



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0083327  
(43) 공개일자 2018년07월20일

<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>G06F 19/00</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>A61K 48/00</i> (2013.01) <i>A61K 48/005</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7013301</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년10월12일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년05월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/056550</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/066256 국제공개일자 2017년04월20일</p> <p>(30) 우선권주장 62/240,487 2015년10월12일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 <b>난토믹스, 엘엘씨</b> 미국 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블리바드 9920 (우:90232)</p> <p>(72) 발명자 <b>순-시용, 패트릭</b> 미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블리바드 9920</p> <p><b>벤츠, 스티븐 찰스</b> 미국 95062 캘리포니아 산타크루즈 파크 웨이 436 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 <b>특허법인에이아이피</b></p>
---	---

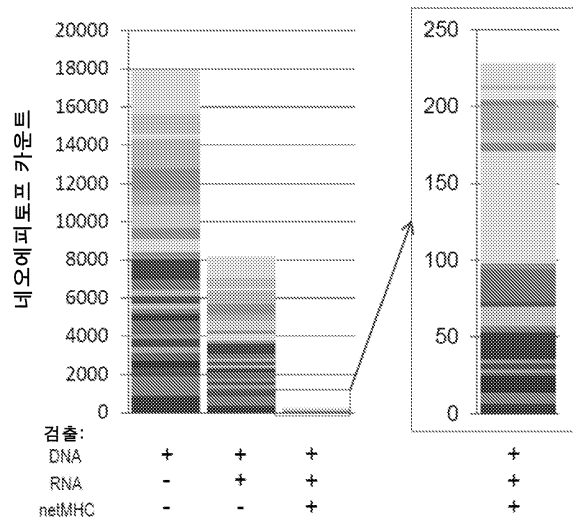
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **바이러스성 암 네오에피토프를 위한 조성물 및 방법**

**(57) 요약**

네오에피토프가 환자- 및 암-특이적 방식으로 먼저 동정된 다음 추가로 환자에게 HLA-매칭에 의해 필터링되는 재조합 바이러스 또는 다른 재조합 발현 시스템의 제조 및 용도를 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 선택된 네오에피토프는 필터링된 네오에피토프에 대해 바람직한 친화도를 갖는 HLA-유형(MHC-I 및/또는 MHC-II 하위-유형)에 대해 발현된 네오에피토프를 유도하는 서열 요소를 사용하는 발현이다.

**대표도 - 도2**



(52) CPC특허분류

*G06F 19/708* (2013.01)

(72) 발명자

**응유옌, 앤드류**

미국 95112 캘리포니아 산호세 사쿠라 드라이브  
929

**라비자데흐, 사흐루즈**

미국 90077 캘리포니아 로스앤젤레스 앤젤로 드라  
이브 2816

**니아치, 카이반**

미국 90049 캘리포니아 로스앤젤레스 키오와 드라  
이브 #202 11928

**버즈코, 올렉산드**

미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블리바드  
9920

**넬슨, 제이 가드너**

미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블리바드  
9920

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

면역요법을 사용하여 환자의 암을 치료하는 방법으로서,

암- 및 환자-특이적 네오에피토프를 발현하도록 구성된 재조합 핵산을 생성하는 단계로서,

여기서, 상기 네오에피토프가 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합체이고,

상기 재조합 핵산이 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의해 제시되도록 상기 발현된 네오에피토프를 유도하는 서열 요소를 포함하는, 단계; 및

상기 재조합 핵산으로 세포를 형질감염시켜 상기 세포가 상기 세포의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 암- 및 환자-특이적 네오에피토프를 발현 및 제시하도록 강제하는 단계로서,

여기서, 상기 형질감염 단계가 환자에서 수행되거나 또는 상기 형질감염된 세포가 환자에게 투여되는, 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 암- 및 환자-특이적 네오에피토프는 환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 옴ิกส์(omics) 데이터를 비교함으로써 동정되는, 방법.

#### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 암- 및 환자-특이적 네오에피토프는 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도 및 선형적으로 알려진(*a priori* known) 분자 변이 중 적어도 하나에 의해 필터링됨으로써 동정되는, 방법.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 핵산이 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 또는 RNA인, 방법.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 고-친화성 결합체는 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖는, 방법.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 환자의 HLA-유형은 드브루인(de Bruijn) 그래프를 사용하여 인-실리코(in silico)로 결정되는, 방법.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 서열 요소는 리소좀성 표적화 서열, 엔도좀성 표적화 서열, 피옥시좀성 표적화 서열 또는 세포질 유지 서열인, 방법.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 핵산이 공동-자극(co-stimulatory) 분자를 코딩하는 서열 및 체크포인트(checkpoint) 억제제를 코딩하는 서열 중 적어도 하나를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 세포가 상기 환자의 항원 제시(antigen presenting) 세포인, 방법.

**청구항 10**

청구항 1에 있어서, 상기 환자에서의 형질감염이 아데노바이러스를 사용하여 수행되는, 방법.

**청구항 11**

청구항 1에 있어서, 프록시(proxy) 세포에서, 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 네오에피토프의 제시를 검증하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 프록시 세포는 상기 환자로부터 이전에 획득된 환자 세포 또는 HLA-상용성 동종(alllogenic) 세포인, 방법.

**청구항 13**

청구항 1에 있어서, 환자 암세포 또는 환자 암 조직에서, 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 상기 네오에피토프의 제시를 검증하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 14**

청구항 13에 있어서, 상기 제시를 검증하는 단계는 상기 네오에피토프에 결합하는 합성 결합제 또는 항체를 사용하여 수행되는, 방법.

**청구항 15**

면역요법을 위한 재조합 핵산을 생성하는 방법으로서,

환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 오믹스 데이터를 비교하여 환자의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정하는 단계;

상기 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형을 동정하는 단계;

상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 상기 네오에피토프의 결합 친화도를 결정하는 단계;

상기 결합 친화도가 사전-결정된 임계치 값 미만인 경우에 상기 네오에피토프를 선택하는 단계; 및

공동-자극 분자를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 상기 선택된 네오에피토프를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하도록 재조합 핵산을 생성하는 단계로서, 여기서, 상기 선택된 네오에피토프를 코딩하는 핵산 서열이 상기 선택된 네오에피토프의 발현을 유도하는 프로모터의 통제하에 있고,

상기 핵산 서열이, 상기 발현된 선택된 네오에피토프를 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의해 제시되도록 유도하는 서열 요소를 추가로 포함하는, 단계

를 포함하는, 방법.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서, 상기 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 상기 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬(incremental synchronous alignment)에 의해 수행되는, 방법.

**청구항 17**

청구항 15에 있어서, 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형은 드브루인 그래프를 사용하여 인-실리코로 결정되는, 방법.

**청구항 18**

청구항 15에 있어서, 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에

대한 네오에피토프의 결합 친화도는 인-실리코로 결정되며, 여기서 상기 사전-결정된 임계치 값은 150 nM 미만인, 방법.

**청구항 19**

청구항 15에 있어서, 상기 재조합 핵산이 제2 네오에피토프를 코딩하는 제3 핵산 서열을 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 20**

청구항 15에 있어서, 상기 재조합 핵산이 체크포인트 억제제를 코딩하는 서열을 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 21**

청구항 15에 있어서, 상기 서열 요소는 리소좀성 표적화 서열, 엔도좀성 표적화 서열, 피옥시좀성 표적화 서열 또는 세포질 유지 서열인, 방법.

**청구항 22**

청구항 15에 있어서, 상기 재조합 핵산이 아테노바이러스성 발현 벡터인, 방법.

**청구항 23**

암 신생항원 제시(neoantigen presentation)를 개선하는 방법으로서,

환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 오믹스 데이터를 비교하여 환자의 복수의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정하는 단계;

상기 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도 및 선형적으로 알려진 분자 변이 중 적어도 하나에 의해 필터링하여 필터링된 네오에피토프를 획득하는 단계;

상기 필터링된 네오에피토프로부터 상기 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합체를 선택하는 단계;

환자 세포 또는 상용성 HLA-유형의 세포에서, 상기 고-친화성 결합체를 발현시키고, 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 고-친화성 결합체의 제시를 검증하는 단계; 및

발현의 검증시 면역요법 양상(modality)에서 고-친화성 결합체를 사용하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 24**

청구항 23에 있어서, 상기 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 상기 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬에 의해 수행되고, 상기 질환 조직은 암 조직인, 방법.

**청구항 25**

청구항 23에 있어서, 상기 돌연변이 유형은 미스센스 돌연변이이며, 여기서 상기 전사 강도는 RNAseq에 의해 측정되고, 상기 번역 강도는 선택적 반응 모니터링 질량 분광법에 의해 측정되고, 상기 선형적으로 알려진 분자 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 짧은 결실 및 삽입 다형성, 마이크로위성 마커, 짧은 탠덤 반복, 이형접합 서열, 다중 뉴클레오타이드 다형성 및 명명된 변이체 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

**청구항 26**

청구항 23에 있어서, 상기 고-친화성 결합체는 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖는, 방법.

**청구항 27**

청구항 23에 있어서, 상기 환자 세포 또는 상용성 HLA-유형의 세포는 항원 제시 세포인, 방법.

**청구항 28**

청구항 27에 있어서, 상기 항원 제시 세포는 수지상 세포, 자연 살해 세포, 대식세포 또는 T 세포인, 방법.

**청구항 29**

청구항 23에 있어서, 상기 상용성 HLA-유형의 세포는 상기 질환 조직과 동일한 조직 유형을 갖는, 방법.

**청구항 30**

청구항 23에 있어서, 상기 고-친화성 결합체의 제시를 검증하는 단계는 상기 환자 세포 또는 상용성 HLA-유형의 세포의 표면상의 고-친화성 결합체의 결합을 검출하는 단계를 사용하는, 방법.

**청구항 31**

청구항 30에 있어서, 상기 고-친화성 결합체의 결합을 검출하는 단계는 상기 고-친화성 결합체에 결합하는 합성 결합체 또는 항체를 사용하는, 방법.

**청구항 32**

청구항 23에 있어서, 상기 면역치료 양상은 제조항 아데노바이러스, 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 또는 RNA인, 방법.

**청구항 33**

암 신생항원 제시를 개선하는 방법으로서,

환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 오믹스 데이터를 비교하여 환자의 복수의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정하는 단계;

상기 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도 및 선형적으로 알려진 분자 변이 중 적어도 하나에 의해 필터링하여 필터링된 네오에피토프를 수득하는 단계;

상기 필터링된 네오에피토프로부터 상기 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합체를 선택하는 단계;

상기 고-친화성 결합체에 특이적으로 결합하는 합성 결합체를 제조하는 단계;

환자 세포 또는 조직에 대한 상기 합성 결합체의 결합을 검출하는 단계; 및

상기 합성 펩타이드의 결합의 검증시 면역요법 양상에서 상기 고-친화성 결합체를 사용하는 단계  
를 포함하는, 방법.

**청구항 34**

청구항 33에 있어서, 상기 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 상기 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬에 의해 수행되고, 상기 질환 조직은 암 조직인, 방법.

**청구항 35**

청구항 33에 있어서, 상기 돌연변이 유형은 미스센스 돌연변이이며, 여기서 상기 전사 강도는 RNAseq에 의해 측정되고, 상기 번역 강도는 선택적 반응 모니터링 질량 분광법에 의해 측정되고, 상기 선형적으로 알려진 분자 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 짧은 결실 및 삽입 다형성, 마이크로위성 마커, 짧은 탠덤 반복, 이형접합 서열, 다중 뉴클레오타이드 다형성 및 명명된 변이체 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

**청구항 36**

청구항 33에 있어서, 상기 고-친화성 결합체는 상기 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖는, 방법.

**청구항 37**

청구항 33에 있어서, 상기 합성 결합체는 항체 또는 이의 단편, 또는 파지(phage) 디스플레이 또는 RNA 디스플레이로부터 수득된 펩타이드인, 방법.

**청구항 38**

청구항 33에 있어서, 상기 검출하는 단계는 상기 환자 세포 또는 조직상의 상기 합성 결합체의 광학적 검출을 포함하는, 방법.

**청구항 39**

청구항 38에 있어서, 상기 환자 세포 또는 조직은 생검(biopsy) 샘플에 배치되는, 방법.

**청구항 40**

청구항 33에 있어서, 상기 면역치료 양상은 재조합 아데노바이러스, 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 또는 RNA인, 방법.

**청구항 41**

청구항 15의 방법에 의해 제조된 핵산을 포함하는 재조합 바이러스.

**청구항 42**

청구항 41에 따른 재조합 바이러스를 포함하는 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원은 2015년 10월 12일자로 출원된 미국 가출원 제62/240487호를 우선권으로 주장한다.

[0002] 기술분야

[0003] 본 발명의 분야는 암 치료를 위한 치료 양상으로서의 유전적으로 변형된 바이러스이며, 특히 환자 특이적 HLA-매칭된 네오펜토프의 바이러스성 전달 및 발현에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 배경 기술은 본 발명을 이해하는 데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 여기에 제공된 임의의 정보가 선행 기술이거나 본원에 청구된 발명과 관련이 있다거나 또는 구체적으로 또는 암시적으로 언급된 임의의 공보가 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다.

[0005] 본원에 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 인용되도록 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다. 인용된 참고문헌에서의 용어의 정의 또는 사용이 일관성이 없거나 본원에 제공된 해당 용어의 정의와 상반되는 경우에는 본원에 제공된 해당 용어의 정의가 적용되며 참고문헌에서의 해당 용어의 정의는 적용되지 않는다.

[0006] 보다 최근에는, 유전적으로 변형된 바이러스를 이용한 면역요법이 다양한 암 치료를 위한 개념적으로 효과적이며 매력적인 방법이 되었다. 그러나, 다수의 과제가 해결되어야 한다. 예를 들어, 발현되는 적합한 항원의 선택은 무시할 수 없다(예를 들어 문헌[Nat Biotechnol. 2012 Jul 10;30(7):658-70] 참조). 더욱이, 빈번하게 발현되는 에피토프는 모든 환자에서 강한 중앙-방어적 면역 반응을 보장하지는 못한다. 또한, 환자는 대부분의 바이러스성 벡터에 대해 면역 반응을 일으키기 때문에 이전에 바이러스에 노출되어 있는 환자에서의 바이러스 사용을 배제하고 벡터 사용을 단일 용도로 제한할 것이다. 다른 바이러스들 중에서도, 아데노바이러스는 유전자 치료에 일반적으로 사용되지만(예를 들어 문헌[Oncotarget. 2015 Aug 21; 6(24):19976-89] 참조), 여전히 유사한 결점을 가지고 있다.

[0007] 면역원성을 감소시키기 위해, 유전적으로 변형된 아데노바이러스는 다중 백신 접종뿐만 아니라 면역원성을 감소시키기 위한 E2b 유전자 및 다른 후기 단백질의 결실에 의해 전형적으로 달성되는 아데노바이러스에 대한 기존의 면역성을 가진 개체에서의 백신 접종에도 적합한 것으로 보고되었다(예를 들어, WO 2009/006479 및 WO 2014/031178 참조). 더욱이, 이러한 특이적 결실로 인해, 이러한 유전적으로 변형된 바이러스는 복제가 불완전

하고 비교적 큰 재조합 화물(cargo)에 허용된다. 예를 들어, WO 2014/031178은 결장암에 대한 면역 반응을 제공하기 위해 CEA(결장직장 배아성 항원)를 발현시키는 유전적으로 변형된 바이러스의 용도를 기술한다. 이러한 바이러스를 사용하는 치료군에서 적어도 일부 결과 측정이 향상되었지만, 그럼에도 불구하고 여러 가지 단점이 남아있다. 다른 요인들 중에서도, 많은 종양에 공통적으로 나타나는 단일 발현된 항원은 의미있는 면역 반응을 일으키기에 충분하지 않을 수 있다. 또한, 면역 시스템이 환자마다 매우 다양하기 때문에, 단일 항원에 대한 예측가능성과 효능은 전형적으로 쉽게 알 수 없다.

[0008] 따라서, 다양한 암에 대한 면역요법의 다양한 시스템 및 방법이 당업계에 공지되어 있지만, 이들 모두 또는 거의 모두가 몇 가지 단점을 갖는다. 특히, 많은 암에서 비교적 다수의 네오에피토프를 고려할 때, 면역원성을 예측하는 네오에피토프의 파라미터는 아직 파악하기 힘들다. 이와 같이, 현재 알려진 시스템 및 방법은 네오에피토프-기반 면역요법에 대한 합리적인 설계 접근법을 제공하지 못한다. 따라서, 네오에피토프 선택 및 네오에피토프-기반 요법 생성을 위한 개선된 시스템 및 방법에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

**발명의 내용**

[0009] **발명의 요약**

[0010] 본 발명의 대상은, 합리적인 설계 접근법을 사용하여 네오에피토프가 동정된 환자와 관련하여 높은 특이성과 반응성을 갖는 네오에피토프를 동정하는 면역요법의 시스템, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이러한 고-신뢰도의 네오에피토프는 바람직하게는 유전적으로 조작된 복제 결핍 비-면역원성 바이러스(즉, 숙주가 바이러스에 노출된 후 숙주에서 바이러스에 대한 방어적 면역을 유도하지 않음) 또는 다른 발현 시스템을 통해 전달되어 면역 반응을 자극한다.

[0011] 본 발명의 대상 중 하나의 양태에서, 본 발명자들은 암- 및 환자-특이적 네오에피토프를 발현하도록 구성된 재조합 핵산을 생성하는 단계를 포함하는 면역요법을 사용하여 환자의 암을 치료하는 방법을 고찰한다. 가장 전형적으로 네오에피토프는 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합제이다. 또한, 이러한 방법에서 재조합 핵산은 발현된 네오에피토프를 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의해 제시되도록 유도하는 서열 요소를 포함하는 것으로 고려된다. 또 다른 단계에서, (예를 들어, 바이러스, 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 또는 RNA를 사용하여) 세포를 재조합 핵산으로 형질감염시켜 세포의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형 상에 암- 및 환자-특이적 네오에피토프를 발현 및 제시하도록 하며, 여기서 상기 형질감염 단계가 환자에서 수행되거나 또는 형질감염된 세포가 환자에게 투여된다.

[0012] 또한, 암- 및 환자-특이적 네오에피토프는 환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 옴믹스 데이터를 비교함으로써 동정되고 및/또는 암- 및 환자-특이적 네오에피토프는 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도, 및 선형적으로 알려진 분자 변이 중 적어도 하나에 의한 필터링에 의해 동정되는 것으로 생각된다. 가장 전형적으로, 고-친화성 결합제는 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖고 및/또는 환자의 HLA-유형은 드브루인(de Bruijn) 그래프를 사용하여 인-실리코(in-silico) 결정된다.

[0013] 상기 방법의 추가의 양태에서, 서열 요소는 리소솜성 표적화 서열, 엔도솜성 표적화 서열, 퍼옥시솜성 표적화 서열 또는 세포질 유지 서열이고, 재조합 핵산은 공동-자극(co-stimulatory) 분자를 코딩하는 서열 및/또는 체크포인트 억제제를 코딩하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 대상을 제한하는 것은 아니지만, 상기 세포는 전형적으로 환자의 면역 수용성 세포(competent cell) 또는 항원 제시 세포이며, 형질감염은 아데노바이러스를 사용하여 환자에서 수행될 수 있다. 또한, 이러한 방법은 프록시 세포(예를 들어, 이전에 환자 또는 HLA-상용성 동종 세포로부터 획득된 환자 세포)에서 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 네오에피토프의 제시를 검증하는 추가적인 단계를 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 대안적으로, 고려되는 방법은, 환자 암세포 또는 환자 암 조직에서, 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 네오에피토프의 제시를 검증하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 검증하는 단계는 네오에피토프에 결합하는 합성 결합제 또는 항체를 사용하여 수행될 수 있다.

[0015] 본 발명의 대상의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 옴믹스 데이터를 비교하여 환자의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정하는 단계를 포함하는 면역요법을 위한 재조합



핵산을 생성하는 방법을 고찰한다. 또 다른 단계에서, 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형이 동정되고, 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 네오에피토프의 결합 친화도가 결정된다. 그 후, 결합 친화도가 소정의 임계치 값보다 낮은 경우, 상기 네오에피토프는 추후 사용을 위해 선택된다. 상기 방법의 또 다른 단계에서, 제조합 핵산(예를 들어, 아데노바이러스성 발현 벡터)은 선택된 네오에피토프를 코딩하는 핵산 서열을 포함하도록 구성되며, 여기서 선택된 네오에피토프를 코딩하는 핵산 서열은 선택된 네오에피토프의 발현을 유도하는 프로모터의 통제하에 있다. 가장 전형적으로, 핵산 서열은 발현된 선택된 네오에피토프를 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의해 제시되도록 유도하는 서열 요소를 추가로 포함한다.

[0016] 이러한 방법에서, 일반적으로, 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬 (incremental synchronous alignment)에 의해 수행되고, 및/또는 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형이 드브루인 그래프를 사용하여 인-실리코 결정되는 것으로 고려된다. 또한, 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 네오에피토프의 결합 친화도는 인-실리코 결정되며, 여기서 소정의 임계치는 150 nM 미만인 것으로 고려된다.

[0017] 또한, 일반적으로, 제조합 핵산은 제2 네오에피토프를 코딩하는 제2 핵산 서열 및/또는 공동-자극 분자를 코딩하는 서열 및/또는 체크포인트 억제제를 코딩하는 서열을 추가로 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 적합한 서열 요소는 리소좀성 표적화 서열, 엔도좀성 표적화 서열, 피옥시좀성 표적화 서열 및/또는 세포질 유지 서열을 포함한다.

[0018] 따라서, 본 발명자들은 또한 환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 오믹스 데이터를 비교하여 환자의 복수의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정하는 단계를 포함하는 암-신생항원(neoantigen) 제시를 개선하는 방법을 고려한다. 또 다른 단계에서, 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프는 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도 및/또는 선형적으로 알려진 분자 변이에 의해 필터링되어 필터링된 네오에피토프를 수득한다. 또 다른 단계에서, 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합제는 필터링된 네오에피토프로부터 선택되고, 고-친화성 결합제는 환자 세포 또는 사용성 HLA-유형의 세포에서 발현된다. 또 다른 단계에서, 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 의한 고-친화성 결합제의 제시가 검증되고, 발현 및 제시의 검증시, 고-친화성 결합제는 면역 치료 양상으로 사용된다.

[0019] 가장 바람직하게는, 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬에 의해 수행되고, 질환 조직은 암 조직이다. 추가로 고려되는 양태에서, 돌연변이 유형은 미스센스 돌연변이이며, 여기서 상기 전사 강도는 RNAseq에 의해 측정되고, 상기 번역 강도는 선택적 반응 모니터링 질량 분광법에 의해 측정되고, 선형적으로 알려진 분자 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 짧은 결실 및 삽입 다형성, 마이크로위성 마커, 짧은 tandem 반복, 이형접합 서열, 다중 뉴클레오타이드 다형성 및 명명된 변이체 중 적어도 하나를 포함한다. 또한, 고-친화성 결합제는 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖는 것으로 고려된다. 또한, 환자 세포 또는 이러한 방법에서 상용성인 HLA-유형의 세포는 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포, 자연 살해 세포, 대식세포, T-세포)이고 및/또는 상용성 HLA-유형의 세포는 질환 조직과 동일한 조직 유형을 갖는 것으로 고려된다.

[0020] 고-친화성 결합제의 제시를 검증하는 단계는 전형적으로 (예를 들어, 합성 결합제 또는 고-친화성 결합제에 결합하는 항체를 통해) 환자 세포 또는 상용성 HLA-유형의 세포의 표면상의 고-친화성 결합제의 결합을 검출하는 단계를 사용한다. 또 다른 고려되는 양태에서, 면역 치료 양상은 제조합 아데노바이러스, 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 또는 RNA이다.

[0021] 본 발명의 대상의 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 또한 암-신생항원 제시를 개선시키는 방법을 고찰하며, 여기서 하나의 단계에서 환자의 질환 조직 및 건강한 조직으로부터의 오믹스 데이터를 비교하여 환자의 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프를 동정한다. 또 다른 단계에서, 질환-관련 환자-특이적 네오에피토프는 돌연변이 유형, 전사 강도, 번역 강도 및 선형적으로 알려진 분자 변이 중 적어도 하나에 의해 필터링되어 필터링된 네오에피토프를 수득하고, 환자의 HLA-유형의 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 및 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대한 고-친화성 결합제는 상기 필터링된 네오에피토프로부터 선택된다. 또 다른 단계에서, 고-친화성 결합제에 특이적으로 결합하는 합성 결합제가 제조되고, 환자 세포 또는 조직에 대한 합성 결합제의 결합이 검출된다. 합성 펩타이드의 결합이 검증되면, 고-친화성 결합제가 면역 치료 양상으로 사용된다.

[0022] 가장 바람직하게는, 오믹스 데이터를 비교하는 단계는 오믹스 데이터의 증분 동기식 정렬에 의해 수행되고, 질 환 조직은 암 조직이다. 추가로 고려되는 양태에서, 돌연변이 유형은 미스센스 돌연변이이며, 여기서 상기 전사 강도는 RNAseq에 의해 측정되고, 상기 번역 강도는 선택적 반응 모니터링 질량 분광법에 의해 측정되고, 선행적 으로 알려진 분자 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 짧은 결실 및 삽입 다형성, 마이크로위성 마커, 짧은 텐 덤 반복, 이형접합 서열, 다중 뉴클레오타이드 다형성 및 명명된 변이체 중 적어도 하나를 포함한다. 또한, 고-친화성 결합체는 적어도 1종의 MHC 클래스 I 하위-유형 또는 적어도 1종의 MHC 클래스 II 하위-유형에 대해 150 nM 미만의 친화도를 갖는 것으로 고려된다.

[0023] 합성 결합체는 바람직하게는 항체 또는 이의 단편, 또는 파지 디스플레이 또는 RNA 디스플레이로부터 수득된 펩 타이드이다. 또한, 검출 단계와 관련하여, 이러한 단계는 (예를 들어, 환자 세포 또는 조직이 생검 샘플에 배치 되는 경우) 환자 세포 또는 조직상의 합성 결합체의 광학적 검출을 포함할 것으로 예상된다. 전술한 바와 같이, 적합한 면역 치료 양상은 재조합 아데노바이러스, 바이러스성 발현 벡터, 박테리아성 발현 벡터, 효모 발현 벡 터, 또는 RNA를 포함한다.

[0024] 따라서, 다른 관점에서 볼 때, 본 발명자들은 또한 본원에서 고려되는 방법에 의해 생성된 핵산을 포함하는 재 조합 바이러스를 고려한다. 이러한 바이러스(또는 다른 발현 시스템)는 그 후 암 치료를 위한 약학 조성물에 포 함될 수 있다.

[0025] 본 발명의 대상의 다양한 목적, 특징, 양태 및 이점은 바람직한 구현예에 대한 하기의 상세한 설명으로부터 더 욱 명백해질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0026] 도 1a 및 1b는 인간 염색체, 대립형질 다양성(도 1a), 및 발현 및 막 위치(도 1b)상의 HLA-유형의 위치에 대한 예시적인 개략도이다.

도 2는 계산된 네오에피토프에 대한 필터링 결과를 나타내는 예시적인 플롯이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0027] 본 발명자들은 이제 바이러스성 벡터 또는 다른 발현 시스템을 사용하여 하나 이상의 환자- 및 암-특이적 항원 을 숙주에게 전달하여 치료 효과를 생성시키는 면역요법의 다양한 시스템, 조성물 및 방법을 발견하였다. 가장 전형적으로, 치료 효과는 항원을 운반하는 세포 또는 병원균에 대한 방어적 면역 반응이다. 따라서, 본 발명의 대상 중 특히 고려되는 일 양태에서, 암으로 진단된 개체의 환자- 및 암-특이적 네오에피토프는 바람직하게는 환자의 종양 및 매칭된 정상(즉, 비-암) 조직 샘플로부터의 핵산 서열 정보를 사용하여 결정된다. 이러한 맥락 에서, 네오에피토프가 종양 및 매칭된 정상 샘플을 사용하여 동정되는 경우, 환자 샘플과 기준 게놈 간의 다른 관찰된 비-종양 관련 변화의 전부 또는 거의 모든 것이 배제된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 다른 관점에서 볼 때, 종양과 매칭된 정상 샘플 또는 동일한 환자를 비교하면 상대적으로 높은 빈도로 발생하는 모든 대인간 또는 환자-기준 간 변동을 제거하므로 많은 양의 잠재적 위양성 네오에피토프를 제거할 것이다.

[0028] 또한, 이렇게 동정된 환자- 및 암-특이적 네오에피토프의 적절한 제시 및 인식 가능성을 높이기 위해, (예를 들 어, 아래에서 보다 상세하게 기술되는 바와 같은 인-실리코 예측을 사용하여) 환자의 특정 HLA-유형을 결정하고 동정된 네오에피토프의 결합 친화도를 상기 결정된 HLA-유형에 대해 인-실리코 시험한다. 가장 전형적으로, HLA-유형 결정은 적어도 3종의 MHC-I 하위-유형(예컨대, HLA-A, HLA-B, HLA-C) 및 적어도 3종의 MHC-II 하위-유형(예컨대, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR)을 포함하며, 여기서 바람직하게는 각각의 하위-유형은 적어도 4-자리 깊 이(4-digit depth)로 결정된다. 그런 다음 이렇게 동정된 고친화도 결합체에 대한 서열은 각각의 상응하는 핵산 서열로 역-번역되어, 그 후, 바이러스 감염 후 숙주 세포에서의 발현을 위한 하나 이상의 조절 서열의 제어하에 재조합 발현 시스템(예컨대 아데노바이러스 Ad5[E1-E2b-]) 내로 클로닝된다. 또한, 바람직한 발현 시스템은 고 친화도를 가지고 있는 발현된 네오에피토프를 MHC-I 및/또는 MHC-II 하위-유형으로 유도하게 할 네오에피토프 서열(들)과 관련하여 하나 이상의 서열 요소를 포함할 것이다.

[0029] 따라서, 재조합 바이러스 또는 다른 발현 시스템이, 단지 네오에피토프에 대해 높은 친화도를 갖도록 확립된 HLA-제시에 적합할 뿐만 아니라 HLA-제시를 향하는 진정한 환자- 및 암-특이적 네오에피토프의 세포 내 발현을 유도하고, 이는 또한 높은 예측 가능성을 갖는 면역 반응을 생성하여 숙주 내 종양에 대한 치료학적으로 효과적인 면역 반응을 유도할 것으로 기대된다.

[0030] 종양에 대한 치료학적으로 유효한 면역 반응의 기회를 더욱 증가시키기 위해, 네오에피토프는 하기에 더 상세히 논의되는 바와 같이 다양한 방식으로 발현 및 제시를 위해 시험될 수 있다. 시험관내에서 만족스런 시험을 하게 되면, 네오에피토프는, 전형적으로 환자내 세포에서의 발현에 의해 생체내에서 치료제로서 사용될 수 있다. 물론, 다수의 네오에피토프가 본원에 제시된 교시와 관련하여 사용될 수 있으며, 특히 바람직한 양태에서, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 상이한 네오에피토프가 사용될(예를 들어, 동일한 재조합 바이러스 또는 별개의 바이러스로 인코딩될) 것이라는 점에 유의해야 한다. 마지막으로, 발현 시스템은 네오에피토프가 발현되는 세포 환경 내에서 면역 반응을 지지하는 단백질을 코딩하는 부가적인 서열을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 적합한 단백질은 면역 자극성 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 또는 IL-15 초작용제(superagonist) 등), 체크포인트 억제제(예를 들어, CTLA-4 또는 PD1 신호전달 억제제) 및/또는 공동-자극 분자(예를 들어, CD80, CD86 등)를 포함한다.

[0031] **네오에피토프의 선택**

[0032] 네오에피토프는 고유한 종양 특이적 항원을 생성하는 종양 세포에서 무작위 돌연변이를 발현한 것을 특징으로 할 수 있다. 따라서, 다른 관점에서 볼 때, 네오에피토프는 침묵 및 다른 비-연관 돌연변이를 제거시키는 제1 내용 필터로서 작용할 수 있는 돌연변이의 유형(예컨대 결실, 삽입, 전환, 전이, 전좌) 및 영향(예컨대 넌센스(non-sense), 미스센스, 프레임 이동 등)을 고려하여 식별할 수 있다. 또한, 네오에피토프 서열은 비교적 짧은 길이(예컨대 7 내지 11mer)의 서열 신장으로 정의될 수 있으며, 여기서 이러한 신장은 아미노산 서열의 변화(들)를 포함할 것이라는 점을 이해해야 한다. 가장 전형적으로, 변화된 아미노산은 중앙 아미노산 위치 또는 그 근처에 있을 것이다. 예를 들어, 전형적인 네오에피토프는 A<sub>4</sub>-N-A<sub>4</sub>, 또는 A<sub>3</sub>-N-A<sub>5</sub>, 또는 A<sub>2</sub>-N-A<sub>7</sub>, 또는 A<sub>5</sub>-N-A<sub>3</sub>, 또는 A<sub>7</sub>-N-A<sub>2</sub>의 구조를 가질 수 있으며, 여기서 A는 단백질생성 아미노산이고 N은 변화된 아미노산(야생형 또는 매칭된 정상군에 대해)이다. 예를 들어, 본원에서 고려되는 네오에피토프 서열은 비교적 짧은 길이(예컨대 5 내지 30mer, 보다 전형적으로 7 내지 11mer 또는 12 내지 25mer)의 서열 신장을 포함하며, 여기서 이러한 신장은 아미노산 서열의 변화(들)를 포함한다.

[0033] 따라서, 단일 아미노산 변화가, 변화된 아미노산의 위치에 따라, 변화된 아미노산을 포함하는 다수의 네오에피토프 서열에 제시될 수 있음을 이해해야 한다. 유리하게는, 이러한 서열 가변성은 네오에피토프의 다중 선택을 가능하게 하여 하나 이상의 바람직한 형질(예컨대 환자 HLA-유형에 대한 가장 높은 친화도, 가장 높은 구조적 안정성 등)을 기초로 선택될 수 있는 잠재적으로 유용한 표적의 수를 증가시킨다. 가장 전형적으로, 네오에피토프는 2 내지 50개의 아미노산, 보다 전형적으로는 5 내지 30개의 아미노산, 가장 전형적으로는 9 내지 15개의 아미노산의 길이를 갖도록 계산되며, 변화된 아미노산은 바람직하게는 중앙에 위치하거나 그렇지 않으면 MHC와의 결합을 향상시키는 방식으로 위치한다. 예를 들어, 에피토프가 MHC-I 복합체에 의해 제공되는 경우, 전형적인 네오에피토프 길이는 약 8 내지 11개의 아미노산이고, MHC-II 복합체를 통해 제시된 전형적인 네오에피토프 길이는 약 13 내지 17개의 아미노산을 가질 것이다. 용이하게 이해되는 바와 같이, 네오에피토프에서의 변화된 아미노산의 위치는 중심이 아니기 때문에, 실제 펩타이드 서열 및 네오에피토프의 실제 위상은 상당히 다를 수 있다.

[0034] 물론, 네오에피토프의 동정 또는 발견은 새로운 생검, 동결 또는 달리 보존된 조직 또는 세포 샘플, 순환형 종양 세포, 엑소솜, 다양한 체액(및 특히 혈액)을 비롯한 다양한 생물학적 물질로 시작될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 적절한 옴믹스 분석 방법은 핵산 시퀀싱, 특히 DNA 상에서 작동하는 NGS 방법(예를 들어, 일루미나 시퀀싱, 이온 토렌트 시퀀싱, 454 파이로시퀀싱, 나노기공 시퀀싱 등), RNA 시퀀싱(예를 들어, RNAseq, 역전사 기반 시퀀싱 등), 및 단백질 시퀀싱 또는 질량 분광학 기반 시퀀싱(예를 들어, SRM, MRM, CRM 등)을 포함한다.

[0035] 이와 같이, 특히 핵산 기반 시퀀싱의 경우, 종양 조직의 높은 처리량의 게놈 시퀀싱이 특히 네오에피토프의 신속한 동정을 허용할 것이라는 점을 인식해야 한다. 그러나, 이렇게 획득된 서열 정보가 표준 참조와 비교되는 경우, 이중접합뿐만 아니라 정상적으로 발생하는 환자 간 변화(예를 들어, SNP, 짧은 삽입-결실(indel), 다른 반복 횟수 등에 기인함)가 비교적 많은 수의 잠재적인 위양성 네오에피토프를 초래한다. 결과적으로, 동정된 네오에피토프 중 많은 수가 성공적인 면역 접종 전략의 후보자가 될 수는 없을 것이다. 특히, 환자의 종양 샘플이 동일한 환자의 매칭된 정상(즉, 비-종양) 샘플과 비교되는 경우, 이러한 부정확성은 제거될 수 있다.

[0036] 본 발명의 대상 중 하나의 특히 바람직한 양태에서, DNA 분석은 종양 및 매칭된 정상 샘플 둘 다의 전체 게놈 시퀀싱 및/또는 엑손 시퀀싱(전형적으로 적어도 10x, 보다 전형적으로는 적어도 20x의 커버리지(coverage) 깊이에서)에 의해 수행된다. 대안적으로, DNA 데이터는 또한 이전의 서열 결정으로부터 이미 확립된 서열 기록(예를

들어, SAM, BAM, FASTA, FASTQ 또는 VCF 파일)으로부터 제공될 수도 있다. 따라서, 데이터 세트는 처리되지 않거나 처리된 데이터 세트를 포함할 수 있고, 예시적인 데이터 세트는 BAMBAM 포맷, SAMBAM 포맷, FASTQ 포맷 또는 FASTA 포맷을 갖는 것들을 포함할 수 있다. 그러나, 데이터 세트가 BAMBAM 포맷 또는 BAMBAM 디프(diff) 대상으로 제공되는 것이 특히 바람직하다(예를 들어, US2012/0059670A1 및 US2012/0066001A1 참조). 또한, 데이터 세트는 동일한 환자의 종양 및 매칭된 정상 샘플을 반영하여 환자 및 종양 특이적 정보를 얻는다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 종양을 유발하지 않는 유전적 배선 변이(예를 들어, 침묵 돌연변이, SNP 등)가 배제될 수 있다. 물론, 종양 샘플은 초기 종양, 치료 시작시 종양, 재발성 종양 또는 전이 부위 등에서 유래될 수 있다는 것을 인식해야 한다. 대부분의 경우, 환자의 매칭된 정상 샘플은 종양과 동일한 조직 유형의 혈액 또는 비-질환 조직일 수 있다.

[0037] 마찬가지로, 서열 데이터의 컴퓨터 분석은 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 그러나, 가장 바람직한 방법에서, BAM 파일 및 BAM 서버를 사용하여 예를 들어 US 2012/0059670A1 및 US 2012/0066001A1에 개시된 바와 같이 종양 및 정상 샘플의 위치-유도 동시 정렬에 의해 인-실리코로 분석된다. 이러한 분석은 위양성 네오에피토프를 유리하게 감소시키고 메모리 및 계산 자원에 대한 요구를 상당히 감소시킨다.

[0038] 컴퓨터에 지시된 임의의 언어는 서버, 인터페이스, 시스템, 데이터베이스, 에이전트, 피어(peer), 엔진, 컨트롤러, 또는 개별적으로 또는 집합적으로 작동하는 기타 유형의 컴퓨팅 장치를 포함하는 컴퓨팅 장치들의 임의의 적절한 조합을 포함하도록 판독되어야 한다는 점에 유의해야 한다. 컴퓨팅 장치는 유형의(tangible) 비-일시적인 컴퓨터 판독가능한 저장 매체(예를 들어, 하드 드라이브, 솔리드 스테이트 드라이브, RAM, 플래시, ROM 등) 상에 저장된 소프트웨어 명령을 실행하도록 구성된 프로세서를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 소프트웨어 명령은 바람직하게는 개시된 장치와 관련하여 후술되는 바와 같은 역할, 책임 또는 다른 기능을 제공하도록 컴퓨팅 장치를 구성한다. 또한, 개시된 기술은 프로세서로 하여금 컴퓨터-기반 알고리즘, 프로세스, 방법 또는 다른 명령들의 구현과 관련된 개시된 단계들을 실행하게 하는 소프트웨어 명령들을 저장하는 비-일시적인 컴퓨터 판독가능한 매체를 포함하는 컴퓨터 프로그램 제품으로서 구현될 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 다양한 서버, 시스템, 데이터베이스, 또는 인터페이스는 아마도 HTTP, HTTPS, AES, 공개-개인 키 교환, 웹 서비스 API, 공지의 금융 거래 프로토콜 또는 다른 전자 정보 교환 방법 기반의 표준화된 프로토콜 또는 알고리즘을 사용하여 데이터를 교환한다. 장치간 데이터 교환은 패킷-교환 네트워크, 인터넷, LAN, WAN, VPN, 또는 다른 유형의 패킷 교환 네트워크; 회선 교환 네트워크; 셀 교환 네트워크; 또는 다른 유형의 네트워크를 통해 수행될 수 있다.

[0039] 컴퓨터 분석을 더욱 용이하게 하고 네오에피토프 기반 치료법의 치료 결과를 개선시키기 위해, 네오에피토프 서열은 MHC-1 결합(예를 들어, 적어도 5 내지 6개의 아미노산)에 필요한 최소 크기 및 MHC-1 결합에 유리한 최대 크기(예를 들어, 9 내지 11개의 아미노산)를 갖는 비교적 작은 단편 또는 MHC-II 결합에 필요한 최소 크기(예를 들어, 적어도 12 내지 14개의 아미노산) 및 MHC-II 결합에 유리한 최대 크기(예를 들어, 19 내지 21개의 아미노산)를 갖는 비교적 작은 단편으로 한정될 것이다. 따라서, 네오에피토프는 전형적으로 MHC-I 결합에 대해 7 내지 12개의 아미노산 길이 및 MHC-II 결합에 대해 14 내지 20개의 아미노산 길이를 가질 것이다. 예를 들어, 적합한 네오에피토프는 변화된 아미노산을 포함하는 9개의 아미노산 길이(여기서 이들은 MHC-I에 결합하는 것으로 결정된다) 및 변화된 아미노산을 포함하는 20개의 아미노산 길이(여기서 이들은 MHC-II에 결합하는 것으로 결정된다)를 가질 수 있다.

[0040] 상이한 관점에서 볼 때, 5 내지 25개 아미노산의 소정의 길이를 가지며 적어도 하나의 변화된 아미노산을 포함하는 서열의 환자- 및 암-특이적인 인-실리코 수집을 확립할 수 있다. 이러한 수집은 전형적으로 각각의 변화된 아미노산에 대해, 변화된 아미노산의 위치가 동일하지 않은 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 또는 6개 이상의 구성원을 포함할 것이다. 그런 다음, 이러한 수집은 하기에 보다 상세히 설명되는 바와 같이(예를 들어, 하위-세포 위치, 전사/발현 수준, MHC-1 및/또는 II 친화도 등에 의해) 추가의 여과를 위해 사용될 수 있다.

[0041] 예를 들어, 종양 및 매칭된 정상 서열 데이터에 동기식 위치 유도 분석법을 사용하여, 본 발명자들은 이전에 BLCA, BRCA, CESC, COAD, DLBC, GBM, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LAML, LGG, LIHC, LUAD, LUSC, OV, PRAD, READ, SARC, SKCM, STAD, THCA, 및 UCEC과 같은 암 유형을 포함하는 각종의 암 및 환자로부터 다양한 암 네오에피토프를 동정하였다. 모든 네오에피토프 데이터는 국제 출원 제PCT/US16/29244호에서 찾을 수 있으며, 이를 본원에 참고로 인용한다.

[0042] 암의 유형과 단계에 따라, 네오에피토프의 수가 면역 요법에 사용하기에 실용적인 숫자를 훨씬 초과할 수 있음

에 유의해야 한다. 더욱이, 이렇게 동정된 모든 네오에피토프가 반드시 환자에서 치료학적으로 효과적인 반응을 유도하는 것은 아니다. 실제로, 일부의 네오에피토프만이 면역 반응을 생성한다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 치료학적으로 바람직한 반응의 가능성을 높이기 위해, 네오에피토프를 추가로 필터링할 수 있다. 물론, 다운스트림 분석은 본원에서 제시된 방법의 목적을 위한 침묵 돌연변이를 고려할 필요가 없음을 이해해야 한다. 그러나, 바람직한 돌연변이 분석은 돌연변이 유형(예를 들어 결손, 삽입, 전환, 전이, 전좌)뿐만 아니라 돌연변이 영향(예를 들어 넌센스, 미스센스 등)에 대한 정보를 제공하며, 침묵 돌연변이를 제거시키는 제1 내용 필터로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 네오에피토프는 돌연변이가 프레임-이동, 넌센스 및/또는 미스센스 돌연변이인 추가 고려를 위해 선택될 수 있다.

[0043] 추가적인 필터링 접근법에서, 네오에피토프는 또한 하위-세포 위치 파라미터에 대한 상세한 분석 대상이 될 수 있다. 예를 들어, 네오에피토프 서열은 네오에피토프가 멤브레인 관련 위치를 갖는 것으로 동정된 경우(예를 들어, 세포의 세포막 외부에 위치하는 경우) 및/또는 인-실리코 구조 계산에 의해 네오에피토프가 용매에 노출되거나 구조적으로 안정한 에피토프(예컨대 문헌[J Exp Med 2014])를 나타낼 수 있는 경우에 추가적인 고찰을 위해 선택될 수 있다.

[0044] 네오에피토프를 필터링하는 것과 관련하여, 네오에피토프는 네오에피토프가 실제로 발현되는 것으로 밝혀진 옴믹스(또는 다른) 분석에 사용하기에 특히 적합하다고 고려된다. 네오에피토프의 발현 및 발현 수준의 동정은 당업계에 공지된 모든 방식으로 수행될 수 있으며, 바람직한 방법은 정량적 RNA(hnRNA 또는 mRNA) 분석 및/또는 정량적 프로테오믹스 분석을 포함한다. 가장 일반적으로, 네오에피토프를 포함하는 것에 대한 임계치 수준은 상응하는 매칭된 정상 서열의 발현 수준의 적어도 20%, 보다 전형적으로 50%의 발현 수준이 될 것이므로, (네오)에피토프가 면역 시스템에 적어도 잠재적으로 "가시적"인 것으로 보인다. 따라서, 옴믹스 분석은 또한 유전자 발현 분석(전사체 분석(transcriptomic analysis))을 포함하여 돌연변이가 있는 유전자 발현 수준을 동정하는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0045] 당해 분야에 공지된 전사체 분석의 수많은 방법이 존재하며, 공지된 모든 방법이 본원에서 사용에 적합한 것으로 간주된다. 예를 들어, 바람직한 물질은 mRNA 및 1차 전사체(hnRNA)를 포함하고, RNA 서열 정보는 동일한 환자의 종양 샘플 및 매칭된 정상(건강한) 샘플로부터 차례로 얻어지는 역전사된 폴리 A<sup>+</sup>-RNA로부터 얻을 수 있다. 마찬가지로, 폴리 A<sup>+</sup>-RNA는 전형적으로 전사체의 표현으로서 바람직하지만, 다른 형태의 RNA(hn-RNA, 비-폴리아데닐화된 RNA, siRNA, miRNA 등)도 본원에서 사용에 적합한 것으로 간주됨을 유의해야 한다. 바람직한 방법은 정량적 RNA(hnRNA 또는 mRNA) 분석 및/또는 정량적 프로테오믹스 분석, 특히 예를 들어 RNAseq 등을 포함한다. 다른 양태에서, 다양한 대안적인 방법(예를 들어, 고상 하이브리드화-기반 방법)이 또한 적합한 것으로 여겨지지만, RNA 정량화 및 시퀀싱은 qPCR 및/또는 rtPCR 기반 방법을 사용하여 수행된다. 또 다른 관점에서 볼 때, 전사체 분석은 암- 및 환자-특이적 돌연변이를 갖는 유전자를 동정하고 정량화하기 위해 (단독으로 또는 게놈 분석과 함께) 적합할 수 있다.

[0046] 유사하게, 프로테오믹스 분석은 네오에피토프의 RNA의 실제적인 번역을 확인하기 위해 다양한 방식으로 수행될 수 있으며, 프로테오믹스 분석의 모든 공지된 방식이 본원에서 고려된다. 그러나, 특히 바람직한 프로테오믹스 방법은 항체-기반 방법 및 질량 분광분석 방법을 포함한다. 또한, 프로테오믹스 분석은 단백질 그 자체에 관한 정성적 또는 정량적 정보를 제공할 뿐만 아니라, 단백질이 촉매 작용 또는 다른 기능적 활성을 갖는 단백질 활성 데이터도 또한 포함할 수 있음을 주목해야 한다. 프로테오믹스 분석을 수행하기 위한 하나의 예시적인 기술은 본원에 참고로 인용된 US 7473532에 기재되어 있다. 단백질 발현의 더 적절한 동정 및 심지어 정량화의 또 하나의 적합한 방법은 다양한 질량분광 분석(예를 들어, 선택적 반응 모니터링(SRM), 다중 반응 모니터링(MRM) 및 연속 반응 모니터링(CRM))을 포함한다.

[0047] 필터링의 또 다른 양태에서, 네오에피토프는 인간-동일 서열의 사용을 피하기 위해 (예를 들어, 환자 또는 환자 집단)의 공지된 인간 서열을 함유하는 데이터베이스와 비교될 수 있다. 또한, 필터링은 SNP가 종양 및 매칭된 정상 서열 둘 다에 존재하는 환자의 SNP로 인한 네오에피토프 서열의 제거를 포함할 수도 있다. 예를 들어, dbSNP(단일 뉴클레오티드 다형성 데이터베이스(Single Nucleotide Polymorphism Database))는 국립 인간 게놈 연구소(NHGRI)와 공동으로 국립 생물공학 정보 센터(NCBI)가 개발하고 호스팅한 여러 종에 걸친 유전적 변이에 대한 무료 공개 아카이브이다. 데이터베이스의 명칭이 한 종류의 다형성(단일 뉴클레오티드 다형성(SNP))의 집합만을 의미하지만, 실제로는 (1) SNP, (2) 짧은 결실 및 삽입 다형성(인델/DIP), (3) 마이크로위성(microsatellite) 마커 또는 짧은 tandem 반복(STR), (4) 다중 뉴클레오티드 다형성(MNP), (5) 이중접합 서열, 및 (6) 명명된 변이체와 같은 비교적 광범위한 분자적 변이를 포함한다. dbSNP는 명백하게도 중성 다형성, 공지

된 표현형에 상응하는 다형성, 및 불변 영역을 수용한다. 상기한 바와 같은 데이터베이스 및 다른 필터링 옵션을 사용하여, 환자 및 중앙 특이적 네오에피토프를 필터링하여 이들 공지된 서열을 제거함으로써, 실질적으로 감소된 위양성을 갖는 다수의 네오에피토프 서열을 갖는 서열 세트를 산출할 수 있다.

[0048] 덜 바람직한 양태에서, 암- 및 환자-특이적 네오에피토프는 보다 일반적인 네오에피토프로 보강되거나 심지어 대체될 수 있다. 예를 들어, 고려되는 일반적인 네오에피토프는 다양한 암 관련 및 암 특이적 항원(예를 들어, 적어도 0.1%, 또는 적어도 0.5%, 또는 적어도 1%, 또는 적어도 5%의 빈도를 갖는)을 포함한다. 대안적으로, 적합한 네오에피토프는 또한 소정의 최소 빈도(예를 들어, 적어도 0.1%, 또는 적어도 0.5%, 또는 적어도 1%, 또는 적어도 5%)로 적어도 1종의 특정 MHC 하위-유형으로서 동정되는 것들을 포함할 수 있다. 동일하게 관련된 네오에피토프, 방법 및 시스템의 다른 양태는 본원에 참고로 인용된 공동 소유의 국제 출원 PCT/US16/26798 및 PCT/US16/29244에 개시되어 있다.

[0049] **HLA 결정 및 매칭**

[0050] 인간 주요 조직적합성 복합체(MHC) 또는 인간 백혈구 항원(HLA) 복합체는 공동-발현되는 고도의 다형성 세포 표면 항원의 2개의 별개의 부류를 코딩하는 적어도 7개의 좌위를 포함하는 많은 유전 좌위를 포함한다. 이들 분자는 처리된 펩타이드와 결합하여 순환하는 T-세포 림프구에 제시되며 세포성 및 체액성 면역 반응에 중요한 역할을 한다. 결과적으로, 면역 요법의 맥락에서, 네오에피토프가 MHC 복합체에 결합되고 제시될 때 네오에피토프가 보다 효과적인 것이라는 것은 너무나도 분명하다.

[0051] 그러나 불행하게도 MHC 복합체는 매우 다양하고 다른 환자들 사이에서 뚜렷이 나타나 네오에피토프 결합 예측을 어렵게 만든다. 클래스 I 분자, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C, 및 클래스 II 분자, DR, DQ 및 DP는 염색체 6p21.31의 짧은 팔(arm)의 약 3500 kbp 세그먼트로 암호화된다(도면 1a 및 1b에 개략적으로 도시되어 있다). 클래스 I 항원은 모든 핵생성 세포에 존재하며, 여기서 이는 세포 표면 헤테로다имер로 작용하여 주로 세포질(바이러스 및 자가 펩타이드)에서 유래된 펩타이드를 순환하는 CD8+ T 세포에 제공한다. 클래스 I 세포 표면 헤테로다имер는 하나의 고도의 다형성 알파 사슬을 가지며, 가변 잔기는 펩타이드 결합 틈새 내에서 클러스터링되며, 이는 유전자의 엑손 2 및 3에 의해 암호화된다. HLA 클래스 I 분자는 또한 살해 면역글로불린 수용체(KIR)의 리간드로서 작용하여 자연 살해(NK) 세포의 세포독성 활성을 조절한다. HLA 클래스 II 분자는 B 세포, 대식세포 및 다른 항원 제시 세포의 표면에서 발견되며, 여기서 알파-베타 헤테로다имер는 순환하는 CD4+ T 세포에 주로 외인성으로 유도된 펩타이드(박테리아 및 화학 독소)를 제공한다. 클래스 II 분자에서, 베타 사슬은, 유전자의 엑손 2에 국한되어 펩타이드-결합 틈새를 암호화하는 고도의 다형성 영역을 함유한다.

[0052] 따라서, 효과적인 결합 및 제시는 환자의 네오에피토프 서열과 특정 HLA-유형의 조합된 기능임을 이해해야 한다. 가장 전형적으로, HLA-유형 결정은 적어도 3종의 MHC-I 하위-유형(예컨대, HLA-A, HLA-B, HLA-C) 및 적어도 3종의 MHC-II 하위-유형(예컨대, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR)을 포함하며, 여기서 바람직하게는 각각의 하위-유형은 적어도 4-자리 깊이로 결정된다. 그러나, 더 큰 깊이(예를 들어, 6자리, 8자리)도 또한 본원에서 고려된다.

[0053] (공지의 화학 또는 인-실리코 결정을 사용하여) 일단 환자의 HLA-유형이 확인되면, HLA-유형에 대한 구조 용액을 데이터베이스에서 계산하거나 얻은 다음, HLA 구조 용액에 대한 (전형적으로 필터링된) 네오에피토프의 결합 친화력을 결정하기 위해 인-실리코 도킹(docking) 모델에 사용한다. 하기에 추가로 논의되는 바와 같이, 결합 친화력을 결정하기에 적합한 시스템은 NetMHC 플랫폼을 포함한다(예를 들어 문헌[Nucleic Acids Res. 2008 Jul 1; 36(Web Server issue): W509-W512.] 참조). 그런 다음, 환자의 MHC-I/II 하위-유형에 대한 지식과 함께, 사전 결정된 HLA-유형에 대해 높은 친화도(예를 들어, 100 nM 미만, 75 nM 미만, 50 nM 미만)를 갖는 네오에피토프가 요법 생성을 위해 선택된다.

[0054] HLA 결정은 당해 분야에 잘 공지된 습식-화학에서의 다양한 방법을 사용하여 수행될 수 있고, 이들 방법 모두는 본원에서의 사용에 적합한 것으로 간주된다. 그러나, 특히 바람직한 방법에서, HLA-유형은 또한 하기에 보다 상세히 도시된 바와 같이 공지된 및/또는 공통 HLA-유형의 대부분 또는 전부를 함유하는 참조 서열을 사용하여 인-실리코의 오픈믹스 데이터로부터 예측될 수 있다.

[0055] 예를 들어, 본 발명의 대상에 따른 하나의 바람직한 방법에서, 염색체 6p21.3(또는 HLA 대립 형질이 발견되는 곳/근처에 있는 임의의 다른 위치)에 매핑하는 비교적 다수의 환자 서열 관독이 데이터베이스 또는 시퀀싱 기계에 의해 제공된다. 가장 전형적으로, 서열 관독은 약 100 내지 300개의 염기의 길이를 가지며 관독 품질, 정렬 정보, 배향, 위치 등을 포함한 메타데이터를 포함한다. 예를 들어 적절한 포맷에는 SAM, BAM, FASTA, GAR 등이

포함된다. 본 발명의 대상을 제한하는 것은 아니지만, 일반적으로 환자 서열 판독은 적어도 5x, 보다 전형적으로는 적어도 10x, 더욱 전형적으로는 적어도 20x, 가장 일반적으로는 적어도 30x의 커버리지의 깊이를 제공하는 것이 바람직하다.

[0056] 환자 서열 판독에 추가하여, 고려된 방법은 공지된 별개의 HLA 대립형질의 다수의 서열을 포함하는 하나 이상의 참조 서열을 추가로 이용한다. 예를 들어, 전형적인 참조 서열은 상기 HLA-유형의 다중 HLA-대립형질을 갖는 적어도 하나의 HLA-유형의 서열 단편을 포함하는 합성(상응하는 인간 또는 다른 포유동물 대응물을 갖지 않음) 서열일 수 있다. 예를 들어, 적합한 참조 서열은 HLA-A의 적어도 50개의 상이한 대립형질에 대한 공지된 게놈 서열의 집합을 포함한다. 대안적으로, 또는 부가 적으로, 상기 참조 서열은 또한 HLA-A의 적어도 50개의 상이한 대립형질에 대한 공지된 RNA 서열의 집합을 포함할 수 있다. 물론, 이하에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 참조 서열은 HLA-A의 50개의 대립형질에 한정되지 않고 HLA-유형 및 대립형질의 수/조성에 대한 대안적인 조성물을 가질 수 있다. 가장 전형적으로, 참조 서열은 컴퓨터 판독가능한 포맷으로 존재하고 데이터베이스 및 다른 데이터 저장 장치로부터 제공될 것이다. 예를 들어, 적합한 참조 서열 포맷은 FASTA, FASTQ, EMBL, GCG 또는 GenBank 포맷을 포함하고, 공용 데이터 저장소(예컨대 국제 면역유전학 정보 시스템(IMG) 또는 대립형질 빈도 네트워크 데이터베이스(The Allele Frequency Net Database), EUROSTAM, www.allelefrequencys.net)의 데이터로부터 직접 얻거나 구축할 수 있다. 대안적으로, 참조 서열은 또한 대립형질 빈도, 종족 대립형질 분포, 공통 또는 희귀 대립형질 유형 등과 같은 하나 이상의 사전 결정된 기준에 기초한 개별적인 공지의 HLA-대립형질로부터 구축될 수 있다.

[0057] 참조 서열을 사용하여, 환자 서열 판독은 이제 드브루인(de Bruijn) 그래프를 통해 스레딩되어(threaded) 가장 적합한 대립형질을 동정할 수 있다. 이러한 맥락에서, 각 개인은 각각의 HLA-유형에 대해 2개의 대립형질을 갖고 있으며 이러한 대립형질은 매우 유사하거나 어떤 경우에는 동일할 수도 있다는 점에 주목해야 한다. 이러한 고도의 유사성은 전통적인 정렬 방식에 상당한 문제를 제기한다. 본 발명자들은 이제 HLA 대립형질 및 심지어 매우 밀접하게 관련된 대립형질이 드브루인 그래프가 상대적으로 작은 k-mer(전형적으로 10 내지 20개의 염기 길이를 가짐)로 판독된 서열을 분해함으로써 그리고 대립형질의 서열과 매칭되는 서열 판독의 k-mer에 기초하여 각각의 환자 서열 판독이 각각의 대립형질에 대한 투표("정량적 판독 지원")를 제공하는 가중 투표 과정을 구현함으로써 구성되는 접근법을 사용하여 해결될 수 있음을 발견하였다. 그런 다음, 대립형질에 대해 누적적으로 가장 높은 투표가 가장 가능성이 높게 예측된 HLA 대립형질을 나타낸다. 또한, 일반적으로 대립형질에 매칭되는 각각의 단편을 사용하여 대립형질의 전체적인 커버리지와 커버리지의 깊이를 계산하는 것이 바람직하다.

[0058] 특히 탑 히트(top hit) 중 많은 부분이 유사한 경우(예를 들어, 스코어의 상당 부분이 고도로 공유된 k-mer 세트의 경우) 스코어를 더 높이거나 세분화할 수 있다. 예를 들어, 스코어 정제는 현재의 탑 히트와 실질적으로 유사한(예를 들어, 99% 초과 또는 다른 소정의 값) 대립형질이 차후 고려사항으로부터 제거되는 가중치 방식을 포함할 수 있다. 현재의 탑 히트에 의해 사용되는 k-mer에 대한 카운트는 인자(예컨대, 0.5)에 의해 재-가중되고, 각 HLA 대립형질에 대한 스코어는 이들 가중된 카운트를 합산함으로써 재계산된다. 이러한 선택 과정은 새로운 탑 히트를 구하기 위해 반복된다. 이러한 방법의 정확성은 심지어 DNA에 존재하는 2개의 대립형질 중 때로는 단지 1개일 수 있는 종양에 의해 발견되는 대립형질을 동정할 수 있는 RNA 서열 데이터를 사용하여 더욱 개선될 수 있다. 고려된 시스템 및 방법의 또 다른 유리한 양태에서, DNA 또는 RNA, 또는 DNA와 RNA 둘 다의 조합을 처리하여 고도로 정확하고 종양 또는 혈액 DNA 또는 RNA로부터 유도될 수 있는 HLA 예측을 수행할 수 있다. 인-실리코 HLA 타이핑에서의 고정밀도에 대한 추가의 양태, 적합한 방법 및 고려사항은 본원에 참고로 인용된 국제 출원 제PCT/US16/48768호에 기재되어 있다.

[0059] 원하는 경우, 네오에피토프는 대립형질 빈도에 백만 개당 전사체를 곱하여 우도 스코어(likelihood score)를 얻기 위해 스코어를 매기거나 순위를 매길 수 있다. 이러한 스코어는 이어서 HLA 정보를 사용하여 추가로 보강될 수 있으며 환자의 HLA 유형에 대한 실제 결합 친화도를 위해 계산될 수 있다. 예를 들어, 예시적인 순위 포맷은 다음과 같을 수 있다:

> 254 NM\_001000.3 RPL39 Missense p.M29K A->T Normal: WIRMKTGNK, AF: 0.179104477612 TPM: 1023.96  
TPM\_MEDIAN: 7.35 LL: 183.395820896 netMHC: 242.96 Allele: HLA-A0301 WIRKKTGNK.

[0060]

[0061] 여기서, 파일은 FASTA 포맷의 파일이며 항목은 샘플 정보를 보고하는 '>' 문자로 시작한다. 다음 라인은 네오에피토프이다. 샘플 정보 라인에는 샘플 색인화에 사용되는 번호(예컨대 254), Refseq Gene ID(예컨대 NM\_001000.3), HUGO 일반 명칭(예컨대 RPL39), 변이체 분류(예컨대 미스센스), 단백질 변화(예컨대 p.M29K), 염기쌍 변화(예컨대 A->T), 정상 에피토프(예컨대 정상: WIRMKTGNK), 대립형질 빈도(예컨대 AF:

0.179104477612), 이러한 유전자에 대한 백만개 당 전사체(예컨대 TPM: 1023.96), 모든 유전자의 중간 발현 수준인 TPM\_MEDIAN(예컨대 TPM\_MEDIAN: 7.35), LL 스코어는 단지 AF × TPM(예컨대 LL: 183.395820896), netMHC 예측 결합 값(예컨대 netMHC: 242.96), 및 네오에피토프가 결합하는 특정 HLA 대립형질(예컨대 대립형질: HLA-A0301)가 포함된다. 이어서 다음 라인은 네오에피토프(예컨대 WIRKKTGNK)이다.

[0062] 일단 환자 및 종양 특이적 네오에피토프 및 HLA-유형이 확인되면, HLA에 네오에피토프를 도킹하고 예를 들어 NetMHC를 사용하여 최상의 결합제(예를 들어, 최저 KD 예컨대 500 nM 미만, 또는 250 nM 미만, 또는 150 nM 미만, 또는 50 nM 미만)를 결정하여 추가적인 컴퓨터 분석을 수행할 수 있다. 이러한 접근법은 환자 및 종양에 진정된 특정 네오에피토프를 동정할 뿐만 아니라 세포 상에 나타날 가능성이 가장 높고 치료 효과에 의해 면역 반응을 이끌어낼 가능성이 가장 큰 네오에피토프를 동정할 수 있음을 이해해야 한다. 물론, 이와 같이 동정된 HLA-매칭된 네오에피토프는 추가로 후술되는 바와 같이 페이로드(payload)로서 에피토프를 암호화하는 핵산을 바이러스 내에 포함시키기 전에 시험관내에서 생화학적으로 유효화될 수 있음을 이해해야 한다.

[0063] 물론, 환자의 HLA-유형과 환자- 및 암-특이적 네오에피토프의 매칭은 NetMHC 이외의 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 적합한 시스템에는 NetMHC II, NetMHCpan, IEDB 분석 자원(URL [immuneepitope.org](http://immuneepitope.org)), RankPep, PREDEP, SVMHC, Epipredict, HLABinding 및 기타(예컨대, 문헌[J Immunol Methods 2011; 374: 1-4] 참조)가 포함된다. 가장 높은 친화도를 계산할 때, 변형된 아미노산의 위치가 이동된 네오에피토프 서열의 수집(상술됨)이 사용될 수 있다는 점에 주목해야 한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 네오에피토프에 대한 변형은 N- 및/또는 C-말단 변형을 가함으로써 발현된 네오에피토프와 환자 HLA-유형의 결합을 더욱 증가시킴으로써 구현될 수 있다. 따라서, 네오에피토프는 특정 HLA-유형에 보다 잘 매칭되도록 동정되거나 추가로 변형된 상태의 원형일 수 있다.

[0064] 또한, 필요한 경우, 상응하는 야생형 서열(즉, 아미노산 변화가 없는 네오에피토프 서열)의 결합을 계산하여 높은 차등 친화도를 보장할 수 있다. 예를 들어, 네오에피토프와 이의 상응하는 야생형 서열 간의 MHC 결합에서 특히 바람직한 높은 차등 친화도는 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000배 등이다.

[0065] 도 2는 일련의 필터링 단계의 전형적인 결과를 예시적으로 도시한다. 여기서, 동기식 위치 유도 정렬에서 매칭되는 정상(즉, 동일한 환자의 비-질환 조직과 비교시)에 대한 삼중 네거티브 유방암 샘플의 전체 게놈 시퀀싱 분석은 종양 샘플에서 네오에피토프의 비교적 다수(약 18,000)를 나타냈다. 특히, 첫 번째 필터링 단계는 발현 강도를 기초로 동정된 모든 네오에피토프의 50% 이상을 제거했다. 여기서, 네오에피토프 서열은 매칭된 정상 샘플과 비교하여 20% 미만의 발현 수준으로 제거되었다. 나머지 서열을 인-실리코 분석하여 동일한 샘플의 단일 특이적 HLA-유형에 결합하는 서열(예를 들어 500 nM 미만의 친화도)을 결정하였다. 한 번 더 상당한 분율의 네오에피토프가 제거되었고 궁극적으로 모든 네오에피토프 중 단지 1.3%만이 사용에 적합한 것으로 밝혀졌다는 것에 주목해야 한다.

[0066] 이러한 분석은 각각의 HLA-유형이 종종 매우 유사한 대립형질을 가지고 있기 때문에 DNA 및/또는 RNA 시퀀싱 정보로부터의 HLA 결정에 특히 유리하며, 전통적인 정렬 방법은 일반적으로 서열이 높은 유사성 정도를 갖는 경우 중요한 분화능을 갖지 못한다는 점에 유의해야 한다. 또한, 이러한 분석은 유리하게는 전용 실험실 장비를 필요로 하지 않고 환자로부터 이미 얻어진 옴믹스 데이터를 시퀀싱하는 것으로부터 수행된다는 것을 이해해야 한다. 다른 관점에서 보면, 네오에피토프 발견, 필터링, HLA-유형 결정, 이렇게 동정된 네오에피토프를 환자의 특정 HLA 유형에 결합하는 것조차 모두 인-실리코에서 수행될 수 있다.

[0067] **바이러스 구성**

[0068] 바람직한 환자- 및 암-특이적 HLA 매칭된 네오에피토프를 선택하면, 재조합 핵산을 세포내 발현에 이어서 세포상의 네오에피토프의 제시를 위해 구성할 수 있다. 재조합 핵산은 네오에피토프가 MHC-I 및/또는 MHC-II 제공 경로로 유도되고 네오에피토프가 높은 친화도를 갖는 것으로 알려진 MHC 하위-유형으로 유도되도록 한 배열에서 하나 이상의 환자- 및 암-특이적 네오에피토프를 암호화하는 서열 부분을 포함한다. 이러한 표적화되고 이성적인 표현은 피하 전달에 의해 또는 보다 전형적으로는 하나 이상의 공동-자극 분자 및/또는 체크포인트 억제제의 발현에 의해 추가로 보강될 수 있는 보다 강력한 면역 반응을 생성하는 것으로 생각된다. 물론, 이러한 재조합 핵산 전달의 모든 방식이 적합하고 재조합 핵산이 DNA 백신, 재조합 바이러스 게놈 또는 형질전환 조성물에서 전달가능한 DNA 또는 RNA로서 제형화될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 당업계에 공지된 모든 발현 시스템(예를 들어, 세균 발현 시스템, 효모 발현 시스템, '누드(naked)' DNA 및 RNA 발현 시스템)은 본원에서의 사용에 적합한 것으로 간주된다는 점에 유념해야 한다.



[0069] 그러나, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 알파바이러스, 헤르페스 바이러스, 렌티바이러스 등을 포함하여 유전자 치료에서 이미 확립된 바이러스를 사용하는 것이 특히 바람직하다. 그러나, 다른 적절한 선택 중에서도, 아데노바이러스가 특히 바람직하다. 또한, 일반적으로, 바이러스는, 선택된 바이러스 단백질(예를 들어, E1, E3 단백질)의 표적화된 결실에 의해 전형적으로 달성되는 복제 결핍 및 비-면역원성 바이러스인 것이 더욱 바람직하다. 이러한 바람직한 특성은 E2b 유전자 기능을 결실시킴으로써 더욱 강화될 수 있으며, 최근에 보고된 바와 같이 유전자 변형된 인간 293 세포를 사용하여 높은 역가의 재조합 바이러스를 달성할 수 있다(예를 들어 문헌[J Virol 1998 Feb; 72(2): 926-933]). 가장 전형적으로, (바이러스 감염된 세포로부터의 발현을 위한) 원하는 핵산 서열은 당업계에 널리 공지된 적절한 조절 요소의 제어하에 있다.

[0070] 네오에피토프를 코딩하는 서열 부분의 통합과 관련하여, 다양한 네오에피토프가 다양한 방식으로 배열될 수 있고, 전사 또는 번역 단위가 전형적으로 프로테아제 절단 부위를 추가로 포함할 수 있는 짧은 링커(예를 들어, 4 내지 20개의 아미노산을 갖는 가요성 링커)에 의해 분리된 다중 에피토프의 연쇄체성(concatemeric) 배열을 가질 수 있다. 이러한 연쇄체에는 (전형적으로 바이러스를 통해 전달될 수 있는 재조합 핵산의 크기에 의해 제한되는) 1 내지 20개의 네오에피토프가 포함될 수 있으며, 연쇄체는 MHC-I 및 MHC-II 복합체에 전달하기 위해 동일하거나 상이할 수 있음에 유념해야 한다. 따라서, 그리고 후술되는 바와 같이, MHC-I 및/또는 MHC-II를 통한 우선적 또는 심지어 특이적 발현을 달성하기 위해 다양한 펩타이드가 특정 세포 구획으로 전달될 수 있음을 이해해야 한다. 또 다른 관점에서 볼 때, 중앙 관련 항원 및 네오에피토프는 발현 경로 모두를 통해 또는 선택적으로 동시에 또는 이후의 치료 회차에서 하나 또는 다른 경로로 제공될 수 있음을 인식해야 한다.

[0071] 유전적으로 변형된 바이러스의 '페이로드(payload)'와 관련하여, 하나 초과 예를 들어 2, 3, 4, 5개 및 그 이상의 네오에피토프의 발현이 바람직하며, 이는 다수의 별개의 변형된 바이러스, 또는 하나 초과 네오에피토프 서열(예를 들어, 연쇄체 또는 키메라 서열로서)을 갖는 바이러스를 사용하여 달성될 수 있다. 본 발명의 대상을 한정하는 것은 아니지만, 일반적으로 네오에피토프 서열은 탠덤 미니유전자(minigene)(예를 들어 aa<sub>12</sub>-네오에피토프<sub>12</sub>-aa<sub>12</sub>) 또는 키메라 단백질로 번역되거나 번역되지 않을 수 있는 단일 전사 단위로 구성되는 것이 바람직하다. 따라서, 에피토프는 모노머, 멀티머, 개별적으로 또는 연쇄체성으로, 또는 N- 및/또는 C-말단 펩타이드와의 하이브리드 서열로 존재할 수 있음을 이해해야 한다. 가장 전형적으로, 핵산 서열은 바이러스 및/또는 숙주 코돈 선호도를 수용하기 위해 적절한 코돈 사용법을 사용하여 역-번역되는 것이 바람직하다. 그러나, 대체 코돈 사용 또는 비-매칭된 코돈 사용도 적절한 것으로 간주된다. 추가의 적합한 구성 및 발현 카세트에 관해, 본원에 참고로 인용된 2016년 3월 2일자로 출원된 공-계류중인 미국 가출원 제62/302168호 및 2016년 3월 28일자로 출원된 미국 가출원 제62/314366호를 참조한다.

[0072] 또한, 네오에피토프 서열(예를 들어, 단일 네오에피토프 또는 폴리토프로서 발현된)은 적합한 서열 요소를 사용하여 하나 또는 둘 모두의 MHC 발현 경로로 구성되고 유도될 수 있음을 이해해야 한다. 이와 같이 발현된 네오에피토프를 목적하는 MHC 시스템으로 전달하는 것과 관련하여, MHC-I 발현된 펩타이드는 전형적으로 프로테아좀 처리 및 소포체를 통한 전달을 통해 세포질로부터 발생할 것이라는 점에 주목해야 한다. 따라서, MHC-I 제시를 위해 의도된 에피토프의 발현은 일반적으로 하기에 더 상세히 논의되는 바와 같이 세포질로 유도될 것이다. 한편, MHC-II 제시된 펩타이드는 전형적으로 세포막에 전달되기 전에 산성 프로테아제(예를 들어, 레그마인, 카텡신 L 및 카텡신 S)에 의한 분해 및 가공을 통해 엔도솜성 및 리소솜성 구획으로부터 발생할 것이다. 따라서, MHC-II 제시를 위해 의도된 에피토프의 발현은 일반적으로 하기에 보다 상세히 논의되는 바와 같이 엔도솜성 및 리소솜성 구획으로 유도될 것이다.

[0073] 가장 바람직한 양태에서, 신호 펩타이드는 네오에피토프를 엔도솜성 및 리소솜성 구획으로 (MHC-II에 대한 네오에피토프 제시를 유도하면서) 트래피킹(trafficking)하거나 세포질 공간에 (MHC-I에 대한 네오에피토프 제시를 유도하면서) 머무르도록 하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드가 엔도솜성 및 리소솜성 구획을 표적으로 하는 예비-서열(presequences)을 표출하는 경우, 내부 표적화 펩타이드가 사용될 수 있다. 표적화 펩타이드의 예비-서열은 바람직하게는 N-말단에 부가되고 6 내지 136개의 염기성 및 소수성 아미노산을 포함한다. 펌프 표적화의 경우, 표적화 서열은 C-말단에 있을 수 있다. 다른 신호(예를 들어, 신호 패치)가 사용될 수 있으며, 펩타이드 서열에서 분리되고 적절한 펩타이드 접합시 기능성이 되는 서열 요소를 포함할 수 있다. 또한, 글리코실화와 같은 단백질 변형은 표적화를 유도할 수 있다. 다른 적합한 표적화 신호 중에서도, 본 발명자들은 N-말단 근처에 위치하는 노나펩타이드인 펌프 표적화 신호 1(PTS1), C-말단 트리펩타이드 및 펌프 표적화 신호 2(PTS2)를 고려한다. 또한, 엔도솜 및 리소솜에 대한 단백질의 분류는, 전형적으로 짧은 선형 서열을 포함하는, 단백질의 세포질 도메인 내의 신호에 의해 매개될 수 있다. 일부 신호는 티로신-계 분류 신호라고

하며 NPXY 또는 YXXØ 공통 모티프에 순응한다. 다이류신-계 신호로 알려진 다른 신호는 [DE]XXXL[LI] 또는 DXXLL 공통 모티프에 적합하다. 이러한 모든 신호는 멤브레인의 세포질 표면과 관련된 주변의 단백질 코팅 성분으로 인식된다. YXXØ 및 [DE]XXXL[LI] 신호는 어댑터 단백질(AP) 복합체 AP-1, AP-2, AP-3 및 AP-4에 의해 특징적인 미세 특이성으로 인식되지만, DXXLL 신호는 어댑터는 GGA로 알려진 어댑터의 또 다른 계통으로 인식된다. 또한, 액포 단백질 분류 및 엔도솜 기능과 관련되어 있는 FYVE 도메인을 추가할 수 있다. 또 다른 양태에서, 인간 CD1 꼬리 서열을 사용하여 엔도솜 구획을 표적화할 수도 있다(예를 들어, 문헌[Immunology, 122, 522-531] 참조).

[0074] 세포질 구획 내 트래피킹 또는 보유는 반드시 하나 이상의 특정 서열 요소를 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 적어도 일부 양태에서, 막-고정 단백질 또는 막-고정 단백질의 막 앵커 도메인을 포함하는 N- 또는 C-말단 세포질 보유 신호가 추가될 수 있다. 예를 들어, 막-고정 단백질은 SNAP-25, 신택신(syntaxin), 시냅토프레빈(synaptrebin), 시냅토타그민(synaptotagmin), 소포 관련 막 단백질(VAMP), 시냅스 소포 당단백질(SV2), 고친화도 콜린 수송체, 뉴렉신(Neurexin), 전압-관문 칼슘 채널, 아세틸콜린에스터라제 및 NOTCH를 포함한다.

[0075] 또한, 바이러스 전달 비허클은 또한 감염된 수지상 세포와 T-세포 사이의 상호작용을 향상시키기 위해 적어도 1종, 보다 전형적으로 적어도 2종, 보다 더 전형적으로 적어도 3종, 가장 전형적으로 적어도 4종의 공동-자극 분자를 코딩하는 것으로 고려된다. 예를 들어, 적절한 공동-자극 분자는 특히 B7.1(CD80) 및/또는 B7.2(CD86)와 조합된 ICAM-1(CD54), ICOS-L 및 LFA-3(CD58)을 포함한다. 추가 고려되는 공동-자극 분자는 4-1BBL, CD30L, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD112, CD155, GITRL, OX40L 및 TL1A를 포함한다. 또한, 공동-자극 분자의 발현은 바람직하게는 항원 및/또는 네오에피토프가 하나 이상의 공동-자극 분자와 함께 제시되도록 조정된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 전형적으로, 공동-자극 분자는 예를 들어 내부 리보솜 진입 부위 또는 2A 서열을 사용하여 단일 전사체로부터, 또는 다중 전사체로부터 생성되는 것으로 간주된다.

[0076] 마찬가지로, 바이러스 벡터는 체크포인트 수용체에 결합하는 하나 이상의 펩타이드 리간드를 코딩하는 서열 부분을 추가로 포함할 것으로 예상된다. 가장 전형적으로, 결합은 수용체를 통한 신호전달을 억제하거나 적어도 감소시킬 것이며, 특히 고려되는 수용체는 CTLA-4(특히 CD8+ 세포의 경우) 및 PD-1(특히 CD4+ 세포의 경우)을 포함한다. 예를 들어, 펩타이드 결합체는 항체 단편 및 특히 scFv뿐만 아니라 수용체에 특이적으로 결합하는 소분자 펩타이드 리간드를 포함할 수 있다. 다시 한번, 펩타이드 분자의 발현은 바람직하게는 항원 및/또는 네오에피토프가 하나 이상의 펩타이드 분자와 함께 제시되도록 배워질 것임을 이해해야 한다. 따라서, 전형적으로, 펩타이드 분자는 예를 들어 내부 리보솜 진입 부위 또는 2A 서열을 사용하여 단일 전사체로부터, 또는 다중 전사체로부터 생성되는 것으로 간주된다.

[0077] 이어서, 바이러스는 전형적으로 투여 단위당  $10^4$  내지  $10^{11}$  바이러스 입자의 바이러스 역가를 갖는 멸균 주사용 조성물로서 제형화된 약학적 조성물에서 치료 백신으로서 개별적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 대안적으로, 바이러스는 환자(또는 다른 HLA 매칭된) 세포를 생체외에서 감염시키기 위해 사용될 수 있고 이렇게 감염된 세포는 환자에게 수혈된다. 추가의 예에서, 바이러스에 의한 환자의 치료는 베어(bare) 형태의 동종이식 또는 자가 자연 살해 세포 또는 T 세포에 의하거나 또는 네오에피토프, 네오에피토프들, 종양 관련 항원 또는 바이러스와 동일한 페이로드를 표적으로 하는 항체를 발현하는 키메라성 항원 수용체에 의해 달성될 수 있다. 환자-유래 NK-92 세포주를 포함하는 자연 살해 세포는 또한 CD16을 발현할 수 있으며 항체와 결합할 수 있다. 본원에 사용된 약학 조성물 또는 약물을 "투여하는"이란 용어는 약학 조성물 또는 약물의 직접 및 간접 투여 둘 다를 의미하고, 여기서 약학 조성물 또는 약물의 직접 투여는 전형적으로 건강 관리 전문가(예를 들어, 의사, 간호사 등)에 의해 수행되며, 간접 투여는 (예를 들어, 주사, 주입, 경구 전달, 국소 전달 등을 통한) 직접 투여를 위해 건강 관리 전문가에게 약학 조성물 또는 약물을 제공하거나 이용가능하게 하는 단계를 포함한다.

[0078] 마지막으로, 바이러스가 다수의 네오에피토프를 암호화하는 핵산 페이로드를 포함하는 경우, 다수의 네오에피토프가 숙주 면역 반응을 적어도 부가적으로 또는 상승작용적으로 증강시킬 수 있다는 점에 주목해야 한다. 유사하게, 각각의 바이러스가 상이한 네오에피토프를 갖는 다수의 바이러스가 사용되는 경우, 다수의 네오에피토프는 숙주 면역 반응을 적어도 부가적으로 또는 상승작용적으로 증강시킬 수 있는 것으로 고려된다. 이러한 부가적 또는 상승작용적 효과는 특정 종양 또는 단계에 대해 전정한 것이거나 또는 특정 환자 파라미터(예를 들어, 연령, 성별, 이전 치료 등)에 특이적일 수 있다.

[0079] **테스트/품질 제어**

[0080] 네오에피토프의 실제 발현, 가공 및 MHC-제시를 동정하기 위한 또 다른 고려된 접근법에서, 본 발명자들은 네오에피토프를 코딩하는 핵산이 환자 세포 또는 프록시 세포 내로 생체 외에서 형질감염될 수 있고 이렇게 형질감

염된 세포가 이어서 상기 에피토프의 MHC-제시에 대해 분석될 수 있음을 고려한다. 예를 들어, 이러한 환자 세포는 동일한 환자의 면역 수용성 세포, 보다 바람직하게는 전문적인 항원 제시 세포(예를 들어 대식세포, 수지상 세포, NK 세포, T 세포 등)를 포함하는 것으로 고려된다. 대안적으로, 백혈구 세포(예를 들어, 버피(buffy) 코트 또는 다른 방식으로 제조된) 또는 부분적으로 농축된 백혈구 세포가 형질감여될 수 있다. 이어서, 세포 표면상의 결합된 네오에피토프의 검출은 하기에서 보다 상세히 기술되는 항체 또는 합성 결합제를 사용하여 수행될 수 있다. 한편, 세포가 비-환자 세포인 경우, 이들 세포는 적어도 7개, 또는 적어도 8개, 또는 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 MHC 하위-유형에 대해 (적어도 4자리 수준까지) HLA-매칭되어 있다고 생각된다. 가장 바람직하게는, 이러한 세포는 인간(동종의) 세포일 것이다. 그러나, 다른 포유 동물(이종의) 세포도 적합하다고 여겨진다.

[0081] 또 다른 고려되는 양태에서, 잠재적인 네오에피토프 제시의 검증은 또한 바람직하게는 광학적 검출을 위한 친화도 마커 또는 개체로 라벨링된 합성 네오에피토프를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 합성 네오에피토프는 T-세포 수용체, MHC 복합체 등에 대한 네오에피토프의 결합을 검출하는 데 유용할 수 있다. 또한, 특히 이러한 합성 네오에피토프가 고체상에 결합되는 경우, 합성 네오에피토프는 이미 존재할 수 있는 환자로부터 항체를 검출 및 분리하는 데 사용될 수 있다.

[0082] 동정된 네오에피토프(들)에 대한 합성 항체를 획득하기 위해, 인-실리코 동정된 물질이 합성 펩타이드를 생산하기 위해 시험관 내에서 제조되는 것으로 고려된다. 당업계에는 합성 펩타이드를 제조하는 다수의 방법이 있으며, 모든 공지된 방법이 본원에서 사용에 적합한 것으로 여겨진다. 예를 들어, 암 네오에피토프 서열을 갖는 펩타이드는 고체상에서 (예를 들어, 메리필드(Merrifield) 합성을 사용하여), 액체상 합성을 통해, 또는 보다 작은 펩타이드 단편으로부터 제조될 수 있다. 덜 바람직한 양태에서, (특히 다중 네오에피토프가, 임의적으로 네오에피토프들 또는 절단 부위들 사이에 스페이서가 있는 단일 펩타이드 사슬상에 존재하는 경우) 적합한 숙주에서 제조할 핵산을 발현시킴으로써 펩타이드를 생성시킬 수도 있다.

[0083] 따라서, 네오에피토프 서열에 상응하거나 이를 포함하는 합성 펩타이드의 구조는  $X-L_1-(A_n-L_2)_m-Q$ 일 수 있으며, 여기서 X는 합성 펩타이드를 고체상에 공유 결합 또는 비공유 결합시키는 데 적합한 임의적인 커플링 기 또는 잔기이고,  $L_1$ 은 합성 펩타이드를 고체상 또는 커플링 기에 공유 결합시키는 임의적 링커이다.  $A_n$ 은 네오에피토프 서열을 갖는 합성 펩타이드이고, 여기서 A는 자연 (단백질생성) 아미노산이고 n은 7 내지 30의 정수이고, 가장 전형적으로는 7 내지 11 또는 15 내지 25의 정수이다.  $L_2$ 는 특히 다수의 합성 펩타이드 서열(동일하거나 상이한)이 구조 내에 존재하는 경우에 존재할 수 있는 임의적 링커이고, m은 정수, 전형적으로 1 내지 30, 가장 전형적으로 2 내지 15의 정수이다. 마지막으로, Q는 합성 펩타이드의 말단을 고체상(예를 들어, 펩타이드를 입체적으로 구속하기 위해) 또는 리포터 기(예를 들어, 형광 마커) 또는 다른 기능성 잔기(예를 들어 친화도 마커)에 커플링하는 데 사용될 수 있는 말단 기이다. 결과적으로, 합성 펩타이드가 직접적인 MHC-1 결합에 사용되는 경우, 전체 길이는 8 내지 10개의 아미노산이 됨에 주목해야 한다.

[0084] 예를 들어, X는 고체상에 상응하는 결합제(예를 들어 아비딘)를 결합시키는 비공유 친화도 잔기(예를 들어 비오틴), 또는 펩타이드의 N- 또는 C-말단 아미노 또는 카복실 기와 반응하는 화학 기(스페이서를 갖거나 갖지 않음), 또는 펩타이드 또는 링커  $L_1$ 에서 설프하이드릴 기와 반응하는 선택적 반응성 기(예를 들어 아이오도아세틸 또는 말레이미드 기)일 수 있다.  $L_1$ 은 합성 펩타이드의 고체상으로부터의 거리를 증가시키는 데 사용될 수 있고, 따라서 전형적으로 약 2 내지 20개의 탄소-탄소 결합과 등가의 길이(예를 들어, 0.3 nm 내지 3 nm)를 갖는 (예를 들어, 글리콜 기, 알콕시 기, 글리신 등을 포함하는) 가요성 선형 잔기를 포함할 것이다. 물론, 합성 펩타이드는 펩타이드가 생성된 고체상을 사용할 수 있으며 별도의 커플링 기 또는 링커가 필요하지 않음을 이해해야 한다.

[0085] 특정 합성 펩타이드 및 커플링 방법에 따라, 고체상의 성질은 상당히 변할 수 있고, 펩타이드의 부착을 위한 모든 공지된 고체상이 본원에서 사용에 적합한 것으로 간주됨을 이해해야 한다. 예를 들어, 적합한 고체상은 아가로스 비드, 폴리머 비드(착색되거나 그렇지 않으면 개별적으로 어드레싱가능한), 마이크로타이터 플레이트 내의 웰의 벽 표면, 종이, 니트로셀룰로오스, 유리 등을 포함한다. 당업자는 고체상 및 부착 화학물질의 적합한 선택을 용이하게 평가할 수 있을 것이다. 추가의 바람직한 양태에서, 고체상은 일반적으로 파지(phage)(또는 다른 스캐폴드 캐리어) 상에 제공된 펩타이드가 합성 펩타이드를 통해 고체상에 가역적으로 결합하도록 허용하는 것과 같은 파지 디스플레이 방법과 관련된 프로토콜에 적합하다는 점에 주목한다. 여전히 추가로 고려된 용도에서, 고체상은 또한 특히 합성 단백질이 포유동물에서 백신으로서 또는 항체 생산을 위한 비-인간 포유동물에서

면역원성 화합물로서 사용되는 경우에 백신 접종에 사용되는 캐리어 단백질(예를 들어, 알부민, KLH, 과상풍 특 소이드, 디프테리아 독소 등)일 수 있음을 인식해야 한다. 마찬가지로, 합성 단백질은 또한 임의의 캐리어 없이 백신 또는 면역원성 화합물로서 사용될 수도 있다.

[0086] 또 다른 바람직한 방법에서, 상술한 바와 같이, 합성 펩타이드(암 네오에피토프를 포함하거나 이에 상응하는 것)가 고체상에 고정되는 경우, 네오에피토프에 대한 친화제, 특히 항체가 분리 및/또는 정제될 수 있음을 인식해야 한다. 가장 바람직하게는, 이러한 단리는 예비-제작된 고-다양성 라이브러리의 항체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥상 달리 지시되지 않는 한, 용어 "항체"는 항체(예를 들어, IgG, IgM, IgE 등)의 모든 동형(isotype) 및 하위-유형뿐만 아니라 1가 IgG, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, scFv, scFv-Fc, VhH 등을 포함하는 이의 모든 단편을 포함한다. 또한, 고려되는 항체는 인간 또는 비인간(예를 들어, 설치류) 기원으로 인간화되거나 키메라일 수 있다. 전형적인 방법에서, 고-다양성 라이브러리는 전형적으로 M13 파지 및 pIII, pVIII, pVI 또는 pIX를 통한 디스플레이, 또는 T7 파지 및 유전자 10 캡시드 단백질을 기준으로 적어도 10<sup>9</sup>개의 다양한 구성원, 또는 적어도 10<sup>10</sup>개의 다양한 구성원, 또는 그 이상의 다양성을 갖는 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있다.

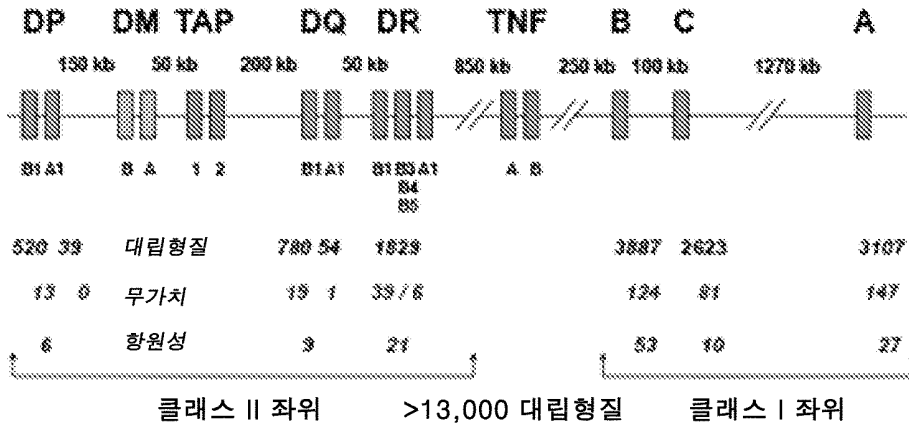
[0087] 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 큰 다양성 라이브러리의 사용은 비교적 짧은 시간 내에 최상의 결합체에 대해 추가로 선택될 수 있는 몇 가지 결합 후보 항체를 제공할 것이다. 실제로, 고정화된 합성 펩타이드에 대한 결합 친화도가 원하는 것보다 적은 경우, 친화도는 당업계에 공지된 프로토콜을 사용하여 친화도 성숙을 통해 개선될 수 있음을 인식해야 한다. 예를 들어, 낮은 친화도(KD>10<sup>-7</sup> M) 결합체 또는 보다 작은 라이브러리의 구성원은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 결합 친화도 및/또는 동역학을 개선시키기 위해 친화도 성숙을 수행할 수 있다(예를 들어 문헌[Briefings In Functional Genomics and Proteomics. Vol 1. No 2. 189-203. July 2002] 참조). 또한, 항체 라이브러리가 일반적으로 바람직한 반면에, 다른 스캐폴드가 또한 적절하다고 여겨지며 베타 배럴, 리보솜 디스플레이, 세포 표면 디스플레이 등(예를 들어 문헌[Protein Sci. 2006 Jan; 15(1): 14-27]), 특히 RNA 디스플레이(예를 들어 문헌[Proc Natl Acad Sci 2001; 98(9):4825-6])가 포함된다는 점에 주목한다. 따라서, 바람직한 양태에서, 합성 펩타이드는 항체 라이브러리에서 미끼로 사용되어 고-친화성 결합(KD<10<sup>-7</sup> M, 보다 전형적으로 KD<10<sup>-8</sup> M) 항체를 동정한다는 것을 이해해야 한다.

[0088] 본 발명의 개념을 벗어나지 않고 이미 기술된 것들 이외에 많은 수정이 가능하다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 대상은 첨부된 청구범위의 범주를 제외하고는 제한되지 않는다. 또한, 명세서 및 청구범위 모두를 해석함에 있어서, 모든 용어는 문맥에 따라 가능한 가장 넓은 방식으로 해석되어야 한다. 특히, 용어 "포함하는"은 요소, 성분 또는 단계를 비-배타적인 방식으로 참조하여, 그 참조된 요소, 성분 또는 단계가 명시적으로 언급되지 않은 다른 요소, 성분 또는 단계들과 함께 존재하거나 이용되거나 조합될 수 있음을 나타내는 것으로 해석되어야 한다. 명세서가 A, B, C ... 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 것 중 적어도 하나를 가리키는 경우, 본문은 A와 N, 또는 B와 N 등이 아닌, 군으로부터 단지 하나의 요소만을 필요로 하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

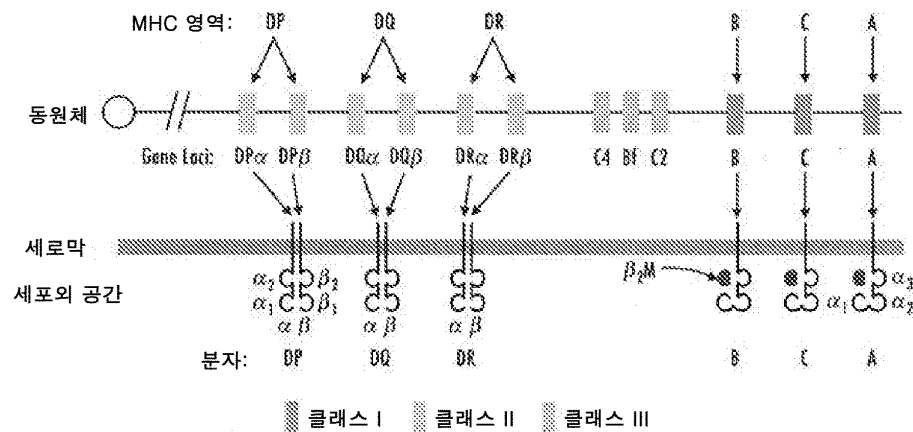
도면1a

6p21.31 상의 HLA 복합체



도면1b

인간 HLA 복합체



도면2

