



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0024495
(43) 공개일자 2022년03월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/761 (2014.01) *A61K 38/19* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/761 (2013.01)
A61K 38/191 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7000995
- (22) 출원일자(국제) 2020년06월12일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년01월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/FI2020/050422
- (87) 국제공개번호 WO 2020/249873
 국제공개일자 2020년12월17일
- (30) 우선권주장
 62/861,339 2019년06월14일 미국(US)
 62/988,422 2020년03월12일 미국(US)

- (71) 출원인
틸트 바이오세라퓨틱스 오이
 핀란드, 헬싱키, 에프아이-00290, 하트마니카투 3씨, 씨/오 하트만 인스티튜띠
- (72) 발명자
헨민키, 악셀리
 핀란드 헬싱키 00290 하트마니카투 3씨 씨/오 하트만 인스티튜띠
칼레르보, 아이노
 핀란드 헬싱키 00290 하트마니카투 3씨 씨/오 하트만 인스티튜띠
 티트 바이오세라퓨틱스 오이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **중양용해성 아데노바이러스 및 체크포인트 억제제 조합 요법**

(57) 요약

본 발명은 암 치료를 위한 중양용해성 바이러스, 특히 중양용해성 아데노바이러스, 및 체크포인트 억제제와의 조합 요법에 관한 것으로, 특히 암 치료에 사용되기 위한, (a) 이식유전자로서 종양 괴사 인자 알파 (TNF알파) 및/또는 인터류킨-2 (IL-2)를 인코딩하는 중양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제와의 조합에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

세르베라-카라스콘, 빅토르

핀란드 헬싱키 00290 하트마니카투 3씨 씨/오 하트
만 인스티튜띠 틸트 바이오세러퓨틱스 오이 내

하부넨, 리카

핀란드 헬싱키 00290 하트마니카투 3씨 씨/오 하트
만 인스티튜띠 틸트 바이오세러퓨틱스 오이 내

비에이라 로우렌코 도스 산토스, 호아오

핀란드 헬싱키 00290 하트마니카투 3씨 씨/오 하트
만 인스티튜띠 틸트 바이오세러퓨틱스 오이 내

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에게 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 종양내, 정맥내, 동맥내 또는 복강내로 투여되는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 종양내로 투여되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1에 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체이고, 종기로는 BMS-936559, LY3300054, 아테졸리주맙, 두르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1에 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체이고, 종기로는 웹브롤리주맙(MK-3475) 및 니볼루맙(BMS-936558)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 바이러스는 약 10^6 - 10^{14} VP, 10^6 - 10^{12} VP, 10^8 - 10^{14} VP, 10^8 - 10^{12} VP 또는 10^{10} - 10^{12} VP의 양으로 투여되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 체크포인트 억제제는 약 2 mg/kg 내지 25 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 대상체는 간세포암종, 결장직장암, 신세포 암종, 방광암, 폐암(비소세포폐암 포함), 위암, 식도암, 육종, 중피종, 흑색종, 췌장암, 두경부암, 난소암, 유방암, 자궁경부암 및 간암으로부터 선택된 암을 갖는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 대상체는 신세포 암종 또는 두경부암을 갖는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 대상체는 체크포인트 억제제를 사용한 치료와 같은 적어도 하나의 화학요법 또는 면역요법 치료에 대해 이전에 실패한 적이 있는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 대상체는 CD8+ T-세포의 기능장애를 매개할 수 있는 암을 갖는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 대상체는 GZMG, GMZF, KLRC2 및 CD46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 활성화와 관련된 유전자, 및 특히 TNFSF18/GITRL 및 EAR2로 이루어진 군으로부터 선택되는 T-세포 활성화 조절제에 관련된 유전자 중 적어도 하나가 하향조절되는 암에 걸린 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 대상체는 항-PD-1 불응성 암을 갖고, 상기 암은 종기로는 흑색종인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 방사선요법, 화학요법, 항혈관신생제 또는 표적 요법, 예컨대 알킬화제, 뉴클레오사이드 유사체, 세포골격 변형제, 세포증식억제제, 모노클로날 항체, 키나제 억제제로부터 선택된 추가 요법을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터의 제1 용량 및 면역 체크포인트 억제제의 제1 용량이 동시에 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터의 제1 용량 및 면역 체크포인트 억제제의 제1 용량은 24시간 내에 순차적으로 투여되는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는

- 5/3 키메라 파이버 노브,
 - E1A의 종양 특이적 발현을 위한 E2F1 프로모터,
 - 아데노바이러스 E1의 Rb 결합 불변 영역 2에서의 24bp 결실(D24),
 - 바이러스 gp19k 및 6.7k 관독 프레임의 핵산 서열 결실, 및
 - E3 영역에서 결실된 gp19k/6.7K 대신 이식유전자(들)로서 적어도 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩함으로써 바이러스 E3 프로모터 하에 이식유전자 발현의 복제-관련 제어를 초래하는 핵산 서열
- 을 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 E1B19k의 결실을 더 포함하는 방법.

청구항 21

(a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 억제학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는

- 5/3 키메라 파이버 노브,
 - E1A의 종양 특이적 발현을 위한 E2F1 프로모터,
 - 아데노바이러스 E1의 Rb 결합 불변 영역 2에서의 24bp 결실(D24),
 - 바이러스 gp19k 및 6.7k 관독 프레임의 핵산 서열 결실, 및
 - E3 영역에서 결실된 gp19k/6.7K 대신 이식유전자(들)로서 적어도 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩함으로써 바이러스 E3 프로모터 하에 이식유전자 발현의 복제-관련 제어를 초래하는 핵산 서열
- 을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제1 용기, 제2 용기 및 패키지 삽입물을 포함하는 키트로서, 제1 용기는 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터를 함유하는 약제학적 조성물의 적어도 1회 용량을 포함하고, 제2 용기는 체크포인트 억제제를 포함하는 약제학적 조성물의 적어도 1회 용량을 포함하며, 패키지 삽입물은 약제학적 조성물(들)을 사용하여 암에 걸린 개체를 치료하기 위한 설명서를 포함하는 것인 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터는

- 5/3 키메라 파이버 노브,
 - E1A의 종양 특이적 발현을 위한 E2F1 프로모터,
 - 아데노바이러스 E1의 Rb 결합 불변 영역 2에서의 24bp 결실(D24),
 - 바이러스 gp19k 및 6.7k 관독 프레임의 핵산 서열 결실, 및
 - E3 영역에서 결실된 gp19k/6.7K 대신 이식유전자(들)로서 적어도 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩함으로써 바이러스 E3 프로모터 하에 이식유전자 발현의 복제-관련 제어를 초래하는 핵산 서열
- 을 포함하는 키트.

청구항 26

제21항 또는 제24항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 E1B19k의 결실을 더 포함하는 조성물 또는 키트.

청구항 27

암 또는 종양의 치료에 사용되기 위한, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 종양내, 정맥내, 동맥내 또는 복강내로 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 종양내로 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1에 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체이고, 종기로는 BMS-936559, LY3300054, 아테졸리주맙, 두라발루맙 및 아벨루맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 32

제27항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1에 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체이고, 종기로는 펌브롤리주맙(MK-3475) 및 니볼루맙(BMS-936558)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 33

제27항 내지 제32항 중 어느 하나의 항에 있어서, 바이러스는 약 10^6 - 10^{14} VP, 10^6 - 10^{12} VP, 10^8 - 10^{14} VP, 10^8 - 10^{12} VP 또는 10^{10} - 10^{12} VP.의 양으로 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 체크포인트 억제제는 약 2 mg/kg 내지 25 mg/kg의 양으로 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 35

제27항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상체는 간세포암종, 결장직장암, 신세포 암종, 방광암, 폐암(비소세포폐암 포함), 위암, 식도암, 육종, 중피종, 흑색종, 췌장암, 두경부암, 난소암, 유방암, 자궁경부암 및 간암으로부터 선택된 암을 갖는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체는 신세포 암종 또는 두경부암을 갖는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 37

제27항 내지 제36항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상체는 체크포인트 억제제를 사용한 치료와 같은 적어도 하나의 화학요법 또는 면역요법 치료에 대해 이전에 실패한 적이 있는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, 대상체는 CD8+ T-세포의 기능장애를 매개할 수 있는 암을 갖는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 대상체는 GZMG, GMZF, KLRC2 및 CD46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역 활성화와 관련된 유전자, 및 특히 TNFSF18/GITRL 및 EAR2로 이루어진 군으로부터 선택되는 T-세포 활성화 조절제에 관련된 유전자 중 적어도 하나가 하향조절되는 암에 걸린 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상체는 항-PD-1 불응성 암을 가지며, 상기 암은 종기로는 흑색종인 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 41

제27항 내지 제40항 중 어느 하나의 항에 있어서, 방사선요법, 화학요법, 항혈관신생제 또는 표적 요법, 예컨대 알킬화제, 뉴클레오사이드 유사체, 세포골격 변형제, 세포증식억제제, 모노클로날 항체, 키나제 억제제로부터 선택된 추가 요법을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 42

제27항 내지 제41항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대상체는 인간인 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 43

제27항 내지 제42항 중 어느 하나의 항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터의 제1 용량 및 면역 체크포인트 억제제의 제1 용량은 대상체에게 동시에 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 44

제27항 내지 제43항 중 어느 하나의 항에 있어서, 종양용해성 아데노바이러스 벡터의 제1 용량 및 면역 체크포인트 억제제의 제1 용량은 24시간 이내에 순차적으로 투여되는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 45

제27항 내지 제44항 중 어느 하나의 항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는

- 5/3 키메라 파이버 노브,
- E1A의 종양 특이적 발현을 위한 E2F1 프로모터,
- 아데노바이러스 E1의 Rb 결합 불변 영역 2에서의 24bp 결실(D24),
- 바이러스 gp19k 및 6.7k 관독 프레임의 핵산 서열 결실, 및
- E3 영역에서 결실된 gp19k/6.7K 대신 이식유전자(들)로서 적어도 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩함으로써 바이러스 E3 프로모터 하에 이식유전자 발현의 복제-관련 제어를 초래하는 핵산 서열

을 포함하는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

청구항 46

제45항에 있어서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 E1B19k의 결실을 더 포함하는 것인, 면역 체크포인트 억제제와 함께, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 일반적으로 바이러스학, 면역학 및 의학에 관한 것이다. 특정 태양에서, 본 발명은 암 치료를 위한 종양용해성(oncolytic) 바이러스, 특히 종양용해성 아데노바이러스, 및 체크포인트 억제제와의 조합 요법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] **발명의 배경**

[0003] 체크포인트 억제제(CPI: Checkpoint inhibitors)는 암 치료에 일대 혁명을 일으켜, 면역 요법을 한 가지 접근 방식으로서 검증한 바 있다. 불행히도 반응은 소수의 환자에서 나타난다. 일부 환자는 제한된 시간 동안만 혜택을 받는 반면 대다수는 감지할 수 있는 혜택을 얻지 못하는데, 특히 일반적인 유형의 비흑색종 고형 종양과 관련하여 그러하다. 따라서 CPI는 접근 방식으로 확실히 검증되었지만 소수의 환자만이 혜택을 받기 때문에 여전히 충족되지 않은 임상 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이러한 충족되지 않은 요구의 한 가지 예는 항-PD-1 니볼루맙이 2선 치료제로 승인된 바 있는 신세포 암종(RCC)이다. 무작위 3상 시험에서 확인된 반응률은 CPI 부문에서 21.5%인 반면 에베롤리무스(포유류의 라파마이신 표적 억제제) 부문에서는 3.9%였다. 전체 생존(OS) 중앙값은 각각 25.0개월 및 19.1개월이었다¹. 또 다른 임상 시험에서는 CPI(아테졸리주맙, 항-PD-L1)와 항-VEGF(수니티닙) 약물의 사용을 결합하여, 전체 반응 비율(ORR)을 32%로 증가시켰다(단독 요법으로 항-PD-L1의 경우 25% 및 단독 요법으로서 수니티닙의 경우 29%)². RCC는 이전에 "면역원성"으로 기술된 종양 유형이며 일부 환자는 고용량 IL-2 치료에는 반응하지만³, 대다수는 면역 요법에 반응을 보이지 않는다. ORR이 여전히 낮기 때문에(특히 흑색종 40%⁴, 요로상피 암종 21.1%⁵, 비소세포폐암종 19.4%⁶, 간세포암종 14.3%⁷ 등) 대부분의 종양 유형에서 개선의 여지가 분명히 있다.

[0005] **WO2014170389**는 암 치료 용도 및 치료 방법을 위한 종양용해성 아데노바이러스 벡터 단독 또는 이것과 치료 조성물과의 조합에 관한 것이다. 수년간의 개발 끝에 종양용해성 바이러스는 현재 암 치료제로 사용되기 시작하였다. 바이러스의 효능에 영향을 미치는 요인 및 작용 기전과 관련된 몇 가지 발견이 있었지만, 바이러스 요법에 대한 전반적인 반응을 결정하는 경로를 식별할 필요는 여전히 있다. 임상 시험에서 종양용해성 바이러스는 유리한 안전성 프로파일과 유망한 효능을 입증하였다. 그러나 특히 전이 부담이 큰 환자의 경우 반응이 개선될 여지가 있다. 종양용해성 바이러스의 활성화와 관련된 경로의 추가 특징화는 바이러스 요법의 효능을 개선하기 위한 잠재적인 표적을 밝힐 수 있다.

과제의 해결 수단

[0006] **발명의 개요**

[0007] 본 발명은 임상적으로 관련된 암 모델에 사이토카인 TNF알파 및/또는 IL-2를 코딩하는 종양용해성 아데노바이러스성 바이러스와 면역 체크포인트 억제제인 항-PD-L1 또는 PD-1을 공동 투여하면 어느 하나의 체제를 단독 투여한 경우에 비해 높은 생존 이익을 수반하면서, 치료된 암에 대한 면역 활성화로의 유의한 쉬프트가 초래된다는 발견에 기초한 것이다. 따라서, 여러 구체예에서, 본 출원은 포유동물에게 (a) 이식유전자(transgene)로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를 공동 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 암 및/또는 전이 확립의 치료 및/또는 예방에 사용되기 위한, 및/또는 포유동물에서 항-종양 반응을 개시, 증강 또는 연장시키는 데 사용되기 위한, 조합 요법을 제공한다.

[0008] 특정 태양에서, 암에 걸린 대상체에 대한 종양용해성 바이러스 및 면역 체크포인트 억제제의 공동-투여는 단독 치료에 비해 향상되고 심지어 상승적인 항종양 면역을 제공한다.

[0009] 다른 관련 태양에서, (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를, 이를 필요로 하는 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 체크포인트 억제제의 효과를 증강, 강화, 또는 연장하거나, 또는 체크포인트 억제제의 독성 또는 용량 또는 치료 횟수를 감소시키는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0010] **도 1. 비뇨기과 암 환자-유래 샘플은 T 세포 침윤 및 억제 차이에도 불구하고 종양용해성 바이러스 요법에 반응**

한다. 환자 샘플 1은 요로상피 암종이고, 환자 샘플 2 및 3은 투명 세포 신세포 암종이다. (A) 파라핀-포매된 샘플에서 수행된 헤마톡실린 및 에오신 염색. (B) CD8 면역조직화학. (C) PD-L1 면역조직화학. (D) 조직배양의 생체의 처리 후 MTS 생존력 분석. 제7일에 있어서 통계적 유의성은 Welch의 보정과 함께 독립표본 t-검정(독립 표본 t-검정)에 의해 계산되었다(**p<0.01; ***p<0.001). 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)를 나타내었다.

도 2. 치료 7일 동안의 사이토카인 수준에서의 바이러스 요법 및 체크포인트 억제제 치료에 대한 반응. 3 가지 개별 환자 유래 종양 조직배양의 발현 값을 함께 표시하였다. (A) IFN γ . (B) TNF α . (C) IL-2. (D) IFN β . (E) 그랜자임 B. (F) CXCL10. (G) IL-6. (H) TGF β . (I) 아르기나제. 양방향 ANOVA에 의해 계산된 통계적 유의성. (*p<0.05; **p<0.01). 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)를 나타내었다.

도 3. 제7일에서의 바이러스 요법 및 체크포인트 억제제 치료에 대한 그룹화된 사이토카인 반응 분석. 3가지 다른 환자 유래 종양 조직배양의 발현 값을 함께 표시하였다. (A) 면역자극성 사이토카인의 배수 변화. (B) 면역 억제성 이펙터의 배수 변화. (C) 전체 억제(IL-6, TGF- β 및 아르기나제 포함) 대 전체 자극(IFN γ , IFN β , 그랜자임 B 및 CXCL10 포함). (D) 면역자극성 사이토카인 발현과 종양 조직배양 생존력 간의 피어슨 r 상관관계.

도 4. 체크포인트 억제 요법을 가능하게 하는 바이러스 요법의 생체내 테스트. (A) 실험 설계: B16.OVA 종양이 있는 66마리의 동물에 대해 제0일에 치료를 개시하였다. 이들 중 30마리를 치료 후 제7일에 희생시켜(희생 점선) 종양을 수집하고, 나머지는 종양이 완전히 퇴행하거나 사망할 때까지 더 많은 치료 라운드에 실험하면서 생존 실험을 위해 살려두었다 (S: 바이러스 및 항-PD-L1의 동시 투여, PB: 프라임 및 부스트). (B) 전체 생존 (Kaplan-Meier, Log 순위 Mantel-Cox 검정). (C-G) 개별 종양 성장 라인. (*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001).

도 5. 단일 사이토카인 또는 두 개의 사이토카인을 발현하는 아데노바이러스 작제물의 개략도. 바이러스 백본은 혈청형 3에서 유래한 파이버 노브(fiber knob)와 별개로, 인간 아데노바이러스 혈청형 5이다. 단일 및 이중 이식유전자(TNF α 와 IL-2 또는 TNF α 및 IL-2)는 모두 바이러스 E3 프로모터의 전사 제어 하에 있다. 이중 이식유전자의 경우 IRES 요소가 두 사이토카인을 분리하여 각 사이토카인을 독립적으로 합성한다. 이식유전자는 gp19k 및 6.7k에 대해 삭제된 E3 영역에 배치된다. E1A 단백질은 불변 영역 2에서 24개 아미노산이 결실되어 ("D24"), 바이러스 E1A가 Rb 결합하지 못하게 한다. E1A 발현은 E2F 프로모터의 조절 하에 있다. E1B/19k는 비활성화 결실을 포함한다.

도 6. 항-PD-1에 불응성인 생체내 모델의 개발 및 검증. (A) 실험 설계: 17마리의 마우스에게 B16.OVA 종양을 피하 생착시켰다. 이들 종양의 최대 직경이 4 mm에 도달하면 이들을 모크(또는 모의: Mock)(n=7) 또는 항-PD-1 그룹(n=10)으로 지정하였다. 0.1 mg의 항-PD-1(또는 PBS)을 3일마다 제공하였다. 종양이 10 mm 이상 진행되면 동물을 희생시켰다. (B) 치료를 시작한 후 10 mm 미만의 종양이 있는 동물의 백분율. (C) 두 그룹에 대한 개별적인 종양 성장 곡선(Kaplan-Meier, 로그 순위 Mantel-Cox 검정; ***p<0.001).

도 7. 치료 경험이 없는(나이브) 진행성 종양과 항-PD-1 요법 후 진행 중인 종양의 유전자 발현 수준 비교. 도 6에 기재된 바와 같이 처리된 동물을 희생시키고 종양이 항-PD-1에 대해 불응성인 것으로 간주될 때 종양을 수확하였다. RNA를 추출하고 두 그룹의 발현 프로파일을 비교하였다. (A) 히트맵 및 샘플의 감독되지 않은 클러스터링. (B) 치료 경험이 없는 종양과 항-PD-1 치료 종양 사이의 발현 수준 비교를 위한 화산 플롯. (C) 면역 관련 유의하게 조절된 유전자. (배수 변화가 ≤ -2 또는 ≥ 2 이고 q-값 ≤ 0.001 인 경우 유전자 규정의 차이가 고려되었다.)

도 8. 조작된 아데노바이러스의 사용은 항-PD-1 불응성 종양에서 종양 성장 조절을 유발할 수 있다. (A) 실험 설계: 29마리의 마우스에게 B16.OVA 종양을 피하 생착시켰다. 종양의 최대 직경이 4mm에 도달했을 때 3일마다 0.1mg의 항-PD-1을 복강내 투여하기 시작하였다. 종양이 8mm 이상 진행되면 동물을 그룹에 할당하여, 동물들을 동일한 aPD-1 요법으로 처리하거나(n=8), 3일에 한 번 1×10^8 개의 바이러스 입자(vp)로 종양내 처리하거나(n=8) 또는 두 가지 모두로 처리하였다(n=8). 완전한 반응이 관찰되거나 희생 기준에 도달할 때까지 치료를 계속하였다. (B) 암 특이적 생존. (C) 그룹에 대한 개별 종양 성장 곡선. (Kaplan-Meier, 로그 순위 Mantel-Cox 검정; ***p<0.001).

도 9. 종양 샘플의 생성 및 치료의 작용 메커니즘을 연구하기 위한 분석. (A) 실험 설계: B16.OVA 종양을 보유한 27마리의 마우스를 이전에 설명된 바와 같이 약물에 불응성이 될 때까지 aPD-1로 처리하였다. 이어서, 동물들을 동일한 aPD-1 요법(n=9)으로, 1×10^8 바이러스 입자(vp)를 3일에 한 번(n=9) 종양 내로, 또는 둘 다(n=9)로 처리한 그룹에 할당하였다. 불응성으로 간주된 후 제0, 1, 3 및 6일에 4회의 치료를 행하고 종양 수집을 위해 제7일에 이들을 희생시켰다. (B) 제0일(불응성으로 자격이 부여된 때) 및 제7일(종양이 수확된 때)에서의

평균 중앙 부피(및 SEM). (C) CyTOF에 의한 중앙 분석 및 면역(CD45+) 세포에 대해 64개의 서로 다른 세포 클러스터를 제공하는 FLOWSOM에 의한 데이터의 후속 처리 후 히트맵. (Mann Whitney 검정; ****p<0.0001).

도 10. 질량 세포 계측법 및 클러스터 분석 후 평가된 바이러스 요법 후 주요 면역 집단의 변화. CD45+ 분획에서 편향되지 않은 세포 클러스터 생성은 세포 유형 또는 표현형과 관련된 여러 클러스터를 렌더링하였다. Mann-Whitney 검정을 이용하여 실험 그룹 간의 해당 클러스터의 상대적 백분율을 비교하였다. 클러스터 ID를 식별하는 키 마커를 나타내었다. (A) 클러스터 25. (B) 클러스터 41. (C) 클러스터 10. (D) 클러스터 17. (E) 클러스터 6. (F) 클러스터 14. (G) 클러스터 36. (H) 클러스터 5. (I) 클러스터 39. (J) 클러스터 58. (K) 클러스터 32. (L) 클러스터 55.

도 11. IL-2 및 TNF알파로 무장한 아데노바이러스와 항-PD-L1의 조합은 면역원성이 낮은(MOC2) 쥐 구강암 모델에서 중앙 성장 조절 및 생존을 개선한다. (A) 제0일로 정규화된 개별 중앙 부피; 샘플 그룹: PBS 대조군(PBS), 항-PD-L1 항체 처리(aPD-L1), 바이러스 Ad5-CMV-IL2 + Ad5-CMV-TNF알파 처리(바이러스), 항-PD-L1 항체 및 바이러스 Ad5-CMV-IL2 + Ad5-CMV-TNF알파 조합 처리 (aPD-L1+ 바이러스). (B) 제30일까지 개선된 중앙 성장 조절을 나타내는 정규화된 평균 중앙 부피. (C) 각 그룹에 대한 중앙 생존을 포함한 전체 생존 곡선. 중앙 성장 곡선의 경우 Tukey의 사후 검정을 이용한 혼합 효과 분석(*p < 0.05, ***p < 0.001)으로 통계치를 계산하였다. 중앙 부피 데이터는 평균 + SEM(평균의 표준 오차)으로 표시된다.

도 12. TILT-123과 항-PD-L1 요법은 환자 유래 난소암 샘플의 조직학에도 불구하고 빠른 중앙 세포 사멸을 위해 상승작용한다. Ad5/3-E2F-D24-TNFa-IRES-IL2(TILT-123)의 세포당 100개의 바이러스 입자(vp)로, 또는 20ug/ml의 항-PD-L1 (aPD-L1)로, 또는 양자 모두로, 또는 배지(비히클)로 난소암 중앙 조직배양물의 생체의 처리 후 MTS 생존력 분석 -L1(aPD-L1). OVCA P1은 난소 저등급 장액암종(병기 IVB)이고, OVCA P2는 난소 고등급 장액암종(병기 IIIC)이며, OVCA P3은 난소 투명 세포 암종(병기 IVB)이다. Welch 보정(**p<0.01; ****p<0.001)과 함께 독립표본 t-검정에 의해 계산된 1일차에 대한 통계적 유의성이 표시된다. 모든 데이터는 평균 + SEM(평균의 표준 오차)으로 표시된다.

도 13. TILT-123은 aPD-1 요법에 내성이 있는 환자로부터 유래된 중앙 세포의 사멸을 유도한다. Ad5/3-E2F-D24-TNFa-IRES-IL2(TILT-123) 또는 Ad5/3-E2F-D24의 세포당 100개의 바이러스 입자(vp), 또는 배지(바이러스 없음)로 난소암 중앙 조직배양물을 생체의 처리한 후 MTS 생존력 분석. SCCHN P1은 항-PD-1 요법에 불응성인 두경부 편평세포암의 뇌 전이이다. Welch 보정(*p<0.05; **p<0.01)과 함께 독립표본 t-검정에 의해 계산된 7일차에 대한 통계적 유의성이 표시된다. 모든 데이터는 평균 + SEM(평균의 표준 오차)으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 구체예의 상세한 설명

[0012] TILT-123(Ad5/3-E2F-d24-hTNFα-IRES-hIL2) 및 CPI와 같은 사이토카인(들) TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 중앙용해성 아데노바이러스 벡터가 하기 실험 섹션에 설명된 대로 함께 사용된 경우, 면역 활성화(인터페론 감마, 즉, IFNγ 및 그랜자임 B)에 대한 상당한 이동 및 증가된 T 세포 트래피킹 신호(CXCL10)가 관찰되었다. 바이러스가 TNF알파 및 IL-2 이식유전자로 무장함에 따라, 이들 사이토카인 수준은 중앙 미세환경에서도 증가하였다. 생체내에서, 본 발명의 바이러스는 항-PD-L1(CPI)으로 하여금 100% 완전한 반응에 이르게 할 수 있었는데(항-PD-L1 단독에 대한 위험 비율 0.057 [0.007; 0.451]) 또는 바이러스 요법 단독에 대한 위험 비율 0.067 [0.011; 0.415]), 이는, 대조군보다 유의하게 높은 것이다(p<0.01). 같은 그룹은 활성화 CD8 T 세포도 크게 증가한 것으로 나타났다. 따라서, 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 코딩하는 중앙용해성 아데노바이러스 벡터 및 PD-L1에 선택적으로 결합하는 체크포인트 억제제와의 조합 요법은 암을 치료하는데 있어 예상치 못한 개선을 초래하는 것으로 밝혀졌다. 중앙용해성 바이러스와 체크포인트 억제제는 동시에 또는 순차적으로 투여되는 경우, 어느 한 성분을 단일 투여하는 경우에 비해 협력 및 심지어 상승적으로 상호작용하여 명백한 부작용이나 바이러스 역가의 감소 없이 생존을 유의하게 개선시킨다. 이러한 예상치 못한 효과는 각 성분의 유효 용량을 감소시켜 부작용을 감소시키고 화합물 및 치료의 임상 효과를 향상시킬 수 있다.

[0013] 추가 실험(하기 실시예 2)에서, 항-PD-1 항체와 함께 TNF알파 및 IL-2를 코딩하는 중앙용해성 아데노바이러스는 CPI 불응성 중앙에 대해 효과적인 것으로 나타났다.

[0014] 여러 구체예에서, 포유동물에게 (i) TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 중앙용해성 아데노바이러스 벡터를 (ii) an 면역 체크포인트 억제제와 조합하여 공동 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 전이의 확립 및/또는 암을 치료하는데 사용하기 위한 조합 요법이 제공된다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-

L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합한다. 바람직일 구체예에서, 상기 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 면역 체크 포인트 억제제와 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0015] **종양용해성 바이러스**

[0016] 바람직한 구체예에서, 조합의 종양용해성 바이러스는 종양용해성 아데노바이러스이다.

[0017] 본원에 사용된 "종양용해성 아데노바이러스 벡터"는 종양 대 정상 세포에서 선택적인 복제에 의해 암세포를 감염 및 사멸시킬 수 있는 아데노바이러스 벡터를 지칭한다. W02014170389는 본 발명에서 사용될 수 있는 이식유전자(들)로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터를 개시한다.

[0018] 벡터는 당업계에 공지된 임의의 방식으로, 예컨대 바이러스 영역을 삭제, 삽입, 돌연변이 또는 변형함으로써 변형될 수 있다. 벡터는 복제와 관련하여 종양 특이적으로 만들어진다. 아데노바이러스 벡터는 E1, E3 및/또는 E4에서 종양 특이적 프로모터의 삽입(예를 들어, E1을 구동하기 위한), 영역의 결실(예를 들어, "D24"에서 사용되는 E1의 불변 영역 2, E3 /gp19k, E3/6.7k) 및 이식유전자의 삽입과 같은 변형을 포함할 수 있다. 또한 벡터의 파이버 노브 영역이 변형될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 아데노바이러스 벡터는 Ad5 핵산 백본 및 Ad3 파이버 노브 또는 Ad5/3 키메라 파이버 노브를 포함하는 Ad5/3이다.

[0019] 본원에 사용된 표현 "아데노바이러스 혈청형 5(Ad5) 핵산 백본"은 Ad5의 게놈을 지칭한다.

[0020] "Ad5/3 벡터"는 Ad5 및 Ad3 벡터 모두의 일부를 갖는 키메라 벡터를 지칭한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 벡터의 캡시드 변형은 Ad5/3 키메라 현상이다. 본원에 사용된 "Ad5/3 키메라 파이버 노브"는 파이버의 노브 부분은 Ad 혈청형 3에서 유래하고 파이버의 나머지 부분은 Ad 혈청형 5에서 유래하는, 키메라 현상을 가리킨다. 구체적으로, 일 구체예에서, 이 작제물은 Ad3 유래의 파이버 노브를 갖는 반면 게놈의 나머지는 Ad5(SEQ ID NO: 5)로부터 유래한다.

[0021] 종양 특이적 종양용해성 아데노바이러스의 생성을 위한 한 가지 접근법은 E1(SEQ ID NO:4)의 불변 영역 2(CR2)에 영향을 미치는 24개 염기쌍 결실(D24)을 조작하는 것이다. 야생형에서 아데노바이러스 CR2는 합성(S) 단계, 즉 DNA 합성 또는 복제 단계의 유도를 위해, 세포의 Rb 종양 억제인자/세포 주기 조절 단백질에 결합하는 역할을 한다. Rb와 E1A 사이의 상호작용은, 본 발명에서는 결실되는, E1A 단백질 보존 영역의 8개 아미노산(121 내지 127)을 필요로 한다. 본 발명의 벡터는 Heise C. et al.에 따른 벡터의 아미노산 122-129에 상응하는 뉴클레오타이드의 결실을 포함한다(2000, Nature Med 6, 1134-1139). D24가 있는 바이러스는 G1-S 체크포인트를 극복하는 능력이 감소되어 예컨대, 모든 인간 종양은 아니지만 대부분을 포함하는 Rb-p16 경로에 결합이 있는 종양 세포에서와 같이, 이러한 상호작용이 필요하지 않은 세포에서만 효율적으로 복제하는 것으로 알려져 있다.

[0022] E1A 내인성 바이러스 프로모터를 예를 들어 종양 특이적 프로모터로 대체하는 것도 가능하다. 본 발명의 특정 구체예에서, hTERT 프로모터는 E1A 내인성 바이러스 프로모터 대신에 이용된다.

[0023] 특정 구체예에서, 일반적으로 아데노바이러스 벡터의 복제를 지원하는 것으로 알려진 E1B 19K 유전자(SEQ ID NO:1)는, 본 벡터에서 무력화 결실 dE1B 19K(SEQ ID NO:2)를 갖는다. E1B 19K의 결실은 암세포를 TNF α에 민감하게 하여 아포토시스를 촉진하는 것으로 알려져 있다(7).

[0024] 야생형 E1B 19K 유전자의 서열은 다음과 같다(결실가능한 영역에 밑줄):

[0025] atggaggctt gggagtgttt ggaagathtt tctgctgtgc gtaacttgct ggaacagagc tctaacagta cctcttggtt ttggaggttt
ctgtggggct catcccagc aaagttagtc tgcagaatta aggaggatta caagtgggaa tttgaagagc ttttgaatc ctgtggtgag
ctgtttgatt ctttgaatct gggtcaccag gcgcttttcc aagagaaggt catcaagact ttggatTTTT ccacaccggg gcgctgtcgc
gctgctgttg cttttttgag ttttataaag gataaatgga gcaagaaac ccatctgagc ggggggtacc tgctggattt tctggccatg
catctgtgga gagcggttgt gagacacaag aatcgctgtc tactgtgttc ttcgctccgc ccggcgataa taccgacgga ggagcagcag
cagcagcagg aggaagccag gcggcggcgg caggagcaga gcccatggaa cccgagagcc ggcctggacc ctcgggaatg a (SEQ ID
NO:1)

[0026] 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 바이러스 벡터에서 dE1B 19K에 대한 서열은 다음과 같다:

[0027] atggaggctt gggagtgttt ggaagathtt tctgctgtgc gtaacttgct ggaacagctg ggtcaccagg cgcttttcca agagaaggtc
atcaagactt tggatTTTT cacaccgggg gcgctgtcgc ctgctgttgc ttttttgagt tttataaagg ataaatggag cgaagaaac
catctgagcg gggggtacct gctggatTTT ctggccatgc atctgtggag agcggttgtg agacacaaga atcgctgtc actgttgtct
tccgtccgcc cggcgataat accgacggag gagcagcagc agcagcagga ggaagccagg cggcggcggc aggagcagag cccatggaac

ccgagagccg gcctggacc cgggaatga (SEQ ID NO:2)

- [0028] E3 영역은 시험관내 바이러스 복제에 필수적이지 않지만 E3 단백질은 숙주 면역 반응의 조절, 즉 선천적 및 특정 면역 반응의 억제에서 중요한 역할을 한다. E3에서 gp19k/6.7K 결실은 아데노바이러스 E3A 영역에서 965개 염기쌍의 결실을 의미한다. 결과적인 아데노바이러스 작제물에서 gp19k 및 6.7K 유전자는 두 가지 모두 결실된다(Kanerva A et al. 2005, Gene Therapy 12, 87-94). gp19k 유전자 산물은 소포체의 주요 조직적합성 복합체 I(MHC1, 인간에서 HLA1으로 알려짐) 분자에 결합 및 격리(sequester)하여, 세포독성 T-림프구에 의한 감염된 세포의 인식을 방지하는 것으로 알려져 있다. 많은 종양이 HLA1/MHC1이 결핍되어 있기 때문에 gp19k의 결실은 바이러스의 종양 선택성을 증가시킨다(바이러스는 정상 세포에서 야생형 바이러스보다 더 빨리 제거되지만 종양 세포에서는 차이가 없다). 6.7K 단백질은 세포 표면에서 발현되며 이들은 TNF 관련 아포토시스 유도 리간드 (TRAIL) 수용체 2를 하향조절하는 데 참여한다.
- [0029] 이러한 결실은 양자 모두 이점을 제공한다. 예를 들어, 입양 전달된(adoptively transferred) T 세포에 대한, 종양 에피토프의 제시를 위한 HLA/MHC의 발현을 회복하기 위해, gp19k 단백질의 발현은 역효과를 내고, 실제로 HLA/MHC의 상향조절은 gp19k의 결실을 필요로 한다. 6.7k와 관련하여, 본 발명의 구체예는 바이러스로부터 TNF 알파의 생산이고, 그의 항종양 활성 중 하나는 직접적인 항종양 전구사멸 효과(형질도입 및 비형질도입 방관자 세포 모두에 대한)이기 때문에, 6.7k의 존재는 역효과를 낸다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에서, 사이토카인 이식유전자 또는 이식유전자들은 E3 프로모터 하에, gp19k/6.7k 결실된 E3 영역에 배치된다. 이것은 바이러스의 복제와 E3 프로모터의 후속 활성화를 허용하는 종양 세포에 대한 전이 유전자 발현을 제한한다. E3 프로모터는 임의의 외인성(예를 들어, CMV 또는 E2F 프로모터, SEQ ID NO:3)) 또는 당업계에 공지된 내인성 프로모터, 특히 내인성 E3 프로모터일 수 있다. E3 프로모터는 주로 복제에 의해 활성화되지만 일부 발현은 E1이 발현될 때 일어난다. D24 유형 바이러스의 선택성은 E1 발현 후에 발생하기 때문에 (E1이 Rb에 결합할 수 없을 때), 이들 바이러스는 형질도입된 정상 세포에서도 E1을 발현한다. 따라서, E3 프로모터 매개된 이식유전자 발현을 종양 세포로 제한하기 위해서는 E1 발현도 조절하는 것이 매우 중요하다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구체예에서 E3 gp19k/6.7k는 백터에 유지되지만 하나 이상의 다른 E3 영역이 결실되었다(예컨대 E3 9-kDa, E3 10.2 kDa, E3 15.2 kDa 및/또는 E3 15.3 kDa).
- [0032] 본 발명의 특정 구체예에서 종양용해성 아데노바이러스 백터는 5/3 키메라 파이버 노브를 포함하고 다음을 포함하는 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5) 핵산 백본을 기반으로 한다: E1A의 종양 특이적 발현을 위한 E2F1 프로모터, 아데노바이러스 E1의 Rb 결합 불변 영역 2에서의 24 bp 결실(D24), 바이러스 gp19k 및 6.7k 판독 프레임의 핵산 서열 결실(결실된 영역으로의 이식유전자 삽입으로, 바이러스 E3 프로모터 하에서의 이식유전자 발현의 복제 관련 제어가 초래됨), 및 E3 영역에서 결실된 아데노바이러스 유전자 gp19k/6.7K 대신에 적어도 하나의 사이토카인 이식유전자를 인코딩하는 핵산 서열. 본 발명의 한 구체예에서, 아데노바이러스 백터는 인간 아데노바이러스에 기초한다.
- [0033] 아데노바이러스 3에서 초기 영역(E3) 단백질의 정확한 기능은 알려져 있지 않다. 일반적으로 아데노바이러스에서 이들은 결실되도 복제를 손상시키지 않는 것으로 보이며 아데노바이러스에 대한 항-바이러스 숙주 반응에 영향을 미치는 것으로 보인다. 인간 아데노바이러스 계통의 E3는 인간에서 발견되는 6종(A-F)의 아데노바이러스 중 가장 높은 수준의 유전적 다양성을 포함한다. 유전자 콘텐츠의 이러한 다양성은 주로 유전자의 종 특이적 어레이가 인코딩되는 고도로 보존된 E3-gp19K와 E3-RID α 오픈 판독 프레임(ORF) 사이에 위치한다.
- [0034] 바이러스에 감염된 세포의 세포독성 T-세포 매개 살해는 E3-gp19K에 의해 조절된다. 이것은 원형질막으로의 MHC 클래스 I의 수송을 차단하고 TAP-MHC 클래스 I 복합체 형성을 억제함으로써 달성된다.
- [0035] 따라서, 본 발명의 일 태양에서 중요한 분자 E3-gp19K는 아데노바이러스 백터에 포함되어 바이러스 복제를 더 은밀하게 만들고 종양 용해 및 이의 유익한 효과를 위한 더 많은 시간을 가능하게 한다. 또한, E3-gp19K를 유지하면 항-아데노바이러스-세포독성 T 세포의 유도가 감소하여, 더 많은 항-종양 T 세포가 생성될 수 있다.
- [0036] 사이토카인은 종양을 향한 T 세포 모집을 포함한 다양한 메커니즘을 통해 작용함으로써 면역 반응에 참여한다. 사이토카인 이식유전자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인간, 유인원, 쥐, 마우스, 햄스터, 개 또는 고양이와 같은 임의의 동물로부터 유래될 수 있지만, 구체적으로는 인간 서열에 의해 인코딩된다. 이식유전자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 그 효과를 개선하기 위해 변형되거나 변형되지 않은, 즉 야생형일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 특정 구체예는 적어도 하나의 사이토카인을 코딩하는 바이러스 백터를 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 사이토카인은 IL-2 또는 TNF알파이고, 종기로는 바이러스 백터는 두 가지 사이토카인 모두를 코딩하

는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 구체예에서, 바이러스 벡터는 IL-2 및/또는 TNF알파 및 종기로는 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 보체 C5a, CD40L, IL12, IL-23, IL15, IL17, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14-1, CCL14-2, CCL14-3, CCL15-1, CCL15-2, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23-1, CCL23-2, CCL24, CCL25-1, CCL25-2, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCR10, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCRL1, CCRL2, CX3CL1, CX3CR, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7 및 XCL2로 이루어진 군으로부터 선택되는 추가 사이토카인을 코딩한다.

[0038] 사이토카인 TNF알파(종양 괴사 인자 알파)는 T 세포를 유인 및 활성화하고 종양 면역억제를 감소시킴으로써 기능하는 반면, IL-2(인터루킨-2)는 T 세포 이식편의 증식을 유도한다. 따라서, IL-2는 T 세포 요법에서 일반적으로 수행되는, 부작용을 일으킬 수 있는 전신 주사 대신에 이를 필요로 하는 종양에서 국소적으로 생성되며, 따라서 선행 기술 요법의 주요 문제(즉, 전신 IL-2)의 독성이, 이 구체예에 방지될 수 있다.

[0039] 바이러스 DNA에 의한 병원체 관련 분자 패턴 인식 수용체의 활성화 및 종양용해성 바이러스의 복제에 의해 제공되는 위험 신호는, 이식유전자(들)의 작용과 함께, 종양 면역 억제를, 사전 조절 요법이 생략될 수 있는 정도까지 감소시킬 수 있다. 결과적으로, 선행 기술의 주요 문제인 선행 화학요법 및 방사선으로 인한 독성이 회피될 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에서, 바이러스 벡터는 내부 리보솜 진입 부위(IRES: internal ribosomal entry site) 또는 선택적으로 2개의 이식유전자들 사이에 리보솜 섀트 부위 2A를 포함한다. 따라서, IRES 또는 리보솜 섀트 부위 2A는, IL-2 및 종기로는 상기 사이토카인 그룹 목록으로부터 선택되는 임의의 기타 사이토카인과 같은 임의의 사이토카인들 사이에 존재할 수 있다. 본원에서 "IRES"라 함은 단백질 합성에서 메신저 RNA 서열의 중간에서 번역의 개시를 가능하게 하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. IRES는 임의의 바이러스로부터 유래할 수 있지만, 본 발명의 일 구체예에서 IRES는 너십근염 바이러스(EMCV)로부터 유래한다. 본원에 사용된 "리보솜 섀트 부위 2A"는 리보솜이 5' 비번역 영역의 일부를 물리적으로 우회하여 개시 코돈에 도달하는 번역 개시 부위를 지칭한다. IRES와 A2는 모두 바이러스가 하나의 프로모터(E3 프로모터)에서 2개의 이식유전자를 생성할 수 있게 해준다.

[0041] 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터의 상세한 구조의 예는 WO2014170389에 개시되어 있다. 도 5도 참조할 것.

[0042] 요약하면, 적어도 하나의 사이토카인 이식유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 이용하는 본 발명의 주요 장점은 다음과 같다: i) 사이토카인 및 바이러스 자체가 T 세포 및 기타 면역 세포를 종양으로 동원하는 위험 신호를 유발하고, ii) 사이토카인이 종양 및 국소 림프 장기 모두에서 T-세포 증식을 유도하며, iii) 사이토카인 및 바이러스 자체가 T 세포(입양 T-세포 이식편 및 천연의 선천성 항종양 T 세포 모두)로 하여금 종양에서 증식하도록 유도할 수 있으며, iv) 사이토카인 및/또는 바이러스가 암세포에서 항원-제시 분자(HLA)의 상향조절을 유도하여, T 세포에 의한 인식 및 살해에 민감하게 만들고, v) 사이토카인 및 바이러스 복제가 면역억제 및 세포 무반응(cell anergy)을 감소시켜 종양 미세환경을 유리하게 변경시킨다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 바이러스 벡터는 또한 상기 기술된 것 이외의 다른 변형을 포함할 수 있다. 임의의 추가 구성요소 또는 변형이 선택적으로 사용될 수 있지만 본 발명에 있어서 필수적인 것은 아니다.

[0044] 외인성 요소의 삽입은 표적 세포에서 벡터의 효과를 향상시킬 수 있다. 외인성 조직 또는 종양-특이적 프로모터의 사용은 재조합 벡터에서 일반적이며 본 발명에서도 이용가능하다.

[0045] 요약하면, 본 발명에 따라, 종양용해성 바이러스의 복제가 T 세포를 모집하고 종양에서 위험 신호를 유도하여 면역억제 및 세포 무반응을 감소시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 효과는 내성을 나타내지 않고 면역을 유도하기 위해 진화적으로 보존된 메커니즘인 병원체 관련 분자 패턴 인식 수용체를 통해 매개된다. 본 발명은 또한 종양에서는 복제가능하지만 정상 세포에서는 복제할 수 없는 종양용해 플랫폼의 추가적인 장점이, 종양에서 자가-증폭된다는 것도 밝혀냈다. 또한, 종양용해 효과 그 자체가 인간의 전반적인 항종양 효과에 추가될 수 있다.

[0046] **체크포인트 억제제**

[0047] 면역 체크포인트 단백질은 T 세포 기능을 억제하는 신호를 T 세포로 보내는 특정 리간드와 상호작용한다. 암세포는 그의 표면에서 체크포인트 단백질을 높은 수준으로 유도하여 항암 면역 반응을 억제함으로써 이를 악

용한다.

- [0048] 본원에 기재된 바와 같은 체크포인트 억제제(CPI로도 지칭됨)는 면역 체크포인트 단백질의 기능을 억제할 수 있는 임의의 화합물이다. 억제에는 기능의 감소와 완전한 차단이 포함된다. 특히 면역 체크포인트 단백질은 인간 체크포인트 단백질이다. 따라서, 면역 체크포인트 억제제는 바람직하게는 인간 면역 체크포인트의 억제제이다.
- [0049] 체크포인트 단백질에는 CTLA-4, PD-1(및 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2), B7-H3, B7-H4, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BTLA, TIGIT 및/또는 IDO가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. LAG3, BTLA, B7-H3, B7-H4, TIM3 및 KIR을 포함하는 경로는 CTLA-4 및 PD-1 의존성 경로와 유사한 면역 체크포인트 경로를 구성하는 것으로 당업계에서 인지되고 있다. 면역 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PD-1(및 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2), B7-H3, B7-H4, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BTLA, TIGIT 및/또는 IDO의 억제제일 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 또는 PD-1의 억제제이다.
- [0050] 일부 구체예에서, 조합물의 체크포인트 억제제는 항체이다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 예를 들어 결합할 수 있는 자연 발생된 항체 및 조작된 항체 뿐만 아니라 전장 항체 또는 표적 면역 체크포인트 또는 에피토프(예컨대 항원 결합 부분 유지)에 결합할 수 있는 그의 기능적 단편 또는 유사체를 포괄한다. 본원에 기재된 방법에 따라 사용하기 위한 항체는 비제한적인 예로서 인간, 인간화, 동물 또는 키메라 항체를 비롯한 임의의 기원으로 부터 유래할 수 있고, 모든 이소형(IgG1 또는 IgG4 이소형이 바람직함)의 것일 수 있으며 추가로 글리코실화되거나 비-글리코실화될 수 있다. 용어 항체는 또한 항체(들)가 본원에 기재된 결합 특이성을 나타내는 한 이중특이성 또는 다중특이성 항체를 포함한다. 좋기로는, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1에 선택적으로 결합하는 모노클로날 항체이고, 더욱 좋기로는 BMS-936559, LY3300054, 아테졸리주맙, 두르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 인간 PD-1에 결합하는 모노클로날 항체의 예는 US 7521051, US 8008449 및 US 8354509에 기재되어 있다. 치료 방법에서 PD-1 길항제로서 유용한 특정 항-인간 PD-1 mAb는 다음을 포함한다: 캄브롤리주맙(MK-3475), 니볼루맙(BMS-936558), 및 WO2008156712에 기재된 인간화 항체 h409A11, h409A16 및 h409A17.
- [0051] 인간화 항체는 인간 항체와의 유사성을 증가시키도록 단백질 서열이 변형된 비인간(예컨대 쥐(murine), 래트 등) 항체를 지칭한다. 키메라 항체는 어느 한 종의 하나 이상의 요소(들) 및 다른 종의 하나 이상의 요소(들)를 포함하는 항체, 예컨대 인간 면역글로불린의 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함하는 비인간 항체를 지칭한다.
- [0052] 많은 형태의 항체가 본 발명의 조합에 사용하기 위해 조작될 수 있으며, 대표적인 예로는 Fab 단편(VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편), F(ab')₂ 단편(힌지 영역에서 적어도 하나의 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편), Fd 단편(VH 및 CH1 도메인으로 구성됨), Fv 단편(항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 구성됨), dAb 단편(단일 가변 도메인 단편(VH 또는 VL 도메인)으로 구성됨), 중국적으로 링커와 함께 융합되어, 단일 단백질 사슬을 만드는, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH를 포함하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 들 수 있다.
- [0053] 일부 구체예에서, 조합 요법의 체크포인트 억제제(CPI로도 지칭됨)는 면역 체크포인트 단백질 PD-L1 또는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이다. 특히 바람직할 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 또는 PD-1을 적어도 부분적으로 길항할 수 있는 모노클로날 항체, 완전한 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 그의 단편이다.
- [0054] **암(Cancer)**
- [0055] 본 발명의 재조합 벡터는 종양 세포에서 복제 가능하다. 본 발명의 일 구체예에서 벡터는 Rb-경로, 구체적으로 Rb-p16 경로에 결합이 있는 세포에서 복제 가능하다. 이러한 결합이 있는 세포에는 동물과 인간의 모든 종양 세포가 포함된다. 본원에 사용된 "Rb-경로의 결합"은 그 경로의 임의의 유전자 또는 단백질에서의 돌연변이 및/또는 후성유전학적 변화를 지칭한다. 이러한 결합으로 인해 종양 세포는 E2F를 과발현하므로, 일반적으로 효과적인 복제에서 요구되는 E1A CR2에 의한 Rb의 결합이 불필요하다. 추가 선택성은 E2F 프로모터에 의해 매개되며, 이는 Rb/p16 경로 결합 세포에서 볼 수 있는 바와 같이 유리 E2F의 존재 하에서만 활성화된다. 유리 E2F가 없으면 E1A의 전사가 일어나지 않고 바이러스가 복제되지 않는다. E2F 프로모터의 포함은 정상 조직에서 E1A의 발현을 방지하는 데 중요하며, 이는 E3 프로모터로부터 이식유전자 발현을 허용함으로써 직간접적으로 독성을 유발할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 대상체에서 암을 치료하기 위한 접근법에 관한 것이다. 본 발명의 일 구체예에서, 대상체는 인간 또는 포유동물, 구체적으로 포유동물 또는 인간 환자, 보다 구체적으로 인간 또는 암을 앓고 있는 포유동물이다.

- [0057] 이 접근법은 악성 및 양성 종양을 포함하여 모든 암 또는 종양을 치료하는 데 사용할 수 있으며, 원발성 종양과 전이 종양 모두 이 접근법의 표적이 될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 암은 종양-침윤성 림프구를 특징으로 한다. 본 발명의 도구는 종양-침윤성 림프구를 특징으로 하는 전이성 고형 종양의 치료에 특히 매력적이다. 또 다른 구체예에서, T-세포 이식편은 키메라 항원 수용체의 종양 또는 조직 특이적 T-세포 수용체에 의해 변형되었다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "치료/처리(treatment)" 또는 "치료/처리하는(treating)"은 암 또는 종양과 관련된 장애 또는 증상의 완전한 치유 뿐만 아니라 예방, 개선 또는 완화를 비롯한 목적으로, 대상체, 종기로는 포유동물 또는 인간 대상체에게, 적어도 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 PD-L1에 선택적으로 결합하는 체크포인트 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 치료 효과는 환자의 증상, 혈액 내 종양 표지자, 또는 예를 들어 종양의 크기 또는 환자의 생존 기간을 모니터링하여 평가할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 암 또는 종양은 비인두암, 활막암, 간세포암, 신장암, 결합 조직 암, 흑색종, 폐암, 대장암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 뇌암, 인후암, 구강암, 간암, 골암, 췌장암, 용모막암, 가스트린종, 갈색세포종, 프로락틴종, T세포 백혈병/림프종, 신경종, 폰 히켈-린다우병, 줄거기-엘리슨 증후군, 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 요관암, 뇌암, 희소돌기아교종, 신경모세포종, 수막종, 척수종양, 뼈암, 골연골종, 연골육종, 유잉육종, 알 수 없는 원발성 암, 카르시노이드, 위장관의 카르시노이드, 파이버육종, 유방암, 파제트병, 자궁경부암, 결장직장암, 직장암, 식도암, 담낭암, 두경부암, 안암, 신장암, 윌름스 종양, 간암, 카포시 육종, 전립선암, 폐암, 고환암, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 구강암, 피부암, 중피종, 다발성 골수종, 난소암, 내분비 췌장암, 글루카곤종, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 뇌하수체암, 연조직육종, 망막모세포종, 소장암, 위암, 흉선암, 갑상선암, 영양막암, 포상체, 자궁암, 자궁내막암, 질암, 외음부암, 음향 신경종, 균상식육종, 인슐린종, 카르시노이드 증후군, 체세포종, 잇몸암, 심장암, 입술암, 수막암, 구강암, 신경암, 구개암, 이하선암, 복막암, 인두암, 흉막암, 침샘암, 혀암 및 편도암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 종기로는, 치료되는 암 또는 종양은 신장암, 난소암, 방광암, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 폐암(소세포 폐암, 비소세포 폐암종 및 편평 비소세포 폐암종 등), 위암, 고전적 호지킨 림프종, 중피종 및 간암을 포함한다. 보다 바람직일 구체예에서, 암 또는 종양 유형은 두경부암, 가장 바람직하게는 인간 두경부암이다.
- [0060] 본 발명의 요법에 대한 적합 여부에 대해 인간 또는 동물 환자를 분류하기 전에 임상 의는 환자를 검사할 수 있다. 정상에서 벗어나 종양 또는 암을 나타내는 결과에 기초하여, 임상 의는 환자에게 본 발명의 치료를 제안할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 구체예에서, 대상체 또는 환자는 이미 적어도 하나의 이전 화학요법 또는 CPI 치료와 같은 면역요법 치료에 실패한 적이 있는 경우로서, 즉 환자의 암은 체크포인트 억제제(CPI)에 불응성인 종양이다. 바람직일 구체예에서, 본 발명은 CPI 불응성 종양의 치료에 관한 것이다. 본 실험 결과는 CD8+ T-세포 활성을 매개하고 따라서 면역 활성화와 관련된 유전자, 예를 들어 T-세포 전구체 GZMG 및 GMZF에 대한 유전자, KLRC2와 같은 다른 세포 유형과의 상호작용과 연관된 T-세포 단백질에 대한 유전자, 보체 CD46과 같은 면역 성분에 대한 유전자, 및 특히 TNFSF18/GITRL 및 EAR2와 같은 T 세포 활성 조절자에 대한 유전자는 CPI 요법에 대한 경험이 없는(나이브) 세포와 관련하여 CPI 불응성 암세포에서 하향조절된다는 것, 그리고 이에 따라 유전자 발현의 이러한 변화는 불응성 표현형을 반영할 수 있다는 것을 보여주나, 특정 이론에 구애되는 것은 아니다. 따라서 일 구체예에서, 본 발명은 CD8+ T-세포의 기능장애 및/또는 불활성을 매개하거나 유발할 수 있는 CPI 불응성 암의 치료에 관한 것이다.
- [0062] **약제학적 조성물**
- [0063] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 바이러스 벡터의 적어도 하나의 유형을 포함한다. 종기로는, 본 발명은 (a) 종양용해성 바이러스를 (b) 체크포인트 억제제와 조합하여 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 암 치료에 사용하기 위한 상기 약제학적 조합물을 제공한다. 또한, 이러한 조성물은 적어도 2개, 3개 또는 4개의 상이한 벡터를 포함할 수 있다. 벡터 및 체크포인트 억제제에 더하여, 약제학적 조성물은 또한 다른 치료학적 유효 제제, 약제학적으로 허용되는 담체, 완충제, 부형제, 보조제, 첨가제, 방부제, 방부제, 충전제, 안정화제 및/또는 증점제와 같은 임의의 다른 제제, 및/또는 해당 제품에서 일반적으로 발견되는 임의의 구성 요소들도 포함할 수 있다. 조성물을 제형화하기 위한 적절한 성분 및 적절한 제조 방법의 선택은 당업자의 일반적인 지식에 속한다.
- [0064] 약제학적 조성물은 투여에 적합한 고체, 반고체 또는 액체 형태와 같은 임의의 형태일 수 있다. 제형은 용액, 에멀전, 현탁액, 정제, 펠렛 및 캡슐로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발

명의 조성물은 특정 제형으로 제한되지 않으며, 그 대신 본 발명의 조성물은 임의의 공지된 약제학적으로 허용되는 제형으로 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 임의의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0065] 본 발명의 약제학적 키트는 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다. 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 제1 제형으로 제형화되고 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 상기 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제는 제2 제형으로 제형화된다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 제1 및 제2 제형은 임의의 순서로 대상체에 동시 또는 순차적으로 투여된다. 또 다른 구체예에서, 상기 키트는 암 또는 종양의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0066] **투여**

[0067] 본 발명의 벡터 또는 약제학적 조성물은 임의의 포유동물 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 대상체는 인간이다. 포유동물은 애완동물, 가축 및 생산 동물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0068] 벡터 또는 조성물을 대상체에 투여하기 위해 임의의 통상적인 방법이 사용될 수 있다. 투여 경로는 조성물의 제형 또는 형태, 질병, 종양의 위치, 환자, 동반 질환 및 기타 요인에 따라 다르다. 따라서, 조합에서 각 치료제의 투여량 및 투여 빈도는 특정 치료제, 치료되는 암의 중증도 및 환자 특성에 부분적으로 의존한다. 바람직하게는, 투여 요법은 부작용의 허용 가능한 수준을 감안하여 환자에게 전달되는 각 치료제의 양을 최대화하는 것이 좋다. 바람직할 구체예에서, 체크포인트 억제제는 약 2 mg/kg 내지 50 mg/kg, 보다 바람직하게는 약 2 mg/kg 내지 25 mg/kg의 양으로 투여된다.

[0069] 본 발명의 일 구체예에서, 대상체에 대한 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제의 개별 투여(들)은 동시에, 또는 임의의 순서로 연속적으로 수행된다. 이는 (a) 및 (b)가 함께 복용하기 위한 단일 단위 투여 형태로 제공되거나 동시에 또는 특정 시간 차이를 두고 투여되는 개별적인 실체(예컨대 별도의 용기에)로서 제공될 수 있음을 의미한다. 이러한 시차는 1시간 내지 1주, 바람직하게는 12시간 내지 3일, 더욱 바람직하게는 최대 24시간 또는 48시간일 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 아데노바이러스 벡터의 1차 투여는 체크포인트 억제제의 1차 투여 전에 수행된다. 또한, 체크포인트 억제제와는 다른 투여 방식을 통해 바이러스를 투여하는 것도 가능하다. 이와 관련하여, 바이러스 또는 체크포인트 억제제 중 어느 하나는 종양내 투여하고 다른 하나는 전신 또는 경구 투여하는 것이 유리할 수 있다. 특히 바람직한 일 구체예에서, 바이러스는 종양내로 투여되고 체크포인트 억제제는 정맥내로 투여된다. 바람직하게는, 바이러스 및 체크포인트 억제제는 별도의 화합물로서 투여된다. 두 약제의 조합 치료도 가능하다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "별도의(또는 개별적인) 투여" 또는 "별도의(또는 개별적인)"은 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제가 두 개의 별개 산물이거나 서로 구별되는 조성물인 상황을 지칭한다.

[0071] (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제의 1회 조합 투여만으로 치료 효과가 나타날 수 있다. 예를 들어 환자 및 암의 유형, 중증도 또는 위치에 따라 투여 사이에 임의의 기간이 있을 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터와 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제의 연속적인 투여 사이에 1분 내지 4주, 구체적으로 1 내지 10일, 보다 구체적으로 1 내지 5일, 가장 구체적으로 최대 24 또는 48시간의 기간이 있고/있거나 a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터와 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제는 여러 번 투여된다. 치료 기간 동안 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제의 투여 횟수도 다를 수 있다. 종양용해성 아데노바이러스 벡터 또는 체크포인트 억제제는 예를 들어 처음 2주, 4주, 매일 또는 치료 기간 동안 1 내지 10회 투여될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 벡터 또는 임의의 조성물의 투여는 처음 2주 동안 3 내지 7회, 그 다음 4주 차에, 그 다음에는 매일 수행된다. 본 발명의 특정 구체예에서, 투여는 처음 2주 동안 4회, 그 다음 4주 차에, 그 다음에는 매일 수행된다. 또 다른 특정 구체예에서, 아데노바이러스 벡터의 투여는 처음 4주 동안 3회 수행되고(일 구체예에서 제1 용량은 정맥내, 두 번째 및 세 번

제 용량은 종양내로 제공됨) 체크포인트 억제제의 투여는 처음 4주 동안 1회 또는 2회 수행되며, 그 후 바이러스 벡터와 체크포인트 억제제 양자 모두는 한 달에 한 번 투여된다. 치료 기간의 길이는 다양할 수 있으며, 예를 들어 2개월에서 12개월 이상 지속될 수 있다.

[0072] 본 발명의 특정 구체예에서, (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 종기로는 PD-L1 또는 PD-1에 선택적으로 결합하는 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제는 같은 날 투여되고 그 후 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 예를 들어 1개월 내지 6개월 또는 12개월 이상 지속될 수 있는 치료 기간 동안 매주, 2주, 3주 또는 매월 투여된다..

[0073] 본 발명의 일 구체예에서, 종양용해성 바이러스의 투여는 종양내, 동맥내, 정맥내, 흉막내, 방광내, 강내 또는 복막 주사, 또는 경구 투여를 통해 수행된다. 임의의 투여 조합도 가능하다. 이 접근법은 국소 주사에도 불구하고 전신 효능을 제공할 수 있다. 체크포인트 억제제는 정맥내 또는 종양내 투여될 수 있다. 일 구체예에서 체크포인트 억제제의 투여는 종양내, 동맥내, 정맥내, 흉막내, 방광내, 강내 또는 복막 주사, 또는 경구 투여를 통해 수행된다.

[0074] 벡터의 유효 용량은 적어도 치료가 필요한 대상, 종양 유형 및 종양의 위치 및 종양의 단계에 따라 다르다. 용량은 예를 들어 약 1×10^8 바이러스 입자 (VP) 내지 약 1×10^{14} VP, 구체적으로 약 5×10^9 VP 내지 약 1×10^{13} VP 및 더욱 구체적으로 약 3×10^9 VP 내지 약 2×10^{12} VP으로 다양할 수 있다. 일 구체예에서, 적어도 하나의 사이토카인을 코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터는 $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{14}$ 바이러스 입자의 양으로 투여된다. 본 발명의 다른 실시예에서, 용량은 약 $5 \times 10^{10} - 5 \times 10^{11}$ VP의 범위에 있다.

[0075] 본 발명의 치료법에 추가하여 임의의 다른 치료법 또는 치료법의 조합이 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 대상체에 대한 동시 또는 순차적 방사선 요법, 화학 요법, 항혈관신생제 또는 표적 요법, 예를 들어 알킬화제, 뉴클레오사이드 유사체, 세포골격 변형제, 세포증식억제제, 모노클로날 항체, 키나제 억제제 또는 기타 항암 약물의 투여 또는 중재(수술 포함)를 추가로 포함한다.

[0076] 본 명세서에 사용된 용어 "치료하다" 또는 "증가하다", 뿐만 아니라 그로부터 유래하는 단어는 반드시 100% 또는 완전한 치료 또는 증가를 의미하는 것은 아니다. 오히려, 당업자가 잠재적인 이점 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 정도는 다양하다.

[0077] **기타 구체예**

[0078] 본 발명은 또한 암 또는 종양, 종기로는 인간 암 또는 종양의 치료에 사용하기 위한 (a) 이식유전자로서 TNF알파 및/또는 IL-2를 인코딩하는 종양용해성 아데노바이러스 벡터 및 (b) 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제에 관한 것이기도 하다.

[0079] 본 명세서 전반에 걸쳐 일 구체예 또는 구체예라 함은 그 구체예와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구체예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 위치에서 "일 구체예에서" 또는 "구체예에서"라 함은 반드시 모두 동일한 실시예를 지칭하는 것은 아니다. 예를 들어, 약 또는 실질적으로와 같은 용어를 사용하여 수치가 언급되는 경우, 정확한 수치도 개시된다.

[0080] 본 명세서에서 동사 "구성하다" 및 "포함하다"는 언급되지 않은 특징의 존재를 배제하지도 요구하지도 않는 열린 제한으로서 사용된다. 종속항에 인용된 특징은 달리 명시적으로 언급되지 않는 한 상호 자유롭게 조합될 수 있다. 또한, 본 명세서 전체에서 "a" 또는 "an", 즉 단수 형태의 사용은 복수를 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0081] 기술이 발전함에 따라 본 발명의 개념이 다양한 방식으로 구현될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명 및 그 구체예는 이하에 기술된 실시예로 한정되지 않으며 청구범위 내에서 다양할 수 있다.

표 1

[0082] 표 1. 첨부된 서열목록에 나열된 서열

SEQ ID NO:	명칭:
1	E1B 19K
2	dE1B 19K
3	E2F

4	D24
5	5/3 노브 변형(knob modification)

- [0083] **실험 섹션**
- [0084] **실시예1**
- [0085] **재료 및 방법**
- [0086] *비뇨기과 종양 샘플의 인간 종양 조직배양*
- [0087] 비뇨기과 샘플을 외과적으로 제거된 신장에서 수집하고 이전에 설명한 방법론에 따라 단일 세포 현탁액으로 개변시켰다(9). 단일-세포 배양물을 세포당 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2의 바이러스 입자(vp) 100개, 항-인간 PD-L1(아테졸리주맙, Roche) 20 µg/mL 또는 두 가지 모두로 삼중 처리하였다. 1, 3, 및 7일 후에 사이토카인 생산과 세포 생존력을 평가하였다.
- [0088] *조직병리학 분석*
- [0089] 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 및 CD8(클론 4B11, CD8-4B11-L-CE-H, Novocastra) 염색을 환자 샘플에서 수행하고 숙련된 병리학자가 분석하였다. PD-L1 발현 평가를 위해 숙련된 병리학자가 PD-L1 VENTANA(SP142) 분석(Roche)을 수행하였다. 쥐 샘플의 조직병리학적 분석은 이전에 설명한 대로 수의병리학자에 의해 수행되었다(10).
- [0090] *세포 생존력 분석*
- [0091] 인간 종양 조직배양물을 7일까지 (전술한 바와 같이) 처리하였다. 세포 생존력은 제조사의 지침에 따라 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, G3582)으로 평가하였다. 모크-처리된 세포의 생존력을 100%로 설정하였다.
- [0092] *생체내 실험*
- [0093] 종양의 치료-유도 변화를 연구하기 위해 2.5×10^5 B16.OVA 흑색종 세포를 4-6주령 암컷 C57BL/6J01aHsd 마우스(Envigo Labs)에 피하 이식하였다. 생착 11일 후, 동물을 여러 그룹으로 무작위화하였다(n=12-14/그룹). 그런 다음 0, 1, 3 및 6일에 이들을 0.1mg의 항-PD-L1(클론 10F.9G2, BE0101, BioXCell)로 전신 치료하고 1×10^8 vp(동일한 양의 Ad5-CMV-mIL2 및 Ad5-CMV-mTNFa 바이러스 포함, 마우스에서 비-복제)를 종양 내 주사하였다. 바이러스를 투여받지 않은 그룹에는 PBS를 종양내 주사하였다. 제7일에, 그룹당 6마리의 동물을 희생시키고 종양을 수집하여 면역 세포 표현형 및 사이토카인 특징을 조사하였다. 나머지 동물(n=6-8/그룹)은 최대 종양 크기(18mm)에 도달하거나 완전한 종양 퇴행에 도달할 때까지 90일 OS 연구를 계속하였으며 이 동안 3일마다 한 번씩 치료를 계속하였다.
- [0094] *세포주 및 바이러스*
- [0095] 마우스 흑색종 세포주인 B16.OVA를 권장 조건에서 배양하였다(8). 사이토카인-무장된 쥐의 아테노바이러스(Ad5-CMV-mIL2 및 Ad5-CMV-mTNFa)의 작제 및 생산은 이전에 설명되었으며(12) 생체내 실험에 사용되었다. 인간 종양 조직 배양 실험을 위해 종양용해성 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2(TILT-123으로 알려짐)(11)가 사용되었다.
- [0096] *사이토카인 분석*
- [0097] 종양 조직배양물로부터 유래된 세포 배양 배지 상청액을 1, 3 및 7일 후에 수집하였다. 사이토카인 분석을 위한 샘플 크기는 종양 샘플의 가용성에 따라 제한되었다(모크; n=4, aPD-L1; n=6, 바이러스; n=3, 바이러스+aPD-L1(S); n= 2, 바이러스+aPD-L1(PB), n=0). 샘플의 사이토카인 수준(IFNg, TNFa, IL-2, IFNb, 그랜자임 B, CXCL10, IL-6, 아르기나제 및 TGF-b1)은 맞춤형 Legendplex 패널(Biolegend) 및 Free Active/Total TGF-b1 검출 키트(740488, 740486 및 740487, Biolegend)로 평가되었다. Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 사이토카인 키트(560485, BD)를 사용하여 이전에 설명한 대로 쥐 종양 샘플을 연구하였다(8). 두 사이토카인 비드 어레이 모두 Accuri®(BD)로 분석되었다. 얻어진 사이토카인 값은 샘플의 총 단백질 농도로 정규화되었다.
- [0098] *PD-L1/2 발현 분석*
- [0099] PD-L1 발현 역학 연구서, PD-L1 발현에 대한 공지된 유도제인 1000U/mL의 뮤린 IFNg(315-05, Peprotech)로

B16.OVA 세포를 처리하였다. 모크 대조군 세포는 처리하지 않은 채로 두었다. 배양 24시간 후, 세포의 일부를 PD-L1 발현에 대해 확인하고 나머지를 PBS로 2회 세척하고 이중 12-웰 플레이트에 통과시켰다. 이전에 IFN γ 로 처리한 세포의 일부는 처리를 중단하고("철회" 그룹) 및 다른 부분은 치료를 계속하였다("IFN γ 유지" 그룹). 플레이팅 한지 24시간 및 72시간 후에 플레이트들을 분석하였다.

[0100] 마찬가지로, B16.OVA 세포의 PD-L1 및 PD-L2 발현에 대한 IFN γ (1000U/mL), TNF α (1000U/mL 및 10000U/mL), IL-2 (1000U/mL 및 10000U/mL), Ad5-luc (1 및 100vp/세포), Ad5-CMV-mIL2 (1 및 100 vp/세포), Ad5-CMV-mTNF α (1 및 100vp/세포) 또는 다른 조합들의 효과에 대해 분석하였다. 이러한 발현 수준은 24시간 및 72시간 시점에서 연구되었다.

[0101] 유세포 분석

[0102] 세포 배양물 및 종양 샘플을 다른 곳에서 설명한 대로 처리하고 표지하였다(8). 제조업체의 지침에 따라 항-CD4-FITC (클론 GK1.5, 100406, Biolegend), 항-CD3e-PE (클론 145-2C11, 12-0031-82, eBioscience), 항-CD69-PE-Dazzle (클론 H1.2F3, 104536, Biolegend), 항-CD8-PE-Cy5 (클론 53.6-7, 100710, Biolegend), 항-PD-1-PE-Cy-7 (클론 29F.1A12, 135216, Biolegend), 항-CD45-FITC (클론 30-F11, 103107, Biolegend), 항-PD-L2-PE (클론 MIH5, 558091, BD), 항-Gr-1-PE-Dazzle (RB6-8C5, 108452, Biolegend), 항-CD11b-PE-Cy5 (M1/70, 101210, Biolegend), 항-PD-L1-PE-Cy7 (TY-25, 107214, Biolegend)을 유세포 분석에 사용하였다. 분석은 s SH800Z 세포측정기(SONY)로 수행되었다.

[0103] 통계 분석

[0104] SPSS Statistics 25(IBM)를 사용하여 로그 변환된 종양 부피의 혼합 모델 분석에 의해 종양 성장 진화를 연구하였다. GraphPad 소프트웨어를 사용하여 데이터를 표시하고 OS(Kaplan-Meier, Log rank Mantel-Cox 검정), 위험 비율(HR) 및 95% 신뢰 구간(CI)을 분석하였다. 또한 유세포분석 또는 사이토카인 분석(Welch 보정을 사용한 독립표본 t-검정), 변수 간의 상관 관계 분석(Pearson's r), 시간 경과에 따른 변수의 진화(two-way ANOVA) 및 선형 회귀 사이에 있어 그룹간 차이를 GraphPad를 사용하여 분석하였다. 부분 종양 부피(FTV) 방법을 사용하여 시너지를 계산하였다. P 값 < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0105] **결과**

[0106] 환자 유래 비노기과 종양 조직배양물에서 종양용해성 아테노바이러스 매개된 종양 세포 용해

[0107] 종양용해성 바이러스 요법이 고형 종양의 체크포인트 억제제에 대한 반응을 가능하게 하는 방법을 이해하기 위해 병리학 분석 후 외과적으로 제거된 조직을 연구하였다. 이들 종양은 헤마톡실린 및 에오신 염색으로부터 평가된 바와 같이 병리학적 등급 3(환자 샘플 2) 또는 4(환자 샘플 1 및 3)이었다(도 1A). 바이러스로 전달된 화물의 주요 효과 중 하나가 CD8+ T 세포에 영향을 미치기 때문에 이들의 존재 여부도 평가되었으며(도 1B), 두 개의 샘플(환자 샘플 1 및 2)은 면역-배제("콜드") 표현형을, 하나의 샘플(환자 샘플 3)은 면역-염증("핫") 표현형을 나타낸다. 또한, 항-PD-L1 표적화와 관련하여 PD-L1 양성을 결정하는 분석을 수행하였다. 이것은 모든 샘플의 면역 세포에서 5% 미만의 PD-L1 발현을 보였는데, 이에 따라 이들은 검정 지침에 따라 음성으로 되었다(도 1C).

[0108] 샘플 처리 후, 치료가 종양 조직 배양의 생존에 어떻게 영향을 미치는지 측정하기 위해 생존력 분석이 수행되었다(도 1D). 제7일까지, 모크 또는 항-PD-L1 단독요법과 비교할 때 3개 샘플 모두에서 종양 생존력의 통계적으로 유의한 감소가 바이러스 요법에 의해 달성되었다(p < 0.01). 이 때 바이러스 처리군의 생존력은 모크에 비해 62%(95%CI=[54.19; 69.89]), 항-PD-L1으로 처리된 샘플에 비해 56%(95%CI=[38.49; 73.39]) 떨어졌다. 바이러스와 항-PD-L1을 함께 투여했을 때 이미 제1일에 두 샘플에서 세포 생존력은 크게 감소하였다.

[0109] 종양용해성 바이러스 요법은 인간 비노기과 종양 조직 배양에서 광범위한 면역 자극 반응을 유발한다

[0110] 본 발명자들은 또한 처리가 사이토카인 수준에 미치는 영향에 대해 조직배양을 연구하였다(도 2). 실제 환자 종양에서 일반적으로 나타나는 이질성 때문에 샘플 간의 사이토카인 수준이 다양하였다. 그럼에도 불구하고, 바이러스 요법을 받은 그룹은 면역자극성 사이토카인(IFN γ , TNF α , IL-2, 그랜자임 B 및 CXCL10)의 발현 증가에 대한 분명한 경향을 나타내었다(도 2A-F). IFN γ 와 관련하여 "모크(Mock)"(p= 0.0182) 및 "항-PD-L1" 단독(p= 0.0181)에 비해 Ad5/3-E2F-d24-hTNF α -IRES-hIL2를 항-PD-L1과 함께 투여했을 때 생산 증가가 달성되었다. "바이러스" 단독 그룹도 비슷한 경향을 보였다(p=0.068). TNF α 및 IL-2 생산도 바이러스 처리군에서 증가했으며 샘플을 개별적으로 분석했을 때 그 차이가 상당하였다. 반면에 IFN β 생산은 이중 처리로 3일째 생산의 피크를 제

의하고는 다른 면역자극성 사이토카인만큼 명확하게 영향을 받지 않았다.

- [0111] 그랜자임 B와 CXCL10은 바이러스 처리군에서 더 높은 발현 값을 보였다. 이들 두 사이토카인의 발현은 IFN γ 발현과 상관관계가 있었다(IFN γ /그랜자임 B: $r = 0.629$ [0.376; 0.792], $p < 0.001$. IFN γ /CXCL10: $r = 0.494$ [0.198; 0.708], $p = 0.002$). CXCL10 발현은 "모크"($p = 0.003$) 및 "항-PD-L1"($p = 0.002$)과 비교할 때 "바이러스" 그룹에서 유의하게 증가하였다. aPD-L1 단독 치료는 "모크" 그룹과 비교하여 면역자극성 사이토카인의 발현에 영향을 미치지 않았다.
- [0112] 면역억제 매개체(IL-6, TGF- β 및 아르기나제)와 관련하여 치료 효과는 자극 효과만큼 명확하지 않다(도 2A-F). 그러나 3개 샘플 중 2개에서 "모크" 또는 "바이러스"와 비교할 때 "항-PD-L1" 그룹 및 "바이러스 + 항-PD-L1" 그룹에서 IL-6이 통계적으로 유의하게 감소하였다. TGF- β 의 경우 "바이러스 + 항-PD-L1" 그룹의 모든 샘플에서 상당한 감소가 달성된 반면, "항-PD-L1" 그룹의 경우 이는 하나의 샘플에서만 나타났다. 아르기나제는 사이토카인이 아니라 면역 활동에 영향을 미치는 효소라는 사실에도 불구하고 패널에 포함되었다. 이 효소의 경우, 한 샘플은 "모크" 또는 "바이러스"와 비교할 때 "항-PD-L1" 그룹 및 "바이러스 + 항-PD-L1"에서 감소된 발현을 나타내었다.
- [0113] 치료-유도된 면역자극성 사이토카인 생산은 고휘도 종양 샘플의 생존력 감소와 관련이 있다.
- [0114] 제7일에 종양 조직배양에서 사이토카인과 아르기나제의 차등 발현을 비교하기 위해 "모크"와 비교한 평균 배수 변화를 나란히 표시하였다(도 3A 및 B). 분석된 6가지 자극성 사이토카인 중에서, TNF α 와 IL-2 발현의 증가는 적어도 부분적으로는 이식유전자의 바이러스 발현과 관련된 가능성이 있으며 내인성 생성과 구별될 수 없다. 참고로, TNF α 와 발현은 1000배 이상 증가했고 IL-2는 약 100배 증가하였다. IFN γ 와 관련하여 바이러스 처리된 그룹은 모크 조건과 비교하여 100배 이상 증가하였다. 흥미롭게도 바이러스 치료에 항-PD-L1을 추가하면 바이러스 단독에 비해 10배 더 높은 발현이 나타난다("모크"에서보다 1000배 높음). 또한, 바이러스 처리는 CXCL10 수준의 평균 25배 증가를 유도하였다.
- [0115] 처리는 IL-6, TGF- β 및 아르기나제의 발현 수준에 덜 과감한 영향을 미쳤다(도 3B). 항-PD-L1 요법은 IL-6과 TGF- β 의 양을 감소시키는 것으로 보인 반면, 아르기나제 발현은 바이러스와 체크포인트 억제제를 함께 투여했을 때만 감소했다. 내인적으로 생성된 면역억제제 및 면역자극제에 대한 치료의 효과를 비교하기 위해, IL-6, TGF- β 및 아르기나제의 평균값을 IFN γ , IFN β , 그랜자임 B 및 CXCL10의 평균값에 대해 플롯팅하였다(도 3C). 두 치료법을 함께 사용하면 체크포인트 억제제에 의해 전달되는 면역 억제와 바이러스 요법을 통한 면역 자극이 감소한다. 면역자극성 사이토카인의 생성과 종양 조직배양 세포 생존력 사이에는 반비례하는 상관관계가 관찰되었다($r = -0.716$ [-0.914; -0.241], $p = 0.009$). 세포 생존력과 면역억제성 사이토카인 사이에는 상관관계가 발견되지 않았다.
- [0116] TNF α 와 IL-2 발현 아테노바이러스는 생체내 항-PD-L1 요법을 가능하게 하여 100% 완전한 반응 비율을 제공한다
- [0117] 이어서, 본 발명자들은 바이러스에 의해 촉발된 면역 자극 및 항-PD-L1에 의해 달성된 억제 감소가 생체 내에서 재현 가능한지 평가하는 것을 목표로 하였다. 또한, 본 발명자들은 항종양 효능 태양에서 종양 면역 리모델링의 영향을 연구하고자 하였다(도 4A). 치료들 간의 상호 작용을 이해하기 위해 두 그룹을 바이러스와 체크포인트 억제제로 치료하되 투여 방식을 달리하여 치료하였다; 즉, 한 그룹은 두 가지 치료를 동시에 받은 반면(S) 다른 그룹은 "프라이밍 앤 부스트" 방식(PB)으로 두 차례의 바이러스 치료 후에만 체크포인트 억제제를 받았다.
- [0118] 바이러스와 항-PD-L1을 함께 투여받은 두 그룹은 생존 면에서 더 나은 결과를 보였다(도 4B). 특히 항-PD-L1(복강내)과 바이러스(종양내)를 동시에 투여했을 때 완전반응률 100%를 달성했다. "바이러스 + aPD-L1(s)" 그룹은 다른 어떤 그룹보다도 유의하게 더 긴 생존 기간을 보였다("모크"에 대해 $p < 0.001$, "aPD-L1"에 대해 $p = 0.007$, "바이러스"에 대해 $p = 0.005$ 및 "바이러스 + aPD-L1 (PB)"에 대해 $p = 0.025$). "바이러스 + aPD-L1(s)" 전략의 위험 비율은 연구된 다른 어떤 그룹보다도 우수하였다(HR = 0.033 [0.006; 0.181] 대 "모크", HR = 0.057 [0.007; 0.451] 대 "aPD-L1", "바이러스"에 대한 HR = 0.067 [0.011; 0.415] 및 "바이러스 + aPD-L1(PB)"에 대한 HR = 0.104 [0.014; 0.752]).
- [0119] "프라이밍 및 부스트" 접근 방식은 모크에 비해 훨씬 더 긴 전체 생존(OS)($p < 0.001$)과 더 낮은 위험 비율(HR)(0.059 [0.012; 0.290])을 가져왔다. 바이러스 요법 또는 체크포인트 억제제 단독요법은 약 33%의 완전 반응을 보였다. 바이러스 요법 단독의 OS는 모크($p = 0.016$)보다 통계적으로 개선되었으며 HR은 더 낮았다(0.180[0.044; 0.727]). 개별 종양 부피 그래프도 표시했고(도 4C) 일찍 이종 요법 후 5일째에 이미 상승 효과

가 나타났다. 치료가 시작된 후 제90일에 완전한 반응을 겪은 일부 동물은 주변 영역에서 흉터(Scar) 조직을 가졌다. 동물들을 희생시킨 후 병리학자가 흉터를 수집 및 분석했는데, 병리학자는 멜라노파지, 형질 세포 및 림프구가 존재하지만 악성 세포는 없다고 보고하였다.

[0120] 논의

[0121] 이 연구에서 본 발명자들은 TNF알파와 IL-2를 코딩하는 바이러스 플랫폼이 면역 종양 미세환경에 상당한 영향을 미치고 항-PD-L1 체크포인트 억제의 맥락에서 더 높은 반응을 이끌어내는 방법을 보여준다. 인간의 비뇨기과 임상 샘플 조직배양(신장 세포암 및 요로상피암) 및 생체내에서 유사한 결과가 관찰되어 종양 성장 조절 및 생존이 개선되었다. 두 단독 요법 모두 긍정적인 효과를 나타냈다는 점은 주목할 만하다. 이들이 함께 사용되었을 때의 시너지 효과는 종양 조절의 맥락에서 명백하였다.

[0122] 환자에 있어서, 완전한 반응은 매우 드물고 부분적인 반응이 더 일반적이지만 함께 조합되는 경우에도, CPI의 경우의 ORR은 대부분의 고품 종양 유형에서 단독요법 후 10-40%이다. 그러나 TIL 존재(1, 2)와 상향조절된 염증성 사이토카인 시그니처(3-5)는 가장 강력한 예측 인자 중 하나이다(6). 이와 관련하여, 연구된 바이러스 플랫폼이 "콜드" 종양을 "핫" 상태로 만들어 효과적인 CPI 요법을 능하게 하고 반응률과 생존율을 높일 수 있다는 것이 잠재적으로 중요하다.

[0123] 실시예2

[0124] 재료 및 방법

[0125] 생체내 실험

[0126] 생체내(in vivo) 실험은 개시 시점에 4-6주령인 C57BL/601aHsd 암컷 마우스에서 수행되었다(Envigo Labs, Huntingdon, UK에서 구입). 2.5×10^5 B16.OVA 흑색종 세포주를 왼쪽 아래 옆구리에 피하 이식한 다음, 더 긴 쪽 직경이 적어도 4 mm로 축진되는 종양의 존재 여부를 확인하였다. 최소 종양 크기 기준이 충족되면 동물을 다른 치료 그룹으로 무작위 배정하였다. 종양 부피를 매일 측정하고 전반적인 건강을 평가하였다. 열린 상처(즉, 주사 부위의 궤양)가 있는 동물을 즉시 안락사시켰다. 최대 허용 종양 부피는 18 mm였으며, 그 후 동물은 즉시 안락사되었다. 관찰 가능한 종양이 없는 동물은 종양 재발을 보장하기 위해 첫 번째 치료를 받은 후 적어도 90 일 동안 살려두었다.

[0127] 항체 및 바이러스

[0128] 각 특정 실험에 대한 처리 다이어그램이 제공된다. 항-PD-1 항체(aPD-1) 처리는 PBS에 희석된 0.1mg(클론 10F.9G2, BE0101, BioXCell, Lebanon, New Hampshire, USA)으로 투여된 전신(복강내) 전달된 항체로 구성되었다. 바이러스 요법 치료는 1×10^8 바이러스 입자(마우스에서 복제되지 않는, 동일한 양의 Ad5-CMV-mIL2 및 Ad5-CMV-mTNFα 바이러스 포함)로 구성되었다.

[0129] 전사체 분석

[0130] 생체내 실험에서 채취된 종양을 RNeasy(R0901, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)에서 안정화시키고 -20°C에서 보관하였다. RNeasy(74104, Qiagen, Hilden, Germany) 키트 제조업체 가이드에 따라 분광 광도계(Biophotometer, Eppendorf, Wesbury, New York, USA)로 측정된 후 해당 종양 샘플에서 RNA를 정제하고 농도를 조정하였다. RNA 샘플의 시퀀싱은 BGI Tech Solutions(Tai Po, Hong Kong)에 아웃소싱되었으며 이 업체에서 단일 블라인드 방식으로 데이터 정리 및 정량 분석도 수행하였다.

[0131] CyTOF

[0132] 생체내 실험에서 채취한 종양을 단일 세포 현탁액으로 처리하고 질량 세포 분석을 위해 염색될 때까지 동결 배지(10% 디메틸 설폭사이드 포함)에 보관하였다.

[0133] 통계 분석

[0134] GraphPad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA) 분석 도구를 사용하여 Kaplan-Meier 생존 곡선 및 Mann-Whitney 검정에 대한 로그 순위 Mantel-Cox 검정과 데이터의 그래픽 표현을 생성하는 평균을 내었다. SPSS Statistics 25(IBM, Armonk, New York, USA)는 앞에서 설명한 종양 직경의 일일 측정값을 기반으로 하는 종양 성장 진화 분석에 사용된 소프트웨어였다⁸. 통계적 유의성은 0.05 미만의 p-값에 대해 주장되었다.

- [0135] **결과**
- [0136] *B16.OVA 종양 모델은 항-PD-1에 반응하지만 실패하여 장기간 반응을 얻지 못한다.*
- [0137] aPD-1에 대한 내성 메커니즘을 연구하기 위해, 억제 항체⁸에 대해 제한된 반응을 나타내는 모델인 B16.OVA를 선택하였다. 약물에 대한 내성의 내재적 원인이 있는지 또는 약물이 제공하는 생존 압력 이후에 종양이 적응하는지 이해하기 위해 종양 성장 기준을 채택하였다(도 6). 그런 의미에서, 처음에 종양의 최대 직경이 적어도 4 mm에 도달한 동물들을 "모크" 그룹 또는 "aPD-1" 그룹에 무작위로 할당하였다. 그 후, "aPD-1" 그룹의 동물은 3일에 한 번(총 5회 이상) 전신적으로 PD-1 억제 항체 치료를 받았다. 모든 동물의 종양을, 종양의 최대 직경이 적어도 10 mm가 되는 순간까지 매일 측정하였다. 해당 역치를 초과하는 종양이 있는 동물을 안락사시키고 추가 분석을 위해 종양을 수집하였다.
- [0138] 치료 시작 시점과 안락사 시점의 종양 크기는 동일했지만 두 번째 임계값에 도달하는 시간은 유의하게 달랐다($p=0.0008$)(도 6B). 치료는 종양 성장 조절에서 유의한($p=0.0002$) 이점이 있었고 항-PD-1로 치료한 동물 10마리 중 1마리는 제30일까지 명백한 완전한 반응을 나타내었다. 치료가 종양 진행을 늦추더라도, 종양의 90%는 결국 재발하여 두 번째 임계값에 도달하였다(도 6C).
- [0139] 이러한 결과는 PD-1 차단 후 항종양 효능의 존재 뿐만 아니라 장기간 반응의 부족을 입증한다.
- [0140] *항-PD-1에 대한 반응이 중단된 종양은 치료를 받지 않은(나이프) 종양과는 상이한 유전자 발현 프로파일을 보여준다*
- [0141] 도 6에 설명된 대로 종양을 수집한 후 처리하고 RNA를 추출하였다. 총 RNA 시퀀싱을 수행하고 각 샘플의 유전자 발현 수준을 정량화하였다. 해당 분석을 위해 "모크(모의)" 그룹에 속하는 4개의 샘플과 "aPD-1" 그룹의 6개의 샘플을 무작위로 선택하였다. 데이터 소거 후 샘플을 히트맵(도 7A)에 배열하고 샘플 간의 유사성을 기반으로 클러스터링하였다. 이 접근 방식은 합리적인 정확도로 두 그룹의 샘플을 그룹화하였다. 그룹 간의 발현 프로파일 비교는 357개의 유전자를 차별적으로 상향조절 또는 하향조절하였다(도 7B). 이들 유전자 중 19개는 현저한 면역성을 나타내었다(도 7C).
- [0142] 기능이 확립된 하향조절된 면역 관련 유전자들 중 75%가 T 세포에 연결될 수 있다. 이러한 유전자에는 T 세포 전구체(GZMG 및 GMZF), T 세포 활성 조절자(TNFSF18[일명 GITRL] 및 EAR2) 및 다른 세포 유형(KLRC2)과의 상호작용과 관련된 기타 T 세포 단백질 및 보체(CD46)와 같은 면역 성분이 포함된다. T 세포 외에, 다른 림프구 집단은 NK 세포 또는 B 세포와 같은 하향 조절에 의해 덜 영향을 받을 수 있다.
- [0143] 상향조절된 유전자와 관련하여, B 세포 구획은 더 많은 수의 유전자(CD19, CD20, CR2, MMP8 및 LY6D)를 가진 집단이고 그 다음으로 호중구(NGP, MMP8 및 CXCL3)가 있다. 보체-관련 유전자는 상향조절된 유전자(C1S2 및 CR2)에서도 눈에 띈다. aPD-1 불응성 종양에서 하향조절되는 많은 수의 T-세포 관련 유전자와 대조적으로, 이 세포 집단과 명백하게 연관된 상향조절된 유일한 유전자는 FOXP3이다.
- [0144] aPD-1 불응성 종양에서 차등적으로 발현되는 유전자의 전체 목록 중에서, T-세포 활성의 억제를 나타내는 관찰 가능한 경향이 있다. 다른 세포 집단도 영향을 받지만 결과는 명확하지 않는다.
- [0145] *바이러스 요법을 가능하게 하는 T-세포의 사용은 항-PD-1 불응성 종양이 항-PD-1에 반응하도록 만든다*
- [0146] aPD-1 불응성 종양에 존재하는 T-세포 하향조절에 태클을 거는 것이 치료에 대한 더 나은 반응을 초래할 수 있는지 연구하기 위해 항종양 T-세포 활성(TNF알파 및 IL-2)을 표적으로 하는 2개의 사이토카인을 코딩하는 아데노바이러스. 도 6A에 기재된 바와 유사하게, 피하 종양을 보유하는 동물들을, 약물에 대해 불응성인 것으로 간주될 때까지 aPD-1("초기 치료")로 치료하였다. 불응 상태에 도달한 후, 동물들을, 동물이 aPD-1을 계속 투여받는 "aPD-1" 그룹, 동물이 바이러스 요법만 받은 "바이러스" 그룹 또는 동물이 aPD-1 및 추가로 바이러스 요법을 받는 "aPD-1 + 바이러스" 그룹("레스큐 치료")으로 무작위 배정하였다. 치료는 도 8A에 기술된 바와 같이 윤리적으로 허용되는 최대 종양 부피(18mm) 또는 명백한 완전한 반응(해당 부위에 시각적으로 눈에 띄는 병변 없음)이 될 때까지 계속되었다.
- [0147] 난치성 역치에 도달한 후 종양 특이적 생존의 연구 시(도 8B), T-세포 활성화 바이러스 요법이 어떻게 생존을 유의하게 증가시키고($p=0.0009$), 심지어 동물의 50%에 대해 완전한 반응을 유발할 수 있는지 보여주었다. 바이러스 요법을 단독요법으로서의 PD-1과 비교했을 때, 생존율의 유의한 향상은 없었으나, 앞서 언급한 바이러스를 사용하여 일부 완전한 반응이 달성되었다. 개별 종양 성장 곡선의 분석에서 유사한 결론을 도출할 수 있다(도

8C).

- [0148] 또한, 생존 및 종양 성장 데이터는 모두 이 실험에서와 같이 이전에 가정된 종양의 aPD-1 불응성 상태에 대한 검증 역할을 한다. "aPD-1" 그룹의 동물은 불응성 역치에 도달한 후에도 추가 혜택 없이 항체를 계속 투여받았다.
- [0149] *바이러스 요법으로 치료된 aPD-1 불응성 종양 샘플을 이 요법의 면역 세포 영향을 이해하기 위해 연구하였다*
- [0150] 종양의 면역 표현형에 대한 연구 대상 샘플을 생성하기 위해 도 8A와 유사한 실험 설계를 따랐지만, 단, 이 경우 불응 상태를 얻은 후 제공된 "레스큐 치료"는 7일 동안 진행된다(도 9A). 그 후, 종양을 수집하고 분석을 위해 처리하였다. "레스큐 치료"를 받은 종양이 유사하다더라도, 제7일까지 바이러스 요법을 받은 그룹과 aPD-1 치료를 받은 그룹의 동물을 비교할 때 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 감소된 종양 부피가 있었다(도 9B).
- [0151] 제7일에 수집된 종양을 사용하여 aPD-1에 대한 다시 나타나는 반응이 종양 미세환경에 존재하는 면역 구획의 리모델링과 관련이 있는지 조사하였다. 그런 의미에서, 28개의 세포 마커를 사용하여 샘플에서 질량 세포 분석을 실행하였다. 이어서, 세포의 CD45+ 분획에서 FlowSOM 알고리즘을 사용하여 64개의 세포 클러스터를 동정하였다. 그런 다음 해당 클러스터들을 그들이 나타내는 세포 유형 및 표현형의 추가 식별을 위해 히트맵(도 9C)에 표시하였다.
- [0152] *항-PD-1과 조합된 바이러스 요법은 항종양 반응에 유리하게 항-PD-1 불응성 종양의 면역 미세환경을 재구성한다*
- [0153] 질량 세포 계측법으로 생성된 세포 클러스터를 개별적으로 연구하여 가장 가능성 있는 세포 유형 및 표현형을 결정하였다. 특정 세포 집단과 가장 명확한 연관성이 있는 클러스터들을 도 10에 나타내었다.
- [0154] 64개의 모든 세포 클러스터 중에서 29개는 CD45, CD3e 및 TCRb 공동 발현을 기반으로 하는 T-세포 표현형을 가졌다. 이러한 T-세포 클러스터 중 22개는 CD8+(CD4-)이었고 그 중 4개는 CD4+(CD8-)였다. 추가로, 하나의 클러스터(4번)는 CD3e+ TCRb+ CD8+ CD4+이었고 다른 두 개(클러스터 42 및 43)는 CD3e+ TCRb+ CD8-CD4-였다. 유의미한 변화는 CD8 T 세포 클러스터에서만 관찰되었고 CD4, 이중 양성 또는 이중 음성 T 세포 클러스터에서는 관찰되지 않았다(도 10A-H). 전반적으로, 14개의 서로 다른 CD8 T 세포 서브세트들은 aPD-1과 바이러스 요법을 둘 다 받을 때 종양에서 유의하게 증가한다. 이중 요법 후 염증 부위로의 이동과 관련된 표현형을 갖는 T 세포(CCR2 마커 기반)가 얼마나 더 많이 나타나는지 관찰할 수 있다. T 세포의 더 많은 트래피킹뿐만 아니라 광범위한 T 세포 존재가 증가하며 여기에는 이펙터/메모리 증식 CD8 T 세포(CD44 및 Ki-67 마커 기반), 활성화 및 증식 세포(Ki-67 및 TIM-3 마커 기반) 뿐만 아니라 나이브 T-세포(CD44 마커 기반)도 포함된다. PD-1과 바이러스 요법을 동시에 사용하면 종양에서 지속적으로 개선된 CD8 T 세포 분포를 나타내지만, 바이러스 요법만으로는 동일한 정도의 효능을 제공하지 않는다.
- [0155] 관련 골수 집단과 관련하여 바이러스 요법이 치료에 추가되면 종양에서 M2 대식세포와 MDSC가 감소한다. 언급된 조합에 대해 M1 대식세포 또는 수지상 세포에서는 유의미한 변화가 관찰되지 않았지만, 단일 요법으로서 바이러스 요법과 aPD-1을 비교시 수지상 세포가 감소한다.
- [0156] **논의**
- [0157] aPD-1 불응성 종양 중 어느 것도 단독 요법으로서 aPD-1에 대한 반응의 징후를 나타내지 않았지만, TNF알파 및 IL-2(aPD-1에 추가하여)를 코딩하는 바이러스를 사용한 바이러스 요법의 포함은 명백한 종양 성장 제어를 촉발하고 심지어 완전한 반응을 나타냈다. 이들 종양을 거부하려는 챌린지가 불응성 상태에서 나타날 뿐만 아니라 종양 부피가 초기에 체크포인트 억제제로 치료된 종양보다 약 8배 더 크기 때문에, 이러한 완전한 반응은 놀라운 것이다. 더 높은 초기 종양 부피는 더 강한 면역 및 대사 억제 상태를 포함한다. 흥미롭게도, 종양 샘플에 대한 생물학적 분석과 함께 생존에 대한 결과는, aPD-1 내성을 우회하여 항종양 반응을 구동시키기 위해 상이한 작용 메커니즘을 이용하는 것 보다, 바이러스 요법이 종양의 억제 상태에 태클을 걸어 이들을 PD-1 차단에 취약하게 만들 수 있음을 가리킨다.
- [0158] 실시예3
- [0159] *생체내 실험*
- [0160] 쥐의 두경부암 모델에서 바이러스 요법 및 체크포인트 억제의 항종양 효능을 연구하기 위해 1×10^5 MOC2 쥐 구강암 세포를 4-6주령 암컷 C57BL/6J01aHsd 마우스(Envigo Labs)에 피하 이식하였다. 생착 20일 후, 동물을 여러 그룹으로 무작위화하였다($n=7-8$ /그룹). 그런 다음 동물들에게 3일마다(제0일부터 시작하여) 항-PD-L1 0.1mg(클

론 10F.9G2, BE0101, BioXCell)의 전신 치료 및 제0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 및 18일에 1×10^8 바이러스 입자(vp)의 종양내 주사(동일한 양의 Ad5-CMV-mIL2 및 Ad5-CMV-mTNFa 바이러스, 마우스에서 비-복제성임)를 실시하였다. 바이러스를 받지 않은 그룹에 대해 PBS를 종양내 주사하였다. 종양 성장은 제30일까지 이어졌다. 동물의 생존은 최대 종양 크기(18mm)에 도달하거나 완전한 종양 퇴행에 도달할 때까지 항-PD-L1 처리가 3일마다 1회 계속되는 90일까지 이어졌다.

[0161] 세포주 및 바이러스

[0162] 마우스 구강 편평 세포 암종 세포주인 MOC2를 권장 조건에서 배양하였다. 사이토카인-무장 무린 아데노바이러스(Ad5-CMV-mIL2 및 Ad5-CMV-mTNFa)의 작제 및 생산은 이전에 설명되었으며(12) 생체내 실험에 사용되었다.

[0163] 통계 분석

[0164] GraphPad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA) 분석 도구를 이용하여 Kaplan-Meier 생존 곡선 및 Mann-Whitney 검정에 대한 로그 순위 Mantel-Cox 검정 및 데이터의 그래픽 표현을 생성하는 평균을 내었다. SPSS Statistics 25(IBM, Armonk, New York, USA)는 앞에서 설명한 종양 직경의 일일 측정값을 기반으로 한 종양 성장 진화 분석에 사용된 소프트웨어이다(8). 통계적 유의성은 0.05 미만의 p-값에 대해 주장되었다.

[0165] **결과**

[0166] 바이러스 요법 및 항-PD-L1 요법은 쥐의 두경부암 모델에서 최고의 항종양 효과와 생존을 제공한다

[0167] TNFa 및 IL-2 코딩 아데노바이러스 및 항-PD-L1의 치료 시너지 효과는 흑색종에만 국한되지 않는다. 실제로, 본 발명자들은 30일 동안 쥐 구강암 모델에서 이 조합의 항종양 효과를 추적하였다. 예상대로 개별 종양 성장 곡선은 PBS의 종양 내 주사가 종양 부피에 거의 영향을 미치지 않음을 보여주었다(도 11A). 항-PD-L1(aPD-L1) 또는 Ad5-CMV-mIL2 + Ad5-CMV-mTNFa(바이러스)의 투여는 종양 보유 마우스에서 일부 추가 치료 이점을 제공했으며, 흥미롭게도 aPD-L1은 시간이 지남에 따라 더 장기간 동안 종양 부피 제어를 제공한다(도 11A). 참고로, 바이러스와 aPD-L1은 테스트된 다른 치료법보다 더 적은 재발과 더 긴 종양 성장 조절을 가능하게 하였다(도 11A). 이것은 분명히 조합 요법으로 하여금 대조군 또는 단일-제제 요법보다 훨씬 더 우수한 항종양 효과를 제공할 수 있게 하였다(도 11B). 바이러스 및 항-PD-L1을 받은 마우스가 PBS 또는 단일-제제 처리된 마우스보다 가장 오래 생존했고 더 나은 생존을 보였다는 것이 중요하다(도 11C).

[0168] **논의**

[0169] 전반적으로, 이러한 결과는 흑색종을 제외한 다른 생체내 종양 모델에서, 놀랍고도 강력한 치료 활성을 제공하는, TNF α 및 IL-2-코딩 아데노바이러스 및 항-PD-L1 억제제의 조합의 시너지를 보여준다.

[0170] 실시예 4

[0171] **재료 및 방법**

[0172] 난소암 샘플의 인간 종양 조직배양

[0173] 난소암 샘플은 수술을 받는 환자로부터 수집되어 이전에 설명된 방법(9)에 따라 단일 세포 현탁액으로 전환되었으며 10% DMSO를 포함하는 동결 배지에서 최대 -140°C까지 동결되었다. 해동 후, 3.5×10^5 세포를 96웰 플레이트에 접종하고 세포당 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2의 100 바이러스 입자(vp), 20 μg/mL의 항-인간 PD-L1(Avelumab, Evidentic) 또는 두 가지 모두로 4중으로 처리하였다.

[0174] 세포 생존력 분석

[0175] 인간 종양 조직배양물을 최대 7일 동안 처리하였다(앞서 기술한 바와 같이). 세포 생존력은 제조사의 지시에 따라 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, G3582)를 사용하여 제1일, 5일 및 7일에 평가되었다. 모크-처리된 세포의 생존력은 100%로 설정되었다.

[0176] 바이러스

[0177] 인간 종양 조직 배양 실험을 위해 종양용해성 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2(TILT-123으로 알려짐)(11)가 사용되었다.

[0178] 조직병리학

- [0179] 절제 후 환자 유래 난소암 조직을 조직 병리학 분석을 위해 처리하였다. 종양 조직학은 부인과 병리학자에 의해 확인되었다.
- [0180] 통계 분석
- [0181] GraphPad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA) 분석 도구를 사용하여 Welch 보정을 사용하여 독립표본 t-검정과 데이터의 그래픽 표현을 생성하는 수단을 수행하였다. 통계적 유의성은 0.05 미만의 p-값에 대해 주장되었다.
- [0182] 결과
- [0183] *TILT-123과 항-PD-L1 요법을 함께 사용하면 환자-유래 난소암 종양 조직 배양물에서 빠르고 강력한 종양 세포 사멸이 가능하다*
- [0184] 본 발명자들은 또한 환자 유래 난소암 샘플에서 확립된 종양 조직 배양물에서 Ad5/3-E2F-D24-TNFa-IRES-IL-2(TILT-123) 및 항-PD-L1(aPD-L1)을 사용한 조합 치료를 테스트하였다. 이러한 실험을 통해 본 발명자들은 인간 암의 조직학적 이질성을 고려하는 한편 임상적으로 관련된 종양 모델에서 조합 전략을 검증할 수 있었다. 확립된 난소암 종양 조직배양물(종양 및 면역 세포 함유)의 처리 시, 본 발명자들은 조합 처리가 제1일에 입증된 바와 같이 비히클 및/또는 단일-제제 처리보다 더 빠른 종양 세포 사멸을 가능하게 한다는 것을 관찰하였다(도 12). 참고로, 이 실험에는 OVCA P1 난소 저등급 장액 암종(IVB기), OVCA P2 난소 고등급 장액 암종(IIIC기) 및 OVCA P3 난소 투명 세포 암종(IVB기)의 세 가지 유형의 조직이 존재하였다.
- [0185] 논의
- [0186] 전반적으로, 이러한 결과는 다른 항-PD-L1 억제제(아벨루맙) 및 난소암과 같은 다른 적응증과 함께 강력한 항종양 효능을 촉진하는 TILT-123의 놀라운 능력을 보여준다. 중요하게는, 이 치료 효과는 조직 기원의 조직학과 무관하다.
- [0187] 실시예5
- [0188] 재료 및 방법
- [0189] *항-PD-1 요법에 불응성인 두경부 편평세포암의 뇌전이로부터의 인간 종양 조직배양물*
- [0190] 수술을 받는 항-PD-1 요법에 불응성인 두경부 환자의 편평 세포 암종에서 뇌 전이 샘플을 수집하여 이전에 설명한 방법론에 따라 단일 세포 현탁액으로 전환하였다(9). 3.5×10^5 개의 세포를 96웰 플레이트에 새로 접종하고 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2 또는 Ad5/3-E2F-d24 또는 배지(바이러스 없음)로 삼중 처리하였다.
- [0191] 세포 생존력 분석
- [0192] 인간 종양 조직배양물을 최대 7일 동안 처리하였다(앞서 기술한 바와 같이). 세포 생존력은 제조사의 지시에 따라 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, G3582)를 사용하여 제3일, 5일 및 7일에 평가되었다. 모크-처리된 세포의 생존력은 100%로 설정되었다.
- [0193] 바이러스
- [0194] 인간 종양 조직 배양 실험을 위해 종양용해성 Ad5/3-E2F-d24-hTNFa-IRES-hIL2(TILT-123으로 알려짐) 또는 종양용해성 Ad5/3-E2F-D24(11)가 사용되었다.
- [0195] 조직병리학
- [0196] 절제술을 받기 전에 환자는 허 기저부에 3등급 원발성 종양이 확인되었다. 종양 조직학은 병리학자에 의해 확인되었다.
- [0197] 통계 분석
- [0198] GraphPad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA) 분석 도구를 사용하여 Welch 보정을 사용하여 독립 표본 t-검정과 데이터의 그래픽 표현을 생성하는 수단을 수행하였다. 통계적 유의성은 0.05 미만의 p-값에 대해 주장되었다.
- [0199] 결과

- [0200] 단일-제제 TILT-123은 항-PD-1 요법에 불응하는 환자의 뇌 전이 세포 사멸을 유도한다
- [0201] 항-PD-1 요법에 불응성인 두경부 편평 세포 암종에서 TILT-123의 항종양 활성은 중간 정도이다(도 13). 참고로, TILT-123은 바이러스가 없는 대조군과 비교하여 제7일까지 조직배양의 종양 세포 함량을 유의하게 감소시킬 수 있었다(도 13).
- [0202] **논의**
- [0203] 전반적으로, 이들 데이터는 단일-제제 TILT-123의 항종양 활성이 높지만 항-PD-1 요법에 불응성인 환자의 종양 세포에서 제한적이라는 것도 보여준다. 후자는 이러한 유형의 종양에서 개선된 치료 효능을 달성하기 위해서는 TILT-123을 체크포인트 억제제와 조합할 필요성이 있음을 강조하는 것이다.
- [0204] 참고문헌
- [0205] 1. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515: 568-71.
- [0206] 2. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14: 655-68.
- [0207] 3. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu W-J, Weber JS, Zarour HM, Kefford R, Loboda A, Albright A, Kang SP, et al. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol* 2015;33: 3001-.
- [0208] 4. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515: 563-567.
- [0209] 5. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, Braiteh F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387: 1837-46.
- [0210] 6. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017;541: 321-30
- [0211] 7. White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S.M., Kusher, D.I., and Gooding, L. (1992). The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12: 2570-2580.
- [0212] 8. Cervera-Carrascon V, Siurala M, Santos JM, Havunen R, Tahtinen S, Karell P, et al. TNF α and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):e1412902.
- [0213] 9. Taipale K, Tahtinen S, Havunen R, Koski A, Liikanen I, Pakarinen P, et al. Interleukin 8 activity influences the efficacy of adenoviral oncolytic immunotherapy in cancer patients. *Oncotarget*. 2018;9(5):6320-35.
- [0214] 10. Santos JM, Havunen R, Siurala M, Cervera-Carrascon V, Tahtinen S, Sorsa S, et al. Adenoviral production of interleukin-2 at the tumor site removes the need for systemic postconditioning in adoptive cell therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2017;141(7):1458-68.
- [0215] 11. Havunen R, Siurala M, Sorsa S, Gronberg-Vaha-Koskela S, Behr M, Tahtinen S, et al. Oncolytic Adenoviruses Armed with Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-2 Enable Successful Adoptive Cell Therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2017;4:77-86.
- [0216] 12. Siurala M, Havunen R, Saha D, Lumen D, Airaksinen AJ, Tahtinen S, et al. Adenoviral Delivery of

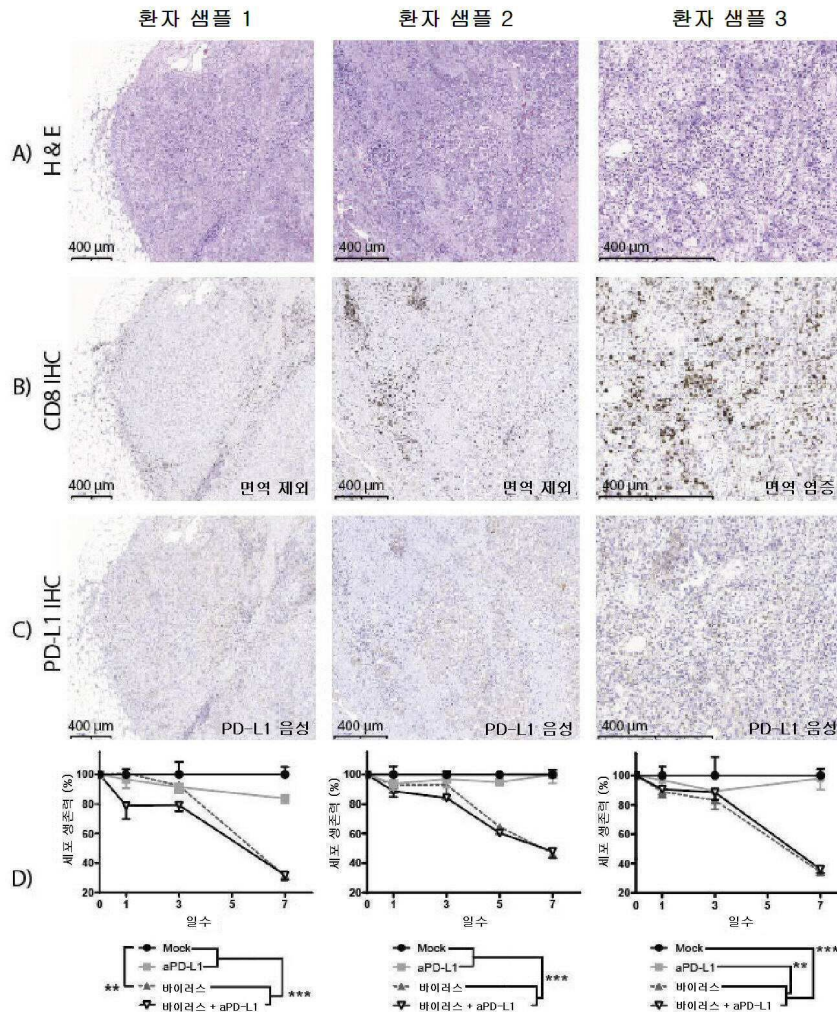
Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-2 Enables Successful Adoptive Cell Therapy of Immunosuppressive Melanoma. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(8):1435-43.

[0217] 인용된 특허문헌

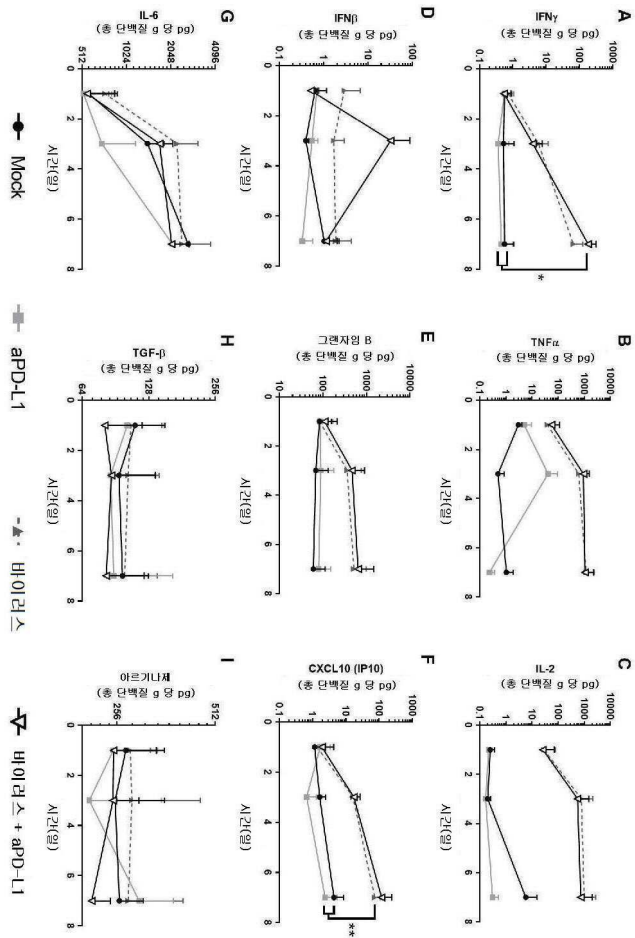
[0218] W02014170389

도면

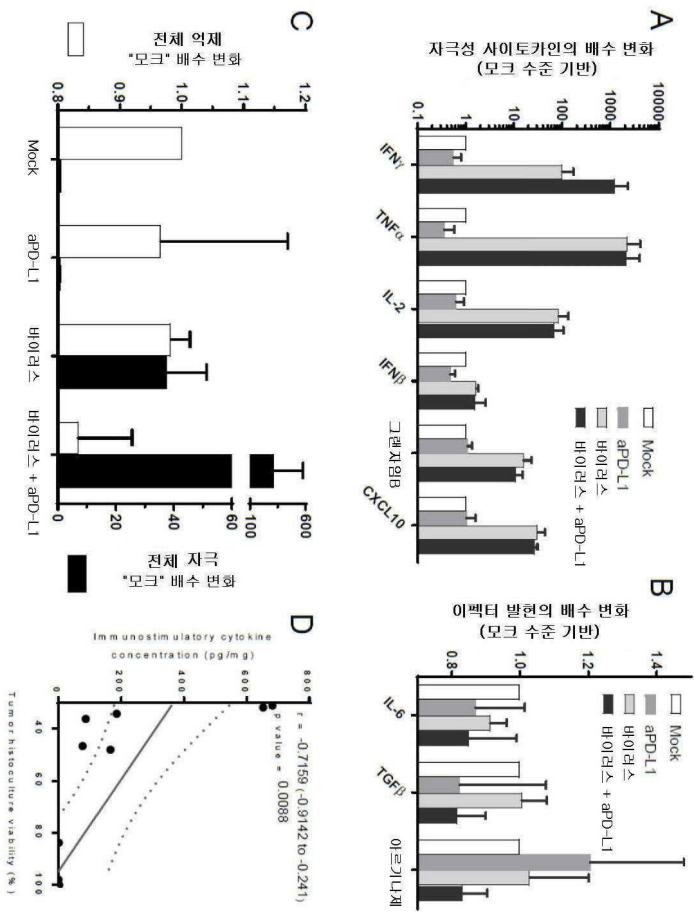
도면1



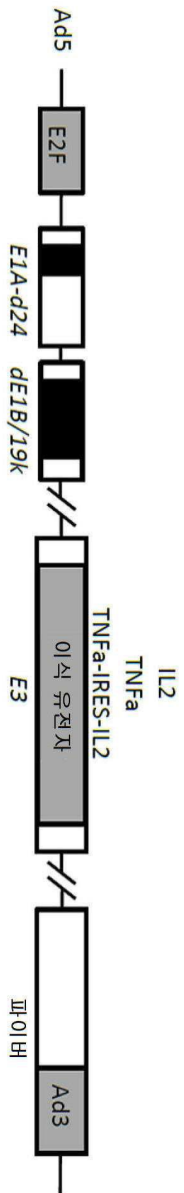
도면2



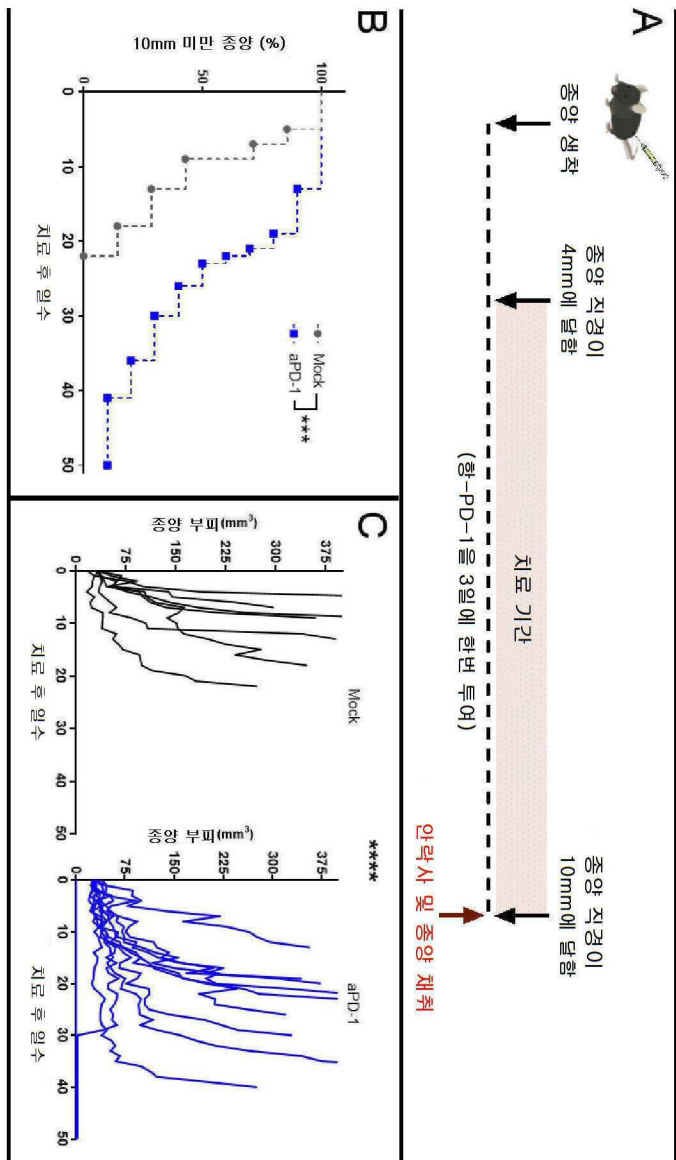
도면3



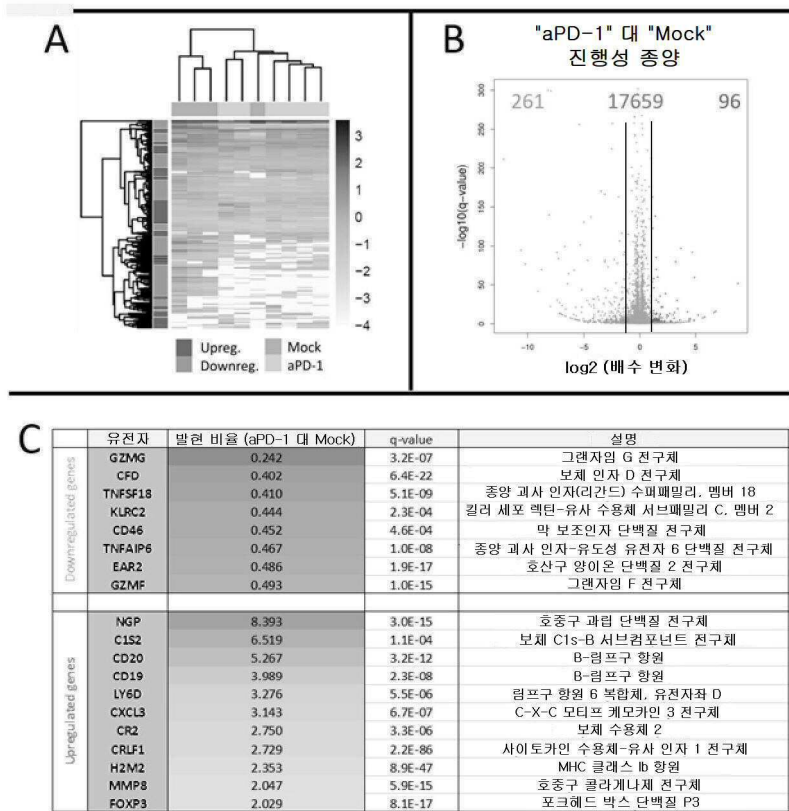
도면5



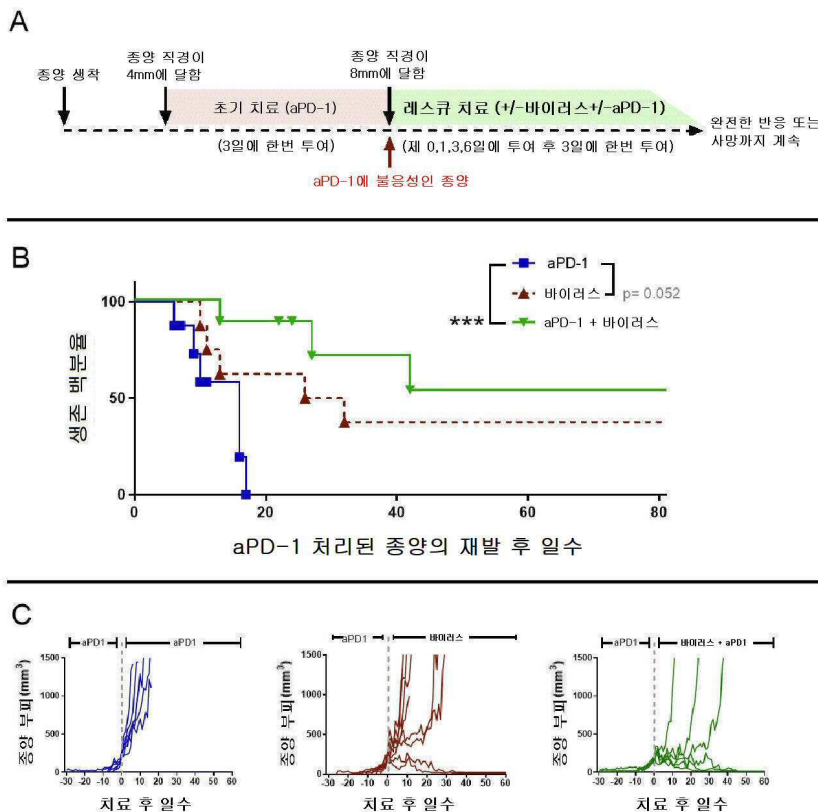
도면6



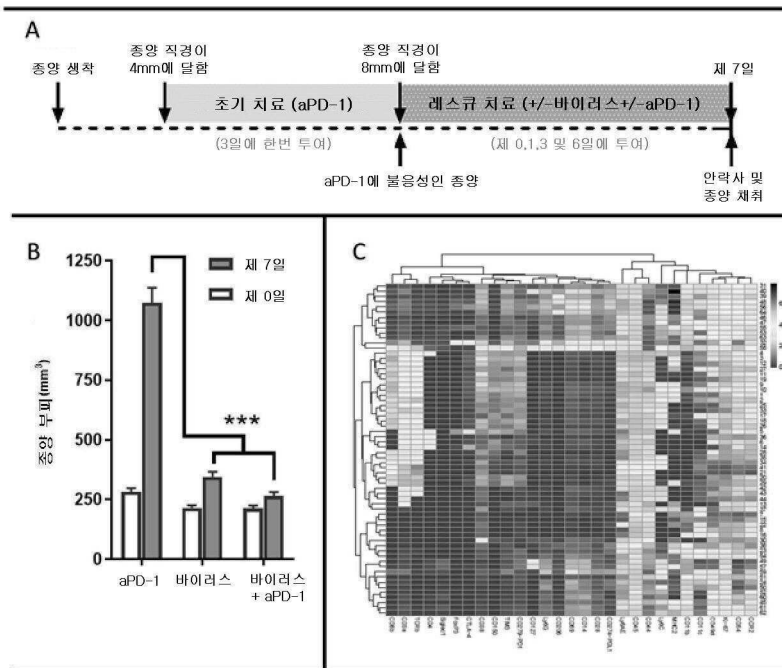
도면7



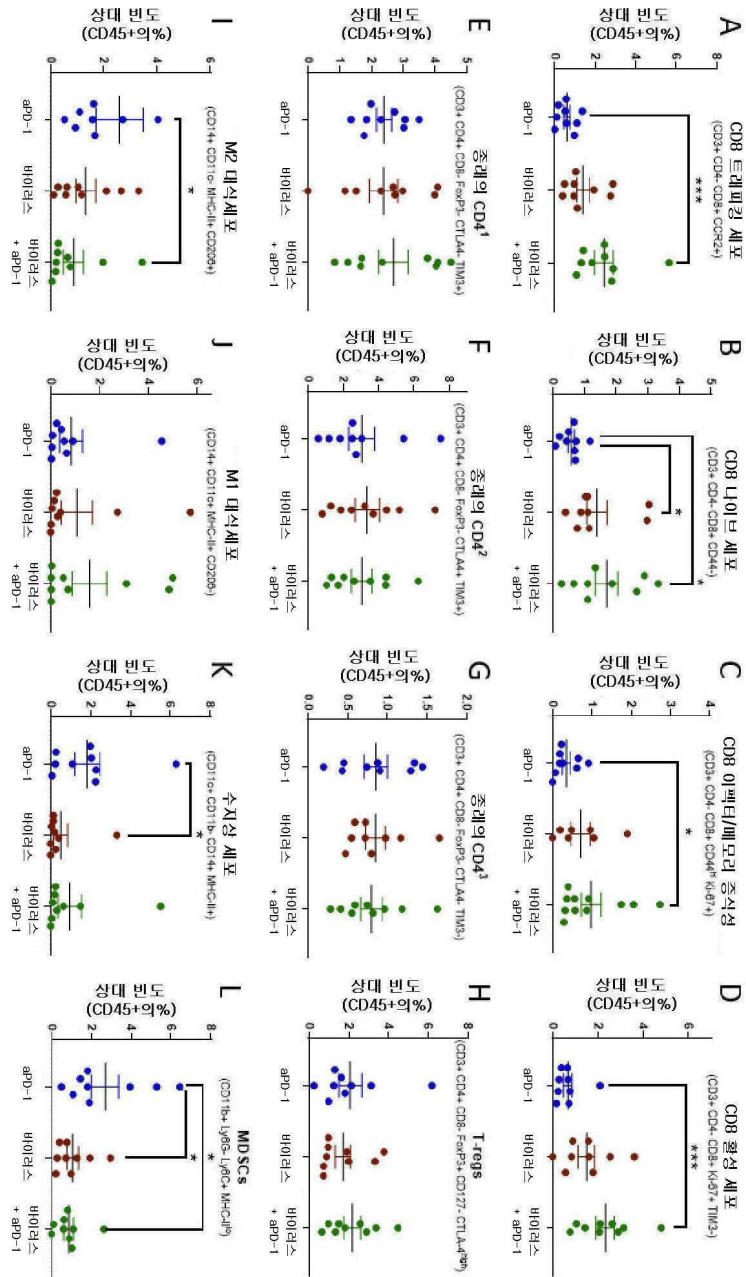
도면8



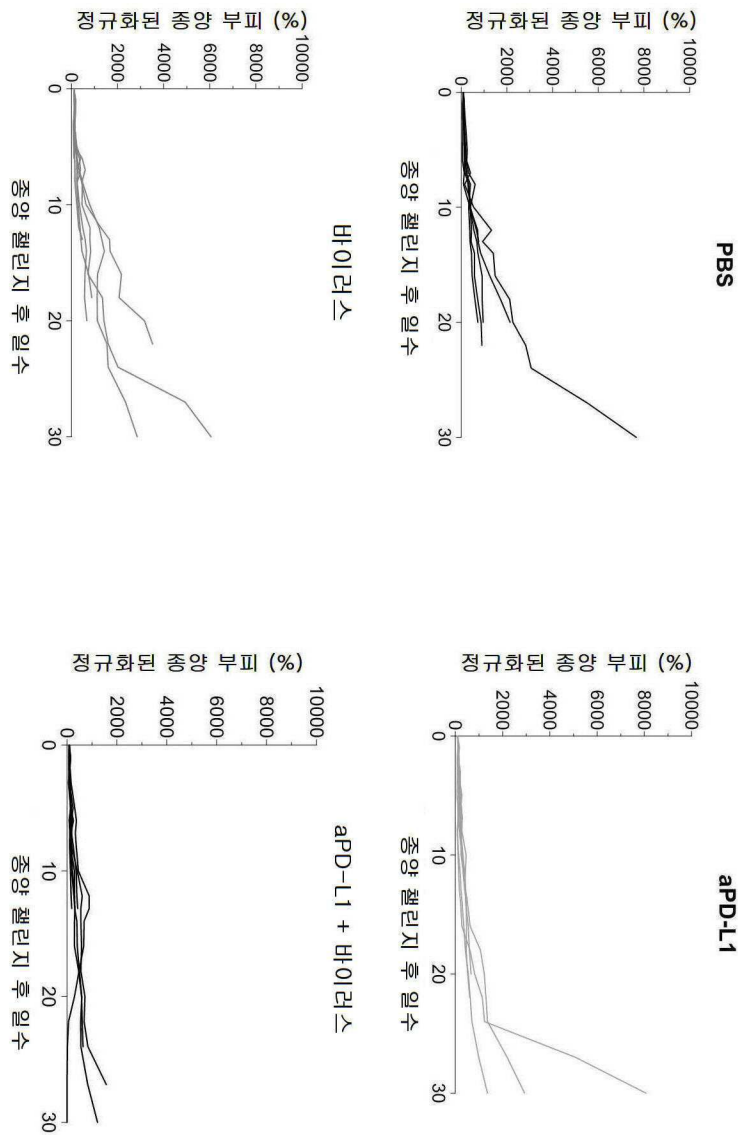
도면9



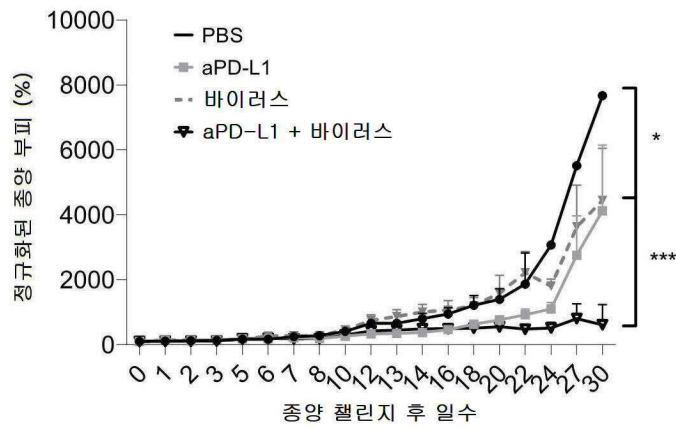
도면10



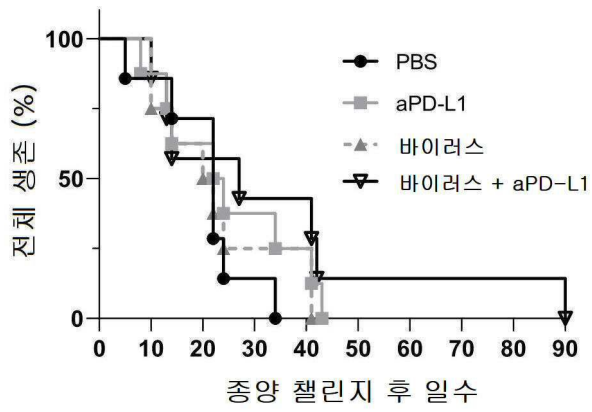
도면11a



도면11b

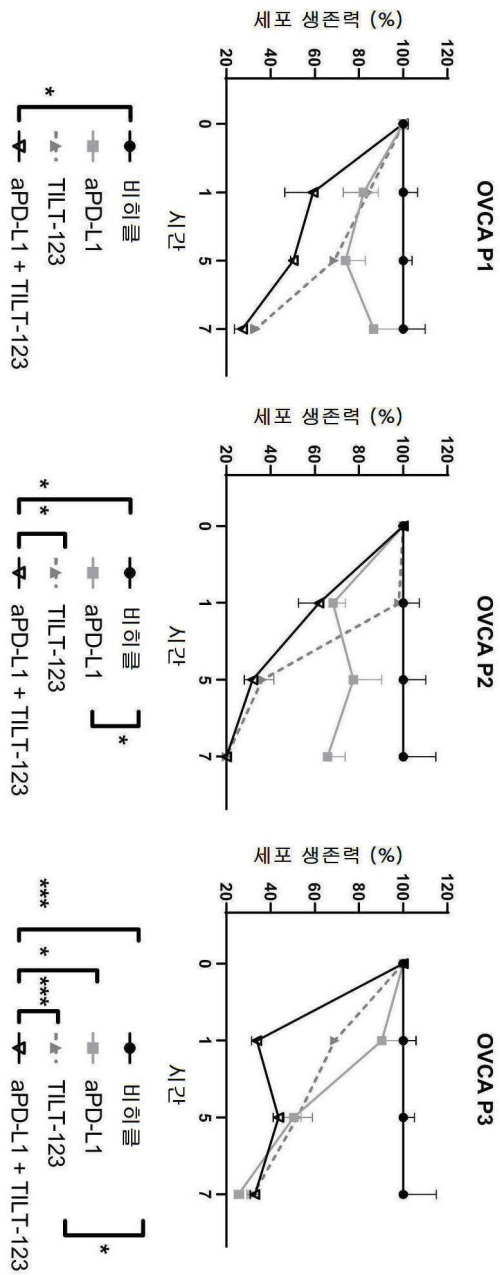


도면11c

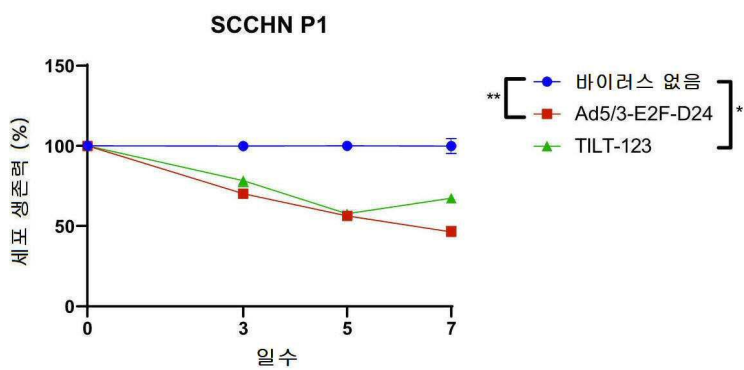


	PBS	aPD-L1	바이러스	바이러스 + aPD-L1
생존 중앙값	22	23	21	27

도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Tilt Biotherapeutics Oy

<120> ONCOLYTIC ADENOVIRUS AND CHECKPOINT INHIBITOR COMBINATION THERAPY

<130> TILB4PCT

<150> US 62/861339

<151> 2019-06-14

<150> US 62/988422

<151> 2020-03-12

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 531

<212> DNA

<213> adenovirus

<400> 1

```

atggaggctt gggagtgttt ggaagatfff tctgctgtgc gtaacttgct ggaacagagc      60
tctaacagta ccctttggtt ttggaggttt ctgtggggct catcccaggc aaagttagtc      120
tgcagaatta aggaggatta caagtgggaa tttgaagagc tttttaaadc ctgtggtgag      180

ctgtttgatt ctttgaatct gggtcaccag gcgcttttcc aagagaaggt catcaagact      240
ttggatffff ccacaccggg gcgcgctgcg gctgctgttg cttttttgag ttttataaag      300
gataaatgga gcgaagaaac ccatctgagc ggggggtacc tgctggattt tctggccatg      360
catctgtgga gagcggttgt gagacacaag aatcgctgca tactgtttgc ttccgtccgc      420
ccggcgataa taccgacgga ggagcagcag cagcagcagg aggaagccag gcggcggcgg      480
caggagcaga gcccatggaa cccgagagcc ggccctggacc ctcgggaatg a              531

```

<210> 2

<211> 390

<212> DNA

<213> adenovirus

<400> 2

```

atggaggctt gggagtgttt ggaagatfff tctgctgtgc gtaacttgct ggaacagctg      60
ggtcaccagg cgcttttcca agagaaggtc atcaagactt tggatffffc cacaccgggg      120
cgcgctgagg ctgctgttgc ttttttgagt tttataaagg ataaatggag cgaagaaacc      180

```

catctgagcg gggggtacct gctggatttt ctggccatgc atctgtggag agcggttgtg 240
 agacacaaga atcgctgct actgttgtct tccgtccgcc cggcgataat accgacggag 300
 gagcagcagc agcagcagga ggaagccagg cggcggcggc aggagcagag cccatggaac 360
 ccgagagccg gcctggacce tcggaatga 390

<210> 3

<211> 680

<212> DNA

<213> adenovirus

<400> 3

tgttaccatc cggacaaagc ctgctgcgcgccc cccgccccgc cattggccgt accgccccgc 60
 gccgcccgcc catccccgcc ctccgcccgc ggtccggcgc gttaaagcca ataggaaccg 120
 ccgccgttgt tcccgctcacg gccggggcag ccaattgtgg cggcgctcgg cggctcgtgg 180
 ctctttcgcg gcaaaaagga tttggcgcgt aaaagtggcc gggactttgc aggcagcggc 240
 ggccgggggc ggagcgggat cgagccctcg ccctcgagct agaagcttgt tttctcctcc 300
 gagccgctcc gacaccggga ctgaaaatga gacatattat ctgccacgga ggtgttatta 360

ccgaagaaat ggccgccagt cttttggacc agctgatcga agaggtactg gctgataatc 420
 ttccacctcc tagccatttt gaaccacctc cccttcacga actgtatgat ttagacgtga 480
 cggccccga agatcccaac gaggaggcgg tttcgcagat tttcccgac tctgtaatgt 540
 tggcggtgca ggaagggatt gacttactca cttttccgcc ggcgcccggg tctccggagc 600
 cgctcacct ttcccggcag cccgagcagc cggagcagag agccttgggt ccggtttcta 660
 tgccaaacct tgtaccggag 680

<210> 4

<211> 27458

<212> DNA

<213> adenovirus

<400> 4

gtgatcgatc caccagtgca cgacaggat gaagagggtg aggagtttgt gttagattat 60
 gtggagcacc cgggacacgg ttgcaggtct tgcattatc accgaggaa tacgggggac 120
 ccagatatta tigtttcgt ttgctatatg aggacctgtg gcatgtttgt ctacagtaag 180
 tgaaaattat gggcagtggt tgatagagtg gtgggtttgg tgtgtaatt ttttttttaa 240
 tttttacagt tttgtggttt aaagaatttt gtatttgat ttttttaaaa ggtcctgtgt 300
 ctgaacctga gcctgagccc gagccagaac cggagcctgc aagacctacc cgccgtccta 360

aaatggcgcc tgctatcctg agacgcccga catcacctgt gtctagagaa tgcaatagta 420

 gtacggatag ctgtgactcc ggtccttcta acacacctcc tgagatacac ccggtggtcc 480
 cgctgtgccc cattaacca gttgccgtga gagttggtgg gcgtcgccag getgtggaat 540
 gtatcgagga ctigtctaac gagcctgggc aacctttgga cttgagctgt aaacgcccc 600
 ggccataaag tgtaacctg tgattgcgtg tttgggtaac gcctttgttt gctgaatgag 660
 ttgatgtaag ttaataaag ggtgagataa ttttaactt gcatggcgtg ttaaatgggg 720
 cggggcttaa agggatata atgcccgtg ggctaactt ggttacatct gacctcatgg 780
 aggcttggga gtgtttggaa gatTTTTctg ctgtgcgtaa cttgctggaa cagagctcta 840

 acagtacctc ttggttttgg aggtttctgt ggggctcatc ccaggcaaag ttagtctgca 900
 gaattaagga ggattacaag tgggaatttg aagagctttt gaaatcctgt ggtgagctgt 960
 ttgatctttt gaatctgggt caccaggcgc tttccaaga gaaggtcatc aagactttgg 1020
 atttttccac accggggcgc gctgcggctg ctgttgcttt tttgagtttt ataaaggata 1080
 aatggagcga agaaacccat ctgagcgggg ggtacctgct ggattttctg gccatgcatc 1140
 tgtggagagc ggttgtgaga cacaagaatc gctgctact gttgtcttcc gtccgcccgg 1200
 cgataatacc gacggaggag cagcagcagc agcaggagga agccaggcgg cggcggcagg 1260

 agcagagccc atggaaccgg agagccggcc tggacctcg ggaatgaatg ttgtacaggt 1320
 ggctgaactg tatccagaac tgagacgcat tttgacaatt acagaggatg ggcaggggct 1380
 aaaggggga aagagggagc ggggggcttg tgaggctaca gaggaggcta ggaatctagc 1440
 ttttagctta atgaccagac accgtcctga gtgtattact tttcaacaga tcaaggataa 1500
 ttgcgctaag gagcttgatc tgctggcgca gaagtattcc atagagcagc tgaccactta 1560
 ctggctgcag ccaggggatg attttgagga ggctattagg gtatatgcaa aggtggcact 1620
 taggccagat tgcaagtaca agatcagcaa acttgtaaat atcaggaatt gttgctacat 1680

 ttctgggaac ggggccgagg tggagataga tacggaggat aggggtgcct ttagatgtag 1740
 catgataaat atgtggccgg ggggtccttg catggacggg gtggttatta tgaatgtaag 1800
 gtttactggc cccaatttta gcggtacggt tttcctggcc aataccaacc ttatcctaca 1860
 cgggtgaagc ttctatgggt ttaacaatac ctgtgtggaa gcctggaccg atgtaagggt 1920
 tcggggctgt gccttttact gctgtcggaa gggggtggtg tgtcgccca aaagcagggc 1980
 ttcaattaag aaatgcctct ttgaaaggig taccttgggt atcctgtctg agggtaactc 2040
 cagggtgcgc cacaatgigg cctccgactg tggttgctc atgctagtga aaagcgtggc 2100

tgtgattaag cataacatgg tatgtggcaa ctgcgaggac agggcctctc agatgctgac 2160
 ctgctcggac ggcaactgtc acctgctgaa gaccattcac gtagccagcc actctcgsaa 2220
 ggccctggcca gtgtttgagc ataacatact gaccgcctgt tccttgcat tgggtaacag 2280
 gaggggggtg ttctacctt accaatgcaa ttgagtcac actaagatat tgcttgagcc 2340
 cgagagcatg tccaaggtga acctgaacgg ggtgtttgac atgacatga agatctgaa 2400
 ggtgctgagg tacgatgaga cccgcaccag gtgcagaccc tgcgagtgtg gcgtaaaca 2460
 tattaggaac cagcctgtga tgctggatgt gaccgaggag ctgaggcccg atcacttgg 2520

 gctggcctgc acccgcctg agtttggctc tagcgatgaa gatacagatt gaggtactga 2580
 aatgtgtggg cgtggcctaa ggggtggaaa gaatatataa ggtgggggtc ttatgtagtt 2640
 ttgtatctgt ttgacagcag ccgccccgc catgagcacc aactcgtttg atggaagcat 2700
 tgtgagctca tatttgaaa cgcgcatgcc cccatgggcc ggggtgcgtc agaatgtgat 2760
 gggctccagc atgatggtc gcccgtcct gcccgcaaac tctactacct tgacctacga 2820
 gaccgtgtct ggaacgccgt tggagactgc agcctccgcc gccgcttcag ccgctgcagc 2880
 caccgccgc gggattgtga ctgactttgc tttctgagc ccgcttcaa gcagtgcagc 2940

 ttcccgttca tccgcccg atgacaagt gacggctctt ttggcacaat tggattcttt 3000
 gacccgggaa cttaatgtcg tttctcagca gctgttggat ctgcccagc aggtttctgc 3060
 cctgaagct tectccctc ccaatgcgtt taaaacata aataaaaaac cagactctgt 3120
 ttggatttgg atcaagcaag tgtcttgctg tctttattta ggggttttgc gcgcgcgta 3180
 ggccccggac cagcgtctc ggtcgtttag ggtcctgtgt atttttcca ggacgtgta 3240
 aagtgactc tggatgtca gatacatggg cataagcccc tctctggggt ggaggtagca 3300
 cactgcaga gcttcatgct gcgggggtgt gttgtagatg atccagtcgt agcaggagcg 3360

 ctgggcgtgg tgcctaaaaa tgtctttcag tagcaagctg attgccagg gcagccctt 3420
 ggtgtaagt tttacaaagc ggttaagctg gtaggggtgc atacgtggg atagatg 3480
 catcttggac tgtattttta ggttggctat gttcccagcc atatccctcc ggggattcat 3540
 gttgtgcaga accaccagca cagtgtatcc ggtgcaactg ggaaatttgt catgtagctt 3600
 agaaggaaat gcgtggaaga acttggagac gcccttgtga cctccaagat tttcatgca 3660
 ttctccata atgatggcaa tgggccacg ggcggcgcc tggcggaaga ttttctggg 3720
 atcactaacg tcatagttgt gttccaggat gagatcgtca taggccattt ttacaaagc 3780

 cggcgaggag gtgccagact gcggtataat ggttccatcc ggccagggg ctagttacc 3840
 ctacagatt tgcatttccc acgctttgag ttcagatggg gggatcatgt ctacctcgg 3900
 gcgatgaag aaaacggttt ccgggtagg ggagatcagc tgggaagaaa gcaggttct 3960

gagcagctgc gacttacgc agccgggtggg cccgtaaadc acacctatta cggggtgcaa 4020
ctggtagtta agagagctgc agctgccgtc atccctgagc aggggggcca ctctgtaag 4080
catgtccctg actcgcattg tttccctgac caaatccgcc agaaggcgtc cgccgccag 4140
cgatagcagt tcttgcaagg aagcaaagt tttcaacggt ttgagaccgt cgccgtagg 4200

catgcttttg agcgtttgac caagcagttc caggcgggtcc cacagctcgg tcacctgctc 4260
tacggcatct cgatccagca tatctcctcg tttcgcggtg tggggcggtc ttcgctgtac 4320
ggcagtagtc ggtgctcgtc cagacgggcc agggatcatgt cttccacgg gcgcagggtc 4380
ctcgtcagcg tagtctgggt caggtgaag ggtgctcgtc cgggctcgc gctggccagg 4440
gtgctcttga ggctggctct gctggtgctg aagcgtgcc ggtcttcgcc ctgcgctcg 4500
gccagtagc attgacat ggtgtcatag tccagccct cgcggcgtg gcccttggcg 4560
cgcagcttc ccttgagga ggccgcgcac gaggggcagt gcagactttt gagggcgtag 4620

agcttggcg cgagaaatc cgattccggg gagtagcat ccgcgccca ggccccgag 4680
acggtctgc attccagag ccaggtgagc tctggccgtt cggggtcaa aaccagttt 4740
ccccatgct tttgatgag tttcttacct ctggtttcca tgagccggtg tcacgctcg 4800
gtgacaaaa ggctgtccgt gtcccgtat acagacttga gaggcctgtc ctgcagcgtt 4860
gttcccggt cctcctcgt tagaaactc gaccactctg agacaaagc tcgctccag 4920
gccagcacga agaggctaa gtgggagggg tagcggctgt tgtccactag ggggtccact 4980
cgctccaggg tgaagaca catgtcgcc tcttcggcat caaggaagt gattggtttg 5040

taggtgtagg ccacgtgacc ggtgttct gaaggggggc tataaaagg ggtggggcg 5100
cgttctct cactctctc cgcatcgtc tctgcaggg ccagctgtt ggtgagtagc 5160
tcctctgaa aagcgggcat gacttctgc ctaagattg cagtttcaa aaacaggag 5220
gatttgatat tcacctggc cgcggtgatg cctttgaggg tggccgcatc catctggtca 5280
gaaaagaca tcttttgtt gtcaagctt gtggcaaac acccgtagag ggcgttggac 5340
agcaacttg cgatggagc cagggtttg ttttctgc gatcggcgc ctcttggc 5400
gcgatgtta gctgcagta ttcgcgcga acgaccgcc attcgggaaa gacggtggtg 5460

cgctcgtcgg gcaccagtg cacgcgcaa ccgcggtgt gcagggtgac aaggtcaacg 5520
ctggtggcta cctctcccg taggcgctc ttggtccagc agaggcgcc gcccttgcgc 5580
gagcagaatg gcgtagggg gtctagctgc gtctcgtcc gggggtctgc gtccacgta 5640
aagaccccg gcagcaggc cgcgtcgaag tagtctatc tgcatcttg caagtctagc 5700
gcctgctgcc atgcggggc ggcaagcgc cgtcgtatg ggttgagtg gggacccat 5760
ggcatgggt ggtgagcgc ggaggcgtac atccgcaa tgtcgtaac gttaggggc 5820

tctctgagta ttccaagata tgtaggtag catcttcac cgcgatgct ggcgcgacg 5880

taatcgata gttcgtgca gggagcgagg aggtcggac cgagttgct acggcgggc 5940

tgctctgctc ggaagaactat ctgctgaag atggcatgtg agttggatga tatggttga 6000

cgctggaaga cgttgaagct ggcgtctgtg agacctaccg cgtcacgcac gaaggaggc 6060

taggagtgcg gcagcttgtt gaccagctcg gcggtgacct gcacgtctag ggcgcagtag 6120

tccagggttt ccttgatgat gtcatactta tctgtcctt ttttttcca cagctcgcg 6180

ttgaggaaa actcttcgag gtccttcag tactcttga tcgaaacc gtcggcctcc 6240

gaacgtaag agcctagcat gtagaactgg ttgacggcct ggtaggcgca gcatccctt 6300

tctacgggta ggcgctatgc ctgdcggcc ttccggagcg aggtgtggg gagcgcaaag 6360

gigtccctga ccatgacttt gaggtactgg tatttgaagt cagtgtctc gcatccgcc 6420

tgctcccaga gcaaaaagtc cgtgdccttt ttggaacgag gatttggcag ggcaagggt 6480

acatcgttga agagtatctt tcccgcgca ggcataaagt tgcgtgtgat gcggaagggt 6540

cccggcacct cggaacggtt gtttaattacc tggcgcgca gcacgatctc gtcaaagccg 6600

ttgatgttgt ggccccaat gtaaagtcc aagaagcgcg ggatgccctt gatggaaggc 6660

aatTTTTTaa gttcctcgtg ggtgagctct tcaggggagc tgagcccgtg ctctgaaagg 6720

gcccagtctg caagatgagg gttggaagcg acgaatgagc tccacaggtc acgggccatt 6780

agcatttga ggtggtcgcg aaaggtccta aactggcgac ctatggccat ttttctggg 6840

gtgatgcagt agaaggtaa cgggtcttgt tcccagcggc ccatccaag gttcgcggct 6900

aggtctcgcg cggcagtcac tagaggctca tctccgccga acttcatgac cagcatgaag 6960

ggcacgagct gcttccaaa ggccccatc caagtatagg tctctacatc gtaggtgaca 7020

aagagacgct cggtcgagag atgcgagccg atcgggaaga actggatctc ccgccacaa 7080

ttggaggagt ggcattgat gtggtgaaag tagaagtccc tgcgacgggc cgaacactcg 7140

tgctggcttt tgtaaaaacg tgcgcagtac tggcagcggg gcacgggctg tacatcctgc 7200

acgaggttga cctgacgacc gcgcacaagg aagcagagtg ggaattttag cccctcgct 7260

ggcgggtttg gctggtggtc ttctacttcg gctgcttgtc cttgaccgtc tggctgctcg 7320

aggggagtta cggtggatcg gaccaccag ccgcgcgagc ccaaagtcca gatgtccgcg 7380

cgcgggcgtc ggagcttcat gacaacatcg cgcagatggg agctgtccat ggtctggagc 7440

tcccgcggcg tcaggtcagg cgggagctcc tgcaggttta cctcgcatac acgggtcagg 7500

gcgcgggcta gatccaggtg atacctaatt tccaggggct ggttgggtgc ggcgtcgatg 7560

gcttgcaaga ggccgcatcc ccgcggcgcg actacggtac cgcgcggcgg gcggtgggcc 7620
gcgggggtgt ccttgatga tgcatctaaa agcggtgacg cgggcgagcc cccggaggta 7680
gggggggctc cggaccgcc gggagagggg gcaggggcac gtcggcgccg cgcgcgggca 7740
ggagctggtg ctgcgcgctg aggttgctgg cgaacgcgac gacgcggcgg ttgatctcct 7800
gaatctggcg cctctgctg aagacgacgg gcccggtgag cttgagcctg aaagagagtt 7860
cgacagaatc aatttcggtg tcggtgacgg cggcctggcg caaaatctcc tgcacgtctc 7920
ctgagttgtc ttgataggcg atctcgcca tgaactgctc gatctcttcc tctggagat 7980

ctccgctcc ggctcgtcc acggtggcgg cgaggctggt ggaaatgcgg gccatgagct 8040
gcgagaaggc gttgaggcct ccctcgttcc agacgcggct gtagaccacg ccccttcgg 8100
catcgcgggc gcgcatgacc acctgcgcga gattgagctc cacgtgccgg gcgaagacgg 8160
cgtagtttcg caggcgctga aagaggtagt tgagggtggt ggcggtgtgt tctgccacga 8220
agaagtacat aaccagcgt cgcaacgtgg attcgttgat atccccaaag gcctcaaggc 8280
gctccatggc ctctagaag tccacggcga agttgaaaaa ctgggagtgg cgcgccgaca 8340
cggttaactc ctctccaga agacggatga gctcggcgac agtgtcgcgc acctcgcgct 8400

caaaggctac aggggcctct tcttcttct caatctctc ttccataagg gcctccctt 8460
cttcttctc tggcggcgtt gggggagggg ggacacggcg gcgacgacgg cgcaccggga 8520
ggcggctgac aaagcgtcg atcatctcc cgcggcgacg gcgcatggtc tcggtgacgg 8580
cgcggccgtt ctcgcgggg cgcagttgga agacgccgcc cgtcatgtcc cggttatggg 8640
ttggcggggg gctgccatgc ggcagggata cggcgctaac gatgcatctc aacaattggt 8700
gtgtaggtac tccgcccgcg agggacctga gcgagtcgcg atcgaccgga tcggaaaacc 8760
tctcgagaaa ggctctaac cagtcacagt cgcaagtag gctgagcacc gtggcgggcg 8820

gcagcgggcg gcggtcgggg ttgtttctgg cggaggctgct gctgatgatg taattaaagt 8880
aggcggctct gagacggcgg atggtcgaca gaagcaccat gtccttgggt ccggcctgct 8940
gaatgcgcag gcggtcggcc atgccccagg ctctgttttg acatcggcgc aggtctttgt 9000
agtagtcttg catgagcctt tctaccgca cttcttctc tcttctct tgtctgcat 9060
ctcttgcatc tatcgtcgc gcggcggcgg agtttgccg taggtggcgc cctcttctc 9120
ccatgcgtgt gaccccgaag cccctcatcg gctgaagcag ggctaggtcg gcgacaacgc 9180
gctcggctaa tatggcctgc tgcaectgcg tgagggtaga ctggaagtca tccatgtcca 9240

caaagcggtg gtatgcgcc gtgttgatgg tgtaagtgca gttggcata acggaccagt 9300
taacggctct gtgaccggc tgcgagagct cgggtgacct gagacgcgag taagccctcg 9360
agtcaatac gtagtcgttg caagtccgca ccaggtagct gatatccacc aaaaagtgcg 9420

gcggcggctg gcggtagagg ggccagcgtg gggtagccgg ggctccgggg gcgagatctt 9480
ccaacataag gcgatgatat ccgtagatgt acctggacat ccaggtgatg ccggcggcgg 9540
tggtggaggc gcgcggaag tgcgggacgc ggttccagat gttgcgcagc ggcaaaaagt 9600
gctccatggt cgggacgctc tggccgggtca ggcgcgcgca atcgttgacg ctctagaccg 9660

tgcaaaagga gagcctgtaa gcgggcactc ttccgtggtc tggtggataa attcgcaagg 9720
glatcatggc ggacgaccgg ggttcgagcc ccgtatccgg ccgtccgccg tgatecatgc 9780
ggttaccgcc cgcgtgtcga acccaggtgt gcgacgtcag acaacggggg agtgctcctt 9840
ttggcttctc tccaggcgcg gcggctgctg cgttagcttt tttggccact ggccgcgcgc 9900
agcgtaaagc gttaggctgg aaagcgaag cattaagtgg ctgcctccct gtagccggag 9960
ggttattttc caaggttga gtcgcgggac ccccggttcg agtctcggac cggccggact 10020
gcggcgaacg ggggtttgcc tccccgtcat gcaagacccc gcttgcaaat tcctccggaa 10080

acagggacga gcccttttt tgcttttccc agatgcatcc ggtgctgcgg cagatgcgcc 10140
ccccctccta gcagcggcaa gagcaagagc agcggcagac atgcagggca ccctccctc 10200
ctcctaccgc gtcaggaggc gcgacatccg cggttgacgc ggcagcagat ggtgattacg 10260
aaccctccgc gcgccgggcc cggcactacc tggacttggg ggaggggcag gcctggcgc 10320
ggctaggagc gccctctcct gagcggtagc caaggttga gctgaagcgt gatacgcgtg 10380
aggcgtacgt gcccgggcag aacctgtttc gcgaccgca gggagaggag cccgaggaga 10440
tgcgggatcg aaagtccac gcagggcgcg agctgcggca tggcctgaat cgcgagcgg 10500

tgctgcgca ggaggacttt gagccccgac gcggaaccgg gattagtccc gcgcgcgac 10560
acgtggcggc gcccgacctg gtaaccgcat acgagcagac ggtgaaccag gagattaact 10620
ttcaaaaaag cttaacaac cacgtgcgta cgtttgtggc gcgcgaggag gtggctatag 10680
gactgatgca tctgtgggac tttgtaagcg cgtgggagca aaacccaat agcaagccgc 10740
tcatggcgca gctgttctt atagtgcagc acagcaggga caacaggca ttcagggatg 10800
cgctgctaaa catagtagag cccgagggcc gctggctgct cgatttgata aacatcctgc 10860
agagcatagt ggtgcaggag cgcagcttga gcctggctga caagtggtcc gccatcaact 10920

attccatgct tagcctgggc aagttttacg cccgaagat ataccatacc ccttacgttc 10980
ccatagacaa ggaggtaaag atcgaggggt tctacatgcg catggcgtg aaggtgctta 11040
ccttgagcga cgacctgggc gtttatcgca acgagcgcac ccacaaggcc gtgagcgtga 11100
gccggcggcg cgagctcagc gaccgcgagc tgatgcacag cctgcaaagg gccctggctg 11160
gcacgggcag cggcgataga gaggccgagt cctactttga cgcgggcgct gacctgcgt 11220
gggcccgaag ccgacgcgcc ctggaggcag ctggggccgg acctgggctg gcggtggcac 11280

ccgcgcgcg tggcaacgtc ggcggcgtgg aggaatatga cgaggacgat gagtacgagc 11340

 cagaggacgg cgagtactaa gcggtgatgt ttctgatcag atgatgcaag acgcaacgga 11400
 cccggcggtg cggcgggcgc tgcagagcca gccgtccggc cttactcca cggacgactg 11460
 gcgccaggtc atggaccgca tcatgtcgct gactgcgcgc aatcctgacg cgttccggca 11520
 gcagcccgag gccaacggc tctccgcaat tctggaagcg gtgtcccgg cgcgcgcaaa 11580
 ccccacgca gagaaggcgc tggcgatcgt aaacgcgctg gccgaaaaca gggccatccg 11640
 gcccacgag gccggcctgg tctacgacgc gctgcttcag cgcgtggctc gttacaacag 11700
 cggcaacgtg cagaccaacc tggaccggct ggtgggggat gtgcgcgagg cctggcgca 11760

 gcgtgagcgc gcgacgagc agggcaacct gggctccatg gttgcactaa acgccttctt 11820
 gagtacacag cccgccaacg tcccgcgggg acaggaggac tacaccaact ttgtgagcgc 11880
 actgcggcta atggtgactg agacaccgca aagtgaggctg taccagtctg ggccagacta 11940
 tttttccag accagtagac aaggcctgca gaccgtaaac ctgagccagg ctttcaaaaa 12000
 cttgcagggg ctgtgggggg tgcgggctcc cacaggcgac cgcgcgaccg tgtctagctt 12060
 gctgacgccc aactcgcgcc tgttctgct gctaatagcg cccttcacgg acagtggcag 12120
 cgtgtcccgg gacacatacc taggtcactt gctgacactg taccgcgagg ccataggtca 12180

 ggcgcatgtg gacgagcata ctttcagga gattacaagt gtcagccgcg cgctggggca 12240
 ggaggacacg ggcagcctgg aggcaacct aaactacctg ctgaccaacc ggcggcagaa 12300
 gatcccctcg ttgcacagtt taaacagcga ggaggagcgc attttgcgt acgtgcagca 12360
 gagcgtgagc cttaacctga tgcgcgacgg ggtaacgccc agcgtggcgc tggacatgac 12420
 cgcgcgcaac atggaaccgg gcatgtatgc ctcaaaccgg ccgtttatca accgcctaat 12480
 ggactacttg catcgcgcgg ccgccgtgaa ccccgagtat ttcaccaatg ccatctttaa 12540
 cccgcaactg ctaccgcccc ctggtttcta caccggggga ttcgaggtgc ccgagggtaa 12600

 cgatggattc ctctgggacg acatagacga cagcgtgttt tccccgcaac cgcagaccct 12660
 gctagagttg caacagcgcg agcaggcaga ggcggcgctg cgaaaggaaa gcttccgcag 12720
 gccaaagcagc ttgtccgac taggcgctgc ggccccgagg tcagatgcta gtagccatt 12780
 tccaagcttg atagggtctc ttaccagcac tgcaccacc cccccgcgc tgctgggcca 12840
 ggaggagtac ctaaacact cgctgctgca gccgcagcgc gaaaaaaccc tgctccggc 12900
 atttccaac aacgggatag agagcctagt ggacaagatg agtagatgga agacgtacgc 12960
 gcaggagcac agggacgtgc caggccccgc cccgccacc cgtcgtcaaa ggcacgaccg 13020

tcagcggggt ctggtgtggg aggacgatga ctcggcagac gacagcagcg tcttggattt 13080
 gggaggaggt ggcaaccgt ttg'gcacct tcgcccagg ctggggagaa tgttttaaaa 13140
 aaaaaaaaagc atgatgcaaa ataaaaaact caccaaggcc atggcaccga gcgttggttt 13200
 tcttgtattc cccttagtat gcggcgcgcg gcgatgtatg aggaaggtcc tctcctcc 13260
 tacgagatg tggtagcgc ggcgccagt gcggcgcgc tgggttctcc cttcgatgct 13320
 cccctggacc cgcctttgt gcctccgagg tacctgcggc ctaccggggg gagaaacagc 13380
 atccgttact ctgagttggc acccctattc gacaccacc gtgtgtacct ggtggacaac 13440

 aagtcaacgg atgtggcatc cctgaactac cagaacgacc acagcaactt tctgaccacg 13500
 gtcatcmeta acaatgacta cagcccgggg gaggcaagca cacagacat caatcttgac 13560
 gaccggtcgc actggggcgg cgacctgaaa accatcctgc ataccaacat gccaaatgtg 13620
 aacgagtta tgtttacaa taagtttaag gcgcgggtga tgggtcgcg cttgcctact 13680
 aaggacaatc aggtggagct gaaatcagag tgggtggagt tcacgctgcc cgaggcaac 13740
 tactccgaga ccatgacat agaccttatg aacaacgca tcgtggagca ctactgaaa 13800
 gtgggcagac agaacggggt tctggaaagc gacatcgggg taaagttga caccgcaac 13860

 ttcagactgg ggtttgacc cgtcactggt cttgtcatgc ctggggtata tacaacgaa 13920
 gccttccatc cagacatcat tttgtgcca ggatgcgggg tggacttac ccacagccgc 13980
 ctgagcaact tgttggcat ccgcaagcgg caaccctcc aggagggtt taggatcacc 14040
 tacgatgatc tggagggtgg taacattccc gactgttgg atgtggacgc ctaccaggcg 14100
 agcttgaag atgacaccga acaggcggg ggtggcgcag gcggcagcaa cagcagtggc 14160
 agcggcgcgg aagagaactc caacgcggca gccgcggcaa tgcagccggt ggaggacatg 14220
 aacgatcatg ccattcgcgg cgacacctt gccacacggg ctgaggagaa gcgcgctgag 14280

 gccgaagcag cggccgaagc tgccccecc gctgcgcaac ccgaggtcga gaagcctcag 14340
 aagaaaccgg tgatcaaac cctgacagag gacagcaaga aacgcagtta caacctmeta 14400
 agcaatgaca gcaccttac ccagtaccgc agctggtacc ttgcataca ctacggcgac 14460
 cctcagaccg gaatccgctc atggacctg ctttgactc ctgacgtaac ctgcggctcg 14520
 gagcaggtct actggtcgtt gccagacatg atgcaagacc ccgtgacctt ccgtccacg 14580
 cgccagatca gcaacttcc ggtggtgggc gccgagctgt tgcccgtgca ctccaagagc 14640
 ttctacaacg accaggcgt ctactccaa ctcatccgc agtttacctc tetgaeccac 14700

 gigttaate gctttccga gaaccagatt ttggcgcgcc cgccagccc caccatcacc 14760
 accgtcagtg aaaacgttcc tgctctcaca gatcacggga cgctaccgt gcgcaacagc 14820
 atcggaggag tccagcaggt gaccattact gacccagac gccgcacctg ccctacgtt 14880

tacaaggccc tgggcatagt ctcgccgcgc gtccatcga gccgcacttt ttgagcaagc 14940
atgtccatcc ttatatgcc cagcaataac acaggctggg gcctgcgctt cccaagcaag 15000
atgtttggcg gggccaagaa gcgctccgac caacaccag tgcgctgcg cgggcactac 15060
cgcgccctt ggggcgcgca caaacgcggc cgcactgggc gcaccaccgt cgatgacgcc 15120

atcgacgagg tggaggagga ggccgcaac tacacgcca cggccacc agtgtccaca 15180
gtggacgagg ccattcagac cgtggtgccc ggagcccggc gctatgctaa aatgaagaga 15240
cggcggaggc gcgtagcagc tcgccaccgc cggcaccgg gcactgccc ccaacgcgcg 15300
gcggcggccc tcttaaccg cgcacgtcgc accggccgac gggcggccat ggggcccgt 15360
cgaaggctgg ccgcccgtat tgtcactgtg cccccagggt ccaggcgagc agcggccgcc 15420
gcagcagccg cggccattag tgctatgact cagggtcgca ggggcaact gtattgggtg 15480
cgcgactcgg ttagcggcct gcgctgccc gtgcgcccc gcccccgcg caactagatt 15540

gcaagaaaaa actacttaga ctcgtactgt tgtatgtatc cagcggcggc ggccgcaac 15600
gaagctatgt ccaagcga aatcaagaa gagatgtcc aggtcatcgc gccggagatc 15660
tatggcccc cgaagaagga agagcaggat tacaagcccc gaaagctaaa gcgggtcaaa 15720
aagaaaaaga aagatgatga tgatgaactt gacgacgagg tggaactgct gcacgctacc 15780
gcgccaggc gacgggtaca gtggaagggt cgacgcgtaa aacgtgtttt gcgaccggc 15840
accaccgtag tctttaccg ccgtgagcgc tccaccgca cctacaagcg cgtgtatgat 15900
gaggtgtacg gcgacgagga cctgcttgag caggccaacg agcgcctcgg ggagttgcc 15960

tacggaaagc ggcataagga catgctggcg ttgccgctgg acgagggcaa cccaacacct 16020
agcctaaagc ccgtaacct gcagcagggt ctgcccgcgc ttgcaccgtc cgaagaaaag 16080
cgcgccctaa agcgcgagtc tggtagcttg gcaccaccg tgcagctgat ggtaccaag 16140
cgccagcgac tggaagatgt cttggaaaaa atgaccgtgg aacctgggct ggagcccag 16200
gtcccgtg gcgcaatcaa gcaggtggcg ccgggactgg gcgtgcagac cgtggacgtt 16260
cagatacca ctaccagtag caccagtatt gccaccgcca cagagggcat ggagacacaa 16320
acgtccccgg ttgcctcagc ggtggcggat gcccggtg aggcggtcgc tgcggccgcg 16380

tccaagacct ctacggagg gcaaacggac ccgtggatgt ttcgctttc agcccccg 16440
cgcccgcggt gttcaggaa gtacggcgcc gccagcgcgc tactgcccga atatgccta 16500
catccttcca ttgcgctac ccccggctat cgtggctaca cctaccgccc cagaagacga 16560
gcaactacce gacgccgaac caccactgga accgcccgc gccgtcggc tcgccagccc 16620
gtgctggccc cgatctcgt gcgcagggtg gctcgcgaag gaggcaggac cctggtgctg 16680
ccaacagcgc gctaccacc cagcatcgt taaaagccgg tctttgtgt tcttgagat 16740

atggccctca cctgccgect ccgtttcccg gtgccgggat tccgaggaag aatgcaccgt 16800

aggaggggca tggccggcca cggcctgacg ggcggcatgc gtcgtgca ccaccggcg 16860

cggcgcgctg cgcaccgtcg catgcgcggc ggtatcctgc cctccttat tccactgatc 16920

gccgcggcga ttggcgccgt gcccgaatt gcatccgtgg ccttgcaggc gcagagacac 16980

tgattaaaa caagttgcat gtggaaaaat caaataaaa agtctggact ctcacgctcg 17040

cttggctctg taactatfff gtagaatgga agacatcaac tttgcgtctc tggccccgcg 17100

acacggctcg cggccgttca tgggaaactg gcaagatc ggcaccagca atatgagcgg 17160

tggcgcttc agctggggct cgctgtggag cggcattaaa aatttcggtt ccaccgttaa 17220

gaactatggc agcaaggcct ggaacagcag cacaggccag atgctgaggg ataagttgaa 17280

agagcaaaa ttccaacaaa aggtggtaga tggcctggcc tctggcatta gcggggtggt 17340

ggacctggcc aaccaggcag tgcaaaataa gattaacagt aagcttgatc cccgcctec 17400

cgtagaggag cctccaccgg ccgtggagac agtgtctcca gagggcgctg gcgaaaagcg 17460

tccgcgccc gacaggggag aaactctggt gacgcaata gacgagcctc cctcgtacga 17520

ggaggcacta aagcaaggcc tgcccaccac ccgtccatc gcgcccattg ctaccggagt 17580

gctgggccag cacacaccg taacgtgga cctgcctccc cccgcccaca cccagcagaa 17640

acctgtgctg ccaggcccga ccgcccgtgt tgaaccctg cctagccgcg cgtccctgcg 17700

ccgcgcccgc agcggctcgc gatcgttgcg gcccgtagcc agtggcaact ggcaaagcac 17760

actgaacagc atcgtgggtc tgggggtgca atccctgaag cgcgacgat gcttctgaat 17820

agctaactg tegtatgtgt gtcatgtatg cgtccatgtc gccgcccagag gagctgctga 17880

gccgcccgcg gcccgcttcc caagatggct accccttcca tgatgccga gtggtcttac 17940

atgcacatct cgggccagga cgcctcggag tacctgagcc cgggctggt gcagtttgcc 18000

cgcgccaccg agacgtactt cagcctgaat aacaagtta gaaacccac ggtggcgctt 18060

acgcacgacg tgaccacaga ccggtcccag cgtttgacgc tgcggttcat cctgtggac 18120

cgtgaggata ctgcgtactc gtacaaggcg cggttcacc tagctgtggg tgataaccgt 18180

gtgctggaca tggcttccac gtactttgac atccgcgcg tgctggacag gggccctact 18240

tttaagccct actctggcac tgcctacaac gcctggctc ccaagggtgc cccaaatcct 18300

tgcaatggg atgaagctg tactgctctt gaaataaacc tagaagaaga ggacgatgac 18360

aacgaagacg aagtagacga gcaagctgag cagcaaaaaa ctcacgtatt tgggcaggcg 18420

ccttattctg gtataaatat tacaaggag ggtattcaaa taggtgtcga aggtcaaca 18480

cctaaatatg ccgataaaac atttcaacct gaacctcaaa taggagaatc tcagtggtag 18540
gaaactgaaa ttaatcatgc agctgggaga gtccttaaaa agactacccc aatgaaacca 18600
tgttacggtt catatgcaaa acccacaat gaaaatggag ggcaaggcat tcttghtaaag 18660
caacaaaatg gaaagctaga aagtcaagt gaaatgcaat ttttctcaac tactgaggcg 18720
accgcaggca atggtgataa cttgactcct aaagtggat tgtacagtga agatgtagat 18780
atagaaacce cagacactca tatttcttac atgcccacta ttaaggaagg taactcacga 18840
gaactaatgg gccacaatc tatgccaac aggcctaatt acattgcttt tagggacaat 18900

tttattggtc taatgtatta caacagcacg ggtaatatgg gtgttctggc gggccaagca 18960
tcgcagttga atgctgttgt agatttgcaa gacagaaaca cagagctttc ataccagctt 19020
ttgcttgatt ccattgggta tagaaccagg tacttttcta tgtggaatca ggctgttgac 19080
agctatgac cagatgttag aattattgaa aatcatggaa ctgaagatga acttccaaat 19140
tactgctttc cactgggagg tgtgattaat acagagactc ttaccaaggt aaaacctaaa 19200
acaggtcagg aaaatggatg ggaaaaagat gctacagaat tttcagataa aatgaaata 19260
agagttggaa ataattttgc catggaaatc aatctaaatg ccaacctgtg gagaaatttc 19320

ctgtactcca acatagcgt gtatttgccc gacaagctaa agtacagtcc ttccaacgta 19380
aaaatttctg ataacccaaa cacctacgac tacatgaaca agcgagtggg ggctcccggg 19440
ttagtggact gctacattaa ccttggagca cgtgggtccc ttgactatat ggacaacgct 19500
aaccattta accaccaccg caatgctggc ctgcgctacc gctcaatggt gctgggcaat 19560
ggtcgctatg tgccttcca catccaggtg cctcagaagt tctttgcat taaaaacctc 19620
cttctctgc cgggctcata cacctacgag tggaaactca ggaaggatgt taacatggtt 19680
ctgcagagct ccctaggaaa tgacctagg gttgacggag ccagcattaa gtttgatagc 19740

atgtgcttt acgccactt cttecccatg gccacaaca ccgctccac gettgaggec 19800
atgcttagaa acgacaccaa cgaccagtcc ttaacgact atctctccgc cgccaacatg 19860
ctctaccta taccgcca cgtaccaac gtgccatat ccatccctc cgcaactgg 19920
gcggtttcc gggctgggc ctteacgcgc ctaagacta aggaaacccc atcactgggc 19980
tcgggctac acccttatta cacctactct ggctctatac cctacctaga tggaaacttt 20040
taactcaacc acactttaa gaaggtggcc attaccttg actcttctgt cagctggcct 20100
ggcaatgacc gcctgcttac cccaacgag ttgaaatta agcgtcagt tgacggggag 20160

ggttacaacg ttgccagtg taacatgacc aaagactgg tcttggtaca aatgctagct 20220
aactacaaca ttggctacca gggcttctat atcccagaga gctacaagga ccgcatgtac 20280
tccttcttta gaaacttcca gcccatgagc cgtcaggtgg tggatgatac taaatacaag 20340

gactaccaac aggtgggcat cctacaccaa cacaacaact ctggatttgt tggctacctt 20400
gccccacca tgcggaagg acaggcctac cctgctaact tcccctatcc gcttataggc 20460
aagaccgcag ttgacagcat taccagaaa aagtttcttt gcgatcgcac cttttggcgc 20520
atcccattct ccagtaactt tatgtccatg ggcgcaactca cagacctggg ccaaaaacctt 20580

ctctacgcca actccgcca cgcgctagac atgacttttg aggtggatcc catggacgag 20640
cccacccttc tttatgtttt gtttgaagtc tttgacgtgg tccgtgtgca ccggccgcac 20700
cgcggcgtca tcgaaaccgt gtacctgcmc acgcccttct cggccggcaa gccacaaca 20760
taaagaagca agcaacatca acaacagctg ccgccatggg ctccagttag caggaactga 20820
aagccattgt caaagatctt ggtttggggc catatTTTTT gggcacctat gacaagcgt 20880
ttccaggctt tgtttctcca cacaagctcg cctgcgcat agtcaatacg gccggtcgcg 20940
agactggggg cgtacactgg atggcctttg cctggaacct gcactcaaaa acatgctacc 21000

tctttgagcc ctttggcttt tctgaccagc gactcaagca ggtttaccag tttgagtacg 21060
agtcactcct gcgccgtagc gccattgctt ctccccga ccgctgtata acgctggaaa 21120
agtccacca aagcgtacag gggcccaact cggccgctg tggactatc tgctgcatgt 21180
ttctccagc ctttgccaac tggcccaaaa ctccatgga tcacaacccc accatgaacc 21240
ttattaccgg ggtaccaaac tccatgctca acagtccca ggtacagccc accctgcgtc 21300
gcaaccagga acagctctac agcttcctgg agcgcactc gccctactc cgcagccaca 21360
gtgcgcagat taggagcgc acttctttt gtcactttaa aaacatgtaa aaataatgta 21420

ctagagacac ttcaataaaa ggcaaatgct ttattttgta cactctcggg tgattattta 21480
ccccaccct tgcgctctgc gccgtttaa aatcaaagg gttctgccgc gcatcgtat 21540
gcgccactgg caggacacg ttgcgatact ggtgtttagt gctccactta aactcaggca 21600
caaccatccg cggcagctcg gtgaagtttt cactccacag gctgcgcacc atcaccaacg 21660
cgttttagcag gtcgggcgcc gatatctga agtcgcagtt ggggcctccg cctgcgcgc 21720
gcgagttgag atacacaggg ttgcagcact ggaacactat cagcgcggg tggcgcgcg 21780
tggccagcac gctcttctg gagatcagat ccgctccag gtcctccgcg ttgctcaggg 21840

cgaacggagt caactttggt agctgccttc caaaaaggg cgcgtgcca ggctttgagt 21900
tgcaactgca ccgtagtggc atcaaaagg gaccgtgccc ggtctgggag ttaggataca 21960
gcgcctgcat aaaagcctg atctgcttaa aagccactg agcctttgag ccttcagaga 22020
agaacatgcc gcaagactg ccggaaaact gattggccgg acaggccgcg tcgtgcacgc 22080
agcacttgc gtcggtgtg gagatctgca ccacatttc gcccaccgg ttcttcacga 22140
tcttggcctt gctagactgc tcttcagcg cgcgctgccc gtttctgctc gtcacatcca 22200

tttcaatcac gtgctcctta tttatcataa tgcttccgtg tagacactta agctcgcctt 22260

 cgatctcagc gcagcggcgc agccacaacg cgcagcccgt gggctcgtga tgctttagg 22320
 tcacctctgc aaacgactgc aggtacgcct gcaggaatcg ccccatcacc gtcacaaagg 22380
 tcttgttgcct ggigaaggc agctgcaacc cgcggctcctc ctcgttcagc caggtcttgc 22440
 atacggccgc cagagcttcc acttggcag gcagtagttt gaagtccgc tttagatcgt 22500
 tatccacgtg gtacttgcct atcagcgcgc gcgcagcctc catgcccttc tcccacgcag 22560
 acacgatcgg cacactcagc gggttcatca ccgtaatttc actttccgct tcgctgggct 22620
 ctctctcttc ctcttgcgtc cgcataccac gcgccactgg gtcgtcttca ttcagccgcc 22680

 gcaactgtgc cttacctct ttgccatgct tgattagcac cggggggtg ctgaaacca 22740
 ccattttagt ccccacatct tctctttctt cctcgtctgc caccattacc tctggtgatg 22800
 gcgggcgctc gggcttggga gaagggcgtc tctttttctt cttgggcgca atggcacaat 22860
 ccgcccccga ggtcgatggc cgcgggctgg gtgtgcgcgg caccagcgcg tcttgtgatg 22920
 agtcttctc gtctcggac tcgatacgc gcctcatccg cttttttggg ggcgcccggg 22980
 gaggcggcgg cgacggggac ggggacgaca cgtctccat ggttggggga cgtcgcgcgcg 23040
 caccgcgtcc gcgctcgggg gtggtttcgc gctgctctc ttcccactg gccatttctt 23100

 tctcctatag gcagaaaaag atcatggagt cagtcgagaa gaaggacagc ctaaccgccc 23160
 cctctgagtt ccccaccacc gcctccaccg atgccgcaa cgcgcctacc accttccccg 23220
 tcgaggcacc cccgctttag gaggaggaag tgattatcga gcaggacca ggtttttaa 23280
 gcgaagacga cgaggaccgc tcagtaccaa cagaggataa aaagcaagac caggacaacg 23340
 cagaggcaaa cgaggaacaa gtcgggcggg gggacgaaag gcatggcgac tacctagatg 23400
 tgggagacga cgtgctgtg aagcatctgc agcgcagtg cgccattatc tgcgacgcgt 23460
 tgcaagagcg cagcgatgtg cccctcgcca tagcggatgt cagccttgc taccgaacgc 23520

 acctattctc accgcgcgta cccccaaac gccaaagaaa cggcacatgc gagccaacc 23580
 cgcgcctcaa ctctacccc gtatttgcg tgccagaggt gcttgccacc tatcacatct 23640
 ttttcaaaa ctgcaagata cccctatcct gccgtgcaa cgcagccga gcggacaagc 23700
 agctggcctt gcggcagggc gctgtcatac ctgatatcg ctcgctcaac gaagtccaa 23760
 aaatctttga gggctttgga gcgcacgaga agcgcgcggc aaacgctctg caacaggaaa 23820
 acagcaaaa tgaagtcac tctggagtgt tgggtggaact cgagggtgac aacgcgcgcc 23880
 tagccgtact aaaacgcagc atcaggtca cccacttgc ctaccggca cttaacctac 23940

cccccaaggt catgagcaca gtcgatgagtg agctgatcgt gcgccgtgcg cagcccctgg 24000
 agagggatgc aaatttgcaa gaacaacag aggaggcct accccagatt ggcgacgagc 24060
 agctagcgcg ctggcttcaa acgcgcgagc ctgccgactt ggaggagcga cgcaactaa 24120
 tgatggccgc agtgctcgtt accgtggagc ttgagtgcac gcagcggttc tttgctgacc 24180
 cggagatgca gcgcaagcta gaggaacat tgcaactacac ctttcgacag ggctacgtac 24240
 gccaggcctg caagatctcc aacgtggagc tctgcaacct ggtctctac ctiggaattt 24300
 tgcacgaaaa ccgccttggg caaacgtgc ttcattccac gctcaagggc gaggcgcgcc 24360

 gcgactacgt ccgcgactgc gtttacttat ttctatgcta cacctggcag acggccatgg 24420
 gcgtttggca gcagtgcttg gaggagtgca acctcaagga gctgcagaaa ctgctaaagc 24480
 aaaacttga gacctatgg acggccttca acgagcgtc cgtggccgcg cacctggcgg 24540
 acatcatttt ccccgaacgc ctgcttaaaa cctgcaaca gggctgcca gacttcacca 24600
 gtcaaagcat gttgcagaac tttaggaact ttatcctaga gcgctcagga atcttgcccg 24660
 ccacctgctg tgcacttct agcgactttg tgccattaa gtaccgcaa tgcctccgc 24720
 cgctttgggg ccaactgctac cttctgcagc tagccaacta ccttgctac cactctgaca 24780

 taatggaaga cgtgagcggg gacggtctac tggagtgtca ctgtcgtgc aacctatgca 24840
 ccccgaccg ctcctggtt tgcaattcgc agctgcttaa cgaaagtcaa attatcggtg 24900
 cctttgagct gcagggtccc tcgctgacg aaaagtccgc ggctccgggg ttgaaactca 24960
 ctccgggct gtggacgtc gcttacctc gcaaatgtt acctgaggac taccagccc 25020
 acgagattag gttctacgaa gaccaatccc gcccgccaaa tgcggagctt accgctgcg 25080
 tcattacca gggccacatt cttggccaat tgcaagccat caacaagcc cgccaagagt 25140
 ttctgtacg aaaggacgg ggggttact tggacccca gtccggcgag gagctcaacc 25200

 caatccccc gccgcgcag ccctatcagc agcagccgcg ggccttctt tcccaggatg 25260
 gcacccaaaa agaagctgca gctgccgccc ccaccacgg acgaggagga atactgggac 25320
 agtcaggcag aggaggtttt ggacgaggag gaggaggaca tgatggaaga ctgggagagc 25380
 ctagacgagg aagcttccga ggtcgaagag gtgtcagacg aaacaccgtc accctcggtc 25440
 gcattccct cgccggcgc ccagaaatcg gcaaccggtt ccagcatggc tacaacctc 25500
 gctctcagg cgccgcccgc actgccgtt cgccgacca accgtagatg ggacaccact 25560
 ggaaccaggg ccgtaagtc caagcagccc ccgccgttag cccaagagca acaacagcgc 25620

 caagctacc gtcgatggc cgggcacaag aacgcatag ttgcttgctt gcaagactgt 25680
 gggggcaaca tctccttcgc ccgcccctt cttctctacc atcagggctt ggcttcccc 25740
 cgtaacatcc tgcattacta ccgtcatctc tacagccat actgcaccgg cggcagcggc 25800

agcggcagca acagcagcgg ccacacagaa gcaaaggcga ccggatagca agactctgac 25860
 aaagcccaag aaatccacag cggcggcagc agcaggagga ggagcgtgc gtctggcgcc 25920
 caacgaacc gtatcgacc gcgagcttag aaacaggatt tttcccactc tgtatgctat 25980
 atttcaacag agcagggggc aagaacaaga gctgaaaata aaaaacaggt ctctgcgatc 26040

 cctcaccgc agctgcctgt atcacaaaag cgaagatcag cttcggcgca cgctggaaga 26100
 cgcgaggct ctcttcagta aatactgcgc gctgactctt aaggactagt ttcgcgccct 26160
 ttctcaaatt taagcgcgaa aactacgtca tctccagcgg ccacaccgg gccagcacc 26220
 tgtctcagc gccattatga gcaaggaaat tcccacgcc tacatgtgga gttaccagcc 26280
 acaaatggga cttcggctg gagctgcca agactactca acccgaataa actacatgag 26340
 cgcgggacc cacatgatat cccgggtcaa cggaatccgc gccaccgaa accgaattct 26400
 cttggaacag gcggctatta ccaccacacc tcgtaataac cttaatcccc gtagttggcc 26460

 cgctgcctg gtgtaccagg aaagtcccgc tcccaccact gtggtacttc ccagagacgc 26520
 ccaggccgaa gttcagatga ctaactcagg ggcgcagctt gcggcggtct ttcgtcacag 26580
 ggtgctgctg cccgggcagg gtataactca cctgacaatc agagggcgag gtattcagct 26640
 caacgacgag tcggtgagct cctcgttgg tctccgtccg gacgggacat ttcagatcgg 26700
 cgcgccggc cgctcttcat tcacgctcg tcaggcaatc ctaactctgc agacctctc 26760
 ctctgagccg cgctctggag gcattggaac tctgcaattt attgaggagt ttgtgccatc 26820
 ggtctacttt aacccttct cgggacctcc cggccactat ccgatcaat ttattcctaa 26880

 ctttgacgcg gtaaaggact cggcggatgg ctacgactga atgttaagt gagaggcaga 26940
 gcaactgcgc ctgaaacacc tggtcactg tcgccccac aagtgtttg cccgcgactc 27000
 cggtagttt tgctactttg aattgccga ggatcatatc gagggcccgg cgcacggcgt 27060
 ccgcttacc gccaggag agcttgcccg tagcctgatt cgggagtta cccagcgcc 27120
 cctgctagt gagcgggaca ggggacctg tgttctcact gtgatttga actgtcctaa 27180
 ccctggatta catcaagatc tttgttcca tctctgtct gagtataata aatacagaaa 27240
 ttaaaatata ctgggctcc tategccatc ctgtaaacgc caccgtctc acccgcccaa 27300

 gcaaaccaag gcgaacctta cctgtactt ttaacatctc tcctctgtg atttacaaca 27360
 gtttcaacc agacggagtg agtctacgag agaacctctc cgagctcagc tactccatca 27420
 gaaaaaacac caccctctt acctgccggg aacgtacg 27458

<210> 5

<211> 3712

<212> DNA

<213> adenovirus

<400> 5

tggacaggtc caaaaccaga agccaactgc ataattgaat acgggaaaca aaaccagat	60
agcaaaactaa ctttaactct tgtaaaaaat ggaggaattg ttaatggata tgtaacgcta	120
atgggagcct cagactacgt taacacctta tttaaaaaca aaaatgtctc cattaatgta	180
gaactatact ttgatgccac tggatcatata ttaccagact catcttctct taaaacagat	240
ctagaactaa aatacaagca aaccgctgac tttagtgcaa gaggttttat gccaaagtact	300
acagcgtatc catttgtctc tcctaatacg ggaacacata atgaaaatta tatttttgg	360
caatgctact acaaagcaag cgatggtgcc ctttttccgt tggaagttac tgttatgctt	420
aataaacgcc tgccagatag tcgcacatcc tatgttatga cttttttatg gtccttgaat	480
gctggcttag ctccagaaac tactcaggca accctcataa cctccccatt taccttttcc	540
tatattagag aagatgactg aagaatcgtt tggttatgt ttcaacgtgt ttatttttca	600
attgcagaaa atttcaagtc atttttcatt cagtagtata gccccaccac cacatagctt	660
atacagatca cegtacctta atcaaaactca cagaacctta gtattcaacc tgccacctec	720
ctcccaacac acagagtaca cagtcctttc tccccggctg gccttaaaaa gcatcatatc	780
atgggtaaca gacatattct taggtgttat attccacacg gtttcctgtc gagccaaacg	840
ctcatcagtg atattaataa actccccggg cagctcactt aagttcatgt cgctgtccag	900
ctgctgagcc acaggctgct gtccaacttg cggttgctta acgggcggcg aaggagaagt	960
ccacgcctac atgggggtag agtcataatc gtgcatcagg ataggcggtt ggtgctgcag	1020
cagcgcgca ataaactgct gccgcgcccg ctccgtcctg caggaataca acatggcagt	1080
ggtctcctca gcatgattc gcaccgcccg cagcataagg cgccttgtcc tccgggcaca	1140
gcagcgcacc ctgatctcac ttaaatcagc acagtaactg cagcacagca ccacaatatt	1200
gttcaaaatc ccacagtgca aggcgctgta tccaaagctc atggcgggga ccacagaacc	1260
cacgtggcca tcataccaca agcgcaggta gattaagtgg cgaccctca taaacacgt	1320
ggacataaac attacctctt ttggcatgtt gtaattcacc acctcccgtt accatataaa	1380
cctctgatta aacatggcgc catccaccac catcctaacc cagctggcca aaacctgccc	1440
gccggctata cactgcaggg aaccgggact ggaacaatga cagtggagag cccaggactc	1500
gtaaccatgg atcatcatgc tcgtcatgat atcaatgttg gcacaacaca ggcacacgtg	1560
catacacttc ctgaggatta caagctctc ccgcgttaga accatatacc agggaacaac	1620
ccattctgta atcagcgtaa atcccacact gcaggggaaga cctcgcacgt aactcacgtt	1680
gtgcattgtc aaagtgttac attcgggcag cagcggatga tcctccagta tggtagcgcg	1740

ggtttctgtc tcaaaaggag gtagacgac cctactgtac ggagtgcgcc gagacaaccg 1800
 agatcgtggt ggtcgtagtg tcatgccaaa tggaacgccg gacgtagtca tatttcctga 1860

 agcaaaaacca ggtgcggggc tgacaaacag atctgcgtct ccggtctcgc cgcttagatc 1920
 gctctgtgta gtagttgtag tataatccact ctctcaaagc atccaggcgc cccttgctt 1980
 cgggttctat gtaaactcct tcatgcgccg ctgccctgat aacatccacc accgcagaat 2040
 aagccacacc cagccaacct acacattcgt tctgcgagtc acacacggga ggagcgggaa 2100
 gagctggaag aaccatgttt tttttttat tcaaaaagat tatccaaaac ctcaaatga 2160
 agatctatta agtgaacgcg ctcccctccg gtggcgtggt caaactctac agccaaagaa 2220
 cagataatgg catttgtaag atgttgcaca atggcttcca aaaggcaaac ggccctcacg 2280

 tccaagtgga cgtaaaggct aaacccttca gggtgaatct cctctataaa cattccagca 2340
 ccttcaacca tgcccaata attctcatct cggcaccttc tcaatatac tetaagcaaa 2400
 tcccgaatat taagtccggc cattgtaaaa atctgctcca gagcgcctc caccttcagc 2460
 ctcaagcagc gaatcatgat tgcaaaaatt caggttctc acagacctgt ataagattca 2520
 aaagcggaac attaacaaaa ataccgcgat cccgtaggtc ccttcgcagg gccagctgaa 2580
 cataatcgtg caggtctgca cggaccagcg cggccacttc cccgccagga accatgacaa 2640
 aagaacccac actgattatg acacgcatac tcggagctat gctaaccagc gtagccccga 2700

 tgtaagcttg ttgcatgggc ggcgatataa aatgcaaggt gctgctcaa aaatcaggca 2760
 aagcctcgcg caaaaaagaa agcacatcgt agtcatgctc atgcagataa aggcaggtaa 2820
 gctccggaac caccacagaa aaagacacca tttttctctc aaacatgtct ggggtttct 2880
 gcataaacac aaaataaaat aacaaaaaaa catttaaca ttagaagcct gtcttacaac 2940
 aggaaaaaca acccttataa gcataagacg gactacggcc atgccggcgt gaccgtaaaa 3000
 aaactggtca ccgtgattaa aaagcaccac cgacagctcc tcggtcatgt ccggagtcat 3060
 aatgtaagac tcggtaaaca catcaggttg attcaccatcg gtcagtgcta aaaagcacc 3120

 gaaatagccc gggggaatac ataccgcag gcgtagagac aacattacag ccccatagg 3180
 aggtataaca aaattaatag gagagaaaaa cacataaaca cctgaaaaac cctcctgcct 3240
 aggcaaaata gcacctccc gctccagaac aacatacagc gcttccacag cggcagccat 3300
 aacagtcagc cttaccagta aaaaagaaaa cctattaaaa aaacaccact cgacacggca 3360
 ccagctcaat cagtcacagt gtaaaaaagg gccaaagtga gagcgagtat atataggact 3420
 aaaaaatgac gtaacggtta aagtccacaa aaaacacca gaaaaccgca cgcgaacct 3480

cgcccagaaa cgaaagccaa aaaaccaca acttcctcaa atcgtcactt cegttttccc 3540

acgttacgtc acttccatt ttaagaaac tacaattccc aacacataca agttactcgg 3600

ccctaaaacc tacgtaacc gcccegttcc caegcccgc gccacgtcac aaactcaacc 3660

ccctcattat catattggct tcaatccaaa ataaggtata ttattgatga tg 3712