



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0116191
(43) 공개일자 2022년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
 - A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
 - C07K 14/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 - C12N 15/86 (2013.01)
 - A61K 39/0011 (2021.08)
- (21) 출원번호 10-2022-7020948
- (22) 출원일자(국제) 2022년11월20일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/082888
- (87) 국제공개번호 WO 2021/099572
 국제공개일자 2021년05월27일
- (30) 우선권주장
 19210369.5 2019년11월20일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (뒷면에 계속)
- (71) 출원인
 버베리안 노딕 에이/에스
 덴마크 헬레루프 필립 헤이만 알레 3 (우: 2900)
- (72) 발명자
 힌터베르거, 마리아
 독일 82054 자우에라흐 다이센호페너 슈트라쎬 8
 메디나 에헤베르츠, 요세
 독일 81669 뮌헨 세인트 카에탄슈트라쎬 23
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **4-1BBL 아쥬반트화 재조합 변형 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)의 의약적 용도**

(57) 요약

본 발명은 (i) 고품 종양의 재발 예방, 또는 (ii) 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 TAA 및 공동자극 분자 4-1BBL을 발현하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)에 관한 것으로, 여기서 재조합 MVA는 고품 종양에 종양내로 투여되고, 재조합 MVA가 또 다른 고품 종양에 종양내로 투여된다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
C07K 14/82 (2013.01)
A61K 2039/5256 (2013.01)
C12N 2710/24143 (2013.01)

(72) 발명자

하브얀, 마티아스

독일 82178 푸호하임 라이너슈트라쎄 1

하우스만, 위르겐

독일 79194 군텔핑겐 알테 분데슈트라쎄 130

칼라, 마르쿠스

독일 82377 펜츠베르크 빌플 6쎄

(30) 우선권주장

20191226.8 2020년08월14일
유럽특허청(EPO)(EP)
20193706.7 2020년08월31일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)로서,

대상체의 관해 중 또는 관해 후에 고행 종양의 재발 예방에 사용하기 위한,

(a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및

(b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산

을 포함하고,

상기 관해는 고행 종양에 재조합 MVA를 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여함으로써 유도되는, 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA).

청구항 2

재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)로서,

대상체에서 전신 항종양 면역 반응의 유도에 사용하기 위한,

(a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및

(b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산

을 포함하고,

상기 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되는, 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA).

청구항 3

재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)로서,

대상체에서 2차 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 재조합 MVA는 관련된 원발성 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 2차 종양에는 투여되지 않거나; 또는

대상체에서 원발성 고행 종양의 치료 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 재조합 MVA는 관련 2차 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 원발성 고행 종양에는 투여되지 않거나; 또는

대상체에서 2차 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 재조합 MVA는 또 다른 관련 2차 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 첫 번째 언급된 2차 종양에는 투여되지 않는,

(a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및

(b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산

을 포함하는, 재조합 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA).

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 MVA는

(a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산; 및

(b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산; 및

(c) TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산

을 포함하는, 재조합 MVA.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
상기 TAA는 신생항원 또는 내인성 자가-항원인, 재조합 MVA.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,
상기 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, 엽산 수용체 알파 (FOLR1), 흑색종에서 우선적으로 발현된 항원(PRAME), 및 내인성 레트로바이러스 펩타이드 MEL; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 7

청구항 6에 있어서,
상기 ERV 단백질은 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터의 것이고, 바람직하게는 HERV-K 외피(HERV-K-env) 단백질 및 HERV-K gag 단백질로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 8

청구항 6에 있어서,
상기 ERV 펩타이드는 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피 단백질(HERV-K-env/MEL)의 유사유전자로부터 선택되는, 재조합 MVA.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,
상기 고휘 종양은 악성 종양, 바람직하게는 흑색종 또는 암성 유방, 결장 또는 난소 종양인, 재조합 MVA.

청구항 10

청구항 3 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,
상기 2차 종양은 전이인, 재조합 MVA.

청구항 11

청구항 3 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,
상기 재조합 MVA가 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지 않은 종양은 수술에 의해 절개할 수 없거나 접근할 수 없는, 재조합 MVA.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,
상기 재조합 MVA는 인간 세포주에서 생식 복제가 불가능한, 재조합 MVA.

청구항 13

청구항 12에 있어서,
상기 재조합 MVA는 유럽 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN으로부터 유래되는, 재조합 MVA.

청구항 14

복수의 종양을 갖는 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, TAA를 암호화하는 적어도 하나의 제1 핵산 및 4-1BBL를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA를 상기 대상체의 모든 종양보다 적은 수의 종양에 국소적으로 투여하는 단계를 포함하고, 상기 TAA에 대한 면역 반응은 대상체에서 자극되는, 방법.

청구항 15

적어도 하나의 접근할 수 없는 종양 및 적어도 하나의 접근 가능한 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, TAA를 암호화하는 적어도 하나의 제1 핵산 및 4-1BBL를 암호화하는 제2 핵산을 포함하는 재조합 MVA를 대상체의 적어도 하나의 접근 가능한 종양에 국소적으로 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해 접근할 수 없는 종양의 성장이 감소되거나 중단되는, 방법.

발명의 설명

기술분야

분야

본 발명은 암 면역요법 분야, 특히 종양용해성 바이러스요법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 종양 및 전이의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 종양-관련 항원(TAA) 및 공동자극 분자 4-1BBL을 발현하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA)에 관한 것으로, 여기서 재조합 MVA는 고�형 종양에 종양내 투여된다. 본 발명은 또한 각각의 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

배경

인간 암은 종양 항원 발현과 면역 침윤 및 조성물 면에서 매우 이종성이다. 그러나, 일반적인 특징은 숙주가 종양 성장을 효과적으로 방지하는 강력한 면역 반응을 일으킬 수 없다는 점이다. 종종, 고�형 종양에 대해 자연적으로 프라이밍된 CD8⁺ T 세포는 적대적인 종양 미세환경으로 인해 종양 조직의 적절한 자극 및 효율적인 침투가 부족하다.

적대적인 종양 미세환경(TME)에서 면역 세포가 침투하거나 이펙터 기능을 수행하지 못하기 때문에 고�형 종양에 대한 강력한 면역 반응의 부족은 암 면역요법의 주요 과제이다[1]. 면역억제성 TME를 종양-지향 요법에 의해 염증성 TME로 재프로그래밍한다는 개념이 최근 많은 주목을 받고 있다[2]. 목표는 이미 종양 및 국소 림프절에 있는 면역 세포를 활성화하거나, TME에 새로운 면역 세포를 모집하는 동시에, 나머지 면역 시스템의 관련 없는 활성화를 최소화하는 것이다[3]. 이를 달성하기 위해, 병원체 인식 및 프로그래밍되지 않은 세포 파괴에서 유래된 생화학적 신호의 국소 방출 및 활성화, 또는 면역자극 단일클론 항체 및 사이토카인의 국소 투여를 사용하는 여러 전략들이 전임상 모델 및 임상에서 탐색되고 있다[2].

국소 종양용해성 바이러스요법은 종양 세포의 특정 감염 및 파괴 및 TME의 조절을 통한 종양-표적 요법의 개념에 의존한다. 최근 식약청(Food and Drug Administration, FDA)은 인간 GM-CSF를 암호화하는 변형된 단순 포진 바이러스 1인 종양용해제 IMLYGIC을 III기 흑색종 환자에 대해 승인하면서[4], 종양용해성 바이러스(OV)의 큰 잠재력을 강조했다. 헤르페스바이러스, 폭스바이러스 및 아데노바이러스를 포함하여 이들의 종양용해 효과에 대해 조사된 광범위한 바이러스 계열이 있다[5].

역사적으로 OV 바이러스의 종양 세포-특이적 복제 및 직접 사멸 활성이 주요 작용 방식으로 간주되었지만, 이제 숙주 항종양 면역 반응의 개시 또는 증대가 종양용해성 바이러스요법에 필수적인 것으로 알려져 있다[6]. 따라서, 국소 바이러스요법은 손상-관련 또는 병원체-관련 분자 패턴의 방출과 종양 항원 방출을 수반하는 면역원성 세포 사멸을 유도하는 원위치 백신으로 간주될 수 있으며, 이는 궁극적으로 선천성 및 적응성 항종양 면역 반응의 개시를 초래한다[7].

대부분의 OV의 두드러진 특징은 이들 종양 특이성과 바이러스 복제 및 수반되는 종양 세포 용해에 의해 종양 조직을 통해 퍼질 수 있는 능력이다[8]. 종양 세포에 대해 조각된 조직 친화성에도 불구하고, 환자에게 복제가 가능 바이러스를 사용하는 것은 여전히 안전성 문제를 제기한다. MVA-BN은 FDA(JYNNEOS®)가 천연두 및 원숭이 두창에 대한 비복제 백신으로 승인된 고도로 약독화된 백시니아 균주이다[9]. 또한, 재조합 MVA-BN 백신 벡터는 최

근 에볼라 백신의 일부로 유럽의약품청(EMA)에 의해 승인되었으며, 다른 것들은 다양한 감염원에 대한 임상 시험에 사용된다[10]. MVA는 유형 I 인터페론(IFN)의 강력한 유도제이며[11, 12, 13], 벡터-암호화된 이중 항원에 대해 강력한 체액 및 세포 면역 반응을 이끌어낸다[14, 16]. 중요하게는, MVA의 복제 능력이 배아 조류 세포로 제한되기 때문에 인간 세포에서 MVA가 복제될 수 없다[15]. 따라서, MVA의 우수한 안전성 프로파일과 면역 자극 특성은 치료 개입의 주요 후보가 된다.

[0009] MVA는 항원-특이적 T 세포 반응을 유도하고 특정 면역-활성화 경로를 강화하기 위해 이중 항원 및 면역 자극 분자의 통합을 촉진하는 대형 이식유전자 삽입물을 수용할 수 있다. CD40L이 아주반트된 MVA는 IV 주사 시 선천성 및 적응성 면역 반응을 크게 증가시켰다[16, 17]. 또한, 공동 자극 분자 또는 염증성 사이토카인으로 유전적으로 변형된 OV는 종양내(IT) 요법 후에 치료 효능을 증가시켰다[18]. 따라서 공동 자극 분자와 함께 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 MVA를 사용한 IT 치료는 TME에서 항종양 면역 반응을 향상시킬 수 있다.

[0010] 종양 괴사 인자 수용체(TNFR)-패밀리 구성원 4-1BB 또는 CD137은 T 세포에서 진정한 공동-자극 분자로 정의된다. 4-1BB는 TCR 자극 시 일시적으로 유도되고 이 공동-자극 수용체의 후속적인 결합은 사이토카인 분비의 상승된 수준뿐만 아니라 항세포자멸사 분자 Bcl-2 및 Bcl-x1의 상향조절을 유도한다. 그 결과 면역 기억 형성에 중요한 활성화-유도 T 세포 사멸에 대한 보호 및 증식이 증가한다[19, 20]. 종양 침윤 T 세포(TIL)에서 4-1BB 발현[21]은 활성화된 T 세포의 생존, 확장 및 향상된 이펙터 기능을 촉진하는 능력과 결합되어, 암 면역요법의 매력적인 표적이 되었다. 실제로, 공동 자극 경로 4-1BB/4-1BBL의 자극은 작용성 4-1BB 항체 또는 4-1BBL-발현 바이러스 벡터를 사용한 단일 또는 병용 요법을 포함한 많은 치료 암 환경에서 유익하다[22]. 4-1BB 동시-자극은 또한 3세대 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 치료의 핵심이며, 이는 이의 엔도도메인이 종양 결합 키메라 수용체에 통합되어 신호전달 및 결과적으로 종양 세포 사멸을 향상시키기 때문이다[23].

[0011] 그럼에도 불구하고, 지금까지 달성된 주목할만한 진전에도 불구하고, 종양용해성 바이러스요법의 추가 의학적 용도가 여전히 필요하다.

[0012] **발명의 내용**

[0013] 본 발명의 목적은 국소, 즉 종양용해성 바이러스를 사용한 종양 지향 바이러스요법의 추가 의학적 용도를 제공하는 것이다.

[0014] 간략하게, 본 발명의 목적은

[0015] (i) 재조합 MVA가 고행 종양에 종양내로 투여되는, 고행 종양의 재발 예방, 또는

[0016] (ii) 재조합 MVA가 또 다른 고행 종양에 종양내로 투여되는, 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 TAA 및 공동자극 분자 4-1BBL을 발현하는 재조합 MVA에 의해 해결된다.

[0017] 특히, 본 발명은 첨부된 청구범위와 하기 양태들 및 그의 실시형태에 의해 정의된다.

[0018] 한 양태에서, 본 발명은 대상체에서 고행 종양의 치료 및 재발 예방에 사용하기 위한,

[0019] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및

[0020] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산

[0021] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.

[0022] 추가 양태에서, 본 발명은 대상체에서 고행 종양의 관해 중 또는 관해 후에 고행 종양의 재발 예방에 사용하기 위한,

[0023] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및

[0024] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산

[0025] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 관해는 고행 종양에 재조합 MVA를 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여함으로써 유도되거나 이에 따른다.

[0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 2차 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 재조합 MVA는 관련된 원발성 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 2차 종양에는 투여되지 않거나; 또는

- [0027] 대상체에서 원발성 고행 종양의 치료 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 상기 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 관련 2차 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 원발성 고행 종양에는 투여되지 않거나; 또는
- [0028] 대상체에서 2차 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한 것이고, 여기서 재조합 MVA는 또 다른 관련 2차 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 첫 번째 언급된 2차 종양에는 투여되지 않는
- [0029] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0030] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0031] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공한다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 수술에 의해 절개될 수 없거나 접근할 수 없는 종양의 치료, 예방 및/또는 재발 예방에 사용하기 위한,
- [0033] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0034] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0035] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 또 다른 관련 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지만, 첫 번째 언급된 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여되지 않는다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 전신 항종양 면역 반응의 유도에 사용하기 위한,
- [0037] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0038] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0039] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전신 항종양 요법에 사용하기 위한,
- [0041] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0042] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0043] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.
- [0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신보조 항종양 요법에 사용하기 위한,
- [0045] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0046] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0047] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 항종양 면역학적 기억의 유도에 사용하기 위한,
- [0049] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0050] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0051] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 고행 종양에 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 복수의 종양의 치료에 사용하기 위한,
- [0053] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산, 및
- [0054] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산
- [0055] 을 포함하는 재조합 MVA를 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 상기 복수의 종양 중 전부가 아닌 적어도 하나에 국

소적으로, 바람직하게는 종양내로 투여된다.

[0056] 본 발명은 또한 재조합 MVA를 상기 복수의 종양 중 전부가 아닌 적어도 하나에 국소적으로(바람직하게는 종양내로) 투여하는 단계를 포함하는, 복수의 종양을 갖는 환자를 위한 치료 방법을 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1-BB 리간드(4-1-BBL)를 암호화하는 제2 핵산을 포함한다.

[0057] 이러한 양태 및 이들의 실시형태는 본 발명의 설명과 관련하여 더욱 상세하게 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 관련이 없는 큰 종양 모델에서 MVA-TAA-4-1BBL의 종양내 투여의 치료 효능이 항원의 선택과 무관함을 보여준다.

C57BL/6(A-D) 또는 Balb/c 마우스(E-F)는 옆구리에 5×10^5 B16.OVA(A-B), 5×10^5 B16.F10(C-D) 또는 5×10^5 CT26.WT(E-F) 세포를 피하로(SC) 투여받았다. 7일 내지 14일 후, 종양이 60 mm^3 이상일 때, 마우스가 PBS 또는 지시된 MVA 작제물로 종양내(IT) 면역화되었다. IT 면역화는 첫 번째 면역화 후 4일차 또는 5일차 및 8일차에 반복되었다(점선). (A) PBS, 2×10^8 TCID₅₀ MVA-OVA 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA-OVA-4-1BBL을 주사한 B16.OVA 보유 마우스의 종양 크기 추적(n=5 마우스/그룹) 및 (B) 전체 생존(n=20 마우스/그룹); (C) PBS, 5×10^7 TCID₅₀ MVA-Gp70 또는 5×10^7 TCID₅₀ MVA-Gp70-4-1BBL을 주사한 B16.F10 보유 마우스의 종양 크기 추적(n=5 마우스/그룹) 및 (D) 전체 생존(n=15 마우스/그룹); (E) PBS, 5×10^7 TCID₅₀ MVA-Gp70 또는 5×10^7 TCID₅₀ MVA-Gp70-4-1BBL를 주사한 CT26.WT 보유 마우스의 종양 크기 추적(n=5 마우스/그룹) 및 (F) 전체 생존(n=10 마우스/그룹). (A, C 및 E) 데이터는 적어도 2개의 독립적인 실험을 나타낸다. (B, D 및 F)는 적어도 2개의 병합된 독립적인 실험의 전체 생존을 나타낸다. 마우스 생존에 대한 로그 순위 테스트는 도 B, D 및 F에 대해 수행되었다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$.

도 2는 MVA-TAA-4-1BBL 면역화된 종양-보유 마우스에서 증가된 말초 혈액 CD8⁺ T 세포 반응을 보여준다.

(A) B16.OVA 종양-보유 마우스(n=5 마우스/그룹)의 마지막 IT PBS, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL 면역화 3일 후 말초 혈액 CD44⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ CD8⁺ T 세포의 대표적인 점 플롯 및 빈도. (B) B16.F10 종양-보유 마우스(n=5 마우스/그룹)의 마지막 IT PBS, MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-4-1BBL 면역화 3일 후 p15E₆₀₄₋₆₁₁ 펩타이드 재자극된 말초 혈액 CD44⁺ IFN γ ⁺ CD8⁺ T 세포의 대표적인 점 플롯 및 빈도. (C) CT26.WT 종양-보유 마우스(n=5 마우스/그룹)의 마지막 IT PBS, MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-4-1BBL 면역화 3일 후 AH1₆₋₁₄ 펩타이드 재자극된 말초 혈액 CD44⁺ IFN γ ⁺ CD8⁺ T 세포의 대표적인 점 플롯 및 빈도. (D) IT MVA-TAA-4-1BBL 치료된 C57BL/6 마우스에서 백반증 발달의 대표적인 사진. (E) 각각 IT MVA-TAA(MVA-OVA 및 MVA-Gp70에서 결합된 데이터) 및 MVA-TAA-4-1BBL(결합된 MVA-OVA-4-1BBL 및 MVA-Gp70-4-1BBL에서 결합된 데이터) 치료된 C57BL/6 마우스의 백반증 발병률을 표시하는 파이 차트. (A-E) 데이터는 적어도 2개의 독립적인 실험을 나타낸다. (A-C) 평균 \pm SEM으로 표현된 데이터. 일원 분산 분석을 수행하였다. *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$.

도 3은 IT MVA 주사 시 MVA 국소화 및 MVA-OVA 및 MVA-OVA-4-1-BBL에 의한 염증성 사이토카인 유도를 나타낸다.

(A) C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 SC로 받았다. 종양이 60 mm^3 에 도달했을 때, 마우스가 그룹화되고(n=3 마우스/그룹), PBS 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA(TAA 또는 4-1-BBL을 암호화하지 않는 MVA)와 함께 IT가 투여되었다. 종양을 IT 주입하고 6시간 후에, TdLN, NdLN, 비장 및 혈액을 급속 동결하고, 조직 용해물에서 바이러스 DNA를 추출하였다. 상이한 기관에서 MVA 유전자 MVA082L의 유전자 카피(gcs)가 표시된다. 평균 \pm SEM으로 표현된 데이터. 양방향 ANOVA를 수행하였다. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$; ****, $p < 0.0001$. (B) C57BL/6 마우스는 5×10^5 B16.OVA 세포를 받았다. 종양이 60 mm^3 에 도달했을 때, 마우스를 그룹화하고(n=3 마우스/그룹), PBS 또는 2×10^8 TCID₅₀ MVA, MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL과 함께 IT 투여하였다. IT 주사 6시간 후 종양을 추출하

고 종양 용해물을 처리하였다. 종양 용해물에서 표시된 사이토카인/케모카인의 농도(pg/ml)가 표시된다. 평균 ± SEM으로 표현된 데이터. 일원 분산 분석을 수행하였다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

도 4는 종양내 MVA-면역요법이 치료되지 않은 병변의 거부를 유도함을 보여준다.

(A-D) 양측 종양 모델. (A) 실험적 레이아웃. Balb/c 마우스는 오른쪽 및 왼쪽 옆구리에 각각 5×10^5 및 1×10^5 CT26.WT 종양 세포를 SC로 받았다. 5일 후 우측 옆구리 종양을 PBS 또는 표시된 MVA 작제물로 IT 면역화시켰다. IT 면역화는 첫 번째 면역화 후 5일차 및 8일차에 반복되었다(화살표). (B) PBS IT 주사 후 처리 및 비처리 종양의 종양 크기 추적($n=10$ 마우스/그룹). (C) 5×10^7 TCID₅₀ MVA-gp70 IT 주사 후 처리 및 비처리 종양의 종양 크기 추적($n=10$ 마우스/그룹). (D) 5×10^7 TCID₅₀ MVA-Gp70-4-1BBL IT 주사 후 처리 및 비처리 종양의 종양 크기 추적($n=10$ 마우스/그룹).

도 5는 종양내 MVA-TAA-4-1BBL 처리된 마우스가 후속적인 국소 및 전신 종양 재접종에 내성이 있음을 보여준다.

(A) 실험적 레이아웃. 도 1a 및 1b의 나이브 C57BL/6 마우스 또는 장기 생존자(종양 제거 후 12-36주)에 5×10^5 B16.OVA 세포가 있는 치료된 마우스의 종양-나이브 옆구리에 SC 재접종하였다. 말초혈액은 재접종 전(-6일차) 및 재접종 후(7일차) 유세포 분석에 의해 분석되었다. 혈액, 비장, 비-dLN 및 TdLN 단핵 세포를 종양 세포 접종 후 41일차에 분석하였다. (B) 시간 경과에 따른 무종양 마우스의 백분율이 표시된다($n=5-11$ 마우스/그룹). 괄호 안에 그룹당 무종양 마우스의 수가 표시된다. (C) IT MVA-OVA 또는 MVA-OVA-4-1BBL 처리 후 나이브 마우스 및 장기 생존자의 B16.OVA 재접종 전후 말초 혈액 CD44⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ CD8⁺의 빈도. (D) 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD44⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ CD8⁺ T의 빈도. (E) OVA₂₅₇₋₂₆₄ 펩타이드로 재자극한 후 비장 CD44⁺ IFN γ ⁺ TNF α ⁺ IL2⁺ CD8⁺ T 세포의 빈도. (F) 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁻ CD127⁺ CD69⁻ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ 세포(T_{EM})의 빈도(왼쪽). 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁺ CD127⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺ 세포(T_{CM})의 빈도(중간). B16.OVA 세포 접종 41일 후 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁻ CD127⁺ CD69⁺ OVA₂₅₇₋₂₆₄ Dex⁺(T_{RM})의 빈도(오른쪽). (G-I) 전신 종양 재접종. (G) 실험적 레이아웃. 도 1c의 나이브 Balb/c 마우스 또는 장기 생존자는 2×10^5 CT26.WT 세포로 IV 재접종하였다. 종양 세포 주사 후 19일차에 비장 및 폐를 분석하였다. (H) 종양 세포를 나이브 또는 치료된 마우스로 이식한 후 19일차에 Bouin 용액에 고정한 후 폐의 대표적인 사진. 육안적 폐 전이의 총 수를 평가하였다($n=2-9$ 마우스/그룹). (I) 재접종 19일 후 AH1₆₋₁₄ 펩타이드로 재자극한 후 비장 CD44⁺ IFN γ ⁺ TNF α ⁺ IL2⁺ CD8⁺ T 세포의 빈도. (A-H) $n=5-11$ 마리 마우스/그룹. (C-H) 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 양방향 ANOVA를 수행하였다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$. (I) 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 일원 분산 분석을 수행하였다 *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

도 6은 종양내 MVA-Gp70-4-1BBL 면역요법이 국소 종양 재접종으로부터 보호를 부여한다는 것을 보여준다.

도 1c 및 1d의 나이브 C57BL/6 마우스 또는 장기 생존자에게 5×10^5 B16.F10 세포가 있는 치료된 마우스의 종양 나이브 옆구리에 SC 재접종하였다. 말초혈액은 재접종 전(-6일차) 및 재접종 후(7일차) 유세포 분석에 의해 분석되었다. 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN은 종양 세포 접종 후 42일차에 분석되었다. (A) 시간 경과에 따른 무종양 마우스의 백분율이 표시된다($n=5-11$ 마우스/그룹). 괄호 안에 그룹당 무종양 마우스의 수가 표시된다. (B) B16.F10 세포 재접종 전후 말초 혈액 CD44⁺ p15E₆₀₄₋₆₁₁ Pent⁺ CD8⁺ T 세포의 빈도. (C) 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁺ CD127⁺ p15E₆₀₄₋₆₁₁ Pent⁺ CD8⁺ T 세포(T_{CM})의 빈도. (D) 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁻ CD127⁺ p15E₆₀₄₋₆₁₁ Pent⁺ CD8⁺ T 세포(T_{EM})의 빈도. (E) 혈액, 비장, NdLN 및 TdLN에서 CD62L⁻ CD127⁺ CD69⁺ p15E₆₀₄₋₆₁₁ Pent⁺ CD8⁺ T 세포(T_{RM})의 빈도. (A-E) $n=5-11$ 마리 마우스/그룹. (B-E) 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. (C-E) 일원 분산 분석을 수행하였다 **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

도 7은 복제 바이러스가 감염된 종양 세포 및 면역 세포의 사멸을 유도함을 보여준다[33-35].

MVA, MVA-TAA 또는 MVA-TAA-4-1BBL에 의한 감염은 시험관 내에서 B16.OVA 및 CT26.WT 종양 세포 사멸을 향상시켰다(도 7a). MVA[36]에 의해 우선적으로 감염된 것으로 나타난 대식세포는 효과적으로 사멸되었고, 이에 의해 이 효과는 4-1BBL 아류반트에 의해 상당히 증가되었다(도 7a). 세포 사멸은 선천성 면역 세포에 의해 감지되고 면역 반응의 개시에 기여하는 고분자 그룹 박스 1(HMGB1)과 같은 세포내 단백질의 방출을 초래한다[37, 38]. 4-1BBL에 관계없이 종양 세포 또는 대식세포의 MVA 감염 후 HMGB1의 상당한 증가가 감지되었다(도 7b).

도 8은 MVA-기반 벡터 MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL("MVA-mBN494" 또는 "MVA-BN-4IT")을 예시하고(도 8a), 또한 감염된 세포의 TAA를 HLA로 로딩하는 것(도 8b)뿐만 아니라 기능적, 즉 h4-1-BB 수용체 결합 형태로 h4-1-BBL을 발현하는 것(도 8c) 벡터의 능력을 보여준다. 자세한 내용은 실시예 7을 참조한다.

도 9는 MVA-기반 벡터 "MVA-mBN502"(도 9c)를 보여주고, ERVK-env/MEL(도 9a; MVA-mBN494에서 사용됨) 및 ERVK-env/MEL_03(도 9b; MVA-mBN502에서 사용됨)의 개략도를 추가로 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 본 연구에서 본 발명자들은 TAA-암호화 MVA의 면역-자극 특성과 4-1BBL의 극상의 T 세포 강화 잠재력을 결합하고, 고형 종양에 대한 치료 효능을 평가하였다. 본 발명자들은 MVA-TAA-4-1BBL의 IT 주사가 다양한 관련 없는 종양 모델에서 강력하고 객관적인 치료 반응을 발휘한다는 것을 발견하였다. 이 요법은 강력하게 재활성화된 종양-특이적 CD8⁺ T 세포와 TME에서 다중 전염증성 케모카인 및 사이토카인의 바람직한 유도로 인한 것이었다. 또한, IT MVA-TAA-4-1BBL 주사는 전신 항종양 면역 반응을 유도하여, 원격 부위에서 종양 침착물의 성장을 억제했다. 중요하게도, IT MVA-TAA-4-1BBL은 국소 및 전이 재발로부터 보호하는 다양한 종양-특이적 기억 반응의 생성을 촉발했다.

[0060] 본 발명자들은 종양 관련 항원(TAA)과 면역-자극 보조제 4-1BBL을 종양 내 바이러스요법을 위해 변형된 백시니아 앙카라(MVA)의 계능에 클로닝하였다. MVA-TAA-4-1BBL에 의한 국소 치료는 확립된 종양의 제어를 초래하였다. 종양내 주사 시, MVA는 종양 배액 림프절로의 누출을 최소화하면서 주로 종양에 국한되었다. MVA-TAA-4-1BBL에 의한 원위치 감염은 다중 전염증성 분자 및 면역원성 세포 사멸의 유도를 포함하여 종양 미세환경에 중대한 변화를 촉발했다. 이것은 항원-경험이 있는 사이토카인 생성 종양-특이적 세포독성 T 세포의 재활성화 및 확장으로 이어졌다. 놀랍게도, 본 발명자들은 원격의 치료되지 않은 병변에서 종양 성장을 제어하고 국소 및 전신 종양 재접종에 대한 보호를 부여한 국소 MVA-TAA-4-1BBL 치료에 의한 전신 항종양 면역 반응의 유도를 보고한다. 모든 경우에 4-1BBL 아류반트화된 MVA가 MVA보다 우수했다. 따라서, 종양 내 4-1BBL-보조 MVA 면역요법은 강력한 종양-특이적 CD8⁺ T 세포의 확장을 유도할 뿐만 아니라 종양 미세환경에서 유리한 전염증성 변화를 유도하여, 종양 및 보호 면역학적 기억을 제거한다.

[0061] 정의

[0062] 본원에 사용된 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어 "핵산 서열"에 대한 언급은 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다.

[0063] 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.

[0064] 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. 본 발명의 설명에서 양태 또는 실시형태의 맥락에서 사용될 때 용어 "포함하는(comprising)"은 용어 "함유하는" 또는 "포함하는(including)"으로 대체될 수 있거나, 또는 때때로 본원에 사용되는 경우 용어 "갖는"으로 대체될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 설명에서 양태 또는 실시형태의 맥락에서 본원에 사용될 때마다 상기 언급된 용어들(포함하는(comprising), 함유하는, 포함하는(including), 갖는) 중 임의의 것은 용어 "~로 구성된" 또는 "본질적으로 구성되는"을 포함하며, 각각은 관할권에 따라 특정한 법적 의미를 나타낸다.

- [0065] 본원에 사용되는 경우 "~로 구성된"은 청구항 요소에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본 명세서에서 사용될 때, "본질적으로 구성되는"은 청구범위의 기본적인이고 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다.
- [0066] 용어 "재조합 MVA"는 모 바이러스에 자연적으로 존재하지 않는 그의 게놈에 삽입된 외인성 핵산 서열을 갖는 MVA를 지칭한다. 따라서, 재조합 MVA는 합성 또는 반합성 기원의 핵산 서열의 단편과 MVA 핵산 서열의 인위적인 조합에 의해 제조된 MVA를 지칭하며, 조합은 자연에서 발생하지 않거나 상이하게 배열된다. 인위적인 조합은 잘 확립된 유전 공학 기술을 사용하여 단리된 핵산 세그먼트를 인위적으로 조합함으로써 가장 일반적으로 수행된다. 일반적으로, 본원에 기재된 "재조합 MVA"는 표준 유전 공학 방법에 의해 생성된 MVA를 지칭하며, 예를 들어 재조합 MVA는 따라서 유전자 조작된 또는 유전자 변형된 MVA이다. 따라서, 용어 "재조합 MVA"는 그의 게놈에 바람직하게는 전사 단위의 형태로 적어도 하나의 재조합 핵산을 통합한 MVA(예를 들어, MVA-BN)를 포함한다. 전사 단위는 프로모터, 인핸서, 종결자 및/또는 사일렌서(silencer)를 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 MVA는 조절 요소, 예를 들어 프로모터의 유도 시 이중 항원 결정기, 폴리펩타이드 또는 단백질(항원)을 발현하도록 설계된다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 전형적으로 비-영장류 또는 영장류(예를 들어, 원숭이 또는 인간)와 같은 포유 동물이고 바람직하게는 인간인, 재조합 MVA의 수혜자를 지칭한다. 이 용어에는 인간 또는 동물 "환자" 및 실험실 동물이 포함된다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환해서 사용된다.
- [0068] 용어 "고형 종양"은 예를 들어 백혈병 또는 혈액암과 대조적으로 국소화되거나 정착된 신생물 조직을 지칭한다.
- [0069] 용어 "원발성 종양"은 신생물 세포가 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있고 새로운("2차") 종양을 형성할 수 있는 초기 또는 제1 종양을 지칭한다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "2차 종양"은 "원발성 종양" 또는 또 다른 "2차 종양"으로부터 확산된 신생물 세포에 의해 형성된 종양을 지칭한다. 특히, 용어는 "전이"를 포함한다.
- [0071] 용어 "전이"는 암성 원발성 또는 2차 종양에서 유래하는 종양 침착물을 지칭한다.
- [0072] 본원에 사용된 단어 "관련된"은 2개의 종양이 동일한 재조합 MVA 또는 TAA에 반응하는 것으로 가정됨을 의미한다. 예를 들어, 그들은 동일한 종양 유형이다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "공간적으로 떨어져 있는"은 예를 들어 광학 수단에 의해 개별 종양으로 명확하게 식별가능하고 다른 것과 이격된 종양에 관한 것이다.
- [0074] 용어 "국소" 투여는 예를 들어 고형 종양에 대한 종양내 또는 국소 투여를 포함한다. 따라서 국소는 해당 부위를 의미한다. 투여는 예를 들어 재조합 MVA의 국소 또는 국소적 적용에 의해, 또는 종양내 주사에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 피부에 가까운 종양 또는 흑색종과 같은 피부 세포의 종양인 경우, 국소 투여는 종양의 바로 부근에 피하 주사에 의해 달성될 수 있다. 대조적으로, "원격(distant)" 또는 "전신"과 같은 용어는 부위 위가 아님을 의미한다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "전신"은 "국소"의 반대를 의미한다. 따라서, 전신은 효과가 국소적으로 제한되지 않음, 즉 오히려 전신과 관련됨을 의미할 수 있다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "종양 지향 바이러스요법"은 전신 종양 바이러스요법과 대조되는 국소 바이러스요법을 의미한다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "전신적 항종양 요법"은 재조합 MVA가 고형 종양에 국소적으로 투여되지만 항종양 활성이 국소적으로 치료되지 않은 다른 종양까지 확장됨을 의미한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "전신 항종양 면역 반응"은 잠재적으로 신체의 어느 곳에서도 발생할 수 있는 항종양 면역 반응을 의미한다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "재발"은 종양의 재발 또는 복귀를 의미한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "재발 예방"은 완화된 종양의 재발, 즉 관해 중 또는 이후의 종양, 예를 들어 근절된 종양이 예방되거나 억제됨을 의미한다. 최소한 종양의 완전한 재발이, 예를 들어, 적어도 50% 억제된다.
- [0081] 이와 대조적으로 "예방"이라는 용어는 종양의 첫 번째 출현이 예방되는 것을 의미한다.

- [0082] 본원에 사용된 용어 "관해"는 예를 들어 감소되거나 근절된 종양에 관한 것이다. 보다 일반적으로, "관해"는 종양과 같은 질환의 징후 및 증상의 감소 또는 소실이다. 관해는 부분 관해 또는 완전 또는 전체 관해로 간주될 수 있다. 예를 들어, 종양의 부분 관해는 신체 검사, 방사선 연구 또는 혈액 또는 소변 검사로부터의 바이오마커 수준에 의해 발견될 수 있는 종양 성장의 측정 가능한 매개변수의 50% 이상 감소로 정의될 수 있다. 반면, 완전한 관해는 재발 가능성에도 불구하고 종양이 완전히 사라지는 것이다.
- [0083] 용어 "신보조 요법"은 본 요법 이전의 치료를 의미한다. 여기서, 재조합 MVA를 사용한 신보조 요법은 예를 들어 외과적 절제 전에 종양의 크기 또는 범위를 줄이는 것을 목표로 한다.
- [0084] 선택된 약어
- [0085] IT 종양내(i.t.)
- [0086] MVA 변형된 백시니아 바이러스 앙카라(MVA)
- [0087] OV 종양용해성 바이러스
- [0088] TAA 종양 관련 항원
- [0089] TME 종양 미세환경
- [0090] 실시형태
- [0091] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 비-복제 또는 복제 결핍 MVA이다. 바람직하게는, 재조합 MVA는 인간 세포주에서 생식 복제가 불가능하다.
- [0092] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 유럽 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 번호 V00083008로 기탁된 MVA-BN, 또는 MVA-BN 유도체로부터 유래된다.
- [0093] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는
- [0094] (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산; 및
- [0095] (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산; 및
- [0096] (c) TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산
- [0097] 을 포함한다.
- [0098] 한 실시형태에서, TAA를 암호화하는 제1 핵산 및 TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산은 동일하거나 상이하다.
- [0099] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 각각 상이한 TAA를 암호화하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 이상의 핵산을 포함한다.
- [0100] 한 실시형태에서, TAA는 신생항원 또는 내인성 자가-항원이다.
- [0101] 한 실시형태에서, TAA는 전위 요소(TE)이다.
- [0102] 한 실시형태에서, TAA는 내인성 레트로바이러스 단백질(HERV)이다.
- [0103] 한 실시형태에서, TAA는 산재된 긴 핵 요소(LINE)이다.
- [0104] 한 실시형태에서, TAA는 산재된 짧은 핵 요소(SINE)이다.
- [0105] 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 2(TRP2), 브라큐리, 엽산 수용체 알파(FOLR1), 흑색종에서 우선적으로 발현된 항원(PRAME), 및 내인성 레트로바이러스 펩타이드 MEL; 및 이들의 조합을 포함한다. 임의의 TAA는 알려진 종양 또는 그것이 치료될 환자의 종양과 관련된 항원이고 발현될 때 면역 반응을 일으키거나 자극시킬 수 있는 한 본 발명의 조성물 및/또는 방법에 사용하기에 적합하다.
- [0106] 한 실시형태에서, ERV 단백질은 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터의 것이고, 바람직하게는 HERV-K 외피(HERV-K-env) 단백질 및 HERV-K gag 단백질로부터 선택된다.

- [0107] 한 실시형태에서, ERV 썬타이드는 인간 내인성 레트로바이러스 K(HERV-K) 패밀리로부터 유래하고, 바람직하게는 HERV-K 외피 단백질(HERV-K-env/MEL)의 유사유전자로부터 선택된다.
- [0108] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는
- [0109] (i) HERV-K-env/MEL을 암호화하는 핵산;
- [0110] (ii) HERV-K gag를 암호화하는 핵산;
- [0111] (iii) 바람직하게는 융합 단백질로서 발현되는 FOLR1 및 PRAME를 암호화하는 핵산; 및
- [0112] (iv) 4-1BBL을 암호화하는 핵산
- [0113] 을 포함한다.
- [0114] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 HERV-K env 표면(SU) 단위 및 HERV-K 막관통(TM) 단위를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화하며, 여기서 HERV-K TM 단위는 돌연변이되고, 바람직하게는 HERV-K TM 단위가 돌연변이되어 면역억제 도메인이 비활성화된다. 바람직하게는, HERV-K-MEL은 돌연변이된 HERV-K TM 단위 내에 삽입된다. 더욱 바람직하게는, HERV-K-MEL이 HERV-K TM의 면역억제 도메인의 일부를 대체한다.
- [0115] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 7에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0116] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 8에 나타난 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0117] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 HERV-K env 표면(SU) 단위 및 HERV-K 막관통(TM) 단위를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화하며, 여기서 HERV-K TM 단위는 20개 미만의 아미노산, 바람직하게는 10개 미만의 아미노산, 더욱 바람직하게는 8개 미만의 아미노산, 가장 바람직하게는 6개의 아미노산으로 단축된다.
- [0118] 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.
- [0119] 한 실시형태에서, (i)의 핵산은 바람직하게는 인간 PDGF(혈소판-유래 성장 인자) 수용체로부터 유래된 이중성 막 앵커를 포함하는 HERV-K-env/MEL을 암호화한다.
- [0120] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 11에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0121] 한 실시형태에서, (i)의 핵산 서열은 서열번호 12에 도시된 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0122] 한 실시형태에서, 고행 종양, 원발성 고행 종양 및/또는 2차 종양은 암성 또는 악성 종양이다.
- [0123] 한 실시형태에서, 고행 종양, 원발성 고행 종양 및/또는 2차 종양은 흑색종 또는 악성 유방, 결장 또는 난소 종양이다.
- [0124] 한 실시형태에서, 2차 종양은 전이이다.
- [0125] 한 실시형태에서, 2차 종양은 고행 종양이다. 대안적으로, 2차 종양은 예를 들어 혈액 림프와 같은 체액에 떠 있는 종양 세포의 응집이거나, 체강, 예를 들어 복막강 내에 존재한다. 그러나, 재조합 MVA가 국소적으로 또는 종양내로 투여되는 원발성 또는 2차 종양은 항상 고행 종양이다.
- [0126] 한 실시형태에서, 재조합 MVA가 국소적으로 또는 종양내로 투여되지 않은 종양은 수술에 의해 절개할 수 없거나 접근할 수 없다.
- [0127] 한 실시형태에서, 원발성 및 2차 종양은 서로 공간적으로 떨어져 있다.
- [0128] 한 실시형태에서, 2차 종양 및 또 다른 2차 종양은 서로 공간적으로 떨어져 있다.
- [0129] 한 실시형태에서, 원발성 및 2차 종양은 대상체 신체의 동일한 조직 또는 기관 내에 위치한다.
- [0130] 한 실시형태에서, 2차 종양 및 또 다른 2차 종양은 대상체의 동일한 조직 또는 기관 내에 위치한다.
- [0131] 한 실시형태에서, 원발성 및 2차 종양은 대상체 신체의 상이한 조직 또는 기관 내에 위치한다.

- [0132] 한 실시형태에서, 2차 종양 및 또 다른 2차 종양은 대상체의 신체의 상이한 조직 또는 기관 내에 위치한다. 한 실시형태에서, 2차 종양은 나이브(*naïve*), 즉 이전에 재조합 MVA로 국소적으로, 바람직하게는 종양내로 치료되지 않았다.
- [0133] 한 실시형태에서, 종양은 적어도 부분적으로 관해, 예를 들어, 적어도 50% 이상 관해, 바람직하게는 완전 관해 상태이다.
- [0134] 한 실시형태에서, 재조합 MVA는 국소적으로, 바람직하게는 종양내 이외의 다른 방식으로 투여되지 않는다. 따라서, 재조합 MVA는 예를 들어, 전신, 정맥내, 복막, 비경구, 피하 또는 비강내로 대상체에게 투여되지 않는다.
- [0135] 한 실시형태에서, 항종양 면역학적 기억은 장기간, 즉 수일, 수주, 수개월, 수년 또는 수십년 동안 지속된다.
- [0136] 치료 방법
- [0137] 본 발명은 대상체의 모든 종양보다 적은 수의 종양이 재조합 MVA의 국소 투여에 의해 치료되는, 하나 초과 종양을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 즉, 본 발명은 재조합 MVA를 상기 복수의 종양 중 적어도 하나, 그러나 전부는 아닌 종양에 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는 복수의 종양을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 재조합 MVA를 국소적으로 투여하는 단계는 종양내 주사를 포함한다. 이러한 방식으로, 치료 방법은 재조합 MVA가 국소적으로 또는 종양내로 투여되거나 주사된 "치료된 종양" 또는 "주사된 종양", 및 재조합 MVA가 국소적으로 투여되지 않았거나 재조합 MVA가 주사되지 않은 "미처리 종양" 또는 "주사되지 않은 종양"을 생성한다고 말할 수 있다. 치료 방법은 또한 대상체의 적어도 하나의 다른 종양에 재조합 MVA를 국소 투여하거나 종양내 주사함으로써 대상체에서 주사되지 않은 종양을 치료하는 방법을 제공한다고 말할 수 있다. 본 발명의 방법의 일부 실시형태에서, 대상체는 인간 환자이다.
- [0138] 일부 실시형태에서, 치료 방법은 상기 제1 또는 원발성 종양으로의 재조합 MVA의 국소 투여(일부 실시형태에서는 종양내 주사)에 의해 제1 또는 원발성 종양의 전이 또는 재발을 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체의 복수의 종양 중 어느 것이 먼저 발생했는지(즉, "원발성 종양") 결정하는 것은 불가능하며, 방법은 복수의 종양 중 적어도 하나를 MVA의 국소 투여 또는 종양내 주사에 의해 치료하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, "전이" 또는 "2차 종양"은 "제1 종양" 또는 "원발성 종양"으로 지정된 종양과 상이한 위치에 있거나 상이한 경계를 갖는 것으로 의도된다.
- [0139] 본 발명의 방법은 국소 투여 또는 종양내 주사에 의해 대상체에서 복수의 종양 중 적어도 하나를 치료하거나, 또는 상기 종양 중 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 그 이상을 치료하거나, 대상체에서 상기 복수의 종양 중 하나를 제외한 전부를 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은 대상체의 모든 종양보다 적은 수의 종양이 주사 또는 치료되는 한, 대상체의 임의의 수의 종양이 재조합 MVA를 사용한 국소 투여 또는 종양내 주사에 의해 주사 또는 치료될 수 있음을 제공한다.
- [0140] 본 발명은 특정 메커니즘 또는 작용 방식에 구속되지 않지만, 상기 대상체 또는 그의 세포에서 적어도 하나의 TAA 또는 종양에 대한 면역 반응을 자극하거나 적어도 하나의 2차 또는 주사되지 않은 종양의 부피 또는 크기 감소를 일으키는 한, 임의의 방법이 본 발명을 실시하는데 적합하다. "면역 반응을 자극한다"는 것은 예를 들어 CD8+ T 세포 집단의 증가 및/또는 본원의 작업 실시예에 예시된 바와 같이 대상체의 CD8+ T 세포에 의해 생성된 IFN-감마, TNF-알파 및/또는 IL-2의 양의 증가와 같은 새로운 또는 증가된 면역 반응의 지표가 대상체에서 확인될 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 방식으로, 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 MVA를 대상체에게 종양내 투여하는 단계를 포함하는, TAA에 대한 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0141] 일부 실시형태에서, 재조합 MVA는 (a) 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산; 및 (b) 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 암호화하는 제2 핵산을 포함한다. 재조합 MVA는 추가 TAA를 암호화하는 추가 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 적어도 하나의 TAA 및 4-1-BBL 둘 다를 암호화하는 재조합 MVA와 함께 사용하기에 적합하다. 일부 실시형태에서, 재조합 MVA는 당업계에서 공지된 기술을 사용하여 입증될 수 있는 적어도 하나의 TAA 및 4-1-BBL을 발현한다.
- [0142] 본 발명의 방법 및 구성물에 유용한 다양한 TAA 및 4-1-BBL의 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 PCT/EP2019/081942(WO 2020/104531로 공개됨) 및 유럽 특허 출원 번호 19210369.5에 기재되어 있으며, 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 예시적인 4-1-BBL 서열은 NCBI RefSeq NP_003802.1(및 서열번호 3에 제시되고/되거나 서열번호 4에 제시된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열)에 제시되어 있다.

- [0143] 본 발명의 용도 및 방법에 유용한 재조합 MVA는 또한 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함된 유럽 특허 출원 번호 19210369.5에 기재되어 있다.
- [0144] 특정 실시형태에서, 4-1-BBL을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 3과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 4-1-BBL을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 4에 제시된 서열이거나, 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 4-1-BBL을 암호화한다.
- [0145] 특정 실시형태에서, TAA를 암호화하는 핵산 서열은 예를 들어 본원에 제공된 서열 목록에 제시된 서열과 같은 이전에 공지된 TAA와 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 TAA를 암호화한다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열 목록에 제시된 아미노산 서열을 갖는 TAA, 또는 당업계에 공지된 아미노산 서열을 갖는 TAA를 암호화한다.
- [0146] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 개별 종양은 재조합 MVA의 국소 투여(예를 들어, 종양내 주사) 전후에 측정되어, 투여 후 종양이 계속 성장하는지 또는 크기가 증가 또는 감소하는지를 결정한다. 일부 방법에서, 적어도 하나의 개별 종양의 반응을 추적하기 위해 투여 후 간격을 두고 추가 측정을 수행할 수 있다. 이러한 측정은 임의의 적합한 기술에 의한 것일 수 있고, 시각적 평가 또는 외부 측정뿐만 아니라 X-선, 초음파 영상, 생체내 현미경, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적합한 방법을 포함할 수 있다. 치료에 대한 종양의 반응 및/또는 치료의 효과를 평가하기 위해 사용되는 종양의 측정은 예를 들어, 종양의 적어도 하나의 직경 및/또는 종양의 부피 추정을 포함할 수 있다.
- [0147] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법은 (a) 상기 대상체에서 종양의 제1 측정치를 획득하는 단계; (b) 적어도 하나의 TAA를 발현하는 재조합 MVA를 상기 대상체의 종양 중 전부보다 적은 하나 이상에 투여하여 치료되거나 주사된 종양 및 치료되지 않거나 주사되지 않은 종양을 생성하는 단계; (c) 상기 치료되지 않거나 주사되지 않은 종양 중 적어도 하나의 제2 측정치를 획득하는 단계; 및 (d) 상기 제2 측정치를 상기 치료되지 않거나 주사되지 않은 종양의 제1 측정치와 비교함으로써, 상기 측정치의 감소 또는 상기 측정치의 증가 부족은 종양이 퇴행 또는 부피 감소되거나 종양 성장이 지연되었음을 나타내는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원의 다른 곳에서 추가로 논의된 바와 같이, 이들 방법에 사용된 재조합 MVA는 적어도 하나의 TAA 및 4-1-BBL을 발현한다.
- [0148] 일부 실시형태에서, 원발성 종양 및 하나 이상의 전이, 또는 전이 가능성(즉, 악성 종양을 가짐)을 갖는 대상체를 치료하는 방법은 신규 또는 추가 전이를 예방하기 위한 것이며, (a) 대상체에서 전이 위험이 있는 하나 이상의 종양을 확인하는 단계; (b) TAA를 발현하는 재조합 MVA를 상기 대상체의 모든 종양이 아닌 적어도 하나의 종양에 (일부 실시형태에서, 종양내 주사에 의해) 국소적으로 투여하는 단계; (c) 상기 대상체에서 종양을 검출하여, 새로운 종양 또는 전이가 상기 대상체에서 검출될 수 없음을 확인하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원의 다른 곳에서 추가로 논의된 바와 같이, 이들 방법에 사용된 재조합 MVA는 TAA 및 4-1-BBL을 발현한다. 일부 실시형태에서, 이들 방법에 사용되는 재조합 MVA는 TAA를 암호화하는 이중 핵산 및 4-1-BBL을 암호화하는 이중 핵산을 포함하지만, 대상체의 면역 반응에 영향을 미칠 수 있거나, MVA의 구성요소로 또는 별도로 대상체를 치료하는 데 사용되는 경우 대상체의 면역 반응에 영향을 미칠 것으로 예상되는 이중 핵산에 의해 암호화되는 임의의 추가 유전자를 포함하지 않는다.
- [0149] 일부 실시형태에서, 본 발명은 재조합 MVA를 복수의 종양 중 적어도 하나의 접근 가능한 종양에 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 복수의 종양이 있는 대상체에서 접근할 수 없는 종양을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 재조합 MVA는 종양-관련 항원(TAA)을 암호화하는 제1 핵산 및 4-1-BBL 리간드(4-1-BBL)를 암호화하는 제2 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 MVA는 적어도 하나의 추가 TAA를 암호화하는 적어도 하나의 추가 핵산, 또는 적어도 2개, 3개 또는 4개의 추가 TAA를 암호화하는 적어도 2개, 3개, 또는 4개의 추가 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 MVA를 국소적으로 투여하는 단계는 종양내 주사를 포함한다.
- [0150] "접근할 수 없는 종양"은 종양내 주사 및/또는 다른 기술을 사용하는 것과 같은 재조합 MVA의 국소 투여에 의해 직접 치료하기 어려운 종양을 의미한다. "접근할 수 없는 종양" 또는 절제할 수 없는 종양은 신체의 민감한 부위, 예를 들어 중요한 신경이나 혈관에 가깝거나 그 주변, 또는 뇌 내에, 또는 수술 및/또는 재조합 MVA의 국소 투여가 대상체에게 손상을 줄 위험이 있고/있거나 투여하기 어려울 수 있는 또 다른 위치에 위치할 수 있다. 본 발명은 접근이 더 용이하고/하거나 국소 투여가 대상체에 손상을 일으킬 가능성이 적은 다른 종양에 국소 투여하는 단계를 포함하는, 복수의 종양이 있는 대상체에서 접근할 수 없거나 절제할 수 없는 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 (a) 대상체에서 적어도 하나의 접근할 수 없는 종양 및 적어도 하나의 접근 가능한 종양을 확인하는 단계; 및 (b) TAA를 발현하는 재조합 MVA를 상기 대상체에서 적어도 하나의

접근 가능한 종양에 국소적으로 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 접근할 수 없는 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 선택적으로, 이 방법은 종양의 성장이 느려지거나 멈췄는지 확인하기 위해 상기 접근할 수 없는 종양을 모니터링하는 단계, 및/또는 재조합 MVA의 투여 후 상기 대상체가 증가된 면역 반응 또는 새로운 면역 반응을 갖는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 본 발명은 TAA를 발현하는 재조합 MVA를 상기 종양 중 적어도 하나에 국소 투여하여 치료된 종양을 생성하는 단계를 포함하는, 복수의 악성 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 치료는 치료된 종양, 및 재조합 MVA로 직접 치료되거나 주사되지 않은 적어도 하나의 다른 종양("미처리된 종양" 또는 "주사되지 않은 종양"으로도 지칭됨)의 종양 부피 감소를 초래한다.

[0152] 일부 실시형태에서, "종양내 주사"는 투여가 종양 내로, 또는 종양의 경계 내에서 이루어지는 것으로 의도된다. 일부 실시형태에서, "국소 투여"는 투여가 종양에 매우 근접하게 이루어지는 것으로 의도된다. 당업자는 이러한 주사가 동시에 종양의 위치에 따라 예를 들어 비경구 또는 피하와 같은 또 다른 유형의 투여로도 특징화될 수 있다는 것을 알고 있다.

[0153] 추가 설명

[0154] 변형된 백시니아 바이러스 양카라(MVA)

[0155] 과거에, MVA는 백시니아 바이러스의 양카라 균주의 닭 배아 섬유아세포(CVA)에 대한 516개의 연속 계대에 의해 생성되었다(검토를 위해, Mayr et al. 1975 참조). 이 바이러스는 실질적으로 변형된 특성을 설명하기 위해 570 계대로 CVA에서 MVA로 개명되었다. MVA는 570 이상의 계대 수까지 추가 계대되었다. 이러한 장기간 계대의 결과로, 생성된 MVA 바이러스의 계놈은 약 31 킬로베이스의 계놈 서열이 결실되어 조류 세포로의 복제가 제한된 고도 숙주 세포로 기술되었다(Meyer et al. 1991). 다양한 동물 모델에서 생성된 MVA가 완전히 복제 가능한 출발 물질과 비교하여 상당히 악성이 아닌 것으로 나타났다(Mayr and Danner 1978).

[0156] 본 발명의 실시예에 유용한 MVA는 MVA-572(1994년 1월 27일 ECACC V94012707로 기탁됨); MVA-575(2000년 12월 7일 ECACC V00120707로 기탁됨), MVA-1721(Suter et al. 2009에서 참조됨), NIH 클론 1(2003년 3월 27일 ATCC® PTA-5095로 기탁됨) 및 MVA-BN(2000년 8월 30일 번호 V00083008의 유럽 세포 배양 컬렉션(ECACC)에 기탁됨)을 포함한다.

[0157] 보다 바람직하게는 본 발명에 따라 사용되는 MVA는 MVA-BN 및 MVA-BN 유도체를 포함한다. MVA-BN은 WO 02/042480에 기재되어 있다. "MVA-BN 유도체"는 본원에 기재된 바와 같이 MVA-BN과 본질적으로 동일한 복제 특성을 나타내지만 계놈의 하나 이상의 부분에서 차이를 나타내는 임의의 바이러스를 지칭한다.

[0158] MVA-BN 및 MVA-BN 유도체는 복제가 불가능하며, 이는 생체내 및 시험관내에서 생식적으로 복제하는데 실패함을 의미한다. 보다 구체적으로, 시험관 내에서 MVA-BN 또는 MVA-BN 유도체는 닭 배아 섬유아세포(CEF)에서 생식 복제가 가능하지만, 인간 각질세포 세포주 HaCat(Boukamp et al 1988), 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 기재되어 있다. 부가적으로, MVA-BN 또는 MVA-BN 유도체는 HeLa 세포 및 HaCaT 세포주에서 MVA-575보다 적어도 2배, 보다 바람직하게는 3배 적은 바이러스 증폭 비율을 갖는다. MVA-BN 및 MVA-BN 유도체의 이러한 특성에 대한 테스트 및 분석은 WO 02/42480 및 WO 03/048184에 기재되어 있다.

[0159] 상기 기재된 바와 같이 시험관내 인간 세포주에서 용어 "생식 복제가 불가능하다"는, 예를 들어, WO 02/42480에 기재되어 있으며, 이는 또한 상기 언급된 바와 같은 원하는 특성을 갖는 MVA를 획득하는 방법을 교시하고 있다. 이 용어는 WO 02/42480 또는 미국 특허 제6,761,893호에 기재된 분석을 사용하여 감염 후 4일째 시험관 내 바이러스 증폭 비율이 1 미만인 바이러스에 적용된다.

[0160] 재조합 MVA 바이러스의 예시적인 생성

[0161] 본원에 개시된 바와 같은 재조합 MVA의 생성을 위해, 상이한 방법이 적용될 수 있다. 바이러스에 삽입될 DNA 서열은 포스바이러스의 DNA 부분에 대하여 상동성인 DNA가 삽입된 *이. 콜라이*(*E. coli*) 플라스미드 작제물에 위치될 수 있다. 별도로, 삽입되는 DNA 서열은 프로모터에 결합될 수 있다. 프로모터-유전자 연결은 비필수 유전자 좌를 함유하는 포스바이러스 DNA의 영역을 플랭킹하는 DNA 서열에 대하여 상동성인 DNA에 의해 프로모터-유전자 연결이 양쪽 말단에서 플랭킹되도록 플라스미드 작제물에 위치될 수 있다. 생성된 플라스미드 작제물은 *이. 콜라이* 박테리아 내에서 증식에 의해 증폭되고 단리될 수 있다. 삽입될 DNA 유전자 서열을 함유하는 단리된 플라

스미드는 배양물이 MVA로 감염되는 것과 동시에, 예를 들어 닭 배아 섬유아세포(CEF)의 세포 배양물에 형질감염될 수 있다. 플라스미드와 바이러스 게놈 각각의 상동 MVA 바이러스 DNA 간의 재조합은 외래 DNA 서열, 즉 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 존재에 의해 변형된 MVA를 생성할 수 있다.

[0162] 바람직한 실시형태에 따르면, 예를 들어 CEF 세포와 같은 적합한 세포 배양물의 세포는 MVA 바이러스로 감염될 수 있다. 이어서, 감염된 세포는 바람직하게는 폭스바이러스 발현 조절 요소의 전사 조절 하에, 본원에 제공된 핵산 중 하나 이상과 같은 외래 또는 이중 유전자 또는 유전자들을 포함하는 제1 플라스미드 벡터로 형질감염될 수 있다. 상기 설명된 바와 같이, 플라스미드 벡터는 또한 MVA 바이러스 게놈의 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. 선택 또는 마커 카세트의 사용은 생성된 재조합 MVA의 식별 및 단리를 단순화한다. 그러나, 재조합 폭스바이러스는 PCR 기술로도 확인될 수 있다. 후속적으로, 추가의 세포는 상기 기재된 바와 같이 수득된 재조합 MVA로 감염될 수 있고, 제2 외래 또는 이중 유전자 또는 유전자들을 포함하는 제2 벡터로 형질감염될 수 있다. 이 유전자가 폭스바이러스 게놈의 다른 삽입 부위에 도입되어야 하는 경우, 제2 벡터는 또한 제2 외래 유전자 또는 유전자들을 폭스바이러스 게놈으로 통합하는 것을 지시하는 폭스바이러스-상동 서열이 상이하다. 상동 재조합이 일어난 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 단계들이 반복될 수 있다. 재조합 MVA를 생성하는 것으로 알려진 다른 기술들이 많이 있다.

[0163] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 실시는 면역학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 재조합 기술의 통상적인 기술을 사용할 것이며, 이들은 모두 당업계의 기술 내에 있다. 예를 들어 Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al., eds, 1987; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds, 1988을 참조한다.

[0164] **실시예**

[0165] 하기 실시예는 본 개시내용을 추가로 예시하는 역할을 한다. 그것들은 첨부된 청구범위에 의해 결정되는 범위가 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0166] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0167] *1.1 MVA 재조합체의 생성*

[0168] MVA 재조합체의 생성은 이전에 설명한 대로 수행되었다[1]. MVA-BN®은 Bavarian Nordic에 의해 개발되었으며, 유럽동물세포배양기탁기관(ECACC, European Collection of Cell Cultures)(V00083008)에 기탁되었다. 오브알부민(MVA-OVA)을 발현하는 재조합 MVA의 생성은 이전에 설명되었다[1, 2]. 4-1BBL을 암호화하는 유전자를 합성하고(Geneart, Life Technologies), MVA-OVA 게놈에 클로닝하여 MVA-OVA-4-1BBL을 생성하였다. 마우스 백혈병 바이러스 유래 외피 당단백질 Gp70을 암호화하는 유전자를 합성하고(Geneart, Life Technologies), MVA 및 MVA-4-1BBL 게놈에 각각 클로닝하여 MVA-Gp70 및 MVA-Gp70-4-1BBL을 생성하였다. 동물 실험에 사용된 모든 바이러스는 수크로스 쿠션을 통해 두 번 정제되었다.

[0169] *1.2 윤리 선언문*

[0170] 동물 실험은 Upper Bavaria 정부의 동물 윤리 위원회(Regierung von Oberbayern, Sachgebiet 54, Tierschutz)의 승인을 받았으며, Bavarian Nordic GmbH의 승인된 동물 실험 지침에 따라 수행하였다. 양측 CT26.WT 종양 실험은 국제실험동물인증협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC)에 따라 나바라 대학(스페인 팜플로나)의 CIMA에서 수행하였다.

[0171] *1.3 마우스 및 종양 세포주*

[0172] 6 내지 8주령 암컷 C57BL/6J (H-2^b) 및 Balb/cJ (H-2^d) 마우스는 Janvier Labs에서 구입하였다. 모든 마우스는 기관 지침에 따라 Bavarian Nordic GmbH, 취리히 대학 또는 나바라 대학의 동물 시설에서 처리, 급여, 사육 및 유지되었다.

- [0173] B16.OVA 흑색종 세포주는 **Roman Spörri** (취리히 대학)의 친절한 선물이었다. B16.F10(ATCC® CRL-6475™) 및 CT26.WT(ATCC® CRL-2638™) 세포주는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection, ATCC)에서 구입했다. 종양 세포를 37°C 5% CO₂의 인큐베이터에서 10% FCS, 1% NEAA, 1% 피루브산 나트륨 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco의 모든 시약)이 보충된 DMEM Glutamax 배지에서 배양하였다. Bavarian Nordic에서 수행된 실험에 사용된 모든 종양 세포주는 정기적으로 PCR에 의해 *마이코플라스마(Mycoplasma)*에 대해 음성 테스트를 거쳤다.
- [0174] 1.4 종양 세포 주사
- [0175] 마우스의 옆구리에 5×10⁵ 종양 세포를 피하 주사하였다. B16.OVA 및 B16.F10과 관련하여, 주사 전에 세포를 7 mg/ml Matrigel(Trevigen)과 혼합하였다. 피하 양측 종양 실험을 위해, 5×10⁵ 및 1×10⁵ CT26.WT 종양 세포를 오른쪽 옆구리와 왼쪽 옆구리에 각각 주사했다. 종양 재접종 실험은 종양이 제거된 후 3개월에서 6개월 사이에 수행하였다. 5×10⁵ 종양 세포를 사용하여 반대쪽 옆구리에 피하 재접종을 수행하였다. 2×10⁵ CT26.WT 세포를 주입하여 정맥내 재접종을 수행하였다. 일주일에 2회 캘리퍼를 사용하여 규칙적인 간격으로 종양 직경을 측정하였다.
- [0176] 1.5 면역화
- [0177] 종양내 주사는 각각의 MVA 제조합체를 함유하는 50 μl의 총 부피로 고휘 종양 덩어리에 제공하였다. 종양 그룹화 후 0일차, 5일차 및 8일차에 반복적인 종양내 주사를 수행하였고, 수직 점선으로 그래프에 표시하였다. 지시된 경우, 말초 혈액 면역 세포 표현형을 위해 마지막 종양내 면역화 3일 후에 혈액을 수집하였다.
- [0178] 1.6 세포 단리
- [0179] 표시된 경우, 비장과 림프절을 마우스에서 채취하였다. 비장 및 림프절 단일-세포 현탁액은 40-μm 세포 여과기(Falcon)를 통해 조직을 기계적으로 파괴하여 준비했다. 비장 샘플을 적혈구 용해(Sigma-Aldrich)에 적용하였다.
- [0180] 혈액은 2% FCS, 0.1% 아지드화나트륨 및 2.5 U/ml 헤파린을 함유하는 PBS에서 수집하였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 적혈구를 적혈구 용해 완충액으로 용해하여 준비했다. 상기 언급된 기관으로부터의 단핵 세포를 세척하고, RPMI + 2% FCS에 재현탁하고, 카운팅하고, 추가 분석이 있을 때까지 얼음 위에 보관하였다. 100 μl TrueCount 카운팅 비드(BD Biosciences)를 종양 세포 현탁액에 첨가하였다.
- [0181] 1.7 펩타이드 제작
- [0182] 지시된 경우, 단핵 세포를 2.5 μg/ml의 MHC 클래스 I 제한 펩타이드[OVA₂₅₇₋₂₆₄(SIINFEKL); p15E₆₀₄₋₆₁₁(KSPWF₆₁₁TTL); AH1₆₋₁₄(SPSYVYHQF)]와 함께 T 세포 배지 및 10 μg/ml BFA에서 37°C 5% CO₂에서 5-6시간 동안 인큐베이션하였다. 펩타이드는 GenScript에서 구입했다.
- [0183] 1.8 유세포분석
- [0184] 단핵 세포 현탁액, BMDM 또는 종양 세포는 염색 전에 고정 가능한 생/사멸 생존 키트를 사용하여 암실에서 4°C에서 30분 동안 염색하였다(Life Technologies). 단핵 세포는 BD Biosciences, eBioscience 또는 Biolegend의 항체를 사용하여 염색하였다. 지시된 경우, 세포 현탁액을 H-2K^b OVA₂₅₇₋₂₆₄-텍스트라머(Immudex), H-2K^b p15E₆₀₄₋₆₁₁-펜타머(ProImmune) 또는 H-2L^d AH1₆₋₁₄ 펜타머(ProImmune)를 사용하여 염색하였다. FoxP3 전사 인자 및 Ki67 염색 세포의 경우 FoxP3 염색 키트(eBioscience)를 사용하여 세포를 고정했다. 세포내 사이토카인 염색을 위해 세포 현탁액을 염색하고 IC Fixation & Permeabilization 염색 키트(eBioscience)를 사용하여 세포내 사이토카인 검출을 위해 고정했다. 모든 세포는 디지털 유세포 분석기(LSR II, BD Biosciences)를 사용하여 수집하였고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어 버전 10.3(Tree Star)으로 분석하였다.
- [0185] 1.9 MVA-특이적 DNA 게놈 사본의 정량화를 위한 정량적 실시간 PCR
- [0186] 게놈 DNA(gDNA)을 제조업체의 지침(Qiagen)에 따라 QIAamp DNA 미니 키트를 사용하여 조직에서 단리하고 NanoVue 분광광도계(Biochrom)에서 정량화하였다. 간단히 말해서, 5×10⁷ 게놈 사본(gcs)에서 시작하는 표준 곡

선은 MVA 백본 DNA의 검출을 위한 표적인 MVA의 오픈 리딩 프레임 082L을 발현하는 플라스미드를 사용하여 준비하였다. 그런 다음, 정량적 실시간 PCR을 특정 프라이머 MVA082L 센스 5'-acgttttagccgcctttaatagag-3', MVA082L 안티센스 5'-tggtcagaactatcgctgttgg-3', 및 플루오레세인 프로브 6FAM-aatcccaccgcctttctggatctc-BBQ를 사용하여 TaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo-Fisher)로 수행하였다. 계산은 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)의 7500 소프트웨어로 수행하였다. 소프트웨어는 특정 DNA의 gcs 양의 로그에 반비례하는 모든 표준 희석, 대조군 및 복제에 대한 임계값 주기(C_T)를 결정한다. 표준 곡선을 기반으로, 소프트웨어는 각 복제에 대해 측정된 C_T 값을 사용하여 표적 유전자의 각 gcs 수를 결정했다. 샘플의 수량(gcs)은 중복 측정의 평균 수량으로 계산된다.

[0187] 1.10 통계 분석

[0188] 통계 분석을 Windows용 GraphPad Prism 버전 7.02(GraphPad Software, La Jolla, CA)를 사용하여 도 범례에 설명된 대로 수행하였다. 면역학적 데이터의 경우, 결과는 '평균' 및 '평균의 표준 오차'(SEM)로 표시된다. 다중 비교 테스트를 사용한 분산 분석(ANOVA) 또는 원-테일드 비페어링 스튜던트 t 테스트(one-tailed unpaired Student's t tests)를 사용하여 처리 그룹 간의 통계적 유의성을 결정했다. 치료 후 종양-보유 마우스 생존의 경우, 로그 순위 테스트를 수행하여 치료 그룹 간의 통계적 유의성을 결정하였다.

[0189] 실시예 2: 4-1BBL은 종양내 MVA 면역요법을 강화한다

[0190] 폭스바이러스의 IT 적용은 다양한 종양 모델에서 항종양 반응을 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다[24-28]. 그러나, 이러한 연구의 대부분은 복제 바이러스에 대해 수행되었다. 본원에서, 본 발명자들은 종양 관련 항원(상기 정의된 TAA) 및 공동-자극 분자 4-1BBL을 암호화하는 비복제 폭스바이러스 MVA를 사용하여, 확립된 종양의 국소 치료가 강력한 항종양 효과를 전달할 수 있는지 여부를 테스트했다.

[0191] TAA 오브알부민을 암호화하는 MVA(본원에서 MVA-OVA로 지칭됨)의 IT 주사는 확립된 B16.OVA 흑색종을 보유하는 마우스의 종양 성장 및 연장된 생존을 제어하였다(도 1a 및 1b). 특히, MVA-OVA-4-1BBL의 IT 투여는 B16.OVA 종양-보유 마우스의 50%까지 종양 거부를 증가시켰다(도 1b). 마지막 IT 주입 후 말초 혈액 림프구(PBL)의 분석은 국소 MVA-OVA 치료에 의해 촉발된 TAA-특이적 CD8⁺ T 세포의 전신 확장이 MVA-OVA-4-1BBL IT 투여에 의해 증가된 것으로 나타났다(도 2a).

[0192] 다음으로, 본 발명자들은 다른 독립적이고 확립된 종양 모델을 평가하였다. 내인성 레트로바이러스 항원 Gp70[29 30](본원에서 MVA-Gp70으로 지칭됨)을 암호화하는 MVA의 IT 투여는 B16.F10 흑색종에서 항종양 효과를 나타냈다(도 1c 및 1d). 흥미롭게도, IT MVA-Gp70-4-1BBL은 종양 성장 조절을 현저하게 연장하고 마우스 생존을 유의하게 개선했다(도 1c 및 1d). 유사한 결과가 MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-4-1BBL로 IT 면역화한 후 CT26.WT 종양-보유 마우스에서 관찰되었다(도 1e 및 1f). MVA-Gp70-4-1BBL의 국소 투여는 CT26.WT 종양의 80% 이상의 거부를 초래했다. Gp70-유래 펩타이드로 PBL을 재자극한 결과 각각 B16.F10 및 CT26.WT 종양-보유 마우스에서의 MVA-Gp70-4-1BBL IT 요법(regime)시 p15E(H-2K^b-제한 Gp70 펩타이드)- 및 AH1(H-2K^d-제한 Gp70 펩타이드)-특이적 CD8⁺ T 세포에 의한 인터페론 감마(IFN- γ)의 강력한 유도가 밝혀졌다(각각 도 2b 및 2c). 참고로, MVA-OVA-4-1BBL 또는 MVA-Gp70-4-1BBL IT 치료로 치유된 C57BL/6 마우스의 70% 이상이 백반증을 발생시켰다(도 2d 및 2e). 종합하면, 4-1BBL 아췌반트화된 MVA의 IT 투여는 사용된 종양 항원 또는 종양 모델의 유형에 관계없이 MVA-매개 항종양 면역 반응을 강화한다.

[0193] 실시예 3: IT 주사된 MVA는 종양에 국소화되고 종양 미세환경(TME)의 변화를 유도한다

[0194] IT MVA 주사 후 T 세포가 TdLN에서 빠르게 확장되었다는 사실을 확인하면서, 복제-결핍 MVA가 주입 부위에만 존재하는지 아니면 다른 기관으로 이동하는지에 대한 의문이 제기되었다. 이를 해결하기 위해, 본 발명자들은 IT 주사 6시간 후 종양, TdLN, NdLN, 비장 및 혈액에서 MVA-유래 게놈 DNA(gDNA)의 존재를 결정하였다. 중요하게도, MVA gDNA는 TdLN에서 최소한의 외관으로 B16.F10 종양에서 다량으로 검출되었다(도 3a).

[0195] 본 발명자들은 IT 적용 후 MVA 감염이 주로 종양에 국한되고 따라서 바이러스-유발 항종양 면역 반응이 종양에서 유래했을 가능성이 가장 높다는 것을 입증했다. 따라서, 본 발명자들은 MVA-TAA-4-1BBL의 IT 주사가 TME의 변화를 유발할 수 있다고 가정했다. MVA 또는 MVA-OVA를 사용한 B16.OVA 종양의 IT 주사는 PBS와 비교하여 전염 증성 분자 IFN γ 및 TNF α 의 상향조절을 유도하였다. 이 효과는 MVA-OVA-4-1BBL에 의해 크게 증가했다(도 3b). 흥미롭게도, IFN γ 및 GM-CSF와 같은 사이토카인은 4-1BBL 아췌반트화된 MVA에 의해 거의 독점적으로 유도되었

다(도 3b).

- [0196] 복제 바이러스는 감염된 종양 세포와 면역 세포의 사멸을 유도한다[33-35]. MVA, MVA-TAA 또는 MVA-TAA-4-1BBL에 의한 감염은 시험관 내에서 B16.OVA 및 CT26.WT 종양 세포 사멸을 향상시켰다(도 7a). MVA[36]에 의해 우선적으로 감염된 것으로 나타난 대식세포는 효과적으로 사멸되었고, 이에 의해 이 효과는 4-1BBL 아류반트에 의해 상당히 증가되었다(도 7a). 세포 사멸은 선천성 면역 세포에 의해 감지되고 면역 반응의 개시에 기여하는 고분자 그룹 박스 1(HMGB1)과 같은 세포 내 단백질의 방출을 초래한다[37, 38]. 4-1BBL에 관계없이 종양 세포 또는 대식세포의 MVA 감염 후 HMGB1의 상당한 증가가 감지되었다(도 7b).
- [0197] 본 발명자들의 결과는 MVA의 국소 주사가 MVA 암호화된 유전자의 IT 발현을 초래하여, 염증 유도, 감염된 세포의 세포 사멸 및 TME에서 면역원성 매개체의 방출을 유도함을 시사한다.
- [0198] **실시예 4:** 국소 MVA 면역요법은 치료되지 않은 원격 병변의 종양 성장을 조절한다
- [0199] 종양-지향적 면역요법의 목표는 원격 전이 또한 근절하는 전신 항종양 면역 반응을 생성하는 것이다. MVA-TAA-4-1BBL을 사용한 국소 치료가 TME뿐만 아니라 혈액에서도 강력한 종양-특이적 T 세포 반응을 유도함에 따라, 본 발명자들은 다음으로 원격 종양 침착에 대한 IT MVA 면역요법의 전신 항종양 잠재력을 평가하였다. CT26.WT 종양 세포를 Balb/c 마우스의 오른쪽과 왼쪽 옆구리에 피하 이식하였다(도 4a). MVA-Gp70의 IT 주사는 PBS와 비교하여 종양 성장을 지연시켰다(도 4b 및 4c). IT MVA-Gp70-4-1BBL 주사는 7/10 CT26.WT 종양 보유 마우스에서 처리된 종양의 제거를 초래하였다(도 4d). 중요하게도, MVA-Gp70 및 MVA-Gp70-4-1BBL 모두의 국소 투여는 종양 성장 지연을 초래하고, 일부 경우에는 치료되지 않은 종양 병변의 완전한 종양 제거를 초래했다(도 4c 및 4d). 이 데이터는 IT MVA-Gp70-4-1BBL 면역요법에 의한 치료되지 않은 원격 종양 병변에 대한 항종양 면역 반응의 효과적인 유도를 입증한다.
- [0200] **실시예 5:** IT MVA-TAA-4-1BBL 치료는 국소 및 전신 종양 재접종으로부터의 보호를 부여한다
- [0201] 암 백신의 주요 목표 중 하나는 종양 재발을 방지하기 위해 장기간 보호 면역학적 기억을 달성하는 것이다. 따라서, 본 발명자들은 먼저 IT MVA-TAA-4-1BBL-유도된 항종양 반응이 국소 종양 재접종으로부터 보호하는 면역학적 기억을 생성하는지 여부를 평가했다(도 5a). 대조군으로 사용된 나이브 마우스는 종양이 빠르게 성장한 반면, IT MVA-OVA 치료 후 이전에 치료된 마우스는 재접종 시 종양 재성장에 대한 높은 유효성을 보였다. 대조적으로, 이전에 IT MVA-OVA-4-1BBL을 받은 마우스의 80%는 2차 종양 성장(9/11)에 내성이 있었다(도 5b). MVA-Gp70-4-1BBL 처리 및 B16.F10 세포로의 국소 재접종 후 치료된 마우스에서 유사한 결과가 얻어졌다. 사전-치료 받은 마우스의 60%는 B16.F10 종양 세포 이식 후 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 6a). 따라서, IT MVA-TAA-4-1BBL 치료는 국소 종양 재접종에 대한 강력한 보호 면역학적 기억을 유도했다.
- [0202] OVA-특이적 CD8⁺ T 세포는 MVA-OVA-4-1BBL로 IT 처리 후 종양을 거부한 마우스에서 재접종 전에 쉽게 검출될 수 있었지만, MVA-OVA에서는 그렇지 않았다(도 5c). 종양 세포 주입 7일 후, OVA-특이적 T 세포 집단이 유의하게 확장되어 효과적인 종양 인식을 나타냈다(도 5c). 비장세포 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 펩타이드 재자극은 IT MVA-OVA-4-1BBL 요법이 다중 사이토카인-생성 항원-특이적 CD8⁺ T 세포의 대규모 집단을 유도함을 보여주었다(도 5e). 종양 재접종 후 41일차에 비장, 혈액, TdLN 및 NdLN을 분석한 결과 분석된 모든 기관에서 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포가 축적된 것으로 나타났다(도 5d). 기억 하위집합 검사[31]는 OVA-특이적 T_{CM} 세포가 모든 기관에 걸쳐 균등하게 분포되어 있는 반면, T_{EM} 세포는 주로 혈액, 비장 및 TdLN에서 발견되지만 NdLN에서는 발견되지 않는 것으로 나타났다(도 5f). 다음으로, 본 발명자들은 항종양 면역에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 조직 상주 기억 T 세포(T_{RM})를 분석했다[32,33]. 놀랍게도, 본 발명자들은 TdLN에만 독점적으로 위치한 상주 기억 T 세포(T_{RM})의 상당한 집단을 검출할 수 있었다(도 5f)[34]. 마찬가지로, 혈액 내 p15E-특이적 CD8⁺ T 세포는 IT MVA-Gp70-4-1BBL 처리 시 원발성 B16.F10 종양을 제거한 마우스의 재접종 전후에 검출되었다(도 6b). 또한, 본 발명자들은 B16.F10 재접종 후 42일차에 p15E-특이적 T_{CM}, T_{EM} 및 T_{RM} 세포를 식별할 수 있었으며(도 6c-e), 후자는 TdLN에서만 발견되었다(도 6e). 본 발명자들의 결과는 IT MVA-TAA-4-1BBL 면역요법이 T_{CM}, T_{EM} 및 T_{RM} 세포를 포함하는 종양-특이적 기억 CD8⁺ T 세포의 다양한 집단의 유도를 유도했음을 보여준다.
- [0203] IT MVA-TAA-4-1BBL 주사는 국소 재발 종양 및 치료되지 않은 병변의 제어를 매개하는 전신 면역 반응을 유도하였다. 본 발명자들은 IT MVA 주사에 의해 생성된 종양-특이적 T 세포 기억이 전이성 재발로부터 보호할 수도 있

다고 추론했다(도 5g). IV CT26.WT 종양 세포 주사 후 폐의 종양 결절의 육안 정량화는 나이브 마우스에서 다중 병변의 발달을 보여주었다. 거시적 전이성 병변은 이전에 IT MVA-Gp70 또는 MVA-Gp70-4-1BBL로 치료한 마우스의 폐에서 발견되지 않았다(도 5h). T 세포 분석은 MVA-Gp70-4-1BBL 치료받은 마우스에서 다기능 AH1-특이적 CD8⁺ T 세포의 집단을 밝혀냈다(도 5i).

[0204] 종합하면, 공동-자극 분자 4-1BBL과 함께 종양 항원을 발현하도록 유전적으로 변형된 MVA를 사용한 국소 면역요법은 선천성 및 적응 면역 활성화를 결합하여 강력한 항종양 활성을 전달했다. 이는 전신 항종양 효과의 유도뿐만 아니라 국소 및 전신 종양 재접종으로부터 보호하는 강력한 종양-특이적 기억 반응의 생성을 초래했다.

[0205] **실시예 6:** 결과에 대한 추가 논의

[0206] 현재 연구에서 본 발명자들은 종양-지향적 바이러스요법에 대한 새로운 접근 방식을 취하고, TAA 및 공동자극 분자 4-1BBL을 발현하도록 유전적으로 변형된 비-복제 MVA를 사용하였다. 이것은 MVA[12]의 우수한 면역-자극 특성과 그의 높은 안전성 프로파일[35]을 4-1BBL[22]의 면역-활성화 가능성과 결합한다. IT MVA-TAA-4-1BBL 주사는 일련의 즉각적 및 장기적 면역 이벤트를 활성화하여 궁극적으로 종양 근절을 초래한다. IT MVA 치료에 의한 다중 전염증성 매개체의 유도는 종양 특이적 T 세포의 재활성화 및 확장을 촉진하는 이전의 면역-억제 TME의 근본적인 변경을 나타낸다. MVA-암호화된 4-1BBL은 원발성 종양에 대한 치료 효능과 국소 및 전신 장기 면역 기억 형성 모두에 필수적인 세포독성 항종양 면역 반응에서 급격한 질적 및 양적 변화를 촉발했다.

[0207] 본 발명자들은 비복제 MVA의 IT 주사가 강력한 치료적 항종양 효과를 전달한다는 것을 처음으로 보여준다. 흥미롭게도, 열 불활성화 MVA의 IT 전달은 주로 세포독성 T 세포의 활성화에 의존하여 강력한 항종양 효과를 유도하지만 MVA는 유도하지 않는 것으로 보고되었다[25]. 이 연구와 대조적으로, 본 발명자들은 4-1BBL을 추가로 발현하거나 발현하지 않으면서 TAA에 대한 활성 MVA 암호화를 활용하였다. 중요하게도, MVA-TAA 단독은 이미 종양 성장을 지연시키는 데 효과적이었고 4-1BBL을 사용한 아류반트화는 치료 효능을 상당히 개선하여 여러 모델 내에서 확립된 종양의 거부로 이어졌다. 더욱이, 항종양 효과는 종양 항원의 선택과 무관했다. 모델 항원 OVA와는 별도로, 본 발명자들은 TAA로서의 면역원 가능성에 대해 내인성 레트로바이러스 단백질 Gp70을 조사하였다. 내인성 레트로바이러스 요소는 건강한 조직에서는 후성유전학적으로 침묵하지만, 다양한 암에서 다시 활성화되고 발현된다[36]. 마찬가지로, Gp70은 여러 무린 종양 세포주에서 고도로 발현된다[37]. 인간의 경우, 이러한 비암호화 영역이 강력한 면역원성을 가질 수 있으므로 암 면역요법에 대한 우수한 TAA 표적을 나타낼 수 있다는 증거가 증가하고 있다[38-40]. Gp70의 자체-성질[41]을 감안할 때, Gp70-발현 종양 모델에서 IT MVA-Gp70-4-1BBL 치료에 의해 얻은 강력한 치료 효과는 국소 MVA 요법이 신생항원을 발현하는 종양의 거부를 유도할 뿐만 아니라 내인성 자기 항원에 대한 내성을 파괴한다는 것을 의미한다.

[0208] IT 바이러스요법은 면역억제성 TME를 변경하기 위해 바이러스-유발 염증 및 세포 사멸의 용도를 변경한다[50]. 이러한 일련의 이벤트들은 항종양-특이적 면역을 향상시킬 것이다. 마찬가지로, 본 발명의 데이터는 MVA 감염이 종양용해성 백시니아 바이러스[51]와 유사하게 종양 세포 사멸 및 따라서 HMGB1 방출을 촉진한다는 것을 보여준다(도 7a, 7b). 더욱이, MVA의 IT 주사는 다중 MVA-관련 사이토카인 및 케모카인의 유도를 동반하는 TME 내에서 강한 염증 반응을 유도했다[52]. 4-1BBL-아류반트화된 MVA의 IT 적용은 B16.OVA 종양에서 IFN γ 및 GM-CSF의 농도를 강력하게 증가시켰다(도 3b). 이것은 이들 분자의 유도가 4-1BB 신호전달의 다운스트림임을 나타낸다. 실제로, MVA-감염된 종양 세포에 의한 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 시험관내 활성화는 MVA-암호화된 4-1BBL의 존재하에 독점적으로 다량의 IFN γ 및 GM-CSF의 생성을 유도하였다(도 3b). 본 발명자들은 IT rMVA 투여 시 TdLN 및 기타 기관에서 MVA-암호화된 항원 분포 및 잠재적인 T 세포 프라이밍을 조사하였다. 본 발명자들은 IT 주사 후 다른 기관 내에서 rMVA의 국소화에 대한 포괄적인 분석을 수행하여 이 문제를 해결했다. MVA gDNA는 대부분 종양 부위에 국한되었다. 그러나, MVA gDNA는 TdLN에서도 검출되었지만, 종양에 비해 상당히 적은 양이었다. 따라서 TdLN은 종양-특이적 T 세포의 프라이밍 부위 역할도 할 수 있다. 본 발명의 결과는 MVA의 풋패드 주사 후 MVA가 배액 LN의 피질주변 영역에 국한된다는 것을 보여주는 이전 연구와 일치한다[42]. 이에 따라 NdLN에서는 단백질이나 gDNA가 발견되지 않았다.

[0209] 종양-지향적 면역요법의 중요한 양태는 원격 전이를 근절하고 장기적인 종양 면역을 유도하는 전신 항종양 면역 반응의 생성이다. 본 발명자들은 국소 MVA-TAA-4-1BBL 치료가 TME 내에서 면역 반응을 유발할 뿐만 아니라 혈액 내에서 전신 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 반응을 유도한다는 것을 보여주었다. 또한, 많은 개별 실험과 다양한 TAA를 사용하여, IT MVA-TAA-4-1BBL 치료 시 흑색종을 거부한 마우스에서 백반증이 발생하였다. 백반증은 피부의 멜라닌 세포를 염색하는 모발을 표적으로 하는 자가반응성 CD8 T 세포에 의해 발생한다. 이 세포는 초기에 집중

되고 지배적인 에피토프-특이적 면역 반응, 예를 들어 Gp70 또는 OVA로부터 에피토프 특이성의 다양화를 설명하는 현상인, 항원 확산을 통해 활성화되었을 가능성이 높은, IT MVA-TAA-4-1BBL 바이러스요법에 의해 활성화되었다. 종양 항원 확산은 항종양 반응을 확장하고 TAA 손실에 의한 종양 탈출 가능성을 방지하기 때문에 암 면역요법의 바람직한 특징이다.

[0210] 또한, 양측 종양 모델에서 얻은 데이터는 IT MVA-TAA-4-1BBL 주사가 치료되지 않은 병변에서 상당한 항종양 효과를 초래했음을 명확하게 입증하였다. 따라서 이러한 결과는 국소 MVA-TAA-4-1BBL 투여에 의해 촉발된 항종양 반응이 원발성 종양에 대한 시스템 전체의 면역과 관련이 있음을 강력하게 나타낸다.

[0211] 이전 항원과의 만남에 대한 기억을 유지하는 면역 시스템의 능력은 장기 면역의 기초이다. 본원에서, 본 발명자들은 IT MVA 투여 시 유도되는 면역학적 기억의 구성요소를 정의했다. 순환하는 TAA-특이적 CD8⁺ T 세포는 사용된 종양 모델 또는 마우스 계통에 관계없이 종양 제거 후 수개월 후에 마우스에서 검출되었다. CD8⁺ T 세포 빈도는 4-1BBL-아주반트화된 MVA가 사용되었을 때 유의하게 증가했다. 본 발명자들은 이전에 IT MVA-TAA-4-1BBL로 치료된 마우스가 MVA-TAA 처리된 대응물보다 B16.OVA 또는 B16.F10을 사용한 피하 종양 재접종에 더 내성이 있다는 것을 발견하였다. 그 마우스로부터의 조직을 분석한 결과는 T 세포 기억 하위집합이 순환계뿐만 아니라 여러 해부학적 부위에서 발견되어 면역 감시를 시사하는 것으로 나타났다. 증가된 항원-특이적 CD8⁺ T_{CM} 및 T_{EM} 하위집합의 빈도를 4-1BBL을 암호화하는 MVA를 이전에 받은 치료된 마우스의 국소 종양 재접종 후 비장과 혈액에서 발견했다. 4-1BBL/4-1BB 신호가 CD8 이펙터와 기억 T 세포의 확장과 유지를 향상시키는 데 특히 강력하다는 것은 잘 알려져 있다[43-45]. 마찬가지로, MVA-암호화된 4-1BBL 공동자극은 종양-특이적 세포독성 T 세포의 활성화 및 이펙터 기능을 향상시켜, 강력하고 다양한 기억 구획을 형성하였다.

[0212] 순환하는 CD8⁺ T_{CM} 및 T_{EM} 하위집합 외에도, 상주 CD8⁺ T_{RM} 세포는 항종양 면역에 협력하는 것으로 나타났다[32, 33, 46]. 흥미롭게도, IT 4-1BBL 아주반트화된 MVA 후 치료된 마우스는 B16.OVA 또는 B16.F10으로 국소 재접종 후 TdLN에서만 종양-특이적 T_{RM} 세포의 빈도가 증가한 것으로 나타났다. CD8⁺ T_{RM} 세포는 조직에서 처음으로 확인되었지만, 항원 재결합 시 조직에서 이동하여 마우스의 배액 LN에 축적될 수도 있다[34, 46, 47]. 본 발명의 결과에 따라, 4-1BB는 비강내 면역화 시 폐에서 인플루엔자-특이적 CD8⁺ T_{RM} 풀의 확립을 촉진하는 것으로 나타났다[48]. 본 발명자들은 TdLN에서 종양-특이적 CD8⁺ T_{RM} 세포의 확장과 IT 4-1BBL 아주반트화된 MVA 시 치료된 마우스에 의한 국소 2차 종양 재접종에 대한 더 나은 반응 사이의 관계를 가정한다.

[0213] 암에서, 기억 CD8⁺ T 세포는 종종 차선의 분화 또는 유지 조건 및 만성 항원 노출로 인해 기능 장애가 있다 [49]. 이 현상은 IL-2와 TNF α를 분비하지 못하는 것과 관련이 있다[50, 51]. 중요하게도, IT 4-1BBL 아주반트화된 MVA는 매우 유능한 CD8⁺ T 세포 기억 풀을 생성했으며, 이는 종양 항원이 다시 만났을 때 테스트된 모든 재접종 모델에서 IT MVA와 비교하여 확장되고 상당한 양의 IFN γ, TNF α 및 IL-2를 생성하였다.

[0214] 요약하면, 본 발명자들은 4-1BBL과 함께 종양 항원을 발현하는 비복제 MVA의 국소 주사를 기반으로 하는 신규한 치료 플랫폼을 설명한다. IT 바이러스 주사는 TME에서 심각한 전염증성 변화를 유도하여, 종양-특이적 CD8⁺ T 세포의 재활성화 및 확장을 이끌었다. 또한, 본 발명자들은 국소 및 전신 종양 재접종으로부터 보호하는 다양한 CD8⁺ T 세포 기억 집단의 생성을 입증하였다. MVA의 우수한 안전성 프로파일과 함께, 당사의 전임상 데이터는 클리닉에서 이 접근 방식을 탐구하는 데 강력한 근거를 제공한다.

[0215] 최종 논평: 본 명세서의 전문에 걸쳐 여러 문헌들이 인용되었다. 본원에 인용된 각 문헌들(모든 특허, 특허 출원, 과학 간행물, 제조업체 사양, 지침 등 포함)는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다. 참조로 포함된 자료가 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 범위 내에서, 본 명세서는 그러한 자료를 대체할 것이다. 본 명세서의 어떠한 내용도 본 발명이 선행 발명에 의해 그러한 개시내용보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0216] **실시예 7: 의료용 MVA 제조합체**

[0217] 7.1 MVA 제조합체의 작제

[0218] 본 개시내용의 요소를 구현하는 제조합 MVA 바이러스의 생성은 벡터 MVA-BN 내로 그들의 프로모터를 갖는 지시

된 이식유전자의 삽입에 의해 수행되었다. 이식유전자를 MVA-BN 내의 표적화된 유전자좌와 상동성인 서열 뿐만 아니라 이식유전자 및 선택 카세트를 함유하는 재조합 플라스미드를 사용하여 삽입하였다. 바이러스 계놈과 재조합 플라스미드 사이의 상동성 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 옆에 있는 1oxP 부위를 특이적으로 표적화하여, 개재 서열을 절단하였다. 대안적으로, 선택 카세트의 결실은 MVA-유래 내부 반복 서열을 사용한 MVA-매개 재조합에 의해 달성되었다.

[0219] 재조합 MVA-mBN 바이러스의 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 단리하였다. 이러한 바이러스 클론에서 형광-단백질-함유 선택 카세트의 손실은 두 번째 단계에서 각 작제물내 선택 카세트의 측면에 있는 2개의 1oxP 부위를 포함하는 CRE-매개 재조합 또는 MVA-매개 내부 재조합에 의해 매개되었다. 두 번째 재조합 단계 후에는 MVA-BN의 표적 유전자좌에 프로모터가 삽입된 이식유전자 서열(예를 들어, 4-1BBL)만 유지되었다. 선택 카세트가 없는 플라크-정제된 바이러스의 스톱을 준비하였다. 확인된 이식유전자의 발현은 설명된 작제물로 접종된 세포에서 입증된다.

[0220] 7.2 HERV-K 항원을 포함하는 재조합 MVA

[0221] 인간 내인성 레트로바이러스(HERV-K)의 K 슈퍼패밀리의 단백질, 구체적으로 ERV-K-env 및 ERV-K-gag인 TAA를 포함하는 MVA-기반 벡터("MVA-mBN489," 또한 "MVA-HERV-Prme-FOLR1-4-1-BBL-CD40L"로도 지칭됨)가 설계되었다. MVA는 또한 인간 FOLR1 및 PRAME를 암호화하고 h4-1BBL 및 hCD40L을 발현하도록 설계되었다.

[0222] "MVA-HERV-Prme-FOLR1-4-1-BBL"이라고 하는 유사한 MVA-기반 벡터는 TAA ERV-K-env 및 ERV-K-gag 및 인간 FOLR1 및 PRAME를 발현하도록, 그리고 h4-1BBL을 발현하도록 설계되었다. 구체적으로, 벡터 "MVA-BN-4IT"("MVA-mBN494" 또는 "MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL")는 도 8a에 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 향상시키려는 의도이다.

[0223] "MVA-HERV-Prme-FOLR-CD40L"이라고 하는 또 다른 MVA-기반 벡터는 TAAs ERV-K-env 및 ERV-K-gag 및 인간 FOLR1 및 PRAME를 발현하고, hCD40L을 발현하도록 설계되었다. 이들 작제물 각각은 본 발명의 방법에 유용하다.

[0224] 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.

[0225] 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 면역우성 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.

[0226] MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTLQATKYLENTKVTQTPESSMLLAALMIVSMVSLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPMIRAVTWMDNPIEVVNDVSVVWPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPICLGRAPGCLMPAVQNWLVVPTVSPISRFYTHMVSGLSRP
RVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKPCPKIIPKESKNTVVLWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVSDLTSLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKGIISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLTRDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIIVIKPDSQITCENC
RLLTICIDSTFNWQHRILLVRAREGVIPVSMRDPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR
LWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTIVWMDRLMSLEHRFQLQCDWNTSDFCI TPQIYNSESHHDMVRRHLQGREDNLTLDISKLEKQIFEASKAHLNLVPGTE
AIAAGVADGLANLNPVTWVKTIIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRSDHREAMMTMAVL SKRKGNGVKGSKRDQIVTVSV

[0227] ERVK-env의 변형된 컨센서스 아미노산 서열(상기):

[0228] 잠재적인 면역억제 도메인이 돌연변이에 의해 비활성화되었다. 도입된 돌연변이는 면역우성 T-세포 에피토프 HERV-K-me1에 의해 면역억제 도메인의 상당한 부분을 대체한다.

[0229] 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. 막횡단 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 234 내지 257(Ser 잔기 포함)의 C-말단 영역이 결실되었다.

[0230] 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.

[0231] 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.

[0232] 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 염기서열은 인간 코돈 사용에 최적화되어 있으며 폴리-nt 스트레치, 반복 요소, 및 음성 시스-작용 요소를 제거하고, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 10("hFOLR1Δ_hPRAMEΔ 융합" 뉴클레오타이드 서열)에 제시되어 있는 반면, 융합 단백질 서열은 서열번호 9에 제시되어 있다.

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHEKPGPEDKLHEQCRPW
 RKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWIIQQV
 DQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNTSGFNKCAVGAACQP
 FHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAG
PWAAWPFLLSLALMLLWLLSMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVELAGQSLKDEAL
AIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGLVMKQGHLHLETFKAVLD
GLDVLLAQEVRPRRWKLVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTTKAKV
DGLSTEAQPFIPVEVLVDFLKEGACDELFSYLIEKVAAKKNVLRLLCCKKLIKIFAMPMDIK
MILKMQVLDSDIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQF
TSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRDLQLLRHVMNPLETLSITNCRLSEGDVMHLSQSPSVSQ
LSVLSLSGVMLTDVSPPELQALLERASATLQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSF
YGNISISALQSLQLHLIGLSNLTHVLPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRP
SMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

[0233]

[0234] **hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 서열(상기):**

[0235] hFOLR1-hPRAME 융합 단백질의 아미노산 서열, 변형된 인간 FOLR1(N-말단 부분) 및 PRAME(C-말단 부분)의 융합. 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).

[0236] 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.

[0237] 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.

[0238] 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. 재조합 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 유

도하기 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).

[0239] MVA-mBN494(상기 참조)에 기초하여 또 다른 벡터가 ERVK-env/MEL의 변형을 함유하도록 설계되었다. 생성된 벡터는 "MVA-mBN502"로 지칭되었으며, 도 9c에 개략적으로 도시되어 있다. 변형된 ERVK-env/MEL 외에도, MVA-mBN502는 ERVK-gag, hFOLR1-hPRAME 융합 단백질 및 h4-1BBL도 암호화한다.

[0240] 본래, HERV-K-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 9a).

[0241] MVA-mBN494와 비교하여, ERVK-env/MEL의 TM 도메인은 MVA-mBN502에서 결실된다. 이 ERVK-env/MEL 변이체는 "ERVK-env/MEL_03"으로 지정되었으며, 결실된 RSKR 푸린 절단 부위를 제외한 전체 SU 도메인으로 구성된다. MEL 펩타이드는 C-말단 단부에 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 9b). 생성된 ERVK-env/MEL 변이체, 즉 ERVK-env/MEL_03은 MVA-mBN502에 함유된다(도 9c). 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.

[0242] 7.3 MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(MVA-BN-4IT)의 생물활성

[0243] MVA-BN-4IT(즉, MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL; 또한 상기 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.

[0244] 먼저, 항원이 HLA 클래스 I에 로딩될 수 있기 때문에(Nyambura L. et al. *J. Immunol* 2016), 인간 단핵구 세포 주 THP-1은 항원 제시 능력을 발휘하는 대식세포로 분화되었다(Daigneault et al. *PLoS One*, 2010). 실제로, THP-1 세포는 미국과 유럽(인구의 대략 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 2일 동안 추가로 배양하였다. 5일차에 세포를 12시간 동안 4의 InfU(감염 단위)로 MVA-BN-4IT로 감염시켰다. 도 8b에 도시된 바와 같이, HERVK-env/MEL, HERVK-gag 및 융합 단백질 FOLR1-PRAME는 THP-1 세포를 MVA-BN-4IT로 감염시킨 후 발현되었다(도 8b에서 "mBN494"). 대조적으로, 항원은 감염되지 않은 THP-1 세포에서 내인적으로 발현되지 않았다(도 8b에서 "ctr").

[0245] 다음으로, "ProPresent" HLA-ABC 리간덤 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 ALQSLQHL 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 ALQSLQHL은 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.

[0246] 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 루시퍼라제 리포터로 구성된다. h4-1-BB가 h4-1-BBL에 의해 자극되면, RE는 세포 내에서 세포 루시퍼라제 생산을 활성화한다. 세포 용해 및 "Bio-Glo" 시약(Promega)을 첨가한 후, 발광계를 사용하여 발광도를 측정하고 정량화한다. 간단히 말해서, HeLa 세포를 도 8c에 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 루시퍼라제 발현을 1로 설정하였다(도 8c, 점선). MVA-BN(즉, h4-1-BBL을 암호화하지 않음)을 백본 대조군으로 사용하였다. 도 8c에 도시된 바와 같이, h4-1-BBL을 발현하는 MVA-기반 벡터로 감염된 HeLa 세포는 참조물과 비교하여 (공동 배양된 Jurkat-h4-1-BB 세포를 통해) 루시퍼라제 생성을 6배 이상 유도하였다. 특히, MVA-BN-4IT에 의해 매개되는 루시퍼라제 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.

[0247] **서열 목록**

[0248] 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.

[0249] 서열 목록의 서열:

[0250] 서열번호 1: NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L 아미노산 서열(261 아미노산)

[0251] 서열번호 2: NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 hCD40L(792 뉴클레오타이드)

[0252] 서열번호 3: NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1-BBL(254 아미노산)

[0253] 서열번호 4: NCBI RefSeq NP_003802.1로부터의 h4-1-BBL

[0254] 서열번호 5: ERV-K-gag (666 아미노산) 합성 컨센서스 서열

[0255] 서열번호 6: ERV-K-gag; nt 서열

[0256] 서열번호 7: ERV-K-env/MEL (699 아미노산) 합성 서열

[0257] 서열번호 8: ERV-K-env/MEL nt 서열

[0258] 서열번호 9: hFOLR1Δ_hPRAMEΔ 융합(741 아미노산)

[0259] 서열번호 10: hFOLR1Δ_hPRAMEΔ 융합(741 아미노산) nt 서열

[0260] 서열번호 11: ERV-K-env/MEL_03 (517 아미노산) 합성 서열

[0261] 서열번호 12: ERV-K-env/MEL_03 nt 서열

[0262] **서열번호 1**

[0263] NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 **hCD40L**. (261 아미노산)

[0264] MIETYNQTSRPSAATGLPI SMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNK EETKKNESFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERI LLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

[0265] **서열번호 2**

[0266] NCBI RefSeq NP_000065.1로부터의 **hCD40L**. (792 뉴클레오타이드)

[0267] nt-서열:

[0268] atgatcgagacatacaaccagacaagccctagaagcgcgccacaggactgcctatcagcatgaagatcttcatgtacctgctgaccgtgttctgatcacc cagatgatcggcagcgcctgtttgccgtgtacctgcacagacggctggacaagatcgaggacgagagaaacctgcacgaggacttcgtgttcatgaagacc atccagcgggtgcaacaccggcgagagaagtctgagcctgctgaactgcgaggaaatcaagagccagttcgagggcttcgtgaaggacatcatgctgaacaaa

gaggaacgaagaaagagaactccttcgagatgcagaagggcgaccagaatcctcagatcgccgctcacgtgatcagcaggccagcagcaagacaacaagc
gtgctgcagtgaggccgagaagggtactacaccatgagcaacaacctggcaccctggagaacggcaagcagctgacagtgaagcggcaggcctgtactac
atctacccaagtgaccttctgcagcaacagagaggccagctctcaggctcctttcatcgccagcctgtgcctgaagtctcctggcagatcgcagcggat
ctgctgagagccccaacacacacagcagcgccaaaccttggccagcagctctatccacctcgccggagtggttgagctgcagcctggcgaagcgtgttc
gtgaatgtgacagaccctagccaggtgtcccacggcaccggctttacatcttccggactgctgaagctgtgatgatag

[0269] **서열번호 3**

[0270] NCBI RefSeq NP_003802.1 **로부티의 h4-1BBL**. (254 아미노산)

[0271] MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL
IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVLPPASSEARNSAFGFQGRLL
HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE

[0272] **서열번호 4**

[0273] NCBI RefSeq NP_003802.1 **로부티의 h4-1BBL**.

[0274] nt 서열:

[0275] atggaatagccagcagcctctctggaccctgaagctccttggcctccagctcctagagccagggttctgtagagtgccttgggctcttggctgga
cttctgcttctgtgctcctggctgctgctgagcagtgcttcttctgcttgcctatgggctgtgtcaggagccagagcctcctggatctgcccttctcc
agactgagagaggacactgaactgagcctgatgatcctgctggactgctgacactgagacaggcagtgcttggccagctggggccagaatgtgctgctg
attgatggcctctgagctggtacagcagatcctggacttctgctgcttagcctgactggaggcctgagctacaaggaggacaccaagaactggggctggcc
aaggctggcgtgactacgtgtcttctcagctggaactgagcagagtggtggcagggcgaaggatctggatccgtgtctctggcactgcatctgcagcctctg
agatctgctgctggtgacagctgccctggctctgacagtgatctgcctcctgctccagcgaagccagaacagcgccttggcctccaaggcagactgctg
cacctgtctgctggccagagactgggagtgacactccacacagaagcaagagcaagacacgctggcagcttacacaaggcgtctacagtgctgggctgttc
agagtgacacctgagatccagctggcttggcatctcctcgagcagtgatga

[0276] **서열번호 5**

[0277] **ERV-K-env/MEL** (699 아미노산)

[0278] MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNKMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKQLTQLATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVSLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPMIRAVTWMDNPIEVVYVNDVSVWVPGPIDDRCPAKPEEEMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLVVPTVSPISRFYTHMVSGMSLRP
RVNYLQDFSQYRSLKFRPKGKPCPKKIPKESKNTVELVWEECVANSVILQNNFEGTIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLTESLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKGI STPRPKIISPVSQPEHPPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLSTRDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIIVIKPDSQITCENC
RLLTCIDSTFNWQHRILLVRAREGVIPVSMRDPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRIFITL IAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR
LWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTVIWMGDRLMSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLDI SKLKEQIFEASKAHLNLVPGTE
A IAGVADGLANLNPVTWVKTI GSTTI INLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSHRERAMMTMAVL SKRKGNGVKGSKRDQIVTVSV

[0279] **서열번호 6**

[0280] **ERV-K-env/MEL**

[0281] nt 서열

[0282] atgaacctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggtcctctgacacacaagatgaacaagatggtcaccagcag
gaacagatgaaactgccagcaccagaaggccagcctccaacatgggctcagctgaagaaactgaccagctggccaccaagtacctggagaacacacaa
gtgaccagacacctgagagcatgctgctggcagctctgatgatcggtgctccatggctgctccctgcctatgcctgctggctgctgccctgccaactacaca
tactggcctacgtgcccttctcctctatgatcagagcctgacctggatggacaacctattgaggtgtagctgaacgacagcgtgtgggtgccaggacct
atcgacgatagatgctcctgcaaacctgaggaagaggcagatgatcaacatcagcatcggtaccggtatcctccaatctgcctgggcagagacctggc
tgtcttatggcagctgtgcaaatggctggtggaagtgcctaccgtgtctccatcagccggttccactaccacatggtgtccggcatgagcctcagacct
agagtgaactactgaggactctcagctatcagcggagcctgaagtgcagcccaagggaagccctgtcctaaagagatcccaagagctccaagaacacc
gaggtgctgctgagggaagagtgcgtggccaatctgccgtgatcctgcagaacaacagagtgcggccacctatgactgggctcctagaggccagctctac
cacaatgacagcggacagacacagagctgtcctagcgcacaagtgtcaccagcctggatagcagctgaccagagcctggacaagcacaacacaagaaa
cttcagagcttctatcctgggagtgaggagagaaggcagctctacaccaaggcctaaagatcatagccctgtgctggaccagaacatcccgaacttgg
agactgacagtgccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagacctggaaacacgggacagaaagccctctacacctcgatctgaacagcagc
ctgaccgtgctctccagagctgtgtgaagcctccttacctgctggctgctggccaacatgtgatcaagcccactccagacctcacatgagcagaactgc

agactgctgacctgcatcgacagcaccttcaactggcagcaccggatcctgctcgtgagctagagaaggcgtggatccctgtctctatggacaggcct
 tgggaagccagccctagcgtgacatcttgacagaggtgctgaaggcgtgctcaacagatccaagcgttcatctcaccctgatcgccgtcatcatggg
 ctgatgtctgtgacagccacagctgctgtgctggcgtggccctgcatagctctgtgcagagcgtgaacttcgtgaacgatggcagaagaacagcacagg
 ctgtggaacagccagagcagcatcgaccagaagatgctggccgtgatctcctgtgccgtgcagacagtatctggatggcgacagactgatgagcctgaa
 caccggttccagctgcagtgcgactggaataccagcagcttctgcatcacacctcagatctacaacgagagcgcagcaccactgggatggcgaagc
 ctgcagggcagagaggacaacctgacctggacatcagcaagctgaaagagcagatcttcgaggccagcaaggctcacctgaatctggcctggaaccgaa
 gctatgtctggagtgcagatggcctggccaatctgaatcctgtgacctgggtcaagacatcggcagcaccacaatcatcaacctgatcctgatcctgtg
 tgcctgtttgcctgctgctgtgtgcagatgcaccagcagctgagaagagacagcagcatagagaaagagccatgatgacctggccgtcctgagcaag
 agaaagggaggcaacgtgggcaagagcaagcgggatcagatcgtgacctgtccgtttgat aa

[0283] 서열번호 7

[0284] ERV-K-gag (666 아미노산)

[0285] MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGVVKVSTKNLIKLFQIEQFCPWFPQGTLDLKDWRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSV
 SVSDAPGSCI IDCNENTRKKKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYQLQEVIPYETLKGKGPPELVGSESKPRGTSPLPAGQVPVTLQPQKQVKNKT
 QPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQSYGYGMPAPQGRAPYQPPTRRLNPTAPPSRQSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLPEMPGEGAQEGEPPVTEAR
 YKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLDSIAHGHRLIPYDWEILAKSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRANPPVNIADQLLGIGQNWSTISQQ
 ALMQNEAIEQVRAICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIDAEKARKVIVELMAYENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYV
 KACDGI GGAMHKAMLAQAITGVVLGGQVTRFGGKCYNCQIGHLKKNCPVLNKQNIITIQATTTGREPPDLCPRCKKKGKHWASQCRSKFDKNGQPLSGNEQR
 GQPQAPQQTGAFFIQPFVQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYNNCPPPQAAVQQ

[0286] 서열번호 8

[0287] ERV-K-gag

[0288] nt 서열

[0289] atgggacagaccaagagt aagat caagt ct aagt acgccagct acct cagct t cat caagat cct gct gaagagaggaggcgt gaaagt gt ccaccaagaac
 ct gat caagct gt tccagat cat cgagcagct t ct gt ccct ggt t t cct gacagggcaccct ggat ct gaaggact ggaagcggat cggcaagagct gaag
 caggct ggcagaaaagggcaacat cat ccct ct gaccgt gt ggaacgact gggccat cat caagcagct ct ggaacct t ccagaccgaagaggat agcgt g
 t ccgt gt ct gat gct cct ggcagct gcat cat cgact gcaacgagaac accc ggaagaagt cccagaaagagacagagagcct gcact gcgagt acgt ggc
 gaacct gt gat ggt cagagcaccagaacct ggaact acaaccagct ccaagaagt gat ct at cccgaaact gaagct ggaaggcaaggacct gaact c
 gt ggggt cct t ct gagt ct aagccagagggacat ct cct ct gect gcaggacaggt gccagt gacct gcagcct cagaacaagt gaaagagaacaagacc
 cagcct cct gt ggcct accagt at tggcct ccagccagct gcagt acagacct cct ccagagagccagt acggct accct ggaat gcct cct gct cct caa
 ggcagagct cct t at cct cagcct cct accagagcggct gaacct acagct cct cct agcagacagggct ct gagt gcacagat cat tgacaagagccgg
 aaagagggcgacaccagggct tggcagtt tcccgt t aact ggaacctat gcct ccaggcgaaggcgt caagaaggcgaacct cct acagt ggaagccagg
 tacaagagct t cagcat caagat gct gaaggacat gaaggaaggcgt caagcagt acggacct aacagccat acat gcggacct gct ggat t ct at t gcc
 cacggccaccggct gat ccct t acgat tgggagat cct ggt aagt cct ct ct gaccct agccagt t cct gcagt t caagacct ggt ggat cgacggcgt g
 caagaacaagt gagacggaacagagct gccaat cct cct gt gaacat cgacgccagcagct cct cggaat cgccagaat tggagcaccat ct ct cagcag
 gct ct gat gcagaacgagccat tgaacaagt cagagccat ct gcct gagagct tgggagaagt t caggaccagggcagcacaat gt cccagct t caat acc
 gt tggcagggcagcaaaagaccct at cct gact t t gt ggt agact gcaggat gt ggcceagaagt ct at tggcgacgagaaggct cggaaagt gat cgt g
 gaact gat ggcct acgagaacgct aat ccagagt gcagagcgcct caagccct t gaagggcaaaagt gcct gccggat ccgat gt gat cagcagat at gt g
 aaggcct gcagcgaat cggaggt gccat gcacaaagccat gct gat ggcacaggccat cact ggcgt t gt gct cggaggacaagt t cggacct t tggaggc
 aagt gct acaact gt ggccagat cggacacct gaagaagaact gccct gt gct gaacaagcagaacat caccat ccagggcaccaccggcagagaacct
 ccagat ct gt gccct agat gcaagaaggcaagcact gggccagccagt gcagaagcaagt tgcacaagaacggccagcct ct gacggcaacgaacaaga
 ggacagcct caggct cct cagcagact ggcgcat t tccaat ccagccct t cgt gcct caaggct t ccagggacaacagcct cact gt ct caggt gt tccag
 gcat tagccagct ccct cagt acaacaact gccct ccaact caggct gct gt gcagcagt gat ga

[0290] 서열번호 9

[0291] hFOLR1 Δ hPRAME Δ 융합 (741 아미노산)

[0292] MAQRMTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAAKHHKKEKPGPEDKLEHQCRPWRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHF IQ
 DTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWVEDCRTSYTCKSNWHKGNWNTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYR
 GSGRCIQMWFDAQGNPNEEVARFYAAAMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVELAGQSLKDEALAI AALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQ
 AWPFTCLPLGVLKMGQHLHLETFKAVLDGLDVLQAQEVPRRWKLVLDLDRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFPEPEAAQPMTTKAKVDGLSTEAEQPFIPVE

VLVDLFLKEGACDELF SYLIEKVAAKKNVLR LRCCKKLIKIFAMPMQDIKMLKMQVLDSDIEDLEVTCTWKLP TLAKFSPYLQGMINLRRLLSHIHASSYISP
EKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGR LDQLLRHVMNPLETLSITNCR LSEGDMHLSQSPSVS QLSVLSL SGVMLTDVSPEPLQALLERASATL
QDLVFDECGITDDQLLALPSLSHCSQLTTL SFYGNSSISALQSL LQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWL
SANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

[0293] 서열번호 10

[0294] hFOLR1Δ hPRAMEΔ 융합 (741 아미노산)

[0295] nt 서열

[0296] tggcccagagaatgaccacacaactgctgctgctcctgggtgtgggttgccgttgttggagaggcccagaccagaatgacctggggcagaacgagctgctga
acgtgtgcatgaacgccaagcatcacaagagaagcctggacctgaagacaagctgcatgaacagctgtcgcccttggagaaagaatgcttgcctgtgacacca
acaccagccaagaggcccacaaggacgtgtcctacctgtaccggttcaactggaaccactgaggagaatggctcctgacctgcaagagacacttcatccagg
atacctgacctgacagtgctctcccaatctcggaccttggatccagcaagtggaccagagctggcggaaagaacgggtgctgaatgtgccttgtgcaaa
aggatfgcagcagctgggggaagatggccggaccagctacacatgtgaagcaactggcacaaggctggaactggaccagcggcttcaacaagtgtgccg
tgggagctgctgaccagccttccacttctacttccaacacctaccgtgctgtgcaacgaaatctggaccacagctacaaggtgtccaactacagcagag
gcagcggcaggtgtatccagatgtggttgcacccgctcagggcaatccaatgaggaagtggctagattctacgctgctgcatggaagaagaaggctct
ggggcagcatccagagccggtacatagcatgagcgtgtggacaagcctagacggctggttgaactggctggacagagcctgctcaaggatgaggccctgg
ccattgctgctgctggagctgctgacctagagagctgttccctcctctgttcatggctgacctgcagcggcagacacagccagacactgaaagccatggtgcagg
cctggcctttcacctgtctgacctgggagtgtgatgaagggccagcatctgcacctggaaccttcaaggcctgctggacggcctggatgttctcctgg
ctcaagaggtgaggcctcgccgttggaaactgcaggttctggatctgcggaagaactctcaccaggtattctggaccttgggtccggcaacagagccagcc
tgtacagctttcctgaacctgaggctgcccagccatgaccacaaaggccaaagtggatggcctgagcacagaggccgagcagccttctatcccctggaag
tctgtgtggacctgttctgaaagaaggagcctgcgatgagctgttcagctacctgatgagaaggtggcagccaagaagaactgctgcggctgtgctgca
agaagctgaagatcttgcctgacctatgcaggatcaagatgatcctgaagatggtgcagctggacagcatcgaggacctggaagtgacctgtacctgga
agctgcccacactggccaagttagccttacctgggacagatgataaactgcggaggctgctgctgtctcatccacgccagctcctacatcagcctg
agaaaggaagactatctgcctcagtctcacaagccagttctgagcctgagctgtctgagggcctgtacctggacagcctgttcttctgagagggcaggc
tggatcagctgctgcggcacgtgatgaacctctggaacctgagcatcacaactgtagactgagcagggcgacgtgatgacctgtctcagagccat
ctgtgtctcagctgagcgtgctgtctgtctggcgtgatgctgacctgtgagcctgaaactctgcaggcactgctggaagagcctcgctactctgc
aggacctggtgttgcgatgagtgccgatcaccgatgaccagctgcttgcctgctgccaagcctgagccactgtagccagctgacaacctgtccttctacg
gcaacagcatctccatctctgcctgagctctctcctgagcatctgatcgccctgtccaatctgacccacgtgctgtacctgtgacctggaaagctacg
aggacatccacggaacctgcacctcagagactggcctatctgcatgctcgctgagagaactgctgtgcgaactggcagaccagcagatggttggctga
gcgccaatccatgtcctcactgtggcgaccggaccttctacgacctgagcctatctgtgtccttgcctcatgcccactaatag

[0297] 서열번호 11

[0298] ERV-K-env/MEL_03 (517 아미노산)

[0299] MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNMVTSSEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLQQLATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVSLPMPAGAAAANYT
YWAYVPFPPMIRAVTWMDNPIEVVYVNDVSVVWVPGIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGLMPAVQNWLVVPTVSPISRFYTHMVSGMSLRP
RVNYLQDFSQYRSLKFRPKGKPCPKIIPKESKNTEVLVWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLDTESLDKHKHKK
LQSFYPWEWGEKISTPRPKIISPVSGPEHPPELWRLTVASHHIRIWSGNQLETRDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIIVIKPDSQITCENC
RLLTCIDSTFNWQHRILLVRAREGVWIPVSMRDPWEASPSVHILTEVLKGVLNMLAVISCAVAGVALHGSAGSAGSGEFVVISAILALVVLTIISLIIILIM
LWQKKPR

[0300] 서열번호 12

[0301] ERV-K-env/MEL_03

[0302] nt 서열

[0303] atgaacctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggtcctctgacacacaagatgaacaagatggtcaccagcgag
gaacagatgaaactgcccagcacaagaaggccgagcctccaacatgggctcagctgaagaaactgaccagctggccaccaagtacctggagaacacacaaa
gtgaccagacacctgagagcatgctgctggcagctctgatgatcgtgtccatgggtggtgtccctgacctgacctgctggctgctgccctgccaactacaca
tactggcctacgtgaccttctcctctatgatcagagccgtgacctggatggacaacctatagaggtgtacgtgaacgacagcgtgtgggtgccaggacct
atcgacgatagatgctgccaacctgaggaagaggcagatgatgatcaacatcagcatcgctaccggtatcctccaatctgacctgggcagagcacctggc
tgtcttatgccagctgtgcagaattggctggtggaagtgcctaccgtgtctcccatcagccggttccctaccacatggtgtcgccgatgagcctcagacct

agagtgaactacttgcaggacttcagctatcagcggagcctgaagttcagacccaagggaaagccctgtcctaaagagattcccaaagagttccaagaacacc
gaggtgctcgtgtgggaagagtgctggccaattctgccgtgatcctgcagaacaacagagttcggcaccatcattgactgggctcctagaggccagttctac
cacaattgcagcggacagacacagagctgtcctagcgcacaagtgaccagccgtggatagcgatctgaccgagagcctggacaagcacaacacaagaaa
cttcagagcttctatccctgggagtgaggagagaagggcatctctacaccaaggcctaagatcattagccctgtgtctggaccagaacatcccgaacttgg
agactgacagtgccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagaccctggaacacgggacagaaagcccttctacaccgtgatctgaacagcagc
ctgaccctgctctccagagctgtgtgaagcctccttacatgctggtcgtggcaacattgtgatcaagcccactccagaccatcacatgcgagaactgc
agactgctgacctgcatcgacagcacttcaactggcagcaccggatcctgctcgtgagagctagagaagggcgtgtggatccctgtctctatggacaggcct
tgggaagccagccctagcgtgcacattctgacagaggtgctgaaggcgtgctcaacatgctggcctgatctcctgtgccgtggctggcctgcat
ggctctgctggatctgctgctggaagcggcgagttcgtggtcatctctgccattctggctctggtggtgctgaccatcatcagcctgatcatcctgattatg
ctgtggcagaagaagccccgggtataa

[0304] **참고문헌**

[0305] 1. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239 [published Online First: 2012/03/23]

[0306] 2. Aznar MA, Tinari N, Rullan AJ, et al. Intratumoral Delivery of Immunotherapy—Act Locally, Think Globally. *J Immunol* 2017;198(1):31-39. doi: 10.4049/jimmunol.1601145 [published Online First: 2016/12/21]

[0307] 3. Ellmark P, Mangsbo SM, Furebring C, et al. Tumor-directed immunotherapy can generate tumor-specific T cell responses through localized co-stimulation. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66(1):1-7. doi: 10.1007/s00262-016-1909-3 [published Online First: 2016/10/08]

[0308] 4. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 2016;5(1):e1115641. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115641 [published Online First: 2016/03/05]

[0309] 5. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(9):642-62. doi: 10.1038/nrd4663

[0310] 6. Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology* 2019;8(6):e1581528. doi: 10.1080/2162402X.2019.1596006 [published Online First: 2019/05/10]

[0311] 7. Russell SJ, Barber GN. Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines. *Cancer Cell* 2018;33(4):599-605. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.011

[0312] 8. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):658-70. doi: 10.1038/nbt.2287

[0313] 9. Pittman PR, Hahn M, Lee HS, et al. Phase 3 Efficacy Trial of Modified Vaccinia Ankara as a Vaccine against Smallpox. *N Engl J Med* 2019;381(20):1897-908. doi: 10.1056/NEJMoa1817307 [published Online First: 2019/11/14]

[0314] 10. Anywaine Z, Whitworth H, Kaleebu P, et al. Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines: 12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania. *J Infect Dis* 2019;220(1):46-56. doi: 10.1093/infdis/jiz070 [published Online First: 2019/02/24]

[0315] 11. Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, et al. Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *J Virol* 2009;83(4):1563-71. doi: 10.1128/JVI.01617-08 [published Online First: 2008/12/17]

[0316] 12. Price PJ, Torres-Dominguez LE, Brandmuller C, et al. Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine* 2013;31(39):4231-4. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.017 [published Online First: 2013/03/26]

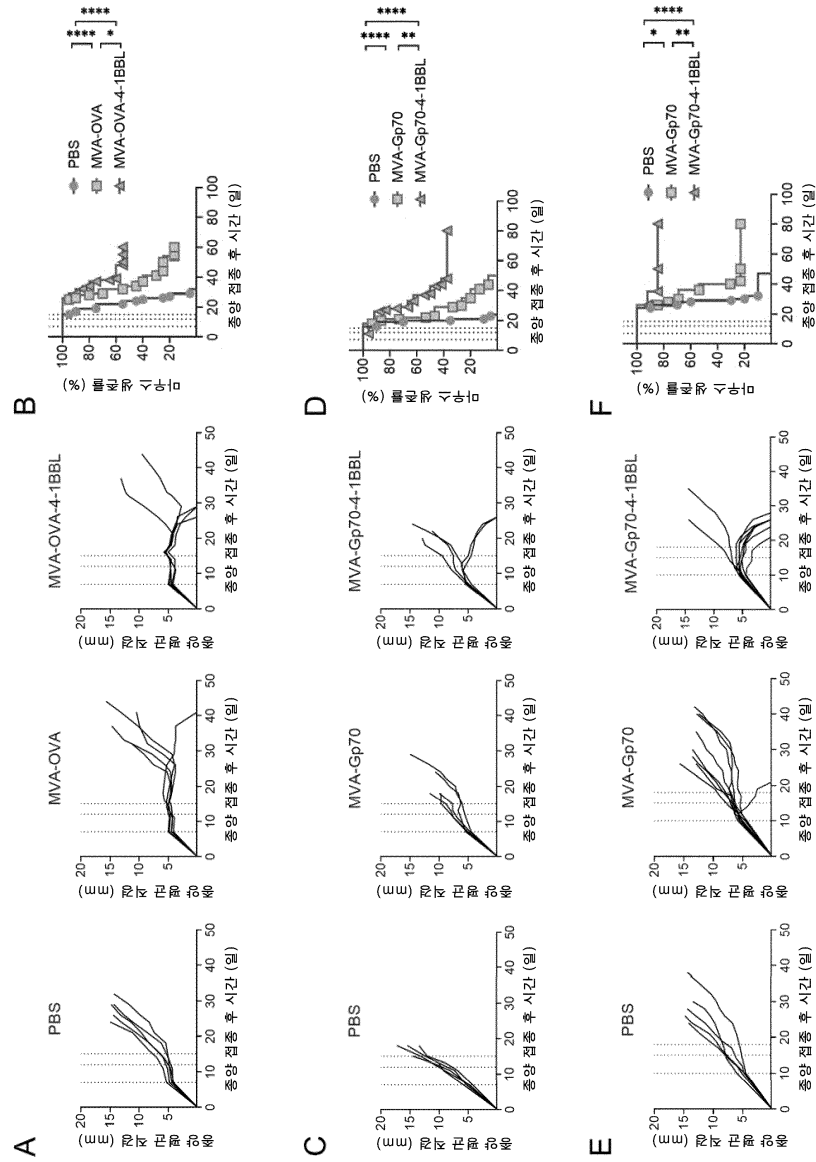
- [0317] 13. Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, et al. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* 2008;118(5):1776-84. doi: 10.1172/JCI33940 [published Online First: 2008/04/10]
- [0318] 14. Harrer E, Bauerle M, Ferstl B, et al. Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA: safety, immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption. *Antivir Ther* 2005;10(2):285-300. [published Online First: 2005/05/04]
- [0319] 15. Suter M, Meisinger-Henschel C, Tzatzaris M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine* 2009;27(52):7442-50. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.095 [published Online First: 2009/06/23]
- [0320] 16. Lauterbach H, Patzold J, Kassub R, et al. Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity. *Front Immunol* 2013;4:251. doi: 10.3389/fimmu.2013.00251 [published Online First: 2013/08/30]
- [0321] 17. Medina-Echeverez J, Hinterberger M, Testori M, et al. Synergistic cancer immunotherapy combines MVA-CD40L induced innate and adaptive immunity with tumor targeting antibodies. *Nat Commun* 2019;10(1):5041. doi: 10.1038/s41467-019-12998-6 [published Online First: 2019/11/07]
- [0322] 18. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, et al. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol* 2017;3(6):841-49. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.2064
- [0323] 19. Watts CWGHYLAJMT. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological Reviews* 2009
- [0324] 20. Hendriks J, Xiao Y, Rossen JW, et al. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol* 2005;175(3):1665-76. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1665
- [0325] 21. Palazon A, Martinez-Forero I, Teijeira A, et al. The HIF-1 α hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov* 2012;2(7):608-23. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0314 [published Online First: 2012/06/22]
- [0326] 22. Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol* 2015;5:117. doi: 10.3389/fonc.2015.00117 [published Online First: 2015/06/25]
- [0327] 23. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676-84. doi: 10.1038/sj.leu.2403302
- [0328] 24. Nakao S, Arai Y, Tasaki M, et al. Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med* 2020;12(526) doi: 10.1126/scitranslmed.aax7992 [published Online First: 2020/01/17]
- [0329] 25. Dai P, Wang W, Yang N, et al. Intratumoral delivery of inactivated modified vaccinia virus Ankara (iMVA) induces systemic anti-tumor immunity via STING and Batf3-dependent dendritic cells. *Sci Immunol* 2017;2(11) doi: 10.1126/sciimmunol.aal1713 [published Online First: 2017/08/02]
- [0330] 26. Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):1090-9. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0145 [published Online First: 2004/02/12]
- [0331] 27. Rivadeneira DB, DePeaux K, Wang Y, et al. Oncolytic Viruses Engineered to Enforce Leptin Expression Reprogram Tumor-Infiltrating T Cell Metabolism and Promote Tumor Clearance. *Immunity* 2019;51(3):548-60 e4. doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.003 [published Online First: 2019/09/01]

- [0332] 28. Kim HS, Kim-Schulze S, Kim DW, et al. Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand. *Cancer Res* 2009;69(21):8516-25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2522
- [0333] 29. Huang AY, Gulden PH, Woods AS, et al. The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9730-5. doi: 10.1073/pnas.93.18.9730 [published Online First: 1996/09/03]
- [0334] 30. Risser R, Horowitz JM, McCubrey J. Endogenous mouse leukemia viruses. *Annu Rev Genet* 1983;17:85-121. doi: 10.1146/annurev.ge.17.120183.000505 [published Online First: 1983/01/01]
- [0335] 31. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4(12):1191-8. doi: 10.1038/ni1009 [published Online First: 2003/11/20]
- [0336] 32. Enamorado M, Iborra S, Priego E, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 2017;8:16073. doi: 10.1038/ncomms16073 [published Online First: 2017/07/18]
- [0337] 33. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun* 2017;8:15221. doi: 10.1038/ncomms15221 [published Online First: 2017/05/26]
- [0338] 34. Beura LK, Wijeyesinghe S, Thompson EA, et al. T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity* 2018;48(2):327-38 e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.015 [published Online First: 2018/02/22]
- [0339] 35. Overton ET, Lawrence SJ, Wagner E, et al. Immunogenicity and safety of three consecutive production lots of the non replicating smallpox vaccine MVA: A randomised, double blind, placebo controlled phase III trial. *PLoS One* 2018;13(4):e0195897. doi: 10.1371/journal.pone.0195897 [published Online First: 2018/04/14]
- [0340] 36. Kassiotis G, Stoye JP. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* 2016;16(4):207-19. doi: 10.1038/nri.2016.27
- [0341] 37. Scrimieri F, Askew D, Corn DJ, et al. Murine leukemia virus envelope gp70 is a shared biomarker for the high-sensitivity quantification of murine tumor burden. *Oncoimmunology* 2013;2(11):e26889. doi: 10.4161/onci.26889
- [0342] 38. Attermann AS, Bjerregaard AM, Saini SK, et al. Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. *Ann Oncol* 2018;29(11):2183-91. doi: 10.1093/annonc/mdy413
- [0343] 39. Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycak K, et al. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res* 2008;68(14):5869-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6838
- [0344] 40. Kong Y, Rose CM, Cass AA, et al. Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nat Commun* 2019;10(1):5228. doi: 10.1038/s41467-019-13035-2
- [0345] 41. McWilliams JA, Sullivan RT, Jordan KR, et al. Age-dependent tolerance to an endogenous tumor-associated antigen. *Vaccine* 2008;26(15):1863-73. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.052 [published Online First: 2008/03/11]
- [0346] 42. Reynoso GV, Weisberg AS, Shannon JP, et al. Lymph node conduits transport virions for rapid T cell activation. *Nat Immunol* 2019;20(5):602-12. doi: 10.1038/s41590-019-0342-0 [published Online First: 2019/03/20]

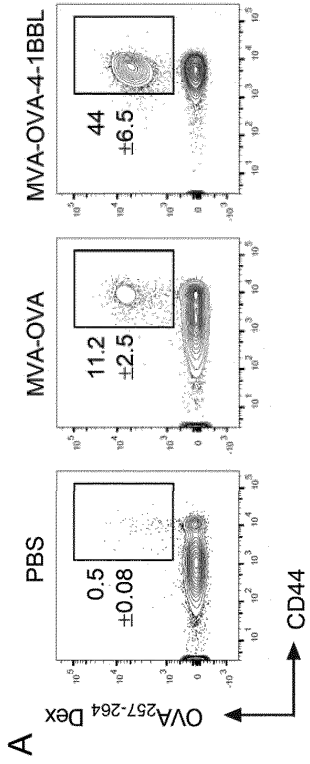
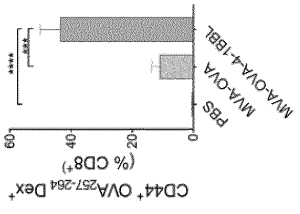
- [0347] 43. Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 2016;46(3):513-22. doi: 10.1002/eji.201445388 [published Online First: 2016/01/17]
- [0348] 44. Bertram EM, Lau P, Watts TH. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 2002;168(8):3777-85. doi: 10.4049/jimmunol.168.8.3777 [published Online First: 2002/04/09]
- [0349] 45. Willoughby JE, Kerr JP, Rogel A, et al. Differential impact of CD27 and 4-1BB costimulation on effector and memory CD8 T cell generation following peptide immunization. *J Immunol* 2014;193(1):244-51. doi: 10.4049/jimmunol.1301217 [published Online First: 2014/05/27]
- [0350] 46. Park SL, Buzzai A, Rautela J, et al. Tissue-resident memory CD8(+) T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. *Nature* 2019;565(7739):366-71. doi: 10.1038/s41586-018-0812-9 [published Online First: 2019/01/02]
- [0351] 47. Schenkel JM, Fraser KA, Masopust D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2014;192(7):2961-4. doi: 10.4049/jimmunol.1400003 [published Online First: 2014/03/07]
- [0352] 48. Zhou AC, Wagar LE, Wortzman ME, et al. Intrinsic 4-1BB signals are indispensable for the establishment of an influenza-specific tissue-resident memory CD8 T-cell population in the lung. *Mucosal Immunol* 2017;10(5):1294-309. doi: 10.1038/mi.2016.124 [published Online First: 2017/01/05]
- [0353] 49. Reading JL, Galvez-Cancino F, Swanton C, et al. The function and dysfunction of memory CD8(+) T cells in tumor immunity. *Immunol Rev* 2018;283(1):194-212. doi: 10.1111/imr.12657 [published Online First: 2018/04/18]
- [0354] 50. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003;77(8):4911-27. doi: 10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003 [published Online First: 2003/03/29]
- [0355] 51. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192(1):63-75. doi: 10.1084/jem.192.1.63 [published Online First: 2000/07/06]

도면

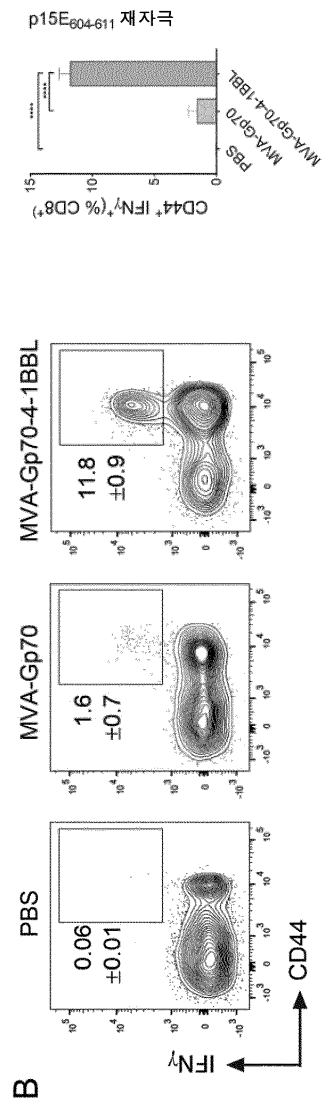
도면1



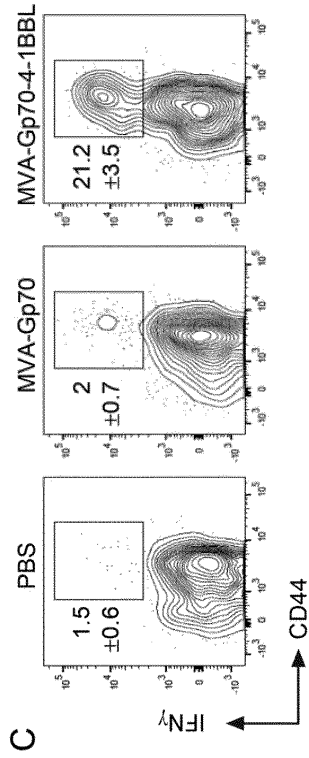
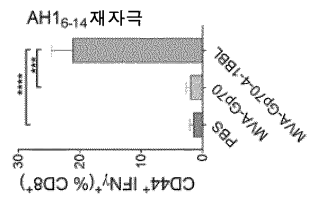
도면2a



도면2b



도면2c

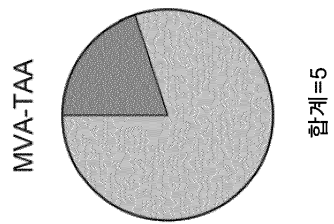
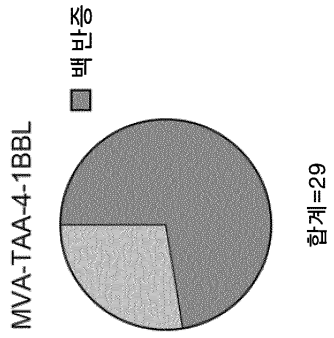


도면2d



D

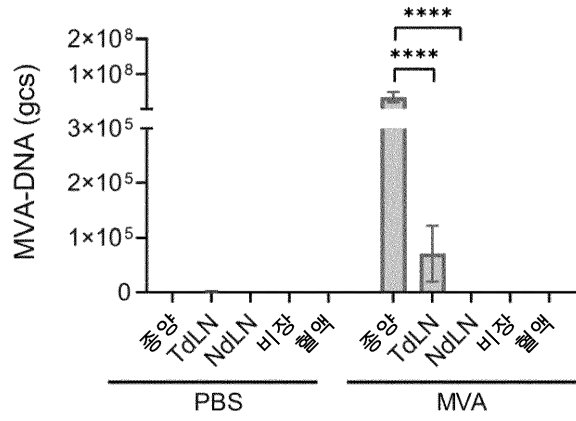
도면2e



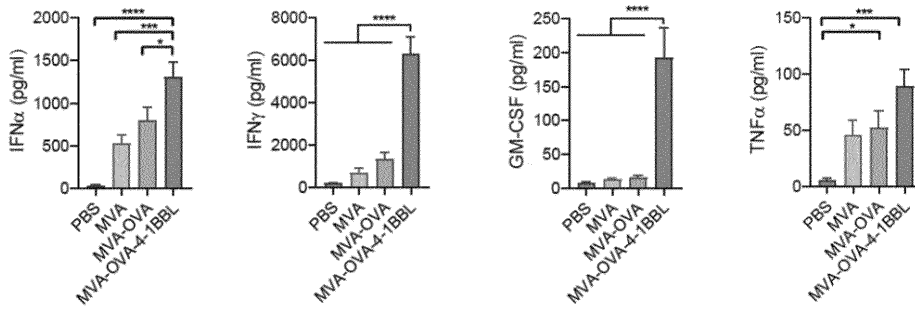
E

도면3

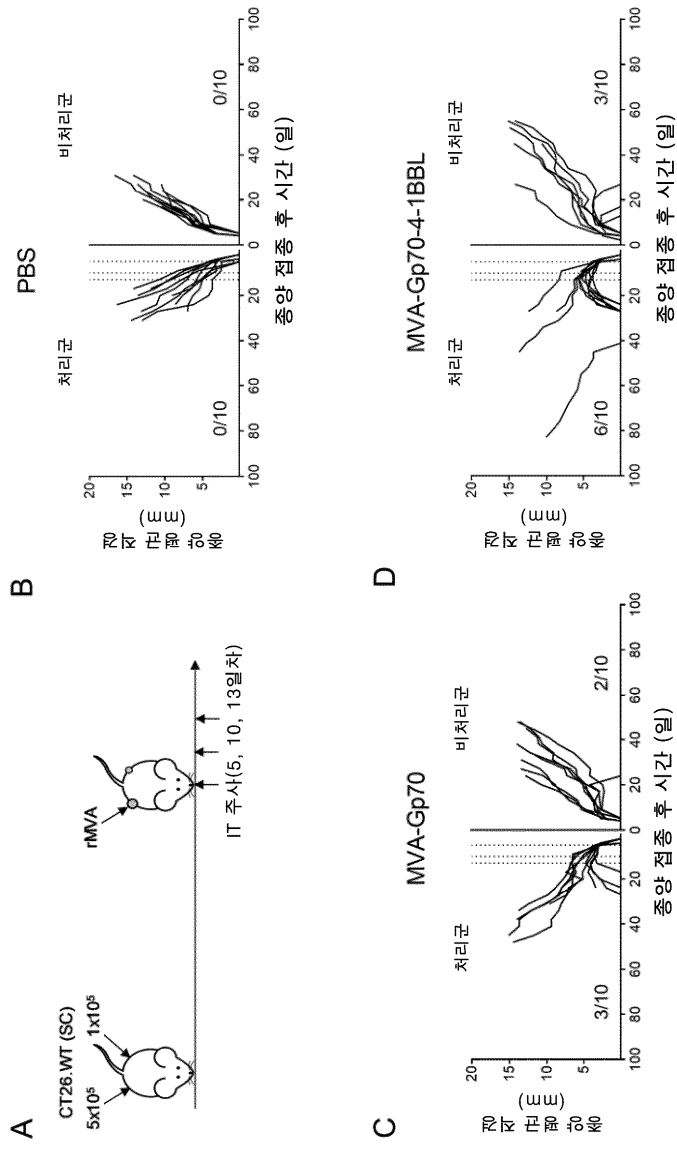
A



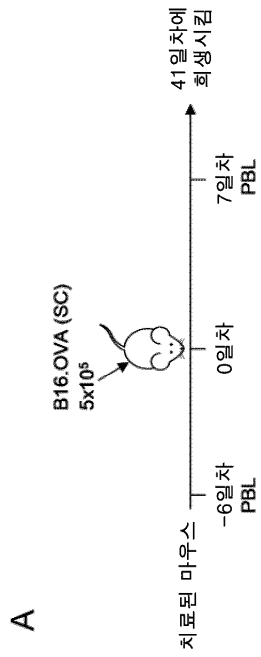
B



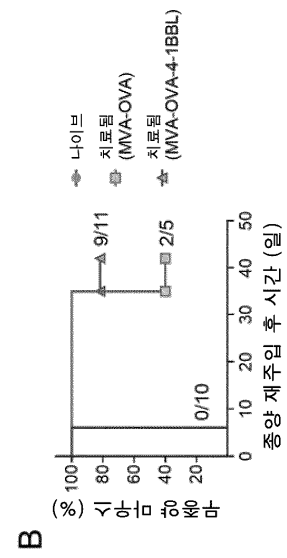
도면4



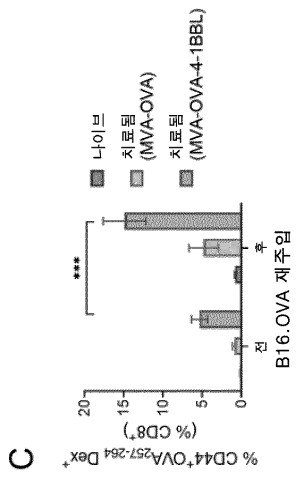
도면5a



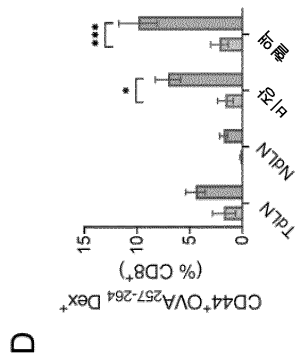
도면5b



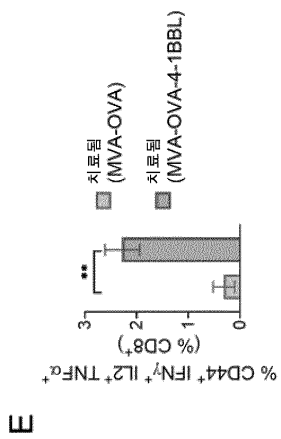
도면5c



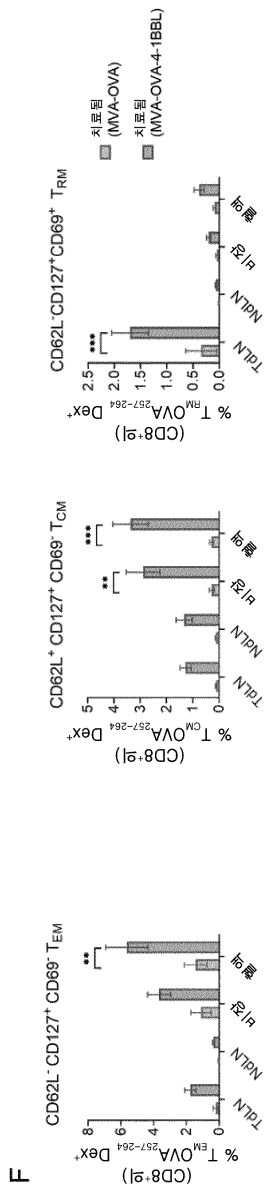
도면5d



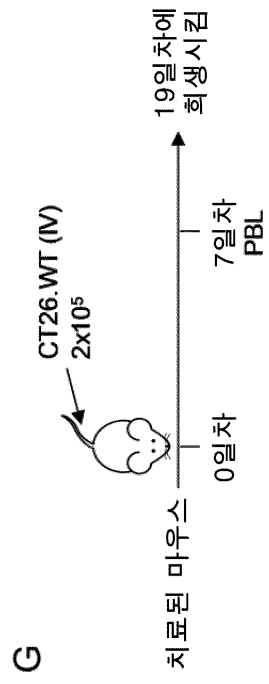
도면5e



도면5f



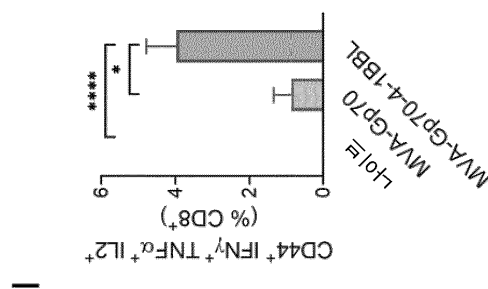
도면5g



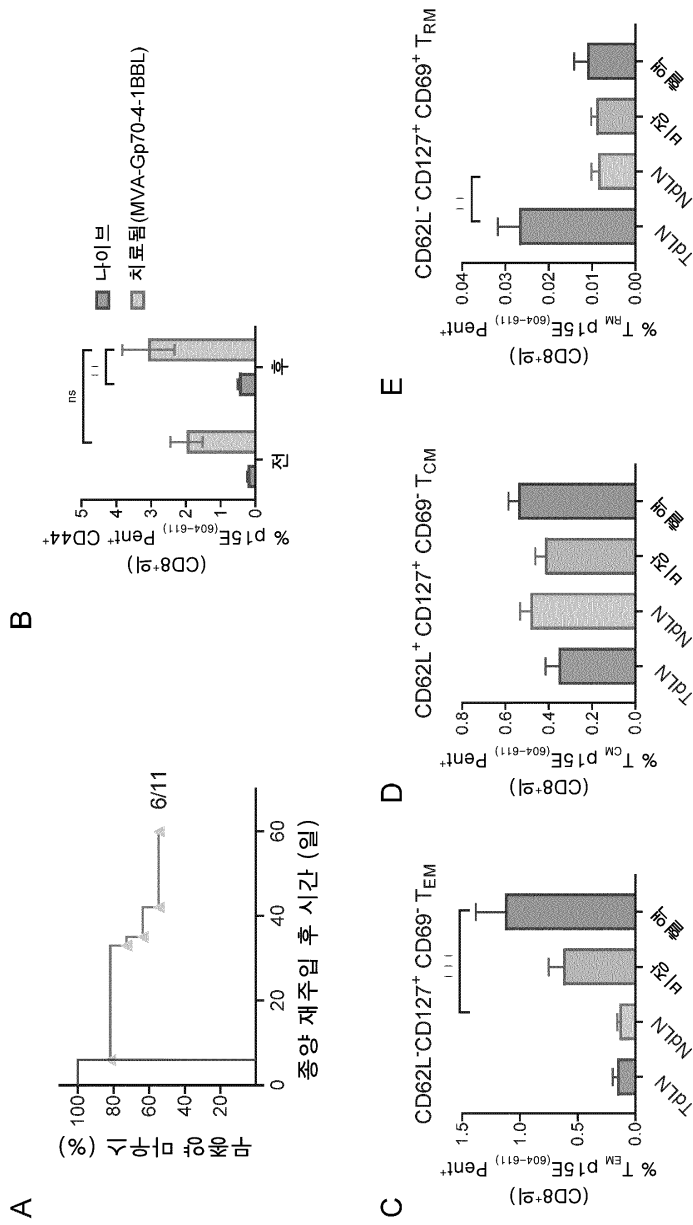
도면5h



도면5i

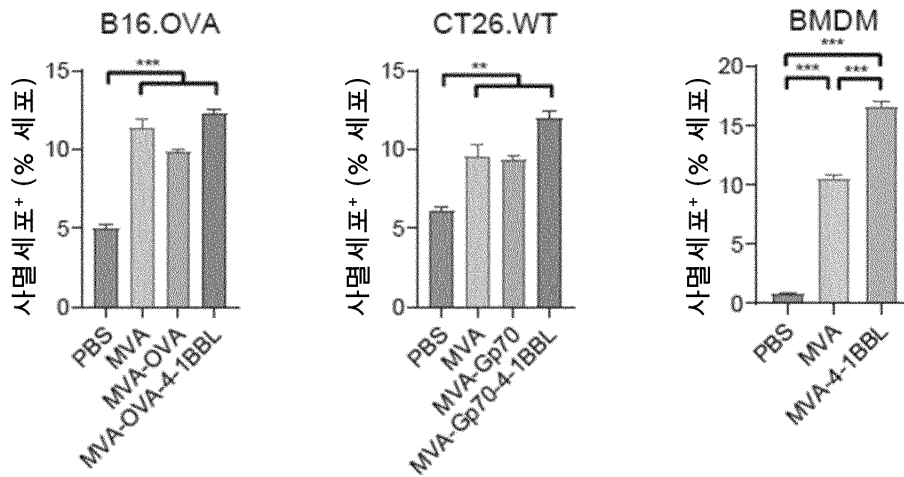


도면6

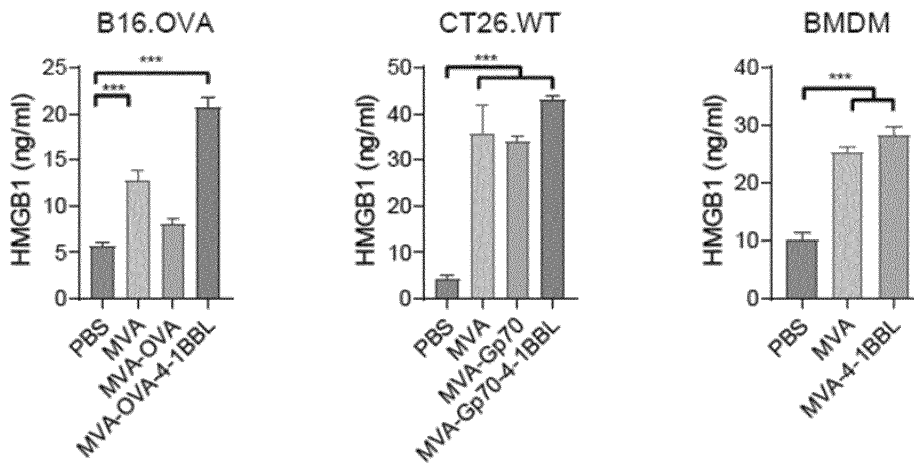


도면7

A



B



도면8a

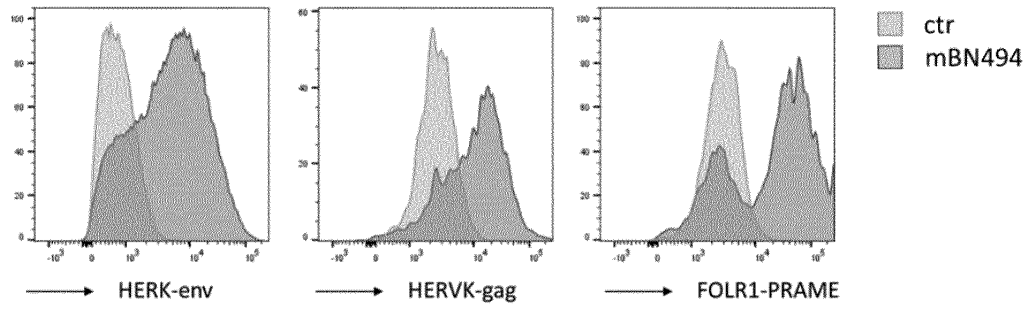
A

MVA-BN-4IT



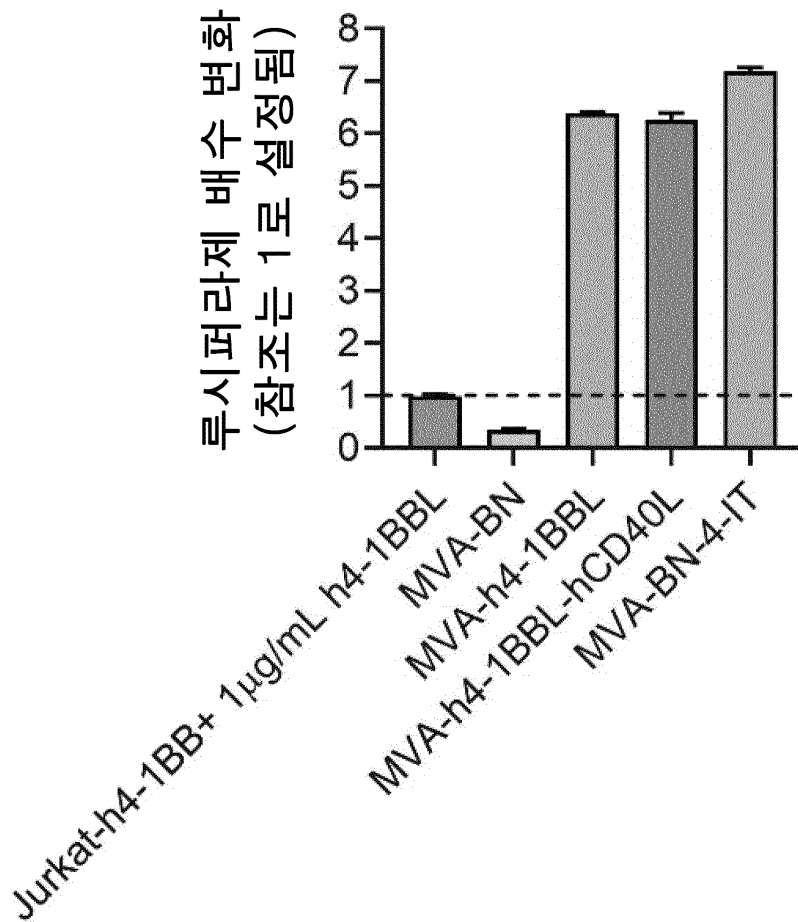
도면8b

B



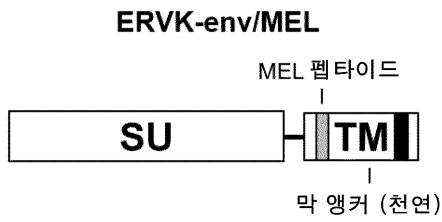
도면8c

C

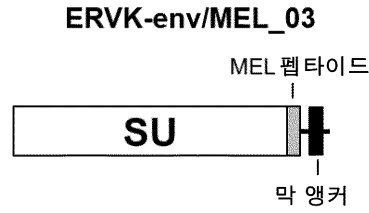


도면9

A

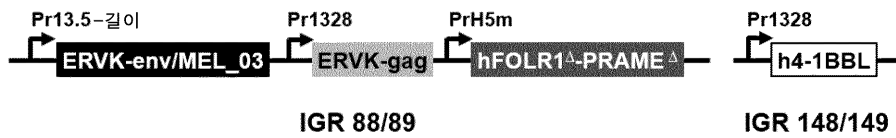


B



C

MVA-mBN502



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bavarian Nordic A/S

<120> Medical Uses of 4-1BBL Adjuvanted Recombinant Modified Vaccinia
Virus Ankara (MVA)

<130> BNIT0016PCT

<150> EP 20191226.8

<151> 2020-08-14

<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

<211> 792

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgatcgaga catacaacca gacaagcct agaagcgccg ccacaggact gcctatcagc      60

atgaagatct teatgtacct gctgaccgtg ttctgatca cccagatgat cggcagcgcc      120
ctgtttgccg tgiacctgca cagacggctg gacaagatcg aggacgagag aaacctgcac      180
gaggacttcg tgttcatgaa gaccatccag cggtgcaaca ccggcgagag aagtctgagc      240
ctgctgaact gcgaggaat caagagccag ttcgagggtc tcgtgaagga catcatgctg      300
aacaagagg aaacgaagaa agagaactcc ttcgagatgc agaagggcga ccagaatcct      360
cagatcgccc ctacgtgat cagcagggcc agcagcaaga caacaagcgt gctgcagtgg      420
gccgagaagg gctactacac catgagcaac aacctggtca ccctggagaa cggcaagcag      480

ctgacagtga agcggcaggg cctgtactac atctacgcc aagtacctt ctgcagcaac      540
agagaggcca gctctcaggc tcctttcacc gccagcctgt gcctgaagtc tectggcaga      600
ttcgagcgga ttctgctgag agcccacaac acacacagca gcgccaacc ttgtggccag      660
cagtctattc acctcggcgg agtgtttgag ctgcagcctg gcgcaagcgt gttcgtgaat      720
gtgacagacc ctagccaggt gtcccagggc 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

<400> 4

atggaatacg ccagcgacgc ctctctggac cctgaagctc cttggcctcc agctcctaga 60
 gccagggctt gtagagtct gccttgggct cttgtggctg gacttctgct tctgttgctc 120
 ctggctgctg cctgcgcagt gtttcttgct tgtccatggg ctgtgtcagg agccagagca 180

tctcctggat ctgccgcttc tcccagactg agagagggac ctgaactgag ccctgatgat 240
 cctgctggac tgctcgacct gagacagggc atgtttgccc agctgggtggc ccagaatgtg 300
 ctgctgattg atggccctct gagctggtag agcgatcctg gacttgctgg cgttagcctg 360

actggaggcc tgagctacaa ggaggacacc aaagaactgg tggaggccaa ggctggcgtg 420
 tactactgtt tctttcagct ggaactgcgg agagtgggtg caggcgaagg atctggatcc 480
 gtgtctctgg cactgcatct gcagcctctg agatctgctg ctggtgcagc tgccctgget 540
 ctgacagtgt atctgcctcc tcctccagc gaagccagaa acagcgcctt tgcttccaa 600
 ggcagactgc tgcacctgic tgctggccag agactgggag tgcacctcca cacagaagca 660
 agagcaagac acgctggca gcttacacaa ggcgctacag tgctgggctt gttcagagtg 720
 acacctgaga ttccagctgg cttgccatct cctcgcagcg 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

agccagttcc tgcagttcaa gacctggtgg 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 tatcctgact ttgtggctag actgcaggat 1380
 gtggcccaga agtctattgc cgacgagaag gctcggaaag tgatcgtgga actgatggcc 1440
 tacgagaacg ctaatccaga gtgccagagc gccatcaagc ccttgaaggg caaagtgcct 1500
 gccggatccg atgtgatcag cgagtatgtg aaggcctgcg acggaatcgg aggtgccatg 1560
 cacaaagcca tgctgatggc acaggccatc actggcgttg tgctcggagg acaagttcgg 1620
 acctttggag gcaagtgcta caactgtggc cagatcggac acctgaagaa gaactgcctt 1680
 gtgctgaaca agcagaacat caccatccag gccaccacca ccggcagaga acctccagat 1740

ctgtgccta gatgcaagaa gggcaagcac tggccagcc agtcgagaag caagttcgac 1800
 aagaacggcc agcctctgag cggcaacgaa caaagaggac agcctcagc tcctcagcag 1860
 actggcgcac ttccaatcca gcccttcgtg cctcaaggct tccagggaca acagcctcca 1920
 ctgtctcagg tgttccaggg 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
 gctcctctga cacacaagat gaacaagatg gtcaccagcg aggaacagat gaaactgccc 120
 agcaccaaga aggccgagcc tccaacatgg gctcagctga agaaactgac ccagctggcc 180
 accaagtacc tggagaacac caaagtgacc cagacacctg agagcatgct gctggcagct 240
 ctgatgatcg tgcctatggt ggtgtccctg cctatgctg 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 gcctgggcag agcacctggc tgccttatgc cagctgtgca gaattggctg 540
 gtggaagtgc ctaccgtgtc tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg 600
 agcctcagac ctagagttaa ctacttcagc gacttcagct atcagcggag cctgaagttc 660
 agaccaagg gaaagccctg tccaaagag attcccaaag agtccaagaa caccgaggtg 720
 ctctgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaacaa cgagttcggc 780
 accatcattg actgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag 840

 agctgtccta gcgcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gacccctggac 900
 aagcacaaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaaggcatc 960
 tctacaccaa ggctaagat cattagccct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg 1020
 agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaacaa 1080
 cgggacagaa agcccttcta caccgtgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag 1140
 agctgtgtga agcctcctta catgtgtgtc gtgggcaaca ttgtgatcaa gcccactcc 1200
 cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac cttcaactgg 1260

 cagcaccgga tectgtctgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac 1320
 aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc 1380
 aacagatcca agcggttcat cttcaccctg atcgccgtca tcatgggcct gattgtctgtg 1440
 acagccacag ctgtctgtgc 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 gagcagcac cactgggata tgggccgaag gcactctgcag 1740
 ggcagagagg acaacctgac actggacatc agcaagetga aagacagat cttcgaggec 1800
 agcaaggctc acctgaatct ggtgcctgga accgaagcta ttgctggagt tgcagatggc 1860
 ctggccaatc tgaatcctgt gacctgggtc aagaccatcg gcagaccac aatcatcaac 1920
 ctgatcctga tectctgtg cctgttttgc ctgctgcttg tgtgcagatg cacccagcag 1980
 ctgagaagag acagcgacca tagagaaaga gccatgatga ccatggccgt cctgagcaag 2040
 agaaaggagg 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 tgcctcctggt gtgggttgcc gttgttggag      60
aggcccagac cagaattgcc tgggccagaa ccgagctgct gaactgtgtc atgaacgcca      120
agcatcacia agagaagcct ggacctgaag acaagctgca tgaacagtgt cggccttggga      180
gaaagaatgc ttgctgtagc accaacacca gccaaagggc ccacaaggac gtgtcctacc      240
tgtaccggtt caactggaac cactgctggag aaatggctcc tgcctgcaag agacacttca      300

tccaggatac ctgctgttac gagtgtcttc ccaatctcgg accttggatc cagcaagtgg      360
accagagctg gcggaaagaa cgggtgctga atgtgccctt gtgcaaagag gattgctgagc      420
agtgggtggga agattgccgg accagctaca catgtaagag caactggcac aaaggctgga      480
actggaccag cggcttcaac aagtgtgccg tgggagctgc ctgccagcct ttccacttct      540
acttccaac acctaccgtg ctgtgcaacg aaatctggac ccacagctac aaggtgtcca      600
actacagcag aggcagcggc aggtgtatcc agatgtggtt cgatcccgtc cagggcaatc      660
ccaatgagga agtggctaga ttctacgctg ctgcatgga aagaagaagg ctctggggca      720

gcatccagag ccggtacatt agcatgagcg tgtggacaag ccctagacgg ctggttgaac      780
tggctggaca gagcctgttc aaggatgagg ccttgcccat tgctgtcttg gagctgtctgc      840
ctagagagct gttccctcct ctgttcatgg ctgccttcga cggcagacac agccagacac      900
tgaaagccat ggtgcaggcc tggcctttca cctgtctgcc tctgggagtg ctgatgaagg      960
gccagcatct gcacctggaa accttcaagg ccgtgctgga cggcctggat gttctcctgg      1020
ctcaagaggt gaggcctcgg cgttggaac tgcaggttct ggatctgctg aagaactctc      1080
accaggattt ctggaccgtt tggccggca acagagccag cctgtacagc tttcctgaac      1140

ctgaggctgc ccagcccatg accacaaagg ccaaagtgga tggcctgagc acagaggcgc      1200
agcagccttt cattcccgtc gaagtgtctg tggacctgtt cctgaaagaa ggagcctgcg      1260

```

atgagctggt cagctacctg attgagaagg tggcagccaa gaagaacgtg ctgcggtgt 1320
 gctgcaagaa gctgaagatc tttgcatgc ctatgcagga tatcaagatg atcctgaaga 1380
 tgggtgacgt ggacagcatc gaggacctgg aagtgacctg tacctggaag ctgcccacac 1440
 tggccaagtt cagcccttac ctgggacaga tgattaacct gcggaggctg ctgctgtctc 1500
 acatccacgc cagctcctac atcagccctg agaaagagga acagtatac gccagttca 1560

caagccagtt tctgagcctg cagtgtctgc aggccctgta cgtggacagc ctgttctttc 1620
 tgagaggcag gctggatcag ctgctgcggc acgtgatgaa ccctctggaa acctgagca 1680
 tcaccaactg tagactgagc gagggcgacg tgatgcacct gtctcagagc ccatctgtgt 1740
 ctcagctgag cgtgctgtct ctgtctggcg tgatgtgac cgatgtgagc cctgaacctc 1800
 tgcaggcact gctggaaaga gcctccgcta cctgcagga cctgggttgc gatgagtgcg 1860
 gcatcaccga tgaccagctg cttgtctctg tgccaagcct gagccactgt agccagctga 1920
 caacctgtc ctctacggc aacagcatct ccatctctgc cctgcagtct ctctgcagc 1980

atctgatcgg cctgtccaat ctgaccacg tgctgtacc tgtgccactg gaaagctacg 2040
 aggacatcca cggaacctg cacctcgaga gactggccta tctgcatgct cggctgagag 2100
 aactgctgtg cgaactgggc agaccagca tggtttggct gagcgccaat ccatgtcctc 2160
 actgtggcga ccggaccttc tacgacctg agcctatcct gtgtccttgc ttcattgcca 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

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

<400> 12

```

atgaacccta gcgagatgca gagaaaaggct ccacctagac ggagaagaca cagaaacagg      60
gctcctctga 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
aacctattg aggtgtacgt gaacgacagc gtgtgggtgc caggacctat cgacgataga      420
tgtcctgcca aacctgagga agagggcatg atgatcaaca tcagcatcgg ctaccggtat      480
cctccaatct gcctgggcag agcacctggc tgtcttatgc cagctgtgca gaattggctg      540
gtggaagtgc ctaccgtgtc tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg      600
agcctcagac ctagagtgaa ctactgcag gacttcagct atcagcggag cctgaagttc      660
agaccaagg gaaagccctg tctaagag attccaaag agtccaagaa caccgaggtg      720

ctcgtgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaaca cgagttcggc      780
accatcattg actgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag      840
agctgtccta ggcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gaccctggac      900
aagcacaaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaaggcatc      960
tctacaccaa ggcctaagat cattagcct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg      1020
agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaaaca      1080
cgggacagaa agcccttcta caccgtcgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag      1140

agctgtgtga agcctcetta catgetggtc gtgggcaaca ttgtgatcaa geccgactec      1200
cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac cttcaactgg      1260
cagcaccgga tctgtctcgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac      1320
aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc      1380
aacatgctgg ccgtgatctc ctgtgccgtg gctggcgtgg ccctgcatgg ctctgctgga      1440
tctgtctcgt gaagcggcga gttcgtggtc atctctgcca ttctggctct ggtggtgctg      1500
accatcatca gcctgatcat cctgattatg ctgtggcaga agaagccccg gtgataa      1557

```