(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0139738
(43) 공개일자 2020년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/768 (2014.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/768 (2013.01)
A61K 39/39541 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7031272
(22) 출원일자(국제) 2019년04월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년10월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/025402
(87) 국제공개번호 WO 2019/195302
국제공개일자 2019년10월10일
(30) 우선권주장
62/651,470 2018년04월02일 미국(US)
62/823,277 2019년03월25일 미국(US)

(71) 출원인
듀크 유니버시티
미국, 노스캐롤라이나 27705, 더럼, 스위트 406, 2812 에르윈 로드
(72) 발명자
비그너, 다렐
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 슈트 306 에르윈 로드 2812
그로마이어, 마티아스
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 슈트 306 에르윈 로드 2812
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **신보조 암 치료**

(57) 요 약

종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제를 투여하고 이에 따라 종양이 감소되는 단계를 포함하는, 종양 부담을 효과적으로 감소시키기 위한 치료를 이전에 받은 적이 없는 개체에서 신보조 요법에 의해 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 종양 감소에 따라 면역 체크포인트 억제제 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 방법을 수행하기 위한 키트가 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2770/32621 (2013.01)
C12N 2770/32632 (2013.01)

(72) 발명자
내어, 스미타
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 슈트 306 에르윈 로드 2812
프리드만, 헨리
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 슈트 306 에르윈 로드 2812
데스자딘스, 애닉
미국 27705 노스캐롤라이나주 더럼 슈트 306 에르윈 로드 2812

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 종양의 수술적 절제 전에, 종양을 갖는 개체에게 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제 및 치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하는 단계,

b) 이후 종양을 절제하기 위한 수술을 수행하는 단계,

c) 종양 절제 후, 개체에게 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하고; 여기서 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 임의적으로 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함하는 것인, 종양을 갖는 개체를 치료하는 방법.

청구항 2

a) 하나 이상의 면역치료제를 치료 유효량으로 종양을 갖는 개체에게 투여하는 단계이며, 여기서 하나 이상의 면역치료제는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 것인 단계;

b) 하나 이상의 면역치료제를 받은 후, 개체의 종양 부담을 감소시키기에 효과적인 항암 요법으로 개체를 치료하는 단계

를 포함하는, 암의 신보조 면역요법을 위한 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 항암 요법이 수술, 방사선 요법 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 단 하나의 면역치료제가 종양을 갖는 개체에게 종양 부담을 감소시키기 위해 개체가 항암 요법을 받기 전에 투여되고, 여기서 면역치료제는 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 종양 부담을 감소시키기 위해 항암 요법을 받은 후, 방법이 개체가 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 면역 체크포인트 억제제 중 하나 이상을 포함하는 유지 요법을 받는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는

것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 뇌 종양, 신장 세포 암종, 전립선 종양, 방광 종양, 식도 종양, 위 종양, 췌장 종양, 결장직장 종양, 간 종양, 담낭 종양, 유방 종양, 폐 종양, 두경부 종양, 피부 종양, 흑색종, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 종양이 NECL5 (넥틴-유사 단백질 5)를 발현하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 NECL5 (넥틴-유사 단백질 5)를 발현하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 종양에 직접적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 개체에게 투여하기 전에, 방법이 NECL5의 발현을 확인하기 위해 개체의 종양을 시험하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 개체에게 투여하기 전에, 방법이 NECL5의 발현을 확인하기 위해 개체의 종양을 시험하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-LAG-3 항체, 및 항-TIM-3 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 항-PD-1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-LAG-3 항체, 및 항-TIM-3 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제2항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제가 종양을 갖는 개체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제2항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제 둘 모두가 종양을 갖는 개체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 19

제1항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 개체가 면역 체크포인트 억제제를 받기 전에 개체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 20

제1항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 개체가 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 받기 전에 개체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하기 수일 전에 개체에게 폴리오바이러스 면역화 부스터를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하기 수일 전에 개체에게 폴리오바이러스 면역화 부스터를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 종양의 절제 또는 감소 후 개체에게 다수 용량의 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 용량은 수일 또는 수주 분리되는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 종양의 절제 또는 감소 후 개체에게 다수 용량의 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 용량은 수일 또는 수주 분리되는 것인 방법.

청구항 25

종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 키트.

청구항 26

제25항에 있어서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 제1 용기에 있고, 면역 체크포인트 억제제가 제2 용기에 있는 것인 키트.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 종양 세포 샘플에서 NECL5 발현을 정지시키기 위한 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 28

제27항에 있어서, 시약이 NECL-5에 특이적인 항체 또는 NECL-5에 특이적인 PCR 프라이머를 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 특허 출원은 2018년 4월 2일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/651,470 및 2019년 3월 25일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/823,277의 우선권의 이익을 주장하며, 둘 다 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0003] **연방 지원 연구에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 NCI/NIH가 수여하는 연방 보조금 번호 R35-CA197264 및 국방부 유방암 연구 프로그램 레벨 3 혁신상이 수여하는 연방 보조금 번호 BC151083 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 연방 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0005] **발명의 기술분야**

[0006] 본 발명은 항-종양 요법 분야에 관한 것이다. 특히, 신보조 요법에서 종양용해성 바이러스 항-종양 치료에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] PVSRIPO는 재조합 종양용해성 폴리오바이러스이다. 이는 인간 리노바이러스 2형 (HRV2)의 외래의 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 함유하는 살아있는 약독화된 1형 (사빈) PV 백신으로 이루어진다 (Gromeier et al., PNAS

93: 2370-2375 (1996) 및 미국 특허 번호 6,264,940 참조). IRES는 폴리오바이러스 게놈의 5' 비번역 영역에 위치된 시스-작용 유전 요소로서, 바이러스의 m^7G-캡-독립적 번역을 매개한다. PVSRIPO의 항-종양 효과는 직접적인 바이러스-매개된 종양 세포 사멸; 및 종양에 대해 지시되는 2차 숙주-매개된 면역 반응을 포함한다 (Brown et al., Sci Transl Med (: 4220 (2017) 참조). 바이러스는 인간에게 흥미롭고 예상치 못한 효능을 나타내었다. 그럼에도 불구하고, 인간, 특히 치료하기 어려운 암을 갖는 개체에게 하나 이상의 개선된 치료 이점을 제공하는 항암 치료를 확인하고 개발하기 위한 관련 기술분야의 지속적인 요구가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 한 측면에 따라, 신보조 요법에 의해 개체에서 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법에서, 개체는 이전에 종양 부담을 감소시키기 위한 치료를 받은 적이 없다 (예컨대, 종양 부담을 감소시키기 위한 수술적 치료 또는 방사선 치료 없음). 면역 체크포인트 억제제는 또한 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 (투여 전 또는 후)과 관련하여 동시에 또는 순차적으로 개체에게 투여된다. 치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제로 치료한 후, 개체는 종양 부담을 감소시키기 위해 치료된다. 한 측면에서, 개체에게 투여되는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 신보조 요법에 의해 개체에서 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법에서, 개체는 이전에 종양 치료를 위한 절제술을 받은 적이 없다 (예컨대, 종양 부담을 감소시키기 위한 수술적 치료 없음). 면역 체크포인트 억제제가 개체에게 투여된다. 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물이 또한 개체에게 투여되며, 여기에서 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주 (PVSRIPO)를 포함한다. 면역 체크포인트 억제제 및 종양용해성 키메라 폴리오바이러스를 포함하는 신보조 요법의 투여 후, 개체는 종양의 수술적 절제를 포함하여 종양 부담을 감소시키도록 치료된다. 이러한 종양 절제는 면역 체크포인트 억제제 및 종양용해성 키메라 폴리오바이러스의 투여 후 1주 내지 1개월 범위의 기간 내에 발생할 수 있다.

[0010] 본 발명의 추가 측면에 따라, 본원에 기재된 신보조 요법의 방법 중 어느 하나는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하기 6개월 내지 1주 전에 폴리오바이러스 면역화 부스터 (예컨대, 사노피-파스퇴르 (Sanofi-Pasteur)로부터의 3가 불활성화된 IPOL)를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 본원에 기재된 방법 중 어느 하나는 종양 절제 후 보조 요법을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 이러한 요법은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 또는 면역 체크포인트 억제제 중 하나 이상을 감소된 종양 부담을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 예컨대, 종양 절제 또는 종양의 방사선 치료 후, 유지 요법에 필요한 경우 면역 체크포인트 억제제를 개체에게 투여할 수 있다. 또 다른 예에서, 종양이 절제 또는 방사선 후 재발하는 경우, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스를 개체에게 투여할 수 있다.

[0012] 본 발명의 추가 측면에 따라, 개체에서 종양의 신보조 요법, 및 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물의 단독으로 또는 면역 체크포인트 억제제와의 조합으로 종양의 신보조 요법에서 약제로서 또는 조성물로서의 용도가 제공되며, 여기서 개체는 이전에 종양을 치료하기 위해 절제를 받은 적이 없으며, 여기서 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함하며; 종양이 치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 조합으로 치료된 후, 종양 부담이 감소된다. 신보조 요법은, 종양 부담의 감소 후, 치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제, 또는 그의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 하나 이상의 치료를 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 또한, a) 하나 이상의 면역치료제를 치료 유효량으로 종양을 갖는 개체에게 투여하는 단계이며, 여기서 하나 이상의 면역치료제는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 조합 요법으로 순차적으로 투여되는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 단계; b) 하나 이상의 면역치료제를 받은 후, 개체의 종양 부담 (예컨대, 종양의 양)을 감소시키기에 효과적인 수술, 방사선 요법 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항암 요법으로 개체를 치료하는 단계를 포함하는 (즉, 하나 이상의 면역치료제는

항암 요법 전에 투여됨) 암의 신보조 면역요법을 위한 방법이 제공된다. 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 또는 면역 체크포인트 억제제, 또는 그의 조합은 제약상 허용되는 담체의 첨가를 추가로 포함할 수 있다. 한 측면에서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 PVSRIPO이다.

[0014] 면역 체크포인트 억제제 및 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 각각 치료 유효량으로 종양이 이전에 절제 또는 방사선 치료에 의해 감소된 적이 없는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서의 종양의 신보조 요법이 제공되며, 여기서 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 상기 폴리오바이러스의 클로버잎과 상기 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이의 상기 폴리오바이러스의 5' 비번역 영역에 인간 리노바이러스 2 (HRV2) 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 갖는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주를 포함하고; 여기서 종양이 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제로 치료된 후, 종양은 종양 부담을 감소시키기 위해 치료되고; 여기서 신보조 요법은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제의 조합을 사용하는 보조 요법과 비교하여 개선된 치료 이점을 제공한다. 치료 이점은 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (절제 전 및/또는 후) 종양 부위 주변의 염증 감소; 전체 생존 개선; 무질환 생존 개선; (원발성 기관 및/또는 원거리 재발에서) 재발 가능성 감소; 전이성 질환 발생 감소; 및 증가된 항종양 면역 반응; 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 치료된 암의 유형에 따라 적절한 반응 평가 기준을 사용한 전반적인 객관적 반응률의 개선 (예컨대, 림프종의 경우 문헌 (Cheson et al., 2014, J. Clin. Oncology32 (27):3059-3067) 참조; 고형 비림프양 종양의 경우 고형 종양에서의 반응 평가 기준 (RECIST)). 염증 감소와 관련하여, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물로 치료되고 최소 또는 쉽게 제어 가능한 염증을 경험한, 종양, 특히 뇌 종양을 갖는 개체는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물로 치료되고 광범위한 또는 다루기 어려운 염증을 경험한 개체와 비교하여 더 우수한 (더 효과적인 및/또는 더 오래 지속되는) 항종양 반응을 나타낸다는 것이 발견되었다.

[0015] 이들 및 다른 측면은 명세서를 읽음으로써 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이며 암을 치료하기 위한 새로운 치료 요법을 관련 기술분야에 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 PVSRIPO의 유전자 구조를 나타내는 다이어그램이다. 폴리오바이러스 5' 비번역 영역 (UTR)은 폴리오바이러스의 5' 말단에 있는 클로버잎과 폴리오바이러스의 오픈 리딩 프레임 사이에 천연 폴리오바이러스 서열 대신 인간 리노바이러스 B로부터의 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 함유한다.

도 2는 다양한 용량의 PVSRIPO (청색선; "PVSRIPO")로 처리된 개체와 비교한 과거 대조군 (historical control) (적색선)에 대한 전체 생존의 카플란-메이어 (Kaplan-Meier) 곡선이며, y-축은 전체 생존 ("생존 확률")이며 x축은 개월 수이다.

도 3은 유방암 (SUM149 및 MDA-MB231), 흑색종 (DM6) 및 전립선암 (LNCaP)을 대표하는 4개의 상이한 종양 세포주를 사용한 결과를 나타낸다. 수지상 세포 (DC)를 접시에 시딩하였다. 종양용해물로부터의 상청액을 DC 배양물에 첨가하고, 인큐베이션하였다. 이어서, 상청액을 제거하고, DC를 세척하였다. DNase I-처리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 37℃에서 인큐베이션하였다. 비-부착 세포를 수거하고, CTL 자극 배지에서 IL-7의 존재 하에 10:1의 반응자 세포 대 자극자 DC 비율로 폴리오바이러스-유도된 종양용해물이 로딩된 DC로 자극하였다. T 세포를 제12일-제14일에 수거하고, 계수하고, 유로퓸-방출 CTL 검정에서 이펙터 T 세포로 사용하였다. 관련된 및 무관한 종양 항원-코딩 mRNA로 형질감염된 자가 DC를 대조군 표적으로 사용하였다. DC 대조군 표적의 경우, mRNA-전기천공된 표적 세포를 수거하고 세척하여 모든 미량의 배지를 제거하고 유로퓸 (Eu)으로 표지하였다. 대안적으로, 원래의 표적 세포 (Sum149, MDAMB231, LNCaP 또는 DM6)를 Eu로 표지하였다. 다양한 E:T 비율의 1만 유로퓸-표지된 표적 (T) 및 이펙터 세포 (E)의 연속 희석물을 96-웰 V-바닥 플레이트에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 3분 동안 원심분리하고, 37℃에서 인큐베이션하였다. 50 μl의 상청액을 수거하고, 96-웰 평저 플레이트에서 150 μl의 강화 용액에 첨가하고, 유로퓸 방출을 VICTOR3 멀티라벨 카운터 (VICTOR3 Multilabel Counter) (퍼킨-엘머 (Perkin-Elmer))를 사용하여 시간 분해 형광으로 측정하였다. 특이적 세포독성 활성은 하기 수학식을 이용하여 결정되었다: 특이적 방출 % = [(실험 방출-자발적 방출)/(총 방출-자발적 방출)] x 100. 표적 세포의 자발적 방출은 세제에 의한 총 방출의 25% 미만이었다. 표적 세포의 자발적 방출은 T 세포가 없는 배지에서 표적 세포를 인큐베이션함으로써 결정되었다. 모든 검정은 3중으로 수행되었으며, 막대는 평균 용해 %를 나타내고, 오류 막대는 평균의 표준 오류를 나타낸다.

도 4A-도 4D는 본 발명과 유사한 조합된 폴리오바이러스 및 체크포인트 억제제 처리를 포함하는 다양한 처리를

이용하여 C57B16 마우스에서 CT2A 신경교종을 사용하는 마우스 종양 모델에서의 생체내 시험 결과를 나타내며; 마우스 및 CT2A 세포는 모두 인간 폴리오바이러스 수용체 CD155를 발현한다. 하기의 실험적 처리에 따른 결과 (시간 경과에 따른 종양 부피)가 상단 패널에 표시된다: 도 4A, 그룹 I: DMEM (바이러스에 대한 대조군으로의 비히클) + IgG (항-PD1에 대한 대조군); 도 4B, 그룹 II: PVSRIPO + IgG의 단일 종양내 주사; 도 4C, 그룹 III: DMEM + 항-PD1의 단일 종양내 주사; 도 4D, 그룹 IV: PVSRIPO ("mRIPO") + 항-PD1의 단일 종양내 주사. 항-PD1은 복강내 주사에 의해 3회 분할 (제3일, 제6일, 제9일)로 제공되었다. 3개의 하부 패널은 처리 그룹 II-IV에서의 개별 마우스 (각각의 라인마다 상이한 마우스)의 종양 반응 (시간 경과에 따른 종양 부피)을 나타낸다.

도 5A-도 5B는, 유방암의 E0771 동소 면역적격 뮤린 모델에서 성장을 제한하는, 항-PD1 또는 항-PDL1 체크포인트 억제제 항체와 조합된 PVSRIPO (mRIPO)로 마우스를 처리한 결과를 나타낸다. 마우스는 유방 지방패드에 10^6개의 E0771-CD155 종양 세포가 이식되었다. 종양이 ~100 mm^3에 도달되었을 때 PBS 또는 mRIPO ($5x10^7$ pfu)를 종양에 주사하였다. 항-PD1 (도 5A)/항-PDL1 (도 5B)을 mRIPO 주사일에 복강내 (200 μL PBS 중 250 μg) 주사한 후 2-3일마다 4회 주사하였다. 시간 경과에 따라 종양 성장을 모니터링하였다. 도 5A에 나타난 바와 같이, mRIPO 및 항-PD1 항체는 둘 다 PBS에 비해 종양 부피를 제어할 수 있었으나, mRIPO와 항-PD1의 조합이 상당히 더 우수하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이, 항-PDL1을 사용하여 유사한 결과를 얻었으며, mRIPO 또는 항-PDL1 단독이 PBS 대조군보다 종양 성장을 더 잘 제어할 수 있었으나, mRIPO와 항-PDL1의 조합이 종양 성장을 감소시켰다.

도 6A-도 6B는 $5x10^5$개의 E0771-CD155 세포가 동소 이식된 C57BL/6-CD155 트랜스제닉 마우스의 다양한 처리의 결과를 나타낸다. 도 6A는 (i) 신보조 요법 (mRIPO에 이어 수술)을 받은 (-★-), (ii) PBS에 이어 수술을 받은 (-◆-), (iii) 수술을 받지 않고 mRIPO로의 처리를 받은 (-■-), 및 (iv) 수술을 받지 않고 PBS로의 처리를 받은 (-●-) 마우스의 종양 이식 후 일수에 따른 종양 부피의 그래프이다. 유의도는 p 값으로 표시된다: ★, $P \leq 0.05$; ★★, $P \leq 0.01$; ★★★, $P \leq 0.001$. 도 6B는 PBS에 이어 수술로 처리된 마우스 (-◆-)와 비교하여 mRIPO에 이어 수술로 처리된 마우스 (-★-)의 종양 재-접종 후 일수에 따른 종양 부피의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 암의 신보조 화학요법이 수년 동안 적용되었지만, 암의 신보조 면역요법은 여전히 개발중인 의학적 응용 분야이다. 본 발명자들은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 조합을 포함하는 하나 이상의 면역치료제가 종양을 갖는 인간에게 투여되는 신보조 면역요법 (또한 본원에서 신보조 요법으로 지칭됨)을 개발하였다. 하나 이상의 면역치료제의 투여 후, 하나 이상의 면역치료제에 의해 치료되는 종양이 감소된다 (예컨대, 수술에 의해 절제되거나 방사선 요법에 의해 크기 및/또는 양이 감소됨). 임의적으로, 개체는 하나 이상의 면역치료제를 포함하는 유지 요법을 받을 수 있다. 예상치 못하게, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 (예컨대, 미국 특허 번호 6,264,940 (전체가 참조로 본원에 포함됨)에 기재된 PVSRIPO) 또는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물과 면역 체크포인트 억제제의 조합을 포함하는 신보조 면역요법으로 치료된 개체에 대해 하나 이상의 치료 이점이 관찰된다. 이들 치료 이점은 본 발명 당시에 분명하지 않았다. 예컨대, 본 발명 당시, 신보조 요법의 사용으로부터 관찰된 병리학적 완전 반응률은 신보조 요법 후 일부 유방암 환자에서 관찰된 바와 같이 항상 개선된 생존으로 해석되는 것은 아니라고 공지되어 있었다. 또한, 돌연변이 부담이 낮은 종양은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 PVSRIPO에 의한 치료에 가장 반응하고; 반면에 (및 대조적으로) 면역 체크포인트 억제제로의 치료로 인한 면역 체크포인트 차단에 대한 반응성은 주로 돌연변이 부담이 높은 종양에 의해 발생한다. 또한, PVSRIPO는 임상 시험에서 보조 세팅에 사용되었다; 즉, PVSRIPO로 치료한 후 종양이 절제되지 않은 경우. 보조 세팅에서, 종양 세포는 PVSRIPO에 의해 감염되고, 더 많은 감염성 바이러스가 생성되고, 감염된 종양 세포는 바이러스에 의해 용해되고, 새로 생성된 감염성 바이러스가 방출되어 종양의 추가 종양 세포를 감염시킬 수 있으며, 주기가 반복된다. 새로 생성된 바이러스는 또한 항종양 면역 반응 유도 시 수지상 세포를 더욱 자극할 수 있다. 이러한 종양 감염 및 용해의 반복된 주기 및 면역 반응의 추가 자극은 PVSRIPO 및 면역 체크포인트 억제제 투여 후 종양 부담이 감소되기 때문에 신보조 요법에서 제한된다. 따라서, 증가된 생존율 또는 관찰된 다른 치료 이점에 의해 관찰되는 바와 같이 생성된 항종양 반응의 지속성은 이 신보조 면역요법에서 예상치 못한 것이다.

[0018] 본 발명의 방법에서, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 종양에 직접적으로 투여하기 위한 임의의 기술이 이용될 수 있다. 직접 투여는 종양에 접근하기 위해 혈액 혈관계에 의존하지 않는다. 제제는 종양의 표

면에 페인팅되거나, 종양에 주사되거나, 수술 중 종양 부위 내에 또는 부위에 점적주입되거나, 카테터를 통해 종양에 주입될 수 있다. 이용될 수 있는 뇌암 치료를 위한 하나의 특정한 기술은 대류 강화된 전달이다. 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물은 천연 폴리오바이러스 IRES가 인간 리노바이러스 2와 같은 다른 피코르나바이러스의 IRES와 적어도 부분적으로 교환된 재조합 또는 유전자 조작된 폴리오바이러스이다. 폴리오바이러스는 일반적으로 사빈 폴리오바이러스, 적합하게는 폴리오바이러스의 사빈 I형 균주이다. 따라서, 본원에 기재된 조작된 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물의 5' 비번역 영역 (UTR)에서, 천연 폴리오바이러스의 5'클로버잎이 포함되고, 폴리오바이러스의 천연 IRES는 적어도 부분적으로 인간 리노바이러스 2로부터의 IRES로 대체되고, 천연 또는 야생형 폴리오바이러스 오픈 리딩 프레임의 나머지는 그대로 유지된다.

[0019] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 면역 체크포인트 억제제는 세포독성 T 세포 및 종양 세포의 억제 상호작용을 방해하는 임의의 것이다. 이들은 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-LAG-3 항체, 및/또는 항-TIM-3 항체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 미국에서 승인된 체크포인트 억제제는 아테졸리주맙, 이피밀루맙, 펨브롤리주맙, 니볼루맙 및 티슬렐리주맙을 포함한다. 억제제는 항체일 필요는 없지만 소분자 또는 기타 중합체일 수 있다. 억제제가 항체인 경우, 폴리클로날, 모노클로날, 단편, 단일쇄 또는 다른 항체 변이체 구축물일 수 있다. 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, 및 B-7 계열 리간드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 면역 체크포인트를 표적으로 할 수 있다. 단일 표적 면역 체크포인트에 대한 억제제 또는 상이한 면역 체크포인트에 대한 상이한 억제제의 조합이 사용될 수 있다. 또한, CSF-1R 차단이 원거리 전이 및 재발 종양을 효과적으로 제거하는 강력하고 지속적인 면역의 생성을 보장하기 위해 조합으로 또는 면역 체크포인트 억제제(들)의 대안으로 이용될 수 있다. 이마크투주맙 및 AMG820을 포함하지만 이에 제한되지 않는 CSF-1R에 특이적인 항체 또는 CSF-1R을 억제하거나 차단하는 약물이 이 목적에 사용될 수 있다.

[0020] 신보조 요법의 방법에서, 하나 이상의 면역치료제 (치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 또는 면역 체크포인트 억제제 및 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물)가 개체에서 종양의 양을 감소시키기 위해 수술 또는 방사선에 의해 치료를 받는 개체에 앞서 투여된다. 전형적으로, 신보조 요법이 2개의 면역치료제를 포함하는 경우, 2개의 작용제는 서로 수일 내에 투여될 것이다. 예컨대, 면역 체크포인트 억제제를 투여한 후 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 면역 체크포인트 억제제 투여 후 30, 28, 21, 14, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일에 투여한다. 대안적으로, 면역 체크포인트 억제제를 투여하기 전에 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 투여하는 것이 유리할 수 있으며, 여기서 면역 체크포인트 억제제는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물의 투여 후 수일 또는 수주 내에 (예컨대, 30, 28, 21, 14, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일) 개체에게 투여된다. 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물에 의한 세포독성 T 림프구 반응의 프라이밍은 약 5일 내지 약 14일이 걸릴 수 있다. 면역 체크포인트 억제제의 투여는 이러한 프라이밍 기간 전, 도중 또는 후에 유익하게 시작될 수 있다. 예컨대, 한 측면에서, 면역 체크포인트 억제제는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 투여 14일 후에 투여되고, 면역 체크포인트 억제제 투여 후 약 1주 내지 약 3주 후에 개체는 종양 부담을 감소시키기 위해 (예컨대, 수술 또는 방사선 요법 의해) 치료된다. 전형적으로, 신보조 요법이 종양용해성 키메라 폴리오바이러스의 투여를 포함하는 경우, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 받은 지 약 1주 내지 약 3주 후에, 개체는 종양 부담을 감소시키기 위해 (예컨대, 수술 또는 방사선 요법에 의해) 치료된다. 임의적으로, 종양 부담의 감소 후, 개체는 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제의 주기적 (예컨대, 약 1주 내지 3주마다) 투여를 포함하는 면역 체크포인트 억제제로 유지 요법을 받을 수 있고/있거나 종양이 재발하는 경우 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0021] 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 또는 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 면역치료제의 치료 유효량은 면역치료제를 받는 개체에게 치료 이점을 유발하기에 효과적인 양이다. 이러한 유효량은 건강 상태, 성별, 크기 (예컨대, 체중), 연령, 암 유형, 암 병기, 투여 경로, 치료에 대한 내성, 독성 또는 부작용, 및 숙련된 의사가 적절한 치료 용량 및 요법을 설정할 때 고려할 다른 요소를 포함한 개체의 특징에 따라 달라질 수 있다. 예컨대, 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물의 치료 유효량은 약 1×10^8 조직 배양 감염 용량 (TCID) 내지 약 5×10^6 TCID 범위일 수 있다. 면역 체크포인트 억제제의 치료 유효량은 약 0.5 mg/kg 체중 내지 약 5 mg/kg 체중; 약 1 mg/kg 체중 내지 약 5 mg/kg 체중; 약 1 mg/kg 체중 내지 약 3 mg/kg 체중; 약 500 mg 내지 약 1500 mg, 또는 의사에 의해 결정된 그 이하 또는 그 이상의 양의 범위일 수 있다.

[0022] 면역 체크포인트 억제제는 특정 억제제에 대해 관련 기술분야에 공지된 임의의 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 이들은 정맥내, 경구, 복강내, 설하, 경막내, 강내, 근육내, 종양내 및 피하를 포함한다. 임의적으로,

면역 체크포인트 억제제는 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0023] 모든 인간 종양은 소아 및 성인 종양을 포함하여 이 신보조 요법의 방법으로 치료될 수 있다. 종양은 임의의 기관, 예컨대 뇌, 전립선, 유방, 폐, 결장 및 피부에 있을 수 있다. 예컨대, 교모세포종, 속질모세포종, 암종, 선암종 등을 포함하는 다양한 유형의 종양이 치료될 수 있다. 종양의 다른 예는 부신피질 암종, 항문암, 충수암, 등급 I (역형성) 별아교세포종, 등급 II 별아교세포종, 등급 III 별아교세포종, 등급 IV 별아교세포종, 중추신경계의 비정형 기형/막대모양 종양, 기저 세포 암종, 방광암, 유방 육종, 기관지암, 기관지폐포 암종, 자궁경부암, 두개인두종, 자궁내막암, 자궁내막 자궁암, 뇌실막모세포종, 뇌실막종, 식도암, 감각신경모세포종, 유잉 육종, 두개외 생식 세포 종양, 생식선외 생식 세포 종양, 간외 담관암, 섬유성 조직구종, 담낭암, 위암, 위장 유암종 종양, 위장 간질 종양, 임신성 영양막 종양, 임신성 영양막 종양, 신경교종, 두경부암, 간세포암, 간문 담관암, 하인두암, 안내 흑색종, 도세포 종양, 카포시 육종, 랑게르한스 세포 조직구증식증, 대세포 미분화 폐 암종, 후두암, 입술암, 폐 선암, 악성 섬유성 조직구종, 속질상피종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 내분비 신생물, 비강암, 비인두암, 신경모세포종, 구강암, 구인두암, 골육종, 난소 투명 세포 암종, 난소 상피암, 난소 생식 세포 종양, 췌장암, 유두종증, 부비동암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 송과체 실질 종양, 송과체모세포종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 신세포암, 15번 염색체 변화를 동반한 호흡기암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 소세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 편평 비-소세포 폐암, 편평 경부암, 천막위 원시 신경외배엽 종양, 천막위 원시 신경외배엽 종양, 고환암, 인후암, 흉선 암종, 흉선종, 갑상선암, 신장 골반의 암, 요도암, 자궁 육종, 질암, 외음부암 및 빌름스 종양을 포함한다.

[0024] 임의적으로, 종양을 갖는 개체는 본원에 기재된 방법에 따른 치료 전에 개체의 종양에 의한 NECL5 (CD155, 폴리오바이러스 수용체) 발현에 기초하여 치료를 위해 계층화될 수 있다. 이는 예컨대 프로브, 프라이머 또는 항체를 사용하여 RNA 또는 단백질 수준에서 검정될 수 있다. NECL5 발현은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물로 치료할지 아닐지의 여부를 결정하도록 안내할 수 있다. NECL5 발현은 또한 용량, 빈도 및 치료 기간을 포함하여 치료의 공격성을 안내하는데 사용될 수 있다. NECL5 (CD155)에 대한 항체는 시판되며 사용될 수 있다. NECL5 RNA 발현은 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 검정될 수 있다.

[0025] 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물 및 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를 투여한 후 종양의 수술적 제거 또는 종양의 수술적 감소를 포함하는 신보조 요법에 추가하여, 개체의 치료는 화학요법, 생물학적 요법 및 방사선요법 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 이들 양식은 특정한 인간 종양 치료를 위한 현재 표준 치료일 수 있다. 신보조 요법은 종양 치료를 위한 표준 치료 전, 도중 또는 후에 투여될 수 있다. 예컨대, 신보조 요법을 포함하는 PVSRIPO 및 면역 체크포인트 억제제 조합은 표준 치료 실패 후에 투여될 수 있다. 면역치료제의 조합이 명시되는 경우, 각각의 작용제는 단일 조합 요법 내에서 2개의 개별 작용제로 시간 내에 개별적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 2개 (또는 그 초과의) 작용제가 혼합하여 투여될 수 있다.

[0026] 키트는 단일 분할 용기 또는 분할되지 않은 용기에 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물, 예컨대 PVSRIPO 뿐만 아니라 면역 체크포인트 억제제를 모두 포함할 수 있다. 2개의 작용제는 별도의 용기에 있거나 혼합하여 단일 용기에 있을 수 있다. 투여를 위한 설명서가 포함될 수 있다. 임의적으로, 키트의 성분으로 개체의 종양에 의한 NECL5 발현을 시험하기 위한 항체 및 시약 또는 PCR 프라이머가 포함된다.

[0027] 출원인은 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물의 생성 방법 및 유전적 안정성 및 균질성을 시험하는 방법을 개발하였다. 생성 및 유전적 안정성 시험에 대한 임의의 적합한 방법이 이용될 수 있다. 예컨대, 안정성을 평가하는 방법은 39.5℃에서 성장할 수 없는지에 대한 시험, 돌연변이의 존재 또는 부재를 확인하기 위한 대량 시퀀싱, 영장류 신경독성 시험을 포함한다.

[0028] 암세포의 감염 및 용해, 항원 제시 세포의 감염 및 활성화, 암세포 표적화를 위한 면역 세포의 모집 및 활성화를 포함하는 항종양 면역 반응을 유도하는데 다수의 메커니즘이 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물인 PVSRIPO의 효능에 기여할 수 있다. 따라서, PVSRIPO로 종양을 치료하는 것은 바이러스에 의한 종양의 직접적인 사멸 외에도 면역요법을 포함한다.

[0029] 본 발명의 설명에 사용된 용어는 종양학 및 의학 분야의 통상의 기술자에 의해 잘 이해되는 것으로 믿어지지만, 본원에 제공된 정의는 본 발명의 설명을 용이하게 하고 용어의 사용을 위한 설명에 도움이 되는 예를 제공하기 위해 제시된다.

[0030] 본원에 사용된 단수 형태의 용어는 단수형이 확실히 명시되지 않는 한 "하나 이상"을 의미한다 (예컨대, 단수형은 문구 "단일 제제"에서와 같이 확실히 명시된다).

[0031] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체"는 본원에 기재된 조성물 또는 조합의 투여, 전달, 저장, 안정성 중 임의의 하나 이상에 유용한 임의의 화합물 또는 조성물 또는 담체 매질을 의미한다. 이들 담체는 희석제, 물, 식염수, 적합한 비히클 (예컨대, 리포솜, 마이크로입자, 나노입자, 에멀젼, 캡슐), 완충제, 추적제, 의료용 비경구 비히클, 부형제, 수용액, 현탁액, 용매, 에멀젼, 세제, 킬레이트제, 가용화제, 염, 착색제, 중합체, 히드로겔, 계면활성제, 유화제, 보조제, 충전제, 보존제, 안정화제, 오일, 결합제, 붕해제, 흡수제, 향미제 및 제약 분야에서 널리 공지된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0032] 암을 치료하거나 종양을 갖는 개체를 치료하는 것은 대상체에서 암 세포수 또는 종양 크기 감소, 암의 보다 공격적인 형태로의 진행 감소, 암세포 증식 감소 또는 종양 성장 속도 감소, 암세포 사멸, 암세포 전이 감소 또는 대상체에서 암 재발 가능성 감소를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 개체를 치료하는 것은 대상체의 병태 (예컨대, 하나 이상의 증상)의 개선, 질환 진행의 지연, 증상 발현의 지연 또는 증상 진행의 늦춤을 포함하여 질환에 걸리거나 질환이 발병할 위험이 있는 대상체에게 이익을 제공하는 임의의 유형의 치료를 지칭한다.

[0033] 본원에 사용된 "치료 유효량" 또는 유효량은 종양 치료를 위해 대상체에게 투여될 때 치료를 수행하기에 충분한 조성물의 양을 의미한다 (상기 정의된 바와 같음). 치료 유효량은 제형 또는 조성, 종양 유형 및 그의 중증도 및 치료될 대상체의 연령, 체중, 신체 상태 및 반응성에 따라 달라질 것이다.

[0034] "신보조 요법"은, 개체가 종양의 양을 제거 또는 감소시키기 위한 수술 또는 종양의 양을 감소시키기 위한 방사선 요법과 같은 종양 부담의 감소를 겪기 전에, 종양을 갖는 개체에게 제공되는 요법을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 수술은 종양의 전체 절제 또는 부분 절제를 포함할 수 있다. 신보조 요법은 종양 부담을 감소시켜 후속 절제를 용이하게 할 수 있다.

[0035] "보조 요법"은 종양 절제를 위한 수술 후 제공되는 요법을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0036] "유지 요법"은 질환 진행 또는 재발 가능성을 감소시키기 위해 제공되는 치료 요법을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 유지 요법은 요법에 대한 반응을 평가하기 위한 임상 파라미터의 평가에 따라 임의의 기간 동안 제공될 수 있다.

[0037] "생존"은 치료 후 살아남은 개체를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 전체 생존 및 무질환 생존을 포함한다. 생존은 전형적으로 카플란-메이어 방법에 의해 측정된다. 무질환 생존은 암 재발의 증거 없이 살아남은 치료된 개체를 지칭한다. 전체 생존은 정해진 기간 동안 살아남은 개체를 지칭한다.

[0038] 상기 개시 내용은 일반적으로 본 발명을 설명한다. 보다 완전한 이해는 단지 예시의 목적으로 본원에 제공되고 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아닌 하기의 특정 실시예를 참조하여 얻을 수 있다.

[0039] **실시예 1**

[0040] I상 임상 시험을 종양을 갖는 개체에서 PVSRIPO를 단독으로 사용하여 수행하였다. 종양은 재발성 교모세포종 (GBM)이었고, PVSRIPO는 종양 절제 후에 투여되었다 (보조 요법). 1×10^8 조직 배양 감염 용량 (TCID), 5×10^7 TCID 및 1×10^7 TCID를 포함하여 다수의 용량이 시험되었다. PVSRIPO ("PVSRIPO DL 1-5", 도 2, 표 1)는 종양으로 직접적으로 전달되었다. 대류-강화된 전달을 이용하여 PVSRIPO를 종양내로 주입하였다. 이식된 카테터를 사용하여 500 μL/hr의 전달 속도로 PVSRIPO를 주입하였으며, 3 mL는 개체에게 전달된 접종물의 총량이다. I상 시험의 결과는 표 1 및 도 2에 요약되어 있으며 (2018년 3월 20일까지 이어짐), 여기서 PVSRIPO로 처리된 개체는 과거 대조군과 비교된다. 표 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, PVSRIPOP로 처리된 개체에 대한 전체 생존은 과거 대조군과 비교하여 특히 2년 이상에서 상당히 개선되었다.

[0041] <표 1>

과거 대조군에 대비하여 환자에서 PVSRIPO 용량 상승: 전체 생존

그룹	총	# 실패	12개월 생존 (95% CI)	24개월 생존 (95% CI)	36개월 생존 (95% CI)	48개월 생존 (95% CI)	60개월 생존 (95% CI)
PVSRIPO DL 1-5	15	12	60.0% (31.8%, 79.7%)	20.0% (4.9%, 42.4%)	20.0% (4.9%, 42.4%)	20.0% (4.9%, 42.4%)	20.0% (4.9%, 42.4%)
과거 대조군	104	103	45.2% (35.5%, 54.4%)	13.5% (7.8%, 20.7%)	3.8% (1.3%, 8.8%)	1.9% (0.4%, 6.1%)	0%

[0042]

[0043] **실시예 2**

[0044] 면역 체크포인트 억제제의 메커니즘은 이펙터 기능을 차단하는 종양에 의해 유발된 이벤트로부터 세포독성 T 세포 기능을 방출하는 것이다. 종양은 세포독성 T 세포를 제어하는 자연적으로 존재하는 '브레이크' 시스템에 관여한다. 종양에 대해, 이는 면역계가 돌연변이 단백질을 발현하는 종양을 공격하는 가능성을 제한하는 이점이 있으며, 따라서 외래 시그니처를 나타낸다. 면역 체크포인트 억제제는 이 종양 메커니즘을 역전시키고 면역 기능을 방출한다. PVSRIPO는 종양을 공격하기 위해 세포독성 T 세포 (CTL)를 유도하는 면역 반응을 유도한다. 따라서, PVSRIPO와 면역 체크포인트 억제제의 조합은 치료 효과를 향상시킨다. 하기에 나타난 바와 같이, PVSRIPO는 실제로 CTL 반응을 유도하여 종양을 치료하는데 작용한다.

[0045] 흑색종, 유방암, 뇌 종양, 전립선암 세포는 배양물에서 PVSRIPO와 접촉 및 감염되었고, 배양물에서 죽어가는/죽은 세포로부터의 상청액이 수집되었다. 감염된 종양 세포로부터의 상청액을 사용하여 인간 대상체로부터 단리된 수지상 세포 (CTL과 소통하고 그들의 활성화를 조정하는 역할을 하는 면역 세포 집단)를 노출하였다. 그 결과, 수지상 세포는 염증유발 활성화의 강력한 징후를 나타내었다 (즉, 종양 세포의 바이러스 감염은 수지상 세포의 CTL 활성화 기능을 촉진하는 가용성 인자를 생성하였으며; 감염된 종양 세포로부터 방출된 바이러스는 수지상 세포를 활성화시켰다). 이어서, 활성화된 수지상 세포를 수지상 세포를 공여한 동일한 인간 대상체로부터의 T 세포 (CTL 포함)와 함께 공동-배양하였다. 이어서, 공동-배양된 T 세포 (CTL 포함)를 감염 단계에 사용된 동일한 세포주로부터의 감염되지 않은 종양 세포와 공동-배양하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 종양 세포에 대한 활성화된 CTL의 높은 수준의 세포독성이 관찰되었다.

[0046] 시험관내에서의 이 실험은 PVSRIPO로 처리된 종양을 갖는 개체에서 발생하는 것으로 여겨지는 것을 예시한다: 바이러스 감염은 궁극적으로 종양에 대한 CTL 반응을 생성하게 하는 일련의 이벤트를 유발한다. 이러한 일련의 이벤트는 면역 체크포인트 억제제와 함께 상승작용적으로 향상될 수 있다. T 세포 기능에 대한 자연에 존재하는 '브레이크' (면역 체크포인트) 중 하나는 PD1-PD-L1 링크이다. 종양에서의 수지상 세포는 종종 PD-L1을 발현하도록 유도되며, 이는 T 세포 상의 PD1에 결합하여 T 세포의 활성화를 억제한다. PVSRIPO/PVSRIPO-종양용해물에 노출된 수지상 세포가 PD-L1 발현을 증가시킨다는 것이 입증되었다. 전형적인 체크포인트 억제제인 PD-1 또는 PD-L1 억제제는 이 효과를 방지하고 PVSRIPO 종양용해에 의해 CTL 활성화를 증가시킨다.

[0047] 이 실험에서 Sum149, MDAMB231, LNCaP, 또는 DM6 세포의 컨플루언트 10 cm 접시를 AIMV 배지에서 모의 (DMEM) 또는 PVSRIPO (MOI 0.1)로 48시간 동안 감염시켰다. 상청액을 수집하고, 세포 파편을 원심분리로 제거하였다. 동결된 PBMC를 해동시키고, PBS에서 세척하고, T-150 조직 배양 플라스크에서 30 ml AIM-V 배지에 2 x 10^8개의 세포로 재현탁시켰다. 세포를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비-부착 세포를 플라스크를 좌우로 흔들어 제거함으로써 수거하였다. 부착 세포에 800 U/ml 인간 GM-CSF 및 500 U/ml 인간 IL-4가 보충된 30 ml AIM-V를 보충한 후, 37℃에서 인큐베이션하였다. DC를 제6일에 모든 비-부착 세포를 수집한 다음 차가운 PBS 세척에 의해 수거하였다. 여전히 부착되어 있는 세포를 세포 해리 완충제로 해리시켰다. DC를 AIMV 배지에서 세척하고, 계수하고, 35 mm 접시에 접시당 1x10^6개 세포로 시딩하였다. 종양용해물로부터의 상청액을 DC 배양물에 첨가하고, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상청액을 제거하고, DC를 AIMV 배지에서 세척하였다. PBMC를 해동시키고, PBS에 재현탁시키고, 200 U/ml의 DNase I로 37℃에서 20분 동안 처리하였다. DNase I-처리된 PBMC를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 비-부착 세포를 수거하고, 25 ng/ml IL-7의 존재 하에 10:1의 반응자 세포 대 자극자 DC 비율로 폴리오바이러스-유도된 종양용해물이 로딩된 DC로 자극하였다. 모든 자극은 10% FCS, 2 mM L-글루타민, 20 mM HEPES, 1 mM 나트륨 피루베이트, 0.1 mM MEM 비-필수 아미노산, 100

IU/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신 및 5 x 10^{-5} M β-메르캅토에탄올을 갖는 RPMI 1640 (CTL 자극 배지)에서 수행되었다. 반응자 T-세포 농도는 2 x 10^{6}개 세포/ml였다. IL-2를 제3일 및 제12일-제14일 동안 4-5일마다 100 U/ml로 첨가하였다. T 세포를 CTL 자극 배지에서 1-2 x 10^{6}개 세포/ml로 유지하였다. T 세포를 제12일-제14일에 수거하고, 계수하고, 유로퓸-방출 CTL 검정에서 이펙터 T 세포로 사용하였다. 종양 항원-코딩 mRNA로 형질감염된 자가 DC를 대조군으로 표적으로 사용하였다. DC 표적 대조군의 경우, (도 2에 지정된 바와 같이) mRNA-전기천공된 표적 세포를 수거하고 세척하여 모든 미량의 배지를 제거하고 유로퓸 (Eu)으로 표지하였다. 대안적으로, 원래의 표적 세포 (Sum149, MDAMB231, LNCaP 또는 DM6)를 Eu로 표지하였다. Eu-표지 완충제 (표적당 1 ml)는 1 ml HEPES 완충제 (50 mM HEPES, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, pH 7.4), 10 μl Eu (0.01N HCl 중 10 mM $EuCl_3.6H_2O$), 5 μl DTPA (HEPES 완충제 중 100 mM 디에틸렌트리아민 펜타아세테이트) 및 4 μl DS (1% 덱스트란-술페이트)를 함유하였다. 5 x 10^{6}개의 표적 세포를 1 ml의 유로퓸-표지 완충제에 매우 천천히 재현탁시키고, 20분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 30 μl의 $CaCl_2$ 용액 (100 mM)을 표지된 세포에 첨가하고, 혼합하고, 세포를 얼음 상에서 또 다른 5분 동안 인큐베이션하였다. 30 ml의 복구 완충제 (10 mM 글루코스, 2 mM $CaCl_2$를 갖는 HEPES 완충제)를 세포에 첨가하고, 세포를 10분 동안 1000rpm에서 원심분리하였다. 세포를 계수하고, 5 x 10^{6}개의 세포를 복구 완충제로 4회 세척하였다. 최종 세척 후, 세포를 10^{5}개 세포/ml로 페니실린-스트렙토마이신 없이 CTL 자극 배지에 재현탁시켰다. 다양한 E:T 비율의 1만 유로퓸-표지된 표적 (T) 및 이펙터 세포 (E)의 연속 희석물을 96-웰 V-바닥 플레이트에서 페니실린-스트렙토마이신이 없이 200 μl의 CTL 자극 배지에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 500 xg에서 3분 동안 원심분리하고, 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 50 μl의 상청액을 수거하고, 96-웰 평저 플레이트에서 150 μl의 강화 용액에 첨가하고, 유로퓸 방출을 VICTOR3 멀티라벨 카운터 (퍼킨-엘머)를 사용하여 시간 분해 형광으로 측정하였다. 특이적 세포독성 활성은 하기 수학식을 사용하여 결정되었다: 특이적 방출 % = [(실험 방출-자발적 방출)/(총 방출-자발적 방출)] x 100. 표적 세포의 자발적 방출은 세제에 의한 총 방출의 25% 미만이었다. 표적 세포의 자발적 방출은 T 세포가 없는 배지에서 표적 세포를 인큐베이션함으로써 결정되었다. 모든 검정은 삼중으로 수행되었으며, 막대는 평균 용해 %를 나타내고, 오류 막대는 SEM을 나타낸다.

[0048] **실시예 3**

[0049] PVSRIPO 항종양 효능은 감염된 종양 세포 및 감염된 항원-제시 세포 (수지상 세포, 대식세포, 미세아교세포)에서 강력한 면역원성 1형 인터페론 (IFN) 반응을 유도하는 바이러스의 능력에 의해 지원될 수 있다. 그러나, 1형 IFN 반응이 면역요법의 매개체로서 매우 바람직하지만, PVSRIPO에 의해 유발되는 항-신생물 면역 반응을 약화시킬 수 있는 공지된 면역 체크포인트, 예컨대 PD-L1과도 관련된다. 따라서, 면역 체크포인트 차단과 조합하여 PVSRIPO 면역요법을 극대화하려는 작업이 조사될 수 있다.

[0050] 이 실험에서, CT2A 신경교종은 폴리오바이러스 수용체 CD155에 대한 트랜스제닉 C57B16 마우스에 피하 이식되었다. 종양을 개시하는데 사용된 CT2A 세포는 (인간 세포와 유사한 PVSRIPO 감염을 가능하게 하기 위해) 미리 CD155로 형질도입되었다. 4개의 종양-보유 동물 그룹 (n=10)을 하기와 같이 처리하였다: 그룹 I: DMEM (바이러스에 대한 대조군으로의 비히클) + IgG (항-PD1에 대한 대조군); 그룹 II: PVSRIPO + IgG의 단일 종양내 주사; 그룹 III: DMEM + 항-PD1의 단일 종양내 주사; 그룹 IV: PVSRIPO + 항-PD1의 단일 종양내 주사. 항-PD1은 복강내 주사로 3회 분할 (제3일, 제6일, 제9일)로 제공되었다. 결과는 도 4A-4D에 나타나 있다.

[0051] PVSRIPO 및 항-PD1 모두 개별적으로 상당한 항-종양 효과를 가졌다 (도 4B;도 4C). 두 작용제의 조합은 추가된 치료 효과를 가졌고, 이는 기계적 상승작용을 시사한다 (도 4D). 중요한 것은, 지속적인 종양 완화 (매우 낮은 종양 부피에서 종양 반응 곡선의 평평한 선으로 표시됨)는 조합 치료로만 달성되었다.

[0052] **실시예 4**

[0053] 이 실시예는 종양용해성 바이러스인 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 PVSRIPO와 상당한 항-종양 효과를 매개하는 면역 체크포인트 억제제의 조합에 대한 또 다른 예시를 제공한다. 이들 연구에서, E0771 동소 유방 종양 모델이 유방암에 대한 표준 실험 모델로 사용되었다. 이 모델은 삼중 음성 유방암 (TNBC)을 대표한다. 뮤린 종양 세포주 E0771을 폴리오바이러스 수용체인 인간 CD155로 형질감염시켜 세포 ("E0771-CD155")를 종양용해성 폴리오바이러스인 PVSRIPO에 의한 감염에 민감하게 만들었다. 마우스 종양 세포주에서 복제를 보장하기 위해, PVSRIPO를 마우스 종양 세포주에서 계대하여 마우스 PVSRIPO (mRIPO)를 생성하였다. 모든 연구는 C57BL/6-

CD155 트랜스제닉 마우스에서 수행되었다. 마우스는 유방 지방패드에 10^6개의 E0771-CD155 종양 세포가 이식되었다. 종양이 70-100 mm^3에 도달하면 PBS 또는 mRIPO ($5x10^7$ pfu)를 종양에 주사하였다. 면역 체크포인트 억제제인 항-PDL1 항체 또는 항-PD1 항체 (200 μL PBS 중 250 μg)를 mRIPO 주사일 및 이어서 면역 체크포인트 억제제의 총 4회 주사 동안 2-3일마다 복강내 주사하였다. 이어서, 종양 성장을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.

[0054] mRIPO와 조합하여 PD1 또는 PDL1을 표적으로 하는 항체를 사용하여 PD1/PDL1 경로를 차단함으로써 각각 단일요법 (mRIPO 단독, 항-PD1 항체 단독 또는 항-PDL1 항체 단독)과 비교하여 종양 성장 제어가 우수한지 여부가 시험되었다. 도 5A & 5B에 나타난 바와 같이, 종양용해성 폴리오바이러스 단독 (mRIPO, ■), 항-PD1 항체 (항-PD1, 도 5A -◆-) 또는 항-PDL1 항체 단독 (항-PDL1, 도 5B -◆-) 및 조합 요법 mRIPO + 항-PD1/PDL1은 PBS 대조군과 비교하여 종양 성장을 상당히 억제하였다. 연구 전반에 걸쳐 mRIPO와 항-PD1 (도 5A) 또는 항-PDL1 (도 5B) 단일요법 사이에는 종양 성장 억제에 유의한 차이가 없었다. mRIPO와 항-PD1 또는 항-PDL1의 조합은 연구가 끝날 무렵 종양 성장 제어에 있어 각각의 단일요법 단독보다 더 효과적이었다 (통계적으로 유의하지 않음). 이 예비 실험은 PVSRIPO와 항-PD1/PDL1 요법의 조합이 뮤린 동소 면역적격 유방암 모델에서 종양 성장 억제에 상승작용적 개선 경향이 있음을 나타낸다.

[0055] **실시예 5**

[0056] 하나 이상의 면역치료제를 사용하는 신보조 요법이 제공된다. 이 실시예에서, C57BL/6-CD155 트랜스제닉 마우스는 $5x10^5$개의 E0771-CD155 세포로 동소 이식되었다. 종양 이식 15일 후, 마우스를 mRIPO 또는 PBS로 처리한 후 (각각 종양이 ~50 mm^3 크기에 도달하면 종양내 주사됨), 종양 이식 후 제22일에 수술을 하거나 수술을 하지 않았다. 도 6A에 나타난 바와 같이, 신보조 요법 (mRIPO에 이어 수술; 도 6A, -★-)을 받은 그룹에서, 처리된 9마리 중 9마리는, PBS로 처리한 후 수술을 받은 5/10마리의 마우스와 비교하여, 종양이 없었다 (도 6A, -◆-). 대조적으로, 수술을 받지 않은 그룹의 모든 마우스는 (PBS를 받았는지 또는 mRIPO를 받았는지에 관계없이) 종양을 발병시켰으며, 여기서 mRIPO로의 처리 (도 6A, -■-)는 PBS로의 처리 (도 6A, -●-)에 비해 종양 성장 제어에 더 효과적이었다. PBS에 이어 수술로 처리된 그룹으로부터의 5마리의 마우스 및 mRIPO에 이어 수술로 처리된 5마리의 마우스는 종양 이식 후 제80일에 모 E0771 세포로 재-접종되었다. 도 6B에 나타난 바와 같이, 종양 이식 후 제130일에, 신보조 요법을 받은 5마리의 마우스 중 3마리 (mRIPO에 이어 수술로 처리된 마우스; 도 6B; -★-)는 종양이 없었으며, PBS-처리된 그룹에서의 5마리 마우스 중 1마리 (도 6B; -◆-)와 비교된다.

[0057] **실시예 6**

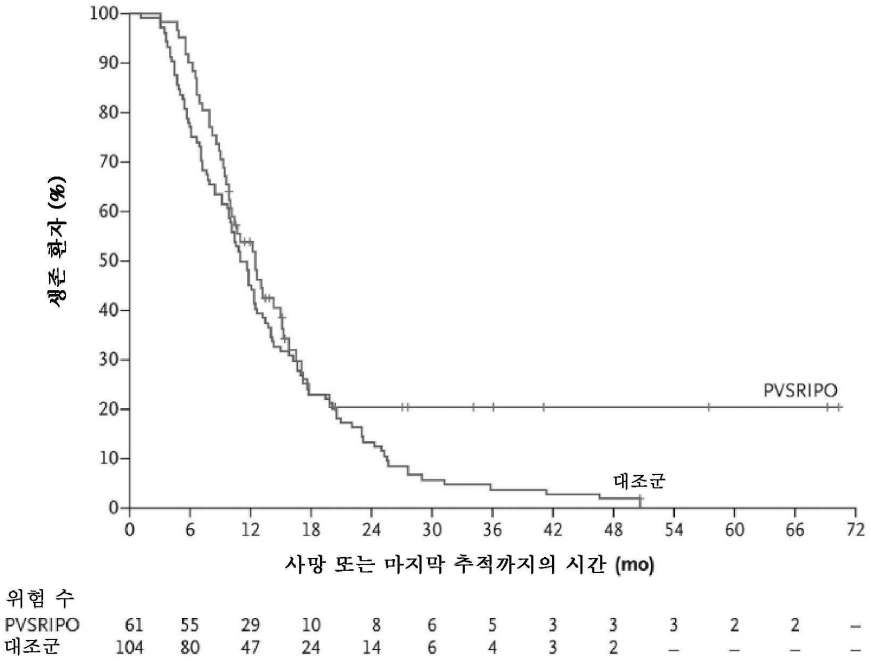
[0058] 종양의 수술적 절제 전에 치료 유효량의 면역 체크포인트 억제제 및 치료 유효량의 종양용해성 키메라 폴리오바이러스 구축물을 종양을 갖는 개체에게 투여하는 단계, 종양 절제 수술을 수행하는 단계를 포함하고, 여기서 종양 절제 후 면역 체크포인트 억제제가 개체에게 투여되는 것인, 종양을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 이 신보조 요법의 방법을 설명하기 위해, PVSRIPO 투여 대략 1주 전에, 절제되지 않은 종양을 갖는 개체는 시판되는 폴리오바이러스 면역화 부스터를 받고, PVSRIPO를 개체에게 투여함으로써 처리를 시작한다. 예컨대, PVSRIPO는 종양내로 투여될 수 있다. 이 실시예에서, PVSRIPO로 처리한 지 수일 (약 7 내지 약 14일) 후에 항-PD-1 항체가 개체에게 투여된다. 항-PD1 항체는 정맥내로 투여될 수 있다. 항-PD1 항체 투여 후 1 내지 3주에, 개체는 종양 부담을 감소시키기 위해 처리된다 (예컨대, 종양이 수술적으로 절제됨). 임의적으로, 종양 부담의 감소 후, 개체는 의학적으로 보증된 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 요법을 받을 수 있으며, 항-PD-1 항체는 4개월 동안 2주마다, 이후 최대 2년 동안 4주마다 투여될 수 있다.

도면

도면1



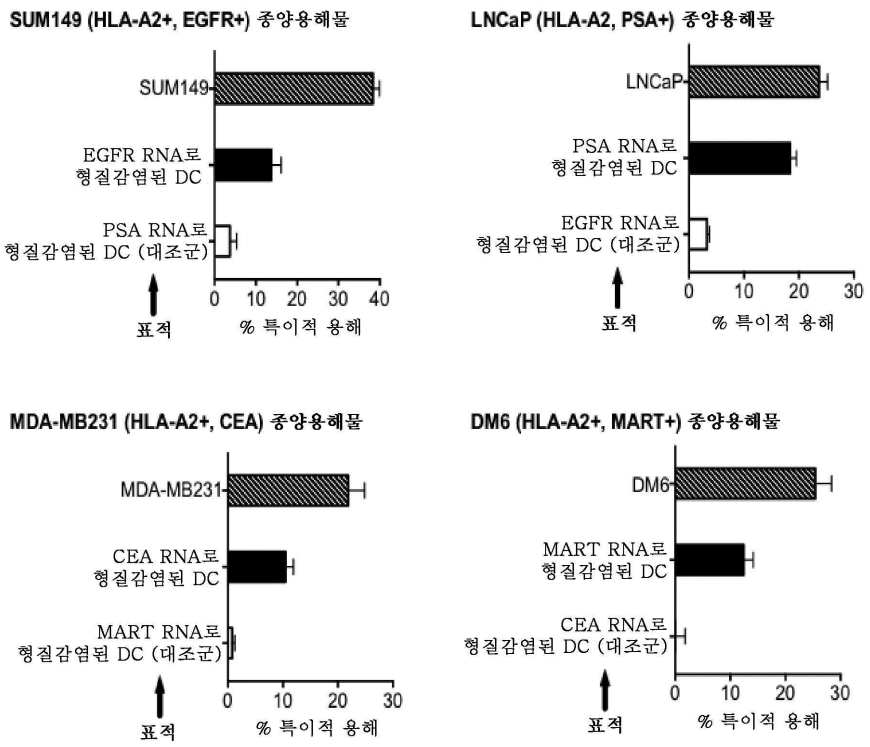
도면2



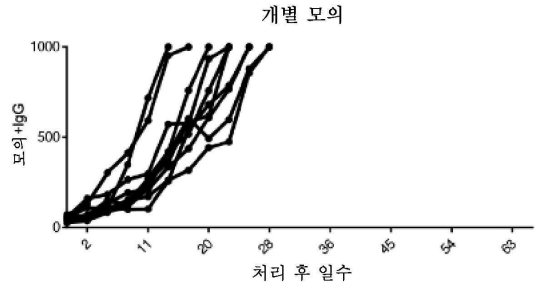
위험 수

PVSRIPO	61	55	29	10	8	6	5	3	3	3	2	2	–
대조군	104	80	47	24	14	6	4	3	2	–	–	–	–

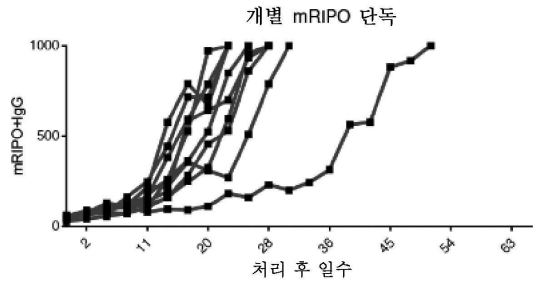
도면3


SUM149 (HLA-A2+, EGFR+) 종양용해물
SUM149
EGFR RNA로 형질감염된 DC
PSA RNA로 형질감염된 DC (대조군)
표적
0 10 20 30 40
% 특이적 용해
LNCaP (HLA-A2, PSA+) 종양용해물
LNCaP
PSA RNA로 형질감염된 DC
EGFR RNA로 형질감염된 DC (대조군)
표적
0 10 20 30
% 특이적 용해
MDA-MB231 (HLA-A2+, CEA) 종양용해물
MDA-MB231
CEA RNA로 형질감염된 DC
MART RNA로 형질감염된 DC (대조군)
표적
0 10 20 30
% 특이적 용해
DM6 (HLA-A2+, MART+) 종양용해물
DM6
MART RNA로 형질감염된 DC
CEA RNA로 형질감염된 DC (대조군)
표적
0 10 20 30
% 특이적 용해

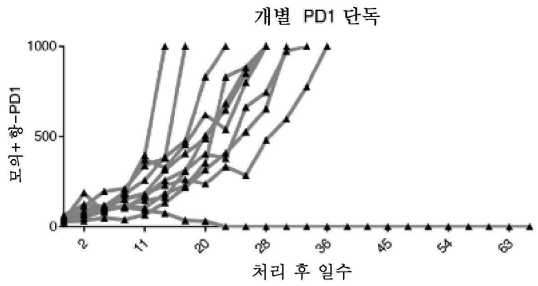
도면4



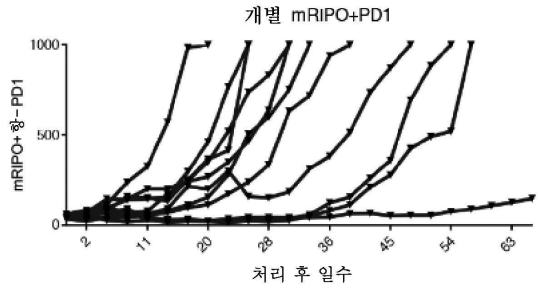
도 4A



도 4B

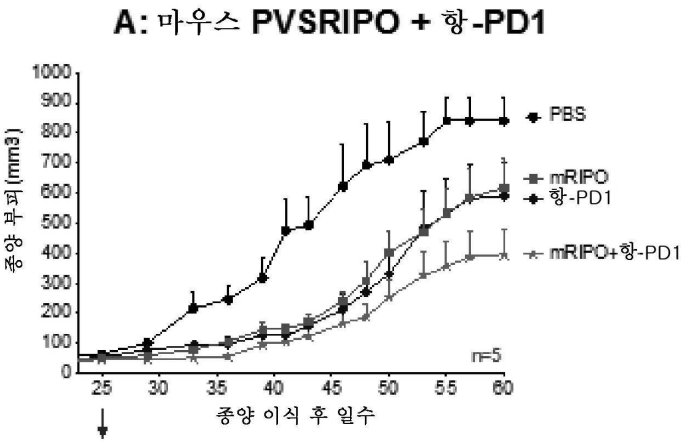


도 4C



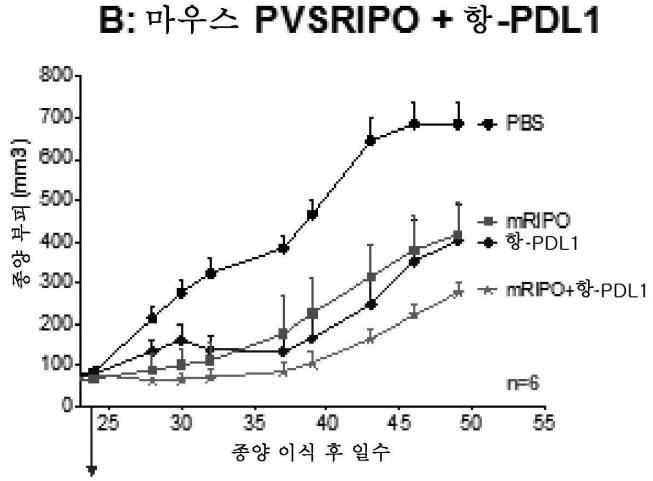
도 4D

도면5



제25일에 인트라튬 또는 PBS 또는 mRIPO
제25일에 시작하여 2-3일마다 항-PD1의 4회 주사

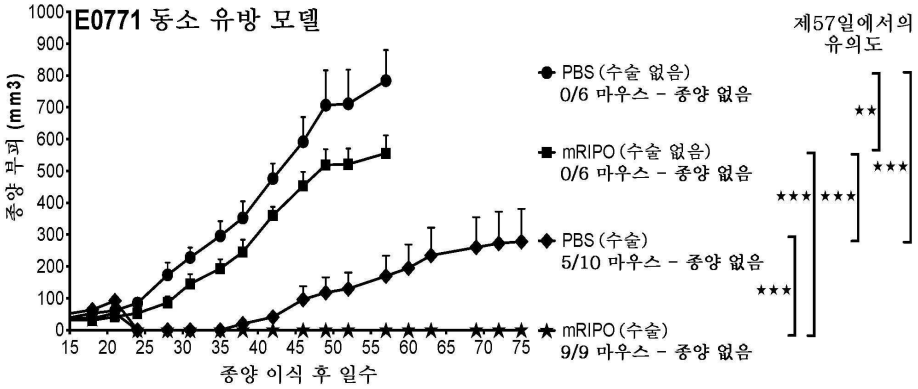
도 **5A**



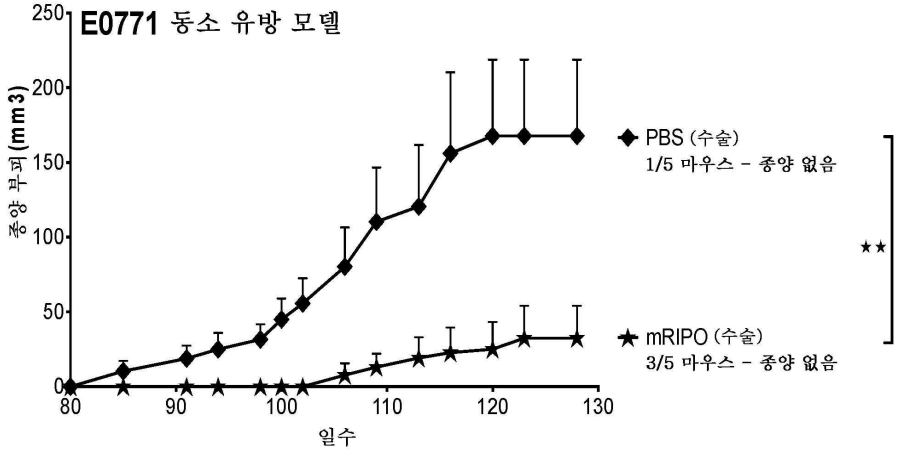
제24일에 인트라튬 또는 PBS 또는 mRIPO
제24일에 시작하여 2-3일마다 항-PDL1의 4회 주사

도 **5B**

도면6


E0771 동소 유방 모델
종양 부피 (mm3)
종양 이식 후 일수
PBS (수술 없음)
0/6 마우스 – 종양 없음
mRIPO (수술 없음)
0/6 마우스 – 종양 없음
PBS (수술)
5/10 마우스 – 종양 없음
mRIPO (수술)
9/9 마우스 – 종양 없음
제57일에서의
유의도

도 6A


E0771 동소 유방 모델
종양 부피 (mm3)
일수
PBS (수술)
1/5 마우스 – 종양 없음
mRIPO (수술)
3/5 마우스 – 종양 없음

도 6B