(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112533620 B
(45)授权公告日 2025.03.28

(21)申请号 201980016785.2

(22)申请日 2019.03.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112533620 A

(43)申请公布日 2021.03.19

(30)优先权数据
EP18000210.7 2018.03.05 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/000067 2019.03.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/170283 EN 2019.09.12

(73)专利权人 慕尼黑工业大学临床教学中心
地址 德国慕尼黑

(72)发明人 佩尔·松内·霍尔姆
罗曼·纳夫罗特

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.
A61K 35/761(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

Juming Ma等.E2F promoter-regulated oncolytic adenovirus with p16 gene induces cell apoptosis and exerts antitumor effect on gastric cancer.Digestive diseases and sciences.2008,第54卷(第7期),第1425-1431页.

徐镇喜等.DK4/6抑制剂在乳腺癌治疗中的研究进展.中国医药指南.2023,第21卷(第16期),第74-76+83页.

Juming Ma等.E2F promoter-regulated oncolytic adenovirus with p16 gene induces cell apoptosis and exerts antitumor effect on gastric cancer.Digestive diseases and sciences.2008,第54卷(第7期),第1425-1431页.

审查员 金玥昕

权利要求书1页 说明书48页
序列表8页 附图27页

(54)发明名称

通过溶瘤腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合治疗肿瘤

(57)摘要

本发明涉及腺病毒和CDK4/抑制剂的组合。

CN 112533620 B

1.包含溶瘤腺病毒和小分子CDK4/6抑制剂的组合物,其中所述溶瘤腺病毒以YB-1依赖性方式复制,其中所述溶瘤腺病毒缺乏E1A13S的表达,并且其中所述小分子CDK4/6抑制剂选自由以下各项组成的组:帕博西尼,其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼,其也被称为LEE011;和Trilaciclib,其也被称为G1T28。

2.权利要求1的组合物,其中所述溶瘤腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

3.权利要求1的组合物,其中所述组合物还包含PARP抑制剂,其中所述PARP抑制剂是BMN673。

4.权利要求1至3中任一项的组合物,其中所述组合物还包含布罗莫结构域抑制剂,其中所述布罗莫结构域抑制剂是JQ1。

5.权利要求1至4中任一项的组合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途,其中所述肿瘤是Rb阳性的。

6.根据权利要求5所述的用途,其中所述肿瘤是癌症。

7.权利要求1的组合物,或权利要求5的用途,其中所述溶瘤腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev。

8.权利要求1的组合物,或权利要求5的用途,其中所述溶瘤腺病毒缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

9.权利要求1的组合物,或权利要求5的用途,其中所述溶瘤腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的溶瘤腺病毒。

10.权利要求1的组合物,或权利要求5的用途,其中所述溶瘤腺病毒是XVir-N-31。

11.权利要求5或6的用途,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中含有YB-1。

12.权利要求5或6的用途,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

13.权利要求12所述的用途,其中所述乳腺癌为转移性乳腺癌。

14.权利要求5或6的用途,其中所述溶瘤腺病毒和小分子CDK4/6抑制剂是用于分别施用的。

通过溶瘤腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合治疗肿瘤

[0001] 本发明涉及溶瘤病毒和CDK4/抑制剂的组合;这种组合在治疗诸如肿瘤的疾病中的用途;与CDK4/6抑制剂一起用于治疗诸如肿瘤的疾病的溶瘤病毒,优选溶瘤腺病毒;以及与溶瘤病毒,优选溶瘤腺病毒一起用于治疗诸如肿瘤的疾病的CDK4/6抑制剂。

[0002] 当前在肿瘤的治疗中使用许多治疗概念。除了使用手术以外,主要是化学疗法和放射疗法。然而,所有这些技术都具有相当大的副作用。复制选择性溶瘤病毒的使用提供了治疗肿瘤的新平台。与此相关的是,启动了病毒剂的选择性肿瘤内复制,这导致病毒复制,感染肿瘤细胞的裂解以及病毒向相邻肿瘤细胞的扩散。由于病毒的复制能力仅限于肿瘤细胞,因此可以避免正常组织复制,从而避免被病毒裂解。

[0003] 本发明的问题是提供手段,以提高基于溶瘤病毒和特别是腺病毒的肿瘤治疗的功效。

[0004] 这些和其他问题通过所附独立权利要求的主题解决。优选的实施方案可取自所附的从属权利要求。

[0005] 在第一方面,还通过包含腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合解决了本发明所基于的问题,这也是该第一方面的第一实施方案。

[0006] 在下文中,公开了该第一方面的其他实施方案。

[0007] 实施方案2:实施方案1的组合,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0008] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的组合,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0009] 实施方案4:实施方案3的组合,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0010] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的组合,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自由E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP组成的组。

[0011] 实施方案6:实施方案5的组合,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0012] 实施方案7:实施方案6的组合,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0013] 实施方案8:实施方案6的组合,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0014] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的组合,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0015] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的组合,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0016] 实施方案11:实施方案10的组合,其中所述缺失选自包含CR3片段(stretches)的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0017] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的组合,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0018] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的组合,其中与野生型癌基因蛋白相比,所

述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0019] 实施方案14:实施方案13的组合,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0020] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的组合,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0021] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的组合,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0022] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的组合,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0023] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的组合,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0024] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的组合,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0025] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的组合,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0026] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的组合,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒性致癌基因的病毒,其能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0027] 实施方案22:实施方案21的组合,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0028] 实施方案23:实施方案21的组合,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0029] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的组合,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0030] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的组合,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0031] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的组合,其中所述病毒编码YB-1。

[0032] 实施方案27:实施方案26的组合,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0033] 实施方案28:实施方案27的组合,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0034] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的组合,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0035] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的组合,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0036] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的组合,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0037] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的组合,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中

的G1阻滞并抑制E2F1。

[0038] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的组合,其中所述组合物还包含PARP抑制剂。

[0039] 实施方案34:实施方案33的组合,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、rucaparib和BMN673的组。

[0040] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的组合,其中所述组合物还包含布罗莫结构域抑制剂。

[0041] 实施方案36:实施方案35的组合,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0042] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的组合,其中所述组合的成分用于分别施用。

[0043] 通过根据第一方面,包括其任何实施方案的包含腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合用于治疗疾病,更优选地用于治疗肿瘤或癌症,在第二方面中也解决了本发明的问题,其也是该第二方面的第一实施方案。

[0044] 在下文中,公开了该第二方面的其他实施方案。

[0045] 实施方案1:包含腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合,其用于治疗和/或预防疾病,优选肿瘤或癌症的方法。

[0046] 实施方案2:实施方案1的组合的用途,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0047] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的组合的用途,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0048] 实施方案4:实施方案3的组合的用途,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0049] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的组合的用途,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0050] 实施方案6:实施方案5的组合的用途,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0051] 实施方案7:实施方案6的组合的用途,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0052] 实施方案8:实施方案6的组合的用途,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0053] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的组合的用途,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0054] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的组合的用途,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0055] 实施方案11:实施方案10的组合的用途,其中所述缺失选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0056] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的组合的用途,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0057] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的组合的用途,其中与野生型癌基因蛋白相

比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0058] 实施方案14:实施方案13的组合的用途,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0059] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的组合的用途,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0060] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的组合的用途,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0061] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的组合的用途,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0062] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的组合的用途,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0063] 实施方案19:用于实施方案1至18中任一项的组合的用途,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0064] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的组合的用途,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0065] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的组合的用途,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒性致癌基因的病毒,其能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0066] 实施方案22:实施方案21的组合的用途,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0067] 实施方案23:实施方案21的组合的用途,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0068] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的组合的用途,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0069] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的组合的用途,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0070] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的组合的用途,其中所述病毒编码YB-1。

[0071] 实施方案27:实施方案26的组合的用途,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0072] 实施方案28:实施方案27的组合的用途,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0073] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的组合的用途,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0074] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的组合的用途,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0075] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的组合的用途,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0076] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的组合的用途,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0077] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的组合的用途,其中所述组合物还包含PARP抑制剂。

[0078] 实施方案34:实施方案33的组合的用途,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0079] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的组合的用途,其中所述组合物还包含布罗莫结构域抑制剂。

[0080] 实施方案36:实施方案35的组合的用途,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0081] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的组合的用途,其中所述组合的成分用于分别施用。

[0082] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的组合的用途,其中肿瘤的细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0083] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0084] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0085] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0086] 实施方案42:实施方案41的组合的用途,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0087] 实施方案43:实施方案41的组合的用途,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0088] 实施方案44:实施方案43的组合的用途,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0089] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0090] 实施方案46:实施方案45的组合的用途,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0091] 实施方案47:权利要求46的组合的用途,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0092] 实施方案48:权利要求47的组合的用途,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0093] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的组合的用途,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0094] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0095] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0096] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤的细胞在诱导

后在细胞核中具有YB-1。

[0097] 实施方案53:实施方案52的组合的用途,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0098] 实施方案54:实施方案53的组合的用途,其中所述措施应用于细胞、器官或生物体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0099] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的组合的用途,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0100] 通过腺病毒用于治疗和/或预防受试者的疾病,更优选肿瘤或癌症,其中该方法包括向受试者施用腺病毒和CDK4/6抑制剂,在第三方面中也解决了本发明的问题,其也是该第三方面的第一实施方案。

[0101] 在下文中,公开了这种第三方面的其他实施方案。

[0102] 实施方案2:实施方案1的用途的腺病毒,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0103] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0104] 实施方案4:实施方案3的用途的腺病毒,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0105] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0106] 实施方案6:实施方案5的用途的腺病毒,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0107] 实施方案7:实施方案6的用途的腺病毒,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0108] 实施方案8:实施方案6的用途的腺病毒,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0109] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的用途的腺病毒,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0110] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的用途的腺病毒,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0111] 实施方案11:实施方案10的用途的腺病毒,其中所述缺失选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0112] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的用途的腺病毒,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0113] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的用途的腺病毒,其中与野生型癌基因蛋白相比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0114] 实施方案14:实施方案13的用途的腺病毒,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0115] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0116] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0117] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0118] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0119] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0120] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0121] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ24、Ad Δ24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,所述表达的病毒癌基因能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0122] 实施方案22:实施方案21的用途的腺病毒,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0123] 实施方案23:实施方案21的用途的腺病毒,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0124] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0125] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0126] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的用途的腺病毒,其中所述病毒编码YB-1。

[0127] 实施方案27:实施方案26的用途的腺病毒,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0128] 实施方案28:实施方案27的用途的腺病毒,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0129] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的用途的腺病毒,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0130] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的用途的腺病毒,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0131] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的用途的腺病毒,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0132] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的用途的腺病毒,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0133] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的用途的腺病毒,其中所述方法还包括向受试者施用PARP抑制剂。

[0134] 实施方案34:实施方案33的用途的腺病毒,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕

尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0135] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的用途的腺病毒,其中所述组合物还包括向受试者施用布罗莫结构域抑制剂。

[0136] 实施方案36:实施方案35的用途的腺病毒,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0137] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的用途的腺病毒,其中所述腺病毒、所述CDK4/6抑制剂、所述PARP抑制剂和/或所述布罗莫结构域抑制剂分别或以任何组合形式施用于受试者。

[0138] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的用途的腺病毒,其中肿瘤的细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0139] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0140] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0141] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0142] 实施方案42:实施方案41的用途的腺病毒,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0143] 实施方案43:实施方案41的用途的腺病毒,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0144] 实施方案44:实施方案43的用途的腺病毒,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0145] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0146] 实施方案46:实施方案45的用途的腺病毒,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0147] 实施方案47:权利要求46的用途的腺病毒,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0148] 实施方案48:权利要求47的用途的腺病毒,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0149] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的用途的腺病毒,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0150] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0151] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0152] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤的细胞在诱导后在细胞核中具有YB-1。

[0153] 实施方案53:实施方案52的用途的腺病毒,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自包含辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0154] 实施方案54:实施方案53的用途的腺病毒,其中所述措施应用于细胞、器官或生物

体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0155] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的用途的腺病毒,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0156] 通过CDK4/6抑制剂用于治疗和/或预防受试者的疾病,更优选肿瘤或癌症,其中该方法包括向受试者施用腺病毒和CDK4/6抑制剂,在第四方面中也解决了本发明的问题,其也是该第四方面的第一实施方案。

[0157] 在下文中,公开了该第四方面的其他实施方案。

[0158] 实施方案2:实施方案1的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0159] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0160] 实施方案4:实施方案3的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0161] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0162] 实施方案6:实施方案5的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0163] 实施方案7:实施方案6的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0164] 实施方案8:实施方案6的用途的CDK4/6抑制剂,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0165] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0166] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0167] 实施方案11:实施方案10的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述缺失是选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0168] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0169] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白相比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0170] 实施方案14:实施方案13的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0171] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0172] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0173] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0174] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0175] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0176] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0177] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,所述表达的病毒癌基因能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0178] 实施方案22:实施方案21的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0179] 实施方案23:实施方案21的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0180] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0181] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0182] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述病毒编码YB-1。

[0183] 实施方案27:实施方案26的用途的CDK4/6抑制剂,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0184] 实施方案28:实施方案27的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0185] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0186] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0187] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0188] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0189] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述方法还包括向受试者施用PARP抑制剂。

[0190] 实施方案34:实施方案33的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0191] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述方法还包括向受试者施用布罗莫结构域抑制剂。

[0192] 实施方案36:实施方案35的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0193] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述腺病毒、所述CDK4/6抑制剂、所述PARP抑制剂和/或所述布罗莫结构域抑制剂分别或以任何组合形式施用于受试者。

[0194] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中肿瘤的细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0195] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0196] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0197] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0198] 实施方案42:实施方案41的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0199] 实施方案43:实施方案41的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0200] 实施方案44:实施方案43的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0201] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0202] 实施方案46:实施方案45的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0203] 实施方案47:权利要求46的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0204] 实施方案48:权利要求47的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0205] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0206] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0207] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0208] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在诱导后在细胞核中具有YB-1。

[0209] 实施方案53:实施方案52的用途的CDK4/6抑制剂,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自包含辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0210] 实施方案54:实施方案53的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述措施应用于细胞、器官

或生物体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0211] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的用途的CDK4/6抑制剂,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0212] 通过PARP抑制剂用于治疗和/或预防受试者的疾病,更优选肿瘤或癌症,其中所述方法包括向所述受试者施用腺病毒、CDK4/6抑制剂和PARP抑制剂,第五方面也解决了本发明的问题,其也是该第五方面的第一实施方案。

[0213] 在下文中,公开了这种第五方面的其他实施方案。

[0214] 实施方案2:实施方案1的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0215] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0216] 实施方案4:实施方案3的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0217] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0218] 实施方案6:实施方案5的用途的PARP抑制剂,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0219] 实施方案7:实施方案6的用途的PARP抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0220] 实施方案8:实施方案6的用途的PARP抑制剂,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0221] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的用途的PARP抑制剂,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0222] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的用途的PARP抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0223] 实施方案11:实施方案10的用途的PARP抑制剂,其中所述缺失选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0224] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的PARP抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0225] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的用途的PARP抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白相比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0226] 实施方案14:实施方案13的用途的PARP抑制剂,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0227] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0228] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0229] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0230] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0231] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0232] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0233] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,所述表达的病毒癌基因能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0234] 实施方案22:实施方案21的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0235] 实施方案23:实施方案21的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0236] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0237] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0238] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述病毒编码YB-1。

[0239] 实施方案27:实施方案26的用途的PARP抑制剂,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0240] 实施方案28:实施方案27的用途的PARP抑制剂,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0241] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0242] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0243] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0244] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0245] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述方法还包括向受试者施用PARP抑制剂。

[0246] 实施方案34:实施方案33的用途的PARP抑制剂,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0247] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述组合物还包括向受试者施用布罗莫结构域抑制剂。

[0248] 实施方案36:实施方案35的用途的PARP抑制剂,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0249] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述腺病毒、所述CDK4/6抑制剂、所述PARP抑制剂和/或所述布罗莫结构域抑制剂分别或以任何组合形式施用于受试者。

[0250] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的用途的PARP抑制剂,其中肿瘤的细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0251] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0252] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0253] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0254] 实施方案42:实施方案41的用途的PARP抑制剂,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0255] 实施方案43:实施方案41的用途的PARP抑制剂,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0256] 实施方案44:实施方案43的用途的PARP抑制剂,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0257] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0258] 实施方案46:实施方案45的用途的PARP抑制剂,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0259] 实施方案47:用于权利要求46的用途的PARP抑制剂,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0260] 实施方案48:权利要求47的用途的PARP抑制剂,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0261] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0262] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0263] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0264] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在诱导后在细胞核中具有YB-1。

[0265] 实施方案53:实施方案52的用途的PARP抑制剂,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0266] 实施方案54:实施方案53的用途的PARP抑制剂,其中所述措施应用于细胞、器官或

生物体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0267] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的用途的PARP抑制剂,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0268] 通过布罗莫结构域抑制剂用于治疗和/或预防受试者的疾病,更优选肿瘤或癌症,其中该方法包括向受试者施用腺病毒、CDK4/6抑制剂和布罗莫结构域抑制剂,在第六方面中解决了本发明的问题,其也是该第六方面的第一实施方案。

[0269] 在下文中,公开了这种第六方面的其他实施方案。

[0270] 实施方案2:实施方案1的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0271] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0272] 实施方案4:实施方案3的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0273] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0274] 实施方案6:实施方案5的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0275] 实施方案7:实施方案6的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0276] 实施方案8:实施方案6的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0277] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0278] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0279] 实施方案11:实施方案10的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述缺失选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0280] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0281] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中与野生型癌基因蛋白相比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0282] 实施方案14:实施方案13的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0283] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的腺病毒。

[0284] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病

毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0285] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0286] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0287] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0288] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0289] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、AdΔ24、AdΔ24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,所述表达的病毒癌基因能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0290] 实施方案22:实施方案21的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0291] 实施方案23:实施方案21的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0292] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0293] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0294] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述病毒编码YB-1。

[0295] 实施方案27:实施方案26的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0296] 实施方案28:实施方案27的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0297] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0298] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0299] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0300] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0301] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述方

法还包括向受试者施用PARP抑制剂。

[0302] 实施方案34:实施方案33的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0303] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述组合物还包括向受试者施用布罗莫结构域抑制剂。

[0304] 实施方案36:实施方案35的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0305] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述腺病毒、所述CDK4/6抑制剂、所述PARP抑制剂和/或所述布罗莫结构域抑制剂分别或以任何组合形式施用于受试者。

[0306] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中肿瘤细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0307] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0308] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0309] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0310] 实施方案42:实施方案41的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0311] 实施方案43:实施方案41的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0312] 实施方案44:实施方案43的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0313] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0314] 实施方案46:实施方案45的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0315] 实施方案47:权利要求46的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0316] 实施方案48:权利要求47的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0317] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0318] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0319] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿

瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0320] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤的细胞在诱导后在细胞核中具有YB-1。

[0321] 实施方案53:实施方案52的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0322] 实施方案54:实施方案53的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述措施应用于细胞、器官或生物体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0323] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的用途的布罗莫结构域抑制剂,其中所述肿瘤选自包含以下各项的组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0324] 通过用于治疗和/或预防受试者的疾病,更优选肿瘤或癌症的方法,其中该方法包括向受试者施用腺病毒和CDK4/6抑制剂,在第七方面中解决了本发明的问题,其也是该第七方面的第一个实施方案。

[0325] 在下文中,公开了该第七方面的其他实施方案。

[0326] 实施方案2:实施方案1的方法,其中所述腺病毒是溶瘤腺病毒。

[0327] 实施方案3:实施方案1和2中任一项的方法,其中所述腺病毒以YB-1依赖性方式复制。

[0328] 实施方案4:实施方案3的方法,其中所述腺病毒在细胞核中缺乏YB-1的细胞中是复制缺陷的,但是在细胞核中具有YB-1的细胞中复制。

[0329] 实施方案5:实施方案2至4中任一项的方法,其中所述腺病毒编码癌基因蛋白,其中所述癌基因蛋白使至少一个腺病毒基因反式激活,其中所述腺病毒基因选自包含E1B55kDa、E4orf6、E4orf3和E3ADP的组。

[0330] 实施方案6:实施方案5的方法,其中所述癌基因蛋白是E1A蛋白。

[0331] 实施方案7:实施方案6的方法,其中所述E1A蛋白能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0332] 实施方案8:实施方案6的方法,其中E1A蛋白不能结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0333] 实施方案9:实施方案6至8中任一项的方法,其中E1A蛋白不诱导YB-1定位到细胞核中。

[0334] 实施方案10:实施方案5至9中任一项的方法,其中与野生型癌基因蛋白E1A相比,所述癌基因蛋白表现出一个或几个突变或缺失。

[0335] 实施方案11:实施方案10的方法,其中所述缺失选自包含CR3片段的缺失、N末端的缺失和C末端的缺失的组中的一种。

[0336] 实施方案12:实施方案6至11中任一项的方法,其中所述E1A蛋白能够结合Rb。

[0337] 实施方案13:实施方案6至12中任一项的方法,其中与野生型癌基因蛋白相比,所述E1A蛋白包含一个或多个突变或缺失,其中所述缺失优选为CR1区域和/或CR2区域中的缺失。

[0338] 实施方案14:实施方案13的方法,其中所述E1A蛋白不能结合Rb。

[0339] 实施方案15:实施方案1至14中任一项的方法,其中所述病毒是表达E1A12S蛋白的

腺病毒。

[0340] 实施方案16:实施方案1至15中任一项的方法,其中所述病毒是缺乏E1A13S蛋白表达的腺病毒。

[0341] 实施方案17:实施方案1至16中任一项的方法,其中所述病毒是缺乏功能活性腺病毒E3区域的腺病毒。

[0342] 实施方案18:实施方案1至17中任一项的方法,其中所述病毒是缺乏E1B 19kDa蛋白表达的腺病毒。

[0343] 实施方案19:实施方案1至18中任一项的方法,其中所述病毒是在尾丝上表达RGD基序的腺病毒。

[0344] 实施方案20:实施方案1至19中任一项的方法,其中所述病毒是腺病毒血清型5。

[0345] 实施方案21:实施方案1至20中任一项的方法,其中所述腺病毒选自包含以下各项的组:XVir-N-31、dl520、Ad Δ 24、Ad Δ 24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,所述表达的病毒癌基因能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0346] 实施方案22:实施方案21的方法,其中所述腺病毒是XVir-N-31。

[0347] 实施方案23:实施方案21的方法,其中所述腺病毒是dl520,其中所述腺病毒E3区域是功能失活的。

[0348] 实施方案24:实施方案21至23中任一项的方法,其中所述腺病毒是dl520,其中dl520缺乏E1B 19kDa蛋白的表达。

[0349] 实施方案25:实施方案21至24中任一项的方法,其中所述腺病毒是在尾丝上表达RGD基序的dl520。

[0350] 实施方案26:实施方案1至25中任一项的方法,其中所述病毒编码YB-1。

[0351] 实施方案27:实施方案26的方法,其中编码YB-1的基因在组织特异性启动子、肿瘤特异性启动子和/或YB-1依赖性启动子的控制下。

[0352] 实施方案28:实施方案27的方法,其中所述YB-1依赖性启动子是腺病毒E2晚期启动子。

[0353] 实施方案29:实施方案1至28中任一项的方法,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb磷酸化的化合物。

[0354] 实施方案30:实施方案1至29中任一项的方法,其中所述CDK4/6抑制剂是降低细胞,优选肿瘤细胞中Rb表达的化合物。

[0355] 实施方案31:实施方案1至30中任一项的方法,其中所述CDK4/6抑制剂选自包含以下各项的组;帕博西尼(palbociclib),其也被称为PD 0332991;阿贝西利,其也被称为LY-2835219;瑞博西尼(ribociclib),其也被称为LEE011;Trilaciclib,其也被称为G1T28;和Dinaciclib。

[0356] 实施方案32:实施方案1至31中任一项的方法,其中所述CDK4/6抑制剂引起细胞中的G1阻滞并抑制E2F1。

[0357] 实施方案33:实施方案1至32中任一项的方法,其中所述方法还包括向受试者施用PARP抑制剂。

[0358] 实施方案34:实施方案33的方法,其中所述PARP抑制剂选自包含奥拉帕尼

(olaparib)、维利帕尼(veliparib)、鲁卡帕尼(rucaparib)和BMN673的组。

[0359] 实施方案35:实施方案1至32中任一项的方法,其中所述组合物还包括向受试者施用布罗莫结构域抑制剂。

[0360] 实施方案36:实施方案35的方法,其中所述布罗莫结构域抑制剂选自包含JQ1、OTX-015、I-BET151、CPI-0610、I-BET762、CPI203、PFI-1和MS 436的组。

[0361] 实施方案37:实施方案1至36中任一项的方法,其中所述腺病毒、所述CDK4/6抑制剂、所述PARP抑制剂和/或所述布罗莫结构域抑制剂分别或以任何组合形式施用于受试者。

[0362] 实施方案38:实施方案1至37中任一项的方法,其中肿瘤的细胞具有CDK4/6信号途径的破坏。

[0363] 实施方案39:实施方案1至38中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞具有细胞周期的不受控制的G1-S转变。

[0364] 实施方案40:实施方案1至38中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞在选自包含RB1基因、CDKN2A基因和CDKN2B基因的组中的基因中具有功能丧失的突变或缺失。

[0365] 实施方案41:实施方案1至38中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞具有基因的扩增和/或基因中的活化突变。

[0366] 实施方案42:实施方案41的方法,其中所述基因选自包含CCND1、E2F1、E2F2、E2F3、CDK4和CDK6的组。

[0367] 实施方案43:实施方案41的方法,其中所述基因是编码有丝分裂信号途径的组分的一个基因。

[0368] 实施方案44:实施方案43的方法,其中所述有丝分裂信号途径选自包含PI3K途径和MAPK途径的组。

[0369] 实施方案45:实施方案1至44中任一项的方法,其中所述肿瘤细胞的细胞对一种或几种药物活性剂和/或辐射具有抗性或对其不敏感。

[0370] 实施方案46:实施方案45的方法,其中所述药物活性剂是细胞抑制剂。

[0371] 实施方案47:权利要求46的方法,其中所述抗性由ABC转运蛋白介导。

[0372] 实施方案48:权利要求47的方法,其中所述ABC转运蛋白选自包含MRP和MDR,特别是MDR-1的组。

[0373] 实施方案49:实施方案45至48中任一项的方法,其中所述抗性是多重抗性或多抗性,特别是针对细胞抑制剂和/或辐射的多重或多抗性。

[0374] 实施方案50:实施方案1至49中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞是Rb阳性的。

[0375] 实施方案51:实施方案1至50中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞在细胞核中具有YB-1。

[0376] 实施方案52:实施方案1至51中任一项的方法,其中所述肿瘤的细胞在诱导后在细胞核中具有YB-1。

[0377] 实施方案53:实施方案52的方法,其中YB-1向细胞核内的运输通过选自辐射、施用细胞抑制剂和过热的组中的至少一种措施触发。

[0378] 实施方案54:实施方案53的方法,其中所述措施应用于细胞、器官或生物体,优选需要其的生物体,更优选患有肿瘤的生物体。

[0379] 实施方案55:权利要求1至54中任一项的方法,其中所述肿瘤选自包含以下各项的

组:膀胱癌、乳腺癌、转移性乳腺癌(mBC)、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和白血病。

[0380] 在第八方面,本发明还涉及组合物在制备药物中的用途,其中所述组合物是结合本发明的第一方面,包括其任何实施方案公开的组合物,并且该药物用于治疗和/或预防结合本发明的第二方面,包括其任何实施方案指定的疾病。

[0381] 在第九方面,本发明还涉及腺病毒在制备药物中的用途,其中所述腺病毒是结合本发明第三方面,包括其任何实施方案公开的腺病毒,并且该药物用于治疗和/或预防结合本发明的第三方面,包括其任何实施方案指定的疾病。

[0382] 在第十方面,本发明还涉及CDK4/6抑制剂在制备药物中的用途,其中所述CDK4/6抑制剂是结合本发明第四方面,包括其任何实施方案所公开的CDK4/6抑制剂,并且该药物用于治疗和/或预防结合本发明的第四方面,包括其任何实施方案指定的疾病。

[0383] 在第十一方面,本发明还涉及PARP抑制剂在制备药物中的用途,其中所述PARP抑制剂是结合本发明第五方面,包括其任何实施方案公开的PARP抑制剂,并且该药物用于治疗和/或预防结合本发明的第五方面,包括其任何实施方案指定的疾病。

[0384] 在第十二方面,本发明还涉及布罗莫结构域抑制剂在制备药物中的用途,其中所述布罗莫结构域抑制剂是结合本发明第六方面,包括其任何实施方案公开的布罗莫结构域抑制剂,并且该药物用于治疗和/或预防结合本发明的第六方面,包括其任何实施方案指定的疾病。

[0385] 本领域技术人员将认识到,本发明一个方面的每个和任意实施方案也是本发明每个和任意其它方面的实施方案,包括其任何实施方案。

[0386] 不希望被任何理论所束缚,本发明人惊奇地发现,将溶瘤病毒,优选溶瘤腺病毒与CDK4/6抑制剂组合,提高了基于这种溶瘤腺病毒的肿瘤治疗的功效。更具体地,假定CDK4/6抑制剂抑制E2F-1,从而降低其有效浓度,优选降低其在肿瘤细胞中的浓度,并使细胞的G1阻滞同步。因此,更多受感染的细胞可以完成整个病毒生命周期。

[0387] 基于本文提供的证据和见解,本领域技术人员将理解,任何突变腺病毒均适用于本发明的实践,其允许通过这种腺病毒可实现至少低至10%、20%或30%的野生型表达以及和E1B55K和E4orf6的活性。本领域技术人员将理解,可以通过修饰E1A来产生这种突变腺病毒。示例性的突变腺病毒是腺病毒XVir-N-31、dl520、AdΔ24、AdΔ24-RGD、dl922-947、E1Ad/01/07、dl1119/1131、CB 016、VCN-01、E1Adl1107、E1Adl1101、ORCA-010、Enadenotucirev和缺乏表达的病毒癌基因的病毒,其能够结合功能性Rb肿瘤抑制基因产物。

[0388] 腺病毒的得名由于Wallace P.Rowe和Robert J.Huebner于1953年在人的扁桃体和腺样体组织中首次分离出该病毒(Rowe等人,1953年)。腺病毒科包括五个属,即哺乳动物腺病毒属(Mastadenoviruses)、禽腺病毒(Aviadenoviruses)、唾液酸酶同源性腺病毒属(Siadenoviruses)、腺嘌呤-胸腺嘧啶富集性腺病毒属(Atadenoviruses)和鱼腺病毒属(Ichtadenoviruses)(Modrow,2013)。由于它们在新生啮齿动物中的致癌性,可以将它们分为7个亚型HAdV-A至HAdV-G(Boulanger和Blair,1991),共有62种血清型。因此,溶瘤病毒疗法的研究主要集中在哺乳动物腺病毒C型血清型5。

[0389] 大小为80至110nm的未包被二十面体衣壳包括252个壳粒,这些壳粒由衣壳顶点上

的12个五邻体(penton)(其由五邻体为基础和刺突状(spike-like)蛋白结构(称为尾丝)组装)和249个称为六邻体(hexon)的面(Modrow,2013)组成。腺病毒的整个生命周期可以细分为具有细胞进入的早期、病毒基因组的核转运、早期基因的转录和翻译以及具有晚期基因的转录和翻译的晚期。因此,晚期蛋白质主要负责结构蛋白质的组装和病毒体的成熟(Russell,2000)。在受纳细胞中,早期阶段大约需要6-8小时,随后的晚期大约需要4-6小时。至少对于腺病毒HADV-A、-C、-E和-F,通过存在于尾丝结构的每个末端上的球形结构与靶细胞上的受体的相互作用而发生附着。由于检测到该受体与引起柯萨奇B病毒吸附的受体相同,因此将该受体称为柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)(Bergelson,1997)。此外,靶细胞表面上的结合由“桥分子”支撑,“桥分子”是体液中的可溶性蛋白,例如凝血因子VII和X,其介导某些腺病毒类型的尾丝蛋白的结合(Modrow,2013)。在该吸附步骤之后,五邻体基础(penton base)中的RGD-基序(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)与异二聚体整联蛋白αvβ3或αvβ5相互作用,后者在此过程中起共受体的作用。这种相互作用导致病毒的内化(Wickham等人,1993)。随后,通过网格蛋白介导的内化作用在细胞质膜中发生内吞作用,然后病毒出现于内体中。内吞囊泡酸化后,病毒尾丝蛋白会改变其构象,从而破坏内体膜(Greber等人,1996)。病毒颗粒现在在细胞质中游离。通过将残留颗粒结合在微管的动力蛋白上,病毒基因组被转移到细胞核中(Modrow,2013)。

[0390] 腺病毒的基因组由长度为36-38kb的双链线性DNA组成。通过两个与5’端共价连接的末端蛋白质(TP)分子的相互作用,形成了准圆形状态(Modrow,2013)。通常,腺病毒基因组的五个编码区可细分为早期基因E1-E4(主要在感染的早期阶段有活性)和晚期基因(L1-L5),后者编码主要是病毒颗粒形成所必需的蛋白质(Modrow,2013)。

[0391] 腺病毒复制尤其取决于早期病毒基因E2的表达,该基因被大E1A蛋白(E1A13S)强烈诱导。感染后被转录的第一个病毒基因是早期1A区(E1A)。通过差异剪接处理主要的E1A转录物,以产生5个不同的信息,其沉降系数分别为13S、12S、11S、10S和9S。13S和12S mRNA在感染期间的早期最为丰富,而9S mRNA则在晚期最丰富。11S和10S mRNA是少数种类,在感染后的后期变得更加丰富。13S、12S、11S、10S和9S E1A mRNA分别编码289个残基(R)、243R、217R、171R和55R蛋白,所有这些蛋白都可以在体内检测到,只有9S产物才在体外检测到。通常,腺病毒基因表达在感染过程中受到高度调节,具有高度的复杂性。因此,E2基因的转录在两个启动子E2-早期和E2-晚期启动子的控制下,其产物编码病毒DNA聚合酶和有效病毒复制所必需的其他蛋白质。

[0392] 由于其两个重叠的转录控制区,E2-早期启动子可以细分为从+1位开始的主要启动子和从-26位开始的次要启动子,两者都含有TATA基序(Swaminathan和Thimmapaya,1996)。这些基序充当TATA盒结合蛋白(TBP)的结合位点。此外,-68位和-77位之间的一个活化转录因子(ATF)的结合位点和彼此反向排列的两个E2F/DP-1结合位点(TTTCGCGC)位于主要E2早期启动子的-35位和-63位(Swaminathan和Thimmapaya,1996)。E2早期启动子通过E1A的激活主要取决于位于主要启动子部分的两个E2F结合位点。

[0393] 在感染的中间阶段,大约6hpi(感染后小时数)后,E2基因的表达受E2-晚期启动子控制。在其157bp序列的nt-33至-22位,有一个TATA盒,可以被细胞TBP结合并激活(Swaminathan和Thimmapaya,1996)。此外,两个SP1识别位点和三个CCAAT盒是E2-晚期启动子的特征。

[0394] 由于显示出细胞因子YB-1能够结合倒置的CCAAT盒,因此研究了Y盒结合蛋白1(YB-1)和E2-晚期启动子之间的相互作用。Holm等人在2002年表明YB-1与E2-晚期启动子中存在的Y-盒(倒置的CCAAT-盒)存在特定的相互作用,并具有控制该启动子活性的能力(Holm等人,2002)。为了发挥其反式激活活性,YB-1必须通过腺病毒复合体E1B-55k/E4-orf6转移到细胞核中。这些早期病毒基因在E1A-13S反式激活后表达(Frisch和Mymryk,2002)。

[0395] 由YBX1基因编码的细胞因子YB-1是一种带有DNA结合蛋白的冷休克结构域,在转录、剪接、翻译控制和DNA损伤修复中具有多种功能(Kohno等人,2003)。此外,由于它激活了参与癌细胞多药耐药表型的发展的MDR1和MRP1基因,因此它在耐药性中起着重要的作用(Mantwill等人,2006)。通过暴露于外部应激因素(如腺病毒感染、化学疗法或紫外线辐射),随后的核转运可诱导YB-1表达(Mantwill等人,2006)。

[0396] 腺病毒早期基因和晚期基因的转录激活对于病毒生命周期至关重要。简而言之,病毒生命周期是由E1A转录的激活开始的,随后是E2、E3和E4基因的激活的级联。最后,激活主要晚期启动子(MLP)以协调衣壳和主要参与基因组壳体化的辅助蛋白的表达(Turner等人,2015)。为了克服对非增殖细胞中存在的病毒DNA复制的阻碍,该病毒表达了早期1A蛋白(E1A)。这些立即早期蛋白将细胞驱动到S期,并诱导所有其他病毒早期基因的表达。在感染过程中,表达了几种E1A同种型,其中存在5型人类腺病毒的289、243、217、171和55个残基的蛋白。在感染的情况下,病毒基因表达的主要驱动因子是大的E1A289R蛋白(Radko等人,2015年)。

[0397] 感染后,即使在最终分化的上皮细胞(人类腺病毒的主要靶标)中,腺病毒E1A蛋白的表达也能促进细胞周期从G0/G1期进入S期,并促进病毒复制。该过程被认为是腺病毒生命周期必不可少的。

[0398] 腺病毒已被设计为在保留正常细胞的同时感染、复制和杀死癌细胞。在肿瘤细胞中感染和复制后,溶瘤病毒杀死细胞,释放病毒体以用于随后的扩增循环。为了实现仅向肿瘤细胞中的复制,已经进行了两种遗传修饰,导致设计了溶瘤腺病毒的三个亚类(在本文中也称为CRAd),所有这些亚类都可以用于实施本发明。此外,WO2003/099859中特别描述了适用于实施本发明的溶瘤腺病毒。

[0399] I型CRAd的特征在于基因组的E1区域中的突变或缺失,干扰了细胞周期调节剂如p53和视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)的失活。结果,I型CRAd在活跃分裂的肿瘤细胞中复制。例如,Onyx-015(也称为dl1520)无法表达E1B-55kDa蛋白,无法使p53失活并避免p53诱导的细胞周期阻滞。几项研究将Onyx-015选择性的分子基础归因于p53或p53通路相关基因之一的表达缺失。但是,O'Shea等人表明,晚期病毒RNA输出而不是p53失活决定了Onyx-015病毒的选择性。在E1A区域中具有缺失的其他I型CRAd无法结合Rb并触发S期进入。例如,dl922-947和Δ24在E1A区域的CR2结构域中含有24个核苷酸缺失,从而废除了E1A-Rb相互作用。结果,这些病毒主要在肿瘤细胞中复制,其中游离的、未结合的E2F是可得的。

[0400] 将腺病毒复制限制到肿瘤细胞的另一种方法是调节病毒复制所需的病毒基因的转录。在II型CRAd中,基因组处于肿瘤特异性启动子的控制之下。这些启动子来自已知在某些肿瘤中与正常组织相比优先表达的基因(例如端粒酶或环加氧酶II);或与正常组织相比在肿瘤中过度表达(例如,前列腺特异性抗原,PSA或甲胎蛋白,AFP)的基因。在III型CRAd

中,例如XVir-N-31(Ad-Delo3-RGD)的特征是E1A13S蛋白中反式激活结构域CR3的缺失。XVir-N-31是正常细胞中的复制缺陷型腺病毒。XVir-N-31通过细胞核中存在的细胞多功能蛋白YB-1来恢复其复制能力。因此,CRAd仅能在肿瘤细胞中复制并最终使其裂解。p53突变、ras或RB突变均不能有效弥补XVir-N-31的复制缺陷。XVir-N-31缺乏E1A13S,因此未表达E1B55k蛋白和E4orf6蛋白。在肿瘤细胞核中存在YB-1可以弥补这种缺陷,这可以独立于E1A13S而触发E1B55k和E4orf6的表达。一旦由细胞核中存在的YB-1诱导,E1B55k和E4orf6会进一步将细胞YB-1转移到细胞核中,从而促进病毒复制。

[0401] 细胞周期依次经历间隙1期(G1)、合成期(S)、间隙2期(G2)和有丝分裂(M)期。该进程通过复杂的信号网络进行调节。当与特定的细胞周期蛋白复合时,CDK(细胞周期蛋白依赖性激酶)蛋白CDK1、CDK2、CDK4和CDK6是细胞周期进程的主要调节剂。CDK的组成型表达和各种细胞周期蛋白的时序控制,可以通过不同的细胞周期蛋白-CDK复合物调节特定的细胞周期阶段。CDK活性受到几种抑制蛋白的负调控。CDK生物学和功能的各个方面以前已经进行了全面的评论。

[0402] 具有结构和功能同源性的CDK4和CDK6与细胞周期蛋白D蛋白复合时,可调节G1期的静止细胞向S期的转变。细胞周期蛋白D蛋白具有三种亚型,即细胞周期蛋白D1-3,并在有丝分裂刺激下积累。CDK4/6的负调节剂包括CDK4(INK4)蛋白抑制剂p16INK4A、p15INK4B、p18INK4C和p19INK4D,它们可通过减少它们与细胞周期蛋白D1的结合或直接占据其催化结构域来抑制CDK4/6的活性。

[0403] CDK4/6的激酶活性导致成视网膜细胞瘤(Rb)蛋白家族成员(包括Rb、p107和p130)的磷酸化,导致其功能失活。在静止的细胞中,活性低磷酸化的Rb与E2F转录因子家族的成员结合并抑制E2F功能(Rubin等,2005),所述成员与DP-1/2以及其他共抑制因子一起形成复合物。磷酸化后,Rb从该复合物中解离,并允许E2F靶基因,包括细胞周期蛋白A、细胞周期蛋白E和DHFR等的转录,其是细胞周期过渡到S期所必需的。因此,CDK4/6活性的抑制导致Rb脱磷酸化和E2F活性的抑制,从而促进G0/G1阻滞。这推动了CDK4/6抑制剂作为癌细胞靶向治疗的发展。

[0404] CDK4/6-Rb信号途径的破坏和细胞周期的不受控制的G1-S过渡是癌细胞的共同特征。发生这种情况的原因可能是各种分子变化,包括功能突变的缺失或RB1基因(编码Rb)、CDKN2A(编码p16INK4A和p14ARF)或CDKN2B(编码p15INK4B)的缺失。这种失调也可能是由于CCND1(编码细胞周期蛋白D1)、E2F1-3、CDK4、CDK6或各种促有丝分裂信号途径(例如PI3K或MAPK途径)成分中的扩增或激活突变引起的。

[0405] 已经开发了几种ATP竞争性小分子CDK抑制剂。但是,第一代抑制剂如flavopiridol是非选择性的,可以抑制多种CDK,这可能会导致有限的功效和高毒性。下一代CDK4/6抑制剂显示出高选择性,包括帕博西尼(palbociclib)(来自Pfizer的PD-0332991)、阿贝西利(来自Eli Lilly的LY-2835219)和瑞博西尼(ribociclib)(来自Novartis的LEE011)和Trilaciclib(G1T28)。这些CDK4/6抑制剂已在多种癌症实体的体外和体内模型中进行过临床前测试,包括白血病、乳腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、肝细胞癌、肺腺癌、肉瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和转移性乳腺癌(mBC)。在大多数研究中,它们已经表现出一致的分子和功能表型,具有Rb磷酸化、蛋白质表达和E2F靶基因的转录的剂量依赖性降低,这与G0/G1阻滞和细胞增殖抑制相关。此外,所有这些报告表明Rb表达是对

这些抑制剂敏感的先决条件。

[0406] CDK4/6抑制剂(例如PD-0332991)导致总Rb蛋白的剂量依赖性降低,这与磷酸化Rb的降低有关。总Rb的降低与RB1转录水平的降低以及E2F靶基因CCNA2和CCNE2转录的降低部分相关。同样,E2F表达水平明显下调。

[0407] 在图25中公开了适用于实施本发明的CDK4/6抑制剂。

[0408] 从实施例部分显而易见,任何CDK4/6抑制剂均适合与病毒(优选腺病毒,更优选溶瘤性腺病毒)联合使用,从而CDK4/6抑制剂可引起G1细胞阻滞并抑制E2F1,更具体地抑制E2F1活性。

[0409] 本领域技术人员将认识到,任何CDK4/6抑制剂以治疗有效浓度使用。

[0410] PARP1是一种对修复单链断裂(DNA中的“缺口”)重要的蛋白质。在哺乳动物中,已发现17个PARP家族成员,其中只有6个合成聚ADP-核糖(pADPr)。PARP1、PARP2和PARP3在DNA修复中起作用。PARP1结合遭受单链断裂(SSB)和双链断裂(DSB)的DNA。然后,PARP1经历构象变化,该构象变化使活性位点中的关键氨基酸残基对齐,从而增加了其活性。一旦PARP1被激活,它就会合成pADPr,pADPr与蛋白质结合并改变它们的功能。pADPr糖原水解酶迅速降解pADPr,以确保存在的pADPr的水平反映DNA损伤,并确保在DNA修复后终止对pADPr的反应。

[0411] 通过抑制DNA修复途径,PARP1抑制剂导致DNA内单链断裂的增加。这种DNA损伤未被修复,并且在复制后被带入子细胞,因为BER不再发生。这导致具有BRCA1和BRCA2突变的肿瘤中DSB的增加(Scott等人,2015,J Clin Oncol.,33(12):1397-140)。包括PARP候选药物鲁卡帕尼(rucaparib)、维利帕尼(veliparib)和奥拉帕尼(olaparib)的PARP抑制剂的化学结构如图26所示,并在Antolin和Mestres 2014,Oncotarget,30;5(10):3023-8中进行了描述,包括表征所有PARP抑制剂结构的苯甲酰胺部分。

[0412] 此外,已经确定YB-1增强PARP活性并降低PARP1抑制剂的功效(Alemasova等人,2018,Oncotarget,34,23349-65),这表明YB-1依赖性溶瘤性腺病毒与CDK4/6抑制剂和PARP抑制剂联合使用可协同作用杀死癌细胞。奥拉帕尼(olaparib)和BMN673(Pfizer开发的Talazolarib,USA,Clin Cancer Res.2013,15;19(18):5003-15)是PARP抑制剂的实例。

[0413] 本领域技术人员将理解,任何PARP抑制剂以治疗有效浓度使用。

[0414] 在图25中公开了适用于实施本发明的CDK4/6抑制剂。

[0415] 表观遗传学景观(epigenetic landscape)中的异常是癌症的标志,赖氨酸残基的乙酰化是与细胞信号转导和疾病生物学广泛相关的翻译后修饰。“写入”(组蛋白乙酰转移酶,HAT)和“擦除”(组蛋白脱乙酰基酶,HDAC)乙酰化位点的酶是当前药物开发中广泛研究的领域。通过乙酰化赖氨酸残基向大分子复合物的蛋白质募集由布罗莫结构域(BRD)介导,该结构域是进化上高度保守的蛋白质相互作用模块,可识别ε-N-赖氨酸乙酰化基序。保守的BRD折叠包含一个深的、主要是疏水性的乙酰赖氨酸结合位点,其代表了一个开发小的药理活性分子的吸引人的口袋。含有BRD的蛋白质与多种疾病的发展有关。

[0416] 最近,靶向BET(布罗莫结构域和超末端(extra-terminal))家族BRD的两种高效的选择性抑制剂提供了令人信服的数据,支持将这些BRD靶向癌症。由BRD2、BRD3、BRD4和BRDT组成的布罗莫结构域蛋白的BET(布罗莫结构域和超末端结构域)亚家族,在RNA聚合酶II(POLII)的调控转录中发挥多种作用,是令人兴奋的新型表观遗传药物靶标。这些蛋白质通

过与乙酰化赖氨酸残基处的活化染色质结合而促进转录的起始和延伸阶段。这些所谓的表观遗传“阅读器”对活化染色质的识别促进了RNA聚合酶II复合物向活性转录位点的募集。BRD4/P-TEFb相互作用对于有丝分裂后的快速转录重新启动很重要(Muller等人,2011,Expert Rev.Mol.Medicine,13,e19)。使用源自果蝇细胞的体外转录系统,将P-TEFb鉴定并纯化为生成长失控转录物(run-off transcript)所需的因子。它是果蝇中的一种细胞周期蛋白依赖性激酶,含有催化亚基Cdk9和调节性亚基细胞周期蛋白T。在人类中,有多种形式的P-TEFb,其包含Cdk9和几种细胞周期蛋白亚基(细胞周期蛋白T1、T2和K)之一。P-TEFb与包括布罗莫结构域蛋白BRD4在内的其他因子缔合,并发现与称作超延伸复合物的大型蛋白质复合物缔合(Yang Z等人,2005.Mol Cell;19:535-45;Fu等人,1999,J Biol Chem.,274:34527-30)。

[0417] JQ1((噻吩并-三唑并-1,4-二氮杂䓬)thieno-triazolo-1-4-diazepine)是布罗莫结构域蛋白BET家族的有效抑制剂,该BET家族包括BRD2、BRD3、BRD4(Filippakopoulos等人,2010Nature 468,1067-1073)。JQ1阻止了布罗莫结构域和乙酰基之间的相互作用,从而导致某些基因的下调。已经描述了其他BET布罗莫结构域抑制剂,包括OTOX15、BAY1238097、GSK2820151、I-BET762和PLX51107(Perez-Salvia和Esteller 2017,EPIGENETICS,12,323-339;Brandt等人,2015ACS Chem.Biol.,10,22-39)。JQ-1在结构上与苯并二氮杂䓬类有关。分子式为C23H25ClN4O2S。

[0418] 最近,已经表明BET抑制剂JQ1促进腺病毒感染和腺病毒载体介导的基因递送。用JQ1处理细胞会诱导BRD4与CDK9(转录延伸的P-TEFb的一个亚基)的结合增加。但是,正如本文所述,需要进一步研究以阐明BED4用于调节腺病毒感染和转基因表达的机制(Baojie Lv等人,2018,Scientific report,8,11554)。重要的是,还未研究病毒复制和病毒转录。然而,已知的是,CDK9通过增加转录聚合酶的数量并因此增加单位时间内的mRNA合成量来刺激暂停的聚合酶释放并激活转录(Gressel等人,2017,eLife,6,e29736)。此外,已经表明CDK4/6抑制剂可以克服BET抑制剂抗性(Jin等人,2018,Mol Cell;71(4):592-605)。最近证明了从细胞周期的晚期有丝分裂到早期的G1阶段,P-TEFb-Brd4相互作用显著增加以及P-TEFb向染色体的主动募集,随后启动关键基因转录以促进G1进程。重要的是,Brd4的耗尽通过减少必需的G1基因的转录而取消了整个过程,从而导致G1细胞周期阻滞和凋亡(Yang等人,2008,Mol Cell Biol.,28:967-976,Kohoutek,2009,Cell Division,4.19)。

[0419] 但是,关于将YB-1依赖性溶瘤腺病毒与CDK 4/6抑制剂和BET抑制剂联用尚一无所知。

[0420] 应当理解并且在本发明内,其他布罗莫结构域抑制剂将同样适用于使用病毒(优选腺病毒,更优选溶瘤性腺病毒例如XVir-N-31)和CDK4/6抑制剂的三联疗法中。

[0421] 本领域技术人员将认识到,任何布罗莫结构域(Bet)抑制剂以治疗有效浓度使用。

[0422] 在图27中公开了适用于实施本发明的布罗莫结构域抑制剂。

[0423] 可以特别地通过病毒以及因此在此描述的本发明的组合治疗的肿瘤优选地是选自包含以下各项的组的那些肿瘤:神经系统肿瘤、眼肿瘤、皮肤肿瘤、软组织肿瘤、胃肠道肿瘤,呼吸系统肿瘤、骨骼肿瘤、内分泌系统肿瘤、女性生殖系统肿瘤、乳腺肿瘤、男性生殖系统肿瘤、泌尿外流系统肿瘤、包括混合和胚胎瘤的造血系统肿瘤、以及白血病。在本发明的范围内,这些肿瘤特别是如本文特别定义的抗性肿瘤。

[0424] 神经系统肿瘤组优选包括：

[0425] 1.颅骨和大脑(颅内)肿瘤，优选星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、神经节神经瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤、血管母细胞瘤、脂肪瘤、颅咽管瘤、畸胎瘤和脊索瘤；

[0426] 2.脊髓和椎管肿瘤，优选胶质母细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、血管肉瘤、纤维肉瘤和多发性骨髓瘤；和

[0427] 3.周围神经肿瘤，优选神经鞘瘤、神经纤维瘤、神经纤维肉瘤和神经周围纤维母细胞瘤。

[0428] 眼肿瘤组优选包括：

[0429] 1.眼睑和睑腺肿瘤，优选腺瘤、腺癌、乳头状瘤、组织细胞瘤、肥大细胞瘤、基底细胞瘤、黑色素瘤、鳞状细胞癌、纤维瘤和纤维肉瘤；

[0430] 2.结膜和瞬膜肿瘤，优选鳞状细胞癌、血管瘤、血管肉瘤、腺瘤、腺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤和乳头状瘤；和

[0431] 3.眼眶、视神经和眼球肿瘤，优选成视网膜细胞瘤、骨肉瘤、肥大细胞瘤、脑膜瘤、网状细胞瘤、神经胶质瘤、神经鞘瘤、软骨瘤、腺癌、鳞状细胞癌、浆细胞瘤、淋巴瘤、横纹肌肉瘤和黑色素瘤。

[0432] 皮肤肿瘤组优选包括：

[0433] 组织细胞瘤、脂肪瘤、纤维肉瘤、纤维瘤、肥大细胞瘤、恶性黑色素瘤、乳头状瘤、基底细胞瘤、角化棘皮瘤、血管外皮细胞瘤、毛囊肿瘤、汗腺肿瘤、皮脂腺肿瘤、血管瘤、血管肉瘤、脂肪瘤、脂肪肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、浆细胞瘤和淋巴管瘤。

[0434] 软组织肿瘤组优选包括：

[0435] 肺泡软组织肉瘤、上皮样细胞肉瘤、软组织软骨肉瘤、软组织骨肉瘤、软组织的尤因氏肉瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、纤维肉瘤、纤维瘤、平滑肌肉瘤、平滑肌瘤、脂肪肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、恶性血管外皮细胞瘤、恶性血管瘤、血管瘤、血管肉瘤、恶性间质瘤、恶性周围神经鞘瘤(MPNST)、恶性神经鞘瘤、恶性黑素细胞性神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤、淋巴管瘤和淋巴管肉瘤。

[0436] 胃肠道肿瘤组优选包括：

[0437] 1.口腔和舌头的肿瘤，优选鳞状细胞癌、纤维肉瘤、梅克尔细胞瘤、诱导型纤维成釉细胞瘤、纤维瘤、纤维肉瘤、病毒性乳头状瘤病、特发性乳头状瘤病、鼻咽息肉、平滑肌肉瘤、成肌细胞瘤和肥大细胞瘤；

[0438] 2.唾液腺肿瘤，优选腺癌；

[0439] 3.食道肿瘤，优选鳞状细胞癌、平滑肌肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、巴雷特癌和食道旁肿瘤；

[0440] 4.外分泌胰腺肿瘤，优选腺癌；和

[0441] 5.胃肿瘤，优选腺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤和纤维肉瘤。

[0442] 呼吸系统肿瘤组优选包括：

[0443] 1.鼻和鼻腔，喉和气管的肿瘤、优选鳞状细胞癌、纤维肉瘤、纤维瘤、淋巴肉瘤、淋巴瘤、血管瘤、血管肉瘤、黑色素瘤、肥大细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、嗜酸粒细胞腺瘤(横纹肌瘤)、腺癌和成肌细胞瘤；和

[0444] 2.肺部肿瘤,优选鳞状细胞癌、纤维肉瘤、纤维瘤、淋巴肉瘤、淋巴瘤、血管瘤、血管肉瘤、黑色素瘤、肥大细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、嗜酸粒细胞腺瘤(横纹肌瘤)、腺癌、成肌细胞瘤、小细胞癌、非小细胞癌、支气管腺癌、支气管肺泡腺癌和肺泡腺癌。

[0445] 骨骼肿瘤组优选包括:

[0446] 骨肉瘤、软骨肉瘤、骨旁骨肉瘤、血管肉瘤、滑膜细胞肉瘤、血管瘤肉瘤、纤维肉瘤、恶性间叶瘤、巨细胞瘤、骨瘤和多叶骨瘤。

[0447] 内分泌系统肿瘤组优选包括:

[0448] 1.甲状腺/甲状旁腺肿瘤,优选腺瘤和腺癌;

[0449] 2.肾上腺肿瘤,优选腺瘤、腺癌和嗜铬细胞瘤(肾上腺髓质瘤);

[0450] 3.下丘脑/垂体肿瘤,优选腺瘤和腺癌;

[0451] 4.内分泌胰腺肿瘤,优选胰岛素瘤(β细胞瘤,APUDom)和Zollinger-Ellison综合征(胰腺δ细胞的胃泌素分泌性肿瘤);和

[0452] 5.多发性内分泌肿瘤(MEN)和化学感受器瘤。

[0453] 女性性系统肿瘤的肿瘤组优选包括:

[0454] 1.卵巢肿瘤,优选腺瘤、腺癌、囊腺瘤和未分化癌;

[0455] 2.子宫肿瘤,优选平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、腺瘤、腺癌、纤维瘤、纤维肉瘤和脂肪瘤;

[0456] 3.子宫颈肿瘤,优选腺癌、腺瘤、平滑肌肉瘤和平滑肌瘤;

[0457] 4.阴道和外阴肿瘤,优选平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、纤维平滑肌瘤、纤维瘤、纤维肉瘤、息肉和鳞状细胞癌。

[0458] 乳腺肿瘤组优选包括:

[0459] 纤维腺瘤、腺瘤、腺癌、间质瘤、癌、癌肉瘤。

[0460] 男性性系统的肿瘤组优选包括:

[0461] 1.睾丸肿瘤,优选精原细胞瘤、间质细胞瘤和睾丸支持细胞瘤;

[0462] 2.前列腺肿瘤,优选腺癌、未分化癌、鳞状细胞癌、平滑肌肉瘤和移行细胞癌;和

[0463] 3.阴茎和外生殖器肿瘤,优选肥大细胞瘤和鳞状细胞癌。

[0464] 泌尿外流系统的肿瘤组优选包括:

[0465] 1.肾脏肿瘤,优选腺癌、移行细胞癌(上皮细胞肿瘤)、纤维肉瘤、软骨肉瘤(间质瘤)、威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor)、肾母细胞瘤和胚胎性肾瘤(胚胎多能母细胞瘤);

[0466] 2.输尿管肿瘤,优选平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、纤维乳头瘤、移行细胞癌;

[0467] 3.膀胱肿瘤,优选为移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、botryoid(胚胎性横纹肌肉瘤)、纤维瘤、纤维肉瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉肉瘤、乳头状瘤和血管肉瘤;和

[0468] 4.尿道肿瘤,优选移行细胞癌、鳞状细胞癌和平滑肌肉瘤。

[0469] 造血系统的肿瘤组优选包括:

[0470] 1.淋巴瘤,淋巴白血病、非淋巴白血病、骨髓增生性白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤。

[0471] 混合和胚胎瘤组优选包括:

[0472] 血管肉瘤、胸腺瘤和间皮瘤。

[0473] 优选地,这些肿瘤选自乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、骨肉瘤、成胶质细胞瘤、黑色素瘤、小细胞肺癌和结肠直肠癌。另外的肿瘤是如本文所述的那些抗性肿瘤,优选是那些多重

抗性肿瘤,特别是上述组的那些肿瘤。

[0474] 在本发明内,分别鉴定和筛选了要施用本发明的组合的受试者。可以在本发明的各个方面中受益于本发明的患者的这种鉴定是基于对受试者样品的细胞核中YB-1的检测。

[0475] 在一个实施方案中,通过使用选自包含以下各项的组的试剂进行肿瘤组织的检查:抗YB-1的抗体,针对YB-1的适体和针对YB-1的spiegelmer以及针对YB-1的anticaline。基本上,可以为相应的标志物产生相同的手段并相应地使用。抗体、特别是单克隆抗体的制备是本领域技术人员已知的。用于特异性检测YB-1或所述标志物的另一手段是与靶结构(在当前情况下为YB-1或所述标志物)高亲和力结合的肽。在现有技术中,已知例如噬菌体展示的方法以产生此类肽。通常,以肽文库为起点,其中各个肽的长度为8至20个氨基酸,并且文库的大小为约102至1018,优选108至1015个不同的肽。靶分子结合多肽的一种特殊形式是所谓的anticalines,其例如在德国专利申请DE 197 42 706中描述。

[0476] 用于特异性结合YB-1或本文公开的相应标记物并因此用于检测YB-1在细胞核中的细胞周期独立定位的另一种手段是所谓的适体,即D-核酸,其以RNA或DNA、单链或双链形式存在,并且可以与目标分子特异性结合。适体的产生例如在欧洲专利EP 0 533 838中描述。适体的一种特殊形式是所谓的适酶(aptazyme),其例如由Piganeau,N.等人(2000),Angew.Chem.Int.Ed.,39,no.29,第4369-4373页描述。这些是适体的特殊实施方案,因为它们除了适体部分外还包含核酶部分,并在结合或释放与适体部分结合的靶分子时具有催化活性并裂解核酸底物,这伴随着信号的产生。

[0477] 适体的另一种形式是所谓的spiegelmers,即由L-核酸制成的靶分子结合核酸。例如,在WO 98/08856中描述了用于制备这种spiegelmers的方法。

[0478] 肿瘤组织的样品可以通过穿刺或手术获得。经常通过使用显微镜技术和/或免疫组织分析,优选地使用抗体或任何其他前述手段,来评估YB-1是否与细胞周期无关地位于细胞核中。用于检测细胞核中的YB-1,特别是用于检测YB-1与细胞周期无关地位于细胞核中的其他手段是本领域技术人员已知的。例如,在筛选染色组织切片时,可以很容易地检测到YB-1在其中的定位。YB-1在细胞核中的出现频率已经表明该定位独立于细胞周期。细胞核中YB-1的细胞周期独立检测的另一选择在于对YB-1染色,并检测YB-1是否位于细胞核中以及确定细胞的阶段。也可以通过使用针对YB-1的上述手段来执行YB-1的检测。手段的检测通过本领域技术人员已知的方法完成。通过所述试剂与YB-1特异性结合而不与待分析的样品(特别是细胞)中的任何其他结构结合,可以检测它们的定位,并且由于它们与YB-1的特异性结合,通过适当的手段标记还可以检测和确定YB-1的定位。标记所述手段的方法是本领域技术人员已知的。

[0479] 在下文中,将参考附图和实施例进一步阐述本发明,从这些附图和实施例中可以得到新的特征、实施方案和优点。

[0480] 图1a是柱状图,显示了与CDK4/6抑制剂LY(LY-2835219)、PD(PD-032991)或LEE(LEE011)组合使用时,XVir-N-31(XVir)、野生型腺病毒(WT)和对照(Ctrl)的作为细胞活力指标的相对吸光度。

[0481] 图1b是柱状图,显示了与CDK4/6抑制剂LY(LY-2835219)、PD(PD-032991)或LEE(LEE011)组合使用时,XVir-N-31(XVir)和野生型腺病毒(WT)的病毒滴度。

[0482] 图1c是柱状图,显示了与CDK4/6抑制剂LY(LY-2835219)、PD(PD-032991)或LEE

(LEE011)组合使用时,XVir-N-31(XVir)和野生型腺病毒(WT)的相关尾丝DNA。

[0483] 图2描绘了蛋白质印迹分析的结果。

[0484] 图3a-d是柱状图。

[0485] 图4a-d是柱状图。

[0486] 图5是柱状图。

[0487] 图6是一系列显微照片。

[0488] 图7是用和不用帕博西尼(palbociclib)处理的、用表达GFP的E1缺失的腺病毒感染的T24细胞的荧光显微图像。

[0489] 图8是柱状图,显示了使用化合物Nutlin 3a、Lee、Cl1040和Roscovertine 48小时后腺病毒dl703的病毒DNA复制。

[0490] 图9A-C显示了用指定浓度的Nutlin-3a和LEE011(瑞博西尼)(图9A),roscovitine(图9B)和CI-1040(图9C)处理的UMUC细胞的蛋白质印迹分析结果;Rb表示成视网膜细胞瘤蛋白;phRB是指磷酸化的成视网膜细胞瘤蛋白;E2F-1是指转录因子E2F-1;GAPDH作为上样对照。

[0491] 图10是柱状图,显示在处理后48小时测量的UMUC3细胞中细胞周期分布,其中CDK4/6抑制剂的浓度如下:Roscovetine:10μM,CI-1040:1μM,Nutlin-3a:10μM和LEE011:10μM。

[0492] 图11是显示用和不用帕博西尼处理的腺病毒六邻体基因表达的显微图像图。

[0493] 图12是柱状图,显示了暴露于单独的XVir-N-31、含有15nM PARP抑制剂PARPi、500nM PD(帕博西尼)或15nM PARPi和500nM PD的组合的T24细胞的效能测定结果,以细胞存活百分比表示,其中细胞未感染(左栏),或以10MOI(中间栏)或50MOI(右栏)感染。

[0494] 图13是一组图片,其显示了用XVir-N-31(20MOI),XVir-N-31和15nM PARPi,XVir-N-31和500nM PD,XVir-N-31、15nM PARPi和500nM PD处理1dpi,2dpi,3dpi,4dpi,5dpi和6dpi后SRB染色的T24细胞培养物。

[0495] 图14是一组图片,其显示了用XVir-N-31(10MOI),XVir-N-31和160nM PARPi,XVir-N-31和400nM PD,XVir-N-31、160nM PARPi和400nM PD处理1dpi,2dpi,3dpi,4dpi,5dpi和6dpi后SRB染色的UMUC细胞培养物。

[0496] 图15是柱状图,显示了用XVir-N-31、CDK 4/6抑制剂帕博西尼和布罗莫结构域抑制剂JQ-1感染后5天的T24细胞的效能测定结果。Y轴:以%表示的细胞存活率。

[0497] 图16是柱状图,显示了在暴露于单独的XVir-N-31、含有200nM阿贝西利、500nM JQ1或200nM阿贝西利和500nM JQ1的组合后,SK-N-MC细胞的效能测定结果,以细胞存活百分比表示,其中细胞未感染,或以5、10或20MOI感染。

[0498] 图17显示了用指定浓度的CDK 4/6抑制剂LY-2835219(阿贝西利)和Wee抑制剂MK-1775(Adavosertib)处理24和48小时后的SK-N-MC细胞的蛋白质印迹分析结果;Rb是指成视网膜细胞瘤蛋白;phRB是指磷酸化的成视网膜细胞瘤蛋白;E2F-1是指转录因子E2F-1;GAPDH作为上样对照。

[0499] 图18显示了用XVir-N-31、CDK 4/6抑制剂阿贝西利和Adavosertib(Wee抑制剂MK-1775)感染后5天对SK-N-MC细胞的效能测定结果,以存活细胞的百分比表示。

[0500] 图19显示了用指定的抑制剂处理SK-N-MC细胞后的细胞周期分布。

[0501] 图20是显示针对E2F1的siRNA对各种细胞系中E2F1表达的影响的柱状图。Y轴:对肌动蛋白归一化的E2F1表达,以siCTRL转染细胞的%表示。

[0502] 图21是显示在用siRNA-E2F-1处理的T24细胞中,E2F1抑制导致E2早期表达增加的柱状图。Y轴:针对肌动蛋白归一化的腺病毒基因表达(以siCTRL的%表示)。

[0503] 图22是显示用于确定腺病毒E2-早期表达的引物的位置的示意图。

[0504] 图23是野生型E2早期启动子腺病毒(上)和在E2F结合位点具有突变的突变型E2早期启动子(下)的核苷酸序列表示。

[0505] 图24是柱状图,显示了在感染后24小时通过RT-qPCR获得的AdWT-RGD和AdE2Fm(在尾丝中还包含RGD基序)感染的T24细胞中的RNA表达;将AD-WT基因表达设置为100%。

[0506] 图25显示了适用于本发明的各种CDK4/6抑制剂。

[0507] 图26显示了适用于本发明的各种PARP抑制剂。

[0508] 图27显示了适用于本发明的各种Bet抑制剂。

[0509] 图28显示了WT-Ad5和腺病毒dl520的结构,该腺病毒dl520是通过缺失E1A基因的CR3结构域而仅表达E1A12蛋白的溶瘤腺病毒。

[0510] 图29显示了XVir-N-31的结构,其特征在于缺失E1B19K蛋白,缺失E3区中的2kb,缺失E1A13S蛋白,并向尾丝蛋白引入RGD基序。

[0511] 图30显示了Ad-Δ24和Ad-Δ24-RGD的结构,它们也由Kleijn等人描述(Kleijn等人,PLoS One.2014;9(5):e97495),其特征在于缺失了E1A基因的CR2结构域;它仅在具有失调成视网膜细胞瘤途径(Rb)的肿瘤细胞中复制。如XVir-N-31所示,Ad-Δ24-RGD在尾丝球中还包含一个RGD基序(motive)。请注意,溶瘤腺病毒dl922-947与Δ24类似,因为该病毒的缺失也位于E1A-CR2结构域中,并影响RB结合(成视网膜细胞瘤蛋白)。

[0512] 图31显示了VCN-01的结构,其是一种具有复制能力的腺病毒,被特别工程化以在RB途径缺陷的肿瘤中复制,通过修饰的尾丝表现出增强的感染性,并通过表达可溶性透明质酸酶表现出改善的分布(Pascual-Pasto等人,Sci Transl Med.2019,11 476)。VCN-01中E1A中的缺失类似于Δ24中的缺失(E1A中CR2结构域的缺失)。此外,通过在E1A启动子中引入E2F结合位点来调节该E1A蛋白的表达。此外,它在尾丝球中含有RGD基序并表达可溶性透明质酸酶(Martínez-Vélez等人,2016,Clin Cancer Res.1;22(9):2217-25.The Oncolytic Adenovirus VCN-01as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma)。

[0513] 图32显示了E1Adl1107和E1Adl1101的结构,其中这两种溶瘤腺病毒的缺失影响了与p300(组蛋白乙酰转移酶p300,也称为p300 HAT或E1A相关蛋白p300)或pRb(成视网膜细胞瘤蛋白)的结合(Howe等人,MOLECULAR THERAPY 2000,2,485-495)

[0514] 图33显示了溶瘤腺病毒CB016(和野生型腺病毒5(WT-Ad5)之一)的结构,其中E1A-CR2结构域中的缺失与Ad-Δ24中的相似。此外,CB016在CR1结构域中含有缺失。此外,其在尾丝中或在来自血清型3的尾丝中包含RGD基序(LaRocca等人,Oral Oncol.2016,56,25-31)。

[0515] 图34显示了腺病毒ORCA-010的结构,其含有E1A CR2结构域中的E1AΔ24缺失,E3/19K蛋白中的效能增强的T1突变,以及传染性增强的尾丝RGD修饰(Dong等人,Hum Gene Ther.20140ct 1;25(10):897-904)。

[0516] 实施例1:材料和方法

[0517] 细胞培养

[0518] 将人膀胱癌细胞系在亚汇合(subconfluent)条件下分别在补充有10％FBS(Biochrom AG)和1％NEA(Biochrom AG)的RPMI或DMEM培养基(Biochrom AG)中在5％或10％CO2下培养。根据细胞系和实验条件,分别以10cm,6孔,12孔和96孔形式接种0.2-1x10^6、0.5-1x10^5、0.25-0.5x10^5和500-700个细胞。

[0519] 细胞系

[0520] HeLaP

[0521] HeLa P细胞(ATCC CCL-2)是来自宫颈腺癌的上皮细胞,以患者Henrietta Lacks的名字命名。该细胞系是分布最广、最古老的细胞系(Rahbari等人,2009),因为它是1951年建立的第一个永久细胞系(Gey等人,1952)。在37℃于10％CO2条件下在DMEM(10％FBS,1％PS)中进行培养。

[0522] HeLaRDB

[0523] HeLaRDB是HeLaP细胞系的一个亚细胞系,基于糖蛋白P的过度表达,对柔红霉素具有抗性。该抗性是通过用含有该蒽环类抗生素的培养基培养而获得的。这种细胞抑制剂插入双链DNA序列中,并抑制细胞的转录和复制(Mizuno等人,1975)。由于由柔红霉素处理引起的应激反应的结果,与亲本细胞系相比,细胞因子YB-1显示出更高的细胞核定位(Holm等人,2004)。为了维持对柔红霉素的抗性,每14天将细胞在含有0.25μg/ml柔红霉素的DMEM(10％FBS,1％PS)中在10％CO2条件下于37℃培养。

[0524] A549

[0525] A549细胞(ATCC CCL-185)在1972年从人肺泡基底的腺癌中分离出来(Giard等人,1973)。在37℃和10％CO2下于Dulbecco MEM(10％FBS和1％PS)中进行培养。

[0526] T24

[0527] T24细胞(ATCC HTB-4)源自1970年的原发性人膀胱癌(Bubenik,Baresovà等人,1973)。由于HRAS基因中的点突变(Reddy等人,1982),MAPK和PI3K途径被激活。此外,该细胞系中还存在肿瘤抑制基因p53的基因座中的另一个突变(Pinto-Leite等人,2014)。将细胞用含有10％FCS,1％PS和1％非必需氨基酸的RPMI于37℃在5％CO2条件下培养。

[0528] HEK293

[0529] HEK293细胞(ATCC CRL-1573)是1973年分离的人类胚胎肾细胞。由于腺病毒血清型5(其中包括整个E1区域(Graham和Smiley,1977年))基因组的4.5kb大小部分的稳定转染,该细胞系用于产生E1缺陷型腺病毒和测量病毒滴度。

[0530] 表1:引物

[0531]

名称	正向引物	反向引物
公司		
尾丝		
Eurofins	AAGCTAGCCCTGCAAACATCA	CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA
E2 早期		
Invitrogen		

CCGTCATCTCTACAGCCCAT GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC

E2 晚期

Invitrogen CTTCCTAGCGACTTTGTGCC GTCAGAGTGGTAGGCAAGGT

E1A 12S

Metabion CGACGAGGATGAAGTCCTGTGTCTG CTCAGGATAGCAGGCGCCAT

E1A 12S 短的

Metabion GAGGATGAAGTCCTGTGT CTCAGGATAGCAGGCGCCAT

E1A 13S

Metabion TGTTTGTCTACAGTCCTGTGTCTG CTCAGGATAGCAGGCGCCAT

E1A 13S 短的

Metabion TTGTCTACAGTCCTGTGT CTCAGGATAGCAGGCGCCAT

E4orf6 Metabion TCCCTCCCAACA CACAGAGT GACAGGAAACCGTGTGGAAT

Rb

Life Techno. AGCAACCCTCCTAAACCACT TGTTTGAGGTATCCATGCTATCA

[0532] E2F1

Life Technology ACGCTATGAGACCTCACTGAA TCCTGGGTCAACCCCTCAAG

E2F2

Life Technology CGTCCCTGAGTTCCCAACC GCGAAGTGTCATACCGAGTCTT

GAPDH

MWG TGGCATGGACTGTGGTCATGAG ACTGGCGTCTTCACCACCATGG

肌动蛋白

Eurofins TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGA

AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG

L4 33K

EurofinsGAACCAGGGCCGCCCATACTG GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC

L4 22 K

Eurofins CCGTTAGCCCAAGAGCAAC CGGCCGTGATGGTAGAGAAG

L4HexAss

Eurofins CTGTGGTACTTCCCAGAGAC CAGGTGAGTTATACCCTGCC

[0533] 病毒特征

[0534] Ad-WT+AdWT-RGD野生型哺乳动物腺病毒,C型,血清型5和带有额外的RGD-尾丝基序的ADWT

[0535] AdWT-E2Fmut.哺乳动物腺病毒,C型,血清型5,在E2-早期启动子的两个E2F结合位

点突变,带有额外的RGD-尾丝基序,在E3区域(ΔE3)有2,7kb大小的缺失

[0536] XVir-N-31哺乳动物腺病毒,C型,血清型5,在E1B区域(1.716-1915,200bp),E3区域(28.132-30.813)具有缺失,在E1A区缺失12个碱基。在癌细胞中复制品仅显示细胞核YB-1表达。

[0537] XVir-N-31/E2FM哺乳动物腺病毒,C型,血清型5,在E1B区域(1.716-1915,200bp),E3区域(28.132-30.813)具有缺失,在E1A区缺失12个碱基。在癌细胞中复制品仅显示细胞核YB-1表达。E2早期启动子的两个E2F结合位点存在突变,带有额外的RGD尾丝基序,并且在E3区域有2,7kb大小的缺失(ΔE3)

[0538]

靶基因	siRNA 构建体	生产商
对照	对照（非沉默）siRNA, 20 μM	Qiagen，荷兰
E2F-1	E2F-1(SASI_Hs01_00162220),10 μM	Sigma，Merck，德国
YB-1	YBX1 siRNA FlexiTube, 10μM	Qiagen，荷兰

[0539] 方法

[0540] siRNA转染

[0541] 使用siRNA转染进行某些基因的下调。由此,在一个试管中将5μl的Lipofectamin RNAiMAX(Thermo Fischer)试剂添加到150μl的Opti-MEM中,在另一支试管中将36pmol的siRNA与150μl的Opti-MEM合并。合并两个试管的内容物并短暂涡旋后,将溶液在室温下温育5分钟。然后将250μl siRNA-脂质复合物添加到250,000-1,000,000个细胞中,这些细胞在前一天接种到6孔板中,无需更换培养基,siRNA的终浓度达到30pmol/孔。在37℃在10％CO2条件下温育48小时后,发生了感染或裂解。

[0542] 组合siRNA的RNA定量

[0543] 还定量了细胞中的RNA,其中病毒与siRNA转染组合。因此,第二天接种125,000个细胞,并用30pmol Ctrl-,YB-1-和E2F1-siRNA的siRNA构建体转染。温育48小时后,发生感染,并在感染后24小时发生裂解。将裂解物储存在-20℃。

[0544] RNA分离

[0545] 用PBS冲洗细胞,并用裂解缓冲液(mirVana miRNA分离试剂盒,Life Technologies)裂解,并转移至1.5ml反应管中。将50μl匀浆添加剂(mirVana miRNA分离试剂盒,Life Technologies)添加至裂解液中,重悬并在冰上温育10分钟。加入500μl的酸-苯酚-氯仿,涡旋约30秒,并在冰上温育2分钟。在室温下以14,000g离心5分钟后,分离出水相和有机相。将上层水相转移至新的卡口盖管(snap cap)中,并与等量的异丙醇合并并倒置。在室温下温育10分钟后,将样品在4℃和14,000g下离心30分钟。随后除去上清液,并用1ml 75％乙醇洗涤RNA沉淀。将样品在4℃下以7500g短暂离心5分钟。除去上清液后,将风干的沉淀物溶于20μl无核酸酶的水中,并在55℃和500rpm下在热混合器中温育10分钟。随后,通过分光光度法测量RNA浓度。为了避免DNA辙迹(ruts)的扩增,进行了DNAse消化。因此,使用了脱氧核糖核酸酶I,Life Technologies的Invitrogen扩增级试剂盒。向1μg RNA中加入1μl 10x DNAse I反应缓冲液和1μl DNAse I,并用DEPC处理的水填充至最终体积10μl,并在室温下精确温育15分钟。通过加入1μl 25mM EDTA溶液,使DNase I失活,从而终止DNAse消化过程。将样品在65℃下温育10分钟,然后用于逆转录。

[0546] 逆转录

[0547] 为了将RNA重写为cDNA,使用了高容量cDNA逆转录试剂盒(High capacity cDNA Reverse Transcription Kit)(Thermo Scientific)。将经DNA消化的样品的2μg RNA加入PCR软管中的Mastermix中,其中含有转录缓冲液,100mM dNTP和RNAse抑制剂。因此,必须考虑到,通过E2-早期和E2-晚期启动子转录的RNA不能被通常用于逆转录的随机引物重写,因为这些随机引物会与双链腺病毒基因组的两条链结合。因此,使用特定的E2早期反向引物(表1)对用于E2早期和E2晚期定量的样品进行了从RNA到cDNA的重写。对于用于使结果归一化的管家基因肌动蛋白,使用随机引物。

[0548] DNA复制分析

[0549] 为了研究感染细胞内的病毒复制,进行了DNA复制分析。将125,000个细胞接种在6孔板中,并用10-20MOI感染。分别在感染后2、8、12、24、36和48小时后,发生裂解。由此,除去培养基,并用1ml PBS洗涤贴壁细胞。加入200μl DNA裂解缓冲液后,使用细胞刮刀将贴壁细胞从平板分离。然后将裂解物转移到卡口盖管中。加入3μl的蛋白酶K,并在热混合器上于56℃和550rpm下温育过夜。在第二天,进行DNA分离。

[0550] DNA分离

[0551] 为了纯化DNA,将200μl苯酚-氯仿-异戊醇加入到裂解物中。涡旋并随后在冰上温育5分钟后,通过在4℃下以16430g离心3分钟来实现相分离。将上层水相转移到新的卡口盖管中,该卡口盖管中含有溶于10mM TrisCl中的200μl氯仿和20μl甲酚红,以更好地显示各相。涡旋并在冰上温育5分钟后,在4℃下以16430g离心3分钟。再次将上层水相与800μl乙醇和50μl 3M乙酸钠溶液合并。加入2μl糖原,以实现更好的沉淀。将管短暂倒置后,将溶液在4℃下以16430g离心30分钟。随后,将DNA沉淀用400μl 70%乙醇覆盖,并在室温下温育10分钟。在室温下以4760g离心7分钟后,DNA沉淀在37℃下干燥约5-10分钟。随后,将沉淀溶解在100μl的0.1xTE缓冲液中,并在40℃以400rpm振荡大约3小时。当DNA完全溶解时,通过分光光度计测量DNA浓度,使用2μl DNA溶液进行测量,并用0.1xTE-缓冲液作为空白溶液。然后将DNA在4℃储存。

[0552] qPCR

[0553] 为了进一步定量,使用实时定量PCR。以10ng/μl的终浓度分别使用5μl模板DNA和cDNA。使用在96孔板中以一式两份移取的10μl Mastermix GoTaq qPCR(Promega Corporation)(7.5μl Mastermix,1.5μl引物,1μl H2O)和5μl DNA模板进行qPCR。使用具有两个标准化基因的比较CT方法进行相对定量。通过箔封闭平板,并在室温下以220g离心2分钟。然后在热循环仪中按照一定的温度-时间程序温育平板。表1列出了所用的引物。反应在CFX96实时PCR检测系统(Bio-Rad Laboratories)上进行。

[0554] qPCR循环条件

[0555] 尾丝:94℃持续2分钟,94℃持续15秒,60℃持续15秒和72℃持续15秒,45个循环

[0556] 其他病毒基因:94℃持续1.5分钟,94℃持续15秒,58℃持续15秒和72℃持续15秒,共45个循环

[0557] Rb:94℃持续2分钟,94℃持续15秒,60℃持续30秒和72℃持续1分钟,共44个循环

[0558] E2F:95℃持续2分钟,95℃持续15秒,60℃持续30秒和72℃持续30秒,共40个循环

[0559] 蛋白质分离

[0560] 使用1％SDS缓冲液裂解细胞,以破坏核膜。为了避免蛋白质变性,整个过程在冰上进行。抽吸培养基后,将细胞用冷PBS洗涤两次。用200μl的1％SDS缓冲液裂解一式两份方法(duplicate approach)的一孔的贴壁细胞,并用细胞刮刀刮除。然后将裂解物转移至该一式两份方法的另一孔中,并再次刮除。然后将合并的两个孔的裂解物转移到卡口盖管中。随后将裂解物用注射器处理,以破坏粘性DNA,并在4℃以31000rpm离心30分钟。由于上清液中存在蛋白质,因此将上清液转移到新的卡口盖管中,并用于进一步的步骤。

[0561] 蛋白质定量

[0562] 为了定量蛋白质的量,通过Pierce TM BCA蛋白质试剂盒进行了二辛可宁酸(BCA)分析。由此,将112.5μl的BCA溶液A+B(50:1)和12.5μl的样品加入96孔板的一个孔中,并在37℃下温育30分钟。取决于蛋白质浓度,导致溶液染色。通过具有已知蛋白质浓度的标准系列,通过酶标仪在562nm处通过光度测量确定样品的蛋白质浓度。

[0563] SDS凝胶电泳

[0564] 为了在随后的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离蛋白质,将计算量的裂解物和裂解缓冲液与15μl上样缓冲液-DDT-Mixture(6:1)混合。然后将蛋白质上样物质在100℃下煮5分钟。然后将5μl的有色蛋白质标准品和40μl的样品上样到凝胶上。为了蛋白分离进行病毒蛋白检测,使用了10％的凝胶。为了研究通过siRNA下调的基因,使用了12％的凝胶。分离胶和浓缩胶的组成列在“缓冲液和溶液”部分。凝胶在TGS-缓冲液中在90V运行约20分钟,以将所有蛋白质浓缩在一条带中。随后,凝胶在TGS-Buffer中于150V下运行约60分钟,以按大小分离蛋白质。

[0565] 蛋白质印迹

[0566] 为了将蛋白质从凝胶转移到膜上,使用蛋白质印迹技术将其印迹。为了活化疏水性PVDF膜,将其在甲醇中温育约2分钟。随后,将膜与海绵、滤纸和凝胶一起沉积在印迹缓冲液中。通过在4℃在100V下电泳大约两个小时,将蛋白质在印迹缓冲液中转移到膜上。为避免非特异性抗体结合,将膜在溶于TBST中的10ml 5％乳粉中于室温下封闭旋转一小时,以分别在5ml 5％BSA-TBST中分析细胞蛋白,随后用于检测病毒蛋白的抗体。将膜在TBST中洗涤五次,每次五分钟后,将膜与一级抗体溶液在4℃下旋转温育过夜。对于抗体GAPDH、E1A、E1B55K、E2A和E4orf6,此步骤在室温下进行1小时。抗体因此在含有0.02％叠氮化钠的溶于TBST的5％BSA中稀释不同倍数。再经过五个洗涤步骤后,将膜在1:10,000稀释的二级抗体中于室温旋转温育30分钟。病毒抗体的二级抗体(抗小鼠)用5％的BSA-TBST稀释,所有其他抗体用溶于TBST的5％奶粉稀释。这些二级抗体与辣根过氧化物酶缀合。经过5个最后的洗涤步骤后,将该膜在增强化学发光(ECL)溶液中温育5分钟,以显示过氧化物酶的信号。对于与一级抗体DP-1和E2F-1温育的膜,使用GE-Healthcare的Amersham ECL Prime蛋白质印迹检测试剂来获得更明亮的信号,对于所有其他膜,均使用实验室生产的ECL溶液。“缓冲液和溶液”部分列出了在1:1使用之前不久混合在一起的ECL A和ECL B的组成。最后,可以通过在膜上显影信号来检测蛋白质。

[0567] 抗体:

[0568] 检查点激酶1(sc-377231,Santa Cruz Biotechnology)

[0569] 总RB(554136,BD Biosciences)

[0570] phospho RB Ser 780(8180,Cell Signaling Technology)

[0571] E2F1(sc-251,Santa Cruz Biotechnology)

[0572] E2F2(ab138515,abcam)

[0573] E2F3(PG37,Thermo FisherScientific)

[0574] E2F4(WUF10,Thermo Fisher Scientific)

[0575] E2F5(sc-999,Santa Cruz Biotechnology)

[0576] 细胞周期蛋白D1(92G2,Cell Signaling Technology)

[0577] 细胞周期蛋白E2(4132,Cell Signaling Technology)

[0578] CDK2(78B2,Cell Signaling Technology)

[0579] GAPDH(14C10,Cell Signaling Technology)

[0580] 肌动蛋白(A2066,Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

[0581] E1A(sc-25,Santa Cruz Biotechnology)

[0582] E1B55k(由M.Dobbelstein提供)

[0583] E4orf6(由M.Dobbelstein提供

[0584] E2A(DBP,由M.Dobbelstein提供)

[0585] 六邻体(ABIN2686029,Antibodies online)

[0586] 小分子抑制剂处理

[0587] 将PD-0332991羟乙磺酸盐(帕博西尼,Sigma-Aldrich Chemie GmbH)和LY-2835219(Abemaciclib,Selleck Chemicals)溶解在无菌水中,作为10mM储备溶液。将LEE011(瑞博西尼,MedChem Express)和Nutlin-3a(Sigma)分别溶解在DMSO中,作为10mM和5μM的储备溶液。新鲜配制的工作浓度可立即使用。

[0588] 病毒感染和联合治疗

[0589] 为了确定病毒诱导的细胞杀伤,将细胞接种在12孔板中。对于与PD-033299、LY-2835219和LEE011的组合处理,将细胞用抑制剂预处理24小时。在没有FBS的200-400μl培养基中,用指定的病毒以指定的MOI感染细胞。在1hpi,将具有或不具有小分子抑制剂的完全培养基添加到细胞中。

[0590] 细胞活力(SRB测定)

[0591] 在4℃用10％TCA固定细胞1小时,并在室温下用1％乙酸中的0.5％磺基罗丹明B(SRB,Sigma-Aldrich Chemie GmbH)染色30分钟,然后用1％乙酸洗涤以去除多余的SRB。将干燥的SRB溶解在10mM Tris缓冲液中,并通过在590nm处的光度测量进行定量。

[0592] 滴度测试

[0593] 为了确定感染性病毒颗粒的产生,使用细胞刮刀在3dpi收获感染的细胞和上清液。通过多次冻融循环,然后以1600rcf离心,从完整细胞中释放出病毒。如AdEasy病毒滴度试剂盒说明手册(972500)中所述,使用Hek293细胞测试了细胞裂解物上清液的病毒颗粒产生。使用了以下试剂:山羊抗六邻体抗体(1056,Chemicon),兔抗山羊抗体(P0449,Dako),DAB溶液(Dako)。

[0594] 实施例2:CDK4/6抑制剂PD0332991对E1-负型腺病毒复制的作用

[0595] 已经表明,E1缺失的腺病毒在癌细胞中复制,尽管功效非常低。用100MOI的表达绿色荧光蛋白(Ad-GFP)的E1-负型腺病毒感染T24细胞,并在感染前一天和温育期间用500nM PD0332991处理。在这种条件下,观察到GFP表达的增加,因此表明由腺病毒E2-早期启动子

的激活介导的E1A独立的病毒复制和基因表达。

[0596] 实施例3:野生型腺病毒或XVir-N-31与不同的CDK4/6抑制剂的组合使用

[0597] 基于使用E2早期突变的腺病毒Ad-WT/E2M和Ad-GFP与PD0332991结合的结果,使用不同的CDK4/6抑制剂与野生型腺病毒Ad-WT或XVir-N-31结合进行了实验。由于这些试剂可将细胞阻滞在G1期,因此令人惊讶地发现所有抑制剂均能够支持病毒复制。

[0598] 进一步检查了用三种临床上先进的CDK4/6抑制剂PD-033299、LY-2835219和LEE011处理细胞是否可以影响感染对细胞活力、病毒复制和病毒滴度产生的作用。

[0599] 经处理后,所有三种抑制剂均对RB的表达和磷酸化水平表现出相似的作用,这在之前的许多出版物中已有描述。经过24小时几乎完全的去磷酸化以及总蛋白的下调后,磷酸化水平随时间而部分恢复。处理后CDK2水平上调,而细胞周期蛋白D2和细胞周期蛋白E2水平下调。

[0600] 实施例4:CDK4/6抑制剂和溶瘤腺病毒的组合产生的协同作用

[0601] CDK4/6抑制剂PD-033299、LY-2835219和LEE011与腺病毒感染细胞联合使用。处理后24小时完成了细胞感染,因为只能在处理后8到24小时之间检测到对靶分子的下游影响。

[0602] 结果如图1所示。

[0603] CDK4/6抑制剂对细胞活力、病毒复制和病毒滴度具有协同作用。(a)用三种CDK4/6抑制剂PD-033299、LY-2835219和LEE011预处理细胞24小时,并用XVir-N-31(Moi 60)或野生型腺病毒(Moi 80)感染。感染后四天,通过SRB测定法测量细胞活力。图显示了最少三个独立实验的平均值。(b)感染后三天,从细胞制备裂解物,并对HEK293细胞进行滴度测试。病毒滴度显示为相对于对照的倍数变化。(c)在4、24、36和48hpi从感染细胞中提取DNA,并使用qPCR对尾丝cDNA进行病毒复制分析。将数值对4hpi时的GAPDH归一化。图显示了至少两个独立实验的代表。误差线代表标准误。

[0604] 从图1可以明显看出,所有三种CDK4/6抑制剂均显著支持细胞裂解(图1a),细胞内复制(图18)和病毒颗粒形成(图1b)。

[0605] 实施例5:CDK4/6抑制剂帕博西尼(PD-033299)对所选病毒蛋白表达水平的作用

[0606] 为了更详细地分析这些作用,确定了处理或未处理细胞中所选病毒蛋白的表达水平。对于该实验,抑制剂帕博西尼(PD-033299)用作代表性的CDK4/6抑制剂。用15的MOI感染细胞。感染后24小时进行500nM的PD处理,直到进行蛋白质分离。12、24和36小时后,使用1%SDS缓冲液进行蛋白质分离。包括作为阳性对照的肌动蛋白。由于上样对照在所有细胞系中均显示相同水平的细胞肌动蛋白,因此可以确保在细胞系之间进行适当的比较。hpi:感染后小时数

[0607] 结果显示在图2中,其显示了结合CDK4/6抑制剂PD0332991(PD)的Ad-WT和XVir-N-31感染的T24细胞的病毒蛋白表达结果。与腺病毒野生型病毒相比,在用CDK4/6抑制剂PD-0332991处理的细胞中,该实验中研究的病毒蛋白(E1A、E1B-55k、DBP(E2A)和六邻体)均以更高的水平表达。对于E1A,这种作用最早可在12hpi时观察到,对于其他蛋白质,则可在24hpi时观察到。

[0608] 实施例6:CDK4/6抑制剂介导的作用的特异性

[0609] 实施例5中的CDK4/6抑制剂类别要求表达RB。因此,使用了三个RB阳性和两个RB阴性膀胱癌衍生的细胞系,并用联合疗法处理了这些细胞。将细胞系用IC50浓度的PD-

0332991(T24:500nM,RT112:2000nM,253J:100nM)预处理24小时,并用XVir-N-31(T24 MOI50、253J MOI 25,RT112 MOI450)感染。数值是至少两次独立实验的平均值。误差线显示标准误。使用SRB分析(a,c)测量4dpi时的细胞活力。3dpi时制备细胞的(b,d)裂解物,并对Hek293细胞进行滴度测试。病毒滴度显示为相对于对照的倍数变化。

[0610] 结果如图3所示。

[0611] 从图3可以明显看出,只有RB阳性的细胞系分别显示出细胞生长和细胞活力的显著下降(图3a,c)。另外,PD-0332991处理后,病毒颗粒形成仅在RB阳性细胞系中增加(图3b,d)。

[0612] 实施例7:CDK4/6抑制剂PD-0332991与XVir-N-31联合处理的作用

[0613] 为了研究PD-0332991对RB阳性细胞系中病毒复制的作用,使用qPCR对尾丝DNA拷贝进行了相对定量。将膀胱癌细胞系预处理24小时,并用XVir-N-31(T24 MOI 40,UMUC3和253J MOI 20,RT112 MOI 400)感染。24-48hpi时提取DNA,并使用qPCR分析病毒尾丝。将数值对GAPDH归一化。数据代表至少两次独立实验;误差线S.D.

[0614] 结果如图4所示。

[0615] 从图4中可以看出,CDK4/6抑制剂PD-0332991与XVir-N-31的联合处理显著增加了病毒复制。

[0616] 实施例8:CDK4/6抑制剂的时间动力学

[0617] CDK4/6抑制剂对RB的去磷酸化和降解的时间动力学在细胞处理后约10小时。同样,以上提供的结果显示了RB下游目标随时间的部分恢复(图1)。该观察结果暗示CDK4/6抑制剂的时间动力学以及对病毒诱导的细胞死亡的作用是该联合疗法的重要参数,如实施例7所示。对于联合疗法的应用,测试了用于细胞预处理的不同时间点。据此,在感染之前(感染前天/小时,dai/hai)或感染后1小时,处理细胞,并使用SRB测定法测量细胞生长。误差线代表S.E.,数值是三个独立实验的平均值。

[0618] 结果如图5所示。

[0619] 从图5可以明显看出,平行治疗已经足以增加细胞死亡。

[0620] 实施例9:不同腺病毒与CDK4/6抑制剂PD0332991的联合处理

[0621] 进行该实施例是为了提供实验证据,表明可以将不同的溶瘤腺病毒与CDK4/6抑制剂(例如PD0332991)一起用于细胞杀伤,并且观察到的病毒复制和细胞杀伤的增加并不限于XVir-N-31。据此,具有Ad-Δ24和XVir-E2FM的T24癌细胞如下:用20MOI的指定溶瘤腺病毒感染T24膀胱癌细胞。利用500nM CDK4/6抑制剂PD0332991的处理在感染前一天和感染后4天进行。感染后4天拍摄照片。细胞病变效应(CPE)的出现表明病毒复制和细胞杀伤。

[0622] 结果如图6所示。

[0623] 从图6中可以看出,CDK4/6抑制剂PD0332991作为CDK4/6抑制剂的代表性实例,当与其他溶瘤性腺病毒如Ad-Δ24和XVir-E2FM组合时,减少了RB磷酸化,增加了细胞杀伤。

[0624] 实施例10:用表达GFP的重组E1缺失腺病毒(Ad-负型/GFP)与帕博西尼组合感染T24细胞导致GFP表达增加

[0625] 将100,000个T24细胞/孔接种在6孔板中,并在37℃和5%CO_2下在含有10%FCS的RPMI培养基中生长。感染前24小时用500nM帕博西尼处理T24细胞并在感染后1小时再次处理。在没有血清的400μl培养基中感染表达GFP的E1缺失腺病毒(Ad-负型/GFP)。感染后48小

时使用10倍放大率的荧光显微镜拍摄照片。

[0626] 使用和不使用帕博西尼处理的GFP表达的荧光显微镜分析结果如图7所示。

[0627] 结果表明,用帕博西尼处理T24细胞引起GFP表达的强烈增加,GFP表达是由帕博西尼诱导的病毒DNA复制介导的。

[0628] 实施例11:在用各种细胞周期抑制剂处理的UMUC细胞中E1A独立的病毒复制

[0629] 为了研究在不同处理条件下dl703的复制差异(Mantwill等人,2013,Journal of Translational Medicine,11,216),进行了DNA复制分析。将100,000个UMUC细胞接种在6孔板中,并在37℃在5%CO_2条件下在含有10%FCS的DMEM培养基中生长。接种后24小时,将细胞用10μM Lee(瑞博西尼),1μM CI-1040、10μM Nutlin-3a和10μM Roscovertine处理24小时,并在感染后再次向培养基中添加适量的抑制剂。在处理后24小时,用50MOI的dl703(哺乳动物腺病毒,C型,在E1区域中缺失3.2kb的血清型5)感染。感染后4小时和48小时后,分离DNA,并使用病毒尾丝基因的特异性引物进行qPCR。尾丝正向引物5`-AAGCTAGCCCTGCAAACATCA-3`;尾丝反向引物5`-CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA-3`。

[0630] 结果如图8所示。

[0631] 从图8可以明显看出,用CDK 4/6抑制剂LEE011(瑞博西尼)处理UMUC细胞导致E1-负型腺病毒dl703的病毒DNA复制急剧增加(近100倍)。这种增加强烈表明,瑞博西尼特异性诱导的G1阻滞与E2F-1表达的抑制一起促进了E1独立的腺病毒复制。结果,不仅在E1A基因中具有特定缺失的病毒在CDK 4/6处理下显示出增强的腺病毒DNA复制,而且即使E1A基因完全缺失的腺病毒也显示出病毒DNA复制的增加。

[0632] 尽管Mek抑制剂GI-1040在抑制E2F-1表达和G1阻滞方面表现出相似的特性,但与瑞博西尼处理的细胞相比,复制要低得多。这可能是由于以下事实:同时抑制了其他重要的细胞周期相关途径,例如病毒复制所必需的MEK/ERK。此外,已表明抑制MEK/ERK途径可将颗粒形成减少100倍以上,使得其在临床环境中不适用于与溶瘤腺病毒复制的联合治疗(Schümannand Doppelstein 2016,Cancer Research,66,1282-1288)。

[0633] 实施例12:用指定细胞周期抑制剂处理的UMUC细胞的蛋白质印迹分析

[0634] 用指定浓度的CI-1040、Roscovitine,Nutlin-3a和LEE011(瑞博西尼)处理的UMUC细胞的蛋白质印迹分析。将1×10^6个细胞接种在10cm培养皿中。处理后24小时使用1%SDS缓冲液以破坏核膜,分离蛋白质。将所有样品吸取到注射器中数次以破坏DNA,随后在4℃下以30000rpm离心30分钟。将上清液转移到新的反应管中,直接用于进一步的步骤或保存在-80℃。为了分离蛋白质,进行了十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。通过在4℃100V下电泳约2个小时,装载40μg总蛋白并针对指定的特异性抗体进行探测。

[0635] 结果示于图9A、9B和9C中。

[0636] 从图9可以明显看出,Roscovitine和Nutlin-3a对Rb、phRB和E2F-1的表达没有明显影响,而10μM的LEE-011(瑞博西尼)和1μM的MI-1040则可以诱导E2F-1的抑制以及Rb和phRb表达。

[0637] 实施例13:CDK 4/6抑制剂对E1缺失的复制缺陷型腺病毒dl703的病毒DNA复制的分析

[0638] 为了进行细胞周期分析,将细胞接种在6孔板中(2.5×10E4个细胞/孔)。在用dl703感染前8小时,用指定浓度的细胞周期抑制剂处理细胞。用10MOI的dl703感染后,再次

处理细胞48小时。未处理的细胞和dl703感染的细胞仅用作对照。感染后48小时,通过胰蛋白酶消化收集细胞,并在涡旋的同时用80％乙醇固定。为了研究细胞周期状态,将固定的细胞在室温和300g下离心5分钟,然后抽吸乙醇。将细胞重悬并用1％BSA-PBS(牛血清白蛋白)洗涤,并再次离心。将细胞用EDU染色,并使用来自Thermo Fischer的Click-iT™Plus EdU流式细胞术检测试剂盒(目录号C10632)进行细胞周期分析。此外,用1％BSA/PBS洗涤3次后,将细胞用PI(碘化丙锭,50μg/ml)染色。用FACScalibur流式细胞术系统在染色后直接进行测量。使用FlowJo软件分析数据。

[0639] CDK4/6抑制剂的特征

[0640] CI1040:双特异性苏氨酸/酪氨酸激酶,map激酶激酶(MEK),是人肿瘤中经常被激活的RAS/RAF/MEK/ERK信号途径的关键组分。CI-1040是一种benzhydroxamate化合物,其有效抑制MEK(Allen等人,2003,Semin Oncol.(5Suppl.16):105-16)并引起G1阻滞。

[0641] Nutlin-3a:Nutlin-3是MDM2的小分子拮抗剂,可有效地恢复具有野生型p53的MDM2正常表达和MDM2过表达细胞系中的p53功能,从而导致细胞周期阻滞和凋亡(Wang等人,2012,Acta Biochimica et Biophysica Sinica,第44卷,第8期,2012年8月1日,第685-691页)。

[0642] Roscovitine(Seliciclib或CYC202)是药理细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂家族中的实验性候选药物,其优先抑制多种酶靶标,包括CDK2、CDK7和CDK9,这些靶标改变了所治疗细胞的细胞周期的生长阶段或状态(Whitaker等人,2004,Cancer Research 64,262-272)。

[0643] LEE011(瑞博西尼;商品名Kisqali)是细胞周期蛋白D1/CDK4和CDK6的抑制剂,用于治疗某些类型的乳腺癌。CDK 4/6的抑制导致G1细胞周期阻滞和E2F-1表达的抑制(Kim S.等人,Oncotarget.2018,Oct 16;9(81):35226-35240;Yang C等人,Oncogene(2017)(36,2255-2264)。

[0644] 结果如图10所示。

[0645] CDK 4/6抑制剂LEE011(瑞博西尼)和CI-1040诱导明显的G1阻滞。Roscovitine处理显示G2/m阻滞细胞略有增加。在所使用的浓度下,Nutlin-3a对细胞周期的影响很小或没有影响。用E1缺失的(没有E1A蛋白)重组腺病毒dl703感染UMUC细胞并没有显著改变细胞周期分布。

[0646] 实施例14:帕博西尼增加处理后体外腺病毒六邻体染色

[0647] 将膀胱细胞系RT112、T24和UMUC接种在6孔板中(2×10^5个细胞/孔)。接种后一天,在感染前24小时用500nM帕博西尼处理细胞并在感染后1小时再次处理。在无血清的400μl DMEM培养基中,用指定MOI的AD-WT进行感染。感染后两天,使用来自Agilent的Adeasy病毒滴定试剂盒(目录号:972500)按照制造商的说明进行六邻体染色。

[0648] 结果如图11所示。

[0649] 从图11可以明显看出,感染后48小时,以帕博西尼处理的细胞中帕博西尼(500nM)作为示例性CDK4/6抑制剂的处理显著增加了六邻体阳性细胞,如棕色/红色所示。必须得出的结论是,由于腺病毒六邻体的表达只发生于病毒复制的开始,因此接受帕博西尼处理的更多细胞能够产生病毒颗粒并显示出增加的病毒DNA复制。

[0650] 从实施例10至14的结果可以看出,只有CDK4/6抑制剂但没有其他细胞周期抑制剂

能够增加复制缺陷型腺病毒(缺乏E1基因的dl703)和Ad-GFP的复制和基因表达。此外,为了提供这种增加的病毒复制和基因表达的CDK4/6抑制剂必须引起(感染)细胞的G1阻滞和F2F1表达的抑制。

[0651] 实施例15:使用包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂的三联疗法处理T24细胞

[0652] 为了表明使用包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂(BMN673(Talazolarib))的三联疗法对T24细胞进行三联疗法的功效,进行了效能测定。

[0653] 将12,500个T24细胞接种到12孔板的每个孔中,并在37℃在含10％FCS的RPMI培养基中过夜生长。通过向培养基中添加指定浓度,在细胞接种后24小时对细胞进行抑制剂处理并在感染后1小时再次处理。抑制剂处理后24小时,在无血清的250μl培养基中发生细胞感染。感染后4天进行固定和SRB染色。PD,帕博西尼;PARPi:BMN673。

[0654] 为了SRB染色,通过抽吸除去培养基。将细胞用1ml(每孔)10％的冷TCA在4℃固定1小时。通过抽吸去除TCA,并用自来水洗涤细胞层4次。用溶于1％乙酸中的1ml(每孔)0.5％SRB(磺基罗丹明B)染色细胞30分钟。在五个洗涤步骤中,用1ml 1％乙酸/孔除去未结合的SRB;在每个洗涤步骤之后,通过抽吸除去乙酸。将板风干2小时。为了溶解SRB染色的细胞,向每个孔中加入200μl 10mM Tris碱。然后,将20μl分别分配到96孔板的孔中。将96孔板装载到Elisa板读数器中,并在560nm处测量样品的吸收。模拟物处理的细胞设定为100％细胞存活。

[0655] 结果如图12所示。

[0656] 图12中显示的结果清楚地表明,由帕博西尼、BMN673和XVir-N-31组成的三联疗法在细胞杀伤方面表现出优于单一疗法或联合疗法的优异性能。使用10MOI的XVir-N-31与PARP抑制剂PARPi(BMN673)和CDK4/6抑制剂帕博西尼(PD)结合可以达到近90％的细胞杀伤率。没有XVir-N-31的PARPi和帕博西尼的组合仅杀死了65％的细胞。T24细胞和UMUC细胞对CDK 4/6-抑制剂敏感(通过E2F-1下调来提供G1阻滞)。

[0657] 实施例16:包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂的三联疗法的动力学

[0658] 为了表明使用包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂(BMN673(Talazolarib))的三联疗法对T24细胞进行三联疗法的动力学,进行了效能测定,并在不同时间点评估了效能。

[0659] 将3000个T24细胞接种到12孔板的每孔中,并在37℃在含10％FCS的RPMI培养基中过夜生长。通过向培养基中添加指定浓度,在细胞接种后24小时对细胞进行抑制剂处理并在感染后1小时再次处理。抑制剂处理后24小时,在无血清的250μl培养基中感染细胞。固定和SRB染色在感染后1-5天(dpi:感染后天数)进行。15nM PARPi对应于T24细胞中的IC-80值。

[0660] 结果如图13所示。

[0661] 从图13可以明显看出,从动力学的观点来看,使用除XVir-N-31以外还包含CDK4/6抑制剂(帕博西尼(PD)和PARP抑制剂PARPI(BMN673))的三联疗法比仅使用XVir-N-31的单一疗法或使用XVir-N-31与PARP抑制剂或CDK4/6抑制剂的联合疗法更有效。重要的是,CDK4/6敏感细胞系UMUC和T24中,在第4天和第5天肿瘤细胞的重新生长显著减少(dpi:感染后天数)。

[0662] 实施例17:包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂的三联疗法的动力学

[0663] 为了表明使用包含XVir-N-31、帕博西尼和PARP抑制剂(BMN673(Talazolarib))的三联疗法对UMUC细胞进行三联疗法的动力学,进行了效能分析,并在不同的时间点评估了效能。

[0664] 接种UMUC-3:将3000个细胞接种到12孔板的每孔中,并在37℃在含10％FCS的DMEM培养基中过夜生长。通过向培养基中添加指定浓度,在接种后24小时对细胞进行抑制剂处理并在感染后1小时再次处理。在抑制剂处理后24小时进行细胞感染。固定和SRB染色在感染后1-6天(dpi:感染后天数)进行。160nM PARPi对应于UMUC3细胞中的IC-80值。

[0665] 结果如图14所示。

[0666] 图14所示的结果清楚地表明,由帕博西尼、BMN673和XVir-N-31组成的三联疗法显示出优于单疗法或联合疗法的性能。重要的是,在CDK4/6敏感细胞系UMUC和T24中,在第4天和第5天肿瘤细胞的重新生长显著降低(dpi:感染后的天数)。

[0667] 实施例18:包含XVir-N-31、CDK4/6抑制剂和布罗莫结构域抑制剂的三联疗法

[0668] 将5000个T24细胞接种在12孔板中,并在含有10％FCS的1ml RPMI培养基中生长。第二天,用500nM帕博西尼和300nM JQ-1处理细胞。处理后24小时,在200μl不含FCS的RPMI-培养基中,用指定MOI的XVir-N-31感染细胞。1小时后,将800μl含10％FCS的RPMI-培养基添加到每个孔中。此外,将500nM帕博西尼和300nM JQ-1添加到培养基中。感染后5天进行SRB染色。模拟物处理的细胞设定为100％细胞存活。

[0669] 结果如图15所示。

[0670] 从图15可以明显看出,布罗莫结构域抑制剂JQ1在低MOI时与CDK 4/6抑制剂帕博西尼结合可提高XVir-N-31的细胞杀伤能力。感染后48小时的光学显微镜分析表明,经JQ1/帕博西尼/XVir-N-31处理的细胞已发生大量细胞死亡。必须得出的结论是,JQ-1增加了帕博西尼处理的细胞中的病毒转录,从而促进了病毒复制,因为仅使用300nM JQ1的单一疗法在10和20MOI时不会增加XVir-N-31的细胞杀伤力。

[0671] 在腺病毒感染的癌细胞中观察到的JQ-1增强的前提条件是帕博西尼诱导G1阻滞的能力。在对帕博西尼有抗性的细胞中(参见实施例18,相同的处理步骤),未观察到细胞杀伤的增加。该观察结果与Baojie Lv等人,2018,Scientific reports,8,11554形成鲜明对比,后者用不同浓度的JQ1处理的细胞未引起G1阻滞,也没有联合使用帕博西尼。

[0672] 实施例19:包含XVir-N-31、CDK4/6抑制剂和布罗莫结构域抑制剂的三联疗法

[0673] 将100,000个SK-N-MC细胞/孔接种到12孔板中,并在37℃在5％CO2下在含10％FCS的RPMI培养基中生长。通过在培养基中添加适量的培养基,在感染前24小时用200nM阿贝西利+500nM JQ1处理细胞并在感染后1小时再次处理。在500μl无血清的RPMI培养基中进行XVir-N-31的感染。感染后5天进行SRB染色。模拟物处理的细胞设定为100％细胞存活。

[0674] 结果如图16所示。

[0675] 已经确定,SK-N-MC细胞对CDK 4/6抑制剂具有抗性,因此不会引起G1阻滞。添加JQ1不会增加对CDK 4/6(阿贝西利)抗性的SK-N-MC细胞的杀伤力,这表明CDK 4/6介导的G1阻滞是JQ1介导的细胞杀伤作用的前提。

[0676] 因此,图16(以及图15)表明,在CDK 4/6抑制剂诱导处理的细胞中G1阻滞的前提下,靶向BRD2、BRD3,BRD4的布罗莫结构域抑制剂进一步提高了XVir-N-3的细胞杀伤作用。

[0677] 实施例20:用CDK 4/6抑制剂LY-2835219(Abemaciclib)和Wee抑制剂MK-1775

(Adavosertib)处理的SK-N-MC细胞的蛋白质印迹分析

[0678] 将1×10^{6}个细胞接种在10cm培养皿中。使用1％SDS缓冲液分离处理后24小时的蛋白质,以实现核膜的破坏。将所有样品抽吸到注射器中数次以破坏DNA,随后在4℃下以30000rpm离心30分钟。将上清液转移到新的反应管中,直接用于进一步的步骤或保存在-80℃。为了分离蛋白质,进行了十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。通过在4℃100V下电泳约2个小时,装载40μg总蛋白并针对指定的特异性抗体进行探测。

[0679] 结果如图17所示。

[0680] 已知SK-N-MC细胞对Abenaciclib处理有抗性(Dowless M等人,2018,Clin Cancer Res:24,6028-6039)。Wee1是G2/M细胞周期检查点控制的关键组分,并通过调节CDC2的磷酸化来介导细胞周期阻滞。据报道,MK1775对Wee1的抑制作用可增强DNA损伤剂在不同类型癌症中的细胞毒性作用。数项研究表明,小分子激酶抑制剂MK-1775对Wee1的药理抑制作用导致肿瘤细胞中Tyr15处CDC2磷酸化的去除(Kreahling等人,2013,PLoS One.8(3),e57523)。尽管在联合处理中观察到了强的G1阻滞,但未观察到Rb和E2F-1表达的变化。

[0681] 实施例21:包含XVir-N-31、CDK4/6抑制剂阿贝西利和Adavosertib(Wee抑制剂MK-1775)的三联疗法

[0682] 将100,000个SK-N-MC细胞/孔接种到12孔板中,并在37℃在5％CO_2下在含有10％FCS的RPMI培养基中生长。通过在培养基中添加适量,在感染前24小时用200nM阿贝西利处理细胞并在感染后1小时再次处理。在500μl无血清的RPMI培养基中进行XVir-N-31的感染。感染后5天进行SRB染色。模拟物处理的细胞设定为100％细胞存活。

[0683] 结果如图18所示。

[0684] 图17(和18)表明CDK 4/6抑制剂阿贝西利和Wee抑制剂MK-1775的组合可诱导G1阻滞,而不会抑制E2F-1。图18中的效能测定表明,该组合不能增强溶瘤腺病毒XVir-N-31的细胞杀伤作用。这些结果清楚地表明,CDK 4/6抑制剂Abemaciclib和Wee抑制剂MK-1775的组合诱导的G1阻滞不促进XVir-N-31的细胞杀伤能力。因此,抑制E2F-1表达是增强病毒溶瘤的进一步要求。

[0685] 实施例22:与E2F-1抑制组合的G1阻滞是与CDK 4/6抑制剂组合的增强XVir-N-31的细胞杀伤力的前提

[0686] 处理后48小时,用PBS(含有RNase A,100U/ml)洗涤细胞两次。用胰蛋白酶消化细胞,并在4℃以1500rpm离心5分钟。通过将1ml冰冷的80％乙醇逐滴缓慢滴加到沉淀中来固定细胞,并温育过夜。通过向细胞中加入1ml染色溶液(碘化丙锭,50μg/ml)并在室温下轻轻摇动温育30-60分钟来进行染色。MK:MK-1775;LY:LY-2835219。

[0687] 结果如图19所示。

[0688] 从图19可以明显看出,用LY(阿贝西利)处理SK-M-NC细胞对细胞周期没有影响。单独进行500nM的MK-1775处理会导致G2/M细胞增加。两者的组合导致强烈的G1阻滞。

[0689] 实施例23:E2F-1表达在病毒DNA复制中的作用

[0690] I.

[0691] 将2x10^{5}T24,A549和HeLa细胞接种到6孔板的每个孔中,并在含有10％FBS、青霉素/链霉素和非必需氨基酸的1.5ml RPMI 1640培养基(或DMEM培养基)中生长。第二天,在150μL Opti-MEM培养基中稀释30pmol siRNA-阴性对照siRNA(Qiagen#1022076)或siE2F1

(Sigma#NM_005225,siRNA ID SASI_Hs01_00162220),并在150μL Opti-MEM中制备9μl Lipofectamine RNAiMAX。将siRNA溶液和Lipofectamine RNAiMAX溶液混合并温育5分钟。将该混合物滴加到细胞中。48小时后,分离RNA并进行RT-qPCR。

[0692] 结果如图20所示。从图20可以明显看出,E2-早期表达降低。

[0693] II.

[0694] 对于6孔板的每个孔,将2x10^{5}个T24细胞接种到包含10%FBS、青霉素/链霉素和非必需氨基酸的1.5ml RPMI 1640培养基中。第二天,在150μL Opti-MEM培养基中稀释30pmol siRNA-阴性对照siRNA(Qiagen#1022076)或siE2F1(Sigma#NM_005225,siRNA ID SASI_Hs01_00162220),并在150μL Opti-MEM中制备9μl Lipofectamine RNAiMAX。将siRNA溶液和Lipofectamine RNAiMAX溶液混合并温育5分钟。将该混合物逐滴添加至T24细胞。在将细胞与10MOI的ADWTRGD在400μl无血清培养基中温育并每10-15分钟摇动平板48小时后,发生感染。1小时后,加入1.6ml完全培养基。感染后24小时进行RNA分离。

[0695] 结果如图21所示。

[0696] III.

[0697] 用冷PBS冲洗细胞,然后加入500μl MirVana试剂盒(Thermo Fisher目录号AM1560)中的裂解缓冲液破坏细胞,用刮刀收集裂解物,然后吸取到1.5ml试管中。为了有机萃取,添加50μl匀浆添加剂,并将样品在冰上温育10分钟。加入500μl的酸-苯酚:氯仿,将样品涡旋60秒并在冰上温育2分钟。样品在室温下以14000x g离心5分钟以分离水相和有机相。将上层相小心地转移到新管中,并加入等量的异丙醇。在室温下温育10分钟后,沉淀出RNA(14000x g,4℃,30分钟),并用1mL的75%乙醇洗涤两次(离心7500×g,4℃,5分钟)。将RNA风干5-10分钟,然后重悬于20-50μl无RNase的水,通过在55℃下以500rpm摇动10分钟溶解,并通过Nanodrop进行测量。使用1μg RNA样品mit 1μl 10x DNAse I反应缓冲液,无核酸酶水至9μl体积,1μl DNaseI(1U/μl)在室温下温育15分钟进行DNA消化后(脱氧核糖核酸酶I,Invitrogen目录号18068-015),通过添加1μl 25mM EDTA溶液,在65℃下加热10分钟使DNAseI失活。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher/Applied Biosystems™目录号:4368814)进行逆转录。使用随机六聚体进行尾丝和肌动蛋白PCR的转录,并使用E2早期引物用于E2早期转录-PCR。

[0698] 使用的引物和siRNA

[0699] E2早期正向引物:CCGTCATCTCTACAGCCCAT

[0700] E2早期反向引物:GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC

[0701] 尾丝正向引物:AAGCTAGCCCTGCAAACATCA

[0702] 尾丝反向引物:CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA

[0703] 肌动蛋白正向引物:TCACCCACACTGTGCCCATCTACG

[0704] 肌动蛋白反向引物:CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

[0705] E2F1正向引物:CATCCCAGGAGGTCACTTCTG

[0706] E2F1反向引物:GACAACAGCGGTTCTTGCTC

[0707] 对照siRNA

[0708] 正义UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT

[0709] 反义:ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT

[0710] E2F-1siRNA

[0711] CUGAGGAGUUCAUCAGCCU[dT][dT]

[0712] AGGCUGAUGAACUCCUCAG[dT][dT]

[0713] 为了通过RT-qPCR证明E2早期表达的作用,绝对必要选择正确的引物。引物的位置应在E2-早期和E2-晚期启动子之间。否则,E2-晚期启动子将强烈影响结果。引物的位置如图22所示。

[0714] 如图20和21所示,siRNA对E2F1的下调导致E2早期表达增加。这只能由E2F1在E2早期表达中的抑制作用来解释。如果E2F-1是激活剂,则可能会导致E2早期表达减少。此外,针对E2F-1的siRNA模拟CDK 4/6抑制剂的作用,其也抑制E2F-1的表达(Yang C等人,Oncogene 2017,36,2255-2264)。

[0715] 实施例24:在腺病毒E2-早期启动子中具有两个E2F结合位点突变的重组腺病毒显示出E2-早期表达增加。

[0716] 产生了在腺病毒E2早期启动子的两个E2F结合位点具有突变的突变腺病毒。野生型E2早期启动子和突变的E2早期启动子的启动子示于图23。

[0717] 在感染后24小时,通过RT-qPCR在获得的AdWT-RGD和AdE2Fm(也包含RGD基序)感染的T24细胞中进行RNA表达分析。将AD-WT基因表达设置为100%。该方法与实施例23的III部分所述的方法相同。

[0718] 结果如图24所示。

[0719] 从图24可以明显看出,与AD-WT感染的细胞相比,AdE2Fm感染的细胞中E2-早期基因表达更高。因此,必须得出结论,E2F-1在E2早期启动子激活中起抑制作用。这与当前的理解形成了鲜明的对比,在当前的理解中,E2F-1被假定为激活剂(DeCaprio JA,Virology.2009Feb 20;384(2):274-84)。

[0720] 众所周知,如图22所示,在所有当前已知的溶瘤腺病毒中E2区域的结构均已建立。因此,E2F-1的作用方式与此处所述相同。结果,所有它们,即所有溶瘤腺病毒都可以与CDK 4/6抑制剂(包括ColoAd1和Delta-24-RGD)组合使用。

[0721] ColoAd1的特征如下:

[0722] Enadenotucirev(以前称为ColoAd1)是一种具有所阐明的临床前活性的肿瘤选择性嵌合腺病毒。ColoAd1的衣壳来自Ad11p,这是一种在人类中具有有限血清流行病学的血清型。EnAd通过结合在许多癌细胞上广泛表达的CD46和/或桥粒芯糖蛋白2,6而感染细胞。大多数EnAd基因组均源自Ad11p,在E3中具有大的缺失并且在E4中具有较小缺失。另外,E2B区域由来自Ad11p和Ad3的序列的嵌合体组成。EnAd中的E4缺失是在E4ORF4中,它在Ad5中编码一种使蛋白磷酸酶2A失活的蛋白,从而激活蛋白翻译机制并在反馈抑制环中调节E1A蛋白的活性。这些缺失,可能与嵌合的E2B区组合,可能有助于EnAd的惊人的癌症选择性复制(Deyer等人,Mol Ther Oncolytics.2017,16;5:62-74)

[0723] Delta-24-RGD(DNX-2401)的特征如下:

[0724] Delta-24-RGD(DNX-2401)是一种有条件复制能力的溶瘤病毒,其被设计用于优先在具有p16/RB/E2F途径异常的肿瘤细胞中复制并裂解肿瘤细胞(Fueyo等人,Oncogene.2000年1月6日;19(1):2-12)。靶向Rb途径的突变溶瘤腺病毒在体内产生抗神经胶质瘤作用(Dai B.等人,Mol Cancer Therapy.2017年4月;16(4):662-670)。

[0725] 在前述说明书、权利要求书和附图中公开的本发明的特征对于在本发明的各种实施方案中实现本发明是重要的,其既可以是单独的,也可以是以任何组合的方式。

序列表

<110> 慕尼黑工业大学临床教学中心

<120> 通过溶瘤腺病毒和CDK4/6抑制剂的组合治疗肿瘤

<130> H 10067 PCT

<140> PCT/EP2019/000067
<141> 2019-03-05

<150> EP 18 000 210.7
<151> 2018-03-05

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0001] <223> 引物

<400> 1
aagctagccc tgcaaacatc acccaagcta ccagtggcag ta 42

<210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 2
ccgtcatctc tacagcccat gggctttgtc agagtcttgc 40

<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 3
cttcctagcg actttgtgcc gtcagagtgg taggcaaggt 40

<210> 4
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 4
cgacgaggat gaagtcctgt gtctgctcag gatagcaggc gccat 45

<210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

[0002]

<400> 5
gaggatgaag tcctgtgtct caggatagca ggcgccat 38

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 6
tgtttgtcta cagtcctgtg tctgctcagg atagcaggcg ccat 44

<210> 7
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 7
ttgtctacag tcctgtgtct caggatagca ggcgccat 38

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 8
tccctcccaa cacacagagt gacaggaaac cgtgtggaat 40

<210> 9
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

[0003] <400> 9
agcaaccctc ctaaaccact tgtttgaggt atccatgcta tca 43

<210> 10
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 10
acgctatgag acctcactga atcctgggtc aacccctcaa g 41

<210> 11
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 11

cgtccctgag ttcccaaccg cgaagtgtca taccgagtct t 41

<210> 12
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 12
tggcatggac tgtggtcatg agactggcgt cttcaccacc atgg 44

<210> 13
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 13
[0004] taagtaggtg cacagtaggt ctgaaaagtg caaagaacac ggctaag 47

<210> 14
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14
gaaccagggc cgcccatact ggggctttgt cagagtcttg c 41

<210> 15
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
ccgttagccc aagagcaacc ggccgtgatg gtagagaag 39

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 16
ctgtggtact tcccagagac caggtgagtt ataccctgcc 40

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
aagctagccc tgcaaacatc a 21

[0005]

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 18
cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 19
ccgtcatctc tacagcccat 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 20
gggctttgtc agagtcttgc 20

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 21
aagctagccc tgcaaacatc a 21

[0006]

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 22
cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 23
tcacccacac tgtgcccatc tacg 24

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 24
cagcggaacc gctcattgcc aatgg 25

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 25
catcccagga ggtcacttct g 21

[0007] <210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 26
gacaacagcg gttcttgctc 20

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 27
uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 28

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 28
acgugacacg uucggagaat t 21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0008] <220>
<223> siRNA

<400> 29
cugaggaguu caucagccut t 21

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 30
aggcugauga acuccucagt t 21

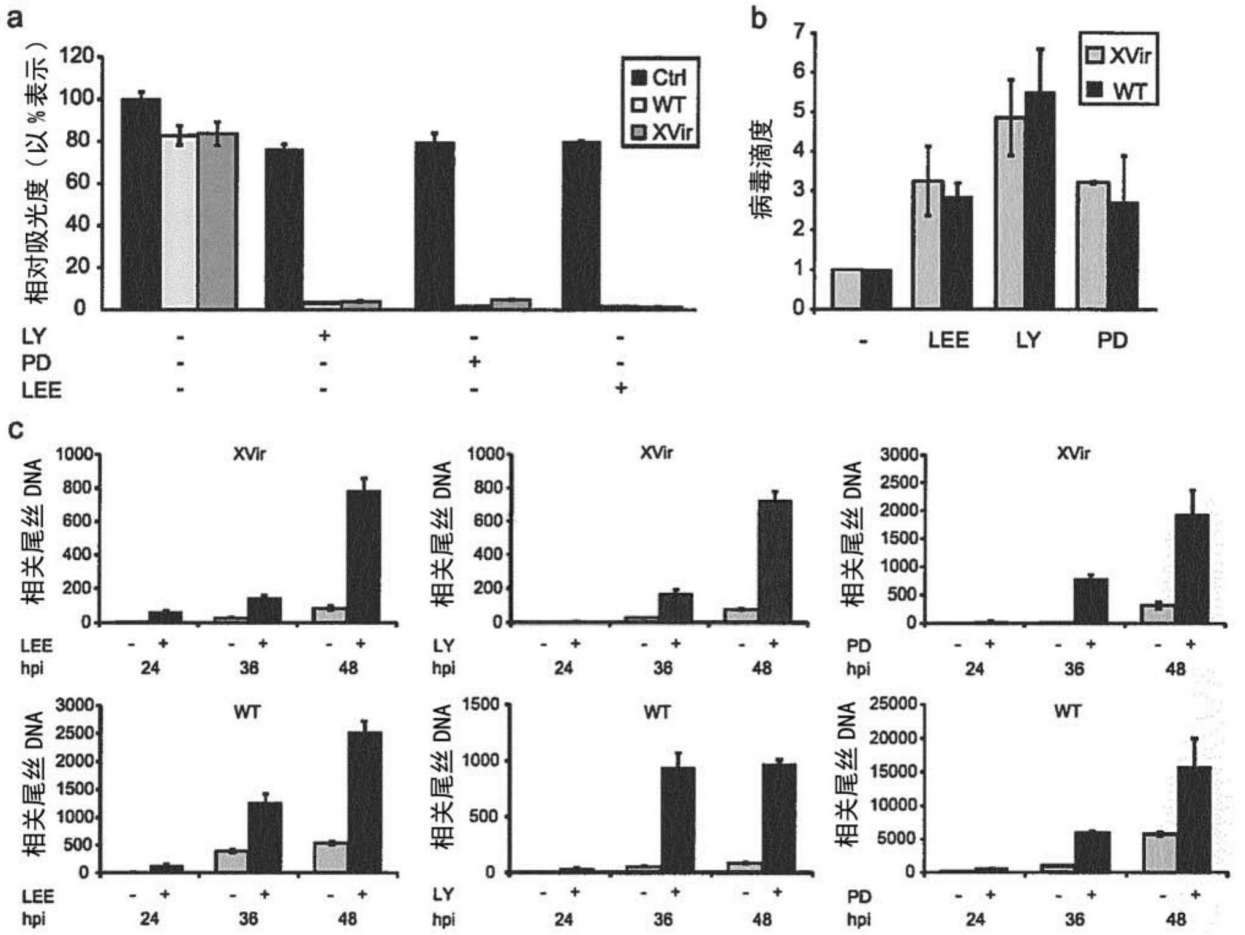

a
相对吸光度（以%表示）
Ctrl
WT
XVir
LY
PD
LEE
b
病毒滴度
XVir
WT
LEE
LY
PD
c
相关尾丝 DNA
XVir
WT
LEE
LY
PD
hpi
24
36
48

图1

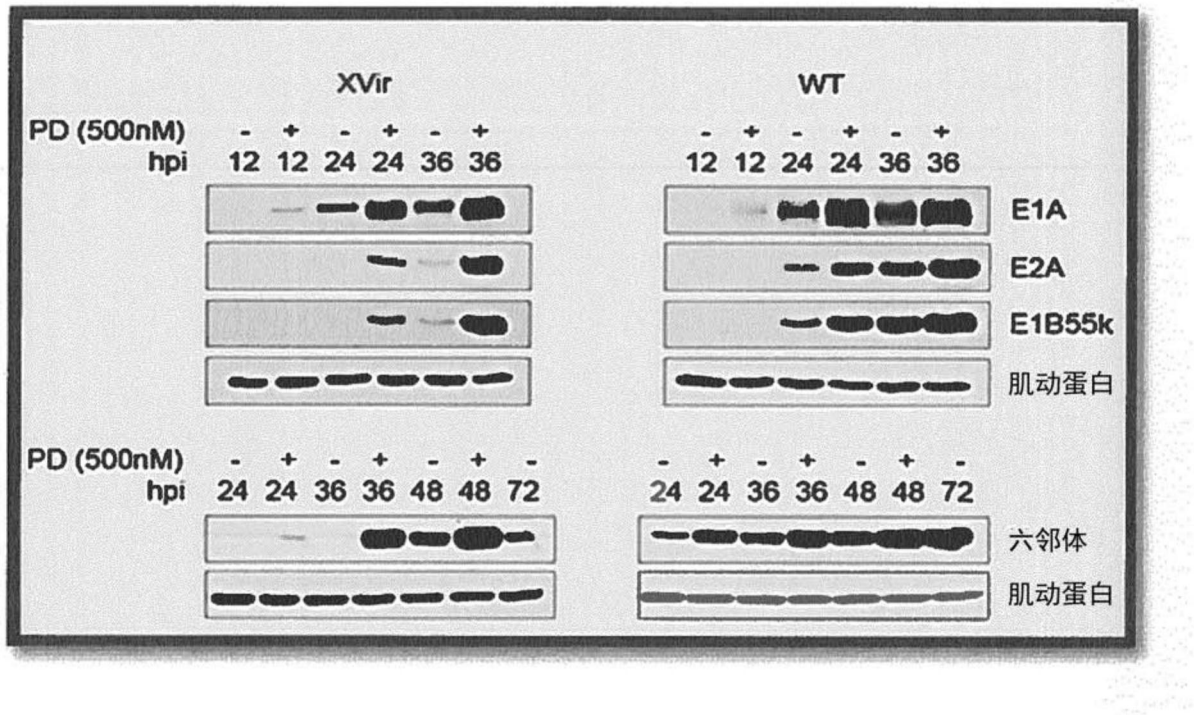

XVir
WT
PD (500nM) - + - + - +
hpi 12 12 24 24 36 36
E1A
E2A
E1B55k
肌动蛋白
PD (500nM) - + - + - + -
hpi 24 24 36 36 48 48 72
六邻体
肌动蛋白

图2

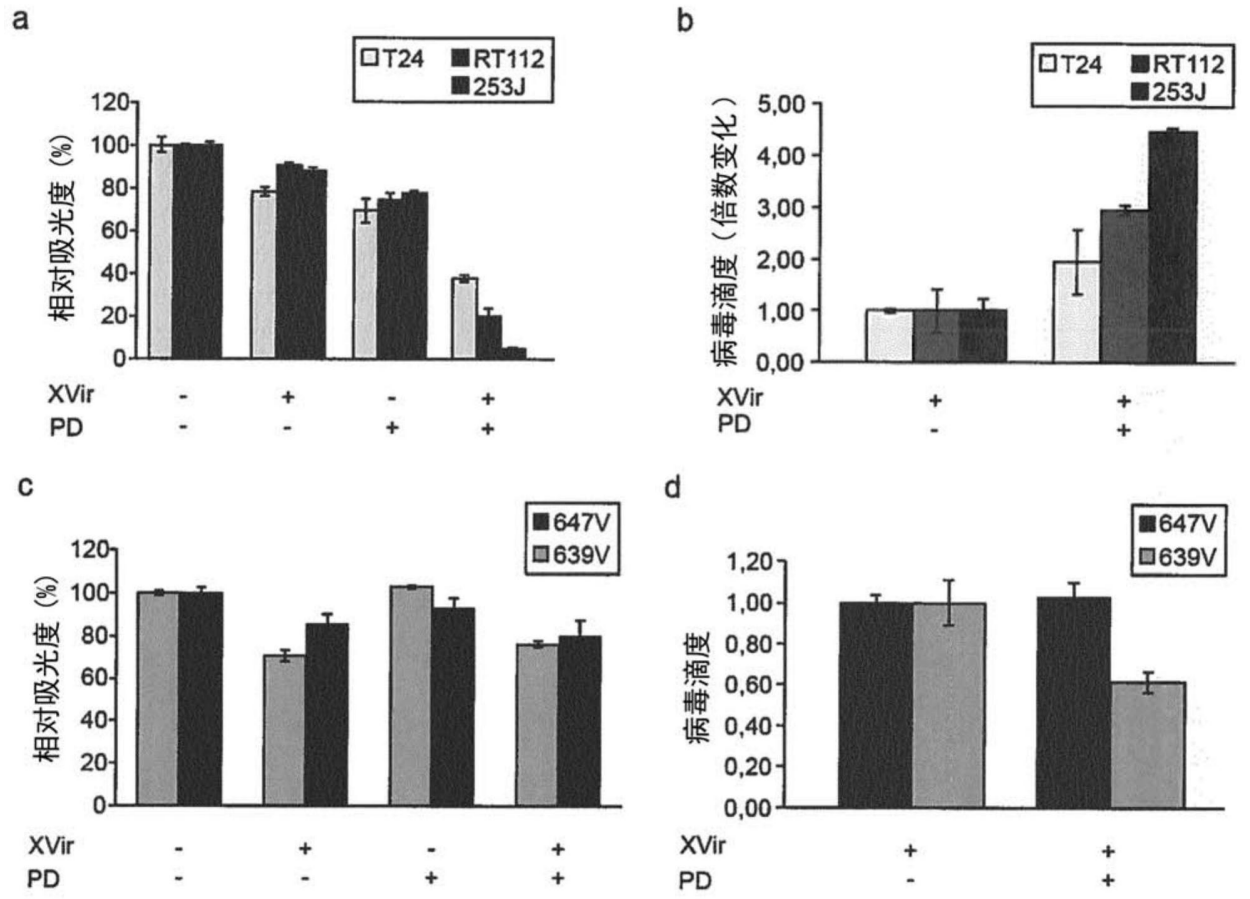

a
T24
RT112
253J
相对吸光度（%）
120
100
80
60
40
20
0
XVir - + - +
PD - - + +
b
T24
RT112
253J
病毒滴度（倍数变化）
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
XVir + +
PD - +
c
647V
639V
相对吸光度（%）
120
100
80
60
40
20
0
XVir - + - +
PD - - + +
d
647V
639V
病毒滴度
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
XVir + +
PD - +

图3

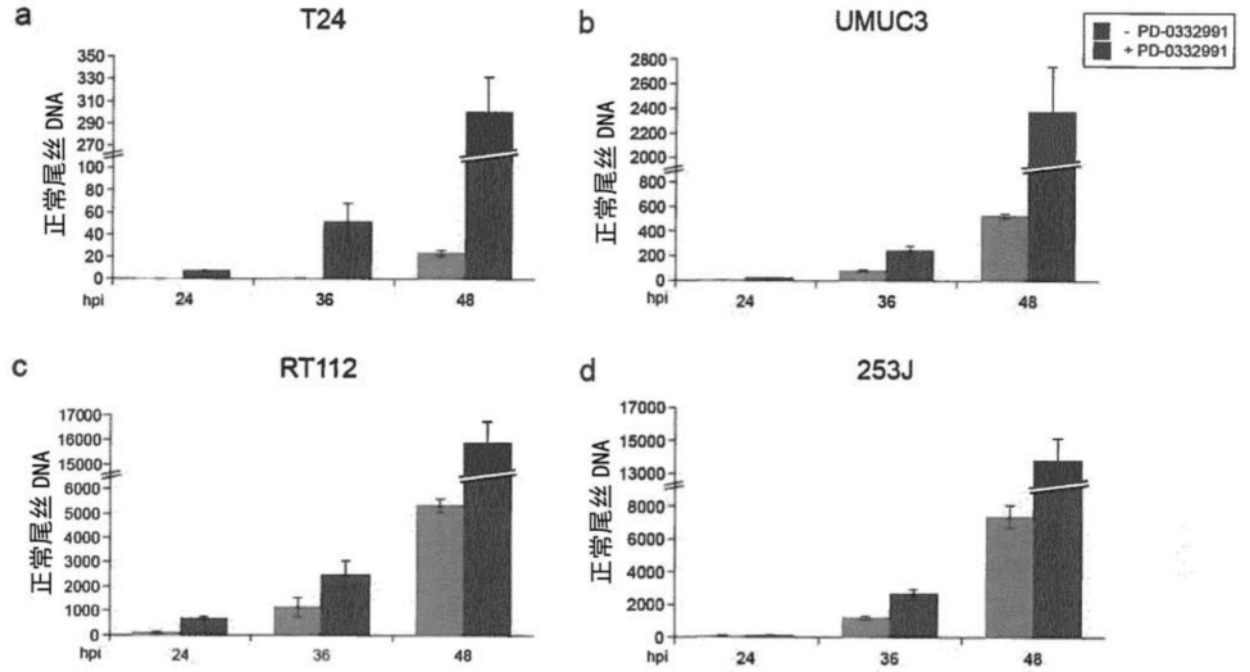

a
T24
正常尾丝 DNA
350
330
310
290
270
100
80
60
40
20
0
hpi 24 36 48
b
UMUC3
- PD-0332991
+ PD-0332991
正常尾丝 DNA
2800
2600
2400
2200
2000
800
600
400
200
0
hpi 24 36 48
c
RT112
正常尾丝 DNA
17000
16000
15000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
hpi 24 36 48
d
253J
正常尾丝 DNA
17000
15000
13000
8000
6000
4000
2000
0
hpi 24 36 48

图4

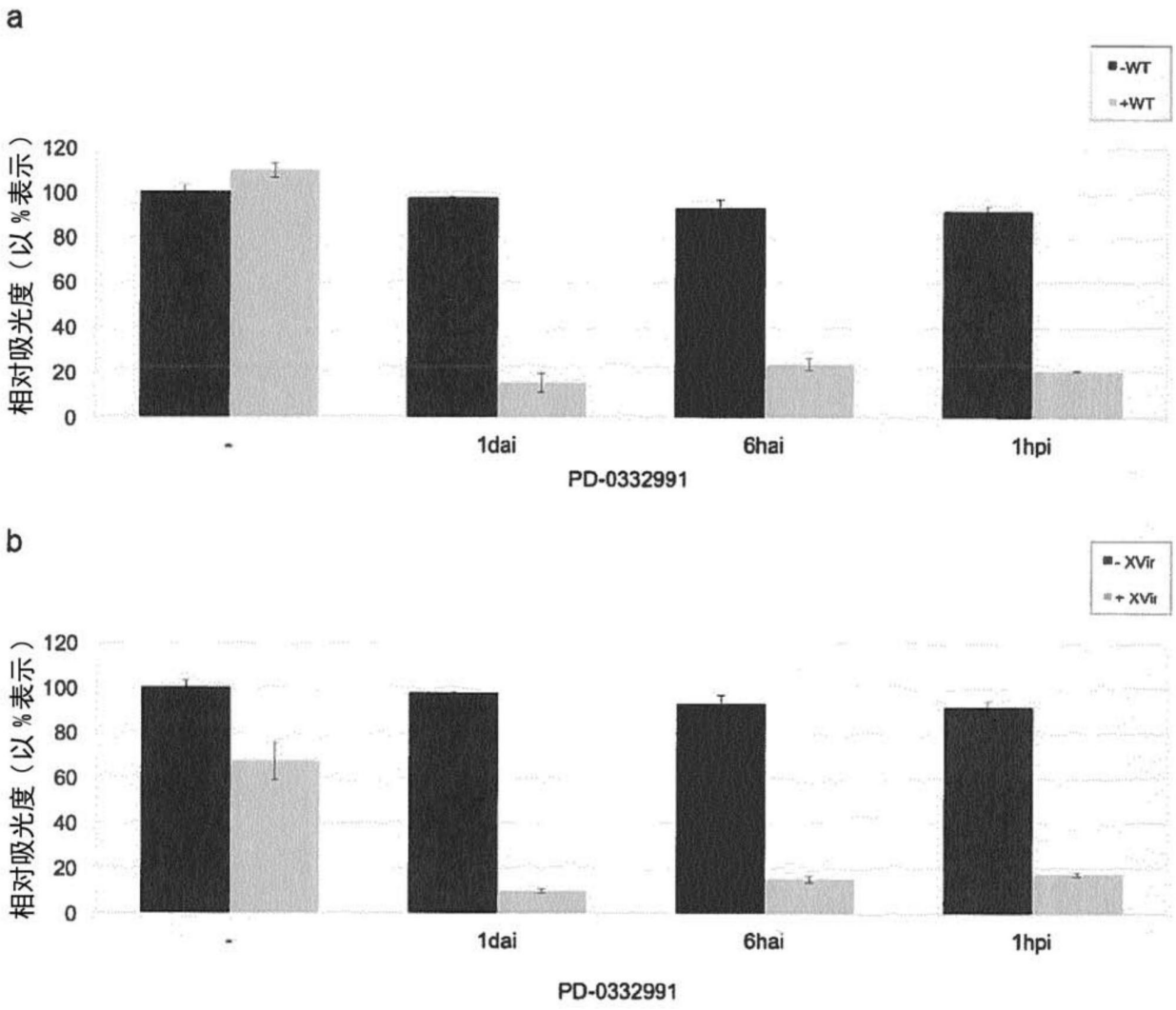

a
-WT
+WT
相对吸光度（以％表示）
120
100
80
60
40
20
0
-
1dai
6hai
1hpi
PD-0332991
b
- XVir
+ XVir
相对吸光度（以％表示）
120
100
80
60
40
20
0
-
1dai
6hai
1hpi
PD-0332991

图5

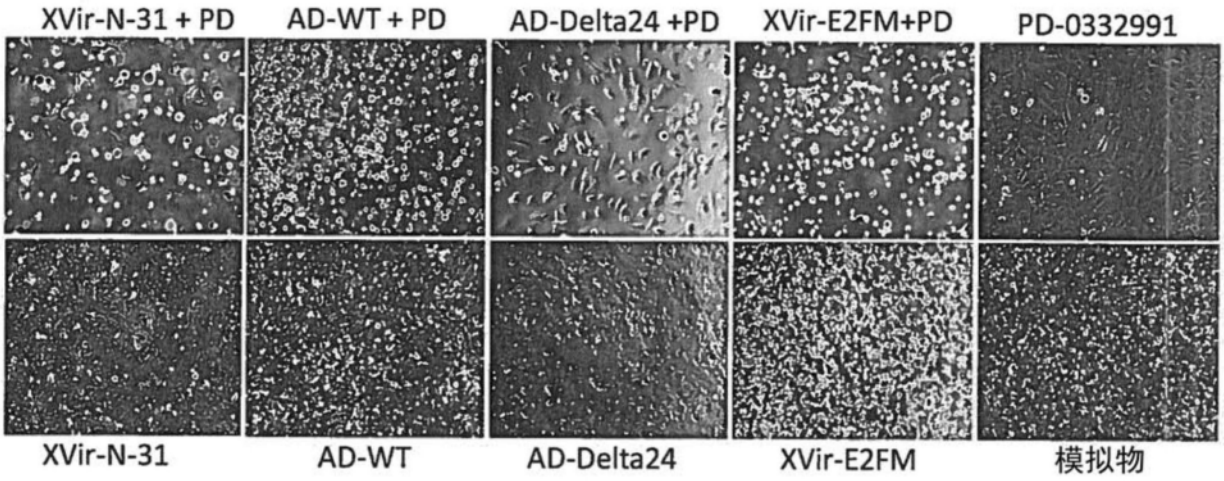

XVir-N-31 + PD
AD-WT + PD
AD-Delta24 +PD
XVir-E2FM+PD
PD-0332991
XVir-N-31
AD-WT
AD-Delta24
XVir-E2FM
模拟物

图6

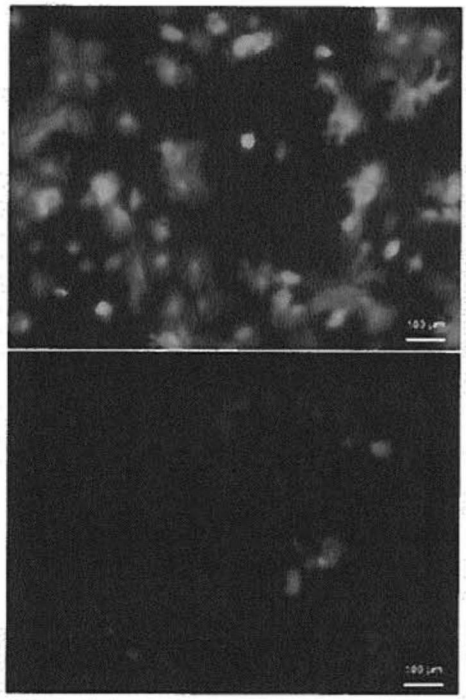

500mM帕博西尼
-帕博西尼

图7

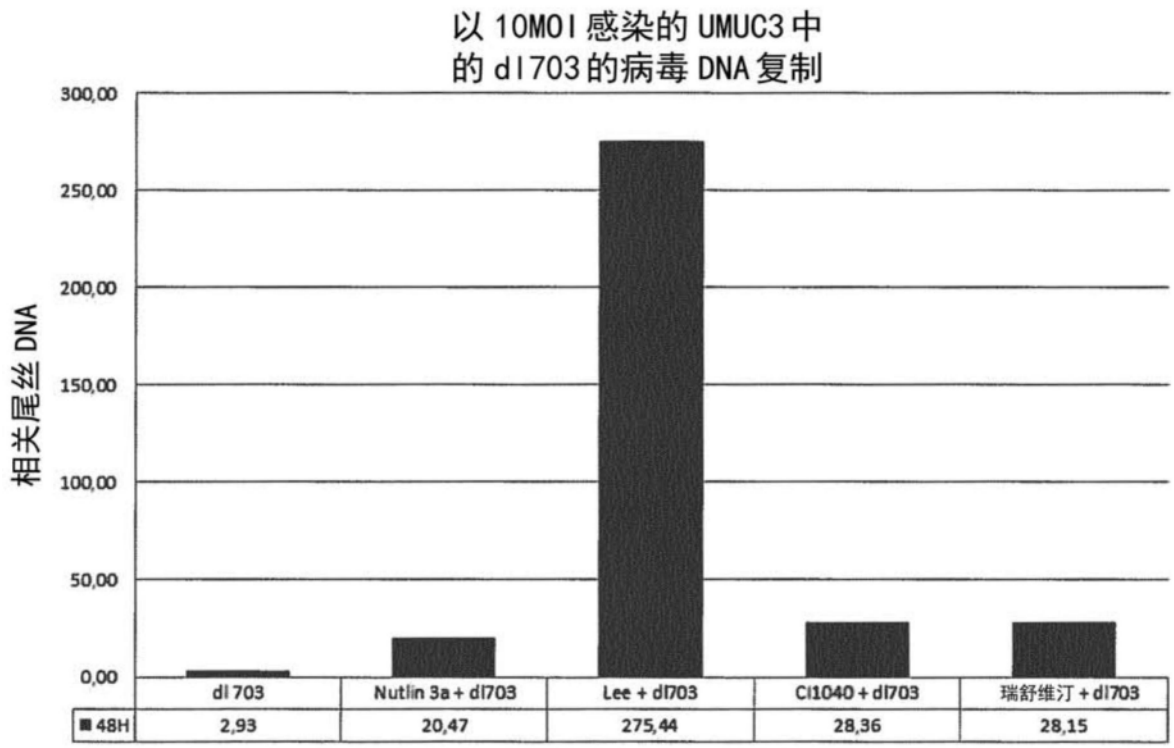

以 10MOI 感染的 UMUC3 中
的 dl703 的病毒 DNA 复制
相关尾丝 DNA
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
dl 703
Nutlin 3a + dl703
Lee + dl703
CI1040 + dl703
瑞舒维汀 + dl703
48H
2,93
20,47
275,44
28,36
28,15

图8

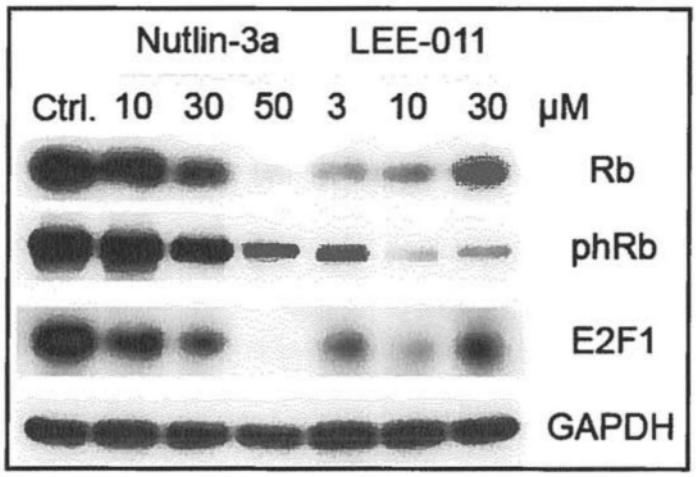

Nutlin-3a
LEE-011
Ctrl. 10 30 50 3 10 30 μM
Rb
phRb
E2F1
GAPDH

图9A

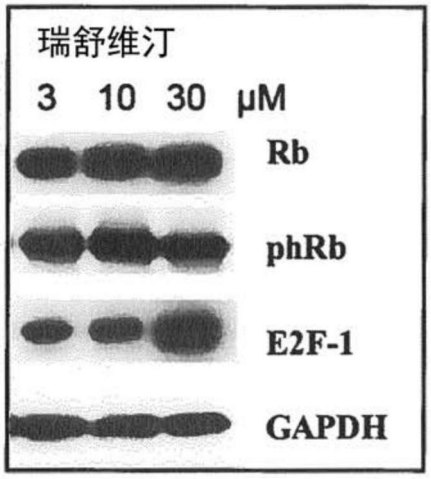

瑞舒维汀
3 10 30 μM
Rb
phRb
E2F-1
GAPDH

图9B

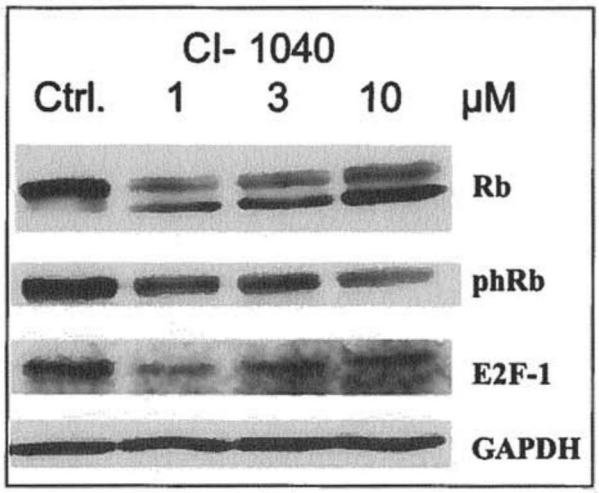

CI- 1040
Ctrl.
1
3
10
μM
Rb
phRb
E2F-1
GAPDH

图9C

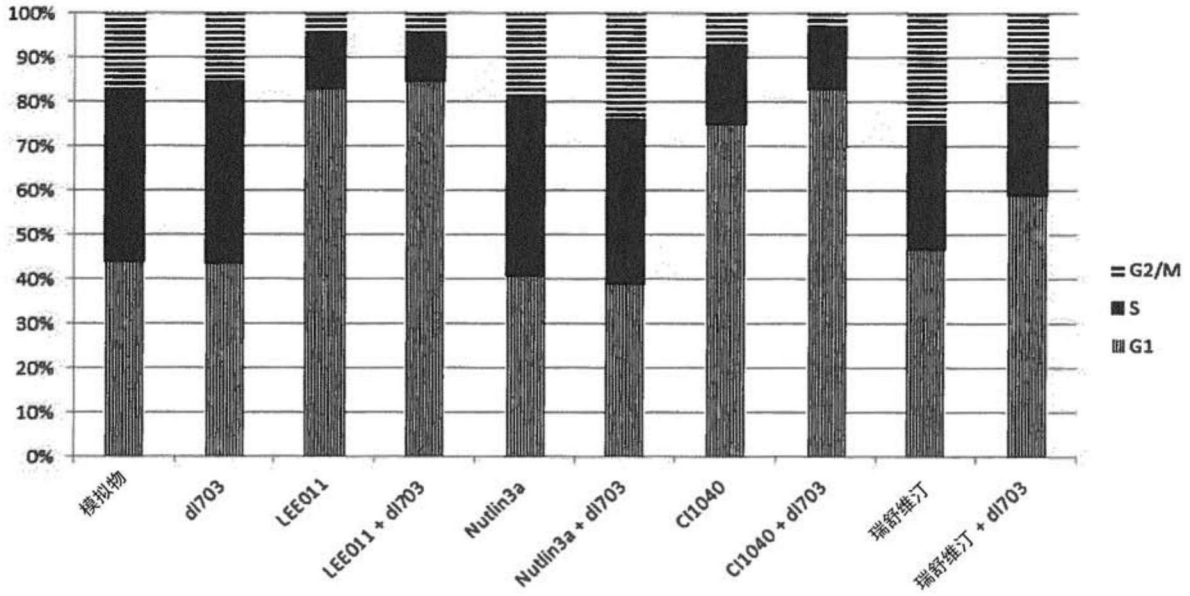

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
模拟物
dl703
LEE011
LEE011 + dl703
Nutlin3a
Nutlin3a + dl703
CI1040
CI1040 + dl703
瑞舒维汀
瑞舒维汀 + dl703
G2/M
S
G1

图10

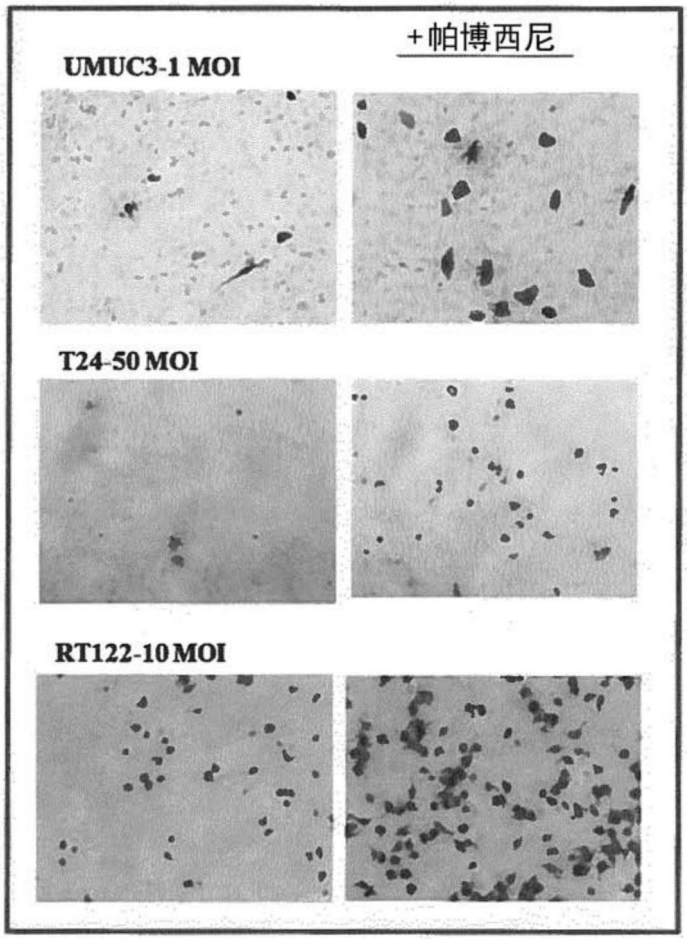


图11

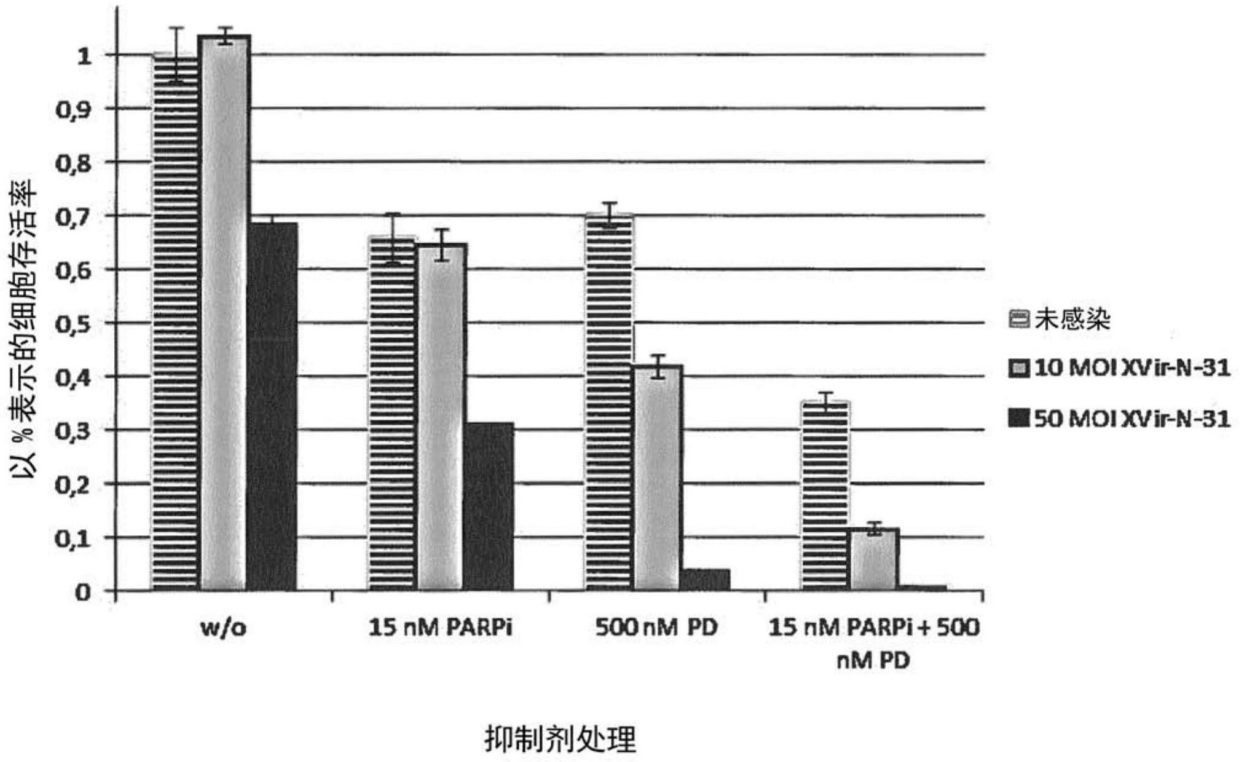

以%表示的细胞存活率
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
w/o
15 nM PARPi
500 nM PD
15 nM PARPi + 500 nM PD
抑制剂处理
未感染
10 MOI XVir-N-31
50 MOI XVir-N-31

图12

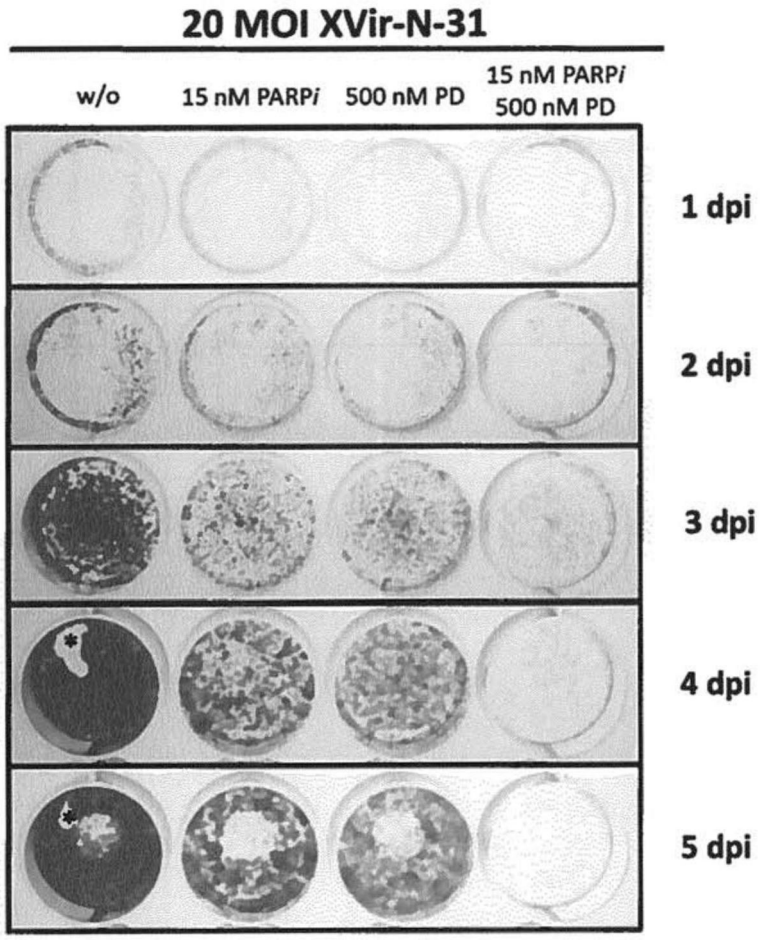

20 MOI XVir-N-31
w/o
15 nM PARPi
500 nM PD
15 nM PARPi
500 nM PD
1 dpi
2 dpi
3 dpi
4 dpi
5 dpi
星号 (*) 表示细胞固定的伪影

图13

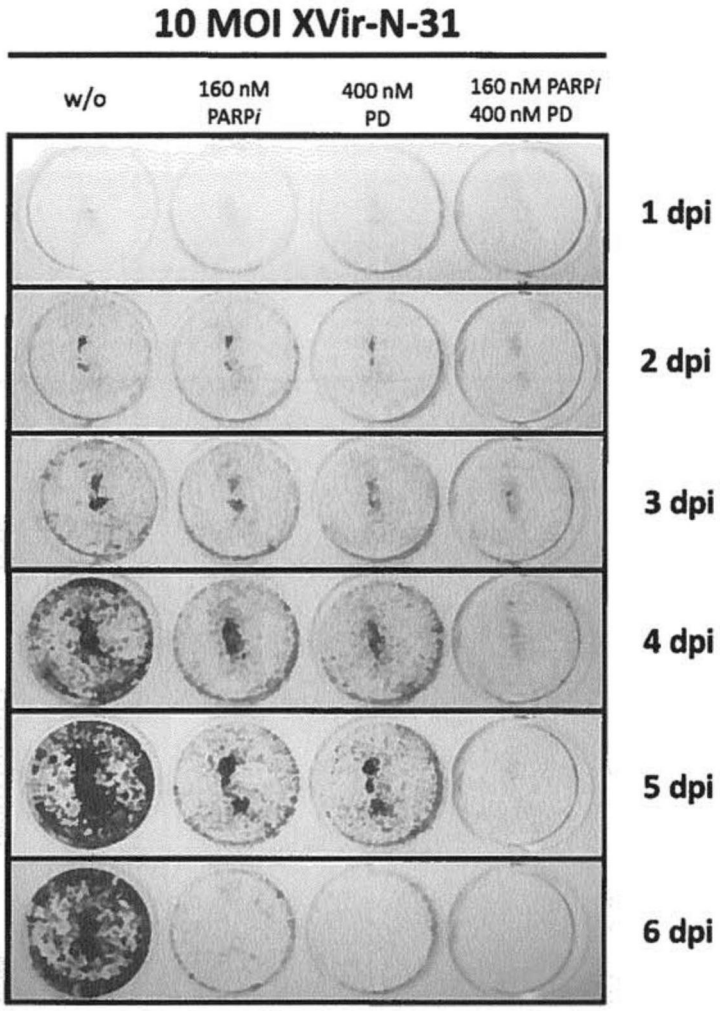

10 MOI XVir-N-31
w/o
160 nM PARPi
400 nM PD
160 nM PARPi 400 nM PD
1 dpi
2 dpi
3 dpi
4 dpi
5 dpi
6 dpi

图14

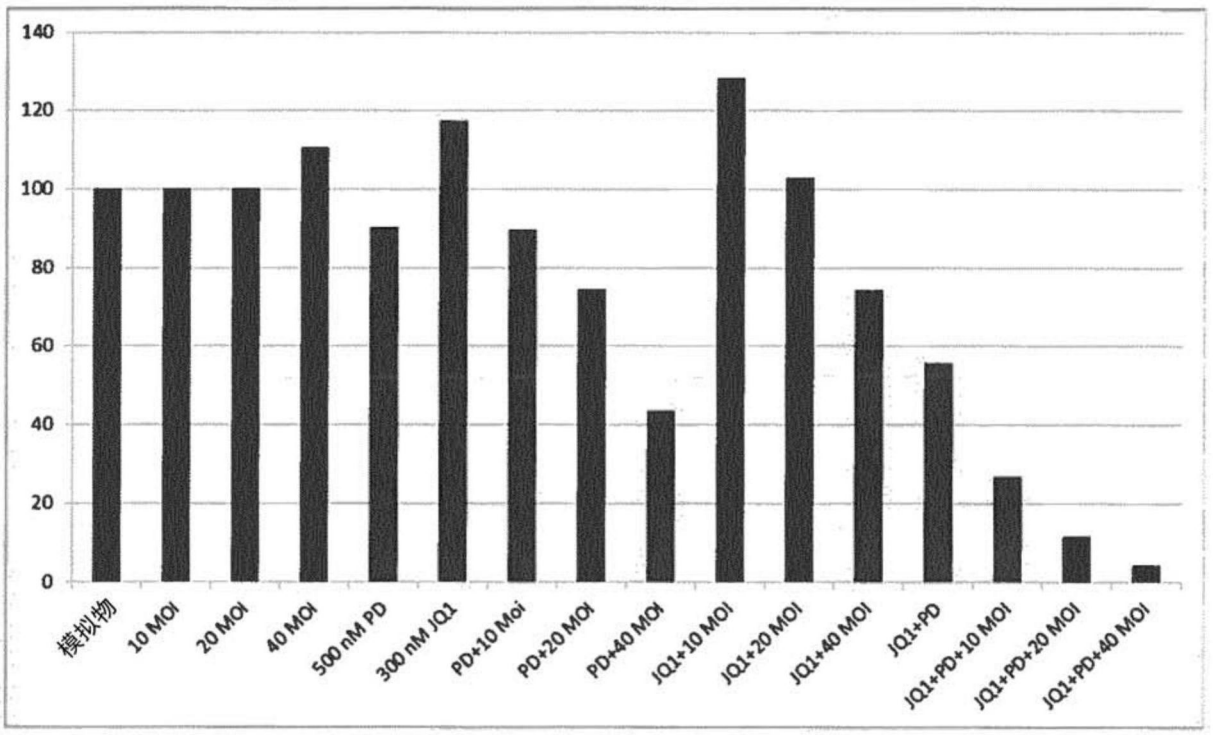

140
120
100
80
60
40
20
0
模拟物
10 MOI
20 MOI
40 MOI
500 nM PD
300 nM JQ1
PD+10 Moi
PD+20 MOI
PD+40 MOI
JQ1+10 MOI
JQ1+20 MOI
JQ1+40 MOI
JQ1+PD
JQ1+PD+10 MOI
JQ1+PD+20 MOI
JQ1+PD+40 MOI

图15

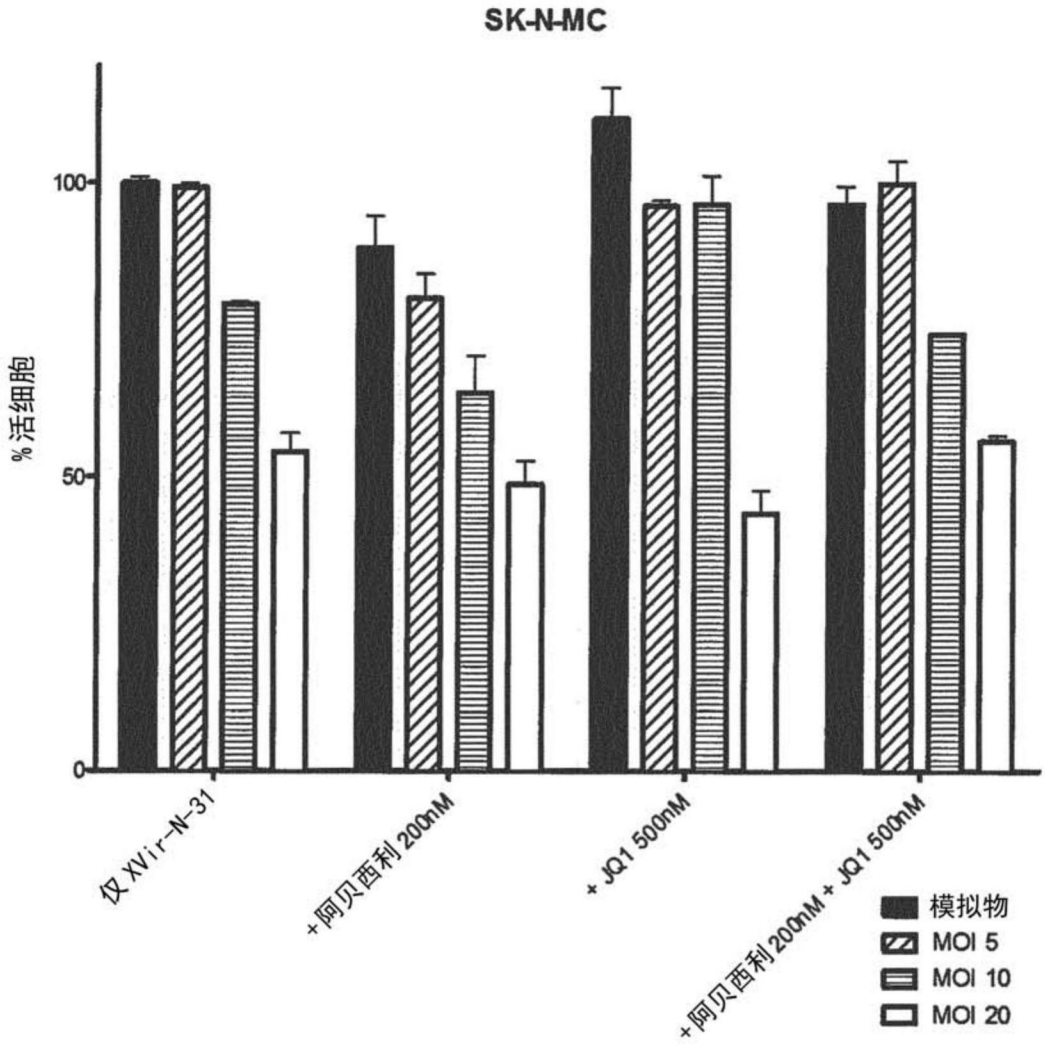

SK-N-MC
% 活细胞
100
50
0
仅 XVir-N-31
+阿贝西利 200nM
+ JQ1 500nM
+阿贝西利 200nM + JQ1 500nM
模拟物
MOI 5
MOI 10
MOI 20

图16

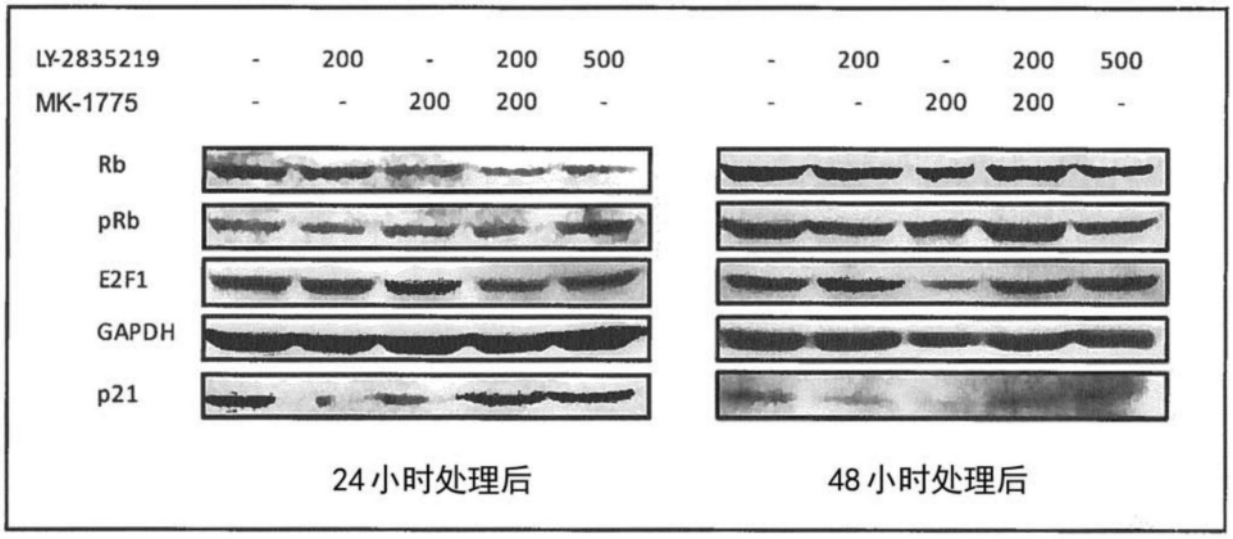

LY-2835219 - 200 - 200 500 - 200 - 200 500
MK-1775 - - 200 200 - - - 200 200 -
Rb
pRb
E2F1
GAPDH
p21
24 小时处理后
48 小时处理后

图17

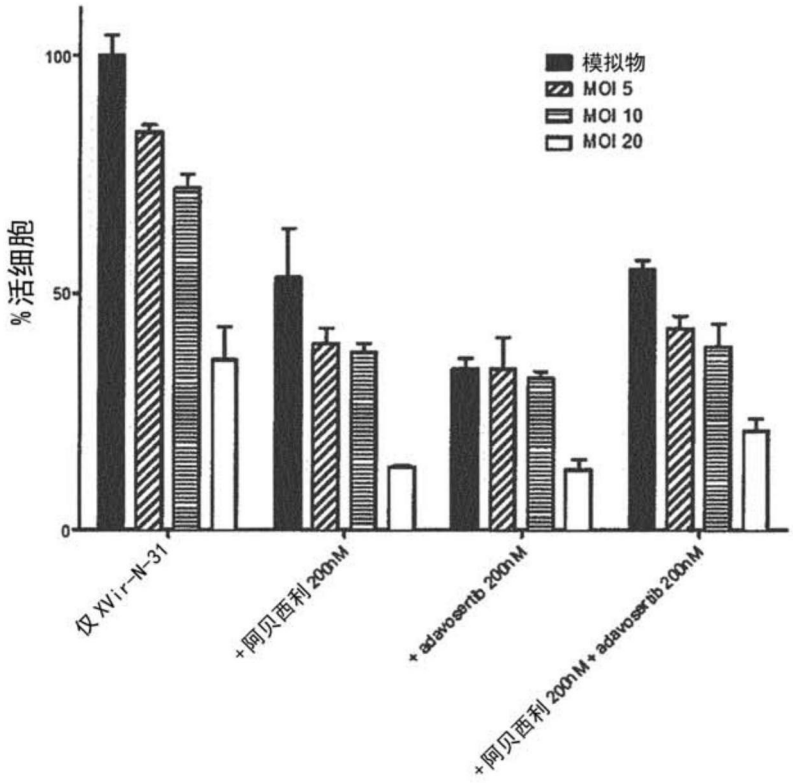

100
50
0
% 活细胞
模拟物
MOI 5
MOI 10
MOI 20
仅 XVir-N-31
+阿贝西利 200nM
+ adavosertib 200nM
+阿贝西利 200nM+ adavosertib 200nM

图18

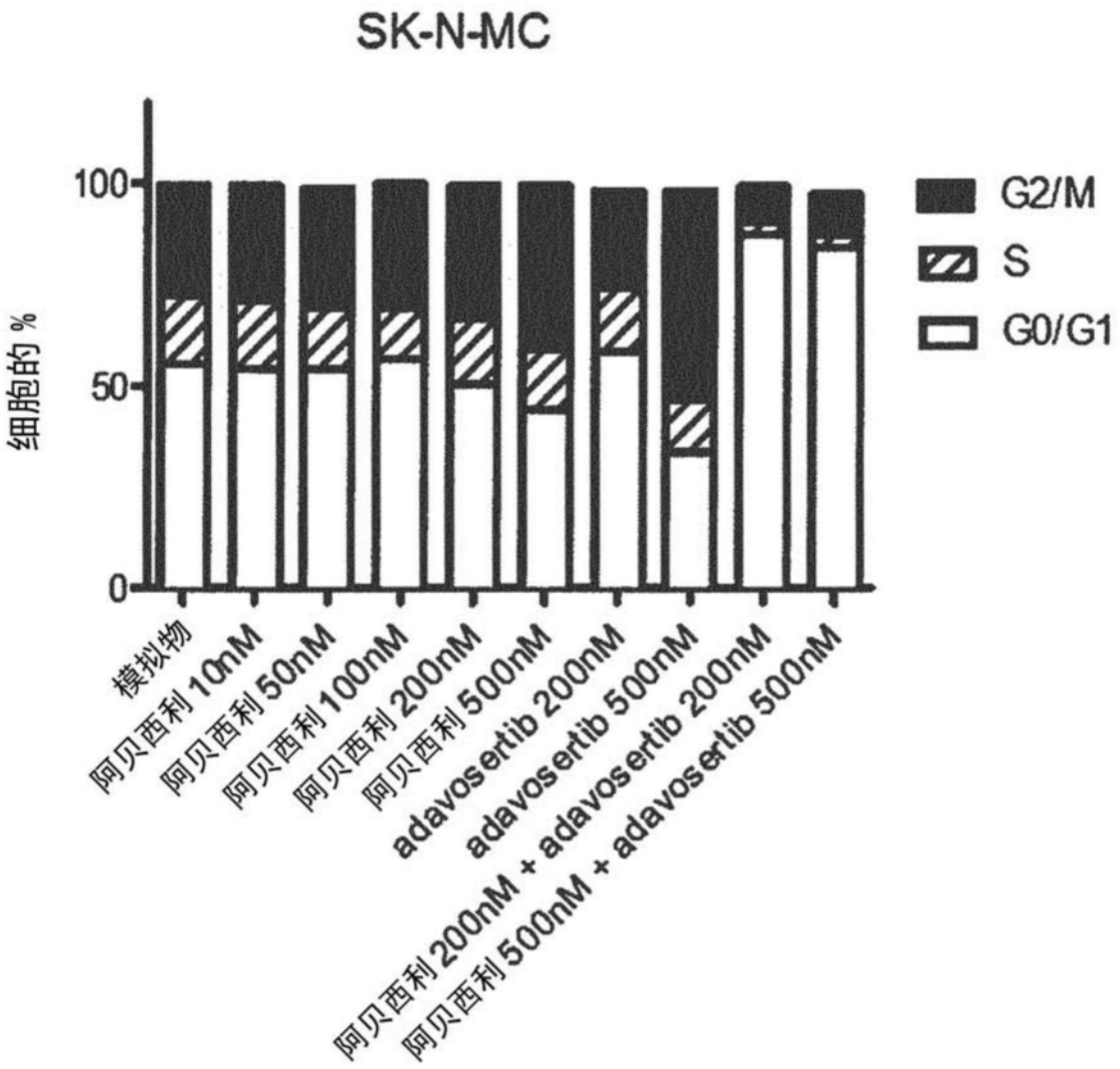

SK-N-MC
细胞的 %
100
50
0
G2/M
S
G0/G1
模拟物
阿贝西利 10nM
阿贝西利 50nM
阿贝西利 100nM
阿贝西利 200nM
阿贝西利 500nM
adavosertib 200nM
adavosertib 500nM
阿贝西利 200nM + adavosertib 200nM
阿贝西利 500nM + adavosertib 500nM

图19

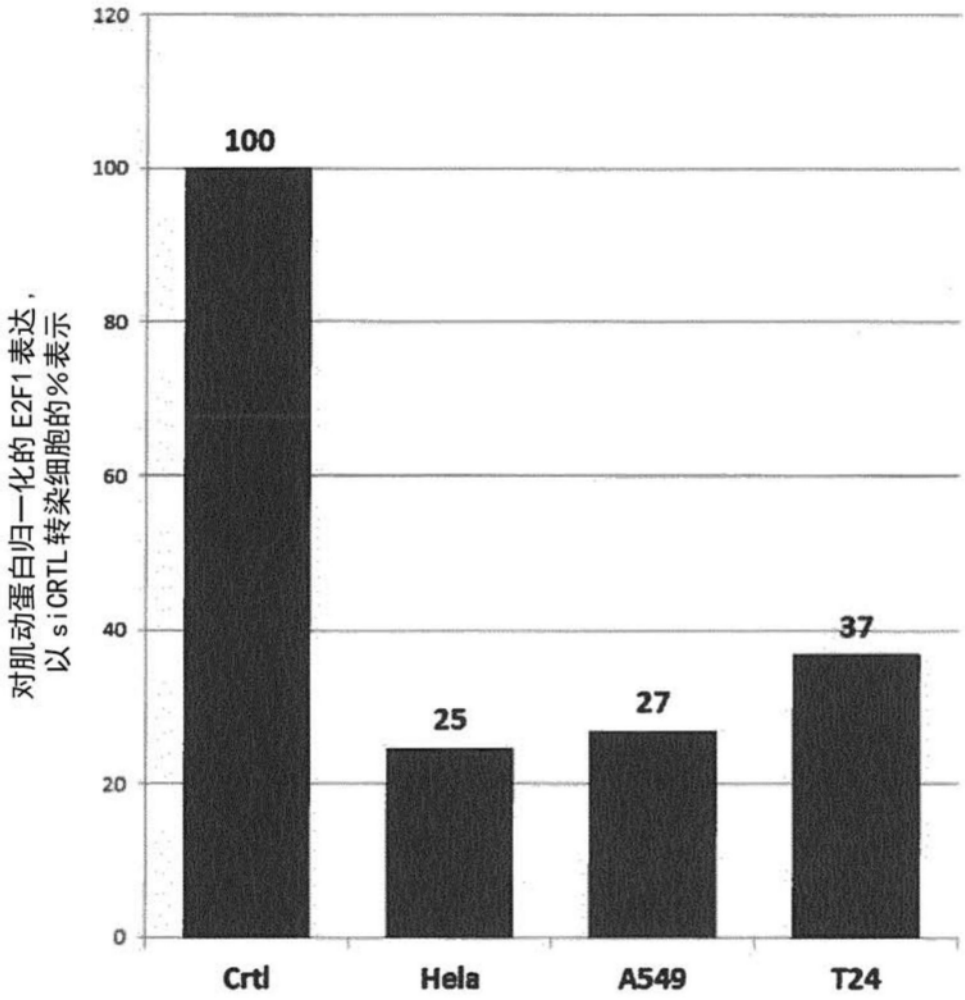

对肌动蛋白归一化的 E2F1 表达，
以 siCRTL 转染细胞的%表示
120
100
80
60
40
20
0
100
25
27
37
Crtl
Hela
A549
T24

图20

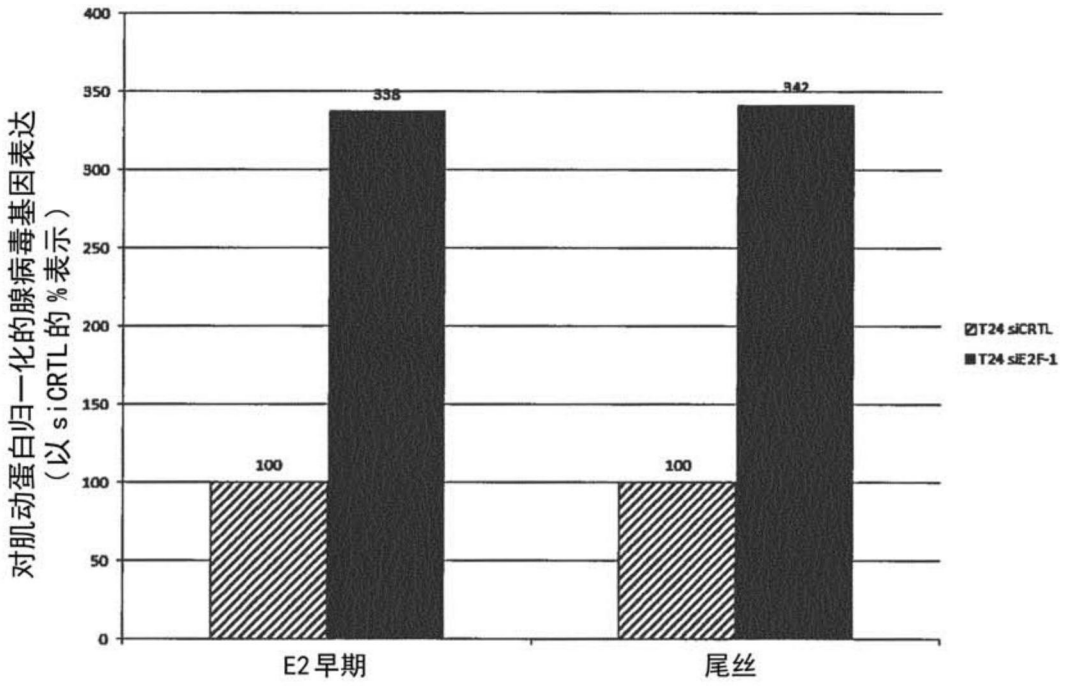


图21

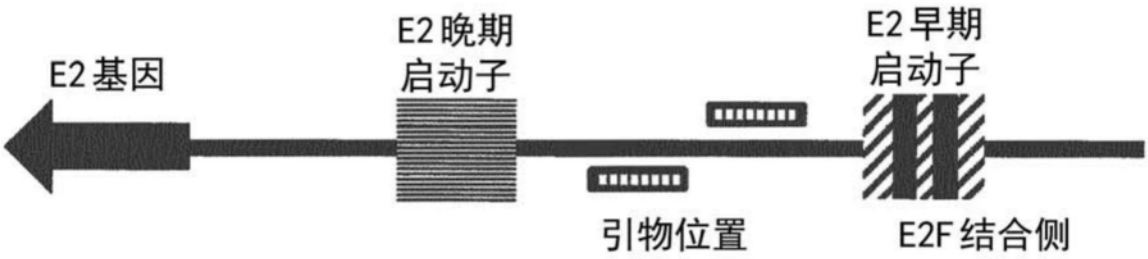


图22

野生型E2早期启动子

5-AG**TTTTCGCGC**TTAAATTTGAGAAAG**GGCGCGAA**ACTAGTCCTT
3-TC**AAAAGCGCG**AATTTAAACTCTTTC**CCGCGCTT**TGATCAGGAA

5-AG**GAGTCGGAT**TTAAATTTGAGAAAG**TAATAGGT**ACTAGTCCTT
3-TC**CTCAGCCTA**AATTTAAACTCTTTC**ATTATCCA**TGATCAGGAA

突变的E2早期启动子

图23

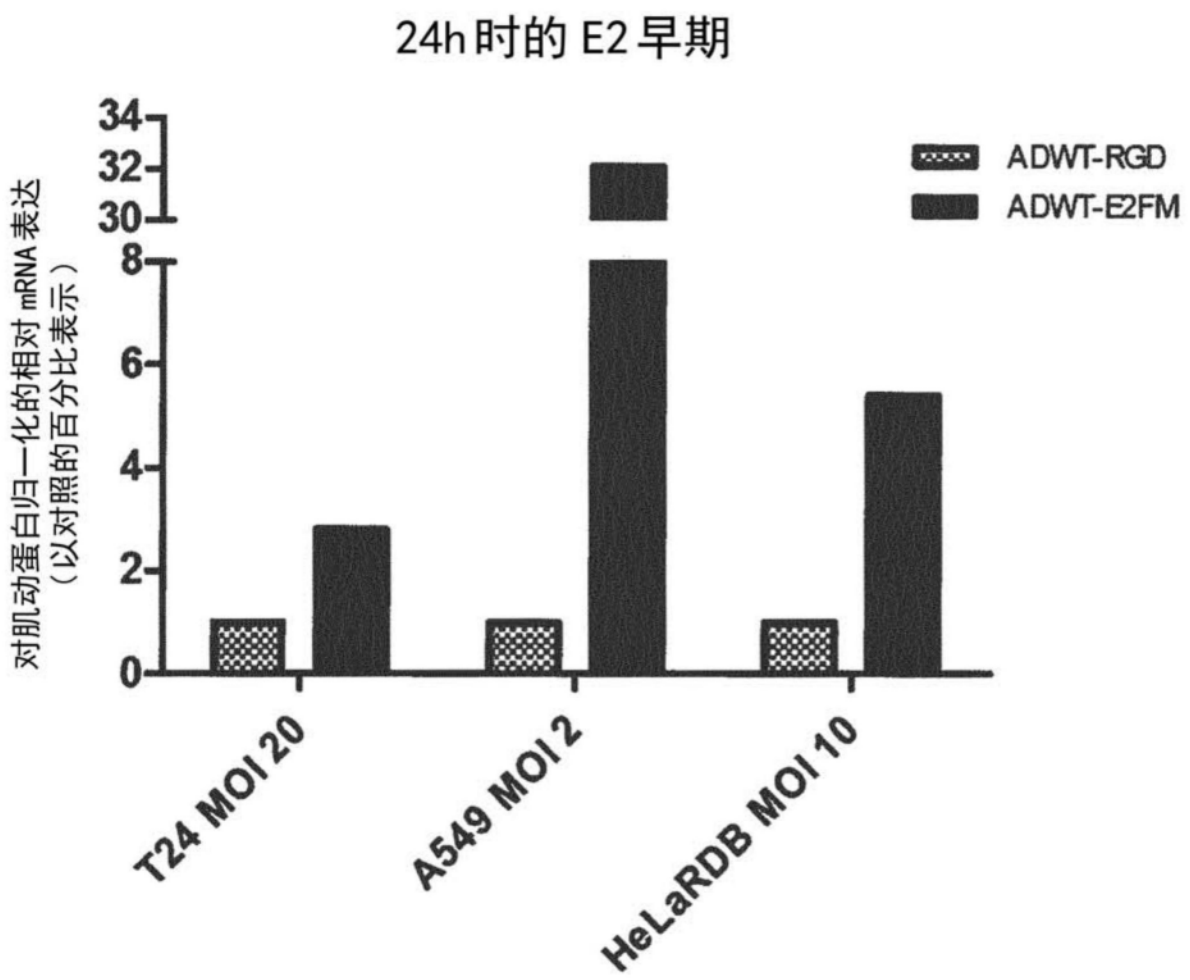
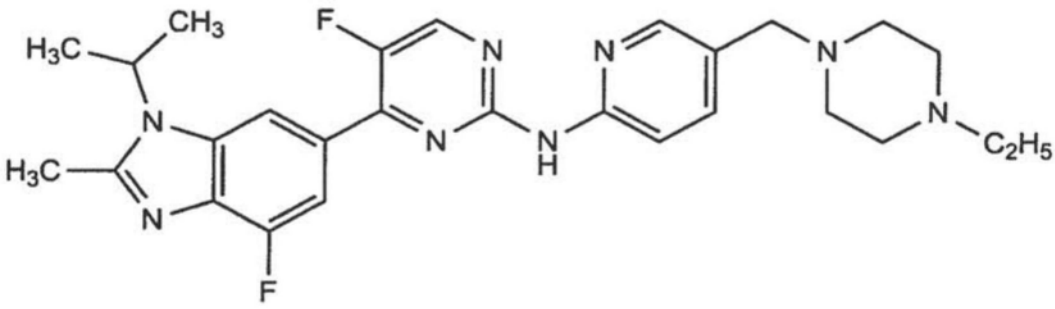
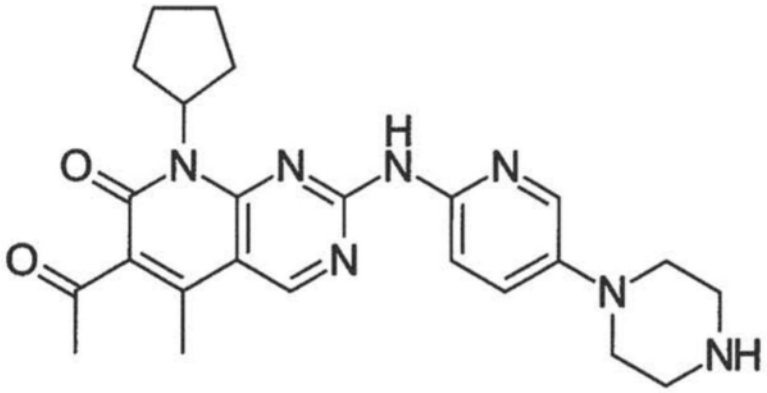

24h时的E2早期
对肌动蛋白归一化的相对mRNA表达
（以对照的百分比表示）
34
32
30
8
6
4
2
0
ADWT-RGD
ADWT-E2FM
T24 MOI 20
A549 MOI 2
HeLaRDB MOI 10

图24

Abemaciclib



帕博西尼



瑞博西尼

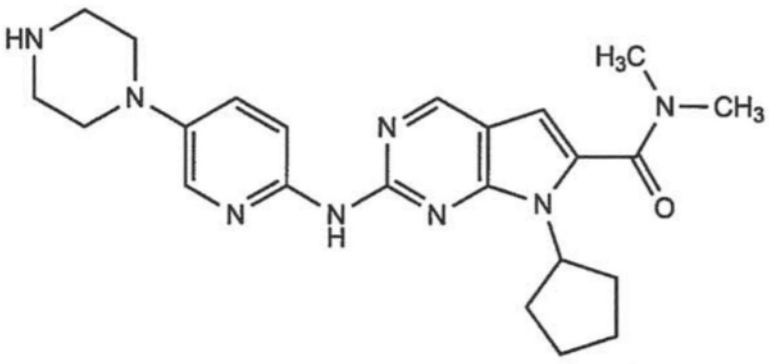


图25

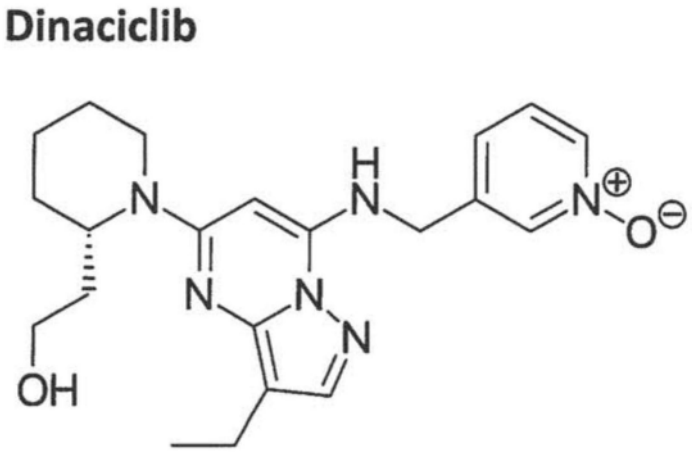
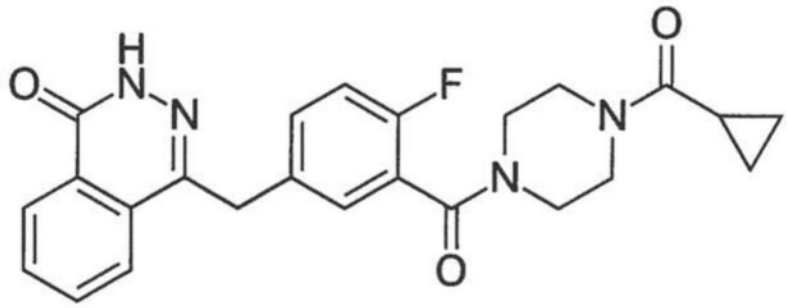
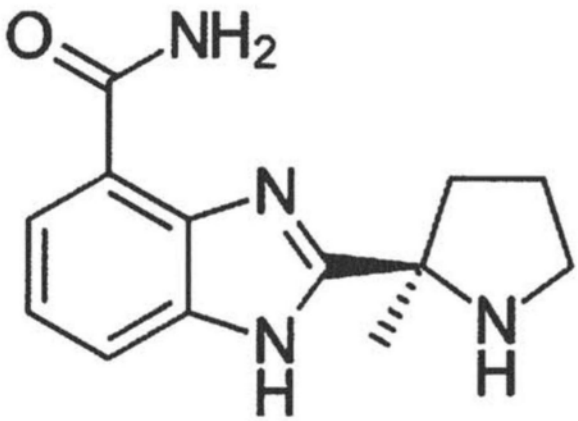


图25(续)

奥拉帕尼



维利帕尼



鲁卡帕尼

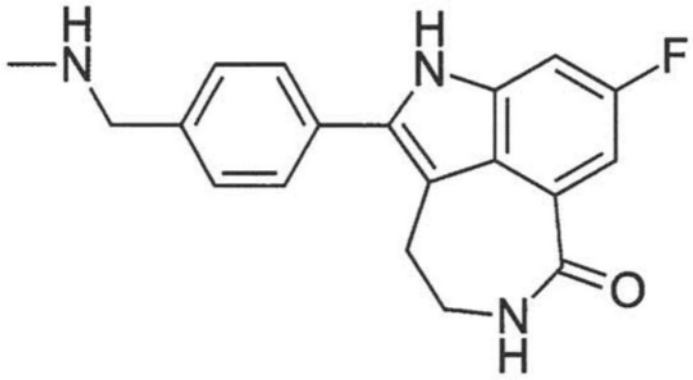
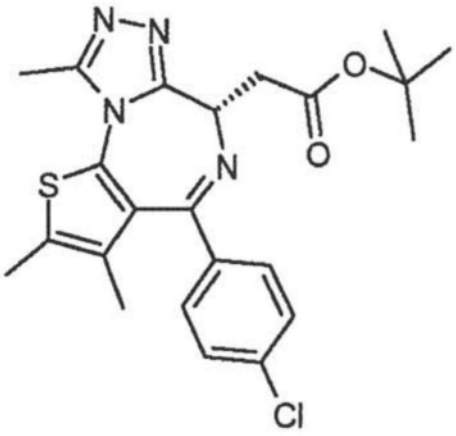


图26

(取自Montserrat Perez-Savia and Manel Esteller: Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structure to applications. EPIGENTCS 2017, 12, 323-339)

JQ1



OTX-015

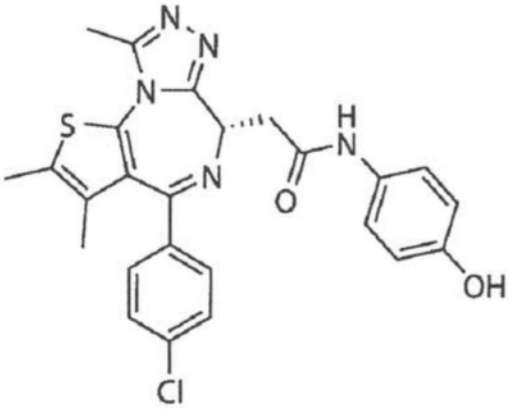
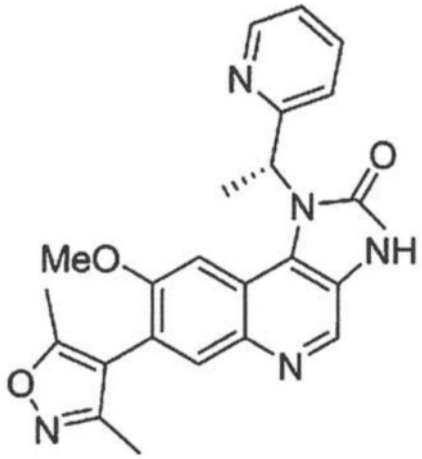


图27

I-BET151



CPI-0610

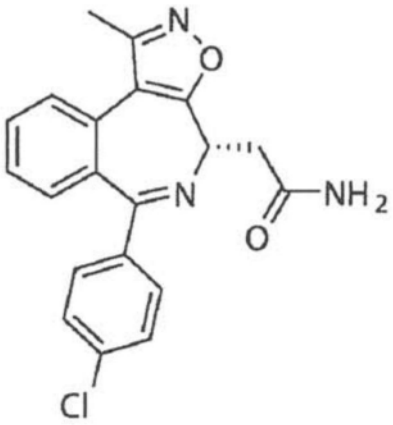


图27(续)

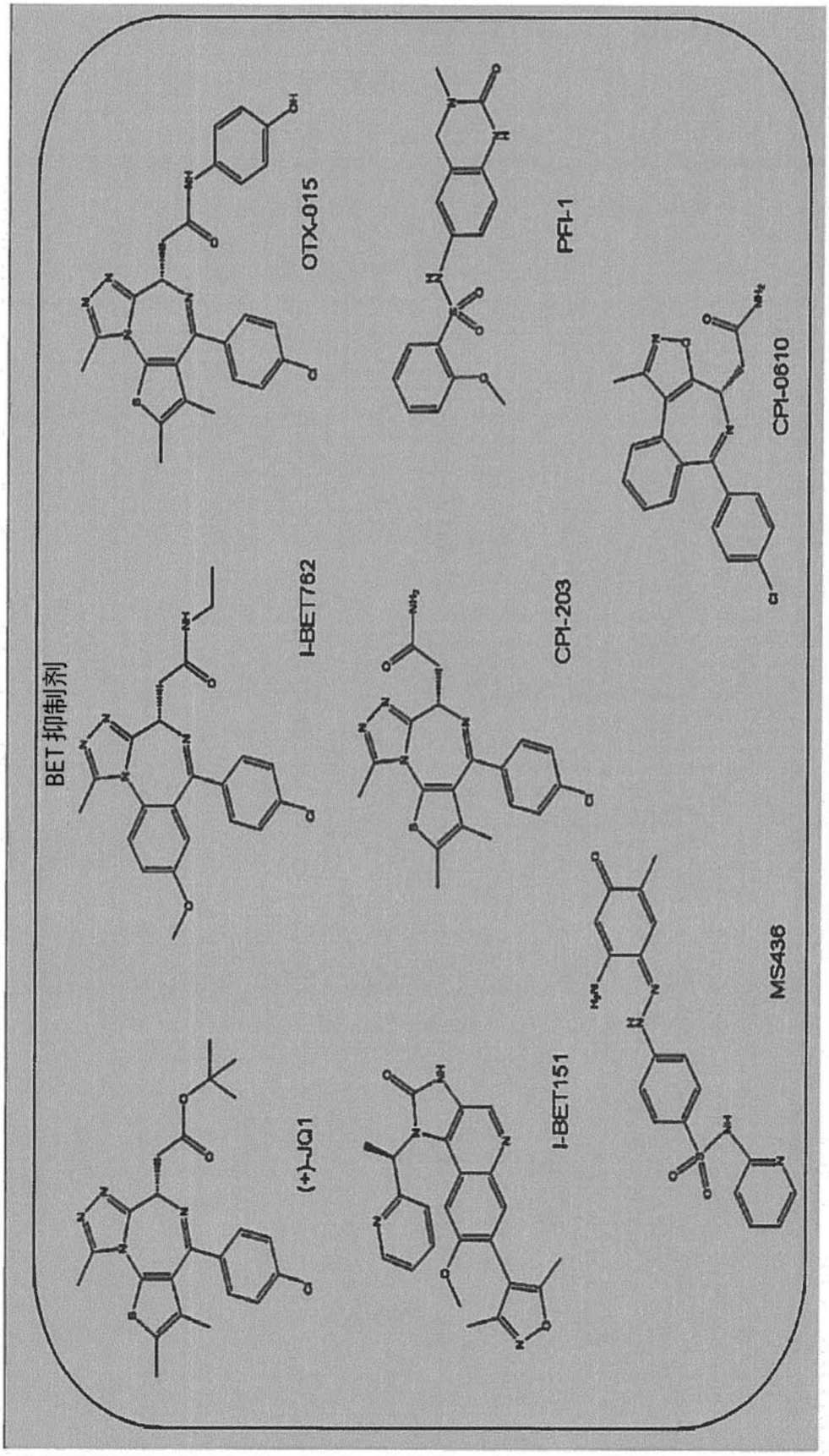

BET 抑制剂
(+)-JQ1
I-BET762
OTX-015
I-BET151
CPI-203
PFI-1
MS436
CPI-0610

图27(续)

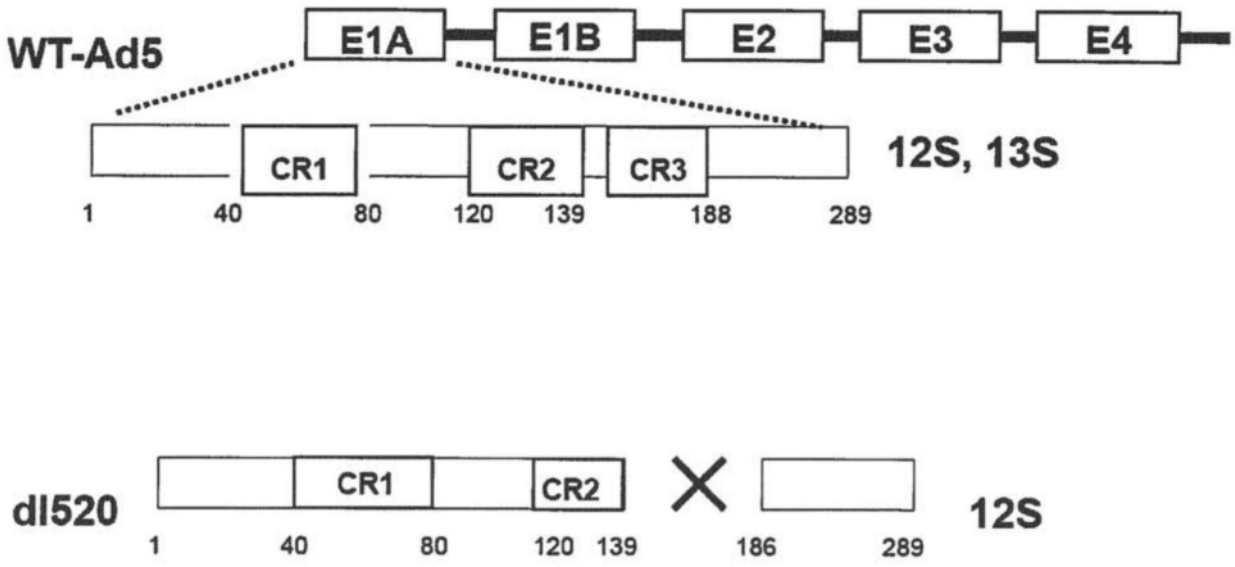

WT-Ad5
E1A
E1B
E2
E3
E4
CR1
CR2
CR3
12S, 13S
1
40
80
120
139
188
289
dl520
CR1
CR2
12S
1
40
80
120
139
186
289

图28

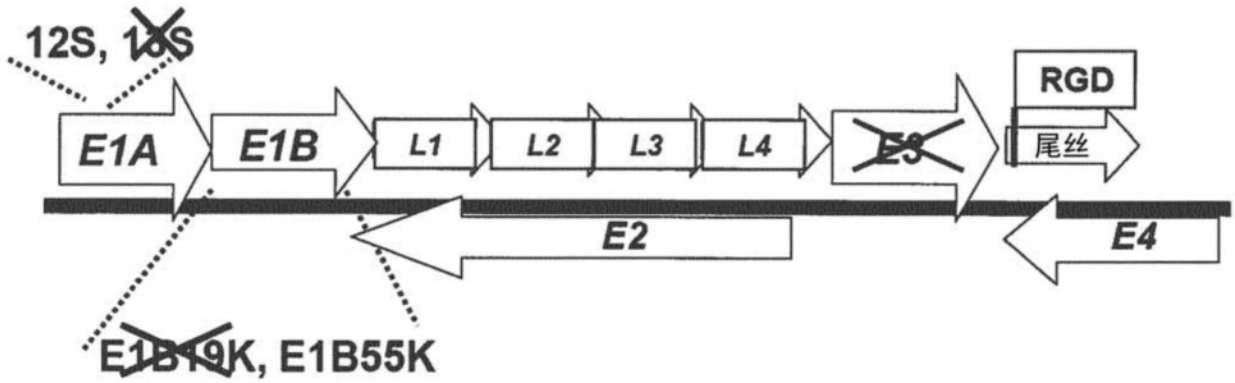

12S, 13S
E1A
E1B
L1
L2
L3
L4
E3
RGD
尾丝
E2
E4
E1B19K, E1B55K

图29

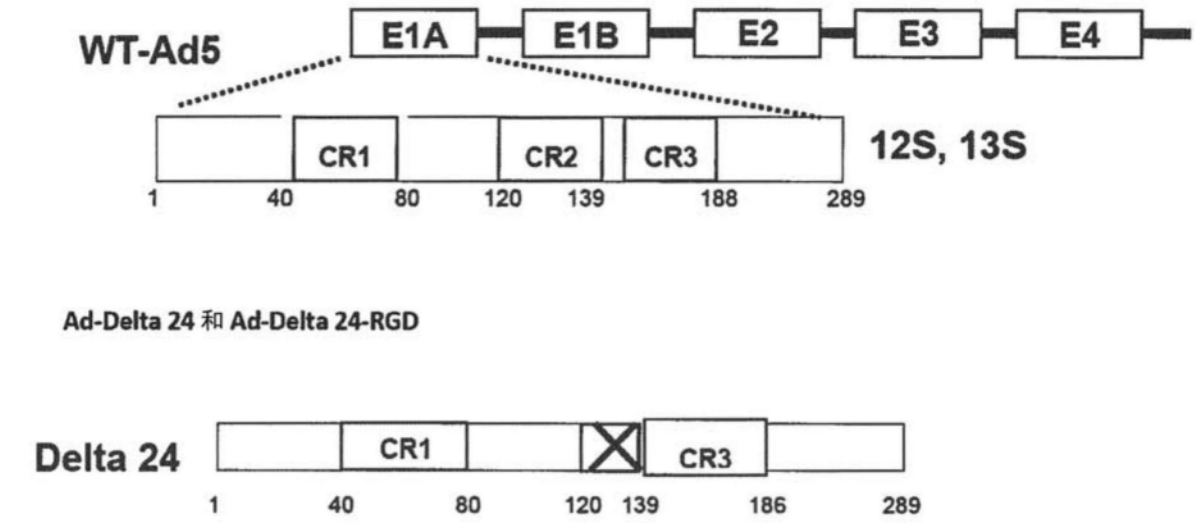

WT-Ad5
E1A
E1B
E2
E3
E4
CR1
CR2
CR3
12S, 13S
1
40
80
120
139
188
289
Ad-Delta 24 和 Ad-Delta 24-RGD
Delta 24
CR1
CR3
1
40
80
120
139
186
289

图30

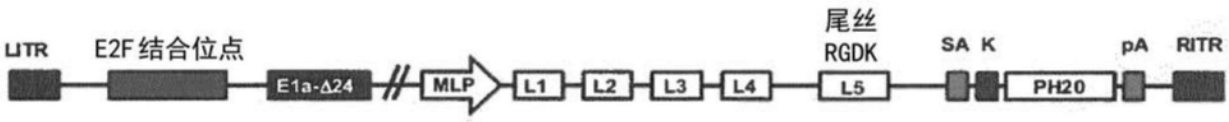

LITR
E2F 结合位点
E1a-Δ24
MLP
L1
L2
L3
L4
尾丝
RGDK
L5
SA
K
PH20
pA
RITR

图31

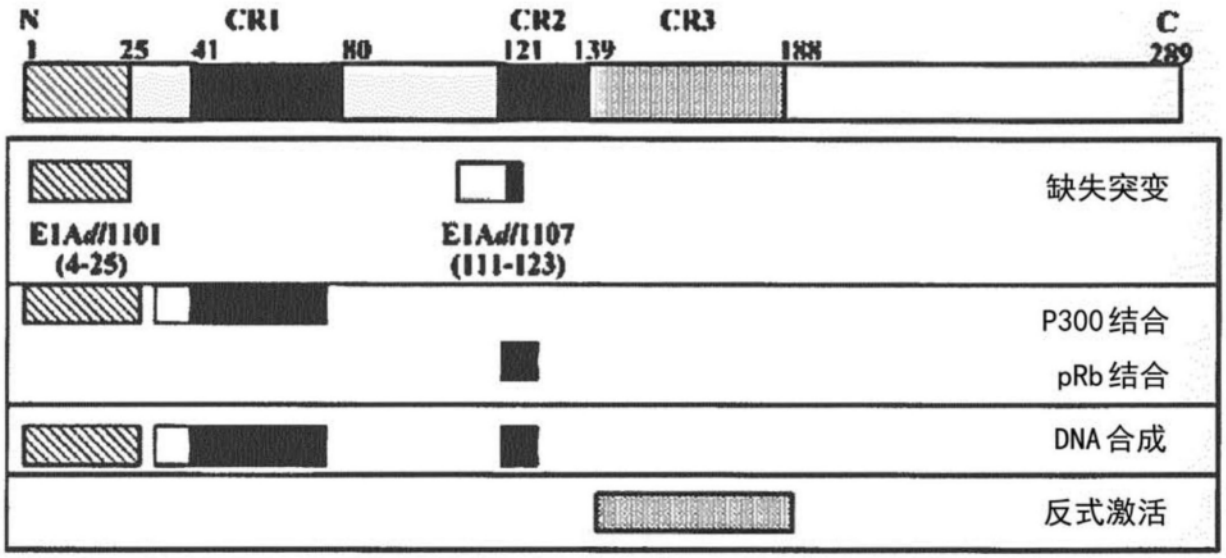

N
CR1
CR2
CR3
C
1
25
41
80
121
139
188
289
缺失突变
E1Adl1101
(4-25)
E1Adl1107
(111-123)
P300 结合
pRb 结合
DNA 合成
反式激活

图32

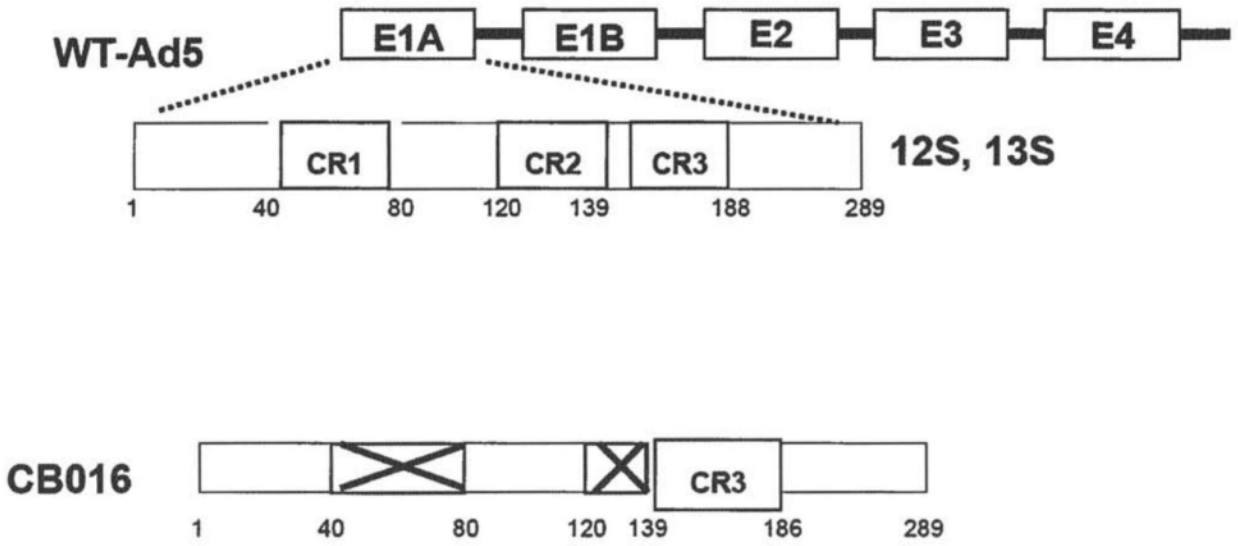

WT-Ad5
E1A
E1B
E2
E3
E4
CR1
CR2
CR3
12S, 13S
1
40
80
120
139
188
289
CB016
CR3
1
40
80
120
139
186
289

图33

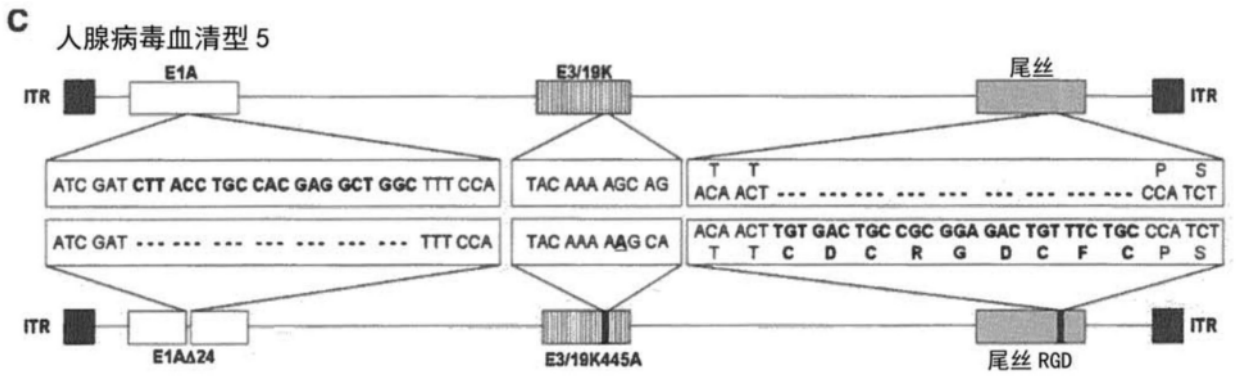

C
人腺病毒血清型 5
ITR
E1A
E3/19K
尾丝
ITR
ATC GAT CTT ACC TGC CAC GAG GCT GGC TTT CCA
TAC AAA AGC AG
T T
P S
ACA ACT --- --- --- --- --- --- --- --- --- CCA TCT
ATC GAT --- --- --- --- --- --- --- --- TTT CCA
TAC AAA AAG CA
ACA ACT TGT GAC TGC CGC GGA GAC TGT TTC TGC CCA TCT
T T C D C R G D C F C P S
ITR
E1AΔ24
E3/19K445A
尾丝 RGD
ITR

图34