



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0113953  
(43) 공개일자 2013년10월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/385* (2006.01) *A61K 47/42* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7033163
- (22) 출원일자(국제) 2011년05월20일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년12월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/037327
- (87) 국제공개번호 WO 2011/146828  
 국제공개일자 2011년11월24일
- (30) 우선권주장  
 61/347,336 2010년05월21일 미국(US)
- (71) 출원인  
 유니버시티 오브 마이애미  
 미국, 플로리다 33124, 코랄 게이블즈, 슈트 327,  
 맥스 오로비즈 빌딩, 1507 레반트 에버뉴
- (72) 발명자  
 포드크, 애크하드, 알.  
 미국, 플로리다 33133, 코코넛 그로브, 1720 에스  
 파놀라 드라이브
- (74) 대리인  
 허용록

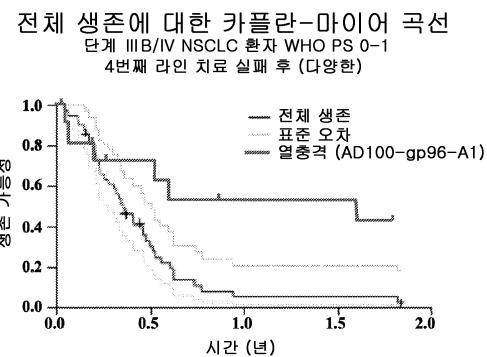
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 암 치료

### (57) 요 약

세포-기초 백신이 암 환자의 생존을 연장한다. 백신은 HLA A1 및 gp96-Ig(소포체 잔류신호, KDEL이 인간 IgG1의 Fc-부분으로 대체된 인간 gp96)으로 트랜스펙션된 방사선 조사된 배양된 폐 선암 세포(AD100)의 일정 양을 포함하고, 진전되거나, 재발되거나, 또는 전이된 NSCLC를 앓고 있는 환자에게 피내 주사하였다. 백신의 투여가 플라시보로 처리된 유사한 환자에 비해 환자의 평균 생존 시간을 증가시켰다. 더구나, 백신에 대한 환자의 면역 반응(T 세포에 의한 항원-유도된 인터페론 감마 생성)은 생존 기간과 상관관계가 있었다.

대 표 도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

인간 대상에서 암을 치료하기 위한 복수의 숙주 세포를 포함하는 백신의 용도로서, 각각의 숙주 세포가 적어도 하나의 종양 항원 및 각각의 숙주세포로부터 분비되도록 개질된 열충격 단백질을 공-발현하는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 대상의 생존 기간이 동일 유형 및 동일 단계의 암을 갖는 다른 대상의 예상 생존 시간 보다 증가되는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 암세포인 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 인간 대상의 암이 폐암이고, 상기 숙주 세포는 폐암 세포인 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 폐암이 비소세포성 폐암이고, 상기 숙주 세포가 비소세포성 폐암 세포인 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 대상에 대하여 동종이계인 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 방사선 조사되는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 백신이 피내 투여되는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 백신이 하루에 대상의 피부의 다중 부위에 투여되는 것을 특징으로 하는 용도.

## 명세서

### 기술분야

- [0001] 본 출원은 5월 21일 출원된 미국가출원 제 61/347,336 호에 대하여 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 참고로 그 전체가 포함된다.
- [0002] 연방 후원 연구에 대한 진술
- [0003] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 지원되는 승인번호 P01 CA109094 의 정부 지원으로 행해진 것이다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 가진다.
- [0004] 본 발명은 일반적으로 의약, 종양학 및 면역학 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 세포-기초 백신을 사용하여 비소세포성 폐암(NSCLC) 환자의 수명을 연장하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [0005] 많은 진전에도 불구하고, 암은 선진국에서 사망과 이환률의 주된 원인들 중의 하나로 남아있다. 현재 종양형성

의 분자적 기전에 대하여 많은 것이 밝혀졌지만, 대부분의 공격적인 종양의 표준 치료법은 계속하여 외과 수술, 화학요법, 및 방사선요법이다. 점점 더 성공하고 있지만, 이들 각각의 치료는 여전히 수많은 바람직하지 않은 부작용을 일으킨다. 많은 다양한 유형의 암 중, NSCLC가 가장 흔하고 치명적인 것 중 하나이다.

[0006] 미국에서 NSCLC의 연간 발병률은 135,000 명(모든 유형의 폐암 환자 총 170,000명 중)이 넘는다. 전이되거나 재발한 후, NSCLC는 5년 생존률이 5% 미만(<5%)으로 거의 균일하게 치명적이다. 폐암에 의한 연간 사망률은 결장암, 유방암 및 전립선암 조합보다 높다. NSCLC 질환을 화학요법으로 치료한 결과는 나쁘다. III 상 시험은 전형적으로 15% 내지 30%의 반응률을 나타내었고, 생존 중앙값은 1년 미만이었다. 최선의 대중치료와 화학요법 사이에서 전이 NSCLC 환자를 무작위로 선정하여 실시한 임상시험의 최근의 메타 분석 결과는 생존에서의 평균 잠재적 이득은 단지 6주였다. NSCLC에 대하여 많은 새로운 약물과 그의 조합들이 최근에 보고되었지만, 이들 요법은, 10% 미만(<10%)의 환자에 대해서만 완전한 반응을 나타내고 생존에 아주 적거나 그다지 대단하지 않은 영향을 미친다. 보다 양호한 생존과 관련된 인자는 III 기 질병(IV기 질병 대), 체중 감소 없음, 양호한 전신 상태(performance status) 상태, 정상 LDH, 보다 적은 전이 부위, 필수 기관, 예를 들어 뇌, 수막, 골수 및 간으로의 전이 없음, 및 보다 긴 재발 간격을 포함한다. 분명히, 효과적인 치료를 위해서는 혁신적인 전략이 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 세포-기초 백신이 암 환자의 생존을 연장하고, 병의 진행을 감소시킬 수 있다는 발견에 관한 것이다. 이러한 발견은, HLA A1 및 gp96-Ig(소포체 잔류신호, KDEL이 인간 IgG1의 Fc-부분으로 대체된 인간 gp96)으로 트랜스펙션된(transfected) 배양된 폐 선암 세포(AD100)를 일정 용량으로 포함하는 백신을 방사선 조사하고 (irradiated), 진전되거나, 재발되거나, 또는 전이된 NSCLC를 앓고 있는 환자에게 피내주사 하는 것으로 이루어진다. 결과는 플라시보로 처리된 유사한 환자의 평균 생존 기간과 비교하여 백신의 투여가 환자의 평균 생존 기간을 증가시킴을 보였다. 더구나, 백신에 대한 환자의 면역 반응은 생존 기간과 상관관계가 있었다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명의 일측면은 인간 대상에서 암을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 대상에 복수의 숙주 세포를 포함하는 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 각각의 숙주 세포는 적어도 하나의 종양 항원 및 각각의 숙주 세포로부터 분비되도록 개질된 열충격 단백질을 공-발현한다(co-expressing). 이 방법에서, 대상의 생존 기간이 같은 유형과 같은 단계의 암을 갖는 다른 대상에서 예상되는 생존 기간보다 증가될 수 있었다. 이 방법은 백신의 투여 전 및/또는 투여 후 대상의 혈중 CD8 T 림프구를 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0009] 숙주 세포는 암세포(예를 들어, 대상의 암과 같은 세포 유형 및/또는 등급에서 발생한 세포주)일 수 있다. 인간 대상의 암이 폐암인 경우, 숙주 세포는 폐암 세포일 수 있다. 한 예로서, 폐암이 비소세포성 폐암인 경우, 숙주 세포는 비소세포성 폐암 세포일 수 있다. 숙주 세포는 대상에서 유래하거나, 대상에 대한 동종이계일 수 있고, 백신을 투여하기 전에 를 들어, 방사선 조사가 될 수 있다. 백신은 피내 투여될 수 있다. 한 예에서, 백신은 하루 안에 대상의 피부의 다중 부위에 투여된다.

[0010] 본 발명의 다른 측면은 인간 대상에서 암 세포를 치료하기 위하여 복수의 숙주 세포를 포함하는 백신의 용도에 관한 것으로서, 각각의 숙주 세포는 적어도 하나의 종양 항원과 각각의 숙주 세포로부터 분비되도록 개질된 열충격 단백질을 공-발현한다. 이 용도에서, 대상의 생존 기간은 같은 유형과 같은 단계의 암을 갖는 다른 대상에서 예상되는 생존 기간과 비교하여 증가될 수 있다. 인간 대상의 암이 폐암인 경우, 숙주 세포는 폐암 세포일 수 있다. 한 예로서, 폐암이 비소세포성 폐암인 경우 숙주 세포는 비소세포성 폐암 세포일 수 있다. 숙주 세포는 대상에서 유래하거나, 대상에 대한 동종이계일 수 있고, 백신을 투여하기 전에 (를 들어 방사선 조사가 될 수 있다. 그리고, 백신은, 예를 들어 하루 안에 대상 피부의 다중 부위에, 피내 투여될 수 있다.

[0011] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 갖는 자에 의하여 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 생물학적 용어의 일반적으로 이해되는 정의는 Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5<sup>th</sup> edition, Springer-Verlag: New York, 1991; 및 Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994에서 발견될 수 있다.

[0012] 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료들이 본 발명의 실시 및 시험에서 사용될 수 있지만,

적절한 방법 및 재료가 하기에 기술된다. 본 명세서에서 언급된 모든 특허 문헌 및 공보물은 그 전체가 참조로 포함된다. 충돌하는 경우에는, 정의들을 포함하여 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 하기에 기술된 특정한 실시 형태들은 단지 예시적이며, 제한되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 다른 연구의 기준 데이터에 덧씌운 를 보여주는 카플란-마이어 곡선(Kaplan-Meier curve)의 그래프이다. 체크 표시된 시점에서 살아있는 환자를 나타낸다.

도 2는 AD100 세포에 반응하여 말초 혈액 CD8+ T 세포에 의한 IFN- $\gamma$  생산과 전체 생존(overall survival) 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

도 3은 IFN- $\gamma$  ELIspots에서 검출되는 CD8 CTL 빈도(좌측), 혈액에서의 FoxP3(+) CD4 세포의 빈도(중간), 및 생존 중앙값(우측)을 보여주는 일련의 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 암 치료에 관한 방법 및 조성물을 포함한다. 아래 기술된 바람직한 실시 형태는 이들 조성물 및 방법의 조정을 예시한다. 그럼에도 불구하고, 이들 실시 형태의 기재로부터, 본 발명의 다른 면이 하기 제공된 기술에 기초하여 이루어지고/이루어지거나 실시될 수 있다.

### [0015] 생물학적 방법

[0016] 통상적인 면역학적 기술 및 분자 생물학적 기술을 포함하는 방법들이 본 명세서에 기술된다. 면역학적 방법은 일반적으로 본 분야에 공지되어 있으며, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., John Wiley & Sons, New York)과 같은 방법론적 문헌에 기술되어 있다. 분자 생물학적 기술은 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; 및 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York과 같은 문헌에 상세히 기술되어 있다. 세포 배양 기술은 일반적으로 본 분야에 잘 알려져 있으며, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4<sup>th</sup> edition, by R Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2000; 및 General Techniques of Cell Culture, by Maureen A Harrison and Ian F Rae, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994 와 같은 방법론적 문헌에 상세히 기술되어 있다. 단백질 정제의 방법은 Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol. 182, Deutscher M P, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990에 언급되어 있다. 의학적 치료의 일반적 방법은 McPhee and Papadakis, Current Medical Diagnosis and Treatment 2010, 49<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill Medical, 2010; 및 Fauci et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, 17<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill Professional, 2008 에 기술되어 있다.

### [0017] 신생물 질병의 치료

[0018] 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법은 하나 이상의 종양-관련 항원을 발현하고 열충격 단백질(예를 들어, gp96의 분비된 형태)을 분비하는 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상에 투여하여 인간 대상에서 신생물 질환(예를 들어, 암)을 치료하는 데에 유용하다. 인간 대상은 남자, 여자, 성인, 어린이, 노인(65세 이상), 및 다른 질병을 갖는 대상일 수 있다. 특히 바람직한 대상은 화학요법, 방사선요법, 수술, 및/또는 생물학적 제제로 치료 후 질환이 진전된 대상이다. 이 기술은 폐 조직에서 발생한 암(예를 들어, NSCLC)의 치료에 특히 효과적이지만, 본 명세서에 기술된 백신 치료에 민감한 암은 어느 것이라도 목표가 될 수 있다. 다른 유형의 암으로는 방광, 유방, 결장, 직장, 자궁내막, 자궁경부, 신장, 혈액(예를 들어, 백혈병 및 럼프종), 피부(예를 들어, 흑색종), 췌장, 전립선, 갑상선, 고환 및 난소에서 발생한 암을 포함한다.

[0019] 암 환자 치료의 성공여부는 예상되는 생존기간의 연장, 항-종양 면역 반응 유도, 또는 암의 특정 특성의 개선으로 평가될 수 있다. 될 수 있는 암의 특성의 예는 종양 크기(예를 들어, T0, Tis, 또는 T1-4), 전이의 상태(예를 들어, M0, M1), 관찰 가능한 종양의 수, 결절침범(node involvement)(예를 들어, N0, N1-4, Nx), 등급(즉, 등급 1, 2, 3, 4), 단계(예를 들어, 0, I, II, III, 또는 IV), 세포 상에 또는 신체 유체 안의 특정 마커의 존재 또는 농도(예를 들어, AFP, B2M, 베타-HCG, BTA, CA 15-3, CA 27.29, CA 125, CA 72.4, CA 19-9, 칼시토닌,

CEA, 크롬그라이닌 A, EGFR, 호르몬 수용체, HER2, HCG, 면역글로불린, NSE, NMP22, PSA, PAP, PSMA, S-100, TA-90, 및 티로글로불린), 및/또는 연관된 병리학(예를 들어, 복수 또는 부종) 또는 증상(예를 들어, 악액질, 열, 거식증, 또는 통증)을 포함한다. 퍼센트로 측정할 수 있다면, 개선은 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90%(예를 들어, 생존, 또는 종양의 부피 또는 선형 치수)일 수 있다.

#### [0020] 백신 조성물

[0021] 본 발명은 하나 이상의 종양-관련 항원을 발현하고 열충격 단백질(예를 들어, gp96의 분비된 형태)을 분비하는 세포를 활성 성분으로서 포함하거나 사용하는 약제학적 조성물 및 약제를 포함한다. 세포는 환자로부터 외식된 (explanted) 종양으로부터 발달된 하나 이상의 인간 종양 세포주(예를 들어, 단일 종양 세포주, 또는 동일 암 유형 또는 상이한 암 유형의 다중 종양 세포주)로부터 유래된 것일 수 있고, 암에서 유래되지 않았지만, 하나 이상의 종양-관련 항원을 발현하도록 조작된 인간 세포주(예를 들어, HEK293)일 수 있다. 세포에는, 열충격 단백질이 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 동안 분비되게 하면서, 그들의 증식을 방지하기 위하여 방사선이 조사를 들어 될 수 있다. 세포는 또 다른 마커(예를 들어, 인간 MHC 단백질)를 발현하도록 또한 조작될 수 있다. 백신에서 사용하기 위한 세포는 냉동 저장되고 멸균된 약제학적으로 허용가능한 액체, 예를 들어 USP 등급 식염수 또는 완충 염 용액에서 사용 바로 전에 재구성될 수 있다. 약제학적 제제뿐만 아니라 약제학적으로 허용가능한 담체의 목록을 이 기술분야에서 표준 교과서인, Remington's Pharmaceutical Sciences와 USP/NF에서 찾아볼 수 있다. 다른 물질이 조성물에 첨가될 수 있고(예를 들어, 인간 혈청 알부민 및/또는 DMSO) 다른 단계가 조성물을 안정화 및/또는 보존하기 위해서, 및/또는 대상에 이들 투여를 용이하게 하기 위하여 이루어질 수 있다.

#### [0022] 백신 투여

[0023] 본 발명의 조성물은 모든 적절한 기술에 의해서도 동물 또는 인간에 투여될 수 있다. 전형적으로, 이러한 투여는 비경구적(예를 들어, 피내, 피하, 근육내, 또는 복강내 도입)일 것이다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 실시 형태에서, 바늘 크기는 세포의 일체성을 보호하기 위하여 전단을 최소화하도록 선택되어야 한다(예를 들어, 적용에 따라, 14, 16, 18, 20, 22, 또는 24 게이지 보다 큼). 조성물은 바람직하게는, 다중 부위(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 또는 14개 부위)에서 다중 주사(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 45 또는 50회 주사) 또는 연속적인 주입방법을 들어으로 투여된다.

[0024] 한 예에서, 피부 주사는 국소적 피부 반응의 정도를 감소시키기 위하여 다중 신체 부위에서 수행된다. 정해진 백신 접종일에, 환자는 하나의 주사기로 투여되는 할당된 세포의 총 투여량을 투여받는데 이때 가장 가까운 주사의 바늘 주입으로부터 각각 적어도 약 5 cm 떨어진 가장 끝부분에 투여량(예를 들어, 적어도 0.4 ml, 0.2 ml, 또는 0.1 ml)의 3 내지 5회의 개별 피내 주입이 이루어진다. 이후 백신 접종일에는, 주사 부위가 시계 방향으로 또는 반 시계 방향으로 다른 사지로 순환 변경된다.

#### [0025] 백신 접종의 투여량 및 횟수

[0026] 치료 유효량은 치료되는 동물 또는 인간에서 의학적으로 바람직한 결과를 만들 수 있는 양이다. 본 발명의 조성물의 유효 투여량은 예상되는 생존기간 증가(유사한 환자들의 평균과 비교하여)로 측정되는 환자에서의 임상적 효능 또는 상기 암 특성 중 하나 이상의 개선을 보여주는 양이다. 의료 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 임의의 한 동물이나 인간에 대한 투여량은 대상의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여하려는 특정 조성물, 성별, 투여 시간 및 경로, 종합적인 건강, 및 함께 투여되는 다른 약제를 포함하는 많은 인자들에 의해 좌우된다. 투여당 바람직한 용량은 시험관 내 배양에서 열충격 단백질의 분비 형태가 적어도 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 또는 9000 mg/ml/day로 분비되는 세포의 수이다. 각 투여량에서 세포의 수는 100,000 내지 100,000,000(예를 들어, 약 100,000; 250,000; 500,000; 750,000; 1,000,000, 2,000,000; 5,000,000; 10,000,000; 20,000,000; 50,000,000; 또는 100,000,000+/-20, 10, 또는 5%)개 범위일 수 있다. 투여량은 예로서, 시간당, 하루당, 반주당, 1주당, 2주당, 3주당, 또는 개월당 반복적으로 공급될 수 있다.

[0027] 투여 프로토콜의 한 예로서, 치료를 위해 각 방문시(매주 또는 격주로), 암 및 독성의 임상적 평가가 수행된다. 면역학적 평가를 위한 혈액 샘플은 백신 접종 전에 각 코스의 1일차에 얻어진다. 백신 접종의 제 1 코스가 완료되어 안정한 질병 또는 반응 NSCLC의 증거 및 허용가능한 독성을 갖는 환자는 동일 투여량 및 스케줄로 추가 코스로 치료된다. 동일 투여량 및 스케줄의 제 3 코스는, 제 2 코스 완료시 환자가 안정한 질병 또는 반응 NSCLC

의 증거, 및 허용가능한 독성(자가 면역 <등급 2, 및 다른 신체 계에 대해 등급 ≤2)을 갖는다면, 행해진다.

[0028] 실시예

[0029] 실시예 I-약물

[0030] 명: Ad100-gp96Ig-HLA A1, 짧은 gp96-백신(gp96-Ig 및 HLA A1 트랜스펙션된 NSCLC 세포주). 이 약물은 미국 특허 출원 제 11/878,460 호에 기술되어 있다. 인간 폐 선암 세포주는 폐암 환자의 생체 검사로부터 1994년에 확립되고, AD#100으로 지칭된다. 환자는 74세 백인 남성으로서 1993년에 1차 전이 및 폐 선암의 폐 소결절 및 장 골능의 골 무름에 기인한 골반 통증의 초기 증상을 나타냈다. 배양을 위한 암 세포는 골반 뼈 파괴 부위로부터 골수천자에 의해 얻었다. 환자의 골반을 방사선 요법으로 치료하였으나, 진단 한달 후 환자가 숨졌다. 이 환자로부터 유래된 세포주는 (아래에 기술된) 표준 배지에서 배양하였고 마이코플라즈마, 바이러스 또는 다른 외래성 인자에 의한 오염이 없다. 세포주는 균일하고, 플라스틱에 접착성이고, 대략 26h의 분열 속도로 성장한다. 세포주는 다음의 HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HBV, 아데노바이러스, 폴리오마바이러스(polyomavirus), CMV, EBV, HHV6, HCV, VZV, 파보바이러스 B19, HPV, 및 마이코플라즈마 없는지 시험하고 결정하였다.

[0031] 플라스미드 cDNA 'B45-neo-gp96Ig-HLA A1'으로 트랜스펙션시킨 Ad100을 G418로 선별했다. B45는 캡시드-인코딩 유전자 L1 및 L2를 결실시키고, 추가로 잠재적인 형질전환 유전자 E5, E6 및 E7을 결실시켜 소유두종 바이러스로부터 유래된 벡터이다. 이 벡터는 진핵 cDNAs의 발현을 위한 두 개의 카세트를 함유한다; 이 경우 메탈로티오네인 프로모터로 구동되는 HLA A1 및 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터로 구동되는 gp96-Ig. 셔틀 벡터는 또한 대장균에서 선별하기 위한 β-락타메이즈 유전자 및 트랜스펙션된 Ad100 세포의 G418 선별을 위한 티미딘 키나제 프로모터 하의 네오마이신-저항성 유전자를 함유한다. B45 벡터의 E1 및 E2의 유전자는 플라스미드의 애피좀유사 복제 및 인코딩된 cDNA의 고 수준 발현을 위해 요구되는 두 개의 바이러스 단백질을 인코딩한다. cDNAs의 높은 수준 발현은 인간 β-글로빈 유전자의 비-코딩 부분을 포함함으로써 추가로 향상된다. 백신 세포주는 영구적으로 트랜스펙션되어(어떤 새로운 트랜스펙션도 필요하지 않음) 트랜스펙션된 세포에서 플라스미드-애피좀이 유지되도록 G418에서의 주기적인 재선별 조건 하에 유지된다.

[0032] 특이적 항체를 사용하는 FACS 분석에 의해 인간 HLA A1의 발현을 결정하였다. 백신 접종을 위해 70% 이상의 세포에서 HLA A1을 발현하는 제제(preparations)를 사용하였다. gp96-Ig 융합 단백질의 Ig-부분을 검출하는 효소 면역학적 방법(ELISA)에 의해 gp96-Ig의 발현을 측정하였다.  $10^6$  개의 세포에 의해 24 시간 내에 60ng 이상( $\geq 60ng$ )의 gp96-Ig를 생성하는 세포를 백신 접종에 사용하였다. 멸균 조건하의 GMP 설비에서 세포주를 성장시켰다. 박테리아, 바이러스, 효모, 및 마이코플라즈마의 결여 및 엔도톡신의 농도는 FDA가 규정하고 인정한 방법에 의해 각 배치(batch)에 대하여 결정하였다.

[0033] GIBCO로부터 FCS, IMDM, 트립신 EDTA, HBSS, G418을 얻고 외래성 시약이 없음을 확인하였다. Sigma로부터 DMSO를 얻고, 이는 또한 외래성 인자가 없었다. 인간 혈청 알부민 및 완충된 식염수 용액은 약제학적 등급이었다. 조직 배양 플라스크에서 세포 배치(batch)를 약  $1\sim 5 \times 10^9$  세포수까지 성장시키고, FACS를 이용하여 발현 HLA A1의 존재여부 및 ELISA에 의해 gp96Ig 발현의 존재여부를 시험하였다. 세포들을 수확하고, 세척하여, 4°C에서 완충 식염수+10% DMSO+0.5% 인간 혈청 알부민 중에 재현탁시키고,  $5 \times 10^7/0.5ml$ 로 분취시켜(aliquoted), 4°C에서 코발트-방사선 조사기를 사용하여 12,000rad에서 방사선 조사하였다. 생물학적 및 안전성 분석을 위해 샘플을 회수하였다. 나머지 분취량은 -135°C에서 냉동저장하였다.

[0034] 방사선 조사 후, 백신 세포주가 생물학적 활성을 유지하지만 복제는 되지 않는다는 것을 확인하기 위하여, 12,000rad 방사선 조사 후 AD100-gp96-Ig-HLA A1 세포주를 다음과 같이 시험하였다: 연 한천에서 콜로니 생성: 플레이트된 세포로서 방사선 조사된  $10^8$  개 세포로부터 검출가능한 콜로니없음; Gp96-Ig 분비: 방사선 비조사된 대조군은 gp96-Ig 생성을 유지하는 한편, 방사선 조사하고 14일 후 0 ng에 근접; DNA 회복에 기인하여, (대조군과 비교해서) 처음 48 시간 동안방사선 조사된 세포에서는 티미딘 흡수가 증가되었고(한 주 후 방사선 조사된 세포는, 계속 증식하고 티미딘을 섭취하는 대조군에 비교해서, 어떤 티미딘 섭취도 보이지 않았다); 코발트 방사선 조사기는 봉괴에 대하여 설정되며 매년 조정되어 보정되었다(calibrated). 코발트 방사선 조사기는 파노라마식의 방사선 조사기이다; 방사선 조사량은 매년 조정되는 공급원의 물리적 봉괴에만 의존한다.

[0035] 주사되는 백신은 적어도 70%의 세포에서 HLA A1를 발현하는 방사선 조사된 Ad100 세포를 함유하고, 60ng 이상( $\geq 60ng$ ) gp96-Ig/24h x 1백만 세포수를 생성한다; 트립판 블루 배제에 의한 70% 이상( $\geq 70\%$ )의 생존성. 세포들

을 0.5% 인간 혈청 알부민, 10% DMSO를 갖는 완충 식염수에 재현탁시켰다.

[0036] 실시예 II-CD8 반응

[0037] 스템 셀 테크로노지즈(밴쿠버, 캐나다)의 로제트-셉(Rosette-Sep) 키트를 사용하여 15 ml 혈액으로부터 CD8 세포를 정제하였다. 이 과정은 또한 항 CD56을 갖는 NK 세포를 제거하면서, 음성 선택에 의해 약 85% 순도의 약 1.5 백만CD8 세포수를 생성시킨다. 1차 오염 세포는 B 세포이다. CD8 세포(20,000)를 ELI-spot 플레이트에서 각각 자가 종양 세포인 1,000 개 세포, AD100-HLA A1-gp96Ig(백신), AD100(비트랜스펙션됨), Mel-A1(HLI A1 트랜스펙션된 흑색종), SCLC-A1(A1 트랜스펙션된 소세포 폐암), K562(NK 표적)로 48 시간 동안 삼중으로 챌린지시키고(challenged) 챌린지시키지 않았다. 적절한 ELI-spot 항체(Becton & Dickinson)를 사용하여 IFN- $\gamma$ 의 분비, IL-4의 분비 및 그랜자임 B의 분비를 측정한다. 샘플을 삼중으로 시험하여 C.T.L.(셀룰라 테크노로지즈 엘티디, 클리블랜드, 오하이오)로부터의 자동화된 ELI-spot 리더 안에서 정량화시킨다.

[0038] 실시예 III-임상적 결과

[0039] 무진행 생존 및 전체 생존을, 투여량-스케줄 코호트에 의해 계층화되는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법으로 평가하였다. 등록후 6, 12, 18, 24 및 36 개월에 생존해 남아있는 환자의 누적 퍼센트와 같이, 상응하는 생존 기간의 중앙값(90% 신뢰 한계)을 측정하였다. 가능한 정도까지, 투여량-스케줄 배정, 받은 치료(예를 들어, 총 투여량, 백신 접종 횟수), 기준선 특성 및 면역 반응의 다양한 측정(예, CD8 배 증가)과 관련하여 무진행 생존 및 전체 생존을 평가하기 위하여 비례위험 회귀분석을 사용하였다.

[0040] 실시예 IV: 다중 예비-처리 투약 계획으로 단계 IIIB/IV의 비소세포성 폐암(NSCLC)을 앓는 환자의 I 상(phase) 연구

[0041] 등록된 환자 군을 한정하는 특성은 다음과 같다: 국소적으로 진전된 또는 재발 단계 IIIB/IV NSCLC, ECOG 전신 상태 0-2, 및 화학요법, 방사선 요법 및 생물학적 개질제 치료를 포함하는 다중-예비 치료. 환자들을 세 개 부문(arms) 중의 하나에 위치시켰다. 부문 1에 등록된 환자는 AD100-gp96-A1을 2주당 일회의 투여로 9번 투여 받고, 부문 2에 등록된 환자는 AD100-gp96-A1을 1주당 일회의 투여로 18번 투여 받았으며, 부문 3에 등록된 환자는 AD100-gp96-A1을 주당 2회의 투여로 36번 투여 받았다. AD100-gp96-A1의 총 투여량은 3개 부문 각각의 처리 코스에서 일정하다. AD100-gp96-A1 치료와 함께 어떠한 추가 보조제 또는 치료를 받지 않았다.

[0042] 실시예 V: 일회 기간에서의 결과

[0043] 연구에 등록된 최초 12명의 환자 중, 한 명은 백신 접종을 받기 전에 사망했고, 9명은 부문 1(2주당 1회 투여)에 등록되었으며, 한 명은 부문 2(주당 1회 투여)에 등록되었고, 한 명은 부문 3(주당 2회 투여)에 등록되었다. 백신-관련된 어떤 심각한 부작용(SAE)도 보고되지 않았으며, 한편, 모든 환자는 홍반 및 작은 팽윤을 포함하는 백신-부위 반응을 경험했다. 한 명의 환자는 백신 접종을 받고 한 달 안에 사망하였지만, 이 환자에 대한 SAE 보고는 사망이 질병의 진전에 기인하였고, 백신 치료로부터 온 것이 아니라고 결정했다. 백신을 적어도 1회 투여량을 투여받은 12명 환자의 전체 생존이 도 1에 도시되었다.

[0044] 도 1에서 본 연구 데이터를 마사렐리(Massarelli) 연구(Lung Cancer 39:55061, 2002)에 의한 기준 데이터에 덧씌웠다. 마사렐리 연구가 환자가 받은 이전 치료의 수에 따른 환자 생존 및 반응을 분석하는 유일한 연구들 중 하나이기 때문에 마사렐리 연구는 본 연구에 대해 우수한 비교대상이다. 마사렐리 연구는 4개 라인의 치료를 통하여 진행된 환자들에 대한 생존 데이터를 제공한다. 도 1 데이터의 환자들은 AD100-gp96-A1으로 치료하기 전에 평균하여 5.3 치료 라인에서 실패하였다(중앙값 4 개 라인들, 수술 및 방사선 치료요법은 포함되지 않음).

[0045] 환자 면역 반응을 평가하기 위하여, 백신을 투여받기 전에 각 환자로부터 말초혈액 샘플을 얻고, 추후 6주 간격으로 얻었다. 이어서 말초 혈액 램프구를 AD100 백신 세포 또는 다른 비관련된 세포주의 자극에 대한 반응으로 인터페론 감마 및 그랜자임 B와 같은 사이토카인의 생성에 대해 평가하였다. 말초 혈액의 램프구 서브셋 조성을 유세포 분석기에 의해 또한 분석하였다. 도 2를 참조하면, 부문 1에 등록된 4 명의 환자로부터 모아진 데이터는 CD8+T 세포에 의한 인터페론  $\gamma$ 의 생성과 전체 생존 사이의 상관 관계를 나타낸다.

- [0046] 수명의 환자는 치료의 전체 코스를 완료하지 않고 질병 안정화를 달성하였다. 한 명의 환자는 이 시점에서 치료 후 20개월에 걸쳐 생존했고; 두 번째 환자는 치료 후 18개월 동안 생존했다. 치료 동안 측정된 AD100-gp96-A1-특이적 T 세포 반응의 크기는 생존의 증가를 예견하는 것으로 보인다.
- [0047] 환자 1003은 상당한 흉수를 가지고 시험 등록시에 국소적으로 진전되고 진행성의 질병을 가졌다. 환자 1006은 용골에 국소적으로 침습성이며 하나의 폐 전체에 크고 널리 퍼진 덩어리(mass)를 가졌다. 이들 두 환자는 T4-흉수 및 T4-침습성 서브유형에 속한다. 다양한 서브-유형(William WN et al., Chest 2009;136)의 각각과 생존을 비교하는 현재까지 수행된 가장 큰 연구를 통해 전체 생존기간이 개선된 단계 IIIB/IV NSCLC의 유일한 서브-유형은 T4-위성 질병을 갖는 환자라는 것이 밝혀졌다. T4-침습성 또는 T4-흉수를 갖는 환자는 단계 IV 질병을 갖는 환자와 구별될 수 없는 전체 생존을 갖는 것으로 확인되었다. 따라서, 이들 환자들이 시험에 등록된 다른 환자에 비해 등록 시점에 개선된 전체 예후를 갖는 질병을 가졌다는 것을 암시하는 증거는 없다. 또한, 양성 림프 결절 또는 재발 손상의 수 및 부위와 이러한 작은 그룹의 환자의 전체 생존 사이에서 분명한 상관관계가 있는 것으로 보이지 않는다. 등록된 어떤 환자보다도 가장 진전된 질환을 가짐에도 불구하고 환자 1011은 안정적인 질환을 달성하였고, 모든 세 개 코스의 치료를 거의 완료했다.
- [0048] 실시예 VI: 후기 기간에서의 결과
- [0049] 19명의 환자가 등록되었고, 18 주 동안 세 개의 투여량 투여 스케줄로 총  $4.5 \times 10^8$  백신 세포수로 백신 접종했다: 투여 스케줄(DS-1) 9번 백신 접종(각  $5 \times 10^7$  세포수), 매 2 주 마다 (부문(Arm) 1); 투여 스케줄(DS-2) 18번의 백신 접종(각  $2.5 \times 10^7$  세포수), 매주 (부문 2); 및 투여 스케줄(DS-3) 36번 백신 접종(각  $1.25 \times 10^7$  세포수), 주당 2회(부문 3). 면역 반응 및 임상적 반응을 6, 12, 및 18 주 후 기준 선에서 측정했다. 백신은 백신 접종 부위에서 최소한의, 예상되는 부작용을 가지며 모든 투여 스케줄에서 잘 받아들여졌다. 이는 IFN-γ ELI spots에서 검출된 유의한 CD8 CTL 빈도를 발생시켰고, 일부 환자들에서는 혈액중의 FoxP3(+)CD4 세포의 빈도를 감소시키는 경향을 만들었다(도 3, 중간). 생존 기간의 중앙값은 8.0 개월로 측정되었고(95% CI: 6.7 내지 18.2), 이는 예상되는 생존 추정치의 2배이다(도 3, 우측). 비교는 DS-2 및 DS-3에 대한 불완전한 자연증식에 기인하여 제한되었지만, DS 3(주당 두 번 백신 접종)에서의 3명의 환자 중 두 명뿐만 아니라 DS-2(주당 한 번 백신 접종)에서의 4명의 환자 중 두 명이 DS1에서의 11명 환자 경우의 7.1 개월의 생존 기간의 중앙값보다 오래 생존했다. 특히, 8.3 및 20 개월(각각 DS-2 및 DS-3)에서 두 명의 환자가 사망했고, 9.7 개월 및 11.5 개월(각각 DS-3 및 DS-2)에 두 명의 환자가 생존하였다.
- [0050] 다른 실시 형태
- [0051] 본 발명은 상세한 설명과 결합하여 기술되었지만, 앞서의 기술은 첨부된 청구범위에 의해 한정되는 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다. 다른 면, 이점 및 변형이 다음 청구범위의 범주에 든다.

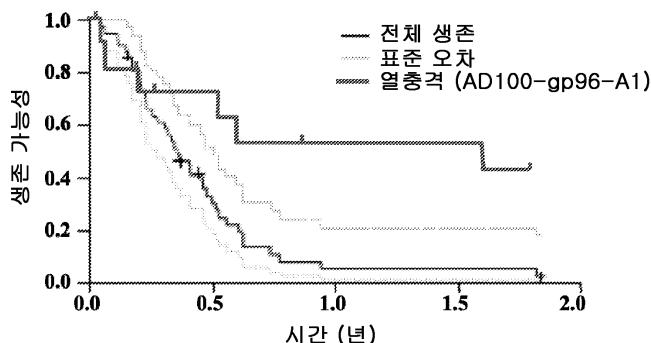
## 도면

## 도면1

## 전체 생존에 대한 카플란-마이어 곡선

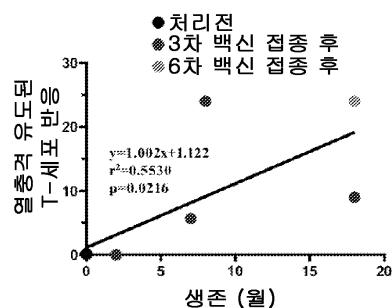
단계 III B/IV NSCLC 환자 WHO PS 0-1

#### 4번째 라인 치료 실패 후 (다양한)



Massarelli E. et al. Lung Cancer 39:55-61 2002 :  
에서 보고된 데이터에 덧씌운 예비 데이터

## 도면2



## 도면3

