



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0104597
(43) 공개일자 2018년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 35/763 (2014.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 35/763 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7015569
(22) 출원일자(국제) 2016년11월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/060833
(87) 국제공개번호 WO 2017/079746
국제공개일자 2017년05월11일
(30) 우선권주장
62/252,453 2015년11월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
멀티비르 인코포레이티드
미국, 텍사스 77010-1028, 휴스턴, 스위트 2100,
909 패닌 스트리트, 2 휴스턴 센터
(72) 발명자
소블 로버트 이.
미국, 텍사스 77010-1028, 휴스턴, 스위트 2100,
909 패닌 스트리트, 2 휴스턴 센터, 멀티비르 인
코포레이티드 내
메난더 커스틴 비.
미국, 텍사스 77010-1028, 휴스턴, 스위트 2100,
909 패닌 스트리트, 2 휴스턴 센터, 멀티비르 인
코포레이티드 내
차다 수닐
미국, 텍사스 77010-1028, 휴스턴, 스위트 2100,
909 패닌 스트리트, 2 휴스턴 센터, 멀티비르 인
코포레이티드 내
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 종양 억제 유전자 요법 및 번역관문 봉쇄를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 개인에게 유효량의 적어도 하나의 번역관문 억제제 및 p53 및/또는 MDA-7(IL24) 유전자 요법을 투여함을 포함하는, 상기 개인에서 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 세포외 기질-분해 단백질을 투여함으로써 항-종양 효능을 증대시키는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 메트로노믹 화학요법(상술한 작용제들의 경우, 5FU+CTX+GM-CSF)을 p53 및/또는 IL24 유전자 요법과 함께 투여함으로써 항-종양 효능을 증대시키는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/193 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/276,615	2016년01월08일	미국(US)
62/333,817	2016년05월09일	미국(US)
62/345,094	2016년06월03일	미국(US)
62/408,879	2016년10월17일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

피실험자(subject)에서 암을 치료하는 방법으로서,

- (a) 상기 피실험자에게 유효량의 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산을 투여하고;
 - (b) 적어도 하나의 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)를 투여함
- 을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

적어도 하나의 관문 억제제가 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR, 또는 A2aR의 억제제 중에서 선택되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

적어도 하나의 면역관문 억제제가 인간 예정세포사 1(PD-1) 축 결합 길항물질인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

PD-1 축 결합 길항물질이 PD-1 결합 길항물질, PDL1 결합 길항물질 및 PDL2 결합 길항물질로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

PD-1 축 결합 길항물질이 PD-1 결합 길항물질인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

PD-1 결합 길항물질이 PDL1 및/또는 PDL2에 대한 PD-1의 결합을 억제하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

PD-1 결합 길항물질이 단클론 항체(monoclonal antibody) 또는 그의 항원 결합 단편인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

PD-1 결합 길항물질이 니블루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, AMP-514, REGN2810, CT-011, BMS 936559, MPDL3280A 또는 AMP-224인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

적어도 하나의 면역관문 억제제가 항-CTLA-4 항체인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,
항-CTLA-4 항체가 트레멜리뮤맵 또는 이필리뮤맵인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,
적어도 하나의 면역관문 억제제가 항-살해세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 항체인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,
항-KIR 항체가 리틸루맵인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,
하나 초과와 관문 억제제를 투여하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,
면역관문 억제제를 전신적으로 투여하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,
세포외 기질-분해 단백질을 제공함을 또한 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,
제공이 세포외 기질-분해 단백질을 암호화하는 발현 카세트를 투여함을 포함하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,
세포외 기질-분해 단백질이 렐락신, 히아루로니다제 또는 데코린인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,
발현 카세트가 바이러스 벡터 중에 있는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,
바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 또는 폴리오마 바이러스 벡터인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서,
세포외 기질-분해 단백질을 단계 (a) 전에 제공하는 방법.

청구항 21

제16항에 있어서,

세포외 기질-분해 단백질을 암호화하는 발현 카세트를 종양내, 동맥내, 정맥내, 혈관내, 흉막내, 복강내, 기관지내, 경막내, 근육내, 내시경에 의해, 병변내, 경피, 피하, 국소적으로, 주축성으로 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여하는 방법.

청구항 22

제16항에 있어서,

세포외 기질-분해 단백질을 암호화하는 발현 카세트를 종양내로 투여하는 방법.

청구항 23

제1항에 있어서,

암이 흑색종, 비-소세포 폐, 소세포 폐, 폐, 간암종, 망막모세포종, 성상세포종, 교모세포종, 백혈병, 신경모세포종, 머리, 목, 유방, 췌장, 전립선, 신장, 뼈, 고환, 난소, 중피종, 경부, 위장, 비뇨생식기, 호흡관, 조혈, 근골격, 신경내분비, 암종, 육종, 중추신경계, 말초신경계, 림프종, 뇌, 결장 또는 방광암인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서,

암이 전이성인 방법.

청구항 25

제1항에 있어서,

p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산이 발현 카세트 중에 있는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

발현 카세트가 바이러스 벡터 중에 있는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 또는 폴리오마 바이러스 벡터인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서,

바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서,

바이러스 벡터를 약 10^3 내지 약 10^{13} 개의 바이러스 입자로 투여하는 방법.

청구항 30

제26항에 있어서,

아데노바이러스 벡터를 피실험자에게 정맥내, 동맥내, 혈관내, 흉막내, 복강내, 기관지내, 종양내, 경막내, 근

육내, 내시경에 의해, 병변내, 경피, 피하, 국소적으로, 주촉성으로 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여하는 방법.

청구항 31

제26항에 있어서,

아데노바이러스 벡터를 피실험자에게 종양내로 투여하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산 및 적어도 하나의 면역관문 억제제가 압스코팔(abscopal) 효과를 유도하는 방법.

청구항 33

제26항에 있어서,

피실험자에게 아데노바이러스 벡터를 1회 초과하여 투여하는 방법.

청구항 34

제1항에 있어서,

피실험자에게 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산을 적어도 하나의 면역관문 억제제 전에, 상기 억제제와 동시에, 또는 상기 억제제 후에 투여하는 방법.

청구항 35

제1항에 있어서,

피실험자에게 p53을 암호화하는 핵산을 투여하는 방법.

청구항 36

제1항에 있어서,

피실험자에게 MDA-7을 암호화하는 핵산을 투여하는 방법.

청구항 37

제1항에 있어서,

피실험자에게 p53을 암호화하는 핵산 및 MDA-7을 암호화하는 핵산을 투여하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

p53 및 MDA-7이 단일 프로모터의 조절하에 있는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

프로모터가 거대세포바이러스(CMV), SV40 또는 PGK인 방법.

청구항 40

제1항에 있어서,

핵산을 피실험자에게 리포플렉스 중에서 투여하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서,

리포플렉스가 DOTAP 및 적어도 하나의 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체 또는 콜레스테롤 혼합물을 포함하는 방법.

청구항 42

제1항에 있어서,

투여가 국소 또는 국부 주사를 포함하는 방법.

청구항 43

제1항에 있어서,

투여가 연속 주입, 종양내 주사 또는 정맥내 주사를 통하는 방법.

청구항 44

제1항에 있어서,

피실험자가 인간인 방법.

청구항 45

제1항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 항암 치료를 투여함을 또한 포함하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 항암 치료가 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법, 면역요법, 소분자요법, 수용체 키나제 억제제 요법, 혈관형성방지술, 사이토킨 요법, 냉동요법 또는 생물학적 요법인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서,

생물학적 요법이 단클론 항체, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 유전자 요법인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 항암 치료가 항암 바이러스인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서,

항암 바이러스(oncolytic virus)가 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 우두 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 폴리오 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 레오바이러스인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서,

항암 바이러스가 헤르페스 단순 바이러스(herpes simplex virus)인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서,
항암 바이러스를, 사이토킨을 발현하도록 조작하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서,
사이토킨이 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인 방법.

청구항 53

제48항에 있어서,
항암 바이러스가 탈리모겐 라히파렙벡(talimogene laherparepvec)(T-VEC)으로서 추가로 한정되는 방법.

청구항 54

제45항에 있어서,
적어도 하나의 추가적인 항암 치료가 단백질 키나제 또는 성장인자 신호전달 경로 억제제인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서,
단백질 키나제 또는 성장인자 신호전달 경로 억제제가 아파티니브, 악시티니브, 베바시주맵, 보수티니브, 세톡시맵, 크리조티니브, 다사티니브, 에를로티니브, 포스타마티니브, 제피티니브, 이마티니브, 라파티니브, 렌바티니브, 무브리티니브, 닐로티니브, 파니투뮤맵, 파조파니브, 페가프타니브, 라니비주맵, 록솔리티니브, 사라카티니브, 소라페니브, 수니티니브, 트라스투주맵, 반데타니브, AP23451, 베무라페니브, CAL101, PX-866, LY294002, 라파마이신, 템시롤리무스, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 알보시디브, 제니스테인, 셀루메티니브, AZD-6244, 바탈라니브, P1446A-05, AG-024322, ZD1839, P276-00, 또는 GW572016인 방법.

청구항 56

제54항에 있어서,
단백질 키나제 억제제가 PI3K 억제제인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서,
PI3K 억제제가 PI3K 텔타 억제제인 방법.

청구항 58

제46항에 있어서,
면역요법이 사이토킨을 포함하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서,
사이토킨이 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인 방법.

청구항 60

제58항에 있어서,
사이토킨이 인터류킨 및/또는 인터페론인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서,
인터류킨이 IL-2인 방법.

청구항 62

제60항에 있어서,
인터페론이 IFN α 인 방법.

청구항 63

제46항에 있어서,
면역요법이 보조-자극 수용체 작용물질, 내재 면역 세포의 자극제, 또는 내재 면역성의 활성제를 포함하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서,
보조-자극 수용체 작용물질이 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 항-CD137 항체, 항-CD40 항체, 또는 항-CD27 항체인 방법.

청구항 65

제63항에 있어서,
면역세포의 자극제가 세포독성-억제 수용체의 억제제 또는 면역 자극 톨형 수용체(TLR)의 작용물질인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서,
세포독성-억제 수용체가 NKG2A/CD94 또는 CD96 TACTILE의 억제제인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서,
TLR 작용물질이 TLR7 작용물질, TLR8 작용물질 또는 TLR9 작용물질인 방법.

청구항 68

제46항에 있어서,
면역요법이 PD-L1 억제제, 4-1BB 작용물질, 및 OX40 작용물질의 조합을 포함하는 방법.

청구항 69

제46항에 있어서,
면역요법이 인터페론 유전자(STING) 작용물질의 자극제를 포함하는 방법.

청구항 70

제63항에 있어서,
내재 면역성의 활성제가 IDO 억제제, TGF β 억제제, 또는 IL-10 억제제인 방법.

청구항 71

제46항에 있어서,

화학요법이 DNA 손상제를 포함하는 방법.

청구항 72

제70항에 있어서,

DNA 손상제가 감마-조사, X-선, UV-조사, 극초단파, 전자선방출, 아드리아마이신, 5-플루오로우라실(5FU), 카페시타빈, 에토포시드(VP-16), 캄프토테신, 액티노마이신-D, 미토마이신 C, 시스플라틴(CDDP), 또는 과산화 수소인 방법.

청구항 73

제70항에 있어서,

DNA 손상제가 5FU 또는 카페시타빈인 방법.

청구항 74

제46항에 있어서,

화학요법이 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 펠팔란, 클로람부실, 비설판, 니트로스우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독숨비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탁소테레, 탁솔, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토티렉세이트, 또는 이들의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 11월 7일자로 출원된 미국 가출원 제 62/252,453 호, 2016년 1월 8일자로 출원된 제 62/276,615 호, 2016년 5월 9일자로 출원된 제 62/333,817 호, 2016년 6월 3일자로 출원된 제 62/345,094 호, 및 2016년 10월 17일자로 출원된 제 62/408,879 호의 우선권 이점을 주장하며, 각 출원의 전체 내용은 본 발명에 참고로 인용된다.

[0002] 서열목록의 통합

[0003] "SOBLP0143WO_ST25.txt"(3 KB(마이크로소프트 윈도우에서 측정시)이고 2016년 11월 7일자로 생성되었다)라는 명칭의 파일에 함유된 서열 목록은 전자 제출에 의해 본 출원과 함께 제출되며 본 발명에 참고로 인용된다.

[0004] 발명의 배경

[0005] 1. 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 생물학 및 의학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 면역관문 억제제의 효능 및 종양 억제 인자의 발현을 병용하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 2. 관련 분야의 설명

[0008] 악성 세포는 흔히 DNA 손상제, 예를 들어 화학요법 및 방사선요법-유발된 예정세포사 또는 세포사멸에 내성이다. 상기와 같은 내성은 일반적으로 세포사멸 억제하에서 몇몇 종양유전자의 이상 발현 또는 종양 억제 유전자의 발현 상실의 결과이다. 결합성 종양 억제 유전자를 대체할뿐만 아니라 세포사멸-유도 유전자의 발현을 강제하도록 설계된 전략들은 종양 세포에서 상기 방식의 세포사의 복원에 대한 가망을 제공한다.

[0009] 추정상 가장 많이 연구된 종양 억제 유전자 중 하나는 p53이며 이는 세포-주기 조절 및 세포사멸 억제를 포함한 다수의 과정들에 중요한 역할을 한다(Hartwell et al., 1994). p53 돌연변이는 종양 세포에서 빈번하며 암 진행 및 화학요법 및 방사선요법 모두에 대한 내성의 발생과 관련되었다(Spitz et al., 1996). 시험관내 및 생체

내 모두에서의 전임상 연구는 야생형(wt) p53 기능의 복원이 암세포에서 세포사멸을 유도할 수 있음을 입증하였다. 동물 모델에서 레트로바이러스 또는 아데노바이러스 wt-p53 구조물의 종양내 주사는 비-소세포 폐암(NSCLC), 백혈병, 교모세포종, 및 유방, 간, 난소, 결장 및 신장암을 포함하여 다양한 상이한 종양 조직구조에 대해 종양 퇴행을 발생시킨다(Fujiwara et al., 1994). 유망한 전임상 및 임상 데이터는 난소암 환자의 제1선 치료에 대한 p53 유전자-요법 시험의 국제적으로 임의 추출된 II/III기 시험의 개시를 도출하였다(Buller et al., 2002). 그러나, 상기 연구는 1차 중간 분석후에 종결되었는데, 그 이유는 적합한 치료 이점이 나타나지 않았기 때문이었다(Zeimet and Marth, 2003).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 종양 억제 유전자 요법의 현저한 진보에도 불구하고, 비특이적인 발현, 저-효율 전달 및 생물학적 안전성을 포함한 다수의 장애물들이 임상에서의 성공을 여전히 제한한다. 또한, 암의 다수의 유전적 변화 및 유전자의 이상 침묵을 도출하는 후성적인 조절장애가 존재하며; 따라서 단일의 유전자 요법은 암 치료에 적합한 전략이 아닐 수도 있다. 따라서, 다른 항암제와 함께 다수의 종양 억제인자를 표적화하는 방법이 유전자 요법의 증대된 항종양 활성 및 효율적인 전달에 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0011] 발명의 요약
- [0012] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 (a) 피실험자(subject)에게 유효량의 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산을 투여하고; (b) 적어도 하나의 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)를 투여함을 포함하는, 상기 피실험자에서 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 몇몇 태양에서, 하나 초과와 관문 억제제를 투여한다. 특정한 태양에서, 상기 피실험자는 인간이다.
- [0013] 몇몇 태양에서, 상기 적어도 하나의 관문 억제제는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR, 또는 A2aR의 억제제 중에서 선택된다. 일부 태양에서, 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제는 항-CTLA-4 항체이다. 일부 태양에서, 상기 항-CTLA-4 항체는 트레멜리뮤맵 또는 이필리뮤맵이다. 몇몇 태양에서, 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제는 항-살해세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 항체이다. 일부 실시태양에서, 상기 항-KIR 항체는 리틀리뮤맵이다. 일부 태양에서, 상기 PD-L1의 억제제는 듀르발루맵, 아테졸리주맵 또는 아벨루맵이다. 일부 태양에서, 상기 PD-L2의 억제제는 rHlgM12B7이다. 일부 태양에서, 상기 LAG3 억제제는 IMP321 또는 BMS-986016이다. 일부 태양에서, 상기 A2aR의 억제제는 PBF-509이다.
- [0014] 일부 태양에서, 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제는 인간 예정세포사 1(PD-1) 측 결합 길항물질이다. 몇몇 태양에서, 상기 PD-1 측 결합 길항물질은 PD-1 결합 길항물질, PDL1 결합 길항물질 및 PDL2 결합 길항물질로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 일부 태양에서, 상기 PD-1 측 결합 길항물질은 PD-1 결합 길항물질이다. 몇몇 태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 PDL1 및/또는 PDL2에 대한 PD-1의 결합을 억제한다. 특히, 상기 PD-1 결합 길항물질은 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, AMP-514, REGN2810, CT-011, BMS 936559, MPDL3280A 또는 AMP-224이다.
- [0015] 몇몇 태양에서, 상기 방법은 세포외 기질-분해 단백질을 제공함을 추가로 포함한다. 일부 태양에서, 제공은 상기 세포외 기질-분해 단백질을 암호화하는 발현 카세트를 투여함을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 세포외 기질-분해 단백질은 렐락신, 히아루로니다제 또는 데코린이다. 특정한 태양에서, 상기 세포외 기질-분해 단백질은 렐락신이다. 일부 태양에서, 상기 발현 카세트는 바이러스 벡터 중에 있다. 몇몇 태양에서, 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 또는 폴리오마 바이러스 벡터이다. 특정한 실시태양에서, 상기 세포외 기질-분해 단백질을 단계 (a) 전에 제공한다.
- [0016] 일부 태양에서, 상기 세포외 기질-분해 단백질을 암호화하는 발현 카세트를 종양내, 동맥내, 정맥내, 혈관내, 흉막내, 복강내, 기관지내, 경막내, 근육내, 내시경에 의해, 병변내, 경피, 피하, 국소적으로, 주축성으로 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여한다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제 다음에 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산이 투여된다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제 전에 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산이 투여된다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제와 동시에 p53을 암호화하는

핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산이 투여된다. 특정한 태양에서, 아데노바이러스 벡터를 상기 피실험자에게 종양내로 투여한다. 일부 태양에서, 상기 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산 및 적어도 하나의 면역관문 억제제는 처리되지 않은 원위 종양상에 압스코팔(abscopal) 효과를 유도한다.

- [0017] 몇몇 태양에서, 상기 암은 흑색종, 비-소세포 폐, 소세포 폐, 폐, 간암종, 망막모세포종, 성상세포종, 교모세포종, 백혈병, 신경모세포종, 머리, 목, 유방, 췌장, 전립선, 신장, 뼈, 고환, 난소, 중피종, 경부, 위장, 비노생식기, 호흡관, 조혈, 근골격, 신경내분비, 암종, 육종, 중추신경계, 말초신경계, 림프종, 뇌, 결장 또는 방광암이다. 일부 태양에서, 상기 암은 전이성이다.
- [0018] 일부 태양에서, 상기 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산은 발현 카세트 중에 있다. 몇몇 태양에서, 발현 카세트는 바이러스 벡터 중에 있다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 또는 폴리오마 바이러스 벡터이다. 특정한 태양에서, 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터이다.
- [0019] 몇몇 태양에서, 상기 바이러스 벡터는 약 10^3 내지 약 10^{13} 바이러스 입자로 투여된다. 일부 태양에서, 상기 아데노바이러스 벡터는 피실험자에게 정맥내, 동맥내, 혈관내, 흉막내, 복강내, 기관지내, 종양내, 경막내, 근육내, 내시경에 의해, 병변내, 경피, 피하, 국소적으로, 주축성으로 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여된다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 아데노바이러스 벡터가 1회 초과하여 투여된다.
- [0020] 일부 태양에서, 상기 피실험자는 상기 p53을 암호화하는 핵산이 투여된다. 다른 태양에서, 상기 피실험자는 상기 MDA-7을 암호화하는 핵산이 투여된다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 p53을 암호화하는 핵산 및 상기 MDA-7을 암호화하는 핵산이 투여된다. 일부 태양에서, p53 및 MDA-7은 단일 프로모터의 조절하에 있다. 일부 실시태양에서, 상기 프로모터는 거대세포바이러스(CMV), SV40 또는 PGK이다.
- [0021] 일부 태양에서, 상기 핵산은 상기 피실험자에게 리포플렉스 중에서 투여된다. 몇몇 태양에서, 상기 리포플렉스는 DOTAP 및 적어도 하나의 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체 또는 콜레스테롤 혼합물을 포함한다.
- [0022] 몇몇 태양에서, 투여는 국소 또는 국부 주사를 포함한다. 다른 태양에서, 투여는 연속 주입, 종양내 주사 또는 정맥내 주사를 통한다.
- [0023] 일부 태양에서, 상기 방법은 적어도 하나의 추가적인 항암 치료를 투여함을 추가로 포함한다. 몇몇 태양에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 항암 치료는 수술요법, 화학요법(예를 들어 단백질 키나제 억제제의 투여 또는 EGFR-표적화된 요법), 색전술, 화학색전술, 방사선요법, 냉동요법, 발열요법, 광선요법, 고주파절제술, 호르몬요법, 면역요법, 소분자요법, 수용체 키나제 억제제 요법, 혈관형성방지술, 사이토킨 요법 또는 생물학적 요법, 예를 들어 단클론 항체, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 유전자 요법이다.
- [0024] 일부 태양에서, 상기 면역요법은 사이토킨을 포함한다. 특정한 태양에서, 상기 사이토킨은 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터류킨, 예를 들어 IL-2, 및/또는 인터페론, 예를 들어 IFN-알파이다. 종양-표적화된 면역 반응을 증대시키기 위한 추가적인 접근법은 추가적인 면역관문 억제제이다. 일부 태양에서, 상기 면역관문 억제제는 항-CTLA4, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2, 항-TIM-3, 항-LAG-3, 항-A2aR, 또는 항-KIR 항체를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 면역요법은 보조-자극 수용체 작용물질, 예를 들어 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 항-CD137 항체, 항-CD40 항체, 및 항-CD27 항체를 포함한다. 몇몇 태양에서, 상기 면역요법은 T 조절 세포(Treg), 골수 유래된 억제세포(MDSC) 및 암 관련 섬유아세포(CAF)의 억제를 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 면역요법은 내재 면역 세포, 예를 들어 자연살해(NK) 세포, 대식세포, 및 수지상세포의 자극을 포함한다. 추가적인 면역 자극 치료는 IDO 억제제, TGF-베타 억제제, IL-10 억제제, 인터페론 유전자(STING) 작용물질, toll형 수용체(TLR) 작용물질(예를 들어 TLR7, TLR8 또는 TLR9)의 자극제, 종양 백신(예를 들어 전종양세포 백신, 펩티드, 및 제조합 종양 관련 항원 백신), 및 입양세포 요법(ACT)(예를 들어 T 세포, 자연살해 세포, TIL 및 LAK 세포)을 포함할 수 있다. 몇몇 태양에서, 이들 작용제의 조합, 예를 들어 면역관문 억제제들의 병용, 관문억제 + T-세포 보조자극 수용체의 작용성, 및 관문억제 + TIL ACT를 사용할 수도 있다. 몇몇 태양에서, 추가적인 항암 치료는 항-PD-L1 면역관문 억제제(예를 들어 아벨루맵), 4-1BB(CD-137) 작용물질(예를 들어 유토밀루맵), 및 OX40(TNFRS4) 작용물질의 조합을 포함한다.
- [0025] 일부 태양에서, 상기 화학요법은 DNA 손상제를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 DNA 손상제는 감마-조사, X-선, UV-조사, 극초단파, 전자선방출, 아드리아마이신, 5-플루오로우라실(5FU), 카페시타빈, 에토포시드(VP-16), 캄프토테신, 액티노마이신-D, 미토마이신 C, 시스플라틴(CDDP), 또는 과산화 수소이다. 특정한 태양에서,

상기 DNA 손상제는 5FU 또는 카페시타빈이다. 일부 태양에서, 상기 화학요법은 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 비설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독숨비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탁소테레, 탁솔, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토포렉세이트, HDAC 억제제 또는 이들의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체를 포함한다.

[0026] 일부 태양에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 항암 치료는 항암 바이러스이다. 몇몇 태양에서, 상기 항암 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 우두 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 폴리오 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 또는 레오바이러스이다. 특정한 태양에서, 상기 항암 바이러스는 헤르페스 단순 바이러스(herpes simplex virus)이다. 일부 태양에서, 상기 항암 바이러스는 트랜스유전자, 예를 들어 사이토킨을 발현하도록 조작된다. 일부 실시태양에서, 상기 사이토킨은 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)이다. 일부 실시태양에서, 상기 항암 바이러스는 탈리모겐 라허파렐백(T-VEC)(예를 들어 IMLYGIC(상표))으로서 더욱 한정된다. 일부 실시태양에서, 상기 항암 바이러스는 상기 p53 및/또는 MDA-7 핵산 및 면역관문 억제제 전에, 이와 동시에 또는 그 후에 투여된다.

[0027] 일부 태양에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 암 치료제는 단백질 키나제 또는 성장인자 신호전달 경로에 관련된 수용체들을 억제하는 단백질 키나제 억제제 또는 단클론 항체이다. 예를 들어, 상기 단백질 키나제 또는 수용체 억제제는 EGFR, VEGFR, AKT, Erb1, Erb2, ErbB, Syk, Bcr-Abl, JAK, Src, GSK-3, PI3K, Ras, Raf, MAPK, MAPKK, mTOR, c-Kit, eph 수용체 또는 BRAF 억제제일 수 있다. 특정한 태양에서, 상기 단백질 키나제 억제제는 PI3K 억제제이다. 일부 실시태양에서, 상기 PI3K 억제제는 PI3K 델타 억제제이다. 예를 들어, 상기 단백질 키나제 또는 수용체 억제제는 아파티니브, 엑시티니브, 베바시주맵, 보수티니브, 세톡시맵, 크리조티니브, 다사티니브, 에를로티니브, 포스타마티니브, 제피티니브, 이마티니브, 라파티니브, 렌바티니브, 무브리티니브, 닐로티니브, 파니투무맵, 파조파니브, 페가프타니브, 라니비주맵, 록솔리티니브, 사라카티니브, 소라페니브, 수니티니브, 트라스투주맵, 반데타니브, AP23451, 베무라페니브, CAL101, PX-866, LY294002, 라파마이신, 템시롤리무스, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 알보시디브, 제니스테인, 셀루메티니브, AZD-6244, 바탈라니브, P1446A-05, AG-024322, ZD1839, P276-00, GW572016, 또는 이들의 혼합물이다. 몇몇 태양에서, 상기 단백질 키나제 억제제는 AKT 억제제(예를 들어, MK-2206, GSK690693, A-443654, VQD-002, 밀테포신 또는 페리포신)이다. 몇몇 태양에서, 상기 실시태양들에 따라 사용하기 위한 EGFR-표적화된 요법은 비제한적으로 EGFR/ErbB1/HER, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3, 및/또는 ErbB4/HER4의 억제제들을 포함한다. 광범위한 상기와 같은 억제제들은 공지되어 있으며 비제한적으로 상기 수용체(들)에 대해 활성인 티로신 키나제 억제제 및 EGFR-결합 항체 또는 앵타머를 포함한다. 예를 들어, 상기 EGFR 억제제는 제피티니브, 에를로티니브, 세톡시맵, 마투주맵, 파니투무맵, AEE788; CI-1033, HKI-272, HKI-357, 또는 EKB-569일 수 있다. 상기 단백질 키나제 억제제는 BRAF 억제제, 예를 들어 다브라페니브, 또는 MEK 억제제, 예를 들어 트라메티니브일 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점들은 하기 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 이들 상세한 설명 및 특정한 실시예들이 본 발명의 바람직한 실시태양들을 가리키지만 단지 예시로서 제공되는 물론이며, 따라서 본 발명의 진의 및 범위내의 다양한 변화 및 변형은 이들 상세한 설명으로부터 당해 분야의 숙련가들에게 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 하기의 도면들은 본 명세서의 부분을 형성하며 본 발명의 몇몇 태양을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제공된 특정한 실시태양들의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1: Ad-p53 + 항-PD-1 효능: 종양 부피. 포스페이트 완충된 염수(PBS) 대조용, 항-PD-1, Ad-p53, 또는 Ad-p53 + 항-PD-1의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 요법 중 심한 종양 진행이 존재하였으며, Ad-p53 요법에 의해 항-PD-1 내성의 역전이 유도되었다. 항-PD-1 또는 Ad-p53 요법 단독과 비교된, Ad-p53 + 항-PD-1 처리의 증대된 효능이 존재하였다. 22일까지, Ad-p53 + 항-PD-1에 의한 병용 처리는 항-PD-1 또는 Ad-p53 요법 단독에 비해, 종양 부피의 큰 감소를 유도하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 Ad-p53 + 항-PD1의 항-종양 효과가 22일정도로 일찍 상승작용적이며(p-값 0.0001), 29일째에 평가 전체를 통해 계속됨(p-값 0.013)을 판정하였다.

도 2: Ad-p53 + 항-PD-1 효능: 대측성 종양 부피. 항-PD-1, Ad-p53 또는 Ad-p53 + 항-PD-1 처리의 조합을 수

용한 1차 종양을 갖는 설치류에서 시간에 대한 대측성 종양 부피. 1차 종양 성장의 억제에서 관찰된 상승작용적 효과와 일관되게, 우리는 또한 종양 억제 요법을 수용하지 않은 대측성(2차) 종양에서 감소된 성장을 갖는 통계학적 유의수준의 압스코팔 효과를 관찰하였다. 이러한 발견은 상기 병용 처리(Ad-p53 + 항-PD-1)가 압스코팔 효과를 매개하는 전신 면역성을 유도하였음을 의미한다. Ad-p53 단독 처리된 1차 종양을 갖는 동물에서 대측성 종양은 항-PD-1 단독 처리된 1차 종양의 성장 속도에 비해 현저하게 지연된 종양 성장($p=0.046$)을 나타내었다. 대측성 종양 성장에 대한 훨씬 더 큰 압스코팔 효과($p=0.0243$)가 Ad-p53 + 항-PD-1 병용 처리된 1차 종양을 갖는 마우스에서 관찰되었다.

도 3: Ad-p53 + 항-PD-1 효능: 생존. PBS, 항-PD-1, Ad-p53 또는 이들 작용제의 조합으로 처리된 마우스에 대한 카플란-마이어 생존 곡선. 결과는 PBS 또는 항-PD-1으로 처리된 동물의 생존에서 그다지 차이는 없었으며, Ad-p53으로 처리된 경우에는 증가된 생존을 나타내고, Ad-53($p=0.0167$) 또는 항-PD-1($p<0.001$) 단독요법으로 처리된 마우스에서 관찰된 경우에 비해 Ad-p53 + 항-PD-1 병용 처리된 동물에서는 생존의 현저한 증대를 나타낸다.

도 4: Ad-IL24 + 항-PD-1 효능: 종양 부피. PBS 대조용, 항-PD-1, Ad-IL24, 또는 Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 요법 중 심한 종양 진행이 존재하였으며, Ad-IL24 요법과의 병용에 의해 항-PD-1 내성이 역전되었다. 항-PD-1 또는 Ad-IL24 요법 단독에 비해, Ad-IL24 + 항-PD-1 처리의 증대된 효능이 존재하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 Ad-IL24 및 항-PD-1 처리의 복합 효과가 14일 처리까지 상승작용적임을 판정하였다(p -값 = 0.002).

도 5: Ad-IL24 + 항-PD-1 효능: 대측성 종양 부피. 항-PD-1, Ad-IL24 또는 Ad-IL24 + 항-PD-1 처리의 조합을 수용한 1차 종양을 갖는 설치류에서 시간에 대한 대측성 종양 부피. 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1 처리에 의한 1차 종양 성장의 억제에서 관찰된 증가된 효과와 일관되게, 우리는 또한 종양 억제 요법을 주사하지 않은 대측성(2차) 종양에서 감소된 성장을 갖는 통계학적 유의수준의 압스코팔 효과를 관찰하였다. 이러한 발견은 상기 병용 처리 Ad-IL24 + 항-PD-1(Ad-53 + 항-PD-1 요법처럼)이 또한 압스코팔 효과를 매개하는 전신 면역성을 유도하였음을 의미한다. 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1로 처리된 1차 병변을 갖는 동물에서 대측성 종양은 종양 성장의 가장 큰 감소를 나타내었다. 상기 Ad-IL24 단독($p=0.0021$) 및 Ad-IL24 + 항-PD-1($p<0.0001$) 처리 그룹은 모두 항-PD-1 단독으로 처리된 1차 종양의 성장 속도에 비해 통계학적 유의수준의 감소된 압스코팔 종양 성장을 나타내었다.

도 6: Ad-IL24 + 항-PD-1 효능: 생존. PBS, 항-PD-1, Ad-IL24 또는 이들 작용제의 조합으로 처리된 마우스에 대한 카플란-마이어 생존 곡선. 결과는 PBS 또는 항-PD-1으로 처리된 동물의 생존에서 그다지 차이는 없었으며, Ad-IL24로 처리된 경우에는 증가된 생존을 나타내고, Ad-IL24($p=0.0011$) 또는 항-PD-1($p<0.001$) 단독요법으로 처리된 마우스에서 관찰된 경우에 비해 Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합으로 처리된 동물에서는 생존의 현저한 증대를 나타낸다.

도 7: Ad-p53 + Ad-IL24 + 항-PD-1 효능: 종양 부피. 포스페이트 완충된 염수(PBS) 대조용, 항-PD-1, Ad-p53 + Ad-IL24, 또는 Ad-53 + Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 요법 중 심한 종양 진행이 존재하였으며, Ad-p53 + Ad-IL24 요법에 의해 항-PD-1 내성의 역전이 유도되었다. 항-PD-1 또는 Ad-p53 + Ad-IL24 요법 단독에 비해, Ad-p53 + Ad-IL24 + 항-PD-1 처리의 증대된 효능이 존재하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 Ad-p53 + Ad-IL24 + 항-PD-1 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.035)을 판정하였다.

도 8: 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 효능: 종양 부피. PBS 대조용, 항-PD-1, 5FU + CTX + GM-CSF 또는 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 처리의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 또는 5FU + CTX + GM-CSF 처리후 심한 종양 진행이 존재하였으며, 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 조합으로 처리된 마우스에서 항-PD-1 내성이 역전되었다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 5-FU+CTX+GM-CSF 및 항-PD-1 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.028)을 판정하였다.

도 9: Ad-IL24 + 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 효능: 종양 부피. PBS 대조용, Ad-IL24, 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 또는 Ad-IL24 + 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 처리의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. PBS, Ad-IL-24 또는 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 처리후 심한 종양 진행이 존재하였으며, Ad-IL24 + 5FU + CTX + GM-CSF + 항-PD-1 조합으로 처리된 마우스에서 항-PD-1 내성이 역전되었다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 5-FU+CTX+GM-CSF+항-PD-1 및 Ad-IL24 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.010)을 판정하였다.

도 10: Ad-렐락신 + Ad-IL24 + 항-PD-1 효능: PBS 대조용, 항-PD-1, Ad-렐락신 + Ad-IL24, 또는 Ad-렐락신 + Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 요법 중 심한 종양 진행이 존재하였으며, Ad-렐락신 + Ad-IL24 요법의 조합에 의해 항-PD-1 내성이 역전되었다. 항-PD-1 또는 PBS 처리 단독에 비해 Ad-렐락신 + Ad-IL24 + 항-PD-1 처리의 증대된 효능이 존재하였다. 제11일에 종양 부피의 다중 비교를 위한 분산(ANOVA)의 통계분석을 수행하여 처리 효과들을 비교하였다. PBS 대 항-PD-1 처리간에는 통계학적 유의수준 차이가 없는 반면($P=0.8343$) PBS 대 Ad-RLX+Ad-IL24($P=0.0416$) 및 PBS 대 Ad-RLX+Ad-IL24+항-PD-1($P=0.0039$)은 PBS 대조용에 비해 종양 크기의 통계학적 유의수준의 감소를 나타내었다. 항-PD-1 대 Ad-RLX+Ad-IL24 처리간에는 통계학적 유의수준 차이가 없는 반면($P=0.0929$) 항-PD-1 대 Ad-RLX+Ad-IL24+Ant-PD-1 그룹간의 차이는 통계학적 유의수준이었으며($P=0.0049$) 이는 상기 Ad-RLX+Ad-IL24+항-PD-1 조합의 우수한 효능을 가리킨다.

도 11: Ad-IL24/CTV-IL24 + 항-PD1 + 항-LAG-3 효능: 생존. PBS, 항-PD-1 + 항-LAG-3, Ad-IL24/CTV-IL24 또는 Ad-IL24/CTV-IL24와 항-PD-1 + 항-LAG3과의 조합으로 처리된 마우스에 대한 카플란-마이어 생존 곡선. 결과는 PBS 또는 항-PD-1 + 항-LAG-3으로 처리된 동물의 생존에서 그다지 차이는 없었으며, Ad-IL24/CTV-IL24로 처리된 경우에는 증가된 생존($p<0.0001$)을 나타내고, Ad-IL24/CTV-IL24 + 항-PD-1 + 항-LAG3의 조합으로 처리된 동물에서는 생존의 현저한 증대($p=0.0011$)를 나타낸다.

도 12: TAV-Ad-p53/항-PDL1 효능: 종양 부피. PBS 완충제 대조용, 항-PD-1, TAV-Ad-p53, 또는 TAV-Ad-p53 + 항-PD-1의 조합을 수용한 설치류에서 시간에 대한 종양 부피를 나타내는 그래프. 항-PD-1 요법 중 심한 종양 진행이 존재하였으며, TAV-Ad-p53 요법과의 병용에 의해 항-PD-1 내성이 역전되었다. TAV Ad-p53 단독 및 TAV Ad-p53 + 항-PD-L1, 종양 부피는 복강내 항-PDL1과의 종양내 완충제에 비해 TAV Ad-p53 + 항-PD-L1으로 처리된 마우스에서 현저하게 더 작았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 종양은 그의 개시 및 진행 중에 진화하여 면역계에 의한 파괴를 벗어나는 것으로 주지되어 있다. 이러한 내성을 역전시키기 위한 최근의 면역관문 억제제의 사용이 일부 성공을 나타내었지만, 대다수의 환자는 상기 치료에 응답하지 않는다. 본 발명은 내성을 극복하고 항-종양 면역응답을 증대시키기 위해 종양의 미세환경을 변경시키는 방법 및 조성물을 제공함으로써 현행 기술과 관련된 도전들을 극복한다. 하나의 실시태양에서, 적어도 하나의 면역관문 억제제와 함께 p53 및/또는 MDA-7을 발현시킴으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특히, 상기 종양 억제 유전자를 복제-불능 아데노바이러스로서 투여한다. 하나의 방법에서, 상기 p53 유전자 요법을 면역관문 억제제, 예를 들어 항-PD1 항체 또는 항-KIR 항체와 함께 투여하여 내재적 항-종양 면역성을 증대시킨 후에 항-PD-1 항체와 같은 면역관문 억제제와 함께 상기 MDA-7 유전자 요법을 투여하여 적응적 항-종양 면역응답을 유도한다. 한편으로, 상기 p53 및 MDA-7을 상기 면역관문 억제제와 동시에 투여할 수 있다.

[0031] 추가로, 발명자들은 종양 세포의 세포외 기질을 분해시키는 추가적인 요법을 투여하여 상기 종양 억제 유전자 요법과 상기 면역관문 억제제의 병용 요법의 종양 침투를 증대시킬 수 있음을 판정하였다. 특히, 상기 세포외 기질 분해 요법을 상기 병용 요법 전에 투여한다. 하나의 방법에서, 상기 세포외 기질 분해 요법은 렐락신 유전자 요법, 예를 들어 아데노바이러스 렐락신이다. 특히, 상기 아데노바이러스 렐락신을 종양내 또는 동맥내 투여한다.

[0032] 더욱이, 상기 치료 방법은 본 명세서에서 제공된 병용 요법의 항-종양 효과를 증대시키기 위해 추가적인 항암 요법, 예를 들어 사이토킨 또는 화학요법제를 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 사이토킨은 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)일 수 있고 상기 화학요법은 5-플루오로우라실(5FU) 또는 카페시타빈 또는 사이클로포스파미드 또는 PI3K 억제제일 수 있다. 본 연구에서, 국소부위 종양 억제 치료는 전신 면역관문 억제제 요법에 대한 내성을 역전시켰으며, 이는 면역관문 억제제 치료와의 뜻밖의 상승작용을 입증하였고 상기 병용 요법은 종양 억제 요법으로 치료되지 않은 원위 종양에 대해 우수한 암스코팔 효과를 유도하였다. 이러한 뜻밖의 전신 치료 효과는 종양 미세환경의 세포외 기질을 변경시키는 추가적인 요법(렐락신) 및 화학요법, 사이토킨 요법 및 골수 유래된 억제세포(MDSC), T-Reg 및 수지상 세포를 조절하는 것으로 공지된 작용제와 병용시 증대되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 내재적 및 적응적 항-종양 면역응답을 증대시킴으로써 뿐만 아니라 면역관문 요법에 대한 내성을 극복하고 암스코팔 전신 치료 효과를 유도함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0033] I. 정의

[0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 명시된 성분에 관하여 "필수적으로 없는"은 본 명세서에서 명시된 성분 중 어

는 것도 조성물 중에 고의로 제형화하지 않았고/않았거나 단지 오염물질로서 또는 미량으로 존재함을 의미하는데 사용된다. 따라서 조성물의 임의의 의도하지 않은 오염으로부터 생성되는 명시된 성분의 총량은 0.05% 훨씬 미만, 바람직하게는 0.01% 미만이다. 조성물 중에서 명시된 성분의 양이 표준 분석 방법에 의해 검출될 수 없는 것이 가장 바람직하다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "하나의"는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 청구항(들)에서 "포함하는"이란 단어와 함께 사용될 때, "하나의"란 단어는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.

[0036] 청구항에서 "또는"이란 용어는, 명백하게 오직 양자택일만을 지칭하거나 또는 양자택일이 상호 배타적임을 가리키지 않는 한, "및/또는"을 의미하는데 사용되지만, 본 명세는 오직 양자택일 및 "및/또는"만을 지칭하는 정의를 지지한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "또 다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0037] 본 출원 전체를 통해서, "약"이란 용어는 하나의 값이 장치, 상기 값을 측정하는데 사용되는 방법에 대한 오차의 본래의 변화, 또는 연구 주제 중에 존재하는 변화를 포함함을 가리키는데 사용된다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "야생형"은 유기체 계통 중의 유전자좌의 핵산의 천연 서열, 및 상기와 같은 핵산으로부터 전사되거나 번역된 서열을 지칭한다. 따라서, "야생형"이란 용어는 또한 상기 핵산에 의해 암호화된 아미노산 서열을 지칭한다. 유전자좌는 개별 집단에서 하나 초과 서열 또는 대립유전자를 가질 수 있기 때문에, "야생형"이란 용어는 모든 상기와 같은 천연 대립유전자를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "다형성"이란 용어는 한 집단의 개인에서 유전자좌에 변화가 존재함(즉 2개 이상의 대립유전자가 존재함)을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "돌연변이체"는 재조합 DNA 기술의 결과인 핵산 또는 그의 암호화된 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 서열의 변화를 지칭한다.

[0039] "외인성"이란 용어는 세포 또는 유기체 중의 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때 인공 또는 자연 수단에 의해 상기 세포 또는 유기체에 도입된 단백질, 유전자, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭하거나; 또는 세포와 관련하여, 상기 용어는 단리되어 후속으로 인공 또는 자연 수단에 의해 다른 세포 또는 유기체에 도입된 세포를 지칭한다. 외인성 핵산은 상이한 유기체 또는 세포로부터 유래되거나 또는 상기 유기체 또는 세포내에 자연적으로 존재하는 핵산의 하나 이상의 추가적인 사본일 수 있다. 외인성 세포는 상이한 유기체로부터 유래하거나, 또는 동일한 유기체로부터 유래할 수 있다. 비제한적인 예로서, 외인성 핵산은 자연 세포 중에 있는 염색체 위치와 상이한 위치 중에 있거나, 또는 달리 자연에서 발견된 상이한 핵산 서열이 인접해 있는 것이다.

[0040] "발현 구조물" 또는 "발현 카세트"는 전사를 지시할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현 구조물은 최소한, 하나 이상의 목적하는 세포 유형, 조직 또는 기관에서 유전자 발현을 지시하는 하나 이상의 전사 조절 요소(예를 들어 프로모터, 인핸서 또는 그의 기능상 동등한 구조)를 포함한다. 추가적인 요소들, 예를 들어 전사 종결 신호를 또한 포함할 수 있다.

[0041] "벡터" 또는 "구조물"(때때로 유전자 전달 시스템 또는 유전자 전달 "비히클"이라 지칭된다)은 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 거대분자 또는 분자들의 복합체를 지칭한다.

[0042] 벡터의 통상적인 유형인 "플라스미드"는 염색체 DNA와 독립적으로 복제 가능한, 상기 염색체 DNA로부터 분리된 염색체의 DNA 분자이다. 몇몇 경우에, 상기는 환상이고 이중가닥이다.

[0043] "복제의 기원"("ori") 또는 "복제 기원"은 예를 들어 림프친화성 헤르페스 바이러스에서, 세포 중의 플라스미드 중에 존재할 때 상기 플라스미드 중에서 및/또는 DNA 합성이 개시되는 부위 또는 그 부근의 부위에서 결합된 서열을 유지할 수 있는 DNA 서열이다. 일례로서, EBV에 대한 ori는 FR 서열(30 bp 반복부의 20개의 불완전한 사본), 및 바람직하게는 DS 서열을 포함한다; EBV 중의 다른 부위는 EBNA-1에 결합한다, 예를 들어 Rep* 서열은 복제 기원으로서 DS를 대체할 수 있다(Kirshmaier and Sugden, 1998). 따라서, EBV의 복제 기원은 FR, DS 또는 Rep* 서열 또는 상기로부터의 핵산 변형 또는 합성적 조합을 통한 임의의 기능적으로 동등한 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 또한 예를 들어 문헌[Lindner, et al., 2008]에 구체적으로 기재된 바와 같이, 개별적인 요소의 삽입 또는 돌연변이에 의해 EBV의 유전자 조작된 복제 기원을 사용할 수 있다.

[0044] 특정 단백질을 "암호화하는" "유전자", "폴리뉴클레오티드", "암호화 영역", "서열", "절편", "단편", 또는 "트랜스유전자"는 적합한 조절 서열의 조절하에 놓일 때 시험관내 또는 생체내에서 전사되고 임의로 또한 유전자 산물, 예를 들어 폴리펩티드로 번역되는 핵산 분자이다. 상기 암호화 영역은 cDNA, 게놈 DNA 또는 RNA 형태로

존재할 수 있다. DNA 형태로 존재하는 경우, 상기 핵산 분자는 단일가닥(즉 센스 가닥) 또는 이중가닥일 수 있다. 암호화 영역의 경계는 5'(아미노) 말단에서 시작 코돈 및 3'(카복시) 말단에서 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 유전자는 비제한적으로 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA로부터의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA로부터의 게놈 DNA 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 대개 상기 유전자 서열에 대해 3'에 위치할 것이다.

[0045] "조절 요소"란 용어는 집합적으로 프로모터 영역, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결 서열, 상류 조절 도메인, 복제 기원, 내부 리보솜 진입부위(IRES), 인헨서, 이어맞추기 접합부 등을 지칭하며, 이들은 집합적으로 수용 세포에서 암호화 서열의 복제, 전사, 전사-후 가공 및 번역을 제공한다. 선택된 암호화 서열이 적합한 숙주 세포 중에서 복제되고, 전사되고, 번역될 수 있는 한, 이들 조절 요소가 전부 존재할 필요가 있는 것은 아니다.

[0046] "프로모터"란 용어는 본 명세서에서 DNA 조절 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 영역을 지칭하는 그의 통상적인 의미로 사용되며, 여기에서 상기 조절 서열은, RNA 폴리머라제와 결합할 수 있고 하류(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시시킬 수 있는 유전자로부터 유래한다. 상기는 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전자 요소, 예를 들어 RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자를 함유하여 핵산 서열의 특이적인 전사를 개시시킬 수 있다. "작동적으로 위치하는", "작동적으로 연결된", "조절하에서", 및 "전사 조절하에서"란 어구들은 프로모터가 핵산 서열과 관련하여 정확한 기능상 위치 및/또는 배향으로 존재하여 상기 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 조절함을 의미한다.

[0047] "인헨서"는 프로모터에 근접하여 위치할 때 인헨서 도메인 부재하에서 상기 프로모터로부터 생성되는 전사 활성화에 비해 증가된 전사 활성을 부여하는 핵산 서열을 의미한다.

[0048] 핵산 분자와 관련하여 "작동적으로 연결된" 또는 "동시-발현된"은 2개 이상의 핵산 분자(예를 들어 전사되는 핵산 분자, 프로모터, 및 인헨서 요소)가 상기 핵산 분자의 전사를 허용하는 바와 같은 방식으로 연결됨을 의미한다. 펩티드 및/또는 폴리펩티드 분자와 관련하여 "작동적으로 연결된" 또는 "동시-발현된"은 2개 이상의 펩티드 및/또는 폴리펩티드 분자가, 융합되는 각 펩티드 및/또는 폴리펩티드 성분의 적어도 하나의 성질을 갖는 단일 폴리펩티드 쇄, 즉 융합 폴리펩티드를 생성시키는 바와 같은 방식으로 연결됨을 의미한다. 상기 융합 폴리펩티드는 바람직하게는 키메릭이다, 즉 이중 분자로 구성된다.

[0049] "상동성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩티드간의 일치성 퍼센트를 지칭한다. 하나의 서열과 또 다른 서열간의 일치를 당해 분야에 공지된 기법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 상동성을, 서열 정보를 정렬시키고 쉽게 입수할 수 있는 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써 2개의 폴리펩티드 분자간의 서열 정보를 직접 비교하여 측정할 수 있다. 한편으로, 상동성을, 상동성 영역들간의 안정한 듀플렉스의 형성을 촉진하는 조건하에서 폴리뉴클레오타이드들을 하이브리드화한 다음 단일가닥-특이성 뉴클레아제(들)로 절단하고 상기 절단된 단편을 크기 측정함으로써 측정할 수 있다. 2개의 DNA, 또는 2개의 폴리펩티드 서열은, 상기 뉴클레오타이드, 또는 아미노산의 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 95%가, 각각 상기 방법들을 사용하여 측정시, 상기 분자들의 한정된 길이에 걸쳐 합치될 때 서로에 대해 "실질적으로 상동성"이다.

[0050] "핵산"이란 용어는 일반적으로 적어도 하나의 핵염기, 예를 들어 DNA(예를 들어 아데닌 "A", 구아닌 "G", 티민 "T", 및 시토신 "C") 또는 RNA(예를 들어 A, G, 우라실 "U" 및 C) 중에서 발견되는 천연 퓨린 또는 피리미딘을 포함하는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체 또는 모방물의 적어도 하나의 분자 또는 가닥을 지칭할 것이다. "핵산"이란 용어는 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"란 용어를 포함한다. 상기 "올리고뉴클레오타이드"란 용어는 길이가 약 3 내지 약 100 핵염기인 적어도 하나의 분자를 지칭한다. 상기 "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 길이가 약 100 핵염기 초과인 적어도 하나의 분자를 지칭한다. 이들 정의는 일반적으로 적어도 하나의 단일가닥 분자를 지칭하나, 특정한 실시태양에서는 상기 적어도 하나의 단일가닥 분자에 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보성인 적어도 하나의 추가적인 가닥을 또한 포함할 것이다. 따라서, 핵산은 하나의 가닥을 포함하는 특정 서열의 하나 이상의 상보성 가닥(들) 또는 "보체(들)"를 포함하는 적어도 하나의 이중가닥 분자 또는 적어도 하나의 삼중가닥 분자를 포함할 수 있다.

[0051] 본 출원 전체를 통해 사용되는 "치료 이득"이란 용어는 의학적 암 치료에 관하여 환자의 안녕을 촉진하거나 증대시키는 어떤 것을 지칭한다. 이의 망라되지 않은 예의 목록은 상기 환자의 생명의 임의의 기간까지의 연장; 상기 질병의 신생물 발생의 감소 또는 지연; 과증식의 감소; 종양 성장의 감소; 전이의 지연; 암세포 또는 종양 세포의 증식속도의 감소; 임의의 치료된 세포 또는 치료된 세포에 의해 병든 임의의 세포에서 세포사멸의 유도; 및 상기 환자의 상태에 기여될 수 있는 상기 환자에 대한 통증의 감소를 포함한다.

- [0052] "유효량"은 적어도 특정 질환의 측정 가능한 개선 또는 예방을 수행하는데 필요한 최소량이다. 본 명세서에서 유효량은 질병 상태, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 개인에서 목적하는 응답을 이끌어내는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 유효량은 또한 치료의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료학적으로 이로온 효과에 의해 능가되는 양이다. 예방학적 용도의 경우, 이롭거나 목적하는 결과는 질병의 생화학적, 조직학적 및/또는 작용 증상, 그의 합병증 및 상기 질병이 발병하는 동안 나타나는 중간의 병적인 표현형을 포함하여, 질병의 위험이 제거 또는 감소되거나, 질병의 중증도가 줄어들거나, 또는 질병의 개시가 지연되는 바와 같은 결과를 포함한다. 치료학적 용도의 경우, 이롭거나 목적하는 결과는 질병으로부터 발생하는 하나 이상의 증상의 감소, 상기 질병을 앓고 있는 환자의 삶의 질의 증가, 상기 질병의 치료에 필요한 다른 투약 용량의 감소, 표적화를 통해서와 같은 또 다른 투약 효과의 증대, 상기 질병의 진행의 지연, 및/또는 생존의 연장과 같은 임상적 결과를 포함한다. 암 또는 종양의 경우에, 약물의 유효량은 암세포수의 감소; 종양 크기의 감소; 말초 기관내로의 암 세포 침윤의 억제(즉 어느 정도의 늦춤 또는 바람직하게는 중지); 종양 전이의 억제(즉 어느 정도의 늦춤 및 바람직하게는 중지); 종양 성장의 어느 정도의 억제; 및/또는 상기 질환과 관련된 증상들 중 하나 이상의 어느 정도의 경감에 있어서 효과를 가질 수 있다. 유효량을 하나 이상의 투여로 투여할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 약물, 화합물 또는 약학 조성물의 유효량은 예방학적 또는 치료학적 치료를 직접적으로 또는 간접적으로 수행하기에 충분한 양이다. 임상 상황에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물 또는 약학 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 약학 조성물과 함께 성취되거나 성취되지 않을 수도 있다. 따라서, "유효량"은 하나 이상의 치료제의 투여와 관련하여 고려될 수 있으며, 단일 작용제는 하나 이상의 다른 작용제와 함께 바람직한 결과가 있을 수 있거나 성취되는 경우 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다.
- [0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "담체"는 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 상기와 같은 매질 및 작용제의 용도는 당해 분야에 주지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 성분과 상용성이지 않은 경우를 제외하고, 치료 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 성분을 또한 상기 조성물에 혼입시킬 수 있다.
- [0054] "약학 제형"이란 용어는, 활성 성분의 생물 활성을 유효하게 허용하는 바와 같은 형태로 존재하고 상기 제형이 투여되는 피실험자에게 허용 가능하지 않게 독성인 추가적인 성분은 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 상기와 같은 제형은 멸균성이다. "약학적으로 허용 가능한" 부형제(비히클, 첨가제)는 사용되는 활성 성분의 유효 용량을 제공하기 위해 피실험 포유동물에게 합리적으로 투여될 수 있는 것들이다.
- [0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "치료"란 용어는 임상적으로 병적인 과정 동안 치료되는 개인 또는 세포의 자연적인 과정을 변경시키도록 설계되는 임상적 중재를 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 경감 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 개인은 암과 관련된 하나 이상의 증상이 누그러지거나 제거된 경우, 예를 들어 비제한적으로 암성 세포의 증식의 감소(또는 상기 세포의 파괴), 상기 질병으로부터 발생하는 증상의 감소, 상기 질병을 앓고 있는 상기 개인의 삶의 질의 증가, 상기 질병의 치료에 필요한 다른 투약 용량의 감소, 및/또는 상기 개인의 생존의 연장의 경우, 성공적으로 "치료된다".
- [0056] "항암"제는 예를 들어 암세포의 살해를 촉진하거나, 암세포에서 세포사멸을 유도하거나, 암세포의 성장속도를 감소시키거나, 전이의 발생 또는 수를 감소시키거나, 종양 크기를 감소시키거나, 종양 성장을 억제하거나, 종양 또는 암세포로의 혈액 공급을 감소시키거나, 암세포 또는 종양에 대한 면역응답을 촉진하거나, 암의 진행을 예방 또는 억제하거나, 또는 암이 있는 피실험자의 수명을 증가시킴으로써 상기 피실험자에서 암세포/종양에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0057] 본 명세서에서 "항체"란 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며 구체적으로 단클론 항체(완전길이 단클론 항체 포함), 다클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들어 이중특이성 항체), 및 목적하는 생물 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.
- [0058] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "단클론 항체"란 용어는 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 획득된 항체를 지칭한다. 예를 들어 상기 집단을 차지하는 개별적인 항체들은 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 천연 돌연변이를 제외하고 동일하다. 따라서, 수식어구 "단클론"은 별개 항체들의 혼합물이 아니므로 상기 항체의 특성을 가리킨다. 몇몇 실시태양에서, 상기와 같은 단클론 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기에서 상기 표적-결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의해 획득되었다. 예를 들어, 상기 선택 과정은 다수의 클론, 예를 들어 하이브리도마 클론, 파지 클론, 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특유의 클론

의 선택될 수 있다. 선택된 표적 결합 서열을, 예를 들어 상기 표적에 대한 친화성을 개선시키고, 표적 결합 서열을 인간화시키고, 세포 배양물 중에서의 그의 생산을 개선시키고, 생체내에서 그의 면역원성을 감소시키거나, 다중특이성 항체를 생성시키는 등을 위해서 추가로 변경시킬 수 있으며 상기 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체가 또한 본 발명의 단클론 항체임은 물론이다. 상이한 결정인자(에피토프)에 대한 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다클론 항체 제제와 대조적으로, 단클론 항체 제제의 각 단클론 항체는 항원상의 단일 결정인자에 대한 것이다. 단클론 항체 제제는 그의 특이성 외에, 전형적으로 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다.

[0059] "면역관문"이란 용어는 면역 반응의 균형을 맞추기 위해서 억제 신호를 그의 성분들에 제공하는 면역계 중의 단백질과 같은 분자를 지칭한다. 공지된 면역관문 단백질은 CTLA-4, PD-1 및 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2 및 또한 LAG-3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, KIR을 포함한다. LAG3, BTLA, B7H3, B7H4, TIM3, 및 KIR을 수반하는 경로들은 당해 분야에서 CTLA-4 및 PD-1 의존적인 경로와 유사한 면역관문 경로를 구성하는 것으로 인지되어 있다 (예를 들어 문헌[Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264]; [Mellman *et al.*, 2011. Nature 480:480-489]을 참조하시오).

[0060] "PD-1 축 결합 길항물질"이란 용어는 PD-1 신호전달 축상에서의 신호전달로부터 발생하는 TG-세포 기능장애를 제거하기 위해서 상기 PD-1 축 결합짝과 그의 결합짝 중 하나 이상과의 상호작용을 억제하는 - 그 결과 T-세포 기능이 복원되거나 증대된다(예를 들어 증식, 사이토킨 생성, 표적 세포 살해) - 분자를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, PD-1 축 결합 길항물질은 PD-1 결합 길항물질, PD-L1 결합 길항물질 및 PD-L2 결합 길항물질을 포함한다.

[0061] "PD-1 결합 길항물질"이란 용어는 PD-1과 그의 결합짝, 예를 들어 PD-L1 및/또는 PD-L2 중 하나 이상과의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 PD-1의 그의 결합짝 중 하나 이상과의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 PD-1의 PD-L1 및/또는 PD-L2와의 결합을 억제한다. 예를 들어, PD-1 결합 길항물질은 항-PD-1 항체, 그의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-1과 PD-L1 및/또는 PD-L2와의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 하나의 실시태양에서, PD-1 결합 길항물질은 기능장애 T-세포를 덜 기능장애성으로 만들기 위해서(예를 들어 항원 인식에 대한 효과기 응답을 증대시키기 위해서) PD-1을 통한 신호전달을 매개하는 T 림프구상에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 상기 단백질을 통해 매개되는 음의 보조-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 항-PD-1 항체이다. 특정한 태양에서, PD-1 결합 길항물질은 MDX-1106(니볼루맵)이다. 또 다른 특정한 태양에서, PD-1 결합 길항물질은 MK-3475(켄브롤리주맵)이다. 또 다른 특정한 태양에서, PD-1 결합 길항물질은 CT-011(피달리주맵)이다. 또 다른 특정한 태양에서, PD-1 결합 길항물질은 AMP-224이다.

[0062] "PD-L1 결합 길항물질"이란 용어는 PD-L1과 그의 결합짝, 예를 들어 PD-1 또는 B7-1 중 하나 이상과의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-L1 결합 길항물질은 PD-L1의 그의 결합짝과의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PD-L1 결합 길항물질은 PD-L1의 PD-1 및/또는 B7-1과의 결합을 억제한다. 일부 실시태양에서, PD-L1 결합 길항물질은 항-PD-L1 항체, 그의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L1과 그의 결합짝, 예를 들어 PD-1 또는 B7-1과 중 하나 이상과의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 하나의 실시태양에서, PD-L1 결합 길항물질은 기능장애 T-세포를 덜 기능장애성으로 만들기 위해서(예를 들어 항원 인식에 대한 효과기 응답을 증대시키기 위해서) PD-L1을 통한 신호전달을 매개하는 T 림프구상에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 상기 단백질을 통해 매개되는 음의 보조-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-L1 결합 길항물질은 항-PD-L1 항체이다. 특정한 태양에서, 항-PD-L1 항체는 YW243.55.S70이다. 또 다른 특정한 태양에서, 항-PD-L1 항체는 MDX-1105이다. 더욱 또 다른 특정한 태양에서, 항-PD-L1 항체는 MPDL3280A이다. 더욱 또 다른 특정한 태양에서, 항-PD-L1 항체는 MEDI4736이다.

[0063] "PD-L2 결합 길항물질"이란 용어는 PD-L2와 그의 결합짝 중 하나 이상, 예를 들어 PD-1과의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-L2 결합 길항물질은 PD-L2의 그의 결합짝 중 하나 이상과의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PD-L2 결합 길항물질은 PD-2의 PD-1과의 결합을 억제한다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-L2 결합 길항물질은 항-PD-L2 항체, 그의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L2와

그의 결합작 중 하나 이상, 예를 들어 PD-1과의 상호작용으로부터 생성되는 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 하나의 실시태양에서, PD-L2 결합 길항물질은 기능장애 T-세포를 덜 기능장애성으로 만들기 위해서(예를 들어 항원 인식에 대한 효과기 응답을 증대시키기 위해서) PD-L2를 통한 신호전달을 매개하는 T 림프구상에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 상기 단백질을 통해 매개되는 음의 보조-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시태양에서, PD-L2 결합 길항물질은 면역부착소이다.

[0064] "면역관문 억제제"는 면역관문 단백질의 기능을 억제하는 임의의 화합물을 지칭한다. 억제는 기능의 감소 및 완전 봉쇄를 포함한다. 특히, 상기 면역관문 단백질은 인간 면역관문 단백질이다. 따라서, 상기 면역관문 단백질 억제제는 특히 인간 면역관문 단백질의 억제제이다.

[0065] "세포외 기질 분해성 단백질" 또는 "세포외 기질 분해 단백질"은 세포기질의 완전성에 대해 작용하는, 특히 기질의 구성성분들 중 적어도 하나 또는 이들 다양한 구성성분들을 하나로 묶는 결합에 대한 작용을 전적으로 또는 부분적으로 분해하거나 또는 탈안정화시키는 임의의 단백질을 지칭한다.

[0066] "압스코팔 효과"는 본 명세서에서 종양의 국소화된 치료 범위 밖에서의 종양의 수축으로서 지칭된다. 예를 들어, 면역관문 요법에 의한 전신 치료와 함께 p53 및/또는 IL-24에 의한 국소 치료는 원위의 치료되지 않는 종양에서 압스코팔 효과를 생성시킬 수 있다.

[0067] II. 종양 억제인자

[0068] A. p53

[0069] 본 발명은 암 치료를 위한 병용 요법을 제공한다. 본 명세서에 제공된 병용 요법 중 일부는 피실험자에게 야생형 p53 유전자를 투여함을 포함하는 p53 유전자 요법을 포함한다. 야생형 p53은 다수의 세포 유형에서 중요한 성장 조절제인 것으로 인정된다. 상기 p53 유전자는 대-T 항원 및 E1B와 같은 호스트 단백질과 복합체를 형성할 수 있는 375-아미노산 인단백질을 암호화한다. 상기 단백질은 정상적인 조직 및 세포에서 발견되나, 형질전환된 세포 또는 종양 조직에 비해 사소한 농도로 발견된다.

[0070] 미스센스 돌연변이는 상기 p53 유전자에 흔하며 종양유전자의 형질전환 능력에 필수적이다. 점 돌연변이에 의해 촉진된 단일 유전자 변화는 발암성 p53을 생성시킬 수 있다. 그러나, 다른 종양유전자들과 달리, p53 점 돌연변이는 적어도 30개의 독특한 코돈들에서 발생하는 것으로 공지되어 있으며, 종종 동형접합성으로의 환원 없이 세포 표현형의 이동을 생성시키는 우성 대립유전자를 생성시킨다. 추가로, 이들 우성 음성 대립유전자 중 다수는 유기체에서 허용되고 생식세포계열로 전달되는 것으로 보인다. 다수의 돌연변이 대립유전자는 최소 기능장애에서부터 강한 침투성 범위의 우성 음성 대립유전자로 존재한다(Weinberg, 1991). 높은 수준의 돌연변이 p53이, 화학적 발암작용, 자외선조사, 및 여러 바이러스에 의해 형질전환된 다수의 세포에서 발견되었다.

[0071] B. MDA-7

[0072] 본 명세서에 제공된 병용 요법은 또한 완전길이 또는 절두된 MDA-7 유전자를 투여함을 포함하는 MDA-7 유전자 요법을 추가로 포함할 수 있다. *mda-7* 유전자, 인터류킨(IL)-24의 단백질 생성물은, IL-10과의 사이토킨에 속하고 또한 종양 억제인자인 사이토킨이다. 상기 MDA-7 단백질을 암호화하는 cDNA는 장(Jiang) 등에 의해 기재되었다(Jiang *et al.*, 1995 (W01995011986)). 상기 MDA-7 cDNA는 23.8 kDa의 예견된 크기를 갖는 206 아미노산의 진화적으로 보존된 단백질을 암호화한다.

[0073] 본 명세서에 제공된 MDA-7을 암호화하는 핵산은 완전길이 또는 절두된 인간 IL-24 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. MDA-7의 절두된 버전은 완전길이 서열의 연속적인 아미노산 영역의 일부 또는 부분들을 포함하나, 전체 서열은 함유하지 않을 것이다. 상기 절두된 버전은 상기 폴리펩티드 중 임의의 부위에서 임의의 수의 연속적인 아미노산에 의해 절두될 수 있다. 예를 들어, MDA-7의 절두된 버전은 서열번호 1의 약 49 내지 약 206; 약 75 내지 약 206; 약 100 내지 약 206; 약 125 내지 약 206; 약 150 내지 약 206; 약 175 내지 약 206; 또는 약 182 내지 약 206의 아미노산을 암호화할 수 있다. 또한 서열번호 1의 적어도 약 85%, 90% 및 95%를 함유하는 MDA-7 폴리펩티드는 본 발명의 범위내에 있는 것으로 간주된다.

[0074] III. 세포외 기질 분해

[0075] 종양 억제 유전자 요법 및/또는 면역관문 억제제의 항-종양 효과를 증대시키는 방법을 또한 본 명세서에 제공한다. 하나의 태양에서, 상기 유전자 요법의 전달(예를 들어 바이러스 분배) 및 종양 침투가, 종양 세포 세포외

기질(ECM) 또는 그의 성분을 분해하는 단백질 또는 작용제에 의해 증대된다.

[0076] 상기 세포외 기질(ECM)은, 주위 세포에 대한 구조 및 생화학적 지지를 제공하는 세포에 의해 분비되는 세포외 분자의 콜렉션이다. 다세포성은 상이한 다세포 계통들에서 독립적으로 진화되었기 때문에, ECM의 조성은 다세포 구조들간에 다양하나; 세포 부착, 세포-세포 연통 및 분화는 상기 ECM의 공통 기능이다. 상기 세포외 기질 분해성 단백질에 의해 표적화될 수 있는 ECM의 성분은 콜라겐, 엘라스틴, 히아루론산, 피브로넥틴 및 라미닌을 포함한다.

[0077] A. 렐락신

[0078] 본 명세서에 제공된 방법들에 사용될 수 있는 하나의 세포외 기질 분해 단백질은 렐락신이다. 렐락신은 인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자와 구조적으로 관련된 6 kDa 펩티드 호르몬이다. 상기는 황체 및 자궁내막에서 우세하게 생산되며 그의 혈청 수준은 임신 중에 크게 증가한다(Sherwood et al., 1984). 렐락신은 콜라겐이 과발현될 때 콜라겐 발현의 효능 있는 억제제이나, 다른 콜라겐과 대조적으로, 콜라겐 발현의 기본 수준을 그다지 변경시키지는 않는다. 상기는 결합 조직 및 기저막을 분해시켜 산도의 세포외 기질 파괴를 유도하도록 다양한 MMP, 예를 들어 MMP2, MMP3 및 MMP9의 발현을 촉진하여 콜라겐을 분해시킨다. 이 외에, 렐락신에 의한 MMP1 및 MMP3 발현의 촉진이 또한 폐, 심장, 피부, 장, 유선, 혈관 및 정관에서 관찰되는데, 여기에서 렐락신은 콜라겐의 과발현을 방지하는 억제제로서 한 역할을 한다(Qin, X., et al., 1997a; Qin, X., et al., 1997b).

[0079] 상기 렐락신 단백질 또는 상기 렐락신 단백질을 암호화하는 핵산의 투여는 종양 세포를 둘러싸는 세포외 기질의 주요 성분인 콜라겐의 파괴를 유도하여 결합조직 및 기저막을 파괴시켜 세포외 기질의 분해를 발생시킨다. 특히, 결합 조직에 의해 단단히 둘러싸인 종양 조직에 투여시, 렐락신과 함께 상기 종양 억제 유전자 요법의 투여는 개선된 항-종양 효능을 나타낸다.

[0080] 상기 렐락신 단백질은 미국특허 제 5,023,321 호에 기재된 바와 같이 생물 활성을 유지하는 렐락신 분자의 일부 또는 완전길이 렐락신일 수 있다. 특히, 상기 렐락신은 재조합 인간 렐락신(H2) 또는 렐락신-유사 활성을 갖는 다른 활성 작용제, 예를 들어 수용체로부터 결합된 렐락신을 경쟁적으로 쫓아내는 작용제이다. 렐락신은 당해 분야의 숙련자들에게 공지된, 바람직하게는 미국특허 제 4,835,251 호에 기재된 바와 같은 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 렐락신 유사체 또는 그의 유도체가 US5811395에 기재되어 있으며 펩티드 합성이 미국특허 공보 제 US20110039778 호에 기재되어 있다.

[0081] 본 명세서에 제공된 방법들에 사용될 수 있는 예시적인 아테노바이러스 렐락신이 문헌[Kim et al. (2006)]에 기재되어 있다. 간단히, 렐락신-발현, 복제-능력(Ad-ΔE1B-RLX) 아테노바이러스가, 렐락신 유전자를 E3 아테노바이러스 영역에 삽입시킴으로써 생성된다.

[0082] B. 히아루로니다제

[0083] 일부 실시태양에서, 세포외 기질 중에 일반적으로 존재하는 폴리사카라이드를 가수분해할 수 있는 임의의 물질, 예를 들어 히아루론산을 투여할 수 있다. 특히, 본 발명에 사용되는 세포외 기질 분해 단백질은 히아루로니다제일 수 있다. 히아루로난(또는 히아루론산)은 척추동물 세포외 기질의 편재하는 구성성분이다. 상기 선형 폴리사카라이드(글루쿠론산 및 글루코사민 [D-글루쿠론산 1-β-3)N-아세틸-D-글루코사민(1-β-4)]을 기본으로 한다)는 매우 점성인 용액을 형성하는 그의 성질에 의해 상기 기질의 물리화학적 특성에 영향을 발휘할 수 있다. 히아루론산은 또한 세포 표면상에 위치하는 다양한 수용체 및 결합 단백질과 상호작용한다. 상기는 다수의 생물학적 과정들, 예를 들어 수정, 배발생, 세포이동 및 분화, 상처-치유, 염증, 종양 성장 및 전이의 형성에 관련된다.

[0084] 히아루론산은 히아루로니다제에 의해 가수분해되며 그의 가수분해는 세포외 기질의 해체를 유도한다. 따라서, 크레이일(Kreil)(Protein Sci., 1995, 4:1666-1669)에 의해 기재된 바와 같은 히아루로니다제와 같이 히아루로니다제 활성을 갖는 임의의 물질이 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 것으로 생각된다. 상기 히아루로니다제는 포유동물, 파충류 또는 벌목 히아루로네이트 글리카노하이드롤라제로부터, 거머리의 침샘으로부터의 히아루로네이트 글리카노하이드롤라제로부터, 또는 세균, 특히 스트렙토코커스, 뉴모코커스 및 클로스트리디움 히아루로네이트 라이아제로부터 유래된 히아루로니다제일 수 있다. 상기 히아루로니다제의 효소 활성을 통상적인 기법, 예를 들어 문헌[Hynes and Ferretti, Methods Enzymol., 1994, 235: 606-616] 또는 [Bailey and Levine, J. Pharm. Biomed. Anal., 1993, 11: 285-292]에 기재된 바와 같은 기법에 의해 평가할 수 있다.

[0085] C. 데코린

- [0086] 작은 류신-풍부 프로테오글리칸인 데코린은 세포외 기질의 편재하는 성분이며 콜라겐 피브릴과 함께 우세하게 발견된다. 데코린은 콜라겐 피브릴에 결합하며 개별적인 삼중나선 콜라겐 분자의 측방향 조립을 지연시켜 상기 피브릴의 감소된 직경을 생성시킨다. 또한, 데코린은 세포외 기질 성분들, 예를 들어 피브로넥틴 및 트롬보스폰딘과 세포와의 상호작용을 조절할 수 있다. 더욱 또한, 데코린은 기질 금속프로테이나제 콜라게나제의 유도에 의해 세포외 기질 리모델링에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 관찰은 데코린이 다수의 수준에서 상기 세포외 기질의 생성 및 조립을 조절하며, 따라서 결합 조직 리모델링에 중요한 역할을 함을 암시한다(Choi *et al.*, Gene Therapy, 17: 190-201, 2010 및 Xu *et al.*, Gene Therapy, 22(3) : 31-40, 2015).
- [0087] 본 명세서에 제공된 방법들에 사용될 수 있는 예시적인 아데노바이러스 데코린이 문헌[Choi *et al.*, Gene Therapy, 17: 190-201, 2010]에 기재되어 있다. 간단히, 데코린-발현, 복제-능력(Ad- Δ E1B-DCNG) 아데노바이러스를, 데코린 유전자를 E3 아데노바이러스 영역에 삽입시킴으로써 생성시킨다. 본 명세서에 제공된 방법들에 사용될 수 있는 또 다른 예시적인 아데노바이러스 데코린이 문헌[Xu *et al.*, Gene Therapy, 22(3): 31-40, 2015]에 기재되어 있다. 유사하게, 데코린-발현, 복제-능력(Ad.dcn) 아데노바이러스를, 데코린 유전자를 E3 아데노바이러스 영역에 삽입시킴으로써 생성시킨다.
- [0088] IV. 핵산
- [0089] 핵산을 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 임의의 기법에 의해 제조할 수 있다. 합성 핵산, 특히 합성 올리고뉴클레오타이드의 비제한적인 예는 포스포트리에스테르, 포스포이트 또는 포스포아미다이트 화합물을 사용하는 시험관내 화학 합성 및 고상 기법, 예를 들어 EP 266,032에 기재된 기법에 의해, 또는 문헌[Froehler *et al.*, 1986] 및 미국특허 제 5,705,629 호에 기재된 바와 같은 데옥시뉴클레오시드 H-포스포네이트 중간체를 통해 제조된 핵산을 포함한다. 효소적으로 생성된 핵산의 비제한적인 예는 PCR(상표)(예를 들어 미국특허 제 4,683,202 호 및 미국특허 제 4,682,195 호를 참조하십시오)과 같은 증폭 반응에서 효소에 의해, 또는 미국특허 제 5,645,897 호에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 합성에 의해 생성된 것을 포함한다. 생물학적으로 생성된 핵산의 비제한적인 예는 살아있는 세포에서 재조합 핵산 생성, 예를 들어 세균에서 재조합 DNA 벡터 생성(예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, 1989]을 참조하십시오)을 포함한다.
- [0090] 상기 핵산(들)은 서열 자체의 길이에 관계없이 다른 핵산 서열, 예를 들어 비제한적으로 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 제한 효소 부위, 다수의 클로닝 부위, 암호화 분절 등과 결합하여 하나 이상의 핵산 구조물(들)을 생성시킬 수 있다. 전체 길이는 핵산 구조물마다 상당히 다양할 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 핵산 분절을 사용할 수 있으며, 이때 전체 길이는 바람직하게는 제조의 용이성 또는 의도된 재조합 핵산 프로토콜에서의 용도에 의해 제한된다.
- [0091] A. 발현 벡터에 의한 핵산 전달
- [0092] 본 명세서에 제공된 벡터는 주로 조절된 진핵생물 프로모터(즉 구성, 유도성, 억제성, 조직-특이성)의 조절하에서 치료학적 종양 억제 유전자(예를 들어 p53 및/또는 MDA-7) 및/또는 세포외 기질 분해 유전자(예를 들어 렐락신)를 발현하도록 설계된다. 일부 태양에서, p53 및 MDA-7은 하나의 벡터에서 동시-발현될 수 있다. 또 다른 태양에서, 상기 p53 및/또는 MDA-7은 세포외 기질 분해 유전자와 동시-발현될 수 있다. 또한, 상기 벡터는, 다른 이유 때문은 아니고, 시험관내 조작의 용이성을 위해서라면 선택성 마커를 함유할 수도 있다.
- [0093] 당해 분야의 숙련가는 표준 재조합 기법(예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, 2001] 및 [Ausubel *et al.*, 1996] (둘 다 본 발명에 참고로 인용된다))을 통해 벡터를 구성하는데 준비가 잘 되어 있을 것이다. 벡터는 비제한적으로 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체(예를 들어 YAC), 예를 들어 레트로바이러스 벡터(예를 들어 모로니 쥐 백혈병 바이러스 벡터(MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV 등으로부터 유래된), 렌티바이러스 벡터(예를 들어 HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV 등으로부터 유래된), 복제 능력, 복제 결합 및 그의 내용없는(gutless) 형태를 포함하는 아데노바이러스(Ad) 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 유인원 바이러스 40(SV-40) 벡터, 소 유두종 바이러스 벡터, 엡스타인-바 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 하비(Harvey) 쥐 육종 바이러스 벡터, 쥐 유방종양 바이러스 벡터, 라우스 육종 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0094] 1. 바이러스 벡터
- [0095] 상기 종양 억제인자 및/또는 세포외 기질 분해 유전자를 암호화하는 바이러스 벡터를 본 발명의 몇몇 태양에서 제공할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터의 생성에서, 비-필수 유전자를 전형적으로는 이중(또는 비-천연) 단백질에 대한 유전자 또는 암호화 서열로 대체한다. 바이러스 벡터는 바이러스 서열을 사용하여 핵산 및 가능하게

는 단백질을 세포내에 도입시키는 일종의 발현 구조물이다. 수용체-매개된 세포이물흡수를 통해 세포를 감염시키거나 세포에 진입하고 숙주 세포 계층내에 통합되고 바이러스 유전자를 안정하고 효율적으로 발현시키는 몇몇 바이러스의 능력은 이들 바이러스를 외래 핵산의 세포(예를 들어 포유동물 세포)내로의 전달에 매력적인 후보로 만든다. 본 발명의 몇몇 태양의 핵산을 전달하는데 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적인 예를 하기에 기재한다.

[0096] 렌티바이러스는 복합 레트로바이러스이며, 상기는 통상적인 레트로바이러스 유전자 *gag*, *pol* 및 *env* 외에, 조절 또는 구조 기능을 갖는 다른 유전자들을 함유한다. 렌티바이러스 벡터는 당해 분야에 주지되어 있다(예를 들어 문헌[Naldini *et al.*, 1996]; [Zufferey *et al.*, 1997]; [Blomer *et al.*, 1997]; 미국특허 제 6,013,516 호 및 제 5,994,136 호를 참조하시오).

[0097] 재조합 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고 핵산 서열의 생체내 및 생체의 유전자 전달 및 발현 모두에 사용될 수 있다. 예를 들어, 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스(여기에서 적합한 숙주 세포를 패키징 기능을 갖는 2개 이상의 벡터, 즉 *gag*, *pol* 및 *env* 뿐만 아니라 *rev* 및 *tat*로 형질감염시킨다)가 본 발명에 참고로 인용된 미국특허 제 5,994,136 호에 기재되어 있다.

[0098] a. 아데노바이러스 벡터

[0099] 종양 억제인자 및/또는 세포의 기질 분해 유전자의 한 가지 전달 방법은 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 수반한다. 아데노바이러스 벡터는 계놈 DNA내로의 통합에 대해 낮은 능력을 갖는 것으로 공지되어 있지만, 상기 특징은 상기 벡터에 의해 제공된 유전자 전달의 높은 효율에 의해 상쇄된다. 아데노바이러스 발현 벡터는 (a) 구조물의 패키징을 지지하고 (b) 상기 중에 클로닝된 재조합 유전자 구조물을 최종적으로 발현시키기에 충분한 아데노바이러스 서열을 함유하는 구조물을 포함한다.

[0100] 아데노바이러스 성장 및 조작은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있으며, 시험관내 및 생체내에서 광범위한 숙주 범위를 나타낸다. 상기 그룹의 바이러스를 높은 역가, 예를 들어 10^9 내지 10^{11} 플라크-형성 단위로 수득할 수 있으며, 이들은 고도로 감염성이다. 아데노바이러스의 생활사는 숙주세포 계층내로의 통합을 필요로 하지 않는다. 아데노바이러스 벡터에 의해 전달된 외래 유전자는 예외소말이며, 따라서 숙주 세포에 대해 낮은 유전자독성을 갖는다. 야생형 아데노바이러스에 의한 백신화 연구에서 부작용은 보고되지 않았으며(Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), 이는 그의 생체내 유전자 전달 벡터로서의 안전성 및 치료학적 잠재성을 입증한다.

[0101] 아데노바이러스, 36 kb, 선형, 이중가닥 DNA 바이러스의 유전자 기구에 대한 지식은 7 kb 이하의 외래 서열에 의한 아데노바이러스 DNA의 큰 조각의 치환을 허용한다(Grunhaus and Horwitz, 1992). 레트로바이러스와 대조적으로, 숙주 세포의 아데노바이러스 감염은, 아데노바이러스 DNA가 잠재적인 유전자독성 없이 에피솜 방식으로 복제할 수 있기 때문에 염색체 통합을 생성시키지 않는다. 또한, 아데노바이러스는 구조적으로 안정성이며, 광범위 증폭후 계층 재배열은 검출되지 않았다.

[0102] 아데노바이러스는 그의 중간크기 계층, 조작의 용이성, 높은 역가, 넓은 표적-세포 범위 및 높은 감염성으로 인해 유전자 전달 벡터로서 사용하기에 특히 적합하다. 상기 바이러스 계층의 양쪽 단부는 100 내지 200 염기쌍 역위 반복부(ITR)(바이러스 DNA 복제 및 패키징에 필요한 시스 요소이다)를 함유한다. 상기 계층의 초기(E) 및 말기(L) 영역은 바이러스 DNA 복제의 개시에 의해 분할되는 상이한 전사 단위들을 함유한다. E1 영역(E1A 및 E1B)은 상기 바이러스 계층 및 소수의 세포 유전자의 전사 조절을 담당하는 단백질을 암호화한다. 상기 E2 영역(E2A 및 E2B)의 발현은 바이러스 DNA 복제를 위한 단백질의 합성을 생성시킨다. 이들 단백질은 DNA 복제, 말기 유전자 발현 및 숙주 세포 정지에 관련된다(Renan, 1990). 바이러스 캡시드 단백질의 대부분을 포함하는, 상기 말기 유전자의 생성물은 오직 주요 말기 프로모터(MLP)에 의해 허여된 단일 1차 전사물의 현저한 가공후에만 발현된다. 상기 MLP(16.8 m.u.에 위치한다)는 감염 말기 동안 특히 효율적이며, 상기 프로모터로부터 허여된 모든 mRNA들은 5'-3조 리더(TPL) 서열을 갖고, 이는 상기 mRNA들을 번역에 특정한 mRNA로 만든다.

[0103] 본 명세서에 제공된 재조합 아데노바이러스를 서플 벡터 및 프로바이러스 벡터간의 상동성 재조합으로부터 생성시킬 수 있다. 상기 두 프로바이러스 벡터들간의 가능한 재조합으로 인해, 야생형 아데노바이러스가 상기 과정으로부터 생성될 수 있다. 따라서, 바이러스의 단일 클론을 개별적인 플라크로부터 단리하고 그의 계층 구조를 검사한다.

[0104] 상기 아데노바이러스 벡터는 복제 능력성, 복제 결함성, 또는 조건적 결함성일 수 있으며, 상기 아데노바이러스 벡터의 성질은 본 발명의 성공적인 실행에 중요한 것으로 여겨지지 않는다. 상기 아데노바이러스는 42개의 상

이한 공지된 혈청형 또는 하위그룹 A-F 중 어느 하나일 수 있다. 하위그룹 C의 아데노바이러스 유형 5는 본 발명에 사용하기 위한 조건적 복제-결합성 아데노바이러스 벡터를 획득하기 위한 특정한 출발 물질이다. 이는 아데노바이러스 유형 5가, 다량의 생화학적 및 유전학적 정보가 공지되어 있고 벡터로서 아데노바이러스를 사용하는 대부분의 구성에 역사적으로 사용된 인간 아데노바이러스이기 때문이다.

[0105] 핵산을 암호화 서열이 제거된 위치로서 아데노바이러스 벡터에 도입시킬 수 있다. 예를 들어, 복제 결합성 아데노바이러스 벡터는 제거된 E1-암호화 서열을 가질 수 있다. 관심 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 또한, 문헌[Karlsson et al.(1986)]에 기재된 바와 같이 E3 대체 벡터 중에 또는 헬퍼 세포주 또는 헬퍼 바이러스가 E4 결합을 보충하는 E4 영역 중에 상기 결실된 E3 영역 대신에 삽입할 수 있다.

[0106] 복제 결합 아데노바이러스 벡터의 생성 및 증식을 헬퍼 세포주로 수행할 수 있다. 하나의 독특한 헬퍼 세포주(293으로 표시됨)가 Ad5 DNA 단편에 의해 인간 배신장 세포로부터 형질전환되었으며 상기는 E1 단백질을 구성적으로 발현시킨다(Graham et al., 1977). 상기 E3 영역은 아데노바이러스 계놈으로부터 없어도 괜찮으므로(Jones and Shenk, 1978), 293 세포의 도움으로 아데노바이러스 벡터는 E1, E3 또는 두 영역 모두에 외래 DNA를 갖는다(Graham and Prevec, 1991).

[0107] 헬퍼 세포주는 인간 세포, 예를 들어 인간 배신장 세포, 근육 세포, 조혈 세포 또는 다른 인간 배 중간엽 또는 상피 세포로부터 유래될 수 있다. 한편으로, 상기 헬퍼 세포는 인간 아데노바이러스에 허용되는 다른 포유동물 종의 세포로부터 유래될 수도 있다. 상기와 같은 세포는 예를 들어 배로 세포 또는 다른 원숭이 배 중간엽 또는 상피 세포를 포함한다. 상기 서술된 바와 같이, 특정한 헬퍼 세포주는 293이다.

[0108] 재조합 아데노바이러스의 생성 방법은 당해 분야에, 예를 들어 미국특허 제 6740320 호(본 발명에 참고로 인용된다)에 공지되어 있다. 또한 레이처(Racher) 등(1995)은 293 세포를 배양하고 아데노바이러스를 증식시키는 개선된 방법을 개시하였다. 하나의 포맷으로, 천연 세포 응집체를, 개별적인 세포를 100 내지 200 ml의 배지를 함유하는 1 리터 실리콘 처리된 스피너 플라스크(테크니(Techni), 영국 캠브리지 소재)에 집중함으로써 증식시킨다. 40 rpm에서 교반에 이어서, 상기 세포 생육력을 트립핀 불투로 평가한다. 또 다른 포맷으로, 피브라 셀(Fibra-Cel) 미세담체(비비 스티얼린(Bibby Sterlin), 영국 스톤 소재)(5 g/l)를 하기와 같이 사용한다. 5 ml의 배지에 재현탁된 세포 집중물을 250 ml 에를렌마이어 플라스크 중의 담체(50 ml)에 가하고 때때로 교반하면서 1 내지 4시간 동안 정치시킨다. 이어서 상기 배지를 50 ml의 새로운 배지로 교체하고 진탕을 개시시킨다. 바이러스 생성을 위해서, 세포를 약 80% 융합물로 증식시키고, 그 후에 배지를 교체하고(최종 부피의 25%로) 아데노바이러스를 0.05의 MOI로 가한다. 배양물을 밤새 정치시키고, 이어서 상기 부피를 100%로 증가시키고 추가로 72시간 동안 진탕을 개시시킨다.

[0109] b. 레트로바이러스 벡터

[0110] 추가로, 상기 중앙 억제인자 및/또는 세포외 기질 분해 유전자는 레트로바이러스 벡터에 의해 암호화될 수 있다. 상기 레트로바이러스는 감염된 세포에서 역-전사 과정에 의해 그의 RNA를 이중가닥 DNA로 전환시키는 능력을 특징으로 하는 단일가닥 RNA 바이러스의 한 그룹이다(Coffin, 1990). 이어서 상기 생성되는 DNA는 프로바이러스로서 세포 염색체에 안정하게 통합되고 바이러스 단백질의 합성을 지시한다. 상기 통합은 수용 세포 및 그의 자손들에서 바이러스 유전자 서열을 유지시킨다. 상기 레트로바이러스 계놈은 각각 캡시드 단백질, 폴리머라제 효소, 및 외막 성분을 암호화하는 3개의 유전자 gag, pol 및 env를 함유한다. 상기 gag 유전자의 상류에서 발견되는 서열은 상기 계놈을 비리온으로 패키징하는 신호를 함유한다. 2개의 긴 말단 반복부(LTR) 서열은 상기 바이러스 계놈의 5' 및 3' 단부에 존재한다. 이들은 강한 프로모터 및 인핸서 서열을 함유하며 또한 숙주 세포 계놈에서 통합에 필요하다(Coffin, 1990).

[0111] 레트로바이러스 벡터의 구성을 위해서, 관심 유전자를 암호화하는 핵산을 몇몇 바이러스 서열의 자리에서 상기 바이러스 계놈내에 삽입하여 복제-결합성인 바이러스를 생성시킨다. 비리온을 생성시키기 위해서, 상기 gag, pol 및 env 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 성분은 없는 패키징 세포주를 구성한다(Mann et al., 1983). cDNA를 상기 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께 함유하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 도입시키는 경우(예를 들어 칼슘 포스페이트 침전에 의해), 상기 패키징 서열은 상기 재조합 플라스미드의 RNA 전사물이 바이러스 입자내에 패키징되게 하며, 이어서 상기 입자는 배양 매지내로 분비된다(Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). 이어서 상기 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고, 임의로 농축시키고, 유전자 전달에 사용한다. 레트로바이러스 벡터는 광범위하게 다양한 세포 유형들을 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합 및 안정한 발현은 숙주세포의 분열을 필요로 한다(Paskind et al., 1975).

- [0112] 결합성 레트로바이러스 벡터의 사용에 대한 우려는 상기 패키징 세포 중의 야생형 복제-능력 바이러스의 잠재적인 출현이다. 이는 상기 재조합 바이러스로부터의 완전 서열이 숙주 세포 계통내로 통합된 gag, pol, env 서열로부터의 상류에 삽입되는 재조합 사건으로부터 발생할 수 있다. 그러나, 재조합 가능성을 크게 감소시키는 패키징 세포주를 입수할 수 있다(Markowitz *et al.*, 1988; Hersdorffer *et al.*, 1990).
- [0113] c. 아데노-관련 바이러스 벡터
- [0114] 아데노-관련 바이러스(AAV)는, 높은 통합 빈도를 가지며 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 따라서 상기를 포유 동물 세포로의 유전자 전달에 유용하게 만들기 때문에 본 명세에 사용하기에 매력적인 벡터 시스템이다(Muzyczka, 1992). AAV는 감염성을 위한 광범위한 숙주 범위를 가지며(Tratschin, *et al.*, 1984; Laughlin, *et al.*, 1986; Lebkowski, *et al.*, 1988; McLaughlin, *et al.*, 1988), 이는 상기를 본 발명의 용도에 적용할 수 있음을 의미한다. 상기 rAAV 벡터의 생성 및 용도에 관한 세부내용이 미국특허 제 5,139,941 호 및 미국특허 제 4,797,368 호에 기재되어 있다.
- [0115] AAV는 배양된 세포에서 생산적인 감염을 겪기 위해 또 다른 바이러스(아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 의 일원)와 동시감염을 요한다는 점에서 의존성 파르보바이러스이다(Muzyczka, 1992). 헬퍼 바이러스와의 동시 감염의 부재하에서, 야생형 AAV 계통은 그의 단부를 통해 인간 염색체 19내에 통합되고 여기에서 프로바이러스로서 잠복 상태로 존재한다(Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). 그러나, rAAV는, AAV Rep 단백질이 또한 발현되지 않는 경우 통합을 위해 염색체 19로 제한되지 않는다(Shelling and Smith, 1994). AAV 프로바이러스를 갖는 세포를 헬퍼 바이러스로 초감염시키는 경우, 상기 AAV 계통은 염색체로부터 또는 재조합 플라스미드로부터 "구제되고", 정상적인 생산적인 감염이 확립된다(Samulski *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1988; Kotin *et al.*, 1990; Muzyczka, 1992).
- [0116] 전형적으로, 재조합 AAV(rAAV) 바이러스를, 2개의 AAV 말단 반복부가 인접해 있는 관심 유전자를 함유하는 플라스미드(McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1989; 각각 본 발명에 참고로 인용된다) 및 말단 반복부가 없는 야생형 AAV 암호화 서열을 함유하는 발현 플라스미드, 예를 들어 pIM45(McCarty *et al.*, 1991)를 동시형질 감염시킴으로써 제조한다. 상기 세포를 또한 아데노바이러스 또는 AAV 헬퍼 기능에 필요한 아데노바이러스 유전자를 갖는 플라스미드로 감염시키거나 또는 형질감염시킨다. 상기와 같은 방식으로 제조된 rAAV 바이러스 스톱을 아데노바이러스(상기는 상기 rAAV 입자로부터 물리적으로 분리되어야 한다(예를 들어 염화 세슘 밀도 원심 분리에 의해))로 오염시킨다. 한편으로, 상기 AAV 암호화 영역을 함유하는 아데노바이러스 벡터 또는 상기 AAV 암호화 영역 및 상기 아데노바이러스 헬퍼 유전자 중 일부 또는 전부를 함유하는 세포주를 사용할 수 있다(Yang *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1995). 통합된 프로바이러스로서 rAAV DNA를 갖는 세포주를 또한 사용할 수 있다(Flotte *et al.*, 1995).
- [0117] d. 다른 바이러스 벡터
- [0118] 다른 바이러스 벡터를 본 명세에서 구조물로서 사용할 수 있다. 우두 바이러스(Ridgeway, 1988; Baichwal 및 Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988) 및 헤르페스바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 벡터를 사용할 수 있다. 상기는 다양한 포유동물 세포에 다수의 매력적인 특징들을 제공한다(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).
- [0119] 베네수엘라 말 뇌염(VEE) 바이러스의 분자 클로닝된 군주가 이중 바이러스 단백질의 발현을 위한 복제 능력 백신 벡터로서 유전학적으로 정제되었다(Davis *et al.*, 1996). 연구들은 VEE 감염이 효능 있는 CTL 응답을 자극함을 입증하였으며 VEE가 면역화에 대단히 유용한 벡터일 수 있음을 암시하였다(Caley *et al.*, 1997).
- [0120] 추가의 실시태양에서, 키메라 CD154를 암호화하는 핵산을 특정한 결합 리간드를 발현하도록 조작된 감염성 바이러스내에 수용한다. 따라서 상기 바이러스 입자는 표적 세포의 동족 수용체에 특이적으로 결합하고 내용물을 상기 세포에 전달할 것이다. 레트로바이러스 벡터의 특이적인 표적화를 허용하도록 설계된 신규의 접근법, 바이러스 외막에의 락토스 잔기의 화학적 첨가에 의한 레트로바이러스의 화학적 변형에 기반하여 최근에 개발되었다. 상기 변형은 시알로당단백질 수용체를 통한 간세포의 특이적인 감염을 허용할 수 있다.
- [0121] 예를 들어, 레트로바이러스 외막 단백질 및 특정한 세포 수용체에 대한 비오틴화된 항체를 사용하는 재조합 레트로바이러스의 표적화가 설계되었다. 상기 항체들을 스트렙타비딘을 사용하여 비오틴 성분을 통해 결합시켰다(Roux *et al.*, 1989). 주 조직적합성 복합체 부류 I 및 부류 II 항원에 대한 항체를 사용하여, 시험관내에서 동종지향성 바이러스에 의한 상기 표면 항원을 갖는 다양한 인간 세포의 감염을 입증하였다(Roux *et al.*, 1989).

- [0122] 2. 조절 요소
- [0123] 특히 본 명세에 유용한 벡터에 포함된 발현 카세트는 단백질-암호화 서열에 작동적으로 연결된 진핵생물 전사 프로모터, 중재 서열들을 포함하는 이어맞추기 신호, 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유한다(5'에서 3' 방향으로). 진핵생물 세포 중의 단백질 암호화 유전자의 전사를 조절하는 프로모터 및 인헨서는 다수의 유전자 요소들로 구성된다. 상기 세포 기구는 각 요소에 의해 운반되는 조절 정보를 모아 통합시킬 수 있으며, 이는 상이한 유전자들이 독특한, 종종 복잡한 패턴의 전사 조절을 도출할 수 있게 한다. 본 발명과 관련하여 사용되는 프로모터는 구성, 유도성 및 조직-특이성 프로모터를 포함한다.
- [0124] a. 프로모터/인헨서
- [0125] 본 명세서에 제공된 발현 구조물은 종양 억제인자 및/또는 세포외 기질 분해 유전자의 발현을 구동하는 프로모터를 포함한다. 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위해 출발 부위의 위치를 지정하는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이에 대해 가장 잘 알려진 예는 TATA 박스이나, TATA 박스가 없는 일부 프로모터, 예를 들어 포유동물 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 유전자용 프로모터 및 SV40 말기 유전자용 프로모터에서는 출발 부위 자체 위에 놓이는 별개의 요소가 상기 개시 장소를 고정시키는 것을 돕는다. 추가적인 프로모터 요소는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 상기는 상기 출발 부위의 상류 30 내지 110 bp 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터가 또한 상기 출발 부위의 하류에 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터의 "조절하에" 암호화 서열을 가져오기 위해서, 전사 판독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 단부를 상기 선택된 프로모터의 "하류"(즉 3')에 위치시킨다. 상기 "상류" 프로모터는 상기 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진시킨다.
- [0126] 프로모터 요소들간의 간격은 흔히 유연하며, 따라서 요소들이 거꾸로 되거나 또는 서로에 대해 이동할 때 프로모터 기능이 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들간의 간격은 활성이 감퇴하기 시작하기 전에 50 bp까지 멀리 증가될 수 있다. 상기 프로모터에 따라, 개별적인 요소들은 협동해서 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다. 프로모터를 "인헨서"(핵산 서열의 전사 활성화에 관련된 시스-작용성 조절 서열을 지칭한다)와 함께 사용하거나 또는 사용하지 않을 수 있다.
- [0127] 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 상류에 위치하는 5' 비-암호화 서열의 단리에 의해 수득될 수 있기 때문에, 핵산 서열과 자연적으로 결합될 수 있다. 상기과 같은 프로모터를 "내인성"이라 지칭할 수 있다. 유사하게, 인헨서는 상기 서열의 하류 또는 상류에 위치한 핵산 서열과 자연적으로 결합될 수 있다. 한편으로, 몇몇 이점이, 상기 암호화 핵산 분절을 재조합 또는 이중 프로모터(그의 자연 환경에서 핵산 서열과 통상적으로 결합되지 않는 프로모터를 지칭한다)의 조절하에 상기 암호화 핵산 분절을 위치시킴으로써 획득될 것이다. 재조합 또는 이중 인헨서는 또한 그의 자연 환경에서 핵산 서열과 통상적으로 결합되지 않는 인헨서를 지칭한다. 상기과 같은 프로모터 또는 인헨서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인헨서, 및 임의의 다른 바이러스, 또는 원핵생물 또는 진핵생물 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인헨서, 및 "천연"이 아닌, 즉 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소 및/또는 발현을 변경시키는 돌연변이를 함유하는 프로모터 또는 인헨서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 구성에 가장 통상적으로 사용되는 프로모터는 β -락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인헨서의 핵산 서열을 합성적으로 생성시키는 것 외에, 본 명세서에 개시된 조성물과 관련하여, PCR(상표)을 포함한 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다(미국특허 제 4,683,202 호 및 제 5,928,906 호, 각각 본 발명에 참고로 인용된다). 더욱 또한, 비-핵 세포소기관, 예를 들어 미토콘드리아, 엽록체 등 내에서 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는 조절 서열을 또한 사용할 수 있는 것으로 생각된다.
- [0128] 당연히, 발현을 위해 선택된 상기 세포소기관, 세포 유형, 조직, 기관 또는 유기체 중에서 DNA 분절의 발현을 유효하게 지시하는 프로모터 및/또는 인헨서를 사용하는 것이 중요할 것이다. 분자 생물학 분야의 숙련가들은 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인헨서 및 세포 유형 조합의 용도를 알고 있다(예를 들어 본 발명에 참고로 인용된 문헌[Sambrook et al. 1989]을 참조하시오). 상기 사용되는 프로모터는 도입된 DNA 분절의 높은 수준 발현을 지시하기에 적합한 조건하에서 구성적, 조직-특이적, 유도성이고/이거나 유용할 수 있다, 예를 들어 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대규모 생산에 유리하다. 상기 프로모터는 이중이거나 또는 내인성일 수 있다.
- [0129] 추가로, 임의의 프로모터/인헨서 조합(예를 들어 www.epd.isb-sib.ch/를 통해, 진핵생물 프로모터 데이터 베이스 EPDB에 따라)을 또한 발현의 구동에 사용할 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용이 또 다른 가능한 실시태양이다. 진핵생물 세포는 적합한 세균 폴리머라제가 제공되는 경우, 전달 복합체의 부분으로

서 또는 추가적인 유전자 발현 구조물로서 몇몇 세균 프로모터로부터의 세포질 전사를 지지할 수 있다.

[0130] 프로모터의 비제한적인 예는 초기 또는 말기 바이러스 프로모터, 예를 들어 SV40 초기 또는 말기 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 전초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 초기 프로모터; 진핵생물 세포 프로모터, 예를 들어 베타 액틴 프로모터(Ng, 1989; Quitsche *et al.*, 1989), GAPDH 프로모터(Alexander *et al.*, 1988, Ercolani *et al.*, 1988), 금속티오네인 프로모터(Karin *et al.*, 1989; Richards *et al.*, 1984); 및 연쇄상 응답 요소 프로모터, 예를 들어 환상 AMP 응답 요소 프로모터(cre), 혈청 응답 요소 프로모터(sre), 포르볼 에스 테르 프로모터(TPA), 및 최소 TATA 박스 부근의 응답 요소 프로모터(tre)를 포함한다. 인간 성장 호르몬 프로모터 서열(예를 들어 진뱅크(Genbank), 수납번호 X05244, 뉴클레오티드 283-341에 기재된 인간 성장 호르몬 최소 프로모터) 또는 마우스 유방 종양프로모터(ATCC로부터 입수할 수 있다, Cat. No. ATCC 45007)를 사용하는 것이 또한 가능하다. 몇몇 실시태양에서, 상기 프로모터는 CMV IE, 텍틴-1, 텍틴-2, 인간 CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, 베타-액틴, MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 프로모터이나, 상기 p53, MDA-7 및/또는 텔락신 유전자의 발현을 구동하는데 유용한 임의의 다른 프로모터를 본 발명의 실시예에 적용할 수 있다.

[0131] 몇몇 태양에서, 본 명세의 방법은 또한 인헨서 서열, 즉 프로모터의 활성을 증가시키고 시스로 작용할 잠재성을 가지며, 배향에 관계없이, 심지어 비교적 긴 거리에 걸친(표적 프로모터로부터 수 킬로염기까지 떨어진) 핵산 서열에 관한 것이다. 그러나, 인헨서 기능은 상기 인헨서가 주어진 프로모터에 인접하여 또한 기능할 수 있기 때문에, 반드시 상기와 같이 긴 거리로 제한될 필요는 없다.

[0132] b. 개시 신호 및 연결된 발현

[0133] 특이적인 개시 신호를 또한 암호화 서열의 효율적인 번역을 위해 본 명세서에 제공된 발현 구조물에 사용할 수 있다. 상기 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하여 외인성 번역 조절 신호를 제공할 필요가 있을 수 있다. 당해 분야의 통상적인 숙련가는 쉽게 이를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다. 상기 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해서 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 "인프레임"이어야 함이 주지되어 있다. 상기 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연 또는 합성일 수 있다. 발현 효율을 적합한 전사 인헨서 요소의 포함에 의해 증대시킬 수 있다.

[0134] 몇몇 실시태양에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소의 사용을, 다중유전자, 또는 폴리시스트론 메시지를 생성시키기 위해 사용할 수 있다. IRES 요소는 5' 메틸화된 Cap 의존적인 번역의 리보솜 주사 모델을 우회하여 내부 부위에서 번역을 시작할 수 있다(Pelletier and Sonenberg, 1988). 피코르나바이러스과의 2개의 구성원(폴리오 및 뇌척수수심근염)으로부터의 IRES 요소(Pelletier and Sonenberg, 1988)뿐만 아니라 포유동물 메시지로 부터의 IRES(Macejak and Sarnow, 1991)가 개시되었다. IRES 요소를 이중 개방 판독 프레임에 연결시킬 수 있다. 다중 개방 판독 프레임들을 함께 전사시킬 수 있으며, 이들은 각각 IRES에 의해 분리되어 폴리시스트론 메시지를 생성시킨다. 상기 IRES 요소에 의해, 각각의 개방 판독 프레임은 효율적인 번역을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 유전자를 단일 프로모터/인헨서를 사용하여 효율적으로 발현시켜 단일 메시지를 전사할 수 있다(미국특허 제 5,925,565 호 및 제 5,935,819 호(각각 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오).

[0135] 추가로, 몇몇 2A 서열 요소를 사용하여 본 명세서에 제공된 구조물에서 유전자들의 연결된- 또는 동시-발현을 생성시킬 수 있다. 예를 들어 절단 서열을 사용하여 개방 판독 프레임들을 연결시켜 단일 시스트론을 형성시킴으로써 유전자를 동시-발현시킬 수 있다. 예시적인 절단 서열은 F2A(구제역 바이러스 2A) 또는 "2A-유사" 서열(예를 들어 토세아 아시그나(*Thosea asigna*) 바이러스 2A; T2A)이다(Minskaia and Ryan, 2013).

[0136] c. 복제 기원

[0137] 숙주 세포에서 벡터를 번식시키기 위해서, 하나 이상의 복제 기원 부위(종종 "ori"라 칭한다), 예를 들어 상술한 바와 같은 EBV의 oriP 또는 프로그래밍에서 유사하거나 상승된 기능을 갖는 유전자 조작된 oriP에 상응하는 핵산 서열(이는 복제가 개시되는 특정한 핵산 서열이다)을 함유할 수 있다. 한편으로, 상술한 바와 같은 다른 염색체의 복제 바이러스의 복제 기원 또는 자율 복제 서열(ARS)을 사용할 수 있다.

[0138] 3. 선택 및 선별성 마커

[0139] 일부 실시태양에서, 본 명세의 구조물을 함유하는 세포를 발현 벡터에 마커를 포함시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 확인할 수 있다. 상기와 같은 마커는 상기 세포에 확인가능한 변화를 부여하여 상기 발현 벡터를 함유하는 세포를 쉽게 확인할 수 있게 한다. 일반적으로 선택 마커는 선택을 허용하는 성질을 부여하는 마커이다. 양성 선택 마커는 상기 마커의 존재가 그의 선택을 허용하는 것인 반면, 음성 선택 마커는 그의 존

재가 그의 선택을 방지하는 것이다. 양성 선택 마커의 일례는 약물 내성 마커이다.

[0140] 대개 약물 선택 마커의 포함은 형질전환체의 클로닝 및 확인을 돕는다, 예를 들어 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선택 마커이다. 조건의 실행에 기반하여 형질전환체의 식별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커들 외에, 비색분석에 기반한 GFP와 같은 선별성 마커를 포함하는 다른 유형의 마커들이 또한 고려된다. 한편으로, 음성 선택 마커로서 선별성 효소, 예를 들어 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제(tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)를 사용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 또한 가능하게는 FACS 분석과 함께, 면역학적 마커를 어떻게 사용하는 지를 알 것이다. 상기 사용되는 마커는, 유전자 산물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한, 중요한 것으로 여겨지지 않는다. 선택 및 선별성 마커의 추가적인 예는 당해 분야의 숙련가에게 주지되어 있다.

[0141] B. 핵산 전달의 다른 방법들

[0142] 상기 종양 억제인자(들) 및/또는 세포의 기질 분해 유전자를 암호화하는 핵산의 바이러스 전달 외에, 하기는 주어진 숙주 세포로의 제조합 유전자의 추가적인 전달 방법이며 따라서 본 명세에서 고려된다.

[0143] 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA의 도입은 본 명세에서 기재되거나 또는 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 바와 같이, 세포의 형질전환을 위한 임의의 적합한 핵산 전달 방법을 사용할 수 있다. 상기과 같은 방법은 비제한적으로 생체의 형질감염(Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989), 주사(미국특허 제 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 및 5,580,859 호(각각 본 발명에 참고로 인용된다)), 예를 들어 미세주사(Harland and Weintraub, 1985; 미국특허 제 5,789,215 호(본 발명에 참고로 인용된다)); 일렉트로포레이션(미국특허 제 5,384,253 호(본 발명에 참고로 인용된다)); Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); 칼슘 포스페이트 침전(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); DEAE-덱스트란에 이온 폴리에틸렌 글리콜의 사용(Gopal, 1985); 직접적인 음과 로딩(Fechheimer *et al.*, 1987); 리포솜 매개된 형질감염(Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) 및 수용체-매개된 형질감염(Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); 미립자가속장치 충격(PCT 출원 제 WO 94/09699 및 95/06128 호; 미국특허 제 5,610,042; 5,322,783 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 및 5,538,880 호(각각 본 발명에 참고로 인용된다)); 탄화규소 섬유와의 교반(Kaepler *et al.*, 1990; 미국특허 제 5,302,523 및 5,464,765 호(각각 본 발명에 참고로 인용된다)); 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 형질전환(미국특허 제 5,591,616 및 5,563,055 호(각각 본 발명에 참고로 인용된다)); 건조/억제-매개된 DNA 흡수(Potrykus *et al.*, 1985), 및 상기과 같은 방법들의 임의의 조합에 의해서와 같은 DNA의 직접적인 전달을 포함한다. 이들과 같은 기법들의 적용을 통해 세포소기관(들), 세포(들), 조직(들) 또는 유기체(들)를 안정하거나 일시적으로 형질전환시킬 수 있다.

[0144] 1. 일렉트로포레이션

[0145] 본 명세의 몇몇 특정한 실시태양에서, 상기 유전자 구조물을 일렉트로포레이션을 통해 표적 과증식성 세포내에 도입시킨다. 일렉트로포레이션은 세포(또는 조직) 및 DNA(또는 DNA 복합체)의 고전압 전기 방전에서의 노출을 수반한다.

[0146] 일렉트로포레이션을 사용하는 진핵생물 세포의 형질감염은 꽤 성공적이었다. 상기 방식으로 마우스 프리-B 림프구를 인간 카파-면역글로불린 유전자(Potter *et al.*, 1984)로 형질감염시켰으며, 래트 간세포를 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 유전자로 형질감염시켰다(Tur-Kaspa *et al.*, 1986).

[0147] 상이한 공급원으로부터의 과증식성 세포에 대한 일렉트로포레이션 조건들을 최적화할 수 있는 것으로 생각된다. 특히 전압, 정전용량, 시간 및 일렉트로포레이션 매질 조성과 같은 매개변수들을 최적화할 것이 특별히 요구될 수 있다. 다른 통상적인 조절의 실행은 당해 분야의 숙련가들에게 공지될 것이다. 예를 들어 문헌[Hoffman, 1999]; [Heller *et al.*, 1996]을 참조하시오.

[0148] 2. 지질-매개된 형질전환

[0149] 추가의 실시태양에서, 상기 종양 억제인자 및/또는 세포의 기질 분해 유전자를 리포솜 또는 지질 제형 중에 포집할 수 있다. 리포솜은 인지질 2층막 및 내부 수성 매질을 특징으로 하는 소낭 구조이다. 다층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다층 지질층을 갖는다. 상기는 인지질이 과잉의 수용액 중에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 상기 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자가-재배열을 겪고 물을 포집하고 상기 지질 2층 사이에 용질을 용해시켰다(Ghosh and Bachhawat, 1991). 또한 리포솜(Gibco BRL)과 복합체를 형성한 유전자 구조

물이 고려된다.

- [0150] 시험관내에서 외래 DNA의 지질-매개된 핵산 전달 및 발현은 매우 성공적이었다(Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). 웅 등(Wong *et al.* (1980))은 배양된 병아리 배, HeLa 및 간종양 세포에서 외래 DNA의 지질-매개된 전달 및 발현의 용이성을 입증하였다.
- [0151] 지질계 비-바이러스성 제형은 아데노바이러스 유전자 요법에 대한 대안을 제공한다. 다수의 세포 배양 연구가 지질계 비-바이러스성 유전자 전달을 기록하였지만, 지질계 제형을 통한 전신 유전자 전달은 제한되었다. 비-바이러스성 지질계 유전자 전달의 주요 한계는 상기 비-바이러스성 전달 비히클을 포함하는 양이온성 지질의 독성이다. 리포솜의 생체내 독성은 시험관내 및 생체내 지질 전달 결과들간의 불일치를 부분적으로 설명한다. 상기 서로 모순되는 데이터에 기여하는 또 다른 인자는 혈청 단백질의 존재 및 부재하에서의 지질 비히클 안정성의 차이이다. 지질 비히클과 혈청 단백질간의 상호작용은 지질 비히클의 안정성 특성에 극적인 영향을 미친다(Yang and Huang, 1997). 양이온성 지질은 음으로 하전된 혈청 단백질을 끌어당겨 결합한다. 혈청 단백질과 결합된 지질 비히클은 대식세포에 의해 용해되어 순환으로부터 제거된다. 현행 생체내 지질 전달 방법은 순환 중인 양이온성 지질과 관련된 독성 및 안정성 문제를 피하기 위해 피하, 피내, 종양내 또는 두개내 주사를 사용한다. 지질 비히클 및 혈장 단백질의 상호작용은 시험관내(Felgner *et al.*, 1987) 및 생체내 유전자 전달(Zhu *et al.*, 1993; Philip *et al.*, 1993; Solodin *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Thierry *et al.*, 1995; Tsukamoto *et al.*, 1995; Aksentijevich *et al.*, 1996)의 효율간 불일치의 원인이다.
- [0152] 지질 제형의 진보는 생체내에서 유전자 전달의 효율을 개선시켰다(Templeton *et al.* 1997; WO 98/07408). 동물비의 1,2-비스(올레오일옥시)-3-(트리메틸 암모니오)프로판(DOTAP)과 콜레스테롤로 구성된 신규의 지질 제형은 전신 생체내 유전자 전달을 대략 150배 현저하게 증대시킨다. 상기 DOTAP:콜레스테롤 지질 제형은 "샌드위치 리포솜"이라 칭하는 특유의 구조를 형성시킨다. 상기 제형은 합입된 이중-층 또는 '꽃병' 구조 사이에 DNA를 "샌드위치하는" 것으로 보고된다. 이들 지질 구조의 이로운 특성은 양의 ρ , 콜레스테롤에 의한 콜로이드 안정화, 2차원 DNA 충전 및 증가된 혈청 안정성을 포함한다. 특허 출원 제 60/135,818 및 60/133,116 호는 본 발명에 사용될 수 있는 제형들을 논의한다.
- [0153] 지질 제형의 생성은 종종 (I) 역상 증발 (II) 탈수-재수화 (III) 세제 투석 및 (IV) 박층 수화 후 리포솜 혼합물의 음과처리 또는 연속 압출에 의해 수행된다. 지질 구조물은 일단 제조되었으면 순환시 독성이거나(화학요법) 또는 불안정한(핵산) 화합물을 캡슐화하는데 사용될 수 있다. 지질 캡슐화는 상기와 같은 화합물에 대해 보다 낮은 독성 및 보다 긴 혈청 반감기를 생성시켰다(Gabizon *et al.*, 1990). 다수의 질병 치료는 통상적인 요법을 향상시키거나 또는 신규 요법, 특히 과증식성 질병의 치료를 위한 요법을 확립시키기 위해 지질계 유전자 전달 전략들을 사용한다.
- [0154] V. 면역관문 억제제
- [0155] 본 명세는 종양 억제 유전자 요법, 예를 들어 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법과 면역관문의 봉쇄를 병용하는 방법을 제공한다. 면역관문은 신호를 높이거나(예를 들어 보조-자극 분자) 또는 신호를 낮추는 면역계의 분자이다. 면역관문 봉쇄에 의해 표적화될 수 있는 억제성 관문분자는 아데노신 A2A 수용체(A2AR), B7-H3(또한 CD276으로서 공지됨), B 및 T 림프구 감독제(BTLA), 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4, 또한 CD152로서 공지됨), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 살해-세포 면역글로불린(KIR), 림프구 활성화 유전자-3(LAG3), 예정세포사 1(PD-1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3(TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제인자(VISTA)를 포함한다. 특히, 상기 면역관문 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.
- [0156] 상기 면역관문 억제제는 소분자, 리간드 또는 수용체의 재조합 형태와 같은 약물이거나, 또는 특히 항체, 예를 들어 인간 항체이다(예를 들어 국제 특허 공보 WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; 둘 다 본 발명에 참고로 인용된다). 면역관문 단백질 또는 그의 유사체의 공지된 억제제를 사용할 수 있다, 특히 키메라화된, 인간화된 또는 인간 형태의 항체를 사용할 수 있다. 숙련가가 알게되는 바와 같이, 대체 및/또는 동등한 명칭이 본 명세에 언급된 몇몇 항체들에 대해 사용 중일 수 있다. 상기와 같은 대체 및/또는 동등한 명칭은 본 발명과 관련하여 호환 가능하다. 예를 들어 램브롤리주맵은 또한 대체 및 동등한 명칭 MK-3475 및 캄브롤리주맵하에 공지되어 있다.
- [0157] 면역 응답을 자극하는 것으로 당해 분야에 공지된 면역관문 억제제들 중 임의의 것을 사용할 수 있는 것으로 생각된다. 여기에는 항원-특이성 T-림프구를 직접적으로 또는 간접적으로 자극하거나 또는 증대시키는 억제제들이 포함된다. 이들 면역관문 억제제는 비제한적으로 PD-L2, LAG3, BTLA, B7H4 및 TIM3을 수반하는 면역관문 단

백질 및 경로를 표적화하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 당해 분야에 공지된 LAG3 억제제는 용해성 LAG3(WO2009044273에 개시된 IMP321, 또는 LAG3-Ig)뿐만 아니라 인간 LAG3을 차단하는 마우스 또는 인간화된 항체(WO2008132601에 개시된 IMP701), 또는 인간 LAG3을 차단하는 완전 인간 항체(EP 2320940에 개시된 바와 같은)를 포함한다. 또 다른 예는 비제한적으로, 리간드와의 인간 BTLA 상호작용을 차단하는 항체를 포함하는, BTLA에 대한 차단제의 사용에 의해 제공된다(예를 들어 WO2011014438에 개시된 4C7). 더욱 또 다른 예는 비제한적으로 인간 B7H4에 대한 항체(WO 2013025779, 및 WO2013067492에 개시된) 또는 B7H4의 용해성 재조합 형태(US20120177645에 개시된 바와 같은)를 포함하는 B7H4를 중화시키는 작용제의 사용에 의해 제공된다. 더욱 또 다른 예는 비제한적으로 인간 B7-H3을 중화시키는 항체(예를 들어 US 20120294796에 BRCA84D로서 개시된 MGA271 및 유도체)를 포함하는, B7-H3을 중화시키는 작용제에 의해 제공된다. 더욱 또 다른 예는 비제한적으로 인간 TIM3을 표적화하는 항체(예를 들어 WO 2013006490 A2에 개시된 바와 같은 또는 문헌[Jones *et al.*, J Exp Med. 2008; 205(12):2763-79]에 개시된 항체 F38-2E2를 차단하는 항-인간 TIM3)를 포함하는, TIM3을 표적화하는 작용제에 의해 제공된다.

[0158] 또한, 하나 초과 의 면역관문 억제제(예를 들어 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체)를 종양 억제 유전자 요법과 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, p53 유전자 요법 및 면역관문 억제제(예를 들어 항-KIR 항체 및/또는 항-PD-1 항체)를 투여하여 내재적 항-종양 면역성을 증대시킨 다음 IL24 유전자 요법 및 면역관문 억제제(예를 들어 항-PD-1 항체)를 투여하여 적응적 항-종양 면역 응답을 유도할 수 있다.

[0159] A. PD-1 축 길항물질

[0160] T 세포 기능장애 또는 아네르기는 억제성 수용체, 예정세포사 1 폴리펩티드(PD-1)의 유도되고 지속된 발현과 동반하여 발생한다. 따라서, PD-1 및 PD-1과의 상호작용을 통해 신호를 전달하는 다른 분자, 예를 들어 예정세포사 리간드 1(PD-L1) 및 예정세포사 리간드 2(PD-L2)의 치료학적 표적화를 본 명세서에 제공한다. PD-L1은 다수의 암에서 과발현되며 종종 불량한 예후와 관련된다(Okazaki *T et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813). 따라서, p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법과 함께 PD-L1/PD-1 상호작용의 억제를 본 명세서에서 제공하며, 이는 예를 들어 종양의 CD8⁺ T 세포-매개된 살해를 증대시킨다.

[0161] 개인에게 유효량의, p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법과 함께 PD-1 축 결합 길항물질을 투여함을 포함하는 상기 개인에서 암을 치료하거나 그 진행을 지연시키는 방법을 본 명세서에 제공한다. 또한, 면역기능의 증대가 필요한 개인에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항물질 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 투여함을 포함하는 상기 개인에서 상기 기능의 증대 방법을 본 명세서에 제공한다.

[0162] 예를 들어, PD-1 축 결합 길항물질은 PD-1 결합 길항물질, PDL1 결합 길항물질 및 PDL2 결합 길항물질을 포함한다. "PD-1"에 대한 대체 명칭은 CD279 및 SLEB2를 포함한다. "PDL1"에 대한 대체 명칭은 B7-H1, B7-4, CD274, 및 B7-H를 포함한다. "PDL2"에 대한 대체 명칭은 B7-DC, Btcd, 및 CD273을 포함한다. 일부 실시태양에서, PD-1, PDL1, 및 PDL2는 인간 PD-1, PDL1 및 PDL2이다.

[0163] 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 PD-1의 그의 리간드 결합쪽에의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PD-1 리간드 결합쪽은 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 실시태양에서, PDL1 결합 길항물질은 PD-L1의 그의 리간드 결합쪽에의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PDL1 결합쪽은 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 실시태양에서, PDL2 결합 길항물질은 PDL2의 그의 리간드 결합쪽에의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 태양에서, 상기 PDL2 리간드 결합쪽은 PD-1이다. 상기 길항물질은 항체, 그의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 또는 올리고펩티드일 수 있다. 예시적인 항체들이 미국특허 제 US8735553, US8354509, 및 US8008449 호(모두 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다. 본 명세서에 제공된 방법들에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항물질은 미국특허 출원 제 US20140294898, US2014022021, 및 US20110008369 호(모두 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.

[0164] 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 항-PD-1 항체(예를 들어 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 키메라 항체)이다. 일부 실시태양에서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 및 CT-011로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 면역부착소(예를 들어 불변 영역(예를 들어 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역부착소)이다. 일부 실시태양에서, 상기 PD-1 결합 길항물질은 AMP-224이다. 니볼루맵(또한 MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO(등록상표)로서 공지됨)은 WO2006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. 펌브롤리주맵(또한 MK-3475, 머크(Merck) 3475, 람브롤리주맵, KEYTRUDA(등록상표), 및 SCH-900475로서 공지됨)은 WO2009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. CT-011(또한 hBAT 또는 hBAT-1로서 공지됨)은

WO2009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다. AMP-224(또한 B7-DCIg로서 공지됨)는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 용해성 수용체이다. 추가적인 PD-1 결합 길항물질은 피딜리주맵(또한 CT-011로서 공지됨), MEDI0680(또한 AMP-514로서 공지됨), 및 REGN2810을 포함한다.

[0165] 일부 태양에서, 상기 면역관문 억제제는 PD-L1 길항물질, 예를 들어 듀르발루맵(또한 MEDI4736으로서 공지됨), 아테졸리주맵(또한 MPDL3280A로서 공지됨) 또는 아벨루맵(또한 MSB00010118C로서 공지됨)이다. 몇몇 태양에서, 상기 면역관문 억제제는 PD-L2 길항물질, 예를 들어 rHIgM12B7이다. 일부 태양에서, 상기 면역관문 억제제는 LAG-3 길항물질, 예를 들어 비제한적으로 IMP321 또는 BMS-986016이다. 상기 면역관문 억제제는 아데노신 A2a 수용체(A2aR) 길항물질, 예를 들어 PBF-509이다.

[0166] 일부 태양에서, 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어 항-PD-1 항체, 항-PDL1 항체, 또는 항-PDL2 항체)는 인간 또는 쥐 불변 영역을 추가로 포함한다. 더욱 추가의 태양에서, 상기 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 더욱 추가의 특정한 태양에서, 상기 인간 불변 영역은 IgG1이다. 더욱 추가의 태양에서, 상기 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 더욱 추가의 특정한 태양에서, 상기 항체는 감소된 또는 최소의 효과기 기능을 갖는다. 더욱 추가의 특정한 태양에서, 상기 최소의 효과기 기능은 원핵생물 세포에서의 생성으로부터 유래한다. 더욱 추가의 특정한 태양에서, 상기 최소의 효과기 기능은 "효과기-없는 Fc 돌연변이" 또는 아글리코실화로부터 생성된다.

[0167] 상응하게, 본 명세서에 사용된 항체는 아글리코실화될 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-결합되거나 O-결합된다. N-결합된 아스파라진 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라진-X-세린 및 아스파라진-X-쓰레오닌(여기에서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 아스파라진 측쇄에의 탄수화물 부분의 효소적 부착에 대한 인지 서열들이다. 따라서, 폴리펩티드 중의 이들 트리펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성시킨다. O-결합된 글리코실화는 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토스, 또는 자일로스 당 중 하나의 하이드록시 아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 쓰레오닌에의 부착을 지칭하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시 리신이 또한 사용될 수도 있다. 항체로부터 글리코실화 부위의 제거는 편의상, 상술한 트리펩티드 서열(N-결합된 글리코실화 부위에 대한) 중 하나가 제거되도록 상기 아미노산 서열을 변경시킴으로써 수행된다. 상기 변경은 상기 글리코실화 부위내 아스파라진, 세린 또는 쓰레오닌 잔기의 또 다른 아미노산 잔기(예를 들어 글리신, 알라닌 또는 보존적 치환)에 의한 치환에 의해 수행될 수 있다.

[0168] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어 앞서 기재된 항-PDL1, 항-PD-1 또는 항-PDL2 항체 또는 항원-결합 단편 중 어느 하나를 발현에 적합한 형태로 암호화하는 핵산을 함유하는 숙주 세포를 상기 항체 또는 단편을 생성시키기에 적합한 조건하에서 배양하고 상기 항체 또는 단편을 회수함을 포함하는 과정에 의해 제조할 수 있다.

[0169] B. CTLA-4

[0170] 본 명세서에 제공된 방법들에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역관문은 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4)(또한 CD152로서 공지됨)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 진뱅크 수납 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포의 표면상에서 발견되며 항원-제공 세포 표면의 CD80 또는 CD86에 결합될 때 "오프" 스위치로서 작용한다. CTLA4는, 헬퍼 T 세포의 표면상에서 발현하고 T 세포로 억제 신호를 전송하는 면역글로불린 상과의 일원이다. CTLA4는 T-세포 보조-자극 단백질 CD28과 유사하며, 상기 두 분자는 모두 항원-제공 세포상의 CD80 및 CD86(또한 각각 B7-1 및 B7-2라 칭한다)에 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포로 전송하는 반면 CD28은 자극 신호를 전송한다. 세포내 CTLA4는 또한 조절성 T 세포에서 발견되며 그의 기능에 중요할 수 있다. 상기 T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체, CTLA-4의 증가된 발현을 유도한다.

[0171] 일부 실시태양에서, 상기 면역관문 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 키메라 항체), 그의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질 또는 올리고펩티드이다.

[0172] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 항-인간-CTLA-4 항체(또는 상기로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)를 당해 분야에 주지된 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 한편으로, 당해 분야에 인정된 항-CTLA-4 항체를 사용할 수 있다. 예를 들어, US 8,119,129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504(CP675,206, 또한 트레멜리주맵으로서 공지됨; 이전에는 티실리주맵), 미국특허 제 6,207,156 호; 문헌[Hurwitz *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17): 10067-10071]; [Camacho *et al.* (2004) J Clin Oncology 22(145): Abstract No. 2505](항체

CP-675206); 및 [Mokyr *et al.* (1998) Cancer Res 58:5301-5304]에 개시된 항-CTLA-4 항체를 본 명세서에 개시된 방법들에 사용할 수 있다. 상기 언급된 각 발행물들의 교시는 본 발명에 참고로 인용된다. CTLA-4에의 결합에 대해 이들 당해분야에 인정된 항체들과 경쟁하는 항체를 또한 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간화된 CTLA-4 항체가 국제특허 출원 WO2001014424, WO2000037504, 및 미국특허 제 US8017114 호(이들은 모두 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.

- [0173] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리루맵(또한 10D1, MDX-010, MDX-101, 및 예르보이(Yervoy)(등록상표)로서 공지됨) 또는 그의 항원 결합 단편 및 변이체이다(예를 들어 WO 1/14424를 참조하시오). 다른 실시태양에서, 상기 항체는 이필리루맵의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 상응하게, 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 이필리루맵의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 이필리루맵의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 항체는 상기 언급한 항체와 동일한 CTLA-4 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁하고/하거나 상기에 결합한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 항체는 상기 언급한 항체와 적어도 약 90% 가변 영역 아미노산 서열 일치성(예를 들어 이필리루맵과 적어도 약 90%, 95%, 또는 99% 가변 영역 일치성)을 갖는다.
- [0174] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 방법은 미국특허 US5844905, US5885796 및 국제특허 출원 WO1995001994 및 WO1998042752(이들은 모두 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 CTLA-4 리간드 및 수용체, 및 미국특허 US8329867(본 발명에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 면역부착소를 포함한다.
- [0175] C. 살해 면역글로불린-유사 수용체(KIR)
- [0176] 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 면역관문 억제제는 항-KIR 항체이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 항-인간-KIR 항체(또는 이로부터 유래된 VH/VL 도메인)를 당해 분야에 주지된 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0177] 한편으로, 당해 분야에서 인정된 항-KIR 항체를 사용할 수 있다. 상기 항-KIR 항체는 다수의 억제성 KIR 수용체와 교차-반응성일 수 있으며 이들 수용체 중 하나 이상을 갖는 NK 세포의 세포독성을 강화시킨다. 예를 들어, 상기 항-KIR 항체는 KIR2D2DL1, KIR2DL2, 및 KIR2DL3 각각에 결합할 수 있으며, 이들 KIR 전부에 의해 매개되는 NK 세포 세포독성의 억제를 감소, 중화 및/또는 역전시킴으로써 NK 세포 활성을 강화시킨다. 일부 태양에서, 상기 항-KIR 항체는 KIR2DS4 및/또는 KIR2DS3에 결합하지 않는다. 예를 들어, WO 2006/003179(그의 교시는 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재된 단클론 항체 1-7F9(또한 IPH2101로서 공지됨), 14F1, 1-6F1 및 1-6F5를 사용할 수 있다. KIR에의 결합에 대해 이들 당해 분야에서 인정된 항체들 중 어느 하나와 경쟁하는 항체를 또한 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 추가적인 당해분야에서 인정된 항-KIR 항체는 예를 들어 WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 및 WO/2012/160448에 개시된 것들을 포함한다.
- [0178] 예시적인 항-KIR 항체는 릴리루맵(또한 BMS-986015 또는 IPH2102로서 지칭됨)이다. 다른 실시태양에서, 상기 항-KIR 항체는 릴리루맵의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR) 또는 가변 영역(VR)을 포함한다. 상응하게, 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 릴리루맵의 중쇄 가변(VH) 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 릴리루맵의 경쇄 가변(VL) 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 항체는 릴리루맵과 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 일치성을 갖는다.
- [0179] VI. 치료 방법
- [0180] 개인에게 유효량의 적어도 하나의 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체) 및 적어도 하나의 종양 억제 유전자 요법(예를 들어 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법)을 투여함을 포함하는, 상기 개인에서 암을 치료하거나 그 진행을 지연시키는 방법을 본 명세서에 제공한다.
- [0181] 일부 실시태양에서, 상기 치료는 상기 치료의 중지 후 상기 개인에서 지속적인 응답을 생성시킨다. 본 명세서에 기재된 방법은 증대된 면역원성이 요구되는 상태의 치료, 예를 들어 암 치료를 위한 종양 면역원성의 증가에서 용도를 찾을 수 있다. 또한, 예를 들어 암을 갖는 개인에게 유효량의 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체) 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 투여함을 포함하는, 상기 개인에서 면역기능을 증대시키는 방법을 본 명세서에 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 개인은 인간이다.
- [0182] 치료를 위해 고려되는 암의 예는 폐암(lung cancer), 두경부암(head and neck cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal cancer), 골암(bone cancer), 고환암(testicular cancer), 경부암(cervical cancer), 위장암(gastrointestinal cancer), 림프종(lymphomas), 폐 중 종양전 병변(pre-neoplastic lesions in the lung), 결장암(colon cancer), 흑색종(melanoma), 및 방광

암(bladder cancer)을 포함한다.

- [0183] 일부 실시태양에서, 상기 개인은 하나 이상의 항암 요법에 내성인(내성인 것으로 입증된) 암을 갖는다. 일부 실시태양에서, 항암 요법에 내성은 암 또는 무반응성 암의 재발을 포함한다. 재발은 치료후 원래 부위 또는 새로운 부위에서의 암의 재출현을 지칭할 수 있다. 일부 실시태양에서 항암 요법에 대한 내성은 항암 요법에 의한 치료 중 암의 진행을 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 암은 초기 단계 또는 말기 단계이다.
- [0184] 상기 개인은 PD-L1 생물마커를 발현하는(예를 들어 진단 시험에서 발현하는 것으로 입증된) 암을 가질 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 환자의 암은 낮은 PD-L1 생물마커를 발현한다. 일부 실시태양에서, 상기 환자의 암은 높은 PD-L1 생물마커를 발현한다. 상기 PD-L1 생물마커를 FACS, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역침전, 면역조직화학, 면역형광, 방사성면역분석, 도트 블롯팅, 면역검출 방법, HPLC, 표면 플라즈몬 공명, 광학적 분광학, 질량 분광 분석, HPLC, qPCR, RT-qPCR, 복합 qPCR 또는 RT-qPCR, RNA-seq, 미세배열 분석, SAGE, MassARRAY 기법, 및 FISH, 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 방법을 사용하여 샘플 중에서 검출할 수 있다.
- [0185] 본 명세서에 기재된 방법들(예를 들어 유효량의 적어도 하나의 면역관문 억제제 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법의 조합을 투여함을 포함하는 병용 치료) 중 어느 하나의 효능을 당해 분야에 공지된 다양한 모델, 예를 들어 임상 또는 전임상 모델에서 시험할 수 있다. 적합한 전임상 모델을 본 명세서에 예시하며, 상기 모델은 비제한적으로 ID8 난소암, GEM 모델, B16 흑색종, RENCA 신세포암, CT26 결장직장암, MC38 결장직장암, 및 클라우 드만 흑색종 암 모델을 포함할 수 있다.
- [0186] 본 명세의 방법의 일부 실시태양에서, 상기 암은 낮은 수준의 T 세포 침윤을 갖는다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 검출할 수 없는 T 세포 침윤물을 갖는다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 비-면역원성암(예를 들어 비-면역원성 결장직장암 및/또는 난소암)이다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 병용 치료는 상기 조합의 투여 이전에 비해 T 세포(예를 들어 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 기억 T 세포) 프라이밍, 활성화 및/또는 증식을 증가시킬 수 있다.
- [0187] 본 명세의 방법의 일부 실시태양에서, 상기 개인에서 활성화된 CD4 및/또는 CD8 T 세포는 상기 조합의 투여 이전에 비해 γ -IFN 생산 CD4 및/또는 CD8 T 세포 및/또는 증대된 세포용해 활성을 특징으로 한다. γ -IFN은 당해 분야에 공지된 임의의 수단, 예를 들어 세포 고정을 수반하는 세포내 사이토킨 염색(ICS), 침투, 및 γ -IFN에 대한 항체에 의한 염색에 의해 측정될 수 있다. 세포용해 활성을 당해 분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들어 혼합된 효과기 및 표적 세포에 대한 세포 살해 분석을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0188] 본 명세는 면역계에 대한 표적으로서 또는 외래 표적에 대한 면역계 응답의 부분으로서 면역 반응에 참여하는 임의의 인간 세포에 유용하다. 상기 방법은 생체외 방법, 생체내 방법, 및 숙주 세포내로 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 주사를 포함하는 다양한 다른 방법들을 포함한다. 상기 방법은 또한 상기 종양 또는 종양층에 직접적으로 뿐만 아니라 상기 종양에 국소적으로 또는 국부적으로 주사함을 포함한다.
- [0189] A. 투여
- [0190] 본 명세서에 제공된 병용 요법은 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체) 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법의 투여를 포함한다. 상기 병용 요법을 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 방식으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체) 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 순차적으로(상이한 시간에) 또는 동반하여(동일한 시간에) 투여할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 하나 이상의 면역관문 억제제는 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법 또는 그의 발현 구조물과 별도의 조성물 중에 있다. 일부 실시태양에서, 상기 면역관문 억제제는 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법과 동일한 조성물 중에 있다. 몇몇 태양에서, 상기 피실험자는 상기 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산이 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제 전에, 상기 억제제와 동시에, 또는 상기 억제제 후에 투여된다.
- [0191] 상기 하나 이상의 면역관문 억제제 및 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 동일한 투여 경로에 의해 또는 상이한 투여 경로에 의해 투여할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 면역관문 억제제를 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식에 의해, 흡입에 의해, 경막내, 심실내, 또는 비내 투여한다. 일부 실시태양에서, 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식에 의해, 흡입에 의해, 경막내, 심실내, 또는 비내 투여한다. 유효량의 상기 면역관문 억제제 및 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법을 질병의 예방 또는 치료를 위해 투여할 수 있다. 면역관문 억제제 및/또는 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법의 적합한 투여량을 치료하려는 질병의 유형, 상기 질병의 중증도 및 과정, 개인의 임

상적 상태, 개인의 임상 병력 및 상기 치료에 대한 응답, 및 주치의의 판단을 근거로 결정할 수 있다. 일부 실시태양에서, 적어도 하나의 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체) 및 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법의 병용 치료는 상승작용적이며, 이에 의해 상기 조합 중 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법의 유효 용량이 단일 제제로서 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제(예를 들어 PD-1 축 결합 길항물질 및/또는 CTLA-4 항체)의 유효 용량에 비해 감소된다.

[0192] 예를 들어, 인간에게 투여되는 치료 유효량의 상기 면역관문 억제제, 예를 들어 항체, 및/또는 p53 및/또는 MDA-7 암호화 핵산 또는 그의 발현 구조물은 하나 이상의 투여에 의해 환자 체중의 약 0.01 내지 약 50 mg/kg의 범위일 것이다. 일부 실시태양에서, 상기 사용되는 항체는 예를 들어 매일 약 0.01 내지 약 45 mg/kg, 약 0.01 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 내지 약 35 mg/kg, 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 내지 약 25 mg/kg, 약 0.01 내지 약 20 mg/kg, 약 0.01 내지 약 15 mg/kg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.01 내지 약 1 mg/kg 투여된다. 일부 실시태양에서, 상기 항체는 15 mg/kg으로 투여된다. 그러나, 다른 투여량 섭생이 유용할 수도 있다. 하나의 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 항-PDL1 항체를 인간에게 21-일 주기 중 1일에 약 100 mg, 약 200 mg, 약 300 mg, 약 400 mg, 약 500 mg, 약 600 mg, 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg, 약 1000 mg, 약 1100 mg, 약 1200 mg, 약 1300 mg 또는 약 1400 mg의 용량으로 투여한다. 상기 용량을 단일 용량으로서 또는 수회 용량(예를 들어 2 또는 3회 용량)으로서, 예를 들어 주입으로 투여할 수 있다. 상기 요법의 진행을 통상적인 기법에 의해 용이하게 모니터링한다.

[0193] 종양내 주사, 또는 종양 혈관내 주사가 분리된 고형의 접근 가능한 종양에 대해 구체적으로 고려된다. 국소, 국부 또는 전신 투여가 또한 적합할 수 있다. >4 cm 종양의 경우, 투여되는 부피는 약 4 내지 10 ml(특히 10 ml)일 것인 반면, <4 cm 종양의 경우, 약 1 내지 3 ml(특히 3 ml)의 부피가 사용될 것이다. 단일 용량으로서 전달되는 수회 주사는 약 0.1 내지 약 0.5 ml 부피를 포함한다. 예를 들어, 아데노바이러스 입자를 유리하게는 종양에 수회 주사를 투여함으로써 접촉시킬 수 있다.

[0194] 치료 섭생이 또한 다양할 수 있으며, 이는 종종 종양 유형, 종양 위치, 질병 진행, 및 환자의 건강 및 연령에 따라 변할 수 있다. 명백하게, 몇몇 유형의 종양은 보다 공격적인 치료를 요하는 동시에, 몇몇 환자는 보다 부담이 큰 프로토콜은 견딜 수 없다. 치료학적 제형의 공지된 효능 및 독성(존재하는 경우)을 근거로 상기와 같은 결정을 하는데 의사가 가장 적합할 것이다.

[0195] 몇몇 실시태양에서, 상기 치료되는 종양은 적어도 초기에는 절제 가능하지 않을 수도 있다. 치료학적 바이러스 구조물에 의한 치료는 몇몇 특별히 침습적인 부분의 제거에 의해 또는 가장자리의 수축으로 인해 상기 종양의 절제성을 증가시킬 수 있다. 치료에 이어서, 절제가 가능할 수 있다. 절제에 이은 추가적인 치료는 종양 부위에서의 미시적인 잔여 질병을 제거하는데 도움이 될 것이다.

[0196] 상기 치료는 다양한 "단위 용량"을 포함할 수 있다. 단위 용량은 소정량의 상기 치료학적 조성물을 함유하는 것으로서 정의된다. 투여되는 양, 및 특정 경로 및 제형은 임상 분야의 숙련가의 기술내에 있다. 단위 용량을 단일 주사로서 투여할 필요는 없으며 상기 용량은 지정된 시간에 걸쳐 연속적인 주입을 포함할 수 있다. 본 발명의 단위 용량을 편의상 바이러스 구조물의 경우 플라크 형성 단위(pfu)에 의해 기재할 수 있다. 단위 용량 범위는 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu 이상이다. 한편으로, 바이러스의 종류 및 획득 가능한 역가에 따라, 환자 또는 환자의 세포에 1 내지 100, 10 내지 50, 100-1000, 또는 약 1×10^4 이하, 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 또는 1×10^{15} 이상의 감염성 바이러스 입자(vp)를 전달할 것이다.

[0197] B. 주사성 조성물 및 제형

[0198] 본 발명에서 인간 p53 및 MDA-7 단백질 및/또는 면역관문 억제제(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 구조물의 과증식성 세포로의 전달을 위한 한 가지 방법은 종양내 주사를 통해서이다. 그러나, 본 명세서에 개시된 약학 조성물을 미국특허 제 5,543,158 호, 미국특허 제 5,641,515 호 및 미국특허 제 5,399,363 호에 기재된 바와 같이 비경구, 정맥내, 피내, 근육내, 경피 또는 심지어 복강내로 선택적으로 투여할 수 있다.

[0199] 핵산 구조물의 주사는 상기 발현 구조물이 주사에 필요한 특정 게이지의 바늘을 통과할 수 있는 한, 주사기 또는 용액의 주사에 사용되는 임의의 다른 방법에 의해 전달될 수 있다. 용액을 유지하기 위한 앰플 챔버를 한정하는 노즐 및 상기 용액을 전달 부위로 상기 노즐 밖으로 밀어내기 위한 에너지 장치를 갖는 신규의 무바늘 주사 시스템이 기재되었다(미국특허 제 5,846,233 호). 정확하게 임의의 깊이에서 소정량의 용액을 수회 주사할

수 있게 하는 유전자 요법에 사용하기 위한 주사기 시스템이 또한 기재되었다(미국특허 제 5,846,225 호).

[0200] 유리 염기 또는 약물학적으로 허용 가능한 염으로서 활성 화합물의 용액을 계면활성제, 예를 들어 하이드록시프로필셀룰로스와 적합하게 혼합된 수 중에서 제조할 수 있다. 분산액을 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물 중에서 및 오일 중에서 제조할 수 있다. 통상적인 보관 및 사용 조건하에서, 이들 제제는 미생물의 생육을 방지하기 위해 보존제를 함유한다. 주사용으로 적합한 약제 형태는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다(미국특허 제 5,466,468 호). 모든 경우에 상기 형태는 멸균성이어야 하며 용이한 주사성이 존재할 정도로 유동성이어야 한다. 상기는 제조 및 보관 조건하에서 안정성이어야 하며 미생물, 예를 들어 세균 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적합한 유동성을 예를 들어 코팅제, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지시킬 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 발생할 수 있다. 다수의 경우에, 등장성 작용제, 예를 들어 당 또는 염화 나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 상기 주사성 조성물의 연장된 흡수는 상기 조성물 중에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 발생할 수 있다.

[0201] 수용액 중에서의 비경구 투여를 위해서, 예를 들어 상기 용액을 필요한 경우 적합하게 완충시켜야 하며, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성으로 만들어야 한다. 상기 특정한 수용액은 정맥내, 근육내, 피하, 종양내 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 명세에 비추어 당해 분야의 숙련가들에게 공지될 것이다. 예를 들어, 하나의 투여량을 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시키고 1000 ml의 피하주입액에 가하거나 또는 제안된 주입 부위에 주사한다(예를 들어 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 22nd Edition]을 참조하시오). 치료되는 피실험자의 조건에 따라 투여량의 약간의 변화가 반드시 발생할 것이다. 투여 책임자는 어쨌든 개별 피실험자에 적합한 용량을 결정할 것이다. 더욱이, 인간 투여를 위해서, 제제는 FDA 생물 표준청에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 충족시켜야 한다.

[0202] 멸균 주사성 용액을, 적합한 용매 중에서 필요에 따라 상기에 열거된 다양한 다른 성분들과 필요량의 활성 화합물을 혼합한 다음 여과 멸균시킴으로써 제조한다. 일반적으로, 다양한 멸균된 활성 성분을, 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼합시킴으로써 분산액을 제조한다. 멸균 주사성 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 상기 활성 성분 + 앞서 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가적인 목적하는 성분의 분말을 제공하는 진공-건조 및 동결-건조 기법이다.

[0203] 본 명세서에 개시된 조성물을 중성 또는 염 형태로 제형화할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 산부가염(단백질의 유리 아미노기와 형성된)을 포함하며, 무기산, 예를 들어 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 옥살산, 타타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 형성된다. 유리 카복실기와 형성된 염은 또한 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 철 수산화물과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다. 제형화시, 용액을 상기 투여량 제형과 상용성인 방식으로 및 치료학적으로 유효한 양으로 투여할 것이다. 상기 제형을 다양한 투여형으로, 예를 들어 주사성 용액, 약물 방출 캡슐 등으로 용이하게 투여한다.

[0204] C. 추가적인 항암 요법

[0205] 상기 p53 및/또는 MDA-7 핵산 및 적어도 하나의 면역관문 억제제의 유효성을 증가시키기 위해서, 이들을 암의 치료에 유효한 적어도 하나의 추가적인 작용제와 병용할 수 있다. 보다 일반적으로, 이들 다른 조성물을 상기 세포를 살해하거나 상기 세포의 증식을 억제하기에 유효한 총량으로 제공할 것이다. 상기 과정은 상기 세포를 발현 구조물 및 상기 작용제(들) 또는 다수의 인자(들)와 동시에 접촉시킴을 포함할 수 있다. 이를, 상기 세포를 상기 두 작용제를 모두 포함하는 단일 조성물 또는 약물학적 제형과 접촉시키거나, 또는 상기 세포를 2개의 별도의 조성물 또는 제형(여기에서 하나의 조성물은 상기 발현 구조물을 포함하고 다른 것은 제2 작용제(들)를 포함한다)과 동시에 접촉시킴으로써 성취할 수 있다. 한편으로, 상기 발현 구조물은 상기 증식 세포와 접촉할 수 있고 상기 추가적인 요법은 항-종양 면역 응답 및 치료 효능을 증대시키기 위해 면역계의 다른 세포 또는 종양 미세환경에 영향을 미칠 수 있다. 상기 적어도 하나의 추가적인 항암 요법은 비제한적으로 수술요법, 화학요법(예를 들어 단백질 키나제 억제제 또는 EGFR-표적화된 요법의 투여), 방사선요법, 냉동요법, 발열요법, 광선요법, 고주파열제술, 호르몬요법, 면역요법, 소분자요법, 수용체 키나제 억제제 요법, 혈관형성방지술, 사이

토킨 요법 또는 생물학적 요법, 예를 들어 단클론 항체, siRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 유전자 요법일 수 있다. 비제한적으로 상기 생물학적 요법은 유전자요법, 예를 들어 종양 억제 유전자 요법, 세포사 단백질 유전자 요법, 세포주기 조절 유전자 요법, 사이토킨 유전자 요법, 독소 유전자 요법, 면역원 요법, 자살 유전자 요법, 전구약물 유전자 요법, 항-세포증식 유전자 요법, 효소 유전자 요법, 또는 혈관형성 방지 인자 유전자 요법일 수 있다.

[0206] 상기 유전자 요법은 수분에서 수주 범위의 간격에 의해 다른 작용제 치료에 선행하거나 후행할 수 있다. 상기 다른 작용제 및 발현 구조물을 세포에 별도로 적용하는 실시태양에서, 일반적으로 각 전달 시간 사이에 상당한 기간이 만료되지 않도록 하였으며, 따라서 상기 작용제 및 발현 구조물은 여전히 상기 세포에 대해 유리한 복합 효과를 발휘할 수 있을 것이다. 상기와 같은 경우에, 상기 세포를 서로 약 12 내지 24시간 이내에, 및 보다 바람직하게는 서로 약 6 내지 12시간 이내에 상기 두 양상 모두로 접촉시킬 수 있는 것으로 생각된다. 일부 상황에서, 상기 치료 기간을 연장시키는 것이 바람직할 수 있으나, 각 투여 사이에 수일(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6 또는 7) 내지 수주일(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)이 경과하는 것이 바람직할 수 있다.

[0207] 다양한 조합들이 사용될 수 있으며, 유전자 요법 및 면역관문 억제제는 "A"이고, 2차 작용제, 즉 화학요법은 "B"이다.

[0208] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0209] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0210] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0211] 1. 화학요법

[0212] 암 요법은 일반적으로 화학 및 방사선 기반 치료 둘 다에 의한 다양한 병용 요법을 또한 포함한다. 병용 화학 요법은 예를 들어 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 피코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스테로젠 수용체 결합제, 탁솔, 켄시타빈, 나벨빈, 파메실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토트렉세이트, 테마졸로미드(DTIC의 수성 형태), 또는 이들의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체를 포함한다. 상기 화학요법과 생물학적 요법의 조합은 생화학요법으로서 공지된다. 상기 화학요법을 또한 메트로노믹 화학요법으로서 공지된 연속적인 저 용량으로 투여할 수 있다.

[0213] 더욱 추가의 병용 화학요법은 예를 들어 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토제닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘뤼테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰지스타틴; 질소 머스터드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라머스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니머스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스터드; 니트로소우레아, 예를 들어 카머스틴, 클로로조토신, 포테머스틴, 로머스틴, 니머스틴, 및 라님너스틴; 항생제, 예를 들어 에네딘 항생제(예를 들어 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감마II 및 칼리키아미신 오메가I1; 디네미신, 예를 들어 디네미신 A; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키노스타틴 크로모포어 및 관련된 크로모단백질 에네딘 항생제 크로모포어, 아클라시노마이신, 액티노마이신, 오프라르니신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라르니신, 올리보마이신, 펄플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 대사길항물질, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어 테노프테린, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티

딘, 6-아자유리딘, 카르모푸어, 시타라빈, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록슈리딘; 안드로젠, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들어 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미탄; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK 폴리사카라이드 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테세네스(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다칼바진; 만노머스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피로프로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어 패클리탁셀 및 도세탁셀 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토프린; 백금 배위 착체, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 플라티늄; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에타트랙세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예를 들어 CPT-11); 국소이성화효소 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카바진, 플리코마이신, 쟈시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스플라티늄; 및 이들 중 어느 하나의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 조성물을 히스톤 데아세틸라제 억제제와 함께 사용할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 조성물을 제피티니브와 함께 사용할 수 있다. 다른 실시태양에서, 본 실시태양을 글리벡과 함께 실시할 수 있다(예를 들어 약 400 내지 약 800 mg/일의 글리벡을 환자에게 투여할 수 있다). 몇몇 실시태양에서, 하나 이상의 화학요법제를 본 명세서에 제공된 조성물과 함께 사용할 수 있다.

[0214] 2. 방사선요법

[0215] DNA 손상을 야기하고 광범위하게 사용된 다른 인자들로는 γ -선으로서 통상적으로 공지된 것, X-선 및/또는 방사성동위원소의 종양 세포로의 직접적인 전달이 있다. 다른 형태의 DNA 손상 인자, 예를 들어 극초단파 및 UV-조사가 또한 공지되어 있다. 가장 그럴듯하게는 이들 인자 모두 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 수복, 및 염색체의 조립 및 유지에 광범위한 손상을 수행하는 듯하다. X-선에 대한 투여량 범위는 연장된 기간(3 내지 4주) 동안 50 내지 200 린트겐의 1일 용량에서부터 2000 내지 6000 린트겐의 단일 용량까지이다. 방사성동위원소에 대한 투여량 범위는 광범위하게 다양하며, 상기 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 따라 변한다.

[0216] 3. 면역요법

[0217] 면역요법은 일반적으로, 암세포를 표적화하고 파괴하기 위한 면역 효과기 세포 및 분자의 용도에 따라 변한다. 상기 면역 효과기는 예를 들어 종양 세포 표면상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 상기 항체는 단독으로 치료법의 효과기로서 작용하거나 또는 세포 살해를 실제로 수행하기 위해 다른 세포들을 모집할 수 있다. 상기 항체는 또한 약물 또는 독소(화학요법제, 방사성핵종, 리신 A 쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합되며 단지 표적화제로서 작용할 수 있다. 한편으로, 상기 효과기는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 갖는 림프구일 수 있다. 다양한 효과기 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포뿐만 아니라 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 이들 세포 유형의 유전자 조작된 변이체를 포함한다. 종양 세포로의 Mda-7 유전자 전달은 종양 세포사 및 세포사멸을 일으킨다. 상기 세포사멸성 종양 세포는 수지상 세포 및 대식세포를 포함한 망내계 세포에 의해 제거되며 면역계에 제공되어 항-종양 면역성을 생성시킨다(Rovere et al., 1999; Steinman et al., 1999).

[0218] 다른 상보성 면역요법을 상술한 섭생들에 가하여 그들의 효능을 추가로 증대시킬 수 있음, 예를 들어 비제한적으로 GM-CSF를 가하여 골수 유래된 내재 면역계 세포의 수를 증가시키고, 저 용량의 사이클로포스파미드 또는 PI3K 억제제(예를 들어 PI3K 델타 억제제)를 가하여 내재 및 적응 면역성을 억제하는 T 조절 세포를 제거하고, 5FU(예를 들어 카페시타빈), PI3K 억제제 또는 히스톤 데아세틸라제 억제제를 가하여 억제성 골수 유래된 억제 세포를 제거할 수 있음을 암 면역요법 분야의 숙련가들이 알 것이다. 예를 들어, PI3K 억제제는 비제한적으로 LY294002, 페리포신, BKM120, 듀벨리십, PX-866, BAY 80-6946, BEZ235, SF1126, GDC-0941, XL147, XL765, 팔로미드 529, GSK1059615, PWT33597, IC87114, TG100-15, CAL263, PI-103, GNE-477, CUDC-907, 및 AEZS-136을 포함한다. 일부 태양에서, 상기 PI3K 억제제는 PI3K 델타 억제제, 예를 들어 비제한적으로 이텔라리십, RP6530, TGR1202, 및 RP6503이다. 추가적인 PI3K 억제제는 미국특허 출원 US20150291595, US20110190319, 및

국제특허 출원 WO2012146667, WO2014164942, WO2012062748, 및 WO2015082376에 개시되어 있다. 상기 면역요법은 또한 인터류킨, 예를 들어 IL-2, 또는 인터페론, 예를 들어 INF α 의 투여를 포함할 수 있다.

[0219] 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법 및 면역관문 억제제와 병용될 수 있는 면역요법의 예는 면역 항원보강제(예를 들어 마이코박테리움 보비스, 플라스모디움 팔시파룸, 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물)(미국특허 제 5,801,005 호; 미국특허 제 5,739,169 호; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), 사이토킨 요법(예를 들어 인터페론 α , β 및 γ ; 인터류킨(IL-1, IL-2), GM-CSF 및 TNF)(Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998) 유전자 요법(예를 들어 TNF, IL-1, IL-2, p53)(Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국특허 제 5,830,880 호 및 미국특허 제 5,846,945 호) 및 단클론 항체(예를 들어 항-강글리노시드 GM2, 항-HER-2, 항-p185)(Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; 미국특허 제 5,824,311 호)이다. 허셉틴(트라스투주맵)은 HER2-neu 수용체를 차단하는 키메릭(마우스-인간) 단클론 항체이다. 상기는 항-종양 활성을 가지며 악성 종양의 치료에 대한 사용이 승인되었다(Dillman, 1999). 허셉틴 및 화학요법과의 암의 병용 요법은 개별 요법보다 더 유효한 것으로 나타났다. 따라서, 하나 이상의 항암 요법을 본 명세서에 기재된 Ad-mda7 요법과 함께 사용할 수 있음이 고려된다.

[0220] 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법 및 면역관문 억제제와 병용될 수 있는 추가적인 면역요법은 보조-자극 수용체 작용물질, 내재 면역세포의 자극제, 또는 내재 면역성의 활성제를 포함한다. 상기 보조-자극 수용체 작용물질은 항-OX40 항체(예를 들어 MEDI6469, MEDI6383, MEDI0562, 및 MOXR0916), 항-GITR 항체(예를 들어 TRX518, 및 MK-4166), 항-CD137 항체(예를 들어 우렐루맵, 및 PF-05082566), 항-CD40 항체(예를 들어 CP-870,893, 및 Chi Lob 7/4), 또는 항-CD27 항체(예를 들어 발릴루맵, 또한 CDX-1127로서 공지됨)일 수 있다. 내재 면역 세포의 자극제는 비제한적으로 KIR 단클론 항체(예를 들어 릴릴루맵), 세포독성-억제 수용체의 억제제(예를 들어 NKG2A, 또한 KLRC 및 CD94로서 공지됨, 예를 들어 단클론 항체 모날리주맵, 및 항-CD96, 또한 TACTILE로서 공지됨), 및 toll형 수용체(TLR) 작용물질을 포함한다. 상기 TLR 작용물질은 BCG, TLR7 작용물질(예를 들어 폴리OICLC, 및 이미퀴모드), TLR8 작용물질(예를 들어 레시퀴모드), 또는 TLR9 작용물질(예를 들어 CPG 7909)일 수 있다. 내재 면역 세포, 예를 들어 천연 살해(NK) 세포, 대식세포, 및 수지상 세포의 활성제는 IDO 억제제, TGF β 억제제, IL-10 억제제를 포함한다. 내재 면역성의 예시적인 활성제는 인독시모드(Indoximod)이다. 일부 태양에서, 상기 면역요법은 인터페론 유전자(STING) 작용물질의 자극제이다(Corrales et al., 2015).

[0221] 본 명세서의 방법들에 사용하기 위해 고려되는 다른 면역요법은 문헌[Tchekmedyian et al., 2015](본 발명에 참고로 인용된다)에 기재된 것들을 포함한다. 상기 면역요법은 T 조절 세포(Treg), 골수 유래된 억제 세포(MDSC) 및 암 관련 섬유아세포(CAF)의 억제를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 면역요법은 종양 백신(예를 들어 완전 종양 세포 백신, 펩티드, 및 재조합 종양 관련 항원 백신), 또는 입양 세포 요법(ACT)(예를 들어 T 세포, 자연살해세포, TIL 및 LAK 세포)이다. 상기 T 세포를 특이적인 종양 항원에 대한 키메릭 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)로 조작할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 키메릭 항원 수용체(또는 CAR)는, T 세포에서 발현시 상기 T 세포상에 CAR의 특이성을 부여하는 관심 항원에 특이적인 임의의 조작된 수용체를 지칭할 수 있다. 일단 표준 분자 기법을 사용하여 생성되었으면, 키메릭 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 입양 세포 전달과 같은 기법에 의해서와 같이 환자에게 도입시킬 수 있다. 일부 태양에서, 상기 T 세포는 γ -IFN 생성 CD4 및/또는 CD8 T 세포 및/또는 상기 조합의 투여 이전에 비해 증대된 세포용해 활성을 특징으로 하는 개인에서 활성화된 CD4 및/또는 CD8 T 세포이다. 상기 CD4 및/또는 CD8 T 세포는 IFN- γ , TNF- α 및 인터류킨으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 사이토킨의 증가된 방출을 나타낼 수 있다. 상기 CD4 및/또는 CD8 T 세포는 효과기 기억 T 세포일 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 CD4 및/또는 CD8 효과기 기억 T 세포는 CD44^{high}CD62L^{low}의 발현을 가짐을 특징으로 한다.

[0222] 몇몇 태양에서, 2개 이상의 면역요법을 상기 p53 및/또는 MDA-7 유전자 요법, 및 추가적인 면역관문 억제제와 T-세포 보조자극 수용체의 작용물질과의 병용, 또는 TIL ACT와의 병용을 포함하는 면역관문 억제제와 병용할 수 있다. 다른 조합은 T-세포 관문 봉쇄 + 보조자극 수용체 작용물질, 내재 면역 세포 기능을 개선시키기 위한 T-세포 관문 봉쇄, 관문 봉쇄 + IDO 억제, 또는 관문 봉쇄 + 입양 T-세포 전달을 포함한다. 몇몇 태양에서, 면역요법은 항-PD-L1 면역관문 억제제(예를 들어 아벨루맵), 4-1BB(CD-137) 작용물질(예를 들어 유토밀루맵) 및 OX40(TNFRS4) 작용물질의 조합을 포함한다. 상기 면역요법을 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 예를 들어 5-아자시티딘 및 엔티노스태트와 병용할 수 있다.

[0223] 상기 면역요법은 하나 이상의 암 항원, 특히 그의 단백질 또는 면역원성 단편, 상기 암 항원을 암호화하는 DNA 또는 RNA, 특히 그의 단백질 또는 면역원성 단편, 암세포 용해물, 및/또는 종양 세포로부터의 단백질 제제를 포

함하는 암 백신일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 암 항원은 암세포 중에 존재하는 항원성 물질이다. 원칙적으로, 돌연변이로 인한 이상 구조를 갖는 암세포에서 생성되는 임의의 단백질은 암 항원으로서 작용할 수 있다. 원칙적으로, 암 항원은 돌연변이된 종양유전자 및 종양 억제 유전자의 생성물, 다른 돌연변이된 유전자의 생성물, 과발현되거나 이상 발현된 세포 단백질, 종양형성 바이러스에 의해 생성된 암 항원, 태아성 암 항원, 변형된 세포 표면 당지질 및 당단백질, 또는 세포 유형-특이성 분화 항원일 수 있다. 암 항원의 예는 ras 및 p53 유전자의 이상 생성물을 포함한다. 다른 예는 조직 분화 항원, 돌연변이 단백질 항원, 종양형성 바이러스 항원, 암-고환 항원 및 혈관 또는 기질 특이성 항원을 포함한다. 조직 분화 항원은 몇몇 유형의 조직에 특이적인 것들이다. 돌연변이 단백질 항원은, 정상 세포가 상기 단백질을 함유해서는 안되기 때문에 암세포에 훨씬 더 특이적인 듯하다. 정상 세포는 그의 MHC 분자상에 정상 단백질 항원을 나타낼 것인 반면, 암세포는 돌연변이체 버전을 나타낼 것이다. 일부 바이러스 단백질이 암 형성에 관련되며, 일부 바이러스 항원도 또한 암 항원이다. 암-고환 항원은 고환의 생식세포에서 주로, 그러나 태아 난소 및 영양막에서도 발현되는 항원이다. 일부 암세포는 이들 단백질을 이상 발현하며 따라서 이들 항원을 제공하여, 이들 항원에 특이적인 T-세포에 의한 공격을 허용한다. 이러한 유형의 예시적인 항원은 CTAG1 B 및 MAGEA1뿐만 아니라 린도페피무트(Rindopepimut), 표피 성장 인자 수용체(EGFR) v111 변이체에 대해 표적화된 14-머 피내 주사성 펩티드 백신이다. 린도페피무트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 CD95/CD95L 신호전달 시스템의 억제제와 함께 사용될 때 교모세포종의 치료에 특히 적합하다. 또한, 통상적으로 매우 낮은 양으로 생성되지만 암세포에서는 그의 생성이 대단히 증가하는 단백질이 면역 반응을 촉발시킬 수 있다. 상기와 같은 단백질의 일례는 효소 티로시나제이며, 이는 멜라닌 생성에 필요하다. 통상적으로 티로시나제는 미미한 양으로 생성되나 흑색종 세포에서 그의 수준은 매우 많이 상승된다. 태아종양 항원이 암 항원의 또 다른 중요한 부류이다. 예는 알파태아단백질(AFP) 및 암 태아성 항원(CEA)이다. 이들 단백질은 통상적으로 배발생의 초기 단계에서 생성되며 면역계가 완전히 발생될 때까지는 사라진다. 따라서 자기-관용이 이들 항원에 대해 발생하지 않는다. 이상 단백질이 또한 종양바이러스, 예를 들어 EBV 및 HPV로 감염된 세포에 의해 생성된다. 이들 바이러스에 의해 감염된 세포는 잠복성 바이러스 DNA를 함유하며, 이는 전사되고 생성 단백질은 면역 반응을 생성시킨다. 암 백신은 펩티드 암 백신을 포함할 수 있으며, 상기 백신은 일부 실시태양에서 맞춤형 펩티드 백신이다. 일부 실시태양에서, 상기 펩티드 암 백신은 다가의 긴 펩티드 백신, 다중-펩티드 백신, 펩티드 콕테일 백신, 하이브리드 펩티드 백신, 또는 펩티드-펄스화된 수지상 세포 백신이다.

[0224] 상기 면역요법은 항체, 예를 들어 다클론 항체 제제의 부분이거나, 또는 단클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 인간화된 항체, 키메라 항체, 항체 단편, 이중특이성 항체 또는 단쇄 항체일 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체는 항체 단편, 예를 들어 비제한적으로 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 디설파이드-결합된 Fvs(sdfv) 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편을 포함한다. 일부 태양에서, 상기 항체 또는 그의 단편은 상피 성장인자 수용체(EGFR1, Erb-B1), HER2/neu(Erb-B2), CD20, 혈관내피 성장인자(VEGF), 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGF-1R), TRAIL-수용체, 상피세포 부착 분자, 암태아성 항원, 전립선-특이성 막항원, 뮤신-1, CD30, CD33 또는 CD40과 특이적으로 결합한다.

[0225] 본 명세서에 제공된 조성물과 함께 사용될 수 있는 단클론 항체의 예는 비제한적으로 트라스투주맵(항-HER2/neu 항체); 페르투주맵(항-HER2 mAb); 세투시맵(상피 성장인자 수용체 EGFR에 대한 키메라 단클론 항체); 파니투주맵(항-EGFR 항체); 니모투주맵(항-EGFR 항체); 잘루투주맵(항-EGFR mAb); 네시투주맵(항-EGFR mAb); MDX-210(인간화된 항-HER-2 이중특이성 항체); MDX-210(인간화된 항-HER-2 이중특이성 항체); MDX-447(인간화된 항-EGF 수용체 이중특이성 항체); 리톡시맵(키메라 쥐/인간 항-CD20 mAb); 오비누투주맵(항-CD20 mAb); 오파투주맵(항-CD20 mAb); 토시투주맵-I131(항-CD20 mAb); 이브리투모맵 티옥세탄(항-CD20 mAb); 베바시주맵(항-VEGF mAb); 라무시루맵(항-VEGFR2 mAb); 라니비주맵(항-VEGF mAb); 아플리베르셉트(IgG1 Fc에 융합된 VEGFR1 및 VEGFR2의 세포외 도메인); AMG386(IgG1 Fc에 융합된 안지오프로테아제-1 및 -2 결합 펩티드); 달로투주맵(항-IGF-1R mAb); 켈투주맵 오조가미신(항-CD33 mAb); 알렘투주맵(항-카스파스-1/CD52 mAb); 브렌투시맵 베도틴(항-CD30 mAb); 카투막소맵(상피세포 부착 분자 및 CD3을 표적화하는 이중특이성 mAb); 나프투모맵(항-5T4 mAb); 지렌투시맵(항-카보닉 안하이드라제 ix); 또는 파레투주맵(항-폴레이트 수용체)를 포함한다. 다른 예는 파노렉스(Panorex)(상표)(17-1A)(쥐 단클론 항체); 파노렉스(17-1A)(키메라 쥐 단클론 항체); BEC2(ami-유전자형 mAb, GD 에피토프를 모방한다)(BCG와 함께); 온콜림(Oncolym)(Lym-1 단클론 항체); SMART M195 Ab, 인간화된 13' 1 LYM-1(온콜림), 오바렉스(Ovarex)(B43.13, 항-유전자형 마우스 mAb); 선암종상의 EGP40(17-1A) 범암종 항원에 결합하는 3622W94mAb; 제나팍스(Zenapax)(SMART Anti-Tac(IL-2 수용체); SMART M195 Ab, 인간화된 Ab, 인간화된); NovoMAB-G2(범암종 특이성 Ab); TNT(히스톤 항원에 대한 키메라 mAb); TNT(히스톤 항원에 대한 키메라 mAb); 글리오맵-H(단클론성-인간화된 Ab); GNI-250 Mab; EMD-72000(키메라-EGF 결합물질); LymphoCide(인간

화된 IL.L.2 항체); 및 MDX-260 이중특이성, 표적 GD-2, ANA Ab, SMART IDIO Ab, SMART ABL 364 Ab 또는 ImmurAIT-CEA와 같은 항체를 포함한다. 항체의 예는 미국특허 제 5,736,167 호, 미국특허 제 7,060,808 호 및 미국특허 제 5,821,337 호에 개시된 것들을 포함한다.

[0226] 항체의 추가의 예는 자눌리뮤맵(항-CD4 mAb), 켈릭시맵(항-CD4 mAb); 이필리뮤맵(MDX-101; 항-CTLA-4 mAb); 트레밀리뮤맵(항-CTLA-4 mAb); (다클리주맵(항-CD25/IL-2R mAb); 바실릭시맵(항-CD25/IL-2R mAb); MDX-1106 (항-PD1 mAb); GITR에 대한 항체; GC1008 (항-TGF- β 항체); 메텔리뮤맵/CAT-192(항-TGF- β 항체); 레르텔리뮤맵/CAT-152(항-TGF- β 항체); ID11(항-TGF- β 항체); 데노수맵(항-RANKL mAb); BMS-663513(인간화된 항-4-1BB mAb); SGN-40(인간화된 항-CD40 mAb); CP870,893(인간 항-CD40 mAb); 인플릭시맵(키메릭 항-TNF mAb); 아달리뮤맵(인간 항-TNF mAb); 세르톨리주맵(인간화된 Fab 항-TNF); 골리뮤맵(항-TNF); 에타너셉트(IgG1 Fc에 융합된 TNFR의 세포외 도메인); 벨라타셉트(Fc에 융합된 CTLA-4의 세포외 도메인); 아바타셉트(Fc에 융합된 CTLA-4의 세포외 도메인); 벨리뮤맵(항-B 림프구 자극제); 뮤로모넵-CD3(항-CD3 mAb); 오텔릭시주맵(항-CD3 mAb); 테폴리주맵(항-CD3 mAb); 토실리주맵(항-IL6R mAb); REGN88(항-IL6R mAb); 우스테키누맵(항-IL-12/23 mAb); 브리아키누맵(항-IL-12/23 mAb); 나탈리주맵(항- α 4 인테그린); 베돌리주맵(항- α 4 β 7 인테그린 mAb); T1 h(항-CD6 mAb); 에프라투주맵(항-CD22 mAb); 에팔리주맵(항-CD11a mAb); 및 아타시셉트(Fc와 융합된 막관통 활성제 및 칼슘-조절 리간드 상호작용제의 세포외 도메인)를 포함한다.

[0227] a. 수동 면역요법

[0228] 암의 수동 면역요법에 대한 다수의 상이한 접근법들이 존재한다. 이들은 하기로 광범위 분류될 수 있다: 항체 단독 주사; 독소 또는 화학요법제와 결합된 항체의 주사; 방사성 동위원소와 결합된 항체의 주사; 항-유전자형 항체의 주사; 및 최종적으로 골수 중 종양 세포의 피징.

[0229] 바람직하게, 인간 단클론 항체가 환자에서 부작용이 거의 또는 전혀 없기 때문에 수동 면역요법에 사용된다. 강글리오시드 항원에 대한 인간 단클론 항체가 피부 재발성 흑색종을 앓고 있는 환자에게 병변내 투여되었다(Irie & Morton, 1986). 매일 또는 매주 병변내 주사에 이어서 10명의 환자 중 6명에서 역행이 관찰되었다. 또 다른 연구에서, 2개의 인간 단클론 항체의 병변내 주사로부터 온건한 성공이 성취되었다(Irie et al., 1989).

[0230] 2개의 상이한 항원에 대한 하나 초과인 단클론 항체 또는 심지어 다중 항원 특이성을 갖는 항체를 투여하는 것이 유리할 수 있다. 치료 프로토콜은 또한 문헌[Bajorin et al.(1988)]에 기재된 바와 같이 림포킨 또는 다른 면역 인핸서의 투여를 포함할 수 있다. 인간 단클론 항체의 발생이 명세서의 다른 어딘가에 추가로 상세히 기재된다.

[0231] b. 능동 면역요법

[0232] 능동 면역요법에서, 항원성 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 또는 자가유래 또는 동종이계 종양 세포 조성물 또는 "백신"을 일반적으로 별도의 세균 항원보강제와 함께 투여한다(Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindranath, 1996; Morton et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Mitchell et al., 1993). 흑색종 면역요법에서, 높은 IgM 응답을 이끌어내는 환자들은 종종 IgM 항체를 이끌어내지 않거나 낮게 이끌어내는 환자보다 더 양호하게 생존한다(Morton et al., 1992). IgM 항체는 종종 일시적인 항체이며 상기 법칙에 대한 예외는 항-강글리오시드 또는 항탄수화물 항체인 것으로 보인다.

[0233] c. 입양 면역요법

[0234] 입양 면역요법에서, 상기 환자의 순환하는 림프구 또는 종양 침윤된 림프구를 시험관내에서 단리하고, 림포킨, 예를 들어 IL-2에 의해 활성화시키거나, 종양 괴사 유전자로 형질도입시키고, 재투여한다(Rosenberg et al., 1988; 1989). 이를 성취하기 위해서, 동물, 또는 인간 환자에게 면역학적 유효량의 활성화된 림프구를 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원보강제-통합된 항원성 펩티드 조성물과 함께 투여할 것이다. 상기 활성화된 림프구는 가장 바람직하게는 혈액 또는 종양 샘플로부터 보다 일찍 단리되고 시험관내에서 활성화된(또는 "확대된") 상기 환자 자신의 세포일 것이다. 이러한 형태의 면역요법은 흑색종 및 신장 암종의 다수의 역행 사례를 생성시켰으나, 응답자의 비율은 응답하지 않은 경우에 비해 극히 적었다. 보다 최근에, 상기와 같은 입양 면역 세포 요법을 CAR T 세포 요법이라 칭하는 키메릭 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자 조작된 T 세포와 통합시켰을 때 보다 높은 응답률이 관찰되었다. 유사하게, 자가유래 및 동종이계 모두의 자연살해 세포가 단리되고, 확대되고, 수용체 또는 리간드를 발현하도록 유전자 변형되어 종양 세포의 결합 및 살해를 촉진하였다.

[0235] 4. 다른 작용제

[0236] 다른 작용제들을 본 명세서에 제공된 조성물과 함께 사용하여 치료의 치료학적 효능을 개선시킬 수 있음이 고려된다. 이들 추가적인 작용제는 면역조절제, 세포 표면 수용체 및 GAP 연결의 상향조절에 영향을 미치는 작용제, 세포증식 억제 및 분화제, 세포 부착의 억제제, 또는 세포사멸 유도제에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 작용제를 포함한다. 면역조절제는 종양 괴사 인자; 인터페론 알파, 베타 및 감마; IL-2 및 다른 사이토킨; F42K 및 다른 사이토킨 유사체; 또는 MIP-1, MIP-1베타, MCP-1, RANTES 및 다른 케모킨을 포함한다. 세포 표면 수용체 또는 그의 리간드, 예를 들어 Fas/Fas 리간드, DR4 또는 DR5/TRAIL의 상향조절이 과증식성 세포에 대한 자가분배 또는 주변분비 효과의 확립에 의해 본 명세서에 제공된 조성물의 세포사멸 유도 능력을 강화할 것임이 추가로 고려된다. GAP 연결수의 상승에 의한 세포간 신호전달의 증가는 이웃하는 과증식성 세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 실시태양에서, 세포증식 억제 또는 분화제를 본 명세서에 제공된 조성물과 함께 사용하여 상기 치료의 항-과증식성 효능을 개선시킬 수 있다. 세포 부착의 억제제가 본 발명의 효능을 개선시키는 것으로 생각된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소부착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 세포사멸에 대한 과증식성 세포의 감수성을 증가시키는 다른 작용제, 예를 들어 항체 c225를 본 명세서에 제공된 조성물과 함께 사용하여 치료 효능을 개선시킬 수 있음이 추가로 고려된다.

[0237] 추가의 실시태양에서, 상기 다른 작용제는 p53 및/또는 IL24, 예를 들어 사이토킨 이외의 유전자를 발현하도록 조작된 항암 바이러스와 같은 하나 이상의 항암 바이러스일 수 있다. 항암 바이러스의 예는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 우두 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 폴리오 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 레오바이러스를 포함한다. 특정한 실시태양에서, 상기 다른 작용제는 GM-CSF를 발현하도록 유전자 조작된 항암 헤르페스 단순 바이러스인 탈리모젠 라허파렙백(T-VEC)이다. 탈리모젠 라허파렙백, HSV-1[균주 JS1] ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF(앞서 OncoVEX^{GM-CSF}으로서 공지됨)는 고형 종양에서 선택적으로 복제하는 면역-증대된 HSV-1을 포함하는 종양내 전달된 항암 면역요법이다(Lui *et al.*, *Gene Therapy*, 10:292-303, 2003; 미국특허 제 7,223,593 호 및 미국특허 제 7,537,924 호(본 발명에 참고로 인용된다)). 2015년 10월에, 미국 FDA는 T-VEC를 상표명 IMLYGIC(상표)하에 수술할 수 없는 종양이 있는 환자에서 흑색종 치료에 승인하였다. T-VEC의 특성 및 투여 방법이 예를 들어 IMLYGIC(상표) 패키지 삽입지(암젠(Amgen), 2015) 및 미국특허 공보 US2015/0202290에 기재되어 있으며, 이 둘은 모두 본 발명에 참고로 인용된다. 예를 들어, 탈리모젠 라허파렙백을 전형적으로는 제1주의 제1일에 4.0 ml 이하의 10^6 플라크 형성 단위/ml(PFU/ml)의 용량에 이어서 제4주의 제1일 및 그 후 매 2주마다(± 3 일) 4.0 ml 이하의 10^8 PFU/ml의 용량을 주사 가능한 피부, 피하, 및 결절 종양에 종양내 주사에 의해 투여한다. 종양(들)내에 주사되는 탈리모젠 라허파렙백의 권장 부피는 상기 종양(들)의 크기에 따라 변하며, 주사 부피 지침에 따라 결정되어야 한다. T-VEC가 흑색종 환자에서 임상 활성이 입증되었지만, 다수의 암 환자들은 T-VEC 치료에 응답하지 않거나 상기에 대한 응답을 멈추었다. 하나의 실시태양에서, 상기 p53 및/또는 MDA-7 핵산 및 적어도 하나의 면역관문 억제제를 예를 들어 치료 내성을 역전시키기 위해 T-VEC 요법 후, 상기 요법 도중 또는 상기 요법 전에 투여할 수 있다. 예시적인 항암 바이러스는 비제한적으로 Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, 카바탁(Cavatak)(상표), CG0070, DNX-2401, G207, HF10, IMLYGIC(상표), JX-594, MG1-MA3, MV-NIS, OBP-301, 레오리신(Reolysin)(등록상표), 토카(Toca) 511, 온코린, 및 RIGVIR을 포함한다. 다른 예시적인 항암 바이러스는 예를 들어 국제특허 공보 W02015/027163, W02014/138314, W02014/047350, 및 W02016/009017(이들은 모두 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.

[0238] 몇몇 실시태양에서, 호르몬 요법을 또한 본 실시태양들과 함께 또는 앞서 기재된 임의의 다른 암 요법과 함께 사용할 수 있다. 호르몬의 사용은 몇몇 호르몬, 예를 들어 테스토스테론 또는 에스트로겐의 수준을 낮추거나 또는 상기 효과를 차단하기 위해 몇몇 암, 예를 들어 유방, 전립선, 난소 또는 경부암의 치료에 사용될 수 있다. 상기 치료는 종종 치료 선택권으로서 또는 전이의 위험을 감소시키기 위해 적어도 하나의 다른 암 요법과 함께 사용된다.

[0239] 일부 태양에서, 상기 추가적인 항암제는 단백질 키나제 또는 성장인자 신호전달 경로에 관련된 수용체를 억제하는 단백질 키나제 억제제 또는 단클론 항체, 예를 들어 EGFR, VEGFR, AKT, Erb1, Erb2, ErbB, Syk, Bcr-Abl, JAK, Src, GSK-3, PI3K, Ras, Raf, MAPK, MAPKK, mTOR, c-Kit, eph 수용체 또는 BRAF 억제제이다. 단백질 키나제 또는 성장인자 신호전달 경로 억제제의 비제한적인 예는 아파티니브, 악시티니브, 베바시주맵, 보수티니브, 세톡시맵, 크리조티니브, 다사티니브, 에를로티니브, 포스타마티니브, 제피티니브, 이마티니브, 라파티니브, 렌바티니브, 무브리티니브, 닐로티니브, 파니투무맵, 파조파니브, 페가프타니브, 라니비주맵, 루소리

티니브, 사라카티니브, 소라페니브, 수니티니브, 트라스투주맵, 반데타니브, AP23451, 베무라페니브, MK-2206, GSK 690693, A-443654, VQD-002, 밀테포신, 페리포신, CAL101, PX-866, LY294002, 라파마이신, 템시롤리무스, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 알보시티브, 제니스테인, 셀루메티니브, AZD-6244, 바탈라니브, P1446A-05, AG-024322, ZD1839, P276-00, GW572016, 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0240]

일부 태양에서, 상기 PI3K 억제제는 부파르리시브, 이렐라리시브, BYL-719, 닥토리시브, PF-05212384, 픽틸리시브, 코판리시브, 코판리시브 디하이드로클로라이드, ZSTK-474, GSK-2636771, 두베리시브, GS-9820, PF-04691502, SAR-245408, SAR-245409, 소노리시브, 알렉신, GDC-0032, GDC-0980, 아피토리시브, 필라라리시브, DLBS 1425, PX-866, 복스타리시브, AZD-8186, BGT-226, DS-7423, GDC-0084, GSK-21 26458, INK-1 1 17, SAR-260301, SF-1 1 26, AMG-319, BAY-1082439, CH-51 32799, GSK-2269557, P-71 70, PWT-33597, CAL-263, RG-7603, LY-3023414, RP-5264, RV-1729, 타세리시브, TGR-1 202, GSK-418, INCB-040093, 파누리시브, GSK-105961 5, CNX- 1351, AMG-51 1, PQR-309, 17베타-하이드록시보르트만닌, AEZS-129, AEZS-136, HM-5016699, IPI-443, ONC-201, PF-4989216, RP-6503, SF-2626, X-339, XL- 499, PQR-401, AEZS-132, CZC-24832, KAR-4141, PQR-31 1, PQR-316, RP- 5090, VS-5584, X-480, AEZS-126, AS-604850, BAG-956, CAL-130, CZC-24758, ETP-46321, ETP-471 87, GNE-317, GS-548202, HM-032, KAR-1 139, LY-294002, PF-04979064, PI-620, PKI-402, PWT-143, RP-6530, 3-HOI-BA-01, AEZS-134, AS-041 164, AS-252424, AS-605240, AS-605858, AS-606839, BCCA-621 C, CAY-10505, CH-5033855, CH-51 08134, CUDC-908, CZC-1 9945, D-106669, D-87503, DPT-NX7, ETP-46444, ETP-46992, GE-21, GNE-123, GNE-151, GNE-293, GNE-380, GNE-390, GNE-477, GNE-490, GNE- 493, GNE-614, HMPL-51 8, HS-104, HS-1 06, HS-1 16, HS-173, HS-196, IC- 486068, INK-055, KAR 1 141, KY-1 2420, 보르트만닌, Lin-05, NPT-520-34, PF- 04691503, PF-06465603, PGNX-01, PGNX-02, PI 620, PI-103, PI-509, PI-516, PI-540, PIK-75, PWT-458, RO-2492, RP-5152, RP-5237, SB-201 5, SB-2312, SB-2343, SHBM-1009, SN 32976, SR-13179, SRX-2523, SRX-2558, SRX- 2626, SRX-3636, SRX-5000, TGR-5237, TGX-221, UCB-5857, WAY-266175, WAY-266176, EI-201, AEZS-131, AQX-MN100, KCC-TGX, OXY-1 1 1 A, PI-708, PX-2000, 및 WJD-008로 이루어지는 PI3K 억제제의 그룹 중에서 선택된다.

[0241]

추가적인 암 요법은 예를 들어 상피성장인자 수용체(EGFR, EGFR1, ErbB-1, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3/HER3, ErbB-4/HER4, EGFR 리간드과; 인슐린-유사 성장인자 수용체(IGFR)과, IGF-결합 단백질(IGFBPs), IGF 리간드과(IGF-1R); 혈소판 유래된 성장인자 수용체(PDGFR)과, PDGFR 리간드과; 섬유아세포 성장인자 수용체(FGFR)과, FGFR 리간드과, 혈관내피 성장인자 수용체(VEGFR)과, VEGF과; HGF 수용체과; TRK 수용체과; 에프린(EPH) 수용체과; AXL 수용체과; 백혈구 티로신 키나제(LTK) 수용체과; TIE 수용체과, 안지오프이오텐 1, 2; 수용체 티로신 키나제-유사 희귀 수용체(ROR) 수용체과; 디스코이딘 도메인 수용체(DDR)과; RET 수용체과; KLG 수용체과; RYK 수용체과; MuSK 수용체과; 형질전환 성장인자 알파(TGF- α , TGF- β 수용체; 형질전환 성장인자-베타(TGF- β), TGF- β 수용체; 인터류킨 13 수용체 알파2 체(IL13R α 2), 인터류킨-6 (IL-6), IL-6 수용체, 인터류킨-4, IL-4 수용체, 사이토킨 수용체, 부류 I(헤마토포이에틴과) 및 부류 II(인터페론/IL-10과) 수용체, 종양괴사인자(TNF)과, TNF- α , 종양괴사인자(TNF) 수용체 상과(TNTRSF), 사멸 수용체과, TRAIL-수용체; 암-고환(CT) 항원, 계통-특이성 항원, 분화 항원, 알파-액티닌-4, ARTC1, 절단점 군집 영역-아벨슨(Bcr-abl) 융합 생성물, B-RAF, 카스파제-5(CASP-5), 카스파제-8(CASP-8), 베타-카테닌(CTNB1), 세포분열 주기 27(CDC27), 사이클린-의존성 키나제 4(CDK4), CDKN2A, COA-1, dek-can 융합 단백질, EFTUD-2, 연장인자 2(ELF2), Ets 변형 유전자 6/급성 골수성 백혈병 1 유전자 ETS(ETC6-AML1) 융합 단백질, 피브로넥틴(FN), GPNMB, 저밀도 지질 수용체/GDP-L 퓨코스: 베타-D갈락토스 2-알파-L퓨코실트라이오스페라제(LDLR/FUT) 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A2 유전자 중의 알파2-도메인의 알파-나선의 170번 잔기에서 아르기닌에서 이소류신 교환(HLA-A^{*}201-R170I), MLA-A11, 돌연변이된 열충격 단백질 70-2(HSP70-2M), KIAA0205, MART2, 돌연변이된 편재하는 흑색종 1, 2, 3(MUM-1, 2, 3), 전립선산 포스파타제(PAP), neo-PAP, 미오신 부류 1, NFYC, OGT, OS-9, pml-RAR알파 융합 단백질, PRDX5, PTPRK, K-ras(KRAS2), N-ras(NRAS), HRAS, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SYT-SSX1 또는 -SSX2 융합 단백질, 트리오세포스페이트 이소머라제, BAGE, BAGE-1, BAGE-2,3,4,5, GAGE-1,2,3,4,5,6,7,8, GnT-V(이상 N-아세틸 지우코스아미딜 트랜스퍼라제 V, MGAT5), HERV-K-MEL, KK-LC, KM-HN-1, LAGE, LAGE-1, 흑색종 상의 CTL-인식된 항원(CAMEL), MAGE-A1 (MAGE-1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-AS, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-3, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, 뮤신 1(MUC1), MART-1/Melan-A(MLANA), gp100, gp100/Pmel17(SILV), 티로시나제(TYR), TRP-1, HAGE, NA-88, NY-ESO-1, NY-ESO-1/LAGE-2, SAGE, Sp17, SSX-1,2,3,4, TRP2-INT2, 암태아성 항원(CEA), 칼리크페인 4, 맘마글로빈-A, OA1, 전립선 특이성 항원(PSA), 전립선 특이성 막항원, TRP-1/gp75, TRP-2, 아디포필린, 흑색종 2 중에 부재하는 인터페론 유도성 단백질 2(AIM-2), BING-4, CPSF, 사이클린D1, 상피세포 부착 분자(Ep-CAM), Epa3, 섬유아세포 성장

인자-5 (FGF-5), 당단백질 250(gp250장 카복실 에스테라제(ice), 알파-태아 단백질(AFP), M-CSF, mdm-2, MUC1, p53(TP53), PBF, FRAME, PSMA, RAGE-1, RNF43, RU2AS, SOX10, STEAP1, 설비빈(BIRCS), 인간 텔로머라제 역전사 효소(hTERT), 텔로머라제, 빌름 종양 유전자(WT1), SYCP1, BRDT, SPANX, XAGE, ADAM2, PAGE-5, LIP1, CTAGE-1, CSAGE, MMA1, CAGE, BORIS, HOM-TES-85, AF15q14, HCA66I, LDHC, MORC, SGY-1, SPO11, TPX1, NY-SAR-35, FTHL17, NXF2 TDRD1, TEX 15, FATE, TPTE, 면역글로불린 유전자형, 벤스-존스 단백질, 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), CD40, CD30, CD20, CD19, CD33, CD4, CD25, CD3, 암 항원 72-4(CA 72-4), 암 항원 15-3(CA 15-3), 암 항원 27-29(CA 27-29), 암 항원 125(CA 125), 암 항원 19-9(CA 19-9), 베타-인간 융모막 성선 자극호르몬, 1-2 마이크로글로불린, 편평세포 암종 항원, 뉴런-특이성 enoJase, 혈충격 단백질 gp96, GM2, 사르 그라모스틴, CTLA-4, 707 알라닌 프롤린(707-AP), T 세포에 의해 인식된 선암종 항원 4 (ART-4), 암태아성 항원 캡티드-1(CAP-1), 칼슘-활성화된 클로라이드 채널-2(CLCA2), 사이클로필린 B(Cyp-B), 인간 반지세포 종양-2(HST-2), 인유두종 바이러스(HPV) 단백질(HPV-E6, HPV-E7, 주 또는 부 캡시드 항원, 기타), 엡스타인-바 vims(EBV) 단백질(EBV 잠복성 막 단백질-LMP1, LMP2; 기타), B 또는 C형 간염 바이러스 단백질, 및 HIV 단백질 표적화하는 항체, 펩티드, 폴리펩티드, 소분자 억제제, siRNA, miRNA 또는 유전자 요법을 포함할 수 있다.

[0242] VII. 제조 물품 또는 키트

[0243] 본 명세서에 또한 제공된 적어도 하나의 면역관문 억제제(예를 들어 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체) 및 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산(예를 들어 ad-p53 및/또는 ad-MDA-7)을 포함하는 제조 물품 또는 키트를 제공한다. 상기 제조 물품 또는 키트는 개인에서 암을 치료하거나 또는 암의 진행을 지연시키거나, 또는 암을 갖는 개인의 면역 기능을 증대시키기 위해 상기 적어도 하나의 관문 억제제를 종양 억제 유전자 요법과 함께 사용하기 위한 설명서를 포함하는 패키지 삽입지를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 상기 면역관문 억제제 및 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산 중 어느 하나가 상기 제조 물품 또는 키트에 포함될 수도 있다. 상기 키트는 세포의 기질 분해 단백질 또는 상기 세포의 기질 분해 단백질을 암호화하는 발현 구조물을 추가로 포함할 수 있다.

[0244] 일부 실시태양에서, 상기 적어도 하나의 면역관문 억제제(예를 들어 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체) 및 p53을 암호화하는 핵산 및/또는 MDA-7을 암호화하는 핵산은 동일한 용기 또는 별도의 용기 중에 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주머니 및 주사기를 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 예를 들어 유리, 플라스틱(예를 들어 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리에틸렌), 또는 금속 합금(예를 들어 스테인레스 강 또는 하스텔로이)으로부터 형성될 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 용기는 상기 제형을 유지하며 상기 용기상의 또는 상기 용기와 결합된 표지는 사용법을 가리킬 수 있다. 상기 제조 물품 또는 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 설명서를 갖는 패키지 삽입지를 비롯하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 제조 물품은 하나 이상의 또 다른 작용제(예를 들어 화학요법제, 및 항종양제)를 추가로 포함한다. 상기 하나 이상의 작용제에 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주머니 및 주사기를 포함한다.

[0245] VIII. 실시예

[0246] 하기의 실시예들은 본 발명의 바람직한 실시태양을 설명하기 위해 포함된다. 당해 분야의 숙련가들은, 하기 실시예들에 개시된 기법들이 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기법들을 나타내며, 따라서 그의 바람직한 실시 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 알아야 한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가들은 본 명세서에 비추어 다수의 변화가 본 발명의 진의 및 범주로부터 이탈됨 없이 개시되고 여전히 유사한 결과를 획득하는 특정한 실시태양들에서 이루어질 수 있음을 알아야 한다.

[0247] 실시예 1 - 압스코팔 효과의 유도 및 선행 면역요법에 대한 내성의 역전을 위한 Ad-p53 또는 Ad-IL24 종양 억제 면역 유전자 요법

[0248] 선행 면역요법에 대해 내성인 종양에 대한 압스코팔 효과를 유도하기 위한 종양 억제 면역 유전자 요법의 효능을 면역능력 동물 종양 모델에서 입증하였다. 하기의 처리 방법, 용량 및 스케줄을 사용하였다:

[0249] 동물, 종양 접종 및 측정: C57BL/6(B6) 마우스(6 내지 8주령)를 사용하였다. 동물에게 우측 옆구리에 B16F10 흑색종 세포(ATCC, 5×10^5 세포/마우스)를 피하 주사하여 "1차 종양"을 형성시켰다. 종양이 대략 50 mm³의 크기에 도달했을 때 처리를 시작하였으며 이를 처리 제1일이라 칭하였다. 종양 성장을, 상기 종양의 길이(L) x 너비(w)를 측정하여 모니터링하고, 종양 부피를 하기 식을 사용하여 산정하였다: 부피 = $0.523L(w)^2$. 동물을 60

일까지 모니터하고, 종양이 대략 2000 mm³에 도달하면 죽였다.

[0250] 바이러스 벡터: p53 또는 IL24 종양 억제 유전자의 발현을 암호화하는 복제-결합 인간 유형 5 아데노바이러스 (Ad5)를 이들 실험에 사용하였다. 상기 벡터의 구성, 성질 및 정제는 Ad5/CMV p53 및 IL24 벡터 모두에 대해 달리 어딘가에 보고되었다(Zhang 1994; Mhashilkar *et al.*, 2001). 4회 용량의 바이러스 벡터를 48시간 간격으로 종양내 투여하였다. 각 바이러스 용량은 50 μ l의 부피 중에 5×10^{10} 바이러스 입자를 함유하였다.

[0251] 면역관문 억제제: 면역관문 억제제 요법 중 종양 진행의 통상적인 임상 조건을 모방하기 위해서, 항-PD 처리를 10 mg/kg의 용량으로 제1일에 복강내로 시작하고 31일까지 3일마다 투여하였다. 일부 실험에서, 선행 면역요법에 내성인 종양에서 종양 억제인자 요법의 효과를 평가하기 위해, 종양 억제인자 처리를, 항-PD-1 요법상에서 종양 진행 후에 개시하였으며, 이때 1차 종양 억제인자 요법을 항-PD-1 처리의 개시후 2 내지 3일째에 제공하였다. 다른 실험들에서, 종양 억제인자 요법을 초기 처리로서 면역관문 억제제와 동반하여 개시하였다. 이들 연구를 면역관문 억제제 요법에 고도로 내성인 것으로 공지된 종양에서 수행하였다. B16F10 및 B16 흑색종 모델은 면역요법에 고도로 내성인 것으로 공지되어 있다. 이들 모델에서, 종양은 면역관문 억제제 요법상에서, 포스페이트 완충된 염수(PBS)에 의한 대조용 처리와 유사하게 진행된다. 마찬가지로, 쥐 폐 종양 모델 ADS 12도 또한 면역관문 억제제 처리에 고도로 내성이다. 생체내에서 사용하기 위해 특별히 생성된 항-마우스 PD-1 항체 (CD279)를 면역 조절제 항-LAG-3 및 항-PD-L1에 대한 항체와 같이 바이옥셀(BioXcell)(카탈로그 #BE0146)로부터 구입하였다. 놀랍게도, 국소부위 종양 억제인자 처리는 전신 면역관문 억제제 요법에 대한 내성을 역전시켰으며, 면역관문 억제제 처리와 뜻밖의 상승작용을 나타내었고, 상기 병용 요법은 종양 억제인자 요법으로 처리되지 않은 원위 종양에 대해 우수한 압스코발 효과를 유도하였다. 이러한 뜻밖의 치료 효과는 종양 미세환경의 세포외 기질을 변경시킨 추가적인 요법(렐락신) 및 화학요법, 및 사이토킨 요법 및 골수 유래된 억제 세포(MDSC), T-Reg 및 수지상 세포와 병용시 증대되는 것으로 밝혀졌다.

[0252] 선행 면역요법상에서 진행하는 종양에서 Ad-p53 + 관문 억제제: 항-PD-1과 병용된 Ad-p53의 치료 효능을 종양 부피(1차 및 대측성 종양에서) 및 생존에 의해 평가하였다. 1차 종양 부피에 관하여(도 1), 항-PD-1 단독요법으로 처리된 동물에서 심한 종양 진행이 존재하였으며 PBS 처리된 대조용에서 관찰된 성장과 거의 차이가 없었다. 대조적으로, 상기 동물을 병용 요법(Ad-p53 + 항-PD-1)으로 처리했을 때 항-PD-1 내성의 역전이 관찰되었다. 22일까지, Ad-p53 + 항-PD-1에 의한 병용 처리는 항-PD-1 또는 Ad-p53 요법 단독에 비해, 종양 부피의 큰 감소를 유도하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계학적 분석은 상기 Ad-p53 + 항-PD1의 항-종양 효과가 22일정도 일찍 상승작용적이며(p-값 0.0001), 29일째에 평가 전체를 통해 계속됨(p-값 0.013)을 판정하였다. 1차 종양 성장의 억제에서 관찰된 상승작용적 효과와 일관되게, 종양 억제 요법을 수용하지 않은 대측성(2차) 종양에서 감소된 성장을 갖는 통계학적 유의수준의 압스코발 효과가 관찰되었다. 이러한 발견은 상기 병용 처리(Ad-p53 + 항-PD-1)가 압스코발 효과를 매개하는 전신 면역성을 유도하였음을 의미한다. 도 2에 도시된 바와 같이, Ad-p53 단독 처리된 1차 종양을 갖는 동물에서 대측성 종양은 항-PD-1 단독 처리된 1차 종양의 성장 속도에 비해 현저하게 지연된 종양 성장(p=0.046)을 나타내었다. 대측성 종양 성장에 대한 훨씬 더 큰 압스코발 효과(p=0.0243)가 Ad-p53 + 항-PD-1 병용 처리된 1차 종양을 갖는 마우스에서 관찰되었다(도 2). 상기 대측성 종양에 어떠한 치료제도 주사하지 않았음을 지적하는 것은 중요하다. 종합해보면, 이들 결과는 국소부위 종양 억제인자 치료와 면역관문 억제제 요법과의 병용은 전신 면역관문 억제제에 대한 내성을 역전시켰으며, 면역관문 억제제 처리와 뜻밖의 상승작용을 나타내었고, 상기 병용 요법은 종양 억제인자 요법으로 처리되지 않은 원위 종양에 대해 우수한 압스코발 효과를 유도하였음을 입증한다.

[0253] 생존에 관하여, 병용된 Ad-p53 및 항-PD-1 요법은 Ad-53 요법 단독(p=0.0167) 및 항-PD-1 요법 단독(p<0.001)에 비해 생존의 통계학적으로 의미있는 증가를 나타내었다(도 3). 상기 종양 성장에 대한 상승작용적 효과와 일관되게, 상기 병용된 Ad-p53 및 항-PD-1 그룹의 중간 생존의 증가는 Ad-p53 및 항-PD-1 치료의 효과에 비해 부가적인 것보다 더 컸다.

[0254] 선행 면역요법상에서 진행하는 종양에서 Ad-IL24 + 관문 억제제: 항-PD-1과 병용된 Ad-IL24의 치료 효능을 종양 부피(1차 및 대측성 종양에서) 및 생존에 의해 평가하였다. 종양 부피에 관하여(도 4), 항-PD-1 단독요법으로 처리된 동물에서 심한 종양 진행이 존재하였고, Ad-IL24 단독으로 처리된 동물의 경우 적당하게 감소하였으며, 병용 요법(Ad-IL24 + 항-PD-1)으로 처리된 동물에서는 항-PD-1 내성의 역전이 존재하였다. 상기 병용 처리는 항-PD-1 또는 Ad-IL24 요법 단독과 비교하여, 종양 성장의 큰 감소를 유도하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 Ad-IL24 + 항-PD1 처리의 복합 효과가 14일 처리까지 상승작용적임을 판정하였다(p-값 = 0.002). 또한, 종양 성장 속도의 평가(반복된 측정 ANOVA 통계학적 분석을 사용하여)는 또한 단독요

법으로서 사용된 어느 하나의 작용제에 비해 상기 병용 처리의 상승작용적 효과를 입증하였다($p < 0.0001$).

- [0255] 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1 처리에 의한 1차 종양 성장의 억제에서 관찰된 증가된 효과와 일관되게, 종양 억제 요법을 주사하지 않은 대측성(2차) 종양에서 감소된 성장을 갖는 통계학적 유의수준의 압스코팔 효과가 관찰되었다. 이러한 발견은 상기 병용 처리 Ad-IL24 + 항-PD-1(Ad-53 + 항-PD-1 요법처럼)이 또한 압스코팔 효과를 매개하는 전신 면역성을 유도하였음을 의미한다. 도 5에 도시된 바와 같이, 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1로 처리된 1차 병변을 갖는 동물에서 대측성 종양은 종양 성장의 가장 큰 감소를 나타내었다. 상기 Ad-IL24 단독($P = 0.0021$) 및 Ad-IL24 + 항-PD-1($P < 0.0001$) 처리 그룹은 모두 항-PD-1 단독으로 처리된 1차 종양의 성장 속도에 비해 통계학적 유의수준의 감소된 압스코팔 종양 성장을 나타내었다.
- [0256] 생존에 관하여, 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1 요법은 Ad-IL24 요법 단독($p = 0.0167$) 및 항-PD-1 요법 단독($p < 0.001$)에 비해 생존의 통계학적 유의수준의 증가를 나타내었다(도 6). 상기 종양 성장에 대한 상승작용적 효과와 일관되게, 상기 병용된 Ad-IL24 및 항-PD-1 그룹의 중간 생존의 증가는 Ad-IL24 및 항-PD-1 치료의 효과에 비해 부가적인 것보다 더 컸다.
- [0257] 실시예 2 - 선행 면역요법에 대한 종양 내성에 대한 Ad-p53 또는 Ad-IL24 종양 억제 면역 유전자 병용 요법
- [0258] 종양 억제인자의 조합에 의해 유도된 항-종양 효과를 측정하기 위해서, Ad-p53 및 Ad-IL24를 병용하여 최종 처리 제제 중 각 벡터의 원래 용량의 50%를 사용하여 상술한 바와 같이 투여하였다. 동물을 1차 종양 부피에 대해 평가하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 단독요법으로 처리된 동물에서 심한 종양 진행이 존재한 반면, Ad-p53 + Ad-IL24의 조합은 감소된 종양 성장을 나타내었다. 항-PD-1 또는 Ad-p53 + Ad-IL24 요법 단독과 비교시, Ad-p53 + Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합(1차 종양 부피의 가장 큰 감소를 유도하였다)으로 처리된 동물에서 항-PD-1 내성의 역전이 관찰되었다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 Ad-p53 + Ad-IL24 + 항-PD1 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.035)을 판정하였다. 또한, 종양 성장 속도의 평가(반복된 측정 ANOVA 통계학적 분석을 사용하여)는 또한 단독요법으로서 사용된 어느 하나의 작용제에 비해 상기 병용 처리의 상승작용적 효과를 확인하였다($p = 0.01$).
- [0259] 실시예 3 - 선행 면역요법에 대한 종양 내성에 대한 화학요법 및 사이토킨 요법과 병용된 종양 억제 면역 유전자 요법
- [0260] 동물, 종양 접종 및 측정, Ad-IL24 벡터 처리 및 항체 처리를 실시예 1에 기재된 바와 같이 사용하였다.
- [0261] 화학요법 및 사이토킨 처리: 화학요법 처리(5FU 및 사이클로포스파미드, CTX)를 제3일에 개시하였으며, 상기 처리는 1 ml 주사기를 사용하여 약물(5FU 및 CTX)의 i.p. 단일 주사로 이루어졌다. 5FU의 경우, 용량은 체중의 50 mg/kg이었으며; 사이클로포스파미드의 경우 용량은 체중의 80 mg/kg이었다. GM-CSF 사이토킨 요법을, 사용 직전에 멸균 ddH₂O에 용해되고 1XPBS로 조절된 제조합 쥐 GM-CSF로서 제공하였다. 동물을 i.p. 처리하였으며 투여된 용량은 0.5 μ g/마우스였다. 처리를 상기 연구의 3 내지 13일에 매일 2회 투여하였다.
- [0262] 항-PD-1 및 Ad-IL24와 함께 5-FU+CTX+GM-CSF의 치료 효능을 종양 부피에 의해 평가하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 단독요법으로 처리된 동물에서 심한 종양 진행이 존재하였고, 5-FU+CTX+GM-CSF로 처리된 동물의 경우 유사한 진행이 존재하였으며, 병용 요법(5FU+CTX+GM-CSF+항-PD-1)으로 처리된 동물에서는, 항-PD-1 내성의 적당하지만 통계학적 유의수준의 역전이 존재하였다. 상기 병용 처리는 항-PD-1 또는 5FU+CTX+GM-CSF 요법 단독에 비해, 종양 성장의 감소를 유도하였다. 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 5-FU+CTX+GM-CSF 및 항-PD-1 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.028)을 판정하였다. Ad-IL24를 5FU+CTX+GM-CSF+항-PD-1 조합에 첨가했을 때(도 9), 상기는 항-PD-1 내성의 역전을 증폭시켰다. 도 9에 도시된 바와 같이, 각 처리에 대한 종양 부피의 분산(ANOVA) 비교의 통계분석은 5-FU+CTX+GM-CSF+항-PD-1 및 Ad-IL24 처리의 복합 효과가 14일의 처리까지 상승작용적임(p -값 = 0.010)을 판정하였다.
- [0263] 실시예 4 - 선행 면역요법에 대한 종양 내성에 대한 Ad-IL24 종양 억제 면역 유전자 요법을 개선시키기 위한 Ad-렐락신에 의한 종양 미세환경의 변경
- [0264] 종양 억제 면역 유전자 요법의 항-종양 효과가 종양 미세환경의 변경에 의해 증대될 수 있는지를 판정하기 위해서, Ad-L24 처리를, 세포의 기질을 분해하는 렐락신을 발현하는 복제 능력 아데노바이러스 벡터와 병용하였다. Ad-렐락신(Ad-RLX) 및 Ad-IL24를 병용하여 최종 처리 제제 중 3×10^{10} - vp와 병용된 2×10^{10} vp의 Ad-RLX의 병용 용량을 사용하여 상기 실시예 2에 기재한 바와 같이 투여하였다. 동물을 1차 종양 부피에 대해 평가하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 단독요법으로 처리된 동물에서 심한 종양 진행이 존재한 반면, Ad-RLX

+ Ad-IL24의 조합은 감소된 종양 성장을 나타내었다. 항-PD-1 또는 Ad-RLX + Ad-IL24 요법과 비교시, Ad-RLX + Ad-IL24 + 항-PD-1의 조합(1차 종양 부피의 가장 큰 감소를 유도하였다)으로 처리된 동물에서 항-PD-1 내성의 역전이 관찰되었다. 제11일에 종양 부피의 다중 비교를 위한 분산(ANOVA)의 통계분석을 수행하여 처리 효과를 비교하였다. PBS 대 항-PD-1 처리간에는 통계학적 유의수준의 차이가 없는 반면($P=0.8343$) PBS 대 Ad-RLX+Ad-IL24($P=0.0416$) 및 PBS 대 Ad-RLX+Ad-IL24-항-PD1($P=0.0039$)은 모두 PBS 대조용에 비해 종양 크기의 통계학적 유의수준의 감소를 나타내었다. 상기 항-PD-1 대 Ad-RLX+Ad-IL24 처리간에는 통계학적 유의수준의 차이가 없는 반면($P=0.0929$) 항-PD-1 대 Ad-RLX+Ad-IL24-항-PD-1 그룹간의 차이는 통계학적으로 유의수준이었고($P=0.0049$), 이는 상기 Ad-RLX+Ad-IL24+항-PD-1 조합의 우수한 효능을 가리킨다.

[0265] 실시예 5 - 면역요법 내성을 역전시키기 위한 초기 처리로서 Ad-p53 또는 Ad-IL24 종양 억제 면역 유전자 요법

[0266] 이들 연구를, 종양 억제 요법을 제1일에 면역관문 억제 처리와 동시에 개시시킴을 제외하고 실시예 1에 상술한 실험과 유사한 방식으로 수행하였다. 이들 실험에서 다른 차이는 하기 설명에 나타난다.

[0267] 면역요법에 내성인 종양에서 초기 처리로서 Ad-IL24 + 관문 억제제: 복제 불능 Ad-IL24 및 복제 능력 Ad-IL24(CTV-IL24)의 치료 효능을 B16 흑색종 종양 모델에서 항-PD-1 + 항-LAG-3 면역요법과 함께 평가하였으며, 상기 모델은 항-PD-1 + 항-LAG3 처리 효과에 완전하게 내성인 것으로 공지되어 있다. 효능을 동물 생존에 의해 평가하였다.

[0268] 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법과 병용시 복제 불능 Ad-IL24 및 복제 능력 CTV-IL24는 모두 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법 단독에 비해 통계학적 유의수준의 증가된 생존을 나타내었다. 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법은 PBS 처리에 비해 생존에 대해 효과가 없었다. 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법과 병용시 Ad-IL24 또는 CTV-IL24 처리간의 생존의 통계학적 유의수준 차이는 없었으며, 따라서 Ad-IL24 및 CTV-IL24 처리 그룹을 도 11에 도시된 생존 분석을 위해 병용하였다. 앞서 처리된 면역요법 상에서 진행하는 종양에서 관찰된 상승작용적 효과와 일관되게, 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법과 병용된 Ad-IL24/CTV-IL24 요법은 Ad-IL24/CTV-IL24 요법 단독($P = 0.0011$) 및 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법 단독($p < 0.0001$)에 비해 생존에 있어서 통계학적 유의수준 증가를 나타내었다(도 11). 병용된 Ad-IL24/CTV-IL24 및 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법 그룹에 대한 생존의 증가는 Ad-IL24/CTV-IL24 및 항-PD-1 + 항-LAG-3 요법 처리의 효과에 비해 추가적인 것보다 더 컸다(도 11).

[0269] 면역요법에 대해 내성인 종양에서 초기 처리로서 Ad-53 + 관문 억제제: 본 연구를 문헌[Zhang et al., 2015]에 기재된 바와 같은 ADS-12(마우스 폐 암종) 세포주 종양 모델을 사용하여 6 내지 12주 된 129S4 마우스에서 수행하였다.

[0270] 본 연구에서, p53 종양 억제 처리를 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 Ad-p53 단독으로서 및 Ad-p53과 복제 능력 아데노바이러스 벡터 TAV 255와의 혼합물을 나타내는 TAV Ad-p53이라 칭하는 이중 바이러스 조성물 중에서 투여하였다. TAV 255의 특성은 문헌[Zhang et al.]에 기재되어 있다. 이들 처리를 초기 요법으로서 항-PD-L1 항체와 병용하였다. 상기 ADS-12 종양 모델은 항-PD-L1 요법에 고도로 내성인 것으로 공지되었다. 본 연구는 TAV Ad-p53이 항-PD-L1 요법에 대한 내성을 억제시킬 수 있는지를 판단하도록 설계되었다.

[0271] 마우스에게 우측 옆구리에 포스포이트 완충된 염수 중에 현탁된 10^6 ADS-12 세포를 피하 주사하여 "1차 종양"을 형성시켰다. 처리 개시시 표적 종양 부피는 50 내지 75 mm³이었다. 상기 표적 종양 부피에 도달되었을 때, 종양내 주사에 의한 처리를 같은 날에 시작하였다.

[0272] 종양내 바이러스 또는 비히클 주사: 종양 부피가 50 내지 75 mm³에 도달한 후에, 마우스를 표 1에 기재된 6개 처리 그룹 중 하나로 무작위 분류하였으며, 이때 5마리의 수컷과 5마리의 암컷 마우스를 각 그룹에 무작위 분류하였다. 모든 마우스를 종양 부피가 50 내지 75 mm³에 도달했을 때 시험 바이러스 또는 비히클의 종양내 주사로 처리하였으며, 제1일, 제5일, 및 제 9일에 투여하였다. 그룹 1 및 2는 비히클을 수용하였고, 그룹 3, 4, 5 및 6은 바이러스를 수용하였다.

[0273] 복강내 항-PD-L1 또는 포스포이트 완충된 염수 주사: 모든 마우스를 200 µg의 항-PD-L1 항체 또는 포스포이트 완충된 염수의 복강내 주사로, 바이러스 또는 비히클의 종양내 주사에 의한 처리의 출발 후 당일에 시작하여 30 일 동안 4일마다(즉 제2일, 제6일, 제10일, 제14일, 제18일, 제22일, 제26일, 제30일) 처리하였다. 그룹 1, 3, 4 및 5는 포스포이트 완충된 염수를 수용하였고, 그룹 2 및 6은 항-PD-L1 항체를 수용하였다.

표 1

[0274]

연구 처리 그룹			
바이러스 #1	바이러스 #2	다른 처리	동물의 #
비히클	없음	PBS	10
비히클	없음	항-PD-L1	10
Ad-p53	없음	PBS	10
용량 = 3×10^{10} vp			
AD-TAV 255	없음	PBS	10
용량 = 109 PFU			
Ad-p53	AD-TAV 255	PBS	10
용량 = 3×10^{10} vp	용량 = 109 PFU		
Ad-p53	AD-TAV 255	항-PD-L1	10
용량 = 3×10^{10} vp	용량 = 109 PFU		
총계			60

[0275]

하기의 시험 품목을 본 실험에 사용하였다:

표 2

[0276]

시험 품목	
시험 품목	설명
Ad-TAV255	아데노바이러스 유형 5를 기본으로 하는 복제 능력 항암 바이러스 벡터
Ad-p53	인간 p53 유전자를 발현하는 비복제성 아데노바이러스 벡터
항-PD-L1(클론 10F.9G2)(바이옥셀)	PD-L1에 대한 마우스 항체

[0277]

모니터링 연구 종점: 종양 성장을 종양의 길이(L) 및 너비(w)를 측정함으로써 모니터링하였다. 종양 부피를 하기 식을 사용하여 계산하였다: $0.523L(w)^2$.

[0278]

통계학적 분석: 1차 종양 부피를, 그룹간의 부등 분산을 가정하여 양측 T-검정을 사용하여 처리 제12일에(모든 마우스에 대해 데이터를 입수할 수 있는 최종 시점) 그룹들간에 비교하였다.

[0279]

결과: 평균±SEM 1차 종양 부피를 도 12에 나타낸다. 대조용 종양내 완충제, 항-PDL-1 항체 단독, TAV Ad-p53 단독 및 TAV Ad-p53 + 항-PD-L1으로 처리된 마우스들간의 4월 비교에서, 종양 부피는 복강내 항-PDL1을 갖는 종양내 완충제에 비해 TAV Ad-p53 + 항-PD-L1으로 처리된 마우스에서 현저하게 더 작았다($p < 0.05$). TAV Ad-p53의 부재하에서, 항-PDL1 항체는 그다지 활성을 갖지 않았다($p = 0.379$). 항-PD-L1 항체의 부재하에서, 병용 바이러스 요법은 통계학적 유의수준($p = 0.0627$)을 충족하지 않으면서 보다 작은 종양 부피를 향한 성향을 도출하였다.

[0280]

항-PDL1 항체 부재하의 바이러스 요법 섭생들간의 비교: 종양 부피는 완충제에 비해 TAV의 경우 현저하게 더 작다($p < 0.05$). 이중 바이러스 요법 대 완충제($p = 0.0627$) 및 Ad-p53 대 완충제($p = 0.156$)간의 차이는 통계학적 유의수준에 도달하지 않으면서 바이러스 요법에 유리한 성향이였다.

[0281]

상기 데이터는 처리 및 항-PDL1 항체 및 이중 TAV Ad-p53 바이러스 요법으로부터 가장 강한 활성을 보이는 반면, 항-PDL1 항체 단독은 그다지 활성을 보이지 않았다. TAV Ad-p53 바이러스 요법과 함께 또는 상기 요법 없이 항-PDL1으로 처리된 그룹들간의 비교는 TAV Ad-p53 바이러스 요법의 추가가 항-PDL1 항체 요법의 활성을 현저하게 개선시킴을 가리킨다.

[0282]

상기 치료학적 접근법의 또 다른 실시태양에서, 항암 아데노바이러스 VRX-007을 TAV 255 대신 사용한다. VRX-007은 E3 영역의 대부분이 없고 E3-11.6K 아데노바이러스 사멸 단백질(ADP)을 과발현함을 제외하고, Ad5와 동일한 항암 아데노바이러스 벡터이다. VRX-007의 구성은 앞서 기재되어 있다(Doronin 2003; Tollefson 1996; Lichtenstein 2004). VRX-007을 또한 종양 억제인자 및 다른 치료학적 유전자를 발현하도록 변형시킬 수 있다.

[0283]

실시에 6 - 방사선 요법 및 화학방사선 요법과 병용된 종양 억제 면역요법

- [0284] 종양 억제 면역요법의 국소부위 및 압스코팔 효능을 방사선 및 화학방사선 요법과의 병용에 의해 추가로 증대시킬 수 있다. p53, IL24 및 텔락신 바이러스 벡터, 화학요법, 사이토킨 요법, 면역관문 억제제 치료 및 이들의 가장 유효한 조합에 대한 동물 모델 및 치료 스케줄은 실시예 1 내지 5에서 상술한 바와 같다. 종양이 대략 50 mm³에 도달하면, 동물을 대조용(염수 또는 PBS 주사), 방사선 단독(6일째에 하나의 분획 중 5 Gray), 및 방사선과 함께(6일째에 하나의 분획 중 5 Gray) 및 방사선 없이 제공된 상기 실시예 1 내지 5에 기재된 처리 그룹을 포함하는 처리 그룹들 내로 무작위 분류한다. 각 처리 그룹은 최소 5 내지 10마리의 동물을 함유한다. 종양 크기 및 동물 생존을 측정하며, 상기 실시예 1 내지 5에 기재된 바와 같이 분석된 데이터는 방사선과의 병용 처리의 증가된 효능을 입증한다.
- [0285] 실시예 7 - 항암 헤르페스 바이러스 벡터 요법
- [0286] 본 치료학적 접근법의 또 다른 실시태양에서, rRp450이라 칭하는 신규의 항암 헤르페스 단순 바이러스 벡터를 추가적인 치료학적 바이러스로서 사용하여 상기 실시예 1 내지 6에 기재된 접근법의 효능을 증대시킨다. 상기 rRp450 벡터를 종양 세포를 복제하고 선택적으로 살해하도록 조작하며; 그의 구조 및 변형은 문헌[Aghi et al 1999]에 추가로 기재된다. 간단히, 상기 rRp450 벡터는 RR³ 활성을 제공하는 펩티드, ICP6을 암호화하는 유전자가 결실된 헤르페스 단순 바이러스 유형 1을 기본으로 하며, 무활동 세포에서 바이러스 복제 및 용해에 필수적이다(Chase et al., 2008). 상기 벡터는 또한 사이클로포스파미드(CPA)-감수성 래트 시토크롬 p450 2B1, 및 강시클로비어(GCV)-감수성 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제(HSV-TK) 트랜스유전자의 발현을 암호화한다.
- [0287] 상기 실시예 1 내지 6에 기재된 접근법을 평가하는 외에, 상기 rRp450 벡터를 면역관문 억제제 및 사이클로포스파미드(CPA) 및 강시클로비어(GCV) 요법과 병용한다. 간단히, 피하 종양을, 무혈청 배지 중에 현탁된 종양 세포(예를 들어 9L 신경교종 세포)를 6주된 C57BL/6 암컷 마우스의 옆구리에 주사함으로써 확립시킨다. 상기 주사된 종양 세포의 수는 종양 유형에 따라 변한다(9L 신경교종세포의 경우, 10⁶). 상기 종양이 대략 50 내지 70 mm³에 도달하면, 동물을 하기의 처리 그룹들로 분류한다: 대조용 비히클, rRp450, CPA, GCV, 항-PD1, CPA+GCV, rRp450+CPA+GCV. 처리 용량 및 스케줄은 하기와 같다: rRp450(2.5 x 10⁸ pfu, 총 부피 60 µl 중의) 또는 CPA(100 mg/kg 체중, 총 부피 60 µl 중의)를 처리 1일째에 투여하고 3, 5 및 7일째에 반복한다. 바이러스로 처리된 동물은 총 10⁹ pfu를 수용하며; 바이러스의 확산을 보장하기 위해 종양내 바늘 조작이 요구된다. GCV로 처리된 동물은 11일로부터 21일까지 200 µl의 0.9% NaCl 중에 용해된 30 mg의 GCV/kg/체중을 매일 i.p. 주사로 수용한다. 항-PD1(10 mg/kg 체중, i.p.)로 처리된 동물은 실시예 5에 기재된 바와 같이, 1일째에 시작하여 그 후 3일마다 처리를 수용한다.
- [0288] 종양 크기 및 동물 생존을 측정하고 상기 실시예 1 내지 5에 기재된 바와 같이 분석된 데이터는 방사선과의 병용 처리의 증가된 효능을 입증한다.
- [0289] 실시예 8 - 헤르페스 벡터
- [0290] TVEC(이전에는 OncoVex^{GM-CSF})는 결실된 ICP34.5 유전자(정상 세포는 아닌 종양 세포에서 바이러스 복제를 부여한다) 및 결실된 ICP47 유전자(상기 바이러스에 대한 면역 응답의 억제를 생성시킨다) 대신에 인간 GM-CSF 트랜스유전자를 함유하는 복제 결함 HSV 벡터이다. TVEC는 실험 균주라기보다는, 상기 바이러스로 감염된 사람으로부터 채취한 헤르페스 단순 바이러스 1(HSV-1)의 균주를 유전자 조작하여 생성되었다.
- [0291] 초기 연구를, 온도-감수성 ICP4 돌연변이체를 암호화하고 쥐 GM-CSF 벡터를 암호화하는 실험 균주 17 HSV로부터 유래된 보다 이른 세대 벡터인 dv-GM으로 수행하였다. 하딩-패세이(Harding-Passey)(쥐 흑색종), M3(쥐 흑색종), CT26(쥐 결장 선암종), MCA38(쥐 결장 선암종), MCA207(쥐 섬유육종), 및 GL261(쥐 뇌 종양) 세포내 dv-GM의 주사는 95 pg 이하의 쥐 GM-CSF/10⁵ 종양 세포/48h의 분비를 생성시켰다(Toda et al., 2000). B16 쥐 흑색종 세포는 HSV에 대한 수용체가 없으며 따라서 상기 작용제에 적합한 모델이 아니고 따라서 B16 마우스 중의 하딩-패세이 모델을 대신 사용한다. 상기 모델은 고도로 종양발생성이며 종양 퇴행이 자발적으로 발생하지 않는다. 양측성 종양을, 각 옆구리에 1X10⁶ 흑색종 종양 세포를 피하 이식함으로써 B/6 마우스에서 확립시킨다. 종양이 5 mm 직경(대략 60 mm³)에 도달하면 2X10⁵ pfu를 사용하여 한 쪽 옆구리내로의 처리를 개시시키며 접종 및 비-접종된 대측성 종양 모두에서 종양의 현저한 억제가 생성된다. 보다 낮은 바이러스 용량(2X10³ 내지 2X10⁴ pfu/주사)은 종양 성장의 약간의 감소를 보였으며, 이는 유의수준이 아니고 종양 함유 마우스

의 개선된 생존을 생성시키지 않았다. 따라서, TVEC를 항-PD-1과 함께 종양 억제 면역 요법(예를 들어 Ad-p53 또는 Ad-IL24)과 병용하여, 앞서 TVEC로 처리되었거나 선행 TVEC 요법상에서 진행된 종양을 갖는 동물에서 증가된 치료학적 효과를 입증한다.

[0292] TVEC 동물 모델은 A20 림프종 모델을 포함하며, 상기 모델에서 2×10^6 종양 세포가 Balb/c 마우스의 각 옆구리에 피하 주사되었다(Liu et al., 2003). 우측 종양은 종양이 대략 60 mm³에 도달하면 총 3회의 주사로, 이틀마다 주사되는 1×10^6 , 1×10^7 및 1×10^8 pfu의 용량을 사용하여 처리되었다. 모두 3개의 용량이 1차 종양에서 항-종양 효과를 나타내었지만, 오직 1×10^8 pfu의 최고 용량만이 대측성 종양의 퇴행을 나타내었다.

[0293] 임상 연구는 TVEC가 생존을 개선시키거나 전이의 퇴행을 유도하지 않음을 입증하였다. 환자는 TVEC에 의해 야기된 면역 세포 활성화에 대해 내성을 나타낼 듯하다. 상기 효과를 모방하기 위해서, TVEC에 대한 내성을 획득하였거나 본래적으로 갖는 동물 모델을 생성시킨다(우리가 상기에서 나타내는 바와 같이, 쥐 B16F10 모델은 항-PD-1 요법에 본래적인 내성을 갖는다). 예를 들어, A20 림프종 세포는 본래 TVEC에 감수성이다. 생존 세포에 대한 TVEC의 반복된 투여에 의해, TVEC 내성 A20 세포주를 생성시킬 수 있다. 상기 주를 Balb/c 마우스에게 이식하고 종양을 TVEC로 처리한다(내성 확인을 위해). 상기 TVEC 내성 종양을 항-PD-1과 함께 종양 억제인자 요법(예를 들어 Ad-p53 또는 Ad-IL24)으로 처리하여, 앞서 TVEC로 처리되었거나 또는 선행 TVEC 요법상에서 진행된 종양을 갖는 동물에서 치료학적 효과를 입증한다.

[0294] 실시예 9 - 국소부위 및 전신 투여 모두에 대한, N1L 결실, IL12 발현으로 조작된 또는 PI3K델타/감마 억제제와 병용된 우두 바이러스의 적용

[0295] 본 치료학적 접근법의 또 다른 실시태양에서, VVL 15-N1L-IL12라 칭하는 신규의 항암 우두 바이러스를, 상기 실시예 1 내지 9에 기재된 접근법의 효능을 증대시키기 위한 추가적인 치료학적 바이러스로서 사용한다. 항암 우두 바이러스의 다수의 균주, 예를 들어 웨스턴 리저브(Western Reserve), 와이어스 및 리스트어(Wyeth and Lister) 균주가 보고되었다. 이들 균주 각각의 다양한 결실 돌연변이체들이 생성되었다. 왕(Wang) 등(특허 WO2015/150809A1)은 증대된 선택성 및 항종양 효능을 나타내는 불활성화된 N1L 유전자를 갖는 TK-결합성 우두 바이러스 균주를 개발하였다. N1L은 NF- κ B 활성화뿐만 아니라 감염된 세포의 세포사멸을 억제하는 것으로 여겨진다. N1L 유전자 결실은 자연살해(NK) 세포 응답의 조절 외에 NF- κ B에 의해 조절된 염증성 항바이러스 사이토킨의 증가를 유도하는 것으로 나타났다. 상기 N1L 결실 유도체는 왕 등(Wang et al., 2015)(특허 WO2015/150809A1)에 기재되어 있다. VVL 15N1L, GM-CSF, IL-12, IL-21의 항종양 효능을 증대시키기 위해서, 종양 억제인자 및 다른 치료학적 유전자를 상기 VVL 15N1L 바이러스의 N1L 영역에 삽입한다. 이들 치료학적으로 "무장된" VVL 15N1L 바이러스를 상기 실시예 1 내지 8에 기재된 바와 같이 사용하여 국소 및 압스코팔 치료 효과를 증대시킨다.

[0296] 상기 실시예 1 내지 8에 기재된 접근법들을 평가하는 외에, 상기 VVL 15N1L 바이러스를 또한 면역관문 억제제 및 PI3K 억제제와 병용한다. PI3K델타 또는 PI3K감마/델타 억제제를 포함하는 일례가 바이러스 바이러스의 정맥내 투여를 증대시키는 것으로 기재되어 있다. 동물은 IC87114(PI3K 델타 억제제)를 75 mg kg⁻¹의 농도로 수용하고 이어서 3시간 후에 정맥내 VVL 15N1L 바이러스를 100 μ l의 PBS 중의 1×10^8 PFU/마우스로 꼬리 정맥을 통해 수용한다. 상기 처리를 0일, 3일 및 5일째에 적어도 3회 제공한다. 이들 처리를 실시예 1 내지 8에 기재된 바와 동일한 요법과 병용한다. 종양 크기 및 동물 생존을 측정하며, 상기 1 내지 8에 기재된 바와 같이 분석된 데이터는 VVL 15N1L 바이러스, 면역관문 억제제 및 PI3K 억제제와 병용된 처리의 증가된 효능을 입증한다.

[0297] 실시예 10 - 아데노, 우두 및 HSV 바이러스 바이러스의 조합

[0298] 실시예 1 내지 9에 기재된 바이러스 및 치료법들의 조합은 본 실시예에 기재된 바와 같이 치료학적 효능을 추가로 증대시킬 수 있다. 3×10^6 HPD-1NR 시리안 햄스터 체장암 세포를 5 내지 6주된 시리안 햄스터의 한쪽 옆구리에 피하 이식한다. 상기 종양 이종이식편이 약 8 mm 직경(대략 300 내지 350 mm³)으로 성장하면, 하기 표에 나열된 그룹들 중의 상이한 바이러스 및 비히클 완충제를 종양내 주사한다.

표 3

[0299]

연구 설계				
G그룹	처리 그룹	용량/주사(pfu)	처리 스케줄	전체 바이러스 용량/ 마우스 (그룹) pfu
A	PBS	비히클 BUF	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	N/A
B	ViRx-007 (아데노)	1.0×10^9	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	9×10^9 pfu (6.3×10^{10})
C	ViRx-007 (아데노)	5.0×10^8	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	4.5×10^9 pfu (3.15×10^{10})
D	VVL 15-N1-L12	5.0×10^7	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	4.5×10^8 pfu (3.15×10^9)
E	VVL 15-N1-L12	2.0×10^7	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	1.8×10^8 pfu (1.26×10^9)
F	rRp450 (HSV)	2.0×10^8	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	1.8×10^9 pfu (1.26×10^{10})
G	rRp450 (HSV)	5×10^8	IT* 1,2,3, 10,11,12, 및 19,20 및 21일째	4.5×10^9 pfu (3.15×10^{10})
주: ViRx-007은 항암 아데노바이러스이고; VVL 15-N1-L12는 항암 우두 바이러스이고; rRp450은 항암 헤르페스 바이러스이다.				

[0300]

이들 처리를 실시예 1 내지 9에 기재된 바와 동일한 치료법들과 병용한다. 종양 크기 및 동물 생존을 측정하며, 상기 1 내지 9에 기재된 바와 같이 분석된 데이터는 면역관문 억제제와 병용된 처리의 증가된 효능을 입증한다.

[0301]

상기 실시예 1 내지 10의 발견들을 근거로, 종양 억제 면역 유전자 요법의 임상적 용도를 하기 실시예 11 내지 12에 보다 충분히 기재한다. 실시예 11 및 12의 일부 실시태양에서, 상기 처리를 초기 암 치료로서 적용하거나 또는 TVEC 또는 면역관문 억제제 요법, 또는 사이토킨 또는 인터루킨 또는 방사선 또는 화학요법 또는 소분자 요법과 같은 면역요법들을 포함하는 다른 요법들에 대한 내성의 발생에 이어서 투여한다.

[0302]

실시예 11 - 면역요법을 포함하여 선행 치료 중인 환자에서 동맥내 Ad-p53 및 카페시타빈 및 항-PD-1 치료의 병용 요법

[0303]

1기 안전성 단계를 Ad-p53 + 메트로노믹 카페시타빈 및 항-PD-1의 최대 허용 용량(MTD)을 측정하도록 설계한다. 1기 단계의 종료 및 최적 Ad-p53 용량의 선택에 이어서, 무작위 분류된, 조절된 2기 시험을 수행한다. 상기 2기 시험은 상기 1기 시험에서 한정된 Ad-p53 MTD를 사용한다. 상기 2기 연구는 Ad-p53 + 카페시타빈 + 면역관문 억제제 요법이 카페시타빈 + 면역관문 억제제 치료 단독보다 우수한 지를 측정하는 적합하고 잘-조절된 시험이도록 설계된다.

[0304]

상기 Ad-p53을 2 ml 부피/바이알로 공급하며; 각 ml은 1×10^{12} 바이러스 입자(vp)를 함유한다. 상기를 안정제로서 10%(v/v) 글리세롤을 함유하는 포스페이트 완충된 염수(PBS) 중의 멸균성 바이러스 현탁액으로서 제공한다. Ad-p53을 투여 전에, 과정이 기재된 프로토콜에 따라 희석하고 여과한다. 상기 연구에서 모든 환자는 100 ml 부피 중에 20분 지속기간의 간내 동맥(IHA) Ad-p53 주입을 수용할 것이다. Ad-p53을 적어도 1회 이상의 주기 동안 각 8주 주기의 최종 6주(제15일에 출발) 동안 매주 2회(월요일 및 목요일) 투여한다.

[0305]

카페시타빈(젤로다(Xeloda)(등록상표))을 2회 이하의 주기 동안 8주 주기 동안 연속해서 625 mg/m² bid로서 매일 경구 투여한다. 상기 젤로다를 각 주기에서 Ad-p53 2주 전에 출발하여 상기 주기 전체를 통해 투여한다. 항-PD-1 요법을 FDA 승인된 패키지 삽입지 설명서에 따라 투여한다.

[0306]

I기 연구. 3명(+3명)의 환자를 매일 경구 카페시타빈과 병용하여, 각 8주 주기의 최종 6주 동안(제15일에 출발

하여) 매주 2회(월요일 및 목요일) 2.0×10^{12} vp의 용량으로 출발하여 IHA Ad-p53으로 처리한다. 경구 카페시타빈 처리를 제1일에 출발하여(상기 Ad-p53 처리 시작 2주 전) 각 8주 주기 동안 매일 연속해서(메트로노믹) 하루에 2회(BID) 625 mg/m²의 용량으로 투여한다. 환자를 진행성 질병(PD), DLT 또는 철회 동의서의 부재하에 2회 이하의 8주 주기 동안 치료한다. 표 5는 1기 시험에서 평가되는 용량 수준의 설명을 나타낸다. Ad-p53을 각 주기의 최종 6주일 동안 매주 2회(월요일 및 목요일) IHA를 통해 투여한다.

표 5

[0307]

1기 시험에서 평가되는 용량 수준		
코호트 수	환자수/코호트	Ad-p53 용량 ^a
용량 단계적 감소 (필요한 경우)	3+3	0.75×10^{12} vp/용량
출발 용량	3+3	2.0×10^{12} vp/용량
용량 점증 1	3+3	7.5×10^{12} vp/용량
용량 점증 2	3+3	20.0×10^{12} vp/용량

[0308]

상기 실행되는 1기 단계 동안 분석 집단은 연구 투약 중 적어도 하나의 용량을 수용하는 모든 피실험자들로 이루어질 것이다. 인구통계학, 기준선 특성, 및 동반 투약을 기술 통계학을 사용하여 요약한다. 연속적인 변수들을 샘플 크기(n), 평균, 표준 편차(SD), 최소(min), 중간 및 최대(max)에 의해 요약한다. 범주 변수들을 빈도 및 퍼센트에 의해 요약한다. 인구통계학, 기준선 특성, 및 동반 투약을 용량 수준에 의해 별도로 요약한다. 형식적인 통계학적 비교는 수행하지 않는다.

[0309]

모든 분석은 기술적이며 형식적인 통계학적 검증은 수행하지 않는다. 부작용(AE) 및 그의 중증도를 부작용에 대한 국립암 연구소(NCI; 미국 소재) 공통 용어 기준(CTCAE) 버전 4.0을 사용하여 분류한다. 사건의 수, 환자당 사건수, 및 적어도 하나의 사건을 갖는 환자의 수를 요약한다. 이들 사건 요약은 투여 후 시작하는 AE로서 한정되는 치료-발생 AE(TEAE) 및 연구 중 악화된 기존 상태에 집중할 것이다. 기술 통계학, 예를 들어 카운트 및 퍼센트를 사용하여 용량 수준에 의한 AE 및 DLT를 요약한다. 실험 데이터를 CTCAE 버전 4.0에 따라 등급화하고 기준선 및 용량 수준에 의한 기준선-후 시점들에서 기술적으로 요약한다.

[0310]

기술 통계학을 사용하여 용량 수준에 의한 효능 종점들을 요약한다. 환자를 2 주기 이하의 치료법으로 치료한다. 상응하는 양측 95% 신뢰도 구간과 함께, 객관적인 응답(CR+PR)을 성취하는 용량 수준에 의한 환자의 비율을 보고한다. 상기 분석에서, 임의의 이유로 인해 응답을 평가할 수 없는 환자는 응답을 성취하지 않은 것으로서 간주한다.

[0311]

효능 평가. 전체 생존(OS)은 치료의 출발로부터 임의의 원인의 사망까지 경과된 시간으로서 정의된다. 무진행 생존기간(PFS)(RECIST 1.1)을 치료의 출발로부터 질병 진행 또는 사망까지 계산한다. 객관적인 응답률(CR 또는 PR)은 CT 또는 MRI를 사용하여 가장 잘 확인된 응답 CR 또는 PR을 갖는 환자의 퍼센트로서 정의되며, RECIST 1.1에 따라 중심 판독자에 의해 판정된다. 상기 응답은 4주 이상 떨어진 후속 측정에 의해 확인되어야 한다. 일부 부위에 PET가 사용된다. 평가 및 측정을 선별시, 이어서 처음 치료로부터 출발하여 PD 또는 또 다른 또는 추가적인 항종양 요법(어느 것이든 먼저 발생하는 것)의 개시시까지 8주 간격으로 수행한다. 또한, 진행시까지 각각의 장기간 추적조사 방문시에 스캔을 수행한다. p53은 항-종양 면역 응답을 유도하는 것으로 공지되어 있기 때문에, 완전 응답(CR), 부분 응답(PR), 안정한 질병(SD) 및 질병 진행(PD)에 대한 기준을 면역관련 응답 기준(irRC) 및 RECIST 1.1 모두를 사용하여 평가한다. CR 또는 PR의 경우에 방문시 기록하며, 또 다른 종양 평가를 응답의 확인을 위해 4주 후에 수행해야 한다. SD는 초기 관찰후 6 내지 8주째에 확인되어야 한다. 응답 확인후, 종양 평가를 위한 스캔을 계획대로 수행한다.

[0312]

실시에 12 - Ad-MDA7(IL24) 및 항-PD1 항체에 의한 병용 요법

[0313]

항-PD-1 치료는 진행된, 절제할 수 없는 질병이 있는 흑색종 환자에 승인된 치료법이 되고있다. 항-PD-1은 다수의 환자들에게 이로운 획기적인 치료를 나타내지만, 다수 연구로부터의 임상 데이터는 대부분의 환자가 상기 치료법에 응답하지 않음을 가리킨다.

- [0314] 상기 연구를 Ad-MDA-7(주: Ad-MDA-7 = Ad-IL24) 및 항-PD-1 항체에 의한 치료에 의해, 진행된 흑색종 환자의 예후를 개선시키도록 설계한다. 상기 병용 요법의 임상적 효능은 전체 응답률[ORR = 부분 응답(PR) + 완전 응답(CR)], 완전 경감률(CRR), 영속성 응답률(적어도 6개월 동안 유지된 DRR=PR + CR); 내장 기관 전이까지의 속도 및 시간; 무진행 생존기간(PFS) 및 전체 생존(OS)의 평가를 포함한다. 림프구 표현형 및 혈청 사이토킨, 질병-관련 생물마커, 선택된 항원에 대한 항체 응답, 및 종양 항원에 대한 체액 및 세포 응답에 대한 상기 연구 약물의 효과를 또한 평가할 것이다.
- [0315] 또한, 종양 샘플을 (비제한적으로) 염증성 침윤물(예를 들어 CD8 및 CD4 세포 및 각각 림프구 및 종양 세포상의 예정세포사-1(PD-1) 및 예정세포사-리간드 1(PD-L1))의 풍부성 및 특징을 포함하여, 임상 활성의 병적인 상관성에 대해 검사한다.
- [0316] 환자들을 12개월까지 또는 18개월까지(이들이 상기 시간에 응답하는 경우) 치료한다. 12개월째에 응답하는 환자(CR 또는 PR)는 18개월 또는 임상적으로 관련된 진행성 질병(PDr)시까지, 어느 것이 먼저든, 계속 치료되어야 한다.
- [0317] 면역요법은 종양 응답의 지연된 개시를 야기하고 종양 진행으로 오인된 종양 염증과 관련될 수 있기 때문에, 상기 프로토콜에서 한정된 3가지 유형의 PD가 존재한다. 비-임상적으로 관련된 진행성 질병(PDn)은 활동도의 감퇴를 경험하지 않은 및/또는 조사자의 의견에서 대체 요법을 필요로 하지 않는 환자에서의 PD로서 정의된다. PDn을 나타내는 환자는 연구 치료의 계속이 허용된다. 임상적으로 관련된 진행성 질병(PDr)은 활동도의 감퇴와 관련된 및/또는 조사자의 의견에서 상기 환자가 대체 요법을 필요로 하는 PD로서 정의된다. PDr을 갖는 환자는, 조사자의 의견에서 다른 치료가 보장되지 않는 한, 치료 24주까지 연구를 계속할 것이 허용된다. CNS 진행성 질병(PDcns)은 중추신경계(뇌)에서의 진행으로서 정의된다.
- [0318] 연구 치료, Ad-IL24는 염수 및 10% 글리세롤을 함유하는 중성 완충제 중에 1×10^{12} vp/ml 농도의 동결된 바이알 현탁액(2.0 ml/바이알)으로서 제공된다. 주사에 적당한 종양 질량의 최소 크기는 없다. 피부 병변을, 피부 항원 제공 세포에 의해 매개되는 치료법의 면역 효과를 증대시키기 위해 치료되는 종양의 첫 번째 그룹에 포함시켜야 한다.
- [0319] 개별 환자는 최장 직경이 5 cm를 초과하는 단일 병변이 없는 20개 이하의 병변을 가질 수 있다. 상기 의도는 적어도 1 주기의 Ad-IL24 요법(3주 동안 매주 2회의 종양내 주사)으로 모든 병변을 최종적으로 치료하는 것이다. 각 환자의 병변들을 종양 직경에 의해 지시되는 각 치료 그룹 중의 병변수, 및 각 치료일에 전달된 상기 Ad-IL24가 표 3에 명시된 용량 점증 개요에 명시된 각 치료일에 허용되는 전체 부피 용량을 초과하지 않는 용량 점증 코호트를 갖는 Ad-IL24 처리 그룹들로 나눈다. 상기 종양(들)에 전달된 전체 용량(부피)은 표 3에 명시된 부피를 초과하지 않을 것이며, 처리 그룹내 각 개별 종양내에 주사된 용량은 종양 결절(들)의 크기에 따라 변하고 하기 알고리즘에 따라 결정된다:
- [0320] · 0.5 cm 이하의 최장 치수 종양에 대해 0.1 ml 이하.
- [0321] · 0.5 내지 1.5 cm의 최장 치수 종양에 대해 0.5 ml 이하.
- [0322] · 1.5 내지 2.5 cm의 최장 치수 종양에 대해 1.0 ml 이하.
- [0323] · 2.5 내지 5 cm의 최장 치수 종양에 대해 2.0 ml 이하. ·
- [0324] 임의의 개별적인 병변내에 주사되는 최대 부피는 2 ml이다. 임의의 하나의 치료일에 최대 용량은 표 2에 명시된 치료 용량 점증 코호트에 따라 2, 4 또는 6 ml이다.

표 6

[0325]

치료 스케줄																																			
주기	1				2				3																										
주	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4																			
일	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		M	T	M	T	M	T														
Ad-I L24	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+														
Niv o.*						+				+				+			+																		
Pemb ro.*						+				+							+																		

- Aghi *et al.*, *Cancer Res.*, 59:3861-3865, 1999.
- Aksentijevich *et al.* *Human Gene Ther.* 7:1111, 1996.
- Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 1 17-148, 1986.
- Bailey and Levine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11: 285-292, 1993.
- Bouvet *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2288-2292, 1998.
- Buller *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 9: 553-566, 2002.
- Camacho *et al.* *J Clin Oncology*, 22(145), 2004.
- Carroll *et al.*, *Mol Cancer Therapeutics*, 1:49-60, 2001.
- Caudell *et al.*, *J Immunol.*, 168:6041-6046, 2002.
- Chada *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 13:490-502, 2006.444-448, 1998.
- Chada *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 13:490-502, 2006.444-448, 1998.
- Chase *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:
- Chen and Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752, 1987.
- Choi *et al.* *Gene Therapy*, 17: 190-201, 2010.
- Corrales *et al.*, *Cell Reports*, 11, 1018-1030, 2015.
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Doronin *et al.*, *Virology*, 305:378-387, 2003.
- Fraley *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 76:3348-3352, 1979.
- Fujiwara *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 86: 1458-1462, 1994.
- Ghiringhelli *et al.*, *Biomed. J.*, 38:111-116, 2015.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Gurnani *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 44(2): 143-151, 1999.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol*, 101:1094-1099, 1985.
- Hartwell *et al.*, *Science*, 266: 1821-1828, 1994.
- Hurwitz *et al.* *Proc Natl Acad Sci.* 95(17): 10067-10071, 1998.
- Hynes and Ferretti, *Methods Enzymol.*, 235: 606-616, 1994.
- Iannello *et al.*, *J Experimental Medicine*, 210(10):2057-2069.

[0332]

IMLYGIC™ [package insert]. Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA; October 2015.

Inoue *et al.*, *Cancer Letters*, 157:105-112, 2000.

International Patent Application No. WO1995001994.

International Patent Application No. WO1998042752.

International Patent Application No. WO2000037504.

International Patent Application No. WO2001014424.

International Patent Application No. WO2004058801.

International Patent Publication No. WO 2005/003168.

International Patent Publication No. WO 2005/009465.

International Patent Publication No. WO 2006/003179.

International Patent Publication No. WO 2006/072625.

International Patent Publication No. WO 2006/072626.

International Patent Publication No. WO 2007/042573.

International Patent Publication No. WO 2008/084106.

International Patent Publication No. WO 2010/065939.

International Patent Publication No. WO 2012/071411.

International Patent Publication No. WO 2012/160448.

International Patent Publication No. WO 2012009703.

International Patent Publication No. WO1995011986.

International Patent Publication No. WO2014/047350.

International Patent Publication No. WO2014/138314.

International Patent Publication No. WO2015/016718.

International Patent Publication No. WO2015/027163.

International Patent Publication No. WO2015/150809.

International Patent Publication No. WO2016/009017.

Jiang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:9160-9165.

Kawabe *et al.*, *Mol Ther.* 6(5):637-44, 2002.

Kawabe *et al.*, *Mol Ther.* 6(5): 637-644, 2002.

Kim *et al.* *Journal of the National Cancer Institute*, 98(20): 1482-1493, 2006.

Kotin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.

Kreil, *Protein Sci.*, 4:1666-1669, 1995.

Lichtenstein *et al.*, *Int. Rev. Immunol.*, 23:75-111, 2004.

Liu *et al.* *J. Biol. Chem.*, 270:24864, 1995.

Lui *et al.*, *Gene Therapy*, 10:292-303, 2003.

[0333]

- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62: 1120-1124, 1988.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Mellman *et al.*, *Nature* 480:480-489, 2011.
- Mellman *et al.*, *Nature*, 480:480-489, 2011.
- Mhashilkar *et al.*, *Mol. Medicine* 7(4): 271-282, 2001.
- Miyahara *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 13:753-761, 2006.
- Mokyr *et al.*, *Cancer Res.*, 58:5301-5304, 1998.
- MultiVir Inc., Form S-1 Registration Statement, U.S. Securities and Exchange Commission, 2015
- Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.* *Methods Enzymol*, 149:157-176, 1987.
- Nishikawa *et al.*, *Mol. Ther.*, 9(8):818-828, 2004b.
- Nishikawa *et al.*, *Oncogene*, 23(42): 7125-7131, 2004a.
- Nishizaki M, *et al.*, *Clin. Can. Res.*, 5: 1015-1023, 1999.
- Ohashi M, *et al.*, *Gut*, 44:366-371, 1999.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012.
- Pardoll, *Nature Rev Cancer*, 12:252-264, 2012.
- Philip *et al.* *J. Biol. Chem.*, 268: 16087, 1993.
- Qin, X., *et al.*, *Biol Reprod.*, 56:800-11, 1997a.
- Qin, X., *et al.*, *Biol Reprod.*, 56:812-20, 1997b.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol*, 10:689-695, 1990.
- Rosenberg *et al.*, *Nat Med.*, 10(19): 909-15, 2004.
- Samulski *et al.*, *EMBO J.* 10:3941-3950, 1991.
- Samulski *et al.*, *J Virol*, 63:3822-3828, 1989.
- Sherwood *et al.*, *Endocrinology* 114:806-13, 1984.
- Sobel RE, *et al.*, Chapter 11: Tp53 Gene Therapy for Cancer Treatment and Prevention, NY: Springer Science + Business Media, 2013.
- Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34: 13537, 1995.

[0334]

Spitz *et al.*, *Clin Cancer Research*, 2: 1665-1671, 1996.
 Swisher *et al.*, *Clin Cancer Research*, 9:93-101, 2003.
 Tatebe S, *et al.*, *Int. J Oncol.*, 15: 229-235, 1999.
 Tatebe S, *et al.*, *Int. J Oncol.*, 15: 229-235, 1999.
 Tchekmedyian *et al.*, *Oncology*, 29(12):990-1002, 2015.
 Temin, n: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
 Textor *et al.*, *Cancer Res.*, 71(18):5998-6009, 2011.
 Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(21):9742-6, 1995.
 Timiryasova *et al.*, *Biotechniques*, 31:534, 6, 8-40, 2001.
 Toda *et al.*, *Mol. Therapy*, 2(4): 324-329, 2000.
 Tollefson *et al.*, *J. Virol.*, 70: 2296-2306, 1996.
 Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
 Tsukamoto *et al.*, *Nature Genetics*, 9:243, 1995.
 U.S. Patent Application No. US20110008369.
 U.S. Patent Application No. US2014022021.
 U.S. Patent Application No. US20140294898.
 U.S. Patent No. 4,797,368.
 U.S. Patent No. 4,835,251.
 U.S. Patent No. 5,023,321.
 U.S. Patent No. 5,139,941.
 U.S. Patent No. 5,302,523.
 U.S. Patent No. 5,384,253.
 U.S. Patent No. 5,464,765.
 U.S. Patent No. 5,580,859.
 U.S. Patent No. 5,589,466.
 U.S. Patent No. 5,656,610.
 U.S. Patent No. 5,702,932.
 U.S. Patent No. 5,736,524.
 U.S. Patent No. 5,780,448.
 U.S. Patent No. 5,789,215.
 U.S. Patent No. 5,811,395.
 U.S. Patent No. 5,925,565.
 U.S. Patent No. 5,935,819.
 U.S. Patent No. 5,945,100.

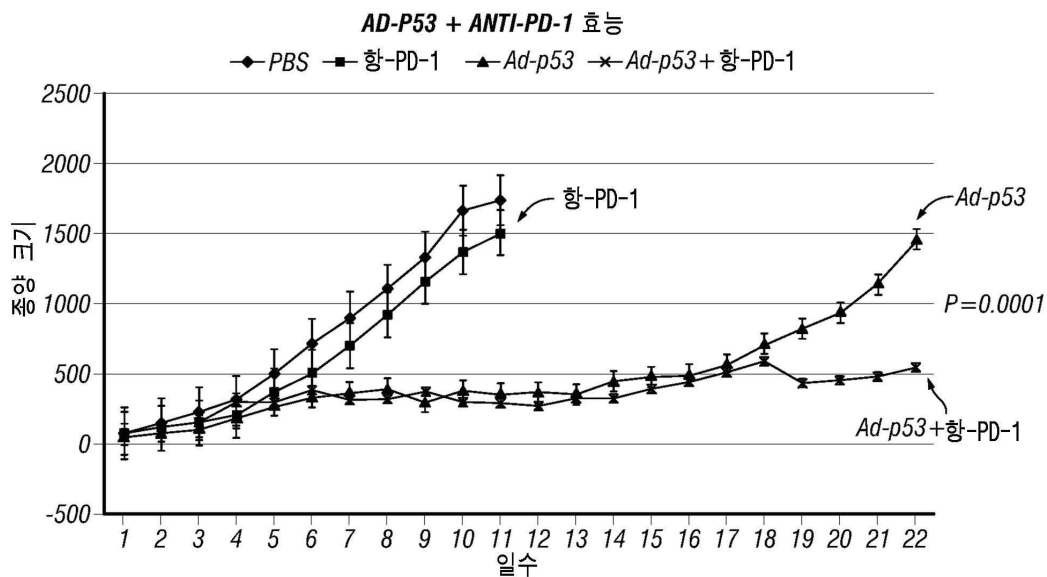
[0335]

U.S. Patent No. 5,981,274.
 U.S. Patent No. 5,994,136.
 U.S. Patent No. 5,994,624.
 U.S. Patent No. 6,013,516.
 U.S. Patent No. 6,207,156.
 U.S. Patent No. 7,223,593.
 U.S. Patent No. 7,537,924.
 U.S. Patent No. 8,017,114.
 U.S. Patent No. 8,119,129.
 U.S. Patent No. 8,329,867.
 U.S. Patent No. 8,354,509.
 U.S. Patent Publication No. US2011/0039778.
 U.S. Patent Publication No. US2015/0202290.
 Vincent *et al.*, *Cancer Res.*, 70(8):3052-3061, 2010.
 Waku *et al.*, *J Immunol.*, 165:5884-5890, 2000.
 Xu *et al.*, *Gene Therapy*, 22(3): 31-40, 2015.
 Xu *et al.*, *J Gastroenterol.*, 48(2):203-13, 2013.
 Xue *et al.*, *Nature*, 445(7128):656-660, 2007.
 Young *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 20(9): 531-537, 2013.
 Zeimet and Marth, *The Lancet Oncology*, 7:415-422, 2003.
 Zhang *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 22:17-22, 2015.
 Zhang *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 1:5-13, 1994.

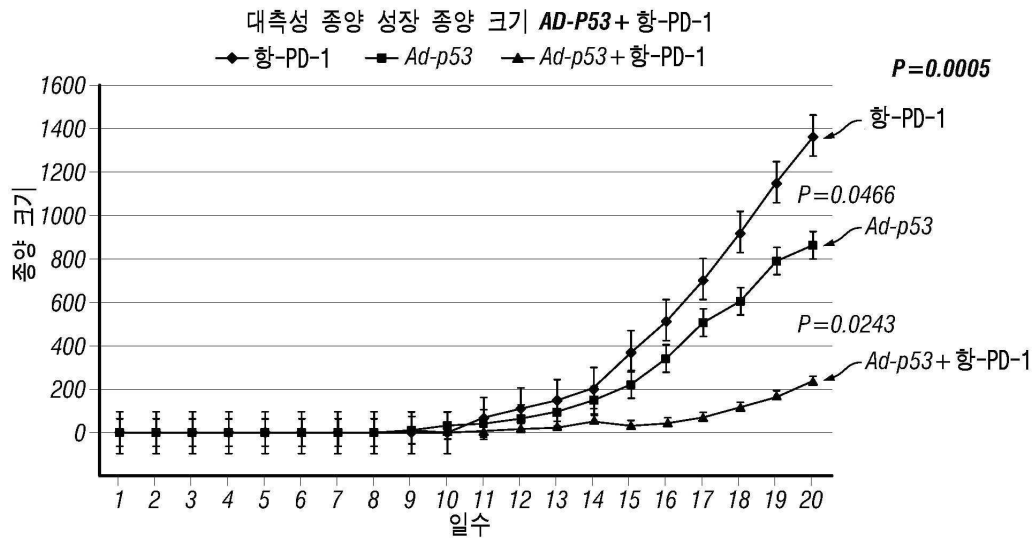
[0336]

도면

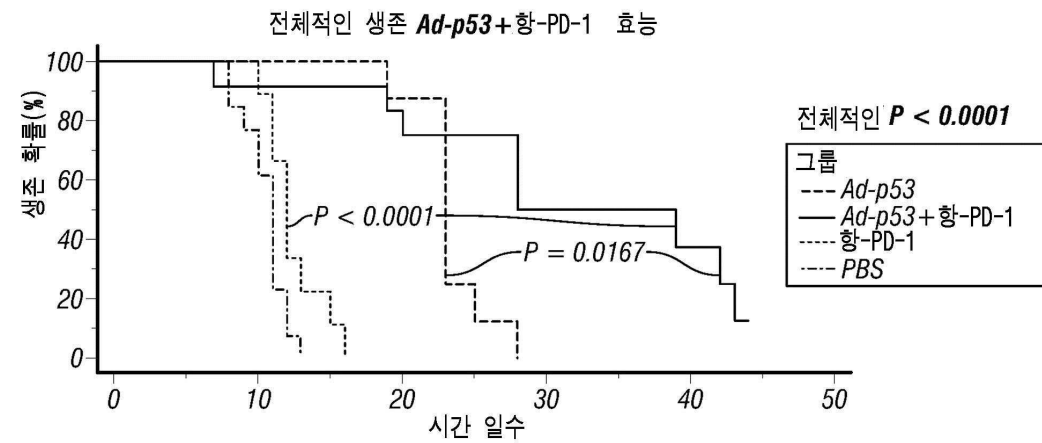
도면1



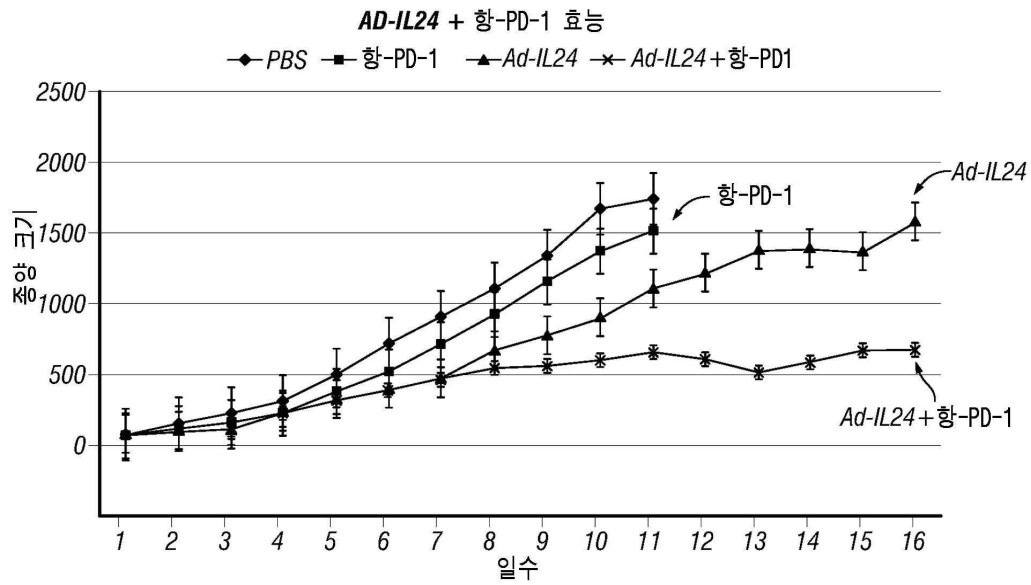
도면2



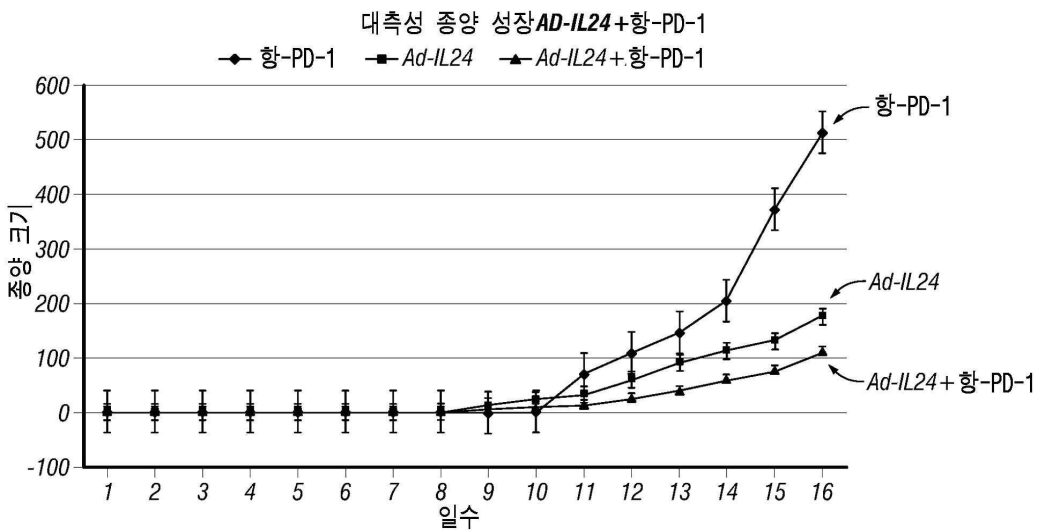
도면3



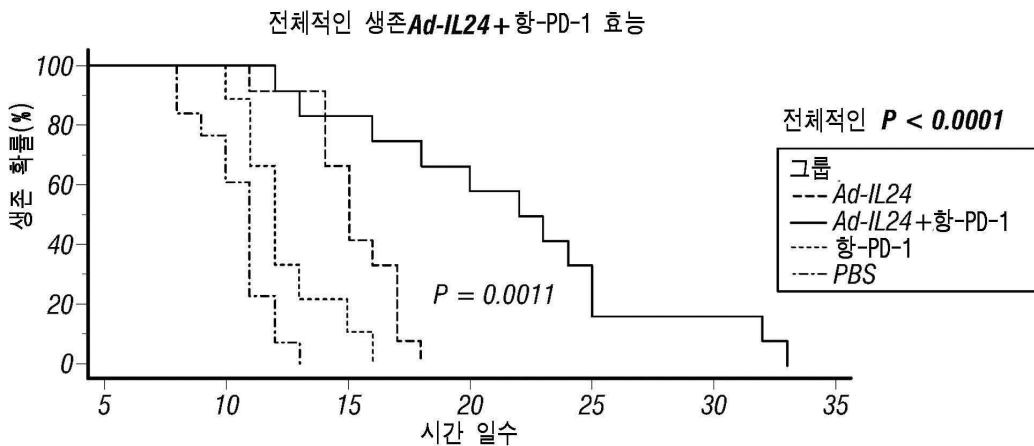
도면4



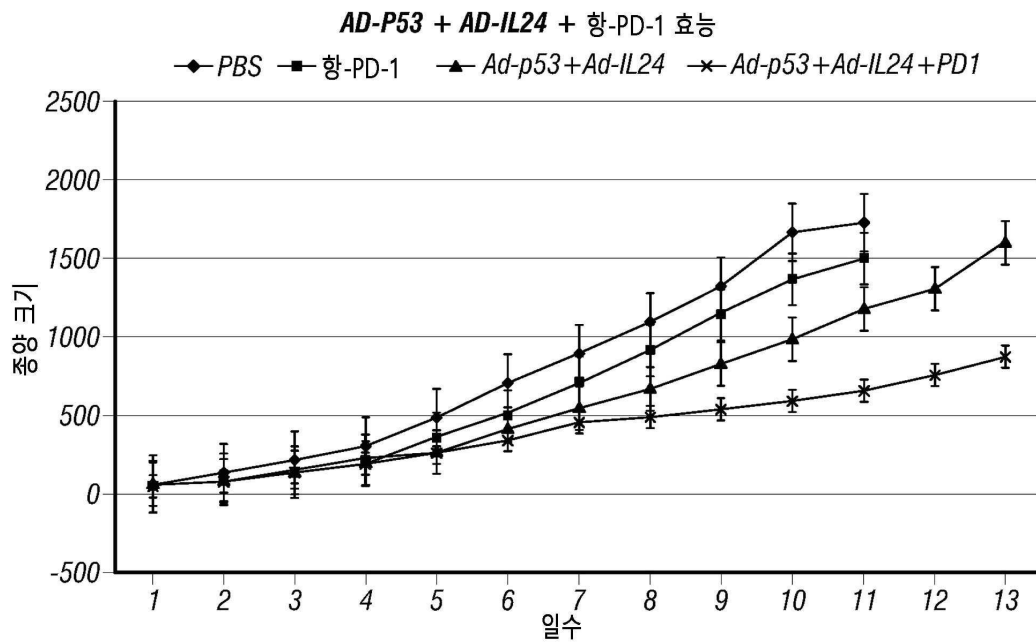
도면5



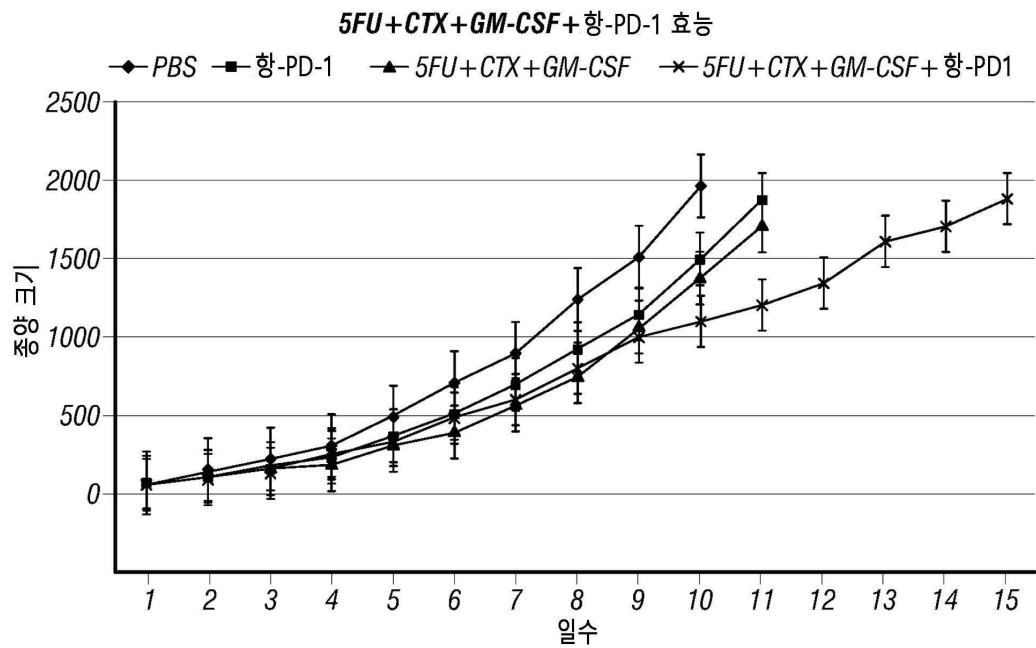
도면6



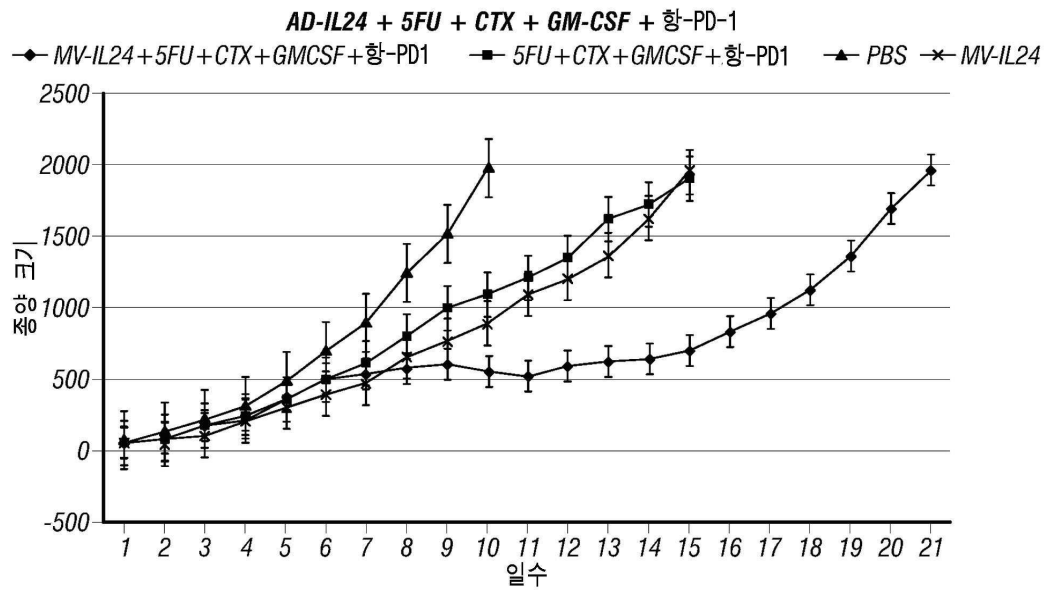
도면7



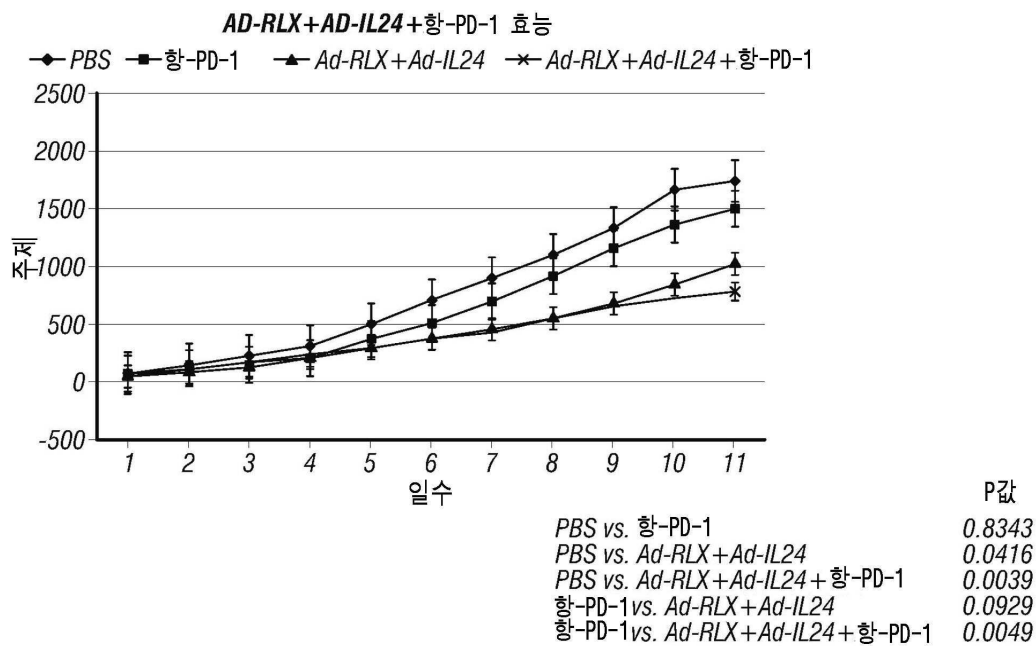
도면8



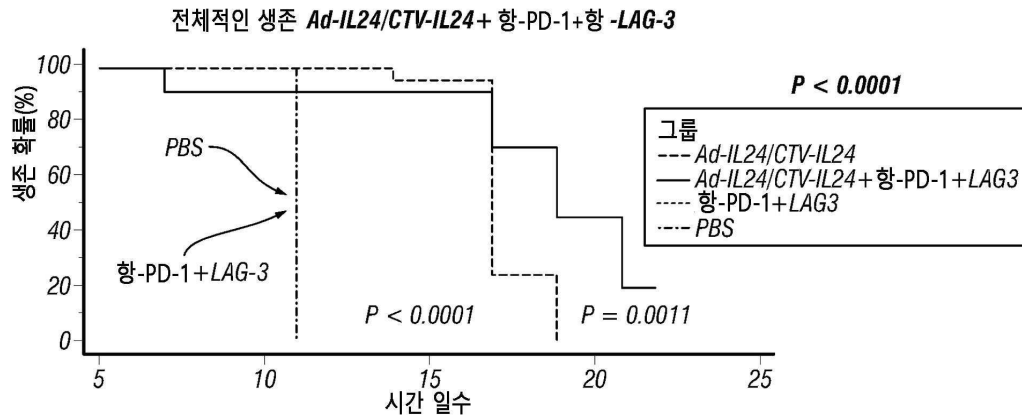
도면9



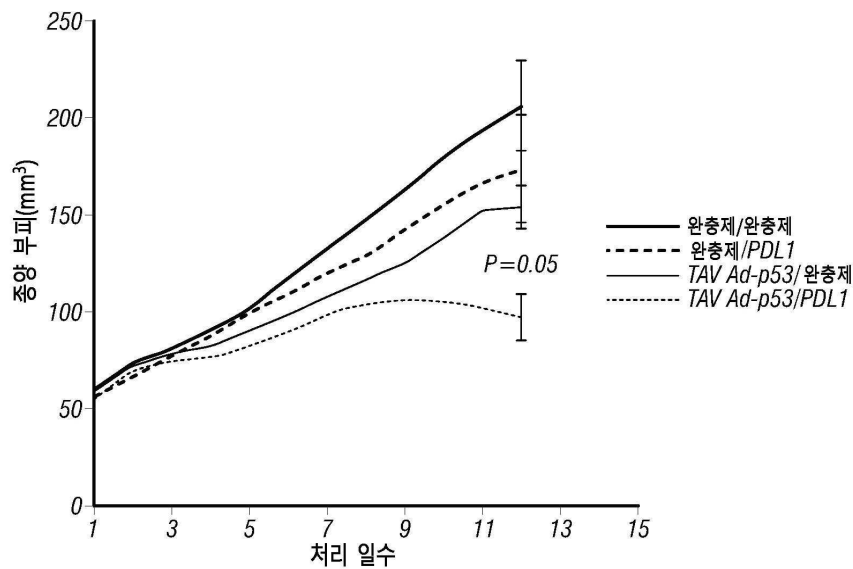
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MULTIVIR INC.

<120> COMPOSITIONS COMPRISING TUMOR SUPPRESSOR GENE THERAPY AND
IMMUNE CHECKPOINT BLOCKADE FOR THE TREATMENT OF CANCER

<130> IPA180533-US

<140> PCT/US2016/060833

<141> 2016-11-07

<150> 62/252,453

<151> 2015-11-07

<150> 62/276,615

<151> 2016-01-08

<150> 62/333,817

<151> 2016-05-09

<150> 62/345,094

<151> 2016-06-03

<150> 62/408,879

<151> 2016-10-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 206

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Phe Gln Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Thr Leu Ala Arg Pro

1 5 10 15

Phe Cys Pro Pro Leu Leu Ala Thr Ala Ser Gln Met Gln Met Val Val

20 25 30

Leu Pro Cys Leu Gly Phe Thr Leu Leu Leu Trp Ser Gln Val Ser Gly

35 40 45

Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu Val

85 90 95

Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr Leu

100 105 110

Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg Thr

115 120 125

Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn Phe

130 135 140

Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met Phe

145	150	155	160
Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg Ala			
	165	170	175
Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly Glu			
	180	185	190
Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu			
195	200	205	