



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0006916
(43) 공개일자 2018년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/768 (2014.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/285* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/768 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7032858

(22) 출원일자(국제) 2016년04월18일

심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 2017년11월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/028184

(87) 국제공개번호 WO 2016/168862

국제공개일자 2016년10월20일

(30) 우선권주장

62/149,484 2015년04월17일 미국(US)

(71) 출원인

메모리얼 슬로안-캐터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275

(72) 발명자

덩량

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리얼
슬로안 캐터링 캔서 센터

월초크 제드

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 애비뉴 1275 메모리얼
슬로안 캐터링 캔서 센터

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

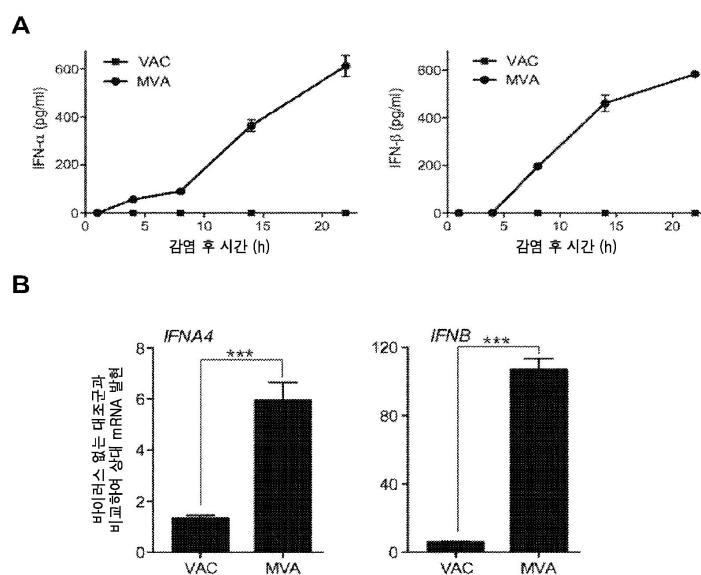
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 고형 종양에 대한 면역치료제로서 MVA 또는 MVA△E3L의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 악성 고형 종양을 치료하는데 항암 면역치료제 단독 또는 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제와 조합하여 종양내 또는 전신으로 전달되는 변형된 박시니아 안카라 (MVA) 바이러스 또는 MVA△E3L에 관한 것이다. 특정 구현예는 숙주의 면역계를 이동시켜서 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키는 것에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 39/285 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

A61K 2039/525 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

C12N 2710/24122 (2013.01)

C12N 2710/24132 (2013.01)

(72) 발명자

메르구브 타하

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 에비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터

슈만 스튜어트

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 에비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터

다이 페이홍

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 에비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터

왕 웨이이

미국 뉴욕 10021 뉴욕 요크 에비뉴 1275 메모리얼
슬로안 케터링 캔서 센터

명세서

청구범위

청구항 1

악성 고형 종양을 앓고 있는 피험체를 치료하는 방법으로서, MVA 및 MVA Δ E3L 및 그 조합의 군으로부터 선택된 변형된 박시니아 바이러스 (modified vaccinia virus)를 상기 종양 세포에 전달함으로써, 상기 종양을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 바이러스의 양은 하기 중 약 하나 이상을 야기하기에 효과적인 것인 방법:

- a. 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 면역계에 의해 진행 중인 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하고;
- b. 상기 종양의 크기를 감소시키고;
- c. 상기 종양을 박멸시키고;
- d. 상기 종양의 성장을 저해하고;
- e. 상기 종양의 전이를 저해하고; 및
- f. 전이성 종양을 감소 또는 박멸시킴.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 종양에 대한 면역 반응은 하기 중 하나 이상을 달성하는 것인 방법:

- a. 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 항종양 세포독성 CD8 $^+$ T 세포 및 이펙터 (effector) CD4 $^+$ T 세포의 적어도 하나를 증가시키고;
- b. 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙을 유도하고;
- c. 상기 종양 내의 면역 억제 (조절) CD4 $^+$ T 세포를 감소시키고;
- d. 상기 종양 내의 면역 억제 종양-관련 마크로파지 (tumor-associated macrophages: TAMs)를 감소시키고;
- e. 면역 세포 및 간질 섬유아세포에서 타입 I IFN, 염증 시토킨 및 케모킨 생성을 유도함.

청구항 4

청구항 1 내지 3에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L은 종양 항원을 코딩 또는 발현하는 핵산을 갖고 (harboring) 있지 않은 것인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 종양은 MVA 또는 MVA Δ E3L의 부위에 위치한 종양 또는 상기 피험체의 체내 다른 곳에 위치한 종양을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 CD4 $^+$ 이펙터 T 세포의 보충 (recruitment) 및 활성화가 상기 종양에서 조절 CD4 $^+$ 세포의 감소를 수반하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 종양은 흑색종 또는 결장 암종 또는 다른 고형 종양인 것인 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 종양 퇴행 또는 박멸을 유도할 때까지 계속되는 것인 방법.

청구항 9

청구항 5 내지 8 중 하나 이상에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 수 주, 수개월 또는 수년간 또는 혜택이 지속되거나 또는 최대 허용 용량에 도달하는 한 무기한으로 계속되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 5에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 최대 허용 용량에 도달할 때까지 무기한으로 계속되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 5 내지 10 중 하나 이상에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 비경구 주사에 의한 것인 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 종양내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 정맥내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 14

청구항 5 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 것인 방법.

청구항 15

청구항 5 내지 14 중 하나 이상에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L이 약 10^5 - 10^{10} 플라크-형성 단위 (plaque-forming units: pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 16

청구항 5 내지 14에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L이 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전달된 양은 모든 종양 세포를 감염시키기에 충분한 것인 방법.

청구항 18

청구항 5 내지 17 중 하나 이상에 있어서, 상기 전달은 월 (month) 당 1회 내지 주 (week) 당 2회 범위 내의 벤도로 반복되는 것인 방법.

청구항 19

청구항 5 내지 18에 있어서, 상기 전달은 주 당 1회로 반복되는 것인 방법.

청구항 20

청구항 5 내지 19에 있어서, 상기 흑색종은 전이성 흑색종인 것인 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 하나 이상에 있어서, 상기 MVA는 MVA Δ E3L인 것인 방법.

청구항 22

피험체에서 고형 악성 종양을 치료하는 방법으로서, 하기 면역 효과 중 약 적어도 하나를 야기하기에 효과적인, 변형된 박시니아 바이러스 안카라 (modified vaccinia virus Ankara: MVA) 또는 MVA Δ E3L 또는 둘의 조합의 양을 상기 피험체의 종양에 전달하는 단계를 포함하는 방법:

- a. 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 이펙터 CD8 $^+$ T 세포 및 이펙터 CD4 $^+$ T 세포의 적어도 하나를 증가시키고;
- b. 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙을 유도하고;
- c. 상기 종양 내의 면역 억제 (조절) CD4 $^+$ T 세포를 감소시키고;
- d. 상기 종양 내의 면역 억제 종양-관련 마크로파지 (TAM)를 감소시키고;
- e. 면역 세포 및 간질 섬유아세포에서 타입 I IFN, 염증 시토킨 및 케모킨 생성을 유도함.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 MVA Δ E3L은 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙을 유도하는 것인 방법.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 양은 상기 종양 세포를 인식하는 상기 피험체내 CD4 $^+$ 이펙터 T 세포를 보충 및 활성화하는데 효과적인 것인 방법.

청구항 25

청구항 22 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4 $^+$ 이펙터 T 세포의 보충 및 활성화는 상기 종양에서 조절 CD4 $^+$ 세포의 감소를 수반하는 것인 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 종양은 흑색종 또는 결장 암종 또는 다른 고형 종양인 것인 방법.

청구항 27

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L은 감염된 종양 세포에서 타입 I 인터페론을 유도하는 것인 방법.

청구항 28

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 종양 퇴행 또는 박멸을 유도할 때까지 계속되는 것인 방법.

청구항 29

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 혜택이 지속되는 것인 방법.

청구항 30

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 최대 허용 용량에 도달할 때까지 계속되는 것인 방법.

청구항 31

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 종양내 또는 정맥내 주사에 의하거나 또는 복강내 전이의 경우 복강내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 32

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 종양내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 33

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 정맥내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 34

청구항 22, 23, 24 또는 25에 있어서, 상기 피험체는 인간인 것인 방법.

청구항 35

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L이 약 10^5 - 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 36

청구항 25에 있어서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L이 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 37

청구항 25에 있어서, 상기 전달된 양은 모든 종양 세포를 감염시키기에 충분한 것인 방법.

청구항 38

청구항 25에 있어서, 상기 전달은 월 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되는 것인 방법.

청구항 39

청구항 25에 있어서, 상기 전달은 주 당 1회로 반복되는 것인 방법.

청구항 40

청구항 25 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 상기 흑색종은 전이성 흑색종인 것인 방법.

청구항 41

청구항 22 내지 40 중 하나 이상에 있어서, 상기 바이러스는 MVA Δ E3L인 것인 방법.

청구항 42

피험체에서 고형 악성 종양을 치료하는 방법으로서, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 상기 피험체의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하기에 효과적인, MVA 또는 MVA Δ E3L 또는 그 조합의 양을 상기 피험체의 종양 세포에 전달하여, 상기 종양 크기의 감소, 상기 종양의 박멸, 상기 종양 성장의 저해, 상기 종양의 전이 성장의 저해, 종양 세포의 세포자멸 유도 또는 상기 피험체 생존의 연장 중 하나 이상을 달성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

피험체에서 악성 종양을 치료하는 방법으로서, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 상기 피험체의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하기에 효과적인 양으로 변형된 박시니아 안카라 (MVA), MVA Δ E3L 및 그 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 바이러스를 상기 피험체의 종양 세포에 전달하는 단계 및 합동으로, 상기 종양 내 면역 억제 기전을 차단하는데 효과적인, 면역 체크포인트 차단제 또는 면역 체크포인트 작용제의 제2 양을 상기 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 면역 억제 기전이 종양 세포, 간질 세포 또는 종양 침윤 면역 세포에 의해 유도되는

것인 방법.

청구항 45

청구항 43에 있어서, 상기 투여는 비경구 경로에 의한 것인 방법.

청구항 46

청구항 43에 있어서, 상기 전달은 종양내 주사에 의한 것이고, 및 상기 투여는 정맥내 경로에 의한 것인 방법.

청구항 47

청구항 43에 있어서, 상기 전달 및 상기 투여 둘 다는 정맥내 경로에 의한 것인 방법.

청구항 48

청구항 43에 있어서, 상기 전달 및 상기 투여 둘 다는 종양내 주사에 의한 것인 방법.

청구항 49

청구항 43에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 PD-1 저해제, PD-L1 저해제, CTLA4 저해제, LAG-3 (림프구 활성화 유전자 3)에 대한 저해 항체, TIM3 (T 세포 면역글로불린 및 뮤신-3), B7-H3, 및 TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체)로 구성된 군으로부터 선택되고; 및 상기 면역 체크포인트 작용제가 4-1BB (CD137) 및 GITR에 대한 항-ICOS 항체 항-OX40 항체 작용제 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 저해제들 중 어느 하나는 항체인 것인 방법.

청구항 51

청구항 43에 있어서, 상기 종양은 원발성 또는 전이성 흑색종 또는 원발성 또는 전이성 결장 암종인 것인 방법.

청구항 52

청구항 43 내지 46에 있어서, 상기 바이러스가 전달되고, 상기 면역 체크포인트 차단제가 간격을 두고 그 자체의 투여 스케줄에 따라 각각 투여되는 것인 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 바이러스의 제1 용량이 먼저 전달되고, 시간 경과 후 상기 면역 체크포인트 차단제의 제1 용량이 투여되는 것인 방법.

청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 상기 전달 및 투여는 동일한 전체 기간 동안 병렬로 (in parallel) 수행되는 것인 방법.

청구항 55

청구항 52에 있어서, 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제 중 하나 또는 둘 다가, 수 주, 수개월 또는 수년간 또는 혜택이 지속되고 및 최대 허용 용량에 도달하지 않는 한 무기한으로, 각각 전달 및 투여되는 것인 방법.

청구항 56

청구항 43 내지 55 중 하나 이상에 있어서, 상기 바이러스가 약 10^5 - 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 상기 바이러스가 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 58

청구항 43 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 전달은 월 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되는 것인 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 바이러스 전달은 주 당 1회로 반복되는 것인 방법.

청구항 60

청구항 43 내지 59 중 하나 이상에 있어서, 상기 바이러스는 MVA Δ E3L인 것인 방법.

청구항 61

청구항 43 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스는 MVA인 것인 방법.

청구항 62

청구항 43 내지 59 중 하나 이상에 있어서, 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 63

청구항 61에 있어서, 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 동일 조성물내 투여되는 것인 방법.

청구항 64

청구항 43 내지 63에 있어서, 상기 불활성화된 MVA 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 종양내로 전달되는 것인 방법.

청구항 65

청구항 43에 있어서, 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 불활성화된 MVA 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 종양내로 전달되는 것인 방법.

청구항 67

고형 종양을 치료하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 숙주의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 조성물이 투여될 숙주의 면역계를 유도하기에 효과적인 양의 MVA 및 MVA Δ E3L 및 그 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 박시니아 바이러스; 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 상기 유효량은 단위 투여 제형 (unit dosage form)으로 약 10^5 - 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에 있는 것인 조성물.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 상기 유효량은 10^6 내지 10^9 pfu의 범위 내에 있는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2015년 4월 17일자로 출원된 미국 가출원 제62/149,484호에 대한 우선권을 주장한다. 상기 가출원의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명에 개시된 연구는 국립보건원에서 수여하는 교부금 번호 K08AI073736 및 R56 AI095692로 지원받았다. 미국 정부는 본 발명에서 권리를 가질 수 있다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되어진 서열 목록을 포함하고, 그 전문이 참조로 본원에 포함된다. 상기 ASCII 사본은 2016년 6월 15에 형성되었고, 파일명은 11000-005111-W00_SL.txt이며, 크기는 3,493 바이트이다.

[0007] 발명의 분야

[0008] 본 발명은 일반적으로 종양학, 바이러스학 및 면역요법의 분야에 관한 것이다. 암 면역치료제로서 뿐만 아니라 면역요법 백터의 개발을 위한 폭스바이러스 (poxviruses), 특히 고도로 약독화된 (highly attenuated) 변형된 박시니아 바이러스 안카라 (modified vaccinia virus Ankara: MVA) 및 박시니아 독성 인자 E3이 결실된 재조합 변형된 박시니아 안카라 바이러스 (MVAΔE3L)의 용도에 관한 것이다. 상기 폭스바이러스는 또한 면역 체크포인트 차단 요법 (immune checkpoint blockade therapy)과 조합하여 사용될 수 있다.

배경 기술

[0009] 면역계 및 암

[0010] 많은 연구가 암 진행에서 면역계 성분들의 구별되는 존재의 중요성을 뒷받침한다 (1)(Jochems et al., *Exp Biol Med*, 236(5): 567-579 (2011)). 임상 데이터는 고 밀도의 종양-침윤 림프구가 향상된 임상 결과와 관련이 있음을 제시하였다 (2)(Mlecnik et al., *Cancer Metastasis Rev.*; 30: 5-12, (2011)). 흑색종, 난소, 두경부, 유방, 요로상피세포, 결장직장, 폐, 간세포, 담낭 및 식도 암을 포함하는 다양한 타입의 암에 있어서, 강한 림프 구 침윤과 환자 생존 사이의 상관관계가 보고되었다 (3)(Angell et al., *Current Opinion in Immunology*, 25:1-7, (2013)). 종양 면역 침윤은, 종양 세포에 의해 발현되는 항원을 인식하고, 후속하여 세포독성 T 세포에 의한 상기 종양 세포의 파괴를 담당하는, 마크로파지, 수지상 세포 (dendritic cells: DC), 비만 세포, 자연 살해 (natural killer: NK) 세포, 나이브 (naive) 및 기억 림프구, B 세포 및 이펙터 (effector) T 세포 (T 림프구)를 포함한다.

[0011] 암 세포에 의한 항원 제시 및 종양 세포에 잠재적으로 반응할 수 있는 면역 세포의 존재에도 불구하고, 많은 경우에 면역계는 활성화되지 않거나 또는 긍정적으로 억제되지 않는다. 이러한 현상의 핵심은 종양이 면역계의 다른 세포를 저해하도록 면역계의 세포를 강요하여 면역 반응으로부터 스스로를 보호할 수 있는 종양의 능력이다. 종양은 항종양 면역 반응을 회피하기 위해 다양한 면역조절 기전을 개발한다. 예를 들면, 종양 세포는 면역 저해 시토킨 (가령 TGF- β)을 분비하거나 또는 상기 시토킨을 분비하도록 종양 병변에서 CD4 $^+$ T 조절 세포 및 마크로파지와 같은 면역 세포를 유도한다. 종양은 또한 조절 표현형을 발현하도록 CD4 $^+$ T 세포를 바이어스시키는 능력을 갖는다. 전체 결과는 T 세포 반응이 손상되고, 세포자멸 (apoptosis)이 유도되거나, 또는 CD8 $^+$ 세포독성 T 세포의 항-종양 면역 능력이 감소되었다. 또한, 종양 세포의 표면에서 MHC 클래스 I의 종양-관련 변경된 발현으로 면역 반응을 보이지 않게 하였다 (4)(Garrido et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 59(10), 1601-1606 (2010)). 항원 제시 기능의 저해 및 수지상 세포 (DC)는 또한 항-종양 면역의 회피에 기여한다 (5)(Gerlini et al. *Am. J. Pathol.* 165(6), 1853-1863 (2004)).

[0012] 또한, 면역 편집 (immune editing)과 함께 종양 미세환경의 국소 면역억제 성질은 표적 항원을 발현하지 않는 암 세포 하위집단의 탈출을 유도할 수 있다. 따라서, 면역계의 항-종양 활성의 보존 및/또는 회복을 촉진시킬 수 있는 접근법을 발견하는 것은 상당한 치료 혜택이 있을 것이다.

[0013] 면역 체크포인트는 항-종양 면역의 종양-매개 하향조절에 연루되어 치료 표적으로 사용되었다. T 세포 기능이

상은, CD28 계열 수용체의 구성원인 저해 수용체인 CTLA-4 및 프로그램된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)의 발현 유도와 동시에, 발생한다는 것이 입증되었다. PD-1은, PD-1 이외에 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 포함하는 수용체의 CD28 계열의 저해 구성원이다. 그러나, 흑색종 치료에서 면역요법의 사용에 관한 가능성은 항-CTLA-4 (이필리무맙) 및 항-PD-1 약물 (예를 들어, 펜브롤리주맙 및 니볼루맙)의 임상 사용 및 규제 승인에 의해 강조되어 왔지만, 상기 면역요법들에 대한 환자의 반응이 제한적이었다. T 세포에서 이러한 저해 신호를 차단하는 데 초점을 둔 최근의 임상 시험 (예컨대, CTLA-4, PD-1 및 PD-1 PD-L1의 리간드)에서 T 세포 억제를 역전시키는 것이 성공적인 면역요법에서 중요하다는 사실이 밝혀졌다 (6, 7)(Sharma et al., *Science* 348(6230), 56-61 (2015); Topalian et al., *Curr Opin Immunol.* 24(2), 202-217 (2012)). 이러한 관찰은 암에 대한 면역계를 이용하는 신규한 치료법 개발의 필요성을 강조하였다.

[0014] 폭스바이러스

조작된 (engineered) 박시니아 바이러스와 같은 폭스바이러스는 전이 암에 대한 종양용해성 요법 (oncolytic therapy)으로 선두에 있다 (8)(Kirn et al., *Nature Review Cancer* 9, 64-71 (2009)). 박시니아 바이러스는 큰 DNA 바이러스로, 빠른 생명 주기와 멀리 떨어져 있는 조직으로의 효율적인 혈행 확산을 갖는다 (9)(Moss, In *Fields Virology* (Lippincott Williams & Wilkins, 2007), pp.2905-2946). 폭스바이러스는 암 세포에서 다수의 도입유전자를 발현시켜서 치료 효능을 향상시키는 벡터로 매우-적합하다 (10)(Breitbach et al., *Current pharmaceutical biotechnology* 13, 1768-1772 (2012)). 전임상 연구 및 임상 시험은 기존의 치료법에 대해 난치성인 진행 암 치료를 위해 종양용해성 박시니아 바이러스 및 기타 폭스바이러스의 사용 효능을 입증하였다 (11-13)(Park et al., *Lacent Oncol* 9, 533-542 (2008); Kirn et al., *PLoS Med* 4, e353 (2007); Thorne et al., *J Clin Invest* 117, 3350-3358 (2007)). 폭스바이러스-기반 종양용해성 요법은 세포 용해, 세포자멸 및 괴사의 조합을 통해 암 세포를 사멸시키는 장점을 갖는다. 이는 또한 종양으로 면역 세포의 보충 및 항-종양 적응 면역 반응의 발생을 촉진하는 본래의 면역 센싱 경로 (immune sensing pathway)를 유발한다. 임상 시험에서 현재 종양용해성 박시니아 균주 (예를 들면, JX-594)는 종양 선택성을 높이기 위해 티미딘 키나제가 결실되고, 및 면역 반응을 자극하기 위해 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자 (granulocyte macrophage colony stimulating factor: GM-CSF)와 같은 도입유전자를 발현시키는 야생형 박시니아를 사용한다 (10)(Breitbach et al., *Curr Pharm Biotechnol* 13, 1768-1772 (2012)). 그러나, 많은 연구에서 야생형 박시니아는 항원 제시 세포 (APC)에 있어서 면역 억제 효과를 가지므로 (14-17)(Engelmayer et al., *J Immunol* 163, 6762-6768 (1999); Jenne et al., *Gene therapy* 7, 1575-1583 (2000); P. Li et al., *J Immunol* 175, 6481-6488 (2005); Deng et al., *J Virol* 80, 9977-9987 (2006)), 종양 자체의 면역억제 및 면역회피 (immuno-evasive) 효과를 부과하는 것이 개시되었다. 대조적으로, 고도로 약독화된 박시니아 균주인, 변형된 박시니아 바이러스 안카라 (MVA)는 적당한 면역 활성화 효과를 갖는다 (18, 19)(Drillien et al., *J Gen Virol* 85, 2167-75 (2004); Dai et al., *PLoS Pathog* 10(4), e1003989 (2014)).

변형된 박시니아 바이러스 앙카라 (MVA)는 감염병 및 암에 대한 중요한 백신 벡터인 고도로 약독화된 박시니아 균주이다. MVA는 닭 (chicken) 배아 섬유아세포에서 570회 이상의 계대를 통해 박시니아 균주로부터 유래되었다. MVA는 양친 (parental) 박시니아 계놈에서 31-kb가 결실되었고, 대부분의 포유류 세포에서 복제가 불가능하다. MVA는 WHO가 후원하는 천연두 백신화 동안 120,000명이 넘는 사람들이 사용했으며, 인간이 사용하기에 매우 안전하다고 개시되었다. MVA는 안전성과 외래 항원을 발현시키는 능력 때문에, HIV, 결핵, 말라리아, 인플루엔자, 코로나바이러스 및 CMV 뿐만 아니라 암에 대한 백신 벡터로 연구되었다 (20-25) (Sutter et al., *Current drug targets. Infectious disorders* 3, 263-271 (2003); Gomez et al., *Curr Gene Ther* 8, 97-120 (2008); Gomez et al., *Curr Gene Ther* 11, 189-217 (2011); Goepfert et al., *J Infect Dis* 203, 610-619 (2011); Wyatt et al., *Virology* 372, 260-272 (2008); Garcia et al., *Vaccine* 29, 8309-8316 (2011)).

암 치료제로서의 MVA의 연구는 지금까지 종양 항원을 발현시키기 위한 백신 벡터로서의 그 용도로 제한되어 왔다 (26, 27)(Tagliamonte et al., *Hum Vaccin Immunother* 10, 3332-3346 (2014); Verardi et al., *Hum Vaccin Immunother* 8, 961-970 (2012)). 다양한 종양 항원이 MVA-기반 벡터에 의해 발현되었으며, 일부 재조합 바이러스는 다양한 임상 시험 단계에 있다. 예를 들면, 전립선 특이적 항원 (prostate specific antigen: PSA)과 전립선 산 포스파타제 (prostate acid phosphatase: PAP)를 모두 발현하는 MVA-PSA-PAP는 전이성 전립선암 환자에 대해 임상 시험 중에 있다. 종양 항원 brachyury 및 T 세포 동시-자극 분자를 발현하는 재조합 바이러스 MVA-brachyury-TRICOM도 전이암 환자에 대해 임상 시험 중에 있다. 또한 임상 시험 중에 있는, p53 종양 억제 인자를 발현시키는 재조합 바이러스 MVA-p53이 안전하다고 개시되었다. 표적이 되는 다른 종양 항원에는 Her2, hMUC-1, TWIST 등을 포함한다.

- [0018] MVA가 고도로 약독화되고, 중간 정도의 면역자극성이 있음에도 불구하고, 중요 독성 인자 E3을 포함하는 다수의 면역 억제 바이러스 유전자를 보유한다. 상기 박시니아 독성 인자 E3의 결실에 의해 더 약독화된 재조합 MVA 바이러스인 MVA Δ E3L은 제1 닫 배아 섬유아세포 (CEFs)에서 복제할 수 없지만, 베이비 햄스터 신장 BHK-21 세포에서 그 복제 능력을 유지한다 (28)(Hornemann et al., *J Virol* 77(15), 8394-07 (2003)). MVA Δ E3L은 CEFs에서 바이러스 DNA 계놈을 복제할 수 있고, 바이러스 후기 단백질 합성에서 결여되어 있다 (28)(Hornemann et al., *J Virol* 77(15), 8394-07 (2003)). 또한 CEF에서 세포자멸을 유도한다 (28)(Hornemann et al., *J Virol* 77(15), 8394-07 (2003)). HeLa 세포의 MVA Δ E3L 감염은 유사한 효과를 갖지만, 순상된 바이러스 복제, 바이러스 후기 유전자 전사 및 번역을 갖는다 (29)(Ludwig et al., *J Virol* 79(4), 2584-2596 (2005)). 또한 MVA Δ E3L은 미토콘드리아 경로를 활성화시킴으로써 HeLa 세포에서 세포자멸을 유도한다 (29)(Ludwig et al., *J Virol* 79(4), 2584-2596 (2005)). dsRNA는 중간 유전자 전사 동안 생성되어, 2'-5'-올리고아데닐레이트 신타제/RNase L 및 단백질 키나제 R (Protein Kinase R: PKR)의 활성화를 유도할 수 있다. PKR-결핍 MEFs에서, MVA Δ E3L은 중간 및 후기 단백질을 발현하는 능력을 얻는다 ((29)(Ludwig et al., *J Virol* 79(4), 2584-2596 (2005))).
- [0019] 일 연구는 전-세포자멸 (pro-apoptotic) 단백질인 Noxa가 MVA Δ E3L 세포자멸 유도에서 역할을 한다고 제시하였다 (30)(Fischer et al., *Cell Death Differ* 13, 109-118 (2006)). 비록 초기 연구에서는 MVA Δ E3L이 MVA보다 CEFs에서 더 높은 수준의 타입 I IFN을 유도한다는 것을 보여 주었지만, 정확한 메카니즘은 완전히 밝혀지지 않았다 (28)(Hornemann et al., *J Virol* 77(15), 8394-07 (2003)).
- [0020] 하나의 MVA Δ E3L이 미국특허 제7049145호에 개시되었고, 참조로 포함되었다. 상기는 감염 능력이 있지만, 마우스 및 인간을 포함하는 대부분의 포유류 세포에서 복제가 불가능하다.
- [0021] 본 개시내용은 항암 면역치료제로서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달에 초점을 두었다. MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달은 종양에 침윤하는 면역 세포 (예컨대, 백혈구), 종양 세포 및 종양 관련 기질 세포로부터 본래의 면역 반응을 유도하면서, 타입 I IFN 및 전염증성 (proinflammatory) 시토킨 및 케모킨의 유도를 이끌어서, 종양 면역 억제 미세환경의 변경을 가져올 것으로 기대되었다.
- [0022] 다양한 고형 종양에서 종양 신생항원 (neoantigens)의 최근 발견은 고형 종양이 대개 사람마다 다른 독특한 신생항원을 가지고 있음을 나타내었다 (31, 32)(Castle et al., *Cancer Res* 72, 1081-1091 (2012); Schumacher et al., *Science* 348, 69-74 (2015)). 본 발명에 개시된 재조합 바이러스는 종양 항원을 발현시킴으로써 작동하지 않는다. 본 재조합 MVA 바이러스의 종양내 전달은 종양 신생항원의 효율적인 교차-제시 및 종양 내 항-종양 적응 면역의 생성을 가능하게 하고 (따라서 전신으로 확장시키며), "인 시투 (in situ) 암 백신화"를 유도하여, 종양에 대한 면역 반응을 일으키는데 상기 종양 세포에 의해 발현되는 종양 분화 항원 및 신생항원을 사용하였다.
- [0023] 종양 내에서 체세포 돌연변이에 의해 생성된 신생항원의 존재에도 불구하고, 종양 항원-특이적 T 세포의 기능이 다수의 저해 기전에 의해 확인되는 경우가 있다 (33)(Mellman et al., *Nature* 480, 480-489 (2011)). 예를 들면, 활성화된 T 세포에 있어서 세포독성 T 림프구 항원 4 (CTLA-4)의 상향조절은 수지상 세포 (DCs)에서 CD80 (B71)/CD86 (B7.2)과 상호작용하는 T 세포 동시-자극인자 CD28과 경쟁할 수 있으므로, T 세포 활성화 및 증식을 저해한다. CTLA-4는 조절 T (Treg) 세포에서도 발현되며, Tregs의 저해 기능을 매개하는데 중요한 역할을 한다 (34, 35)(Wing et al., *Science* 322, 271-275 (2008); Peggs, et al., *J Exp Med* 206, 1717-1725 (2009)). 또한, 종양 세포에서 PD-L1/PD-L2의 발현은 T 세포 고갈을 유도하는 CD28 계열의 저해 수용체인 PD-1의 활성화를 유도할 수 있다. CTLA-4 및 프로그램된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)와 같은 저해 수용체에 대한 항체를 사용하는 면역요법은 동물 연구에서 전임상 활성 및 전이암 환자에서 임상 반응에서 놀라운 활성을 나타내었고, 전이성 흑색종, 비-소세포 폐암뿐만 아니라 신장 세포 암종의 치료에 대해 FDA의 승인을 받았다 (6, 36-39)(Leach et al., *Science* 271, 1734-1746 (1996); Hodi et al., *NEJM* 363, 711-723 (2010); Robert et al., *NEJM* 364, 2517-2526 (2011); Topalian et al., *Cancer Cell* 27, 450-461 (2012) ; Sharma et al., *Science* 348(6230), 56-61 (2015)).
- [0024] 흑색종
- [0025] 치명적인 암 중 하나인 흑색종은 미국 및 전 세계적으로 가장 빠르게 증가하고 있는 암이다. 그 발생률은 1980년 이후 젊은 백인 여성들 사이에서 50%로 증가되었고, 주로 과도한 일광 노출 및 태닝 (tanning) 침대 사용으로 인한 것이다. 미국 암 협회 (American Cancer Society)에 따르면, 미국에서 대략 78,000명의 사람이 2015년에 흑색종으로 진단될 것이며, 거의 10,000명 (또는 1시간당 1명)이 흑색종으로 사망할 것이다. 대부분의 사

례에서, 진행성 흑색종은 화학요법 및 방사선을 포함한 기존의 치료법에 내성이 있다. 결과적으로, 전이성 흑색종 환자의 예후는 매우 좋지 않으며, 평균 기대 수명은 6 내지 10개월이다. 흑색종의 약 50%는 BRAF (주요 종양-촉진 유전자)에서 돌연변이를 갖는다는 발견으로 상기 질병에서 표적 요법의 문을 열었다. BRAF 저해제를 사용한 초기 임상 시험은 BRAF 돌연변이가 있는 흑색종 환자에서 현저했지만, 불행하게도 반응을 지속할 수 없는 것으로 나타났다. 그러므로, 상기 환자 뿐만 아니라 BRAF 돌연변이가 없는 흑색종을 가진 다른 환자를 위한 대체 치료 전략이 시급히 필요하다.

[0026] 인간 병리학적 데이터는 흑색종 병변내 T-세포 침윤의 존재가 더 긴 환자 생존율과 긍정적인 상관관계가 있음을 나타내었다 (40)(Oble et al. *Cancer Immun.* 9, 3 (2009)). 흑색종에 대한 방어에서 면역계의 중요성은 면역 활성제인 IFN- α 2b 및 IL-2와 같은 면역요법의 일부 성공에 의해 (41)(Lacy et al. *Expert Rev Dermatol* 7(1):51-68 (2012)) 뿐만 아니라 항-CTLA-4 및 항-PD-1/PD-L1을 포함하는 면역 체크포인트 요법 단독 또는 병용 요법에 대한 전이성 흑색종 환자의 전례가 없는 임상 반응에 의해 더 뒷받침되었다 (6, 7, 37, 42-45)(Sharma and Allison, *Science* 348(6230), 56-61 (2015); Hodi et al., *NEJM* 363(8), 711-723 (2010); Wolchok et al., *Lancet Oncol.* 11(6), 155-164 (2010); Topalian et al., *NEJM* 366(26), 2443-2454 (2012); Wolchok et al., *NEJM* 369(2), 122-133 (2013); Hamid et al., *NEJM* 369(2), 134-144 (2013); Tumeh et al., *Nature* 515(7528), 568-571 (2014)). 그러나, 많은 환자들이 면역 체크포인트 차단 요법 단독에 반응하지 못했다. 바이러스 요법 (virotherapy)의 부가는 면역 체크포인트 차단에 대한 내성을 극복할 수 있고, 이는 동물 종양 모델에 의해 뒷받침되었다 (46)(Zamarin et al., *Sci Transl Med* 6(226), 2014).

[0027] 종양 면역에서 타입 I IFN 및 시토졸 DNA-센싱 경로

[0028] 타입 I IFN은 숙주 항종양 면역에서 중요한 역할을 한다 (47) (Fuertes et al., *Trends Immunol* 34, 67-73 (2013)). IFNAR1-결핍 마우스는 종양 세포를 이식한 후 종양이 발생되기 쉽고; 자발적인 종양-특이적 T 세포 프라이밍은 또한 IFNAR1-결핍 마우스에서도 결함이 있다 (48, 49) (Diamond et al., *J Exp Med* 208, 1989-2003 (2011); Fuertes et al., *J Exp Med* 208, 2005-2016 (2011)). 보다 최근의 연구에 따르면, 시토졸 DNA-센싱 경로는 종양-유래된 DNA의 본래의 면역 센싱에서 중요하며, 이는 항종양 CD8 $^+$ T 세포 면역의 발생을 유도한다고 개시하였다 (50) (Woo et al., *Immunity* 41, 830-842 (2014)). 상기 경로는 또한 방사선-유도된 항종양 면역에서 역할을 한다 (51) (Deng et al., *Immunity* 41, 843-852 (2014)). 비록 자발적인 항-종양 T 세포 반응이 암 환자에서 검출될 수 있지만, 암은 결국 대부분의 환자에서 숙주 항종양 면역을 극복한다. 상기 종양 면역 억제 미세환경을 변경하는 신규한 전략이 암 치료에 유익할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0029] 본 개시내용은 MVA 및 MVA Δ E3L 둘 다가 암에 대한 면역치료제를 개발하는데 효과적으로 사용될 수 있는 특성을 갖는다는 발견에 관한 것이다. MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사는 종양 퇴행 및 심지어 박멸을 유도하고, 또한 전신성 항종양 면역의 생성을 초래한다. 그러므로 MVA 및 MVA Δ E3L은 고형 종양의 치료를 위한 면역요법으로 사용될 수 있다. 더욱이 MVA-기반의 바이러스요법의 종양내 전달 및 면역 체크포인트 차단 (또는 체크포인트 작용제 요법)의 조합으로 전신 또는 종양내로 전달되고, 주사된 종양 뿐만 아니라 주사되지 않은 떨어져 있는 종양에서 항상된 항종양 활성을 초래할 것으로 기대된다.

[0030] 본 발명자들은 새롭게 발견된 시토졸 DNA 센서 cGAS (고리형 GMP-AMP 신타제) 및 그 어댑터 (adaptor)인 STING (IFN 유전자의 자극인자)에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로를 통해 종래의 수지상 세포 (cDCs)의 MVA 감염에 타입 I IFN을 유발하는 것을 관찰하였다. 대조적으로, cDCs의 야생형 박시니아 감염은 타입 I IFN을 유도하지 못했다. 본 발명자들은 또한 박시니아 독성 인자 E3이 결실된 재조합 MVA 바이러스 (MVA Δ E3L)가 cDCs 감염에서 MVA보다 타입 I IFN을 더 높은 수준으로 유도하는 것을 관찰하였다. 이는 또한 cDCs에서 MVA Δ E3L 바이러스에 대한 본래의 면역-센싱 경로를 활성화시키고, MVA 및 MVA Δ E3L에 의해 암 세포에서 타입 I IFN, 염증성 시토킨 및 케모킨, 및 세포자멸을 유도한다.

[0031] 이러한 관찰은 종양 세포뿐만 아니라 면역 세포에서 타입 I IFN 및 기타 염증성 시토킨 및 케모킨의 유도를 통해 종양-유도된 면역 억제 미세환경을 변경시키기 위해 상기 고도로 약독화된 변형된 박시니아 바이러스를 면역 활성제로 사용하는 가능성을 유도하였다 (즉, 숙주에서 항종양 면역 반응을 유도하거나 또는 이미 진행중인 항종양 반응을 향상시키고 및 그 억제를 역전시키도록 함). 이는 차례로 더 효과적인 종양 항원 제시를

유도하고, 또한 항-종양 세포독성 CD8⁺ T 세포, 이펙터 CD4⁺ T 세포의 생성 및 활성화 뿐만 아니라 면역 억제 CD4⁺ 조절 T 세포 및 종양-관련 마크로파지의 감소를 유도하였다. MVA와 MVAΔE3L은 안전한 백신 백터이기 때문에, 상기 종양 내에서 이러한 바이러스 백터를 사용하여 종양 항원 방출, 효과적인 제시, 및 항종양 이펙터 및 기억 T 세포 반응의 발생 및 항종양 항체 생성이 가능하다. 실제로, 본 발명자들은 종양내에 사용된 MVA 및 MVAΔE3L이 수지상 세포의 활성화 및 종양 항원 (발암성 바이러스 항원, 종양 분화 항원 및 종양 신생항원)의 향상된 제시를 유도하는 것을 관찰하였다.

[0032] MVA 및 MVAΔE3L의 국소적 (예컨대, 종양내) 주사가 종양의 다양한 단계에서 사용될 수 있다. 초기 단계 암의 경우, 종양을 수술로 제거하기 2-3주 전에 바이러스요법이 사용될 수 있다. 그 기간 동안, 숙주는 전신 항종양 적응 면역을 발생시킬 수 있다. 진행 암의 경우, 바이러스요법이, 수술, 화학요법, 표적 치료, 방사선 및 면역 체크포인트 요법과 같은 다른 치료 방법과 병용하여 사용될 수 있고, 하기에 상세하게 서술할 것이다.

[0033] 불활성화된 MVA로 본 발명자들에 의해서 수득되고, 또한 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된, 2016년 2월 25일자로 제출된 PCT US2016/019663에 개시된 결과에 기반하여, 본 발명자들은 MVA 또는 MVAΔE3L의 종양내 주사가 면역 세포 및 암 세포에서 타입 I IFN의 유도를 통해, PD-1 또는 CTLA-4 표적 접근법에 부가의 유익한 효과를 제공하여, 수지상 세포를 포함하는 면역 세포의 활성화를 통해 종양 면역 억제 환경을 변경할 뿐만 아니라 종양 항원 제시를 촉진할 수 있다고 가정하였다.

과제의 해결 수단

[0034] 일 양태에서, 본 개시내용은 피험체에서 고형 악성 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 예를 들면 전술한 바와 같이, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키도록 상기 피험체의 면역을 유도하기에 효과적인, MVA 또는 MVAΔE3L의 양을 상기 피험체의 종양 세포에 전달하여, (순서와 상관없이) 하기 중 하나 이상을 달성하는 단계를 포함한다: 상기 종양 크기의 감소, 상기 종양의 박멸, 상기 종양 성장의 저해, 또는 상기 종양의 전이 또는 전이 성장의 저해.

[0035] 다른 양태에서, 본 개시내용은 악성 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로서:

- 상기 종양에 대해 면역 반응을 일으키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하기에 효과적인, MVA 또는 MVAΔE3L의 양을 상기 피험체의 종양 세포로 전달하는 단계를 포함한다.

[0037] 일부 구현예에서, 하기 특별한 특성들 중 하나 이상이 또한 존재한다:

[0038] • 이펙터 T 세포의 보충 및 활성화는 상기 종양에서 조절 CD4⁺ 세포의 감소를 수반하고;

[0039] • 상기 종양은 흑색종 또는 결장 암종이고;

[0040] • MVA 또는 MVAΔE3L의 주기적 전달의 요법 (regimen)은 종양 퇴행 또는 박멸을 유도할 때까지 계속되고,

[0041] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 주기적 전달의 요법은 수 주, 수개월 또는 수년간 또는 혜택이 지속되는 한 무기한으로 계속되고;

[0042] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 주기적 전달의 요법은 최대 허용 용량에 도달할 때까지 무기한으로 계속되고;

[0043] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 비경구 주사에 의한 것이고;

[0044] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 종양내 주사에 의한 것이고;

[0045] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 정맥내 주사에 의한 것이고;

[0046] • 상기 피험체는 인간이고;

[0047] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L이 약 10^5 - 10^{10} 플라크-형성 단위 (plaque-forming units: pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되고;

[0048] • 상기 MVA 또는 MVAΔE3L이 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로

전달되고;

[0049] • 상기 전달된 양은 모든 종양 세포를 감염시키기에 충분하고;

[0050] • 상기 전달은 월 (month) 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되고;

[0051] • 상기 치료는 수 주, 수개월 또는 수년간 계속되고;

[0052] • 상기 전달은 월 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되고;

[0053] • 상기 흑색종은 전이성 흑색종이다.

[0054] 상기 종양의 위치에 MVA 또는 MVA Δ E3L의 전달은 악성 고형 종양을 앓고 있는 피험체의 면역계를 유도하여 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으킨다. 상기 종양에 대한 피험체의 면역계의 자극으로 하기 면역 효과들 중 하나 이상을 나타낼 수 있다 (및 실제로 테스트될 수 있다):

[0055] • 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절 (tumor-draining lymph nodes)에서 항종양 세포독성 CD8 $^+$ 및 이펙터 CD4 $^+$ T 세포의 증가;

[0056] • 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙 유도;

[0057] • 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 종양 세포를 인식하는 상기 피험체에서 활성화된 항종양 이펙터 T 세포의 유도;

[0058] • 상기 종양 내 면역 억제 (조절) CD4 $^+$ T 세포의 감소; 및

[0059] • 상기 종양 세포의 표면에서 MHC 클래스 I을 발현시키고, 또한 타입 I IFN을 생성하도록 상기 종양 세포의 유도.

[0060] 더 구체적으로, 일 양태에서, 본 개시내용은 악성 고형 종양을 앓고 있는 피험체를 치료하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 MVA 및 MVA Δ E3L 및 그 조합의 군으로부터 선택된 변형된 박시니아 바이러스를 상기 종양 세포에 전달함으로써, 상기 종양을 치료하는 단계를 포함한다.

[0061] 일부 구현예에서, 상기 바이러스의 양은 하기 중 약 하나 이상을 야기하는데 효과적이다:

[0062] a. 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 면역계에 의해 진행 중인 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하고;

[0063] b. 상기 종양의 크기를 감소시키고;

[0064] c. 상기 종양을 박멸시키고;

[0065] d. 상기 종양의 성장을 저해하고;

[0066] e. 상기 종양의 전이를 저해하고; 및

[0067] f. 전이성 종양을 감소 또는 박멸시킨다.

[0068] 또다른 양태에서, 본 개시내용은 피험체에서 고형 악성 종양을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 상기 피험체의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하기에 효과적인, MVA 또는 MVA Δ E3L 또는 그 조합의 양을 상기 피험체의 종양 세포에 전달하여, 상기 종양 크기의 감소, 상기 종양의 박멸, 상기 종양 성장의 저해, 상기 종양의 전이 성장의 저해, 종양 세포의 세포자멸 유도 또는 상기 피험체의 생존 연장 중 하나 이상을 달성하는 단계를 포함한다.

[0069] 다른 양태에서, 본 개시내용은 피험체에서 고형 악성 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 하기 면역 효과 중 약 적어도 하나를 야기하기에 효과적인, 변형된 박시니아 바이러스 안카라 (MVA) 또는 MVA Δ E3L 또는 두 조합의 양을 상기 피험체의 종양에 전달하는 단계를 포함한다:

[0070] a. 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 이펙터 CD8 $^+$ T 세포 및 이펙터 CD4 $^+$ T 세포의 적어도 하나의 증

가;

[0071] b. 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙 유도;

[0072] c. 상기 종양 내 면역 억제 (조절) CD4⁺ T 세포의 감소;

[0073] d. 상기 종양 내 면역 억제 종양-관련 마크로파지 (tumor-associated macrophages: TAM)의 감소;

[0074] e. 면역 세포 및 간질 섬유아세포에서 타입 I IFN, 염증성 시토킨 및 케모킨 생성의 유도.

[0075] 전술한 각 양태의 일부 구현예에서:

[0076] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L은 종양 항원을 코딩 또는 발현하는 핵산을 갖고 (harboring) 있지 않고;

[0077] 상기 종양은 MVA 또는 MVAΔE3L의 부위에 위치한 종양 또는 상기 피험체의 체내 다른 곳에 위치한 종양을 포함하고;

[0078] CD4⁺ 이팩터 T 세포의 보충 및 활성화는 상기 종양내 조절 CD4⁺ 세포의 감소를 수반한다.

[0079] 상기 종양은 흑색종 또는 결장 암종 또는 다른 고형 종양이고;

[0080] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 종양 퇴행 또는 박멸을 유도할 때까지 계속되고;

[0081] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 수 주, 수개월 또는 수년간 또는 혜택이 지속되거나 또는 최대 허용 용량에 도달하는 한 무기한으로 계속되고;

[0082] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 최대 허용 용량에 도달할 때까지 무기한으로 계속되고;

[0083] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L의 전달은 비경구, 예컨대 종양내 또는 정맥내 주사에 의한 것이고;

[0084] 상기 피험체는 인간이고;

[0085] MVA 또는 MVAΔE3L이 약 10^5 ~ 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되고;

[0086] 상기 MVA 또는 MVAΔE3L이 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되고;

[0087] 상기 전달된 양은 모든 종양 세포를 감염시키기에 충분하고;

[0088] 상기 전달은 월 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되고;

[0089] 상기 전달은 주 당 1회로 반복되고;

[0090] 상기 흑색종은 전이성 흑색종이고;

[0091] 상기 MVA는 MVAΔE3L이다;

[0092] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 피험체에서 악성 종양을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 상기 피험체의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 피험체의 면역계를 유도하기에 효과적인 양으로 변형된 박시니아 안카라 (MVA), MVAΔE3L 및 그 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 바이러스를 상기 피험체의 종양 세포에 전달하는 단계 및 합동으로, 상기 종양 내 면역 억제 기전을 차단하는데 효과적인, 면역 체크포인트 차단제 또는 면역 체크포인트 작용제의 제2 양을 상기 피험체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0093] 더 구체적인 구현예에서:

[0094] 상기 면역 억제 기전이 종양 세포, 간질 세포 또는 종양 침윤 면역 세포에 의해 유도되고;

[0095] 상기 투여는 비경구 경로에 의한 것이고;

[0096] 상기 전달은 종양내 주사에 의한 것이고, 및 상기 투여는 정맥내 경로에 의한 것이고;

[0097] 상기 전달 및 상기 투여 둘 다는 정맥내 경로에 의한 것이고;

[0098] 상기 전달 및 상기 투여 둘 다는 종양내 주사에 의한 것이고;

- [0099] 상기 면역 체크포인트 차단제가 PD-1 저해제, PD-L1 저해제, CTLA4 저해제, LAG-3 (림프구 활성화 유전자 3)에 대한 저해 항체, TIM3 (T 세포 면역글로불린 및 뮤신-3), B7-H3, 및 TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체)로 구성된 군으로부터 선택되고; 및 상기 면역 체크포인트 작용제가 4-1BB (CD137) 및 GITR에 대한 항-Icos 항체 항-OX40 항체 작용제 항체로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0100] 상기 저해제 또는 작용제의 어느 하나는 항체이고;
- [0101] 상기 종양은 원발성 또는 전이성 흑색종 또는 원발성 또는 전이성 결장 암종 또는 다른 고형 종양이다.
- [0102] 상기 바이러스가 전달되고, 상기 면역 체크포인트 차단제가 간격을 두고 그 자체의 투여 스케줄에 따라 각각 투여되고;
- [0103] 상기 바이러스의 제1 용량이 먼저 전달되고, 시간 경과 후 상기 면역 체크포인트 차단제의 제1 용량이 투여되고;
- [0104] 상기 전달 및 투여는 동일한 전체 기간 동안 병렬적으로 수행되고;
- [0105] 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제 중 하나 또는 둘 다가 각각 수 주, 수개월 또는 수년간 또는 혼택이 지속되고 및 최대 허용 용량에 도달하지 않는 한 무기한으로 전달 및 투여되고;
- [0106] 상기 바이러스가 약 10^5 ~ 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되고;
- [0107] 상기 바이러스가 약 10^6 내지 약 10^9 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에서 투여 당 투여량으로 전달되고;
- [0108] 상기 바이러스 전달은 월 당 1회 내지 주 당 2회 범위 내의 빈도로 반복되고;
- [0109] 상기 바이러스 전달은 주 당 1회로 반복되고;
- [0110] 상기 바이러스는 MVAΔE3L이고;
- [0111] 상기 피험체는 인간이고;
- [0112] 상기 바이러스는 MVA이고;
- [0113] 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제 또는 작용제가 동시에 투여되고;
- [0114] 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제 또는 작용제가 동일 조성물내 투여되고;
- [0115] 상기 MVA 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 종양내로 전달되고;
- [0116] 상기 바이러스 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 순차적으로 투여되고;
- [0117] 상기 불활성화된 MVA 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 종양내로 전달된다.
- [0118] 부가의 양태에서, 본 개시내용은 고형 종양을 치료하는데 사용하기 위한 조성물을 제공하고, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키거나 또는 상기 종양에 대한 숙주의 진행 중인 면역 반응을 향상시키도록 상기 조성물이 투여될 숙주의 면역계를 유도하기에 효과적인 양의 MVA 및 MVAΔE3L 및 그 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 변형된 박시니아 바이러스; 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.
- [0119] 상기 조성물의 더 구체적인 구현예에서, 상기 유효량은 단위 투여 제형 (unit dosage form)내 약 10^5 ~ 10^{10} 플라크-형성 단위 (pfu)의 범위 내에 있거나; 또는 상기 유효량은 10^6 내지 10^9 pfu의 범위 내에 있다.

도면의 간단한 설명

- [0120] 도 1은 쥐과 (murine) cDCs에서 MVA가 타입 I IFN 생성을 유도하는 것을 나타내는 데이터의 일련의 그래프이다. 도 1 (A)은 WT VAC 또는 MVA로 감염시키고 1, 4, 8, 14, 및 22시간 후에 GM-CSF-BMDCs에서 IFN- α 및 IFN- β 의 분비 수준을 나타내는 그래프이다. 도 1 (B)는 WT VAC 또는 MVA로 감염시키고 6시간 후에 GM-CSF-BMDCs에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 2는 전사 인자 IRF3/IRF7 및 IFNAR1에 의해 매개된 타입 I IFN 포지티브 피드백 루프를 쥐과 cDCs에서 MVA에 의해 타입 I IFN의 유도하는데 필요로 한다는 것을 나타내는 일련의 막대 그래프이다. 도 2 (A)-2 (C)는 IRF3-

^{/-} (2A), IRF7^{-/-} (2B), IFNAR1^{-/-} (2C) 마우스 (mice), 또는 그 연령-매치된 WT 대조군으로부터 생성된 GM-CSF-BMDCs에서 IFN- α 및 IFN- β 농도의 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다 (n= 3). 대표적인 실험이 개시되고, 2회 반복되었다. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

도 3은 STING을 BMDCs에서 타입 I IFN의 유도 및 MVA에 의한 IRF3 포스포릴화 (phosphorylation)에 필요로 한다는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 3 (A)는 $\text{Sting}^{+/+}$ 및 $\text{Sting}^{Gt/Gt}$ 마우스로부터 생성되고, LPS에 의해 자극되거나 또는 MVA로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs 세포에서 IFN- α 및 IFN- β 분비 수준의 막대 그래프를 나타내었다. 도 3 (B)는 $\text{Sting}^{+/+}$ 및 $\text{Sting}^{Gt/Gt}$ 마우스로부터 생성되고, 및 MVA로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs 세포에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 발현 수준을 나타내었다. 도 3 (C)는 포스포-TBK1, TBK1, IRF3의 포스포세린-396, IRF3, 및 GAPDH의 단백질 수준을 나타내는 면역블롯 (immunoblot)의 스캔한 이미지이다. "hpi"는 감염후 시간 (hours post infection)이고, "M"은 모의 감염 대조군 (mock infection control)이다. 도 3 (D)는 MVA로 감염시킨, $\text{Sting}^{Gt/Gt}$, IRF3^{-/-} 및 연령-매치된 WT C57B/6 대조군 마우스에서 IFN- α 및 IFN- β 의 분비 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SD이다. 개시된 결과는 2회의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 4는 cGAS가 cDCs의 MVA 감염에 있어서 중요한 시토졸 (cytosolic) DNA 센서라는 것을 입증하는 일련의 그래프이다. 도 4 (A)는 cGAS^{-/-} 마우스 및 그 연령-매치된 WT 대조군에서 생성되고, MVA로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs에서 IFN- α 및 IFN- β 분비 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다 (n= 3). 대표적인 실험이 개시되었고, 2회 반복되었다 (***, p < 0.001). 도 4 (B)는 cGAS^{-/-} 마우스 및 그 연령-매치된 WT 대조군으로부터 생성되고, 및 MVA로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs 세포에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 발현 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다 (n= 3). 대표적인 실험이 개시되었고, 2회 반복되었다 (***, p < 0.001). 도 4 (C)는 MVA로 감염시킨 cGAS^{+/+} 및 cGAS^{-/-} cDCs에서 포스포-TBK1, TBK1, IRF3의 포스포세린-396, IRF3, 및 GAPDH의 단백질 수준을 나타내는 면역블롯의 스캔한 이미지이다. "hpi", 감염후 시간.

도 5는 MVA Δ E3L이 MVA보다 BMDCs에서 타입 I IFN 유전자 발현의 수준을 더 높게 유도하는 것을 보여주는 일련의 그래프이다. 도 5 (A)는 WT VAC, MVA, 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs에서 E3 및 β -액틴 (actin)의 단백질 수준을 나타내는 면역블롯의 스캔한 이미지이다. "hpi", 감염후 시간, "M", 모의 감염 대조군. 도 5 (B)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다 (n= 3). 대표적인 실험이 개시되었고, 2회 반복되었다. ***, p < 0.001; 비교 (comparisons)가 MVA 및 MVA Δ E3L로 감염시킨 세포들 사이에서 수행되었다. 도 5 (C)는 IRF3^{-/-} 마우스 및 연령-매치된 WT C57B/6 마우스로부터 생성되고, 및 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다 (n=3). 대표적인 실험이 개시되었고, 2회 반복되었다. ***, p < 0.001; 비교가 MVA 및 MVA Δ E3L로 감염시킨 세포들 사이에서 수행되었다. 도 5 (D)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 GM-CSF-BMDCs에서 p-IRF3 및 β -액틴의 단백질 수준을 나타내는 면역블롯의 스캔한 이미지이다.

도 6은 cGAS를 cDCs에서 MVA Δ E3L에 의한 타입 I IFN의 유도를 위해 필요로 한다는 것을 나타내는 일련의 막대 그래프이다. 도 6 (A)는 MVA Δ E3L로 감염시킨 cGAS^{+/+} 및 cGAS^{-/-} cDCs에서 IFNA4 및 IFNB의 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프를 포함한다. 도 6 (B)는 MVA Δ E3L로 감염시키거나 또는 STING에 대한 작용제인 cGAMP로 치료된 cGAS^{+/+} 및 cGAS^{-/-} cDCs에서 IFN- α 및 IFN- β 분비 수준을 나타내는 막대 그래프를 포함한다. 도 6 (C)는 MVA Δ E3L로 감염시킨 cGAS^{+/+} 및 cGAS^{-/-} cDCs에서 p-IRF3 및 GAPDH의 단백질 수준을 나타내는 면역블롯의 스캔한 이미지이다.

도 7은 dsRNA-센싱 경로가 또한 IRF3의 MVA Δ E3L-유도된 포스포릴화에서 역할을 하는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 (Western blot) 데이터의 일련의 스캔한 이미지이다. 도 7 (A)는 WT, STING^{Gt/Gt}, 또는 MAVS^{-/-} 마우스에서 생성되고, 및 MVA Δ E3L로 감염시키거나 또는 치료되지 않은 (not treated: NT) cDCs에서 p-IRF3 및 β -액틴의 단백질 수준을 나타내었다. "hpi", 감염후 시간. 도 7 (B)는 WT 또는 STING^{Gt/Gt}/MDA5^{-/-} (DKO) 마우스로부터 생성되었고, MVA Δ E3L 또는 MVA로 감염시킨 cDCs에서 포스포-TBK1, TBK1, IRF3의 포스포세린-396, IRF3, 및 GAPDH의 단백질 수준을 나타내었다. "hpi", 감염후 시간.

도 8은 쥐과 원발성 섬유아세포의 MVA 및 MVA Δ E3L 감염으로 Ifnb (도 8 (A)), Cc14 (도 8 (B)), I16 (도 8 (C)), 및 Cc15 (도 8 (D))의 유전자 발현의 유도를 초래하는 것을 나타내는 일련의 막대 그래프이고, 이는 cGAS에 크게 의존한다. "NT", 치료되지 않음. Ifnb (도 8 (E)), Cc14 (도 8 (F)), I16 (도 8 (G)), 및 Cc15 (도 8 (H))의 MVA Δ E3L-유도된 발현이 STING 및 MDA5-이 중 결핍 쥐과 원발성 섬유아세포에서 완전히 파괴되었다.

도 9는 쥐과 원발성 섬유아세포의 MVA 및 MVA Δ E3L 감염으로 IFN- β (도 9 (A)), CCL4 (도 9 (B)), IL-6 (도 9 (C)), 및 CCL5 (도 9 (D))의 생성을 유도하는 것을 나타내는 일련의 막대 그래프이고, 이는 STING에 크게 의존하고, MDA5로부터 기여도가 약간 있다.

도 10은 MVA Δ E3L 감염으로, B16-F10 흑색종 세포에서, MVA보다, Ifna4 (도 10 (A)), Ifnb (도 10 (B)), I16 (도 10 (C)), Tnf (도 10 (D)), Cc14 (도 10 (E)), 및 Cc15 (도 10 (F))의 분비 수준이 더 높게 유도되는 것을 나타내는 일련의 막대 그래프이다. "NT", 치료되지 않음.

도 11은 MVA 또는 MVA Δ E3L에 의한 B16-F10 흑색종 세포의 감염으로 세포자멸을 유도하는 것을 나타내는 일련의 스캔한 면역블롯 이미지이다. 도 11 (A)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 B16-F10 흑색종 세포에서 PARP, 절단된 (cleaved) PARP, 및 β -액틴의 단백질 수준을 나타내었다. 도 11 (B)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 B16-F10 흑색종 세포에서 MCL-1, 및 β -액틴의 단백질 수준을 나타내었다. "hpi", 감염후 시간. 도 11 (C)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시킨 B16-F10 흑색종 세포에서 포스포릴화된 IRF3 및 GAPDH의 수준을 나타내었다. "hpi", 감염후 시간.

도 12는 MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 일부 마우스에서 종양-함유 마우스의 생존율을 연장시키고 및 종양의 박멸을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 12 (A)-(C)는 PBS (A), MVA (B), 및 MVA Δ E3L (C)이 주사된 개별 마우스에서 시간 경과에 대한 종양 부피의 그래프이다. 도 12 (D)는 PBS, MVA, 또는 MVA Δ E3L이 주사된 종양-함유 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선이다. ****, p < 0.0001 (MVA 대 PBS 그룹); **, p < 0.001 (MVA Δ E3L 대 PBS 그룹). 도 12 (E)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 성공적으로 치료한 후에, 반대쪽에서 B16-F10 흑색종 세포로 챌린지시킨 (challenged) 무-종양 (tumor-free) 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선이다. 나아이브 마우스는 과거에 임의의 종양 세포 또는 바이러스가 주사된 적이 없다.

도 13은 MVA의 종양내 주사로 종양 미세환경에서 면역학적 변화가 유도되는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 13 (A)-(B)는 PBS (13 (A)) 또는 MVA (13 (B))로 치료된 종양에서 FoxP3을 발현하는 CD4 $^+$ 세포의 유세포 분석 (flow cytometric analysis)의 점도표이다. 도 13 (D)-(E)는 PBS (13 (D)) 또는 MVA (13 (E))로 치료된 종양에서 그랜자임 (Granzyme) B를 발현하는 CD8 $^+$ 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 13 (G)-(H)는 PBS (13 (G)) 또는 MVA (13 (H))로 치료된 종양에서 Ki-67을 발현하는 CD8 $^+$ 세포의 유세포 분석의 산점도 (scatterplots)이다. 도 13 (C)는 PBS 또는 MVA로 치료된 종양에서 CD4 $^+$ Foxp3 $^+$ 의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 13 (F)는 PBS 또는 MVA로 치료된 종양에서 그랜자임 B $^+$ CD8 $^+$ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 13 (I)는 PBS 또는 MVA로 치료된 종양에서 CD8 $^+$ Ki-67 $^+$ 의 백분율을 나타내는 그래프이다.

도 14는 MVA의 종양내 주사로 종양 배출 림프절 (TDLNs)에서 면역학적 변화를 유도하는 것을 나타내는 데이터의 일련의 그래프이다. 도 14 (A)-(B)는 PBS (14 (A)) 또는 MVA (14 (B))로 치료된 마우스의 TDLNs에서 그랜자임 B $^+$ CD8 $^+$ 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 14 (C)-(D)는 PBS (14 (D)) 또는 MVA (14 (E))로 치료된 마우스의 TDLNs에서 Ki-67 $^+$ CD8 $^+$ 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 14 (C)는 PBS 또는 MVA로 치료된 마우스로부터 TDLNs에서 그랜자임 B $^+$ CD8 $^+$ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 14 (F)는 PBS 또는 MVA로 치료된 마우스로부터 TDLNs에서 CD8 $^+$ Ki-67 $^+$ 의 백분율을 나타내는 그래프이다.

도 15는 MVA Δ E3L이 MC38 결장암 세포에서 타입 I IFN 및 염증성 시토킨/케모킨 생성을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 15 (A)-(D)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염된 MC38 결장암 세포의 상층액에서 IFN- β (15 (A)), IL-6 (15 (B)), CCL4 (15 (C)), 및 CCL5 (15 (D))의 단백질 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 15 (E)-(H)는 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염시키고 6시간 후에 MC38 결장암 세포에서 Ifnb (15 (E)), I16 (15 (F)), Cc14 (15 (G)), 및 Cc15 (15 (H))의 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 15 (I)는 PARP, 절단된-PARP, 포스포-IRF-3, IRF3, 및 β -액틴의 단백질 수준을 나타내는 웨스턴 블로트의 스캔한 이미지이다. "hpi", 감염후 시간.

도 16은 MVAΔE3L이 쥐과 결장 암종 모델에서 종양형성 (tumorigenesis)을 저해하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 16 (A) 및 16 (B)는, MVAΔE3L의 종양내 주사가 마우스 (C57B/6)에서 일방에 이식된 쥐과 결장 샘 암종 (MC38 세포)의 치료에 효과적임을 보여주는, 마우스에서 종양 부피 대 PBS 또는 바이러스의 주사후 시간의 플롯이다. 치료되기 전 (0일) 및 치료 후 최대 45일까지 PBS 또는 MVAΔE3L 그룹으로 치료된 마우스의 종양 부피가 개시되었다. 도 16 (C)는 상기 치료된 마우스 (MVAΔE3L) 대 대조군 마우스 (PBS)에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선이다. ***, p < 0.001 (MVAΔE3L 대 PBS 그룹).

도 17은 MVA 또는 MVAΔE3L의 종양내 주사가 쥐과 B16-F10 흑색종 양측 이식 모델에서 주사되지 않은 말단 종양에서 항종양 효과를 유도하는 것을 나타내는 데이터의 일련의 그래프이다. 도 17 (A)-(F)는 각각 PBS, MVA, 또는 MVAΔE3L 주사 후 시간 (일)에 대해 플로팅된 주사된 (A, C, E) 및 주사되지 않은 (B, D, F) 종양 부피의 그래프이다. 도 17 (G)는 PBS (검은색 원), MVA (검은색 사각형), 또는 MVAΔE3L (검은색 삼각형)이 주사된 종양-함유 마우스 (B16-F10 세포)의 Kaplan-Meier 생존 곡선이다. ****, p < 0.0001 (MVAΔE3L 대 PBS 그룹); ***, p < 0.001 (MVA 대 PBS 그룹).

도 18은 MVA 또는 MVAΔE3L의 종양내 주사로, 쥐과 B16-F10 흑색종 양측 이식 모델에서 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서, 활성화된 이펙터 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포를 유도하고 및 조절인자 CD4⁺ T 세포를 감소시키는 것을 나타내는 데이터의 일련의 그래프이다. 도 18 (A)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된, 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 18 (B)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 %CD3⁺CD8⁺ T 세포의 그래프이다. 도 18 (C) 및 (E)는 그랜자임 B⁺ (18 (C)) 또는 Ki-67 (18 (E))을 발현하는 CD8⁺ 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 18 (D) 및 (F)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 %CD8⁺그랜자임 B⁺ (18 (D)), CD8⁺Ki-67⁺ (18 (F)) T 세포의 그래프이다. 도 18 (G)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 18 (H)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 %CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 그래프이다. 도 18 (I) 및 (K)는 그랜자임 B⁺ (18 (I)) 또는 Ki-67 (18 (K))을 발현하는 CD4⁺ 세포의 유세포 분석의 점도표이다. 도 18 (J) 및 (L)은 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 %CD4⁺그랜자임 B⁺ (18 (J)), CD8⁺Ki-67⁺ (18 (L)) T 세포의 그래프이다. (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001).

도 19는 MVA 또는 MVAΔE3L의 종양내 주사가 쥐과 B16-F10 흑색종 모델에서 종양-관련된 마크로파지 (TAMs)를 감소시키는 것을 나타내는 데이터의 일련의 그래프이다. 도 19 (A)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 종양에서 TAM 세포 (CD45⁺Ly6C⁻MHCII⁺CD24^{lo}F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺)의 유세포 분석의 점도표이다. 도 19 (B)-(D)는 PBS, MVA 또는 MVAΔE3L로 치료된 종양에서 CD45⁺ 세포에서 % TAM, TAM1 (CD11C^{lo}CD11b^{hi}), 및 TAM2 (CD11C^{hi}CD11b^{lo})의 그래프이다. (*, p < 0.05; ns: 비-유의성).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] 정의:

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, 하기 용어는 문단에서 달리 분명하게 지시하지 않는 한 하기에 이를 설명하는 의미를 가져야 한다:

[0123] "암"은 제어되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 인간 및 동물의 질병 부류를 나타낸다. 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 용어 "암"은 용어 "종양", "악성", "과잉증식" 및 "신생물(들)"과 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있고; 용어 "암세포(들)"는 용어 "종양 세포(들)", "악성 세포(들)", "과잉증식 세포(들)" 및 "신생물 세포(들)"과 상호교환가능하다.

[0124] "흑색종"은 멜라닌을 생성할 수 있는 세포로부터 기인된 악성 신생물을 나타낸다. 용어 흑색종은 "악성 흑색종"과 동의어이다. 흑색종은 환자의 림프절, 피부, 간, 폐 및 뇌 조직을 포함하여 널리 전이된다.

[0125] "고형 종양"은 모든 신생 세포 성장 및 증식, 모든 암-이전 (pre-cancerous) 및 암성 세포 및 조직을 나타내고, 혈액암, 가령 림프종, 백혈병 및 다발 골수종은 제외한다. 고형 종양의 예로는, 이에 한정되지 않고 하기를 포

함한다: 연조직 육종 (soft tissue sarcoma), 가령 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양 (Ewing's tumor) 및 다른 골 종양 (예컨대, 골육종, 악성 섬유조직구종), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저 세포 암종, 샘암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 샘암종, 낭샘암종, 속질 암종, 기관지 암종, 신세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막암종, 고환종, 배아 암종, 윌름즈 종양 (Wilms' tumor), 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 뇌/CNS 종양 (예컨대, 별아교세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 소아기 종양, 가령 비정형 기형/막대형 종양, 생식 세포 종양, 배아 종양, 뇌실막종, 머리인두종, 뇌실막종, 솔방울샘종, 혈관모세포종, 속귀신경집종, 희소돌기아교 세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종. 본 개시내용의 조성물 및 방법이 유용할 수 있는 대부분의 일반적인 고형 종양의 일부는 하기를 포함한다: 두경부암, 직장 샘암종, 신경아교종, 속질모세포종, 요로상피세포 암종, 이자 샘암종, 자궁 (예컨대, 자궁내막암, 자궁관암), 난소암, 자궁경부암, 전립샘암종, 비-소 세포 폐암 (편평 및 샘암종), 소세포 폐암, 흑색종, 유방 암종, 유관상피내암종 (ductal carcinoma in situ), 신세포 암종 및 간세포 암종, 부신 암종 (예컨대, 부신겉질 암종), 식도, 눈 (예컨대, 흑색종, 망막모세포종), 담낭, 위장관, 윌름즈 종양, 심장, 두경부, 후두, 하인두, 구강 (예컨대, 입술, 입, 침샘, 코인두, 신경모세포 종, 복막, 뇌하수체, 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma), 소장, 위, 고환, 가슴샘, 갑상샘, 부갑상샘, 질 종양, 및 상기 어느 것의 전이암.

[0126]

"전이"는 그 원발성 부위로부터 체내에서 이웃하는 조직 또는 더 먼 위치로 암이 퍼지는 것을 나타낸다. 암 세포는 원발성 종양으로부터 떨어져 나와서, 림프 및 혈관으로 침투하여, 혈류를 통해 순환하고, 체내 다른 곳의 정상 조직에서 성장한다. 전이는 종양 세포 (또는 암 줄기 세포)가 원발성 종양으로부터 떨어져 나와, 혈류 또는 림프를 통해 이동하고, 먼 부위에서 면모를 순차적인 과정이다. 일단 다른 부위에 도달하면, 암 세포는 혈관 또는 림프관 벽을 통해 재-침투되어, 증식을 지속하고, 결국 새로운 종양 (전이성 종양)을 형성한다. 일부 구현예에서, 상기 새로운 종양을 전이 (또는 속발성) 종양이라 한다.

[0127]

"면역 반응"은 림프구, 항원 제시 세포, 포식 세포, 과립구 및 상기 세포 또는 간에 의해 생성된 가용성 거대분자 (항체, 시토킨 및 보체 포함)의 하나 이상의 작용을 나타내고, 이는 암종 세포, 전이 종양 세포 등의 체내로부터 선택적 손상, 파괴 또는 제거를 유도한다. 면역 반응은 세포성 반응, 가령 T 세포 기능인 세포성 기능의 변경 (alteration) (조절, 예컨대, 상당한 향상, 자극, 활성화, 손상 또는 저해)인 T 세포 반응을 포함할 수 있다. T 세포 반응은 생성, 증식 또는 팽창, 또는 T 세포, 또는 T 세포의 서브세트, 예를 들면 이펙터 CD4+, CD4⁺ 헬퍼 (helper), 이펙터 CD8+, CD8⁺ 세포독성 또는 자연살해 (NK) 세포의 특정 형태의 자극을 포함할 수 있다. 이러한 T 세포 서브세트가 하나 이상의 세포 수용체 또는 세포 표면 분자 (예컨대, CD 또는 분화 분자의 클러스터)를 겸출함으로써 동정될 수 있다. T 세포 반응은 또한 다른 세포의 분화 또는 증식에 영향을 주는 세포성 인자, 가령 가용성 매개체 (예컨대, 시토킨, 림포킨, 시토킨 결합 단백질 또는 인터류킨)의 변경된 발현 (통제적으로 유의한 증가 또는 감소)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 타입 I 인터페론 (IFN- α / β)은 본래 면역의 중요한 조절인자이다 (52)(Huber *et al.* *Immunology* 132(4):466-474 (2011)). 동물 및 인간 연구에서 항원 인식 항-종양 면역 반응의 초기 단계 동안 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 운명에 직접 영향을 주는 IFN- α / β 의 역할이 개시되었다. IFN 타입 I이 수지상 세포의 활성화에 반응하여 유도되고, 차례로 본래의 면역계의 표지 (sentinel)가 된다.

[0128]

"종양 면역"은 종양이 면역계에 의해 인식 및 청소를 회피하는 하나 이상의 과정을 나타낸다. 그러므로, 치료 개념으로서, 이러한 회피가 감소 또는 제거되고, 및 상기 종양이 면역계에 의해 인식 및 공격될 때 종양 면역이 "치료된다" (후자는 본원에서 "항-종양 면역"이라 함). 종양 인식의 예는 종양 결합이고, 종양 공격의 예는 종양 감소 (수, 크기 또는 둘 다) 및 종양 청소이다.

[0129]

"T 세포"는 다양한 세포-매개 적응 면역 반응에 참여하는 가슴샘 유래 림프구를 나타낸다.

[0130]

"헬퍼 T 세포"는 CD4⁺ T 세포를 나타내고; 헬퍼 T 세포는 MHC 클래스 II 분자에 결합된 항원을 인식한다. 상이한 시토킨을 생성하는, 헬퍼 T 세포의 적어도 2가지 타입인, Th1 및 Th2가 있다.

[0131]

"세포독성 T 세포"는 그 표면에 CD8 분자 마커 (markers)를 일반적으로 포함하고 (CD8+), 그 표면에서 특정 항원성 분자를 갖는 표적 세포를 파괴함으로써 세포-매개된 면역에서 기능하는 T 세포를 나타낸다. 세포독성 T 세포는 또한 퍼포린 (perforin)-형성 공극을 통해 표적 세포로 진입할 수 있고 또한 세포자멸 (세포사)을 유도할 수 있는 세린 프로테아제인 그랜자임을 분비한다. 그랜자임은 세포독성 표현형의 마커로 제공된다. 세포독

성 T 세포의 다른 명칭은 CTL, 세포용해 T 세포, 세포용해 T 림프구, 킬러 T 세포, 또는 킬러 T 림프구를 포함한다. 세포독성 T 세포의 표적은 바이러스-감염된 세포, 박테리아 또는 원충 기생충 (protozoal parasites)으로 감염된 세포, 또는 암 세포를 포함할 수 있다. 대부분의 세포독성 T 세포는 그 세포 표면에 존재하는 단백질 CD8을 갖는다. CD8이 상기 클래스 I MHC 분자의 일부에 부착된다. 통상적으로, 세포독성 T 세포는 CD8+ 세포이다.

[0132] "종양-침윤하는 백혈구"는 암 (가령 흑색종)을 앓고 있는 피험체의 백색 혈액 세포를 나타내고, 이는 순환계 (혈액 또는 림프액)에 존재하거나 또는 그렇지 않으면 떠나서, 또한 종양으로 이동한다.

[0133] "면역 체크포인트 저해제" 또는 "면역 체크포인트 차단제"는 하나 이상의 체크포인트 단백질의 활성을 전부 또는 일부 감소, 저해, 방해 또는 조절하는 분자를 나타낸다. 체크포인트 단백질은 T-세포 활성화 또는 기능을 조절한다. 체크포인트 단백질은, 이에 한정되는 것은 아니지만, CD28 수용체 패밀리 멤버, CTLA-4 및 그 리간드 CD80 및 CD86; PD-1 및 그 리간드 PDL1 및 PDL2; LAG3, B7-H3, B7-H4, TIM3, ICOS, 및 BTLA를 포함한다 (53).

[0134] 치료 물질의 투여 문맥에서 사용될 때 "비경구"는 소화관을 통한 투여 이외의 임의의 투여 경로를 포함한다. 본원에 개시된 특별한 방법은 정맥내 (예를 들면 간문맥을 통한 것을 포함), 종양내 또는 경막내 투여이다.

[0135] "항체"는 항원에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자 또는 상기 분자의 항원-결합 단편을 나타낸다. 그러므로, 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 본래의 면역글로불린일 수 있고, 본래 면역글로불린의 면역반응성 (항원-결합) 단편 또는 부분일 수 있다. 상기 항체가 예를 들면 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, Fv, Fab 및 F(ab)2, 뿐만 아니라 단체 항체 (single chain antibodies: scFv) 인간화된 항체 (humanized antibodies), 키메라 항체, 인간 재조합 항체 및 이- 및 삼-특이적 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다.

[0136] "종양용해성 바이러스"는 암 세포를 우선적으로 감염시키고, 상기 세포에서 복제하고, 또한 그 복제 과정을 통해 암 세포의 용해를 유도하는 바이러스를 나타낸다. 자연 발생하는 종양용해성 바이러스의 비제한적인 예는 소수포 구내염 바이러스 (vesicular stomatitis virus), 레오바이러스 (reovirus)뿐만 아니라 아데노바이러스, 뉴캐슬병 (Newcastle disease) 바이러스 및 단순 헤르페스 바이러스 (herpes simplex virus)와 같은 종양선택성인 것으로 엔지니어링된 바이러스를 포함한다 (예컨대, Nemunaitis, J. *Invest New Drugs.* 17(4):375-86 (1999); Kirn, DH *et al.* *Nat Rev Cancer.* 9(1):64-71(2009); Kirn *et al.* *Nat. Med.* 7:781 (2001); Coffey *et al.* *Science* 282:1332 (1998) 참조) (8, 54-56). 박시니아 바이러스는 다수의 세포 타입을 감염시키지만, 그러나 종양 세포는 복제에 유익한 대사를 갖고, 복제에 유익한 특정 경로의 활성화를 나타내고, 및 본래 면역계를 회피하는 환경을 형성한다는 사실에 의해 종양 세포에서 우선적으로 복제하고, 이는 또한 바이러스 복제에 유익하다. 본 개시내용의 문맥에서, MVA 및 MVA Δ E3L은 원래 종양 세포 내부에서 복제 및 세포자멸을 야기시킴으로써 항종양 효과를 생성하지 않기 때문에 종양용해성 바이러스의 정의에 맞지 않았다 (이는 상기 바이러스가 종양 항원을 나타내지 않기 때문에 백신의 전통적인 정의에도 부합되지 않는다. 그러나, 이는 상기 종양에 대한 숙주의 면역 반응을 향상시키도록 제공되기 때문에 상기는 면역자극 분자, 보조제에 대한 akin으로 작용한다고 말할 수 있다).

[0137] "MVA"는 "변형된 박시니아 안카라 (modified vaccinia Ankara)"를 의미하고, 안카라 균주로부터 유래되고 또한 백신 및 백신 아쥬반트로서 사용하도록 개발된 박시니아의 고도로 약독화된 균주를 나타낸다. 원 MVA가 닦 배아 세포를 통한 연속 계대에 의해 야생형 안카라 균주로부터 단리되었고, 이와 같이 치료되어, 영장류 (인간 포함) 세포에서 효율적으로 복제할 수 있는 능력을 포함하는 야생형 박시니아 계놈의 약 15%를 소실하였다 (57) (Mayr *et al.*, *Zentralbl Bakteriol B* 167, 375-390 (1978)). 천연두 (smallpox) 백신화 균주 MVA: 마카, 유전자 구조, 비경구적 백신화로 얻어진 경험 및 양측 방어 기전을 갖는 생물체에서 거동. MVA가 감염 질환 또는 종양에 대한 백신화 전달 또는 유전자에 대해 재조합 벡터로서 개발하기 위한 적절한 후보체인 것으로 고려된다. (58)(Verheust *et al.*, *Vaccine* 30(16), 2623-2632 (2012)). MVA는 길이 178 kb의 계놈 및 (59)(Antoine *et al.*, *Virology* 244(2): 365-396 (1998))에 먼저 개시된 서열을 갖는다. 서열이 또한 Genbank U94848.1에 개시되었다. 임상적 등급 MVA는 덴마크 Bavarian Nordic A/S Kvistgaard로부터 상업적으로 및 공개적으로 이용가능하다. 또한, MVA가 ATCC (Rockville, MD) 및 CMCN (Institut Pasteur Collection Nationale des Microorganismes) (Paris, France)으로부터 입수 가능하다.

[0138] "MVA Δ E3L"은 기능적 E3L 유전자가 결실되고 감염성이지만, 복제되지 않고, 숙주의 면역계를 회피하는 능력이 더 손상된 MVA의 결실 돌연변이체를 의미한다. 이는 백신 벡터로서 사용될 수 있다. 상기 돌연변이체 MVA E3L

녹아웃 (knockout) 및 그 제조가 예를 들면 미국특허 제7,049,145호에 개시되어 있다.

[0139] "피험체"는 암을 앓을 수 있고 그러므로 암에 걸렸을 때 치료를 필요로 하는 임의의 동물 (포유류, 인간 또는 기타) 환자를 의미한다.

[0140] "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 질병을 경감, 치료 또는 완화하는데 원하는 생물학적 결과를 제공하기에 충분한 기간동안 1회 이상의 투여량으로 투여될 때 작용제의 충분한 양을 나타낸다. 본 개시내용에서, MVA 또는 MVA Δ E3L의 각 유효량은 (적절한 기간 동안 적절한 빈도로 투여될 때) 암세포의 수가 감소되거나; 또는 상기 종양 크기가 감소되거나 또는 상기 종양을 박멸시키거나; 또는 암세포가 주변 장기로의 침입을 저해시키고 (즉, 늦춤 또는 멈춤); 전이 성장을 저해시키고 (즉, 늦춤 또는 멈춤); 종양 성장을 저해시키고 (안정화 또는 정지); 상기 종양의 치료를 가능하게 하고, 및/또는 상기 종양에 대한 면역 반응을 유도하는 양이다. 임의의 개별 사례에서 적절한 치료량은 본 개시내용의 관점에서 통상의 실험을 사용하여 당분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 결정될 수 있다. 이러한 결정은 인 비트로에서 유효한 것으로 발견된 양 및 동물에서 유효한 것으로 발견된 양에서 시작될 것이다. 상기 치료적 유효량은 배양에서 세포에게 혜택을 주는 것으로 발견된 농도 또는 농도들에 기반하여 초기에 결정될 것이다. 유효량은 세포 배양 내의 데이터로부터 추론될 수 있고, 본원에 상세히 개시된 바와 같은 인자들에 기반하여 높이거나 또는 낮춰서 조정될 수 있다. 유효량 범위의 예는 투여 당 10^5 바이러스 입자 내지 약 10^{12} 바이러스 입자이다.

[0141] 본원에 개시되는 바이러스-기반 면역자극제와 관련하여, "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 종양 세포 성장을 감소, 저해 또는 폐기함으로써, 상기 종양을 감소 또는 제거하는데 충분하거나 또는 피험체에서 인 비트로, 엑스비보로 전이되는 것을 저해, 감소 또는 폐기하거나 또는 상기 종양에 대한 면역 반응을 유도하여 결국 상기 사례에서 나타낸 바와 같이 전이 발생 감소, 억제 및/또는 폐기 중 하나 이상을 초래하기에 충분한 MVA 또는 MVA Δ E3L을 포함하는 조성물의 양을 나타낸다. 종양 세포 성장의 감소, 저해 또는 박멸은 피사, 세포자멸, 또는 면역 반응, 또는 상기 둘 이상의 조합의 결과일 수 있다 (그러나, 세포자멸의 침전은 예를 들면 종양용해성 바이러스에서 관찰되는 것과 동일한 인자들에 기인하는 것은 아닐 수 있다). 치료적 유효한 양은 상기 조성물에 사용된 특정 MVA, 치료될 피험체의 연령 및 병태, 종양 형성의 정도, 다른 치료 기법의 존재 또는 부재 등과 같은 요인들에 의해 가변될 수 있다. 유사하게, 투여될 상기 조성물의 투여량 및 그 투여 빈도는 활성 성분의 효능, 1회 투여시 그 활성의 지속 기간, 투여 경로, 피험체의 크기, 연령, 성별 및 신체 상태, 유해 반응의 위험 및 의사의 판단과 같은 다양한 요인에 의존할 것이다. 상기 조성물이 주사용 용액과 같은 다양한 제형으로 투여된다.

[0142] 면역 체크포인트 저해제와의 병용 요법과 관련하여, "면역 체크포인트 차단제에 대한 치료적 유효량"은 상기 종양 미세환경에서 면역 억제를 역전 또는 감소시키고 및 치료되는 피험체의 숙주 면역을 활성화 또는 향상시키기에 충분한 면역 체크포인트 차단제의 양을 의미한다. CD28 저해제에 대한 저해 항체, 가령 CTLA-4 (세포독성 T 림프구 항원 4) (예컨대, 이필리무맙), 항-PD-1 (프로그램된 사멸 1) 저해 항체 (예컨대, 니볼루맙 (nivolumab), 펠브롤리주맙 (pembrolizumab), 피딜리주맙 (pidilizumab), 람브롤리주맙 (lambrolizumab)), 및 항-PD-L1 (프로그램된 사멸 리간드 1) 저해 항체 (MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB 00107180) 뿐만 아니라 LAG-3 (림프구 활성화 유전자 3)에 대한 저해 항체, TIM3 (T 세포 면역글로불린 및 뮤신-3), B7-H3, 및 TIGIT (Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체)를 포함하는, 임상 시험에서 승인되었거나, 또는 개발 중에 있는 몇가지 면역 체크포인트 차단제가 있다. 상기의 투여량 범위는 몇가지 투여 임상 시험이 완료되어진 바와 같이 당분야의 통상의 지식을 가진 자에게 알려지고 또는 용이하게 실시되어, 다른 가능한 작용제에 추론하여 수행된다.

[0143] 바람직하게, 상기 종양은 특정 체크포인트를 발현하지만, 면역 체크포인트 차단제가, 종양 세포, 간질 세포 및 종양-침윤 면역 세포에 의해 유도되는, 상기 종양내에서 더 일반적으로 면역 억제 기전을 차단하기 때문에 엄격하게 필요하지는 않다.

[0144] 예를 들면, 흑색종에서 수술 후에 아쥬반트 요법으로 투여될 때, CTLA4 저해제 이필리무맙이 총 4개의 도스에 대해 매 3주마다 3 mg/kg의 총 인큐전 양으로 90분에 걸쳐서 1-2 mg/mL로 투여된다. 상기 요법은 종종 심각한 생명-위험 면역-매개 유해 반응을 수반하므로, 이는 허용 용량 뿐만 아니라 투여될 수 있는 누적량이 제한된다. MVA 또는 MVA Δ E3L과 합동으로 투여될 때 이필리무맙의 용량 및/또는 누적량을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 하기에 개시된 실험 결과의 관점에서, 상기 MVA 바이러스 중 하나 또는 둘 다와 동시에 또는 순차적으로 상기 종양으로 직접 투여되는 경우 CTLA4 저해제의 용량이 더 감소될 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 이필리무맙에 대해 상기에 제공된 양은 병용 투여로 환자에게 제공될 특정 투여량 및 누적량을 결정하는 출발점

일 것이지만, 그러나 투여량 연구가 적정량을 결정하기 위해 요구될 것이다.

[0145] 펨브롤리주맙이 25 mg/mL로 희석시켜서 흑색종에서 아쥬반트 요법으로 투여되기 위해 처방된다. 매 3주마다 30분에 걸쳐서 2 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 다시, 상기는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 합동 투여에서 투여량 및 투여를 결정하는 출발점일 수 있다.

[0146] 니볼루맙이 매 2주마다 60분에 걸쳐서 정맥내 인퓨전으로 3 mg/kg으로 투여하기 위해 처방되어, MVA 또는 MVA Δ E3L과 합동으로 상기 체크포인트 저해제의 투여량 및 투여를 결정하는데 유사한 출발점을 제공한다.

[0147] 작용제 항체와 같은 면역 자극제가 암에 대한 면역요법으로 또한 탐색되었다. 예를 들면, 항-ICOS 항체가 ICOS의 세포외 도메인에 결합되어 ICOS 신호전달의 활성화 및 T 세포 활성화를 유도한다. 항-OX40 항체가 OX40에 결합할 수 있고, T 세포 수용체 신호전달을 가능하게 하여 T 세포 활성화, 증식 및 생존을 유도한다. 다른 예는 4-1BB (CD137)에 대한 작용제 항체, GITR을 포함한다. 상기 모든 작용제는 임상 시험의 다양한 단계에 있다.

[0148] 면역 자극 작용제 항체가 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사와 조합하여 전신으로 사용될 수 있다. 대안으로, 상기 면역 자극 작용제 항체가 MVA 또는 MVA Δ E3L과 합동으로 종양내 전달을 통해 동시 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0149] "약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제" 또는 "약학적으로 허용가능한 부형제"는 어떠한 제한 없이 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제, 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 생물학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 부형제에 대한 상세는 하기에 제공된다. 항미생물제, 예를 들면 항진균제와 같은 보충 활성 성분이 또한 상기 조성물로 혼입될 수 있다.

[0150] 상기 종양 미세환경에서 본 개시내용의 MVA 또는 MVA Δ E3L을 침적시키는 것과 관련하여 사용된 "전달"은 상기 종양으로 국소 투여에 의해 또는 예를 들면 정맥내 경로에 의해 수행된다. 상기 용어는 상기 종양 자체에 도달하는 MVA 또는 MVA Δ E3L에 초점을 두었다.

[0151] 본원에서 "합동 투여"는 MVA 또는 MVA Δ E3L과 조합하여 제2 치료 기법의 투여를 나타내고, 예를 들면 면역 체크포인트 차단제가 투여되고, 시간적으로 근접하게 MVA 또는 MVA Δ E3L이 투여된다. 예를 들면, PD-1/PDL-1 저해제 및/또는 CTLA4 저해제 (더 구체적인 구현예에서, 항체)가 MVA 또는 MVA Δ E3L과 동시에 투여될 수 있거나 (상기 MVA 또는 MVA Δ E3L가 전술한 바와 같이 종양내 또는 전신으로 투여될 때 정맥내 또는 종양내 주사에 의해), 또는 MVA 또는 MVA Δ E3L 투여 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L 투여 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 1-7일 간격으로 또는 심지어 최대 3주 간격으로 투여될 수 있다면, 이는 본원에 명시된 바와 같이 "시간적으로 근접한" 내에 있을 수 있다.

* * *

[0153] 일 구현예에서, 본 개시내용은 종양을 앓고 있는 피험체에서 항종양 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것으로서, MVA 또는 MVA Δ E3L의 유효량을 상기 종양에 전달하는 단계를 포함한다. 상기 면역계의 자극은 하기의 면역 효과 중 하나 이상에 의해 나타날 수 있다:

[0154] 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 이펙터 CD8 $^+$ T 세포 및 이펙터 CD4 $^+$ T 세포의 적어도 하나의 증가;

[0155] 타입 I IFN의 유도를 통한 상기 종양에 침윤하는 수지상 세포의 성숙 유도;

[0156] 상기 종양 내 및/또는 종양-배출 림프절에서 종양 세포를 인식하는 상기 피험체에서 이펙터 CD4 $^+$ T 세포의 유도;

[0157] 상기 종양 내의 면역 억제 (조절) CD4 $^+$ T 세포의 감소;

[0158] 하나 이상의 타입 I IFN 또는 다른 염증 시토킨 또는 케모킨을 생성하도록 상기 종양 세포의 유도;

[0159] 상기 종양 내의 면역 억제 종양-관련 마크로파지의 감소.

[0160] 상기 하나 이상의 면역 효과는 상기 치료에 대한 상기 피험체의 초기 반응 지표로 제공될 수 있고, 이의 지속되는 효과의 모니터로 제공될 수 있다. 본 발명의 바이러스가 종양을 치료하는 방식은 종양 항원을 갖는 백신 백터 방식과는 상이하고 (종양내로 전달되는 것이 아니라, 근육내, 피하 또는 드물게 정맥 경로로 전달됨), 또한 종양용해성 바이러스의 방식과도 상이하다는 (종양 세포에서 바이러스 복제에 의해 세포병증을 유발시킴) 것을

상기 효과의 관찰로 알 수 있다. 본 발명의 치료에 따라 세포자멸이 발생되면, 이는 결과적으로 일어나는 세포 자멸과 동일한 기전에 기인한 것이 아니며, 또는 다른 작용 기전에 기인할 수도 있다.

[0161] 본 발명자들은 면역 반응의 기전을 탐색하고, 타입 1 IFN의 생성을 매개하는 cGAS/STING에 의해 매개되는 시토졸 DNA-센싱 경로에 의해 개시되는 것으로 결론지었다. 보충되는 기전 및 면역 세포에 대한 부가의 견해가 실시예에 제공되었다. 본원에 제시된 결론은 이러한 기전이 밝혀지는 구체적인 실험 환경에 국한되지 않는다.

[0162] 일 구현예에서, 본 개시내용은 고형 종양으로 진단된 피험체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L의 치료적 유효량을 상기 종양에 전달하는 단계를 포함한다.

[0163] 일 구현예에서, 본 개시내용은 암으로 진단된 피험체에서 항-종양 면역을 유도하는 방법을 제공하고, MVA 또는 MVA Δ E3L의 치료적 유효량을 상기 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용의 방법은 상기 종양 크기의 감소, 상기 종양의 박멸, 상기 종양 성장의 저해, 상기 종양의 전이 저해 또는 전이 성장 감소, 또는 상기 종양의 전이 성장의 박멸, 상기 종양 세포의 세포자멸 유도 또는 상기 피험체의 수명을 연장시킬 수 있는 항-종양 면역의 유도를 포함한다 (치료되지 않았거나 또는 기존에 치료된 피험체와 비교함).

[0164] 다른 구현예에서, 본 개시내용은 고형 악성 종양으로 진단된 피험체에서, MVA 또는 MVA Δ E3L의 치료적 유효량을 상기 종양에 노출시킴으로써 T 세포 반응과 같은 본래 면역 반응 및/또는 적응 면역 반응을 포함할 수 있는 항-종양 면역 반응을 향상, 자극 또는 유도하는 방법을 제공한다.

[0165] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 종양 세포에 대한 T-세포 세포독성의 관점 및 종양 세포에 대한 이펙터 T 세포를 유도하는 관점에서 적응 면역 반응을 매개하는 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 MVA 또는 MVA Δ E3L을 포함하는 조성물을 고형 종양을 앓고 있는 피험체에게 종양내 또는 (본 발명자가 기대하는 바와 같은) 정맥내로 투여하는 단계를 포함하고, 상기 조성물의 투여는 상기 종양에 대한 종양-특이적 면역 반응을 유도하고, 결국 종양 성장의 감소, 저해 또는 박멸, 전이 성장의 저해, 종양 세포의 세포자멸 및/또는 상기 피험체의 생존의 연장을 유도한다. 실제로, 본 발명자들은 암 세포가 사멸되었고, 전이 사례에서 있을 수 있는 바와 같이 멀리 떨어져 있는 위치로 면역 반응이 이동하는 것을 개시하였다.

[0166] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 종양 세포에 대한 T-세포 세포독성의 관점 및 종양 세포에 대한 이펙터 T 세포를 유도하는 관점에서 적응 면역 반응을 매개하는 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 MVA 또는 MVA Δ E3L을 포함하는 조성물을 피험체에게 비경구로 투여하는 단계를 포함하고, 상기 조성물의 투여는 상기 종양에 대한 종양-특이적 면역 반응을 유도하고, 결국 종양 성장의 감소, 저해 또는 박멸 및/또는 전이 성장의 저해, 감소 또는 제거, 종양 세포의 세포자멸 및/또는 치료된 피험체의 생존 연장이 종래 치료법 또는 치료되지 않은 피험체와 비교하여 유도되었다. 복강내 전이의 경우에, 상기 바이러스가 복강내로 주사될 수 있다.

[0167] 실제로 본 발명자들은 암 세포가 사멸되었고, 전이 사례에서 있을 수 있는 바와 같이 멀리 떨어져 있는 위치로 면역 반응이 이동될 수 있고, 또한 항-종양 효과를 발휘할 수 있다는 것을 개시하였다.

[0168] MVA 및 MVA Δ E3L은 대부분의 포유류 세포에서 복제 능력이 실질적으로 없기 때문에, 복제 능력이 있는 백신 또는 백터와 동일한 방식으로 면역계에 영향을 발휘하지 못한다. 그러므로, 면역계의 자극은 종양용해성에 대한 효능에 있어서 장벽인 것으로 여겨졌고 (8)(Kirn et al., *Nat Rev Cancer.* (1), 64-71 (2009)), MVA 및 MVA Δ E3L은 본래의 면역계를 이용하여, 세포독성 측면에서뿐만 아니라 더 광의로 상기 종양에 대한 이펙터 T 세포 활성화 측면에서, 적응 면역을 자극할 수 있다.

[0169] 그러므로, 본 개시내용은 고형 악성 종양을 치료하는 방법을 제공하고, 고형 종양으로 진단된 피험체에서 상기 종양에 대한 면역 반응을 유도하기에 효과적인 양의 MVA 또는 MVA Δ E3L을 상기 피험체의 종양에 전달하는 단계를 포함한다.

[0170] 본 개시내용은 또한 고형 악성 종양을 앓고 있는 피험체에서 항종양 전신 면역을 생성하는 방법을 제공하고, 상기 피험체에서 주사되지 않은 종양의 거부 및 종양 전이의 저해 (본 발명자들은 종양 재-챌린지로 테스트함) 중 하나 또는 둘 다를 야기하기에 효과적인 양의 MVA 또는 MVA Δ E3L을 상기 피험체의 종양에 전달하는 단계를 포함한다.

[0171] 본원에 개시된 바와 같이, MVA는 cGAS/STING에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로를 통해 종래의 수지상 세포 (cDCs)에서 타입 I IFN 유도를 유발한다. C57B/6 마우스에서 MVA의 정맥내 전달로 야생형 마우스에서 타입 I IFN을 유도하였지만, STING 또는 IRF3이 결여된 마우스에서는 그렇지 않았다. 또한 MVA Δ E3L은 타입 I IFN 유전자 발현 및 IRF3의 포스포릴화가 cDCs에서 MVA보다 더 높은 수준을 유도하였다. MVA Δ E3L의 cGAS/STING에 의

해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로 및 MDA5/MAVS에 의해 매개된 dsRNA-센싱 경로 둘 다에 의해 검출되었다. 또한, B16 흑색종 세포 및 MC38 결장 샘암종 세포의 MVA Δ E3L 감염은 타입 I IFN 및 전염증 시토킨 및 케모킨뿐만 아니라 IRF3의 포스포릴화의 활성화를 유도한다. MVA 및 MVA Δ E3L은 PARP 및 카스파제 (Caspase)-3의 절단에 의해 입증된 바와 같이 B16 및 MC38 세포에서 세포자멸을 유도하였다. 본 개시내용에 따르면, MVA 또는 MVA Δ E3L 바이러스가 직접 항-암 요법으로 사용된다. 취과 B16 흑색종 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사는 세포자멸, 연장된 생존 및 종양 박멸, 뿐만 아니라 전신 항-종양 면역의 발생을 유도한다.

[0172] 현재 문헌에 기반하지만, 이론에 국한되지 않고, 하기의 기전이 MVA 및 MVA Δ E3L의 항-종양 효과에 기여할 것으로 여겨진다: (i) 기존 수지상 세포 및 마크로파지를 포함하는 면역 세포에서 타입 I IFN 반응의 유도; (ii) 암 세포에서 타입 I IFN 및 전염증 시토킨 및 케모킨의 유도; (iii) 암 세포에서 세포자멸의 유도; 및 (iv) 종양 면역 억제 환경을 면역 활성 환경으로 변경.

[0173] 변형된 박시니아 안카라 (MVA)

[0174] 변형된 박시니아 안카라 (MVA) 바이러스는 폭스비리대 (Poxviridae)과에서 속 오르토폭스바이러스 (Orthopoxvirus)의 구성원이다. MVA가 박시니아 바이러스 (CVA)의 안카라 균주의 닭 배아 섬유아세포 (CEF)에서 대략 570회의 일련의 계대에 의해 생성되었다 (60)(Mayr et al., *Infection* 3, 6-14 (1975)). 상기 장기간 계대의 결과로서, 결과의 MVA 바이러스는 광범위한 계놈 결실을 포함하고, 숙주 세포가 조류 세포로 제한된다 (61)(Meyer et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991)). 결과의 MVA가 현저하게 비병원성인 것이 다양한 동물 모델에서 개시되었다 (57) (Mayr et al., *Dev. Biol. Stand.* 41, 225-34 (1978)).

[0175] MVA의 안전성 및 면역원성이 특히 인간 천연두 질환에 대한 임상 시험에서 광범위하게 테스트되었고 기록되었다. 상기 연구는 120,000명의 개체에 대한 것을 포함하고, 인간에서 우수한 효능 및 안전성이 입증되었다. 더욱이, 다른 박시니아 기반 백신과 비교하여, MVA는 약해진 독력 (virulence) (감염성)을 갖지만 양호한 특정 면역 반응을 유발시킨다. 그러므로, MVA는 특정 면역 반응을 유발할 수 있는 능력을 갖는, 안전한 백신 벡터로 확립되었다.

[0176] 전술한 특성에 기인하여, MVA는, 재조합 유전자 발현 및 백신에 대해 사용되는, 엔지니어링된 MVA 벡터의 개발에 대한 매력적인 후보체가 되었다. 백신 벡터로서, HIV, 결핵 및 말라리아뿐만 아니라 암을 포함하는 수 많은 병리학적 형태에 대해 MVA가 조사되었다 (20, 21)(Sutter et al., *Curr Drug Targets Infect Disord* 3: 263-271(2003); Gomez et al., *Curr Gene Ther* 8: 97-120 (2008)).

[0177] 인간 단핵구-유래된 수지상 세포 (DC)의 MVA 감염은 동시-자극 분자의 상향조절 및 전염증 시토킨의 분비를 특징으로 하는 DC 활성화를 유도하는 것이 입증되었다 (18)(Drillien et al., *J Gen Virol* 85: 2167-2175 (2004)). 이와 관련하여, MVA는 표준 야생형 박시니아 바이러스 (wild type Vaccinia virus: WT-VAC)와는 다르고, 이는 DCs를 활성화시키지 못한다. 수지상 세포가 2개의 주요 서브타입인 종래의 수지상 세포 (conventional dendritic cells: cDCs) 및 형질세포양 수지상 세포 (plasmacytoid dendritic cells: pDCs)로 분류될 수 있다. 전자인, 특히 CD103+/CD8 α^+ 서브타입은 T 세포에 대해 교차-제시 항원으로 적응되고; 후자는 타입 I IFN의 강한 생성인자이다.

[0178] 인간 세포의 바이러스 감염은 타입 I 인터페론, 특히 인터페론-알파 (α)에 의해 매개된 본래의 면역 반응 (제1방어선)의 활성화를 초래한다. 상기는 통상적으로 면역학적 "캐스케이드"의 활성화를 유도하여, 활성화된 T 세포 (CTL 및 헬퍼 둘 다)의 보충 및 증식으로 결국 항체를 생성한다. 그러나 바이러스는 상기 숙주의 면역 반응을 약화시키는 요인을 발현시킨다. MVA는 WT-VAC보다 우수한 면역원이고, 포유류 세포에서 잘 복제되지 않는다. (예컨대, Brandler et al., *J. Virol.* 84, 5314-5328 (2010) 참조) (62).

[0179] 그러나, MVA는 전체적으로 비복제성이 아니며, 본 발명자들은 일부 잔류하는 면역억제 활성을 포함하는 것을 보았다. 그럼에도 불구하고, 본원에 개시된 바와 같이, MVA는 치료된 환자의 생존을 현저하게 연장시켰다. 이러한 발견의 의미는 MVA (또는 MVA Δ E3L)를 종양에 주사하거나 또는 전신으로 전달함으로써 숙주의 본래 및 적응 면역 반응을 향상시켜서 면역 반응을 회피하고, 상기 반응이 본래의 것이거나 또는 체크포인트 저해제와 같은 다른 면역치료제에 의해 유발 또는 향상되는, 상기 종양에 대한 면역 반응을 일으키도록 상기 숙주의 능력을 회복시키는 상기 종양의 능력을 극복할 수 있다.

[0180] E3이 결실된 변형된 박시니아 안카라 (MVA Δ E3L)

[0181] 이전 섹션에 개시된 MVA의 항종양 효과가 또한 MVA Δ E3L에서 관찰되었다. 후자는 MVA보다 면역억제성이 떨어지

고, 대부분의 포유류 세포에서 심지어 복제성이 떨어지고, 이러한 관점에서 바람직하다. 또한, MVAΔE3L의 효과는 일반적으로 본원에 개시된 실험에서 볼 수 있는 바와 같이 MVA에 의한 효과보다 질적으로 더 우수했다.

[0182] 면역 반응

특정 면역계 활성의 상향-조절에 의한 면역 반응의 유도뿐만 아니라 (가령 항체 및/또는 시토킨 생성, 또는 세포 매개된 면역의 활성화), 면역 반응은 또한 숙주 자신의 기관 및 조직에 대한 항상성을 재수립하고 이에 대한 과도한 손상을 방지하기 위해, 검출가능한 면역의 억제, 약독화, 또는 임의의 다른 하향조절을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법에 따라 유도되는 면역 반응은 중양 세포의 사멸, 또는 전파 능력의 손실을 직접 또는 간접적으로 야기할 수 있는 이펙터 CD8⁺ (항종양 세포독성 CD8⁺) T 세포 또는 활성화된 T 헬퍼 세포, 또는 둘 다를 생성한다.

본 개시내용의 방법에 의한 면역 반응의 유도가 다양한 잘 알려져 있는 면역 파라미터들 중 어느 것을 검출함으로써 결정될 수 있다 (63, 64)(Takaoka et al., *Cancer Sci.* 94:405-11 (2003); Nagorsen et al., *Crit. Rev. Immunol.* 22:449-62 (2002)). 그러므로 면역 반응의 유도는, 면역 분석을 포함하는 다수의 잘 알려져 있는 분석법의 어느 것에 의해 확립될 수 있다. 이러한 분석은 이에 한정될 필요는 없지만, 가용성 면역글로불린 또는 항체; 가용성 매개체 가령 시토킨, 케모킨, 호르몬, 성장 인자 등뿐만 아니라 다른 가용성 소 펩티드, 탄수화물, 뉴클레오티드 및/또는 지질 매개체의 인 비보, 엑스 비보, 또는 인 비트로 결정; 예를 들면 세포 증식, 변경된 이동성, 변경된 세포내 양이온 구배 또는 농도 (가령 칼슘)과 같은 면역계 세포의 변경된 기능적 또는 구조적 특성에 의해 결정되는 바와 같은 세포성 활성화 상태 변경; 세포성 폴리펩티드의 포스포릴화 또는 데포스포릴화; 특정 유전자 발현 또는 세포용해 거동과 같은 특별한 활성의 유도; 변경된 표면 항원 발현 프로파일을 포함하는 면역계 세포에 의한 세포 분화, 또는 세포자멸 (프로그램된 세포 사멸)의 개시; 또는 면역 반응의 존재가 검출될 수 있는 임의의 다른 기준을 포함한다. 예를 들면, 면역 세포 타입을 구별하는 세포 표면 마커가 CD4+, CD8+, 또는 NK 세포에 결합하는 특정 항체에 의해 검출될 수 있다. 검출될 수 있는 다른 마커 및 세포 성분은 이에 한정되는 것은 아니지만 인터페론 γ (IFN- γ), 종양 괴사 인자 (TNF), IFN- α , IFN- β , IL-6, 및 CCL5를 포함한다. 상기 면역 반응을 검출하는 일반적 방법은 이에 한정되는 것은 아니지만, 유세포 분석법, ELISA, 면역조직화학을 포함한다. 상기 및 유사한 분석을 수행하는 절차가 널리 알려져 있고, 예를들면 Letkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, Current Protocols in Immunology*, 1998)에서 찾을 수 있다.

[0185] 약학적 조성을 및 조제

MVA 또는 MVAΔE3L을 포함하는 약학적 조성물은 담체 또는 희석제를 포함할 수 있고, 이는 예를 들면 물, 폴리올 (예를 들면 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 그 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적정한 유동성이 예를 들면 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산의 경우에 필요로 하는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제로, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 (thimerosal) 등에 의해 수행될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들면 당 (sugars) 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 상기 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 상기 조성물내에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 야기될 수 있다. 일반적으로, 주사용 조제에 적합한 부형제가 당분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백하게 포함될 수 있다.

MVA 또는 MVAΔE3L을 포함하는 약학적 조성물 및 조제가 종래의 혼합, 용해, 과립화, 유화, 캡슐화 (encapsulating), 트래핑화 (entrapping) 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 약학적 바이러스 조성물은, 인 비트로, 인 비보 또는 엑스 비보 사용에 적합한 바이러스 조제 제형화를 촉진하는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 종래 방식으로 조제될 수 있다. 상기 조성물은 하나 이상의 부가의 생물학적 활성제와 조합될 수 있고 (예를 들면 GM-CSF의 병렬 투여), 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조제되어 비경구 또는 종양내 투여에 적합한 본 개시내용의 약학적 (생물학적 포함) 또는 수의학적 조성물을 생성할 수 있다.

당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 알 수 있는 바와 같이 많은 타입의 조제가 가능하다. 선택된 특정 타입은 당 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이 선택된 투여 경로에 의존한다. 예를 들면, 전신 조제는 일반적으로 주사, 예컨대 정맥내 주사로 투여하기 위해 디자인될뿐만 아니라 상기는 종양내 전달을 위해 디자인될 것이다. 바람직하게, 상기 전신 또는 종양내 조제가 멸균되었다.

- [0189] 멸균된 주사 가능한 용액이 필요로 하는 양의 적절한 용매 중 MVA 또는 MVA Δ E3L을 본원에 개시된 다양한 다른 성분들과 혼합시켜서, 요구되는 바와 같이 적합한 멸균 수단에 의해 제조된다. 일반적으로, 분산물이 염기성 분산 매질 및 전술한 것으로부터의 필요로 하는 다른 성분들을 포함하는 멸균 부형제에 다양한 멸균된 활성 성분들을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결-건조 기술이고, 이는 상기 바이러스와 이전에 그 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 부가의 바람직한 성분들의 분말을 생성하였다.
- [0190] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 MVA 및 MVA Δ E3L 조성물이 수성 용액, 또는 생리학적 상용가능한 용액 또는 버퍼, 가령 헹크 용액 (Hanks's solution), 링거 용액 (Ringer's solution), 만니톨 용액 또는 생리학적 식염수 버퍼에서 조제될 수 있다. 특정 구현예에서, MVA 및 MVA Δ E3L 조성물 중 어느 것은 제형화제 (formulator agents), 가령 혼탁, 안정화, 침투 또는 분산 제제, 버퍼, 동결건조보호제 (lyoprotectants) 또는 보존제 가령 폴리에틸렌 글리콜, 폴리소르베이트 80, 1-도데실헥사하이드로-2H-아제핀-2-온 (라우로카프란), 올레산, 소듐 시트레이트, 트리스 HC1, 텍스트로스, 프로필렌 글리콜, 만니톨, 폴리소르베이트 폴리에틸렌소르비탄 모노라우레이트 (Tween®-20), 이소프로필 미리스테이트, 벤질 알콜, 이소프로필 알콜, 에탄올 수크로스, 트레할로스 및 본 개시내용의 조성물들 중 어느 것에 사용될 수 있는 일반적으로 당분야에 알려져 있는 것을 포함할 수 있다 (Pramanick et al., *Pharma Times* 45(3), 65-76 (2013))(65).
- [0191] 본 개시내용의 생물학적 또는 약학적 조성물은, 상기 조성물이 피험체에게 투여되었을 때 종양 세포를 감염시킬 수 있도록 그 안에 바이러스를 포함하도록 조제될 수 있다. 투여 후에 혈청, 종양 및 원한다면 다른 조직내 바이러스 수준이 다양한 잘 수립된 기술, 가령 항체-기반 분석 (예컨대, ELISA, 면역조직화학 등)에 의해 모니터될 수 있다.
- [0192] MVA 및 MVA Δ E3L의 투여량
- [0193] 일반적으로, 상기 피험체에게 약 10^5 내지 약 10^{10} 의 플라크 형성 단위 (pfu) 범위의 MVA 및 MVA Δ E3L의 투여량이 투여되고, 하지만 더 적거나 또는 더 많은 용량이 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 투여량은 약 10^6 - 10^9 의 pfu이다. 바이러스 입자에 대한 pfu의 당량은 사용된 특정 pfu 적정 방법에 따라 상이할 수 있다. 일반적으로, pfu는 약 5 내지 100개의 바이러스 입자에 해당한다. MVA 또는 MVA Δ E3L의 치료적 유효량이 처방된 기간 동안 처방된 투여 빈도로 1회 이상으로 분할된 용량으로 투여될 수 있다.
- [0194] 예를 들면, 당분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 바와 같이, 본 개시내용에 따른 MVA 또는 MVA Δ E3L의 치료적 유효량은 상기 피험체의 질병 상태, 연령, 성별, 체중 및 일반적 형태, 및 특정 피험체에서 원하는 면역 반응을 유도할 수 있는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 능력 (상기 피험체의 치료에 대한 반응)과 같은 요인에 따라 가변될 수 있다. MVA 또는 MVA Δ E3L을 피험체에게 전달하는데, 상기 투여량은 또한 일반적인 의학적 상태, 이전 병력, 질병 진행, 종양 부하 등과 같은 요인에 따라 가변될 것이다.
- [0195] 일부 구현예에서, 투여의 용이성 및 투여량의 균일함을 위해 투여 단위 제형으로 본 개시내용의 조성물을 조제화하는 것이 유익할 수 있다. 본원에서 사용되는 투여 단위 제형은 치료될 포유류 피험체에 대해 단일 투여량으로 적절한 물리적으로 별개의 유닛을 나타내고; 각 유닛은 요구되는 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체와 화합된 요구되는 치료적 효과를 발생하도록 산출된 활성 물질의 선정된 양을 포함한다.
- [0196] MVA 및 MVA Δ E3L의 투여 및 치료 요법
- [0197] MVA 및 MVA Δ E3L의 투여가, 비경구, 예를 들면 종양내 또는 정맥내 투여를 포함하는 2 이상의 경로를 사용하여 수행될 수 있다. 일 구현예에서, MVA 또는 MVA Δ E3L이 상기 종양으로, 예컨대 종양내 주사에 의해 직접 투여되고, 여기서 직접 국소 반응이 바람직하다. 또한, MVA 및 MVA Δ E3L의 투여 경로는, 예컨대 종양내 주사를 사용한 제1 투여, 정맥내 주사를 통한 후속 투여, 또는 그 임의의 조합으로 가변할 수 있다. MVA 또는 MVA Δ E3L 주사의 치료적 유효량이 처방된 기간동안 처방된 투여 빈도로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, MVA 및 MVA Δ E3L이 다른 치료 치료법과 결합하여 사용될 수 있다. 예를 들면, MVA 및 MVA Δ E3L이, 부피가 큰 원발성 종양을 가진 피험체에 대해 설정된 네오아쥬반트 (수술전) 또는 아쥬반트 (수술후)로 투여될 수 있다. 이러한 최적화된 치료 요법은 상기 종양에 대한 면역 반응을 유도하고, 수술과 같은 1차 요법 이전 또는 이후에 피험체에서 종양의 무게를 감소시킬 것으로 기대된다. 또한, MVA 또는 MVA Δ E3L이 화학요법 또는 방사선과 같은 다른 치료 치료법과 결합하여 투여될 수 있다.
- [0198] 특정 구현예에서, 상기 MVA 또는 MVA Δ E3L 바이러스가 매주 또는 매달 적어도 1회 투여되지만, 그러나 필요하다

면 더 자주, 가령 수 주, 수개월, 수년, 또는 혜택이 지속되는 한 무기한으로 주 2회 투여될 수 있다. 더 빈번하게 투여하는 것은 허용되는 경우 및 지속적인 또는 증가된 혜택을 초래할 경우 고려된다. 본 발명의 이점은 이에 한정되는 것은 아니지만 하기를 포함한다: 암 세포 수의 감소, 종양 크기의 감소, 종양의 박멸, 말초 기관으로의 암세포 침윤의 저해, 전이 성장의 저해 또는 안정화 또는 박멸, 종양 성장의 억제 또는 안정화, 삶의 질의 안정화 또는 개선. 또한, 상기 이점은 상기 종양에 대한 면역 반응의 유도, 이펙터 CD4⁺ T 세포의 활성화, 이펙터 CD8⁺ T 세포의 증가 또는 조절 CD4⁺ 세포의 감소를 포함할 수 있다. 예를 들면, 흑색종의 문단에서 흑색종 처음 진단으로부터 1, 2, 3, 4, 5년 또는 그 이상 이내에 재발 또는 전이가 결여되는 이점이 있을 수 있다. 결장암 및 기타 고형 종양에 대해서도 유사한 평가가 만들어질 수 있다.

[0199] 특정 다른 구현예에서, 상기 종양 질량 또는 종양 세포가 인 비보, 엑스 비보 또는 인 비트로에서 MVA 또는 MVA Δ E3L로 치료된다.

실시예

[0200] 물질 및 방법

[0202] 바이러스 및 세포주

[0203] MVA 및 MVA Δ E3L 바이러스가 Gerd Sutter (University of Munich)에 의해 친절하게 제공받았고, BHK-21 (베이비 햄스터 신장 세포, ATCC CCL-10) 세포에 전염시켰다. MVA는 상업적 및/또는 공개적으로 이용가능하다. MVA Δ E3L 바이러스의 생성 방법이 개시되었다 (28)(Hornemann et al., *J Virol* 77, 8394-8407 (2003)). 상기 바이러스가 36% 수크로스 쿠션 (sucrose cushion)을 통해 정제되었다. BHK-21이 10% FBS, 0.1 mM 비필수 아미노산 (nonessential amino acids: NEAA), 및 50 mg/ml의 젠타마이신 (gentamycin)을 함유하는 이글 최소 필수 배지 (Eagle's Minimal Essential Medium) (Eagle's MEM, Life Technologies로부터 구입, Cat# 11095-080)에서 배양되었다. 쥐과 흑색종 세포주 B16-F10이 I. Fidler (MD Anderson Cancer Center)로부터 입수되었다. B16-F10 세포가 10% FBS, 100 Units/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 0.1 mM NEAA, 2 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 및 10 mM HEPES 버퍼가 보충된 RPMI 1640 배지에서 유지되었다. MC38 결장 샘암종 암 세포가 Dulbecco 변형된 이글 배지 (DMEM, Invitrogen)에서 유지되었다. 모든 세포가 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 성장되었다.

[0204] 본원에 사용된 세포 및 세포주가 달리 언급되지 않는 한 상업적 또는 공개적으로 입수가능하다.

마우스

[0206] 6주령 내지 10주령의 암컷 C57BL/6J 마우스가 Jackson Laboratory로부터 구입되었고, 골수-유래 수지상 세포의 제조 및 인 비보 실험을 위한 대조군 마우스로서 사용되었다. 상기 마우스가 Sloan Kettering Institute의 동물 시설에서 관리되었다. 모든 절차는 National Institute of Health의 실험 동물의 조치 및 사용에 대한 지침에서 권고사항에 따라 엄격하게 수행되었다. 상기 프로토콜은 Sloan-Kettering Cancer Institute의 동물 실험의 윤리 위원회의 승인을 받았다. cGAS^{-/-}, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-}, MAVS^{-/-}, MDA5^{-/-}, 및 STING^{Gt/Gt} 마우스가 Drs. Zhijian Chen (University of Texas Southwestern Medical Center; cGAS^{-/-} and MAVS^{-/-}), Tadatsugu Taniguchi (University of Tokyo; IRF3^{-/-} and IRF7^{-/-}), Marco Colonna (Washington University, MDA5^{-/-}), 및 Russell Vance (University of California, Berkeley; STING^{Gt/Gt})의 실험실에서 생성되었다.

[0207] 상기 또는 비교가능한 동물에 대한 상업적 공급원은 하기와 같다:

표 1

마우스	공급원	상업적 공급원
cGAS ^{-/-}	Zhijian Chen	Jackson Stock# 026554
MAVS ^{-/-}	Zhijian Chen	Jackson stock# 008634
MDA5 ^{-/-}	Marco Colonna	Jackson stock# 015812
STING ^{Gt/Gt}	Russell Vance	Jackson stock# 017537

IRF3 ^{-/-}	T. Taniguchi	Taniguchi lab http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?reg_no=RBRC00858
IRF7 ^{-/-}	T. Taniguchi	Taniguchi lab https://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC01420

[0209] 골수-유래 수지상 세포의 생성

[0210] 마우스의 경골 (tibia) 및 대퇴골 (femur)로부터 골수 세포가, 먼저 상기 뼈로부터 근육이 제거되고, 그 후 10% FCS을 갖는 RPMI을 구비한 0.5 cc U-100 인슐린 시린지 (Becton Dickinson)를 사용하여 상기 세포를 플러싱 (flushing)함으로써 수집되었다. 원심분리 후에, 상기 세포들을 빙 (ice) 상에서 1-3분 동안 인큐베이트함으로써 적혈구 세포 용해를 위한 ACK 용해 버퍼 (Lonza)에 상기 세포들이 쟈-현탁되었다. 세포들이 그 후 수집되었고, 새로운 배지에 쟈-현탁되었고, 40- μ m 세포 스트레이너 (cell strainer) (BD Biosciences)를 통해 여과되었다. 세포의 수가 계수되었다. GM-CSF-BMDCs의 생성을 위해서, 상기 골수 세포 (각 15 cm 세포 배양 디쉬에서 5,000,000개의 세포)가 CM에서 GM-CSF (30 ng/ml, Monoclonal Antibody Core facility at the Sloan Kettering Institute에 의해 제조)의 존재하에 10-12일 동안 배양되었다. CM은 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum: FBS), 100 Units/ml 폐니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 0.1mM 필수 및 비필수 아미노산, 2 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 및 10 mM HEPES 버퍼가 보충된 RPMI 1640 배지이다. 50%의 오래된 배지를 새로운 배지로 교체시킴으로써 세포가 매 2일마다 공급되었고, 매 3-4일마다 쟈-플레이트되어서 (re-plated) 부착된 세포가 제거되었다. 부착되지 않은 세포 만이 실험을 위해서 사용되었다.

[0211] RNA 단리 및 실시간 PCR

[0212] RNA가 전체-세포 용해물 (whole-cell lysates)로부터 RNeasy Mini 키트 (Qiagen)에 의해 추출되었고, First Strand cDNA 합성 키트 (Fermentas)에서 역전사되었다. 정량적 실시간 PCR이 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 SYBR Green PCR Mater Mix (Life Technologies) 및 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument (Life Technologies)로 3중으로 수행되었다. 상대 발현이 글리세르알데히드-3-포스페이트 테하드로게나제 (GAPDH)의 수준으로 정규화되었다.

[0213] 하기 프라이머가 실시간 PCR을 위해 사용되었다:

IFNA4 전향: 5'-CCTGTGTGATGCAGGAACC-3',
IFNA4 후향: 5'-TCACCTCCCAGGCACAGA-3';
IFNB 전향: 5'-TGGAGATGACGGAGAAGATG-3',
IFNB 후향: 5'-TTGGATGGCAAAGGCAGT-3';
CCL5 전향: 5'-GCCACGTCAAGGAGTATTCTA-3',
CCL5 후향: 5'-ACACACTTGGCGGTCCCTTC-3';
IL-6 전향: 5'-AGGCATAACGCACTAGGTTT-3',
IL-6 후향: 5'-AGCTGGAGTCACAGAAGGAG-3';
CXCL10 전향: 5'ATTCTTTAAGGGCTGGTCTGA 3'

CXCL10 후향:
5' CACCTCCAC
ATAGCTTACA
GT 3'
TNF 전향: 5' GTCAGGTTGCCTCTGTCTCA 3'
TNF 후향: 5' TCAGGGAAGAGTCTGGAAAG 3'

GAPDH 전향: 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3',
GAPDH 후향: 5'-AGACAACCTGGCCTCAGTGT-3'.

- [0215] 상대 발현이 글리세르알데히드-3-포스페이트 테하드로게나제 (GADPH)의 수준으로 정규화되었다.
- [0216] 시토킨 분석
- [0217] 세포가 1시간 동안 MOI 10으로 다양한 바이러스로 감염되거나 또는 모의 감염되었다. 접종물이 제거되었고, 상기 세포가 PBS로 2번 세척되었고, 새로운 배지로 인큐베이션되었다. 상층액이 감염 후에 다양한 시간에서 수집되었다. IFN- α/β (PBL Biomedical Laboratories), IL-6, CCL4, 및 CCL5 (R & D systems)에 대해 효소-연결된 면역흡착 분석 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 키트를 사용함으로써 시토킨 수준이 측정되었다.
- [0218] 웨스턴 블로트 분석
- [0219] BMDCs, B16-F10, 또는 MC38 세포 (1×10^6)가 MVA에 의해 MOI (multiplicity of infection) 10 또는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 동등량으로 감염되었다. 감염후 다양한 시간에서, 상기 배지가 제거되었고, 세포가 수집되었다. 전체-세포 용해물이 제조되었다. 동등량의 단백질이 소듐 도데실 슬레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 치료되었고, 폴리펩티드가 니트로셀룰로스 막으로 전달되었다. IRF3의 포스포릴화가 IRF3의 포스포세린-396에 대해 특이적인 토키 폴리클로날 항체를 사용하여 결정되었다 (Cell Signaling). IRF3의 수준이 IRF3에 대한 토키 폴리클로날 항체를 사용하여 결정되었다 (Cell Signaling). 항-STING 항체가 Cell Signaling으로부터 구입되었다. 박시니아 E3 단백질 수준이 Dr. Stuart N. Isaacs (University of Pennsylvania)에 의해 친절하게 제공된 항-E3 모노클로날 항체 (MAb 3015B2)를 사용하여 결정되었다 (66)(Weaver et al. *Virus Res* 130: 269-274 (2007)). 항-PARP 및 항-MCL-1 항체 (Cell Signaling)가 PARP 절단 및 MCL-1 단백질 분해를 결정하기 위해 사용되었다. 항-글리세르알데히드-3-포스페이트 테하드로게나제 (GADPH) 또는 항- β -액틴 항체 (Cell Signaling)가 로딩 대조군 (loading controls)으로 사용되었다.
- [0220] 종양 이식 및 바이러스에 의한 종양내 주사
- [0221] B16-F10 흑색종 세포 (1×10^5)가 C57BL/6J 마우스의 우측 옆구리 상에 면도된 피부로 피부내로 이식되었다. 이식 후 10일 내지 12일 후에, 종양 크기가 측정되었고, 상기 마우스를 마취하고, 직경이 3 mm 이상인 종양에 MVA 또는 MVA Δ E3L (2×10^7 pfu) 또는 PBS가 주사되었다. 바이러스가 매주 또는 각 실험에서 명시된 바와 같이 주사되었다. 마우스가 매일 모니터되었고, 종양 크기가 1주일에 2회 측정되었다. 종양 부피가 하기 식에 따라 산출되었다: 1 (길이) \times w (너비) \times h (높이)/2. 고통의 증후 또는 상기 종양의 직경이 10 mm에 도달하면 마우스를 안락사시켰다. 마우스가 안락사될 때 혈청이 수집되었다.
- [0222] MC38 쥐과 결장 샘암종 세포 (2×10^5)가 C57BL/6J 마우스의 우측 옆구리 상에 면도된 피부로 피부내로 이식되었다. 이식하고 7일 후에, 종양 크기가 측정되었고, 상기 마우스를 마취하고, 직경이 2-3 mm인 종양에 PBS 또는 MVA Δ E3L (2×10^7 pfu)이 주사되었다. 종양 크기가 바이러스 주사 후 다양한 일 수에서 측정되었다.
- [0223] 양측 종양 이식 모델 및 MVA 또는 MVA Δ E3L에 의한 종양내 주사
- [0224] 간단하게, B16-F10 흑색종 세포가 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리 (우측 옆구리에 5×10^5 및 좌측 옆구리에 1×10^5)에 피부내로 이식되었다. 종양 이식하고 8일 후에, 우측 옆구리의 더 큰 종양에 MVA의 2×10^7 pfu 및 MVA Δ E3L의 동등량이 종양내로 주사되었다. 상기 종양 크기가 측정되었고, 상기 종양에 1주일에 2회 재-주사되었다. 상기 마우스의 생존이 모니터되었다.
- [0225] 일부 실험에서, MC38 결장 샘암종 세포가 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리 (우측 옆구리에 5×10^5 및 좌측 옆구리에 1×10^5)에 피부내로 이식되었다.
- [0226] 유세포 분석
- [0227] 상기 종양 또는 종양 배출 림프절에서 면역 세포 표현형 및 특성을 분석하기 위해서, 본 발명자들은 하기 프로토콜에 따라 FACS 분석 전에 세포 혼탁물을 생성하였다 (46)(Zamarin et al., *Science Translational Medicine* 6, 226-232 (2014)). 먼저, 본 발명자들은 MVA 또는 PBS에 의해 치료하고 3일 후에 집게 (forceps) 및 수술용 가위를 사용하여 종양을 단리시켰다. 그 후 상기 종양이 칭량되었다. 종양 또는 종양 배출 림프절이 난작되었고 (minced), 그 후 리베라제 (1.67 Wunsch U/ml) 및 DNase (0.2mg/ml)와 30분 동안 37°C에서 인큐베이션되었고

다. 세포 혼탁물이 반복된 피펫팅으로 생성되었고, 70- μm 나일론 필터를 통해 여과되었고, 그 후 사멸한 세포를 제거하기 위한 Ficoll 정제 이전에 완전 RPMI로 세척되었다. 항-CD3, CD45, CD4, 및 CD8 항체로 표면 표지 (surface labeling)를 위해 세포가 치료되었다. 고정 염료 (fixable dye) eFluor506 (eBioscience)을 사용하여 살아 있는 세포를 사멸한 세포와 구별하였다. FoxP3 고정 및 투과 키트 (eBioscience)를 사용하여 상기가 더 투과되었고, 또한 Ki-67, FoxP3, 및 그랜자임 B를 염색하였다. 상기 골수성 세포 개체군의 염색을 위해서, CD45.2 (104), CD11b (M1/70), Ly-6C (HK1.4), MHC II (M5/114.15.2), CD24 (M1/69), F4/80 (BM8), CD103 (2E7) 및 CD11c (N418)에 대한 형광색소 접합된 (fluorochromeconjugated) 항체가 eBioscience로부터 구입되었다. 모든 항체가 그 개별 이소타입 대조군으로 테스트되었다. LSRII 유세포분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 데이터가 획득되었다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (Treestar)를 사용하여 분석되었다.

[0228] 시약

시약에 대한 상업적 공급원은 하기와 같다: CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 ODN2216 (Invitrogen); cGAMP가 InvivoGen으로부터 구입되었다. 항-PARP, 항-Mcl1 항체가 Cell Signaling으로부터 입수되었다. 유세포분석을 위해 사용된 항체가 eBioscience로부터 구입되었다 (CD45.2 Alexa Fluor 700, CD3 PE-Cy7, CD4 APC-eFluor780, CD8 PerCP-eFluor710, FOXP3 Alexa Fluor 700, CD45.2 eFluor 450, CD11b APC-eFluor 780, Ly-6C PE, MHC II PE-eFluor 610, CD24 APC, F4/80 PerCP-Cy5.5, CD103 FITC, CD11c Alexa Fluor 700). Invitrogen (CD4 QDot 605, Granzyme B PE-Texas Red, Granzyme B APC), BD Pharmingen (Ki-67-Alexa Fluor 488). IRF3의 항-포스포세린-396 및 항-IRF3 항체가 Cell signaling으로부터 구입되었다.

[0229] 통계

Two-tailed unpaired Student *t* 검정이 상기 연구에서 2개의 그룹의 비교를 위해 사용되었다. 생존 데이터가 log-rank (Mantel-Cox) 테스트에 의해 분석되었다. 유의한 것으로 간주되는 *p* 값은 도면에서 다음과 같이 표시되었다: *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001.

[0230] 종양 침윤 텁프구 (TIL) 조제

종양이 마우스로부터 분리되었고, 종양의 전체 중량이 가위로 분쇄되기 전에 평가되었다. 종양이 그 후 RPMI 1640에서 1.7 U/ml 리베라제 (Roche) 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase (Sigma)로 분해되었고, 37 °C의 세이커 (shaker)에서 30분 동안 인큐베이션되었다. 분해 후에, 세포 시료가 RPMI 1640에서 희석되었고, 세포 스트레이너를 통과시켰다. 다음 세포들이 RPMI 1640으로 세척되었고, FACS 버퍼에서 재현탁되었다. 단일 세포가 유세포 분석을 위한 염색 전에 빙 상에 유지되었다.

[0231] TIL의 유세포 분석

TILs가 2.4G2 mAb로 사전-인큐베이션되어서 Fc γ R 결합을 차단시키고, 빙 상에서 30분 동안 항체 패널로 염색되었다. CD45.2 (104), CD11b (M1/70), Ly-6C (HK1.4), MHC II (M5/114.15.2), CD24 (M1/69), F4/80 (BM8), CD103 (2E7) 및 CD11c (N418)에 대한 형광색소-접합된 항체가 eBioscience로부터 구입되었다. 모든 항체가 그 개별의 이소타입 대조군으로 테스트되었다. 생존력이 LIVE/DEAD 키트 (Invitrogen)에 의한 염색에 의해 평가되었다. 모든 시료가 LSRII 유세포분석기 (Becton Dickinson)에 의해 획득되었고, FlowJo 소프트웨어 (Tree Star)로 분석되었다.

[0232] 마우스 피부로부터 원발성 섬유아세포의 생성을 위한 프로토콜

마우스가 CO₂ 흡입에 의해 안락사되었고, 면도되었고, 화학적으로 탈모시켰다. 상기 마우스를 70% 에탄올에 1-2분 동안 담궜다. 몸통 피부를 잘라내어, 100-mm 조직 배양 디쉬의 뚜껑에 PBS에 넣었고, 이를 표피 아래쪽으로 퍼뜨렸다. 2개의 집게를 사용하여 피부면을 긁어서 표피 조직을 제거한 후, 표피 시료가 500 μl 디스파제 (dispase) (0.5 U/ml)/PBS와 45분 동안 37 °C로 인큐베이션되었다. 표피 시료를 표피면이 위로 향하도록 100-mm 조직 배양 디쉬의 뚜껑에 놓고, 표피가 2개의 집게를 사용하여 기계적으로 제거되었다. 표피 시트가, 37 °C에서 3시간 동안 타입 I 콜라겐나제 (1% BSA를 갖는 PBS 중 4mg/ml)에서 분해시키기 전에, PBS로 4회 세척되었다. 세포가 20% FBS를 함유한 DME 배지에서 1-2주 동안 배양되었다.

[0233] 실시예 1

[0234] MVA가 주파 cDCs에서 타입 I IFN 생성을 유도함

MVA가 타입 I IFN 유도를 유발할 수 있는지를 테스트하기 위해서, 골수-유래된 수지상 세포가 GM-CSF (GM-CSF-

BMDCs 또는 cDCs)의 존재 하에 배양되었고, WT VAC 또는 MVA에 의해 감염 다중도 (MOI) 10으로 감염되었다. 상 층액이 감염후 다양한 시점 (1, 4, 8, 14, 및 22 시간)에서 수집되었고, IFN- α 및 IFN- β 단백질 수준이 ELISA에 의해 평가되었다. 도 1 (A)에 개시된 바와 같이, IFN- α 및 IFN- β 둘 다가 MVA에 의해 감염되고 8시간 후에 검출되었고, 최대 24시간의 감염후 시간까지 계속 측정되었다.

[0241] cDCs의 WT VAC 또는 MVA 감염이 타입 I IFN 유전자 발현에 영향을 미치는지를 테스트하기 위해서, 정량적 실시간 PCR 분석이 감염 후 6시간에서 WT VAC 또는 MVA에 의해 감염된 GM-CSF-배양된 cDCs로부터 단리된 RNA를 사용하여 수행되었다. 모의-감염된 대조군이 또한 상기 실험에 포함되었다. 도 1 (B)에서 입증된 바와 같이, 치료되지 않은 세포와 비교될 때, cDCs의 MVA 감염으로 IFNA4 및 IFNB mRNA 수준이 6-배 및 105-배로 각각 증가되었다. 대조적으로, WT VAC에 의한 감염으로 IFNA4 및 IFNB mRNA 수준이 2-배 및 6-배로 각각 증가되었다 (도 1 (B)). 상기 결과는 MVA가 WT VAC보다 IFNA4 및 IFNB 유전자 발현의 실질적으로 더 강한 유발인자인 ($p < 0.001$) 것을 나타내었다. 본 실험은 IFN- α 및 IFN- β 로 표시되는 타입 I 인터페론의 발현을 유도하기 위해서 WT VAC가 아닌 MVA의 능력으로 시작하는 숙주의 면역계 (여기서 수지상 세포에서 효과에 의해 평가됨)에 있어서 WT VAC 및 MVA가 다른 효과를 갖는 것을 개시하였다.

[0242] 실시예 2

[0243] *취과 cDCs에서 MVA-유도된 타입 I IFN 생성은 IRF3/IRF7/IFNAR1에 의존함*

[0244] 전사 인자 IRF3 및 IRF7은 타입 I IFN 유도의 중요 조절인자이고, 바이러스 감염에 대한 숙주 방어를 위해 중요하다 (67)(Sato et al., *Immunity* 13: 539-548, 2000). 타입 I IFN의 MVA-유도가 IRF3 및 IRF7을 필요로 하는지를 테스트하기 위해서, cDC가 IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} 및 WT 마우스 (연령-매치됨)로부터 생성되었고, MVA로 감염되었다. MVA-유도된 IFN- α / β 분비가 IRF3 결핍 cDCs에서 폐기되었다 (도 2 (A)). IRF7^{-/-} 세포가 MVA 감염에 대한 반응에서 IFN- α 를 생성하는데 실패하였고, IFN- β 유도가 MVA-감염된 IRF7^{-/-} 세포에서 57%까지 감소되었다 (도 2 (B)).

[0245] IFNAR1에 의해 매개된 타입 I IFN 포지티브 피드백 루프는 IFN의 유도를 필요로 하는지를 평가하기 위해서, IFNAR1^{-/-} cDCs 및 WT 대조군들이 MVA에 의해 MOI 10으로 감염되었고, IFN- α / β 분비 수준이 ELISA로 평가되었다. MVA에 의한 IFN- α 유도가 IFNAR1^{-/-} 세포에서 폐지되었고, MVA에 의한 IFN- β 유도가 WT 대조군과 비교하여 IFNAR1^{-/-} 세포에서 45%까지 감소되었다 (도 2 (C)). 전체적으로, 상기 결과는 하기를 나타내었다: (i) IRF3은 MVA-유도된 타입 I IFN 생성에 대한 중요 전사 인자이고, 및 (ii) IRF7 및 IFNAR1은 MVA 감염에 의해 유도된 타입 I IFN 신호전달을 증폭시키는데 역할을 한다. 그러므로, 상기 결과로부터 상기 면역계의 활성화에 관련된 기전을 통해 타입 I IFN을 유도할 수 있는 MVA의 능력을 확인하였다.

[0246] 실시예 3

[0247] *MVA-유도된 타입 I IFN 유도는 STING에 의존함*

[0248] STING은 박테리아 및 DNA 바이러스를 포함하는 세포내 DNA 또는 DNA 병원체에 대한 반응에서 타입 I IFN 유도에 필수적인 소포체-관련 단백질이다 (68, 69)(Ishikawa et al. *Nature* 455: 674-678 (2008); Barber et al. *Curr Opin Immunol* 23: 10-20 (2011). STING이 MVA에 의해 cDCs에서 타입 I IFN 유도에 필요한지를 테스트하기 위해서, 기능적으로 제로인 대립유전자를 초래하는 Sting의 단일 뉴클레오티드 변이체를 갖는 N-에틸-N-니트로소우레아 (ENU)-유도된 골든티켓 (Gt) 돌연변이체 마우스 (Sting^{Gt/Gt})로부터 cDCs가 생성되었다 (70)(Sauer et al. *Infect Immun* 79: 688-694 (2011)). 연령-매치된 WT 마우스로부터 cDCs가 대조군으로 사용되었다. 세포가 MOI 10으로 MVA에 의해 감염되거나 또는 리포폴리사카리드 (LPS)로 치료되었다. IFN- α / β 의 MVA 유도가 Sting^{Gt/Gt} 세포에서 폐지되었고, 반면에 LPS-유도된 IFN- α / β 생성에 영향을 받지 않았다 (도 3 (A)). MVA에 의한 IFNA4 mRNA의 유도가 WT 세포에서 6-배로부터 Sting^{Gt/Gt} 세포에서 2-배까지 감소되었고, 반면에 MVA에 의한 IFNB mRNA의 유도가 WT 세포에서 133배로부터 Sting^{Gt/Gt} 세포에서 14배까지 감소되었다 (도 3 (B)). 또한, 웨스턴 블로트 분석으로 MVA-유도된 IRF3 포스포릴화가 WT cDCs에서 감염 후 4시간 및 6시간에서 피크에 도달했고, Sting^{Gt/Gt} cDCs에서는 부재한 것이 입증되었다 (도 3 (C)). 또한, 상기 결과로 STING은 cDCs에서 MVA-유도된 타입 I IFN 생성 및 IRF3 포스포릴화에서 필수적인 것으로 입증되었다.

- [0249] STING 및 전사 인자 IRF3을 포함하는 그 하류 신호전달 경로를 활성화할 수 있는 MVA의 능력은 복제가능한 WT VAC와는 다르고, 이는 STING/IRF3을 활성화할 수 없다. 본 발명자들은 MVA-매개된 항종양 면역의 기전이 WT VAC 또는 티미딘 키나제가 결실된 재조합 복제가능한 VAC에 의해 매개되는 종양용해성 효과의 기전과 다를 것이라고 추측하였다.
- [0250] 실시예 4
- [0251] MVA는 STING/IRF3-의존성 방식으로 인 비보에서 타입 I IFN 생성을 유발함
- [0252] MVA가 STING/IRF3-의존성 방식으로 인 비보에서 타입 I IFN 생성을 유발하는지를 테스트하기 위해서, *Sting*^{+/+}, *Sting*^{Gt/Gt}, 및 *IRF3*^{-/-}가 꼬리 혈관 주사에 의해서 2×10^7 pfu로 감염되었다. 혈청이 감염 후 6시간에 수집되었다. *Sting*^{+/+} 마우스의 MVA 감염으로 IFN- α 및 IFN- β 생성이 각각 798 pg/ml 및 1017 pg/ml까지 유도되었고, 이는 *Sting*^{Gt/Gt}, 및 *IRF3*^{-/-} 마우스에서 폐지되었다 (도 3 (D)). 상기 결과는 인 비보에서 MVA-유도된 타입 I IFN 생성이 STING 및 전사 인자 IRF3에 또한 의존하는 것을 나타내었다.
- [0253] 정맥내 전달을 통해서 STING/IRF3-의존성 방식으로 타입 I IFN 생성을 유도하는 MVA의 능력은 또한 MVA에 의해 매개되는 IFN-의존성 치료 효과를 나타낸다.
- [0254] 실시예 5
- [0255] *cGAS*는 *cDCs*에서 MVA에 의해 타입 I IFN의 유도를 필요로 함
- [0256] STING/IRF3 경로가 DNA 바이러스 감염에 반응하는 고리형 GMP-AMP 신타제 (*cGAS*)에 의해 생성된 제2 전달인자 (second messenger)인 고리형 GMP-AMP (*cGAMP*)에 의해 활성화될 수 있다 (71)(Sun et al., *Science* 339: 786-791 (2013)). *cDCs*의 MVA 감염이 시토졸 DNA 센서 *cGAS*에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로를 통해 타입 I IFN 유도를 유발하는지를 테스트하기 위해서, *cDCs*가 *cGAS*^{-/-} 마우스 (72)(Li et al., *Science* 341(6152): 1390-1394 (2013)) 및 연령-매치된 WT 대조군으로부터 생성되었고, MVA로 감염되었다. 도 4 (A)에 개시된 바와 같이, MVA-유도된 IFN- α / β 생성이 *cGAS*^{-/-} 세포에서 폐지되었다. MVA에 의한 IFNA4 및 IFNB mRNA의 유도가 WT 세포와 비교하여 *cGAS*^{-/-} 세포에서 약화되었다 (도 4 (B)). 마지막으로, 웨스턴 블로트 분석으로 TBK1 및 IRF3의 MVA-유도된 포스포릴화가 *cGAS*^{-/-} 세포에서 부재한 것이 입증되었다 (도 4 (C)). 상기 결과는 *cGAS*가 MVA에 대한 중요한 시토졸 DNA 센서인 것이 입증되었다
- [0257] 실시예 6
- [0258] *MVA* Δ *E3L*은 쥐과 *cDCs*에서 MVA보다 타입 I IFN 생성의 더 높은 수준을 유도함
- [0259] E3은 타입 I IFN 유도를 포함하는 다양한 본래의 면역 반응을 약독화시키는 중요한 독성 인자이다. MVA는 E3L 유전자를 보유한다. 웨스턴 블로트 분석으로 E3 단백질이 WT VAC 및 MVA-감염된 BMDCs에서 생성되었지만, MVA Δ E3L-감염된 세포에서는 생성되지 않은 것을 보여주었다 (도 5 (A)). E3이 *cDCs*에서 MVA 센싱에서 저해 역할을 하는지를 테스트하기 위해서, 타입 I IFN 유전자 발현의 유도가 MVA와 MVA Δ E3L 사이에서 비교되었다. MVA Δ E3L이 MVA보다 IFNA4 및 IFNB mRNAs의 더 높은 수준을 유도하는 것이 발견되었다 (도 5 (B)) ($P < 0.001$). 상기 유도가 전사 인자 IRF3이 결여된 세포에서 폐지되었다 (도 5 (C)). 또한, 웨스턴 블로트 분석으로 MVA Δ E3L 감염은 감염 후 4시간 및 8시간에서 MVA보다 포스포-IRF3의 더 높은 수준을 유도하는 것이 입증되었다 (도 5 (D)). 상기 결과는 E3이 MVA의 본래의 면역-센싱을 약화시키고, MVA로부터 E3를 제거하면 타입 I IFN 유전자 발현의 향상된 활성화를 초래하는 것을 시사하였다. 본 발명자들은 MVA Δ E3L이, MVA와 비교하여 타입 I IFN을 유도하는 우수한 능력에 기인하여, MVA보다 더 강한 항종양 효과를 가질 수 있다고 추론하였다.
- [0260] 실시예 7
- [0261] *cGAS*에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로는 *cDCs*에서 MVA Δ E3L-유도된 타입 I IFN 유도에서 중요한 역할을 함
- [0262] *cDCs*의 MVA Δ E3L 감염이 시토졸 DNA 센서 *cGAS* (고리형 GMP-AMP 신타제) (71, 73)(Sun et al., *Science* 339(6121): 786-791 (2013); Wu et al., *Science* 339(6121): 826-830 (2013)), 및 그 어댑터 STING (68, 74)(Ishikawa et al., *Nature* 455(7213): 674-678 (2008); Gao et al., *Ce11* 154(4): 748-762 (2013))에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로를 통해 타입 I IFN 유도를 유발하는지를 테스트하기 위해서, *cDCs*가 *cGAS*^{-/-}

(72)(Li et al., *Science* 341(6152): 1390-1394 (2013)) 마우스 및 연령-매치된 WT 대조군으로부터 생성되었고, MVAΔE3L로 감염되었다. 정량적 실시간 PCR 분석을 사용하여, 감염 후 6시간에서 MVAΔE3L-유도된 IFNA4 및 IFN- β 유전자 발현이 cGAS-결핍 세포에서 모두 감소되었다는 것이 밝혀졌다 (도 6 (A), $P < 0.001$). 감염 후 22시간에서 수집된 상층액의 ELISA 분석으로 또한 MVAΔE3L-유도된 IFN- α / β 분비가 cGAS-결핍 세포에서 현저하게 감소된 것을 보여주었다 (도 6 (B), $P < 0.001$). 대조적으로, 15 μ M 최종 농도에서 cGAMP 치료로 WT 및 cGAS $^{-/-}$ cDCs 모두에서 유사한 수준으로 IFN- α / β 분비를 유도하였다. 마지막으로, 웨스턴 블롯 분석으로 IRF3의 MVAΔE3L-유도된 포스포릴화가 cGAS $^{-/-}$ 세포에서 감염 후 2시간 및 4시간에서 부재하였고, 및 감염 후 6시간 및 8시간에서 현저하게 감소된 것이 입증되었다 (도 4 (C)). 상기 결과는 cGAS가 MVAΔE3L에 대한 중요한 시토졸 DNA 센서인 것이 입증되었다. 이러한 결과는 또한 수지상 세포에서 cGAS/STING 경로를 유도하는 MVAΔE3L의 능력이 그 치료 효과에 기여할 수 있음을 암시하였다. 불활성화된 MVA로 본 발명자들에 의해 수득되고 및 2016년 2월 25일자로 출원되고, 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된 PCT US2016/019663에 개시된 결과에 기반하여, 본 발명자들은 MVAΔE3L의 항종양 효과가 cGAS 또는 STING이 결핍된 마우스에서 감소될 것으로 기대되었다. E3이 결실된 WT VAC은 수지상 세포에서 타입 I IFN을 유도할 수 없고 (데이터가 개시되지 않음), 이는 WT VAC에 의해 발현된 cGAS/STING 경로의 바이러스 저해제(들)가 MVA에서 소실되었음을 나타내었다.

[0263] 실시예 8

[0264] MDA5/MAVS에 의해 매개된 시토졸 dsRNA-센싱 경로는 또한 cDCs에서 MVAΔE3L-유도된 타입 I IFN 생성에 기여함

[0265] 웨스턴 블롯 분석으로 IRF3의 MVAΔE3-유도된 포스포릴화가 STING $^{Gt/Gt}$ 마우스에서 생성된 STING-결핍 골수-유래된 cDCs에서 WT 세포와 비교하여 감염 후 4시간에서 줄어들었고, 감염 후 8시간에서 감소되는 것을 보여주었다 (도 7 (A)). IRF3의 MVAΔE3L-유도된 포스포릴화가 MAVS $^{-/-}$ cDCs에서 WT 세포와 비교하여 감염 후 8시간에서 또한 감소되었다 (도 7 (A)). 상기 결과는 cDCs의 MVAΔE3L 감염이 cGAS/STING에 의해 매개된 시토졸 dsRNA-센싱 경로 뿐만 아니라 MDA5/MAVS에 의해 매개된 시토졸 dsRNA-센싱 경로 모두에 의해 감지될 수 있다는 것을 시사하였다. 상기 가설을 테스트하기 위해서, STING $^{Gt/Gt}$ /MDA5 $^{-/-}$ 마우스가 생성되었고, 이중-결핍 cDCs가 단리되었다. TBK1 및 IRF3의 MVAΔE3L-유도된 포스포릴화가 STING $^{Gt/Gt}$ /MDA5 $^{-/-}$ 세포에서 폐지되었다 (도 7 (B)). 상기 결과는 시토졸 dsRNA-센싱 경로는 MVAΔE3L에 의해 생성된 dsRNA를 감지하는데 역할을 하는 것을 나타내었다. 모두를 고려하여, 상기 결과는 cDCs에서 MVAΔE3L 감염으로 cGAS/STING 및 MDA5/MAVS 신호전달 경로에 의해 바이러스 DNA 및 dsRNA의 시토졸 검출을 각각 초래하고, TBK1 및 IRF3의 활성화 및 타입 I IFN 유전자 발현의 유도를 초래하는 것을 입증하였다. 합성 dsRNA의 정맥내 전달은 MDA5를 활성화하고, 항 종양 효과를 유도하는 것이 개시되었다 (Tormo et al., 2009). 면역 세포, 섬유아세포 (실시예 참조) 및 종양 세포 (실시예 참조) 둘 다에서 dsRNA의 생성을 통한 MDA5 활성화를 유도하는 MVAΔE3L의 능력이 또한 그 치료 효과에 기여할 수 있다.

[0266] 실시예 9

[0267] cGAS/STING에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로는 귀과 원발성 섬유아세포에서 MVAΔE3L-유도된 Ifnb 유전자 발현에 중요한 역할을 함

[0268] 피부 진피 섬유아세포는 흑색종 간질 세포에서 중요한 세포 타입을 구성하며, 성장 인자 및 다른 가용성 매개체의 생성을 통한 흑색종 진행 및 전이에 기여한다 (Li et al., *Oncogene* 2003; Inada et al., 2015). 피부 진피 섬유아세포가 또한 MVA 또는 MVAΔE3L에 반응하는지를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 WT 및 cGAS $^{-/-}$ 마우스에서 원발성 피부 섬유아세포를 생성하고, 이들을 MVA 또는 MVAΔE3L에 의해 MOI 10으로 감염시켰다. 세포가 감염 후 6시간에서 수집되었다. 정량적 실시간 PCR 분석을 사용하여, 본 발명자들은 MVAΔE3L 감염이 감염 후 6시간에서 MVA보다 더 높은 수준으로 Ifnb, Ccl4, 및 I16 유전자 발현을 유도하는 것이 밝혀졌다 (도 8 (A)-(D)). MVA 및 MVAΔE3L에 의한 Ifnb, Ccl4, Cc15, 및 I16 유전자 발현의 유도가 cGAS-결핍 섬유아세포에서 줄어들었다 (도 8 (A)-(D)). 상기 결과는 섬유아세포의 MVA 및 MVAΔE3L 감염이 시토졸 DNA 센서 cGAS에 의해 검출될 수 있고, 이는 IFNB, 및 다른 전염증 시토킨 및 케모킨의 유도를 초래하였다. STING은 시토졸 DNA-센싱 경로에 대한 중요 어댑터이다. MDA5는 시토졸 dsRNA 센서이다 (Gitlin et al., *PNAS* 2006). STING 또는 MDA5, 또는 둘 다가 또한 피부 섬유아세포에서 MVA 또는 MVAΔE3L를 감지하는데 관여하는지를 테스트하기 위해서, 본 발명자들은 WT, STING $^{Gt/Gt}$, MDA5 $^{-/-}$, 및 STING $^{Gt/Gt}$ MDA5 $^{-/-}$ 마우스로부터 원발성 피부 섬유아세포를 생성시키고, MVA 또는 MVAΔE3L로 이들을 감염시켰다. 정량적 실시간 PCR 분석으로 Ifnb, Ccl4, Cc15, 및 I16 유전

자 발현을 유도하는 MVA 또는 MVA Δ E3L이 STING-결핍 세포에서 크게 감소된 것을 보였고, 이는 cGAS/STING에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로는 바이러스 감염을 검출하고 항바이러스 본래 면역을 유도하는데 중요하다는 것을 확인하였다. STING-결핍 세포에서 MVA Δ E3L에 의해 유도된 I16 및 Ccl4 유전자 발현의 잔류 수준이 약간 낮았고, 상기 수준은 STING 및 MDA5-이중 결핍 세포에서는 없었으며, 이는 MDA5가 MVA Δ E3L 바이러스에 의해 생성되는 dsRNA를 검출하는데 지원하는 역할을 하는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 피부 진피 원발성 섬유아세포에서, MVA가 Ifnb, Ccl14, Ccl15, 및 I16 유전자 발현을 유도하기 위해 cGAS/STING 시토졸 DNA-센싱 경로에 의해 검출되었고, 반면에 MVA Δ E3L은 cGAS/STING 및 MDA5 경로를 모두 활성화시켜서 본래 면역을 유도하는 것으로 결론지었다.

[0269] 실시예 10

cGAS/STING에 의해 매개된 시토졸 DNA-센싱 경로는 쥐과 원발성 섬유아세포에서 MVA 및 MVA Δ E3L-유도된 타입 I IFN, 염증성 시토킨 및 케모킨 생성에 중요한 역할을 함

[0271] 감염된 피부 섬유아세포로부터 단백질 분비를 상호연관시키기 위해서, 본 발명자들은 MVA 또는 MVA Δ E3L로 감염된 WT, STING^{Gt/Gt}, MDA5^{-/-}, 및 STING^{Gt/Gt} MDA5^{-/-} 마우스로부터 피부 섬유아세포로부터 상층액들을 수집하였고, ELISA 분석을 수행하였다. MVA Δ E3L 감염은 MVA보다 IFN- β , IL-6 및 CCL4의 더 높은 분비 수준을 유도한 것으로 관찰되었다. 유전자 발현 분석으로 관찰된 것과 유사하게, IFN- β , IL-6 및 CCL5의 MVA-유도된 분비가 STING-결핍 세포에서 폐지되었다. MVA Δ E3L-유도된 IFN- β 및 CCL5가 STING-결핍 세포에서 줄어들었음에도 불구하고, MVA Δ E3L 바이러스에 의해 감염된 STING-결핍 세포의 상층액에서 잔류 수준의 IL-6 및 CCL4가 있었고, 이는 STING 및 MDA5-이중 결핍 세포에서 폐지되었다. 함께 고려하여, 상기 결과는 피부 섬유아세포가 MVA 또는 MVA Δ E3L 감염에 반응하는 IFN- β , IL-6, CCL4, 및 CCL5의 생성에서 중요 공급원인 것을 나타내었고, 이는 상기 시토졸 DNA-센싱 경로에 의존한다. 본 발명자들은 종양 간질 섬유아세포가 또한 MVA 또는 MVA Δ E3L과 같은 면역 활성화 바이러스에 반응하는 타입 I IFN 및 전염증 시토킨 및 케모킨을 유도할 수 있다고 추측하였다.

[0272] 실시예 11

B16 흑색종 세포의 MVA Δ E3L 감염은 타입 I IFN 및 염증성 시토킨/케모킨 생성을 유도함

[0274] B16 흑색종 세포의 MVA Δ E3L 감염이 또한 타입 I IFN, 및 염증성 시토킨/케모킨 생성을 유도하는지를 테스트하기 위해서, B16 흑색종 세포가 MVA 또는 MVA Δ E3L에 의해 MOI 10으로 감염되었거나, 또는 모의-감염되었다 (NT). 세포가 감염 후 6시간에서 수집되었고, 실시간 PCR 분석이 유전자 발현을 분석하기 위해서 수행되었다. 도 10 (A)-(F)에 개시된 바와 같이, MVA Δ E3L 감염은 MVA 보다 더 높은 수준의 IFNA4 (도 10 (A)), IFNb (도 10 (B)), I16 (도 10 (C)), TNF (도 10 (D)), CCL5 (도 10 (E)) 및 CXCL-10 (도 10 (F)) 유전자 발현을 유도하였다.

[0275] 실시예 12

MVA 또는 MVA Δ E3L에 의한 B16 흑색종 세포의 감염이 세포자멸을 유도함

[0277] 카스파제에 의한 폴리(ADP-리보스) 폴리미라제 (PARP)의 단백질분해 절단은 세포자멸의 특징이다. 박시니아 E3은 HeLa 세포에서 dsRNA에 의해 유도된 세포자멸을 저해하는 것으로 개시되었다 (75, 76)(Kibler *et al.*, *J Virol* **71**, 1992-2003 (1997); Lee *et al.*, *Virology* **199**, 491-496 (1994)). MVA Δ E3L은 MVA보다 닳 배아 섬유아세포 (CEFs)에서 세포자멸을 더 유도한다 (28)(Hornemann *et al.*, *J Virol* **77**, 8394-8407 (2003)). MVA 및 MVA Δ E3L이 흑색종 세포에서 세포자멸을 유도하는지를 평가하기 위해서, B16 흑색종 세포가 MVA 또는 MVA Δ E3L에 의해 MOI 10으로 감염되었고, PARP의 절단이 웨스턴 블로트 분석을 사용하여 결정되었다. 도 9 (A)에 개시된 바와 같이, MVA 및 MVA Δ E3L 감염은 감염 후 22시간에서 116-kDa 전장 단백질을 89-kDa 단편으로 PARP의 절단을 유발하였다. 또한, MVA Δ E3L은 MVA보다 PARP 절단을 더 효과적으로 유도한다 (도 11 (A)).

[0278] MVA 및 MVA Δ E3L이 세포자멸을 유발한다는 관찰에 따라, MVA 및 MVA Δ E3L 감염은 중요한 항-세포자멸 Bcl-2 패밀리 구성원인 골수성 세포 백혈병-1 (Mcl-1) 단백질의 분해를 야기하였다 (도 11 (B)). 함께 고려하여, 상기 결과는 흑색종 세포의 MVA Δ E3L 감염이 MVA보다 동일하거나 또는 심지어 더 큰 정도로 세포자멸을 유발하는 것을 보여주었다.

[0279] 실시예 13

MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 종양-함유 마우스의 생존을 연장시키고, 전신 항종양 면역을 발생시킴

[0281] 이식가능한 인 비보 B16 흑색종 모델은 C57B/6 마우스의 한쪽 옆구리에서 쥐과 B16F10 흑색종 세포 (1×10^5)의 피부내 이식을 포함한다. 종양을 이식하고 12일 후에, 상기 종양의 직경이 대략 3 mm일 때, MVA 또는 MVA Δ E3L (2×10^7 pfu) 또는 PBS가 상기 종양에 매주 주사되었다. MVA의 종양내 주사로 치료된 마우스의 60%에서 종양 박멸 및 나머지에서 생존 연장이 유도되었고 (도 12 (B)-(D)), 반면에 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 치료된 마우스의 57%에서 종양 박멸 및 나머지에서 생존 연장이 유도되었고 (도 12(B)-(D)), 이는 두 제제에 의한 우수한 치료 효능을 입증하였다. 대조적으로, PBS를 종양내 주사한 모든 마우스는 종양 성장이 계속되었고, 종양 이식후 21일의 중앙값에서 안락사되었다 (도 12 (A) 및 (D)). 초기 실험에서, MVA의 종양내 주사는 MVA Δ E3L 바이러스에서와 적어도 유사한 항-종양 효능을 갖는 것으로 보였다.

[0282] MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 후에 종양이 박멸된 마우스가 상기 동물에서 전신 항-종양 면역이 발생하는지를 테스트하기 위해서, 초기 종양을 박멸하고 8주 후에 B16 흑색종 세포의 치사량 (5×10^4)을 대측면에 피부내 주사에 의해서 동물이 챌린지되었다. B16 흑색종 세포 또는 바이러스에 절대 노출되지 않은 나이브 마우스가 챌린지 실험에서 대조군으로 사용되었다. 동물이 종양 챌린지 후에 70일 동안 추적 관찰되었다. MVA-치료된 마우스의 80% 및 MVA Δ E3L-치료된 마우스의 100%가 종양 챌린지에서 생존했고, 반면에 모든 나이브 마우스는 종양이 성장되었고, 결국 안락사되었다 (도 10 (E)). 전체적으로, 상기 결과는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 종양 박멸, 생존 연장 뿐만 아니라 전신 항종양 면역의 발생을 유도하는 것이 시사되었다. 또한, 상기 실험은 종양 챌린지에 의해 나타내는 전이를 억제하는데 있어서 개시된 치료의 효능을 나타내었다.

[0283] 실시예 14

[0284] MVA의 종양내 주사로 종양 환경에서 면역 변화를 유도함

[0285] MVA의 종양내 주사에 의해 유도된 종양내 면역 변화를 조사하기 위해서, 종양이 MVA 또는 PBS의 종양내 주사 후 3일에 수확되었고, 상기 면역 세포 침윤이 FACS에 의해 분석되었다. 본 발명자들은 Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ T 세포의 백분율 (즉, 조절 CD4+ T 세포)은 PBS-치료된 종양에서 34.7%로부터 MVA-치료된 종양에서 7.0%로 감소된 것을 관찰하였다 ($P<0.0001$, 도 13 (A)-(C)). 본 발명자들은 또한, PBS로 치료된 종양 (31%)과 비교하여 MVA로 치료된 종양 (89%)내에 그랜자임 B를 발현시키는 (즉, 세포독성 표현형을 발현시킴) CD8 $^+$ T 세포의 백분율의 증가가 관찰되었다 ($P<0.0001$, 도 13 (D)-(F)). Ki-67 $^+$ CD8 $^+$ T 세포 (즉, 증식하는 CD8 $^+$ T 세포)의 백분율이 PBS-치료된 종양에서 51%로부터 MVA-치료된 종양에서 76%로 증가되었다 ($P=0.0004$, 도 11, (G)-(I)). 상기 결과는 MVA의 종양내 주사로, 상기 종양내 세포독성 CD8 $^+$ T 세포의 증식 및 활성화 및 CD4+ 조절 T 세포의 수반되는 감소를 포함하는, 종양 미세환경에서 면역 반응을 크게 상향조절시키는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 MVA Δ E3L로 치료된 종양내에 침윤한 면역 세포에서 유사한 변화를 볼 것으로 기대하였다.

[0286] 실시예 15

[0287] MVA의 종양내 주사는 종양-배출 텁프절 (TDLNs)에서 면역 변화를 유도함

[0288] MVA의 종양내 주사가 TDLNs에서 면역 변화를 야기하는지를 테스트하기 위해서, TDLNs이 치료되고 3일 후에 MVA- 또는 PBS-주사된 마우스로부터 단리되었고, FACS로 분석되었다. TDLNs에서 그랜자임 B $^+$ CD8 $^+$ T 세포의 백분율이 PBS로 치료된 마우스에서 0.15%로부터 MVA로 치료된 마우스에서 4.6%로 증가되었다 ($P=0.0002$, 도 14 (A)-(C)). 또한, Ki-67 $^+$ CD8 $^+$ T 세포의 백분율이 PBS로 치료된 마우스에서 7.2%로부터 MVA로 치료된 마우스에서 15%로 증가되었다 ($P=0.0008$, 도 14 (D)-(F)). 상기 결과는, PBS-치료된 마우스에서보다, MVA-치료된 마우스에서 TDLNs에서 CD8 $^+$ T 세포가 더 활성화되고 복제가능하다는 것을 나타내었다. 함께 고려하여, 상기 결과는 MVA의 종양내 주사로 상기 종양내 국소 부위 뿐만 아니라 상기 숙주 전신에서 CD8 $^+$ T 세포의 활성화 및 증식을 유도하는 것을 나타내었다.

[0289] 실시예 16

[0290] MC38 쥐과 결장 샘암종 세포의 MVA 및 MVA Δ E3L 감염은 타입 I IFN 및 염증성 시토킨/케모킨 생성을 유도함

[0291] MVA 및 MVA Δ E3L이 다른 타입의 고형 종양 세포에서 유사한 반응을 유발하는지를 확인하기 위해서, 타입 I IFN 경로를 유도하는 MVA 및 MVA Δ E3L의 능력이 MC38 결장 샘암종 세포에서 테스트되었다. MC38 세포가 MVA 또는

MVA Δ E3L에 의해 MOI 10으로 감염되었고, 대조군이 모조-감염되었다. 상층액이 감염 후 22시간에서 수집되었다. ELISA를 사용하여, MVA Δ E3L이 MVA보다 MC38 세포에서 높은 수준으로 IFN- β , IL-6, CCL4 및 CCL5의 생성을 유도하는 것이 결정되었다 (도 15 (A)-(D)). 유사하게, 실시간 PCR 분석으로 MVA Δ E3L 감염이 MVA보다 MC38 세포에서 더 높은 수준으로 *Ifnb*, *I16*, *Cc14*, 및 *Cc15* 유전자 발현을 유발하는 것을 나타내었다 (도 15 (E)-(H)). 웨스턴 블로트 분석으로 MVA Δ E3L 감염은 감염 후 22시간에서 MC38 세포에서 MVA보다 더 높은 수준으로 IRF3의 포스포릴화를 유발하는 것을 입증하였다 (도 15 (I)). 상기 결과는 본 치료의 효능이 흑색종에 한정되는 것은 아니라는 것을 보여주었다. 더욱이, 결장 암종의 선택은 임의적이었기 때문이고, 2개의 종양은 연관성이 없기 때문이다. 고형 종양 및 기저 세포 기원 (암종)을 갖는 것 이외에, 본 발명의 결과를 모든 암종으로 추론시킬 수 있다. 더욱이, 본 발명자들은 MVA 및 MVA Δ E3L이 면역계에서 전신으로 및 종양 항원-독립적 방식으로 그 활성을 발휘하기 때문에, 본 발명의 발견은 고형 종양으로 더 추론될 수 있다.

[0292] 실시예 17

[0293] MC38 쥐과 결장 챔암종 세포의 MVA Δ E3L 감염은 세포자멸을 유도함

[0294] MVA 및 MVA Δ E3L이 또한 MC38 쥐과 결장 챔암종 세포에서 세포자멸을 유발하는지를 조사하기 위해서 MC38 세포가 MVA 또는 MVA Δ E3L에 의해 MOI 10으로 감염되었거나 또는 대조군은 모조-감염되었다. B16 흑색종 세포에서 관찰한 바와 같이, 웨스턴 블로트 분석으로 MVA 및 MVA Δ E3L은 116-kDa 전장 단백질로부터 89-kDa 단편으로 PARP의 절단을 유발하는 것으로 보였다 (22시간에서, 도 15 (I)). 또한, 실시예 16 및 17은 MVA 및 MVA Δ E3L 각각은 상이한 타입의 암세포에서 타입 I IFN 및 염증성 시토킨/케모킨 생성 뿐만 아니라 세포자멸을 유도할 수 있는 역량을 갖는 것을 나타내었다. MVA Δ E3L은 MVA와 비교하여 타입 I IFN 및 전염증 시토킨 및 케모킨 생성 뿐만 아니라 세포자멸의 더 강하게 유도하는 것으로 보였다. 그럼에도 불구하고, 두 결과는 본 발명의 바이러스에 의해 유도된 면역 반응은 세포자멸을 유도하여서, 암 세포 사멸을 초래하는 것을 나타났다. 이는 흑색종, 결장 암, 일반적이고 실제로 고형 종양인 암종의 치료에 실행가능한 접근법으로서 본원에 개시된 치료법을 더 확립하였다.

[0295] 실시예 18

[0296] MVA Δ E3L은 결장 암종의 쥐과 모델에서 종양생성을 저해함

[0297] 실시예 11에 개시된 실험 연구는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사가 쥐과 이식가능한 B16 흑색종 모델에서 종양 박멸 및 전신 항-종양 면역을 유도하는 것을 보여주었다. MVA Δ E3L이 다른 고형 종양에서 종양 성장을 저해할 수 있는지를 테스트하기 위해서, 본 발명자들은 쥐과 결장 암종 이식 모델에서 MVA Δ E3L의 항-종양 효과를 테스트하였다. 결장 암종은 흑색종과 관련이 없는 대표적인 종양이지만, 이는 무작위로 선택되었다. 2×10^5 MC38 결장 암종 세포가 C57B/6 마우스의 우측 옆구리로 피부내로 이식되었다. 종양이 7일 동안 형성되었고, 그 후 MVA Δ E3L (2×10^7) 또는 PBS 대조군이 마우스에 종양내 주사되었다. 종양이 주사 전 (0일) 및 주사 후 최대 45일까지 측정되었고, 종양 부피가 하기 식에 따라 산출되었다: l (길이) \times w (너비) \times h (높이)/2. 도 16 (A 및 B)에 개시된 바와 같이, MVA Δ E3L로 치료된 종양은 PBS-치료된 종양보다 현저하게 더 작았다. 또한, PBS 또는 MVA Δ E3L이 주사된 종양-함유 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선에 의해 입증된 바와 같이 MVA Δ E3L로 치료된 마우스는 향상된 생존율을 나타내었다 (도 16 (C)). 전체적으로, 이러한 발견은 결장 암뿐만 아니라 흑색종의 문맥에서 MVA Δ E3L이 종양형성 및 종양 성장을 저해하는 능력을 유지한다는 것을 나타낸다. 전체적으로, 여기서 관찰된 결과 뿐만 아니라 실시예 13 및 실시예 17에서 MVA Δ E3L이 다양한 고형 종양에서 항-종양 효과를 촉진하는데 효과적이고, 또한 본 개시내용에 기술된 발견은 흑색종에 국한되지 않고, 다양한 기원의 다른 고형 종양으로 추론될 수 있다는 것을 입증하고 서술하였다.

[0298] 실시예 19

[0299] MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사는 주사된 및 주사되지 않은 떨어져 있는 종양에서 항종양 효과 및 향상된 생존을 유도함

[0300] 다음, 본 발명자들은 쥐과 B16-F10 흑색종 양측 이식 모델을 사용하여 전이 성장에 있어서 MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사의 효과를 조사하였다. 간단하게, B16-F10 흑색종 세포가 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리에 피부내로 이식되었다 (우측 옆구리에 5×10^5 및 좌측 옆구리에 1×10^5). 종양 이식하고 8일 후에, 본 발명자들은 매주 2회 우측 옆구리에 더 큰 종양에 MVA 또는 MVA Δ E3L (2×10^7 pfu) 또는 PBS를 종양내로 주사하였다. 상기 종양 크기가 측정되었고, 마우스의 생존이 모니터되었다 (도 17). 반면에 PBS-치료된 마우스는 다음 10-

14일에 걸쳐 종양 성장의 증가로 빠르게 사망했고 (도 17 (A) 및 (B)), MVA 및 MVA Δ E3L로 치료된 마우스는 대측에서 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양 모두에서 종양 성장이 지연되는 것으로 나타났다 (도 17 (A)-(F)).

[0301] 주사되지 않은 떨어져 있는 종양의 성장을 제어하는 능력은 MVA 및 MVA Δ E3L로 치료된 동물의 생존율 향상과 상관관계가 있었다 (도 17 (G), ***, MVA 대 PBS에 대해 $P < 0.001$, ****, MVA Δ E3L 대 PBS에 대해 $P < 0.0001$). 전체적으로, 상기 결과는 전이성 고형 종양의 치료에 대한 치료 접근법의 견실성을 개시하였다.

[0302] 실시예 20

[0303] MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사는 주사된 종양 및 주사되지 않은 떨어져 있는 종양 둘 다에서 면역학적 변화를 유도함

[0304] MVA 및 MVA Δ E3L의 항종양 효과에 기초한 면역 기전을 이해하기 위해서, 본 발명자들은 PBS 대조군과 비교하여, MVA 또는 MVA Δ E3L-치료된 마우스에서 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 면역 세포 침윤물을 조사하였다. 간단하게, 2.5×10^5 B16-F10 흑색종 세포가 좌측 옆구리에 피부내 이식되었고, 및 5×10^5 B16-F10 흑색종 세포가 상기 마우스의 우측 옆구리에 피부내 이식되었다. 이식하고 7일 후에, 2×10^7 pfu의 MVA, 또는 MVA Δ E3L, 또는 PBS가 우측 옆구리의 더 큰 종양에 주사되었다. 상기 주사는 3일 후에 반복되었다. 주사되지 않은 종양이 수확되었고, 세포 혼탁물이 생성되었다. 상기 종양내 살아있는 면역 세포 침윤물이 유세포 분석법 (FACS)으로 분석되었다. 본 발명자들은 PBS로 치료된 마우스에서와 비교하여, MVA 또는 MVA Δ E3L로 치료된 마우스의 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 $CD8^+CD3^+$ 면역 세포의 상당한 증가를 관찰하였다 (도 18 (A) 및 (B)). 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양 둘 다에서 $CD8^+CD3^+$ 의 보충에서 MVA Δ E3L이 MVA보다 더 효과적이었다 (도 18 (A) 및 (B)). MVA 또는 MVA Δ E3L-치료는 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양 둘 다에서 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포를 발현하는 그랜자임 B의 수의 증가를 유도하였다 (도 18 (C), (D), (I), 및 (J)). 또한, MVA 또는 MVA Δ E3L-치료는, 증식 마커 Ki-67의 발현에 의해 측정되는 바와 같이, 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양 둘 다에서 이펙터 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포의 증식을 유도하였다 (도 18 (E), (F), (K), 및 (L)). 마지막으로, MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 FoxP3-발현하는 $CD4^+$ T 세포의 백분율의 감소를 유도하였다 (도 18 (G) 및 (H)). 상기 결과는 MVA 및 MVA Δ E3L 둘 다는 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양에서 이펙터 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ 의 증식의 보충, 활성화, 및 유도 뿐만 아니라 면역 억제 조절 $CD4^+$ T 세포를 감소시킬 수 있다는 것을 나타내었다. 이는 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양의 성장을 박멸 또는 지연하는데 그 효능 및 생존의 연장과 상관관계가 있었다. 대부분의 경우에서, MVA Δ E3L은 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양 내에 면역학적 변화의 유도에 있어서 MVA보다 더 효능이 있었다. 이는 MVA와 비교하여, 면역 세포, 종양 세포, 뿐만 아니라 간질 세포에서 타입 I IFN의 유도에서 MVA Δ E3L의 향상된 능력에 기인할 수 있다.

[0305] 실시예 21

[0306] MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사는 주사된 종양에서 종양-관련 마크로파지의 현저한 감소를 유도함

[0307] 흑색종 종양에서 종양-관련 마크로파지 (TAM)가 MVA 또는 MVA Δ E3L 요법에 의해 영향을 받는지를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 이전에 보고된 전략에 기반하여 TAM을 한정하기 위해 항체 패널에 적용시켰다 (Broz et al., Cancer Cell 2014). 일반적으로, 살아 있는 $CD45^+$ 및 $Ly6C^-$ 세포가 먼저 한정되었다. $MHCII^+$ 세포 내에, 마크로파지는 $CD24^{hi}$ 및 $F4/80^{lo}$ 발현에 기반하여 DCs와 구별되었다. 상기 TAM 개체군은 $CD11c$ 및 $CD11b$ 의 차등 발현에 의해 2개 타입의 마크로파지 (TAM1 및 TAM2)를 더 나타내었다. MVA 또는 MVA Δ E3L 요법 이후에, TAM 개체군이 대조군과 비교하여 흑색종 종양에서 감소되었다 (도 19 (A) 및 (B)). 한편, TAM1 및 TAM2 개체군 둘 다가 낮은 수준으로 감소되었다 (도 19 (A), (C), 및 (D)). 상기 관찰은 MVA 및 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 TAMs의 감소를 유도하는 것을 나타내었고, 이는 종양 미세환경 내에서 면역 억제 효과를 유도하였다.

[0308] 예측 실시예 22

[0309] 단측 흑색종 이식 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 면역 체크포인트 차단 항체의 복강내 전달의 조합

[0310] 본 발명 바이러스의 종양내 주사가 면역 체크포인트 (예를 들면, 항-CTLA-4 항체)의 차단과 같은 현재 면역요법의 치료 효과를 향상시키는데 사용될 것이고, 종양-함유 마우스가 항-CTLA-4 항체의 복강내 전달과 조합된 MVA

또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사로 치료될 것이다. 간단하게, B16-F10 흑색종 세포 (2×10^5)가 WT C57B/6 마우스의 우측 옆구리로 피부내로 이식될 것이다. 종양 이식하고 10일 후에, 상기 종양이 실시예 11에서의 종양보다 더 크게 성장될 때, 마우스를 하기의 조합으로 치료할 것이다: PBS + 이소타입 대조군, PBS + 항-CTLA-4 항체, MVA + 이소타입 대조군, MVA + 항-CTLA-4, MVA Δ E3L + 이소타입 대조군, 및 MVA Δ E3L + 항-CTLA. 본 발명자들은 상기 종양 부피를 상기 바이러스 주사의 시작에서 시험된 그룹들 사이에서 일정하게 할 것이다. MVA 및 항-CTLA-4 항체에 의한 치료, 또는 MVA Δ E3L 및 항-CTLA-4 항체에 의한 치료는 면역 체크포인트 차단 단독 또는 MVA 또는 MVA Δ E3L 치료 단독과 비교하여 우수한 치료 효능을 유도할 것이다.

[0311] 예측 실시예 23

[0312] 양측 흑색종 이식 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 면역 체크포인트 차단의 복강내 전달의 조합

[0313] 본 발명자들은 양측 B16-F10 흑색종 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L을 종양내로 주사하여 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 항-PD-L1 항체와 같은 면역 체크포인트 차단 요법의 치료 효과를 향상시킬 것이고, 또한 전이 질병을 갖는 개체를 시뮬레이트하였다. 간단하게, B16-F10 흑색종 세포가 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리에 종양내 이식될 것이다 (우측 옆구리에 5×10^5 및 좌측 옆구리에 1×10^5). 종양 이식하고 8일 후에, MVA 또는 MVA Δ E3L이 매주 2회 우측 옆구리에서 더 큰 종양에 (2×10^7 pfu의 MVA 또는 MVA Δ E3L) 또는 PBS가 종양내로 주사될 것이다. 마우스의 4개 그룹이 MVA로 치료되었고, 4개 그룹은 MVA Δ E3L로 치료되었으며, 각 그룹은 이소타입 대조군, 또는 항-CTLA-4, 또는 항-PD-1, 또는 항-PD-L1 항체를 복강내 전달로 투여되었다.

[0314] 본 발명자들은 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 체크포인트 저해제 (항-CTLcomA-4, 항-PD-1 및 항-PD-L1 항체로 표시됨)의 전신 전달의 조합은 체크포인트 저해제 단독 또는 MVA 또는 MVA Δ E3L 단독의 종양내 주사와 비교하여 주사되지 않은 종양 성장을 더 지연시키거나 또는 박멸시킬 것이다.

[0315] 상기 결과는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달로 유익한 결과를 갖는 이 접근법을 인간 치료에 이전시키는데 전이성 B16 흑색종 모델에서 면역 체크포인트 차단에 대한 치료 저항성을 극복하는 것을 보여줄 것으로 기대된다.

[0316] 예측 실시예 24

[0317] 양측 MC38 결장 쌈암종 이식 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 면역 체크포인트 차단의 복강내 전달의 조합

[0318] 본 발명자들은 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사가 다른 양측 종양 이식 모델에서 항-CTLA-4, 항- 또는 항-PD-L1 항체와 같은 면역 체크포인트 차단 요법의 치료 효과를 향상시키는 실험을 더 수행할 것이고, 이는 전이성 질환을 갖는 개체를 시뮬레이트하였다. 간단하게, MC38 결장 쌈암종 세포를 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리에 피부내로 이식할 것이다 (우측에 5×10^5 및 좌측에 1×10^5). 종양 이식하고 8일 후에, MVA 또는 MVA Δ E3L이 매주 2회 우측 옆구리의 더 큰 종양에 (2×10^7 pfu의 MVA 또는 MVA Δ E3L) 또는 PBS가 종양내로 주사될 것이다. 3개 그룹의 마우스가 PBS로 치료될 것이고, 각 그룹에 이소타입 대조군, 또는 항-CTLA-4, 또는 항-PD-L1 항체를 복강내 전달로 투여하였다. 부가의 3개 그룹의 마우스는 MVA로 치료될 것이고, 각 그룹은 이소타입 대조군, 또는 항-CTLA-4, 또는 항-PD-L1 항체의 복강내 전달로 투여될 것이다. 마지막으로, MVA Δ E3L로 치료된 마우스를 3개의 그룹으로 나누고, 각 그룹은 각각 이소타입 대조군, 또는 항-CTLA-4, 또는 항-PD-L1 항체로 치료되었다. 각 그룹은 MVA 또는 MVA Δ E3L로 치료된 서브그룹으로 나눌 것이다. 바이러스 단독으로 치료된 대조군이 또한 제공될 것이다.

[0319] 마우스의 각 그룹의 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양의 종양 부피가 모니터되고 평가될 것이다. 또한, 본 발명자들은 각 치료 그룹의 생존율을 모니터할 것이다.

[0320] MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달 및 항-CTLA-4 항체의 복강내 전달로 표시되는 체크포인트 차단의 조합 또는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달 및 항-PD-1/PD-L1의 복강내 전달의 조합은 MVA 또는 MVA Δ E3L보다 더 높은 효능으로 주사되지 않은 멀어져 있는 종양의 박멸을 유도할 것으로 기대되었다. 그러므로, 상기 결과는 체크포인트 차단 단독 또는 바이러스 단독과 비교하여 MVA 또는 MVA Δ E3L 및 면역 체크포인트 차단의 조합을 사용하여 전이성 고형 종양의 치료에서 개선을 보여줄 것으로 기대된다. 더 구체적으로, 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양이 단일 요법의 어느 타입으로 수득되는 결과보다 더 큰 정도로 크기가 감소되거나 또는 심지어 박멸되고, 상기 결과는 적어도 45일 이상 동안 지속되어서, 원발성 및 전이성 고형 종양 치료에 있어서 조합 접근법이 유

효할 것으로 기대된다.

[0321] 예측 실시예 25

[0322] 양측 B16-F10 이식 모델에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 면역 체크포인트 차단 항-CTLA-4 항체의 종양내 전달의 조합

[0323] 예측 실시예 22, 23, 및 24에서, 본 발명자들은 흑색종 및 결장 샘암종 모델 둘 다에서 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 면역 체크포인트 차단의 전신 전달의 조합을 테스트할 것이다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 MVA 또는 MVA Δ E3L 및 항-CTLA-4 항체 (복강내 전달에 사용되는 용량의 1/10로)로 표시되는 체크포인트 차단의 병용-투여가 엄격한 양측 종양 이식 모델에서 항종양 효과를 달성하는지를 테스트할 것이다. 간단하게, B16-F10 흑색종 세포가 C57B/6 마우스의 좌측 및 우측 옆구리에 피부내로 이식될 것이다 (우측 옆구리에 5×10^5 및 좌측 옆구리에 1×10^5). 종양 이식하고 8일 후에, MVA 또는 MVA Δ E3L이 매주 2회 우측 옆구리에서 더 큰 종양에 (2×10^7 pfu의 MVA 또는 MVA Δ E3L 또는 PBS) 종양내로 주사될 것이다. 3개 그룹의 마우스가 MVA로 치료될 것이고, 각 그룹에 하기를 투여하였다: (i) 항-CTLA-4 (100 μ g/마우스)의 복강내 전달, (ii) 이소타입 항체 (10 μ g/마우스)의 종양내 전달, 또는 (iii) 항-CTLA-4 항체 (10 μ g/마우스)의 종양내 전달. 부가의 3개의 그룹의 마우스가 MVA Δ E3L로 치료될 것이고, 각 그룹에 하기를 투여하였다: (i) 항-CTLA-4 (100 μ g/마우스)의 복강내 전달, (ii) 이소타입 항체 (10 μ g/마우스)의 종양내 전달, 또는 (iii) 항-CTLA-4 항체 (10 μ g/마우스)의 종양내 전달.

[0324] 주사된 종양 및 주사되지 않은 종양의 종양 부피가 모니터되고 평가될 것이다. 본 발명자들은 MVA 또는 MVA Δ E3L 및 체크포인트 차단 (10 μ g/마우스로 항-CTLA-4 항체)의 종양내 병용-주사는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 주사 및 항-CTLA-4 항체 (100 μ g/마우스)의 복강내 전달의 조합의 치료 효과에 필적할 것으로 기대하였다. MVA 또는 MVA Δ E3L 및 실질적으로 더 적은 용량의 면역 체크포인트 차단의 병용-투여는 MVA 또는 MVA Δ E3L의 종양내 전달 및 더 높은 용량의 항-CTLA-4 항체의 전신 전달의 조합에 대해 유사한 전신 항종양 효과를 달성할 수 있을 것으로 기대하였다.

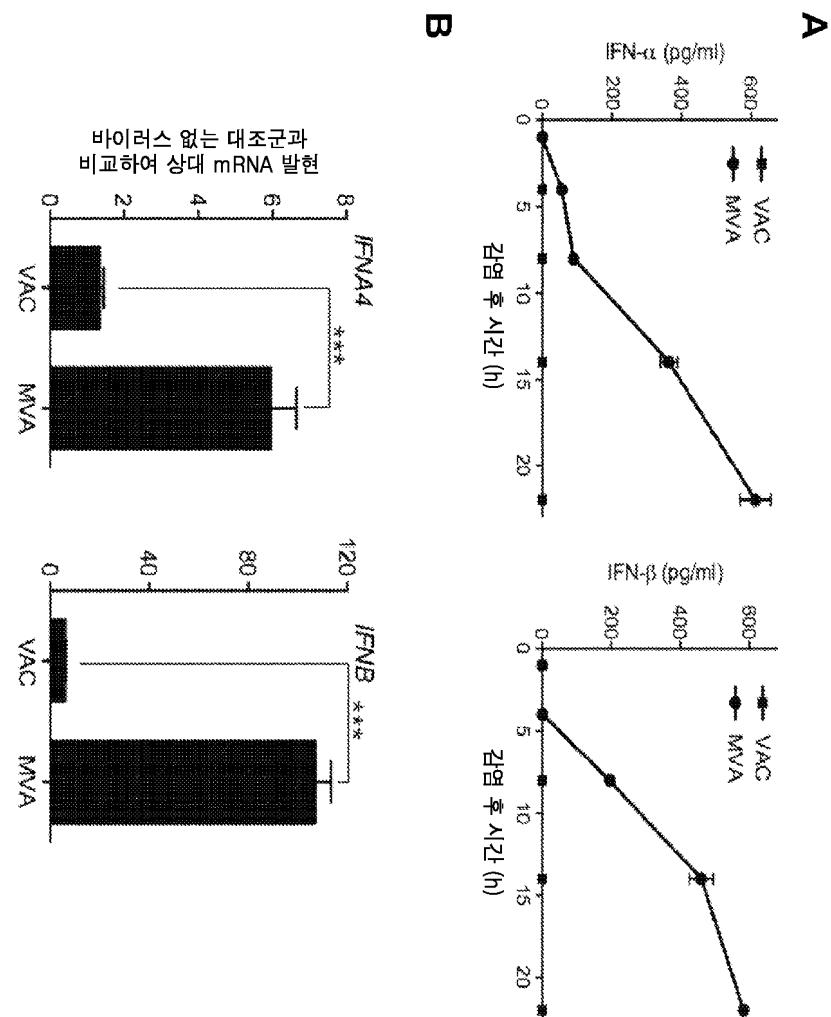
[0325] * * *

[0326] 상기 명세서, 실시예 및 데이터는 본 발명의 조성물의 제조 및 사용의 완전한 서술을 제공한다. 그러나, 상기는 예시하는 것이고, 제한되지 않는다. 본 발명의 범위는 청구범위에 있다.

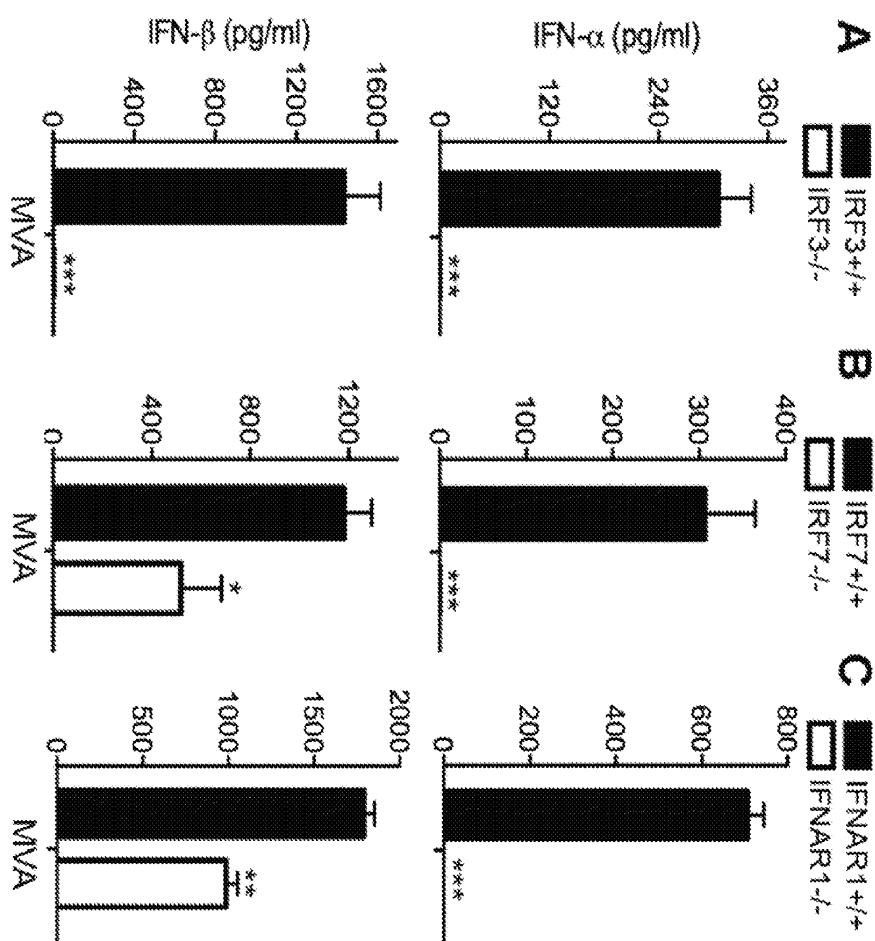
[0327] 본원에 인용된 모든 특허 및 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 본원에 개시된 임의의 구현 예 또는 청구항 특성이 출원인의 재량에 의해 부인될 수 있다.

도면

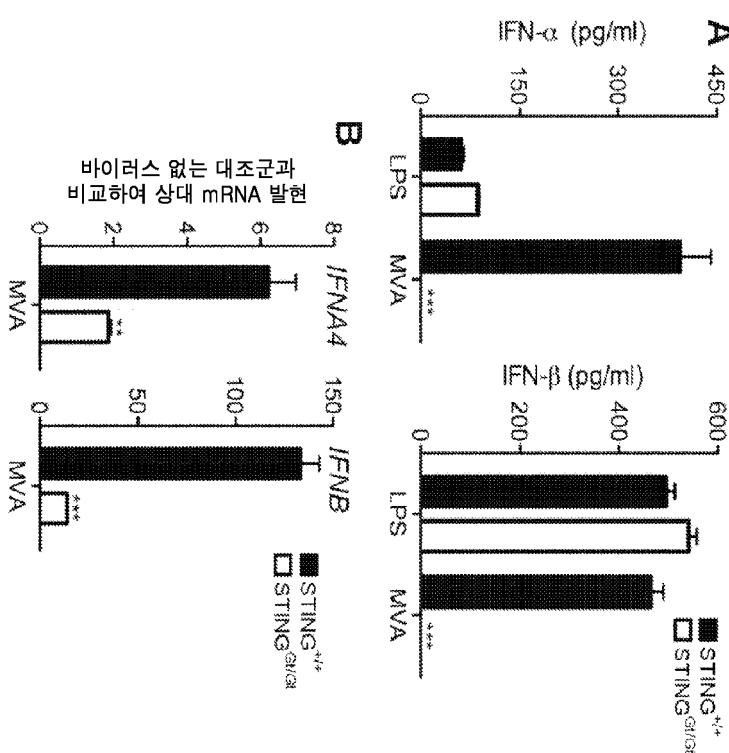
도면1



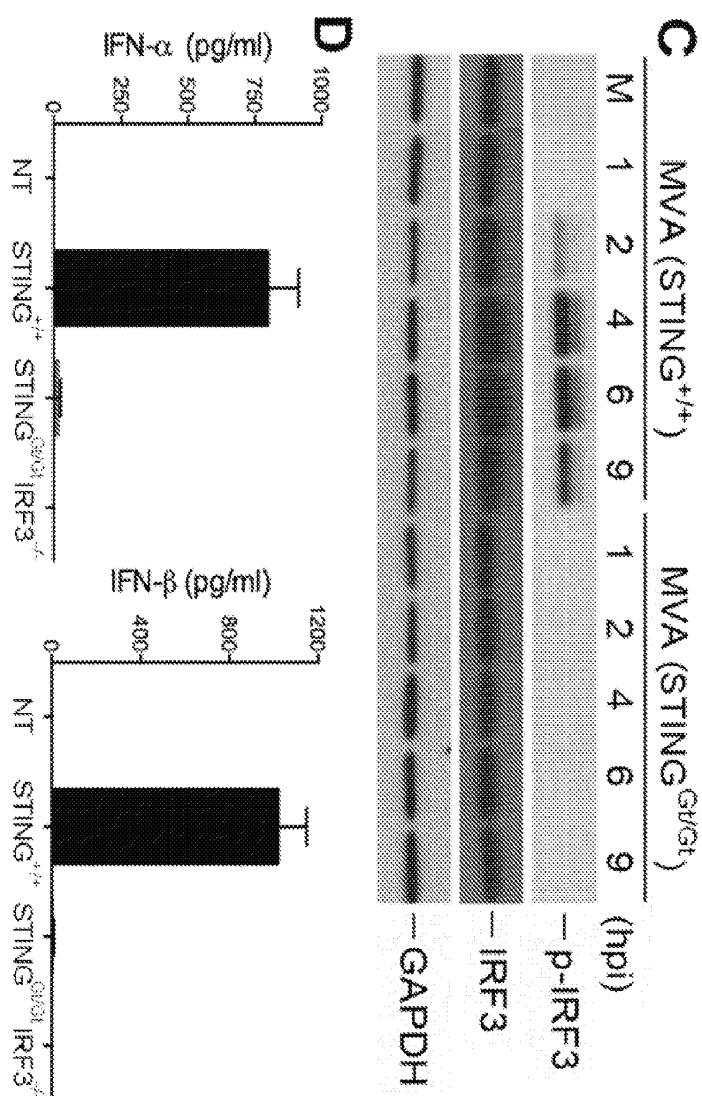
도면2



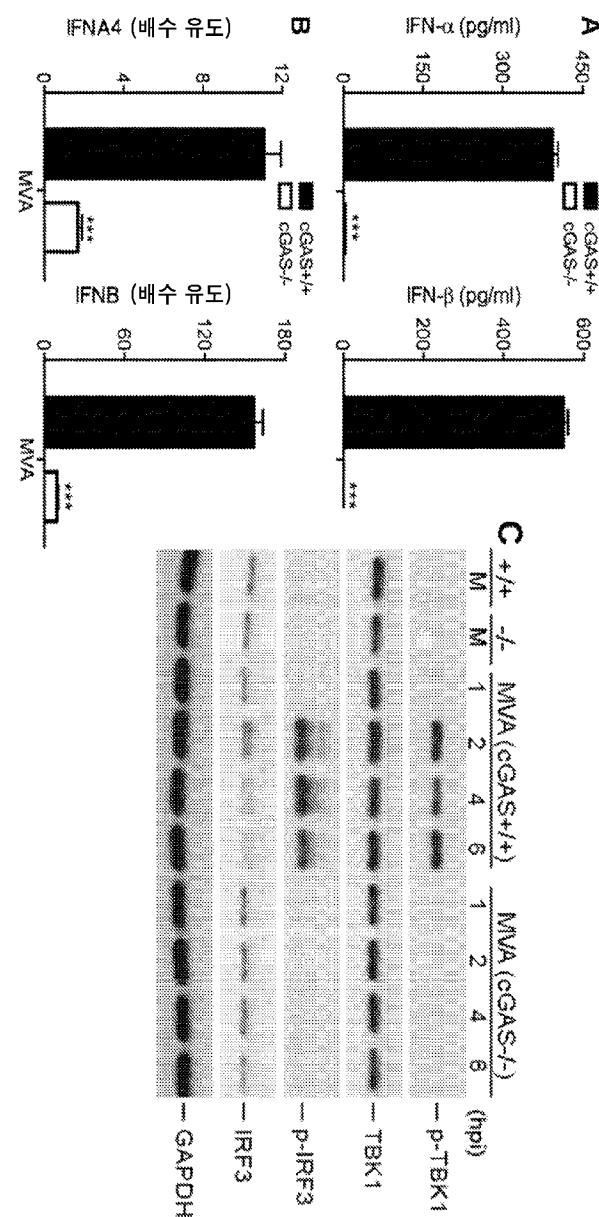
도면3a



도면3b

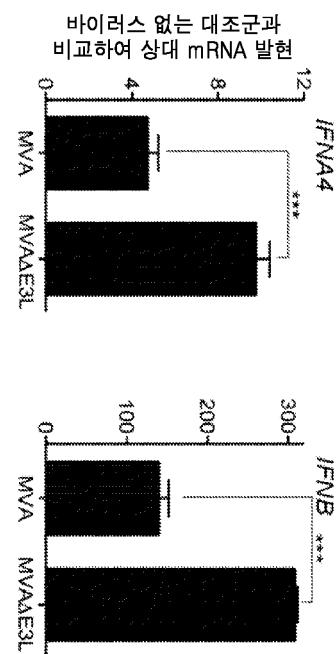


도면4

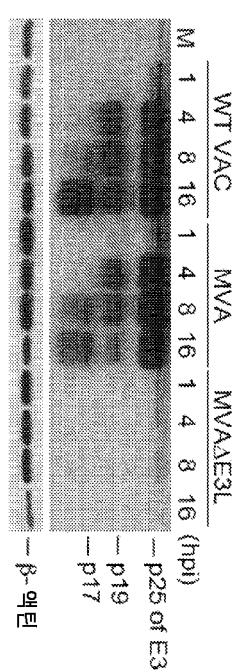


도면5a

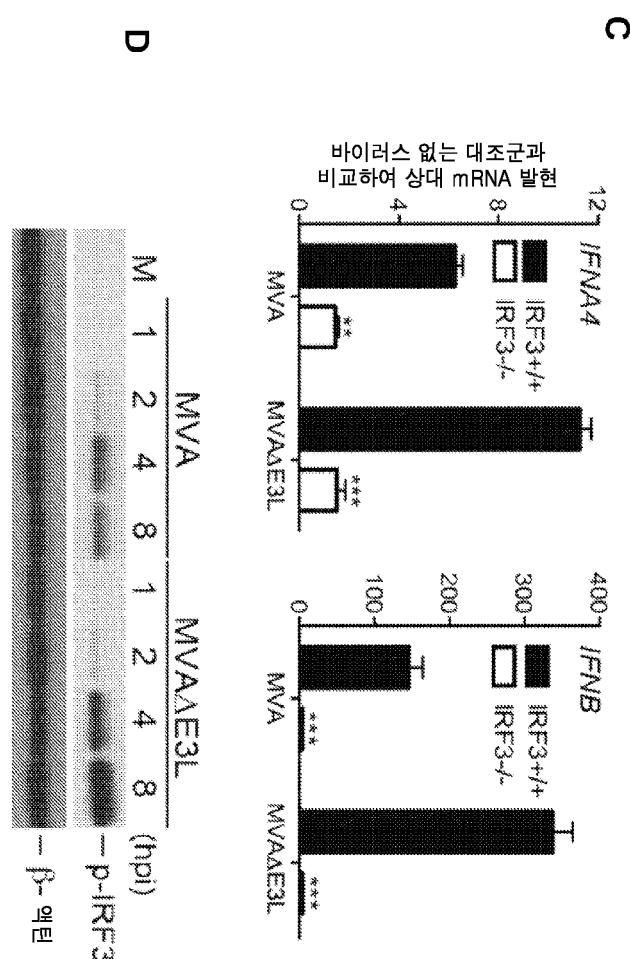
B



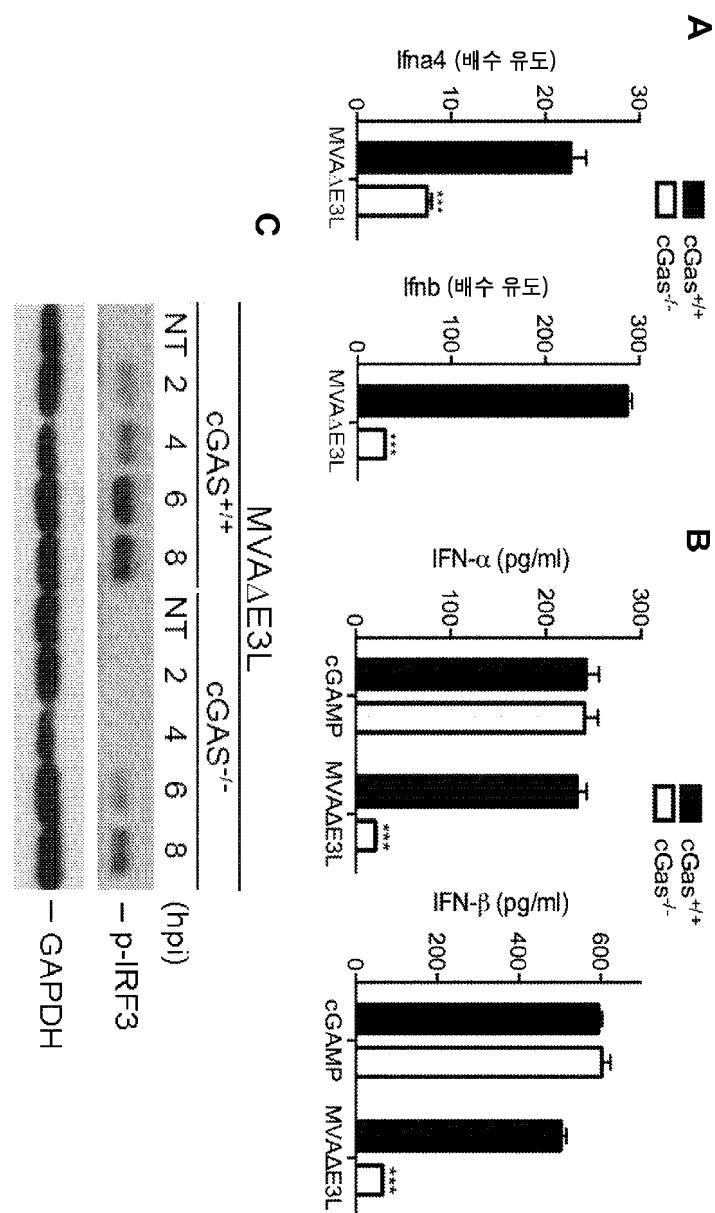
A



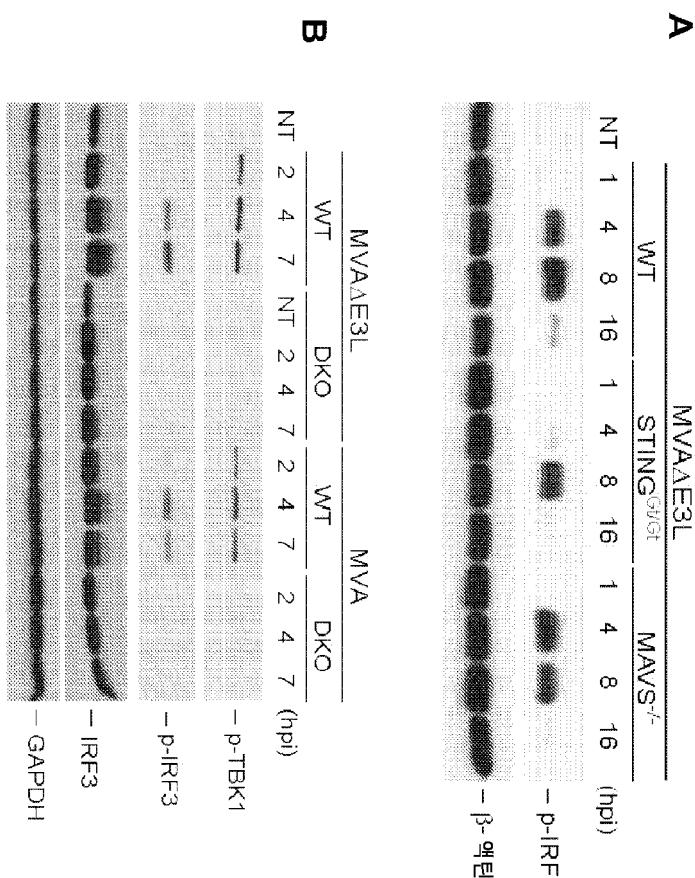
도면5b



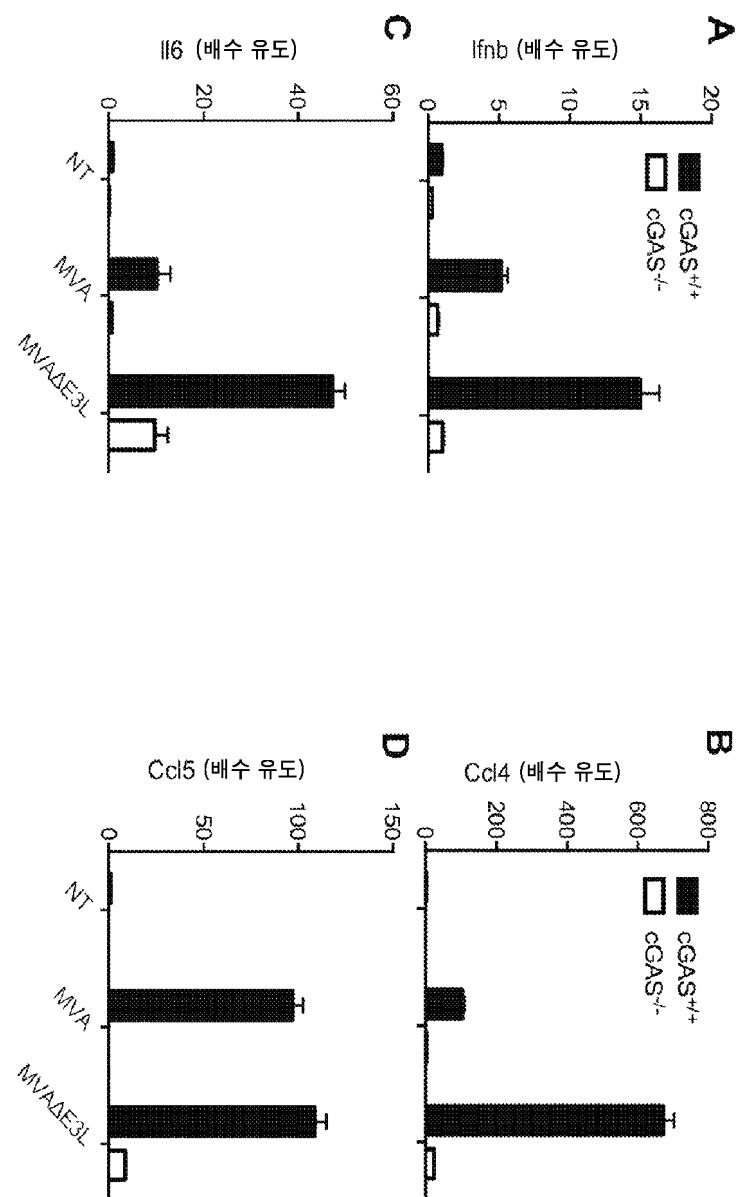
도면6



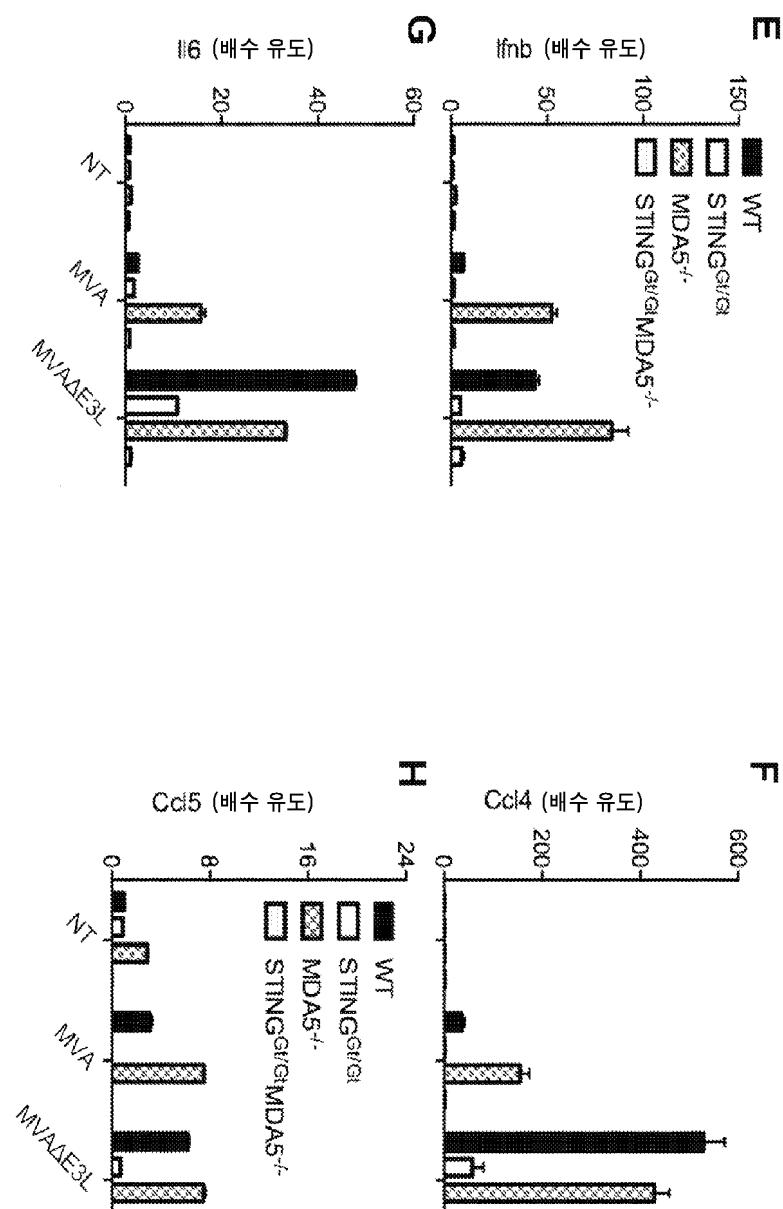
도면7



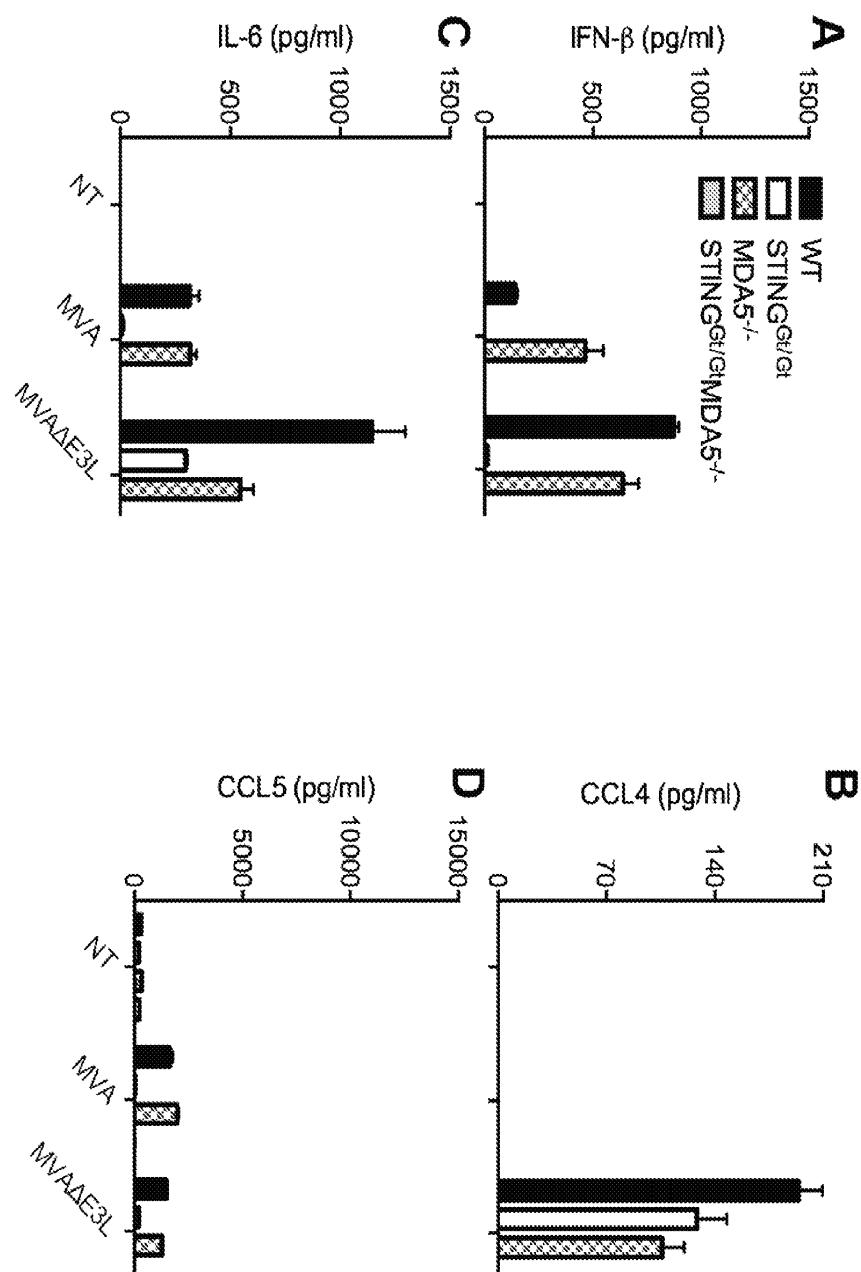
도면8a



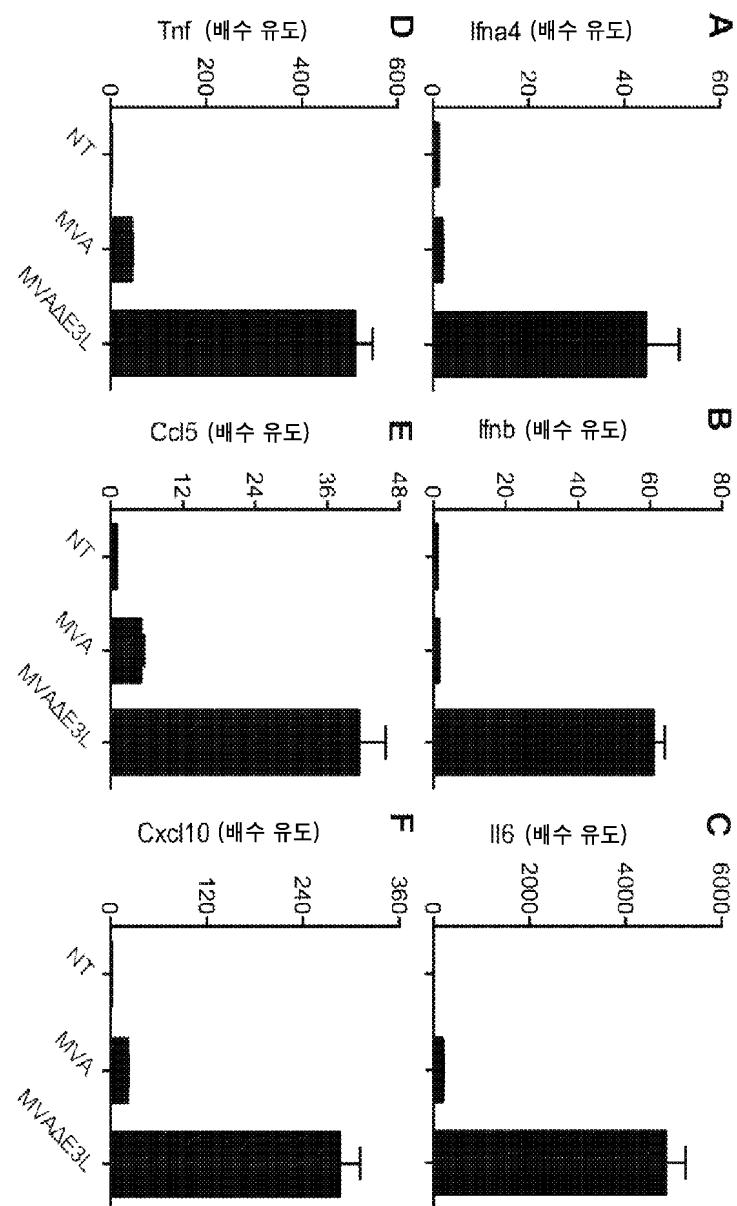
도면8b



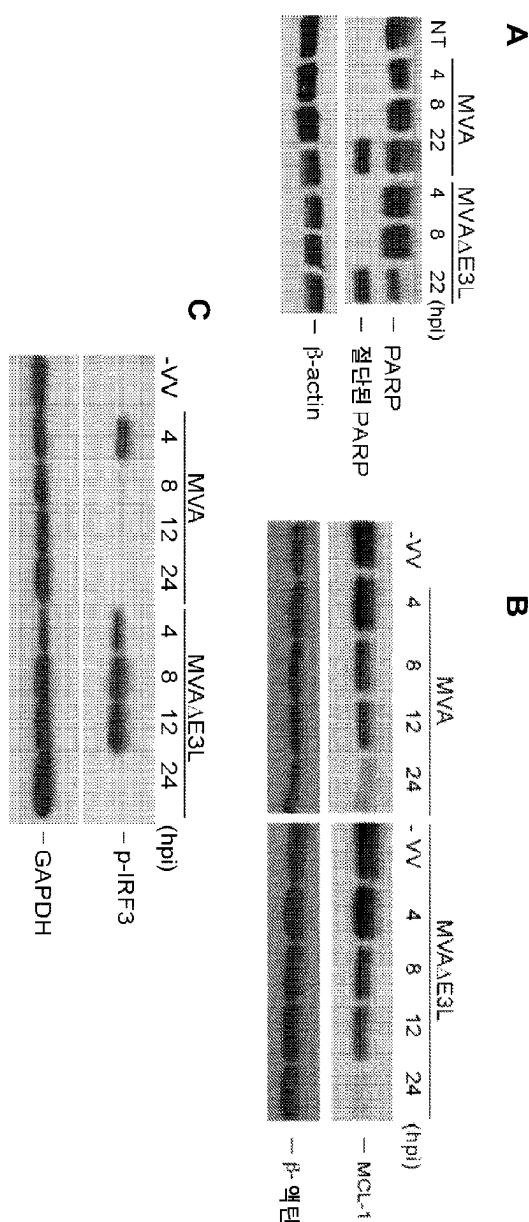
도면9



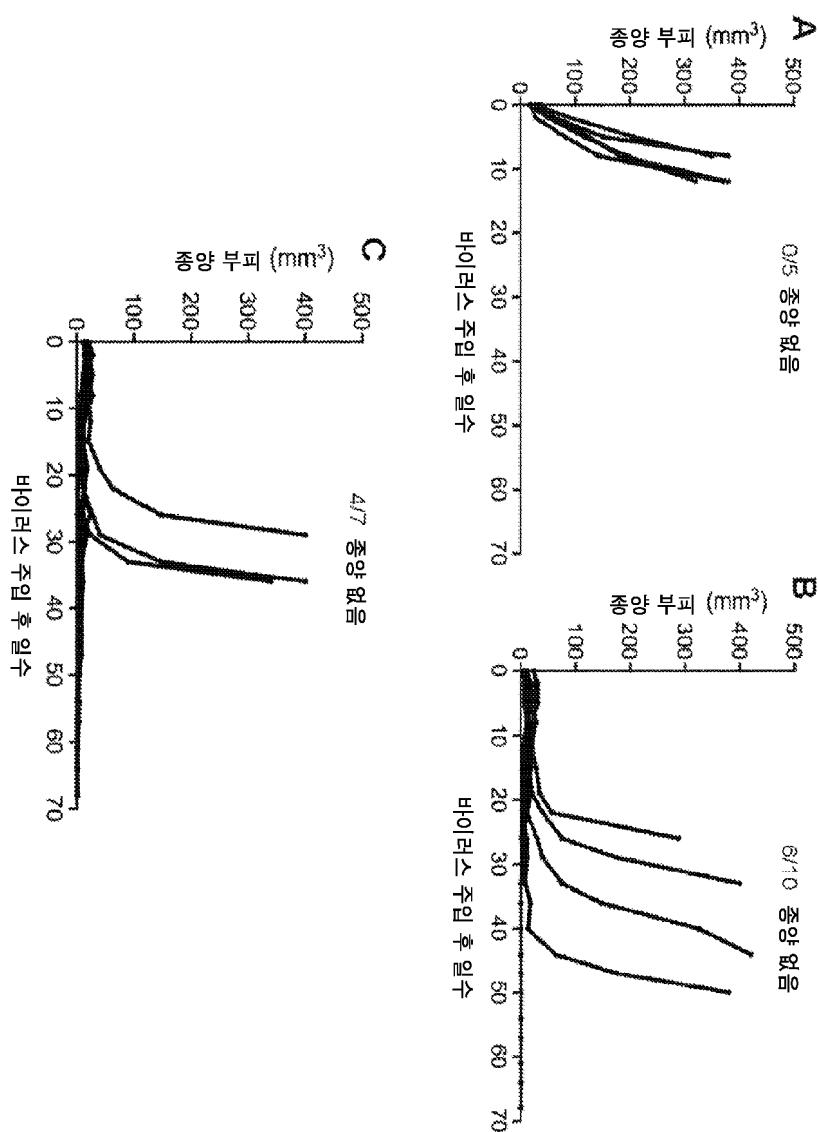
도면10



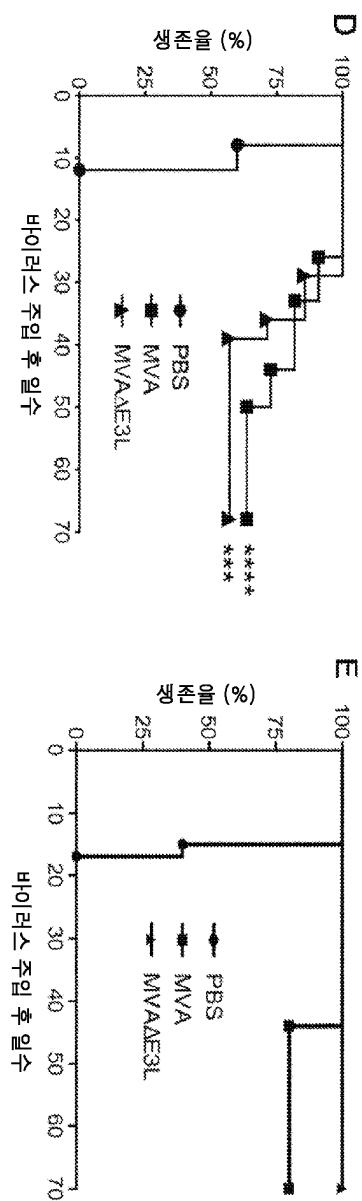
도면11



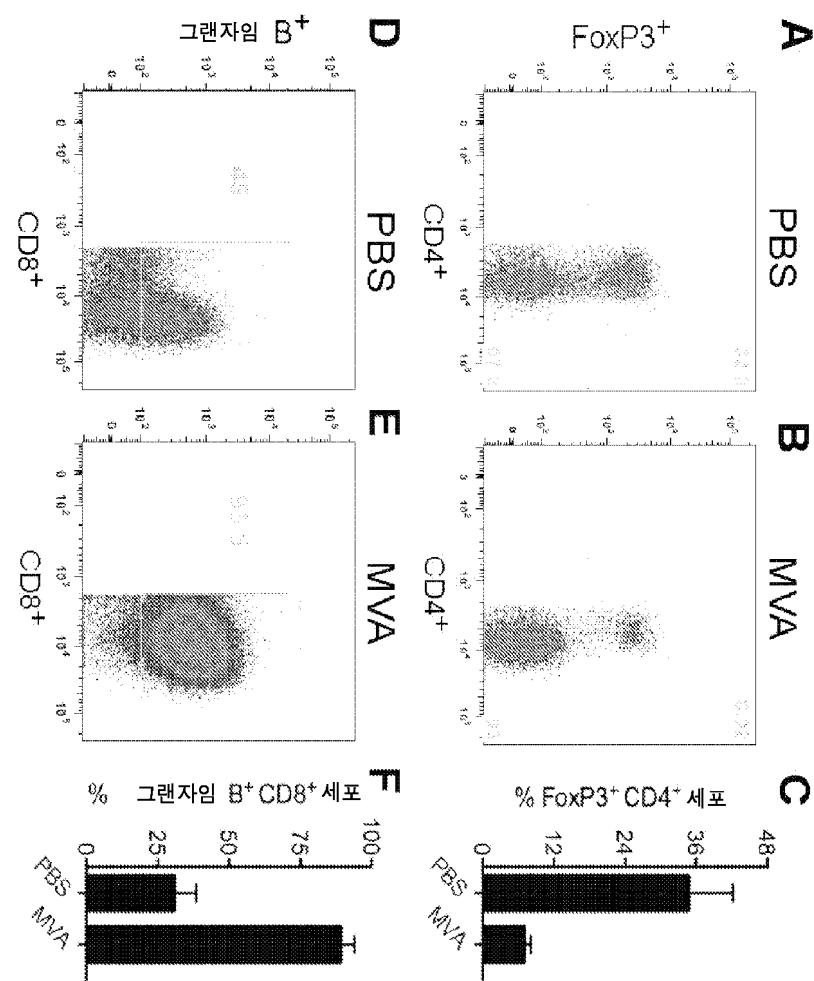
도면12a



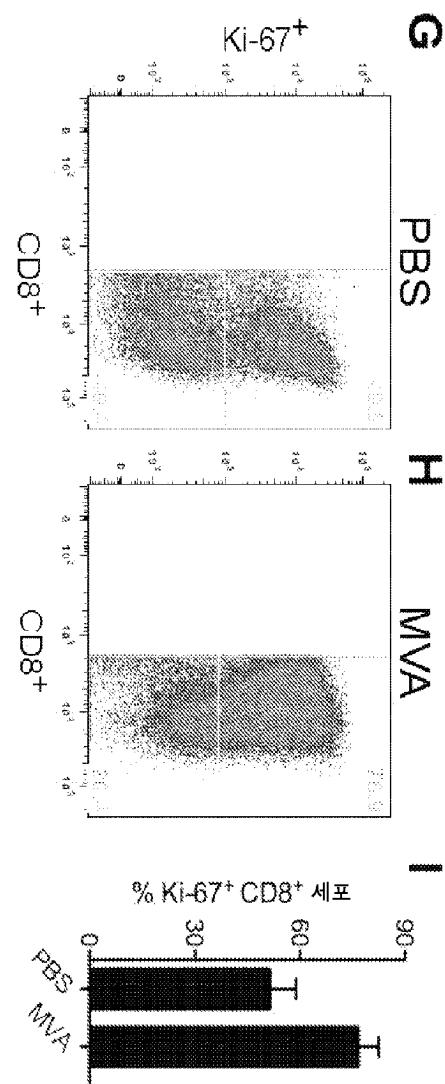
도면12b



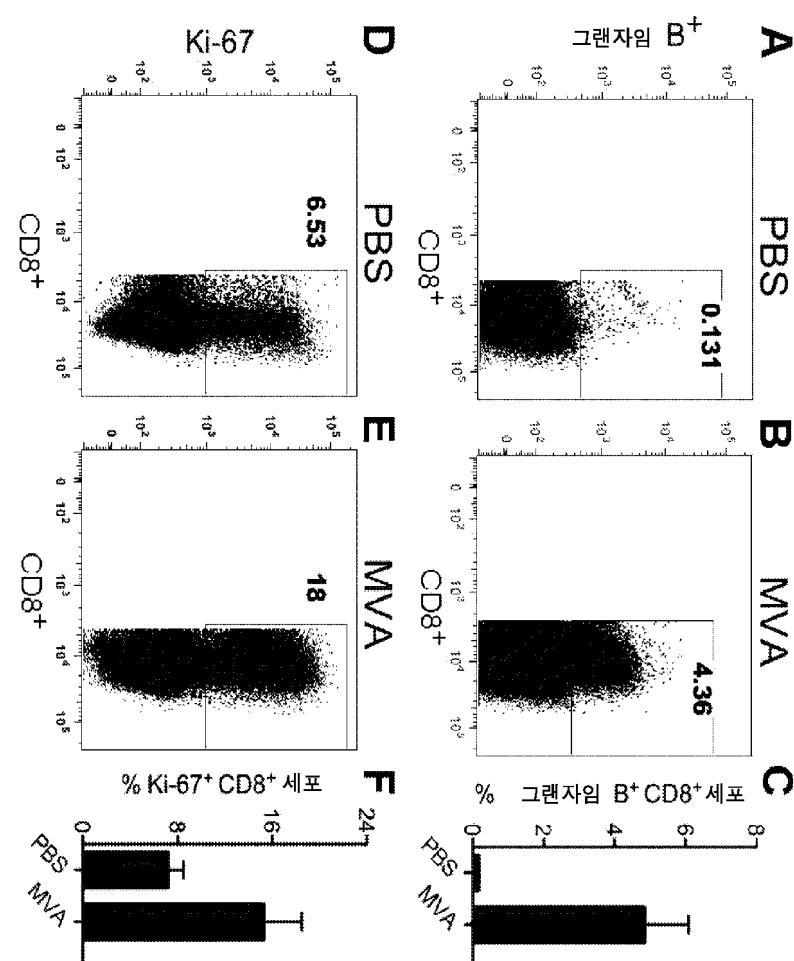
도면13a



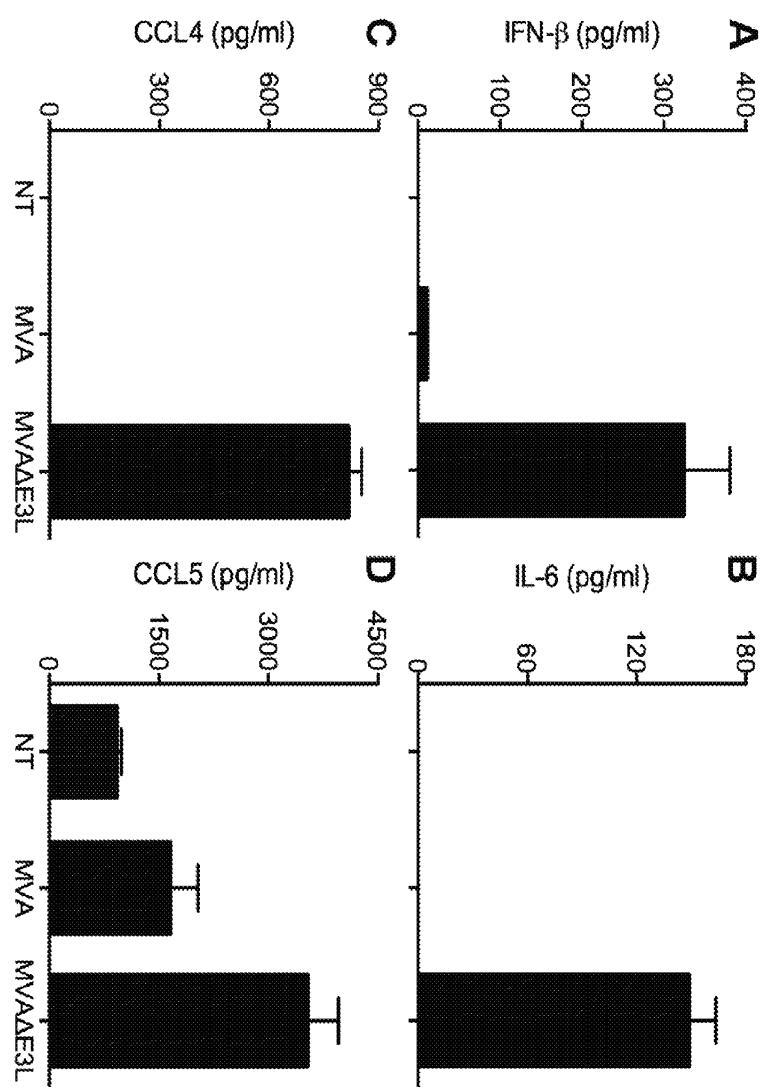
도면13b



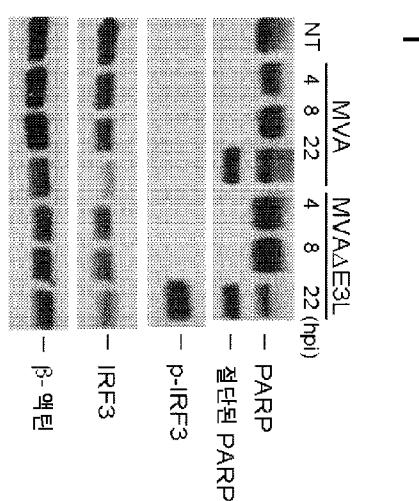
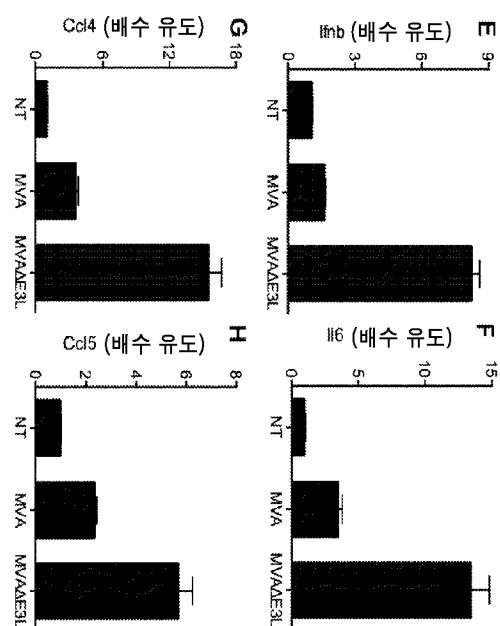
도면14



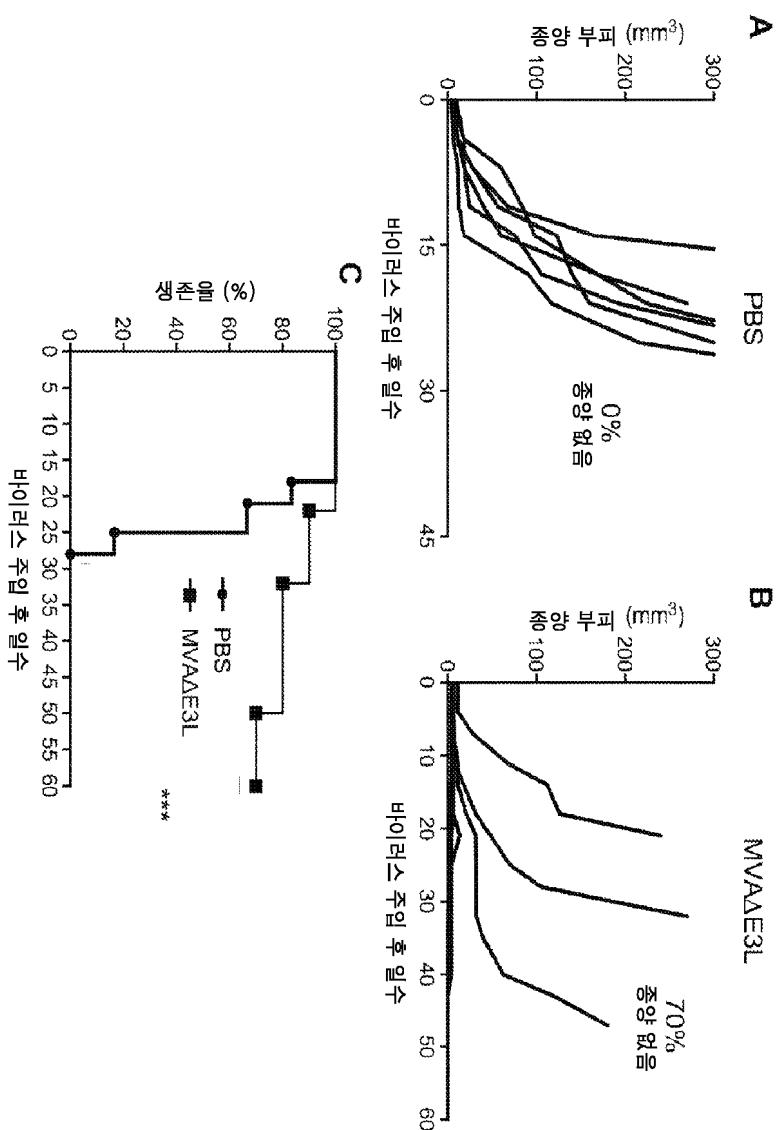
도면15a



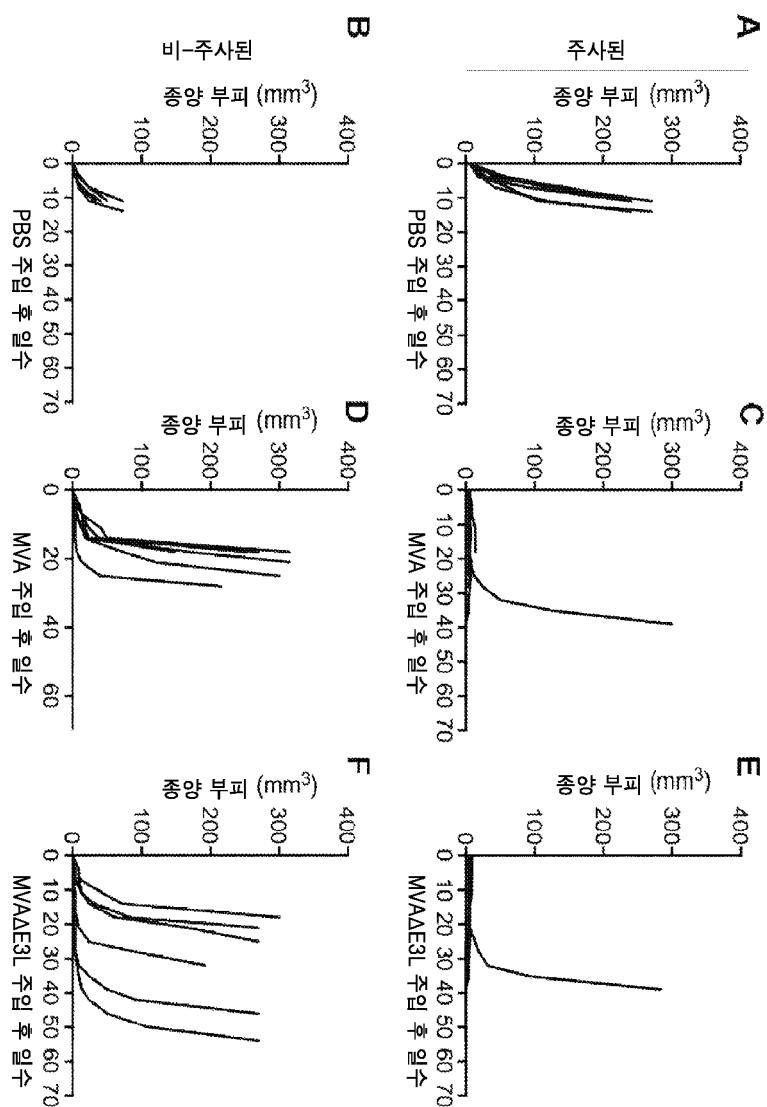
도면15b



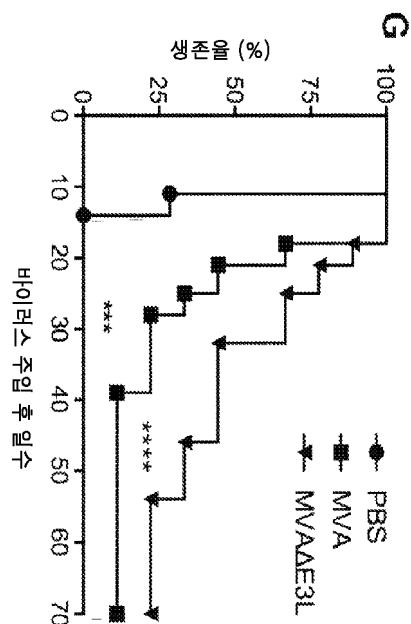
도면16



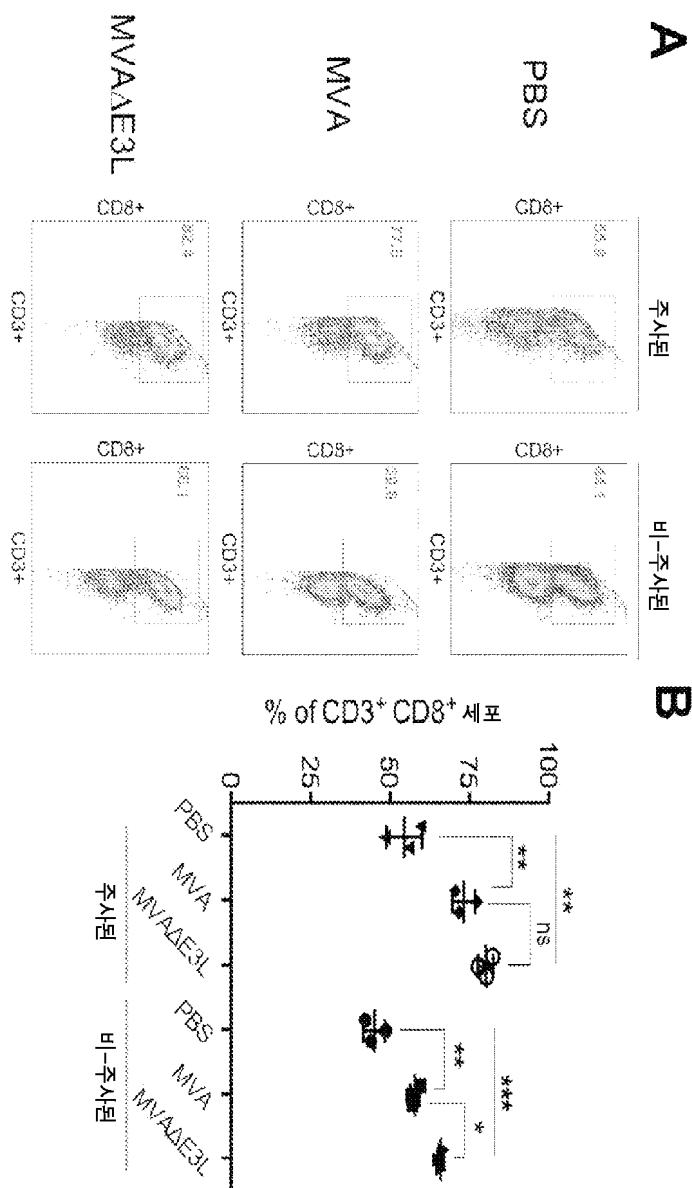
도면17a



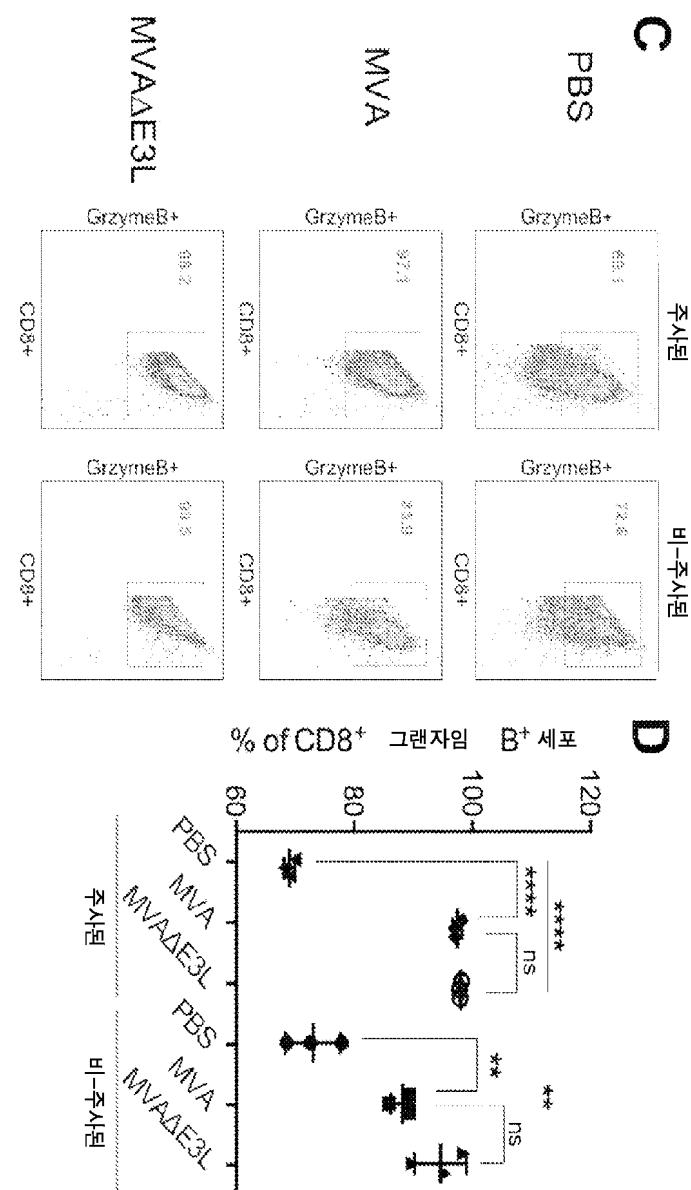
도면17b



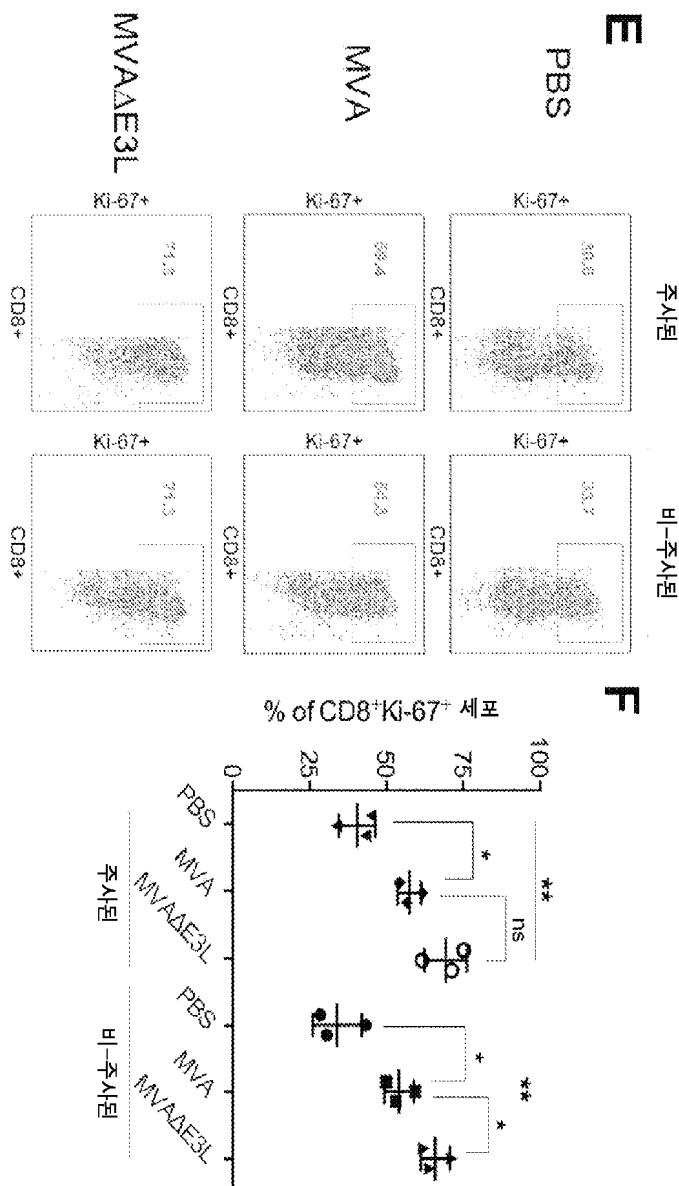
도면18a



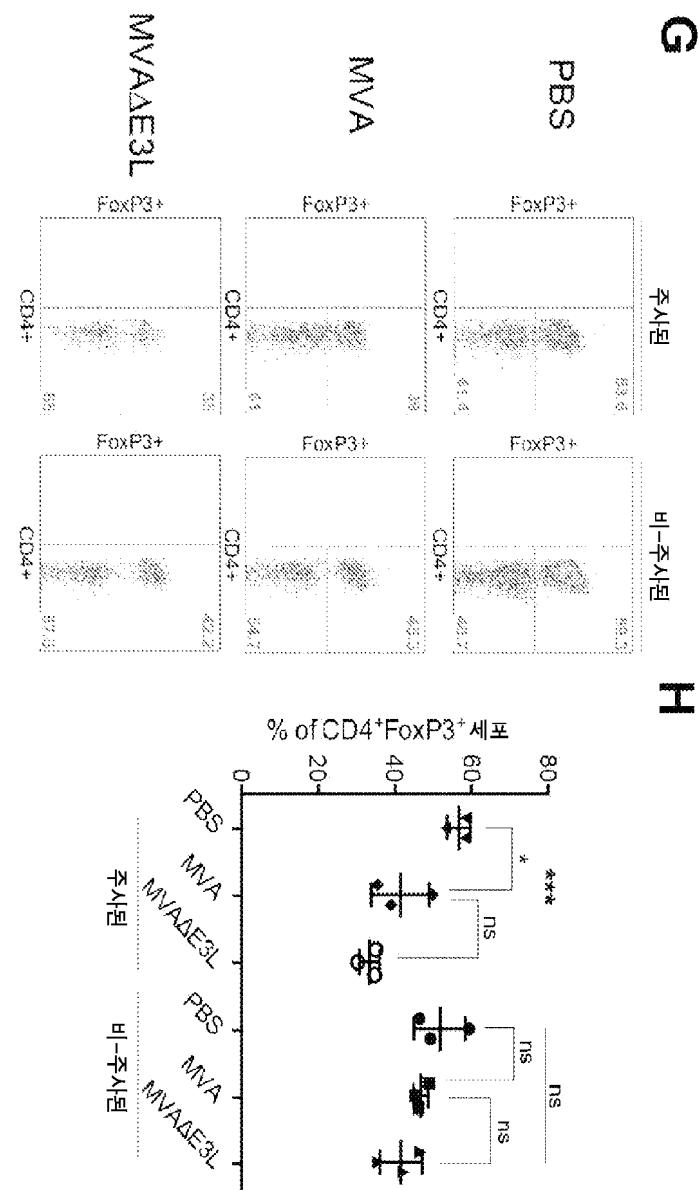
도면18b



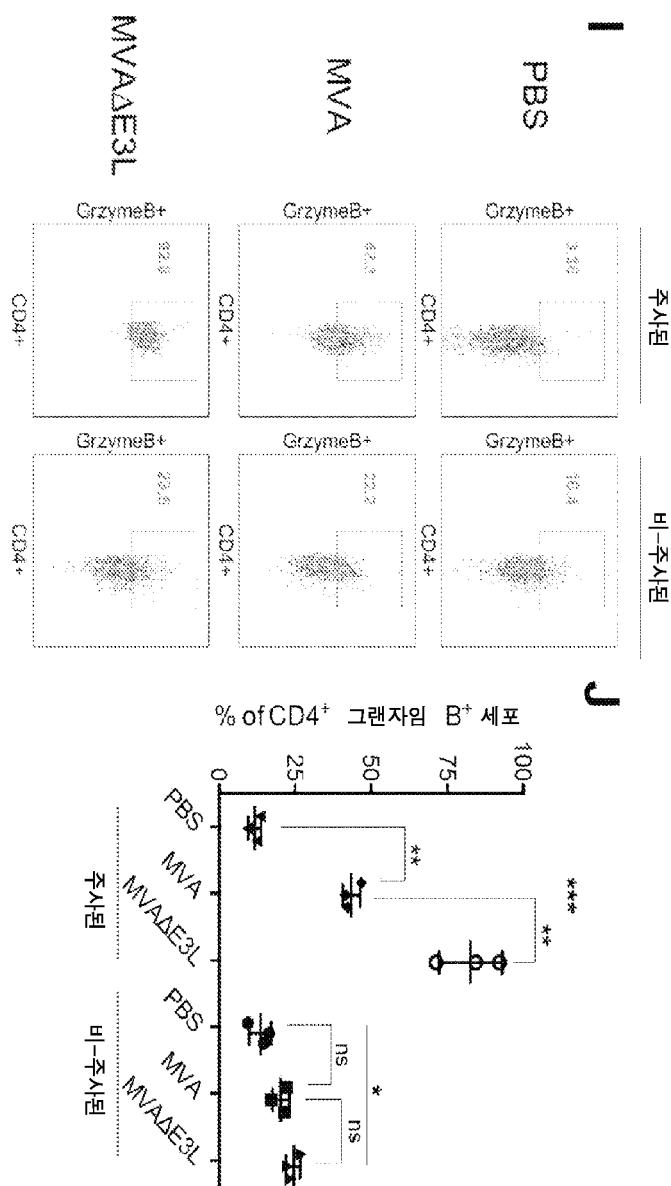
도면 18c



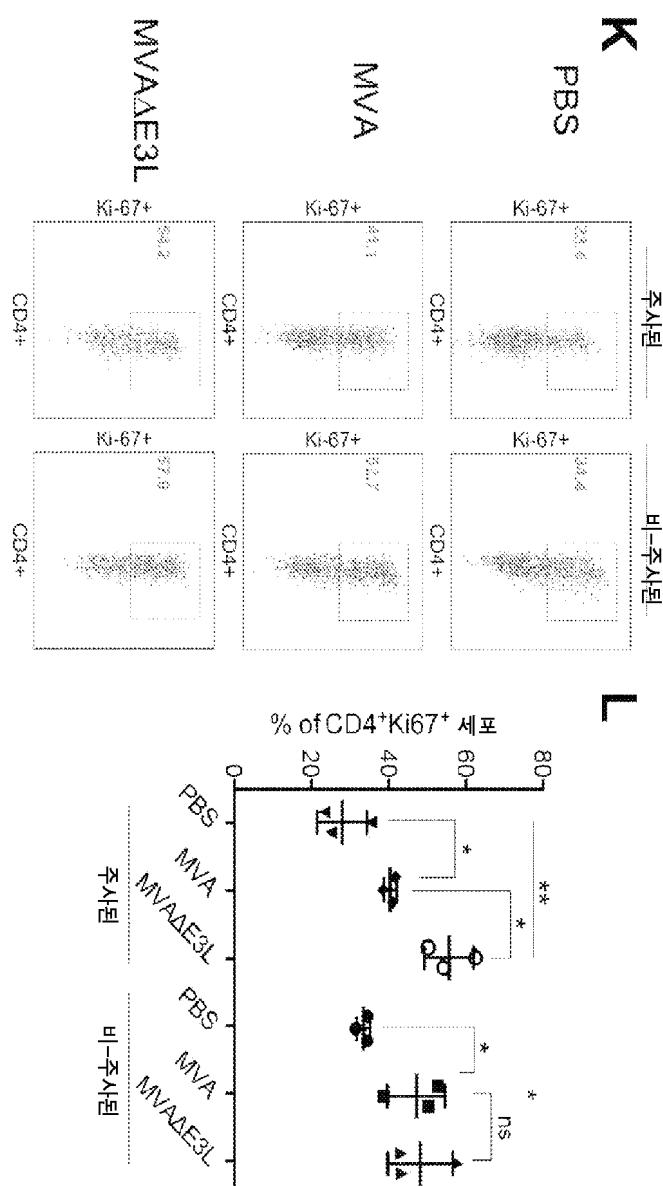
도면18d



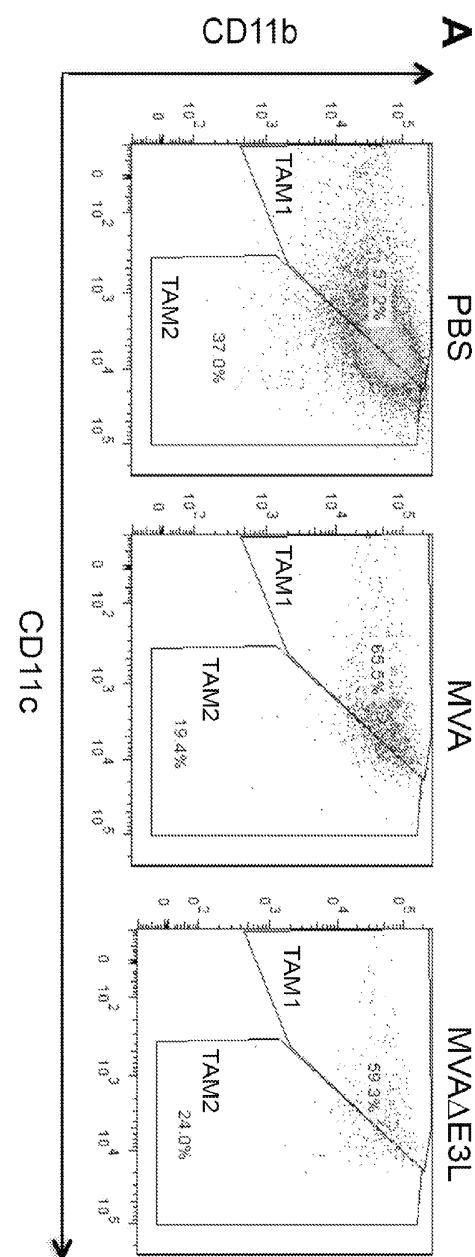
도면18e



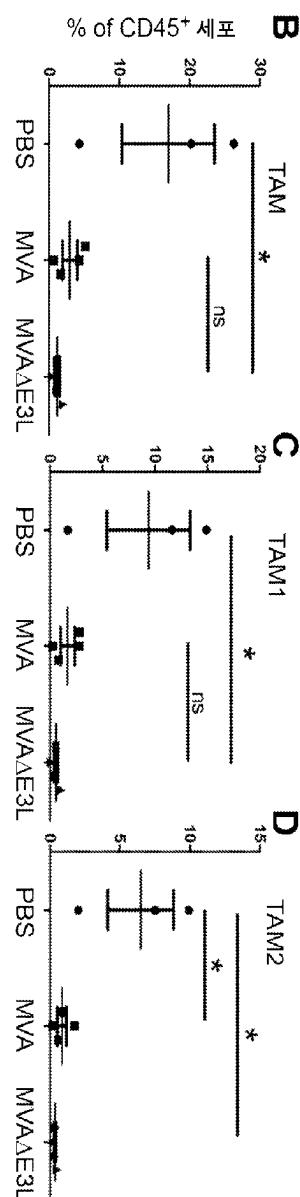
도면18f



도면19a



도면19b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER

<120> USE OF MVA OR MVADELTAE3L MUTANT AS IMMUNOTHERAPEUTICS AGAINST
SOLID TUMORS

<130> 11000/005111-W00

<140> PCT/US2016/028184

<141> 2016-04-18

<150> 62/149,484

<151> 2015-04-17

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 1

cctgtgtat gcaggaacc

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 2

tcacctccca ggcacaga

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 3

tggagatgac ggagaagatg

20

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

ttggatggca aaggcagt	18
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400> 5	
gccccacgtca aggagttt cta	23
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400	
> 6	
acacacttgg cggttccttc	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400> 7	
aggcataaact cactagttt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
primer	
<400> 8	
agctggagtc acagaaggag	20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 9

attcttaag ggctggctcg a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 10

cacctccaca tagttacag t

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 11

gtcagggtgc ctctgtctca

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 12

tcagggaaaga gtctggaaag

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 13

atcaagaagg tggtaagca 20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 14

agacaacctg gtcctcagtg t 21