(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월22일
(11) 등록번호 10-2687425
(24) 등록일자 2024년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 35/761* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 35/761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7026679
(22) 출원일자(국제) 2019년02월13일
심사청구일자 2022년01월26일
(85) 번역문제출일자 2020년09월15일
(65) 공개번호 10-2020-0122346
(43) 공개일자 2020년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2019/050380
(87) 국제공개번호 WO 2019/158914
국제공개일자 2019년08월22일
(30) 우선권주장
1802539.5 2018년02월16일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009098492 A2
Blood. vol. 108, no. 8, pp. 2554-2561.

(73) 특허권자
유니버시티 칼리지 카디프 컨설턴츠 리미티드
영국, 카디프 씨에프24 0디이, 뉴포트 로드 30-36
(72) 발명자
파커, 알란
영국, 사우스 글러모건 씨에프71 7엘제이, 코우브릿지, 크로스웨이즈, 타마린드 하우스
우시, 케르튤라, 하니
핀란드, 00100 헬싱키, 아폴론카투 11비 3에이
(74) 대리인
특허법인정진

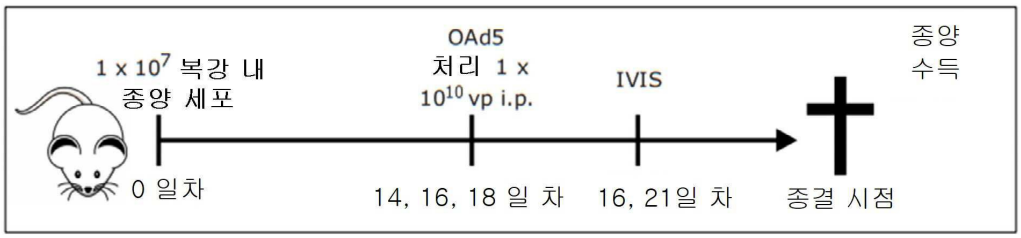
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **변형 아데노바이러스**

(57) 요 약

본 발명은 혈청형(serotype) Ad5의 변형 종양융해(oncolytic) 아데노바이러스; 이를 포함하는 약학적 조성물; 및 이를 이용하는 암 치료 방법에 관한 것으로 상기 변형 아데노바이러스는 헥손 초가변영역 7 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)(HVR7 돌연변이)로서 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들); 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)(KO1 돌연변이)로서 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들); 및 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp (RGD) 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)로서 바이러스가 $\alpha_V\beta_3$/ $\alpha_V\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들)를 포함한다.

대 표 도 - 도7a



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 2710/10321 (2013.01)
C12N 2710/10322 (2013.01)
C12N 2710/10332 (2013.01)
C12N 2710/10345 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 변형을 특징으로 하는, Ad5 혈청형(serotype) 아데노바이러스:

a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S, E450Q 또는 L426Y 중 적어도 하나의 점 돌연변이(HVR7 돌연변이)로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이(HVR7 돌연변이);

b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 또는 P409A 중 적어도 하나의 점 돌연변이(KO1 돌연변이)로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이(KO1 돌연변이); 및

c) 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp(RGD) 내의 D342E 또는 D342A 중 적어도 하나의 점 돌연변이로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha v\beta_3$/$\alpha v\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HVR7 돌연변이는 하기의 점 돌연변이들: I421G, T423N, E424S 및 L426Y 중 적어도 하나를 포함하거나 또는 적어도 하나로 이루어지는, 아데노바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 KO1 돌연변이는 S408E 및 P409A 점 돌연변이들을 포함하거나 또는 이들로 이루어지는, 아데노바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 RGD 돌연변이는 D342E이며, RGE를 생산하는, 아데노바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 종양 세포들을 선택적으로 표적화하는 적어도 하나의 암 표적화 변형 또는 서열을 포함하도록 추가적으로 변형되는, 아데노바이러스.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 아미노펩티데이즈 N(aminopeptidase N)과 결합하는 적어도 하나의 NGR 펩타이드 모티프로서, 상기 NGR은 아데노바이러스 섬유 단백질의 HI 루프에 존재하는, 적어도 하나의 NGR 펩타이드 모티프; 또는 팬-암 마커(pan-cancer marker) EphA2와 결합하는 적어도 하나의 YSA 펩타이드 모티프로서, 상기 YSA는 키메릭 섬유에 존재하는, 적어도 하나의 YSA 펩타이드 모티프; 또는 적어도 하나의 암 표적화 항체 또는 적어도 하나의 성장 인자 항체 또는 적어도 하나의 매트릭스 분해 효소(matrix degrading enzyme)를 포함하는, 아데노바이러스.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 암 표적화 변형은 $\alpha v\beta 6$ 인테그린 결합 펩타이드 또는 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART(서열번호 1)의 삽입 또는 발현을 상기 바이러스 내로 또는 상기 바이러스에 의해 포함하는, 아데노바이러스.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 A20 펩타이드 서열은 바이러스 섬유 노브 HI 루프에 삽입되거나 또는 상기 루프에서 발현

되는, 아데노바이러스.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 다음을 포함하는, 아데노바이러스:

a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S, E450Q 또는 L426Y 중 적어도 하나의 점 돌연변이(HVR7 돌연변이)로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이(HVR7 돌연변이);

b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 또는 P409A 중 적어도 하나의 점 돌연변이(KO1 돌연변이)로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이(KO1 돌연변이);

c) 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp(RGD) 내의 D342E 또는 D342A 중 적어도 하나의 점 돌연변이로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha v\beta_3$/$\alpha v\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제하는, 적어도 하나의 점 돌연변이; 및

d) 바이러스 섬유 노브 HI 루프 내의 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART(서열번호 1)의 삽입 또는 발현.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 다음을 포함하는, 아데노바이러스:

a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S 및 L426Y 점 돌연변이들(HVR7 돌연변이)로서, 상기 돌연변이들은 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제하는, 점 돌연변이들(HVR7 돌연변이);

b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 및 P409A 점 돌연변이들(KO1 돌연변이)로서, 상기 돌연변이들은 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제하는, 점 돌연변이들(KO1 돌연변이);

c) RGE 돌연변이를 생성하기 위한 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp(RGD) 내의 D342E 점 돌연변이로서, 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha v\beta_3$/$\alpha v\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제하는, 점 돌연변이; 및

d) 바이러스 섬유 노브 HI 루프 내의 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART(서열번호 1)의 삽입 또는 발현.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 치료적 분자 또는 제제를 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자(transgene)를 포함하도록 추가적으로 변형되는, 아데노바이러스.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 pRB-결함(pRB-defective) 세포로의 바이러스 복제를 제한하기 위해 E1A 유전자의 24-염기 쌍 결실 d1922-947을 포함하도록 추가적으로 변형되는, 아데노바이러스.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 향상된 암 용해 효능(oncolytic potency)을 위해 E3/19K의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 유지(retention) 도메인 내의 445 위치에 단일 아데닌 염기 추가를 포함하도록 추가적으로 변형되는, 아데노바이러스.

청구항 14

암 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 아데노바이러스 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 어쥬번트, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 비인두암, 활막암, 간세포암, 신장암(renal cancer), 결합조직암, 흑색종, 폐암,

대장암(bowel cancer), 결장암, 직장암, 결장직장암(colorectal cancer), 인후암, 구강암, 간암, 골암, 췌장암, 융모암, 가스트린종, 갈색세포종, 프로락틴종, T세포백혈병/림프종, 신경종, 폰힙펠 린도우병(von Hippel-Lindau disease), 조린거-엘리슨증후군(Zollinger-Ellison syndrome), 부신암, 항문암, 담도암, 방광암, 요관암(ureter cancer), 뇌암, 핍지교종(oligodendroglioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 뇌수막종, 척수 종양, 연골종(osteochondroma), 연골육종, 유잉육종(Ewing's sarcoma), 원발부위불명암(cancer of unknown primary site), 카르시노이드(carcinoid), 위장관 카르시노이드(carcinoid of gastrointestinal tract), 섬유육종(fibrosarcoma), 유방암, 파제트병(Paget's disease), 자궁경부암, 식도암, 담낭암, 두부암(head cancer), 안암, 경부암(neck cancer), 신장암(kidney cancer), 빌림스 종양(Wilms' tumor), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 전립선암, 고환암, 호지킨 병(Hodgkin's disease), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 피부암, 중피종, 다발성 골수증, 난소암, 내분비 췌장암(endocrine pancreatic cancer), 글루카곤종(glucagonoma), 부갑상선암, 음경암, 뇌하수체암, 연부조직 육종(soft tissue sarcoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 소장암, 위암, 흉선암, 갑상선암, 영양막암(trophoblastic cancer), 포상기태(hydatidiform mole), 자궁암, 자궁내막암, 질암(vagina cancer), 외음부암(vulva cancer), 속귀신경집종(acoustic neuroma), 균상식육종, 인슐린종, 카르시노이드 증후군, 소마토스타틴종(somatostatinoma), 치육암(gum cancer), 심장암, 구순암, 뇌막암(meninges cancer), 구강암(mouth cancer), 신경암(nerve cancer), 구개암(palate cancer), 이하선암(parotid gland cancer), 복막암(peritoneum cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(cancer of the larynx), 늑막암(pleural cancer), 및 침샘암을 포함하는 군에서 선택되는, 아데노바이러스.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형 아데노바이러스를 약학적으로 또는 수의학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클과 결합 또는 연합시키는 것을 포함하는, 약학 조성물의 제조 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈청형(serotype) Ad5의 변형 종양융해(oncolytic) 아데노바이러스; 이를 포함하는 약학적 조성물; 및 이를 이용하는 암 치료 방법에 관한 것으로 상기 변형 아데노바이러스는 헥손 초가변영역 7 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)(HVR7 돌연변이)로서 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들); 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)(KOI 돌연변이)로서 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들); 및 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) ARG-GLY-ASP (RGD) 내의 하나 이상의 점 돌연변이(들)로서 바이러스가 αVβ3/αVβ5 인테그린에 결합하는 것을 방지하는 점 돌연변이(들)를 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 암 바이러스치료는 진행성 흑색종에 대한 최초의 종양융해 면역 치료로서 헤르페스 심플렉스 유형 1-기반 탈모

형 라에르파렙벡(T-VEC)을 사용하여 빠르게 부상하는 분야이다. 종양융해 아데노바이러스는 매우 면역력이 높은 바이러스로서 감염성 질환들에 대항하는 다양한 백신 접종에 자주 사용된다. 중요한 것은, 그들은 면역 반응을 유발하고 증가시키는 특별한 능력을 가지고 있다는 것이다. 추가적으로, 종양 내의 종양융해 아데노바이러스의 존재와 상기 바이러스의 존재가 유발하는 면역원성 세포사(immunogenic cell death)는 임상적으로 관련성이 있는 항-종양 면역성이 발생하기 쉬운 상태에 적대적인 종양 미세환경을 형성할 가능성이 있으며, 이는 IFNg와 같은 TH1-유형 면역 조절기의 발현을 통해 야기된다. 그러나, 종양융해 아데노바이러스의 면역원성은 양날의 검이다; 항-바이러스 면역성은 주로 너무나 압도적이기 때문에, 종양에 의해 발현되는 자기-항원에 대항하여 유발되는 훨씬 약한 면역반응은 무시한다.

[0003] 아데노바이러스 5(Ad5)는 암 및 유전자 치료를 위한 수많은 임상 시도들에 배포된 일반적인 벡터이며(clinicaltrials.gov, 2016) 이는 상기 벡터가 유전적으로 조작가능하며, 많은 이식유전자들을 용인할 수 있기 때문이다. 그러나, 이 혈청형은 더 넓은 임상 사용을 방해하는 몇 가지 부적당한 특징을 가지고 있다. Ad5는 특정 집단에서의 혈청 유병률 비율(seroprevalence rates)이 거의 100%에 가까운 일반적인 호흡기 바이러스이다-중화 항체(nAbs)가 빠르게 전신 전달 치료 벡터를 비활성화한다. 다른 부적당한 특징으로는 바이러스성 헥손 단백질과 헤파란 황산 프로테오글리칸(HSPGs)의 브리징을 통해 비장과 간으로 광범위하게 표적 외 격리되는 것이며, 인간 응고 인자 10(FX)에 의해 매개되는 굴성-독화 상호작용이다. *시험관 내에서*, Ad5는 바이러스성 섬유 단백질과 콕사키 아데노바이러스 수용체(CAR) 사이의 상호작용을 통해 숙주 세포로 들어가며, 상기 수용체는 편광 상피 세포의 타이트한 접합부 내에서는 보편적으로 발현되나, 진행성 암에서는 하향 조절된다. 그 후, Ad5는 바이러스성 펜톤 염기 단백질에 의해 매개된 클라트린-매개 내포작용(clathrin-mediated endocytosis)에 의한 αVβ3/5 인테그린들에 의해 숙주 세포들에서 내면화된다.

[0004] 암 치료에 있어서의 종양융해 바이러스 역할에 대한 인식은 지난 10년동안 극적으로 변화해 왔으며, 면역 치료 및 환자 자신의 면역 체계의 자극으로 암을 표적화 및 공격하는 것은 인기를 얻어왔다. 21세기 초, 종양융해 바이러스는 암 치료에 있어서 활성제로 인식되었으며, 그들의 본질적인 종양융해를 통한 종양 세포 용해 능력을 통해 홀로 역할을 해왔다. 최근에는, 암 백신으로서의 사용이 인기를 얻고 있으며, 면역 체계 활성화를 위한 암 세포로부터 종양 항원의 방출 능력은 종양융해를 넘어서서 암에 대항하는 궁극적인 면역 치료를 설계하기 위한 중요한 특성으로 인식되고 있다.

[0005] 따라서 바이러스성 벡터는 임상 환경에서 점점 더 매력적이지만, 일반적인 혈청형 -Ad5- 의 임상적 효능은 종양 특이성 저하, 광범위한 표적 외 전달 및 선천적 면역력에 의한 불활성화로 인하여 저해되고 있으며, 혁신적인 조정 전략을 필요로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서 본 발명자들은 상기 부작용들을 극복하기 위하여 설계된 아데노바이러스성 벡터를 개시한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 첫 번째 측면에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 변형 Ad5 혈청형(serotype) 아데노바이러스를 제공한다:

[0008] a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S, E450Q 또는 L426Y 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)(HVR7 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제함;

[0009] b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 또는 P409A 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)(KO1 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제함; 및

[0010] c) 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp (RGD) 내의 D342E 또는 D342A 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha_V\beta_3$/ $\alpha_V\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제함.

[0011] 본 발명에 따른 상기 변형 Ad5 혈청형 아데노바이러스는 표적 외 조직을 감염시킬 수 있는 능력이 심하게 조절되고, 실제로, 간 및 비장을 감염시키는 것을 방지/억제할 뿐만 아니라 광범위하게 신체의 세포를 감염시킬 수 있는 능력이 조절되기 때문에 이점이 있다. 따라서 상기 변형 아데노바이러스는 그가 감염될 수 있는 조직 측면

에서 조절된다.

[0012] 아데노바이러스는 중간 크기(90-100 nm)이며, 외피가 없는(외부 지방산 이중층이 없음) 바이러스이고, 이중 가닥의 DNA 게놈을 포함하는 다면체형의 뉴클레오캡시드를 가진다. 인간의 경우, 57가지 인간 아데노바이러스 혈청형(Ad-1부터 57)이 인정되었으며, 7개 종(인간 아데노바이러스 A 부터 G)으로 분류된다: A - 12, 18, 31; B - 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55; C - 1, 2, 5, 6, 57; D - 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56; E - 4; F - 40, 41; 및 G - 52. 따라서, 여기서 언급된 Ad5는 아데노바이러스 하위분류 C에 속하는 아데노바이러스 혈청형 5이다.

[0013] 본 기술분야의 통상의 기술자에 알려진 바와 같이, 아데노바이러스 비리온(virion)은 외피가 없는(non-enveloped) 다면체형의 캡시드로 구성되어 있으며, 상기 캡시드는 바이러스의 DNA-단백질 중심 복합체를 둘러싸고 있다. 헥손(hexon)은 가장 풍부한 구조 단백질이며, 캡시드당 240개의 트리머성 분자 복사체가 존재한다. 12개의 핵손 트리머성 복사체는 캡시드의 20개의 삼각형 면 각각을 형성한다. 펜톤 염기 및 섬유 단백질의 복합체는 캡시드의 정점을 봉합하고 바이러스의 부착(섬유) 및 내성(펜톤 염기)을 용이하게 한다.

[0014] 상기 헥손 단백질은 9개의 초가변영역(hypervariable regions, HVRs)을 제외하고는 다른 아데노바이러스 혈청형 간에 매우 잘 보존되어 있다. 이 HVR들은 헥손 단백질의 노출된 표면을 형성하는 두 개의 별개의 루프에 위치하며, HVRs 1 내지 6은 DE1 루프에 존재하며, HVRs 7 내지 9는 FG1 루프에 위치한다.

[0015] 따라서, 여기서 언급된 HVR7의 하나 이상의 돌연변이는 초가변영역 7에서의 돌연변이다. 구체적으로 상기 하나 이상의 HVR7 돌연변이는 응고인자 X(FX)와의 상호작용을 방지하여 변형 아데노바이러스의 간으로의 표적 외 격리를 제한하며, 그리고 표적 암 세포로의 표적화를 향상시킨다.

[0016] 바람직한 구현예에서, 상기 하나 이상의 HVR7 돌연변이는 FX 상호작용을 방지하기 위하여 적어도 하나의 아미노치환 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 I421G, T423N, E424S, E450Q 또는 L426Y로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 하나이상의 돌연변이이다. 더욱 바람직하게는, 상기 적어도 하나의 HVR7 돌연변이는 추가적으로 또는 대체적으로 I421G, T423N, E424S 및 L426Y 점 돌연변이들 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0017] 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 아데노바이러스 벡터는 자연적인 향성(tropism)을 가지며, 상기 향성은 벡터의 광범위한 분포를 이끈다. Ad5와 같은 그룹 C 아데노바이러스의 세포로의 진입은 바이러스 섬유 단백질과 콕사키바이러스-아데노바이러스 수용체(CAR)의 상호작용을 통한 세포로의 바이러스의 높은 친화적 결합을 수반하는 것으로 여겨진다. 따라서 항암 치료의 목적을 위해, 특정 조직 또는 세포 유형으로의 아데노 바이러스 벡터의 표적화는 특이성을 향상시키기 위해 벡터의 정상적인 향성의 변형을 필요로 한다.

[0018] 아데노바이러스 감염은 바이러스 표면의 특수 단백질 즉, 아데노바이러스 섬유 단백질 및 특히 카복시-말단 노브 영역(carboxy-terminal knob domain)으로 지칭되는 아데노바이러스 섬유 단백질의 구상성 카르복시-말단 영역을 통해 숙주 세포 수용체를 인식하는 것으로 시작된다. 따라서, 여기서 언급된 아데노바이러스 섬유 단백질의 노브(knob)는 아데노바이러스 섬유 단백질의 구상성의(globular) 카르복시-말단 영역에 대한 언급이다.

[0019] 따라서, 언급된 하나 이상의 KO1 돌연변이는 하나 이상의 섬유 노브 영역 AB 루프에서의 돌연변이를 말한다. 특히, 상기 하나 이상의 KO1 돌연변이는 바이러스가 CAR에 결합하는 것을 방지한다. 바람직한 구현예에서, 상기 하나 이상의 KO1 돌연변이는 CAR에 결합하는 것을 방지하기 위하여 S408E 또는 P409A를 포함하는 군에서 선택된 하나 또는 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 더욱 바람직하게는 상기 점 돌연변이는 S408E 및 P409A 점 돌연변이들을 포함한다.

[0020] 아데노바이러스 펜톤 염기는 다섯개의 Arg-Gly-Asp 서열을 포함하며 인테그린 알파 v 베타 3 및 알파 v 베타 5 ($\alpha_V\beta_3$/$\alpha_V\beta_5$)를 결합하여 바이러스 내성 허용에 의한 바이러스 감염을 촉진한다. 이 상호작용을 예방함을 통하여, 비장을 대상으로 하는 오프사이트(off-site) 표적화가 감소하고, 따라서 종양 특이적 표적화가 촉진되며, 더욱이, 항암 치료의 맥락에서 사용될 때 불리한 면역 숙주 반응을 유발하는 전-염증성 사이토카인의 방출이 약화된다.

[0021] 따라서, 여기서 언급된 하나 이상의 RGD 돌연변이는 하나 이상의 펜톤 인테그린 결합 모티프 Arg-Gly-Asp (RGD 돌연변이)에서의 돌연변이를 말하며, 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha_V\beta_3$/$\alpha_V\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 방지한다. 바람직한 구현예에서, 상기 하나 이상의 RGD 돌연변이는 각각 RGE 또는 RGA를 생산하는 D342E 또는 D342A를 포함하는 군의 하나 또는 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 더욱 바람직하게

는 상기 점 돌연변이는 RGE를 생산하는 D342E이다.

[0022] 더욱 바람직한 구현예에서는 상기 아데노바이러스는 추가적으로 하나 이상의 암 표적화 변형을 포함하도록 변형되며, 상기 변형은 선택적으로 종양 세포를 표적화하며, 특히, 특정 유형의 종양 세포를 표적화한다. 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 아데노바이러스의 고유한 향성을 변형하고 또한 하나 이상의 표적화 변형/서열을 도입하기 위하여 여기에 개시된 돌연변이를 통합함으로써, 상기 변형 바이러스는 종양 특이성이 증가되고 오프-사이트 표적화가 감소하며, 따라서 원치않는 부작용이 감소한다. 암 표적화 변형/서열의 예시들은 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져 있으며, 아미노펩티데이즈 N과 결합하는 NGR(포함) 펩타이드, 특히 아데노바이러스 섬유 단백질의 HI 루프에 존재하는 아데노바이러스(Ads) 함유 NGR; 팬-암 마커 EphA2에 결합하는 YSA(포함) 펩타이드, 특히 아데노바이러스 함유 YSA는 키메릭 섬유에 존재하고, 강한 EphA2-양성 암세포의 형질도입을 유발하나 EphA2-음성 암 세포 형질도입은 유발하지 않는 YSA; 성장 인자 항체, 특히 이러한 표적화 모이어티들, 즉 bFGF, EGFR, 항체들(즉, 세툭시맙(Cetuximab), 허셉틴(Herceptin), 아바스틴(Avastin) 또는 이와 같은 것)의 아비딘/바이오틴 연결을 이용한 아데노바이러스에의 화학적 연결; 및 일단 바이러스의 외부에 부착되어(전형적으로, 화학적으로 연결되며, 즉 히알루론산분해효소를 통한 연결), 세포외막을 분해하고, 바이러스가 더욱 효과적으로 종양 미세환경으로 침투하는 것을 가능하게 하는 매트릭스 분해 효소(matrix degrading enzyme)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 바람직한 구현예에서, 상기 암 표적 변형은 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART (서열번호 1)와 같은 αvβ6 인테그린 결합 펩타이드(서열 결합 및 상동성 기술과 같은 일반적인 기술을 사용하여 확인된)를 바이러스에 또는 바이러스에 의해 각각 삽입 또는 발현하는 것을 포함할 수 있으며, 그리고, 이상적으로, 바이러스 섬유 노브 HI 루프 내로 또는 내부로 이다(이 변형 바이러스는 이후에 Ad5.3D.A20 이라 한다). A20은 원래 구제역바이러스(foot-and-mouth disease virus, FMDV) 캡시드 단백질 VP1으로부터 유래했으며, αvβ6 인테그린에 대해 고유한 높은 친화도를 갖는다. αvβ6 인테그린은 난소암의 3분의 1 및 다양한 다른 상피암에서 발현되며 건강한 성인 조직에서는 검출되지 않는다. 그러므로, 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 변형 바이러스에서의 이 서열의 발현 및 통합을 통해, 상기 변형 바이러스는 선택적으로 αvβ6 인테그린 과발현 암을 표적화할 수 있으며, 상기 암은 난소암, 췌장암, 식도암, 폐암, 자궁경부암, 두경부암, 구강암(oral cancer), 후두암, 피부암, 유방암, 신장암 및 대장암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 당업자는 언급된 돌연변이의 상동체(homologues), 이종상동체(orthologues) 또는 기능적 유도체가 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 예시적으로 하나 이상의 삽입, 결실, 치환 또는 그와 같은 것을 포함하는 돌연변이들이 본 발명에 의해 포함된다. 또한, 하나의 아미노산을 다른 유사한 "유형(type)"의 다른 아미노산으로 대체하는 것이 가능할 수 있다. 예시적으로, 하나의 소수성 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것은 아미노산 서열을 비교하는 CLUSTAL 프로그램과 같은 프로그램을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이 프로그램은 아미노산 서열을 비교하고 적절하게 두 서열 중 하나에 공백을 삽입함으로써 최적의 정렬을 찾는다. 최적의 정렬을 위해 아미노산 동일성 또는 유사성(동일성은 아미노산 유형의 보존을 의미한다)을 계산할 수 있다. BLASTx와 같은 프로그램은 유사한 서열의 가장 긴 스트레치(stretch)를 정렬하고 맞춤 값을 할당한다. 따라서 여러 유사 영역이 발견된 비교를 얻을 수 있으며, 각각은 서로 다른 점수를 갖는다. 두 가지 분석 유형 모두가 본 발명에서 고려된다.

[0025] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 변형 아데노바이러스 벡터(Ad5.3D.A20)는

[0026] a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S, E450Q 또는 L426Y 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)(HVR7 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제함;

[0027] b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 또는 P409A 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)(KO1 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제함;

[0028] c) 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp (RGD) 내의 D342E 또는 D342A 중 하나 이상의 점 돌연변이(들)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha_v\beta_3$/ $\alpha_v\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제함; 및

[0029] d) 바이러스 섬유 노브 HI 루프 내의 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART(서열번호 1)의 삽입 또는 발현을 포함한다.

[0030] 더욱 바람직하게는 여전히 상기 변형 아데노바이러스 벡터(Ad5.3D.A20)는

[0031] a) 헥손 초가변영역 7 내의 I421G, T423N, E424S 및 L426Y 점 돌연변이들(HVR7 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 응고 인자 10(FX)에 결합하는 것을 억제함;

[0032] b) 섬유 노브 영역 AB 루프 내의 S408E 및 P409A 점 돌연변이들(KO1 돌연변이)로서 상기 돌연변이는 바이러스가 콕사키 아데노바이러스 수용체(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)에 결합하는 것을 억제함;

[0033] c) 펜톤 인테그린 결합 모티프(penton integrin binding motif) Arg-Gly-Asp 내의 D342E 점 돌연변이로서(RGE 돌연변이를 생산하기 위한) 상기 돌연변이는 바이러스가 $\alpha_V\beta_3$/ $\alpha_V\beta_5$ 인테그린에 결합하는 것을 억제함; 및

[0034] d) 바이러스 섬유 노브 HI 루프 내의 A20 펩타이드 서열 NAVPNLRGDLQVLAQKVART(서열번호 1)의 삽입 또는 발현을 포함한다.

[0035] 본 발명의 상기 바이러스 벡터에서 본 발명자들은 주요 캡시드 단백질: 헥손, 섬유 및 펜톤을 돌연변이 시킴으로써 Ad5의 고유한 향성을 성공적으로 제거하였다. 삼중 탈 표적 Ad5-기반 벡터 백본(backbone)이 생성되었으며(Ad5.3D), 헥손 초가변영역(HVR7 돌연변이), 섬유 노브 AB 루프(KO1 돌연변이) 및 펜톤 인테그린-결합 모티프 Arg-Gly-Asp(RGD 돌연변이)에서의 변형과 아미노산 잔기의 치환 돌연변이가 동반되었으며, 상기 아미노산 잔기는 응고 인자 10(FX), 콕사키 아데노바이러스 수용체(CAR), 및 αvβ3/5 인테그린 각각에 결합하는 역할을 한다.

[0036] 상기 Ad5.3D 벡터는 상동 재조합 기술을 사용하여 생성되었으며, 손상된 아데노 바이러스를 구제하도록 조작된 상보 세포주를 사용하여 높은 바이러스 역가로 제공되었다. 삼중 향성-제거 돌연변이의 조합은 αvβ3/5 인테그린, CAR 및 FX를 통한 *시험관 내* 세포 진입을 완벽히 차단했다. 또한, 원리 검증으로서, 본 발명자들은 추가적으로 아데노 바이러스를 변형하였으며, 상기 변형은 추가적인 표적 서열을 선별적으로 특정 암 종양 세포를 표적화 및 감염시키는, 일명 αvβ6 에 통합함으로써 이루어졌으며, 이종 αvβ6 인테그린-결합 펩타이드(A20, NAVPNLRGDLQVLAQKVART; 서열번호 1)를 바이러스 섬유 노브 HI 루프에 유전적 통합하였다(Ad5.3D.A20). 상기 Ad5.3D.A20 아데노바이러스는 β6를 과발현하도록 조작된 296-β6 세포를 사용하여 증식되었다.

[0037] αvβ6 인테그린은 난소암의 3분의 1 및 다양한 다른 상피암에서 발현되며 건강한 성인 조직에서는 검출되지 않는다. Ad5.3D.A20는 효율적으로 αvβ6 + 난소암 세포주 및 주요 임상 복수(ascite)-유래 EOC 탈체 배양물을 형질도입하였으며, 심지어 고도로 중화하는 복수가 존재하는 경우에도 형질도입 하였다. 종양-비보유 마우스에서의 전신 전달 후의 Ad5.3D.A20의 *생체 내* 생체 분포 프로파일은 Ad5와 비교하여 현저하게 변경되었으며, 모든 표적 외 기관(organ)에서 루시퍼라아제 발현이 감소하고 간에서의 바이러스 게놈 부하가 7-로그 감소하였다. 추가적으로, 복강 내 전달 후 종양융해 Ad5.3D.A20(OAd5.3D.A20)의 항-종양 효능은 복강 내 SKOV3(-β6) EOC 이종 이식을 보유한 면역 저하된 마우스에서 평가되었다. OAd5.3D.A20를 통한 종양 융해 치료는 Ad5 치료와 비교하여 전체 생존(OS)이 개선되었다.

[0038] 따라서, Ad5.3D 변형 아데노바이러스는 추가적인 암 특이적 표적 돌연변이의 통합을 통해 암 치료 및 아데노바이러스 요법을 위해 흥미로운 표적화 플랫폼을 나타내는 바이러스 벡터이다.

[0039] 더욱 바람직한 구현예에서는, 상기 아데노바이러스는 추가적으로 분자 또는 제제를 암호화하는 이식 유전자를 하나 이상 포함하도록 변형되며, 상기 분자 또는 제제는 치료적 제제와 같으나, 이에 제한되지 않는다. 따라서 이 구현예는 표적화된 암 세포에 치료 작용을 발휘하기 위해, 세포 내로의, 제제의 전달에 관한 것이다. 제제의 예시는 직접적으로 면역 반응을 자극하는 제제, 예시적으로 GM-CSF, IL-12; 간적접으로 면역 체계를 자극하는 제제, 즉 항체(또는 항체의 단편)로서 면역 관문 억제제를 암호화하여 공동-억제제를 억제하는 CTLA-4, PD-L1, PD1, 또는 Lag3과 같은 항체; 이중-특이적 t 세포 관여(BiTE) 항체 구축물; 이중-특이적 자연 살해 세포 참여(BiKE) 항체 구축물; 종양을 세포 기반 면역 요법에 민감하게 하는 제제, 즉 CD19 암호화; 종양 미세 환경 내에서 조절 T 세포를 고갈시키는 제제, 항-CD25 항체 암호화; 방사선 요법 또는 영상화를 위해 종양을 민감하게 하는 제제 즉, 나트륨/요오드화물 심포터(NIS) 또는 소마토스탄틴 수용체 2형(SSTR2)을 암호화하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 이식유전자는 치료 제제를 암호화할 수 있으며, 상기 제제는 즉, 이식 유전자 Reduced Expression in Immortalized Cell(REIC/DKK3)을 암호화함으로써 종양 세포에 직접적으로 독성이 있는 치료적 제제를 암호화하거나, 또는 비-독성 전구 약물의 독성이 있는 약물로의 전환을 통해 암 세포를 민감하게 하는 효소를 암호화하며, 상기 효소는 즉, 사이토신 디아미네이즈(cytosine deaminase), 나이트로리덕테이즈(nitroreductase), 티미딘 카이네이즈(thymidine kinase)이다. 당 분야에 알려지고 치료에 유용한 다른 이식유

전자들은 본 발명의 실시에 있어서 사용될 수있다.

[0040] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 아데노바이러스는 pRB-결함(defective) 세포로의 바이러스 복제를 제한하기 위해 E1A 유전자의 24-염기 쌍 결실 d1922-947(△24 돌연변이)를 포함하도록 추가적으로 변형된다.

[0041] 더욱 더 바람직하게는, 상기 아데노바이러스는 향상된 종양 융해 능력을 위해 E3/19K의 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 유지(retention) 도메인 내의 445 위치에 단일 아데닌 염기 추가를 포함하도록 추가적으로 변형(T1 돌연변이)된다.

[0042] 본 발명의 두 번째 측면에 따르면, 약제로서 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 상기 변형 아데노 바이러스가 제공된다.

[0043] 본 발명의 세 번째 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 상기 변형 아데노바이러스가 제공된다

[0044] 본 발명의 네 번째 측면에 따르면, 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본 명세서에 정의된 상기 변형 아데노바이러스가 제공된다.

[0045] 더욱 바람직하게는 여기서 언급되는 상기 암은 하기 암 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 비인두암, 활막암, 간세포암, 신장암, 결합조직암, 흑색종, 폐암, 대장암(bowel cancer), 결장암, 직장암, 결장직장암(colorectal cancer), 뇌암, 인후암, 구강암, 간암, 골암, 췌장암, 융모암, 가스트린종, 갈색세포종, 프로락틴종, T세포백혈병/림프종, 신경종, 폰힙펠 린도우병(von Hippel-Lindau disease), 조린거-엘리슨증후군(Zollinger-Ellison syndrome), 부신암, 항문암, 담도암, 방광암, 요관암(ureter cancer), 뇌암, 핍지교종(oligodendroglioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 뇌수막종, 척수종양, 골암, 연골종(osteochondroma), 연골육종, 유잉육종(Ewing's sarcoma), 원발부위불명암(cancer of unknown primary site), 카르시노이드(carcinoid), 위장관 카르시노이드(carcinoid of gastrointestinal tract), 섬유육종(fibrosarcoma), 유방암, 파제트병(Paget's disease), 자궁경부암, 결장직장암(colorectal cancer), 직장암, 식도암, 담낭암, 두부암(head cancer), 안암, 경부암(neck cancer), 신장암, 빌림스 종양(Wilms' tumor), 간암, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 전립선암, 폐암, 고환암, 호지킨 병(Hodgkin's disease), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 구강암, 피부암, 중피종, 다발성 골수증, 난소암, 내분비 췌장암(endocrine pancreatic cancer), 글루카곤종(glucagonoma), 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 뇌하수체암, 연부조직 육종(soft tissue sarcoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 소장암, 위암, 흉선암, 갑상선암, 영양막암(trophoblastic cancer), 포상기태(hydatidiform mole), 자궁암, 자궁내막암, 질암(vagina cancer), 외음부암(vulva cancer), 속귀신경집종(acoustic neuroma), 균상식육종, 인슐린종, 카르시노이드 증후군, 소마토스타틴종(somatostatinoma), 치육암(gum cancer), 심장암, 구순암, 뇌막암(meninges cancer), 구강암(mouth cancer), 신경암(nerve cancer), 구개암(palate cancer), 이하선암(parotid gland cancer), 복막암(peritoneum cancer), 인두암(pharynx cancer), 늑막암(pleural cancer), 침샘암, 설암 및 편도암.

[0046] 의약에 사용하기 위한 화합물은 일반적으로 약학적 또는 수의학적 조성물로 제공되며 그러므로 본 발명의 다섯 번째 측면에 따르면 본 명세서에 정의된 상기 아데노바이러스 및 약학적으로 허용가능한 담체, 어쥬번트, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0047] 바람직한 약학적 부형제는 본 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려져있다. 약학적 조성물은 임의의 바람직한 경로에 의한 투여를 위해 제제화될 수 있으며, 예를 들어 경구, 협측(buccal), 비강 또는 기관지(흡입), 경피 또는 비경구로 투여될 수 있고, 약학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법으로 제조될 수 있다.

[0048] 상기 조성물은 상기 정의된 아데노바이러스를 담체와 결합시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 상기 제형은 아데노바이러스와 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 결합시킨 후, 필요한 경우 제품을 성형함으로써 제조된다. 상기 발명은 본 명세서에 정의된 아데노바이러스를 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클과 함께 또는 결합시키는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조 방법으로 확장된다.

[0049] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 본 명세서에 정의된 변형 아데노바이러스 또는 약학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[0050] 아데노바이러스 또는 이를 포함하는 조성물의 "유효량"은 암 세포 사멸과 같은 원하는 생물학적 효과를 달성하기에 충분한 것을 말한다. 유효 투여량은 연령, 성별, 건강, 및 환자의 체중, 동시 치료의 종류, 존재하는

경우, 치료의 빈도, 및 원하는 효과의 특성에 의존하는 것으로 이해된다. 전형적으로, 상기 유효량은 치료를 투여하는 사람들에 의해 결정된다.

[0051] 하기 청구항 및 본 발명의 상기 설명에 있어서, 언어 또는 필요한 함축을 표현하기 위해 달리 문맥이 필요로 하는 것이 아닌한, 상기 단어 "포함하다", 또는 "포함하다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 포괄적인 의미로 사용되며, 즉, 다양한 본 발명의 실시예에서 언급된 특징들의 존재를 명확히 하나, 추가적인 특징들의 존재 또는 추가를 배제하는 것은 아니다.

[0052] 본 명세서에 인용된 임의의 특허 또는 특허 출원을 포함하는 모든 참고문헌은 본 명세서에 참고로서 편입된다. 어떤 참조도 선행 기술을 구성하는 것은 허락되지 않는다. 또한, 종래 기술 중 어느 것이라도 당해 기술분야의 일반적인 지식의 일부를 구성하는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 각 측면의 바람직한 특징은 임의의 다른 측면과 관련하여 설명된 바와 같을 수 있다.

[0054] 본 발명의 다른 특징은 다음 실시예로부터 명확해질 것이다. 일반적으로 말하면, 본 발명은 (첨부된 청구항 및 도면을 포함하여) 본 명세서에 개시된 특징의 임의의 신규한 특징 또는 임의의 신규한 조합으로 확장된다. 또한, 본 발명의 특정 측면, 구현예 또는 실시예와 함께 기술된 특징, 정수, 특성, 화합물 또는 화학적 모이어티는 그와 양립할 수 없는 경우를 제외하고는 본 명세서에 기술된 임의의 다른 측면, 구현예 또는 실시예에 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다.

[0055] 더욱이, 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 임의의 특징은 동일하거나 유사한 목적을 제공하는 대안적인 특징으로 대체될 수 있다.

[0056] 본 명세서의 설명 및 청구범위 전체에서, 단수는 문맥이 달리 요구하지 않는 한 복수를 포함한다. 특히, 부정관사가 사용되는 경우, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 명세서는 단수뿐만 아니라 복수를 고려하는 것으로 이해되어야 한다.

[0057] 본 발명의 구현예는 이제 하기 참조와 함께 실시예로 설명될 것이다:

도면의 간단한 설명

[0058] **도 1. 생성된 벡터.** (A) Ad5 및 삼중 탈 표적, αvβ6 인테그린 재-표적화된 벡터, Ad5.3D.A20의 바이러스 역가 및 예상되는 향성 (B) 종양융해 Ad5.3D.A20의 벡터맵 (C) 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5) 섬유 노브의 비교 예측 3D 모델링 및 A20 펩타이드(NAVPNLRGDLQVLAQKVART; 서열번호 1)가 HI 루프(초록색)에 삽입된 변형 Ad5.3D.A20 섬유 노브의 비교 예측 3D 모델링. CAR, 콕사키 아데노바이러스 수용체; FX, 응고 인자 10; HVR7, 헥손 초가변 영역 7에서의 FX-결합 돌연변이; KO1, 섬유 노브 AB 루프에서의 CAR-결합 돌연변이; Luc, 루시퍼라아제 이식유전자; vp, 바이러스 입자.

도 2. 고유 수용체 향성의 제거. (A) 복제-결핍 Ad5 및 Ad5.3D.A20 벡터의 콕사키 아데노바이러스 수용체(CAR)에의 결합. Ad5에 대한 Ad5.3D.A20의 바이러스 이식유전자 발현 비율은 상단 막대에 표시된다. (B) 복제-결핍 Ad5 및 HVR7-돌연변이된 Ad5 변이체의 응고 인자 10(FX)에의 결합은 루시퍼라아제 분석에서 인간 FX의 존재하에 세포를 항응고제 X-bp와 함께(+) 또는 없이(-) 3시간동안 37℃에서 감염시켜 평가하였다. HVR7, FX-결합 돌연변이. 통계적 유의성: ns, $p>0.05$, **, $p<0.01$.

도 3. αvβ6 인테그린-표적화의 *시험관 내(in vitro)* 평가. (A) αvβ6+ BT-20 유방암 세포 및 (B) 환자 004로부터의 αvβ6+ 일차 상피성 난소암(primary epithelial ovarian cancer, EOC) 세포에서의 복제-결핍 야생형(Ad5) 및 삼중 탈 표적, 인테그린 재-표적(Ad5.3D.A20) 벡터의 형질도입 효율. (C) αvβ6-저(low)/CAR+ SKOV3 및 αvβ6-고(high)/CAR+ SKOV3-β6 세포(αvβ6 레트로바이러스 발현을 갖는 in-house 제조된 SKOV3 세포)에서의 종양융해 벡터(T1/△24)에 의한 루시퍼라아제 발현. (D) αvβ6 인테그린-매개 세포 진입의 경쟁 억제. 가장 높은 10% αvβ6-발현 SKOV3-β6 세포는 FACS에 의해 분류되고, 계대배양되고, 감염되었다. IgG, 정상 마우스 IgG 대조군; 10D5, 항-αvβ6 기능-차단 항체. 바이러스 이식유전자 발현 비율은 상단 막대에 표시된다. 통계적 유의성 ns, $p>0.05$; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$.

도 4. *탈체(ex vivo)* 벡터 형질 도입에서의 악성 난소 복수의 효과. (A) 건강한 남성 지원자(검은 색 실선)로부터의 20개의 임상 난소 복수(OAS) 샘플 및 대조군 혈청에서의 ELISA에 의한 항-Ad5 항체의 정량화. 수평선은 대조군 혈청에서의 항-Ad5 항체의 50% 및 100% 결합을 나타낸다. (B) 웨스턴 블롯에 의한 항-Ad5 항체의 복수 및 혈청에서의 항원 특이성. (C) BT-20 세포 및 (D) 환자 004로부터의 일차 탈체(ex vivo) 상피성 난소암 세포에서

의 환자 004로부터의 다양한 복수 희석의 존재 및 부존재 하에서, 복제-결핍(Ad5) 및 Ad5.3D.A20 벡터의 형질도입 효율. 세포는 복수의 농도가 증가함에 따라 사전 배양되고 감염되었다.

도 5. 전신 전달 후 72시간 시점에서의 복제-결핍 벡터의 생체 분포. (A) 생체 분포 연구 일정 및 (B) 정맥 주사 3일 후, 복제-결핍(Ad5) 및 삼중 탈 표적 Ad5.3D.A20 바이러스의 분포에 대한 생체 내 이미징. 패널 B로부터의 총 발광 신호의 정량화: (C) 전신, (D) 간, 335 (E) 비장, (F) 폐, (G) 난소 및 (H) 심장에서. i.p., 복강 내; IVIS, 생체 내 이미징 시스템; p.i., 감염-후; vp, 바이러스 입자. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다; n=5/집단; ns, p>0.05; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

도 6. 전신 전달 후 표적 외 기관에서의 바이러스 게놈 복제수. 도 5에서 절제된 조직으로부터의 아데노바이러스 게놈 복제수: 전신 벡터 전달 후의 헥손 유전자의 qPCR을 통한 (A) 간, (B) 비장, (C) 폐, (D) 난소 및 (E) 심장. 데이터는 GraphPad Prism에서 Sidak의 다중 비교 *post hoc* 테스트와 단방향 ANOVA에 의해 정규화되고 분석되었다. 오차 막대는 평균의 오차를 나타낸다; n=5/집단; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; p<0.0001; ns, 통계적으로 유의한 차이 없음. 그래프 아래 숫자는 Ad5 집단에 비해 Ad5.3D.A20 그룹의 배수적 감소(fold decrease)를 나타낸다.

도 7. 종양융해 효능 연구: 난소암 이종이식 모델에서의 종양융해 벡터의 복강 내 전달. (A) 연구 일정. 인간 난소암 세포(SKOV3 및 SKOV3-β6)의 복강 내 이종이식은 면역-손상 마우스(n=5/집단)에게 이식되었으며, 그 후 3회 용량의 정맥 내 종양융해 Ad5 또는 삼중 탈 표적, 인테그린 재-표적화 Ad5.3D.A20을 14일, 16일 및 18일에 처리하였다. 발광 히트맵 이미지(B, D) 및 전신 발광의 정량(C,E)은 첫 번째 치료(16일) 후 349 48시간, 및 첫 치료 후 7일째(21일)에 결정되었다. (F) SKOV3(αvβ6-저(low)/CAR+) 및 (G)SKOV3-β6(αvβ6-고(high)/CAR+) 세포를 접종한 다음, 바이러스로 처리한 동물의 전체 생존은, 상기와 같이, 101일의 최종 연구 종결시점까지 Kaplan-Meyer 생존 곡선으로 나타난다. i.p., 복강 내; IVIS, 생체 내 이미징 시스템; vp, 바이러스 입자; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. IVIS, 생체 내 이미징 시스템.

도 8. 생체 분포 연구: 탈체(ex vivo) 발광 강도의 히트맵(heat-map) 이미지. 간, 비장, 폐, 난소 및 심장은 (A) PBS(대조군), (B) Ad5.Luc 또는 (C) Ad5.3D.A20 벡터들이 정맥 내로 접종된 동물들로부터 사후 즉시 수집되었다. 기관을 D-루시페린에 담그고, IVIS 이미저(imager)로 이미지화하였다. 조직의 색은 루시퍼라아제 이식 유전자에 의해 방출되는 상대적인 발광 강도를 나타낸다; 배경 발광 강도를 배제하기 위해 스케일을 표준화하였다. (D) Ad5.Luc에 비해 전체 발광(광자/초)의 배수적 감소. Ad5.Luc 집단의 평균 발광 강도를 Ad5.3D.A20 집단의 각각의 기관에서의 평균 발광으로 나누었다. 모든 값에서 PBS 대조군에서의 평균값을 빼고 계산하였다.

도 9. 생체 분포 연구: 포르말린-고정, 파라핀-포매된 간 절편에 대한 면역 조직 화학. (A) 세포 구조의 시각화를 위한 헤마토실린-에오신(haematoxyli-eosin) 염색 및 토끼 IgG 아이소타입(isotype) 대조군 항체(1 μg/mL), 일차 토끼 항-CAR 항체(1:100) 및 일차 토끼 항-ITGB6(αvβ6) 항체(1:10)를 사용한 마우스 간 염색. (B) Ad5 또는 Ad5.3D.A20 벡터에 감염된 동물들의 Ad5-감염 간 세포의 염색으로서, 일차 토끼 항-Ad5 항체(1 μg/mL)를 사용. DAB는 기질로서 사용되었으며, 섹션을 헤마톡실린에 카운터 염색하고 커버 슬립에 장착하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

도 10. 파일럿 연구: NOD/SCID 마우스에서의 종양 국소화 및 속도 측정. 1 X 10^7의 SKOV3-β6 세포/동물을 0일차에 복강 내에 이식하였고, 각 시점에서의 두 마리의 마우스가 희생되었다: 7일, 14일, 21일 및 48/49일(종결시점). 대략적인 종양 크기를 측정하였으며, 복수의 부피를 정량화하였다.

도 11. 종양융해 효능 연구: 종결 시점 종양의 특성. (A) 바이러스 게놈 복제수(40ng DNA 당) 및 (B) qPCT에 의한 SKOV3 및 SKOV3-β6 코호트로부터의 OAd5 및 OAd5.3D.A20에의 사후 종양에서의 αvβ6 인테그린(ITGB6) 유전자 발현. αvβ6 발현 수준은 SKOV3 코호트의 음성 대조군 PBS 집단의 마우스 #1과 비교하여 표시하며, 인간 ACTB(β-액틴)를 내인성 대조군으로 사용하였다.

도 12. 췌장암 세포주에서의 루시퍼라아제를 발현하는 Ad5.3D.A20 및 Ad5의 형질도입 활성. αvβ6 및 hCAR의 발현 수준은 ASPC-1 (A), BxPc (B), CFPAC (C), PANC10-05 (D), SW1990 (E), PANC0403 (F), SUIT-2 (G), MiPaCa2 (H) 및 PT45 (I) 췌장암 세포주에서 결정되었다. 세포를 5,000vp/세포의 루시퍼라아제 발현 바이러스로 감염시키고, 그리고 감염 48시간 후 총 세포 단백질에 대해 이식유전자 발현을 정량화하고 수정하였다.

도 13. 식도암 세포주에서의 루시퍼라아제를 발현하는 Ad5.3D.A20 및 Ad5의 형질도입 활성. αvβ6 및 hCAR의 발현 수준은 Kyes-30 식도암 세포에서 결정되었다. 세포를 5,000vp/세포의 루시퍼라아제 발현 바이러스로 감염

시키고, 그리고 감염 48시간 후 총 세포 단백질에 대해 이식유전자 발현을 정량화하고 수정하였다.

도 14. 유방암 세포주에서의 루시퍼라아제를 발현하는 Ad5.3D.A20 및 Ad5의 형질도입 활성. αvβ6 및 hCAR의 발현 수준은 BT-20(A), BT-474(B), MDA-MB-361(C), 및 MDA-MB-231(D) 유방암 세포에서 결정되었다. 세포를 5,000vp/세포의 루시퍼라아제 발현 바이러스로 감염시키고, 그리고 감염 48시간 후 총 세포 단백질에 대해 이식유전자 발현을 정량화하고 수정하였다.

도 15. 폐암 세포주에서의 루시퍼라아제를 발현하는 Ad5.3D.A20 및 Ad5의 형질도입 활성. αvβ6 및 hCAR의 발현 수준은 A427(A), A549(B), 및 NCI-H460(C) 폐암 세포에서 결정되었다. 세포를 5,000vp/세포의 루시퍼라아제 발현 바이러스로 감염시키고, 그리고 감염 48시간 후 총 세포 단백질에 대해 이식유전자 발현을 정량화하고 수정하였다.

도 16. 췌장암 및 유방암 세포주에서의 복제 결핍 및 종양융해(O) Ad5.3D.A20 및 Ad5의 종양융해 활성. 췌장암 세포주 Suit 2($\alpha v\beta 6^{high}$/$hCAR^{high}$), MiCaPa2($\alpha v\beta 6^{low}$/$hCAR^{high}$), PANC0403($\alpha v\beta 6^{Vhigh}$/$hCAR^{high}$) 및 PT45($\alpha v\beta 6^{neg}$/$hCAR^{high}$) 및 유방암 세포주 BT-20($\alpha v\beta 6^{high}$/$hCAR^{neg}$) 및 MDA-MB-231($\alpha v\beta 6^{neg}$/$hCAR^{high}$)을 96 웰 플레이트에 20,000세포/웰의 밀도로 플레이팅 하였다. 세포를 5,000vp/세포로 감염시키고, 세포 생존율을 표준 MTS 세포 생존 분석을 통해 매 24시간마다 정량화하였다. 예상대로, 복제 결핍 벡터는 세포 생존율에 해로운 영향을 미치지 않았으나, OAd5.3D.A20 및 OAd5의 세포 사멸(종양융해) 활성은 직접적으로 세포의 αvβ6 및 hCAR의 존재/부존재와 관련있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] **재료 및 방법**

[0060] 생성된 벡터는 모두 루시퍼라아제(luciferase, Luc)-발현 벡터였고, 박테리아 인공 염색체(BAC)에서 포획된 야생형 Ad5 게놈을 기반으로 하였다. 모든 유전적 변형은 AdZ 상동 재조합 방법(stanton et al.,2008)에 의해 BAC들로 도입되었으며 이는 앞서 설명한 바와 같다(Uusi-Kerttula et al., 2016). 바이러스들은 T-Rex 293 또는 HEK293-β6 세포들(A20-변형 바이러스들)에서 제조되었다. 복제-결핍 벡터들은 완전한 E1/E3 유전자 결손을 전달하며, 종양융해 벡터들은 E1A 유전자에 24-염기 쌍의 결손 *d122-947*(△et al., 2000)을 가지고 pRB-결함(defective) 세포들(Sherr, 1996)로의 바이러스 복제를 제한하며, 그리고 T1 돌연변이, 즉 하나의 아데닌 염기가 E3/19K의 소포체(ER) 유지 도메인 내의 445 위치에 추가되어 종양융해 능력이 향상된다(Gros et al., 2008). FMDV로부터 유래하는 이종의 A20 펩타이드 서열(NAVPNLRGDLQVLAQKVART; 서열번호 1)은 섬유 노브 HI 루프에 유전적으로 도입된다. 고 역가 바이러스(high titre virus)들은 T-REx-293 또는 HEK293-β6 세포들에서 제조되었으며, 특히 이는 앞서 설명한 바와 같다(Uusi-Kerttula et al., 2015, Uusi-Kerttula et al., 2016).

[0061] SKOV3-β6 세포주는 직접 제조되었다(in-house). β6 유전자가 삽입된 퓨로마이신-선택적 pBABE-β6 플라스미드((#13596; Addgene)는 293Phoenix 패키징 세포주에 Effectene을 사용하여 형질주입되었다(transfected). 48시간 후, 레트로바이러스는 수거 및 여과되었고, SKOV3 세포들을 감염시키는데 사용되었다; αvβ6 인테그린-발현 세포들은 5 μg/mL 퓨로마이신의 존재하에서 선별되었다. 1차 EOC 세포들의 복수(ascites)로부터의 수집 및 배양을 위해 웨일스 암 은행(Wales Cancer Bank application for biomaterials, reference WCB 14/004)을 통해 허가를 받았다. 모든 환자는 모집 이전에 서면 동의를 제출했다. 복수 임상 샘플은 베린드레 암 센터(Velindre Cancer Centre, Cardiff)에서 진행성 난소 암 치료를 받고 있는 환자로부터 수집되었으며, 익명 처리 되었다. 세포들은 처리 및 계대 배양 되었으며 이는 앞서 설명한 바와 같다(Uusi-Kerttula et al., 2015, Uusi-Kerttula et al., 2016).

[0062] ***시험관 내(in vitro) 분석***

[0063] 세포 표면 수용체 발현은 앞서 설명한대로(Uusi-Kerttula et al., 2016) 유세포 분석법에 의해 평가되었으며, 항-αvβ6 클론 10D5 및 항-CAR 항체 클론 RmcB에 이어 2차 F(ab')2-염소 α-마우스 IgG (H+L) IgG AlexaFluor647를 사용하였다. 항 Ad5 항체의 난소 복수 및 혈청에서의 존재는 기본적으로 이전에 보고된 ELISA 방법(Stallwood et al., 2000)에 따라서 결정되었다. 항체의 항원 특이성은 웨스턴 블롯에 의해 평가하였다.

[0064] *시험관 내* 세포 형질도입 효율은 앞서 설명한대로 (Uusi-Kerttula et al., 2015, Uusi-Kerttula et al., 2016) 다중 모드 플레이트 리더(multimode plate reader)에서 루시퍼라아제 리포터 유전자 분석에 의해 기본적으로 평가하였으며, RLU(relative light units)는 각각의 웰에서의 총 단백질 농도에 따라 정규화하였다. 형질도입 효율에서의 FX의 효과를 평가하기 위해, 형질도입 배지에 인간 FX 10 μg/mL를 보충하였다. 세포 수용체에 대한

벡터 향성은 앞서 설명한대로(Uusi-Kerttula et al., 2016) 경쟁 억제 분석으로 평가되었으며, 항-αvβ6 항체(10 μg/mL; clone 10D5, Millipore) 또는 정상 항-마우스 대조군 IgG(10 μg/mL; Santa Cruz)를 사용하였다. 중화 분석은 무 세포(cell-free) OAS의 2배 연속 희석(1:40-1:2.5, 최종 농도 2.5-40% 해당)에서의 사전 배양 단계를 포함하였다.

[0065] ***생체 내(in vivo) 연구***

[0066] 모든 동물 실험은 미국 로체스터의 메이오 클리닉(Mayo Clinic)에서 수행하였다. 결과의 일관성을 위해, 모든 동물은 7 주령이었으며, 성별이 일치했다; 하우징이 쉽기 때문에 암컷 마우스를 선택하였다. 모든 동물 취급 및 주사는 현지 규정에 따라 숙련된 수의 기술자인 Mrs.Jill M. Thompson이 수행하였다.

[0067] 복제-결핍 벡터에 대한 생체 분포 연구는 루시퍼라아제의 추적을 위한 백색 털의 타당성 때문에 야생형 B6 알비노 마우스(B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrl) (n = 5/집단) 상에서 수행되었다. 바이러스를 1 X10^{11} vp로 측면 꼬리 정맥에 주입하였다. 모든 마우스는 감염 후 72시간 시점에서의 IVIS 이미징 후에 CO_2 흡입으로 희생되었으며, 분석을 위해 기관을 수거하였다. 효능 연구는 면역 손상 NOD/SCID 마우스(n=5/집단)에서 수행되었다. 파일럿 연구에서 처음으로 치료 일정이 최적화되었다(n=8). 1 X10^{7} SKOV3-β6 세포가 0일 차에 복강내로 이식되었으며, 7일, 14일, 21일, 및 48/49일(종결 시점)에 두 마리의 마우스가 희생되었다. 각 시점에서 종양에서의 CAR 및 αvβ6 발현은 유세포 분석에 의해 평가되었다. 종양융해 효능 연구에서, NOD/SCID 마우스는 0일차에 1 X10^{7}의 SKOV3 또는 SKOV3-β6 세포를 복강 내 이종 이식하였다. 마우스(n=5/집단)에 1 X10^{10} vp의 OAds(PBS, OAd5 및 OAd5.3D.A20)를 14일, 16일 및 18일에 복강 내 주사로 처리하였다. 1차 종결 시점은 전체 생존(%)이었다. 벡터 흡수는 Xenogen IVIS 200 이미저(PerkinElmer)에서의 루시퍼라아제 이식 유전자에 의해 방출되는 발광 신호를 정량화하여 모니터링하였다. 일차 표적 외 기관 및 종결점 종양에서의 바이러스 게놈 복제수는 qPCR에 의해 정량화 되었다. 종양 종결 시점에서의 αvβ6 유전자의 발현 수준은 qPCR에 의해 정량화 되었다.

[0068] ***세포 생존율 분석 요약 프로토콜***

[0069] 세포 생존력 분석의 경우, 제조사의 추천 프로토콜에 따라 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation assay가 사용되었다. 20,000 또는 30,000개의 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 접종하고 밤새 배양하였다. 세포 당 5,000 바이러스 입자(vp/cell)로 무혈청 배지에서 3시간 동안 세포를 감염시켰다. 감염 24, 48, 72, 96 및 144시간 후 생존 세포를 결정했으며, 웰 당 20μl CellTiter 96 AQueous One Solution 시약을 첨가하여 결정하였다. CO_2 5% 가습 대기에서 2시간 동안 배양한 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. % 생존 세포는 처리되지 않은 세포와 관련하여 계산하였다. 결과는 평균, n=3, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

[0070] ***통계적 분석***

[0071] 모든 수치 및 통계 분석은 GraphPad Prism version 6.03에서 수행되었다. *시험관 내* 및 *탈체* 분석은 양측 비 대응 t-test 또는 DUNNETT의 다중 비교 *post hoc* 테스트와 동반한 단방향 ANOVA에 의해 분석하였다. *생체 내* 데이터는 Sidak의 다중 비교 *post hoc* 테스트와 단방향 ANOVA에 의해 정규화되고 분석되었다. 종양 융해 치료 후 전체 생존(%)은 Kaplan-Meyer 생존 곡선으로 나타난다; 생존 비율은 Gehan-Breslow-Wilcoxon test로 분석하였다. 모든 테스트: ns, p>0.05; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

[0072] **결과**

[0073] 본 발명자들은 새로운 Ad5.3D.A20 벡터의 높은 바이러스 역가 복제-결핍 및 종양융해 변이체를 생성 및 제조하였으며, 상기 벡터는 삼중 탈 표적 돌연변이 및, αvβ6 인테그린-발현 세포로 벡터를 재표적화하는 A20 펩타이드 삽입을 가지고 있다(도 1). 상기 다중 유전자 조작은 역가에 중요한 영향을 미치지 않는다. SWISS147 모델 플랫폼의 예측 모델링은 면역 우성 HI 루프 내의 A20 펩타이드의 돌출을 나타낸다(도 1C).

[0074] 복제-결핍 벡터의 형질도입 효능은 다양한 양의 CAR 및 αvβ6 인테그린을 발현하는 세포주에서 평가되었다. Ad5.3D.A20의 탈표적화 돌연변이는 CHO-CAR 세포 (CAR+)에서의 CAR를 통한 진입을 완전히 차단한 반면, Ad5는 이 세포들을 효율적으로 형질도입하였다(도 2A). 상기 HVR7 돌연변이는 FX를 통한 벡터 형질도입을 차단하였다(도 2B). 예상대로, FX는 무-FX 배지 상태와 비교하여 Ad5의 세포로의 형질 도입을 상당히 증가시켰다(도 2B; 오른쪽 패널). 대조적으로, 인간 FX의 배양 배지에의 추가는 CHO-K1 세포에서의 FX-결합이 제거된 Ad5.HVR7 대조군 벡터의 형질 도입 효율에 영향이 없었다(도 2B; 왼쪽 패널). 더욱이, Ad5에서의 증가된 형질도입은 3:1 몰 과량의 Gla-도메인 상호 작용 단백질인, 항응고제 X-bp의 추가로 역전되었으며, 상기 X-bp는 배지의 FX에 결합

및 비활성화한다(도 2B, 오른쪽 패널). 대조적으로, FX 고갈은 Ad5.HVR7 벡터의 형질도입에는 영향을 미치지 않았다(도 2B, 왼쪽 패널).

[0075] αvβ6 인테그린은 삼중 탈표적, 인테그린 재표적화 Ad5.3D.A20의 주요 진입 수용체로 확인되었다(도 3). Ad5.3D.A20는 Ad5와 비교하여 305배 높은 효율로 αvβ6+/CAR- BT-20 유방암 세포(도 3A; p=0.0270) 및 69배 증가된 효율로 1차 EOC004 세포(αvβ6+/CAR-)(도 3B; p=0.0090)에 형질도입되었다. 추가적으로, Ad5.3D.A20 벡터의 종양융해 변이체를 SKOV3-β6 세포(αvβ6-고/CAR+)에 형질 도입하였으며, 이는 낮은 수준의 αvβ6을 발현하는 SKOV3 세포(αvβ6-저/CAR+, 도 3C; p<0.0001)에 비해 ~5배 증가된 효율로 도입되었고, 종양융해 변형이 A20 펩타이드:αvβ6 상호작용을 손상시키지 않음을 확인하였다. 항-αvβ6 항체를 사용한 경쟁 분석은 Ad5.3D.A20 벡터에 의한 형질도입을 상당히 억제하였으며(169 도 3D; p+0.0010), αvβ6에 대한 선택성을 확인하였다.

[0076] 20명의 환자로부터 수득한 임상 난소 복수(OAS)의 항-Ad5 항체의 존재를 ELISA를 통해 스크리닝 하였다. 악성 난소 복수에서 항-Ad5 항체의 역가를 건강한 성인 남성 지원자의 혈청 항-Ad5 항체 역가에 대해 면밀히 조사하였다(도 4A). 동일한 비율의 환자가 대조군 혈청에 비해 더 낮은 및 더 높은 항체 역가를 가지는 것으로 밝혀졌다(도 4A, 검정 점선). 환자 001로부터의 복수(OAS001)는 대조군 혈청과 비슷한 항체 역가를 가지고 있었기 때문에 후속 중화 분석을 위해 선택하였다. OAS001 및 대조군 혈청에서의 항체는 섬유 단백질에 대해 특이적으로 나타났으며, 가장 풍부한 캡시드 단백질 헥손은 변성 바이러스 입자를 사용한 웨스턴 블롯에서 매우 낮은 수준에서만 인식되었다(도 4B). OAS001의 Ad5.3D.A20의 형질도입 효능에 대한 중화 효과는 αvβ6+/CAR- EOC004 일차 세포에서 평가하였다. Ad5.3D.A20은 OAS 농도 2.5, 5 및 10%에서의 Ad5와 비교하여 우수한 형질 도입 효율(최대 902배 높음)을 보였으나, 반면 Ad5는 검출 가능한 수준에서 이러한 세포들을 형질 도입하지 않았다(도 4C).

[0077] 종양 비보유 마우스를 정맥 내로 접종하여 *생체 내* 벡터 향성, 특히 벡터 생체 분포에 대한 삼중 탈표적 돌연변이의 효과를 평가하였다(도 5A). Ad5는 간 및 비장의 영역에서 강한 국소화를 보였으며, Ad5.3D.A20 벡터에 의한 발광은 72 시간 시점에서 검출되지 않았다(도 5B). Ad5를 접종한 동물들은 PBS(p<0.0001) 또는 Ad5.3D.A20(p<0.0001)로 처리된 대조군 동물들보다 전신 발광이 상당히 높았다(도 5C). 상기 간, 비장, 폐, 난소 및 심장은 *탈체* 발광(발광 히트맵을 위해, 도 8A-C 참고)을 위해 제거되고 정량화되었다. Ad5-챌린지된 동물들의 간은 PBS 대조군 또는 Ad5.3D.A20 집단(둘다 p<0.0001)에 비해 더욱 상당한 발광을 방출하였다. 유사하게, Ad5.3D.A20는 비장, 폐, 난소 및 심장에서 Ad5에 비해 상당히 감소된 이식유전자 발현을 보였다(도 E-H; 모두 p<0.0001). 각 기관의 발광 강도의 배수 변화에 대해서는 도 8D를 참고한다.

[0078] Ad5.3D.A20의 변형이 여러 정상 조직에서의 196의 바이러스 격리를 감소시킴을 확인하는 것은 qPCR에 의한 표적 외 기관에서의 바이러스 부하의 정량화를 통해 확인되었다. Ad5.3D.A20의 게놈 복제수는 Ad5와 비교하여 간에서 1000만배 더 낮았다(도 6A; p<0.0001). 유사하게, Ad5.3D.A20 게놈 복제수는 Ad5와 비교하여 비장에서 700배 더 낮았다(도 6B; p<0.0001). 게다가, 상기 Ad5.3D.A20 벡터는 Ad5에 비하여 모든 기관에서 향상된 표적 외 프로파일을 보여주며, 바이러스 로드는 폐, 심장 및 난소 각각에서 10^5, 10^4 및 10^3 더 낮다(도 6C-E). Ad5의 유전적 변형에 기인하는 성공적인 간의 비표적화는 간 섹션의 면역 조직 화학적 염색에 의해 뒷받침 되며, CAR의 높은 발현 수준을 보이나, αvβ6는 검출되지 않았다(도 9A). Ad5.3D.A20에서의 유전적 변형의 비표적화 효과는 마우스의 간 절편이 Ad5 그룹에서 Ad 캡시드 단백질에 대해 양성 염색을 보였으나, Ad5.3D.A20 벡터에 감염된 마우스의 간에서는 그렇지 않았다는 관찰에 의해 확인되었다(도 9B).

[0079] *생체 내* 암 모델에서의 αvβ6 재표적화의 효과를 평가하기 위해, αvβ6-high/CAR-SKOV3-β6 인간 난소 암 이종이식을 면역 손상 NOD/SCID 마우스에서 확립하였다. 동물들은 SKOV3-β6 세포의 복강 내 이식 후 14일 이내에 세포 주입 부위와 복강 내 다양한 부위에 큰 고형 종양이 발생하였으며, 49일 째에는 종양이 다량의 복수 축적과 함께 복강 전체에 퍼졌다. 종양은 높은 αvβ6 발현을 유지하였다(유세포 분석의 경우, 도 10 참고). 이러한 관찰을 기반으로, 본 발명자들은 바이러스 요법 효능 연구를 수행하였으며, 상기 연구는 Ad5 및 Ad5.3D.A20의 종양융해 변이체의 3가지 정맥 투여량을 αvβ6-low/CAR-SKOV3 및 αvβ6-high/CAR-SKOV3-β6 이식 후 14일, 16일 및 18일에 전달함으로써 수행하였다.

[0080] 첫 번째 바이러스 요법 치료 투여량(16일) 후 48시간 시점에서의 IVIS 이미징은 종양융해 Ad5 벡터에 의해 치료된 동물의 복부 영역의 전체적으로 광범위한 발광을 나타내었고, 간/비장 영역에서 가장 높은 강도를 보였으며, SKOV3 및 SKOV3-β6 이종이식 모델 모두에서 나타났다(도 7B). 이 분포는 유지되었으나, 그러나 5일 후인 21일 째에는 더 낮은 강도를 보였다(도 7D). 반면에, 상기 Ad5.3D.A20 223 벡터는, 그러나, 매우 선택적인 국소화를

보였으며, Ad5에 비해 상당히 감소된 전체적인 발광을 보였고, 성공적인 비 종양 조직 비표적화와 일치하였다. SKOV3 및 SKOV3-β6 모델 모두에 대해서, 전신 발광의 정량화는 16일 째(도 7C; 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$)와 21일 째(도 7E; $p<0.0001$) 모두에서 Ad5보다 상당히 낮은 Ad5.3D.A20 벡터의 흡수를 나타냈다.

[0081] 항-종양 활성은 SKOV3 이종이식 모델의 종양융해 Ad5 및 종양융해 Ad5.3D.A20 모두에서 관찰되었다(도 7F). Ad5.3D.A20의 향상된 종양-선택적 효과와 일관되게, Ad5.3D.A20가 처리된 5마리의 마우스 모두는 101일째인 최종 시점에 여전히 생존하였으며, Ad5로 처리된 동물들은 단지 70일째까지만 생존하였다.

[0082] 본 발명자들은 췌장(도 12), 식도(도 13), 유방(도 14) 및 폐(도 15) 기원의 다양한 암 세포주에서 추가 형질도입 분석을 수행하였다. 먼저 모든 세포 유형의 αvβ6 및 hCAR 발현에 대해 분석을 수행하였다(각 도의 히스토그램). 9개 중 7개 췌장 세포주(ASPC-1, BxPc, CFPAC, PANC 10.05, SW1990, PANC 0403 및 Suit2)는 αvβ6를 다양한 수준으로 발현하였으며, 효율적으로 Ad5.3D.A20를 형질 도입할 수 있었다(도 12A-G). 대조적으로, MiPaCa2 (도 12H) 및 PT45 (도 12I) 세포는 매우 낮은 αvβ6 발현 또는 αvβ6 비발현을 보였으며, 예상한 바와 같이, Ad5.3D.A20 매개 형질 도입을 잘 허용하지 않았다. 식도 세포주 Kyse-30은 높은 αvβ6 발현을 보였으며 Ad5.3D.A20 매개 형질 도입에 대해서도 매우 허용적이었다(도 13). 유방암 세포주에서 시험된 4 세포주 중 3 세포주(BT-20, BT-474 및 MDA-MB361)는 αvβ6를 다양한 정도로 발현하였고, Ad5.3D.A20에 의한 형질도입에도 허용적이었으나(도 14A-C), 반면에 MDA-MB-231 세포에서의 αvβ6 발현 부족은 세포를 Ad5.3D.A20에 비-감염적이도록 하였다(도 14D). 시험된 모든 3개 폐암 세포주(A427, A549 및 NCI-H460, 도 15A-C)에 있어서, αvβ6는 부재하였고 세포는 Ad5.3D.A20 매개 형질 도입에 굴절되었다.

[0083] Ad5.3D.A20의 종양 융해 버전의 세포 사멸 활성을 평가하기 위하여, $\alpha v\beta 6^{high}$(Suit2, Panc0403) 및 $\alpha v\beta 6^{low}$(MiPaCa2) 또는 $\alpha v\beta 6^{neg}$(PT45) 췌장암 세포주에서 세포 생존율 분석이 수행되었다. 세포들은 5,000vp/세포의 복제 결핍 Ad5 또는 Ad5.3D.A20 또는 종양융해(O) Ad5 또는 Ad5.3D.A20에 감염되었다. 예상한대로, 복제 결핍 벡터는 세포 생존율에 어떤 상당한 효과도 매개하지 않았으나, 종양융해 벡터의 세포 사멸 활성은 αvβ6 발현과 잘 연관되는 것으로 나타났다. 유사하게, $\alpha v\beta 6^{high}$/$hCAR^{neg}$ 삼중 음성 유방암 세포주 BT-20에서, hCAR의 부족과 함께하는 높은 수준의 αvβ6 존재는 오직 OAd5.3D.A20가 효율적으로 세포 사멸을 매개하도록 하였다. 반대로 $\alpha v\beta 6^{neg}$/$hCAR^{high}$ 유방암 세포주 MDA-MB-231에서는, hCAR의 존재와 αvβ6의 부재로 인해 오직 OAd5만이 효율적으로 세포를 사멸할 수 있었다.

[0084] **논의**

[0085] 본 발명자들은 새로운, 종양-선택적인 종양융해 아데로바이러스 벡터, Ad5.3D.A20에 대해서 설명하며, 상기 벡터는 알려진 모든 고유 향성(native tropism)들은 제거되고, 과-발현되는 예후적인 암 마커-αvβ6 인테그린(integrin)에 대해 재-표적화되었다. 인테그린 αvβ6는 공격적으로 변형된 암에서 발현되기 때문에 치료적인 암 적용에 있어서 유망한 표적이다.

[0086] 본 연구에서, Ad5.3D.A20 벡터의 복제-결핍 형태는 성공적으로 고유 바이러스 흡수 경로에 의한 세포에 의한 바이러스적 흡수를 비표적화하는 대신(도 2, 선택적으로 *시험관 내* 및 *탈체*에서의 αvβ6+ 세포들을 재-표적화하였다(도 3). 아데노바이러스 벡터의 전신 전달에서 발생하는 효능-제한 상호작용은, 이론적으로, 복강 내 경로를 통한, 벡터의 공동(cavity) 내 투여로서 우회될 수 있으나, 실제로 이 접근법은 야생형 Ad5가 복수액에서 항-Ad5 중화 항체에 의해 격리되기 때문에 어려움이 존재한다. 그러므로 본 발명자들은 높은 수준으로 이미 존재하는 Ad5 중화항체를 가지는 OAS의 존재 하에서 Ad5.3D.A20의 형질도입 효능을 평가하였다(도 4A). Ad5와 달리, Ad5.3D.A20은 비교적 높은 OAS 농도에서도, αvβ6+ 세포를 형질도입하는 능력을 유지하였다(도 4C).

[0087] 또한 변형되지 않은 캡시드를 가지는 Ad5 벡터의 임상 효능은 표적 외 조직 격리에 의해 상당히 제한되며, 특히 간에서 제한된다. 본 발명자들은 Ad5.3D.A20가 성공적으로 *생체 내* Ad5의 생체 분포를 변화시킬 수 있음을 증명하였다. 종양이 없는 마우스에서, 복제-결핍 Ad5.3D.A20는 조상격인 Ad5와 비교하여 향상된 생체 분포를 나타내며, 간, 비장 및 폐에서 상당히 감소된 바이러스 이식유전자 발현을 나타내고(도 5), 모든 표적 외 기관 274 에서 Ad5와 비교하여 낮은 바이러스 게놈 복제수를 나타낸다(도 6).

[0088] 비-표적화/재-표적화 Ad5.3D.A20 벡터의 종양융해 형태의 효능을 시험하기 위해, 본 발명자들은 면역 손상된 마우스에서의 인간 난소암 정위(orthotopic) 복강 내 이종 이식 모델을 수립하였다. 복강 내 투여 후 종양 융해 Ad5.3D.A20의 바이러스로 암호화된 이식유전자의 더욱 국소화된 생체 분포는 감소된 표적 외 격리 및/또는 종양-선택적인 바이러스 흡수와 일치하였다(도 7B-E). 상기 결과는 SKOV3 이종이식 모델에서, Ad5에 비해

Ad5.3D.A20로 처리된 동물의 우수한 생존에 의해 뒷받침된다(도 7F).

[0089] Ad5.3D 또는 Ad5.3D.A20 투여는 진행성, 항암화학요법-저항성 암 또는 αvβ6+ 암, 특히 난소암, 췌장암, 식도암 및 유방암 각각에 대해 유망한 치료 옵션을 제공한다. 상기 벡터는 중요한 플랫폼을 제공하며 궁극적으로 정확한 바이러스 치료 적용을 위해 수정될 수 있다.

[0090] **참고문헌**

[0091] FUEYO, J., GOMEZ-MANZANO, C., ALEMANY, R., LEE, P. S. Y., MCDONNELL, T. J., MITLIANGA, P., SHI, Y. X., LEVIN, V. A., YUNG, W. K. A. & KYRITSIS, A. P. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. Oncogene, 19, 2-12.

[0092] GROS, A., MARTIEZ-QUINTANILLA, J., PUIG, C., GUEDAN, S., MOLLEVI D. G., ALEMANY, R. & CASCALLO, M. 2008. Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency. Cancer Research, 68, 8928-8937.

[0093] SHERR, C. J. 1996. Cancer cell cycles. Science, 274, 1672-1674.

[0094] STALLWOOD, Y., FISHER, K. D., GALLIMORE, P. H. & MAUTNER, V. 2000. Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. Gene Therapy, 7, 637-643.

[0095] STANTON, R. J., MCSHARRY, B. P., ARMSTRONG, M., TOMASEC, P. & WILKINSON, G. W. G. 2008. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. BioTechniques, 45, 659-668.

[0096] UUSI-KERTTULA, H., DAVIES, J., COUGHLAN, L., HULIN-CURTIS, S., JONES, R., HANNA, L., CHESTER, J. D. & PARKER, A. L. 2016. Pseudotyped alphavbeta6 integrin-targeted adenovirus vectors for ovarian cancer therapies. Oncotarget.

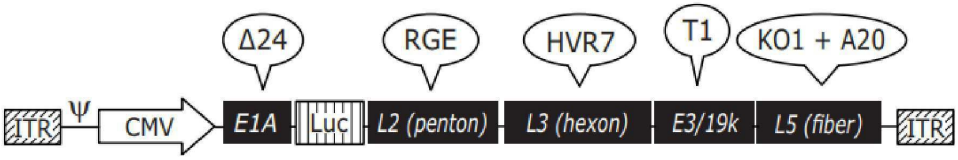
[0097] UUSI-KERTTULA, H., LEGUT, M., DAVIES, J., JONES, R., HUDSON, E., HANNA, L., STANTON, R. J., CHESTER, J. D. & PARKER, A. L. 2015. Incorporation of Peptides Targeting EGFR and FGFR1 into the Adenoviral Fiber Knob Domain and Their Evaluation as Targeted Cancer Therapies. Hum Gene Ther, 26, 320-9.

도면

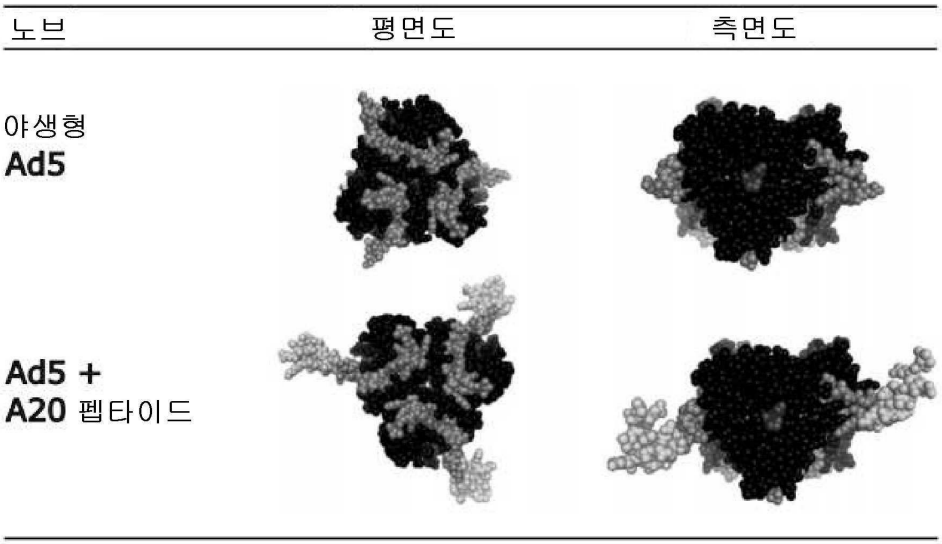
도면1a

벡터	역가 (vp/ml)		수용체 결합			
	Repl. def.	Oncolytic	αvβ3/5	αvβ6	CAR	FX
Ad5.Luc	3.9×10^{12}	1.1×10^{12}	+	–	+	+
Ad5.KO1.HVR7.RGE. A20 *'Ad5.3D.A20'*	3.0×10^{12}	1.5×10^{12}	–	+	–	–

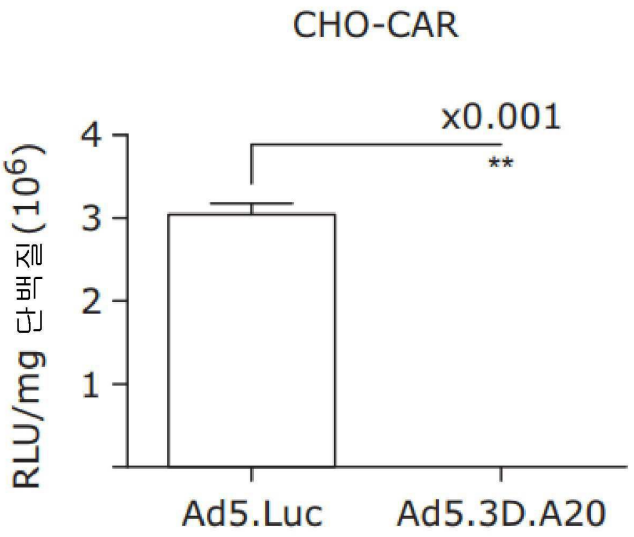
도면1b



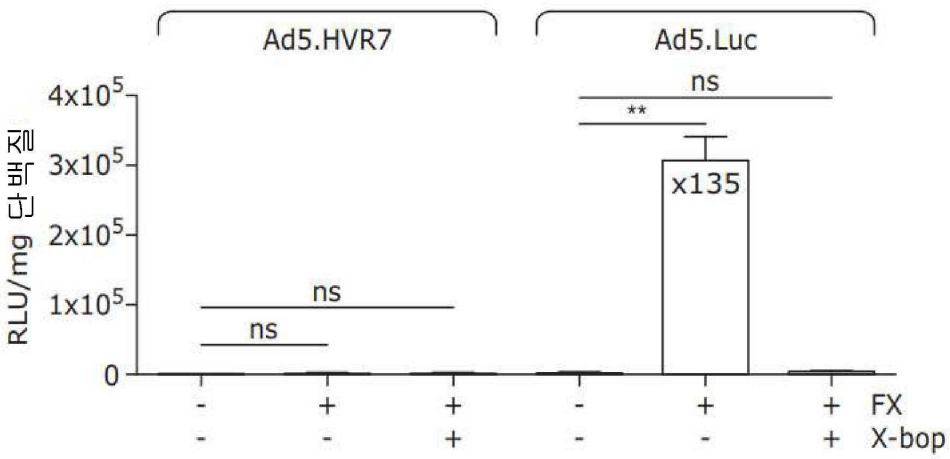
도면1c



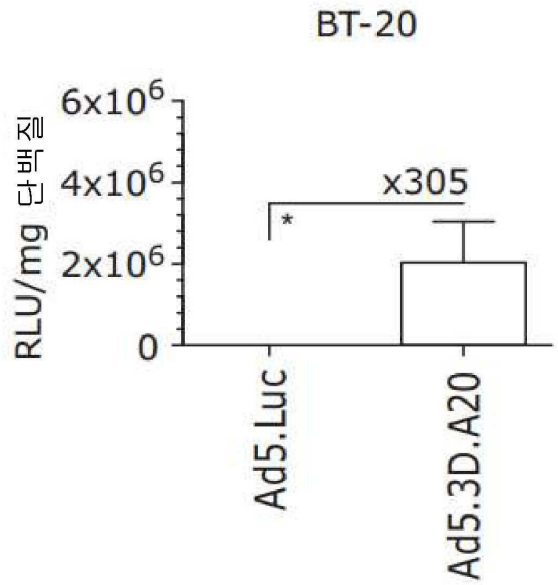
도면2a



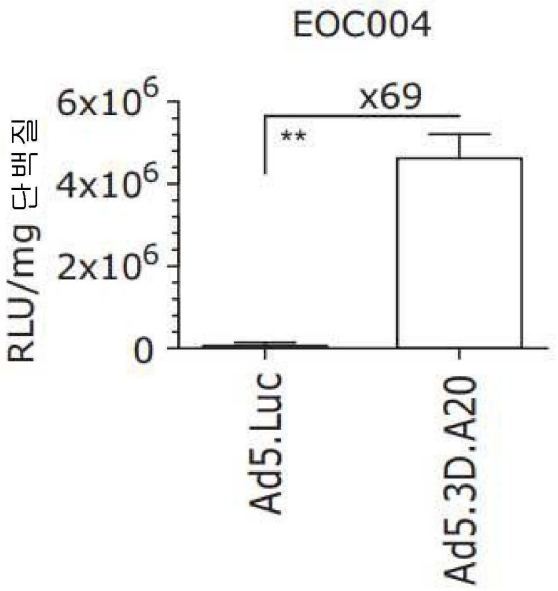
도면2b



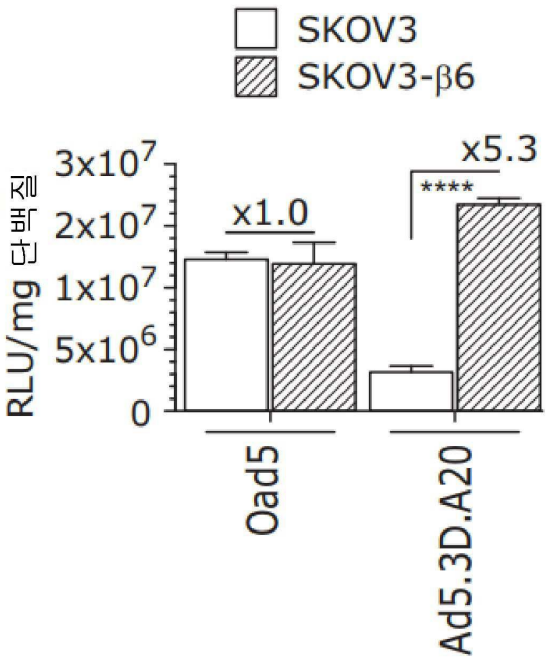
도면3a


BT-20
RLU/mg 단백질
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
x305
*
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20

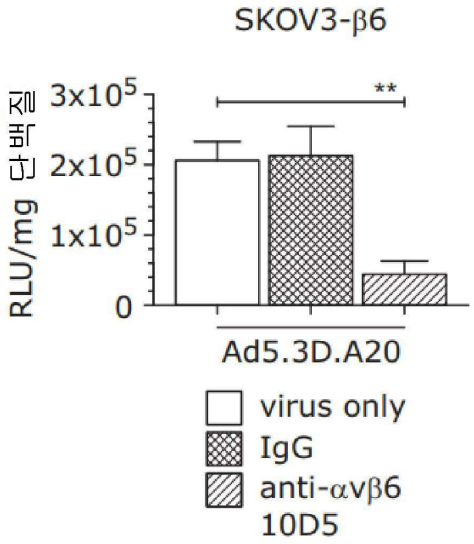
도면3b


EOC004
RLU/mg 단백질
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
x69
**
Ad5.Luc
Ad5.3D.A20

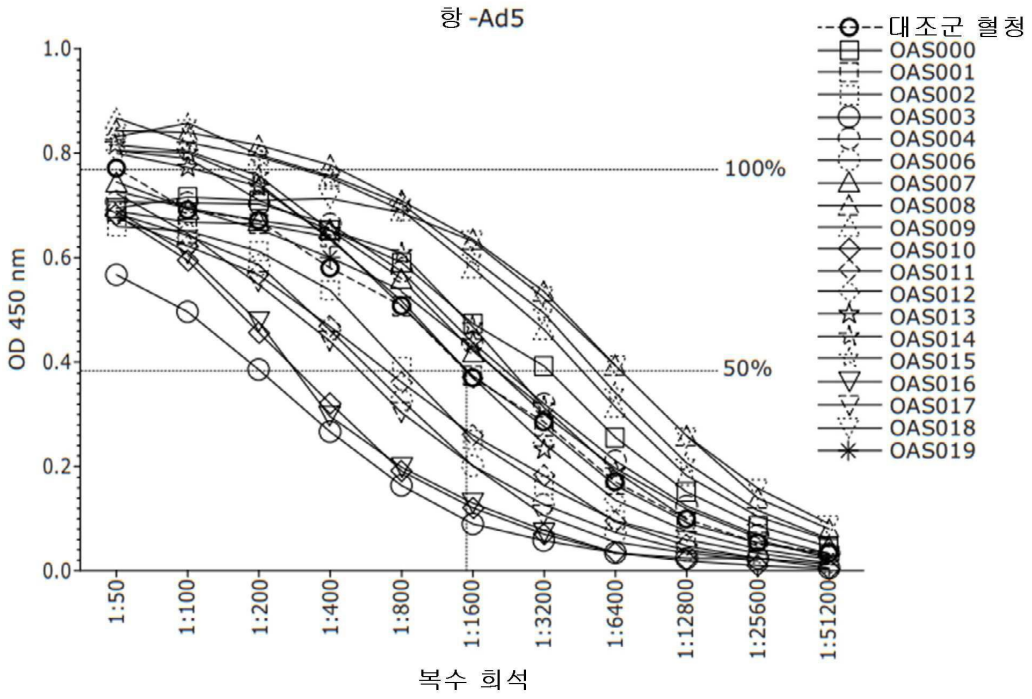
도면3c


SKOV3
SKOV3-β6
RLU/mg 단백질
3x10^7
2x10^7
1x10^7
5x10^6
0
x1.0
x5.3
****
Oad5
Ad5.3D.A20

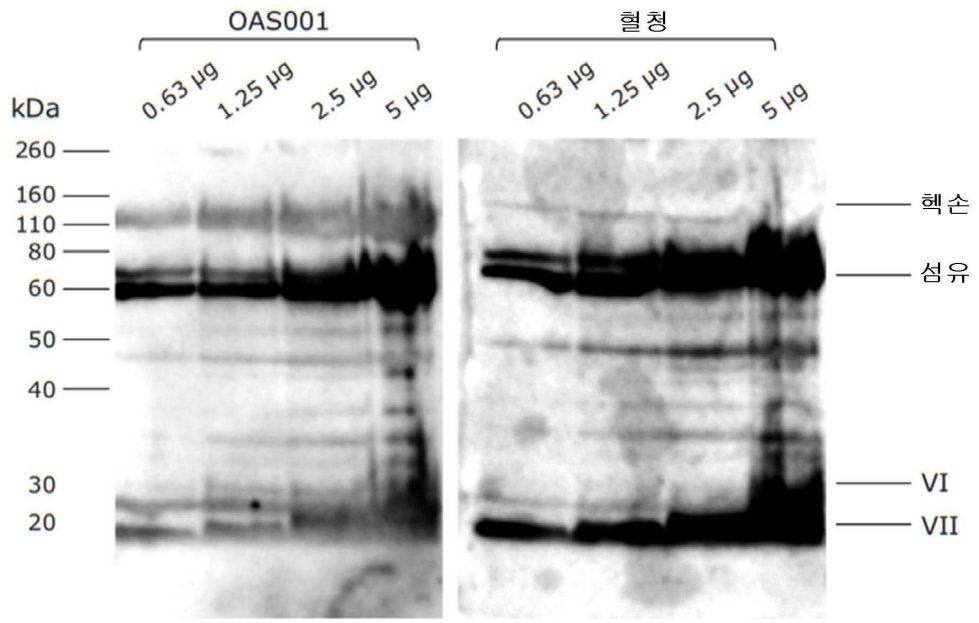
도면3d


SKOV3-β6
RLU/mg 단백질
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
**
Ad5.3D.A20
virus only
IgG
anti-αvβ6
10D5

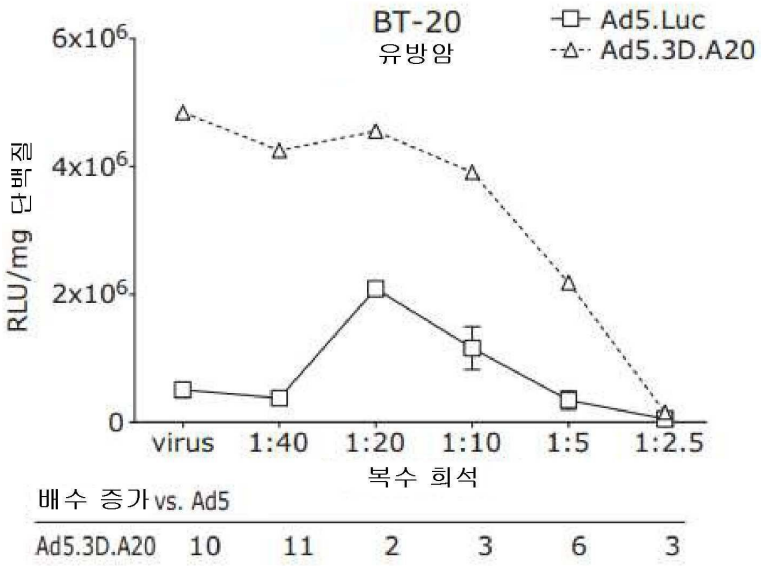
도면4a


항-Ad5
대조군 혈청
OAS000
OAS001
OAS002
OAS003
OAS004
OAS006
OAS007
OAS008
OAS009
OAS010
OAS011
OAS012
OAS013
OAS014
OAS015
OAS016
OAS017
OAS018
OAS019
100%
50%
OD 450 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
1:12800
1:25600
1:51200
복수 희석

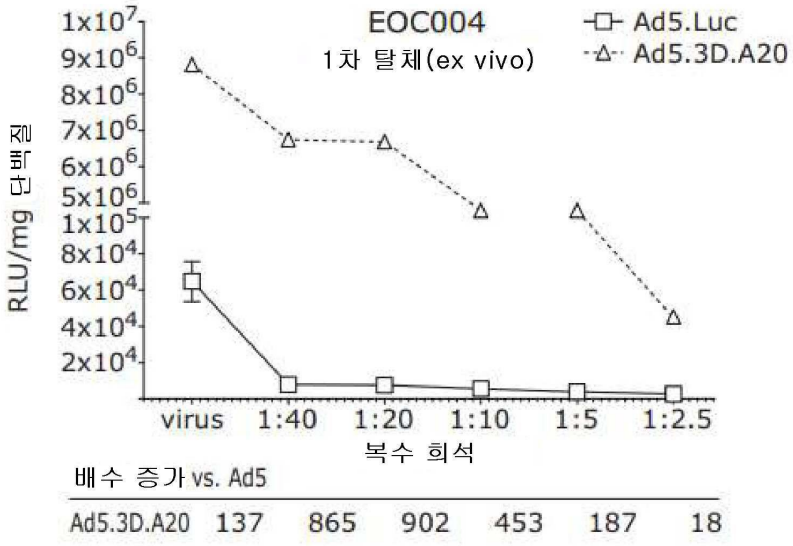
도면4b


OAS001
혈청
kDa
0.63 μg
1.25 μg
2.5 μg
5 μg
0.63 μg
1.25 μg
2.5 μg
5 μg
260
160
110
80
60
50
40
30
20
헥손
섬유
VI
VII

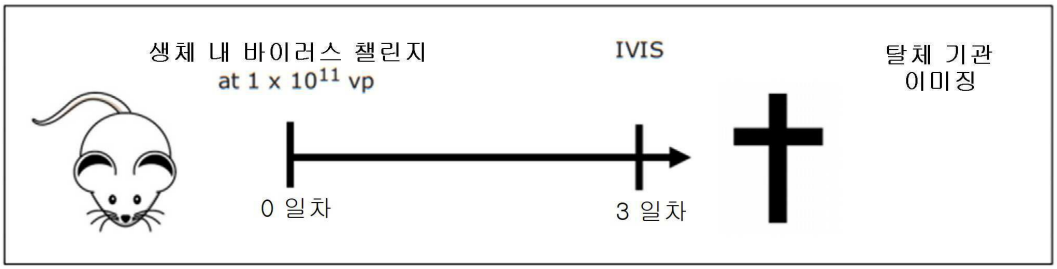
도면4c



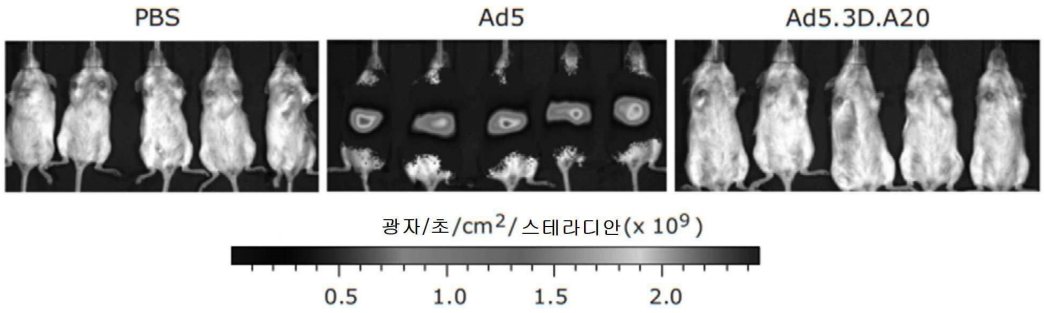
도면4d



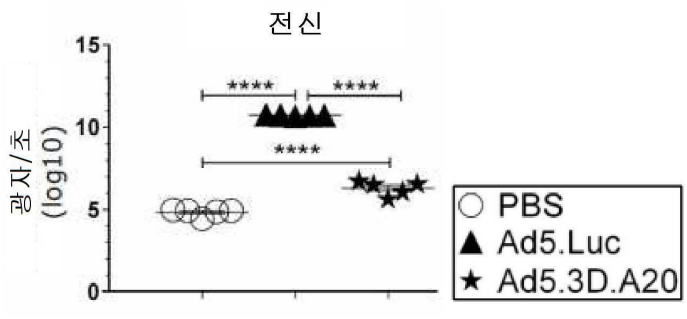
도면5a



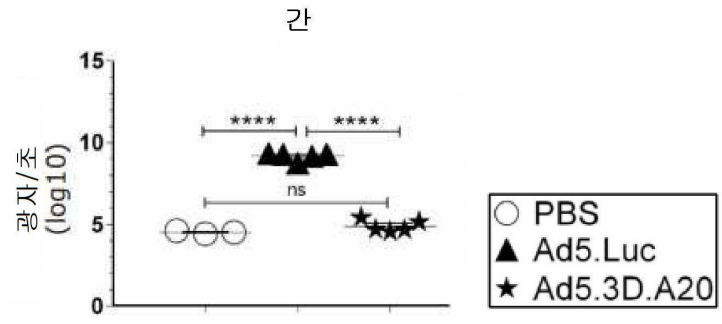
도면5b



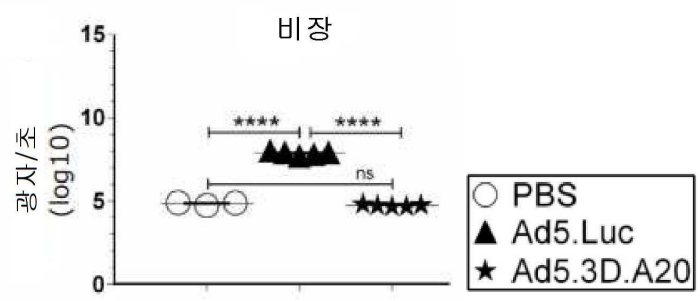
도면5c



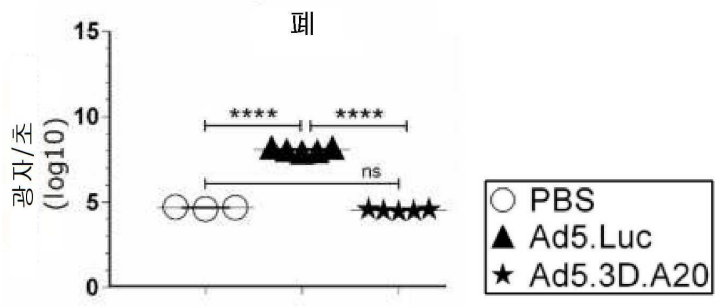
도면5d



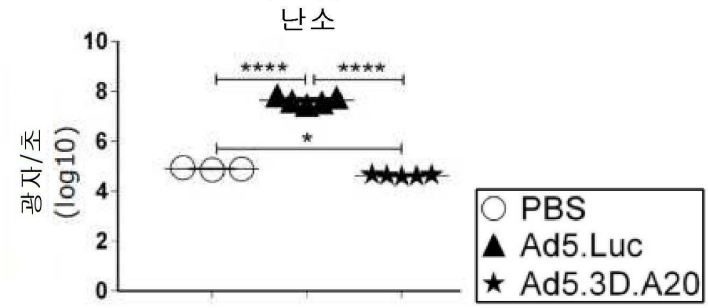
도면5e



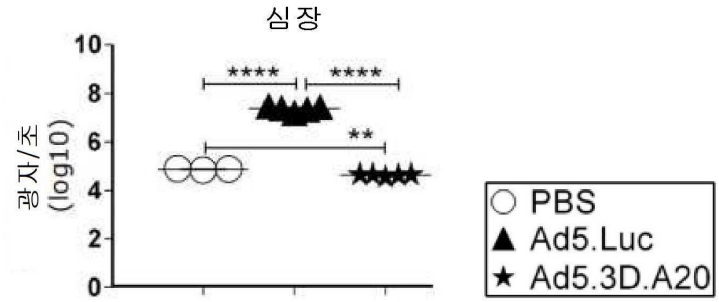
도면5f



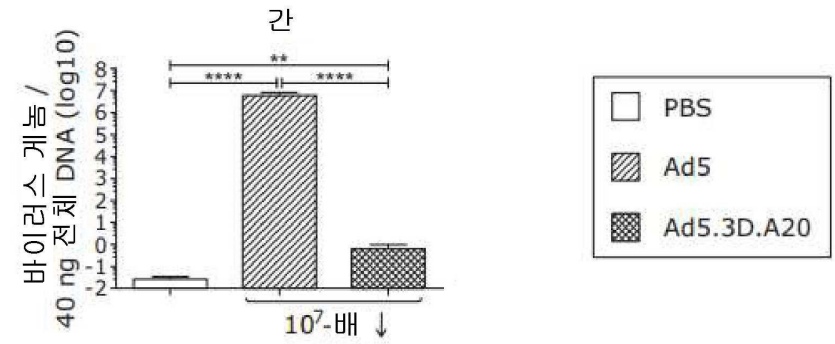
도면5g



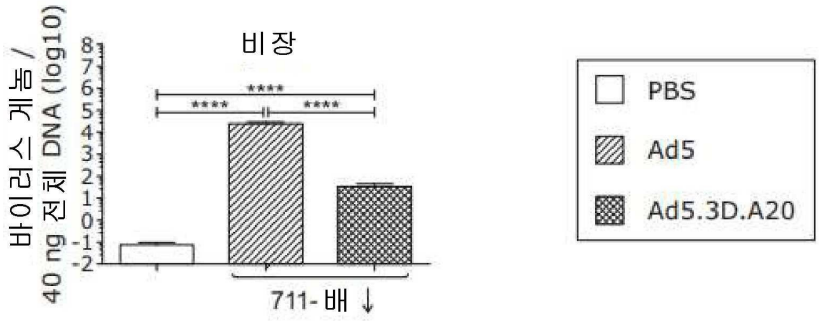
도면5h



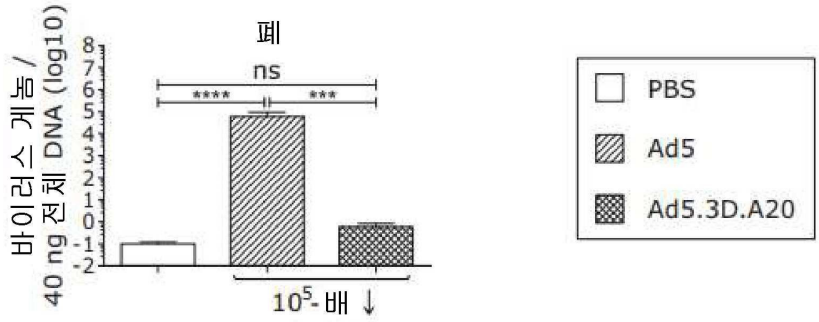
도면6a



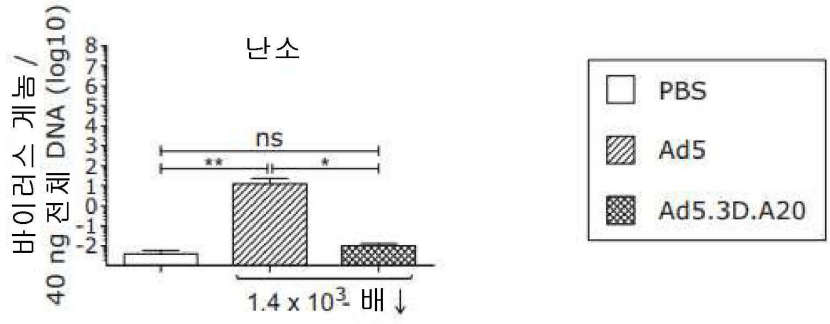
도면6b



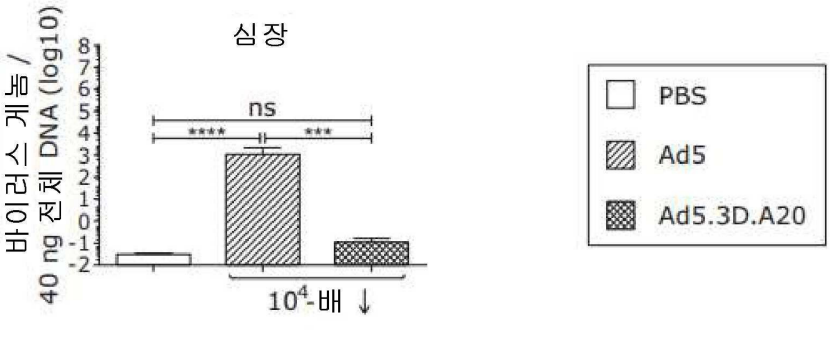
도면6c



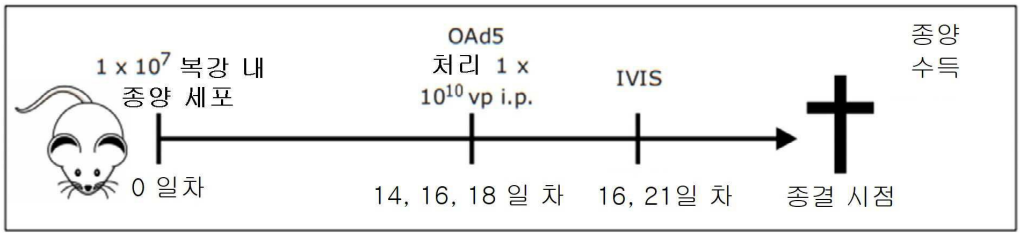
도면6d



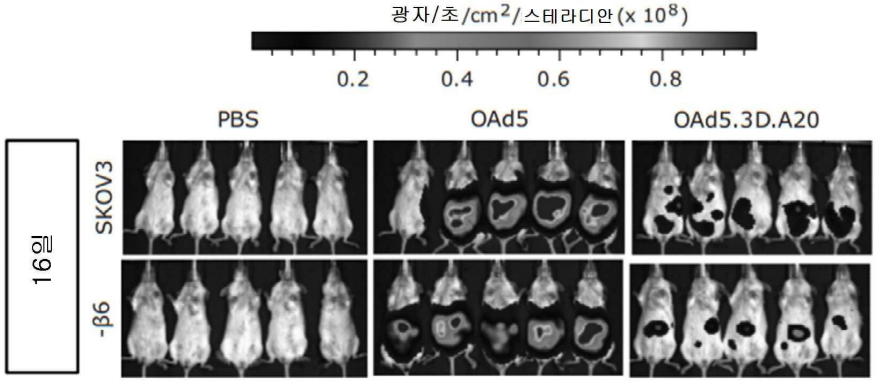
도면6e



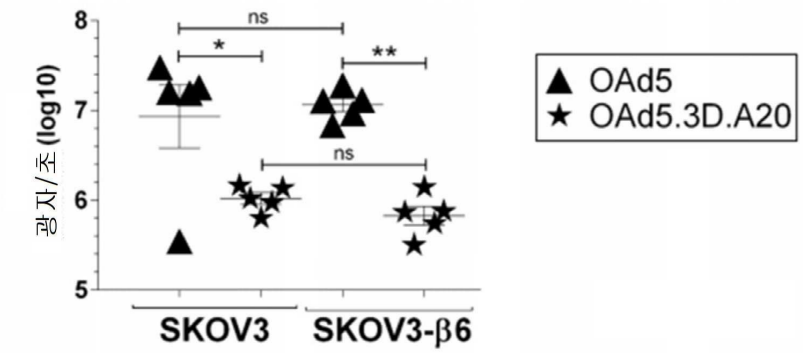
도면7a



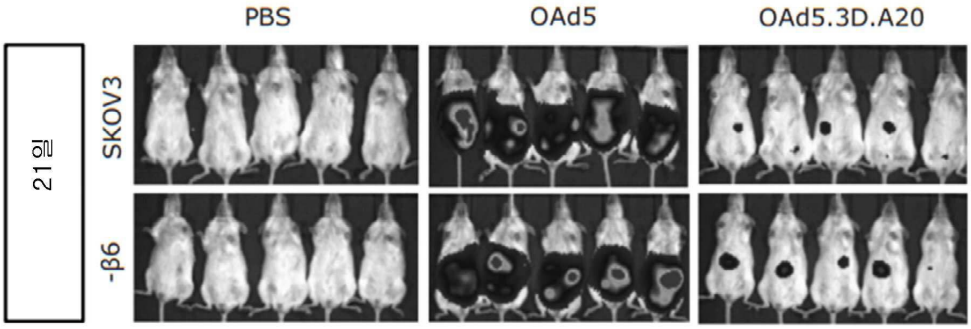
도면7b



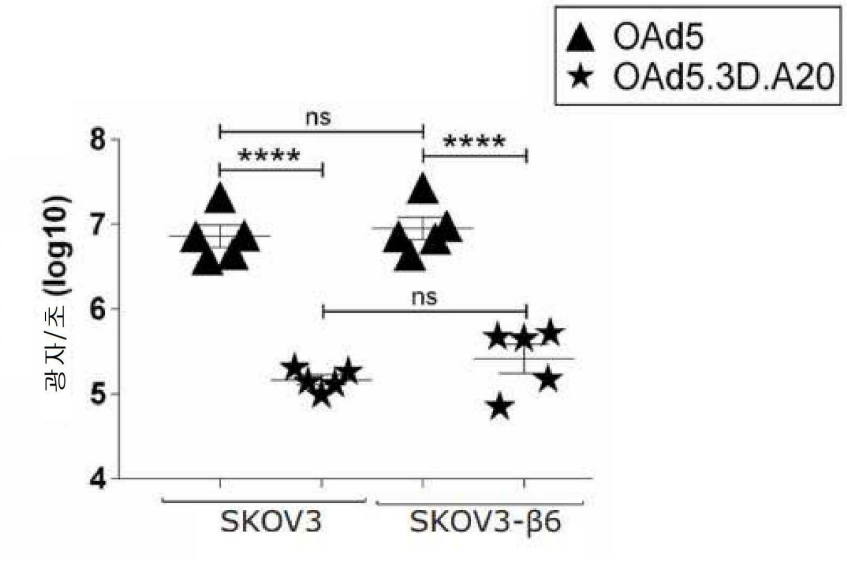
도면7c



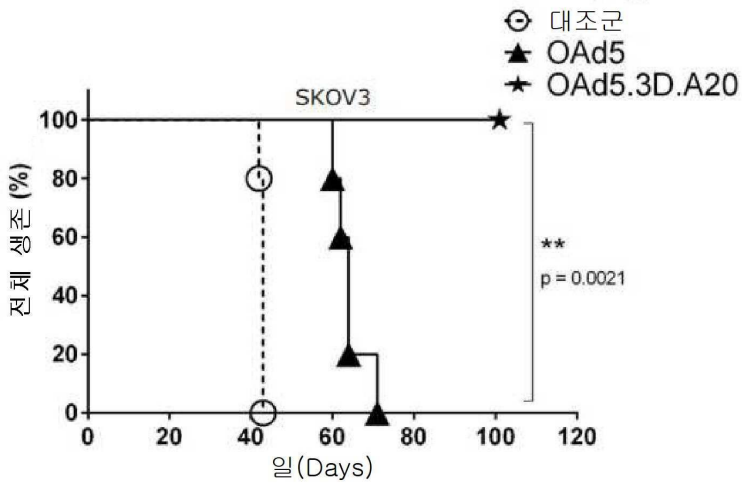
도면7d



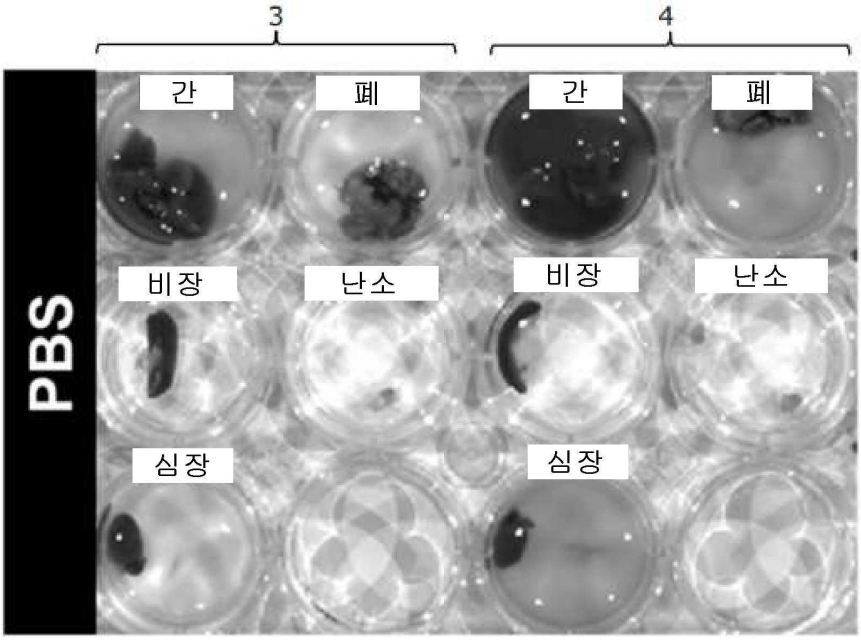
도면7e


OAd5
OAd5.3D.A20
ns
****
****
ns
광자/초 (log10)
8
7
6
5
4
SKOV3
SKOV3-β6

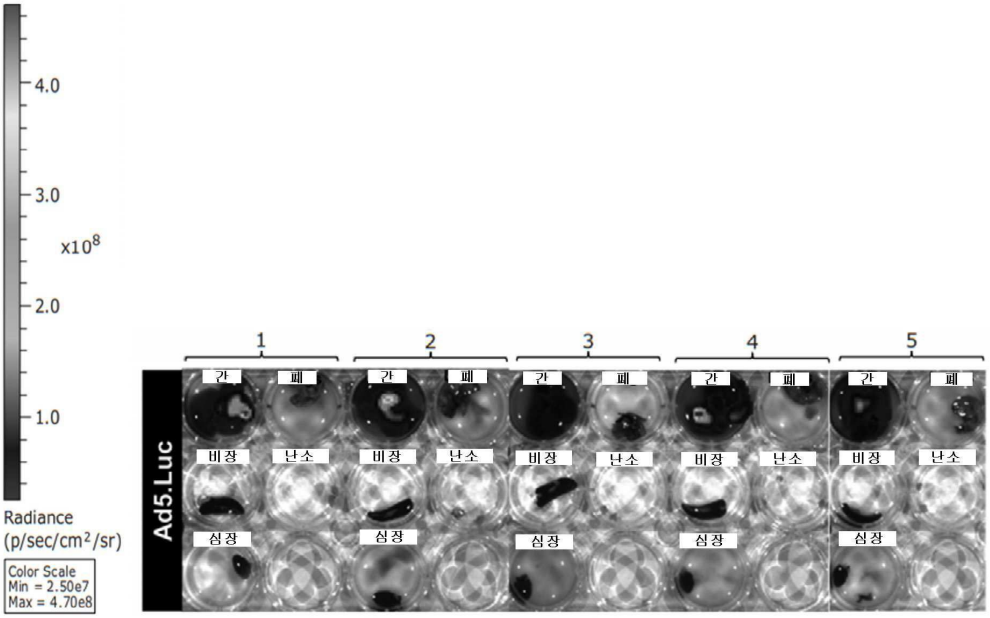
도면7f


대조군
OAd5
OAd5.3D.A20
SKOV3
전체 생존 (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
일(Days)
**
p = 0.0021

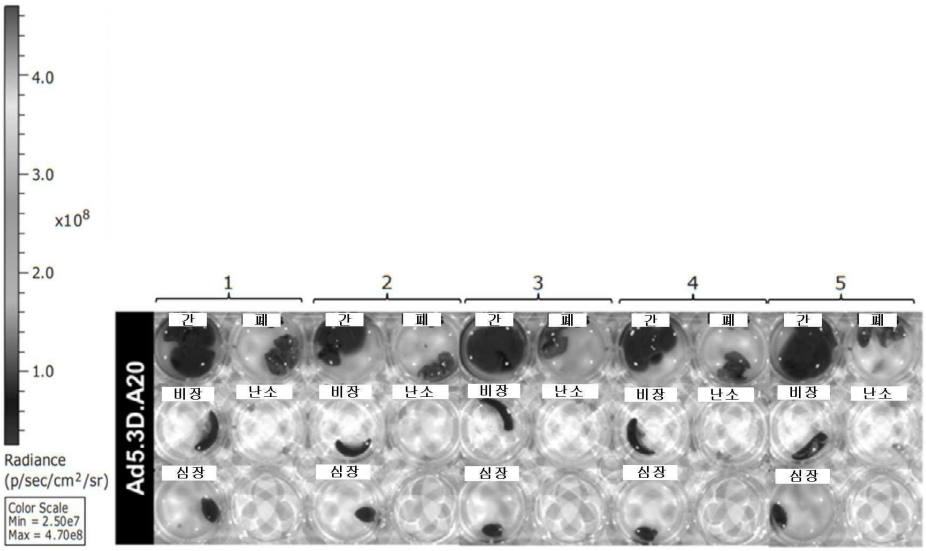
도면8a


3
4
PBS
간
폐
간
폐
비장
난소
비장
난소
심장
심장

도면8b


4.0
3.0
x10^8
2.0
1.0
Radiance
(p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min = 2.50e7
Max = 4.70e8
1
2
3
4
5
Ad5.Luc
간
폐
비장
난소
심장

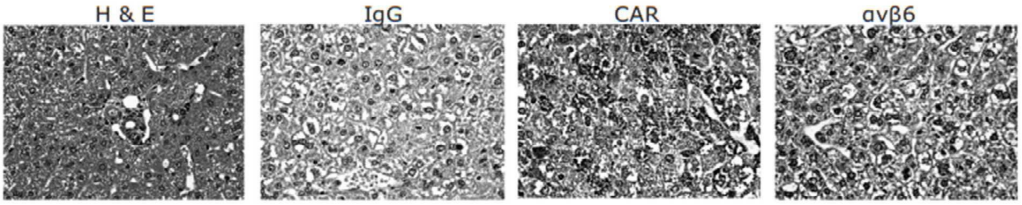
도면8c



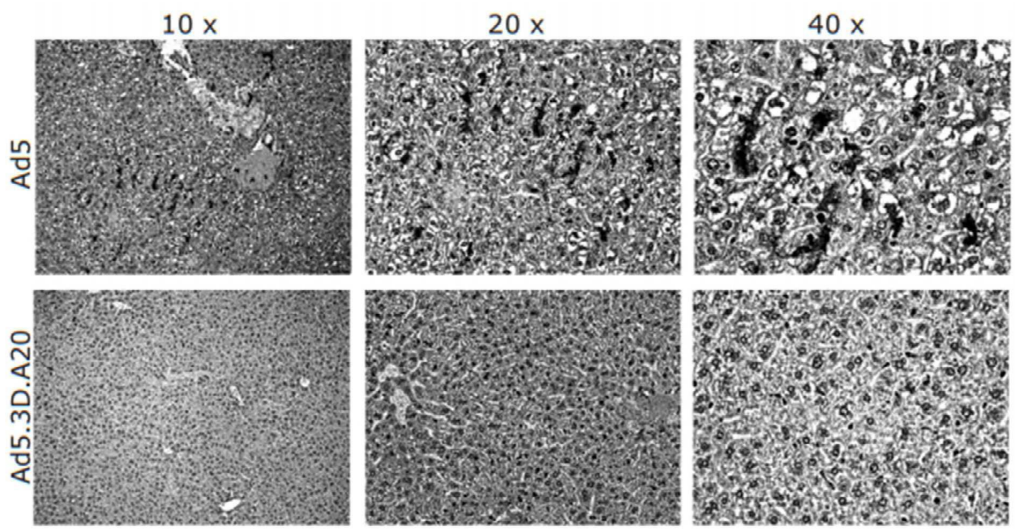
도면8d

탈체 형광에서의 배수적 감소 vs. ad5 그룹					
그룹	간	비장	폐	난소	심장
Ad5.3D.A20	13 300	9230	3700	1100	573

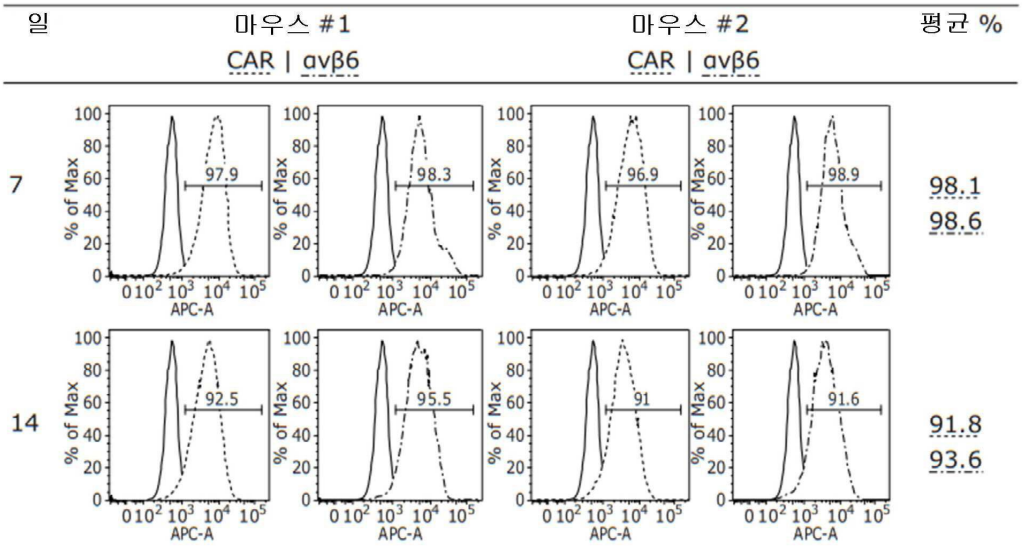
도면9a



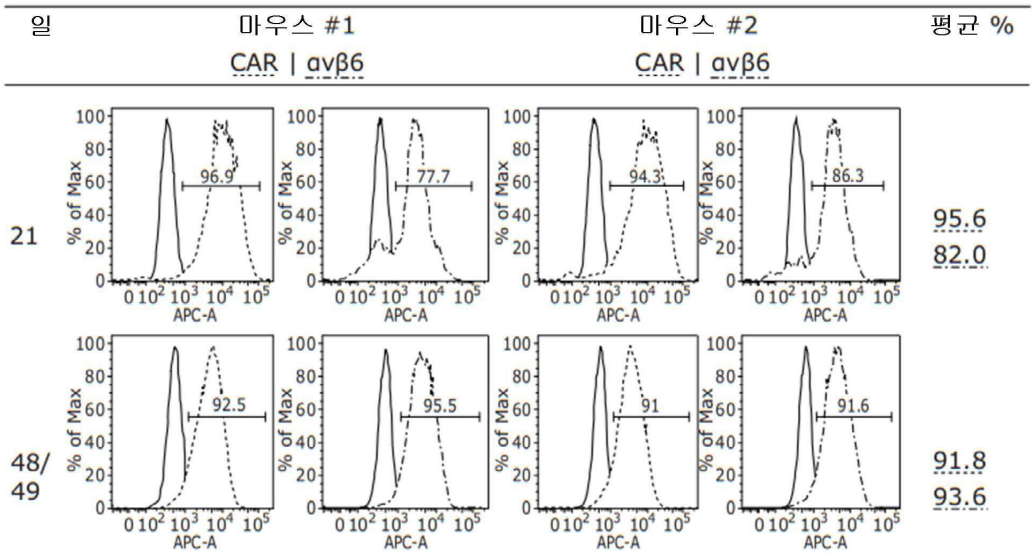
도면9b


10 x
20 x
40 x
Ad5
Ad5.3D.A20

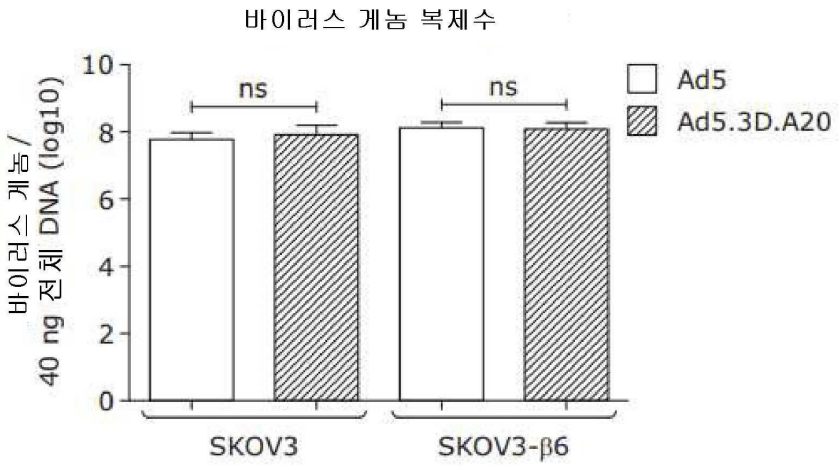
도면10a


일
마우스 #1
CAR | αvβ6
마우스 #2
CAR | αvβ6
평균 %
7
97.9
98.3
96.9
98.9
98.1
98.6
14
92.5
95.5
91
91.6
91.8
93.6
% of Max
APC-A

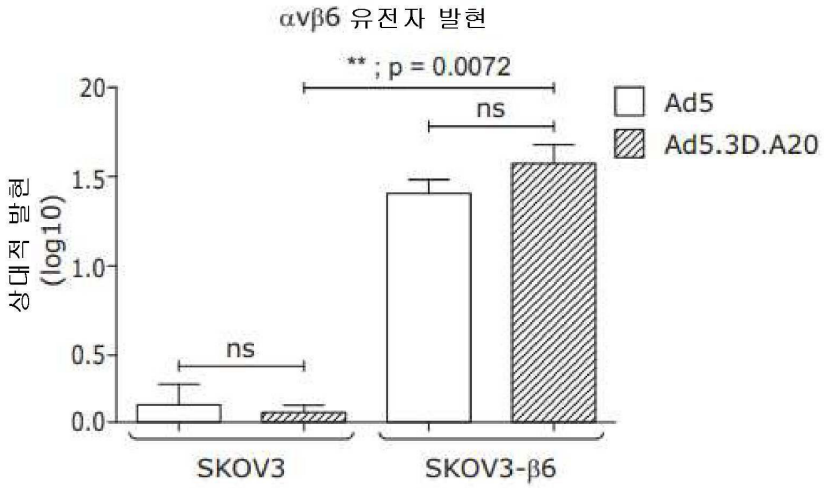
도면10b



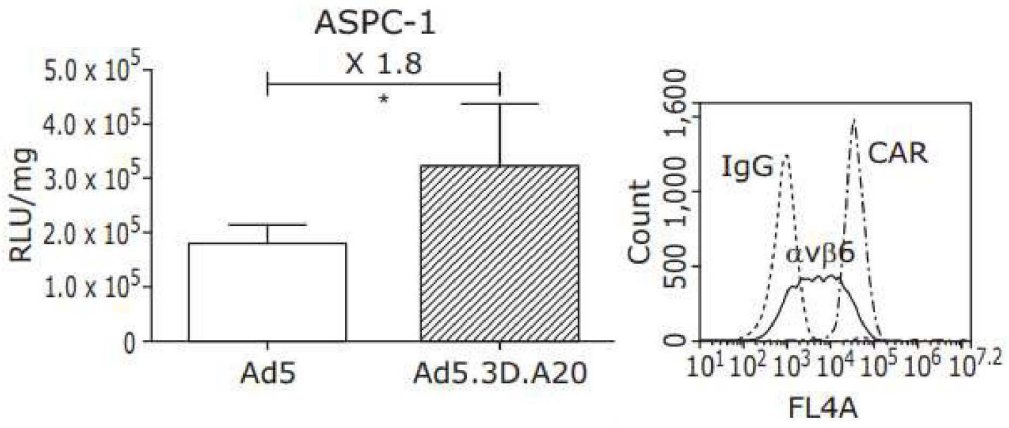
도면11a



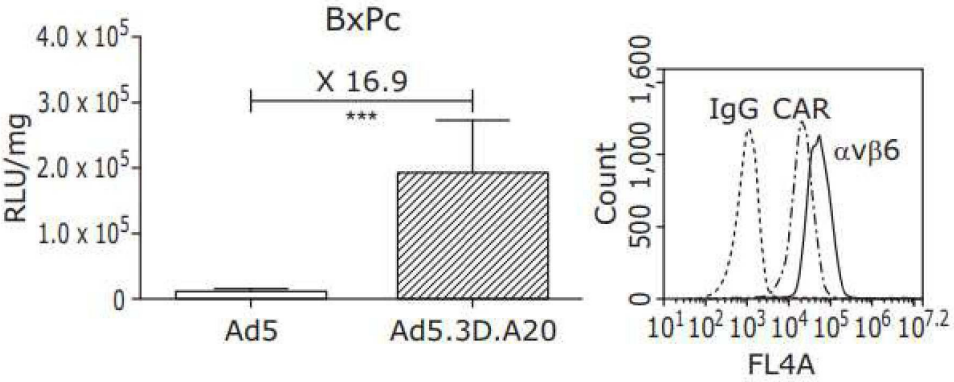
도면11b



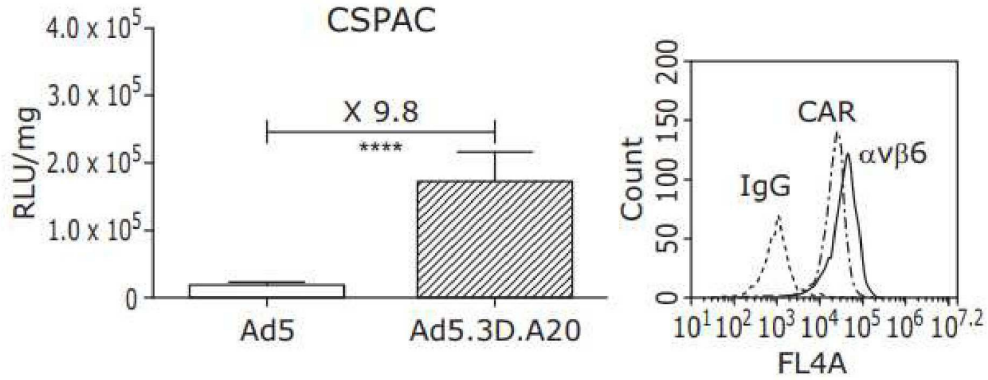
도면12a



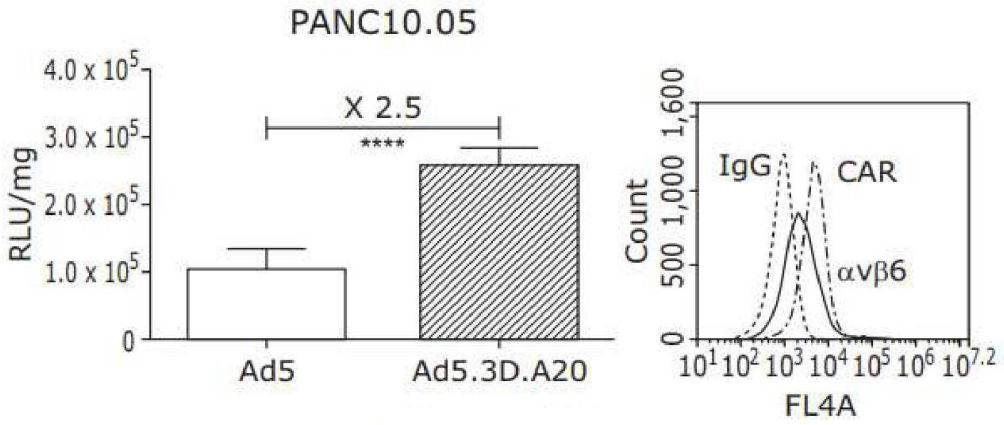
도면12b



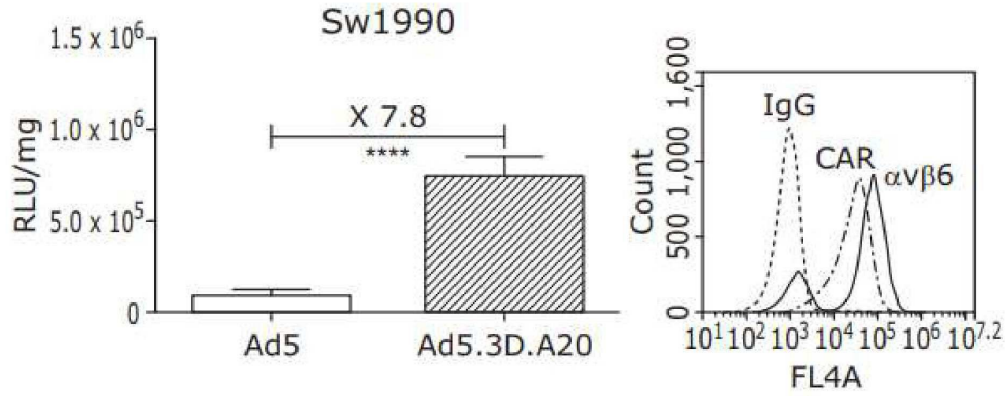
도면12c



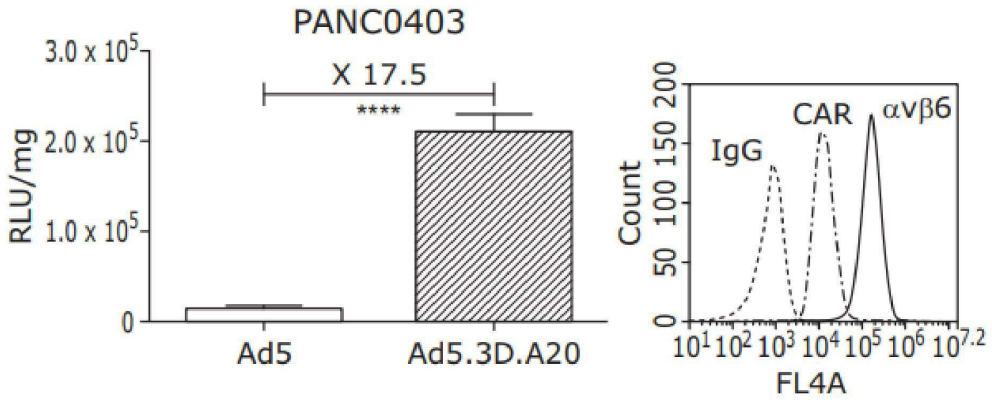
도면12d



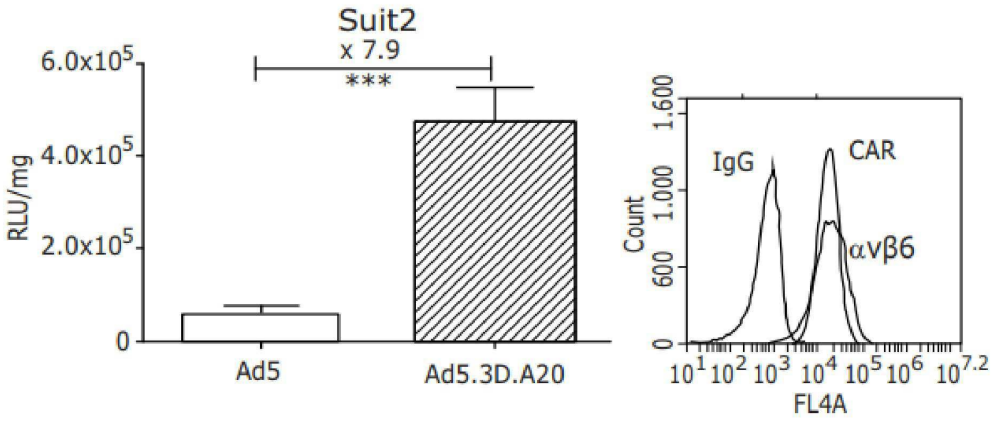
도면12e



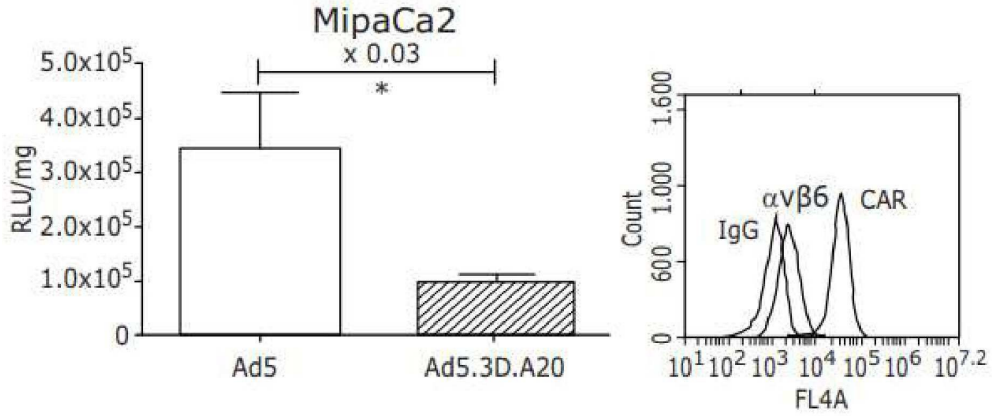
도면12f



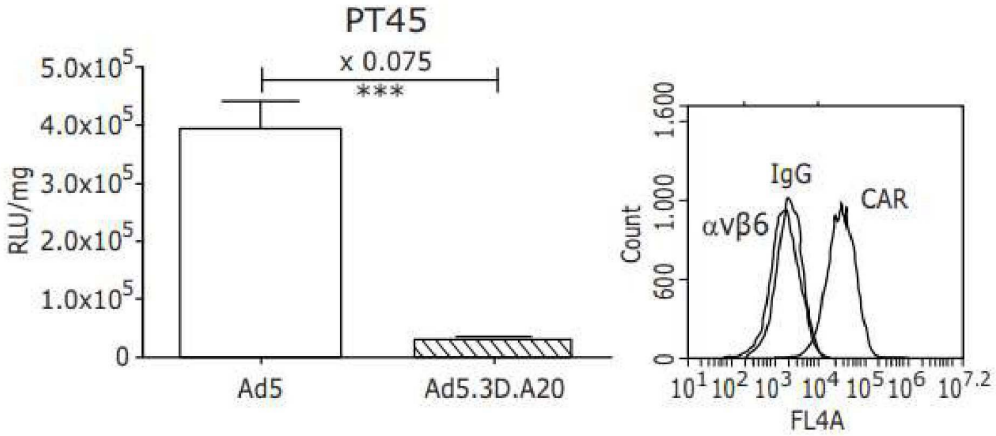
도면12g



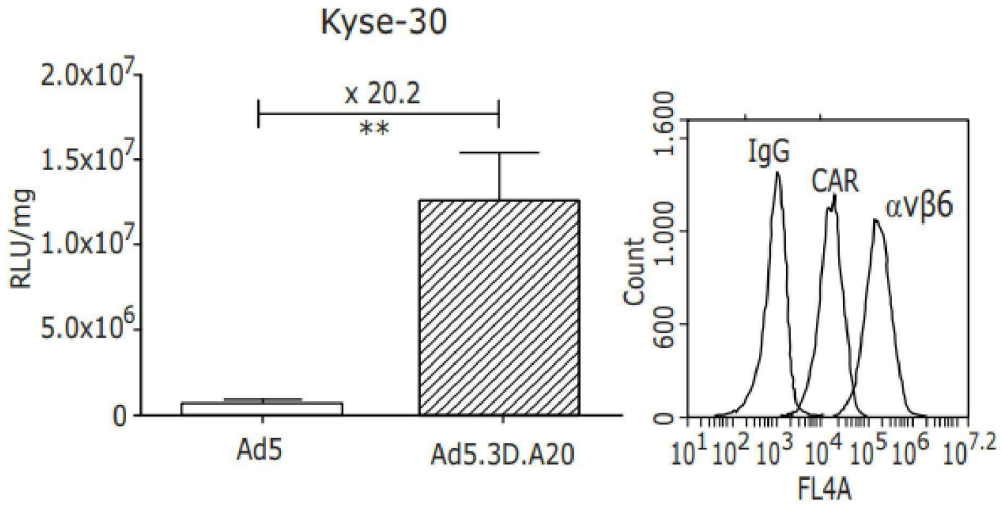
도면12h



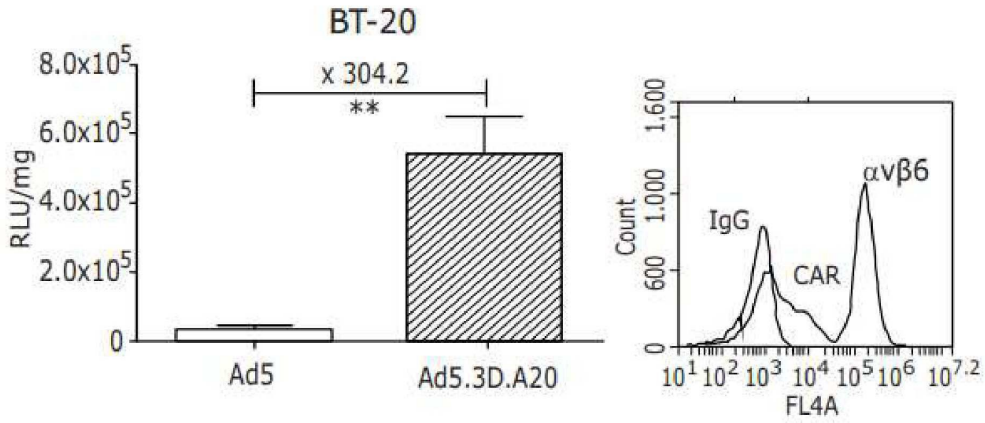
도면12i



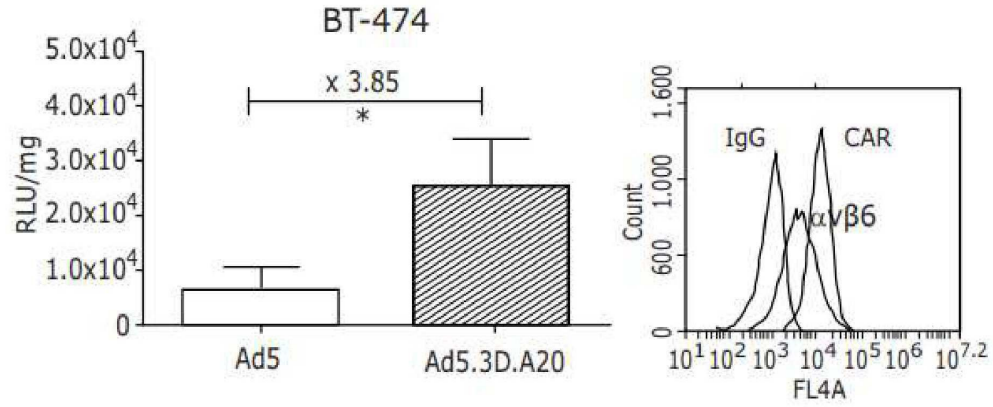
도면13



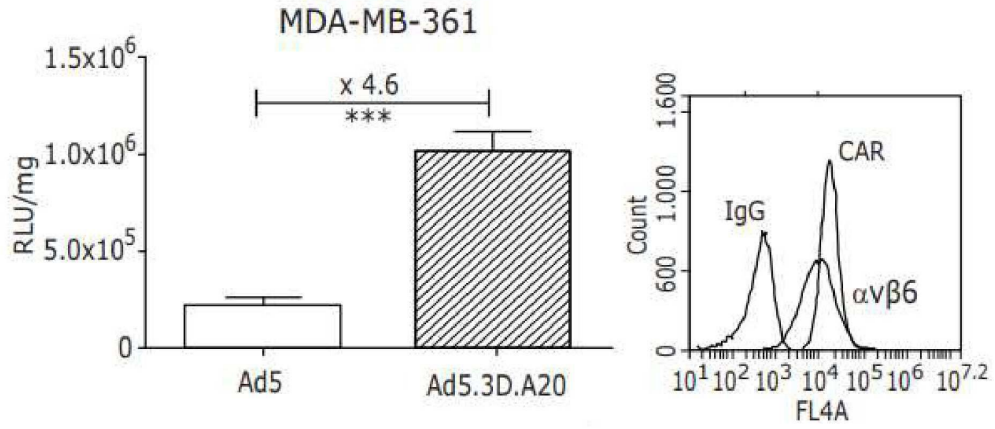
도면14a



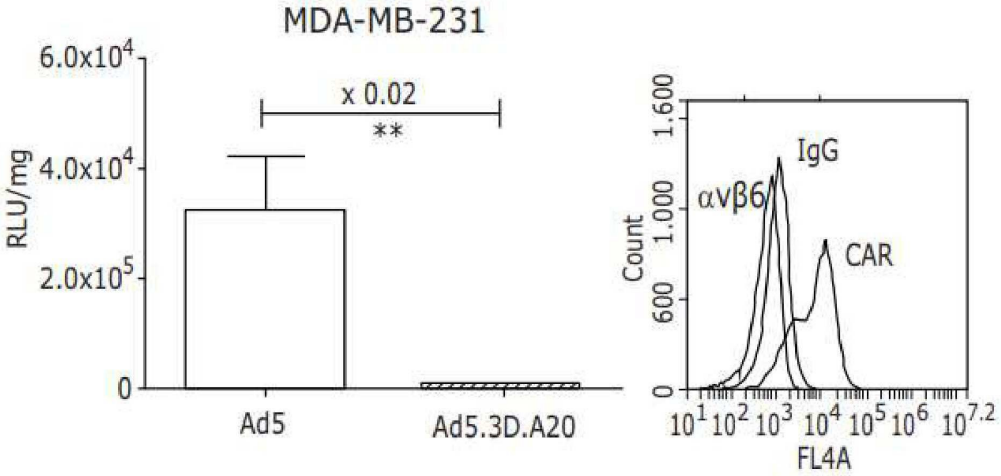
도면14b



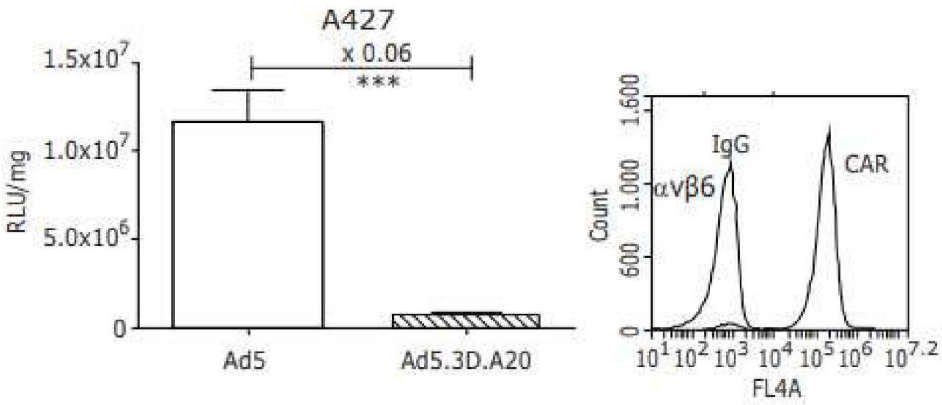
도면14c



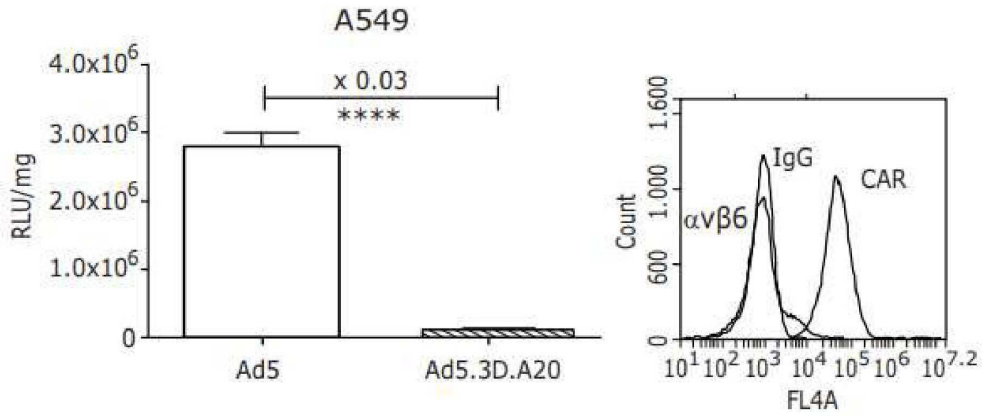
도면14d



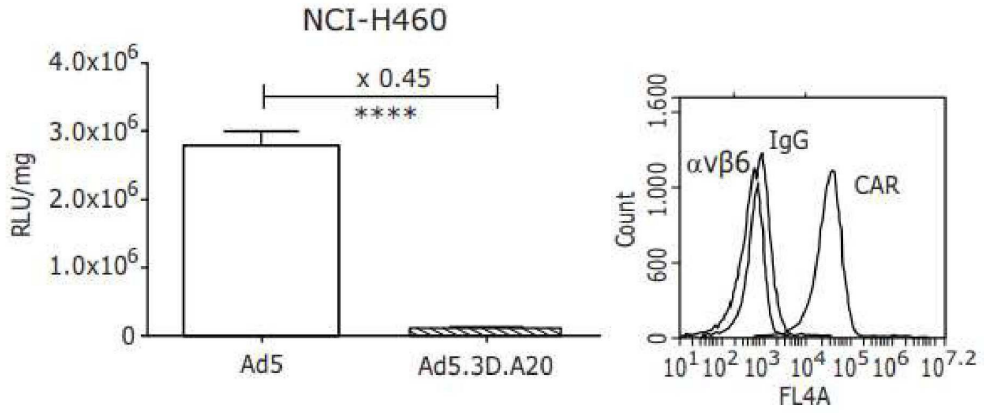
도면15a



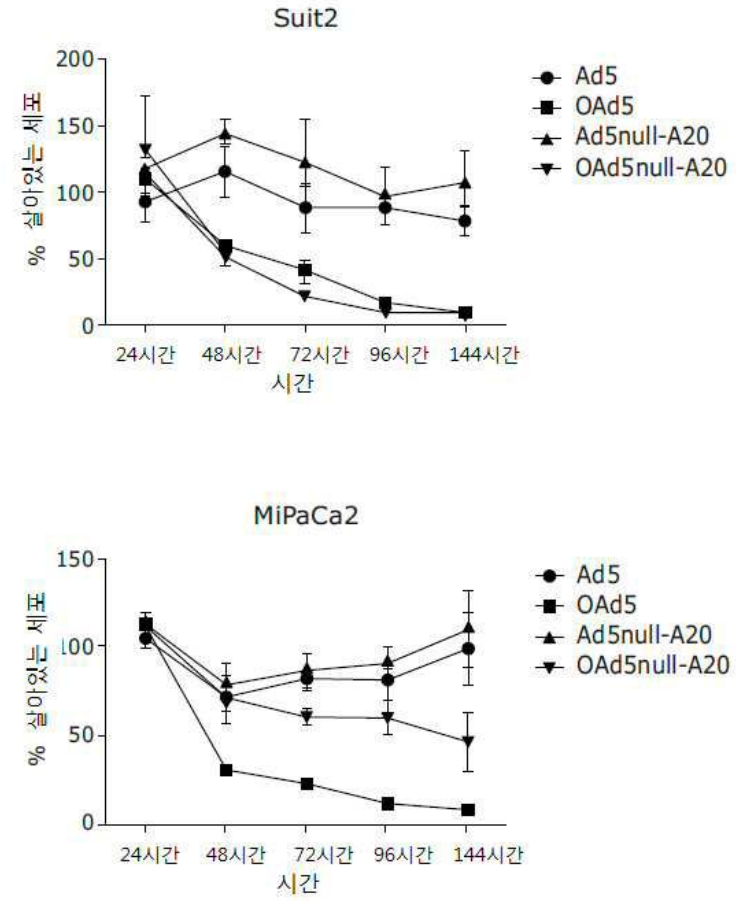
도면15b


A549
x 0.03
****
RLU/mg
4.0x10^6
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
Ad5
Ad5.3D.A20
Count
1.600
1.000
600
0
IgG
CAR
αvβ6
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7.2
FL4A

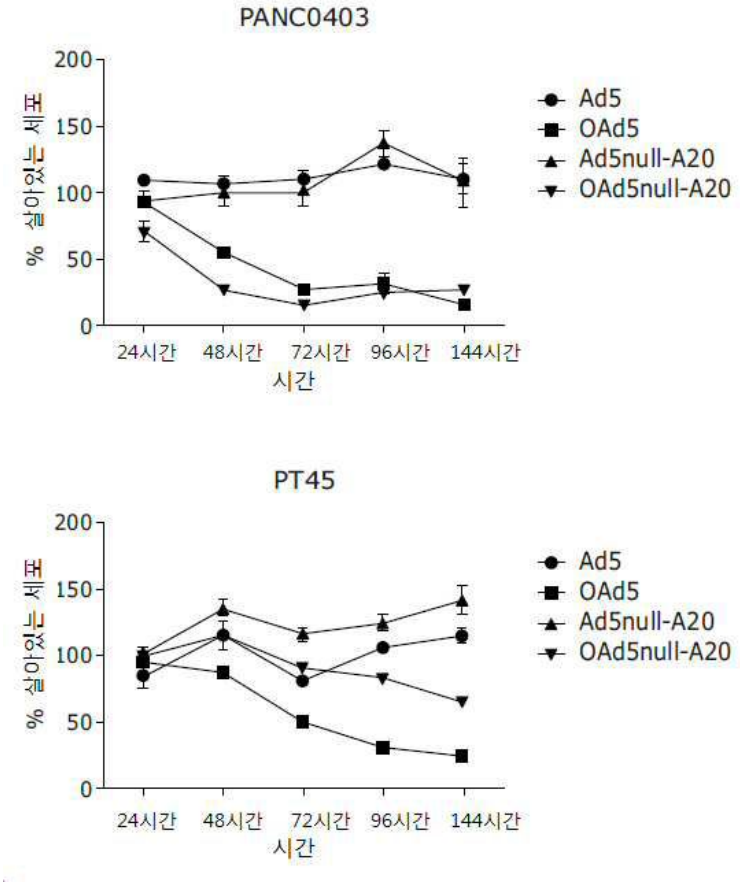
도면15c


NCI-H460
x 0.45
****
RLU/mg
4.0x10^6
3.0x10^6
2.0x10^6
1.0x10^6
0
Ad5
Ad5.3D.A20
Count
1.600
1.000
600
0
IgG
CAR
αvβ6
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7.2
FL4A

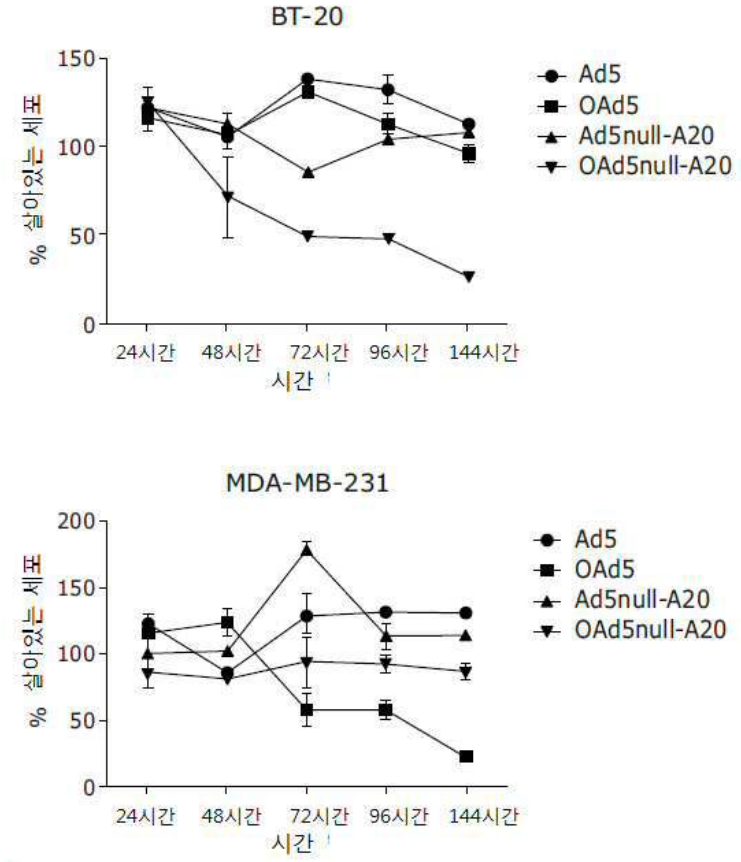
도면16a


Suit2
% 살아있는 세포
200
150
100
50
0
24시간
48시간
72시간
96시간
144시간
시간
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20
MiPaCa2
% 살아있는 세포
150
100
50
0
24시간
48시간
72시간
96시간
144시간
시간
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20

도면16b


PANC0403
% 살아있는 세포
200
150
100
50
0
24시간
48시간
72시간
96시간
144시간
시간
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20
PT45
% 살아있는 세포
200
150
100
50
0
24시간
48시간
72시간
96시간
144시간
시간
Ad5
OAd5
Ad5null-A20
OAd5null-A20

도면16c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> University College Cardiff Consultants Limited

<120> Modified Adenoviruses

<130> 0277P/WO

<150> GB1802539.5

<151> 2018-02-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 1

Asn Ala Val Pro Asn Leu Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys

1 5 10 15

Val Ala Arg Thr

20