



등록특허 10-2499737



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월13일
(11) 등록번호 10-2499737
(24) 등록일자 2023년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/275* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2021.08)
A61K 39/275 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7030977

(22) 출원일자(국제) 2015년05월08일
심사청구일자 2020년04월24일

(85) 번역문제출일자 2016년11월04일

(65) 공개번호 10-2017-0003556

(43) 공개일자 2017년01월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/029855

(87) 국제공개번호 WO 2015/175334
국제공개일자 2015년11월19일

(30) 우선권주장
61/992,788 2014년05월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
국제공개공보 WO2006/121168(2006.11.16.)*
Lancet Oncol, 제13권, 제5호, 501-508
면(published online: 2012.2.10.)*
Cancer Immunol Immunother, 제61권, 19-29
면(published online: 2011.8.7.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 14 항

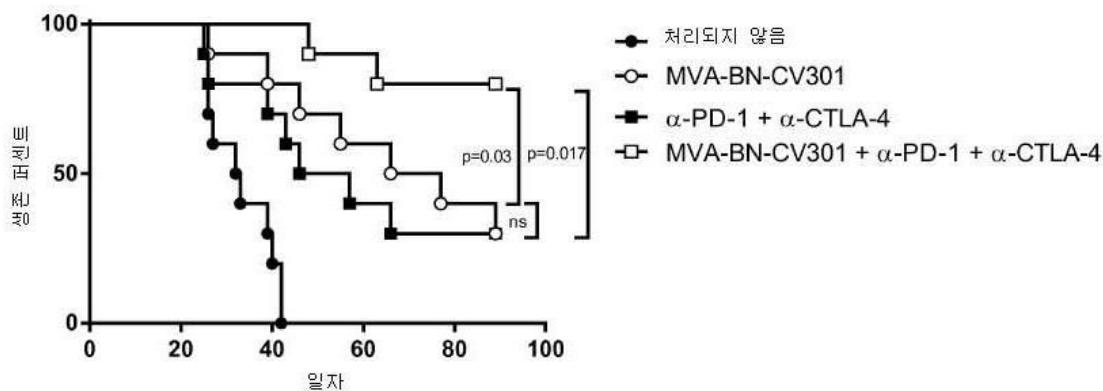
심사관 : 김해민

(54) 발명의 명칭 종양 항원을 발현하는 재조합 폭스바이러스 및 면역 체크포인트 분자 길항제 또는 효현제로 암을 치료하기 위한 복합 요법

(57) 요약

본 발명은 면역 체크포인트 저해제의 길항제 또는 효현제와 합동으로 종양-연관된 항원을 인코딩하는 재조합 폭스바이러스를 이용한 암 요법을 위한 조성물, 키트 및 방법에 관계한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 2039/5254 (2013.01)

(72) 발명자

라운트리, 라이언

미국 95118 캘리포니아 새너제이 브리어글렌 드라

이브 4029

프란즈소프, 알렉스

미국 94022 캘리포니아 로스 알토스 체리 애비뉴

571

명세서

청구범위

청구항 1

인간 암 환자를 치료하기 위한 약학적 조성물로서,

(a) (i) 암배아 (CEA) 항원, 및 세포 표면 연관된 점액소 1(MUC-1) 항원, 또는 (ii) 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER-2) 항원의 종양-연관된 항원 (tumor-associated antigen, TAA)을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 오소폭스바이러스; 및

(b) PD-1 길항체 및 CTLA-4 길항체를 포함하고,

상기 PD-1 길항체는 항-PD-1 길항체 항체이고, 상기 CTLA-4 길항체는 항-CTLA-4 항체이며,

상기 재조합 오소폭스바이러스는 변형된 우두 앙카라 (MVA) 바이러스 또는 MVA-BN인, 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 TAA는 CEA 항원 및 MUC-1 항원인 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 TAA는 HER-2 항원인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 환자는 유방암, 폐암, 두경부암, 갑상선암, 흑색종, 위암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 난소암, 또는 대장암인 암을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 9

인간 환자에서 암을 치료하기 위한 키트로서, 상기 키트는

(a) (i) 암배아 (CEA) 항원, 및 세포 표면 연관된 점액소 1(MUC-1) 항원, 또는 (ii) 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER-2) 항원의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 오소폭스바이러스;

(b) PD-1 길항체; 및

(c) CTLA-4 길항체를 포함하고,

상기 PD-1 길항체는 항-PD-1 길항체 항체이고, 상기 CTLA-4 길항체는 항-CTLA-4 항체이며,

상기 재조합 오소폭스바이러스는 변형된 우두 앙카라 (MVA) 바이러스 또는 MVA-BN인, 키트.

청구항 10

인간 암 환자를 치료하기 위한 약학적 조성물로서,

(a) (i) 암배아 (CEA) 항원, 및 세포 표면 연관된 점액소 1(MUC-1) 항원, 또는 (ii) 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER-2) 항원의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하는, 치료적으로 효과적인 양의 재조합 오소폭스바이러스; 및

(b) 치료적으로 효과적인 양 이하의 양(sub-therapeutically effective amount)의 면역 체크포인트 길항제를 포함하고,

상기 면역 체크포인트 길항제는 PD-1 길항제 및 CTLA-4 길항제이고,

상기 PD-1 길항제는 항-PD-1 길항제 항체이고, 상기 CTLA-4 길항제는 항-CTLA-4 항체이며,

여기서 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양 이하의 양은, 적어도 하나의 TAA를 포함하는 오소폭스바이러스를 단독으로 투여한 것과 비교하거나, 또는 면역 체크포인트 길항제를 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제와 조합하여 치료적으로 효과적인 양 이하로 투여한 것과 비교하여, 상기 TAA 및 면역 체크포인트 길항제를 조합한 치료 효과가 증가되는 정도의 양이고,

상기 재조합 오소폭스바이러스는 변형된 우두 앙카라 (MVA) 바이러스 또는 MVA-BN인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 적어도 하나의 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양 이하의 양은 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양의 75% 내지 5%인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양 이하의 양은 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양의 50% 내지 10%인 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양 이하의 양은 면역 체크포인트 길항제의 치료적으로 효과적인 양의 75% 내지 5%인 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 10 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 치료적으로 효과적인 양의 재조합 오소폭스바이러스가 상동성 또는 이종성 프라임 부스트 투여요법(regimen)의 일부로서 면역 체크포인트 길항제와 조합으로 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 이종성 프라임 부스트는 CV301을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상동성 프라임 부스트 투여요법은 MVA-BN-HER2를 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 10 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 면역 체크포인트 길항제의 용량은 재조합 오소폭스바이러스의 용량을 투여한 후 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 면역 체크포인트 길항제의 용량은 재조합 오소폭스바이러스의 용량을 투여한 지 1일 내지 13일 후에 투여되는 것인 약학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

본 발명은 면역 체크포인트 분자의 하나 또는 그 이상의 효현제 또는 길항제와 합동으로 종양 항원을 인코딩하는 재조합 폭스바이러스를 이용한 암의 치료에 관계한다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

재조합 폭스바이러스는 감염성 생물체 및 더욱 최근에, 종양에 대한 백신으로서 이용되었다. Mastrangelo et al. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1031-1034. 이들 폭스바이러스 군 중에서 2가지, 조류폭스바이러스 및 오소폭스바이러스는 종양과 싸우는데 효과적인 것으로 나타났고 잠재적 암 치료와 관련되었다. 동일 저자.

한 가지 예시적인 조류폭스바이러스 종, 계두는 인간 투여를 위한 안전한 운반체인 것으로 나타났는데, 그 이유는 계두바이러스가 포유류 세포에 들어가고 단백질을 발현하지만, 불현적으로 복제하기 때문이다. Skinner et al. *Expert Rev Vaccines.* 2005 Feb;4(1):63-76. 추가적으로, 발현을 위한 운반체로서 계두바이러스의 이용은 암, 말라리아, 결핵, 그리고 AIDS에 대항하여 백신의 다양한 임상 시험에서 평가되고 있다. 동일 저자.

오소폭스바이러스 중에서 가장 널리 공지된 우두는 천연두의 전 세계-범위 근절에 이용되었고, 그리고 벡터 및/ 또는 백신으로서 유용성을 보여주었다. 재조합 우두 벡터는 여러 종양 연관된 유전자, 예를 들면, p97, HER-2/neu, p53 및 ETA를 비롯한 넓은 범위의 삽입된 유전자를 발현하도록 가공되었다 (Paoletti, et al., 1993).

오소폭스바이러스의 유용한 균주는 변형된 우두 앙카라 (MVA) 바이러스이다. MVA는 우두바이러스 (CVA)의 앙카라 균주의 닦 배아 섬유모세포에서 516회 연속 계대에 의해 산출되었다 (검토를 위해, Mayr, A., et al. *Infection* 3, 6-14 (1975)를 참조한다). 이들 장기간 계대의 결과로서, 결과의 MVA 바이러스의 유전체는 이의 유전체 서열 중에서 약 31 킬로베이스가 결실되었고, 그리고 이런 이유로, 조류 세포로의 복제에 한정된 고도의 숙주 세포로서 설명되었다 (Meyer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991)). 다양한 동물 모형에서, 결과의 MVA는 유의미하게 비병원성인 것으로 나타났다 (Mayr, A. & Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34 (1978)). 추가적으로, 이러한 MVA 균주는 임상 시험에서, 인간 천연두 질환에 대항하여 면역화시키는 백신으로서 시험되었다 (Mayr et al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B* 167, 375-390 (1987); Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386-2392 (1974)). 이를 인간 연구에서, MVA는 우두-기초된 백신과 비교하여 축소된 독력 또는 감염성을 가졌고, 반면 MVA는 우수한 특이적 면역 반응을 여전히 유도하였다.

다음 수십 년 동안, MVA는 재조합 유전자 발현을 위한 바이러스 벡터로서 또는 재조합 백신으로서 이용을 위해 가공되었다 (Sutter, G. et al., *Vaccine* 12: 1032-40 (1994)).

비록 Mayr 등이 1970년대에, MVA가 인간 및 포유동물에서 고도로 약독화되고 비병원성이라는 것을 증명하긴 했지만, 일정한 조사자들은 MVA가 포유류 및 인간 세포주에서 완전히 약독화되지는 않는다는 것을 보고하였는데, 그 이유는 잔여 복제가 이를 세포에서 발생할지도 모르기 때문이다. (Blanchard et al., *J Gen Virol* 79, 1159-1167 (1998); Carroll & Moss, *Virology* 238, 198-211 (1997); Altenberger, U.S. 특허 번호 5,185,146; Ambrosini et al., *J Neurosci Res* 55(5), 569 (1999)). 이를 간행물에서 보고된 결과는 MVA의 다양한 공지된 균주로 획득되었던 것으로 추정되는데, 그 이유는 이용된 이를 바이러스가 다양한 세포주에서 그들의 성질, 특히 그들의 성장 행동에서 본질적으로 다르기 때문이다. 이런 잔여 복제는 인간에서 이용과 관련된 안정성 우려를 비롯한 다양한 이유로 바람직하지 않다.

더욱 안전한 산물, 예를 들면, 백신 또는 약제의 개발을 위한 증강된 안전성 프로필을 갖는 MVA의 균주가 설명

되었다. 국제 PCT 공보 WO2002042480 (또한, 예로서 U.S. 특허 번호 6,761,893 및 6,913,752)을 참조하는데, 이를 모두 본원에 참조로서 편입된다. 이런 균주는 비인간 세포 및 세포주, 특히 닭 배아 섬유모세포 (CEF)에서 재생산적 복제를 할 수 있지만, 공지된 우두 균주로 복제를 허용하는 것으로 알려진 일정한 인간 세포주에서 유의미한 재생산적 복제를 할 수 없다. 이런 세포주는 인간 각질세포 세포주, HaCat (Boukamp et al., *J Cell Biol* 106(3): 761-71 (1988)), 인간 자궁경부 선암종 세포주, HeLa (ATCC 번호 CCL-2), 인간 배아 신장 세포주, 293 (ECACC 번호 85120602), 그리고 인간 뼈 골육종 세포주, 143B (ECACC 번호 91112502)를 포함한다. 이런 균주는 또한, 생체내에서, 예를 들면, 일정한 생쥐 균주, 예를 들면, 심하게 면역-약화되고 복제 바이러스에 고도로 감수성인 유전자도입 생쥐 모형 AGR 129에서 유의미한 재생산적 복제를 할 수 없다. U.S. 특허 번호 6,761,893을 참조한다. "MVA-BN"으로서 지칭되는 이와 같은 한 가지 MVA 균주 및 이의 유도체 및 재조합체가 설명되었다. 국제 PCT 공보 WO2002042480 (또한, 예로서 U.S. 특허 번호 6,761,893 및 6,913,752)을 참조한다.

[0011] MVA 및 MVA-BN은 각각, 재조합 유전자 발현을 위한 바이러스 벡터로서 또는 재조합 백신으로서 이용을 위해 개발되었다. 가령, Sutter, G. et al., *Vaccine* 12: 1032-40 (1994), 국제 PCT 공보 WO2002042480 (또한, 예로서 U.S. 특허 번호 6,761,893 및 6,913,752)을 참조한다.

[0012] 암 면역요법에 대한 일정한 접근법은 종양-연관된 항원으로 예방접종을 포함하였다. 일정한 사례에서, 이런 접근법은 종양-연관된 항원에 대한 숙주 면역 반응을 증진하기 위한 전달 시스템의 이용을 포함하였다. 일정한 사례에서, 이런 전달 시스템은 재조합 바이러스 벡터를 포함하였다. 가령, Harrop et al., *Front. Biosci.* 11:804-817 (2006); Arlen et al., *Semin. Oncol.* 32:549-555 (2005); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (suppl. 2):14567-14571 (2004)을 참조한다.

[0013] HER-2는 다수의 암 환자의 종양 세포에서 과다발현되는 종양-연관된 항원이다. 다양한 HER-2 폴리펩티드로 면역화가 이러한 항원을 발현하는 종양 세포에 대한 면역 반응을 산출하는데 이용되었다. 가령, Renard et al., *J. Immunology* 171:1588-1595 (2003); Mittendorf et al., *Cancer* 106:2309-2317 (2006)을 참조한다.

[0014] HER-2 항원을 인코딩하는 MVA, MVA-BN-HER2는 폐에서 조절 T 세포 (T_{reg})의 높은 빈도에 의해 특징화되는 강한 종양-매개된 면역억제 환경에도 불구하고, 실험적 폐 전이의 드물 모형에서 강력한 항종양 효력을 발휘하는 것으로 나타났다. Mandl et al., *Cancer Immunol Immunother* (2012) 61:19-29. 재조합 MVA는 Th1-지배된 HER-2-특이적 항체 및 T-세포 반응을 강하게 유도하는 것으로 보고되었다. 동일 저자. 항종양 활성은 고도로 활성화된, HER-2-특이적, CD8+CD11c+ T 세포로 폐의 증가된 침윤에 의해 특징화되었고, 그리고 폐에서 T_{reg} 세포의 빈도에서 감소를 동반하여, 작동체 T 세포 대 T_{reg} 세포의 유의미하게 증가된 비율을 유발하였다. 동일 저자.

[0015] MVA-BN-HER2는 인간 임상적 연구에서 전이성 세팅에서 안전하고 내성을 깨뜨려 특이적 T 및 B 세포 반응을 유도하는 것으로 또한 나타났다. Guardino et al., *Cancer Research*: December 15, 2009; Volume 69, Issue 24, Supplement 3.

[0016] 트拉斯투주맙 (헤르셉틴)은 HER2의 세포외 도메인을 표적으로 하는 인간화 단일클론 항체 (mAb)이고, 그리고 HER2-양성 유방암에서 임상 효능을 보여주었다. Wang et al., *Cancer Res.* 2012 September 1; 72(17): 4417-4428. 하지만, 유의미한 숫자의 환자가 초기 트拉斯투주맙 치료에 반응하는데 실패하고, 그리고 많은 트拉斯투주맙-반응성 종양은 연속 치료 후 내성이 발달한다. 동일 저자.

[0017] 면역 세포 상에서 저해성 수용체는 암에서 면역 도피의 중심적인 조절인자이다. Woo et al., *Cancer Res.* 72(4): 917-27, 2011. 이를 저해성 수용체 사이에서, CTLA-4 (세포독성 T-림프구-연관된 단백질 4)는 지배적인 끄기 스위치로서 역할을 하고, 반면 다른 수용체, 예를 들면, PD-1 (예정된 사멸 1, CD279), LAG-3 (림프구 활성화 유전자, CD223), 그리고 TIM-3 (T-세포 면역글로불린 도메인 및 접액소 도메인-3)는 더욱 미묘한 가변저항 기능을 제공하는 것으로 보인다. 동일 저자.

[0018] CTLA-4는 면역 체크포인트 분자인데, 이것은 활성화된 T-세포에서 상항조절된다. Mackiewicz, Wspolczesna onkol 2012; 16 (5):363-370. CTLA-4는 활성화된 T-세포 상에서 발현된 음성적 동시자극성 분자인데, 이것은 이들의 중식을 저해한다. Mellman, *Nature* 2011; 480:480-9)를 참조한다. 항-CTLA4 mAb는 CTLA-4와 CD80/86의 상호작용을 차단하고 면역 억제의 기전을 끌 수 있고, 그리고 DC에 의한 T-세포의 연속 자극을 할 수 있게 한다. CTLA-4에 대해 저항된 2가지 IgG mAb, 이필리무맙 및 트레멜리무맙이 임상 시험에서 흑색종을 앓는 환자에 이용되었다. 동일 저자.

[0019] 이들 최근 연구가 CTLA-4에 대해 저항된 IgG mAb를 이용하는 것이 흑색종 환자에 치료적 이익을 제공할 수 있다

는 것을 지시하긴 했지만, 이들 항-CTLA-4 항체로 치료는 높은 수준의 면역-관련된 부작용을 보여주었다. Mellman et al. *Nature* 2011; 480(7378): 480-489. 이런 부작용은 적중한 독성으로서 특징화되었는데, 여기서 치료된 환자는 대장염 및 뇌하수체염을 비롯한 부정적인 효과뿐만 아니라 간 관련된 문제가 발생하였다. 동일 저자.

[0020] 면역계를 조정하는 다른 인간 mAb는 사멸-1 수용체 (PD-1R)에 대해 지향된 BMS-936558 (MDX-1106)인데, 이의 리간드 (PD-1L)는 흑색종 세포 상에서 직접적으로 발현될 수 있다. 동일 저자. PD-1R은 T-세포 활성화 및 내성을 조절하는 동시자극성 분자의 B7:CD28 패밀리의 일부이고, 그리고 따라서 항-PD-1은 내성을 깨뜨리는데 일정한 역할을 수행할 수 있다. 동일 저자. PD-1/PD-L1 경로의 포용은 T-세포 작동체 기능, 사이토킨 분비 및 증식의 저해를 유발한다. Turnis et al., *OncoImmunology* 1:7, 1172-1174; 2012. 높은 수준의 PD-1은 탈진한 또는 장기적으로 자극된 T 세포와 연관된다. 동일 저자. 게다가, 증가된 PD-1 발현은 암 환자에서 감소된 생존과 상관한다. 동일 저자.

[0021] 이들 최근 연구가 PD-1 발현이 암에서 생존율에 연계될 수 있다는 것을 제안하긴 했지만, 암을 치료하는데 있어서 PD-1의 저해를 이용한 초기 연구는 매우 다양한 불리한 부작용을 보여주었다. Mellman et al. *Nature* 2011; 480(7378): 480-489; 또한, Chow, *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2013, "Exploring novel immune-related toxicities and endpoints with immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer"를 참조한다.

[0022] LAG-3은 다양한 림프구양 세포 상에서 발현된 음성적 동시자극성 분자이다. 염증성 병태 (가령, IFN-감마 자극) 하에 LAG-3 및 MHC 클래스 II 둘 모두 상향조절된다 (Triebel *Trends Immunol* 2003;24:619-22).

[0023] TIM-3은 만성 감염 및 암 동안 T-세포 상에서 발현된다 (Jin *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:14733-8, Baghadi *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:629-37.

[0024] 활성 면역요법 및 암 백신을 비롯한 추가 암 치료에 대한 실제적인 충족되지 않은 의료 수요가 명백하게 존재한다. 게다가, 많은 현재 암 요법, 예를 들면, 체크포인트 저해제 요법에서 목격되는 불리한 부작용에 비추어, 더욱 낮은 용량에서 효력을 유지하는 요법에 대한 필요가 당분야에서 존재한다. 이들 더욱 낮은 용량 요법은 이들 부정적인 효과를 감소시키고 및/또는 제거하는데 도움을 줄 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

발명의 짧은 요약

본 발명은 인간 암 환자를 치료하기 위한 방법, 조성물, 그리고 키트를 포함한다.

한 구체예에서, 상기 방법은 최소한 하나의 종양 항원을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스를 인간 암 환자에 투여하고; 그리고 PD-1 길항체 및 CTLA-4 길항체를 상기 환자에 투여하는 것을 포함한다.

바람직한 구체예에서, 재조합 폴스바이러스는 재조합 오소폴스바이러스 또는 재조합 조류폴스바이러스이다.

더욱 바람직한 구체예에서, 재조합 오소폴스바이러스는 재조합 우두바이러스 또는 재조합 변형된 우두 앙카라 (MVA) 바이러스이다. 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 오소폴스바이러스는 MVA-BN이다.

다른 바람직한 구체예에서, 재조합 조류폴스바이러스는 재조합 계두바이러스이다.

다양한 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 종양 항원은 CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리 항원을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

다른 바람직한 구체예에서, PD-1 길항체 및 CTLA-4 길항체는 각각, 항-PD-1 길항체 항체 및 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 본원에서 설명된 암 치료는 암, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 유방암, 폐암, 위암, 신장암, 간암, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 대장암, 또는 이들의 조합에 대해 지향될 수 있다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 환자에서 암을 치료하기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 다음의 조합을 환자에 투여하는 것을 포함한다: (a) 치료 효과량의 재조합 폴스바이러스 백터, 상기 폴스바이러스 백터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 치료 효과량은 단독으로 최

소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 또는 복수의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여, 상기 조합을 투여하는 치료 효과가 증가되는 정도의 양이다.

[0035] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 한 명 또는 그 이상의 암 환자의 치료를 위한 키트를 포함할 수 있고, 상기 키트는 최소한 하나의 종양 항원 (TAA)을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스; (b) PD-1 길항제; 그리고 (c) CTLA-4 길항제의 치료 효과량을 포함할 수 있다.

[0036] 또 다른 구체예에서, 키트는 다음을 포함할 수 있다: (a) 재조합 폭스바이러스 벡터, 상기 폭스바이러스 벡터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; (b) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제; 그리고 (c) 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여, 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 증가된 치료 효과를 갖도록, 치료 효과량의 폭스바이러스 벡터 및 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하기 위한 사용설명서.

[0037] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자에서 암을 치료하기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 다음의 조합을 환자에 투여하는 것을 포함한다: (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여, 상기 조합의 치료 효과가 증가되는 정도의 양이다.

[0038] 본 발명의 추가 목적과 이점이 부분적으로, 아래의 설명에서 진술될 것이고, 그리고 부분적으로, 이러한 설명으로부터 명백할 것이고, 또는 발명의 실시에 의해 학습될 수 있다. 본 발명의 목적과 이점은 첨부된 청구항에서 특히 지적된 요소와 조합에 의하여 실현되고 획득될 것이다.

[0039] 전술한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명 둘 모두 단지 예시적이고 설명적이며 청구된 발명을 제한하지 않는 것으로 이해된다.

[0040] 본 명세서에 통합되고 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 구체예를 예시하고, 그리고 상세한 설명과 함께, 본 발명의 원리를 설명하는데 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

도면의 간단한 설명

도면 1. MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4는 종양 침윤성 항원 특이적 CD8+ T-세포를 증가시킨다. 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이 이식되었고, 그리고 처리되지 않거나 또는 3 및 18 일자에 200 μ g 항-CTLA-4 (100 μ L PBS에서, i.p.), 및/또는 4 및 18 일자에 1x10⁷ Inf.U MV-BN-HER2 (7.1 μ L, t.s.)로 처리되었다. 25 일자에, 종양/폐 또는 비장이 모아지고 (4마리 생쥐/군), 그리고 바이러스 및 종양 항원 특이적 반응을 계측하기 위해 하룻밤 동안 재자극되었다.

도면 2. MVA-BN-HER2로 처리는 비장에서 종양 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 크기 및 질을 증가시켰다. 생쥐는 실시예 3에서 설명된 바와 같이 이식되었다. A) 파이 도표는 백만 CD8+ T-세포마다 IFN γ + 세포의 숫자를 반영하기 위해 가중된 구역이다. B) IFN γ MFI는 복합 요법에서 다기능성 T-세포와 함께 증가한다.

도면 3. MVA-BN-HER2는 실험적 폐 전이 모형에서 항-CTLA-4와 협력 작용하여 종양을 제거하고 생존을 증가시킨다. 생쥐는 1 일자에 실시예 4에서 설명된 바와 같이 이식되고, 그리고 4 및 18 일자에 MVA-BN-HER2, 그리고 3 및 17 일자에 항-CTLA-4로 처리되었다. ^{****} p<0.0001, 로그 순위 검증.

도면 4. CT26-HER-2 폐 종양을 갖는 생쥐는 실시예 5에서 설명된 바와 같이 처리되었고 종양 부담이 25 일자에 분석되었다. A) 생쥐는 안락사되고 기도를 통해 트리판 블루로 관류되었다. 폐가 제거되고 과산화수소, 이후 PBS에 짧게 담겨졌다. 종양은 처리되지 않은 폐 및 항-CTLA-4 처리된 폐에서 작은 덩어리로서 가시적이다. MVA-BN-HER2로 처리된 생쥐에서는 가시적인 종양이 없었다. 눈금자는 1 cm에 해당한다. B) MVA-BN-HER2로 처리된 생쥐는 25 일자에 미경험 생쥐와 유사한 폐 중량을 갖고, 반면 처리되지 않은 생쥐 및 항-CTLA-4 처리된 생쥐에서

는 25 일자에 폐 중량이 훨씬 크다. *** p<0.0001, Dunnett의 다중 비교 검증과 함께 일원 변량분석 (ANOVA).

도면 5. 생쥐는 실시예 6에서 설명된 바와 같이 CT26-HER-2 종양으로 이식되었다. 생쥐는 4 및 18 일자에 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 ug (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.에서 MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4로 처리되었다. *** p<0.0001, 로그 순위 검증.

도면 6. 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이 이식되었다. 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-HER2 (100 μ L TBS에서 1E7 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.) 및 1 및 15 일자에 22 μ g 항-CTLA-4 (1 mg/kg)로 처리되었다. 결과는 저용량 항-CTLA-4와 합동으로 MVA-BN-HER2가 종양 부담을 20 일자까지, 다른 처리와 비교하여 유의미하게 감소 시켰다는 것을 증명한다.

도면 7. 생쥐는 실시예 8에서 설명된 바와 같이 CT26-HER-2 종양으로 이식되었다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 ug (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.로 4 및 18 일자에 MVA-BN-HER2 및 항-PD-1로 처리되었다. *** p<0.0001, * p<0.05, ns= 로그 순위 검증에 의해 유의미하지 않음.

도면 8. 암컷 BALB/c 생쥐 (6-8 주령, ~ 20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA)는 실시예 9에서 설명된 바와 같이 이식되었다. 생쥐는 각 항체에 대해 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 ug (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.로 4 및 18 일자에 MVA-BN-HER2, 그리고 3 및 17 일자에 항-CTLA-4 및 항-PD-1로 처리되었다. *** p<0.0001, 로그 순위 검증.

도면 9. 암컷 C57/BL6 생쥐 (6-8 주령, ~ 20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA)는 1 일자에 실시예 10에서 설명된 바와 같이 이식되었다. 생쥐는 i.p.로 4 및 18 일자에 MVA-BN-CV301로 처리되고, 그리고 항-CTLA-4 및 항-PD-1 (각각 200 μ g)로 처리되었다.

도면 10. E6 고형 종양 모형에서 PROSTVAC 및 항-PD-1 복합 요법. 생쥐는 실시예 12에서 설명된 바와 같이 이식되었다. A) 생쥐는 1 일자에 PROSTVAC-V로, 그리고 8 및 15 일자에 PROSTVAC-F로 처리되었다. 항-PD-1은 1 및 15 일자에 제공되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 11. E6 고형 종양 모형에서 PROSTVAC 및 항-LAG-3 복합 요법. 생쥐는 실시예 13에서 설명된 바와 같이 이식되었다. A) 생쥐는 1 일자에 PROSTVAC-V로, 그리고 8 및 15 일자에 PROSTVAC-F로 처리되었다. 항-LAG-3은 1 및 15 일자에 제공되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 12. E6 고형 종양 모형에서 항-PD-1 및 항-LAG-3과 합동으로 PROSTVAC. 생쥐는 실시예 14에서 설명된 바와 같이 이식되었다. A) 생쥐는 1 일자에 PROSTVAC-V로, 그리고 8 및 15 일자에 PROSTVAC-F로 처리되었다. 항-PD-1 및 항-LAG-3은 1 및 15 일자에 제공되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 13. 생쥐는 실시예 15에서 설명된 바와 같이 이식되었다. 생쥐는 7 및 22 일자에 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.), 그리고 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 일자에 항-ICOS (200 μ g i.p.)로 처리되었다. A) 평균 종양 성장. B) 개별 생쥐에서 종양 성장.

도면 14. Tim-3 발현은 MVA-BN-HER2 처리로 증가한다. 생쥐는 실시예 32에서 설명된 바와 같이 처리되었다. Tim-3 발현은 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.)로 1 일자 및 15 일자 처리 후 생쥐에서 계측되었다.

도면 15. 생쥐는 실시예 33에서 설명된 바와 같이 처리되었다. ICOS는 MVA-BN-HER2로 단일 처리 후, 10 일자에 폐 및 혈액 내에 CD8+ T 세포에서 (A), 그리고 폐, 혈액 및 비장 내에 CD4+ T-세포 (B)에서 증가하였다. 15 일자에 MVA-BN-HER2의 두 번째 처리로, ICOS는 폐, 혈액 및 비장 내에 CD8+ T-세포 (C), 그리고 CD4+ T-세포 (D)에서 증가하였다. 평균 \pm SEM으로서 도시된 데이터, 각 시점에서 군마다 3마리 생쥐.

도면 16. 생쥐는 실시예 34에서 설명된 바와 같이 처리되었다. PD-1 발현은 1 일자에 MVA-BN-HER2 처리로 폐 및 혈액 내에 CD8+ T-세포에서 증가하였다 (A). PD-1 발현은 15 일자에 두 번째 처리로 폐, 비장 및 혈액 내에서 더욱 증가하였다 (C). PD-1는 단일 처리 후 폐 내에 CD4+ T-세포에서 약간 증가하였고 (B), 그리고 두 번째 MVA-BN-HER2 처리 후 안정된 상태로 남겨졌다 (D).

도면 17. 생쥐는 실시예 35에서 설명된 바와 같이 처리되었다. LAG-3 발현은 MVA-BN-HER2로 1 일자 (d1) (A) 또는 1 일자 및 15 일자 처리 (C) 후 폐, 비장 및 혈액 내에 CD8+ T-세포에서 증가하였다. CD4+ T-세포에서 LAG-3 발현은 1 일자 (B) 또는 1 일자 및 15 일자 (D) MVA-BN-HER2 처리 후 약간 증가하였다.

도면 18. MVA-BN-CV301 및 항-PD-1은 MC38-CEA 고형 종양 모형에서 종양 성장을 늦춘다. 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 37에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 생쥐는 MVA-BN-CV301 및 항-PD-1로 더욱 처리되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 19. MC38-CEA 고형 종양 모형에서 MVA-BN-CV301 및 항-LAG-3 복합 요법. 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 38에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 생쥐는 MVA-BN-CV301 및 항-LAG-3으로 더욱 처리되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 20. 항-PD-1 및 항-LAG-3과 협동으로 MVA-BN-CV301. 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 39에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 생쥐는 MVA-BN-CV301 및 항-LAG-3 및 항-PD-1로 더욱 처리되었다. A) 생쥐에서 평균 종양 체적. B) 생쥐에서 개별 종양 성장.

도면 21. 생쥐는 실시예 40에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 모아진 비장세포는 유세포분석법 (% CD107⁺ IFN γ + CD8 T 세포)에 의해, IFN ELISPOT (A, B)에 의한 PSA-특이적 반응 및 세포독성 활성에 대해 검정되었다 (C). 항-PSA IgG 역가는 각 개별 생쥐에 대해 ELISA에 의해 결정되었다 (D). ELISPOT의 경우에, 그래프는 4번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다.

도면 22. 생쥐는 실시예 41에서 설명된 바와 같이 처리되었다. (A) 파이 도표는 검출된 세포의 숫자를 반영하기 위해 크기에서 가중된다 (백만 T 세포마다 PSA-특이적 CD8의 총수가 각 차트 아래에 표시된다). (B) 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 계측될 때 세포당 기저에서 IFN γ 생산의 양. 그래프는 2번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다.

도면 23. 생쥐는 실시예 42에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 모아진 비장세포는 최후 처리 후 14 일에 유세포 분석법 (% CD107⁺ IFN γ + CD8 T 세포)에 의해 우두바이러스 (VV)-특이적 (왼쪽에 A 및 C 패널) 또는 PSA-특이적 (오른쪽에 A 및 C 패널) 세포독성 활성에 대해 검정되었다. 그래프는 2번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

발명의 상세한 설명

[0043]

다수의 현재 임상 시험은 하나 또는 그 이상의 종양-연관된 항원 (TAA)을 발현하도록 가공된 우두, 변형된 우두 양카라 (MVA), 그리고 계두-기초된 백터를 이용하는 요법을 수반한다. 이들 백터는 다양한 암에 대항하여 능동 면역 반응을 산출하기 위해 단독으로 또는 프라임 부스트 전략에서 이용된다. PROSTVAC®는 PSA 및 TRICOM™을 발현하는 우두 및 계두를 이용한 프라임 부스트 전략을 이용하고, 그리고 현재 거세-내성 전이성 전립선암에 대한 전역 III 단계 임상 시험 (PROSPECT) 중에 있다. CV301, 또는 CV-301은 MUC-1 항원을 발현하는 우두 및 계두, CEA, 그리고 TRICOM™을 이용한 이종성 프라임 부스트 전략을 이용하고, 그리고 현재 방광암에 대한 II 단계 임상 시험 중에 있다.

[0044]

MVA-BN-HER2 (Mandl et al, 2012)는 HER-2⁺-유방암의 치료를 위한 I 단계 임상 시험 중에 있다. 이러한 재조합 백터는 MVA-BN으로서 알려져 있는 고도로 약독화된 변형된 우두 양카라 (MVA) 바이러스 스톡으로부터 유래된다. 이것은 HER-2에 대한 효과적인 면역 반응의 유도를 조장하기 위해 파상풍 독소로부터 2개의 보편적인 T 세포 에피토프 (TTp2 및 TTp30)를 포함하도록 가공된 HER-2의 세포외 도메인으로 구성되는 HER-2의 변형된 형태 (HER2로 지정됨)를 발현한다.

[0045]

폭스바이러스-기초된 면역요법의 항종양 효력을 더욱 증강하기 위해, MVA-BN-HER2는 T 세포 활성화를 하향조절하는 면역 체크포인트 단백질인 CTLA-4의 활성을 차단하는 단일클론 항체와 협동되었다. CT26-HER-2 실험적 폐전이 모형에서, 평균 생존 시간은 처리되지 않은 생쥐에서 30 일에서 MVA-BN-HER2 처리 시에 49.5 일로 증가하였고, 반면 항-CTLA-4 처리는 그것만으로는 생존 이익이 거의 나타나지 않았다 (평균 생존 35 일). 대조적으로, 항-CTLA-4와 협동으로 MVA-BN-HER2는 생쥐 중에서 50% 이상에서 생존을 100 일 이상으로 유의미하게 증가시켰다 ($p<0.0001$). 100 일에서, 생존 생쥐의 폐가 조사되었고 가시적인 종양이 없었다.

[0046]

PROSTVAC® 및 MVA-BN-CV301 (TRICOM과 함께 또는 이것 없이 CEA 및 MUC-1을 발현하는 MVA)는 각각, 다양한 종양 모형에서 PD-1 및 LAG-3에 대해 지향된 다양한 길항체 항체와 협동으로 또한 시험되었다. 조합은 PROSTVAC® 및 MVA-BN-CV301의 효과를 증강하는 것으로 밝혀졌다.

[0047] CTLA-4의 길항제 및 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 (가령, Mellman et al. *Nature* 2011을 참조한다)를 수반하는 암 치료의 독성 및 부정적인 효과에 비추어, CTLA-4의 활성을 차단하는 단일클론 항체와 합동으로 종양 연관된 항원, 예를 들면, MVA-BN-HER2를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스를 이용한 용량 적정 검정이 수행되었다. 본원에서 예시되고 설명된 바와 같이, 재조합 폭스바이러스 요법, 예를 들면, MVA-BN-HER2는 CTLA-4 저해와 합동될 때, CTLA-4 저해 단독 또는 재조합 폭스바이러스 요법 단독을 이용한 암 치료와 비교할 때 증가된 치료 효과를 달성할 수 있었다. 가장 중요하게는, 치료 효력이 심지어 더욱 낮은 용량에서도 조합 치료에 의해 유지되었다.

[0048] 추가 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 이용한 폭스바이러스-기초된 면역요법의 항종양 효력의 증강을 결정하기 위해, MVA-BN-HER2가 CTLA-4의 활성을 차단하는 단일클론 항체뿐만 아니라 PD-1에 대한 길항성 항체와 합동되었다. 본원에서 예시되고 설명된 바와 같이, 재조합 폭스바이러스 요법은 CTLA-4 항체 및 PD-1 길항제와 합동될 때, 합동된 CTLA-4 및 PD-1 저해 단독 또는 재조합 폭스바이러스 요법 단독을 이용한 암 치료와 비교할 때 증가된 치료 효과를 달성할 수 있었다. 가장 중요하게는, 치료 효력이 심지어 더욱 낮은 용량에서도 조합 치료에 의해 유지되었다.

[0049] 추가 면역 체크포인트 길항제 및 효현제를 이용한 폭스바이러스-기초된 면역요법의 항종양 효력의 증강을 더욱 결정하기 위해, 본원에서 설명된 바와 같은 다양한 추가 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 종양 연관된 항원, 예를 들면, MVA-BN-HER2를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스를 이용한 용량 적정 검정이 수행되었다. 본원에서 예시되고 설명된 바와 같이, 재조합 폭스바이러스 요법은 본 출원의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동될 때, 증가된 치료 효과를 달성할 수 있었다. 가장 중요하게는, 치료 효력이 심지어 더욱 낮은 용량에서도 조합 치료에 의해 유지되었다.

[0050] 최소한 하나의 양상에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 낮은 용량에서도 그들의 유리한 치료 효력과 함께, 현재 암 요법에서 목격되는 불리한 부작용을 최소화하면서 면역 체크포인트 및 폭스바이러스 암 요법의 치료적 이익을 최대화하도록 설계된다. 한 구체예에서, 감소된 부정적인 효과와 함께 이를 치료적 이익은 폭스바이러스 요법과 합동으로 더욱 낮은 용량의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 (가령, CTLA-4 길항제 항체)를 투여함으로써 달성된다. 본 발명에서 제시된 바와 같이, 폭스바이러스 요법과 합동될 때, 면역 체크포인트 효현제 및 길항제는 심지어 더욱 낮은 용량에서도 치료 효력을 유지한다. 유의미하게는, 치료 효력이 유지되었던 이를 더욱 낮은 용량은 면역 체크포인트 효현제 또는 길항제가 단일요법으로서 투여될 때 치료적으로 무효할 용량을 포함할 수 있다.

[0051] 다른 구체예에서, 본 발명은 폭스바이러스 요법 및 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 조합을 투여하는 하나 또는 그 이상의 투약 섭생 및 방법을 포함한다. 최소한 하나의 양상에서, 본원에서 제공된 투약 섭생 및 투여 방법은 암 요법과 연관된 불리한 부작용을 최소화하면서, 면역 체크포인트 및 폭스바이러스 암 요법의 치료적 이익을 최대화하도록 설계된다.

[0052] **종양 항원을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폭스바이러스**

[0053] 본 발명의 한 구체예에서, 최소한 하나의 종양 항원 또는 종양 연관된 항원을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 및/또는 발현하는 재조합 폭스바이러스를 인간 암 환자에 투여하고; 그리고 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 상기 환자에 투여하는 것을 포함하는 방법이 제시된다.

[0054] 한 구체예에서, 종양 항원을 발현하는 재조합 폭스바이러스는 바람직하게는 오소폭스바이러스, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 우두바이러스, 변형된 우두 양카라 (MVA) 바이러스, 또는 MVA-BN이다.

[0055] 우두바이러스 균주의 실례는 균주 Temple of Heaven, Copenhagen, Paris, Budapest, Dairen, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Bern, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda 및 WR이다. 바람직한 우두바이러스 (VV) 균주는 Wyeth (DRYVAX) 균주이다 (U.S. 특허 7,410,644). 다른 바람직한 VV 균주는 변형된 우두바이러스 양카라 (MVA)이다 (Sutter, G. et al. [1994], Vaccine 12: 1032-40). 다른 바람직한 VV 균주는 MVA-BN이다.

[0056] 본 발명의 실시에서 유용하고 부다페스트 조약의 규정에 따라 기탁된 MVA 바이러스 균주의 실례는 1994년 1월 27일자 수탁 번호 ECACC 94012707로 European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom에 기탁된 균주 MVA 572, 그리고 2000년 12월 7일자에 ECACC 00120707 하에 기탁된 MVA 575이다. 2000년 8월 30일자에 번호 V00083008 하에

European Collection of Cell Cultures (ECACC)에 기탁된 MVA-BN, 그리고 이의 유도체가 추가 예시적인 균주이다.

[0057] 비록 MVA-BN이 이의 더욱 높은 안전성 (더욱 적은 복제 적격성)으로 인해 선호되긴 하지만, 모든 MVA가 본 발명에 적합하다. 본 발명의 한 구체예에 따라, MVA 균주는 MVA-BN 및 이의 유도체이다. MVA-BN 및 이의 유도체의 정의는 본원에 참조로서 편입되는 PCT/EP01/13628에서 제공된다.

[0058] 한 구체예에서, 본 발명은 암 요법을 위한 재조합 오소폭스바이러스, 바람직하게는 우두바이러스 (VV), Wyeth 균주, ACAM 1000, ACAM 2000, MVA, 또는 MVA-BN의 이용을 포함한다. 재조합 오소폭스바이러스는 오소폭스바이러스 내로 이종성 서열의 삽입에 의해 산출된다.

[0059] 일정한 구체예에서, 오소폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함한다. 바람직한 구체예에서, TAA는 CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리 항원을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0060] 추가 구체예에서, 종양-연관된 항원은 하나 또는 그 이상의 외래 T_H 에피토프를 포함하도록 변형된다. 다양한 암 면역치료적 작용제가 본원에서 설명된다. 최소한 하나의 양상에서, 본 발명은 면역손상된 환자를 비롯한 인간 및 다른 포유동물의 프라임/부스트 예방접종 섭생에서 이런 작용제를 이용하고; 그리고 체액성 및 세포성 면역 반응 둘 모두를 유도하는, 예를 들면, 기존 Th2 환경에서 Th1 면역 반응을 유도하는 것을 허용한다.

[0061] 일정한 구체예에서, MVA는 2000년 8월 30일자에 번호 V00083008 하에 European Collection of Cell Cultures (ECACC)에 기탁되고, 그리고 국제 PCT 공보 WO2002042480 (예로서, U.S. 특허 번호 6,761,893 및 6,913,752를 또한 참조한다)에서 설명된 MVA-BN이다. 이를 특허 공보에서 설명된 바와 같이, MVA-BN은 세포주 293, 143B, HeLa 및 HaCat에서 재생산적으로 복제하지 않는다. 특히, MVA-BN은 인간 배아 신장 세포주 293에서 0.05 내지 0.2의 증폭 비율을 전시한다. 인간 뼈 골육종 세포주 143B에서, MVA-BN은 0.0 내지 0.6의 증폭 비율을 전시한다. MVA-BN은 인간 자궁경부 선암종 세포주 HeLa에서 0.04 내지 0.8, 그리고 인간 각질세포 세포주 HaCat에서 0.02 내지 0.8의 증폭 비율을 전시한다. MVA-BN은 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (CV1: ATCC 번호 CCL-70)에서 0.01 내지 0.06의 증폭 비율을 갖는다.

[0062] MVA-BN의 증폭 비율은 국제 PCT 공보 WO2002042480 (예로서, U.S. 특허 번호 6,761,893 및 6,913,752를 또한 참조한다)에서 설명된 바와 같이 닦 배아 섬유모세포 (CEF: 일차 배양액)에서 1 초파이다. 상기 바이러스는 CEF 일차 배양액에서 500을 초과하는 비율로 쉽게 증식되고 증폭될 수 있다.

[0063] 일정한 구체예에서, 재조합 MVA는 MVA-BN의 유도체이다. 이런 "유도체"는 기탁된 균주 (ECACC 번호 V00083008) 와 본질적으로 동일한 복제 특징을 전시하지만, 이의 유전체의 하나 또는 그 이상의 부분에서 차이를 전시하는 바이러스를 포함한다. 기탁된 바이러스와 동일한 "복제 특징"을 갖는 바이러스는 CEF 세포 및 세포주, HeLa, HaCat 및 143B에서 기탁된 균주와 유사한 증폭 비율로 복제하고; 그리고 생체내에서, 예로서 AGR129 유전자도입 생쥐 모형에서 결정될 때 유사한 복제 특징을 보여주는 바이러스이다.

[0064] 일정한 구체예에서, 폭스바이러스는 폭스바이러스에 이종성인 추가 뉴클레오티드 서열을 내포하는 재조합 우두 바이러스이다. 일정한 이런 구체예에서, 이종성 서열은 면역계에 의한 반응을 유도하는 에피토프를 코딩한다. 따라서, 일정한 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 에피토프를 포함하는 단백질 또는 작용제에 대항하여 예방 접종하는데 이용된다. 한 구체예에서, 에피토프는 종양-연관된 항원, 바람직하게는, HER-2이다. 한 구체예에서, HER-2 항원은 서열 번호:2의 서열을 포함한다.

[0065] 다른 구체예에서, 에피토프는 항원, 예를 들면, 하지만 제한 없이, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리에서 선택되는 종양-연관된 항원이다.

[0066] 일정한 구체예에서, 본원에서 설명된 종양-연관된 항원을 인코딩하는 이종성 핵산 서열은 바이러스 유전체의 비 필수적인 영역 내로 삽입된다. 일정한 이들 구체예에서, 이종성 핵산 서열은 PCT/EP96/02926에서 설명된 바와 같이 MVA 유전체의 자연발생 결실 부위에 삽입된다. 이종성 서열을 폭스바이러스 유전체 내로 삽입하기 위한 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0067] 다른 구체예에서, 종양 항원을 발현하는 재조합 폭스바이러스는 조류폭스바이러스, 예를 들면, 하지만 제한 없이 계두바이러스이다.

[0068] 용어 "조류폭스바이러스"는 임의의 조류폭스바이러스, 예를 들면, 계두바이러스, 카나리아두바이러스, 운코폭스

바이러스, 미나흐폭스바이러스, 구두바이러스, 프시타신폭스바이러스, 큐알리폭스바이러스, 피아콕폭스바이러스, 펭귄폭스바이러스, 스패로우폭스바이러스, 스탈링폭스바이러스 및 터키폭스바이러스를 지칭한다. 바람직한 조류폭스바이러스는 카나리아두바이러스 및 계두바이러스이다.

[0069] 카나리아두바이러스의 실례는 균주 렌슬러 (Rentschler)이다. ALVAC로 명명된 플라크 정제된 카나리아 두창 균주 (U.S. 특허 번호 5,766,598)는 부다페스트 조약의 규정 하에, 수탁 번호 VR-2547로 American Type Culture Collection (ATCC)에 기탁되었다. 다른 카나리아 두창 균주는 Institute Merieux, Inc.로부터 가용한, LF2 CEP 524 24 10 75로서 지정된 상업적인 카나리아 두창 백신 균주이다.

[0070] 계두바이러스의 실례는 균주 FP-1, FP-5, TROVAC (U.S. 특허 번호 5,766,598), 그리고 POXVAC-TC (U.S. 특허 7,410,644)이다. FP-1는 1일령 닭에서 백신으로서 이용되도록 변형된 Duvette 균주이다. 상기 균주는 O DCEP 25/CEP67/2309 October 1980으로서 지정된 상업적인 계두바이러스 백신 균주이고 Institute Merieux, Inc.로부터 가용하다. FP-5는 American Scientific Laboratories (Division of Schering Corp.) Madison, Wis., 미국 수의학적 면허 번호 165, 일련 번호 30321로부터 가용한 닭 배아 기원의 상업적인 계두바이러스 백신 균주이다.

[0071] 우두바이러스 균주의 실례는 균주 Temple of Heaven, Copenhagen, Paris, Budapest, Dairen, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Bern, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda 및 WR이다. 바람직한 우두바이러스 (VV) 균주는 Wyeth (DRYVAX) 균주 (U.S. 특허 7,410,644), ACAM 1000, 또는 ACAM 2000을 포함할 수 있다. 다른 바람직한 VV 균주는 변형된 우두바이러스 앙카라 (MVA)이다 (Sutter, G. et al. [1994], Vaccine 12: 1032-40). 다른 바람직한 VV 균주는 MVA-BN이다.

[0072] 일정한 구체예에서, 조류폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함한다. 바람직한 구체예에서, TAA는 CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리 항원을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0073] 다른 구체예에서, 종양 항원을 발현하는 재조합 폭스바이러스는 종양 항원을 발현하는 우두바이러스 및 종양 항원을 발현하는 조류폭스바이러스, 예를 들면, 계두의 조합이다. 우두바이러스 및 계두바이러스 조합은 이종성 프라임 부스트 부스트 섭생으로서 투여될 수 있는 것으로 예상된다. 무제한적 실례에서, 이종성 프라임 부스트 섭생은 PROSTVAC® 또는 CV301이다.

[0074] 백신의 제조를 위해, 폭스바이러스는 생리학적으로 허용되는 형태로 전환될 수 있다. 일정한 구체예에서, 이런 제조는 예로서, Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974)에서 설명된 바와 같이, 천연두에 대항하여 예방접종에 이용된 폭스바이러스 백신의 제조에서 경험에 근거된다.

[0075] 예시적인 제조는 다음과 같다. 정제된 바이러스는 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4에서 조제된 5×10^8 TCID_{50/ml}의 역가로 -80°C에서 저장된다. 예방 주사의 제조를 위해, 가령, 10^2 - 10^8 입자의 바이러스가 앰풀, 바람직하게는 유리 앰풀 내에 2% 펩톤 및 1% 인간 알부민의 존재에서 인산염 완충된 식염수 (PBS)에서 동결건조될 수 있다. 대안으로, 예방 주사는 제제에서 바이러스의 단계별, 동결건조에 의해 제조될 수 있다. 일정한 구체예에서, 제제는 추가 첨가제, 예를 들면, 만니톨, 텍스트란, 당, 글리신, 락토오스, 폴리비닐파리돈, 또는 생체 내 투여에 적합한 다른 첨가제, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 항산화제 또는 불활성 가스, 안정제 또는 재조합 단백질 (가령, 인간 혈청 알부민)을 내포한다. 앰풀은 이후, 밀봉되고 적합한 온도에서, 예를 들면, 4°C 및 실온 사이에서 수개월 동안 저장될 수 있다. 하지만, 더 이상 필요하지 않으면, 앰풀은 바람직하게는 -20°C 미만의 온도에서 저장된다.

[0076] 예방접종 또는 요법을 수반하는 다양한 구체예에서, 동결건조물은 0.1 내지 0.5 ml의 수성 용액, 바람직하게는 생리 식염수 또는 Tris 완충액에서 용해되고, 그리고 전신적으로 또는 국부적으로, 다시 말하면, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비내, 피내, 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 투여 경로에 의해 투여된다. 투여 방식, 용량, 그리고 투여 횟수의 최적화는 당업자의 기술 및 지식 범위 안에 있다.

[0077] 일정한 구체예에서, 약독화된 우두바이러스 균주는 면역-약화된 동물, 예를 들면, SIV로 감염된 원숭이 (CD4<400/ μ l의 혈액), 또는 면역-약화된 인간에서 면역 반응을 유도하는데 유용하다. 용어 "면역-약화된"은 단지 불완전 면역 반응만을 전시하거나 또는 감염체에 대항한 방어에서 감소된 효율을 갖는 개체의 면역계의 상태를 설명한다.

[0078] 일정한 예시적인 종양-연관된 항원

[0079] 일정한 구체예에서, 면역 반응은 세포-연관된 폴리펩티드 항원에 대항하여 개체에서 발생된다. 일정한 이런 구체예에서, 세포-연관된 폴리펩티드 항원은 종양-연관된 항원이다.

[0080] 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 2개 또는 그 이상 아미노산의 중합체를 지칭한다. 아미노산은 자연발생뿐만 아니라 비자연발생이거나, 또는 자연발생 아미노산의 화학적 유사체일 수 있다. 상기 용어는 또한, 단백질, 다시 말하면, 최소한 하나의 폴리펩티드를 포함하는 기능적 생체분자를 지칭한다; 최소한 2개의 폴리펩티드를 포함할 때, 이들은 복합체를 형성하거나, 공유 연결되거나, 또는 비공유적으로 연결될 수 있다. 단백질 내에 폴리펩티드(들)은 당화되고 및/또는 지질화되고 및/또는 보결분자단을 포함할 수 있다.

[0081] 바람직하게는, 종양-연관된 항원은 단독으로 또는 합동으로 HER-2, PSA, PAP, CEA, MUC-1, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 이런 예시적인 조합은 CV301으로서 또한 알려져 있는 CEA 및 MUC-1을 포함할 수 있다. 다른 예시적인 조합은 PAP 및 PSA를 포함할 수 있다.

[0082] 다양한 종양-연관된 항원이 당분야에서 공지된다. 예시적인 종양-연관된 항원은 5 알파 환원효소, 알파 태아단백질, AM-1, APC, April, BAGE, 베타-카테닌, Bc112, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, 카텝신, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33 CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, 파르네실 전달효소, FGF8b, FGF8a, FLK-1/KDR, 엽산 수용체, G250, GAGE-페밀리, 가스트린 17, 가스트린-방출 호르몬, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP-1, hCG, 헤파라나아제, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT, IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, MAGE-페밀리, 맘마글로빈, MAP17, 멜란-A/MART-1, 메소텔린, MIC A/B, MT-MMPs, 점액소, NY-ESO-1, 오스테오넥틴, p15, P170/MDR1, p53, p97/멜라노트랜스페린, PAI-1, PDGF, uPA, PRAME, 프로바신, 프로게니포이엔틴, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-페밀리, STAT3, STn, TAG-72, TGF-알파, TGF-베타, 티모신-베타-15, TNF-알파, TYRP-, TYRP-2, 티로시나아제, VEGF, ZAG, p16INK4, 그리고 글루타티온-S-전달효소를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0083] 바람직한 PSA 항원은 위치 155에서 이소류신의 류신으로의 아미노산 변화를 포함한다. 본원에 참조로서 편입되는 U.S. 특허 7,247,615.

[0084] 한 가지 예시적인 종양-연관된 항원은 HER-2이다. HER-2는 현재까지 4가지 상이한 수용체로 구성되는 표피 성장 인자 수용체 패밀리 (c-erbB)의 구성원이다: c-erbB-1 (EGFr), c-erbB-2 (HER-2, c-Neu), c-erbB-3 및 c-erbB-4 (Salomon et al, 1995). C-erbB-3 및 c-erbB-4는 EGFr 및 HER-2보다 충분히 특징화되지 않았다. HER-2는 필수 막 당단백질이다. 성숙 단백질은 EGFr 수용체와 많이 유사한 구조적 특질과 함께 185 kD의 분자량을 갖는다 (Prigent et al, 1992). EGFr 역시 하나의 아단위로 구성되는 필수 막 수용체이다. 이것은 170 kD의 겉보기 분자량을 갖고, 그리고 621개 아미노산의 표면 리간드-결합 도메인, 23개 아미노산의 단일 소수성 막경유 도메인, 그리고 542개 아미노산의 고도로 보존된 세포질 티로신 키나아제 도메인으로 구성된다. 상기 단백질은 N-당화된다 (Prigent et al, 1994).

[0085] 이러한 패밀리 내에 모든 단백질은 티로신 키나아제이다. 리간드와의 상호작용은 수용체 이합체화를 야기하는데, 이것은 티로신 키나아제의 촉매성 작용을 증가시킨다 (Bernard. 1995, Chantry 1995). 상기 패밀리 내에 단백질은 동종- 및 이형이합체를 형성할 수 있는데, 이것은 그들의 활성에 중요하다. EGFr은 성장 증진 효과를 전달하고 세포에 의한 글루코오스 및 아미노산의 흡수를 자극한다 (Prigent et al 1992). HER-2는 또한, 성장 증진 신호를 전달한다.

[0086] 표피 성장 인자 수용체는 정상적인 조직에서 적은 양으로 발현되지만, 많은 유형의 암에서 과다발현된다. EGFr은 유방암 (Earp et al, 1993, Eppenberger 1994), 신경교종 (Schlegel et al, 1994), 위암 (Tkunaga et al, 1995), 피부 편평상피 암종 (Fujii 1995), 난소암 (van Dam et al, 1994) 등에서 과다발현된다. HER-2는 또한, 극소수의 정상적인 인간 조직, 가장 특징적으로 분비성 상피에서 적은 양으로 발현된다. HER-2의 과다발현은 유방, 위, 췌장, 방광 및 난소암의 약 30%에서 발생한다.

[0087] 이들 수용체의 발현은 종양의 분화의 정도 및 암 유형에 따라 변한다, 예를 들면, 유방암에서, 원발성 종양은 양쪽 수용체를 과다발현하고; 반면 위암에서, 과다발현은 전이성 종양에서 후기 단계에서 발생한다 (Salomon et al, 1995). 암종 세포 상에서 과다발현된 수용체의 숫자는 환자로부터 단리된 여러 두경부암, 외음부, 유방 및 난소암 라인의 경우에 10^6 /세포보다 크다 (Dean et al, 1994).

[0088] 수용체의 EGFr 패밀리가 종양 면역요법을 위한 적합한 표적을 구성하는 데에는 여러 이유가 있다. 첫 번째, 이

들은 많은 유형의 암에서 과다발현되는데, 이것은 면역 반응이 종양을 향하도록 할 것이다. 두 번째, 종양은 종종, 수용체의 이러한 패밀리에 대한 리간드를 발현하거나 또는 과다발현하고, 그리고 일부가 이를 리간드에 의해 매개된 증식 효과에 과민성이다. 세 번째, 성장 인자 수용체를 과다발현하는 종양을 앓는 환자는 종종, 불량한 예후를 갖는다. 과다발현은 특히 유방암, 폐암, 그리고 방광암에서 불량한 예후와 밀접하게 연결되었고, 그리고 침습성/전이성 표현형과 연관될 수 있는데, 이들 표현형은 전통적인 요법에 상당히 둔감하다 (Eccles et al., 1994).

[0089] 변형된 종양-연관된 항원

[0090] 일정한 구체예에서, 세포-연관된 폴리펩티드 항원은 APC의 표면 상에서 MHC 클래스 I 분자와 연관하여 제시될 때, 자신의 표면 상에 폴리펩티드 항원으로부터 유래된 에피토프를 제시하는 세포에 대항하여 CTL 반응이 유도되도록 변형된다. 일정한 이런 구체예에서, 최소한 하나의 첫 번째 외래 TH 에피토프는 제시될 때, APC의 표면 상에서 MHC 클래스 II 분자와 연관된다. 일정한 이런 구체예에서, 세포-연관된 항원은 종양-연관된 항원이다.

[0091] 에피토프를 제시할 수 있는 예시적인 APC는 수지상 세포 및 대식세포를 포함한다. 추가 예시적인 APC는 임의의 피노사이팅 또는 식균 APC를 포함하는데, 이것은 1) MHC 클래스 I 분자에 결합된 CTL 에피토프 및 2) MHC 클래스 II 분자에 결합된 T_H 에피토프를 동시에 제시할 수 있다.

[0092] 일정한 구체예에서, 본원에서 제공된 종양-연관된 항원 (TAA), 예를 들면, 하지만 제한 없이, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리 중에서 하나 또는 그 이상에 변형은 개체에 투여 후, 본원에서 설명된 TAA 중에서 하나 또는 그 이상과 지배적으로 반응하는 다중클론 항체가 유도되도록 만들어진다. 이런 항체는 종양 세포를 공격하고 제거할 뿐만 아니라 전이성 세포가 전이로 발달하는 것을 예방 할 수 있었다. 이러한 항종양 효과의 작동체 기전은 보체 및 항체 의존성 세포 세포독성에 의해 매개될 것이다. 이에 더하여, 유도된 항체는 또한, 수용체의 성장 인자 의존성 올리고-이합체화 및 내재화의 저해를 통해 암 세포 성장을 저해할 수 있었다. 일정한 구체예에서, 이런 변형된 TAA는 종양 세포에 의해 전시된 공지된 및/또는 예측된 TAA 에피토프에 대해 지향된 CTL 반응을 유도할 수 있었다.

[0093] 일정한 구체예에서, 변형된 TAA 폴리펩티드 항원은 세포-연관된 폴리펩티드 항원의 CTL 에피토프 및 변이를 포함하고, 여기서 변이는 외래 T_H 에피토프의 최소한 하나의 CTL 에피토프를 포함한다. 일정한 이런 변형된 TAA는 무제한적 실례에서, 최소한 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 하나 또는 그 이상의 HER-2 폴리펩티드 항원 및 외래 T_H 에피토프의 최소한 하나의 CTL 에피토프를 포함하는 변이를 포함할 수 있고, 그리고 이들을 생산하는 방법은 U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허 공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 설명된다.

[0094] 일정한 구체예에서, 외래 T_H 에피토프는 자연발생 "불규칙한" T-세포 에피토프이다. 이런 불규칙한 T-세포 에피토프는 동물 종의 대부분의 개체 또는 동물 개체군에서 활성이다. 일정한 구체예에서, 백신은 이런 불규칙한 T-세포 에피토프를 포함한다. 일정한 이런 구체예에서, 불규칙한 T-세포 에피토프의 이용은 동일한 백신 내에 매우 다수의 상이한 CTL 에피토프에 대한 필요를 감소시킨다. 예시적인 불규칙한 T-세포 에피토프는 P2 및 P30 에피토프를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 파상풍 독소 (Panina-Bordignon et al., 1989), 디프테리아 독소, 인플루엔자 바이러스 적혈구응집소 (HA), 그리고 열대열원충 (*P. falciparum*) CS 항원으로부터 에피토프를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0095] 추가 불규칙한 T-세포 에피토프는 상이한 HLA-DR에 의해 인코딩된 HLA-DR 분자의 대부분에 결합할 수 있는 펩티드를 포함한다. 가령, WO 98/23635 (Frazer IH et al., The University of Queensland에 양도됨); Southwood S et. al., 1998, J. Immunol. 160: 3363 3373; Sinigaglia F et al., 1988, Nature 336: 778 780; Rammensee HG et al., 1995, Immunogenetics 41: 4 178 228; Chicz RM et al., 1993, J. Exp. Med 178: 27 47; Hammer J et al., 1993, Cell 74: 197 203; 그리고 Falk K et al., 1994, Immunogenetics 39: 230 242를 참조한다. 후자 참고문헌은 또한, HLA-DQ 및 -DP 리간드를 다룬다. 이들 참고문헌에서 열거된 모든 에피토프는 이들과 공통 모티프를 공유하는 에피토프가 그러한 것처럼, 본원에서 설명된 바와 같은 후보 자연 에피토프로서 적절하다.

[0096] 일정한 다른 구체예에서, 불규칙한 T-세포 에피토프는 대부분의 일배체형에 결합할 수 있는 인공 T-세포 에피토프이다. 일정한 이런 구체예에서, 인공 T-세포 에피토프는 WO 95/07707에서 및 상응하는 논문 Alexander J et al., 1994, Immunity 1: 751 761에서 설명된 바와 같은 범 DR 에피토프 펩티드 ("PADRE")이다.

[0097] mHER2

[0098] 다양한 변형된 HER-2 폴리펩티드 항원 및 이들을 생산하기 위한 방법이 U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허

공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 설명되는데, 이들은 본원에 참조로서 편입된다. 이들 문서는 HER-2 폴리펩티드 내에 상이한 위치에서 불규칙한 T-세포 에피토프를 포함하는 다양한 변형된 HER-2 폴리펩티드 항원을 설명한다.

[0099] 인간 HER-2 서열은 단백질의 일차 구조에만 근거하여 다수의 도메인으로 나뉘질 수 있다. 이들 도메인은 다음과 같다. 세포외 (수용체) 도메인은 아미노산 1-654로부터 연장되고 아래와 같은 여러 서브도메인을 내포한다: 도메인 I (성숙 폴리펩티드의 N 말단 도메인)은 아미노산 1-173으로부터 연장된다; 도메인 II (시스테인 풍부한 도메인, 24개 시스테인 잔기)는 아미노산 174-323으로부터 연장된다; 도메인 III (상동성 EGF 수용체 내에 리간드 결합 도메인)은 아미노산 324-483으로부터 연장된다; 그리고 도메인 IV (시스테인 풍부한 도메인, 20개 시스테인 잔기)는 아미노산 484-623으로부터 연장된다. 막경유 잔기는 아미노산 654-675로부터 연장된다. 세포내 (키나아제) 도메인은 아미노산 655-1235로부터 연장되고 티로신 키나아제 도메인을 내포하는데, 이것은 아미노산 655-1010으로부터 연장된다 (코어 TK 도메인은 725-992로부터 연장된다); 그리고 아미노산 1011-1235로부터 연장되는 C 말단 도메인.

[0100] P2 또는 P30 인간 T 보조 에피토프에 의해 이동되는 HER-2의 아미노산 서열 내에 부위의 선별은 U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허 공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 설명된다. 요약하면, 다음의 파라미터가 고려되었다:

1. 공지된 및 예측된 CTL 에피토프;

2. 관련된 수용체 (특히 EGFR)에 상동성;

3. 시스테인 잔기의 보존;

4. 예측된 루프, α -나선 및 β -시트 구조;

5. 잠재적 N-당화 부위;

6. 노출된 및 매몰된 아미노산 잔기의 예측;

7. 도메인 조직화.

[0108] CTL 에피토프는 도메인 I, 도메인 III, TM 도메인, 그리고 TK 도메인 내에 2개 또는 3개의 "핫스팟"에서 군집되는 것으로 보인다. U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허 공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 설명된 바와 같이, 이들은 거의 보존될 것이다.

[0109] 다른 수용체와 고도의 상동성을 갖는 영역은 HER-2의 "전반적인" 삼차 구조, 그리고 따라서 항체 인식에 구조적으로 중요할 개연성이 있고, 반면 낮은 상동성을 갖는 영역은 아마도 결과로서 구조의 단지 국부 변경으로 교체될 수 있다.

[0110] 시스테인 잔기는 종종, 분자내 이황화 가교 형성을 관리되고, 그리고 따라서 삼차 구조에 관련되고 변화되지 않아야 한다. 알파-나선 또는 베타-시트 구조를 형성하는 것으로 예측된 영역은 외래 에피토프의 삽입 포인트로서 회피되어야 하는데, 그 이유는 이를 영역이 단백질의 접힘에 관련되는 것으로 생각되기 때문이다.

[0111] 잠재적 N-당화 부위는 단백질의 만노실화가 요망되면, 보존되어야 한다.

[0112] 분자 내에 내측인 것으로 예측된 영역 (그들의 소수성 성질에 의해)은 바람직하게는 보존되어야 하는데, 그 이유는 이들이 접힘에 관련될 수 있었기 때문이다. 대조적으로, 용매 노출된 영역은 모형 T_H 에피토프 P2 및 P30의 삽입을 위한 후보 위치로서 역할을 할 수 있었다.

[0113] 최종적으로, 단백질의 도메인 조직화가 단백질 구조 및 기능에 대한 이의 관련성 때문에 고려되어야 한다.

[0114] U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허 공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 설명된 바와 같이, 전략의 초점은 HER-2의 세포외 부분의 구조를 가능한 한 보존하는 것이었는데, 그 이유는 이것이 중화 항체에 대한 표적으로서 적절한 단백질의 부분이기 때문이다. 대조적으로, 암 세포의 표면 상에서 선천적 막 결합된 HER-2의 세포내 부분은 체액성 면역계가 접근불가능하다.

[0115] HER-2의 다양한 도메인 내에 삽입된 파상풍 독소의 P2 및 P30 에피토프를 이용한 다양한 예시적인 구조체는 U.S. 특허 번호 7,005,498 및 U.S. 특허 공개 번호 2004/0141958 및 2006/0008465에서 제공된다. "mHER2"로서 지칭되는 한 가지 예시적인 변형된 HER-2 폴리펩티드 항원은 세포외 도메인 및 막경유 도메인의 9개 아미노산;

변형된 HER-2 폴리펩티드의 도메인 II 내에 아미노산 잔기 273 내지 287 사이에 삽입된 P2 에피토프; 그리고 변형된 HER-2 폴리펩티드의 도메인 IV 내에 아미노산 잔기 655 내지 675 사이에 삽입된 P30 에피토프를 포함한다.

[0116] 재조합 MVA-BN-mHER2

무제한적 구체예에서, 종양-연관된 항원을 포함하는 재조합 MVA, 예를 들면, MVA-BN-mHER2는 아래와 같이 구축된다. 초기 바이러스 스톡이 복제에 허용적인 세포 유형, 예를 들면, CEF 세포를 이용한 세포 배양 동안 재조합에 의해 산출된다. 세포는 약독화된 우두바이러스, 예를 들면, MVA-BN으로 접종되고, 그리고 종양-연관된 항원, 예를 들면, 바이러스 유전체의 mHER2 서열 및 측면 영역을 인코딩하는 재조합 플라스미드 (가령, pBN146)로 형질감염된다. 한 무제한적 구체예에서, 플라스미드 pBN146은 MVA-BN 내에 또한 존재하는 서열 (14L 및 15L 개방해독틀)을 내포한다. mHER2 서열은 MVA-BN 바이러스 유전체 내로 재조합을 허용하기 위해 MVA-BN 서열 사이에 삽입된다. 일정한 구체예에서, 플라스미드는 또한, CEF 세포에서 재조합 구조체의 선별을 허용하는 하나 또는 그 이상의 선별 유전자를 포함하는 선별 카세트를 내포한다. 바람직한 구체예에서, 재조합 MVA는 서열 번호:2를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0118] 배양액의 동시적 감염 및 형질감염은 바이러스 유전체 및 재조합 플라스미드 사이에 상동성 재조합이 발생하도록 허용한다. 삽입물-운반 바이러스는 이후, 단리되고, 특징화되고, 그리고 바이러스 스톡이 제조된다. 일정한 구체예에서, 바이러스는 선별 유전자, gpt 및 EGFP를 인코딩하는 영역의 상실을 허용하기 위해 선별의 부재에서 CEF 세포 배양액에서 계대된다.

[0119] 면역 체크포인트 분자의 길항제

[0120] 본원에서 설명된 바와 같이, 최소한 한 양상에서, 본 발명은 면역 체크포인트 길항제의 이용을 포함한다. 이런 면역 체크포인트 길항제는 면역 체크포인트 분자, 예를 들면, 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4), 예정된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1), 예정된 사멸-리간드 1 (PDL-1), 림프구-활성화 유전자 3 (LAG-3), 그리고 T-세포 면역글로불린 및 점액소 도메인 3 (TIM-3)의 길항제를 포함한다. CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, 또는 TIM-3의 길항제는 각각, CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, 또는 TIM-3 기능을 간섭한다.

[0121] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 이런 길항제는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3 각각에 특이적으로 결합하고, 그리고 생물학적 활성 및 기능을 저해하고 및/또는 차단하는 항체를 포함할 수 있다.

[0122] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 다른 길항제는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 발현을 간섭하는 안티센스 핵산 RNA; CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 발현을 간섭하는 짧은 간섭 RNA; 그리고 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 소형 분자 저해제를 포함할 수 있다.

[0123] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3의 후보 길항제는 당분야에서 공지된 및/또는 본 출원 내에서 개시된 다양한 기술에 의해 기능, 예를 들면, 시험관내 또는 생쥐 모형에서 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3 및 TIM-3 기능을 간섭하는 능력에 대해 선별검사될 수 있다.

[0124] ICOS의 효현제

[0125] 본 발명은 ICOS의 효현제를 더욱 포함한다. ICOS의 효현제는 ICOS를 활성화시킨다. ICOS는 활성화된 T 세포 상에서 발현된 양성 동시자극성 분자이고, 그리고 이의 리간드에 결합은 그들의 증식을 증진한다 (Dong, *Nature* 2001; 409:97-101).

[0126] 한 구체예에서, 효현제는 ICOS-L, ICOS 자연 리간드이다. 효현제는 결합 및 활성화 성질을 유지하는 ICOS-L의 돌연변이된 형태일 수 있다. ICOS-L의 돌연변이된 형태는 시험관내에서 ICOS를 자극하는 활성에 대해 선별검사될 수 있다.

[0127] 항체

[0128] 한 구체예에서, CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3의 길항제, 그리고 ICOS의 효현제는 항체이다. 항체는 합성, 단일클론, 또는 다중클론일 수 있고, 그리고 당분야에서 널리 공지된 기술에 의해 만들어질 수 있다. 이런 항체는 항체의 항원 결합 부위를 통해 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 특이적으로 결합한다 (비특이적 결합과는 대조적으로). CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS 폴리펩티드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 그들과 면역반응성인 항체를 생산하는데 있어서 면역원으로서 이용될 수 있다. 더욱 특정하게는, 폴리펩티드, 단편, 변이체, 융합 단백질 등은 항체의 형성을 이끌어내는 항원 결정인자 또는 에피토프를 내포한다.

[0129] 이를 항원 결정인자 또는 에피토프는 선형 또는 입체형태적 (불연속적)일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩티드의 아미노산의 단일 섹션으로 구성되고, 반면 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 단백질 접힘 시에 매우 근접하여 놓이는 폴리펩티드 사슬의 상이한 영역으로부터 아미노산 섹션으로 구성된다 (C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 접힘된 단백질이 복잡한 표면을 갖기 때문에, 가용한 에피토프의 숫자가 매우 많다; 하지만, 단백질의 입체형태 및 입체 장애로 인해, 에피토프에 실질적으로 결합하는 항체의 숫자는 가용한 에피토프의 숫자보다 적다 (C. A. Janeway, Jr. and P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). 에피토프는 당분야에서 공지된 방법 중에서 한 가지에 의해 확인될 수 있다.

[0130] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 특이적으로 결합하고, 그리고 이의 기능을 차단하거나 ("길항체 항체") 또는 이의 기능을 증강/활성화시키는 ("효현제 항체"), scFv 단편을 비롯한 항체는 본 발명에 의해 포괄된다. 이런 항체는 전통적인 수단에 의해 산출될 수 있다.

[0131] 한 구체예에서, 본 발명은 각각, CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS 면역 체크포인트 분자의 기능을 차단하거나 ("길항체 항체") 또는 증강/활성화시키는 ("효현제 항체"), CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 대한 단일클론 항체를 포괄한다. PD-1에 대한 예시적인 차단 단일클론 항체는 WO 2011/041613에서 설명되고, 이것은 본원에 참조로서 편입된다.

[0132] 항체는 높은 결합능 및 특이성 둘 모두로 그들의 표적에 결합할 수 있다. 이들은 상대적으로 큰 분자 (~150kDa)인데, 이들은 항체 결합 부위가 단백질-단백질 상호작용 부위의 근접 범위에 들어갈 때, 두 단백질 (가령, PD-1 및 이의 표적 리간드) 사이에 상호작용을 입체적으로 저해할 수 있다. 본 발명은 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS 리간드 결합 부위에 매우 근접하여 에피토프에 결합하는 항체를 더욱 포괄한다.

[0133] 다양한 구체예에서, 본 발명은 분자간 상호작용 (가령, 단백질-단백질 상호작용)을 간섭하는 항체뿐만 아니라 분자내 상호작용 (가령, 분자 내에 입체형태적 변화)을 섭동하는 항체를 포괄한다. 항체는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS의 생물학적 활성, 또는 리간드에 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS의 결합을 차단하거나 또는 증강/활성화시키는 능력에 대해, 및/또는 다른 성질에 대해 선별검사될 수 있다.

[0134] 다중클론 및 단일클론 항체 둘 모두 전통적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0135] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS, 그리고 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 아미노산 서열에 근거된 웹티드는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는데 활용될 수 있다. 용어 "항체"는 다중클론 항체, 단일클론 항체, 이들의 단편, 예를 들면, F(ab')2 및 Fab 단편, 단일 사슬 가변 단편 (scFvs), 단일-도메인 항체 단편 (VHHs 또는 나노바디), 이가 항체 단편 (디아바디)뿐만 아니라 임의의 재조합적으로 및 합성적으로 생산된 결합 상대를 포함하는 것으로 의미된다.

[0136] 항체는 그들이 약 $10^7 M^{-1}$ 보다 크거나 또는 이와 동등한 Ka로 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩티드에 결합하면 특이적으로 결합하는 것으로 규정된다. 결합 상대 또는 항체의 친화성은 전통적인 기술, 예를 들면, Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660 (1949)에 의해 설명된 것들을 이용하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0137] 다중클론 항체는 당분야에서 널리 공지된 절차를 이용하여, 다양한 공급원, 예를 들면, 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 토끼, 생쥐, 또는 쥐로부터 쉽게 산출될 수 있다. 일반적으로, 정제된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS, 또는 적절하게 접합되는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 아미노산 서열에 근거된 웹티드는 전형적으로 비경구 주사를 통해 숙주 동물에 투여된다. CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS의 면역원성을 어쥬번트, 예를 들면, 프로인드 완전한 또는 불완전 어쥬번트의 이용을 통해 증강될 수 있다. 추가 접종 면역화 이후에, 혈청의 작은 표본이 수집되고 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩티드에 반응성에 대해 시험된다. 이런 결정에 유용한 다양한 검정의 실례는 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow 및 Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988에서 설명된 것들뿐만 아니라 역류 면역전기영동 (CIEP), 방사면역검정, 방사성-면역침전, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 도트 블롯 검정, 그리고 샌드위치 검정과 같은 절차를 포함한다. U.S. 특허 번호 4,376,110 및 4,486,530을 참조한다.

[0138] 단일클론 항체는 널리 공지된 절차를 이용하여 쉽게 제조될 수 있다. 가령, U.S. 특허 번호 RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439, 그리고 4,411,993; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol (eds.), 1980에서 설명된 절차를

참조한다.

[0139] 가령, 속주 동물, 예를 들면 생쥐는 임의선택적으로 어쥬번트의 존재에서, 단리된 및 정제된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 또는 접합된 CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 웨პ티드로 약 3 주 간격에서 최소한 1회 및 바람직하게는 최소한 2회 복막내 주사될 수 있다. 생쥐 혈청은 이후, 어떤 동물이 융합하는데 최적 인지를 결정하기 위해 전통적인 도트 블롯 기술 또는 항체 포획 (ABC)에 의해 검정된다. 대략 2 내지 3 주 후, 이를 생쥐는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 또는 접합된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 웨პ티드의 정맥내 부스트가 제공된다. 생쥐는 추후 희생되고, 그리고 비장 세포가 확립된 프로토콜에 따라서 상업적으로 가용한 골수종 세포, 예를 들면, Ag8.653 (ATCC)과 융합된다. 간단히 말하면, 골수종 세포는 배지에서 수회 세척되고 약 3개 비장 세포 대 1개 골수종 세포의 비율에서 생쥐 비장 세포에 융합된다. 융합 작용제는 당분야에서 이용되는 임의의 적절한 작용제, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)일 수 있다. 융합체는 융합된 세포의 선택적 성장을 허용하는 배지를 내포하는 평판 내로 도말된다. 융합된 세포는 이후, 대략 8 일 동안 성장하도록 허용되었다. 결과의 하이브리도마로부터 상층액은 수집되고, 그리고 염소 항생쥐 Ig로 먼저 코팅된 평판에 첨가된다. 세척 이후에, 라벨, 예를 들면, 표지화된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리웨პ티드가 각 웰에 첨가되고, 그 이후에 배양된다. 양성 웰은 차후에 검출될 수 있다. 양성 클론은 대량 배양으로 성장될 수 있고, 그리고 상층액은 단백질 A 칼럼 (Pharmacia) 위에서 차후에 정제된다.

[0140] 본 발명의 단일클론 항체는 대안적 기술, 예를 들면, Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990)에 의해 설명된 것들을 이용하여 생산될 수 있고, 이것은 본원에 참조로서 편입된다. 유사하게, 결합 상대는 특이적 결합 항체를 인코딩하는 유전자의 가변 영역을 통합하도록 재조합 DNA 기술을 이용하여 작제될 수 있다. 이런 기술은 Larrick et al., Biotechnology, 7:394 (1989)에서 설명된다.

[0141] 전통적인 기술에 의해 생산될 수 있는, 이런 항체의 항원 결합 단편 역시 본 발명에 의해 포함된다. 이런 단편의 실례는 Fab 및 F(ab')2 단편을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 유전공학 기술에 의해 생산된 항체 단편 및 유도체 역시 제공된다.

[0142] 본 발명의 단일클론 항체는 키메라 항체, 예를 들면, 인간화 이형의 뮤린 단일클론 항체를 포함한다. 이런 인간화 항체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있고, 그리고 이들 항체가 인간에 투여될 때 감소된 면역원성의 이점을 제공한다. 한 구체예에서, 인간화 단일클론 항체는 뮤린 항체의 가변 영역 (또는 이의 항원 결합 부위) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 영역을 포함한다. 대안으로, 인간화 항체 단편은 뮤린 단일클론 항체의 항원 결합 부위 및 인간 항체로부터 유래된 가변 영역 단편 (항원 결합 부위를 결여)을 포함할 수 있다. 키메라 및 더욱 가공된 단일클론 항체의 생산을 위한 절차는 Riechmann et al. (Nature 332:323, 1988), Liu et al. (PNAS 84:3439, 1987), Larrick et al. (Bio/Technology 7:934, 1989), 그리고 Winter and Harris (TIPS 14:139, May, 1993)에서 설명된 것들을 포함한다. 유전자도입에 의해 항체를 산출하기 위한 절차는 GB 2,272,440, U.S. 특허 번호 5,569,825 및 5,545,806에서 발견될 수 있고, 이들 둘 모두 본원에 참조로서 편입된다.

[0143] 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 만들어질 수 있는, 인간 및 비인간 부분 둘 모두를 포함하는 유전공학 방법에 의해 생산된 항체, 예를 들면, 키메라 및 인간화 단일클론 항체가 이용될 수 있다. 이런 키메라 및 인간화 단일클론 항체는 당분야에서 공지된 표준 DNA 기술을 이용하여, 예를 들면, Robinson et al. 국제 공개 번호 WO 87/02671; Akira, et al. 유럽 특허 출원 0184187; Taniguchi, M., 유럽 특허 출원 0171496; Morrison et al. 유럽 특허 출원 0173494; Neuberger et al. PCT 국제 공개 번호 WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. 특허 번호 4,816,567; Cabilly et al. 유럽 특허 출원 0125023; Better et al., Science 240:1041 1043, 1988; Liu et al., PNAS 84:3439 3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139:3521 3526, 1987; Sun et al. PNAS 84:214 218, 1987; Nishimura et al., Canc. Res. 47:999 1005, 1987; Wood et al., Nature 314:446 449, 1985; 그리고 Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1553 1559, 1988); Morrison, S. L., Science 229:1202 1207, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; Winter U.S. 특허 번호 5,225,539; Jones et al., Nature 321:552 525, 1986; Verhoeven et al., Science 239:1534, 1988; 그리고 Beidler et al., J. Immunol. 141:4053 4060, 1988에서 설명된 방법을 이용하여 유전공학에 의해 생산될 수 있다.

[0144] 합성 및 반합성 항체와 관련하여, 이런 용어는 항체 단편, 아이소타입 변환 항체, 인간화 항체 (가령, 생쥐-인간, 인간-생쥐), 하이브리드, 복수 특이성을 갖는 항체, 그리고 완전히 합성 항체-유사 분자를 커버하는 것으로 의도되지만 이들에 한정되지 않는다.

[0145] 치료적 적용의 경우에, 항체에 대한 환자의 면역 반응을 최소화하기 위해 인간 불변과 가변 영역을 갖는 "인간"

단일클론 항체가 종종 바람직하다. 이런 항체는 인간 면역글로불린 유전자를 내포하는 유전자도입 동물을 면역화함으로써 산출될 수 있다. Jakobovits et al. Ann NY Acad Sci 764:525-535 (1995)를 참조한다.

[0146] CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩티드에 대한 인간 단일클론 항체는 또한, 개체의 램프구로부터 유래된 mRNA로부터 제조된 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 cDNA를 이용하여, 조합 면역글로불린 라이브러리, 예를 들면, Fab 파지 전시 라이브러리 또는 scFv 파지 전시 라이브러리를 구축함으로써 제조될 수 있다. 가령, McCafferty et al. PCT publication WO 92/01047; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581 597; 그리고 Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725 734를 참조한다. 이에 더하여, 항체 가변 영역의 조합 라이브러리는 공지된 인간 항체를 돌연변이시킴으로써 산출될 수 있다. 가령, CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS에 결합하는 것으로 알려진 인간 항체의 가변 영역은 예로서, 무작위로 변경된 돌연변이화된 올리고뉴클레오티드를 이용함으로써 돌연변이되어 돌연변이된 가변 영역의 라이브러리가 산출될 수 있고, 이것은 이후, CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS에 결합에 대해 선별검사될 수 있다. 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 영역 내에 무작위 돌연변이유발을 유도하는 방법, 무작위화된 중쇄와 경쇄를 교차시켜 짹짓기를 형성하는 방법, 그리고 선별검사 방법은 예로서, Barbas et al. PCT 공보 WO 96/07754; Barbas et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4457 4461에서 발견될 수 있다.

[0147] 면역글로불린 라이브러리는 항체 전시 라이브러리를 형성하기 위해, 바람직하게는 실모양 파지로부터 유래된 전시 패키지의 개체군에 의해 발현될 수 있다. 항체 전시 라이브러리를 산출하는데 있어서 특히 이용될 수 있는 방법 및 시약의 실례는 예로서, Ladner et al. U.S. 특허 번호 5,223,409; Kang et al. PCT 공보 WO 92/18619; Dower et al. PCT 공보 WO 91/17271; Winter et al. PCT 공보 WO 92/20791; Markland et al. PCT 공보 WO 92/15679; Breitling et al. PCT 공보 WO 93/01288; McCafferty et al. PCT 공보 WO 92/01047; Garrard et al. PCT 공보 WO 92/09690; Ladner et al. PCT 공보 WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370 1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81 85; Huse et al. (1989) Science 246:1275 1281; Griffiths et al. (1993) 상기 참조; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889 896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624 628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576 3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373 1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133 4137; 그리고 Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978 7982에서 발견될 수 있다. 전시 패키지 (가령, 실모양 파지)의 표면 상에서 일단 전시되면, 항체 라이브러리는 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 또는 ICOS 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발현하는 패키지를 확인하고 단리하기 위해 선별검사된다. 바람직한 구체예에서, 라이브러리의 일차 선별검사는 고정된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩티드로 패닝하는 것을 수반하고, 그리고 고정된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 폴리펩티드에 결합하는 항체를 발현하는 전시 패키지가 선별된다.

[0148] 본원에서 이미 설명된 CTLA-4, PD-1, PDL-1, LAG-3, TIM-3 및 ICOS 길항체 및 효현제에 더하여, 길항체 및 효현제는 당분야에서 공지된 것들을 포함할 수 있는 것으로 예기된다. 가령, 이필리무맙® 및 트레멜리무맙은 공지된 CTLA-4 항체이다. 추가적으로, 람브롤리주맙, 암플리뮨-224 (AMP-224), 암플리뮨 -514 (AMP-514), 니볼루맙, MK-3475, 그리고 B7H1은 공지된 PD-1 항체이다. PDL-1에 대한 일부 예시적인 공지된 항체는 다음을 포함한다: MPDL3280A (Roche), MED14736 (AZN), MSB0010718C (Merck).

[0149] 본 발명에서, 면역 체크포인트 길항체 또는 효현제는 소형 문자, 펩티드, 가용성 수용체 단백질, 그리고 다른 유형의 융합 단백질에서 구현될 수 있는 것으로 또한 구상된다.

종양 항원을 발현하는 폭스바이러스 및 면역 체크포인트 길항체 또는 효현제로 복합 요법

[0150] 최소한 하나의 양상에서, 본 발명은 종양 항원을 인코딩하는 재조합 폭스바이러스 및 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현제의 조합을 이용한 치료 방법을 포함한다.

[0152] 한 구체예에서, 종양-연관된 항원 HER-2를 과다발현하는 세포에 의해 매개된 암 (가령, 유방암)을 앓는 환자는 종양-연관된 항원, HER-2 항원을 인코딩하는 오소폭스바이러스 (가령, 우두바이러스, Wyeth, ACAM1000, ACAM2000, MVA, 또는 MVA-BN) 또는 조류폭스바이러스 (가령, 계두바이러스, POXVAC-TC), 그리고 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 항체, 효현제 또는 길항제의 본 발명에 따른 조합에 의해 치료될 수 있다. 바람직한 구체예에서, MVA는 MVA-BN이다. 특히 바람직한 구체예에서, MVA는 서열 번호:2를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0153] 한 구체예에서, 전립선암을 앓는 환자는 PSA 및/또는 PAP 항원을 인코딩하는 오소폭스바이러스, 예를 들면, 우두바이러스 (예를 들면, 하지만 제한 없이, 우두바이러스, Wyeth, ACAM1000, ACAM2000, MVA, 또는 MVA-BN) 또

는 조류폭스바이러스 (가령, 계두바이러스, 예를 들면, POXVAC-TC), 그리고 하나 또는 그 이상의 항체, 효현제 또는 길항제의 본 발명에 따른 조합에 의해 치료될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 우두바이러스는 PROSTVAC®의 일부이다.

[0154] 한 구체예에서, 종양-연관된 항원 CEA 및/또는 MUC-1을 과다발현하는 세포에 의해 매개된 암 (가령, 유방암, 대장암, 폐암 및 난소암)을 앓는 환자는 CEA 및/또는 MUC-1 항원을 인코딩하는 오소폭스바이러스, 예를 들면, 우두바이러스 (가령, 우두바이러스, Wyeth, ACAM1000, ACAM2000, MVA 또는 MVA-BN Wyeth, 또는 MVA) 또는 조류폭스바이러스 (가령, 계두바이러스 (가령 POXVAC-TC)), 그리고 하나 또는 그 이상의 항체, 효현제 또는 길항제의 본 발명에 따른 조합에 의해 치료될 수 있다.

[0155] 재조합 폭스바이러스는 전신적으로 또는 국부적으로, 다시 말하면, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 비내, 피내, 난절, 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 난절에 의 한다. 더욱 바람직하게는, 투여는 피하 주사에 의한다. 한 구체예에서, 10^{5-10} TCID₅₀의 재조합 폭스바이러스가 환자에 투여된다. 바람직하게는, 10^{7-10} TCID₅₀의 재조합 폭스바이러스가 환자에 투여된다. 더욱 바람직하게는, 10^{8-10} TCID₅₀의 재조합 폭스바이러스가 환자에 투여된다. 가장 바람직하게는, 10^{8-10} TCID₅₀의 재조합 폭스바이러스가 환자에 투여된다.

[0156] 암은 바람직하게는 전립선암, 유방암, 폐암, 위암, 췌장암, 방광암, 또는 난소암을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 바람직한 구체예에서, 암은 전이성 유방암이다.

[0157] 암 환자는 생쥐 또는 쥐를 비롯한 임의의 포유동물일 수 있다. 바람직하게는, 암 환자는 영장류, 가장 바람직하게는, 인간이다.

[0158] 하나 또는 그 이상의 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 면역 체크포인트 효현제 및/또는 길항제 투여의 동일자에, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 일 이내에 투여를 위한 것이다. 재조합 폭스바이러스는 면역 체크포인트 효현제 및/또는 길항제 전후에 투여될 수 있다.

[0159] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 항체, 효현제 또는 길항제, 그리고 종양 항원을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폭스바이러스는 동시에 투여된다. 조합 치료는 각 치료 단독보다 뛰어나다.

[0160] 하나 또는 그 이상의 바람직한 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 면역 체크포인트 길항제 및 효현제의 투여에 앞서 투여를 위한 것이다.

상동성/이종성 프라임 부스트 섭생을 이용한 복합 요법

[0162] 상기 규정된 바와 같은 재조합 폭스바이러스의 단일 투여로 면역 반응을 유도하는 것이 가능하다. 본 발명에 따른 폭스바이러스는 또한, 상동성 프라임 부스트 섭생의 일부로서 이용될 수 있다. 상동성 프라임 부스트에서, 첫 번째 프라임 예방접종이 제공되고, 그 이후에 하나 또는 그 이상의 차후 부스팅 예방접종이 제공된다. 부스팅 예방접종은 첫 번째 예방접종에서 이용되었던 동일한 재조합 폭스바이러스의 투여에 의해, 첫 번째 예방접종에서 산출된 면역 반응을 부양하도록 형성된다.

[0163] 본 발명에 따른 재조합 폭스바이러스는 또한, 이종성 프라임 부스트 섭생에서 이용될 수 있는데, 여기서 초기 프라임 예방접종 중에서 하나 또는 그 이상은 본원에서 규정된 바와 같은 폭스바이러스로 행위되고, 그리고 여기서 하나 또는 그 이상의 차후 부스팅 예방접종은 상이한 백신, 예를 들면, 다른 바이러스 백신, 단백질 또는 핵산 백신으로 행위된다.

[0164] 한 구체예에서, 이종성 프라임 부스트 섭생의 하나 또는 그 이상의 차후 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종과 상이한 속의 폭스바이러스에서 선택된다. 무제한적 실례에서, 첫 번째 또는 초기 폭스바이러스 백신이 우두를 포함할 때, 두 번째 및 차후 폭스바이러스 백신은 상이한 속, 예를 들면, 수이폭스, 조류폭스, 카프리폭스로부터 폭스바이러스 또는 우두와 면역원성으로 상이한 오소폭스에서 선택된다.

[0165] 한 예시적인 구체예에서, 상동성 프라임 부스트 섭생이 이용될 수 있는데, 여기서 하나 또는 그 이상의 종양 연관된 항원 (TAAs), 예를 들면, 하지만 제한 없이 HER2를 발현하는 폭스바이러스, 예를 들면, MVA-BN이 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 첫 번째 용량에서 투여된다. 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로, 하나 또는 그 이상의 TAA, 예를 들면, 하지만 제한 없이

HER2를 발현하는 MVA-BN의 하나 또는 그 이상의 차후 투여가 첫 번째 투여에서 제공된 면역 반응을 부양하기 위해 제공될 수 있다. 바람직하게는, 두 번째 및 차후 MVA-BN에서 하나 또는 그 이상의 TAA는 첫 번째 투여의 것들과 동일하거나 유사한 TAA이다.

[0166] 다른 예시적인 구체예에서, 이종성 프라임 부스트가 이용될 수 있는데, 여기서 하나 또는 그 이상의 TAA를 발현하는 폭스바이러스, 예를 들면, 우두가 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 협동으로 첫 번째 용량에서 투여된다. 이러한 첫 번째 용량은 하나 또는 그 이상의 TAA를 발현하는 상이한 폭스바이러스, 예를 들면, 계두의 하나 또는 그 이상의 투여에 의해 이어진다. 바람직하게는, 계두바이러스에서 하나 또는 그 이상의 TAA는 첫 번째 투여의 우두바이러스 내에 포함된 것들과 동일하거나 유사한 TAA이다. 추가 예시적인 이종성 프라임 부스트 섭생의 추가 설명은 US 특허 6,165,460; 7,598,225; 그리고 7,247,615에서 발견될 수 있고, 이를 모두 본원에 참조로서 편입된다.

[0167] 바람직한 구체예에서, 이종성 프라임 부스트 섭생에서 하나 또는 그 이상의 TAA는 전립선 특이 항원 (PSA) 및/또는 전립선 산성 인산분해효소 (PAP) 항원을 포함한다. 더욱 바람직한 구체예에서, PSA 항원은 US 특허 7,247,615 및 7,598,225에서 발견된 PSA 항원을 포함할 수 있고, 이를 둘 모두 본원에 참조로서 편입된다. 무제한적 실례에서, PSA를 포함하는 이종성 프라임 부스트는 PROSTVAC®이다.

[0168] 또 다른 바람직한 구체예에서, 이종성 프라임 부스트 섭생에서 하나 또는 그 이상의 TAA는 A 점액소 1, 세포 표면 연관된 (MUC1) 항원 및 암배아 항원 (CEA)를 포함한다. 더욱 바람직한 구체예에서, MUC1 및 CEA 항원은 US 특허 7,118,738; 7,723,096; 그리고 PCT 출원 번호 PCT/US2013/020058에서 발견된 것들을 포함할 수 있고, 이를 모두 본원에 참조로서 편입된다. 무제한적 실례에서, MUC-1 항원 및 CEA를 포함하는 이종성 프라임 부스트 섭생은 CV301이다.

[0169] 또 다른 예시적인 구체예에서, 이종성 프라임 부스트가 이용될 수 있는데, 여기서 하나 또는 그 이상의 TAA를 발현하는 폭스바이러스, 예를 들면, MVA 또는 MVA-BN가 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 협동으로 첫 번째 용량에서 투여된다. 이러한 첫 번째 용량은 하나 또는 그 이상의 TAA를 발현하는 상이한 폭스바이러스, 예를 들면, 계두의 하나 또는 그 이상의 투여에 의해 이어진다. 바람직하게는, 계두바이러스에서 하나 또는 그 이상의 TAA는 첫 번째 투여의 MVA 또는 MVA-BN 바이러스 내에 포함된 것들과 동일하거나 유사한 TAA이다.

[0170] 본 발명에서, 본원에서 설명된 상동성 및 이종성 프라임 부스트 섭생은 본 발명의 용량 투여 구체예 중에서 하나 또는 그 이상을 통합할 수 있는 것으로 예기된다. 실례로서, 상동성 및 이종성 프라임 부스트 섭생 중에서 하나 또는 둘 모두에서 치료이하 효과량 또는 용량의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 본원에서 설명된 바와 같이 투여될 수 있다.

[0171] 추가적으로, 실례로서, 상동성 및 이종성 프라임 부스트 섭생 중에서 하나 또는 둘 모두에서 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 본원에서 설명된 바와 같이, TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스 후에 투여될 수 있다.

[0172] 또한 실례로서, 상동성 및 이종성 프라임 부스트 섭생 중에서 하나 또는 둘 모두에서 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 용량 또는 투여는 첫 번째 용량 또는 투여와 비교하여 증가될 수 있다.

[0173] 일정한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종의 투여 후 수일, 수주 또는 수개월을 포함하는 간격을 두고 투여된다. 일정한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종의 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 이상의 간격을 두고 투여된다. 일정한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종의 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 또는 그 이상의 간격을 두고 투여된다. 일정한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종의 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 또는 그 이상의 간격을 두고 투여된다. 일정한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 부스팅 예방접종은 초기 프라임 예방접종의 투여 후 간격의 임의의 조합에서 투여된다)(가령, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 이상, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 또는 그 이상, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월 또는 그 이상).

재조합 폭스바이러스 치료와 협동으로 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량 투여

[0175] 본원에서 설명되고 예시된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 협동으로 재조합 폭스바이러스 벡터를 이용한 암의 치료는 다양한 용량에서 효과적일 수 있다. 유의미하게는, 그리고 당분야에서 이해되었던 바와 대조적으로, 본 발명은 종양 연관된 항원을 인코딩하는 재조합 폭스바이러스 벡터와 협

동으로 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 심지어 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 더욱 낮은 용량에서 투여될 때에도 암을 치료하는데 효과적일 수 있다는 것을 증명한다. 이들 더욱 낮은 용량 치료는 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 이용한 현재 암 치료에서 목격되었던 많은 불리한 부작용을 감소시키고 및/또는 제거할 수 있다.

[0176] 본 발명의 다양한 양상에서, 본원에서 설명된 바와 같이 환자에 투여된 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg일 수 있다. 바람직하게는, 환자에 투여된 용량은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 및 약 20 mg/kg 사이, 더욱 바람직하게는 환자 체중의 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 더욱 바람직하게는 환자 체중의 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 그리고 가장 바람직하게는 환자 체중의 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg이다. 인간에 대한 더욱 높은 용량의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제로 인간의 치료의 부정적인 효과에 비추어, 효현제 또는 길항제의 가장 바람직한 용량은 환자 체중의 약 1mg/kg 내지 약 3mg/kg이다.

[0177] 재조합 폭스바이러스 요법과 합동될 때 더욱 낮은 용량에서 면역 체크포인트 효현제 및 길항제의 효력에 비추어, 대안적 구체예에서, 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 또는 환자 체중의 약 0.1 mg/kg 내지 약 1mg/kg이다. 추가 구체예에서, 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 약 0.1 mg/kg, 약 0.5mg/kg, 약 1mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 또는 약 3mg/kg이다.

[0178] 본 발명의 추가의 양상에서, 본원에서 설명된 바와 같이 환자에 투여된 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg일 수 있다. 바람직하게는, 환자에 투여된 용량은 환자 체중의 0.1 mg/kg 및 20 mg/kg 사이, 더욱 바람직하게는 환자 체중의 1 mg/kg 내지 10 mg/kg, 더욱 바람직하게는 환자 체중의 3 mg/kg 내지 10 mg/kg, 그리고 가장 바람직하게는 환자 체중의 1 mg/kg 내지 3 mg/kg이다. 인간에 대한 더욱 높은 용량의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제로 인간의 치료의 부정적인 효과에 비추어, 효현제 또는 길항제의 가장 바람직한 용량은 환자 체중의 1mg/kg 내지 3mg/kg이다.

[0179] 재조합 폭스바이러스 요법과 합동될 때 더욱 낮은 용량에서 면역 체크포인트 효현제 및 길항제의 효력에 비추어, 대안적 구체예에서, 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 0.1 mg/kg 내지 3 mg/kg, 환자 체중의 0.1 mg/kg 내지 2 mg/kg, 또는 환자 체중의 0.1 mg/kg 내지 약 1mg/kg이다. 추가 구체예에서, 효현제 또는 길항제의 용량은 환자 체중의 0.1 mg/kg, 0.5mg/kg, 1mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 또는 3mg/kg이다.

[0180] 효과적인 요법에 필요한 활성 성분의 양은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 그리고 투여된 다른 약제를 비롯한 많은 상이한 인자에 의존할 것이다. 따라서, 치료 용량은 안전성, 내약성 및 효력을 최적화하기 위해 적정되어야 한다. 전형적으로, 시험관내에서 이용된 용량은 활성 성분의 원자 투여에 유용한 양에서 유익한 보도를 제공할 수 있다. 특정 장애의 치료를 위한 유효 용량의 동물 시험은 인간 용량의 더욱 예측적 시도를 제공할 것이다. 다양한 고려 사항은 예로서, Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Edition (1985), MacMillan Publishing Company, New York, 그리고 Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Edition, (1990) Mack Publishing Co, Easton Pa에서 설명된다. 경구, 정맥내, 복막내, 근육내, 경피, 코, 이온영동 투여 등을 비롯한 투여 방법이 그 안에서 논의된다.

[0181] 본 발명의 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 약형에서 투여될 수 있다. 가령, 경구 투여에 적합한 단위 약형은 고체 약형, 예를 들면, 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 당의정, 그리고 액체 약형, 예를 들면, 엘리시르, 시럽 및 혼탁액을 포함한다. 활성 성분은 또한, 무균 액체 약형에서 비경구 투여될 수 있다. 젤라틴 캡슐은 활성 성분, 그리고 비활성 성분으로서 분말화된 담체, 예를 들면, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 전분, 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체, 마그네슘 스테아르산염, 스테아르산, 나트륨 사카린, 활석, 탄산마그네슘 등을 내포한다. 바람직한 컬러, 맛, 안정성, 완충능, 분산 또는 다른 알려진 바람직한 특질을 제공하기 위해 첨가될 수 있는 추가 비활성 성분의 실례는 적색 철 산화물, 실리카겔, 나트륨 라우릴 황산염, 이산화티타늄, 식용 백색 잉크 등이다. 유사한 화석제가 압축된 정제를 제조하는데 이용될 수 있다. 정제 및 캡슐 둘 모두 수 시간의 기간에 걸쳐 약제의 연속 방출을 제공하기 위한 지속된 방출 산물로서 제조될 수 있다. 압축된 정제는 임의의 불쾌한 맛을 차폐하고 정제를 공기로부터 보호하기 위해 당 코팅되거나 또는 필름 코팅될 수 있고, 또는 위장관에서 선택적 붕괴를 위해 장-코팅될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 약형은 환자 용인을 증가시키기 위해 착색제 및 풍미제를 내포할 수 있다.

[0182] 제약학적 제제에서 본 발명의 조성물의 농도는 폭넓게, 다시 말하면, 중량으로 약 0.1% 이하, 통상적으로 약 2% 또는 최소한 약 2% 내지 많게는 20% 내지 50% 또는 그 이상 변할 수 있고, 그리고 선별된 특정 투여 방식에 따라, 유체 부피, 점성 등에 의해 일차적으로 선별될 것이다.

[0183] 고체 조성물의 경우에, 예로서 제약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아르산염, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 탄산마그네슘 등을 비롯한 전통적인 비독성 고체 담체가 이용될 수 있다. 경구 투여를 위해, 제약학적으로 허용되는 비독성 조성물은 정상적으로 이용되는 부형제 중에서 한 가지, 예를 들면, 이전에 열거된 담체, 그리고 일반적으로 10-95%의 활성 성분, 다시 말하면, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 조성물을, 그리고 더욱 바람직하게는 25%-75%의 농도에서 함입함으로써 형성된다.

[0184] 에어로졸 투여를 위해, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 계면활성제 및 추진제와 함께 미세하게 갈라진 형태로 공급된다. 본 발명의 조성물의 바람직한 백분율은 중량으로 0.01%-20%, 바람직하게는 1-10%이다. 계면활성제는 당연히, 비독성이고 그리고 바람직하게는 추진제에서 가용성이어야 한다. 대표적인 이런 작용제는 지방족 다가알코올 또는 이의 환상 무수물로 6 내지 22개 탄소 원자를 내포하는 지방산, 예를 들면, 카프로산, 옥탄산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레스테릭산 및 올레산의 에스테르 또는 부분적인 에스테르이다. 혼합된 에스테르, 예를 들면, 혼합된 또는 자연 글리세리드가 이용될 수 있다. 계면활성제는 중량으로 조성물의 0.1%-20%, 바람직하게는 0.25%-5%를 구성할 수 있다. 조성물의 나머지 부분은 통상적으로 추진제이다. 담체 역시 예로서, 비내 전달을 위한 레시틴에서처럼, 필요에 따라 포함될 수 있다.

[0185] 본 발명의 구조체는 당분야에서 널리 공지된 기술에 의해 저장소-유형 시스템, 피포된 형태, 또는 이식물에 담겨 부가적으로 전달될 수 있다. 유사하게는, 구조체는 펌프를 통해 관심되는 조직으로 전달될 수 있다.

[0186] 임의의 전술한 제제는 제제 내에 활성제가 제제에 의해 비활성화되지 않고 제제가 생리학적으로 양립성이라면, 본 발명에 따른 치료 및 요법에서 적절할 수 있다.

[0187] 일정한 구체예에서, 본 발명의 재조합 폭스바이러스는 하나 또는 그 이상의 제약학적 조성물에서 구현될 수 있다. TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스 및 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제에 더하여, 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용되는 및/또는 승인된 담체, 첨가제, 항생제, 보존제, 어쥬번트, 희석제 및/또는 안정제를 포함할 수 있다. 이런 첨가제는 예로서, 하지만 제한 없이, 물, 식염수, 글리세롤, 에탄올, 적심제 또는 유화제, 그리고 pH 완충 물질을 포함한다. 예시적인 담체는 전형적으로 크고, 천천히 물질대사되는 분자, 예를 들면, 단백질, 다당류, 폴리유산, 폴리글리콜산, 중합성 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체, 또는 기타 유사한 것이다.

[0188] **면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투약 섭생**

[0189] 본 발명의 추가 구체예에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 용량 농도 및 투약 섭생은 하나 또는 그 이상의 암 관련된 인자, 예를 들면, 종양 크기, 종양 체적, 암 환자 또는 암 환자군의 암 단계 (가령, 전이성 암 이전 또는 이후)에 근거하여 설정된다. 추가적으로, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 용량 농도 및 투약 섭생 중에서 하나 또는 그 이상은 연관된 생물마커 또는 항체, 예를 들면, 하지만 제한 없이 Forssman 또는 sCD27 항체의 이용에 의해 효력을 모니터링하고 검토함으로써 설정될 수 있다. 이러한 양상에 따라서, 더욱 효과적인 투약 섭생이 인간 암 환자 또는 인간 암 환자군에 대해 설정될 수 있다. 최소한 한 양상에서, 본원에서 설명된 바와 같이 더욱 효과적인 투약 섭생을 제공하는 것은 환자 또는 환자군에 치료 동안 너무 많은 또는 너무 적은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 투여되는 사례를 감소시킬 수 있다.

[0190] 본원에서 규정된 바와 같이, "투약 섭생"은 투약 사이에 시간 또는 투약이 제공되는 시간, 그리고 각 특정한 시간에서 제공되는 약제 또는 치료적 작용제의 양을 비롯하여, 시간의 단위당 치료적 작용제의 투약의 일정으로서 규정될 수 있다.

[0191] 최소한 한 양상에서, 본원에서 개시된 방법, 예를 들면, 특정 투약 섭생은 불리한 부작용을 최소화하면서 본 발명의 조합의 치료적 이익을 최대화하도록 설정된다. 한 구체예에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 하나 또는 그 이상의 TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스의 투여와 동일자에 환자에 투여된다. 추가 구체예에서, 다음의 단락에서 설명된 바와 같이, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 하나 또는 그 이상의 TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스의 투여 후 환자에 투여된다.

[0192] **재조합 폭스바이러스 요법 후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하는 것은 암 치료의 효력을 증가시킨다**

[0193] 도면 14-17에서 도시되고 실시예 32-35에서 설명된 바와 같이, 개체는 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스가 투여되었고, 그 후에 면역 체크포인트 분자, 예를 들면, TIM-3, LAG-3, ICOS 및 PD-1의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. 처리에 대한 응답으로, 면역 체크포인트 발현에서 매우 적은 증가의 초기 기간이 있었다.

하지만, 대략 1-2 일 후, T-세포는 면역 체크포인트 분자의 발현을 증가시켰다. 약 3 일자부터 약 12 일자까지 면역 체크포인트 발현이 극적으로 증가하였다. 증가된 발현은 약 18 일자까지 여전히 목격되었다. 훨씬 유의미하게는, 면역 체크포인트 발현에서 이러한 증가는 CD4 T-세포와 비교하여 CD8 T-세포에서 더욱 현저하였다. (도면 14-17을 참조한다).

[0194] 도면 14-17 및 실시예 32-35의 결과에 비추어, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여를 위한 가장 효과적인 기간은 재조합 폴스바이러스로 처리 후 발생한다. 가령, 도면 14에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2로 처리 후 면역 체크포인트 분자 TIM-3의 발현 수준이 약 1-3 일자부터 약 18 일자까지 증가하였고, 가장 유의미한 증가가 약 3 일자부터 약 14 일자까지 발생하였다. 이에 따라서, TIM-3 길항제를 투여하기 위한 더욱 효과적인 기간은 재조합 폴스바이러스로 처리 후, 증가된 발현이 발생하는 이들 기간 동안이었다.

[0195] 도면 15-17에 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER-2로 처리 후, 유사한 증가된 발현 결과가 면역 체크포인트 분자 ICOS, PD-1 및 LAG-3에서 목격되었다. 이들 발현 결과에 따라서, 더욱 큰 치료 효력을 달성하기 위해, 각 면역 체크포인트 길항제 (가령, TIM-3, PD-1, PDL-1 및 LAG-3) 또는 효현제 (가령, ICOS)는 재조합 폴스바이러스로 처리된 후에 암 환자에 투여된다.

[0196] 최소한 한 양상에서, 더욱 큰 치료 효력은 최소한 부분적으로, 증가된 발현이 투여된 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 결합할 수 있는 더욱 많은 기질을 제공하고, 따라서 면역 체크포인트 분자의 더욱 큰 차단 또는 활성화를 제공하기 때문에, 증가된 면역 체크포인트 분자 발현의 이들 기간 동안 발생한다.

[0197] 다른 양상에서, 도면 14-17에서 도시된 결과는 재조합 폴스바이러스 처리 후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하는 것이 효력을 증강하는데 중요하다는 것을 지시한다. 이러한 중요성은 재조합 폴스바이러스로 처리 후 증가된 면역 체크포인트 분자 발현의 기간에 의해 명확하게 증명된다.

[0198] 본 발명의 교시에 비추어, 한 구체예에서, 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 재조합 폴스바이러스의 용량을 환자에 투여하고, 상기 재조합 폴스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량을 환자에 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하기 위한 방법이 제공되고; 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량 후 투여된다.

[0199] 한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 동일자에, 치료적 암 백신의 용량 후 투여되는 것으로 예상된다. 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 약 1 내지 약 18 일, 약 2 내지 약 17 일, 약 3 내지 약 16 일, 약 3 내지 약 14 일, 약 3 내지 약 12 일, 약 3 내지 약 10 일, 약 3 내지 약 8 일, 약 3 내지 약 7 일, 약 4 내지 약 15 일, 약 4 내지 약 14 일, 약 4 내지 약 13 일, 또는 약 4 내지 약 12 일에 투여되는 것으로 부가적으로 예상된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 약 3 내지 약 15 일에 투여된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 약 3 내지 약 7 일에 투여된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 3 일 또는 7 일에 투여된다.

[0200] 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 동일자에 또는 투여한 후 1 내지 18 일, 2 내지 17 일, 3 내지 16 일, 3 내지 15 일, 3 내지 14 일, 3 내지 12 일, 4 내지 15 일, 4 내지 14 일, 4 내지 13 일, 또는 4 내지 12 일에 투여되는 것으로 부가적으로 예상된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 3 내지 15 일에 투여된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 3 내지 7 일에 투여된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 3 일 또는 7 일에 투여된다.

[0201] 추가 구체예에서, 본 발명은 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하는 재조합 폴스바이러스의 차후 (이전 단락에서 용량에 비하여) 또는 두 번째 용량을 환자에 투여하고; 그리고 (b) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 차후 (이전 단락에서 용량에 비하여) 또는 두 번째 용량을 환자에 투여하는 것을 포함하고; 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 차후 용량은 치료적 암 백신의 차후 용량 후 투여된다. 차후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 용량은 치료적 암 백신의 차후 용량 후 유사한 간격에서 투여될 수 있는 것으로 예상된다 (가령, 치료적 암 백신의 용

량을 투여한 후 약 1 내지 약 18 일, 약 2 내지 약 17 일, 약 3 내지 약 16 일, 약 3 내지 약 15 일, 약 3 내지 약 14 일, 약 3 내지 약 12 일, 약 4 내지 약 15 일, 약 4 내지 약 14 일, 약 4 내지 약 13 일, 또는 약 4 내지 약 12 일).

[0202] 치료적 암 백신, 예를 들면, 재조합 폭스바이러스 요법을 투여한 후에 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하는 것으로부터 발생하는 증강된 치료 효력은 실시예 26 내지 31에 의해 더욱 증명된다.

[0203] 한 구체예에서, 치료적 암 백신은 최소한 하나의 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 최소한 하나의 TAA를 포함하는 오소폭스바이러스 또는 조류폭스바이러스를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 오소폭스바이러스는 우두, MVA, 또는 MVA-BN을 포함한다. 다른 구체예에서, 조류폭스바이러스는 계두바이러스를 포함한다.

[0204] 다른 구체예에서, CTLA-4 길항제는 치료적 암 백신의 용량을 투여한 동일자에, 또는 투여한 후 약 1-3 일에 투여되는 것으로 예기된다.

[0205] 또 다른 구체예에서, PD-1 길항제 또는 PDL-1 길항제는 치료적 암 백신의 용량을 투여한 후 약 2 내지 18 일에 투여되는 것으로 예기된다.

[0206] **면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 투여의 치료 효과량을 증가시키는 것은 암 치료의 효력을 증가시킨다**

[0207] 도면 14-17에서 도시되고 실시예 32-35에서 설명된 바와 같이, 개체는 1 일자 및 15 일자에 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스가 투여되었다. 면역 체크포인트 분자, 예를 들면, TIM-3, LAG-3, ICOS 및 PD-1의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. 1 일자 처리에 대한 응답으로, 면역 체크포인트 발현에서 매우 적은 증가의 초기 기간이 있었다. 하지만, 1 일자 처리 후 대략 1-2 일에, 면역 체크포인트 분자의 T-세포 발현에서 증가가 있었다. 약 3 일자부터 약 12 일자까지 면역 체크포인트 발현이 극적으로 증가하였다. 증가된 발현은 약 18 일자까지 여전히 목격되었다.

[0208] 특히, 15 일자에 재조합 폭스바이러스의 두 번째 또는 차후 처리 후, T-세포에 의한 면역 체크포인트 분자의 발현에서 훨씬 큰 증가가 일어났다. 훨씬 유의미하게는, 면역 체크포인트 발현에서 이러한 증가는 CD4 T-세포와 비교하여 CD8 T-세포에서 더욱 현저하였다. (도면 14-17을 참조한다). 가령, 도면 12에서 도시된 바와 같이, 15 일자에 MVA-BN-HER-2로 처리 후, 발현에서 약간 증가가 있었고, 그 후에 18 일자에 TIM-3의 발현 수준이 유의미하게 증가하였다. 이를 TIM-3 발현 결과에 따라서, 첫 번째 용량과 비교하여 TIM-3 길항제의 두 번째 또는 차후 용량을 증가시키는 것은 훨씬 큰 치료 효력을 달성한다.

[0209] 도면 14-17에 도시된 바와 같이, 15 일자에 MVA-BN-HER-2로 두 번째 재조합 폭스바이러스 처리 후, 면역 체크포인트 분자 ICOS, PD-1 및 LAG-3의 유사한 증가된 발현이 발생하였다. 게다가, 증가된 발현은 첫 번째 MVA-BN-HER2 처리 후와 비교하여 훨씬 높았다. 이를 발현 결과에 따라서, 증가된 용량의 면역 체크포인트 길항제 (가령, TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3) 또는 효현제 (가령, ICOS)가 두 번째 또는 차후 재조합 폭스바이러스 후 시점 동안 암 환자에 투여된다.

[0210] 최소한 한 양상에서, 더욱 큰 치료 효력은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 첫 번째 용량과 비교하여 두 번째 또는 차후 처리에서 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량 또는 양을 증가시킴으로써 달성된다. 이것은 최소한 부분적으로, 두 번째 처리 후 증가된 발현이 투여된 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 결합할 수 있는 더욱 많은 기질을 제공하고, 따라서 면역 체크포인트 분자의 더욱 큰 차단 또는 활성화를 제공하기 때문에 실현된다.

[0211] 다른 양상에서, 도면 14-17에서 도시된 결과는 첫 번째 용량과 비교하여 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 또는 차후 용량을 증가시키는 것이 재조합 폭스바이러스 요법과 합동으로 투여될 때 면역 체크포인트 길항제 치료의 증가된 효력을 달성하는데 중요하다는 것을 지시한다. 이러한 중요성은 본원에서 설명되고 예시된 재조합 폭스바이러스로 두 번째 처리 후 증가된 면역 체크포인트 분자 발현의 기간에 의해 뒷받침된다.

[0212] 추가의 양상에서, 본원에서 설명된 바와 같은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 또는 차후 투여의 용량을 증가시키는 것은 면역 체크포인트 길항제 T 세포 수용체 점유 (RO)를 설명하는 최근 데이터에 비추어 치료 효력을 크게 증강한다. 면역 체크포인트 길항제, 항-PD1 항체의 첫 번째 용량 후, 수용체 점유 (RO)가 FACS (CD45+, CD3 케이트)에 의해 T 세포의 표면 상에서 계측되었다 (데이터 제시되지 않음). 상기 데이터는 면역 체크포인트 길항제 PD-1의 다양한 용량 (가령, .1mg/kg, .4 mg/kg, 1.4 mg/kg, 그리고 5 mg/kg)에서 혈류 내에 T

세포 상에서 높은 백분율의 PD-1 RO가 있었다는 것을 지시한다 (.1mg/kg의 RO = 65%, .4 mg/kg의 RO = 84%, 1.4 mg/kg의 RO = 96%, 그리고 5 mg/kg의 RO = 89%). 혈액 내에 RO 백분율과 비교할 때, 종양에서 발견된 T 세포의 RO는 더욱 낮았다 (.1mg/kg의 RO = 9%, .4 mg/kg의 RO = 41%, 1.4 mg/kg의 RO = 58%, 그리고 5 mg/kg의 RO = 65%).

[0213] 재조합 폭스바이러스와 합동으로 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 최초 투약 동안, 더욱 큰 백분율의 종양 특이적 T-세포 (CD8 T 세포)가 말초 구역, 예를 들면, 혈액 및 림프절 내에 전형적으로 존재하는 것으로 생각된다. 혈액 내에 T 세포 상에서 면역 체크포인트 길항제에서 증가된 RO에 비추어, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 첫 번째 투여는 더욱 낮은 용량에서 더욱 효과적이다. 재조합 폭스바이러스와 합동으로 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 또는 차후 용량에서 증가된 효력을 위해, 종양 내에 T 세포 상에서 더욱 낮은 RO에 비추어 첫 번째 용량과 비교하여 증가된 용량이 투여된다.

[0214] 추가 구체예에서 본 발명의 교시에 비추어, 본 발명은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료적 암 백신을 이용하여 인간 암 환자를 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량과 합동으로 치료적 암 백신, 예를 들면, 재조합 폭스바이러스의 첫 번째 투여를 환자에 제공하고; 그리고 (b) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량과 합동으로 치료적 암 백신의 두 번째 투여를 제공하는 것을 포함하고, 여기서 두 번째 투여의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량은 첫 번째 투여의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량과 비교하여 증가된다.

[0215] 추가적으로, 본 발명은 환자에 일련의 투여를 제공하기 위한 방법을 제공하는 것으로 예기되고, 이들 투여는 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량과 합동으로 치료적 암 백신, 예를 들면, 재조합 폭스바이러스를 포함하고, 여기서 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 증가된다.

[0216] 다양한 구체예에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 투여의 용량 (또는 양)은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 약 2 내지 약 100, 약 3 내지 약 100, 약 5 내지 약 100, 약 10 내지 약 100, 약 5 내지 약 90, 약 10 내지 약 80, 약 10 내지 약 70, 약 10 내지 약 60, 약 10 내지 약 50의 계수로 증가된다. 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 약 10 내지 약 100의 계수로 증가된다. 다른 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 약 10 내지 약 50의 계수로 증가된다. 또 다른 더욱 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 약 3, 약 10, 약 30, 또는 약 100의 계수로 증가된다.

[0217] 다양한 추가 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 2 내지 100, 3 내지 100, 5 내지 100, 10 내지 100, 5 내지 90, 10 내지 80, 10 내지 70, 10 내지 60, 10 내지 50의 계수로 증가된다. 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 10 내지 100의 계수로 증가된다. 다른 더욱 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 10 내지 50의 계수로 증가된다. 또 다른 더욱 바람직한 구체예에서, 두 번째 투여의 용량은 3, 10, 30, 또는 100의 계수로 증가된다.

[0218] 일부 예시적인 구체예에서, 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이 재조합 폭스바이러스와 함께 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 첫 번째 투여는 치료이하 용량 또는 치료이하 효과적인 용량을 포함하고, 그 후에 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이 재조합 폭스바이러스와 함께 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 또는 차후 투여는 본원에서 설명된 투약 섭생에서 진술된 바와 같은 증가된 용량을 포함하는 것으로 예기된다. 무제한적 실례에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 첫 번째 투여는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1mg/kg의 용량을 포함한다. 이러한 첫 번째 투여는 약 3mg/kg 내지 약 10mg/kg의 증가된 용량으로 하나 또는 그 이상의 차후 투여로 이어진다.

[0219] 바람직한 구체예에서, 치료적 암 백신은 최소한 하나의 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 최소한 하나의 TAA를 포함하는 오소폭스바이러스 또는 조류폭스바이러스를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 오소폭스바이러스는 우두, MVA, 또는 MVA-BN을 포함한다. 다른 구체예에서, 조류폭스바이러스는 계두바이러스를 포함한다. 첫 번째 용량과 비교하여 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 증가된 두 번째 또는 차후 용량을 투여하는 것으로부터 발생하는 증강된 치료 효력은 실시예 26 내지 31에 의해 더욱 증명된다.

[0220] 치료적 암 백신은 종양 및/또는 종양 세포를 특이적으로 표적으로 하도록 환자 또는 환자군의 자체 면역계를 자

극하는 하나 또는 그 이상의 독특한 면역학적 성질을 전시하는 백신이다. 이들 독특한 면역학적 성질은 전형적으로, 종양 또는 종양 세포와 연관되는 항원이다. 최소한 하나의 양상에서, 치료적 암 백신은 암 세포 성장을 저체시키거나 또는 중지시키고; 종양 위축을 유발하고; 암이 재발하는 것을 예방하고; 또는 다른 형태의 치료에 의해 사멸되지 않은 암 세포를 제거하는 기능을 한다.

[0221] 바람직한 구체예에서, 치료적 암 백신은 바이러스 기초된다. 치료적 암 백신으로서 유용한 바이러스의 일부 무제한적 실례는 다음을 포함한다: 폭스바이러스, 아데노바이러스, 알파바이러스, 홍역 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 파보바이러스, 레오바이러스, 그리고 수포성 구내염 바이러스 (VSV). 더욱 바람직한 구체예에서, 치료적 암 백신은 폭스바이러스 기초된 치료제이다.

[0222] 현재 개발 중인 바이러스 기초된 치료적 암 백신의 일부 무제한적 실례가 표 1에 도시된다.

표 1

바이러스	치료적 암 백신 (백신을 개발 중인 기업)
폭스바이러스	MVA-BN, 우두, PROSTVAC, CV-301, (Bavarian Nordic, Inc.)
아데노바이러스	AdhTAP (Tap Immune), ColoAd-1(PsiOxus)
알파 바이러스	AVX-701 (AlphaVax Inc.)
렌티바이러스	ID-LV(Immune Design Corp.)
단순 헤르페스 바이러스	OncovEX (Amgen)
파보바이러스	H-IPV (OryxGmbH & Co. KG)
홍역 바이러스	MV-CEA 및 MV-NIS (Mayo Clinic)
소아마비 (세이빈 I)	PVS-RIPO (Duke Univ.)
세네카 밸리 바이러스	NTX-10 (Neotropix Inc.)
레오바이러스	REOLYSIN ² (Oncolytics, Biotech, Inc.)

[0224] 다른 구체예에서, 치료적 암 백신은 효모 기초될 수 있다. 가령, *Cancer Immunol Immunother.* 2014 Mar; 63(3):225-34를 참조한다. 무제한적 실례에서, 효모-기초된 치료적 암 백신은 현재 II 단계 임상 시험 중인 재조합 효모-CEA 백신 (GI-6207)을 포함한다. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr TPS3127)을 참조한다.

[0225] 또 다른 구체예에서, 치료적 암 백신은 세균 기초될 수 있다. 무제한적 실례에서, 세균 기초된 암 백신은 콜리 백신을 포함한다. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 1; 18 (19):5449-59를 참조한다.

[0226] 이종성 프라임 부스트에서 부스트 투약 후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하는 것은 암 치료의 효력을 증가시킨다

[0227] PROSTVAC®는 PROSTVAC-V (PSA 및 TRICOMTM을 발현하는 우두바이러스)로 단일 프라임 투여, 그 이후에 PROSTVAC-F (PSA 및 TRICOMTM을 발현하는 계두바이러스)의 하나 또는 그 이상의 연속 부스팅 투약을 포함하는 이종성 프라임 부스트 섭생을 포함한다; 또한 *J Clin Oncol* 2010, 28:1099-1105에서 설명되고, 이것은 본원에 참조로서 편입된다.

[0228] 도면 21-23 및 실시예 40-43에서 도시되고 설명된 바와 같이, 암 치료에서 이종성 PROSTVAC® 투약 섭생은 동일한 백터로 상동성 투약과 비교하여 PSA-특이적 T 세포 반응의 크기 및 질을 크게 증강한다. 추가적으로, 이들 도면 및 실시예는 PROSTVAC-V로 기폭 및 PROSTVAC-F로 부스팅이 고도로 기능적 CD8 CTL 면역 반응을 PSA, 표적 종양 항원을 향하여 집중시키고, 그리고 우두 백터로부터 멀어지게 하는 부가된 이익을 제공한다는 것을 증명한다.

[0229] 최소한 한 양상에서, 재조합 폭스바이러스의 하나 또는 그 이상의 용량이 암 치료의 일부로서 투여될 때, 더욱 큰 치료 효력은 두 번째 또는 차후 재조합 폭스바이러스 투약 또는 투여와 합동으로 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여함으로써 달성된다.

[0230] 더욱 특정 양상에서, 본 발명의 재조합 폭스바이러스의 하나 또는 그 이상의 용량이 이종성 프라임 부스트 섭생의 일부로서 암 치료의 일부로서 투여될 때, 더욱 큰 치료 효력은 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폭스 바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약과 합동으로 최소한 하나의 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여함으로써 달성된다. 이러한 더욱 큰 치료 효력은 최소한 부분적으로, 이종성 프라임 부스트 섭생의 두 번째 또는 차후 부스트 투약 동안 및 이후 환자의 면역 T-세포 반응이 재조합 폭스바이러스와 비교하여 종양 항원에 더욱

집중되기 때문에 실현된다. 따라서, 최소한 한 양상에서, 부스팅 투약 동안 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여는 종양 항원에 대한 환자의 면역 반응을 증강하고, 그리고 따라서 환자의 면역 반응을 종양에 더욱 특정하게 증가시키는 기능을 한다.

[0231] 최소한 다른 양상에서, 이종성 프라임 부스트 섭생을 수반하는 암 치료의 일부로서, 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약과 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 투여하는 것은 면역 체크포인트 치료에서 목격되었던 불리한 부작용을 최소화하면서 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료적 이익을 최대화한다.

[0232] 본 발명의 교시에 비추어, 추가 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 다음을 환자에 투여하는 것을 포함하고: (a) 첫 번째 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 첫 번째 재조합 폴스바이러스, 상기 폴스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 두 번째 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 두 번째 재조합 폴스바이러스, 상기 두 번째 재조합 폴스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 여기서 두 번째 재조합 폴스바이러스는 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 투여된다. 추가 구체예에서, 두 번째 재조합 폴스바이러스는 첫 번째 재조합 폴스바이러스와 상이하다. 다른 구체예에서, 두 번째 재조합 폴스바이러스는 첫 번째 재조합 폴스바이러스와 상이한 속으로부터 유래된다.

[0233] 다른 구체예에서, 첫 번째와 두 번째 재조합 폴스바이러스는 상이하거나 또는 상이한 속이고, 그리고 이종성 프라임 부스트 섭생으로서 투여되고, 상기 이종성 프라임 부스트 섭생은 a) 첫 번째 재조합 폴스바이러스를 첫 번째 프라임 투약으로서 투여하고; 그리고 b) 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 두 번째 재조합 폴스바이러스를 하나 또는 그 이상의 부스트 투약으로서 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 이종성 프라임 부스트 섭생은 PROSTVAC®, CV301 또는 MVA-BN-CV301에서 선택된다.

[0234] 또 다른 구체예에서, 첫 번째 재조합 폴스바이러스, 또는 초기 또는 프라임 투약의 재조합 폴스바이러스는 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하지 않는 것으로 예상된다.

[0235] 첫 번째와 두 번째 재조합 폴스바이러스는 임의의 폴스바이러스, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명에서 설명된 것들일 수 있는 것으로 부가적으로 예상된다. 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)은 임의의 TAA, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 본 발명에서 설명된 TAA일 수 있는 것으로 더욱 예상된다.

[0236] 추가 구체예에서, (a) 첫 번째 치료적 암 백신, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 첫 번째 재조합 폴스바이러스, 상기 폴스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 두 번째 치료적 암 백신을 포함하는 이종성 프라임 부스트 섭생을 암 환자에 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공되고, 여기서 두 번째 치료적 암 백신은 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 투여된다. 설명된 이종성 프라임 부스트 섭생인 것으로 예상된다.

[0237] 하나 또는 그 이상의 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 투약의 동일자에, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일 이내에 투여된다. 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 이종성 프라임 부스트 섭생의 일부로서 투여되고, 그리고 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약 후 투여된다. 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약 후, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 투여되는 시간 간격은 본 발명에서 설명된 시간 간격을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0238] 하나 또는 그 이상의 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 용량이 투여된 후에 투여된다. 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 이종성 프라임 부스트 섭생의 일부로서 투여되고, 그리고 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약 후 투여된다. 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 차후 부스트 투약 후, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 투여되는 시간 간격은 본 발명에서 설명된 시간 간격을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0239] 최소한 하나의 TAA를 인코딩하는 재조합 폴스바이러스의 두 번째 또는 하나 또는 그 이상의 차후 부스트 투약과 합동으로 투여될 때, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 본 발명에서 제공된 바와 같은 용량 또는 농도에서 투여될 수 있는 것으로 부가적으로 예상된다.

치료 조성물 및 용도

[0241] 본 발명은 종양 에피토프에 대한 면역학적 반응을 유도하거나 또는 면역학적 반응의 발생 또는 향상에 기여할

수 있는 치료 조성물 또는 백신의 제조를 위한 본 발명에 따른 폭스바이러스 벡터의 용도에 더욱 관계한다. 본 발명은 따라서, 약제 또는 백신으로서 유용한 벡터를 제공한다.

[0242] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 항체, 효현제, 또는 길항제와 합동으로 본 발명에 따른 MVA 벡터를 포함하는 면역원성 조성물에 관계한다.

[0243] 따라서, 본 발명에 따른 MVA 벡터는 암의 치료를 위한 치료 조성물의 제조에 이용될 수 있다.

[0244] 본 발명은 종양의 치료를 위한 예방적 및/또는 치료적 예방접종 프로토콜에서, 그리고 특히 항암 치료제로서 이용을 위한 조성물을 포함한다.

[0245] 한 구체예에서, 본 발명은 암 환자, 특히 예를 들면, 하지만 제한 없이, 유방암, 폐암, 위암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 난소암, 또는 대장암을 앓는 환자에 투여 또는 이런 환자의 치료를 위한 조성물을 포함한다.

[0246] 한 구체예에서, 본 발명은 암 환자, 특히 유방암, 폐암, 위암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 난소암, 또는 대장암에서 선택되는 암을 앓는 환자에 투여 또는 이런 환자의 치료를 위한 조성물의 용도를 포함한다.

[0247] 추가 구체예에서, 본 발명은 암 환자, 특히 유방암 환자에 투여 또는 이런 환자의 치료를 위한 조성물 또는 조성물의 용도를 포함한다.

[0248] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 MVA 벡터 및 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 항체, 효현제, 또는 길항제를 포함하는 동시적 또는 순차적 투여를 위한 조성물.

[0249] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 암 환자, 특히 전립선암 환자에 투여 또는 이런 환자의 치료를 위한 조성물 또는 조성물의 용도를 포함한다.

[0250] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 PROSTVAC® 벡터 및 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 항체, 효현제, 또는 길항제를 포함하는 동시적 또는 순차적 투여를 위한 조성물.

[0251] 다른 구체예에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 방법을 포함하고, 상기 방법은 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스 벡터, 상기 폭스바이러스 벡터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 환자에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여, 상기 조합을 투여하는 치료 효과가 증가되는 정도의 양이다.

[0252] 본 발명의 다양한 구체예에 따라서, 암 치료에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 TAA를 인코딩하는 폭스바이러스 벡터와 합동될 때, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 치료적으로 효과적인 용량은 1) 폭스바이러스 벡터 없이 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료적으로 효과적인 용량 또는 2) 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 그것만의 치료적으로 효과적인 용량과 비교하여 적거나 또는 감소된다. 따라서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료적으로 효과적인 용량은 더욱 낮은 용량에서 투여될 수 있고, 따라서 선행 기술에서 발견된 치료의 독성 및 불리한 부작용을 감소시키고 및/또는 제거한다.

[0253] "치료 효과량"은 치료되는 개체에서 원하는 치료적 또는 임상적 효과를 달성하는데 충분한 조성물의 양이다. 가령, 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 종양 연관된 항원 (TAA) 핵산 (예를 들면, 하지만 제한 없이, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, 서바이빈, tyrp1, tyrp2, 또는 브라큐리 항원)을 포함하는 폭스바이러스 벡터의 치료 효과량은 TAA-특이적 면역 반응을 이끌어 내거나, 종양 크기 또는 부담을 감소시키거나, 종양 전이의 숫자를 감소시키거나, 암의 진행을 지체시키거나, 또는 암을 앓는 환자 또는 환자 개체군의 전체 생존을 증가시키는데 충분한 양일 것이다.

[0254] 또한, 실례로서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량은 표적화된 면역 체크포인트 분자의 기능을 저해하거나, 종양 크기 또는 부담을 감소시키기 위해 표적화된 면역 체크포인트 분자에 결합하거나, 종양 전이의 숫자를 감소시키거나, 암의 진행을 지체시키거나, 또는 암을 앓는 환자 또는 환자 개체군의 전체 생존을 증가시키는데 충분한 양일 것이다.

[0255] "치료 효과"는 개체에서 원하는 치료적 또는 임상적 효과이다. 암 치료에서 "치료 효과"는 종양 크기, 종양 덩어리, 또는 종양 부담에서 감소; 종양 전이의 숫자에서 감소; 암의 진행에서 지체, 또는 암을 앓는 환자 또는

환자 개체군의 전체 생존에서 증가에 의해 특정화될 수 있다.

[0256] 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 및 재조합 폭스바이러스의 조합 암 치료는 상기 길항제 또는 효현제의 낮은 용량에서 치료 효력을 가능하게 한다

[0257] 본원에서 예시되고 설명된 바와 같이, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 TAA를 인코딩하는 폭스바이러스 백터와 합동될 때, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제가 치료적으로 효과적인 용량이 더욱 적거나 또는 감소된다. 다양한 추가 구체예에서, 본 발명은 다음의 조합을 인간 암 환자에 투여하는 것을 포함한다: (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제. 이러한 구체예에서, 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 "치료 효과"를 달성한다.

[0258] 최소한 하나의 양상에서, 치료이하 효과적인 용량은 선행 기술에서 면역 체크포인트 치료에서 목격되었던 불리한 부작용을 최소화하면서 치료적 이익을 최대화하도록 설정된다.

[0259] "치료이하 효과량"은 단일-치료제 또는 단일요법으로서 투여될 때, 또는 다른 또는 복수의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 함께 투여될 때, 면역 체크포인트 길항제가 그것만으로는 "치료 효과"에 무효한 용량 또는 양이다.

[0260] 한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 약 99% 내지 약 5%, 약 90% 내지 약 5%, 약 85% 내지 약 5%, 약 80% 내지 약 5%, 75% 내지 약 5%, 약 70% 내지 약 10%, 약 65% 내지 약 15%, 약 60% 내지 약 20%, 약 55% 내지 약 25%, 약 50% 내지 약 30%, 또는 약 50% 내지 약 10%이다. 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 약 99% 감소 내지 약 30% 감소이다. 다른 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 약 90% 감소 내지 약 30% 감소이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 약 99% 감소, 약 90% 감소, 또는 약 30% 감소이다.

[0261] 다른 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 99% 내지 5%, 90% 내지 5%, 85% 내지 5%, 80% 내지 5%, 75% 내지 5%, 70% 내지 10%, 65% 내지 15%, 60% 내지 20%, 55% 내지 25%, 50% 내지 30%, 또는 50% 내지 10%이다. 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 99% 감소 내지 30% 감소이다. 다른 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 약 90% 감소 내지 약 30% 감소이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량의 99% 감소, 90% 감소, 또는 30% 감소이다.

[0262] 하나 또는 그 이상의 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 본원에서 설명된 바와 같은 이종성 또는 상동성 프라임 부스트 협생의 일부로서 최소한 하나의 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스와 합동으로 이용될 수 있다.

키트

[0263] 한 구체예에서, 본 발명은 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하는 키트를 포괄한다. 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 각각, 바이알 또는 용기에 내포될 수 있다. 한 구체예에서, 재조합 폭스바이러스는 본원에서 설명된 바와 같은 종양-연관된 항원 (TAA)을 인코딩한다. 다른 구체예에서, 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 본원에서 설명된 바와 같은 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제에서 선택된다. 다양한 구체예에서, 예방접종을 위한 키트는 한 세트의 첫 번째 바이알 또는 용기에서 첫 번째 예방접종 ("기폭")을 위한, 그리고 두 번째 또는 세 번째 바이알 또는 용기에서 두 번째 또는 세 번째 예방접종 ("부스팅")을 위한 재조합 폭스바이러스 및 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함한다.

[0265] 한 구체예에서, 키트는 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 조합, 그

리고 암의 예방을 위한 상기 조합의 투여를 위한 사용설명서를 내포할 수 있다. 한 구체예에서, 키트는 상기 조합, 그리고 하나 또는 그 이상의 종양 연관된 마커에서 증가가 검출된 후, 암의 예방을 위한 상기 조합의 투여를 위한 사용설명서를 내포할 수 있다.

[0266] 한 구체예에서, 키트는 재조합 폭스바이러스 벡터 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 조합, 그리고 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 투여와 비교하여, 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체가 증가된 치료 효과를 갖도록, 치료 효과 용량 또는 효과량의 폭스바이러스 및 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 투여를 위한 사용설명서를 내포할 수 있다.

[0267] 다른 구체예에서, 키트는 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 조합, 그리고 치료이하 용량 또는 양의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체를 투여하기 위한 사용설명서를 내포할 수 있고, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 치료이하 효과량은 상기 조합의 치료 효과가 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체와 합동으로 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 투여와 비교하여 증가되는 정도의 양이다.

[0268] 다른 구체예에서, 키트는 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 조합, 그리고 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 일련의 투여를 환자에 제공하기 위한 사용설명서를 내포할 수 있고, 여기서 사용설명서는 일련의 첫 번째 투여의 용량과 비교하여 일련의 두 번째 투여의 용량을 증가시키는 것을 포함한다.

[0269] 다른 구체예에서, 키트는 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 조합, 그리고 재조합 폭스바이러스 및 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 일련의 투여를 환자에 제공하기 위한 사용설명서를 내포할 수 있고, 여기서 사용설명서는 치료이하 효과적인 용량을 포함하는 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체와 함께 상기 조합의 첫 번째 투여를 제공하고; 그리고 이후, 두 번째 투여를 제공하는 것을 포함하고, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 용량을 증가시키는 용량은 본원에서 진술된 바와 같이 증가된다.

[0270] 본 발명에서, 본원에서 제공된 사용설명서 중에서 하나 또는 그 이상은 단일 키트에서 합동될 수 있는 것으로 예기된다. 본원에서 제공된 하나 또는 그 이상의 사용설명서는 본 출원에서 제시된 바와 같은 투약 섭생 중에서 하나 또는 그 이상을 포함하는 것으로 부가적으로 예기된다.

조합 또는 약제에 대한 추가 구체예

[0271] 추가 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함한다. 조합 또는 약제는 재조합 폭스바이러스 벡터, 상기 폭스바이러스 벡터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; (b) PD-1 길항체; 그리고 (c) CTLA-4 길항체를 포함한다. PD-1 길항체 및 CTLA-4 길항체는 각각, 항-PD-1 길항체 항체 및 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다.

[0272] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스 벡터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체를 포함하고; 여기서 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다. 또 다른 구체예에서, 조합 또는 약제는 CTLA-4 길항체, PD-1 길항체, PDL-1 길항체, LAG-3 길항체, TIM-3 길항체, 또는 ICOS 효현체에서 선택되는 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체를 포함할 수 있다. 다양한 면역 체크포인트 길항체 또는 효현체는 하나 또는 그 이상의 항체에서 구현될 수 있는 것으로 예기된다.

[0273] 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자에서 전체 생존율을 증가시키는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 다음을 포함한다: (a) 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하는 폭스바이러스; (b) PD-1 길항체; 그리고 (c) CTLA-4 길항체. PD-1 길항체 및 CTLA-4 길항체는 각각, 항-PD-1 길항체 항체 및 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다.

[0275] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자에서 전체 생존율을 증가시키는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 (a) 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하는 폭스바이러스; 그리고 (b) 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하고; 여기서 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0276] 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하고, 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여, 상기 조합의 치료 효과가 증가되는 정도의 양이다. 조합 또는 약제는 CTLA-4 길항제, PD-1 길항제, PDL-1 길항제, LAG-3 길항제, TIM-3 길항제, 또는 ICOS 효현제에서 선택되는 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 다양한 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 하나 또는 그 이상의 항체에서 구현될 수 있는 것으로 예상된다.

[0277] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스 벡터는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하고; 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량 또는 치료이하 효과량은 치료적으로 효과적인 재조합 폭스바이러스 후 투여되도록 설정되고; 그리고 여기서 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량 및 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0278] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 암 환자를 치료하는데 이용하기 위한 조합 또는 약제를 포함할 수 있고, 상기 조합 또는 약제는 최소한 첫 번째와 두 번째 투여를 포함하고, 각 투여는 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하고; 여기서 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 두 번째 투여는 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 첫 번째 투여와 비교하여 증가되고; 그리고 여기서 폭스바이러스와 합동된 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0279] 또 다른 구체예에서, 본원에서 설명된 조합 또는 약제에서 TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스는 PROSTVAC®일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본원에서 설명된 조합 또는 약제에서 TAA를 인코딩하는 재조합 폭스바이러스는 CV301일 수 있다.

[0280] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성물 또는 약제의 제조에서 (a) 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; (b) PD-1 길항제; 그리고 (c) CTLA-4 길항제의 용도를 포함할 수 있다. PD-1 길항제 및 CTLA-4 길항제는 각각, 항-PD-1 길항제 항체 및 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 개시된 제약학적 조성물 또는 약제의 용도는 인간 암 환자의 치료일 수 있다.

[0281] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성물 또는 약제의 제조에서 (a) 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하는 폭스바이러스; 그리고 (b) 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용도를 포함할 수 있고; 여기서 폭스바이러스 벡터와 합동된 치료 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 벡터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0282] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성을 또는 약제의 제조에서 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양-연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용도를 포함할 수 있고; 여기서 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료이하 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스, 또는 단독으로 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 CTLA-4 길항제, PD-1 길항제, PDL-1 길항제, LAG-3 길항제, TIM-3 길항제, 또는 ICOS 효현제에서 선택될 수 있는 것으로 예기된다. 다양한 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 하나 또는 그 이상의 항체에서 구현될 수 있는 것으로 예기된다.

[0283] 다른 추가 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성을 또는 약제의 제조에서 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용도를 포함할 수 있고; 여기서 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스 후 투여되도록 설정되고; 그리고 여기서 폭스바이러스 백터와 합동된 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제는 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 백터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0284] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성을 또는 약제의 제조에서 최소한 첫 번째와 두 번째 용량 투여의 용도를 포함할 수 있고, 각 용량 투여는 (a) 치료 효과량의 재조합 폭스바이러스, 상기 폭스바이러스는 최소한 하나의 종양 연관된 항원 (TAA)을 포함하고; 그리고 (b) 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제를 포함하고; 여기서 두 번째 투여의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량 또는 치료이하 효과량은 첫 번째 투여와 비교하여 증가되고; 그리고 여기서 폭스바이러스 백터와 합동된 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 치료 효과량 또는 치료이하 효과량은 단독으로 최소한 하나의 TAA를 포함하는 폭스바이러스 백터, 또는 단독으로 또는 다른 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 치료 효과량 또는 치료이하 효과량의 최소한 하나의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 투여와 비교하여 증가된 치료 효과를 갖는다.

[0285] **실시예**

[0286] **실시예 1**

[0287] **MVA-BN-mHER2의 작제**

[0288] 배양액의 동시적 감염 및 형질감염은 바이러스 유전체 및 재조합 플라스미드 사이에 상동성 재조합이 발생하도록 허용하였다. 삽입물-운반 바이러스는 단리되고, 특징화되고, 그리고 바이러스 스톡이 제조되었다.

[0289] 플라스미드 pBN146은 MVA-BN 내에 또한 존재하는 서열 (14L 및 15L 개방 해독틀)을 내포한다. mHER2 서열은 MVA-BN 바이러스 유전체 내로 재조합을 허용하기 위해 MVA-BN 서열 사이에 삽입되었다. 따라서, 폭스바이러스 프로모터, 구체적으로 우두바이러스 A-유형 봉입체 유전자 프로모터의 하류에 mHER2 서열을 내포하는 플라스미드가 작제되었다. 플라스미드는 또한, 합성 우두바이러스 프로모터 (Ps), 약제 내성 유전자 (구아닌-크산틴 포스포리보실전달효소; Ecogpt), 내부 리보솜 유입 부위 (IRES), 그리고 증강된 녹색 형광 단백질 (EGFP)을 포함하는 선별 카세트를 내포하였다. 양쪽 선별 유전자 (gpt 및 EGFP)는 단일 이중시스트론 전사체에 의해 인코딩되었다.

[0290] HER-2 서열은 이에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 p2 및 p30의 파상풍 독소 에피토프를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 부가에 의해 변형되었다. mHER2가 MVA-BN 유전체 내로 삽입된 후에, 바이러스 "삽입물 영역"은 다음의 구조를 가졌다:

[0291] ATI 프로모터 - mHER2 서열 - Ps 프로모터 - gpt - IRES - EGFP. 삽입물 영역은 세균 재조합 플라스미드 pBN146 내에서 MVA-BN I4L 유전자간 영역 서열 (F1 및 F2)에 의해 측면에서 접하였다. 상기 구조체의 뉴클레오티드 서열은 아래에 도시된다.

[0292] AGTATGCATTTTACGGATGGAGTCTCGGTCTAAAACGGGAATGTACTATCTACGTACG

[0293] AAACCCGCATCCGCTCCCATTCAATTACATGGACAAGGGATAAAATAAAACCACTGGTG

[0294] GTTGCGATTCCGAAATCTGTACATCATGCACTGGTTAACAAATCTAGAACTAGTTAA
 [0295] TTAAGGAGCTGTTTGAATAAAATTTTTATAATAATCTAGAACTAGTGGATCCCCG
 [0296] GGCTGCAGGAATTGATCTAGCCGCCACCATGGAGCTGGCGCCTGTGCCGCTGGGGC
 [0297] TCCTCCTGCCCTTGGCCCCGGAGCCGAGCACCAAGTGTGCCACGGCACAGACA
 [0298] TGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACC
 [0299] AGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCT
 [0300] TAAGTTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGTACGTGCTCATGCTCACACCAAG
 [0301] TGAGGCAGGTCCCAGTCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTTTGAGGACA
 [0302] ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAG
 [0303] GGGCCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTCGAAGCCTCACAGAGATCTGAAAG
 [0304] GAGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAGCTGCTACCAGGACACGATTGGAAGG
 [0305] ACATCTCCACAAGAACACCAGCTGGCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCGGG
 [0306] CCTGCCACCCCTGTTCTCGATGTGTAAGGGCTCCGCTGCTGGGAGAGAGTTCTGAGG
 [0307] ATTGTCAGAGCCTGACGCGACTGTCTGCCCCGTGCTGCAAGGGCCAC
 [0308] TGCCCAGTGCCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCAACGACTCTG
 [0309] ACTGCCCTGGCCTGCCCTCAACTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCC
 [0310] TGGTCCAGTACATCAAAGCTAACCTCAAATTCACTCGGTATCACCGAGCTGCCGTACAT
 [0311] TCGGCCAGCTGTGACTGCCCTACAACTACCTTCTACGGACGTGGATCCT
 [0312] GCACCCCTGCTGCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGT
 [0313] GTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCAGTGCTATGGCTGGCATGGAGCACTTGC
 [0314] GAGAGGTGAGGGCAGTTACCAAGTGCCTACAGGAGTTGCTGGCTGCAAGAAGATCT
 [0315] TTGGGAGCCTGGCATTCCTGCCAGAGCTTGTGATGGGACCCAGCCTCAACACTGCC
 [0316] CGCTCCAGCAGCAGCTCCAAGTGTGACTCTGGAGAGATCACAGGTTACCTAT
 [0317] ACATCTCAGCATGCCGACAGCCTGCCTGACCTCAGCTTCCAGAACCTGCAAGTAA
 [0318] TCCGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCTACTCGCTGACCTGCAAGGGCTGGCATCA
 [0319] GCTGGCTGGGCTGCGCTACTGAGGAAGTGGCAGTGGACTGGCCTCATCCACCATA
 [0320] ACACCCACCTCTGCTTGTGACACGGTGCCTGGGACCAGCTTTCGGAACCCGACCC
 [0321] AAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAGTGTGAGGCTGGCCTGGCCT
 [0322] GCCACCCAGCTGCGCCGAGGGACTGCTGGGTCCAGGGCCACCCAGTGTGTCACCT
 [0323] GCAGCCAGTTCTGGGCCAGGAGTGCCTGGAGGAATGCCAGTACTGCAGGGCTCC
 [0324] CCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGACTGTTGCCGTGCCACCCCTGAGTGTCAAGCCCAGA
 [0325] ATGGCTCAGTGACCTGTTGGACGGAGGCTGACCACTGTGAGGCTGTGCCCCACTATA
 [0326] AGGACCCCTCTCTGCGTGGCCGCTGCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACA
 [0327] TGCCCATCTGGAAGTTCCAGATGAGGAGGGCGATGCCAGCCTGCCACCAACTGCA
 [0328] CCCACTCTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCGCCAGCAGAGAGGCCAGCCCTC
 [0329] TGACGTCTTCAACAACCTCACCGTGAGCTCTGGCTGCCGTGCCAAGGTGAGCGCCA

[0330] GCCACCTGGAGATCGTCTCGCGTGGTGGCATTCTG**TAGAAGCTGGTACCGAGCTCG**

[0331] *GATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCATCAAG*

[0332] *CTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGTACCCAGTTAATTAGGATCCCCCG*

[0333] *GGCTGCAGGAATTCCATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATATATATCATATAT*

[0334] *ACAAAGTA*

[0335] (서열 번호:1).

[0336] HER2 시작과 종결 코돈은 굵게 표시된다. 측면 서열은 이탈릭체로 표시된다.

[0337] 인코딩된 mHER2 폴리펩티드의 번역은 아래에 도시된다:

[0338] MELAACRWGLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHYQGCQVQGNL

[0339] ELTYLPTNASLSFLQDIQEYQYVILAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNG

[0340] DPLNNTPVTGASPGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPLCYQDTILWKDIFHKNNQLA

[0341] LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQC

[0342] AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVQYIKANSK**FIGITE**LYTFGASCVTACP

[0343] YNYLSTDVGSCTLVCPNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMELREVRAVTSAN

[0344] IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLP

[0345] DLSVFNQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHTHLCFVHTV

[0346] PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQEC

[0347] VEECRVLQGLPREVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARC

[0348] PSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTS**FNNFTVS**

[0349] **FWLRVPKVSASHLEIVSAVVGIL.**

[0350] (서열 번호:2).

[0351] p2 및 p30 서열의 파상풍 독소 애피토프는 굵게 표시된다.

[0352] CEF 배양액은 MVA-BN으로 접종되고, 그리고 또한, pBN146 플라스미드 DNA로 형질감염되었다. 차례로, 이를 세포 배양액으로부터 표본은 선별 약물을 내포하는 배지에서 CEF 배양액 내로 접종되었고, 그리고 EGFP-발현 바이러스 클론은 플라크 정제에 의해 단리되었다. 선별 약물 및 발현된 EGFP의 존재에서 성장된 바이러스 스톡은 MVA-BN-mHER2로 지정되었다. MVA-BN-mHER2의 산출 및 바이러스 스톡의 제조는 5회 플라크 정제를 비롯하여 12회 순차적 계대를 수반하였다.

[0353] MVA-BN-mHER2는 선별 약물의 부재에서 CEF 세포 배양액에서 계대되었다. 선별 약물의 부재는 삽입된 서열로부터, 선별 유전자, gpt와 EGFP 및 연관된 프로모터를 인코딩하는 영역 (선별 카세트)의 상실을 허용하였다. 선별 카세트의 상실을 유발하는 재조합은 F1 I4L 영역 및 상기 영역의 하위섹션, F1 반복 (F1 rpt)에 의해 매개되는데, 이들은 플라스미드 pBN146 내에서 선별 카세트를 측면에서 접한다. 이들 중복 서열은 선별 카세트의 상실을 유발하여, 단지 mHER2 서열만 I4L 유전자간 영역 내에 삽입된 상태로 남겨두는 재조합을 매개하기 위해 포함되었다.

[0354] 선별 카세트를 결여하는 플라크-정제된 바이러스가 제조되었다. 이런 제조는 5회 플라크 정제를 비롯하여 15회 계대를 수반하였다.

[0355] MVA-BN-mHER2 스톡 내에서 mHER2 서열의 존재 및 부모 MVA-BN 바이러스의 부재가 PCR 분석에 의해 확증되었고, 그리고 네스티드 (nested) PCR이 선별 카세트 (gpt 및 EGFP 유전자)의 부재를 실증하는데 이용되었다.

[0356] mHER2 단백질의 발현은 시험관내에서 MVA-BN-mHER2로 접종된 세포에서 증명되었다.

[0357] 실시예 2

[0358] MVA-BN-mHER2 및 항-CTLA4로 처리의 결과로서 IFN γ 에서 증가

[0359] 암컷 BALB/c 생쥐 (6-8 주령, ~ 20 g)는 Simonsen Laboratories, Gilroy, CA로부터 구입되었다. 실험적 폐 전이 모형을 위해, 생쥐는 1 일자에, 폐에서 종양을 형성하는 300 μ L DPBS에서 5.0×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되었다.

[0360] 다음의 항체는 Bio X Cell (West, Lebanon, NH)로부터 구입되었다: 항-ICOS 효현성 항체 (클론 17G9), 항-CTLA-4 (9D9), 항-PD-1 (RMP1-14), 그리고 항-LAG-3 (C9B7W). 모든 항체는 달리 지시되지 않으면, 3 및 17 일자에 100 μ L PBS에서 생쥐마다 200 μ g으로 i.p. 주사되었다. 바이러스 처리를 위해, 생쥐는 달리 지시되지 않으면, 4 및 18 일자에 꼬리 난절에 의해 7.1 μ L의 1.0×10^7 Inf. U. MVA-BN-HER2로 처리되었다 (t.s., Bavarian Nordic [BN], Martinsried, Germany에 의해 생산됨).

[0361] 25 일자에, 전혈, 종양/폐 또는 비장이 유세포 계측 분석을 위해 모아졌다 (4마리 생쥐/군). 비장세포는 비장을 2개의 반투명 유리 슬라이드 사이에서 압박하고, 그리고 적혈구를 ACK 용해 완충액 (Life Technologies, Grand Island, NY)으로 용해함으로써 준비되었다. 폐 및 연관된 종양은 ~1-2 mm^3 조각으로 깍둑썰기되었고, 그리고 10% FBS, 50 U/mL DNA분해효소 I 및 250 U/mL 콜라겐분해효소 I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)를 포함하는 DMEM에서 37 °C에서 1 시간 동안 단일 세포 혼탁액에 더욱 소화되었다. 폐 및 전혈 둘 모두 내에 적혈구는 RBC 용해 완충액 (eBioscience)으로 용해되었다.

[0362] 다음의 단백질에 대한 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA)로부터 구입되었다: CD3e (500A2), CD4 (RM4-5), CD8a (53-6.7), CD107a (1D4B), IFN- γ (XMG1.2); BioLegend (San Diego, CA): CD3e (145-2C11), IL-2 (JES6-5H4), LAG-3 (C9B7W), PD-1 (CD279, 29F.1A12), Tim-3 (RMT3-23), TNF- α (MP6-XT22); 또는 eBioscience (San Diego, CA): ICOS (7E.17G9), CD16/CD32 (93).

[0363] 탈과립 T-세포를 확인하기 위해, 비장세포 (2×10^6 세포/웰) 또는 종양/폐 (1×10^6 세포/웰)의 단일 세포 혼탁액은 RPMI-10 (10% FBS, 1% Pen-strep, 그리고 0.1% β -메르캅토에탄올)에서 재현탁되고, 그리고 항-CD107a 항체 및 골지스탑 (BD Bioscience)의 존재에서 37 °C에서 하룻밤 동안 재자극되었다. 다음의 웹티드가 재자극에 이용되었다: MVA E3L 및 F2L (VGPSNSPTF 및 SPGAAGYDL, 각각 1 μ M), HER2 p63 (TYLPTNASL, 1 μ M), HER2 ECD 중복 웹티드 라이브러리 (HER2 OPL, 1 μ M), 그리고 PSA (HPQKVTKFML, 1 μ M) (5, 9-11). 콘카나발린 A (ConA)가 5 μ g/mL에서 양성 대조로서 이용되었다. 그 다음날, 세포는 세척되고, 항-CD16/CD32 항체로 차단되고, 그리고 표면 마커에 대해 염색되었다. 세포는 이후 세척되고, BD Cytofix/Cytoperm 완충액으로 고정되고/투과화되고, 그리고 IFN- γ 에 대해 세포내에 염색된다.

[0364] 항-CD107a 항체가 배제되고, 골지스탑 및 골지플러그가 첨가되고, 그리고 세포가 IFN- γ , IL-2 및 TNF- α 에 대해 세포내에 염색된 점을 제외하고, 앞서 설명된 바와 같이 추가 세포내 사이토킨 염색이 비장세포에서 수행되었다.

[0365] 모든 FACS 표본은 BD LSRII 또는 Fortessa에서 획득되었고 FlowJo 버전 9.6.2 (TreeStar Inc., Ashland, OR)를 이용하여 분석되었다.

[0366] 모든 통계학적 분석은 윈도우용 GraphPad Prism 버전 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA)을 이용하여 수행되었다.

[0367] 결과는 도면 1에서 도시된다. 종양 항원 특정한 탈과립 세포 (HER2 p63 CD107+IFN γ +)는 MVA-BN-HER2 및 CTLA-4 복합 요법으로 처리된 생쥐의 종양/폐 및 비장에서 증가하였다. 바이러스 특정한 탈과립 세포 (MVA E3L F2L CD107+ IFN γ +)는 MVA-BN-HER2로 처리된 생쥐의 종양/폐 및 비장 둘 모두에서 높았다.

3. 실시예

[0368] MVA-BN-mHER2 및 항-CTLA4로 처리의 결과로서 IFN γ 및 사이토킨 생산에서 증가

[0369] MVA-BN-HER2로 처리는 비장에서 종양 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 크기 및 절을 증가시켰다. 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4로 처리되었다. 25 일자에, 실시예 2에서 설명된 바와 같이 종양/폐 또는 비장이 모아지고 (4마리 생쥐/군), 그리고 바이러스 및 종양 항원 특이적 반응을 계측하기 위해 하룻밤 동안 재자극되었다.

[0371] 결과는 도면 2에서 도시되는데, A) 파이 도표는 백만 CD8+ T-세포마다 IFN γ + 세포의 숫자를 반영하기 위해 가중된 구역이다. B) IFN γ MFI는 복합 요법에서 종양 항원 특이적 (HER2 p63) 다기능성 T-세포와 함께 증가한다.

[0372] 실시예 2 및 3 둘 모두에서, MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4의 조합으로 치료의 결과로서, 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 숫자 및 질이 증가되었다. 게다가, 이러한 조합 치료는 종양 내에 존재하는 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 숫자를 증가시켰다. 도면 1 및 2에 의해 보여지는 바와 같이, 종양 위치에서 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 증가는 MVA-BN-HER2 또는 항-CTLA-4 처리 단독을 이용한 치료에 비하여 현저한 향상이다. 항원 및 바이러스 특정한 T-세포의 양 및 특이성에서 이런 증가는 인간 암에 대한 더욱 우수하고 더욱 효과적인 치료를 제공할 수 있다.

[0373] 추가적으로, 도면 2에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2는 IFN γ 을 생산하는 종양 항원 특정한 T 세포를 유도한다. 본 발명에서, IFN γ 을 분비하는 바이러스 유도된 TIL (종양 침윤성 림프구)는 종양 세포에서 증가된 PD-L1을 야기할 수 있는 것으로 예상된다; 바이러스 치료와 협동으로 이러한 경로의 차단을 뒷받침.

실시예 4

[0375] 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되고 MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4로 처리되었다. **** p<0.0001, 로그 순위 검증. 결과. 도면 3에 도시된 바와 같이, 결과는 MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4로 처리가 MVA-BN-HER2 또는 항-CTLA-4 단독으로 암의 치료와 비교하여 개체의 전체 생존율을 유의미하게 증가시킨다는 것을 증명한다.

실시예 5

MVA-BN-HER2는 폐 종양 부담을 25 일자까지 유의미하게 감소시킨다

[0378] 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되고 MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4로 처리되었다. A) 생쥐는 안락사되고 기도를 통해 트리판 블루로 관류되었다. 폐가 제거되고, 과산화수소에 짧게 담겨지고, 그리고 PBS에서 세척되었다. 종양은 처리되지 않은 생쥐 및 항-CTLA-4 처리된 생쥐에서 작은 덩어리로서 가시적이었다. MVA-BN-HER2로 처리된 생쥐의 폐에서는 가시적인 종양이 없었다. 눈금자는 1 cm에 해당한다. B) 25 일자에 폐 중량. **** p<0.0001, Dunnett 다중 비교 검증과 함께 일원 변량분석 (ANOVA).

[0379] 결과. 도면 4에서 도시된 바와 같이, 결과는 단독으로 또는 항-CTLA-4와 협동으로 MVA-BN-HER2로 처리가 처리 없음 또는 항-CTLA-4 단독으로 암의 치료와 비교하여, 25 일자까지 종양 부담을 유의미하게 감소시켰다는 것을 증명한다.

실시예 6

MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4 처리는 전체 생존율을 증가시킨다

[0382] 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리되었다. 생쥐는 4 및 18 일자에 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 μ g (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4로 처리되었다. **** p<0.0001, 로그 순위 검증.

[0383] 결과. 도면 5에서 도시된 바와 같이, 결과는 항-CTLA-4와 협동으로 MVA-BN-HER2가 처리 없음 또는 항-CTLA-4 단독으로 치료와 비교하여 각 용량 농도에서 개체의 전체 생존율을 증가시켰다는 것을 증명한다.

실시예 7

MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4는 종양 부담을 감소시킨다

[0386] 고령 종양 모형에서, 암컷 BALB/c 생쥐는 1 일자에 CT26-HER-2 세포 (1.0×10^5 , 등의 옆부분에서 i.d.)로 이식되었다. 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-HER2 (100 μ L TBS에서 1E7 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.) 및 1 및 15 일자에 22 μ g 항-CTLA-4 (1 mg/kg)로 처리되었다. 종양은 주 2회 계측되었고, 그리고 종양 체적은 공식: 종양 체적 (mm^3) = (길이 x 너비 2)/2에 따라 계산되었다.

[0387] 결과. 도면 6에서 도시된 바와 같이, 결과는 저용량 항-CTLA-4와 협동으로 MVA-BN-HER2가 종양 부담을 20 일자 까지, 다른 처리와 비교하여 유의미하게 감소시켰다는 것을 증명한다. **** p<0.0001, * p<0.05, 이원 변량분석

(ANOVA)

[0388] 실시예 8

[0389] MVA-BN-HER2 및 항-PD-1 처리

[0390] 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리되었다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 μ g (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.로 4 및 18 일자에 항-PD-1로 처리되었다. *** p<0.0001, * p<0.05, ns= 로그 순위 검증에 의해 유의미하지 않음.

[0391] 결과. 도면 7에서, 결과는 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2를 보여준다.

[0392] 실시예 9

[0393] 항-CTLA-4 및 항-1 PD-1 처리와 합동으로 MVA-BN-HER2는 더욱 낮은 용량에서 전체 생존율을 증가시킨다

[0394] 생쥐는 실시예 2에서 설명된 바와 같이, 5×10^4 CT26-HER-2 세포로 i.v. 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리되었다. 생쥐는 3 및 17 일자에 각 항체에 대해 100 μ L PBS에서 200 μ g (A, 10 mg/kg), 66 μ g (B, 3 mg/kg), 또는 22 μ g (C, 1 mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-PD-1로 처리되었다. *** p<0.0001, 로그 순위 검증.

[0395] 결과. 도면 8에서 도시된 바와 같이, 결과는 항-CTLA-4 및 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2가 MVA-BN-HER2 또는 항-CTLA-4 및 항-CTLA-4 단독으로 암의 치료와 비교하여 각 용량 농도에서 개체의 전체 생존율을 유의미하게 증가시켰다는 것을 증명한다. 더욱 중요하게는, 생존율은 MVA-BN-HER2 또는 항-CTLA-4 및 항-PD-1 단독과 비교하여, 항-CTLA-4 및 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2의 경우에 3 mg/kg 및 1 mg/kg 항체의 더욱 낮은 용량에서 증가되었다.

[0396] 실시예 10

[0397] 항-CTLA-4 및 항-PD-1과 함께 MVA-BN-CV301은 전체 생존율을 증가시킨다

[0398] 암컷 C57/BL6 생쥐 (6-8 주령, ~20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA)는 1 일자에, 폐에서 종양을 형성하는 300 μ L DPBS에서 1.0×10^6 MC38-MUC1 세포로 i.v. 이식되었다. 생쥐는 i.p.로 4 및 18 일자에 MVA-BN-CV301 (4E5 Inf.U. 피하, 꼬리 기부 위에 s.c.)로 처리되고, 그리고 항-CTLA-4 및 항-PD-1 (각각 200 μ g)로 처리되었다.

[0399] 결과. 도면 9에서 도시된 바와 같이, 결과는 항-CTLA-4 및 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-CV301이 MVA-BN-CV301 또는 항-CTLA-4 및 항-PD-1 단독으로 암의 치료와 비교하여 개체의 전체 생존율을 유의미하게 증가시켰다는 것을 증명한다.

[0400] 실시예 11

[0401] PROSTVAC 및 항체로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0402] 수컷 BALB/c 생쥐 (6-8 주령, ~20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy CA)는 1 일자에, 고형 종양을 형성하는 E6 세포 (1.5×10^5 , 등의 옆부분에서 i.d.)로 이식되었다. 생쥐는 1 일자에 PROSTVAC-V (2E7 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.), 그리고 8과 15 일자에 PROSTVAC-F (1E8 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.)로 처리되었다. 생쥐는 1 및 15 일자에 항-PD-1 및 또는 (200 μ g)으로 i.p. 처리되었다. 종양은 주 2회 계측되었고, 그리고 종양 체적은 공식: 종양 체적 (mm^3) = (길이 x 너비²)/2에 따라 계산되었다.

[0403] 실시예 12

[0404] PROSTVAC 및 항-PD-1로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0405] 생쥐는 E6 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 11에서 설명된 바와 같이 PROSTVAC 및 항-PD-1로 처리되었다. 결과는 도면 10에서 도시된다.

[0406] 실시예 13

[0407] PROSTVAC 및 항-LAG-3으로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0408] 생쥐는 E6 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 11에서 설명된 바와 같이 PROSTVAC 및 항-LAG-3으로 처리되었다. 결

과는 도면 11에서 도시된다.

[0409] **실시예 14**

[0410] **PROSTVAC 및 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도**

생쥐는 E6 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 11에서 설명된 바와 같이 PROSTVAC, 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리되었다. 결과는 도면 12에서 도시된다.

[0412] **실시예 15**

[0413] **MVA-BN-HER2 및 항-CTLA-4는 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 1 일자에, 실시예 7에서 설명된 바와 같이 CT26-HER-2 세포 i.d로 이식되었다. 생쥐는 7 및 22 일자에 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.), 그리고 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 일자에 항-ICOS (200 μ g i.p.)로 처리되었다. A) 평균 종양 성장. B) 개별 생쥐에서 종양 성장. **** $p<0.0001$, ** $p<0.01$, 이원 변량분석 (ANOVA). 결과는 도면 13에서 도시된다.

[0415] **실시예 16**

[0416] **항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2는 더욱 낮은 용량에서 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 1 및 15 일자에 100 μ L PBS에서 200 μ g (10 mg/kg), 66 μ g (3 mg/kg), 또는 22 μ g (1 mg/kg) i.p.에서 항-PD-1로 처리된다. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0418] **실시예 17**

[0419] **항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 더욱 낮은 용량에서 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 1 및 15 일자에 100 μ L PBS에서 200 μ g (10 mg/kg), 66 μ g (3 mg/kg), 또는 22 μ g (1 mg/kg) i.p.에서 항-ICOS로 처리된다. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0421] **실시예 18**

[0422] **항-PD-1 및 항-LAG-3과 합동으로 MVA-BN-HER2는 더욱 낮은 용량에서 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 1 및 15 일자에 각 항체에 대해 100 μ L PBS에서 200 μ g (10 mg/kg), 66 μ g (3 mg/kg), 또는 22 μ g (1 mg/kg) i.p.에서 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된다. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0424] **실시예 19**

[0425] **항-CTLA-4 및 항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 더욱 낮은 용량에서 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 1 및 15 일자에 각 항체에 대해 100 μ L PBS에서 200 μ g (10 mg/kg), 66 μ g (3 mg/kg), 또는 22 μ g (1 mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-ICOS로 처리된다. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0427] **실시예 20**

[0428] **항-CTLA-4와 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다**

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3 mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4로 처리된다. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0430] 실시예 21

[0431] 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다

[0432] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0433] 실시예 22

[0434] 항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다

[0435] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-ICOS로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0436] 실시예 23

[0437] 항-CTLA-4 및 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다

[0438] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0439] 실시예 24

[0440] 항-PD-1 및 항-LAG-3과 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다

[0441] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0442] 실시예 25

[0443] 항-CTLA-4 및 항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 증가된 두 번째 용량으로 종양 부담을 감소시킨다

[0444] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 1 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 15 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-ICOS로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0445] 실시예 26

[0446] 항-CTLA-4와 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-CTLA-4에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

[0447] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0448] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0449] 실시예 27

항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-PD-1에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0453] 실시예 28

항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-ICOS에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-ICOS로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-ICOS로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0457] 실시예 29

항-CTLA-4 및 항-PD-1과 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-CTLA-4 및 항-PD-1에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-PD-1로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0461] 실시예 30

항-PD-1 및 항-LAG-3과 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-PD-1 및 항-LAG-3에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된다. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L

PBS에서 각 항체에 대해 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된다. ****
 p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0465] 실시예 31

[0466] 항-CTLA-4 및 항-ICOS와 합동으로 MVA-BN-HER2는 항-CTLA-4 및 ICOS에 앞서 폭스바이러스로 종양 부담을 감소시킨다

[0467] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 3 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 18 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-ICOS로 처리된다. ****
 p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0468] 생쥐는 실시예 7에서 설명된 바와 같이, CT26-HER-2 세포로 이식되고 MVA-BN-HER2로 처리된다. 생쥐는 100 μ L PBS에서 각 항체에 대해 7 일자에 66 μ g (3 mg/kg), 22 μ g (1 mg/kg) 또는 2.2 μ g (0.1 mg/kg) 및 각 항체에 대해 21 일자에 200 μ g (10 mg/kg) 또는 66 μ g (3mg/kg) i.p.에서 항-CTLA-4 및 항-ICOS로 처리된다. ****
 p<0.0001, *** p<0.001, ** p <0.01, * p<0.05, 이원 변량분석 (ANOVA).

[0469] 실시예 32

[0470] MVA-BN-HER2 처리로 Tim-3 발현에서 증가

[0471] 암컷 BALB/c 생쥐 (6-8 주령, ~ 20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA)는 1 일자 및 5 일자에, 꼬리 난절 (t.s., Bavarian Nordic [BN], Martinsried, Germany에 의해 생산됨)에 의해 7.1 μ L의 1.0x10⁷ Inf. U. MVA-BN-HER2로 처리되었다. 조직은 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수집되고, 처리되고, 염색되고, 그리고 Tim-3의 표면 발현이 다양한 간격에서 계측되었다.

[0472] 결과. 도면 14에서 도시된 바와 같이, 개체는 MVA-BN-HER-2가 투여되었고, 그 이후에 Tim-3의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. 처리에 대한 응답으로, 면역 체크포인트 발현에서 매우 적은 증가의 초기 기간이 있었다. 약 3 일자부터 약 12 일자까지 TIM-3의 T-세포 발현이 극적으로 증가하였다. 증가된 발현은 약 18 일자까지 여전히 목격되었다. 15 일자에 MVA-BN-HER2의 두 번째 처리로, Tim 3 발현이 17 일자를 시작으로 증가하였다. 훨씬 유의미하게는, 면역 체크포인트 발현에서 이러한 증가는 CD4 T-세포와 비교하여 CD8 T-세포에서 더욱 현저하였다.

[0473] 도면 14에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2로 처리는 T 세포 상에서 Tim-3의 발현을 일시적으로 유도하였다. 한 양상에서, T-세포 상에서 Tim-3의 이러한 유도된 발현은 하나 또는 그 이상의 TIM-3 길항체를 통해 Tim-3 경로를 차단하는 것이 암 환자의 T-세포 반응을 증강할 수 있다는 것을 지시한다.

[0474] 실시예 33

[0475] MVA-BN-HER2 처리는 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포 상에서 ICOS를 증가시킨다

[0476] 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.)로 처리되었다. 조직은 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수집되고, 처리되고, 염색되고, 그리고 ICOS의 표면 발현이 다양한 간격에서 계측되었다.

[0477] 결과. 도면 15에서 도시된 바와 같이, 개체는 MVA-BN-HER-2가 투여되었고, 그 이후에 ICOS의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. 처리에 대한 응답으로, 면역 체크포인트 발현에서 매우 적은 증가의 초기 기간이 있었다. 대략 1-2 일 후, ICOS의 T-세포 발현은 약간 증가를 보여주었다. 약 3 일자부터 약 12 일자까지 ICOS의 T-세포 발현이 극적으로 증가하였다. 증가된 발현은 약 18 일자까지 여전히 목격되었다. 15 일자에 MVA-BN-HER2의 두 번째 처리로, ICOS 발현이 17 일자를 시작으로 증가하였다. 훨씬 유의미하게는, 면역 체크포인트 발현에서 이러한 증가는 CD4 T-세포와 비교하여 CD8 T-세포에서 더욱 현저하였다.

[0478] 도면 15에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2로 처리는 T 세포 상에서 ICOS의 발현을 일시적으로 유도하였다. 한 양상에서, T-세포 상에서 ICOS의 이러한 유도된 발현은 하나 또는 그 이상의 ICOS 효현체를 통해 ICOS 경로를 활성화하는 것이 암 환자의 T-세포 반응을 증강할 수 있다는 것을 지시한다.

[0479] 실시예 34

[0480] PD-1 발현은 MVA-BN-HER2 처리로 증가한다.

[0481] 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.)로 처리되었다. 조직은 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수집되고, 처리되고, 염색되고, 그리고 PD-1의 표면 발현이 다양한 간격에서 계측되었다.

[0482] 결과. 결과는 도면 16에서 도시된다. 개체는 MVA-BN-HER-2가 투여되었고, 그 이후에 PD-1의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. 처리에 대한 응답으로, 면역 체크포인트 발현에서 매우 적은 증가의 초기 기간이 있었다. 대략 1-2 일 후, PD-1의 T-세포 발현은 약간 증가를 보여주었다. 약 3 일자부터 약 12 일자까지 PD-1의 T-세포 발현이 극적으로 증가하였다. 증가된 발현은 약 18 일자까지 여전히 목격되었다. 15 일자에 MVA-BN-HER2의 두 번째 처리로, PD-1 발현이 17 일자를 시작으로 증가하였다. 훨씬 유의미하게는, 면역 체크포인트 발현에서 이러한 증가는 CD4 T-세포와 비교하여 CD8 T-세포에서 더욱 현저하였다.

[0483] 도면 16에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2로 처리는 T 세포 상에서 PD-1의 발현을 일시적으로 유도하였다. 한 양상에서, T-세포 상에서 PD-1의 이러한 유도된 발현은 하나 또는 그 이상의 PD-1/PDL-1 효험체를 통해 PD-1/PDL-1 경로를 차단하는 것이 암 환자의 T-세포 반응을 증강할 수 있다는 것을 지시한다.

[0484] MVA-BN-HER2에 의해 유도된 PD-1을 차단하는 것은 LAG-3 공동발현을 야기할 수 있고, 그리고 치료적 이익은 MVA-BN-HER2와 협동으로 PD-1/PD-L1 및 LAG-3 경로의 이중 차단으로 달성될 수 있는 것으로 더욱 제안된다.

[0485]

[0486] 실시예 35

[0487] MVA-BN-HER2에 대한 LAG-3 면역 반응

[0488] 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-HER2 (1E7 Inf.U., t.s.)로 처리되었다. 조직은 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수집되고, 처리되고, 염색되고, 그리고 LAG-3의 표면 발현이 다양한 간격에서 계측되었다.

[0489] 결과. 결과는 도면 17에서 도시된다. 개체는 MVA-BN-HER-2가 투여되었고, 그 이후에 LAG-3의 발현 수준이 규칙적인 간격에서 계측되었다. MVA-BN-HER2 처리 후 CD4 또는 CD8 T 세포 상에서 LAG-3 발현의 증가가 있었다.

[0490] 실시예 36

[0491] MVA-BN-CV301 및 항체로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0492] 암컷 C57BL/6 생쥐 (6-8 주령, ~20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy CA)는 1 일자에, MC38-CEA 세포 (2x105, 등의 옆부분에서 i.d.)로 이식되었다. 생쥐는 1 및 15 일자에 MVA-BN-CV301 (1E7 Inf.U., 꼬리 기부 위에 s.c.)로 처리되었다. 생쥐는 각 도면 및 실시예에서 설명된 바와 같이, 그리고 실시예 2에서 설명된 바와 같이 항-PD-1 및/또는 항-LAG-3으로 i.p. 처리되었다.

[0493] 실시예 37

[0494] MVA-BN-CV301 및 항-PD-1로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0495] C57/BL6 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 36에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 결과는 도면 18에서 도시된다.

[0496] 실시예 38

[0497] MVA-BN-CV301 및 항-LAG-3으로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0498] C57/BL6 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 36에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 결과는 도면 19에서 도시된다.

[0499] 실시예 39

[0500] MVA-BN-CV301 및 항-PD-1 및 항-LAG-3으로 처리된 생쥐에서 항종양 반응의 유도

[0501] C57/BL6 생쥐는 MC38-CEA 종양으로 i.d. 이식되고 실시예 36에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 결과는 도면 20에서 도시된다.

[0502] 실시예 40

[0503] 이종성 프라임 부스트는 PSA-특이적 T 세포 반응을 증폭한다

BALB/c 수컷 (5마리/군)은 완충액 (대조), PROSTVAC-V (VVV) (2E6 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.), PROSTVAC-F (FFF) (1E7 Inf. U., 꼬리 기부에서 s.c.)로 2주마다 처리되거나, 또는 PROSTVAC-V 프라임, 그 이후에 2번의 PROSTVAC-F 부스트 (VFF)를 제공받았다. 모아진 비장세포는 Mandl et al. Cancer Immunol. Immunother (2012), 61:19-29에서 설명된 바와 같이 IFN γ ELISPOT에 의해 PSA-특이적 반응에 대해 검정되었고, 상기 문헌은 본원에 참조로서 편입된다.

(A, B) 및 유세포분석법에 의한 세포독성 활성 (% CD107+ IFN γ + CD8 T 세포) (C). 항-PSA IgG 역가는 각 개별 생쥐에 대해 ELISA에 의해 결정되었다 (D). ELISPOT를 위해, 비장세포는 CD4 또는 CD8 PSA-특이적 펩티드 또는 대조로 재자극되었다 (대조는 표시되지 않음). 계산하기에는 너무 다양한 반응은 1000개 스팟/백만 세포로서 전시되었다. 통계학적 유의성은 0.01 μ M에서 Tukey 사후 검증과 함께 RM-ANOVA에 의해 결정되었다. 대조 (A & B)와 비교하여 $^{****}P < 0.0001$. 세포독성 CD8+ T 세포를 확인하기 위해, 비장세포는 항-CD107 항체의 존재에서 PSA CD8-특이적 펩티드로 하룻밤 동안 재자극되었다. 그래프는 4번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다.

도면 21에서 도시된 바와 같이, 우두바이러스로 이종성 프라임 부스트 섭생, 그 이후에 하나 또는 그 이상의 계두바이러스 부스트 투약은 VVV 또는 FFF 상동성 투약 섭생과 비교하여 훨씬 높은 빈도의 IFN γ -생산 PSA-특이적 CD4 T 세포 (도면 21A) 및 CD8 T 세포 (도면 21B와 22A)를 유발하였다.

계다가, VFF 투약으로부터 PSA-특이적 T 세포는 ELISPOT에서 더욱 낮은 0.01 μ M 펩티드 농도에서 반응하는 T 세포의 더욱 높은 빈도에 의해 증거된 바와 같이, 더욱 높은 결합능을 가졌다 (도면 21A 및 21B). 중요하게는, VFF 이종성 프라임 부스트 섭생으로부터 발생하는 기능적으로 활성 PSA-특이적 CD8 CTL의 숫자는 어느 한쪽의 상동성 투약 섭생에 의해 산출된 것들보다 7 내지 20 배 높았다 (도면 21C).

T 세포 반응과 대조적으로, 이종성 프라임 부스트 섭생은 PSA-특이적 항체 반응을 향상시키지 않았다 (도면 21D). 이들 결과는 이종성 VFF 투약이 더욱 높은 결합능 및 증가된 CD8 CTL 활성에 의해 계측될 때 더욱 큰 크기 및 더욱 높은 질의 CD4 및 CD8 PSA-특이적 T 세포 반응을 산출한다는 것을 지시한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 이들은 이종성 PROSTVAC-V/F 투약 이후에 향상된 항-PSA 특정한 항종양 반응에 기여한다.

[0509] 실시예 41

[0510] 이종성 프라임 부스트는 PSA-특이적 T 세포 반응의 질을 향상시킨다

BALB/c 수컷 (5마리/군)은 실시예 40에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 비장은 최후 처리 후 14 일에 수확되었고, 그리고 모아진 비장세포는 PSA OPL 또는 대조로 하룻밤 동안 재자극되었다 (대조는 표시되지 않음). 세포는 유세포 계측 분석에 앞서 세포내 IFN γ , TNF α 및 IL-2에 대해 염색되었다. (A) 파이 도표는 검출된 세포의 숫자를 반영하기 위해 크기에서 가중된다 (백만 T 세포마다 PSA-특이적 CD8의 총수가 각 차트 아래에 표시된다). (B) 평균 형광 강도 (MFI)에 의해 계측될 때 세포당 기저에서 IFN γ 생산의 양. 그래프는 2번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다.

도면 22에 도시된 바와 같이, PSA-특이적 CD8 T 세포 반응의 질에서 추가 식별 특질은 PSA-특이적 CD8 T 세포가 유세포분석법에 의해 IFN γ , TNF α 및 IL-2의 멀티사이토킨-생산에 대해 분석될 때 관찰되었다 (도면 22). 사이토킨 발현을 이용하여, CD8 기억 T 세포는 이중-양성 CD8 작동체 기억 T 세포 (IFN γ + TNF α +, TEM) 및 삼중-양성 CD8 중심 기억 T 세포 (IFN γ + TNF α + IL-2+; TCM)로서 분류되었다. 가령, Nat Rev Immunol 2008, 8:247-258을 참조한다.

CD8 T 세포 반응의 증가된 크기 (도면 21 및 도면 22A)에 더하여, CD8 T 세포 반응의 질에서 확인한 변동이 상동성 투약 섭생과 비교하여 이종성 PROSTVAC-V/F 섭생의 결과로서 더욱 높은 비율의 이중-양성 TEM 및 삼중-양성 TCM (도면 22A)에 의해 드러났다. 5 배 높은 PROSTVAC-V 용량으로 기록은 CD8 T 세포 반응의 크기 또는 질에서 어떤 추가적인 이익도 산출하지 못하였다 (데이터 제시되지 않음). 추가 이중-양성 TEM 및 삼중-양성 TCM CD8 T 세포는 단일 양성 세포보다 세포당 기저에서 더욱 높은 수준 of IFN γ 를 생산하였다 (도면 22B). 이러한 증가된 IFN γ 생산은 투약 섭생에 상관없이 TEM 및 TCM CD8 T 세포에서 관찰되었다.

추가적으로, 도면 22에서 도시된 바와 같이, MVA-BN-HER2는 IFN γ 를 생산하는 종양 항원 특정한 T 세포를 유도한다. 본 발명에서, IFN γ 를 분비하는 바이러스 유도된 TIL (종양 침윤성 림프구)는 종양 세포에서 증가된 PD-

L1을 야기할 수 있는 것으로 예기된다; 바이러스 치료와 합동으로 이러한 경로의 차단을 뒷받침.

[0515] **실시예 42**

[0516] **PSA를 항한 T 세포 반응의 면역 집속**

[0517] 생쥐는 실시예 40에서 설명된 바와 같이 처리되었다. 모아진 비장세포는 최후 처리 후 14 일에 유세포분석법 (% CD107+ IFN γ + CD8 T 세포)에 의해 우두 바이러스 (VV)-특이적 (왼쪽에 A 및 C 패널) 또는 PSA-특이적 (오른쪽에 A 및 C 패널) 세포독성 활성에 대해 검정되었다. 비장세포는 항-CD107 항체의 존재에서 우두 E3L 및 F2L 웨티드로 또는 PSA OPL로 하룻밤 동안 재자극되었다. 그 다음날, 세포는 IFN γ 에 대해, 그리고 표면 마커 CD127 및 KLRG1로 세포내에 염색되었다. % 항원 특이적 세포독성 SLEC 및 DPEC는 각각, (CD8 +CD127-KLRG1+) 및 (CD8+CD127+KLRG1+) 세포에서 케이팅함으로써 결정되었다. 그래프는 2번의 독립적으로 수행된 실험의 대표적인 데이터를 보여준다. 결과는 도면 23에서 도시된다.

[0518] 벡터-특이적 대 PSA-특이적 작동체 T 세포 부분집합의 세포독성 능력에 대한 상동성 투약과 비교하여 이종성 PROSTVAC 우두바이러스 계두/F 투약 섭생의 충격이 분석되었다. 상동성 VVV 투약은 상대적으로 높은 숫자의 우두-특이적 세포독성 SLEC (~50%) 및 DPEC (~20%)를 산출하긴 하지만 (도면 23A 및 23C), 10%보다 적은 SLEC 또는 DPEC 세포독성 CD8 T 세포가 PSA-특이적이었다. 반대로, 이종성 VFF 투약 이후에 65%의 SLEC 및 30%의 고도로 활성 DPEC 작동체 기억 T 세포가 PSA-특이적 CTL이었고, 반면 우두-특이적 CTL은 10%보다 적었다 (도면 23A 및 23C). 이런 이유로, 이종성 PROSTVAC-V/F 섭생은 PSA-표적화된 대 우두-표적화된 SLEC 및 DPEC T 세포 반응의 비율에서 100 배 향상을 유발하였다 (도면 23B 및 23D). 다시 한 번, 5 배 많은 PROSTVAC-V로 기폭은 어떤 추가적인 이익도 산출하지 못하였다 (데이터 제시되지 않음).

[0519] **실시예 43**

[0520] **면역 집속 후 CTLA-4로 복합 요법**

[0521] BALB/c 수컷 (5마리/군)은 실시예 40에서 설명된 바와 같이, 완충액 (대조), PROSTVAC-V 프라임, 그 이후에 2번의 PROSTVAC-F 부스트로 2주마다 처리된다. 생쥐는 1, 15 및 29 일자에 (A), 또는 15 및 29 일자에 (B), 또는 16 및 30 일자에 (C) 또는 17 및 31 일자에 (D), 항-CTLA-4 (60 μ g)로 i.p. 처리된다. PSA 특이적 T 세포 반응은 실시예 40, 41 및 42에서 설명된 바와 같이 분석된다.

[0522] 본원에서 설명되고 본 출원에 의해 증명된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 TAA를 포함하는 재조합 폭스바이러스를 투여하는 것은 다양한 용량에서 치료적으로 효과적이다. 특히, 개시된 조합은 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 또는 폭스바이러스 요법 단독을 이용할 때 용량보다 낮은 용량에서 효과적이다.

[0523] 본 출원은 부가적으로, 재조합 폭스바이러스 및 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 조합의 효력이 치료 동안 이용된 투약 섭생에 따라 크게 증강된다는 것을 증명한다. 가령, 재조합 폭스바이러스 치료 후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 중에서 하나 또는 그 이상을 투여하는 것은 조합 치료의 효력을 크게 증강한다. 추가적으로, 두 번째 또는 차후 재조합 폭스바이러스 치료 후 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제의 용량을 증가시키는 것은 본원에서 설명된 조합 치료의 효력을 크게 증강한다.

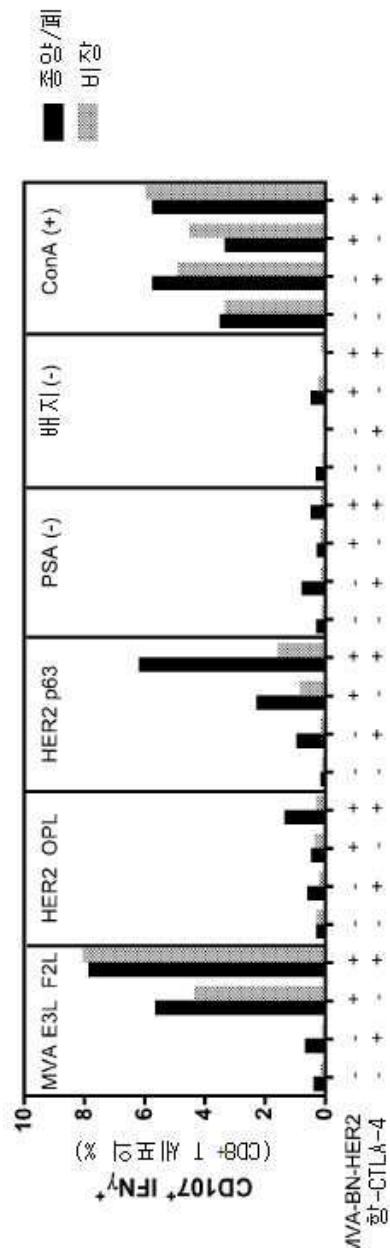
[0524] 본 출원은 부가적으로, 본원에서 설명된 투약 섭생이 재조합 폭스바이러스 및 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제 복합 요법의 크게 증강된 효력에 중요하다는 것을 보여준다.

[0525] 유의미하게는, 본 발명은 TAA를 갖는 폭스바이러스 벡터가 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 합동으로 투여될 때, 폭스바이러스 벡터의 유형과는 관계없이 증가된 치료 효과를 제공할 수 있다는 것을 증명한다. 특히, 본 발명은 복수 유형의 폭스바이러스가 조합 치료에서 이용될 때, 증가된 치료 효과를 증명한다. 가령, 치료 효과는 폭스바이러스, 예를 들면, 오소폭스바이러스 또는 조류폭스바이러스가 본원에서 설명된 바와 같이 면역 체크포인트 길항제 또는 효현제와 함께 투여될 때 달성되었다.

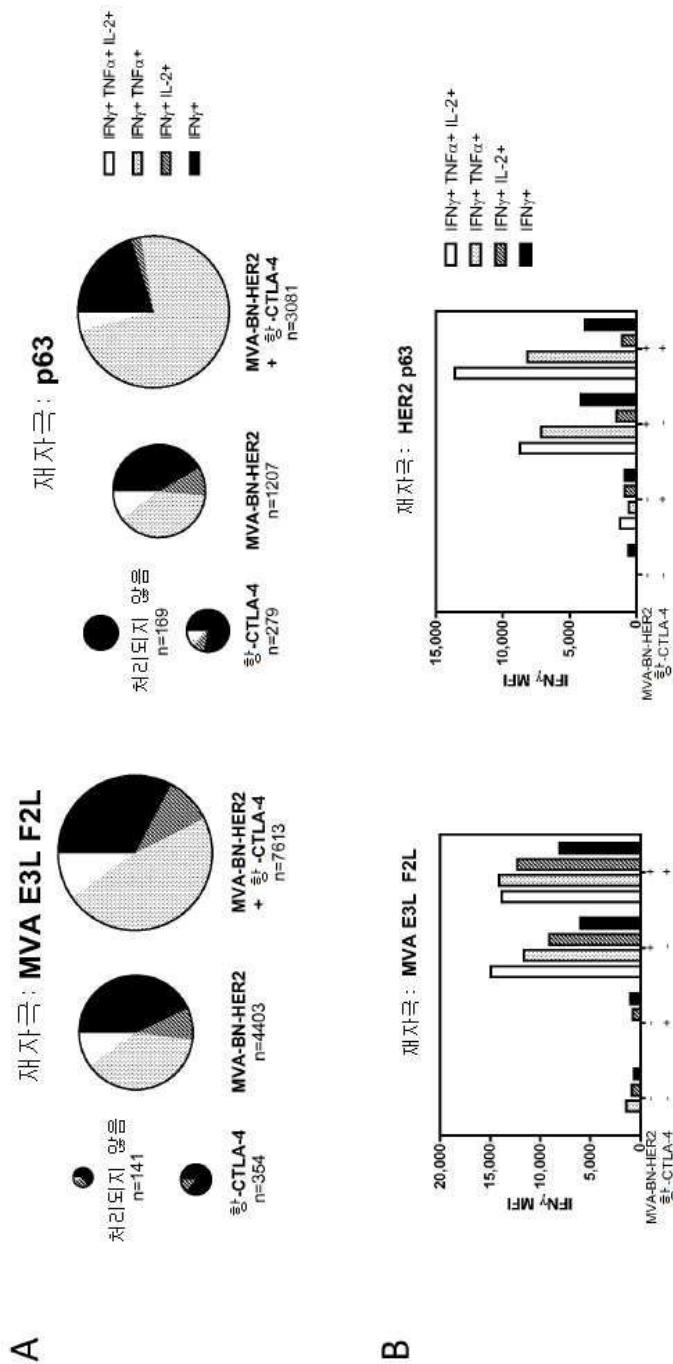
[0526] 본원에서 설명된 방법 또는 조성물의 정밀한 상세가 설명된 발명의 사상으로부터 벗어나지 않으면서 변하거나 또는 변형될 수 있다는 것은 명백할 것이다. 우리는 아래 청구항의 범위 및 사상 내에 들어가는 이와 같은 모든 변형과 변이를 청구한다.

도면

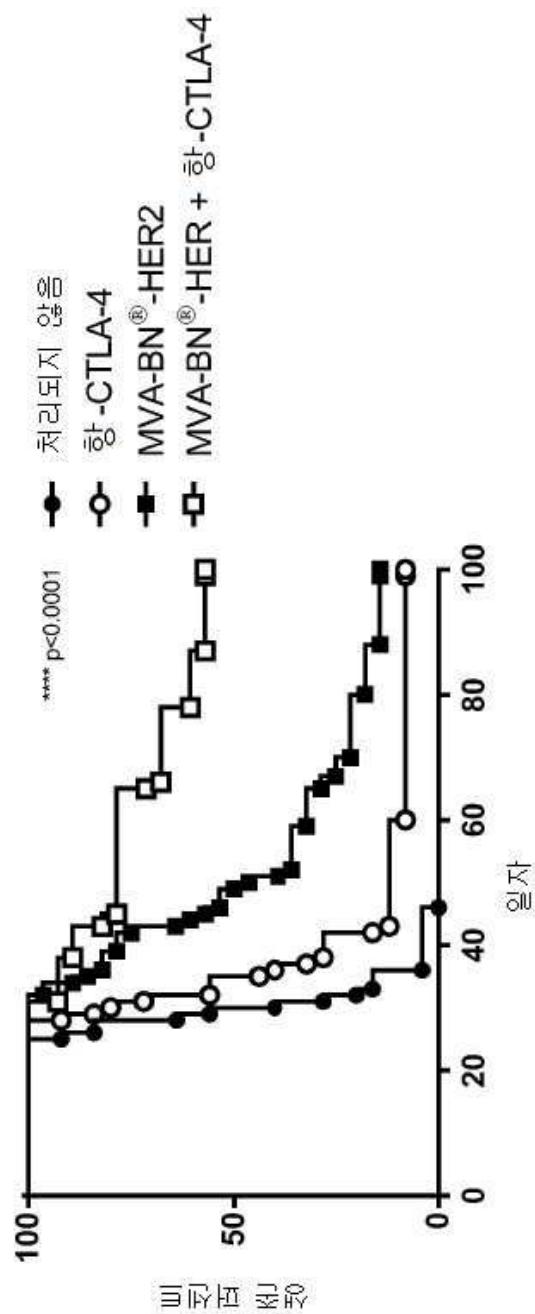
도면 1



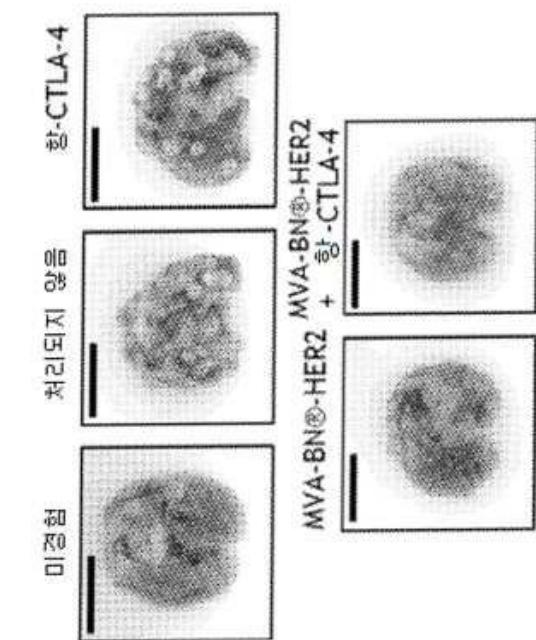
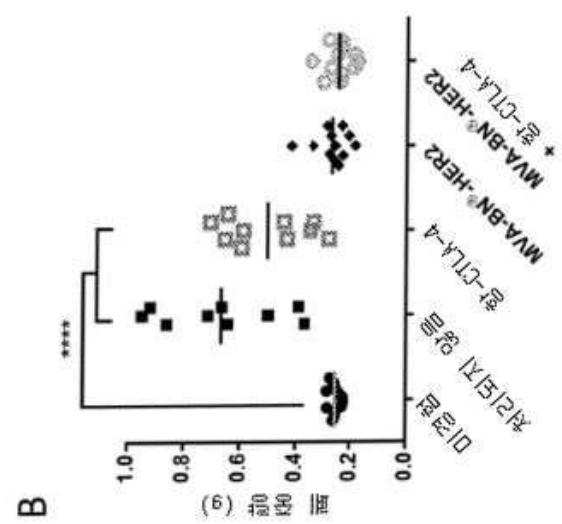
도면2



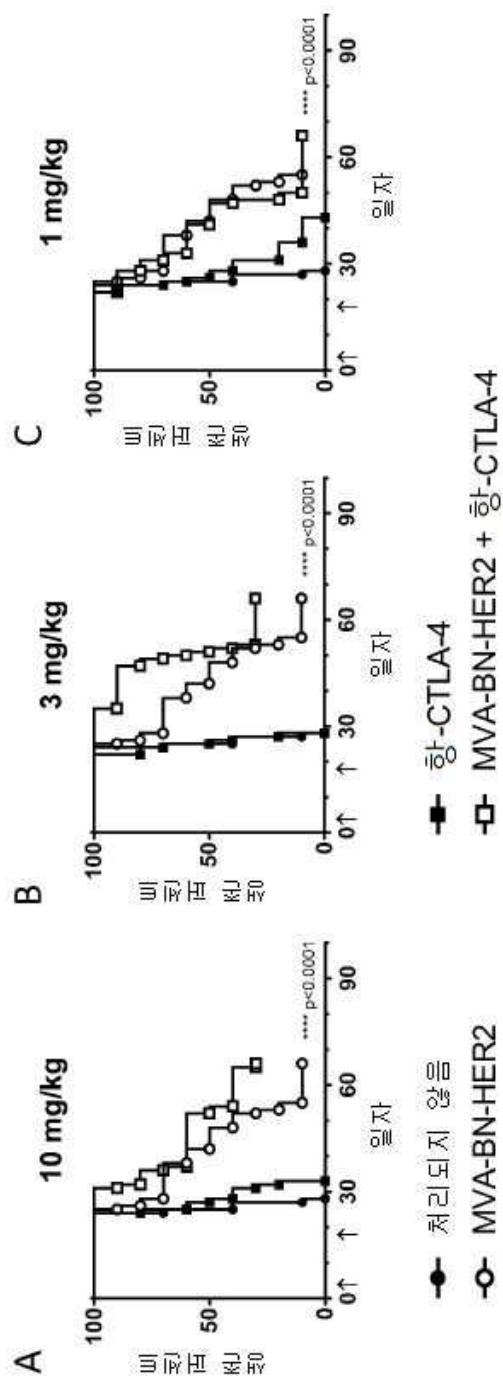
도면3



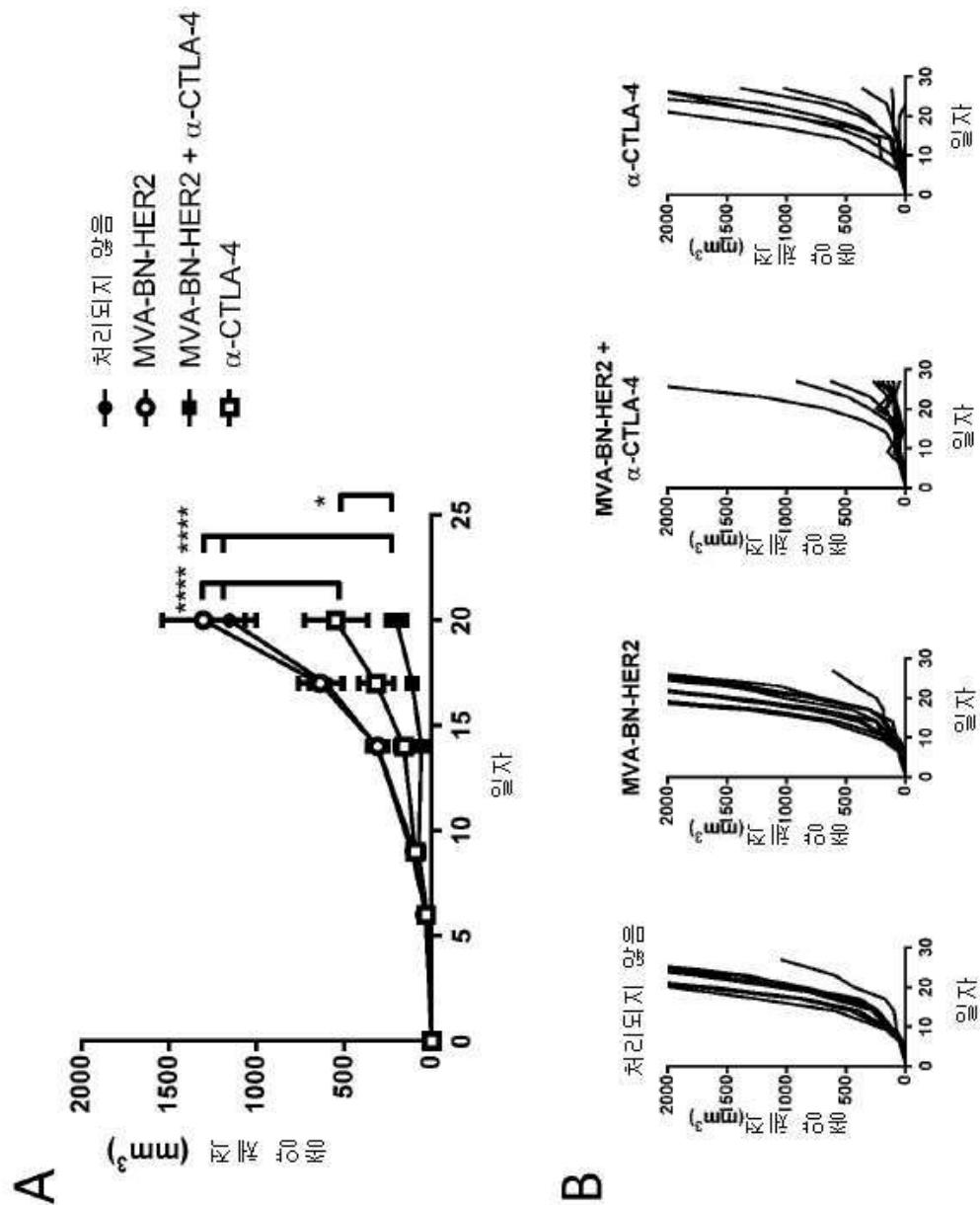
도면4



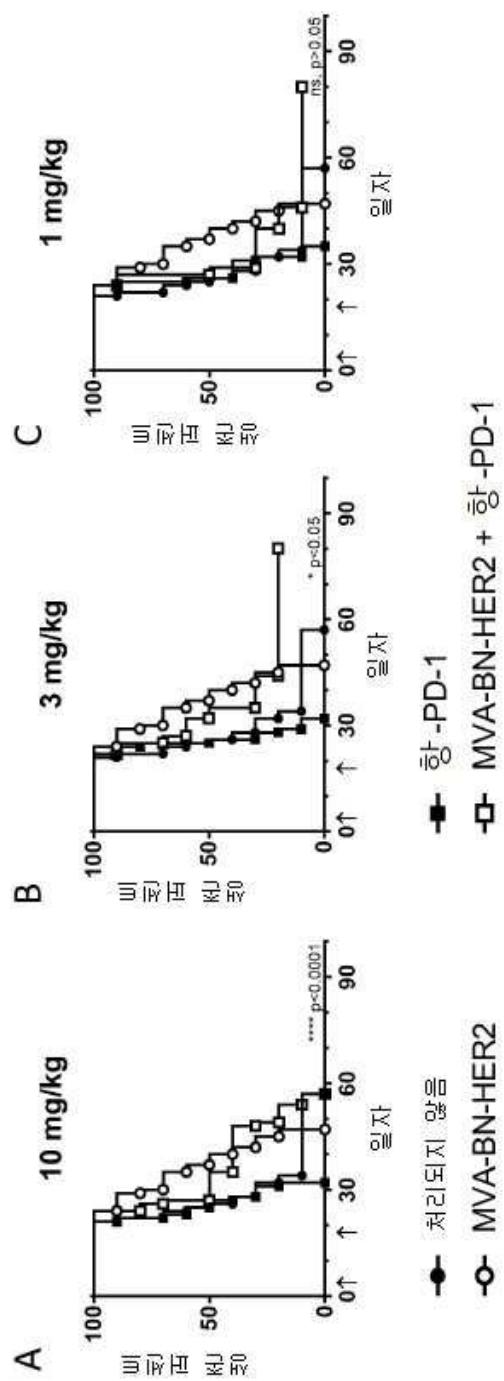
도면5



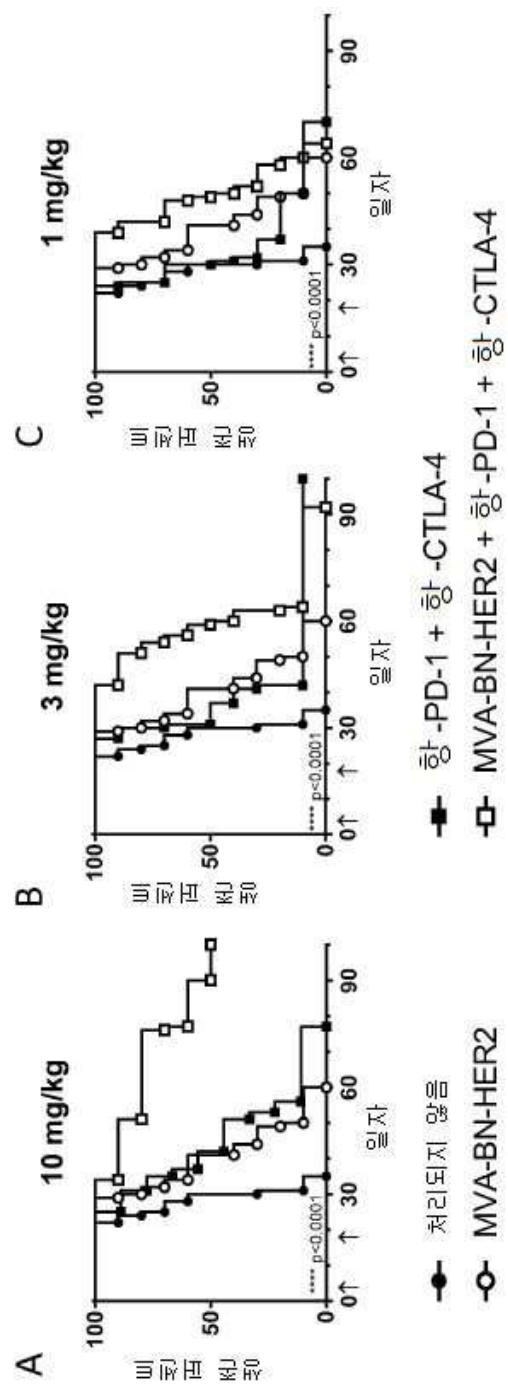
도면6



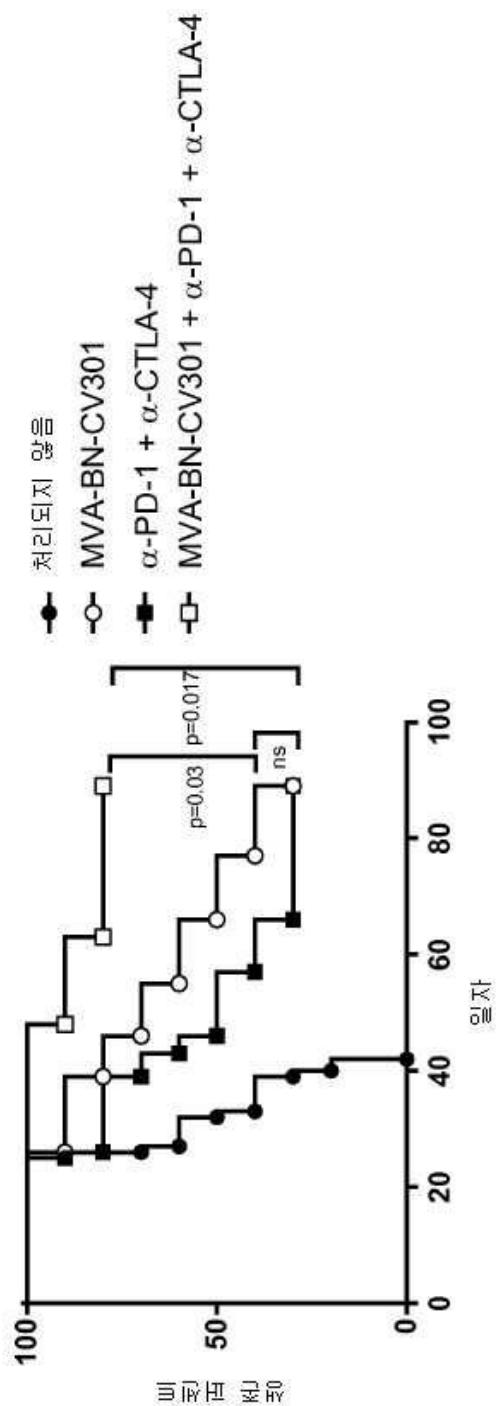
도면7



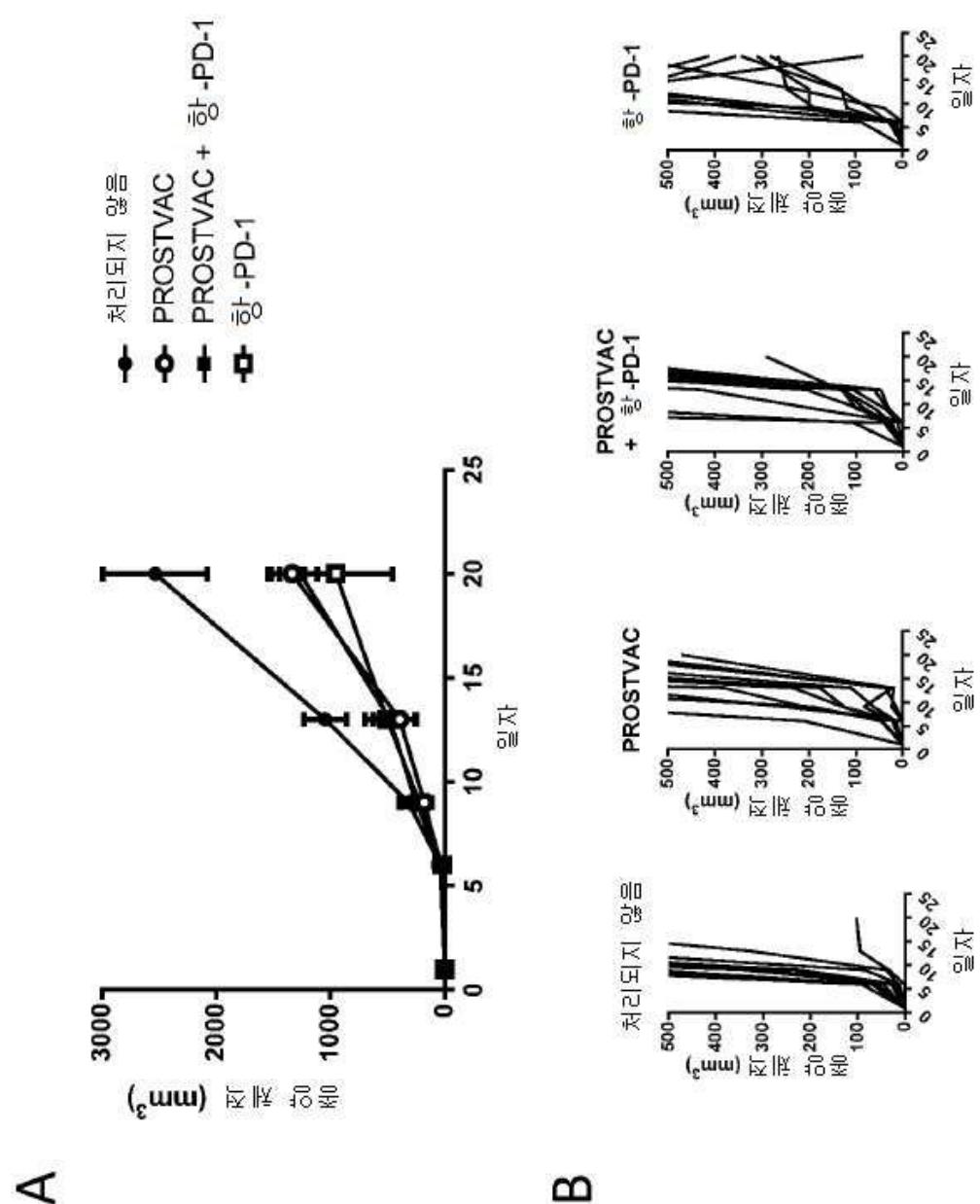
도면 8



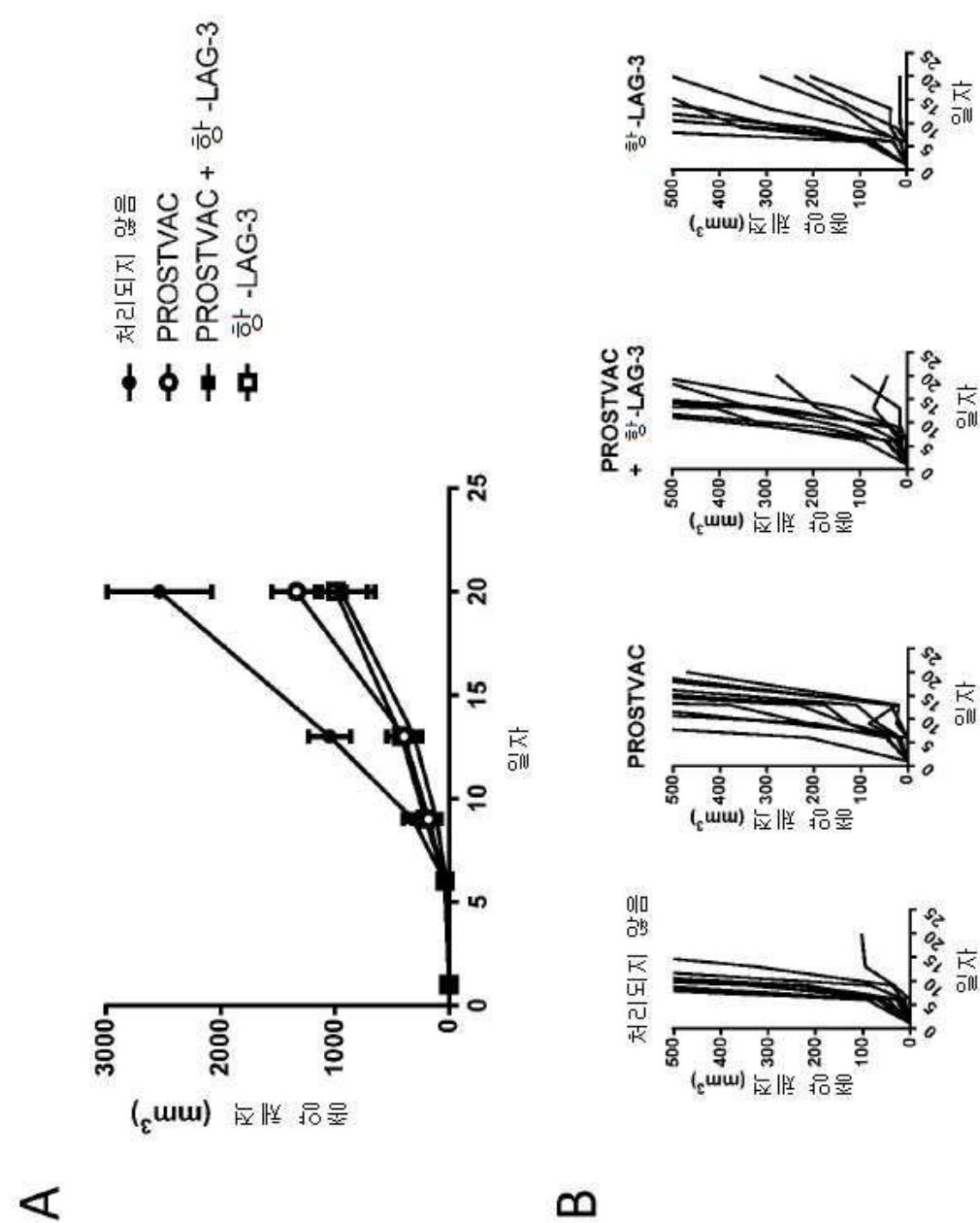
도면9



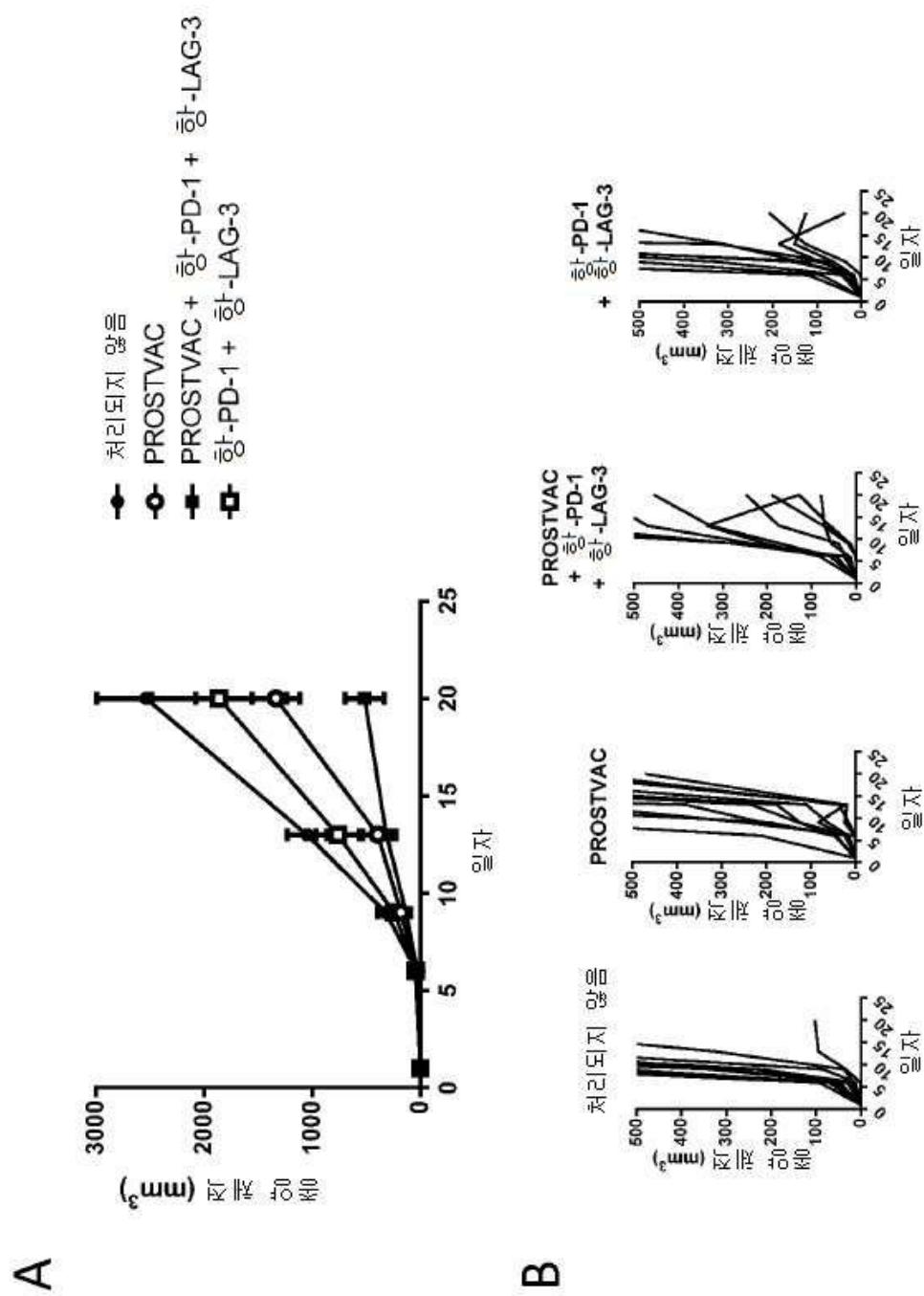
도면 10



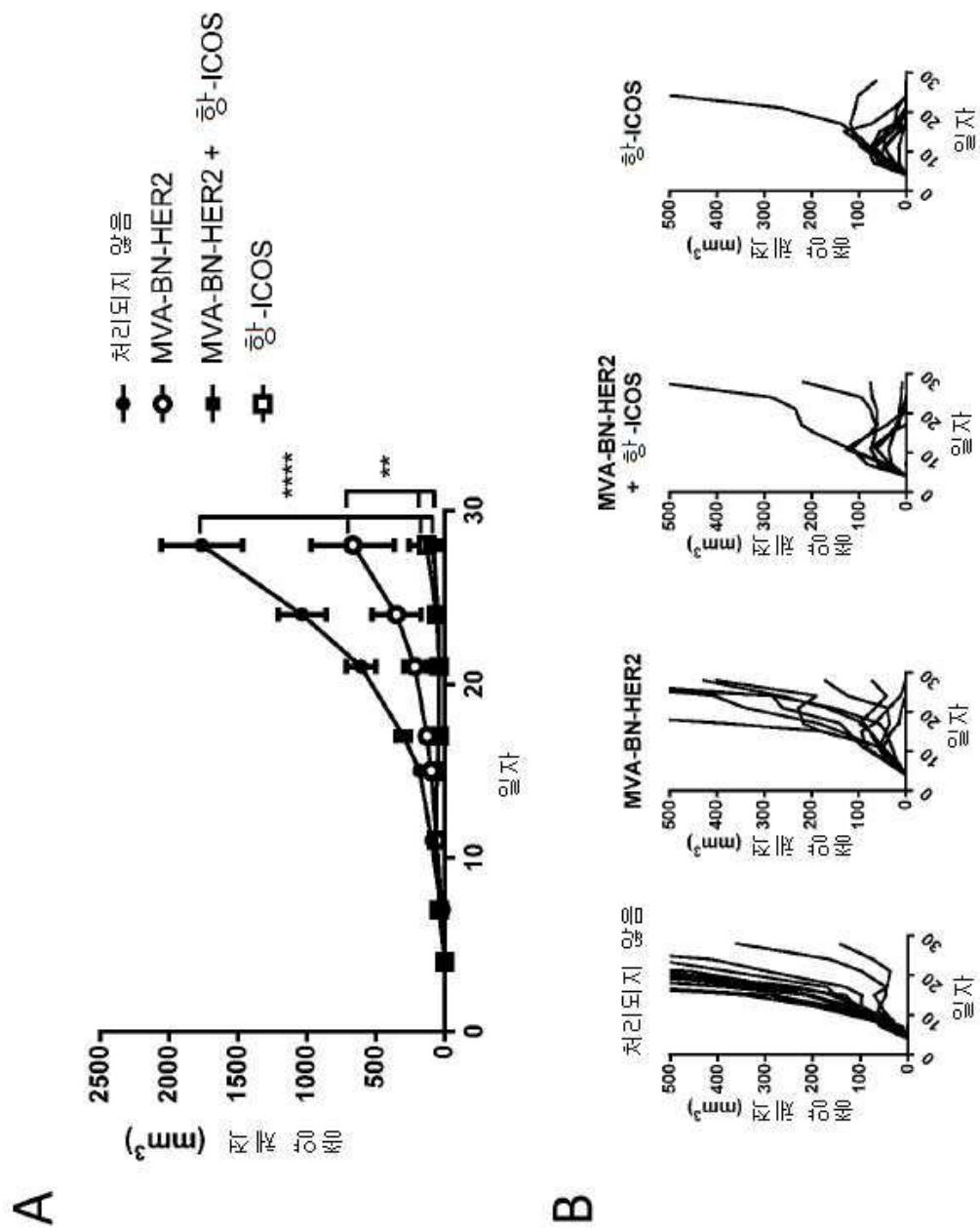
도면11



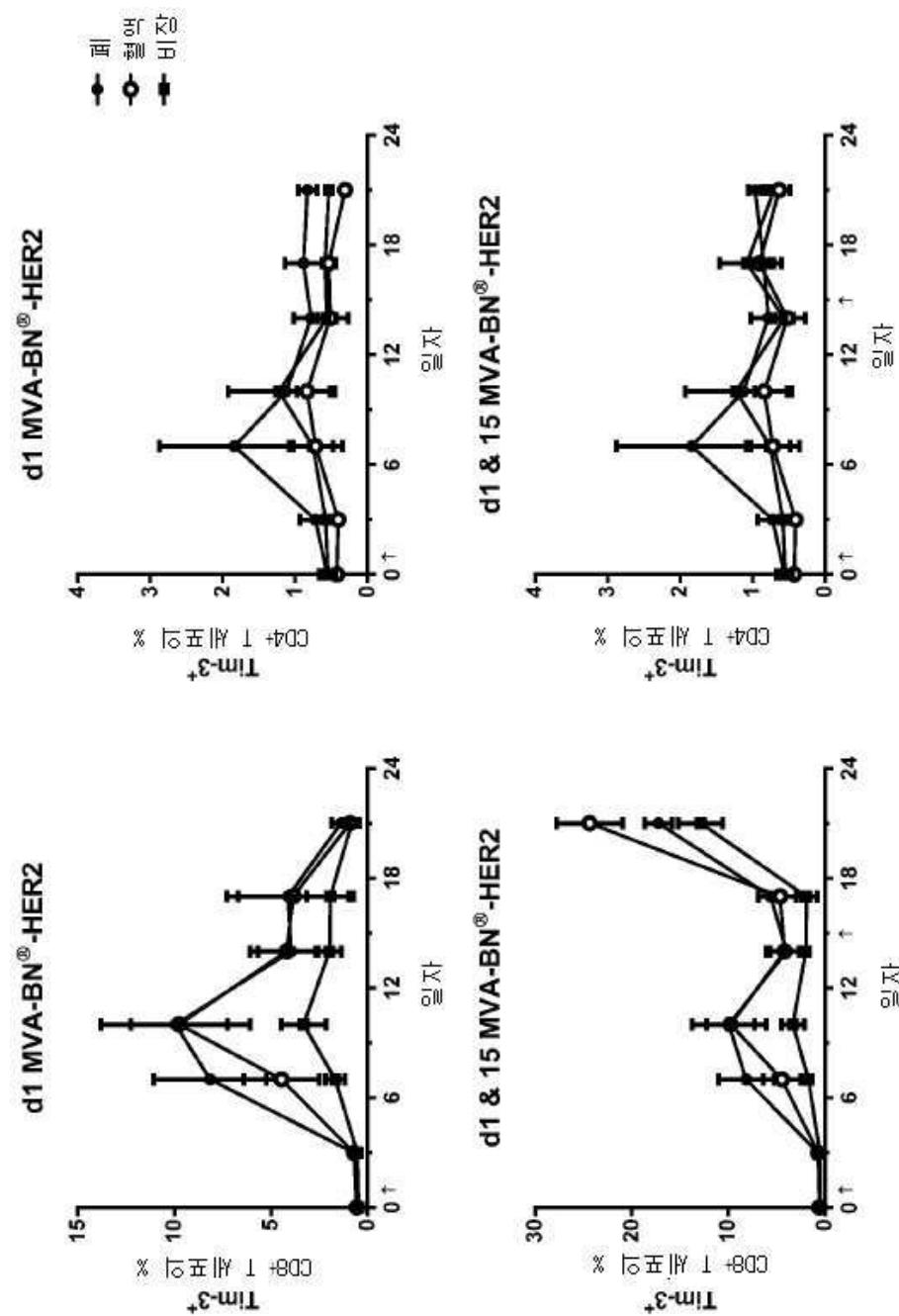
도면 12



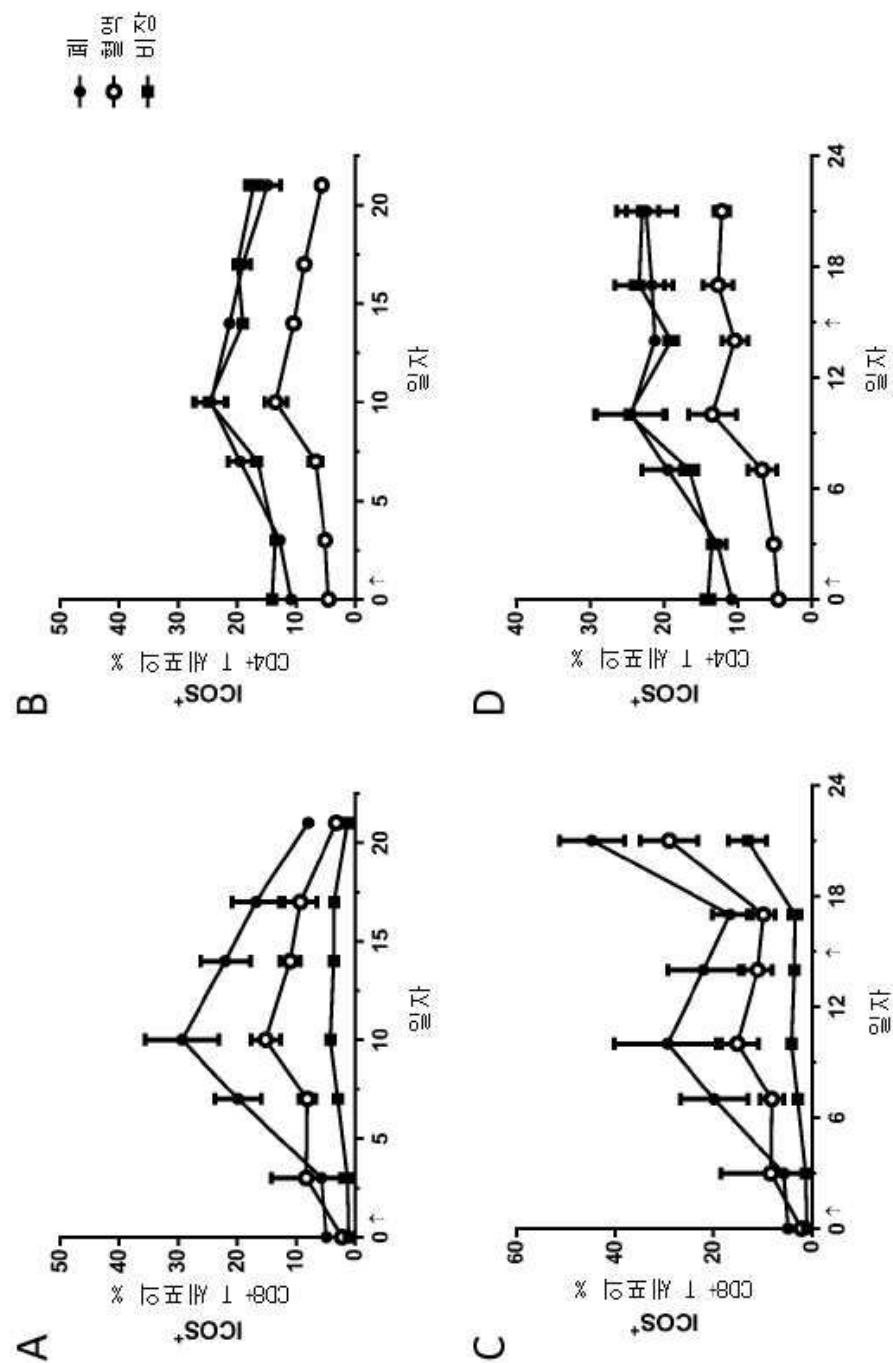
도면 13



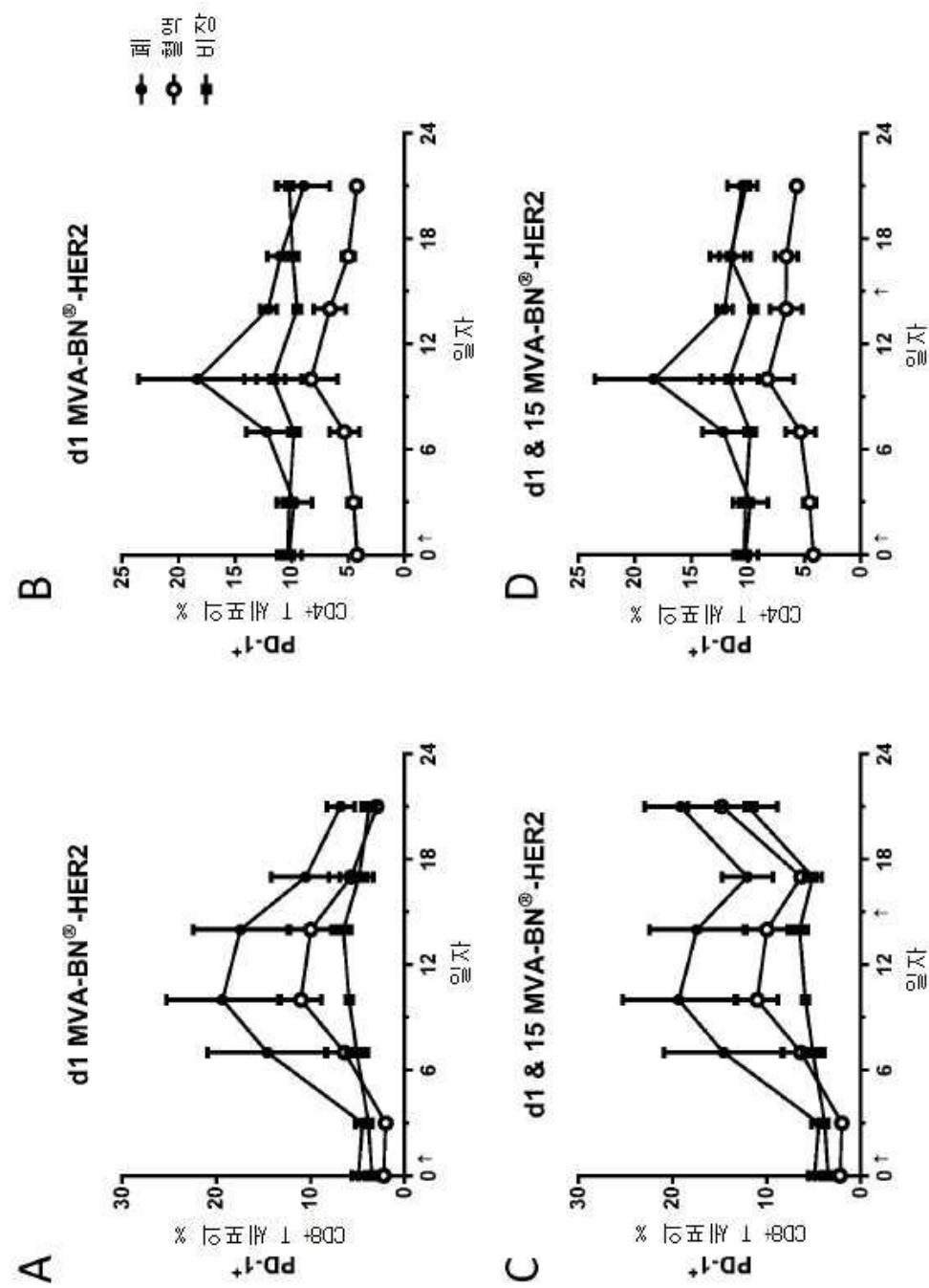
도면14



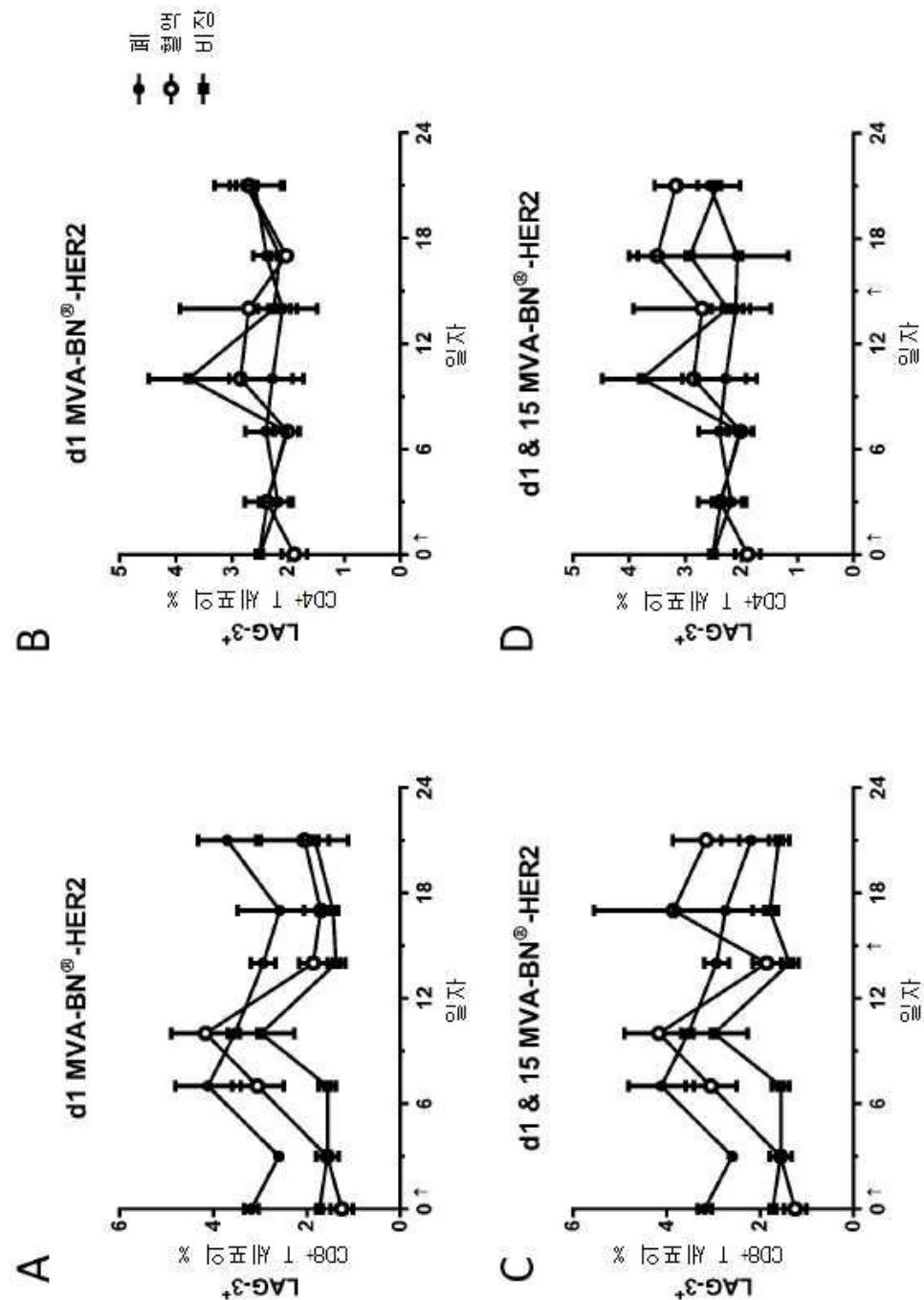
도면 15



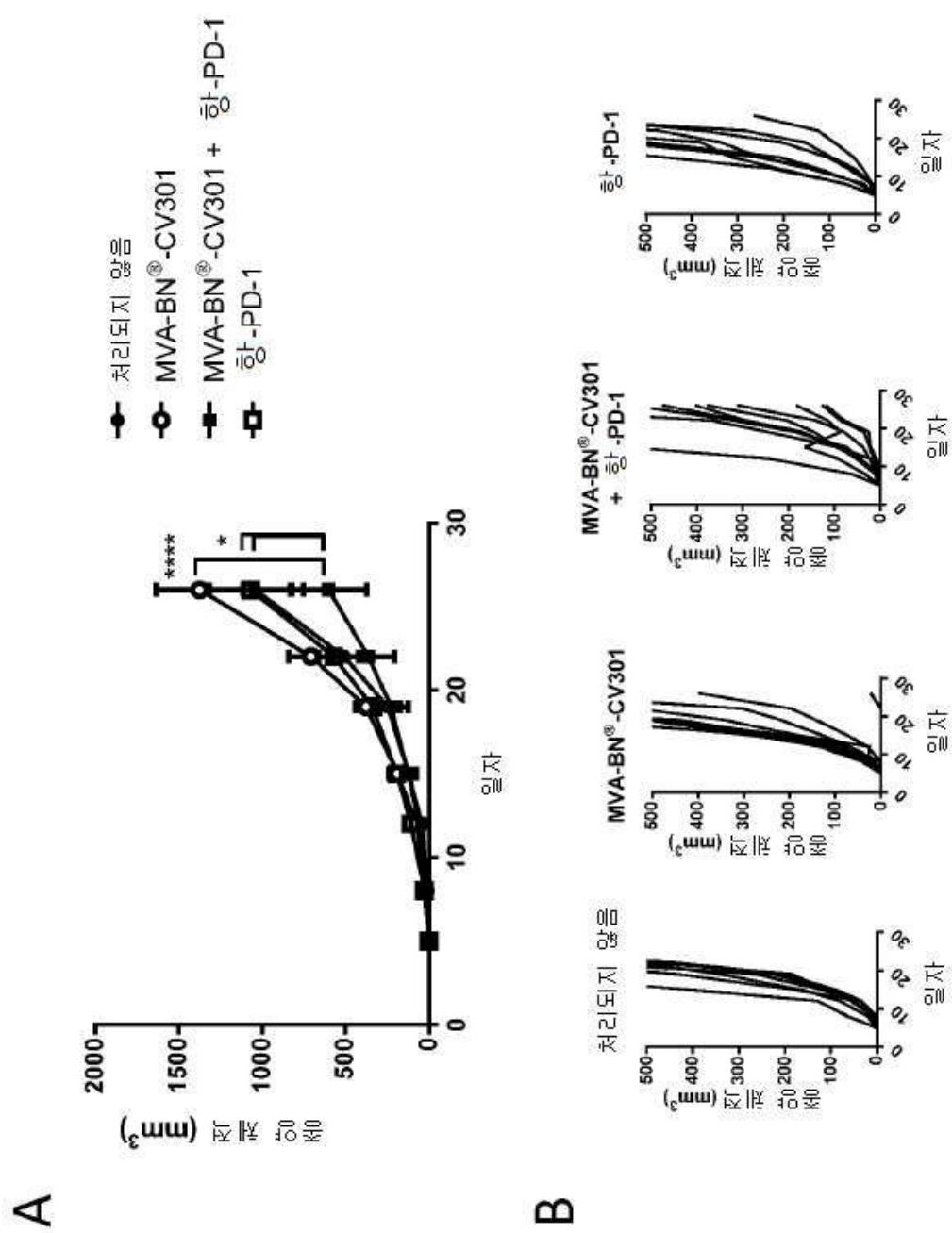
도면 16



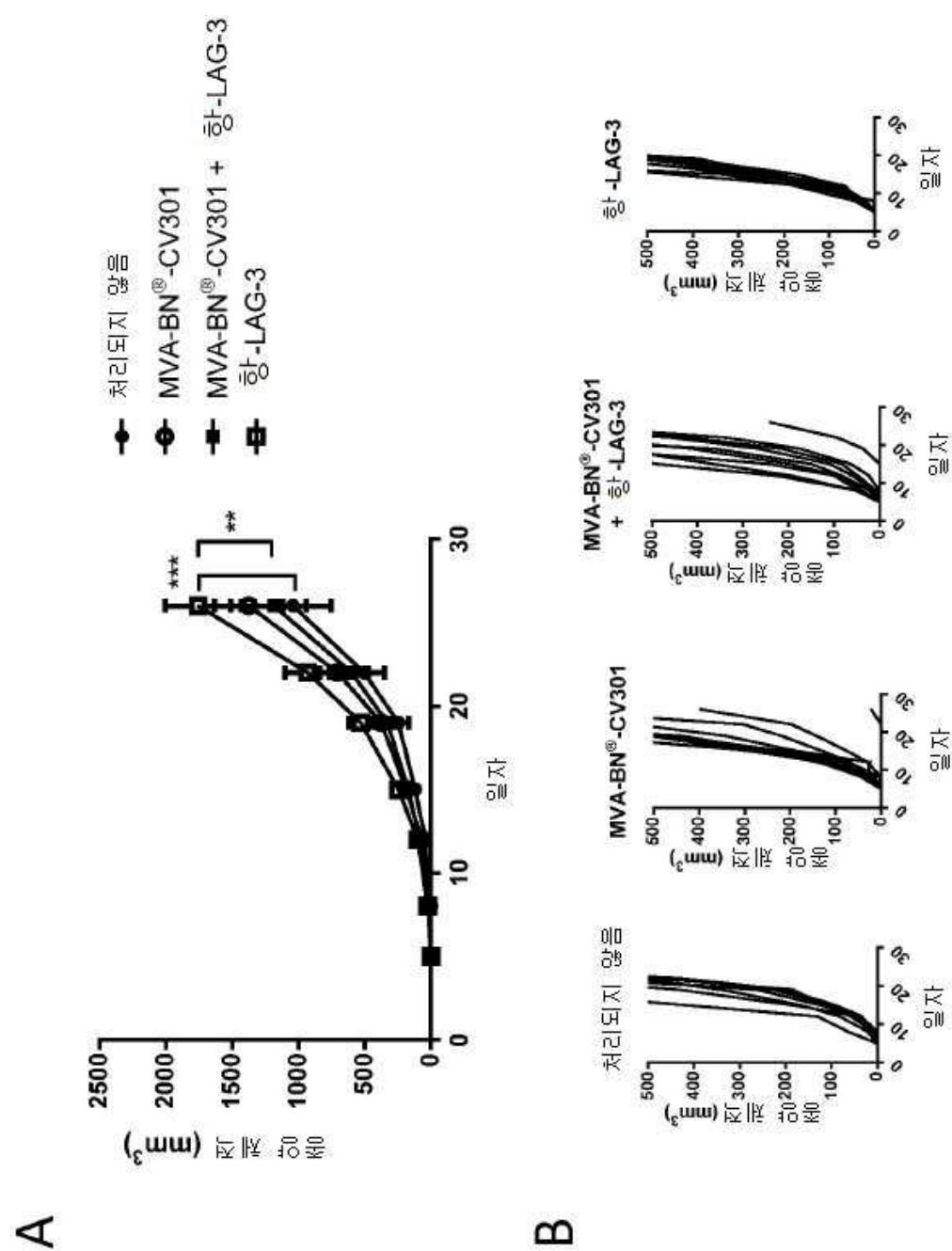
도면 17



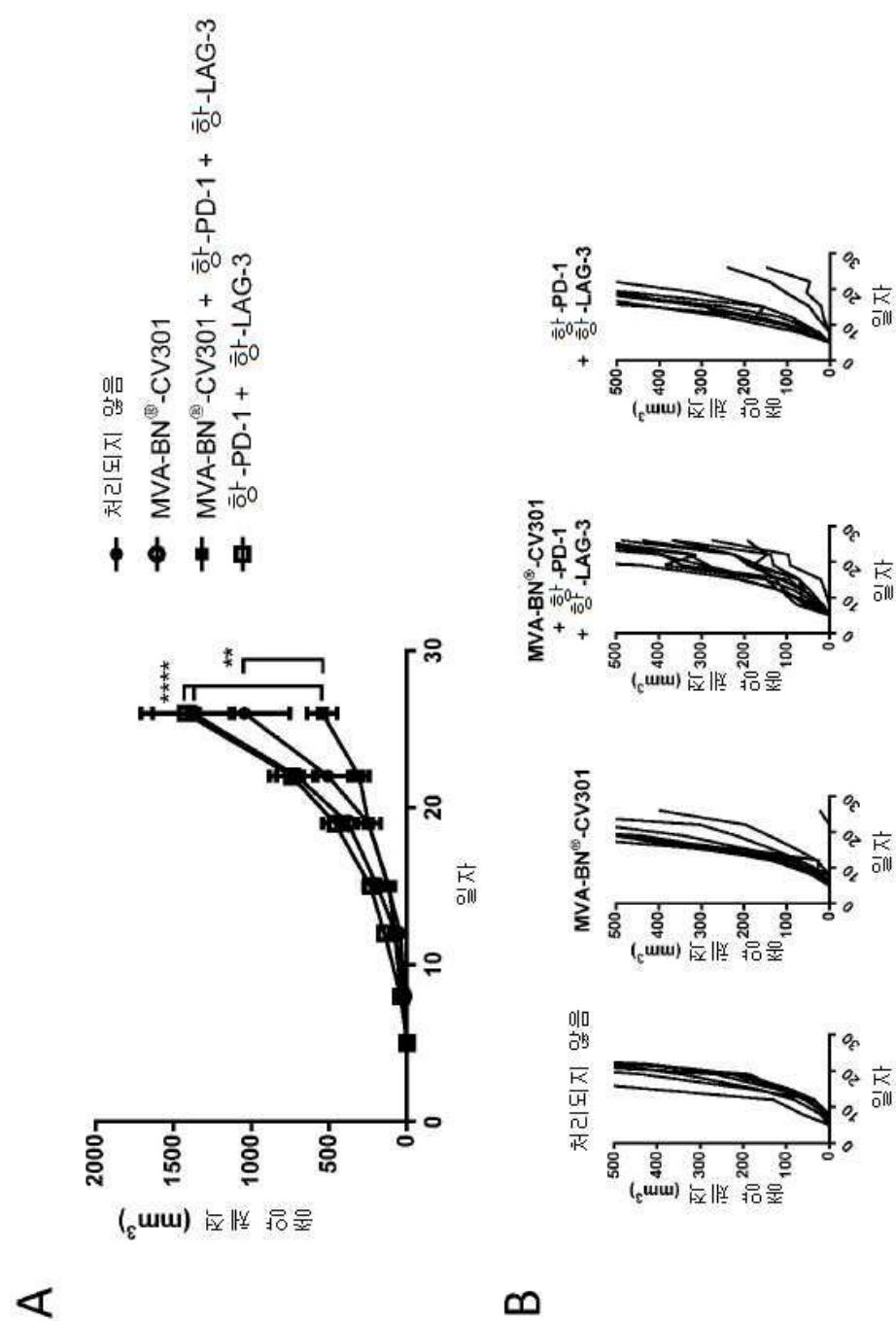
도면 18



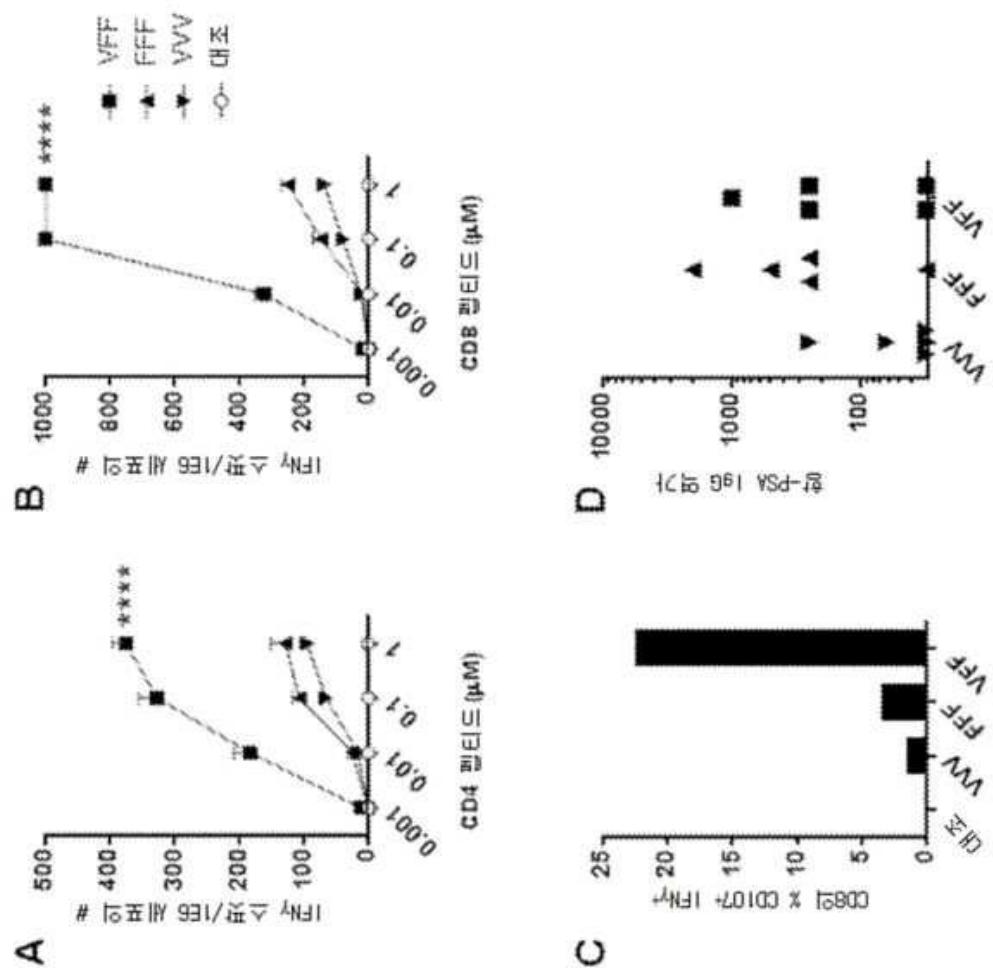
도면 19



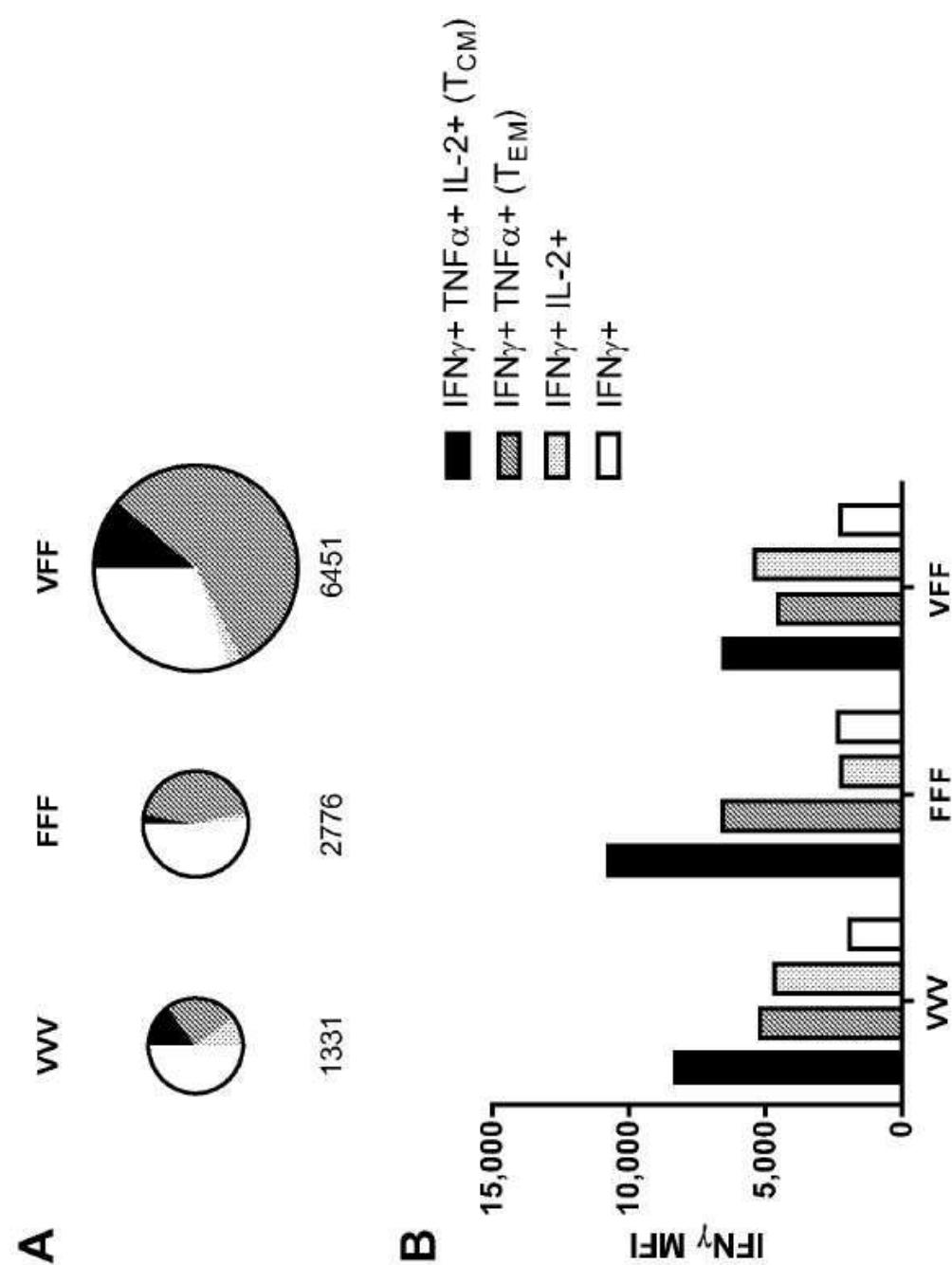
도면20



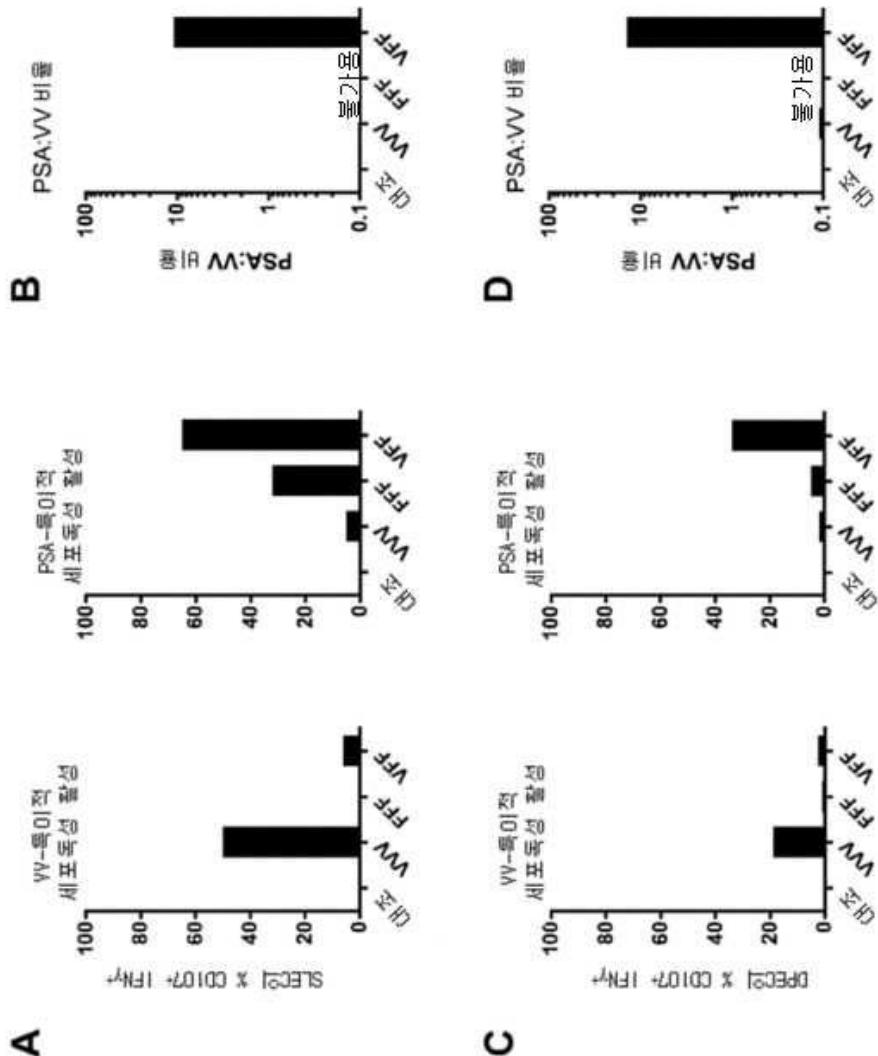
도면21



도면22



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BAVARIAN NORDIC, INC

<120> COMBINATION THERAPY FOR TREATING CANCER WITH A RECOMBINANT
POXVIRUS EXPRESSING A TUMOR ANTIGEN AND AN IMMUNE CHECKPOINT
MOLECULE ANTAGONIST OR AGONIST

<130> BNIT0008PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of a construct encoding a modified HER2
protein including two epitopes derived from tetanus toxin

<400> 1

agtatgcatt ttacggatg gagtctcggt ctaaaaacgg gaatgtacta tctacgtacg	60
aaacccgcat ccgctccat tcaattcaca ttggacaagg ataaaataaa accactggtg	120
gtttgcgatt ccgaaatctg tacatcatgc agtggttaaa caaatctaga actagttaa	180
ttaaggagct gtttgaata aaatttttt ataataaaatc tagaactagt ggatcccccg	240
ggctgcagga attcgatcta gccgccacca tggagctggc ggccttgtgc cgctggggc	300
tcctcctcgc cctcttgccc cccggagccg cgagcaccca agtgtgcacc ggcacagaca	360
tgaagctgcg gctccctgcc agtcccgaga cccacctgga catgctccgc caccttacc	420
aggcgtgcca ggtgggtcag ggaaacctgg aactcaccta cctgcccacc aatgccagct	480
taagtttctt gcagggatatac caggagggtgc agggctacgt gctcatcgct cacaaccaag	540
tgaggcaggt cccactgcag aggctgcgga ttgtgcgagg cacccagctc tttgaggaca	600
actatgcctt gcccgtgcta gacaatggag acccgctgaa caataccacc cctgtcacag	660
gggcctcccc aggaggcctg cgggagctgc agcttcgaag cctcacagag atcttgaag	720
gaggggtctt gatccagcgg aaccccccagc tctgctacca ggacacgatt ttgtggaagg	780
acatcttcca caagaacaac cagctggctc tcacactgat agacaccaac cgctctcggt	840
cctgccaccc ctgttctccg atgtgttaagg gctcccgctg ctggggagag agttctgagg	900
attgtcagag cctgacgcgc actgtctgtc ccgggtggctg tgcccgtgc aaggggccac	960
tgcctactga ctgctgccat gagcagtgtc ctgcccggctg cacggggccc aagcactctg	1020
actgcctggc ctgcctccac ttcaaccaca gtggcatctg tgagctgcac tgcccagccc	1080
tggccacta catcaaagct aactccaaat tcatcggtat caccgagctg cggtatacat	1140
tcggcgccag ctgtgtgact gctgtccct acaactacct ttctacggac gtggatcct	1200
gcaccctcggt ctgccccctg cacaaccaag aggtgacagc agaggatgga acacagcggt	1260
gtgagaagtgcagcaagccc tggcccgag tggctatgg tctggccatg gagcacttgc	1320
gagaggtgag ggcaggtaacc agtgcataa tccaggagtt tgctggctgc aagaagatct	1380
ttgggagcct ggcatttctg ccggagagct ttgtatgggaa cccagctcc aacactgccc	1440
cgctccagcc agagcagctc caagtgtttg agactctgga agagatcaca ggttacctat	1500
acatctcagc atggccggac agcctgcctg acctcagcgt ctccagaac ctgcaagtaa	1560

tccggggacg aattctgcac aatggcgcct actcgctgac cctgcaaggg ctgggcatca 1620
 gctggctggg gctgcgtca ctgagggaac tggcagttgg actggccctc atccaccata 1680

acacccacct ctgcttcgtc cacacgggtgc cctggacca gctttcgg aaccgcacc 1740
 aagctctgct ccacactgcc aaccggccag aggacgagtg tgtggcgag ggcctggcct 1800
 gccaccaggt gtgcgcccga gggactgct ggggtccagg gcccacccag tgtgtcaact 1860
 gcagccagtt cttcggggc caggagtgcg tggaggaatg ccgagtactg cagggctcc 1920
 ccagggagta tgtgaatgcc aggcactgtt tgccgtccca ccctgagttt cagccccaga 1980
 atggctcagt gacctttt ggaccggagg ctgaccagtg tgtggctgt gcccactata 2040
 aggaccctcc ctctgcgtg gcccgtgcc ccagcgtgt gaaacctgac ctctcata 2100

tgcccatctg gaagtttcca gatgaggagg ggcgcattccca gccttgcctt atcaactgca 2160
 cccactcctg tgtggacctg gatgacaagg gctgcccgc cgagcagaga gcccgcctc 2220
 tgacgtcctt caacaacttc accgtgagct tctggctgcg cgtgccaag gtgagcgc 2280
 gcccacccgtt gatgtcttgcg gtcgtgttgc gcattctgtt gaagcttggt accgagctcg 2340
 gatccactag tccagtgtgg tggattctg cagatatcca gcacagtggc ggcattcaag 2400
 cttatcgata cctgtcgaccc cggggggggg cccgttaccc agtttattaa ggatccccgg 2460
 ggctgcagga attccatttt tattctcaaa tgagataaag tgaaaatata tatcatatat 2520

acaatgtt 2528

<210> 2

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the Modified HER2 protein encoded by SEQ

ID NO:1

<220><221> P2

<222> (273)..(287)

<223> T-helper cell epitope P2 derived from Tetanus Toxin

<220><221> P30

<222> (654)..(674)

<223> T-helper cell epitope P30 derived from Tetanus Toxin

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Ala Leu Leu

1	5	10	15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys			
20	25	30	
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His			
35	40	45	
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr			
50	55	60	
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val			
65	70	75	80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu			
85	90	95	
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr			
100	105	110	
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro			
115	120	125	
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser			
130	135	140	
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln			
145	150	155	160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn			
165	170	175	
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys			
180	185	190	
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser			
195	200	205	
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys			
210	215	220	
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys			
225	230	235	240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu			
245	250	255	

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val

260 265 270

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg

275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu

290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln

305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys

325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu

340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys

355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp

370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe

385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro

405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg

420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu

435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly

450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val

465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr

485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His

500	505	510
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys		
515	520	525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys		
530	535	540
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys		
545	550	555
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys		
565	570	575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp		
580	585	590
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu		
595	600	605
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln		
610	615	620
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys		
625	630	635
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Phe Asn Asn		
645	650	655
Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His		
660	665	670
Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu		
675	680	