



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0147693
(43) 공개일자 2022년11월03일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 38/21</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>A61K 38/21</i> (2013.01) <i>A61K 39/0011</i> (2021.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7035962(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년02월11일 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2020-7018114 원출원일자(국제) 2017년02월11일 심사청구일자 2020년06월24일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년10월17일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/017568</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/142818 국제공개일자 2017년08월24일</p> <p>(30) 우선권주장 62/295,268 2016년02월15일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인 에프케이디 테라피즈 리미티드, 영국 오엑스39 4티더블유 옥스퍼드셔 치노르 샌더 룸 하우스 오클리 로드</p> <p>(72) 발명자 파커, 나이젤 영국, 오엑스39 4티더블유 옥스퍼드셔, 치노르 샌 더룸 하우스 오클리 로드</p> <p>(74) 대리인 강철중</p> |
|--|---|

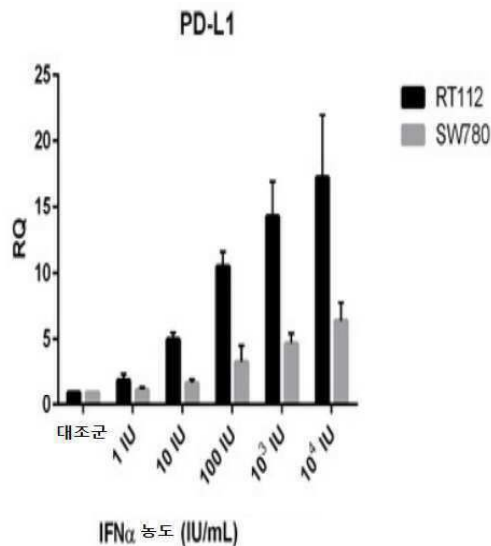
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 향상된 인터페론 치료

(57) 요약

인터페론 치료는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 (CD279라고도 알려짐)의 발현을 상향-조절하는 인터페론의 능력을 최소화하는 작용제를 병용 투여함으로써 향상된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/02 (2013.01)

A61K 39/12 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인터페론으로 인간 환자를 치료하는 방법에 관한 것으로서:

- a. 인간 환자에서 인터페론으로 치료할 수 있는 상태를 진단하는 단계;
- b. 제1 작용제를 투여하는 단계로서, 상기 제1 작용제는 인간 면역계 체크 포인트의 기능에 영향을 미치기에 충분한 양으로 인간 환자의 인터페론 수준을 증가시킬 수 있으며, 상기 체크 포인트는 면역 기능을 감소시키는 것인, 단계; 및
- c. 동일한 인간 면역계 체크 포인트의 기능에 영향을 미치는 제2 작용제를 인간에게 투여하는 단계로서, 상기 제2 작용제는 상기 제1 작용제가 상기 체크 포인트 상에 가질 수 있는 면역 기능의 감소를 실질적으로 개선시키는 데 유효한 양으로 투여되는 것인, 단계를 포함하고,

상기 방법에서 상기 제2 화합물은 제1 작용제에 의해 야기된 면역 기능의 감소를 실질적으로 개선시키는 것인, 방법.

청구항 2

제1항의 방법으로 필수적으로 이루어지는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 작용제 및 상기 제2 작용제를 거의 동일한 시간에 환자에게 처리하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 작용제는 외인성으로 생산된 (exogenously-produced) 인터페론 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1 작용제는 환자가 내인성으로 (endogenously) 인터페론을 발현하도록 유도하는 작용제를 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제1 작용제는 발현 가능한 인터페론 전이 유전자를 갖는 (carrying) 벡터인 것인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 제1 작용제는 미생물 항원, 바이러스 항원 및 미생물 또는 바이러스 항원 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제1 작용제는 폴리 I:C를 포함하는 바이러스 항원 유사체를 포함하는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 제1 작용제는 박테리아 항원을 포함하는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 제1 작용제는 바이러스 항원을 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1 작용제는 항원성 바이러스를 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 인간 환자의 인터페론 수준은 억제성 인간 면역계 체크 포인트의 기능을 증가시키기에 충분한 양으로 증가되는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 억제성 체크 포인트는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 및 세포 독성 T-림프구-연관 단백질 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 억제성 체크 포인트는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1을 포함하고, 제2 작용제는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 또는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 리간드에 결합하는 것인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 상태는 암을 포함하는, 방법.

청구항 16

체크 포인트가 인간 면역 기능을 억제하지 않는 인간 면역계 체크 포인트의 기능에 영향을 미치는 작용제로서, 상기 작용제는 인간 환자에 대한 인터페론의 면역-억제 효과를 제거하는데 사용하기 위한 작용제이며, 상기 작용제는 인터페론의 면역-억제 효과를 감소시키기에 유효한 양으로 공급되는 것인, 작용제.

청구항 17

인간 치료제로서 인터페론의 효능을 개선시키는 방법으로서,

- 인간 환자에서 인터페론으로 치료할 수 있는 상태를 진단하는 단계, 및
- 억제성 인간 면역계 체크 포인트를 억제하는 제2 작용제를 인간에게 투여하는 단계로서, 상기 작용제를 면역 활성 감소에 대한 체크 포인트의 활성을 감소시키기에 충분한 양으로 투여하는 것인, 단계, 및
- 상기 상태를 치료하는데 유효한 양으로 상기 인간 환자의 인터페론 수준을 증가시키는 제1 작용제를 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

다음 단계를 필수적으로 포함하는 방법에 관한 것으로서:

- 억제성 인간 면역계 체크 포인트를 억제하는 제2 작용제를 인간에게 투여하는 단계, 및
- 인간 환자의 인터페론 수준을 증가시키는 제1 작용제를 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제2 작용제는 체크 포인트의 활성을 감소시키기에 충분한 양으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 작용제는 환자가 내인성으로 (endogenously) 인터페론을 발현하도록 유도하며, 상기 제2 작용제는 발현 가능한 인터페론 전이 유전자를 갖는 (carrying) 벡터를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 출원인: 에프케이디 테라피스 리미티드, 치노르, 옥스퍼드셔 영국, 영국 시민.
- [0002] 관련 출원: 본 출원은 2016년 2월 15일자로 출원된, 임시 특허 (provisional patent) 출원 일련 번호 US 62/295268의 우선권을 주장하며, 그 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0003] 연방-후원 연구 및 개발: 없음.
- [0004] 공동 연구 계약: 출원인은 *인터 알리아* MD 앤더슨 암 센터 (텍사스 주, 휴스턴) 및 마요 클리닉(미네소타 주 로체스터)과 이 출원 관련 업무에 관한 연구 계약을 맺고 있다.
- [0005] 서열 목록: 없음.
- [0006] 발명자에 의한 사전 공개: 없음.

배 경 기 술

- [0007] 인터페론은 많은 임상적 이점이 있다. 예를 들어, 인터페론은 면역계를 상향-조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 암세포를 확인하고 공격하기 위해 환자의 내재 면역계를 모집하는 데 잠재적으로 유용하다. 그러나 항암제로서 인터페론의 효능은 현재까지 입증되길 원해지고 있다. 이는 수수께끼였다.
- [0008] 예를 들어, 미국에서 현재 승인된 가장 효과적인 방광암 치료는 요도내 바실러스 칼메트-게랭균(*Bacillus Calmette-Guerin*) 백신이다. 항원성 백신은 방광 세포를 자극하여 인터페론을 발현시켜, 내재 면역계를 모집함으로써 암세포 표면 항원을 보다 잘 인식하고 암세포를 공격할 수 있는 하는 것으로 생각된다. 그러나 3분의 1 이 넘는 경우에서 백신은 효과적이지 않다.
- [0009] 유사하게, 외인성으로 생산된 인터페론 폴리펩티드의 방광 내 주입은 방광암을 치료하기 위해 시험되었지만, 예상보다 덜 효과적이다. 이에 발명자는 그 이유를 발견하고, 해결 방법을 알아냈다.

발명의 내용

- [0010] 발명자는 (외인성으로 투여되거나 내인성 발현을 상향 조절하는 백신 또는 다른 작용제의 반응에 의해 발현되는) 인터페론 및, 또한 인터페론 발현을 자극하는 것은 CD279라고도 알려진, 프로그램된 세포 사멸 단백질 1의 발현을 자극한다는 것을 발견하였다. 따라서 발명자는 이전에 인식되지 않았던 인터페론 치료법의 불리한 부작용을 확인했다: 인터페론은 환자 면역계의 특정 측면을 유리하게 자극하고, 또한 프로그램된 세포 사멸 단백질 1의 발현을 상향-조절한다. 결과적으로 프로그램된 세포 사멸 단백질 1의 증가는 보호 T세포 기능을 하향-조절한다. 이것은 암세포-표면 항원을 가지고 있는 세포를 확인하고 공격하는데 있어서 T 세포의 효율성을 손상시킨다. 따라서 인터페론은 두 가지 상반되는 행동을 일으킨다: 이는 면역계 활성을 증가시키면서, 암세포-표면 항원을 확인하는 면역계의 능력을 억제한다.
- [0011] 따라서 발명자는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1의 발현을 억제하는 작용제를 병용-투여함으로써 인터페론 치료법을 개선할 것을 제안한다. 이것은 인터페론이 치료학적 잠재성을 보다 완전하게 성취할 수 있도록 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 RT112 및 SW780 인간 세포주에서 인터페론 노출에 대한 반응으로 PD-L1 발현을 측정한 차트이다. 수평축: 인터페론 양. 수직축: 발현된 폴리펩티드.
- 도 2는 RT112 및 SW780 인간 세포주에 대한 인터페론 노출에 대한 반응으로 TRAIL 발현을 측정한 차트이다. 수평축: 인터페론 양. 수직축: 발현된 폴리펩티드.
- 도 3은 RT112 및 SW780 인간 세포주에 대해 인터페론 노출에 대한 반응으로 IRF1 발현을 측정한 차트이다. 수평축: 인터페론 양. 수직축: 발현된 폴리펩티드.
- 도 4는 SW780 인간 암 세포주에서 증가하는 인터페론 알파에 대해 시험관 내 투여량 반응을 보여주는 PAGE 겔의 사진이다. 수평축: 인터페론 양. 수직축: 발현된 폴리펩티드.
- 도 5는 인터페론 노출에 대한 반응으로 IRF1, FOXA1 및 PD-L1의 RT12 세포에서 발현을 측정한다 (실시예 2 참조). IRF1은 인터페론-자극된 유전자 대조군으로 기능한다. FOXA1은 인터페론 노출 후에 발현이 변화하지 않는, 유형 I 인터페론 조절된 유전자의 하나의 예시이다.
- 도 6은 인터페론 노출에 대한 반응으로 IRF1, FOXA1 및 PD-L1의 UC3 세포에서 발현을 측정한다 (실시예 2 참

조). IRF1은 인터페론-자극된 유전자 대조군으로 기능한다. FOXA1은 인터페론 노출 후에 발현이 변화하지 않는 유형 I 인터페론 조절된 유전자의 예이다.

도 7은 인터페론 노출에 대한 반응으로 IRF1, FOXA1 및 PD-L1의 T24 세포에서 발현을 측정한다 (실시예 2 참조). IRF1은 인터페론-자극된 유전자 대조군으로 기능한다. FOXA1은 인터페론 노출 후에 발현이 변화하지 않는 유형 I 인터페론 조절된 유전자의 예이다.

도 8은 인터페론 노출에 대한 반응으로 IRF1, FOXA1 및 PD-L1의 UC14 세포에서 발현을 측정한다 (실시예 2 참조). IRF1은 인터페론-자극된 유전자 대조군으로 기능한다. FOXA1은 인터페론 노출 후에 발현이 변화하지 않는 유형 I 인터페론 조절된 유전자의 예이다.

도 9는 6-레인 PAGE 겔의 사진이다. 그것은 BBN972 세포를 쥐 인터페론에 노출시킨 후, PD-L1 폴리펩티드의 존재를 측정한다. 레인 (왼쪽에서 오른쪽)은 배양배지의 0 (제로), 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 및 1×10^4 국제 단위 인터페론/ml이다.

도 10은 6-레인 PAGE 겔의 사진이다. MB49 #1 (MB49-*luc*) 세포를 쥐 인터페론에 노출시킨 후, PD-L1 폴리펩타이드의 존재를 측정한다. 레인 (왼쪽에서 오른쪽)은 배양배지의 0 (제로), 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 및 1×10^4 국제 단위 인터페론/ml이다.

도 11은 6-레인 PAGE 겔의 사진이다. BBN972 세포를 쥐 인터페론에 노출시킨 후, 액틴 폴리펩타이드의 존재를 측정한다. 레인 (왼쪽에서 오른쪽)은 배양배지의 0 (제로), 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 및 1×10^4 국제 단위 인터페론/ml이다.

도 12는 6-레인 PAGE 겔의 사진이다. MB49 #1 세포를 쥐 인터페론에 노출시킨 후, 액틴 폴리펩타이드의 존재를 측정한다. 레인 (왼쪽에서 오른쪽)은 배양배지의 0 (제로), 1×10^0 , 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 및 1×10^4 국제 단위 인터페론/ml이다.

도 13은 폴리 I:C의 복막 내 주사에 대한 반응으로 마우스에서 혈청 인터페론 a를 측정한다.

도 14는 폴리 I:C를 6시간에 종양 내 주사에 대한 반응으로 마우스에서 혈청 인터페론 a를 측정한다

도 15는 폴리 I:C (500 meg)의 복막 내 주사 후, 종양 내 PD-L1 발현을 측정한다.

도 16은 인간 인터페론 알파 2B 전이 유전자를 갖는 (carrying), 재조합 복제-결핍 아데노 바이러스 유전자 치료 벡터인 INSTILADRIN™으로 치료한 사람에서 RNA 발현을 나타낸다.

도 17은 피하 C57BL6/J 종양 (n=5 그룹 당 암컷 쥐)에 대한 MB49 종양 크기 대 시간을 나타낸다. 치료는 종양 이식 후 10일에 시작하여 200 meg q3 일이다. Error bard는 SEM을 나타낸다.

도 18은 암을 접종한 암컷 마우스에 식염수 (최하위 라인), IgG (다음 상위 라인), 항-PD1 단일클론 항체 (다음 상위 라인), 폴리 I:C (다음 상위 라인) 및 폴리 I:C 및 항-PD1 단일 클론 항체의 조합 (가장 높은 계통)을 처리한 케팔란-메이어(Kaplan-Meyer) 생존 곡선을 나타낸다.

도 19는 수컷 마우스의 시간에 따른 표준화된 (평균 \pm SD) 복사 강도를 비교한다. 로그-순위 테스트를 사용하여, 이들 데이터는 IgG 대조군 ($p=0.06$), 폴리 I:C 단독 요법 ($p=0.32$), 및 항-PD1 단일클론 항체 ($p=0.14$)보다 우수한 병용 치료법을 나타낸다.

도 20은 "생존 부분 (survival portions)", 즉 도 19마다 처리한 수컷 마우스에서 시간에 따른 살아남을 성향에 대한 생존을 보여주는 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 인터페론 치료법

[0014] 인터페론은 신호 단백질의 그룹이다. 그들은 예를 들어, 바이러스, 박테리아 및 기생충, 및 또한 암세포와 같은 몇가지 항원성 병원균의 존재에 대한 반응으로 인간 세포에 의해 발현되고 분비된다. 일반적으로 바이러스-감염된 세포는 인터페론을 방출하며, 근처의 방관자 세포 (bystander cell)에 신호를 보내 항-바이러스 방어를 강화한다. 또한 인터페론은 자연 살해 세포 및 대식세포와 같은 면역 세포를 활성화시킨다. 인터페론 주요

조직 적합성 복합 항원의 발현을 증가시켜, 면역계에 대한 외부 항원의 제시를 증가시킨다.

- [0015] 인터페론은 그들이 신호하는 수용체의 종류에 따라 정렬되거나 분류될 수 있다. 따라서, 인간에 있어서 인터페론은 종종 3 가지 종류로 분류된다: 유형 I (인간 IFN- α/β 수용체에 결합하는 인터페론), 유형 II (인간 IFN- γ 수용체에 결합하는 인터페론) 및 유형 III (인간 IFN- λ 수용체에 결합하는 인터페론).
- [0016] 모든 인터페론은 몇 가지 공통적인 효과를 공유한다: 그들은 모두 항바이러스 체제이며, 면역계의 기능을 조절한다. 유형 I IFN의 투여는 실험 동물에서 종양 성장을 억제함을 보여주지만, 인간 종양에서 유의한 작용은 널리 문서화되지 않았다. 바이러스-감염된 세포는 주변 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 방출한다. 그러나, 감염된 세포는 방출된 인터페론에 의한 바이러스에 의해 잠재적 감염에 대해 주변 세포를 준비시킬 수 있다. 인터페론에 반응하여, 세포는 많은 양의 단백질 키나아제 R (PKR)로 알려진 효소를 생산한다. 이 효소는 새로운 바이러스 감염에 대한 반응으로, eIF-2로 알려진 단백질을 인산화시키고; 인산화된 eIF-2는 세포 내 단백질 합성을 감소시키기 위해, eIF2B라고 불리는 다른 단백질과 함께 불활성 복합체를 형성한다. 또 다른 세포 효소, RNase L은, 또한 인터페론 작용에 의해 유도되어, 세포 내에서 RNA를 파괴하고, 나아가 바이러스 또는 숙주 유전자 모두의 단백질 합성을 감소시킨다. 억제된 단백질 합성은 바이러스와 감염된 숙주 세포 모두를 파괴한다. 또한, 인터페론은 인터페론-자극된 유전자 (ISGs)로서 집합적으로 알려진 수백 가지의 다른 단백질의 생산을 유도하고, 상기 단백질은 바이러스 및 인터페론에 의해 생성된 다른 작용들과 싸우는 역할을 한다. P53에 대한 인터페론의 효과는 또한 특정 암에 대한 그들의 보호 역할과 연결되어 있다.
- [0017] 인터페론의 또 다른 기능은 주요 조직 적합성 복합체 분자인, MHC I 및 MHC II의 발현을 상향-조절하고, 면역-프로테아좀 활성을 증가시키는 것이다. 높은 MHC I 발현은 세포 독성 T세포에 대한 바이러스 펩타이드의 제시를 증가시키는 반면, 면역-프로테아좀은 MHC I 분자 상에 로딩하기 위한 바이러스 펩타이드를 처리하여, 감염된-세포의 인식 및 사멸을 증가시킨다. 더 높은 MHC II 발현은 도움 T 세포에 대한 바이러스 펩타이드의 제시를 증가시킨다; 이들 세포는 사이토카인 (예를 들어, 다른 분자들 사이에서 보다 많은 인터페론 및 인터루킨)을 방출하고, 상기 사이토카인은 다른 면역 세포의 작용에 신호를 보내고 이를 공동으로-조정한다.
- [0018] 인터페론의 생산은 바이러스와 같은 미생물 및 박테리아 및 그들의 생산물에 대한 반응으로 주로 발생한다. 패턴 인식 수용체, 예를 들어 막 결합된 톨 유사 수용체 또는 세포질 수용체 RIG-I 또는 MDA5에 의한, 미생물에서 고유하게 발견되는 분자-바이러스성 글리코프로틴, 바이러스 RNA, 박테리아 내독소 (리포폴리사카라이드), 박테리아 편모, CpG 모티프-와의 결합은 IFN의 분비를 유도할 수 있다. 톨 유사 수용체 3 (TLR3)은 이중-가닥 RNA 바이러스 존재에 반응하여 인터페론을 유도하는데 중요하다; 이 수용체에 대한 리간드는 이중 가닥 RNA (dsRNA)이다. dsRNA에 결합한 후, 이 수용체는 많은 염증 단백질의 합성을 개시하는데 중요한 전사 인자 IRF3 및 NF- κ B를 활성화시킨다. siRNA 또는 벡터-기반 반응제와 같은 RNA 간섭 기술 도구는 인터페론 경로를 침묵시키거나 자극할 수 있다. 세포 (특히 림프구 세포의 IFN)로부터 IFN의 방출은 또한 유사분열 물질에 의해 유도된다. 인터루킨 1, 인터루킨 2, 인터루킨-12, 종양 괴사 인자 및 기타 집락-자극 인자와 같은 다른 사이토카인은 또한 인터페론 생산을 향상시킬 수 있다.
- [0019] 인터페론 치료법은 (화학 요법 및 방사선과 함께) 몇몇 암의 치료법으로서 사용된다. 이 치료법은 혈액학적 악성 종양; 털세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결정성 림프종 및 피부 T-세포 림프종을 포함하는 백혈병 및 림프종에서 사용될 수 있다. 재발하는 흑색종 환자는 제조한 IFN- α 2b를 받는다. B형 간염 및 C형 간염 모두는 종종 다른 항 바이러스 약물과 조합하여, IFN-b로 치료된다. 인터페론으로 치료받은 사람들 중 몇몇은 바이러스성 반응을 유지하고, 간염 바이러스를 제거할 수 있다. 가장 해로운 계통-간염 C 유전자형 I 바이러스는 현재 표준-치료의 인터페론인 RIBAVIRIN™ 및 최근에 승인된 프로테아제 억제제인 텔라프레비르 (Telaprevir) (Incivek™) 2011년 5월, 보세프레비르 (Boceprevir) (VICTRELIS™ 2011년 5월, 또는 뉴클레오타이드 유사체 중합효소 억제제 소포스비르 (Sofosbuvir) (SOVALDI™ 2013년 12월과 함께 60-80 %의 성공률로 치료될 수 있다. 이 치료를 받은 환자의 생검은 간손상 및 간경변의 감소를 나타낸다. 비록 감염 초기에 진단하는 것은 간염 C 감염 초기에 신체적 증상이 드물기 때문에 어렵지만, 몇몇 증거는 감염 후 바로 인터페론을 제공하는 것은 만성 C형 간염을 예방할 수 있음을 보여준다. IFN에 의한 만성 C형 간염 조절은 감소된 간-세포성 암종과 관련이 있다.
- [0020] 이 기술은 인터페론이 외인성 폴리펩티드로 투여될 수 있음을 교시한다.
- [0021] 대안적으로, 천연 인터페론 유전자의 내인성 발현을 유도할 수 있다. 예를 들어, 이 기술은 예를 들어, 항원성 바실러스 칼메트-게랭균 (*Bacillus Calmette-Guerin*) 또는 마이코박테리아 또는 아데노 바이러스 백신을 교시한다. 이러한 항원성 제제는 환자 고유의 세포가 인터페론을 발현하도록 유도한다.

- [0022] 대안적으로, 인터페론 전이 유전자를 갖는 벡터로 숙주 세포를 형질 형질전환 함으로써, 비-천연 인터페론 전이 유전자의 내인성 발현을 유도할 수 있다. 정말로, 심지어 외인성으로-투여된 인터페론 폴리펩타이드 자체가 인터페론 생산을 자극하기 위한 전달자로서 작용한다.
- [0023] 여기에 사용된 용어 "인터페론"(약자로 "IFN")은 집합적으로 유형 1 및 유형 2 인터페론을 의미하며, 결실, 삽입 또는 이들의 치환 변이체, 생물학적 활성 단편 및 대립 형질을 포함한다. 여기에 사용된 용어 인터페론 ("IFN"으로 약칭 함)은 집합적으로 유형 1 및 유형 2 인터페론을 지칭한다. 유형 1 인터페론은 인터페론 α , β , 및 ω 및 이들의 아형을 포함한다. 인간 인터페론- α 는 적어도 14개의 확인된 아형을 가지며, 인터페론- β 는 3개의 확인된 아형을 가지고 있다. 특히, 바람직한 인터페론- α 는 인간 인터페론 알파 아형 α -1 (GenBank Accession Number NP 076918), α -1b (GenBank Accession Number AAL35223), α -2, α -2a (GenBank Accession Number NP000596), α -2b (GenBank Accession Number AAP20099), α -4 (GenBank Accession Number NP066546), α -4b (GenBank Accession Number CAA26701), α -5 (GenBank Accession Number NP 002160 및 CAA26702), α -6 (GenBank Accession Number CAA26704), α -7 (GenBank Accession Number NP 066401 및 CAA 26706), α -8 (GenBank Accession Number NP002161 및 CAA 26903), α -10 (GenBank Accession Number NP 002162), α 13 (GenBank Accession Number NP 008831 및 CAA 53538), α -14 (GenBank Accession Number NP 002163 및 CAA 26705), α -16 (GenBank Accession Number NP 002164 및 CAA 26703), α -17 (GenBank Accession Number NP 067091), α -21 (GenBank Accession Number P01568 및 NP002166), 및 Stabinsky, 1996년 7월 30일에 허여된 US Pat. No. 5,541,293, Stabinsky, 1990년 1월 30일에 허여된 US Pat. No. 4,897,471, 및 Stabinsky, 1987년 9월 22일에 허여된 US Pat. No. 4,695,629에 개시된 것과 동일한 인터페론, 및 Goeddel et al., 1983년 11월 8일에 허여된 US Pat. No. 4,414,150에 개시된 하이브리드 인터페론을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 상기 문헌의 교시는 본 명세서에 참고로 포함된다. 유형 2 인터페론은 인터페론 γ (EP 77,670 A 및 EP 146,354 A) 및 아형으로서 언급된다. 인간 인터페론 감마는 최소한 5개의 확인된 아형을 가지며, 인터페론 오메가 1 (GenBank Accession Number NP 002168)을 포함한다. 발현을 위한 인터페론을 암호화하는 DNA 서열의 구축은 공지된 아미노산 서열에 기반한 종래의 재조합 DNA 기술에 의해 달성될 수 있으며, 상기 공지된 아미노산 서열은 상기 문헌 및 Goeddel et al., 2002년 11월 19일에 허여된 US Pat. No. 6,482,613에 개시된 것에서 참조되며, 상기 문헌의 교시는 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0024] "생물학적으로 활성" 인터페론의 단편은 임의의 항-중양 또는 항-증식 활성을 갖는다고 확인된 것일 수 있으며, 이는 당업계에 공지된 기술 (예를 들어, Openakker et al., supra; Mossman, J. Immunol. Methods, 65: 55 (1983) 및 IFN 수용체 매개 메커니즘을 통한 IFN 반응성 유전자의 활성화 참고)에 의해 측정될 수 있다. 가용성 IFN- α 및 IFN- β 단백질은 일반적으로 유형 1 IFN 수용체 복합체 (GenBank Accession Number NP 000865)와 결합하는 것으로 확인되고, 세포 내의 신호 유사한 세포 내 신호 전달 경로를 활성화시킨다. IFN- γ 는 일반적으로 유형 II IFN 수용체와 결합하는 것으로 확인된다. 리간드-유도된 양쪽 IFN 수용체 유형의 결합은 야누스 (Janus) 키나아제에 의해 수용체의 인산화를 가져오고, 이어서 STAT 단백질 (신호 변환기 및 전사의 활성화제)을 활성화시켜 추가적인 인산화 반응이 IFN-유도 가능한 전사 인자의 형성을 초래하고, 이는 IFN-유도 가능한 유전자에 존재하는 IFN 반응 요소에 결합하게 한다. 유형 1 및/또는 유형 2 IFN 수용체와 결합 후, IFN 경로 활성화로서 확인된 폴리펩타이드는 우리발명의 목적을 위한 인터페론으로 간주된다.
- [0025] **프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1**
- [0026] 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 ("PD-1")은 CD279라고도 불리며, 이는 PDCD1 유전자에 의해 암호화되는 인간 내의 단백질이다. PD-1은 면역 글로블린 슈퍼 패밀리에 속하며, 2 개의 공지된 리간드인 PD-L1 및 PD-L2에 결합하는 세포 표면 수용체로서 기능한다.
- [0027] PD-1은 T 세포의 활성화를 막아, 자가 면역을 감소시키고 "자가-내성 (self-tolerance)"을 촉진시킴으로써, 인간 면역계를 하향 조절하는데 중요한 역할을 한다. PD-1의 면역 조절 효과는 활성 T 세포를 도태시키고, 억제자 T 세포를 보호함으로써 초래된다. PD-1은 림프절에서 항원-특이적 T 세포의 사멸을 촉진하고, 그러나 조절 ("억제자") T 세포에서 세포사멸을 감소시킨다.
- [0028] PD-L1은 특정 종양에서 고도로 발현될 수 있다. 이는 종양에서 면역 세포의 감소, 심지어 제거된 증식 또는 및 암세포-표면 항원을 인지하고 확인된 암세포와 싸우는 환자의 내재 면역계의 손상을 초래한다.
- [0029] PD-1은 T 세포 및 전-B 세포 (pro-B cell)에서 발현된다. 면역 체크 포인트로서 기능을 하는, PD-1은 T-세포의 활성화를 억제함으로써 면역계를 하향 조절하는데 중요한 역할을 하며, 이는 자가면역을 감소시키고, 자가-내성을 촉진하게 된다. PD-1의 억제성 효과는 림프절 내의 항원 특이적 T-세포에서 세포 사멸 (프로그래밍된 세포 사

멸)을 촉진시키는 반면, 동시에 조절 T 세포 (억제자 T 세포)에서 세포 사멸을 감소시키는 이중 메커니즘을 통해 달성된다.

[0030] 프로그램된 사멸 1은 268개의 아미노산으로 구성된 유형 I 막 단백질이다. PD-1은 T 세포 조절자의 확장된 CD28/CTLA-4 패밀리의 구성원이다. 단백질의 구조는 막을 가로지르는 영역 및 세포내 꼬리로 이어지는 세포 외 IgV 도메인을 포함한다. 세포 내 꼬리는 면역-수용체 티로신-기반 억제성 모티프 및 면역-수용체 티로신-기반 스위치 모티프 내에 위치하는 두 개의 인산화 부위를 함유하고, 이는 PD-1이 음성적으로 TCR 신호를 조절함을 제안한다. 리간드 결합에 따라 SHP-1 및 SHP-1 포스포타아제가 PD-1의 세포질 꼬리에 결합하는 것은 일관된다. 또한, PD-1 결합은 E3-유비퀴틴 리가아제 CBL-b 및 c-CBL을 상향 조절하고, 이는 T 세포 수용체 하향-조절을 유도한다. PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 대식세포의 표면 상에 발현되며, 이는 CTLA-4와 비교하여, PD-1이 보다 광범위하게 면역 반응을 음성적으로 조절함을 시사한다.

[0031] PD-1에는 B7 패밀리의 구성원인 PD-L1 및 PD-L2의 두가지 리간드가 있다. PD-L1 단백질은 LPS, 및 GM-CSF 치료에 반응하여 대식세포 및 수지상 세포 (DC), 및 TCR 및 B 세포 수용체 신호 전달에 따른, T 세포 및 B 세포에서 상향 조절되며, 반면에 쉬고 있는 쥐에서는 PD-L1 mRNA는 심장, 폐, 흉선, 비장, 및 신장에서 검출될 수 있다.

[0032] 면역계를 활성화시키는, PD-1을 표적으로 하는 단일 클론 항체가 암 치료를 위해 개발되었다. 많은 종양 세포가 PD-L1, 면역 억제성 PD-1 리간드를 발현한다; 시험 관내에서 PD-1 및 PD-L1 사이의 상호 작용의 억제는 T 세포 반응을 향상시키고, 전임상 항종양 활성을 매개한다. 이것은 면역 체크 포인트 봉쇄로 알려져 있다.

[0033] 하나의 그러한 항-PD-1 항체 약물인, 니볼루맵 (nivolumab) (OPDIVO™ Bristol Myers Squibb Co., Princeton, NJ에서 상업적으로 수득 가능함)은 296명의 환자 전체의 임상시험에서 비-소-세포성 폐암, 흑색종 및 신-세포암에서 완벽한 또는 부분적인 반응을 나타냈다. 결장 및 췌장암 환자는 반응이 없었다. 또한 PD-1 수용체를 표적으로 하는, 니볼루맵 (OPDIVO™ Bristol-Myers Squibb)은 2014년 7월 일본에서, 2014년 12월 미국 FDA에서 전이성 흑색종 치료제로 승인받았다.

[0034] 또한 펌브롤리주맵 (Pembrolizumab) (KEYTRUDA™ 또는 MK-3475, Merck & Co., Rahway, NJ에서 상업적으로 이용 가능함)은 PD-1 수용체를 표적으로 하고, 2014년 9월 FDA에서 전이성 흑색종 치료로 승인을 받았다. 펌브롤리주맵은 UK 의약품 조기 접근 제도 (Early Access to Medicines Scheme, EAMS) 통해 영국에서 진전된 (advanced) 흑색종 환자에게 접근 가능해졌다. 또한 이것은 미국에서 폐암, 림프종 및 악성종괴종에 대한 임상 시험에서 사용되었다. 그것은 부작용이 거의 없이 성공적이었다. 2015년 10월 2일에 펌브롤리주맵은 다른 치료 후에 질병이 진전된 (전이성) 비-소세포 폐암 (NSCLC) 환자에 대해 FDA에서 승인을 받았다.

[0035] PD-1 수용체를 목표로 하는 초기 단계 개발에 있는 다른 약물 (종종 "체크 포인트 억제제"로 언급됨): 피딜리주맵 (Pidilizumab) (CT-011, Cure Tech), BMS 936559 (Bristol Myers Squibb), MPDL3280A (Roche) 및 아테졸리주맵 (atezolizumab) (Amgen).

[0036] 병용 요법

[0037] 발명자는 인터페론으로 암을 치료하는 것은-인터페론 폴리펩티드를 투여하거나, 인터페론을 발현하는 세포를 유도하는 작용제를 처리함으로써-동시에 PD-1의 발현을 유도한다는 것을 발견하였다.

[0038] 따라서 발명자는 인터페론-기반 암 치료법의 효능을 개선하기 위해 PD-1의 활성을 억제하는 화합물 및 인터페론을 병용-투여하는 것을 제안한다.

[0039] 이것은 예를 들어, 암 치료로서 유효한 양의 인터페론 폴리펩타이드를 정맥내로 주사하는 것 및 단일 클론 항체 체크 포인트 봉쇄 억제제를 PD-1 발현에서 인터페론-야기된 증가를 억제하기에 충분한 양, 바람직하게는 PD-1의 효과를 감소시키는 양을 정맥내로 투여하는 것을 포함한다.

[0040] 대안적으로, 이는 암 치료로서 유효한 양의 인터페론 발현을 유도하는, 작용제를 정맥내로 주사하는 것 및 예방적으로 단일 클론 항체 체크 포인트 봉쇄 억제제를 PD-1 발현에서 인터페론-야기된 증가를 억제하기에 충분한 양, 바람직하게는 PD-1의 효과를 감소시키는 양으로 정맥내로 투여하는 것을 포함한다. 상기 작용제는 인터페론 발현을 유도하는, 항원성 백신일 수 있다 (바이러스, 또는 BCG 백신 또는 *마이코박테리아* 백신). 대안적으로 상기 작용제는 발현가능한 인터페론 형질 전환 유전자로 숙주 세포를 형질전환시키는 전이 유전자 벡터일 수 있다. 대안적으로, 이는 또한 인터페론 전이 유전자를 갖는 항원성 바이러스 또는 박테리아일 수 있다.

- [0041] 실시예 1-IFN α 는 PD-L1 및 TRAIL 발현을 유도한다.
- [0042] 인터페론-알파 (IFN α)는 임상적으로 두드러지게 효과적이지 못했다. 발명자는 벡터-매개 IFN α 유전자 치료의 설정 보다 더 효과적일 수 있다는 것을 가정했다. 몇 년 전, 발명자는 인터페론 알파 2b로 매개되는 INSTILADRIN™ 브랜드 아데노 바이러스 벡터의 임상 2상 인간 임상 실험을 시작했다. 이 실험에서, 발명자는 인터페론 노출에 대한 반응으로 PD-L1, TRAIL, IRF1 및 라미닌 A의 발현을 측정하였다.
- [0043] 재료 및 방법: RT112 및 SW780 세포를 배지에서 배양한 다음, 인터페론 알파 폴리펩티드를 함유하는 배지에 노출시켰다. 인터페론의 양은 0 (대조군)에서 10^4 국제 단위/mL로 배열되었다. 유전자 발현은 상업적으로 이용 가능한 항체 및 프라이머를 사용하여, 웨스턴 블랏 및 정량적 실시간 PCR 를 사용하여 평가되었다. RNA는 MIRVANA™ 키트 (Thermo Fisher)를 사용하여 배양되는 세포로부터 분리되었다. TAQMAN™ 어레이 카드 (A 및 B) (Thermo Fisher)를 사용하여 RT112에서 mIR을 프로파일링 하였다. 전체 게놈 mRNA 발현 프로파일링을 Illumina HumanHT_12_v4 BEADCHIP™ 어레이 (47323 프로브)을 사용하여 RT112 및 UC3에서 수행하였다.
- [0044] 결과: 결과는 도 1 내지 4에서 제공된다. 모든 세포주는 IFN α 의 노출에 반응하여 PD-L1, TRAIL 및 IRF1 발현을 상향-조절 하였고, 라미닌 A 발현에는 측정가능한 효과가 없었다. PD-L1, TRAIL 및 IRF1 발현에 대해서, 효과는 다른 세포주에서 큰 차이였다.
- [0045] 결론: 암세포주의 패널에서, 인터페론 노출은 PD-L1 면역 체크 포인트 발현에서 중대한 증가를 이끌었다. 발명자는 이는 인터페론이 당업계에서 효과적인 암 치료제로 사용하는데 실패한 이유를 암시하기 때문에, 이것이 이러한 발견이 놀랍다는 것을 발견하였다. 인터페론이 이론적으로 항암 치료제로서 효과적이어야 하는 반면, 인터페론은 또한 PD-L1을 상향-조절 하고, 이에 따라 인터페론의 치료학적 효과가 좌절될 것이다.
- [0046] 실시예 2-IFN α 는 PD-L1 발현을 용량-의존적 방식으로 유도한다.
- [0047] 여기서 발명자는 면역 체크 포인트 PD-L1, 마이크로-RNA(miR) 및 mRNA의 발현을 측정하였다.
- [0048] 재료 및 방법: RT112, T14, UC3 및 UC14 세포를 배지에서 배양한 후, 6시간 동안 다른 대조군 배지, 또는 1000 IU/ML의 인터페론 알파 폴리펩티드를 함유하는 배지에서 노출시켰다. Pd-L1의 발현은 상업적으로 이용 가능한 항체 및 프라이머를 사용하여, 웨스턴 블랏 및 정량적 실시간 PCR를 사용하여 평가되었다. RNA는 MIRVANA™ 키트 (Thermo Fisher)를 사용하여 배양되는 세포로부터 분리되었다. TAQMAN™ 어레이 카드 (A 및 B) (Thermo Fisher)를 사용하여 RT112에서 mIR을 프로파일링 하였다. 전체 게놈 mRNA 발현 프로파일링을 Illumina HumanHT_12_v4 BEADCHIP™ 어레이 (47323 프로브)을 사용하여 RT112 및 UC3에서 수행하였다. 전체 실험을 통계적 신뢰성을 증가시키기 위해 3번 반복 수행하였다.
- [0049] 결과: 모든 세포주는 IFN α 의 노출에 반응하여 PD-L1 발현을 상향-조절하였다. 이러한 효과는 UC3 세포보다 RT112 세포에서 가장 두드러졌다 (도 5 참고). 대조적으로, 세가지 잠재적 oncomiR 지역의 발현은 RT112:1233 세포 ($p=0.0036$), 19b-1# ($p=0.0157$), 및 222# ($p=0.0061$)에서 IFN α 을 노출한 후, 유의하게 하향-조절되었다. IFN α 노출 후, log (발현) (거짓 발견을 <0.001)에서 최소 2배 이상 차이로 상이하게-발현된 유전자를 분석한 결과, 302 및 181은 RT112 및 UC3 세포 주에서 각각 상이하게 발현된 유전자였다. 두 세포주에서 최고 순위의 IFN α 로 유도된 유전자에는 몇가지를 포함하였으나, 이는 이전에 방광암에서 개시되지 않았던 것이며, IFIT2 (전이의 음성적 조절자) 및 IFI27 (TRAIL에 대한 민감도와 관련됨)을 포함한다. IFN α - 유도된 PD-L1 발현을 또한 실시간 PCR 데이터와 평행한 배수-변화 (fold-changes)를 갖는 mRNA 유전자 칩에 대해 입증 가능하였다.
- [0050] 결론: 암 세포주 패널에서, 인터페론 노출은 유의한 PD-L1 면역 체크 포인트 발현의 증가를 가져왔다. 어레이-기반 마이크로 RNA 및 mRNA 프로파일링은 방광암에서 IFN α 반응의 신규한 잠재적 매개자를 드러냈다. 이 방광 IFN α 프로파일은 아데노 바이러스성 IFN α 유전자 치료에 대한 반응을 측정하기 위한 중간 종말점으로서 유용할 수 있다. IFN α 치료에서 PD-L1의 발현의 나야간 예측은 면역 체크 포인트 억제제를 활용한 합리적인 병용 치료법으로 이끌 수 있다.
- [0051] 실시예 3-마우스 인터페론은 PD-L1 발현을 유도한다
- [0052] 재료 및 방법: BBN972 및 MB49 #1 (MB49-*luc*) 세포를 배양하고, 0 내지 1×10^4 개의 마우스 인터페론의 국제 단위를 함유하는 매체에 노출시켰다. 이어서 PD-L1 및 (대조군으로서) 액틴의 발현을 측정하였다.
- [0053] 결과: 마우스 인터페론은 양 세포주 모두에서 액틴의 발현에 영향을 미치지 않았다 (도 11, 12 참조). 대조적으로, 마우스 인터페론은 PD-L1 발현에 있어서 현저한, 용량-의존적 효과를 나타냈다 (도 9, 10을 참조).

- [0054] 결론: 이러한 데이터는 PD-L1 발현에서 인터페론의 효과가, 인간 인터페론 알파 2a 또는 정말로인간 인터페론에 한정되지 않음을 나타낸다. 오히려, PD-L1의 발현에서 인터페론의 효과가 일반적으로 인터페론에 대해 포괄적인 것으로 보인다.
- [0055] 실시예 4-폴리이노시닉: 폴리시티딜산 (폴리 I:C)은 PD-L1을 유도한다
- [0056] 재료 및 방법: 상기 데이터는 인터페론이 다른 종의 인터페론에 대한 반응에서 PD-L1을 용량 의존적인 방식으로, 빠르고, 명백하게 유도한다는 것을 나타낸다. 인터페론을 복용한 동물 중에 상관없이 효과를 감안할 때, 발명자는 효과가 인터페론에 한정되지 않으며, 다른 유형의 면역 자극제에 의해 더욱 일반적으로 유발될 수 있다고 가정하였다. 이러한 개념을 시험하기 위하여, 발명자는 폴리이노시닉:폴리시티딜산 (종종 “폴리 I:C”로 약식됨)을 평가하였다. 폴리 I:C는 면역자극제이다. 이는 바이러스 감염을 자극하기 위해 나트륨 염 형태로 사용된다. 폴리 I:C는 구조적으로 이중-가닥 RNA와 유사하다. dsRNA는 일부 바이러스에 존재한다. 발명자는 폴리 I:C를 *plc* 또는 *ulc* 종양을 이식한 실험용 마우스에 복막 내 주사로 투여하였다.
- [0057] 결과: 도 13은 대조군 마우스 (n=3)가 혈청 인터페론의 최소 기준선 측정을 나타낸 것을 보여준다. a. 대조적으로, 폴리 I:C의 복막 내 주사는 시간-의존적 혈청 인터페론 증가를 생산한다 a. 도 14는 6 시간에 종양 내 폴리 I:C 주사의 결과를 나타낸다. 상기 데이터 (각 시리즈에 대해 n=1)는 종양 내 인터페론이 *plc* 종양에서 유의하게 증가하고, *ulc* 종양에서 다소 증가하며, 대조군의 종양에서 측정 가능한 증가가 없음을 보여준다. 도 15는 폴리 I:C (500 meg) 또한 종양 내 PD-L1 발현을 유도함을 나타낸다 (24시간에)(Mann Whitney p=0.0495).
- [0058] 결론: 이들 데이터는 PD-L1 발현이 단지 인터페론에 의해 유도되는 것이 아니라, dsRNA를 모방하고 인터페론을 유도하는 화합물인 폴리 I:C에 의해 유도되는 것임을 시사한다.
- [0059] 실시예 5-인터페론 바이러스 유전자 치료는 사람에서 PD-L1을 유도한다
- [0060] 재료 및 방법: 이 데이터는 BCG 치료 후, 반응성이 없거나 재발성인 환자에서 인간 인터페론 알파 2b 전이 유전자를 갖는, INSTILADRIN™ 복제-결핍된 아데노 바이러스 유전자 치료 벡터에 대한 인간의 임상 2단계에서 가져온 것이다. 이 연구 계획은 공개되었으며, 여기에 참조로 포함된다.
- [0061] 결과: 도 16은 인간 인터페론 알파 2b 전이 유전자를 갖는, INSTILADRIN™ 복제-결핍된 아데노 바이러스 유전자 치료 벡터로 인간에서 8 회의 치료 주기에서의 RNA 발현을 나타낸다. 홀수 (흰색으로 코드됨) 컬럼은 치료 전 RNA 전사를 측정한다; 짝수 (밝은 파란색으로 코드됨) 컬럼은 후에 측정한다. RNA 양은 정량적으로 표시되며, 밝은 녹색은 가장 적게 보이고 밝은 빨간색은 가장 많이 보인다. 컬럼 1 및 2는 PD-L1 RNA가 치료 전 -2에서 후에 +2로 증가하는 것을 보여준다. 컬럼 3 및 4는 유사하게 PD-L1 RNA가 치료 전 -2에서 후에 +3로 증가하는 것을 보여준다. 모두에서, 치료 쌍의 3 분의 1은 치료 후, PD-L1 발현의 유의한 증가를 보여준다. 치료는 또한 다른 면역 체크 포인트 마커를 상향-조절했다.
- [0062] 결론: 이들 데이터는 환자의 3 분의 1이 인터페론 유전자 치료법의 치료 후에, T-세포 및 인터페론 체크 포인트 마커 (PD-L1 포함)를 유도하는 것을 입증함을 나타낸다.
- [0063] 실시예 6-병용 요법은 생존을 증가시킨다
- [0064] 재료 및 방법: 암컷 실험실 래트에게 종양 세포를 접종하고, 세포가 측정 가능한 종양으로 발전하도록 허용했다. 그 후, 래트를 식염수 (대조군), IgG (대조군), 항-PD1 단일 클론 항체 (단독 요법), 폴리 I:C (인터페론 발현을 유도하기 위한 단일 요법) 및 폴리 I:C 및 항-PD1 단일 클론 항체의 병용 (병용 요법)로 처리하였다.
- [0065] 결과: 도 17은 피하 C57BL6/J 종양에 대한 MB49 종양 크기 대 시간을 나타낸다 (n=그룹당 5마리 암컷 마우스). 치료는 종양 이식 10일 후부터 시작하여, 200 meg q3 일이다. 에러 바드 (Error bard)는 SEM을 나타낸다. 40 일 때에 가장 큰 종양 부피를 나타내는, 가장 높은 (노란색) 선이 대조군 (모든 그룹 n=5, 암컷만)이다. 다음으로 가장 낮은 (파란색) 선은 IgG 대조군이다. 다음으로 가장 낮은 (빨간색) 선은 폴리 I:C이다. 그 다음으로 낮은 (녹색) 선은 항-PDL 단일 클론 항체이다. 가장 낮은 (검정색) 선은 X 축 자체에 놓여 있으며, 이는 병용 요법이다.
- [0066] 도 18은 암컷 마우스에 종양을 접종하고, 식염수 (최하위 선), IgG (다음 상위 선), 항-PD1 단일 클론 항체 (다음 상위 선), 폴리 I:C (다음 상위 선) 및 폴리 I:C 및 항-PD1 단일 클론 항체의 병용 (가장 높은 선)을 처리한 경우의 캐플란-메이어 생존 곡선을 나타낸다. 이러한 데이터는 인터페론-유도제 (폴리 I:C) 및 PD1 억제제 (항-PD1 단일 클론 항체)를 병용하는 것은 생존을 유의하게 증가시킨 것을 보여준다: 50 일에서, 대조군 동물의 ~20 %

가 살아 있었고, 폴리 I:C 동물의 50 %가 살아 있으며, 병용 요법으로 처리된 동물의 100 %가 살아 있었다.

[0067] 도 19는 수컷 마우스의 시간에 따른 표준화된 (평균 \pm SD) 복사 강도를 비교한다. 로그-순위 테스트를 사용하여, 이들 데이터는 IgG 대조군 ($p=0.06$), 폴리 I:C 단일 요법 ($p=0.32$), 및 항-PD1 단일클론 항체 ($p=0.14$)보다 우수한 병용 요법 ($p=0.06$)을 보여 준다.

[0068] 도 20은 "생존 부분 (survival portions)", 즉 시간이 지남에 따른 생존 경향성을 보여주는 데이터이다.

[0069] 결론: 이러한 데이터는 병용 요법이 시너지적인 효과가 있고, 단지 부가적인 효과 이상을 부여함을 보여준다.

[0070] 실시예 7-표재성 확산 흑색종

[0071] 재료 및 방법: 표재성 확산 흑색종으로 진단된 인간 환자를 광범위한 국소 절제 및 전초 림프절 (sentinel node) 생검으로 치료하여, 림프계 또는 말초 기관으로 질병의 확산이 없음을 확인하였다. 그 다음 환자는 INSTILADRIN™ 및 KEYTRUDA™의 병용으로 치료하였다. 치료는 외과적 절제술 후 실용적으로 즉시 시작하였다.

[0072] INSTILADRIN™ 브랜드 아데노 바이러스는 복제-결핍된, 인터페론 알파 2b 전이 유전자를 갖는 재조합 아데노 바이러스 유전자 치료 벡터이다. 그러한 유전자 치료 벡터의 제조는 예를 들어, Muralidhara Ramachandra *et al.*, *Selectively Replicating Viral Vector*, 미국 문자 특허 번호 7691370에 개시되어 있다. 인터페론 전이 유전자의 분리는 예를 들어, Charles Weissmann, *DNA Sequences, Recombinant DNA Molecules and Process for Producing Human Interferon-Like Polypeptides*, 미국 문자 특허 번호 6835557에 개시되어 있다.

[0073] KEYTRUDA™ 브랜드 펩트올리주맙은 인간화된 단일 클론 항-프로그램된 세포 사멸-1 (PD-1)항체 (Fc 지역에서 서열 변이가 안정화된 IgG4/kappa 동형)이다.

[0074] INSTILADRIN™은 단일-용량 바이알로 제공된다. INSTILADRIN™의 1 회 복용량은 주사용 멸균 식염수로 재구성되었고, 절단 부위에 국소적으로 피하에 투여하였다. 투여를 4주에 한번씩 반복하였다. KEYTRUDA™ 파우더 한 바이알에는 50mg의 펩트올리주맙이 들어 있다. KEYTRUDA™는 30분에 걸쳐 정맥 내 주입되며, 3 주마다 반복해 투여하였고, 환자는 질병의 진행 또는 허용할 수 없는 독성이 있을 때까지 치료받는다. 비정형 반응 (즉, 종양 수축 후 처음 몇 개월 내에 초기 일시적인 종양 크기 증가 및 작은 새로운 병변)이 관찰될 수 있다. 임상적으로-안정한 환자의 치료는 질병 진전이 확인될 때까지 질병 진행의 초기 증거와 함께 계속하는 것이 바람직하다.

[0075] 시험 대상을 등록한 후, 치료 그룹에 배정한다: 절제 후 KEYTRUDA™만 사용, 절제 후 INSTILADRIN™만 사용, 절제 후 KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™를 병용, 절제 후 INSTILADRIN™ 및 NSAID (COX-2 억제제)를 병용, 및 절제 후 KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 및 NSAID를 병용.

[0076] 결과: 1차 유효성 결과 측정은 진행 자유 생존 (progression free survival) (예를 들어, 고형암에서 반응 평가 기준 [Response Evaluation Criteria in Solid Tumours, RECIST]을 사용하는 통합된 방사선학 (Integrated Radiology) 및 종양학 평가 검토 (Oncology Assessment review)에 의해 평가됨), 전체 생존율, 및 전초 림프절 생검이다. 다른 효능 결과 측정은 전반적인 반응율과 반응 지속이 될 수 있다. 이어지는 전초 림프절 생검은 병의 확산이 없음을 나타낼 것으로 예상된다.

[0077] 발명자는 INSTILADRIN™ 단독을 투여한 경우에 비하여, INSTILADRIN™ 및 COX-2 억제제를 병용투여는 상승된 효율을 입증할 것이라고 예상했다. 발명자는 작용제 단독 투여에 비하여, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 병용 투여가 상승된 효능 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다. 발명자는 KEYTRUDA™ 단독 또는 INSTILADRIN™ 및 NSAID 단독을 투여한 경우에 비하여, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 및 NSAID의 병용 투여가 상승된 효능 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다.

[0078] 실시예 8-표재성 확산 흑색종

[0079] 재료 및 방법: 앞의 실시예와 같은 KEYTRUDA™

[0080] 인터페론의 공급원로서, SYLATRON™페길화된 인터페론 알파 2b를 6회 mcg/kg으로 1주일에 한번 8회 피하 투여하였고 (유도), 3 mcg/kg으로 1주일에 1번, 5년까지 (유지) 투여하였다. 만약 부작용으로 인해 SYLATRON™투여량 조절이 1-8주 치료 동안에 (유도) 필요하다면, 원래 투여량 (1주일에 한번 6 mcg/kg)에서 3 단계 감소가 바람직하다 (즉, 투여량을 1주일에 한번 3mcg/kg으로 감소시키고; 필요하다면 일주일에 한번 2mcg/kg으로 감소시킨다; 그 후, 필요한 경우 추가로 일주일에 한번 1 mcg/kg로 감소시킨다). 만약 부작용으로 인해 9-260주 치

료 동안에 (유지) 투여량 조절이 필요한 경우, 원래 투여량 (일주일에 한번 3 mcg/kg) 보다 2 단계 감소가 바람직하다 (즉, 투여량을 일주일에 한번 2mcg/kg으로 감소시킨다; 필요한 경우 추가로 일주일에 한번 1 mcg/kg로 감소시킨다).

- [0081] 시험 대상을 등록한 후, 치료 그룹에 배정한다: 절제 후 KEYTRUDA™만 사용, 절제 후 SYLATRON™만 사용, 절제 후 KEYTRUDA™ 및 SYLATRON™를 병용, 절제 후 SYLATRON™와 NSAID (COX-2 억제제)를 병용, 및 절제 후 KEYTRUDA™ 및 SYLATRON™ 및 NSAID를 병용.
- [0082] 결과: 1차 유효성 결과 측정은 진행 자유 생존 (progression free survival) (예를 들어, 고형암에서 반응 평가 기준 [Response Evaluation Criteria in Solid Tumours, RECIST]을 사용하는 통합된 방사선학 (Integrated Radiology) 및 종양학 평가 검토 (Oncology Assessment review)에 의해 평가됨), 전체 생존율, 및 전초 림프절 생검이다. 다른 효능 결과 측정은 전반적인 반응율과 반응 지속이 될 수 있다. 이어지는 전초 림프절 생검은 병의 확산이 없음을 나타낼 것으로 예상된다.
- [0083] 발명자는 SYLATRON™ 단독을 투여한 경우에 비하여, SYLATRON™ 및 COX-2 억제제를 병용투여는 상승된 효율을 입증할 것이라고 예상했다. 발명자는 작용제 단독 투여에 비하여, KEYTRUDA™ 및 SYLATRON™ 병용 투여가 상승된 효율 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다. 발명자는 KEYTRUDA™ 단독 또는 SYLATRON™ 및 NSAID 단독을 투여한 경우에 비하여, KEYTRUDA™ 및 SYLATRON™ 및 NSAID의 병용 투여가 상승된 효율 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다.
- [0084] 실시예 9-비-소 세포 폐암
- [0085] 재료 및 방법: 상기 실시예 7에 따른 약학적 작용제. 인체 시험 대상은 비소 세포 폐암으로 진단된다. 환자는 Greene, Frederick L., *Cancer Staging Manual* (American Joint Committee on Cancer, publ., 6th edition)에 따라 선별하여 필적하는 질병을 갖는 필적하는 시험 대상으로 확실히 하였다. 시험 대상은 PD-L1의 종양 발현을 기반으로 치료대상으로 선별되었다.
- [0086] KEYTRUDA의 권장 용량은 다음과 같다: 이전에 화학 요법으로 치료받지 않은 경우, NSCLC (비소 세포 폐암)에 대해 200mg, 및 화학 요법으로 이전에 치료받은 경우, NSCLC 또는 흑색종에 대해 2mg/kg.
- [0087] INSTILADRIN™은 늑막-내부로 주입된다. 이 방법은 미국 특허 공보 US2014/17202의 도 2에 설명되어 있다.
- [0088] 시험 대상을 등록한 후, 치료 그룹에 배정한다: KEYTRUDA™만 사용, INSTILADRIN™만 사용, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™를 병용, INSTILADRIN™ 및 NSAID (COX-2 억제제)를 병용, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 및 NSAID를 병용.
- [0089] 결과: 1차 유효성 결과 측정은 진행 자유 생존 (progression free survival), 전체 생존율, 및 전초 림프절 생검이다. 다른 효능 결과 측정은 전반적인 반응율과 반응 지속이 될 수 있다. 이어지는 전초 림프절 생검은 병의 확산이 없음을 나타낼 것으로 예상된다.
- [0090] 발명자는 INSTILADRIN™ 단독을 투여한 경우에 비하여, INSTILADRIN™ 및 COX-2 억제제를 병용투여는 상승된 효율을 입증할 것이라고 예상했다. 발명자는 작용제 단독 투여에 비하여, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 병용 투여가 상승된 효율 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다. 발명자는 KEYTRUDA™ 단독 또는 INSTILADRIN™ 및 NSAID 단독을 투여한 경우에 비하여, KEYTRUDA™ 및 INSTILADRIN™ 및 NSAID의 병용 투여가 상승된 효율 결과 측정을 입증할 것이라고 예상했고, 발명자는 이것이 단순한 첨가물 이상으로 유용할 것으로 예상했다.
- [0091] 요약
- [0092] 상기 실시예는 특정 암 치료에 대해 논의한다. 그러나 우리의 발견은 인터페론 신호 전달에서 유익한 모든 상태 및 CD279의 과-발현으로 고통받는 상태를 치료하는데 보다 일반적으로 사용될 것이다.
- [0093] 첨부된 청구항에서, "치료"란 용어는 완전한 치료가 필요로 하는 것이 아닌, 경감시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 암을 "치료하는 것"은 암을 완전히 제거함으로써 달성할 수 있으며, 또한, 예를 들어, 암의 성장을 늦추거나, 사망의 위험을 감소시키거나, 이러한 치료를 받은 적 없는 환자와 비교하여 병의 진전을 늦춤으로써, 달성할 수 있다.
- [0094] 상기 우리의 논의를 고려할 때, 당업자는 특정한 이의 응용 또는 변형을 쉽게 볼 수 있다. 예를 들어, 상기 논

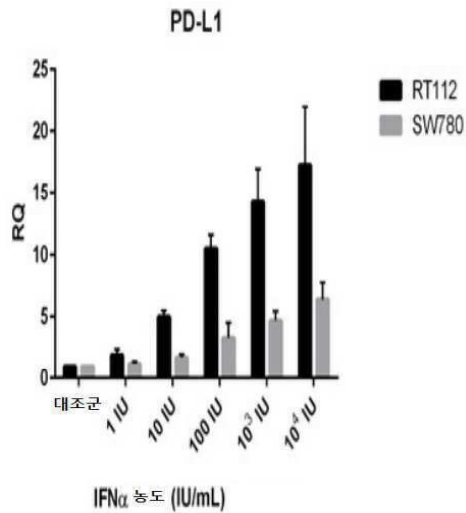
의는 인간 인터페론의 특정 종을 언급하지만, 비슷하게 기능하는 다른 종 및 인터페론 변이체 또는 유사체는 동일한 혜택을 제공할 것이다. 따라서, 발명자는 우리의 특허의 법적 적용 범위가 논의한 실시예에 의해서가 아니라, 첨부된 법적 청구항 및 그의 허용가능한 등가물에 의하여 결정될 것을 의도하였다.

[0095]

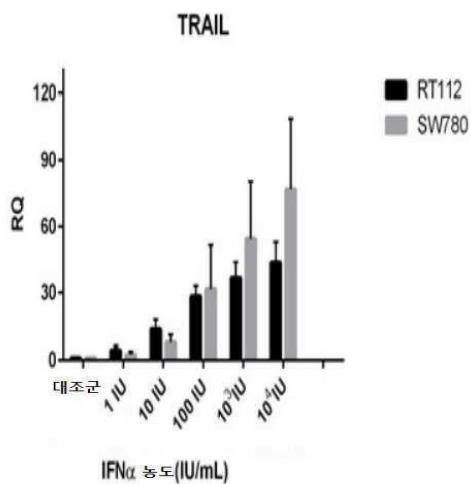
첨부된 법적 청구항이 약 "동시에" 치료를 언급할 때 (원래 청구항 3 참조), 이는 동시에 환자에서 두 화합물이 작용하는 것을 요구한다. 이는 동시에 투여해야 하는 것을 요구하는 것은 아니다. 따라서 만약 제2 작용제의 효과가 최소한 일주일 지속될 경우, 제2 작용제를 투여하고 일주일 후에, 제1 작용제를 투여할 수 있다.

도면

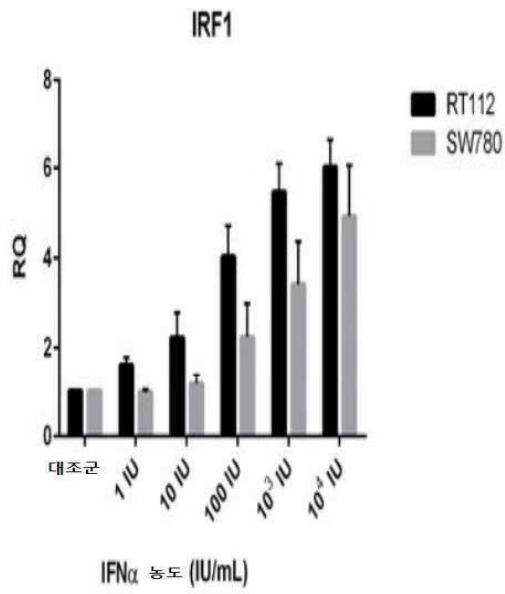
도면1



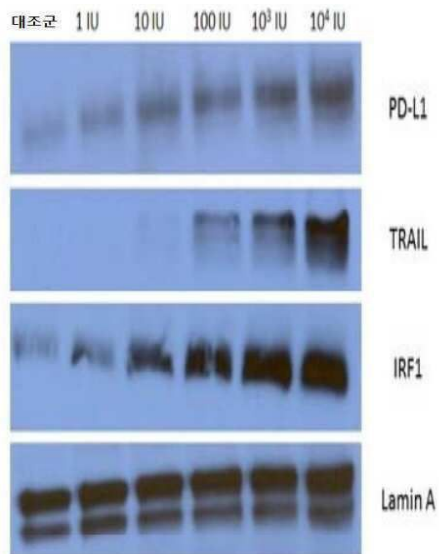
도면2



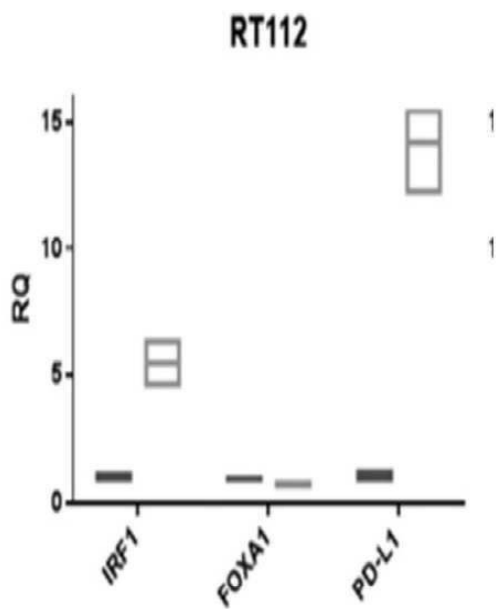
도면3



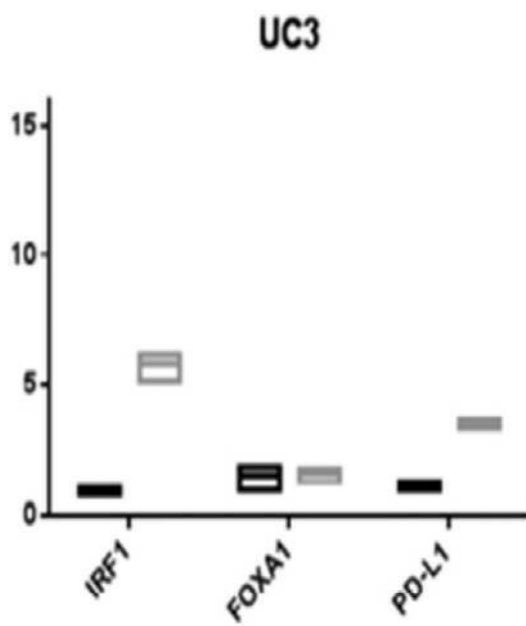
도면4



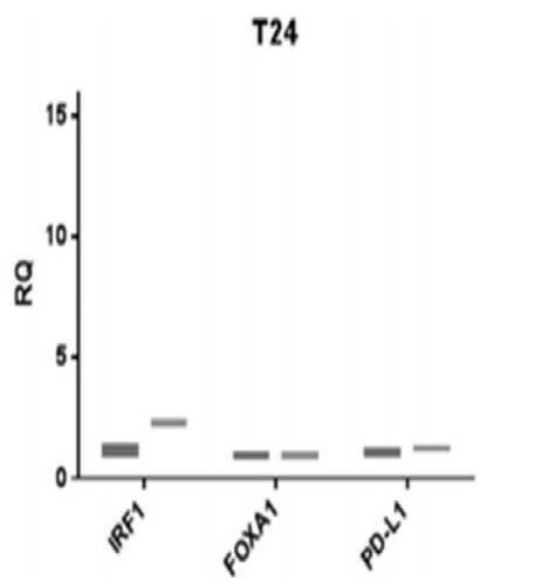
도면5



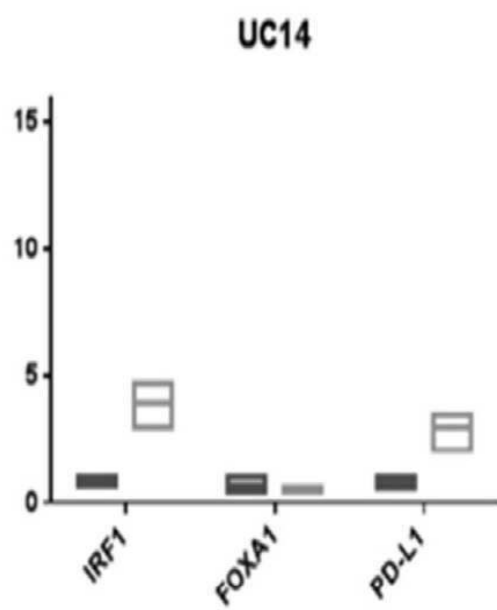
도면6



도면7



도면8



도면9



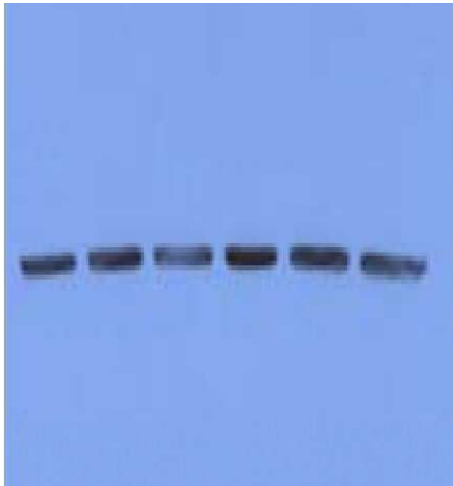
도면10



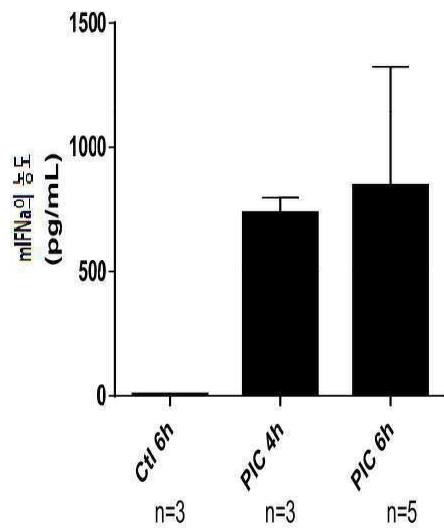
도면11



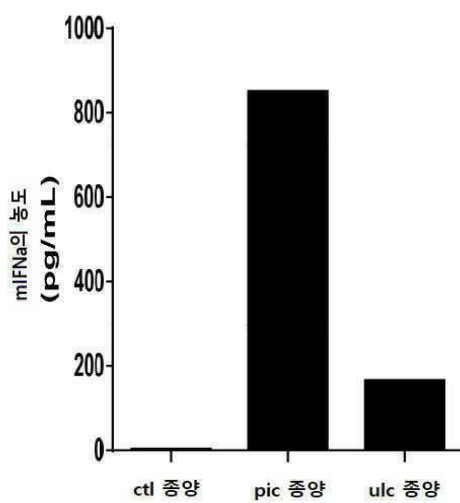
도면12



도면13

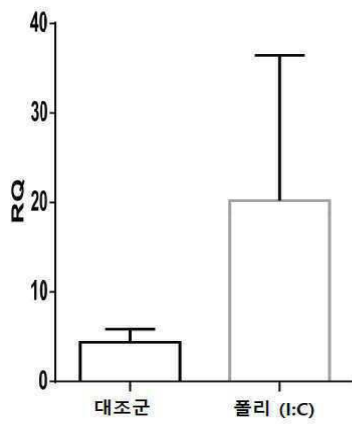


도면14

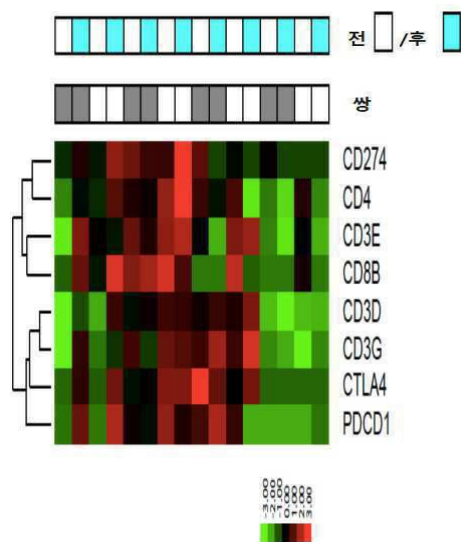


도면15

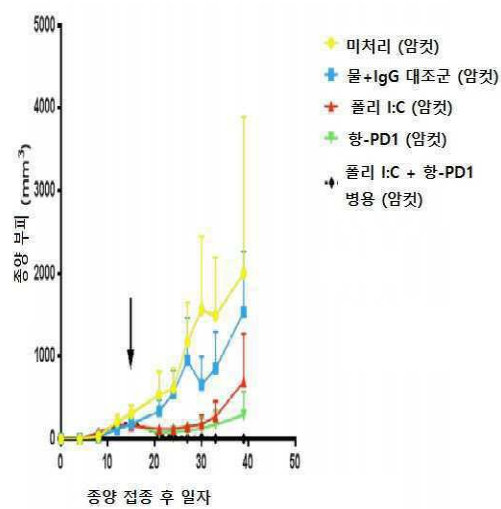
PD-L1
(24시간 병변-내부 대조군 vs 풀리 (I:C) 500 mcg)



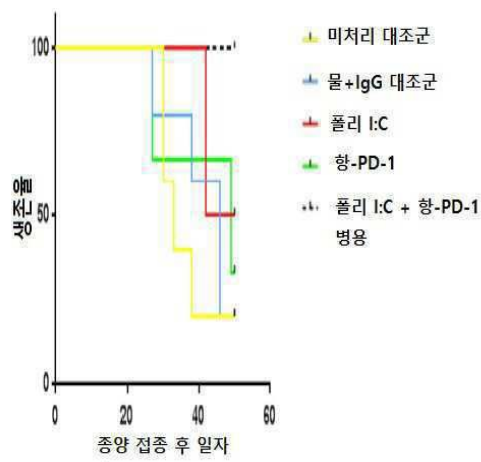
도면16



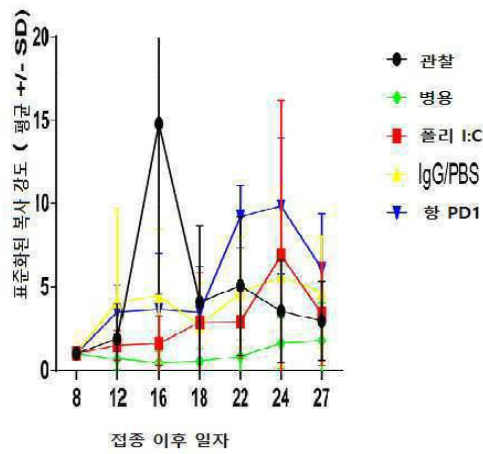
도면17



도면18



도면19



도면20

