 세포가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서,

상기 포유동물 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 38

제29항에 있어서,

상기 벡터를 엑스 비보에서 인간 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체에 인간 세포를 전달하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 인간 세포가 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 일차 T 세포 또는 항원-제시 세포인, 방법.

청구항 40

제29항에 있어서,

대상체가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 대상체에 벡터를 전달하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 42

제26항의 방법에 따라 생성된 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리.

청구항 43

제27항 또는 제28항의 방법에 따라 생성된 증폭 산물.

청구항 44

제29항의 방법에 따라 생성된 벡터.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 벡터가 클로닝 벡터인, 벡터.

청구항 46

제44항에 있어서,

상기 벡터가 발현 벡터인, 벡터.

청구항 47

제44항에 있어서,

상기 벡터가 백신-코딩 벡터인, 벡터.

청구항 48

제43항의 증폭 산물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 49

제44항 내지 제47항 중 어느 한 항의 벡터 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 50

종양 백신을 생성하는 방법으로서,

(a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계;

(b) RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계;

(c) cDNA 단편을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지

코돈을 함유하는 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계:

(f) RNA 전사물을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(h) 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제하여, 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 생성하는 단계;

(i) 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리에 대해 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계; 및

(j) 단계 (i)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 51

종양 백신을 생성하는 방법으로서,

(a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계;

(b) 세포성 RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계;

(c) cDNA 단편을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; 및 (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열;

(iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및

(iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임

에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계;

(f) RNA 전사물을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(h) 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제하여, 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 생성하는 단계;

(i) 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리에 대해 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계; 및

(j) 단계 (i)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서,

상기 RNA 전사물의 집단이 다음에 의해 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합되는, 방법:

(a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 단계이되, 여기서:

스플린트 폴리뉴클레오티드 각각이 3'에서 5' 순서로,

(I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및

(II) 링커-표적 서열을 포함하고,

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각이 5'에서 3' 순서로,

(1) 링커-표적 서열에 상보적인 서열; 및

(2) 퓨로마이신 분자를 포함하며,

여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 상보적인 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 혼성화하는, 단계;

(b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계.

청구항 53

제52항에 있어서,

(i) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dT 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dA 서열이거나;

(ii) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dA 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dT 서열인, 방법.

청구항 54

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 샘플이 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플인, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서,

상기 샘플이 파라핀 포매된 (FFPE) 종양 샘플인, 방법.

청구항 56

제50항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체로부터 종양 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 57

제50항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편이 150 내지 250 nt의 길이인, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편이 약 200 nt의 길이인, 방법.

청구항 59

제50항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 번역 개시 부위가 샤인-달가노 서열을 포함하는, 방법.

청구항 60

제50항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (j) 이전에 상기 증폭 산물을 백신-코딩 벡터에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 백신-코딩 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서,

단계 (j)가 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 62

제60항에 있어서,

단계 (j)가 백신-코딩 벡터를 효모에 삽입하고, 효모가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

제60항에 있어서,

단계 (j)가 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 포함하는, 방법

청구항 64

제60항에 있어서,

단계 (j)가 백신-코딩 벡터를 포유동물 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 포유동물 세포가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서,

상기 포유동물 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 66

제50항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체에 종양 백신을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 67

제60항에 있어서,

단계 (j)가 백신-코딩 벡터를 인간 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체에 인간 세포를 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서,

상기 인간 세포가 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 항원-제시 세포인, 방법.

청구항 69

제60항에 있어서,

단계 (j)가 대상체가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 대상체에 백신-코딩 벡터를 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 70

제66항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 71

종양을 치료하는 방법으로서,

종양의 치료를 필요로 하는 대상체에 제50항 내지 제65항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 종양 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 72

약물 표적을 식별하는 방법으로서,

제29항에 따라 생성된 벡터를 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 선택가능한 표현형을 야기하는 프레임-내 코딩 영역 단편을 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서,

상기 벡터가 생체 외 또는 생체 내에서 세포에 형질주입 또는 형질도입되는, 방법.

청구항 74

제72항 또는 제73항에 있어서,

상기 프레임-내 코딩 영역 단편이 선택가능한 표현형을 갖는 세포에서 강화 또는 고갈되는, 방법.

청구항 75

제72항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프레임-내 코딩 영역 단편이 세포내 경로를 긍정적으로 또는 부정적으로 변경하는, 방법.

청구항 76

제72항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포가 정상 세포이고, 선별가능한 표현형이 질환 표현형인, 방법.

청구항 77

세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계;

(b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(c) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계;

(d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계:

(f) RNA 전사물을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고, RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계;

(g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(h) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계;

(b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계;

(c) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계;

(d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; 및 (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계;

(e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로,

(i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열;

(iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및

(iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계;

(f) RNA 전사물을 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합시키는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각은 3' 퓨로마이신 분자를 포함하고 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 접합되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는, 단계;

(g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및

(h) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서,

상기 RNA 전사물의 집단이 다음에 의해 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드에 접합되는, 방법:

(a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드와 접촉시키는 단계이되, 여기서:

스플린트 폴리뉴클레오티드 각각이 3'에서 5' 순서로,

(I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및

(II) 링커-표적 서열을 포함하고,

퓨로마이신-태깅된 링커 폴리뉴클레오티드 각각이 5'에서 3' 순서로,

(1) 링커-표적 서열에 상보적인 서열; 및

(2) 퓨로마이신 분자를 포함하며,

여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 상보적인 서열이 스플린트 폴리뉴클레오티드의 링커-표적 서열에 혼성화하는, 단계;

(b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계.

청구항 80

제79항에 있어서,

(i) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dT 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dA 서열이거나;

(ii) 상기 스플린트-표적 서열이 폴리-dA 서열이고, 스플린트-표적 서열에 상보적인 서열이 폴리-dT 서열인, 방법.

청구항 81

세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계;

(b) cDNA 단편의 집단을 클로닝 벡터에 삽입하여, DNA 작제물의 라이브러리를 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로,

(i) 프로모터;

(ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열;

(iv) cDNA 단편의 집단으로부터의 하나의 cDNA 단편; 및

(v) 막-제시 단백질-코딩 서열을 포함하는, 단계,

(c) DNA 작제물의 라이브러리를 세포에 형질전환시키는 단계,

(d) 세포가 DNA 작제물을 발현하도록 하는 조건 하에서 세포를 항온처리하는 단계;

(e) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드, cDNA 단편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및 막-제시 단백질을 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 친화도 정제하는 단계;

(f) PCR 증폭에 의해 정제된 세포로부터 프레임-내 cDNA 단편 서열을 회수함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서,

상기 세포가 박테리아인, 방법.

청구항 83

제81항 또는 제82항에 있어서,

상기 세포에서의 DNA 작제물의 발현이 유도성인, 방법.

청구항 84

제81항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 막-제시 단백질-코딩 서열이 AIDA를 코딩하는, 방법.

청구항 85

제81항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 (a)가 cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편 의 라이브러리를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 86

제81항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 (a)가 cDNA 단편의 집단을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 87

제85항에 있어서,

상기 단계 (a)가 엑솜-코딩 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-코딩 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 88

제81항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 증폭 산물을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 증폭 산물을 강화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 89

제81항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플로부터 세포성 RNA 단편의 집단을 제조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서,

상기 샘플이 종양 샘플, 정상 조직 샘플, 질환의 조직 샘플, 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플인, 방법.

청구항 91

제90항에 있어서,

상기 샘플이 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 또는 종양 샘플인, 방법.

청구항 92

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 93

제81항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편의 집단에서의 세포성 RNA 단편이 150 내지 250 nt 길이인, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편의 집단에서의 세포성 RNA 단편이 약 200 nt 길이인, 방법.

청구항 95

제81항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 번역 개시 부위가 샤인-달가노 서열을 포함하는, 방법.

청구항 96

제81항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 증폭 산물을 벡터에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 97

제96항에 있어서,

상기 벡터가 클로닝 벡터인, 방법.

청구항 98

제96항에 있어서,

상기 벡터가 발현 벡터인, 방법.

청구항 99

제96항에 있어서,

상기 벡터가 백신-코딩 벡터인, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 101

제99항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 효모에 삽입하고, 효모가 백신 코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 102

제99항에 있어서,

상기 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 103

제96항에 있어서,

상기 벡터를 포유동물 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 포유동물 세포가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 104

제103항에 있어서,

상기 포유동물 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 105

제96항에 있어서,

상기 벡터를 엑스 비보에서 인간 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체에 인간 세포를 전달하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 106

제105항에 있어서,

상기 인간 세포가 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 일차 T 세포 또는 항원-제시 세포인, 방법.

청구항 107

제96항에 있어서,

대상체가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 대상체에 벡터를 전달하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 108

제105항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 109

제81항 내지 제95항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 증폭 산물.

청구항 110

제96항의 방법에 따라 생성된 벡터.

청구항 111

제110항에 있어서,

상기 벡터가 클로닝 벡터인, 벡터.

청구항 112

제110항에 있어서,

상기 벡터가 발현 벡터인, 벡터.

청구항 113

제110항에 있어서,

상기 벡터가 백신-코딩 벡터인, 벡터.

청구항 114

제109항의 증폭 산물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 115

제110항 내지 제113항 중 어느 한 항의 벡터 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 116

종양 백신을 생성하는 방법으로서,

(a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계;

(b) RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계;

(c) cDNA 단편의 집단을 클로닝 벡터에 삽입하여, DNA 작제물의 라이브러리를 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로,

(i) 프로모터;

(ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위;

(iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열;

(iv) cDNA 단편의 집단으로부터의 하나의 cDNA 단편; 및

(v) 막-제시 단백질-코딩 서열을 포함하는, 단계,

(d) DNA 작제물의 라이브러리를 세포에 형질전환시키는 단계,

(e) 세포가 DNA 작제물을 발현하도록 하는 조건 하에서 세포를 항온처리하는 단계;

(f) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드, cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드 및 막-제시 단백질을 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 친화도 정제하는 단계;

(g) PCR 증폭에 의해 정제된 세포로부터 프레임-내 cDNA 단편 서열을 회수하는 단계,

(h) 단계 (g)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 117

제116항에 있어서,

상기 종양 샘플이 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플인, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서,

상기 샘플이 파라핀 포매된 (FFPE) 종양 샘플인, 방법.

청구항 119

제116항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체로부터 종양 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 120

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편이 150 내지 250 nt의 길이인, 방법.

청구항 121

제120항에 있어서,

상기 세포성 RNA 단편이 약 200 nt의 길이인, 방법.

청구항 122

제116항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 번역 개시 부위가 샤인-달가노 서열을 포함하는, 방법.

청구항 123

제116항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (h) 이전에 상기 증폭 산물을 백신-코딩 벡터에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 백신-코딩 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 124

제123항에 있어서,

단계 (h)가 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 125

제123항에 있어서,

단계 (h)가 백신-코딩 벡터를 효모에 삽입하고, 효모가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 126

제123항에 있어서,

단계 (h)가 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 127

제123항에 있어서,

단계 (h)가 백신-코딩 벡터를 포유동물 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 포유동물 세포가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 128

제127항에 있어서,

상기 포유동물 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 129

제116항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체에 종양 백신을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 130

제123항에 있어서,

단계 (h)가 백신-코딩 벡터를 인간 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체에 인간 세포를 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 131

제130항에 있어서,

상기 인간 세포가 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 항원-제시 세포인, 방법.

청구항 132

제123항에 있어서,

단계 (h)가 대상체에 백신-코딩 벡터를 전달하여, 대상체가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 133

제129항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 134

종양을 치료하는 방법으로서,

종양의 치료를 필요로 하는 대상체에 제116항 내지 제128항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 종양 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 135

약물 표적을 식별하는 방법으로서,

제96항에 따라 생성된 벡터를 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 선택가능한 표현형을 야기하는 프레임-내 코딩 영역 단편을 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 136

제135항에 있어서,

상기 벡터가 생체 외 또는 생체 내에서 세포로 형질주입 또는 형질도입되는, 방법.

청구항 137

제135항 또는 제136항에 있어서,

상기 프레임-내 코딩 영역 단편이 선택가능한 표현형을 갖는 세포에서 강화 또는 고갈되는 것인, 방법.

청구항 138

제135항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프레임-내 코딩 영역 단편이 세포내 경로를 긍정적으로 또는 부정적으로 변경하는, 방법.

청구항 139

제135항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포가 정상 세포이고, 선별가능한 표현형이 질환 표현형인, 방법.

청구항 140

제1항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열이 18 개 이상의 뉴클레오티드 길이인, 방법, 라이브러리, 증폭 산물, 벡터 또는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련된 출원

[0002] 본 출원은 2020 년 5 월 26 일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 63/030,056에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 원용된다.

배 경 기 술

[0003] 오픈 리딩 프레임을 코딩하는 서열이 강화된 핵산 인공 미니-프로테옴 라이브러리의 가용성은 많은 상이한 잠재적 적용을 가질 것이다. 예를 들어, 이러한 라이브러리는 백신, 특히 암 백신의 생산에 가치가 있을 것이다.

[0004] 백신은 암의 치료에 오랜 역사를 가지고 있다. 암 백신은 전형적으로 종양 세포를 인식하고 용해하는 항원-특이적 세포독성 T 세포 (CTL)를 활성화하기 위해 함께 작용하는 종양 항원 및 면역자극 분자 (예컨대, 사이토카인 또는 TLR 리간드)로 구성된다. 이러한 백신은 종종 공유된 또는 환자-특이적 종양 항원 또는 전체 종양 세포 제제를 함유한다. 공유된 종양 항원은 많은 개체에 걸쳐 종양에서 선택적으로 발현되는 면역원성 단백질이며, 일반적으로 합성 펩티드, 재조합 단백질, RNA 또는 DNA 벡터로서 환자에 전달된다. 백신에 사용된 환자-특이적 종양 항원은 변경된 아미노산 서열을 초래하는 종양-특이적 돌연변이를 갖는 단백질로 이루어진다. 이러한 돌연변이된 단백질은 다음에 대한 잠재력을 가지고 있다: (a) 면역계에 의한 인식 및 파괴를 위해 (비-종양 세포에 비해) 종양을 고유하게 표시함; 및 (b) 중추 및 때때로 말초 T 세포 내성을 피하고, 따라서 보다 효과적이고 높은 결합활성 T 세포 수용체에 의해 인식됨. 전체 종양 세포 제제는 종양 세포의 모든 잠재적 항원을 함유하며, 자가유래 방사선조사된 세포, 세포 용해물, 세포 융합체, 열-충격 단백질 제제 또는 전체 mRNA (또는 전체 mRNA에 상응하는 cDNA/DNA 벡터)로서 환자에 전달될 수 있다. 전체 종양 세포가 자가유래 환자로부터 단리될 때, 세포는 공유된 종양 항원뿐만 아니라 환자-특이적 종양 항원을 발현한다.

[0005] 세포로부터의 전체 mRNA는 전체 세포 프로테옴에 기반하여 암 백신을 제조하는 데 사용되었다. 그러나, 이러한 mRNA 샘플은 특히 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플로부터 수득되는 경우 종종 단편화될 수 있다. 암 백신으로서 종양 세포로부터 단편화된 mRNA를 사용하는 문제는 대부분의 RNA 단편이 효과적인 번역을 위한 적절한 리딩 프레임에 있지 않을 것이라는 점이다. 따라서, 암 백신을 생산하는 데 유용한 오픈 리딩 프레임 단편이 강화된 개선된 핵산 미니-프로테옴 라이브러리에 대한 필요성이 남아있다. 특히, 각각의 개체의 프로테옴의 조성에 기반하여 개인용 백신의 제조를 위한 개선된 핵산 미니-프로테옴 라이브러리의 제조에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

[0006] **요약**

[0007] 본원은 세포의 단편화된 RNA로부터 프레임-내 코딩 영역을 함유하는 서열이 강화된 핵산 라이브러리의 제조와 관련된 조성물 및 방법을 제공한다. 이러한 라이브러리는 라이브러리의 핵산이 미니-프로테옴을 발현하기 위해 적합한 숙주 세포에 전달될 수 있도록 세포의 미니-프로테옴을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 미니-프로테옴 핵산 라이브러리는 종양 백신 및/또는 종양 백신, 특히 개체의 종양 RNA로부터 제조된 개인용 종양 백신의 제조에 유용하다.

[0008] 특정 양태에서, 본원은 RNA 전사물의 집단 또는 (예를 들어, 종양으로부터의) 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 종양 백신을 생성하는 방법, 또는 생성된 종양 백신을 사용하여 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 본 개시내용은 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리, 강화된 프레임-내 코딩 단편 서열을 포함하는 증폭 산물 및 벡터, 종양 백신, 및 이의 약학 조성물에 관한 것이다.

[0009] 특정 양태에서, 본원은 RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단에서의 각각의 RNA 전사물은 5'에서 3' 순서로 (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) (예를 들어, 종양으로부터의) cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (b) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및 (c) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계.

[0010] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서

로 (I) 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로: (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0011] 특정 양태에서, 본원은 RNA 전사물의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 라이브러리의 각각의 RNA 전사물은 5'에서 3' 순서로 (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iii) (예를 들어, 종양으로부터의) cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및 (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (b) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리퓁티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리퓁티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및 (c) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리퓁티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계.

[0012] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로 (I) 어댑터 서열에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로 (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리퓁티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 어댑터 서열에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 RNA 발현 작제물의 라이브러리에 대해 전사 반응을 수행함으로써 단계 (a) 이전에 RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 각각의 RNA 발현 작제물은 다음을 포함한다: (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) cDNA 단편 서열 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열; 및 (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리퓁티드 코딩 뉴클레오티드 서열. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 각각의 RNA 발현 작제물은 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, cDNA 단편 서열의 라이브러리는 엑솜-함유 cDNA 단편에 대해 강화된다. 일부 실시양태에서, cDNA 단편 서열의 라이브러리는 미스매치-함유 cDNA 단편 서열에 대해 강화된다.

[0015] 특정 양태에서, 본원은 (예를 들어, 종양으로부터의) 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계; (b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의

임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계; (d) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로, (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계; (e) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및 (g) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0017] 특정 양태에서, 본원은 (예를 들어, 종양으로부터의) 세포성 RNA 단편의 집단으로부터의 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계; (b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; 및 (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고, 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계; (d) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로, (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및 (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계; (e) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클

레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및 (g) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 어댑터 서열에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 어댑터 서열에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법의 단계 (b)는 cDNA 단편의 집단을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법의 단계 (b)는 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 샘플로부터 세포성 RNA 단편의 집단을 제조하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 샘플, 정상 조직 샘플, 질환의 조직 샘플, 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플이다. 특정 실시양태에서, 샘플은 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 또는 종양 샘플이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임 내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 대상체 (예를 들어, 암 환자)로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포성 RNA 단편의 집단의 세포성 RNA 단편은 150 내지 250 nt 길이 (예를 들어, 약 200 nt 길이)이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제함으로써 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 분리된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 정제된 단백질-연결된 RNA 복합체에 대해 RT-PCR 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편 서열의 증폭된 DNA 카피를 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 증폭 산물을 벡터 (예를 들어, 클로닝 벡터, 발현 벡터 또는 백신-코딩 벡터)에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 증폭 산물을 MutS 단백질과 접촉시킴으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 증폭 산물을 강화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 백신-코딩 벡터를 효모에 추가로 포함하고, 효모가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 벡터를 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)에 형질주입 또는 형질도입하고, 포유동물 세포가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 벡터를 엑스 비보에서 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체 (예를 들어, 인간, 바람직하게는 암 환자)에 포유동물 세포를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)는 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 일차 T 세포 또는 항원-제시 세포이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 대상체가 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 대상

체 (예를 들어, 인간, 바람직하게는 암 환자)에 벡터를 전달하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 제공한다.

[0024] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 증폭 산물을 제공한다.

[0025] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 벡터 (예를 들어, 클로닝 벡터, 발현 벡터 또는 백신-코딩 벡터)를 제공한다.

[0026] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 증폭 산물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 벡터 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 특정 양태에서, 본원은 다음을 포함하는, 종양 백신을 생성하는 방법을 제공한다: (a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계; (b) RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계; (c) cDNA 단편을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; (d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계; (e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로, (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계: (f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; (h) 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제하여, 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 생성하는 단계; (i) 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리에 대해 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계; 및 (j) 단계 (i)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0029] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0030] 특정 양태에서, 본원은 다음을 포함하는, 종양 백신을 생성하는 방법을 제공한다: (a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계; (b) 세포성 RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭

반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계; (c) cDNA 단편을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; (d) (i) 전사 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터의 엑솜-강화된 cDNA 단편 중 하나; 및 (v) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 발현 작제물을 생성하는 단계; (e) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, 각각이 5'에서 3' 순서로, (i) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (ii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열; (iii) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및 (iv) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하지 않고 각각의 다른 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함하는, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계; (f) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 RNA 전사물의 3' 단부는 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 접합되는, 단계; (g) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-내에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임 내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; (h) 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제하여, 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 생성하는 단계; (i) 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리에 대해 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계; 및 (j) 단계 (i)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0031] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 어댑터 서열에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 어댑터 서열에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0032] 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 샘플, 정상 조직 샘플, 질환의 조직 샘플, 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플이다. 특정 실시양태에서, 샘플은 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 또는 종양 샘플이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 종양 백신을 생성하는 방법은 대상체 (예를 들어, 암 환자)로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포성 RNA 단편의 집단의 세포성 RNA 단편은 150 내지 250 nt 길이 (예를 들어, 약 200 nt 길이)이다.

[0033] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 종양 백신을 생성하는 방법은 단계 (j) 이전에 증폭 산물을 백신-코딩 벡터에 삽입하여, cDNA 단편의 서열을 포함하는 백신-코딩 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 백신-코딩 벡터를 박테리아에 삽입하고, 박테리아가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 박테리아를 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 백신-코딩 벡터를 효모에 삽입하고, 효모가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 효모를 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0036] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 백신-코딩 벡터를 생체 외 번역 반응에 적용하여, 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 생성하는 단계를 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 백신-코딩 벡터를 포유동물 세포 (예를 들어, 인간 세포)에 삽입하고, 포유동물 세포가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 하는 조건 하에서 포유동물 세포를 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 대상체가 백신-코딩 벡터에 의해 코딩된 백신을 발현하도록 대상체 (예를 들어, 인간 및 바람직하게는 암 환자)에 백신-코딩 벡터를 전달하는 단계를 포함한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 종양 백신을 생성하는 방법의 단계 (j)는 백신-코딩 벡터를 엑스 비보에서 인간 세포에 형질주입 또는 형질도입하고, 대상체에 인간 세포를 전달하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 세포는 동일한 대상체 또는 상이한 대상체로부터 단리된 일차 T 세포 또는 항원-제시 세포이다.

[0040] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 종양 백신을 생성하는 방법은 대상체 (예를 들어, 인간 및 바람직하게는 암 환자)에 종양 백신 또는 종양 백신을 함유하는 세포를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0041] 특정 양태에서, 본원은 종양을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 종양의 치료를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간 및 바람직하게는 암 환자)에 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 종양 백신을 투여하는 단계를 포함한다.

[0042] 특정 양태에서, 본원은 세포에 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 벡터를 형질주입 또는 형질도입하고, 선택가능한 표현형을 야기하는 프레임-내 코딩 영역 단편을 식별하는 단계를 포함하는, 약물 표적을 식별하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 생체 외 또는 생체 내에서 세포에 형질주입 또는 형질도입된다. 특정 실시양태에서, 프레임-내 코딩 영역 단편은 선택가능한 표현형을 갖는 세포에서 강화 또는 고갈된다. 특정 실시양태에서, 프레임-내 코딩 영역 단편은 세포내 경로를 긍정적으로 또는 부정적으로 변경한다. 특정 실시양태에서, 세포는 정상 세포이고, 선별가능한 표현형은 질환 표현형이다.

[0043] 특정 양태에서, 본원은 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계; (b) cDNA 단편의 집단을 클로닝 벡터에 삽입하여, DNA 작제물의 라이브러리를 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, (i) 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) cDNA 단편의 집단으로부터의 하나의 cDNA 단편; 및 (v) 막-제시 단백질-코딩 서열을 포함하는, 단계, (c) DNA 작제물의 라이브러리를 세포에 형질전환시키는 단계, (d) 세포가 DNA 작제물을 발현하도록 하는 조건 하에서 세포를 항온처리하는 단계; (e) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드, cDNA 단편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및 막-제시 단백질을 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 정제하는 (예를 들어, 세포를 친화도 정제하는) 단계; (f) (예를 들어, PCR 증폭에 의해) 정제된 세포로부터 프레임-내 cDNA 단편 서열을 회수함으로써, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계.

[0044] 특정 양태에서, 본원은 다음을 포함하는, 종양 백신을 생성하는 방법을 제공한다: (a) 대상체의 종양 샘플로부터 세포성 RNA 단편을 생성하는 단계; (b) RNA 단편에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편을 생성하는 단계; (c) cDNA 단편의 집단을 클로닝 벡터에 삽입하여, DNA 작제물의 라이브러리를 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, (i) 프로모터; (ii) 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따르는 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에 의해 코딩되고 해당 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) cDNA 단편의 집단으로부터의 하나의 cDNA 단편; 및 (v) 막-제시 단백질-코딩 서열을 포함하는, 단계, (d) DNA 작제물의 라이브러리를 세포에 형질전환시키는 단계, (e) 세포가 DNA 작제물을 발현하도록 하는 조건 하에서 세포를 항온처리하는 단계; (f) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드, cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드 및 막-제시 단백질을 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 정제하는 (예를 들어, 친화도 정제하는) 단계; (g) (예를 들어, PCR 증폭에 의해) 정제된 세포로부터 프레임-내 cDNA 단편 서열을 회수하는 단계, (h) 단계 (g)의 증폭 산물 중 하나 이상으로부터 종양 백신을 생성하는 단계.

도면의 간단한 설명

[0045] **도 1**은 가닥의 이중-가닥 (ds) cDNA의 합성을 도시하는 개략도이다. 원하는 경우, 안티-센스 RNA로부터의 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 포획하기 위해, 동일한 라이브러리를 사용할 수 있지만, 반대 센스 엑솜 포획 믹스가 필요하고 후속 단계에 대한 프라이머의 가닥 특이성이 역전된다.

도 2는 MutS 강화 (임의적) 및 엑솜 포획을 도시하는 개략도이다.

도 3은 디스플레이용 RNA의 제조를 도시하는 개략도이다. 작은 단백질 코딩 서열은 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 단편 서열의 5' 업스트림 또는 3' 다운스트림 영역에 첨가될 수 있다.

도 4는 RNA 디스플레이를 도시하는 개략도이다.

도 5는 폴리펩티드-연결된 RNA (AMPL-NA 라이브러리 단편)의 포획 및 회수를 도시하는 개략도이다.

도 6은 막 표면 디스플레이를 위한 예시적인 클로닝 공정을 도시하는 개략도이다.

도 7은 본원에 개시된 특정 예시적인 실시양태에 따른 프레임-내 라이브러리 구성원의 형질전환, 성장 및 표면 제시를 도시하는 개략도이다.

도 8은 본원에 개시된 특정 예시적인 실시양태에 따른 프레임-내 라이브러리의 친화도 강화 및 DNA 회수를 도시하는 개략도이다.

도 9는 예시적인 엑솜 포획 전사 라이브러리의 구조를 도시하는 개략도이다. RBS는 대장균 리보솜 결합 부위이고, ATG는 단백질 번역을 위한 개시 코돈이고, 판독물1 및 판독물2는 Illumina TruSeq 서열이고, Twin-Strep-태그는 결합 정제에 사용된 28-개의 아미노산 펩티드에 대한 코딩 서열이며, 펩티드는 펩티드 스페이서 세그먼트에 대한 코딩 서열이다.

도 10은 엑솜 포획 후 ("RNA 디스플레이 전") 및 RNA 디스플레이 후 ("RNA 디스플레이 후") 작제물에 대한 표적 리딩 프레임에서 온전한 ORF와 전장 삽입물을 비교한 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] ***일반적인***

[0047] 특정 양태에서, 본원은 RNA 전사물의 집단 또는 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본원은 종양 백신을 생성하는 방법, 또는 생성된 종양 백신을 사용하여 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 본 개시내용은 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리, 강화된 프레임-내 코딩 단편 서열을 포함하는 증폭 산물 및 벡터, 종양 백신, 및 이의 약학 조성물에 관한 것이다.

[0048] 특정 양태에서, 본 개시내용은 세포의 미니-프로테옴 (미니-프로테옴은 본원에서 세포의 발현된 RNA 코딩 잠재력을 나타내는 ~70 개의 아미노산 세그먼트의 수집물로서 정의됨)을 나타내는 적절한 프레임 내 코딩 영역을 함유하는 세포의 단편화된 RNA로부터 핵산 라이브러리를 제조하여, 핵산이 미니-프로테옴을 발현하기 위해 적합한 숙주 세포에 전달될 수 있도록 하는 방법에 관한 것이다.

[0049] 이러한 라이브러리의 제조와 연관된 많은 어려움이 있었다. 이러한 라이브러리를 제조하는 데 있어서의 어려움은 (a) 외인성 번역 개시 부위가 필요하기 때문에 무작위로 단편화된 RNA가 천연 단백질을 코딩하는 자연 리딩 프레임에서 번역될 것을 제어할 방법이 없으며 (b) 이것이 빠르게 종결되지 않는 리딩 프레임에서 단편화된 RNA를 빠져나갈 것이고 따라서 적합한 숙주 세포에 일단 삽입되면 넌센스-매개된 붕괴에 의해 빠르게 분해될 것을 제어할 방법이 없다는 것이다. 따라서, 본원에 제공된 해결책이 없으면 거의 90%의 라이브러리 구성원이 비-표현적일 것이거나, 기능적이지 않을 것이다.

[0050] 본 개시내용에 의해 제공된 방법은 프레임 내에서 성공적으로 번역되고 원하는 리딩 프레임에서 다운스트림 영역으로 진입할 세포 단편으로부터의 ~200 nt RNA 단편의 복잡한 혼합물로부터 농축을 허용하여, 미니-프로테옴 라이브러리의 작제에 적합하지 않은 RNA의 89%를 제거할 수 있다.

[0051] 이러한 라이브러리는 RNA가 종양 세포로부터 유래된 경우 핵산 항-종양 백신의 제조에 유용하거나, 약학 생성물의 발견을 위한 새롭거나 더 고도로 정제된 표적을 식별할 수 있는 선택가능한 표현형을 야기하는 세포내 (생체외에서, 즉, 세포 배양물에서, 또는 생체 내에서) 경로를 긍정적으로 또는 부정적으로 변경하는 미니-프로테옴

의 부분의 식별에 유용하다.

[0052] ***정의***

[0053] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어는 여기에 수집되었다.

[0054] 관사 "(단수형)"은 본원에서 관사의 문법적 목적어 중 하나 또는 하나 초과 (예를 들어, 하나 이상)을 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0055] 용어 "*바코딩된 프라이머*"는 고유한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프라이머를 지칭한다. 이 뉴클레오티드 서열의 최소 길이는 고유하게 표지되어야 하는 프라이머의 총 수에 따라 다르다. 예를 들어, 4 개의 뉴클레오티드 길이인 뉴클레오티드 서열은 256 개의 상이한 서열을 가질 수 있으며, 이는 최대 256 개의 프라이머를 고유하게 표지할 수 있다. 용어 "바코딩된-표지된 증폭 산물은 PCR 증폭 반응에 의해 "바코딩된 프라이머"로 생성된다.

[0056] 용어 "*결합하는*" 또는 "*상호작용하는*"은 예를 들어, 정전기, 소수성, 이온성 및/또는 생리학적 조건 하에서의 수소-결합 상호작용으로 인해 2 개의 분자 사이, 예를 들어, 항체 및 표적 사이의 안정한 회합일 수 있는 회합을 지칭한다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, 2 개의 핵산 서열은 서로 "*보완적*"이거나, 각각의 위치 또는 모든 위치의 일부에서 서로 염기 쌍을 이루는 경우 서로 "*상보적*"이다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, 2 개의 핵산 서열은 둘 모두 동일한 핵산 서열에 대해 상보적인 경우 서로에 대해 "*상응한다*".

[0059] 기능적 특성 또는 생물학적 활성 또는 과정 (예를 들어, 효소 활성 또는 수용체 결합)과 관련하여 사용될 때 용어 "*조정*" 또는 "조정하다"는 상향 조절 (예를 들어, 활성화 또는 자극)하거나, 하향 조절 (예를 들어, 억제 또는 억압)하거나, 달리 이러한 특성, 활성 또는 과정의 품질을 변화시키는 역량을 지칭한다. 특정 경우에, 이러한 조절은 신호 전달 경로의 활성화와 같은 특이적 이벤트의 발생에 따라 달라질 수 있고/있거나, 특정 세포 유형에서만 나타날 수 있다.

[0060] 용어 "*폴리뉴클레오티드*" 및 "*핵산*"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 임의의 길이의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체 중 뉴클레오티드의 중합체성 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3-차원 구조를 가질 수 있으며, 알려지거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 연결 분석으로부터 정의된 유전자좌들 (유전자좌), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 합성 폴리뉴클레오티드, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 구성요소에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예컨대, 표지 구성요소와의 컨쥬게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0061] 용어 "*신생항원*" 또는 "*신생항원성*"은 게놈 코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변경하는 종양-특이적 돌연변이(들)로부터 발생하는 종양 항원의 부류를 의미한다.

[0062] "*백신*"은 질환 (예컨대, 종양)의 예방 및/또는 치료를 위한 면역 생성용 조성물을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 따라서, 백신은 항원을 포함하는 의약이며, 백신접종에 의해 특이적 방어 및 보호 물질을 생성하기 위해 인간 또는 동물에 사용되도록 의도된다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "*투여하는*"은 대상체에 약제 또는 조성물을 제공하는 단계를 의미하며, 의료 전문가에 의한 투여 및 자가-투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "*대상체*"는 치료 또는 요법을 위해 선택된 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다.

[0065] 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한, "*단백질*", "*폴리펩티드*" 및 "*펩티드*"는 유전자 발현 생성물, 예를 들어, 코딩 서열에 의해 코딩된 바와 같은 아미노산 서열을 언급할 때 본원에서 상호교환적으로 사용된다. "단백질"은 또한 항체와 같은 하나 이상의 단백질의 회합을 지칭할 수 있다. "*단백질*"은 또한 단백질 단편을 지칭할 수 있다. 단백질은 글리코실화된 단백질과 같은 번역-후 변형된 단백질일 수 있다. "유전자 발현 산물"은 유전자의 전체 또는 일부의 전사의 결과로서 생산되는 분자를 의미한다. 유전자 산물은 유전자로부터 전사된 RNA 분자뿐

만 아니라 이러한 전사물로부터 번역된 단백질을 포함한다. 단백질은 자연적으로 발생하는 단리된 단백질일 수 있거나, 재조합 또는 화학적 합성의 산물일 수 있다. 용어 "단백질 단편"은 참조 단백질 자체와 비교하여 아미노산 잔기가 결실된 단백질을 지칭하지만, 여기서 나머지 아미노산 서열은 일반적으로 참조 단백질의 아미노산 서열의 적어도 일부와 동일하다. 이러한 결실은 참조 단백질의 아미노-말단 또는 카복시-말단 또는 참조 단백질의 일부 내부 위치, 또는 하나 초과의 이러한 위치에서 발생할 수 있다. 단편은 전형적으로 약 5, 6, 8 또는 10 개 이상의 아미노산 길이, 약 14 개 이상의 아미노산 길이, 약 20, 30, 40 또는 50 개 이상의 아미노산 길이, 약 75 개 이상의 아미노산 길이, 또는 약 100, 150, 200, 300, 500 개 이상의 아미노산 길이이다. 단편은 더 큰 단백질을 단편화하기 위해 프로테이나제를 사용하거나, (단독의 또는 다른 단백질-코딩 핵산 서열과 융합된) 단백질-코딩 뉴클레오티드 서열의 일부만을 발현하는 것과 같은 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 단편은 예를 들어, 세포 수용체에 대한 참조 단백질의 효소 활성 및/또는 상호작용 부위를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 단편은 면역원성 특성을 가질 수 있다. 단백질은 다양한 알려진 기술에 의해 특정 유전자좌에 도입된 돌연변이를 포함할 수 있으며, 이는 역효과를 주지는 않지만 본원에 제공된 방법에서의 사용을 향상시킬 수 있다. 단편은 참조 단백질의 생물학적 활성 중 하나 이상을 유지할 수 있다.

[0066] "*벡터*"는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 바람직한 벡터의 일 유형은 에피솜, 즉, 염색체-외 복제가 가능한 핵산이다. 바람직한 벡터는 이들이 연결된 핵산의 자율 복제 및/또는 발현이 가능한 것들이다. 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 본원에서 "*발현 벡터*"로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성의 발현 벡터는 종종 일반적으로 벡터 형태에서 염색체에 결합되지 않은 원형 이중 가닥의 DNA 루프를 지칭하는 "*플라스미드*"의 형태이다. 본 명세서에서, "*플라스미드*" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이기 때문에, 상호교환적으로 사용된다. 그러나, 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 본 발명은 등가의 기능을 제공하고 후속적으로 당업계에 알려지는 발현 벡터의 이러한 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0067] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가질 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된, 화학, 분자 생물학, 세포 및 암 생물학, 면역학, 미생물학, 약리학, 및 단백질 및 핵산 화학과 관련된 명명법 및 기술은 잘 알려진 것들이며, 당업계에서 일반적으로 사용되는 것들이다.

[0068] ***프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법***

[0069] 특정 양태에서, 본원은 RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 (a) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계; (b) 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 대해 생체 외 번역 반응을 수행하는 단계이되, 여기서 각각의 퓨로마이신-태깅된 RNA 단편에 대해, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열이 번역 개시 부위를 포함하는 프레임-재에 있고, 해당 리딩 프레임 내에 정지 코돈을 갖지 않고, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열과 함께 프레임-내에 있는 경우, 퓨로마이신은 번역된 폴리펩티드를 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물에 공유적으로 연결하여, 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 형성할 것인, 단계; 및 (c) 이러한 복합체에 있지 않은 RNA 전사물로부터 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체를 분리함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서, RNA 전사물의 집단의 각각의 RNA 전사물은 5'에서 3' 순서로, (i) 번역 개시 부위; (ii) cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; (iii) 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0071] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0072] 일부 실시양태에서, RNA 전사물 라이브러리의 각각의 RNA 전사물은 5'에서 3' 순서로, (i) 번역 개시 부위; (ii) 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iii) cDNA 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열; 및 (iv) 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 포함한다.

[0073] 특정 실시양태에서, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물의 집단은 (a) RNA 전사물을 스플린트 폴리뉴클레오티드 및 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커와 접촉시키는 단계이되, 여기서 스플린트 폴리뉴클레오티드 각각은 3'에서 5' 순서로, (I) 어댑터 서열에 상보적인 서열; 및 (II) 폴리-T 서열을 포함하고, 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커 각각은 5'에서 3' 순서로, (1) 폴리-dA 서열; 및 (2) 퓨로마이신 분자를 포함하며, 여기서 RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 어댑터 서열에 상보적인 서열에 혼성화하고, 링커 폴리뉴클레오티드의 폴리-dA 서열은 스플린트 폴리뉴클레오티드의 폴리-T 서열에 혼성화하는, 단계; (b) RNA 전사물의 3' 단부를 퓨로마이신-태깅된 DNA 링커의 5' 단부에 결찰시키도록 결찰 반응을 수행하여, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하는 단계에 의해 생성된다.

[0074] RNA 전사물의 번역 출발 부위는 출발 코돈 (예를 들어, AUG), 샤인-달가노 (SD) 서열 및/또는 번역 인핸서를 포함할 수 있다. 샤인-달가노 서열은 박테리아 및 고세균 메신저 RNA에 일반적으로 존재하는 리보솜 결합 부위이며, 일반적으로 출발 코돈 AUG의 업스트림의 약 8 개의 염기에 위치한다. 샤인-달가노 서열은 AGGAGG, AGGAGGU, GAGG, ACAGGAGGCA 또는 UAAGGAGGUG를 포함할 수 있다. 번역 인핸서는 A/U-풍부 인핸서, 예를 들어, 5'-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3', 5'-ACAUGGAUUC-3', 5'-UUAACUUUAA-3', 5'-UUAACGGGAA-3', 5'-AAAAAAAAAA-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3', 또는 5'-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3'을 포함할 수 있다. 번역 출발 부위는 번역 효율을 더욱 개선하기 위해 번역 인핸서 서열 및 샤인-달가노 서열 사이에 A 잔기의 짧은 (10-20 개의 뉴클레오티드) 스트레치를 포함할 수 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, RNA 전사물의 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따른다. 예를 들어, 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드가 뒤따를 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 9 개 이상, 12 개 이상, 15 개 이상, 18 개 이상, 21 개 이상, 24 개 이상, 27 개 이상, 30 개 이상, 33 개 이상, 36 개 이상, 39 개 이상, 42 개 이상, 45 개 이상, 48 개 이상, 51 개 이상, 54 개 이상, 57 개 이상, 60 개 이상, 63 개 이상, 66 개 이상, 69 개 이상, 또는 72 개 이상의 뉴클레오티드 길이 및 3의 배수 개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 18 개의 뉴클레오티드 길이이다. 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열은 cDNA 단편 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열의 5' 업스트림 또는 3' 다운스트림에 있을 수 있다.

[0077] 특정 실시양태에서, RNA 전사물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 작은 가용성 단백질 또는 비제한적으로 Titin I27, 유비퀴틴, Stefin A, 10FN-III, Ig-L 필라민 A, 테나신, Darpin, 피브로넥틴, 티오레독신 또는 생체 외 번역 또는 대장균에서 발현될 때 고도로 가용성인 임의의 기타 작은 단백질 도메인 (인간 또는 임의의 기타 종으로부터 유래됨)을 포함하는 단백질의 가용성 도메인(들)을 코딩할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 친화도 태그를 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 이러한 친화도 태그는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 (HA) 태그, 칼모듈린 태그, FLAG 태그, Myc 태그, S 태그, 스트렙트아비딘 태그, SBP 태그, Softag 1, Softag 3, V5 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카복실 담체 단백질 (BCCP) 태그, GST 태그, 형광 단백질 태그 (예를 들어, 녹색 형광 단백질 태그), 말토스 결합 단백질 태그, Nus 태그, Strep-태그, 티오레독신 태그, TC 태그 및 Ty 태그 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임으로부터 폴리펩티드를 코딩한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 어댑터 서열은 9 개 이상, 12 개 이상, 15 개 이상, 18 개 이상, 21 개 이상, 24 개 이상, 27 개 이상, 30 개 이상, 33 개 이상, 36 개 이상, 39 개 이상, 42 개 이상, 45 개 이상, 48 개 이상, 51 개

이상, 54 개 이상, 57 개 이상, 60 개 이상, 63 개 이상, 66 개 이상, 69 개 이상, 또는 72 개 이상의 뉴클레오티드 길이 및 3의 배수 개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 어댑터 서열은 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 어댑터 서열은 cDNA 단편 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열로부터 전사된 RNA 서열의 3' 다운스트림에 있다.

[0079] 본원에 기재된 스플린트 폴리뉴클레오티드는 3'에서 5' 순서로, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 3' 단부 또는 어댑터 서열에 상보적인 서열, 및 폴리-T 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 스플린트 폴리뉴클레오티드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 초과의 뉴클레오티드의 폴리-T 서열을 포함할 수 있다.

[0080] 본원에 기재된 링커 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 순서로, 폴리-dA 서열 및 퓨로마이신 분자를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커 폴리뉴클레오티드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 초과의 뉴클레오티드의 폴리-dA 서열을 포함할 수 있다.

[0081] 특정 실시양태에서, 결찰 반응은 RNA 전사물의 3' 단부가 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 결찰되어, 퓨로마이신-태깅된 RNA 전사물을 생성하도록 하는 조건 하에서 T4 DNA 리가아제의 존재 하에 수행된다. 링커 폴리뉴클레오티드의 5' 단부를 RNA 전사물의 3' 단부에 결찰할 수 있는 다른 방법이 또한 사용될 수 있다.

[0082] 특정 양태에서, 본원에 기재된 RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 RNA 발현 작제물의 라이브러리에 대해 전사 반응을 수행함으로써 단계 (a) 이전에 RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, RNA 발현 작제물의 라이브러리의 각각의 RNA 발현 작제물은 다음을 포함한다: (i) 전사 프로모터; (ii) 번역 개시 부위; (iii) cDNA 단편 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열; 및 (iv) 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임에서 프레임-내 정지 코돈이 결여되지만 각각의 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0084] RNA 발현 작제물의 전사 프로모터는 이의 DNA 다운스트림으로부터 RNA의 전사를 개시할 수 있는 임의의 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 T7 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0085] RNA 발현 작제물의 번역 출발 부위는 출발 코돈 (예를 들어, ATG), 샤인-달가노 (SD) 서열 및/또는 번역 인핸서를 포함할 수 있다. 샤인-달가노 서열은 박테리아 및 고세균 메신저 RNA에 일반적으로 존재하는 리보솜 결합 부위이며, 일반적으로 출발 코돈 AUG의 업스트림의 약 8 개의 염기에 위치한다. 샤인-달가노 서열은 AGGAGG, AGGAGGU, GAGG, ACAGGAGGCA, UAAGGAGGUG를 포함할 수 있다. 번역 인핸서 서열은 단백질 합성량을 더 증가시킬 수 있는 샤인-달가노 서열의 업스트림 서열이다. 번역 인핸서는 A/U-풍부 인핸서, 예를 들어, 5'-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3', 5'-ACAUGGAUUC-3', 5'-UUAACUUUAA-3', 5'-UUAACGGGAA-3', 5'-AAAAAAAAAA-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3', 또는 5'-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3'를 포함할 수 있다. 번역 출발 부위는 번역 효율을 더욱 개선하기 위해 번역 인핸서 서열 및 샤인-달가노 서열 사이에 A 잔기의 짧은 (10-20 개의 뉴클레오티드) 스트레치를 포함할 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, RNA 발현 작제물의 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따른다. 예를 들어, 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드가 뒤따를 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 9 개 이상, 12 개 이상, 15 개 이상, 18 개 이상, 21 개 이상, 24 개 이상, 27 개 이상, 30 개 이상, 33 개 이상, 36 개 이상, 39 개 이상, 42 개 이상, 45 개 이상, 48 개 이상, 51 개 이상, 54 개 이상, 57 개 이상, 60 개 이상, 63 개 이상, 66 개 이상, 69 개 이상, 또는 72 개 이상의 뉴클레오티드 길이 및 3의 배수 개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 폴리펩티드 코딩 뉴클레오티드 서열은 cDNA 단편 서열의 라이브러리로

부터의 cDNA 단편 서열의 5' 업스트림 또는 3' 다운스트림에 있을 수 있다.

[0088] 특정 실시양태에서, RNA 발현 작제물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 작은 가용성 단백질 또는 비제한적으로 Titin I27, 유비퀴틴, Stefin A, 10FN-III, Ig-L 필라민 A, Darpin, 테나신, 피브로넥틴, 티오레독신 또는 생체 외 번역 또는 대장균에서 발현될 때 고도로 가용성인 임의의 기타 작은 단백질 도메인 (인간 또는 임의의 기타 종으로부터 유래됨)을 포함하는 단백질의 가용성 도메인(들)을 코딩할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 친화도 태그를 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 이러한 친화도 태그는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 (HA) 태그, 칼모듈린 태그, FLAG 태그, Myc 태그, S 태그, Strep 태그, SBP 태그, Softag 1, Softag 3, V5 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카복실 담체 단백질 (BCCP) 태그, GST 태그, 형광 단백질 태그 (예를 들어, 녹색 형광 단백질 태그), 말토스 결합 단백질 태그, Nus 태그, Strep-태그, 티오레독신 태그, TC 태그 및 Ty 태그 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임으로부터 폴리펩티드를 코딩한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 각각의 RNA 발현 작제물은 어댑터 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 시작하는 리딩 프레임에서 정지 코돈이 결여되지만 다른 2 개의 리딩 프레임에서 정지 코돈을 함유하는 어댑터 서열을 추가로 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 어댑터 서열은 9 개 이상, 12 개 이상, 15 개 이상, 18 개 이상, 21 개 이상, 24 개 이상, 27 개 이상, 30 개 이상, 33 개 이상, 36 개 이상, 39 개 이상, 42 개 이상, 45 개 이상, 48 개 이상, 51 개 이상, 54 개 이상, 57 개 이상, 60 개 이상, 63 개 이상, 66 개 이상, 69 개 이상, 또는 72 개 이상의 뉴클레오티드 길이 및 3의 배수 개의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 어댑터 서열은 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 어댑터 서열은 cDNA 단편 서열의 라이브러리로부터의 cDNA 단편 서열의 3' 다운스트림에 있다.

[0091] 특정 실시양태에서, RNA 발현 작제물은 cDNA 단편 서열의 라이브러리에 대한 전사 프로모터, 번역 개시 부위, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 및 임의로 어댑터 서열의 PCR-기반 첨가에 의해 생성된다. cDNA 단편 서열의 라이브러리는 엑솜-함유 cDNA 단편 및/또는 미스매치-함유 cDNA 단편 서열에 대해 강화될 수 있다. 특정 실시양태에서, RNA 발현 작제물의 전사는 T7 중합효소의 존재 하에 생체 외에서 실시된다. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0092] 특정 양태에서, 본원은 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공한다. RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하기 위한 위에 기재된 방법과 비교하여, 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 본원에 기재된 RNA 전사물의 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0093] 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 RNA 전사물의 집단을 생성하는 이러한 추가적인 단계는 다음을 포함한다: (a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계; (b) cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리로부터 RNA 발현 작제물을 생성하는 단계; 및 (d) RNA 발현 작제물을 사용하여 전사 반응을 수행하여, RNA 전사물의 라이브러리를 생성하는 단계.

[0094] 단계 (c)에서 생성된 RNA 발현 작제물 및 단계 (d)에서 생성된 RNA 전사물의 라이브러리는 RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법에 기재된 것들과 동일한 구조를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, RNA 발현 작제물은 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 제조된 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리에 대한 전사 프로모터, 번역 개시 부위, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열, 및 임의로 어댑터 서열의 PCR-기반 첨가에 의해 생성된다. 특정 실시양태에서, 번역 개시 부위는 샤인-달가노 서열을 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 RNA 전사물의 집단 또는 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 단백질-연결된 RNA 복합체를 친화도 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 폴리펩티드에 결합하는 시약은 폴리펩티드에 연결된 친화도 태그에 특이적으로 결합하는 항체이거나, 폴리펩티드 자체에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 친화도 태그에 특이적으로 결합하는 항체는 당업계에 잘 알려져 있으며 상업적

으로 이용가능하다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 정제된 폴리펩티드-연결된 RNA 복합체의 라이브러리를 제공한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 RNA 전사물의 집단 또는 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 정제된 단백질-연결된 RNA 복합체에 대해 RT-PCR 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편 서열의 증폭된 DNA 카피를 포함하는 증폭 산물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, PCR 반응은 증폭 산물이 벡터에 용이하게 클로닝될 수 있도록 가닥-특이적 클로닝 프라이머를 이용하여 실시된다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생성된 증폭 산물을 제공한다.

[0097] 특정 양태에서, 본원은 세포성 RNA 단편의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법을 제공하며, 방법은 다음을 포함한다: (a) 세포성 RNA 단편의 집단에 대해 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응을 수행하여, cDNA 단편의 집단을 생성하는 단계; (b) cDNA 단편의 집단을 클로닝 벡터에 삽입하여, DNA 작제물의 라이브러리를 생성하는 단계이되, 여기서 각각의 DNA 작제물은 5'에서 3' 순서로, (i) 프로모터; (ii) 번역 개시 부위; (iii) 3의 배수 개의 뉴클레오티드의 길이이고 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임의 프레임-내 정지 코돈이 결여된 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열; (iv) cDNA 단편의 집단으로부터의 하나의 cDNA 단편; 및 (v) 막-제시 단백질-코딩 서열을 포함하는, 단계, (c) DNA 작제물의 라이브러리를 세포에 형질전환시키는 단계, (d) 세포가 DNA 작제물을 발현하도록 하는 조건 하에서 세포를 항온처리하는 단계; (e) 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 시약을 사용하여 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드, cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드 및 막-제시 단백질을 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 정제하는 (예를 들어, 친화도 정제하는) 단계; 및 (f) (예를 들어, PCR 증폭에 의해) 정제된 세포로부터 프레임-내 cDNA 단편 서열을 회수함으로써, RNA 전사물의 집단으로부터 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 단계.

[0098] 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 cDNA 단편의 집단을 엑솜 포획 프로브와 접촉시킴으로써, 엑솜-코딩 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화시켜, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 이어서, 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리는 다음 단계에 사용될 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, DNA 작제물의 프로모터는 박테리아 (예를 들어, 대장균)에서 유전자의 발현을 구동할 수 있는 프로모터이다. 이러한 프로모터는 박테리오파지 T7 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0100] DNA 작제물의 번역 출발 부위는 출발 코돈 (예를 들어, ATG), 샤인-달가노 (SD) 서열 및/또는 번역 인핸서를 포함할 수 있다. 샤인-달가노 서열은 박테리아 및 고세균 메신저 RNA에 일반적으로 존재하는 리보솜 결합 부위이며, 일반적으로 출발 코돈 AUG의 업스트림의 약 8 개의 염기에 위치한다. 샤인-달가노 서열은 AGGAGG, AGGAGGU, GAGG, ACAGGAGGCA, UAAGGAGGUG를 포함할 수 있다. 번역 인핸서 서열은 단백질 합성량을 더 증가시킬 수 있는 샤인-달가노 서열의 업스트림 서열이다. 번역 인핸서는 A/U-풍부 인핸서, 예를 들어, 5'-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3', 5'-ACAUGGAUUC-3', 5'-UUAACUUUAA-3', 5'-UUAACGGGAA-3', 5'-AAAAAAAAAA-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3', 5'-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3', 또는 5'-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3'를 포함할 수 있다. 번역 출발 부위는 번역 효율을 더욱 개선하기 위해 번역 인핸서 서열 및 샤인-달가노 서열 사이에 A 잔기의 짧은 (10-20 개의 뉴클레오티드) 스트레치를 포함할 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, DNA 작제물의 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 3의 임의의 배수 개의 뉴클레오티드가 뒤따른다. 예를 들어, 번역 개시 부위 다음에는 정지 코돈을 코딩하지 않는 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드가 뒤따를 수 있다.

[0102] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 9 개 이상, 12 개 이상, 15 개 이상, 18 개 이상, 21 개 이상, 24 개 이상, 27 개 이상, 30 개 이상, 33 개 이상, 36 개 이상, 39 개 이상, 42 개 이상, 45 개 이상, 48 개 이상, 51 개 이상, 54 개 이상, 57 개 이상, 60 개 이상, 63 개 이상, 66 개 이상, 69 개 이상, 또는 72 개 이상의 뉴클레오티드 길이 및 3의 배수의 뉴클레오티드 길이이다. 예를 들어, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0103] 특정 실시양태에서, DNA 작제물의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 작은 가용성 단백질 또는 비제한적으로

Titin I27, 유비퀴틴, Stefin A, 10FN-III, Ig-L 필라민 A, Darpin, 테나신, 피브로넥틴, 티오레독신 또는 생체 외 번역 또는 대장균에서 발현될 때 고도로 가용성인 임의의 기타 작은 단백질 도메인 (인간 또는 임의의 기타 종으로부터 유래됨)을 포함하는 단백질의 가용성 도메인(들)을 코딩할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 친화도 태그를 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 이러한 친화도 태그는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 (HA) 태그, 칼모듈린 태그, FLAG 태그, Myc 태그, S 태그, Strep 태그, SBP 태그, Softag 1, Softag 3, V5 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카복실 담체 단백질 (BCCP) 태그, GST 태그, 형광 단백질 태그 (예를 들어, 녹색 형광 단백질 태그), 말토스 결합 단백질 태그, Nus 태그, Strep-태그, 티오레독신 태그, TC 태그 및 Ty 태그 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열의 제1의 5' 뉴클레오티드에서 개시하는 리딩 프레임으로부터 폴리펩티드를 코딩한다.

[0104] 특정 실시양태에서, 막-제시 단백질-코딩 서열은 번역된 단백질의 외부 세포막으로의 삽입 및 세포의 외부 표면 상의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드의 노출을 허용하는 임의의 막-제시 단백질을 코딩할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 막-제시 단백질-코딩 서열은 번역된 단백질의 외부 박테리아 막으로의 삽입 및 박테리아 세포의 외부 표면 상의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 펩티드 서열의 노출을 허용하는 확산 점착에 관여하는 점착 (AIDA-I) 자동-수송체와 같은 박테리아 막-제시 단백질을 코딩한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 세포는 진핵 세포 (예를 들어, 포유동물 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 원핵 세포 (예를 들어, 박테리아)이다. 특정 실시양태에서, 박테리아 세포 (예를 들어, 대장균)는 T7 RNA 중합효소의 발현을 특이적으로 제어할 수 있는 균주로부터 유래한다. 이러한 박테리아 균주는 작은 분자 (예를 들어, 아라비노스)가 박테리아 (예를 들어, 대장균) 배양물에 첨가되어, T7 RNA 중합효소의 발현을 유도할 수 있도록 araBAD 프로모터의 제어 하에서 T7 RNA 중합효소의 유전자를 보유하는 균주를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이어서, T7 RNA 중합효소는 cDNA 단편의 집단을 포함하는 DNA 작제물의 발현 및 번역된 단백질의 박테리아 (예를 들어, 대장균)의 외부 막으로의 삽입을 유도할 수 있다.

[0106] 특정 실시양태에서, 세포는 각각의 세포가 하나 이하 (예를 들어, 0 또는 1)의 DNA 작제물을 갖도록 하는 비율로 DNA 작제물로 형질주입 또는 형질전환된다.

[0107] 특정 실시양태에서, 친화도 정제에 사용된 시약은 폴리펩티드-코딩 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합한다. 폴리펩티드에 결합하는 시약은 폴리펩티드에 연결된 친화도 태그에 특이적으로 결합하는 항체이거나, 폴리펩티드 자체에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0108] 특정 실시양태에서, 막-제시 단백질-코딩 서열은 세포에 의해 내인성으로 발현되지 않는 막-제시 단백질을 코딩한다. 이러한 경우, DNA 작제물은 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 포함할 필요가 없으며, 친화도 정제는 막-제시 단백질에 결합하는 시약을 사용할 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 프레임-내 cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드를 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포를 강화하기 위해 친화도 정제 이외의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열은 c-말단 선택 마커를 코딩한다. 일부 실시양태에서, c-말단 선택 마커는 약물 저항성 유전자 (예를 들어, 항생제 저항성 유전자)이고, 프레임-내 cDNA 단편 및 약물 저항성 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드를 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포는 세포 배양물에 약물을 첨가함으로서 강화될 수 있다. 특정 실시양태에서, c-말단 선택 마커는 세포 배양 배지 구성요소의 부재 하에 세포 생존을 가능하게 하는 단백질이고, 프레임-내 cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드 및 c-말단 선택 마커를 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포는 세포 배양 배지로부터 구성요소를 회수함으로써 강화될 수 있다. 일부 실시양태에서, c-말단 선택 마커는 형광 단백질이고, 프레임-내 cDNA 단편에 의해 코딩된 폴리펩티드 및 약물 저항성 유전자를 포함하는 완전한 융합 단백질을 발현하는 세포는 FACS에 의해 강화될 수 있다.

[0110] 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서의 PCR 증폭 반응은 증폭 산물이 벡터에 용이하게 클로닝될 수 있도록 가닥-특이적 클로닝 프라이머를 이용하여 실시된다. 일부 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생성된 증폭 산물을 제공한다.

[0111] 세포성 RNA 단편의 집단은 샘플, 예컨대, 종양 샘플, 정상 조직 샘플, 질환의 조직 샘플; 신선한 샘플, 동결된 샘플 및/또는 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플로부터 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 샘플은 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 또는 종양 샘플이다. 샘플은 대상체 (예를 들어, 인간 및 바람직하게는 암 환자)로부터 수득될 수

있으며, 각각의 대상체에 대해 특이적으로 제조될 것이다. 샘플은 대상체에 대해 제조되고, 상이한 대상체에게 사용될 수 있다. 이들 샘플로부터의 전체 RNA 또는 mRNA는 단리되고, 적절한 크기로 단편화될 수 있다. 세포성 RNA 단편의 집단의 세포성 RNA 단편은 150 내지 250 nt 길이일 수 있다. 예를 들어, 세포성 RNA 단편의 집단의 세포성 RNA 단편은 약 150 nt, 약 160 nt, 약 170 nt, 약 180 nt, 약 190 nt, 약 200 nt, 약 210 nt, 약 220 nt, 약 230 nt, 약 240 nt, 약 250 nt 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포성 RNA 단편의 집단의 세포성 RNA 단편은 약 200 nt 길이이다.

[0112] cDNA 단편의 집단을 생성하기 위한 가닥-특이적 무작위 프라이밍된 핵산 증폭 반응은 Illiumina TruSeq 가닥의 전체 RNA 프로토콜과 같은 임의의 표준 프로토콜을 사용하여 수행될 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 cDNA 단편의 집단을 MutS 단백질과 접촉시키고, MutS 단백질에 결합하는 cDNA 단편을 회수함으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 cDNA 단편의 집단을 강화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 MutS 단백질과 접촉시키고, MutS 단백질에 결합하는 cDNA 단편을 회수함으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프레임-내 코딩 영역 단편의 라이브러리를 강화하는 방법은 프레임-내 강화된 증폭 산물을 MutS 단백질과 접촉시키고, MutS 단백질에 결합하는 이들 프레임-내 cDNA 단편을 회수함으로써, 돌연변이 또는 단일 뉴클레오티드 다형성으로 인한 미스매치-함유 cDNA 단편에 대해 프레임-내 강화된 증폭 산물을 강화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0116] 엑솜-강화된 cDNA 단편의 라이브러리를 생성하는 데 사용된 엑솜 포획 프로브는 참조 게놈 서열에 기반하여 설계되어, 모든 알려진 CDS로부터 주로 코딩 영역 엑손을 포획하는 표준 엑솜 포획 프로브일 수 있다. 대안적으로, 엑솜 포획 프로브는 SNP의 알려진 위치 및 빈도에 기반하여 설계되어, 이들 엑솜 포획 프로브가 SNP의 MutS 강화를 감소시키도록 이들 SNP의 위치 주위에 설계될 수 있다. 엑솜 포획 프로브를 설계하기 위한 추가적인 고려사항은 본원의 실시예 1에 기재되어 있다.

[0117] 용어 "엑솜"은 연구되는 세포 유형, 조직 및 질환, 및 원하는 RNA 전사 수준 등에 기반한 완전한 엑솜 또는 완전한 엑솜의 임의의 원하는 부분을 지칭한다.

[0118] ***종양 백신의 제조 방법***

[0119] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생성된 증폭 산물 중 하나 이상을 사용하여 종양 백신을 제조하는 방법을 제공한다. 본 개시내용 및 당해 분야의 지식으로부터의 당업자는 이러한 종양 백신을 생산하는 다양한 방법이 있음을 인식할 것이다. 일반적으로, 이러한 종양 백신은 생체 외 또는 생체 내에서 생산될 수 있다. 프레임-내 cDNA 단편 서열을 포함하는 증폭 산물 중 하나 이상은 생체 외에서 발현되어, 하나 이상의 종양 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드를 생산할 수 있으며, 이어서, 이는 개인화된 종양 백신 또는 면역원성 조성물로 제형화되어, 대상체에 투여될 수 있다. 본원에서 더 상세히 기재된 바와 같이, 이러한 생체 외 생산은 예를 들어, 다양한 박테리아, 진핵 세포 또는 바이러스 재조합 발현 시스템 중 임의의 것에서 증폭 산물 중 하나 이상의 발현에 이어서, 발현된 펩티드/폴리펩티드의 정제와 같이 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 발생할 수 있다. 대안적으로, 종양 백신은 증폭 산물 중 하나 이상을 발현 벡터에 삽입한 다음, 이러한 발현 벡터를 대상체에 도입함으로써 생체 내에서 생산될 수 있으며, 이때 코딩된 종양 백신이 발현된다. 종양 백신의 생체 외 및 생체 내 생산 방법은 또한 약학 조성물 및 전달 방법과 관련하여 본원에 추가로 기재되어 있다.

[0120] 특정 실시양태에서, 종양 백신을 제조하기 위해, 본원에 기재된 방법으로 생성된 증폭 산물을 벡터에 삽입하여, 프레임-내 cDNA 단편의 서열을 포함하는 벡터를 생성한다. 이러한 벡터는 클로닝 벡터, 발현 벡터 또는 백신-코딩 벡터일 수 있다.

[0121] 상이한 세포 유형에 대한 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있으며, 과도한 실험 없이 선택될 수 있다. 일반적으로, 증폭 산물은 플라스미드와 같은 발현 벡터에 적절한 배향 및 발현을 위한 올바른 리딩 프레임으로 삽입된다. 필요한 경우, 증폭 산물은 원하는 숙주 (예컨대, 박테리아)에 의해 인식되는 적절한 전사 및 번역 조절 제어 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있지만, 이러한 제어는 일반적으로 발현 벡터에서 이용가능하다. 그런 다음, 벡터는 표준 기술을 사용하여 클로닝을 위해 숙주 박테리아에 도입된다 (예를 들어, Sambrook et al.

(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 참고).

[0122] 증폭된 산물을 포함하는 발현 벡터뿐만 아니라 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 고려된다. 본 발명의 하나 이상의 증폭 산물은 단일 발현 벡터에 의해 코딩될 수 있다.

[0123] 일부 실시양태에서, 증폭 산물은 발현 벡터에 삽입되고, 원하는 숙주에서 단백질의 발현에 적절한 발현 제어 서열에 선택적으로 작동가능하게 연결된다. 적절한 조립은 뉴클레오티드 시퀀싱, 제한 매핑 및 적합한 숙주에서 생물학적 활성인 폴리펩티드의 발현에 의해 확인될 수 있다. 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 숙주에서 형질주입된 유전자의 높은 발현 수준을 수득하기 위해, 유전자는 선택된 발현 숙주에서 기능적인 전사 및 번역 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0124] 재조합 발현 벡터는 종양 특이적 신생항원성 펩티드를 코딩하는 cDNA 단편 서열을 증폭하고 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된 종양 특이적 신생항원성 펩티드 또는 생물등가의 유사체를 코딩하는 합성적 또는 cDNA-유래된 DNA 단편을 갖는 복제가능한 DNA 작제물이다. 전사 유닛은 일반적으로 (1) 유전적 요소 또는 유전자 발현에서 조절 역할을 갖는 요소, 예를 들어, 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 코딩 서열, 및 (3) 본원에 상세히 기재된 바와 같은 적절한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 조립체를 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사를 제어하기 위한 오퍼레이터 서열을 포함할 수 있다.

[0125] 일반적으로 복제 원점에 의해 부여되는 숙주에서 복제하는 능력 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하는 선택 유전자가 추가적으로 혼입될 수 있다. DNA 영역은 서로 기능적으로 관련될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 신호 펩티드 (분비 리더)의 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우, 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터는 서열의 전사를 제어하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 번역이 가능하도록 배치된 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결되어 있다는 것은 연속적이라는 의미이며, 분비 리더의 경우에는 연속적이며 리딩 프레임 내에 있다는 의미이다. 효모 발현 시스템에서 사용하기 위한 구조적 요소는 숙주 세포에 의해 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 리더 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 리더 또는 수송 서열 없이 발현되는 경우, N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 이 잔기는 최종 생성물을 제공하기 위해 발현된 재조합 단백질로부터 후속적으로 선택적으로 절단될 수 있다.

[0126] 진핵 숙주, 특히 포유동물 또는 인간에 대한 유용한 발현 벡터는 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주에 대한 유용한 발현 벡터는 pCR 1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 포함하는 대장균으로부터의 플라스미드와 같은 알려진 박테리아 플라스미드, M13 및 사상 단일-가닥의 DNA 파지와 같은 더 넓은 숙주 범위의 플라스미드를 포함한다.

[0127] 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 적절한 프로모터의 제어 하의 고등 진핵 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 대장균 또는 바실리를 포함한다. 고등 진핵 세포는 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 무-세포 번역 시스템이 또한 사용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유동물 세포성 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있다 (Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985 참고).

[0128] 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 또한 유리하게 재조합 단백질을 발현하기 위해 사용된다. 포유동물 세포에서 재조합 단백질의 발현은 이러한 단백질이 일반적으로 정확하게 폴딩되고 적절하게 변형되며 완전히 기능하기 때문에 수행될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 Gluzman (Cell 23:175, 1981)에 기재된 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주, 및 예를 들어, L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소 (CHO), 293, HeLa 및 BHK 세포주를 포함하여 적절한 벡터를 발현할 수 있는 다른 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 비전사된 요소, 예컨대, 복제 원점, 발현될 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 플랭킹 비전사된 서열, 및 5' 또는 3' 비번역된 서열, 예컨대, 필수 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여자 및 수용자 부위 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이종 단백질의 생산을 위한 배큘로바이러스 시스템은 Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)에 의해 검토되었다.

[0129] 형질전환된 숙주에 의해 생산된 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 크로

마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 및 친화도 및 사이징 컬럼 크로마토그래피 등), 원심분리, 차등 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술을 포함한다. 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제 등과 같은 친화도 태그를 단백질에 부착하여, 적절한 친화도 컬럼을 통과시켜 쉽게 정제할 수 있다. 단리된 단백질은 또한 단백질분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정학과 같은 이러한 기술을 사용하여 물리적으로 특성화될 수 있다.

[0130] 예를 들어, 재조합 단백질을 배양 배지로 분비하는 시스템으로부터의 상청액은 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축될 수 있다. 농축 단계 후에, 농축물을 적합한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들어, 펜던트 디에틸아미노에틸 (DEAE) 기를 갖는 매트릭스 또는 기질이 사용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에 일반적으로 사용되는 기타 유형일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계를 사용할 수 있다. 적합한 양이온 교환기는 설포프로필 또는 카복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 배지, 예를 들어, 펜던트 메틸 또는 다른 지방족 기를 갖는 실리카 겔을 사용하는 하나 이상의 역-상 고 성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC) 단계를 사용하여, 암 줄기 세포 단백질-Fc 조성물을 추가로 정제할 수 있다. 또한 전술한 정제 단계의 일부 또는 전부를 다양한 조합으로 사용하여, 균질한 재조합 단백질을 제공할 수 있다.

[0131] 박테리아 배양물에서 생산된 재조합 단백질은 예를 들어, 세포 펠렛으로부터 초기 추출에 이어 하나 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. 고 성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)는 최종 정제 단계에 사용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에 사용되는 미생물 세포는 동결-해동 순환, 초음파 처리, 기계적 붕괴 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 붕괴될 수 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 벡터는 종양 백신을 생성하기 위해 생체 외 번역 반응에 적용될 수 있다. 당업자가 활용할 수 있는 많은 예시적인 시스템이 존재한다 (예를 들어, Retic 용해물 IVT 키트, Life Technologies, Waltham, MA).

[0133] 본 발명은 또한 예를 들어, DNA/RNA 백신의 형태로 생체 내 또는 엑스 비보에서, 신생항원성 펩티드/폴리펩티드의 전달을 필요로 하는 대상체에 신생항원성 펩티드/폴리펩티드를 전달하기 위한 비히클로서 핵산 분자의 사용을 고려한다 (예를 들어, 그 전체가 참조로 본원에 원용된, WO2012/159643, 및 WO2012/159754 참고).

[0134] 일 실시양태에서, 프레임-내 cDNA 단편 서열을 포함하는 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)를 종양 백신을 필요로 하는 환자에 투여하여, 생체 내에서 종양 백신을 생산할 수 있다. 이들은 일반적으로 관심 있는 유전자 (또는 상보적 DNA)의 생체 내 전사 및 번역을 구동하는 강력한 바이러스 프로모터로 이루어진 벡터이다 (Mor, et al., (1995). The Journal of Immunology 155 (4): 2039-2046). 인트론 A는 때때로 mRNA 안정성을 개선하기 위해 포함될 수 있으므로, 단백질 발현을 증가시킨다 (Leitner et al. (1997).The Journal of Immunology 159 (12): 6112-6119). 플라스미드는 또한 소 성장 호르몬 또는 토끼 베타-글로불린 폴리아데닐화 서열과 같은 강력한 폴리아데닐화/전사 종결 신호를 포함한다 (Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410; Robinson et al., (2000). Adv. Virus Res. Advances in Virus Research 55: 1-74; Bohmet al., (1996). Journal of Immunological Methods 193 (1): 29-40.). 멀티시스트론 벡터는 때때로 하나 초과의 면역원을 발현하거나, 면역원 및 면역자극 단백질을 발현하도록 작제된다 (Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88).

[0135] 벡터는 종양 백신이 발현되는 "비히클"이기 때문에, 최대 단백질 발현을 위한 벡터 설계 최적화가 필수적이다 (Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88). 다른 고려사항은 프로모터의 선택이다. 이러한 프로모터는 SV40 프로모터 또는 라우스 육종 바이러스 (RSV)일 수 있다.

[0136] 벡터는 다수의 상이한 방법에 의해 동물 조직에 도입될 수 있다. 가장 대중적인 2 개의 접근법은 표준 피하 바늘을 사용한 식염수 중 DNA의 주사 및 유전자 총 전달이다. DNA 백신 벡터의 작제 및 이 두 가지 방법에 의한 숙주로의 후속 전달에 대한 개략적인 개요는 Scientific American (Weiner et al., (1999) Scientific American 281 (1): 34-41)에 예시되어 있다. 식염수 중 주사는 일반적으로 골격근에 근육내 (IM) 또는 피부내 (ID)로 실시되며, DNA는 세포외 공간으로 전달된다. 이는 부피바카인과 같은 근독소로 근육 섬유를 일시적으로 손상시킴으로써; 또는 식염수 또는 수크로스의 고장성 용액을 사용함으로써 전기천공에 의해 도움을 받을 수 있다 (Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410). 이 전달 방법에 대한 면역 반응은 바늘 유형, 바늘 정렬, 주사 속도, 주사의 부피, 근육 유형, 주사될 동물의 연령, 성별 및 생리학

적 병태를 포함한 많은 인자에 의해 영향을 받을 수 있다 (Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410).

[0137] 일반적으로 사용된 다른 전달 방법인 유전자 총 전달은 압축 헬륨을 촉진제로서 사용하여 금 또는 텅스텐 미립자에 흡착된 플라스미드 DNA (pDNA)를 표적 세포로 탄도적으로 가속한다 (Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410; Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88).

[0138] 대안적인 전달 방법은 비강 및 폐 점막과 같은 점막 표면에 네이키드 DNA의 에어로졸 점적 (Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88) 및 눈 및 질 점막에 대한 pDNA의 국부 투여 (Lewis et al., (1999) Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88)를 포함할 수 있다. 점막 표면 전달은 또한 양이온성 리포좀-DNA 제제, 생분해성 마이크로스피어, 장 점막에 경구 투여하기 위한 약독화된 시겔라 또는 리스테리아 벡터, 및 재조합 아데노바이러스 벡터를 사용하여 달성되었다.

[0139] 전달 방법은 효과적인 면역 반응을 일으키는 데 필요한 DNA의 용량을 결정한다. 식염수 주사는 10 μg-1 mg에서 다양한 양의 DNA를 필요로 하는 반면, 유전자 총 전달은 효과적인 면역 반응을 일으키기 위해 근육내 식염수 주사보다 100 내지 1000 배 적은 DNA를 필요로 한다. 일반적으로, 0.2 μg - 20 μg이 필요하지만, 16 ng 정도의 낮은 수량이 보고되었다. 이러한 수량은 종마다 다르며, 예를 들어, 마우스는 영장류보다 대략 10 배 적은 DNA를 필요로 한다. 식염수 주사는 DNA가 표적 조직 (일반적으로 근육)의 세포외 공간으로 전달되기 때문에 더 많은 DNA를 필요로 하며, 여기서 DNA는 세포에 의해 흡수되기 전에 물리적 장벽 (몇 가지를 언급하자면 기저판 및 많은 양의 결합 조직과 같음)을 극복해야 하는 반면, 유전자 총 전달은 DNA를 세포에 직접 공격하여 "낭비"를 줄인다 (예를 들어, Sedegah et al., (1994). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 (21): 9866-9870; Daheshiaet al., (1997). The Journal of Immunology 159 (4): 1945-1952; Chen et al., (1998). The Journal of Immunology 160 (5): 2425-2432; Sizemore (1995) Science 270 (5234): 299-302; Fynan et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (24): 11478-82 참고).

[0140] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 백신-코딩 벡터는 엑스 비보에서 면역 요법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 백신-코딩 벡터는 항원 제시 세포 (예컨대, 수지상 세포)에 형질주입 또는 형질도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 항원 제시 세포는 이어서 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 이들 항원 제시 세포는 생체 외에서 T 세포 (예를 들어, 자가유래 T 세포, 동계 T 세포)를 활성화시킨 다음, 대상체에 투여하는 데 사용된다.

[0141] 일 실시양태에서, 종양 백신 또는 면역원성 조성물은 예를 들어, 본 발명에 따라 식별된 바와 같은 하나 이상의 신생항원성 펩티드/폴리펩티드를 코딩하는 별도의 DNA 플라스미드를 포함할 수 있다. 본원에서 논의된 바와 같이, 발현 벡터의 정확한 선택은 발현될 펩티드/폴리펩티드에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자의 기술 범위 내에 있다. (예를 들어, 근육 세포에서 에피솜, 비-복제, 비-통합된 형태의) DNA 작제물의 예상되는 지속성은 증가된 보호의 지속기간을 제공할 것으로 예상된다.

[0142] 대안적으로, 프레임-내 강화 RNA 라이브러리는 생체 외에서 세포로 형질주입 또는 전기천공되거나, 생체 내에서 대상체에 직접 전달될 수 있다. 자가-복제 RNA는 RNA 백신을 생성하는 데 사용될 수 있다. RNA 백신은 다수의 방법을 사용하여, 예를 들어, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사, 피부에 대한 국부 적용, 또는 비강 스프레이를 통해 대상체에 전달될 수 있다. RNA 백신은 또한 지질 나노입자 또는 RNA 바이러스를 사용하여 전달될 수 있다. 벡터로서 사용된 전형적인 RNA 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 알파바이러스 및 랍도바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0143] 본 발명의 종양 백신은 바이러스 기반 시스템 (예를 들어, 아데노바이러스 시스템, 아데노 연관된 바이러스 (AAV) 벡터, 폭스바이러스 또는 렌티바이러스)을 사용하여 코딩되고 생체 내에서 발현될 수 있다. 일 실시양태에서, 종양 백신 또는 면역원성 조성물은 이를 필요로 하는 인간 환자에서 사용하기 위한 바이러스 기반 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스를 포함할 수 있다 (예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용된, Baden et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). J Infect Dis. 2013 Jan 15;207(2):240-7 참고). 아데노 연관된 바이러스, 아데노바이러스 및 렌티바이러스 전달에 사용될 수 있는 플라스미드는 이전에 기재되었다 (예를 들어, 본원에 참조로 원용된, 미국 특허 번호 6,955,808 및 6,943,019, 및 미국 특허 출원 번호 20080254008을 참고).

[0144] 본 발명의 실시에 사용될 수 있는 벡터 중에서, 레트로바이러스 유전자 전달 방법으로 세포의 숙주 게놈에서의 통합이 가능하며, 종종 삽입된 트랜스진의 장기간 발현을 초래한다. 바람직한 실시양태에서, 레트로바이러스는 렌티바이러스이다. 추가적으로, 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 높은 형질도입 효율이 관찰되었다. 레트로바이러스의 향성은 외래 외피 단백질을 통합하여, 표적 세포의 잠재적인 표적 집단을 확장함으로써 변경될 수 있다. 레트로바이러스는 또한 특정 세포 유형만이 렌티바이러스에 의해 감염되도록 삽입된 트랜스진의 조건부 발현을 허용하도록 조작될 수 있다. 세포 유형 특이적 프로모터를 사용하여, 특이적 세포 유형에서 발현을 표적화할 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다 (따라서 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터 둘 모두는 본 발명의 실시에 사용될 수 있음). 더욱이, 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 형질도입 또는 감염시킬 수 있고, 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생산할 수 있기 때문에 바람직하다. 따라서, 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 달라질 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6-10 kb의 외래 서열에 대한 패키징 용량을 가진 cis-acting 긴 말단 반복부를 포함한다. 최소 cis-acting LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이후 영구 발현을 제공하기 위해 원하는 핵산을 표적 세포에 통합하는 데 사용된다. 본 발명의 실시에 사용될 수 있는 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 시미안 면역 결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 및 이들의 조합에 기반한 것들을 포함한다 (예를 들어, Buchscher et al., (1992) J. Virol. 66:2731-2739; Johann et al., (1992) J. Virol. 66:1635-1640; Sommnerfelt et al., (1990) Virol. 176:58-59; Wilson et al., (1998) J. Virol. 63:2374-2378; Miller et al., (1991) J. Virol. 65:2220-2224; PCT/US94/05700 참고). Zou et al.은 1 x 10^9 개의 형질도입 유닛 (TU)/ml의 역가를 갖는 약 10 μl의 재조합 렌티바이러스를 척수강내 카테터로 투여하였다. 이러한 분류의 투여량은 본 발명에서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 사용에 적절하거나 외삽될 수 있다.

[0145] 또한 본 발명의 실시에 유용한 것은 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV)에 기반한 렌티바이러스 벡터와 같은 최소 비-영장류 렌티바이러스 벡터이다 (예를 들어, Balagaan, (2006) J Gene Med; 8: 275 - 285, 2005 년 11월 21일 Wiley InterScience (interscience.wiley.com) 에서 온라인으로 게시됨. DOI: 10.1002/jgm.845 참고). 벡터는 표적 유전자의 발현을 구동하는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터를 가질 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 실시에 유용한 벡터(들) 중에서 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터를 고려한다.

[0146] 또한 본 발명의 실시에 유용한 것은 아데노바이러스 벡터이다. 한 가지 이점은 재조합 아데노바이러스가 생체외 및 생체 내에서 다양한 포유동물 세포 및 조직에서 재조합 유전자를 효율적으로 전달하고 발현하여 전달된 핵산의 높은 발현을 초래하는 능력이다. 추가로, 휴지 세포를 생산적으로 감염시키는 능력은 재조합 아데노바이러스 벡터의 유용성을 확장한다. 게다가, 높은 발현 수준은 핵산의 산물이 면역 반응을 생성하기에 충분한 수준으로 발현되도록 한다 (예를 들어, 본원에 참조로 원용된 미국 특허 번호 7,029,848 참고).

[0147] 본원의 일 실시양태에서 전달은 아데노바이러스를 통해 이루어지며, 이는 1 x 10^5 개 이상의 입자 (입자 유닛, pu로서 또한 지칭됨)의 아데노바이러스 벡터를 함유하는 단일 부스터 용량일 수 있다. 본원의 일 실시양태에서, 용량은 바람직하게는 약 1 x 10^6 개 이상의 입자 (예를 들어, 약 1 x 10^6-1 x 10^{12} 개의 입자), 더 바람직하게는 약 1 x 10^7 개 이상의 입자, 더 바람직하게는 약 1 x 10^8 개 이상의 입자 (예를 들어, 약 1 x 10^8-1 x 10^{11} 개의 입자 또는 약 1 x 10^8-1 x 10^{12} 개의 입자), 가장 바람직하게는 약 1 x 10^9 개 이상의 입자 (예를 들어, 약 1 x 10^9-1 x 10^{10} 개의 입자 또는 약 1 x 10^9-1 x 10^{12} 개의 입자), 또는 심지어 약 1 x 10^{10} 개 이상의 입자 (예를 들어, 약 1 x 10^{10}-1 x 10^{12} 개의 입자)의 아데노바이러스 벡터이다. 대안적으로, 용량은 약 1 x 10^{14} 개 이하의 입자, 바람직하게는 약 1 x 10^{13} 개 이하의 입자, 보다 더 바람직하게는 약 1 x 10^{12} 개 이하의 입자, 보다 더 바람직하게는 약 1 x 10^{11} 개 이하의 입자, 대부분 바람직하게는 약 1 x 10^{10} 개 이하의 입자 (예를 들어, 약 1 x 10^9 개 이하의 물품)을 포함한다. 따라서, 용량은 예를 들어, 약 1 x 10^6 입자 유닛 (pu), 약 2 x 10^6 pu, 약 4 x 10^6 pu, 약 1 x 10^7 pu, 약 2 x 10^7 pu, 약 4 x 10^7 pu, 약 1 x 10^8 pu, 약 2 x 10^8 pu, 약 4 x 10^8 pu, 약 1 x 10^9 pu, 약 2 x 10^9 pu, 약 4 x 10^9 pu, 약 1 x 10^{10} pu, 약 2 x 10^{10} pu, 약 4 x 10^{10} pu, 약 1 x 10^{11} pu, 약 2 x 10^{11} pu, 약 4 x 10^{11} pu, 약 1 x 10^{12} pu, 약 2 x 10^{12} pu, 또는 약 4 x 10^{12} pu의 아데노바이러스 벡터를 갖는 아데노바이러스 벡터의 단일 용량을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 원용된 2013 년 6 월 4 일자

로 허여된 Nabel 등의 미국 특허 번호 8,454,972 B2의 아데노바이러스 벡터, 및 이의 col 29, 라인 36-58의 투여량을 참고한다. 본원의 실시양태에서, 아데노바이러스는 다중 용량을 통해 전달된다.

[0148] 생체 내 전달 측면에서, AAV는 독성이 낮고 숙주 게놈에 통합되지 않기 때문에 삽입 돌연변이유발을 유발할 가능성이 낮아 다른 바이러스 벡터보다 유리하다. AAV는 4.5 또는 4.75 Kb의 패키징 제한을 갖는다. 4.5 또는 4.75 Kb보다 큰 작제물은 유의하게 감소된 바이러스 생산을 초래한다. 핵산 분자 발현을 구동하는 데 사용될 수 있는 많은 프로모터가 있다. AAV ITR은 프로모터로서 역할을 할 수 있으며, 추가적인 프로모터 요소가 필요하지 않은 이점이 있다. 유비퀴터스 발현을 위해, CMV, CAG, CBh, PGK, SV40, 페리틴 중쇄 또는 경쇄 등의 프로모터를 사용할 수 있다. 뇌 발현을 위해, 다음의 프로모터를 사용할 수 있다: 모든 뉴런에 대해 시냅신I, 흥분성 뉴런에 대해 CaMKII알파, GABAergic 뉴런에 대해 GAD67 또는 GAD65 또는 VGAT 등, RNA 합성을 구동하는 데 사용된 프로모터는 다음을 포함할 수 있다: U6 또는 H1과 같은 Pol III 프로모터. Pol II 프로모터 및 인트론 카세트를 사용하여 가이드 RNA (gRNA)를 발현할 수 있다.

[0149] AAV의 경우, AAV는 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 표적화될 세포와 관련하여 AAV를 선택할 수 있으며; 예를 들어, 뇌 또는 뉴런 세포를 표적화하기 위해 AAV 혈청형 1, 2, 5 또는 하이브리드 캡시드 AAV1, AAV2, AAV5 또는 이들의 임의의 조합을 선택할 수 있고; 심장 조직을 표적화하기 위해 AAV4를 선택할 수 있다. AAV8은 간 전달에 유용하다. 위의 프로모터 및 벡터는 개별적으로 바람직하다.

[0150] 본원의 실시양태에서, 전달은 AAV를 통해 이루어진다. AAV를 인간에 생체 내 전달하기 위한 치료적 유효 투여량은 약 1 x 10^{10} 내지 약 1 x 10^{14} 개의 기능적 AAV/ml 용액을 함유하는 식염수의 약 20 내지 약 50 ml 범위인 것으로 여겨진다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이익의 균형을 맞추기 위해 조정될 수 있다. 본원의 실시양태에서, AAV 용량은 일반적으로 약 1 x 10^{5} 내지 1 x 10^{14} 개의 게놈 AAV, 약 1 x 10^{8} 내지 1 x 10^{14} 개의 게놈 AAV, 약 1 x 10^{10} 내지 약 5 x 10^{13} 개의 게놈, 또는 약 1 x 10^{11} 내지 약 1 x 10^{13} 개의 게놈 AAV의 농도 범위이다. 인간 투여량은 약 1 x 10^{13} 개의 게놈 AAV일 수 있다. 이러한 농도는 약 0.001 ml 내지 약 100 ml, 약 0.05 내지 약 50 ml, 또는 약 10 내지 약 25 ml의 담체 용액으로 전달될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, AAV는 약 2 x 10^{13} 개의 바이러스 게놈/밀리리터의 역가로 사용되며, 마우스의 선조체 반구 각각은 1 회 500 나노리터 주사를 받는다. 다른 유효 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 일상적인 시험을 통해 당업자에 의해 용이하게 확립될 수 있다. 예를 들어, 2013 년 3 월 26 일자로 허여된 Hajjar 등의 미국 특허 번호 8,404,658 B2, col. 27, 라인 45-60을 참고한다.

[0151] 다른 실시양태에서, 종양 백신 또는 면역원성 조성물에 대한 세포성 면역 반응을 효과적으로 활성화시키는 것은 비-병원성 미생물에서 백신 또는 면역원성 조성물에서 관련 항원을 발현함으로써 달성될 수 있다. 이러한 미생물의 잘 알려진 예는 마이코박테리움 보비스 BCG, 살모넬라 및 슈도모나이다 (그 전체가 본원에 참조로 원용된 미국 특허 번호 6,991,797 참고).

[0152] 다른 실시양태에서, 폭스바이러스는 종양 백신 또는 면역원성 조성물에 사용된다. 이들은 오르토폭스바이러스, 아비폭스, 백시니아, MVA, NYVAC, 카나리폭스, ALVAC, 폴폭스, TROVAC 등을 포함한다 (예를 들어, Verardiet al., Hum Vaccin Immunother. 2012 Jul;8(7):961-70; 및 Moss, Vaccine. 2013; 31(39): 4220-4222 참고). 폭스바이러스 발현 벡터는 1982 년에 기재되었으며, 백신 개발뿐만 아니라 수많은 분야의 연구에 빠르게 널리 사용되었다. 벡터의 장점은 간단한 작제, 많은 양의 외래 DNA 수용 능력 및 높은 발현 수준을 포함한다.

[0153] 다른 실시양태에서 백시니아 바이러스는 종양 백신 또는 면역원성 조성물에 사용되어, 신생항원을 발현한다 (Rolph et al., Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. Curr Opin Immunol 9:517-524, 1997). 재조합 백시니아 바이러스는 감염된 숙주 세포의 세포질 내에서 복제할 수 있으며, 따라서 관심 있는 폴리펩티드는 면역 반응을 유도할 수 있다. 더욱이, 폭스바이러스는 면역 세포, 특히 항원-제시 세포를 직접 감염시킴으로써 주요 조직적합성 복합체 클래스 I 경로에 의해 가공하기 위해 코딩된 항원을 표적화하는 능력, 및 자가-아쥬반트에 대한 능력으로 인해 백신 또는 면역원성 조성물 벡터로서 널리 사용되어 왔다.

[0154] 다른 실시양태에서, ALVAC은 종양 백신 또는 면역원성 조성물에서 벡터로서 사용된다. ALVAC은 외래 트랜스진을 발현하도록 변형될 수 있는 카나리아폭스 바이러스이며, 원핵 및 진핵 항원 둘 모두에 대한 백신접종의 방법으로서 사용되었다 (Horig H, Lee DS, Conkright W, et al. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. Cancer Immunol Immunother 2000;49:504-14; von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, et al. Pilot

study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. Clin Cancer Res 2000;6:2219-28; Musey L, Ding Y, Elizaga M, et al. HIV-1 vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals. J Immunol 2003;171:1094-101; Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:11349-53; 미국 특허 번호 7,255,862). I 상 임상 시험에서, 종양 항원 CEA를 발현하는 ALVAC 바이러스는 우수한 안전성 프로파일을 보여주었고, 선택된 환자에서 CEA-특이적 T-세포 반응을 증가시켰으나; 객관적인 임상 반응은 관찰되지 않았다 (Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. J Clin Oncol 1999;17:332-7).

[0155] 다른 실시양태에서 변형된 백시니아 앙카라 (MVA) 바이러스는 종양 백신 또는 면역원성 조성물을 위한 바이러스 벡터로서 사용될 수 있다. MVA는 오르토폭스바이러스 패밀리의 구성원이며, 백시니아 바이러스 (CVA)의 앙카라 균주의 닭 배아 섬유아세포에서 약 570 회의 연속 계대에 의해 생성되었다 (검토를 위해 Mayr, A., et al., Infection 3, 6-14, 1975 참고). 이러한 계대의 결과로서, 생성된 MVA 바이러스는 CVA에 비해 31 킬로베이스 적은 게놈 정보를 함유하고, 고도로 숙주-세포 제한되었다 (Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991). MVA는 이의 극단적인 약독화, 즉, 줄어된 병독성 또는 감염성 능력을 특징으로 하지만, 여전히 우수한 면역원성을 보유한다. 다양한 동물 모델에서 테스트하였을 때, MVA는 면역-억압된 개체에서도 무독성인 것으로 입증되었다. 게다가, MVA-BN®-HER2는 HER-2 양성 유방암의 치료를 위해 설계된 후보 면역요법이며, 현재 임상 시험 중이다 (Mandl et al., Cancer Immunol Immunother. Jan 2012; 61(1): 19-29). 재조합 MVA를 제조하고 사용하는 방법이 기재되었다 (예를 들어, 그 전체가 본원에 원용된, 미국 특허 번호 8,309,098 및 5,185,146 참고).

[0156] 다른 실시양태에서, 백시니아 바이러스의 변형된 코펜하겐 균주, NYVAC 및 NYVAC 변이체가 벡터로서 사용된다 (그 전체가 본원에 참조로 원용된, 미국 특허 번호 7,255,862; PCT WO 95/30018; 미국 특허 번호 5,364,773 및 5,494,807 참고).

[0157] 일 실시양태에서 백신 또는 면역원성 조성물의 재조합 바이러스 입자는 이를 필요로 하는 환자에 투여된다. 백신 또는 면역원성 조성물은 이러한 투여량 수준에서 발현을 달성하기 위해 임의의 적합한 양으로 투여될 수 있다. 바이러스 입자는 이를 필요로 하는 환자에 투여되거나, 약 $10^{3.5}$ pfu 이상의 양으로 세포에 형질주입될 수 있으며; 따라서, 바이러스 입자는 바람직하게는 이를 필요로 하는 환자에 투여되거나 약 10^{4} pfu 이상 내지 약 10^{6} pfu로 세포에 감염 또는 형질주입되나; 이를 필요로 하는 환자에게는 보다 바람직한 투여량이 약 10^{7} pfu 이상 내지 약 10^{9} pfu일 수 있도록 약 10^{8} pfu 이상이 투여될 수 있다. NYVAC에 대한 용량은 ALVAC, MVA, MVA-BN 및 카나리폭스 및 폴폭스와 같은 아비폭스에 적용할 수 있다.

[0158] **약학 조성물/전달 방법**

[0159] 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생성된 프레임-내 cDNA 단편 서열을 포함하는 증폭 산물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정 양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생산된 프레임-내 cDNA 단편 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0160] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 종양 백신 생성에 사용하기 위한 것이다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 암 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0161] 본 발명은 또한 임의로 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 첨가제와 조합하여 본원에 기재된 방법으로 생산된 종양 백신의 유효량을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0162] "약학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에 대한 활성제의 투여 및 대상체에 의한 흡수를 돕는 물질을 지칭하며, 환자에게 유의한 유해한 독성학적 효과를 유발하지 않으면서 본원에 기재된 조성물에 포함될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제의 비-제한적인 예는 물, NaCl, 일반 식염수, 락테이티드 링거액, 일반 수크로스, 일반 글루코스, 바인더, 충전제, 붕해제, 윤활제, 코팅제, 감미료, 향료, 염 용액 (예컨대, 링거액), 알콜, 오일, 젤라틴, 탄수화물, 예컨대, 락토스, 아밀라아제 또는 전분, 지방산 에스테르, 하이드록시메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리딘 및 색소 등을 포함한다. 이러한 제제는 멸균될 수 있고, 원하는 경우, 본원에 기재된 조성물과 유해하

게 반응하지 않는 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충액, 착색제 및/또는 방향족 물질 등과 같은 보조제와 혼합될 수 있다. 당업자는 다른 약학적 부형제가 유용하다는 것을 인식할 것이다.

[0163] 종양 백신은 유일한 활성 약제로서 투여될 수 있지만, 이들은 또한 하나 이상의 다른 약제 및/또는 아쥬반트와 조합하여 사용될 수 있다. 조합으로서 투여되는 경우, 치료제는 동시에 또는 상이한 시간에 제공되는 별개의 조성물로서 제형화될 수 있거나, 치료제는 단일 조성물로서 제공될 수 있다.

[0164] 조성물은 1 일 1 회, 1 일 2 회, 2 일 마다 1 회, 3 일 마다 1 회, 4 일 마다 1 회, 5 일 마다 1회, 6 일 마다 1 회, 7 일 마다 1 회, 2 주 마다 1 회, 3 주 마다 1 회, 4 주 마다 1 회, 2 개월 마다 1 회, 6 개월 마다 1 회 또는 1 년당 1 회 투여될 수 있다. 투약 간격은 개별 환자의 필요에 따라 조정될 수 있다. 더 긴 투여 간격을 위해, 연장 방출 또는 데포 제형을 사용할 수 있다.

[0165] 본 발명의 조성물은 급성인 질환 및 질환 병태를 치료하는 데 사용될 수 있고, 또한 만성 병태의 치료를 위해 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 종양을 치료 또는 예방하는 방법에 사용된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 1 년, 2 년, 3 년, 4 년, 또는 5 년, 10 년 또는 15 년을 초과하는 기간 동안 투여되거나; 예를 들어, 범위의 하한이 14 일 내지 15 년의 임의의 기간이고 범위의 상한이 15 일 내지 20 년 (예를 들어, 4 주 내지 15 년, 6 개월 내지 20 년)인 수일, 수개월 또는 수년의 임의의 기간 범위 동안 투여된다. 일부 경우에, 본 발명의 화합물이 환자의 남은 생애 동안 투여되는 것이 유리할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 환자는 질환 또는 장애의 진행을 확인하기 위해 모니터링되고, 이에 따라 용량이 조정된다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 1 년, 2 년, 3 년, 4 년, 또는 5 년, 10 년, 15 년, 20 년 이상 또는 대상체의 남은 생애 동안 효과적이다.

[0166] 종양 백신은 주사에 의해, 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 직장으로, 질로, 또는 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트 및 비히클을 함유하는 투여량 유닛 제형으로 국부적으로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 비경구는 림프절 또는 결절에, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 주입 기술, 복강내, 눈 또는 안구, 유리체강내, 협내, 경피, 비강내, 두개내 및 경막내를 포함하는 뇌에, 발목, 무릎, 엉덩이, 어깨, 팔꿈치, 손목을 포함하는 관절에, 종양에 직접 등, 및 좌약 형태를 포함한다.

[0167] 외과적 절제술은 종격동, 신경성 또는 생식 세포 종양 또는 흉선종과 같은 암의 비정상적인 조직을 제거하기 위해 수술을 사용한다. 특정 실시양태에서, 종양 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 종양 절제 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 주 이상에 개시된다. 바람직하게는, 종양 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 종양 절제 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 주에 개시된다. 일부 실시양태에서, 종양은 완전히 절제되지 않을 수 있고, 종양 백신의 투여는 종양이 환자에 여전히 존재하는 동안 발생한다.

[0168] 프라임/부스트 양생법은 백신 또는 면역원성 또는 면역학적 조성물의 연속적인 투여를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 종양 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 프라임/부스트 투약 양생법, 예를 들어, 프라임으로서 1, 2, 3 또는 4 주차에 종양 백신 또는 면역원성 조성물의 투여이며, 종양 백신 또는 면역원성 조성물의 투여는 부스트로서 2, 3 또는 4 개월차에 있다. 다른 실시양태에서, 이종 프라임-부스트 전략은 더 큰 세포독성 T-세포 반응을 이끌어내기 위해 사용된다. (Schneider et al., Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunization strategies, Immunological Reviews Volume 170, Issue 1, pages 29-38, August 1999 참고). 다른 실시양태에서, 종양 백신을 코딩하는 DNA는 프라이밍에 이어, 단백질 부스트에 사용된다. 다른 실시양태에서, 단백질은 종양 백신을 코딩하는 바이러스로 프라이밍한 후 부스팅하기 위해 사용된다. 다른 실시양태에서, 종양 백신을 코딩하는 바이러스는 프라이밍에 사용되고 다른 바이러스는 부스트에 사용된다. 다른 실시양태에서, 단백질은 프라이밍에 사용되고 DNA는 부스트에 사용된다. 바람직한 실시양태에서, DNA 백신 또는 면역원성 조성물은 T-세포 반응을 프라이밍하기 위해 사용되고, 재조합 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물은 반응을 부스팅하기 위해 사용된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물은 단백질 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물에 대한 아쥬반트로서 작용하기 위해 단백질 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물과 공동-투여된다. 이어서, 환자는 바이러스 백신 또는 면역원성 조성물, 단백질 또는 DNA 백신 또는 면역원성 조성물로 부스팅될 수 있다 (Hutchings et al., Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge. Infect Immun. 2007 Dec;75(12):5819-26. Epub 2007 Oct 1 참고).

[0169] 약학 조성물은 인간 및 다른 포유류를 포함하여 약제를 필요로 하는 환자에 투여하기 위한 약제를 생산하기 위

해 통상적인 약학의 방법에 따라 가공될 수 있다.

[0170] 본원에 기재된 방법으로 생성된 종양 백신은 하나 이상의 신생항원을 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 면역조정제 또는 아쥬반트를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역조정제 또는 아쥬반트는 폴리-ICLC, 1018 ISS, 알루미늄 염, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, 이미퀴모드, ImuFact IMP321, IS 패치, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, 모노포스포릴 지질 A, 몬타나이드 IMS 1312, 몬타나이드 ISA 206, 몬타나이드 ISA 50V, 몬타나이드 ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PEPTEL, 벡터 시스템, PLGA 마이크로입자, 레시퀴모드, SRL172, 바이로좀 및 기타 바이러스-유사 입자, YF-17D, VEGF 트랩, R848, 베타-글루칸, Pam3Cys 및 Aquila의 QS21 스티뮬론으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 면역조정제 또는 아쥬반트는 폴리-ICLC를 포함한다.

[0171] 예를 들어, 바디메잔 또는 AsA404 (5,6-디메틸아크산테논-4-아세트산 (DMXAA)로서 또한 알려짐)와 같은 크산테논 유도체가 또한 본 발명의 실시양태에 따른 아쥬반트로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 이러한 유도체는 또한 종양 부위에서 면역성을 자극하기 위해 예를 들어, 전신 또는 종양내 전달을 통해 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물과 병행하여 투여될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 크산테논 유도체는 IFN 유전자 ISTING) 수용체의 자극제를 통해 인터페론 (IFN) 생산을 자극함으로써 작용하는 것으로 여겨진다 (예를 들어, Conlon et al. (2013) Mouse, but not Human STING, Binds and Signals in Response to the Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid, Journal of Immunology, 190:5216-25 및 Kim et al. (2013) Anticancer Flavonoids are Mouse-Selective STING Agonists, 8:1396-1401 참고).

[0172] 종양 백신 또는 면역학적 조성물은 또한 아크릴 또는 메타크릴 중합체 및 말레산 무수물 및 알케닐 유도체의 공중합체로부터 선택되는 아쥬반트 화합물을 포함할 수 있다. 이는 특히 당 또는 폴리알콜 (카보머)의 폴리알케닐 에테르와 가교된, 특히 알릴 수크로스 또는 알릴펜타에리트리톨과 가교된 아크릴산 또는 메타크릴산의 중합체이다. 이는 또한 예를 들어, 디비닐 에테르와 가교된 말레산 무수물 및 에틸렌의 공중합체일 수 있다 (그 전체가 본원에 참조로 원용된 미국 특허 번호 6,713,068 참고).

[0173] 약학 조성물은 임의로 약학적으로 허용가능한 첨가제, 담체 및/또는 부형제와 조합하여 본원에 기재된 질환 및 병태 (예를 들어, 종양)를 치료하기 위한 치료적 유효량으로 본원에 기재된 종양 백신을 포함한다. 본 개시내용 및 당해 분야의 지식으로부터 당업자는 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물의 치료적 유효량이 치료될 병태, 이의 중증도, 사용될 치료 양생법, 사용된 약제의 약동학뿐만 아니라 치료되는 환자 (동물 또는 인간)에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다.

[0174] 본 발명에 따른 약학 조성물을 제조하기 위해, 본 발명에 따른 화합물 중 하나 이상의 치료적 유효량은 바람직하게는 통상적인 약학 배합 기술에 따라 약학적으로 허용가능한 담체와 친밀하게 혼합되어, 용량을 생산한다. 담체는 투여에 원하는 제제의 형태에 따라, 예를 들어, 특히 안구, 경구, 국부 또는 비경구, 겔, 크림 연고, 로션 및 시간 방출 이식형 제제에 따라 다양한 형태를 취할 수 있다. 경구 투여량 형태의 약학 조성물을 제조함에 있어서, 통상적인 약학 매질 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 따라서, 현탁액, 엘릭시르 및 용액과 같은 액체 경구 제제의 경우, 물, 글리콜, 오일, 알콜, 향미제, 보존제, 착색제 등을 포함하는 적합한 담체 및 첨가제가 사용될 수 있다. 분말, 정제, 캡슐과 같은 고형 경구 제제 및 좌약과 같은 고형 제제의 경우, 전분, 덱스트로스, 만니톨, 락토스와 같은 당 담체 및 관련 담체, 희석제, 과립화제, 윤활제, 바인더 및 붕해제 등을 포함하는 적합한 담체 및 첨가제가 사용될 수 있다. 원하는 경우, 정제 또는 캡슐은 장용-코팅되거나 표준 기술에 의해 지속 방출될 수 있다.

[0175] 활성 화합물은 치료된 환자에게 심각한 독성 효과를 유발하지 않으면서 원하는 적응증에 대한 치료적 유효량을 환자에 전달하기에 충분한 양으로 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에 포함된다.

[0176] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 동봉되거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료적 투여를 위해, 활성 화합물 또는 이의 전구약물 유도체는 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 정제, 트로키 또는 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 약학적으로 상용성인 결합제 및/또는 아쥬반트 재료가 조성물의 일부로서 포함될 수 있다.

[0177] 정제, 알약, 캡슐 및 트로키 등은 다음의 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 바인더, 예컨대, 미정질 셀룰로스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대, 전분 또는 락토스, 분산제, 예컨대, 알긴산 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트; 활택제, 예컨대, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대, 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향료. 투여량 유

닛 형태가 캡슐인 경우, 본원에서 논의된 재료 이외에 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 게다가, 투여량 유닛 형태는 투여량 유닛의 물리적 형태를 변형하는 다양한 기타 재료, 예를 들어, 당, 셸락 또는 장용제의 코팅을 함유할 수 있다.

[0178] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제형은 활성 성분의 소정량을 각각 함유하는 캡슐, 사쉐 또는 정제와 같은 개별 유닛으로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 액체 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서; 또는 수-중-유 액체 에멀젼 또는 유-중-수 에멀젼으로서 및 볼루스 등으로서 제시될 수 있다.

[0179] 정제는 임의로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형으로 만들 수 있다. 압축된 정제는 임의로 바인더, 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 표면-활성제 또는 분산제와 혼합된 분말 또는 과립과 같은 자유-유동성 형태의 활성 성분을 적합한 기계에서 압축함으로써 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 희석제로 적신 분말의 화합물의 혼합물을 적합한 기계에서 성형함으로써 제조될 수 있다. 정제는 임의로 코팅되거나 스코어링될 수 있고, 활성 성분의 느린 방출 또는 제어된 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다.

[0180] 약학적 활성 성분의 이러한 느린 방출 또는 제어된 방출 조성물을 제형화하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 몇몇 발행된 미국 특허에 기재되어 있으며, 이들 중 일부는 미국 특허 번호 3,870,790; 4,226,859; 4,369,172; 4,842,866 및 5,705,190를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 이들의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 코팅은 화합물을 장으로 전달하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,638,534, 5,541,171, 5,217,720 및 6,569,457 및 본원에 인용된 참조 참고).

[0181] 활성 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 또한 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 또는 츄잉 검 등의 구성요소로서 투여될 수 있다. 시럽은 활성 화합물 외에도 감미제로서의 수크로스 또는 프럭토스, 특정 보존제, 염료, 착색제 및 향료를 함유할 수 있다.

[0182] 안구, 비경구, 피내, 피하 또는 국부 적용에 사용된 용액 또는 현탁액은 다음의 구성요소를 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대, 주사용 물, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트; 킬레이팅제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 및 장성 조절제, 예컨대, 소듐 클로라이드 또는 덱스트로스.

[0183] 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용되가능한 담체는 수성 용매, 즉, 임의로 추가적인 보조-용매와 함께 물을 포함하는 용매이다. 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 물, 수 중 완충 용액 (예컨대, 포스페이트-완충된 식염수 (PBS) 및 수중 5% 덱스트로스 (D5W) 또는 10% 트레할로오스 또는 10% 수크로스를 포함한다. 특정 실시양태에서, 수성 용매는 예를 들어, 약 1-4%, 또는 1-3%의 양으로 디메틸 설폭사이드 (DMSO)를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용가능한 담체는 등장성이다 (즉, 혈장과 같은 체액과 실질적으로 동일한 삼투압을 가짐).

[0184] 일 실시양태에서, 활성 화합물은 이식체 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어된 방출 제형과 같이 신체로부터의 급속한 제거에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락틱-코-글리콜산 (PLGA)와 같은 생분해성 생체적합성 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 본 개시내용 및 당해 분야의 지식을 고려하여 당업자의 영역 내에 있다.

[0185] 본 개시내용 및 당해 분야의 지식으로부터 당업자는 정제에 더하여, 활성 성분의 느린 방출 또는 제어된 방출을 제공하기 위해 다른 투여량 형태가 제형화될 수 있음을 인식한다. 이러한 투여량 형태는 캡슐, 과립화 및 겔-캡을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0186] 리포좀 현탁액은 또한 약학적으로 허용가능한 담체일 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 제형은 적절한 지질(들)을 무기 용매에 용해시킨 다음, 증발시켜, 용기 표면에 건조된 지질의 박막을 남김으로써 제조될 수 있다. 그런 다음, 활성 화합물의 수용액이 용기에 도입된다. 그런 다음, 용기를 손으로 휘저어, 용기 측면으로부터 지질 재료를 제거하고, 지질 응집체를 분산시켜, 리포솜 현탁액을 형성한다. 당업자에게 잘 알려진 다른 제조 방법이 또한 본 발명의 이러한 양태에서 사용될 수 있다.

[0187] 제형은 편리하게 유닛 투여량 형태로 제시될 수 있고, 통상적인 약학 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분 및 약학 담체(들) 또는 부형제(들)를 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고형 담체 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 회합시킨 다음, 필요한 경우, 생성물을

성형함으로써 제조된다.

[0188] 입안의 국부 투여에 적합한 제형 및 조성물은 향미 베이스, 보통 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트의 성분을 포함하는 로젠지; 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 불활성 베이스에 활성 성분을 포함하는 알약; 및 적합한 액체 담체에 투여될 성분을 포함하는 구강청결제를 포함한다.

[0189] 피부에 대한 국부 투여에 적합한 제형은 약학적으로 허용가능한 담체에 투여될 성분을 포함하는 연고, 크림, 겔 및 페이스트로서 제시될 수 있다. 바람직한 국부 전달 시스템은 투여될 성분을 함유하는 경피 패치이다.

[0190] 직장 투여를 위한 제형은 예를 들어, 코코아 버터 또는 살리실레이트를 포함하는 적합한 베이스와 함께 좌약으로서 제공될 수 있다.

[0191] 담체가 고형인 비강 투여에 적합한 제형은 스너프(snuff)가 투여되는 방식, 즉, 코 가까이에 있는 분말의 용기로부터의 비강 통과를 통해 빠른 흡입에 의해 투여되는 예를 들어, 20 내지 500 미크론 범위의 입자 크기를 갖는 굵은 분말을 포함한다. 예를 들어, 비강 스프레이 또는 점비제와 같은 투여를 위한 담체가 액체인 적합한 제형은 활성 성분의 수성 또는 유성 용액을 포함한다.

[0192] 질 투여에 적합한 제형은 활성 성분 이외에 당업계에 적절한 것으로 알려진 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형으로서 제시될 수 있다.

[0193] 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만든 다중 용량 바이알에 동봉될 수 있다. 정맥내 투여되는 경우, 바람직한 담체는 예를 들어, 생리식염수 또는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)를 포함한다.

[0194] 비경구 제형의 경우, 담체는 일반적으로 멸균수 또는 소듐 클로라이드 수용액을 포함하지만, 분산을 돕는 성분을 포함하는 다른 성분이 포함될 수 있다. 물론, 멸균수가 사용되고 멸균 상태로서 유지되는 경우, 조성물 및 담체가 또한 멸균된다. 주사가능한 현탁액이 또한 제조될 수 있으며, 이 경우 적절한 액체 담체 및 현탁제 등이 사용될 수 있다.

[0195] 비경구 투여에 적합한 제형은 항산화제, 완충액, 정균제 및 의도된 수용자의 혈액과 등장성 제형을 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 유닛-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알로 제시될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용 물의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조된 (동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0196] 활성 화합물의 투여는 연속 (정맥 점적) 내지 하루당 수회의 경구 투여 (예를 들어, Q.I.D.)의 범위일 수 있으며, 경구, 국부, 눈 또는 안구, 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 경피 (이는 침투 증진제를 포함할 수 있음), 눈 또는 안구 경로를 통한 것을 비롯하여 다른 투여 경로 중에서 협측 및 좌약 투여를 포함할 수 있다.

[0197] 종양 백신 또는 면역원성 조성물은 주사에 의해, 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 직장으로, 질로, 또는 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체, 아쥬반트 및 비히클을 함유하는 투여량 유닛 제형으로 국부적으로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 비경구는 림프절 또는 결절에, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 주입 기술, 복강내, 눈 또는 안구, 유리체강내, 협내, 경피, 비강내, 두개내 및 경막내를 포함하는 뇌에, 발목, 무릎, 엉덩이, 어깨, 팔꿈치, 손목을 포함하는 관절에, 종양에 직접 등, 및 좌약 형태를 포함한다.

[0198] 주사, 카테터, 트로카스, 발사체, 플루로닉 겔, 스텐트, 지속 약물 방출 중합체 또는 내부 접근을 제공하는 다른 장치의 사용과 같은 관심 있는 부위에 대상 조성물을 제공하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있다. 장기 또는 조직이 환자로부터 제거되어 접근이 가능한 경우, 이러한 장기 또는 조직은 대상 조성물을 함유하는 매질에 담겨질 수 있고, 대상 조성물은 장기 상에 페인팅될 수 있거나, 임의의 편리한 방식으로 적용될 수 있다.

[0199] 종양 백신은 원하는 국소 또는 전신 생리학적 또는 약리학적 효과를 수득하는 데 효과적인 조성물의 제어된 및 지속된 방출에 적합한 장치를 통해 투여될 수 있다. 이 방법은 약제의 방출을 원하는 구역에 서방형 약물 전달 시스템을 배치하고, 약제가 장치를 통해 원하는 치료 구역을 통과하도록 하는 단계를 포함한다.

[0200] ***치료적 방법***

[0201] 본 발명은 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터를 대상체에 투여함으로써 대상체에서 종양 특이적 면역 반응을 유도하고, 종양에 대해 백신접종하고, 대상체에서 암의 증상을 치료

및/또는 완화하는 방법을 제공한다.

[0202] 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터는 암을 갖는 것으로서 진단되었거나 암이 발달할 위험이 있는 환자에 대해 사용될 수 있다.

[0203] 이 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터를 사용하여 치료될 수 있는 암은 다른 화학요법제를 사용한 치료에 불응성인 경우를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "불응성"은 다른 화학요법제로 치료한 후 항증식 반응을 나타내지 않거나 약한 항증식 반응 (예를 들어, 종양 성장의 억제를 나타내지 않거나 단지 약한 억제)만을 나타내는 암 (및/또는 이의 전이)을 지칭한다. 이들은 다른 화학요법제로 만족스럽게 치료될 수 없는 암이다. 불응성 암은 (i) 환자 치료 동안 하나 이상의 화학요법이 이미 실패한 암뿐만 아니라 (ii) 다른 수단, 예를 들어, 화학요법제의 존재 하에서의 생검 및 배양에 의해 불응성인 것으로 나타날 수 있는 암을 포함한다.

[0204] 본원에 기재된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터는 또는 이전에 치료된 적이 없는 치료를 필요로 하는 환자의 치료에 적용가능하다.

[0205] 본원에 기재된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터는 또한 대상체가 검출가능한 종양을 갖지 않지만 질환 재발의 위험이 높은 경우에 적용가능하다.

[0206] 또한 특별한 관심은 자가유래 조혈 줄기 세포 이식 (AHSCT)을 겪은 치료가 필요한 환자, 특히 AHSCT를 겪은 후 잔여 질환을 보이는 환자의 치료이다. AHSCT-후 설정은 적은 부피의 잔류 질환, 항상성 확장 상황에 대한 면역 세포의 주입 및 표준 재발-지연 요법의 부재를 특징으로 한다. 이들 특징은 질환 재발을 지연시키기 위해 기재된 신생물 백신 또는 면역원성 조성물을 사용하는 고유한 기회를 제공한다.

[0207] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 조성물, 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터는 임의의 다른 통상적인 항-암 치료, 예를 들어, 방사선 요법 및 종양의 외과적 절제와 함께 투여될 수 있다. 이들 치료는 필요에 따라 및/또는 표시된 바와 같이 적용될 수 있으며, 따라서, 본원에 기재된 약학 조성물, 종양 백신, 종양 백신을 코딩하는 벡터, 투여량 형태 및 키트의 투여 전, 이와 동시에 또는 후에 발생할 수 있다.

[0208] 본원에 기재된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터의 유효 용량은 환자에 대해 최소한의 독성을 갖는, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료적 반응을 달성하기에 효과적인 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터의 양이다. 유효 투여량 수준은 본원에 기재된 방법을 사용하여 식별될 수 있으며, 투여되는 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료의 지속기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 재료, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반적인 건강 및 이전 병력을 포함하는 다양한 약동학적 인자, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 달라진다. 일반적으로, 암 요법의 유효 용량은 치료적 효과를 생산하는 데 효과적인 최저 용량인 치료제의 양이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 위에 기재된 인자에 따라 달라진다.

[0209] 투여 경로의 예는 경구 투여, 직장 투여, 국부 투여, 흡입 (비강) 또는 주사를 포함한다. 주사에 의한 투여는 정맥내 (IV), 병변내, 종양주위, 근육내 (IM) 및 피하 (SC) 투여를 포함한다. 본원에 기재된 조성물은 경구, 비경구, 장내, 정맥내, 종양내, 복강내, 국부, 경피 (예를 들어, 임의의 표준 패치 사용), 피내, 안과적, 비강(내), 국소, 비-구강, 예컨대, 에어로졸, 흡입, 피하, 근육내, 협측, 설하, (경)직장, 질, 동맥-내 및 척수강내, 경점막 (예를 들어, 설하, 설측, (경)협측, (경)요도, 질 (예를 들어, 경- 및 질주위), 이식된, 방광내, 폐내, 십이지장내, 위내 및 기관지내를 비제한적으로 포함하는 임의의 효과적인 경로에 의해 임의의 형태로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 조성물, 종양 백신 또는 백신-코딩 벡터는 경구로, 직장으로, 국부로, 방광내로, 배액 림프절에 또는 이에 인접하여 주사에 의해, 정맥내로, 흡입 또는 에어로졸에 의해, 또는 피하로 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여는 비경구 투여 (예를 들어, 피하 투여)이다. 투여는 종양내 주사 또는 종양주위 주사일 수 있다.

[0210] 투여량 양생법은 다양한 방법 및 양 중 임의의 것일 수 있고, 알려진 임상 인자에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 의학 분야에 알려진 바와 같이, 임의의 한 명의 환자에 대한 투여량은 대상체의 종, 크기, 체표면적, 연령, 성별, 면역적합, 종양 치수 및 일반적인 건강, 투여될 특정 미생물, 투여의 지속기간 및 경로, 질환의 종류 및 단계, 예를 들어, 종양 크기 및 동시에 투여되는 약물과 같은 기타 화합물을 포함하는 많은 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0211] 본원에 기재된 치료 방법은 일차 종양, 이차 종양 또는 전이뿐만 아니라 재발성 종양 또는 암의 치료에 적합할 수 있다. 본원에 기재된 약학 조성물의 용량은 투여량 형태, 투여 경로, 및 표적 질환의 정도 또는 단계 등에

따라 적절하게 설정 또는 조정될 수 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 대상체에 투여되는 용량은 암을 예방하거나, 이의 발병을 지연시키거나, 이의 진행을 늦추거나 정지시키거나, 암의 재발을 방지하거나, 대상체의 전체 생존에 기여하기에 충분하다. 당업자는 투여량이 대상체의 연령, 종, 병태 및 체중뿐만 아니라 사용되는 특정 화합물의 강도를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것임을 인지할 것이다. 용량의 크기는 또한 투여의 경로, 시기 및 빈도뿐만 아니라 특정 화합물의 투여 및 원하는 생리학적 효과에 수반될 수 있는 임의의 유해 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정될 것이다.

[0213] 적합한 용량 및 투여량 양생법은 당업자에게 알려진 통상적인 범위-찾기 기술에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 치료는 화합물의 최적 용량보다 적은 더 적은 용량으로 개시된다. 그 후, 환경 하에서 최적의 효과에 도달할 때까지 투여량을 작은 증분으로 증가시킨다. 효과적인 투여량 및 치료 프로토콜은 예를 들어, 실험실 동물에서 적은 용량으로 출발한 다음, 효과를 모니터링하면서 투여량을 증가시키고 투여량 양생법을 체계적으로 변동시키는 일상적이고 통상적인 수단에 의해 결정될 수 있다. 동물 연구는 일반적으로 체중 킬로그램당 생물활성제의 최대 용인가능한 용량 ("MTD")을 결정하는 데 사용된다. 당업자는 인간을 포함하는 다른 종에서 독성을 피하면서 효험에 대한 용량을 정기적으로 외삽한다.

[0214] 위에 따라, 치료적 적용에서, 본원에 제공된 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터의 투여량은 선택한 투여량에 영향을 미치는 다른 인자 중에서, 투여된 특이적 종양 백신 또는 종양 백신을 코딩하는 벡터, 수용 환자의 연령, 체중 및 임상 병태, 및 요법을 투여하는 임상의 또는 개업의의 경험 및 판단에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 용량은 종양의 성장을 늦추고, 바람직하게는 퇴행시키고, 가장 바람직하게는 암의 완전한 퇴행을 유발하기에 충분해야 한다.

[0215] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 예는 혈액 악성종양, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 과립구성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, 호염기성 백혈병, 백혈구 백혈병, 호염기성 백혈병, 모세포 백혈병, 소 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 피부 백혈병, 배아 백혈병, 호산 구성 백혈병, 육안 백혈병, 리더 세포 백혈병, 실링 백혈병, 줄기 세포 백혈병, 아백혈병성 백혈병, 미분화 세포 백혈병, 모세포 백혈병, 혈모세포성 백혈병, 조혈모세포성 백혈병, 조직구성 백혈병, 줄기세포 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 백혈구감소성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프성 백혈병, 림프구성 백혈병, 림프육종 세포 백혈병, 비만 세포 백혈병, 거핵구성 백혈병, 미세골수구성 백혈병, 단구성 백혈병, 골수구성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수성 과립구성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 내겔리 백혈병, 형질세포 백혈병, 형질세포성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 포상암종, 포상암종, 선낭포암종, 선양낭성암종, 선종암종, 부신피질암종, 폐포암종, 폐포세포암종, 기저 세포 암, 기저 세포 암종, 기저양 암종, 기저 편평 세포 암종, 기관지 폐포 암종, 세기관지 암종, 기관지 암종, 뇌상 암종, 담관세포 암종, 융모막 암종, 콜로이드 암종, 코메도 암종, 코퍼스 암종, 뇌상 암종, 흉갑상피암종, 피부암종, 원통형 암종, 원통형 세포 암종, 관 암종, 듀럼 암종, 배아 암종, 뇌양 암종, 상피막 암종, 암 상피 아데노이드, 외피성 암종, 궤양성 암종, 섬유종 암종, 젤라틴형 암종, 젤라틴성 암종, 거대 세포 암종, 반지 세포 암종, 단순 암종, 소세포 암종, 솔라노이드 암종, 구상 세포 암종, 스핀들 세포 암종, 해면상암종, 편평상피암종, 편평세포암종, 끈상 암종, 모세혈관확장 암종, 모세혈관외외암종, 전이 세포 암종, 결절성 암종, 결절성 암종, 사마귀 암종, 융모 암종, 거대세포암종, 선암종, 과립막 세포 암종, 모발 기질 암종, 혈종암, 간세포 암종, 허슬 세포 암종, 유리질 암종, 과신장 암종, 영아 배아 암종, 상피내 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 크롬페허 암종, 쿨치츠키 세포 암종, 대세포 암종, 수정체 암종, 렌티큘라 암종, 지방종성 암종, 림프상피 암종, 수질 암종, 수질 암종, 흑색성 암종, 암종 몰리, 점액성 암종, 점액성 암종, 점액성 암종, 점액표피양 암종, 점액암종, 점액암종, 점액종암종, 비인두암종, 귀리세포 암종, 골화성 암종, 골양 암종, 유두상 암종, 문맥주위 암종, 전침윤성 암종, 가시 세포 암종, 풀타세우스(pultaceous) 암종, 신장의 신장 세포 암종, 예비 세포 암종, 육종 암종, 슈나이더 암종, 경상 암종, 음낭암종, 연골 육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 자궁내막 육종, 간질 육종, 유윙 육종, 근막 육종, 섬유아세포 육종, 거대 세포 육종, 아베메시 육종, 지방 육종, 지방육종, 폐포 연조직 육종, 법랑모세포 육종, 보트로이드 육종, 녹색종 육종, 융모막 암종, 배아 육종, 윌름스 종양 육종, 과립구성 육종, 호지킨 육종, 특발성 다발색소 출혈성 육종, B 세포의 면역모세포 육종, 림프종, T 세포의 면역모세포 육종, 젠센(Jensen) 육종, 카포시 육종, 쿠퍼 세포 육종, 혈관육종, 백혈구육종, 악성 중간엽 육종, 방골육종, 망상구성 육종, 횡문근 육종, 장낭성 육종, 윤활막 육종, 모세혈관확장 육종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 방광암, 유방암, 난소암, 폐암, 결장직장암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 소-세포 폐종양, 원발성 뇌종양, 위암, 결장암, 악성 췌장 섬도종, 악성 카르시노이드, 전암성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식기암, 악성 고칼슘혈증, 자궁경부암, 자

궁내막암, 부신피질암, Harding-Passey 흑색종, 소아 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 악성 흑색종, 말단 흑색 흑색종, 무색 흑색종, 양성 소아 흑색종, 클라우드맨 흑색종, S91 흑색종, 결절성 흑색종 조갑하 흑색종, 표재성 전이성 흑색종, 형질세포종, 결장직장암, 직장암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0216] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 육종의 치료에 관한 것이다. 용어 "육종"은 일반적으로 배아 결합 조직과 같은 물질로 구성되고 일반적으로 원섬유형, 이종 또는 균질 물질에 포매된 밀접하게 패킹된 세포로 구성된 종양을 지칭한다. 육종은 연골육종, 섬유육종, 림프육종, 흑색육종, 점액육종, 골육종, 자궁내막육종, 간질 육종, 유윙육종, 근막육종, 섬유아세포육종, 거대세포육종, 아베메시육종, 지방육종, 지방육종, 폐포연부육종, 법랑모세포육종, 보트로이드 육종, 녹색종 육종, 융모막 암종, 배아 육종, 윌름스 종양 육종, 과립구 육종, 호지킨의 육종, 특발성 다색소 출혈성 육종, B 세포의 면역모세포 육종, 림프종, T 세포의 면역모세포 육종, 젠센 육종, 카포시 육종, 쿠퍼 세포 육종, 혈관육종, 백혈구육종, 악성 중간엽 육종, 방골육종, 망상적혈구 육종, 라우스 육종, 장낭 육종, 윤활막 육종 및 모세혈관확장 육종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0217] 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 추가적인 예시적인 종양은 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 소-세포 폐 종양, 원발성 뇌 종양, 위암, 결장암, 악성 췌장 섬도종, 악성 유암종, 전암성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식기암, 악성 고칼슘혈증, 자궁경부암, 자궁내막암 및 부신피질암을 포함한다.

[0218] 일부 실시양태에서, 치료되는 암은 흑색종이다. 용어 "흑색종"은 피부 및 기타 장기의 멜라닌세포계에서 발생하는 종양을 의미하는 것으로 간주된다. 흑색종의 비-제한적인 예는 Harding-Passey 흑색종, 소아 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 악성 흑색종, 선단 흑자성 흑색종, 무색소성 흑색종, 양성 소아 흑색종, Cloudman의 흑색종, S91 흑색종, 결절성 흑색종 조갑하 흑색종, 및 표재 확산 흑색종이다.

[0219] 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 특정 범주의 종양은 림프증식성 장애, 유방암, 난소암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 골암, 간암, 위암, 결장암, 결장직장암, 췌장암, 갑상선의 암, 두경부암, 중추 신경계의 암, 말초 신경계의 암, 피부암, 신장 암뿐만 아니라 위의 모든 전이를 포함한다. 특정 유형의 종양은 간세포 암종, 간종, 간모세포종, 횡문근육종, 식도 암종, 갑상선 암종, 신경절모세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 침습성 관 암종, 유두상 선암종, 흑색종, 폐 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종 (잘 분화된, 중간 정도 분화된, 약하게 분화된 또는 미분화된), 기관지 폐포 암종, 신장 세포 암종, 과다신종, 과신상 선암종, 담관암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양, 고환 종양, 소세포, 비-소세포 및 대세포 폐 암종을 포함하는 폐 암종, 방광 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 망막모세포종, 신경모세포종, 결장 암종, 직장 암종, 모든 유형의 백혈병 및 급성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 비만 세포 백혈병, 다발성 골수종, 골수성 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종을 포함한 림프종을 포함한 조혈 악성 종양을 포함한다.

[0220] 특정 실시양태에서 치료되는 암은 또한 전암성 병변, 예를 들어, 광선 각화증 (일광 각화증), 모반 (이형성 모반), 아시틴성 구순염 (농부 입술), 피부 뿔, 바렛 식도, 위축성 위염, 선천 각화 이상증, 철철감소성 삼킴곤란, 편평 태선, 구강 점막하 섬유증, 광선 (태양) 탄력증 및 자궁경부 이형성증을 포함한다.

[0221] 일부 실시양태에서 치료되는 암은 담관종, 결장 폴립, 선종, 유두종, 낭포선종, 간 세포 선종, 포상기태, 신관선종, 편평 세포 유두종, 위 폴립, 혈관종, 골종, 연골종, 지방종, 섬유종, 림프관종, 평활근종, 횡문근종, 성상세포종, 모반, 수막종 및 신경절신경종을 비제한적으로 포함하는 내배엽, 외배엽 또는 중간엽 기원의 비-암성 또는 양성 종양을 포함한다.

[0222] 흑색종, 유방암, 전립선암, 췌장암, 교모세포종, 신장 세포 암종 및 결장직장암의 치료가 특히 관심이다.

[0223] **실시예**

[0224] 본 발명은 이제 일반적으로 기재되며, 본 발명의 특정 양태 및 실시양태의 예시 목적으로만 포함되며 본 발명을 제한하려는 의도가 아닌 다음의 실시예를 참조하여 보다 용이하게 이해될 것이다. 이와 같이, 개시된 유익한 물질 및 요법 중 임의의 것이 본 개시내용의 범주 내에서 치환될 수 있음이 용이하게 명백할 것이다.

[0225] *실시예 1*

[0226] 도 1 및 2에 예시된 바와 같이, 세포에 의해 발현된 단백질의 전체 또는 선택된 분획을 코딩하는 엑솜-선택된

가닥-특이적-cDNA 단편의 수집물을 세포로부터의 RNA 또는 환자로부터의 신선한 동결된 파라핀 포매된 (FFPE) 조직 슬라이스로부터 제조하였다. 일부 경우에, FFPE는 시각적 기술 또는 확대 (레이저 포획)를 통해 고농도의 종양 세포를 함유하는 영역에 대해 강화된다. 세포가 종양 세포인 경우, 라이브러리는 전체 또는 거의 모든 신생항원뿐만 아니라 종양 연관된 항원 및 인트론 근처의 추가적인 게놈 영역 및 핵산 시퀀싱 및 항원 예측 알고리즘 의 사용에 의해 용이하게 결정될 수 없는 신생항원 번역 산물을 함유할 수 있는 비번역된 영역을 포함한다.

[0227] 임의로, 도 2에 예시된 바와 같이, 종양 세포로부터의 엑솜-포획된 단편은 먼저 박테리아 종, 예컨대, 비제한적으로 미스-매칭된 이중-가닥의 올리고뉴클레오티드에 선택적으로 결합할 수 있고, 매칭된 이중체에 완벽하게 결합하지 않아, 물리적 분리 및 미스-매칭된 이중-가닥의 올리고뉴클레오티드의 농축 및 돌연변이-함유 단편에 대한 농축을 허용하는 대장균 또는 *D. 라디오누란스*로부터의 단백질 MutS와의 항온처리를 통해 미스-매칭된 이종이중체 단편에 대해 농축된다.

[0228] 엑솜 포획 프로브를 설계하는 방법에는 여러 가지가 있다. 이용가능한 표준 엑솜 포획 프로브는 참조 게놈 서열을 기반으로 하며, 모든 알려진 CDS에서 주로 코딩 영역 엑손을 포획한다. 이는 3 개의 함의를 갖는다: (1) 참조 게놈 및 환자 게놈 사이의 SNP는 결과적으로 MutS에 의해 강화되며; (2) 5' 및 3' UTR이 누락되고 5' 및 3' 엑손-인트론 접합부의 제한된 길이 적용범위가 있으며; (3) 임의의 주어진 종양 조직학은 전형적으로 완전한 CDS보다 더 제한된 유전자 세트를 발현하기 때문에, 조직학-특이적 포획 프로브를 설계하는 것이 가능하다. 이는 다중 "순수한" 종양 샘플의 서열 분석 및 일부 기준선 임계치 초과로 발현되는 유전자만을 포함하는 것을 기반으로 할 수 있다. 이는 일부 환자의 종양에서 비정상적으로 발현된 일부 유전자를 제거할 수 있다. 조직학적-특이적 포획 세트가 사용되는 경우, 일부 잠재적인 "기질-연관된" 유전자 (예를 들어, 유용한 에피토프 표적을 함유할 수 있는 암-연관된 섬유아세포의 섬유아세포 활성화 단백질 (FAP))가 포함되지 않을 수 있다. 이들은 별도의 포함을 보증할 수 있다.

[0229] 대안적으로, SNP의 MutS 강화를 감소시키기 위해 (이식 적용을 제외한 일반적인 상황), SNP의 알려진 위치 및 빈도를 기반으로 엑솜 포획 프로브 세트를 설계하였다. 이 프로브 세트를, SNP 미스-매치 영역이 발생하지 않도록 이러한 SNP 위치 주변에 설계하였다. 주변에 설계된 SNP 빈도의 깊이를 분석하였다. 5' 및 3' UTR 및 더 확장된 인트론 영역을 포함하는 포획 프로브를 설계하였다. 관련 기질-연관된 표적 유전자의 정의된 세트는 모든 조직학-특이적 세트에 포함될 수 있다.

[0230] 도 3에 예시된 바와 같이, T7 RNA 중합효소 개시를 위한 프로모터를 함유하는 업스트림 영역과 뒤이은 번역 개시 부위 (샤인-달가노 리보좀 결합 부위 또는 등가물), ATG (개시) 코돈, 작은 가용성 단백질-코딩 도메인에 대한 말단 정지 코돈이 없는 코딩 서열 (작은 단백질-코딩 도메인은 프레임-밖 리딩 프레임 둘 모두에서 번역 정지 서열을 함유함); 및 이후의 RNA/DNA 결찰을 향상시키기 위해 사용될 수 있는 정의된 어댑터 서열을 함유하는 다운스트림 영역 사이에서 PCR 또는 클로닝에 의해 적절한 배향으로 가닥-특이적 단편이 삽입된다. 작은 가용성 단백질-코딩 도메인 (작은 단백질 코딩 도메인은 프레임-밖 리딩 프레임 둘 모두에서 번역 정지 서열을 함유함)에 대한 말단 정지 코돈이 없는 코딩 서열은 또한 가닥-특이적 단편의 다운스트림에 있을 수 있다. 이 대안적인 설계에서, 작은 단백질-코딩 서열의 3' 단부를 사용하여, 나중에 RNA/DNA 결찰을 강화할 수 있으며, 어댑터 서열은 선택사항이다.

[0231] 도 3에서 예시된 바와 같이, PCR/클로닝 산물을 사용하여, T7 개시 부위에서 RNA를 생산하였다. 그런 다음, RNA 산물을 RNA 및 퓨로마이신-함유 DNA 올리고뉴클레오티드를 브릿징하는 스플린트 DNA 올리고뉴클레오티드의 존재하에 3' 단부에 퓨로마이신 분자를 함유하는 DNA 올리고뉴클레오티드 (예시 서열 dA21dCdC-퓨로마이신[5'에서 3'])에 결찰하고, 과잉의 링커 및 기타 반응 구성요소로부터 정제하였다.

[0232] 도 4에 예시된 바와 같이, RNA는 생체 외 번역 반응 (토끼 망상적혈구 용해물, 밀 배아, 대장균 또는 등가물)에 사용되고, 작은 단백질 도메인을 통해 완전히 판독되고 프레임-밖 번역 정지 코돈에 대응하지 않는 결찰된 DNA 올리고뉴클레오티드에 도달하는 임의의 전사물은 DNA 서열에서 일시 중단되어, 퓨로마이신이 리보솜의 A 부위로 진하가고 정상적인 펩티딜 트랜스퍼라제 활성을 통해 초기 폴리펩티드 쇄에 연결되도록 하여, 성공적으로 번역된 RNA를 폴리펩티드 쇄에 연결한다.

[0233] 도 5에 예시된 바와 같이, 성공적으로 연결된 mRNA/폴리펩티드 쇄 분자를 작은 단백질 도메인에 대한 친화도 시약을 함유하는 컬럼에 대한 결합을 통해 강화시켜, 프레임 내 번역 역량이 있는 RNA 라이브러리를 생산하였다. RNA가 종양 세포에서 나온 경우, 라이브러리를 시퀀싱 또는 생물정보학을 필요로 하지 않고 유의한 양의 신선한 조직을 수확할 필요가 없고 정의된 다중 서열의 올리고뉴클레오티드를 합성할 필요가 없으므로 신속하고 저렴하

게 제조될 수 있는, 작고 저장된 생검 샘플에서 제조될 수 있는 "전체 종양 세포" 백신으로서 사용할 수 있다. 역전사 및 PCR은 성공적인 RNA 삽입물을 증폭하기 위해 가닥-특이적 방식으로 사용되며 증폭된 산물은 미니-프로테옴 (AMPL-NA)을 함유하는 RNA 라이브러리를 생산하기 위해 클로닝 벡터에 클로닝된다.

[0234] *실시예 2*

[0235] 전체 RNA를 전체 엑솜 시퀀싱 데이터 및 합리적으로 풍부하고 확인된 돌연변이 부하가 있는 인간 종양 세포주로부터 제조하였다. Illumina TruSeq RNA 엑솜 라이브러리 (가닥)를 제조하였다. 엑솜 포획을 실시하였다. 엑솜 시퀀싱 후 라이브러리 샘플을 사전-강화된 시퀀싱을 위해 저장된다.

[0236] 단일-라운드의 RNA 디스플레이를 실시하고, PCR-증폭된 강화된 라이브러리를 수득하였다. 사전-강화된 및 강화된 라이브러리를 시퀀싱 및 분석하였다.

[0237] 적절한 리딩 프레임에 진입하고 나가고 전체-프레임 판독을 지지하는 단편의 강화를 분석하였다. 알려진 돌연변이-함유 영역 또는 엑솜 포획 프로브 서열 및 세포주 서열의 비교에 의해 식별된 SNP에 초점을 맞춘 유사한 분석을 또한 실시하였다.

[0238] *실시예 3*

[0239] 전체 RNA를 전체 엑솜 시퀀싱 데이터 및 합리적으로 풍부하고 확인된 돌연변이 부하가 있는 인간 종양 세포주로부터 제조하였다. Illumina TruSeq RNA 엑솜 라이브러리 (가닥)를 제조하였다. 그런 다음, RNA 엑솜 라이브러리 (가닥)를 엑솜 포획 프로브에 혼성화하였다. 그런 다음 샘플의 절반 (또는 다른 결정된 부분)을 강화되지 않은 샘플로 사용되는 엑솜 포획를 위해 처리하였다. 샘플의 나머지 절반 또는 나머지 부분을 His-태그깅된 MutS (이상적으로는 *D. 라디오두란스* 사용)에 결합하고 니켈-코팅된 ELISA 플레이트에 결합시켰다. 그런 다음 라이브러리를 세척하고, 서브틸리신으로 소화하고, 엑솜 포획을 위해 가공하고, 돌연변이-강화된 엑솜-포획된 샘플을 PCR 증폭하였다. 사전-강화된 및 강화된 라이브러리를 시퀀싱 및 분석하였다. 알려진 돌연변이를 함유하는 서열의 강화 (전체 판독체물 # 판독체물)를 분석하였다. 엑솜 포획 프로브 서열 및 세포주 서열의 비교에 의해 식별된 SNP에 초점을 맞춘 유사한 분석을 또한 수행하였다.

[0240] *실시예 4*

[0241] 전체 RNA를 표준 전체 엑손 시퀀싱 (WES)이 병렬로 수행되는 FFPE 블록에서 제조하였다. Illumina TruSeq RNA 엑솜 라이브러리 (가닥)를 제조하였다. 엑솜 포획을 실시하였다. 엑솜 시퀀싱 후 라이브러리 샘플을 사전-강화된 시퀀싱을 위해 저장하였다. 단일-라운드의 RNA 디스플레이를 실시하고, PCR-증폭된 강화된 라이브러리를 수득하였다. 사전-강화된 및 강화된 라이브러리를 시퀀싱 및 분석하였다.

[0242] 적절한 리딩 프레임에 진입하고 나가고 전체-프레임 판독을 지지하는 단편의 강화를 분석하였다. 알려진 돌연변이-함유 영역 또는 엑솜 포획 프로브 서열 및 세포주 서열의 비교에 의해 식별된 SNP에 초점을 맞춘 유사한 분석을 또한 실시하였다.

[0243] *실시예 5*

[0244] 도 6, 87 및 8은 프레임-내 구성원에 대한 cDNA 단편의 라이브러리를 강화하는 대안적인 방법을 제시한다. 이 도면에서, 박테리아 표면 디스플레이 방법은 프레임 내 라이브러리 구성원을 강화하는 데 사용된다. 유사한 단계 및 유전자 작제물을 예를 들어, 이들 모두가 본원에 참조로 원용되는 미국 특허 US8710017, US8685893 및 US8372954에 기재된 것들과 같은 당업자에게 알려진 특이적 변형을 갖는 프레임-내 라이브러리 구성원을 강화시키는 파지 디스플레이를 실시하는 데 사용할 수 있다.

[0245] 도 6에 예시된 바와 같이, 가닥-특이적 단편을 PCR에 의해 확장시켜, 배향된 클로닝 부위를 첨가한다. 그런 다음, 클로닝 부위를 사용하여, 라이브러리 DNA 단편을 클로닝 벡터에 삽입하여, 라이브러리 DNA가 프로모터, 샤인-달가노 (SD) 서열, ATG 개시 코돈 및 라이브러리 DNA의 업스트림의 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 및 라이브러리 DNA의 막 제시 단백질-코딩 서열 (예컨대, AIDA)의 다운스트림 사이에 위치하도록 하였다.

[0246] 도 7에 예시된 바와 같이, 플라스미드를 대장균과 같은 박테리아 균주에 형질전환시키고, 프로모터에 의한 성장 및 발현의 유도 후에 라이브러리가 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 및 막 제시 단백질-코딩 서열을 포함하는 프레임-내에 있는 경우 박테리아의 외부 막 상에 제시된다. 번역이 ATG에서 개시되고 막 제시 단백질-코딩 서열의 단부까지 프레임 내로 계속되면, 막 제시 단백질이 막에 삽입되고 폴리펩티드-코딩 서열이 박테리아 표면 상에 제시된다. 막 제시 단백질이 번역되기 전에 정지 코돈이 마주하거나 막 제시 단백질-코딩 서열의 번역

이 잘못된 리딩 프레임에 있으면, 막 단백질이 생산되지 않고 막 제시 단백질이 세포의 표면 상에 제시되지 않는다.

[0247] 도 8에 예시된 바와 같이, 프레임-내 및 프레임-밖 코딩 플라스미드를 함유하는 박테리아의 수집물을 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드에 결합하는 친화도 시약에 노출시킨다. 친화도 시약에 결합하는 세포는 프레임을 벗어난 플라스미드를 함유하는 세포와 분리되어, 친화도 시약에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 자기 비드는 친화도 시약에 부착되어, 친화도 시약에 결합된 세포를 친화도 시약에 결합되지 않은 세포로부터 분리하기 위한 자기 분리를 허용할 수 있다. 친화도 시약에 결합된 세포로부터 DNA를 회수한 다음, DNA를 PCR-증폭하여, 강화된 라이브러리 작제를 위한 강화된 가닥의 라이브러리 단편을 제조하였다.

[0248] *실시예 6*

[0249] *라이브러리의 제조*

[0250] RNeasy 미니 키트 (Qiagen 74104)을 사용하여 흑색종 세포주 13240-011에서 전체 RNA를 추출하였다. NEBNext rRNA 고갈 키트 v2 (New England BioLabs E7405)를 사용하여 리보솜 RNA를 고갈시킨 후, SEQuoia 완전한 가닥의 RNA 라이브러리 프렙 키트 (Bio-Rad 17005726)를 사용하여 RNA-seq 라이브러리를 제조하였다. 컨센서스 코딩 서열 (CCDS) 데이터베이스 [Pujar *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **46**(D1):D221-D228, 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1031]를 기반으로 베이트를 사용하는 Twist Comprehensive 엑솜 키트 (Twist Bioscience 102031)를 사용하여 라이브러리를 엑솜-함유 단편에 대해 강화하였다. 도 9와 같은 구조의 라이브러리를 작제하기 위해 꼬리가 달린 프라이머를 사용한 PCR을 사용하여 라이브러리 단편에 5' 및 3' 확장물을 첨가하였다.

[0251] *생체 외 전사*

[0252] 전사 라이브러리를 주형으로 사용하여 HiScribe T7 고 수율 RNA 합성 키트 (New England BioLabs E2040S)를 사용하여 RNA를 합성하였다. 구체적으로, 8 μL 74 ng/μL 엑솜 포획 전사 라이브러리를 2 μL10 × 반응 완충액, 2 μL 100 mM ATP, 2 μL 100 mM GTP, 2 μL 100 mM UTP, 2 μL 100 mM CTP, 및 2 μL T7 RNA 중합효소 믹스와 혼합한 후, 37℃에서 2 시간 동안 항온처리하였다. RNA는 Monarch RNA 클린업 키트 (New England BioLabs T2030S)를 사용하여 정제하고, 20 μL 물에서 회수하였다. 생물분석기 (RNA 6000 Pico 키트, Agilent 5067-1513)로 분석하기 위해 1 μL 분취량을 사용하여 희석액을 만들고 나머지는 -80℃에서 보관하였다.

[0253] *퓨로마이신 올리고에 대한 RNA의 결찰*

[0254] Integrated DNA Technologies (IDT)로부터 수득된 다음의 2 개의 DNA 올리고를 사용하여 생체 외에서 전사된 RNA의 3' 단부에 퓨로마이신을 추가하였다: A27.C2.Puro (AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC/3Puro/) 및 T10.ExPepSplint (TTTTTTTTTCCAGTCGCTATAG). T10.ExPepSplint의 3' 단부에서의 13 개의-뉴클레오티드 서열은 생체 외에서 전사된 RNA의 3' 단부에서의 13 개의-뉴클레오티드 서열에 상보적이다. 올리고 A27.C2.Puro는 5 μL 물, 2 μL의 20 μM A27.C2.Puro, 1 μL 10x T4 폴리뉴클레오티드 키나아제 반응 완충액, 1 μL 10 mM ATP 및 1 μL 10 개의 유닛/μL T4 폴리뉴클레오티드 키나아제 (New England BioLabs M0201S)를 혼합함으로써 인산화하여, 37℃에서 30 분 동안 항온처리하고, 얼음으로 옮겼다. 다음의 구성요소를 첨가하였다: 7 μL 물, 50 μL 폴리에틸렌 글리콜 8000 (T4 RNA 리가아제 2 키트, New England BioLabs M0373L), 2 μL의 20 μM T10.ExPepSplint, 4 μL 20 개의 유닛/μL SUPERase●In RNase 억제제 (Thermo Fisher, AM2696) 및 8 μL 1.8 μg/μL 생체 외 전사된 RNA. 위아래로 피펫팅하여 잘 혼합한 후, 혼합물을 65℃에서 2 분 동안 항온처리하였다. 여전히 가온된 상태일 때 10 μL 10x T4 RNA 리가제 반응 완충액 (T4 RNA 리가제 2 키트로부터의)를 첨가한 다음, 용액을 위아래로 피펫팅하여 잘 혼합하고, 10 분 동안 얼음에 두었다. 실온에서 5 분 동안 항온처리한 후, 9 μL의 25 개의 유닛/μL SplintR 리가제 (New England BioLabs M0375S)를 첨가한 다음, 위아래로 피펫팅하여 용액을 잘 혼합하고, 실온에서 2 시간 동안 항온처리하였다. 반응을 2.5 μL의 500 mM EDTA (pH 8.0)를 첨가하고, 잘 혼합하여, 반응을 정지시켰다. 모듈과 함께 제공된 프로토콜에 따라 NEBNext 폴리(A) mRNA 자기 단리 모듈 (New England BioLabs E7490L)을 사용하여 RNA-퓨로마이신 산물을 정제하였다. 100 μL 결찰 반응물의 정제를 위해, 잘-재현탁된 100 μL NEBNext 자기 올리고 d (T)25 비드를 사용하였다. 비드에 결합하고 세척하는 프로토콜을 따른 후, RNA-퓨로마이신 산물을 20 μL 뉴클레아제가 없는 물로 용출하고, 신선한 튜브로 옮겼다. 생물분석기 (RNA 6000 Pico 키트, Agilent 5067-1513)로 분석하기 위해 1 μL 분취량을 사용하여, 희석액을 만들고, 나머지는 -80℃에서 저장하였다. 결찰된 산물의 수율은 51.4%였다.

[0255] *RNA 디스플레이*

[0256] PURExpress 생체 외 단백질 합성 키트 (New England BioLabs E6800L)의 구성요소를 사용하여 생체 외 번역을

수행하였다. 반응물을 10 μL 용액 A, 7.5 μL 용액 B, 1 μL의 20 개의 유닛/μL SUPERase●In RNase 억제제 (Thermo Fisher, AM2696) 및 6.5 μL의 375 ng/μL RNA-퓨로마이신 산물을 혼합함으로써, 조립하였다. 37℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 3.1 μL의 1 M $MgCl_2$ 및 34.4 μL의 1 M KCl을 첨가하여, 번역된 펩티드 및 퓨로마이신 간의 공유 결합을 촉진하였다. 반응물을 실온에서 30 분 동안 항온처리한 후, -20℃에서 밤새 항온처리하였다. 모듈과 함께 제공된 프로토콜에 따라 NEBNext 폴리(A) mRNA 자기 단리 모듈 (New England BioLabs E7490L)을 사용하여 펩티드-RNA 융합 산물을 정제하였다. 62.5-μL 번역 반응의 정제를 위해, 잘-재현탁된 40 μL NEBNext 자기 올리고 d (T)25 비드를 사용하였다. 비드에 결합하고 세척하는 프로토콜을 따른 후, 펩티드-RNA 산물을 20 μL의 1 mM 디티오트레이톨 (Teknova D9750)로 용출하고, 신선한 튜브로 옮겼다. cDNA를, IDT로부터 수득된 DNA 올리고 ExPep RT 프라이머 (CCAGTCGCTATAGCTGGCGTA) 및 5x RT 완충액 (75 mM Tris-HCl, pH 8.4, 375 mM KCl, 50 mM M $MgCl_2$), 25% (v/v) 글리세롤)을 사용하여 주형으로서 펩티드-RNA 산물의 RNA 부분을 사용하여 합성하였다. cDNA 반응을 위해, 15.4 μL 물, 2 μL 10% NP-40 (Thermo Fisher 28324), 1.6 μL의 25 mM 각각의 dNTP (Thermo Fisher FERR1121) 및 1 μL의 10 μM ExPep RT 프라이머를 혼합하여, 혼성화 믹스를 만들었다. 10 μL의 펩티드-RNA 융합 샘플의 분취량을 10 μL 혼성화 믹스와 혼합하고, 65℃에서 1 분 동안 항온처리한 후 4℃에서 유지하였다. 26.5 μL 물, 20 μL 5x RT 완충액, 1 μL의 1 M 디티오트레이톨 (Teknova D9750), 2 μL의 40 U/μL RNaseOUT RNase 억제제 (Thermo Fisher 10777019) 및 0.5 μL의 200 U/μL SuperScript II 역전사효소 (Thermo Fisher 18064014)를 혼합하여 RT 믹스를 제조하였다. 20 μL 펩티드-RNA/혼성화 믹스 샘플을 20 μL RT 믹스와 혼합한 후, 반응물을 42℃에서 60 분, 85℃에서 5 분 동안 항온처리한 후, 4℃에서 유지하였다. 펩티드-RNA-cDNA 산물의 특이적 선택을 위해, 펩티드 부분의 Twin-Strep-태그를 MagStrep "유형 3" XT 비드 (Strep-Tactin XT 코팅된 자기 비드, IBA LifeSciences 24090002)를 사용하여 고정하였다. 25 μL 잘-현탁된 비드를 튜브에 전달하고, 자기 스탠드에 넣은 후 상청액을 버렸다. 비드를 200 μL 세척 완충액 (100 mM의 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 재현탁하고, 자기 스탠드에 놓고, 상청액을 버림으로써 2 회 세척하였다. 40 μL 역전사효소 반응물을 비드에 첨가하고, 30 분 동안 얼음 위에서 항온처리하고, 주기적으로 튜브를 부드럽게 흔들어, 비드를 재현탁하였다. 샘플을 자기 스탠드에 놓고, 상청액을 버렸다. 비드를 100 μL 세척 완충액에 재현탁하고, 자기 스탠드에 놓고, 상층액을 버림으로써 3 회 세척하였다. 비드를 20 μL 물에 재현탁하고, 얼음에 보관하였다. 선택된 펩티드-RNA-cDNA 산물에 대해, rhPCR 증폭 [Dobosy et al., BMC Biotechnol. 11:80, 2011, doi: 10.1186/1472-6750-11-80]을 사용하여 서열 라이브러리를 저장하였다. 이 증폭을 IDT: P5.IDT312.Rd1x.x1 프라이머 (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGACACAACACTCTTTCCCTACrACGACa/3SpC3/, rA는 리보A임) 및 P7.IDT024.Rd2x.x1 프라이머 (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCACTGGTGACTGGAGTTCAGArCGTGTa/3SpC3/, rC는 리보C임)로부터 다음의 2 개의 올리고를 사용하였다. 펩티드-RNA-cDNA 산물에서 발견되는 cDNA로부터 각자 판독물1 및 판독물2 세그먼트에서 이러한 올리고 프라임 DNA 합성의 3' 단부 (도 9 참고). 프라이머는 PCR 산물의 Illumina 시퀀싱에 필요한 P5 및 P7 세그먼트를 각자 추가한다. 증폭은 또한 20x rhPCR 완충액 (300 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 80 mM $MgCl_2$) 및 RNase H2 효소 및 RNase H2 희석 완충액을 함유하는 RNase H2 효소 키트 (IDT 11-02-12-01)를 사용하였다. RNase H2는 1 μL의 2 개의 유닛/μL RNase H2 효소 및 99 μL H2 희석 완충액을 혼합하여 20 mU/μL로 희석한 다음, 얼음에 보관하였다. 펩티드-RNA-cDNA 산물을 함유하는 MagStrep 비드 현탁액의 10 μL 분취량을 2.5 μL의 6 μM 각각의 P5.IDT312.Rd1x.x1/P7.IDT024.Rd2x.x1 프라이머와 혼합하였다. 59.1 μL 물, 4 μL 20x rhPCR 완충액, 1.3 μL 25 mM 각각의 dNTP (Thermo Fisher FERR1121), 2 μL 20 mU/μL RNase H2, 및 1.6 μL의 5 개의 유닛/μL 고온의 출발 *Taq* DNA 중합효소 (New England BioLabs M0495L), 37.5 μL rhPCR 믹스를 비드 현탁액/프라이머 샘플에 첨가하였다. 열 프로토콜을 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다: 95℃ 30초; (96℃ 20 초, 62℃ 1 분, 72℃ 1 분)의 18 사이클; 4℃ 유지. 반응 튜브를 마그네틱 스탠드에 놓고 상청액을 신선한 튜브로 옮겼다. ProNex 크기-선택적 정제 시스템 (Promega NG2003)을 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. 50 μL 증폭 반응을 70 μL (1.4x) ProNex 비드와 혼합하고 ProNex 프로토콜에 따라 처리하였다. PCR 결과 RNA 디스플레이 시퀀싱 라이브러리를 20 μL ProNex 용출 완충액으로 용출하였다. 1 μL 분취량을 생물반응기 (고 민감성 DNA 키트, Agilent 5067-4626)로 분석하고 나머지는 -20℃에서 보관하였다. 라이브러리를 제조업체의 지침에 따라 300-주기 MiSeq 시약 키트 v2 (Illumina MS-102-2022)를 사용하여 Illumina MiSeq에서 시퀀싱하였다. 시퀀싱 파라미터는 판독물1 150 주기, index1 8 주기, index2 8 주기, 판독물2 150 주기였다. 시퀀싱 결과를 분석하여 라이브러리 삽입물에 온전한 ORF (오픈 리딩 프레임)가 있는지 확인하였다. 엑솜 포획 후 ("RNA 디스플레이 전") 및 RNA 디스플레이 후 ("RNA 디스플레이 후") 작제물에 대한 표적 리딩 프레임에서 완전한 길이의 삽입물의 검출을 온전한 ORF와 비교한 결과를 도 10에 나타내었다.

[0257] 정지 코돈이 없는 라이브러리 삽입물의 분율 ("정지 없음")은 RNA 디스플레이 전 28%에서 RNA 디스플레이 후

37%로 증가하였다 ($p < 0.001$). 이러한 결과는 RNA 디스플레이가 암 환자로부터 제조된 엑솜-포획된 RNASeq 라이브러리에서 오픈 리딩 프레임으로 인간 cDNA 단편을 강화할 수 있음을 보여준다.

[0258] **참조에 의한 통합**

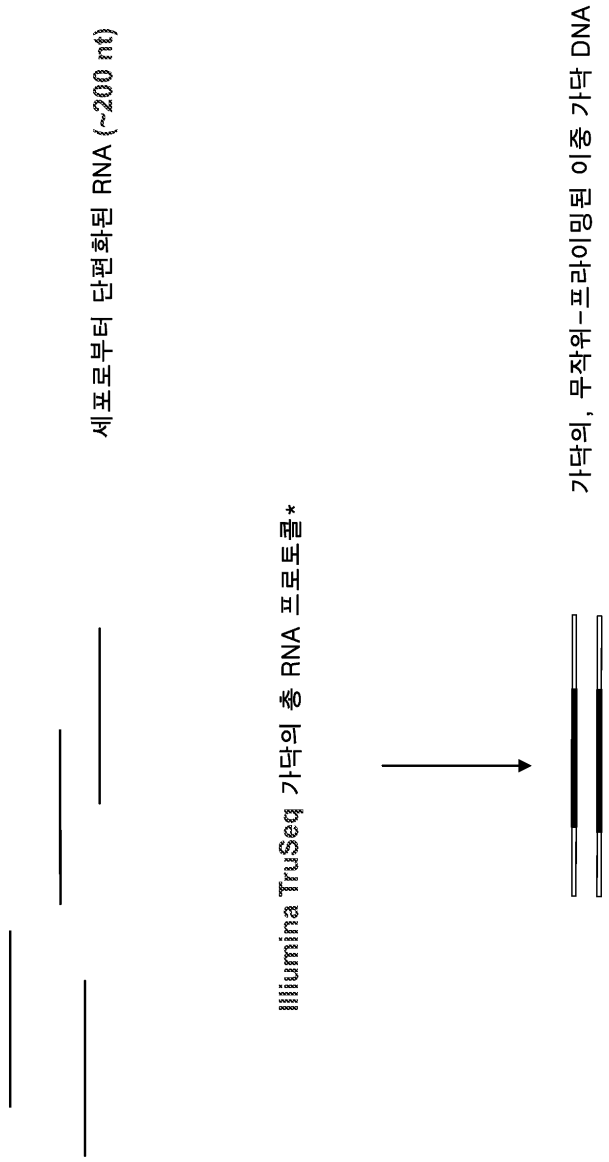
[0259] 본원에 언급된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공개물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 표시되는 것처럼 전체가 참조로 원용된다. 상충하는 경우, 본 문서의 모든 정의를 포함하여 본 출원이 우선한다.

[0260] **등가물**

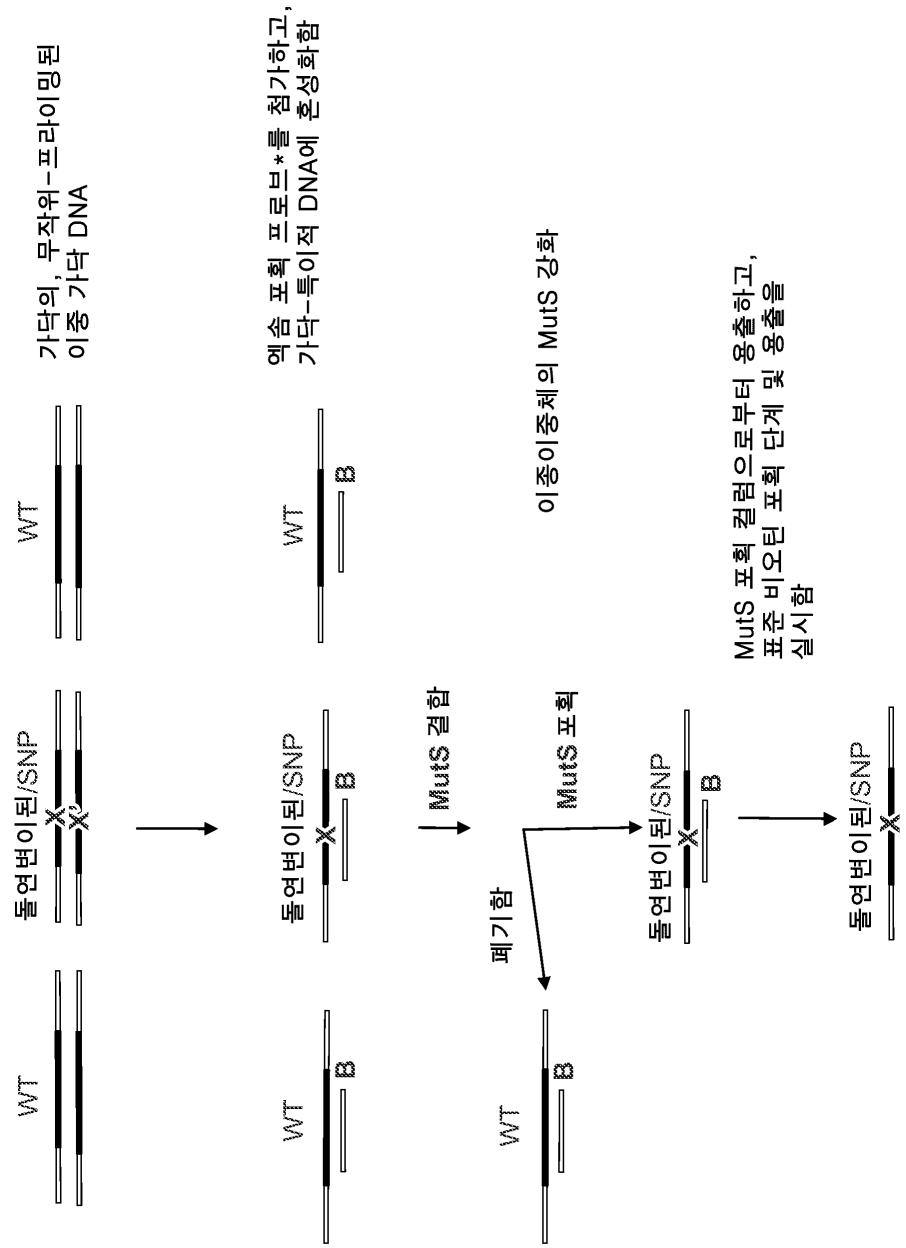
[0261] 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음 청구범위에 포함되도록 의도된다.

도면

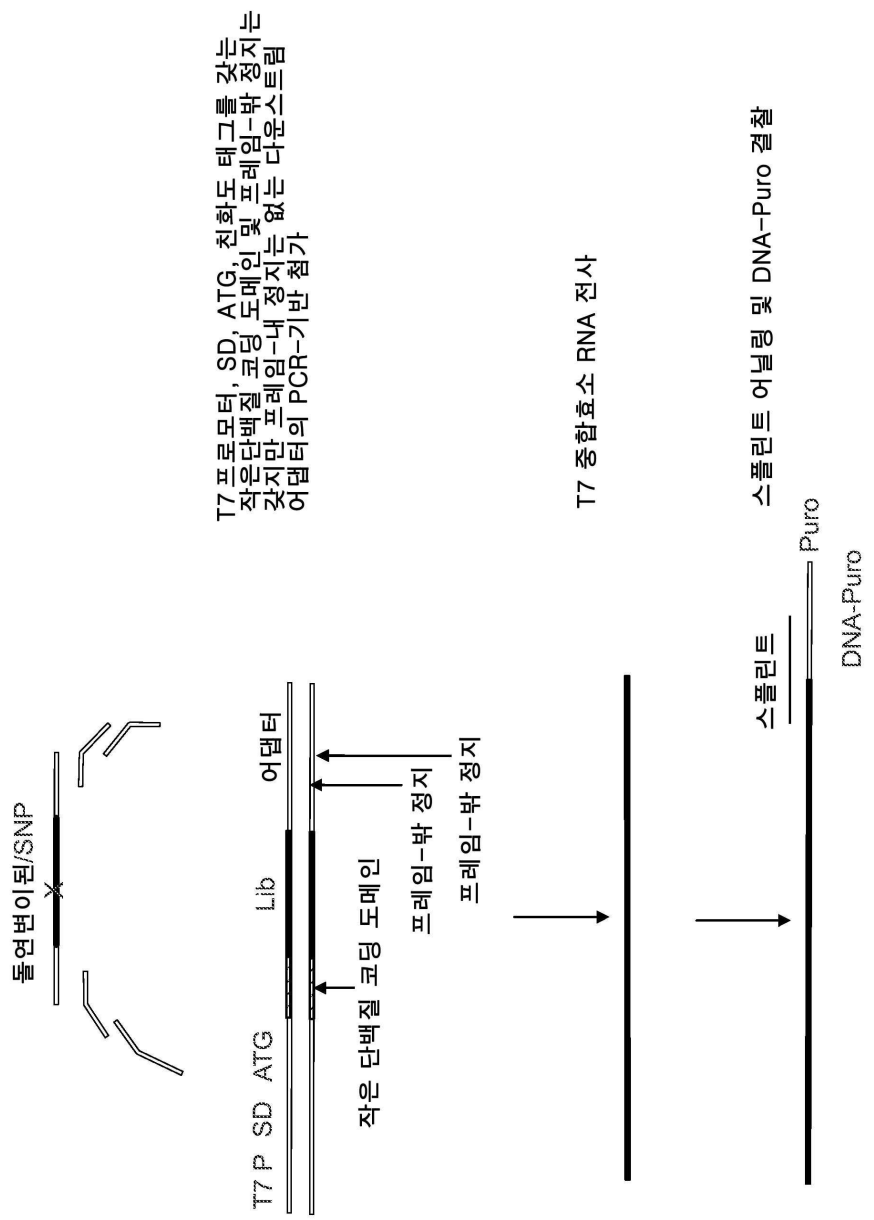
도면1



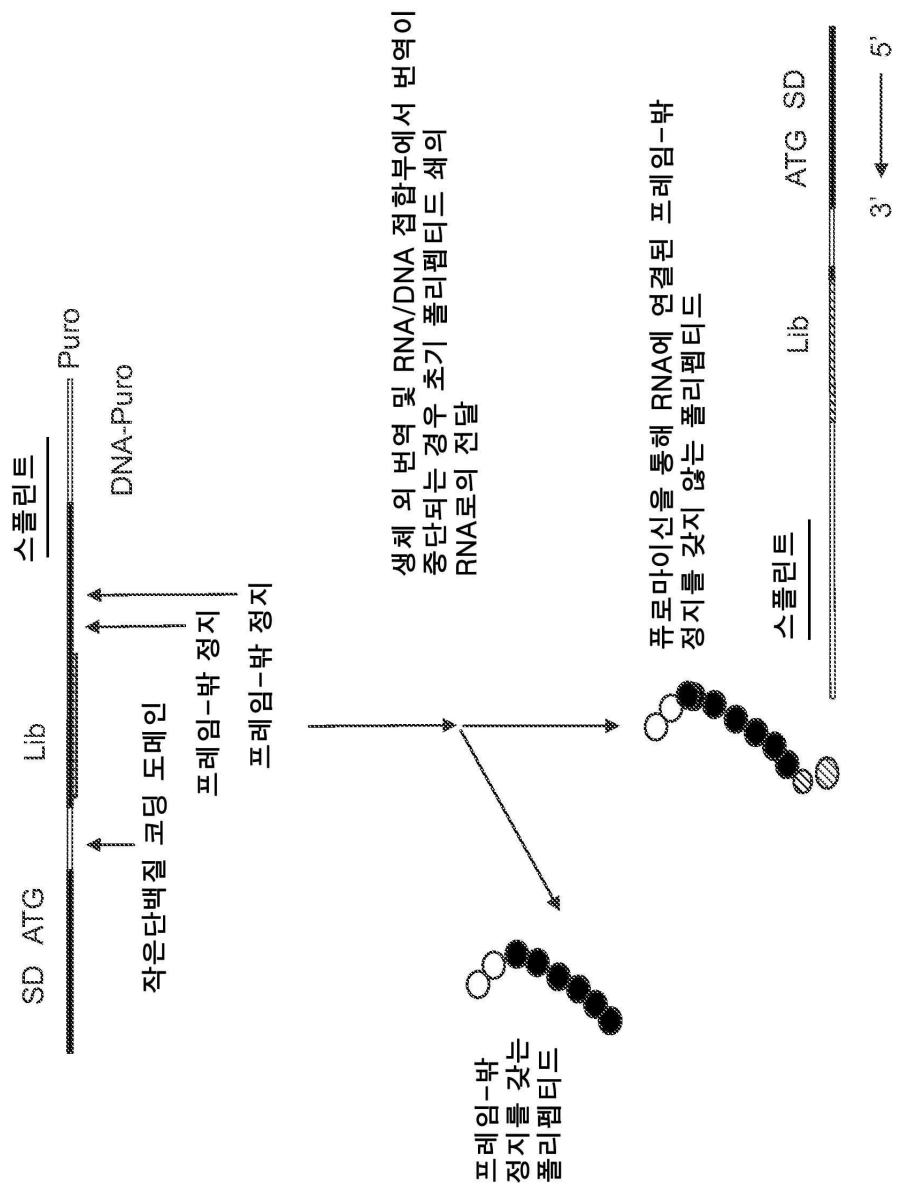
도면2


WT
돌연변이된/SNP
가닥의, 무작위-프라이밍된
이중 가닥 DNA
엑솜 포획 프로브*를 첨가하고,
가닥-특이적 DNA에 혼성화함
B
MutS 결합
이중이중체의 MutS 강화
MutS 포획
폐기함
MutS 포획 컬럼으로부터 용출하고,
표준 비오틴 포획 단계 및 용출을
실시함

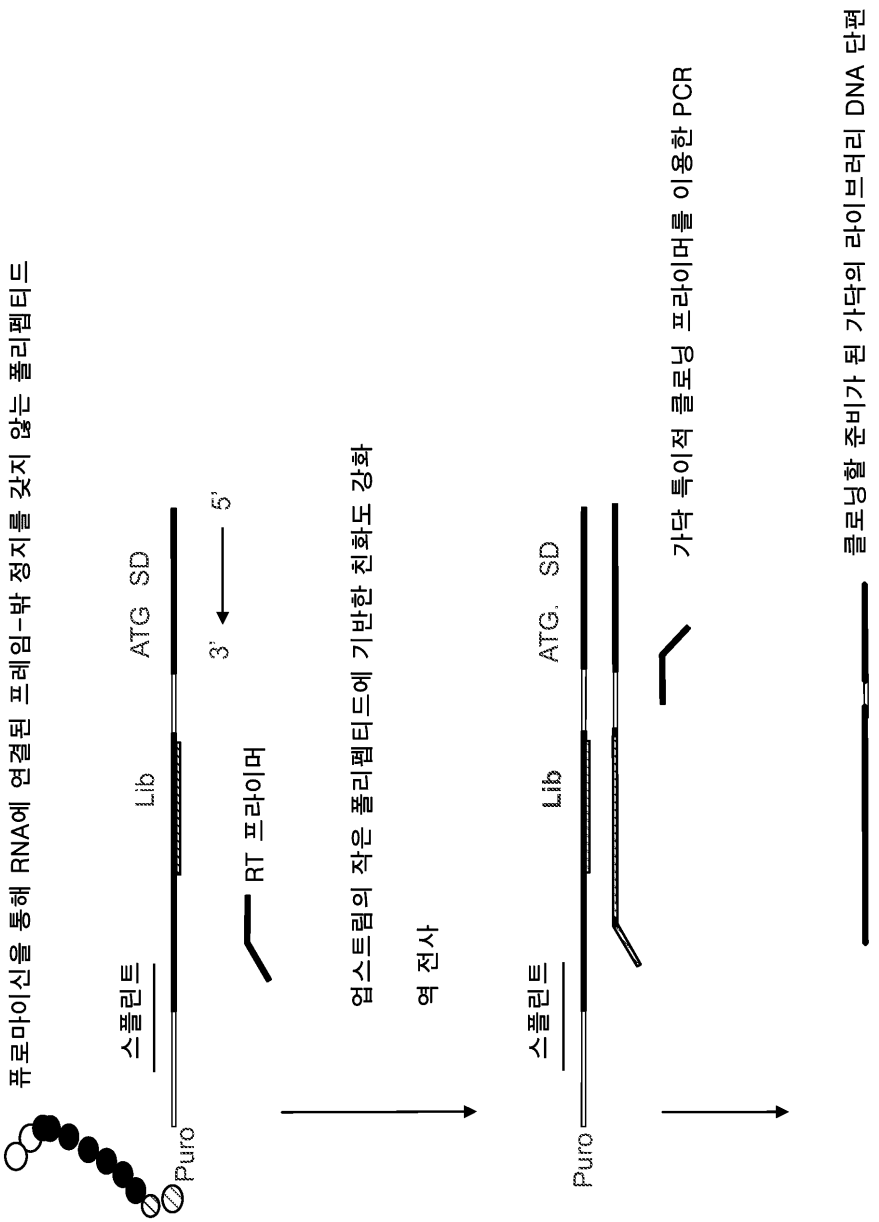
도면3


돌연변이된/SNP
T7 P SD ATG
Lib
어댑터
작은 단백질 코딩 도메인
프레임-밖 정지
프레임-밖 정지
T7 프로모터, SD, ATG, 친화도 태그를 갖는
작은단백질 코딩 도메인 및 프레임-밖 정지는
갖지만 프레임-내 정지는 없는 다운스트림
어댑터의 PCR-기반 첨가
T7 중합효소 RNA 전사
스플린트
Puro
DNA-Puro
스플린트 어닐링 및 DNA-Puro 결찰

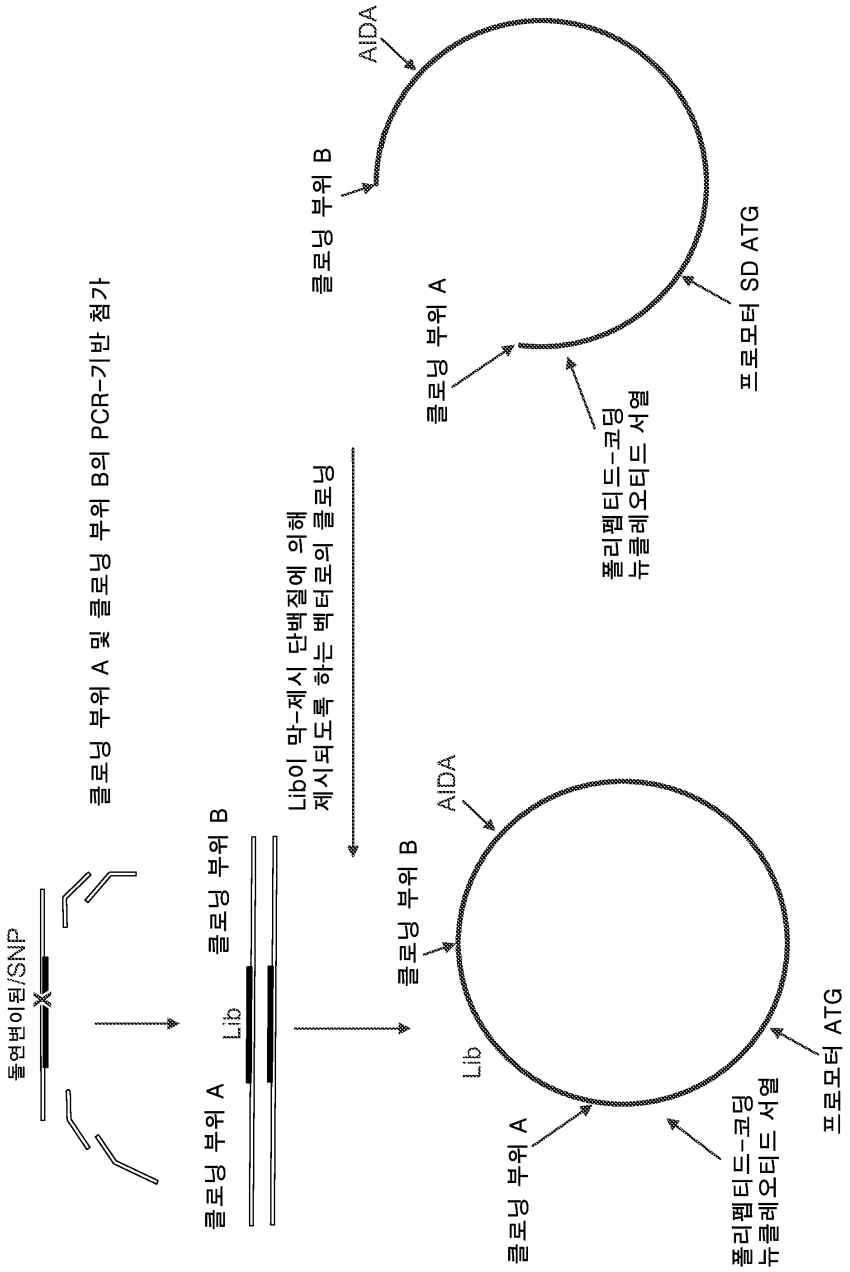
도면4


SD ATG
Lib
스플린트
Puro
DNA-Puro
작은단백질 코딩 도메인
프레임-밖 정지
프레임-밖 정지
생체 외 번역 및 RNA/DNA 접합부에서 번역이
중단되는 경우 초기 폴리펩티드 쇄의
RNA로의 전달
퓨로마이신을 통해 RNA에 연결된 프레임-밖
정지를 갖지 않는 폴리펩티드
스플린트
Lib
ATG SD
3'
5'
프레임-밖
정지를 갖는
폴리펩티드

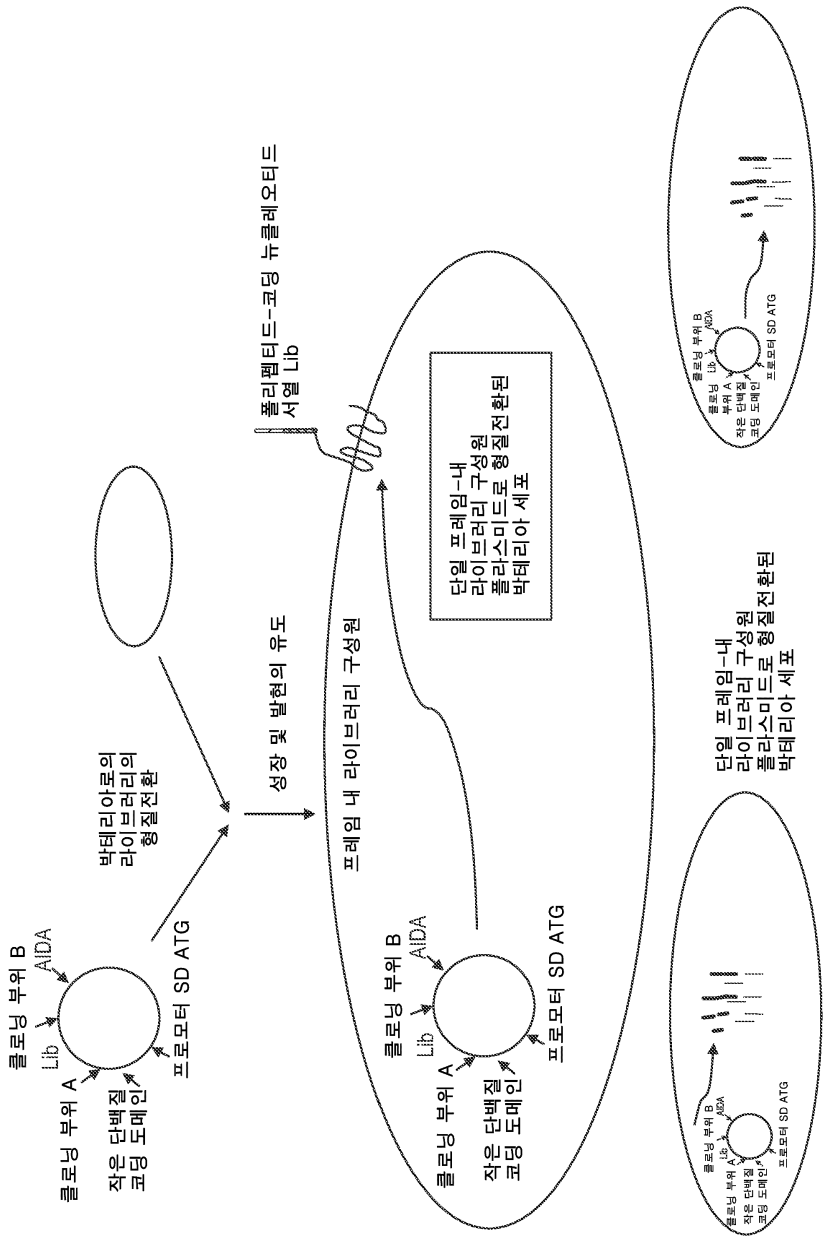
도면5


퓨로마이신을 통해 RNA에 연결된 프레임-밖 정지를 갖지 않는 폴리펩티드
스플린트
Lib
ATG SD
Puro
3'
5'
RT 프라이머
업스트림의 작은 폴리펩티드에 기반한 친화도 강화
역 전사
스플린트
Lib
ATG SD
Puro
가닥 특이적 클로닝 프라이머를 이용한 PCR
클로닝할 준비가 된 가닥의 라이브러리 DNA 단편

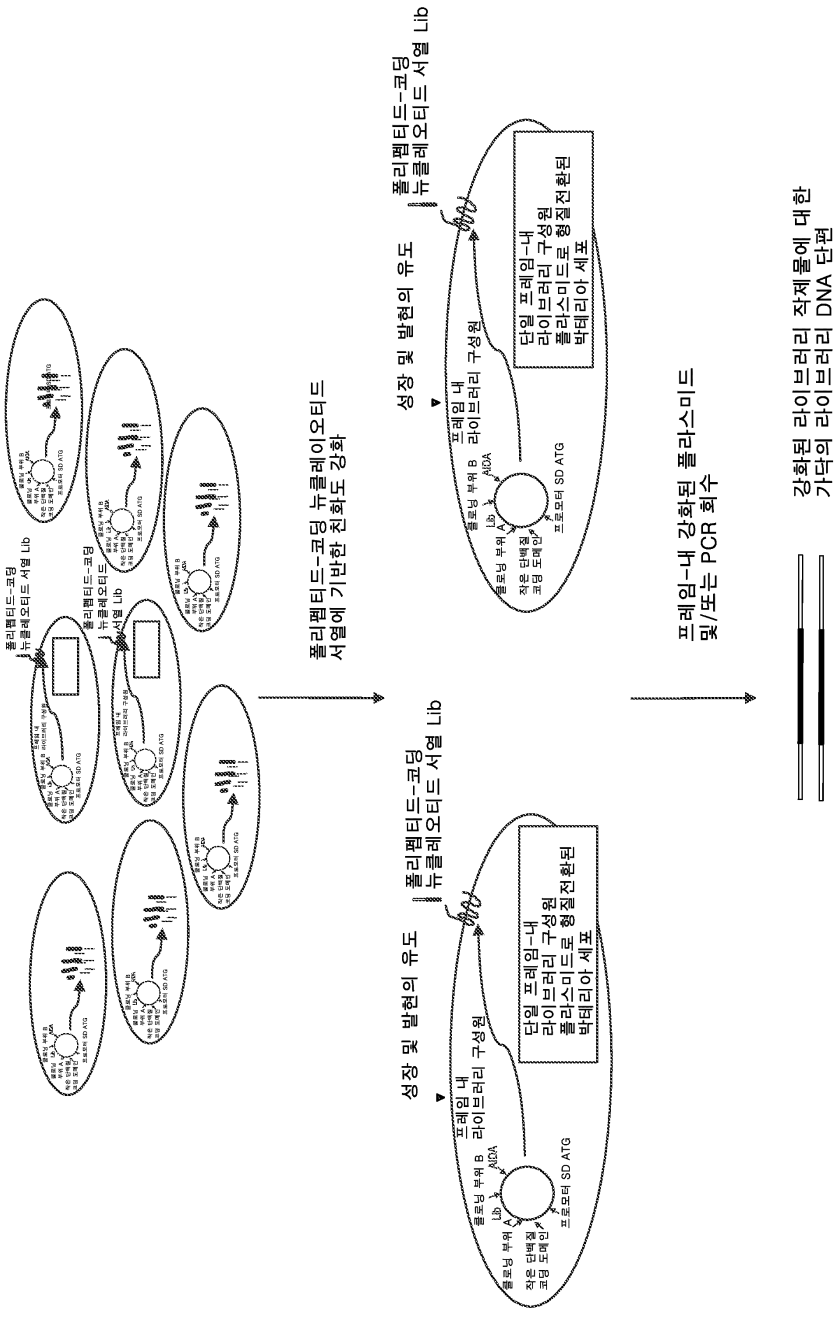
도면6


돌연변이원/SNP
클로닝 부위 A 및 클로닝 부위 B의 PCR-기반 첨가
클로닝 부위 A
Lib
클로닝 부위 B
Lib이 막-제시 단백질에 의해
제시되도록 하는 벡터로의 클로닝
AIDA
클로닝 부위 B
Lib
클로닝 부위 A
폴리펩티드-코딩
뉴클레오티드 서열
프로모터 ATG
AIDA
클로닝 부위 B
클로닝 부위 A
폴리펩티드-코딩
뉴클레오티드 서열
프로모터 SD ATG

도면7


클로닝 부위 B
AIDA
Lib
클로닝 부위 A
작은 단백질
코딩 도메인
프로모터 SD ATG
박테리아로의
라이브러리의
형질전환
성장 및 발현의 유도
폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드
서열 Lib
프레임 내 라이브러리 구성원
단일 프레임-내
라이브러리 구성원
플라스미드로 형질전환된
박테리아 세포

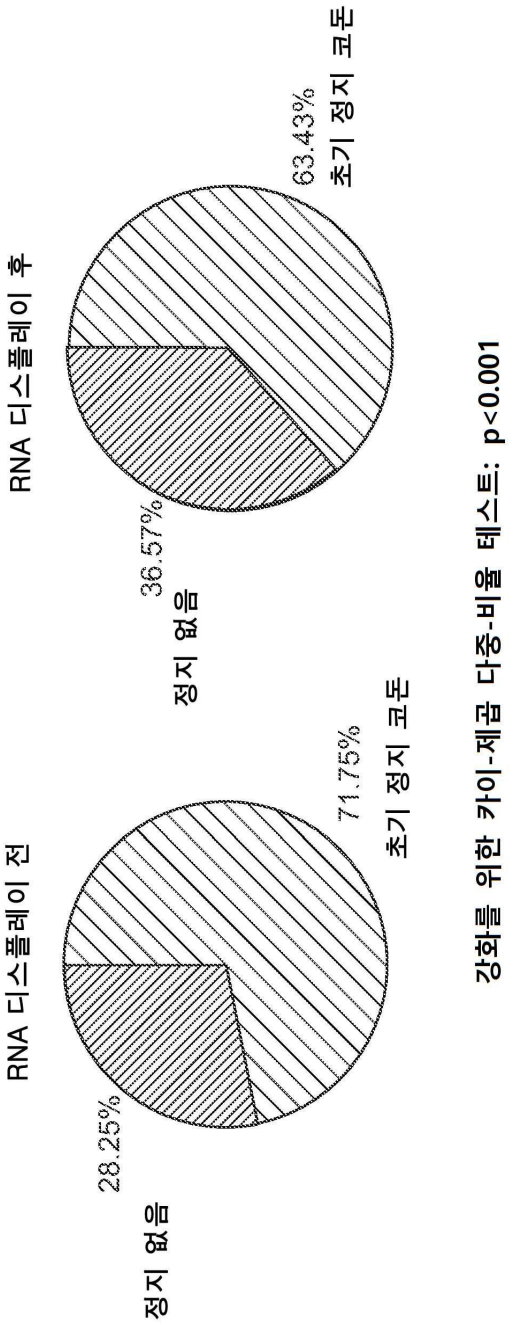
도면8


폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 Lib
폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 Lib
폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열에 기반한 천화도 강화
성장 및 발현의 유도
폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 Lib
프레임 내 라이브러리 구성원
플로닝 부위 B
AIDA
Lib
플로닝 부위 A
작은 단백질 코딩 도메인
프로모터 SD ATG
단일 프레임-내 라이브러리 구성원 플라스미드로 형질전환된 박테리아 세포
성장 및 발현의 유도
폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 Lib
프레임 내 라이브러리 구성원
플로닝 부위 B
AIDA
Lib
플로닝 부위 A
작은 단백질 코딩 도메인
프로모터 SD ATG
단일 프레임-내 라이브러리 구성원 플라스미드로 형질전환된 박테리아 세포
프레임-내 강화된 플라스미드 및/또는 PCR 회수
강화된 라이브러리 작제물에 대한 가닥의 라이브러리 DNA 단편

도면9



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BROAD INSTITUTE, INC.

<120> NUCLEIC ACID ARTIFICIAL MINI-PROTEOME LIBRARIES

<130> BRB-01525 (35500-01525)

<140> PCT/US2021/034131

<141> 2021-05-26

<150> 63/030,056

<151> 2020-05-26

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 1

ccagtcgcta tagctggcgt a 21

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
primer"

<400> 2

aatgatacgg cgaccaccga gatctacacc tgacacaaca ctctttccct acacgaca 58

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221
> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

primer"

<400> 3

caagcagaag acggcatacg agataagcac tggtgactgg agttcagacg tgta 54

<210> 4

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 4

acaggaggca 10

<210> 5

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 5

uaaggaggug 10

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 6

gcucuuuaac aauuuauca 19

<210> 7

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 7

acauggauuc 10

<210> 8

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 8

uuaacuuuaa 10

<210> 9

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 9

uuaacgggaa 10

<210> 10

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 10

aaaaaaaaaa 10

<210> 11

<211> 15

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

uuaacuuuaa aaaaa 15

<210> 12

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 12

uuaacuuuaa aaaaaaaaaa 20

<210> 13

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<

400> 13

uuaacuuuaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 30

<210> 14

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 14

uuaacuuuaa acauggauuc acauggauuc 30

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 15

His His His His His His

1 5

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 16

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaacc 29

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 17

ttttttttttt ccagtcgcta tag 23

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 18

ttttttttt ttttttttt ttttt 25

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 19

aaaaaaaaa aaaaaaaaa acc 23