



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0132124
(43) 공개일자 2024년09월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 35/761 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7028510(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년05월25일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2019-7037594
원출원일자(국제) 2018년05월25일
심사청구일자 2021년05월25일
- (85) 번역문제출일자 2024년08월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/034655
- (87) 국제공개번호 WO 2018/218151
국제공개일자 2018년11월29일
- (30) 우선권주장
62/511,010 2017년05월25일 미국(US)

- (71) 출원인
유니버시티 오브 센트럴 플로리다 리서치 파운데이션, 인코포레이티드
미합중국, 플로리다 32826, 올랜도, 스테. 501, 리서치 파크웨이 12201
- (72) 발명자
파크스, 그리프
미국 32827 플로리다주 올랜도 로리어트 블러바드 8495
코픽, 엘리샤
미국 32816 플로리다주 카셀베리 폴 맥클루어 코트 196
- (74) 대리인
양영준, 이상남

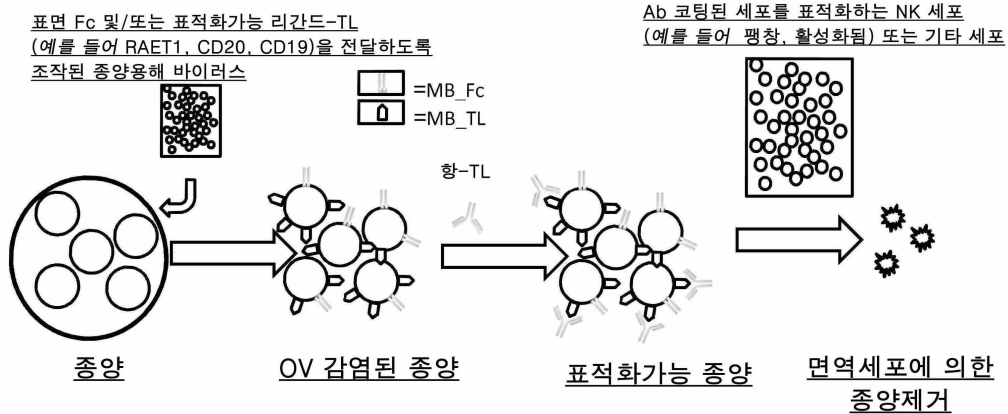
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 천연 살해 세포에 의해 사멸하는 종양 세포를 감작시키기 위한 신규한 종양용해 바이러스

(57) 요약

조작된 종양용해 바이러스, 관련된 융합 단백질 및 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 조작된 바이러스를 사용하여 암을 치료하는 방법이 개시된다. 일 양태에서, 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에 개시되되, 상기 종양용해 바이러스는 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현시킨다

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/768 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C12N 2760/18732 (2013.01)

C12N 2760/18743 (2013.01)

C12N 2760/18745 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 외인성 막결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 조작된 종양용해 바이러스의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 천연 살해 세포에 의해 사멸하는 종양 세포를 감작시키기 위한 신규한 종양용해 바이러스

배경 기술

[0002] 1. 종양용해 바이러스 (OV)는 암 치료제로서 높은 유망함을 보유한다. OV는 암 세포에 선택적으로 퍼지고 엄청난 세포병리적 효과를 야기한다. 이들 바이러스로 감염된, 죽어가는 암 세포는 NK 세포 또는 세포독성 T 세포와 같은 면역 세포를 추가로 모집하여 바이러스 사멸을 탈출한 감염된 암 세포를 "세척"한다. 그러나, 암 환자는 빈번하게 감염된 표적 암 세포를 사멸 및/또는 제거하는 일을 수행하는 데 실패한 면역계를 손상시켰다. 따라서, 개선된 결과를 제공할 수 있는 신규한 종양용해 바이러스 및 상기 세포를 사용하는 방법이 필요한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0003] 2. 조작된 또는 변형된 종양용해 바이러스에 관련된 방법 및 조성물이 개시된다.

[0004] 3. 일 양태에서, 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시되고 여기서 상기 종양용해 바이러스는 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 외인성 막결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현시킨다.

[0005] 4. 세포질 꼬리 영역, 막관통 영역 및 세포외 줄기 영역; 및 세포외 줄기 영역의 C-말단에 융합된 N-말단을 포함하는 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 융합 단백질이 또한 본 명세서에서 개시된다.

[0006] 5. 일 양태에서, 임의의 선행하는 양태의 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 본 명세서에서 개시되고; 여기서 하나 이상의 외인성 막결합된 면역 세포 표적화 리간드는 조작된 면역글로불린 Fc 도메인, NK 세포 수용체 NKG2D의 단백질 효능제 (예컨대, 예를 들어 RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, MICB), 항-CD19에 반응성인 단백질 에피토프 (예컨대 CD19), 및/또는 항-CD20에 반응성인 단백질 에피토프 (예컨대 CD20)를 포함한다.

[0007] 6. 또한 임의의 선행하는 양태의 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 개시되고; 여기서 외인성 막결합된 면역 세포 표적화 리간드는 면역글로불린 Fc 도메인이고 상기 면역글로불린 Fc 도메인 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 Fc 도메인)은 세포내에서 면하는 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 가지도록 변형된다 (즉, Fc는 세포 표면으로부터 최대 거리에 있는 N-말단측보다는 세포막의 표면 근처 막 앵커 펩타이드에 부착된 그것의 N-말단측을 갖는 세포 표면의 세포외 측면 상에서 발현된다). 일 양태에서, 임의의 선행하는 양태의 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 본 명세서에서 개시되고; 여기서 Fc 도메인의 N-말단은 비절단된 신호 앵커의 세포외 줄기 영역의 C-말단에 융합된다.

[0008] 7. 일 양태에서, 조작된 종양용해 바이러스가 융합유도 종양용해 바이러스인 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시된다. 일부 양태에서, 본 융합유도 종양용해 바이러스는 변형된 또는 조작된 파라인플루엔자 바이

러스 유형 5일 수 있다. 또한 임의의 선행하는 양태의 융합유도 종양용해 바이러스가 개시되고; 여기서 상기 융합유도 종양용해 바이러스는 종양 세포가 융합하도록 하는 과융합유도 특성을 허용하는 펩타이드에 대해 코딩하는 유전자를 포함한다. 일 양태에서, 종양용해 바이러스는 임의의 선행하는 양태의 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함하도록 변형되거나 또는 조작된다.

- [0009] 8. 또한 임의의 선행하는 양태의 종양용해 바이러스가 개시되고, 여기서 상기 종양용해 바이러스는 IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 또는 IL-15 중 하나 이상을 발현하도록 조작된다.
- [0010] 9. 일 양태에서, 대상체에게 임의의 선행하는 양태의 조작된 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시된다.
- [0011] 10. 또한 임의의 선행하는 양태의 암을 치료하는 방법이 개시되고, 여기서 본 방법은 추가로 입양적으로 이송시키는 항체 또는 면역 세포 (예를 들어, NK 세포, 유전자 변형된 NK 세포, 및/또는 CAR T 세포)를 포함한다.
- [0012] 11. 일 양태에서, 임의의 선행하는 양태의 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시되고, 여기서 NK 세포는 하나 이상의 NK 세포 자극제, 예컨대, 예를 들어, 사이토카인, 성장 인자, 합성 리간드, NK 세포 자극 입자, NK 세포 자극 엑소솜, 또는 NK 세포 자극 피더 세포로 자극되고 팽창된다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 12. 본 명세서에 포함되어 그의 일부를 구성하는 수반되는 도면들은 몇 개의 구현예를 설명하고 설명과 함께 개시된 조성물 및 방법을 예시한다.
- 13. 도 1은 항체의 막 결합된 Fc 영역 (MB_Fc) 또는 막 결합된-표적화가능 리간드 (MB_TL); (예를 들어 RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, MICB, CD19, 및/또는 CD20)를 전달하도록 조작된 종양 표적화 종양용해 바이러스로 처리되고 감염된 표적화가능 항원을 결합하는 종양의 개략도를 도시한다. NK 세포 수용체 효능제가 아닌 MB_TL이 사용된 경우, 종양은 TL에 대한 치료적 항체 (예를 들어 항-CD20- 리투시맵, 오파투무맵, 오브티누투주맵, 벨투주맵, 또는 오크렐리주맵 또는 항-CD19 MDX1342, MEDI-551, AFM11, XmAb 5871, MOR-208, SGN-19A, SAR3419, 블리나투모맵, 또는 타플리투모맵)로 처리될 수 있다. Fc 또는 항-TL 항체로 마킹된 종양은 그런 다음 예를 들어 CD16+ NK 세포와 같은 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC)이 가능한 입양으로 전달된 세포로 처리될 수 있다.
- 14. 도 2A 및 2B는 비절단된 신호 앵커를 포함하는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드의 구조를 도시한다. 도 2A는 유형 I 및 유형 II 내재성 막 단백질과 각각에 대한 신호 앵커의 구조를 도시한다. 도 2B는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드에서 사용된 비절단된 신호 앵커의 구조를 도시한다.
- 15. 도 3A는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 및 임의의 융합유도 돌연변이의 부위에 대한 삽입 점을 포함한 조작된 종양용해 바이러스에서 유전자의 개략도를 도시한다.
- 16. 도 3B는 종양용해 바이러스로 감염 후 Vero 세포의 현미경사진을 도시한다.
- 17. 도 3C는 모의 처리된 종양 표적에 비교하여 조작된 종양용해 바이러스로 처리될 때 PM21 활성화된 NK 세포가 종양 세포 더 효과적으로 인식하고 사멸한다는 것을 도시한다.
- 18. 도 3D는 뉴라미니다제 신호 앵커 및 증가하는 뉴라미니다제 줄기 길이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드의 대안적인 구성을 도시한다.
- 19. 도 4는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 서열의 일 예를 도시한다. 여기서 뉴라미니다제 신호 앵커는 RS 링커 (즉, 제한 부위 링커)에 의해 IgG Fc 도메인에 융합된다.
- 20. 도 5는 NA-Fc 작제물을 수반하는 플라즈미드에 의해 형질감염될 때 감염된 세포의 표면 상에서 막 결합된 Fc 표적화 리간드를 정확하게 발현하는 NA-Fc 융합된 작제물의 능력에 대한 유세포측정 분석을 도시한다.
- 21. 도 6은 P/V/F 바이러스가 NK 세포 사멸을 위해 A549 세포를 감작시키는 것을 도시한다. A549 폐암 세포주는 모의 감염되었거나 또는 P/V/F 바이러스로 감염되었다. 감염 후 NK 세포는 지시된 비율로 세포에 첨가되고 4시간 동안 인큐베이션되었다. 세포사는 Cytotox Glow 검정을 사용하여 측정되었다. NK 단독 및 표적 (모의 또는 P/V/F 감염됨) 단독 웰들이 대조군으로 포함되었다.
- 22. 도 7은 제오신 선택 하에서 NA1-Fc 작제물로 형질감염된 A549 폐암 세포가 세포 표면 상에 Fc를 발현하는 것을 도시한다. A549 폐암 세포주는 NA1-Fc의 발현을 인코딩하는 작제물로 형질감염되었고 제오신의 존재에서

배양되었다. 세포는 항-humanFc-APC 항체로 염색되었고 유세포측정에 의해 분석되었다. 친계 세포가 대조군으로 사용되었다.

23. 도 8은 종양 상에 Fc의 발현뿐만 아니라 P/V/F로 감염은 NK 세포에 의해 A549 세포의 사멸을 증가시킨다는 것을 도시한다. A549 세포 또는 표면상에 Fc를 안정적으로 발현하는 A549 세포 (A549-Fc)는 모의 또는 P/V/F로 감염되었고 1:1 또는 1:3 표적 대 NK 세포 비에서 NK 세포로 인큐베이션되었다. 세포사는 각각의 표적 단독 세포를 함유하는 대조군을 참조하여 표적 게이트에서 생존 세포 사건을 측정하는 유세포측정에 의해 결정되었다.

24. 도 9는 NA1-Fc -NA4-Fc 작제물로 형질감염된 SKOV-3 난소암 세포가 FACS 분류 후 세포 표면 상에서 Fc를 발현한다는 것을 도시한다. SKOV-3 난소암 세포주는 NA1-Fc, NA2-Fc, NA3-Fc 또는 NA4-Fc의 발현을 인코딩하는 작제물로 형질감염되었다. 며칠 후, 세포를 항-인간 Fc-APC 항체로 염색하고 FACS에 의해 분류하여 Fc- 발현 세포 모집단 세포측정을 풍부하게 하였다. 분류된 세포는 시험된 모든 작제물에 대해 안정하지만 가변성인 Fc의 발현 수준을 갖는다. 친계 세포가 대조군으로 사용되었다.

25. 도 10은 NA 줄기의 증가된 길이가 표면 발현된 Fc 도메인의 인식을 통해 NK 세포 사멸을 개선한다는 것을 도시한다. (NA1-NA4)-Fc의 안정적인 발현이 있거나 없는 SKOV-3 세포를 NK:표적의 3:1 비로 NK 세포와 혼합하였다. 세포사는 각각의 표적 단독 세포를 함유하는 대조군을 참조하여 표적 게이트에서 생존 세포 사건을 측정하는 유세포측정에 의해 결정되었다. 사멸은 SKOV-3의 세포 표면에서 Fc의 밀도보다는 NA 줄기의 길이와 관련이 있다 (도 9).

26. 도 11은 종양 상에 Fc의 발현뿐만 아니라 P/V/F로 감염이 NK 세포에 의한 SKOV-3 세포의 사멸을 증가시킨다는 것을 도시한다. SKOV-3 세포 또는 표면상에서 안정적으로 NA1-Fc를 발현하는 SKOV-3 세포 (SKOV-3-Fc)는 모의 또는 P/V/F로 감염되었고 1:1 또는 1:3 표적 대 NK 세포 비에서 NK 세포로 인큐베이션되었다. 세포사는 각각의 표적 단독 세포를 함유하는 대조군을 참조하여 표적 게이트에서 생존 세포 사건을 측정하는 유세포측정에 의해 결정되었다. 표면 상에 Fc의 발현뿐만 아니라 P/V/F로 감염 둘 모두는 NK 세포에 의한 SKOV-3 세포의 증가된 사멸을 유발시키고 이 효과는 부가적이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 27. 본 화합물, 조성물, 물질, 디바이스, 및/또는 방법이 개시 및 기재되기 전에, 이들은 달리 구체화되지 않는 한 특이적 합성 방법 또는 특이적 제조법 생명공학 방법에, 또는 달리 구체화되지 않는 한 특정 시약에 제한되지 않고, 물론 이와 같이 다양할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 구현 예들을 설명하기 위한 것이며 제한하려는 것이 아님이 또한 이해되어야 한다.

[0015] **A. 정의**

[0016] 28. 본 명세서 및 첨부된 청구항들에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "약제학적 담체"에 대한 언급은 2 또는 그 초과와 이러한 담체의 혼합물, 및 기타 동종의 것을 포함한다.

[0017] 29. 범위는 "약" 하나의 특정 값 및/또는 "약" 또 다른 특정 값으로 본 명세서에서 표현될 수 있다. 그러한 범위가 표현될 때, 다른 구현예는 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 선행된 "약"의 사용에 의해, 값이 근사치로 표현될 때, 특정한 값은 또 다른 구현예를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 각각의 범위의 종점은 다른 종점과 관련하여 그리고 다른 종점과 무관하게 양자에서 중요하다라는 것이 추가로 이해될 것이다. 본 명세서에서 개시된 다수의 값이 존재하고, 또한 각각의 값은 그 값 자체 외에 그 특정 값에 대해 "약"으로 본 명세서에 개시되는 것이 또한 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되면, "약 10"도 또한 개시된다. 값이 개시될 때 "값과 같거나 보다 작은", "값과 같거나 보다 큰" 및 값들 사이의 가능한 범위는 또한 숙련자에게 적절하게 이해되는 바와 같이 개시되는 것으로 또한 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되면 "10과 같거나 그 보다 작은" 뿐만 아니라 "10과 같거나 그 보다 큰" 것도 또한 개시된다. 본 출원 전체에 걸쳐, 데이터는 수많은 상이한 포맷으로 제공되며, 이 데이터는 종점 및 개시점을 나타내며, 데이터 포인트의 임의의 조합에 대한 범위인 것으로 또한 이해된다. 예를 들어, 특정 데이터 포인트 "10" 및 특정 데이터 포인트 15가 개시되면, 10 및 15의 초과, 이상, 미만, 이하 및 그 값뿐만 아니라 10과 15 사이도 개시된 것으로 고려된다고 이해된다. 또한 2개의 특정 단위 사이의 각각의 단위가 또한 개시되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 10 및 15가 개시되면, 11, 12, 13 및 14도 또한 개시된다.

- [0018] 30. 본 명세서 및 이어지는 청구범위에서, 하기 의미를 갖도록 정의될 다수의 용어가 언급될 것이다:
- [0019] 31. "선택적인" 또는 "선택적으로"는 후속으로 기재된 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있으며, 설명은 상기 사건 또는 상황이 발생하는 사례 및 그렇지 않은 사례를 포함한다는 것을 의미한다.
- [0020] 32. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "N-말단측" 또는 "아미노 말단 끝"은 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 방향성을 지칭하고, N-말단을 의미하지 않을 수 있다. 일부 양태에서, 키메라 또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 논의된 경우, N-말단측은 키메라 또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 전체 구조가 아닌 일 성분만을 언급할 수 있다. 예를 들어, 비절단된 신호 앵커를 포함하는 Fc 도메인이 논의되고, 그리고 Fc 도메인이 세포내에서 면하는 아미노 말단 끝 또는 N-말단측과 역전된 배향을 갖는 것으로 기재된 경우, 신호 앵커는 키메라 또는 융합 작제물의 N-말단에 있고 실제로 세포 막에 걸쳐 있는 키메라 또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 본 명세서에서 고려된다. 따라서, 이러한 키메라에서, 앵커는 Fc 도메인보다 아미노 말단에 더 가깝지만, Fc 도메인의 방향성은 전형적으로 세포 막과 세포외 기질로 연장하는 아미노 말단 끝에 걸치는 카복시 말단을 갖는 전형적인 B 세포에서 Fc 도메인의 배향에 대해 역전된 세포를 면하는 N-말단측을 갖는다.
- [0021] 33. 본원 전반에 걸쳐, 다양한 간행물이 언급된다. 이들 간행물의 개시내용은 그것의 전체로 본 발명이 속하는 기술분야의 상태를 보다 완전하게 설명하기 위해 본원에 이로써 참고로 편입된다. 개시된 참고문헌은 또한 참고 문헌이 의존하는 문장에서 논의되는 이들에 함유된 물질에 대해 개별적으로 그리고 구체적으로 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0022] **B. 조성물**
- [0023] 34. 본 명세서에서 개시된 방법 내에서 사용되는 조성물 자체뿐만 아니라 개시된 조성물을 제조하기 위해 사용되는 성분이 개시된다. 이들 및 다른 물질이 본 명세서에서 개시되어 있고, 이들 물질의 조합, 서브셋, 상호작용, 그룹 등이 개시될 때 이들 화합물의 각각의 다양한 개별 및 집합적 조합 및 순열에 대한 특이적 참조는 명백하게 개시되지 않을 수 있지만, 각각은 구체적으로 본 명세서에서 고려되고 기재된다는 것으로 이해된다. 예를 들어, 특정 종양용해 바이러스 또는 융합 단백질이 개시되고 논의되고, 종양용해 바이러스 및/또는 융합 단백질을 포함한 수많은 분자에 대해 이루어 질 수 있는 수많은 변형이 논의된 경우, 구체적으로 반대로 나타내지 않는 한 종양용해 바이러스 및/또는 융합 단백질의 각각의 모든 조합 및 순열과 가능한 변형이 구체적으로 고려된다. 따라서, 분자 A, B, 및 C의 부류가 개시될 뿐만 아니라 분자 D, E, 및 F의 부류 및 조합 분자, A-D의 예가 개시된 경우, 각각이 개별적으로 인용되지 않더라도 각각은 개별적으로 의미되고 집합적으로 고려되어 조합, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, 및 C-F가 개시된 것으로 고려된다. 마찬가지로, 임의의 서브셋 또는 이들의 조합이 또한 개시된다. 따라서, 예를 들어, A-E, B-F, 및 C-E의 하위-그룹이 개시된 것으로 고려될 것이다. 이 개념은, 비제한적으로, 개시된 조성물을 제조 및 사용하는 방법의 단계를 포함한 본원의 모든 양태에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가의 단계가 있는 경우, 이들 추가의 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 특정 구현에 또는 구현예의 조합으로 수행될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0024] 35. 암 세포를 우선적으로 감염시키고 사멸시키는 종양용해 바이러스 (OV)는 암 치료로서 높은 유망함을 보유한다. OV는 암 세포에 선택적으로 퍼지고 엄청난 세포병리적 효과를 야기한다. 이들 바이러스로 감염된, 죽어가는 암 세포는 NK 세포 또는 세포독성 T 세포와 같은 면역 세포를 추가로 모집하여 바이러스 사멸을 탈출한 감염된 암 세포를 "세척"한다. 암 환자에서, 면역계 빈번하게 손상되고 일을 수행하는 데 실패하기 때문에, 입양 면역 세포 전이와의 조합이 개선된 결과를 제공할 수 있다.
- [0025] 36. 면역 세포 예컨대 NK 세포는 직접적으로 감염된 세포의 파괴를 표적으로 한다. 예를 들어, NK 세포는 효율적으로 종양 세포, 스트레스 받은 세포, 및 바이러스로 감염된 세포를 다양한 상이한 방법에 의해 파괴한다. 첫 번째는 표적 세포에 직접적으로 결합하고, 그것의 막을 투과하고 그 다음 몇 개의 세포자멸적 단백질을 절단 및 활성화시키는 단백질을 주입함으로써, 그것에 의해 표적화된 세포의 프로그래밍된 세포사 (세포자멸사)를 개시하는 것이다. NK 세포의 표면은 또한 세포자멸적 프로그래밍된 세포사를 위한 내부 신호를 작동시키는 표적 세포 상에, 수용체, 예컨대 종양-괴사 인자 (TNF)-관련된 세포자멸사-유도 리간드 (TRAIL)에 대한 수용체에 결합하고 활성화할 수 있는 단백질 리간드를 또한 함유한다. 자극될 때, NK 세포는 또한 바이러스 및 종양을 억제할 뿐만 아니라 다른 면역 세포로 신호 침습을 억제하는 사이토카인 예컨대 $INF\gamma$ 및 $TNF\alpha$ 을 분비할 수 있다.
- [0026] 37. 재조합 핵산 변형의 사용을 통해, 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질이 조작되거나 또는 달리 변형될 수 있어 암 세포에서 융합 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 발현이 암 세포

를 표적화하는 NK 세포 동원을 개선한다는 것이 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, 용어들 "융합 펩타이드(들)", "융합 폴리펩타이드(들)", 및 "융합 단백질"은 2개 또는 그 초과와 관련없는 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질로부터 도메인을 포함하도록 조작된 임의의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 지칭한다. 일부 양태에서, 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질은 융합을 형성하도록 연결되는 2개 또는 그 초과 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질 각각의 성분의 모두 또는 일부를 포함한다.

[0027] 38. 따라서, 본 발명의 일 측면은 조작된 융합 단백질, 즉, 본 명세서에서 개시된 바와 같은 조작된 종양용해 바이러스에 의해 발현되는 외인성 막 결합된 표적화 리간드에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질"은 "키메라 단백질"과 동의어이고, 세포질 꼬리 영역, 하기에 더욱 상세하게 설명된 바와 같은 막관통 영역 및 세포외 줄기 영역, 면역 세포 표적화 리간드 폴리펩타이드에 작동가능하게 연결된 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1, 비절단된 신호 앵커 폴리펩타이드를 지칭한다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개 폴리펩타이드의 융합, 즉, 프레임 내에서 다른 프레임에 각각의 영역의 융합을 지칭한다. 융합은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 또는 그 초과 아미노산으로 구성되는 짧은 폴리펩타이드 링커의 사용으로 또는 사용 없이 달성될 수 있다. 예를 들어, 표적화 리간드 폴리펩타이드는 제1 폴리펩타이드의 C-말단에 대해 그것의 N-말단에서 융합될 수 있다.

[0028] 39. 일 양태에서, 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질은 본 명세서에서 개시된 바와 같은 외인성 막 결합된 표적화 리간드이다. 융합 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 따라서 세포질 꼬리 영역, 막관통 영역 및 세포외 줄기 영역; 및 면역 세포 표적화 리간드의 N-말단이 세포외 줄기 영역의 C-말단에 융합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함할 수 있다. (예를 들어, 도 2B 참고). 환언하면, 융합 단백질이 세포에서 발현될 때, 면역 세포 표적화 리간드는 면역 세포 표적화 리간드의 자연 발생 배향에 비교하여 세포에 관하여 역전된 배향으로 세포막에 결합된다.

[0029] 40. 일 양태에서, 비절단된 신호 앵커 도메인은 도 2A의 하부 패널에서 개략적으로 묘사된 유형 II 내재성 막 단백질로부터 유래된다. 유형 II 내재성 막 단백질은 일반적으로 세포 내측에 N-말단, 즉, 세포질 꼬리 영역, 막관통 영역, 세포외 줄기 영역 및 C-말단을 갖는 구상 헤드 영역을 포함한다. 본 명세서에서 개시된 바와 같은, 비절단된 신호 앵커 도메인은 세포질 꼬리 영역, 막관통 영역, 및 세포외 줄기 영역을 포함하지만, 구상 헤드 영역을 결한다. 비절단된 신호 앵커 도메인은 예를 들어 유형 II 내재성 막 단백질의 관련된 부분 예컨대 뉴라미니다제, 과라닌플루엔자 바이러스 혈구응집소-뉴라미니다제, 트랜스페린 수용체, MHC 부류 II 불변 사슬, P 당단백질, 아시알로당단백질 수용체, 또는 중성 엔도펩티다아제를 포함할 수 있다. 예시적인 양태에서, 비절단된 신호 앵커 도메인은 도 2B에서 나타낸 바와 같이 뉴라미니다제 신호 앵커 도메인을 포함한다.

[0030] 41. 면역 세포 표적화 리간드는 예를 들어 결합할 수 있는, 예를 들어 선택적으로 면역 세포를 결합할 수 있고, 리간드의 N-말단이 비절단된 신호 앵커 도메인의 세포외 줄기 도메인의 C-말단에 (펩타이드 링커를 통해) 융합하거나 융합되는 아미노산 변형을 포함할 수 있는 리간드이다. 리간드는 NK 세포, B 세포, T 세포 및/또는 CAR-T 세포 같은 면역 세포를 결합할 수 있는 알려진 리간드로부터 선택될 수 있다. 이러한 리간드는, 예를 들어, 면역글로불린 Fc 도메인 예컨대 IgG1 (도 2B에서 나타낸 바와 같음), 또는 대안적으로 IgG2, IgG3, 또는 IgG4를 포함한다. 본 명세서에 기재된 역전된 배향을 달성하기에 적합한 Fc 도메인에 대한 아미노산 변형은 하기를 포함한다: 256A/K290A/S298A/E333A/K334A 또는 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L. 대안적으로, 표적화 리간드는 NK2GD 리간드 예컨대, 예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및 MICB; 또는 항-리간드 도메인 예컨대 CD19 또는 CD20로부터 선택된다.

[0031] 42. 비-제한적인 예로서, 본 명세서에서 개시된 바와 같은 융합 단백질은 서열번호:1의 아미노산 서열에 충분히 동일하거나 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포괄한다. 본 명세서에서 개시된 바와 같은 융합 단백질은 서열번호:1의 전장 서열보다 적거나 또는 그 초과와 아미노산을 갖는 폴리펩타이드를 포괄하고, 서열번호: 1의 서열을 갖는 융합 단백질에 의해 실증된 바와 같이 표적화 리간드와 동일한 막 고착 기능을 나타낸다. 본 개시내용에 따른 유용한 융합 단백질의 예는 서열번호: 1의 아미노산 서열과 적어도 약 45%, 바람직하게는 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호:1의 융합 단백질의 기능적 활성을 보유하는 단백질을 포함한다. 더 구체적으로, 본 개시내용에 따른 융합 단백질은 서열번호: 1의 아미노산 서열에 적어도 약 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0032] 43. 2개 아미노산 서열 또는 2개 핵산 서열의 동일성 퍼센트는 2개의 서열 사이의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 일치의 수를 최적화하기 위해 2개의 서열을 말단 대 말단으로 정렬함으로써 결정될 수 있으며, 여기서 예를 들어 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 최적의 정렬을 얻기 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에 갭이 도입될 수 있다. 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 그런 다음 비교된다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 2개 서열 사이의 서열 동일성 퍼센트는 서열에 의해 공유되는 동일한 위치 수의 함수이다 (즉, % 서열 동일성은 동일한 위치의 수/위치의 총수 X 100이다).
- [0033] 44. 2개 서열 사이의 서열 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 당해 분야에서 알려지고 2개 서열의 비교를 위해 이용되는 바와 같은 수학적 알고리즘의 비-제한적인 예는 Karlin and Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5877에서와 같이 변형된, Karlin and Altschul (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:2264-2268의 알고리즘이다. 그와 같은 알고리즘은 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램으로 편입된다. BLAST 뉴클레오타이드 조사는 본 발명의 부착소 핵산 분자에 유사하거나 또는 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 점수=100, 단어길이=12로 수행될 수 있다. 비교하기 위해 갭핑된 정렬을 얻기 위해, 갭핑된 BLAST는 Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402에서 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭핑된 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다.
- [0034] 45. 융합 단백질 및 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 당해 분야에서 알려진 바와 같은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 상이한 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 DNA 단편은 종래의 기술을 적용하여 프레임 내에서 함께 결합된다. 적합한 기술은 결합을 위해 독특한-종료된 또는 엇갈린-종료된 말단을 이용함으로써, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 적절하게는 응집성 단부의 충전, 바람직하지 않은 결합을 피하기 위한 알칼리성 포스파타제 처리 및 효소적 결합을 포함한다. 대안적으로, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속적인 유전자 단편 사이에 상보적 돌출부를 야기하는 앵커 프라이머를 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 후속으로 어닐링 및 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 생성할 수 있다. (예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons: 1992 참고).
- [0035] 46. 본 명세서에서 개시된 바와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 융합 유전자는 제1 폴리펩타이드를 인코딩하는 cDNA 서열로부터 정지 코돈을 제거하고, 그 다음 결합 또는 중첩 연장 PCR을 통해 프레임 내에 제2 폴리펩타이드 단백질을 인코딩하는 cDNA를 부가함에 의해 창작될 수 있다. 선택적으로, 아미노산의 짧은 서열 (예를 들어, 약 2 내지 약 20 아미노산의 서열)은 제1 폴리펩타이드와 제2 폴리펩타이드 사이의 링커로 조작될 수 있다. 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 얻어진 융합 유전자는 그 다음, 예를 들어 본 명세서에서 개시된 바와 같은 조작된 종양용해 바이러스를 포함한 숙주 바이러스의 계놈에 도입될 수 있다. 숙주 바이러스가 숙주세포와 접촉하고 그것의 변형된 유전적 패키지를 세포의 세포질에 전달할 때, 융합 유전자는 그 다음 단일 융합 단백질로 숙주세포에 의해 발현될 것이다.
- [0036] 47. 전술한 바와 같이, 개시된 종양용해 바이러스는 표적 암 부위에서 면역 세포 (예를 들어 NK 세포, T 세포, CAR T 세포, 타코난 림프양 세포, 대식세포, 및 B 세포 (형질 세포를 포함함))의 수를 최대화하고, 따라서 비변형된 종양용해 바이러스가 수행하는 것을 넘어서 암을 제거하는데 있어 면역 세포 활성화 (예를 들어, NK 세포 활성화, T 세포 활성화, CAR T 세포 활성화, 및/또는 B 세포 활성화 (형질 세포 및 항체 활성을 포함함))를 증가시키기 위해 변형되거나 또는 조작될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "종양용해 바이러스"는 암 세포에 대해 굴성이고 이를 사멸시키는 바이러스를 지칭한다. 종양용해 바이러스는 암 세포를 선택적으로 공격하도록 조작될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시된다. 일부 양태에서, 조작된 종양용해 바이러스는 본 명세서에서 개시된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질 중 하나 이상을 발현한다.
- [0037] 48. 일 양태에서, 개시된 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질은 NK 세포에 대한 친화도를 증가시키기 위한 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 (예컨대, 예를 들어, NK 세포 표적화 리간드)를 발현하거나 포함하도록 변형된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 비제한적으로 NK 세포 활성화, B 세포 활성화, T 세포 활성화, 및 CAR T 세포 활성을 포함한 면역 세포 활성화에 대해 표적으로 기능할 수 있는 임의의 외인성 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 지칭한다. 따라서, 일 양태에서, 종양용해 바이러스는 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는

융합 단백질을 포함하는 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 하나 이상의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함할 수 있다. 개시된 중앙용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 NK 세포, B-세포, T-세포, 또는 CAR T-세포에 의해 결합될 수 있다. 일 양태에서, 면역 세포 표적화 리간드는 신호전달 앵커를 포함하는 변형을 통해 결합된 막이다. 면역 세포 표적화 리간드는, 예를 들어, NK 세포 상의 CD16에 대한 리간드, NK 세포 상의 NKG2D 수용체에 대한 리간드, 또는 항체 또는 CAR T 세포에 대한 표적인 면역글로불린 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 일 양태에서, 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 NK 세포 수용체 예컨대, 예를 들어, Fc 도메인 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4), NK2GD 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB)에 의해 직접적으로 결합될 수 있거나 또는 항-리간드 항체 (예를 들어 항-CD19 또는 항-CD20 항체에 의해 결합될 수 있는 CD19 또는 CD20)의 사용을 통해 NK 세포에 간접적으로 결합될 수 있거나 항-리간드 CAR T 세포 (예컨대, 예를 들어, 항-CD19 CAR T 세포)에 의해 직접적으로 표적화될 수 있다는 것이 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 따라서, 일 양태에서, 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 융합 단백질 및 하나 이상의 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 중앙용해 바이러스가 본 명세서에서 개시되고, 여기서 상기 면역 세포 표적화 리간드는 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4로 구성되는 군으로부터 선택된 Fc 도메인이다.

[0038] 49. Fc 도메인은 NK 세포의 표면 상에서 발견되는 CD16 (FcγRIII)이 결합하는 리간드이다. CD16은 NK 세포 상의 일차 수용체 중의 하나이고 항체의 Fc 부분 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인)에 CD16이 결합할 때, 이것은 NK 세포 항체-의존적 세포 매개된 세포독성 (ADCC)을 활성화시킨다. 그러나, 항체의 Fc 부분은 전형적으로 분비될 때에만 이용가능하다. B 세포 상에서 발견된 막 결합된 항체 수용체가 존재하는 경우, Fc 부분은 전형적으로 세포의 사이토솔에 대해 배향된다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 변형된 중앙용해 바이러스에서, Fc 도메인은 감염된 중앙 표적의 막 상에서 발현될 때 세포내에서 직면된 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 갖도록 변형되고, 따라서 세포의 표면에 결합된 세포의 항체의 배향을 모방한다. 일 양태에서, 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 변형된 또는 조작된 중앙용해 바이러스가 본 명세서에서 개시되고; 여기서 상기 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 갖도록 변형된 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인)이다 (즉, Fc는 세포 표면으로부터 최대 거리에 있는 N-말단 측보다는 세포막의 표면 근처의 막 앵커 펩타이드에 부착된 N-말단측으로 세포 표면의 세포의 측 상에서 발현된다).

[0039] 50. Fc 도메인은 단량체성, 이량체성, 또는 다량체 작체물로 제시될 수 있다는 것이 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 일 양태에서, Fc 도메인은 항체 매개된 사멸, NK 세포 인식을 증진하고 활성화 Fcγ 수용체의 팽창을 조절하도록 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인은 CD16에 대한 친화도를 증가시키도록 변형될 수 있다. 따라서, 예를 들어, Fc 도메인은 하나 이상의 돌연변이 예컨대, 예를 들어, T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, L235V, F243L, R292P, Y300L, 및/또는 P396L을 포함할 수 있다. 유사하게, Fc 도메인은 활성화 (IIIa) 대 억제성 Fc (IIb) 수용체에 대한 결합의 선택성을 증가시키도록 추가로 변형될 수 있다. 따라서, 예를 들어, Fc 도메인은 하나 이상의 돌연변이 예컨대, 예를 들어, S239D, I332E, A330L, F243L, R292P, V305I, 및/또는 P396L을 포함할 수 있다.

[0040] 51. NKG2D는 표적 세포에서 액틴 재구성 (세포 분극) 및 탈과립을 촉발하는 NK 세포 상에서 수용체를 활성화시킨다. NKG2D는 전형적으로 완전히 존재하지 않거나 정상 세포의 표면 상에 낮은 수준으로만 존재하지만, 감염, 형질전환, 노화 및 스트레스 받은 세포에 의해 과발현되는 유도된-자체 단백질을 인식한다. NKG2D에 대한 리간드는 스트레스 받은, 악성 전환된, 및 감염된 세포의 표면에 나타나는 MHC 부류 I 폴리펩타이드-관련된 서열 (MIC) 및 레테노산 초기 전사체 1 (RAET1)/ULBP 계열로부터의 것이다. MIC는 표면 당단백질이다. 단백질의 MIC 계열 (MICA 및 MICB)은 MHC와 구조적으로 유사하지만 β2-마이크로글로불린 또는 펩타이드 유사 MHC와는 연관이 없다. MIC 계열 단백질은 세포의 도메인 (α1α2α3 도메인), 막관통 도메인, 및 C-말단 세포질 꼬리로 구성된다. RAET1 계열은 세포의 도메인 (α1α2 도메인), 막관통 도메인, 및 C-말단 세포질 꼬리를 포함하는 표면 당단백질이다. RAET1 계열은 NKG2D에 대해 스트레스 받은 유도된 리간드로 작용하고 MHC 부류 1 분자에 관련된다. 일 양태에서, 비절단된 신호 앵커를 포함하는 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 조작된 중앙용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 본 명세서에서 개시되고; 여기서 상기 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 NKG2D 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB)이다.

[0041] 52. 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드, 즉, 본 명세서에서 개시된 바와 같은 조작된 중앙용해 바이러

스에 의해 인코딩된 융합 단백질은 감염된 암 세포의 표면 상에 존재하도록 변형된다. 일 양태에서, 이 막 결합된 제시는 비절단된 신호 앵커의 사용을 통해 달성될 수 있다. 신호 앵커는 세포 표면 막 상에 인코딩된 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 함유하는 임의의 신호전달 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 신호 앵커는 뉴라미니다제의 막관통 도메인, 파라인플루엔자 바이러스 혈구응집소-뉴라미니다제로부터의 신호-앵커, 트랜스페린 수용체로부터의 신호-앵커, MHC 부류 II 불변 사슬로부터의 신호-앵커, P 당단백질로부터의 신호-앵커, 아시알로당단백질 수용체로부터의 신호-앵커, 또는 중성 엔도펩타이드아제로부터의 신호-앵커일 수 있다. 대안적으로, 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 아미노 말단 끝 상에 추가의 양성으로 하전된 아미노산을 포함하는 아미노산 치환을 인코딩하도록 변형될 수 있다. 일 양태에서, 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 신호 앵커가 링커 예컨대 RS 링커의 사용을 통해 표적화 리간드에 연결 또는 융합된 융합 단백질일 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질로, 여기서 상기 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드는 비절단된 신호 앵커를 포함한다. 일 양태에서, 면역 세포 표적화 리간드는 Fc 도메인의 N-말단이 신호 앵커 도메인의 세포외 줄기 도메인의 C-말단에 융합하는 아미노산 변형을 포함하는 면역글로불린 Fc 도메인을 포함한다. 일 양태에서, 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 및 비절단된 신호 앵커를 포함하는 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질인, 조작된 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질이 본 명세서에서 개시되고, 여기서 상기 비절단된 신호 앵커는 뉴라미니다제, 파라인플루엔자 바이러스 혈구응집소-뉴라미니다제, 트랜스페린 수용체, MHC 부류 II 불변 사슬, P 당단백질, 아시알로당단백질 수용체, 또는 중성 엔도펩타이드아제이다. 예를 들어, 조작된 종양용해 바이러스는 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인) 및 뉴라미니다제 신호 앵커 도메인을 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 여기서 Fc 도메인은 세포에 관하여 Fc 도메인의 자연 발생 배향에 비교할 때 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 갖도록 변형된다. 환언하면, 면역 세포 표적화 리간드가 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질에서, Fc 도메인은 세포 표면으로부터 최대 거리에 있는 N-말단측보다는 세포막의 표면 근처의 막 앵커 펩타이드에 부착된 그것의 N-말단측으로 세포 표면의 세포외 측 상에서 발현된다. 대안적으로, 본 명세서에서 기재되고 조작된 종양용해 바이러스에서 인코딩된 바와 같은 융합 단백질은 NKG2D 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB) 및 뉴라미니다제 신호 앵커 도메인; 또는 CD20 및 뉴라미니다제 신호 앵커 도메인; 및/또는 CD19 및 뉴라미니다제 신호 앵커 도메인을 포함할 수 있다.

[0042] 53. 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 및 비절단된 신호 앵커를 포함하는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 하나의 구현에는 서열번호: 1
MNPNQKITTTIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNRSDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK로 제시되고 도 4에 도시되어 있다.

[0043] 54. 본 명세서에서 논의된 바와 같이 알려지고 본 명세서에서 고려된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 및/또는 단백질; 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드, 및/또는 신호 앵커 도메인의 수많은 변이체가 있다. 단백질 변이체 및 유도체는 당해 분야의 숙련자에게 잘 이해되며 여기서 아미노산 서열 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변형은 전형적으로 치환, 삽입 또는 결실 변이체인 3가지 부류 중 하나 이상에 속한다. 삽입은 아미노 및/또는 카복실 말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 삽입은 통상적으로 아미노 또는 카복실 말단 융합의 것보다 더 작은 삽입, 예를 들어, 1 내지 4개 잔기의 정도일 것이다. 실시예에 기재된 것과 같은 면역원성 융합 단백질 유도체는 시험관내 가교결합 또는 융합을 인코딩하는 DNA로 형질전환된 재조합 세포 배양에 의해 표적 서열에 면역원성을 부여하기에 충분히 큰 폴리펩타이드를 융합시킴에 의해 제조된다. 결실은 단백질 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 제거를 특징으로 한다. 전형적으로, 약 2 내지 6개 이하의 잔기가 단백질 분자 내의 임의의 한 부위에서 결실된다. 이들 변이체는 통상적으로 단백질을 인코딩하는 DNA에서 뉴클레오타이드의 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 제조되고, 그것에 의해 변이체를 인코딩하는 DNA를 생성하고 그 후에 재조합 세포 배양물에서 DNA를 발현시킨다. 알려진 서열을 갖는 DNA에서 사전결정된 부위에서 치환 돌연변이를 만드는 기술, 예를 들어 M13 프라이머 돌연변이 유발 및 PCR 돌연변이 유발이 잘 알려져 있다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기이지만, 수많은 상이한 위치 한번에 일어날 수 있다; 삽입은 일반적으로 약 1 내지 10개 정도의 아미노산 잔기 상에서 일어날 것이고; 결실은 약 1 내지 30개의 잔기 범위일 것이다. 결실 또는 삽입은 바람직하게는 인접한 쌍, 즉 2개 잔기의 결실 또는

2개 잔기의 삽입으로 이루어진다. 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의의 조합은 조합되어 최종 작제물에 도달할 수 있다. 돌연변이는 해독틀을 벗어난 서열에서 일어나지 않아야 하며 바람직하게는 2차 mRNA 구조를 생성할 수 있는 상보적 영역을 생성하지 않을 것이다. 치환형 변이체는 적어도 하나의 잔기가 제거되고 다른 잔기가 그 자리에 삽입된 것이다. 이러한 치환은 일반적으로 하기 표 1 및 2에 따라 이루어지며 보존적 치환으로 지칭된다.

[0044] 표 1: 아미노산 약어

아미노산	약어	약어
알라닌	Ala	A
알로소류신	Ala	
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산 산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산 산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
라이신	Lys	K
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
파이로글루탐산 산	pGlu	
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
티로신	Tyr	Y
트립토판	Trp	W
발린	Val	V

[0045]

[0046] 표 2: 아미노산 치환

[0047] 최초 잔기 예시적인 보존적 치환, 기타는 당해 기술에 공지되어 있다.

Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0048]

[0049] 55. 기능 또는 번역학적 동일성에서 실질적인 변화는 표 2의 것보다 덜 보존적인 치환을 선택함에 의해, 즉 (a) 치환의 영역에서 폴리펩타이드 골격의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 형태, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 대한 그것의 효과에서 보다 상당히 다른 잔기를 선택함에 의해 이루어진다. 일반적으로 단백질 특성에서 가장 큰 변화를 생성할 것으로 기대되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예

를 들어, 세틸 또는 트레오닐은 소수성 잔기, 예를 들어 류실, 이소류실, 페닐알라닌, 발릴 또는 알라닐로 (또는 이에 의해) 치환되거나; (b) 시스테인 또는 프롤린은 임의의 다른 잔기로 (또는 이에 의해) 치환되거나; (c) 양전기 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어, 라이실, 아르기닌, 또는 히스티딘은 음전기 잔기, 예를 들어 글루타미드 또는 아스파르틸로 (또는 이에 의해) 치환되거나; 또는 (d) 큰 부피의 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어, 페닐알라닌은 이 경우에 측쇄를 갖지 않는 것, 예를 들어, 글리신으로 (또는 이에 의해) 치환되거나 (e) 황산화 및/또는 당화에 대한 부위의 수를 증가시킴에 의한 것들 일 것이다.

[0050] 56. 예를 들어, 하나의 아미노산 잔기를 생물학적으로 및/또는 화학적으로 유사한 또 다른 것으로의 대체는 보존적 치환으로 당해 분야의 숙련자에게 알려져 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 하나의 소수성 잔기를 또 다른 소수성 잔기로, 또는 하나의 극성을 또 다른 극성 잔기로 대체하는 것일 수 있다. 치환은, 예를 들어, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 및 Phe, Tyr와 같은 조합을 포함한다. 각각의 명백하게 개시된 서열의 이러한 보존적으로 치환된 변이체는 본 명세서에 제공된 모자이크 폴리펩타이드 내에 포함된다.

[0051] 57. 치환형 또는 결실형 돌연변이유발은 N-당화 (Asn-X-Thr/Ser) 또는 O-당화 (Ser 또는 Thr)를 위한 부위를 삽입하기 위해 이용될 수 있다. 시스테인 또는 다른 불안정성 잔기의 결실이 또한 바람직할 수 있다. 잠재적 단백질 분해 부위, 예를 들어 Arg의 결실 또는 치환은 예를 들어 염기성 잔기 중 하나를 결실시키거나 글루타미드 또는 히스티딘으로 치환함으로써 달성된다.

[0052] 58. 특정 번역후 유도체화는 발현된 폴리펩타이드에 대한 재조합 숙주세포의 작용의 결과이다. 글루타미드 및 아스파르기닌 잔기는 빈번하게 상응하는 글루타미드 및 아스파르틸 잔기로 번역 후에 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 약산성 조건 하에서 탈아미드화된다. 다른 번역후 변형은 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실 그룹의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 o-아미노기의 메틸화 (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983]), N-말단 아민의 아세틸화 및, 일부 사례에서, C-말단 카복실의 아미드화를 포함한다.

[0053] 59. 본 명세서에 개시된 단백질의 변이체 및 유도체를 정의하는 한 가지 방법은 특정한 알려진 서열에 대한 상동성/동일성 관점에서 변이체 및 유도체를 정의하는 것을 통한 것으로 이해된다. 예를 들어, 서열번호: 1은 융합 단백질의 특정 서열을 제시한다. 언급된 서열에 적어도, 70% 또는 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 본 명세서에 개시된 이들 및 다른 단백질의 변이체가 구체적으로 개시된다. 당해 분야의 숙련가는 두 단백질의 서열 동일성을 결정하는 방법을 쉽게 이해한다. 예를 들어, 서열 동일성은 상동성이 그것의 최고 수준이 되도록 두 서열을 정렬한 후 계산될 수 있다.

[0054] 60. 본 명세서는 다양한 단백질 및 단백질 서열을 논의함에 따라 이들 단백질 서열, 즉, 폴리뉴클레오타이드를 인코딩할 수 있는 핵산이 또한 개시되는 것으로 이해된다. 이것은 특정한 단백질 서열과 관련된 모든 변성 서열, 즉 하나의 특정 단백질 서열을 인코딩하는 서열을 갖는 모든 핵산뿐만 아니라 변성 핵산을 포함하여 단백질 서열의 개시된 변이체 및 유도체를 인코딩하는 모든 핵산을 포함할 것이다. 따라서, 각각의 특정 핵산 서열은 본 명세서에 기재되지 않을 수 있지만, 각각의 모든 서열은 개시된 단백질 서열을 통해 본 명세서에 사실상 개시되고 기술된 것으로 이해된다. 따라서, 개시된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 아미노산 서열을 갖는 당업자는 상기 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 구상하고 구축할 수 있는 것으로 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 일 양태에서, 본 명세서에서 개시된 융합 단백질 (예를 들어, 서열번호: 1에 제시된 융합 단백질)을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 본 명세서에서 개시된다.

[0055] 61. 일 양태에서, 본 명세서에서 개시된 조작된 종양용해 세포 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질에 의해 유도된 임의의 NK 세포 활성이 활성화 사이토카인 예컨대 IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 또는 IL-15와 NK 세포의 접촉을 통해 NK 세포를 활성화시킴에 의해 증가될 수 있다는 것이 본 명세서에서 고려된다. 일 양태에서, 활성화 사이토카인은 종양용해 바이러스에 의해 발현될 수 있다는 것이 인식된다. 따라서, 일 양태에서는 종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 조작된 종양용해 바이러스로, 여기서 상기 종양용해 바이러스는 IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 또는 IL-15 중 하나 이상을 발현하도록 추가로 조작된다.

[0056] 62. 본 명세서에서 개시된 종양용해 바이러스는 임의의 바이러스 핵본으로부터 구축될 수 있다. 일 양태에서, 바이러스는 변형된 또는 조작된 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어, 단순 포진 바이러스- 1, 단순 포진 바이러스-2, 수두-대상포진 바이러스, 엡슈타인-바르 바이러스, 사이토메갈로바이

러스, 및/또는 인간 헤르페스 바이러스-6), 폭스바이러스 (예를 들어, 두창 바이러스, 백시니아 바이러스, 전염성 연속종 바이러스, 및/또는 Orf 바이러스), 레오바이러스 (예를 들어, 로타바이러스), 피코나바이러스 (예를 들어, 에테로바이러스, 세네카바이러스, 폴리오바이러스, 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 간염 A 바이러스, 및/또는 구제역 바이러스), 토가바이러스 (예를 들어, 알파바이러스, 쉰리키 포레스트 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스, 신드비스 바이러스, 및/또는 풍진 바이러스), 코로나바이러스, 플라비바이러스 (예를 들어, 간염 C 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 밸리 열 바이러스, 황열병 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 지카 바이러스, 및/또는 뎅기열 바이러스), 필로바이러스 (예를 들어, 에볼라 바이러스 및/또는 마르부르크 바이러스), 아레나바이러스 (예를 들어, 라사열 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 피킨 바이러스, 주닌 바이러스, 및/또는 마추포 바이러스), 분야바이러스 (예를 들어, 한탄 바이러스, 및/또는 리프트밸리 열 바이러스), 파라믹소바이러스 (예를 들어, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 유인원 바이러스 5, 및/또는 홍역 바이러스), 램도바이러스 (예를 들어, 소포성 구내염 바이러스 및/또는 광견병 바이러스), 뉴모바이러스 (예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스), 오르토믹소바이러스 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B, 및/또는 인플루엔자 C 바이러스), 델타 바이러스 (예를 들어 간염 D 바이러스), 레트로바이러스 (예를 들어, 유인원 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 유형-1, 및 인간 면역결핍 바이러스 유형-2, 루 육종 바이러스, 인간 T-세포 백혈병 바이러스 유형-1 및/또는 유인원 발포성 바이러스), 헤파드나바이러스 (예를 들어 B형 간염 바이러스), 오르토헤페바이러스 (예를 들어 간염 E 바이러스), 인간 파필로마바이러스, 또는 폴리오마바이러스이다. 예를 들어, 종양용해 바이러스는 HSV-1 종양용해 바이러스 HSV1716 또는 탈리모젠 라하파렙백, 변형된 아데노바이러스 종양용해 바이러스 H101, 폴리오바이러스 종양용해 바이러스 PVSRIPO, 레오바이러스 종양용해 바이올스 레오실린, 세네카 밸리 바이러스 SVV-001, 콕사키 바이러스 종양용해 바이러스 콕사키바이러스 A21, 에테로바이러스 종양용해 바이러스 리가 바이러스, 또는 백시니아 바이러스 종양용해 바이러스 GL-ONC1 또는 JX-594일 수 있다. 일 양태에서, 종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 변형된 또는 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시되고; 여기서 상기 변형된 또는 조작된 종양용해 바이러스는 파라인플루엔자 바이러스, 예컨대, 예를 들어 변형된 또는 조작된 파라인플루엔자 바이러스 유형 5 예를 들어, CPI 파라인플루엔자, 야생형 파라인플루엔자, 또는 CPI로부터 P/V를 인코딩하는 CPI-WT 파라인플루엔자 키메라 바이러스이고 바이러스 백본의 나머지는 WT 파라인플루엔자이다).

[0057]

63. 일 양태에서, 암 세포와 같은 표적 세포에 바이러스의 막 융합을 용이하게 하는 것은 종양용해 바이러스로부터 표적 세포로의 유전 물질의 전달 속도 및 효율을 증가시킬 수 있다는 것이 인식된다. 종양용해 바이러스의 표적 세포에 대한 융합이 촉진될 수 있는 한 방법은 융합유도 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질의 사용을 통한 것이다. 융합유도 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질은, 비제한적으로 바이러스 융합유도 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질 예컨대, 예를 들어, 인플루엔자 핵구성소 펩타이드 (HA), 뎅기열 융합유도 펩타이드, HIV 외피 (Env), 파라믹소바이러스 (예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스 및 SV5) 융합 단백질 (F) 및 파라믹소바이러스 헤마글루티닌-뉴라미니다제 (HN)를 포함할 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 조작된 종양용해 바이러스가 융합유도 종양용해 바이러스인, 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 및 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시된다. 일 양태에서, 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질은 종양용해 바이러스에 대해 내인성일 수 있거나 또는 상기 바이러스는 외인성 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. 환언하면, 종양용해 바이러스는 천연적인 것일 수 있거나 융합유도되도록 조작/변형될 수 있다. 예를 들어, 백본 종양용해 바이러스는 레오바이러스, 폴리오바이러스, 또는 아데노바이러스일 수 있고, 이것은 융합유도 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함하고 따라서 융합유도되도록 변형/조작될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현하는 변형된 또는 조작된 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시되고; 여기서 상기 변형된 또는 조작된 종양용해 바이러스는 파라인플루엔자 바이러스, 예컨대, 예를 들어 변형된 또는 조작된 파라인플루엔자 바이러스 유형 5이고; 그리고 상기 종양용해 바이러스는 파라믹소바이러스 F 및/또는 HN를 발현한다. 일 양태에서, 천연적으로 융합유도 종양용해 바이러스는 또한 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 추가로 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 조작된 융합유도 종양용해 바이러스는 과융합유도이다. 따라서, 일 양태에서, 종양 세포가 융합하도록 하는 과융합유도 특성을 허용하는 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 융합유도 종양용해 바이러스가 본 명세서에서 개시된다.

[0058]

64. 전술한 바와 같이, 개시된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질 및/또는 변형된 종양용해 바이러스는 표적 암 부위에서 면역 세포 (예를 들어 NK 세포, T 세포, CAR T 세포, 타고난 림프양 세포, 대식세포, 및 B 세포 (형질 세포를 포함함))의 수를 최대화하고 따라서 면역 세포 활성화 (예를 들어, NK 세포 활성화, T 세포 활성화,

CAR T 세포 활성화, 및/또는 B 세포 활성화 (형질 세포 및 항체 활성을 포함함)을 증가시키도록 설계된다. 따라서, 일 양태에서, 암 면역요법을 위해 암 세포에 대해 면역 세포를 표적화하는 방법이 본 명세서에서 개시되고, 상기 방법은 본 명세서에서 개시된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질; 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드, 및/또는 신호 앵커 도메인을 중앙용해 바이러스 게놈 안으로 삽입함에 의해 중앙용해 바이러스를 변형시키는 단계 및 세포를 변형된 중앙용해 바이러스와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0059] **1. 약제학적 담체/의약품의 전달**

[0060] 65. 상기에 기재된 바와 같이, 본 조성물은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체에서 *생체내*로 투여될 수 있다. "약제학적으로 허용가능한"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않지 않은 물질을 의미하고, 즉, 물질은 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하거나 그것이 함유된 약제학적 조성물의 다른 성분 중 하나와 유해한 방식으로 상호작용함이 없이 핵산 또는 백터와 함께 대상체에게 투여될 수 있다. 담체는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 바와 같이 활성 성분의 임의의 열화를 최소화하고 대상체에서 임의의 유해한 부작용을 최소화하도록 자연적으로 선택될 것이다.

[0061] 66. 조성물은 경구로, 비경구로 (예를 들어, 정맥내로), 근육내 주사로, 복강내 주사로, 경피로, 체외로, 국소 비강내 투여 또는 흡입제에 의한 투여를 포함한 국소적으로, 기타로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "국소 비강내 투여"는 비강들 중 하나 또는 둘 모두를 통해 코 및 콧구멍 내로의 조성물의 전달을 의미하고, 분무 기전 또는 액적 기전에 의한, 또는 핵산 또는 백터의 분무주입법을 통한 전달을 포함할 수 있다. 흡입제에 의한 조성물의 투여는 분무 또는 액적 기전에 의한 전달을 통해 코 또는 입을 통해 이루어질 수 있다. 삼관을 통해 호흡계 (예를 들어, 폐)의 임의의 영역으로 직접적으로 전달될 수도 있다. 요구되는 조성물의 정확한 양은 대상체의 중, 연령, 체중 및 일반적인 상태, 치료되는 알려지성 장애의 중증도, 사용되는 특정한 핵산 또는 백터, 그의 투여 방식 및 기타 동종의 것에 따라 대상체 별로 다양할 것이다. 따라서 모든 조성물에 대해 정확한 양을 지정하는 것을 가능하지 않다. 그러나, 적절한 양은 본 명세서의 교시에 주어진 일상적인 실험과정만을 사용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다.

[0062] 67. 사용된다면, 조성물의 비경구 투여는 일반적으로 주사를 특징으로 한다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전 액체 내 현탁액의 용액에 적합한 고체 형태, 또는 에멀전과 같은 통상적인 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여를 위한 보다 최근에 수정된 접근법은 일정한 투약량이 유지되도록 서방형 또는 지속 방출 시스템의 사용을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로 편입된, 미국 특허 번호 3,610,795 참고.

[0063] 68. 물질은 용액, 현탁액 (예를 들어, 극미립자, 리포솜, 또는 세포 안으로 편입됨) 안에 있을 수 있다. 이들은 항체, 수용체, 또는 수용체 리간드를 통해 특정 세포 유형을 표적화할 수 있다. 하기 참고문헌은 특이 단백질을 중앙 조직에 표적화하기 위한 이 기술의 사용의 예이다 (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); 및 Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol*, 42:2062-2065, (1991)). 비히클 예컨대 "스텔스" 및 다른 항체 접합된 리포솜 (결장 암종에 대해 표적화하는 지질 매개된 약물을 포함함), 세포 특이적 리간드를 통해 DNA의 수용체 매개된 표적화, 림프구 지향된 중앙 표적화, 및 *생체내* 컷과 신경아교종 세포의 고도로 특이적 치료적 레트로바이러스 표적화. 하기 참고문헌은 특이 단백질을 중앙 조직에 표적화하기 위한 이 기술의 사용의 예이다 (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger and Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992)). 일반적으로, 수용체는 구성적 또는 리간드 유도된 세포내이입의 경로에 관여된다. 이들 수용체는 클라트린-코팅된 구덩이에서 클러스터링되고, 클라트린-코팅된 소포를 통해 세포로 들어가고, 수용체가 분류된 산성화된 엔도솜을 통과하고, 그 다음 세포 표면으로 재순환되거나, 세포내에서 저장되거나, 리소솜에서 분해된다. 내재화 경로는 다양한 기능, 예컨대 영양소 흡수, 활성화된 단백질의 제거, 거대분자의 청소능, 바이러스 및 독소의 기회적 유입, 리간드의 해리 및 열화, 및 수용체-수준 조절을 제공한다. 많은 수용체는 세포 유형, 수용체 농도, 리간드의 유형, 리간드 원자가 및 리간드 농도에 따라 1 초과의 세포내 경로를 따른다. 수용체-매개된 세포내이입의 분자 및 세포 기전이 검토되었다 (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991)).

[0064] **a) 약제학적으로 허용가능한 담체**

[0065] 69. 항체를 포함한 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 치료적으로 사용될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 하나 이상의 조각된 중앙용해 바이러스 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성

물이 본 명세서에서 개시되고; 여기서 상기 중앙용해 바이러스는 비절단된 신호 앵커 도메인 (예를 들어, 뉴라미니다제 막관통 분절)을 포함하는, 예를 들어, 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 갖도록 변형된 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인); NKG2D 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB); 및/또는 CD19)로부터 선택된 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 발현시킨다.

[0066] 70. 적합한 담체 및 그것의 제형은 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995에 기재되어 있다. 전형적으로, 약제학적으로-허용가능한 염의 적절한 양은 제형에서 제형 등장성을 부여하도록 사용된다. 약제학적으로-허용가능한 담체의 예는, 비제한적으로, 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함한다. 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8, 그리고 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5이다. 추가의 담체는 지속 방출 제제 예컨대 항체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함하여, 이 매트릭스는 형성화된 물품, 예를 들어, 필름, 리포솜 또는 극미립자의 형태로 된다. 예를 들어, 중앙용해 바이러스 벡터의 유형 (즉, 중앙용해 바이러스의 바이러스 백본), 투여되는 조성물의 투여 경로 및 농도에 의존하여 특정 담체가 보다 바람직할 수 있다는 것은 이들 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0067] 71. 약제학적 담체는 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 이들은 가장 전형적으로 생리적 pH에서 멸균수, 염수 및 완충 용액과 같은 용액을 포함하여 약물을 인간에게 투여하기 위한 표준 담체일 것이다. 조성물은 근육내로 또는 피하로 투여될 수 있다. 다른 화합물은 당해 분야의 숙련가에 의해 사용되는 표준 절차에 따라 투여될 것이다.

[0068] 72. 약제학적 조성물은 선택 분자에 부가하여 담체, 증점제, 희석제, 완충액, 보존제, 계면 활성제 및 기타 동종의 것을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 하나 이상의 활성 성분 예컨대 항미생물제, 항염증 제제, 마취제, 및 기타 동종의 것을 포함할 수 있다.

[0069] 73. 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 요구되는지의 여부 및 치료될 부위에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소적으로 (안과적으로, 질로, 직장으로, 비강내로를 포함함), 경구로, 흡입에 의해, 또는 비경구로, 예를 들어 정맥내 점적에 의해, 피하, 복강내 또는 근육내 주사로 될 수 있다. 개시된 항체는 정맥내로, 복강내로, 근육내로, 피하로, 공동내, 또는 경피로 투여될 수 있다.

[0070] 74. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀션을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 예컨대 올리브 오일, 및 주입가능 유기 에스테르 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 물, 알코올성/수용액, 염수 및 완충된 배지를 포함하는 에멀션 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 담체는 유체 및 영양소 보충물, 전해질 보충물 (예컨대 링거 텍스트로스 에 기초한 것들), 및 기타 동종의 것을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예컨대, 예를 들어, 항미생물제, 산화방지제, 킬레이트제, 및 불활성 가스 및 기타 동종의 것이 또한 존재할 수 있다.

[0071] 75. 국소 투여용 제형은 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭스, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 포함할 수 있다. 통상적인 약제학적 담체, 수성, 분말 또는 오일성 베이스, 증점제 및 기타 동종의 것이 필요하거나 또는 바람직할 수 있다.

[0072] 76. 경구 투여용 조성물은 분말 또는 과립, 물 또는 비-수성 매질에서 현탁액 또는 용액, 캡슐, 샤세트, 또는 정제를 포함한다. 증점제, 풍미제, 희석제, 유화제, 분산 조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다.

[0073] 77. 조성물의 일부는 잠재적으로, 무기 산 예컨대 염산 산, 브롬화수소산 산, 과염소산 산, 질산, 티오시안산 산, 황산 산, 및 인산, 및 유기 산 예컨대 포름산, 아세트산, 프로피온산 산, 글라이콜산 산, 락트산 산, 피루브산 산, 옥살산 산, 말론산 산, 석신산 산, 말레산 산, 및 푸마르산 산과 반응에 의해, 또는 무기 염기 예컨대 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 및 유기 염기 예컨대 모노-, 디-, 트리알킬 및 아릴 아민 및 치환된 에탄올아민과 반응에 의해 형성된, 약제학적으로 허용가능한 산- 또는 염기- 부가 염으로 투여될 수 있다.

[0074] **b) 치료 용도**

[0075] 78. 조성물을 투여하기 위한 효과적인 투약량 및 스케줄은 실험적으로 결정될 수 있고, 이러한 결정을 하는 것은 당업계의 기술 내이다. 일 양태에서, 본 명세서에서 개시된 중앙용해 바이러스 (또는 상기 바이러스를 포함하는 조성물)는 임의의 입양으로 전달된 NK 세포의 투여 이전에 투여될 수 있다. 예를 들어, 중앙용해 바이러스는 투여되는 NK 세포 이전에 본 명세서에서 개시된 중앙용해 바이러스에 숙주 면역계가 반응하도록 하는 NK 세

포의 입양 전달 이전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18시간, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 또는 30일에 투여될 수 있다. 또 다른 양태에서, 종양용해 바이러스 및 입양으로 전달된 NK 세포는 동일 또는 상이한 부위에 동반하여, 또는 동시에 투여될 수 있다. 또 다른 양태에서, NK 세포는 본 명세서에서 개시된 종양용해 바이러스 또는 상기 바이러스를 포함하는 임의의 조성물의 투여 이전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18시간, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 또는 30일에 투여될 수 있다. 종양용해 바이러스 전 또는 후에 투여될 때, NK 세포는 동일 또는 상이한 부위에 투여될 수 있다.

[0076] 79. 조성물의 투여를 위한 투약 범위는 장애의 증상이 영향을 받는 원하는 효과를 생성하기에 충분히 큰 것이다. 투약량은 유해한 부작용, 예컨대 원치않는 교차-반응, 과민성 반응, 및 기타 동종의 것을 유발할 정도로 크지 않아야 한다. 일반적으로, 투약량은 환자에서 연령, 상태, 성별 및 질환의 정도, 투여 경로, 또는 다른 약물이 레지멘에 포함되는지 여부에 따라 다양할 것이고, 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 투약량은 임의의 반대징후의 경우에 개별 의사에 의해 조정될 수 있다. 투약량은 다양할 수 있고, 1일 또는 며칠 동안 매일 1회 이상의 용량 투여로 투여될 수 있다. 주어진 부류의 의약품에 대한 적절한 투약량에 대한 지침은 참고문헌에서 발견될 수 있다. 예를 들어, 항체에 대한 적절한 용량을 선택하는 지침은, 예를 들어 아래의 항체의 치료 용도에 대한 문헌에서 발견될 수 있다: *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389. 단독 사용된 항체의 전형적인 1일 투약량은 상기 언급된 인자에 의존하여, 1일당 약 1 µg/kg부터 최대 100 mg/체중 kg 또는 그 초과 범위일 수 있다.

[0077] **C. 암을 치료하는 방법**

[0078] 80. 종양용해 바이러스는 당업계에서 암의 치료에 효과적인 치료제인 것으로 나타나있다. 바이러스는 출구에서 감염된 암 세포를 용해시키고 암 세포의 감염은 또한 감염된 세포를 사멸시키기 위해 숙주 면역 반응을 자극한다. 개시된 조각된 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 암의 치료에 유사하게 유용하고 NK 세포를 감염된 암 세포로 동원하기 위한 이러한 종양용해 바이러스의 효능을 개선시키는 것으로 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 따라서, 일 양태에서, 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 (예를 들어, 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과 역전된 배향을 포함하는 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인); NKG2D 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB); 및/또는 CD19) 및 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 하나 이상의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 발현하는 개시된 종양용해 바이러스 및/또는 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 및 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일 양태에서, 조각된 종양용해 바이러스는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함하도록 변형될 수 있다. 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드가 면역글로불린 Fc 도메인인 경우, Fc 도메인은 세포막의 표면 근처의 막 앵커 펩타이드에 부착된 그것의 N-말단측으로 세포 표면의 세포외 측면에서 발현되도록 변형될 수 있는 것으로 이해된다.

[0079] 81. 본 명세서에서 개시된 종양용해 바이러스 중 하나를 대상체에게 투여함에 의해 치료될 수 있는 상이한 암 유형의 비제한적인 목록은 아래와 같다: 림프종 (호지킨 및 비-호지킨), 백혈병, 암종, 고체 조직의 암종, 편평상피 세포 암종, 선암종, 육종, 신경아교종, 고등급 신경아교종, 모세포종, 신경교세포종, 형질세포종, 조직구종, 흑색종, 샘종, 저산소 종양, 골수종, AIDS-관련된 림프종 또는 육종, 전이암, 또는 일반적으로 암. 개시된 종양용해 바이러스 및 이를 포함하는 조성물이 치료하기 위해 사용될 수 있는 암의 대표적이지만 비제한적인 목록은 하기와 같다: 림프종, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 근상식육종, 호지킨 질환, 골수성 백혈병, 방광암, 뇌암, 신경계 암, 두경부 암, 두경부의 편평상피 세포 암종, 신장암, 폐암 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암, 신경교세포종/교모세포종, 머털 세포 암종, 난소암, 췌장 암, 전립선암, 피부암, 간암, 흑색종, 입, 목, 후두, 및 폐의 편평상피 세포 암종, 결장암, 자궁경부암, 자궁경부 암종, 유방암, 및 상피성 암, 신장암, 비노생식 암, 폐암, 식도 암종, 두경부 암종, 큰 장암, 조혈 암; 고환암; 결장 및 직장암, 전립선 암, 또는 췌장 암.

[0080] 82. 따라서, 일 양태에서, 하나 이상의 조각된 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 포함하는 조성물 (개시된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 발현하는 종양용해 바이러스를 포함함)을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시되고, 여기서 상기 하나 이상의 종양용해 바이러스는 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 하나 이상의 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 발현한다. 일 양태에서, 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함

하는, 본 명세서에서 개시된 바와 같은 융합 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 세포질 꼬리 영역, 막관통 영역 및 세포외 줄기 영역; 및 세포외 줄기 영역의 C-말단에 융합된 N-말단을 포함하는 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함한다. 따라서 본 융합 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 (예컨대, 예를 들어, 리간드의 자연 발생 배향에 비교될 때, 세포외로보다는 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과, 세포에 관하여 역전된 배향을 가지도록 변형된 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인), NKG2D 리간드 (예를 들어, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB); 및/또는 또 다른 표적화가능 리간드 (예를 들어, CD19 또는 CD20))를 제공한다.

[0081] 83. 본 치료 방법은 변형된 종양용해 바이러스 및/또는 표적 암 세포에 대해 NK 세포 활성을 증가시키도록 합성된 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 이용하는 것으로 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 종양용해 바이러스 및/또는 융합 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질의 치료적 활성은 본 명세서에서 개시된 임의의 종양용해 바이러스로 종양용해 바이러스 요법 동안 대상체 안으로 면역 세포 (예컨대, 예를 들어, 자연 살해 (NK) 세포, 비제한적으로 유전자 변형된 NK 세포를 포함함) 또는 이들의 임의의 조합의 입양 전달을 통해 증강될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 대상체에게 면역 세포, 예컨대, 예를 들어 NK 세포 (예를 들어, 유전자 변형된 NK 세포를 포함함) 및/또는 CD19 표적화 항-CD19 CAR T 세포를 입양적으로 이송시키는 단계를 더 포함하는 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시된다. 일 양태에서, NK 세포는 항-CD19 키메라 항원 수용체를 표적화하는 CD19를 발현하도록 변형될 수 있다.

[0082] 84. 일 양태에서, 개시된 종양용해 바이러스에 사용된 일부 표적화 리간드는 NK 세포 상의 수용체에 대한 직접적인 리간드가 아니라는 것이 이해되고 본 명세서에서 고려된다. 일 양태에서, 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 하나 이상의 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 종양용해 바이러스를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시되며, 상기 방법은 표적화 리간드 (예를 들어, 항-CD19 항체 (예를 들어, MDX1342, MEDI-551, AFM11, XmAb 5871, MOR-208, SGN-19A, SAR3419, 블리나투모맵, 또는 타플리투모맵) 또는 항-CD-20 항체 (예를 들어, 리톡시맵, 오파투무맵, 오브티누투주맵, 벨투주맵, 또는 오크렐리주맵)를 인식하는 하나 이상의 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 표적 리간드를 인식하는 항체와 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 하나 이상의 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 포함하는 종양용해 바이러스를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 개시된 방법으로, 상기 방법은 상기에 개시된 임의의 면역 세포의 투여를 추가로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 추가로, 개시된 방법은 당해 분야의 숙련가에게 알려진 임의의 항-암 치료제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0083] 85. 개시된 암 치료 방법에서, 효과적인 치료적 용량에 도달하는 NK 세포 활성화 및/또는 팽창의 정도를 달성하는 것이 바람직할 수 있다. NK 세포는 자극인자 세포의 표면 상에 발현된 수용체 (예컨대 4-1BBL)를 활성화시키기 위한 리간드와 사이토카인 (예컨대 IL-15 또는 IL-21)으로 자극될 때 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 혼합물 내에서 시험관내 배양에서 기하급수적으로 그리고 우선적으로 증식한다. 막 결합된 IL-21로의 자극은 배양물이 새로운 자극 세포로 주기적으로 보충된다면, NK 세포의 연속적인 팽창을 허용하는 무수한 세대에 걸쳐 NK 세포의 연속적인 번식을 자극하는 것으로 밝혀졌다. 이들 방법은 시험관내 NK 세포 팽창을 효율적으로 할 수 있지만, 살아있는 피더 세포에 대한 필요성으로 인해 본 방법론이 큰 GMP 시설 및 능력을 갖지 않는 임상 환경으로 이전하는 것이 어렵다. 또한, 환자에게 주입된 NK 세포는 공급기에 의한 계속된 자극의 결여에 기인해 분열을 멈출 수 있다. NK 세포를 접촉 및 활성화 및/또는 팽창시키기 위해 하나 이상의 활성화제, 자극 펩타이드, 사이토카인, 및/또는 접착 분자를 포함하는 원형질막 (PM) 입자, 엑소솜 (EX), 또는 피더 세포의 사용을 통해 이러한 장애물은 극복된다. NK 세포 활성화제 및 자극 펩타이드의 예는, 비제한적으로, 41BBL, IL-2, IL-12, IL-21, IL-18, MICA, LFA-1, 2B4, BCM/SLAMF2, CCR7 및/또는 다른 귀소 수용체를 포함한다. 사이토카인의 예는, 비제한적으로, IL-2, IL-12, IL-21, 및 IL-18을 포함한다. 접착 분자의 예는, 비제한적으로 LFA-1, MICA, BCM/SLAMF2를 포함한다. 예를 들어, 피더 세포 또는 원형질막 입자 (PM 입자) 또는 엑소솜 (EX)은 막 결합된 IL-21를 발현하는 피더 세포 (각각, FC21 피더 세포, PM21 입자, 및 EX21 엑소솜)로부터 제조된다. 막 결합된 IL21 발현 FC21 세포, PM21 입자, 및 EX21 엑소솜은 추가의 하나 이상의 활성화제, 자극 펩타이드, 사이토카인, 및/또는, 비제한적으로, 41BBL, IL-2, IL-12, IL-18, MICA, LFA-1, 2B4, BCM/SLAMF2, CCR7 (예를 들어, PM21 입자, EX21 엑소솜, 또는 41BBL 및 막 결합된 인터류킨 21을 발현하는 FC21 피더 세포)을 비롯한 접착 분자를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 하나 이상의 종양용해 바이러스가 비절단된 신호 앵커 도메인을 포함하는 하나 이상의 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 (예를 들어, 리간드의 자연 발생 배향에 비교할 때 세포외로보다는 세포내에서 대면된 아미노 말단 끝과, 세포에 대해 역전된 배향을 갖도록 변형된 면역글로불린 Fc 도메인 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4 Fc 도메인), NKG2D 리간드 (예를 들어,

RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB); 및/또는 CD19)를 발현하는, 하나 이상의 조작된 종양용해 바이러스를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고; 대상체에게 면역 세포, 예컨대, 예를 들어 NK 세포 (예컨대, 예를 들어, 유전자 변형된 NK 세포) 또는 CD19 표적화 항-CD19 CAR T 세포를 상기 대상체에게 입양적으로 이송시키는 단계를 추가로 포함하는 암을 치료하는 방법이 본 명세서에서 개시되고, 여기서 상기 면역 세포는 NK 세포이고, 상기 NK 세포는 하나 이상의 NK 세포 자극제 예컨대 사이토카인 (예컨대, 예를 들어, IL-12; IL-15; IL-18; 및 IL-12 및 IL-15; IL-12 및 IL-18; IL-15 및 IL-18; 및 IL-12, IL-15, 및 IL18을 포함한 이들의 임의의 조합), 성장 인자, 합성 리간드, NK 세포 자극 입자, NK 세포 자극 엑소솜, 및/또는 NK 세포 자극 입자, 엑소솜, 및/또는 IL-21, 4-1BBL, IL-21 및 4-1BBL을 포함하는 피더 세포를 비롯한 NK 세포 자극 피더 세포; 또는 사이토카인 또는 NK 세포 자극 입자, 엑소솜, 또는 이들의 피더 세포의 임의의 조합으로 자극되고 팽창된다.

[0084] 86. 일 양태에서, 원형질막 입자 또는 엑소솜은 NK 세포 피더 세포로부터 정제될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 원형질막 입자 및 엑소솜을 제조하는데 사용하고 청구된 발명에 사용하기 위한 NK 세포 피더 세포는 조사된 자가 또는 동종이계 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 또는 비조사된 자가 또는 동종이계 PBMC, RPMI8866, HFWT, K562, 막 결합된 IL-15 및 41BBL로 형질감염된 K562 세포, 막 결합된 IL-21 및 41BBL로 형질감염된 K562 세포, 또는 EBV-LCL일 수 있다. 일부 양태에서, NK 세포 피더 세포는 막 결합된 IL-21 및 41BBL로 형질감염된 K562 세포 또는 막 결합된 IL-15 및 41BBL로 형질감염된 K562 세포일 수 있다.

[0085] **D. 실시예**

[0086] 87. 하기 실시예는 당해 분야의 숙련가에게 본 명세서에 청구된 화합물, 조성물, 물품, 디바이스 및/또는 방법이 제조되고 평가되는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제공되고, 순수하게 예시적인 것으로 의도되며 본 개시내용을 한정하고자 하는 것이 아니다. 숫자 (예를 들어, 양, 온도, 등)와 관련하여 정확도를 보장하기 위해 노력했지만, 일부 오류 및 편차를 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 온도는 °C이거나 주위 온도이고, 압력은 대기압 또는 그 근처이다.

[0087] 88. 본 명세서에서, 종양용해 바이러스는 향상된 면역 자극을 위해 추가로 개선되고, 입양으로 전달된 NK 세포의 향상된 효능을 위해 면역 표적화가능 리간드, 구체적으로 외인성 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드 예컨대, 예를 들어, 항체의 막 결합된 Fc 도메인 (MB_Fc)을 전달하기 위해 사용된다 (도 1). 항체의 Fc 도메인은 그 다음 항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC)을 유도하는 NK 세포 상의 CD16 (Fcγ III 수용체)에 의해 인식된다. ADCC를 통한 표적 세포의 NK 세포 사멸은 종양에 의해 전개된 면역 억제 기전에 덜 민감하고, 따라서 효율적인 종양 제거를 위해 ADCC를 통한 보다 효과적인 사멸을 초래하는 항체 유래된 Fc로 종양 표면을 마킹한다. 막 결합된 면역 세포 표적화 리간드를 구축하기 위해, 유형 II 내재성 막 단백질로부터의 비절단된 신호 앵커가 표적화 리간드에 융합될 수 있다. 효과적으로, 유형 II 내재성 막 단백질 상에 전형적으로 존재하는 구상 헤드가 표적화 리간드로 대체된다 (도 2).

[0088] 89. 인공 Fc-함유 단백질은 표적화가능 항원 또는 치료적 항체의 부재에서 ADCC에 대한 암 세포를 "표지"하기 위해 종양-표적화 종양용해 바이러스를 사용하여 종양으로 전달될 수 있다. 키메라 단백질은 표면-결합된 항체: 리간드의 자연 발생 배향에 대해 역전된 배향인 C-말단으로 세포외로 노출된 Fc 도메인과 융합된 유형 II 막 배향을 모방할 수 있어, Fc 도메인의 아미노 말단 끝은 단량체성, 이량체성 또는 다량체 형태로 세포막에 (즉, 세포내에서) 대면한다. 대안적으로, 다른 표적화가능 리간드 (예를 들어 CD19, RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, MICB, 및/또는 CD20)는 종양용해 바이러스를 통해 직접적으로 표면 막에 전달될 수 있고 여기서 표적화 리간드 (예컨대 RAET1, RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1L, RAET1N, MICA, 및/또는 MICB)는 NK 세포 상의 NKG2D 수용체에 의해 또는 ADCC (예를 들어 항-CD20-리톡산, 오파투무맙, 오브티누투주맙, 벨투주맙, 오크렐리주맙 등 또는 항-CD19 MDX1342, MEDI-551, AFM11, XmaB 5871, MOR-208, SGN-19A, SAR3419, 블리나투모맙, 또는 타플리투모맙 등)를 결합할 수 있는 표적화가능 리간드 (예를 들어, CD20 또는 CD19)에 대한 치료적 항체와 함께 및/또는 표적화 리간드를 표적화하는 CAR T 세포 (예를 들어, 항-CD19 CAR T 세포)와 함께 직접적으로 인식될 수 있다. 막 결합된 (MB_Fc) 또는 막 결합된 (MB_TL)의 전달에 대해 적합한 인정되는 종양용해 바이러스의 예는 파라인플루엔자 바이러스 5의 P/V/F 돌연변이체이다. 이 조작된 P/V/F 돌연변이체는: 1) 양 중합 효소 기능 (P) 및 면역 반응의 억제 (V)에 관련된 단백질을 발현하는 P/V 유전자 (도 3A), 및 2) 바이러스 유입 및 다핵질의 생성에 관련된 융합 단백질을 인코딩하는 바이러스 F 유전자 (도 3B)에서의 돌연변이를 갖는다. P/V 돌연변이는 종양 세포에서 성장에 대해 바이러스를 제한하였고 그리고 바이러스는 세포사 및 항바이러스 반응을 유도한다 (14-16). F 돌연변이는 엄청난 세포-세포 융합 (다핵질), 바이러스를 종양 전반에 걸쳐 분산시키고 괴사를 통해 사멸시키는 바람직한 특성을 생성하는 바이러스를 초래한다. 이것은 P/V/F 감염 후 Vero 세포에

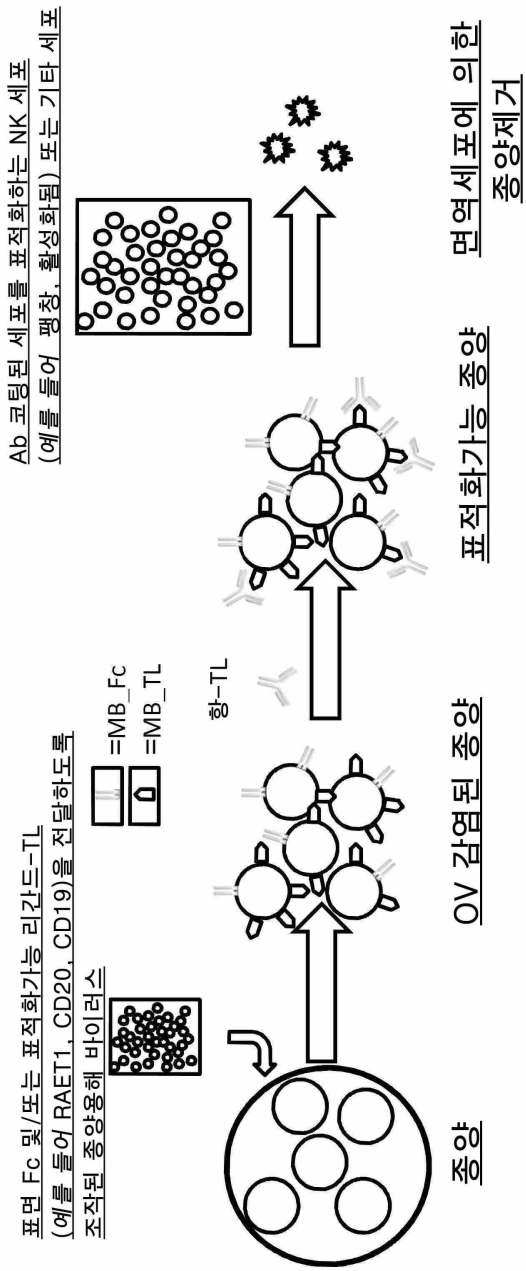
서 엄청난 다핵질을 나타내는 도 3B에서의 현미경사진에서 분명하다. P/V/F 감염된 암 세포는 또한 인간 PM21-NK 세포에 의해 보다 효율적으로 인식되고 사멸되었다 (도 3C). 이 실험에서, 인간 난소 SKOV3-Luc 세포는 모의 감염되었거나 또는 P/V/F 바이러스로 MOI=10에서 감염되었고, PM21-입자 접근법에 의해 생산된, 인간 NK 세포와 다양한 비로 20시간 후 인큐베이션되었다. 생존가능 세포의 백분율은 NK 세포의 부재에서 P/V/F 세포병리적 효과가 분명하지 않을 때 (세포 생존력 >90%) 24시간 후 한 번에 결정되었다. 도 3C에서 나타난 바와 같이, PM21-NK 세포는 사멸에서 모의 감염된 세포에 비교할 때 PV/F 감염된 세포가 훨씬 더 효과적이었고, 여기서 표적 세포의 50%를 사멸하기 위해 적어도 5배 더 적은 NK 세포가 필요하였다. 따라서, P/V/F는 입양 NK 세포 치료로 의도한 용도에 대한 사용에 대해 적합한 인정되는 바이러스이다. 전달 벡터로서 이 바이러스는 또한 하기를 비롯한 수많은 강력한 인정되는 특성을 갖는다: (1) 다수의 외부 유전자를 첨가하는데 알려진 패키징 구조가 없는 작은 계능; (2) 고역가 (>10¹⁰ pfu/ml)로 생산할 수 있는 비-분열 세포의 효율적인 감염; (3) 숙주 DNA에 통합 없이 그리고 관찰된 재조합이 없는 세포질 복제; (4) 인간을 감염시키지만 감염은 질환 또는 병원성 특성과 연관되지 않음. 원형질막 상의 Fc 도메인을 얻기 위해, N-말단 세포질 꼬리, 막관통 도메인으로 작용하는 비절단된 신호-앵커, 및 원형질막으로부터 신장하는 줄기 영역으로 구성되는 잘 특성규명된 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제 단백질 (NA)로부터의 막 표적화 도메인이 사용될 수 있다. 도 3D에서 나타난 바와 같이, 작제물은 Fc 도메인이 NA 줄기 영역의 증가하는 길이에 연결된 NA-Fc 키메라로 구성된다. NA-Fc는 재조합 P/V/F 바이러스에 삽입되어 종양 대 정상 세포 (P/V 돌연변이로 인함)에 특이적이고 NK 세포 (A)에 의해 ADCC를 증진할 수 있는 신규한 종양용해 바이러스를 생성할 수 있다 (도 3A). NA-Fc 작제물 중 하나의 아미노산 서열의 예는 도 5에서 형질감염된 종양 세포의 표면 상에 Fc를 제시하는 그것의 능력을 도 4에 도시되어 있다. 이 실험에서 A549 폐암 세포는 모의 대조군, 빈 벡터 또는 NA1_Fc를 인코딩하는 벡터로 형질감염되었고 그 다음 항-인간 Fc 항체 (APC 항-인간 IgG Fc HP6017-Biolegend)로 다음 날 표면 발현에 대해 염색되어 세포 표면 상의 Fc의 존재를 검출하였다. NA1_Fc로 형질도입된 세포만이 Fc 발현 세포의 표면에 결합된 항-Fc 항체를 반사하는 APC 채널에서 높은 평균 형광 강도를 가졌다. 따라서, NA는 Fc를 적절한 배향으로 발현시키기에 적합한 막 앵커이다. NH₂-말단 세포질 도메인 및 COOH-말단 도메인의 (N_{cyt} 위상기하학)를 갖는 적합한 막관통 도메인의 다른 예는 비제한적으로 트랜스페린 수용체, 아시아고당단백질, 골지-상주하는 글리코실전달효소의 계열 및 파라믹소바이러스 HN 단백질을 포함한다.

[0089]

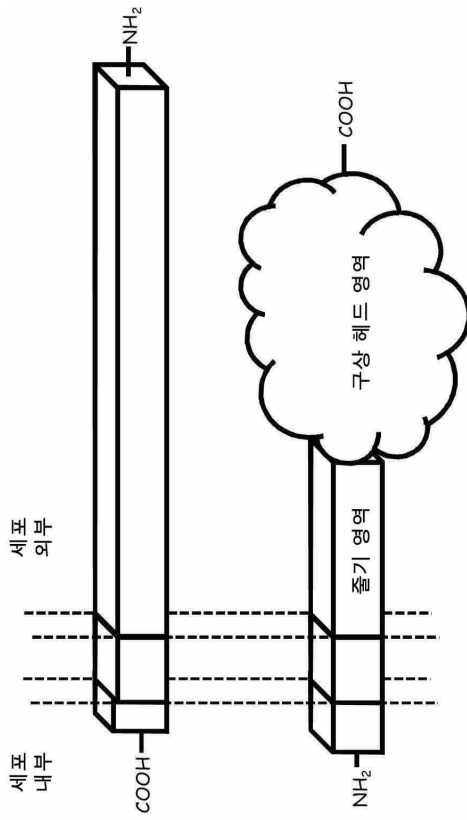
90. 2개의 NK 세포 저항성 세포주-A549 비소형 폐 암종 및 SKOV-3 난소암 세포주를 사용하여 종양용해 바이러스가 NK 세포 사멸에 대한 종양 표적을 감작시킬 수 있고 (도 6, 8, 11), 따라서 "보편적인 표적화가능 리간드"를 종양 세포에 전달하기 위한 전달 비히클로 또한 사용될 수 있음을 보여주기 위해 개념의 증명 연구를 수집하였다. P/V/F를 포함한 많은 바이러스는 감염된 세포로 DNA를 전달하고 숙주세포에서 바이러스로 인코딩된 단백질의 발현을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다. NK 세포 상에서 CD16 수용체를 결합하는 항체의 Fc 도메인은 상기 언급된 "보편적인 표적화가능 리간드"의 한 예이다. 뉴라미다아제 (NA) 줄기에 Fc 도메인의 부착은 세포 표면 상에서 Fc의 발현을 허용한다 (도 7 및 9). 기대된 대로, SKOV-3 세포 또는 A549 세포 중 어느 하나 상에서 NA1-Fc의 안정한 발현은 NK 세포에 의한 증가된 사멸을 초래하였고, 이 효과는 P/V/F 감염에 부가적이었다 (도 3 및 6). 또한 뉴라미다아제 줄기 도메인의 길이를 증가시킴에 의해 Fc 인식을 통한 사멸이 추가로 향상되었다 (도 10). 따라서, 사멸을 향상시키기 위해서뿐만 아니라 "보편적인 리간드" 전달을 위해 OV의 사용의 조합은 가장 NK 세포 저항성 암 세포주조차도 NK 세포 감수성으로 감작시킬 수 있다.

도면

도면1



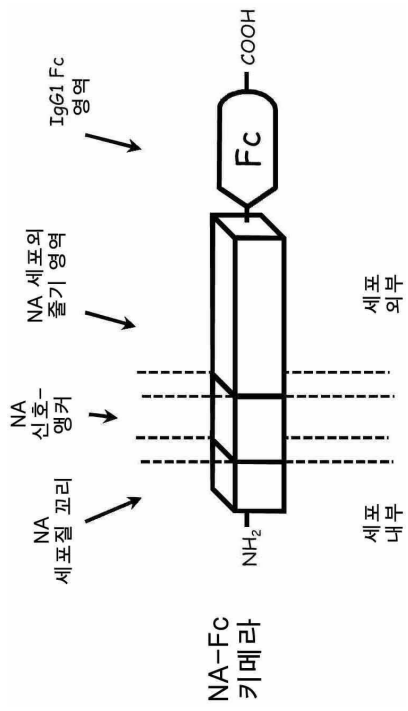
도면2a



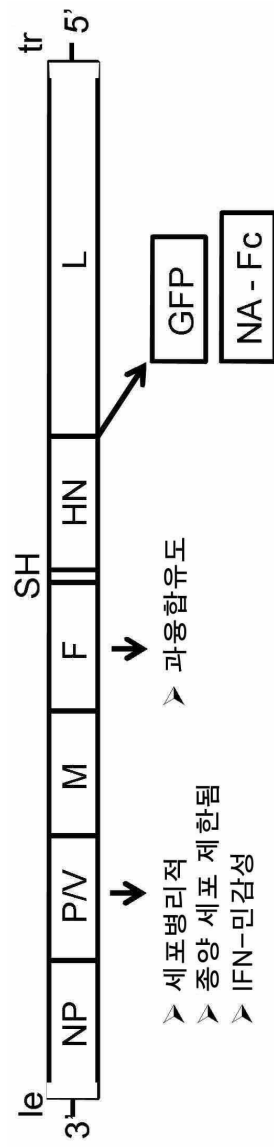
유형 I 내재성 막 단백질
 절단된 신호 서열
 별개의 C-말단 엔커
 가장 일반적인 유형
 N-아웃, C-인 위상기화학

유형 II 내재성 막 단백질
 막에서 엔커로 또한 기능 하는
 비절단된 신호 서열
 단백질의 드문 유형
 N-인, C-아웃 위상기화학

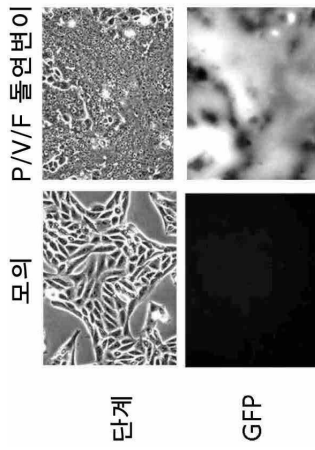
도면2b



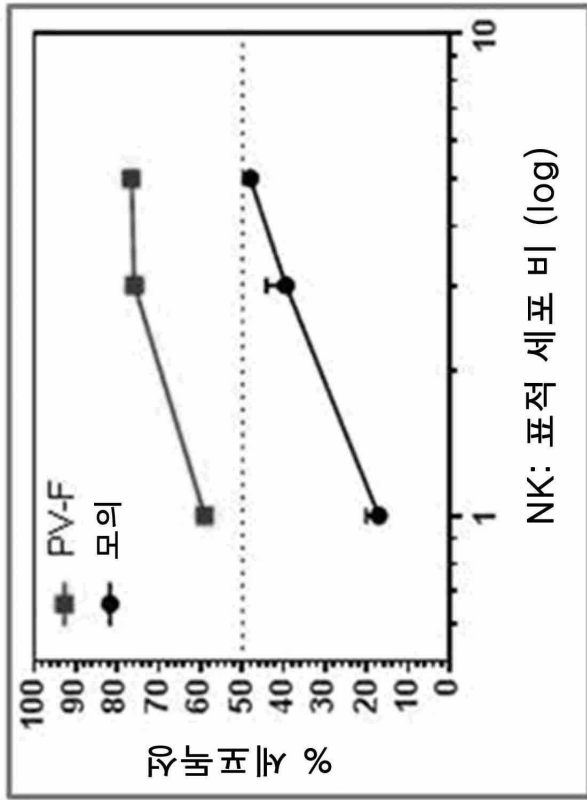
도면3a



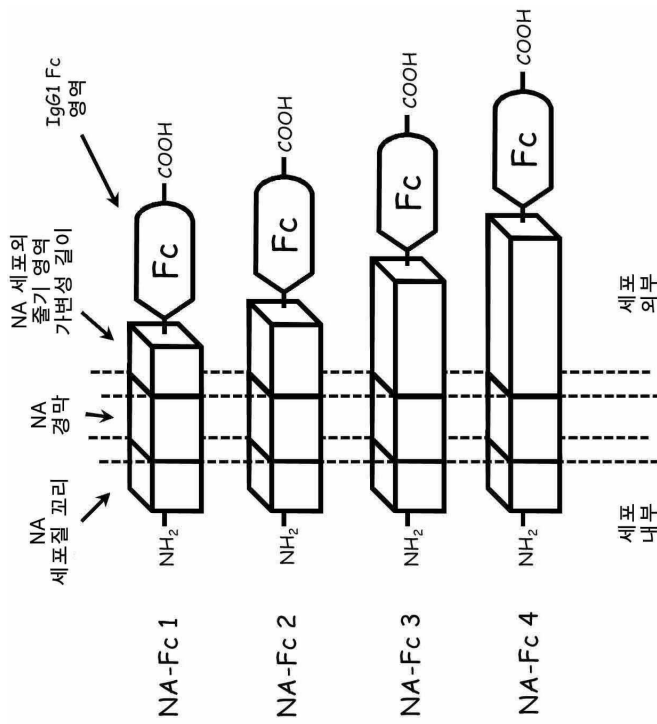
도면3b



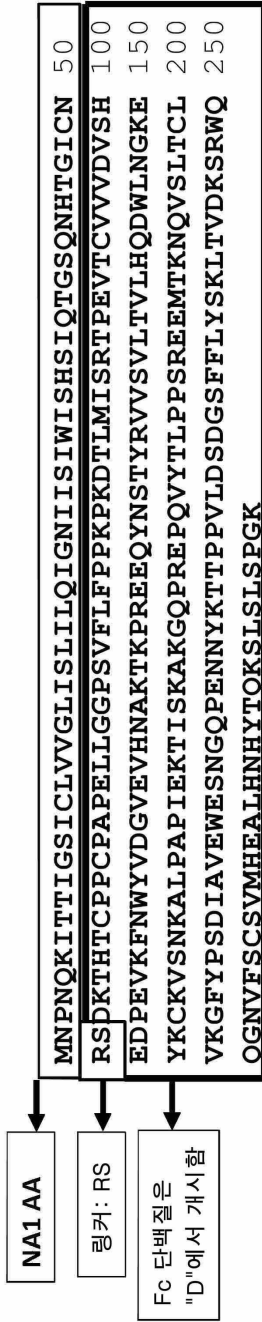
도면3c



도면3d

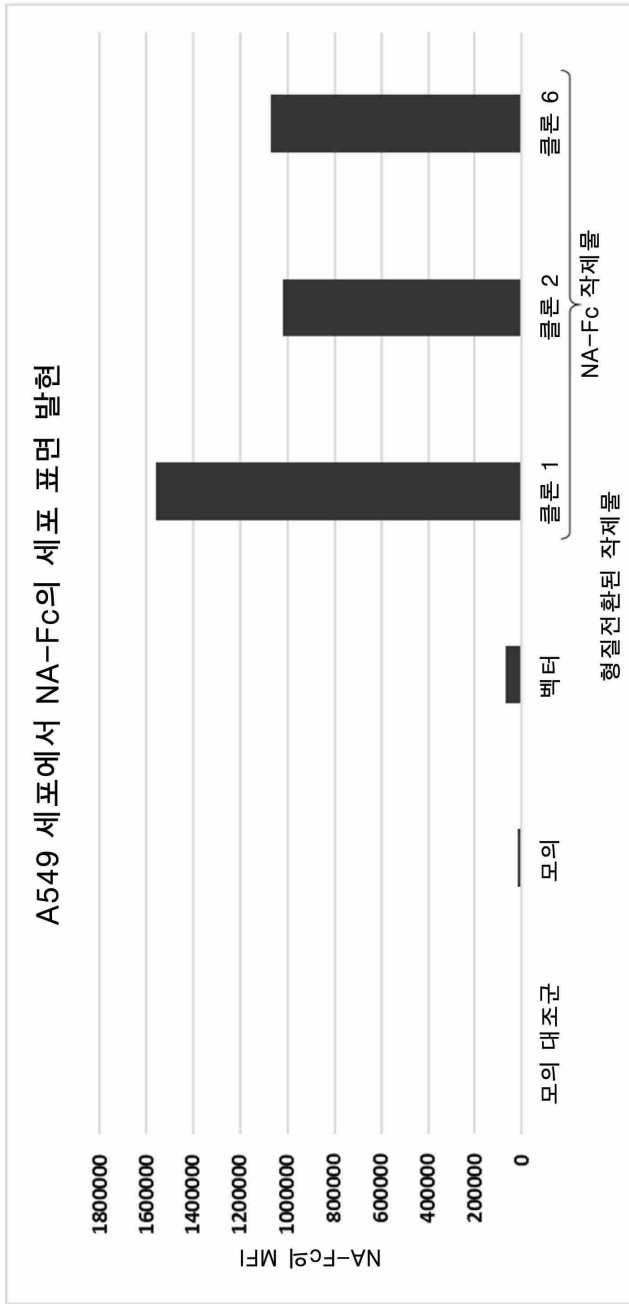


도면4

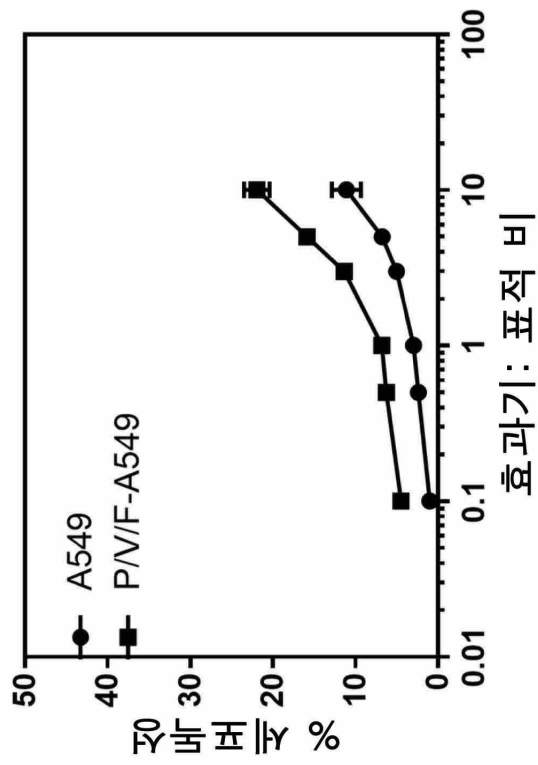


총 길이는 279

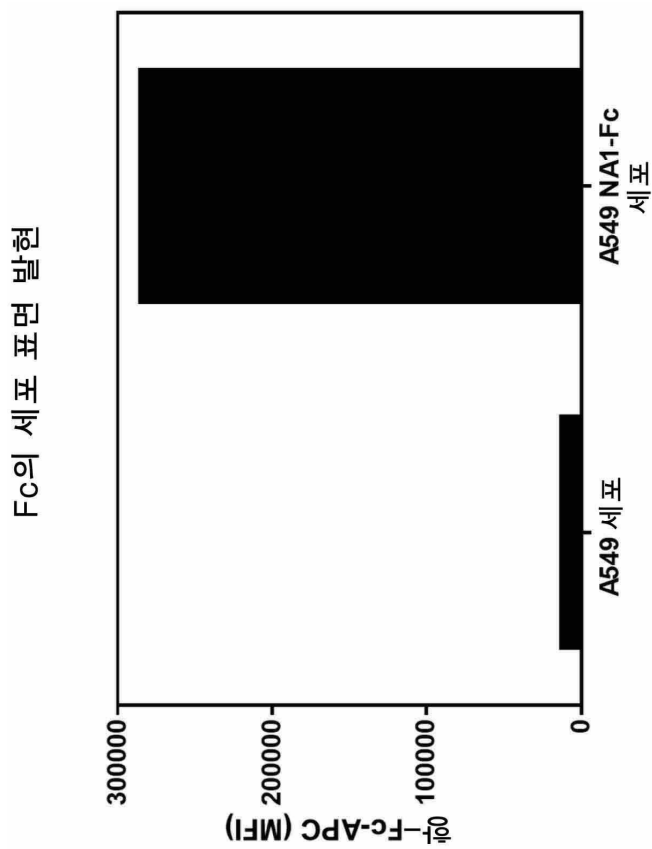
도면5



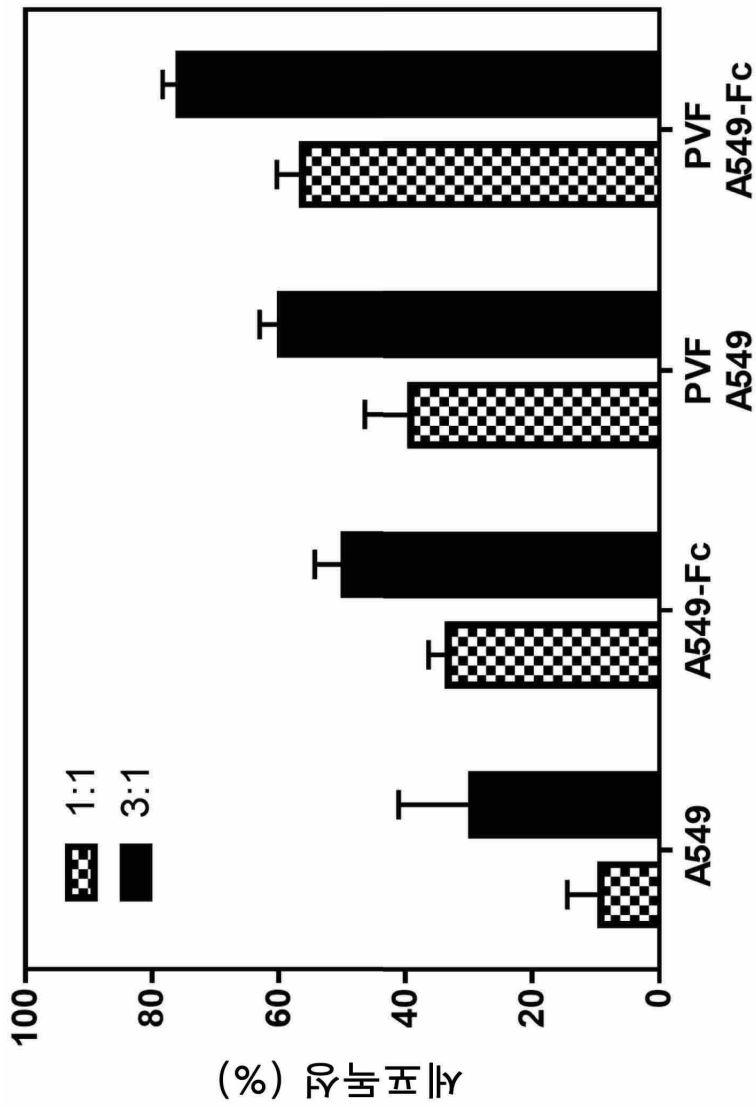
도면6



도면7

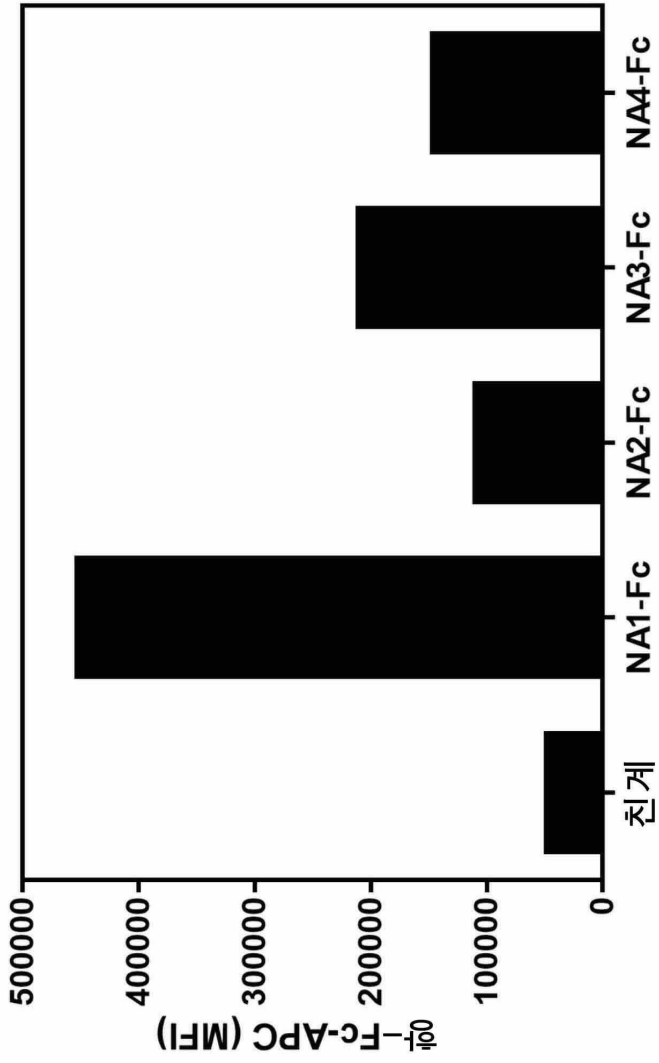


도면8

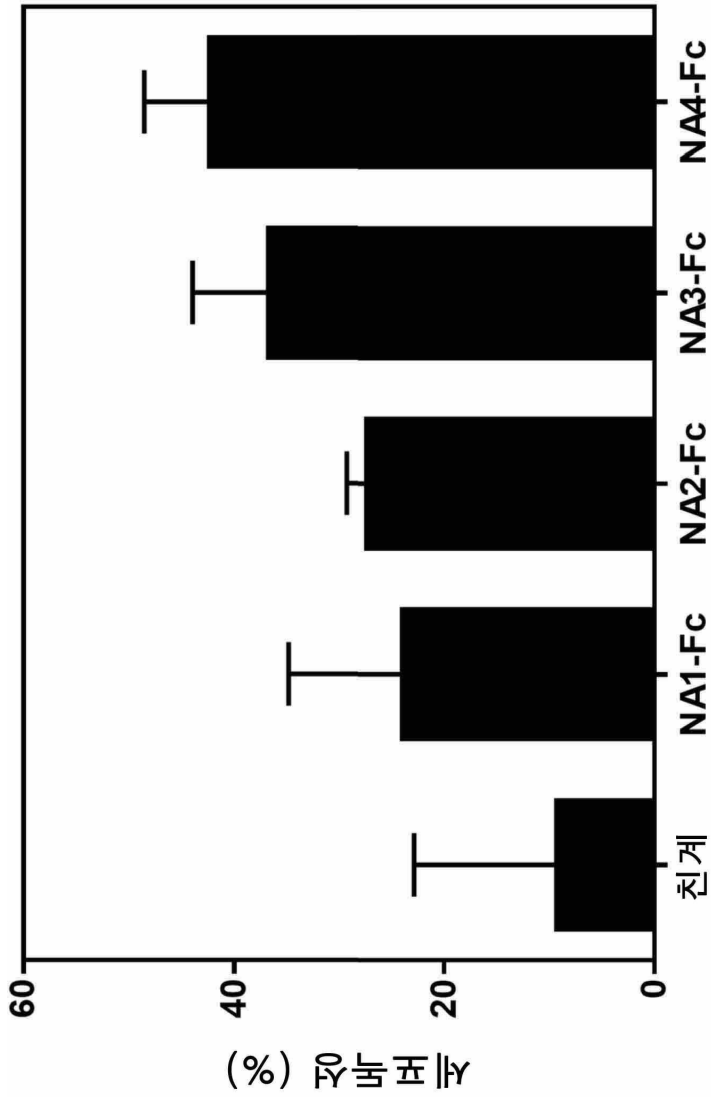


도면9

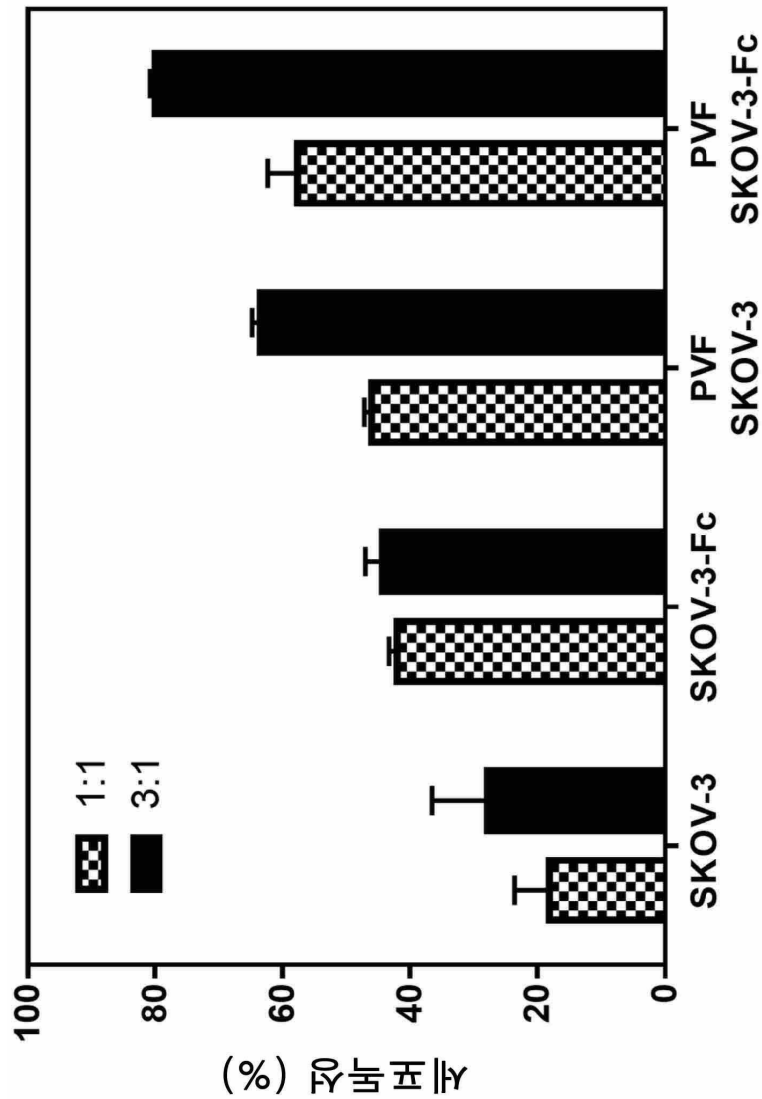
SKOV-3 세포 상에 Fc의 세포 표면 발현



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Central Florida Research Foundation, Inc.

<120> NOVEL ONCOLYTIC VIRUSES FOR SENSITIZING TUMOR CELLS TO KILLING BY
NATURAL KILLER CELLS

<130> 10613-062W01

<140> PCT/US2018/034655

<141> 2018-05-25

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic constructs

<400> 1

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Thr Thr Ile Gly Ser Ile Cys Leu Val

1 5 10 15

Val Gly Leu Ile Ser Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile

20 25 30

Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Ser Gln Asn His Thr Gly Ile

35 40 45

Cys Asn Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

115 120 125

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

