(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0116525
(43) 공개일자 2021년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 39/0011 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2021-7025453
(22) 출원일자(국제) 2020년01월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년08월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/013353
(87) 국제공개번호 WO 2020/150152
국제공개일자 2020년07월23일
(30) 우선권주장
62/792,387 2019년01월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
비온테크 에스이
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12
(72) 발명자
뮐러, 라스
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
파인, 그렉 대니얼
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
장덕순, 이귀동

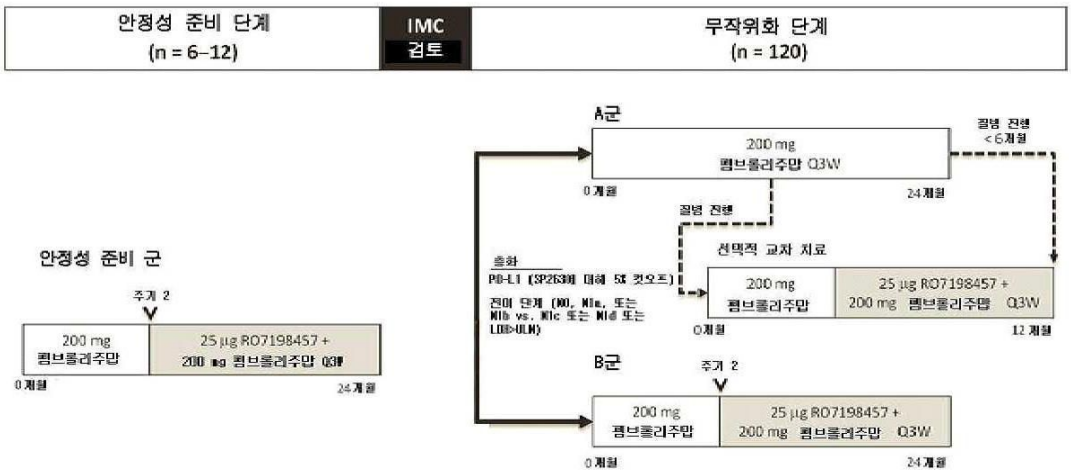
전체 청구항 수 : 총 108 항

(54) 발명의 명칭 **PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신으로 암을 치료하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 개체의 암을 치료하는 방법, 이의 사용, 및 이를 위한 키트를 제공한다. 이러한 방법들은 개체에게 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체) 및 RNA 백신 (예를 들어, 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이들로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 맞춤형 암 백신)을 투여하는 것을 포함한다. 추가로 RNA 분자 (예를 들어, 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 맞춤형 RNA 암 백신), 뿐만 아니라 RNA 백신의 생산 또는 사용에 유용한 DNA 분자 및 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/795,476 2019년01월22일 미국(US)
62/887,410 2019년08월15일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법으로서, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제인, 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체인, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙인, 방법.

청구항 5

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서, 항-PD-1 항체는 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 PD-1 축 결합 길항제는 PD-L1 결합 길항제인, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체인, 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 항-PD-L1 항체는 아벨루맙 또는 더발루맙인, 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 항-PD-L1 항체는 다음을 포함하는, 방법:

(a) GFTFSDSWIH (서열 번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPYGGSTYYADSVKG (서열 번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-2 및 아미노산 RHWPGGFDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및

(b) RASQDVSTAVA (서열 번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 QQYLYHPAT (서열 번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

청구항 10

청구항 7에 있어서, 항-PD-L1 항체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하는, 방법.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙인 방법.

청구항 12

청구항 7 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체는 약 1200 mg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 10-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, RNA 백신은 리포플렉스 나노입자 또는 리포솜으로 제형화되는, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, RNA 백신은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, RNA 백신은 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 8회의 21-일 주기로 개체에게 투여되고, RNA 백신은 주기 2의 1, 8 및 15일차에 및 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 20

청구항 18 또는 청구항 19에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 주기 8 이후 개체에게 추가로 투여되는, 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 17회의 추가 21-일 주기로 개체에게 추가 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 13-29의 1일차에 개체에게 투여되고, RNA 백신은 주기 13, 21, 및 29의 1일차에 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 22

청구항 1에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 8회의 21-일 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, RNA 백신은 주기 2의 1일차에 약 25 μg, 주기 2의 8일차에 약 25 μg, 주기 2의 15일차에 약 25 μg, 및 주기 3-7 각각의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 인간인, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택되는, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 암은 흑색종인, 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 흑색종은 피부 또는 점막 흑색종인 방법.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 흑색종은 안구 또는 말단 흑색종이 아닌, 방법.

청구항 30

청구항 27 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 흑색종은 전이성 또는 절제불가능한 국소 진행성 흑색종인, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 흑색종은 IV기 흑색종인, 방법.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 흑색종은 IIIC기 또는 IIID기 흑색종인, 방법.

청구항 33

청구항 27에 있어서, 흑색종은 이전에 치료받지 않은 전이성 흑색종인, 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 무진행 생존 (PFS)을 개선시키는, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 객관적 반응률 (ORR)을 증가시키는, 방법.

청구항 36

청구항 1 내지 35 중 어느 한 항의 방법에 따라 암을 가진 개체를 치료하기 위한, RNA 백신과 조합하여 사용하기 위한 PD-1 축 결합 길항제를 포함하는 키트.

청구항 37

유효량의 PD-1 축 결합 길항제를 RNA 백신과 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 인간 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 PD-1 축 결합 길항제로서, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, PD-1 축 결합 길항제.

청구항 38

유효량의 RNA 백신을 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 인간 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 RNA 백신으로서, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특

이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, RNA 백신.

청구항 39

5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 RNA 분자:

(1) 5' 캡;

(2) 5' 비번역 영역 (UTR);

(3) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열;

(4) 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열;

(5) 다음을 포함하는 3' UTR:

(a) 아미노-말단 스플릿 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및

(b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및

(6) 폴리(A) 서열.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 적어도 1개의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 1개의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, RNA 분자.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 5'→3' 방향으로 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고;

이때 아미노산 링커 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하고;

이때 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, RNA 분자.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 아미노산 링커는 서열 GGSGGGGSGG (서열 번호: 39)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC (서열 번호: 37)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 44

청구항 41 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 5'→3' 방향으로 적어도 제2 링커-에피토프 모듈을 추가로 포함하고, 이때 적어도 제2 링커-에피토프 모듈은 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고;

이때 제2 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 제1 링커-네오에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하고;

이때 제1 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프는 제2 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프와 상이한, RNA 분자.

청구항 45

청구항 44에 있어서, RNA 분자는 5개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 5개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 46

청구항 44에 있어서, RNA 분자는 10개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 10개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 47

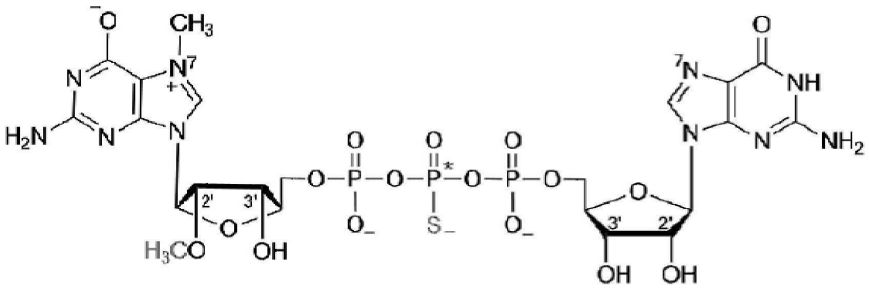
청구항 44에 있어서, RNA 분자는 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 20개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 48

청구항 40 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 3' 방향에서 가장 원위에 있는 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, RNA 분자.

청구항 49

청구항 39 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 5' 캡은 다음 구조의 D1 부분입체이성질체를 포함하는, RNA 분자:



.

청구항 50

청구항 39 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 5' UTR은 서열 UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 23)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 51

청구항 39 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 5' UTR은 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 21)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 52

청구항 39 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 분비 신호 펩티드는 아미노산 서열 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS (서열 번호: 27)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 53

청구항 39 내지 51 중 어느 한 항에 있어서, 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 25)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 54

청구항 39 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분은 아미노산

서열 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA (서열 번호: 30)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 55

청구항 39 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC (서열 번호: 28)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 56

청구항 39 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, AES mRNA의 3' 비번역 영역은 서열 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC (서열 번호: 33)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 57

청구항 39 내지 56 중 어느 한 항에 있어서, 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA의 비-코딩 RNA는 서열 CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG (서열 번호: 35)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 58

청구항 39 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 3' UTR은 서열 CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (서열 번호: 31)를 포함하는, RNA 분자.

청구항 59

청구항 39 내지 58 중 어느 한 항에 있어서, 폴리(A) 서열은 120개 아데닌 뉴클레오티드를 포함하는, RNA 분자.

청구항 60

5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 RNA 분자: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 19); 및 폴리뉴클레오티드 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (서열 번호: 20).

청구항 61

청구항 60에 있어서, 서열 번호: 19와 서열 번호: 20의 서열들 사이에, 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, RNA 분자.

청구항 62

청구항 60에 있어서, 서열 번호: 19와 서열 번호: 20의 서열들 사이에, 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함하는, RNA 분자:

(a) 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈; 및

(b) 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 5개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 5개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 64

청구항 62에 있어서, 10개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 10개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 65

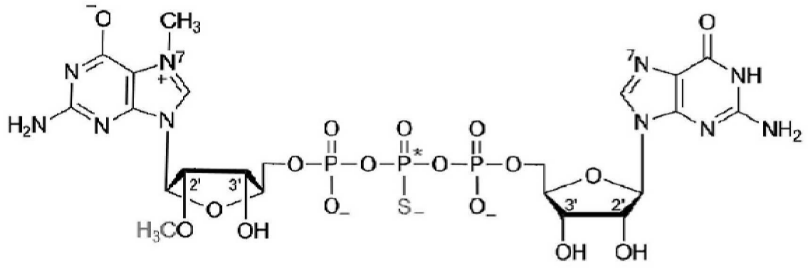
청구항 62에 있어서, 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 20개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, RNA 분자.

청구항 66

청구항 60 내지 65 중 어느 한 항에 있어서, 5' 캡을 추가로 포함하고, 이때 5' 캡은 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 19)에 대해 5'에 위치하는, RNA 분자.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 5' 캡은 다음 구조의 D1 부분입체이성질체를 포함하는, RNA 분자:



.

청구항 68

청구항 39 내지 67 중 어느 한 항의 RNA 분자 및 하나 이상의 지질을 포함하는 리포솜으로서, 하나 이상의 지질은 RNA 분자를 캡슐화하는 다중층 구조를 형성하는, 리포솜.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 하나 이상의 지질은 적어도 하나의 양이온성 지질 및 적어도 하나의 헬퍼 지질을 포함하는, 리포솜.

청구항 70

청구항 68에 있어서, 하나 이상의 지질은 (R)-N,N,N-트라이메틸-2,3-다이올레일옥시-1-프로판아미늄 클로라이드 (DOTMA) 및 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)을 포함하는, 리포솜.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하비는 1.3:2 (0.65)인, 리포솜.

청구항 72

청구항 39 내지 67 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 청구항 68 내지 71 중 어느 한 항의 리포솜의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서, RNA 분자는 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 74

청구항 72 또는 청구항 73에 있어서, PD-1 축 결합 길항제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 75

청구항 72 내지 74 중 어느 한 항에 있어서, 암은 흑색종, 비-소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택되는, 방법.

청구항 76

개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법에 사용하기 위한, 청구항 39 내지 67 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 청구항 68 내지 71 중 어느 한 항의 리포솜.

청구항 77

5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 DNA 분자:

(1) 5' 비번역 영역 (UTR)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열;

(2) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열;

(3) 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열;

(4) 다음을 포함하는 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열:

(a) 아미노-말단 스플릿 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및

(b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및

(5) 폴리(A) 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 78

청구항 77에 있어서, 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, DNA 분자.

청구항 79

청구항 77에 있어서, 5'→3' 방향으로 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고;

이때 아미노산 링커 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하고;

이때 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, DNA 분자.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 아미노산 링커는 서열 GGSGGGGSGG (서열 번호: 39)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 81

청구항 79에 있어서, 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC (서열 번호: 38)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 82

청구항 79 내지 81 중 어느 한 항에 있어서, 5'→3' 방향으로 적어도 제2 링커-에피토프 모듈을 추가로 포함하고, 이때 적어도 제2 링커-에피토프 모듈은 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고;

이때 제2 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 제1 링커-네오에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하고;

이때 제1 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프는 제2 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프와 상이한, DNA 분자.

청구항 83

청구항 82에 있어서, DNA 분자는 5개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 5개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 84

청구항 82에 있어서, DNA 분자는 10개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 10개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 85

청구항 82에 있어서, DNA 분자는 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 20개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 86

청구항 78 내지 85 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 3' 방향에서 가장 원위에 있는 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재하는, DNA 분자.

청구항 87

청구항 77 내지 84 중 어느 한 항에 있어서, 5' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 24)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 88

청구항 77 내지 84 중 어느 한 항에 있어서, 5' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 22)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 89

청구항 77 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 분비 신호 펩티드는 아미노산 서열 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS (서열 번호: 27)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 90

청구항 77 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 26)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 91

청구항 77 내지 90 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분은 아미노산 서열 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA (서열 번호: 30)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 92

청구항 77 내지 90 중 어느 한 항에 있어서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC (서열 번호: 29)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 93

청구항 77 내지 92 중 어느 한 항에 있어서, AES mRNA의 3' 비번역 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (서열 번호: 34)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 94

청구항 77 내지 93 중 어느 한 항에 있어서, 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA의 비-코딩 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG (서열 번호: 36)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 95

청구항 77 내지 94 중 어느 한 항에 있어서, 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (서열 번호: 32)를 포함하는, DNA 분자.

청구항 96

청구항 77 내지 95 중 어느 한 항에 있어서, 폴리(A) 서열은 120개 아데닌 뉴클레오티드를 포함하는, DNA 분자.

청구항 97

5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 DNA 분자: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 40); 및 폴리뉴클레오티드 서열 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (서열 번호: 41).

청구항 98

청구항 97에 있어서, 5'→3' 방향으로 서열 번호: 40과 서열 번호: 41의 서열들 사이에, 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, DNA 분자.

청구항 99

청구항 97에 있어서, 5'→3' 방향으로 서열 번호: 40과 서열 번호: 41의 서열들 사이에 다음을 추가로 포함하는, DNA 분자:

(a) 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈; 및

(b) 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 100

청구항 99에 있어서, 5개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 5개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 101

청구항 99에 있어서, 10개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 10개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 102

청구항 99에 있어서, 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함하고, 이때 20개 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩하는, DNA 분자.

청구항 103

청구항 77 내지 102 중 어느 한 항의 DNA 분자를 전사하는 것을 포함하는, RNA 분자의 제조 방법.

청구항 104

청구항 1 내지 35 중 어느 한 항의 방법에 따라 청구항 39 내지 67 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 청구항 68 내지 71 중 어느 한 항의 리포솜을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 105

청구항 39 내지 67 중 어느 한 항의 RNA 분자 또는 청구항 68 내지 71 중 어느 한 항의 리포솜을 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 106

청구항 105에 있어서, RNA 분자 또는 리포솜은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 약 200mg 또는 약 1200mg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 107

청구항 105 또는 청구항 106에 있어서, RNA 분자 또는 리포솜 및 PD-1 축 결합 길항제는 8회의 21-일 주기로 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 108

청구항 107에 있어서, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg 용량으로 개체에게 투여되고, RNA 분자 또는 리포솜은 주기 2의 1, 8 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg 용량으로 개체에게 투여되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원들에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 1월 14일 출원된 미국 가특허출원 제 62/792,387; 2019년 1월 22일 출원된 제 62/795,476; 및 2019년 8월 15일 출원된 제 62/887,410의 우선권 이익을 주장하며; 이들 문헌 각각은 본원에 그 전문이 참고문헌으로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출

[0004] 다음과 같은 ASCII 텍스트 파일 제출 내용은 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다: 컴퓨터 판독가능한 형태

(CRF)의 서열 목록 (파일명: 146392046940SEQLIST.txt, 기록일자: 2020년 1월 13일, 크기: 41 KB).

[0005] 기술분야

[0006] 본 발명은 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체)를 RNA 백신과 조합하여 투여함으로써 암을 치료하는 것과 관련된 방법, 이의 사용 및 키트에 관한 것이다. 추가로 RNA 분자 (예를 들어, 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 맞춤형 RNA 암 백신), 뿐만 아니라 RNA 백신의 생산 또는 사용에 유용한 DNA 분자 및 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0007] 흑색종은 멜라닌 세포에서 기원하는 잠재적으로 치명적인 형태의 피부암이다. 2012년에 전 세계적으로 흑색종으로 인해 약 232,000건의 신규 사례와 55,000건의 사망이 있었으며 유럽에서는 100,000건 이상의 신규 사례 및 22,000건의 사망이 있었다 (Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, 외 *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403). 2018년 미국에서는 흑색종의 신규 진단이 91,270건으로 추산되고 약 9,320명의 환자가 이 질병으로 사망할 것으로 예상된다 (American Cancer Society 2018). 또한 추정치에 따르면 흑색종의 발병률은 10~20년마다 두 배로 증가한다 (Garbe C, Leiter U. *Clin Dermatol* 2009;27:3-9).

[0008] 흑색종 환자의 임상 결과는 발병 단계에 따라 크게 좌우된다. 최근까지 전이성 흑색종의 치료 옵션은 제한적이었다. 다카르바진이 표준 1차 치료제로 고려되었다. 그러나 결과는 5%~12%의 반응률, 2개월 미만의 무진행 생존 (PFS) 중앙값, 6.4~9.1개월의 전체 생존 (OS) 중앙값으로 좋지 않았다 (Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, 외 *J Clin Oncol* 2000;18:158-66; Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, 외 *J Clin Oncol* 2006;24:4738-45; Chapman PB, Hauschild A, Robert C, 외 *N Engl J Med* 2011;364:2507-16; Robert C, Thomas L, Bondarenko I, 외 *N Engl J Med* 2011;364:2517-26). 조합 화학 요법 및 인터페론-α (IFN)-α 또는 인터루킨-2(IL-2)과 조합된 화학 요법은 개선된 반응률을 나타내긴 했지만 OS 개선으로 이어지지 않았다 (Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, 외 *J Clin Oncol* 1999;17:2745-51; Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, 외 *J Clin Oncol* 2007;25:5426-34).

[0009] T 세포 활성화를 억제하는 공동-억제 수용체 또는 “면역 체크포인트”를 표적으로 하는 면역치료제는 진행성 흑색종 환자의 결과를 개선했다. 이러한 발전에도 불구하고 많은 환자가 현재 치료법에 반응하지 않거나 나중에 질병에 걸리게 되므로 보다 효과적인 치료 옵션에 대한 충족되지 않은 의학적 요구가 계속 존재함을 강조한다.

[0010] 현재 이용가능한 면역요법에 대한 임상 및 비임상 데이터는 단일 제제 면역요법이 대다수의 환자에서 완전하고 지속적인 항종양 반응을 유도할 가능성이 낮다는 것을 시사한다. 악성 세포에 의한 숙주 면역 억제는 여러 경로에 의해 매개된다. 따라서 두 가지 이상의 표적화 암 면역요법(CIT) 제제를 사용하는 조합 치료 요법들은 숙주 면역계의 항종양 능력을 완전히 사용하는 데 필요할 수 있다.

[0011] 치료 백신은 유망하지만 역사적으로 기대에 미치지 못했었다. 가능한 이유들 중 하나는 암-특이적 T 세포가 암 세포에 만성적으로 노출되는 동안 기능적으로 소진되기 때문이다.

[0012] 특허 출원, 특허 공보 및 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호를 포함하여 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 마치 각 개별 참고 문헌이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고 문헌으로 포함된 것으로 기재된 것처럼 그 전체가 참고문헌으로 본 명세서에 포함된다.

발명의 내용

[0013] 요약

[0014] 본원은 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD1 또는 항-PD-L1 항체) 및 RNA 백신을 포함하는 암 치료 방법, 암 치료용 키트 및 이의 사용을 제공한다.

[0015] 일부 양상들에서, 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신을 투여하는 것을 포함하는, 개체의 암 치료 방법이 본원에 제공되며, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로 인해 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0016] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제이다. 일부 구체예들에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체이다. 일부 구체예들에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙이다. 일부

구체예들에서, 항-PD-1 항체는 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여된다.

[0017] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 PD-L1 결합 길항제이다. 일부 구체예들에서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 일부 구체예들에서, 항-PD-L1 항체는 아벨루맙 또는 더발루맙이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-PD-L1 항체는 다음을 포함한다: (a) GFTFSDSWIH (서열 번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPYGGSTYYADSVKG (서열 번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-2, 및 RHWPGGFDY (서열 번호: 3)의 아미노산을 포함하는 HVR-3를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 (b) RASQDVSTAVA (서열 번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQYLYHPAT (서열 번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL). 일부 구체예들에서, 항-PD-L1 항체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙이다. 일부 구체예들에서, 항-PD-L1 항체는 약 1200 mg의 용량으로 개체에게 투여된다.

[0018] 상기 구체예들 중 어느 하나의 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다.

[0019] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 10-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 리포플렉스 나노입자 또는 리포솜으로 제형화된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다.

[0020] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, RNA 백신은 주기 2의 1, 8 및 15일차에 그리고 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 주기 8 이후 개체에게 추가로 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 추가 21-일 17회 주기로 개체에게 추가 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 13-29의 1일차에 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 13, 21, 및 29의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1일차에 약 25 μg, 주기 2의 8일차에 약 25 μg, 주기 2의 15일차에 약 25 μg, 및 주기 3-7 각각의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 정맥내 투여된다. 일부 구체예들에서, 개체는 인간이다.

[0021] 일부 구체예들에서, 암은 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 암은 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 피부 또는 점막 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 안구 또는 말단 흑색종이 아니다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 전이성 (예를 들어, IV기, 가령, 재발성 또는 새로운 IV기)이거나 절제불가능한 국소 진행성 (예를 들어, IIIC 또는 IIID기) 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 이전에 치료되지 않은 전이성 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 무진행 생존 (PFS)을 개선시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 객관적 반응률 (ORR)을 증가시킨다.

[0022] 일부 양상들에서, 본원은 상기 구체예들 중 어느 하나의 방법에 따라 암을 가진 개체를 치료하기 위한, RNA 백신과 조합하여 사용되는 PD-1 축 결합 길항제를 포함하는 키트 또는 제조 물품을 제공한다.

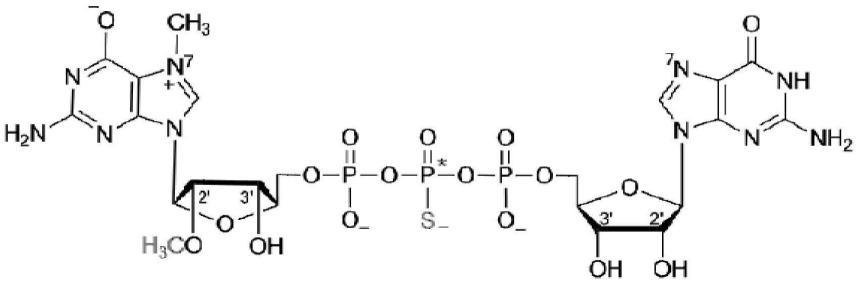
[0023] 일부 양상들에서, 본원은 유효량의 PD-1 축 결합 길항제를 RNA 백신과 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 인간 개체의 치료 방법에서 사용하기 위한 PD-1 축 결합 길항제를 제공하며, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 양상들에서, 본원은 유효량의 RNA 백신을 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 가진 인간 개체의 치료 방법에서 사용하기 위한 RNA 백신을 제공하며, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0024] 일부 양상들에서, 본원은 5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 RNA 분자를 제공한다: (1) 5' 캡; (2) 5' 비번역 영

역 (UTR); (3) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (4) 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (5) 다음을 포함하는 3' UTR: (a) 스플릿의 아미노-말단 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및 (b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및 (6) 폴리(A) 서열.

[0025] 일부 구체예들에서, RNA 분자는 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (3))과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (4)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들과 네오에피토프는 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하고; 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 상기 (3))과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 상기 (4)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커는 서열 GGSGGGGSGG (서열 번호: 39)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC (서열 번호: 37)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 적어도 제2 링커-에피토프 모듈, 이때 적어도 제2 링커-에피토프 모듈은 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고; 이때 제2 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 제1 링커-네오에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (4)) 사이에 존재하며; 그리고 제1 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프는 제2 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프와 다르다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, 각 링커-에피토프 모듈은 다른 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, RNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 3' 방향에서 가장 원위에 있는 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (4)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 **도 4**에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, **도 4**에서 N은 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 (*예를 들어*, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는) 폴리뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 일부 구체예들에서, **도 4**에서 N은 하나 이상의 (예를 들어, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한) 링커-네오에피토프 모듈(들)을 나타내고, 각 모듈은 5'→3' 방향으로 하나 이상의 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0026] 일부 구체예들에서, RNA 분자의 5' 캡 (예를 들어, 상기 (1))은 상기 구조의 D1 부분입체이성질체를 포함한다:



[0027] .

[0028] 일부 구체예들에서, RNA 분자의 5' UTR (*예를 들어*, 상기 (2))은 서열 UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 23)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 5' UTR (*예를 들어*, 상기 (2))은 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 21)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자에 의해 인코딩되는 분비 신호 펩티드 (*예를 들어*, 상기 (3))는 아미노산 서열 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS (서열 번호: 27)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 분비 신호 펩티드 (*예를 들어*, 상기 (3))를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 25)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자에 의해 인코딩되는 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부 (*예를 들어*, 상기 (4))는 아미노산 서열 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA (서열 번호: 30)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (4))은 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGC GGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC (서열 번호: 28)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 AES mRNA의 3' 비번역 영역 (*예를 들어*, 상기 (5a))은 서열 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCC CCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC (서열 번호: 33)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA (*예를 들어*, 상기 (5b))의 비-코딩 RNA는 서열 CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUA UACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG (서열 번호: 35)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 3' UTR (*예를 들어*, 상기 (5))은 서열 CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCA CCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAG UGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUA GCCGCGUCGCU (서열 번호: 31)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자의 폴리(A) 서열 (*예를 들어*, 상기 (6))은 120개 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다.

[0029] 일부 양상들에서, 본원은 5'→3' 방향으로 다음을 포함하는, RNA 분자를 제공한다: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUG GCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 19); 및 폴리뉴클레오티드 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGC GGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGC UGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGA CACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAAC UAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (서열 번호: 20).

[0030] 일부 양상들에서, 본원은 5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 RNA 분자를 제공한다: 폴리뉴클레오티드 서열

[0031] GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC

[0032] ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC

[0033] CCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG **CNA**UCGUGGGA AUUGUGGCAG

[0034] GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG

[0035] AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC

[0036] CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU

[0037] AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUUCCCGUC

[0038] CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCUCGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC

[0039] UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCA

[0040] CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA

[0041] CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACU

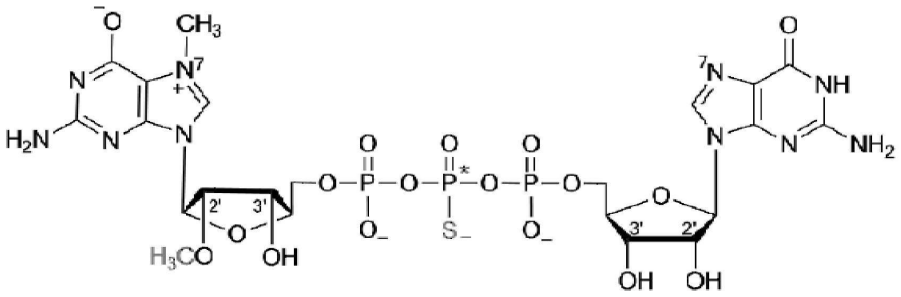
[0042] AACCCCAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG

[0043] AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[0044] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[0045] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA (서열 번호: 42)

[0046] 일부 구체예들에서, RNA 분자는 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 19와 서열 번호: 20의 서열들 사이, 또는 서열 번호: 42에서 "N" 표지된 위치에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 5'→3' 방향으로 (*예를 들어*, 서열 번호: 19와 서열 번호: 20의 서열들 사이, 또는 서열 번호: 42에서 "N" 표지된 위치에) 다음을 추가로 포함한다: (a) 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈, 이때 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈은 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고; 및 (b) 제2 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, 각 링커-에피토프 모듈은 다른 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, RNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함하고, 이때 5' 캡은 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUG GCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 19)에 대해 5'에 위치한다. 일부 구체예들에서, 5' 캡은 두 개의 구아닌 뉴클레오티드 사이에 위치한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 5' 캡을 추가로 포함하고, 이때 5' 캡은 서열 번호: 42에서 처음 2개 G 염기들 사이에 위치한다 (*예를 들어*, **도 4에 도시**). 일부 구체예들에서, 5' 캡은 다음 구조의 D1 입체이성질체를 포함한다:

[0047] 

.

[0048] 일부 양상들에서, 상기 구체예들 중 어느 하나의 RNA 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 또는 서열 목록 또는 도면에 기재된 임의의 RNA 분자 포함) 및 하나 이상의 지질을 포함하는 리포솜이 제공되며, 이때 하나 이상의 지질은 RNA 분자를 캡슐화하는 다중층 구조를 형성한다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 지질은 적어도 하나의 양이온성 지질 및 적어도 하나의 헬퍼 지질을 포함한다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 지질은 (R)-N,N,N-트라이메틸-2,3-다이올레일옥시-1-프로판아미늄 클로라이드 (DOTMA) 및 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에

탄올아민(DOPE)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.3:2 (0.65)이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.0:2.0 이상이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.9:2.0 이하이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.0:2.0 이상 및 1.9:2.0 이하이다.

[0049] 일부 양상들에서, 본원은 개체의 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 상기 구체예들 중 어느 하나의 RNA 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 또는 서열 목록 또는 도면에 기재된 임의의 RNA 분자 포함) 또는 상기 구체예들 중 어느 하나의 리포솜의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 또한 본원은 개체의 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키는 방법에 사용하기 위한 상기 구체예 중 어느 하나의 RNA 분자 또는 상기 구체예 중 어느 하나의 리포솜을 제공하며, 이때 상기 방법은 개체에게 유효량의 RNA 분자 또는 리포솜을 투여하는 것을 포함한다. 또한 본원은 개체의 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키는 약물의 제조에 사용하기 위한, 상기 구체예들 중 어느 하나의 RNA 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 또는 서열 목록 또는 도면에 기재된 임의의 RNA 분자 포함) 또는 상기 구체예들 중 어느 하나의 리포솜을 제공한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 PD-1 축 결합 길항제 (*예를 들어*, 항-PDL1 항체)를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예들에서, 암은 흑색종, 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택된다. 일부 구체예들에서, RNA 분자 또는 리포솜은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 분자 또는 리포솜은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 투여되고, PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PDL1 항체)는 약 200 또는 약 1200mg의 용량으로 투여된다.일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 분자 또는 리포솜은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다.

[0050] 일부 양상들에서, 본원은 본원에 기재된 RNA 분자들 중 어느 하나를 인코딩하는 DNA 분자를 제공한다. 일부 양상들에서, 본원은 5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 DNA 분자를 제공한다: (1) 5' 비번역 영역 (UTR)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (2) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (3) 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (4) 다음을 포함하는 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열: (a) 스플릿의 아미노-말단 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및 (b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및 (5) 폴리(A) 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

[0051] 일부 구체예들에서, DNA 분자는 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (2))과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (3)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들과 네오에피토프는 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하고; 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 상기 (2))과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 상기 (3)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커는 서열 GGSGGGGSGG (서열 번호: 39)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC (서열 번호: 38)를 포함한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 적어도 제2 링커-에피토프 모듈, 이때 적어도 제2 링커-에피토프 모듈은 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고; 이때 제2 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 제1 링커-네오에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드

서열 (*예를 들어*, 상기 (3)) 사이에 존재하며; 그리고 제1 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프는 제2 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프와 다르다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, 각 링커-에피토프 모듈은 다른 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, DNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이때 아미노산 링커를 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 3' 방향에서 가장 원위에 있는 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (3)) 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, 5' UTR (*예를 들어*, 상기 (1))을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 24)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 5' UTR (*예를 들어*, 상기 (1))을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 22)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 분비 신호 펩티드 (*예를 들어*, 상기 (2)에 의해 인코딩됨)는 아미노산 서열 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS (서열 번호: 27)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (2))은 서열 ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 26)를 포함한다. 일부 구체예들에서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부 (*예를 들어*, 상기 (3)에 의해 인코딩됨)는 아미노산 서열 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA (서열 번호: 30)를 포함한다. 일부 구체예들에서, MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (3))은 서열 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGC GGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC (서열 번호: 29)를 포함한다. 일부 구체예들에서, AES mRNA의 3' 비번역 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (*예를 들어*, 상기 (4a))은 서열 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCC CCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (서열 번호: 34)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA의 비-코딩 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (*예를 들어*, 상기 (4b))는 서열 CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTA TACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG (서열 번호: 36)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (*예를 들어*, 상기 (4))는 서열 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCC CCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTA ACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCG TCGCT (서열 번호: 32)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리(A) 서열 (*예를 들어*, 상기 (5))은 120개 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다.

[0052] 일부 양상들에서, 본원은 5'→3' 방향으로 다음을 포함하는 DNA 분자를 제공한다: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTG GCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 40); 및 폴리뉴클레오티드 서열 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGC GGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGC TGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGA CACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAAC TAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (서열 번호: 41).

[0053] 일부 구체예들에서, DNA 분자는 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 40과 서열 번호: 41의 서열들 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 5'→3' 방향으로 서열 번호: 40과 서열 번호: 41의 서열들 사이에 다음을 포함한다: (a) 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈, 이때 적어도 제1 링커-네오에피토프 모듈은 아

미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고; 및 (b) 제2 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, 각 링커-에피토프 모듈은 다른 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, DNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0054] 일부 양상들에서, 본원은 상기 구체예들 중 어느 한 항의 DNA 분자를 전사하는 것을 포함하는, RNA 분자의 제조 방법을 제공한다.

[0055] 본원에 기재된 다양한 구체예의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합될 수 있어 본 발명의 다른 구체예를 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 본원의 이들 및 다른 양상들은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 이들 및 다른 구체예는 하기 상세한 설명에 의해 추가로 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성한 최소한 하나의 도면을 내포한다. 색상 도면이 첨부된 본 특허 또는 특허 출원 공개본의 사본은 특허청에 요청 및 필요한 요금 지불시 제공될 것이다.

도 1은 RNA 기반 개인 맞춤형 암 백신(RO7198457)과 항-PD1 항체 (펨브롤리주맙)의 효능 및 안전성을 평가하기 위해 설계된 II상 무작위 개방 연구에 대한 연구 개요를 보여준다. 무작위배정 단계에서 환자는 실험 치료 (B군) 또는 대조 치료 (A군)에 무작위 (2:1)로 배정된다. IMC = 내부 모니터링 위원회; LDH = 젖산 탈수소효소; Q3W = 3주 마다; TBD = 결정될 예정; ULN = 정상의 상한.

도 2는 II 상 연구의 A군 (펨브롤리주맙) 및 안전성 준비 단계 (safety run-in stage)및 B군 (RO7198457 + 펨브롤리주맙)에 대한 투약 계획을 보여준다. C = 주기; D = 일차.

도 3은 예시적인 RNA 백신 (즉, 폴리-네오에피토프 RNA)의 일반 구조를 보여준다. 이 도면은 일정한 5'-캡 (베타-S-ARCA(D1)), 5'-및 3'-비번역 영역 (각각 hAg-코작 및 FI), N- 및 C-말단 융합 태그 (각각 sec2.0 및 MITD), 폴리(A)-꼬리(A120) 및 GS-풍부 링커에 의해 융합된 네오에피토프 (neo1 내지 10)를 인코딩하는 환자 특이적 서열을 갖는 RNA 약물의 일반 구조의 개략도이다.

도 4는 예시적인 RNA 백신의 불변 영역의 리보뉴클레오티드 서열 (5'->3') (서열 번호: 42)이다. 처음 2개의 잔기들 사이의 링키지는 5' 캡핑 구조에 관한 **도 5** 및 **표 5**에서 보는 바와 같이 비정상적 결합 (5'->5')-pp$_s$p-이다. 환자 암 특이적 서열의 삽입 부위는 C131과 A132 잔기 사이에 존재한다 (**볼드체**로 표시). "N"은 (선택적 링커에 의해 분리된) 하나 이상 (예를 들어, 1-20개)의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(들)의 위치를 지칭한다.

도 5는 RNA 불변 영역들의 5' 말단에서 사용되는 5'- 캡핑 구조 베타-S-ARCA(D1) ($m_2^{7\cdot2'\cdot O}$GppspG)이다. 입체 P 중심은 "D1" 이성질체에서 *Rp*-구조이다. 비고: 빨간색으로 표시된 것은 베타-S-ARCA(D1)와 기본 캡 구조 m^7GpppG의 차이점; 베타-포스페이트에서 비-가교 산소의 황에 의한 치환 및 빌딩 블록 m^7G의 C2' 위치의 -OCH3기이다. 입체 P 중심(*로 표시됨)의 존재로 인해 포스포로티오에이트 캡 유사체 베타-S-ARCA는 두 개의 부분입체이성질체로 존재한다. 이들은 역상 고성능 액체 크로마토그래피에서의 용출 순서에 따라 01 및 02로 지정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 상세한 설명

[0058] ***I. 정의***

[0059] 본 발명을 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 특정 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않으며, 이는 물론 달라질 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 특정 구체예들을 오직 설명하기 위한 것이며, 제한을 하고자 하는 것이 아님을 또한 이해하여야 한다.

[0060] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 이용된 바와 같이, 단수 형태 (“a”, “an” 및 “the”)는 문맥에서 별도로 지시되지 않으면, 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, “분자”에 대한 언급은 2개 또는 그 이상의 이런 분자의 조합 등을 임의적으로 포함한다.

[0061] 본 명세서에 사용된 용어 “약”은 기술 분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지된 바와 같이, 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본 명세서에서 “약” 값 또는 파라미터 지칭은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 구체예를 포함한다 (그리고 기재한다).

[0062] 본원에 기재된 본 발명의 양상 및 구체예는 “포함하는(comprising)”, “구성되는(consisting) 및 “~로 본질적으로 구성되는”의 양상 및 구체예를 포함하는 것으로 이해된다.

[0063] 용어 “PD-1 축 결합 길항제(axis binding antagonist)”는 상기 PD-1 신호생성 축에서 신호생성으로 인한 T 세포 기능이상을 제거하기 위하여, PD-1 축 결합 짝과 이의 하나 또는 그 이상의 결합 짝과의 상호작용을 억제하는 분자를 지칭하며, 그 결과 T-세포 기능 (예로써, 증식, 사이토카인 생산, 표적 세포 사멸)이 복원 또는 강화된다. 본 명세서에서 이용되는 PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제, PD-L1 결합 길항제 및 PD-L2 결합 길항제를 포함한다.

[0064] 용어 “PD-1 결합 길항제(binding antagonist)”는 PD-1과 이의 하나 또는 그 이상의 결합 짝, 이를 테면 PD-L1, PD-L2와의 상호작용으로 인하여 신호전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 분자를 지칭한다. 일부 구체예들에 있어서, PD-1 결합 길항제는 PD-1이 이의 결합 짝에 결합하는 것을 억제하는 분자다. 특정 양상에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 PD-1이 PD-L1 및/또는 PD-L2에 결합하는 것을 억제한다. 예를 들면, PD-1 결합 길항제들은 PD-1과 PD-L1 및/또는 PD-L2와의 상호작용으로 인하여 생성되는 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 항-PD-1 항체, 이의 항원 결합 단편들, 면역접합체, 융합 단백질, 올리고펩티드 및 기타 분자를 포함한다. 한 구체예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1을 통하여 T 림프구 매개된 신호생성에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통하여 매개된 음성 공동-자극 신호를 감소시켜, 이상기능 T-세포의 기능이상을 더 적게 한다 (예로써, 항원 인지에 대한 효과기 반응을 강화). 일부 구체예들에서, 상기 PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체이다. PD-1 결합 길항제의 구체적인 예는 아래에 제공된다.

[0065] 용어 “PD-L1 결합 길항제”는 PD-L1과 이의 하나 또는 그 이상의 결합 짝, 이를 테면 PD-1, B7-1과의 상호작용으로 인하여 신호전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 분자를 지칭한다. 일부 구체예들에 있어서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1이 이의 결합 짝에 결합하는 것을 억제하는 분자다. 특정 양상에서, 상기 PD-L1 결합 길항제는 PD-L1이 PD-1 및/또는 B7-1에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 PD-L1 결합 길항제들은 PD-L1과 하나 또는 그 이상의 이의 결합 짝, 이를 테면 PD-1, B7-1과의 상호작용으로 인하여 생성되는 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 항-PD-L1 항체, 이의 항원 결합 단편들, 면역접합체, 융합 단백질, 올리고펩티드 및 기타 분자를 포함한다. 한 구체예에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1을 통하여 T 림프구 매개된 신호생성에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통하여 매개된 음성 공동-자극 신호를 감소시켜, 이상기능 T-세포의 기능이상을 더 적게 한다(예로써, 항원 인지에 대한 효과기 반응을 강화). 일부 구체예들에 있어서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. PD-L1 결합 길항제의 구체적인 예는 아래에 제공된다.

[0066] 용어 “PD-L2 결합 길항제”는 PD-2와 이의 하나 또는 그 이상의 결합 짝, 이를 테면 PD-1과의 상호작용으로 인하여 신호전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 분자를 지칭한다. 일부 구체예들에 있어서, PD-L2 결합 길항제는 PD-L2가 하나 또는 그 이상의 이의 결합 짝에 결합하는 것을 억제하는 분자다. 특이적 양상에 있어서, 상기 PD-L2 결합 길항제는 PD-L2가 PD-1에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 PD-L2 길항제들은 PD-L2와 하나 또는 그 이상의 이의 결합 짝, 이를 테면 PD-1과의 상호작용으로 인하여 생성되는 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 소멸 또는 간섭하는 항-PD-L2 항체, 이의 항원 결합 단편들, 면역접합체, 융합 단백질, 올리고펩티드 및 기타 분자를 포함한다. 한 구체예에서, PD-L2 결합 길항제는 PD-L2를 통하여 T 림프구 매개된 신호생성에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통하여 매개된 음성 공동-자극 신호를 감소시켜, 이상기능의 T-세포가 기능이상이 덜 되도록 한다(예로써, 항원 인지에 대한 효과기 반응을 강화). 일부 구체예들에 있어서, PD-L2 결합 길항제는 면역접합체이다.

[0067] “지속적인 반응”은 치료 중단 후 종양 성장 감소에 대한 지속적인 효과를 지칭한다. 예를 들어, 종양 크기는 투여 단계 초기의 크기와 비교하여 동일하거나 더 작게 유지 될 수 있다. 일부 구체예에서, 지속 반응은, 치료 기간의 적어도 1.5X, 2.0X, 2.5X, 또는 3.0X 길이의 치료 기간과 적어도 동일한 기간을 가진다.

[0068] 용어 “약학 제제 (pharmaceutical formulation)”이란 이러한 형태 안에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이

효과가 있도록 하기 위한 형태의 조제물을 지칭하며, 제형이 투여되는 대상에게 수용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다. 이러한 제제는 멸균이다. "약학적으로 허용되는" 부형제 (비히클, 첨가제)는 사용된 활성 성분의 유효량을 제공하기 위해 대상 포유동물에게 합리적으로 투여 될 수 있는 것들이다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리 과정 동안 치료되는 개인 또는 세포의 자연 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과에는 질병 진행률 감소, 질병 상태 개선 또는 완화, 관해 또는 예후 개선이 포함된다. 예를 들어, 암세포의 증식 (또는 파괴) 감소, 질병으로 인한 증상 감소, 질병을 앓고 있는 사람들의 삶의 질 증가, 질병 치료에 필요한 다른 약물의 용량 감소, 및/또는 개체의 생존 연장을 비롯하여 (그러나 이에 제한되는 것은 아님), 암과 관련된 하나 이상의 증상이 완화되거나 제거되는 경우, 개체는 성공적으로 "치료된다".

[0070] 본원에서 사용되는, "질병의 진행 지연"은 질병 (예컨대 암)의 진행을 보류, 방해, 지체, 저지, 안정화, 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질병의 이력 및/또는 치료받는 개체에 따라 시간의 길이가 다양할 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의미한 지연은, 사실상, 개체에서 질병이 발병하지 않는다는 점에서, 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 말기 암, 예컨대 전이의 발병이 지연될 수 있다.

[0071] "유효량"은 특정 장애의 측정가능한 개선 또는 예방에 영향을 미치는데 필요한 최소한의 양이다. 본원의 유효량은 환자의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자 및 개인에서 원하는 반응을 유도하는 항체의 능력에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 또한 치료상 유익한 효과가 치료의 임의의 독성 또는 유해 효과를 능가하는 양이다. 예방적 사용에 있어서, 유익한 또는 원하는 결과는 위험의 제거 또는 감소, 중증도 감소, 또는 질병의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동 증상, 질병의 발달 중 나타나는 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 비롯한, 질병의 발병 지연과 같은 결과를 포함한다. 치료적 사용에 있어서, 유익한 또는 원하는 결과는 임상 결과, 예컨대 질병에서 비롯되는 하나 이상의 증상 감소, 질병을 앓는 군의 삶의 질 증가, 질병을 치료하는데 필요한 다른 약제의 용량 감소, 예컨대 질병의 표적화, 질병 진행의 지연을 통한 기타 약제의 효과 증강, 및/또는 생존 연장을 포함한다. 암 또는 종양의 경우, 유효량의 약물은 암 세포수 감소; 종양 크기 감소; 말초 기관으로의 암 세포 침윤 억제 (즉, 어느 정도 둔화 또는 바람직하게는 정지); 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게하고 바람직하게는 정지); 종양 성장을 어느 정도 억제; 및/또는 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시키는 효과를 가질 수 있다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적과 관련하여, 유효량의 약물, 화합물 또는 약학 조성물은 직접 또는 간접적으로 예방 또는 치료적 치료를 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 맥락에서 이해되는 바와 같이, 유효량의 약물, 화합물 또는 약학 조성물은 다른 약물, 화합물 또는 약학 조성물과 함께 조합되어 달성되거나 달성되지 않을 수 있다. 따라서, "유효량"은 하나 이상의 치료제 투여 내용에서 고려될 수 있으며, 그리고 만약 하나 이상의 다른 제제와 함께 바람직한 결과가 달성될 수 있거나 달성되면 단일 제제는 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다.

[0072] 본원에서 사용되는 "~와 함께" 또는 "~와 조합하여"는 또 다른 치료 방식에 더하여 하나의 치료 방식을 투여하는 것을 지칭한다. 따라서, "~와 함께" 또는 "~와 조합하여"는 개체에게 하나의 치료 방식을 기타 치료 방식의 투여 전, 동안, 또는 후에 투여하는 것을 지칭한다.

[0073] "질병"은, 문제의 질병에 포유동물을 취약하게 만드는 병리 상태를 포함하는 만성 및 급성 질병 또는 질병을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 치료에서 이익을 얻는 임의의 병태이다.

[0074] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 일정 정도의 이상 세포 증식과 관련된 장애를 지칭한다. 한 구체예에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 한 구체예에서, 세포 증식성 장애는 종양이다.

[0075] 본원에서 사용되는 "종양"은, 악성 또는 양성이든, 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 그리고 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에서 상호 배타적인 것이 아니다.

[0076] "대상체" 또는 "개체"란 치료 목적으로 인간, 가축 및 농장 동물, 동물원, 스포츠 또는 개, 말, 고양이, 소 등과 같은 애완 동물을 비롯하여 포유동물로 분류된 동물을 의미한다. 바람직하게는 포유동물은 인간이다.

[0077] 본 명세서에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 구체적으로 단클론 항체 (전장 단클론 항체 포함), 다클론 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 항체 단편을 포괄한다.

[0078] "분리된" 항체는 이의 자연 환경의 성분으로부터 식별되어, 분리되고, 그리고/또는 회수된 항체이다. 자연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질

성 또는 비단백질성 용질을 포함 할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항체는 (1) 예를 들어, Lowry법으로 결정시 항체의 95 중량% 초과까지, 일부 구체예에서, 99 중량% 초과까지; (2) 예를 들어, 회전 컵 시퀀싱 장치를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들어, 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질성에 도달하도록 정제된다. 분리된 항체는 항체의 자연 환경의 최소한 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에, 재조합 세포 내에서 인시튜(in situ) 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 최소한 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0079] “고유 항체”는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 이황화 링키지의 수는 상이한 면역글로불린 아이소형의 중쇄에 따라 다르다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적 간격의 사슬내 이황화 가교를 가진다. 각 중쇄는 한 쪽 말단에서 가변 도메인 (VH)을 가지며 복수의 불변 도메인이 이에 수반된다. 각각의 경쇄는 한 쪽 말단에 가변 도메인을(VL) 그리고 이의 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제 1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄와 중쇄 가변 도메인들 사이의 경계면을 형성하는 것으로 생각된다.

[0080] 용어 “불변 도메인”은 항원 결합 부위를 함유하는 가변 도메인인 면역글로불린의 다른 부분에 비해 보다 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자 부분을 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 CH1, CH2 및 CH3 도메인 (통칭하여 CH) 및 경쇄의 CHL (또는 CL) 도메인을 함유한다.

[0081] 항체의 “가변 영역” 또는 “가변 도메인”은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 “VH”로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 “VL”로 지칭될 수 있다. 이러한 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분이며 항원-결합 부위를 포함한다.

[0082] 용어 “가변”은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 간 서열에 있어 광범위하게 다름을 의미하며 각 특정 항체의 그 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포되지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역 (HVR)이라고 불리는 3개의 분절에 집중되어 있다. 가변 도메인들 중 보다 많이 보존되는 부분들을 프레임워크 영역 (FR)이라 한다. 고유의 중쇄 및 경쇄의 각 가변 도메인들은 3개의 HVR에 의해 연결된, 대체로 베타-쉬트 배위를 취하는 4개의 FR 영역들을 포함하며, 루프 연결을 만들고, 일부 경우에는 베타-쉬트 구조의 일부가 된다. 각 쇄에서 HVRs은 FR 영역들에 의해 근접하게, 그리고 다른 쇄의 HVRs과 함께 유지되며, 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다 (Kabat 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). 불변 도메인은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

[0083] 임의의 포유동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 “경쇄”는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열들에 기초하여, 카파 (“κ”) 및 람다 (“λ”)로 불리는 두 가지 명확히 상이한 유형들 중 하나에 배정될 수 있다.

[0084] 본원에서 사용되는 용어 IgG “아이소형” 또는 “하위분류”는 그의 불변 영역들의 화학적 및 항원성 특징에 의해 정의된 면역글로불린의 임의의 하위분류들을 의미한다.

[0085] 그 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (면역글로불린)는 상이한 분류에 할당될 수 있다. 5가지 주요 분류의 면역글로불린이 존재한다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇몇은 하위분류(아이소형), 예컨대, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 더욱 세분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 분류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, γ, ε, γ 및 μ로 불린다. 상이한 분류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 잘 알려져 있으며 일반적으로 예를 들어, Abbas 외 Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)에 기재되어 있다. 항체는 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와 항체의 공유 또는 비공유 결합에 의해 형성된 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0086] 본원에서 사용된 용어들 “전장 항체”, “무손상 항체” 및 “전체 항체”는 상호교환적으로 아래에서 정의된 바와 같은 항체 단편이 아니라, 이의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 지칭한다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.

[0087] 본원의 목적에서 “네이키드 (naked) 항체”는 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체를 말한다.

[0088] “항체 단편”은 바람직하게는 이들의 항원-결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 항체 단편은 항원-결합 단편이다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(linear antibodies); 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0089] 항체의 파파인 분해는 “Fab” 단편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원 결합 단편을 생성하며, 각각은 단일 항원 결합 부위와 잔류 “Fc” 단편을 가지는데, 이 명칭은 용이하게 결정화 할 수 있는 능력을 반영한다. 펩신 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합 할 수 있는 F(ab')2 단편을 생성한다.

[0090] “Fv”는 완전한 항원-결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 일 구체예에서, 2-사슬 Fv 종들은 밀접한 비-공유 결합으로 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 단일 사슬 Fv (scFv) 종에서, 하나의 중쇄와 하나의 경쇄 가변 도메인은 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결되어, 이러한 경쇄와 중쇄가 2-사슬 Fv 종에서와 유사한 “이량체” 구조로 결합될 수 있다. 이러한 구성에서 각 가변 도메인의 3개 HVR이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면 상의 항원-결합 부위를 정의한다. 집합적으로 6개의 HVR은 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)은 비록 전체 결합 부위보다 친화도가 더 낮기는 하지만, 여전히 항원을 인지하고, 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0091] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge)의 영역으로부터의 하나 또는 그 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개 잔기들을 부가함에 의해, Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본 명세서에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 표시한다. F(ab')2 항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 가지는 Fab' 단편 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

[0092] “단일-사슬 Fv” 또는 “scFv” 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, scFv 폴리펩티드는 상기 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하는데, 이 링커는 상기 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성하도록 한다. scFv의 내용에 관하여, 예를 들어, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)를 참조하라.

[0093] 용어 “디아바디”는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하는데, 이들 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬 (VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 너무 짧아서 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 형성할 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 예를 들면, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 외,, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 그리고 Hollinger 외,, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)에서 더욱 충분히 설명된다. 트리아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies) 또한 Hudson 외. Nat. Med. 9:129-134 (2003)에서 설명된다.

[0094] 본원에 사용된 용어 “단클론 항체”는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 예를 들어, 집단을 포함하는 개별 항체는 가능한 돌연변이, 예를 들어, 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 따라서, 수식어 “단클론”은 별개 항체들의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다. 특정 구체예에서, 이러한 단클론 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 이때 표적 결합 폴리펩티드 서열은 복수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선택 과정은 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀과 같은 복수의 클론으로부터 고유한 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은, 예를 들어, 표적에 대한 친화도를 개선하고, 표적 결합 서열을 인간화하고, 세포 배양에서 이의 생산을 개선하고, 생체내 면역원성을 감소시키고, 다중특이적 항체 등을 생성하기 위해 추가로 변경 될 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 단클론 항체임을 이해하여야 한다. 상이한 결정부위(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 다클론 항체 제제와 반대로, 단클론 항체 제제의 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정부위에 대해 지시된다. 이들의 특이성 이외에도, 단클론 항체 제제는 통상적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다.

[0095] 수식어 “단클론(monoclonal)”은 실질적으로 동종 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 출원에 따라 사용되는 단클론 항체들은, 예를 들면, 하이브리도마 방법 (예컨대, Kohler and Milstein., Nature, 256:495-97

(1975); Hongo 외, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow 외, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling 외, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA 방법 (예컨대, 미국 특허 제 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예컨대, Clackson 외, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks 외, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu 외, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee 외, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee 외, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004), 그리고 인간 면역글로불린 좌위 또는 인간 면역글로불린 서열을 인코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 가지는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체들을 생산하는 기술 (예컨대, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits 외, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits 외, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann 외, Year in Immunol. 7:33 (1993); 미국 특허 제 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; Marks 외, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg 외, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild 외, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995) 참고)를 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0096] 본 발명의 단클론 항체들은 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래한 또는 특정 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체들의 상응하는 서열들과 동일하거나 이와 상동성이지만, 상기 쇄(들)의 잔부는 또 다른 종으로부터 유래한 또는 또 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체들의 상응하는 서열들과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체들, 뿐만 아니라 필요한 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체들의 단편들을 포함한다 (예컨대, 미국 특허 제 4,816,567; 및 Morrison 외, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) 참조). 키메라 항체에는 PRIMATIZED®항체가 포함되며, 이때 항체의 상기 항원-결합 영역은, 예를 들면, 관심 항원으로 마카크 원숭이를 면역화하여 생성된 항체로부터 유도된다.

[0097] 비인간 (예를 들어, 쥐과) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 한 구체예에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 가진 비인간 종, 가령, 마우스, 래트, 토끼, 또는 비인간 영장류의 HVR (공여자 항체)의 잔기들로 대체되는 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에서, 상기 인간 면역글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 게다가, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 상기 인간화 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이 때 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 상기 인간화 항체는 임의선택적으로 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 최소한 일부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 최소한 일부분을 또한 포함할 것이다. 더욱 상세한 것은, 예컨대, Jones 외, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 외, Nature 332:323-329 (1988); 그리고 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)을 참고하라. 또한, 예를 들어, Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); 및 미국 특허 제 6,982,321 및 7,087,409도 참고하라.

[0098] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고 및/또는 본원에 개시된 인간 항체를 제조하는 임의의 기술을 사용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 정의에서 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 비롯하여 해당 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성 될 수 있다. Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks 외, J. Mol. Biol., 222:581 (1991). 또한 인간 단클론 항체의 제조를 위해 Cole 외, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner 외, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)에 기재된 방법들도 이용가능하다. 또한 van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)도 참고하라. 인간 항체는 항원 시험감염에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되어 있으나, 그 내인성 유전자좌위는 비활성화(disabled)되어 있는 유전자삽입 동물, 예컨대, 면역화된 제노마우스에 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다 (예컨대, XENOMOUSE™기술에 관한 미국 특허 제 6,075,181 및 6,150,584 참고). 또한, 예를 들어, 인간 B-세포 하이브리도마 기술에 의해 생성된 인간 항체들에 관한 Li 외, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)를 참고하라.

[0099] "종-의존성 항체"는 이것이 상기 제 2 포유동물 종 유래의 항원의 상동체에 대해 갖는 것보다 제 1 포유동물

종 유래의 항원에 대해 보다 강한 결합 친화성을 갖는 항체이다. 정상적으로, 종-의존성 항체는 인간 항원(예를 들어, 약 1 x 10-7 M 이하, 바람직하게는, 약 1 x 10-8 M 이하 및 가장 바람직하게는 약 1 x 10-9 M 이하의 결합 친화성 (Kd) 값을 갖는다)에 "특이적으로 결합"하지만 인간 항원에 대한 이의 결합 친화성 보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 약한 제2 비인간 포유동물 종 유래의 항원의 상동체에 대해 결합 친화성을 갖는다. 종-의존성 항체는 상기 정의된 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있지만 바람직하게 인간화된 또는 인간 항체이다.

[0100] 본 출원에서 사용되는 용어 "초가변 영역(hypervariable region)", "HVR" 또는 "HV"는 서열에서 초가변적이고, 및/또는 구조적으로 특정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체들은 6개의 HVR: VH에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 자연 항체에서, H3 및 L3은 6 개 HVR 중 가장 큰 다양성을 나타내며, H3은 특히 항체에 우수한 특이성을 부여하는데 있어서 고유한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 하기를 참고한다: 예를 들어, Xu 외, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). 실제로 중쇄로만 구성된 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄가 없을 때 기능적이고 안정적이다. 예컨대, Hamers-Casterman 외, Nature 363:446-448 (1993); Sheriff 외, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)을 참고하라.

[0101] 다수의 HVR 설명들이 사용되고 있으며 본원에 포함된다. Kabat 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성에 기초하며 가장 일반적으로 사용된다 (Kabat 외, 서열들 of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Chothia는 대신 구조 루프의 위치를 지칭한다 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 Kabat CDRs과 코티아 구조 루프 사이의 절충(compromise)을 나타내며, Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어에 이용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 이들 HVR 각각으로부터의 잔기들을 하기에 나타낸다.

루프	Kabat	AbM	Chothia	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(Kabat 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothia 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0102]

[0103] HVR은 다음과 같은 "확장된 HVR들"을 포함할 수 있다: V_L에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 V_H에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기들은 이들 정의 각각에 대해 상기 Kabat 외의 문헌에 따라 넘버링된다.

[0104] HVR은 다음과 같은 "확장된 HVR들"을 포함할 수 있다: V_L에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 V_H에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기들은 이들 정의 각각에 대해 상기 Kabat 외의 문헌에 따라 넘버링된다.

[0105] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0106] 용어 "Kabat에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "Kabat와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 이의 변형은 Kabat 외, 상기 문헌들에서 항체 컴파일에 관한 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 넘버링 시스템을 의미한다. 이 넘버링 체계를 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 삽입에 상응하도록 몇개 더 적은 수의 아미노산을, 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입 (Kabat에 따른 잔기 52a)와 중쇄 FR 잔기 82

다음에 삽입된 잔기(가령, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c, 등등)를 포함할 수 있다. Kabat의 잔기 넘버링은 “표준” Kabat 넘버링 서열과 항체의 서열의 상동성 영역을 정렬하여 주어진 항체에 대하여 결정될 수 있다.

[0107] Kabat 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107과 중쇄의 잔기 1-113) 를 나타낼 때 사용된다 (가령, Kabat 외, 서열s of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). “EU 넘버링 체계” 또는 “EU 색인”은 면역글로불린 중쇄 불변 영역에서 잔기를 지칭할 때 일반적으로 사용된다 (예컨데, 상기 Kabat 외의 문헌에서 보고된 EU 색인). “Kabat에서와 같은 EU 색인”은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 나타낸다.

[0108] 표현 “선형 항체”는 Zapata 외 (1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062)에 기재된 항체들을 지칭한다. 간략하게, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩타이드와 함께 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 탠덤 Fd 분절 (VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0109] 본원에서 사용된, 용어 “~에 특이적으로 결합하는” 또는 “~에 특이적인”은, 표적 및 항체 간의 결합과 같은 측정가능하고 재현가능한 상호작용을 지칭하며, 이는 생물학적 분자를 비롯한 분자의 이종성 집단의 존재하에서 표적의 존재를 결정한다. 예를 들면, 표적 (에피토프일 수 있음)에 결합 또는 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더욱 쉽게, 및/또는 더 긴 지속시간으로 상기 표적에 결합하는 항체이다. 일 구현예에서, 비관련 표적에 대한 항체의 결합 정도는, 예를 들면, 방사면역검정법(RIA)으로 측정 시, 표적에 대한 항체 결합의 약 10% 미만이다. 특정 구체예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, 또는 ≤ 0.1 nM의 해리 상수 (K_D)를 갖는다. 특정 구체예에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 중에서 보존되는 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 구체예에서, 특이적 결합은 배타적 결합을 포함할 수 있지만, 배타적 결합을 필요로 하는 것은 아니다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “샘플,”은 예를 들어, 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특성을 기준으로 특성화되고/되거나 식별되어야만 하는 세포 및/또는 다른 분자 실체를 함유하는 목적하는 대상자 및/또는 개체로부터 수득되거나 유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 문구 “질병 샘플” 및 이의 변화형은 특성화되는 세포 및/또는 분자 독립체를 함유하는 것으로 공지된 또는 예상되는 관심 대상자로부터 수득된 임의의 샘플을 지칭한다. 샘플은, 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈소판, 혈청, 혈장, 유리체 유체, 림프액, 활막 유체, 여포성 유체, 정액, 양수, 밀크, 전체의 혈액, 혈액-유도된 세포, 소변, 뇌척수액, 타액, 객담, 눈물, 땀, 점액, 종양 용해물, 및 조직 배양 배지, 조직 추출물 예컨대 균질화된 조직, 종양 조직, 세포성 추출물, 및 이들의 조합을 비제한적으로 포함한다. 일부 구체예들에서, 샘플은 종양 세포 및 선택적으로 종양-침윤성 면역 세포를 포함하는 개체의 암으로부터 얻은 샘플 (예를 들어, 종양 샘플)이다. 예를 들어, 샘플은 파라핀 블록에 내장되거나 새로 절제된 염색되지 않은 일련의 섹션들을 포함하는 종양 표본일 수 있다. 일부 구체예들에서, 샘플은 생검에서 유래하고 50개 이상의 생존가능한 종양 세포를 포함한다 (예를 들어, 코어-바늘 생검, 선택적으로 파라핀 블록에 내장됨, 절제, 절개, 펀치 또는 겸자 생검, 또는 종양 조직 절제에서 유래).

[0111] “조직 샘플” 또는 “세포 샘플”은 대상자 또는 개체의 조직으로부터 수득된 유사한 세포의 수집물을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 출처는 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기, 조직 표본, 생검 및/또는 흡인물로부터 얻은 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 성분, 예컨대 혈장; 체액, 예컨대 뇌척수액, 양수, 복막액, 또는 사이질액; 대상자의 임신 또는 발생에 있어서의 임의의 시점에서 얻은 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주 일 수 있다. 선택적으로, 조직 또는 세포 샘플은 질병 조직/장기로부터 수득된다. 조직 샘플은 본래 해당 조직과 자연적으로 혼합되지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충액, 고정제, 영양소, 항생제, 또는 기타 유사한 것을 포함할 수 있다.

[0112] 본원에서 사용되는, “참조 샘플”, “참조 세포”, “참조 조직”, “대조 표본”, “대조 세포”, 또는 “대조 조직”은 비교 목적으로 이용되는 표본, 세포, 조직, 표준, 또는 수준을 지칭한다. 일 구체예에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포, 또는 대조 조직은, 동일한 대상자 또는 개체의 신체 (예를 들어, 조직 또는 세포)의 건강한 및/또는 비-질병 부분으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 질병 세포 또는 조직에 인접한 건강한 및/또는 비-질병 세포 또는 조직 (예를 들면, 종양에 인접한 세포 또는 조직). 또 다른 구체예에서, 참조 샘플은 동일한 대상자 또는 개체의 신체의 비처리된 조직 및/또는 세포로부터 수득된다. 또한 또 다른 구체예에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포, 또는 대조군 조직은, 상기 대상자 또는 개체가 아닌 개체의 신체(예를 들어, 조직 또는 세포)의 건강하고/하거나 비-질병 부분으로부터 수

득될 수 있다. 추가의 또 다른 구체예에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포, 또는 대조 조직은, 상기 대상자 또는 개체가 아닌 개체의 신체의 비처리된 조직 및/또는 세포로부터 수득될 수 있다.

[0113] 약제를 이용한 치료에 대한 환자의 "유효한 반응" 또는 환자의 "반응성" 및 이와 유사한 문구는 질병 또는 장애, 예컨대, 암의 발병 위험이 있거나 또는 암을 앓는 환자에게 부여되는 소정의 임상적 또는 치료적 이점을 지칭한다. 일 구체예에서, 상기 이점에는 다음 중 하나 이상이 포함된다: 연장된 생존 (전체 생존 및 무진행 생존 포함); 객관적 반응의 유발 (완전한 반응 또는 부분적 반응 포함); 또는 암의 징후 또는 증상의 개선.

[0114] 치료에 "유효 반응이 없는" 환자는 생존 연장 (전체 생존율 및 무진행 생존 포함); 객관적 반응 생성 (완전 반응 또는 부분 반응 포함); 또는 암의 징후 또는 증상 개선 중 어느 하나를 가지지 않는 환자를 지칭한다.

[0115] "기능적 Fc 영역"은 고유 서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 보유한다. 예시적인 "효과기 기능"에는 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 포식작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체; BCR), 등의 하향조절이 포함된다. 이러한 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합될 것을 필요로 하며, 이는, 예를 들어 본원의 정의에 개시된 다양한 분석법을 사용하여 평가 될 수 있다.

[0116] "인간 효과기 세포를 갖는" 암 또는 생물학적 샘플은, 진단 시험에서, 샘플에 존재하는 인간 효과기 세포 (예를 들면, 침윤 인간 효과기 세포)를 가진다.

[0117] "FcR-발현 세포를 갖는" 암 또는 생물학적 샘플은, 진단 시험에서, 샘플에 존재하는 FcR-발현을 가지는 (예를 들면, 침윤 FcR-발현 세포)를 갖는 것이다. 일부 구체예들에서, FcR은 Fcγ이다. 일부 구체예들에서, FcR은 활성화 Fcγ이다.

[0118] ***II. 개요***

[0119] 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체) 및 RNA 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 암에 존재하는, 예를 들어, 개체로부터 얻은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 하나 이상의 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 개체는 인간이다.

[0120] 일부 구체예들에서, 본원은 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체) 및 RNA 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체의 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키는 방법으로서, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 샘플에 존재하는 체세포 돌연변이에 기반하여 식별된 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 본원은 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체) 및 RNA 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체의 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키는 방법으로서, 이때 RNA 백신은 개체로부터 얻은 종양 샘플에 존재하는 체세포 돌연변이에 상응하는 하나 이상의 네오에피토프를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0121] 일부 구체예들에서, 치료는 RNA 백신의 부재하에 PD-1 축 결합 길항제의 투여를 포함하는 치료와 비교하여 개체의 무진행 생존 (PFS) 및/또는 전체 생존 (OS)을 연장시킨다. 일부 구체예들에서, 치료는 RNA 백신의 부재하에 PD-1 축 결합 길항제의 투여를 포함하는 치료와 비교하여 전체 반응률 (ORR)을 개선한다. 일부 구체예들에서, ORR은 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR) 환자의 비율을 지칭한다. 일부 구체예들에서, 치료는 RNA 백신의 부재하에 PD-1 축 결합 길항제의 투여를 포함하는 치료와 비교하여 개체에서 반응 기간 (DOR)을 연장시킨다. 일부 구체예들에서, 치료는 RNA 백신의 부재하에 PD-1 축 결합 길항제의 투여를 포함하는 치료와 비교하여 개체의 건강 관련 삶의 질 (HRQoL) 점수를 개선한다.

[0122] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 200 mg 용량으로 투여되는 항-PD-1 항체 (*예를 들어*, 펨브롤리주맙)이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 1200 mg 용량으로 투여되는 항-PD-L1 항체 (*예를 들어*, 아테졸리주맙)이다.

[0123] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다.

[0124] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여된

다.

[0125] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 주기 8 이후 개체에게 추가로 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 추가 21-일 17회 주기로 개체에게 추가 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 13-29의 1일차에 개체에게 투여되고, 및/또는 RNA 백신은 주기 13, 21, 및 29의 1일차에 개체에게 투여된다.

[0126] 특정 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 특정 구체예들에서, PD-L1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-L1 축 결합 길항제는 아테졸리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 1200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1일차에 약 25 μg, 주기 2의 8일차에 약 25 μg, 주기 2의 15일차에 약 25 μg, 및 주기 3-7 각각의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다 (즉, 주기 2 동안 3회에 걸쳐 총 약 75μg의 백신이 개체에게 투여됨). 일부 구체예들에서, RNA 백신이 투여되는 첫 번째 주기 동안 총 약 75μg의 백신이 3회에 걸쳐 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PCV는, 예를 들어, 리포좀 제형으로 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 용량으로 정맥내 투여된다. 일부 구체예들에서, 투약 당 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 RNA가 전달된다 (즉, 용량 중량은 투여되는 제형 또는 리포플렉스의 총 중량이 아닌 투여된 RNA의 중량을 반영한다).

[0127] ***III. RNA 백신***

[0128] 본 발명의 특정 양상은 맞춤형 암 백신 (PCV)에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, PCV는 RNA 백신이다. 예시적인 RNA 백신들의 특징이 아래 기재되어 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 하기에 기재된 RNA 백신의 특징/서열 중 하나 이상을 포함하는 RNA 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구체예들에서, RNA 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 mRNA 폴리뉴클레오티드이다. 다른 구체예들에서, 본 발명은 하기에 기재된 RNA 백신의 특징/서열 중 하나 이상을 포함하는 RNA를 인코딩하는 DNA 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0129] 맞춤형 암 백신은 잠재적인 면역자극 활성을 갖는 것으로 확인된 개별화된 신생항원 (즉, 환자의 암에서 특이적으로 발현되는 종양 관련 항원 (TAA))을 포함한다. 본원에 기재된 구체예에서, PCV는 핵산, 예를 들어, 메신저 RNA이다. 따라서 이론에 얽매이지 않고 투여 시 맞춤형 암 백신은 항원 제시 세포 (APC)에 의해 흡수되고 번역되며 발현된 단백질은 APC 표면의 주조직적합성 복합체 (MHC) 분자를 통해 제시되는 것으로 여겨진다. 이것은 TAA(들)를 발현하는 암세포에 대한 세포독성 T-림프구 (CTL) 및 기억 T-세포의존성 면역 반응을 유도한다.

[0130] PCV는 전형적으로 다수의 신생항원 에피토프 (“네오에피토프”), *예를 들어*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28, 29, 또는 30개의 네오에피토프 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ?20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28, 29, ?또는 30개의 네오에피토프를, 선택적으로 개별 네오에피토프들 사이의 링커 서열과 함께 포함한다. 일부 구체예들에서, 본원에서 사용되는 네오에피토프는 환자의 암에 특이적이지만 환자의 정상 세포에서는 발견되지 않는 신규한 에피토프를 의미한다. 일부 구체예들에서, 네오에피토프는 MHC에 결합될 때 T 세포에 제시된다. 일부 구체예들에서, PCV는 또한 5' mRNA 캡 유사체, 5' UTR, 신호 서열, 항원 발현을 용이하게 하는 도메인, 3' UTR 및/또는 폴리A 꼬리를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 10-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 적어도 5개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 5-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 5-10개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

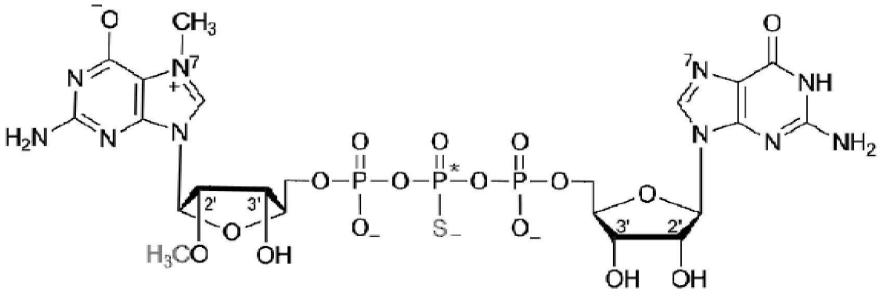
[0131] 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신의 제조는 다단계 과정이며, 이로써 환자 종양의 체세포 돌연변이는 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 확인되고 면역원성 신생항원 에피토프 (또는 “네오에피토프”)가 예측된다. 선별된 네오에피토프를 표적으로 하는 RNA 암 백신이 환자별로 제작된다. 일부 구체예들에서, 백신은 최대 2개의 메신저 RNA 분자로 구성된 RNA-기반 암 백신으로, 각각은 환자의 종양에 특이적인 최대 10개의 네오에피토프 (총 최대 20개의 네오에피토프)를 인코딩한다.

[0132] 일부 구체예들에서, 발현된 비유사 돌연변이는 종양 DNA 및 말초혈액 단핵세포(PBMC) DNA (환자의 건강한 조직의 소스로서)의 전체 엑솜 시퀀싱(WES) 및 종양 RNA 시퀀싱 (발현 평가용)에 의해 식별된다. 생성된 돌연변이 단백질들의 목록으로부터, 개별적인 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자들에 대하여 예측된 에피토프의 결합 친화도를 비롯한 여러 요인들, 및 관련 RNA의 발현 수준에 기반한 가능한 면역원성의 순위를 정하는 생물정보학 워크플로우를 사용하여 가능한 신생항원들이 예측된다. 돌연변이 발견, 우선순위 지정 및 확인 프로세스는 건강한 조직에서 각 야생형 유전자의 발현 수준에 대한 포괄적인 정보를 제공하는 데이터베이스에 의해 보완된다. 이 정보를 통해 위험 프로파일이 좋지 않은 표적 후보들을 제거하여 맞춤형 위험 완화 전략을 개발할 수 있다. 중요한 장기에서 자가 면역 위험이 더 높을 수 있는 단백질에서 발생하는 돌연변이는 걸러내어 백신 생산에 고려되지 않는다. 일부 구체예들에서, 개별 환자에 대해 각각 $CD8^+$ T 세포 및/또는 CD4+ T 세포 반응을 유발할 것으로 예측되는 최대 20개의 MHCI 및 MHCII 네오에피토프가 백신에 포함시키기 위해 선택된다. 다중 네오에피토프에 대한 백신접종은 PCV에 대한 전반적인 면역 반응의 폭과 규모를 증가시킬 것으로 예상되며 종양이 유효한 면역 반응의 선택적 압력에 노출될 때 발생할 수 있는 면역 탈출의 위험을 완화하는데 도움이 될 수 있다 (Tran E, Robbins PF, Lu YC, 외 *N Engl J Med* 2016;375:2255-62; Verdegaal EM, de Miranda NF, Visser M, 외 *Nature* 2016;536:91-5).

[0133] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 아미노산 링커를 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 링커는 2개의 환자-특이적 네오에피토프 서열들 사이, 환자 특이적 네오에피토프 서열과 (예를 들어, MHC 복합 폴리펩티드로부터 유래된 서열을 포함하는) 융합 단백질 태그 사이, 또는 분비 신호 펩티드와 환자-특이적 네오에피토프 서열 사이에 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 다수의 링커들을 인코딩한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 5-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 각 에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드들은 링커 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 5-10개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 각 에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드들은 링커 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 구체예들에서, 링커 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 N-말단 융합 태그 (예: 분비 신호 펩티드)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 네오에피토프 중 하나를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이 및/또는 네오에피토프 중 하나를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 (예를 들어, MHC 폴리펩티드의 일부를 포함하는) C-말단 융합 태그를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신에 의해 인코딩된 2개 이상의 링커는 상이한 서열들을 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 모두가 동일한 아미노산 서열을 공유하는 다수의 링커를 인코딩한다.

[0134] 다양한 링커 서열들이 당업계에 공지되어 있다. 일부 구체예들에서, 링커는 가요성 링커이다. 일부 구체예들에서, 링커는 G, S, A 및/또는 T 잔기를 포함한다. 일부 구체예들에서, 링커는 글리신과 세린 잔기로 구성된다. 일부 구체예들에서, 링커는 약 5 내지 약 20개 아미노산 또는 약 5 내지 약 12개 아미노산 길이, *예를 들어*, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개 아미노산 길이이다. 일부 구체예들에서, 링커는 서열 GGSGGGGSGG (서열 번호: 39)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 링커는 서열 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC (서열 번호: 37)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 링커는 서열 GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC (서열 번호: 38)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다.

[0135] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 5' 캡을 포함한다. 기본 mRNA 캡 구조는 2개의 뉴클레오티드 사이에 5'-5' 트라이포스페이트 링키지 (*예를 들어*, 2개의 구아닌) 및 원위 구아닌에 7-메틸 그룹, 즉, m^7GpppG를 내포하는 것으로 공지되어 있다. 예시적인 캡 구조들은, *예를 들어*, 미국 특허 제 8,153,773 및 9,295,717에 그리고 Kuhn, A.N. *외* (2010) *Gene Ther.* 17:961-971에서 찾을 수 있다. 일부 구체예들에서, 5' 캡은 구조 $m_2^{7,2'-O}$Gpp$_s$pG를 가진다. 일부 구체예들에서, 5' 캡은 베타-S-ARCA 캡이다. S-ARCA 캡 구조는 2'-O 메틸 치환 (*예를 들어*, m^7G의 C2' 위치에) 및 하나 이상의 포스페이트 그룹에서 S-치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 5' 캡은 다음 구조를 포함한다:



[0136]

[0137] 일부 구체예들에서, 5' 캡은 베타-S-ARCA의 D1 입체이성질체이다 (*예를 들어,* 미국 특허 제 9,295,717 참조). 상기 구조에서 *는 2개의 부분입체이성질체 (D1 및 D2로 지정)에 존재할 수 있는 입체 P 중심을 나타낸다. 베타-S-ARCA의 D1 부분입체이성질체 또는 베타-S-ARCA(D1)는 베타-S-ARCA의 D2 부분입체이성질체 (베타-S-ARCA(D2))와 비교하여 HPLC 컬럼에서 먼저 용출되는 베타-S-ARCA의 부분입체이성질체이므로, 더 짧은 체류 시간을 나타낸다. HPLC는 바람직하게는 분석 HPLC이다. 한 구체예에서, Supelcosil LC-18-T RP 컬럼, 바람직하게는: 5 μm, 4.6×250 mm의 형태가 분리에 사용되며, 이에 의해 1.3 ml/분의 유속이 적용될 수 있다. 한 구체예에서, 15분 이내, pH=5.9, 암모늄 아세테이트 중 메탄올의 구배, 예를 들어, 0.05 M 암모늄 아세테이트 중 메탄올의 0-25% 선형 구배가 사용된다. UV 검출 (VWD)은 260 nm에서 수행될 수 있고 형광 검출 (FLD)은 280 nm에서 여기 및 337 nm에서 검출로 수행될 수 있다.

[0138] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 5' UTR을 포함한다. mRNA에서 단백질-코딩 서열들의 5'에서 발견되는 특정한 비번역 서열들은 번역 효율을 증가시키는 것으로 나타났다. *예를 들어,* 코작, M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:947-950을 참조하라. 일부 구체예들에서, 5' UTR은 인간 알파 글로빈 mRNA의 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 23)의 5' UTR 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 5' UTR 서열은 서열 TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 24)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 5' UTR 서열은 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 21)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 5' UTR 서열은 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (서열 번호: 22)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다.

[0139] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 분비 신호 펩티드는 번역시 폴리펩티드가 소포체로부터 분비 경로로 수송되도록 지시하는 아미노산 서열이다. 일부 구체예들에서, 신호 펩티드는 MHC 폴리펩티드와 같은 인간 폴리펩티드로부터 유래된다. *예를 들어,* Kreiter, S. *외* (2008) *J. Immunol.* 180:309-318을 참조하라, 이 문헌은 인간 수지상 세포에서 MHC 클래스 I 및 II 에피토프의 처리 및 제시를 개선하는 예시적인 분비 신호 펩티드를 기재한다. 일부 구체예들에서, 번역시, 신호 펩티드는 RNA 백신에 의해 인코딩된 하나 이상의 네오에피토프 서열(들)에 대해 N-말단이다. 일부 구체예들에서, 분비 신호 펩티드는 서열 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS (서열 번호: 27)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 분비 신호 펩티드는 서열 AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 25)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 분비 신호 펩티드는 서열 ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 26)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다.

[0140] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 막경유 및/또는 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, 막경유 및/또는 세포질 도메인은 MHC 분자의 막경유/세포질 도메인에서 유래한다. 용어 "주조직 적합성 복합체"와 약어 "MHC"는 모든 척추동물에서 발생하는 유전자들의 복합체에 관한 것이다. 정상적인 면역 반응에서 림프구들과 항원 제시 세포들 사이의 신호전달에서 MHC 단백질 또는 분자의 기능은 이들을 펩티드에 결합시켜 T-세포 수용체 (TCR)가 인식할 수 있도록 제시하는 것을 포함한다. MHC 분자는 세포내 처리 구획에서 펩티드에 결합하고 항원 제시 세포 표면의 이러한 펩티드를 T 세포에 제시한다. HLA라고도 하는 인간 MHC 영역은 염색체 6에 위치하며 클래스 I 영역 및 클래스 II 영역을 포함한다. 클래스 I 알파 사슬은 약 44 kDa의 분자량을 갖는 당단백질이다. 폴리펩티드 사슬은 350개 이상의 아미노산 잔기 길이를 갖는다. 이는 외부, 막경유 및 세포질 영역의 세 가지 기능 영역으로 나뉠 수 있다. 외부 영역은 283개 아미노산 잔기의 길이를 가지며 3개의 도메인, 즉, 알파1, 알파2 및 알파3으로 나뉜다. 이러한 도메인 및 영역들은 일반

적으로 별도의 클래스 I 유전자의 엑손들에 의해 인코딩된다. 막경유 영역은 원형질막의 지질 이중층에 걸쳐 있다. 이것은 알파 나선으로 배열된 일반적으로 23개의 소수성 아미노산 잔기로 구성된다. 세포질 영역, 즉 세포질과 마주하고 막경유 영역에 연결된 부분은 일반적으로 32개의 아미노산 잔기의 길이를 가지며 세포골격의 구성요소들과 상호작용할 수 있다. 알파 사슬은 베타2-마이크로글로불린과 상호작용하여 세포 표면에 알파-베타2 이량체를 형성한다. 용어 "MHC 클래스 II" 또는 "클래스 II"는 주조직 적합성 복합체 클래스 II 단백질 또는 유전자에 관한 것이다. 인간 MHC 클래스 II 영역에는 클래스 II 알파 사슬 유전자 및 베타 사슬 유전자에 대한 DP, DQ 및 DR 하위영역 (즉, DP알파, DP베타, DQ알파, DQ베타, DR알파 및 DR베타)이 있다. 클래스 II 분자는 각각 알파 사슬과 베타 사슬로 구성된 이종이량체이다. 두 사슬 모두 분자량이 31-34 kDa (a) 또는 26-29 kDA (베타)인 당단백질이다. 알파 사슬의 총 길이는 229 내지 233개 아미노산 잔기, 그리고 베타 사슬의 총 길이는 225 내지 238개 잔기로 다양하다. 알파 및 베타 사슬 둘 모두 외부 영역, 연결 펩티드, 막경유 영역 및 세포질 꼬리로 구성된다. 외부 영역은 2개 도메인들, 알파1 및 알파2 또는 베타1 및 베타2로 구성된다. 연결 펩티드는 각각 알파이고 알파 및 베타 사슬들에서 9개 잔기 길이이다. 이것은 두 도메인을, 알파 사슬과 베타 사슬 모두에서 23개의 아미노산 잔기로 구성된 막경유 영역에 연결한다. 세포질 영역, 즉 세포질과 마주하고 막경유 영역에 연결된 부분의 길이는 알파 사슬에서 3 내지 16개 잔기, 베타 사슬에서 8 내지 20개 잔기로 다양하다. 예시적인 막경유/세포질 도메인 서열들은 미국 특허 제 8,178,653 및 8,637,006에 기재되어 있다. 일부 구체예들에서, 번역시, 막경유 및/또는 세포질 도메인은 RNA 백신에 의해 인코딩된 하나 이상의 네오에피토프 서열(들)에 대해 C-말단이다. 일부 구체예들에서, RNA 백신에 의해 인코딩되는 MHC 분자의 막경유 및/또는 세포질 도메인은 서열 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA (서열 번호: 30)를 포함한다. 일부 구체예들에서, MHC 분자의 막경유 및/또는 세포질 도메인은 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC (서열 번호: 28)를 포함한다. 일부 구체예들에서, MHC 분자의 막경유 및/또는 세포질 도메인은 서열 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC (서열 번호: 29)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다.

[0141] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 하나 이상의 네오에피토프 서열(들)에 대해 N-말단인 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 하나 이상의 네오에피토프 서열(들)에 대해 C-말단인 막경유 및/또는 세포질 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 둘 모두를 포함한다. 이러한 서열을 결합하면 인간 수지상 세포에서 MHC 클래스 I 및 II 에피토프의 처리 및 제시가 개선되는 것으로 나타났다. *예를 들어,* Kreiter, S. *외* (2008) *J. Immunol.* 180:309-318을 참조하라.

[0142] 골수성 DC에서 RNA는 세포질로 방출되어 폴리-네오에피토프 펩티드로 번역된다. 폴리펩티드는 항원 제시를 향상시키기 위한 추가 서열들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리펩티드의 N-말단에 있는 MHCI 중쇄로부터의 신호 서열(sec)은 발생초기의 분자를 소포체로 표적화하는데 사용되며, 이는 MHCI 제시 효율을 향상시키는 것으로 나타났다. 이론에 얽매이지 않고, MHCI 중쇄의 막경유 및 세포질 도메인은 폴리펩타이드를 MHCII 제시를 개선하는 것으로 밝혀진 엔도솜/리소솜 구획으로 안내하는 것으로 여겨진다.

[0143] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 3'UTR을 포함한다. mRNA에서 단백질-코딩 서열의 3'에서 발견된 특정 비번역 서열은 RNA 안정성, 번역 및 단백질 발현을 개선하는 것으로 나타났다. 3' UTR로 사용하기에 적합한 폴리뉴클레오티드 서열은 예를 들어 PG 공개 번호 US20190071682에 기재되어 있다. 일부 구체예들에서, 3' UTR은 AES 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역 및/또는 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA의 비-코딩 RNA를 포함한다. 용어 "AES"는 스플릿의 아미노-말단 인핸서에 관한 것으로 AES 유전자를 포함한다 (*예를 들어,* NCBI 유전자 ID:166 참고). 이 유전자에 의해 인코딩된 단백질은 단백질의 그루초/TLE 패밀리에 속하며, 동종올리고머로서 또는 다른 패밀리 멤버 유전자의 발현을 지배적으로 억제하기 위해 다른 패밀리 멤버와의 이종올리고머로서 기능할 수 있다. 예시적인 AES mRNA 서열은 NCBI 참조 서열 등록 번호 NM_198969에 제공되어 있다. 용어 "MT_RNR1"은 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA에 관한 것으로 MT_RNR1 유전자를 포함한다 (*예를 들어,* NCBI 유전자 ID:4549 참조). 이 RNA 유전자는 Mt_rRNA 클래스에 속한다. MT-RNR1과 관련된 질병에는 제한성 심근병증 및 청각 신경병증이 포함된다. 관련 경로 중에는 진핵생물의 리보솜 생합성 및 CFTR 번역 충실도 (클래스 I 돌연변이)가 있다. 예시적인 MT_RNR1 RNA 서열은 NCBI 참조 서열 등록 번호 NC_012920의 서열 내부에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 서열 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC (서열 번호: 33)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은

서열 CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG (서열 번호: 35)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 서열 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC (서열 번호: 33) 및 서열 CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG (서열 번호: 35)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 서열 CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (서열 번호: 31)를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 서열 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (서열 번호: 34)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 서열 CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG (서열 번호: 36)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (서열 번호: 34) 및 서열 CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG (서열 번호: 36)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신의 3' UTR은 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (서열 번호: 32)를 포함하는 DNA에 의해 인코딩된다.

[0144] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 그 3' 말단에 폴리(A) 꼬리를 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리(A) 꼬리는 50개 초과 또는 100개 초과의 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 폴리(A) 꼬리는 120개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 이 폴리(A) 꼬리는 RNA 안정성과 번역 효율성을 향상시키는 것으로 입증되었다 (Holtkamp, S. *외* (2006) *Blood* 108:4009-4017). 일부 구체예들에서, 폴리(A) 꼬리를 포함하는 RNA는 5'à 3' 전사 방향으로, 적어도 50, 100, 또는 120개의 아데닌 연속 뉴클레오티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 유형 IIS 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하는 DNA 분자를 전사함으로써 생성된다. 번역을 개선하는 예시적인 폴리(A) 꼬리 및 3' UTR 서열들은, *예를 들어*, 미국 특허 제 9,476,055에 있다.

[0145] 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신 또는 분자는 (5'→3' 방향으로) 다음과 같은 일반 구조를 포함한다: (1) 5' 캡; (2) 5' 비번역 영역 (UTR); (3) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (4) 주조직적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (5) 다음을 포함하는 3' UTR: (a) 스플릿의 아미노-말단 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및 (b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및 (6) 폴리(A) 서열. 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신 또는 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 포함한다: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC (서열 번호: 19); 및 폴리뉴클레오티드 서열 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (서열 번호: 20). 유리하게는, 구조 또는 서열의 이러한 조합 및 배향을 포함하는 RNA 백신은 개선된 RNA 안정성, 향상된 번역 효율,

개선된 항원 제시 및/또는 프로세싱(*예를 들어*, DC에 의한), 및 증가된 단백질 발현 중 하나 이상을 특징으로 한다.

[0146] 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신 또는 분자는 서열 42의 서열 (5'→3' 방향으로)을 포함한다. *예를 들어*, **도 4** 참조. 일부 구체예들에서, N은 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 또는 30개 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 구체예들에서, N은 하나 이상의 링커-에피토프 모듈 (*예를 들어*, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 또는 30개 상이한 링커-피토프 모듈)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 구체예들에서, N은 하나 이상의 링커-에피토프 모듈 (*예를 들어*, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 또는 30개 상이한 링커-피토프 모듈) 및 3' 말단에 추가 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0147] 일부 구체예들에서, RNA 백신 또는 분자는 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고; 이때 적어도 하나의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0148] 일부 구체예들에서, RNA 백신 또는 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 링커-네오에피토프 모듈을 형성한다 (*예를 들어*, 동일한 오픈-리딩 프레임에 5'→3' 방향의 연속 서열). 일부 구체예들에서, 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 또는 서열 번호: 19와 서열 번호: 20의 서열들 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신 또는 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28, 29, 또는 30개 링커-에피토프 모듈들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신 또는 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, RNA 백신 또는 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신 또는 분자는 5, 10, 또는 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, 링커-에피토프 모듈들은 동일한 오픈-리딩 프레임에서 5'→3' 방향으로 연속 서열을 형성한다. 일부 구체예들에서, 제1 링커-에피토프 모듈의 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 3' 이다. 일부 구체예들에서, 최종 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 이다.

[0149] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 적어도 800 뉴클레오티드, 적어도 1000 뉴클레오티드, 또는 적어도 1200 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 2000개 미만의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 800개 뉴클레오티드 이상 2000개 뉴클레오티드 미만의 길이, 1000개 뉴클레오티드 이상 2000개 뉴클레오티드 미만의 길이, 1200개 뉴클레오티드 이상 2000개 뉴클레오티드 미만의 길이, 1400개 뉴클레오티드 이상 2000개 뉴클레오티드 미만의 길이, 800개 뉴클레오티드 이상 1400개 뉴클레오티드 미만의 길이, 또는 800개 뉴

클레오티드 이상 2000개 뉴클레오티드 미만의 길이이다. 예를 들어, 상기 설명한 구성요소들을 포함하는 RNA 백신의 불변 영역은 대략 800개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구체예들에서, 5개의 환자-특이적 네오에피토프 (예를 들어, 각각이 27개의 아미노산을 인코딩함)를 포함하는 RNA 백신은 1300개 초과 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구체예들에서, 10개의 환자-특이적 네오에피토프 (예를 들어, 각각이 27개의 아미노산을 인코딩함)를 포함하는 RNA 백신은 1800개 초과 뉴클레오티드 길이이다.

[0150] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 리포플렉스 나노입자 또는 리포솜으로 제형화된다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신을 IV 전달하기 위해 RNA에 대한 리포플렉스 나노입자 제형 (RNA-리포플렉스)을 사용한다. 일부 구체예들에서, *예를 들어*, IV 전달을 가능하게 하기 위해 합성 양이온성 지질 (R)-N,N,N-트라이메틸-2,3-다이올레일옥시-1-프로판아미늄 클로라이드 (DOTMA) 및 인지질 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)을 포함하는 RNA 암 백신용 리포플렉스 나노입자 제제를 사용한다. DOTMA/DOPE 리포솜 성분은 비장 및 기타 림프 기관에 있는 항원 제시 세포의 IV 전달 및 표적화를 위해 최적화되었다.

[0151] 한 구체예에서, 나노입자는 적어도 하나의 지질을 포함한다. 한 구체예에서, 나노입자는 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 지질은 단일양이온성 또는 다중양이온성일 수 있다. 임의의 양이온성 양친매성 분자, 예를 들어, 적어도 하나의 친수성 및 친유성 부분을 포함하는 분자는 본 발명의 의미에 속하는 양이온성 지질이다. 한 구체예에서, 양전하는 적어도 하나의 양이온성 지질로 인한 것이고 음전하는 RNA로 인한 것이다. 한 구체예에서, 나노입자는 적어도 하나의 헬퍼 지질을 포함한다. 헬퍼 지질은 중성 또는 음이온성 지질일 수 있다. 헬퍼 지질은 인지질 또는 천연 지질의 유사체와 같은 천연 지질, 또는 천연 지질과 유사성이 없는 완전 합성 지질 또는 지질 유사 분자일 수 있다. 한 구체예에서, 양이온성 지질 및/또는 헬퍼 지질은 이중층 형성 지질이다.

[0152] 한 구체예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질은 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트라이메틸암모늄 프로판 (DOTMA) 또는 이의 유사체 또는 유도체 및/또는 1,2-다이올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판 (DOTAP) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 포함한다.

[0153] 한 구체예에서, 적어도 하나의 헬퍼 지질은 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 유사체 또는 유도체, 콜레스테롤 (Chol) 또는 이의 유사체 또는 유도체 및/또는 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 포함한다.

[0154] 한 구체예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질 대 적어도 하나의 헬퍼 지질의 몰비는 10:0 내지 3:7, 바람직하게는 9:1 내지 3:7, 4:1 내지 1:2, 4:1 내지 2:3, 7:3 내지 1:1, 또는 2:1 내지 1:1, 바람직하게는 약 1:1이다. 한 구체예에서, 이 비율에서 양이온성 지질의 몰량은 양이온성 지질의 몰량에 양이온성 지질의 양전하 수를 곱한 결과이다.

[0155] 한 구체예에서, 지질은 상기 RNA를 캡슐화하는 소포에 포함된다. 소포는 다중층 소포, 단층 소포, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 소포는 리포솜일 수 있다.

[0156] 본원에 기재된 나노입자 또는 리포솜은 양이온성 지질 대 RNA의 (+/-) 전하 비율에 따라 양전하를 음전하에 대해 조정하고 RNA와 양이온성 지질을 혼합함으로써 형성될 수 있다. 본원에 기재된 나노입자 내 양이온성 지질 대 RNA의 +/- 전하 비율은 다음 식에 의해 계산될 수 있다. (+/- 전하 비율)=[(양이온성 지질 양 (mol))*(양이온성 지질의 총 양전하 수)]:[(RNA 양 (mol))*(RNA의 총 음전하 수)]. RNA의 양 및 양이온성 지질의 양은 나노입자 제조시 로딩양을 고려하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예시적인 나노입자에 대한 추가 설명은, *예를 들어,* PG 공개 번호 US20150086612를 참조하라.

[0157] 한 구체예에서, (*예를 들어*, 생리학적 pH의) 나노입자 또는 리포솜에서 양전하 대 음전하의 전체 전하 비율은 1.4:1 내지 1:8, 바람직하게는 1.2:1 내지 1:4, 예를 들어 1:1 내지 1:3, 가령, 1:1.2 내지 1:2, 1:1.2 내지 1:1.8, 1:1.3 내지 1:1.7, 특히, 1:1.4 내지 1:1.6, 가령, 약 1:1.5이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 나노입자의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1:1.2 ($0.8\overline{3}$) 내지 1:2 (0.5)이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 나노입자 또는 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.6:2 (0.8)내지 1:2 (0.5) 또는 1.6:2 (0.8) 내지 1.1:2 (0.55)이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 나노입자 또는 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.3:2 (0.65)이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.0:2.0 이상이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은 1.9:2.0 이하이다. 일부 구체예들에서, 생리학적 pH에서 리포솜의 양전하 대 음전하의 총 전하 비율은

1.9:2.0 이상 및 1.9:2.0 이하이다.

[0158] 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTMA 및 DOPE를 10:0 내지 1:9, 바람직하게는 8:2 내지 3:7, 더욱 바람직하게는 7:3 내지 5:5의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTMA의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.8:2 내지 0.8:2, 더욱 바람직하게는 1.6:2 내지 1:2, 더욱 더 바람직하게는 1.4:2 내지 1.1:2 그리고 더욱 더 바람직하게는 약 1.2:2이다. 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTMA 및 콜레스테롤을 10:0 내지 1:9, 바람직하게는 8:2 내지 3:7, 더욱 바람직하게는 7:3 내지 5:5의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTMA의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.8:2 내지 0.8:2, 더욱 바람직하게는 1.6:2 내지 1:2, 더욱 더 바람직하게는 1.4:2 내지 1.1:2 그리고 더욱 더 바람직하게는 약 1.2:2이다. 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTAP 및 DOPE를 10:0 내지 1:9, 바람직하게는 8:2 내지 3:7, 더욱 바람직하게는 7:3 내지 5:5의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTMA의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.8:2 내지 0.8:2, 더욱 바람직하게는 1.6:2 내지 1:2, 더욱 더 바람직하게는 1.4:2 내지 1.1:2 그리고 더욱 더 바람직하게는 약 1.2:2이다. 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTMA 및 DOPE를 2:1 내지 1:2, 바람직하게는 2:1 내지 1:1의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTMA의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.4:1 이하이다. 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTMA 및 콜레스테롤을 2:1 내지 1:2, 바람직하게는 2:1 내지 1:1의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTMA의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.4:1 이하이다. 한 구체예에서, 나노입자들은 DOTAP 및 DOPE를 2:1 내지 1:2, 바람직하게는 2:1 내지 1:1의 몰비로 포함하는 리포플렉스이고, 이때 DOTAP의 양전하 대 RNA의 음전하의 전하 비율은 1.4:1 이하이다.

[0159] 한 구체예에서, 나노입자 또는 리포솜의 제타 전위는 -5 이하, -10 이하, -15 이하, -20 이하, 또는 -25 이하이다. 다양한 구체예들에서, 나노입자 또는 리포솜의 제타 전위는 -35 이상, -30 이상 또는 -25 이상이다. 한 구체예에서, 나노입자 또는 리포솜은 0 mV 내지 -50 mV, 바람직하게는 0 mV 내지 -40 mV 또는 -10 mV 내지 -30 mV의 제타 전위를 가진다.

[0160] 일부 구체예들에서, 나노입자 또는 리포솜의 다분산 지수는 동적 광산란으로 측정시 0.5 이하, 0.4 이하, 또는 0.3 이하이다.

[0161] 일부 구체예들에서, 나노입자 또는 리포솜 은 동적 광산란으로 측정시 약 50 nm 내지 약 1000 nm, 약 100 nm 내지 약 800 nm, 약 200 nm 내지 약 600 nm, 약 250 nm 내지 약 700 nm, 또는 약 250 nm 내지 약 550 nm 범위의 평균 직경을 갖는다.

[0162] 일부 구체예들에서, PCV는, 예를 들어, 리포좀 제형으로 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 용량으로 정맥내 투여된다. 일부 구체예들에서, 투약 당 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 RNA가 전달된다 (즉, 용량 중량은 투여되는 제형 또는 리포플렉스의 총 중량이 아닌 투여된 RNA의 중량을 반영한다). 하나 이상의 PCV가 대상에게 투여될 수 있으며, 예를 들어, 대상체에게 네오에피토프들의 조합을 가지는 하나의 PCV가 투여되고 또한 네오에피토프들의 상이한 조합을 가지는 별도의 PCV가 투여된다. 일부 구체예들에서, 10개의 네오에피토프가 있는 제1 PCV는 10개의 대체 에피토프가 있는 제2 PCV와 조합되어 투여된다.

[0163] 일부 구체예들에서, PCV는 비장으로 전달되도록 투여된다. 예를 들어, PCT는 하나 이상의 항원(들)(예를 들어, 환자-특이적 신생-항원)이 항원 제시 세포(예를 들어, 비장에서)에 전달되도록 투여될 수 있다.

[0164] 본 발명의 임의의 PCV 또는 RNA 백신은 본원에 기재된 방법에서 용도를 찾을 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본 발명의 PD-1 축 결합 길항제는 맞춤형 암 백신 (PCV), 예를 들어, 상기 기재된 RNA 백신과 조합하여 투여된다.

[0165] 본 발명의 임의의 RNA 백신을 인코딩하는 DNA 분자가 본원에 추가로 제공된다. 예를 들어, 일부 구체예들에서, 본 발명의 DNA 분자는 (5'→3' 방향으로) 다음과 같은 일반 구조를 포함한다: (1) 5' 비번역 영역 (UTR)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (2) 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (3) 주조직 적합성 복합체 (MHC) 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일 부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; (4) 다음을 포함하는 3' UTR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열: (a) 스플릿의 아미노-말단 인핸서 (AES) mRNA 또는 이의 단편의 3' 비번역 영역; 및 (b) 미토콘드리아 인코딩된 12S RNA 또는 이의 단편의 비-코딩 RNA; 및 (5) 폴리(A) 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구체예들에서, 본 발명의 DNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 포함한다: 폴리뉴클레오티드 서열 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (서열 번호: 40); 및 폴리뉴클레오티드 서열

ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGC
GGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGC
TGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGA
CACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAAC
TAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (서열 번호: 41).

[0166] 일부 구체예들에서, DNA 분자는 5'→3' 방향으로 다음을 추가로 포함한다: 아미노산 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열; 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열. 일부 구체예들에서, 아미노산 링커 및 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 링커-네오에피토프 모듈을 형성한다 (*예를 들어*, 동일한 오픈-리딩 프레임에 5'→3' 방향의 연속 서열). 일부 구체예들에서, 제1 링커-네오에피토프 모듈을 형성하는 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'→3' 방향으로 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 또는 서열 번호: 40과 서열 번호: 41의 서열들 사이에 존재한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 28, 29, 또는 30개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, 각 링커-에피토프 모듈은 다른 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 링커-에피토프 모듈을 포함하고, DNA 분자는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 20개의 상이한 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, DNA 분자는 5, 10, 또는 20개 링커-에피토프 모듈들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 링커-에피토프 모듈들 각각은 상이한 네오에피토프를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, 링커-에피토프 모듈들은 동일한 오픈-리딩 프레임에서 5'→3' 방향으로 연속 서열을 형성한다. 일부 구체예들에서, 제1 링커-에피토프 모듈의 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 신호 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 3' 이다. 일부 구체예들에서, 최종 링커-에피토프 모듈의 네오에피토프를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 MHC 분자의 막경유 및 세포질 도메인의 적어도 일부분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 이다.

[0167] 또한 본 발명의 DNA 분자를 전사 (예를 들어, 선형, 이중-가닥 DNA 또는 플라스미드 DNA의 전사, 예를 들어, 시험관내 전사에 의함)하는 것을 포함하는, 본 발명의 임의의 RNA 백신을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예들에서, 이 방법은 DNA 분자로부터 전사된 RNA 분자를 단리 및/또는 정제하는 것을 추가로 포함한다.

[0168] 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 또는 DNA 분자는 5' RNA 폴리머라제 프로모터의 제어하에 RNA가 전사될 수 있게 하고 폴리아데닐 카세트 (폴리(A) 서열)를 함유하는 유형 IIS 제한 절단 부위를 포함하며, 이때 인식 서열은 폴리(A) 서열의 3'에 위치하고, 반면 절단 부위는 상류에 위치하여 폴리(A) 서열 내에 위치한다. 유형 IIS 제한 절단 부위에서의 제한 절단은 미국 특허 제 9,476,055 및 10,106,800에 기재된 바와 같이 폴리(A) 서열 내부에서 플라스미드가 선형화될 수 있게 한다. 이후 선형화된 플라스미드는 시험관내 전사를 위한 템플릿으로 사용될 수 있으며, 생성된 전사체는 마스킹되지 않은 폴리(A) 서열로 끝난다. 미국 특허 제 9,476,055 및 10,106,800에 기재된 유형 IIS 제한 절단 부위들이 사용될 수 있다.

[0169] ***IV. PD-1 축 결합 길항제***

[0170] 일부 구체예들에서, 본 발명의 PCV (예를 들어, RNA 백신)는 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 투여된다.

[0171] 예를 들면, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제, PDL1 결합 길항제 및 PDL2 결합 길항제를 포함한다. "PD-1"의 다른 명칭에는 CD279 및 SLEB2가 포함된다. "PDL1"의 다른 명칭에는 B7-H1, B7-4, CD274, 및 B7-H가 포함된다. "PDL2"의 다른 명칭에는 B7-DC, Btdc, 및 CD273이 포함된다. 일부 구체예들에서, PD-1, PDL1, 및 PDL2는 인간 PD-1, PDL1 및 PDL2이다.

[0172] 일부 구체예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 그 리간드 결합 짝(들)에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PD-1 리간드 결합 짝은 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구체예들에 있어서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 그 결합 짝(들)에 대한 결합을 억제하는 분자다. 특정 양상에서, PDL1 리간드 결합 짝(들)은 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구체예들에 있어서, PDL2 결합 길항제는 PDL2의 그 결합 짝(들)에 대한 결합을 억제하는 분자다. 특정 양상에서, PDL2 결합 짝은 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질 또는 올리고펩티드 일 수 있다.

[0173] 일부 구체예들에 있어서, 상기 PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체 (예컨대, 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메

라 항체)이다.

[0174] 일부 구체예들에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙이다 (CAS 등록 번호: 946414-94-4). MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO®로도 공지되어 있는 니볼루맙 (Bristol-Myers Squibb/Ono)은 WO2006/121168에 기재되어 있는 항-PD-1 항체이다. 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0175] (a) 중쇄는 다음 아미노산 서열을 포함하고:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (서열 번호: 11), 및

[0176] (b) 경쇄는 다음 아미노산 서열을 포함한다:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (서열 번호: 12).

[0177] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 서열 번호: 11 및 서열 번호: 12의 6개 HVR 서열 (예를 들어, 서열 번호: 11의 3개 중쇄 HVR 및 서열 번호: 12의 3개 경쇄 HVR)을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 서열 번호: 11의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호: 12의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0178] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 펨브롤리주맙 (CAS 등록 번호: 1374853-91-4)이다. MK-3475, Merck 3475, 람브롤리주맙, KEYTRUDA®, 및 SCH-900475로도 공지되어 있는 펨브롤리주맙 (Merck)은, WO2009/114335에 기재되어 있는 항-PD-1 항체이다. 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0179] (a) 중쇄는 다음 아미노산 서열을 포함하고:

[0180] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGG
INPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (서열 번호: 13), 및

[0181] (b) 경쇄는 다음 아미노산 서열을 포함한다:

[0182] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(서열 번호: 14).

[0183] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 서열 번호: 13 및 서열 번호: 14의 6개 HVR 서열 (예를 들어, 서열 번호: 13의 3개 중쇄 HVR 및 서열 번호: 14의 3개 경쇄 HVR)을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 서열 번호: 13의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호: 14의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0184] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 MEDI-0680 (AMP-514; AstraZeneca)이다. MEDI-0680은 인간화된 IgG4 항-PD-1 항체이다.

[0185] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 PDR001 (CAS 등록 번호 1859072-53-9; Novartis)이다. PDR001은 PDL1 및 PDL2와 PD-1의 결합을 차단하는 인간화 IgG4 항-PD1 항체이다.

[0186] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 REGN2810 (Regeneron)이다. REGN2810은 LIBTAYO® 및 세미플리맙-rwlc로도 알려진 인간 항-PD1 항체이다.

[0187] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 BGB-108 (BeiGene)이다. 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 BGB-A317 (BeiGene)이다.

[0188] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 JS-001 (Shanghai Junshi)이다. JS-001은 인간화 항-PD1 항체이다.

[0189] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 STI-A1110 (Sorrento)이다. STI-A1110은 인간 항-PD1 항체이다.

[0190] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 INCSHR-1210 (Incyte)이다. INCSHR-1210은 인간 IgG4 항-PD1 항체이다.

[0191] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 PF-06801591 (Pfizer)이다.

[0192] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 TSR-042 (ANB011로도 공지됨; Tesaro/AnaptysBio)이다.

[0193] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 AMO001 (ARMO Biosciences)이다.

[0194] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 ENUM 244C8 (Enumeral Biomedical Holdings)이다. ENUM 244C8은 PDL1과 PD-1의 결합을 차단하지 않고 PD-1 기능을 억제하는 항-PD1 항체이다.

[0195] 일부 구체예에서, 항-PD-1 항체는 ENUM 388D4 (Enumeral Biomedical Holdings)이다. ENUM 388D4는 PDL1과 PD-1의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항-PD1 항체이다.

[0196] 일부 구체예에서, PD-1 항체는 6개의 HVR 서열 (예를 들어, 3 개의 중쇄 HVR 및 3 개의 경쇄 HVR) 및/또는 WO2015/112800 (출원인 Regeneron), WO2015/112805 (출원인 Regeneron), WO2015/112900 (출원인 Novartis), US20150210769 (Novartis에게 양도), WO2016/089873 (출원인 Celgene), WO2015/035606 (출원인 Beigene), WO2015/085847 (출원인 Shanghai Hengrui Pharmaceutical/Jiangsu Hengrui Medicine), WO2014/206107 (출원인 Shanghai Junshi Biosciences/Junmeng Biosciences), WO2012/145493 (출원인 Amplimmune), US9205148 (Assigned to MedImmune), WO2015/119930 (출원인 Pfizer/Merck), WO2015/119923 (출원인 Pfizer/Merck), WO2016/032927 (출원인 Pfizer/Merck), WO2014/179664 (출원인 AnaptysBio), WO2016/106160 (출원인 Enumeral), WO2014/194302 (출원인: Sorrento)에 기재된 PD-1 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0197] 일부 구체예들에서, PD-1 결합 길항제는 (예컨대, 불변 영역 (예컨대, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부위를 포함하는 면역접합체)이다. 일부 구체예에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. B7-DCIg로도 알려진 AMP-224 (CAS 등록 번호 1422184-00-6; GlaxoSmithKline/MedImmune)는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0198] 일부 구체예에서, PD-1 결합 길항제는 펩티드 또는 소분자 화합물이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 PD-1 결합 길항제는 AUNP-12 (PierreFabre/Aurigene)이다. 예를 들어, WO2012/168944, WO2015/036927, WO2015/044900, WO2015/033303, WO2013/144704, WO2013/132317 및 WO2011/161699를 참조하라.

[0199] 일부 구체예에서, PDL1 결합 길항제는 PD-1을 억제하는 소분자이다. 일부 구체예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1을 억제하는 소분자이다. 일부 구체예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1 및 VISTA를 억제하는 소분자이다. 일부 구체예에서, PDL1 결합 길항제는 CA-170 (AUPM-170으로도 공지됨)이다. 일부 구체예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1 및 TIM3를 억제하는 소분자이다. 일부 구체예에서, 소분자는 WO2015/033301 및 WO2015/033299에 기재된 화합물이다.

[0200] 일부 구체예에서, PD-1 축 결합 길항제는 항-PDL1 항체이다. 다양한 항-PDL1 항체가 본원에서 고려되며 기재되어 있다. 본원의 임의의 구체예들에서, 상기 분리된 항-PDL1 항체는 인간 PDL1, 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 Q9NZQ7.1에 제시된 인간 PDL1, 또는 이의 변이체에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 PDL1과 PD-1 사이 및/또는 PDL1과 B7-1 사이의 결합을 억제 할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는 단클론 항체이다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 $F(ab')_2$ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 인간화 항체이다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 인간 항체이다. 본 발명의 방법에 유용한 항-PDL1 항체의 예 및 그의 제조 방법은 PCT 특허 출원 WO 2010/077634 A1 및 미국 특허 제 8,217,149에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0201] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 이 때:

[0202] (a) 중쇄 가변 영역은 각각 GFTFSDSWIH (서열 번호: 1), AWISPYGGSTYYADSVKG (서열 번호: 2) 및 RHWPGGFDY (서열 번호: 3)의 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고, 및

[0203] (b) 경쇄 가변 영역은 각각 RASQDVSTAVA (서열 번호: 4), SASFLYS (서열 번호: 5) 및 QQYLYHPAT (서열 번호: 6)의 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0204] 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는 MPDL3280A이며, 아테졸리주맙 및 TECENTRIQ® (CAS 등록 번호: 1422185-06-5)로도 알려져 있으며, 2015년 1월 16일 간행된 WHO 약물 정보 (International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances), Proposed INN: List 112, Vol. 28, No. 4 (485 페이지 참조)에 설명되어 있다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0205] (a) 중쇄 가변 영역 서열은 다음 아미노산 서열을 포함하고: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (서열 번호: 7), 및

[0206] (b) 경쇄 가변 영역 서열은 다음 아미노산 서열을 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (서열 번호: 8).

[0207] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0208] (a) 중쇄는 다음 아미노산 서열을 포함하고: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 번호: 9), 및

[0209] (b) 경쇄는 다음 아미노산 서열을 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 10).

[0210] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 아벨루맙 (CAS 등록 번호: 1537032-82-8)이다. MSB0010718C로도 알려진 아벨루맙은 인간 단클론 IgG1 항-PDL1 항체이다 (Merck KGaA, Pfizer). 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0211] (a) 중쇄는 다음 아미노산 서열을 포함하고: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 번호: 15), 및

[0212] (b) 경쇄는 다음 아미노산 서열을 포함한다: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열 번호: 16).

[0213] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 서열 번호: 15 및 서열 번호: 16의 6개 HVR 서열 (예를 들어, 서열 번호: 15의 3개 중쇄 HVR 및 서열 번호: 16의 3개 경쇄 HVR)을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 서열 번호: 15의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호: 16의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0214] 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는 더발루맙 (CAS 등록 번호: 1428935-60-7)이다. MEDI4736으로도 알려진 더발루맙은 WO2011/066389 및 US2013/034559에 기재된 Fc 최적화된 인간 단클론 IgG1 카파 항-PDL1 항체 (MedImmune, AstraZeneca)이다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하며, 이 때:

[0215] (a) 중쇄는 다음 아미노산 서열을 포함하고: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 번호: 17), 및

[0216] (b) 경쇄는 다음 아미노산 서열을 포함한다: EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (서열 번호: 18).

[0217] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 서열 번호: 17 및 서열 번호: 18의 6개 HVR 서열 (예를 들어, 서열 번호: 17의 3개 중쇄 HVR 및 서열 번호: 18의 3개 경쇄 HVR)을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 서열 번호: 17의 중쇄 가변 도메인 및 서열 번호: 18의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0218] 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는 MDX-1105 (Bristol Myers Squibb)이다. BMS-936559로도 알려진 MDX-1105는 WO2007/005874에 기재된 항-PDL1 항체이다.

[0219] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 LY3300054 (Eli Lilly)이다.

[0220] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 STI-A1014 (Sorrento)이다. STI-A1014는 인간 항-PDL1 항체이다.

[0221] 일부 구체예에서, 항-PDL1 항체는 KN035 (Suzhou Alphamab)이다. KN035는 낙타 파지 디스플레이 라이브러리에서 생성된 단일-도메인 항체 (dAB)이다.

[0222] 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는, (예를 들어, 종양 미세 환경에서 프로테아제에 의해) 절단 될 때 항체 항원 결합 도메인을 활성화하여, 이를 예컨대, 비-결합 입체 모이어티를 제거함으로써, 그 항원에 결합할 수 있게 하는 절단가능한 모이어티 또는 링커를 포함한다. 일부 구체예들에서, 항-PDL1 항체는 CX-072 (CytomX Therapeutics)이다.

[0223] 일부 구체예에서, PDL1 항체는 6 개의 HVR 서열 (예를 들어, 3 개의 중쇄 HVR 및 3 개의 경쇄 HVR) 및/또는 US20160108123 (Novartis), WO2016/000619 (출원인 Beigene), WO2012/145493 (출원인 Amplimmune), US9205148 (MedImmune에 양도), WO2013/181634 (출원인 Sorrento) 및 WO2016/061142 (출원인 Novartis)에 기재된 PDL1 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0224] 또 다른 특정 양상에서, 항체는 인간 또는 쥐과 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양상에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 군에서 선택된다. 또 다른 특정 양상에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 양상에서, 쥐과 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 구성된 군에서 선택된다. 또 다른 추가 양상에서, 쥐과 불변 영역은 IgG2A이다.

[0225] 한 또 다른 특정 양상에서, 항체는 감소된 또는 최소 효과기 기능을 가진다. 한 또 다른 특정 양상에서, 최소 효과기 기능은 "효과기-없는 Fc 돌연변이"또는 비당화 돌연변이로부터 발생한다. 또 다른 추가 구체예에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다. 일부 구체예에서, 단리된 항-PDL1 항체는 비당화된다. 항체의 당화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 의미한다. 트라이펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착하기위한 인식 서열이다. 그러므로, 폴리펩티드에 이러한 트라이펩티드 서열들 중 어느 하나의 존재는 가능한 당화 부위를 생성한다. O-연결된 당화는 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌으로의 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로스의 부착을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 또한 사용될 수 있다. 항체를 형성하는 당화부위의 제거는 위에서 설명한 트라이펩티드 (N-연결 당화 부위의 경우) 중 하나가 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 용이하게 달성된다. 변경은 당화 부위 내의 아스파라긴, 세린 또는 트레오닌 잔기의 또 다른 아미노산 잔기의 치환 (예를 들어, 글리신, 알라닌 또는 보존적 치환)에 의해 이루어질 수 있다.

[0226] 또 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 약학적으로-허용되는 담체와 조합된, 상기 기재된 항-PDL1 항체 중 임의의 것을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0227] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-PDL1, 항-PD-1, 또는 항-PDL2 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 개체에게 투여되는 항-PDL1, 항-PD-1, 또는 항-PDL2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물이다. 본원에 기재된 또는 당업계에 공지된 임의의 약학적으로 허용되는 담체가 사용될 수 있다.

[0228] ***V. 항체 제조***

[0229] 본원에 기재된 항체는 당업계에서 이용가능한 항체를 생성하는 기술을 사용하여 제조되며, 이의 예시적인 방법은 다음 섹션에서 더 상세히 기재된다.

[0230] 항체는 관심 항원 (예를 들어, 인간 PD-1 또는 PD-L1과 같은 PD-1 또는 PD-L1)에 대하여 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고 장애를 앓는 포유동물에 대한 항체의 투여는 그 포유동물에서 치료적 이점을 유발할 수 있다.

[0231] 특정 구체예들에서, 본원에 제공된 항체는 ≤ 1μM, ≤ 150 nM, ≤ 100 nM, ≤ 50 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM (*예컨대*, 10^{-8} M 이하, *예컨대*, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, *예컨대*, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 가진다.

[0232] 특정 구체예들에 있어서, Kd는 하기 분석에 기재된 바와 같이, 관심 항체의 Fab 형태 및 이의 항원으로 수행된, 방사능표지된 항원 결합 분석(RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fabs의 용액 결합 친화력은 비표지 항원의 일련의 역가 존재하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시키고, 그 다음 항-Fab 항체-피복된 플레이트로 결합된 항원을 포집시킴으로써 측정된다 (예로써, Chen 외, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999) 참고). 분석 조건을 설정하기 위해, MICROTITER® 멀티웰 플레이트(Thermo Scientific)를 50 mM 탄산나트륨(pH 9.6) 중에서의 μg/ml의 포획 항-Fab 항체(Cappel Labs)로 밤새 코팅하고, 후속하여 실온 (약 23℃에서 2시간 내지 5시간 동안 PBS 중의 2%(w/v) 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 비-흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원은 해당 Fab의 연속 희석액과 혼합된다. 관심 Fab는 그 다음 하룻밤 동안 배양되고; 그러나, 평형에 확실하게 이를 수 있도록 더 오랜 기간(예로써, 약 65 시간) 동안 배양이 지속될 수 있다. 이후, 상기 혼합물을 실온 배양 (예로써, 1 시간 동안)을 위하여 포획 플레이트로 옮긴다. 이후, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20®)으로 8회 세척한다. 상기 플레이트가 건조되어 있을 경우, 150 μl/웰의 발광제 (MICROSCINT-20™; Packard)를 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 TOPCOUNT™ 감마 카운터 (Packard)에서 계수하였다. 경쟁적 결합 분석에 사용하기 위하여 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab 농도가 선택된다.

[0233] 또 다른 구체예에 따르면, Kd는 25° C에서 ~10 반응 유닛 (RU)에서 고정된 항원 CM5 칩과 함께, BIACORE®-2000 또는 BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)를 이용한 표면 플라스몬 공명 분석을 이용하여 측정된다. 간략하게 설명하자면, 카르복시메틸화된 덱스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIACORE, Inc.)은 공급업자에 따라 N-에틸-N'-(3-다메틸아미노프로필)-카르보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원은 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.8을 이용하여 5 μg/ml (~0.2 μM)으로 희석시킨 후, 5 μl/분의 유속으로 주사하여 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 얻는다. 항원 주사 후, 1 M 에탄올아민을 주사하여 비-반응 그룹을 차단한다. 동역학 측정을 위하여, Fab의 2-배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)은 25° C에서, 약 25 μl/분의 유속으로 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20™) 계면활성제가 있는 PBS (PBST)에서 주사된다. 결합과 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써, 단순 일대일 Langmuir 결합 모델 (BIACORE® Evaluation Software 버전 3.2)을 이용하여 결합 속도 (k_{on})와 해리 속도 (k_{off})가 산출된다. 평형 해리 상수 (K_D)는 비율 k_{off}/k_{on}로 산출된다. 예를 들면, Chen 외, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999) 참조. 결합 속도가 상기 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 106M-1 s-1을 초과하는 경우, 분광기, 예컨대 정지-유동이 구비된 분광광도계(Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계(ThermoSpectronic)에서 측정시 증가하는 항원 농도의 존재하에서 PBS(pH 7.2) 중의 20nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 퀀칭 기법을 이용함으로써 결합 속도를 결정할 수 있다.

[0234] ***키메라, 인간화 및 인간 항체***

[0235] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 키메라 항체다. 특정 키메라 항체는 예로써, 미국 특허 제4,816,567; 그리고 Morrison 외 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))에서 설명된다. 일 예에서, 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비인간 영장류, 예컨대, 원숭이

로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 한 추가 예에서, 키메라 항체는 분류 또는 하위분류가 모 항체의 분류로부터 변화되어 있는 "분류 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편들을 함유한다.

[0236] 특정 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 인간화된 항체다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역원성이 감소되지만, 부모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도는 유지된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 하나 또는 그 이상의 가변적 도메인을 포함하는데, HVR들, 예로써, CDRs, (또는 이의 부분들)는 비-인간 항체로부터 유도되고, FRs (또는 이의 부분들)은 인간 항체 서열로부터 유도된다. 인간화된 항체는 선택적으로 인간 불변 영역의 최소한 일부분을 또한 포함할 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 인간화된 항체에서 일부 FR 잔기는 비-인간 항체 (예로써, HVR 잔기가 유도된 항체)의 대응 잔기로 대체되어, 예로써, 항체 특이성 또는 친화도가 복원 또는 개선된다.

[0237] 인간화된 항체 및 이를 만드는 방법들은 예로써, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)에서 볼 수 있고, 그리고 예로써, Riechmann 외, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen 외, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 미국 특허 제 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; Kashmiri 외, *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR) 접목을 설명); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("재표면화(resurfacing)"을 설명); Dall'Acqua 외, *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 셔플링(shuffling)"을 설명); 그리고 Osbourn 외, *Methods*36:61-68 (2005) 및 Klimka 외, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 셔플링에 대한 "유도된 선별" 방법 설명)에서 추가 설명된다.

[0238] 인간화에 이용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: "최적 적합 (best-fit)" 방법을 이용하여 선별된 프레임워크 영역 (예로써, Sims 외, *J. Immunol.* 151:2296 (1993) 참고); 경쇄 또는 중쇄 가변적 영역의 특정 하위 집단의 인간항체의 공통 서열로부터 유도된 프레임워크영역 (예로써, Carter 외, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 그리고 Presta 외, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993) 참고); 인간 성숙 (체세포 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (예로써, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 참고); 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 프레임워크 영역(예로써, Baca 외, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok 외, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996) 참고).

[0239] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 인간 항체다. 인간 항체는 해당 분야에 공지된 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 인간 항체는 전반적으로 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)에서 설명된다.

[0240] 항원 공격접종(challenge)에 반응하여, 무손상 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 가진 무손상 항체를 만들기 위하여 변형된 유전자삽입 동물에 면역원을 주사함으로써, 인간 항체를 만들 수 있다. 이러한 동물은 통상적으로, 내인성 면역글로불린 유전자 좌위를 대체하거나, 염색체외 존재하거나 무작위로 동물의 염색체에 통합된, 인간 면역글로불린 유전자 좌위의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 유전자삽입 마우스에서 상기 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 비활성화 되어 있다. 유전자삽입 동물로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)을 참조하라. 또한, 예로써, 미국 특허 제 6,075,181 및 6,150,584에서는 XENOMOUSE™ 기술을 설명하고; 미국 특허 제 5,770,429에서는 HuMab® 기술을 설명하고; 미국 특허 제 7,041,870에서는 K-M MOUSE®기술을 설명하고, 그리고 U.S. 공개특허출원 US 2007/0061900에서는 Velocimouse® 기술을 설명한다). 이러한 동물에 의해 생성되는 무손상 항체의 인간 가변 영역은 예로써, 상이한 인간 불변 영역과 조합됨으로써 추가 변형될 수 있다.

[0241] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법들에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단클론 항체를 만들기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 설명된 바 있다. (예컨대, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur 외, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner 외, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)참조) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체가 Li 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에서 설명된다. 추가 방법들은 예를 들면, 미국 특허 제 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터 단클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (Trioma technology)은 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)에서 또한 설명된다.

[0242] 인간 항체는 또한 인간-유도된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리시킴으로써 생성될 수 있다. 이러한 가변 도메인 서열은 그 다음 원하는 인간 불변 도메인에 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 하기에서 설명된다.

[0243] ***항체 단편***

[0244] 항체 단편은 효소 소화와 같은 전통적인 수단에 의해, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서 전장 항체보다는 항체 단편이 이점이 있다. 보다 작은 크기의 단편은 신속한 제거를 가능하게 하여, 고형 종양에 대한 접근을 개선할 수 있다. 특정 항체 단편들에 대한 검토는 Hudson 외, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)을 참고한다.

[0245] 항체 단편을 생성하기 위한 다양한 기술들이 개발되었다. 전형적으로, 이들 단편은 무손상 항체들의 단백질분해 소화를 통해 유도되었다 (*예컨대*, Morimoto *외*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 및 Brennan *외*, *Science* 229:81 (1985) 참고). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. Fab, Fv, 및 ScFv 항체 단편은 모두 대장균에서 발현되고 분비될 수 있으며, 이로써 이들 단편들을 많은 양으로 용이하게 생산할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 *대장균*으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (Carter *외*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근법에 따르면, $F(ab')_2$단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 구난 (salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 제 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편을 생성하기 위한 다른 기술들은 숙련된 기술자들에게 자명할 것이다. 특정 구체예에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제 5,571,894; 및 5,587,458 참고. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이다; 따라서, 이들은 생체내에서 사용되는 동안 감소된 비특이적 결합에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합을 생성하도록 구성될 수 있다. 상기 Antibody *Engineering*, ed. Borrebaeck 참조. 항체 단편은 또한 예컨대, 예를 들면, 미국 특허 제 5,641,870에 기재된 "선형 항체" 일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적 일 수 있다.

[0246] ***단일-도메인 항체***

[0247] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체는 단일 도메인 항체이다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬이다. 특정 구체예들에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; *예컨대*, 미국 특허 제 6,248,516 B1 참고). 한 구체예에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 구성된다.

[0248] ***항체 변이체들***

[0249] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들면, 항체의 상기 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 성질들을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 상기 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 내부에 적절한 변형을 도입시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 상기 항체의 아미노산 서열로부터의 잔기 결실, 및/또는 이들 아미노산 서열 내부로의 잔기 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 만일 최종 구조체가 바람직한 특징을 보유한다면, 최종 구조체에 도달하기 위한 임의의 결실, 삽입, 및 치환의 조합이 이루어질 수 있다. 아미노산 변경은 서열이 만들어질 때 대상 항체 아미노산 서열에 도입 될 수 있다.

[0250] ***치환, 삽입, 및 결실 변이체***

[0251] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들을 갖는 항체 변이체들이 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위에는 HVR들 및 FRs가 포함된다. 보존적 치환이 ***표 3***에 제시되어 있다. 더 많은 실질적인 변화가 표 1의 "예시적 치환"이라는 제목하에 제시되며, 이는 아미노산 측쇄 분류를 참조하여 이하에서 추가로 설명된다. 아미노산 치환들은 바람직한 활성, 예를 들면, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대하여 스크리닝된 관심 항체 및 생성물 안으로 도입될 수 있다.

[0252] *표 3. 보존적 치환*

최초 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0253]

[0254] 아미노산은 다음과 같이 공통적인 측쇄 성질들에 따라 그룹화될 수 있다:

[0255] a.소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0256] b.중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0257] c.산성: Asp, Glu;

[0258] d.염기성: His, Lys, Arg;

[0259] e.사슬 배향에

[0260] 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0261] f.방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0262] 비-보존적 치환은 이들 분류 중 하나의 구성원을 또 다른 분류로 교환하는 것을 포함한다.

[0263] 치환적 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체의 하나 또는 그 이상의 초가변 영역 잔기의 치환 (*예컨대*, 인간화된 또는 인간 항체)과 관련된다. 일반적으로, 추가 연구를 위하여 선별된 생성된 변이체(들)은 부모 항체와 비교하였을 때, 특정 생물학적 성질들의 변형(*예컨대*, 개선), (*예컨대*, 증가된 친화력, 감소된 면역원성)을 가지거나 및/또는 부모 항체의 특정 생물학적 성질들을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이 기반 친화성 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성 될 수 있는 친화성 성숙 항체이다. 간략하게 설명하자면, 하나 또는 그 이상의 HVR 잔기는 돌연변이되며, 변이체 항체는 파지 상에

서 디스플레이되며, 그리고 특정 생물학적 활성 (예컨대, 결합 친화도)에 대하여 스크리닝된다.

[0264] 변경 (예컨대, 치환들)은 예컨대, 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR들에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR에서 "핫스팟(hotspot)", 즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기에서 만들어질 수 있고 (즉, Chowdhury *Methods* Mol. Biol. 207:179-196 (2008)], 및/또는 SDRs (a-CDRs)), 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대하여 테스트된다. 제 2 라이브러리를 구축하고, 재선별함에 의한 친화도 성숙은 *예컨대*, Hoogenboom 외. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 외, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))에서 설명되어 있다. 친화도 성숙의 일부 구체예들에 있어서, 다양성은 다양한 방법들 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자들에 도입된다(*예컨대*, 오류-발생(error-prone) PCR, 사슬 셔플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이생성). 이어서 제 2 라이브러리가 생성된다. 이어서, 이 라이브러리를 스크리닝하여, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 동정한다. 다양성을 도입하는 또다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 포함하는데, 이때 몇개 HVR 잔기 (가령, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위배정된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 예컨대, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 동정될 수 있다. CDR-H3 및 CDR-L3이 특히 종종 표적이 된다.

[0265] 특정 예들에 있어서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경으로 이 항체가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVR들에 발생될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화력을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예컨대, 본 명세서에서 제공된 보존적 치환)이 HVR들에 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDRs 밖에 있을 수 있다. 상기에서 제시된 변이체 VH 및 VL의 특정 구체예들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 함유한다.

[0266] 돌연변이유발의 표적이 될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하기 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에서 설명된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 불린다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 그룹 (*예컨대*, 하전된 잔기, 가령, arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (*예컨대*, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안으로, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 이용하여 항체와 항원 간의 접촉점을 동정한다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 치환의 후보로서 표적되거나, 또는 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 보유하는지를 판단하기 위하여 이 변이체들이 스크리닝될 수 있다.

[0267] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기에서 수백 또는 그 이상의 잔기가 함유된 폴리펩티드 범위, 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 상기 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 효소 (*예컨대*, ADEPT의 경우)에 항체의 N- 또는 C-말단의 융합 또는 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N- 또는 C-말단의 융합을 포함한다.

[0268] ***당화 변이체***

[0269] 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 제공된 항체는 이 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다. 항체의 당화 부위의 추가 또는 결실은 하나 또는 그 이상의 당화 부위가 만들어지거나 또는 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편의적으로 실행될 수 있다.

[0270] 상기 항체가 Fc 영역을 포함할 때, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유류 세포들에 의해 만들어지는 고유 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-링키지에 의해 일반적으로 부착된 분지화된, 이촉각성(biantennary) 올리고당을 전형적으로 포함한다. 예컨대, Wright 외 *TIBTECH* 15:26-32 (1997) 참조. 상기 올리고당은 다양한 탄수화물, 예로써, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 상기 이촉각성 올리고당 구조의 "줄기(stem)"에 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 특정한 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본 발명의 항체의 올리고당의 변형이 이루어질 수 있다.

[0271] 한 구체예에서, Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조가 감소된 푸코스를 가지는 또는 푸코스가 결여되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체가 제공되며, 이는 ADCC 기능을 개선 할 수 있다. 특이적으로, 야생형 CHO 세포에서 생산된 동일한 항체의 푸코스의 양에 비하여 감소된 푸소스를 가지는 항체가 본 명세서에서 고려된다. 즉, 이들은 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포와 같은 천연 당화 패턴을 생성하는 CHO 세포)에 의해 생산되는 경우보다 더 적은 양의 푸코스를 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 구체예들에서, 항체는

항체상의 N-연결된 글리칸 중 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 5% 미만이 푸코스를 포함하는 항체이다. 예를 들면, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%가 될 수 있다. 특정 구체예들에서, 항체는 항체상의 N-연결된 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는, 즉, 항체에 푸코스가 완전히 없거나 항체가 푸코스를 전혀 가지지 않거나 탈푸코실화된 항체이다. 푸코스의 양은 예를 들면, WO 2008/077546에서 설명된 MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 측정된 바와 같이, Asn 297에 부착된 모든 당구조(가령, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조)의 합과 비교하여 Asn297에서 당 쇄 내부의 평균 푸코스 양을 산출함으로써, 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 항체에서 소수의 서열 변이로 인하여 위치 297의 상류 또는 하류의 약 ±3의 아미노산, 가령, 위치 294와 300 사이에 또한 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화는 개선된 ADCC 기능을 보유할 수 있다. *가령*, US 특허 공개 번호. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 참고. "데푸코실화된(defucosylated)" 또는 "푸코스-결핍(fucose-deficient)" 항체 변이체에 관련된 간행물의 예에는 다음이 포함된다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *외 J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *외 Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). 탈푸코실화된 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화 결핍 Lec13 CHO 세포들 (Ripka 외 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 특허 출원 번호 2003/0157108 A1, Presta, L; 그리고 WO 2004/056312 A1, Adams *외*, 특히 실시예 11), 그리고 녹아웃 세포주, 이를 테면 알파-1,6-퓨코실전이효소 유전자, *FUT8,* 녹아웃 CHO 세포들 (예로써, Yamane-Ohnuki 외 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. 외, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 그리고 WO2003/085107 참고)을 포함한다.

[0272] 항체의 Fc 영역의 이촉각성 올리고당이 GlcNAc에 의해 양분되어 있는, 양분된 올리고당을 가진 항체 변이체들이 추가로 제공된다. 이러한 항체 변이체는 푸코실화 감소 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 변이체들의 예들은 예로써, WO 2003/011878 (Jean-Mairet 외); 미국 특허 제. 6,602,684 (Umana 외); US 2005/0123546 (Umana *외*), 및 Ferrara *외*, Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006)에서 설명된다. Fc 영역에 부착된 올리고당에서 최소한 한 개의 갈락토스 잔기를 가진 항체 변이체들이 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 보유할 수 있다. 이러한 항체 변이체들은 예로써, WO 1997/30087 (Patel 외); WO 1998/58964 (Raju, S.); 그리고 WO 1999/22764 (Raju, S.)에서 설명된다.

[0273] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 Fcɣ에 결합 할 수 있다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 인간 효과기 세포의 존재하에 ADCC 활성을 갖거나 인간 야생형 IgG1Fc 영역을 포함하는 다른 동일한 항체에 비해 인간 효과기 세포의 존재하에 증가 된 ADCC 활성을 갖는다.

[0274] ***Fc 영역 변이체***

[0275] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본 발명의 항체의 Fc 영역 안으로 도입되고, 이로 인하여 Fc 영역 변이체가 만들어질 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예컨대, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (*예컨대*, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)를 포함할 수 있다.

[0276] 특정 구체예들에서, 본 발명은 모든 효과기 기능이 아닌 일부를 보유하는 항체 변이체를 고려하는데, 이는 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 또한 특정 효과기 기능 (가령, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 응용분야에 있어서 바람직한 후보가 되게 한다. *시험관내* 및/또는 *생체내* 세포독성 분석을 실행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 수행하여 상기 항체가 FcgR 결합은 없으나 (그리하여 ADCC 활성이 없을 수 있음), FcRn 결합 능력은 유지함을 확인할 수 있다. ADCC를 조정하는 주요 세포, NK 세포들은 오직 Fc(RIII만을 발현시키지만, 단핵구는 Fc(RI, Fc(RII 및 Fc(RIII를 발현시킨다. 조혈 세포들에서 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 비제한적 실시예는 미국 특허 제 5,500,362 (예컨대, Hellstrom, I. 외. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) 참고) 및 Hellstrom, I 외, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. 외, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987) 참고)에 설명되어 있다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법들이 이용될 수 있다 (예를 들면, 유동 세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 분석 (CellTechnology, Inc. Mountain

View, CA); 그리고 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 분석 (Promega, Madison, WI) 참고). 이러한 분석에 유용한 효과기 세포들은 말초 혈액 단핵 세포들 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은, *예컨대*, Clynes 외. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 *생체내*에서 평가될 수 있다. 상기 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 이로 인하여 CDC 활성이 결여된다는 것을 확인하기 위하여 C1q 결합 분석이 또한 실행될 수 있다. 예로써, WO 2006/029879와 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참조. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다 (예를 들면, Gazzano-Santoro *외*. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. 외. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); 그리고 Cragg, M.S. 및 M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004) 참고). 또한 FcRn 결합과 *생체내* 제거/반감기 결정은 해당 분야에 공지된 방법들을 이용하여 또한 실시될 수 있다 (*예컨대*, Petkova, S.B. 외. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006) 참고).

[0277] 감소된 효과기 기능를 가진 항체들은 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 또는 그 이상의 치환을 가진 것들을 포함한다 (미국 특허 제 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 잔기가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상에서 치환을 가진 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 제 7,332,581 참고).

[0278] FcRs에 대한 결합이 개선된 또는 감소된 특정 항체 변이체들이 설명된다. (*가령*, 미국 특허 제 6,737,056; WO 2004/056312, 및 Shields 외, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). 참조)

[0279] 특정 구체예들에 있어서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들, 예로써, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 가진 Fc 영역을 포함한다. 예시적인 구체예에서, 항체는 그의 Fc 영역에 다음 아미노산 치환을 포함한다: S298A, E333A 및 K334A.

[0280] 일부 구체예들에 있어서, Fc 영역 안에 예로써, 미국 특허 제 6,194,551, WO 99/51642, 및 Idusogie 외 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)에서 설명된 바와 같이, 변경된 (*가령*, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 초래하는 변경이 만들어진다.

[0281] 태아로 모계 IgGs의 전달을 담당하는, 반감기가 증가되고 신생아의 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합이 개선된 항체들 (Guyer 외, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 그리고 Kim 외, *J. Immunol.* 24:249 (1994))은 US2005/0014934A1 (Hinton 외)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 또는 그 이상의 치환들을 가진 Fc 영역을 내부에 포함한다. 이러한 Fc 변이체들은 Fc 영역 잔기의 하나 또는 그 이상에서 치환을 가진 것들을 포함한다: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예로써, Fc 영역 잔기 434의 치환 (미국 특허 제 7,371,826). Fc 영역 변이체들의 다른 예들에 관련된 Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 미국 특허 제 5,648,260; 미국 특허 제 5,624,821; 그리고 WO 94/29351 참조.

[0282] ***VI. 약학 조성물 및 제제***

[0283] 또한, 예를 들어 암 치료를 위한 약학 조성물 및 제제가 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 약학 조성물 및 제제는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0284] 관심 항체의 제조 (예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이 제제화 될 수 있는 항체를 생산하기 위한 기술이 본원에 상세히 설명되고 당업계에 공지됨) 후, 이를 포함하는 약학 제제가 제조된다. 특정 구체예에서, 제제화 될 항체는 사전 동결건조되지 않았으며 본원의 관심 제제는 수성 제제이다. 특정 구체예들에서, 항체는 전장 항체이다. 일 구체예에서, 제제 내의 항체는 항체 단편, 예컨대 $F(ab')_2$이며, 이 경우 전장 항체에게 발생할 수 있는 문제점 (예컨대, Fab에 대한 항체의 클리핑)이 언급될 필요가 있을 수 있다. 제제에 존재하는 항체의 치료적 유효량은 예를 들어 원하는 투여량 및 투여 방식 (들)을 고려하여 결정된다. 약 25mg/mL 내지 약 150mg/mL, 또는 약 30mg/mL 내지 약 140mg/mL, 또는 약 35mg/mL 내지 약 130mg/mL, 또는 약 40mg/mL 내지 약 120 mg/mL, 또는 약 50 mg/mL 내지 약 130 mg/mL, 또는 약 50 mg/mL 내지 약 125 mg/mL, 또는 약 50 mg/mL 내지 약 120 mg/mL, 또는 약 50mg/mL 내지 약 110mg/mL, 또는 약 50mg/mL 내지 약 100mg/mL, 또는 약 50mg/mL 내지 약 90mg/mL, 또는 약 50mg/mL 내지 약 80mg/mL, 또는 약 54mg/mL 내지 약 66mg/mL가 제제 내 예시적인 항체 농도이다. 일부 구체예들에서, 본원에 기재된 항-PDL1 항체 (가령, 아테졸리주맙)는 약 1200mg의 용량으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 본원에 기재된 항-PD1 항체 (가령, 펨브롤리주맙)는 약 200mg의 용량으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 본원에 기재된 항-PD1 항체(예를 들어, 니볼루맙)는 약 240mg (예를 들어, 2주마다) 또는 480mg (예를 들어, 4주마다)의 용량으로 투여된다.

[0285] 일부 구체예들에서, 본원에 기재된 RNA 백신은 약 15 μg, 약 25 μg, 약 38 μg, 약 50 μg, 또는 약 100 μg의 용량으로 투여된다.

[0286] 본원에 기재된 바와 같은 약학 조성물 및 제제는 원하는 순도를 갖는 활성 성분 (예를 들어, 항체 또는 폴리펩티드)을 하나 이상의 임의의 약학적으로 허용되는 담체 (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조 할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에 비독성이며, 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 완충액, 가령, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (가령, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토니움 클로라이드; 벤잘코니움 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부탈 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 가령, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르치놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 그리고 m-크레졸); 낮은 분자량의 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 가령, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로블린; 친수성 중합체 가령, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 가령, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 그리고 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트 물질 가령, EDTA; 당, 가령, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 가령, 나트륨; 금속 복합체 (예컨대 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 가령, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본 명세서에서 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 세포간 (insterstitial) 약물 분산 물질, 가령, 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 이를 테면, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 포함한다. rHuPH20를 포함하는 특정 예시적인 sHASEGPs 및 이를 이용하는 방법은 미국 공개 특허 출원 제 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 양상에서, sHASEGP는 하나 또는 그 이상의 추가 글리코사미노글리카나제 가령, 콘드로이티나제와 조합된다.

[0287] 예시적인 동결건조된 항체 제제는 미국 특허 제 6,267,958에서 기재된다. 수용액 항체 제제는 미국 특허 제 6,171,586 및 WO2006/044908에서 기재된 것들을 포함하며, 후자 제제는 히스티딘-아세테이트 완충액을 포함한다.

[0288] 본원의 조성물 및 제제는 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 둘 이상의 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 성분을 함유 할 수 있다. 이러한 활성 성분들은 의도한 목적에 효과적인 양으로 복합물 내에 적절하게 존재한다.

[0289] 활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에서 각각 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합, 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 준비된 마이크로캡슐 또는 마크로에멀젼 (macroemulsions)안에 포집될 수 있다. 이러한 기술은 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 기재되어 있다.

[0290] 서방형 제재가 제조될 수 있다. 서방형 제재의 적합한 예들에는 상기 항체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 이러한 매트릭스는 성형된 제품 형태, *예컨대* 필름, 또는 마이크로캡슐 형태로 존재한다. *생체내* 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 무균이다. 무균은 *예컨대,* 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 구현 될 수 있다.

[0291] 아테졸리주맙 및 펨브롤리주맙의 약학 제제들은 시중에서 구입가능하다. 예를 들어, 아테졸리주맙은 (본원의 다른 부분에 기재된) 상표명 TECENTRIQ®로 공지되어 있다. 펨브롤리주맙은 (본원의 다른 부분에 기재된) 상표명 KEYTRUDA®으로 공지되어 있다. 일부 구체예들에서, 아테졸리주맙 및 RNA 백신, 또는 펨브롤리주맙 및 RNA 백신은 별도의 용기에 제공된다. 일부 구체예에서, 아테졸리주맙 및 펨브롤리주맙은 상업적으로 구입가능한 제품과 함께 이용가능한 처방 정보에 기재된 바와 같이 개체에게 투여하기 위해 사용 및/또는 제조된다.

[0292] ***VII. 치료 방법***

[0293] 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예들에서, 개체는 인간이다.

[0294] 본 발명의 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 본원에 기재된 치료 방법에서 용도를 찾을 수 있다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 10-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 종양 표본에 존재하는 암-특이적 체세포 돌연변이로부터 생성된 5-20개 네오에피토프들을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레

오티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 리포플렉스 나노입자 또는 리포솜으로 제형화된다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 RNA 백신을 IV 전달하기 위해 RNA에 대한 리포플렉스 나노입자 제형 (RNA-리포플렉스)을 사용한다. 일부 구체예들에서, PCV는, 예를 들어, 리포좀 제형으로 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 용량으로 정맥내 투여된다. 일부 구체예들에서, 투약 당 15 μg, 25 μg, 38 μg, 50 μg, 또는 100 μg의 RNA가 전달된다 (*즉*, 용량 중량은 투여되는 제형 또는 리포플렉스의 총 중량이 아닌 투여된 RNA의 중량을 반영한다). 하나 이상의 PCV가 대상에게 투여될 수 있으며, 예를 들어, 대상체에게 네오에피토프들의 조합을 가지는 하나의 PCV가 투여되고 또한 네오에피토프들의 상이한 조합을 가지는 별도의 PCV가 투여된다. 일부 구체예들에서, 10개의 네오에피토프가 있는 제1 PCV는 10개의 대체 에피토프가 있는 제2 PCV와 조합되어 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙을 포함하나 이에 제한되지 않는 항-PD-1 항체이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 아테졸리주맙을 포함하나 이에 제한되지 않는 항-PD-L1 항체이다.

[0295] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 200 mg 용량으로 투여되는 항-PD-1 항체 (*예를 들어*, 펨브롤리주맙)이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 350 mg 용량으로 투여되는 항-PD-1 항체 (*예를 들어*, 세미플리맙-rwlc)이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21 일 또는 3 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 1200 mg 용량으로 투여되는 항-PD-L1 항체 (*예를 들어*, 아테졸리주맙)이다.

[0296] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 14 일 또는 28 일의 간격으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 2 주 또는 4 주의 간격으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 14일, 2주, 28일 또는 4주의 간격으로, 예를 들어, 14일 또는 2주 간격으로 약 240 mg의 용량으로, 또는 28일 또는 4주 간격으로 약 480mg의 용량으로 개체에게 투여되는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 니볼루맙)이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 21일 또는 3주의 간격으로, *예를 들어*, 1, 2, 3, 또는 4회 투약시 약 1mg/kg의 용량으로, 선택적으로 항-CTLA-4 항체 (*예를 들어*, 이필리무맙)와 조합하여 개체에게 투여되는 항-PD-1 항체 (*예를 들어*, 니볼루맙)이며, 그리고 선택적으로 14 일, 2 주, 28 일, 또는 4 주의 간격으로, *예를 들어*, 14 일 또는 2 주 간격으로 약 240 mg 용량으로, 또는 28 일 또는 4 주 간격으로 약 480 mg 용량으로 항-PD-1 항체 (*예를 들어*, 니볼루맙)의 단독 투여가 후속된다.

[0297] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 14 일 또는 2 주의 간격으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 14 일 또는 2 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 10 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여되는 (선택적으로 60분에 걸친 정맥내 주입에 의함) 항-PD-L1 항체 (*예를 들어*, 더발루맙)이다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 14 일 또는 2 주의 간격으로, *예를 들어*, 약 10 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여되는 (선택적으로 60분에 걸친 정맥내 주입에 의함) 항-PD-L1 항체 (*예를 들어*, 아벨루맙)이다.

[0298] 일부 구체예들에서, RNA 백신은 21 일 또는 3 주의 간격으로 개체에게 투여된다.

[0299] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 1-8의 1일차에 개체에게 투여된다.

[0300] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 주기 8 이후 개체에게 추가로 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 추가 21-일 17회 주기로 개체에게 추가 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 주기 13-29의 1일차에 개체에게 투여되고, 및/또는 RNA 백신은 주기 13, 21, 및 29의 1일차에 개체에게 투여된다.

[0301] 특정 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 특정 구체예들에서, PD-L1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-L1 축 결합 길항제는 아테졸리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 약 1200 mg의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1일차에 약 25 μg, 주기 2의 8일차에 약 25 μg, 주기 2의 15일차에 약 25 μg, 및 주기 3-7 각각의 1일차에 약 25 μg의 용량으로 개체에게 투여된다 (즉, 주기 2 동안 3회에 걸쳐 총 약 75μg의 백신이 개체에게 투여

됨). 일부 구체예들에서, RNA 백신이 투여되는 첫 번째 주기 동안 총 약 75㎍의 백신이 3회에 걸쳐 개체에게 투여된다.

[0302] 특정 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-1 축 결합 길항제는 펨브롤리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 200 ㎎의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 25 ㎍의 용량으로 개체에게 투여된다. 특정 구체예들에서, PD-L1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 21-일 8회 주기로 개체에게 투여되고, PD-L1 축 결합 길항제는 아테졸리주맙이고 주기 1-8의 1일차에 1200 ㎎의 용량으로 개체에게 투여되고, 그리고 RNA 백신은 주기 2의 1, 8, 및 15일차 및 주기 3-7의 1일차에 25 ㎍의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 주기 2의 1일차에 25 ㎍, 주기 2의 8일차에 약 25 ㎍, 주기 2의 15일차에 25 ㎍, 및 주기 3-7 각각의 1일차에 25 ㎍의 용량으로 개체에게 투여된다 (즉, 주기 2 동안 3회에 걸쳐 총 75㎍의 백신이 개체에게 투여됨). 일부 구체예들에서, RNA 백신이 투여되는 첫 번째 주기 동안 총 75㎍의 백신이 3회에 걸쳐 개체에게 투여된다.

[0303] PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 임의의 순서로 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 순차적으로 (상이한 시간에) 또는 동시에 (동일한 시간에) 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 별도의 조성물에 존재한다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 동일한 조성물에 존재한다.

[0304] 일부 구체예들에서, 암은 흑색종, 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 암은 국소 진행성 또는 전이성 흑색종, 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 또는 두경부암이다. 일부 구체예들에서, 암은 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 및 두경부암으로 구성된 그룹에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 암은 국소 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암, 방광암, 결장직장암, 삼중음성 유방암, 신장암, 또는 두경부암이다.

[0305] 일부 구체예들에서, 암은 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 피부 또는 점막 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 피부, 점막, 또는 말단 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 안구 또는 말단 흑색종이 아니다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 전이성 또는 절제불가능한 국소 진행성 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 IV기 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 IIIC기 또는 IIID기 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 흑색종은 절제불가능한 또는 전이성 흑색종이다. 일부 구체예들에서, 이 방법은 흑색종의 보조 치료를 제공한다.

[0306] 일부 구체예들에서, 암 (*예를 들어*, 흑색종)은 이전에 치료되지 않은 것이다. 일부 구체예들에서, 암은 이전에 치료되지 않은 전이성 흑색종이다.

[0307] 일부 구체예들에서, 본원에 기재된 임의의 방법에 따른 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신으로 치료하기 전에, 개체는 PD-1 축 결합 길항제-기반 단독요법, 예를 들어, RNA 백신 없이 펨브롤리주맙으로 치료한 후 진행되었나 이러한 치료에 적절히 반응하지 않았다.

[0308] PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, PD-1 축 결합 길항제는 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식, 흡입, 척수강내, 심실내 또는 비강내로 투여된다. 일부 구체예들에서, RNA 백신은 정맥내, 근육내, 피하, 국부, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내, 심실내, 또는 비강내로 (예를 들어, 리포플렉스 입자 또는 리포솜으로) 투여된다. 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 정맥내 주입으로 투여된다. 질병의 예방 또는 치료를 위한 PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신의 유효량이 투여될 수 있다.

[0309] 일부 구체예에서, 상기 방법은 추가요법을 추가로 포함 할 수 있다. 추가 요법은 방사선요법, 수술 (예를 들어, 유방보존술 및 유방절제술), 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역 요법, 골수 이식, 나노 요법, 단클론 항체 요법 또는 상기의 조합일 수 있다. 추가 요법은 보조 요법 또는 신보조 (neoadjuvant) 요법의 형태 일 수 있다. 일부 구체예들에서, 추가 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항-전이물질의 투여이다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 부작용 제한제 (예를 들어, 치료 부작용의 발생 및/또는 중증도를 감소시키는 제제, 예컨대, 항오심제 등)의 투여이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 방사능 요법이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 수술이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 방사능 요법과 수술의 조합이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 감마 조사 (irradiation)이다.

[0310] ***VIII. 제조물품 또는 키트***

[0311] 또한 본원은 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 아테졸리주맙 또는 펨브롤리주맙)를 포함하는 제조물품 또는 키

트를 제공한다. 일부 구체예들에서, 이러한 제조물품 또는 키트는 개체에서 암을 치료 또는 암의 진행을 지연시키거나 암을 가진 개체의 면역 기능을 향상시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제를 RNA 백신과 함께 사용하는 것에 관한 설명서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다. 또한 본원은 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 아테졸리주맙 또는 펨브롤리주맙) 및 RNA 백신을 포함하는 제조물품 또는 키트를 제공한다.

[0312] 일부 구체예들에서, PD-1 축 결합 길항제 및 RNA 백신은 동일한 용기 또는 별도의 용기에 존재한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이얼, 백 및 주사기를 포함한다. 용기는 다양한 재료, 가령, 유리, 플라스틱 (예컨대, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리올레핀) 또는 금속 합금 (예컨대, 스테인리스 강 또는 하스텔로이)으로 형성 될 수 있다. 일부 구체예들에서, 용기는 제제를 보유하며 용기 위의 라벨 또는 용기와 관련된 라벨은 사용지침을 표시할 수 있다. 제조 물품 또는 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 비롯하여, 상업적 및 사용자 관점에서 필요한 다른 물질을 추가로 포함 할 수 있다. 일부 구체예들에서, 제조 물품은 하나 이상의 또 다른 제제 (예컨대, 화학요법제, 및 항-종양제)를 추가로 포함한다. 하나 이상의 제제에 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이얼, 백, 및 주사기를 포함한다.

[0313] 본 명세서는 해당 분야의 숙련된 기술자가 본 발명을 실시하기에 충분한 것으로 간주된다. 전술한 설명으로부터 본 명세서에 제시되고 기재된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형들이 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 명확해질 것이며 첨부된 청구범위에 속할 것이다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원의 참고자료로 포함된다.

[0314] 실시예

[0315] 본 발명은 하기 실시예를 참고하면 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이 실시예들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에 기재된 실시예 및 구체예들은 단지 설명을 위한 것일 뿐이며, 숙련된 기술자는 이들에 비추어 다양한 변형 또는 변화를 제시할 수 있을 것이며 이러한 다양한 변형 또는 변화는 본 출원의 사상 및 범위 그리고 첨부된 청구범위에 속함이 이해된다.

[0316] ***실시예 1: 이전에 치료받지 않은 진행성 흑색종 환자를 대상으로 펨브롤리주맙과 조합된 RNA 백신의 효능 및 안전성에 대한 2상, 공개, 다기관, 무작위 연구***

[0317] *이론적근거*

[0318] 상기 언급한 바와 같이, 체크포인트 억제제는 현재 전이성 흑색종 치료의 표준이다. 그러나 흑색종을 포함한 다양한 악성종양에 걸쳐 PD-L1/PD-1을 표적으로 하는 약제를 이용시 관찰된 지속적인 임상적 이점은 일부 환자에 제한된 것으로 보인다. PD-1 요법 (니볼루맙, 펨브롤리주맙) 또는 항-PD1과 항-CTLA-4 요법의 조합 (니볼루맙과 이필리무맙)과 같이 현재 널리 투여되는 면역요법의 개발에 따라 동반된 OS의 향상에도 불구하고 상당한 부분의 환자가 체크포인트 억제제 치료에 반응하지 않거나 일시적인 질병 안정화만 경험하는데 (Robert C, Long GV, Brady B, 외 *N Engl J Med* 2015a;372:320-30; Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, 외 *Lancet* 2016;387:1909-20), 이는 전이성 고형 종양 환자에 있어서 여전히 충족되지 않은 수요가 존재함을 보여주는 것이다. PD-1 억제제 치료에 반응하는 환자의 약 10%-30%에서 객관적인 반응이 지속되는 경향이 있지만, 그럼에도 불구하고 이러한 환자는 진행 위험이 남아 있다. PD-1을 차단시키고 치료받은 흑색종 환자에 대한 최근 연구에서, 펨브롤리주맙에 객관적인 반응을 보인 환자 205명 중 53명(26%)이 21개월의 중간 추적 조사에서 질병 진행을 보였다 (Ribas A, Hamid O, Daud A, 외 *JAMA* 2016;315:1600-9).

[0319] 항-PD1 그리고 항-PD1과 항-CTLA-4의 조합은 흑색종 환자의 장기적인 결과를 유의하게 개선했지만 후자는 치료 관련 독성을 증가시키는 결과를 가져왔다. 이러한 개선에도 불구하고 상당한 비율의 환자가 여전히 질병 진행의 위험에 처해 있으며 질병에 걸린다. 증가하는 독성과 함께 내성 체크포인트 차단 메커니즘을 해결하는 조합 요법이 필요하다.

[0320] T 세포 자극이 좋지 않음으로 인해 그 활성이 제한될 수 있는 효과기 T 세포의 일정 수준에서 내성이 발생할 수 있다. 전임상 모델에서, PD-L1/PD-1 경로의 동시 차단과 조합된 항원 특이적 면역성 유도는, 단일-제제 백신이 제한된 활성을 가지는 모델에서 조차도, 이러한 경로의 각각의 단일-제제 억제제보다 우수한 효능을 입증했다. 이 연구에서 종양 침윤 T 세포는 PD-L1이 차단된 경우에만 IFN-g 발현 증가 (T 세포의 활성화 및 항종양 활성의 특징)를 나타내었으나 단일-제제 백신에서는 그렇지 않았다 (Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, 외 *Cancer Res* 2013;73:3591-603; Fu J, Malm IJ, Kadayakkara DK, 외 *Cancer Res* 2014;74:4042-52). 이러한 연구를 기반으로 RO7198457과 항-PD-L1/PD-1의 조합이 항종양 면역 반응을 활성화하여 종양 세포의 사멸을 향상시키고 암 환자의 임상 반응을 개선할 수 있다는 가설이 세워졌다.

[0321] *목표*

[0322] 이 연구는 이전에 치료받지 않은 진행성 흑색종 환자를 대상으로 펨브롤리주맙 단독 요법과 비교하여 맞춤형 RNA 네오-에피토프 백신 (PCV) RO7198457과 펨브롤리주맙의 효능, 안전성, 약동학 및 환자 보고 결과 (PRO)를 평가한다. 구체적인 연구 목적 및 상응하는 평가변수를 아래 요약한다.

[0323] 이 연구의 1차 효능 목표는 다음 평가변수를 기준으로 RO7198457 + 펨브롤리주맙의 효능을 펨브롤리주맙 단독과 비교하여 평가하는 것이다.

[0324] ● 무작위배정 후 무진행 생존 (PFS), 고형 종양의 반응 평가 기준, 버전 1.1 (RECIST v1.1)에 따라 조사자가 결정한, 무작위배정시부터 질병 진행의 첫 발생 또는 임의의 원인으로 인한 사망시 (둘 중 먼저 발생하는 것)까지의 시간으로 정의됨.

[0325] ● 객관적 반응률 (ORR), RECIST v1.1에 따라 조사자가 결정한, ≥4주 간격으로 연속 2회에 걸쳐 완전 반응 (CR) 또는 부분 반응 (PR)을 보인 환자의 비율로 정의됨.

[0326] 이 연구의 2차 효능 목표는 다음 평가변수를 기준으로 RNA 네오-에피토프 백신 + 펨브롤리주맙의 효능을 펨브롤리주맙 단독과 비교하여 평가하는 것이다.

[0327] ● 무작위배정 후 전체 생존 (OS), 무작위배정시부터 임의의 원인으로 인한 사망시까지의 시간으로 정의됨.

[0328] ● 반응 기간 (DOR), RECIST v1.1에 따라 조사자가 결정한, 보고된 객관적 반응의 최초 발생시부터 질병 진행 또는 임의의 원인으로 인한 사망시까지의 시간으로 정의됨.

[0329] ● 특정 시점들에서 유럽 암연구치료기구 삶의 질-Core 30 (EORTC QLQ-C30) 중 2개-항목 종합 건강 상태 (GHS)/HRQoL 하위척도 (질문 29 및 30)를 사용하여 평가한, 건강-관련 삶의 질 (HRQoL) 점수의 기준선으로부터의 변화 평균

[0330] 이 연구의 또 다른 2차 효능 목표는 펨브롤리주맙 단독요법에서 조합 요법 (예를 들어, RNA 네오-에피토프 백신 + 펨브롤리주맙)으로의 교차 후 객관적 CR 또는 PR 반응을 보이는 참가자의 비율을 평가하는 것이다.

[0331] 또 다른 2차 목표는 펨브롤리주맙 단독요법 후 진행이 있었던 환자에서 RNA 네오-에피토프 백신과 펨브롤리주맙의 효능을 다음 평가변수를 기반으로 평가하는 것이다:

[0332] ● ORR, 교차 시점에서 RECIST v1.1에 따라 조사자가 결정한, ≥4주 간격으로 두 번의 연속 측정시 CR 또는 PR을 보인 환자의 비율로 정의됨

[0333] 본 연구의 또 다른 목적은 이상 사례 (AE) 발생률과 중증도를 평가하는 것이다.

[0334] *연구 설계*

[0335] 본 연구는 이전에 치료받지 않은 진행성 흑색종 환자에서 RO7198457(PCV) + 펨브롤리주맙 요법의 효능 및 안전성을 펨브롤리주맙 단독요법과 비교하여 평가하기 위해 설계된 2상 무작위, 공개, 다기관 연구이다. 환자 모집단에는 절제불가능한 국소 진행성 (IIIC기 및 IIID기) 및 전이성 (재발 또는 새로운 IV기) 흑색종이 있는 환자가 포함된다. 이 연구는 전세계적으로 수행될 것이다.

[0336] 본 연구는 다음 2 단계로 구성된다: 초기 안전성 준비 단계 및 무작위배정 단계 (**도 1**). 각 단계에는 두 부분의 스크리닝 기간, 치료 기간 및 치료 후 추적 기간이 있다.

[0337] 안전성 준비 단계는 대략 6-12 명의 환자들이 등록된 단일군으로 구성되며, 환자들은 200 mg 펨브롤리주맙을 1 주기 (21 일) 동안 IV 주입으로 투여받은 후, 후속 주기 동안 25 mg RO7198457 + 200 mg 펨브롤리주맙을 3주마다 (Q3W) IV 투여받는다. 무작위배정 단계에서 대상자모집(accrual)은 내부 모니터링 위원회(IMC)가 안전성 준비 단계에서 치료받은 처음 6명의 환자의 안전 데이터를 검토할 때까지 시작되지 않는다.

[0338] 무작위배정 단계는 대략 120명의 환자들이 등록되며, 2:1 비율로 실험군 또는 대조군에 다음과 같이 무작위배정되었다:

[0339] ● A군 (대조군): 200 mg 펨브롤리주맙을 IV 주입으로 Q3W 투여

[0340] ●B군 (실험군): 1 주기는 200 mg 펨브롤리주맙을 IV 주입으로 투여 후 후속 주기 동안 25 ㎍ RO7198457 + 200 mg 펨브롤리주맙을 IV Q3W 투여

[0341] 질병 진행이 확인되면 (RECIST v1.1에 따라 조사자가 평가), A군에 무작위배정된 환자는 적격 기준을 충족하는 한 교차 치료 옵션이 제공되어 RO7198457과 펨브롤리주맙의 조합 치료를 받게 된다.

[0342] 스크리닝 기간의 첫 번째 파트 (파트 A) 동안에 동의한 환자들을 예비 적격성에 대해 평가하고 (예를 들어, 미동부 종양학 협력 그룹 [ECOG] 전신 활동도, 혈액 화학, HIV에 대한 혈청학, B형 간염 바이러스[HBV] 및 C형 간염 바이러스[HCV]) 종양 조직 및 혈액 샘플을 수집하여 종양 특이적 체세포 돌연변이를 결정하고 인간 백혈구 항원 (HLA)-유형화를 수행하여 RO7198457 제작을 가능하게 한다. 현재 계획된 제작 소요 시간은 적절한 양과 품질의 혈액 샘플 및 종양 샘플을 받은 때로부터 약 4-6주이다. 스크리닝 기간의 두 번째 파트 (파트 B)는 환자 적격성을 확인하기 위한 1일차 이전 28일 기간이다.

[0343] 적격 환자에는 측정가능한 IIIC 또는 IIID기 (절제불가능) 또는 전이성 (재발 또는 새로운 IV기) 침습성 피부 또는 점막 흑색종이 조직학적으로 확인되고 그리고 진행성 질병에 대해 이전에 치료받은 적이 없는 ECOG 전신 활동도가 0 또는 1인 ≥18세의 남성 및 여성 환자가 포함된다. 안구 또는 말단 흑색종 또는 치료되지 않은 CNS 전이가 있는 환자는 적격이 아니다. 이필리무맙, BRAF 억제제 및/또는 MEK 억제제를 사용한 사전 보조 요법 (adjuvant therapy)이 허용된다. 항-PD-1/PD-L1 제제를 사용한 사전 보조 요법은 주기 1, 1일차 최소 6개월 전에 마지막 용량을 투여한 경우 허용된다. 환자는 백신 제조 및 PD-L1 테스트를 위해 종양 표본을 제공할 수 있어야 한다.

[0344] 도 2에서 보는 바와 같이, A군 (펨브롤리주맙) 환자는 주기 1에서 시작하여 Q3W IV 주입으로 펨브롤리주맙 200 mg을 투여받는다. 안전성 준비 단계 및 무작위배정 단계의 B군 (25 μg RO7198457 + 200 mg 펨브롤리주맙) 환자는 주기 1에서 시작하여 Q3W IV 주입으로 펨브롤리주맙을 투여받는다. 주기 1은 백신 제작 시간을 허용하기 위한 펨브롤리주맙 단독요법 준비기간이다. RO7198457 + 펨브롤리주맙은 주기 2에서 시작하며, RO7198457은 펨브롤리주맙 주입 완료 후 30분에 IV 주입으로 투여된다. 안전성 준비 단계 및 B군의 경우, RO7198457 투약은 주기 2의 1일차에 시작하며 그 다음 주기 2의 8 및 15일차에 투여되고; 주기 3-7의 1일차 투여도 포함되며, 그 후 유지 치료로서 주기 13에서 시작하여 8주기 마다 투여된다 (주기 13, 21, 및 29). RO7198457과의 조합 치료 시작 지연 (예를 들어, RO7198457은 주기 2의 1일차까지 투여되지 않음) 또는 RO7198457 유도 중 중단을 경험한 환자들은 주기 2의 1일차 보다 이후에 조합 치료를 시작하는 것 및/또는 차후 초기 치료 기간에서 RO7198457의 보충 투약을 받는 것이 허용되어, 의료 모니터요원의 승인을 받아 총 8회 유도 투약을 달성할 수 있다 (예를 들어, 주기 2의 1일차를 놓친 환자는 주기 2의 8일차에 RO7198457을 시작하고 비예정 방문으로서 주기 3의 8일차에 보충 투약을 받을 것이고, 주기 2의 15일차에 RO7198457을 시작하는 환자는 주기 3의 8 및 15일차 모두에 비예정 방문으로서 보충 투약을 받게 되는 등이다).

[0345] 본 연구의 치료 기간은, 방사선사진 데이터와 임상적 데이터를 통합 평가한 후 질병 진행으로 인한 허용할 수 없는 독성 또는 증상 악화가 없는 상태에서 연구자가 평가하여 환자들이 임상 이점을 경험하는 한, 모든 환자에 대해 최대 24개월이다. 환자는 진행성 질병에 대한 RECIST v1.1 기준이 충족된 후 치료를 계속하도록 허용될 수 있다. A군 환자들은 교차 적격 기준이 충족되는 경우 질병 진행 확인 후 RO7198457 + 펨브롤리주맙의 조합 치료로 교차할 수 있는 옵션을 가질 수 있다. 또한, A군 환자는 펨브롤리주맙을 24개월 동안 완료하고 펨브롤리주맙 중단 후 <6개월 동안 확인된 질병 진행을 경험하는 경우 RO7198457 + 펨브롤리주맙의 교차 치료를 받을 수 있는 옵션을 가질 수 있다.

[0346] 환자는 기준선 (주기 1, 1일차), 12주차, 그 후 주기 1, 1일차 후 처음 48주 동안 및 6주마다 (2주기 마다) 종양 평가를 받는다. 지시된 경우, 피부 병변의 디지털 사진촬영을 스크리닝시 및 각 종양 평가 후 첫 병원 방문시 수행한다. 주기 1, 1일차로부터 48주 후, 환자들은 12 (± 1) 주 마다 (대략 4 주기 마다) 종양 평가를 받는다. 종양 평가는 연구 치료 중단, 동의 철회, 후원자에 의한 연구 종료 또는 사망 중 먼저 발생하는 시점까지 계속된다. 치료 중단을 초래하는 질병 진행을 경험한 후 환자는 가능한 경우 확인 종양 평가를 위해 약 6 (± 2)주 후에 병원에 다시 방문해야 한다. 질병 진행 이외의 이유 (예를 들어, 독성)로 치료를 중단한 환자는 질병 진행, 동의 철회, 후원자에 의한 연구 종료 또는 사망 중 먼저 발생하는 시점까지 예정된 종양 평가를 계속해야 한다. 종양 평가에 사용되는 1차 영상 데이터는 필요에 따라 반응 평가변수들에 대한 중앙에서 독립 검토를 할 수 있도록 후원자가 수집한다.

[0347] 또한 환자는 질병 진행 또는 치료 중단 중 나중에 발생하는 시점까지 각 주기 시작 시 PRO 평가를 완료해야 한다.

[0348] *포함 및 제외 기준*

[0349] 환자는 연구 참가를 위해 다음 기준을 충족해야 한다:

[0350] ●사전 동의서에 서명할 당시의 연령 ≥ 18세

[0351] ● AJCC v8.0에 정의된, 조직학적으로 확인된 전이성 (재발성 또는 새로운 IV기) 또는 절제불가능한 국소 진행성 (IIIC 또는 IIID기) 피부 또는 점막 흑색종 (Amin MB, Edge SB, Greene FL, 외, editors. AJCC cancer staging manual. 8th rev ed. New York: Springer; 2017)

[0352] o 점막 흑색종 환자의 등록은 약 10명의 환자로 제한된다

[0353] ● 0 또는 1의 ECOG 전신 활동도

[0354] ● 기대 수명 ≥ 12주

[0355] ● 첫 번째 연구 치료 전 28일 이내에 얻은 다음과 같은 실험실 결과로 정의되는 적절한 혈액 및 말단 기관 기능 (주기 1, 1일차):

[0356] o ANC ≥ 1,500 세포/μL (주기 1, 1일차 이전 2주 이내에 과립구 집락 자극 인자[G-CSF] 보충 없음)

[0357] o WBC 수 ≥ 2,500/μL

[0358] o 혈소판 수 ≥ 100,000/μL (주기 1, 1일차 이전 14일 이내에 수혈 없음)

[0359] o 헤모글로빈 ≥ 9 g/dL (환자는 현지 표준 치료에 따라 수혈을 받거나 적혈구 생성 치료를 받을 수 있음)

[0360] o 총 빌리루빈 ≤ 1.5 × ULN, 다음은 예외: 공지의 길버트병 환자들: 혈청 빌리루빈 수준 ≤ 3 × ULN.

[0361] o AST 및 ALT ≤ 3 × ULN

[0362] o ALP ≤ 2.5 × ULN, 다음은 예외: 간 또는 뼈 전이가 보고된 환자들은 ALP * 5 * ULN을 가질 수 있음.

[0363] o 혈청 알부민 ≥ 2.5 g/dL

[0364] ● Cockcroft-Gault 사구체 여과율 추정치를 바탕으로 측정 또는 계산된 크레아티닌 CL ≥ 50 mL/분:

[0365] (140 - 연령) × (체중, 킬로그램 단위) × (여성의 경우 0.85)

[0366] 72 × (혈청 크레아티닌, mg/dL 단위)

[0367] ● RECIST v1.1에 따라 측정가능한 질병. 이전에 방사선조사된 병변은, 병변의 진행이 입증되었고 다른 표적 병변이 없는 경우가 아닌 한, 표적 병변으로 간주해서는 안 된다. 생검을 목적으로 하는 병변은 표적 병변으로 간주해서는 안 된다. 피부 병변 및 신체 검사로만 발견할 수 있는 기타 표재성 병변은 표적 병변으로 간주하지 않고 비표적 병변으로 포함될 수 있다.

[0368] ● 진행성 흑색종에 대한 이전의 전신 항암 요법 (예를 들어, 화학요법, 호르몬 요법, 표적화 요법, 면역요법 또는 기타 생물학적 요법)에 무경험인 경우, 다음과 같은 보조 요법들은 예외:

[0369] o 항-PD1/PD-L1 또는 항-CTLA-4를 사용한 보조 치료, 주기 1, 1일차 이전 최소 6개월 전에 중단하고 다음 기준 중 어느 것도 충족하지 않는 경우:

[0370] ■ 이전 CIT로 인한 면역 관련 4등급의 이상 사례 이력 (대체 요법으로 관리되는 내분비병증 또는 혈청 아밀라제 또는 리파제의 무증상 상승 제외)

[0371] ■ 지역 처방 정보, 유럽 종양학회 (ESMO) 가이드라인 (Haanen JBAG, Carbonnel F, Robert C, 외 *Ann Oncol* 2017;28:iv119-iv142), 또는 미국 임상 종양학회 (ASCO) 가이드라인 (Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, 외 *J Clin Oncol* 2018;36:1714-68)에 따라 이전 면역치료제의 영구 중단이 필요한 이전 CIT로 인한 면역 관련 3등급의 이상 사례 이력

[0372] ■ 대체 요법으로 관리되는 탈모증, 백반증 또는 내분비병증을 제외하고 등급*1로 해결되지 않았던 이전 항암 요법의 이상 사례. 리파아제/아밀라아제의 무증상 상승이 있는 환자는 의료 모니터요원 (Medical Monitor)과 논의한 후 적격이 될 수 있다.

[0373] ■ 기준선으로 해결되지 않았던 이전 CIT와 관련된 면역 관련 이상 사례(대체 요법으로 관리되는 내분비병증 또는 안정 백반증 제외). 면역 관련 이상 사례로 코르티코스테로이드 치료를 받은 환자는 코르티코스테로이드 중

단 후 ≥ 4주 동안 관련 증상이나 징후가 없음을 입증해야 한다.

[0374] o 표적 요법 (예를 들어, BRAFi/MEKi)을 사용한 보조 치료, 연구 치료를 시작하기 적어도 2개월 전에 중단한 경우

[0375] o 한약 요법을 사용한 보조 치료, 연구 치료를 시작하기 적어도 7일 전에 중단한 경우

[0376] ● 관련 병리 보고서와 함께 포르말린 고정, 파라핀 포매 블록 (선호) 또는 절편화된 조직 (실험실 매뉴얼에 설명된 대로)에서 확인된 대표적인 종양 표본 가용성. 허용되는 샘플에는 심부 종양 조직에 대한 코어-바늘 생검 (최소 5개 코어), 피부, 피하 또는 점막 병변에 대한 절제, 절개, 펀치 또는 겸자 생검이 포함될 수 있다. 코어가 5개 미만인 환자들은 의료 모니터요원의 승인을 받아 적격인 것으로 간주될 수 있다. 가는 바늘 흡인 샘플체, 브러싱, 삼출액이나 복수의 세포 펠릿들, 세척 샘플은 허용되지 않는다. 골 전이로 인한 종양 조직은 PD-L1 발현을 평가하기 어려우므로 피해야 한다. 그러나 뼈 전이 부위가 조직의 유일한 생존 가능한 출처인 경우, 이것은 의료 모니터요원 승인을 받아 허용되는 종양 표본이 될 수 있다. 많은 시약에 PD-L1 IHC에 사용되는 항원과 염기서열 분석에 사용되는 핵산을 손상시키는 강산이 있기 때문에 석회제거된 뼈 조직은 석회제거 전이면 허용될 수 있다. 별개의 시점 (예를 들어, 초기 진단 시점 및 질병 재발 시점)에서 얻은 적절한 조직 및/또는 다중 전이성 종양을 사용할 수 있는 경우, 가장 최근에 수집된 (이상적으로는 가장 최근의 전신 보조 요법 이후) 조직에 우선순위를 부여해야 한다. 가용성에 따라 주어진 환자에 대해 여러 샘플이 수집될 수 있다; 그러나 단일 생검 또는 절제 표본은 블록 또는 단면 조직에 대한 요건을 충족하여야 한다. 불충분하거나 사용할 수 없는 보관 조직이 있는 환자는 환자가 종양의 치료전 생검 샘플 수집에 동의하고 이를 받을 의사가 없는 한 PCV를 생성하기 위해 평가가능한 종양 조직이 필요하기 때문에 적격이 없다 (허용되는 샘플은 상기 참조).

[0377] ● 등록은 후원자가 정한 바와 같이 백신을 제조할 수 있도록 적어도 5개의 식별된 종양 신생항원과 (질과 양 모두에서) 적절한 종양 물질이 있는 환자로 제한된다. 보관 종양 조직은 CIT-미경험 환자에게 허용된다; 이는 등록 전에 돌연변이 평가를 위해 제출 및 평가되어야 한다. CIT-경험 환자 (즉, 보조제 설정에서 면역 체크포인트 억제제로 치료를 받은 환자)의 경우 기준선 종양 생검이 필요하며 등록 전에 돌연변이 평가를 위해 제출 및 평가되어야 한다. CIT를 받은 후 등록 전에 종양 생검을 받은 CIT-경험 환자는 충분한 재료가 있는 경우 해당 조직을 스크리닝에 사용할 수 있다. 가능한 경우 환자는 평가를 위해 보관 종양 조직도 제출해야 한다. 기준선의 신선한 종양 생검이 제조에 부적합한 경우, CIT-경험 환자에 있어서 보관 조직이 사용될 수도 있다. 종양 조직이 평가할 수 없거나 백신을 제조할 수 있는 돌연변이 수가 불충분한 환자는 적격이 아니다.

[0378] ● 가임 여성의 경우: 금욕 유지 (이성간 성교 금지) 또는 피임 방법 사용에 대한 동의 및 난자 기증 자제에 대한 동의

[0379] ● 남성의 경우: 금욕 유지 (이성간 성교 금지) 또는 콘돔 사용에 대한 동의 및 정자 기증 자제에 대한 동의

[0380] 다음 기준 중 하나를 충족하는 환자는 연구 참가에서 제외된다:

[0381] ● 안구 또는 말단 흑색종

[0382] ● 연구 중 또는 RO7198457의 최종 투여 후 1개월 또는 펨브롤리주맙의 최종 투여 후 4개월 이내 (둘 중 더 늦은 날짜 적용) 임신 또는 수유중이거나 임신을 계획 중인 경우. 가임 여성(난관 결찰술을 받은 여성 포함)은 연구 약물 시작 (즉, 주기 1, 1일차) 전 14일 이내에 혈청 임신 테스트 결과가 음성이어야 한다.

[0383] ● 뉴욕 심장학회 분류 심장병 (분류 II 이상), 지난 3개월 이내의 심근경색, 불안정성 부정맥 및/또는 불안정형 협심증과 같은 심각한 심혈관 질병.

[0384] ● 활동성 바이러스, 알코올성 또는 기타 간염, 간경변, 유전성 간 질병 또는 현재 알코올 남용을 포함하여 임상적으로 유의미한 것으로 알려진 간 질병.

[0385] ● 주기 1, 1일차 이전 28일 이내의 주요 수술 절차 또는 연구 과정 중 주요 수술 절차 필요성이 예상되는 경우

[0386] ● 연구용 약물의 사용을 금하거나 결과 해석에 영향을 미칠 수 있거나 환자를 치료 합병증으로 인한 고위험에 빠뜨릴 수 있는 질병 또는 병태에 대한 합리적인 의심을 제공하는 기타 질병, 대사 기능장애, 신체 검사 소견 및/또는 임상 실험실 소견

[0387] ● 7.5 mg 프레드니솔론보다 높은 용량의 코르티코스테로이드 (생리학적 치환이 아닌 경우)

[0388] ● 선행 비장절제술

[0389] ● 세포성 (예를 들어, DiGeorge 증후군, T-음성 중증 복합 면역결핍증[SCID]) 또는 복합 T- 및 B-세포 면역결핍증 (예를 들어, T- 및 B-음성 SCID, Wiskott-Aldrich 증후군, 모세혈관 확장증, 공통변수 면역결핍증)인, 공지의 일차 면역결핍증

[0390] ● 증상이 있거나 치료되지 않았거나 활발히 진행중인 CNS 전이. CNS 병변의 병력이 있는 환자는 다음 기준이 모두 충족되는 경우 적격이다:

[0391] o RECIST v1.1에 따라 측정가능한 질병은 CNS 외부에 있어야 한다

[0392] o 천막상 및 소뇌 전이만 허용됨 (즉, 중뇌, 교뇌, 수질 또는 척수로의 전이 없음)

[0393] o 시각 기관 (시신경 및 시신경교차)으로부터 10mm 이내의 전이 이력

[0394] o CNS 질병에 대한 요법과 같은 지속적인 코르티코스테로이드 필요성 없음

[0395] o 7일 이내 정위 방사선조사 없음

[0396] o 선행 전뇌 방사선조사 없음

[0397] o CNS-지시 요법의 완료시와 스크리닝 방사선사진 연구시 사이 중간 진행에 대한 임상 증거 없음

[0398] o 스크리닝 스캔에서 새로운 무증상 CNS 전이가 검출된 환자는 CNS 전이에 대한 방사선요법 및/또는 수술을 받아야함 치료 후, 이 환자들은 다른 모든 기준이 충족되는 경우, 주기 1 1일차 이전에 추가 뇌 스캔 없이 적격이 될 수 있음

[0399] o 안정적인 용량의 항경련제 치료가 허용됨

[0400] o CNS 병변으로 인한 두개내 출혈의 병력 없음

[0401] ● 연수막 전이 질병의 병력

[0402] ● 통제되지 않는 종양 관련 통증. 마약성 진통제가 필요한 환자는 연구 시작시 안정 요법 중에 있어야 한다. 고식적 방사선요법으로 치료할 수 있는 증상이 있는 병변 (예를 들어, 골 전이 또는 신경 충돌을 유발하는 전이)은 등록 전에 치료해야 함. 환자는 방사선의 영향에서 회복되어야 함. 환자는 방사선의 영향에서 회복되어야 함. 추가 성장시 기능적 결함이나 난치성 통증을 유발할 가능성이 있는 무증상 전이성 병변 (예를 들어, 현재 척수 압박과 관련이 없는 경막외 전이)은 등록 전에 적절한 경우 국소 치료를 고려해야 함.

[0403] ●제어되지 않는 흉막 삼출, 심낭 삼출 또는 28일 마다 한 번 이상 배액 반복을 요하는 복수. 유치 배액 카테터 (예를 들어, PleurX®)는 허용됨.

[0404] ● 연구 치료를 시작하기 전에 화학요법, 호르몬 요법 및/또는 방사선 요법을 포함하여 연구 중이거나 승인된 전이 환경의 모든 항암 요법, 다음은 예외:

[0405] o 주기 1, 1일차의 >1주 전 한방 요법

[0406] o 주기 1, 1일차의 >2주 전 통증성 전이 또는 잠재적으로 민감한 위치 (예를 들어, 경막외강)의 전이에 대한 완화 방사선요법

[0407] o 선행 암 백신 (예를 들어, T-vec)은 허용되지 않음

[0408] ● 주기 1, 1일차 이전 5년 이내에 연구 중인 질병 이외의 악성 종양, 무시할만한 전이 또는 사망 위험이 있는 경우 (예를 들어, 적절히 치료된 자궁상피내 암종, 기저 또는 편평 세포 피부암, 국소 전립선암 또는 또는 관상피내암종)는 예외

[0409] ● 제어되지않는 고칼슘혈증 (> 1.5 mmol/L 이온화 칼슘 또는 Ca^{+2} > 12 mg/dL 또는 교정된 혈청 칼슘 ≥ ULN) 또는 지속적 비스포스포네이트 요법 사용을 요하는 증상성 고칼슘혈증. 특히 골격 사건을 예방하기 위해 비스포스포네이트 요법 또는 데노수맙을 받고 있고 임상적으로 유의한 고칼슘혈증의 이력이 없는 환자가 적격이다.

[0410] ● 수술 및/또는 방사선으로 확실하게 치료되지 않은 또는 질병이 스크리닝 전 ≥2주 동안 임상적으로 안정적이라는 증거가 없는 사전에 진단 및 치료된 척수 압박.

[0411] ● 전신 홍반 루푸스, 류마티스 관절염, 염증성 장질병, 항인지질 증후군과 관련된 혈관 혈전증, 베게너 육아종

증, 쇼그렌 증후군, 벨 마비, 길랭-바레 증후군, 다발성 경화증, 혈관염 또는 사구체신염을 포함하나 이에 국한되지 않는 자가면역 질병의 병력, 다음을 제외:

[0412] o 안정적인 용량의 갑상선 대체 호르몬에 대한 자가면역 갑상선기능저하증의 병력이 있는 환자는 적격일 수 있다.

[0413] o 안정적인 인슐린 요법에 대하여 조절된 제1형 진성 당뇨병 환자는 적격일 수 있다.

[0414] o 습진, 건선, 만성 단순 태선 또는 피부과 증상만 있는 백반증 (예를 들어, 건선성 관절염 없음)이 있는 환자는 다음 조건을 충족하는 경우 적격일 수 있다:

[0415] ■ 발진은 신체 표면적의 10% 미만을 덮어야 함

[0416] ■ 질병은 기준선에서 잘 제어되며 낮은 역가의 국소 스테로이드만 필요함

[0417] ■ 마지막 12개월 이내에 기저 질병의 급성 악화가 없음 (예를 들어, 소랄렌 + 자외선 A 방사선, 메토트렉세이트, 레티노이드, 생물학적 제제, 경구 칼시뉴린 억제제, 고 역가 또는 경구 스테로이드가 필요하지 않음)

[0418] ● 주기 1, 1일차 이전 3주 이내에 모노아민 옥시다제 억제제(MAOI)로 치료

[0419] ● 주기 1, 1일차 이전 2주 이내에 전신 면역억제제 (프레드니손 ≥ 7.5mg/일, 사이클로포스파미드, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 탈리도마이드 및 TNF-a 길항제를 포함하나 이에 국한되지 않음)로 치료

[0420] o 급성, 저용량, 전신 면역억제제 (예를 들어, 메스꺼움으로 덱사메타손 1회 용량)를 받은 환자는 의료 모니터 요원과 논의하고 승인받은 후 연구에 등록할 수 있음.

[0421] o 흡입용 코르티코스테로이드 (예를 들어, 만성 폐쇄성 폐질환용 플루티카손)의 사용은 허용됨

[0422] o 경구 미네랄 코르티코이드(예: 기립성 저혈압 환자의 경우 플루드로코르티손)의 사용은 허용됨

[0423] o 부신 기능부전에 대한 코르티코스테로이드의 생리학적 용량은 허용됨

[0424] · 특발성 폐 섬유증, 폐렴 (약물 유발 포함), 조직성 폐렴 (즉, 폐쇄성 세기관지염, 잠복성 조직성 폐렴 등)의 병력 또는 스크리닝 흉부 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔에서 활동성 폐렴의 증거. 방사선 분야에서 방사선 폐렴 (섬유증) 병력은 허용됨

[0425] ● HIV 감염에 대한 양성 테스트

[0426] ● 활동성 B형 간염 (스크리닝 시 B형 간염 표면 항원 [HBsAg] 테스트 양성으로 정의됨). 과거 또는 해결된 B형 간염 감염이 있는 환자 (HBsAg 검사가 음성이고 B형 간염 핵심 항원 [항-HBc]에 대한 IgG 항체가 양성인 것으로 정의됨)는 적격임. HBV DNA는 주기 1, 1일차 이전에 이들 환자들에서 얻어야 하며 활동성 감염을 나타내지 않아야 함.

[0427] ● 활동성 C형 간염. HCV 항체에 양성인 환자는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)이 HCV RNA에 대해 음성인 경우에만 적격임.

[0428] ● 공지된 활동성 또는 잠복성 결핵 감염. 조사자가 잠재적인 환자가 *결핵균* 감염 위험이 높다고 판단하는 경우, 스크리닝 기간 동안 현지 진료 기준에 따라 잠복 결핵 진단 절차를 따라야 함.

[0429] ● 감염 합병증, 세균혈증 또는 중증 폐렴으로 인한 입원을 포함하나 이에 제한되지 않는 주기 1, 1일차 이전 4주 이내의 중증 감염

[0430] ● 다음을 포함하여 중증 감염의 기준을 충족하지 않는 최근 감염:

[0431] o 주기 1, 1일차 이전 2주 이내에 감염 징후 또는 증상

[0432] o 주기 1, 1일차 이전 2주 이내에 경구 또는 IV 항생제 투여

[0433] o 예방적 항생제를 투여받는 환자 (예를 들어, 요로 감염 또는 만성 폐쇄성 폐질병 예방)는 적격임

[0434] ● 선행 동종 골수 이식 또는 선행 고형 장기 이식

[0435] ● 주기 1, 1일차 이전 4주 이내에 약독화 생백신을 투여 또는 연구 중에 약독화 생백신이 필요할 것으로 예상되는 경우. 인플루엔자 백신접종은 인플루엔자 시즌에만 접종해야 함. 환자는 주기 1, 1일차 이전 4주 이내에 또는 연구 중 어느 때라도, 그리고 마지막 연구 치료 후 5개월 동안 약독화된 인플루엔자 생백신 (예를 들어,

FluMist β)을 접종해서는 안 됨.

[0436] ● 백신 내 활성 물질 또는 부형제에 대한 공지된 과민증

[0437] ● 키메라 또는 인간화 항체 또는 융합 단백질에 대한 심각한 알레르기, 아나필락시스 또는 기타 과민 반응의 병력

[0438] ● 차이니즈 햄스터 난소 세포 제품에 대한 공지된 과민증

[0439] ● 펨브롤리주맙 제제의 성분에 대한 알레르기 또는 과민증

[0440] *실시예 2*:

[0441] 이 실시예는 본원에 기술된 방법에 사용되는 예시적인 RNA 백신을 설명한다.

[0442] 개략적 설명

[0443] RNA 백신은 불변 서열과 환자 특이적 종양 신생항원 서열을 인코딩하는 단일 가닥 메신저 리보핵산(mRNA) 분자이다. 구체적으로, 이것은 5'-캡핑된 단일-가닥 메신저 RNA (mRNA)이다. 각 mRNA는 확인 및 선별된 환자의 종양 특이적 돌연변이에 의해 정의된 최대 20개의 네오에피토프를 인코딩한다. 환자 종양 특이적 돌연변이를 포함하는 서열들은 일반적으로 81개의 뉴클레오티드로 구성된다. 도 3은 mRNA (본 실시예에서는 10개의 환자 특이적 네오에피토프를 인코딩하는 mRNA)의 도식적 표현을 도시한다.

[0444] 불변 서열 구성요소들에는 다음이 포함된다: 5' 캡 (베타-S-ARCA), 5'-, 3'-비번역 영역 [UTR], 분비 신호 펩티드 [$sec_{2.0}$], MHC [주조직 적합성 복합체] 클래스 I 막경유 및 세포질 도메인 [MITD], 및 폴리(A)-꼬리. 이러한 불변 서열은 mRNA의 번역 효율과 안정성을 위해 최적화되었으며 각 배치마다 동일하므로 모든 환자에게 동일하다. 모든 불변 서열 구성요소들의 역할은 표 4에 요약되어 있다: 그들은 환자 특이적 네오에피토프 영역과 글리신/세린(GS)-풍부 링커에 연접된다.

[0445] **표 4**

구성요소	설명
5'-캡	베타-S-ARCA(D1) (**도 5** 참조)는 RNA 안정성 및 번역 효율 향상을 위해 RNA 암 백신의 5' 말단에서 특정 캡핑 구조로 활용된다 (Kuhn 외 2010).
5'-UTR (hAg-코작)	5'-UTR 서열은 인간 알파-글로빈 RNA로부터 유래되었다. 번역 효율성을 높이기 위해 최적화된 "코작 서열"이 추가되었다 (Kozak 1987).
분비 신호 펩티드 ($sec_{2.0}$)	인간 MHC 클래스 I 복합 알파 사슬 "HLA-I, Cw*"를 인코딩하는 서열에서 파생된 분비 신호 펩티드 "$sec_{2.0}$"은 항원 처리 및 제시를 개선하기 위한 융합-단백질 태그로 사용된다 (Kreiter 외 2008). "HLA-I, Cw*"는 가장 빈번한 일배체형 중 하나에 해당하고 다른 빈번한 MHC 클래스 I 대립형질과 높은 상동성을 갖기 때문에 선택되었다.
MITD	MITD는 MHC 클래스 I 분자의 막경유 및 세포질 도메인에 해당하며 항원 처리 및 제시를 개선하기 위한 융합-단백질 태그로 사용된다 (Kreiter 외 2008).
3'-UTR (Fl)	3'-UTR은 AES mRNA (F라고 함)와 미토콘드리아 인코딩된 12S 리보솜 RNA (I라고 함)에서 유래한 두 가지 서열 구성요소의 조합이다. 이들은 RNA 안정성을 부여하는 서열들에 대한 생체외 선별과정을 수행하여 확인되었다.
폴리(A)-꼬리	높은 RNA 안정성과 단백질 발현을 보장하기 위해 폴리(A)-꼬리 측정 120개 뉴클레오티드 (A 120)가 추가되었다 (Holtkamp 외 2006).

[0446]

[0447] 약어: AES = 스플릿의 아미노 말단 인핸서; MHC = 주조직 적합성 복합체;

[0448] MITD=MHC 클래스 I 막경유 및 세포질 도메인; UTR= 비번역 영역.

[0449] 불변 서열 설명

[0450] RNA[1,2-[m_2 $^{7\cdot2'\cdot0}$ G-(5'5')-pp_sp-G (*Rp*-이성질체)]] (불변 5' UTR + 불변 MITD에 연결된 $sec_{2.0}$ + 3' UTR 및 폴리(A)-꼬리)

[0451] 서열 길이: 739 뉴클레오티드 (A: 255, C: 204, G: 168, U: 112)

[0452] 예시적인 RNA 백신의 불변 영역의 RNA 서열이 **도 4**에 도시되어 있다. 환자 특이적 서열 (C131-A132)의 삽입 부위는 볼드체로 표시되어 있다. RNA 서열의 변형된 염기 및 비공통 연결들에 대해서는 표 5를 참조하라.

[0453] **표 5**

유형	위치	설명
변형된 염기	G1	m_2 $^{7\cdot2\cdot0}$ G
비공통 연결	G1-G2	(5'→5')-pp_sp-
비공통 연결	C131-A132	환자 특이적 서열들의 삽입 부위

[0454]

[0455] 전체적으로, 각 RNA의 길이는 각 네오에피토프의 크기와 각 RNA에 인코딩된 네오에피토프의 수에 따라 대략 1000 - 2000 뉴클레오티드 범위를 갖는다. RNA의 불변 영역은 환자 특이적 서열과 무관하게 739개의 리보뉴클레오티드로 구성된다.

[0456] 참고문헌

[0457] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, 외 Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. Blood 2006; 108:4009-17

[0458] Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 1987;196:947-50.

[0459] Kreiter S, Selmi A, Diken M, 외 Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. J lmmunol 2008;180:309- 18.

[0460] Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, 외 Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. Gene Ther 2010;17:961-71.

[0461] Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, 외 Optimization of codon pair use within the (GGGGS)3 linker sequence results in enhanced protein expression. Mol lmmunol 2004;40:717- 22.

[0462] 서열

[0463] 모든 폴리뉴클레오티드 서열들은 5'à3 방향으로 제시된다. 모든 폴리펩티드 서열은 N-말단에서 C-말단 방향으로 제시된다.

[0464] 항-PDL1 항체 HVR-H1 서열 (서열 번호: 1)

[0465] GFTFSDSWIH

[0466] 항-PDL1 항체 HVR-H2 서열 (서열 번호: 2)

[0467] AWISPYGGSTYYADSVKG

[0468] 항-PDL1 항체 HVR-H3 서열 (서열 번호: 3)

[0469] RHWPGGFDY

[0470] 항-PDL1 항체 HVR-L1 서열 (서열 번호: 4)

[0471] RASQDVSTAVA

[0472] 항-PDL1 항체 HVR-L2 서열 (서열 번호: 5)

[0473] SASFLYS

[0474] 항-PDL1 항체 HVR-L3 서열 (서열 번호: 6)

[0475] QQYLYHPAT

[0476] 항-PDL1 항체 VH 서열 (서열 번호: 7)

[0477] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP
GGFDYWGQGTLVTVSS

[0478] 항-PDL1 항체 VL 서열 (서열 번호: 8)

[0479] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

[0480] 항-PDL1 항체 중쇄 서열 (서열 번호: 9)

[0481] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP
GGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0482] 항-PDL1 항체 경쇄 서열 (서열 번호: 10)

[0483] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0484] 니볼루맙 중쇄 서열 (서열 번호: 11)

[0485] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
DGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0486] 니볼루맙 경쇄 서열 (서열 번호: 12)

[0487] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0488] 펨브롤리주맙 중쇄 서열 (서열 번호: 13)

[0489] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGG
INPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0490] 쥐브롤리주맙 경쇄 서열 (서열 번호: 14)

[0491] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0492] 아벨루맙 중쇄 서열 (서열 번호: 15)

[0493] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLG
TVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0494] 아벨루맙 경쇄 서열 (서열 번호: 16)

[0495] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFG
TGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS
TVEKTVAPTECS

[0496] 더발루맙 중쇄 서열 (서열 번호: 17)

[0497] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGW
FGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0498] 더발루맙 경쇄 서열 (서열 번호: 18)

[0499] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0500] 전장 PCV RNA 5' 불변 서열 (서열 번호: 19)

[0501] GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUG
GCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC

[0502] 전장 PCV RNA 3' 불변 서열 (서열 번호: 20)

[0503] AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGC
GGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGC
UGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGA
CACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAAC
UAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU

[0504] 전장 PCV 코작 RNA (서열 번호: 21)

[0505] GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

[0506] 전장 PCV 코작 DNA (서열 번호: 22)

[0507] GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC

[0508] 짧은 코작 RNA (서열 번호: 23)

[0509] UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

[0510] 짧은 코작 DNA (서열 번호: 24)

[0511] TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC

[0512] sec RNA (서열 번호: 25)

[0513] AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC

[0514] sec DNA (서열 번호: 26)

[0515] ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC

[0516] sec 단백질 (서열 번호: 27)

[0517] MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS

[0518] MITD RNA (서열 번호: 28)

[0519] AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC

[0520] MITD DNA (서열 번호: 29)

[0521] ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC

[0522] MITD 단백질 (서열 번호: 30)

[0523] IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA

[0524] 전장 PCV FI RNA (서열 번호: 31)

[0525] CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU

[0526] 전장 PCV FI DNA (서열 번호: 32)

[0527] CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT

[0528] F 구성요소 RNA (서열 번호: 33)

[0529] CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC

[0530] F 구성요소 DNA (서열 번호: 34)

[0531] CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC

[0532] I 구성요소 RNA (서열 번호: 35)

[0533] CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG

[0534] I 구성요소 DNA (서열 번호: 36)

[0535] CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG

[0536] 링커 RNA (서열 번호: 37)

[0537] GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC

[0538] 링커 DNA (서열 번호: 38)

[0539] GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC

[0540] 링커 단백질 (서열 번호: 39)

[0541] GGSGGGGSGG

[0542] 전장 PCV DNA 5' 불변 서열 (서열 번호: 40)

[0543] GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTG GCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC

[0544] 전장 PCV DNA 3' 불변 서열 (서열 번호: 41)

[0545] ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGC GGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGC TGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGA CACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAAC TAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT

[0546] 캡의 5' GG가 있는 전장 PCV RNA (서열 번호: 42)

[0547] GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC

[0548] ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC

[0549] CCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG CNAUCGUGGGA AUUGUGGCAG

[0550] GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG

[0551] AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC

[0552] CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU

[0553] AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUUCCCGUC

[0554] CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCUCGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC

[0555] UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCA

[0556] CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA

[0557] CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACU

[0558] AACCCCAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG

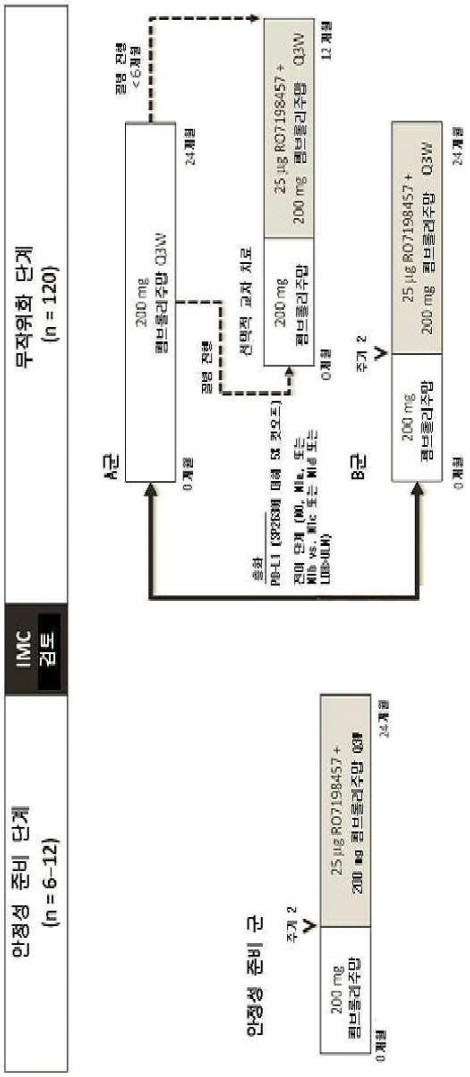
[0559] AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[0560] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

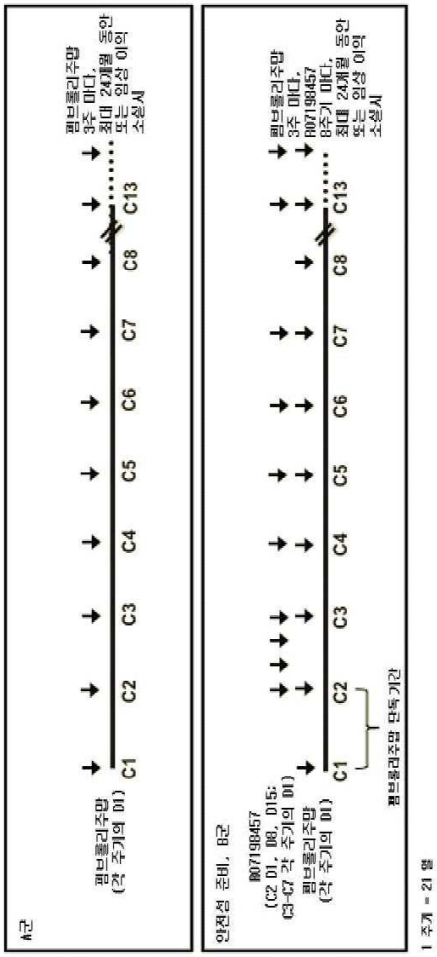
[0561] AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA

도면

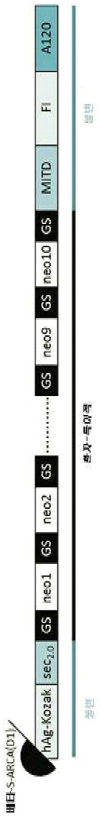
도면1


안정성 준비 단계
(n = 6-12)
IMC
검토
무작위화 단계
(n = 120)
A군
200 mg
콤브롤리주맙 Q3W
24개월
0개월
질병 진행
<6개월
질병 진행
선택적 교차 치료
200 mg
콤브롤리주맙
25 μg RO7198457 +
200 mg 콤브롤리주맙 Q3W
12개월
0개월
B군
주기 2
200 mg
콤브롤리주맙
25 μg RO7198457 +
200 mg 콤브롤리주맙 Q3W
24개월
0개월
안정성 준비 군
주기 2
200 mg
콤브롤리주맙
25 μg RO7198457 +
콤브롤리주맙 Q3W
24개월
0개월

도면2


A군
펩브롤리주맙
(각 주기의 D1)
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C13
펩브롤리주맙
3주 마다,
최대 24개월 동안
또는 임상 이익
소실시
안전성 준비, B군
펩브롤리주맙
(각 주기의 D1)
펩브롤리주맙 단독 기간
1 주기 = 21 일

도면3


베타-5-ARCA(D1)
hAg-Kozak
sec2.0
GS
neo1
GS
neo2
GS
GS
neo9
GS
neo10
GS
MITD
Fl
A120
초자-특이적

도면4

GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC 50

ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC 100

CCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG CNAUCGUGGGA AUUGUGGCAG 150

GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG 200

AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC 250

CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU 300

AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUUCCCGUC 350

CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCUCGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC 400

UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCA 450

CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA 500

CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACU 550

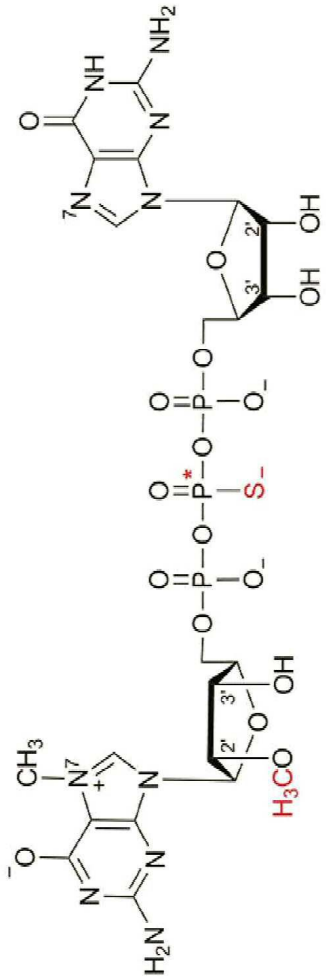
AACCCCAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG 600

AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 650

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 700

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 739

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

BioNTech SE

<120> METHODS OF TREATING CANCER WITH A PD-1

AXIS BINDING ANTAGONIST AND AN RNA VACCINE

<130> 14639-20469.40

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/792,387

<151> 2019-01-14

<150> US 62/795,476

<151> 2019-01-22

<150> US 62/887,410

<151> 2019-08-15

<160> 42

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

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

435 440 445

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440 445

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15
<211> 449
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 16

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 17

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 18
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19

<211> 129

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

ggcgaacuag uauucuucug guccccacag acucagagag aacccgccac caugagagug 60

auggccccca gaacccugau ccugcugcug ucuggcgccc uggcccugac agagacaugg 120

gccggaagc 129

<210> 20

<211> 488

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

aucgugggaa uuguggcagg acuggcagug cuggccgugg uggugaucgg agccguggug 60

gcuaccguga ugugcagacg gaaguccagc ggaggcaagg gcggcagcua cagccaggcc 120

gccagcucug auagcgccca gggcagcgac gugucacuga cagccuagua acucgagcug 180

guacugcaug cacgcaaugc uagcugcccc uuucccgucc uggguacccc gagucucccc 240

cgaccucggg ucccagguau gcucccaccu ccaccugccc cacucaccac cucugcuagu 300

uccagacacc ucccaagcac gcagcaaugc agcucaaaac gcuuagccua gccacacccc 360

cacgggaaac agcagugauu aaccuuuagc aauaaacgaa aguuuaacua agcuauacua 420

accccagggu uggucaauuu cgugccagcc acaccgagac cugguccaga gucgcuagcc 480

gcgucgcu 488

<210> 21

<211> 51

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

ggcgaacuag uauucuucug guccccacag acucagagag aacccgccac c 51

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

ggcgaactag tattcttctg gtccccacag actcagagag aacccgccac c 51

<210> 23

<211> 39

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

uucuucuggu ccccacagac ucagagagaa cccgccacc 39

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

ttcttctggt ccccacagac tcagagagaa cccgccacc 39

<210> 25

<211> 78

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

augagaguga uggccccccag aacccugauc cugcugcugu cuggcgcccu ggcccugaca 60

gagacauggg ccggaagc 78

<210> 26

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

atgagagtga tggcccccag aaccctgatc ctgctgctgt ctggcgccct ggccctgaca 60

gagacatggg ccggaagc 78

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Met Arg Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala

1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser

20 25

<210> 28

<211> 165

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

aucgugggaa uuguggcagg acuggcagug cuggccgugg uggugaucgg agccguggug 60

gcuaccguga ugugcagacg gaaguccagc ggaggcaagg gcggcagcua cagccaggcc 120

gccagcucug auagcgccca gggcagcgac gugucacuga cagcc 165

<210> 29

<211> 165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

atcgtgggaa ttgtggcagg actggcagtg ctggccgtgg tggtgatcgg agccgtggtg 60

gctaccgtga tgtgcagacg gaagtccagc ggaggcaagg gcggcagcta cagccaggcc 120

gccagctctg atagcgccca gggcagcgac gtgtcactga cagcc 165

<210> 30

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile

1 5 10 15

Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly

20 25 30

Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly

35 40 45

Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala

50 55

<210> 31

<211> 317

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

cucgagcugg uacugcaugc acgcaaugcu agcugccccu uucccguccu ggguaccccg 60

agucuccccc gaccucgggu cccagguaug cucccaccuc caccugcccc acucaccacc 120

ucugcuaguu ccagacaccu cccaagcacg cagcaaugca gcucaaaacg cuuagccuag 180

ccacaccccc acgggaaaca gcagugauua accuuuagca auaaacgaaa guuuaacuaa 240

gcuauacuaa ccccaggguu ggucaauuuc gugccagcca caccgagacc ugguccagag 300

ucgcuagccg cgucgcu 317

<210> 32

<211> 311

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

ctggtactgc atgcacgcaa tgctagctgc ccctttcccg tcctgggtac cccgagtctc 60

ccccgacctc gggtcccagg tatgctccca cctccacctg ccccactcac cacctctgct 120

agttccagac acctcccaag cacgcagcaa tgcagctcaa aacgcttagc ctagccacac 180

ccccacggga aacagcagtg attaaccttt agcaataaac gaaagtttaa ctaagctata 240

ctaaccccag ggttggtcaa tttcgtgcca gccacaccga gacctggtcc agagtcgcta 300

gccgcgtcgc t 311

<210> 33

<211> 136

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

cugguacugc augcacgcaa ugcuagcugc cccuuucccg uccuggguac cccgagucuc 60

ccccgaccuc gggucccagg uaugcuccca ccuccaccug ccccacucac caccucugcu 120

aguuccagac accucc 136

<210> 34

<211> 136

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

ctggtactgc atgcacgcaa tgctagctgc ccctttcccg tcctgggtac cccgagtctc 60

ccccgacctc gggtcccagg tatgctccca cctccacctg ccccactcac cacctctgct 120

agttccagac acctcc 136

<210> 35

<211> 143

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

caagcacgca gcaaugcagc ucaaaacgcu uagccuagcc acacccccac gggaaacagc 60

agugauuaac cuuuagcaau aaacgaaagu uuaacuaagc uauacuaacc ccaggguugg 120

ucaauuucgu gccagccaca ccg 143

<210> 36

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

caagcacgca gcaatgcagc tcaaaacgct tagcctagcc acacccccac gggaaacagc 60

agtgattaac ctttagcaat aaacgaaagt ttaactaagc tatactaacc ccagggttgg 120

tcaatttcgt gccagccaca ccg 143

<210> 37

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

ggcggcucug gaggaggcgg cuccggaggc 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

ggcggctctg gaggaggcgg ctccggaggc 30

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 40

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

ggcgaactag tattcttctg gtccccacag actcagagag aacccgccac catgagagtg 60

atggccccca gaaccctgat cctgctgctg tctggcgccc tggccctgac agagacatgg 120

gccggaagc 129

<210> 41

<211> 488

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

atcgtgggaa ttgtggcagg actggcagtg ctggccgtgg tggtgatcgg agccgtggtg 60

gctaccgtga tgtgcagacg gaagtccagc ggaggcaagg gcggcagcta cagccaggcc 120

gccagctctg atagcgccca gggcagcgac gtgtcactga cagcctagta actcgagctg 180

gtactgcatg cacgcaatgc tagctgcccc tttcccgtcc tgggtacccc gagtctcccc 240

cgacctcggg tcccaggtat gctcccacct ccacctgccc cactcaccac ctctgctagt 300

tccagacacc tcccaagcac gcagcaatgc agctcaaaac gcttagccta gccacacccc 360

cacgggaaac agcagtgatt aacctttagc aataaaacgaa agtttaacta agctatacta 420

accccagggt tggtcaattt cgtgccagcc acaccgagac ctggtccaga gtcgctagcc 480

gcgtcgct 488

<210> 42

<211> 740

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc_feature

<222> 1,2

<223> linked by (5'->5')-pp(s)p- as shown in Table 5 and in Fig. 5 of the specification

<220>

<221> misc_feature

<222> 132

<223> n = A,T,C,G or U

<220>

<221> misc_feature

<222> 132

<223> Exists as polynucleotide sequence(s) as defined in the specification and may encode patient cancer-specific epitopes as defined in the specification (e.g., FIG. 3)

<400> 42

ggggcgaacu aguauucuuc uggucccCac agacucagag agaacccgcc accaugagag 60

ugauggcccc cagaacccug auccugcugc ugucuggcgc ccuggcccug acagagacau 120

gggccggaag cnaucguggg aauuguggca ggacuggcag ugcuggccgu gguggugauc 180

ggagccgugg uggcuaccgu gaugugcaga cggaagucca gcggaggcaa gggcggcagc 240

uacagccagg ccgccagcuc ugauagcgcc cagggcagcg acgugucacu gacagccuag 300

uaacucgagc ugguacugca ugcacgcaau gcuagcugcc ccuuucccgu ccuggguacc 360

ccgagucucc cccgaccucg ggucccaggu augcucccac cuccaccugc cccacucacc 420

accucugcua guuccagaca ccucccaagc acgcagcaau gcagcucaaa acgcuuagcc 480

uagccacacc cccacgggaa acagcaguga uuaaccuuua gcaauaaacg aaaguuuaac 540

uaagcuauac uaaccccagg guuggucaau uucgugccag ccacaccgag accuggucca 600

gagucgcuag ccgcgucgcu aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 740