



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월13일
(11) 등록번호 10-2674362
(24) 등록일자 2024년06월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/768 (2015.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 35/768 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009770
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월02일
심사청구일자 2021년09월02일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월05일
- (65) 공개번호 10-2018-0066075
- (43) 공개일자 2018년06월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/KR2016/009866
- (87) 국제공개번호 WO 2017/043815
국제공개일자 2017년03월16일
- (30) 우선권주장
62/215,651 2015년09월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
GENE THERAPY, 2005, vol. 12, no. 12, pages 1011-1018.
JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, 2005, vol. 74, no. 3, pages 283-286.
US20150037355 A1
WO2015027163 A1

- (73) 특허권자
신라젠(주)
서울특별시 중구 소공로 109, 9층(소공동, 한화빌딩)
- (72) 발명자
황 태호
부산광역시 해운대구 센텀 중앙로 145 107-1801
이 남희
부산광역시 금정구 금정로 252 6-7층
조 은아
경상남도 양산시 물금읍 백호로 91 103-2801
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 29 항

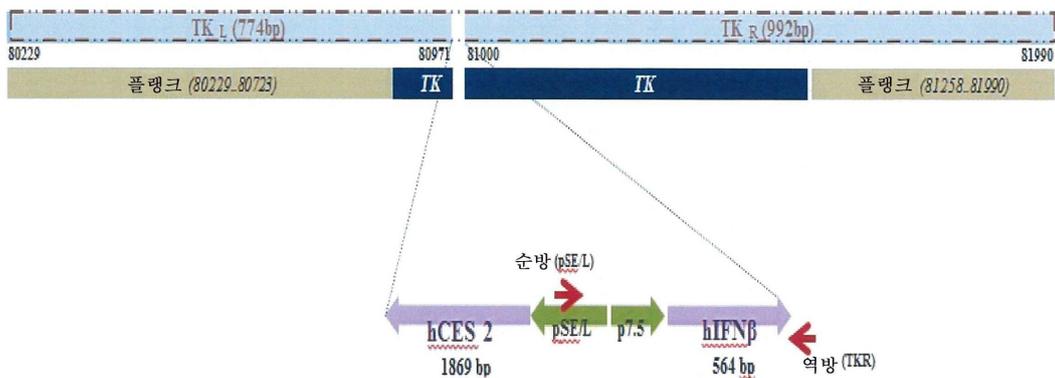
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 사이토카인 및 카르복실에스테라제를 발현하는 변형된 종양용해성 백시니아 바이러스 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 개시는 (a) 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하는 종양용해성 백시니아 바이러스, 및 바람직하게는 (b) 암 공동-약물을 포함하는 동시적, 별도의 또는 순차적 사용을 위한 조성물 및 조합물에 관한 것이고, 암의 치료를 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 38/19 (2013.01)

A61K 38/465 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 14/52 (2013.01)

C07K 14/565 (2013.01)

C12N 9/18 (2013.01)

C12Y 301/01001 (2013.01)

C12N 2710/24141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고, 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는, 재조합 웨스턴 리저브 스트레인 종양용해성 백시니아 바이러스(recombinant Western Reserve strain oncolytic vaccinia virus)를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 카르복실에스테라제 효소가 사람 CES2(hCES2)이고, 상기 사이토카인이 인터페론-베타-1이고, 상기 재조합 웨스턴 리저브 스트레인 종양용해 백시니아 바이러스가 기능성 B18R 유전자를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 카르복실에스테라제 효소가 C-말단 보유 서열을 포함하고, 상기 C-말단 보유 서열이 HTEL(서열번호 1)인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 카르복실에스테라제 효소가 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 카르복실에스테라제 효소가 후기(late)-초기(early) VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현되는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 사이토카인이 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현되는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스가 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF) 단백질을 발현하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스가 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스가 웨스턴 리저브 스트레인이고, 상기 카르복실에스테라제가 C-말단 보유 서열 HTEL (서열번호 1)을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인이 사람 인터페론-베타-1인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물이 1×10^6 내지 1×10^{12} 플라크 형성 단위(pfu)를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물이 1×10^7 내지 1×10^{10} pfu를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 암이 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암인, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 사람인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 암이 하기 (i) 내지 (iv)에 기재된 특성 하나 이상을 갖는, 조성물:

- (i) 상기 암이 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료에 대해 난치성임;
- (ii) 상기 암이 하나 이상의 항체를 이용한 치료에 대해 난치성임;
- (iii) 상기 암이 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 포함하는 치료에 대해 난치성임;
- (iv) 상기 암이 세특시맙, 파니투무맙 또는 이들 둘 다를 포함하는 치료에 대해 난치성임.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 암이 토포이소머라제 억제제를 이용한 치료에 대해 난치성인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암이 이리노테칸을 이용한 치료에 대해 난치성인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 암이 흑색종인, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 대상체가 1×10^6 내지 1×10^{12} 플라크 형성 단위(pfu)의 종양용해성 백시니아 바이러스의 1회 이상의 용량으로 종양내 또는 정맥내 주사에 의해 투여되는, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 대상체가 1×10^7 내지 1×10^{10} pfu의 종양용해성 백시니아 바이러스의 1회 이상의 용량으로 종양내 또는 정맥내 주사에 의해 투여되는, 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 조성물이 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA), 메토틱렉세이트, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 베바시주맙, 세특시맙 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 항암제와 함께 상기 대상체에게 공동-투여되는, 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 조성물이 토포이소머라제 억제제와 함께 상기 대상체에게 공동-투여되는, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 토포이소머라제 억제제가 이리노테칸인, 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 조성물이 파클리탁셀-2-에틸카보네이트와 함께 상기 대상체에게 공동-투여되는, 조성물.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 및 상기 항암제가 상기 대상체에게 순차적으로, 동시

에 또는 별도로 투여되는, 조성물.

청구항 24

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 및 상기 항암제가 상기 대상체에게 동일한 제형으로 공동-투여되는, 조성물.

청구항 25

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 및 상기 항암제가 상기 대상체에게 상이한 제형으로 공동-투여되는, 조성물.

청구항 26

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 및 상기 항암제가 상기 대상체에게 동일한 경로로 투여되는, 조성물.

청구항 27

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 백시니아 바이러스의 제1 용량이 상기 항암제의 제1 용량 이전에 투여되는, 조성물.

청구항 28

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 백시니아 바이러스가 매주 또는 격주로 투여되고, 상기 항암제가 격주로 투여되는, 조성물.

청구항 29

제6항에 있어서, 상기 GM-CSF 단백질이 사람 GM-CSF 단백질인, 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 9월 8일에 출원된 U.S. 가특허 출원 제62/215,651호의 이익을 주장하고, 이의 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다.

[0002] 본 개시는 일반적으로 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하도록 변형되었고, 바람직하게는 활성 티미딘 키나제를 임의로 암 공동-약물(co-drug), 바람직하게는 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제와 병용하여 발현시키지 않는 종양용해성 백시니아 바이러스(oncolytic vaccinia virus)에 관련된 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 정상 조직 항상성은 고도로 조절된 세포 증식 및 세포 사멸 프로세스이다. 세포 증식 또는 세포 사멸의 불균형은 암성 상태(cancerous state)로 발전할 수 있다. 예를 들면, 자궁경부암, 신장암, 폐암, 췌장암, 결장직장암 및 뇌암은 초래될 수 있는 다수의 암들 중 단지 몇몇의 예이다. 실제로, 암 발병률은 매우 높아서 미국에서만 매년 50만명이 넘는 사망자가 발생한다.

[0004] 현재, 일반적인 암 유형의 치료에 대한 효과적인 선택권은 거의 없다. 주어진 개체에 대한 치료의 과정은 진단, 질환이 발병한 병기(stage) 및 환자의 연령, 성별 및 일반적 건강과 같은 인자들에 따른다. 가장 평범한 암 치료 선택권은 수술, 방사선 치료요법 및 화학 치료요법이다. 화학 치료요법은 삶의 질에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 실질적인 독성과 관련되어 있다. 수술은 암의 진단 및 치료에 중심적인 역할을 한다. 전형적으로, 생검을 위해 그리고 암중(cancerous growth)을 제거하기 위해서는 외과적 접근법이 요구된다. 그러나, 암이 전이되어 광범위하게 퍼진 경우, 수술은 치유를 초래할 가능성이 적고 대안의 접근법이 취해져야만 한다.

암 환자의 수명을 연장시키고 삶의 질을 향상시키기 위해서는 새로운 제제(agent) 및 치료요법이 필요하다.

[0005] 복제-선택적 종양용해성 바이러스는 암 치료에 대한 가능성을 갖는다. 이들 바이러스는 직접적인 복제-의존적 종양용해성 효과를 통해 종양 세포 사멸을 야기할 수 있다. 또한, 바이러스는 숙주 내에서 세포-매개된 항종양성 면역을 향상시킬 수 있다. 이들 바이러스는 또한 항종양성 효능을 향상시키기 위해 종양 내에서 치료학적 전이유전자를 발현하도록 조작될 수 있다. 그러나, 이러한 치료학적 접근법에도 주요 제한이 존재한다.

발명의 내용

[0006] **기술적 과제**

[0007] 따라서, 암의 치료를 위한 추가의 치료요법이 필요하다. 면역 반응을 향상시키고 화학 치료학적 효능을 증가시키는 인자들을 발현하는 종양용해성 바이러스의 사용은 개발의 잠재적 영역을 제시한다.

[0008] **과제에 대한 해결책**

[0009] 본원에 개시되는 조성물, 조합물 및 방법의 소정 양상들은 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하도록 변형된, 본원에 개시되는 종양용해성 백시니아 바이러스의 표적화된 순차적 다중-방식(targeted sequential multi-modal)의 종양 사멸 효과에 기초한다. 바람직한 실시형태에서, 순차적 다중-방식의 치료는 기존의 치료요법에 대한 개선 및 보다 효과적인 종양 감축(debulking)을 초래한다. 종양용해성 백시니아 바이러스의 선택성은 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소의 발현이 종양 환경에 크게 제한될 것임을 의미한다. 종양용해성 백시니아 바이러스 및 인터페론-베타-1과 같은 사이토카인은 종양 덩어리를 감축시키기 위해 각각 작용할 것이고, 바이러스 또는 사이토카인의 단독 투여보다 이의 조합이 더욱 더 효과적일 것이다. 바이러스-매개된 세포 용해 후, 바이러스 계놈으로부터 발현된 카르복실에스테라제 효소는 국소 종양 환경으로 방출될 것이고, 여기서 이는 상기 국소 종양 환경 내에서 상기 암 공동-약물을 이들의 활성 형태로 이상적으로 대량으로 전환시켜 활성 약물 형태의 높은 국소 농도를 초래할 것이다. 이러한 메커니즘은 잠재적으로 바이러스-매개된 세포 용해 및 사이토카인의 병용된 감축 효과의 결과로서 제거되지 않는 종양 내의 잔류 암 세포의 효과적인 치료를 달성하는데 보다 낮은(따라서, 보다 안전한) 암 공동-약물 용량이 요구되도록 한다. 모두 병용된 이들 효과는 셋 중 임의의 하나 그 자체보다 더 철저하고 효과적으로 종양의 다중-방식 사멸을 초래할 것이다. 마지막으로, 각각은 상이한 방식으로 작용하고, 이에 의해 추가의 치료에 대해 내성이 있는 암성 세포를 선택할 가능성을 감소시킨다.

[0010] 본 발명의 양상은 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성 종양용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 CES2, 바람직하게는 사람 CES2(hCES2)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 카르복실에스테라제 효소는 후기(late)-초기(early) VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24 CCL3, CCL5 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타 1(바람직하게는 사람)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 와이어스(Wyeth), 코펜하겐(Copenhagen), 웨스턴 리저브(Western Reserve) 또는 리스터(Lister) 스트레인이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상을 발현한다: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(바람직하게는 사람 GM-CSF), 시토신 데아미나제 단백질, 및 소마토스타틴 수용체 2형 단백질. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는다. 선

행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu: plaque forming unit), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu를 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 스트레인이고, 상기 카르복실에스테라제는 C-말단 보유 서열을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인은 사람 인터페론-베타-1이다. 몇몇의 실시형태들에서, A34R 유전자는 K151E 돌연변이를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조성물은 활성 색전형성(embolization)에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 진분, 폴리비닐 알콜, 젤라틴 폼(foam) 및 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 상기 미세입자는 $100\mu\text{m}$ 내지 $2000\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, $200\mu\text{m}$ 내지 $250\mu\text{m}$ 크기, $250\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 또는 $300\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$ 크기이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $100\mu\text{m}$, 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $50\mu\text{m}$, 또는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $25\mu\text{m}$ 의 크기로 다양하다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $100\mu\text{m}$ 이하, 약 $50\mu\text{m}$ 이하, 약 $25\mu\text{m}$ 이하, 약 $10\mu\text{m}$ 이하 또는 약 $5\mu\text{m}$ 이하의 평균 직경 차이를 갖는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $10\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들의 응집체이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 친수성 중합체 겔체는 $10\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들을 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 일시적 색전증제(embolic agent) 또는 영구적 색전증제이다.

[0011]

본 발명의 다른 양상은 포유동물에게 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성의 종양용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물의 유효량을 투여함을 포함하는, 포유동물에서의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 CES2, 바람직하게는 사람 CES2(hCES2)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24 CCL3, CCL5, 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 와이어스, 코펜하겐, 웨스턴 리저브 또는 리스터 스트레인이자. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상을 발현한다: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(바람직하게는 사람 GM-CSF), 시토신 데아미나제 단백질, 및 소마토스타틴 수용체 2형 단백질. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 스트레인이자, 상기 카르복실에스테라제는 C-말단 보유 서열을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인은 사람 인터페론-베타-1이다. 몇몇의 실시형태들에서, A34R 유전자는 K151E 돌연변이를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것

과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분, 폴리비닐 알콜, 젤라틴 폼 및 설문화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 상기 미세입자는 100 μ m 내지 2000 μ m, 150 μ m 내지 350 μ m, 150 μ m 내지 200 μ m, 200 μ m 내지 250 μ m 크기, 250 μ m 내지 300 μ m 또는 300 μ m 내지 350 μ m 크기이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 약 0 μ m 내지 약 100 μ m, 약 0 μ m 내지 약 50 μ m, 또는 약 0 μ m 내지 약 25 μ m의 크기로 다양하다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 100 μ m 이하, 약 50 μ m 이하, 약 25 μ m 이하, 약 10 μ m 이하 또는 약 5 μ m 이하의 평균 직경 차이를 갖는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 10 μ m 내지 200 μ m 또는 10 μ m 내지 100 μ m인 미립자들의 응집체이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 친수성 중합체 겔체는 10 μ m 내지 200 μ m 또는 10 μ m 내지 100 μ m인 미립자들을 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 일시적 색전증제 또는 영구적 색전증제이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 포유동물은 사람이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료에 대해 난치성이고/이거나 하나 이상의 항체를 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 토포이소머라제 억제제, 바람직하게는 이리노테칸을 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 흑색종이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 포함하는 치료에 대해 난치성이고/이거나 세특시맵 및/또는 파니투무맵을 포함하는 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 종양용해성 백시니아 바이러스는 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu의 1회 이상의 용량으로 종양내 또는 정맥내 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 상기 포유동물에게 바람직하게는 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA), 메토티렉세이트, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 베바시주맵, 세특시맵 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 항암제를 투여함을 추가로 포함한다.

[0012] 본 발명의 다른 양상은 포유동물에게 (a) 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성의 종양용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물 및 (b) 암 공동-약물을 포함하는 조합물의 유효량을 투여함을 포함하는, 포유동물에서의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 토포이소머라제 억제제이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 활성화가 가능한(activatable) 암 공동-약물이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 활성화가 가능한 암 공동-약물은 토포이소머라제 억제제, 파클리탁셀-2-에틸카보네이트(이는 파클리탁셀로 전환된다), 카페시타빈(이는 5'-데옥시-5-플루오로시티딘(5-FU)으로 전환된다), 및 기존의 화학치료제의 임의의 3차 아미도메틸 에스테르 프로드럭(prodrug)으로부터 선택된다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 CES2, 바람직하게는 사람 CES2(hCES2)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된(LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24 CCL3, CCL5, 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5

프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 와이어스, 코펜하겐, 웨스턴 리저브 또는 리스터 스트레인이자. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상을 발현한다: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(바람직하게는 사람 GM-CSF), 시토신 데아미나제 단백질, 및 소마토스타틴 수용체 2형 단백질. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 스트레인이고, 상기 카르복실에스테라제는 C-말단 보유 서열을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인은 사람 인터페론-베타-1이다. 몇몇의 실시형태들에서, A34R 유전자는 K151E 돌연변이를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분, 폴리비닐 알콜, 젤라틴 폼 및 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 상기 미세입자는 $100\mu\text{m}$ 내지 $2000\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, $200\mu\text{m}$ 내지 $250\mu\text{m}$ 크기, $250\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 또는 $300\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$ 크기이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $100\mu\text{m}$, 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $50\mu\text{m}$, 또는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $25\mu\text{m}$ 의 크기로 다양하다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $100\mu\text{m}$ 이하, 약 $50\mu\text{m}$ 이하, 약 $25\mu\text{m}$ 이하, 약 $10\mu\text{m}$ 이하 또는 약 $5\mu\text{m}$ 이하의 평균 직경 차이를 갖는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $10\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들의 응집체이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 친수성 중합체 겔체는 10 μm 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들을 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 일시적 색전증제 또는 영구적 색전증제이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 압은 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 포유동물은 사람이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 압은 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료에 대해 난치성이고/이거나 하나 이상의 항체를 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 압은 토포이소머라제 억제제, 바람직하게는 이리노테칸을 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 압은 흑색종이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 압은 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 포함하는 치료에 대해 난치성이고/이거나 세특시맵 및/또는 파니투무맵을 포함하는 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스는 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu의 1회 이상의 용량으로 중앙내 또는 정맥내 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 상기 포유동물에게 바람직하게는 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA), 메트트렉세이트, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 베바시주맵, 세특시맵 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 항암제를 투여함을 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 상승작용적 유효량(synergistically effective amount)으로 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 공동-약물은 캄프토테신 유사체이고, 바람직하게는 토포테칸 및 이리노테칸으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 이리노테칸이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 순차적으로, 동시에 또는 별도로 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 동일한 제형으로 포유동물에게 공동-투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 상이한 제형으로 포유동물에게 공동-투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될

수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 동일한 경로에 의해 포유동물에게 투여되고, 바람직하게는 여기서 (a) 및 (b)는 둘 다 정맥내 투여에 의해 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스의 첫 번째 용량은 암 공동-약물의 첫 번째 용량 이전에 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 120 내지 250mg/m²의 용량으로 격주 투여되고, 바람직하게는 여기서 상기 암 공동-약물은 이리노테칸이고 약 180mg/m²의 용량으로 격주 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 종양용해성 백시니아 바이러스는 매주 또는 격주 투여되고, 여기서 상기 암 공동-약물은 격주 투여되고, 바람직하게는 여기서 상기 암 공동-약물의 투여는 종양용해성 백시니아 바이러스의 두 번째 매주 투약 후 1 내지 3일째에 개시한다.

[0013]

본 발명의 다른 양상은 포유동물의 혈관구조에 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성의 종양용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물, 및 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 도입함을 포함하는, 포유동물에서의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24 CCL3, CCL5, 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 와이어스, 코펜하겐, 웨스턴 리저브 또는 리스터 스트레인이자. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상을 발현한다: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(바람직하게는 사람 GM-CSF), 시토신 테아미나제 단백질, 및 소마토스타틴 수용체 2형 단백질. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 스트레인이고, 상기 카르복실에스테라제는 C-말단 보유 서열을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인은 사람 인터페론-베타-1이다. 몇몇의 실시형태들에서, A34R 유전자는 K151E 돌연변이를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분, 폴리비닐 알콜, 젤라틴 폼 및 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 상기 미세입자는 100 μ m 내지 2000 μ m, 150 μ m 내지 350 μ m, 150 μ m 내지 200 μ m, 200 μ m 내지 250 μ m 크기, 250 μ m 내지 300 μ m 또는 300 μ m 내지 350 μ m 크기이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 약 0 μ m 내지 약 100 μ m, 약 0 μ m 내지 약 50 μ m, 또는 약 0 μ m 내지 약 25 μ m의 크기로 다양하다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 100 μ m 이하, 약 50 μ m 이하, 약 25 μ m 이하, 약 10 μ m 이하 또는 약 5 μ m 이하의 평균 직경 차이를 갖는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 10 μ m 내지 200 μ m 또는 10 μ m 내지 100 μ m인 미립자들의 응집체이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의

것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 친수성 중합체 겔체는 10 μ m 내지 200 μ m 또는 10 μ m 내지 100 μ m인 미립자들을 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 일시적 색전증제 또는 영구적 색전증제이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 포유동물은 사람이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료에 대해 난치성이고/이거나 하나 이상의 항체를 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 토포이소머라제 억제제, 바람직하게는 이리노테칸을 이용한 치료에 대해 난치성이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 흑색종이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 포함하는 치료에 대해 난치성이고/이거나 세특시맙 및/또는 파니투무맙을 포함하는 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 종양용해성 백시니아 바이러스는 1 x 10⁶ 내지 1 x 10¹²의 플라크 형성 단위 (pfu), 바람직하게는 1 x 10⁷ 내지 1 x 10¹⁰의 pfu의 1회 이상의 용량으로 종양내 또는 정맥내 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 상기 포유동물에게 바람직하게는 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA), 메토틱렉세이트, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 베바시주맙, 세특시맙 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 항암제를 투여함을 추가로 포함한다.

[0014] 본 발명의 다른 양상은 (a) 포유동물의 혈관구조에 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성의 종양용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물, 및 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 도입하는 단계 및 (b) 상기 포유동물에게 암 공동-약물의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 토포이소머라제 억제제이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 활성화가능한 암 공동-약물이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 토포이소머라제 억제제, 파클리탁셀-2-에틸카보네이트(이는 파클리탁셀로 전환된다), 카페시타빈(이는 5'-데옥시-5-플루오로시티딘(5-FU)으로 전환된다), 및 기존의 화학치료제의 임의의 3차 아미도메틸 에스테르 프로드럭을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 카르복실에스테라제에 의해 활성화가능한 임의의 암 약물이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 CES2, 바람직하게는 사람 CES2(hCES2)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24 CCL3, CCL5, 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람)이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된 (LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 와이어스, 코펜하겐, 웨스턴 리저브 또는 리스터 스트레인이자. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상을 발현한다: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(바람직하게는 사람 GM-CSF), 시토신 데아미나제 단백질, 및 소마토스타틴 수용체 2형 단백질. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 활성 백시니아 성장 인자(VGF) 유전자를 발현하지 않는다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 스트레인이고, 상기 카르복실에스테라제는 C-말단 보유 서열을 갖는 사람 CES2 효소이고, 상기 사이토카인은 사람 인터페론-베타-1이다. 몇몇의 실시형태들에서, A34R 유전자는 K151E 돌연변이를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들

에서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu를 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분, 폴리비닐 알콜, 젤라틴 폼 및 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 상기 미세입자는 $100\mu\text{m}$ 내지 $2000\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$, $200\mu\text{m}$ 내지 $250\mu\text{m}$ 크기, $250\mu\text{m}$ 내지 $300\mu\text{m}$ 또는 $300\mu\text{m}$ 내지 $350\mu\text{m}$ 크기이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $100\mu\text{m}$, 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $50\mu\text{m}$, 또는 약 $0\mu\text{m}$ 내지 약 $25\mu\text{m}$ 의 크기로 다양하다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $100\mu\text{m}$ 이하, 약 $50\mu\text{m}$ 이하, 약 $25\mu\text{m}$ 이하, 약 $10\mu\text{m}$ 이하 또는 약 $5\mu\text{m}$ 이하의 평균 직경 차이를 갖는다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 제제의 각각의 입자는 $10\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들의 응집체이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 친수성 중합체 겔체는 $10\mu\text{m}$ 내지 $200\mu\text{m}$ 또는 $10\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 인 미립자들을 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 일시적 색전증제 또는 영구적 색전증제이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 또는 간암이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 포유동물은 사람이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 하나 이상의 화학치료제를 이용한 치료에 대해 난치성이고/이거나 하나 이상의 항체를 이용한 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 토포이소머라제 억제제, 바람직하게는 이리노테칸을 이용한 치료에 대해 난치성이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 흑색종이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암은 플루오로피리미딘 및 옥살리플라틴을 포함하는 치료에 대해 난치성이고/이거나 세특시맙 및/또는 파니투무맙을 포함하는 치료에 대해 난치성이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스는 1×10^6 내지 1×10^{12} 의 플라크 형성 단위(pfu), 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{10} 의 pfu의 1회 이상의 용량으로 중앙내 또는 정맥내 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 방법은 상기 포유동물에게 바람직하게는 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA), 메토티렉세이트, 카페시타빈, 옥살리플라틴, 베바시주맙, 세특시맙 및 이들의 임의의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 항암제를 투여함을 추가로 포함한다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 상승작용적 유효량으로 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 공동-약물은 캄프토테신 유사체이고, 바람직하게는 토포테칸 및 이리노테칸으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 이리노테칸이다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 순차적으로, 동시에 또는 별도로 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 동일한 제형으로 포유동물에게 공동-투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 상이한 제형으로 포유동물에게 공동-투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, (a) 및 (b)는 동일한 경로에 의해 포유동물에게 투여되고, 바람직하게는 여기서 (a) 및 (b)는 둘 다 정맥내 투여에 의해 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 중앙용해성 백시니아 바이러스의 첫 번째 용량은 암 공동-약물의 첫 번째 용량 이전에 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 암 공동-약물은 120 내지 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 격주 투여되고, 바람직하게는 여기서 상기 암 공동-약물은 이리노테칸이고 약 $180\text{mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 격주 투여된다. 선행하는 실시형태들 중 임의의 것과 병용될 수 있는 몇몇의 실시형태들에서, 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스는 매주 또는 격주 투여되고, 여기서 상기 암 공동-약물은 격주투여되고, 바람직하게는 여기서 상기 암 공동-약물의 투여는 중앙용해성 백시니아 바이러스의 두 번째 매주 투약 후 1 내지 3일째에 개시한다.

[0015] 본 개시의 다른 실시형태들이 본 출원에 걸쳐 논의된다. 본 개시의 한 양상에 관해 논의된 임의의 실시형태는 본 개시의 다른 양상에 적용되고, 그 반대도 마찬가지이다. 실시예 섹션의 실시형태들은 본 개시의 모든 양상에 적용가능한 본 개시의 실시형태들인 것으로 이해된다.

- [0016] 청구범위 및/또는 명세서에서 사용되는 경우 용어 "억제하는", "감소시키는" 또는 "예방" 또는 이들 용어의 임의의 변형은 원하는 결과를 달성하기 위한 임의의 측정가능한 감소 또는 완전한 억제를 포함한다.
- [0017]본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조합물"은 항암제들, 즉, 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물의 병용된 투여를 의미하고, 상기 조합물은 독립적으로 투약될 수 있거나 또는 구별되는 양의 조합 파트너와의 상이한 고정된 조합의 사용에 의해, 즉, 동시에 또는 상이한 시점에 투약될 수 있다. 용어 "조합물"은 또한 예를 들면, 동시에 또는 시차 순서로, 즉, 키트의 임의의 부분에 대해 상이한 시점에서 같거나 상이한 시간 간격으로 투여될 수 있는 조합 파트너를 포함하는 "키트"를 정의한다. 바람직하게는, 상기 시간 간격은 제제들의 조합물이 상승작용적 효과를 나타내도록 선택된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상승작용적" 또는 "상승작용"은 본 개시에 포함된 항암제의 조합물로 달성되는 효과가 항암제, 즉 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물을 단일 치료요법으로서 사용하는 것으로부터 초래되는 효과의 합보다 크다는 것을 의미한다. 유효하게는, 이러한 상승작용은 동일한 용량으로 더 큰 효능을 제공하고/하거나 다중-약물 내성의 증강(build-up)을 방지하거나 지연시킨다.
- [0018] 용어 "암 공동-약물"은 카르복실에스테라제 및 임의의 토포이소머라제에 의해 활성화가능한 임의의 항암 약물을 포함한다. 토포이소머라제 억제제로는 유리 형태의 또는 약제학적으로 허용되는 염의 형태의 토포이소머라제 I 억제제 및 토포이소머라제 II 억제제가 포함된다. 토포이소머라제 I 억제제의 예로는 CPT-11로서도 공지되어 있는 이리노테칸(예를 들면, 이리노테칸 하이드로클로라이드); 토포테칸(예를 들면, 토포테칸 하이드로클로라이드), 지마테칸(LBQ707로서도 공지되어 있음), 캄프토테신 및 이의 유도체, 9-니트로캄프토테신 및 캄프토테신 접합체 PNU-166148(WO 99/17804에서의 화합물 A1); 10-하이드록시캄프토테신 아세테이트 염; 에토포시드; 이다루비신 하이드로클로라이드; 테니포시드; 독소루비신; 에피루비신 하이드로클로라이드; 미톡산트론 하이드로클로라이드; p-아미노벤질 카바메이트의 펜틸 카바메이트 (PPD); 및 다우노루비신 하이드로클로라이드가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이리노테칸은 예를 들면, 상표명 CAMPTOSAR™ 하에 시판되는 형태로 투여될 수 있다. 토포테칸은 예를 들면, 상표명 HYCANTIN™ 하에 시판되는 형태로 투여될 수 있다. 토포이소머라제 II 억제제로는 리포솜 제형을 포함하는 독소루비신, 예를 들면, CAELYX™, 리포솜 제형을 포함하는 다우노루비신, 예를 들면, DAUNOSOME™, 에피루비신, 이다루비신 및 네모루비신과 같은 안트라사이클린; 안트라퀴논 미톡산트론 및 로속산트론; 및 포도필로톡신 에토포시드 및 테니포시드가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 에토포시드는 ETOPOPHOS™로서 시판되고; 테니포시드는 VM 26-BRISTOL™로서 시판되고; 독소루비신은 ADRIBLASTIN™ 또는 ADRIAMYCIN™으로서 시판되고; 에피루비신은 FARMORUBICIN™으로서 시판되고; 이다루비신은 ZAVEDOS™로서 시판되고; 미톡산트론은 NOVANTRON™으로서 시판된다. 토포이소머라제 억제제 이외에, 파클리탁셀-2-에틸카보네이트(이는 파클리탁셀로 전환된다), 카페시타빈(이는 5'-데옥시-5-플루오로시티딘(5-FU)으로 전환된다) 및 일반적으로 기존 화학치료제의 임의의 3차 아미도메틸 에스테르 프로드럭(이들은 이들의 카르복실산 또는 아민 형태로 전환된다)을 포함하는, 카르복실에스테라제에 의해 활성화된 기타 항암제도 사용할 수 있다.
- [0019] 용어 "활성화가능한 암 공동-약물"로는 이리노테칸과 같은 토포이소머라제 억제제를 포함하는, 카르복실에스테라제에 의해 이의 활성형으로 형질전환되는 임의의 암 약물이 포함된다. 예를 들면, 상기 카르복실에스테라제는 토포이소머라제 또는 암 약물의 모 형태로부터 활성 대사물질로의 전환을 촉매한다.
- [0020]본원에 사용되는 바와 같은 용어 "난치성 암"은 항-신생물성 치료에 양호하게 반응하는데 실패하거나, 또는 그렇지 않으면 항신생물성 치료에 양호하게 반응한 후에 반복되거나 재발되는 암을 말한다. 따라서, 본원에서 사용되는 "치료에 대해 난치성인 암"은 치료에 대해 양호하게 반응하는데 실패하거나, 치료에 대해 내성이거나, 또는 그렇지 않으면 치료에 대해 양호하게 반응한 후에 반복되거나 재발되는 암을 의미한다. 예를 들면, 이러한 이전의 치료는 이리노테칸을 포함하는 화학 치료요법일 수 있다.
- [0021] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우의 단어 "하나" 또는 "한"("a" 또는 "an")의 사용은 "하나(one)"를 의미할 수 있지만, 이는 또한 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와 일치하기도 한다.
- [0022]본원에서 논의되는 임의의 실시형태는 본 개시의 임의의 방법, 조성물, 또는 조합물과 관련하여 실행될 수 있고, 그 반대로 마찬가지이다. 또한, 본 개시의 조성물, 조합물 및 키트는 본 개시의 방법을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0023]본 출원에 걸쳐, 용어 "약"은, 하나의 값이 해당 값을 측정하기 위해 사용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0024] 청구 범위에서의 용어 "또는"의 사용은 명확하게 양자택일(alternatives)만을 의미하는 것으로 명시되어 있거나 선택 대안들이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용되지만, 본 개시는 양자택일만을 나타내는 정의 및 "및/또는"을 나타내는 정의를 지지한다.

[0025] 이러한 명세서 및 청구범위(들)에서 사용되는 바와 같은 단어 "포함하는(comprising)"(및 "포함한다" 및 "포함하다"와 같은 포함하는의 임의의 형태), "갖는(having)"(및 "갖다" 및 "가진다"와 같은 갖는의 임의의 형태), "포함하는(including)"("포함한다" 및 "포함하다"와 같은 포함하는의 임의의 형태) 또는 "함유하는(containing)"("함유한다" 및 "함유하다"와 같은 함유하는의 임의의 형태)은 포괄적이거나 개방형(open-ended)이며, 추가의 인용되지 않은 요소들 또는 방법 단계들을 제외하지 않는다.

[0026] 본 개시의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 및 구체적 실시예들은, 본 개시의 특정 실시형태들을 나타내지만, 본 개시의 취지 및 범위 내에서의 각종 변화 및 변형은 이러한 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용으로부터 당해 분야 숙련자에게 명백해질 것이므로 단지 설명의 방식으로 제공되는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0027] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)을 갖는 이러한 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불시에 관할청에 의해 제공될 것이다.

하기 도면은 본 명세서의 일부를 이루고, 본 개시의 소정 양상들을 입증하기 위해 포함된다. 본 개시는 본원에 제시된 특정 실시형태들의 상세한 설명과 함께 이들 도면들 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a & 도 1b는 hIFN β 리포터(reporter) 세포 검정에 의한 상이한 SJ-815 바이러스 클론에서의 기능적 인터페론 단백질의 검출을 보여준다. **도 1c & 도 1d**는 p-NPA 검정에 의한 SJ-815 바이러스의 상이한 단리물에서의 카복실에스테라제 기능의 검출을 보여준다. 활성 단위는 pNPA 검정 완충액의 부가 후 5분제에 405nm에서 흡광도를 측정하고 0분에서 측정된 흡광도를 뺀셈함으로써 계산하였다.

도 2는 인터페론 전이유전자의 양 측면(flanking side)을 특이적으로 표적으로 하는 프라이머들의 사용을 입증하는 유전자 지도를 보여준다.

도 3a는 6-웰 플레이트에 씨딩(seeding)되고 24시간의 씨딩 후에 명시된 바이러스로 감염된 U-2 OS 세포로부터의 플라크의 화상을 보여준다. 72시간 후, 상기 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. **도 3b**는 6-웰 플레이트에 씨딩되고 WR 또는 SJ-815로 감염된 U-2 OS 세포 및 BS-C-1 세포를 보여준다. 플라크를 **도 3a**에서와 같이 염색하였다. 각각의 대표 실험으로부터의 하나의 그림이 나타내어진다.

도 4a는 사람 췌장암 및 자궁경부암 세포주에 대한 SJ-815 EC50(pfu/세포)을 보여준다. 췌장암 세포주 및 HeLa 세포는 상이한 감염 다중도(multiplicity of infection)에서 TK-로 표지된 SJ-815 또는 대조군 바이러스(WR.A34R.TK-)로 치료하였다. 감염-후 48시간 후에 CCK-8에 의해 세포 생존력(viability)을 평가하였다. EC50을 측정하고 플롯팅(plotting)하였다. **도 4b**는 사람 췌장암 및 자궁경부암 세포 상에서의 SJ-815의 복제를 보여준다. 췌장암 세포주 및 HeLa 세포를 1PFU/세포에서 SJ-815 또는 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염-후 48시간 후에, 상기 세포를 수거하였고, 각각의 암 세포에서 생산된 감염성 바이러스를 U-2 OS 세포에서의 플라크 검정에 의해 측정하였다. 삼중으로 3회 반복된 하나의 대표 실험으로부터의 데이터가 제시된다.

도 5a는 사람 결장암 세포주에 대한 SJ-815 EC50(pfu/세포)을 보여준다. 결장암 세포주는 상이한 감염 다중도에서 TK-로 표지된 SJ-815 또는 대조군 바이러스(WR.A34R.TK-)로 치료하였다. 감염-후 48시간 후에 CCK-8에 의해 세포 생존력을 평가하였다. EC50을 측정하고 플롯팅하였다. **도 5b**는 사람 결장암 세포 상에서의 SJ-815의 복제를 보여준다. 결장암 세포주를 1PFU/세포의 다중도에서 SJ-815 또는 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염-후 48시간 후에, 상기 세포를 수거하였고, 각각 췌장 세포에서 생산된 감염성 바이러스를 U-2 OS 세포에서의 플라크 검정에 의해 측정하였다. 삼중으로 3회 반복된 하나의 대표 실험으로부터의 데이터가 제시된다.

도 6a는 사람 간암 세포주에 대한 SJ-815 EC50(pfu/세포)을 보여준다. 간암 세포주는 상이한 감염 다중도에서 SJ-815, mSJ-815 또는 대조군 바이러스(WR.A34R.TK-)로 치료하였다. 감염-후 48시간 후에 CCK-8에 의해 세포 생존력을 평가하였다. EC50을 측정하고 플롯팅하였다. **도 6b**는 사람 간암 세포 상에서의 SJ-815의 복제를 보여준다. 간암 세포주를 1PFU/세포의 다중도에서 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염-후 48시간 후에, 상기 세포를 수거하였고, 각각의 간 세포에서 생산된 감염성 바이러스를 U-2 OS 세포에서의 플라크 검정에 의해 측정하였다. 삼중으로 실행된 3회의 상이한 실험들로부터의 데이터가 제시된다. 페어링되지 않은

(unpaired) t-시험을 이용하여 상기 데이터 *P<0.05 및 **P<0.01를 분석하였다.

도 7a 내지 도 7d는 골수종 및 흑색종 암 세포에서 바이러스 처리 농도를 증가시킨 후의 세포 생존력을 보여준다. 골수종 및 흑색종 암 세포 SK-MEL 5(**도 7a**), SK-MEL 2(**도 7b**), RPMI8226(**도 7c**) 및 IM-9(**도 7d**)를 상이한 감염 다중도에서 SJ-815, mSJ-815 또는 대조군 바이러스(WR.A34R.TK-)로 치료하였다. 감염-후 48시간 후에 CCK-8에 의해 세포 생존력을 평가하였다. 삼중으로 실행된 3회의 상이한 실험들로부터의 데이터가 제시된다.

도 8은 사람 간암 세포 상에서의 SJ-815의 복제를 보여준다. 골수종 및 흑색종 암 세포주를 1PFU/세포의 다중도에서 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염-후 48시간 후에, 상기 세포를 수거하였고, 각각의 세포주에서 생산된 감염성 바이러스를 U-2 OS 세포에서의 플라크 검정에 의해 측정하였다. 삼중으로 실행된 3회의 상이한 실험들로부터의 데이터가 제시된다. 페어링되지 않은 t-시험을 이용하여 상기 데이터 *P<0.05 및 **P<0.01를 분석하였다.

도 9a 내지 도 9f는 무린 암 세포에서 바이러스 처리 농도를 증가시킨 후의 세포 생존력을 보여준다: TIB-75 간세포 암종(**도 9a**), CT-26 결장 암종(**도 9b**), B16-F10 피부 흑색종(**도 9c**), MC-38 결장 암종(**도 9d**), RENCA 신장 선암종(**도 9e**), 및 4T1 유방암(**도 9f**)을 상이한 감염 다중도에서 mSJ-815 또는 WR.mGM-CSF로 치료하였다. 감염-후 48시간 후에 CCK-8에 의해 세포 생존력을 평가하였다. 삼중으로 실행된 3회의 상이한 실험들로부터의 데이터가 제시된다.

도 10a는 IV 및 IT를 통한 mSJ-815 및 WR.TK-.mGMCSF 바이러스로 치료된 MC-38 결장암 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 생존율(survival)을 보여준다. 각각의 치료 용법에 관한 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선을 나타낸다. 1,500mm³의 종점 종양 체적에 도달시 동물을 희생시켰다. **도 10b**는 첫 번째 치료 주사 후 수일 동안 이어진 상이한 그룹들에 대한 평균 체중을 보여준다. **도 10c**는 대조군(PBS)과 비교한, IT 및 IV를 통한 mSJ-815 및 WR.TK-.mGMCSF(0, 3, 6 및 9일)로의 MC-38 종양을 지닌 마우스의 치료 후 시간에 따른 초기 종양 크기에 대한 종양 크기 백분율을 보여준다. 그룹 평균이 제시된다(n=5). mSJ-815 그룹의 보다 작은 종양 체적이 PBS 그룹으로부터 통계학적으로 유의하였던 21, 24 및 27일째(21일째 및 24일째의 경우 P < 0.05 그리고 27일째의 경우 P < 0.01)를 제외하고는 PBS(대조군)그룹에 대하여 통계학적으로 유의한 차이를 제시한 그룹은 없었다.

도 11은 대조군(PBS)과 비교한, 증가하는 용량(1X10⁵, 1X10⁶ 및 1X10⁷ PFU)으로의 SJ-815 종양내 단독 치료(0, 7 및 14일째), 이리노테칸 정맥내 단독 치료(3, 10 및 17일째) 및 SJ-815(1X10⁶)와 이리노테칸(상기 스케줄 조합)으로의 병용 치료로의 MIA PaCa-2 종양을 지닌 마우스의 치료 후 시간에 따른 종양 크기를 보여준다. 그룹 평균이 제시된다(n=3).

도 12a는 표시된 각각의 치료 요법에 관한 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선을 나타낸다. 1,500mm³의 종점 종양 체적에 도달시 동물을 희생시켰다. 로그-랭크(log-rank)(만텔-콕스(Mantel-Cox)) 시험에 의해 분석된 데이터는 P = 0.002로 유의하게 상이하였다. **도 12b**는 첫 번째 치료 주사 후 수일 동안 이어진 상이한 그룹에 대한 체중의 평균 및 표준 편차를 보여준다.

도 13a는 상이한 농도 및 용량의 mSJ-815로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 평균 종양 크기를 보여준다. 그룹당 평균 종양 크기를 계산하였고, SEM을 플롯팅하였다. 플롯의 경향성(tendency)의 차이는 희생된 동물로 인한 것이었다. 데이터를 일원 분산 분석(ANOVA), 이어서 던넛(Dunnett)의 다중 비교 시험 및 페어링되지 않은 t 시험으로 분석하였다. 상기 데이터는 P = 0.3755로 통계학적으로 유의하지 않았다. **도 13b**는 치료 후 12일째의 각각의 마우스에서의 종양 크기를 보여준다. 상기 데이터는 일원 ANOVA에 의해 P = 0.0119로 통계학적으로 유의하였다. 모든 그룹들은 던넛 다중 비교 시험에 의해 PBS 그룹으로부터 통계학적으로 상이하였다(P < 0.05).

도 14는 표시된 각각의 치료 요법에 대한 카플란-마이어 곡선을 보여준다. 1,500mm³의 종점 종양 체적에 도달시 동물을 희생시켰다. 로그-랭크(만텔-콕스) 시험에 의해 분석된 데이터는 P < 0.0001로 유의하게 상이하였다.

도 15a는 백시니아 바이러스 및 CPT-11 단독 및 바이러스 + 이리노테칸으로의 병용 치료로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 평균 종양 크기를 보여준다. 단일 사망 마우스로부터의 종양 체적값은 이러한 도면 및 분석으로부터 제외되었다. 그룹당 종양 크기의 평균을 계산하였고, SEM을 플롯팅하였다. 데이터를 페어링되지 않은 t-시험에 의해 분석하였다. 데이터는 9일째 및 13일째에 PBS(대조군)과 WR.A34R.TK-(WR.TK-), mSJ-815, 또는 바이러스 + CPT-11 조합물로 치료된 동물들 사이에서 통계학적으로 상이하였다. **도 15b**는 치료

후 16일째까지 그룹당 종양의 평균 크기를 보여준다. 단일 사망 마우스로부터의 종양 체적값은 이러한 도면 및 분석으로부터 제외되었다. 데이터는 페어링되지 않은 t-시험에 의해 통계학적으로 유의하였다. 도 15c는 백시니아 바이러스 및 CPT-11 단독 및 바이러스 + 이리노테칸으로의 병용 치료로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 평균 종양 크기를 보여준다. 표시된 데이터는 단일 사망 마우스로부터의 종양 체적값이 포함된 것을 제외하고는 도 15a에 나타난 것과 동일하다. 그룹당 종양 크기의 평균을 계산하였고, SEM을 플롯팅하였다. 데이터를 페어링되지 않은 t-시험에 의해 분석하였다. 도 15d는 치료 후 16일째까지 그룹당 종양의 평균 크기를 보여준다. 표시된 데이터는 단일 사망 마우스로부터의 종양 체적값이 포함된 것을 제외하고는 도 15c에 나타난 것과 동일하다.

도 16은 백시니아 바이러스 및 이리노테칸과의 병용으로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 상이한 그룹들에 대한 체중의 평균 및 표준 편차를 보여준다. 치료 후 매주 2회 마우스를 측정하였다. 데이터를 일원 분산 분석(ANOVA), 이어서 던넛(Dunnett)의 다중 비교 시험에 의해 분석하였다. 상기 데이터는 P = 0.1845로 통계학적으로 유의하지 않았다. 던넛 다중 비교 시험으로 임의의 그룹들 사이의 유의한 차이는 존재하지 않았다.

도 17a 내지 도 17d는 종양내 또는 정맥내로 mSJ-815로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 간(도 17a), 신장(도 17b), 뇌(도 17c) 및 폐(도 17d) 중량을 보여준다. 종점에서 장기를 수집하고, 칭량하고, 중량을 체중에 대해 정규화(normalized)하였다.

도 18a & 도 18b는 정맥내(도 18a) 또는 종양내(도 18b)로 mSJ-815로 치료된 B16-F10 흑색종 종양을 갖는 B57BL/6 마우스의 비장 중량을 보여준다. 종점에서 비장을 수집하고, 칭량하고, 중량을 체중에 대해 정규화하였다.

도 19는 종양, 근육, 난소 및 간 내에서의 동물 사망일의 바이러스 역가를 보여준다. 바(bar)는 평균의 표준 편차(SD)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명을 위한 방식

[0028]

본원에 개시된 본 개시의 소정 양상들은, 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하도록 조작된 종양용 해성 백시니아 바이러스가 암 공동-약물과 병용하는 경우를 포함하여 암의 치료시 예상치 못한 개선을 초래한다는 놀라운 발견에 기초한다. 이론에 얽매이지 않으면서, 종양용해성 백시니아 바이러스에 의한 바람직한 사람 인터페론 베타 1(hIFNβ1)과 같은 사이토카인의 발현은 항암 면역 반응을 촉매하고 암 선택성을 향상시킨다.

[0029]

본원에 기술된 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물, 바람직하게는 활성화가능한 암 공동-약물을 이용한 병용 요법이 암의 치료시에 예상치 못한 향상을 초래한다는 것이 밝혀졌다. 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여하는 경우, 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물, 특히 활성화가능한 암 공동-약물은 상호 작용하여 구성성분 자체의 투여에 의한 것보다 더 큰 정도로 암 세포를 사멸시킨다. 이러한 예상치 못한 개선은 각각의 구성성분에 요구되는 용량을 감소시켜 부작용을 감소시키고 화합물 및 치료의 임상학적 유효성의 향상으로 유도할 것이다. 이리노테칸과 같은 암 공동-약물은 빈번하고 심각한 위장 문제, 예를 들면, 설사, 구토, 발한, 복부 경련, 과다 유루(hyperlacrimation) 및 비루를 포함하는 상당한 부작용을 야기할 수 있다. 증상의 빈도 및 중증도는 용량-관련되어 있고, 보다 높은 용량을 투여받는 환자들은 증상이 보다 중증임을 입증한다. 따라서, 본원에 기술된 종양용해성 백시니아 바이러스와 병용하여 사용되는 경우 요구되는 암 공동-약물 용량의 잠재적 감소는 임상학적 부작용의 감소를 유도할 것이다.

[0030]

I. 종양용해성 백시니아 바이러스

[0031]

본 개시의 소정 양상들은 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 바람직하게는 활성화 티미딘 키나제를 발현하지 않는 종양용해성 백시니아 바이러스에 관한 것이다. 백시니아 바이러스는 약 190Kbp의 선형 이중-가닥의 DNA 게놈을 갖고 대략 250개의 유전자를 암호화하는 크고 복잡한 외피보유(enveloped) 바이러스이다. 백시니아 바이러스는 약 360nm × 250nm 크기의 큰 바이러스이다. 백시니아는 천연두를 근절시킨 백신으로서 이의 역할이 익히 공지되어 있다. 천연두의 근절 후, 과학자들은 백시니아 바이러스를 유전자 전달을 위한 도구로서 또는 생물학적 조직으로의 백신으로서 사용하는 것(유전자 치료요법 및 유전자 조작)을 모색해왔다.

[0032]

백시니아 바이러스는 세포의 기저 외측 표면을 통해 우선적으로 감염되지만, 이의 바이러스성 자손(progeny)은 선단 표면으로부터 방출된다. 분극화된 세포로는 상피 세포, 내피 세포, 면역 세포, 과일 세포, 뉴런 및 섬유

[0033]

아세포가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

- [0034] 백시니아 바이러스는 숙주 세포의 세포질에서만 복제되므로 DNA 바이러스들 중에서도 고유하다. 따라서, 큰 게놈은 바이러스 DNA 복제에 필요한 다양한 효소 및 단백질을 암호화하는 것이 요구된다. 복제 동안, 백시니아 바이러스는 이들의 외막이 상이한 몇몇의 감염성 형태: 세포내 성숙 비리온(IMV: intracellular mature virion), 세포내 외피보유 비리온(IEV: intracellular enveloped virion), 세포-회합된 외피보유 비리온(CEV: cell-associated enveloped virion) 및 세포외 외피보유 비리온(EEV: extracellular enveloped virion)을 생성한다. IMV는 가장 풍부한 감염성 형태이며 숙주 사이의 확산(spread)에 관여하는 것으로 생각된다. 다른 한편, CEV는 세포-대-세포 확산에서 역할을 행하는 것으로 생각되고, EEV는 숙주 유기체 내에서 원거리 파종(long range dissemination)에 중요한 것으로 생각된다. 본 개시의 종양용해성 백시니아 바이러스는 임의로 백시니아 바이러스의 세포외 외피보유 형태(EEV)의 증진된 양을 생산하는 것으로 공지되어 있는 A34R 유전자를 돌연변이시키함으로써 EEV 생산(output)을 향상시키도록 변형될 수 있다.
- [0035] 임의의 공지의 백시니아 바이러스의 종양용해성 스트레인은 본 개시의 조성물 및 조합물의 백시니아 바이러스 구성성분으로서 사용할 수 있다. 바람직한 실시형태들에서, 본 개시의 종양용해성 백시니아 바이러스는 코펜하겐, 웨스턴 리저브, 리스터 또는 와이어스 스트레인이고, 가장 바람직하게는 웨스턴 리저브 또는 와이어스 스트레인이다. 감염된 개체로부터 또는 종양 특이적 표적화 성질을 선택하는 생체 선택 방법을 통해 단리되고 특성 확인된 다른 스트레인들도 사용될 수 있다.
- [0036] 본 개시의 종양용해성 백시니아 바이러스는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 또는 GM-CSF와 같은 외래(foreign) 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. GM-CSF는 줄기 세포를 자극시켜 과립구(호중구, 호산구 및 호염기구) 및 대식세포를 생산하는 대식세포에 의해 분비되는 단백질이다. 사람 GM-CSF는 아미노산 잔기 23(류신), 27(아스파라긴) 및 39(글루탐산)에서 당화된다(본원에 인용에 의해 포함되는 U.S. 특허 5,073,627호를 참조한다).
- [0037] 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 시토신 데아미나제 단백질을 발현하도록 조작된다. 시토신 데아미나제는 시토신의 우라실로의 가수분해를 촉매한다. 시토신 데아미나제는 세포가 피리미딘 뉴클레오티드 합성을 위해 시토신을 이용하는 것을 가능하게 하는 피리미딘 샬비지 경로에서 역할을 행한다. 시토신 데아미나제는 DNA에서 아데닌의 돌연변이 유발성 산화 생성물인 이소구아닌의 탈아미노화 및 이소시토신의 탈아미노화를 촉매할 수 있고, 5-플루오로시토신(5FC)의 5-플루오로우라실(5FU)로의 전환을 촉매하여 비-세포독성 전구체로부터의 세포독성 화학치료제의 생성을 가능하게 한다.
- [0038] 몇몇의 실시형태들에서, 백시니아 바이러스는 소마토스타틴 수용체 2형 단백질을 발현하도록 조작된다. 소마토스타틴 수용체 2형은 소마토스타틴-14 및 -28에 대한 수용체이다. 소마토스타틴 수용체 2형은 백일해(pertussis) 독소 민감성 G 단백질을 통해 커플링되어 아데닐릴 사이클라제를 억제한다. 이는 또한 포스포티로신 포스포타제 및 PLC를 자극하고, 전압-의존성 칼슘 채널을 억제하여 칼슘 유입을 억제하고, MAPK1 및 MAPK2 인산화의 향상을 통해 세포 성장을 억제하고, 뉴런 이동과 축삭돌기 과성장을 자극하고, PTPN6을 통한 인슐린 수용체 신호전달의 음성 조절을 매개하고, 이종이량체화(heterodimerization) 후 SSTR3 수용체 기능을 불활성화시킨다.
- [0039] 종양용해성 백시니아 바이러스는 바이러스의 암 선택성을 증가시키기 위해 하나 이상의 기능성 유전자가 결여되도록 조작될 수 있다. 바람직한 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 TK 활성이 결여되도록 조작된다. TK-결핍 백시니아 바이러스는 DNA 합성을 위해 티미딘 트리포스페이트를 필요로 하고, 이는 분열 세포(특히 암 세포)에서의 우선적인 복제를 유도한다. 다른 양상에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스 성장 인자(VGF)가 결여되도록 조작될 수 있다. 이러한 분비된 단백질은 감염 프로세스 초기에 생성되어 감염을 위해 주위 세포를 프라이밍하는 미토젠(mitogen)으로서 작용한다. 다른 양상에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 VGF 및 TK 활성이 둘 다 결여되도록 조작될 수 있다. 다른 양상들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 E3L, K3L, B18R 또는 B8R과 같은 숙주 인터페론(IFN) 반응을 회피하는데 관련된 하나 이상의 유전자가 결여되도록 조작될 수 있다. 몇몇의 바람직한 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브 또는 와이어스 스트레인이고 기능성 TK 유전자가 결여되어 있다. 다른 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 기능성 B18R 및/또는 B8R 유전자가 결여된 웨스턴 리저브 스트레인이다.
- [0040] 몇몇의 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 기능성 TK 유전자가 결여되어 있고 사람 GM-CSF를 발현한다. 바람직한 실시형태에서, 종양용해성 백시니아 바이러스는 기능성 TK 유전자가 결여되어 있고 사람 GM-CSF를 발현하는 와이어스 스트레인 종양용해성 백시니아 바이러스이다.

[0041] **A. 카르복실에스테라제 효소**

[0042] 조합물의 종양용해성 백시니아 바이러스 구성성분은 카르복실에스테라제를 발현하도록 조작될 수 있다. 카르복실에스테라제는 주로 각종 생체이물(xenobiotic)의 해독작용(detoxification)에 관여하는 것으로 생각되는 간(카르복실에스테라제 1) 및 장(카르복실에스테라제 2)에서의 세린 에스테라제 효소이다. 본원에서 사용되는 카르복실에스테라아제로는 이리노테칸의 활성 대사물질 SN-38로의 전환을 촉매하는 임의의 효소, 예를 들면, 부티릴콜린에스테라제가 포함된다. 이리노테칸과 같은 SN-38은 토포이소머라제 I 억제제이지만, 모 약물보다 약 100 내지 1000배 더 큰 활성이다. 이리노테칸으로의 표준 치료를 받고 있는 사람 암 환자에서 적은 백분율의 이리노테칸만이 SN-38로 전환된다. 카르복실에스테라아제 1(HIEL)과 카르복실에스테라제 2(HTEL)의 카르복시 말단 4개 아미노산이 효소를 세포에서 유지되게 한다. 이들 말단 4개 아미노산의 제거는 효소를 분비되게 한다.

[0043] 본 출원은 이리노테칸 및 카르복실에스테라제를 발현하도록 유전적으로 조작된 백시니아 바이러스의 병용 요법이 이리노테칸의 SN-38로의 전환에서의 종양-특이적 증가를 초래함을 입증한다. 카르복실에스테라제 전이유전자를 발현하지 않는 동일한 바이러스와 비교하여, 카르복실에스테라제 2를 발현하는 백시니아 바이러스로의 세포 감염 후 다양한 세포주에서의 세포 생존력의 유의한 감소가 관찰되었다. 백시니아 바이러스가 카르복실에스테라제 2를 발현한 경우 몇몇의 사람 암 세포주에서 우수한 결과들이 관찰되었다.

[0044] 한 바람직한 실시형태에서, 종양용해성 바이러스는 사람 카르복실에스테라제 2(예를 들면, 본원에 인용에 의해 포함되는 UniProt 승인 번호 000748)를 발현한다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 백시니아 바이러스는 사람 카르복실에스테라제 2와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드를 발현하도록 조작된다. 다른 실시형태들에서, 상기 종양용해성 백시니아 바이러스는 토끼 카르복실에스테라제 2(본원에 인용에 의해 포함되는 UniProt 승인 번호 P14943) 또는 이와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 폴리펩타이드를 발현한다. 관련 실시형태들에서, 백시니아 바이러스는 카르복시 말단 4개 아미노산의 결실을 포함하는 카르복실에스테라제 2를 발현하여 카르복실에스테라제가 분비된다.

[0045] 몇몇의 바람직한 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함한다. 몇몇의 실시형태들에서, C-말단 보유 서열은 HTEL(서열번호 1)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 C-말단 보유 서열을 포함하지 않는다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 CES2, 바람직하게는 사람 CES2(hCES2)이다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 카르복실에스테라제 효소는 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, psFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된(LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다.

[0046] **B. 사이토카인**

[0047] 소정의 실시형태들에서, 본 개시의 조성물, 조합물 및 방법에서 사용하기 위한 종양용해성 바이러스는 사이토카인을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0048] 사이토카인 및 케모카인은 강한 항종양 효과를 가질 수 있다(Vicari et al., 2002; Homey et al., 2002). 이들 효과는 종양 세포 자체에 대해 직접적으로 이루어질 수 있거나, 이들 효과는 비-암성 세포에 대한 효과를 통해 간접적일 수 있다. 후자의 예는 TNF이고, 이는 종양-관련 혈관에 독성을 야기함으로써 항종양 효과를 가질 수 있고; 이는 종양에의 혈류 손실, 이어서 종양 괴사를 유도한다. 또한, 사이토카인 및 케모카인은 호중구, 호산구, 대식세포 및/또는 림프구와 같은 면역 이펙터 세포를 동원하도록(그리고 몇몇의 경우에는 활성화시키도록) 작용할 수 있다. 이들 면역 이펙터 세포는 다수의 메커니즘에 의한 종양 파괴를 야기할 수 있다. 이들 메커니즘은 항종양 사이토카인의 발현, fas-리간드의 발현, 퍼포린 및 그랜자임의 발현, 자연 살해(NK) 세포의 동원 등을 포함한다. 염증성 반응은 궁극적으로 전신 종양-특이적 면역성을 유도시킬 수 있다. 최종적으로, 이들 사이토카인 또는 케모카인의 다수는 화학 치료요법 또는 방사선 치료요법과 병용 작용하여 종양을 파괴할 수 있다.

[0049] 이들 면역자극성 단백질의 재조합체 버전의 임상학적으로 유효한 전신 투여는 (1) 전신 투여시 심각한 독성 유도로 인하여 그리고 (2) 국소 침윤 및 항종양 효과를 자극하기 위해 종양 조직 내의 국소 발현이 필요하기 때문에 실현가능하지 않다. 전신성 순환에서 수준을 최소화하면서 종양 덩어리 내의 이들 분자의 높은 국소 농도를 달성하기 위한 접근법이 필요하다. 바이러스는 이들의 효능을 향상시키기 위해 사이토카인 또는 케모카인 유전자를 발현하도록 조작될 수 있다. 복제-선택성 벡터로부터의 이들 유전자의 발현은 비-복제 벡터로부터의 발현

에 비해 잠재적인 이점을 갖는다. 복제 바이러스로부터의 발현은 중앙 덩어리 내에서 보다 높은 국소 농도를 초래할 수 있고; 또한 복제 바이러스는 중앙 세포 파괴/중앙용해 및 전염증성(proinflammatory) 환경에서의 중앙 항원의 방출을 통해 항중앙 면역을 유도하는 것을 도울 수 있다.

[0050] 몇몇의 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1(바람직하게는 사람), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, CCL3, CCL5, 및 CXCR4로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 소정 실시형태들에서, 상기 사이토카인은 인터페론-베타-1, 바람직하게는 사람이다. I형 인터페론인 사람 인터페론 베타는 바이러스 감염 또는 이중-가닥의 RNA에 의 노출에 대한 반응으로 섬유아세포에 의해 분비되는 166개 아미노산 당화된 단백질이다. 인터페론 베타는 인터페론-알파 수용체 1(IFNAR1)과 인터페론-알파 수용체 2(IFNAR2)인 2개의 쇠로 이루어진 수용체를 통해 신호를 전달한다. 수용체에의 결합시, IFN β 는 STAT1 및 STAT2의 인산화를 유도하는 JAK/STAT 경로를 활성화시킨다. STAT 단백질은 후속적으로 이량체화되고, 인터페론 조절 인자 3(IRF3)과 회합하고, 세포 핵 내의 인터페론 반응 요소들에 결합한다. 이들 요소들은 인터페론 반응 유전자를 자극하여 인터페론 베타의 다운스트림(downstream) 효과를 유도한다. 인터페론 베타는 항-바이러스 및 항증식 활성을 갖고 소정 유형의 중앙의 화학 치료요법 및 다발성 경화증 치료에 사용되어 왔다. 본원에 기술된 중앙용해성 백시니아 바이러스에 의한 IFN-베타-1의 발현은 항암 면역 반응을 자극하고 암 선택성을 향상시킨다.

[0051] 몇몇의 실시형태들에서, 사이토카인은 후기-초기 VACV p7.5 프로모터, 백시니아 변형된 H5(mH5) 프로모터, 백시니아 짧은 합성 초기-후기 pS 프로모터, pC11R 프로모터, pF11L 프로모터, pSFJ1-10 합성 초기 프로모터, pHyb 합성 초기 프로모터, 임의의 천연 백시니아 초기 프로모터, 및 후기-초기 최적화된(LEO) 프로모터의 제어 하에 발현된다. 특정 예시의 실시형태들

[0052] 특히 바람직한 실시형태에서, 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스는 SJ-815이다. SJ-815는 웨스턴 리저브 백시니아 모 스트레인 WR A34R K151E로부터 유도된 약독화된(attenuated) 형질전환 중앙용해성 백시니아 바이러스이다. WR A34R K151E는 EEV 생산을 향상시키기 위한 K151E 돌연변이를 갖는 A34R 유전자를 함유한다(Blasco 1993). SJ-815는 사람 CES2 및 사람 IFN베타1에 대한 유전자를 (각각 합성 초기-후기 및 p7.5 초기-후기 프로모터의 제어 하에) 모 바이러스의 티미딘 키나제(TK) 유전자에 삽입함으로써 유도되었고, 이에 의해 TK 유전자를 비활성이 되게 하였다. TK 유전자의 불활성화는 백시니아 바이러스의 병독성(virulence)을 감소시키고 중앙 특이적 복제를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0053] 다른 바람직한 실시형태에서, 중앙용해성 백시니아 바이러스는 야생형(WT) A34R 유전자를 갖는 웨스턴 리저브 백시니아 모 스트레인으로 부터 유도된 약독화된 형질전환 중앙용해성 백시니아 바이러스이다. 이러한 스트레인은 사람 CES2 및 사람 IFN베타1에 대한 유전자를 (각각 합성 초기-후기 및 p7.5 초기-후기 프로모터의 제어 하에) 모 바이러스의 티미딘 키나제(TK) 유전자에 삽입함으로써 유도되었고, 이에 의해 TK 유전자를 비활성이 되게 하였다. TK 유전자의 불활성화는 백시니아 바이러스의 병독성을 감소시키고 중앙 특이적 복제를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0054] 마우스 모델에서 사용하기 위한 특히 바람직한 실시형태에서, 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스는 mSJ-815이다. mSJ-815는 웨스턴 리저브 백시니아 모 스트레인 WR A34R K151E로부터 유도된 약독화된 형질전환 중앙용해성 백시니아 바이러스이다. WR A34R K151E는 EEV 생산을 향상시키기 위한 K151E 돌연변이를 갖는 A34R 유전자를 함유한다(Blasco 1993). SJ-815는 모 바이러스의 티미딘 키나제(TK) 유전자에 사람 CES2 및 마우스 IFN베타1에 대한 유전자를 (각각 합성 초기-후기 및 p7.5 초기-후기 프로모터의 제어 하에) 삽입함으로써 유도되었고, 이에 의해 TK 유전자를 비활성이 되게 하였다. TK 유전자의 불활성화는 백시니아 바이러스의 병독성을 감소시키고 중앙 특이적 복제를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0055] **II. 개시된 조성물을 사용하는 방법**

[0056] 본 개시에 따른 중앙용해성 백시니아 바이러스는 국소적으로, 국부적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 개시에 따른 중앙용해성 백시니아 바이러스는 이들에 한정되는 것은 아니지만 혈관내로(동맥내로 또는 정맥내로), 중앙내로, 근육내로, 피부내로, 복강내로, 피하로, 경구로, 비경구로, 비강내로, 기관내로, 경피로, 척수내로, 안구로 또는 두개내로 투여될 수 있다. 바람직하게, 상기 백시니아 바이러스는 혈관내로 그리고/또는 중앙내로 투여된다. 중앙내 투여는 일반적으로 중앙 덩어리 또는 중앙 관련 혈관구조로의 주사를 수반한다. 소정 양상들에서, 상기 중앙은 바이러스 투여 전에 또는 투여 동안에 영상화된다.

[0057] 본 개시에 따른 중앙용해성 백시니아 바이러스는 단일 투여 또는 다중 투여로 투여될 수 있다. 상기 바이러스

는 1×10^5 플라크 형성 단위(PFU), 5×10^5 PFU, 적어도 1×10^6 PFU, 5×10^6 또는 약 5×10^6 PFU, 1×10^7 , 적어도 1×10^7 PFU, 1×10^8 또는 약 1×10^8 PFU, 적어도 1×10^8 PFU, 약 또는 적어도 5×10^8 PFU, 1×10^9 또는 적어도 1×10^9 PFU, 5×10^9 또는 적어도 5×10^9 PFU, 1×10^{10} PFU 또는 적어도 1×10^{10} PFU, 5×10^{10} 또는 적어도 5×10^{10} PFU, 1×10^{11} 또는 적어도 1×10^{11} , 1×10^{12} 또는 적어도 1×10^{12} , 1×10^{13} 또는 적어도 1×10^{13} 의 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 바이러스는 약 10^7 내지 10^{13} pfu, 약 10^8 내지 10^{13} pfu, 약 10^9 내지 10^{12} pfu 또는 약 10^8 내지 10^{12} pfu의 용량으로 투여될 수 있다. 바람직하게, 상기 바이러스는 10^7 내지 10^{10} pfu의 용량으로 투여된다.

[0058] 바이러스의 단일 용량은 이들 사이의 모든 값을 포함하는 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 또는 24시간에 걸쳐 대상체 또는 종양에 투여되는 양을 나타내는 것으로 고려된다. 용량은 시간에 걸쳐 또는 별도의 주사에 의해 확산될 수 있다. 전형적으로, 다중 용량은 동일한 일반적 표적 영역에, 예를 들면, 종양 부근에 또는 정맥내 투여의 경우에는 대상체의 혈류 또는 림프계의 특정 진입점에 투여된다. 소정 양상들에서, 바이러스 용량은 단일 바늘에 다중 포트(port)를 제공하는 바늘 또는 시린지에 결합된 다중 프롱(prong), 또는 이들의 조합물을 포함하는 주사 장치에 의해 전달된다. 단일 용량의 백시니아 바이러스를 투여할 수 있거나, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12주 또는 그 이상을 포함할 수 있는 치료 기간에 걸쳐 다중 용량을 투여할 수 있다. 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 또는 그 이상의 기간 동안 격일로, 매주, 격주마다, 매 3주마다 백시니아 바이러스를 투여할 수 있다.

[0059] 백시니아 바이러스는 문헌[Ausubel et al., 1994]에 얼 및 모스(Earl and Moss)에 의해 기술된 방법 또는 WIPO 공보 제WO2013/022764호에 기술된 방법을 이용하여 증식될 수 있고, 상기 문헌 둘 다는 백시니아 바이러스의 증식 방법에 관해서는 본원에 인용에 의해 포함되어 있지만, 문헌 내의 임의의 정의된 용어들은 포함되어 있지 않다.

[0060] **III. 암 공동-약물**

[0061] 종양용해성 백시니아 바이러스와의 조합물로 유용한 암 공동-약물은 토포이소머라제 I 및 II의 억제제를 포함한다. 토포이소머라제 억제제에 대한 언급은 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 토포이소머라제 억제제가 적어도 하나의 염기성 그룹을 갖는 경우, 이는 산 부가염을 형성할 수 있다. 산 그룹을 갖는 토포이소머라제 억제제는 또한 염기와의 염을 형성할 수 있다. 토포이소머라제 억제제 및 이들의 염은 또한 수화물의 형태로 사용될 수 있거나, 예를 들면, 결정화를 위해 사용되는 다른 용매들을 포함할 수 있다.

[0062] 토포이소머라제 I 억제제로는 이리노테칸 및 토포테칸과 같은 캄프토테신 및 이의 유도체, 라멜라린 D(3,11-디하이드록시-14-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-2,12-디메톡시-6H-크로메노[4',3':4,5]피롤로[2,1-a]이소퀴놀린-6-온)과 같은 해양 알칼로이드(marine alkaloid) 및 인도테칸(LMP400 또는 2,3-디메톡시-6-(3-모르폴리노프로필)-5H-[1,3]디옥솔로[4',5':5,6]인덴노[1,2-c]이소퀴놀린-5,12(6H)-디온이라고도 칭함), 인디미테칸(LMP776 또는 6-(3-(1H-이미다졸-1-일)프로필)-2,3-디메톡시-6,6a-디하이드로-5H-[1,3]디옥솔로[4',5':5,6]인덴노[1,2-c]이소퀴놀린-5,12(12aH)-디온이라고도 칭함) 및 NSC-706744와 같은 이데노이소퀴놀린 유사체가 포함된다.

[0063] 토포이소머라제 II 억제제로는 에토포시드(VP-16이라고도 칭함), 테니포시드, 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 암사크린, 엘립티신, 아우린트리카르복실산, HU-331 및 ICRF-193, ICRF-187, 및 메르바론이 포함된다. 에토포시드 포스페이트는 사람에게 약 25 내지 115mg/m²의 다양한 용량 범위로 투여될 수 있다. 테니포시드는 사람에게 2주마다 약 75 내지 150mg/m²의 용량 범위로 투여될 수 있다. 독소루비신은 사람에게 10 내지 100mg/m²의 용량 범위로 투여될 수 있다. 에피루비신은 사람에게 3 내지 4주마다 약 10 내지 200mg/m², 예를 들면, 100mg/m²의 용량 범위로 i.v. 투여될 수 있다. 이다루비신은 사람에게 약 0.5 내지 50mg/m²의 용량으로 투여될 수 있다.

[0064] 캄프토테신 유도체는 조합물로 사용하기에 바람직한 토포이소머라제 억제제이다. 캄프토테신 유도체는 토포이소머라제 I를 억제하는 항암제이다. 이들 화합물은 일반적으로 주사에 의해, 보다 구체적으로는 멸균 용액 또는 에멀전의 형태로 정맥내 투여되지만; 이들은 또한 고체 또는 액체 제형으로 경구 투여될 수 있다. 본 개시에 유용한 대표적인 캄프토테신 유도체로는 이리노테칸, 토포테칸(하이캄틴(Hycamtin) 또는 S)-10-[(디메틸아미

노)메틸]-4-에틸-4,9-디하이드록시-1H-피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14(4H,12H)-디온모노하이드로클로라이드라고도 칭함), DB-67(AR67 또는 7-t-부틸디메틸실릴-10-하이드록시캄프토테신이라고도 칭함), BNP-1350(7-[(2-트리메틸실릴)에틸]-20(S)-캄프토테신), 엑사테칸((1S,9S)-1-아미노-9-에틸-5-플루오로-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-9-하이드록시-4-메틸-10H,13H-벤조(데)피라노(3',4':6,7)인돌리지노(1,2-b)퀴놀린-10,13-디온), 루르토테칸(GI147211 또는 7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신 디하이드로클로라이드라고도 칭함), ST-1481(7-t-부톡시이미노메틸캄프토테신), 및 CKD-602((20S)-7-(2-이소프로필아미노)-에틸캄프토테신)이 포함된다. 토포테칸은 사람에게 약 1 내지 5mg/m²의 용량 범위로, 예를 들면, 1.5mg/m²로 정맥내 주입에 의해 연이은 5일 동안 매일 30분에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0065] 이리노테칸(CPT-11, 캄토사(Camptosar), 또는 (S)-4,11-디에틸-3,4,12,14-테트라하이드로-4-하이드록시-3,14-디옥소1H-피라노[3',4':6,7]-인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-9-일-[1,4'비피페리딘]-1'-카르복실레이트라고도 공지되어 있음)은 특히 바람직한 캄프토테신 유도체이다. 이리노테칸은 카르복실에스테라제 효소에 의해 SN-38(7-에틸-10-하이드록시-캄프토테신)로서 공지되어 있는 활성 약물로 전환되는 프로드럭이다(Satoh T. et al., Biol. Pharm. Bull., 17:662-664 (1994)). 이는 토포이소머라제 I-DNA 복합체에 결합함으로써 DNA 가닥의 재-라이게이션을 방지함으로써 작용하고, 이중-가닥 DNA 파손(breakage) 및 세포 사멸을 야기한다. 이리노테칸은 단독으로 또는 5-플루오로우라실(5-FU) 및 옥살리플라틴과 같은 다른 제제와 병용하여 암의 치료에 특히 효과적인 것으로 입증되었다. 이리노테칸은 실제로 이전 5-FU 치료 실패 후 전이성 암에서의 표준 치료이다. 이런 양상에서, 이리노테칸은 이전에 화학 치료요법을 받지 않은 전이성 암을 갖는 환자에서 적어도 표준 5-FU/폴린산(FA)만큼 활성인 것으로 밝혀졌다. 결장암 이외에도, 난소암, 폐암, 위암, 식도암 및 자궁경부암에서 활성이 관찰되었다.

[0066] (바람직하게는 하이드로클로라이드염으로서의) 이리노테칸은 중앙용해성 백시니아 바이러스에 의한 카르복실에스테라제의 발현을 고려하여 당해 분야에 공지되어 있는 치료 프로토콜에 따라 투여될 수 있고, 이는 중앙 환경에서의 국소 농도를 증가시킬 것이다. 예를 들면, 암의 치료시 단일 제제로서 사용되는 경우, 이리노테칸은 일반적으로 350mg/m²의 시작 용량(이는 환자의 내성에 따라 50mg/m² 감소분(decrement)으로 200mg/m² 만큼 낮게 조정될 수 있다)으로 3주마다 90분에 걸쳐 정맥내로 투여되거나, 또는 대안으로 125mg/m²의 시작 용량(이는 환자가 임상학적 이점을 계속해서 경험하는 한 환자의 내성에 따라 25 내지 50mg/m² 감소분으로 150mg/m² 만큼 높게 또는 50mg/m² 만큼 낮게 조정될 수 있다)으로 매주 1회 90분에 걸쳐 정맥내로 투여된다. 5-FU 및 FA와 병용하여 사용하는 경우, 이리노테칸은 일반적으로 4회 투약의 경우 매주 1회 90분에 걸쳐 125mg/m²로 정맥내로 투여되거나 또는 3회 투약의 경우 격주마다 90분에 걸쳐 180mg/m²의 용량으로 정맥내로 투여된다. 따라서, 본 개시에 따르면, 이리노테칸은 50 내지 350mg/m²의 용량 범위로, 예를 들면, 125mg/m²의 용량으로 매주 1회 90분의 연속 주입으로 또는 180mg/m²의 용량으로 격주마다 90분의 연속 주입으로 투여될 수 있다. 이리노테칸 투약은 임상학적 이점을 경험하는 한 계속할 수 있다.

[0067] 토포이소머라제 억제제 이외에도, 파클리탁셀-2-에틸카보네이트(이는 파클리탁셀로 전환된다), 카페시타빈(이는 5'-데옥시-5-플루오로시티딘(5-FU)으로 전환된다), 및 일반적으로 기존의 화학치료제의 임의의 3차 아미도메틸 에스테르 프로드럭(이는 이들의 카르복실산 또는 아민 형태로 전환된다)을 포함하는, 카르복실에스테라제에 의해 활성화되는 다른 항암제도 사용될 수 있다. 투약은 중앙용해성 백시니아에 의한 카르복실에스테라제의 발현을 고려하여 이들 다른 항암제에 적합하게 적용될 수 있고, 이는 중앙 환경에서 국소 농도를 증가시킬 것이다.

[0068] **IV. 치료 요법 및 조합물의 약제학적 제형**

[0069] 본 개시의 몇몇 양상은 카르복실에스테라제 효소 및 사이토카인을 발현하고 바람직하게는 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성 중앙용해성 백시니아 바이러스의 유효량을 포유동물에 투여함으로써 포유동물에서의 암을 치료하기 위한 방법으로서, 이상적으로는 암 공동-약물과 함께 사용하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시의 몇몇의 양상들은 (a) 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 바람직하게는 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성 중앙용해성 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물 및 (b) 암 공동-약물을 함유하는 조합물의 유효량을 투여함으로써 포유동물에서의 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0070] 상기 중앙용해성 백시니아 바이러스 및 상기 암 공동-약물은 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여될 수 있다. 동시 투여는 예를 들면, 이들 제제를 포함하는 하나의 고정된 조합물의 형태로 또는 각각의 제제를 독립적인 제형으로 동시에 투여함으로써 발생할 수 있다. 순차적 사용(투여)은 바람직하게는 중앙용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 상이한 시점에서, 즉, 시간차를 둔 방식으로 투여됨을 의미하며, 바람직하게는 그 결과 중앙용해성 백시니아 바이러스 및 암-공동 약물이 독립적으로 투여되는 경우보다 조합물이 더 효과적이다. 별

도의 사용(투여)은 바람직하게는 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 상이한 시점에서 서로 독립적으로 투여됨을 의미한다. 따라서, 본 개시는 동시 또는 교대 치료의 이러한 용법을 모두 포함하는 것으로 이해되어야만 하고, 용어 "투여하는"은 이에 따라 해석되어야 한다.

[0071] 종양용해성 바이러스 및 암 공동-약물이 동시에 투여되지 않는 경우, 종양용해성 바이러스 및 암 공동-약물의 투여 순서는 다양할 수 있다. 따라서, 종양용해성 바이러스가 우선 투여되고, 이어서 암 공동-약물이 투여될 수 있거나, 또는 암 공동-약물이 우선 투여되고, 이어서 종양용해성 바이러스가 투여될 수 있다. 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 동시에 투여되지 않는 실시형태들에서, 각각의 제제는 바람직하게는 세포에 대해 유리한 병용 효과가 획득되도록 투여된다. 이러한 예에서, 상기 제제들은 서로 동일한 일반적 시간 프레임 내에 투여되고 바람직하게는 2주 내에, 보다 바람직하게는 1주 내에 투여됨이 고려된다. 몇몇의 상황들에서, 치료를 위한 시간을 유의하게 연장하여, 각각의 투여 사이에 수일(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 경과하는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 조합물에서, 종양용해성 바이러스 및 암 공동-약물의 순차적 투여는 종양용해성 바이러스의 1회 이상의 용량을 우선 투여하고, 이어서 바람직하게는 각각의 제제의 투여 사이에 14일 이하(예를 들면, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0일)의 개재(intervening) 기간으로 암 공동-약물의 1회 이상의 용량을 투여함을 포함한다. "개재 기간"은 종양용해성 바이러스의 최종 투약으로부터 시작하여 암 공동-약물의 첫 번째 투약의 시작까지의 기간을 의미한다. 개재 기간이 0일인 실시형태들에서는 암 공동-약물이 종양용해성 바이러스의 최종 투약 직후에 투여된다.

[0072] 특히 바람직한 순차적 치료 프로토콜은 암 공동-약물의 격주 간격 투여와 시간차를 둔 종양용해성 바이러스의 매주 투여를 포함하고, 여기서 종양용해성 바이러스는 1일 내지 3일의 개재 기간으로 우선 투여된다. 예를 들면, 암 공동-약물의 격주 투여는 종양용해성 바이러스의 두 번째 매주 투여 후 1 내지 3일째에 시작될 수 있다:

[0073] 종양용해성 바이러스(1, 8, 15, 22, 29일 ...)

[0074] 암 공동-약물(9, 23, 37, 51, 65일 ...).

[0075] 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물의 투여는 치료의 독성(존재하는 경우)을 고려하여 각각의 특정 치료요법의 투여에 대한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 필요에 따라 치료 주기가 반복될 것으로 예상된다. 또한, 각종 표준 치료요법 및 외과적 개입이 본 개시의 치료요법에 추가로 적용될 수 있음이 또한 고려된다.

[0076] 치료 요법은 다양할 수 있고 종종 종양 유형, 종양 위치, 질환 진행 및 환자의 건강과 연령에 따라 다를 수 있다. 소정 유형의 종양은 보다 적극적인 치료가 요구될 것이고, 반면 소정 환자들은 더 많은 과용 프로토콜을 견딜 수 없다. 임상적은 치료학적 제형의 알려진 효능 및 독성(존재하는 경우)에 기초하여 이러한 결정을 내리는데 가장 적합할 것이다.

[0077] 소정 실시형태들에서, 치료되는 종양은 적어도 초기에는 절제가능하지 않을 수 있다. 본 개시의 병용 요법을 사용한 치료는 가장자리에서의 수축으로 인하여 또는 소정의 특히 침윤성인 부분의 제거에 의해 종양의 절제가능성을 증가시킬 수 있다. 치료 후 절제가 가능해질 수 있다. 절제술 후 추가의 치료는 종양 부위에서 미시적인(microscopic) 잔류 질환을 제거하는 작용을 할 것이다.

[0078] 하나 이상의 구성성분 사이의 상승작용적 상호작용을 결정할 때, 효과에 대한 최적 범위 및 효과에 대한 각각의 성분의 절대 용량 범위는 상이한 w/w 비율 범위 및 치료를 필요로 하는 환자에 대한 용량을 통해 구성성분을 투여함으로써 결정적으로 측정될 수 있다. 사람의 경우, 환자에 대한 임상 연구를 수행하는 복잡성 및 비용은 이러한 형태의 시험을 상승작용을 위한 기본 모델로서 사용하는 것을 비현실적으로 만든다. 그러나, 하나의 종에서의 상승작용의 관찰은 다른 종에서의 효과를 예측할 수 있고, 상승작용적 효과를 측정하기 위해 본원에 기술된 바와 같은 동물 모델이 존재하고, 이러한 연구의 결과는 또한 유효 용량 및 혈장 농도 비율 범위 및 약동학적/약력학적 방법의 적용에 의해 다른 종들에서 요구되는 절대 용량 및 혈장 농도를 예측하는데 사용될 수 있다. 종양 모델과 사람에서 보여지는 효과 사이의 확립된 상관관계는 동물에서의 상승작용이 예를 들면, 하기 실시예에 기술된 바와 같이 사람 이종이식 종양 모델에서 입증될 수 있음을 시사한다.

[0079] 소정 양상들에서, 상기 조합물은 포유동물에서의 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 폐암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 신장암, 고환암, 직장암, 유방암, 및 췌장암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 암을 치료하는데 사용된다. 몇몇의 실시형태들에서, 상기 조합물은 결장직장암, 폐암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 자궁경부암 및 간암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 암을 치료하는데 사용된다.

[0080] 상기 방법은 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물의 치료학적 유효량을 투여함을 포함한다. 치료학적 유효량은 종양용해 - 암 세포의 파괴 또는 용해를 유도하기에 충분한 양으로서 정의된다. 바람직하게, 종양

용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물은 상승작용적 유효량으로 투여된다. 해당 용어는 종양의 성장 또는 크기의 감속, 억제 또는 감소를 포함하고, 소정 경우에 종양의 근절을 포함한다. 소정 양상들에서, 유효량의 백시니아 바이러스는 종양으로의 치료학적 바이러스의 전신적 파종, 예를 들면, 주사되지 않은 종양의 감염을 초래한다.

V. 색전증제

본 개시의 몇몇 양상들은 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 바람직하게는 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성 종양용해성 백시니아 바이러스, 및 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 함유하는 조성물을 포유동물의 혈관구조에 도입함으로써 포유동물에서의 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 몇몇의 실시형태들에서, 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물의 조합물을 혈관구조 내로 도입한다. 본 개시의 몇몇의 양상들은 (a) 사이토카인 및 카르복실에스테라제 효소를 발현하고 바람직하게는 활성 티미딘 키나제를 발현하지 않는 합성 종양용해성 백시니아 바이러스, 및 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체를 함유하는 조성물을 포유동물의 혈관구조에 도입함으로써 투여하고, (b) 포유동물에게 암 공동-약물의 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 포유동물에서의 암을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기와 같이, 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물은 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여될 수 있다. 동시 투여는 예를 들면, 이들 제제를 포함하는 하나의 고정된 조합물의 형태로 또는 각각의 제제를 독립적인 제형으로 동시에 투여함으로써 발생할 수 있다. 순차적 사용(투여)은 바람직하게는 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 상이한 시점에서, 즉, 시간차를 둔 방식으로 투여됨을 의미하며, 바람직하게는 그 결과 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암-공동 약물이 독립적으로 투여되는 경우보다 조합물이 더 효과적이다. 별도의 사용(투여)은 바람직하게는 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 상이한 시점에서 서로 독립적으로 투여됨을 의미하고, 이는 바람직하게는 종양용해성 백시니아 바이러스 및 암 공동-약물이 투여되어 상기 제제들 둘 다의 측정가능한 혈액 수준의 중복이 중복 방식으로(동시에) 존재하지 않게 됨을 의미한다. 독립적으로 투여되는 경우, 하나 또는 둘 다는 이에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체로 활성 색전형성을 통해 투여될 수 있다. 따라서, 본 개시는 동시 또는 교대 치료의 이러한 요법을 모두 포함하는 것으로 이해되어야 하고, 용어 "투여"는 이에 따라 해석되어야 한다.

다수의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체가 본 개시의 조성물, 조합물 및 방법에서 사용될 수 있다. 한 바람직한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분 미세입자, 폴리비닐 알콜 미세입자, 젤라틴 폼 미세입자 및 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔 미세입자로부터 선택된다.

생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체("색전증제")는 일시적 또는 영구적일 수 있다. 예시적인 임시 색전증제로는 겔 폼, 콜라겐 및 트롬빈이 포함된다. 예시의 영구적인 색전증제로는 폴리비닐 알콜 입자(PVA) 및 엠보스피어(embosphere)와 같은 입자, 푸시가능한, 주사가능한, 탈착가능한, 기계적, 전해질 및 가수분해성 코일과 같은 코일, 글루, 오닉스, 알콜 및 ALGEL™(하이드로겔, 알기네이트로부터 유도된 당-계 중합체)과 같은 액체, 및 앰플라쳐 플러그(amplatzer plug), 지안투르코-그리프카(Gianturco-Grifka) 혈관 폐색 장치(GGVOD) 및 탈착가능한 벌룬(balloon)을 포함하는 다른 제제들이 포함된다. 색전형성되는 혈관의 크기, 색전형성 후 원하는 길이의 혈관 폐색, 그리고 색전형성된 조직이 폐색 후에 생존해야만 하는지의 여부에 따라 상이한 색전증제가 사용될 수 있다. 색전형성의 광범위한 사용이 주어지면, 숙련된 개제적 방사선 전문의는 원하는 색전형성을 달성하기 위해 적절한 유형의 제제, 제제의 크기 범위 등을 선택하는데 어려움이 없을 것이다. 혈관 폐색은 외상성 부상 및 출혈과 같은 임상학적 시나리오에서 유용하거나, 반복적인 색전형성 절차가 요구되는 경우, 본 명세서에 개시된 종양용해성 바이러스에 의한 종양 색전형성에서와 같이 바람직할 수 있다.

한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 젤라틴 폼 미세입자이다. 예시의 젤라틴 폼으로는 Alicon/Scion Medical Technologies에 의해 생산된 겔폼(Gelfoam)이 포함된다. 겔폼은 정제된 피부 젤라틴으로 이루어진 생물학적 물질이고, 멸균 시트로 또는 분말로서 제형화된다. 겔폼은 30년 이상 동안 색전형성 적용에 사용되어 왔고, 저가의 다용도의 색전증제이다. 겔폼은 기계적 장애를 야기함으로써 혈류를 서행시킨다. 겔폼 분말은 150 내지 1000µm 크기의 미립자들로 구성되어 있고, 수분 흡수시 더 큰 집합체 입자를 형성하기 위해 응집될 수 있다. 겔폼 시트는 다수의 상이한 크기와 형상으로 절단될 수 있고, 원하는 적용에 따라 주사시 다른 수성 제제와 함께 제형화될 수 있다. 조영제와 겔폼 스폰지 둘 다를 포함하는 겔폼 슬러리(slurry)는 근위부 색전형성된 혈관의 "캐스트(cast)"를 형성하는데 사용될 수 있고, 겔폼 어뢰(torpedo) 또는 큐브는 더 큰 혈관에 사용될 수 있다. 겔폼은 혈류를 서행시키고, 혈전 형성을 증가시키고, 응혈을 위한 스캐폴드로서 기능함으로써 혈관을 일시적으로 폐색시킨다.

[0086] 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 분해성 전분 미세입자이다. 예시의 분해성 전분 미세입자(DSM)는 Pharmaceut에 의해 생산된 EMBOCEPTS 입자 및 Mangle Life Sciences에 의해 생산된 SPHEREX 입자이다. EMBOCEPTS 입자(활성 물질로서의 Amilomer)는 가수분해된 감자 전분으로 이루어진 가교-링 크된 입자이다. 이들 입자는 대략 35분의 반감기를 갖고 분해성이므로 일시적 색전형성에 적합하다. SPHEREX 입자는 DSM-S 미세입자로 이루어지고, 멸균시키고, 염수에 현탁시킨다. 전분 미세입자는 중합체 용액의 외부 페이즈에 전분 액 적의 에멀전을 형성하고, 전분 액적을 겔로 전환시키고, 전분 입자를 건조시킴으로써 분자량이 감소된 정제된 아밀로펙틴-기반 전분의 수용액으로부터 제조될 수 있다. 방출-제어 셸(shell)은 또한 임의로 입자에도 적용된다. 생분해성 미세입자는 비경구 투여 후, 체내에 용해되어 궁극적으로는 예를 들면 글루코스와 같은 내인성 물질을 형성한다. 생분해성(biodegradability)은 시험관내에서 적합한 효소, 예를 들면, 알파-아밀라제와 함께 인큐베이션함을 통해 측정되거나 조사될 수 있다. 생분해성은 또한 미세입자의 비경구 주사(예를 들면, 피하 또는 근육내) 및 시간의 함수로서 조직의 조직학적 검사를 통해 조사할 수 있다. 생분해성 전분 미세입자는 보통 수주 내에 그리고 일반적으로는 1주 내에 조직으로부터 사라진다. 전분 미세입자가 예를 들면 코팅된 방출-제어 셸로 코팅되는 경우에, 생분해율을 결정하는 것은 일반적으로 이러한 셸이고, 이어서, 결국 알파-아밀라제가 전분 매트릭스에 이용가능해질 때를 결정한다.

[0087] 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 폴리비닐 알콜(PVA) 미세입자이다. 예시의 폴리비닐 알콜 미세입자는 Boston Scientific Corporation(Natick, MA)에 의해 생산된다. PVA 입자는 진공 건조되어 입자 내로 스크래핑된 PVA 폼 시트로 이루어진다. 입자는 체로 여과되어, 100 μ m 내지 1100 μ m 범위의 크기로 이용가능하다. 폴리비닐 알콜 입자는 크기 및 형태가 불규칙하고, 이는 응집을 촉진시킨다. 현탁 후, PVA 입자는 직사각형, 타원형, 불규칙하고, 날카롭고, 현탁 후 작은 단편으로 각질(angulated) 수 있다. 폴리비닐 알콜 입자는 혈관 벽에 부착함으로써 그리고 이들 입자가 통과하는 가장 작은 혈관을 차단함으로써 영구적인 폐색을 전달한다. PVA 폐색은 염증 반응, 국소 혈관 괴사 및 후속 혈관 섬유증을 초래한다.

[0088] 한 실시형태에서 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔 미세입자이다. 예시의 설폰화된 폴리비닐 알콜 하이드로겔 미세입자는 Biocompatibles(UK, Surrey, UK)에 의해 생산된 DC-비드이다. DC 비드는 설폰네이트 그룹을 이용하여 변형된 폴리비닐 알콜 하이드로겔에 기초한 색전성 미세입자 제품이다. DC 비드는 독소루비신 HCl과 같은 이들의 염 형태의 안트라사이클린 화합물을 상기 용액으로부터 적극적으로 격리시키고 이를 제어되고 지속적인 방식으로 방출시키는 능력을 가진다. 약물은 색전형성 직전에 부가될 수 있고, 이는 약물과 장치가 동시에 전달되어 약물의 지속적인 국소 전달을 초래하는 1-단계 절차를 가능하게 한다.

[0089] 상기 언급된 바와 같이, 당해 분야 숙련가는 다른 인자들 중에서 종양 혈관구조의 크기 및 원하는 색전형성의 성질에 기초하여 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체의 적절한 크기를 용이하게 선택할 수 있다. 한 바람직한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 100 μ m 내지 2000 μ m 크기이다. 한 바람직한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 150 내지 350 μ m 크기이다. 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 150 내지 200 μ m 크기이다. 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 200 내지 250 μ m 크기이다. 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 250 내지 300 μ m 크기이다. 한 실시형태에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 300 내지 350 μ m 크기이다.

[0090] 소정 실시형태들에서, 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 균일한 크기이다. 이는 각각의 입자들 사이의 직경의 차이가 약 0 μ m 내지 약 100 μ m, 약 0 μ m 내지 약 50 μ m, 또는 약 0 μ m 내지 약 25 μ m임을 의미한다. 몇몇의 실시형태들에서, 미세입자는 100 μ m 이하, 약 50 μ m 이하, 약 25 μ m 이하, 약 10 μ m 이하 또는 약 5 μ m 이하의 직경 차이를 갖는다.

[0091] **VI. 색전형성의 방법**

[0092] 한 양상에서, 본 개시는 포유동물의 혈관구조에 본 개시의 종양용해성 바이러스 및 활성 색전형성에 적합한 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔을 임의로 암 공동-약물과 병용하여 도입함으로써 포유동물에서의 혈관 부위의 활성 색전형성 방법을 제공한다.

[0093] 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물의 도입은 전형적으로 종양 부근 또는 주위의 혈관내의 주사에 의해 수행된다. 소정 실시형태들에서, 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물은 카테터(catheter)에 의해 도입된다. 다른 실시형태들에서, 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스

스 및 조성물 및 조합물은 시린지에 부착된 카테터에 의한 주사를 통해 도입된다. 몇몇의 실시형태들에서, 종양 또는 종양의 부분에 직접적으로 공급하는 혈관으로 도입이 이루어진다. 다른 실시형태들에서, 도입은 작용 부위에, 예를 들면, 종양의 근위부 말단의 혈관에 직접적으로 이루어진다. 본 개시에 따른 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 이미 부하된 종양용해성 바이러스(즉, 본 개시의 조성물) 및/또는 암 공동-약물(즉, 본 개시의 조합물)과 함께 도입될 수 있다. 다른 실시형태들에서, 상기 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체는 종양용해성 바이러스와 병용하여 도입되고, 여기서 상기 바이러스는 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체의 도입 전에, 이의 도입과 동시에 또는 이의 도입 후에 도입된다. 도입되는 경우, 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물은 주사에 적합하다. 특정 실시형태들에서, 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물은 멸균이다.

[0094] 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스, 조성물 및 조합물은 카테터 또는 미세카테터를 이용하여 전달될 수 있다. 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물을 전달하는 카테터는 작은 직경의 의학적 카테터일 수 있다. 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물에 컴퍼터블한(compatible) 카테터 재료로는 폴리에틸렌, 플루오로 중합체 및 실리콘이 포함될 수 있다. 일단 카테터가 체자리에 놓이면, 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스, 조성물 또는 조합물은 통상적으로 형광투시 안내법의 도움으로 카테터를 통해 천천히 도입된다. 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물은 중요한 혈관에 직접 도입될 수 있거나, 이들은 표적 혈관의 상류(upstream)에 도입될 수 있다. 색전형성 절차 동안에 도입되는 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체 또는 조성물 또는 조합물의 양은, 색전형성을 야기하기에 충분한 양, 예를 들면 표적 혈관을 통한 혈류를 감소시키거나 중지시키기 위해 충분한 양일 것이다. 전달되는 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물의 양은 예를 들면, 색전형성되는 혈관구조의 전체 크기 또는 면적 및 종양의 크기 및 성질에 따라 다를 수 있다. 색전형성 후, 다른 동맥 조영술(arteriogram)을 수행하여 절차의 완료를 확인할 수 있다. 동맥류는 여전히 색전형성의 근위의 건강한 신체 조직에 어느 정도는 존재할 것이지만, 이환 또는 표적화된 조직으로의 흐름은 차단된다. 또한, 혈관확장제(예를 들면, 아테노신)가 사전에, 동시에 또는 후속적으로 환자에게 투여되어 절차를 용이하게 할 수 있다.

[0095] 의학 또는 색전형성 분야의 숙련가는, 전달 메커니즘을 원하는 혈관성 신체 부위에 유도하고, 상기 부위에 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스, 조성물 또는 조합물의 양을 전달하여 하나 이상의 원하는 혈관의 제한, 폐색, 충전 또는 플러깅(plugging) 및 혈관을 통한 혈류의 감소 또는 중지를 야기함으로써, 본원에 기술된 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물이 각종 색전형성 프로세스에 어떻게 사용될 수 있는지를 이해하고 인식할 것이다. 임의의 특정 색전형성 프로세스에 상기 프로세스를 적용함에 있어서 고려되거나, 제어되거나 또는 조정될 수 있는 인자들로는 본 개시의 선택된 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스, 조성물 및/또는 조합물(예를 들면, 방사선 불투과성 입자 기관의 영상화, 추적 및 검출을 설명하기 위한); 신체 부위에 전달되는 본 개시의 생체적합성 미세입자 또는 친수성 중합체 겔체, 종양용해성 바이러스 및 조성물 및 조합물; 사용된 특정 장비(예를 들면, 카테터) 및 원하는 신체 부위에 카테터의 분배 말단을 위치시키는데 사용되는 방법 및 경로를 포함하는 전달 방법 등이 포함될 수 있다. 이들 인자의 각각은 당해 분야 숙련가에 의해 인식될 것이고, 무수한 색전형성 프로세스에 기술된 방법을 적용하기 위해 쉽게 처리될 수 있다.

[0096] **VII. 추가의 항암 치료제**

[0097] 하나 이상의 추가의 화학치료제는 본 개시의 조성물 및 조합물과 함께 투여될 수 있고, 이들로는 5-플루오로우라실(FU), 폴린산(FA)(또는 류코보린), 메토티렉세이트, 카페시타빈(젤로다(Xeloda); 5-FU의 경구 프로드럭), 옥살리플라틴(엘록사틴(Eloxatin)), 베바시주맙(아바스틴(Avastin)), 세톡시맙(에르비투스(Erbix)) 및 파니투무맙(벡티빅스(Vectivix))가 임의의 조합물이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 이들 제제는 공지의 치료 프로토콜에 따라 투여될 수 있다. 일반적으로, 경구 제형인 카페시타빈을 제외한 추가의 화학치료제는 정맥내로 투여한다.

[0098] 5-FU는 통상적으로 5-FU 활성을 증가시키기 위해 FA와 함께 투여된다. 한 양상에서, 5-FU 및 FA는 본 개시의 조성물 또는 조합물과 함께 투여된다.

- [0099] 관련 양상에서, 5-FU, FA 및 옥살리플라틴은 본 개시의 조성물 또는 조합물과 함께 투여된다. 예를 들면, FOLFOX 치료 프로토콜은 포유동물에게 본 개시의 조성물과 함께 투여될 수 있다. FOLFOX 치료는 5-FU(1일째에 2시간에 걸쳐 400mg/m² IV), FA(1일째에 2시간에 걸쳐 400mg/m² IV) 및 옥살리플라틴(2일 동안 연속적 주입 1200mg/m²/일)을 4회 사이클 동안 2주마다 반복하여 사용한다. 대안으로, FLOX 치료 프로토콜은 본 개시의 조성물(2회 사이클 동안 1, 15 및 29일째의 옥살리플라틴 85mg/m² + 1, 8, 15, 22, 29 및 36일째 FA 500mg/m², 이어서 1, 8, 15, 22, 29 및 39일째에 5-FU 500mg/m²)과 함께 투여될 수 있다.
- [0100] 다른 관련된 양상에서, 카페시타빈 및 옥살리플라틴은 본 개시의 조성물 또는 조합물과 함께 예를 들면, XELOX 치료 요법으로서 투여된다.
- [0101] 다른 관련 양상에서, 임의로 5-FU/FA와 함께 베바시주맙, 세특시맙 또는 파니투무맙과 같은 모노클로날 항체를 본 개시의 조성물 또는 조합물과 투여한다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 표적으로 하고 억제하는 베바시주맙은 전이성 암을 갖는 환자에 대해 승인된 제1선(first-line) 치료이다. 세특시맙 및 파니투무맙은 표피 성장 인자(EGFR)를 표적으로 한다.
- [0102] 다른 양상들에서, 본 개시의 방법은 방사선 치료요법, 호르몬 치료요법, 외과술 및 이들의 병용과 같은 추가의 암 치료요법을 투여함을 추가로 포함한다.
- [0103] 방사선 치료요법으로는 이에 한정되는 것은 아니지만 α -선, X-선 및/또는 중양 세포에의 방사성 동위원소의 지정된 전달이 포함된다. 마이크로파 및 UV-조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 인자도 고려된다. 이들 인자들은 모두 DNA에 대한, DNA의 전구체에 대한, DNA의 복제 및 수리(repair)에 대한 그리고 염색체의 어셈블리 및 유지에 대한 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 가장 높다. X-선에 관한 용량 범위는 장기간(3 내지 4주) 동안 50 내지 200뢴트겐(roentgen)의 1일 용량으로부터 2000 내지 6000뢴트겐의 단일 용량까지의 범위이다. 방사성 동위원소의 용량 범위는 매우 다양하고, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 신생물성 세포의 흡수량에 따라 다르다.
- [0104] 암을 갖는 사람의 대략 60%는 예방학적, 진단학적 또는 병기 결정(staging), 치유적 및 완화적 수술을 포함하는 몇몇 유형의 수술을 경험할 것이다. 치유적 수술은 본 개시의 치료, 화학 치료요법, 방사선 치료요법, 호르몬 치료요법, 유전자 치료요법 및/또는 대안의 치료요법과 같은 다른 치료요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료법이다.
- [0105] 치유적 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거되고/되거나 절개되고/되거나 파괴되는 절제술을 포함한다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 말한다. 종양 절제술 이외에도, 수술에 의한 치료로는 레이저 수술, 냉동 수술(cryosurgery), 전기 수술(electrosurgery) 및 현미경 제어된 수술(모즈(Mohs)의 수술)이 포함된다. 본 개시는 표재성 암, 전암(precancer) 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 관련하여 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.
- [0106] 암성 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부의 절개시, 공동(cavity)이 신체에 형성될 수 있다. 관류, 직접적 주사 또는 추가적인 항암 치료요법을 이용한 부위의 국소적 적용에 의해 치료를 달성할 수 있다. 이러한 치료는 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이들 치료는 또한 다양한 용량으로 이루어질 수 있다.
- [0107] 현재의 방법과 함께 사용하기 위한 다른 형태의 치료요법으로는 환자의 조직이 고온(최대 106° F)에 노출되는 절차인 고열법(hyperthermia)이 포함된다. 외부 또는 내부 가열 장치는 국소, 국부 또는 전신 고열법의 적용에 관여할 수 있다. 국소 고열법은 종양과 같은 작은 면적에 열을 적용하는 것을 포함한다. 열은 신체 외부의 장치로부터의 종양을 표적으로 하는 고주파를 이용하여 외부에서 생성될 수 있다. 내부 열은 온수로 채워진 얇은, 가열된 와이어 또는 중공 튜브, 이식된 마이크로파 안테나 또는 무선 주파수 전극을 포함하는 멸균 프로브를 포함할 수 있다.
- [0108] 환자의 장기 또는 사지는 국부 치료요법을 위해 가열되는데, 이는 자석과 같이 고 에너지를 생성하는 장치를 이용하여 수행된다. 대안으로, 환자의 혈액 중 일부는 내부에서 가열될 영역으로 관류되기 전에 제거되고 가열될 수 있다. 전신 가열은 또한 암이 신체 전체에 걸쳐 퍼진 경우에도 실행될 수 있다. 온수 담요, 핫 왁스(hot wax), 유도성 코일(inductive coil) 및 열 챔버가 이러한 목적으로 사용될 수 있다.
- [0109] 호르몬 치료요법은 또한 본 개시와 관련하여 또는 이전에 기술된 임의의 다른 암 치료요법과 함께 사용될 수 있다. 호르몬의 사용은 테스토스테론 또는 에스트로젠과 같은 소정 호르몬의 영향을 차단하거나 수준을 저하시키

기 위해 유방암, 전립선암, 난소암 또는 자궁경부암과 같은 소정의 암 치료에 사용될 수 있다.

[0110] VIII. 조성물 및 제형

[0111] 암 또는 종양 세포에 종양용해성 백시니아 바이러스를 전달하기 위한 바람직한 방법은 종양내 또는 혈관내 주사를 통한 것이다. 그러나, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 대안으로 U.S. 특허 5,543,158; U.S. 특허 5,641,515 및 U.S. 특허 5,399,363(각각은 구체적으로 그 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다)에 기술된 바와 같이 비경구, 피부내, 근육내, 경피 또는 심지어 복강내 투여될 수 있다.

[0112] 종양용해성 백시니아 바이러스의 주사는 발현 작제물이 주사에 요구되는 특정 바늘의 게이지(gauge)를 통과할 수 있는 한 시린지 또는 용액의 주사에 사용되는 임의의 다른 방법에 의한 것일 수 있다. 용액을 수용하기 위한 앰플 챔버를 한정하는 노즐 및 상기 노즐로부터 용액을 전달 부위로 밀어내기 위한 에너지 장치를 갖는 새로운 무바늘 주사 시스템이 최근에 기술되었다(미국 특허 제5,846,233호). 시린지 시스템은 또한 미리 결정된 양의 용액을 정확히 임의의 깊이에서 다중 주사할 수 있게 하는 유전자 치료요법에서 사용하기 위해 기술되어 있다(미국 특허 제5,846,225호).

[0113] 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 조제될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 중에서 및 오일 중에서 조제될 수 있다. 보관 및 사용의 통상적 조건 하에서 이들 조제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 주사가 가능한 사용에 적합한 약제학적 형태로는 멸균된 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 조제용 멸균 분말이 포함된다(U.S. 특허 제5,466,468호, 그 전문이 본원에 인용에 의해 구체적으로 포함됨). 모든 경우에, 형태는 멸균되어야 하고 용이한 주사가 가능성이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하고, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 및 티메로살 등에 의해 야기될 수 있다. 다수의 경우에, 등장화제, 예를 들면, 당 또는 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 야기될 수 있다.

[0114] 수용액으로의 비경구 투여를 위해, 예를 들면, 필요에 따라 상기 용액을 적절히 완충시켜야 하고, 액체 회석제는 우선 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성이 되어야 한다. 이들 특정한 수용액은 정맥내, 근육내, 피하, 종양내 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 개시의 관점에서 당해 분야 숙련자들에게 공지될 것이다. 예를 들면, 1회 용량을 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시키고, 1000ml의 대량 피하 주사(hypodermoclysis) 유체에 첨가하거나 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다(예를 들면, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 및 1570-1580]을 참조한다). 용량의 일부 변화는 치료되는 대상체의 병태에 따라 필연적으로 발생할 것이다. 투여 책임자는 어떠한 경우에도 개별 대상체에 대한 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 사람 투여의 경우, 조제는 FDA 생물 제제 부서(Office of Biologics) 표준에 의해 요구되는 무균성, 발열성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족해야만 한다.

[0115] 멸균 주사가 가능한 용액은 필요에 따라 상기 열거된 다양한 다른 성분들과 함께 적절한 용매에 필요한 양으로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 조제된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클(vehicle)에 혼입시킴으로써 조제된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 조제를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 조제 방법은 활성 성분의 분말 + 이의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분을 수득하는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다.

[0116] 본원에 개시된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염으로는 산 부가염(단백질의 유리 아미노 그룹으로 형성됨)이 포함되고, 이는 예를 들면, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 및 만델산 등의 유기산으로 이루어진다. 유리 카르복실 그룹으로 이루어진 염은 또한 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 및 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다. 제형화시, 용액은 용량 제형과 컴팩터블한 방식으로 그리고 치료학적으로 유효한 양으로 투여될 것이다. 제형은 주사가 가능한 용액, 및 약물 방출 캡슐 등과 같은 다양한 투약형으로 용이하게 투여된다.

- [0117] 본원에서 사용되는 "담체"는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 및 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 컴패터블하지 않은 경우를 제외하고, 치료학적 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 보충 활성 성분 또한 상기 조성물에 혼입될 수 있다.
- [0118] 어구 "약제학적으로 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는"은 사람에게 투여하는 경우 알레르기성 또는 유사한 부적당한 반응을 생성시키지 않는 분자 실체(entity) 및 조성물을 말한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 조제는 당해 분야에 익히 이해되어 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서의 주사용으로서 조제되고; 주사하기 전에 액체에 용해 또는 현탁시키기에 적합한 고체 형태도 조제할 수 있다.
- [0119] **실시예**
- [0120] 하기는 본 개시의 방법 및 조성물의 예이다. 다양한 다른 실시형태들이 상기 제공된 일반적 설명에 따라 실시될 수 있음이 이해된다.
- [0121] **실시예 1: 사람 카르복실에스테라제 2 및 인터페론 베타를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스 sj-815의 생성**
- [0122] **도입**
- [0123] 사람 카르복실에스테라제 2 및 사람 인터페론 베타 1을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스인 SJ-815는 웨스턴 리저브 스트레인 백시니아 바이러스의 티미딘 키나제 영역에 이들 2개의 유전자를 삽입함으로써 생성되었다. 모 백시니아 바이러스인 웨스턴 리저브는 A34R 유전자에 증강된 양의 백시니아 바이러스의 세포외 외피보유 형태(EEV)를 생성시키는 것으로 알려져 있는 돌연변이를 갖는다.
- [0124] 목적하는 2개의 외래 유전자들을 백시니아 바이러스 게놈 J2R로부터 티미딘 키나제(TK)에 의해 플랭킹되는(flanked) 전이 플라스미드 벡터로 클로닝하였다. 이어서, 전이 플라스미드를 백시니아 바이러스 웨스턴 리저브 A34R에 감염된 143B 세포로 형질감염시켰다. 상동성 재조합이 발생하였고, 재조합 바이러스가 세포 용해물로부터 수득되었다. 활성 TK의 존재 하에 인산화된 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU)이 바이러스성 DNA에서 치명적인 돌연변이를 야기하고 따라서 이론적으로 재조합 바이러스만 생존할 수 있기 때문에, TK 선택을 위해, 시약 BrdU를 사용하여 TK- 바이러스를 단리하였다.
- [0125] **재료 및 방법**
- [0126] **바이러스**
- [0127] 웨스턴 리저브(WR) 스트레인이 와이어스 스트레인보다 더 강력한 것으로 입증되었고, 종양용해성 백시니아 바이러스의 치료학적 지수를 향상시킬 것으로 예상되므로, A34R에 K151E 돌연변이를 지닌 백시니아 바이러스 웨스턴 리저브(WR A34R K151E)를 SJ-815의 골격(backbone)으로서 선택하였다. A34R 영역의 코돈 151에서의 라이신(K)에서 글루탐산(E)으로의 돌연변이는 세포막에서 EEV 입자를 보유하는 A34R 단백질의 능력을 감소시킨다. 이러한 돌연변이는 재조합 백시니아 바이러스 SJ-815의 전이성 종양 및 *원위치(in situ)* 고형 종양에 영향을 미칠 수 있는 능력을 향상시키기 위한 의도로 포함되었다.
- [0128] 모 백시니아 바이러스는 WR A34R K151E이었다. 상기 바이러스는 부착형으로 배양된 사람 자궁경부 선암종(HeLa) 세포에서 추가로 증식되었다. ATCC® #CCL-2로부터 유도된 세포 은행에서 채취한 HeLa 세포를 완전 성장 배지(10% 태아 소 혈청(FBS, Hyclone®, Cat#SH30919.03), 100U/mL 페니실린 및 100 μ/mL 스트렙토마이신을 함유하는 돌베코의 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM))에 유지하였고, EDTA(Gibco, cat#15400-054)와 함께 돼지-공급원의 트립신을 이용하여 계대하였다. 감염 3일 후(0.1의 표적 MOI), 완전한 세포변성(cytopathic) 효과를 나타낸 HeLa 세포를 수집하였고, 상청액을 버리고, 세포내 바이러스를 균질화에 의해 세포로부터 방출시켰다. 방출된 바이러스는 원심분리(Beckman Avanti J-E 고속 원심분리기 #369001, 로터 JA-20.1, 12,000rpm, 80분, 4°C)에 의해 반-정제시켰고, 10mM Tris pH 9.0에 재현탁시켰고, 초저온 냉동고(deep freezer)(-75±20°C)에서 보관하였다. 증폭된 바이러스를 U-2 OS 세포에서 적정하여 플라크 형성 단위(pfu)의 농도를 측정하였다.
- [0129] **플라스미드 벡터**

- [0130] 상동성 재조합에 사용되는 플라스미드 벡터는 2개의 형질전환 삽입물을 갖는 pSC65 플라스미드로 구성되었다. 2개의 삽입물에 관해서, 사람 카르복실에스테라제 2(hCE2) 및 사람 인터페론 베타 1(hIFN β 1) 유전자는 새롭게 합성되었다.
- [0131] 사람 카르복실에스테라제 2(hCE2, 1978 염기 쌍, NM_003869.5; GI: 297632399)에 대한 야생형(WT) 암호화 서열 (CDS)은 SmaI/XmaI 및 BamHI 제한 효소 부위를 제거하도록 변형되었고, 백시니아 바이러스 합성 초기 후기 프로모터(pSE/L)의 제어 하에 두었다. 사람 인터페론 베타(hIFN β , 1734 염기 쌍, NM_002176.2; GI: 50593016)에 대한 CDS는 백시니아 바이러스 초기-후기 프로모터 p7.5의 제어 하에 두었다.
- [0132] 합성 후, 2개의 단편을 겔-정제한 후, 이어서 GENEWIZ, Inc.(South Plainfield, NJ)에 의한 pSC65 벡터(이는 사전에 절단되어 LacZ를 제거하였고, 이어서, 겔-정제하였다)의 티미딘 키나제(TK) 부위에 라이게이션하여 pSC65-hCE2-hIFN β 작제물을 생성하였다. 부가된 5' XmaI 및 3' HindIII 서열을 포함하는 제1 전이유전자 hCE2를 2개의 제한 효소 XmaI 및 HindIII를 이용하여 절단하였고, 5' XmaI 및 3' HindIII를 통해 pSC65-LacZ(암피실린)에 클로닝하여 다음 단계를 위한 중간체 pSC65-hCE2 작제물을 제조하였다. 부가된 5' HindIII 및 3' BamHI 서열을 포함하는 제2 전이유전자 hIFN β 를 HindIII 및 BamHI의 2개의 제한 효소로 절단하였고, 5' HindIII 및 3' BamHI를 통해 이전 단계로부터 pSC65-hCE2(암피실린)에 클로닝하여 최종 pSC65-hCE2-hIFN β 작제물을 제조하였다.
- [0133] 맥시-스케일(maxi-scale) DNA 조제에 의해 1.0 μ g/ μ L 초과 농도로 최종 작제물을 조제하였다. 맥시-스케일 DNA 조제의 절반을 BglIII를 이용하여 선형화하여 상동성 재조합의 효율을 증가시켰다. 선형화된 작제물의 품질 및 양은 260nm 및 280nm의 파장에서의 광학 밀도(OD)를 측정함으로써 그리고 아가로스 겔 전기 영동에 의해 측정하였다. 최종 전이 플라스미드는 정제되고 에탄올 침전된 DNA 단편으로 구성되었다.
- [0134] *재조합 백시니아 바이러스의 작제*
- [0135] 재조합 바이러스의 생성은 상동성 재조합의 원칙에 따라 수행하였다. 상세한 절차는 공개된 방법에 따른다.
- [0136] *기능적 활성 재조합 바이러스의 선택: 카르복실에스테라제 및 사람 인터페론 활성의 확인*
- [0137] 재조합 백시니아 바이러스에 의해 발현된 인터페론- β 는 사람 인터페론 베타 센서 세포주(sensor cell line)에서 JAK/STAT/ISGF3 경로의 IFN- β -매개된 활성화를 모니터링함으로써 측정될 수 있다. 이러한 센서 세포주에서의 JAK/STAT/ISGF3 자극은 분비된 알칼리성 포스파타제(SEAP)의 생산을 후속적으로 유도한다. 현탁액 중의 SEAP 수준은 QUANTI-Blue™ 시스템을 이용하여 측정할 수 있다. 이러한 시스템에서, SEAP의 존재 하에 QUANTI-Blue™ 배지는 자색/청색으로 바뀌고 SEAP의 양에 비례하는 비색 변화(colorimetric change)는 620 내지 655nm의 분광광도계를 사용한 OD 측정을 통해 평가할 수 있다.
- [0138] 형질전환 인터페론- β 를 발현하는 클론을 선택하기 위해서, 단리된 클론 샘플을 제조업자의 지침에 따라 인터페론 센서 세포로 분석하였다. 샘플 클론 10 μ L를 96-웰 조직 배양 플레이트에서 센서 세포 현탁액 50,000개 세포/180 μ L와 혼합하였다. 이어서, 상기 플레이트를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. HEK-Blue™ IFN α / β 센서 세포의 20 μ L의 상청액을 새로운 96-웰 조직 배양 플레이트에 첨가하였고 180 μ L의 QUANTI-blue 용액을 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 3시간의 인큐베이션 후, SEAP 수준을 655nm에서 분광광도계(상승작용 H1 하이브리드 다중-방식 마이크로플레이트 판독기(Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader), BioTek Instruments, Inc.)를 사용하여 측정하였다. 64개의 단리된 클론들 중에서, 7개의 클론은 양성 신호를 나타내었다(도 1a 및 도 1b).
- [0139] 이어서, 인터페론 작용성(functionality)을 나타내는 7개의 클론에 대해, 카르복실에스테라제 전이유전자의 발현은 기질로서 p-니트로페닐아세테이트를 사용한 카르복실에스테라제 효소 활성 검정을 통해 평가하였다. 효소에 의해 염기성 용액 중의 p-니트로페닐 아세테이트로부터 유리된 페놀은 405nm에서 검출될 수 있다. 따라서, DMEM 무 혈청 배지 100 μ L에 재현탁된 재조합 클론으로부터의 20 μ L를 사용하여 24-웰 플레이트에서 5.0 x 10⁴ 세포/웰로 감염시키기 24시간 전에 씨딩된 HeLa 세포를 접종하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 포스페이트 완충된 염수로 1회 세척한 후 세포를 수거하였고, 50 μ L의 용해 완충액, 1.5% N-도데실 B-D-말토사이드와 함께 얼음 상에서 20분 동안 인큐베이션함으로써 용해시켰다. 세포 용해물을 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 12,000rpm에서 원심분리하여 수집하였고, 사용된 용출 완충액의 4배 체적으로 포스페이트 완충된 염수 중에 재현탁시켰다. 10 μ L의 세포 용해물을 90 μ L의 검정 완충액, 메탄올 중에 용해된 50mM p-니트로페닐 아세테이트를 함유한 새로운 96-웰 플레이트에 옮겼다. 405nm에서의 흡광도를 10분 동안 100초마다 측정하였다. 활성 단

위는 pNPA 검정 완충액 첨가 후 5분째에 405nm에서 측정된 흡광도에서 0분째에 측정된 흡광도를 뺀 것으로서 계산되었다.

[0140] 7개의 클론 모두 카르복실에스테라제에 대한 양성 신호를 나타내었고(도 1c 및 도 1d), 따라서 추가의 클론 정제를 위한 씨드(seed) 클론으로서 사용되었다. 이러한 검정에 대한 음성 대조군은 기능성 시험을 위해 단리되었지만 IFN β 활성화에 대해 음성인 것으로 확인된 모 골격 바이러스(WR A34R K151E), WR A34R TK- 바이러스 및 기타 가능한 재조합 클론이었다. 7개의 클론을 표준 방법을 사용하여 다중 횡수의 클론 정제를 실시하여 14개의 재조합 클론을 생성하였고, 이들 중 9개는 이전에 기술된 방법을 사용하여 양성 인터페론 활성을 보였다.

[0141] PCR에 의한 TK 파괴 확인

[0142] 인터페론의 존재는 PCR 생성물에 의해 확인되었다. 인터페론 전이유전자의 양 측면을 특이적으로 표적으로 하는 프라이머를 고안하였고, 후속적으로 BIONEER(대전, 한국)에 의해 합성하였다(순방: GCCTAGATCTGTCGACTTCGAGC. 역방: AACGTATATGTGTACCGGGAGCAG)(도 2). 반응 혼합물은 제조업자의 지침(TaKaRa Ex Taq™)에 따라 100ng의 주형(template) DNA를 포함하는 500 μL 튜브에서 조제하였다. 상기 튜브를 전형적인 파라미터로 사전-프로그래밍된 써모사이클러(thermocycler)(SureCycler 8800, G8800A, Agilent Technologies)에 넣었다.

[0143] 실시예 2: SJ-815 바이러스의 시험관내 특성확인

[0144] 도입

[0145] 플라크 크기, 바이러스 수율, 감염성 입자 양, 바이러스 단백질 생산, 감염된 세포 형태형성(morphogenesis) 및 세포 외피보유 비리온(EEV) 형성에 대한 시험관내 세포 배양 검정을 사용하여 SJ-815 바이러스를 평가하였다.

[0146] 플라크 검정

[0147] 플라크 검정을 위해, 6-웰 조직 배양 플레이트 중의 U-2 OS 또는 BS-C-1 세포 단층을 WR, WR.A34R, SJ-815 또는 mSJ-815 바이러스의 10배 희석액으로 감염시켰다. 2시간의 흡수 후, 상기 바이러스 접종물을 제거하였고, 상기 세포를 2.5% FBS를 갖는 D-MEM 또는 E-MEM으로 세척하였고, 3% 메틸셀룰로스를 함유하는 배지를 첨가하였다. 감염은 37°C에서 72 또는 48시간 동안 진행되었다. 이어서, 상기 단층을 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 1시간 동안 염색하였고, 세척하였고, 상기 플라크를 계수하였다. SJ-815의 관찰된 플라크 크기는 U-2 OS(도 3a & 도 3b) 및 BS-C-1 세포(도 3b)에서 다른 바이러스들보다 더 작았다.

[0148] OS 세포는 BS C-1 세포보다 관찰된 플라크 크기가 더 작았다. 또한, mSJ-815의 플라크 크기는 사람 세포주에서 감소되지 않았다. 이러한 데이터는 SJ-815 바이러스의 구성성분, 특히 hIFNβ가 플라크 형성에 영향을 미쳤고 또한 바이러스의 EEV 방출 및 감염성에도 영향을 미쳤을 가능성이 있음을 시사한다.

[0149] 췌장암 세포주에서의 SJ-815 세포용해 및 복제

[0150] 췌장 및 자궁경부암 세포주 PANC-1, MIA PaCa-2, AsPc-1, Capan-1, Capan-2, BxPc-3 및 HeLa를 성장 배지 100 μL의 체적으로 96-웰 플레이트에 1X10⁴ 세포/웰의 농도로 씨딩하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 100 내지 0.0001 PFU/세포로부터 시작하여 10배의 희석된 감염 다중도로 SJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 제조업자의 지침에 따라 세포 생존력을 CCK-8(Dojindo)을 사용하여 평가하였다. EC50은 그래프패드 프리즘 버전 5(GraphPad Prism Version 5)를 사용하여 계산되었다.

[0151] 바이러스 복제(바이러스 버스트) 검정을 위해, 췌장암 및 자궁경부암 세포를 48-웰 플레이트에 씨딩하였다. 37°C에서 24시간의 인큐베이션 후, 상기 세포를 계수하고 SJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 37°C에서 2시간 후, 상기 접종물을 제거하였고 상기 세포를 세척하였다. 감염 후 48시간 후에 상기 세포를 수거하였다. 감염성 바이러스의 생산량은 U-2 OS 세포에서 플라크 검정에 의해 측정하였다. SJ-815는 췌장암 세포주에서 대조군 바이러스보다 더 강한 세포용해(도 4a) 및 더 적은 복제(도 4b)를 유도하였다.

[0152] 시험관내에서 시험된 6개의 상이한 췌장암 세포주 중, SJ-815는 CPE 검정에서 보다 낮은 EC-50에 의해 나타내어 지는 바와 같이 3개의 세포주(BXPC-3, Capan-1 및 MiaPaca-2)에서 WRA34R TK- 바이러스보다 지속적으로 더 강했다. 또한, 하나의 췌장 종양 세포주(Capan-2)에서, SJ-815는 보다 낮은 MOI(0.001 내지 0.1)에서 WRA34R TK-보다 더 강한 CPE를 가졌고, 보다 높은 MOI에서 유사한 효과를 가졌다. 동일한 세포주를 사용한 두 번째 실험에서, SJ-815는 평가된 상이한 MOI에서 WRA34R TK-보다 더 강했다(데이터 도시하지 않음). CPE가 4종의 종양

세포주에서 더 강했지만, 세포당 감염성 입자의 총 생산량은 WRA34R TK-보다 SJ-815에서 더 낮았다. SJ-815는 BXPc-3 및 Capan-1에서 WRA34R TK-보다 더 강한 CPE를 가졌지만, 이들 세포에서의 PFU의 총 생산량은 20 PFU/세포보다 더 낮았다. SJ-815는 AsPC-1 및 PANC-1에서 WRA34R TK-와 유사한 CPE 및 WRA34R TK-보다 더 낮은 감염성 바이러스 생산량을 가졌다. 전반적으로 이들 결과는 SJ-815의 복제가 WRA34R TK-보다 현저하게 낮았더라도 SJ-815가 시험관내에서 췌장암 세포를 사멸시키는데 있어서 WRA34R TK- 바이러스보다 더 효과적이었음을 시사한다.

[0153] *결장암 세포주에서의 SJ-815 세포용해 및 복제*

[0154] 사람 결장암 세포주 HCT-116, HCT-15, HCT-8 및 SW620을 96-웰 플레이트에서 1×10^4 세포/웰의 농도로 100 μ L의 성장 배지의 체적 중에 씨딩하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 100 내지 0.0001 PFU/세포로부터 시작하여 10배의 희석된 감염 다중도로 SJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 제조업자의 지침에 따라 세포 생존력을 CCK-8(Dojindo)을 사용하여 평가하였다. EC50은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 계산되었다.

[0155] 바이러스 복제(바이러스 버스트) 검정을 위해, 결장암 세포를 48-웰 플레이트에 씨딩하였다. 37°C에서 24시간의 인큐베이션 후, 상기 세포를 계수하고 SJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 37°C에서 2시간 후, 상기 접종물을 제거하였고 상기 세포를 세척하였다. 감염 후 48시간 후에 상기 세포를 수거하였다. 감염성 바이러스의 생산량은 U-2 OS 세포에서 플라크 검정에 의해 측정하였다. SJ-815는 결장암 세포주에서 대조군 바이러스보다 더 강한 세포용해(도 5a) 및 더 적은 복제(도 5b)를 유도하였다.

[0156] 4개의 결장암 세포주를 평가하였다(HCT-116, HCT-115, HCT-8 및 SW620). 2 개의 세포주(HCT-15 및 HCT-8)는 백시니아 바이러스 감염에 대해 보다 내성이었고, HCT-15는 WR.A34R.TK-보다 SJ-815로의 감염에 약간 더 민감(susceptible)하다. HCT-116 및 SW620은 일반적으로 백시니아 바이러스 감염에 보다 더 민감하고, SJ-815는 WR.A34R.TK 바이러스보다 SW620 세포주에서 더 강한 사멸 효과를 입증하였다. 이들 결장암 세포주의 백시니아 바이러스에 대한 상이한 민감성에도 불구하고, 감염 후 48시간 후에 감염성 입자의 생성은 모든 경우에 1 PFU/세포보다 더 낮았다. 시험된 결장암 세포주에서 SJ-185 및 WR.A34R.TK- 바이러스 사이의 감염성 입자의 생산에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 전반적으로 이러한 데이터는 SJ-815의 복제가 WRA34R TK- 바이러스보다 현저하게 더 낮더라도 SJ-815가 시험관내에서 일부 결장암 세포를 사멸시키는데 있어서 WRA34R TK- 바이러스보다 더 효과적이었음을 시사한다.

[0157] *간암 세포주에서의 SJ-815 세포용해 및 복제*

[0158] 사람 간암 세포주 SNU398, SNU449 및 SNU739를 100 μ L 체적의 성장 배지에서 96-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 씨딩하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 10 내지 0.0001 PFU/세포로부터 시작하여 10배의 희석된 감염 다중도로 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 제조업자의 지침에 따라 CCK-8(Dojindo)을 사용하여 세포 생존력을 평가하였다. EC50은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 계산되었다.

[0159] 바이러스 복제(바이러스 버스트) 검정을 위해, 간암 세포를 48-웰 플레이트에 씨딩하였다. 37°C에서 24시간의 인큐베이션 후, 상기 세포를 계수하고 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 37°C에서 2시간 후, 상기 접종물을 제거하였고 상기 세포를 세척하였다. 감염 후 48시간 후에 상기 세포를 수거하였다. 감염성 바이러스의 생산량은 U-2 OS 세포에서 플라크 검정에 의해 측정하였다. SJ-815는 간암 세포주에서 대조군 바이러스보다 더 강한 세포용해를 유도하였고(도 6a) 이와 유사한 복제 수준을 가졌다(도 6b).

[0160] 3개의 간암 세포주를 평가하였다(SNU398, SNU449 및 SNU739). 3종의 바이러스는 모두 SNU739에서 유사한 세포 독성을 가졌고 용량 의존적 효과를 입증하였다. 이들 세포에서 생산된 바이러스는 세포당 약 10 내지 20 PFU이었고, SJ-815, mSJ-815 및 WRA34R.TK-에 의해 생산된 총 바이러스 수준들 사이에는 유의한 차이가 관찰되었다. SJ-815에 의해 생산되는 감염성 입자의 수가 더 적더라도, 이는 세포 사멸의 효력에 영향을 미치지 않았다. SJ-815는 SNU398 및 SNU449 세포에서 보다 강한 사멸 효과를 가졌고, 48시간 후에 생산된 바이러스의 수는 모든 바이러스간에 유사하였다. 이들 결과는 mSJ-815가 동일한 효능을 입증하지 않았기 때문에 평가된 3개의 간암 세포주가 바이러스 감염에 민감하였고 SJ-815에 보유된 사람 인터페론에 의해 사멸 효과가 증가되었음을 시사한다. 간암 세포주의 강화된 사멸은 종양 세포에 의한 감염성 바이러스 입자의 보다 높은 생산과 상관관계가 있었다.

- [0161] *골수종 및 흑색종 세포주에서의 SJ-815 세포용해 및 복제*
- [0162] 사람 골수종 및 흑색종 암 세포주 SK-MEL 5, SK-MEL 2, RPMI8226 및 IM-9 세포를 100 μL 체적의 성장 배지에서 96-웰 플레이트에 씨딩하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 10 내지 0.0001 PFU/세포로부터 시작하여 10배의 희석된 감염 다중도로 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 제조업자의 지침에 따라 CCK-8(Dojindo)을 사용하여 세포 생존력을 평가하였다. 감염성 바이러스의 생산은 U-2 OS 세포에 대한 플라크 검정에 의해 측정되었다. SJ-815는 세포주 SK-MEL 5(도 7a), SK-MEL 2(도 7b), RPMI8226(도 7c) 및 IM-9(도 7d)에서 감소된 세포 생존력에 의해 나타내어지는 바와 같이 일부 골수종 및 흑색종 세포에서 대조군 바이러스보다 더 강한 세포용해를 유도하였다.
- [0163] 바이러스 복제(바이러스 버스트) 검정을 위해, 골수종(RPMI8226 및 IM-9) 및 흑색종(SK-MEL5 및 SK-MEL2) 암세포를 48-웰 플레이트에 씨딩하였다. 37°C에서 24시간의 인큐베이션 후, 상기 세포를 계수하였고, 1pfu/세포의 SJ-815, mSJ-815 및 WR.A34R.TK-로 감염시켰다. 상기 세포를 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 인큐베이션하였고, 감염 후 48시간 후에 수거하였다. SJ-815는 일부 골수종 및 흑색종 암세포주에서 대조군 바이러스보다 더 적게 복제되었다(도 8).
- [0164] 2개의 흑색종 암 세포주를 평가하였다(SK-MEL 2 및 SK-MEL 5). 상기 바이러스는 SK-MEL 5에서 유사한 세포 독성을 입증하였고 용량 의존적 효과가 관찰되었다(도 8). 이들 세포에서 생산된 바이러스는 세포당 약 10 PFU이었고, 시험된 상이한 바이러스들 사이의 총 바이러스 생산에는 유의한 차이가 존재하지 않았다. SJ-815는 SK-MEL 2 세포에서 보다 강한 사멸 효과를 입증하였고(도 8), SJ-815와 WR.A34R.TK- 바이러스 사이에는 감염 후 48시간 후에 바이러스 생산량에 차이가 없었다. SK-MEL2 세포에서 생산된 감염성 입자의 수는 SK-MEL 5 세포에서 생산된 수보다 더 많았다. RPMI2886 및 IM-9 골수종 세포(B 림프구)는 바이러스 사멸에 민감했다(도 8). 그러나, RPMI2886은 mSJ-815 및 WRA34R TK-9보다 SJ-815에 더 민감했다(도 8). 흥미롭게도, 대조군 WR.A34R.TK- 바이러스에 비해 암 세포에서 생산된 SJ-815 감염성 입자의 총량에서 유의한 차이가 관찰되었다. 현탁액 세포는 감염시키기가 더 어려워 세포당 1 PFU로 감염 후 전반적인 바이러스 회수가 보다 낮았다. 전반적으로 이들 결과는 SJ-815의 복제가 일부 경우 WRA34R TK-보다 현저하게 낮았더라도 SJ-815가 시험관내에서 일부 골수종 및 흑색종 암 세포를 사멸시키는데 있어서 WRA34R TK- 바이러스보다 더 효과적이었음을 시사한다.
- [0165] *뮤린 암 세포주에서의 SJ-815 세포용해 및 복제*
- [0166] 마우스 암 세포주 TIB-75, CT-26, B16-F10, MC-38, RENCA 및 4T1을 100 μL 체적의 성장 배지에서 96-웰 플레이트에 씨딩하였다. 플레이트를 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 100 내지 0.0001 PFU/세포의 감염 다중도의 10배의 희석액으로 mSJ-815 및 WR.mGMCSF.TK-로 감염시켰다. 감염 48시간 후, 제조업자의 지침에 따라 Cyto Tox-Glo 검정(Promega)을 사용하여 세포 생존력을 평가하였다. mSJ-815 바이러스의 농도 증가는 TIB-75 간세포 암종(도 9a), CT-26 결장 암종(도 9b), B16-F10 피부 흑색종(도 9c), MC-38 결장 암종(도 9d), RENCA 신장 선암종(도 9e) 및 4T1 유방암(도 9f)을 포함하는 일부 뮤린 암 세포주에서 세포용해를 유도하였다.
- [0167] **실시예 3: SJ-815 바이러스 효능 및 독성의 생체내 특성확인**
- [0168] *도입*
- [0169] 종양 성장, 동물 생존, 및 장기(organ) 중량에 대해 뮤린 SJ-815 바이러스의 단독 및 이리노테칸 치료와의 병용 투여 둘 다의 영향을 측정함으로써 SJ-815 바이러스를 생체내 평가하였다.
- [0170] *MC-38 뮤린 결장 암종 성장*
- [0171] C57BL/6 마우스에게 MC-38 마우스 결장암 세포(마우스당 2 × 10⁶ 세포)를 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(100 내지 200mm³), 마우스를 4개의 치료 그룹(n = 5마리 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충된 염수(PBS) 단독, (2) WR.TK-.mGMCSF(3일마다 제공되는 1x10⁸ pfu의 4회 정맥내 투여), (3) WR.TK-.mGMCSF(종양내를 통한 2와 동일한 스케줄), 및 (4) 종양내를 통해 투여된 참조 및 대조군과 동일한 치료 스케줄로의 mSJ-815를 이용한 치료. 후속적인 종양 부하(burden)는 캘리퍼(caliper) 측정에 의해 이어졌고, 이들의 종양이 1,500mm³에 도달한 경우 마우스를 희생시켰다. 마우스는 주당 2일마다 칭량하였다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행하였다. MC-38 뮤린 결장 암종의 성장은 21일, 24일 및 27일째에 감소된 종양 크기에 의해 나타내어진 바와 같이 mSJ-815를 이용한 치료에 의해 지연되었다(도 10c). 생존 또는 체중에

서의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(도 10a 및 도 10b).

[0172] C57BL/6 마우스에서의 MC38 세포의 종양 성장 속도를 평가하였다. 마우스는 100mm³의 평균 종양 크기에서 종양 세포 주사 후 13일째에 치료되었다. 치료 후 27일째에, 대부분의 그룹은 1500mm³의 종양 크기 평균에 도달하였다. JX-594 및 SJ-815 치료의 종양 성장 및 전반적 생존에 대한 효과를 평가하였다. 대조군과 치료 그룹 사이의 생존율에는 유의한 차이가 없었다. 그러나, 21일, 24일 및 27일째에 PBS와 mSJ-815 치료된 그룹 사이의 종양 크기에는 유의한 차이가 있었다. 치료 IV 대 IT 투여는 WR.mGMCSF를 사용하여 평가하였고, 종양 크기에서 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 전반적으로, mSJ-815를 이용하여 치료한 그룹은 WRmGMCSF에 비해 종양 감소가 증가했다.

[0173] *MIA PaCa-2* 사람 췌장 암종 성장

[0174] 암컷 누드 마우스에게 *MIA PaCa-2* 사람 췌장암 세포를 피하 주사하여 종양을 발병시켰다. 일단 종양이 100 내지 200mm³의 체적에 도달하면, 마우스를 8개의 치료 그룹(n = 3마리 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충된 염수(PBS), (2) SJ-815(1X10⁵), (3) SJ-815(1X10⁶), (4) SJ-815(1X10⁷) 매주 1회 종양내 투여됨(0, 7 및 14일째), (5) CPT-11(0.25mg/kg), (6) CPT-11(2.5mg/kg), (7) CPT-11(25mg/kg) 3, 10 및 17일째 정맥내 투여됨, (8) SJ-815(1X10⁶) + CPT-11(25mg/kg). 종양 측정은 종점을 통해 주당 2회 캘리퍼로 수행하였다. *MIA PaCa-2* 사람 췌장 암종의 성장은 감소된 평균 종양 체적에 의해 나타내어진 바와 같이 mSJ-815 및 CPT-11(이리노테칸)로의 병용 치료에 의해 지연되었다(도 11). 누드 마우스는 T 세포가 거의 없기 때문에 억제된 면역 시스템을 가지므로 이러한 실험은 토포이소머라제 억제제와 병용한 카르복실에스테라제 효소의 발현이 사이토 카인(hIFN- β)과 독립적으로 원하는 효과를 가졌음을 보여준다. 사람 IFN- β 가 마우스 면역 시스템에 영향을 미칠 수 있었다고 하더라도, 누드 마우스는 IFN- β 에 반응하는 능력이 훨씬 더 적어야 한다.

[0175] 이들 데이터는 바이러스 단일 치료요법이 이리노테칸 단일 치료요법과 비교하여 증가된 효력을 나타내는 경향을 입증하였다. 병용 치료요법은 유사하게 단일 치료요법보다 증가된 효력을 나타내는 경향을 입증하였다. 단독 치료요법 그룹 내에서, 최고 용량은 최고 항-종양 반응을 생성시켰다. 종양에 대한 바이러스의 전신적 전달은 직접 주사된 종양에서 보여진 것과 필적하는 항-종양 반응을 생성시켰고, 이는 IV 경로가 IT 경로만큼 효과적인 수 있음을 시사한다.

[0176] *B16-F10* 흑색종 종양을 지닌 *B57BL/6* 마우스의 생존

[0177] 암컷 C57BL/6 마우스를 *B16-F10* 마우스 흑색종 세포(마우스당 1 × 10⁵ 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm³), 마우스를 5개의 치료 그룹(n = 5마리의 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충된 염수(PBS), (2) 0일째에 mSJ-815(1X10⁶) 1회 투약, (3) 0일째에 mSJ-815(1X10⁷) 1회 투약, (4) 0일째에 mSJ-815(1X10⁸) 1회 투약 및 (5) 0, 7 및 14일째에 종양내 mSJ-815(1X10⁶) 3회 투약. 후속적 종양 부하는 캘리퍼 측정에 의해 이어졌고, 이들의 종양이 1,500mm³에 도달하면 마우스를 희생시켰다. 마우스를 매주 2회 칭량하였다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행하였다. *B16-F10* 흑색종 종양을 지닌 *B57BL/6* 마우스의 생존은 mSJ-815를 이용한 치료에 의해 유의하게 향상되었다(도 12a).

[0178] 체중 데이터는 일원 분산 분석(ANOVA), 이어서 던네트의 다중 비교 시험에 의해 분석하였다(도 12b). 데이터는 P = 0.0267로 통계학적으로 유의하였다. 던네트의 다중 비교 시험으로 상이한 그룹들 사이의 유의한 차이는 존재하지 않았다. 분산의 균일성(Homogeneity)은 바틀렛(Bartlett)의 시험을 사용하여 결정되었고, 이는 분산이 P = 0.3973로 유의하지 않았음을 나타낸다.

[0179] 종양내 mSJ-815를 이용한 *B16-F10* 흑색종 종양 성장

[0180] 암컷 C57BL/6 마우스에게 *B16-F10* 마우스 흑색종 세포(마우스당 1 × 10⁵ 세포)를 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면 (50 내지 100mm³), 마우스를 5개의 치료 그룹(n = 5마리의 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충된 염수(PBS), (2) 0일째에 mSJ-815(1X10⁶) 1회 투약, (3) 0일째에 mSJ-815(1X10⁷) 1회 투약, (4) 0일째에 mSJ-815(1X10⁸) 1회 투약 및 (5) 0, 7 및 14일째에 종양내 mSJ-815(1X10⁶) 3회 투약. 후속적 종양 부하는 캘리퍼 측정에 의해 이어졌고, 이들의 종양이 1,500mm³에 도달하면 마우스를 희생시켰다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행하였다. *B16-F10* 흑색종 종양 성장은 감소된 종양 체적에 의해 나타내어지는 바와 같이 mSJ-815를 이용한 병용 치료에 의해 지연되었다(도 13a & 도 13b).

[0181] 그룹당 평균 종양 크기를 계산하였고 SEM을 플롯팅하였다. 플롯의 경향성의 차이는 희생된 동물로 인한 것이었다. 데이터는 일원 분산 분석(ANOVA), 이어서 던네트의 다중 비교 시험 및 페어링되지 않은 t 시험에 의해 분석하였다. 데이터는 $P = 0.3755$ 로 통계학적으로 유의하지 않았다. 분산의 균질성은 바틀렛의 시험을 이용하여 결정되었고, 이는 분산이 $P = 0.0247$ 로 유의하게 상이하였음을 나타냈다. 페어링되지 않은 T 시험에 의해 데이터는 유의하게 상이하지 않았다. PBS 그룹으로부터의 동물이 최대 종양 크기에 도달하여 희생된 날짜에 해당하는 12일째에 데이터를 분석한 경우, 데이터는 $P = 0.0119$ 로 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 의해 통계학적으로 상이하었다. 이러한 시점에서, 모든 그룹은 던네트의 다중 비교 시험($P < 0.05$)에 의해 PBS 그룹과 통계학적으로 상이하었다. 페어링되지 않은 t 시험에 의해 PBS 및 mSJ-815(3e7) 사이에 $p = 0.0434$ 로 유의한 차이가 관찰되었다.

[0182] B16-F10 흑색종 종양을 지닌 B57BL/6 마우스의 생존

[0183] 암컷 C57BL/6 마우스를 B16-F10 마우스 흑색종 세포(마우스당 1×10^5 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm^2), 마우스를 8개의 치료 그룹($n = 8$ 마리의 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충된 염수(PBS), (2) WR.TK-로서 표지된 WR.A34R.TK-, (3) SJ-815, (4) 종양내를 통해 전달되는 mSJ-815, (5) 정맥내를 통해 전달되는 mSJ-815, (6) PBS+CPT-11, (7) WR.TK- + CPT-11 및 (8) mSJ-815 + CPT-11. 모든 바이러스는 mSJ-815가 정맥 경로를 통해 전달된 그룹 5를 제외하고는 종양내 전달하였으며, 0, 7 및 14일째에 1×10^7 PFU를 3회 처리하였다. CPT-11의 25mg/kg을 3, 9 및 17일째에 정맥내 전달하였다. 생존은 치료 후 매일 평가되었다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행되었다. B16-F10 흑색종 종양을 지닌 B57BL/6 마우스의 생존은 mSJ-815 및 CPT-11(이리노테칸)을 이용한 병용 치료에 의해 유의하게 향상되었다. 카플란-마이어 생존 곡선이 생성되었다(도 14). 데이터는 로그-랭크(만텔-콕스) 시험에 의해 분석되었고, $P < 0.0001$ 로 유의하게 상이하었다. P 값은 그룹-간 비교를 위한 로그-랭크(만텔-콕스) 시험에 의해서도 계산되었다. 통계학적으로 유의한 P-값은 하기와 같이 계산되었다: G1 대 G2 $P=0.0166$, G1 대 G4 $P=0.0025$, G2 대 G4 $P=0.0199$, G6 대 G7 $P=0.0053$, G6 대 G8 $P=0.0007$, G7 대 G8 $P=0.0022$. G4 대 G8은 통계학적으로 상이하지 않았다.

[0184] mSJ-815 및 이리노테칸을 이용한 종양내 병용 치료로의 B16-F10 흑색종 종양의 성장

[0185] 암컷 C57BL/6 마우스를 B16-F10 마우스 흑색종 세포(마우스당 1×10^5 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm^2), 마우스를 8개의 치료 그룹($n = 8$ 마리의 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충 식염수 (PBS), (2) WR.TK-로서 표지된 WR.A34R.TK-, (3) SJ-815, (4) 종양내를 통해 전달되는 mSJ-815, (5) 정맥내를 통해 전달되는 mSJ-815, (6) PBS+CPT-11, (7) WR.TK- + CPT-11 및 (8) mSJ-815 + CPT-11. 모든 바이러스는 mSJ-815가 정맥 경로를 통해 전달된 그룹 5를 제외하고는 종양내 전달하였으며, 0, 7 및 14일째에 1×10^7 PFU를 3회 처리하였다. CPT-11의 25mg/kg을 3, 9 및 17일째에 정맥내 전달하였다. 후속적 종양 부하는 캘리퍼 측정에 의해 이어졌고, 이들의 종양이 $1,500\text{mm}^2$ 에 도달하면 마우스를 희생시켰다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행하였다. 한 마리의 마우스가 실험 도중 사망하였다. 사망한 마우스로부터의 종양 체적 값은 도 15a & 도 15b로부터 제외되었고, 도 15c & 도 15d에 포함되었다. 도 15a & 도 15b는 종양 체적에서의 급강하(dip)를 보여주고, 이는 사망한 마우스로부터의 종양 체적 값의 제외로 인한 아티팩트(artifact)를 나타낸다. 역으로, 도 15c & 도 15d는 사망한 마우스로부터의 종양 체적 값을 포함하고 급강하는 관찰되지 않는다. 이들 데이터는 토포이소머라제 억제제의 존재 또는 부재 하에 종양용해성 백시니아 바이러스로의 치료가 종양 성장을 지연시켰음을 나타낸다.

[0186] 전반적으로, 카르복실에스테라제 효소, WR.TK-를 발현하지 않는 종양용해성 백시니아 바이러스는 토포이소머라제 억제제와 병용할 때에 개선을 나타내지 않았고, 이는 종양용해성 백시니아 바이러스를 토포이소머라제 억제제와 병용할 때 자연적 개선이 없음을 나타낸다. 유사하게, WR.TK- 바이러스는 SJ-815와 유사한 결과를 생성시켰고, 이는 토포이소머라제 억제제 부재 하의 카르복실에스테라제의 발현이나 사람 사이토카인의 발현(마우스 면역 시스템에 유의한 영향을 미치는 것으로 예상되지 않음)이 유효성을 향상시키지 못한다는 것을 보여준다. 한편, 무린 사이토카인의 발현은 WR.TK- 바이러스에 비해 결과를 개선시켰다. 토포이소머라제의 첨가는 전반적인 추가의 개선의 유망한 징후를 보여준다. 그룹당 평균 종양 크기를 계산하였고 SEM을 플롯팅하였다. 데이터는 상이한 종양 측정일에 그룹간 분석을 위해 페어링되지 않은 T 시험에 의해 분석하였다. 하기 조합은 통계학적으로 유의한 차이를 보였다: G1 대 G2(D9) $P=0.052$, (D13) $P=0.032$; G1 대 G3(D9) $P=0.027$, (D13) $P=0.0097$; G1 대 G4(D13) $P=0.012$; G6 대 G7(D9) $P=0.027$, (D13) $P=0.0105$ 및 G6 대 G8(D6) $P=0.067$, (D9)

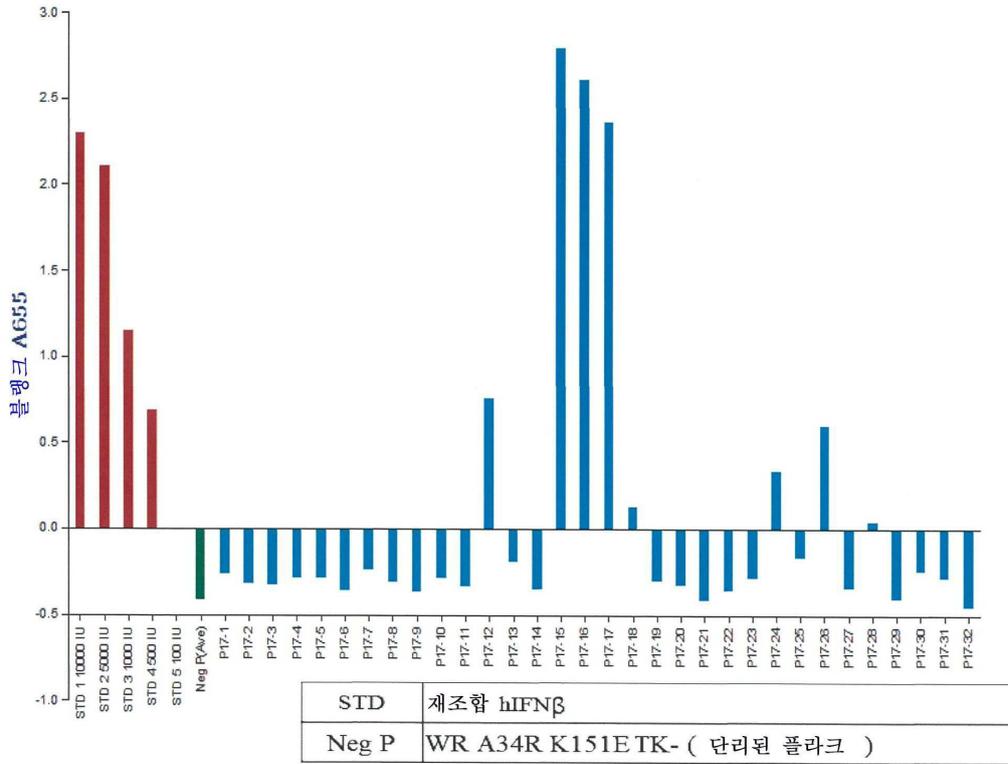
P=0.011, (D13) P=0.004.

- [0187] 백시니아 바이러스 단독으로 또는 이리노테칸과 병용하여 치료한 동물의 체중
- [0188] 암컷 C57BL/6 마우스를 B16-F10 마우스 흑색종 세포(마우스당 1×10^5 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm²), 마우스를 8개의 치료 그룹(n = 8마리의 마우스/그룹)으로 무작위 배정하였다: (1) 포스페이트 완충 식염수 (PBS), (2) WR.TK-로서 표지된 WR.A34R.TK-, (3) SJ-815, (4) 종양내를 통해 전달되는 mSJ-815, (5) 정맥내를 통해 전달되는 mSJ-815, (6) PBS+CPT-11, (7) WR.TK- + CPT-11 및 (8) mSJ-815 + CPT-11. 모든 바이러스는 mSJ-815가 정맥 경로를 통해 전달된 그룹 5를 제외하고는 종양내 전달하였으며, 0, 7 및 14일째에 1×10^7 PFU를 3회 처리하였다. CPT-11의 25mg/kg을 3, 9 및 17일째에 정맥내 전달하였다. 마우스를 매주 2회 칭량하였다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행하였다. 백시니아 바이러스를 단독으로 또는 이리노테칸과 병용하여 치료한 동물에서 유의한 체중 손실 및 이에 따른 독성은 관찰되지 않았다 (도 16).
- [0189] mSJ-815로 치료한 동물에서의 주요 장기의 중량 변화
- [0190] 암컷 C57BL/6 마우스를 B16-F10 마우스 흑색종 세포(마우스당 1×10^5 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm²), 마우스를 무작위 배정하였고 mSJ-815를 종양내 또는 정맥내 치료하였다. 간, 신장, 뇌 및 폐를 수집하였고 각각의 동물에 대한 종점에서 칭량하였다. 데이터는 각 동물의 체중에 대해 정규화되었다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행되었다. mSJ-815를 종양내 또는 정맥내 치료한 동물에서 간(도 17a), 신장(도 17b), 뇌(도 17c) 또는 폐(도 17d)에서 유의한 중량 변화는 검출되지 않았다.
- [0191] mSJ-815를 이용한 IT 및 IV 치료로의 비장 중량
- [0192] 암컷 C57BL/6 마우스를 B16-F10 마우스 흑색종 세포(마우스당 1×10^5 세포)로 피하 이식하였다. 일단 종양이 형성되면(50 내지 100mm²), 마우스를 무작위 배정하였고 mSJ-815를 종양내 또는 정맥내 치료하였다. 비장을 수집하였고 각각의 동물에 대한 종점에서 칭량하였다. 데이터는 각 동물의 체중에 대해 정규화되었다. 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 버전 5를 사용하여 수행되었다. 비장 중량은 mSJ-815를 이용한 IV(도 18a) 및 IT(도 18b) 치료로 증가되었고, 정상 비장 중량이 시간 후에 회복되었다.
- [0193] 종양 및 장기 내에서의 바이러스 정량
- [0194] 동물 사망일에, 종양, 근육, 난소 및 간을 제거하였고, 0.1% 소 혈청 알부민을 함유하는 평형 염 용액 2 mL에 넣고, 추가 사용까지 -80°C에서 즉시 보관하였다. 장기를 해동시켰고 1.4mm 크기의 세라믹 비드를 갖는 1.5mL 튜브를 사용하여 비드 럽터(Bead Ruptor) 24 호모게나이저(Homogenizer)(OMNI International)로 균질화하였다. 조직 균질액을 빙수에 침지된 튜브에서 45초 간격으로 초음파처리하였고, 이어서 미세 원심분리기 Sorvall Legend Micro 17R에서 400 x g로 10초 동안 원심분리하였다. 상청액을 분취하였고, 바이러스 역가를 U-2 OS 세포에서 플라크 검정에 의해 측정하였다. 바이러스 수준은 근육, 난소, 및 간 내에서의 수준과 비교하여 종양 내에서 더 높았다. 바이러스는 주로 종양 내에서 발견되었지만 나중 시점에서는 장기에서 발견되지 않았다(도 19).
- [0195] 본원에 개시되고 청구된 모든 조성물 및/또는 방법은 본 개시의 관점에서 과도한 실험 없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시형태들의 관점에서 기술되었지만, 당해 분야 숙련자들에게는 본 발명의 개념, 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 본원에 기술된 조성물 및/또는 방법 그리고 방법의 단계들 또는 단계들의 순서에 변형이 적용될 수 있음이 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 그리고 생리학적으로 관련되어 있는 소정 제제가 본원에 기술된 제제로 대체될 수 있고, 한편 동일하거나 유사한 결과가 달성될 것임이 명백할 것이다. 당해 분야 숙련자들에게 명백한 이러한 유사한 대체 및 변형은 첨부된 청구 범위에 의해 정의되는 바와 같이 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내인 것으로 간주된다.

도면

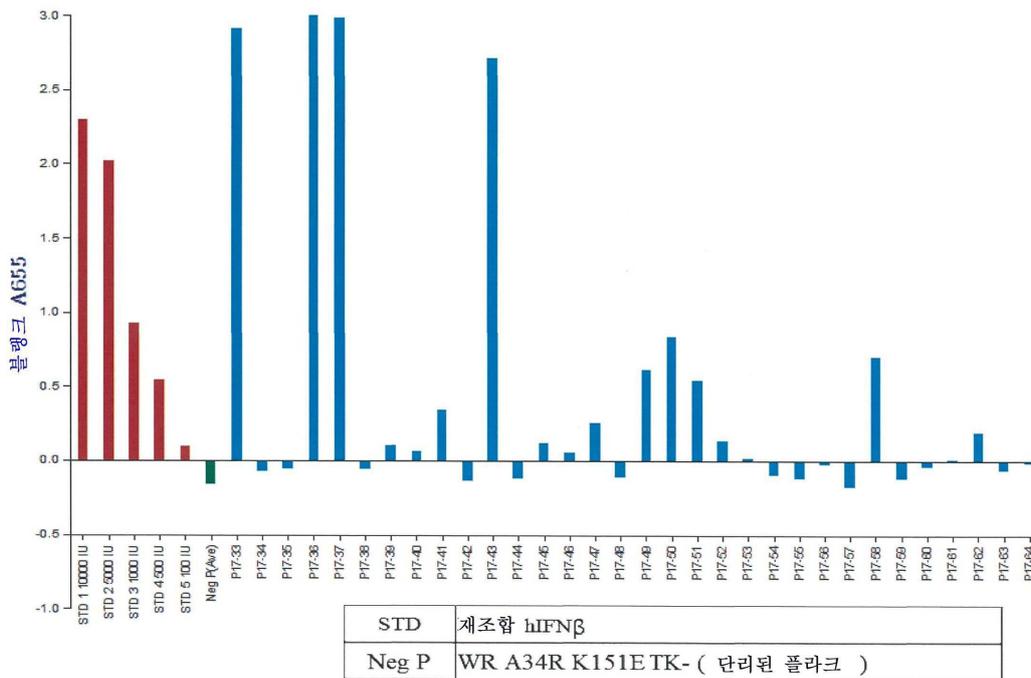
도면1a

hIFN β 리포터 세포를 통한 스크리닝 결과 (17-1 ~ 17-32)

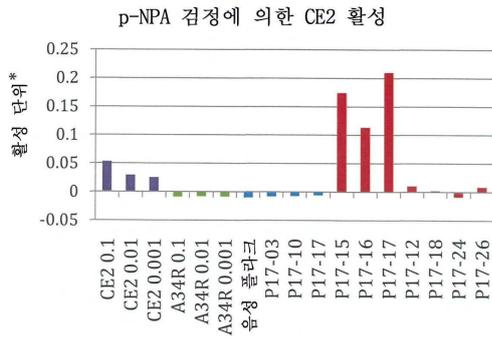


도면1b

hIFN β 리포터 세포를 통한 스크리닝 결과 (17-33 ~ 17-64)



도면1c



범례(좌측으로부터 우측으로):

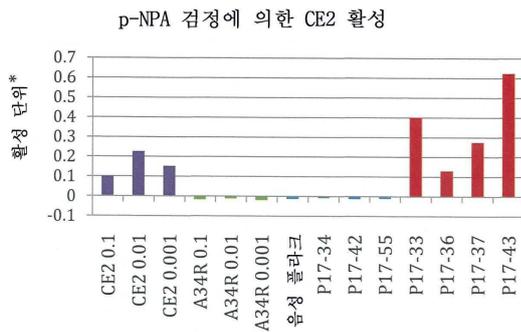
시리즈 1 내지 3: 각종 MOI에서의 WR TK-hCE2

시리즈 4 내지 6: 각종 MOI에서의 WR A34R K151E

시리즈 7 내지 10: 하나의 공지의 음성 플라크(WR A34R TK-, 143B 세포를 통해 선택됨) 및 IFN 베타 활성에 대해 음성인 3개의 다른 추정적 재조합체도 포함한다.

시리즈 11 내지 18:사전에 검정된 추정적 재조합체, IFN 베타 활성을 입증함.

도면1d



범례(좌측으로부터 우측으로):

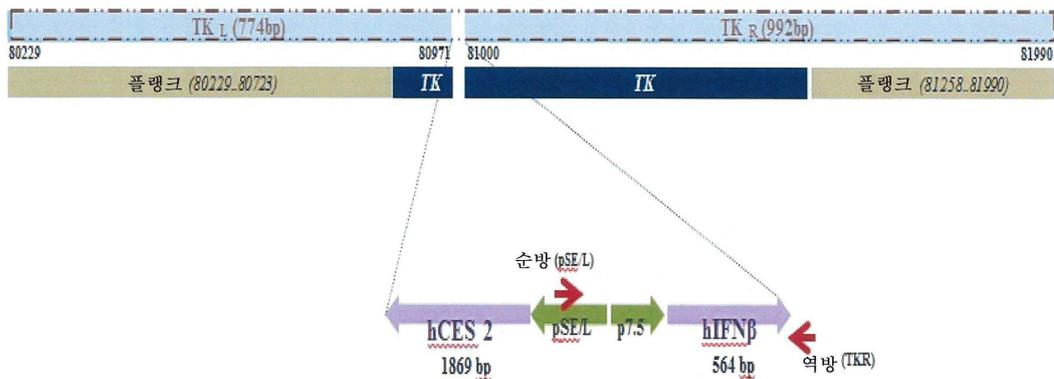
시리즈 1 내지 3: 각종 MOI에서의 WR TK-hCE2

시리즈 4 내지 6: 각종 MOI에서의 WR A34R K151E

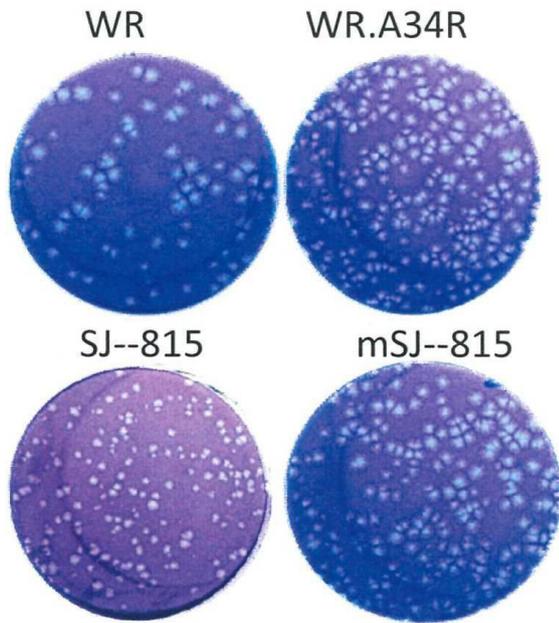
시리즈 7 내지 10: 하나의 공지의 음성 플라크(WR A34R TK-, 143B 세포를 통해 선택됨) 및 IFN 베타 활성에 대해 음성인 3개의 다른 추정적 재조합체도 포함한다.

시리즈 11 내지 18:사전에 검정된 추정적 재조합체, IFN 베타 활성을 입증함.

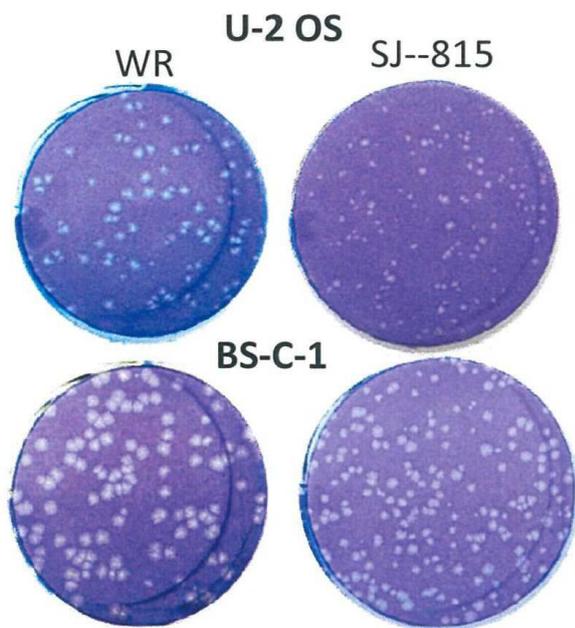
도면2



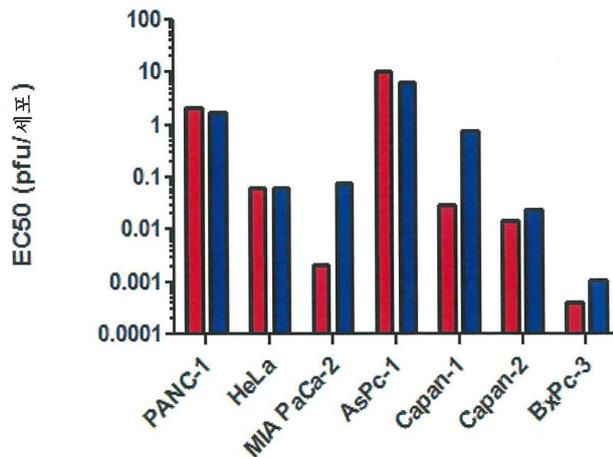
도면3a



도면3b



도면4a

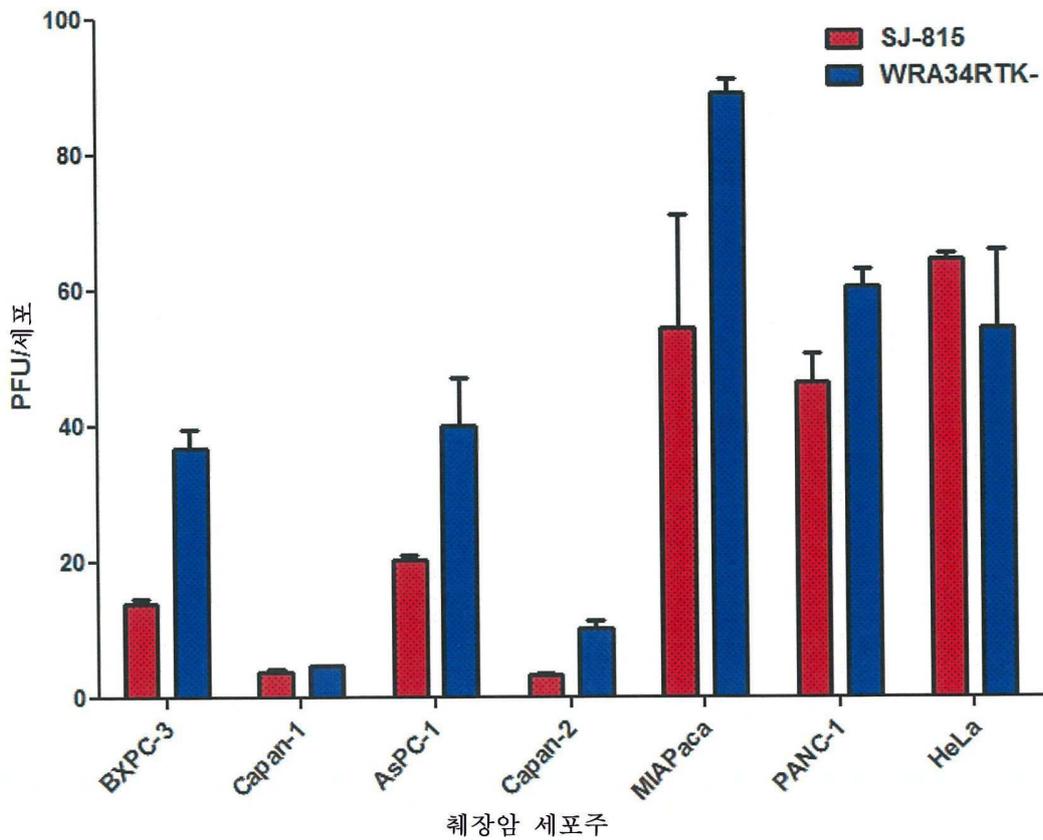


■ SJ-815
■ TK-

	PANC-1	HeLa	MIA PaCa-2	AsPc-1	Capan-1	Capan-2	BxPc-3
SJ-815	2.114463	0.060395	0.002075	10.000000	0.028642	0.014256	0.000394
TK-	1.661881	0.060814	0.077804	6.337238	0.756136	0.023550	0.001072

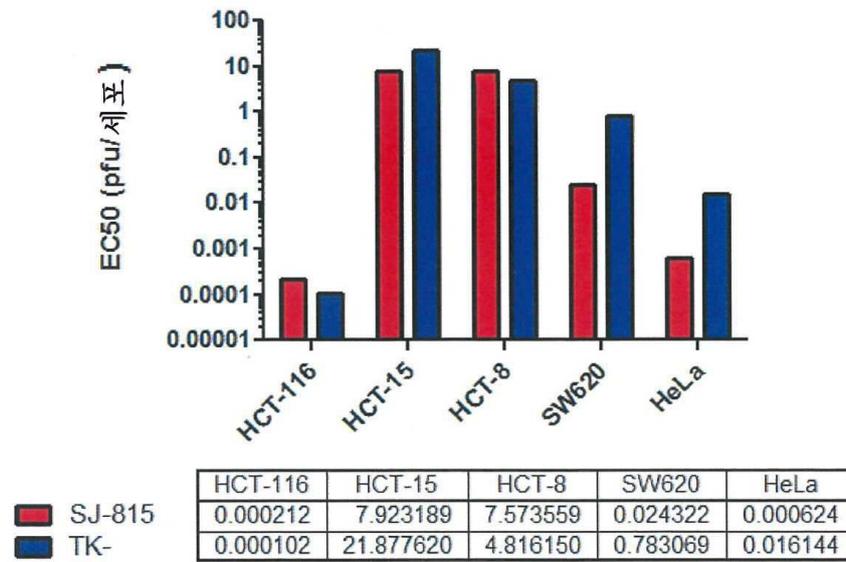
도면4b

48hpi에서 생산된 바이러스의 버스트

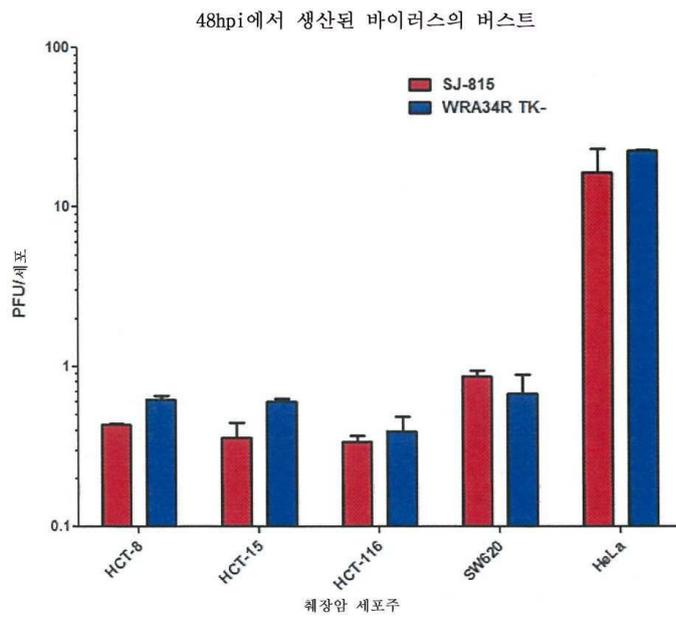


췌장암 세포주

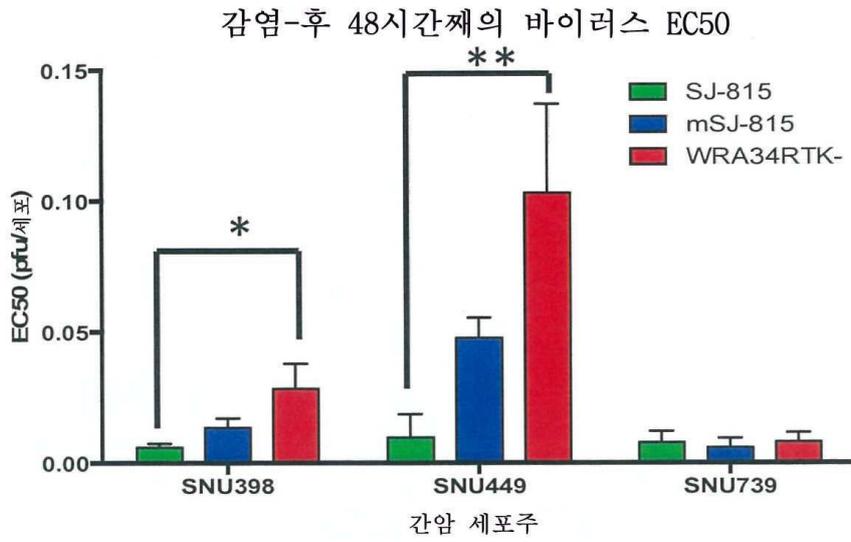
도면5a



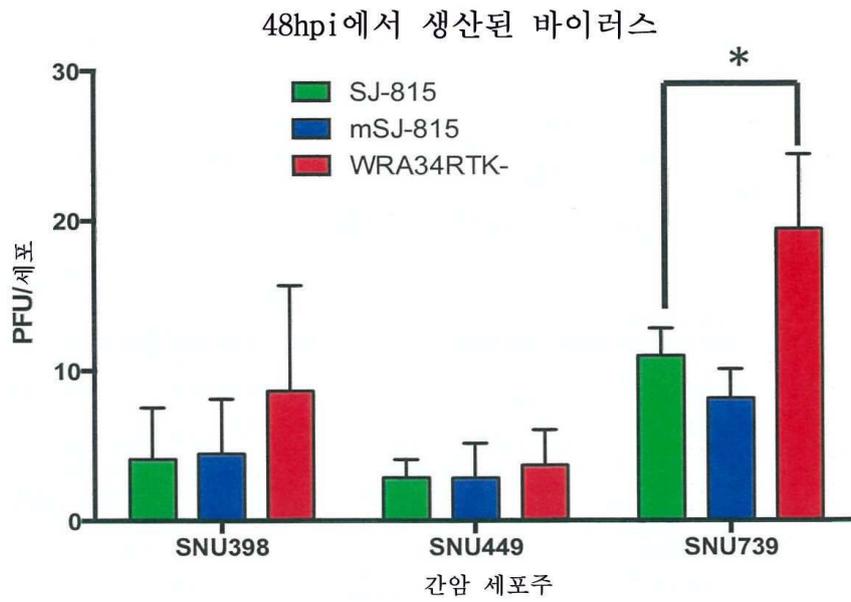
도면5b



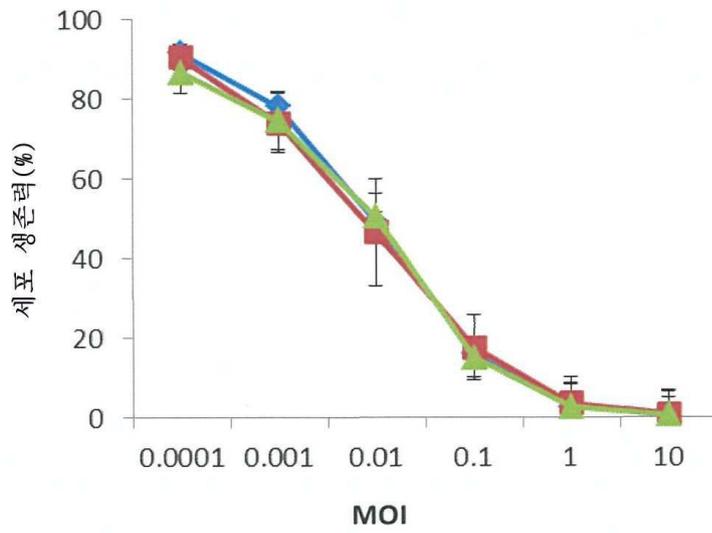
도면6a



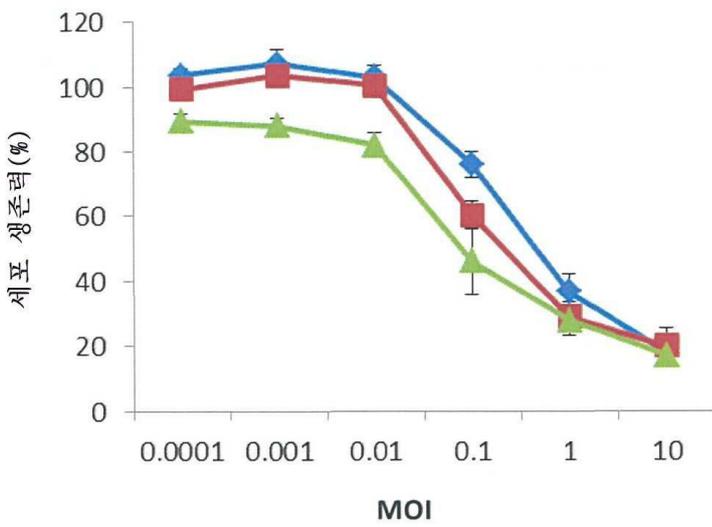
도면6b



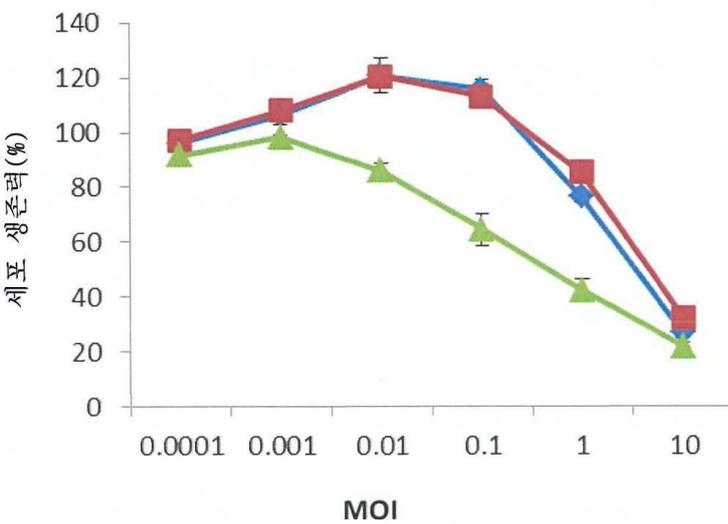
도면7a



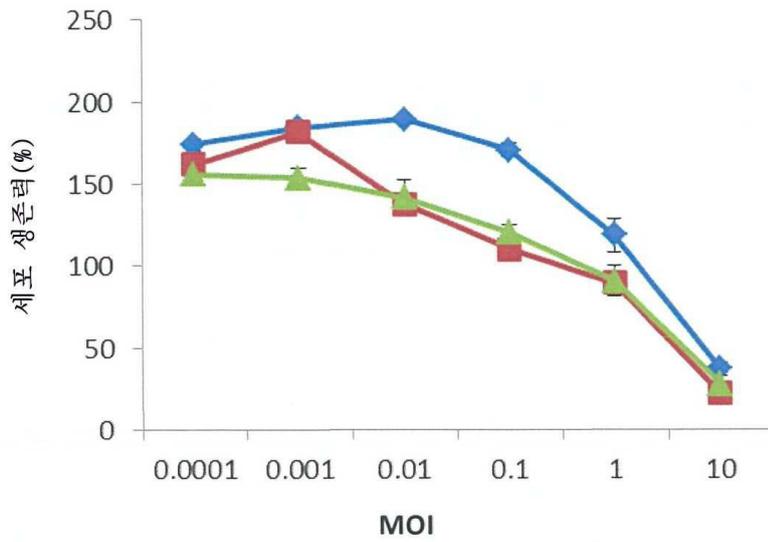
도면7b



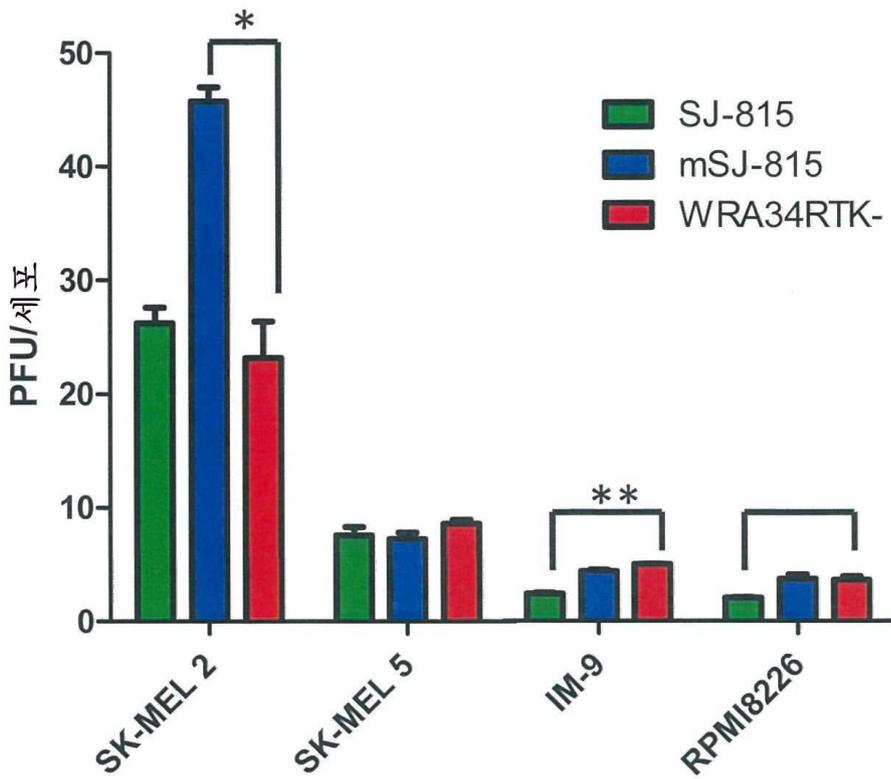
도면7c



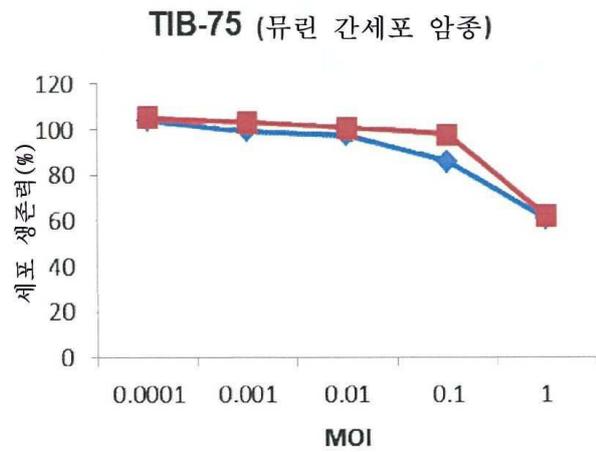
도면7d



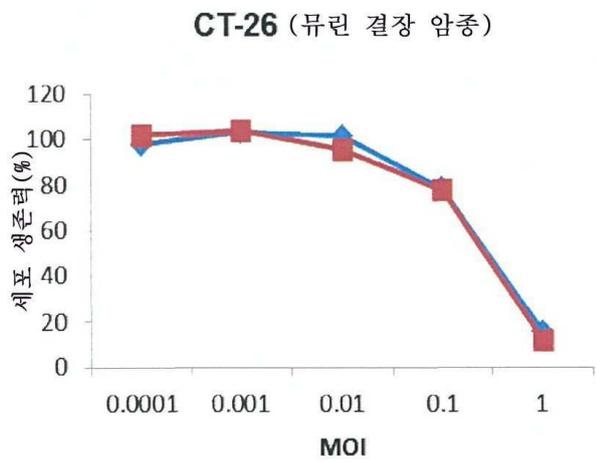
도면8



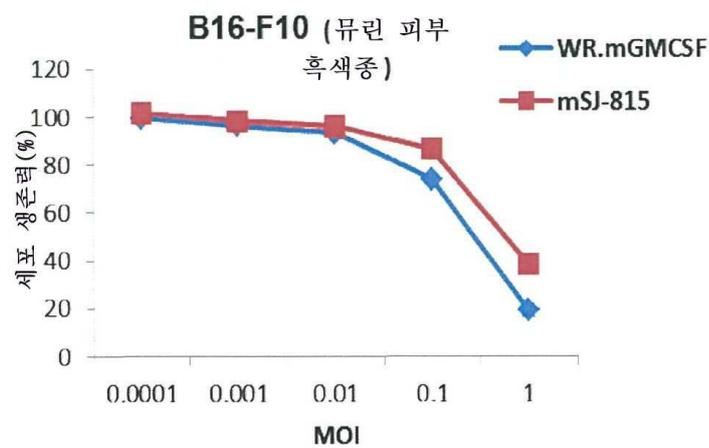
도면9a



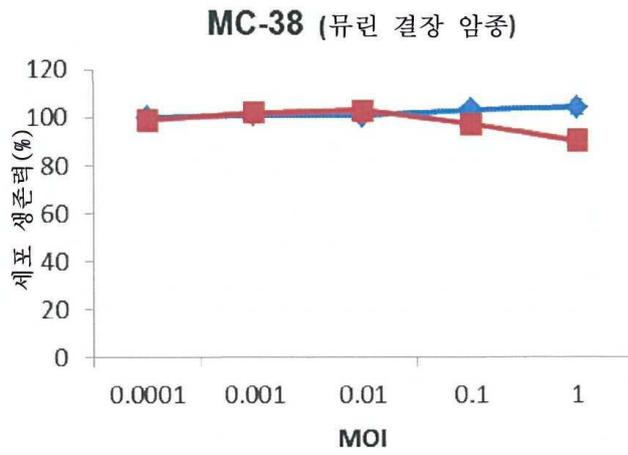
도면9b



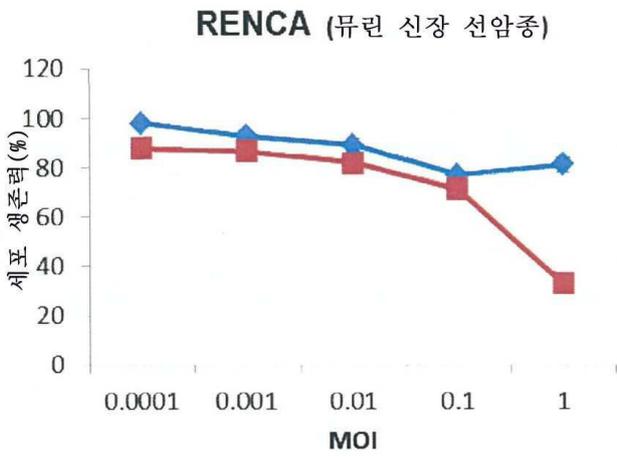
도면9c



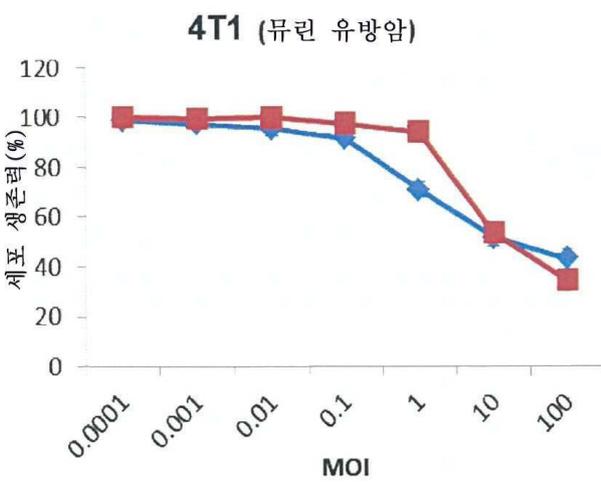
도면9d



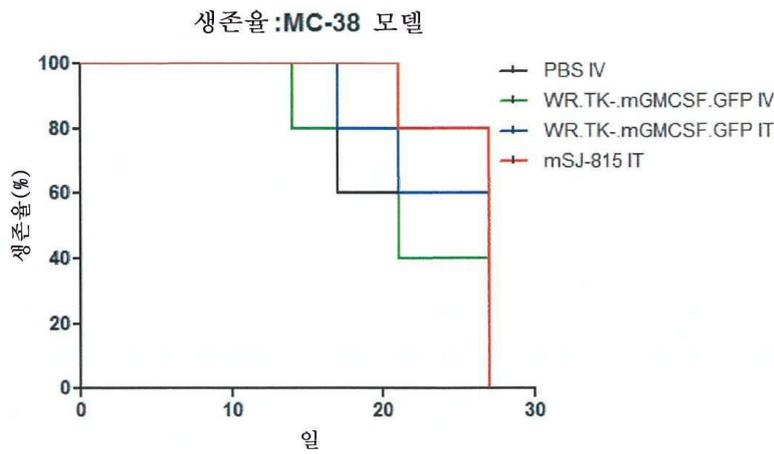
도면9e



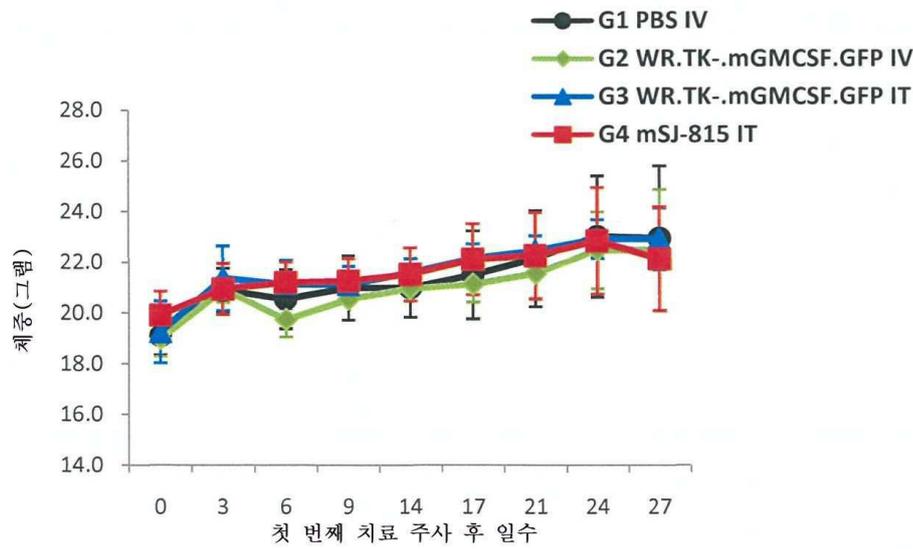
도면9f



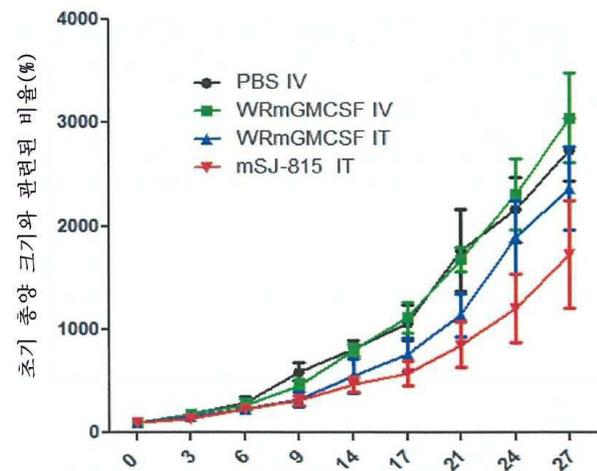
도면10a



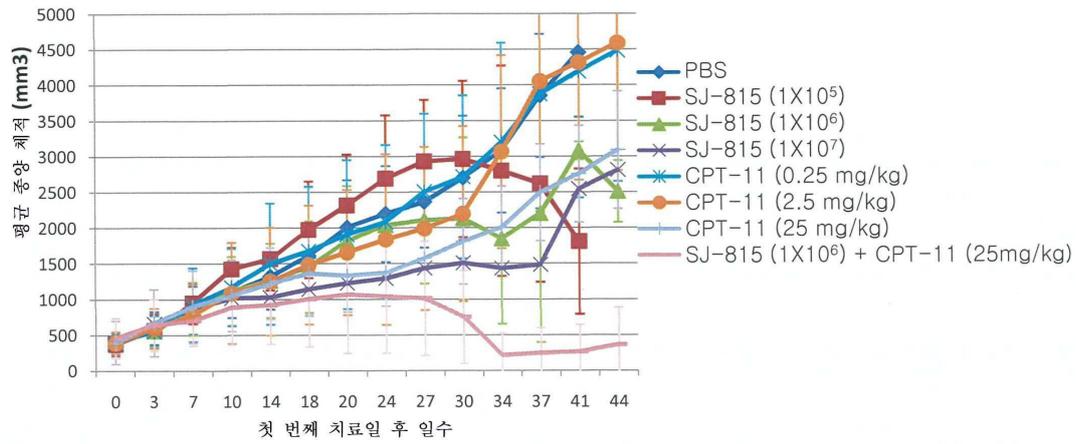
도면10b



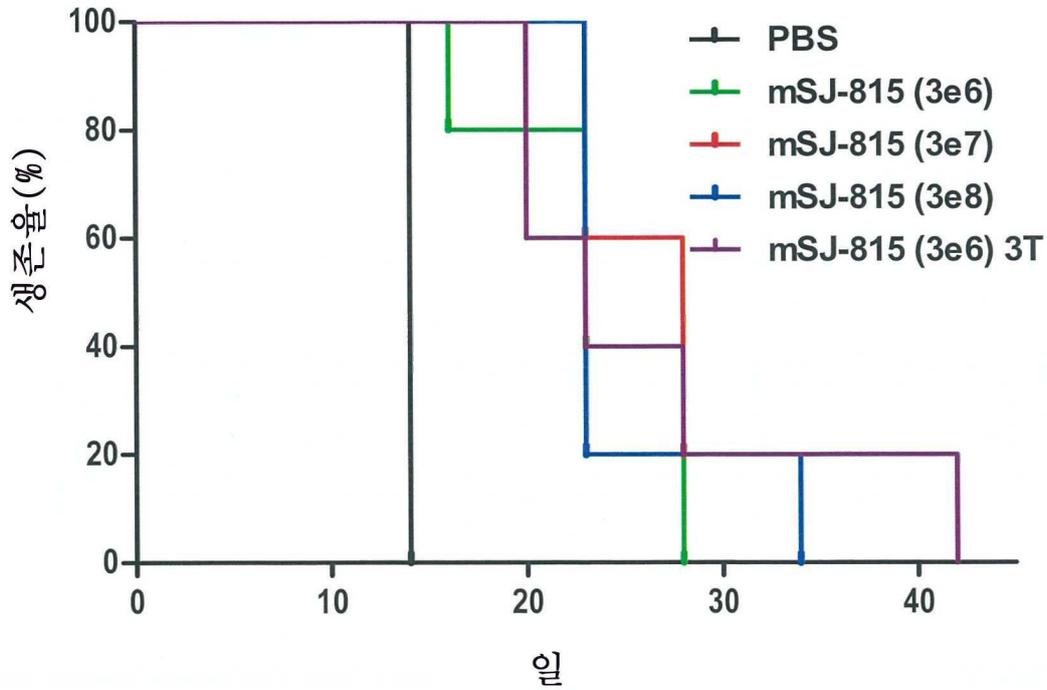
도면10c



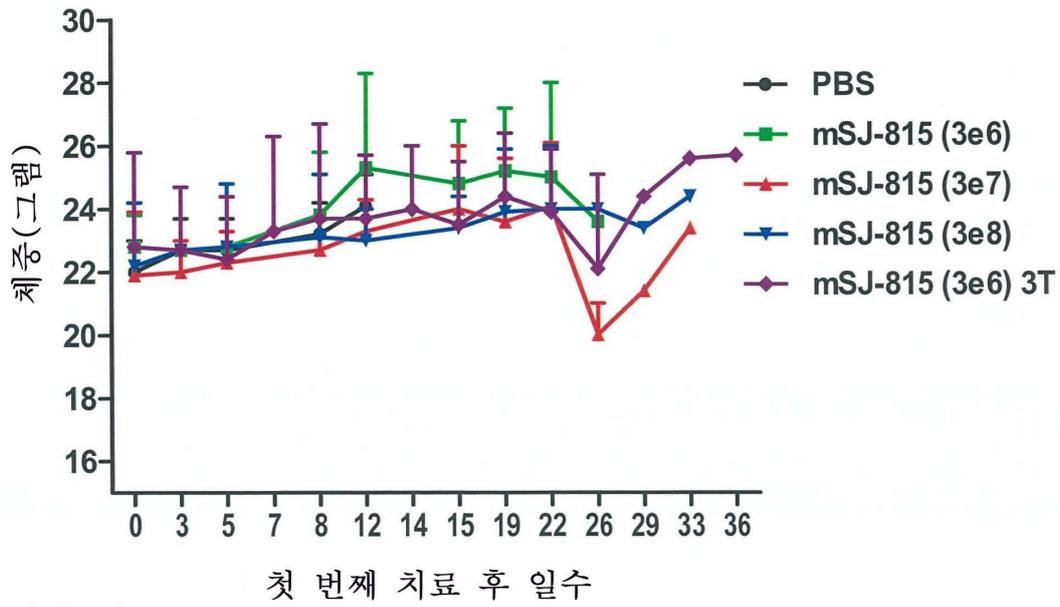
도면11



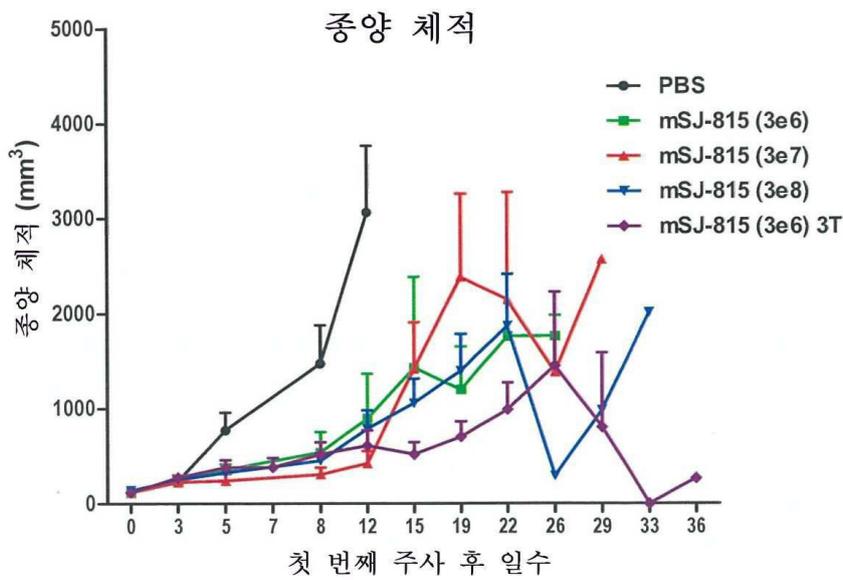
도면12a



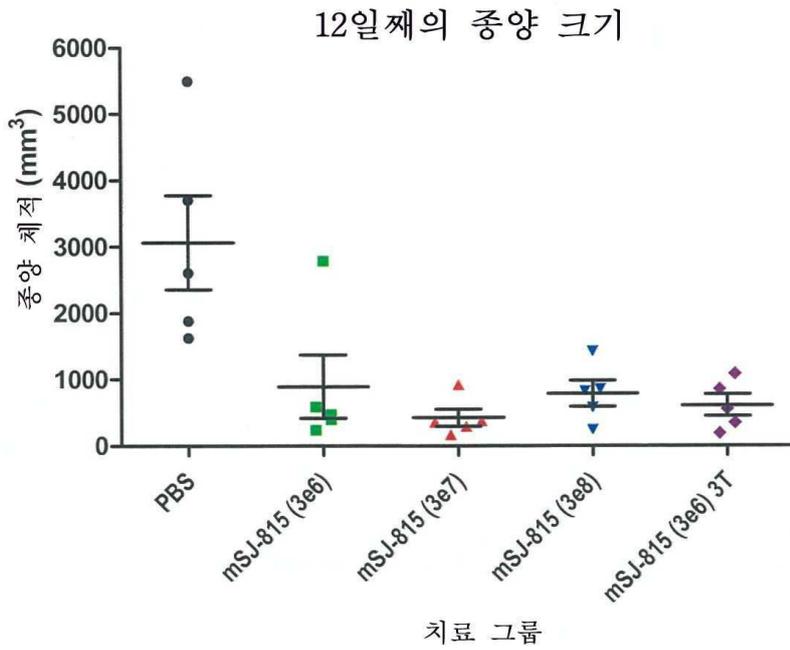
도면12b



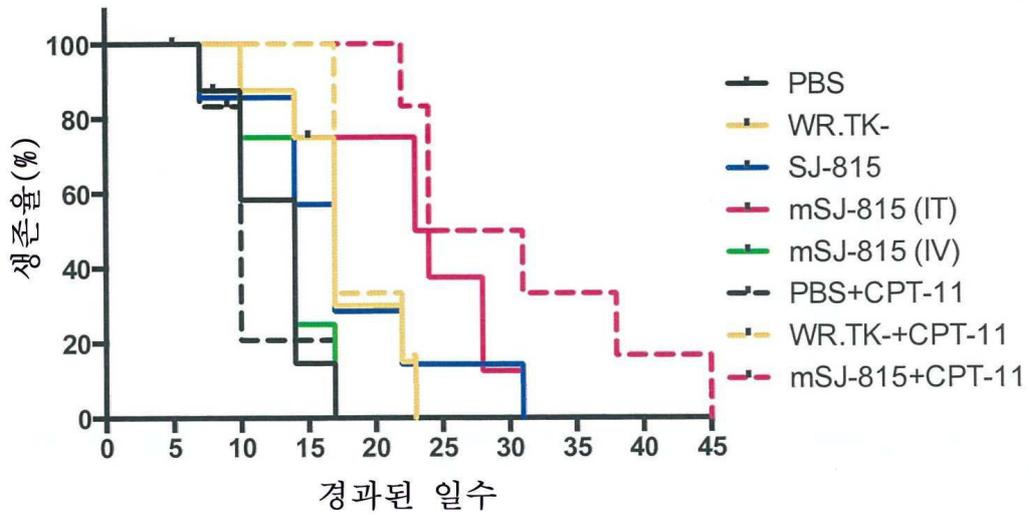
도면13a



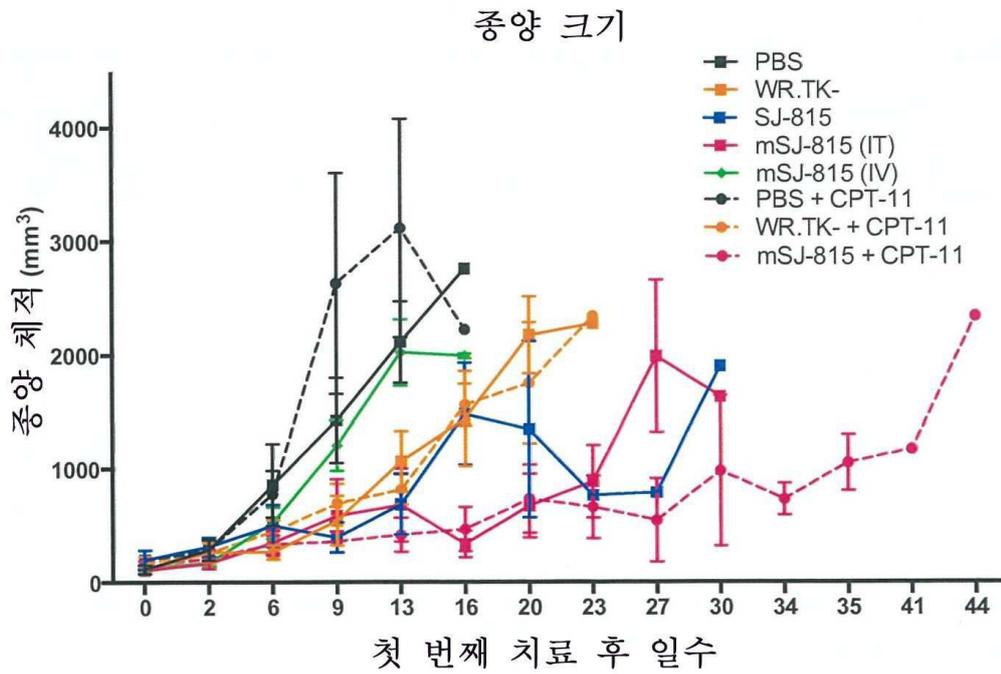
도면13b



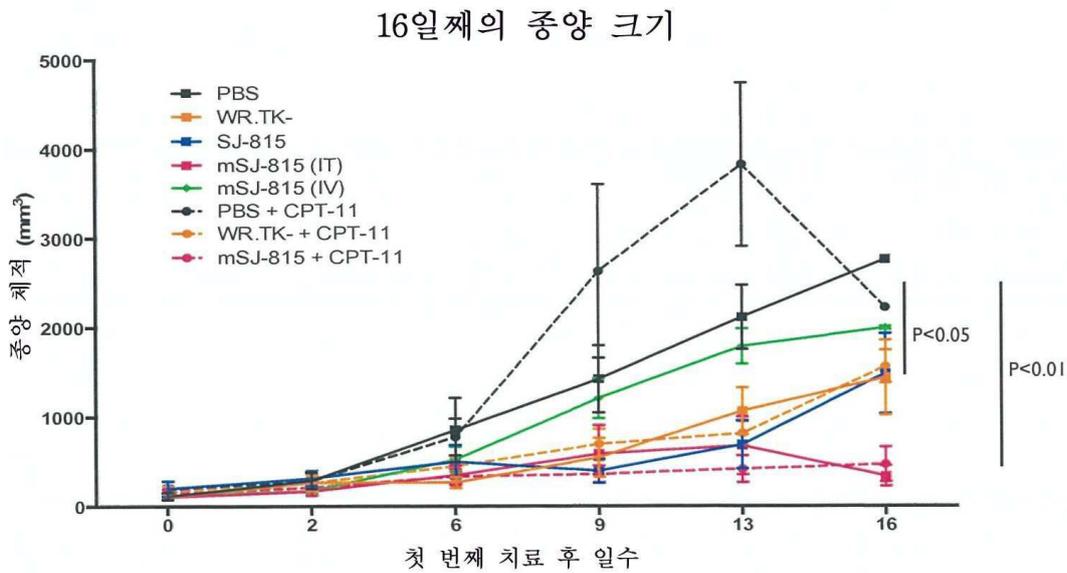
도면14



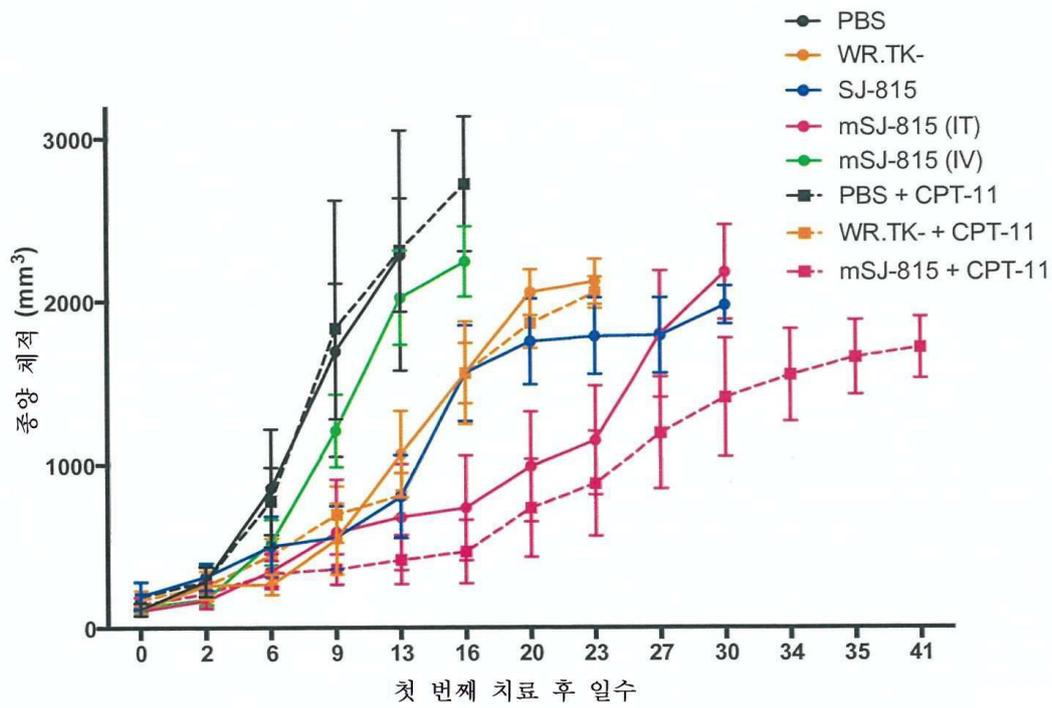
도면15a



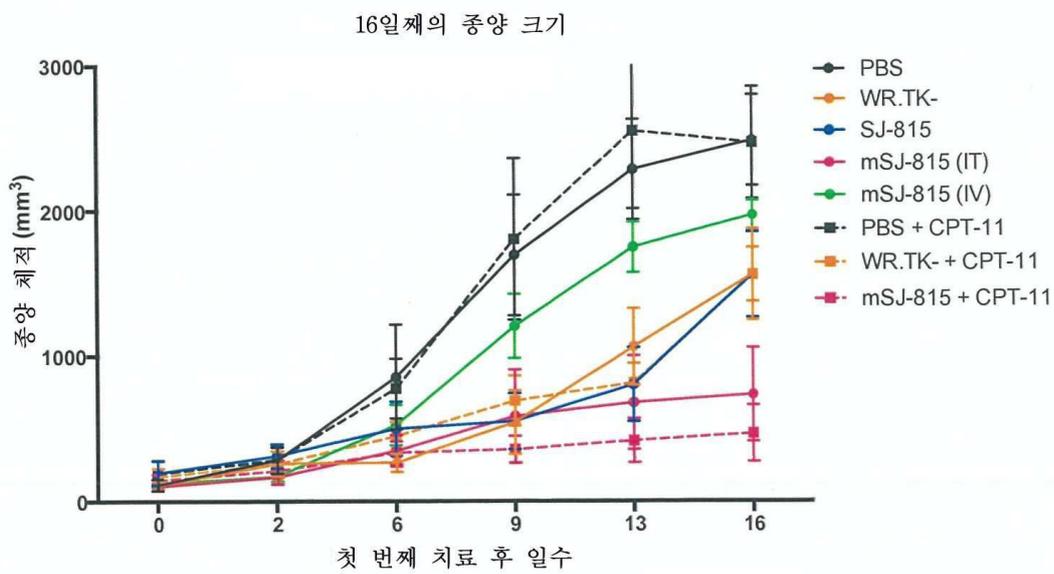
도면15b



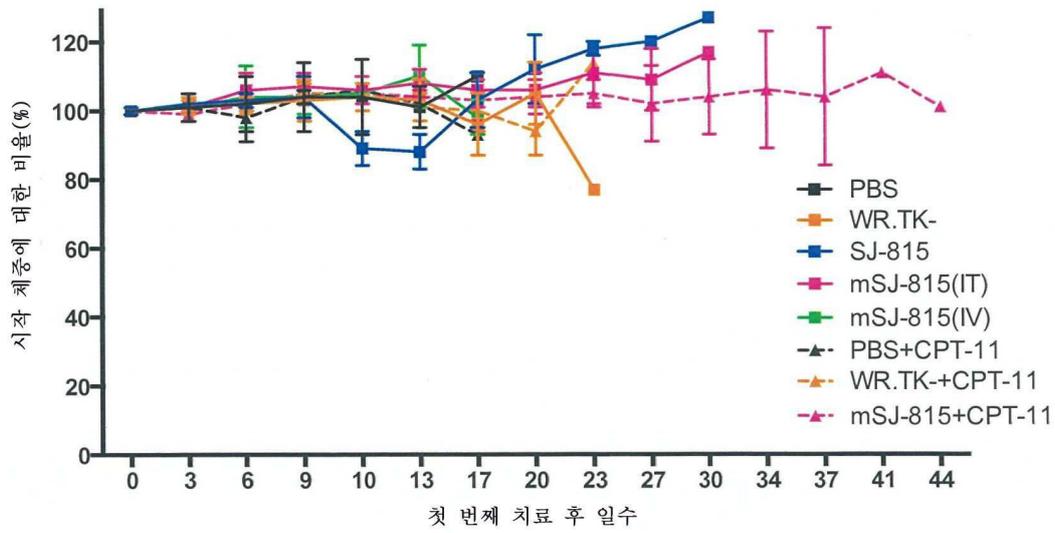
도면15c



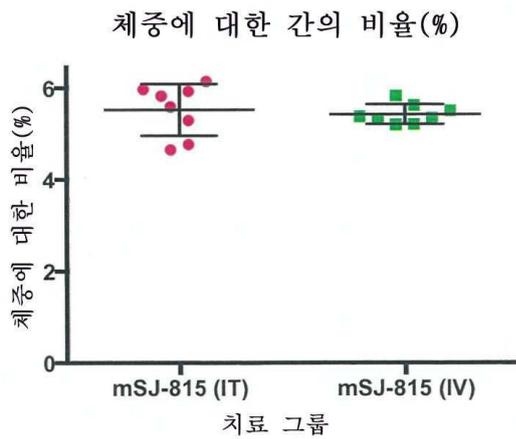
도면15d



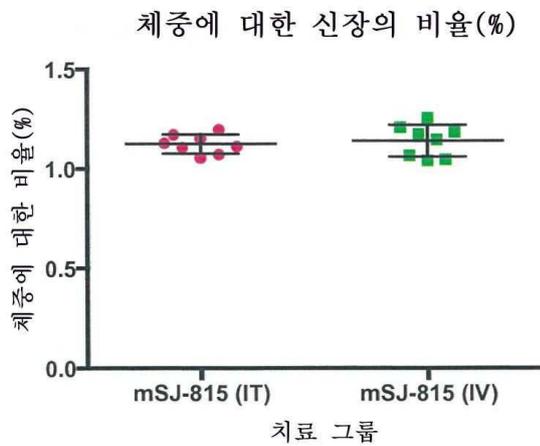
도면16



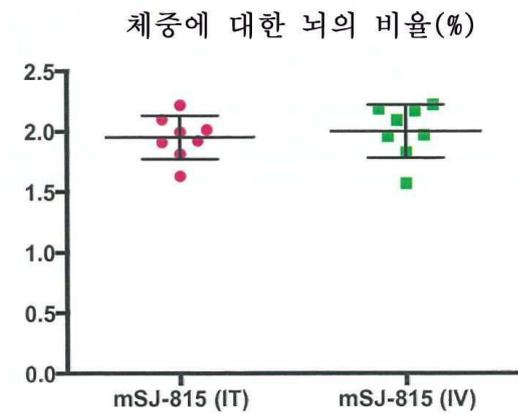
도면17a



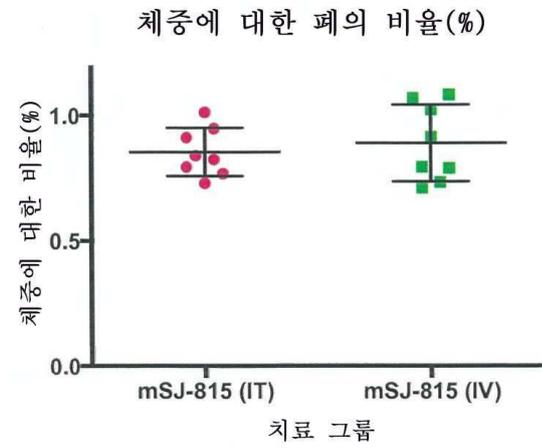
도면17b



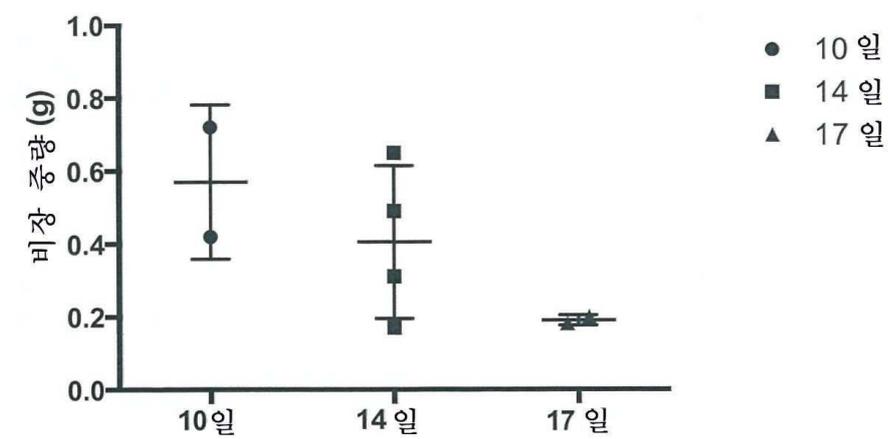
도면17c



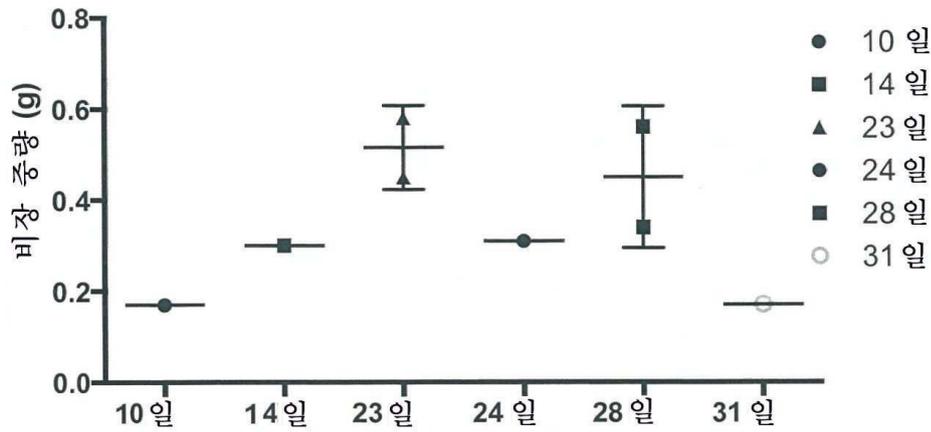
도면17d



도면18a



도면18b



도면19

