

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0106775

(43) 공개일자 2022년07월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) **C07K 14/82** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2021.08)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7020160
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월20일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/082926
- (87) 국제공개번호 WO 2021/099586
 국제공개일자 2021년05월27일
- (30) 우선권주장
 19210369.5 2019년11월20일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 20193706.7 2020년08월31일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
버베리안 노딕 에이/에스
 덴마크 헬레루프 필립 헤이만 알레 3 (우: 2900)
- (72) 발명자
라우터바흐, 헤닝
 독일 82211 헤르싱 암 아메르제 아돌프-스탐-슈트
 라쎄 20베
헌터베르거, 마리아
 독일 82054 자우에라크 다이젠호페너 슈트라쎄 8
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 종양내 및/또는 정맥내 투여를 위한 제조합 MVA 바이러스****(57) 요약**

본 발명은 암 환자의 종양 부피를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키기 위한 조성물 및 관련 방법에 관한 것이다. 조성물은 종양 관련 항원("TAA") 뿐만 아니라 4-1BBL 및/또는 CD40L을 암호화하는 제조합 MVA를 포함하고, 정맥내 및/또는 종양내 투여를 포함하는 임의의 적합한 방식으로 대상체에게 투여될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/70575 (2013.01)

C07K 14/82 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 2039/5256 (2013.01)

C12N 2710/24143 (2013.01)

(72) 발명자

메디나 에체베르즈, 호세

독일 81669 뮌헨 세인트 카제탄슈트라쎄 23

하브안, 마티아스

독일 82178 푸호하임 라이너슈트라쎄 1

하우스만, 위르겐

독일 79194 쾰른 알테 분데스슈트라쎄 130

칼라, 마르쿠스

독일 82377 펜츠베르그 뵐플 6체

명세서

청구범위

청구항 1

암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해 대상체의 암성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 전체 생존을 증가시키는, 방법.

청구항 2

암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 향상시키는, 방법.

청구항 3

암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA 및 4-1BBL 항원 자체의 투여에 비해 대상체에서 종양 감소를 증가시키고/시키거나 전체 생존을 증가시키는, 방법.

청구항 4

대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이종 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 이종 종양-관련 항원 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비종양내 주사에 의해 생성된 염증 반응에 비해 향상된 종양내 염증 반응을 발생시키는, 방법.

청구항 5

암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 내인성 레트로 바이러스 항원(ERV) 단백질을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA 및 4-1BBL 항원 자체의 투여에 비해 대상체에서 종양 감소를 증가시키고/시키거나 전체 생존을 증가시키는, 방법.

청구항 6

암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산, 및 CD40L을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA, 4-1BBL 항원, 및 CD40L 항원 자체의 투여에 비해 대상체에서 종양 감소를 증가시키고/시키거나 전체 생존을 증가시키는, 방법.

청구항 7

대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이종 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 CD40L 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 이종 종양-관련 항원을 암호화하는 제1 핵산, 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 CD40L 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비종양내 주사에 의해 발생된 염증 반응에 비해 향상된 종양

내 염증 반응을 발생시키는, 방법.

청구항 8

하기를 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA):

- (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산;
- (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산; 및
- (c) TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

- (d) CD40 리간드(CD40L)를 암호화하는 핵산
- 을 추가로 포함하는, 재조합 MVA.

청구항 10

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서,

각각이 상이한 TAA를 암호화하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 이상의 핵산을 포함하는, 재조합 MVA.

청구항 11

청구항 8 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TAA가 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질, 내인성 레트로바이러스(ERV) 펩타이드, 암배아 항원(CEA), 뮤신 1 세포 표면 결합(MUC-1), 전립선 산 포스파타제(PAP), 전립선 특이적 항원(PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 서바이빈, 티로신 관련 단백질 1(TRP1), 티로신 관련 단백질 2(TRP2), 브라큐리, p15, AH1A5, 염산 수용체 알파(FOLR1), 흑색종의 우선적으로 발현된 항원(PRAME), 및 MEI; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 ERV 단백질이 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피(HERV-K-env) 단백질 및 HERV-K gag 단백질로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 ERV 펩타이드가 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피 단백질(HERV-K-env/MEL)의 유사유전자로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 14

하기를 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA):

- (i) HERV-K-env/MEL을 암호화하는 핵산;
- (ii) HERV-K gag를 암호화하는 핵산;
- (iii) 바람직하게는 융합 단백질로서 발현되는 FOLR1 및 PRAME를 암호화하는 핵산; 및
- (iv) 4-1BBL을 암호화하는 핵산.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

(v) CD40L을 암호화하는 핵산

을 추가로 포함하는, 제조합 MVA.

청구항 16

청구항 8 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조합 MVA가 MVA-BN으로부터 유래된, 제조합 MVA.

청구항 17

청구항 8 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 따른 제조합 MVA를 포함하는 약제학적 제제 또는 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

종양내 및/또는 정맥내 투여, 바람직하게는 종양내 투여에 적합화된, 약제학적 제제 또는 조성물.

청구항 19

의약 또는 백신으로서 사용하기 위한, 청구항 8 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 따른 제조합 MVA.

청구항 20

암, 바람직하게는 흑색종, 유방암, 결장암 또는 난소암의 치료에 사용하기 위한, 청구항 8 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 따른 제조합 MVA.

청구항 21

대상체, 바람직하게는 인간의 암성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 암성 종양의 크기를 감소시키고, 암성 종양의 성장을 지연 또는 정지시키고/시키거나, 전체 생존을 증가시키는 데 사용하기 위한, 청구항 8 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 따른 제조합 MVA.

청구항 22

청구항 19 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조합 MVA가 종양내로 및/또는 정맥내로, 바람직하게는 종양내로 투여되는, 제조합 MVA.

청구항 23

청구항 19 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조합 MVA가 TAA 특이적 항체와 조합되어 사용되는, 제조합 MVA.

청구항 24

청구항 19 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조합 MVA가 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제와 조합하여 사용되는, 제조합 MVA.

청구항 25

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조합 MVA가 청구항 8 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 따른 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 치료를 위한 요법에 관한 것이고; 치료에는 4-1BBL(CD137L)을 암호화하는 핵산을 포함하는 정맥

내 또는 종양내 투여된 재조합 변형 백시니아 앙카라(MVA) 바이러스가 포함된다. 본원에 사용된 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA) 바이러스(또한 "재조합 MVA" 또는 "rMVA")는 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 MVA를 지칭한다. 보다 특정한 양태에서, 본 발명은 TAA를 암호화하는 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 핵산을 포함하는 정맥내 또는 종양내 투여된 재조합 MVA를 포함한다. 추가 양태에서, 본 발명은 TAA를 암호화하는 핵산 및 CD40L을 암호화하는 핵산을 포함하는 정맥내 또는 종양내 투여된 재조합 MVA를 포함한다. 추가 양태에서, 본 발명은 TAA, 4-1BBL(CD137L), 및 CD40L을 암호화하는 핵산을 포함하는 정맥내 및/또는 종양내 투여된 재조합 MVA를 포함한다.

배경 기술

- [0002] 재조합 폭스바이러스는 감염성 유기체, 보다 최근에는 종양에 대한 면역요법 백신으로 사용되어 왔다 (Mastrangelo *et al.* (2000) *J Clin Invest.* 105(8):1031-1034).
- [0003] 감염성 질환 및 암에 대한 면역요법 백신으로서 유용한 것으로 입증된 한 폭스바이러스 균주는 변형된 백시니아 앙카라(MVA) 바이러스(때로는 단순히 "MVA"로 지칭됨)이다. MVA는 백시니아 바이러스(CVA)의 앙카라 균주의 닭 배아 섬유아세포에 대한 516개의 연속 계대에 의해 생성되었다(검토를 위해 Mayr *et al.* (1975) *Infection* 3: 6-14 참조). 이러한 장기간 계대의 결과로, 생성된 MVA 바이러스의 계통은 계통 서열의 약 31 킬로베이스가 결실되었고, 따라서 조류 세포로의 복제에 대해 고도로 제한된 숙주 세포로 기술되었다(Meyer *et al.* (1991) *J. Gen. Virol.* 72: 1031-1038). 다양한 동물 모델에서 생성된 MVA가 상당히 무병원성인 것으로 나타났다(Mayr & Danner (1978) *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34). 백신 또는 의약품과 같은 보다 안전한 제품의 개발을 위해 향상된 안전성 프로파일을 갖는 MVA의 균주가 기술되어 있다(국제 PCT 공개 WO2002042480 참조; 또한 예를 들어, 미국 특허 제6,761,893호 및 제6,913,752호 참조, 이들 모두는 본원에 참조로 포함됨). 이러한 변이체는 비인간 세포 및 세포주, 특히 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식 복제가 가능하지만, 특히 HeLa, HaCat 및 143B 세포주를 포함하는 인간 세포주에서는 복제가 불가능하다. 이러한 균주는 또한 생체 내에서, 예를 들어 면역이 심하게 손상되고 복제 바이러스에 매우 민감한 형질전환 마우스 모델 AGR 129와 같은 특정 마우스 균주에서 생식 복제가 불가능하다(미국 특허 제6,761,893호 참조). "MVA-BN"으로 지칭되는 재조합체를 포함하는 이러한 MVA 변이체 및 이의 유도체가 기술되어 있다(국제 PCT 공개 WO2002/042480 참조; 예를 들어, 미국 특허 제6,761,893호 및 제6,913,752호 참조).
- [0004] 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 폭스바이러스 벡터의 사용은 종양 크기를 성공적으로 감소시킬 뿐만 아니라 암 환자의 전체 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다(예를 들어, WO 2014/062778 참조). 암 환자에게 HER2, CEA, MUC1 및/또는 브라큐리(Brachyury)와 같은 TAA를 암호화하는 폭스바이러스 벡터를 투여하면, 환자가 암과 싸우기 위해 강력하고 특이적인 T-세포 반응을 생성해낸다는 것이 입증되었다(*Id.*; 또한, Guardino *et al.* ((2009) *Cancer Res.* 69 (24), doi 10.1158/0008-5472.SABCS-09-5089), Heery *et al.* (2015) *JAMA Oncol.* 1: 1087-95 참조).
- [0005] 많은 암 및 종양 세포에서 발현되는 것으로 밝혀진 TAA의 한 유형은 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질이다. ERV는 숙주의 생식선을 침범한 이전 외인성 형태의 잔재이며, 이후 유전적 개체군을 통해 수직으로 전달되었다(Bannert *et al.* (2018) *Frontiers in Microbiology*, Volume 9, Article 178 참조). ERV-유도된 계통 재조합 이벤트와 정상 세포 유전자의 조절장애는 종양 형성에 기여하는 효과가 있는 것으로 문서화되었다(*Id.*). 또한, 특정 ERV 단백질이 발암성 특성을 갖는다는 증거가 있다(*Id.*). ERV는 예를 들어 유방암, 난소암, 흑색종, 전립선암, 췌장암 및 림프종을 비롯한 다양한 암에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. (예를 들어, Bannert *et al.* (2018) *Front. Microbiol.* 9: 178; Cegolon *et al.* (2013) *BMC Cancer* 13: 4; Wang-Johanning *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 1528-35; Wang-Johanning *et al.* (2007) *Int. J. Cancer* 120: 81-90; Wang-Johanning *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68: 5869-77; Wang-Johanning *et al.* (2018) *Cancer Res.* 78 (13 Suppl.), *AACR Annual Meeting April 2018, Abstract 1257*; Contreras-Galindo *et al.* (2008) *J. Virol.* 82: 9329-36; Schiavetti *et al.* (2002) *Cancer Res.* 62: 5510-16; Maliniemi *et al.* (2013) *PLoS One* 8: e76281; Fava *et al.* (2017) *Genes Dev.* 31: 34-45, Muster *et al.* (2003) *Cancer Res.* 63: 8735-41; Buscher *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65: 4172-80; Serafino *et al.* (2009) *Expt'l. Cell Res.* 315: 849-62; Iramaneerat *et al.* (2011) *Int. J. Gynecol. Cancer* 21: 51-7; Ishida *et al.* (2006) *Cancer Sci.* 97: 1139-46; Goering *et al.* (2011) *Carcinogenesis* 32: 1484-92; Agoni *et al.* (2013) *Front. Oncol.* 9: 180; Li *et al.* (2017) *J. Mol. Diagn.* 19: 4-23 참조).
- [0006] TAA에 대한 효과에 추가하여, MVA와 같은 폭스바이러스는 CD40 리간드(CD40L)와 같은 CD40 작용제(WO

2014/037124 참조) 또는 4-1BB 리간드(4-1BBL)와 같은 4-1BB 작용제(Spencer *et al.* (2014) *PLoS One* 9: e105520)와 조합될 때 향상된 효능을 갖는 것으로 나타났다.

- [0007] CD40/CD40L은 종양 괴사 인자 수용체/종양 괴사 인자("TNFR/TNF") 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD40은 B 세포, 대식세포 및 DC를 포함하는 많은 세포 유형에서 구성적으로 발현되지만, 그의 리간드 CD40L은 주로 활성화된 CD4+ T-세포에서 발현된다(Lee *et al.* (2002) *J. Immunol.* 171(11): 5707-5717; Ma and Clark (2009) *Semin. Immunol.* 21(5): 265-272). DC와 CD4+ T-세포 사이의 동족 상호작용은 감염 또는 면역화 후 초기에 DC를 '라이센싱'하여 CD8+ T-세포 반응을 프라이밍한다(Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478). DC 라이선싱은 공동-자극 분자의 상호조절, DC의 생존 증가 및 교차-제시 기능을 향상시킨다. 이 과정은 주로 CD40/CD40L 상호작용을 통해 매개되지만(Bennet *et al.* (1998) *Nature* 393: 478-480; Schoenberger *et al.* (1998) *Nature* 393: 480-483), CD40/CD40L-독립적인 메커니즘도 존재한다(CD70, LT.베타.R). 흥미롭게도, DC에서 발현된 CD40L과 CD8+ T-세포에서 발현된 CD40 사이의 직접적인 상호작용도 제안되었으며, 이는 헬퍼-독립적인 CTL 반응의 생성에 대한 가능한 설명을 제공한다(Johnson *et al.* (2009) *Immunity* 30: 218-227).
- [0008] 4-1BB/4-1BBL은 TNFR/TNF 슈퍼패밀리의 구성원이다. 4-1BBL은 활성화된 B 세포, 단핵구 및 DC에서 발현되는 공동자극 리간드이다. 4-1BB는 자연 살해(NK) 및 자연 살해 T(NKT) 세포, Treg 및, DC, 단핵구 및 호중구를 비롯한 여러 선천 면역 세포 집단에 의해 구성적으로 발현된다. 흥미롭게도, 4-1BB는 활성화된 T 세포에서 발현되지만 휴지기 T 세포에서는 발현되지 않는다(Wang *et al.* (2009) *Immunol. Rev.* 229: 192-215). 4-1BB 결합은 인터페론 감마(IFN- γ) 및 인터루킨 2(IL-2)의 증식 및 생성을 유도할 뿐만 아니라 Bcl-xL과 같은 항세포자멸사 분자의 상호조절을 통해 T 세포 생존을 향상시킨다(Snell *et al.* (2011) *Immunol. Rev.* 244: 197-217). 중요하게는, 4-1BB 자극은 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)의 향상을 통해 NK 세포 증식, IFN- γ 생산 및 세포용해 활성을 향상시킨다(Kohrt *et al.* (2011) *Blood* 117: 2423-32).
- [0009] 면역의 4-1BB/4-1BBL 축은 현재 다양한 면역치료 전략에 의해 연구되고 있다. 예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 자가 전달은 거대 B 세포 림프종에서 임상적 이점을 나타내며, 이는 2017년 FDA의 승인을 받았다. 환자의 자가 T 세포는 종양-특이적 항체로부터 유래된 세포의 도메인, CD3 ζ 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB 공동자극 모티프를 결합하는 CAR로 형질도입된다. 4-1BB의 첨가는 CAR T 세포의 생체내 지속성 및 항종양 독성에 중요하다(Song *et al.* (2011) *Cancer Res.* 71: 4617e27). 4-1BB를 표적으로 하는 항체는 현재 조사되고 있다.
- [0010] 여러 연구에서 4-1BB/4-1BBL 경로를 표적으로 하는 작용 항체가 단독요법으로 사용될 때 항종양 활성을 나타내는 것으로 나타났다(Palazon *et al.* (2012) *Cancer Discovery* 2: 608-23). 4-1BB를 표적으로 하는 작용제 항체(우렐루맵, BMS; 우톨리무맵, Pfizer)는 현재 임상 개발 중이다. 최근 몇 년 동안 4-1BBL을 다른 요법과 결합한 연구가 다양한 성공을 보여주었다. 예를 들어, B16 흑색종 종양이 아닌 기존의 MC38(뮤린 선암종) 종양이 있는 마우스에 CTLA-4 및 항-4-1BB에 대한 항체를 투여했을 때, 이 종양에 대한 장기간-지속적인 면역과 함께 유의미한 CD8+ T 세포-의존적 종양 퇴행이 관찰되었다. 또 다른 예에서, 항-4-1BB(Bristol-Myers Squibb(BMS)-469492)를 사용한 치료는 M109 종양의 완전한 퇴행을 초래했지만 EMT6 종양의 성장을 상당히 지연시켰다.
- [0011] 종양 미세환경은 면역 세포 침윤에서 암세포, 세포외 기질, 내피 세포 및 종양 진행에 영향을 미치는 기타 세포 플레이어에 이르기까지 매우 다양한 세포 유형으로 구성된다. 이 복잡하고 얽힌 평형은 환자마다 변화할 뿐만 아니라 동일한 대상체의 병변 내에서도 변화한다(Jiménez-Sánchez *et al.* (2017) *Cell* 170(5): 927-938). 종양 침윤 림프구(TIL) 및 프로그램된 사멸 리간드 1(PD-L1) 발현을 기반으로 한 종양 계층화는 암에 대한 객관적인 반응을 달성하기 위한 염증 환경의 중요성을 강조한다(Teng *et al.* (2015) *Cancer Res.* 75(11): 2139-45). 암 게놈 아틀라스(TCGA)의 유전자 발현 프로파일에 대한 범-암(pan-cancer) 분석은 종양 염증 시그니처가 면역요법에 대한 객관적인 반응과 상관관계가 있음을 뒷받침한다(Danaher *et al.* (2018) *J. Immunother. Cancer* 6(1): 63).
- [0012] 최근에는 백신 투여의 암 치료 경로를 개선하려는 시도가 피하 주사에서 정맥내 투여 경로로 확대되고 있다. 예를 들어, 이중 항원을 암호화하는 MVA 백신의 정맥내 투여가 항원에 대한 강력한-특이적 면역 반응을 유도할 수 있음이 입증되었다(WO 2014/037124 참조). 또한, MVA 백신이 CD40L을 포함할 때 향상된 면역 반응이 생성되었다.
- [0013] 박테리아-유래 물질(Coley'의 독소)을 종양 병변에 접종하여 치료 반응을 달성하는 것은 오랫동안 보고되어 왔으며, 이는 항종양 반응을 촉진하는 데 있어 국소 감염의 역할을 강조하고 있다(Coley (1906) *Proc. R. Soc.*

Med. 3 (Surg Sect): 1-48). 병원체 관련 분자 패턴(Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP), 박테리아 제품 및 바이러스를 종양 병변에 국소 투여하면, 투여 후 i) I, II 및 III형 인터페론 및 종양 괴사 인자 알파(TNF-알파); ii) 알라민 및 열충격 단백질과 같은 위험 신호; 및 iii) 종양 항원의 방출을 포함하는 일련의 이벤트가 발생하는 항미생물 프로그램이 유도된다(Aznar *et al.* (2017) *J. Immunol.* 198: 31-39). 치료되지 않은 종양 병변에서 퇴행이 평가되었기 때문에 종양에 면역요법을 국소 투여하면 전신 면역 반응을 유도한다((2018) *Cancer Discov.* 8(6): 67).

[0014] MVA 백신의 종양내 투여는 지난 몇 년 동안 보고되었다. GM-CSF를 발현하는 MVA의 종양내 주사 및 DNA 백신으로의 면역화는 HPV16 E7 종양을 보유하는 마우스의 생존을 연장시키는 것으로 밝혀졌다(Nemeckova *et al.* (2007) *Neoplasia* 54: 4). MVA의 종양내 주사에 대한 다른 연구에서는 췌장 종양 성장의 억제를 입증할 수 없었다(White *et al.* (2018) *PLoS One* 13(2): e0193131). 열-비활성화 MVA의 종양내 주사는 위험 신호 생성, I형 인터페론 및 수지상 세포에 의한 항원 교차-제시에 의존하는 항종양 면역 반응을 유도한다(Dai *et al.* (2017) *Sci. Immunol.* 2(11): eaal1713).

[0015] 많은 암 백신의 활성화는 종양에 대한 적응 면역 반응의 유도를 포함한다. 종양-특이적 T 세포의 효과적인 활성화는 다음을 포함한다: 첫째, 내성 유도를 최소화하고 유능한 T 세포 레퍼토리를 선호하기 위해 건강한 조직이 아닌 종양에서의 항원의 독점적이고 높은 발현. 둘째, 종양 항원의 효과적인 처리 및 세포내 HLA 분자 상에서의 로딩. 그리고 마지막으로, 세포 표면에서의 면역원성 HLA/펩타이드 복합체의 제시와 종양-특이적 T 세포에 의한 인식.

[0016] 활성화 면역요법 및 암 백신을 포함하는 추가 암 치료에 대한 상당한 충족되지 않은 의학적 요구가 분명히 존재한다. 또한, 환자의 면역 반응의 여러 영역에서 향상된 면역 반응을 유도할 수 있는 치료법이 필요하다. 많은 양태에서, 본 개시내용의 실시형태는 현재 이용가능한 암 치료를 증가 및 개선하는 백신, 요법 및 조합 요법을 제 공함으로써 이러한 요구를 다룬다.

발명의 내용

[0017] 종양-관련 항원(TAA) 및 4-1BB 리간드(본원에서 41BBL, 4-1BBL 또는 CD137L로도 지칭됨)를 암호화하는 재조합 MVA가 종양내 또는 정맥내로 투여될 때, 암 환자의 치료 효과를 증가시키고/시키거나 치료를 향상시키는 것이 본 발명의 다양한 실시형태에서 결정되었다. 보다 구체적으로, 본 개시내용의 다양한 실시형태가 재조합 MVA 자체의 투여와 비교하여, 종양에서 증가된 염증, 종양에서 조절 T 세포(Treg) 및 T 세포 고갈의 감소, 종양-특이적 T 세포의 확장 및 NK 세포의 활성화, 종양 부피의 감소 증가 및/또는 암 대상체의 생존 증가를 초래하는 것으로 결정되었다.

[0018] 종양-관련 항원(TAA) 및 CD40 리간드(CD40L)를 암호화하는 재조합 MVA가 종양내 또는 정맥내 투여될 때 암 환자의 치료를 향상시키는 것으로 본 발명의 다양한 실시형태에서 결정되었다. 보다 구체적으로, 재조합 MVA 자체의 투여와 비교하여 종양에서 증가된 염증, 종양에서 조절 T 세포(Treg) 및 T 세포 고갈의 감소, 종양-특이적 T 세포의 확장 및 NK 세포의 활성화, 종양 부피의 감소 증가 및/또는 암 대상체의 생존 증가를 초래하는 것으로 본 발명의 다양한 실시형태에서 결정되었다.

[0019] 추가 실시형태에서, 본 발명은 정맥내 및/또는 종양내 투여될 때 암 환자의 치료를 향상시키는, 4-1BBL(CD137L)을 암호화하는 핵산 및 CD40L을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 양카라(MVA) 바이러스를 포함한다.

[0020] 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은 양성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 양카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해 양성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.

[0021] 추가 실시형태에서, 본 발명은 양성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 양카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 TAA 및 CD40L 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해 양성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 대상체의 전

체 생존을 증가시킨다.

- [0022] 추가 실시형태에서, 본 발명은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, CD40L을 암호화하는 제2 핵산, 및 4-1BBL(CD137L)을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 및/또는 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 TAA, CD40L 항원, 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스를 다른 주사 경로(즉, 비종양내 또는 비정맥내 주사)로 주사한 것에 비해 암성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.
- [0023] 추가 실시형태에서, 본 발명은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T-세포 반응을 향상시킨다.
- [0024] 추가 실시형태에서, 본 발명은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 투여는 TAA 및 CD40L 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 향상시킨다.
- [0025] 추가 실시형태에서, 본 발명은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, CD40L을 암호화하는 제2 핵산, 및 4-1BBL을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 및/또는 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 및/또는 종양내 투여는 TAA를 암호화하는 제1 핵산, CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 또는 비-종양내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 향상시킨다.
- [0026] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이중 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 이중 종양-관련 항원 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 의해 생성된 염증 반응에 비해 종양에서 향상된 염증 반응을 생성시킨다.
- [0027] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이중 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 이중 종양-관련 항원 및 CD40L 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 의해 생성된 염증 반응에 비해 종양에서 향상된 염증 반응을 생성시킨다.
- [0028] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이중 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 및/또는 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 및/또는 정맥내 투여는 이중 종양-관련 항원을 암호화하는 제1 핵산, CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 또는 비-정맥내 주사에 의해 생성된 염증 반응에 비해 종양에서 향상된 염증 반응을 생성시킨다.
- [0029] 다양한 추가 실시형태에서, 본 발명은 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 제공하며, 상기 재조합 MVA는 a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 b) 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함한다.
- [0030] 다양한 추가 실시형태에서, 본 발명은 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)

를 포함하며, 상기 재조합 MVA는 a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 b) CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함한다.

[0031] 다양한 추가 실시형태에서, 본 발명은 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 재조합 변형된 백신이나 앙카라(MVA)를 포함하며, 상기 재조합 MVA는 a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산; b) CD40L을 암호화하는 제2 핵산; 및 c) 4-1BBL을 암호화하는 제3 핵산을 포함한다.

[0032] 또 다른 실시형태에서, 4-1BBL 항원을 암호화하는 재조합 MVA는 관문 억제제 길항제의 투여와 조합하여 환자에게 종양내 투여되는 경우, 암 환자의 치료를 향상시키고, 더욱 특히 종양 부피의 감소를 증가시키고/시키거나, 암 환자의 생존을 증가시킨다.

[0033] 또 다른 실시형태에서, CD40L 항원을 암호화하는 재조합 MVA는 관문 억제제 길항제의 투여와 조합하여 환자에게 종양내 투여되는 경우, 암 환자의 치료를 향상시키고, 더욱 특히 종양 부피의 감소를 증가시키고/시키거나, 암 환자의 생존을 증가시킨다.

[0034] 또 다른 실시형태에서, CD40L 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 재조합 MVA는 관문 억제제 길항제의 투여와 조합하여 환자에게 종양내 및/또는 정맥내 투여되는 경우, 암 환자의 치료를 향상시키고, 더욱 특히 종양 부피의 감소를 증가시키고/시키거나, 암 환자의 생존을 증가시킨다.

[0035] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 재조합 MVA는 항체의 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여된다. 보다 바람직한 실시형태에서, 재조합 MVA는 항체 후에 투여된다.

[0036] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 재조합 MVA는 동일한 투여 경로(들)에 의해, 그리고 항체의 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 재조합 MVA는 상이한 투여 경로 또는 항체 투여 후에 투여된다.

[0037] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 암 환자에서의 항체 요법을 향상시키는 방법으로서, 본 발명의 약제학적 조합물을 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법을 포함하고, 여기서 약제학적 조합물을 투여하면 항체 요법 단독 투여와 비교하여, 항체 요법에 의해 유도된 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 향상시킨다.

[0038] 바람직한 실시형태에서, 제1 핵산은 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질인 TAA를 암호화한다. 보다 바람직한 실시형태에서, ERV 단백질은 인간 내인성 레트로바이러스 단백질 K(HERV-K) 패밀리로부터의 것이다. 보다 바람직한 실시형태에서, ERV 단백질은 HERV-K 외피 및 HERV-K gag 단백질로부터 선택된다.

[0039] 바람직한 실시형태에서, 제1 핵산은 내인성 레트로바이러스(ERV) 펩타이드인 TAA를 암호화한다. 보다 바람직한 실시형태에서, ERV 펩타이드는 인간 내인성 레트로바이러스 단백질 K(HERV-K) 패밀리로부터의 것이다. 보다 바람직한 실시형태에서, ERV 펩타이드는 HERV-K 외피 단백질(HERV-K-MEL)의 유사유전자로부터 선택된다.

[0040] 다른 바람직한 실시형태에서, 제1 핵산은 암배아 항원(CEA), 뮤신 1 세포 표면 결합(MUC-1), 전립선 산 포스포타제(PAP), 전립선-특이적 항원(PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 서바이빈, 티로신 관련 단백질 1(TRP1), 티로신 관련 단백질 2(TRP2), 브라큐리, 흑색종에서 우선적으로 발현된 항원(PRAME), 엽산 수용체 1(FOLR1) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 TAA를 암호화한다.

[0041] 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, 재조합 MVA는 MVA-BN 또는 그의 유도체이다.

[0042] 다양한 추가 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제와 조합하여 암 대상체에게 투여된다. 추가 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 암을 갖는 대상체를 치료하기 위해 TAA에 특이적인 항체와 조합하여 암 대상체에게 투여된다. 보다 바람직한 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS로부터 선택되는 면역 관문 분자의 길항제 또는 작용제와 조합하여 투여된다. 가장 바람직한 실시형태에서, 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제는 항체를 포함한다. 가장 바람직한 실시형태에서, 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제는 PD-1 또는 PD-L1 항체를 포함한다.

[0043] 본 발명의 추가적인 목적 및 이점은 다음의 설명에서 부분적으로 설명될 것이며, 부분적으로는 설명으로부터 명백하거나 본 발명의 실시예에 의해 학습될 수 있다. 본 발명의 목적 및 이점은 첨부된 청구범위에서 특히 지적된 요소 및 조합에 의해 실현되고 달성될 것이다.

[0044] 본 명세서에 통합되고 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 하나 이상의 실시형태를 설명과 함께 예시하고, 본 발명의 원리를 설명하는 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

[0045]

도 1a, 1b, 1c 및 1d는 MVA-OVA-4-1BBL 감염된 종양 세포에 의한 CD8 T 세포의 4-1BBL-매개 공동자극이 DC의 필요 없이 사이토카인 생산에 영향을 미친다는 것을 예시한다. 대조적으로 MVA-OVA-CD40L은 DC가 있을 때만 사이토카인 생성을 향상시킨다. 실시예 2에 기재된 바와 같이, 재조합 Flt3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 14일 동안 배양한 후 수지상 세포(DC)가 생성되었다. B16.F10 세포가 MVA-OVA, MVA-OVA-CD40L, 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 감염되고, 감염된 종양 세포가 DC의 존재 하에 표시될 때 수확되고 공동배양되었다. 나이브 OVA(257-264) 특이적 CD8+ T 세포가 OT-I 마우스에서 자기적으로 정제되고 공동배양에 첨가되었다. 세포가 배양되고, Luminex에 의한 사이토카인 농도 분석을 위해 상청액이 수집되었다. IL-6(도 1a), GM-CSF(도 1b), IL-2(도 1c) 및 IFN- γ (도 1d)의 상청액 농도가 표시된다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 2a 및 도 2b는 MVA-OVA-4-1BBL 감염된 종양 세포가 직접적으로, 즉 DC의 필요 없이 항원-특이적 CD8 T 세포의 활성화된 이펙터 T 세포로의 분화를 유도하는 반면, MVA-OVA-CD40L 감염된 종양 세포의 CD40L-매개 공동자극은 DC의 존재 여부에 따라 다르다. 실시예 3에 기재된 바와 같이, 재조합 Flt3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 14일 동안 배양한 후 수지상 세포(DC)가 생성되었다. B16.F10(흑색종 모델) 세포가 MVA-OVA, MVA-OVA-CD40L, 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 감염되었다. 다음날, 감염된 종양 세포가 DC의 존재 하에 (표시될 때) 수확되고 공동배양되었다. 나이브 OVA(257-264)-특이적 CD8+ T 세포가 OT-I 마우스에서 자기적으로 정제되고 공동배양에 1:5의 비율로 첨가되었다. 세포가 37°C 5% CO₂에서 48시간 동안 배양되었다. 그런 다음, 세포가 염색되고, 유세포분석에 의해 분석되었다. 도 2a는 OT-I CD8+ T 세포 상에서의 T-bet의 GMFI를 보여주며(도면에서 "CD8+"로 표시됨); 도 2b는 OT-I CD8+ T 세포의 CD44+그랜자임 B+ IFN γ + TNF α +의 백분율을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 3a, 3b, 3c, 3d 및 3e는 CD40L 또는 4-1BBL을 암호화하는 MVA로의 감염이 종양 세포주 및 대식세포에서 종양 세포 사멸을 유도한다는 것을 예시한다. 실시예 4에 기재된 바와 같이, 종양 세포주 B16.OVA(도 3a 및 3b), MC38(도 3c) 및 B16.F10(도 3d)이 20시간 동안 표시된 MOI에서 백터로 감염되었다. 세포는 유세포 분석에 의해 그들의 생존력에 대해 분석되었으며; 도 3a, 3c, 3d 및 3e는 사멸 세포의 백분율을 보여준다("생세포/사멸세포+"). 도 3b: 도 3a로부터의 상청액에서의 HMGB1이 ELISA로 정량화되었다. 도 3e: 골수-유래 대식세포(BMDM)는 표시된 MOI에서 20시간 동안 감염되었다. 세포는 유세포 분석에 의해 그들의 생존력에 대해 분석되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 4a 및 4b는 rMVA-4-1BBL이 생체내에서 NK 세포 활성화를 유도함을 보여준다. 실시예 5에 기재된 바와 같이, C57BL/6 마우스(n=5/그룹)는 식염수 또는 5×10^7 TCID₅₀ "rMVA"(=MVA-OVA), "rMVA-4-1BBL"(=MVA-OVA-4-1BBL) 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체와 조합된 5×10^7 TCID₅₀ rMVA(클론 TKS-1)으로 정맥내로 면역화되었다. 24시간 후, 마우스를 희생시키고 유세포 분석을 위해 비장을 처리하였다. CD69(A) 및 CD70(B)의 기하학적 평균 형광 강도(GMFI)가 표시된다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 5a 및 5b는 정맥내 rMVA-4-1BBL 면역화가 생체내에서 혈청 IFN- γ 분비를 촉진함을 보여준다. 실시예 6에 기재된 바와 같이, C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 식염수 또는 5×10^7 TCID₅₀ "rMVA"(=MVA-OVA), "rMVA-4-1BBL"(=MVA-OVA-4-1BBL), 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체와 조합된 5×10^7 TCID₅₀ rMVA(클론 TKS-1)로 정맥내로 면역화되었다. 도 5a: 6시간 후, 마우스에서 채혈하고, 혈청을 전혈에서 분리하고 혈청 내 IFN- γ 농도를 Luminex로 측정하였다. 도 5b: 3, 21 및 45시간 후, 단백질 분비를 중지하기 위해 마우스에 브레펠딘(Brefeldin) A를 정맥내 주사했다. 면역화 후 6, 24 및 48시간 후에 마우스를 희생시키고, 유세포 분석으로 비장세포를 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 6은 정맥내 "rMVA-4-1BBL"(=MVA-OVA-4-1BBL) 면역화가 B16.OVA 종양-보유 마우스에서 혈청 IFN- γ 분비를 촉진한다는 것을 보여준다. 실시예 7에 기재된 바와 같이, B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일차에 i.v.(정맥내) PBS 또는 5×10^7 TCID₅₀ rMVA(=MVA-OVA) 또는 rMVA-4-1BBL을 투여받았다. 6시간 후, 마우스를 채혈하고 혈청을 전혈에서 분리하고 혈청 내 IFN- γ 농도를 Luminex로 측정하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 7a, 7b, 7c 및 7d는 정맥내 "rMVA-4-1BBL"(=MVA-OVA-4-1BBL) 프라임 및 부스트 면역화 후 항원 및 벡터-특이적 CD8+ T 세포 확장을 보여준다. 실시예 8에 기재된 바와 같이, C57BL/6 마우스(n=4/그룹)는 0일차에 식염수

또는 5×10^7 TCID50 "rMVA"(=MVA-OVA), rMVA-4-1BBL 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체와 조합된 5×10^7 TCID50 rMVA(클론 TKS-1)으로 정맥내 프라임 면역화를 받고, 41일차에 부스트 면역화를 받았다. 프라임 면역화 후 6, 21, 35, 48 및 64일차에 마우스를 채혈하고, 말초 혈액의 유세포 분석을 수행하였다. 도 7a는 말초 혈액 백혈구(PBL) 중 항원(OVA)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타내며; 도 7b는 PBL 중 벡터(B8R)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 프라임 면역화 후 70일차에 마우스를 희생시켰다. 비장을 수확하고 유세포 분석을 수행하였다. 도 7c는 살아있는 세포 중 항원(OVA)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타내고; 도 7d는 살아있는 세포 중 벡터(B8R)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 8은 4-1BBL이 없는 제조합 MVA와 비교하여 4-1BBL을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 주사의 증가된 항종양 효과를 나타낸다. 실시예 9에 기재된 바와 같이, B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일차 (검은색 점선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA(도면에 "rMVA"로 표시됨) 또는 MVA-OVA-4-1BBL(도면에 "rMVA-4-1BBL"로 표시됨)의 정맥내 투여를 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다.

도 9a, 9b, 9c 및 9d는 4-1BBL 또는 CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 종양내 주사의 향상된 항종양 효과를 나타낸다. 실시예 10에 기재된 바와 같이, B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=4-5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일차 (검은색 점선), 12일차 및 15일차(회색 파선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-OVA(도면에 "rMVA"로 표시됨), MVA-OVA-CD40L(도면에 "rMVA-CD40L"로 표시됨), 또는 MVA-OVA-4-1BBL(도면에 "rMVA-4-1BBL"로 표시됨)의 정맥내 투여를 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다.

도 10a, 10b 및 10c는 확립된 결장암에 대한 CD40L로 암호화된 MVA 바이러스의 종양내 주사의 항종양 효과를 나타낸다. 실시예 11에 기재된 바와 같이, MC38-종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 14일차(검은색 점선), 19일차 및 22일차(검은색 파선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-TAA(도면에 "rMVA"로 표시됨) 또는 MVA-TAA-CD40L(도면에 "rMVA-CD40L"로 표시됨)의 종양내(i.t.) 투여를 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 이 실험에서, 제조합 MVA에 의해 암호화된 TAA는 항원 AH1A5, p15E 및 TRP2를 포함했다.

도 11은 관문 차단 및 종양-표적화 항체가 rMVA-4-1BBL(본원에서 "MVA-OVA-4-1BBL"로도 지칭됨)의 종양내(i.t.) 투여와 상승작용을 나타낸다는 것을 예시한다. 실시예 12에 기재된 바와 같이, B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 지시된 경우(체크표시) 200 μ g의 IgG2a, 항 TRP-1 또는 항 PD-1 항체를 복강내 투여받았다. 마우스를 종양 접종 후 13일(검은색 점선), 18일차 및 21일차(회색 파선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다.

도 12는 종양내 MVA-OVA-4-1BBL 주사가 항-CD137 항체 치료와 비교할 때 우수한 항종양 효과를 유도한다는 것을 입증한다. 실시예 13에 기재된 바와 같이, C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 s.c.(피하) 받았다. 7일 후, 종양이 5x5 mm 이상으로 측정되었을 때, 마우스를 그룹화하고 PBS, 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL 또는 10 μ g 항-4-1BB(3H3) 항체를 종양내 주사했다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 도 12a에서, 종양 평균 부피가 표시된다. 도 12b: 프라임 후 12일째에, 말초 혈액 림프구를 OVA-텍스트라머로 염색하고 FACS로 분석하였다. CD8+ T 세포 중 OVA 텍스트라머+ CD44+ T 세포의 백분율이 표시된다.

도 13은 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 주사의 항종양 효과를 나타낸다. 실시예 14에 기재된 바와 같이, Balb/c 마우스는 5×10^5 CT26.wt 세포를 s.c.(피하) 받았다. 종양이 5x5 mm 이상으로 측정된 경우, CT26.wt 종양-보유 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 12일차에 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA, rMVA-Gp70 또는 rMVA-Gp70-CD40L을 i.v.(정맥내) 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 종양 평균 직경(도 13a) 및 종양 평균 부피(도 13b)가 표시된다. 도 13c: 면역화후 7일차에, 혈액 세포를 재자극하고, 자극 시 혈액 내 CD8+ CD44+ IFN- γ + 세포의 백분율을 나타낸다.

도 14는 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70 + CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 주사의 항종양 효과를 나타낸다. 실시예 15에 기재된 바와 같이, C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.F10 세포를 s.c.(피하) 받았다. 7일 후 종양이 5x5 mm 이상으로 측정되었을 때, B16.F10 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA, rMVA-Gp70 또는 rMVA-Gp70-CD40L을 i.v.(정맥내) 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 종양 평균 직경(도 14a) 및 면역화후 7일차에, p15e로 자극시 혈액 내 CD8+ CD44+ IFN- γ + 세포의

백분율(도 14b)을 나타낸다.

도 15: IT 면역화에 대한 사이토카인/케모카인 MVA-BN 백본 반응은 4-1BBL 아류반트화에 의해 증가될 수 있다. 본원에서 "아류반트화"는 재조합 MVA의 특정 암호화된 단백질 또는 성분이 재조합 MVA의 다른 암호화된 단백질(들) 또는 성분(들)에 의해 생성된 면역 반응을 증가시키는 것으로 의도된다. 본원에서, 5×10^5 B16.OVA 세포를 C57BL/6 마우스에 피하(s.c.) 이식하였다(실시에 23 참조). 마우스를 10일차에 PBS 또는 2×10^8 TCID50 MVA-BN, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다(n=6 마우스/그룹). 6시간 후, 종양을 추출하고 종양 용해물을 처리했다. 사이토카인/케모카인 프로파일은 Luminex에 의해 분석되었다. 도 15는 면역화된 마우스에서 상향조절되는 사이토카인/케모카인을 보여준다.

도 16: 종양내(i.t.) 면역화에 대한 사이토카인/케모카인 전염증 반응은 MVA-OVA-4-1BBL에 의해 증가된다. 5×10^5 B16.OVA 세포를 C57BL/6 마우스에 피하(s.c.) 이식하였다(실시에 23 및 24 참조). 마우스를 10일차에 PBS 또는 2×10^8 TCID50의 MVA-BN, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다(n=6 마우스/그룹). 6시간 후, 종양을 추출하고 종양 용해물을 처리했다. 사이토카인/케모카인 프로파일은 Luminex에 의해 분석되었다. 도 16은 MVA-BN과 비교하여 MVA-OVA-4-1BBL 면역화된 마우스에서 상향조절되는 사이토카인/케모카인을 보여준다.

도 17: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사 후 종양 미세환경(TME) 및 종양-배액 림프절(TdLN)의 정량적 및 정성적 T 세포 분석. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 9일 내지 13일 후, 종양이 5×5 mm 이상으로 측정되었을 때, 마우스를 그룹화하고, PBS, 2×10^8 TCID50 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 25 참조). 면역화 후 1일, 3일 및 7일 후, 마우스를 희생시키고, 종양 및 종양 배액 림프절(TdLN)을 콜라게나제/DNase로 분해하고, 유세포 분석으로 분석하였다. 종양 mg당 및 TdLN당 CD45+ 세포, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포 및 OVA-특이적 CD8+ T 세포의 수가 표시된다.

도 18: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사 후 TME 및 배액 LN의 정량적 및 정성적 T 세포 분석. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 9 내지 13일 후 종양이 5.5×5.5 mm 이상으로 측정되었을 때, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 2×10^8 TCID50 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 26 참조). 면역화 후 1일, 3일 및 7일차에 마우스를 희생시키고, 종양 및 TdLN(종양 배액 림프절)을 콜라게나제/DNase로 분해하고 유세포 분석에 의해 분석하였다. 도 18a: 종양(좌측 패널) 및 TdLN(우측 패널)에서 OVA-특이적 CD8+ T 세포 중 Ki67+ 세포의 백분율이 표시된다. 도 18b: i.t. 면역화 후 7일째, 종양에서 OVA-특이적 CD8+ T 세포 중 PD1의 GMFI가 표시된다. 도 18c: i.t. 면역화 후 7일째, 종양에서 OVA-특이적 Teff/Treg 비율이 표시된다.

도 19: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사 후 TME 및 종양 배액 림프절(TdLN)의 정량적 및 정성적 NK 세포 분석. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 9 내지 13일 후 종양이 5.5×5.5 mm 이상으로 측정되었을 때, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 2×10^8 TCID50 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 27 참조). 면역화 후 1일, 3일 및 7일째, 마우스를 희생시키고, 종양 및 종양 배액 림프절(TdLN)을 콜라게나제/DNase로 분해하고 유세포 분석에 의해 분석하였다. 종양 및 TdLN 및 당 NK 세포의 수 및 종양 및 TdLN에서 NK 세포의 CD69, 그랜자임 B 및 Ki67 표면 마커의 GMFI가 표시된다.

도 20: MVA-OVA-4-1BBL 매개된 항종양 효과의 CD8 T 세포-의존성. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 7일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 28 참조). 이러한 첫 번째 주사 후 5일차 및 8일차에, 이러한 종양내(i.t.) 주사를 반복했다(수직 파선). 추가로, IgG2b 이소형 대조군 항체(왼쪽 및 중간 패널) 또는 항-CD8 항체(2.43; 오른쪽 패널)는 첫 번째 면역화 전 -1일차에, 그리고 면역화 후 1, 4, 7, 11일차에 복강내(i.p.) 주사하였다(100 µg/마우스). 종양 성장을 일정한 간격으로 측정하고, 종양 평균 직경을 표시한다.

도 21: MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL 매개된 항종양 효과의 Batf3+ DC 의존성. C57BL/6 마우스 또는 Batf3^{-/-} 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.) 받았다. 7일 후(수직 점선), 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 2×10^8 TCID50의 MVA, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 29 참조). 첫 번째 종양내 주사 후 5

일차 및 8일차에 i.t. 주사를 반복했다(수직 파선). 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 도 21a: 종양 평균 직경이 표시된다. 도 21b: 첫 번째 면역화후 11일차에, 혈액을 채취하여 항원-특이적 T 세포(즉, OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-특이적 T 세포)의 존재에 대해 분석하였다. CD8⁺ T 세포 내 OVA-특이적 T 세포의 백분율이 표시된다.

도 22: B16.OVA 흑색종 보유 마우스에서 MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여를 위한 NK 세포의 역할. C57BL/6 또는 IL15R α ^{-/-} 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 7일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 2×10^8 TCID50의 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내 주사하였다(실시에 30 참조). 치료는 첫 번째 주사 후 5일차 및 8일차에 반복되었다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 종양 평균 직경(도 22a) 및 생존율(%)이 표시된다(도 22b). 첫 번째 면역화후 11일째에 혈액을 채취하여 항원-특이적 T 세포의 존재에 대해 분석하였다(도 22c). CD8⁺ T 세포 내 OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-텍스트라머+(SIINFEKL+) CD44⁺ T 세포의 백분율이 표시된다.

도 23은 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 IT 면역화에 대한 반응에서 NK 세포-의존성 사이토카인/케모카인 프로파일을 보여준다. 5×10^5 B16.OVA 세포를 C57BL/6 및 IL15R α ^{-/-} 마우스에 피하(s.c.) 이식하였다(실시에 31 참조). 7일차에 마우스를 PBS 또는 2×10^8 TCID50 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다(n=2-3 마우스/그룹). 6시간 후, 종양을 추출하고, 종양 용해물을 처리하였다. 사이토카인/케모카인 프로파일은 Luminex에 의해 분석되었다. 도 23은 MVA-OVA-4-1BBL 종양내(i.t.) 면역화 후 IL15R α 의 부재 하에 감소된 사이토카인/케모카인을 보여준다.

도 24는 B16.F10 흑색종 보유 마우스에서 MVA-gp70-4-1BBL과 비교하여 MVA-gp70-CD40L을 사용한 종양내 면역화의 항종양 효능을 나타낸다. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.F10 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 7일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-4-1BBL 또는 MVA-CD40L을 종양내 주사하였다(실시에 32 참조). 치료는 첫 번째 주사 후 5일차 및 8일차에 반복되었다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 도 24a는 종양 평균 직경을 나타내고, 도 24b는 MVA-gp70-4-1BBL로 처리된 마우스에서 백반증의 출현을 나타낸다. 첫 번째 면역화후 11일차에, 혈액을 채취하여 항원-특이적 T 세포의 존재를 분석하였다. p15E 재자극 시 CD8⁺ T 세포 내에서 CD44⁺ T 세포를 생성하는 IFN γ 의 백분율이 도 24c에 표시된다.

도 25: B16.F10 흑색종 보유 마우스에서 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L의 종양내 투여의 항종양 효능. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.F10 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 7일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L, MVA-4-1BBL, MVA-CD40L 또는 MVA-4-1BBL-CD40L을 종양 내 주사하였다(실시에 33 참조). 치료는 첫 번째 주사 후 5일차 및 8일차에 반복되었다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 종양 평균 직경은 도 25a에 표시된다. 첫 번째 면역화후 11일째에, 혈액을 채취하여 p15E 펩타이드로 재자극하였다. CD8⁺ T 세포 내 IFN γ + CD44⁺ T 세포의 백분율은 도 25b에 표시된다.

도 26: CT26 종양-보유 마우스에서 CD40L 또는 4-1BBL로 아주반트 첨가된 MVA-gp70의 항종양 효능. Balb/c 마우스는 5×10^5 Ct26wt 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 13일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 5×10^7 TCID50: MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L, MVA-4-1BBL, MVA-CD40L 및 MVA-4-1BBL-CD40L를 종양 내 주사하였다(실시에 34 참조). 치료는 첫 번째 주사 후 5일차 및 8일차에 반복되었다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 도 26a는 종양 평균 직경을 나타내고 도 26b는 생존율을 나타낸다. 도 26c: 최초 면역화후 11일째에, 혈액을 채취하고 AH1 펩타이드로 재자극하고; CD8⁺ T 세포 내 IFN γ + CD44⁺ T 세포의 백분율이 표시된다.

도 27: 4-1BBL 및/또는 CD40L을 추가로 포함하는 MVA-gp70의 종양내 주사 후 종양 미세환경(TME) 및 종양 배액 림프절(TdLN)의 정량적 및 정성적 T 세포 분석. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.F10 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 9일 후 종양이 5×5 mm 이상으로 측정되면, 마우스를 그룹화하고, PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L 또는 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 종양내 주사하였다(실시에 35 참조). 면역화후 3일째에, 마우스를 희생시키고 종양 및 종양 배액 림프절(TdLN)을 수집하고, 콜라게나제/DNase로 분해하고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 도 27은 mg 종양 및 TdLN 당 CD8⁺ T 세포, p15E-특이적 CD8⁺ T 세포, 및 Ki67⁺ p15E-특이적 CD8⁺ T 세포의 수를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 28은 4-1BBL 및/또는 CD40L을 추가로 발현하는 MVA-gp70의 종양내 주사 후 종양 미세환경(TME) 및 종양 배액 림프절(TdLN)의 정량적 및 정성적 T 세포 분석을 나타낸다. C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.F10 세포를 피하(s.c.)로 받았다(실시예 36 참조). 9일 후 종양이 5.5×5.5 mm 이상으로 측정되었을 때 마우스를 그룹화하고, PBS 또는 5×10^7 TCID₅₀의 MVA-Gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L 및 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 종양내 주사하였다. 면역화 3일 후, 마우스를 희생시키고 종양 및 TdLN을 수집하고 콜라게나제/DNase로 분해하고, 생성된 개별 세포를 유세포 분석에 의해 분석하였다. mg 종양 및 TdLN당 NK 세포, Ki67⁺ NK 세포 및 그랜자임 B⁺ NK 세포의 수가 표시된다. 데이터는 평균±SEM으로 표시된다.

도 29: CT26.WT 종양-보유 마우스에서 4-1BBL 및/또는 CD40L이 아췌반트첨가된 MVA-gp70의 정맥내 투여의 항종양 효능. Balb/c 마우스는 5×10^5 CT26.WT 세포를 피하(s.c.)로 받았다. 12일 후, 마우스를 그룹화하고 PBS 또는 5×10^7 TCID₅₀의 MVA-Gp70, MVA-Gp70-4-1BBL, MVA-Gp70-CD40L, MVA-Gp70-4-1BBL-CD40L 및 MVA-4-1BBL-CD40L을 정맥내로 주사하였다(실시예 37 참조). 도 29a는 종양 평균 직경을 나타내고, 도 29b는 생존율을 나타낸다. 첫 번째 면역화 7일째에, 혈액을 채취하고, AH1 펩타이드로 재자극하였으며; 도 29c는 평균±SEM으로서 CD8⁺ T 세포 내의 IFN γ ⁺ CD44⁺ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 30은 MVA-기반 벡터 MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL("MVA-mBN494" 또는 "MVA-BN-4IT")(도 30a)을 예시하고, 감염된 세포의 HLA 내로 TAA 로딩(도 30b) 뿐만 아니라 기능적, 즉 h4-1-BB 수용체 결합 형태의 h4-1-BBL 발현(도 30c)의 벡터의 능력을 추가로 보여준다. 상세한 내용은 실시예 38 및 39를 참조한다.

도 31은 MVA-기반 벡터 "MVA-mBN502"(도 31c)를 예시하고, ERVK-env/MEL(도 31a; MVA-mBN494에서 사용됨) 및 ERVK-env/MEL_03(도 31b; MVA-mBN502에서 사용됨)의 모식도를 추가로 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 전술한 발명의 내용 및 하기의 상세한 설명은 모두 예시적이고 설명적일 뿐이며, 청구된 바와 같이 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0047] 본 출원에 기재되고 예시된, 본 발명의 제조합 MVA 및 방법은 암 환자의 면역 반응의 여러 양태를 향상시킨다. 다양한 양태에서, 본 발명은 종양-관련 항원(TAA) 및 4-1BBL 항원을 포함하는 제조합 MVA가 암 대상체에게 종양 내 또는 정맥내 투여될 때, 대상체에서 실현되는 증가된 항종양 효과가 있음을 입증한다. 본원에 더 자세히 설명된 바와 같이, 이 증가된 항종양 효과는 종양 부피의 더 높은 감소, 증가된 전체 생존율, TAA에 대한 향상된 CD8 T 세포 반응, 및 증가된 NK 세포 활성화, 사이토카인 생산의 증가 등과 같은 향상된 염증 반응을 포함한다.
- [0048] 본 출원에 기재되고 예시된, 본 발명의 제조합 MVA 및 방법은 암 환자의 면역 반응의 여러 양태를 향상시킨다. 다양한 양태에서, 본 발명은 종양-관련 항원(TAA) 및 CD40L 항원을 포함하는 제조합 MVA가 암 대상체에게 종양 내 또는 정맥내 투여될 때, 대상체에서 실현되는 증가된 항종양 효과가 있음을 입증한다. 본원에 더 자세히 설명된 바와 같이, 이 증가된 항종양 효과는 종양 부피의 더 높은 감소, 증가된 전체 생존율, TAA에 대한 향상된 CD8 T 세포 반응, 및 증가된 NK 세포 활성화, 사이토카인 생산의 증가 등과 같은 향상된 염증 반응을 포함한다.
- [0049] 추가 양태에서, 본 발명의 다양한 실시형태는 종양-관련 항원(TAA) 및 4-1BBL 항원을 포함하는 제조합 MVA가 적어도 하나의 면역 관문 분자 길항제/작용제와 조합하여 종양내로 투여될 때 증가된 종양 감소 및 암 대상체의 전체 생존율 증가가 있음을 입증한다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 본 발명의 다양한 실시형태는 종양-관련 항원(TAA) 및 4-1BBL 항원을 포함하는 제조합 MVA가 종양 특이적 항체와 조합하여 종양내 투여될 때 증가된 종양 감소 및 암 대상체의 전체 생존율 증가가 있음을 입증한다.
- [0051] 제조합 MVA 바이러스는 이전에 4-1BBL 항원을 암호화했지만, 4-1BBL을 암호화하는 MVA의 면역원성 이점은 불분명했다(예를 들어, Spencer *et al.* (2014) *PLoS One* 9(8): e105520 참조). Spencer에서, MVA 벡터 또는 아데노바이러스 벡터에서의 4-1BBL과 형질전환 항원의 동시 발현은 마우스 CD8 T 세포 반응의 증가를 초래하였지만; 4-1BBL을 암호화하는 아데노바이러스 벡터를 근육 내 투여한 후 비인간 영장류에서 IFN- γ 반응 증가가 관찰되지 않았다(Id. 2, 6페이지 참조). 또한, 암 치료의 일부로 4-1BBL을 암호화하는 MVA 활용 및 종양 및/또는 종양 세포 파괴의 면역원성 이점은 알려지지 않았다.

- [0052] 본 개시내용의 다양한 실시형태는 4-1BBL 및 TAA를 암호화하는 MVA(본원에서 MVA-TAA-4-1BBL로 지칭됨)가 인간과 같은 대상체에서 암을 치료하는데 효과적일 수 있음을 입증한다. 본원에 표시되고 기재된 MVA-TAA-4-1BBL의 투여는 암 대상체의 면역 반응의 여러 양태를 향상시킬 수 있고, 종양 세포를 효과적으로 감소시키고 사멸시킬 수 있다. 본 개시내용의 다양한 실시형태의 향상된 항종양 효과 중 하나 이상은 하기와 같이 요약된다.
- [0053] 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 정맥내 투여는 향상된 항종양 효과를 생성한다. 적어도 하나의 양태에서, 본 발명은 정맥내 투여되는 TAA 및 4-1BBL 항원(rMVA-TAA-4-1BBL)을 암호화하는 재조합 MVA를 포함하며, 여기서 정맥내 투여는 4-1BBL이 없는 재조합 MVA의 정맥내 투여, 또는 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 비-정맥 투여(예를 들어, 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 피하 투여와 같음)와 비교하여, 항-종양 효과를 향상시킨다. 이러한 향상된 항종양 효과에는 향상된 NK 세포 반응(도 4에 도시됨), IFN- γ 분비 증가(도 5 및 6에 도시됨)로 인한 염증 반응 향상, 항원 및 백터-특이적 CD8 T 세포 확장 증가(도 7에 도시됨) 및 종양 감소 증가(도 8에 도시됨) 등이 있다.
- [0054] 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 종양의 염증을 향상시킨다. 본 발명의 또 다른 양태에서, MVA-OVA-CD40L이 아닌, MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양 세포의 감염은 항원-특이적 CD8+ T 세포를 활성화하여 항원 교차-제시 DC가 없는 상태에서 GM-CSF, IL-2 및 IFN- γ 과 같은 T 세포-유래 사이토카인을 생성하는 것으로 결정되었다(도 1a-1d). 이것은 수지상 세포 및 골수 세포 서브세트의 성숙을 유도하는 활성화 시 나이브 T 세포에 의해 생성되는 성장 인자인 GM-CSF의 경우 예상치 못한 것이었다(Min *et al.* (2010) *J. Immunol.* 184: 4625-4629). 항원-교차-제시 DC의 존재 하에, rMVA-CD40L로 감염된 종양 세포에 의해 자극된 항원-특이적 CD8+ T 세포는 IFN- γ 를 생성했지만, rMVA-4-1BBL로 감염된 것에 의해 자극된 세포는 IL-2 또는 GM-CSF를 생성하지 않았다(도 1a-1d). 흥미롭게도, DC에 의해 생성되는 주요 사이토카인인 IL-6이 다량으로 검출되었다(도 1a).
- [0055] 하나의 유리한 양태에서, 종양의 염증이 증가하면 종양 부위에서 종양 세포를 죽이는 많은 수의 TIL(종양 침윤 림프구)을 가질 수 있다(예를 들어, Lanitis *et al.* (2017) *Annals Oncol.* 28 (suppl 12): xii18-xii32 참조). "뜨거운" 종양이라고도 하는 이러한 염증이 있는 종양은 TIL, 사이토카인 및 기타 염증 분자의 수가 증가한다는 점에서 종양 세포 파괴를 강화할 수 있다.
- [0056] 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 종양 부피를 감소시키고, 전체 생존율을 증가시킨다. 한 양태에서, 본 발명은 종양내 투여되는 4-1BBL 항원을 암호화하는 재조합 MVA(MVA-4-1BBL)를 포함하며, 여기서 종양내 투여는 4-1BBL이 없이 재조합 MVA를 종양내 투여하는 것과 비교하여, 암 대상체에서 항-종양 효과를 향상시킨다.
- [0057] 재조합 MVA 바이러스가 이전에 종양내 투여되었지만(예를 들어, White *et al.* (2018) *PLoS One* 13: e0193131, and Nemeckova *et al.* (2007) *Neoplasia* 54: 326-33 참조), 연구는 다양한 결과를 이끌어냈다. 예를 들어, Nemeckova에서 GM-CSF를 발현하는 백시니아 바이러스 MVA의 종양 내 주사 및 DNA 백신으로의 면역화는 HPV16 유도 종양을 보유하는 마우스의 생존을 연장시키는 것으로 밝혀졌다(Nemeckova 문헌의 요약서 참조). 대안적으로, White *et al.*은 MVA의 종양 내 주사 후 체장 종양 성장의 억제를 입증할 수 없었다(White 문헌의 요약서 참조).
- [0058] 본 개시내용의 일부로서, TAA 및 4-1BBL을 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 재조합 MVA가 대상체에게 종양내 투여되었다. 도 9에 도시된 바와 같이, MVA-TAA-4-1BBL의 종양내 주사는 재조합 MVA TAA와 비교하여 종양 부피의 유의한 감소를 입증하였다.
- [0059] 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제와 조합하여 투여되는 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 증가된 항종양 효과를 생성한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 면역 관문 길항제 또는 작용제와 조합된 MVA-TAA-4-1BBL의 투여를 포함한다. 바람직하게는 MVA-TAA-4-1BBL의 투여는 정맥내 또는 종양내이다. 면역 관문 길항제 또는 작용제와 조합된 본 발명의 MVA는 조합이 보다 효과적인 암 치료를 제공하기 때문에 유리하다. 예를 들어, 본 발명의 조합 및/또는 병용 요법은 암 환자의 면역 반응의 여러 양태를 향상시킨다. 적어도 하나의 양태에서, 조합은 선천성 및 후천성 면역 반응 모두를 상승적으로 향상시키고, 면역 관문 분자의 길항제 또는 작용제와 조합되는 경우, 종양 부피를 감소시키고 암 환자의 생존을 증가시킨다.
- [0060] 본 출원에 제시된 데이터는 MVA-TAA-4-1BBL이 면역 관문 길항제 또는 작용제와 조합될 때 증가된 항종양 효과를 생성함을 입증한다. 실제로, 도 11에 도시된 바와 같이, MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여가 PD-1 항체와 복강내 조합되었을 때, PD-1 단독에 비해 종양 부피의 감소가 있었다.
- [0061] 종양 관련 항원(TAA)에 특이적인 항체와 조합하여 투여된 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 증가된 항종양 효과를 생성한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 TAA에 특이적인 항체와 조합된 MVA-TAA-4-

1BBL의 투여를 포함한다. 바람직하게는 MVA-TAA-4-1BBL의 투여는 정맥내 또는 종양내이다. TAA 특이적 항체와 조합된 본 발명의 MVA는 유리하고, 함께 작용하여 보다 효과적인 암 치료를 제공할 수 있다.

[0062] 하나의 예시적인 양태에서, MVA-TAA-4-1BBL의 투여에 의해 유도된 향상된 NK 세포 반응은 대상체에서 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 향상시키기 위해 TAA 특이적 항체와 상승적으로 작용한다. 암 대상체에서 이러한 향상된 ADCC는 종양 세포 사멸 및 종양 파괴를 증가시킨다.

[0063] 본 출원에 제시된 데이터는 MVA-TAA-4-1BBL이 TAA 특이적 항체와 조합될 때 증가된 항종양 효과를 생성함을 입증한다. 실제로, 도 11에 도시된 바와 같이, MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여가 복강내 TRP-1 항체와 조합되는 경우, TRP-1 항체 단독에 비해 종양 부피의 감소가 있었다.

[0064] 본 발명에 따른 프라임 및 부스트 면역화의 일부로서 MVA-TAA-4-1BBL의 투여는 항원 및 벡터-특이적 CD8+ T 세포 확장을 증가시킨다. 다른 양태에서, 본 발명은 MVA-TAA-4-1BBL이 동종 및/또는 이종 프라임-부스트 요법의 일부로서 투여되는 방법을 제공한다. 바람직하게는 MVA-TAA-4-1BBL의 투여는 정맥내 또는 종양내이다. 도 7에 예시된 바와 같이, 항원 및 벡터-특이적 CD8+ T 세포 확장은 MVA-TAA-4-1BBL의 정맥내 투여에 의해 프라임 및 부스팅 동안 증가되었다.

[0065] **정의**

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어 "핵산"에 대한 참조는 핵산 중 하나 이상을 포함하며, "방법"에 대한 참조는 본원에 기재된 방법에 대해 변형되거나 대체될 수 있는 당업자에게 공지된 동등한 단계 및 방법에 대한 참조를 포함한다.

[0067] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소들 앞에 오는 용어 "적어도"는 시리즈의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시형태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0068] 본 명세서 및 뒤따르는 청구범위 전체에 걸쳐, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprise)" 및 "포함하는(comprises)"과 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 의미하지만 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹은 제외되지 않는 것으로 이해될 것이다. 본원에 사용될 경우 용어 "포함하는(comprising)"은 용어 "함유하는" 또는 "포함하는(including)"으로 대체될 수 있거나, 또는 때때로 본원에 사용되는 경우 용어 "갖는"으로 대체될 수 있다. 덜 바람직하지만, 본 발명의 양태 또는 실시형태의 맥락에서 본원에 사용될 때마다 상기 언급된 용어들(포함하는(comprising), 함유하는, 포함하는(including), 갖는) 중 임의의 것은 용어 "구성된"으로 대체될 수 있다. 본원에 사용될 경우, "구성된"은 청구범위 요소에 명시되지 않은 모든 요소, 단계 또는 성분을 제외한다. 본원에 사용되는 경우, "본질적으로 구성되는"은 청구범위의 기본적인 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, 다수의 인용된 요소들 사이의 접속 용어 "및/또는"은 개별 및 조합된 옵션 모두를 포괄하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 요소가 "및/또는"으로 결합된 경우, 첫 번째 옵션은 두 번째 요소 없이 첫 번째 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 두 번째 옵션은 첫 번째 요소 없이 두 번째 요소의 적용 가능성을 나타낸다. 세 번째 옵션은 첫 번째 요소와 두 번째 요소를 함께 적용할 수 있는지 여부를 나타낸다. 이들 옵션 중 임의의 하나는 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 따라서 본원에 사용되는 용어 "및/또는"의 요건을 충족한다. 하나 이상의 옵션의 동시 적용 가능성도 의미에 속하는 것으로 이해되므로, 용어 "및/또는"의 요건을 충족한다.

[0070] 본원에 기재된 "돌연변이된" 또는 "변형된" 단백질 또는 항원은 핵산 또는 아미노산에 대한 임의의 변형, 예컨대 결실, 부가, 삽입 및/또는 치환이 본원에 정의된 바와 같다.

[0071] 본원에 기재된 핵산 서열에 대한 "서열 상동성 또는 동일성 퍼센트(%)"는 서열을 정렬하고 필요한 경우 간격을 도입한 후, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하고 서열 동일성의 일부로 보존적 치환을 고려하지 않는, 참조 서열(즉, 그것이 유래된 핵산 서열)내 뉴클레오타이드와 동일한 후보 서열내 뉴클레오타이드의 백분율로 정의된다. 퍼센트 뉴클레오타이드 서열 동일성 또는 상동성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다.

- [0072] 예를 들어, 핵산 서열에 대한 적절한 정렬은 Smith and Waterman ((1981) *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489)의 국소 상동성 알고리즘에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA에 의해 개발된 스코어링 매트릭스를 사용하여 아미노산 서열에 적용되고, Gribskov((1986) *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763)에 의해 정규화될 수 있다. 서열의 퍼센트 동일성을 결정하기 위한 이 알고리즘의 예시적인 구현은 "BestFit" 유틸리티 애플리케이션에서 Genetics Computer Group(Madison, Wisconsin, USA)에 의해 제공된다. 이 방법에 대한 기본 매개변수는 Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995)(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA로부터 사용가능함)에 기재되어 있다. 본 발명의 맥락에서 퍼센트 동일성을 설정하는 바람직한 방법은 Collins and Sturrock에 의해 개발되고 IntelliGenetics, Inc.(Mountain View, California, USA)에 의해 배포된 에딘버러 대학교(University of Edinburgh)에 의해 저작권이 있는 프로그램의 MPSRCH 패키지를 사용하는 것이다. 이 패키지 모음에서, 기본 매개변수가 스코어링 표에 사용되는 경우 Smith-Waterman 알고리즘이 사용될 수 있다(예를 들어, 갭 개방 패널티 12, 갭 확장 패널티 1, 및 갭 6). 생성된 데이터에서, "일치" 값은 "서열 동일성"을 반영한다. 서열 간의 퍼센트 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램은 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 또 다른 정렬 프로그램은 기본 매개변수와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 기본 매개변수를 사용하여 사용될 수 있다: 유전 코드=표준; 필터=없음; 가닥=둘 다; 컷오프=60; 예상=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50 서열; 정렬 기준=높은 점수; 데이터베이스=비중복, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+ GenBank CDS 번역+스위스 단백질+Spupdate+PIR. 이 프로그램에 대한 자세한 내용은 다음 인터넷 주소에서 찾을 수 있다: blast.ncbi.nlm.nih.gov/.
- [0073] 용어 "프라임-부스트 백신접종" 또는 "프라임-부스트 요법"은 특정 항원을 표적으로 하는 백신의 첫 번째 프라이밍 주사 후 간격을 두고 동일한 백신의 1회 이상의 부스팅 주사를 사용하는 백신접종 전략 또는 요법을 의미한다. 프라임-부스트 백신접종은 동종 또는 이종일 수 있다. 상동 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사와 하나 이상의 부스팅 주사 모두에 대해 동일한 항원 및 벡터를 포함하는 백신을 사용한다. 이종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사 및 하나 이상의 부스팅 주사 둘 다에 대해 동일한 항원을 포함하지만 프라이밍 주사 및 하나 이상의 부스팅 주사에 대해 상이한 벡터를 포함하는 백신을 사용한다. 예를 들어, 상동 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사를 위한 하나 이상의 항원을 발현하는 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스 및 하나 이상의 부스팅 주사를 위한 하나 이상의 항원을 발현하는 동일한 재조합 폭스바이러스를 사용할 수 있다. 대조적으로, 이종 프라임-부스트 백신접종은 프라이밍 주사를 위한 하나 이상의 항원을 발현하는 핵산을 포함하는 재조합 폭스바이러스 및 하나 이상의 부스팅 주사를 위한 하나 이상의 항원을 발현하는 상이한 재조합 폭스바이러스를 사용할 수 있다.
- [0074] 용어 "재조합"은 자연에서 발생하지 않거나 자연에서 발견되지 않는 배열로 다른 폴리뉴클레오타이드에 연결된 반합성 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오타이드, 바이러스 또는 벡터를 의미한다. 본원에 사용된 "재조합 MVA" 또는 "rMVA"는 일반적으로 종양 관련 항원(TAA)을 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 의미한다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같이, 종양 부피의 감소 또는 종양 부피 감소는 종양 부피 및/또는 크기의 감소로 특징화될 수 있지만, 또한 당업계에서 이해되는 임상 시험 종점의 관점에서 특징화될 수 있다. 종양 부피 및/또는 크기의 감소와 관련된 일부 예시적인 임상 시험 종점에는 반응률(RR), 객관적 반응률(ORR) 등이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같이, 생존율의 증가는 암 환자의 생존 증가로 특징화될 수 있지만, 또한 당업계에서 이해되는 임상 시험 종점의 관점에서 특징화될 수 있다. 생존율의 증가와 관련된 일부 예시적인 임상 시험 종점에는 전체 생존율(OS), 무진행 생존(PFS) 등이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같이, "이식유전자" 또는 "이종 유전자"는 야생형 폭스바이러스 게놈(예를 들어, 백시니아, 계두(Fowlpox) 또는 MVA)에 존재하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열인 것으로 이해된다. 숙련된 사람은 백시니아 바이러스와 같은 폭스바이러스에 존재할 때 "이식유전자" 또는 "이종 유전자"가 재조합 폭스바이러스를 숙주 세포에 투여한 후 상응하는 이종 유전자 생성물, 즉 "이종 항원" 및/또는 "이종 단백질"로 발현되는 방식으로 폭스바이러스 게놈에 통합되어야 한다는 것을 이해한다. 발현은 일반적으로 이종 유전자를 폭스바이러스-감염 세포에서 발현을 허용하는 조절 요소에 작동가능하게 연결함으로써 달성된다. 바람직하게는, 조절 요소는 천연 또는 합성 폭스바이러스 프로모터를 포함한다.

- [0078] "벡터"는 이중 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 재조합 DNA 또는 RNA 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다. 이중 폴리뉴클레오타이드는 예방 또는 치료 목적으로 관심 서열을 포함할 수 있고, 선택적으로 발현 카세트의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 벡터는 궁극적인 표적 세포 또는 대상체에서 복제가능할 필요는 없다. 이 용어는 클로닝 벡터 및 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0079] **조합 및 방법**
- [0080] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA를 포함하며, 이는 종양내 투여시, TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비종양내 투여에 의해 유도된 염증 반응 및 T 세포 반응과 비교하여, 염증 반응 및 향상된 T 세포 반응을 모두 유도한다.
- [0081] 다양한 추가 실시형태에서, 본 발명은 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하며, 이는 종양내 투여시, TAA를 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 종양내 투여에 의해 유도된 T 세포 반응 및 종양내 염증 반응과 비교하여 향상된 종양내 염증 반응 및 향상된 T 세포 반응을 모두 유도한다.
- [0082] 종양에서 향상된 염증 반응. 본 개시내용의 다양한 양태에서, TAA 및 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 재조합 MVA 단독 투여와 비교하여 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 것으로 결정되었다. 적어도 하나의 양태에서, 본 개시내용에 따른 종양에서 "향상된 염증 반응"은 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다: 1) IFN- γ 의 발현 증가 및/또는 2) 종양 및/또는 종양 세포에서의 그랜자임 B(GraB)의 발현 증가. 따라서, 본 개시내용에 따른 종양 및/또는 종양 세포에서 염증 반응이 향상되는지 여부는 당업계에 공지된 케모카인 및 사이토카인의 분비를 포함하여 증가된 염증 반응을 나타내는 하나 이상의 분자의 발현 증가가 있는지 여부를 결정하기 위한 측정에 의해 결정될 수 있다. 예시적인 염증 반응 마커는 IFN- γ 및/또는 그랜자임 B(GraB) 중 하나 이상을 포함하는, NK 세포 빈도 및/또는 활성을 측정하는 데 유용한 마커 중 하나 이상을 포함한다. 이들 분자 및 이의 측정은 당업계에 이해되고 공지된 기술에 따라 수행될 수 있는 검증된 분석법이다. 예를 들어, Borrego *et al.* ((1999) *Immunology* 7(1): 159-165)를 참조한다.
- [0083] 향상된 NK 세포 반응. 본 개시내용의 다양한 추가 양태에서, TAA 및 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여 또는 정맥내 투여가 재조합 MVA 단독 투여와 비교하여, 종양 또는 종양 환경에서 향상된 NK 세포 반응을 유도하는 것으로 결정되었다. 한 양태에서, 본 개시내용에 따른 "향상된 NK 세포 반응"은 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다: 1) NK 세포 빈도의 증가, 2) NK 세포 활성화의 증가, 및/또는 3) NK 세포 증식의 증가. 따라서, 본 개시내용에 따라 NK 세포 반응이 향상되는지 여부는 증가된 NK 세포 빈도, 증가된 NK 세포 활성화, 및/또는 증가된 NK 세포 증식을 나타내는 하나 이상의 분자의 발현을 측정함으로써 결정될 수 있다. NK 세포 빈도 및/또는 활성을 측정하는 데 유용한 예시적인 마커는 NKp46, IFN- γ , CD69, CD70, NKG2D, FasL, 그랜자임 B, CD56, 및/또는 Bcl-XL 중 하나 이상을 포함한다. NK 세포 활성화를 측정하는 데 유용한 예시적인 마커는 IFN- γ , CD69, CD70, NKG2D, FasL, 그랜자임 B 및/또는 Bcl-XL 중 하나 이상을 포함한다. NK 세포 증식을 측정하는데 유용한 예시적인 마커는 Ki67을 포함한다. 이들 분자 및 이의 측정은 당업계에서 이해되고 공지된 기술에 따라 수행될 수 있는 검증된 분석법이다(예를 들어, Borrego *et al.* (1999) *Immunology* 7(1): 159-165 참조). 또한, 분자 측정을 위한 분석은 본 개시내용의 실시예 5 및 6에서 찾을 수 있다. 적어도 한 양태에서, 1) NK 세포 빈도의 증가는 전처리/기준선과 비교하여 CD3-NKp46+ 세포의 적어도 2배 증가로 정의될 수 있고; 2) NK 세포 활성화의 증가는 치료 전/기준선 발현과 비교하여 IFN- γ , CD69, CD70, NKG2D, FasL, 그랜자임 B 및/또는 Bcl-XL 발현의 적어도 2배 증가로 정의될 수 있으며/있거나; 3) NK 세포 증식의 증가는 치료전/기준선 발현과 비교하여 Ki67 발현의 적어도 1.5배 증가로 정의된다.
- [0084] 향상된 T 세포 반응. 본 출원에 따르면, "향상된 T 세포 반응"은 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다: 1) CD8 T 세포의 빈도 증가; 2) CD8 T 세포 활성화의 증가; 및/또는 3) CD8 T 세포 증식의 증가. 따라서, 본 출원에 따라 T 세포 반응이 향상되었는지 여부는 1) CD8 T 세포 빈도의 증가, 2) CD8 T 세포 활성화의 증가; 및/또는 3) CD8 T 세포 증식의 증가를 나타내는 하나 이상의 분자들의 발현을 측정함으로써 결정될 수 있다. CD8 T 세포 빈도, 활성화 및 증식을 측정하는데 유용한 예시적인 마커는 각각 CD3, CD8, IFN- γ , TNF- α , IL-2, CD69 및/또는 CD44, 및 Ki67을 포함한다. 항원 특이적 T 세포 빈도의 측정은 또한 본 출원에 의해 나타낸 바와 같이 펜타머 또는 텍스트라머와 같은 MHC 멀티머에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물을 평가하는 데 사용하기에 적합한, 이러한 측정 및 분석 뿐만 아니라 기타는 당업계에서 검증되고 이해된다.
- [0085] 한 양태에서, CD8 T 세포 빈도의 증가는 전처리/기준선과 비교하여 IFN- γ 및/또는 텍스트라머+ CD8 T 세포의

적어도 2배 증가를 특징으로 한다. CD8 T 세포 활성화의 증가는 전처리/기준선 발현과 비교하여 CD69 및/또는 CD44 발현의 적어도 2배 증가를 특징으로 한다. CD8 T 세포 증식의 증가는 전처리/기준선 발현과 비교하여 Ki67 발현의 적어도 2배 증가를 특징으로 한다.

- [0086] 대안적인 양태에서, 향상된 T 세포 반응은 이펙터 사이토카인의 CD8 T 세포 발현의 증가 및/또는 세포독성 이펙터 기능의 증가를 특징으로 한다. 이펙터 사이토카인의 발현 증가는 전처리/기준선과 비교하여 IFN- γ , TNF- α , 및/또는 IL-2 중 하나 이상의 발현에 의해 측정될 수 있다. 세포독성 이펙터 기능의 증가는 CD107a, 그랜자임 B 및/또는 퍼포린 중 하나 이상의 발현 및/또는 표적 세포의 항원-특이적 사멸에 의해 측정될 수 있다.
- [0087] 본원에 기재된 검정, 사이토카인, 마커, 및 분자 및 그의 측정은 당업계에서 검증되고 이해되며 공지된 기술에 따라 수행될 수 있다. 추가로, T 세포 반응을 측정하기 위한 분석은 실시예 2, 3, 8, 13 및 14를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 T 세포 반응이 분석된 작업 실시예에서 찾을 수 있다.
- [0088] 향상된 T 세포가 암 환자의 초기 선천성 면역 반응 이후에 회피 및/또는 생존한 종양 세포를 효과적으로 표적화하고 사멸시키므로, 본 발명에 의해 실현된 향상된 T 세포 반응은 향상된 NK 세포 반응, 및 향상된 염증 반응과 조합되어 특히 유리하다.
- [0089] 또 다른 추가 실시형태에서, 본원에 기재된 조합 및 방법은 인간 암 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 바람직한 실시형태에서, 암 환자는 유방암, 폐암, 두경부암, 갑상선, 흑색종, 위암, 방광암, 신장암, 간암, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 요로상피암, 자궁경부암 또는 결장직장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암을 앓고/앓거나, 이들로 진단된다. 또 다른 추가 실시형태에서, 본원에 기재된 조합 및 방법은 유방암, 결장직장암 또는 흑색종, 바람직하게는 흑색종, 보다 바람직하게는 결장직장암 또는 가장 바람직하게는 결장직장암을 앓고/앓거나 이들로 진단받은 인간 암 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것이다.
- [0090] 특정 예시적인 종양-관련 항원. 특정 실시형태에서, 면역 반응은 세포-관련 폴리펩타이드 항원에 대해 대상체에서 생성된다. 이러한 특정 실시형태에서, 세포-관련 폴리펩타이드 항원은 종양-관련 항원(TAA)이다.
- [0091] 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합 또는 변형된 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 아미노산은 자연 발생뿐만 아니라 비자연 발생, 또는 자연 발생 아미노산의 화학적 유사체일 수 있다. 이 용어는 또한 단백질, 즉 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 기능적 생체분자를 지칭하며; 적어도 2개의 폴리펩타이드를 포함하는 경우, 이들은 복합체를 형성할 수 있거나, 공유적으로 연결되거나, 또는 비-공유적으로 연결될 수 있다. 단백질 내의 폴리펩타이드(들)은 글리코실화되고/되거나, 지질화되고/되거나, 보결분자단(prosthetic groups)를 포함할 수 있다.
- [0092] 내인성 레트로바이러스 단백질(ERV). 바람직하게는, TAA는 내인성 레트로바이러스 단백질(ERV)로 구현된다. 보다 바람직하게는, ERV는 인간 HERV-K 단백질 패밀리로부터의 ERV이다. 가장 바람직하게는, HERV-K 단백질은 HERV-K 외피(env) 단백질, HERV-K 그룹 특이적 항원(gag) 단백질, 및 HERV-K "흑색종 위험 마커"(mel) 단백질로부터 선택된다(예를 들어, Cegolon *et al.* (2013) *BMC Cancer* 13:4 참조).
- [0093] ERV는 인간 게놈의 8%를 구성하며, 백만년 전 생식계열 감염에서 유래한다. 우리 게놈에 삽입된 대부분의 요소는 심하게 돌연변이되어, 전사되거나 번역되지 않는다. 그러나 최근에 획득한 ERV의 작은 부분은 여전히 기능하고 번역되며, 일부 경우에는 바이러스 입자를 생성하기도 한다. ERV의 전사는 유전자좌가 일반적으로 고도로 메틸화되어 결과적으로 체세포에서 전사되지 않기 때문에 매우 제한된다(Kassiotis (2016) *Nat. Rev. Immunol.* 16: 207-19). 세포 스트레스(화학물질, 자외선, 호르몬, 사이토카인)와 같은 일부 상황에서만 ERV가 재활성화될 수 있다. 중요하게도, ERV는 다양한 유형의 암에서도 발현되지만 정상 조직에서는 발현되지 않는다(Cegolon *et al.* (2013) *BMC Cancer* 13: 4; Wang-Johanning *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 1528-35). 이 매우 제한된 발현 패턴은 ERV가 유능한 ERV-특이적 T 세포 레퍼토리를 초래하는 면역학적 내성 기전에 노출되지 않거나 거의 노출되지 않도록 한다. 이러한 방식으로, ERV는 MVA에서 종양 항원("TAA")으로 사용될 수 있다.
- [0094] 다양한 추가 실시형태에서, TAA는 HER2, PSA, PAP, CEA, MUC-1, FOLR1, PRAME, 서바이빈, TRP1, TRP2, 또는 브라퓨리 단독 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 예시적인 조합은 예를 들어 CV301로도 알려진 MVA의 CEA 및 MUC-1을 포함할 수 있다. 다른 예시적인 조합은 PAP 및 PSA를 포함할 수 있다.
- [0095] 또 다른 실시형태에서, 추가의 TAA는 5알파 환원효소, 알파-태아단백질, AM-1, APC, April, BAGE, 베타-카테닌, Bcl12, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, 카텝신, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33 CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파르네실 전이효소, FGF8b, FGF8a, FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, GAGE-계열, 가스트린 17, 가스트린 방출

호르몬, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP1, hCG, 헤파라나제, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT, IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, MAGE-계열, 맘마글로빈, MAP17, 멜란-A/MART-1, 메조텔린, MIC A/B, MT-MMPs, 뮤신, NY-ESO-1, 오스테오백틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, PDGF, uPA, PRAME, 프로바신, 프로제니포이에틴, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-계열, STAT3, STn, TAG-72, TGF-알파, TGF-베타, 티모신-베타-15, TNF-알파, TRP1, TRP2, 티로시나제, VEGF, ZAG, p16INK4, 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0096] 바람직한 PSA 항원은 위치 155에서 이소류신의 류신으로의 아미노산 변화를 포함한다(미국 특허 제7,247,615호를 참조하며, 이는 본원에 참고로 포함됨).

[0097] 본 발명의 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, 이중 TAA는 HER2 및/또는 브라큐리로부터 선택된다.

[0098] 예를 들어, TAA를 함유하는 MVA의 투여 후 면역 반응을 자극하는 것과 같이 본 발명의 적어도 하나의 목적 또는 원하는 목적을 달성하는 한 임의의 TAA가 사용될 수 있다. 본원에 언급된 TAA를 포함하는, TAA의 예시적인 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 TAA의 서열은 당업계에 공지되어 있거나 본원에 개시된 서열과 동일할 수 있거나, 당업계에 공지되어 있거나 본원에 개시된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에 대한 적어도 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성과 같이 100% 미만의 동일성을 공유할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 또는 방법에 사용하기 위한 TAA의 서열은 본 발명의 적어도 하나의 목적 또는 원하는 목적을 달성하는 한 20 미만, 또는 19, 18, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 뉴클레오타이드 또는 아미노산만큼 당업계에 공지되고/되거나 본원에 개시된 참조 서열과 상이할 수 있다. 당업자는 본 발명의 MVA 또는 방법에서의 사용에 대한 적합성을 보장하기 위해 TAA를 평가하기 위한 기술 및 분석에 익숙하다.

[0099] 변형된 종양-관련 항원. 특정 실시형태에서, 세포-관련 폴리펩타이드 항원은 APC 표면 상의 MHC 클래스 I 분자와 회합되어 제시될 때 그의 표면 상에 폴리펩타이드 항원으로부터 유래된 에피토프를 제시하는 세포에 대해 CTL 반응이 유도되도록 변형된다. 이러한 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 제1 외래 TH 에피토프는 제시될 때 APC의 표면 상의 MHC 클래스 II 분자와 회합된다. 이러한 특정 실시형태에서, 세포-관련 항원은 종양-관련 항원이다.

[0100] 에피토프를 제시할 수 있는 예시적인 APC는 수지상 세포 및 대식세포를 포함한다. 추가의 예시적인 APC는 1) MHC 클래스 I 분자에 결합된 CTL 에피토프; 및 2) MHC 클래스 II 분자에 결합된 TH 에피토프를 동시에 제시할 수 있는 임의의 피노- 또는 식세포화 APC를 포함한다.

[0101] 특정 실시형태에서, HERV-K env, HERV-K gag, HERV-K me1, CEA, MUC-1, PAP, PSA, PRAME, FOLR1, HER2, 서바이빈, TRP1, TRP2, 또는 브라큐리와 같은 하나 이상의 TAA에 대한 변형은 대상체에 투여한 후 본원에 기재된 하나 이상의 TAA와 주로 반응하는 폴리클로날 항체가 유도되도록 제조된다. 이러한 항체는 종양 세포를 공격하고 제거할 뿐만 아니라 전이성 세포가 전이로 발전하는 것을 방지할 수 있다. 이러한 항종양 효과의 이펙터 메커니즘은 보체 및 항체 의존적 세포 세포독성을 통해 매개될 것이다. 또한, 유도된 항체는 성장 인자 의존성 올리고-이량체화 및 수용체의 내재화 억제제를 통해 암세포 성장을 억제할 수도 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형된 TAA는 종양 세포에 의해 표시되는 공지된 및/또는 예측된 TAA 에피토프에 대해 지시된 CTL 반응을 유도할 수 있다.

[0102] 특정 실시형태에서, 변형된 TAA 폴리펩타이드 항원은 세포-회합 폴리펩타이드 항원의 CTL 에피토프 및 변이를 포함하고, 여기서 변이는 적어도 하나의 CTL 에피토프 또는 외래 TH 에피토프를 포함한다. 이러한 특정 변형된 TAA는 적어도 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 하나 이상의 HER2 폴리펩타이드 항원 및 외래 TH 에피토프의 적어도 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 변이를 비제한적인 예로 포함할 수 있으며, 이를 생산하는 방법은 미국 특허 번호 제7,005,498호 및 미국 특허 공개 제2004/0141958호 및 제2006/0008465호에 기재되어 있다.

[0103] 이러한 특정 변형된 TAA는 적어도 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 하나 이상의 MUC-1 폴리펩타이드 항원 및 외래 에피토프의 적어도 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 변이체, 및 이를 생산하는 방법을 하나의 비제한적인 예로 포함할 수 있으며, 미국 특허 공개 제2014/0363495호에 기재되어 있다.

[0104] 추가적인 무차별적 T-세포 에피토프는 상이한 HLA-DR에 의해 암호화되는 HLA-DR 분자의 많은 부분에 결합할 수 있는 펩타이드를 포함한다. 예를 들어 WO 98/23635(Frazer IH et al., University of Queensland에 양도됨); Southwood et. al. (1998) *J. Immunol.* 160: 3363 3373; Sinigaglia et al. (1988) *Nature* 336: 778 780;

Rammensee *et al.* (1995) *Immunogenetics* 41: 178 228; Chicz *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178: 27 47; Hammer *et al.* (1993) *Cell* 74: 197 203; and Falk *et al.* (1994) *Immunogenetics* 39: 230 242를 참조한다. 후자의 참고문헌은 또한 HLA-DQ 및 -DP 리간드를 다룬다. 이들 참고문헌에 열거된 모든 에피토프는 이들과 공통 모티프를 공유하는 에피토프와 마찬가지로 본원에 기재된 후보 천연 에피토프와 관련이 있다.

[0105] 특정의 다른 실시형태에서, 무차별적인 T-세포 에피토프는 많은 비율의 일배체형에 결합할 수 있는 인공 T-세포 에피토프이다. 이러한 특정 실시형태에서, 인공 T-세포 에피토프는 WO 95/07707 및 상응하는 논문 Alexander *et al.* (1994) *Immunity* 1: 751 761에 기재된 바와 같은 팬 DR 에피토프 펩타이드("PADRE")이다.

[0106] 4-1BBL(본원에서 "41BBL" 또는 "4-1BB 리간드"로도 지칭됨). 본 개시내용에 의해 예시된 바와 같이, 제조합 MVA 및 관련 방법의 일부로서 4-1BBL의 포함은 암 대상체에서 종양내 또는 정맥내 투여시 증가되고 향상된 항종양 효과를 유도한다. 따라서, 다양한 실시형태에서, TAA를 암호화하는 것 외에, 4-1BBL 항원을 암호화하는 제조합 MVA가 존재한다.

[0107] 4-1BB/4-1BBL은 TNFR/TNF 슈퍼패밀리의 구성원이다. 4-1BBL은 활성화된 B 세포, 단핵구 및 DC에서 발현되는 공동자극 리간드이다. 4-1BB는 자연 살해(NK) 및 자연 살해 T(NKT) 세포, Treg 및 DC, 단핵구 및 호중구를 비롯한 여러 선천 면역 세포 집단에 의해 구성적으로 발현된다. 흥미롭게도, 4-1BB는 활성화된 T 세포에서 발현되지만 휴지기 T 세포에서는 발현되지 않는다(Wang *et al.* (2009) *Immunol. Rev.* 229: 192-215). 4-1BB 결합은 인터페론 감마(IFN- γ) 및 인터루킨 2(IL-2)의 증식 및 생성을 유도할 뿐만 아니라 Bcl-xL과 같은 항세포자멸사 분자의 상향조절을 통해 T 세포 생존을 향상시킨다(Snell *et al.* (2011) *Immunol. Rev.* 244: 197-217). 중요하게는, 4-1BB 자극은 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)의 향상을 통해 NK 세포 증식, IFN- γ 생산 및 세포 용해 활성을 향상시킨다(Kohrt *et al.* (2011) *Blood* 117: 2423-32).

[0108] 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, 4-1BBL은 본 발명의 MVA에 의해 암호화된다. 하나 이상의 다른 바람직한 실시형태에서, 4-1BBL은 인간 4-1BBL이다. 훨씬 더 바람직한 실시형태에서, 4-1BBL은 서열번호 3과 적어도 90%, 95%, 97% 98% 또는 99% 동일성을 갖는, 즉 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열과 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 아미노산만큼 상이한 서열을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시형태에서, 4-1BBL은 서열번호 3을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 4-1BBL을 암호화하는 핵산은 서열번호 4와 적어도 90%, 95%, 97% 98% 또는 99% 동일성을 갖는, 즉, 서열번호 4에 제시된 핵산 서열과 20, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1개 미만의 핵산만큼 상이한 핵산을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 보다 바람직한 실시형태에서, 4-1BBL은 서열번호 4를 포함하는 핵산을 포함한다.

[0109] CD40L. 본 개시내용에 의해 예시된 바와 같이, 조합 및 관련 방법의 일부로서 CD40L의 포함은 종양 부피의 감소를 추가로 향상시키고, 무진행 생존을 연장하고, 본 발명에 의해 실현되는 생존율을 증가시킨다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 조합은 암 환자에게 CD40L을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 바람직한 실시형태에서, CD40L은 본원에 기재된 바와 같은 제조합 MVA의 일부로서 암호화된다.

[0110] CD40은 B 세포, 대식세포 및 수지상 세포를 비롯한 많은 세포 유형에서 구성적으로 발현되지만, 그의 리간드 CD40L은 주로 활성화된 T 헬퍼 세포에서 발현된다. 감염 또는 면역화 초기에 수지상 세포와 T 헬퍼 세포 간의 동족 상호작용은 수지상 세포를 '라이센싱'하여 CTL 반응을 프라임한다. 수지상 세포 라이선싱은 공동 자극 분자의 상향 조절, 증가된 생존 및 더 나은 교차-제시 능력을 초래한다. 이 과정은 주로 CD40/CD40L 상호작용을 통해 매개된다. 그러나, APC의 활성화, 증식 및 분화를 유도하거나 억제하는, 다양한 자극을 유도하는 가용성(단량체에서 삼량체)에 결합된 막에서 CD40L의 다양한 구성이 설명되어 있다.

[0111] 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, CD40L은 본 발명의 MVA에 의해 암호화된다. 하나 이상의 다른 바람직한 실시형태에서, CD40L은 인간 CD40L이다. 더욱 더 바람직한 실시형태에서, CD40L은 서열번호 1과 적어도 90%, 95%, 97% 98%, 또는 99% 동일성을 갖는, 즉 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 아미노산만큼 상이한 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시형태에서, CD40L은 서열번호 1을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함한다. 추가의 실시형태에서, CD40L을 암호화하는 핵산은 서열번호 2와 적어도 90%, 95%, 97% 98% 또는 99% 동일성을 갖는, 즉, 서열번호 2에 제시된 핵산 서열과 20, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1개 미만의 핵산만큼 상이한 핵산 서열을 포함한다. 보다 바람직한 실시형태에서, CD40L은 서열번호 2를 포함하는 핵산을 포함한다.

[0112] 면역 관문 분자의 길항제. 본원에 기재된 바와 같이, 적어도 하나의 양태에서, 본 발명은 면역 관문 길항제의 용도를 포함한다. 이러한 면역 관문 길항제는 면역 관문 분자의 기능을 방해 및/또는 차단하는 기능을 한다. 일

부 바람직한 면역 관문 길항제는 세포독성 T-림프구 항원 4(CTLA-4)의 길항제, 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1), 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3) 및 T-세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3(TIM-3)을 포함한다.

- [0113] 추가로, 예시적인 면역 관문 길항제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제(VISTA)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0114] 면역 관문 분자의 이러한 길항제는 면역 관문 분자에 특이적으로 결합하고 면역 관문 분자의 생물학적 활성 및 기능을 억제 및/또는 차단하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0115] 면역 관문 분자의 다른 길항제는 면역 관문 분자의 발현을 방해하는 안티센스 핵산 RNA; 및 면역 관문 분자의 발현을 방해하는 작은 간섭 RNA를 포함한다.
- [0116] 길항제는 추가로 면역 관문의 기능을 억제하거나 차단하는 소분자 형태일 수 있다. 이들의 일부 비제한적 예에는 NP12(Aurigene), (D) Tsinghua Univ의 PPA-1, 고친화성 PD-1(Stanford); BMS-202 및 BMS-8(Bristol Myers Squibb(BMS), 및 CA170/CA327(Curis/Aurigene); 및 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3 및 TIM-3의 소분자 억제제가 포함된다.
- [0117] 길항제는 추가로 면역 관문 분자의 기능을 억제하거나 차단하는 Anticalins®의 형태일 수 있다. 예를 들어, Rothe *et al.* ((2018) *BioDrugs* 32(3): 233-243)을 참조한다.
- [0118] 길항제는 추가로 Affimers®의 형태일 수 있는 것으로 고려된다. Affimer는 면역 관문 분자의 기능을 억제하거나 차단하는 Fc 융합 단백질이다. 면역 관문의 길항제로서 작용할 수 있는 다른 융합 단백질은 면역 관문 융합 단백질(예를 들어, 항-PD-1 단백질 AMP-224) 및 US2017/0189476에 기재된 것과 같은 항-PD-L1 단백질이다.
- [0119] 면역 관문 분자의 후보 길항제는 시험관내 또는 마우스 모델에서 면역 관문 분자 기능을 방해하는 능력과 같이 당업계에 공지되어 있고/있거나 본 출원에 개시되어 있는 다양한 기술에 의해 기능에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0120] ICOS의 작용제. 본 발명은 ICOS의 작용제를 추가로 포함한다. ICOS의 작용제는 ICOS를 활성화시킨다. ICOS는 활성화된 T 세포에서 발현되는 양성 공동-자극 분자이며, 그의 리간드에 대한 결합은 이들의 증식을 촉진한다 (Dong (2001) *Nature* 409: 97-101).
- [0121] 한 실시형태에서, 작용제는 ICOS 천연 리간드인 ICOS-L이다. 작용제는 결합 및 활성화 특성을 유지하는 돌연변이된 형태의 ICOS-L일 수 있다. ICOS-L의 돌연변이 형태는 *시험관내*에서 ICOS를 자극하는 활성화에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0122] 면역 관문 길항제 또는 작용제에 대한 항체. 바람직한 실시형태에서, 면역 관문 분자의 길항제 및/또는 작용제는 각각 항체를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 다양한 실시형태에서, 항체는 합성, 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고 당업계에 널리 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 항체는 항체의 항원-결합 부위를 통해 면역 관문 분자에 특이적으로 결합한다(비특이적 결합과 반대). 면역 관문 펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 이와 면역반응성인 항체를 생성하는데 있어서 면역원으로 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 폴리펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 항체 형성을 유도하는 항원 결정기 또는 에피토프를 함유한다.
- [0123] 보다 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 암 환자의 치료를 위해 주권 국가의 정부에 의해 승인되거나 승인 과정에 있는 항체이다. 이미 승인되었거나 승인 과정에 있는 이러한 항체의 일부 비제한적 예에는 CTLA-4(이필리무맙® 및 트레멜리무맙); PD-1(펩브롤리주맙, 람브롤리주맙, 앰플리문-224(AMP-224)), 앰플리문-514(AMP-514), 니볼루맙, MK-3475(Merck), . BI 754091(Boehringer Ingelheim)) 및 PD-L1(아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, MPDL3280A(Roche), MED14736(AZN), MSB0010718C(Merck)); LAG-3(IMP321, BMS-986016, BI754111(Boehringer Ingelheim), LAG525(Novartis), MK-4289(Merck), TSR-033(Tesaro)에 대한 항체가 포함된다.
- [0124] 하나의 예시적인 양태에서, 면역 관문 분자 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 및 ICOS, 및 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 아미노산 서열에 기초한 펩타이드를 사용하여 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 특이적으로 결합하는 항체를 제조할 수 있다. 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, F(ab')₂ 및 Fab 단편과 같은 이의 단편, 단일-사슬 가변 단편(scFv), 단일-도메인 항체 단편(VHH 또는 나노바디), 2가 항체 단편(디아바디) 뿐만 아니라 재조합 및 합성으로 생성된 결합 파트너를 포함하는 것으로 의

미된다.

- [0125] 종양 관련 항원(TAA)에 특이적인 항체. 본 발명의 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 TAA에 특이적인 항체와 조합되거나 조합되어 투여된다. 보다 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 종양 세포의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적인 항체와 조합되거나 조합되어 투여된다. 많은 암에서, 하나 이상의 항원이 종양 세포막 상에서 발현되거나 과발현된다는 것이 당업계에서 이해된다. 예를 들어 Durig *et al.* (2002) *Leukemia* 16: 30-5; Mocellin *et al.* (2013) *Biochim. Biophys. Acta* 1836: 187-96; Arteaga (2011) *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, doi:10.1038/nrclinonc.2011.177; Finn (2017) *Cancer Immunol. Res.* 5: 347-54; Ginaldi *et al.* (1998) *J. Clin. Pathol.* 51: 364-9를 참조한다. 항원이 종양 세포 상에서 발현 또는 과발현되는지 여부를 결정하기 위한 검정은 당업계(Id.) 뿐만 아니라 특정 항원에 대한 항체를 생산하는 방법도 쉽게 이해된다.
- [0126] 보다 구체적인 실시형태에서, 약제학적 조합 및 관련 방법은 항체를 포함하며, 여기서 항체는 a) 종양의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적이고 b) Fc 도메인을 포함한다. 적어도 하나의 양태에서, 항체(예를 들어, a) 및 b))의 특징은 항체가 이펙터 세포, 예컨대 NK 세포, 대식세포, 호염기구, 호중구, 호산구, 단핵구, 비만 세포, 및/또는 수지상 세포에 결합하고 이와 상호작용할 수 있게 하며, 항체가 종양 세포 상에서 발현되는 종양 항원에 결합할 수 있게 한다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 Fc 도메인을 포함한다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 항체는 NK 세포에 결합하고 그와 상호작용할 수 있다.
- [0127] 본 개시내용에 의해 고려되는 종양 세포 상에서 발현된 항원에 대한 일부 예시적인 항체는 항-CD20(예를 들어, 리툽시맵; 오파투무맵; 토시투모맵), 항-CD52(예를 들어, 알렘투주맵 Campath®), 항-EGFR(예를 들어, 세툽시맵 Erbitux®, 파니투무맵), 항-CD2(예를 들어, 시플리주맵), 항-CD37(예를 들어, BI836826), 항-CD123(예를 들어, JNJ-56022473), 항-CD30(예를 들어, XmaAb2513), 항-CD38(예를 들어, 다라투무맵 Darzalex®), 항-PDL1(예를 들어, 아벨루맵, 아테졸릴주맵, 더발루맵), 항-GD2(예를 들어, 3F8, ch14.18, KW-2871, 디누툽시맵), 항-CEA, 항-MUC1, 항-FLT3, 항-CD19, 항-CD40, 항-SLAMF7, 항-CCR4, 항-B7-H3, 항-ICAM1, 항-CSF1R, 항-CA125(예를 들어, 오레고보맵), 항-FR α (예를 들어, MOv18-IgG1, 미르베툽시맵 소라브탄신(IMGN853), MORAb-202), 항-메조텔린(예를 들어, MORAb-009), 항-TRP2 및 항-HER2(예를 들어, 트라스투주맵, 허주마(Herzuma), ABP 980 및/또는 퍼투주맵)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0128] 보다 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 일부로 포함된 항체는 환자에게 투여될 때 종양 세포 상의 상응하는 항원에 결합하고 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 유도하는 항체를 포함한다. 더욱 더 바람직한 실시형태에서, 항체는 암 치료에 대해 승인되거나 사전 승인된 항체를 포함한다.
- [0129] 더욱 더 바람직한 실시형태에서, 항체는 항-HER2 항체, 항-EGFR 항체, 및/또는 항-CD20 항체이다.
- [0130] 가장 바람직한 실시형태에서, 항-HER2 항체는 퍼투주맵, 트라스투주맵, 허주마, ABP 980, 및 아도-트라스투주맵 엠탄신으로부터 선택된다.
- [0131] 가장 바람직한 실시형태에서, 항-EGFR 항체 및 항-CD20은 각각 세툽시맵 및 리툽시맵이다.
- [0132] 본원에 기재된 바와 같이, 다양한 실시형태에서, 항체는 합성, 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고, 당업계에 널리 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 항체는 항체의 항원-결합 부위를 통해 TAA에 특이적으로 결합한다(비특이적 결합과 반대). TAA 펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 이와 면역반응성인 항체를 생성하는데 있어서 면역원으로 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 폴리펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 항체 형성을 유도하는 항원 결정기 또는 에피토프를 함유한다.
- [0133] 항체. 본 발명의 다양한 실시형태에서, 본원에 기재된 재조합 MVA 및 방법은 1) 면역 관문 길항제 또는 작용제 항체 또는 2) TAA-특이적 항체와 조합되고/되거나 조합하여 투여된다.
- [0134] 항체는 합성, 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있고 당업계에 널리 공지된 기술에 의해 제조될 수 있는 것으로 고려된다. 이러한 항체는 항체의 항원 결합 부위를 통해 면역 관문 분자 또는 TAA에 특이적으로 결합한다(비특이적 결합과 반대). 면역 관문 및/또는 TAA 펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 이와 면역반응성인 항체를 생성하는데 있어서 면역원으로 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 폴리펩타이드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 항체 형성을 유도하는 항원 결정기 또는 에피토프를 함유한다.
- [0135] 이들 항원 결정기 또는 에피토프는 선형 또는 입체형태적(불연속적)일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩타이드의 단일 아미노산 섹션으로 구성되는 반면, 입체형태 또는 불연속 에피토프는 단백질 폴딩 시 근접하게 되는 폴

리펩타이드 사슬의 다른 영역으로부터의 아미노산 섹션으로 구성된다(Janeway, Jr. and Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 폴딩된 단백질은 복잡한 표면을 가지고 있기 때문에, 사용 가능한 에피토프의 수는 상당히 많지만; 단백질의 입체형태와 입체 장애로 인해, 에피토프에 실제로 결합하는 항체의 수는 사용 가능한 에피토프의 수보다 적다(Janeway, Jr. and Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 에피토프는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0136] CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS와 같은 면역 관문 분자 또는 TAA에 특이적으로 결합하고 이의 기능을 차단하거나("길항제 항체"), 그의 기능을 향상/활성화시키는("작용제 항체") scFV 단편을 비롯한 항체들은 본 발명에 포함된다. 이러한 항체는 통상적인 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0137] 한 실시형태에서, 본 발명은 TAA 또는 면역 관문 분자에 대한 모노클로날 항체를 포함하거나, 또는 면역 관문 분자 또는 TAA의 기능을 차단("길항제 항체") 또는 향상/활성화("작용제 항체")하는 모노클로날 항체를 포함한다.

[0138] 항체는 높은 결합력과 특이성으로 그의 표적에 결합할 수 있다. 이들은 항체 결합 부위가 단백질-단백질 상호작용 부위에 근접할 때 두 단백질(예를 들어, PD-1 및 그의 표적 리간드) 간의 상호작용을 입체적으로 억제할 수 있는, 비교적 큰 분자(~150kDa)이다. 본 발명은 면역 관문 분자 리간드 결합 부위에 매우 근접한 에피토프에 결합하는 항체를 추가로 포함한다.

[0139] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 분자간 상호작용(예를 들어, 단백질-단백질 상호작용)을 방해하는 항체, 뿐만 아니라 분자내 상호작용(예를 들어, 분자 내 입체형태 변화)을 교란시키는 항체를 포함한다. 항체는 면역 관문 분자의 생물학적 활성을 차단 또는 향상/활성화하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 모두 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0140] 하나의 예시적인 양태에서, TAA 또는 면역 관문 분자 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 및 ICOS, 및 TAA 또는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 아미노산 서열에 기초한 펩타이드를 활용하여 TAA 또는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 특이적으로 결합하는 항체를 제조할 수 있다. 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, F(ab')₂ 및 Fab 단편과 같은 이의 단편, 단일-사슬 가변 단편(scFv), 단일-도메인 항체 단편(VHH 또는 나노바디), 2가 항체 단편(디아바디) 뿐만 아니라 재조합 및 합성으로 생성된 결합 파트너를 포함하여 의미한다. 또 다른 예시적인 양태에서, 항체는 약 10^7 M^{-1} 이상의 Kd로 결합하는 경우 면역 관문 분자에 특이적으로 결합하는 것으로 정의된다. 결합 파트너 또는 항체의 친화도는 통상적인 기술, 예를 들어 Scatchard *et al.* ((1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660)에 기재된 기술을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0141] 폴리클로날 항체는 당업계에 널리 공지된 절차를 사용하여 다양한 공급원, 예를 들어 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 토끼, 마우스 또는 래트로부터 용이하게 생성될 수 있다. 일반적으로 정제된 TAA 또는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS, 또는 적절하게 접합된 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 아미노산 서열에 기초한 펩타이드는 전형적으로 비경구 주사를 통해 숙주 동물에 투여된다. 부스터 면역화 후, 소량의 혈청 샘플을 수집하고, CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩타이드에 대한 반응성에 대해 테스트한다. 이러한 결정에 유용한 다양한 분석법의 예는 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988에 기재된 방법들; 뿐만 아니라 역류 면역-전기영동(CIEP), 방사선면역분석, 방사선-면역침전, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 도트 블롯 분석 및 샌드위치 분석과 같은 절차를 포함한다. 미국 특허 제4,376,110호 및 제4,486,530호를 참조한다.

[0142] 모노클로날 항체는 잘 알려진 절차를 사용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 RE 32,011, 제4,902,614호, 제4,543,439호 및 제4,411,993호; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol (eds.) (1980)에 기재된 절차를 참조한다.

[0143] 예를 들어, 마우스와 같은 숙주 동물은 단리되고 정제된 면역 관문 분자를 약 3주 간격으로 적어도 1회, 바람직하게는 적어도 2회 복강내 주사받을 수 있다. 그런 다음, 마우스 혈청이 기존의 도트 블롯 기술 또는 항체 포획(ABC)으로 분석하여 어떤 동물이 융합하기에 가장 적합한지를 결정한다. 대략 2주 내지 3주 후, 마우스에 면역 관문 분자의 정맥내 부스트가 제공된다. 마우스는 나중에 희생되고, 비장 세포가 확립된 프로토콜에 따라 Ag8.653(ATCC)과 같은 상업적으로 이용 가능한 골수종 세포와 융합된다. 간단히 말해서, 골수종 세포는 배지에서 여러 번 세척되고 약 3개의 비장 세포 대 1개의 골수종 세포의 비율로 마우스 비장 세포에 융합된다. 융합제

는 당업계에서 사용되는 임의의 적합한 제제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 융합은 융합된 세포의 선택적 성장을 허용하는 배지를 함유하는 플레이트에 플레이팅된다. 그런 다음, 융합된 세포는 대략 8일 동안 성장할 수 있다. 생성된 하이브리도마로부터의 상청액을 수집하고, 염소 항-마우스 Ig로 먼저 코팅된 플레이트에 첨가하였다. 세척 후, 표지된 면역 관문 분자 폴리펩타이드와 같은 표지를 각 웰에 첨가한 후 인큐베이션한다. 양성 웰이 이후에 검출될 수 있다. 양성 클론은 대량 배양에서 성장할 수 있으며, 상청액은 이후에 단백질 A 컬럼(Pharmacia)을 통해 정제된다.

[0144] 본 발명의 모노클로날 항체는 Altling-Mees *et al.* ((1990) *Strategies in Mol. Biol.* 3: 1-9, "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas")에 기재된 것과 같은 대체 기술들을 사용하여 생산될 수 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다. 유사하게, 결합 파트너는 특이적 결합 항체를 암호화하는 유전자의 가변 영역을 통합하기 위해 재조합 DNA 기술을 사용하여 작제될 수 있다. 이러한 기술은 Larrick *et al.* ((1989) *Biotechnology* 7: 394)에 기재되어 있다.

[0145] 통상적인 기술에 의해 생산될 수 있는 이러한 항체의 항원-결합 단편은 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 단편의 예는 Fab 및 F(ab')₂ 단편을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 유전 공학 기술에 의해 생산된 항체 단편 및 유도체도 제공된다.

[0146] 본 발명의 모노클로날 항체는 키메라 항체, 예를 들어 무린 모노클로날 항체의 인간화 버전을 포함한다. 이러한 인간화 항체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있고, 항체가 인간에게 투여될 때 감소된 면역원성의 이점을 제공한다. 한 실시형태에서, 인간화 모노클로날 항체는 무린 항체의 가변 영역 (또는 그의 항원 결합 부위) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 영역을 포함한다. 대안적으로, 인간화 항체 단편은 무린 모노클로날 항체의 항원 결합 부위 및 인간 항체로부터 유래된 가변 영역 단편(항원-결합 부위 결여)을 포함할 수 있다. 키메라 및 추가 조작된 모노클로날 항체의 생산을 위한 절차는 Riechmann *et al.* ((1988) *Nature* 332: 323), Liu *et al.* ((1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 84: 3439), Larrick *et al.* ((1989) *Bio/Technology* 7: 934), 및 Winter and Harris ((1993) *TIPS* 14: 139)에 기재된 절차들을 포함한다. 트랜스제닉 방식으로 항체를 생성하는 절차는 영국 특허 제2,272,440호, 미국 특허 제5,569,825호 및 제5,545,806호에서 찾아볼 수 있으며, 이들은 둘 다 본원에 참고로 포함된다.

[0147] 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는, 인간 및 비인간 부분을 모두 포함하는, 키메라 및 인간화 모노클로날 항체와 같은 유전 공학 방법에 의해 생산된 항체가 사용될 수 있다. 이러한 키메라 및 인간화 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 표준 DNA 기술, 예를 들어 Robinson *et al.* 국제 공개 번호 WO 87/02671; Akira *et al.* 유럽 특허 출원 0184187; Taniguchi, M., 유럽 특허 출원 0171496; Morrison *et al.* 유럽 특허 출원 0173494; Neuberger *et al.* PCT 국제 공개 번호 WO 86/01533; Cabilly *et al.* 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly *et al.* 유럽 특허 출원 0125023; Better *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 84: 3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 84: 214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47: 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446-449; 및 Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4: 214; Winter 미국 특허 제5,225,539호; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 552-555; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239: 1534; 및 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060에 기재된 방법들을 사용하여, 유전 공학에 의해 생산될 수 있다.

[0148] 합성 및 반합성 항체와 관련하여, 이러한 용어는 항체 단편, 이소형 전환 항체, 인간화 항체(예를 들어, 마우스-인간, 인간-마우스), 하이브리드, 복수 특이성을 갖는 항체, 및 완전 합성 항체-유사 분자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0149] 치료적 적용을 위해, 항체에 대한 환자의 면역 반응을 최소화하기 위해 인간 불변 및 가변 영역을 갖는 "인간" 모노클로날 항체가 종종 바람직하다. 그러한 항체는 인간 면역글로불린 유전자를 함유하는 트랜스제닉 동물을 면역화함으로써 생성될 수 있다. Jakobovits *et al.* Ann NY Acad Sci 764:525-535 (1995)를 참조한다.

[0150] TAA 또는 면역 관문 분자에 대한 인간 모노클로날 항체는 또한 대상체의 림프구에서 유래된 mRNA로부터 제조된 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 cDNA를 사용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리 또는 scFv 파지 디스플레이 라이브러리와 같은 조합 면역글로불린 라이브러리를 작제함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, McCafferty *et al.* PCT 공개 WO 92/01047; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; 및 Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734를 참조한다. 또한, 공지된 인간 항체를 돌연변이시킴으로써 항체 가변 영역의 조합 라이브러리가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역 관문 분자에 결합하는 것으로 알려진 인간 항체의 가변 영역은 예를 들어

무작위로 변경된 돌연변이유발 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 돌연변이된 후 면역 관문 분자에 결합하도록 스크리닝될 수 있는 돌연변이된 가변 영역의 라이브러리를 생성할 수 있다. 면역글로빈 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 영역 내에서 무작위 돌연변이유발을 유도하는 방법, 쌍을 형성하기 위해 무작위화된 중쇄 및 경쇄를 교차시키는 방법 및 스크리닝 방법은 예를 들어 Barbas *et al.* PCT 공개 WO 96/07754; Barbas *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4457-4461에서 찾아볼 수 있다.

[0151] 면역글로불린 라이브러리는 항체 디스플레이 라이브러리를 형성하기 위해 바람직하게는 사상 파지로부터 유래된 디스플레이 패키지의 집단에 의해 발현될 수 있다. 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하는데 사용하기에 특히 적합한 방법 및 시약의 예는 예를 들어 Ladner *et al.* 미국 특허 제5,223,409호; Kang *et al.* PCT 공개 WO 92/18619; Dower *et al.* PCT 공개 WO 91/17271; Winter *et al.* PCT 공개 WO 92/20791; Markland *et al.* PCT 공개 WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT 공개 WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT 공개 WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT 공개 WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT 공개 WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *supra*; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89: 3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucl. Acid Res.* 19: 4133-4137; 및 Barbas *et al.* (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 88: 7978-7982에서 찾아볼 수 있다. 디스플레이 패키지(예를 들어, 사상 파지)의 표면에 표시되면, 항체 라이브러리를 스크리닝하여 TAA 또는 면역 관문 분자에 결합하는 항체를 발현하는 패키지를 식별하고 분리한다.

[0152] 제조합 MVA. 본 발명의 보다 바람직한 실시형태에서, 본원에 개시된 하나 이상의 단백질 및 뉴클레오타이드는 제조합 MVA에 포함된다. 본 개시내용에 의해 기재되고 예시된 바와 같이, 본 개시내용의 제조합 MVA의 정맥내 투여는 다양한 양태에서 암 환자에서 향상된 면역 반응을 유도한다. 따라서, 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 하나 이상의 TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 제조합 MVA를 포함한다.

[0153] 본 발명의 실시예에 유용하고 부다페스트 조약의 요건에 따라 기탁된 MVA 바이러스 균주의 예는 유럽동물세포배양 기탁기관(ECACC), 백신 연구 및 생산 연구소, 공중 보건 연구소 서비스, 응용 미생물학 및 연구 센터, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, 영국에서, 1994년 1월 27일에 기탁 번호 ECACC 94012707로 기탁된 균주 MVA 572, 유럽동물세포배양기탁기관(ECACC)에 2000년 12월 7일에 ECACC 00120707로 기탁된 MVA 575, 2000년 8월 30일에 번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN 및 이의 유도체는 추가의 예시적인 균주이다.

[0154] MVA-BN의 "유도체"는 본원에 기재된 바와 같이 MVA-BN과 본질적으로 동일한 복제 특성을 나타내지만 계놈의 하나 이상의 부분에서 차이를 나타내는 바이러스를 지칭한다. MVA-BN 및 이의 유도체는 복제가 불가능하며, 이는 생체내 및 시험관내에서 생식적으로 복제할 수 없음을 의미한다. 보다 구체적으로 시험관 내에서, MVA-BN 또는 이의 유도체는 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식 복제가 가능하지만 인간 각질세포 세포주 HaCat(Boukamp *et al.* (1988) *J. Cell Biol.* 106: 761-771), 인간 골육종 세포주 143B(ECACC 기탁 번호 91112502), 인간 배아 신장 세포주 293(ECACC 기탁 번호 85120602), 및 인간 자궁경부 선암종 세포주 HeLa(ATCC 기탁 번호 CCL-2)에서는 생식 복제가 불가능한 것으로 기재되었다. 추가로, MVA-BN 또는 이의 유도체는 HeLa 세포 및 HaCaT 세포주에서 MVA-575보다 적어도 2배 적은, 보다 바람직하게는 3배 적은 바이러스 증폭 비율을 갖는다. MVA-BN 및 이의 유도체의 이러한 특성에 대한 테스트 및 분석은 WO 02/42480(미국 특허 출원 번호 2003/0206926) 및 WO 03/048184(미국 특허 출원 번호 2006/0159699)에 기재되어 있다.

[0155] 이전 단락에 기재된 바와 같이 시험관내 인간 세포주에서 "생식 복제가 불가능" 또는 "생식 복제가 불가능함"이라는 용어는 예를 들어 WO 02/42480에 기재되어 있으며, 이는 또한 위에서 언급한 바와 같이 원하는 특성을 갖는 MVA를 수득하는 방법을 교시한다. 이 용어는 WO 02/42480 또는 미국 특허 제6,761,893호에 설명된 분석을 사용하여 감염 후 4일째에 시험관 내 바이러스 증폭 비율이 1 미만인 바이러스에 적용된다.

[0156] 용어 "생식 복제 실패"는 1 미만의 감염 후 4일에 이전 단락에 기재된 바와 같이 시험관내 인간 세포주에서 바이러스 증폭 비율이 1 미만인 바이러스를 지칭한다. WO 02/42480에, 또는 미국 특허 제6,761,893호에 기재된 분석은 바이러스 증폭 비율의 결정에 적용할 수 있다.

[0157] 이전 단락에서 설명한 바와 같이 시험관 내 인간 세포주에서 바이러스의 증폭 또는 복제는 일반적으로 "증폭 비율"로 지칭된 첫 번째 장소(입력)에서 세포를 감염시키기 위해 원래 사용된 양에 대한 감염된 세포(출력)에서 생성된 바이러스의 비율로 표현된다. 증폭 비율 "1"은 감염된 세포에서 생성된 바이러스 양이 세포를 감염시키

기 위해 초기에 사용된 양과 동일한 증폭 상태를 정의하며, 이는 감염된 세포가 바이러스 감염 및 생식에 허용됨을 의미한다. 대조적으로, 증폭 비율이 1 미만, 즉 입력 수준에 비해 출력이 감소하면, 생식 복제가 부족하여 바이러스가 약독화되었음을 나타낸다.

[0158] 본원에서 "아주반트화"는 재조합 MVA의 특정 암호화된 단백질 또는 성분이 재조합 MVA의 다른 암호화된 단백질(들) 또는 성분(들)에 의해 생성된 면역 반응을 증가시키는 것으로 의도된다.

[0159] 발현 카세트/대조군 서열. 다양한 양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 핵산이 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 발현 카세트에 구현된다. "작동가능하게 연결된"은 설명된 구성요소, 예를 들어, 발현될 핵산을 전사하는 프로모터가 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있음을 의미한다. 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 발현 조절 서열과 양립가능한 조건 하에 달성되도록 결합된다. 발현 조절 서열은 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질-암호화 오픈 리딩 프레임의 시작 부분에 있는 시작 코돈, 인트론에 대한 스플라이싱 신호, 및 프레임내 정지 코돈을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 프로모터는 SV40 초기 프로모터, RSV 프로모터, 레트로바이러스 LTR, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 인간 CMV 즉시 초기 I 프로모터, 및 하기 백시니아 바이러스 또는 MVA-유래 및 FPV-유래 프로모터: 30K 프로모터, I3 프로모터, PrS 프로모터, PrS5E 프로모터, Pr7.5K, PrHyb 프로모터, Pr13.5 긴 프로모터, 40K 프로모터, MVA-40K 프로모터, FPV 40K 프로모터, 30k 프로모터, PrSynIIIm 프로모터, PrLE1 프로모터 및 PR1238 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 폭스바이러스 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 추가의 프로모터는 WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611, WO 2014/063832, 및 WO 2017/021776에 추가로 기재되어 있으며, 이는 본원에 전체가 참고로 포함된다.

[0160] 추가 발현 조절 서열은 리더 서열, 종결 코돈, 폴리아데닐화 신호 및, 원하는 숙주 시스템에 원하는 재조합 단백질(예를 들어, HER2, 브라큐리 및/또는 CD40L)을 암호화하는 핵산 서열의 적당한 전사 및 이후 번역에 필요한 임의의 다른 서열들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 폭스바이러스 벡터는 또한 원하는 숙주 시스템에서 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터의 전달 및 후속 복제에 필요한 추가 요소를 함유할 수 있다. 이러한 벡터는 통상적인 방법(Ausubel *et al.*, (1987) in "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley and Sons, New York, N.Y.)을 사용하여 쉽게 작제되고, 상업적으로 이용 가능하다는 것이 당업자에 의해 추가로 이해될 것이다.

[0161] 조합을 투여하기 위한 방법 및 투여 요법. 하나 이상의 양태에서, 본 발명의 조합은 동종 및/또는 이종 프라임-부스트 요법의 일부로서 투여될 수 있다. 도 7에 표시된 데이터에 의해 부분적으로 설명되어 있는, 동종 프라임 부스트 요법은 대상체의 특정 CD8 및 CD4 T 세포 반응을 증가시킨다. 따라서, 하나 이상의 실시형태에서 암 환자에게 본 개시내용의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 암 환자에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키기 위한 조합물 및/또는 방법이 있으며, 여기서 조합물은 동종 또는 이종 프라임-부스트 요법의 일부로서 투여된다.

[0162] **이식유전자를 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 생성**

[0163] 본원에서 제공되는 재조합 MVA 바이러스는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 생성될 수 있다. 재조합 폭스바이러스를 수득하거나 외인성 코딩 서열을 폭스바이러스 계통에 삽입하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, DNA 클로닝, DNA 및 RNA 단리와 같은 표준 분자 생물학 기술, 웨스턴 블롯 분석, RT-PCR 및 PCR 증폭 기술은 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed., Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))에 기재되어 있으며, 바이러스 취급 및 조작 기술은 *Virology Methods Manual* (Mahy *et al.* (eds.), Academic Press (1996))에 기재되어 있다. 유사하게, MVA의 취급, 조작 및 유전자 조작을 위한 기술 및 노하우는 *Molecular Virology: A Practical Approach* (Davison & Elliott (eds.), *The Practical Approach Series*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993))에 기재되어 있으며(예를 들어, "Chapter 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors" 참조), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Son, Inc. (1998))에 기재되어 있다(예를 들어, Chapter 16, Section IV: "Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector" 참조)).

[0164] 본원에 개시된 다양한 재조합 MVA 바이러스의 생성을 위해, 상이한 방법이 적용될 수 있다. 바이러스에 삽입될 DNA 서열은 폭스바이러스의 DNA 섹션에 상동성인 DNA가 삽입된 이. 콜라이(E. coli) 플라스미드 작제물에 배치될 수 있다. 별도로, 삽입되는 DNA 서열은 프로모터에 결합될 수 있다. 프로모터-유전자 연결은 비필수 유전자 좌를 함유하는 폭스바이러스 DNA의 영역을 플랭킹하는 DNA 서열에 상동성인 DNA에 의해 프로모터-유전자 연결이 양쪽 말단에서 플랭킹되도록 플라스미드 작제물에 위치될 수 있다. 생성된 플라스미드 작제물은 이. 콜라이 박

테리아 내에서 증식에 의해 증폭되고, 단리될 수 있다. 삽입될 DNA 유전자 서열을 함유하는 분리된 플라스미드는 배양물이 MVA 바이러스로 감염되는 것과 동시에, 예를 들어 닭 배아 섬유아세포(CEF)의 세포 배양물에 형질 감염될 수 있다. 플라스미드와 바이러스 계놈 각각의 동종 MVA 바이러스 DNA 간의 재조합은 외래 DNA 서열의 존재에 의해 변형된 폭스바이러스를 생성할 수 있다.

[0165] 바람직한 실시형태에 따르면, 적합한 세포 배양물의 세포, 예를 들어, CEF 세포는 MVA 바이러스로 감염될 수 있다. 감염된 세포는 바람직하게는 폭스바이러스 발현 조절 요소의 전사 조절 하에서, 후속적으로 외래 또는 이중 유전자 또는 유전자들, 예컨대 본 개시내용에서 제공된 핵산 중 하나 이상을 포함하는 제1 플라스미드 벡터로 형질감염될 수 있다. 상기 설명된 바와 같이, 플라스미드 벡터는 또한 MVA 바이러스 계놈의 선택된 부분 내로의 외인성 서열의 삽입을 지시할 수 있는 서열을 포함한다. 선택적으로, 플라스미드 벡터는 또한 폭스바이러스 프로모터에 작동가능하게 연결된 마커 및/또는 선택 유전자를 포함하는 카세트를 함유한다. 적합한 마커 또는 선택 유전자는 예를 들어 녹색 형광 단백질, β -갈락토시다제, 네오마이신-포스포리보실트랜스퍼라제 또는 기타 마커를 암호화하는 유전자이다. 선택 또는 마커 카세트의 사용은 생성된 재조합 폭스바이러스의 식별 및 단리를 단순화한다. 그러나, 재조합 폭스바이러스는 PCR 기술로도 식별될 수 있다. 후속적으로, 추가의 세포는 상기 기재된 바와 같이 수득된 재조합 폭스바이러스로 감염되고 제2 외래 또는 이중 유전자 또는 유전자들을 포함하는 제2 벡터로 형질감염될 수 있다. 이 유전자가 폭스바이러스 계놈의 다른 삽입 부위에 도입되어야 하는 경우, 제2 벡터는 또한 폭스바이러스 계놈으로의 제2 외래 유전자 또는 유전자들의 통합을 지시하는 폭스바이러스-상동 서열이 상이하다. 상동 재조합이 발생한 후, 2개 이상의 외래 또는 이중 유전자를 포함하는 재조합 바이러스가 단리될 수 있다. 추가 외래 유전자를 재조합 바이러스에 도입하기 위해, 감염을 위한 이전 단계에서 단리된 재조합 바이러스를 사용하고 형질감염을 위한 추가 외래 유전자 또는 유전자들을 포함하는 추가 벡터를 사용함으로써 감염 및 형질감염 단계가 반복될 수 있다.

[0166] 대안적으로, 상기 기재된 바와 같은 감염 및 형질감염 단계는 상호교환가능하며, 즉 적합한 세포가 외래 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터에 의해 먼저 형질감염된 다음, 폭스바이러스로 감염될 수 있다. 추가 대안으로서, 각각의 외래 유전자를 상이한 바이러스에 도입하고, 수득된 모든 재조합 바이러스로 세포를 공동 감염시키고, 모든 외래 유전자를 포함하는 재조합물을 스크리닝하는 것도 가능하다. 세 번째 대안은 시험관 내에서 DNA 계놈 및 외래 서열의 결합 및 헬퍼 바이러스를 사용한 재조합 백신이나 바이러스 DNA 계놈의 재구성이다. 네 번째 대안은 박테리아 인공 염색체(BAC)로 클로닝된 MVA 바이러스 계놈과 MVA 바이러스 계놈에서 원하는 통합 부위에 플랭킹하는 서열에 상동성인 DNA 서열에 플랭킹된 선행 외래 서열 사이의 이. 콜라이 또는 다른 박테리아 종에서 상동 재조합이다.

[0167] 본 개시내용의 하나 이상의 핵산은 MVA 바이러스 또는 MVA 바이러스 벡터의 임의의 적합한 부분에 삽입될 수 있다. MVA 바이러스의 적합한 부분은 MVA 계놈의 비필수적인 부분이다. MVA 계놈의 비필수적인 부분은 MVA 계놈의 유전자간 영역 또는 알려진 결실 부위 1-6일 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 재조합 MVA의 비필수 부분은 바이러스 성장에 비필수적인 MVA 계놈의 코딩 영역일 수 있다. 그러나, 본 발명의 핵산(예를 들어, HER2, 브라큐리, HERV-K-env, HERV-K-gag, PRAME, FOLR1, 및 CD40L 및/또는 4-1BBL) 및 본원에 기재된 임의의 동반 프로모터가 닭 배아 섬유아세포(CEF 세포)와 같은 적어도 하나의 세포 배양 시스템에서 증폭 및 증식될 수 있는 재조합체를 얻을 수 있는 한 바이러스 계놈의 어느 곳에나 삽입될 수 있는 것이 본 발명의 범위 내에 있으므로, 삽입 부위는 MVA 계놈의 이러한 바람직한 삽입 부위로 제한되지 않는다.

[0168] 바람직하게는, 본 발명의 핵산은 MVA 바이러스의 하나 이상의 유전자간 영역(IGR)에 삽입될 수 있다. 용어 "유전자간 영역"은 바람직하게는 MVA 바이러스 계놈의 2개의 인접한 오픈 리딩 프레임(ORF) 사이, 바람직하게는 MVA 바이러스 계놈의 2개의 필수 ORF 사이에 위치한 바이러스 계놈의 부분을 지칭한다. MVA의 경우, 특정 실시형태에서, IGR은 IGR 07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, 및 IGR 148/149로부터 선택된다.

[0169] MVA 바이러스의 경우, 뉴클레오타이드 서열은 추가로 또는 대안적으로 공지된 결실 부위, 즉, MVA 계놈의 결실 부위 I, II, III, IV, V, 또는 VI 중 하나 이상에 삽입될 수 있다. "공지된 결실 부위"라는 용어는 Meisinger-Henschel *et al.* ((2007) *J. Gen. Virol.* 88: 3249-3259)에 기재된 바와 같이, MVA가 유래된 모 바이러스, 특히 모 용모요막 백신이나 바이러스 양카라(CVA)의 계놈과 관련하여 계대 516에서 특성화된 CEF 세포에 대한 연속 계대를 통해 결실된 MVA 계놈의 부분을 지칭한다.

[0170] **백신**

[0171] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 재조합 MVA는 백신의 일부로서 제형화될 수 있다. 백신 제조를 위해, MVA 바이러스는 생리학적으로 허용되는 형태로 전환될 수 있다.

- [0172] 예시적인 제조는 다음과 같다. 정제된 바이러스는 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4에서 제형화된 5×10^8 TCID50/ml의 역가로 -80°C 에서 저장된다. 백신 주사 준비를 위해, 예를 들어 $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ 입자의 바이러스는 2% 펩톤 및 1% 인간 알부민이 있는 인산염 완충 식염수(PBS)에서 앰플, 바람직하게는 유리 앰플에 동결건조될 수 있다. 대안적으로, 백신 주사는 제형 내 바이러스의 단계적 동결-건조에 의해 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 제형은 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토스, 폴리비닐피롤리돈과 같은 추가 첨가제, 또는 생체 내 투여에 적합한 항산화제 또는 불활성 기체, 안정화제 또는 재조합 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민)과 같은 다른 첨가제를 함유한다. 그런 다음 앰플을 밀봉하고 적합한 온도, 예를 들어 4°C 와 실온 사이에서 몇 개월 동안 보관할 수 있다. 그러나, 필요하지 않은 한, 앰플은 바람직하게는 -20°C 이하, 가장 바람직하게는 -80°C 의 온도에서 보관된다.
- [0173] 백신접종 또는 요법과 관련된 다양한 실시형태에서, 동결건조물은 0.1 내지 0.5 ml의 수용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 10 mM Tris, 140 mM NaCl pH 7.7과 같은 Tris 완충액에 용해된다. 본 개시내용의 재조합 MVA, 백신 또는 약제학적 조성물은 10^4 내지 10^{10} TCID50/ml, 10^5 내지 5×10^9 TCID50/ml, 10^6 내지 5×10^9 TCID50/ml, 또는 10^7 내지 5×10^9 TCID50/ml의 농도 범위로 용액내에 제형화될 수 있다. 인간에 대한 바람직한 용량은 10^6 TCID50, 10^7 TCID50, 10^8 TCID50, 5×10^8 TCID50, 10^9 TCID50, 5×10^9 TCID50, 또는 10^{10} TCID50의 용량을 포함하여 10^6 내지 10^{10} TCID50을 포함한다. 투여량 및 투여 횟수의 최적화는 당업자의 기술 및 지식 범위 내에 있다.
- [0174] 하나 이상의 바람직한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같이, 재조합 MVA는 암 환자에게 정맥내로 투여된다. 다른 실시형태에서, 재조합 MVA는 암 환자에게 종양내 투여된다. 다른 실시형태에서, 재조합 MVA는 암 환자에게 정맥내 및 종양내 둘 다를 동시에 또는 상이한 시간에 투여된다.
- [0175] 일부 실시형태에서, MVA는 TAA 및 공동-자극 분자 둘 다를 함유하도록 설계되고, 정맥내 또는 종양내, 또는 둘 모두의 투여 경로를 통한 투여에 적합하도록 의도된다. 이러한 MVA는 예를 들어 HERV-K-env, HERV-K-gag 또는 HERV-K-me1과 같은 인간 내인성 레트로바이러스(HERV-K)의 K 슈퍼패밀리의 단백질 또는 실시예 38에 기재된 것과 같은 이의 합성 변이체를 포함하는 하나 이상의 TAA를 발현할 수 있다.
- [0176] 추가 실시형태에서, 재조합 MVA는 환자에게 투여되고 또한 면역 관문 길항제 또는 작용제, 또는 바람직하게는 항체는 전신적으로 또는 국소적으로, 즉, 복강내, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비강내, 피내, 또는 숙련된 의사에게 알려진 임의의 다른 투여 경로로 투여될 수 있다.
- [0177] 키트, 조성물 및 사용 방법. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 a) 본원에 기재된 핵산을 포함하는 재조합 MVA 및/또는 b) 본원에 기재된 하나 이상의 항체를 포함하는 키트, 약제학적 조합물, 약제학적 조성물, 및/또는 면역원성 조합물을 포함한다.
- [0178] 키트 및/또는 조성물은 재조합 MVA 및 항체의 투여 지침서와 함께, 본 개시내용의 재조합 폭스바이러스의 하나 이상의 용기 또는 바이알, 본 개시내용의 항체의 하나 이상의 용기 또는 바이알을 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 보다 특정한 실시형태에서, 키트는 1차 프라이밍 투여에서 재조합 MVA 및 항체를 투여한 다음, 재조합 MVA 및 항체의 1회 이상의 후속 부스팅 투여를 투여하기 위한 지침서를 포함할 수 있는 것으로 고려된다.
- [0179] 본원에서 제공되는 키트 및/또는 조성물은 일반적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용되고/되거나 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 보존제, 희석제 및/또는 안정화제를 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질은 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등일 수 있다. 적합한 담체는 전형적으로 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체 등과 같은 크고 천천히 대사되는 분자이다.
- [0180] 특정 예시적 실시형태
- [0181] 실시형태 1은 양성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백신인 양카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법이며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해 양성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨

다.

- [0182] 실시형태 2는 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법이며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 향상시킨다.
- [0183] 실시형태 3은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법이며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA 및 4-1BBL 항원 자체의 투여에 비해 대상체에서 종양 감소를 증가시키고/시키거나 전체 생존을 증가시킨다.
- [0184] 실시형태 4는 대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법으로서, 제1 이중 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, 방법이며, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 이중 종양-관련 항원 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비종양내 주사에 의해 생성된 염증 반응에 비해 향상된 종양내 염증 반응을 생성한다. 이러한 향상된 염증 반응은 본원의 다른 곳에서 논의되며, 예를 들어 NK 세포 및 T 세포의 유도를 포함할 수 있다.
- [0185] 실시형태 5는 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 내인성 레트로바이러스 항원(ERV)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법이며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA 및 4-1BBL 항원의 자체의 투여에 비해 대상체에서 종양 감소를 증가시키고/시키거나 전체 생존을 증가시킨다.
- [0186] 실시형태 6은 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 대상체는 인간이다.
- [0187] 실시형태 7은 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 TAA는 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질이다.
- [0188] 실시형태 8은 실시형태 7에 따른 방법으로서, 여기서 ERV는 종양 세포에서 발현되는 ERV 단백질이다.
- [0189] 실시형태 9는 실시형태 7 또는 8에 따른 방법으로서, 여기서 ERV는 인간 내인성 레트로바이러스 단백질 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래한다.
- [0190] 실시형태 10은 실시형태 9에 따른 방법으로서, 여기서 HERV-K 단백질은 HERV-K 외피 단백질, HERV-K gag 단백질, 및 HERV-K me1 단백질로부터 선택된다.
- [0191] 실시형태 11은 실시형태 9에 따른 방법으로서, 여기서 HERV-K 단백질은 HERV-K 외피 단백질, HERV-K gag 단백질, HERV-K me1 캡타이드, 및 이의 번역원성 단편으로부터 선택된다.
- [0192] 실시형태 12는 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 TAA는 암배아 항원(CEA), 뮤신 1 세포 표면 결합(MUC-1), 전립선 산 포스파타제(PAP), 전립선 특이적 항원(PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 서바이빈, 티로신 관련 단백질 1(TRP1), 티로신 관련 단백질 1(TRP2), 브라큐리, FOLR1, PRAME, p15, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0193] 실시형태 13은 실시형태 1 내지 6 및 12 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 TAA는 암배아 항원(CEA) 및 뮤신 1 세포 표면 결합(MUC-1)으로 구성된 군으로부터 선택되거나, 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같은 AH1A5, p15E 및 TRP2의 합성물 또는 조합인 TAA이다.
- [0194] 실시형태 14는 실시형태 1 내지 6 및 12 중 어느 하나에 따른 방법이며, 여기서 TAA는 PAP 또는 PSA로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0195] 실시형태 15는 실시형태 1 내지 6, 12, 및 14 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 TAA는 PSA이다.
- [0196] 실시형태 16은 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 TAA는 5- α -리덕타제, α -태아단백질(AFP), AM-1, APC, April, B 흑색종 항원 유전자(BAGE), β -카테닌, Bcl12, bcr-abl, 브라큐리, CA-125, 카

스파제-8(CASP-8, FLICE로도 알려짐), 카텝신, CD19, CD20, CD21/보체 수용체 2(CR2), CD22/BL-CAM, CD23/Fc ϵ RII, CD33, CD35/보체 수용체 1(CR1), CD44/PGP-1, CD45/백혈구 공통 항원("LCA"), CD46/막 보조인자 단백질(MCP), CD52/CAMPATH-1, CD55/부패 촉진 인자(DAF), CD59/프로텍틴, CDC27, CDK4, 암배아 항원(CEA), c-myc, 결장직장암 유전자("DCC")에서 결실된, 사이클로옥시게나제-2(cox-2), DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파르네실 전이효소, 섬유아세포 성장 인자-8a(FGF8a), 섬유아세포 성장 인자-8b(FGF8b), FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, G 흑색종 항원 유전자 패밀리(GAGE 패밀리), 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, 강글리오사이드 2(GD2)/강글리오사이드 3(GD3)/강글리오사이드-모노시알산-2("GM2"), 성선자극호르몬 방출 호르몬(GnRH), UDP-GlcNAc:R1Man(α 1-6)R2[GlcNAc에서 Man(α 1-6)으로] β 1,6-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V(GnTV), GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75/티로신-관련 단백질-1(gp75/TRP-1), 인간 융모막 성선자극 호르몬(hCG), 헤파라나제, HER2, 인간 유선 종양 바이러스(HMTV), 70 킬로달톤 열충격 단백질("HSP70"), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인슐린-유사 성장 인자 수용체-1(IGFR-1), 인터루킨-13 수용체(IL-13R), 유도성 질산산화물 합성효소(iNOS), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, 흑색종 항원-암호화 유전자 1(MAGE-1), 흑색종 항원-암호화 유전자 2(MAGE-2), 흑색종 항원-암호화 유전자 3(MAGE-3), 흑색종 항원-암호화 유전자 4(MAGE-4), 맘마글로빈, MAP17, T-세포-1(MART-1)에 의해 인식되는 멜란-A/흑색종 항원, 메조텔린, MIC A/B, MT-MMP, 뮤신, 고환-특이적 항원 NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), μ PA, PRAME, 프로바신, 프로체니포이에틴, 전립선-특이적 항원(PSA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-패밀리, STAT3, STn, TAG-72, 형질전환 성장 인자-알파(TGF- α), 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β), 티모신-베타-15, 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), TP1, TRP-2, 티로시나제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), ZAG, p16INK4 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST). 암배아항원(CEA), 점액1 세포표면결합(MUC-1), 전립선산포스파타제(PAP), 전립선특이항원(PSA), 인간표피성장인자수용체 2(HER-2), 서바이빈, 티로신 관련 단백질 1(TRP1), 티로신 관련 단백질 1(TRP2), 브라큐리 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0197] 실시형태 17은 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 재조합 MVA는 CD40L 항원을 암호화하는 제3 핵산을 추가로 포함한다.
- [0198] 실시형태 18은 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 적어도 하나의 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0199] 실시형태 19는 실시형태 18에 따른 방법으로서, 여기서 면역 관문 분자는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 및 ICOS로부터 선택된다.
- [0200] 실시형태 20은 실시형태 18 내지 19 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 면역 관문 분자는 PD-1 및/또는 PD-L1이다.
- [0201] 실시형태 21은 실시형태 20에 따른 방법으로서, 여기서 면역 관문 분자 길항제는 LAG-3의 길항제를 추가로 포함한다.
- [0202] 실시형태 22는 실시형태 18 내지 21 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 면역 관문 분자 길항제는 항체를 포함한다.
- [0203] 실시형태 23은 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 제2 TAA에 특이적인 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0204] 실시형태 24는 실시형태 23에 따른 방법으로서, 제2 TAA에 특이적인 항체는 종양의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적이다.
- [0205] 실시형태 25는 실시형태 23에 따른 방법으로서, 여기서 제2 TAA에 특이적인 항체는 a) 종양의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적이고 b) Fc 도메인을 포함한다.
- [0206] 실시형태 26은 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 따른 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물이다.
- [0207] 실시형태 27은 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 따른 방법에서 사용하기 위한 백신이다.
- [0208] 실시형태 28은 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 재조합 변형된 백신이나 양카라(MVA)로서, 재조합 MVA는 a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 b) 4-1BBL을 암호화하는 제2 핵산을 포함한다.
- [0209] 실시형태 29는 실시형태 28에 따른 재조합 MVA로서, 여기서 TAA는 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질이다.

- [0210] 실시형태 30은 실시형태 29에 따른 재조합 MVA로서, 여기서 ERV 단백질은 인간 내인성 레트로바이러스 단백질 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래한다.
- [0211] 실시형태 31은 실시형태 30에 따른 재조합 MVA로서, 여기서 레트로바이러스 단백질 K는 HERV-K 외피 단백질, HERV-K gag 단백질, 및 HERV-K me1 단백질로부터 선택된다.
- [0212] 실시형태 32는 실시형태 28 내지 31 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA로서, CD40L을 암호화하는 제3 핵산을 추가로 포함한다.
- [0213] 실시형태 33은 a) 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA 및 b) 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제 중 적어도 하나를 포함하는 약제학적 조합물이다.
- [0214] 실시형태 34는 실시형태 33에 따른 약제학적 조합물로서, 여기서 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 및 ICOS의 길항제 또는 작용제로부터 선택된다.
- [0215] 실시형태 35는 실시형태 34에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 면역 관문 분자 길항제가 PD-1 및/또는 PD-L1의 길항제이다.
- [0216] 실시형태 36은 실시형태 35에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 면역 관문 분자 길항제가 LAG-3의 길항제를 추가로 포함한다.
- [0217] 실시형태 37은 실시형태 33 내지 36 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 여기서 면역 관문 분자 길항제는 항체를 포함한다.
- [0218] 실시형태 38은 a) 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA b) 제2 TAA에 특이적인 항체를 포함하는 약제학적 조합물이다.
- [0219] 실시형태 39는 실시형태 38에 따른 약제학적 조합물로서, 여기서 제2 TAA에 특이적인 항체는 종양의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적이다.
- [0220] 실시형태 40은 실시형태 39에 따른 약제학적 조합물로서, 제2 TAA에 특이적인 항체가 a) 종양의 세포막 상에서 발현되는 항원에 특이적이고, b) Fc 도메인을 포함한다.
- [0221] 실시형태 41은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기 감소 및/또는 생존 증가에 사용하기 위한 것이다.
- [0222] 실시형태 42는 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기 감소 및/또는 생존 증가를 위한 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 방법은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 또는 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물을 대상체에 종양내 투여하는 단계를 포함하고, 이의 종양내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해, 암성 종양의 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시킴거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.
- [0223] 실시형태 43은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기 감소 및/또는 생존 증가를 위한 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 방법은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 또는 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물을 대상체에 정맥내 투여하는 단계를 포함하고, 이의 정맥내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해, 종양 감소를 증가시키고/시킴거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.
- [0224] 실시형태 44는 암 대상체의 암성 종양에서 향상된 염증 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 방법은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 또는 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물을 대상체에 종양내 투여하는 단계를 포함하고, 이의 종양내 투여는 TAA 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-종양내 주사에 비해, 대상체의

암성 종양에서 염증 반응을 개선시킨다.

- [0225] 실시형태 45는 대상체의 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물이다.
- [0226] 실시형태 46은 암 치료 방법에 사용하기 위한 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물이며, 상기 암은 유방암, 폐암, 두경부암, 갑상선, 흑색종, 위암, 방광암, 신장암, 간암, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 요로상피암, 자궁경부암 또는 결장직장암으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0227] 실시형태 47은 실시형태 44에 따른 재조합 MVA로서, 여기서 향상된 염증 반응은 종양에 국한된다.
- [0228] 실시형태 48은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 재조합 MVA의 종양내 투여는 TAA 및 CD40L을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비종양내 주사에 비해 암성 종양의 염증 반응을 향상시키고, 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.
- [0229] 실시형태 49는 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 정맥내 투여는 TAA 및 CD40L 항원을 암호화하는 제1 및 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 비-정맥내 주사에 비해 자연 킬러(NK) 세포 반응을 향상시키고 TAA에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 향상시킨다.
- [0230] 실시형태 50은 암성 종양을 갖는 대상체에서 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 앙카라(MVA)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 재조합 MVA의 투여는 재조합 MVA 및 CD40L 항원 자체의 투여에 비해 종양 감소를 증가시키고/시키거나 대상체의 전체 생존을 증가시킨다.
- [0231] 실시형태 51은 암성 종양을 갖는 대상체의 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 방법은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 또는 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물을 대상체에게 정맥내 및/또는 종양내 투여하는 단계를 포함하고, 상기 정맥내 및/또는 종양내 투여는 1) TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스; 2) TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스; 또는 3) TAA를 암호화하는 제1 핵산, 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 CD40L 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 군으로부터 선택되는 임의의 MVA의 비-정맥내 또는 비-종양내 투여에 비해 대상체의 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 전체 생존을 증가시킨다.
- [0232] 실시형태 52는 암성 종양을 갖는 대상체의 종양 크기를 감소시키고/시키거나 생존을 증가시키는 방법에 사용하기 위한, 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나에 따른 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물로서, 상기 방법은 실시형태 28 내지 32 중 어느 하나의 재조합 MVA, 실시형태 27에 따른 백신, 실시형태 26에 따른 약제학적 조성물, 또는 실시형태 33 내지 40 중 어느 하나에 따른 약제학적 조합물을 대상체에게 정맥내 및 종양내 투여하는 단계를 포함하고, 상기 정맥내 및 종양내 투여는 1) TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스; 2) TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 CD40L 항원을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스; 또는 3) TAA를 암호화하는 제1 핵산, 4-1BBL 항원을 암호화하는 제2 핵산, 및 CD40L 항원을 암호화하는 제3 핵산을 포함하는 재조합 MVA 바이러스의 군으로부터 선택되는 임의의 MVA의 비-정맥내 또는 비-종양내 투여에 비해 대상체의 종양 감소를 증가시키고/시키거나, 전체 생존을 증가시킨다. 상기 정맥내 및 종양내 투여는 당업자에게 명백한 바와 같이 동시에 또는 상이한 시간에 수행될 수 있다.

[0233] **추가 실시형태**

[0234] 한 양태에서, 본 발명은:

- [0235] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산;
- [0236] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산; 및
- [0237] (c) TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산
- [0238] 을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA)를 제공한다.
- [0239] 한 실시형태에서, 상기 재조합 MVA는:
- [0240] (d) CD40 리간드(CD40L)를 암호화하는 핵산
- [0241] 을 추가로 포함한다.
- [0242] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 각각 상이한 TAA를 암호화하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 이상의 핵산을 포함한다.
- [0243] 재조합 MVA의 한 실시형태에서, TAA는 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질, 내인성 레트로바이러스(ERV) 펩타이드, 암배아 항원(CEA), 뮤신 1 세포 표면 결합(MUC-1), 전립선 산 포스파타제(PAP), 전립선 특이적 항원(PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2), 서바이빈, 티로신 관련 단백질 1(TRP1), 티로신 관련 단백질 1(TRP2), 브라큐리, p15, AH1A5, 엽산 수용체 알파 1(FOLR1), 흑색종에서 우선적으로 발현된 항원(PRAME), 및 MEL; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0244] 재조합 MVA의 한 실시형태에서, ERV 단백질은 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피(HERV-K-env) 단백질 및 HERV-K gag 단백질로부터 선택된다.
- [0245] 재조합 MVA의 한 실시형태에서, ERV 펩타이드는 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피 단백질(HERV-K-env/MEL)의 유사유전자로부터 선택된다.
- [0246] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0247] (i) HERV-K-env/MEL을 암호화하는 핵산;
- [0248] (ii) HERV-K gag를 암호화하는 핵산;
- [0249] (iii) 바람직하게는 융합 단백질로서 발현되는 FOLR1 및 PRAME를 암호화하는 핵산; 및
- [0250] (iv) 4-1BBL을 암호화하는 핵산
- [0251] 을 포함하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA)를 제공한다.
- [0252] 한 실시형태에서, 상기 재조합 MVA는:
- [0253] (v) CD40L을 암호화하는 핵산을 추가로 포함한다.
- [0254] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 HERV-K-env 표면(SU) 및 막횡단(TM) 단위를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화하며, 여기서 TM 단위는 돌연변이되고, 바람직하게는 여기서 TM 단위가 돌연변이되어 면역억제 도메인이 비활성화된다. 바람직하게는, HERV-K-MEL은 돌연변이된 TM 단위 내에 삽입된다. 보다 바람직하게는, HERV-K-MEL은 TM 단위의 면역억제 도메인의 일부를 대체한다.
- [0255] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 7에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0256] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 8에 나타난 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0257] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 HERV-K-env 표면(SU) 및 막횡단(TM) 단위를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화하며, 여기서 TM 단위는 20개 미만의 아미노산, 바람직하게는 10개 미만의 아미노산, 더욱 바람직하게는 8개 미만의 아미노산, 가장 바람직하게는 6개의 아미노산으로 단축된다.
- [0258] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 HERV-K-env 표면(SU) 단위를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화하며, 여기서 HERV-K-env SU 단위의 RSKR 푸린 절단 부위는 결실된다. 바람직하게는, HERV-K-MEL은 HERV-K-env SU 단위의 C-말단에 부착된다.
- [0259] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 바람직하게는 인간 PDGF(혈소판-유래 성장 인자) 수용체로부터 유래된 이중성

막 앵커를 포함하는 HERVK-env/MEL을 암호화한다.

- [0260] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 11에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0261] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 12에 나타난 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0262] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 MVA-BN으로부터 유래된다.
- [0263] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 재조합 MVA를 포함하는 약제학적 제제 또는 조성물을 제공한다.
- [0264] 한 실시형태에서, 약제학적 제제 또는 조성물은 종양내 및/또는 정맥내 투여, 바람직하게는 종양내 투여에 적합화된다.
- [0265] 또 다른 양태에서, 본 발명은 의약 또는 백신으로서 사용하기 위한 재조합 MVA를 제공한다.
- [0266] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 바람직하게는 흑색종, 유방암, 결장암 또는 난소암의 치료에 사용하기 위한 재조합 MVA를 제공한다.
- [0267] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암성 종양에서 염증 반응을 향상시키고, 암성 종양의 크기를 감소시키고, 암성 종양의 성장을 지연 또는 정지시키고/시키거나, 바람직하게는 인간인, 대상체의 전체 생존을 증가시키는 데 사용하기 위한 본 발명의 재조합 MVA를 제공한다.
- [0268] 한 실시형태에서, 사용을 위한 재조합 MVA는 종양내 및/또는 정맥내, 바람직하게는 종양내 투여된다.
- [0269] 23. 한 실시형태에서, 사용하기 위한 재조합 MVA는 TAA 특이적 항체와 조합하여 사용된다.
- [0270] 24. 한 실시형태에서, 사용을 위한 재조합 MVA는 면역 관문 분자 길항제 또는 작용제와 조합하여 사용된다.
- [0271] 또 다른 양태에서, 본 발명은 투여된 재조합 MVA가 본 발명에 따른 재조합 MVA인 치료 방법을 제공한다.

[0272] 실시예

- [0273] 하기 실시예는 본 발명을 예시하지만, 청구범위의 범위를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0274] 실시예 1: 재조합 MVA-TAA-4-1BBL 및 MVA-TAA-CD40L의 작제

- [0275] 본 개시내용의 요소를 구현하는 재조합 MVA 바이러스의 생성은 벡터 MVA-BN 내로 그들의 프로모터를 갖는 지시된 이식유전자의 삽입에 의해 수행되었다. MVA-BN 내의 표적화된 유전자좌와 상동성인 서열 뿐만 아니라 이식유전자 및 선택 카세트를 함유하는 재조합 플라스미드를 사용하여 이식유전자를 삽입하였다. 바이러스 계놈과 재조합 플라스미드 사이의 상동 재조합은 재조합 플라스미드를 MVA-BN 감염된 CEF 세포로 형질감염시킴으로써 달성되었다. 그런 다음, 선택 카세트는 CRE-재조합효소를 발현하는 플라스미드의 도움으로 두 번째 단계 동안 결실되었으며, 이는 선택 카세트 측면에 있는 loxP 부위를 특이적으로 표적화하여, 개재 서열을 절단한다. 대안적으로, 선택 카세트의 결실은 MVA-유래 내부 반복 서열을 사용한 MVA-매개 재조합에 의해 달성되었다.
- [0276] MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL의 작제를 위해 재조합 플라스미드는 각각 프로모터 서열뿐만 아니라, MVA-BN 내의 표적화된 삽입 부위와 동일한 서열이 선행되는 이식유전자 OVA 또는 OVA 및 4-1BBL을 포함하여, 바이러스 계놈으로의 상동 재조합을 허용한다.
- [0277] MVA-OVA-CD40L의 작제를 위해 재조합 플라스미드는 각각 프로모터 서열뿐만 아니라, MVA-BN 내의 표적화된 삽입 부위와 동일한 서열이 선행되는 이식유전자 OVA 및 CD40L을 포함하여, 바이러스 계놈으로의 상동 재조합을 허용한다.
- [0278] MVA-gp70-4-1BBL의 작제를 위해, 재조합 플라스미드는 각각 프로모터 서열뿐만 아니라 MVA-BN 내의 표적화된 삽입 부위와 동일한 서열이 선행되는 2개의 이식유전자 gp70 및 4-1BBL을 포함하여, 바이러스 계놈으로의 상동 재조합을 허용한다.
- [0279] MVA-HERV-K, MVA-HERV-K-4-1BBL, 및 MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L의 작제를 위해, 재조합 플라스미드는 각각 HERV-K, HERV-K 및 4-1BBL, 및 HERV-K, 4-1BBL 및 CD40L 이식유전자를 포함하였다. 각각의 이식유전자 또는 이식유전자 세트는 프로모터 서열뿐만 아니라 MVA-BN 내의 표적화된 삽입 부위와 동일한 서열이 선행되어, 바이러스 계놈으로의 상동 재조합을 허용한다.

- [0280] MVA-AH1A5-p15E-TRP2 및 MVA-AH1A5-p15E-TRP2-CD40L의 작제를 위해, 재조합 플라스미드는 각각 프로모터 서열 뿐만 아니라 MVA-BN 내의 표적화된 삽입 부위와 동일한 서열이 진행되는 이식유전자 AH1A5-p15E-TRP2 또는 AH1A5-p15E-TRP2 및 CD40L을 포함하여, 바이러스 계층으로의 상동 재조합을 허용한다.
- [0281] 상기 기재된 mBN MVA의 생성을 위해, CEF 세포 배양물에 각각 MVA-BN을 접종하고, 상응하는 재조합 플라스미드로 각각 형질감염시켰다. 차례로, 이들 세포 배양물로부터의 샘플을 선택 압력을 유도하는 약물을 함유하는 배지에서 CEF 배양물에 접종하고, 형광-발현 바이러스 클론을 플라크 정제에 의해 분리하였다. 이러한 바이러스 클론에서 형광-단백질-함유 선택 카세트의 손실은 두 번째 단계에서 각 작제물 또는 MVA-매개 내부 재조합에서 선택 카세트 측면에 있는 2개의 loxP 부위를 포함하는 CRE-매개 재조합에 의해 매개되었다. 두 번째 재조합 단계 후에, MVA-BN의 표적화된 유전자좌에 삽입된 프로모터가 있는 이식유전자 서열(예를 들어, OVA, 4-1BBL, gp70, HERV-K 및/또는 CD40L)만 보유되었다. 선택 카세트가 없는 플라크-정제된 바이러스의 스톱을 준비하였다.
- [0282] 확인된 이식유전자의 발현은 기재된 작제물로 접종된 세포에서 입증된다.
- [0283] 본원에 기재된 작제물의 생성은 박테리아 인공 염색체(BAC)에서 클로닝된 버전의 MVA-BN을 사용하여 수행하였다. 재조합 플라스미드는 각각 프로모터의 하류에 기재된 이식유전자 서열을 함유하였다. 플라스미드는 MVA에도 존재하는 서열을 포함하므로, 통합 부위의 특정 표적화를 허용한다. 간단히 말해서, 감염성 바이러스는 BAC DNA를 BHK-21 세포에 형질감염시키고 이들을 헬퍼 바이러스로서 Shope 섬유종 바이러스로 중복감염시킴으로써 BAC로부터 재구성되었다. CEF 세포 배양에 대한 3회의 추가 계대 후, 헬퍼 바이러스가 없는 버전의 작제물을 얻었다. 예시적인 MVA 생성은 Baur *et al.* ((2010) *Virology* 84: 8743-52, "Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus Ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses")에서도 발견된다.
- [0284] **실시예 2: MVA-OVA-4-1BBL 감염된 종양 세포에 의한 CD8 T 세포의 4-1BBL-매개 공동자극은 DC의 필요 없이 사이토카인 생산에 영향을 미친다**
- [0285] 수지상 세포(DC)는 14일 동안 재조합 F1t3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 배양한 후 생성되었다. B16.F10(흑색종 모델) 세포를 10의 MOI에서 MVA-OVA, MVA-OVA-CD40L 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 감염시키고, 5% CO₂와 함께 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 감염된 종양 세포를 수확하고 DC의 존재 하에 1:1 비율로 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 공동 배양하였다. 나이트 OVA(257-264) 특이적 CD8+ T 세포를 OT-I 마우스로부터 자기적으로 정제하고, 1:5의 비율로 공동 배양물에 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 배양하였다. 그런 다음, Luminex에 의한 사이토카인 농도 분석을 위해 배양 상청액을 수집하였다. 결과는 IL-6(도 1a); GM-CSF(도 1b); IL-2(도 1c); 및 IFN- γ (도 1d)의 상청액 농도로서 도 1에 도시된다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0286] 이전에 보고된 바와 같이, MVA-OVA-CD40L은 DC의 활성화 및 이들의 항원 제시 능력에 큰 영향을 미쳤다. 따라서, MVA-OVA-CD40L-감염된 FLDC는 많은 양의 IL-6을 생성하였다(도 1a). 중요하게도, OVA-특이적 T 세포 반응은 DC의 존재 하에서 독점적으로 유도될 수 있지만, MVA-CD40L 감염된 B16.F10 세포 자체에 의해 직접 유도되지는 않았다(도 1b 및 1c). 이러한 결과는 MVA-OVA-CD40L의 이점을 펼치기 위한 DC의 명확한 요구사항을 보여준다. 대조적으로, MVA-OVA-4-1BBL은 DC에서 IL-6 생산을 유도하지 않았지만, MVA-OVA-4-1BBL-감염된 B16.F10 세포는 DC-의존적 방식에서 T 세포 활성화 사이토카인 IFN- γ , IL-2 및 GM-CSF의 분비를 유발하였다(도 1a-1d).
- [0287] **실시예 3: MVA-OVA-4-1BBL 감염된 종양 세포가 직접(즉, DC의 필요 없이) 항원-특이적 CD8 T 세포를 활성화된 이펙터 T 세포로 분화 유도한다**
- [0288] 수지상 세포(DC)는 14일 동안 재조합 F1t3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 배양한 후 생성되었다. B16.F10(흑색종 모델) 세포를 10의 MOI에서 MVA-OVA, MVA-OVA-CD40L 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 감염시키고, 5% CO₂와 함께 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 감염된 종양 세포를 수확하고 DC의 존재 하에 1:1 비율로 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 공동 배양하였다. 한편, 나이트 OVA(257-264) 특이적 CD8+ T 세포를 OT-I 마우스로부터 자기적으로 정제하고, 1:5의 비율로 공동 배양물에 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 염색하고 유세포 분석으로 분석하였다. 결과는 도 2에 OT-I CD8+ T 세포에 대한 T-bet의 GMFI(도 2a) 및 OT-I CD8+ T 세포의 CD44+ 그랜자임 B+ IFN- γ + TNF α +의 백분율(도 2b)로 표시된다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0289] 결과는 교차-제시 DC의 부재 하에 그랜자임 B+ 및 IFN- γ + 세포독성 이펙터 T 세포의 유도가 4-1BBL에 의존적임을 나타낸다(도 2b). 종합적으로 도 1에 제시된 결과와 함께, 이러한 발견은 DC의 활성화를 통해 작동하는 MVA-

암호화된 CD40L과 대조적으로, MVA에 의해 암호화된 4-1BBL이 DC-독립적인 방식으로 T 세포에 직접 작용한다는 것을 문서화한다.

[0290] **실시예 4: CD40L 또는 4-1BBL을 암호화하는 MVA로의 감염은 종양 세포주 및 대식세포에서 종양 세포 사멸을 유도한다**

[0291] 종양 세포주 B16.OVA(도 3a 및 3b), MC38(도 3c) 및 B16.F10(도 3d)을 표시된 MOI에서 20시간 동안 감염시켰다. 그런 다음, 유세포 분석에 의해 세포의 생존력을 분석하였다. 도 3a의 샘플에서 혈청 HMGB1은 ELISA에 의해 정량화하였다(도 3b). 골수-유래 대식세포(BMDM)를 표시된 MOI에서 20시간 동안 감염시켰다. 그런 다음 세포를 유세포 분석에 의해 그들의 생존력에 대해 분석하였다. 결과는 도 3a-3e에 개시되어 있다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

[0292] 도 3a 및 3b에 도시된 바와 같이, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-CD40L로의 감염은 PBS-처리된 종양 세포와 비교하여 세포 사멸의 약한 유도를 초래하였다. 흥미롭게도, MVA-OVA-4-1BBL에 의한 감염은 감염 18시간 후에 종양 세포 사멸을 유의하게 증가시켰다.

[0293] 비-항원 세포주에서 이러한 결과를 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 MVA, MVA-CD40L 및 MVA-4-1BBL(암호화된 TAA는 없음)로 감염된 MC38(도 3c) 및 B16.F10(도 3d) 종양 세포를 사용하여 유사한 분석을 수행하였다. 일관되게, 이러한 MVA로의 감염은 이러한 종양 세포주에서 세포 사멸을 유도하고, 골수-유래 대식세포(BMDM)를 효율적으로 사멸시켰다(도 3e). 종합하면, 이들 데이터는 CD40L 또는 4-1BBL이 재조합 MVA에 의해 발현될 때 증가된 종양 세포 및 대식세포 사멸을 MVA 감염이 초래한다는 것을 입증하였다.

[0294] 종양 세포의 종양용해성 바이러스 감염은 소위 면역원성 세포 사멸(ICD)의 유도를 초래한다(Workenhe *et al.* (2014) *Mol. Ther.* 22: 251-56). ICD는 면역계에 대한 알라민으로 작용하는 칼레티쿨린, ATP 또는 HMGB1과 같은 세포 내 단백질의 방출을 포함하여, 항원-제시를 향상시켜 항종양 면역을 유도한다. 본 발명자들은 MVA 감염이 분비된 HMGB1을 통해 ICD 유도를 초래하는지 여부를 테스트하였다. 예기치 않게, 본 발명자들은 MVA-OVA-4-1BBL 및 MVA-OVA-CD40L이 MVA-OVA와 비교하여 HMGB1의 상당한 증가를 유도한다는 것을 발견하였다(도 3b).

[0295] **실시예 5: 4-1BBL을 암호화하는 MVA는 생체내에서 NK 세포 활성화를 유도한다**

[0296] C57BL/6 마우스(n=5/그룹)는 식염수 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA(도 4에서 "rMVA"), 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL(도 4에서 "rMVA-4-1BBL") 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체와 결합된 5×10^7 TCID50 MVA-OVA(클론 TKS-1)로 정맥내로 면역화하였다. 24시간 후, 마우스를 희생시키고, 유세포 분석을 위해 비장을 처리했다. 결과는 도 4a 및 도 4b에 도시되어 있다. CD69(도 4a) 및 CD70(도 4b)의 기하학적 평균 형광 강도(GMFI)가 표시된다. 데이터는 2개의 독립적인 실험을 대표하는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

[0297] 결과는 4-1BBL이 없는 MVA-OVA의 IV 투여에 비해 MVA-OVA에 4-1BBL를 첨가함으로써 NK 세포 반응의 품질이 향상되었으며, NK 세포 활성화 마커인 CD69 및 CD70 모두 MVA-OVA에 비해 강력하게 상향 조절되었음을 나타내었다(도 4a 및 4b). 차단 4-1BBL 항체의 동시 주입은 MVA-OVA-유도 NK 세포 활성화가 완전히 4-1BBL-독립적이었지만, MVA-OVA-4-1BBL에 의해 과도한 4-1BBL 신호가 전달될 때 향상될 수 있음을 보여주었다.

[0298] **실시예 6: 4-1BBL을 암호화하는 MVA를 사용한 정맥내 면역화는 생체내 혈청 IFN- γ 분비를 촉진한다**

[0299] C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 식염수 또는 5×10^7 TCID50 "rMVA"(=MVA-OVA), 5×10^7 TCID50 "rMVA-4-1BBL"(=MVA-OVA-4-1BBL), 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체(클론 TKS-1)와 결합된 5×10^7 TCID50 MVA-OVA로 정맥내로 면역화하였다. 결과는 도 5a 및 5b에 도시되어 있다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 도 5a: 6시간 후, 마우스에서 채혈하고, 혈청을 전혈에서 분리하고 혈청 내 IFN- γ 농도를 Luminex로 측정하였다. 도 5b: 3시간, 21시간 및 45시간 후, 단백질 분비를 중지하기 위해 마우스에 브레펠딘 A를 정맥내로 주사하였다. 면역화 후 6, 24 및 48시간 후에 마우스를 희생시키고, 유세포 분석으로 비장세포를 분석하였다.

[0300] 4-1BB-매개 NK 세포 활성화는 NK 이펙터 사이토카인 IFN- γ 의 증가된 혈청 수준과 일치하였다(도 5a). NK 세포는 활성화 시 다량의 IFN- γ 을 생성하는 것으로 알려져 있다. 혈청 내 증가된 IFN- γ 수준이 NK 세포에서 유래할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 표시된 재조합 MVA 벡터의 정맥내 주사 후 다른 시점에서 IFN- γ -생산 NK 세포의 비율을 결정했다. 주사 후 6시간후에 IFN- γ 의 높은 혈청 수준이 측정되었을 때 IFN- γ + NK 세포의 백분율이 가장 높았고, 그 후 천천히 감소했다(도 5b). MVA-OVA-4-1BBL을 사용할 때 IFN- γ 양성 NK 세포의 가장 높은 빈도가 관찰되었다. 종합하면, 이들 데이터는 rMVA-4-1BBL의 정맥내 면역화가 NK 세포의 강력한 활성화를 유도

하고 NK 세포 이펙터 사이토카인 IFN- γ 의 생산을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0301] **실시예 7: 정맥내 rMVA-4-1BBL 면역화는 B16.OVA 종양-보유 마우스에서 혈청 IFN- γ 분비를 촉진한다**

[0302] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일 후 i.v.(정맥내) PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA(도면에서 "rMVA") 또는 MVA-OVA-4-1BBL(도면에서 "rMVA-4-1BBL")을 받았다. 6시간 후, 마우스를 채혈하고, 전혈로부터 혈청을 분리하고, 혈청 내 IFN- γ 농도를 Luminex로 측정하였다. 결과는 도 6에 도시되어 있다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

[0303] 도 6에 나타난 데이터는 다른 실험에서 보고된 것과 유사한 NK 세포에 대한 효과가 흑색종 종양 모델에서도 얻어질 수 있음을 입증한다. 면역화 6시간 후, MVA-OVA-4-1BBL 면역화된 종양-보유 마우스에서 혈청 IFN- γ 수준이 매우 증가하여 강력한 NK 세포 활성화를 나타낸다(도 6).

[0304] **실시예 8: 정맥내 rMVA-4-1BBL 프라임 및 부스트 면역화는 항원- 및 벡터-특이적 CD8+ T 세포 확장을 향상시킨다**

[0305] 도 7a-7d는 정맥내 rMVA-4-1BBL 프라임 및 부스트 면역화 후 항원 및 벡터-특이적임을 나타낸다. C57BL/6 마우스(n=4/그룹)는 0일차에 식염수 또는 5×10^7 TCID50 rMVA(=MVA-OVA), 5×10^7 TCID50 rMVA-4-1BBL(=MVA-OVA-4-1BBL) 또는 200 μ g 항 4-1BBL 항체(클론 TKS-1)와 결합된 5×10^7 TCID50 rMVA로 정맥 내 프라임 면역 및 41일차에 부스트 면역화를 받았다. 프라임 면역화 후 6, 21, 35, 48 및 64일차에 마우스를 채혈하고 말초혈액의 유세포분석을 수행하였다. 프라임 면역화 후 70일차에 마우스를 희생시켰다. 비장을 수확하고 유세포 분석을 수행하였다.

[0306] 결과는 도 7a-7d에 도시되어 있다. 도 7a는 말초 혈액 백혈구(PBL) 중 항원(OVA)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타내고, 도 7b는 PBL 중 벡터(B8R)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 도 7c는 살아있는 세포 중 항원(OVA)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 예시한다. 도 7d는 살아있는 세포 중 벡터(B8R)-특이적 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

[0307] 결과는 B8- 및 OVA-특이적 CD8 T 세포가 1차 면역화 후 7일차에 최대치에 도달하였고, 41일차 2차 면역화 후에 추가로 확장되었음을 나타낸다(도 7a 및 7b). 41일차 시점에서, B8 및 OVA 모두에 대해 rMVA와 비교할 때 항원-특이적 T 세포 반응의 관점에서 rMVA-4-1BBL의 분명한 이점이 있었다. 흥미롭게도, 차단 4-1BBL 항체의 공동 주사는 rMVA-유도 T 세포 반응이 완전히 4-1BBL-독립적이었지만, rMVA-4-1BBL에 의해 과도한 4-1BBL 신호가 전달되었을 때 향상될 수 있음을 보여주었다(도 7a 및 7b). 이러한 결과와 일치하게, rMVA-4-1BBL 프라임/부스트 면역화는 또한 첫 번째 면역화 70일 후 비장에서 개선된 OVA- 및 B8-특이적 T 세포 반응을 초래했다(도 7c 및 7d).

[0308] **실시예 9: TAA 및 4-1BBL을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 주사의 항종양 효과 증가**

[0309] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일차(검은색 점선) PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL을 i.v.(정맥내) 받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 4-1BBL을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 투여는 종양 성장의 연장된 지연의 결과로서 MVA 또는 대조군(PBS)과 비교하여 종양 부피의 감소를 초래하였다.

[0310] **실시예 10: 4-1BBL 또는 CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 종양내 주사의 향상된 항종양 효과**

[0311] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=4-5/그룹)를 그룹화하고, PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-OVA(도면에서 "rMVA"), MVA-OVA-CD40L(도면에서 "rMVA-CD40L"), 또는 MVA-OVA-4-1BBL(도면에서 "rMVA-4-1BBL")을 종양 접종 후 7일차(검은색 점선), 12 및 15일(회색 파선)에 종양내(i.t.) 제공받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정하였다. 도 9a-9d에 도시된 바와 같이, TAA 및 4-1BBL 또는 CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 종양내 주사를 통해 향상된 항종양 효과가 실현되었다. 보다 구체적으로, 도 9d에 도시된 바와 같이, 4-1BBL을 암호화하는 MVA 바이러스에서 종양 성장의 상당히 더 큰 감소가 관찰되었다. 본 발명이 특정 메커니즘이나 작용 방식에 구속되지는 않지만, 4-1BBL과 CD40L 사이에서 관찰된 차이점에 대한 한 가지 가설은 4-1BBL이 NK 세포 및 T 세포를 활성화하는 것을 목표로 하는 반면 CD40L이 DC를 활성화하는 것을 목표로 한다는 것이다. B16 흑색종 종양은 T 세포로 더 침윤되며(Mosely et al. (2016) *Cancer Immunol. Res.* 5(1): 29-41); 따라서 이 설정에서는 4-1BBL을 암호화하는 MVA가 CD40L을 암호화하는 MVA보다 더 효과적이다.

- [0312] 4-1BBL 및 CD40L이 종양 성장 또는 직경에 영향을 미치는 정확한 기전 또는 경로에 관계없이, 도 9의 데이터는 4-1BBL을 암호화하는 MVA의 종양내 주사가 연장된 종양 성장 제어를 초래하고 일부 경우에는 종양이 완전히 거부된 경우에도 마찬가지이다.
- [0313] **실시예 11: 확립된 결장암에 대한 TAA 및 CD40L로 암호화된 MVA 바이러스의 종양내 주사의 향상된 항종양 효과**
- [0314] MC38 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-AH1A5-p15E-TRP2(도면에서 "rMVA"로 표시됨) 또는 MVA-AH1A5-p15E-TRP2-CD40L(도면에서 "rMVA-CD40L"로 표시됨)을 종양 접종 후 14일(검은색 점선), 19 및 22일차(검정색 파선)에 종양내(i.t.) 제공받았다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정하였다. 결과는 비항원의 확립된 MC38 결장암에 대한 도 10에 제시되어 있다.
- [0315] 이들 백터는 하나의 흑색종-관련 TRP2 유래 에피토프(SVYDFVWL, H2-K^b) 및 2개의 류린 백혈병 바이러스 gp70 유래 CD8⁺ T 세포 에피토프, p15E(KSPWFITL, H2-K^b)로 구성된 일련의 종양 관련 에피토프 및 변형된 AH1, AH1A5(SPYAYHQF, H2-L^d)를 암호화한다. 이러한 결과는 MVA-CD40L의 종양내 주사가 MC38 결장암 모델에서 종양 성장을 상당히 지연시킬 수 있음을 보여준다.
- [0316] **실시예 12: 면역 관문 차단 및 종양 항원 특이적 항체는 MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여와 상승작용한다**
- [0317] B16.OVA 흑색종 세포(5×10^5)를 C57BL/6 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 직경이 약 5 mm에 도달하면 마우스를 그룹화하고(n=5/그룹), 표시된 경우(체크표시), 200 µg IgG2a, 항 TRP-1 또는 항 PD-1을 복강 내(i.p.)로 받았다. 마우스를 종양 접종 후 13일(검은색 점선), 18 및 21일차(회색 파선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정하였다. 결과는 도 11에 도시되어 있다. 종양 관련 항원(TAA) Trp1(항-Trp1)에 특이적인 항체가 MVA-OVA-4-1BBL의 종양 내 투여와 조합되었을 때, 항 PD-1 자체에 비해 종양 부피의 감소가 증가되었다(도 11, 중간 행). 면역 관문 분자 항체 PD-1이 MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여와 조합되었을 때, 항 PD-1 자체에 비해 종양 부피의 감소가 증가되었다(도 11, 맨 아래 줄).
- [0318] 이들 실험은 항-PD-1 및 항-TRP-1 항체가 단일 제제로서 종양 성장 조절을 향상시킨 반면, MVA-OVA-4-1BBL과 항체 중 하나의 조합은 MVA-OVA-4-1BBL에 의해 발휘되는 치료 효과를 개선함을 입증한다. 여기서, 종양내 MVA 4-1BBL과 관문 차단 또는 TAA-표적화 항체의 조합 요법은 단일 요법보다 더 큰 치료 활성을 가졌다. 이 데이터는 또한 잠재적으로 ADCC를 유도하는 종양-특이적 항체가 상승 효과를 위해 4-1BBL을 발현하는 MVA의 종양내 주사와 조합될 수 있음을 나타낸다.
- [0319] **실시예 13: 작용성 항-CD137 항체 치료와 비교하여 종양내 MVA-OVA-4-1BBL 주사의 우수한 항종양 효과**
- [0320] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7, 12, 15일차(검은색 파선)에 PBS, 5×10^7 TCID50 MVA-OVA-4-1BBL, 또는 10 µg 항-4-1BB(3H3, BioXcell)를 종양내 주사하였다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다.
- [0321] 도 12a는 작용성 항-4-1BBL 항체(3H3)에 비해 MVA-OVA-4-1BBL의 우수한 항종양 효과를 나타낸다. 도 12b는 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화가 혈액에서 OVA-특이적 T 세포 반응을 독점적으로 유도한 반면, 작용성 항-4-1BBL 항체는 혈액에서 어떠한 OVA-특이적 T 세포도 유도하지 않았음을 보여준다.
- [0322] 따라서, 이들 데이터는 종양-특이적 T 세포 반응 뿐만 아니라 종양 성장 조절의 관점에서 종양내 MVA-OVA-4-1BBL 치료가 작용제 항-CD137 항체보다 더 강력하다는 것을 보여준다.
- [0323] **실시예 14: CT26 종양 모델에서 CD40L로 암호화된 내인성 레트로바이러스(ERV) 항원 Gp70을 암호화하는 MVA의 정맥내 주사의 항종양 효과 증가**
- [0324] CT26 종양-보유 Balb/c 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 마우스에 종양을 도입한 후 12일째에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-BN, MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-CD40L(검정색 점선)을 정맥내(i.v.) 주사하였다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정하였다. 도 13a 및 13b에 도시된 바와 같이, 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 투여는 MVA 또는 대조군(PBS)에 비해 종양 부피의 감소를 초래하였다. CD40L이 MVA-Gp70-CD40L에 의해 추가로 암호화되었을 때 항종양 효과가 더욱 향상되었다.

- [0325] 도 13c는 MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-CD40L의 정맥내 주사 시 혈액에서 Gp70 특이적 CD8 T 세포의 유도를 나타낸다.
- [0326] 따라서, 이들 실험에서, 무린 단백질 gp70(무린 백혈병 바이러스의 외피 단백질)("MVA-gp70")인 모델 ERV를 암호화하는 MVA가 작제되었다. 공동자극 분자 CD40L을 추가로 포함하는 MVA도 생성되었다("MVA-gp70-CD40L"). CT26.wt 결장암종 모델을 사용하여 이러한 새로운 작제물의 항종양 가능성을 테스트하였다. CT26.wt 세포는 높은 수준의 gp70을 발현하는 것으로 나타났다(예를 들어, Scrimieri (2013) *Oncoimmunol* 2: e26889 참조). CT26.wt 종양 보유 마우스를 생성하고, 종양이 적어도 5 mm×5 mm인 경우, 상기 지시된 바와 같이 정맥내 면역화시켰다. MVA 단독으로 면역화하면 종양 성장이 약간 지연된다. 대조적으로, MVA-gp70에 의한 면역화는 3/5 종양의 완전한 거부를 야기하였다(도 13a 및 13b). MVA-Gp70-CD40L로 면역화하여 훨씬 더 놀라운 결과를 얻었으며, 이는 4/5 종양의 거부를 야기하였다(도 13a 및 13b).
- [0327] 이러한 항종양 반응이 면역화 후 gp70-특이적 T 세포의 유도와 상관관계가 있는지 여부를 결정하기 위해, H-2Kd-제한된 gp70 에피토프 AH1을 사용하여 혈액 재자극을 수행하였다. 이들 결과(도 13c)는 MVA-Gp70 및 MVA-Gp70-CD40L 처리된 마우스에서 gp70-특이적 CD8 T 세포 반응의 강력한 유도를 나타낸다(도 13c).
- [0328] **실시예 15: B16.F10 종양 모델에서 CD40L로 암호화된 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70을 암호화하는 MVA의 정맥내 주사의 항종양 효과 증가**
- [0329] B16.F10 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양이 약 5×5 mm로 측정된 경우 종양 접종 후 7 일차에 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-BN, MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-CD40L을 정맥내(i.v.) 제공받았다(검은색 점선). 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다. 도 14a에 도시된 바와 같이, 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70 및 CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥내 투여는 MVA 또는 대조군(PBS)과 비교하여 종양 부피의 감소를 초래하였다.
- [0330] 도 14b는 MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-CD40L의 정맥내 주사 시 혈액에서 Gp70 특이적 CD8 T 세포의 유도를 보여준다.
- [0331] 따라서, 이들 실험에서, MVA-Gp70 및 MVA-Gp70-CD40L을 사용한 치료의 효능이 추가의 독립적인 종양 모델에서 입증되었다. B16.F10은 C57BL/6에서 유래한 흑색종 세포주이며, 높은 수준의 Gp70을 발현한다(Scrimieri (2013) *Oncoimmunol* 2: e26889). MVA 단독("MVA-BN")을 사용한 치료는 아주반트화되지 않은 MVA-Gp70의 효과에 필적하는 B16.F10 종양의 일부 종양 성장 지연을 야기하였다(도 14a). 그러나, MVA-Gp70-CD40L은 MVA 백본 대조군 단독보다 더 강한 항종양 효과를 나타냈다(도 14a). 추가 실험은 Gp70-항원-암호화 MVA를 받은 두 그룹 모두 H-2Kb-제한된 gp70 에피토프 p15e에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 나타내었지만, CD40L이 MVA에 의해 코딩되었을 때 말초 T 세포 반응의 극적인 증가가 관찰되지 않았다는 것을 보여주었다(도 14b).
- [0332] **실시예 16: gp70 및 4-1BBL을 암호화하는 MVA 바이러스의 정맥 주사의 항종양 효과 증가 [예언적 실시예]**
- [0333] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종후 7일째(검정색 점선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID50 MVA-OVA 또는 MVA-gp70-4-1BBL을 정맥내 투여한다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정된다. 인간 내인성 레트로바이러스(ERV) 단백질의 마우스 상동체는 정상 마우스 조직에서 고도로 발현되지 않고 마우스 종양 조직에서도 주로 발현되지 않기 때문에, 인간 ERV의 효능은 마우스 모델에서 효과적으로 연구될 수 없다. Gp70은 잘 연구된 마우스 ERV 단백질이다(예를 들어, Bronte *et al.* (2003) *J Immunol.* 171 (12): 6396-6405; Bashratyan *et al.* (2017) *Eur. J. Immunol.* 47: 575-584; and Nilsson *et al.* (1999) *Virus Genes* 18: 115-120 참조). 따라서, 마우스를 대상으로 한 gp70-특이적 암 백신 연구는 인간에서 ERV-특이적 암 백신의 효능과 관련하여 강력한 예측 가치를 가질 가능성이 매우 높다.
- [0334] **실시예 17: gp70 및 4-1BBL 또는 CD40L을 암호화하는 MVA 바이러스의 종양내 주사의 항종양 효과 향상 [예언적 실시예]**
- [0335] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=4-5/그룹)를 그룹화하고, 종양 접종 후 7일차(검은색 점선), 12일 및 15일차(회색 파선)에 종양내(i.t.) PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-OVA, MVA-OVA-CD40L, 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 주사하였다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정되었다.
- [0336] **실시예 18: rMVA-HERV-K-4-1BBL을 사용한 투여는 감염된 종양 세포의 직접적인 항원 제시에 의한 사이토카인 생산에 영향을 미친다 [예언적 실시예]**

- [0337] 수지상 세포(DC)는 14일 동안 재조합 F1t3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 배양한 후 생성된다. B16.F10 세포는 MOI 10에서 MVA-HERV-K, MVA-HERV-K-CD40L, MVA-HERV-K-4-1BBL 또는 MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L로 감염되고 밤새 둔다. 다음 날, 감염된 종양 세포를 수확하고, 37℃ 5% CO₂에서 4시간 동안 DC의 존재 하에 1:1 비율로 표시될 때 공동 배양한다. HERV-K 특이적 CD8+ T 세포는 HERV-K 면역화된 마우스로부터 자기적으로 정제하고, 1:5의 비율로 공동 배양에 첨가한다. 세포를 37℃ 5% CO₂에서 48시간 동안 배양한다. 그런 다음, Luminex에 의한 사이토카인 농도 분석을 위해 배양 상청액을 수집한다. 사이토카인 수준 측정은 (A) IL-6, (B) GM-CSF, (C) IL-2 및 (D) IFN γ 를 포함한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0338] **실시예 19: rMVA-HERV-K-4-1BBL을 사용한 투여는 감염된 종양 세포의 직접적인 항원 제시에 의해 항원-특이적 CD8+ T 세포를 활성화된 이펙터 T 세포로 향하게 한다 [예언적 실시예]**
- [0339] 수지상 세포(DC)는 14일 동안 재조합 F1t3L의 존재 하에 C57BL/6 마우스로부터의 골수 세포를 배양한 후 생성된다. B16.F10 세포는 MOI 10에서 MVA-HERV-K, MVA-HERV-K-CD40L, MVA-HERV-K-4-1BBL, 또는 MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L로 감염되고 밤새 둔다. 다음 날, 감염된 종양 세포를 수확하고, 37℃ 5% CO₂에서 4시간 동안 DC의 존재 하에 1:1 비율로 표시될 때 공동 배양한다. 한편, HERV-K 특이적 CD8+ T 세포는 HERV-K 면역화된 마우스로부터 자기적으로 정제하고, 1:5의 비율로 공동 배양에 첨가한다. 세포를 37℃ 5% CO₂에서 48시간 동안 배양한다. 그런 다음, 세포를 염색하고, 유세포분석에 의해 분석하였다. 사이토카인 분석은 (A) OT-1 CD8+ T 세포에 대한 T-bet의 GMFI 및 (B) OT-1 CD8+ T 세포의 CD44+그랜자임 B+ IFN γ + TNF α 의 백분율에 대해 수행한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0340] **실시예 20: CD40L 또는 4-1BBL로 암호화된 rMVA-HERV-K에 의한 감염은 종양 세포주 및 대식세포에서 종양 세포 사멸을 유도한다 [예언적 실시예]**
- [0341] 종양 세포주 B16.OVA(A 및 B), MC38(C) 및 B16.F10(D)을 표시된 MOI에서 20시간 동안 감염시켰다. 그런 다음, 세포는 유세포 분석에 의해 그들의 생존력에 대해 분석한다. (A)로부터의 샘플에서 혈청 HMGB1은 ELISA에 의해 정량화한다. 골수 유래 대식세포(BMDM)를 표시된 MOI에서 20시간 동안 감염시킨다. 그런 다음, 세포를 유세포 분석에 의해 그들의 생존력에 대해 분석한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0342] **실시예 21: 4-1BBL을 암호화하는 재조합 MVA의 종양내 투여는 종양에서 Treg 세포의 감소 및 T세포 소진의 감소를 초래한다 [예언적 실시예]**
- [0343] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고 종양 접종 후 7일차에 종양내(i.t.) PBS 또는 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL(검정색 점선)의 5×10^7 TCID₅₀을 제공받았다. 5일 후, 마우스를 희생시키고, 비장 및 종양을 수확하고 염색하여, 형광색소 접합 항체로 Treg 침윤 및 T 세포 고갈을 평가한다. (A) CD45+ 종양 침윤 백혈구 중 CD4+ FoxP3+ T 세포의 백분율; 종양 침윤 CD8 T 세포에 대한 PD-1(B) 및 Lag-3(C)의 기하 평균 형광 강도. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.
- [0344] **실시예 22: 면역 관문 차단 및 종양 항원 특이적 항체는 rMVA gp-70-4-1BBL의 종양내 투여와 상승작용한다 [예언적 실시예]**
- [0345] B16.OVA 종양-보유 C57BL/6 마우스(n=5/그룹)를 그룹화하고 표시된 경우(체크표시) 200 μ g의 IgG2a, 항 TRP-1 또는 항 PD-1을 제공하였다. 마우스는 종양 접종 후 13일(검정색 점선), 18 및 21일(회색 파선)에 PBS 또는 5×10^7 TCID₅₀ MVA-gp70-4-1BBL로 종양내 면역화한다. 종양 성장은 일정한 간격으로 측정한다.
- [0346] **실시예 23: IT 면역화에 대한 사이토카인/케모카인 MVA-BN 백본 반응은 4-1BBL 아주반트화에 의해 증가될 수 있다**
- [0347] 종양 미세환경(TME) 내에서 염증을 유도하는 재조합 MVA의 가능성을 평가하기 위해, B16.OVA 종양의 조직에서 사이토카인 및 케모카인을 분석하였다. 먼저, 5×10^5 B16.OVA 세포를 C57BL/6 마우스에 피하(s.c.) 이식하였다. 10일차에, 마우스를 PBS 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA-BN, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내(i.t.) 면역화시켰다(n=5 내지 6 마우스/그룹).
- [0348] 주사 6시간 후, 사이토카인 및 케모카인 발현을 측정하였다(도 15). PBS로 처리된 조직에서 사이토카인/케모카인 발현은 바늘을 종양에 삽입하고 염수 전단 압력에 의해 유도된 기저 염증 프로파일을 나타낸다. IL-6, IFN- α , IL-15 및 TNF- α 를 포함한 사이토카인과 CXCL1, CCL2 및 MIP2와 같은 케모카인이 상향 조절되었다(도 15).

NF- κ β 활성화에 의해 유도되고 인간에서 IL-8 생성을 자극하는 IL-25(IL-17E로도 알려짐)도 검출되었다(Lee et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 1660-64). 흥미롭게도, MVA-OVA-4-1BBL을 주사한 종양은 종양 병변이 주사된 MVA-BN 또는 MVA-OVA를 주사한 종양에 비해 IL-6, IFN- α 또는 IL-15/IL15R α 와 같은 전염증성 사이토카인의 상당한 증가를 나타냈다.

[0349] **실시예 24: 종양내(i.t.) 면역화에 대한 사이토카인/케모카인 전염증 반응은 MVA-OVA-4-1BBL에 의해 증가된다**

[0350] 마우스 및 종양을 실시예 23에 기재된 바와 같이 처리하였다. 놀랍게도, IFN- γ 및 GM-CSF를 비롯한 여러 전염증성 사이토카인은 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화 후에만 생성되었다(도 16). IL-18, CCL5, CCL3 및 IL-22를 포함한 다른 전염증성 사이토카인의 생성은 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내(i.t.) 면역화에 의해 향상되었지만, MVA-BN 또는 PBS 단독으로는 그렇지 않았다.

[0351] 종합하면, 이 데이터는 종양내(i.t.) MVA 면역화가 종양 미세환경(TME)에서 염증성 사이토카인/케모카인 이동을 유도하여 염증 반응을 향상시킬 수 있음을 입증한다. MVA 또는 MVA-OVA에 비해 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화에 대해 증가된 효과가 관찰되었다. 이러한 방식으로, 4-1BBL의 추가는 재조합 MVA를 "아주반트화"했다고 할 수 있다.

[0352] **실시예 25: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사 후 TME 및 배액 LN의 정량적 및 정성적 T-세포 분석**

[0353] MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL의 종양내(i.t.) 주사 후 염증에 의해 유도된 세포 과정을 더 잘 이해하기 위해, 종양내(i.t.) 주사 후 다양한 시점에서 선천성 및 적응성 면역 침윤물의 심층 분석을 수행하였다. B16.OVA 종양-보유 마우스에 PBS 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL을 종양내(i.t.) 주사하였다. 프라이밍 면역화 1일, 3일 및 7일 후에 마우스를 희생시켰다. 종양과 종양-배액 림프절(TdLN)을 제거하고, 콜라게나아제와 DNase로 처리하고, 단일 세포를 유세포 분석으로 분석하였다. 면역 세포 집단은 그들의 크기, 증식 거동 및 기능 상태를 결정하기 위해 분석되었다.

[0354] 결과는 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL과 함께 B16.OVA 종양의 주사가 종양내(i.t.) 면역화 7일 후에 종양 내로 CD45⁺ 백혈구의 침윤을 유도함을 보여주었다(도 17, 상단 행, 왼쪽 히스토그램). 흥미롭게도, TdLN에서 CD45⁺ 백혈구 수의 확장은 i.t. (종양내) 면역화(도 17, 상단 행, 오른쪽 히스토그램)후, 특히 4-1BBL을 발현하는 MVA의 주사 후 이미 관찰되었다. 이 차이는 종양내(i.t.) 면역화 7일 후 TdLN에서 더욱 확대되었으며, 이는 MVA 면역-매개 항종양 효과가 면역화 후 3일차 즉시 TdLN에서 시작됨을 시사한다.

[0355] 백신접종-기반 항종양 요법의 한 양태는 종양-특이적 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포의 확장 및 재활성화 및 종양 내 농축이다. CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포는 모두 면역화 1주일 후 종양에서 증가했다(도 17, 각각 두 번째 및 세 번째 행, 왼쪽 히스토그램). CD4⁺ T 세포는 종양에서 7일차까지 증가했으며, TdLN에서도 3일차에 시작하여 MVA-OVA-4-1BBL로 i.t. 면역화한 후 7일째에 피크에 이르렀다. CD8⁺ T 세포는 7일차까지 종양에서 CD45⁺ 세포의 증가에 크게 기여했다. MVA-OVA-4-1BBL의 주사는 종양(7일차)과 dLN(3일차 및 7일차) 모두에서 MVA-OVA의 주사에 비해 CD8⁺ T 세포 집단을 추가로 확장했다.

[0356] OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 정량화는 특히 MVA-OVA-4-1BBL로 처리된 그룹에서 종양내(i.t.) 면역화 7일 후 종양 미세환경 내에서 증가를 나타내었다(도 17, 좌측 하단). 놀랍게도, TdLN에서 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 확장은 면역화 후 3일차에 피크에 도달했으며, MVA-OVA-4-1BBL 처리군에서 더 높았다(도 17, 우측 하단). 종합하면, 이러한 데이터는 MVA-OVA, 특히 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화가 종양 배액 림프절에서 치료 후 3일부터 시작하여 적응 면역 반응의 생성을 향상시켜, 종양 미세환경에서 7일차까지 항원-특이적 CD8⁺ T 세포를 유의하게 증가시켰다.

[0357] **실시예 26: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사에 의한 항원-특이적 CD8+ T 세포의 유도**

[0358] MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사에 의해 유도된 종양 배액 림프절(TdLN)의 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포는 높은 증식 능력을 발휘하였다. Ki67(세포 증식의 지표)을 발현하는 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 백분율은 PBS에 비해 MVA-OVA 처리 후 TdLN에서 더 높았고, MVA-OVA-4-1BBL로 면역화된 마우스에서 더 증가하였다(도 18a). 더욱이, 종양내의 OVA-특이적 CD8 T 세포는 MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL로 면역화한 후 7일차까지 고갈 마커 PD-1을 하향조

절하였고, 이는 기능의 회복을 시사한다(도 18b).

[0359] Treg 세포(또한 "조절 T 세포")는 항종양 면역 반응의 강력한 억제제이다(예를 들어, Tanaka *et al.* (2017) *Cell Res.* 27: 109-118 참조). MVA-OVA의 종양내 주사는 종양에서 OVA-특이적 Teff/Treg 비율을 증가시켰고(즉, Treg 세포에 대한 "Teff" 세포 또는 "이펙터 T 세포"의 비율), MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 치료 후 7일째에 추가 증가가 관찰되었다(도 18c). 따라서, MVA-OVA 및 특히 MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 치료는 항종양 면역 반응에 유익한 CD8+ T 이펙터 세포에 유리하게 종양내 Treg의 빈도를 감소시켰다.

[0360] **실시예 27: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 주사 후 TME 및 배액 LN의 정량적 및 정성적 NK 세포 분석**

[0361] MVA-OVA를 사용한 i.t. 면역화 후 NK 세포의 정량화는 종양내 면역화 후 1일차에 종양에서 NK 세포의 감소를 나타내었다(도 19, 상단 행, 왼쪽 히스토그램). 이러한 변화는 MVA-OVA-4-1BBL을 사용했을 때 더욱 두드러졌다. 동시에, 종양 배액 림프절(TdLN)의 NK 세포는 MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL 둘 다로 면역화한 후 3일 및 7일 후에 증가했지만(도 19, 상단 행, 오른쪽 히스토그램), MVA-OVA-4-1BBL은 TdLN에서 NK 세포의 가장 높은 증가를 유도하였다.

[0362] CD69는 초기 NK 세포 활성화의 마커이다. 바이러스 벡터인 MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL 모두 종양 및 배액 림프절에서 활성화 마커 CD69의 즉각적인 상향조절을 유도하였다(TdLN; 도 19, 두 번째 행). 또한, i.t. 면역화로 인해 종양 및 TdLN 모두에서 다양한 시점에서 NK 세포에서 그랜자임 B가 유도되었으며, 이는 향상된 세포독성 NK 세포 기능을 나타낸다(도 19, 세 번째 행).

[0363] 마지막으로, Ki67 발현에 의한 NK 세포의 증식능을 분석하였다. 3일차에, NK 세포에 대한 Ki67 발현은 MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내 처리된 마우스의 종양 및 TdLN에서 유의하게 증가하였다(도 19, 마지막 행).

[0364] 이들 결과는 4-1BBL-아주반트화된 MVA-OVA(즉, MVA-OVA-4-1BBL)가 MVA-OVA와 비교하여 종양내 주사 후 NK 세포에서 CD69, 그랜자임 B, 및 Ki67 표면 마커의 발현을 추가로 증가시켰다는 것을 입증한다. 이러한 실험은 또한 종양내 면역요법 후 항종양 T 세포 및 NK 세포 반응을 증가시키는 배액 림프절(TdLN)의 중요한 역할을 보여준다.

[0365] 본 발명이 임의의 특정 작동 메커니즘에 구속되지는 않지만, 3일차 TdLN에서 T 세포의 확장 및 7일차 종양에서 T 세포의 지연된 침윤(도 17 참조)은 종양-특이적 T 세포가 TdLN에서 프라이밍되고 확장된 후 종양으로 이동하여 종양 세포를 사멸시키는 시나리오에 찬성한다. 바이러스 벡터의 종양 내 주사는 또한 TdLN에서 직접 NK 세포 활성화를 유도하여, 추가 DC 활성화를 유도할 수 있다.

[0366] **실시예 28: 종양내 MVA 암 요법에서 CD8 T 세포의 역할**

[0367] 종양 및 TdLN(예를 들어, 도 17에서)에서 T 세포 반응의 분석은 종양내(i.t.) 치료 후 양쪽 부위에서 종양-특이적 T 세포의 확장을 보여주었다. MVA-OVA-4-1BBL 매개 항종양 효과에 대한 T 세포의 기여도를 조사하기 위해 실험을 수행하였다. 이 실험에서, C57BL/6 마우스에 B16.OVA 흑색종 세포(5×10^5 세포)를 주사하고, 여러 치료 중 하나에 따라 종양 성장을 모니터링했다. 치료에는 100 μ g CD8-T-세포 고갈 항체("αCD8", 클론 2.43) 또는 이소형 대조군 항체의 존재 또는 부재 하에 PBS 또는 MVA-OVA-4-1BBL의 종양내(i.t.) 주사가 포함되었다. MVA-OVA-4-1BBL의 (i.t.) 주입은 종양이 직경 5 mm에 도달했을 때 수행하였으며, 일주일 이내에 2회 반복하였다. MVA-OVA-4-1BBL을 첫 번째 주사하기 하루 전에 마우스에 항-CD8 또는 IgG2b 항체를 i.p. 주사하고, 이 치료를 다음 2주 이내에 4회 반복하였다. 도 20에 제시된 데이터는 CD8 T 세포가 효과적인 MVA 종양 치료에 필수적임을 보여준다. 함께, 이러한 데이터는 종양 및 TdLN에서 종양-특이적 CD8 T 세포의 MVA-유도 활성화 및 확장이 종양 성장 조절에 중요한 이벤트를 나타낸다.

[0368] **실시예 29: MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1BBL 매개된 항종양 효과의 Batf3+ DC-의존성**

[0369] MVA-OVA-4-1BBL에 의해 유도된 항종양 면역 반응에 기여하는 근본적인 세포 및 분자 엔티티를 설명하기 위해, 본 발명자들은 다양한 면역 세포 플레이어의 역할을 조사하였다. 수지상 세포(DC)는 항원을 강력하게 샘플링하고 적응 면역 시스템의 세포에 공동 자극 신호를 제시하는 능력을 가지고 있으며, 항종양 면역에서 중요한 요소로 간주된다. DC의 다양한 하위 유형은 CD8α+ DC("cDC1"이라고도 함)를 포함하여 종양에 대한 강력한 면역 반응의 활성화와 관련이 있다. 이 DC 서브세트는 면역 반응 동안 항원을 교차-제시하는 독특한 능력을 가지며, CD8α+ DC는 감염(Hochrein *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166: 5448-55; Martinez-Lopez *et al.* (2014) *Eur. J. Immunol.* 45: 119-29) 및 암(Broz *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26: 638-52)에 대한 반응으로 IL-12의 주요 생산체이다. CD8α+ DC는 또한 종양-관련 항원의 교차-제시에 의한 항종양 CD8+ T 세포의 강력한 유도제이다

(Sanchez-Paulete *et al.*, (2015) *Cancer Discovery* 6: 71-79; Salmon *et al.* (2016) *Immunity* 44: 924-38). CD8 α + DC 발달은 전사 인자 Batf3에 결정적으로 의존적이다(Hildner *et al.* (2008) *Science* 322: 1097-1100).

[0370] 종양내 MVA 암 요법에 대한 이 DC 서브세트의 중요성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 야생형 및 Batf3-결핍(Batf3^{-/-}) B16.OVA 종양-보유 마우스를 이용하였다. 도 21a는 B16.OVA 종양이 교차-제시 DC(Batf3^{-/-})의 부재 하에 극적으로 더 빠르게 성장함을 나타내며, 이는 종양-지향적 면역 반응의 유도에서 이 항원 제시 세포(APC) 서브세트의 중요한 역할을 나타낸다. 이전 실험과 마찬가지로, 야생형 마우스에서 MVA-OVA의 종양 내 주사는 종양 성장 지연을 유발하고, 한 경우에는 종양을 완전히 제거했다. 이 효과는 마우스에 MVA-OVA-4-1BBL을 주사했을 때 향상되었으며; MVA-OVA-4-1BBL로 처리된 마우스 5마리 중 3마리가 종양을 거부하였다(도 21a). 흥미롭게도, 교차-제시 DC(Batf3^{-/-})의 부재 하에, 종양내 MVA 면역요법은 WT 그룹에 비해 전혀 손상되지 않았다(도 21a). 그러나, Batf3-DC는 4-1BBL 유도 항종양 반응에 참여하는 것으로 보인다(도 21a, 하단).

[0371] 첫 번째 면역화 11일 후 말초 혈액에서 CD8⁺ T 림프구 집단의 유세포 분석(도 21b)은 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포 빈도가 야생형 대응물에 비해 MVA-OVA-4-1BBL 면역화된 Batf3^{-/-} 종양 보유자에서 단지 약간 감소되었다. 본 발명이 임의의 특정 작동 기전에 구속되거나 이에 의존하지 않지만, 이러한 데이터는 Batf3-의존성 DC가 MVA를 사용한 종양내 암 요법에 대해 중복된 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0372] **실시예 30: MVA-OVA-4-1BBL의 종양내 투여를 위한 NK 세포의 역할**

[0373] NK 세포는 4-1BB를 발현하는 것으로 알려져 있으며, NK 세포 상의 4-1BB의 결합은 이들 세포의 증식 및 세포독성을 증가시키는 것으로 나타났다(Muntasell *et al.* (2017) *Curr. Opin. Immunol.* 45: 73-81). 초기 실험(도 19 참조)에서, 본 발명자들은 MVA-OVA-4-1BBL의 종양 내 주사가 개선된 증식을 수반하는 NK 세포에서 활성화 마커 CD69와 세포독성 마커 그랜자임 B를 강력하게 상향조절하였음을 발견했다.

[0374] 4-1BBL-유도된 항종양 면역 반응에서 NK 세포의 역할을 조사하기 위해, 본 발명자들은 IL15R α ^{-/-} 마우스를 이용하였다. IL-15 수용체 알파 서브유닛(IL-15R α)은 NK 세포의 발달에 중요한 것으로 나타난 다면발현성 사이토카인인 IL-15의 고친화도 결합을 매개한다(Lodolce *et al.* (1998) *Immunity* 9: 669-76). 야생형 및 IL15R α -결핍(IL15R α ^{-/-}) B16.OVA 종양-보유 마우스를 생성하고, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내 면역화시켰다. MVA-OVA로 처리된 마우스는 IL-15R α 의 유무에 관계없이 유사한 치료 효능을 보였다(도 22a). 흥미롭게도, MVA-OVA-4-1BBL을 사용할 때 야생형 마우스에서 관찰된 이점(5마리 중 3마리가 종양을 거부함)은 MVA-OVA-4-1BBL로 처리된 IL15R α -결핍 종양-보유 마우스에서 완전히 상실되었다(마우스 5마리 중 1마리가 종양을 거부한 경우; 도 22a 참조). 이러한 결과는 또한 종양 접종 후 마우스의 생존에 반영되었다(도 22b).

[0375] IL15R α 의 부재는 NK 세포의 발달에 영향을 미칠 뿐만 아니라 T 세포 항상성 및 LN 이동을 감소시키고, 마우스에서 CD8 기억 T 세포를 선택적으로 감소시키는 것으로 알려져 있다(Lodolce *et al.* (1998) *Immunity* 9: 669-76). 따라서, 본 발명자들은 이러한 치료에 대한 T 세포 반응도 조사했다. 우리의 이전 데이터와 일치하게, 본 발명자들은 MVA-OVA-4-1BBL로 추가로 증가된 야생형 동물에서 MVA-OVA 종양내(i.t.) 면역화 시 OVA-특이적 CD8 T 세포의 유도를 관찰했다(도 22c). 그러나, IL15R α ^{-/-} 마우스에서 OVA-특이적 T 세포 반응은 야생형 마우스에서 발견된 반응과 유사했다.

[0376] 본 발명이 특정 메커니즘 또는 작동 방식에 구속되지는 않지만, 이러한 발견은 IL15R α ^{-/-} 종양-보유 마우스가 종양-특이적 T 세포 반응을 일으킬 수 있고, 따라서 4-1BBL-향상 NK 세포가 활성화 및 기능이 종양내 MVA-OVA-4-1BBL 치료의 치료 효능에 기여한다는 것을 뒷받침한다.

[0377] **실시예 31: MVA-OVA-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화에 대한 NK 세포-의존성 사이토카인/케모카인 프로파일**

[0378] NK 세포에 대한 4-1BBL - 4-1BB 상호작용에 의해 선택적으로 유도된 사이토카인을 확인하기 위해, 사이토카인 및 케모카인을 PBS 또는 5×10^7 TCID₅₀ MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL로 종양내 처리된 B16.OVA 종양-보유 야생형 또는 IL15R α ^{-/-} 마우스의 종양 조직에서 분석하였다.

[0379] 이전 실험은 재조합 MVA의 종양내 주사 6시간 후에 다수의 사이토카인 및 케모카인이 증가했음을 보여주었다(도 15 및 16). 이 실험에서, 종양내 MVA-OVA-4-1BBL을 주입하면 4-1BBL로 자극시 NK 세포로 생성되는 것으로 알려진 전염증성 사이토카인 또는 케모카인, 예컨대 IFN- γ , CCL3, 및 CCL5의 생성이 MVA-OVA 주사보다 유의하게 증

가하는 것으로 나타났다(도 23). 이 4-1BBL-유도 증가는 IL15R $\alpha^{-/-}$ 마우스에서 완전히 없어졌으며, 이는 rMVA-OVA-4-1BBL의 종양 내 주사가 NK 세포에서 나오는 주사 후 6시간 후에 종양 미세환경에서 뚜렷한 사이토카인 및 케모카인 프로파일을 유도한다는 것을 입증한다.

[0380] **실시예 32: MVA-gp70-4-1BBL과 비교한 MVA-gp70-CD40L을 사용한 종양내 면역화의 항종양 효능**

[0381] Gp70은 기질 및 면역 세포 조성의 측면에서 별개의 종양 미세환경(TME)을 모두 나타내는 다수의 동계 종양 모델(B16.F10, CT26, MC38, 4T1, EL4 등)에서 발견되는 종양 자가항원이다. 여기에서, 본 발명자들은 B16.F10 종양-보유 마우스의 종양내 면역화에서 CD40L 또는 4-1BBL 외에 종양 항원 gp70을 암호화하는 MVA의 효능을 테스트 하였다.

[0382] B16.F10 흑색종 세포를 C57BL/6 마우스에 피하 주사하였다. 종양 크기가 $\sim 50 \text{ mm}^3$ 에 도달하면, 마우스를 PBS, MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-4-1BBL, 또는 MVA-CD40L로 종양내 면역화하고; 결과는 도 24에 도시되어 있다.

[0383] MVA-gp70에 의한 면역화는 일시적이고 약한 종양 성장 조절을 유도하였다. 이 항종양 효과는 바이러스가 CD40L을 발현할 때 향상될 수 있다. 그러나, MVA-gp70-4-1BBL을 사용한 종양내 면역화는 가장 강력한 치료 효과를 나타내어, 처리된 동물 5마리 중 2마리에서 완전한 종양 제거를 초래하였다(도 24a).

[0384] 놀랍게도, MVA-gp70-4-1BBL로 처리한 후 종양이 치유된 마우스는 종양이 있던 자리에서 색소 침착의 손실을 나타냈다(도 24b). 이 탈색은 자가면역 상태인 백반증을 나타내며, 자가-반응성 T 세포에 의한 멜라닌세포 파괴의 결과이다. 멜라닌세포의 이러한 파괴는 재조합 MVA에 의한 면역계의 활성화가 MVA(여기서는 gp70)에 의해 암호화된 TAA에 제한되지 않음을 시사한다. 오히려, 에피토프 확산으로 알려진 현상인 다른 항원에 대한 면역계의 이러한 확장된 활성화는 더 나은 치료 결과를 제공할 수 있는 광범위한 면역 반응을 초래한다.

[0385] 면역화에 의해 유도된 항원-특이적 T 세포 반응을 평가하기 위해, 첫 번째 면역화 11일 후에 혈액을 채취하고 항원-특이적 T 세포의 존재에 대해 분석하였다. MVA-gp70 및 MVA-gp70-CD40L, 뿐만 아니라 MVA-CD40L 및 MVA-4-1BBL로의 면역화는 1-2% 범위의 측정 가능한 p15E-특이적 T 세포 반응을 유도하였다(도 24c). 중요하게도, 이 반응은 MVA-gp70-4-1BBL을 받은 마우스에서 급격히 증가했다(5배 초과). p15E 펩타이드 재자극에 대한 이러한 항원-특이적 T 세포 반응은 상이한 치료군에서의 치료 효능과 상관관계가 있었다.

[0386] **실시예 33: MVA-gp70-4-1BBL-CD40L의 종양내 면역화의 항종양 효능**

[0387] 4-1BBL 및 CD40L과 함께 종양 항원 gp70을 발현하는 재조합 MVA를 생성하고, B16 흑색종 모델에서 종양내 시험 하였다. B16.F10 흑색종 세포를 C57BL/6 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 $\sim 50 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 PBS, MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L, 또는 gp70을 발현하지 않는 상응하는 MVA 작제물로 종양내 면역화시켰다.

[0388] MVA-gp70에 의한 면역화는 일시적이고 유의한 종양 성장 조절을 유도하였다(도 25a). 이 항종양 효과는 바이러스가 CD40L 또는 4-1BBL을 발현할 때 향상될 수 있다. 그러나, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 종양내 면역화는 처리된 동물 5마리 중 4마리에서 가장 강력한 치료 효과, 즉 완전한 종양 제거를 유도하였다(도 25a). 놀랍게도, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L로 치료된 4마리의 치료된 마우스 중 3마리는 실시예 32에서 상기 논의된 바와 같이 자가면역 상태인 백반증을 나타내는, 종양이 있던 곳에서 색소 침착의 상실을 나타냈다.

[0389] 또한, 1차 면역화 후 11일째에 혈액에서 gp70-특이적 T 세포 반응을 측정하였다. MVA-gp70 및 MVA-gp70-CD40L 뿐만 아니라 MVA-CD40L 및 MVA-4-1BBL을 사용한 면역화는 1-2% 범위의 측정 가능한 종양-특이적 T 세포 반응을 유도하였으며; 이 반응은 MVA-gp70-4-1BBL을 받은 마우스에서 극적으로 증가했다(5배 초과)(도 25b).

[0390] 종합하면, B16.F10 흑색종 모델에서 MVA-gp70에 CD40L 또는 4-1BBL이 아주반트화될 때 항종양 효능이 향상될 수 있었지만, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L에서 4-1BBL과 CD40L이 함께 발현되었을 때 훨씬 더 강력한 효과가 관찰되었다.

[0391] **실시예 34: CT26.WT 종양에서 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 종양내 면역요법**

[0392] 그 다음, T 세포 및 골수 세포가 풍부하고 면역원성인 것으로 기술된 CT26 결장 암종 모델을 사용하여 작제물을 시험하였다(예를 들어, Mosely *et al.* (2016) *Cancer Immunol. Res.* 5: 29-41 참조). Balb/c 마우스에 CT26.wt 결장암종 세포를 피하(s.c.) 주사하였다. 종양이 $\sim 60 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때, 마우스를 PBS, MVA-gp70, MVA-gp70-

4-1BBL, MVA-gp70-CD40L, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L, 또는 MVA-4-1BBL-CD40L로 종양내 면역화하였다.

[0393] MVA-gp70에 의한 종양내 면역화는 일시적이고 유의한 종양 성장 조절을 유도하였다. 이 항종양 효과는 MVA가 CD40L을 발현할 때 향상되지 않았지만, 놀랍게도 MVA-gp70-4-1BBL로 면역화하면 가장 강력한 치료 효과가 나타나 모든 처리된 동물에서 종양이 완전히 제거되었다(도 26a). 그러나, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 치료는 더 나은 치료 효능을 나타내지 않았다. 참고로, 공동-자극 분자만 함유하고 gp70은 함유하지 않은 바이러스도 상당한 종양 성장 지연을 초래했지만, MVA-gp70-4-1BBL과 경쟁할 수 없었다. 이러한 발견은 처리된 마우스의 전체 생존에 반영되었다(도 26b).

[0394] H2-Ld CD8+ T 세포 에피토프 AH-1에 대한 Gp70-특이적 T 세포 반응은 MVA-gp70 및 MVA-gp70-CD40L로 처리된 동물의 혈액에서 쉽게 검출되었다(도 26c). 이 반응은 MVA-gp70-4-1BBL을 받은 마우스에서 극적으로 증가되었으며(10배 초과), 이는 도 26a 및 26b에 나타난 치료 효과와 상관관계가 있다. MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 처리는 또한 혈액에서 AH-1-특이적 T 세포 반응을 향상시켰다(도 26c).

[0395] **실시예 35: MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 B16.F10 종양 보유 마우스에 IT 주사한 후 종양 미세환경 및 종양 배액 LN의 종합 분석**

[0396] 상기 제시된 데이터는 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L로 B16.F10 종양-보유 마우스의 종양내 치료가 치료된 마우스의 80%에서 종양 거부를 초래하였음을 보여주었다(도 26 참조). 이 종양 모델에서 종양 미세환경(TME) 및 TdLN을 연구하기 위해, B16.F10 종양-보유 마우스에 PBS 또는 5×10^7 TCID50의 MVA-gp70, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L 또는 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 종양내(i.t.) 제공하였다. 프라임 면역화 3일 후에 마우스를 희생시켰다. 3일차는 그 시점에서 면역계의 선천성 및 적응성 구성요소 모두에서 변화를 나타낸 OVA 시스템의 이전 실험을 기반으로 선택되었다(도 17 참조). 종양 및 TdLN을 제거하고 콜라게나제/DNase로 분해하여 유세포 분석을 사용하여 단일 세포를 분석하였다. 면역 세포 집단의 풍부함과 증식 거동 및 기능 상태를 평가하였다.

[0397] 4-1BBL- 및 CD40L-아주반트화된 MVA의 종양내 주사는 5량체 염색에 의해 결정된 바와 같이 종양에서 CD8 T 세포 또는 p15E-특이적 T 세포의 수에서 3일차 시점에 이점을 부여하지 않았다. 그러나, TdLN에서 MVA-gp70 및 MVA-gp70-CD40L은 CD8 T 세포의 확장을 생성한 반면, 4-1BBL의 추가는 훨씬 더 큰 효과를 생성했다(도 27, 오른쪽 상단). 4-1BBL의 첨가에 의해 생성된 증가는 TdLN의 p15E-특이적 CD8 T 세포에 대해 훨씬 더 두드러졌으며, 이에 대해 MVA-gp70-4-1BBL 또는 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 i.t. 면역화는 종양-특이적 CD8 T 세포를 증가시켰다(도 27, 오른쪽 중간). p15E-특이적 CD8 T 세포의 수는 또한 이들 세포의 증식 상태와 상관관계가 있었는데; 예를 들어, MVA에 gp70 및 선택적으로 CD40L과 함께 4-1BBL을 추가하면 TdLN에서 가장 많은 수의 Ki67+ gp70-p15E CD8 T 세포가 유도되었다(도 27, 오른쪽 아래).

[0398] 이들 데이터는 MVA-gp70을 사용한 종양내(i.t.) 면역화가 종양 및 종양 배액 림프절에서 치료 후 3일차에 적응 면역 반응의 생성을 향상시키는 반면, 4-1BBL 또는 4-1BBL 플러스 CD40L로의 아주반트화가 TdLN에서 p15E-특이적 CD8 T 세포 반응을 특이적으로 증가시켰다는 것을 입증한다.

[0399] **실시예 36: MVA의 종양내 주사 후 종양 및 TdLN에서 NK 세포의 유도**

[0400] MVA-OVA의 종양내(i.t.) 주사는 각각 1일차 및 3일차에 NK 세포의 활성화 및 확장을 생성하였다(도 19). 그런 다음 본 발명자들은 다른 MVA 작제물을 주사한 후 3일차에 NK 세포 침윤, 활성화 및 확장을 조사하였다. i.t. 면역화 후 재조합 MVA를 사용한 NK 세포의 정량화는 종양(도 28, 좌측 상단) 및 TdLN(도 28, 우측 상단)에 침투하는 NK 세포의 증가를 나타내었다. MVA가 4-1BBL(예를 들어, MVA-gp70-4-1BBL 및 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L)을 암호화할 때 침투가 증가했다. MVA-gp70의 종양내(i.t.) 주사는 종양(도 28 참조, 좌측 중앙) 및 TdLN(도 28, 우측 중앙)에서 NK 세포(Ki67+)의 증식을 유도하고, 4-1BBL 또는 4-1BBL과 CD40L에 의한 아주반트화는 TdLN에서 이 효과를 향상시켰다.

[0401] 그랜자임 B는 NK 세포의 세포독성에 대한 마커이다(예를 들어, Ida *et al.* (2005) *Mod. Rheumatol.* 15: 315-22 참조). 그랜자임 B+ NK 세포는 재조합 MVA를 종양내 주사한 후 종양 및 TdLN에서 유도되었다(도 28, 좌측 하단). 다시, 재조합 MVA에 4-1BBL 또는 4-1BBL-CD40L을 첨가하면, TdLN에서 세포독성 NK 세포의 수가 약간 증가하였다(도 28, 우측 하단).

[0402] 종합하면, 이들 데이터는 종양내(i.t.) 면역요법 후 NK 세포 및 TAA-특이적 T 세포의 확장 및 기능에서 MVA-암호화된 4-1BBL-CD40L의 중요한 역할을 강조한다. 따라서, gp70 및 4-1BBL 또는 gp70, 4-1BBL 및 CD40L을 암호화하는 재조합 MVA를 사용한 종양내 치료는 gp70과 같은 내인성 레트로바이러스 자가-항원에 대한 T 세포 반응

을 향상시킬 수 있다.

[0403] **실시예 37: CT26.WT 종양-보유 마우스에서 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 정맥내 면역요법**

[0404] 위에서 논의된 실험은 공동자극 분자 4-1BBL 및 CD40L과 함께 종양 항원 gp70을 암호화하는 신규 MVA 작제물이 종양내로 적용될 때 매우 강력하다는 것을 보여주었다(도 25 및 26). 또한, Lauterbach *et al.* ((2013) *Front. Immunol.* 4: 251)은 MVA-암호화된 CD40L이 정맥내 제공될 때 선천성 및 적응성 면역 반응을 향상시킨다는 것을 발견했다. 여기에서 본 발명자들은 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L을 사용한 정맥내(i.v.) 면역화가 종양 성장 조절을 제공할 수 있는지 여부를 질문했다.

[0405] CT26.WT 결장암종 세포를 Balb/c 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 ~60 mm³에 도달하면, 마우스를 PBS 또는 MVA-Gp70, MVA-Gp70-4-1BBL, MVA-Gp70-CD40L, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L 및 MVA-4-1BBL-CD40L(gp70이 부족함)로 정맥내 면역화하였다. MVA-gp70에 의한 i.v. 면역화는 동물 5마리 중 2마리에서 종양 제거를 유도하였다(도 29a). 4-1BBL 또는 CD40L을 함유하는 gp70-발현 바이러스로 처리된 마우스는 강력하게 개선된 항종양 반응을 나타내었으며, 이는 각각 치료된 마우스 5마리 중 3마리, 그리고 5마리 중 4마리에서 초래되었다. 중요하게는, MVA-gp70-4-1BBL-CD40L에 의한 i.v. 처리는 모든 치료된 마우스에서 종양 성장 조절이 연장되었고, 마우스 5마리 중 3마리가 종양을 거부하였다(도 29a). 참고로, 공동자극 분자만 함유하고 gp70은 함유하지 않은 재조합 MVA는 상당한 종양 성장 지연을 초래했지만, MVA-gp70-4-1BBL, MVA-gp70-CD40L 또는 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L에서 관찰된 것과 동일한 종양 거부를 일으키지 않았다(도 29a). 이러한 발견은 처리된 마우스의 전체 생존에 반영되었다(도 29b).

[0406] PBL의 펩타이드 재자극에 의한 혈액 내 종양-지향적 CD8 T 세포 반응의 분석은 모든 MVA 치료군에서 AH1-특이적 CD8 T 세포의 유의한 유도를 밝혀냈고, 이로써 이는 CD40L(즉, MVA-gp70-CD40L 및 MVA-gp70-4-1BBL-CD40L)의 존재 하에 추가로 증가될 수 있었다(도 29c).

[0407] **실시예 38: HERV-K 항원을 포함하는 재조합 MVA**

[0408] 인간 내인성 레트로바이러스(HERV-K)의 K 슈퍼패밀리의 단백질, 특히 ERV-K-env 및 ERV-K-gag인 TAA를 포함하는 MVA-기반 벡터("MVA-mBN489", "MVA-HERV-Prme-FOLR1-4-1-BBL-CD40L"로도 지칭됨)를 설계하였다. MVA는 또한 인간 FOLR1 및 PRAME를 암호화하고 h4-1BBL 및 hCD40L을 발현하도록 설계되었다.

[0409] "MVA-HERV-Prme-FOLR1-4-1-BBL"로 지칭되는 유사한 MVA-기반 벡터는 TAA ERV-K-env 및 ERV-K-gag 및 인간 FOLR1 및 PRAME를 발현하고 h4-1BBL을 발현하도록 설계되었다. 구체적으로, 벡터 "MVA-BN-4IT"("MVA-mBN494" 또는 "MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL")가 도 30a에 개략적으로 도시되어 있다. 외피(env) 및 그룹-특이적 항원(gag) 단백질을 암호화하는 HERV-K 유전자는 일반적으로 건강한 인간 조직에서 휴면 상태이지만 많은 종양에서 활성화된다. FOLR1 및 PRAME는 유방암 및 난소암 세포에서 특이적으로 상향조절되는 유전자이다. 공동자극 분자 4-1-BBL의 추가 발현은 TAA에 대한 면역 반응을 향상시키기 위한 것이다.

[0410] "MVA-HERV-Prme-FOLR-CD40L"로 지칭되는 또 다른 MVA-기반 벡터는 TAA ERV-K-env 및 ERV-K-gag 및 인간 FOLR1 및 PRAME를 발현하고 hCD40L을 발현하도록 설계되었다. 이들 작제물 각각은 본 발명의 방법에 유용하다.

[0411] 예시적인 서열은 당업계에 공지되어 있고 또한 제공된 서열 목록에 제시되어 있다. 관련 MVA에 필요한 기능을 제공하는 한 임의의 서열이 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0412] 상기 기재된 ERV-K env 및 gag 서열의 경우, 아미노산 컨센서스 서열은 적어도 10개의 대표 서열로부터 생성되었고, 잠재적인 면역억제 도메인은 돌연변이에 의해 불활성화되고 하기 개시된 바와 같이 부분적으로 면역구성 T-세포 에피토프 HERV-K-me1로 대체되었다. 적합한 서열은 서열번호 5(ERV-K-gag 합성 단백질 컨센서스 서열); 서열번호 6(ERV-K-gag 합성 뉴클레오타이드 서열); 서열번호 7(ERV-K-env/MEL 합성 단백질 서열); 및 서열번호 8(ERV-K-env/MEL 뉴클레오타이드 서열)에 제시되어 있다.

[0413] MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQLATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPIRAVTVMDNPIEVYVNDVSVVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPICLGRAPGCLMPAVQNWLVVPTVSPISRFTYHVMVSGMSLRP
RVNYLQDFSYQSRSLKFRPKGKPCPEIKPKESKNTTEVLVWEECVANSAILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVSDLTESLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISPVSGPEHPPELWRLTVASHHRIWISGNQTLTETDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIIVIKPDSQITITCENC
RLLTCTIDSTFNWQHRIILVRAREGVVIVPMDRPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRIFITLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR
LWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTIVWMDRLMSLEHFRQLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLEQIFEASKAHLNLVPGTE
AIAGVADGLANLNPVTWVKITIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRSDHRRERAMMTMAVL SKRKGNGVKGSKRDQIVTVSV

[0414] **ERVK-env의 변형된 컨센서스 아미노산 서열 (상기):**

[0415] 잠재적인 면역억제 도메인이 돌연변이에 의해 비활성화되었다. 도입된 돌연변이는 면역우성 T-세포 에피토프 HERVK-me1에 의해 면역억제 도메인의 상당한 부분을 대체한다.

[0416] 이들 MVA 중 일부에 대해, hFOLR1 및 PRAME는 융합 단백질로서 생산되도록 설계되었다. FOLR1(엽산 수용체 알파)은 엽산 수용체 계열에 속한다. 엽산 및 그의 유도체에 대해 높은 친화성을 가지며, 세포표면에 막단백질로 분비되거나 발현된다. 막형단 단백질은 단백질의 C-말단 영역에 있는 세린(Ser) 잔기를 통해 소포체(ER)에 부착될 가능성이 가장 높은 GPI(글리코실포스파티딜이노시톨) 앵커를 통해 원형질막에 고정된다. GPI-앵커를 사용한 FOLR1의 변형 및 ER에서 hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 전체 처리를 피하기 위해, aa 234에서 257(Ser 잔기 포함)의 C-말단 영역이 결실되었다.

[0417] PRAME(흑색종의 우선적으로 발현되는 항원)은 전사 조절 단백질이다. 이것은 자가 세포독성 T 세포-매개 면역 반응을 유발하고, 다양한 고형암 및 혈액암에서 발현되는 인간 흑색종에서 항원으로 처음 기술되었다. PRAME는 레티노산 수용체에 대한 결합을 통해 레티노산 신호전달을 억제하여, 암세포에 성장 이점을 제공할 수 있다. PRAME의 기능은 핵 국소화를 필요로 하므로, PRAME의 잠재적 핵 국소화 신호(NLS)는 hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 표적 돌연변이에 의해 변형되었다.

[0418] 따라서, hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 아미노산 서열에 대해, FOLR1은 C-말단 GPI 앵커 신호를 결실시킴으로써 변형된 반면, PRAME에서는 2개의 잠재적인 핵 국소화 신호가 아미노산 치환에 의해 비활성화되었다. 이 융합 단백질에서, hFOLR1의 N-말단 신호 서열은 융합 단백질의 ER-표적화 및 불완전한 처리를 초래하여 PRAME의 핵 국소화를 피하기 위한 추가 보호 역할을 해야 한다.

[0419] 인간 FOLR1 및 인간 PRAME의 단백질 서열은 각각 NCBI RefSeq NP_000793.1 및 NP_001278644.1을 기반으로 하였다. 위에서 설명한 변형 외에도 융합 단백질의 뉴클레오타이드 서열은 인간 코돈 사용에 최적화되어 있으며, 폴리-nt 스트레치, 반복 요소, 및 음성 시스-작용 요소를 제거하고, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 10("fhFOLR1 Δ_hPRAME Δ 융합" 뉴클레오타이드 서열)에 제시되어 있는 반면, 융합 단백질 서열은 서열번호 9에 제시되어 있다.

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQ
CRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCCLYECSPNL
GPWQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKC
AVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWITHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVAR
FYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLSMERRRLWGSISQSRYSMSVWTSPPRL
VELAGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGV
LMKGQHLHLETFKAVLDGLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRA
SLYSFPEPEAAQPMTTKAKVDGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVAA
KKNVLRLLCCKKLKIFAMPMQDIKMILKMVQLDSIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMI
NLRRLLSHHIASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRDLQLLRHVM
NPLETSLITNCRLSEGDMHLSQSPSVSLSVLSLGVMLTDVSPEPLQALLERASATLQ
DLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSISALQSLLQHLIGLSNLTHVLYPV
PLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILC
PCFMPN

[0420]

[0421] **hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 서열(상기):**

[0422] 변형된 인간 FOLR1(N-말단 부분) 및 PRAME(C-말단 부분)의 융합인, hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 아미노산 서열. FOLR1은 C-말단 GPI 앵커 신호(취소선 문자)를 결실시켜 변형되었다. PRAME(밑줄친 문자)에서, 초기 메티오닌이 결실되었고, 2개의 잠재적인 핵 국소화 신호가 아미노산 치환에 의해 비활성화되었다(굵고, 밑줄친 문자).

[0423] 이 MVA에 사용된 막-결합 인간 4-1BBL의 단백질 서열은 NCBI RefSeq NP_003802.1과 100% 동일성을 나타내고, 사용된 막-결합 인간 CD40L의 단백질 서열은 NCBI RefSeq NP_000065.1과 100% 동일성을 나타낸다. 4-1BBL 및

CD40L 모두에 대해, 뉴클레오타이드 서열이 인간 코돈 사용에 최적화되었고, 폴리-nt 스트레치, 반복 요소 및 음성 시스-작용 요소가 제거되었다.

- [0424] NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시되어 있는 반면, hCD40L의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2에 제시되어 있다. NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1BBL 아미노산 서열은 서열번호 3에 제시되어 있는 반면, h4-1BBL의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4에 제시되어 있다.
- [0425] ERV-K-gag 및 h4-1BBL 둘 다 Pr1328 프로모터의 제어 하에 배치된 것을 제외하고는 각 코딩 영역은 상이한 프로모터의 제어 하에 배치되었다. Pr1328 프로모터(길이 100 bp)는 백시니아 바이러스 프로모터 PrB2R의 정확한 상동체이다. 낮은 수준에서 강력한 즉각적인 초기 발현과 늦은 발현을 유도한다. 재조합체 MVA-mBN489에서, Pr13.5long 프로모터는 ERVK-env/MEL의 발현을 유도한다. 이 프로모터는 천연 MVA13.5L 유전자의 발현을 유도하는 014L/13.5L 사이의 유전자간 영역의 124 bp를 손상시키고 2개의 초기 프로모터 코어 서열에 의해 야기되는 매우 강력한 초기 발현을 나타낸다(Wennier *et al.* (2013) *PLoS One* 8(8): e73511 참조). hCD40L의 발현을 유도하기 위해 본원에서 사용된 MVA1-40k 프로모터는 원래 1986년 백시니아 바이러스 Wyeth Hind III H 영역에서 161 bp 단편으로 단리되었다. 이는 후기 유전자 전사 인자 VLTf-4를 구동하는 094L/095R의 유전자간 영역내에서 백시니아 바이러스 Wyeth 및 MVA 계통의 158 bp를 손상시킨다. hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 발현을 유도하기 위해 본원에서 사용되는 프로모터 PrH5m은 백시니아 바이러스 H5 유전자 프로모터의 변형된 버전이다. 이는 강한 초기 및 후기 요소로 구성되어, 재조합 MVA의 감염 초기 및 후기 단계 모두에서 발현을 초래한다(Wyatt *et al.* (1996) *Vaccine* 14: 1451-58 참조).
- [0426] MVA-mBN494(상기 참조)에 기초하여 또 다른 벡터가 ERVK-env/MEL의 변형을 함유하도록 설계되었다. 생성된 벡터는 "MVA-mBN502"로 지칭되었으며, 도 31c에 개략적으로 도시되어 있다. 변형된 ERVK-env/MEL 외에도, MVA-mBN502는 ERVK-gag, hFOLR1-hPRAME 융합 단백질 및 h4-1BBL도 암호화한다.
- [0427] 본래, HERVK-env는 번역 후 절단되는 신호 펩타이드, 표면(SU) 및 막횡단 단위(TM)로 구성된다. 두 도메인으로의 절단은 세포성 프로테아제에 의해 달성된다. RSKR 절단 모티프는 전장 90 kDa 단백질을 SU(약 60 kDa) 및 TM(약 40 kDa) 도메인으로 절단하는 데 필요하고 충분하다. MVA-mBN494의 제조에 대해 위에서 설명한 바와 같이, 적어도 10개의 대표 서열로부터 유래된 env에 대한 아미노산 컨센서스 서열이 생성되었고, TM의 잠재적인 면역억제 도메인은 돌연변이에 의해 비활성화되었다. 도입된 돌연변이는 면역억제 도메인의 상당 부분을 면역우세 T-세포 에피토프 HERV-K-mel로 대체하였다. 이 이식유전자(MVA-mBN494에서 사용됨)는 ERVK-env/MEL로 명명되었다(도 31a).
- [0428] MVA-mBN494와 비교하여, ERVK-env/MEL의 TM 도메인은 MVA-mBN502에서 결실된다. 이 ERVK-env/MEL 변이체는 "ERV-K-env/MEL_03"으로 지정되었으며, 결실된 RSKR 푸린 절단 부위를 제외한 전체 SU 도메인으로 구성된다. MEL 펩타이드는 C-말단에 삽입되었고, 그 다음에는 TM 도메인의 6개 아미노산이 삽입되었다(강력한 소수성인 융합 펩타이드 서열 제외). 또한, 이 변형된 ERVK-env/MEL은 인간 PDGF(혈소판-유래 성장 인자) 수용체에서 유래한 멤브레인 앵커를 추가하여 원형질막을 표적화하였다. 이 막 앵커는 가요성 글리신-함유 링커를 통해 SU 도메인에 부착되었다(도 31b). 생성된 ERVK-env/MEL 변이체, 즉 ERVK-env/MEL_03은 MVA-mBN502에 함유된다(도 31c). 변이체의 적합한 서열은 서열번호 11(ERV-K-env/MEL_03 합성 단백질 서열) 및 서열번호 12(ERV-K-env/MEL_03 뉴클레오타이드 서열)에 제시되어 있다.
- [0429] **실시예 39: MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(MVA-BN-4IT)의 생물활성**
- [0430] MVA-BN-4IT(즉, MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL; 또한 상기 실시예 38 참조)에 의한 감염이 인간 세포의 HLA 분자에 의한 백신-유래 종양 항원의 제시를 초래할 것인지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 항원제시세포의 HLA-ABC 펩타이드 복합체를 면역침전시켜, 질량분석기로 어떤 HLA-결합 펩타이드를 확인할 수 있는지 분석하였다.
- [0431] 먼저, 항원이 HLA 클래스 I에 로딩될 수 있기 때문에(Nyambura L. *et al.* *J. Immunol* 2016), 인간 단핵구 세포주 THP-1은 항원 제시 능력을 발휘하는 대식세포로 분화되었다(Daigneault *et al.* *PLoS One*, 2010). 실제로, THP-1 세포는 미국과 유럽(인구의 약 30%)에서 가장 흔한 일배체형 중 하나인 HLA-A*0201⁺를 발현한다. HLA-A*02:01:01G 외에도 THP-1 세포는 HLA-B*15 및 HLA-C*03을 발현하는 것으로 보고되었다(Battle R. *et al.*, *Int. J. of Cancer*). 여기서, 8×10^5 /ml THP-1 세포를 200 ng/ml PMA(포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트) 존재하에 3일 동안 배양한 후 배지를 교환하고 PMA의 부재하에 세포를 추가로 2일 동안 배양하였다. 5일차에 세포를 12시간 동안 4의 InfU(감염 단위)로 MVA-BN-4IT로 감염시켰다. 도 30b에 도시된 바와 같이, HERVK-env/MEL,

HERVK-gag 및 융합 단백질 FOLR1-PRAME는 THP-1 세포를 MVA-BN-4IT로 감염시킨 후 발현되었다(도 30b에서 "mBN494"). 대조적으로, 항원은 감염되지 않은 THP-1 세포에서 내인적으로 발현되지 않았다(도 30b에서 "ctr").

[0432] 다음으로, "ProPresent" HLA-ABC 리간드 분석(ProImmune)을 수행하였다. MVA-BN-4IT 감염된 세포에서 4개의 종양-항원 유래 펩타이드가 확인되었다: HERV-K env 펩타이드 ILTEVLKGV, HERV-K gag 펩타이드 YLSFIKILL 및 PRAME 펩타이드 ALQSLQLHL 및 SLLQHLIGL. 확인된 2개의 PRAME 펩타이드는 크게 중첩되며, 공통 코어 에피토프를 공유할 가능성이 가장 높다. 두 펩타이드 모두 HLA-A*02:01에 매우 강하게 결합할 것으로 예상되며, 이에 따라 ALQSLQLHL은 HLA-B*15와 거의 유사한 결합 순위를 갖는다. 특히, PRAME 펩타이드 SLLQHLIGL은 이미 인간에서 면역원성 HLA-A*0201-제시된 세포독성 T 림프구 에피토프로 기재되었다(Kessler JH. et al., *J Exp Med.*, 2001). 종합하면, 데이터는 MVA-BN-4IT에 의해 발현된 항원이 감염된 세포의 HLA에 로딩될 수 있음을 입증한다.

[0433] 또한, MVA-BN-4IT는 수용체인 4-1-BB에 결합하는 기능적 형태로 4-1-BBL을 발현하는 능력에 대해 테스트하였다. 이를 위해, 상용 키트("4-1BB Bioassay", Promega)를 사용하였다. 이 분석은 h4-1-BB를 발현하는 유전적으로 조작된 Jurkat T 세포주와 4-1-BB 리간드 자극에 반응할 수 있는 반응 요소(RE)에 의해 구동되는 루시페라제 리포터로 구성된다. h4-1-BB가 h4-1-BBL에 의해 자극되면, RE는 세포 내에서 세포 루시페라제 생산을 활성화한다. 세포 용해 및 "Bio-Glo" 시약(Promega)을 첨가한 후, 발광계를 사용하여 발광도를 측정하고 정량화한다. 간단히 말해서, HeLa 세포를 도 30c에 표시된 MVA-기반 작제물로 각각 플레이팅하고(1×10^6), 감염시키고(TCID₅₀=2), 밤새 배양(37°C, 5% CO₂)한 다음, 6시간 동안 Jurkat-h4-1-BB 세포(HeLa:Jurkat의 비율 = 4:1)와 공동배양하였다. Fc로 가교된 His-태그된 h4-1-BBL을 참조(양성 대조군)로 사용하였고, 1 µg/ml의 가교된 h4-1-BBL과 함께 배양된 Jurkat-h4-1-BB 세포에 의한 루시페라제 발현을 1로 설정하였다(도 30c, 점선). MVA-BN(즉, h4-1-BBL을 암호화하지 않음)을 백본 대조군으로 사용하였다. 도 30c에 도시된 바와 같이, h4-1-BBL을 발현하는 MVA-기반 벡터로 감염된 HeLa 세포는 참조물과 비교하여 (공동 배양된 Jurkat-h4-1-BB 세포를 통해) 루시페라제 생성을 6배 이상 유도하였다. 특히, MVA-BN-4IT에 의해 매개되는 루시페라제 생산은 MVA 벡터를 발현하는 다른 2개의 h4-1-BBL에 의해 매개되는 것보다 훨씬 더 높았다. 따라서, MVA-mBN494는 그의 4-1BB 수용체에 효과적으로 결합하는 기능적 h4-1-BBL을 발현한다.

[0434] **실시예 40: 브라큐리 항원을 암호화하는 MVA를 사용한 종양내 면역화**

[0435] 고도로 약독화된 비-복제 백시니아 바이러스 MVA-BN-브라큐리는 다양한 암에 대해 특이적이고 강력한 면역 반응을 유도하기 위해 4개의 인간 이식유전자로 구성되도록 설계되었다. 벡터는 브라큐리 인간 TAA와 세 가지 인간 공동자극 분자인, B7.1(CD80이라고도 함), 세포간 부착 분자-1(ICAM-1, CD54라고도 함) 및 백혈구 기능-관련 항원-3(LFA-3, CD58이라고도 함)을 공동발현한다. 3개의 공동자극 분자(또는 Costimulatory Molecules의 TRIad, TRICOM™)가 포함되어 있어 브라큐리 인간 TAA에 대한 면역 반응을 극대화한다.

[0436] 브라큐리는 T-box 계열의 전사 인자이며, 암 진행과 관련된 과정인 EMT의 동인이다. 이는 정상 조직에 비해 암 세포에서 과발현되며, 여러 치료 양식 및 전이 가능성에 대한 암세포 내성과 관련이 있다. 브라큐리를 발현하는 것으로 알려진 암에는 폐암, 유방암, 난소암, 척색종, 전립선암, 결장직장암 및 췌장 선암종이 포함된다.

[0437] 시험관내 및 임상 연구를 수행하여 브라큐리를 암호화하는 MVA의 안전성 및 잠재적인 치료 효능을 입증하였고; 예를 들어, Hamilton et al. (2013) *Oncotarget* 4: 1777-90 ("*Immunological targeting of tumor cells undergoing an epithelial-mesenchymal transition via a recombinant brachyury-yeast vaccine*"; Heery et al. (2015a) *J. Immunother. Cancer* 3: 132 ("*Phase I, dose escalation, clinical trial of MVA-brachyury-TRICOM vaccine demonstrating safety and brachyury-specific T cell responses*"; Heery et al. (2015b) *Cancer Immunol. Res.* 3: 1248-56 ("*Phase I trial of a yeast-based therapeutic cancer vaccine (GI-6301) targeting the transcription factor brachyury*"))를 참조한다.

[0438] 1상 임상 개발에서 정맥내 경로의 사용을 뒷받침하는 NHP(사이노물구스 마카크)에서 MVA-BN-브라큐리(MVA-mBN240B)의 임의의 잠재적 독성을 평가하기 위해 GLP-순응 반복-용량 독성 연구를 수행한다. 독성 연구에는 NHP에서 MVA-BN-브라큐리의 공간적 및 시간적 분포를 평가하는 생체분포 부분이 포함된다.

[0439] MVA-BN-브라큐리는 암 환자가 임의로 예를 들어 방사선 및/또는 관문 억제제와 같은 또 다른 치료와 함께 MVA의 종양내 주사로 치료되는 III상 시험에서 사용된다.

[0440] 본원에 기재된 방법 또는 조성물의 정확한 세부사항은 기재된 발명의 정신을 벗어나지 않고 변경되거나 변형될

수 있음이 명백할 것이다. 본 발명자들은 하기 청구범위의 범위와 정신에 속하는 모든 수정과 변형을 주장한다.

[0441] 서열목록

[0442] 첨부된 서열 목록에 나열된 핵산 및 아미노산 서열은 37 C.F.R. 1.822에 정의된 바와 같이, 뉴클레오타이드 염기에 대한 표준 문자 약어, 및 아미노산에 대한 1문자 코드 또는 3문자 코드를 사용하여 표시된다. 각 핵산 서열의 한 가닥만 표시되지만, 상보적 가닥은 표시된 가닥에 대한 임의의 참조에 의해 포함되는 것으로 이해된다.

[0443] 서열 목록의 서열:

[0444] 서열번호 1: NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L 아미노산 서열(261 아미노산)

[0445] 서열번호 2: NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L(792 뉴클레오타이드)

[0446] 서열번호 3: NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1BBL(254 아미노산)

[0447] 서열번호 4: NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1BBL

[0448] 서열번호 5: ERV-K-gag (666 아미노산) 합성 컨센서스 서열

[0449] 서열번호 6: ERV-K-gag; nt 서열

[0450] 서열번호 7: ERV-K-env/MEL (699 아미노산) 합성 서열

[0451] 서열번호 8: ERV-K-env/MEL nt 서열

[0452] 서열번호 9: hFOLR1Δ_{hPRAME}Δ 융합(741 아미노산)

[0453] 서열번호 10: hFOLR1Δ_{hPRAME}Δ 융합(741 아미노산) nt 서열

[0454] 서열번호 11: ERV-K-env/MEL_03 (517 아미노산) 합성 서열

[0455] 서열번호 12: ERV-K-env/MEL_03 nt 서열

[0456] 서열번호 1

[0457] NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L. (261 아미노산)

[0458] MIETYNQTSRPSAATGLPI SMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKD IMLNK
EETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPF IASLCLKSPGRFERI
LLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

[0459] 서열번호 2

[0460] NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L. (792 뉴클레오타이드)

[0461] nt-서열:

[0462] atgatcgagacatacaaccagacaagccctagaagcgccgccacaggactgcctatcagcatgaagatcttcatgtacctgctgaccgtgttccctgatcacc
cagatgatcggcagcgccctgtttgccgtgtacctgcacagacggctggacaagatcgaggacgagagaaacctgcacaggacttcgtgttcatgaagacc
atccagcgggtgcaacaccggcgagagaagctctgagcctgctgaactgcgaggaatcaagagccagttcgagggtctcgtgaaggacatcatgctgaacaaa
gaggaaacgaagaaagagaactccttcgagatgcagaaggcgaccagaatcctcagatcgccgctcacgtgatcagcaggccagcagcaagacaacaagc
gtgctgcagtgggccgagaagggtactacaccatgagcaacaacctgggtcacctggagaacggcaagcagctgacagtgaagcgcgaggcctgtactac
atctacgccaagtaccttctgcagcaacagagaggccagctctcaggctcctttcatcgccagcctgtgctgaagctcctggcagatcagagcggatt
ctgctgagagccgccaacacacacagcagcgccaaaccttggccagcagctctattcacctcgccggagtggttgagctgcagcctggcgcaagcgtgttc
gtgaatgtgacagaccctagccaggtgtcccacggcaccggctttacatcttctcgactgctgaagctgtgatgatag

[0463] 서열번호 3

[0464] NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1BBL. (254 아미노산)

[0465] MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL
IDGPLSWYSYDPLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASSEARNSAFGFQGRLL
HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

[0466] 서열번호 4

[0467] NCBI RefSeq NP_003802.1 로부터의 h4-1BBL.

[0468] nt 서열:

[0469] atggaatacgccagcgacgcctctctggaccctgaagctccttggcctccagctcctagagccagggtttagagtgtgccttgggctcttgtggctgga
cttctgcttctgttgcctcctggctgctgcctgcgagctgttcttgccttgtccatgggctgtgtcaggagccagagcatctcctggatctcccgttctccc
agactgagagaggacactgaactgagccctgatgatcctgctggactgctcgacctgagacagggcatgttggccagctggaggccagaatgtgctgctg
attgatggccctctgagctggtacagcgatcctggacttgcctggcgttagcctgactggaggcctgagctacaaggaggacaccaaagaactggtggtggcc
aaggctggcgtgtactacgtgttcttccagctggaactgcgagagtggtggcaggcgaaggatctggatccgtgtctctggcactgcatctgcagcctctg
agatctgctgctggtgacgtgccccggctctgacagtgatctgcctcctgcctccagcgaagccagaacagcgccttggcctccaaggcagactgctg
cacctgtctgctggccagagactgggagtgacacctccacacagaagcaagacacgcctggcagcttacacaaggcgtacagtgtggcctgttc
agagtacacctgagattccagctggcttgccatctcctcgcagcagtaaatga

[0470] 서열번호 5

[0471] ERV-K-env/MEL (699 아미노산)

[0472] MNPSEMQRKAPPRRRHRNRAPLTHKMNMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQLATKYLENTKVTQTPESMMLAALMIVSMVSLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPMIRAVTWMDNP I EYVYVNDVSVVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPLICGRAPGCLMPAVQNWLVETVSPISRFTYHVMVSGMSLRP
RVNYLQDFSYQSLKFRPKGKPCPEIPKESKNTVLVWEECVANSAILQNEFGTIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLTESLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKGI STPRPKIISPVS GPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTL ETRDRKPFYTVDLNSSLTVP LQSCVKPPYMLVVGNI VIKPDSQITCENC
RLLTCIDSTFNWQHRILLVRAREGVIPVSM DRPWEASPSVHILTEVLKGLVNRSKRFIFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR
LWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTVIWMGDR LMSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLEQIFEASKAHLNLVPGTE
A IAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRSDHRRERAMMTMAVL SKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

[0473] 서열번호 6

[0474] ERV-K-env/MEL

[0475] nt 서열

[0476] atgaaccctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggtcctctgacacacaagatgaacaagatggtcaccagcgag
gaacagatgaaactgccagcaccaagaaggccgagcctccaacatgggctcagctgaagaaactgacctagctggccaccaagtacctggagaacacacaaa
gtgacctgacacacctgagagcatgctgctggcagctctgatgatcgtgtccatgggtggtgtccctgcctatgcctgctggtgctgccgtgccaaactacaca
tactgggctacgtgcccttctcctatgatcagagccgtgacctggatggacaacctatlgaggtgtacgtgaacgacagcgtgtgggtgccaggacct
atcgacgatagatgtcctgccaacctgaggaagagggtgatgatcaacatcagcatcggtaccggtatcctccaatctgcctgggcagagcacctggc
tgtcttatgccagctgtgcagaattggctggtggaagtgcctaccgtgtctcccatcagccggttcaacctaccacatgggtgtccggcatgagcctcagacct
agagtgaactacttgaggacttcagctatcagcggagcctgaagtgcagaccaagggaagccctgtcctaaagagattccaaagagtccaagaacacc
gaggtgctcgtgtgggaagagtgcgtggccaattctgccgtgatcctgcagaacaacaggttcggcaccatcatctgactgggctcctagaggccagtcttac
cacaattgcagcggacagacacagagctgtcctagcgcacaagtgtcaccagccgtggatagcgatctgaccgagagcctggacaagcacaaacacaagaaa
cttcagagcttctatccctgggagtgaggagagaagggtcatctacaccaaggcctaagatcattagccctgtgtctggaccagaacatcccgaacttgg
agactgacagtggccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagacctggaaacacgggacagaaagccctctacaccgtcgatctgaacagcagc
ctgaccgtgcctctccagagctgtgtgaagcctccttacatgctggtcgtgggaacatttgtgatcaagcccactccagaccatcacatgcgagaactgc
agactgctgacctgcatcgacagcaccttcaactggcagcaccggatcctgctcgtgagcagctagagaaggcgtgtggatccctgtctctatggacaggcct
tgggaagccagccctagcgtgcacattctgacagaggtgctgaaggcgtgctcaacagatccaagcgttcatcttaccctgatcgccgtcatcatgggc
ctgatgtgtgtgacagccacagctgtgtgtgctggcgtggccctgcatagctctgtgcagagcgtgaacttcgtgaacgattggcagaagaacagcacacgg
ctgtggaacagccagagcagcatcgaccagaagatgctggccgtgatctcctgtgccgtgcagacagttatctggatgggcgacagactgatgagcctggaa
caccggttccagctgcagtgcgactggaataaccagcagcttctgcatcacacctcagatctacaacgagagcagcaccactgggatatggtccgaaggcat
ctgcagggcagagaggacaacctgacactggacatcagcaagctgaaagagcagatcttcgaggccagcaaggctcacctgaatctggtgcctggaaccgaa
gctatttgcctggagtgcagatggcctggccaatctgaatcctgtgacctgggtcaagaccatcggcagcaccacaatcatcaacctgatcctgatcctcgtg
tgctgtttgcctgctgcttgtgtgcagatgcaccagcagctgagaagagacagcgaccatagagaaagagccatgatgacctggcctcctgagcaag
agaaaggagggcaacgtgggcaagagcaagcgggatcagatcgtgacctgtccgtttgataa

[0477] 서열번호 7

[0478] ERV-K-gag (666 아미노산)

[0479] MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGVKVSTKNLIKLFQIEQFCPWFP EQGTLDLKDWKRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSV

SVSDAPGSC I IDCNENTRKKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYNQLQEV IYPETLKLEGKGPELVGPSESKPRGTSPLPAGQVPVTLQPKQVKENKT
QPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQSYGYGMPMPAPQGRAPYPQPPTRRLNPTAPPSRQGSSELHE I IDKSRKEGDTAWQFPVTLPEMPPGEGAQEGEPPTVEAR
YKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLDSIAHGRLIPYDWEILAKSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRANPPVNIADQLLIGIQNWSTISQQ
ALMQNEAIEQVRAICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSI ADEKARKVI VELMAYENANPECQSAIKPLKGKVPAGSDVI SEYV
KACDGI GGAMHKAMLMAQAITGVVLGGQVRTFGGKCYNCQIGHLKKNCPVLNKNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQCRSKFDKNGQPLSGNEQR
GQPQAPQQTGAFFIQPFVQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYNNCPPPQAAVQQ

[0480] 서열번호 8

[0481] ERV-K-gag

[0482] nt 서열

[0483] atgggacagaccaagagtaagatcaagctctaatgacccagctacctcagcttcatcaagatcctgctgaagagaggaggcgtgaaagtgtccaccaagaac
ctgatcaagctgttccagatcatcgagcagttctgtccctgggttctcctgagcagggcaccctggatctgaaggactggaagcggatcggcaagagctgaag
caggctggcagaagggaacatcatccctctgaccgtgtggaacgactgggcatcatcaagcagctctggaaccttccagaccgaagaggatagcgtg
tccgtgtctgatgctcctggcagctgcatcatcgactgcaacgagaacacccggaagaagtccagaaagagacagagagcctgcactgcgagtacgtggcc
gaacctgtgatggctcagagcaccagaacgtggactacaaccagctccaagaagtgatctatcccgaaacactgaagctggaaggcaaggacctaactc
gtgggtccttctgagctctaaagccagaggcacatctcctctgctgagcagcaggtgccagtgcactgcagcctcagaaacaagtgaagagaacaagacc
cagcctcctgtggcctaccgatattggcctccagccgagctgcagtacagacctcctccagagagccagtacggctaccctggaatgcctcctgctcctcaa
ggcagagctccttatcctcagcctcctaccagacggctgaacctacagctcctcctagcagacagggtctgagctgcacgagatcatgacaagagccgg
aaagagggcacaccgaggttggcagtttcccgttacactggaacctatgcctccaggcgaaggcgtcaagaaggcgaacctcctacagtgaagccagg
tacaagagcttcagcatcaagatgctgaaggacatgaagggaaggcgtcaagcagtagcagacctaacagcccatacatgaggacctgctggatctattgcc
cacggccaccggctgatcccttacgatgggagatcctggctaagtctctctgagccctagccagttcctgcagttcaagacctggaggatcgacggcgtg
caagaacaagtgagacggaacagagctgccaatcctcctgtgaacatcgacgcccagcagctcctcggaatcgccagaattggagaccatctctcagcag
gctctgatgcagaacgagccatgaaacaagtgcagccatctgcctgagagcttgggagaagattcaggaccaggcagcacatgtcccagcttcaatacc
gttgcgcagggcagcaaaagaccctatcctgactttgtggctagactgcaggtgtggcccagaagctctattgccgacgagaaggctcggaagtgtcgtg
gaactgatggcctacgagaacgctaatccagagtgcagagcgccatcaagcccttgaagggcaaaagtgcctgcccgaatccgatgtgatcagcgagtatgtg
aaggcctgcgacggaatcggaggtgccatgcacaaagccatgctgatggcacaggccatcactggcgttgtgctcggaggacaagttcggacctttggagggc
aagtgtacaactgtggccagatcggacacctgaagaagaactgccctgtgctgaacaagcagaacatcaccatccagggccaccaccggcagagaacct
ccagatctgtgcctagatgaagaagggaagcactgggcccagccagtgagaagcaagttcgacaagaacggccagcctctgagcggcaacgaacaaaga
ggacagcctcaggctcctcagcagactggcgcatttccaatccagcccttctgtgcctcaaggcttccagggaacaacagcctccactgtctcaggtgtccag
ggcattagccagctcctcagtaacaacaactgccctccacctcaggtgctgtgcagcagtgatga

[0484] 서열번호 9

[0485] hFOLR1Δ_hPRAMEΔ 융합 (741 아미노산)

[0486] MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCNNAKHHEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQAHKDVSYLRYFNWNHCGEMAPACKRHF IQ
DTCLYECSPNLGPW IQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKA VAGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYR
GSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMERRRLWGS IQSRYISMSVWTSPPRLVELAGQSLKDEALATAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQ
AWPFTCLPLGVL MKGQHLHLETFKAVLDGLDVLLAQEVPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTTAKVDGLSTEAQPFIPVE
VLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVAACKNVRLRCKKLIKIFAMPQDIKIMLKMVQLDSIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGMINLRRLLLSHIHASSYISP
EKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRDLQLLRHVMNPLETLSITNCRLESGDMHLSQSPSVSLSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLERASATL
QDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTL SFYGNISISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWL
SANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

[0487] 서열번호 10

[0488] hFOLR1Δ_hPRAMEΔ 융합 (741 아미노산)

[0489] nt 서열

[0490] tggcccagagaatgaccacacaactgctgctgctcctgggtgtgggttgccgttgttggagaggcccagaccagaattgcctgggcccagaaccgagctgctga
acgtgtgcatgaacccaagcatcacaagagaagcctggacctgaagacaagctgcatgaacagtgctggccttggagaaagaatgcttgctgtagcacca
acaccagccaagaggcccacaaggacgtgtcctacctgtaccggttcaactggaaccactgcggagaaatggctcctgcctgcaagagacacttcatccagg
atactgcctgtacgagtgtctcccaatctcggaccttggatccagcaagtggaccagagctggcggaagaacgggtgctgaatgtgccttgtgcaaaag

aggat tgcgagcagt ggtgggaagatt gccggaccagct acacat gtaagagcaact ggcacaaaggct ggaact ggaccagcggt tcaacaagt gtgccg
tgggagctgcctgccagcct tccact tctact tcccaacacct accgtgct gtgcaacgaaat ctggaccacagct acaaggtgt ccaact acagcagag
gcagcggcaggtgt atccagatgt ggttcgat cccgct cagggcaat cccaat gaggaagt ggctagatt tctacgtgct gccatggaaagaagaaggct ct
ggggcagcat ccagagccggtacatt agcatgagcgtgt ggacaagccct agacggct ggttgaactggct ggacagagcct gctcaaggat gaggccttg
ccattgctgct ctggagctgct gcctagagagctgt tccctcctctgt tcatggctgcct tgcacggcagacacagccagacact gaagccatggtgcagg
cctggcct ttcacctgtct gcctctgggagtgt gatgaaggccagcat ctgcacctggaacct tcaaggccgtgctggacggcctggatgt tctcctgg
ctcaagaggtgaggcctcgcgcttggaaactgcaggttctggatctgcggaagaactctcaccaggatt tctggaccgt tggctccggcaacagagccagcc
tgtacagct ttcctgaacctgaggtgcccagcccatgaccacaaaggccaaagtggatggcctgagcacagaggccgagcagcct tcat tcccgtcgaag
tgctggtggacctgt tctgaaagaaggagcctgcgatgagctgt ttcagctacctgat tgagaaggtggcagccaagaagaacgtgctgcggctgtgctgca
agaagctgaagatct tggccatgcctatgcaggat atcaagatgat cctgaagatggtgcagctggacagcatcgaggacctggaagt gacctgtacctgga
agctgcccacactggccaagt tccagccct tacctgggacagatgat taacctgcggaggctgctgctgtctcacatccacgccagctcctacatcagccctg
agaaagaggaacagtat atcgccagct tcaaacgagct tctgagcctgcagtgctgcaggccctgtacgtggacagcctgt tct tctgagaggcaggc
tggatcagctgctgcggcagctgatgaacctctggaacctgagcat caccaactgtagactgagcagggcgacgtgatgcacctgtctcagagcccat
ctgtgtctcagctgagcgtgctgtctgtctggcgtgatgctgaccgatgtgagccctgaacctctgcaggcactgtggaagagcctccgctactctgc
aggacctggtgttcgatgagtgccgcatcaccgatgaccagctgcttgcctctgctgccaagcctgagccactgtagccagctgacaacctgtccttctacg
gcaacagcatctccatctctgcctgcagctctctcctgcagcatctgatcgccctgtccaatctgacccacgtgctgtacctgtgccactggaagctacg
aggacatccacggaacctgcacctcgagagactggcctatctgcatgctcgctgagagaactgctgtgcgaactgggcagaccagcatggttggctga
gcgccaatccatgtcctcactgtggcgaccggaccttctacgacctgagcctatcctgtgcttctgcttcatgcccactaatag

[0491] 서열번호 11

[0492] ERV-K-env/MEL_03 (517 아미노산)

[0493] MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQLATKYLENTKVTQTPESSMLLAALMIVSMVSLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPIRAVWTMDNPIEVYVNDVSVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPICLGRAPGCLMPAVQNWLVEVPTVSPISRFTYHVMVSGMSLRP
RVNYLQDFSQYRSLKFRPKGKPCPKKEIPKESKNTVELVWEECVANSAILQNEFGTIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLTESLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKGI STPRPKIISPVS GPEHP ELWRLTVASHHIRIWSGNQLETRDKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNI VIKPDSQITCENC
RLLT CIDSTFNWQHRILLVRAREGVWIPVSMRDPWEASPVHILTEVLKGVLNMLAVISCAVAGVALHGSAGSAGSGEFVVISAILALVVLTIISLIILIM
LWQKKPR

[0494] 서열번호 12

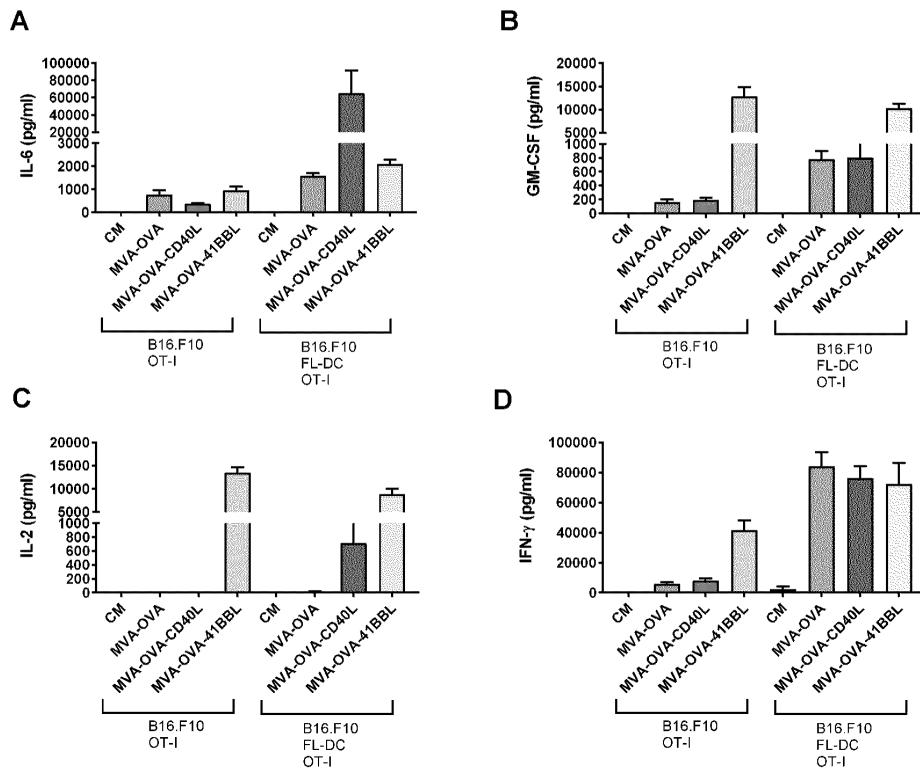
[0495] ERV-K-env/MEL_03

[0496] nt 서열

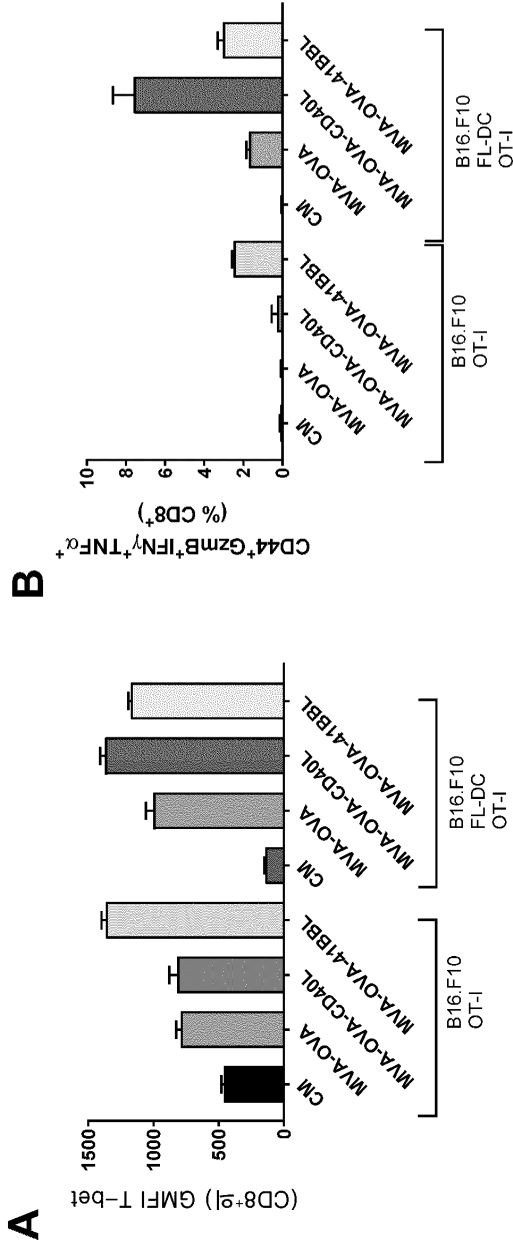
[0497] atgaacctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggtcctctgacacacaagatgaacaagatggtcaccagcgag
gaacagatgaaactgccagcaccaagaaggccgagcctccaacatgggctcagctgaagaaactgaccagctggccaccaagtacctggagaacacaaa
gtgaccacagacacctgagagcatgctgctggcagctctgatgatcgtgtccatggtggtgtcctgcctatgctgctggtgctgccgctgccaactacaca
tactgggcctacgtgccct ttcctcctatgatcagagccgtgacctggatggacaacctat tgaggtgtacgtgaacgacagcgtgtgggtgccaggacct
atcgacgatagatgtcctgccaacctgaggaagaggcgatgatgatcaacatcagcatcggtaccggtatcctccaatctgcctgggcagagcacctggc
tgtcttatgccagctgtgcagaat tggctggtggaagtgcctaccgtgtctcccatcagccggttaccctaccacatggtgtccggcatgagcctcagacct
agagtgaactacttgcaggactt cagctatcagcggagcctgaagt tgcagcccaagggaagccctgtcctaaagagat tccaaagagtccaagaacacc
gaggtgctcgtgtgggaagagtgcgtggccaat tctgccgtgatcctgcagaacaacagagt tggcaccatcat tgaactgggctcctagaggccagt tctac
cacaat tgcagcggacagacacagagctgtcctagcgcaagaagtgtcaccagccgtggatagcgtatgcaggagagcctggacaagcacaacacaagaaa
cttcagagcttctatccctgggagtggggagagaaggcgatctctacaccaaggcct aagatcattagccctgtgtctggaccagaacatcccgaact tgg
agactgacagtggccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagacctggaaacacgggacagaaagcccttctacacctcgatctgaacagcagc
ctgacctgcctctccagagctgtgtgaagcctccttacatgctggtcgtgggaacatttgtgatcaagcccactccagaccatcacatgcgagaactgc
agactgctgacctgcatcgacagcaccttcaactggcagcaccggatcctgctcgtgcgagctagagaaggcgtgtggatccctgtctctatggacaggcct
tgggaagccagccctagcgtgcacattctgacagaggtgtgaaggcgctgtcaacatgctggccgtgatctcctgtgccgtggctggcctggcctgc
ggctctgctggatctgctgctggaagcggcgagttcgtggtcatctctgccattctggctctggtggtgctgaccatcatcagcctgatcatcctgattatg
ctgtggcagaagaagccccggtgataa

도면

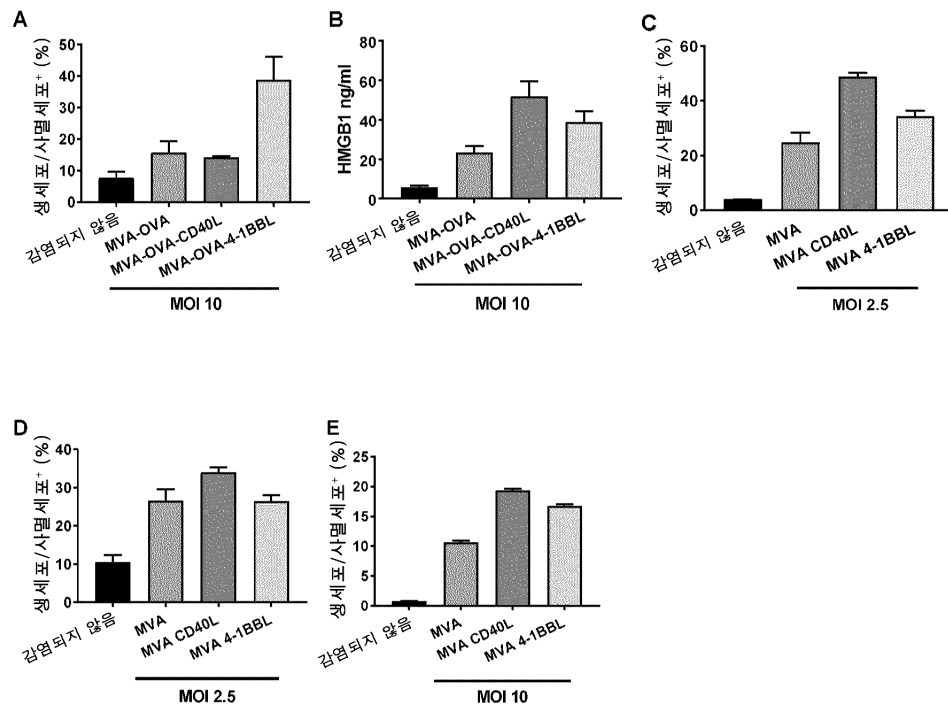
도면1



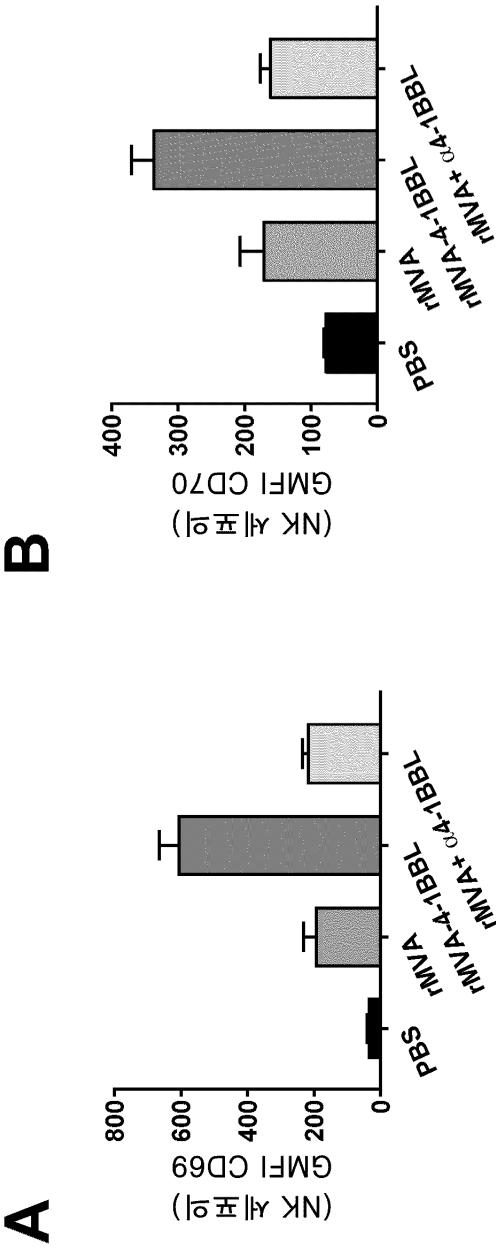
도면2



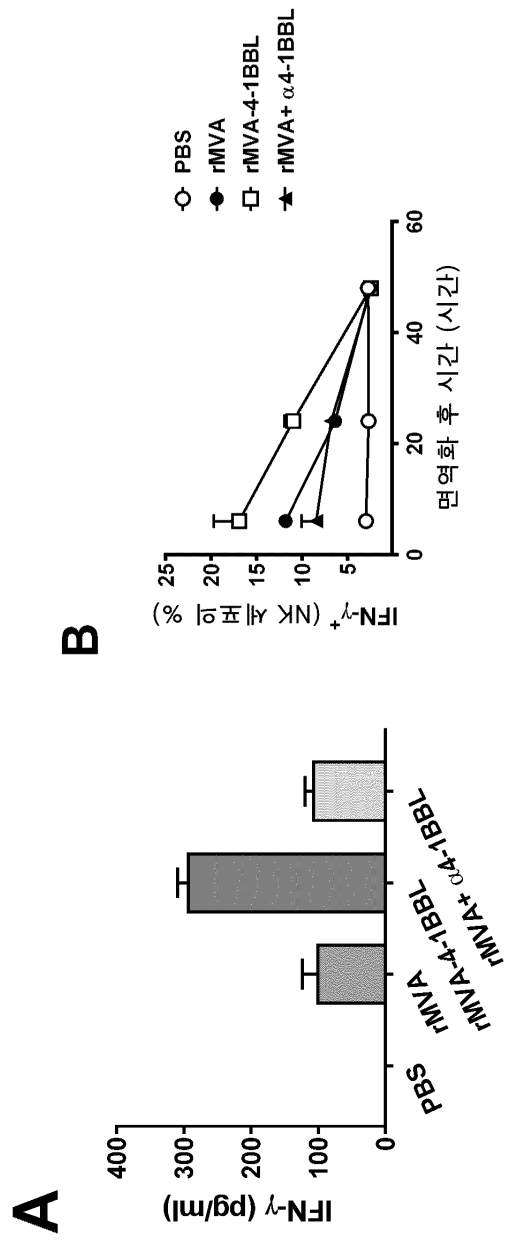
도면3



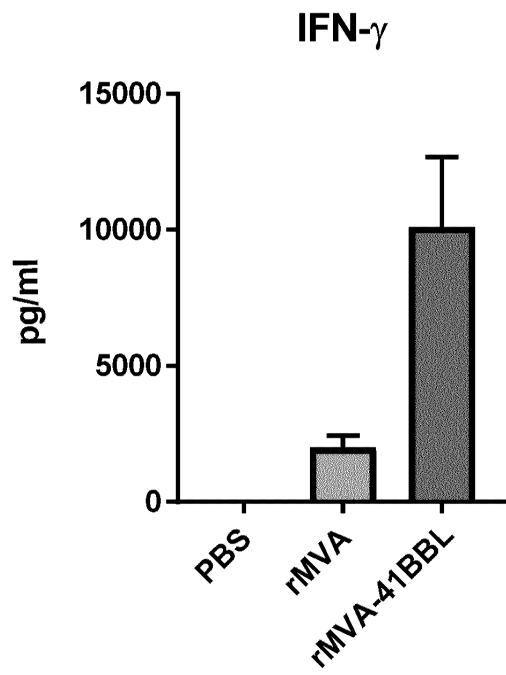
도면4



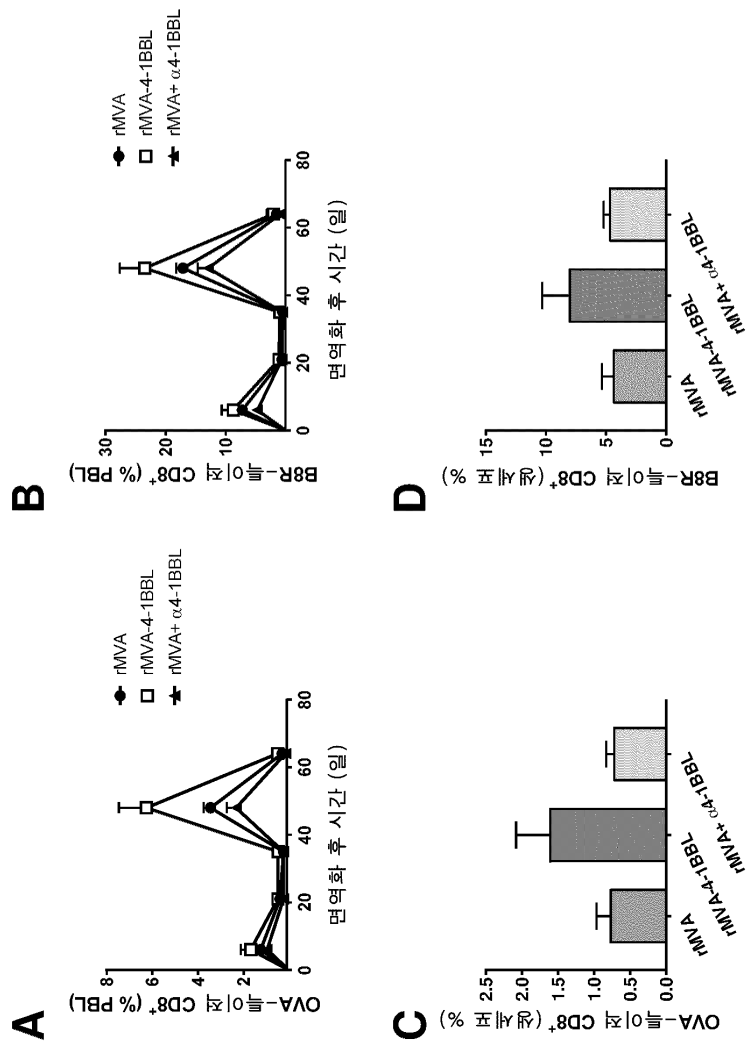
도면5



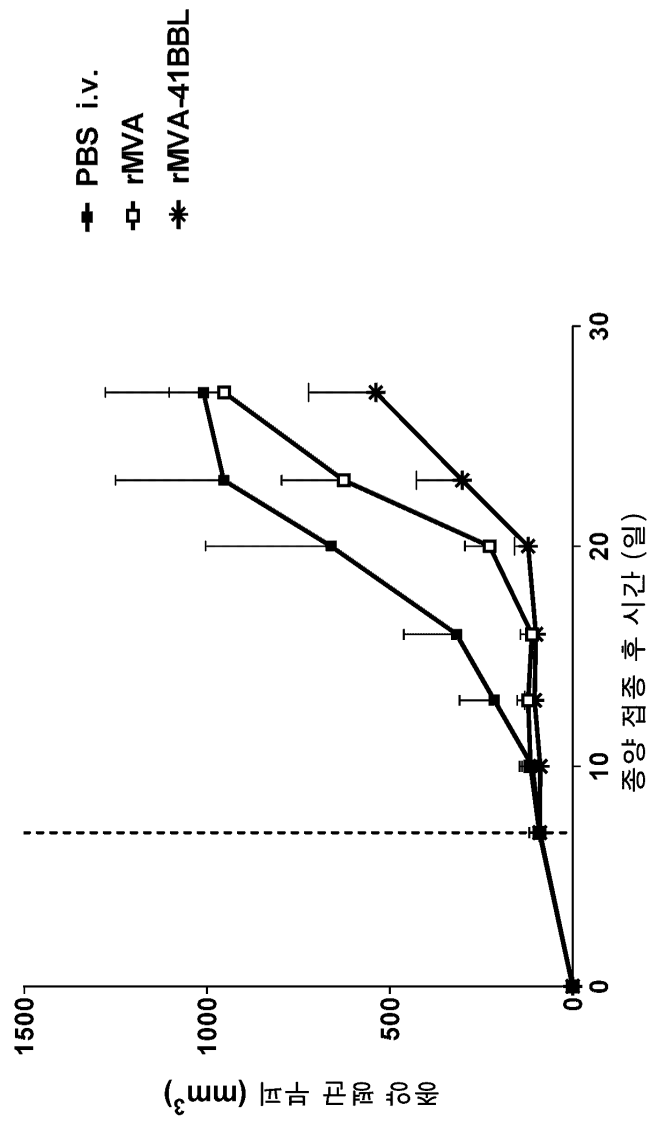
도면6



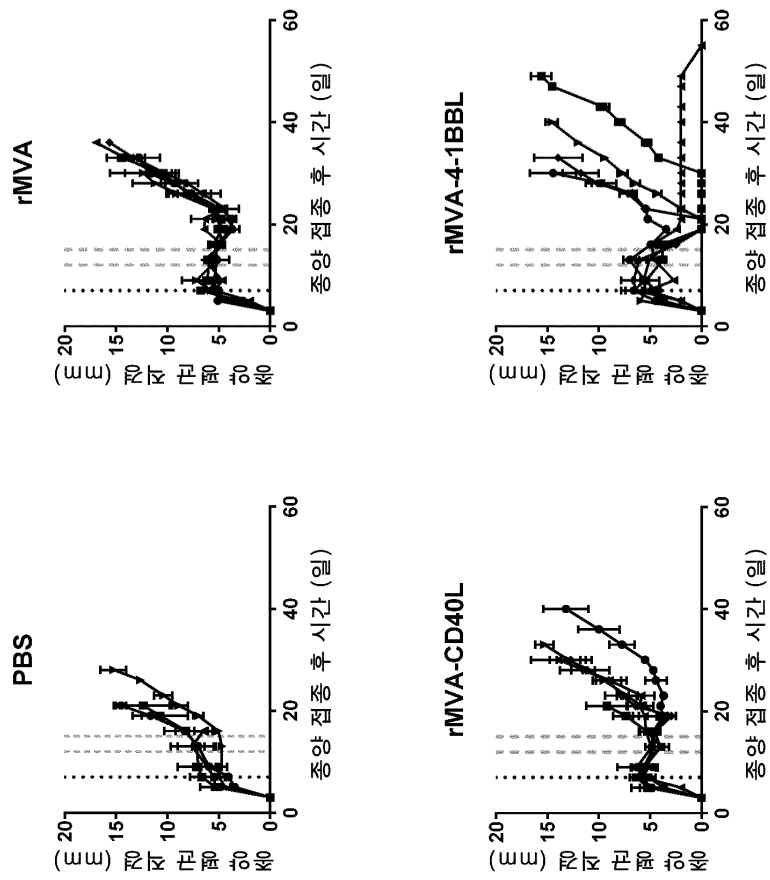
도면7



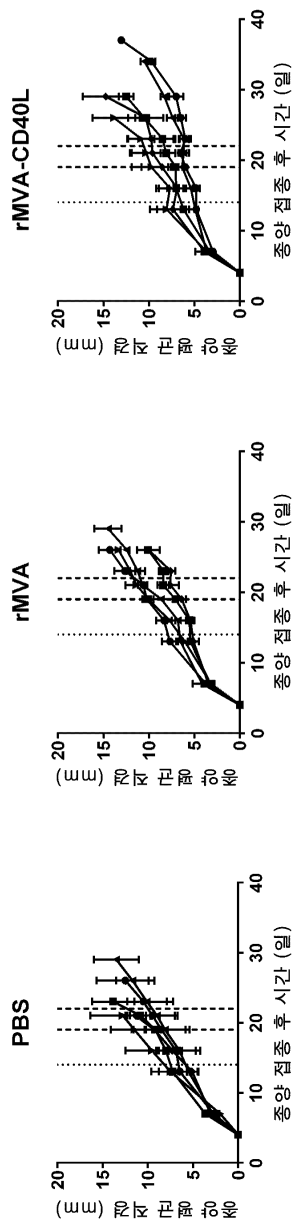
도면8



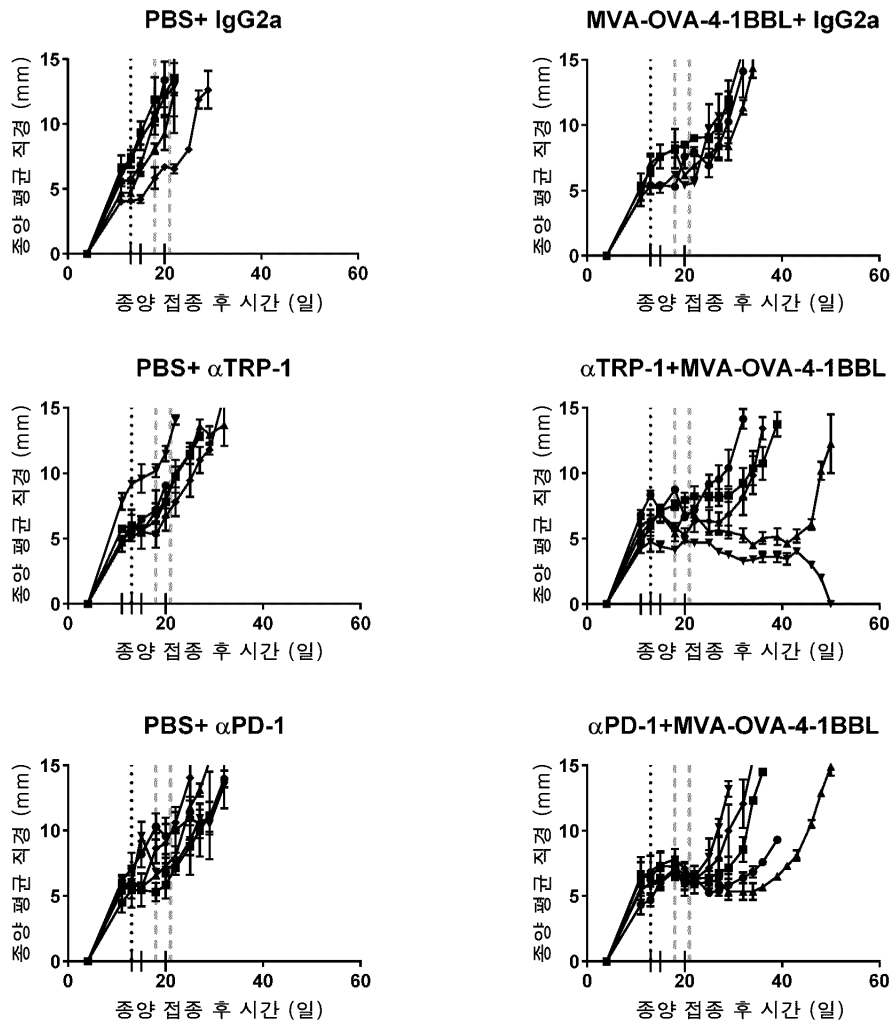
도면9



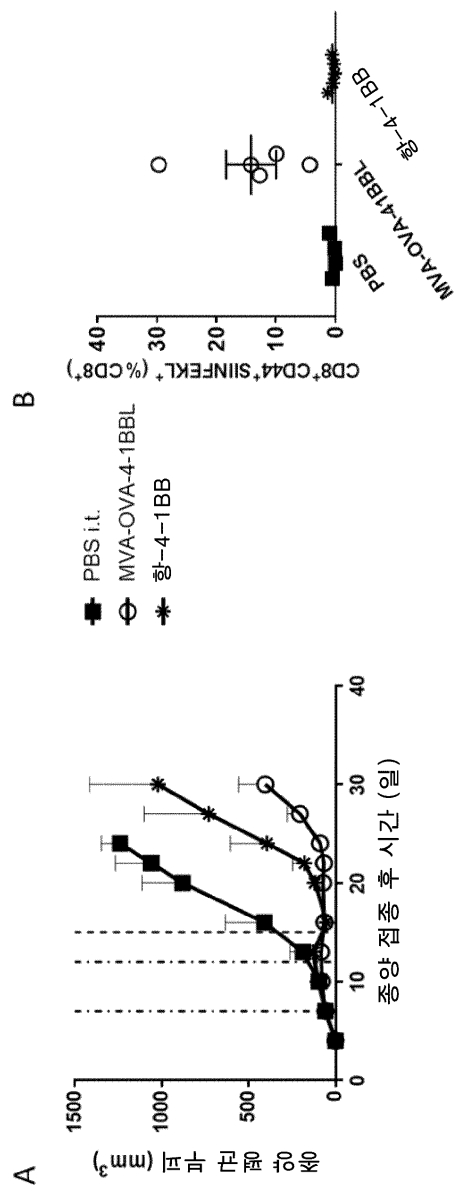
도면10



도면11

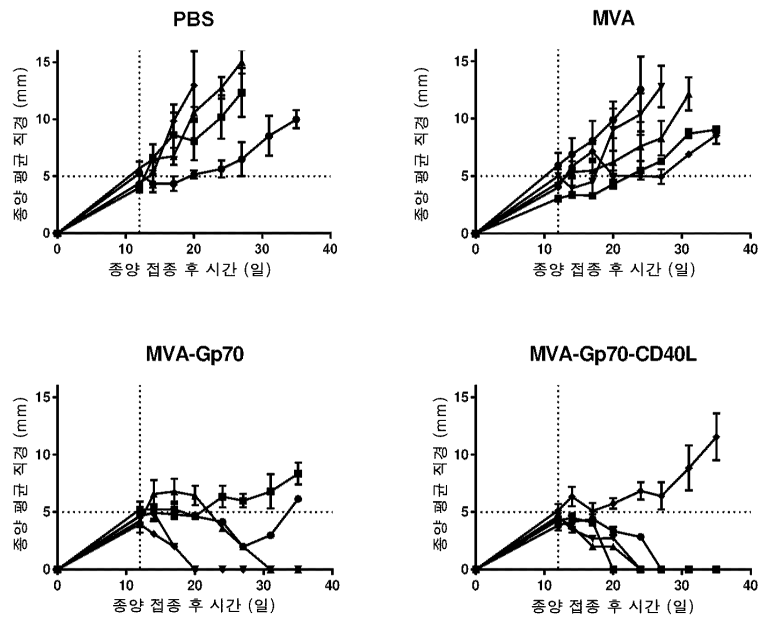


도면12

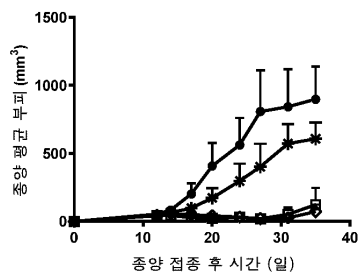


도면13

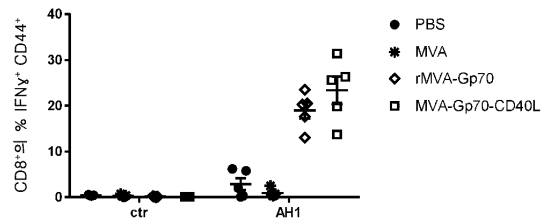
A



B

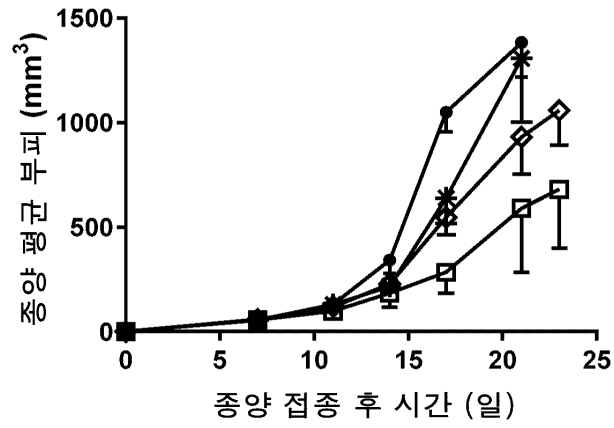


C

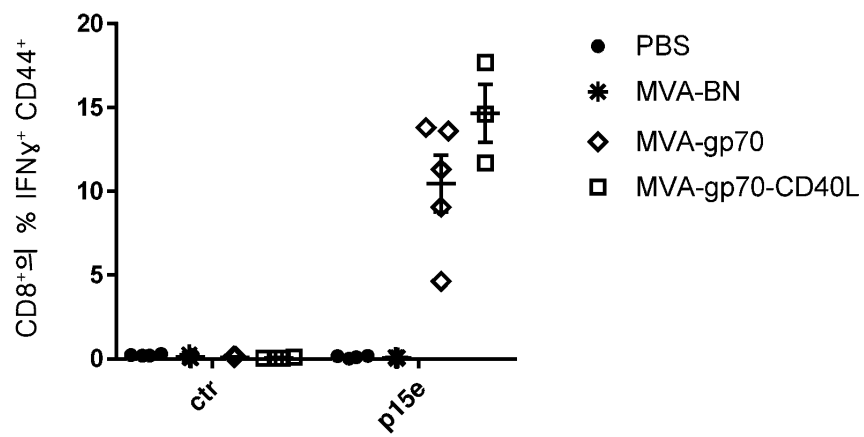


도면14

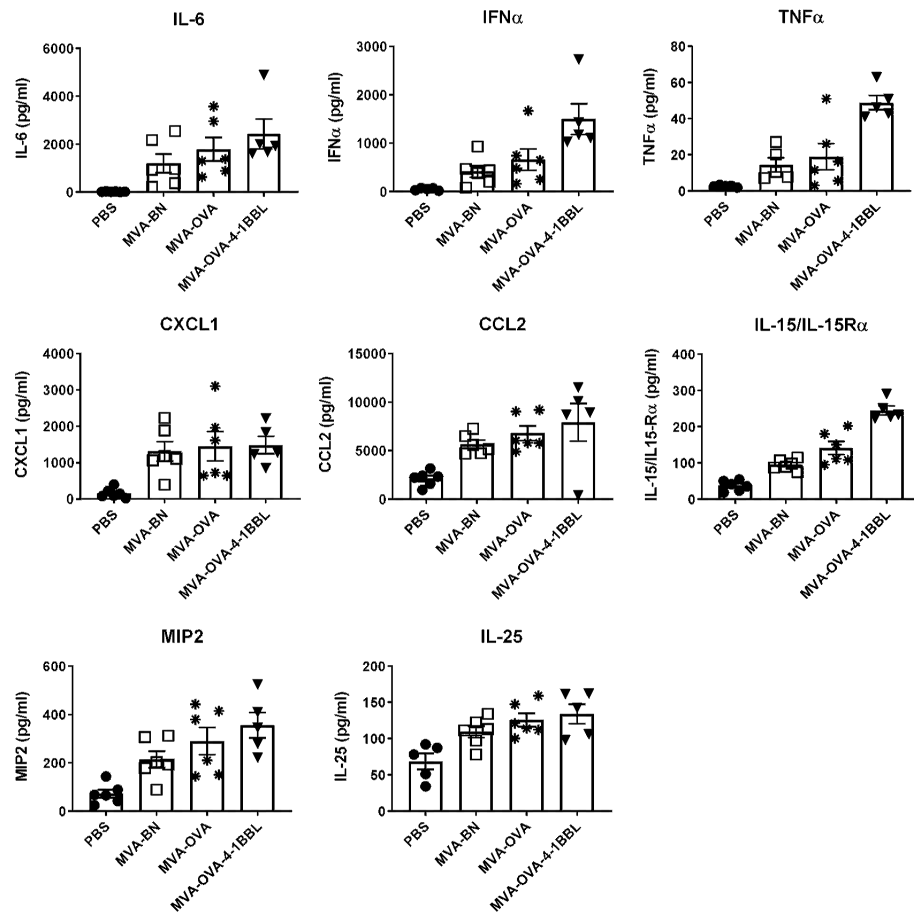
A



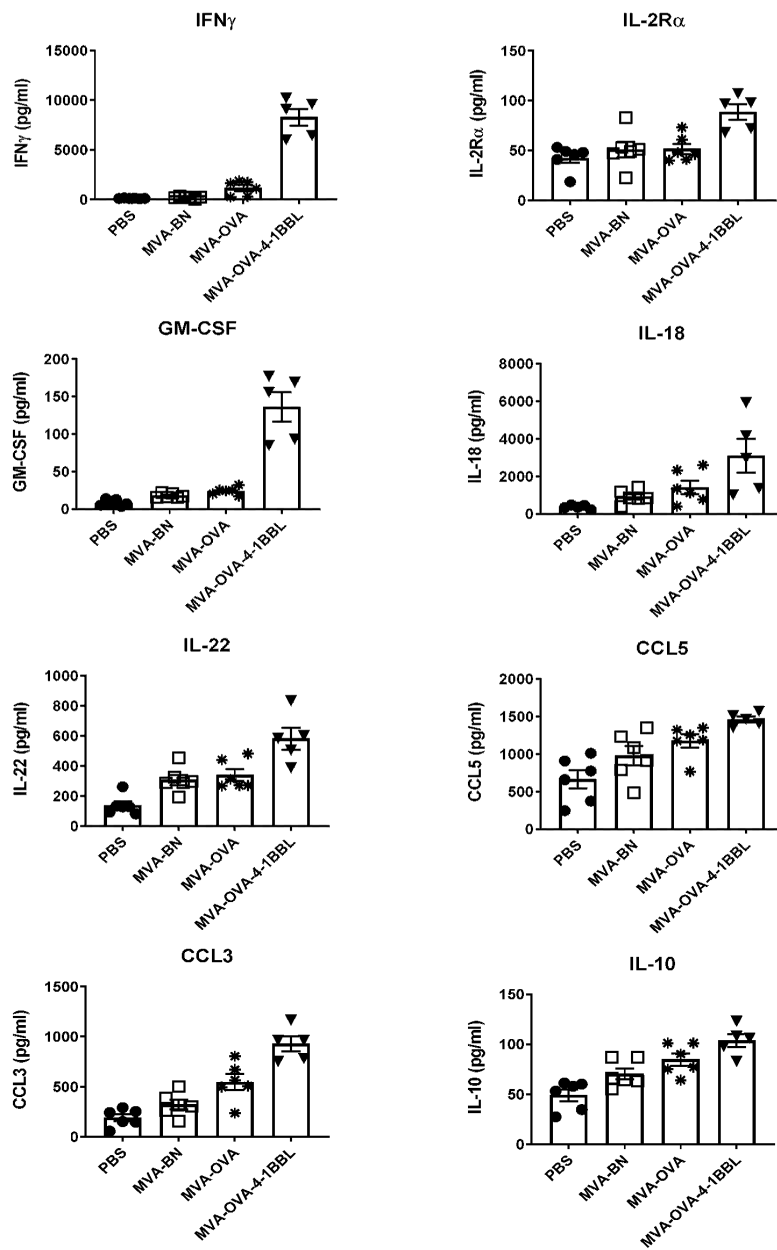
B



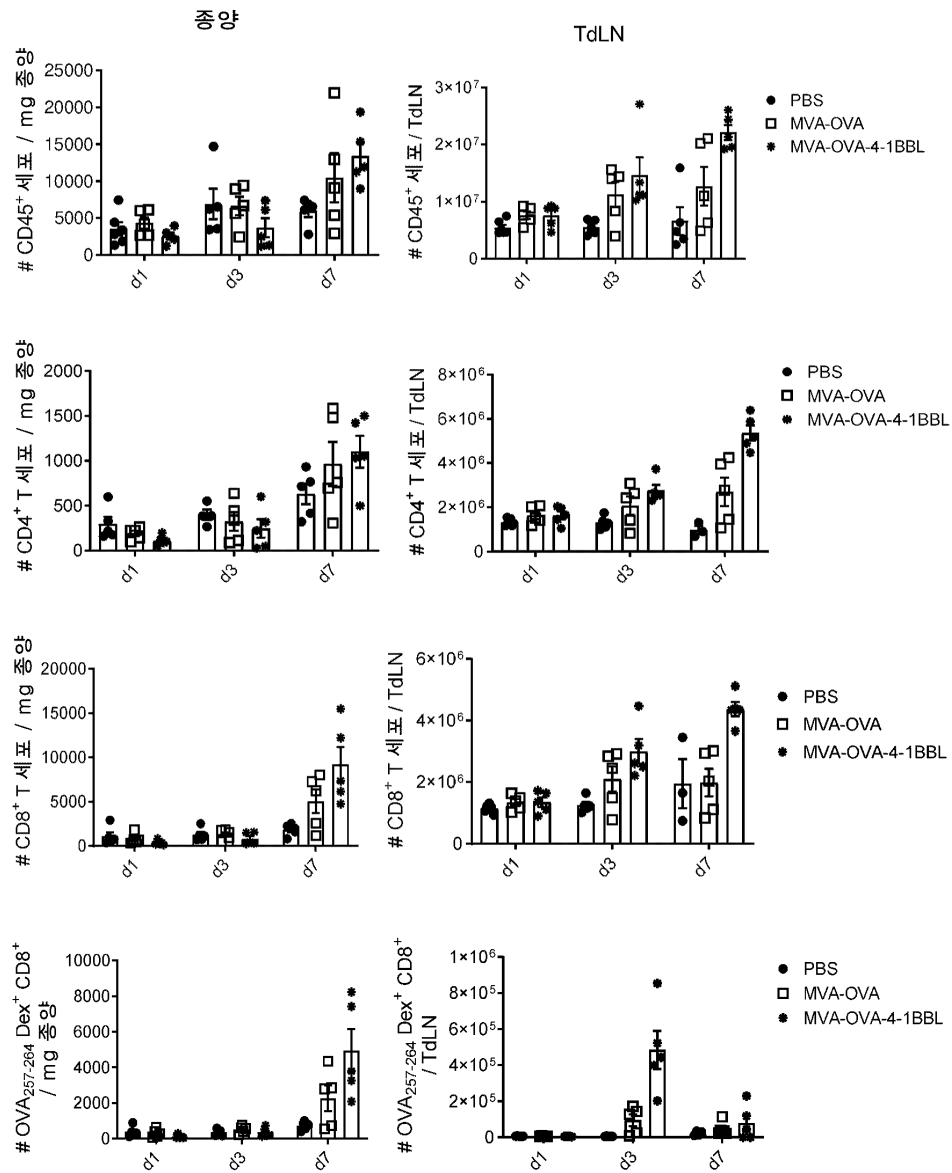
도면15



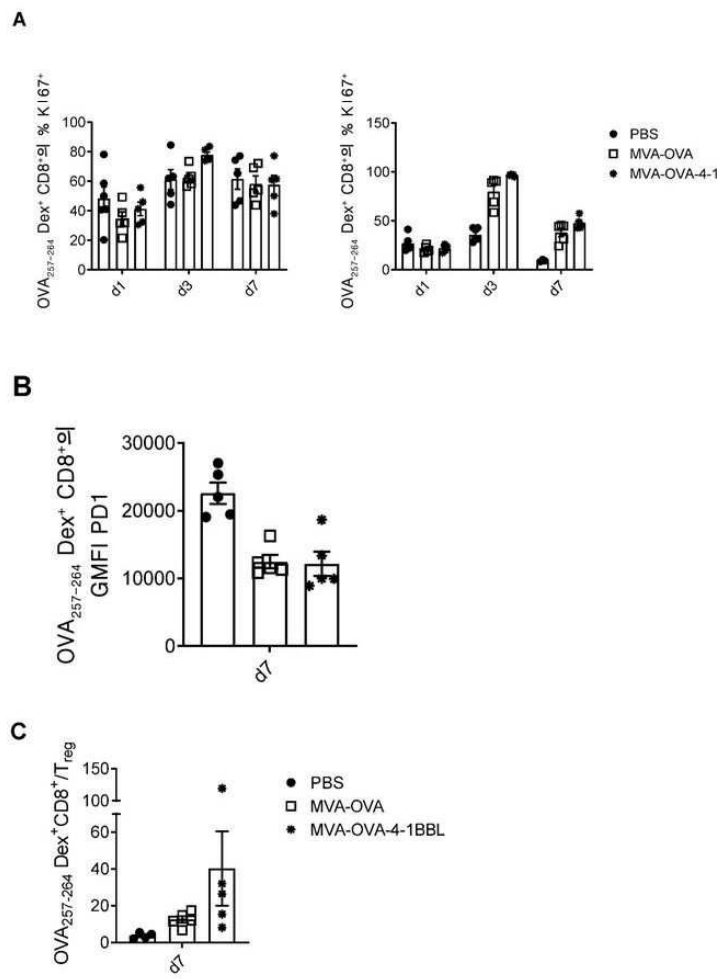
도면16



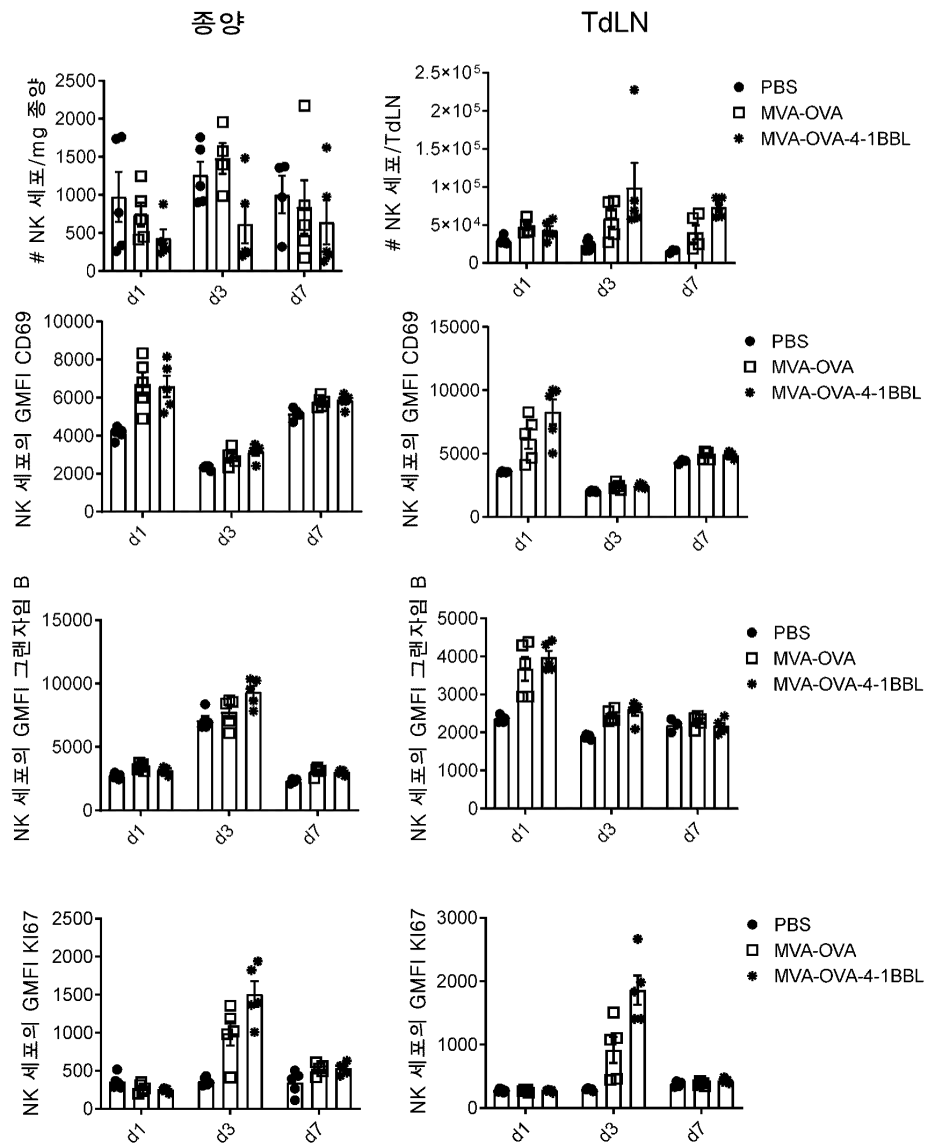
도면17



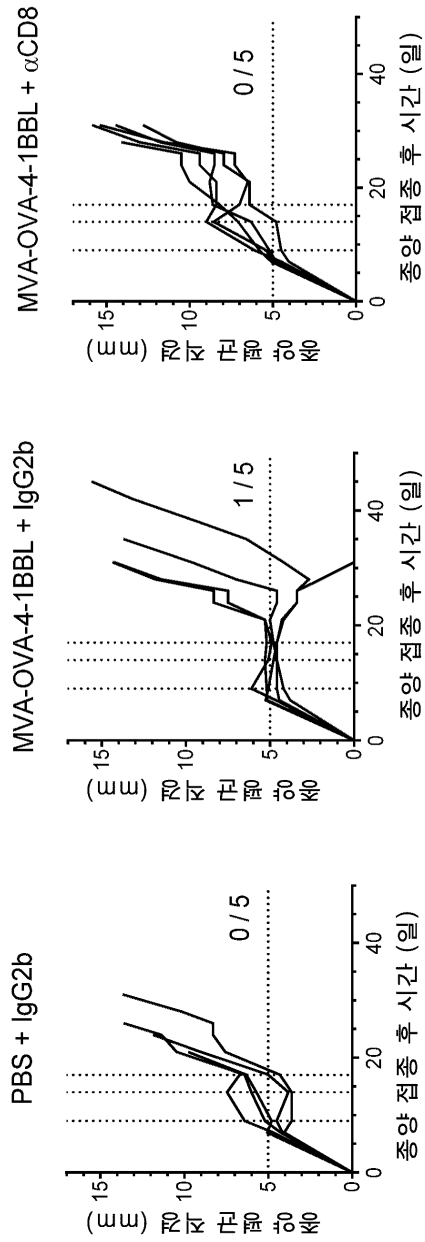
도면18



도면19

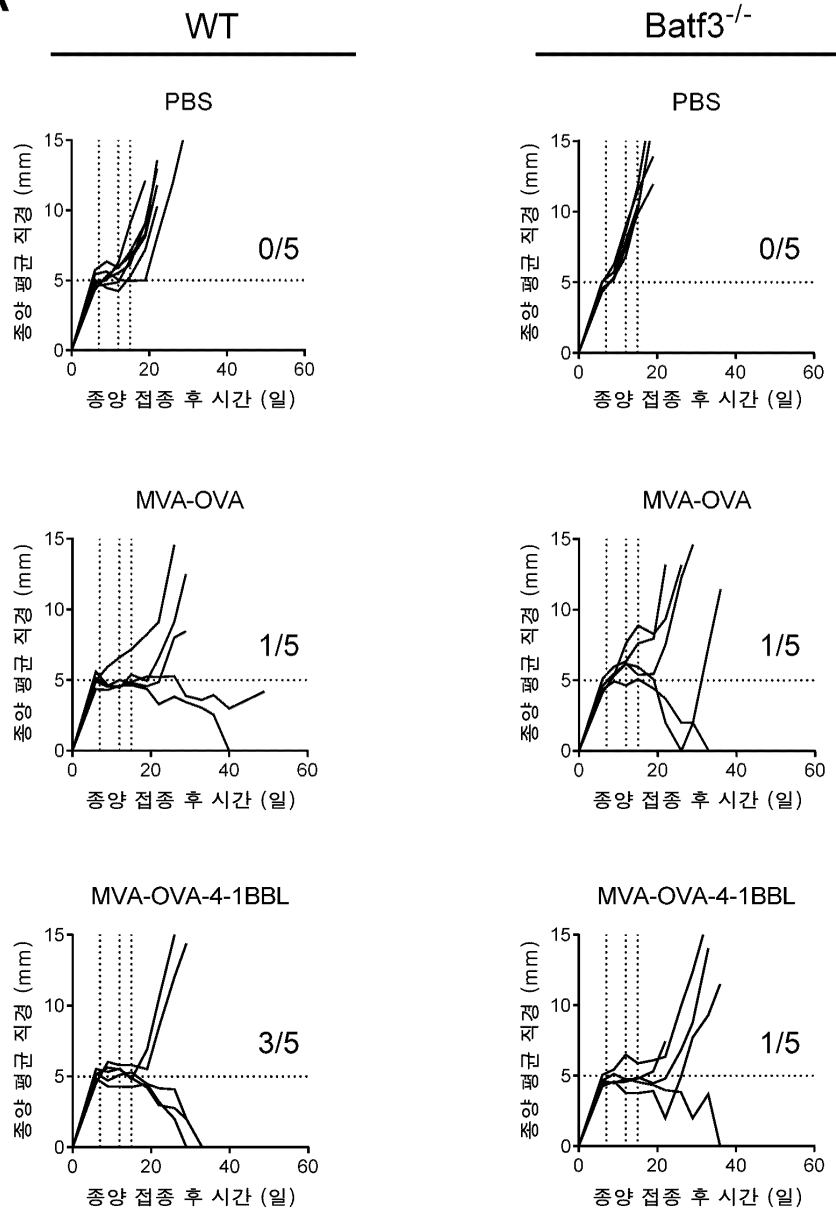


도면20



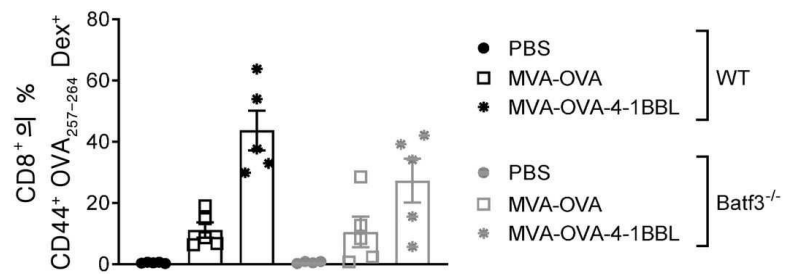
도면21a

A

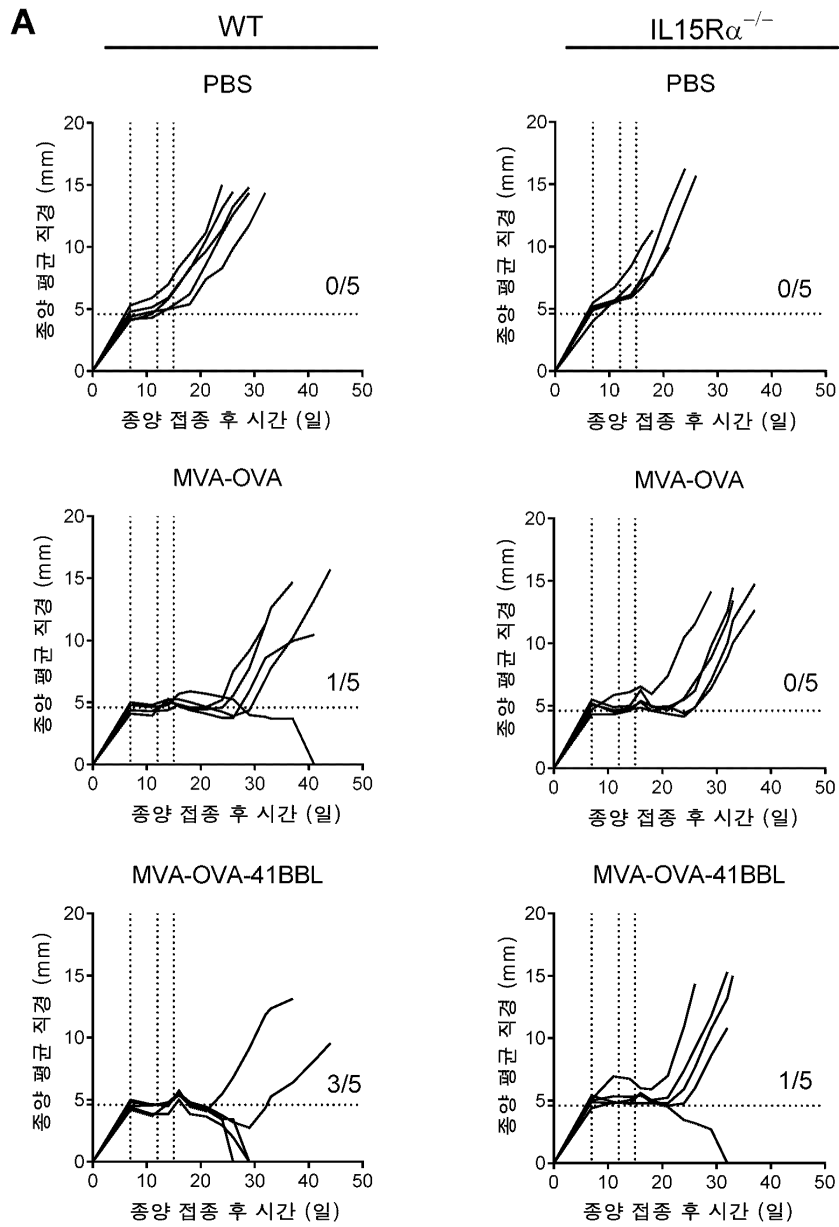


도면21b

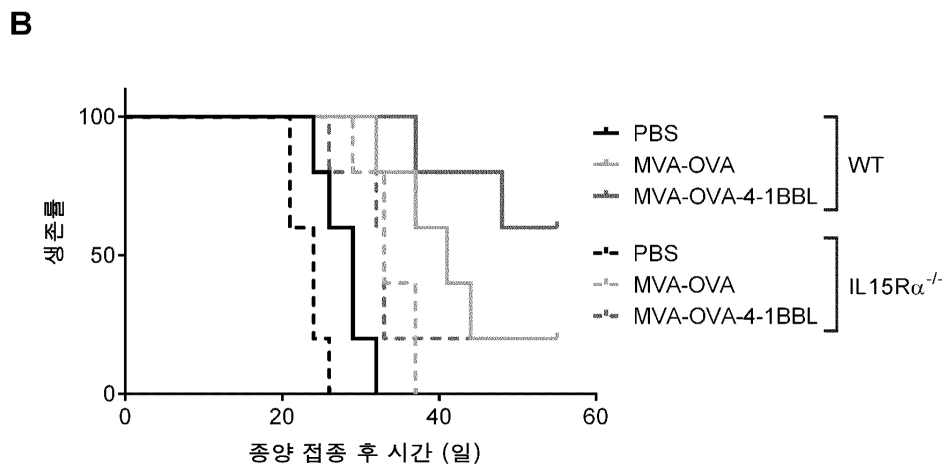
B



도면22a



도면22b

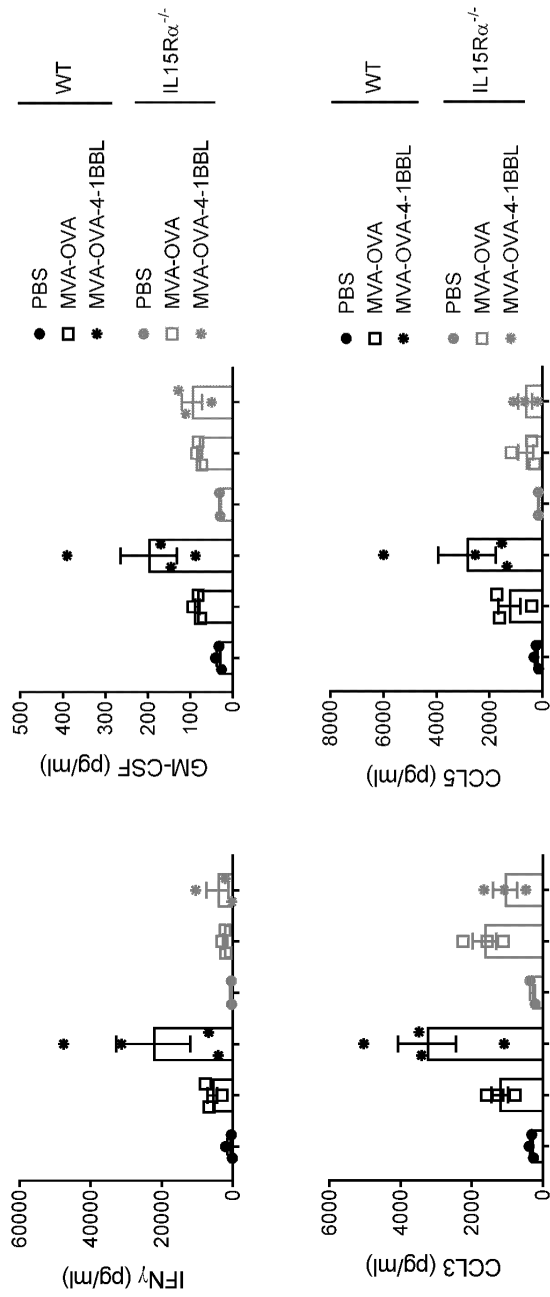


도면22c

C

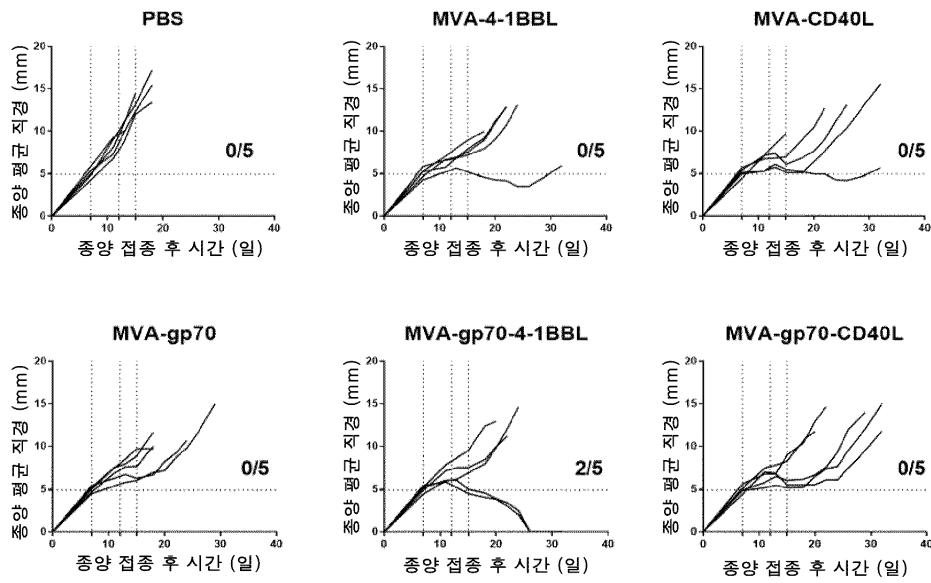


도면23



도면24a

A



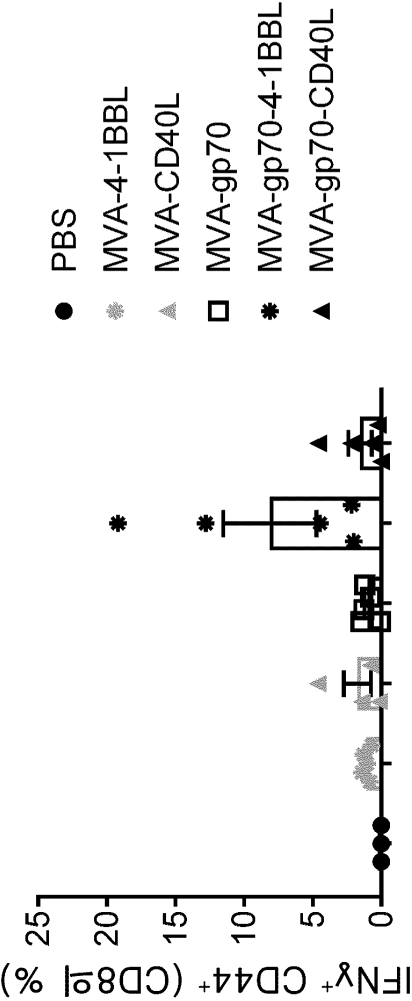
도면24b

B

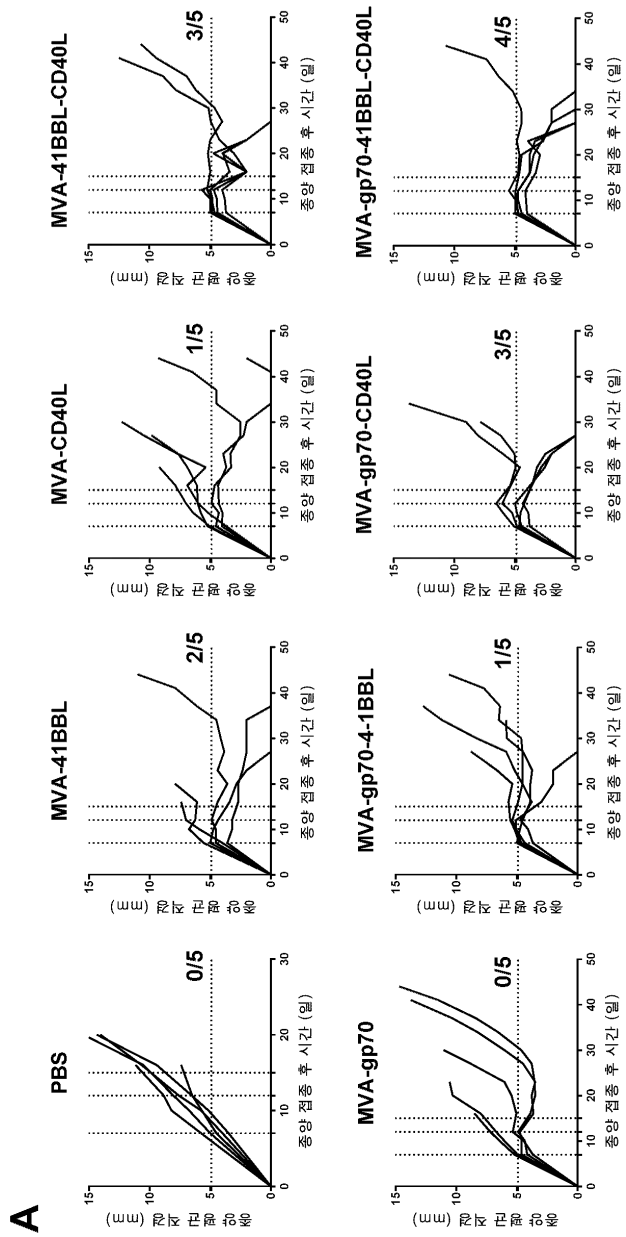


도면24c

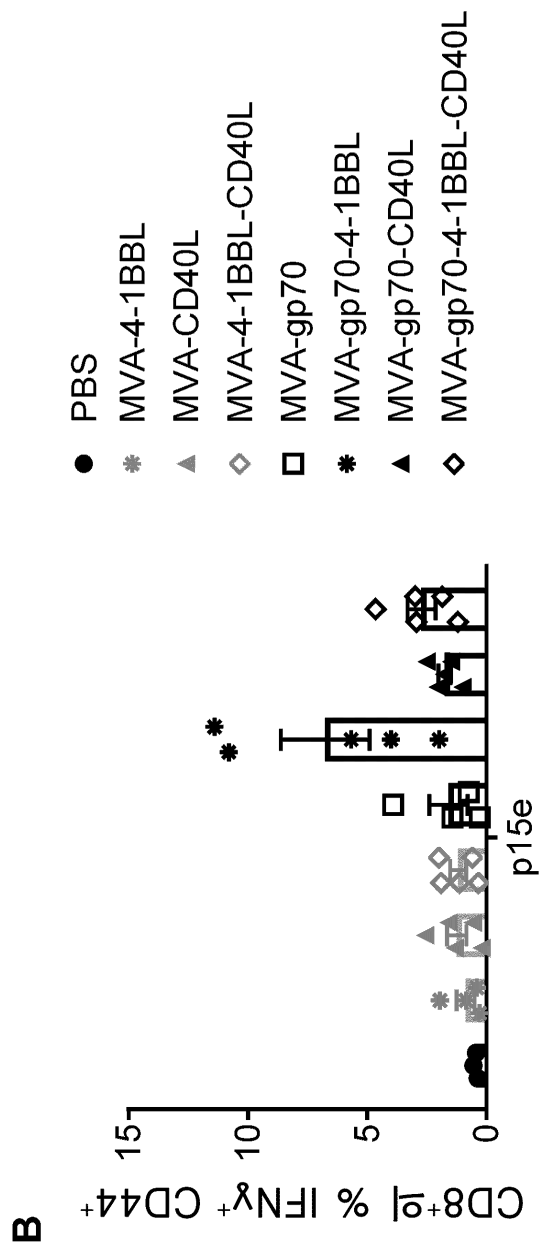
C



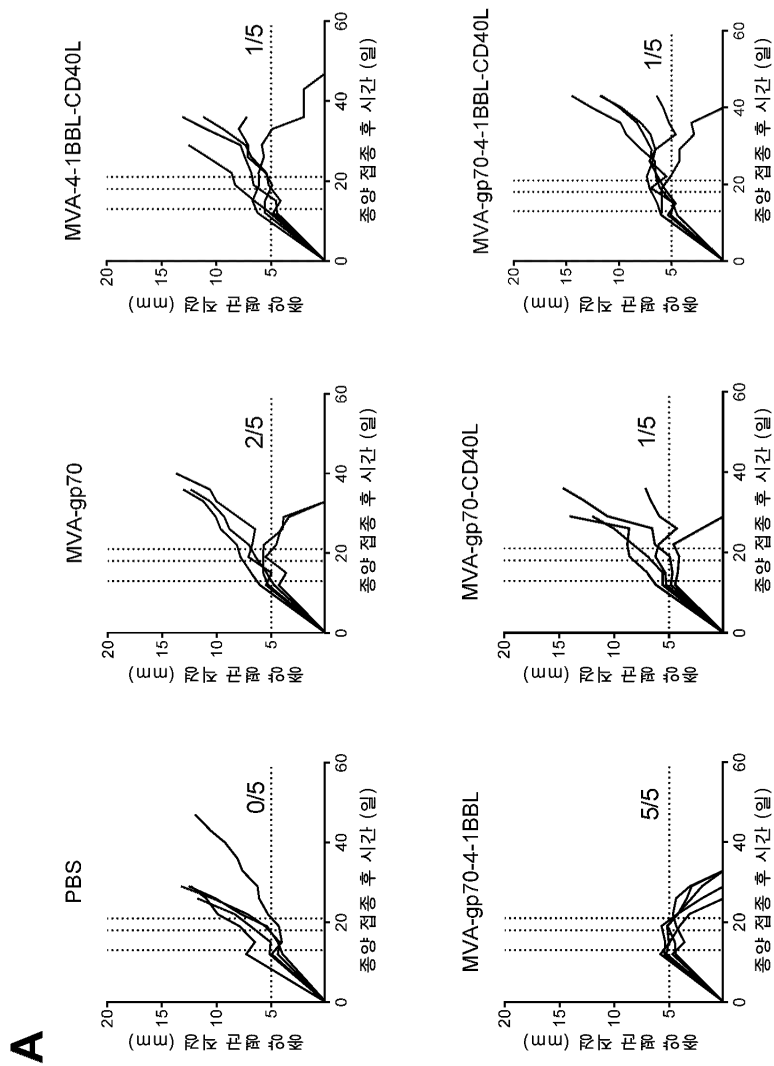
도면25a



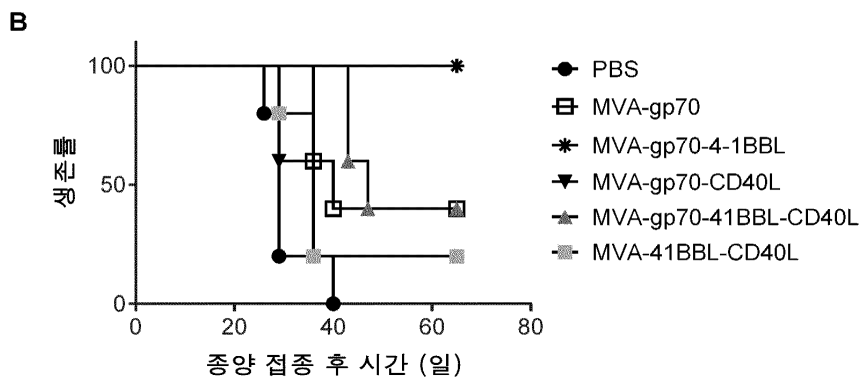
도면25b



도면26a

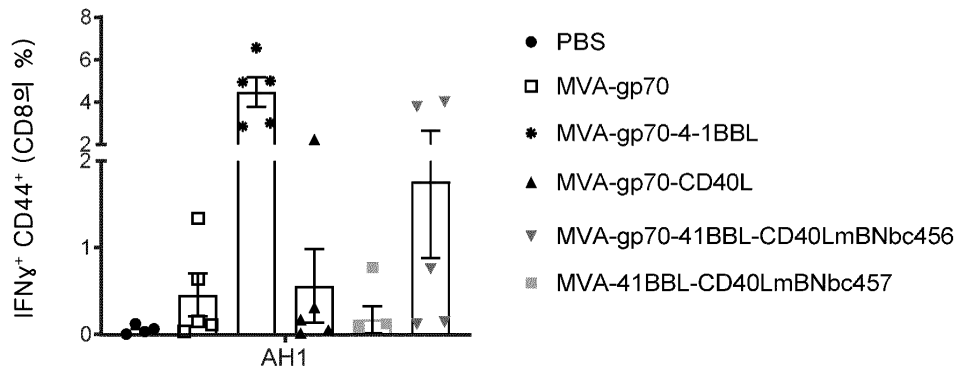


도면26b

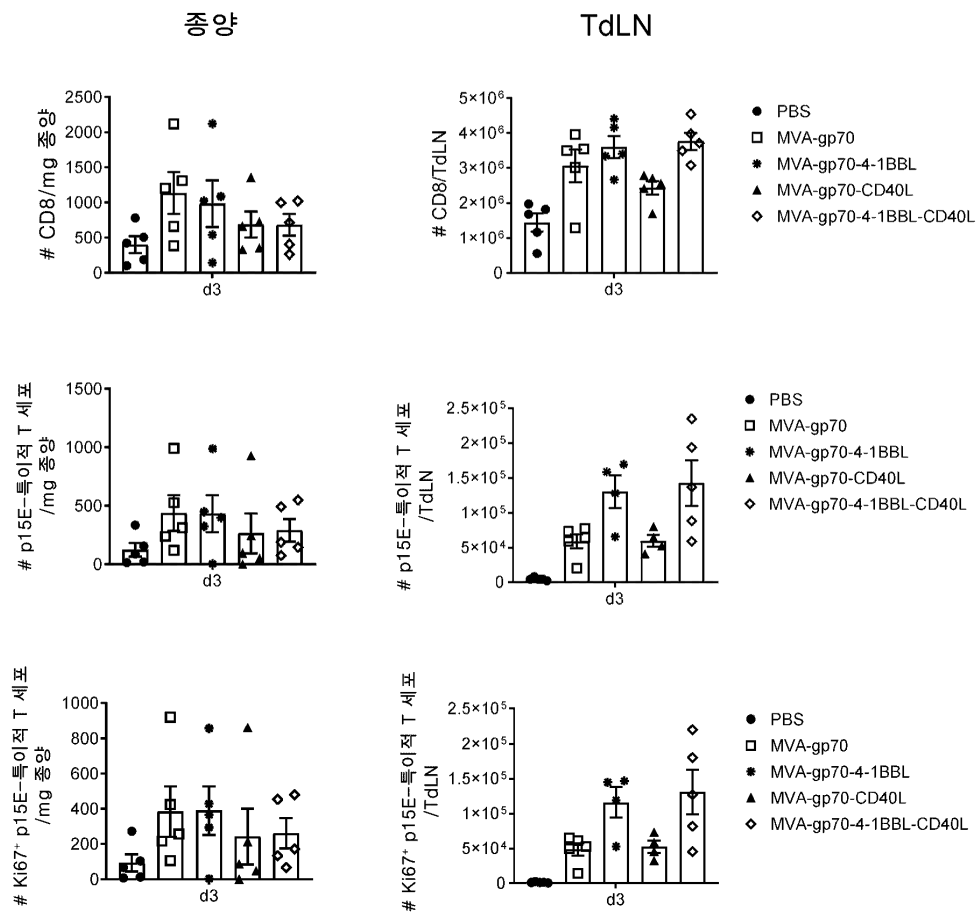


도면26c

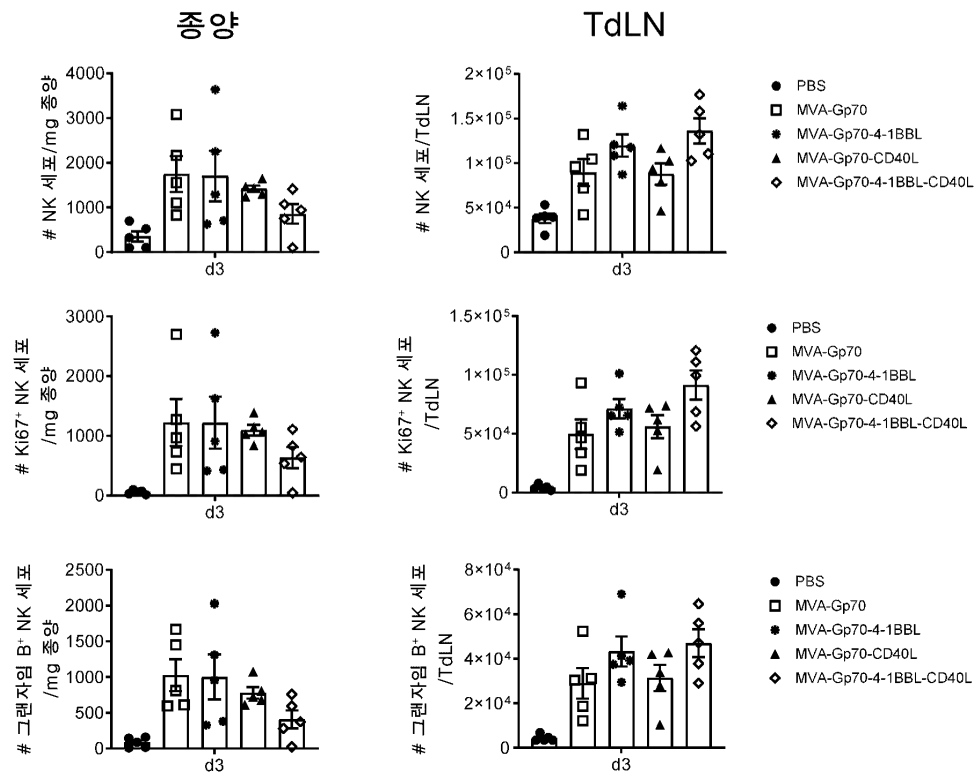
C



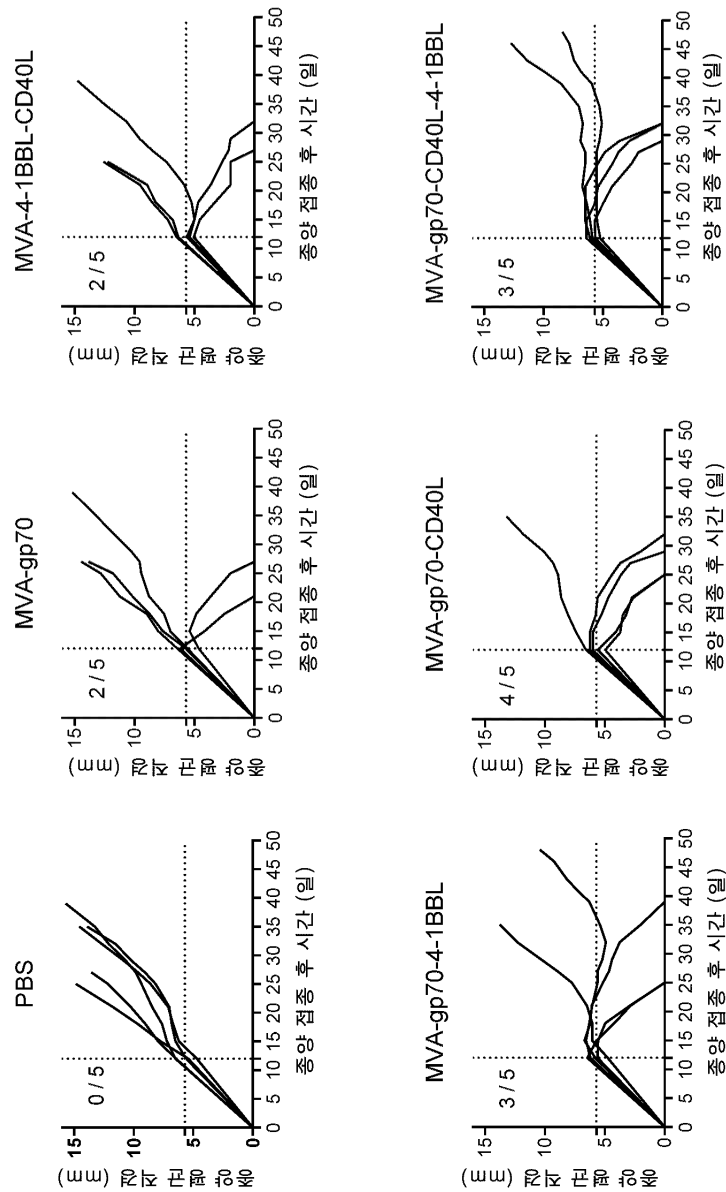
도면27



도면28



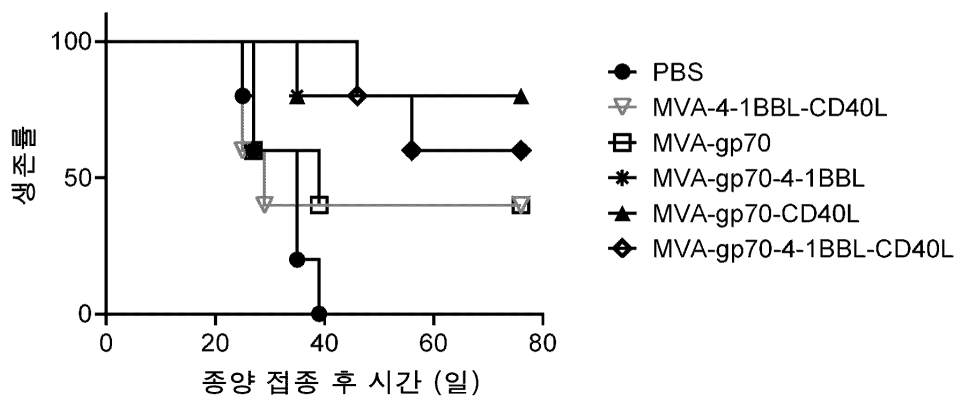
도면29a



A

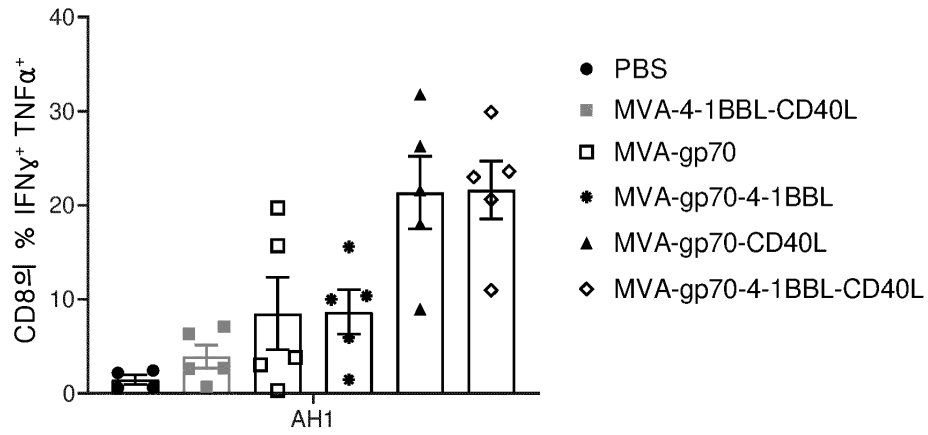
도면29b

B



도면29c

C



도면30a

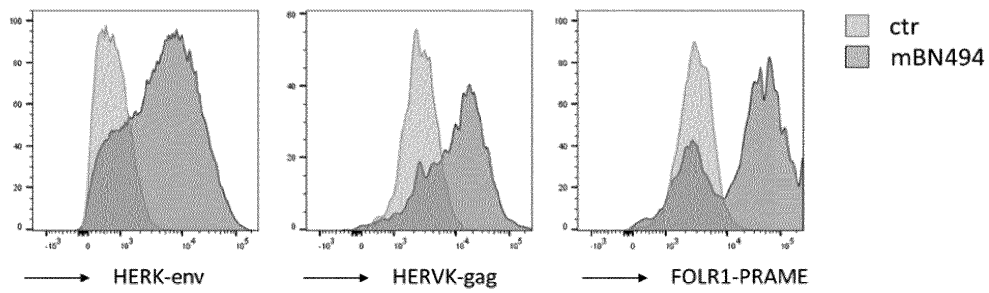
A

MVA-BN-4IT



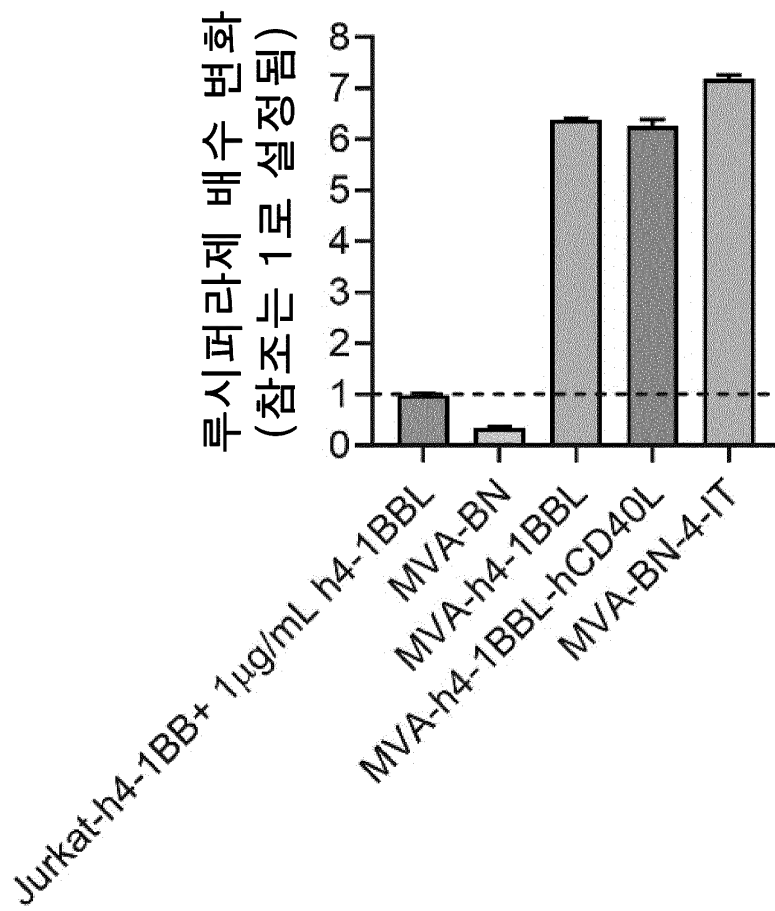
도면30b

B



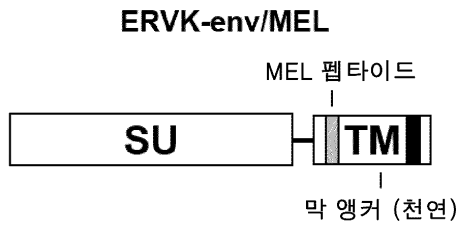
도면30c

C

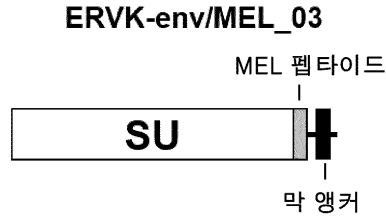


도면31

A

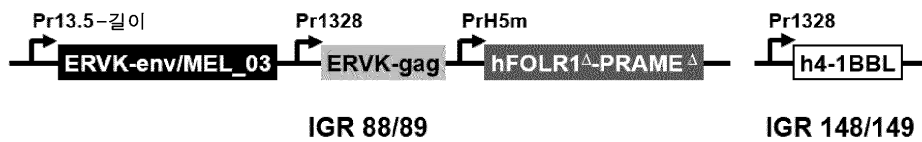


B



C

MVA-mBN502



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> Recombinant MVA Viruses for Intratumoral and/or Intravenous
Administration for Treating Cancer

<130> BNIT0015PCT

<150> EP 19210369.5

<151> 2019-11-20

<150> EP 20193706.7

<151> 2020-08-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 2

<211> 792

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgatcgaga catacaacca gacaagccct agaagcgccg ccacaggact gcctatcagc 60

atgaagatct tcatgtacct gctgaccgtg ttctgatca cccagatgat cggcagcgcc 120

ctgtttgccg tgtacctgca cagacggctg gacaagatcg aggacgagag aaacctgcac 180

gaggacttcg tgttcatgaa gaccatccag cggtgcaaca ccggcgagag aagtctgagc 240

ctgctgaact gcgaggaaat caagagccag ttcgagggtc tcgtgaagga catcatgctg 300

aacaaagagg aaacgaagaa agagaactcc ttcgagatgc agaagggcga ccagaatcct 360

cagatcgccg ctcacgtgat cagcgaggcc agcagcaaga caacaagcgt gctgcagtgg 420

gccgagaagg gctactacac catgagcaac aacctggtca ccctggagaa cggcaagcag 480

ctgacagtga agcggcaggg cctgtactac atctacgccc aagtgacctt ctgcagcaac 540

agagaggcca gctctcagcg tcctttcatc gccagcctgt gcctgaagtc tcctggcaga 600

ttcgagcgga ttctgctgag agccgccaac acacacagca gcgccaacc ttgtggccag 660

cagtctattc acctcggcgg agtgtttgag ctgcagcctg gcgcaagcgt gttcgtgaat 720

gtgacagacc ctagccaggt gtcccacggc accggcttta catctttcgg actgctgaag 780

ctgtgatgat ag 792

<210> 3

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

35 40 45
 Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

 50 55 60
 Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 65 70 75 80
 Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 85 90 95
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 100 105 110
 Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu

 115 120 125
 Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 130 135 140
 Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175
 Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala

 180 185 190
 Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 195 200 205
 Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 210 215 220
 Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 225 230 235 240
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

 245 250

<210> 4

<211> 768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 4

atggaatacg ccagcgacgc ctctctggac cctgaagctc ctgggcctcc agctcctaga	60
gccaggggctt gtagagtgtc gccttgggct cttgtggctg gacttctgct tctgttgctc	120
ctggctgctg cctgcgcagt gtttcttgct tgtccatggg ctgtgtcagg agccagagca	180
tctcctggat ctgccgttc tcccagactg agagagggac ctgaactgag ccctgatgat	240
cctgtctggac tgctcgacct gagacagggc atgtttgccc agctggtggc ccagaatgtg	300

ctgctgattg atggccctct gagctggtac agcgatcctg gacttgctgg cgtagcctg	360
actggaggcc tgagctacaa ggaggacacc aaagaactgg tggtggccaa ggctggcgtg	420
tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg agagtgggtg caggcgaagg atctggatcc	480
gtgtctctgg cactgcatct gcagcctctg agatctgctg ctggtgcagc tgccttggt	540
ctgacagttg atctgcctcc tgcctccagc gaagccagaa acagcgcctt tggcttccaa	600
ggcagactgc tgcacctgtc tgctggccag agactgggag tgcacctcca cacagaagca	660
agagcaagac acgcctggca gcttacacaa ggcgctacag tgctgggcct gttcagagt	720

acacctgaga ttccagctgg cttgccatct cctegcagcg agtaatga 768

<210> 5

<211> 666

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic ERV-K-gag sequence

<400> 5

Met Gly Gln Thr Lys Ser Lys Ile Lys Ser Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu

1 5 10 15

Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu Lys Arg Gly Gly Val Lys Val Ser Thr

20 25 30

Lys Asn Leu Ile Lys Leu Phe Gln Ile Ile Glu Gln Phe Cys Pro Trp

35 40 45

Phe Pro Glu Gln Gly Thr Leu Asp Leu Lys Asp Trp Lys Arg Ile Gly

50 55 60

Lys Glu Leu Lys Gln Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu Thr

65 70 75 80

Val Trp Asn Asp Trp Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe Gln

85 90 95

Thr Glu Glu Asp Ser Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys Ile

100 105 110

Ile Asp Cys Asn Glu Asn Thr Arg Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr Glu

115 120 125

Ser Leu His Cys Glu Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser Thr

130 135 140

Gln Asn Val Asp Tyr Asn Gln Leu Gln Glu Val Ile Tyr Pro Glu Thr

145 150 155 160

Leu Lys Leu Glu Gly Lys Gly Pro Glu Leu Val Gly Pro Ser Glu Ser

165 170 175

Lys Pro Arg Gly Thr Ser Pro Leu Pro Ala Gly Gln Val Pro Val Thr

180 185 190

Leu Gln Pro Gln Lys Gln Val Lys Glu Asn Lys Thr Gln Pro Pro Val

195 200 205

Ala Tyr Gln Tyr Trp Pro Pro Ala Glu Leu Gln Tyr Arg Pro Pro Pro

210 215 220

Glu Ser Gln Tyr Gly Tyr Pro Gly Met Pro Pro Ala Pro Gln Gly Arg

225 230 235 240

Ala Pro Tyr Pro Gln Pro Pro Thr Arg Arg Leu Asn Pro Thr Ala Pro

245 250 255

Pro Ser Arg Gln Gly Ser Glu Leu His Glu Ile Ile Asp Lys Ser Arg

260 265 270

Lys Glu Gly Asp Thr Glu Ala Trp Gln Phe Pro Val Thr Leu Glu Pro

275 280 285

Met Pro Pro Gly Glu Gly Ala Gln Glu Gly Glu Pro Pro Thr Val Glu

290 295 300

Ala Arg Tyr Lys Ser Phe Ser Ile Lys Met Leu Lys Asp Met Lys Glu

305 310 315 320

Gly Val Lys Gln Tyr Gly Pro Asn Ser Pro Tyr Met Arg Thr Leu Leu

325 330 335

Asp Ser Ile Ala His Gly His Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Trp Glu Ile

340 345 350
 Leu Ala Lys Ser Ser Leu Ser Pro Ser Gln Phe Leu Gln Phe Lys Thr

 355 360 365
 Trp Trp Ile Asp Gly Val Gln Glu Gln Val Arg Arg Asn Arg Ala Ala
 370 375 380
 Asn Pro Pro Val Asn Ile Asp Ala Asp Gln Leu Leu Gly Ile Gly Gln
 385 390 395 400
 Asn Trp Ser Thr Ile Ser Gln Gln Ala Leu Met Gln Asn Glu Ala Ile
 405 410 415
 Glu Gln Val Arg Ala Ile Cys Leu Arg Ala Trp Glu Lys Ile Gln Asp

 420 425 430
 Pro Gly Ser Thr Cys Pro Ser Phe Asn Thr Val Arg Gln Gly Ser Lys
 435 440 445
 Glu Pro Tyr Pro Asp Phe Val Ala Arg Leu Gln Asp Val Ala Gln Lys
 450 455 460
 Ser Ile Ala Asp Glu Lys Ala Arg Lys Val Ile Val Glu Leu Met Ala
 465 470 475 480
 Tyr Glu Asn Ala Asn Pro Glu Cys Gln Ser Ala Ile Lys Pro Leu Lys

 485 490 495
 Gly Lys Val Pro Ala Gly Ser Asp Val Ile Ser Glu Tyr Val Lys Ala
 500 505 510
 Cys Asp Gly Ile Gly Gly Ala Met His Lys Ala Met Leu Met Ala Gln
 515 520 525
 Ala Ile Thr Gly Val Val Leu Gly Gly Gln Val Arg Thr Phe Gly Gly
 530 535 540
 Lys Cys Tyr Asn Cys Gly Gln Ile Gly His Leu Lys Lys Asn Cys Pro

 545 550 555 560
 Val Leu Asn Lys Gln Asn Ile Thr Ile Gln Ala Thr Thr Thr Gly Arg
 565 570 575
 Glu Pro Pro Asp Leu Cys Pro Arg Cys Lys Lys Gly Lys His Trp Ala
 580 585 590

Ser Gln Cys Arg Ser Lys Phe Asp Lys Asn Gly Gln Pro Leu Ser Gly
595 600 605

Asn Glu Gln Arg Gly Gln Pro Gln Ala Pro Gln Gln Thr Gly Ala Phe

610 615 620
Pro Ile Gln Pro Phe Val Pro Gln Gly Phe Gln Gly Gln Gln Pro Pro

625 630 635 640

Leu Ser Gln Val Phe Gln Gly Ile Ser Gln Leu Pro Gln Tyr Asn Asn

645 650 655

Cys Pro Pro Pro Gln Ala Ala Val Gln Gln

660 665

<210> 6

<211> 2004

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic ERV-K-gag sequence

<400> 6

atgggacaga ccaagagtaa gatcaagtct aagtacgcca gctacctcag cttcatcaag 60
atcctgctga agagaggagg cgtgaaagtg tccaccaaga acctgatcaa gctgttcag 120
atcatcgagc agttctgtcc ctggtttctt gagcagggca ccctggatct gaaggactgg 180
aagcggatcg gcaaagagct gaagcaggct ggcagaaagg gcaacatcat ccctctgacc 240
gtgtggaacg actgggccat catcaaagca gctctggaac ccttcagac cgaagaggat 300
agcgtgtccg tgtctgatgc tcttggcagc tgcacatcg actgcaacga gaacacccgg 360
aagaagtccc agaaagagac agagagcctg cactgcgagt acgtggccga acctgtgatg 420

gctcagagca cccagaacgt ggactacaac cagctccaag aagtgatcta tcccgaacaa 480
ctgaagctgg aaggcaaggg acctgaactc gtgggtcctt ctgagtctaa gcccagaggc 540
acatctcttc tgctgcagg acaggtgcc a gtgacactgc agcctcagaa acaagtgaac 600
gagaacaaga cccagctcc tgtggcctac cagtattggc ctccagccga gctgcagtac 660
agacctcttc cagagagcca gtacggctac cctggaatgc ctctgtctcc tcaaggcaga 720
gtccttatac ctgagctcc taccagacgg ctgaacccta cagctctcc tagcagacag 780
ggctctgagc tgcacgagat cattgacaag agccggaaag agggcgacac cgaggcttgg 840

cagtttcccg ttacactgga acctatgcct ccaggcgaag gcgctcaaga aggcgaaact 900

cctacagtgg aagccaggta caagagcttc agcatcaaga tgctgaagga catgaaggaa 960
 ggcgtcaagc agtacggacc taacagccca tacatgcgga ccctgctgga ttctattgcc 1020
 caccggccacc ggctgatccc ttacgattgg gagatcctgg ctaagtcctc tctgagccct 1080
 agccagttcc tgcagttcaa gacctgggtg atcgacggcg tgcaagaaca agtgagacgg 1140
 aacagagctg ccaatcctcc tgtgaacatc gacgccgacc agtcctcctg aatcggccag 1200
 aattggagca ccatctctca gcaggctctg atgcagaacg aggccattga acaagtcaga 1260

gccatctgcc tgagagcttg ggagaagatt caggaccagc gcagcacatg tcccagcttc 1320
 aataccgttc ggcagggcag caaagagccc taccctgact ttgtggctag actgcaggat 1380
 gtggcccca agtctattgc cgacgagaag gctcggaag tgatcgtgga actgatggcc 1440
 tacgagaacg ctaatccaga gtgccagagc gccatcaagc ccttgaaggc caaagtcct 1500
 gccggatccg atgtgatcag cgagtatgtg aaggcctgcg acggaatcgg aggtgccatg 1560
 cacaagcca tgctgatggc acaggccatc actggcgttg tgctcggagg acaagttcgg 1620
 acctttggag gcaagtgcta caactgtggc cagatcggac acctgaagaa gaactgcct 1680

gtgctgaaca agcagaacat caccatccag gccaccacca ccggcagaga acctccagat 1740
 ctgtgccta gatgcaagaa gggcaagcac tgggccagcc agtgcagaag caagttcgac 1800
 aagaacggc agcctctgag cggcaacgaa caaagaggac agcctcagc tcctcagcag 1860
 actggcgcat ttccaatcca gcccttcgtg cctcaaggct tccagggaca acagcctcca 1920
 ctgtctcagg tgttccaggc cattagccag ctcctcagt acaacaactg cctccacct 1980
 caggctgctg tgcagcagtg atga 2004

<210> 7

<211> 699

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic ERV-K-env/MEL sequence

<400> 7

Met Asn Pro Ser Glu Met Gln Arg Lys Ala Pro Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

His Arg Asn Arg Ala Pro Leu Thr His Lys Met Asn Lys Met Val Thr

20 25 30

Ser Glu Glu Gln Met Lys Leu Pro Ser Thr Lys Lys Ala Glu Pro Pro

35 40 45

Thr Trp Ala Gln Leu Lys Lys Leu Thr Gln Leu Ala Thr Lys Tyr Leu

50 55 60

Glu Asn Thr Lys Val Thr Gln Thr Pro Glu Ser Met Leu Leu Ala Ala

65 70 75 80

Leu Met Ile Val Ser Met Val Val Ser Leu Pro Met Pro Ala Gly Ala

85 90 95

Ala Ala Ala Asn Tyr Thr Tyr Trp Ala Tyr Val Pro Phe Pro Pro Met

100 105 110

Ile Arg Ala Val Thr Trp Met Asp Asn Pro Ile Glu Val Tyr Val Asn

115 120 125

Asp Ser Val Trp Val Pro Gly Pro Ile Asp Asp Arg Cys Pro Ala Lys

130 135 140

Pro Glu Glu Glu Gly Met Met Ile Asn Ile Ser Ile Gly Tyr Arg Tyr

145 150 155 160

Pro Pro Ile Cys Leu Gly Arg Ala Pro Gly Cys Leu Met Pro Ala Val

165 170 175

Gln Asn Trp Leu Val Glu Val Pro Thr Val Ser Pro Ile Ser Arg Phe

180 185 190

Thr Tyr His Met Val Ser Gly Met Ser Leu Arg Pro Arg Val Asn Tyr

195 200 205

Leu Gln Asp Phe Ser Tyr Gln Arg Ser Leu Lys Phe Arg Pro Lys Gly

210 215 220

Lys Pro Cys Pro Lys Glu Ile Pro Lys Glu Ser Lys Asn Thr Glu Val

225 230 235 240

Leu Val Trp Glu Glu Cys Val Ala Asn Ser Ala Val Ile Leu Gln Asn

245 250 255

Asn Glu Phe Gly Thr Ile Ile Asp Trp Ala Pro Arg Gly Gln Phe Tyr

260 265 270

His Asn Cys Ser Gly Gln Thr Gln Ser Cys Pro Ser Ala Gln Val Ser

275 280 285

Pro Ala Val Asp Ser Asp Leu Thr Glu Ser Leu Asp Lys His Lys His

290 295 300
 Lys Lys Leu Gln Ser Phe Tyr Pro Trp Glu Trp Gly Glu Lys Gly Ile

 305 310 315 320
 Ser Thr Pro Arg Pro Lys Ile Ile Ser Pro Val Ser Gly Pro Glu His
 325 330 335
 Pro Glu Leu Trp Arg Leu Thr Val Ala Ser His His Ile Arg Ile Trp
 340 345 350
 Ser Gly Asn Gln Thr Leu Glu Thr Arg Asp Arg Lys Pro Phe Tyr Thr
 355 360 365
 Val Asp Leu Asn Ser Ser Leu Thr Val Pro Leu Gln Ser Cys Val Lys

 370 375 380
 Pro Pro Tyr Met Leu Val Val Gly Asn Ile Val Ile Lys Pro Asp Ser
 385 390 395 400
 Gln Thr Ile Thr Cys Glu Asn Cys Arg Leu Leu Thr Cys Ile Asp Ser
 405 410 415
 Thr Phe Asn Trp Gln His Arg Ile Leu Leu Val Arg Ala Arg Glu Gly
 420 425 430
 Val Trp Ile Pro Val Ser Met Asp Arg Pro Trp Glu Ala Ser Pro Ser

 435 440 445
 Val His Ile Leu Thr Glu Val Leu Lys Gly Val Leu Asn Arg Ser Lys
 450 455 460
 Arg Phe Ile Phe Thr Leu Ile Ala Val Ile Met Gly Leu Ile Ala Val
 465 470 475 480
 Thr Ala Thr Ala Ala Val Ala Gly Val Ala Leu His Ser Ser Val Gln
 485 490 495
 Ser Val Asn Phe Val Asn Asp Trp Gln Lys Asn Ser Thr Arg Leu Trp

 500 505 510
 Asn Ser Gln Ser Ser Ile Asp Gln Lys Met Leu Ala Val Ile Ser Cys
 515 520 525
 Ala Val Gln Thr Val Ile Trp Met Gly Asp Arg Leu Met Ser Leu Glu
 530 535 540

His Arg Phe Gln Leu Gln Cys Asp Trp Asn Thr Ser Asp Phe Cys Ile
 545 550 555 560
 Thr Pro Gln Ile Tyr Asn Glu Ser Glu His His Trp Asp Met Val Arg

565 570 575
 Arg His Leu Gln Gly Arg Glu Asp Asn Leu Thr Leu Asp Ile Ser Lys
 580 585 590
 Leu Lys Glu Gln Ile Phe Glu Ala Ser Lys Ala His Leu Asn Leu Val
 595 600 605
 Pro Gly Thr Glu Ala Ile Ala Gly Val Ala Asp Gly Leu Ala Asn Leu
 610 615 620
 Asn Pro Val Thr Trp Val Lys Thr Ile Gly Ser Thr Thr Ile Ile Asn

625 630 635 640
 Leu Ile Leu Ile Leu Val Cys Leu Phe Cys Leu Leu Leu Val Cys Arg
 645 650 655
 Cys Thr Gln Gln Leu Arg Arg Asp Ser Asp His Arg Glu Arg Ala Met
 660 665 670
 Met Thr Met Ala Val Leu Ser Lys Arg Lys Gly Gly Asn Val Gly Lys
 675 680 685
 Ser Lys Arg Asp Gln Ile Val Thr Val Ser Val
 690 695

<210> 8

<211> 2103

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic ERV-K-env/MEL sequence

<400> 8

atgaacccta gcgagatgca gagaaaggct ccacctagac ggagaagaca cagaaacagg	60
gtcctcttga cacacaagat gaacaagatg gtcaccagcg aggaacagat gaaactgccc	120
agcaccaaga aggccgagcc tccaacatgg gctcagctga agaaactgac ccagctggcc	180
accaagtacc tggagaacac caaagtgacc cagacacctg agagcatgct gctggcagct	240
ctgatgatcg tgtccatggt ggtgtccctg cctatgcctg ctggtgctgc cgctgccaac	300

tacacatact gggcctacgt gccctttcct cctatgatca gagccgtgac ctggatggac 360

aaccctattg aggtgtacgt gaacgacagc gtgtgggtgc caggacctat cgacgataga 420

tgctctgcca aacctgagga agagggcatg atgatcaaca tcagcatcgg ctaccggtat 480

cctccaatct gcctgggcag agcacctggc tgtcttatgc cagctgtgca gaattggctg 540

gtggaagtgc ctaccgtgtc tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg 600

agcctcagac ctagagtga ctaactgcag gacttcagct atcagcggag cctgaagttc 660

agaccaagg gaaagccctg tctaaagag attcccaaag agtccaagaa caccgaggtg 720

ctcgtgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaacaa cgagttcggc 780

accatcattg acitgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag 840

agctgtccta gcgcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gacacctggac 900

aagcacaaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaagggcac 960

tctacaccaa ggcctaagat cattagccct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg 1020

agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaacaa 1080

cgggacagaa agcccttcta caccgtcgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag 1140

agctgtgtga agcctcctta catgtgtgtc gtgggcaaca ttgtgatcaa gcccgactcc 1200

cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac ctccaactgg 1260

cagcaccgga tctgtctgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac 1320

aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc 1380

aacagatcca agcggttcat cttcacctg atcgccgtca tcatgggcct gattgtctgtg 1440

acagccacag ctgtctgttc tggcgtggcc ctgcatagct ctgtgcagag cgtgaacttc 1500

gtgaacgatt ggcagaagaa cagcacacgg ctgtggaaca gccagagcag catcgaccag 1560

aagatgctgg ccgtgatctc ctgtgccgtg cagacagtta tctggatggg cgacagactg 1620

atgagcctgg aacaccggtt ccagctgcag tgcgactgga ataccagcga cttctgcatc 1680

acacctcaga tctacaacga gagcgagcac cactgggata tggtcgaag gcatctgcag 1740

ggcagagagg acaacctgac actggacatc agcaagctga aagagcagat cttcgaggcc 1800

agcaaggctc acctgaatct ggtgcctgga accgaagcta ttgtctggagt tgcagatggc 1860

ctggccaatc tgaatcctgt gacctgggtc aagaccatcg gcagcaccac aatcatcaac 1920

ctgatcctga tctcgtgtg cctgttttgc ctgtgcttg tgtgcagatg caccagcag 1980

ctgagaagag acagcgacca tagagaaaga gccatgatga ccatggccgt cctgagcaag 2040

agaaaggag gcaacgtggg caagagcaag cgggatcaga tcgtgaccgt gtccgtttga 2100
 taa 2103

<210> 9
 <211> 741
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic hFOLR1-hPRAME fusion sequence
 <400> 9

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15
 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45
 Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60
 Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110
 Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125
 Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140
 Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175
 Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly
225 230 235 240

Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg
245 250 255

Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu
260 265 270

Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu
275 280 285

Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met
290 295 300

Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu Pro Leu Gly Val Leu Met Lys
305 310 315 320

Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu
325 330 335

Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln
340 345 350

Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp
355 360 365

Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala
370 375 380

Gln Pro Met Thr Thr Lys Ala Lys Val Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala
385 390 395 400

Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys
405 410 415

Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser Tyr Leu Ile Glu Lys Val Ala
420 425 430

Ala Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe

435 440 445
 Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met Ile Leu Lys Met Val Gln Leu
 450 455 460
 Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr
 465 470 475 480

 Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg
 485 490 495
 Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys
 500 505 510
 Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln
 515 520 525
 Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg
 530 535 540

 Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser
 545 550 555 560
 Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly Asp Val Met His Leu Ser Gln
 565 570 575
 Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val Leu Ser Leu Ser Gly Val Met
 580 585 590
 Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala
 595 600 605

 Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp
 610 615 620
 Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser Leu Ser His Cys Ser Gln Leu
 625 630 635 640
 Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln
 645 650 655
 Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Val Leu
 660 665 670

 Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu Asp Ile His Gly Thr Leu His
 675 680 685

Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys
690 695 700
Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro
705 710 715 720
His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro
725 730 735

Cys Phe Met Pro Asn
740

<210> 10

<211> 2228

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic hFOLR1-hPRAME fusion nucleotide sequence

<400> 10

tggcccagag aatgaccaca caactgctgc tgctcctggt gtgggttgcc gttgttgag	60
aggcccagac cagaattgcc tgggccagaa ccgagctgct gaacgtgtgc atgaaccca	120
agcatcacia agagaagcct ggacctgaag acaagctgca tgaacagtgt cggccttgga	180
gaaagaatgc ttgtgtagc accaacacca gccaagaggc ccacaaggac gtgtcctacc	240
tgtaccggtt caactggaac cactgcggag aaatggctcc tgctgcaag agacacttca	300
tccaggatac ctgcctgtac gaggctctc ccaatctcgg accttgatc cagcaagtgg	360
accagagctg gcggaaagaa cgggtgctga atgtgccctt gtgcaaagag gattgagcgc	420
agtgggtgga agattgccgg accagctaca catgtaagag caactggcac aaaggctgga	480
actggaccag cggcttcaac aagtgtgccg tgggagctgc ctgccagcct ttccacttct	540
acttcccaac acctaccgtg ctgtgcaacg aaatctggac ccacagctac aagggtgtcca	600
actacagcag aggcagcggc aggtgtatcc agatgtggtt cgatcccgt cagggcaatc	660
ccaatgagga agtggctaga ttctacgtg ctgcatgga aagaagaagg ctctggggca	720
gcattccagag ccgttacatt agcatgagcg tgtggacaag ccctagacgg ctggttgaac	780
tggttggaac gagcctgtc aaggatgagg ccttgccat tgctgctctg gagctgtgc	840
ctagagagct gtccctcct ctgttcattg ctgccttcga cggcagacac agccagacac	900
tgaagccat ggtgcaggcc tggcctttca cctgtctgcc tctgggagtg ctgatgaagg	960
gccagcatct gcacctgga accctcaagg ccgtgctgga cggcctggat gtctcctgg	1020
ctcaagaggt gaggcctcgg cggttggaac tgcaggttct ggatctgcgg aagaactctc	1080

accaggatatt ctggaccgtt tggccggca acagagccag cctgtacagc tticctgaac 1140

ctgaggtctgc ccagcccatg accacaaagg ccaaagtga tggcctgagc acagaggccg 1200

agcagccctt cattcccgtc gaagtgtctg tggacctgtt cctgaaagaa ggagcctgcg 1260

atgagctgtt cagctacctg attgagaagg tggcagccaa gaagaacgtg ctgcgctgt 1320

gctgcaagaa gctgaagatc ttgccatgc ctatgcagga tatcaagatg atcctgaaga 1380

tggctgagct ggacagcatc gaggacctgg aagtgcctg tacctggaag ctgccacac 1440

tggccaagtt cagcccttac ctgggacaga tgattaacct gcggaggctg ctgctgtctc 1500

acatccacgc cagctcctac atcagccctg agaaagagga acagtatatc gcccagttca 1560

caagccagtt tctgagcctg cagtgtctgc aggccctgta cgtggacagc ctgttctttc 1620

tgagaggcag gctggatcag ctgctgcggc acgtgatgaa ccctctggaa accctgagca 1680

tcaccaactg tagactgagc gagggcgacg tgatgcacct gtctcagagc ccatctgtgt 1740

ctcagctgag cgtgctgtct ctgtctggcg tgatgctgac cgatgtgagc cctgaacctc 1800

tgcaggcact gctggaaaga gcctccgcta ctctgcagga cctgggtgtc gatgagtgcg 1860

gcacaccga tgaccagctg cttgtctctg tgccaagcct gagccactgt agccagctga 1920

caacctgtc ctctacggc aacagcatct ccatctctgc cctgcagtct ctctgcagc 1980

atctgatcgg cctgtccaat ctgaccacg tctgtaccc tgtgccactg gaaagctacg 2040

aggacatcca cggaacctg cacctcgaga gactggccta tctgcatgct cggctgagag 2100

aactgtgtg cgaactgggc agaccagca tggtttggct gagcgccaat ccatgtcctc 2160

actgtggcga ccggaccttc tacgacctg agcctatcct gtgtccttgc ttcattgccc 2220

actaatag 2228

<210> 11

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic ERV-K-env/MEL_03 sequence

<400> 11

Met Asn Pro Ser Glu Met Gln Arg Lys Ala Pro Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

His Arg Asn Arg Ala Pro Leu Thr His Lys Met Asn Lys Met Val Thr

20 25 30

Ser Glu Glu Gln Met Lys Leu Pro Ser Thr Lys Lys Ala Glu Pro Pro

35	40	45
Thr Trp Ala Gln Leu Lys Lys Leu Thr Gln Leu Ala Thr Lys Tyr Leu		
50	55	60
Glu Asn Thr Lys Val Thr Gln Thr Pro Glu Ser Met Leu Leu Ala Ala		
65	70	75
80		
Leu Met Ile Val Ser Met Val Val Ser Leu Pro Met Pro Ala Gly Ala		
85	90	95
Ala Ala Ala Asn Tyr Thr Tyr Trp Ala Tyr Val Pro Phe Pro Pro Met		
100	105	110
Ile Arg Ala Val Thr Trp Met Asp Asn Pro Ile Glu Val Tyr Val Asn		
115	120	125
Asp Ser Val Trp Val Pro Gly Pro Ile Asp Asp Arg Cys Pro Ala Lys		
130	135	140
Pro Glu Glu Glu Gly Met Met Ile Asn Ile Ser Ile Gly Tyr Arg Tyr		
145	150	155
160		
Pro Pro Ile Cys Leu Gly Arg Ala Pro Gly Cys Leu Met Pro Ala Val		
165	170	175
Gln Asn Trp Leu Val Glu Val Pro Thr Val Ser Pro Ile Ser Arg Phe		
180	185	190
Thr Tyr His Met Val Ser Gly Met Ser Leu Arg Pro Arg Val Asn Tyr		
195	200	205
Leu Gln Asp Phe Ser Tyr Gln Arg Ser Leu Lys Phe Arg Pro Lys Gly		
210	215	220
Lys Pro Cys Pro Lys Glu Ile Pro Lys Glu Ser Lys Asn Thr Glu Val		
225	230	235
240		
Leu Val Trp Glu Glu Cys Val Ala Asn Ser Ala Val Ile Leu Gln Asn		
245	250	255
Asn Glu Phe Gly Thr Ile Ile Asp Trp Ala Pro Arg Gly Gln Phe Tyr		
260	265	270
His Asn Cys Ser Gly Gln Thr Gln Ser Cys Pro Ser Ala Gln Val Ser		
275	280	285

Pro Ala Val Asp Ser Asp Leu Thr Glu Ser Leu Asp Lys His Lys His
290 295 300

Lys Lys Leu Gln Ser Phe Tyr Pro Trp Glu Trp Gly Glu Lys Gly Ile
305 310 315 320

Ser Thr Pro Arg Pro Lys Ile Ile Ser Pro Val Ser Gly Pro Glu His
325 330 335

Pro Glu Leu Trp Arg Leu Thr Val Ala Ser His His Ile Arg Ile Trp
340 345 350

Ser Gly Asn Gln Thr Leu Glu Thr Arg Asp Arg Lys Pro Phe Tyr Thr
355 360 365

Val Asp Leu Asn Ser Ser Leu Thr Val Pro Leu Gln Ser Cys Val Lys
370 375 380

Pro Pro Tyr Met Leu Val Val Gly Asn Ile Val Ile Lys Pro Asp Ser
385 390 395 400

Gln Thr Ile Thr Cys Glu Asn Cys Arg Leu Leu Thr Cys Ile Asp Ser
405 410 415

Thr Phe Asn Trp Gln His Arg Ile Leu Leu Val Arg Ala Arg Glu Gly
420 425 430

Val Trp Ile Pro Val Ser Met Asp Arg Pro Trp Glu Ala Ser Pro Ser
435 440 445

Val His Ile Leu Thr Glu Val Leu Lys Gly Val Leu Asn Met Leu Ala
450 455 460

Val Ile Ser Cys Ala Val Ala Gly Val Ala Leu His Gly Ser Ala Gly
465 470 475 480

Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala
485 490 495

Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp
500 505 510

Gln Lys Lys Pro Arg
515

<210> 12

<211> 1557

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ERV-K-env/MEL_03 nucleotide sequence

<400> 12

atgaacccta gcgagatgca gagaaaggct ccacctagac ggagaagaca cagaaacagg	60
gtcctctga cacacaagat gaacaagatg gtcaccagcg aggaacagat gaaactgccc	120
agcaccaaga aggccgagcc tccaacatgg gctcagctga agaaactgac ccagctggcc	180
accaagtacc tggagaacac caaagtgacc cagacacctg agagcatgct gctggcagct	240
ctgatgatcg tgtccatggg ggtgtccctg cctatgcctg ctggtgctgc cgctgccaac	300
tacacatact gggcctacgt gccctttcct cctatgatca gagccgtgac ctggatggac	360
aaccctattg aggtgtacgt gaacgacagc gtgtgggtgc caggacctat cgacgataga	420
tgtcctgcca aacctgagga agagggcatg atgatcaaca tcagcatcgg ctaccggtat	480
cctccaatct gccctggcag agcacctggc tgtcttatgc cagctgtgca gaattggctg	540
gtggaagtgc ctaccgtgic tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg	600
agcctcagac ctagagtga ctacttcag gacttcagct atcagcggag cctgaagtgc	660
agaccaagg gaaagccctg tctaaagag attcccaaag agtccaagaa caccgaggtg	720
ctcgtgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaaca cgagttcggc	780
accatcattg actgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag	840
agctgtccta gcgcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gagcctggac	900
aagcacaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaaggcatc	960
tctacaccaa ggcctaagat cattagccct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg	1020
agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaaaca	1080
cgggacagaa agcccttcta caccgtcgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag	1140
agctgtgtga agcctcctta catgtgtgtc gtgggcaaca ttgtgatcaa gcccgaactc	1200
cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac cttcaactgg	1260
cagcaccgga tctgtctgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac	1320
aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc	1380
aacatgctgg ccgtgatctc ctgtgccgtg gctggcgtgg ccctgcatgg ctctgctgga	1440
tctgtctgtg gaagcggcga gtctgtgtc atctctgcca ttctggctct ggtggtgctg	1500
accatcatca gcctgatcat cctgattatg ctgtggcaga agaagccccg gtgataa	1557