



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0031485
(43) 공개일자 2021년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/15 (2014.01)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/76 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7004009
- (22) 출원일자(국제) 2019년07월12일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년02월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/041700
- (87) 국제공개번호 WO 2020/014670
국제공개일자 2020년01월16일
- (30) 우선권주장
62/697,581 2018년07월13일 미국(US)

- (71) 출원인
아리조나 보드 오브 리젠츠 온 비하프 오브 아리
조나 스테이트 유니버시티
미국 아리조나주 85257-3538 스코츠데일 스카이
송-스위트 200 노스 스코츠데일 로드 1475
- (72) 발명자
맥패든 그랜트
미국 85257 애리조나주 스코츠데일 스위트 200 노
스 스코츠데일 로드 1475
크리스티 존
미국 85257 애리조나주 스코츠데일 스위트 200 노
스 스코츠데일 로드 1475
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 49 항

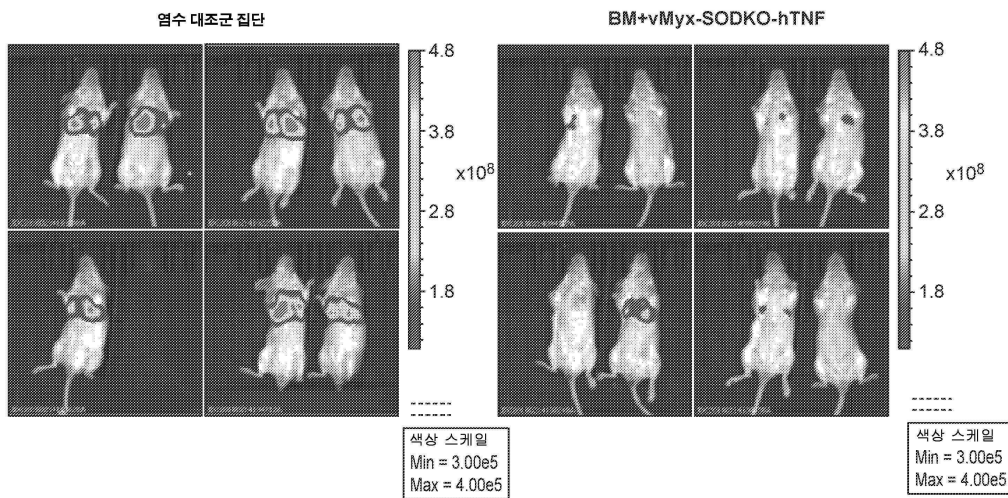
(54) 발명의 명칭 TNF를 발현하는 점액종 바이러스로 암을 치료하는 방법

(57) 요약

특정 실시양태에서, TNF 발현 점액종 바이러스를 사용하여 암을 억제 또는 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시된다. 또한, TNF 발현 점액종 바이러스로 처리된 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포를 사용하여 암을 억제 또는 치료하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 일부 측면은 본 명세서에서 설명되는 하나 이상의 방법과 함께 사용하기 위한 조작된 점액종 바이러스 및 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도

vMyx-SODKO-hTNF 동물은 접종후 제2주에 현저히 작은 종양을 갖는다



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/76 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 2710/24022 (2013.01)
C12N 2710/24033 (2013.01)

(72) 발명자

블랫맨 조셉

미국 85257 애리조나주 스코츠데일 스위트 200 노
스 스코츠데일 로드 1475

라흐만 모하메드 마스무두르

미국 85257 애리조나주 스코츠데일 스위트 200 노
스 스코츠데일 로드 1475

비야 낸시 야네스

미국 85257 애리조나주 스코츠데일 스위트 200 노
스 스코츠데일 로드 1475

명세서

청구범위

청구항 1

중양 피사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액종 바이러스(MYXV)로서, 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자에서의 변형 또는 상기 유전자에 인접한 위치에서의 변형을 포함하는 점액종 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, TNF 단백질은 TNF 알파 단백질인 점액종 바이러스.

청구항 3

제2항에 있어서, TNF 단백질은 표면 TNF 단백질인 점액종 바이러스.

청구항 4

제2항에 있어서, TNF 단백질은 가용성 TNF 단백질인 점액종 바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서, TNF 단백질은 인간 TNF 단백질인 점액종 바이러스.

청구항 6

제1항에 있어서, 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자는 M11L, M063, M135R, M136R, M-T2, M-T4, M-T5, 또는 M-T7을 포함하는 것인 점액종 바이러스.

청구항 7

제1항에 있어서, M135R 유전자의 부분 결실 또는 완전 결실을 포함하는 점액종 바이러스.

청구항 8

제1항에 있어서, M135R 유전자의 기능을 손상시키는 M135R 유전자의 변형을 포함하는 점액종 바이러스.

청구항 9

제1항에 있어서, TNF 단백질은 MYXV 게놈 내의 M135R 유전자를 대체하는 것인 점액종 바이러스.

청구항 10

제1항에 있어서, TNF 단백질은 MYXV 게놈 내의 M135R 유전자와 M136R 유전자 사이에 삽입되는 것인 점액종 바이러스.

청구항 11

제1항에 있어서, 형광 단백질을 추가로 포함하는 점액종 바이러스.

청구항 12

제1항에 있어서, 로잔 종(*Lausanne strain*)인 점액종 바이러스.

청구항 13

제1항에 있어서, vMyx-M135KO-hTNF인 점액종 바이러스.

청구항 14

제1항에 있어서, vMyx-hTNF-M135-136인 점액중 바이러스.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 점액중 바이러스, 및 억제학상 허용되는 부형제를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 전신 투여용으로 제제화되는 것인 억제학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 국소 투여용으로 제제화되는 것인 억제학적 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 투여용으로 제제화되는 것인 억제학적 조성물.

청구항 19

종양 괴사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액중 바이러스(MYXV)에 의해 생체 외에서 처리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수(BM) 세포, 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, MYXV는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 점액중 바이러스인 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, MYXV는 vMYX-SODKO-hTNF인 조성물.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합은 자가 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합은 이종 공여자로부터 획득되는 것인 조성물.

청구항 24

암의 억제 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게, 종양 괴사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액중 바이러스(MYXV)를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 암을 억제 또는 치료하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, MYXV는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 점액중 바이러스인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, MYXV는 vMYX-SODKO-hTNF인 방법.

청구항 27

암의 억제 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게, 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 암을 억제 또는 치료하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 점액중 바이러스를 생체 외에서 PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합의 표면 상에 흡착시키는 단

계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 점액중 바이러스를 PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합의 표면 상에 흡착시키는 단계는, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합의 표면에 대한 점액중 바이러스의 결합을 허용하는 조건 하에 PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합을 점액중 바이러스에 노출시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 조건은 약 4℃ 내지 약 37℃의 온도를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 조건은 약 20℃ 내지 약 37℃, 약 20℃ 내지 약 28℃, 약 24℃ 내지 약 26℃, 약 30℃ 내지 약 37℃, 또는 약 35℃ 내지 약 37℃의 온도를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 조건은 적어도 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간 또는 그 초과인 인큐베이션 시간을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합은 대상체 또는 HLA 관련 공여자로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 흡착된 PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합을 대상체에게 전신 투여하는 것인 방법.

청구항 35

제24항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 고형 종양인 방법.

청구항 36

제24항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 대상체의 제2 위치로 전이되는 것인 방법.

청구항 37

제24항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 위치는 대상체의 폐, 뇌, 간 및/또는 림프절을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제24항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 골육종, 삼중 음성 유방암 또는 흑색종을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제24항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 추가의 치료제는 면역 체크포인트 조절제인 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 추가의 치료제를 MYXV 또는 조성물을 투여하기 전에 대상체에게 투여하는 것인

방법.

청구항 42

제39항 또는 제40항에 있어서, 추가의 치료제를 MYXV 또는 조성물을 투여한 후에 대상체에게 투여하는 것인 방법.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 치료제를 MYXV 또는 조성물과의 조합으로서 대상체에게 투여하는 것인 방법.

청구항 44

제24항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 암을 앓고 있거나 또는 앓고 있을 것으로 의심되는 대상체를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

제24항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 점액종 바이러스는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 감염시킬 수 있는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포는 암 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제24항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 점액종 바이러스로 감염된 세포는 TNF를 발현하는 것인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 점액종 바이러스, 제15항 내지 제18항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물, 또는 제19항 내지 제23항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 7월 13일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/697,581호의 이익을 주장하며, 상기 출원은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 미국 연방 정부의 연구 지원에 대한 언급

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)이 제공하는 P50 CA186781에 따른 정부의 지원을 통해 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 다양한 유형의 암을 치료하기 위해 사용되는 현재의 치료법은 암 세포를 파괴하거나 죽임으로써 작용하는 경향이 있다. 불행히도, 암 세포에 독성이 있는 치료법은 일반적으로 건강한 세포에도 독성이 있는 경향이 있다. 더욱이, 종양의 이질적인 특성은 암에 대한 효과적인 치료가 여전히 어려운 주된 이유 중의 하나이다. 화학 요법 및 방사선 요법과 같은 현재의 주류 요법은 좁은 독성 치료 범위 내에서 사용되는 경향이 있다. 이러한 유형의 치료법은 다양한 유형의 종양 세포 및 이러한 치료를 실시할 수 있는 제한된 범위로 인해 적용 가능성이 제한된 무던 도구로 간주된다.

발명의 내용

[0006] 개시내용의 요약

[0007] 특정 실시양태에서, TNF 단백질을 발현하도록 조작된 점액종 바이러스(MYXV)를 사용하여 암을 억제 또는 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, TNF 발현 점액종 바이러스로 처리된 말초 혈액 단핵 세포 및/또는 골수 세포를 사용하여 암을 억제 또는 치료하는 방법이 또한 본원에서 설명된다. 추가의 실시양태에서, 본원에서 설명되는 방법 중 하나 이상과 함께 사용하기 위한, 조작된 점액종 바이러스 및 억제학적 조성물이 본원에서 설명된다.

[0008] 특정 실시양태에서, 종양 괴사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액종 바이러스(MYXV)가 본원에서 개시되며, 여기서 MYXV는 토끼 세포 친화성(tropism)과 관련된 하나 이상의 유전자에서의 변형 또는 상기 유전자에 인접한 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 TNF 알파 단백질이다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 표면 TNF 단백질이다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 가용성 TNF 단백질이다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 인간 TNF 단백질이다. 일부 실시양태에서, 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자는 M11L, M063, M135R, M136R, M-T2, M-T4, M-T5, 또는 M-T7을 포함한다. 일부 실시양태에서, MYXV는 M135R 유전자의 부분 결실 또는 완전 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, MYXV는 M135R 유전자의 기능을 손상시키는 M135R 유전자의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 MYXV 게놈 내의 M135R 유전자를 대체한다. 일부 실시양태에서, TNF 단백질은 MYXV 게놈 내의 M135R 유전자와 M136R 유전자 사이에 삽입된다. 일부 실시양태에서, MYXV는 형광 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, MYXV는 로잔 종(Lausanne strain)이다. 일부 실시양태에서, MYXV는 vMyx-M135KO-hTNF이다. 일부 실시양태에서, MYXV는 vMyx-hTNF-M135-136이다.

[0009] 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 점액종 바이러스 및 억제학적 허용되는 부형제를 포함하는 억제학적 조성물이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 억제학적 조성물은 전신 투여용으로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 억제학적 조성물은 국소 투여용으로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 억제학적 조성물은 비경구 투여용으로 제제화된다.

[0010] 특정 실시양태에서, 종양 괴사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액종 바이러스(MYXV)에 의해 생체 외에서 처리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수(BM) 세포, 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, MYXV는 본원에서 설명되는 점액종 바이러스이다. 일부 실시양태에서, MYXV는 vMYX-SODKO-hTNF이다. 일부 실시양태에서, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합은 자가 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합은 이중 공여자로부터 획득된다.

[0011] 특정 실시양태에서, 암의 억제 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게, 종양 괴사 인자(TNF) 단백질을 발현하도록 조작된 점액종 바이러스(MYXV)를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 암을 억제 또는 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, MYXV는 본원에서 설명되는 점액종 바이러스이다. 일부 실시양태에서, MYXV는 vMYX-SODKO-hTNF이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 대상체에서 제 2 위치로 전이된 것이다. 일부 실시양태에서, 제 2 위치는 대상체의 폐, 뇌, 간 및/또는 림프절을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 골육종, 삼중 음성 유방암 또는 흑색종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가의 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 면역 체크포인트 조절제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물을 투여하기 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물을 투여한 후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물과의 조합으로서 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 암을 앓고 있거나 또는 앓고 있을 것으로 의심되는 대상체를 선택하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 점액종 바이러스는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 감염시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 점액종 바이러스로 감염된 세포는 TNF를 발현한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 암의 억제 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에서 설명되는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 암을 억제 또는 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 점액종 바이러스를 생체 외에서 PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합의 표면에 흡착시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합의 표면에 점액종 바이러스를 흡착시키는 것은 PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합의 표면에 대한 점액종 바이러스의 결합을 허용하는 조건 하에 PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합을 점액종 바이러스에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조건은 약 4°C 내지 약 37°C의

온도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조건은 약 20°C 내지 약 37°C, 약 20°C 내지 약 28°C, 약 24°C 내지 약 26°C, 약 30°C 내지 약 37°C, 또는 약 35°C 내지 약 37°C의 온도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조건은 적어도 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간 또는 그 초과인 인큐베이션 시간을 포함한다. 일부 실시양태에서, PBMC, BM 세포 또는 이들의 조합은 대상체 또는 HLA 관련 공여자로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 바이러스가 흡착된 PBMC, BM 세포, 또는 이들의 조합은 대상체에게 전신 투여된다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 대상체에서 제2 위치로 전이되었다. 일부 실시양태에서, 제2 위치는 대상체의 폐, 뇌, 간 및/또는 림프절을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 골육종, 삼중 음성 유방암 또는 흑색종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가의 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 면역 체크포인트 조절제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물을 투여하기 전에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물을 투여한 후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 MYXV 또는 조성물과의 조합으로서 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 암을 앓고 있거나 또는 앓고 있을 것으로 의심되는 대상체를 선택하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 점액종 바이러스는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 감염시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 점액종 바이러스로 감염된 세포는 TNF를 발현한다.

[0013] 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 점액종 바이러스, 본원에서 설명되는 약제학적 조성물, 또는 본원에서 설명되는 조성물을 포함하는 키트가 본원에 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 본 발명의 특정 실시양태의 신규한 특징은 첨부된 청구 범위에서 구체적으로 제시된다. 본 발명의 원리가 사용되는 예시적인 실시양태를 설명하는 다음의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조하여 본 발명의 특징 및 이점에 대해 보다 잘 이해할 수 있을 것이다:

도 1은 vMyx-SODKO-hTNF 삽입 플라스미드의 유전자 지도 및 바이러스 구축에 대한 개요를 보여준다. 이 플라스미드는 vMyx-SODKO-hTNF 바이러스의 구축을 위해 vMyx-LacZ 바이러스로 감염되기 전에 RK-13 세포의 형질감염을 위해 사용되었다.

도 2a 및 도 2b는 2개의 예시적인 상이한 조작된 MYXV의 유전자 지도를 보여준다. 도 2a는 vMyx-135KO-hTNF 삽입 플라스미드의 유전자 지도 및 재조합 점액종 바이러스의 유전자 지도의 개요를 보여준다. 이 바이러스는 바이러스 M135R 유전자의 녹아웃(knockout)을 가지고 있음에 주목하여야 한다. 도 2b는 vMyx-hTNF-(MT35-136) 삽입 플라스미드의 유전자 지도 및 상기 재조합 점액종 바이러스의 구축에 대한 개요를 보여준다. TNF 도입 유전자(transgene)가 바이러스 M135R과 M136R 유전자 사이의 유전자간 유전자좌에 삽입되어 유전자 녹아웃이 없기 때문에, 상기 바이러스는 야생형 MYXV 백본을 가지고 있음에 주목하여야 한다. 각각의 플라스미드는 각각 vMyx-M135KO-hTNF(도 2a) 및 vMyx-hTNF-(M135-136)(도 2b) 바이러스의 구축을 위해 모 야생형 vMyx-LacZ로 감염되기 전에 RK-13 세포의 형질감염을 위해 사용되었다..

도 3은 K7M2-Luc 종양 접종 2주 후의 Balb/c 마우스의 이미지 세트이다. 처리되지 않은 동물은 폐에서 진행된 종양을 보이는 반면(왼쪽), vMyx-SODKO-hTNF 처리된 동물은 상당히 더 작은 종양을 나타낸다(오른쪽). 동물을 제0일에 2×10^6 개의 K7M2-luc 세포를 접종하고, 처리 전에 1시간 동안 vMyx-SODKO-hTNF로 감염된 4×10^6 개의 생체 외 BM로 처리하였다. 이어서, 제2주에 동물에게 루시페린을 IP 주사하고, IVIS 영상화 시스템을 사용하여 영상화하였다. 모든 동물에 대해 종양 발광을 계산하고, 표준화하였다.

도 4는 hTNF를 발현하는 점액종 바이러스(MYXV)가 로딩된 골수가 다른 MYXV 구축물에 비해 우수한 종양 용해 능력을 갖는다는 것을 보여주는 그래프이다. 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선은 vMyx-SODKO-hTNF가 대조군 코호트에 비해 평균 생존을 유의하게 증가시키는 것으로 시험된 유일한 MYXV 구축물임을 보여준다. 동물에게 제0일에 2×10^6 개의 K7M2-luc 세포를 접종하고, 처리 전에 1시간 동안 각각의 MYXV 구축물로 감염된 생체의 골수로 처리하였다. 이어서, 안락사 기준이 충족될 때까지 동물을 질환 진행에 대해 모니터링하였다. 접종 후 제8주에, 모든 생존 동물들을 안락사시켰다.

도 5는 처리되지 않은 대조군(왼쪽 이미지)과 vMyx-SODKO-hTNF 바이러스로 처리된 동물(오른쪽 이미지) 사이의 종양 진행 차이를 보여주는, 2주 간격으로 촬영한 두 세트의 이미지이다. 동물에게 제0일에 2×10^6 개의 K7M2-luc

세포를 접종하고, 처리 전에 1시간 동안 vMyx-SODKO-hTNF로 감염된 4×10^6 개의 생체외 PBMC로 처리하였다. 제3주 및 제5주에 동물에게 루시페린을 IP 주사하고, IVIS 영상화 시스템을 사용하여 영상화하였다. 모든 동물에 대해 종양 발광을 계산하고 표준화하였다.

도 6은 생체 외에서 vMyx-SODKO-hTNF 로딩된 PBMC 용량 반응 생존을 보여주는 그래프이다. 점진적으로 증가하는 용량의 Balb/c PBMC 로딩된 vMyx-SODKO-hTNF로 처리된 Balb/c 마우스는 처리되지 않은 대조군보다 유의하게 더 오래 생존한다. 동물에게 제0일에 2×10^6 개의 K7M2-luc 세포를 접종하고, 처리 전에 1시간 동안 각각의 MYXV 구축물로 감염된 생체의 PBMC로 처리하였다. 이어서, 안락사 기준이 충족될 때까지 동물을 질환 진행에 대해 모니터링하였다.

도 7은 vMyx-SODKO-hTNF로 감염된 세포가 세포 표면(회색 및 녹색) 48 hpi에서 hTNF를 발현하는 반면, 대조군 세포는 hTNF(분홍색 및 자주색)에 대해 음성임을 보여주는 일련의 유세포 분석 데이터이다. 세포를 vMyx-SODKO-hTNF로 48시간 동안 실험적으로 감염시켰다. 48 hpi에서, 비-효소적 해리 완충제를 사용하여 세포를 들어올리고, 계수하였다. 그 후, 마우스 항-인간 hTNF PE 접합 항체를 사용하여 세포를 염색하고, 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다.

도 8은 vMyx-SODKO-hTNF로부터의 TNF 발현이 hTNF를 발현하지 않는 대조군 vMyx-M135KO 바이러스에 비해 K7M2-luc 골육종 세포주에서 증가된 세포 사멸을 유발하지 않음을 확인해주는, SYTOX 오렌지를 사용한 세포 사멸 분석 그래프의 세트이다. 세포는 vMyx-M135KO 바이러스 또는 vMyx-SODKO-hTNF 바이러스로 실험적으로 감염되었거나, TNF로 처리되었다. 이어서, 세포를 감염 후 및 처리 후에 24시간 및 48시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 SYTOX 주황색으로 염색하고, 형광 세포의 백분율을 위해 계수하였다. 각각의 웰의 평균 세포 수를 각각의 시점 및 처리에 대해 계수하였다.

도 9는 유세포 분석을 사용하여 감염된 인간 AML(THP1) 세포에 대한 세포 사멸의 정량화를 예시한다. MYXV 매개된 총 THP1 세포 사멸은 Live/Dead 염색으로 세포에 대해 게이팅함으로써 정의되는 바와 같이 APC/Cy7⁺인 세포 집단으로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥(Holm-Sidak) t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다. 결과는 vMyx-SODKO-hTNF-GFP에 의한 THP-1 세포의 감염이 감염 후 두 시점 모두(24시간 및 48시간)에서 시험된 3개의 감염 다중도(MOI = 10, 1 또는 0.1)에서 게이팅된 죽은 세포의 수를 전반적으로 증가시킴을 보여준다.

도 10은 유세포 분석을 사용하여 바이러스에 감염된 인간 AML(THP1) 세포의 MYXV 매개 표적 적중(ON-Target) 사멸의 정량화를 예시한다. THP1 세포의 MYXV 매개 "표적 적중" 사멸은 GFP 양성인 바이러스에 감염된 세포 집단으로부터 게이팅된 APC/Cy7⁺인 세포의 비율로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다.

도 11은 유세포 분석을 사용하여 바이러스에 감염되지 않은 인간 AML(THP1) 세포의 MYXV 유도 표적 이탈(ON-Target) 사멸의 정량화를 예시한다. THP1 세포의 MYXV 매개 표적 이탈 사멸은 GFP 음성인 세포 집단으로부터 게이팅된 APC/Cy7⁺인 세포의 비율로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다.

도 12는 유세포 분석을 사용하여 감염된 인간 다발성 골수종(U266) 세포의 세포 사멸의 정량화를 예시한다. MYXV 매개 총 U266 사멸은 APC/Cy7⁺인 세포 집단으로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다.

도 13은 면역 적격 마우스에서 미리 접종된 무린 다발성 골수종을 제거하기 위해 생체 외에서 로딩된 동계(syngeneic) 무린 골수 백혈구를 통해 전달된 vMyx-SODKO-hTNF에 대한 시험을 보여준다. 도 13a는 C57/B1 마우스에 이식된 보르테조미브 내성 VK*12598 골수종 세포를 사용한 생체내 데이터를 보여주며, 여기서 상기 세포는 대부분 골수 및 비장으로 이동한다. 암 이식 100일 후 생존 곡선이 생성되었다(도 13b). 도 13c는 생존율에 상응한다.

도 14는 SMAC 모방체 또는 면역 체크포인트 억제제와 함께 BM 백혈구에 대해 생체 외에서 미리 로딩된 vMyx-hTNF-(M135-M136)을 사용한 조합 요법을 보여준다. 조합 요법은 생체 외에서 미리 로딩된 자가 무린 골수 백혈

구를 통해 전달된 vMyx-hTNF-(M135-M136)와 조합된, SMAC 모방체 화합물 LCL161(50 mg/Kg) 또는 체크포인트 억제제 모노클로날 항체(mAb) α-muPD-1을 사용하여 시험되었다(도 14a). 도 14b는 생존 곡선을 포함하는 생체내 데이터를 보여준다. 도 14c는 생존율을 설명한다.

도 15는 vMyx-hTNF-(M135-136)으로 감염된 인간 세포로부터 인간 TNF 단백질 발현 및 부분 분비를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] **개시내용의 상세한 설명**
- [0016] **특정 용어**
- [0017] 특별한 언급이 없는 한, 기술 용어는 통상적인 사용법에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 일반적인 용어의 정의는 문헌 [Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCR Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 볼 수 있다.
- [0018] 달리 설명하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에서 설명된다. 또한, 물질, 방법 및 실시에는 단지 예시일 뿐이며, 본 개시내용을 제한하려는 의도가 아니다.
- [0019] 본 명세서에서 "일부의 실시양태", "한 실시양태", "하나의 실시양태" 또는 "다른 실시양태"에 대한 언급은 실시양태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 일부의 실시양태에 포함되지만, 반드시 모든 실시양태에 포함되는 것은 아니라는 것을 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되며, 설명되는 주제를 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.
- [0021] 용어 및 방법에 대한 다음 설명은 본 발명의 화합물, 조성물 및 방법을 더 잘 설명하고, 본 개시내용의 실행시에 관련 기술 분야의 통상의 기술자를 안내하기 위해 제공된다. 또한, 본 개시내용에서 사용되는 용어는 특정 실시양태 및 예를 설명하기 위한 것으로서, 본 발명을 제한하려는 의도가 아님을 이해하여야 한다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않는 한, 복수형도 포함하도록 의도된다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로 표현될 수 있다. 약은 또한 정확한 양도 포함한다. 따라서, "약 5 μL"는 "약 5 μL" 및 또한 "5 μL"을 의미한다. 일반적으로, 용어 "약"은 실험 오차 내에 있을 것으로 예상되는 양을 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "및/또는"은 하나 이상의 연관된 나열된 항목의 임의의 및 모든 가능한 조합뿐만 아니라, 대안적("또는")으로 해석될 때 조합의 결여를 의미하고 포함한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "하나 이상의" 또는 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 이를 초과하는 임의의 수까지를 의미할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하다"는 "포괄하다"를 의미한다. 따라서, "A 또는 B 포함"은 A, B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다.
- [0027] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 치료 및/또는 유익한 효과일 수 있는 원하는 효과를 생성하기에 충분한 본 발명의 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 유효량은 대상체의 연령, 일반적인 상태, 치료되는 병태의 중증도, 투여되는 특정 작용제, 치료 기간, 임의의 병용 치료의 특성, 사용된 약제학상 허용되는 담체, 및 관련 기술 분야의 통상의 기술자의 지식 및 전문성 내의 유사한 인자에 따라 달라질 것이다. 적절하게, 임의의 개별 사례에서 유효량 또는 치료 유효량은 관련 교재 및 문헌을 참조하고/하거나, 일상적인 실험을 사용하여 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy (최신 판)] 참조).
- [0028] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되며, 인간 및 비인간 동물을 모두 지칭한다. 본 개시내용의 "비인간 동물"이라는 용어는 모든 척추동물, 예를 들어

포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트 등) 등을 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간 환자이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 대상체는 인간 대상체이다.

- [0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포"는 단일 세포뿐만 아니라, 복수의 세포 또는 세포 집단을 포함한다. 작용제를 세포에 투여하거나 노출시키는 것은 시험관내 및 생체내 투여를 모두 포함한다.
- [0030] "이를 필요로 하는 대상체" 또는 "필요로 하는 대상체"는 고형 종양과 같은 암을 앓고 있는 것으로 알려져 있거나 앓고 있을 것으로 의심되는 대상체이다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암"은 분화 상실, 성장 속도 증가, 주변 조직 침습과 함께 특징적인 역형성을 겪고 전이될 수 있는 악성 신생물을 지칭한다.
- [0032] 잔류 암은 암을 감소시키거나 근절하기 위해 대상체에게 제공된 임의의 형태의 치료 후에 대상체에 남아있는 암이다. 전이성 암은 전이성 암이 유래된 원래의(원발성) 암의 기원 부위가 아닌 신체의 하나 이상의 다른 부위, 예를 들어 제2 부위의 암이다. 국소 재발은 원래의 암과 같은 부위(예를 들어, 동일한 조직)에 또는 그 근처에서 암이 재발하는 것이다.
- [0033] 육종 및 암종과 같은 고형 암의 예는 다음을 포함한다: 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 골원성 육종 및 기타 육종, 활액종, 증피종, 유잉(Ewing) 육종, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프계 종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 비-소세포 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신세포 암종, 간종양, 담관 암종, 용모막 암종, 윌름스(Wilms) 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 방광 암종 및 CNS 종양(예를 들어, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종).
- [0034] 혈액암의 예는 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함한다. 일부 경우에, 예시적인 혈액암은 B 세포 또는 T 세포 혈액암을 포함한다. 일부 경우에, 예시적인 혈액암에는 호지킨(Hodgkin) 림프종 또는 비-호지킨 림프종이 포함된다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "화학요법제"는 비정상적인 세포 성장을 특징으로 하는 질환의 치료에 치료상 유용성을 갖는 임의의 화학 작용제를 지칭한다. 이러한 질환에는 종양, 신생물 및 암뿐만 아니라, 건선과 같은 과형성 성장을 특징으로 하는 질환이 포함된다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 항-신생물제와 같은 암 치료에 유용한 작용제이다. 한 실시양태에서, 화학요법제는 방사성 화합물이다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 유용한 화학요법제를 쉽게 확인할 수 있다(예를 들어, 문헌 [Slapak and Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Chapter 86 in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th edition; Perry *et al.*, *Chemotherapy*, Ch. 17 in *Abeloff, Clinical Oncology* 2nd ed., 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer and Berkery. (eds): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer Knobf, and Durivage (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993] 참조). 조합 화학요법은 암을 치료하기 위해 하나 초과와 작용제를 투여하는 것이다. 예를 들어, TNF를 발현하는 점액종 바이러스 및 하나 이상의 다른 화학요법제는 동시에 투여되거나, 또는 임의의 순서로 일정 시간 동안 분리되어 투여될 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암과 같은 질환의 억제 또는 치료"는 질환 또는 병태의 완전한 발달을 억제하는 것을 의미한다. "치료"는 질환 또는 병리학적 상태가 발병하기 시작한 후, 그 징후 또는 증상을 개선하는 치료적 개입을 의미한다. 질환 또는 병리학적 상태와 관련하여 용어 "개선"은 치료의 임의의 관찰 가능한 유익한 효과를 의미한다. 유익한 효과는 예를 들어 감수성 대상체에서 질환의 임상 증상의 발병 지연, 질환의 일부의 또는 모든 임상 증상의 중증도 감소, 질환의 보다 느린 진행, 예컨대 전이, 대상체의 전반적인 건강 또는 웰빙의 개선, 또는 특정 질환에 특이적인 관련 기술 분야에 잘 알려진 다른 파라미터에 의해 입증될 수 있다. "예방적" 치료는 질환의 징후를 나타내지 않거나 또는 병상의 발생 위험, 예를 들어 전이성 암을 감소시킬 목적으로 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 투여되는 치료이다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 명세서에서 개시되는 치료 화합물과 함께 사용하기 유용한 "약제학상 허용되는 담체"는 통상적인 것이다. 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th Edition (1995)]에 치료제의 약제학적 전달에 적합한 조성물 및 제제가 설명되어 있다.

- [0038] 일반적으로, 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구 체제는 일반적으로 비히클로서 물, 생리 식염수, 균형잡힌 염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등과 같은 약제학적으로 및 생리학적으로 허용되는 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물(예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 무독성 고체 담체는 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아르산마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중립적인 담체 외에도, 투여될 약제학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제" 및 "치료제"는 대상체 또는 세포에게 적절하게 투여될 때 원하는 치료 또는 예방 효과를 유도할 수 있는 화학적 화합물 또는 조성물을 지칭한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양"은 과도한 세포 분열로 인한 조직의 비정상적인 성장인 신조직 형성의 생성물을 의미한다. 주변 조직을 침범하고/하거나 전이될 수 있는 종양은 "악성"이라고 지칭된다. 신조직 형성은 증식성 장애의 한 예이다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "복제 가능"은 특정 숙주 세포 내에서 감염 및 복제가 가능한 바이러스를 지칭한다.
- [0042] **도입**
- [0043] 폐 및 다른 장기로 전이되는 암은 기본 및 임상 암 연구 모두에서 주요 도전 과제이다. 현재까지 폐 전이를 치료하는 능력은 골육종, 흑색종 및 유방암과 같은 암이 모두 현재 치료법으로는 25% 미만의 5년 생존율을 나타내면서 문제가 되고 있다. 현재의 치료 패러다임은 고전적인 방사선 요법, 화학 요법 및 표적 요법의 혼합 방식이지만, 모든 종양에 효과적인 치료법은 존재하지 않는다. 한때 암 치료를 위한 잠재적인 "마법의 총알"로 홍보되었던 치료법 중 하나는 종양 괴사 인자(TNF)이다. 100년 전에 윌리엄 콜레이(William Coley)가 처음 발견하고 수십 년 후 분자 특성이 규명된 이후, TNF는 기대를 갖게하지만 수수께끼 같은 항암 시약 및 면역 조절제인 것으로 밝혀졌다. 말단 단리된 종양에서 국소 치료와 전신 치료 둘 모두에서 그의 사용에 대한 연구를 통해, 심각한 독성 및 낮은 항-종양 반응률이 밝혀졌다. 실제로, 일부 연구에서는 TNF만 전신 투여하면 특정 암에서 심지어 종양 성장을 촉진할 수도 있음을 발견하였다.
- [0044] TNF(TNF α , 카켈린 또는 카켈틴이라고도 지칭됨)는 염증성 면역 반응의 필수 부분인 사이토카인이다(Coley, WB. 2015 The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 105, 487-511 (1893)). 이는 주로 세포 표면 면역 리간드로서 발현되지만, TNF는 가용성 리간드의 절단 및 방출을 촉매하는 전환 효소를 발현하는 세포, 예를 들어 골수 계통의 세포에서 발현될 때 가용성 사이토카인으로서 분비될 수 있다. 문헌에 보고된 TNF 이펙터 경로 중 하나는 TNF 수용체-1(TNFR1) 경로를 통한 세포 사멸의 유도로서, 특정 표적 세포 내의 하류 효과에 따라 아포토시스(apoptosis) 또는 네크로토시스(necroptosis)를 유발한다(Moriwaki K, Bertin J, Gough P, Orłowski G, Chan FK. 2016. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell death & disease* 6:e1636). TNF는 또한 항-종양 CD8+ T 세포 및 NK 세포를 활성화함으로써 작용하는 선천 및 적응 면역 반응의 활성화제이다(Kashii, Y, Giorda, R, Herberman, R. B., Whiteside, T. L. Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol.* 163, 5358-5366; Prevost-Blondel, A, Roth, E., Rosenthal, F, Pircher, H. 2000 Crucial role of TNF- α in CD8 cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J. Immunol.* 164, 3645-3651). TNF는 원래 잠재적인 항-종양 특효 약물로 생각되었다. 마우스에게 TNF를 전신 주사하는 예비 실험이 이러한 낙관론을 뒷받침하는 것처럼 보였지만, 실험실에서 임상으로의 전환은 TNF가 면역계의 활성화제일뿐만 아니라, 가용성 리간드로 전신적으로 치료받은 환자에게 심각한 전신 독성을 유발했음을 보여주었다. 또한, 연구에 따르면, 상기 전신 TNF 치료는 무린 모델에서 관찰된, 환자에서 유사한 항-종양 효과를 유도하지 않음을 보여주었다(Balkwill, F. Tumor necrosis factor and cancer. 2009 *Nature Reviews Cancer* 9, 361).
- [0045] 종양 용해성 바이러스 요법이 실행 가능한 치료 전략으로 다시 등장하였다(Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology* 30:658-670). 암을 치료하기 위해 종양 용해성 바이러스 요법을 사용하는 아이디어는 1세기 이상 거슬러 올라가지만, 표준 요법에 불응성인 인간 종양의 치료를 위해 점진적으로 더 실현 가능한 양식이 된 것은 불과 지난 20년밖에 지나지 않았다(Kelly E, Russell SJ. 2007.

History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy* 15:651-659).

[0046] 종양 용해성 바이러스는 형질전환된 암 세포를 선택적으로 감염시키고 죽이는 능력 및 바이러스뿐만 아니라 종양 항원에 대해 숙주 면역계를 활성화하는 능력에 의해 설계 및/또는 선택된 포유동물 바이러스이다(Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. 2014. Going viral with cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14:559-567). 점액종 바이러스(MYXV)는 폭스비리대 과 및 레포리폭스바이러스(Leporipoxvirus) 속의 구성원이다(Chan WM, Rahman MM, McFadden G. 2013. Oncolytic Myxoma virus: the path to clinic. *Vaccine* 31:4252-4258; Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191-214). 본질적으로, MYXV는 토끼 특이적이며, 인간 또는 마우스에서 감염 또는 질환을 일으키지 않는다. 그러나, 발암과 관련된 암 경로 돌연변이의 특성 때문에, 마우스와 인간의 모든 암 세포는 아니지만 대부분의 암 세포는 MYXV를 포함하는 많은 바이러스에 의한 감염에 저항하는 타고난 능력의 요소를 예외없이 상실한다(Chan WM, McFadden G. 2014. Oncolytic poxviruses. *Annual review of virology* 1:191-214; Sypula J, Wang F, Ma Y, Bell J, McFadden G. 2004. Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* 8:103-114). 이 시스템에서 생물학의 또 다른 특징은 크고 유전적으로 안정한 폭스바이러스 계통으로서, 이것은 여러 치료 도입 유전자를 사용한 유전자 조작을 허용한다(Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research* 1). 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 상이한 형태의 면역 조절 및/또는 세포 사멸을 조절하는 MYXV 유전자가 선택적으로 제거되고, 치료 활성의 항암 도입 유전자가 도입되어 면역원성 증가를 유도하고/하거나, 바람직한 형태의 암 세포 사멸을 유도한다.

[0047] **조작된 점액종 바이러스 및 사용 방법**

[0048] 특정 실시양태에서, 본 명세서에서 개시되는 것은 외인성 TNF 단백질을 코딩하는 조작된 점액종 바이러스를 포함한다. 일부 경우에, 점액종 바이러스는 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자에서의 변형 또는 상기 유전자에 인접한 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 경우에, 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자는 M11L, M063, M135R, M136R, M-T2, M-T4, M-T5 또는 M-T7을 포함한다. 일부 경우에, 토끼 세포 친화성과 관련된 하나 이상의 유전자는 M135R, M136R 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0049] 일부 경우에, 본 명세서에서 개시되는 것은 TNF 단백질을 발현하도록 조작된 조작된 점액종 바이러스(MYXV)를 포함하며, 여기서 MYXV는 M135R 유전자의 변형을 포함한다. 일부 경우에, 변형은 M135R 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 기능을 손상시키는 결실이다. 일부 경우에, 변형은 M135R 유전자의 부분적 결실(예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 결실)이다. 다른 경우에, 변형은 M135R 유전자의 완전한 결실이다. 추가의 경우에, 변형은 M135R 유전자를 TNF 단백질로 대체하는 것이다. 추가의 경우에, 조작된 MYXV는 vMyx-M135KO-hTNF이다. 또 다른 경우에, 조작된 MYXV는 도 2a에 도시된 바와 같이 vMyx-M135KO-hTNF이다.

[0050] 일부 경우에, 본 명세서에서 개시되는 것은 TNF 단백질을 발현하도록 조작된 조작된 점액종 바이러스(MYXV)를 포함하며, 여기서 TNF 단백질은 MYXV 계통 내의 M135R 유전자와 M136R 유전자 사이에 삽입된다. 일부 경우에, 조작된 MYXV는 vMyx-hTNF-M135-136이다. 일부 경우에, 조작된 MYXV는 도 2b에 예시된 바와 같이 vMyx-hTNF-M135-136이다.

[0051] 일부 경우에, TNF 단백질은 2019년 7월 3일에 공개되고(엔트리 버전 247) 본 명세서에 참조로 포함된 UniProtKB-P01375에 제시된 서열에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 예컨대 95% 내지 98%, 95% 내지 99%, 예를 들어 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 동일성을 포함하거나 또는 상기 서열을 포함한다. 일부 경우에, TNF 단백질은 UniProtKB-P01375의 잔기 77-233에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 예컨대 95% 내지 98%, 95% 내지 99%, 예를 들어 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 동일성을 포함하는 가용성 TNF이다. 일부 경우에, 가용성 TNF는 UniProtKB-P01375의 잔기 77-233을 포함한다.

[0052] 일부 경우에, TNF 단백질을 포함하는 조작된 MYXV는 형광 단백질을 추가로 포함한다. 예시적인 형광 단백질은 TagBFP, 아주라이트(Azurite), 시루스(Sirus) 또는 사파이어(Sapphire)와 같은 청색/UV 단백질; ECFP, 세룰리안 또는 mTurquoise와 같은 청록색 단백질; 녹색 형광 단백질(GFP), 에메랄드, mUKG, mWasabi 또는 클로버(Clover)와 같은 녹색 단백질; EYFP, 시트린, 비너스 또는 SYFP2와 같은 황색 단백질; 단량체 쿠사비라-오렌지(Kusabira-Orange), mK02 또는 mOrange와 같은 주황색 단백질; mRaspberrym mCherry, mStrawberry, mTangerine, tdTomato, mApple 또는 mRuby와 같은 적색 단백질; PA-GFP, PAmCherry1 또는 PATagRFP와 같은 광 활성화 가능 단백질; 및 드롭나(Dropna)와 같은 광 스위치 가능 단백질을 포함한다.

[0053] 특정 실시양태에서, 유도된 TNF 발현(예를 들어, 막 횡단 TNF 단백질 또는 가용성 TNF 단백질)을 종양 용해성 점액종 바이러스(MYXV)와 조합하여 사용하는 암 치료 방법이 또한 본 명세서에서 설명된다. 위에서 논의된 바와 같이, 분비된 TNF는 항-종양 분자이지만, 그의 작은 치료창 및 심각한 부작용으로 인해 전신 사용에 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다. 추가로, 종양 용해성 MYXV는 매우 다양한 종양 유형에 대한 광범위한 친화성을 갖는 종양 특이적 항-종양제인 것으로 밝혀졌다. 일부 경우에, 예를 들어 바이러스 감염된 종양 세포 표면에서, 즉 감염된 세포의 표면에서 hTNF를 발현하도록 변형된 또는 분비된 버전으로서의 MYXV가 본 명세서에 개시된다. 본 명세서에서 개시되는 효과를 달성하기 위해, 강력한 바이러스 특이적 프로모터 하에서 바이러스에 감염된 세포에서 발현되는 면역 리간드로서 재조합 MYXV 구축물(일반적으로 vMyx-hTNF라고 함)로부터 인간 TNF를 발현하도록 종양 용해성 MYXV를 조작할 수 있다. MYXV 기반 TNF 발현의 장점은 리간드가 바이러스에 감염된 종양 조직에서만 발현되고 가용성 TNF 리간드의 전신 전달에서 관찰되는 심각한 부작용을 방지하는 소량으로 발현된다는 것이다.

[0054] 일부 경우에, 점액종 바이러스 계놈은 통상의 기술자에게 공지되고 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 기재되어 있는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 하나 이상의 치료적 도입 유전자를 발현하도록 쉽게 변형된다. 통상의 기술자는 바이러스가 여전히 생산적인 감염이 가능하도록, 예를 들어 복제 가능 바이러스를 제공하기 위해 점액종 바이러스 계놈의 어느 부분이 결실될 수 있는지 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 결실될 수 있는 바이러스 계놈의 비-필수 영역은 공개된 바이러스 계놈 서열을 다른 잘 특성화된 바이러스의 계놈과 비교하여 추론할 수 있다(예를 들어, 문헌 [C. Cameron, S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J.-X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden, *Virology* (1999) 264: 298-318]) 참조). 따라서, 본 개시내용의 측면은 암의 억제 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 억제 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 종양 괴사 인자(TNF)(예를 들어, 막 횡단 TNF 단백질 또는 가용성 TNF 단백질)를 발현하는 MYXV를 인간 대상체와 같은 대상체에게 투여하여 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 억제하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, MYXV는 vMyx-M135KO-hTNF를 포함한다. 특정 실시양태에서, MYXV는 vMyx-hTNF-M135-136을 포함한다. 특정 실시양태에서, MYXV는 vMYX-SODKO-hTNF를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 암을 앓고 있거나 앓을 것으로 의심되는 인간 대상체와 같은 대상체를 선택하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, MYXV는 전신 투여된다. 특정 실시양태에서, MYXV는 종양 및/또는 전이 부위에 투여된다. MYXV는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 감염시키는 것으로 나타났다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "선천적 항-바이러스 반응의 결핍"은 바이러스에 노출되거나 바이러스에 의해 침습될 때 바이러스 복제의 억제, 인터페론의 생성, 인터페론 반응 경로의 유도 및 아폽토시스를 포함하는 항-바이러스 방어 메커니즘을 유도하지 않는 세포를 지칭한다. 이 용어는 정상 세포, 예를 들어 비감염된 세포 또는 비-암 세포와 비교하여 바이러스에 노출되거나 감염될 때 선천적 항-바이러스 반응이 감소되거나 결함이 있는 세포, 예를 들어 암 세포를 포함한다. 여기에는 인터페론에 반응하지 않는 세포 및 아폽토시스 반응 또는 아폽토시스 경로의 유도가 감소하거나 결함이 있는 세포가 포함된다. 결핍은 감염, 유전적 결함 또는 환경 스트레스를 포함한 다양한 원인으로 인해 발생할 수 있다. 그러나, 결핍이 기존 감염에 의해 야기된 경우, MYXV에 의한 중복 감염이 배제될 수 있고 통상의 기술자는 그러한 사례를 쉽게 확인할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 통상의 기술자는 임의의 주어진 세포 유형이 선천적 항-바이러스 반응이 결핍되고 따라서 MYXV에 의해 감염되는지의 여부를 과도한 실험없이 쉽게 결정할 수 있다. 따라서, 방법의 특정 실시양태에서, MYXV는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 감염시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 세포는 인터페론에 반응하지 않는다. 특정 실시양태에서, 세포는 포유동물의 암 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 인간 고형 종양 세포를 포함하는 인간 암 세포이다.

[0055] MYXV는 복제 가능한 폭스 바이러스의 레포리폭스바이러스 종에 속하는 임의의 바이러스일 수 있다. MYXV는 MYXV의 야생형 종이거나 또는 MYXV의 유전자 변형 종일 수 있다. 일부 경우에, MYXV는 로잔 종이다. 일부 경우에, MYXV는 실비라구스 브라질리엔시스(*Sylvilagus brasiliensis*)에서 순환하는 남미 MYXV 종이다. 일부 경우에, MYXV는 실비라구스 바흐마니(*Sylvilagus bachmani*)에서 순환하는 캘리포니아 MYXV 종이다. 일부 경우에, MYXV는 유전자 M009L, M036L, M135R 및 M148R의 변형을 포함하는 약독화된 스페인 필드 종인 6918(2019년 7월 11일 GenBank에 의해 제공되는, 본 명세서에 참조로 포함되는 GenBank 수탁 번호 EU552530)이다. 일부 경우에, MYXV는 6918VP60-T2(2019년 7월 11일 GenBank에 의해 제공되는, 본 명세서에 참조로 포함되는 GenBank 수탁 번호 EU552531)이다. 일부 경우에, MYXV는 표준 실험실 종(SLS: Standard laboratory Strain)으로 명명된 종이다.

[0056] 일부 경우에, MYXV는 문헌 [Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," *Virology* 264:

298-318 (1999)](이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨)에 게시된 서열에 대한 적어도 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, MYXV는 문헌 [Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," Virology 264: 298-318 (1999)]에 게시된 서열을 포함한다.

- [0057] 특정 실시양태에서, 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포는 암 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, MYXV로 감염된 세포는 TNF를 발현한다. 일부 경우에, TNF는 표면에 발현된다. 일부 경우에, TNF는 가용성 TNF이다. 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 폐 전이에 대해 입증된 효능 결과는 연장에 의해 원발성 및 전이성 모두의 다른 고형 암에 적용 가능하다. TNF는 암성 세포의 강력한 킬러이고, 또한 종양 세포에 대한 선천 및 적응 면역 반응의 활성화제일 수 있다. 바이러스와 TNF의 생물학에 대해 알려진 바를 기반으로 하여 상기 바이러스를 광범위한 종양 유형에 적용하면, 다양한 암 유형을 치료할 수 있는 이상적인 후보를 제시할 수 있다. 암은 악성 종양의 존재를 비롯하여 관련 기술 분야에서 일반적으로 인정되는 기준을 사용하여 진단될 수 있다.
- [0058] 개시된 방법에 따라 치료될 수 있는 암의 유형에는 고형 종양, 예를 들어 육종 및 암종, 비제한적인 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 골원성 육종 및 기타 육종, 활액종, 증피종, 유방 육종, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프계 종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 비-소세포 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 방광 암종 및 CNS 종양(예를 들어, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종)이 포함된다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 특정 실시양태에서, 암은 대상체의 제2 위치로 전이된 것이다. 특정 실시양태에서, 제2 위치는 대상체의 폐, 뇌, 간 및/또는 림프절을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 골육종, 삼중 음성 유방암 또는 흑색종을 포함한다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 암의 유형은 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종과 같은 혈액암을 추가로 포함한다.
- [0060] 대상체에게 투여될 때, 세포 표면 발현 TNF 또는 가용성 형태와 같은 TNF를 발현하는 MYXV의 유효량은 바이러스가 질환, 예를 들어 암, 예를 들어 폐, 뇌, 간 또는 다른 장기로 전이된 고형 종양의 확산을 경감, 개선, 완화, 호전, 안정화, 억제하거나, 그 진행을 늦추거나 지연시키거나, 치유하기 위해 충분한 시간 동안 투여시에 필요한 양이다. 예를 들어, 암성 세포 또는 신생물 세포의 수를 감소시키거나 이를 파괴하고/하거나, 바이러스에 만성적으로 감염된 세포의 수를 감소시키거나 이를 파괴하고/하거나, 상기 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/하거나, 전이의 수 및/또는 부위를 감소시키는 효과를 달성하기에 충분한 양일 수 있다.
- [0061] 대상체에게 투여되는 유효량은 MYXV의 약력학적 특성, 투여 방식, 대상체의 연령, 건강 및 체중, 질환 상태의 성질 및 정도, 치료 빈도 및 시행할 경우 병용 치료의 유형, 및 바이러스의 독성 및 역가와 같은 많은 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0062] MYXV는 대상체의 임상 반응에 따라, 필요한 만큼 조정될 수 있는 적절한 양으로 초기에 투여될 수 있다. 바이러스의 유효량은 실증적으로 결정할 수 있으며, 안전하게 투여할 수 있는 MYXV의 최대량 및 원하는 결과를 생성하는 바이러스의 최소량에 따라 결정된다.
- [0063] MYXV는 표준 투여 방법을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있으며, 한 실시양태에서 바이러스는 전신 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 바이러스는 질환 부위에 주사에 의해 투여된다. 다양한 실시양태에서, 바이러스는 경구 또는 비경구로, 또는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 표준 방법에 의해 투여될 수 있다.
- [0064] 바이러스를 질환 부위에 주사하여 얻은 것과 동일한 임상 효과를 전신 투여 할 때 생성하기 위해, 상당히 더 많은 양의 바이러스의 투여가 필요할 수 있다. 그러나, 적절한 용량 수준은 원하는 결과를 얻을 수 있는 최소량이어야 한다.
- [0065] 투여되는 바이러스의 농도는 투여되는 특정 MYXV 종의 병독성 및 표적화되는 세포의 특성에 따라 달라질 것이다. 한 실시양태에서, 약 3×10^{10} 미만의 "감염성 단위"로도 언급되는 병소 형성 단위("ffu")의 용량이 인간 대상체에게 투여되고, 다양한 실시양태에서 약 10^2 내지 약 10^9 pfu, 약 10^2 내지 약 10^7 pfu, 약 10^3 내지 약 10^6 pfu, 또는 약 10^4 내지 약 10^5 pfu가 단일 용량으로 투여될 수 있다.
- [0066] 세포 표면에서 발현되는 TNF 또는 가용성 형태와 같은 TNF를 발현하는 MYXV는 단독 요법으로서 투여될 수 있거나, 화학 요법, 면역 요법 및/또는 방사선 요법을 포함하는 다른 요법과 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, TNF를 발현하는 MYXV는 원발성 종양의 외과적 제거 전에 또는 후에, 또는 방사선 요법 또는 통상적인 화학 요법

약물의 투여와 같은 치료 전에, 치료와 동시에 또는 치료 후에 투여될 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 면역 요법은 면역 조절제를 포함한다. 예시적인 면역 체크포인트 조절제는 다음을 포함하지 만, 이로 제한되지 않는다: PD-L1 억제제, 예를 들어 아스트라제네카(AstraZeneca)의 두르발루맵(Imfinzi), 제넨테크(Genentech)의 아테졸리주맵(MPDL3280A), EMD 세로노(Serono)/화이자(Pfizer)의 아벨루맵, 사이툼엑스 테라퓨틱스(CytomX Therapeutics)의 CX-072, 노바티스 파마슈티칼스(Novartis Pharmaceuticals)의 FAZ053, 3D 메디신(Medicine)/알파맵(Alphamab)의 KN035, 일라이 릴리(Eli Lilly)의 LY3300054 또는 EMD 세로노의 M7824 (항-PD-L1/TGF베타 트랩); PD-L2 억제제, 예를 들어 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)의 AMP-224(Amplimmune) 및 rHIgM12B7; PD-1 억제제, 예를 들어 브리스톨-마이어스 스쿼브(Bristol-Myers Squibb)의 니볼루맵(Opdivo), 머크(Merck)의 켈브롤리주맵(Keytruda), 아게누스(Agenus)의 AGEN 2034, 베이진(BeiGene)의 BGB-A317, 보어링거-인겔하임 파마슈티칼스(Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals)의 B1-754091, CBT 파마슈 티칼스(Pharmaceuticals)의 CBT-501(케놀립주맵), 인사이트(Incyte)의 INCSHR1210, 얀센 리써치 & 디벨롭먼트 (Janssen Research & Development)의 JNJ-63723283, 메데이툼(MedImmune)의 MEDI0680, 마크로제닉스 (MacroGenics)의 MGA 012, 노바티스 파마슈티칼스의 PDR001, 화이자의 PF-06801591, 리제네론 파마슈티칼스/사 노피(Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi)의 REGN2810(SAR439684) 또는 테사로(TESARO)의 TSR-042; CTLA-4 억제 제, 예를 들어 브리스톨-마이어스 스쿼브의 이필리무맵(Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 및 MDX-101로도 알려짐), 화이자의 트레멜리무맵(CP-675,206, 티실리무맵) 또는 아게누스의 AGEN 1884; LAG3 억제제, 예를 들어 브리스톨-마이어스 스쿼브의 BMS-986016, 노바티스 파마슈티칼스의 IMP701, 노바티스 파마슈티칼스의 LAG525, 또는 리제네론 파마슈티칼스의 REGN3767; B7-H3 억제제, 예를 들어 마크로제닉스의 에노블리투주맵(MGA271); KIR 억제제, 예를 들어 이네이트 파마(Innate Pharma)의 리릴루맵(IPH2101; BMS-986015); CD137 억제제, 예를 들어 우렐루맵(BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566(항-4-1BB, PF-2566, Pfizer) 또는 XmA b-5592(Xencor); PS 억제제, 예를 들어 바비톡시맵; 및 TIM3, CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, OX40, GITR, ICOS, BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2, 또는 SLAM에 대한 항체 또는 이의 단편(예 를 들어, 모노클로날 항체, 인간, 인간화 또는 키메라 항체), RNAi 분자 또는 소분자와 같은 억제제.

[0068] 일부 실시양태에서, TNF를 발현하는 MYXV는 약제학적 조성물의 성분으로 제제화된다. 따라서, 추가의 실시양태 에서, TNF를 발현하는 점액종 바이러스 및 약제학적 허용되는 부형제 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물 이 제공된다. 조성물은 통상적으로 약제학적 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제 및 다양한 상용성 담체를 함 유할 수 있다.

[0069] 약제학적 조성물은 추가의 항암제와 같은 추가의 치료제를 추가로 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 화학요법제를 포함한다. 예를 들어, 화학요법제는 대상체의 암 세포 또는 신생물 세포에 대한 중앙 용해 효과를 나타내고 TNF를 발현하는 MYXV의 중앙 사멸 효과를 억제하거나 감소시키지 않는 실질적으로 임의의 작용제일 수 있다. 예를 들어, 화학요법제는 비제한적으로, 안트라사이클린, 알킬화제, 알킬 설포네이트, 아지리딘, 에틸렌 이민, 메틸멜라민, 질소 머스타드, 니트로소우레아, 항생제, 항대사물질, 염산 유사체, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 효소, 포도필로톡신, 백금 함유 작용제 또는 사이토카인일 수 있다. 바람직하게는, 화학요법제는 암성 또는 신생물인 특정 세포 유형에 대해 효과적인 것으로 알려져 있는 것이다.

[0070] 일부 경우에, 추가의 치료제는 상기 설명된 바와 같은 면역 체크포인트 조절제를 포함한다.

[0071] 제약상 허용되는 부형제 또는 희석제의 비율 및 종류는 선택된 투여 경로, 생 바이러스와의 상용성 및 표준 제 약 실무에 의해 결정된다. 일반적으로, 약제학적 조성물은 TNF를 발현하는 MYXV의 생물학적 특성을 유의하게 손 상시키지 않는 성분으로 제제화될 것이다. 약제학적 조성물은 유효량의 활성 물질 또는 물질들이 약제학적 허용 되는 비히클과 혼합물로서 조합되도록, 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 허용되는 조성물의 제조를 위한 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 적합한 비히클은 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1995]에 기재되어 있다. 이에 기초하여, 조성물은 적절한 pH 및 생리학적 유체와의 등삼투압을 갖는 완충제 용액에 포함되는 하나 이상의 약제학적 허용되는 부형제, 비히클 또 는 희석제와 함께 TNF를 발현하는 MYXV의 용액을 포함한다.

[0072] 약제학적 조성물은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이 선택된 투여 경로에 따라 다양 한 형태로 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 경우에, 약제학적 조성물은 전신 투여된다. 다른 경우에, 약제학적 조성물은 국소 투여된다. 일부 경우에, 약제학적 조성물은 경구 투여된다. 추가의 경우, 약제학적 조성물은 비 경구로 투여된다. 비경구 투여에는 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 경상피, 비강, 폐내, 척수강내, 직장 및 국 소 투여 방식이 포함된다. 비경구 투여는 선택된 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 이루어질 수 있다.

- [0073] 약제학적 조성물은 예를 들어 불활성 희석제 또는 담체와 함께 경구 투여될 수 있거나, 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐에 봉입되거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, TNF를 발현하는 MYXV는 부형제와 함께 포함될 수 있으며, 섭취 가능한 정제, 구강 정제, 트로키제, 캡슐, 엘릭시르제, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0074] TNF를 발현하는 MYXV 용액은 생리학적으로 적합한 완충제에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건 하에서, 이러한 제제에는 미생물의 성장을 억제하지만 살아있는 바이러스를 불활성화하지는 않는 보존제가 포함되어 있다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 적합한 제제를 제조하는 방법을 알 것이다. 적합한 제제의 선택 및 제조를 위한 통상적인 절차 및 성분은 예를 들어 1999년에 간행된 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and in The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)]에 기재되어 있다. 사용되는 약제학적 조성물의 용량은 치료되는 특정 병태, 병태의 중증도, 연령, 신체 상태, 크기 및 체중을 포함하는 개별 대상체 파라미터, 치료 기간, 병용 치료(시행될 경우)의 특성, 특정 투여 경로 및 의료 종사자의 지식 및 전문 지식 내에 있는 다른 유사한 요인에 따라 달라진다. 특정 실시양태에서, 치료용 바이러스는 실온에서 저장하기 위해 동결 건조될 수 있다.
- [0075] TNF를 발현하는 MYXV 또는 TNF를 발현하는 MYXV를 포함하는 약제학적 조성물은 또한 암을 치료하기 위해 TNF를 발현하는 점액종 바이러스를 사용하기 위한 설명서를 포함하는 키트로 포장될 수 있다.
- [0076] TNF의 발현 외에도, MYXV는 MYXV 치료의 항암 효과를 향상시킬 임의의 다른 유전자를 운반하도록 변형될 수 있다. 이러한 유전자는 아포토시스를 촉발하는 데 관여하거나, 면역 파괴를 위해 감염된 세포를 표적화하는 데 관여하는 유전자, 예를 들어 인터페론에 대한 반응 결여를 복구하거나, 박테리아 세포 표면 항원과 같은 항체 반응을 자극하는 세포 표면 마커의 발현을 유발하는 유전자일 수 있다. MYXV는 또한 신생물 또는 암 세포의 증식 및 성장을 차단하는 데 관여하는 유전자를 발현하도록 변형되어, 세포 분열을 방지할 수 있다. 또한, 바이러스는 화학요법제의 합성에 관여하는 유전자와 같은 치료 유전자를 포함하도록 변형될 수 있거나, 억제 또는 사멸될 세포가 유래되는 특정 종의 세포, 예를 들어 인간 세포에서 증가된 복제 수준을 갖도록 변형될 수 있다.
- [0077] 상기 논의된 바와 같이, MYXV는 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포를 선택적으로 감염시킬 수 있으며, 세포에서 상기 결핍의 지표로서 사용될 수 있다. 따라서, 대상체로부터 제거된 세포는 본 발명의 방법을 사용하여 선천적 항-바이러스 반응의 결핍에 대해 분석될 수 있다. 이러한 결정은 다른 지표와 조합될 때, 대상체가 특정 질환 상태, 예를 들어 암을 앓고 있을 수 있음을 나타낼 수 있다. 세포는 공지된 생검 방법을 사용하여 인간 대상체를 포함하는 대상체로부터 제거될 수 있다. 생검 방법은 시험되는 세포의 위치 및 유형에 따라 결정될 것이다. 세포는 공지된 배양 기술에 따라 배양되고, 배양 배지에 살아있는 MYXV를 첨가함으로써 MYXV에 노출된다. 감염 다중도("MOI")는 MYXV에 노출될 때 감염되는 것으로 알려진 양성 대조군 세포 배양물을 사용하여, 제시된 세포 유형, 밀도 및 배양 기술에 대한 최적 MOI를 결정하기 위해 변경될 수 있다.
- [0078] 배양된 세포에 첨가되는 MYXV의 양은 세포 유형, 배양 방법 및 바이러스 종에 따라 달라질 수 있다. 이러한 파라미터는 일상적인 방법을 사용하여 최소한의 시험을 통해 쉽게 시험하고 조정될 수 있다.
- [0079] MYXV에 의한 배양된 세포의 감염성은 세포 사멸을 유발하는 MYXV의 능력을 포함하여 통상의 기술자에게 알려진 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 또한, 바이러스 발현 생성물과 효소 반응 또는 화학 반응을 완료하기 위해 세포 배양액에 시약을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 바이러스 발현 생성물은 MYXV 계놈에 삽입된 리포터 유전자로부터 발현될 수 있다.
- [0080] 한 실시양태에서, MYXV는 감염 상태의 검출 용이성을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, MYXV는 위상차 현미경, 형광 현미경 또는 방사선 영상화에 의해 쉽게 검출될 수 있는 마커를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 마커는 발현된 형광 단백질 또는 비색 또는 방사성 표지 반응에 관여할 수 있는 발현된 효소일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 마커는 시험되는 세포의 특정 기능을 방해하거나 억제하는 유전자 산물일 수 있다.
- [0081] MYXV는 관련 기술 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 사용될 MYXV 종으로 배양된 토끼 세포 또는 불멸화된 허용성 인간 또는 영장류 세포를 감염시키고, 바이러스가 배양된 세포에서 복제되고 세포 표면을 파괴하고 수거를 위해 바이러스 입자를 방출하기 위한 관련 기술 분야에 공지된 표준 방법에 의해 바이러스가 방출될 수 있도록 감염을 진행시킴으로써 바이러스가 생산될 수 있다. 수거된 후, 바이러스 역가는 토끼 세포의 함유 잔디를 감염시키고 플라크 분석을 수행하여 결정할 수 있다(그의 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함된 문헌 [Mossman et al. (1996) Virology 215:17-30] 참조).
- [0082] 추가로, 치료 MYXV 바이러스가 암 환자에게 다시 주입되는 것과 같은 주입 전에 골수 또는 말초 혈액 단핵 세포

로부터 유래된 혼합된 백혈구에 생체 외에서 먼저 흡착되는 전달 전략이 개시된다. 이 전략에서, 인간 TNF를 발현하는 MYXV는 생체 외에서 바이러스로 미리 감염된 백혈구의 이동을 통해 전이성 암 부위로 전달된다. 이 전신 전달 방법은 때때로 "생체의 바이러스 요법" 또는 EVV(일명 EV2)로도 언급되는데, 이것은 바이러스가 환자에게 주입되기 전에 단리된 백혈구에 먼저 전달되기 때문이다. MYXV 구축물 및 상기 새로운 전달 전략은 무린 폐 전이 모델에서 종양 부하를 상당히 감소시키고 생존을 증가시키는 능력을 보여주었다(실시에 1 참조). 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 세포 표면 인간 TNF를 발현하는 점액종 바이러스(MYXV) 구축물의 투여는 바이러스 보유 "운반체" 세포를 통해 전이성 폐 질환 부위에 MYXV 바이러스를 효과적으로 전달하였다. 더욱이, 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 본 발명자들은 TNF 발현 바이러스(일반적으로 vMyx-hTNF로 지정됨)의 이러한 세포 보조 전달이 종양 부하를 감소시키고 폐 전이가 있는 마우스의 생존을 증가시키는 능력을 갖는다는 것을 입증하였다(실시에 1 참조). 이러한 결과는 TNF 발현 MYXV의 세포 매개 전달이 표적 폐 전이성 종양 세포의 직접적인 사멸의 수준을 증가시키지만, (이론에 얽매이지 않으면서) 숙주 면역계의 활성화제로 작용하여 암의 장기 퇴행을 유발할 수 있음을 보여준다. 이것은 현재 치료법으로는 치료가 어려운 폐, 간, 뇌, 뼈 및/또는 림프절로 전이된 고형 암의 새로운 치료법을 제공한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포를 투여하고, 이에 의해 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 억제하는 것을 포함하고, 여기서 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포는 세포 표면 종양 괴사 인자(TNF)를 발현하는 MYXV를 포함한다. 조합된 "백혈구/vMyx-hTNF" 요법은 종양상(tumor bed)에서 세포 사멸을 증가시켜 항-종양 면역원성을 향상시키지만, 표적을 벗어난 전신 독성 부작용을 제한하기 위해 실질적으로 바이러스에 감염된 전이성 종양 조직, 예를 들어 폐 종양 조직에서만 TNF를 생성한다. 무린 골육종 폐 전이 모델에서 하기 실시예 1에서 제시되는 시험의 결과는 상기 전략이 종양 부하를 감소시키고 종양 생존 시간을 증가시키는 데 효과적임을 보여준다. 또한, 백혈구/vMyx-hTNF 전략은 암 조직 제한 방식으로 세포 표면 TNF를 선택적으로 발현함으로써 원래의 종양 유형에 관계없이, 예를 들어 폐로 전이되는 모든 고형 암에 대한 새로운 잠재적인 치료 요법을 제시한다. 이론에 얽매이지 않지만, 상기 백혈구/vMyx-hTNF 전략은 예를 들어 폐로 빈번하게 전이되는 고형 암에 대해 다른 확립된 암 치료법과 시너지 효과를 발휘한다고 생각된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포의 표면으로 MYXV를 흡착시키는 것을 포함한다. 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포의 일부가 감염되었을 가능성이 있지만, 이것은 본 명세서에서 개시된 방법에서 유의하지 않을 것이다. 특정 실시양태에서, 점액종 바이러스를 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포의 표면에 흡착시키는 것은 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포의 표면에 대한 점액종 바이러스의 결합을 허용하는 조건 하에서 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포를 점액종 바이러스에 노출시키는 것을 포함한다.

[0083] 본 개시내용의 측면은 상기 설명된 바와 같이 치료 MYXV 구축물을 골수(BM) 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 유래된 혼합된 백혈구에 미리 로딩함으로써, 임의의 종류의 종양 용해성 MYXV 구축물을 전이성 폐 질환에 전달하는 새로운 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 선천적 항-바이러스 반응이 결핍된 세포, 예를 들어 암 세포의 존재를 특징으로 하는 임의의 질환 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. MYXV 구축물은 임의의 치료 유전자 또는 "치료 도입 유전자"를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료 유전자" 또는 "치료 도입 유전자"는 그의 발현이 원하는 결과, 예를 들어 항암 효과를 유도하는 임의의 유전자를 광범위하게 설명하기 위한 것이다. 예를 들어, 바이러스는 바이러스 치료의 항암 효과를 향상시킬 유전자를 운반하도록 변형될 수 있다. 이러한 유전자는 아포토시스를 촉발하는 데 관여하거나, 면역 파괴를 위해 감염된 세포를 표적화하는 데 관여하는 유전자, 예를 들어 인터페론에 대한 반응 결여를 복구하거나, 박테리아 세포 표면 항원과 같은 항체 반응을 자극하는 세포 표면 마커의 발현을 유발하는 유전자일 수 있다. 바이러스는 또한 신생물 또는 암 세포의 증식 및 성장을 차단하여 세포가 분열하는 것을 방지하는 데 관여하는 유전자를 발현하도록 변형될 수 있다. 또한, 바이러스는 화학요법제의 합성에 관여하는 유전자와 같은 치료 유전자를 포함하도록 변형될 수 있거나, 억제 또는 사멸될 세포가 유래되는 특정 종의 세포, 예를 들어 인간 세포에서 증가된 복제 수준을 갖도록 변형될 수 있다.

[0084] 특정 실시양태에서, BM 또는 PBMC 세포는 생체 외에서 1시간 동안 MYXV 구축물로 흡착된 다음, MYXV 로딩된 백혈구가 수용자에게 다시 주입된다. 특정 실시양태에서, 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포는 예를 들어 자가 세포로서 대상체로부터 수득된다. 다른 실시양태에서, 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수 세포는 하나 이상의 이중 공여자로부터 수득된다. 골수 세포 및 단핵 말초 혈액 세포를 얻는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0085] 본 개시내용의 측면은 종양 괴사 인자(TNF), 예를 들어 표면 TNF 또는 가용성 TNF를 발현하는 MYXV, 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, TNF를 발현하는 MYXV는 vMyx-M135KO-hTNF를 포함한다. 특정 실시양태에서, TNF를 발현하는 MYXV는 vMyx-hTNF-M135-136을 포함한다. TNF를 발현하는 점액종 바이러스 또는 TNF

를 발현하는 MYXV를 포함하는 약제학적 조성물은 또한 암을 치료하기 위해 면역 반응이 결핍된 세포를 억제하도록 TNF를 발현하는 MYXV를 사용하기 위한 설명서를 포함하는 키트로 포장될 수 있다.

[0086] **실시예**

[0087] 실시는 단지 예시 목적으로 제공되며, 본 명세서에서 제공되는 청구항의 범위를 제한하지 않는다.

[0088] **실시예 1**

[0089] 본 실시예는 TNF를 발현하는 MYXV의 구축 및 시험을 설명한다.

[0090] **바이러스의 디자인**

[0091] vMyx-hTNF 바이러스의 첫 번째 버전(여기서는 vMyx-SODKO-hTNF라고 언급함)은 구체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 문헌 [Wang F, Gao X, Barrett JW, Shao Q, Bartee E, Mohamed MR, Rahman M, Werden S, Irvine T, Cao J, Dekaban, GA, McFadden, G. 2008). RIG-I mediates the co-induction of tumor necrosis factor and type I interferon elicited by myxoma virus in primary human macrophages. PLoS pathogens 4:e1000099]에서 원래 디자인되고 설명된 것이다. 간단히 설명하면, 바이러스는 종양 용해 바이러스 요법과 관련이 없는 목적을 위해 또는 임의의 암 치료를 위해 MYXV 로잔 모 중을 사용하여 생성되었다. 삽입 벡터는 pBluescript 파지미드를 기반으로 하고, eGFP와 함께 131R ORF(SOD로 언급됨)에 클로닝되었으며, 분리된 합성 백시니아 초기 후기 프로모터에 의해 제어되었다(도 1 참조). 두 번째 hTNF 발현 바이러스(vMyx-M135KO-hTNF라고 언급함)는 인간 임상 시험을 위해 개발 중인 종양 용해성 MYXV 구축물에 대한 표준 약독화 유전적 배경인 M135R-유전자 녹아웃 바이러스 플랫폼을 기반으로 하여 생성되었다. M135R 녹아웃 구조를 위한 전략은 둘 모두 그 전체가 본 명세서에 구체적으로 참고로 포함된 문헌 [Bartee E, Mohamed MR, Lopez MC, Baker HV, McFadden G. 2009. The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts. Journal of virology 83:498-511 및 Barrett JW, Sypula J, Wang F, Alston LR, Shao Z, Gao X, Irvine TS, McFadden G. 2007 M135R Is a Novel Cell Surface Virulence Factor of Myxoma Virus . Journal of Virology. 81(1):106-114]에 자세히 설명되어 있다. 간단히 설명하면, 상기 vMyx-M135KO-hTNF 바이러스는 다중 부위 게이트웨이(Multisite gateway) 3개 단편 클로닝 절차를 사용하여 생성되었다. 요소 1은 합성 초기/후기 프로모터에 의해 제어되는 eGFP와 함께 M134 ORF의 3' 단편을 포함하였다. 요소 2는 또한 합성 초기/후기 프로모터의 제어 하에 전체 hTNF 코딩 서열을 포함하였다. 마지막으로, 요소 3은 5' M136 유전자의 단편을 포함하였다. 이들 3개의 단편은 임의의 MYXV 게놈 백본의 M135R 유전자좌에 eGFP-hTNF 탠덤 카세트를 삽입하기 위해 사용되는 단일 엔트리 비히클 플라스미드 내에 조합되었다. 그 다음, 이를 형질감염/감염에 사용하고, 적어도 3회의 플라크 정제를 사용하여 재조합 바이러스를 정제하였다(도 2a에 제시된 형질감염에 사용된 최종 플라스미드).

[0092] **동물 연구**

[0093] 생체 외에서 바이러스가 미리 로딩된 백혈구를 통해 전달된 vMyx-SODKO-hTNF 바이러스의 폐 전이성 골육종에 대한 효능은 면역 적격 Balb/c 마우스에서 동계 무린 골육종 모델을 사용하여 확인되었다. 동물에게 제0일에 2×10^6 개의 K7M2-FLuc 무린 골육종 세포를 측방 꼬리 정맥을 통해 접종하였다. 접종 4일 후, 대조군 Balb/c 마우스로부터 골수(BM)를 수거하고, 계수하고, 유핵 세포당 2-10개의 감염성 바이러스 단위의 MOI(감염 다중도)로 바이러스를 감염시켰다. 세포 및 바이러스를 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 이어서, 생체 외에서 바이러스 로딩된 BM은 동물당 4×10^6 개의 세포로 역안와로(retro-orbitally) 주입되었다. 그 다음, 그 대부분이 수용자 폐에서 관찰되는, 종양 부하의 실시간 측정으로서 종양 접종 후 제7일로부터 시작하여 매주 루시퍼라제 발광에 대한 IVIS 생체내 영상화 시스템을 사용하여 동물의 영상을 촬영하였다. 진행성 질환의 미리 결정된 임상 증상에 도달할 때까지 또는 감염 후 8주 중 먼저 도래하는 시점까지 동물을 모니터링하였다. 결과는 vMyx-SODKO-hTNF 구축물을 제외하고는 모든 시험된 바이러스 구축물로 처리된 동물이 대조군에 필적하는 종양 부하를 나타냄을 보여준다. 하나의 보다 긴 생존자를 유도한 vMyx-M135KO 바이러스를 제외하고는, 다른 시험 바이러스 역시 대조군과 통계적으로 구별할 수 있는 평균 생존율을 나타내지 않았다. 이와 대조적으로, vMyx-SODKO-hTNF 구축물 코호트는 모든 영상화 시점에서 대조군과 다른 구축물보다, 종양 세포의 발광으로 측정했을 때 통계적으로 더 작은 종양을 가졌다(도 3). vMyx-SODKO-hTNF는 또한 대조군에 비해 평균 생존 시간을 거의 두 배로 늘렸으며(도 4), 이 코호트에서만 입증 가능한 종양 부하가 명백하게 없는 유의한 수의 동물이 관찰되었다.

[0094] 이들 결과에 이어서, 바이러스 "운반체 세포"로서 BM 백혈구를, 전이성 폐 종양 부위에 치료용 MYXV 구축물을

전달하기 위한 운반체 세포로서 벌크 PBMC를 이용하는 것과 비교하였다. PBMC가 대부분의 고휘도 암에 대해 보다 임상적으로 관련성이있는 운반체 백혈구 공급원이라고 추론되었다. 상기 설명한 바와 같이, 동물에게 K7M2-Fluc 세포를 접종하였다. 종양 접종 4일 후, 대조군 Balb/c 마우스로부터의 PBMC를 수거하고, 상기 설명된 바와 같이 생체 외에서 vMyx-SODKO-hTNF(MOI=2)로 1시간 동안 흡착시켰다. 동물은 3개의 투여 그룹, 즉 1×10^6 , 2×10^6 및 4×10^6 개의 PBMC(각각 투입 바이러스의 동일한 MOI로 사전 흡착됨)로 나누고, 존중된 PBMC/바이러스 용량으로 주입되었다. 동물은 제7일차부터 영상을 촬영하였다. 루시페라제 영상화 결과는 동물이 용량 의존 방식으로 처리에 대한 반응을 나타내었고, 동물은 1×10^6 의 용량에서 최소로 반응하였고, 동물은 4×10^6 의 용량에서 대조군에 비해 종양 발광의 가장 현저한 감소를 나타내었다(도 5 및 도 6).

[0095] vMyx-SODKO-hTNF로 감염된 세포에서 TNF 발현의 확인

[0096] vMyxv-SODKO-hTNF 구축물에 의한 hTNF의 발현을 확인하기 위해, 허용성 RK-13 세포를 10의 MOI에서 바이러스로 실험적으로 감염시켰다. 감염 후 48시간 동안 감염이 진행되도록 한 다음, 막 결합 단백질의 일체성을 보장하기 위해 비-효소적 세포 해리 완충제를 사용하여 세포를 수집하였다. 이어서, 세포 표면에 발현된 분자만을 염색하는 비-투과성 조건 하에서 유세포 분석을 위해 PE 형광단에 접합된 마우스 항-인간 TNF 항체를 사용하여 세포를 염색하였다. 이어서, 세포를 감염되지 않은 염색된 대조군 및 감염되지 않은 염색되지 않은 대조군에 대해 실행시켰다. 상기 분석의 결과를 통해, 감염 후 48시간에 vMYX-SODKO-hTNF 감염된 세포의 표면에 TNF가 발현되었고, 감염되지 않은 대조군 세포에 의한 TNF 발현의 징후가 없음을 확인하였다(도 7). 웨스턴 블로팅(미도시)에 의해 분비된 TNF가 검출되지 않았는데, 이것은 감염된 세포가 이론적으로 분비된 형태의 TNF를 생성할 수 있는 필요한 전환/절단 효소(들)를 발현하지 않았음을 나타낸다.

[0097] 시험관 내에서 세포 사멸의 분석

[0098] 백혈구/vMyxv-hTNF 바이러스 요법을 받은 종양 보유 동물에서 관찰된 생존율 개선 및 종양 부하 감소를 유발하는 메커니즘(들)을 더 잘 이해하기 위해, 상이한 시험 바이러스에 대한 골육종 세포의 반응을 측정하기 위해 세포 사멸 분석을 수행하였다. 이것은 감소된 종양 부하가 바이러스에 의해 발현된 TNF에 의해 야기된 직접적인 종양 세포 사멸의 증가에 의해 유도되었는지를 결정하기 위한 것이었다. K7M2-FLuc 세포는 TNFR1 및 TNFR2의 세포 표면 발현에 대해 유세포 분석을 사용하여 분석되었다. 이들 세포는 TNFR1 및 TNFR2 둘 모두의 발현에 대해 양성인 것으로 나타났으며, 이는 TNF가 종양 세포 상의 그의 동족 수용체와 직접 상호작용하여 TNF 유도 세포 사멸을 유발할 수 있음을 의미한다. 이들 세포가 TNF에 의해 직접 죽을 수 있는지 확인하기 위해, 이들 세포를 실험실에서 성장시키고, vMyx-M135KO, vMyx-SODKO-hTNF에 의해 감염시키거나 또는 정제된 무린 TNF와 함께 인큐베이팅하였다. 그런 다음, 다양한 형태의 세포 사멸과 관련된 세포막 일체성이 손실된 후에만 세포에 들어가고 세포를 염색하는 SYTOX 오렌지를 사용하여 세포의 생존력을 측정하였다. 감염/접종 24시간 또는 48시간 후에, 세포를 SYTOX 오렌지와 함께 10분 동안 인큐베이팅하고, 트립신을 사용하여 들어올린 다음, 세포 및 상청액을 함께 합하고, 원심분리하여 과량의 SYTOX를 세척하였다. 이어서, 세포를 100 마이크로리터의 DMEM에 재현탁하고, 세포 계수기를 사용하여 판독하였다. 이 분석의 결과는 무린 TNF가 대조군에 비해 48시간까지 세포 사멸을 20% 증가시켰지만, TNF 처리 후 24시간에는 유의한 차이가 없음을 보여주었다. 이와 반대로, vMyx-SODKO-hTNF 감염은 대조군에 비해 24시간에 20%, 48시간에 50%까지 생존력을 감소시켰다. 이러한 세포 생존력의 감소는 hTNF를 발현하지 않는 대조군 vMyx-135KO 바이러스로 감염된 후 관찰된 것과 본질적으로 동일한 것이다. 이것은 이러한 골육종 세포가 hTNF에 의한 사멸에 추가로 민감하지 않으며, 동물 연구에서 관찰된 종양 감소의 증가는 골육종 세포 상의 TNFR1 또는 TNFR2와 바이러스 발현 TNF의 직접적인 상호작용과는 무관한 면역 관련 메커니즘에 의해 야기되었을 가능성이 있음을 보여준다(도 8).

[0099] 실시예 2

[0100] 이 실시예는 생체 외에서 바이러스가 미리 로딩된 백혈구를 통해 전달된 vMyx-M135KO-hTNF 바이러스의 삼중 음성 유방암에 대한 효능의 결정을 설명한다.

[0101] 면역 적격 Balb/c 마우스에서 동계 무린 삼중 음성 유방암이 사용된다. 동물에게 제0일에 삼중 음성 유방암 세포를 측방 꼬리 정맥을 통해 접종하였다. 접종 후, 대조군 Balb/c 마우스로부터 골수(BM)를 수거하고, 계수하고, vMyx-M135KO-hTNF 및/또는 대조군 바이러스를 감염시켰다. 세포 및 바이러스를 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 이어서, 생체 외에서 바이러스 로딩된 BM은 역안와로 주입되었다. 그 다음, 그 대부분이 수용자 폐에서 관찰되는, 종양 부하의 실시간 측정으로서 종양 접종 후 매주 루시페라제 발광에 대한 IVIS 생체내 영상화 시스템을 사용하여 동물의 영상을 촬영하였다. 진행성 질환의 미리 결정된 임상 증상에 도달할 때까지 동물을

모니터링하였다.

[0102] 실시예 3

[0103] 이 실시예는 생체 외에서 바이러스가 미리 로딩된 백혈구를 통해 전달된 vMyx-M135KO-hTNF 바이러스의 전이성 흑색종에 대한 효능의 결정을 설명한다.

[0104] 면역 적격 Balb/c 마우스에서 동계 무린 삼중 음성 유방암이 사용된다. 동물에게 제0일에 전이성 흑색종 세포를 측방 꼬리 정맥을 통해 접종하였다. 접종 후, 대조군 Balb/c 마우스로부터 골수(BM)를 수거하고, 계수하고, vMyx-M135KO-hTNF 및/또는 대조군 바이러스를 감염시켰다. 세포 및 바이러스를 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 이어서, 생체 외에서 바이러스 로딩된 BM은 역안화로 주입되었다. 그 다음, 그 대부분이 수용자 폐에서 관찰되는, 중앙 부하의 실시간 측정으로서 중앙 접종 후 매주 루시퍼라제 발광에 대한 IVIS 생체내 영상화 시스템을 사용하여 동물의 영상을 촬영하였다. 진행성 질환의 미리 결정된 임상 증상에 도달할 때까지 동물을 모니터링하였다.

[0105] 실시예 4

[0106] 도 9는 유세포 분석을 사용하여 감염된 인간 AML(THP1) 세포에 대한 세포 사멸의 정량화를 예시한 것이다. MYXV 매개된 총 THP1 세포 사멸은 Live/Dead 염색으로 세포에 대해 게이팅함으로써 정의되는 바와 같이 APC/Cy7⁺인 세포 집단으로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다. 결과는 vMyx-SODKO-hTNF-GFP에 의한 THP-1 세포의 감염이 감염 후 두 시점 모두(24시간 및 48시간)에서 시험된 3개의 감염 다중도(MOI = 10, 1 또는 0.1)에서 게이팅된 죽은 세포의 수를 전반적으로 증가시킴을 보여준다.

[0107] 도 10은 유세포 분석을 사용하여 바이러스에 감염된 인간 AML(THP1) 세포의 MYXV 매개 표적 적중 사멸의 정량화를 예시한 것이다. THP1 세포의 MYXV 매개 "표적 적중" 사멸은 GFP 양성인 바이러스에 감염된 세포 집단으로부터 게이팅된 APC/Cy7⁺인 세포의 비율로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다. 결과는 THP1 세포가 시험 바이러스에 감염되었을 때 바이러스에 감염된 죽은 세포의 검출이 대조군 바이러스 또는 TNF 발현 구축물에 대해 매우 유사하다는 것을 보여준다. 이 결과는 감염된 세포를 죽이는 MYXV의 능력이 주로 바이러스 플랫폼의 결과이며, TNF를 포함한 대부분의 도입 유전자에 의해 비교적 영향을 받지 않는다는 일반적인 관찰과 일치한다.

[0108] 도 11은 유세포 분석을 사용하여 감염되지 않은 인간 AML(THP1) 세포의 MYXV 유도 표적 이탈 사멸의 정량화를 예시한 것이다. THP1 세포의 MYXV 매개 표적 이탈 사멸은 GFP 음성인 세포 집단으로부터 게이팅된 APC/Cy7⁺인 세포의 비율로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다. 결과는 hTNF 도입 유전자의 발현이 무장되지 않은(unarmed) MYXV 대조군 감염과 비교하여 감염되지 않은 THP1 세포의 상당한 사멸을 유도하였음을 보여준다.

[0109] 도 12는 유세포 분석을 사용하여 감염된 인간 다발성 골수종(U266) 세포의 세포 사멸의 정량화를 예시한 것이다. MYXV 매개 총 U266 사멸은 APC/Cy7⁺인 세포 집단으로부터 결정되었다. 다중 비교를 위해, 홀름-시닥 t 검정을 사용하여 유의성(* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001)을 결정하였다. 결과는 vMyx-SODKO-hTNF-GFP로 U266 세포를 감염시키면, 감염 후 두 시점 모두(24시간 및 48시간)에서 시험된 3개의 감염 다중도(MOI = 10, 1 또는 0.1)에서 게이팅된 죽은 세포의 수를 전반적으로 증가시킴을 보여준다.

[0110] 도 13은 면역 적격 마우스에서 미리 접종된 무린 다발성 골수종을 제거하기 위해 생체 외에서 로딩된 동계 무린 골수 백혈구를 통해 전달된 vMyx-SODKO-hTNF에 대한 시험을 보여준다. 다발성 골수종의 트랜스제닉 무린 VK^{*}MYC 모델은 매우 공격적이고 약물 내성인 모델이기 때문에, MYXV 바이러스를 사용한 바이러스 요법은 암이 없는 생존율을 개선하기 위해 골수 백혈구를 사용한 자가 줄기 세포 이식(ASCT)과 함께 사용되었다. 도 13a는 C57/B1 마우스에 이식된 보르테조미드 내성 VK^{*}12598 골수종 세포를 사용한 생체내 데이터를 보여주며, 여기서 상기 세포는 대부분 골수 및 비장으로 이동한다. 간단히 설명하면, 1x10⁶개의 VK^{*}12598 골수종 세포를 꼬리 정맥을 통해 정맥 내로(i.v.) 면역 적격 C57BL/6 마우스에게 전달하였다. 암 전달 4일 후, 마우스를 다음과 같이

처리하였다: 골수(BM) 이식을 받지 않은 대조군; 2×10^6 개의 BM 세포 단독 처리; vMyx-M135KO 무장되지 않은 점액종 바이러스(MOI=10)로 생체 외에서 전처리된 2×10^6 개의 BM 세포; 역안와(RO) 주사를 통해 vMyx-SODKO-hTNF(MOI=10)로 생체 외에서 처리된 2×10^6 개의 BM. 암 이식 100일 후에 생존 곡선이 생성되었다(도 13b). 도 13c는 생존율에 상응한다.

[0111] 도 14는 SMAC 모방체 또는 면역 체크포인트 억제제와 함께 BM 백혈구에 대해 생체 외에서 미리 로딩된 vMyx-hTNF-(M135-M136)을 사용한 조합 요법을 보여준다. 조합 요법은 생체 외에서 미리 로딩된 자가 무린 골수 백혈구를 통해 전달된 vMyx-hTNF-(M135-M136)와 조합된, SMAC 모방체 화합물 LCL161(50 mg/Kg) 또는 체크포인트 억제제 모노클로날 항체(mAb) α -muPD-1을 사용하여 시험되었다. 간단히 설명하면, 1×10^6 개의 VK*12598 무린 골수종 세포를 꼬리 정맥을 통해 정맥 내로(i.v.) 면역 적격 C57BL/6 마우스에게 전달하였다. 4주 후, 본 발명자들은 혈청 단백질 전기영동(SPEP)을 사용하여 혈청 내의 골수종 단백질 마커(예를 들어, M-스파이크)의 수준을 정량화하였다. 그 다음, 마우스를 제1, 4, 8 및 11일에 MOI=10에서 vMyx-hTNF-(M135-M136)으로 생체 외에서 전처리한 2×10^6 개의 BM 세포로 처리하였다. 각각의 자가 이식 후, 50 mg/kg의 LCL161을 경구 위관 영양법으로 전달하는 화학 요법 또는 제2, 5, 9, 12일에 복강내(I.p.) 주사를 통한 10 mg/kg의 mAb α -muPD-1를 사용한 면역 요법을 수행하였다. 도 14b는 생존 곡선을 포함하는 생체내 데이터를 보여준다. 도 14c는 생존율을 설명한다.

[0112] 도 15는 vMyx-hTNF-(M135-136)으로 감염된 인간 세포로부터 인간 TNF 단백질 발현 및 부분 분비를 보여준다. 2 개의 인간 세포주, 즉 THP1(인간 단핵구) 및 A549(인간 폐암)를 vMYX-hTNF-(M135-136) 및 대조군 vMyx-GFP로 3 가지의 상이한 감염 다중도(MOI)에서 감염시켰다. 감염 48시간 후, 상청액을 수거하고, 바이러스에 감염된 세포로부터 분비된 가용성 인간 TNF의 수준을 ELISA(BioLegend)에 의해 분석하였다.

[0113] **실시예 5**

[0114] vMyx-hTNF-M135-M136 바이러스는 MYXV 로잔 모 종을 사용하여 생성되었다. 간단히 설명하면, vMyx-hTNF-M135-M136 바이러스는 다중 부위 게이트웨이 3개 단편 클로닝 절차를 사용하여 생성되었다. 요소 1은 합성 초기/후기 프로모터에 의해 제어되는 eGFP와 함께 M134R-부분 및 M135 ORF의 3' 단편을 포함하였다. 요소 2는 또한 합성 초기/후기 프로모터의 제어 하에 전체 hTNF 코딩 서열을 포함하였다. 요소 3은 5' M136 유전자의 단편을 포함하였다. 이들 3개의 단편은 MYXV 게놈 백본의 M135R 유전자와 M136R 유전자 사이의 유전자간 위치에 eGFP-hTNF 텐덤 카세트를 삽입하기 위해 사용되는 단일 엔트리 비히클 플라스미드 내에 조합되었다. 그 다음, 이를 형질감염/감염에 사용하고, 적어도 3회의 플라크 정제를 사용하여 재조합 바이러스를 정제하였다(도 2b에 제시된 형질감염에 사용된 최종 플라스미드).

[0115] 본 명세서에서 설명되는 조성물 및 방법에 상응하는 예시적인 서열은 표 1에 제시된다.

[0116] **표 1**

서열 번호	명칭	서열
1	M134R-부분 및 M135R	ATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACCTACGTAC

[0117]

	(vMyx-hTNF-M135-136 에 이용됨)	<p>GTATAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACGAGTATCTGGC AGCGAAGGCCCGCGAGTGACCTGTTTCCACACGACTTGA TCCCCATTACGGACGAAGAGACACAACGACGTTTTGAGAA AATGATTGTACAGGCGGCGTTAGAGGACGCCCTAACGAGC ATCTTTGAGGAGCACGACAATAACGTAACCGATTACTTCGC GGAATACATGCGATCCCTCCAAATGGCGAATAAAAAGTCAT ACGAATAATATTATCGCGGTGCGTTTAGCGGGGATAATCGT CATTGTAACGACCTACGTGTTACTAGATTACGCTAAGC AAAAAAAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAA TTCCATACAGAAAGAGATTTCAGTTGGACGGTGTATATACTA CTGACAACGTTTTTATATAAACATGGTGTATATTTATTAT CACCTGNGTATGTTTGGTGACGAGATCCTGTGGGGGTGGGT TAGAAGACGATATAGATCGCATATTTCAAAAACGATACAA CGAAGTTCAGCCAGCCGATTAAGCGCAATATGCGTACACTGT GCAAGTTTAGAGGAATTACCGCGACTATGTTACGGAAGG AGAATCTTACCTTATCAATGTCCATAATTCACGATTACGT GCTACGGGCGCTGTATGACTTAGTGGAAAGGAAGTTACACG GTACGCTGGGAACGCGAAACGGAAGACGATGTTGAGTCGG TAGATCCGAAGTTAGTCAAAGGGACGCTATTATACTCCAA CCTAACGCGTCCAGTATAGGAACGTATCTATGTACCTTACA CGATAACCGAGGTATGTGTTATCAATCTGTGCGCACGTCA TCCGACGTCCGAAGATGCAATGCGTGAAACATGCACATA GACATCGACAGCAACCTGTGGATATACCTCGCCATTTAG CAGTTTTGATATCcttagcgctcgttaa</p>
2	M136R	<p>acgacgtaactccgaacTatgaagtaacatttttaaacatttcggtatgtaattATGGAA CGGTGCGCCACTTACACGGTACACGATAAACGCTTTTCTAT CGTCGCACTAAACGGACAATACGACATGGTGGACGATTTTG GTCTTAGTTTTTCTTACACAGCGATCGACGATATTTCTAAAA ATCATTCCATCAAACAGTTTTTAGAAGAATACTTTTCATGG CGCGCGTATATAGGCCGGGTATGTATCATAACGAATCACGT GGGAAAGCTCTACATCAAACCTTACAAAGTTGGACACCACG GCGAAGAACAAACTAGGCAATCTAGATATATTGTTATGCG ACGTGTAAAAATAGACGAGGACGGAGGCAACGAGAAACT GTTCAATTCATACGGTCGCTGAACCTACACAAGAATAAAG AGAACACGTTGACGTTGATAGGATTACTAGCCTACGCGTGC AACTTCTGGGGCAGTCAAAAAATAAATAAATACATTCCTTC CATCATGCCGTTTTTCTTAAACAAACGACCGAGTCTATAC TTTCCGAAGTGTGTGTTATTTTGAACATAACAAATTGTATT AA</p>
3	합성 초기/후기 프로모터	<p>TTAAAAATGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAAATATAAATA</p>
4	hTNF	<p>ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCG AGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCAGGGGTC CAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTCCTGATCGT GGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACCTTGGAG TGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCT CTAATCAGCCCTCTGCCCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCG AACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC CTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGC CAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAAC CAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTC CCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCCTCACCATG TGCTCCTCACCCACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCTAC CAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTG CCAGAGGGGAGACCCAGAGGGGGGTGAGGCCAAGCCCTGG TATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAA</p>

[0118]

		GGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATC TCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATT GCCCTGTGA
5	eGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAA GTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCACTGCACCACCGGCAAGCT GCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG GCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCCGACCACATGAAGCAG CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCA GGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGC CAACACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA TCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG CGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTTCGTGACCCGCGCCGG GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
6	M134-부분 및 M135R 부분 (vMyx-M135KO- hTNF 에 이용됨)	CGAGGATTACCTGGTCTATATAGATAACAAAACCTACGTAC GTATAAACGAGACCGTTGTACCGGAGAACGAGTATCTGGC AGCGAAGGCCCGCGAGTGACCTGTTTCCACACGGACTTGA TCCCCATTACGGACGAAGAGACACAACGACGTTTTGAGAA AATGATTGTACAGGCGGCGTTAGAGGACGCCCTAACGAGC ATCTTTGAGGAGCAGCACAATAACGTAACCGATTACTTCGC GGAATACATGCGATCCCTCCAAATGGCGAATAAAAAGTCAT ACGAATAATATTATCGCGGTCGCTTTAGCGGGGATAATCGT CATTGTAACGACCTACGTGTTTACTAGATTACGCACTAAGC AAAAAAAAGGAAATTATAACGTACGTAATAAGATAGATAA TTCCATACAGAAAGAGATTCAGTTGGACGGTGTATATACTA CTGACAACGTTTTTATATAAACATGGTGTATATTTATAT CACCTGTGTATGTTGGTGACGAGATCCTGTGGGGGTGGGT TAGAAGACGATATAGATCGC

[0119]

[0120]

일부 경우에, MYXV(로잔 중)는 GenBank: AF170726.2(2019년 7월 11일에 GenBank가 제공한 바와 같이 본 명세서에 참조로 포함됨)에 의해 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0121]

일부 경우에, vMyx-hTNF-M135-136은 도 2b에 나타난 바와 같이 배열된 서열 번호 1-5를 포함한다. 일부 경우에, vMyx-hTNF-M135-136은 GenBank: AF170726.2에 의해 제시된 서열을 선택적으로 포함하는 로잔 중 백분을 포함한다.

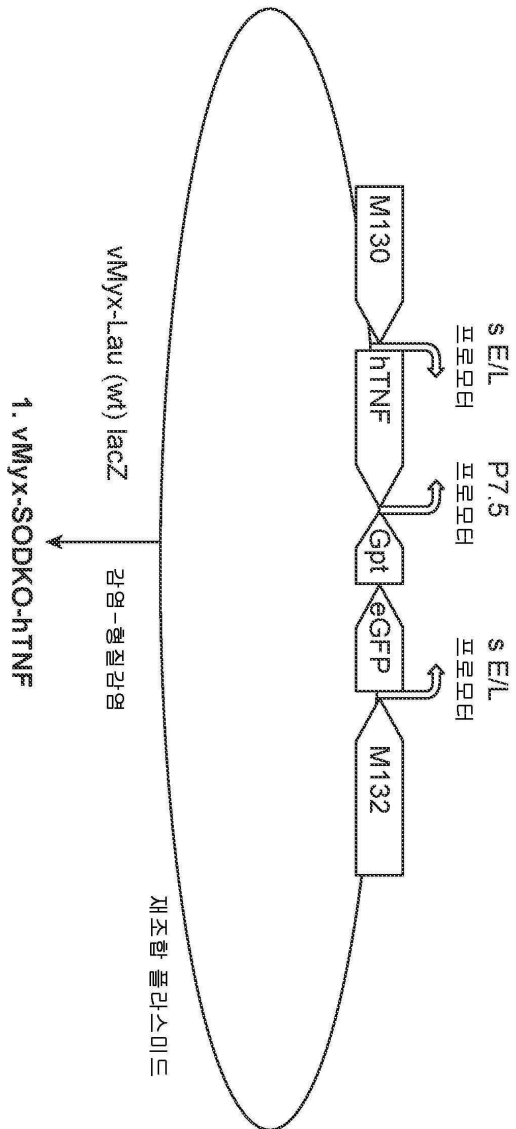
[0122]

일부 경우에, vMyx-M135KO-hTNF는 도 2a에 도시된 바와 같이 배열된 서열 번호 6, 2, 4 및 5를 포함한다. 일부 경우에, vMyx-M135KO-hTNF는 GenBank: AF170726.2에 의해 제시된 서열을 선택적으로 포함하는 로잔 중 백분을 포함한다.

[0123]

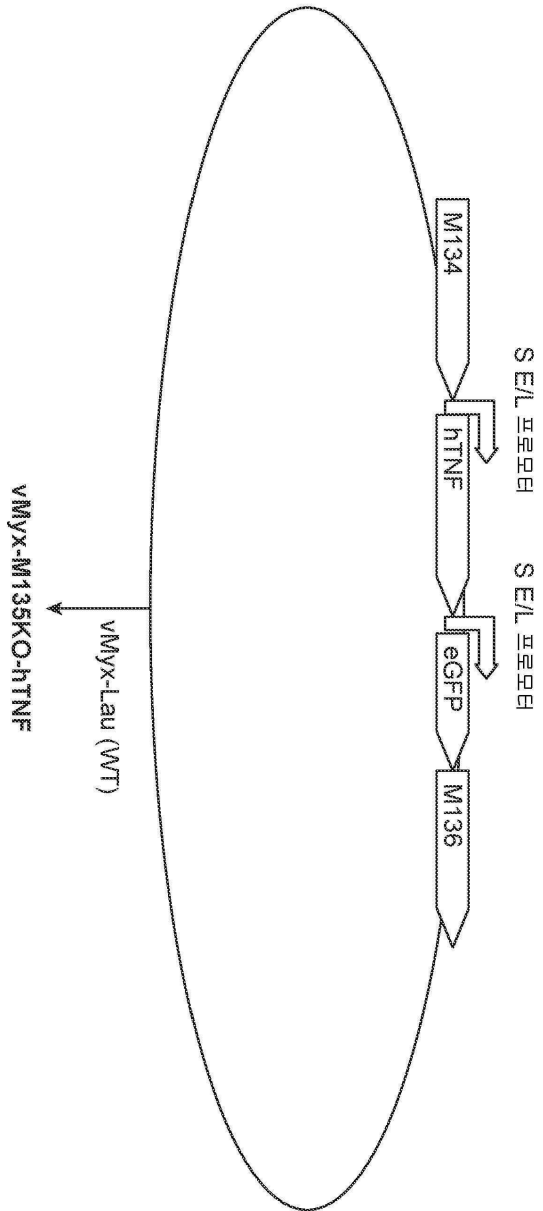
본 발명의 바람직한 실시양태가 본 명세서에서 제시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이제 본 발명을 벗어나지 않고 다양한 변형, 변경 및 대체가 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 실시될 것이다. 본 명세서에서 설명된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 다음의 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하고, 이러한 청구범위 내의 방법 및 구조 및 그의 균등물이 이에 의해 커버된다는 것이 의도된다.

SOD 유사 유전자좌에서 인간 TNF의 유전자 지도: vMyx-SODKO-hTNF



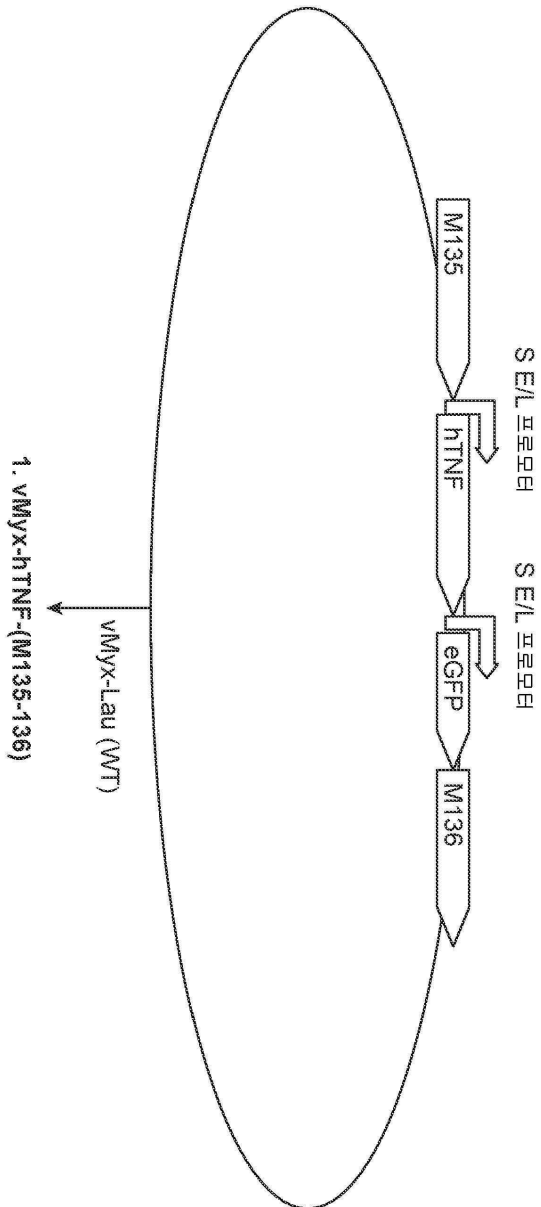
도면
도면1

도면2a



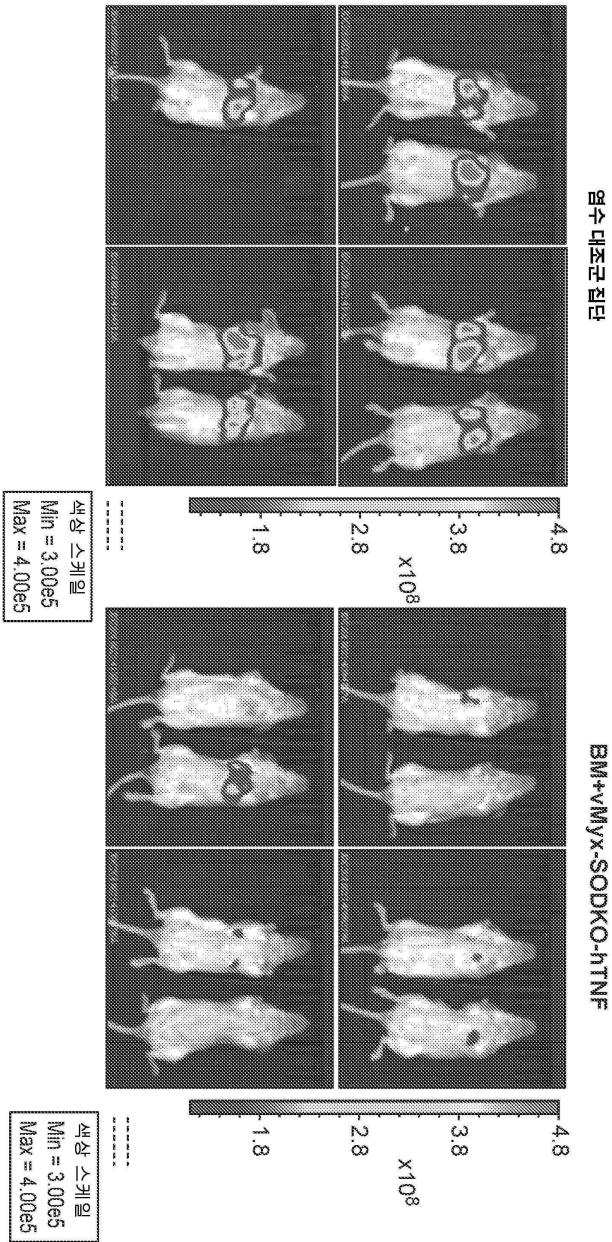
인간 TNF M135KO 접합종 바이러스의 유전자 지도: vMyx-M135KO-hTNF

도면2b



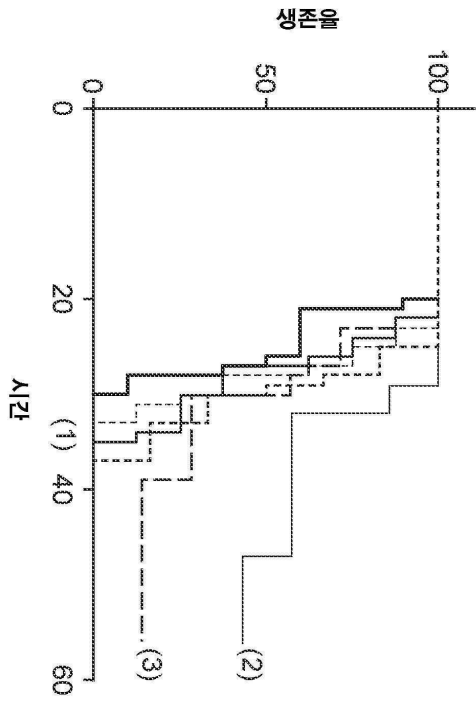
유전자 M135/136R 사이의 인간 TNF 절편을 바이러스의 유전자 지도: vMyx-hTNF-(M135-136)

VMYx-SODKO-hTNF 동물은 접종후 제2주에 천지히 작은 증상을 갖는다

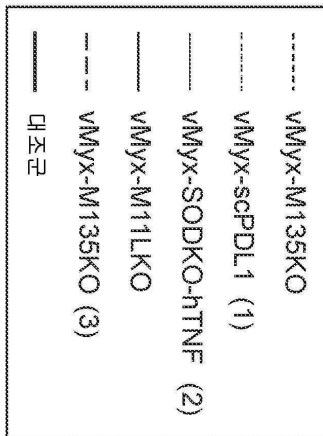


도면3

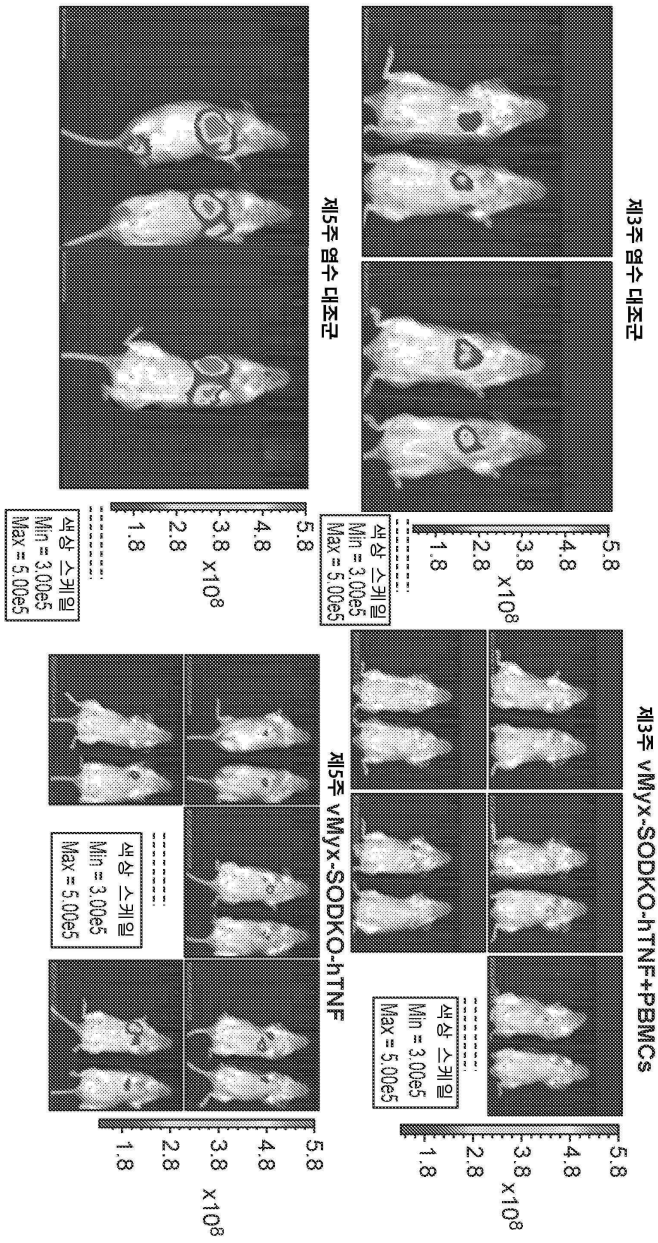
도면4



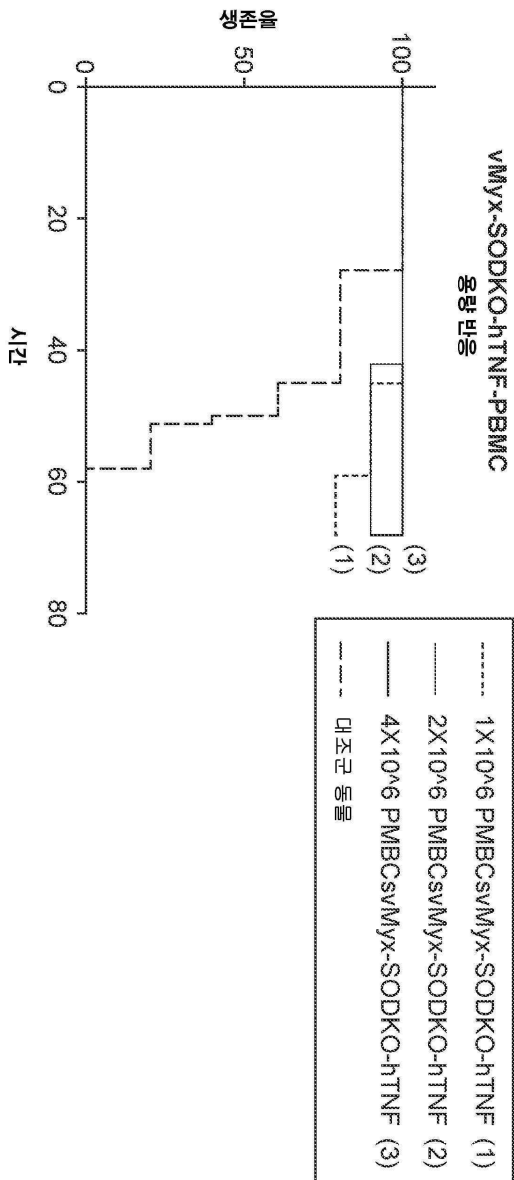
코호트 5



도면5

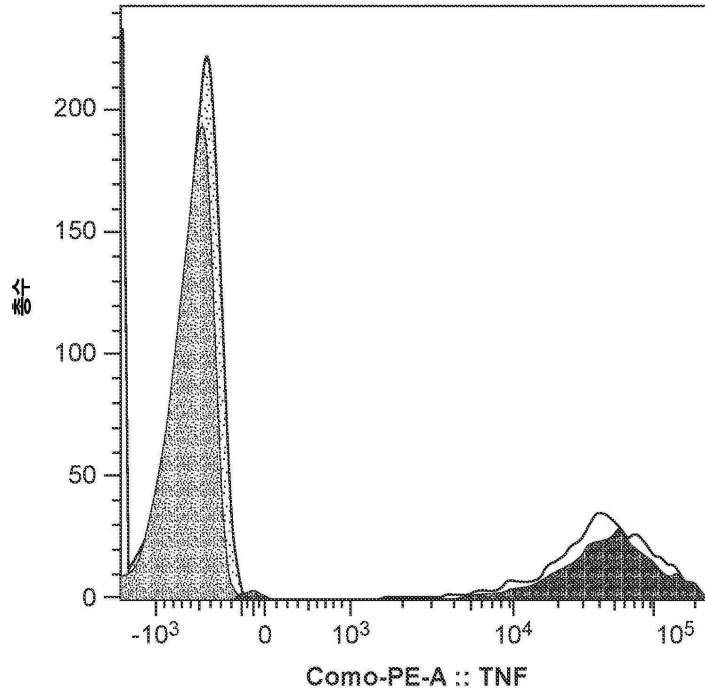


도면6

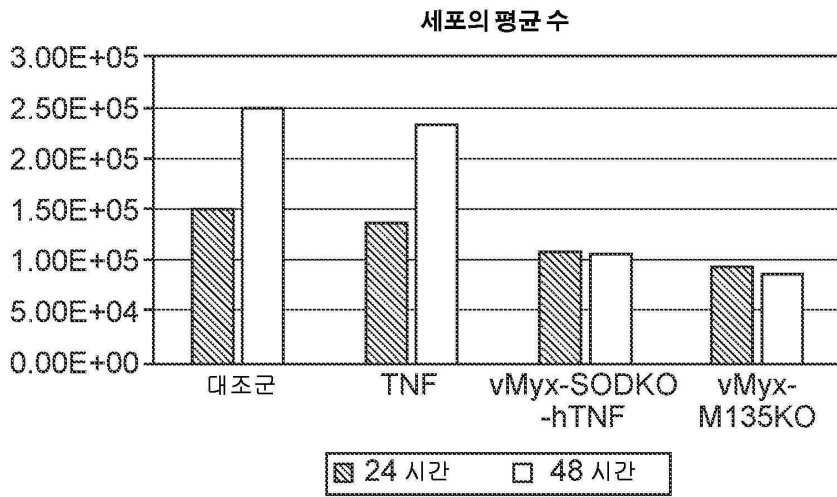
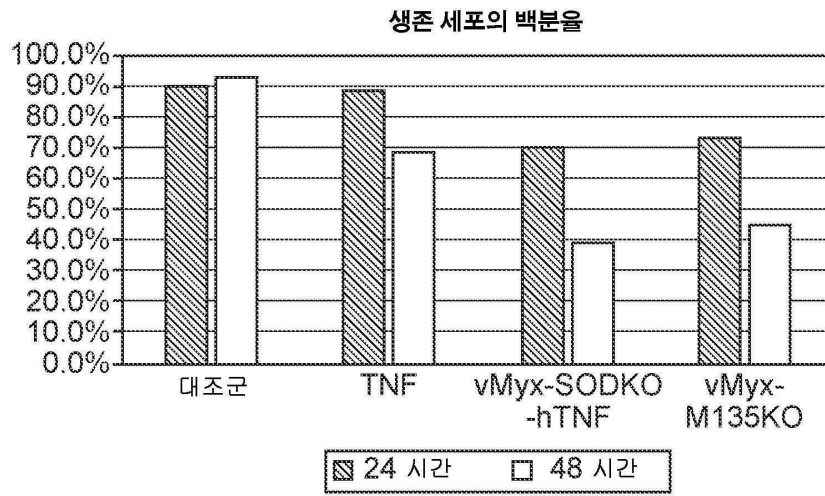


도면7

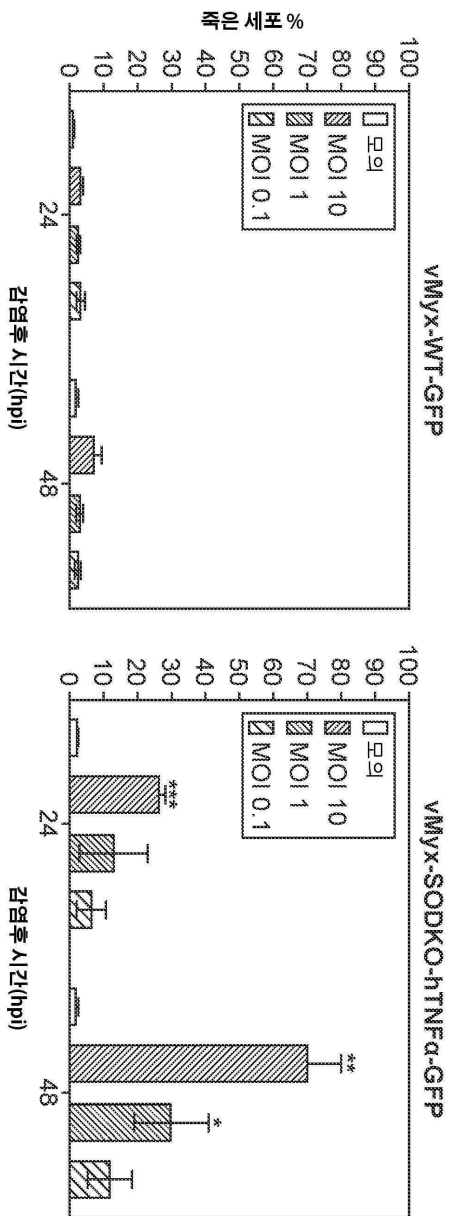
	샘플 명칭	서브세트 명칭	총수
□	TNF Expression_2TNF.fcs	Gate	2667
■	TNF Expression_1TNF.fcs	Gate	2124
▨	TNF Expression_uns_a.fcs	Gate	4084
▩	TNF Expression_Control - no virus_a.fcs	Gate	4756



도면8

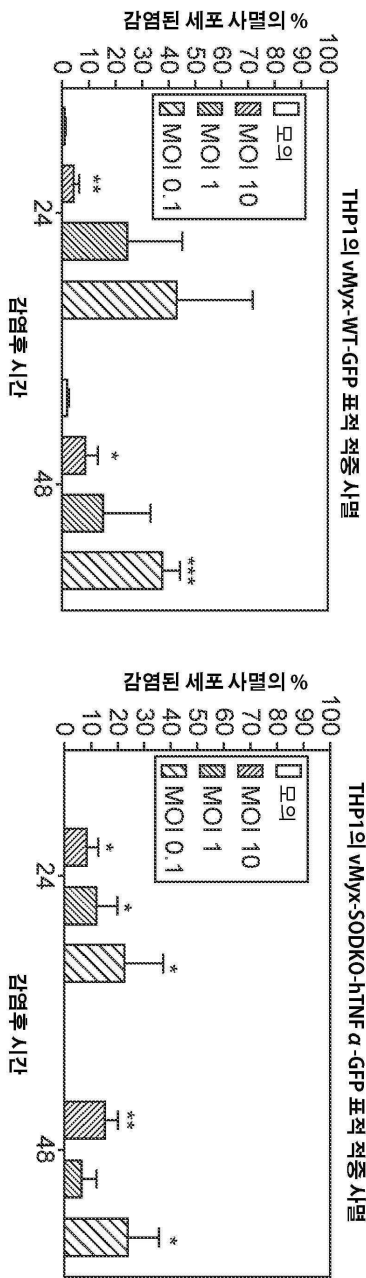


도면9



무세포 분석을 사용하여 감염된 인간 AML(THP1) 세포에 대한 세포 사멸의 정량화

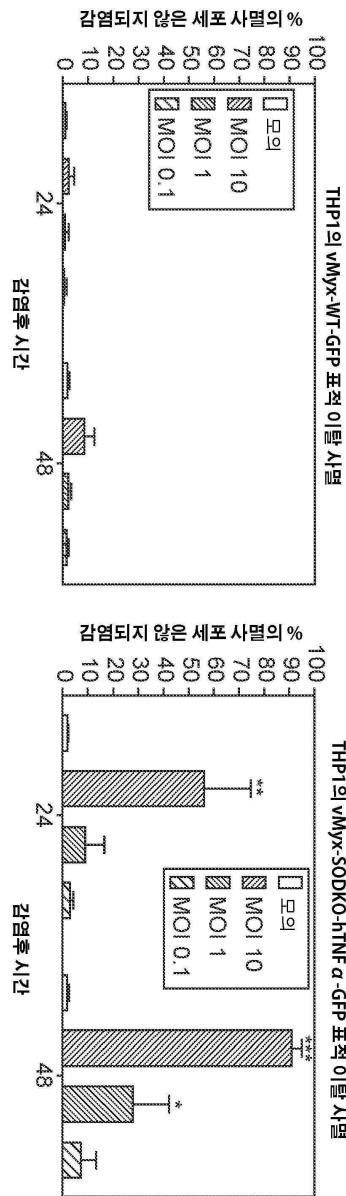
도면10



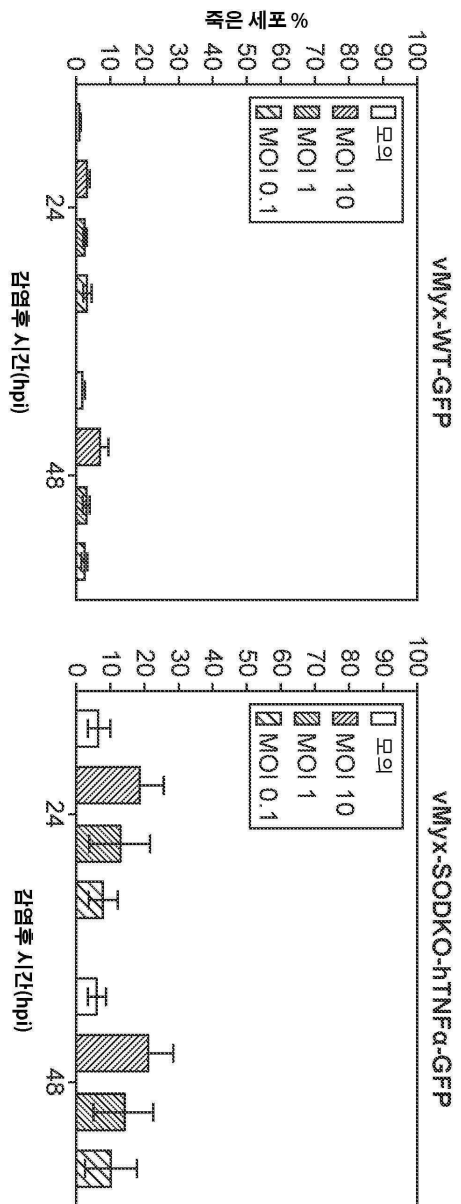
유세포 분석을 사용하여 감염된 인간 AML(THP1) 세포의 표적 적중 시험의 정량화

도면11

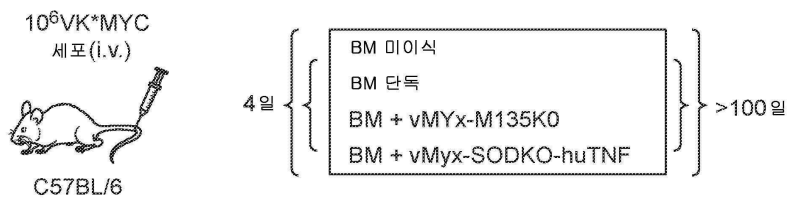
무세포 분석을 사용하여 감염되지 않은 인간 AML(THP1) 세포의 표적 이탈 시멸의 정량화



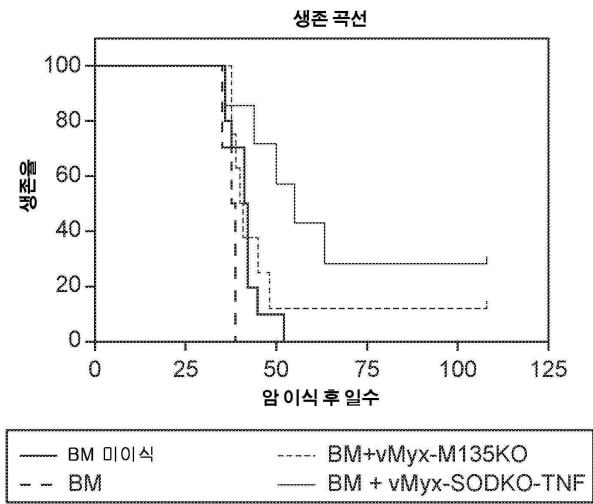
도면12



도면13a



도면13b

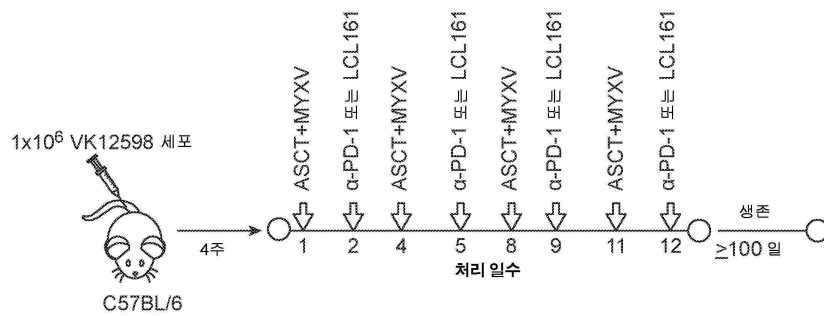


도면13c

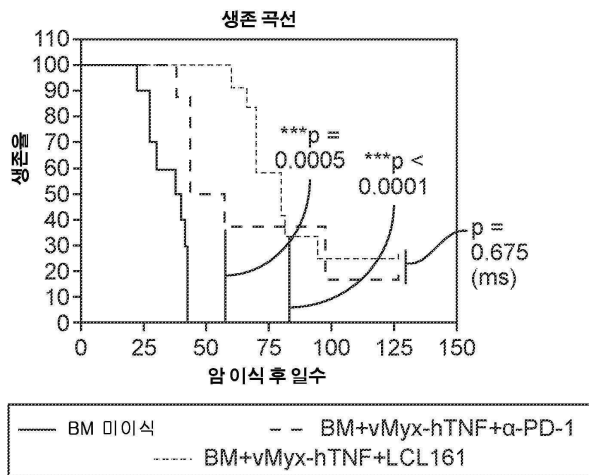
무질환 생존

코호트	무질환/총	생존율 (%)
BM 미이식	0/10	0
BM 단독	0/10	0
BM+vMyx - M135KO	1/8	13
BM + vMyx - SODKO-hTNF	2/7	29

도면14a



도면14b



도면14c

코호트	무질환/총	생존율 (%)
BM 미이식	0/10	0
BM + MYXV + α-PD-1	2/8	25
BM + MYXV + LCL161	2/12	17

도면15

