(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0054865
(43) 공개일자 2022년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/768 (2014.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/768 (2013.01)
A61K 31/366 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010864
(22) 출원일자(국제) 2020년09월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/048932
(87) 국제공개번호 WO 2021/046048
국제공개일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
62/894,929 2019년09월02일 미국(US)
62/913,667 2019년10월10일 미국(US)

(71) 출원인
아리조나 보드 오브 리젠츠 온 비하프 오브 아리조나 스테이트 유니버시티
미국 아리조나주 85257 스코츠데일 스위트 200 노스 스코츠데일 로드 1475
(72) 발명자
맥패든 더글러스 그랜트
미국 85257-9908 아리조나주 스코츠데일 노스 스코츠데일 로드 1475 스카이송 스위트 200
라만 모하메드 마스무두르
미국 85257-9908 아리조나주 스코츠데일 노스 스코츠데일 로드 1475 스카이송 스위트 200
(74) 대리인
김진회, 김태홍

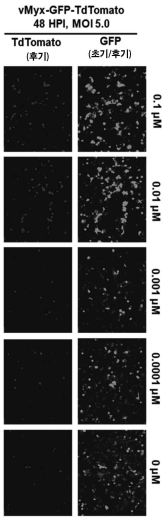
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 **비허용적 암에 대한 종양용해성 바이러스의 감염을 개선하기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

암을 갖는 대상체에게 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 개시된다. 암세포를 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시킴으로써, 비허용적 암세포를 허용적 암세포로 전환시키는 방법 및 암세포를 사멸시키는 방법이 본원에 또한 기재된다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
A61K 31/497 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2710/24032 (2013.01)
C12N 2710/24043 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스, 및

핵세포질간 수송 억제제

를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대(*Poxviridae*) 과로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내(*Chordopoxvirinae*) 아과 또는 엔토모폭스비리내(*Entomopoxvirinae*) 아과로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스(*Orthopoxvirus*), 세르비드폭스바이러스(*Cervidpoxvirus*), 파라폭스바이러스(*Parapoxvirus*), 아비폭스바이러스(*Avipoxvirus*), 카프리폭스바이러스(*Capripoxvirus*), 레포리폭스바이러스(*Leporipoxvirus*), 수이폭스바이러스(*Suipoxvirus*), 몰루시폭스바이러스(*Molluscipoxvirus*), 야타폭스바이러스(*Yatapoxvirus*), 알파엔토모폭스바이러스(*Alphaentomopoxvirus*), 베타엔토모폭스바이러스(*Betaentomopoxvirus*), 또는 감마엔토폭스바이러스(*Gammaentopoxvirus*)의 바이러스 속으로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(*myxoma virus*: MYXV)인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스는 유전자 변형된 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈(Ratjadone) A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 고형 종양인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 고형 종양은 육종 또는 암종인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 고형 종양은 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유윙 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 속귀신경집종, 핍지교종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 또는 망막모세포종인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 고형 종양은 결장직장 선암종, 췌장암, 또는 흑색종인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제가 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제를 투여하기 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제를 투여한 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년의 기간 동안 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 대상체에게 주 2회, 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회 또는 2개월마다 1회 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 치료될 암 조직에 국부적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 종양내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)가 약 0.01 내지 약 10인 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)가 약 0.05 내지 약 5인 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 조직에서 핵세포질간 수송 억제제의 농도가 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM인 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 조직에서 핵세포질간 수송 억제제의 농도가 약 0.01 μM 내지 약 1 μM인 방법.

청구항 28

암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시켜 암세포를 사멸시키는 것을 포함하는, 암세포를 사멸시키는 방법.

청구항 29

암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대한 암세포의 감수성을 향상시키는 방법.

청구항 30

암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하도록 유도하는 방법.

청구항 31

비허용적 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시키는 것을 포함하는, 비허용적 암세포를 허용적 암세포로 전환시키는 방법.

청구항 32

암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하지 않은 암세포에서 종양용해성 바이러스의 증식을 증가시키는 방법.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터의 바이러스인 방법.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터의 바이러스인 방법.

청구항 35

제28항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스인 바이러스 속으로부터의 것인 방법.

청구항 36

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터의 것인 방법.

청구항 37

제28항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)인 방법.

청구항 38

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터의 것인 방법.

청구항 39

제28항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스는 유전자 변형된 것인 방법.

청구항 40

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B인 방법.

청구항 42

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서인 방법.

청구항 43

제28항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 결장직장 암세포, 췌장 암세포, 흑색종 암세포인 방법.

청구항 44

제28항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 인간 암세포인 방법.

청구항 45

제28항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 생체내에서 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉되는 것인 방법.

청구항 46

제28항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 생체외에서 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉되는 것인 방법.

청구항 47

제28항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 동시에 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 48

제28항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 순차적으로 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 암세포는 핵세포질간 수송 억제제와 접촉되기 전에 종양용해성 바이러스와 접촉되는 것인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 암세포는 종양용해성 바이러스와 접촉되기 전에 핵세포질간 수송 억제제와 접촉되는 것인 방법.

청구항 51

제28항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 약 0.01 내지 약 10의 MOI로 종양용해성 바이러스와 접촉되는 것인 방법.

청구항 52

제28항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포는 약 0.05 내지 약 5의 MOI로 종양용해성 바이러스와 접촉되는 것인 방법.

청구항 53

제28항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 방법.

청구항 54

제28항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 방법.

청구항 55

제28항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 56

제28항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 57

제28항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스를 생체외에서 자가 세포 또는 이종 세포에 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 자가 세포 또는 이종 세포는 골수세포 또는 대식세포인 방법.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 자가 세포 또는 이종 세포를 대상체에게 주사하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 60

a. 종양용해성 바이러스, 및

b. 핵세포질간 수송 억제제

를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터 유래되는 것인 약학적 조성물.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터 유래되는 것인 약학적 조성물.

청구항 64

제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스의 바이러스 속으로부터 유래되는 것인 약학적 조성물.

청구항 65

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터 유래되는 것인 약학적 조성물.

청구항 66

제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)인 약학적 조성물.

청구항 67

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터 유래되는 것인 약학적 조성물.

청구항 68

제60항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스는 유전자 변형된 것인 약학적 조성물.

청구항 69

제60항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 70

제60항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B인 약학적 조성물.

청구항 71

제60항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서인 약학적 조성물.

청구항 72

제60항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 종양내 또는 비경구 투여에 적합한 단위 투여 형태인 약학적 조성물.

청구항 73

제72항에 있어서, 단위 투여량이, mL당 약 1×10^{3} 플라크 형성 단위(PFU) 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 74

제72항에 있어서, 단위 투여량이, mL당 약 1×10^{5} PFU 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 75

제60항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 종양용해성 바이러스와 핵세포질간 수송 억제제 간의 중량비가 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{-9}인 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호 참조**

[0002] 본 출원은 2019년 10월 10일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/913,667호 및 2019년 9월 2일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/894,929호를 우선권으로 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 인용된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 개시내용은 종양용해성 바이러스, 특히 핵세포질간 수송 억제제와 조합된 종양용해성 바이러스의 용도에 관한 것이다.

[0005] **정부 지원에 대한 진술**

[0006] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 승인 번호 R01 AI080607 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0007] 폭스비리대(*Poxviridae*) 과의 바이러스와 같은 종양용해성 바이러스는 형질전환된 암세포를 선택적으로 감염 및 사멸시키는 능력으로 인해, 그리고 바이러스 뿐만 아니라 종양 항원에 대해서도 숙주의 면역계를 활성화시키는 능력에 의해 설계 및/또는 선택되는 포유동물 바이러스이다(예컨대, 문헌(Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. 2014. *Going viral with cancer immunotherapy*. Nature Reviews Cancer 14:559-567) 참조). 그러나, 종양용해성 바이러스의 적용은 특정 종양 세포, 예컨대 비허용적 종양 세포에서 제한될 수 있다. 따라서, 종양용해성 바이러스에 기초한 요법을 개선할 필요가 남아 있다.

[0008] **참조에 의한 인용**

[0009] 본 명세서에 언급된 모든 공개문, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공개문, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 본원에 인용된다.

발명의 내용

[0010] 일부 측면에서, 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본원에 개시된다.

[0011] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내(*Chordopoxvirinae*) 아과 또는 엔토모폭스비리내(*Entomopoxvirinae*) 아과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스(*Orthopoxvirus*), 세르비드폭스바이러스(*Cervidpoxvirus*), 파라폭스바이러스(*Parapoxvirus*), 아비폭스바이러스(*Avipoxvirus*), 카프리폭스바이러스(*Capripoxvirus*), 레포리폭스바이러스(*Leporipoxvirus*), 수이폭스바이러스(*Suipoxvirus*), 몰루시폭스바이러스(*Molluscipoxvirus*), 야타폭스바이러스(*Yatapoxvirus*), 알파엔토모폭스바이러스(*Alphaentomopoxvirus*), 베타엔

토모폭스바이러스(*Betaentomopoxvirus*), 또는 감마엔토폭스바이러스(*Gammaentopoxvirus*)의 바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(*myxoma virus*: MYXV)이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈(Ratjadone) A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 육종 또는 암종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유윙 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 속귀신경집종, 핍지교종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 또는 망막모세포종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 결장직장 선암종, 췌장암, 또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제를 투여하기 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제를 투여한 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년의 기간 동안 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 대상체에게 주 2회, 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회, 또는 2개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 치료될 암 조직에 국부적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 종양내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)는 약 0.01 내지 약 10이다. 일부 실시양태에서, 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)는 약 0.05 내지 약 5이다. 일부 실시양태에서, 조직에서 핵세포질간 수송 억제제의 농도는 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM이다. 일부 실시양태에서, 조직에서 핵세포질간 수송 억제제의 농도는 약 0.01 μM 내지 약 1 μM이다.

[0012] 일부 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시켜 암세포를 사멸시키는 것을 포함하는, 암세포를 사멸시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0013] 일부 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대한 암세포의 감수성을 향상시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0014] 일부 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하도록 유도하는 방법이 본원에 개시된다.

[0015] 일부 측면에서, 비허용적 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시키는 것을 포함하는, 비허용적 암세포를 허용적 암세포로 전환시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0016] 일부 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하지 않은 암세포에서 종양용해성 바이러스의 증식을 증가시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0017] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터의 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터의 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스인 바이러스 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부

터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서이다. 일부 실시양태에서, 암세포는 결장직장 암세포, 췌장 암세포, 흑색종 암세포이다. 일부 실시양태에서, 암세포는 인간 암세포이다. 일부 실시양태에서, 암세포는 생체내에서 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 생체외에서 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉된다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 동시에 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 순차적으로 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포는 핵세포질간 수송 억제제와 접촉되기 전에 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 종양용해성 바이러스와 접촉되기 전에 핵세포질간 수송 억제제와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 약 0.01 내지 약 10의 MOI로 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 약 0.05 내지 약 5의 MOI로 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스를 생체외에서 자가 세포 또는 이종 세포에 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가 세포 또는 이종 세포는 골수세포 또는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 자가 세포 또는 이종 세포를 대상체에게 주사하는 것을 추가로 포함한다.

[0018] 일부 측면에서, 종양용해성 바이러스, 및 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 개시된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스의 바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서이다. 일부 실시양태에서, 약학적 조성물은 종양내 또는 비경구 투여에 적합한 단위 투여 형태이다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^{3} 플라크 형성 단위(PFU) 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^{5} PFU 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스와 핵세포질간 수송 억제제 간의 중량비는 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{-9}이다.

[0020] 일부 실시양태는 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 암세포를 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시켜 암세포를 사멸시키는 것을 포함하는, 암세포를 사멸시키는 방법이 본원에 기재된다. 한 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대한 암세포의 감수성을 향상시키는 방법이 본원에 기재된다. 한 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하도록 만드는 방법이 본원에 기재된다. 한 측면에서, 비허용적 암세포를

종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 비허용적 암세포를 허용적 암세포로 전환시키는 방법이 본원에 기재된다. 한 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하지 않은 암세포에서 종양용해성 바이러스의 증식을 증가시키는 방법이 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대과로부터의 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터의 바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스인 바이러스 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 A549 세포, HeLa 세포, 239 세포, 또는 영장류 Vero 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 생체내 세포, 시험관내 세포, 또는 생체외 세포이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 육종 또는 암종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유윙 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 속귀신경집종, 핍지교종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 또는 망막모세포종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 결장 직장 선암종, 췌장암 또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 상기 핵세포질간 수송 억제제는 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 상기 핵세포질간 수송 억제제를 투여하기 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 상기 핵세포질간 수송 억제제를 투여한 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 종양용해성 바이러스 및 상기 핵세포질간 수송 억제제를 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년의 기간 동안 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 종양용해성 바이러스, 상기 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 상기 대상체에게 주 2회, 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회, 또는 2개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 치료될 암 조직에 국부적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 조직에 대한 상기 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)는 약 0.01 내지 약 10이다. 일부 실시양태에서, 상기 조직에 대한 상기 종양용해성 바이러스의 감염 다중도(MOI)는 약 0.05 내지 약 5이다. 일부 실시양태에서, 상기 조직에서 상기 핵세포질간 수송 억제제의 농도는 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM이다. 일부 실시양태에서, 상기 조직에서 상기 핵세포질간 수송 억제제의 농도는 약 0.01 μM 내지 약 1 μM이다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포를 상기 종양용해성 바이러스 및 상기 핵세포질간 수송 억제제와 동시에 또는 순차적으로 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포는 상기 핵세포질간 수송 억제제와 접촉되기 전에 상기 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 상기 종양용해성 바이러스와 접촉되기 전에 상기 핵세포질간 수송 억제제와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포가 상기 종양용해성 바이러스와 접촉되기 전에 상기 암세포를 상기 핵세포질간 수송 억제제로 전처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포는 약 0.01 내지 약 10의 MOI로 상기 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포는 약 0.05 내지 약 5의 MOI로 상기 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 상기 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 상기 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포를, 약 0.0001 μM 내지 약 100 μM 농도의 상기 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 암세포를, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM 농도의 상기 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에

서, 방법은 상기 종양용해성 바이러스를 생체외에서 자가 세포 또는 이종 세포에 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가 세포 또는 이종 세포는 골수세포 또는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 자가 세포 또는 이종 세포를 상기 대상체에게 주사하는 것을 포함한다.

[0021] 한 측면에서, 종양용해성 바이러스, 및 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학적 조성물은 종양내 또는 비경구 투여에 적합한 단위 투여 형태이다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^{3} 플라크 형성 단위(PFU) 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^{5} PFU 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 종양용해성 바이러스와 상기 핵세포질간 수송 억제제 간의 중량비는 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{-9}이다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1a** 및 **도 1b**는 핵세포질간 수송 억제제 렙토마이신 B를 사용한 인간 결장직장 선암종 세포주 HT29의 처리가 MYXV 초기(GFP) 및 후기(TdTomato) 유전자 발현 수준을 향상시켰다는 것을 도시한다. HT29 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하고, 억제제 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 5.0(**도 1a**) 또는 0.5(**도 1b**)의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후(HPI) 24시간(**도 1a**) 및 48시간(**도 1b**)에 촬영하였다.

도 2는 핵세포질간 수송 억제제 렙토마이신 B가 인간 결장직장 선암종 세포주 HT29에서 MYXV 복제를 향상시켰다는 것을 도시한다. HT29 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하였다. 이어서, 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-TdTomato로 0.5 또는 0.05의 MOI로 감염시켰다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거하고, 세포를 세척하고, 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염 후 72시간 후에 감염된 세포를 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다.

도 3a 및 **도 3b**는 핵세포질간 수송 억제제 렙토마이신 B를 사용한 인간 췌장 암세포주 PANC-1의 처리가 MYXV 유전자 발현 및 복제를 향상시켰다는 것을 도시한다. **도 3a**는, PANC-1 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 전처리하고, 억제제의 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 5.0의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후 48시간에 촬영하였다는 것을 나타낸다. **도 3b**는 PANC-1 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 전처리하였다는 것을 나타낸다. 이어서, 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-TdTomato로 0.5 또는 0.5의 MOI로 감염시켰다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거하고, 이어서 세포를 세척하고, 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염 후 48시간 또는 72시간에 감염된 세포를 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다.

도 4a 및 **도 4b**는 핵세포질간 수송 억제제 렙토마이신 B를 사용한 인간 흑색종 세포주 MDA-MB-435의 처리가 MYXV 유전자 발현 및 복제를 향상시켰다는 것을 도시한다. **도 4a**는, MDA-MB-435 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 전처리하고, 억제제의 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 5.0의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후 48시간에 촬영하였다는 것을 나타낸다. **도 4b**는 MDA-MB-435 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 전처리하고, 이어서 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-TdTomato로 0.5 또는 0.5의 MOI로 감염시켰다는 것을 나타낸다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거하고, 이어서 세포를 세척하고, 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염 후 48시간 또는 72시간에 감염된 세포를 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다.

도 5a 및 **도 5b**는 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 인간 암세포주의 처리 및 후속한 MYXV를 사용한 감염이 세포 생존력을 감소시켰다는 것을 도시한다. **도 5a**는 HT29 세포를 나타내고, **도 5b**는 HT29 세포를 나타내고(100 ul 배지/웰에 20,000개 세포), 이들 세포를 불투명 벽 96 웰 플레이트에서 밤새 배양하였다. 이어서, 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 처리하고, 억제제의 존재 하에 vMyx-GFP로 5.0의 MOI로 감염시켰다. 세포 생존력을 감염 후 64시간(**도 5a**) 및 40시간(**도 5b**)에 ATP 수준을 측정하여 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 바이러스는 감염 및 복제를 위해 자연스럽게 허용적 세포를 이용하지만; 모든 종양 세포가 종양용해성 바이러스 감염을 허용하는 것은 아니다. 본 개시내용은 비허용적 암세포를 하나 이상의 핵세포질간 수송 억제제와 같은

작용제로 처리하는 것이 비허용적 세포를 허용적 세포로 전환시키고 암세포에서 종양용해성 바이러스의 복제를 촉진하여 암세포 사멸을 향상시킬 수 있다는 놀라운 발견을 포함한다.

[0024] 본원에서 입증되는 바와 같이, 핵세포질간 수송 억제제의 사용은 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 일반적으로 민감하지 않은(즉, 핵세포질간 수송 억제제의 부재 하에 종양용해성 바이러스 감염에 민감하지 않은) 암세포에서 종양용해성 바이러스 유전자 발현 및 복제를 향상시키는 것을 돕는다. 핵세포질간 수송 억제제의 첨가는 또한 감염에 일반적으로 민감하지 않은 숙주 세포에서 종양용해성 바이러스 자손의 생성, 또는 종양용해성 바이러스의 증식을 향상시킬 수 있다. 비허용적 암세포에 대한 핵세포질간 수송 억제제의 놀라운 효과는, 핵세포질간 수송 억제제가 종양용해성 바이러스와 조합으로 사용될 때 향상된 암세포 사멸 효과로 해석되어 암을 치료하기 위한 보다 효과적인 방법을 제공할 수 있다.

[0025] 본 개시내용은 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 투여함으로써 암, 예컨대 종양용해성 바이러스 감염에 대해 민감하지 않거나 낮은 감수성을 갖는 암을 치료하는 방법을 제공한다. 또한, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시킴으로써 비허용적 암세포를 허용적 암세포로 전환시키는 방법 및 암세포를 사멸시키는 방법이 본원에 제공된다. 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 추가로 제공된다.

[0026] 달리 설명되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기재되어 있다. 또한, 재료, 방법 및 예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다.

[0027] 용어 및 방법에 대한 하기 설명은 본 발명의 화합물, 조성물 및 방법을 더 잘 설명하고, 본 개시내용의 실시에서 당업자를 안내하기 위해 제공된다. 또한, 본 개시에서 사용된 용어는 특정 실시양태 및 예를 설명할 목적으로만 사용되며 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

[0028] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 형태도 포함하도록 의도된다.

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "및/또는"은 연관된 나열된 항목 중 하나 이상의 임의의 모든 가능한 조합뿐만 아니라 대안 ("또는")으로 해석될 때 조합의 결여를 지칭하고 이를 포괄한다.

[0030] 용어 "약"은 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미할 수 있으며, 이는 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지에, 즉 측정 시스템의 제한에 부분적으로 의존할 것이다. 예컨대, "약"은 당업계의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 최대 15%, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 용어는 값의 10배 이내, 5배 이내, 또는 2배 이내를 의미할 수 있다.

[0031] 본원에서 사용되는 바와 같이, "하나 이상" 또는 적어도 하나는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 초과를 의미할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하다" 또는 "포함하는"은 "포괄하다"를 의미한다. 따라서, "A 또는 B를 포함하는"은 A, B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. "포함하다" 및 용어의 변형, 예컨대 본원에서 사용되는 바와 같이 "포함하는", "포함하다" 및 "포함된"은 다양한 추가적 성분 또는 단계가 공동으로 사용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0033] "유효량"은 원하는 효과, 예컨대 폭스바이러스 생성의 증가를 생성하기에 충분한 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 이 예에서, 유효량은 투여되는 세포의 유형 및 특정 작용제, 치료 기간, 임의의 공동 치료의 특성, 및 당업자의 지식 및 전문 지식 내의 기타 인자에 따라 달라질 것이다.

[0034] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "허용적"은 세포가 본 출원에 기재된 바이러스에 의해 감염되기 쉬운지의 여부를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "감염에 민감한"은 세포가 바이러스 또는 또 다른 세포내 유기체로 감염되는 능력을 지칭한다. 이는 "허용적" 감염을 포괄하지만, 세포가 감염되지만 유기체가 감염된 세포로부터 다른 세포로 반드시 복제 및/또는 확산되는 것은 아닌 상황을 포괄하도록 의도되었기 때문에, 용어가 그렇게 제한적인 것은 아니다. 본원에서 사용되는 바와 같이 어구 "바이러스 증식"은 허용적 세포 유형으로부터 허용적 또는 민감한 특징의 추가의 세포로의 감염성 바이러스의 확산 또는 계대를 기술한다.

[0035] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "숙주 세포"는 조직, 기관, 또는 단리된 세포의 특정 조직과 관련하여 어떠

한 제한도 없이 포괄하는 것으로 광범위하게 이해되어야 한다. 이러한 세포는 독특한 유형의 세포 또는 상이한 유형의 세포의 그룹, 예컨대 배양된 세포주, 주로 세포 및 분열 세포일 수 있다. 숙주 세포의 예는 원핵생물 세포, 효모와 같은 하등 진핵생물 세포 및 곤충 세포와 같은 다른 진핵생물 세포, 및 포유동물(인간 또는 비인간) 세포 뿐만 아니라 종양용해성 바이러스를 생성할 수 있는 세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 숙주 세포는 암세포, 예컨대 유기체 내의 암세포일 수 있다.

[0036] "핵세포질간 수송 억제제"는 핵 외수송 경로를 통한 분자의 수송을 억제하는 작용제이다. 용어 "핵세포질간 수송 억제제"는 "핵 외수송 억제제"와 상호교환적으로 사용된다. 핵세포질간 수송 억제제의 예는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, 라차돈 B, 라차돈 C, 라차돈 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, KOS 2464, PKF050-638, CBS9106, 및 셀리넥서를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0037] "바이러스"는 살아있는 세포 내부에서 번식하는 미세한 감염 유기체이다. 바이러스는 본질적으로 단백질 코트로 둘러싸인 단일 핵산의 코어로 이루어질 수 있으며, 살아있는 세포 내부에서만 복제하는 능력을 갖는다. "바이러스 복제"는 적어도 하나의 바이러스 생활 주기가 발생하여 추가 바이러스가 생성되는 것이다. 바이러스는 숙주 세포의 정상적인 기능을 전복시켜 세포가 바이러스에 의해 결정된 방식으로 거동하도록 할 수 있다. 예컨대, 바이러스 감염은 사이토카인을 생성하거나 사이토카인에 반응하는 세포를 초래할 수 있으며, 비감염된 세포는 일반적으로 그렇게 않다. 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "복제 적격"은 특정 숙주 세포 내에서 감염 및 복제할 수 있는 바이러스를 지칭한다.

[0038] "폭스바이러스"는 폭스비리대 과로부터의 바이러스이다. 폭스바이러스는 척추동물 및 무척추동물 모두를 감염시킬 수 있는 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 폭스바이러스는, 예컨대 코르도폭스비리내 아과, 예컨대 오르토폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 및 야타폭스바이러스 속, 및 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 및 감마엔토폭스바이러스 속을 포함하는 엔토모폭스비리내 아과의 일부로 분류되는 바이러스의 종 및 속을 포함한다.

[0039] "접촉"은 직접적인 물리적 회합으로의 배치를 의미한다. 접촉은, 예컨대 작용제를, 예컨대 세포를 갖는 배양물 중의 세포와의 직접적인 물리적 회합으로 배치함으로써 억제제와 같은 분자와 세포 사이의 접촉을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제를 세포에 접촉시키거나 노출시키는 것은 작용제를 세포의 성장 배지에 배치하는 것을 포함한다.

[0040] "억제하다"는, 예컨대 핵 외수송 경로에서 수송을 감소시키기 위해 측정 가능한 정도로 감소시키는 것을 의미한다. "억제제"는, 예컨대 핵 외수송 경로의 수송을 어느 정도 측정 가능한 수준으로 억제할 수 있는 물질이다.

[0041] 용어 "치료하다", "치료된", "치료하는", "치료" 등은 예방(예컨대, 치료될 병리학적 상태를 가질 위험이 있는 대상체에서의 예방 조치) 및/또는 또는 요법(예컨대, 병리학적 병태를 갖는 것으로 진단된 대상체에서의 요법)을 포괄하는 것을 의미한다. 치료의 결과는 장애 및/또는 이와 관련된 증상의 속도를 늦추거나, 치유하거나, 감소시키거나, 제어하거나, 개선하는 것이다. "치료"는 장애 및/또는 관련 부작용과 관련된 임의의 증상 또는 다른 악영향의 발생 또는 재발의 빈도 또는 중증도를 줄이는 것을 지칭하는 "경감"의 개념을 포함한다. 용어 "치료하는"은 또한 환자의 특정 질환 또는 장애의 중증도를 감소시키거나 재발을 지연시키는 것, 예컨대 질환을 앓았던 환자의 관해 기간을 연장하는 것을 지칭하는 "관리하는"의 개념을 포괄한다. 용어 "치료하는"은 앞서 언급된 바와 같이 "예방하다", "예방하는" 및 "예방"의 개념을 추가로 포괄한다. 배제되지는 않지만, 장애 또는 병태를 치료하는 것이 장애, 병태 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거되는 것을 요구하지 않는다는 것이 이해된다.

[0042] "약학적으로 허용되는 부형제 또는 희석제"는 작용제와 함께 대상체에게 투여될 수 있고, 그의 약리학적 활성을 파괴하지 않고, 치료량의 작용제를 전달하기에 충분한 용량으로 투여될 때 무독성인 부형제, 담체 또는 희석제를 지칭한다.

[0043] 본 개시내용의 실시 또는 시험에 적합한 방법 및 재료가 하기에 기재되어 있다. 이러한 방법 및 재료는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 다른 방법 및 재료가 사용될 수 있다. 예컨대, 본 개시내용이 속하는 기술분야에 널리 공지된 통상적인 방법은 예컨대 문헌(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed.*, Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to

2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; and Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)을 포함한 다양한 일반적인 및 보다 구체적인 참조문에 기재되어 있다. 또한, 재료, 방법 및 예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다.

[0044] **종양용해성 바이러스**

[0045] 본원에 기재된 종양용해성 바이러스는, 비-분열 세포에서는 어떠한 복제도 나타내지 않거나 최소한의 복제를 나타내지만, 시험관내 또는 생체내에서 성장을 늦추고/늦추거나 상기 분열하는 세포를 용해시킬 목적으로 분열 세포(예컨대, 증식 세포, 예컨대 암세포)에서 선택적으로 복제할 수 있는 바이러스를 포괄한다. 전형적으로, 종양용해성 바이러스는 바이러스 입자 또는 비리온에 패키징된 바이러스 게놈을 포함하고, 감염성이 있다(즉, 숙주 세포 또는 대상체를 감염시키고 이에 진입할 수 있음). 본원에서 사용되는 바와 같이, 이 용어는 DNA 또는 RNA 벡터(바이러스의 유형에 따라 다름) 뿐만 아니라 이로부터 생성된 바이러스 입자를 포함한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 형질감염된 암세포를 선택적으로 감염시키고 사멸시키는 능력에 대해, 및 바이러스 뿐만 아니라 종양 항원에 대해서도 숙주 면역계를 활성화시키는 능력에 의해 설계 및/또는 선택된 포유동물 바이러스이다.

[0047] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대 과로부터의 바이러스이거나 폭스비리대 과로부터 유래된다. 폭스비리대 과 바이러스의 구성원은 감염된 세포의 세포질에서 복제할 수 있는 크고 복잡한 이중 가닥 DNA 바이러스의 다양한 그룹이다. 대부분의 폭스바이러스 게놈은 길이가 약 150,000 내지 300,000 염기쌍이고 대략 150 내지 300개의 단백질을 코딩한다. 이러한 바이러스 단백질의 약 절반은 상이한 폭스바이러스 구성원 간에 고도로 보존되어 있으며, 세포 결합 및 진입, 게놈 복제, 전사 및 비리온 조립과 같은 필수 기능을 수행한다. 다른 바이러스 단백질은 많은 숙주 방어 기능을 회피하는 데 관여한다. 폭스바이러스 유전자는 별개의 단계에서 발현될 수 있다. 예컨대, 초기 유전자 생성물은 바이러스 DNA 복제에 필요하고 DNA가 복제되기 전에 발현되는 단백질을 포함할 수 있다. 다른 한편, DNA 복제 동안 또는 후에 발현되는 중간/후기 유전자 산물은 비리온 성숙에 필요한 구조 단백질을 포함할 수 있다. 이 복잡한 바이러스 복제 과정의 모든 단계(게놈의 코팅을 해제하는 것부터 시작하여, 초기 유전자 발현, DNA 복제, 후기 유전자 발현 및 훨씬 더 복잡한 비리온 성숙 과정)는 감염된 세포의 세포질에서 독점적으로 발생할 수 있다.

[0048] 폭스바이러스는 감염된 세포의 세포질에서 독점적으로 복제할 수 있는 큰 DNA 바이러스이다. 이들은 DNA 및 mRNA 합성에 필요한 모든 단백질을 코딩할 수 있다. 폭스바이러스 복제에 관여하는 바이러스 단백질과는 별도로, 폭스바이러스 게놈의 약 절반은 세포질 및 핵에서 기능하는 다양한 세포내 항바이러스 신호전달 경로의 억제 또는 조작에 필요한 것으로 밝혀진 단백질을 코딩한다. 그러나, 세포질 및 핵 구획으로부터의 숙주 세포 단백질이 폭스 바이러스 복제의 적어도 일부 단계에 참여한다는 증거가 있다. 많은 다양한 세포 단백질 및 신호전달 경로가 폭스바이러스의 감염 및 복제로부터 세포를 방어하는 것과 관련이 있다. 이것이 절반을 초과하는 게놈-코딩된 폭스바이러스 단백질이 이러한 숙주 항바이러스 경로의 특정 억제 또는 조정에 관여하는 이유이다. 일부 경우에서, 바이러스-코딩된 단백질은 숙주 특이적 방식으로 기능하고, 주어진 폭스바이러스가 특정 종의 숙주를 성공적으로 감염시키고 이에서 복제할 수 있는지의 여부를 결정한다. 폭스바이러스의 구성원, 예컨대 믹소마 바이러스(MYXV), 레포리폭스바이러스, 및 백시니아 바이러스(VACV), 오르토폭스바이러스는 인간 암 치료를 위한 종양용해성 바이러스로 개발될 수 있었다.

[0049] 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 유전자 변형된다. 예컨대, 관심 폭스바이러스는 치료 유전자와 같은 임의의 다른 유전자를 보유하고/하거나 하나 이상의 내인성 유전자를 결실 또는 파괴하도록 변형될 수 있다. 암을 치료하기 위해 변형된 바이러스의 경우, 유전자는 전형적으로 치료의 항암 효과를 향상시키기 위해 선택된다. 이러한 유전자는 아폽토시스를 유발하는데 관여하거나, 면역 파괴를 위해 감염된 세포를 표적화하는 데 관여하는 유전자, 예컨대 인터페론에 대한 반응 결여를 복구하거나, 항체 반응을 자극하는 세포 표면 마커의 발현을 초래하는 유전자일 수 있다. 바이러스는 또한 신생물 또는 암세포의 증식 및 성장을 차단하여 세포 분열을 방지하는데 관여하는 유전자를 발현하도록 변형될 수 있다. 또한, 바이러스는 화학요법제의 합성에 관여하는 유전자와 같은 치료 유전자를 포함하도록 변형될 수 있거나, 억제 또는 사멸될 세포가 있는 특정 종의 세포, 예컨대 인간 세포에서 증가된 복제 수준을 갖도록 변형될 수 있다.

[0050] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터의 바이러스이거나 코르도폭스비리내 아과 또는 엔토모폭스비리내 아과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성

바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스인 속으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스, 세르비드폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루시폭스바이러스, 야타폭스바이러스, 알파엔토모폭스바이러스, 베타엔토모폭스바이러스, 또는 감마엔토폭스바이러스인 속으로부터의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르토폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 오르토폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 백시니아 바이러스이거나 백시니아 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 백시니아 바이러스는 리스터, 와이어스, 웨스턴 리저브, 변형된 백시니아 바이러스 안카라, 및 LC16m 시리즈로 이루어진 군으로부터 선택되는 백시니아 바이러스 스트레인이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 라쿤폭스(*Raccoonpox*) 바이러스이거나 라쿤폭스 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 세르비드폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 세르비드폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 오르프 바이러스(*Orf virus*)이거나 오르프 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 파라폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 파라폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 아비폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 아비폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 카프리폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 카프리폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 수이폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 수이폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 몰루시폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 몰루시폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 야타폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 야타폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 알파엔토모폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 알파엔토모폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 베타엔토모폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 베타엔토모폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 감마엔토폭스바이러스 속으로부터 것이거나 감마엔토폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레포리폭스바이러스 속으로부터의 것이거나 레포리폭스바이러스 속의 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 믹소마 바이러스(MYXV)이거나 MYXV로부터 유래된다.

[0051] MYXV는 독특한 생물학 때문에 골육종과 같은 고형암에 대한 치료 바이러스로서 잠재적으로 매우 적합하다. MYXV는 폭스비리대 과 및 레포리폭스바이러스 속의 구성원이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 종양용해성 바이러스 후보물이다. 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 레포리폭스바이러스, 예컨대 믹소마 바이러스이다. 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 오르토폭스바이러스, 예컨대 리스터, 와이어스, 웨스턴 리저브(WR), 변형된 백시니아 바이러스 안카라(MVA), 및 LC16m 시리즈와 같은 백시니아 바이러스의 상이한 스트레인을 포함하는 백시니아 바이러스; 및 라쿤폭스 바이러스(RCNV)이다. 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 야타폭스바이러스, 예컨대 타나폭스바이러스(Tanapoxvirus)(TPV) 또는 야바-유사 질환 바이러스(Yaba-like disease virus)(YLDV)이다. 특정 실시양태에서, 관심 폭스바이러스는 카프리폭스 바이러스, 예컨대 오르프 바이러스이다.

[0052] MYXV는 토끼 특이적 병원체이다. MYXV는 복제 적격인 폭스바이러스의 레포리폭스바이러스 종에 속하는 임의의 바이러스일 수 있다. 일부 실시양태에서, MYXV는 MYXV의 야생형 스트레인이거나 MYXV의 야생형 스트레인로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, MYXV는 MYXV의 유전자 변형된 스트레인이거나 MYXV의 유전자 변형된 스트레인로부터 유래된다. 일부 경우에서 MYXV는 로잔(*Lausanne*) 스트레인이거나 로잔 스트레인으로부터 유래된다. 일부 경우에서, MYXV는 실빌라구스 브라실리엔시스(*Sylvilagus brasiliensis*)에서 순환하는 남미 MYXV 스트레인이거나 실빌라구스 브라실리엔시스에서 순환하는 남미 MYXV 스트레인으로부터 유래된다. 일부 경우에서, MYXV는 실빌라구스 바크마니(*Sylvilagus bachmani*)에서 순환하는 캘리포니아 MYXV 스트레인이거나 실빌라구스 바크마니에서 순환하는 캘리포니아 MYXV 스트레인으로부터 유래된다. 일부 경우에서, MYXV는 유전자 M009L, M036L, M135R, 및 M148R에 변형을 포함하는 약독화된 스페인 필드 스트레인인 6918(2019년 7월 27일에 진뱅크(GenBank)에 의해 제공된, 참조로 본원에 포함된, 진뱅크 수탁 번호 EU552530)이거나 6918로부터 유래된다. 일부 경우에서, MYXV는 6918VP60-T2(2019년 7월 27일 진뱅크에 의해 제공된, 참조로 본원에 포함된, 진뱅크 수탁 번호 EU552531)이거나 6918VP60-T2로부터 유래된다. 일부 경우에서, MYXV는 표준 실험실 스트레인(SLS)으로 불리는 스트레인이거나 SLS으로부터 유래된다.

[0053] 일부 경우에서, MYXV는 문헌(Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," Virology 264:

298-318 (1999), 전체가 참조로 본원에 포함됨)에 개시된 서열에 대해 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 포함하여 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%, 예컨대 95% 내지 98%, 95% 내지 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에서, MYXV는 문헌(Cameron, et al., "The complete DNA sequence of Myxoma Virus," Virology 264: 298-318 (1999))에 개시된 서열을 포함한다.

[0054] 일부 실시양태에서, MYXV는 인간(예컨대, 면역적격 인간)에서는 비-병원성이지만 상이한 조직으로부터 유래되는 광범위한 인간 암세포를 감염시키고 사멸시킬 수 있다. 정상적인 1차 인간 세포에서, MYXV의 복제는, 예컨대 세포 결합 결정인자, 세포내 항바이러스 신호전달 경로 및 I형 IFN 및/또는 다른 사이토카인 매개된 세포 항바이러스 상태와 같은 다수의 인자에 의해 제한될 수 있다. 인간 암세포에서, 이러한 자기 방어 세포 경로는 일반적으로 결함이 있다. 일부 인간 암세포에서 MYXV 복제는 세포 RNA 헬리카제 패밀리 단백질에 의존할 수 있다. 이론에 구애됨이 없이, 세포의 핵과 세포질 구획 사이를 왕복하는 RNA 헬리카제는 바이러스 감염된 세포에서 MYXV 복제에 영향을 미칠 수 있다. RNA 헬리카제 외에도 다른 핵 단백질이 MYXV 및 다른 폭스바이러스의 복제 주기에 기여할 수 있다. 예컨대, 핵 단백질은 형질전환된 인간 숙주 세포주에서 폭스바이러스의 복제 효율에 영향을 미칠 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스비리대, 헤르페스비리대(*Herpesviridae*), 레오비리대(*Reoviridae*), 파라믹소비리대(*Paramyxoviridae*), 레트로비리대(*Retroviridae*), 아데노비리대(*Adenoviridae*), 랍도비리대(*Rhabdoviridae*), 피코르나비리대(*Picornaviridae*), 파르보비리대(*Parvoviridae*), 및 피코르나비리대로 이루어진 바이러스 과로부터의 것이거나 구성된 바이러스 과로부터의 것이거나, 폭스비리대, 헤르페스비리대, 레오비리대, 파라믹소비리대, 레트로비리대, 아데노비리대, 랍도비리대, 피코르나비리대, 파르보비리대, 및 피코르나비리대로 이루어진 바이러스 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 헤르페스비리대 과로부터의 것이거나 헤르페스비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레오비리대 과로부터의 것이거나 레오비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 파라믹소비리대 과로부터의 것이거나 파라믹소비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 레트로비리대 과로부터의 것이거나 레트로비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 아데노비리대 과로부터의 것이거나 아데노비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 랍도비리대 과로부터의 것이거나 랍도비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 피코르나비리대 과로부터의 것이거나 피코르나비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 파르보비리대 과로부터의 것이거나 파르보비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 피코르나비리대 과로부터의 것이거나 피코르나비리대 과로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 심플렉스바이러스(*Simplexvirus*), 루불라바이러스(*Rubulavirus*), 또는 세네카바이러스(*Senecavirus*)인 속으로부터의 것이거나 심플렉스바이러스, 루불라바이러스, 또는 세네카바이러스인 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 심플렉스바이러스 속으로부터의 것이거나 심플렉스바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 루불라바이러스 속으로부터의 것이거나 루불라바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 세네카바이러스 속으로부터의 것이거나 세네카바이러스 속으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 홍역, 계두, 수포성 구내염 바이러스, 볼거리 루볼라바이러스, 콕사키 바이러스 및 백시니아인 바이러스 종으로부터의 것이거나 홍역, 계두, 수포성 구내염 바이러스, 볼거리 루볼라바이러스, 콕사키 바이러스, 및 백시니아인 바이러스 종으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 홍역 바이러스이거나 홍역 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 계두 바이러스이거나 계두 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 수포성 구내염 바이러스이거나 수포성 구내염 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 볼거리 루볼라바이러스이거나 볼거리 루볼라바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 콕사키 바이러스이거나 콕사키 바이러스로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 백시니아 바이러스이거나 백시니아 바이러스로부터 유래된다.

[0056] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 복제 적격이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 야생형 스트레인로부터의 것이거나, 야생형 스트레인로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 유전자 변형된 스트레인로부터의 것이거나, 유전자 변형된 스트레인로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 인간에서는 비-병원성이지만 상이한 조직으로부터 유래되는 광범위한 인간 암세포를 감염시키고 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스의 핵산 서열은 야생형 바이러스 서열의 핵산 서열에 대해 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 및 99% 서열 동일성을 포함하여 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또

는 적어도 99%, 예컨대 95% 내지 98%, 95% 내지 99%의 서열 동일성을 포함한다.

[0057] **핵세포질간 수송 억제제**

[0058] 본원에 개시된 바와 같이, 핵세포질간 수송 억제제는 바이러스 복제를 향상시키고 비허용적 암세포와 같은 암세포에 대한 세포 생존력을 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 선택적 억제제이다. 특정 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 비-선택적이다. 일부 실시양태에서, 기재된 핵세포질간 수송 억제제는 핵세포질간 트래피킹을 방해할 수 있는 작용제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 단백질 트래피킹을 방해함으로써 핵세포질간 수송을 억제한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 트리푸오페라진 히드로클로라이드, W13, ETP-45648, 빈블라스틴, Akt 억제제 X, INCA, SMIP001/004, 레스베라트롤, 엘리티신, WGA, cSN50 펩티드, bimax1/2 펩티드, 렙토마이신 B, 안귀노마이신, 고니오탈라민, 라차돈, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 15d-PGJ2, 푸무솔리드 A, PKF050-638, KOS-2464, CBS9106, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 소분자 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 라차돈, 발트레이트 및 아세톡시차비콜 아세테이트와 같은 천연 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 핵 외수송의 선택적 억제제(SINE)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 CBS9106과 같은 가역적 핵외수송 억제제를 포함한다.

[0059] 특정 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A, 렙토마이신 B, 라차돈 A, B, C 및 D, 안귀노마이신 A, 고니오탈라민, 피퍼롱구민, 플룸바긴, 커큐민, 발트레이트, 아세톡시차비콜 아세테이트, 프레닐쿠마린 오스톨, 또는 합성 핵세포질간 수송 억제제, 예컨대 KOS 2464, PKF050-638(N-아졸릴아크릴레이트 유사체), CBS9106, 셀리넥서, 및 문헌(Mathew and Ghildyal, CRM1 inhibitors for antiviral therapy, Frontiers in Microbiology 2017, Vol 8, article 1171, 참조로 본원에 포함됨)에서 발견되는 것들 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 라차돈 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 라차돈 B를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 라차돈 C를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 라차돈 D를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 안귀노마이신 A를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 고니오탈라민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 피퍼롱구민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 플룸바긴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 커큐민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 발트레이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 아세톡시차비콜 아세테이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 프레닐쿠마린 오스톨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 KOS 2464를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 PKF050-638을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 CBS9106을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 셀리넥서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 렙토마이신 B이다.

[0060] **치료 방법**

[0061] 핵세포질간 수송 억제제의 사용은 놀랍게도 종양용해성 바이러스(예컨대, MYXV)에 의한 감염에 민감하지 않은 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감한 암세포로 전환시키는 것을 돕는다. 즉, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대한 암세포의 감수성을 유도한다. 핵세포질간 수송 억제제의 추가는 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대한 암세포의 감수성을 증가시킨다. 핵세포질간 수송 억제제는 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대해 감수성이 낮은 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대해 감수성이 높은 암세포로 만드는 데 사용될 수 있다. 따라서, 핵세포질간 수송 억제제는 암을 치료하고 종양 세포를 사멸시키는 종양용해성 바이러스의 효능을 개선하기 위해 종양용해성 바이러스와 조합하여 투여될 수 있다.

[0062] 종양용해성 바이러스 및 종양용해성 바이러스를 포함하는 조성물을 사용하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스(예컨대, MYXV 또는 VACV) 및 핵세포질간 수송 억제제를 대상체에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 한 측면에서, 종양용해성 바이러스에 대해 비허용적인 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시켜 상기 암세포를 전환시키는 것을 포함하는, 비허용적 세포를 허용적 세포로 전환시키는 방법이 본원에 개시된다. 또 다른 측면에서, 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시켜 암세포를 사멸시키는 것을 포함하는, 암세포를 사멸시키는 방법이 본원에 개시된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 비허용적 세포를 핵세포질간 수송 억제제로 처리함으로써 비허용적 암세포에서 바이러스 복제를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0063] 일부 실시양태는 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 대해 암세포의 감수성을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태는 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포를 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하게 만드는 방법에 관한 것이다.

[0064] 일부 실시양태는 암세포를 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제에 접촉시키는 것을 포함하는, 종양용해성 바이러스에 의한 감염에 민감하지 않은 암세포에서 종양용해성 바이러스의 증식을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0065] 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 함께 또는 별도로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 함께 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 별도로 투여될 수 있다. 종양용해성 바이러스와 핵세포질간 수송 억제제가 별도로 투여되는 경우, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 전에 투여될 수 있다. 종양용해성 바이러스와 핵세포질간 수송 억제제가 별도로 투여되는 경우, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 후에 투여될 수 있다.

[0066] 일부 실시양태에서, 암세포, 예컨대 비허용적 암세포는 포유동물 세포와 같은 동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 암세포, 예컨대 비허용적 암세포는 인간 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 불멸환된 인간 또는 영장류 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 암세포주로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 A549 세포, HeLa 세포, 239 세포, 또는 영장류 Vero 세포이다. 암세포는 생체내 세포, 시험관내 세포 또는 생체외 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암세포는 치료될 대상체의 암 조직의 세포이다.

[0067] 암은 고형 종양 또는 혈액 종양일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병(예컨대, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성백혈구증가증, 림프종(예컨대, 호지킨 질환, 비-호지킨 질환), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 중쇄 질환, 또는 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 육종 또는 암종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유윙 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 속귀신경집종, 핍지교종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 또는 망막모세포종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 결장직장 선암종, 췌장암, 또는 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 골암, 예컨대 연골육종, 유잉 육종, 및 골육종이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양은 골육종이다.

[0068] 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 암을 갖는 대상체에게 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 대상체에게 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 대상체에 투여하기 전에 미리 혼합된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제는 대상체에게 별도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 동시에 또는 순차적으로 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 핵세포질간 수송 억제제와 접촉 전에 종양용해성 바이러스와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 종양용해성 바이러스와 접촉 전에 핵세포질간 수송 억제제와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제의 예비혼합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제와 별도로 접촉된다.

[0069] 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 핵세포질간 수송 억제제로 전처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 세포 또는 조직을 종양용해성 바이러스와 접촉시키기 전에 핵세포질간 수송 억제제로 적어도 1분, 적어도 2분, 적어도 5분, 적어도 10분, 적어도 30분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 또는 적어도 1주 동안 전처리된다. 일부 실시양태에서, 암세포 또

는 암 조직은 세포 또는 조직을 종양용해성 바이러스와 접촉시키기 전에 핵세포질간 수송 억제제로 최대 1분, 최대 2분, 최대 5분, 최대 10분, 최대 30분, 최대 1시간, 최대 2시간, 최대 6시간, 최대 12시간, 최대 24시간, 또는 최대 1주 동안 전처리된다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 세포 또는 조직을 종양용해성 바이러스와 접촉시키기 전에 핵세포질간 수송 억제제로 약 1분 내지 약 1일, 약 5분 내지 약 12시간, 약 10분 내지 약 2시간, 또는 약 30분 내지 약 90분의 기간 동안 전처리된다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직은 세포 또는 조직을 종양용해성 바이러스와 접촉시키기 전에 핵세포질간 수송 억제제로 약 1시간 동안 전처리된다.

[0070] 한 측면에서, 종양용해성 바이러스를 암을 갖는 대상체에 대해 자가, 동종이계 또는 이종성인 세포에 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다. 종양용해성 바이러스는 생체내 또는 생체외 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스를 생체외에서 자가 세포에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스를 생체외에서 동종이계 세포에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스를 생체외 이종 세포에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가, 동종이계 또는 이종 세포는 골수세포 또는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 자가, 동종이계, 또는 이종 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 자가, 동종이계, 또는 이종 세포는 종양용해성 바이러스에 대해 비허용적인 임의의 세포이다. 일부 실시양태에서, 자가, 동종이계, 또는 이종 세포는 종양용해성 바이러스에 대해 허용적인 임의의 세포이다. 일부 실시양태에서, 자가, 동종이계, 또는 이종 세포는 건강한 세포이다. 일부 실시양태에서, 투여는 종양용해성 바이러스를 자가, 동종이계, 또는 이종 세포와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 자가, 동종이계, 또는 이종 세포를 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 자가, 동종이계, 또는 이종 세포를 대상체에게 주사하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 자가, 동종이계, 또는 이종 세포의 투여 전에 핵세포질간 수송 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 자가, 동종이계, 또는 이종 세포의 투여 후에 핵세포질간 수송 억제제를 투여하는 것을 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 일정 기간 동안 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기간은 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년이다. 일부 실시양태에서, 기간은 최대 1일, 최대 2일, 최대 3일, 최대 1주, 최대 2주, 최대 3주, 최대 4주, 최대 1개월, 최대 3개월, 최대 6개월, 최대 1년, 또는 최대 10년이다. 일부 실시양태에서, 기간은 약 1일 내지 약 1년, 약 1개월 내지 약 12개월, 또는 1개월 내지 약 6개월이다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 대상체에게 주 2회, 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회, 또는 2개월마다 1회 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 대상체에게 1 내지 4주 간격, 예컨대 약 1주 간격, 약 2주 간격 또는 약 3주 간격으로 투여된다.

[0072] 일부 실시양태에서, 방법은 초기 투여 일정 및 후속 투여 일정에 따라 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 초기 투여 일정은 후속 투여 일정과 상이한 투여 일정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 초기 투여 일정은 후속 투여 일정보다 덜 빈번한 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 초기 투여 일정은 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다의 1 내지 10회의 치료, 예컨대 1 내지 4회의 치료 또는 2 내지 3회의 치료를 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다의 각각의 치료는 초기 투여 일정에 따라 1주 내지 약 6주 간격으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다의 각각의 치료는 초기 투여 일정에 따라 약 1주 간격, 약 2주 간격, 약 3주 간격, 또는 약 4주 간격으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다의 각각의 치료는 후속 투여 일정에 따라 1주 내지 약 6주 간격으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다의 각각의 치료는 후속 투여 일정에 따라 약 1주 간격, 약 2주 간격, 약 3주 간격 또는 약 4주 간격으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 초기 투여 일정에서 약 3주 간격으로 및 후속 투여 일정에서 약 2주 간격으로 투여된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 방법은 치료될 암 조직에 대해 국부적 투여를 포함한다. 예컨대, 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 치료될 암 조직에 국부적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 국부적으로 투여되고 핵세포질간 수송 억제제는 국부적으로 투여되지 않는다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 비경구적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 피부 주사, 피하 주사, 또는 결절 병변에 대한 주사에 의해

투여된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 또는 둘 다는 암 조직 또는 암 조직을 함유하는 암 기관에 주사에 의해 투여된다.

[0074] 일부 실시양태에서, 방법은 암 조직에 또는 암 조직 근처에 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제를 포함하는 배지와 함께 인큐베이션하는 것을 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 주어진 암세포 또는 암 조직(예컨대, 주어진 억제제, 바이러스 스트레인 및 숙주 세포주)에 대해 결정된다. 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는, 예컨대 억제제의 양을 적정하고, 본원에 개시된 바와 같이 바이러스 자손의 복제 및/또는 세포 생존력을 정량화함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 약 0.000001 μM 내지 약 100 μM, 약 0.000001 μM 내지 약 10 μM, 약 0.00001 μM 내지 약 1 μM, 약 0.01 μM 내지 약 1 μM, 약 0.00001 μM 내지 약 0.1 μM, 약 0.00005 μM 내지 약 0.05 μM, 또는 약 0.00005 μM 내지 약 0.005 μM의 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 약 0.01 μM 내지 약 1 μM의 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 약 0.000001 μM, 약 0.000005 μM, 약 0.00001 μM, 약 0.00005 μM, 약 0.0001, 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.05 μM, 또는 약 0.1 μM 초과의 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.0015 μM, 약 0.002 μM, 약 0.0025 μM, 약 0.003 μM, 약 0.0035 μM, 약 0.004 μM, 약 0.0045 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.015 μM, 약 0.02 μM, 약 0.025 μM, 약 0.03 μM, 약 0.035 μM, 약 0.04 μM, 약 0.045 μM, 약 0.05 μM, 약 0.1 μM, 약 0.2 μM, 약 0.25 μM, 약 0.3 μM, 약 0.4 μM, 약 0.5 μM, 약 0.75 μM, 약 0.9 μM, 약 1 μM, 약 1.25 μM, 약 1.5 μM, 약 1.75 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 또는 약 10 μM 이하의 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료학적 유효량의 핵세포질간 수송 억제제는 약 0.000001 μM 내지 약 10 μM, 예컨대 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.0015 μM, 약 0.002 μM, 약 0.0025 μM, 약 0.003 μM, 약 0.0035 μM, 약 0.004 μM, 약 0.0045 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.015 μM, 약 0.02 μM, 약 0.025 μM, 약 0.03 μM, 약 0.035 μM, 약 0.04 μM, 약 0.045 μM, 약 0.05 μM, 약 0.1 μM, 약 0.2 μM, 약 0.3 μM, 약 0.4 μM, 약 0.5 μM, 약 0.6 μM, 약 0.7 μM, 약 0.8 μM, 약 0.9 μM, 약 1.0 μM, 약 1.1 μM, 약 1.2 μM, 약 1.3 μM, 약 1.4 μM, 약 1.5 μM, 약 1.6 μM, 약 1.7 μM, 약 1.8 μM, 약 1.9 μM, 약 2.0 μM, 약 3.0 μM, 약 4.0 μM, 및 약 5.0 μM이다.

[0076] 일부 실시양태에서, 방법은 암 조직에 또는 암 조직 근처에 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스(예컨대, MYXV 또는 VACV)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스로 감염시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직이 효과적인 감염 다중도(MOI)로 감염될 때 치료학적 유효량의 종양용해성 바이러스가 존재한다. 일부 실시양태에서, 방법은 암세포 또는 암 조직을 본원에 기재된 바와 같은 MOI로 종양용해성 바이러스와 접촉시키는 것을 포함한다. MOI는, 예컨대 세포 또는 조직에 대한 바이러스의 비율을 적정하고, 본원에 개시된 바와 같이 바이러스 자손의 복제 및/또는 세포 생존력을 정량화함으로써 주어진 세포 또는 조직에 대해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 효과적인 MOI는 바이러스의 복제를 향상시키고 암세포 생존력을 감소시키면서 약물 특이적 세포 독성을 최소화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 암세포는 관심 바이러스가 세포 표면에 흡착되도록 일정 기간 동안, 예컨대 약 20분 내지 약 5시간, 예컨대 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분, 약 65분, 약 70분, 약 75분, 약 80분, 약 85분, 약 90분, 약 95분, 약 100분, 약 105분, 약 110분, 약 115분, 약 2시간, 약 2.5시간, 약 3시간, 약 3.5시간, 약 4시간, 약 4.5시간, 약 5시간, 12시간, 18시간, 20시간, 24시간, 30시간, 36시간, 또는 그 초과 동안 종양용해성 바이러스(예컨대, MYXV 또는 VACV)와 함께 인큐베이션된다.

[0077] 특정 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 MOI는 약 0.001 내지 2.0 또는 약 0.01 내지 1.0, 예컨대 약 0.001, 약 0.005, 0.01, 약 0.02, 약 0.03, 약 0.04, 약 0.05, 약 0.06, 약 0.07, 약 0.08, 약 0.09, 약 0.1, 약 0.15, 약 0.2, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.35, 약 0.4, 약 0.45, 약 0.5, 약 0.55, 약 0.6, 약 0.65, 약 0.7, 약 0.75, 약 0.8, 약 0.85, 약 0.9, 약 0.95, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 또는 약 2.0이다. 특정 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 MOI는 약 0.01 내지 약 10, 약 0.05 내지 약 5, 및/또는 이들 사이의 범위이다. 특정 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 MOI는 약 0.05, 약 0.5 또는 약 5이다.

일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 MOI는 적어도 약 0.001, 적어도 약 0.005, 적어도 약 0.01, 적어도 약 0.02, 적어도 약 0.03, 적어도 약 0.04, 적어도 약 0.05, 적어도 약 0.06, 적어도 약 0.07, 적어도 약 0.08, 적어도 약 0.09, 적어도 약 0.1, 적어도 약 0.15, 적어도 약 0.2, 적어도 약 0.25, 적어도 약 0.3, 적어도 약 0.35, 적어도 약 0.4, 적어도 약 0.45, 적어도 약 0.5, 적어도 약 0.55, 적어도 약 0.6, 적어도 약 0.65, 적어도 약 0.7, 적어도 약 0.75, 적어도 약 0.8, 적어도 약 0.85, 적어도 약 0.9, 적어도 약 0.95, 적어도 약 1.0, 적어도 약 1.1, 적어도 약 1.2, 적어도 약 1.3, 적어도 약 1.4, 적어도 약 1.5, 적어도 약 1.6, 적어도 약 1.7, 적어도 약 1.8, 적어도 약 1.9, 적어도 약 2.0, 적어도 약 2.5, 적어도 약 3.0, 적어도 약 4.0, 적어도 약 5.0, 또는 적어도 약 6.0이다. 일부 실시양태에서, 암세포 또는 암 조직에 대한 종양용해성 바이러스의 MOI는 최대 약 0.01, 최대 약 0.02, 최대 약 0.03, 최대 약 0.04, 최대 약 0.05, 최대 약 0.06, 최대 약 0.07, 최대 약 0.08, 최대 약 0.09, 최대 약 0.1, 최대 약 0.15, 최대 약 0.2, 최대 약 0.25, 최대 약 0.3, 최대 약 0.35, 최대 약 0.4, 최대 약 0.45, 최대 약 0.5, 최대 약 0.55, 최대 약 0.6, 최대 약 0.65, 최대 약 0.7, 최대 약 0.75, 최대 약 0.8, 최대 약 0.85, 최대 약 0.9, 최대 약 0.95, 최대 약 1.0, 최대 약 1.1, 최대 약 1.2, 최대 약 1.3, 최대 약 1.4, 최대 약 1.5, 최대 약 1.6, 최대 약 1.7, 최대 약 1.8, 최대 약 1.9, 최대 약 2.0, 최대 약 2.5, 최대 약 3.0, 최대 약 4.0, 최대 약 5.0, 최대 약 6.0, 또는 최대 약 10이다.

[0078] 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 사용은 암세포 또는 암 조직에서 종양용해성 바이러스(예컨대, MYXV 또는 VACV)의 복제를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 부재 하의 복제 속도보다 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 더 빠른 속도로 복제된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 부재 하의 복제 속도보다 적어도 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 더 빠르게 복제된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 암세포 또는 암 조직에서 종양용해성 바이러스의 복제를 감염 후 24시간 후 적어도 30%, 50%, 70%, 90%, 2배, 3배, 5배, 7배, 9배, 10배, 12배, 또는 15배 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 암세포 또는 암 조직에서 종양용해성 바이러스의 복제를 감염 후 24시간 후 5배, 10배, 12배, 15배, 20배, 30배, 50배, 70배, 또는 100배 이하로 증가시킨다.

[0079] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스와 조합된 핵세포질간 수송 억제제의 사용은 핵세포질간 수송 억제제의 부재 하에 종양용해성 바이러스의 사용과 비교하여 암세포 또는 암 조직의 생존력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 세포 생존율은 핵세포질간 수송 억제제의 부재 하에 종양용해성 바이러스를 사용하는 경우의 세포 생존율과 비교하여 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%의 암세포에 대해 감소된다.

[0080] 치료 MYXV 바이러스가 암을 갖는 대상체에 세포를 도입하기 전에 생체외에서 골수 또는 말초 혈액 단핵 세포로부터의 혼합 백혈구와 함께 먼저 인큐베이션되는 전달 전략이 추가로 개시된다. 일부 실시양태에서, 백혈구 및 MYXV는 생체외에서 핵세포질간 수송 억제제와 함께 인큐베이션된다. 이 전략에서 MYXV는 생체외에서 바이러스로 미리 감염된 백혈구의 이동을 통해 암 부위로 전달될 수 있다. 이 전신 전달 방법은 환자에게 주입하기 전에 단리된 백혈구에 바이러스를 먼저 전달하기 때문에 때때로 "생체외 바이러스요법" 또는 EVV(일명 EV2)로 불린다. MYXV 구축물 및 이러한 전달 전략은 종양 부담을 상당히 감소시키고 이를 필요로 하는 대상체에서 생존을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, BM 또는 PBMC 세포는 생체외에서 1시간 동안 MYXV 구축물과 함께 인큐베이션된 다음, MYXV 로딩된 백혈구가 수용자에게 다시 주입된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제와의 인큐베이션은 백혈구에 의한 MYXV의 흡수를 증가시키고/시키거나 종양 부위로의 MYXV의 전달을 증가시킨다.

[0081] 특정 실시양태에서, 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수세포는, 예컨대 자가 세포로서 대상체로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수세포는 하나 이상의 동종이계 공여자, 예컨대 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 또는 적어도 8개의 HLA 대립유전자(예컨대, HLA-A, HLA-B, HLA-A 및/또는 HLA-DR 대립유전자의 하나 또는 둘 다의 카피)에 대해 수용자와 일치하는 공여자로부터 수득된다. HLA 대립유전자는, 예컨대 DNA 기반 방법을 이용하여 타이핑될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단핵 말초 혈액 세포 및/또는 골수세포는 하나 이상의 이종 공여자로부터 수득된다.

[0082] **바이러스 수율을 증가시키는 방법**

[0083] 한 측면에서, 숙주 세포를 종양용해성 바이러스가 숙주 세포의 표면에 흡착되도록 하는 조건 하에 유효량의 핵세포질간 수송 억제제 및 종양용해성 바이러스에 노출시키는 단계, 및 감염된 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 종양용해성 바이러스의 복제를 허용하는 것을 포함하는, 폭스바이러스와 같은 종양용해성 바이러스를 복제

하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 MYXV이다.

[0084] 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포에서 생성된 폭스바이러스를 수거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포를 폭스바이러스로 감염시키기 전에 숙주 세포를 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포를 폭스바이러스로 감염시킨 후 숙주 세포를 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포를 핵세포질간 수송 억제제 및 폭스바이러스에 동시에 노출시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 폭스바이러스는 핵세포질간 수송 억제제의 부재 하에서의 복제 속도보다 적어도 30% 더 빠른 속도로 복제된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 감염 후 24시간 후에 폭스바이러스의 복제를 적어도 3배 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 폭스바이러스와 2.0 미만의 감염 다중도(MOI)로 접촉된다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 유효량은 약 0.0005 μM 내지 약 0.5 μM의 범위이다. 일부 실시양태에서, 배양 배지는 핵세포질간 수송 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 불멸화된 인간 또는 영장류 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 폭스바이러스의 제조를 위한 우수 제조 관리기준(GMP)에서 사용되는 세포주로부터 것이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 인간 A549 세포, HeLa 세포, 239 세포, 또는 영장류 Vero 세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 비-흡착된 폭스바이러스를 제거하는 것을 추가로 포함한다.

[0085] 일부 측면에서, 세포에서 증가된 성장률 및/또는 역가로 종양용해성 바이러스를 생성하는 방법이 본원에 개시되며, 방법은 숙주 세포를 유효량의 핵세포질간 수송 억제제와 접촉시키는 단계; 숙주 세포를 관심 종양용해성 바이러스가 숙주 세포의 표면에 흡착되도록 하는 조건 하에 관심 종양용해성 바이러스와 접촉시키는 단계; 및 숙주 세포를 배양하여 관심 종양용해성 바이러스의 자손을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 관심 종양용해성 바이러스의 자손을 수거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 폭스바이러스이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 MYXV이다.

[0086] 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 경로의 약물 억제제를 사용하여 종양용해성 바이러스 유전자 발현 및 자손 바이러스 형성을 증가 또는 향상시키는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스의 GMP 제조에 일반적으로 사용되는 불멸환된 인간 세포에서 핵 외수송 경로의 억제를 이용하여 이들 세포로부터 바이러스 수율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 잠재적 치료 종양용해성 바이러스를 제조하는 강력한 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스는 MYXV이다.

[0087] 일부 실시양태에서, 이러한 향상된 바이러스 복제는 세포가 예컨대 제1 바이러스 흡착 시간 직전에 시작하여 유효량의 억제제로 처리될 때 가장 강력하다. 일부 실시양태에서, 억제제의 유효량은 주어진 세포 배양 시스템(예컨대, 주어진 억제제, 바이러스 스트레인 및 숙주 세포주)에 대해 결정된다. 억제제의 유효량은, 예컨대 세포 배양 시스템에서 억제제의 양을 적정하고 본원에 개시된 바와 같이 바이러스 자손의 수율을 정량화함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 억제제는 바이러스 자손의 수율을 증가시키면서 약물 특이적 세포 독성을 최소화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 유효량은 약 0.000001 μM 내지 약 1 μM, 약 0.000001 μM 내지 약 0.1 μM, 약 0.00001 μM 내지 약 0.1 μM, 약 0.00005 μM 내지 약 0.05 μM, 또는 약 0.00005 μM 내지 약 0.005 μM이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 유효량은 약 0.000001 μM, 약 0.000005 μM, 약 0.00001 μM, 약 0.00005 μM, 약 0.0001, 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.05 μM, 또는 약 0.1 μM 초과이다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 유효량은 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.0015 μM, 약 0.002 μM, 약 0.0025 μM, 약 0.003 μM, 약 0.0035 μM, 약 0.004 μM, 약 0.0045 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.015 μM, 약 0.02 μM, 약 0.025 μM, 약 0.03 μM, 약 0.035 μM, 약 0.04 μM, 약 0.045 μM, 약 0.05 μM, 약 0.1 μM, 약 0.2 μM, 약 0.25 μM, 약 0.3 μM, 약 0.4 μM, 약 0.5 μM, 약 0.75 μM, 약 0.9 μM, 약 1 μM, 약 1.25 μM, 약 1.5 μM, 약 1.75 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 또는 약 10 μM 이하이다.

[0088] 일부 실시양태에서, 향상된 바이러스 복제는 세포가 효과적인 감염 다중도(MOI)로 감염된 다음, 예컨대 핵세포질간 수송 억제제의 연속 존재 하에 유지될 때 발생한다. MOI는, 예컨대 세포 배양 시스템에서 숙주 세포에 대한 바이러스의 비율을 적정하고 본원에 개시된 바와 같이 바이러스 자손의 수율을 정량화함으로써 주어진 세포 배양 시스템(예컨대, 주어진 억제제, 바이러스 스트레인 및 숙주 세포주)에 대해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 효과적인 MOI는 바이러스의 복제를 향상시키고 바이러스 자손의 수율을 증가시키면서 약물 특이적 세포 독성을 최소화할 수 있다.

[0089] 숙주 세포는 관심 폭스바이러스가 숙주 세포의 표면에 흡착되도록 하는 조건 하에 관심 폭스바이러스(예컨대, MYXV)와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 관심 폭스바이러스와 약 0.001 내지 2.0 또는 약 0.01 내지 1.0, 예컨대 약 0.001 MOI, 약 0.005 MOI, 0.01 MOI, 약 0.02 MOI, 약 0.03 MOI, 약 0.04 MOI, 약 0.05 MOI, 약 0.06 MOI, 약 0.07 MOI, 약 0.08 MOI, 약 0.09 MOI, 약 0.1 MOI, 약 0.15 MOI, 약 0.2 MOI, 약 0.25 MOI, 약 0.3 MOI, 약 0.35 MOI, 약 0.4 MOI, 약 0.45 MOI, 약 0.5 MOI, 약 0.55 MOI, 약 0.6 MOI, 약 0.65 MOI, 약 0.7 MOI, 약 0.75 MOI, 약 0.8 MOI, 약 0.85 MOI, 약 0.9 MOI, 약 0.95 MOI, 약 1.0 MOI, 약 1.1 MOI, 약 1.2 MOI, 약 1.3 MOI, 약 1.4 MOI, 약 1.5 MOI, 약 1.6 MOI, 약 1.7 MOI, 약 1.8 MOI, 약 1.9 MOI, 또는 약 2.0 MOI의 감염 다중도(MOI)로 접촉된다. 일부에서 실시양태에서, 관심의 비-흡착된 폭스바이러스는, 예컨대 세포를 세척함으로써 세포를 배양하기 전에 제거된다. 핵세포질간 수송 억제제로 처리한 후, 숙주 세포는 약물의 존재 하에 배양되어 관심 스바이러스의 자손을 생성한다. 특정 세포 유형에 따라 적절한 배양 조건이 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 관심 폭스바이러스가 숙주 세포의 표면에 흡착되도록 하는 기간, 예컨대 약 20분 내지 약 5시간, 예컨대 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분, 약 65분, 약 70분, 약 75분, 약 80분, 약 85분, 약 90분, 약 95분, 약 100분, 약 105분, 약 110분, 약 115분, 약 2시간, 약 2.5시간, 약 3시간, 약 3.5시간, 약 4시간, 약 4.5시간, 약 5시간, 12시간, 18시간, 20시간, 24시간, 30시간, 36시간, 또는 그 초과 동안 관심 폭스바이러스와 함께 인큐베이션된다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 유효량의 핵세포질간 수송 억제제의 존재 하에, 예컨대 상기 기재된 농도에서 배양된다. 숙주 세포는 자손 바이러스가 수거되기 약 1일 내지 수일, 예컨대 3일 내지 5일 전에 배양될 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 관심 폭스바이러스의 자손을 수거하는 것을 포함한다.

[0090] 본원에 개시된 바와 같이, 핵세포질간 수송 억제제는 이러한 세포에서 바이러스 복제 및 자손 바이러스 수율을 향상시킬 수 있다. 이 약물 증강 방법은 MYXV 및 VACV와 같은 폭스바이러스의 수율을 증가시키는 실용적인 방법을 제공하며, 이는 이들 바이러스의 대규모 GMP 생성 및 임상 사용에 활용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 핵세포질간 수송 억제제가 불멸화된 인간 또는 영장류 세포에서 폭스바이러스 GMP 제조에 적용될 때 백시니아 바이러스(VACV) 및 믹소마 바이러스(MYXV)와 같은 종양용해성 바이러스 후보물을 포함하는 폭스바이러스의 수율을 증가시키는 데 사용될 수 있음을 입증한다.

[0091] 본 개시내용은 형질전환된 인간 및 영장류 세포, 예컨대 GMP 제조에 일반적으로 사용되는 세포에서 폭스바이러스 생성 수율 또는 종양용해성 바이러스와 같은 바이러스를 증가시키는 방법을 제공한다. 종양용해성 바이러스 후보물로 제안된 다른 바이러스와 비교할 때, MYXV 및 VACV와 같은 폭스바이러스는 대규모 제조 및 정제에서 몇 가지 고유한 문제를 제시한다. 백시니아 바이러스는 크기가 커서 여과 멸균할 수 없으므로 모든 제조 공정이 전형적으로 폐쇄된다. 전체 생활 주기가 숙주 세포 세포질 내에서 발생하므로, 감염 입자의 대부분은 세포 배지로 방출되지 않고 감염된 세포 내에 유지되어, 정제는 감염된 세포의 용해 및 세포 파편으로부터 바이러스 입자의 정제가 필요하다.

[0092] 일부 실시양태에서, 예컨대 바이러스 흡착 직전에 첨가되는 경우 핵 외수송 경로를 억제하는 작용제, 예컨대 소분자로 불멸화된 인간 세포주를 처리하는 방법이 본원에 개시된다. 예컨대, 후속 감염 주기 전반에 걸쳐 작용제의 존재 하에 세포를 배양하면 전체 감염성 폭스바이러스의 복제 및 궁극적인 수율을 증가시킬 수 있다. 따라서, 개시된 방법은 바이러스 GMP 제조에 사용되는 형질전환된 인간 및 영장류 세포에서 믹소마 바이러스(MYXV) 및 백시니아 바이러스(VACV)와 같은 폭스바이러스의 전체 수율을 증가시키는 명쾌한 방법을 제공한다.

[0093] 핵세포질간 수송 억제제의 사용은 폭스바이러스의 복제를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 폭스바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 부재 하에서의 복제 속도보다 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 더 빠른 속도로 복제된다. 일부 실시양태에서, 폭스바이러스는 핵세포질간 수송 억제제 부재 하에서의 복제 속도보다 적어도 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 더 빠른 속도로 복제된다.

[0094] 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 감염 후 24시간 후에 폭스바이러스의 복제를 적어도 30%, 50%, 70%, 90%, 2배, 3배, 5배, 7배, 9배, 10배, 12배, 또는 15배 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 감염 후 24시간 후에 폭스바이러스의 복제를 5배, 10배, 12배, 15배, 20배, 30배, 50배, 70배, 또는 100배 이하로 증가시킨다.

[0095] 본 개시내용의 측면은 세포에서 증가된 성장률 및/또는 역가로 폭스바이러스와 같은 종양용해성 바이러스를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포를 유효량의 핵세포질간 수송 억제제(이는 또한 핵 외수송 경로 억제제로도 지칭될 수 있음)와 접촉시키는 것을 포함한다. 억제제의 농도는 일반적으로 임의의 세포독성 또는 항바이러스 효과를 야기하는 농도 미만이나 여전히 관심 있는 폭스바이러스의 생성을 증가시

키기에 충분한 농도로 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제의 유효량은 약 0.000001 μM 내지 약 0.1 μM, 예컨대 약 0.000001 μM, 약 0.00001 μM, 약 0.0001, 약 0.0005 μM 및 약 0.05 μM, 예컨대 약 0.0005 μM, 약 0.001 μM, 약 0.0015 μM, 약 0.002 μM, 약 0.0025 μM, 약 0.003 μM, 약 0.0035 μM, 약 0.004 μM, 약 0.0045 μM, 약 0.005 μM, 약 0.01 μM, 약 0.015 μM, 약 0.02 μM, 약 0.025 μM, 약 0.03 μM, 약 0.035 μM, 약 0.04 μM, 약 0.045 μM, 및 약 0.05 μM이다.

[0096] **약학적 조성물**

[0097] 한 측면에서, 종양용해성 바이러스, 핵세포질간 수송 억제제, 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 또는 이들의 조합을 포함하는 약학적 조성물이 본원에 개시된다. 조합으로 투여되는 경우, 치료제(즉, 종양용해성 바이러스 및 핵세포질간 수송 억제제)는 동일한 시간 또는 다른 시간에 제공되는 별도의 조성물로 제형화되거나 치료제는 단일 조성물로 제공될 수 있다.

[0098] 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 6일마다 1회, 7일마다 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 2개월마다 1회, 6개월마다 1회, 또는 1년에 1회 투여될 수 있다. 투여 간격은 개별 대상체의 필요에 따라 조정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 치료제는 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 또는 5년, 10년, 또는 15년을 초과하는 기간; 또는 예컨대, 범위의 하한이 14일 내지 15년의 임의의 기간이고 범위의 상한이 15일 내지 20년(예컨대, 4 주 내지 15년, 6개월 내지 20년)인 수일, 수개월 또는 수년의 임의의 기간 범위 동안 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 치료제가 환자의 남은 생애 동안 투여되는 것이 유리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자는 질환 또는 장애의 진행을 점검하기 위해 모니터링되고, 이에 따라 용량이 조정된다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 적어도 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 또는 5년, 10년, 15년, 20년, 또는 대상체의 남은 생애 동안 효과적이다.

[0099] 본 개시내용에 따른 약학적 조성물을 제조하기 위해, 치료학적 유효량의 하나 이상의 치료제가 통상적인 약학적 배합 기술에 따라 약학적으로 허용되는 담체와 긴밀하게 혼합되어 용량을 생성할 수 있다. 담체는 투여에 필요한 제제, 예컨대 안구, 경구, 국소 또는 비경구의 형태에 따라 특히 겔, 크림 연고, 로션 및 시간 방출형 이식 제제를 포함한 다양한 형태를 취할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약학적으로 허용되는 담체는 수성 용매, 즉 임의적으로 추가의 공용매와 함께 물을 포함하는 용매이다. 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 물, 물 중 버퍼 용액(예컨대, 포스페이트 완충된 식염수(PBS)), 및 슈가 알콜, 예컨대 소르비톨을 포함한다. 비경구 투여에 적합한 조성물은 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비경구 투여에 적합한 제형은 항산화제, 버퍼, 정균제 및 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 단위 투여량 또는 다중 용량 용기, 예컨대 밀봉된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있으며, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예컨대 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조(동결건조) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 앞서 기술된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 핵세포질간 수송 억제제는 약학적으로 허용되는 염, 복합체 또는 전구약물로서 투여된다. 약학적으로 허용되는 염 또는 복합체는 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 정상 세포에 대해 제한된 독성 효과를 나타내는 본 개시내용에 따른 활성 화합물의 적절한 염 또는 복합체를 지칭할 수 있다. 이러한 염의 비제한적인 예는 (a) 무기산(예컨대, 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등)으로 형성된 산 부가염, 및 특히 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산 등과 같은 유기산으로 형성된 산 부가염; (b) 특히 아연, 칼슘, 나트륨, 칼륨 등과 같은 금속 양이온으로 형성된 염기 부가염이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 약학적 조성물은 단위 투여 형태이다. 일부 실시양태에서, 단위 투여 형태는 종양내 또는 비경구, 예컨대 정맥내 투여하기에 적합하다. 단위 투여 제형은 투여된 성분의 1일 용량 또는 단위, 1일 아용량, 주간 용량 또는 단위, 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.1 mL 내지 약 100 mL의 전달 가능한 부피, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.5 mL 내지 약 5 mL, 약 0.75 mL 내지 약 2.5 mL, 약 0.9 mL 내지 약 1.1 mL의 전달 가능한 부피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.5 mL, 약 1 mL, 약 1.5 mL, 또는 약 2 mL의 전달 가능한 부피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^{3} 플라크 형성 단위(PFU) 내지 약 1×10^{10} PFU의 종양용해성 바이러스, 및/또는 이들 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL

당 약 1×10^4 PFU 내지 약 1×10^9 PFU 또는 약 1×10^6 PFU 내지 약 1×10^8 PFU의 종양용해성 바이러스, 및/또는 이들 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 mL당 약 1×10^5 PFU 내지 약 1×10^{10} PFU, 약 1×10^6 PFU 내지 약 1×10^{10} PFU, 약 1×10^5 PFU 내지 약 1×10^{11} PFU, 약 1×10^5 PFU 내지 약 1×10^9 PFU, 약 1×10^6 PFU 내지 약 1×10^9 PFU, 또는 약 1×10^7 PFU 내지 약 1×10^8 PFU의 종양용해성 바이러스, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 1 피코그램 내지 약 1000 마이크로그램의 종양용해성 바이러스, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 10 피코그램 내지 약 100 마이크로그램의 종양용해성 바이러스, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 10 피코그램 내지 약 100 마이크로그램의 종양용해성 바이러스, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 10 피코그램 내지 약 10 마이크로그램, 약 10 피코그램 내지 약 1 마이크로그램, 약 10 피코그램 내지 약 100 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 100 마이크로그램, 약 1000 피코그램 내지 약 100 마이크로그램, 약 10000 피코그램 내지 약 100 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 10 마이크로그램, 또는 약 100 피코그램 내지 약 1 마이크로그램의 종양용해성 바이러스, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 1 피코그램, 약 10 피코그램, 약 100 피코그램, 약 1 나노그램, 약 10 나노그램, 약 100 나노그램, 약 1 마이크로그램, 약 10 마이크로그램, 약 100 마이크로그램, 또는 약 1000 마이크로그램의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.01 피코그램 내지 약 500 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램 내지 약 50 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.1 피코그램, 약 1 피코그램, 약 10 피코그램, 약 100 피코그램, 또는 약 1 나노그램 내지 약 0.1 마이크로그램, 약 1 마이크로그램, 약 10 마이크로그램, 또는 약 50 마이크로그램, 및/또는 그 사이의 범위의 핵세포질간 수송 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 10 피코그램 내지 약 10 마이크로그램, 약 10 피코그램 내지 약 1 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 1000 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 10000 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 5 마이크로그램, 또는 약 100 피코그램 내지 약 1 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램, 약 0.5 피코그램, 약 5 피코그램, 약 50 피코그램, 약 500 피코그램, 약 5 나노그램, 약 50 나노그램, 약 500 나노그램, 약 5 마이크로그램, 약 50 마이크로그램, 또는 약 500 마이크로그램의 종양용해성 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램 내지 약 50 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.01 피코그램 내지 약 100 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램 내지 약 100 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.01 피코그램 내지 약 90 마이크로그램, 약 0.01 피코그램 내지 약 80 마이크로그램, 약 0.01 피코그램 내지 약 60 마이크로그램, 약 0.01 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 0.05 피코그램 내지 약 80 마이크로그램, 약 0.05 피코그램 내지 약 40 마이크로그램, 약 0.1 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 또는 약 0.1 피코그램 내지 약 30 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.01 피코그램, 약 0.05 피코그램, 약 0.075 피코그램, 약 0.1 피코그램, 약 0.5 피코그램, 약 1 피코그램, 약 5 피코그램, 약 10 피코그램, 약 100 피코그램, 약 500 피코그램, 약 1 나노그램, 약 10 나노그램, 약 100 나노그램, 약 1 마이크로그램, 약 10 마이크로그램, 또는 약 100 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.01 피코그램 내지 약 500 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램 내지 약 50 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.1 피코그램, 약 1 피코그램, 약 10 피코그램, 약 100 피코그램, 또는 약 1 나노그램 내지 약 0.1 마이크로그램, 약 1 마이크로그램, 약 10 마이크로그램, 또는 약 50 마이크로그램의 범위, 및/또는 그 사이의 범위의 핵세포질간 수송 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 10 피코그램 내지 약 10 마이크로그램, 약 10 피코그램 내지 약 1 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 1000 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 10000 피코그램 내지 약 50 마이크로그램, 약 100 피코그램 내지 약 5 마이크로그램, 또는 약 100 피코그램 내지 약 1 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제, 및/또는 그 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단위 투여량은 약 0.05 피코그램, 약 0.5 피코그램, 약 5 피코그램, 약 50 피코그램, 약 500 피코그램, 약 5 나노그램, 약 50 나노그램, 약 500 나노그램, 약 5 마이크로그램, 약 50 마이

크로그램, 또는 약 500 마이크로그램의 핵세포질간 수송 억제제를 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 대 핵세포질간 수송 억제제의 중량비는 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{-9}, 및/또는 이들 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 대 핵세포질간 수송 억제제의 중량비는 약 1×10^{8} 내지 약 1×10^{-8}, 약 1×10^{7} 내지 약 1×10^{-7}, 약 1×10^{6} 내지 약 1×10^{-6}, 약 1×10^{5} 내지 약 1×10^{-5}, 약 1×10^{4} 내지 약 1×10^{-3}, 약 1×10^{2} 내지 약 1×10^{-2}, 또는 약 10 내지 약 0.1이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 대 핵세포질간 수송 억제제의 중량비는 약 1 내지 약 1×10^{-9}, 약 1 내지 약 1×10^{-8}, 약 1 내지 약 1×10^{-7}, 약 1 내지 약 1×10^{-6}, 약 1 내지 약 1×10^{-5}, 약 1 내지 약 1×10^{-4}, 약 1 내지 약 1×10^{-3}, 약 1 내지 약 1×10^{-2}, 또는 약 1 내지 약 0.1이다. 일부 실시양태에서, 종양용해성 바이러스 대 핵세포질간 수송 억제제의 중량비는 약 1×10^{-9} 내지 약 1, 약 1×10^{-8} 내지 약 1, 약 1×10^{-7} 내지 약 1, 약 1×10^{-6} 내지 약 1, 약 1×10^{-5} 내지 약 1, 약 1×10^{-4} 내지 약 1, 약 1×10^{-3} 내지 약 1, 약 1×10^{-2} 내지 약 1, 또는 약 0.1 내지 약 1이다.

[0104] **실시예**

[0105] **실시예 1: 핵세포질간 수송 억제제 약물은 비허용적 인간 암세포주에서 MYXV 유전자 발현을 향상시킨다.**

[0106] 특정 인간 암세포주에서, MYXV 유전자 발현, 특히 후기 유전자 발현이 제한된다. MYXV 유전자 발현의 억제는 바이러스 복제를 제한하는 데 기여할 수 있다. 그러나, 어떤 경로 및 세포 단백질이 이러한 비허용적 인간 암세포주에서 MYXV 복제를 제한하는지 명확하게 문서화되지 않다. 핵세포질간 수송 억제제는 일반적으로 MYXV 유전자 발현 및 복제를 제한하는 인간 암세포주, 예컨대 예컨대, 결장직장 선암종 세포주 HT29, 췌장 암세포주 PANC-1, 및 흑색종 세포주 MDA-MB-435에서 시험되었다.

[0107] 렙토마이신 B가 대표적인 핵세포질간 수송 억제제로서 시험되었다. 인간 HT29(**도 1a** 및 **도 1b**), PANC-1(**도 3a**) 및 MDA-MB-435(**도 4a**) 세포를 모의 처리하거나 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하였다. 이어서, 세포를 vMyx-GFP-TdTomato(폭스바이러스 합성 초기/후기 프로모터 하에 GFP 및 폭스바이러스 p11 후기 프로모터 하에 TdTomato를 발현하는 야생형 MYXV)로 5.0 또는 0.5의 감염 다중도(MOI)로 감염시켰다.

[0108] HT29 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하고, 억제제 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 0.5 또는 5.0의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후 24시간(**도 1a**) 또는 48시간(**도 1b**)에 촬영하였다.

[0109] PANC-1 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하고, 억제제 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 5.0의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후 48시간(**도 3a**)에 촬영하였다.

[0110] MDA-MB-435 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하고, 억제제 존재 하에 vMyx-GFP-Tdtomato로 5.0의 MOI로 감염시키고, 형광 이미지를 형광 현미경을 사용하여 감염 후 48시간(**도 4a**)에 촬영하였다.

[0111] 세포를 형광 현미경으로 관찰하여 GFP 및 TdTomato의 발현을 모니터링하였으며, 이들의 발현은 바이러스 감염의 진행을 나타내었다. 렙토마이신 B(예컨대, 1 uM, 0.1 uM 및 0.01 uM)의 존재 하에, 시험된 모든 인간 암세포주에서 향상된 GFP(초기/말기) 및 TdTomato(후기) 발현이 관찰되었다(**도 1a, 도 1b, 도 3a, 도 4a**). 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 처리는 또한 이러한 제한된 인간 암세포주에서 작은 병소의 형성을 허용하였다.

[0112] 이러한 결과는 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 처리가 감염된 세포에서 믹소마 바이러스 유전자 발현을 향상시킨다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 또한 특정 핵 단백질이 이러한 인간 암세포주에서 MYXV 복제를 직접 또는 간접적으로 제한한다는 것을 시사한다.

[0113] **실시예 2: 핵세포질간 수송 억제제 약물 처리는 비허용적 인간 암세포주에서 MYXV 자손 바이러스 생성을 향상시킨다.**

[0114] 바이러스 유전자 발현에 대한 핵세포질간 수송 억제제 렙토마이신 B의 관찰된 효과가 자손 바이러스 형성에 반영될 수 있는지를 정량적으로 평가하기 위해, 정량적 바이러스 적정 검정을 수행하였다. HT29(**도 2**), PANC-1(**도 3b**) 및 MDA-MB-435(**도 4b**) 인간 암세포주는 모의 처리되거나 상이한 농도의 렙토마이신 B로 전처리되었다.

[0115] HT29 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하였다. 이어서, 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-

TdTomato로 0.05 또는 0.5의 MOI로 감염시켰다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거한 다음, 세포를 세척하고 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염된 세포를 감염 후 72시간에 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다. 렙토마이신 B 처리는 바이러스 복제를 향상시켰다(**도 2**).

[0116] PANC-1 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리하였다. 이어서, 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-TdTomato로 0.05 또는 0.5의 MOI로 감염시켰다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거한 다음, 세포를 세척하고 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염된 세포를 감염 후 48시간 및 72시간에 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다. 렙토마이신 B 처리는 모든 조건에서 바이러스 복제를 적어도 10배 향상시켰다(**도 3b**).

[0117] MDA-MB-435 세포를 상이한 농도의 렙토마이신 B로 1시간 동안 전처리한 다음, 세포를 1시간 동안 vMyx-GFP-TdTomato로 0.05 또는 0.5의 MOI로 감염시켰다. 1시간 후, 비-흡착된 바이러스를 제거한 다음, 세포를 세척하고 억제제의 존재 하에 배지와 함께 인큐베이션하였다. 감염된 세포를 감염 후 48시간 및 72시간에 수거하고, RK13 세포에 대한 연속 희석 후 바이러스 역가를 결정하였다. 렙토마이신 B 처리는 모든 조건에서 바이러스 복제를 적어도 10배 향상시켰다(**도 4b**).

[0118] 모든 시험된 세포주에서 렙토마이신 B 처리는 MOI 5.0 또는 0.5로 감염되었을 때 자손 MYXV 형성을 적어도 10 내지 20배로 상당히 향상시켰다(**도 2, 도 3b, 도 4b**). 대조적으로, 허용적 A549 세포주에서, 렙토마이신 B는 0.1 이하의 MOI에서만 바이러스 복제를 증가시켰다.

[0119] 이러한 결과는 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 핵 외수송 경로 차단이 비허용적 인간 암세포주에서 MYXV 복제를 상당히 향상시킬 수 있음을 나타내었다.

[0120] **실시예 3: 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 인간 암세포주의 전처리는 MYXV 매개된 암세포 사멸을 향상시킨다.**

[0121] 핵세포질간 수송 억제제로 향상된 MYXV 복제가 또한 암세포 사멸을 향상시키는지의 여부를 시험하기 위해, ATP를 측정하여 감염된 세포의 생존력을 시험하였다. 이 경우 HT29 및 PANC-1 세포가 시험되었다.

[0122] HT29 및 PANC-1 세포를 불투명 벽 96 웰 플레이트에서 100 ul 배지/웰에 20,000개 세포로 시딩하고, 밤새 배양하였다. 이어서, 세포를 1시간 동안 상이한 농도의 렙토마이신 B로 처리하고, 억제제의 존재 하에 vMyx-GFP로 5.0의 MOI로 감염시켰다. 이어서, ATP 함량을 기반으로 세포 생존율을 측정하였다. ATP 함량은 100 ul CellTiter-Glo® 시약(Promega)을 첨가하고 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 기록함으로써 감염 후 64시간(HT-29 세포, **도 5a**) 또는 40시간(PANC-1 세포, **도 5b**)에 측정되었다. 표시된 데이터는 평균 +/- SD를 나타낸다(n=3 또는 4).

[0123] 결과는 표시된 시점에서 HT29 및 PANC-1 세포 모두가 렙토마이신 B 처리 단독에 민감함을 나타내었다. 렙토마이신 B의 농도가 증가함에 따라 세포 생존력이 감소하였다. 이 시점에서(HT29의 경우 64 hpi 및 PANC-1의 경우 40 hpi), MYXV 단독으로도 세포 생존율이 40-50%로 감소하였다. 그러나, 렙토마이신 B로 HT29 및 PANC-1 세포 둘 다를 전처리하면 이러한 인간 암세포주의 생존력이 더욱 감소하였다. 흥미롭게도, HT29 세포주에서, 최소 세포 생존율에 영향을 미치는 최저 농도의 렙토마이신 B는 MYXV와 조합 후 MYXV의 세포 사멸 능력을 더욱 향상시켰다. 종합하면, 이러한 결과는 핵세포질간 수송 억제제가 비허용적 인간 암세포주에서 MYXV 복제를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 MYXV의 세포 사멸 능력을 상승적으로 향상시킬 수 있음을 나타내었다.

[0124] **실시예 4: 믹소마 바이러스(MYXV) 및 핵세포질간 수송 억제제를 사용한 종양용해성 바이러스요법**

[0125] 대상체는 암(예컨대, 비허용적 혈액암 또는 고형 종양)을 갖는 것으로 확인된다.

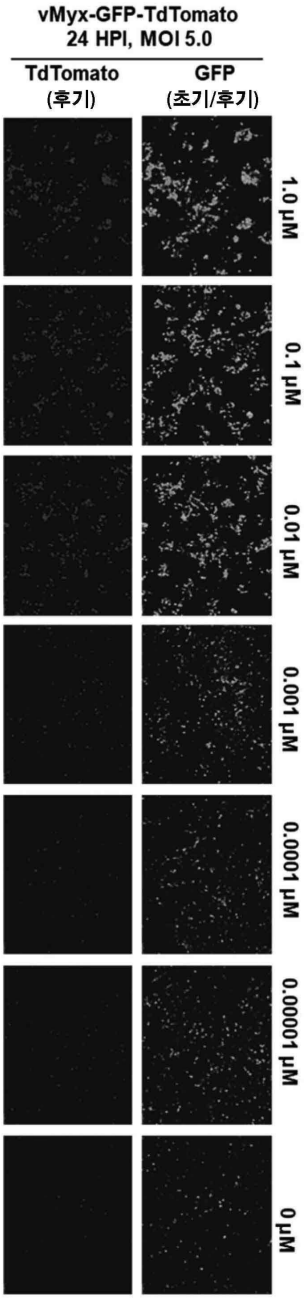
[0126] MYXV는 인간 암 환자에서의 사용이 승인된 핵세포질간 수송 억제제인 셀리넥서와 조합하여 본원에 개시된 바와 같이 대상체에게 투여된다(예컨대, 주사 또는 주입을 통해 투여됨). MYXV는 대상체의 암세포를 감염시켜 암세포를 사멸시키고 항종양 면역 반응을 증가시킨다. 핵세포질간 수송 억제제를 투여하면 믹소마 바이러스의 항암 활성이 향상되어 종양 부담이 감소하고 생존 기간이 연장된다.

[0127] 본 개시가 특정 실시양태에 중점을 두고 설명되었지만, 특정 실시양태의 변형이 사용될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이며, 본 개시내용은 본원에 구체적으로 설명된 것과는 다르게 실시될 수 있음이 의도된다. 본 발명의 특정 측면, 실시양태, 또는 예와 관련하여 기재된 특색, 특징, 화합물 또는 예는 본 발명의 임의의 다른 측면, 실시양태 또는 예에 적용 가능한 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 개시내용은 하기 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 개시의 취지 및 범위 내에 포괄되는 모든 변형을 포함한다. 따라서, 본 출원인은 이러한

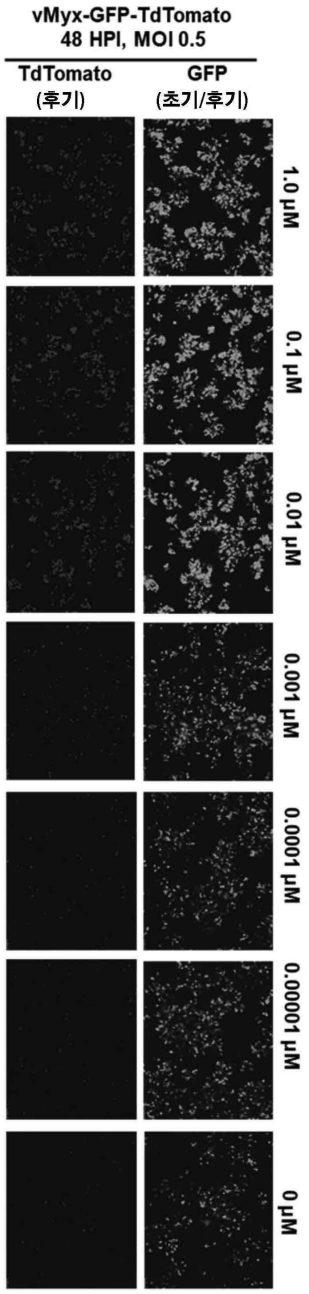
청구범위의 범위 및 취지 내에 있는 모든 것을 본 출원인의 발명으로 주장한다.

도면

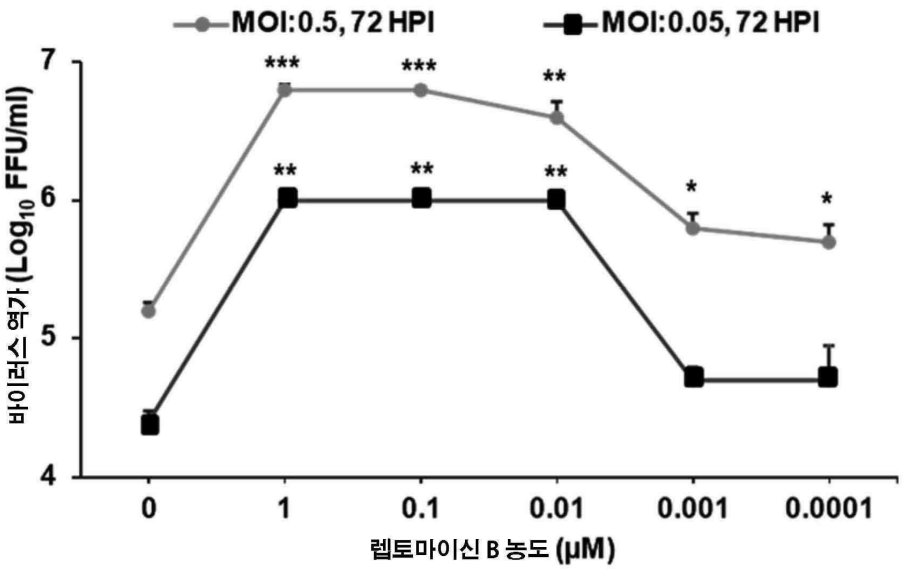
도면1a



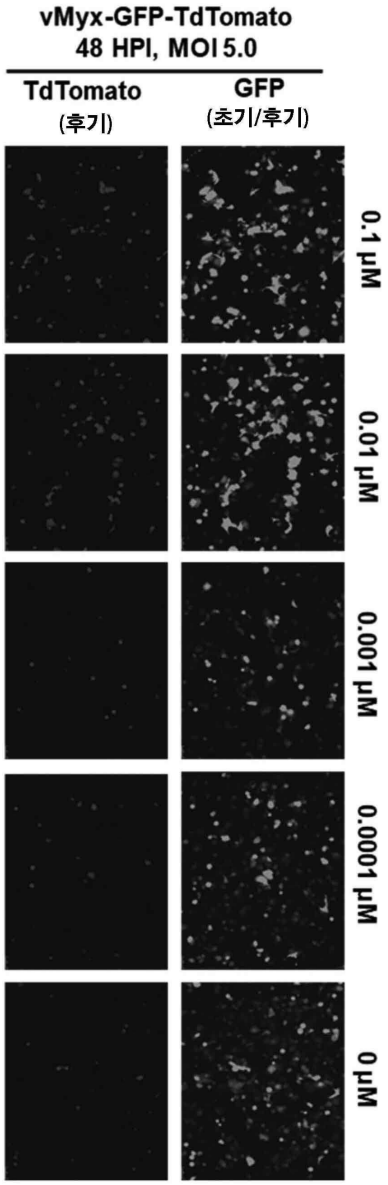
도면1b


vMyx-GFP-TdTomato
48 HPI, MOI 0.5
TdTomato
(후기)
GFP
(초기/후기)
1.0 μM
0.1 μM
0.01 μM
0.001 μM
0.0001 μM
0.00001 μM
0 μM

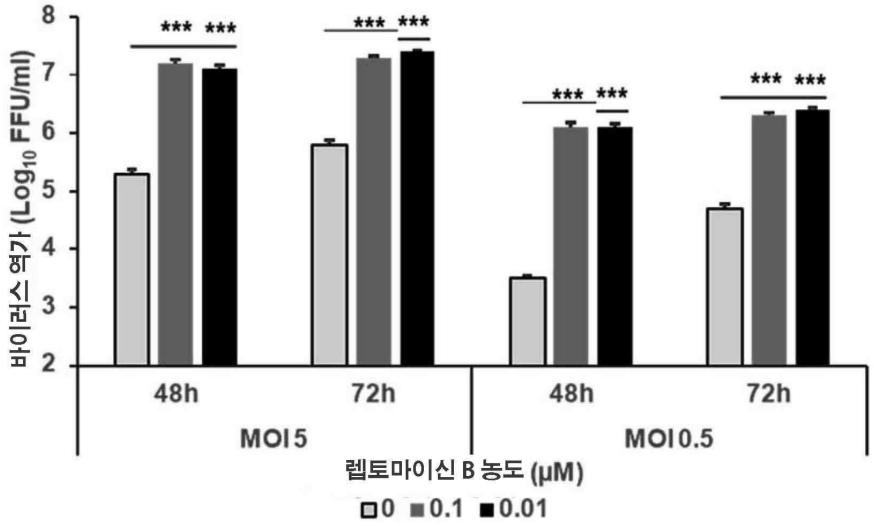
도면2


MOI:0.5, 72 HPI
MOI:0.05, 72 HPI
바이러스 역가 (Log10 FFU/ml)
7
6
5
4
***
***
**
**
**
**
*
*
0
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
렙토마이신 B 농도 (μM)

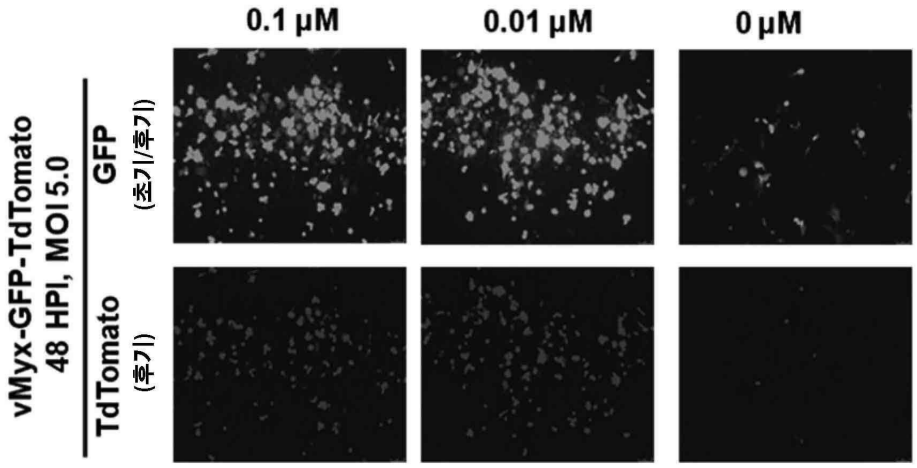
도면3a


vMyx-GFP-TdTomato
48 HPI, MOI 5.0
TdTomato
(후기)
GFP
(초기/후기)
0.1 μM
0.01 μM
0.001 μM
0.0001 μM
0 μM

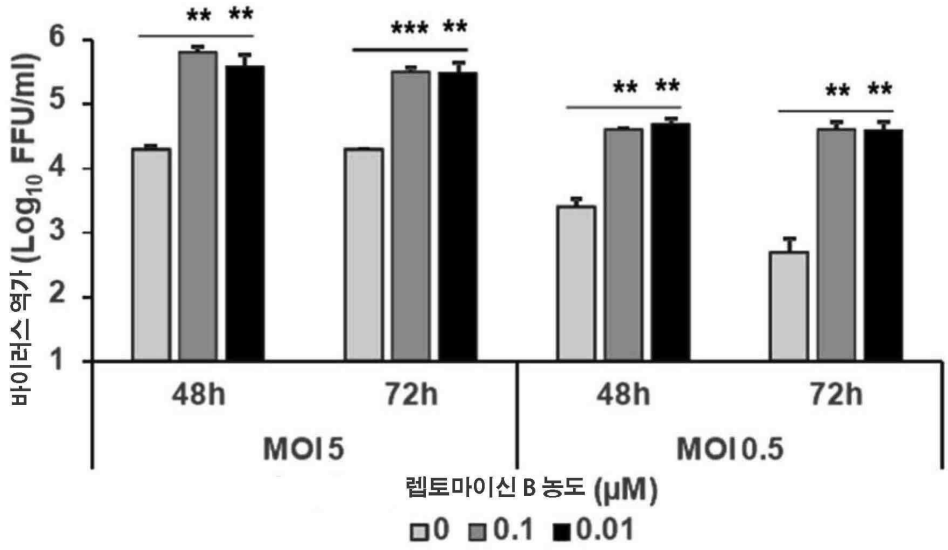
도면3b



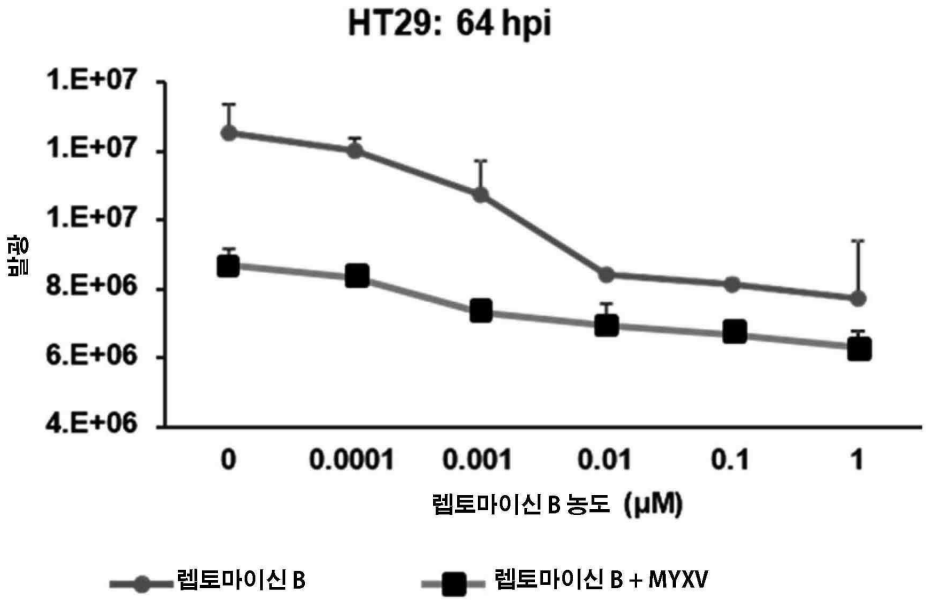
도면4a



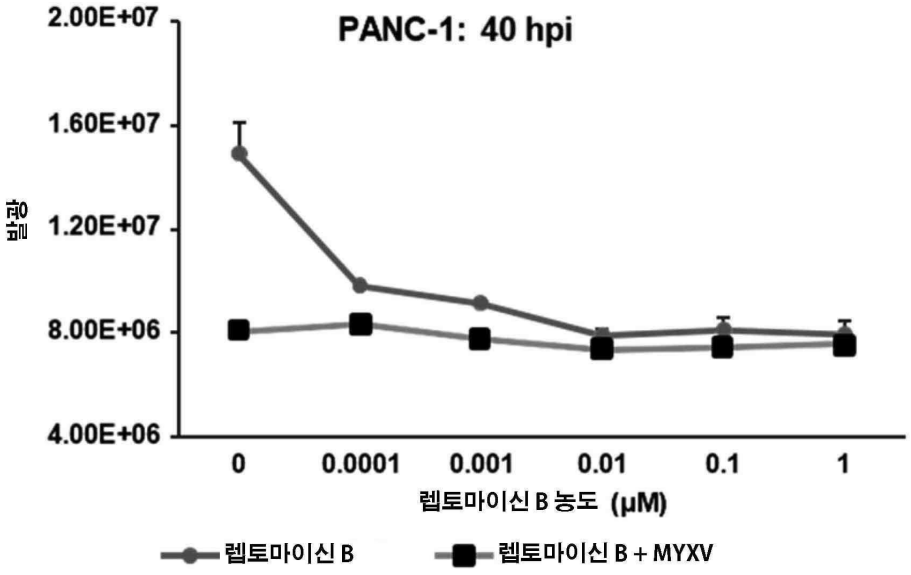
도면4b



도면5a


HT29: 64 hpi
1.E+07
1.E+07
1.E+07
8.E+06
6.E+06
4.E+06
발광
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
렙토마이신 B 농도 (μM)
렙토마이신 B
렙토마이신 B + MYXV

도면5b


PANC-1: 40 hpi
2.00E+07
1.60E+07
1.20E+07
8.00E+06
4.00E+06
발광
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
렙토마이신 B 농도 (μM)
렙토마이신 B
렙토마이신 B + MYXV