



공개특허 10-2021-0054067



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0054067  
(43) 공개일자 2021년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/761* (2014.01) *A61K 38/19* (2006.01)  
*A61K 38/20* (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 35/761* (2013.01)  
*A61K 38/19* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7013679(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년06월12일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2016-7000214  
원출원일자(국제) 2014년06월12일  
심사청구일자 2019년06월03일
- (85) 번역문제출일자 2021년05월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/062284
- (87) 국제공개번호 WO 2014/198852  
국제공개일자 2014년12월18일
- (30) 우선권주장  
1310698.4 2013년06월14일 영국(GB)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
싸이오서스 테라퓨틱스 엘티디.  
영국 오엑스14 3와이에스 옥스퍼드셔 애빙던 바턴  
레인 더 쿼드런트 4-10 싸이오서스 하우스
- (72) 발명자  
비들, 존, 윌리엄  
영국 오엑스14 4에스디 애빙던 옥스포드샤이어 밀  
턴 파크 154비  
피셔, 캐리  
영국 오엑스14 4에스디 애빙던 옥스포드샤이어 밀  
턴 파크 154비 싸이오서스 테라퓨틱스 엘티디.  
윌킨슨 블랭크, 크리스틴  
영국 오엑스14 4에스디 애빙던 옥스포드샤이어 밀  
턴 파크 154비

- (74) 대리인  
특허법인에이아이피

전체 청구항 수 : 총 25 항

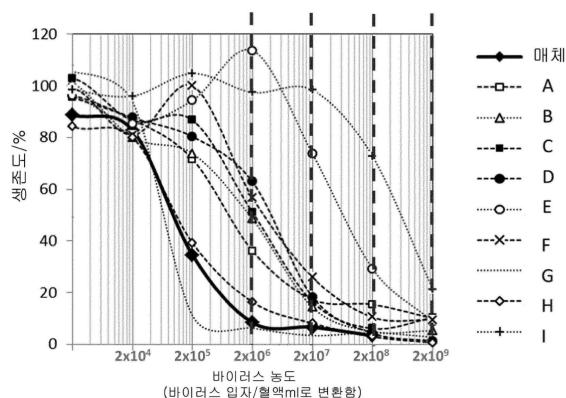
## (54) 발명의 명칭 유형 B 아데노바이러스에 대한 투여 요법 및 제형

**(57) 요약**

본 개시사항은 인간 환자의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 단일 치료 주기에서 하위그룹 B의 복제 가능 종 양용해성 아데노바이러스의 다중 용량의 비경구 제형을 전신으로 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 각각의 용량에 주어진 총 용량은  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 바이러스 입자 범위이고, 각각의 용량의 바이러스가 1분 내지 90분에 걸쳐, 예를 들면 분당  $2 \times 10^{10}$  개의 입자 내지 분당  $2 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 전달 속도로 투여된다. 본 개시사항은 추가로 상기 종양용해성 아데노바이러스의 제형 및 상기 바이러스 및 제형과 다른 치료제와의 병용 요법으로 확대된다.

**대 표 도**

기증자 A-I에 대한 새로운 전체 인간혈액의 존재 하에서의 ColoAd1의 A549 세포에 대한 세포독성 프로파일



(52) CPC특허분류

*A61K 38/2013* (2013.01)  
*A61K 38/212* (2013.01)  
*A61K 38/217* (2013.01)  
*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 45/06* (2013.01)  
*A61K 9/0019* (2013.01)  
*A61K 2300/00* (2013.01)  
*C12N 2710/10032* (2013.01)

---

(30) 우선권주장

1405140.3 2014년03월22일 영국(GB)  
1406509.8 2014년04월10일 영국(GB)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

정맥으로 전신 투여하기 위한 다중 용량의 제형을 치료 주기로 투여함으로써 인간 환자에서 암을 치료하기 위한, 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의 비경구 제형으로,

여기서 투여되는 각 용량은,  $1 \times 10^{10}$  개 내지  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자 범위이고, 그리고

여기서 바이러스의 각 용량은 분당  $2 \times 10^{10}$  개 입자 내지 분당  $6 \times 10^{11}$  개 입자의 범위의 바이러스 전달 속도로 투여되는, 비경구 제형.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 각 투여에서 총 제공 용량은, 용량 당  $1 \times 10^{12}$  개 내지  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자의 범위인, 비경구 제형.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 각 투여에서 총 제공 용량은, 용량 당  $3 \times 10^{12}$  개 내지  $9 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자의 범위인, 비경구 제형.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 각 투여에서 총 제공 용량은 용량 당  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자인, 비경구 제형.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 각 용량의 투여 간의 기간이 6 시간 내지 72 시간의 범위인, 비경구 제형.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 각 용량 투여 간의 기간이 48시간인, 비경구 제형.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 다중 용량이 단일 치료 주기에서 2회 용량, 3회 용량, 4회 용량, 5회 용량, 6회 용량 또는 7회 용량인, 비경구 제형.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 치료 주기가 14일 이하의 기간인, 비경구 제형.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 치료 주기가 7일 또는 5일인, 비경구 제형.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 바이러스의 각 용량은 바이러스 입자의 전달 속도가 분당  $1 \times 10^{11}$  개 바이러스 입자 내지 분당  $3 \times 10^{11}$  개 바이러스 입자의 범위가 되도록 투여되는, 비경구 제형.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 바이러스의 각 용량은, 바이러스 입자의 전달 속도가 분당  $2 \times 10^{11}$  개 바이러스 입자가 되도록 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 용량 당 60분 동안  $1 \times 10^{13}$  개 바이러스 입자가 투여되거나, 용량 당 40분 동안  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자가 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제2 용량 및 임의의 후속 용량의 투여 후 바이러스의 혈장 수준이 1mL 당 적어도  $2 \times 10^6$  개의 바이러스 입자 수준에 도달하는, 비경구 제형.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 바이러스 입자의 혈장 수준이 15분 이상 동안 유지되는, 비경구 제형.

### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 투여되는 제형의 용적이 100mL 이하인, 비경구 제형.

### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 제1 용량이 제1 일에 투여되고, 추가의 치료학적 용량들이 그 후 하루 걸려 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 17

제16항에 있어서, 제1 용량이 제1 일에 투여되고, 추가의 치료학적 용량들이 제3 일 및 제5 일에 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 아데노바이러스가 키메라성 아데노바이러스인, 비경구 제형.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 키메라성 아데노바이러스가 ColoAd1인, 비경구 제형.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 바이러스가 임의의 다른 항암 치료제의 투여와 조합하여 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 바이러스가 하나 이상의 예방적 제제의 투여와 조합하여 투여되는, 비경구 제형.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 하나 이상의 예방적 제제는 해열제, 항구토제, 스테로이드 및 진통제로부터 선택된, 비경구 제형.

### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 종양 치료를 위한, 비경구 제형.

### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 치료 주기의 제1 용량은 상기 주기의 차후 치료에서 투여

되는 용량보다 더 낮은 용량인, 비경구 제형.

## 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 이식유전자를 포함하는, 비경구 제형.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 개시물은 바이러스가 적합한 치료 효과를 가지고/가지거나 생체내 이상 반응을 최소화할 수 있도록 설계된 투여 요법을 이용하는, 예를 들면 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스를 사용하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다. 본 개시물은 또한 본원에 기재된 제형, 상기 제형의 제조 방법 및 치료, 특히 암 치료에서의 이의 용도 까지 확대된다.

### 배경 기술

[0002]

암은 사망의 원인을 초래하는 전세계적으로 심각한 질병이다. 200개 초과의 상이한 유형의 암이 존재하고, 치료의 유형은 암의 유형에 좌우된다. 전형적으로, 치료는 수술, 화학요법 및/또는 방사선요법에 관련될 것이다. 이들 치료는 대개 성공적이지 못하고 단지 부분적으로만 성공적이며 상당한 부작용을 가진다. 암에 대한 5년 생존율은 암의 유형에 좌우되어 5% 미만으로부터 95% 초과 범위이다 (CRUK statistics, 2000-2001). 예를 들면, 2005-2009년 사이에서, 영국에서의 남성 및 여성에서 모든 암의 13%를 차지하는 결장직장 암을 가진 환자는 영국에서 대략 55%의 5년 생존율을 가졌다. 이는 전이성 결장직장 암을 가진 환자에 대해 12%까지 저하된다.

[0003]

전이성 암의 관리는 주로 고식적이며 고식적 수술, 화학요법, 방사선 및 지지 요법의 조합과 관련된다. 임상 결과 예컨대 전체 생존율, 반응 및 독성이 중요하나, 선택적인 결과 예컨대 무진행 생존율, 삶의 질, 편의, 수용 능력 및 환자 선택이 또한 중요하다. 신규한 치료법이 이들 결과를 개선하기 위해 확실히 필요하다.

[0004]

형질전환 과정에서, 암세포는 이를 바이러스 감염에 대해 보다 허용적이게 하는 특정 돌연변이가 이루어진다. 암세포는 또한 호스트 항-종양 활성의 억제를 유도한다. 종양 세포 내에서의 변화 및 국부적 마이크로-환경은 잠재적 취약성을 생성하고 종양이 바이러스에 의한 감염에 노출되게 한다 (Liu 등 2007; Liu 등 2008; Roberts, 2006).

[0005]

자연 바이러스 감염 또는 바이러스 예방접종 후의 일시적인 암 차도의 입증되지 않은 보도로 시작된, 암 치료를 위해 바이러스를 사용한 오랜 이력이 있다. 최초 보도는 광경병을 위해 백신접종된 환자에서의 자궁경부암의 감소에 기인한 1912년인 것으로 보여진다. 유사한 결과가 천연두 예방접종을 받거나, 또는 천연 바이러스 감염 예컨대 불거리 또는 흥역이 뒤따르는 암 환자에게서 보여졌다. 이들 보도 및 동물 데이터에 기초한 암 치료를 위한 환자로의 생 바이러스의 접종은 1940년대 후반 및 1950년대 초반에 개시되어 있다.

[0006]

그러나, 일반적인 시험은 때때로의 일시적 종양 감소 이후, 종양이 재성장하고 환자가 사망하는 것이었다. 이들 접종은 장기-지속되는 완전한 차도를 거의 야기하지 못했다. 1957년에, 생경구 소아마비 백신을 개발한 Albert B. Sabin, M.D.는 하기를 언급하였다, "가장 실망스러운 측면은 바이러스가 종양용해성하고 이것이 종양에 구멍을 내는 경우에도, 바이러스에 대한 개인의 면역 반응은 너무 빨라 그 효과가 급속하게 소진되어 종양이 성장을 지속한다는 사실이다."

[0007]

현 시점에서, 수많은 종양용해성 바이러스가 확인되었으나 현재까지 세상 어디에서도 임상 사용을 위해 승인된 유일한 바이러스는 P53-결핍된 암세포에서 조건적 복제를 가능하게 하는 E1B-55KD 결실에 의해 개질된 Oncorine (H101) 하위그룹 C 아데노바이러스이다 (H101은 1996년에 Bischoff 등에 의해 기재된 ONYX015의 밀접한 유사체임). Oncorine은 두경부암에 대한 종양내 주사에 의해 투여된다.

[0008]

탈리모겐 라히파레벡(talimogene laherparepvec) (Tvec)는 전초기 유전자로서 US11를 발현하고 GM-CSF를 암호화하는, ICP34.5 & ICP47 결실을 수반하는 단순 포진 바이러스 유형-1에 기초한 종양용해성 바이러스이다. OPTiM 시험은 절제 불가능한 단계 III (b-c) 및 단계 IV (M1a-c) 질환을 가진 환자에서의 피하로 투여된 GM-CSF 과 비교하여 종양내 치료로서의 탈리모겐 라히파레벡을 사용한 치료의 효능 및 안정성을 평가하기 위해 설계된, 다중-국가의, 개발 표지, 랜던화 연구이다. 중간 분석시, 탈리모겐 라히파레벡은 GM-CSF를 투여받은 환자에서의 2%와 비교하여 환자의 16%에서 지속적 반응 속도를 유발하였다.

[0009] 현재 개발되는 종양내 투여를 위한 다른 종양용해성 바이러스는 하기를 포함한다 (Sheridan 2013):

- [0011] \* · **Reolysin**, 종양용해성 레오바이러스 혈청형 3 (Dearing strain)
- [0012] · PV701, 종양용해성 뉴캐슬병 바이러스
- [0013] · CG0070, GM-CSF 암호화된 조건적으로 복제가능한 아데노바이러스
- [0014] · **Pexastimogene devacirepvec** (Pexa-Vec, JX-594), GM-CSF 암호화된 티미딘 키나아제-결실된 우두 바이러스
- [0015] · **Cavatak**, 비변형된 콕사키바이러스 A21
- [0016] · **Seprehvir** (HSV1716), ICP34.5 결실을 수반하는 조건적으로 복제가능한 단순 포진 유형 1
- [0017] · DNX-2401, 인테그린-결합 웹타이드가 암호화된 조건적으로 복제가능한 아데노바이러스
- [0018] · CGTG-102, GM-CSF가 암호화된 조건적으로 복제가능한 아데노바이러스

[0019] **ColoAd1**은 키메라성 (Ad11/Ad3) 혈청형 B 아데노바이러스이고, 이는 유도된 진화 공정을 사용하여 발달되고 결장직장 암을 포함하는, 상피성 암 및 그의 전이성 형태의 치료에 적합한 것으로 여겨진다 (Kuhn, I 등 2008).

[0020] 현재까지, 종양용해성 바이러스의 임상 연구는 바이러스의 종양내 주입을 주로 조사하였다. Aghi & Martuza (2005)에 의한 임상 연구의 검토에서, 36개 중 25개의 연구가 바이러스를 투여하기 위한 종양내 주입을 사용하였다. 그러나, 이 방법은 쉽게 접근가능한 종양을 치료하기 위해서만 그리고 종양의 구조체, 예컨대 그 내의 조직 기질 및 괴저성 부분이 종양 내에서 바이러스의 확산을 제한하지 않는 환자에서만 적합하다 (Ries & Korn 2002).

[0021] 암에 의한 사망은 대개 접근불가능한 종양 또는 전이의 결과이다. 종양내로 투여된 종양용해성 바이러스는 이를 2차 종양에 도달하게 하는 종양으로부터의 전신 전파에 의존한다. 그러나, 전파는 일시적인 것이고 대개 비효과적인 것으로 입증되었다 (Ferguson 등 2012).

[0022] 따라서, 종양내 주입은 제한된 수의 암에만 적합하고 예를 들면 많은 전이암의 치료에 적합하지 않다.

[0023] 종양용해성 바이러스의 정맥내 투여가 일반적으로 이용되어 왔고 이는 급성 독성 및 신속한 청소능과 관련된다. 예를 들면, 혼한 콕사키 아데노바이러스 수용체 (CAR)에 의해 이의 흡수가 중재되는 그룹 C 아데노바이러스 Ad5의 경우, 급성 간독성, 인플루엔자 유사 질병 및 혈액학적 변화를 포함하는 부작용이 자주 보고되어 왔고, 한편 급속 간 청소능 및 면역학적 제어가 또한 기재되어 있다.

[0024] 현재 확립된 관점은 효능을 생성하고 유지하기 위해서 반복된 용량이 필요하다는 것이다. 조사 하에서의 모든 종양용해성 암 치료에서, 수주, 수개월 또는 수년에 걸친 반복 투여를 사용하여 치료가 만성적인 것으로 일반적으로 구상된다. 예를 들면, PV701의 경우에서, 한명 이상의 환자에서의 치료는 이전의 치료 주기의 종료시점 및 차후 치료 주기의 개시시점 사이가 제6일 이도록 약 10 개월 동안 주기를 지속하였다.

[0025] Neumanatis 등 (2001)은 암 환자에 대한 최대 24 주간 주기의 ONYX-015의 정맥내 주입의 투여를 보고하였다. 진행 중인 III상 임상 연구 (Clinicaltrials.gov identifier NCT01708993)에서 Reolysin® (종양용해성 레오바이러스)를 제1일 내지 제3일에 1시간 기간 이후 진전될때까지 매 3주에 걸쳐 주입하였다. 최근에 보고된 I상 임상 시험 (Clinicaltrials.gov identifier NCT01380600)에서 JX-594를 매 2주에 4회 정맥내로 투여하였고 2차 진행 중인 I/II상 임상 연구 (Clinicaltrials.gov identifier NCT01394939)에서 JX-594를 5주 동안 매주 정맥내로 그 다음 전이성 결장직장 암을 가진 환자의 간 전이에 대한 최대 3번의 종양내 부스트로 투여하였다. 진행 중인 OPTIM 임상시험에서 탈리모겐 라히파렙벡을 최대 18개월 동안 매 2주 종양내로 투여하였다 (Clinicaltrials.gov identifier NCT00769704).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0026] 발명의 요약

[0027] 본 개시물의 제1 양태에 있어서, 인간 환자의 치료 방법이 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

- [0028] 단일 치료 주기에서 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의 다중 용량의 비경구 제형을 전신으로 투여하는 단계,
- [0029] 여기서, 각각의 투여에 주어진 총 용량은 용량당  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 바이러스 입자 범위이고,
- [0030] 여기서, 각각의 용량의 바이러스가 바이러스 입자 전달 속도가 분당  $2 \times 10^{10}$  개의 입자 내지 분당  $2 \times 10^{12}$  개의 입자 범위이도록 투여된다.

### 과제의 해결 수단

- [0031] 독립적인 양태에 있어서, 본 개시물은 예를 들면 본원에 기재된 투여 요법을 사용하는, 예를 들면 난소암을 가진 환자에 대해 치료적 유효량의 ColoAd1를 투여하는 난소암 치료에서의 사용을 위한 ColoAd1에 관한 것이다.
- [0032] 추가의 독립적인 양태에 있어서, 본 개시물은 종양용해성 유형 B 아데노바이러스, 예컨대 ColoAd1, 및 아데노바이러스 활성, 예컨대 생체내 바이러스 복제를 방해하지 않는 화학치료제를 포함하는 병용 요법에 관한 것이다.
- [0033] 일 구현예에서, 병용 요법은 암, 특히 본원에 기재된 암, 특히 이의 전이성 형태를 포함하는 결장직장 암 또는 난소암을 치료하기 위해 이용된다.
- [0034] 일 구현예에서, 병용 요법에서의 ColoAd1은 본원에 기재된 요법에 따라 투여된다.
- [0035] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 치료를 위한 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의 비경구 제형을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0036] 본 개시물은 또한 본원에 기재된 의약의 제조를 위한 그리고 본원에 기재된 치료를 위한, 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의 비경우 제형의 용도까지 확대된다.
- [0037] 일 양태에서, 또한 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개, 예컨대  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 범위의 단위 용량이 제공된다.
- [0038] 또한, 분당  $2 \times 10^9$  내지  $2 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 (VP), 예를 들면 분당  $1.5 \times 10^{11}$  개의 VP의 바이러스 입자의 투여를 위한 주입 또는 주사 속도를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- 도 1 새로운 전체의 인간 혈액의 존재 하에서의 ColoAd1의 A549 세포에 대한 세포독성 프로파일을 나타냄.
- 도 2 주사 후 24 시간에서 정상 BalbC 마우스에서의 ColoAd1의  $1 \times 10^{11}$  ( $1 \times 10^{11}$ ) 입자의 생체분포.
- 도 3 주사-후 1 시간 및 72 시간에서 CD46 형질전환 마우스에서의 ColoAd1 및 ColoAd1CJ132의 생체분포
- 도 4 65일 동안 후속된 CD46-발현 마우스의 주요 기관 간, 비장 및 폐로부터의 ColoAd1의 청소능 동력학
- 도 5 중화 혈청의 공동-투여를 하거나 하지 않은 마우스에서의 ColoAd1의 동력학
- 도 6 CD-1 마우스에서 전-임상 독성학에서의 제1 및 차후 동등한 치료적 용량 이후 사이토카인 수준
- 도 7a-cColoAd1의 정맥내 투여 이후의 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 사이토카인 수준 (ng/L) (TNF (A), 감마 인터페론 (B) 및 IL6 (C))
- 도 8a 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (게놈 복제/혈액 mL)
- 도 8b 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (게놈 복제/혈액 mL)
- 도 9a (A) 5분에 걸쳐  $1 \times 10^{10}$  ( $1 \times 10^{10}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (게놈 복제/혈액 mL)
- 도 9a (B) 5분에 걸쳐  $1 \times 10^{11}$  ( $1 \times 10^{11}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (게놈 복제/혈액 mL)

**도 9b (C)** 5분에 걸쳐  $1e12$  ( $1 \times 10^{12}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (계놈 복제/혈액 mL)

**도 9b (D)** 5분에 걸쳐  $1e13$  ( $1 \times 10^{13}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (계놈 복제/혈액 mL)

**도 9c (E)** 5분에 걸쳐  $3e12$  ( $3 \times 10^{12}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (계놈 복제/혈액 mL)

**도 9c (F)** 20분에 걸쳐  $3e12$  ( $3 \times 10^{12}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (계놈 복제/혈액 mL)

**도 9d (G)** 40분에 걸쳐  $6e12$  ( $6 \times 10^{12}$ ) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (계놈 복제/혈액 mL)

**도 10** 주입 종료시의 동일한 용량의 더 느린 주입에 따른 더 낮은 cMax 수준 (집단 5 대 6)

**도 11** ColoAd1의 정맥내 투입 후 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 MCP1 수준 (ng/L)

**도 12** 세포에서의 ColoAd1 복제 주기를 나타내는 모식도

**도 13** 바이러스의 시험판내 감염 이후 결직장 세포주에서 핵 염색으로서 나타낸 암세포의 ColoAd1 감염

**도 14 (A)** IT에 의한 ColoAd1의 투여 이후 결장직장 암을 가진 환자로부터의 결직장 조직에서의 ColoAd1의 핵 염색 (핵손 염색)

**도 14 (B)** 도 14a에 대한 아이소타입 대조군 염색

**도 14 (C)** (결장직장 암 환자에 대한 ColoAd1의 IV 투여에 후속하는) 기질 세포에서의 핵 염색 없음을 나타내는 직장 조직 (핵손 염색)

**도 14 (D)** 도 14c에 대한 아이소타입 대조군

**도 15** 바이러스 복제에 대한 이의 영향에 대해 분석된 320개의 화합물 (임상적으로 승인되거나 개발 중인 화합물)

**도 16a-b** 클리탁셀 및 ColoAd1 병용 요법의 효과를 나타내는 생체내 젖과 모델 (및 대조군)

**도 17-18** 젖과 모델에서의 ColoAd1 및 화학요법에 대한 생체내 데이터

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 일 구현예에서 투여된 용량은  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{13}$ , 예컨대  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자(viral particle) 범위이다.

[0041] 일 구현예에서 일회 치료 주기에서 투여되는 총용량은  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  또는  $9 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 범위이다.

[0042] 일 구현예에서, 일회 치료 주기에서 투여되는 총용량은  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자이다.

[0043] 본 발명자들은 효능에 가장 중요할 수 있는 것은 초기 단계, 예를 들면 항-바이러스 면역 반응이 전개되기 이전에 종양 내에 중식적 감염을 확립하는 것이라는 것을 가정하였다.

[0044] 따라서 투여 요법은 환자에게서 독성 및 중증 이상 반응을 야기하지 않으면서 (또는 이들을 최소화하면서), 예를 들면 암세포에서의 바이러스성 감염을 시딩하기에 충분히 긴 기간 동안 바이러스의 충분한 혈장 농도를 발생시키기 위해 충분한 바이러스를 전달하는 것을 균형화해야 한다.

[0045] 본 발명자들은 유형 B 아데노바이러스에 의한 종양의 감염이 정맥내로 투여된 바이러스 입자의 용량으로 확립할 수 있음을 최초로 나타내었다. 암세포가 핵손에 대해 염색되고 또한 PCR에 의해 독립적으로 분석되는 경우에서,

정맥내로의 ColoAd1을 사용한 치료를 받은 결장직장 암을 가진 환자가 암세포의 핵에서의 바이러스 감염을 가진다는 것을 나타내는 이 결론에 대한 증거가 본원에 제공된다. 핵에서의 바이러스는 바이러스의 바이러스 수명 주기가 진행되는 것을 나타내고 환자에서의 바이러스 양에서의 증가는 바이러스가 복제가능함을 나타낸다.

[0046] 종양용해성 아데노바이러스를 환자에게 전신으로 투여하는 경우, 수많은 투여 변수가 고려될 필요가 있다. 이를 투여 변수는, 비체한적으로 하기를 포함한다: 바이러스 투여의 경로, 투여된 바이러스의 용량; 각 용량에 대한 바이러스 투여의 속도; 주어진 주기에서의 각 바이러스 투여 사이의 간격; 치료 주기 당 바이러스 투여의 횟수; 치료 주기 간의 간격; 치료 주기의 횟수; 및 마지막으로 효능을 향상시키거나 부작용을 최소화하기 위해 사용되는 임의의 공동-약제 또는 다른 지원가능 요법. 각각의 투여 변수는 결국 조사 하에서의 종양용해성 바이러스의 유형의 특정한 특징에 좌우된다.

[0047] 주요 파라미터는, 비체한적으로, 하기를 포함한다: 종양 세포 대 비-종양 세포에 대한 바이러스의 임의의 결합의 상대적인 크기 및 결합능; 종양 세포 대 비-종양 세포에서의 바이러스의 상대적인 선택성 및 효력; 세망내피 세포 (예를 들면 간 쿠퍼 세포)에 의한 바이러스의 활성 흡수율 및 청소능 및 바이러스에 대한 혈액 성분의 임의의 특이적 또는 비-특이적 결합.

[0048] 이를 주요 파라미터는 결국 비체한적으로 하기를 포함하는 특정 바이러스 유형의 중요한 물리적 및 표현형 특성에 의해 유도된다: 바이러스의 수용체 특이성; 바이러스 코트 상에 운반되는 전하; 엔필로프의 존재 또는 부재; 바이러스 입자의 크기; 바이러스 입자의 면역원성; 바이러스 입자의 염증성 포텐셜; 바이러스의 종양 특이성; 바이러스의 복제 속도; 및 바이러스의 사멸 능력(killing potency).

[0049] 따라서, 임의의 특정 투여 요법의 적합성은 상이한 유형의 바이러스와 함께 변화될 것이고 가장 적절한 요법은 투여되는 바이러스의 유형에 특이적일 것이다. 예를 들면, Zhang 등 (2012)는 항-종양 활성을 유지하면서 간격리(liver sequestration)를 제거하고, 순환을 향상시키고 독성을 감소시키기 위해 혈액 응고 인자 X와 결합하는 핵손을 감소시키기 위해 생성된 Ad5-Ad48 키메라성 바이러스를 기재하고 있다. 마찬가지로, Shashkova 등 (2009)는 잠재적 항암제로서 조사하는 경우 야생형 인간 아데노바이러스 혈청형 5, 6, 11, 및 35 사이의 유의미한 차이를 기재하고 있다. 따라서, 상이한 바이러스 유형은 인간에 전신으로 투여되는 경우 유의미한 차이로 거동될 것이고 이에 따른 최적 투여 요법은 생체내 데이터 및 바람직한 지지하는 임상 데이터 없이 선형적으로 예상될 수 없는 것으로 예측된다.

[0050] 본원에 기재된 투여 요법은 예를 들면 보다 규칙적으로 간격을 두고 장기간 반복되는 투여의 현재 실시와 비교하는 경우 그룹 B 아데노바이러스에 대해 이를 달성하는 것이 특히 적합할 것이다.

[0051] 따라서 임의의 특정 종양용해성 아데노바이러스에 대한 최적화된 투여 요법의 목적은 부작용 (이상 반응)의 유도 및 항바이러스 면역력 모두 최소화하면서 종양 세포에 대한 바이러스의 전달을 최대화하는 것이고, 이는 요법에 적합하도록 반복 바이러스 투여를 가능하게 하면서 적절한 위험성 유익성 치료 프로파일(risk benefit treatment profile)을 생성하기 위함이다. 따라서 최적화된 투여 요법은 바이러스 유형 간에, 특이적으로는 아데노바이러스 하위유형 간에 바이러스 코트에서의 차이점으로 인해 상이할 것이다.

[0052] 수많은 연구가 하위그룹 C 아데노바이러스인 Ad5에 기초한 선행기술에서 수행되었고, 이의 감염성은 콕사키 아데노바이러스 수용체에 의해 매개된다. 전신으로 전달되는 경우, 90% 초과의 전달된 용량이 간에 의해 흡수된다. 간에 대한 급속하고 광범위한 손실은 종양에 의해 바이러스 흡수를 감소시키고 치료적 효과를 축소시킨다. 이 용량의 거의 대다수는 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 간에서 상주하는 특별한 대식세포인 쿠퍼 세포에 의해 흡수된다. 또한 Ad5는 간독성을 나타내고 쿠퍼 세포의 괴사 및 차후의 결핍을 야기한다.

[0053] Shoshkova 등 2009는 Ad5에 의한 쿠퍼 세포의 결핍이 Ad5 벡터의 후속 전달을 나타내는 간세포 형질도입을 증가시키는 것을 나타내었고, Ad5에 대해 유도된 메카니즘은 하위그룹 B, 예를 들면 Ad11 및 Ad35으로부터의 아데노바이러스와 관련하여 필연적인 것은 아니라는 것을 제시한다. 이에서의 데이터는 하위그룹 C 아데노바이러스가 유사한 방식으로 쿠퍼 세포와 상호작용을 하고, 반면에 하위그룹 B 아데노바이러스는 쿠퍼 세포에 의해 인식되지 않거나 이 세포의 사멸을 야기하지 않는다는 것을 제시한다. 특히, Shoshkova는 Ad11 기저 바이러스를 사용한 예비-투여는 Ad5로서 쿠퍼 세포에 대해 동일한 유익한 효과를 가지지 않는다는 것을 제시한다. 이 논문은 하위그룹 B 아데노바이러스 (Ad11 포함)에 대한 일부 결합이 존재하는 한편 이 영향은 사실상 최소임을 결론짓는다.

[0054] 이론에 구속됨을 원하지 않고, 본 발명자들은 선행기술 제안과 반대로, 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포인 하위그룹 B 아데노바이러스의 청소능에 있어서 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 간주한다.

- [0055] 더욱이, Ad5 혼존에 대한 혈액 응고 인자 X의 결합은 간세포의 감염의 메카니즘이고, 이 메카니즘은 또한 생체 내 다른 아데노바이러스와 관련될 수 있고 (예를 들면 Molecular Therapy vol. 17 no. 10, 1683-1691 October 2009 참조), 그러나 일반적으로 하위그룹 B로부터의 아데노바이러스에 대한 간 흡수의 메카니즘은 아니다.
- [0056] Ad5의 세계적으로 높은 혈청학적 감염률 (인간 집단에서의 높은 Ad5 중화 항체 적정농도) 및 임의의 다른 아데노바이러스 혈청형은 높은 혈청학적 감염률 아데노-기반 요법의 전신 적용에 대해 높은 관련성을 나타내고, 이는 그와 같은 혈액 매개 바이러스가 기존의 항체에 의해 중화될 수 있기 때문이다 (Vogels et al Journal of Virology, Aug 2003 Vol 77, No. 15 page 8263-8271).
- [0057] 하위그룹 B 아데노바이러스는 이들이 더 낮은 혈청학적 감염률과 관련되고 (Stone et al Journal of Virology 2005 Vol 79 No. 8 page 5090-5104) 더 낮은 염증성 포텐셜을 갖기 때문에 이러한 점에서 임의의 고유한 장점을 가진다. 따라서 초기 투여는 예를 들면 Ad5를 사용하는 것보다 훨씬 더 효율적일 수 있다. 그러나, 전신 전달 이후 면역계를 회피하는 능력은 반복 투여와 함께 문제화될 수 있다. 따라서, 암에 의한 면역계의 국소 억제와 함께, 면역계의 회피는 여전히 가능하게는 하위그룹 B 아데노바이러스에 기초하는 종양용해성 바이러스 요법의 장기 성공에 대한 가장 큰 장애물이다.
- [0058] 본 발명자들에 의해 생성된 데이터는 하위그룹 B의 종양용해성 아데노바이러스의 치료 효과가 이에 따라 개선될 수 있고/있거나 면역계에 의한 아데노바이러스의 중화의 제거가 적절한 투여 요법을 사용함으로써 최소화될 수 있다는 점을 지지한다.
- [0059] 일 구현예에서, 본원에서의 투여 요법은 또한 부작용, 예를 들면 독감 유사 증상 및 염증성 반응을 최소화할 것이다.
- [0060] 일 구현예에서, 복제 가능 아데노바이러스는 특이적 항-바이러스 면역 반응이 전개되기 전에 초기 "투여 윈도우" 과정에서 반복적으로 투여되고, 이후 투여 윈도우는 특이적 항-바이러스 면역 반응이 한번 더 약해지는 경우 다시 이용될 것이다. 즉, 단기간에서의 다수의 치료가 후속 치료 주기를 시작하기 이전 기간에 후속된다.
- [0061] 유익하게는, 복제 가능 아데노바이러스를 그와 같은 방식으로 투여함으로써, 바이러스 혈액 수준은 종양 내에 자가-증식 감염 (이는 면역억제 환경으로 알려져 있음)을 확립하기에 충분하고, 그렇게 함으로써 잠재적으로 종양용해성 바이러스의 만성적 반복 투여에 대한 필요성이 회피된다. 종양 내에 자가-증식 감염을 확립하기 위해서, 이상 반응을 초래함 없이 가능한 오랫동안 효과적인 감염 농도 초과의 수준으로 환자의 혈류 내에 바이러스의 수준을 유지하는 것이 유리하다. 이러한 개념은 바이러스에 대한 치료 윈도우, 즉, 치료 효과가 최적화되고 부작용이 최소화되는 용량 범위 또는 투여 요법을 확인하는 것과 유사하다.
- [0062] 이것은 투여되는 바이러스의 용량 및 주입 속도 모두를 최적화함으로써 달성될 수 있다. 일 구현예에서, 바이러스의 주입 속도는 신체에 의한 바이러스의 청소능 속도와 동일하거나 더 크다.
- [0063] 종양 내부에 감염이 확립되는 경우, 바이러스는 상대적으로 중화 항체로부터 보호되고 용량 제한 독성 없이 치료 효과를 반복하고 생성하기 위한 잠재적으로 허용된 환경을 제공한다.
- [0064] 또한, 본 발명자들은 바이러스 농도 ( $C_{max}$ )에서의 피크가 부작용에 기여하고, 플래터 약리적 프로파일 (flatter pharmacological profile)이 바람직할 것이라는 것을 가정한다.
- [0065] 일 구현예에서,  $C_{max}$ 는 특정 값, 예를 들면  $3 \times 10^8$  DNA 복제/mL 미만으로 유지된다. 이는 관련된 역치 초과의  $C_{max}$  수준가 일부 환자에서 심각한 이상 반응 또는 독성을 유도하기 더 쉽다는 것을 나타낸다.
- [0066] 일 구현예에서, 주입 속도는 투여된 바이러스의 절대적인 양 보다 더 큰 영향을 준다.
- [0067] 임상에서 생성된 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 또한 바이러스가 청소능 속도 및 환자에서의 심각한 이상 반응을 유도함 없이 장기간 예컨대 최대 72 시간 이상에 걸친 분당 최대  $1.5$  내지  $2 \times 10^{11}$  개의 바이러스 입자 (전달된 바이러스의 총용량은  $6 \times 10^{12}$  개 초과 바이러스 입자임) 초과로 전달될 수 있다고 간주한다.
- [0068] 일 구현예에서, 혈액 내의 바이러스 계수의  $C_{max}$ 는  $3 \times 10^8$  계수/mL 미만의 수준에서 유지된다.
- [0069] 본 발명자들은 수많은 시나리오에서 바이러스의 청소능의 초기 속도를 평가하였고 추정되는  $\alpha$ -반감기가 18분 부근으로 간주하였다.

- [0070] 종양용해성 바이러스 요법 과정에서의 예방적 항-염증제의 사용은 논란이 많다. 한편, 이의 용도가 이상 반응을 최소화할 수 있고 이에 따라 종양용해성 뉴캐슬병 바이러스의 내성을 향상시킬 수 있다는 것이 제안되었다 (Lorenz 등 2007). 다른 한편으로, 열병의 발생은 아데노바이러스에 대한 증대된 종양용해성 효능과 연관될 수 있음이 보고되었다 (Yu 등 2007).
- [0071] 본 발명자들은 이 치료 주기 과정에서 투여된 예방적 또는 치료제 (항-염증제, 스테로이드, 항구토제, 설사 또는 진통제 포함)의 사용은 이 요법의 허용도를 향상시키고, 특히 더 높은 또는 더 빈번한 투여를 가능하게 할 수 있다는 것을 밝혀내었다.
- [0072] 일 구현예에서, 스테로이드가 치료 주기 동안 투여된다.
- [0073] 따라서, 본 발명자들은 개별적이거나 조합하여 사용되는 6개의 파라미터가 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스의 적절한 전달의 목적을 달성하기에 중요하다는 것을 가정하였다:
- 각 용량으로 투여된 바이러스 입자의 수,
  - 각 바이러스 용량이 투여되는 속도 (분당 전달되는 바이러스 입자의 수),
  - 치료 주기에서의 바이러스의 개별적 투여의 횟수,
  - 치료 주기 내의 각 개별적 투여 간의 간격,
  - 치료 주기 과정에서의 항-염증성 의약의 사용, 및
  - 치료 주기 사이의 기간
- [0079] 이들 파라미터는 서로 균형화될 수 있고, 즉 증가된 용량은 증가의 부정적 효과를 상쇄하기 위해 더 낮은 주입 속도로 주어질 수 있다.
- [0080] 용량이 너무 낮은 경우, 이후 바이러스 입자의 수준이 암세포의 효과적인 감염을 확립하기에 충분하지 않다. 투여의 속도가 너무 느린 경우, 이후 바이러스 입자는 천연 바이러스 싱크(sink) (예를 들면 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 간 쿠퍼 세포 또는 혈액 성분)에 의해 용이하게 청소될 수 있고 암/종양 세포의 효과적인 감염이 달성되지 않는다. 바이러스 용량이 너무 높은 경우 및/또는 투여 속도가 너무 빠른 경우, 이후 이상 반응의 수는 고농도의 바이러스 입자 때문에 증가될 수 있다. 후자는 이후 염증성 사이토카인 반응을 유도하고, 이는 환자가 겪는 부작용을 증가시킬 수 있다. 따라서 중간 정도의 주입 속도가 전달되는 용량을 최적화할 수 있다.
- [0081] 평균적으로, 유형 B 아데노바이러스 예컨대 ColoAd1의 청소능 속도는 약 18분의 α-반감기를 가진다.
- [0082] 바이러스의 단회 용량은 감염을 확립하는데 실패할 수 있으나, 바이러스 싱크(viral sink) (예를 들면 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 간 쿠퍼 세포 또는 혈액 성분)을 적절하게 점거되거나 제거할 수 있다. 바이러스 싱크가 적절하게 점거되거나 제거되는 경우, 및 차후의 용량이 그 후에 곧 투여되는 경우, 바이러스 동력학은 더 긴 순환 반감기 및/또는 더 높은 피크 혈장 수준으로 이후 용량에 대해 변경될 수 있다. 이 경우, 제1 용량 바로 직후 투여된 하나 이상의 용량은 보다 효과적으로 암 세포의 효과적인 감염을 확립할 수 있다.
- [0083] 그러나, 후속 용량이 더 떨어져 (예를 들면 14일보다 더 길게 떨어져) 투여되는 경우, 이후 바이러스 싱크는 보충될 수 있는 시간을 가질 수 있고 앞선 용량의 이점이 상실될 수 있고/있거나 특이적 항-바이러스 면역 반응이 진행될 수 있다. 예를 들면 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 투여 요법의 형태를 갖는 간 쿠퍼 세포의 결핍은 사이토카인 방출을 중재하는 쿠퍼가 후속 바이러스 투여시 크게 감소되어 이러한 투여가 더 높은 바이러스 혈장 수준에도 불구하고 보다 더 허용될 수 있는 중요한 2차 이점을 가질 수 있다.
- [0084] 따라서, 본 발명자들은 예를 들면 하기에 기재된 바와 같은 상대적으로 짧은 기간에 걸쳐 특정 치료 주기의 투여를 지지한다.
- [0085] 본 발명자들에 의해 완료된 연구로부터, 상대적으로 짧은 기간에 걸쳐 투여된 각각의 용량으로, 중간 정도의 빠른 주입으로 투여된 각각의 용량으로, 임의로 예방적 제제와 조합하여 그리고 상대적으로 짧은 기간으로 분리된 각각의 용량으로 치료 주기에서의 그룹 B 아데노바이러스 다중 용량이 최소 독성을 가진 종양용해성 유형 B 아데노바이러스로 암세포를 감염시키기 적합하다는 것을 나타낸다.
- [0086] 치료 주기는 요구되는 바와 같이 반복될 수 있다.

- [0088] 본 발명자들은 급성 독성의 마커로서 염증성 사이토카인 TNF, 감마 인터페론, IL-6 및 MCP-1을 모니터링하였고, 제2 또는 후속 용량에 의해 각 경우에서 암 세포를 감염시키기 위한 바이러스에 대한 감소된 독성 및 증가된 포텐셜이 존재하는 것으로 간주하였고, 이는 비-암성 바이러스 싱크가 이 용량이 적절한 용량 수준, 속도 및 빈도로 투여되는 경우 제1 및 제2 용량 모두에 의해 제거되거나 점거되기 때문이다.
- [0089] 일 구현예에서, 3회 용량이 치료 주기에서 사용되고, 추가 구현예에서 3회 초과의 용량이 치료 주기에 사용된다.
- [0090] 일 구현예에서, 제1, 제3, 제5, 제14, 및 제21일 중 임의의 날 또는 모든 날에 일 용량이 투여된다.
- [0091] 다른 구현예에서, 후속 용량이 유지 또는 증가 용량으로서, 예를 들면 격주, 매주, 매2주당, 또는 매3주당 일회, 예컨대 매주 또는 매3주, 적합한 기간 동안, 특히 치료가 유지 요법으로서 환자에게 유리하면서, 예를 들면 환자가 차도를 유지하도록 투여된다.
- [0092] 숙련된 당업자는 치료 주기에 대한 다양한 변형이 개별 환자의 필요에 따라 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.
- [0093] 본 개시물은 또한 적어도 하나의 용량, 예컨대 단일 치료 주기에서 아데노바이러스를 포함하는 비경구 제형의 복수 용량을 전신으로 투여함으로써 인간 환자의 치료에 사용하기 위한 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스까지 확대되고, 여기서 각 투여에서 주어진 총용량은  $1 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{12}$ , 예를 들면  $1 \times 10^{10}$  내지  $5 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 범위이고, 1분 내지 90분의 기간에 걸쳐 투여된다.
- [0094] 추가 양태에 있어서, 본 개시물은 단일 치료 주기에서 아데노바이러스를 포함하는 비경구 제형의 다중 용량을 전신으로 투여함으로써 인간 환자의 치료에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의 용도까지 확대되고, 여기서 각 용량에 주어진 총용량은  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{13}$  예를 들면  $1 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{12}$ , 예컨대  $1 \times 10^{10}$  내지  $5 \times 10^{12}$ , 또는  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 범위이고, 1분 내지 90분의 기간에 걸쳐 투여된다.
- [0095] 일 구현예에서, 주어진 사이클의 치료에서의 제1 용량은 사이클의 차후 치료에서 투여되는 용량보다 더 낮은 용량이다.
- [0096] Shoshkova가 제시한 것과 반대로, 마우스에서의 연구를 기초하여, Ad11 기반 바이러스를 사용한 예비-투여는 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포에 대한 유리한 점화 효과를 가지지 못한다는 것을 나타낸다. 사실상, 용량의 최적화 및 그룹 B 종양용해성 아데노바이러스 용량의 투여 간의 시기선택이 부작용을 최소화하기에 이용되고 이에 따라 유리할 수 있다.
- [0097] 일 구현예에서, 투여된 용량은 예를 들면 20 내지 60 분의 기간, 예컨대 40 분에 걸쳐  $6 \times 10^{12}$  개이다.
- [0098] 일 구현예에서, 높은 제1 및 제2 용량 (즉, 이는 평균 치료 용량에 해당될 수 있음)은 사이토카인 생성 선천적 면역 세포, 예컨대 쿠퍼 세포 (및/또는 다른 바이러스 싱크)를 완전히 점거하고, 이에 따라 후속 용량에 대한 전달을 최적화하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 방식으로는, 제1 및 제2 용량은 동일할 수 있다.
- [0099] 일 구현예에서, 투여된 모든 용량은 동등한 수의 바이러스 입자를 함유한다. 이는 바이러스 제형의 제조를 단순화하고 투여 착오의 위험성을 감소하는데 있어서 특히 유리할 수 있고, 사실상 매우 효과적인 치료 요법을 제공할 수 있다.
- [0100] 일 구현예에서, 치료의 후속 주기는 이전 치료 주기의 완료 이후 1 개월 내지 6 개월, 예를 들면 그 후 2, 3, 4, 5 개월에 면역 반응이 약해지게 하기 위해 제공된다.
- [0101] 일 구현예에서, 후속 주기는 1 개월 내지 5 년의 기간 동안, 예컨대 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 또는 36 개월 동안 매주 또는 주2회 투여되는 단회 용량일 수 있다.
- [0102] 일 구현예에서, 후속 치료 주기는 제1 치료 주기에서 마지막 용량의 투여의 약 14일 이내에 개시된다.
- [0103] 후속 주기는 또한 유지 용량으로서 작용할 수 있고, 이에 의해 치료 효과를 제공하기에 충분한 수준으로 바이러스 양을 유지하는데 도움이 된다.
- [0104] 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 후속 치료 주기, 예를 들면 1 또는 2의 후속 치료 주기가 존재한다.

- [0105] 일 구현예에서, 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스 (예컨대 ColoAd1)의 주입 또는 주사를 위한 액체 비경구 제형이 제공되고, 여기서 상기 제형은 용량의 용적당  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 바이러스 입자 범위, 예컨대 용량당  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자의 용량을 제공한다.
- [0106] 또한, 예를 들면 본원에 기재된 용량, 예컨대 용량당  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자를 함유하는, 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스를 포함하는 본 개시물에 따른 비경구 제형을 투여함으로써 환자의 치료 방법을 개시한다.
- [0107] 또한, 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스를 포함하는 본 개시물에 따른 비경구 제형을 투여함으로써 환자의 치료 방법을 개시하고 있고, 상기 방법은 항-염증성, 스테로이드, 항히스타민제, 해열 약제 및 수분공급을 위한 유체를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질 또는 약제의 환자에 대한 공동-투여를 포함한다.
- [0108] 또한, 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스를 포함하는 본 개시물에 따른 비경구 제형의 후속 주기를 대상체에 투여하는 것이 적합한 시기를 결정하는 방법을 개시하고 있고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0109] 제1 치료 주기 이전에 환자의 특이적 항바이러스 면역력의 기준의 적정농도를 결정하는 단계,
- [0110] 제1 치료 주기에 후속하는 환자의 특이적 항바이러스 면역력을 연속적으로 결정하는 단계, 및
- [0111] 환자의 특이적 항바이러스 면역력이 기준선의 예비-특정된 백분율에 대해 감소될 때까지 임의의 후속 치료 주기를 지연하는 단계.
- [0112] 본원에서 사용되는 용어 "연속적으로 결정하는 단계"는 복수 시점에서 환자의 특이적 항바이러스 면역력을 결정하는 단계를 지칭하고, 이는 규칙적으로 또는 불규칙적으로 공간적으로 이격될 수 있다. 얻어진 복수 판독은 예를 들면 특정 기간에 걸쳐 평균 적정농도를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0113] 본원에서 사용되는 "기준선의 예비-특정된 백분율"은 인자 예컨대 치료가 개시되기 이전에 측정된 기준선, 환자의 예측, 진행 중인 암 요법, 임의의 불리한 부작용 등을 고려한, 특정한 환자에 대한 역치 또는 한계로 정의된 바이러스 적정농도를 지칭한다.
- [0114] 일 구현예에서, "기준선의 예비-특정된 백분율"은 환자의 기준선 바이러스 적정농도의 90% 이하, 예컨대 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하이다.
- [0115] 대안적인 구현예에서, 차후의 치료 주기를 투여하기 이전에 어떠한 시험도 수행되지 않는다.
- [0116] 일 구현예에서, 3 내지 50ml 범위의 내부 용적을 가진 유리 또는 플라스틱 주사기의 용도가 제공되고, 상기 주사기는 하위그룹 B의 복제 가능 종양용해성 아데노바이러스의  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개, 예를 들면  $1 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{12}$  개 (예컨대  $1 \times 10^{10}$  내지  $6 \times 10^{12}$ , 또는  $1 \times 10^{10}$  내지  $5 \times 10^{12}$ , 또는  $1 \times 10^{10}$  내지  $4 \times 10^{12}$ , 또는  $1 \times 10^{10}$  내지  $3 \times 10^{12}$ , 또는  $1 \times 10^{10}$  내지  $2 \times 10^{12}$ , 또는  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{12}$  개) 바이러스 입자를 포함하는 비경구 제형을 함유하고, 상기 제형은 멀균된 것이고, 치료에서의 사용을 위해, 특히 인간 대상체에 대한 주사 또는 정맥내 주입이 가능한 약제의 제조에서의 사용을 위해 무균성 조건 하에서 주사기로 주입된다.
- [0117] 숙련가는 제형이 예를 들면 주사기의 표면에 부착되어 이후 투여되지 않는 바이러스 입자를 보충하기 위해 과량의 바이러스 입자를 포함할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0118] 유익하게는, 이러한 재충전된 주사기는 비싼 자원 예컨대 특수화된 장비 (배기 장비 포함) 및 훈련된 인력을 사용하는 특수화된 약학에서의 투여 제제에 대한 필요성을 감소시킴으로써, 제조된 하위그룹 B의 종양용해성 아데노바이러스에 대한 유용성 및 비용 효율성을 상당하게 향상시킬 것이다.
- [0119] 본 개시물은 또한 상기 제형의 예비-충전된 바이알, 특히 상기 정의된 범위에서 각각 단회 용량을 함유하는 바이알에 까지 확대된다.
- [0120] 일 구현예에서, 바이러스 제형은 농축된 형태, 예를 들면 멀균된 등장의 희석제, 예컨대 염수, 글루코오스로 희석하기에 적합한 농축된 액체의 형태로 또는 환자에 투여 전에 유사하게 국소적으로 제공된다.
- [0121] 유익하게는, 본원에서의 투여 요법은 암 표적에 대해 하위그룹 B 종양용해성 바이러스의 치료적으로 유효한 양을 전달하기 위해 적합하다. 특히, 본원에서의 투여 요법은 예를 들면 혈액 매개 제제, 싱크, 사이토카인 생성

선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포 및 면역계에 의해 종양용해성 바이러스의 중화 및/또는 청소능을 최소화할 수 있다. 후자는 치료적 용량의 종양용해성 바이러스의 더 나은 이용가능성, 전반적으로 환자에 대한 개선된 예측 및/또는 개선된 생존력을 초래할 수 있다. 유익하게는 본 요법은 또한 치료 과정에서 이상 반응 및/또는 부작용을 감소시킴으로써 환자에 대한 개선된 삶의 질을 제공할 수 있다.

- [0122] 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 치료를 받은 환자는 출원 시점에서의 현재 표준 치료를 받은 환자와 비교하여 증가된 생존율, 예를 들면 생존율에서의 통계적으로 유의미한 증가를 나타낸다.
- [0123] 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 치료를 받은 환자는 출원 시점에서의 표준 치료와 비교하여, 감소된 종양 양, 예를 들면 통계적으로 유의미한 감소를 나타낸다.
- [0124] 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 치료를 받은 환자는 출원 시점에서의 표준 치료와 비교하여 차도가 진행되는 증가된 가능성, 예를 들면 통계적으로 유의미한 증가를 나타낸다.
- [0125] 일 구현예에서, 전이의 양 또는 정도가 감소되고, 예를 들면, 출원 시점에서의 표준 치료와 비교하여 본 개시물에 따른 치료를 받은 환자에서 통계적으로 유의미하게 감소된다.
- [0126] 이론에 구속됨을 바라지 않고, 단핵 식균세포계의 세포, 및 특히 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포는 선행기술이 제안한 것과 다르지만 순환으로부터의 유형 B 종양용해성 바이러스의 청소능과 관련될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0127] 더욱이, 본 발명자들에 의해 수행된 마우스 연구는 치료 요법에서의 제1 또는 제2 용량 이후, 예를 들면 이들 용량이 제2 용량 이후 단시간 프레임 내에 투여되는 경우의 제3 용량 및 차후의 용량 이후 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포가 감소되고 점거되어 이들이 효율적으로 청소될 수 없게 되고, 또는 대안적으로 더 낮은 독성이 관찰될 수 있거나 또는 이들 모두를 믿게 한다. 사이토카인의 수준이 제1 용량과 비교시, 단 상대적으로 단 기간 내에 투여되는 경우 제2 또는 제3 용량의 투여 이후 유의미하게 증가하지 않기 때문에 사이토카인 마커는 후자를 나타낸다고 가정되었다. 본 발명자들은 바이러스 청소능에 대한 메카니즘이 제1 및 제2 투여 이후 억제될 수 있음에 대한 암시로 이를 선택하였다.
- [0128] 마우스에 대한 연구는 특히 바이러스를 사용한 경우 인체에서 보여진 것과 항상 일치되지 않지만, 이 경우 인간 관찰은 본 발명자들에 의해 수행된 젖과 모델에서의 것과 잘 일치하는 것을 보여준다. ColoAd1의 사이토카인 반응 및 약동학에 대한 투여 요법에 대한 영향은 또한 인간 대상체에서 본 발명자들에 의해 예시되었다.
- [0129] 본원에서 이용된 바와 같이, "전신 투여에 의한 환자의 치료 방법"은 환자의 순환계로 독립체 그 자체에 영향을 주기 위해 인간에 대해 치료제를 투여하는 방법을 지칭하는 것으로 의도되고, 특히 여기서 치료는 악성종양, 예컨대 암 또는 합병증 또는 이와 연관된 증상을 예를 들면 정맥내 투여에 의한 순환계로의 직접적인 투여로 이의 진행을 예방하거나 지연하고, 이를 개선하거나 치료하는 것으로 의도된다.
- [0130] 일 구현예에서, 전신 전달은 일차 종양, 임의의 명시적인, 접근불가능한 또는 미진단된 종양 및/또는 전이를 치료할 기회를 제공한다. 이것은 환자에 대한 더 나은 전반적인 예측 및/또는 개선된 생존율을 초래할 수 있기 때문에 특히 유리하다.
- [0131] 따라서, 본원에서 사용되는 전신 전달은 종양 내 또는 체강 내, 예컨대 복강에 국한된 치료를 지칭하지 않는다. 전신 전달의 예는 정맥내 주입 및 근육내 및 피하 주사를 포함한다.
- [0132] 비경구 제형은 GI 관을 통해서도 국소 투여를 통해서도 전달되지 않도록 설계된 제형을 의미한다. 전형적인 비경구 전달 경로는 주사, 이식 또는 주입을 포함한다. 일 구현예에서, 제형은 볼러스 전달을 위한 형태로 제공된다.
- [0133] 일 구현예에서, 비경구 제형은 주사의 형태이다. 주사는 정맥내, 피하, 종양내 또는 근육내 주사를 포함한다. 본원에서 사용되는 주사는 주사기를 통해 신체로의 액체의 주입을 의미한다. 일 구현예에서, 본 개시물의 방법은 종양내 주사와 관련되지 않는다. 주사는 일반적으로 단 기간, 예를 들면 1.5 분 이하에 걸쳐 150mL 이하의 유체의 투여와 관련될 것이다.
- [0134] 일 구현예에서, 제형은 복강으로 전달된다.
- [0135] 두경부암, 또는 상피성 암의 뇌 전이에 대해, 두개내 주사가 필요할 수 있다.
- [0136] 일 구현예에서, 비경구 제형은 주입의 형태일 수 있다.

- [0137] 본원에서 이용되는 주입은 드립, 주입 펌프, 주사기 드라이버 또는 유사 장치에 의한 더 느린 속도에서의 유체의 투여를 의미한다. 일 구현예에서, 주입은 1.5분 내지 90분 범위, 예컨대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60분의 기간에 걸쳐 투여된다.
- [0138] 일 구현예에서, 투여되는 제형의 용적은 예컨대 주사기 드라이버로 투여되는 100mL 이하, 특히 50mL 이하, 예를 들면 30mL, 10mL, 5mL 이하, 예컨대 3mL이다. 후자는 자연 주사(slow injection)로 지칭될 수 있다.
- [0139] 일 구현예에서, 주입은 분당 0.5 내지 6mL 범위, 분당 예를 들면 0.75mL의 속도로 전달된다.
- [0140] 일 구현예에서, 주입은 분당  $2 \times 10^9$  내지  $2 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자 (VP), 예를 들면 분당  $1.5 \times 10^{11}$  VP의 속도로 전달된다.
- [0141] 일 구현예에서, 주사는 예를 들면, 1.5 내지 30 또는 1.5 내지 40 분의 기간에 걸쳐 슬로우 주사로서 투여된다.
- [0142] 일 구현예에서, 제형은 정맥내 투여를 위한 것이다. 이 경로는 종양용해성 바이러스의 전달에 특히 효과적이고, 이는 이것이 대다수의 기관 및 조직에 빠른 접근을 가능하게 하고 전이, 예를 들면 간과 폐와 같은 고도의 혈관성 영역에 위치한 확립된 전이를 치료하기 위해 특히 유용하기 때문이다.
- [0143] 일 구현예에서, 투여 방법의 조합이, 예를 들면 IV 및 종양내, 또는 복강내로 및 종양내로, 또는 IV 및 복막내로 이용된다.
- [0144] 따라서, 일 구현예에서, 본 개시물의 전신 투여가 다른 투여 경로, 예컨대 종양내 투여와 조합하여 부수적으로 또는 순차적으로 이용될 수 있고, 예를 들면 제1 예비-치료 주기가 종양내인 것일 수 있고 제2 치료 주기가 본 개시물에 따라 전신적인 것일 수 있다. 대안적으로, 제1 치료 주기가 본 개시물에 따를 수 있고 후속 주기 또는 부스트(boost)가 적절하게는 종양내일 수 있다. 치료 제형은 통상적으로 멀균될 것이고 제조 및 저장 조건 하에서 안정적일 것이다. 조성물은 인간으로의 투여에 적합한 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 다른 비경구 제형을 제형화될 수 있다. 기충전된 장치 예컨대 단회 용량으로서의 주사기 또는 바이알로서 제형화될 수 있다.
- [0145] 일 구현예에서, 2회 이상의 용량은 치료 주기에서 이용되고, 예를 들면 2, 3, 4, 5 또는 6회 용량이 각 치료 주기에서 이용되고, 예를 들면 키트로서 제공될 수 있다.
- [0146] 특정 치료 주기에서 투여된 각 용량은 본원에서 치료제로서 지칭될 수 있다.
- [0147] 일 구현예에서, 주기에서 투여된 후속 용량과 비교하여 더 낮은 제1 용량이 이용되고, 더 낮은 용량은 후속 용량 또는 용량들의 30-95% 범위, 예를 들면 50, 60, 70 또는 80%일 수 있다.
- [0148] 일 구현예에서, 주기에서 투여된 후속 용량과 비교하여 더 낮은 제1 용량이 이용되고, 이는 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포를 완전히 점거하기 위해 바람직하고 이에 따라 후속 용량에 대한 전달을 최적화한다.
- [0149] 더 높은 용량은 후속 용량의 100% 초과, 예를 들면 후속 용량의 105 내지 150%, 예컨대 후속 용량의 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140% 또는 145%를 의미한다.
- [0150] 일 구현예에서, 투여된 1, 2, 3 또는 모든 용량은 동등한 수의 바이러스 입자를 함유한다. 이는 바이러스 제형의 제조를 단순화하므로 특히 유리하고 사설상 매우 효과적인 치료 요법을 제공할 수 있다.
- [0151] 일 구현예에서, "동일한 용량", 즉, 동일한 수의 바이러스 입자가 일회 이상의 용량, 예컨대 치료 주기에서의 모든 용량에 투여되는 것이나, 용량은 예를 들면 본원에 기재된 바에 따라 상이한 속도로 투여될 수 있다.
- [0152] 본원에 사용되는 치료 주기는 이를 사이의 휴식 기간들을 가진 스케줄에 따라 반복되는 치료 과정에서의 휴식 기간 사이의 치료 기간이다. 치료 주기는 일반적으로 치료의 프로그램 또는 스케줄의 일부로서 투여되고, 상대적으로 단기간, 예를 들면 약 1 내지 4주, 예컨대 3주, 2주, 또는 1주에 걸쳐 투여되는 복수 (즉, 2회 이상) 치료를 지칭한다. 일반적으로, 특정 치료 주기는 더 큰 치료 요법의 일부일 것이다.
- [0153] 일 구현예에서, 치료 주기는 14일 이하의 기간, 예를 들면 10, 9, 8, 7 또는 5일, 예컨대 7 또는 5일이다.
- [0154] 일 구현예에서, 각각의 추가 용량 또는 용량들은 대략 48시간 간격, 예컨대 매 40 내지 56시간에서 투여된다. 이것은 투여가 일반 주중에 또는 외래환자 설정에서 일어날 수 있게 하기 때문에 유리하다.
- [0155] 일 구현예에서, 제1 용량은 1일에 투여되고 추가 치료 용량이 그 후에 하루 걸려, 예컨대 1, 3, 5, 7, 9, 11 및

13, 또는 대략 매 48시간에 한번, 예컨대 매 40 내지 56시간에 투여된다.

[0156] 일 구현예에서, 용량 (예컨대 제2 또는 후속 용량)의 투여 후 환자에서의 바이러스의 혈장 수준은 예를 들면 15분 이상의 기간 동안, 예를 들면 20, 30, 40, 50, 60분 이상 동안, 적어도  $2 \times 10^6$  바이러스 입자/mL이다.

[0157] 발명자들에 의해 수행된 시험관내 연구(도 1 참조)는 37°C에서의 전체 인간 혈액에서의 바라이스 입자에 대해, 사멸은  $2 \times 10^6$  입자/mL 미만에서 50% 미만으로 저하되는 것을 제시한다. 더욱이, 발명자들은 바이러스 계놈 수준이 예를 들면 1.6e6 내지 1e8 초과이고 일관되게 검출될 수 있는 경우 용균반 분석을 사용하여 환자 혈액 내의 생 바이러스 입자의 존재를 나타낼 수 있었다.

[0158] 일 구현예에서, 치료 주기 사이에 적어도 14일이 존재한다.

[0159] 제형은 일반적으로 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 캐리어, 예를 들면 바이러스와 양립가능하고 바이러스가 필요 기간 동안 안정한, 비독성, 등장의 캐리어를 포함할 것이다.

[0160] 캐리어는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 등)을 함유하는 분산매 또는 용매, 및 이들의 적합한 혼합물일 수 있다. 예를 들면 분산제 또는 계면활성제 예컨대 레시틴 또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 폴리소르베이트 80 또는 40를 사용함으로써 적절한 유체성이 유지될 수 있다. 분산물에서, 필요한 입자 크기의 유지는 계면활성제의 존재에 의해 보조될 수 있다. 등장제 예는 조성물에서의 당, 폴리알코올 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함한다.

[0161] 일 구현예에서, 멸균된 등장의 희석제 예컨대 염수 또는 글루코오스이다 (예를 들면 5% 글루코오스가 이용됨).

[0162] 일 구현예에서, 본 방법에서 사용되는 비경구 제형은 하나 이상의 하기 버퍼, 예를 들면 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설휤산, 인산염 버퍼, 및/또는 트리스 버퍼, 당 예를 들면 텍스트로오스, 만노스, 수크로오스 등, 염 예컨대 염화나트륨, 염화마그네슘 또는 염화칼륨, 디터전트 예컨대 비-이온성 계면활성제 예컨대 briji®, PS-80, PS-40 또는 유사체를 포함할 수 있다. 제형은 또한 보존제 예컨대 EDTA 또는 에탄올 또는 EDTA 및 에탄올의 조합을 포함할 수 있고, 이는 가능한 분해의 하나 이상의 경로를 방해하는 것으로 여겨진다.

[0163] 일 구현예에서, 제형은 필요에 따라 과량을 포함하는, 예를 들면 용량당  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{14}$  개의 바이러스 입자, 예컨대 용량당  $1 \times 10^{10}$  내지  $7 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자, 특히 용량당  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자로, 정제된 종양용해성 바이러스를 포함할 것이다.

[0164] 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 제형은  $6 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자를 포함한다.

[0165] 일 구현예에서, 제형에서의 바이러스의 농도는  $2 \times 10^8$  내지  $2 \times 10^{14}$  vp/mL 범위, 예컨대  $2 \times 10^{12}$  vp/mL이다.

[0166] 일 구현예에서, 비경구 제형은 글리세롤을 포함한다.

[0167] 일 구현예에서, 제형은 하위그룹 B로부터의 종양용해성 아데노바이러스, HEPES (N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설휤산), 글리세롤 및 버퍼를 포함한다.

[0168] 일 구현예에서, 비경구 제형은 바이러스, HEPES 예를 들면 5mM, 글리세롤 예를 들면 5-20% (v/v), 예를 들면 7-8 범위로 pH를 조정하기 위한 염산 및 주사를 위한 중류수로 이루어진다.

[0169] 일 구현예에서,  $2 \times 10^{12}$  vp/mL의 농도에서의 0.7 mL의 ColoAd1은 7.8의 최종 pH로 5 mM HEPES, 20% 글리세롤에서 제형화된다.

[0170] 조성물에 흡수를 지연하는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴가 포함됨으로써 주사가능 조성물의 장기적인 흡수가 이루어질 수 있다.

[0171] 따라서, 본원에서 사용되는 종양용해성 아데노바이러스가 지연 방출 제형으로, 예를 들면 느린 방출 폴리머를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 종양용해성 아데노바이러스는 중화로부터 이를 보호하고/하거나 빠른 방출을 방지할 수 있는 캐리어, 예컨대 제어 방출 제형, 예컨대 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템으로 제조될 수 있다.

[0172] 생분해성, 생체적합성 폴리머, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수돌, 폴리글라이콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락트산, 폴리글리콜 공중합체 (PLG)가 사용될 수 있다. 생체적합성 비-분해성

폴리머 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리(N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드)가 또한 사용될 수 있다. 이와 같은 제형의 제조를 위한 많은 방법이 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0173] 멸균된 주사가능 용액이 예를 들면, 관련된 본원에 기재된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에서 필요한 양의 종양용해성 아데노바이러스를 혼입하고, 그 다음 여과 살균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 종양용해성 아데노바이러스를 기본 분산매 및 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균된 비히클로 혼입함으로써 제조된다.

[0174] 일반적으로, 본 개시물에 따른 비경구 제형은 멸균된 액체 제형, 예컨대 무균처리로 제조되고 0.2 마이크론 필터를 통과시켜 살균된, 실질적으로 미립자 무함유 수성 제형이다.

[0175] 일 구현예에서, 치료적 비경구 제형은 예를 들면 피복된 바늘을 이용하거나 캐뉼라를 통해 제형과 환자의 표피의 접촉을 최소화하도록 투여된다. 이 예방조치는 예를 들면 피부에서의 랑제르한 세포와의 접촉을 최소화함으로써, 종양용해성 바이러스에 대한 환자의 면역 반응을 최소화하는 것으로 여겨진다.

[0176] 본원에서 사용되는 복제 가능은 숙주 세포에서 복제될 수 있는 바이러스이다. 일 구현예에서, 복제 가능은 복제 가능 및 복제 선택적 바이러스를 포괄한다.

[0177] 본원에서 사용되는 복제 가능은 야생형 바이러스에 필요한 것에 대한 임의의 추가적인 상보성 없이, 예를 들면 불량성 세포 기구에 의존함 없이, 인간 세포, 예컨대 암세포에서 복제 가능한 종양용해성 아데노바이러스를 의미하는 것으로 의도된다. 즉, 이들은 비-종양 세포에 선호되는 종양 세포를 감염시키는 것에 의해 선택적인 종양이다. ColoAd1은 복제 가능 바이러스의 예이다.

[0178] 본원에서 사용되는 복제 선택적 또는 선택적 복제는 상기 암세포에 특이적이거나 또는 그에서 상향조절되는 것, 예를 들면 불량성 세포 기구, 예컨대 p53 돌연변이에 특이적인 성분을 이용하여 암세포에서 복제할 수 있고, 이에 의해 건강한/정상 세포에 대해 어느 정도의 선택성을 허용하는 종양용해성 아데노바이러스를 의미하는 것으로 의도된다.

[0179] 본원에서 사용되는 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스는 우선적으로 감염하고/하거나 정상 세포와 비교하여 종양 세포를 용해하는 하위그룹 B(Shenk 등 및 표 1 참조)로부터 섬유 및 헥손을 포함하는 아데노바이러스를 지칭한다. 따라서, 본원에서 사용되는 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스는 그룹 B 아데노바이러스의 섬유 및 헥손을 갖고 종양용해성 특성을 보유하는 키메라, 변종 또는 변이체를 포함한다.

[0180] 본원에서 사용되는 아데노바이러스 또는 아데노바이러스 혈청형은 현재 공지된 (51) 또는 미래에서 단리되는 인간 아데노바이러스 혈청형 중 임의의 것을 지칭한다. 예를 들면, Strauss (1984) 및 Shenk (2001) 참조. 아데노바이러스 혈청형은 표 1에 나타낸 하위그룹으로 분류된다.

[0181] 표 1은 아데노바이러스 혈청형의 구분을 보여준다:

하위그룹	아데노바이러스 혈청형
A	12, 18, 31
B	<b>3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51</b>
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-50
E	4
F	40, 41

[0182]

[0183] 하위그룹 B 바이러스의 예는 Ad11 (야생형) 예컨대 Ad11a 및 Ad11p (유전자은행 등록번호: AF532578) 및 키메라성 아데노바이러스 ColoAd1를 포함한다. 후자는 WO 2005/118825에 개시되어 있고 바이러스의 전체 서열은 그에 서의 서열식별번호: 1에 제공되어 있다.

[0184]

따라서, 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 방법에서 사용되는 바이러스는 키메라성 바이러스이다.

[0185]

본원에서 사용되는 키메라성 아데노바이러스는 2개 이상 상이한 아데노바이러스 혈청형으로부터의 DNA를 갖는 아데노바이러스 예컨대 본원에 참조로 포함된 WO2005/118825의 방법에서 발생된 것을 지칭한다.

- [0186] 일 구현예에서, 키메라성 아데노바이러스는 ColoAd1이다. ColoAd1는 세포자멸사보다는 괴사에 보다 더 유사한 메카니즘에 의해 종양 세포를 사멸하는 것으로 여겨진다 (옥스퍼드대에서 생성된 미공개된 데이터). 이는 수많은 잠재적으로 유익한 효과를 가진다 (Kirn et al 2001; Small et al 2006; Reid et al 2002; Liu et al 2007; Ferguson et al 2012):
- [0187] · ColoAd1는 다중-약물 내성 암세포주 및 세포자멸사에 대해 내성을 가지는 것을 공지 암 줄기세포 유사 세포에서 강력한 것을 나타내었다.
- [0188] · 염증성 괴저성 세포사가 특이적 항-종양 면역 반응의 발생에 보다 적합할 수 있다.
- [0189] · ColoAd1은 종양 세포에서 표적 세포사 이전에 매우 빠르게 나오고, 이에 따라 확산하기 위한 향상된 능력을 가질 수 있다.
- [0190] ColoAd1은 Ad11 및 Ad3의 키메라이나 Ad11의 것과 전적으로 상동인 외부 캡슐을 가진다. 이에 따라 ColoAd1의 바이러스 동력학, 염증성 포텐셜 및 면역학적 특성 밀접하게 유사하고 Ad11 및 다른 하위그룹 B 아데노바이러스의 것을 예측한다.
- [0191] 일 구현예에서, 본 개시물의 방법에서 사용되는 종양용해성 바이러스는 E3 및/또는 E4 영역 또는 이의 부분에서 결실된다. 이는 생체내 바이러스의 보다 빠른 복제를 가능하게 하기 때문에 유익할 수 있다.
- [0192] 또한, E3 결실은 호스트의 면역을 회피하는 것과 관련될 수 있는 E3 영역이 암호화된 단백질로서 비-암세포로부터 바이러스의 빠른 청소능에 기여할 수 있다.
- [0193] 일 구현예에서, 본 개시물의 방법에서 이용된 바이러스는 Ad11로 기초하거나 이들로부터 유도되어 핵손 및 섬유가 Ad11, 예컨대 Ad11p와 실질적으로 유사하다. 더욱이, 아데노바이러스의 혈청형 지정은 바이러스의 외부 특성, 즉, 핵손 및 섬유 특성에 기초하기 때문에, 본 개시물은 유사한 표면 특성을 갖는 유형 B 아데노바이러스에 유용하다.
- [0194] 일 구현예에서, 유형 B 아데노바이러스는 본원에 참조로 포함된 WO2008/080003에서의 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2에 각각 개시된 것인 OvAd1 또는 OvAd2이다.
- [0195] 본원에서 사용되는 실질적 유사는 "전체의"의 특정한 단백질에 대해 적어도 95% 동일한 (예를 들면 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일한) 관련 단백질 또는 단백질들에 대한 아미노산 서열을 지칭한다. 비교되는 단백질(들)은 더 큰 독립체의 일부일 수 있으나 관련된 단편 또는 성분의 전체의 길이를 비교할 것이다.
- [0196] 아데노바이러스 유형 5 (Ad5)는 일반적으로 콕사키-아데노바이러스 수용체 (CAR)를 통해 세포로 유입된다. 그러나, 아데노바이러스 혈청형 11 (Ad11)은 모든 유핵 세포에서 저수준으로 발현되는 상이한 수용체 (CD46)을 표적팅하는 하위그룹 B 아데노바이러스이다. 정상 세포에서 CD46은 대개 세포의 기저층 표면 상에 숨겨지고 이에 따라 바이러스 결합에 대해 이용할 수 없다 (Varela JC, et al Int J Cancer 2008 Sep 15;123(6):1357-63; Maisner et al., 1997). 그러나, 종양 세포에서, 이는 전형적으로 특히 더 진전되고 공격성 종양에서 증대된 표면 발현을 가진다 (Kinugasa 등, 1999). 따라서, Ad11은 암종 세포주, 예를 들면 폐 상피성 암종 (A549 세포), 간종양 (HepG2), 전립선암 (DU 145 및 LNCaP), 후두암 (Hep2) 및 유방암 (CAMA 및 MG7)으로부터 또한 교모세포종, 수모세포종 및 신경교세포종 세포까지 효율적으로 감염시킨다 (Mei 등 2003). 따라서 Ad11은 종양 세포를 우선적으로 감염시키고, 이들로부터 유도된 바이러스는 상기 암 종 적어도 하나 이상을 치료하는데 유용한 것으로 여겨진다. Ad11 및 Ad3의 키메라로서, ColoAd1은 Ad11가 갖는 이들 특성을 공유한다.
- [0197] 일 구현예에서, 본 개시물의 방법에서 이용된 바이러스는 이식유전자 (특히 하나 이상의 이식유전자), 예를 들면 생체내 발현을 위한 치료적 이식유전자를 포함한다. 본원에서 사용되는 이식유자는 모 또는 야생형 바이러스에 발견되지 않는 유전자를 지칭하는 것으로 의도된다. 이와 같은 유자는 바이러스성 감염의 추적 효능을 위한 마커 또는 리포터로서 기능할 수 있다. 대안적으로, 상기 유자는 바이러스의 효능을 개선하는 역할을 수행할 수 있다. 대안적으로, 상기 유자는 세포에 대한 세포독성 약물을 전달할 수 있다.
- [0198] 치료적 이식유자는 세포, 예를 들면 siRNA; shRNA; 폴리펩타이드; 종양 연관된 항원 (TAA), 사이토카인; 항체; 또는 항-신생혈관형성 인자에서 치료제를 발현할 수 있다.
- [0199] 치료적 항체의 예는 다른 것들 중 항-VGEF 항체 예컨대 베바시주맙, 항-EGFR 항체 예컨대 세툭시맙, 항-CD20 항체 예컨대 리툭시맙, 또는 면역계 활성제 조절물질 예컨대 항-CTLA4 (예를 들면 이필리무맙), 항-PD-1 및 항-PD-L1을 포함한다. 단일 사슬 항체, 항체 서브유닛, 항체 단편 및 TRAP가 또한 전장 항체와 마찬가지로 암호화

될 수 있다. 현 개시물에 대해 중요하게는, 이들 단백질의 봉입체는 바이러스의 표면 특성을 바꾸지 못하고, 따라서 암세포를 공격하는 추가의 치료적 메카니즘을 제공하면서 본원에 기재된 투여시 유해한 영향 없이 계획으로 용이하게 편입될 수 있다.

[0200]

사이토카인의 예는 다른 것 중 인터페론-알파, 인터페론-감마 및 IL-2를 포함한다.

[0201]

RNA로서 항체, 폴리펩타이드, TAA 또는 사이토카인은 종양에서 발현될 것이고, 이는 전달되는 제제의 전신 부작용을 회피하면서 종양의 미세환경을 변화시키는 기회를 제공하는 것으로 여겨진다. 예를 들면, 이는 암을 공격하기 위한 국소 면역계를 자극하는 것이 가능할 수 있다. RNA, 항체, 폴리펩타이드, TAA 또는 사이토카인이 세포로부터 분비되는 여부와 바이러스 생명 주기 과정에서 이것이 발현되는 시기를 변경함으로써 이 국소 효과를 조정할 수 있다.

[0202]

일 구현예에서, 이식유전자는 예를 들면 비-인간 기원 유래의 티미딘 키나아제, 또는 박테리아 유래 또는 효모로부터의 시토신 테아미나제를 암호화한다.

[0203]

일 구현예에서, 항체, 폴리펩타이드 또는 사이토카인 또는 유사체는 비-인간 유래의 것이고 인간화되지 않는다. 후자는 암세포에서의 독립체의 활성에 악영향을 주지 않을 것이고 암세포를 피할 수 있는 물질이 국소적으로 면역계의 주의를 끌어 급속하게 청소될 수 있는 장점을 가진다.

[0204]

일 구현예에서, 바이러스는 가시적인 또는 시각화 가능한 단백질, 예를 들면 형광성 단백질, 예컨대 GFP 또는 유사체를 생체내 암호화하고 발현한다. 바이러스가 암성 세포를 선택적으로 감염시키는 경우, 이것이 가시적인 또는 시각화 가능한 단백질을 발현한 이후 이것은 절제 또는 방사선을 위해 암성 조직의 부분을 표시하는데 사용될 수 있다.

[0205]

일 구현예에서, 바이러스는 항-종양 면역 기능, 종양 신생혈관형성의 억제, 또는 전구약물 활성화를 유도할 수 있는 치료적 유전자를 가질 수 있다. 본원에서 사용하는 치료적 용량은 적합한 치료 요법에서 이용되는 경우 의도된 치료 효과를 달성하는데 적합하고, 예를 들면 증상 또는 질환의 조건을 개선하는 종양용해성 아데노바이러스의 양을 지칭한다. 용량은 바이러스 입자의 수가 하기를 초래하기에 충분할 수 있는 경우 암 또는 전이의 치료에서의 치료적 용량으로 고려될 수 있다: 종양 또는 전이성 성장이 느려지거나 중지되거나, 종양 또는 전이가 크기가 줄고/줄거나 환자의 수명이 연장된다.

[0206]

일 구현예에서, 치료적 용량 범위는 용량 제한 독성을 가지지 않는다.

[0207]

본원에서 사용되는 용량 제한 독성은 투여량에서의 추가적인 증가, 빈도 또는 강도 중 임의의 하나를 방해하기에 충분하거나 임의의 투여량 수준의 지속을 방해하기에 충분할 정도로 중증인 치료 과정에서의 부작용의 출현을 의미한다. 예를 들면 높은 용량과 연관되는 허용될 수 없는 독성은 이것이 본 개시물의 맥락에서 치료적 용량으로서 사용하기에 적합하지 않다는 것을 의미한다.

[0208]

일 구현예에서, Ad11 캡시드에 대한 기존의 면역력은 7일에 또는 그 이후에 추가의 치료적 용량의 효과적인 투여를 약하게 허용한다.

[0209]

일 구현예에서, Ad11 캡시드의 좋지 못한 면역 자극 특성은 7일에 또는 그 이후에 추가의 치료적 용량의 효과적인 투여를 허용한다.

[0210]

일 구현예에서, 바이러스의 정맥내 전달은 바이러스의 피하 또는 근육내 전달보다 항바이러스 면역성과 관련하여 덜 면역성이다.

[0211]

일반적으로 Ad11의 독성이 임의의 다른 아데노바이러스, 예컨대 Ad5보다 더 낮을 수 있는 것으로 여겨진다. 이는 더 낮은 혈청학적 감염률과 함께 유익하나 이는 Ad11가 면역 반응을 회피하는데 충분하지 않을 수 있다. 문헌에서 하위그룹 B 아데노바이러스가 간 세포에 대해 독성이지 않은 것을 제시하였음에도 불구하고, 폐, 간 (쿠퍼 세포) 및 비장에서의 대식세포가 전신 전달 이후 종양용해성 바이러스를 청소할 수 있다.

[0212]

2회 이상 용량의 종양용해성 바이러스의 신속한 전달이 표적 세포, 즉 암세포의 적절한 감염이 가능한 기간 동안 지속되는 충분한 수준의 바이러스를 발생시키는데 있어서 바람직할 수 있다.

[0213]

신속하게 연속으로 2회 이상의 용량을 제공하는 것은 발생되는 하나 이상의 하기 유익한 사건을 가능하게 할 수 있다: a) 면역계 메카니즘이 제1 용량에 의해 점거되고, 이는 이후 제2 용량이 표적에 도달하도록 면역계의 전체 공격을 회피할 수 있게 하고 및/또는 b) 신속하게 연속으로의 2회 이상의 용량은 바이러스의 생체분포가 생체내 표적 세포에 도달하거나 바이러스가 도달하여 복제할 수 있는 표적 세포를 감염시키기에 충분한 시간 동안

충분한 수준에 도달하게 할 수 있다.

[0214] 본원에서 사용되는 생체분포는 생체내 분포를 의미한다.

[0215] 이론에 구속됨을 바라지 않고, 본 발명자들은 바이러스의 제1 용량이 청소능, 예를 들면 사이토카인 생성 선천적 면역 세포 예컨대 쿠퍼 세포를 사용하여 이에 의해 추가의 치료적 용량(들)에 대한 생체이용률을 개선하는 하는 것과 같은 메카니즘이 하향 조절될 수 있는 것으로 간주한다. 따라서 바이러스의 제1 용량은 순환하는 바이러스에 대한 포식 '싱크(sink)'를 "고갈시키고", 그렇게 함으로써 더 나은 전달 및/또는 증가된 효능을 달성 할 수 있다. 포식 싱크를 고갈시키는 것은 또한 후속 용량에 대한 사이토카인을 방출하는 경향을 감소시키고 이에 따라 더 높은 바이러스 혈액 수준이 과량의 독성을 없이 달성되게 할 수 있다.

[0216] 본원에서 사용하는 생체이용률은 생체내 이의 의도된 치료 기능을 수행하는데 이용가능한 바이러스의 양을 의미 한다.

[0217] 일 구현예에서, 3회 이상의 용량이 투여되는 본원의 방법은 환자에게서 부작용 및/또는 독성을 최소화한다.

[0218] 일 구현예에서, 아데노바이러스는 예를 들면 환자의 면역계를 적어도 부분적으로 회피하기 위해 폴리머로 상기 바이러스를 코팅함으로써 피복된다.

[0219] 본원에서 이용되는 피복은 아데노바이러스의 외부 표면은 예를 들면 폴리머를 이용하여 환자의 면역 반응을 회피하기 위해 개질되는 것을 의미한다. 적합한 폴리머의 예는 WO98/19710, WO00/74722, WO2010/067041, WO2010/067081, 및 WO2006/008513에 개시되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0220] 일 구현예에서, 종양용해성 바이러스는 세포독성 또는 면역조절 제제에 접합된다.

[0222] \*일 구현예에서, 종양용해성 아데노바이러스는 예를 들면 면역원성을 감소시키고/시키거나 반감기를 증가시키기 위해 폐길화된 것이 제공된다.

[0223] 일 구현예에서, 치료 방법은 종양의 치료에서의 사용을 위한 것이다.

[0224] 본원에서 사용되는 종양은 소위 신생물인, 조절되기 않고 진행성인 과량의 세포 분열로부터 생성되는 조직의 비정상 덩어리를 지칭하는 것으로 의도된다. 이는 양성 (암성이 아님) 또는 악성일 수 있다. 종양은 암 및 전이의 모든 형태를 포함한다.

[0225] 일 구현예에서, 종양은 고형 종양이다. 고형 종양은 국부적 또는 전이성일 수 있다.

[0226] 일 구현예에서, 종양은 상피성 유래의 것일 수 있다.

[0227] 일 구현예에서, 종양은 고형 종양이다.

[0228] 일 구현예에서, 종양은 악성 종양, 예컨대 결장직장 암, 간종양 (간암), 전립선암, 췌장암, 유방암, 난소암, 갑상선암, 신장암, 방광암, 두경부암 또는 폐암이다.

[0229] 일 구현예에서, 종양은 결직장 악성종양이다.

[0230] 본원에서 사용되는 악성종양은 암성 세포를 의미한다.

[0231] 일 구현예에서, 암은 결장직장 암 및/또는 이의 전이성 형태 예컨대 간 전이이다.

[0232] 일 구현예에서, 암은 간암 및/또는 이의 전이성 형태이다.

[0233] 일 구현예에서, 암은 폐암 및/또는 이의 전이성 형태이다.

[0234] 일 구현예에서, 암은 난소암 및/또는 이의 전이성 형태, 예컨대 폐 전이이다.

[0235] 일 구현예에서, 암은 신장 암 및/또는 이의 전이성 형태이다.

[0236] 일 구현예에서, 암은 방광암 및/또는 이의 전이성 형태이다.

[0237] 일 구현예에서, 암은 인후두암이다.

[0238] 일 구현예에서, 암은 피부암, 예컨대 흑색종이다. 일 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일 구현예에서, 암은 교모세포종, 수모세포종 또는 신경교세포종이다. 일 구현예에서, 암은 신경내분비 암이다. 일 구현예에서, 암은 호

지킨 또는 비-호지킨 림프종이다.

[0239] 일 구현예에서, 종양용해성 아데노바이러스는 전이의 치료 또는 예방에서 이용된다.

[0240] 일 구현예에서, 본원에 기재된 종양용해성 아데노바이러스는 림프절로 이동되는 암성 세포의 치료에 적합하다. 본 발명자들은 결장직장 암 환자에 투여된 종양용해성 바이러스가 림프절로 이동되는 암성 세포에 영향을 줄 수 있다.

[0241] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 바이러스, 제형 및 요법은 비정상 예비-암성 세포를 치료하는데 적합하다.

[0242] 일 구현예에서, 본원에서 이용되는 방법 또는 제형은 약물 내성암의 치료에 이용된다.

[0243] 일 구현예에서, 본원에서의 방법 또는 제형은 약물 내성암의 치료에 이용된다.

[0244] 일 구현예에서, 방법 또는 제형은 상기 약물에 대한 암의 약물 내성을 민감화시키는데 이용된다.

### 보다 상세한 암의 유형

#### 폐암

[0247] 폐암은 조직학적 유형에 따라 분류되고 현미경으로 조직병리학자에 의해 알려진 암성 세포의 크기 및 외관에 의해 분류된다. 치료적 목적을 위해, 2개의 광범위한 부류로 구분된다: 비-소세포 폐 암종 및 소세포 폐 암종.

[0248] 일 구현예에서, 상피성 암은 폐암, 예를 들면 소세포 폐암 (SCLC) 및 비-소세포 폐암 (NSCLC)이다.

[0249] **비-소세포 폐 암종-** NSCLC의 3개의 주요 하위유형은 선암종, 편평상피-세포 암종 및 대세포 암종이다.

[0250] 폐암의 거의 40%는 선암종이고, 이는 보통 말초 폐 조직에서 유래된다. 선암종의 하위유형, 세기관지폐포 암종은 여성 흡연미경험자에서 보다 일반적이고 보다 장기의 생존력을 가진다.

[0251] 편평상피-세포 암종은 폐암의 약 30%를 차지한다. 이들은 전형적으로 대기도(large airway)에 근접하여 발생한다. 중공 공동 및 연관된 세포사는 통상적으로 종양의 중심에서 발견된다. 폐암의 약 9%는 대세포 암종이다. 이들은 또한 암세포가 과잉의 세포질, 대핵 및 뚜렷한 핵소체를 가져 크기 때문에 이와 같이 명명된다.

[0252] **소세포 폐 암종-** 소세포 폐 암종 (SCLC)에서, 세포는 조밀한 신경분비 과립 (신경내분비 호르몬 함유 소포)를 함유하고, 이는 이 종양이 내분비/방종양성 증후군과 관련되게 한다. 대부분 사례들은 더 큰 기도 (1차 및 2차 기관지)에서 발생한다. 이 암은 빠르게 성장하고 질병 과정의 초기에 확산된다. 60 내지 70 퍼센트는 제시되는 전이성 질환을 가진다.

[0253] 일 구현예에서, 암은 비-소폐 암종이다.

#### 간암

[0255] 일 구현예에서, 암은 간암, 예를 들면, 원발성 암, 예를 들면 간으로 확산되는 결장암으로부터의 간 전이이다. 일 구현예에서, 간암은 간세포 암종 (HCC)이다.

#### 신장암

[0257] 일 구현예에서, 본원에 개시된 종양용해성 아데노바이러스를 사용하는 신장암, 예를 들면 신장 세포 암종 및/또는 요상피 세포 암종의 치료법이 존재한다. 신장암의 다른 예는 편평상피 세포 암종, 방사구체세포종 (레닌종), 혈관근육지방종, 신장 종양세포종, 벨리니 유관 암종, 신장의 투명-세포 육종, 중간막성콩팥종, 월름스 종양, 혼합된 상피성 기질 종양, 투명 세포 선암종, 이행 세포 암종, 역전된 유두종, 신장 림프종, 기형종, 암육종, 및 신장 골반의 카르시노이드 종양을 포함한다.

#### 방광암

[0259] 일 구현예에서, 암은 방광암, 예를 들면 비뇨 방광의 상피벽(즉, 요로상피)로부터 발생되는 암성종양의 몇몇 유형 중 임의의 것이다. 약 90%의 방광암은 이행 세포 암종이다. 나머지 10%는 편평상피 세포 암종, 선암종, 육종, 소세포 암종, 및 신체의 임의의 부분에서 암으로부터의 2차 증착물이다. 단계를 하기에 특정하였다.

#### **T (일차 종양)**

[0261] · TX 일차 종양은 평가될 수 없음

- [0262] · T0 일차 종양의 증거 없음
- [0263] · Ta 비-침습성 유두상 암종
- [0264] · Tis 제자리 암종 ('플랫 종양')
- [0265] · T1 종양이 상피하 결합 조직을 침습함
  
- [0267] \* · T2a 종양이 표층 근육 (내부 절반)을 침습함
- [0268] · T2b 종양이 심부 근육 (외부 절반)을 침습함
- [0269] · T3 종양이 방광주위 조직을 침습함:
- [0270] · T3a 혈마경적으로
- [0271] · T3b 거시적으로 (방광외 조직)
- [0272] · T4a 종양이 전립선, 자궁 또는 외음부를 침습함
- [0273] · T4b 종양이 골반 벽 또는 복벽을 침습함
- [0274] **N (림프절)**
  - [0275] · NX 영역 림프절이 평가될 수 없음
  - [0276] · N0 영역 림프절 전이 없음
  - [0277] · N1 최대 수준로서 2 cm 이하의 단일 림프절에서의 전이
  - [0278] · N2 최대 수준로서 2 cm 초과 5 cm 이하의 단일 림프절, 또는 최대 수준로서 5 cm 이하의 다중 림프절에서의 전이
  - [0279] · N3 최대 수준로서 5 cm 초과의 림프절에서의 전이
- [0280] **M (원격 전이)**
  - [0281] · MX 원격 전이가 평가될 수 없음
  - [0282] · M0 원격 전이 없음
  - [0283] · M1 원격 전이.
- [0284] 본 개시물은 방광암의 임의의 단계로 확대될 수 있다.
- [0285] 난소암
- [0286] 독립적인 양태에 있어서, 본 개시물은 예를 들면 난소암을 가진 환자에 대해 예를 들면 본원에 기재된 투여 요법을 사용하여, 치료적 유효량의 ColoAd1를 투여하는, 난소암의 치료에 사용하기 위한 ColoAd1, 이의 제형 또는 ColoAd1을 포함하는 병용 요법에 관한 것이다.
- [0287] 이들이 출발되는 세포 유형에 따라 분류되는 30개 초파의 상이한 유형의 난소암이 존재한다:
- [0288] · 표면 상피 - 난소의 내벽을 덮는 세포
- [0289] · 생식세포 - 난자를 형성할 운명인 세포
- [0290] · 기질 세포 - 호르몬을 방출하고 상이한 구조의 난소들과 접촉하는 세포
- [0291] 본 개시물은 임의의 공급원, 예를 들면 본원에 기재된 특히 상피 세포로부터의 난소암의 치료에 관한 것이다. 상피성 난소 암종 (EOC)가 난소의 모든 암의 85 내지 90 퍼센트를 차지한다.
- [0292] **공통의 상피성 종양** - 상피성 난소 종양은 난소의 외표면을 덮는 세포로부터 발달된다. 대부분의 상피성 난소 종양은 양성 (암이 아님)이다. 장액 샘종, 점액성 샘종, 및 브레너 종양을 포함하는 몇몇 유형의 양성 상피성 종양이 존재한다. 암성 상피성 종양은 이들이 난소에서 내측막을 형성하는 조직에서 시작되는 것을 의미하는 암 종이다. 이들은 가장 흔한 것이고 모든 유형의 난소암 중 가장 위험하다. 불행하게도, 공통의 상피성 난소암을

갖는 여성의 거의 70%는 질병이 단계로 진전될때까지 진단되지 않는다.

[0293] 현미경 하에서 외관이 암성으로서 명확이 확인이 되지 않는 일부 난소 상피성 종양이 존재한다. 이들은 경계선 종양 또는 낮은 악성 포텐셜의 종양 (LMP 종양)으로 지칭된다. 본 개시물의 방법은 후자의 치료를 포함한다.

[0294] **생식세포 종양** - 난소 생식세포 종양은 난자 또는 난자들을 생성하는 세포로부터 발달된다. 일부가 암성이고 생명을 위협할 수 있으나 대부분의 생식세포 종양은 양성 (비-암성)이다. 가장 흔한 생식세포 악성종양은 성숙한 기형종, 난소고환종, 및 내배엽성 동 종양이다. 생식세포 악성종양은 10대 및 20대의 여성에게서 가장 흔히 발생한다. 오늘날, 난소 생식세포 악성종양을 갖는 환자의 90%는 치료되어 생식능력이 보존될 수 있다.

[0295] **기질 종양** - 난소 기질 종양은 난소와 함께 여성 호르몬, 에스트로겐 및 프로게스테론을 생성하는 것을 보유하는 결합 조직 세포로부터 발달되는 드문 부류의 종양이다. 가장 보편적인 유형은 과립막 세포종 및 써톨리-라이디그 세포종이다. 이들 종양은 매우 드물고 보통 대략 70 퍼센트가 단계 I 질환으로 나타내는 저등급 암으로서 고려된다 (암은 하나 또는 두 난소로 제한됨).

[0296] **일차 복막 암종** - 환자의 난소의 제거는 난소암의 위험성을 제거하지만 일차 복막 암종이라 불리는 덜 일반적인 암에 대한 위험성을 제거하지 못한다. 일차 복막 암종은 상피성 난소암 (가장 보편적인 유형)과 밀접하게 관련된다. 이는 복막 (복부 내벽)으로의 세포로부터 발달되고 현미경 하에 동일하게 보인다. 이는 증상, 확산 및 치료에 있어서 유사하다.

#### 난소암의 단계

[0298] 난소암으로 진단되는 경우, 의사가 암이 난소 외부로 확산되었는지를 말할 수 있는 경우 종양의 단계는 수술 과정에서 결정될 수 있다. 난소암의 4개의 단계 - 단계 I (초기 질환) 내지 단계 IV (진전된 질환)이 존재한다. 치료 계획 및 예측 (가능한 과정 및 환자 질병의 결과)이 환자의 암의 단계에 의해 결정될 것이다.

[0299] 난소암의 다양한 단계의 설명은 하기와 같다:

[0300] 단계 I - 암의 성장이 난소 또는 난소들에 대해 제한적이다.

[0301] 단계 IA - 성장은 하나의 난소에 대해 제한적이고 종양은 난소의 내부로 국한된다. 난소의 외부 표면 상에 암은 존재하지 않는다. 악성 세포를 함유하는 복수(ascite)는 존재하지 않는다. 캡슐이 온전하다.

[0302] 단계 IB - 성장은 이의 외표면 상에 임의의 종양 없는 두 난소에 대해 제한된다. 악성 세포를 함유하는 복수는 존재하지 않는다. 캡슐이 온전하다.

[0303] 단계 IC - 종양은 단계 IA 또는 IB로 분류되고 하기 중 하나 이상이 존재한다: (1) 종양은 하나 또는 두 난소의 외표면에 존재하고; (2) 캡슐은 파열되고; (3) 악성 세포를 함유하거나 양성 복막 세척을 갖는 복수가 존재한다.

[0304] 단계 II - 암의 성장이 골반 확대로 하나 또는 두 난소에 관련된다.

[0305] 단계 IIA - 암은 자궁 또는 나팔관, 또는 둘 모두로 확장되고/되거나 연관된다.

[0306] 단계 IIB - 암은 다른 골반 기관으로 확장된다.

[0307] 단계 IIC - 종양은 단계 IIA 또는 IIB로서 분류되고 하기 중 하나 이상이 나타난다: (1) 종양은 하나 또는 두 난소 모두의 외표면 상에 나타나고, (2) 캡슐은 파열되고; (3) 악성 세포를 함유하거나 양성 복막 세척을 갖는 복수가 존재한다.

[0308] 단계 III - 암의 성장은 하나 또는 두 난소와 관련되고 하기 중 하나 또는 둘 모두가 나타난다: (1) 암은 골반을 너머 복부의 내벽까지 확산되고; (2) 암은 림프절까지 확산된다. 종양은 실제 골반까지 제한되고 소장 또는 장막까지의 조직학적으로 입증된 악성 확대를 가진다.

[0309] 단계 IIIA - 병기수술 과정에서, 의사는 하나 또는 두 난소와 관련된 암을 볼 수 있으나 복부에서는 매우 가시적인 암은 없으며 이는 림프절까지 확산되지 않는다. 그러나, 생검이 현미경 하에서 확인되는 경우, 암의 매우 소량의 증착이 복부 복막 표면에서 발견된다.

[0310] 단계 IIIB - 종양은 하나 또는 두 난소에 존재하고, 외과의사가 보기에 충분하게 크나 직경에 있어서 2 cm를 초과하지 않는 암의 증착이 복부에 존재한다. 암은 림프절에 확산되지 않는다.

[0311] 단계 IIIC - 종양은 하나 또는 두 난소에 존재하고, 하기 중 하나 또는 둘 모두가 나타난다: (1) 암은 림프절로

확산되고; 및/또는 (2) 암의 증착이 직경에 있어서 2 cm를 초과하고 복부에서 발견된다.

[0312] 단계 IV - 이것은 난소암의 가장 진전된 단계이다. 암의 성장은 하나 또는 두 난소와 관련되고 원격 전이 (복강 외부에 위치한 기관으로의 암의 확산)가 발생된다. 능막 유체(폐를 둘러싼 공동으로부터의 것)에서의 난소암 세포의 발견은 또한 단계 IV 질환의 증거이다.

[0313] 일 구현예에서, 난소 암은 하기와 같다: 유형 I, 예를 들면 IA, IB 또는 IC; 유형 II, 예를 들면 IIA, IIB 또는 IIC; 유형 III, 예를 들면 IIIA, IIIB 또는 IIIC; 또는 유형 IV.

[0314] 본 개시물은 특히 본원에 기재된 바와 같은 임의의 단계의 치료에 관한 것이다.

### 병용 요법

[0316] 일 구현예에서, 바이러스는 추가의 암 치료 또는 요법의 투여와 조합하여 투여된다.

[0317] 본원에 사용되는 "조합하여"는 종양용해성 바이러스가 암 치료 또는 요법 이전, 동시에 및/또는 이후에 투여되는 것을 포함하도록 의도된다.

[0318] 일 구현예에서, 종양용해성 아데노바이러스는 고강도 집속 초음파 (HIFU) 치료와 조합하여 사용된다.

[0319] 암 요법은 수술, 방사선 요법, 표적 요법 및/또는 화학요법을 포함한다.

[0320] 본원에서 사용되는 암 치료는 치료적 화합물 또는 생물학적 제제, 예를 들면 암의 치료하기 위해 의도된 항체를 사용한 치료 및/또는 이의 유지 요법을 지칭한다.

[0321] 일 구현예에서, 암 치료는 화학치료제, 표적화된 항암제, 방사선요법, 방사선-동위원소 요법 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 임의의 다른 항암 요법으로부터 선택된다.

[0322] 추가의 독립적인 양태에 있어서, 본 개시물은 종양용해성 유형 B 아데노바이러스, 예컨대 ColoAd1, 및 아데노바이러스 활성을 방해하지 않는 화학치료제를 포함하는 병용 요법과 관련된다. 본원에서 이용된 바와 같은 유형 B 아데노바이러스, 예컨대 ColoAd1는 이의 제형, 예를 들면 약제학적 이의 제형을 포함한다.

[0323] 본원에서 사용되는 활성은 바이러스의 임의의 유리한 특성 또는 특징, 예를 들면 종양용해성 활성 및 또는 암세포에서 복제하는 바이러스의 능력, 예컨대 생체내 바이러스 복제를 지칭한다.

[0324] 일 구현예에서, 병용 요법에서 ColoAd1은 본원에 기재된 요법에 따라 투여된다.

[0325] 일반적으로, 병용 요법은 아데노바이러스의 제형 및 화학치료제의 제형으로 제공될 수 있다. 따라서, 아데노바이러스의 투여 및 화학요법은 적절하게는 별개의 것일 수 있다. 이를 투여는 동일 또는 상이한 날에 있을 수 있다.

[0326] 일 구현예에서, 아데노바이러스는 적합한 요법으로 일주일 투여되고 화학요법은 차후 주, 예를 들면 다음주에 투여된다.

[0327] 하나 이상의 구현예에서, 화학치료제 및 아데노바이러스는 상승작용 치료 효과를 가질 수 있다.

[0328] 종양용해성 아데노바이러스는 요법에 대한 전처리, 예컨대 종양을 축소하고, 전이를 치료하고/하거나 전이 또는 추가 전이를 예방하는 수술 (신보조요법)로서 사용될 수 있다.

[0329] 동시적으로 추가의 암 치료제가 종양용해성 아데노바이러스 제형으로서 동시에 또는 대량적으로 동시에 본원에서와 같이 이용된다. 치료제는 동일한 제형 또는 별개의 제형 내에 함유될 수 있다.

[0330] 일 구현예에서, 바이러스는 화학치료제, 예를 들면 본원에 기재된 바와 같이, 예컨대 파클리탁셀, 아브락산 또는 유사물과 조합하여 투여된다.

[0331] 본원에서 사용되는 화학치료제는 악성 세포 및 조직을 선택적으로 파괴하는 특이적 항신생물성 화학적 제제 또는 약물을 지칭한다. 예를 들면, 알킬화제, 항대사물질, 안트라사이클린, 식물성 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제, 및 다른 항종양 제제. 화학요법의 다른 예는 독소루비신, 5-플루오로우라실 (5-FU), 파클리탁셀, 카페시타빈, 이리노테칸, 및 플라틴 예컨대 시스플라틴 및 옥살리플라틴을 포함한다. 바람직한 용량은 치료되는 암의 특징에 기초하여 선택될 수 있다.

[0332] 놀랍게도, 본 발명자들은 치료제의 특정 부류가 바이러스 복제를 억제할 수 있고, 예를 들면, 토포이소머라제 또는 parp 억제제가 생체내 바이러스의 복제를 억제할 수 있다는 것을 확립하였다. 바이러스가 복제될 수 있도

록 암세포에서 바이러스성 감염을 이루는 것이 바람직한 것으로 여겨지는 경우, 이후 바이러스 복제를 억제하는 화합물의 공동-투여는 바람직하지 않을 수 있다.

- [0333] 일 구현예에서, 화학치료제는 효소 억제제가 아니다. 따라서 일 구현예에서, 병용 요법은 토포이소머라제 억제제를 사용하지 않는다.

[0334] 일 구현예에서, 화학치료제는 parp 억제제가 아니다.

[0335] 일 구현예에서, 병용 요법은 백금 함유 화학치료제, 예를 들면 시스플라틴, 카보플라틴 또는 옥살리플라틴을 사용한다.

[0336] 일 구현예에서, 상기 조합은 미세소관 억제제, 예를 들면 빙크리스틴 설페이트, 에포테론 A, N-[2-[(4-하이드록시페닐)아미노]-3-페리디닐]-4-메톡시벤젠설폰아미드 (ABT-751), 탁솔 유도된 화학치료제, 예를 들면 파클리탁셀, 아브락산, 또는 도세탁셀 또는 이들의 조합을 사용한다.

[0337] 일 구현예에서, 상기 조합은 mTor 억제제를 사용한다. mTor 억제제의 예는 하기를 포함한다: 에버롤리무스 (RAD001), WYE-354, KU-0063794, 파파마이신 (시롤리무스), 템시롤리무스, 테포로리무스(MK-8669), AZD8055 및 BEZ235(NVP-BEZ235).

[0338] 일 구현예에서, 상기 조합은 Pi3 키나아제 억제제를 사용한다. Pi3 키나아제 억제제의 예는 하기를 포함한다: GDC-0941, ZSTK474, PIK-90, LY294002, TG100-115, XL147, GDC-0941, ZSTK474, PIK-90, LY294002, TG100-115, XL147, AS-605240, PIK-293, AZD6482, PIK-93, TGX-221, IC-87114, AS-605240, PIK-293, AZD6482, PIK-93, TGX-221, IC-87114 및 본원에 참조로 포함된 WO2011/048111에 개시된 화합물로서 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-에티닐퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(3-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)프로프-1-인-1-일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인-1-일)퀴나졸린-4(3H)-온; 6-(2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인-1-일)퀴나졸린-4(3H)-온; 3-((2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-(3-(2-(2-하이드록시에톡시)에톡시)프로프-1-인-1-일)-4-옥소퀴나졸린-3(4H)-일)메틸) 벤조니트릴; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(3-(2-모폴리노에톡시)프로프-1-인일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-에티닐퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(3-클로로벤질)-5-에티닐퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(3-클로로벤질) -5-에티닐 퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(2-플루오로벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(2-플루오로벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(3-트리-플루오로메틸) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(4-클로로벤질) -5-에티닐 퀴나졸린-4(3H)-온;

2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(4-(메틸설포닐) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(4-(메틸-설포닐) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(4-(트리플루오로메틸) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(3-(트리플루오로메틸) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(4-클로로벤질) -5-에티닐 퀴나졸린-4(3H)-온;

3-((2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-4-옥소-퀴나졸린-3(4H)-일)메틸) 벤조니트릴; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(3-(메틸-설포닐) 벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 3-((2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-4-옥소-퀴나졸린-3(4H)-일)메틸) 벤조니트릴; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(4-클로로벤질) -5-에티닐 퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(4-클로로벤질) -5-에티닐 퀴나졸린-4(3H)-온;

(3-하이드록시페닐)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(4-클로로벤질)-5-(3-메톡시-프로프-1-인일)퀴나졸린-4(3H)-온;

벤조니트릴;

2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-5-에티닐-3-(2-플루오로-4-메톡시벤질)퀴나졸린-4(3H)-온; 1-(3-(2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)프로프-2-인일)우레아; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-플루오로벤질)-5-(3-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)프로프-1-인일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-플루오로-3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-에티닐-퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(3-페녹시프로프-1-인일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 6-(2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)-N-(2-메톡시에틸)헥스-5-인아미드; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(7-모폴리노-7-옥소헵트-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(5-모폴리노-5-옥소펜트-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-((5-메틸피라진-2-일)메틸)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-옥소-6-(페페리딘-1-일)헥스-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 6-(2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)-N,N-디에틸헥스-5-인아미드; 7-(2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로-벤질)-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)헵트-6-이노익산; 2-아세트아미도-N-(3-(2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-4-옥소-3,4-디하이드로퀴나졸린-5-일)프로프-2-인-1-일)아세트아미드; 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)-3-(3-메톡시-5-(트리플루오로메틸)벤질)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인-1일)퀴나졸린-4(3H)-온; 2-((4-아미노-3-(4-



로[3,4-*d*]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-(3-(디메틸아미노)페롤리딘-1-일)-6-옥소헥스-1-인일)퀴나졸린-4(3*H*)-온;  
 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시페닐)-1*H*-페라졸로[3,4-*d*]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-(4-메틸-1,4-디아제판-1-일)-6-옥소헥스-1-인일)퀴나졸린-4(3*H*)-온; 2-((4-아미노-3-(3-하이드록시페닐)-1*H*-페라졸로[3,4-*d*]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-(4-메틸-1,4-디아제판-1-일)-6-옥소헥스-1-인일)퀴나졸린-4(3*H*)-온, 2-((4-아미노-3-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-1*H*-페라졸로[3,4-*d*]페리미딘-1-일)메틸)-3-(2-클로로벤질)-5-(6-모폴리노-6-옥소헥스-1-인일)퀴나졸린-4(3*H*)-온

[0339] 또는 이의 모든 임체이성질체, 타우토머 및 동위원소 유도체를 포함하는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[0340] 일 구현예에서, 상기 조합은 MEK 억제제를 사용한다. MEK 억제제의 예는 하기를 포함한다: AS703026, CI-1040 (PD184352), AZD6244 (셀루메티닙), PD318088, PD0325901, AZD8330, PD98059, U0126-EtOH, BIX 02189 또는 BIX 02188.

[0341] 일 구현예에서, 상기 조합은 AKT 억제제를 사용한다. AKT 억제제의 예는 하기를 포함한다: MK-2206 및 AT7867.

[0342] 일 구현예에서, 상기 조합은 오로라 키나아제 억제제를 사용한다. 오로라 키나아제 억제제의 예시는 하기를 포함한다: 오로라 A 억제제 I, VX-680, AZD1152-HQPA(바라세르닙), SNS-314 에실레이트, PHA-680632, ZM-447439, CCT129202 및 헤스페라딘.

[0343] 일 구현예에서, 상기 조합은 p38 억제제를 사용하며, 예를 들어, 상기 조합은 예를 들면 WO2010/038086에 개시된 N-[4-{4-[3-(3-*tert*-부틸-1-*p*-톨릴-1*H*-페라졸-5-일)우레이도]나프탈렌-1-일옥시}메틸]페리딘-2-일]-2-메톡시아세트아미드이다.

[0344] 일 구현예에서, 상기 조합은 Bcl-2 억제제를 사용한다. Bcl-2 억제제의 예는 하기를 포함한다: 오바토클락스 에실레이트, ABT-737, ABT-263(나비토클락스) 및 TW-37.

[0345] 일 구현예에서, 상기 조합은 항대사물질을 사용한다. 항대사물질의 예는 하기를 포함한다: 카페시타빈 (크셀로다), 플루다라빈 포스페이트, 플루다라빈(fladara), 테시타빈, 랄티트렉세드(토무텍스), 챔시타빈 하이드로클로라이드 및 클라드리빈.

[0346] 일 구현예에서, 치료제는 면역 반응 및/또는 종양 혈관화를 조절하는 것을 보조할 수 있는 강시클로비르이다.

[0347] 일 구현예에서, 본원의 방법에서 사용되는 하나 이상의 요법은 대개 요법의 다른 방법과 수반되는 경우, 저용량의 항암 약물을 사용한 연속적이거나 빈번한 치료인 메트로노믹이다.

[0348] 하위그룹 B 종양용해성 아데노바이러스, 특히 Ad11 및 이들로부터 유도된 것 예컨대 ColoAd1은 특히 화학치료제와 상승작용하고, 이들은 주로 괴사 메카니즘에 의해 암세포를 사멸하는 세포자멸사와 대체로 무관한 메카니즘을 가지는 것으로 보이기 때문이다. 게다가, 화학요법 과정에서 종양용해성 바이러스가 더 큰 효율로 기능하도록 할 수 있다.

[0349] 일 구현예에서, 화학치료제는 비경구로 투여된다.

[0350] 일 구현예에서, 화학치료제는 일시적으로 또는 투여의 대안적인 방법으로 또는 이 둘 모두로 바이러스에 별도로 투여될 수 있다. 치료는 동시 또는 순차적일 수 있다.

[0351] 일 구현예에서, 암 치료제는 표적화된 제제, 단클론성 항체 예컨대 베마시주맙, 세툭시맙 또는 파니투무맙 또는 항체 콘주게이트, 예컨대 특히 항체 또는 결합 절편이 독소와 연결되는 유형의 항체 약물 콘주게이트이다.

[0352] 일 구현예에서, 암 치료제는 면역치료제, 예를 들면 이필리무맙 또는 다른 항-CTLA4, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 다른 체크포인트 억제제, 또는 사이토카인 또는 사이토카인 유사체이다.

[0353] 본원에서 사용되는 면역관문 억제제는 T-세포 활성화 및 기능을 억제하거나 하향 조절하도록 작용하는 T-세포막 단백질로부터의 신호전달을 억제하는 제제를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0354] 일 구현예에서, 바이러스는 방사선요법의 투여와 조합하여 투여된다.

[0355] 본원에서 사용되는 방사선요법은 이온화 방사선의 의료 용도를 지칭하는 것으로 의도된다. 암세포는 일반적으로 미분화되고 줄기세포-유사이고; 이들은 대부분의 건강한 분화된 세포보다 더 많이 재생되고 아치사 손상을 치유하는 감소된 능력을 가진다. DNA 손상은 이후 세포 분열을 통해 진행되고; 암세포' DNA에 대한 손상이

누적되고, 이는 이들이 사멸되거나 더 느리게 재생되는 것을 야기한다.

[0356] 일 구현예에서, 방사선요법은 동시에 투여된다.

[0357] 일 구현예에서, 방사선요법은 순차적으로 투여된다.

[0358] 일 구현예에서, 바이러스는 암 요법, 예를 들면 악액질에 대한 치료, 예컨대 암 악액질, 예를 들면 S-핀돌룰, S-메핀돌룰 또는 S-보핀돌룰의 치료에 부합하는 요법과 조합하여 투여된다. 적합한 용량은 단회 용량 또는 일일 동안 투여되는 다중 용량으로서 정의되는 다중 용량을 제공하는, 일일당 2.5mg 내지 100mg, 예컨대 2.5mg 내지 50mg/1일의 범위일 수 있다.

[0359] 일 구현예에서, 바이러스는 예를 들면 해열, 항히스타민제, 항구토제, 설사, 스테로이드 및 진통제로부터 선택되는 하나 이상의 예방적 제제의 투여와 조합하여 투여된다.

[0360] 해열제는 아스피린 및 비-스테로이드 항-염증제, 예를 들면 이부프로펜, 나프록센 및 케토프로펜을 포함한다.

[0361] 항히스타민제는 아크리바스틴, 아잘라스틴, 브롬페니라민, 부클리진, 브로모디펜하드라민, 카르보녹사민, 세티리진, 클로르프로마진, 사이클리진, 클로르페니라민, 클로로디펜하드라민, 클레마스틴, 사이프로헵타딘, 테슬로라타딘, 텍스브롬페니라민, 데스클로르페니라민, 텍스클로르페니라민, 디멘하이드리네이트, 디메틴텐, 디펜하드라민, 독실아민, 앱스틴, 엠브라민, 펙소페나딘, 레보세티리진, 로라타딘, 메클리진, 미타자피넴 올로파타드린, 페니니다민, 페니라민, 페닐톨록사민, 프로메타진, 파이릴아민, 쿠에티아핀, 루파타딘, 트리펠렌나민 및 트리프롤리딘을 포함한다.

[0362] 항구토제는 돌라세트론, 그라니엔트론, 온단세트론, 트로피세트론, 팔로노에스트론, 미타자핀, 둠페리돈, 올란자핀, 드로페리돌, 메토클로프라마이드, 알리자프라이드, 프로플로페아진을 포함한다. 일 구현예에서, 항히스타민제는 항구토제로서 이용될 수 있다. 지사제는 메틸셀룰로오스, 아타필자이트, 비스무트 서브살리실레이트, 아트로핀/디페녹실레이트, 로페르아미드 및 다른 오피오이드 예컨대 코데인 및 모르핀을 포함한다.

[0363] 진통제는 비-스테로이드성 항-염증제, 파라세타몰, cox-2 억제제, 아편제 및 모르핀유사작용제, 예컨대 모르핀, 코데인, 옥시코돈, 하이드로코돈, 디하이드로모르핀, 페티딘, 부프레노르핀, 트라마돌 등을 포함한다.

[0364] 일 구현예에서, 바이러스 치료는 스테로이드 과정과 조합하여 사용된다.

[0365] 스테로이드는 하이드로코르티손, 코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 텍사메타존 등을 포함한다.

[0366] 본원에서 사용되는 예방조치는 예를 들면 바이러스의 투여 과정 또는 이후에서의 부작용을 예방 또는 개선하기 위해 취하는 조치로 이루어지는, 예방적인 의약 또는 치료로서 지정되는 것으로 의도된다.

[0367] 일 구현예에서, 예방은 일시적으로 또는 투여의 대안적인 방법에 의해 또는 둘 모두로, 바이러스에 별도로 투여된다. 치료는 동시에 또는 순차적일 수 있다.

[0368] 일 구현예에서, 추가적인 수분공급이 동시에 또는 순차적으로 바이러스의 투여와 조합하여 제공된다.

[0369] 본원에서 사용되는 추가의 수분공급은 환자가 제형에 포함된 것들 외에 유체를 공급받는 것을 의미한다. 이는 적합한 액체의 임의의 형태, 예를 들어 염수 또는 글루코오스 주입액일 수 있다.

[0370] 일 구현예에서, 본원에서의 바이러스 요법은 항-염증성, 예를 들면 스테로이드 또는 비-스테로이드 항-염증성과 조합하여 투여된다.

[0371] 일 구현예에서, 본 개시물에 따른 바이러스 요법은 해열제와 조합하여 투여된다.

[0372] 일 구현예에서, 바이러스 치료제는 수분공급 요법, 예를 들면 유체의 정맥태 투여, 특히 등장의 염수 또는 글루코오스와 조합하여 투여된다.

[0373] 일 구현예에서, 본 방법은 외래환자로서 환자를 치료하기에 적합하다.

[0374] 본원에서 사용되는 외래환자는 치료 과정에서 입원하지 않고, 대신 치료를 위한 간단한 수술을 위해 의사 집무실, 병원 또는 치료를 위한 외래 수술실을 방문하는 환자이다.

[0375] 일 구현예에서, ColoAd1을 포함하는 본원에 기재된 약제학적 제형을 사용한 환자의 치료 방법이 제공되고, 상기 방법은 상기 환자로 정맥내 투여 단계를 포함한다: 1일에서의 투여, 그 다음 3일에서의 용량, 및 5일에서의 3회

용량.

- [0376] 일 구현예에서, 치료에서의 사용을 위한, 예컨대 하기 투여에 의한 종양 및/또는 악성종양 및/또는 암 치료를 위한 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스의 비경구 제형이 제공된다: 본원에 기재된 상기 제형의 제1 용량, 그 다음 이의 추가의 치료적 용량.
- [0377] 여기서 제1 용량 및 추가의 용량은 상기 기재된 바와 같이 14일 기간 내에 투여된다.
- [0378] 일 구현예에서, 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스를 사용한 다중 주기의 치료의 용도가 제공된다. 치료 주기는 본원에서 환자가 반응이 평가된 후 상대적으로 짧은 기간에 걸쳐 환자에 투여되는 일련의 바이러스 용량으로서 해석된다. 치료 주기는 위험성 유익성(risk benefit) 환자의 최대 이익 내인 것으로 결정되는 경우 수회 반복될 수 있다.
- [0379] 일 구현예에서, 특정 항바이러스 적정농도의 수준을 결정하고, 예비-치료 적정농도의 특정 퍼센트 미만의 적정 농도가 재치료에 대해 양성의 위험성 유익성 프로파일(positive risk benefit profile)을 나타내도록 예비-치료 적정농도와 이를 비교함으로써 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스를 사용한 치료의 반복된 사이클의 적합성을 평가하기 위한 방법이 제공된다.
- [0380] 일 구현예에서, 본원에서의 치료 요법의 사용에 의한 종양 및/또는 악성종양의 치료 및/또는 암 치료를 위한 치료를 위한 약제의 제조에서의 복제 가능 종양용해성 하위그룹 B 아데노바이러스의 비경구 제형의 용도가 제공된다.
- [0381] 일 구현예에서, 상기 제형은 전이의 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0382] 일 구현예에서, 멸균 조건 하에서 환자에의 투여에 앞서 공기 조화기 예컨대 배기 장치를 사용하는 복잡하고 비싼 용량 제제의 필요성을 피하기 위해서 적절한 용량 및 용적의 멸균된 재충전된 포장 주사기로서 나타내는 제형을 제공한다.
- [0383] 본 명세서의 맥락에서 "포함하는(comprising)"은 "포괄하는(including)"으로서 해석되어야 한다.
- [0384] 특정 성분을 포함하는 본 발명의 양태는 또한 관련된 성분으로 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진" 대안적인 구현예로 확장되는 것으로 의도된다.
- [0385] 본원에 기재된 이의 임의의 양성적인 구현예 또는 조합은 부정적인 배제, 즉 권리포기의 기준일 수 있다.
- [0386] 실시예
- [0387] 전임상 효력 및 선택성

[0388] 표 2는 다양한 상피 세포주에서의 ColoAd1의 IC<sub>50</sub>를 나타낸다.

세포명	세포형	IC50
HT-29 <sup>1</sup>	결장직장암	0.06
HT-29 <sup>2</sup>	결장직장암	0.04
DLD-1 <sup>1</sup>	결장직장암	0.35
LS1034 <sup>1</sup>	결장직장암	0.21
HCT116 <sup>1</sup>	결장직장암	0.02
LS174T <sup>1</sup>	결장직장암	0.57
SW48 <sup>1</sup>	결장직장암	0.06
SW403 <sup>1</sup>	결장직장암	1
HepG2 <sup>2</sup>	간종양	0.05
PC-3 <sup>1</sup>	전립선암	0.23
DU145 <sup>1</sup>	전립선암	5
Panc-1 <sup>1</sup>	췌장암	12
MDA231 <sup>1</sup>	유방암	0.84
OVCAR-3 <sup>1</sup>	난소암	3
A549 <sup>2</sup>	폐암	2
HMEC <sup>1</sup>	모세관 내피	575
HUVE <sup>1</sup>	제대 내피	50
HUVE <sup>2</sup>	제대 내피	60
간세포 <sup>2</sup>	정상 간세포	1050
W138 <sup>2</sup>	섬유아세포	350

[0389]

[0391] 상피성 유도된 암 및 정상 세포의 범위에서의 ColoAd1의 IC<sub>50</sub>. 세포의 50%를 사멸하는데 요구되는 입자의 수 (IC<sub>50</sub>)를 표준 6일 MTS 분석을 사용하여 시험관내에서 결정하였다.

[0392] 1 Schering AG에 의해 수행되고 Kuhn 등, 2008에 공개된 결과

[0393] 2. 옥스퍼드대에서 수행된 반복 및 추가 연구 (미공개됨)

[0394] 표 3은 다양한 비-상피 세포주에 대한 ColoAd1의 IC<sub>50</sub>를 나타낸다.

세포명	세포형	IC50
Colo320DM <sup>1</sup>	신경 내분비계	105
501 <sup>2</sup>	흑색종	430
IG37 <sup>2</sup>	흑색종	>500
IG39 <sup>2</sup>	흑색종	470
U87MG <sup>2</sup>	교모세포종	>1000
BBA <sup>2</sup>	교모세포종	>1000
BBB <sup>2</sup>	교모세포종	>1000
K562 <sup>2</sup>	백혈병	>1000

[0395]

[0396] 비)- 유도된 암 범위에서의 ColoAd1의 IC<sub>50</sub>. 세포의 50%를 사멸하는데 요구되는 ColoAd1 입자의 수(IC<sub>50</sub>)를 표준 5일 MTS 분석을 사용하여 시험관내에서 결정하였다.

[0397] 1 Schering AG에 의해 수행되고 Kuhn 등, 2008에 공개된 결과

[0398] 2. 옥스퍼드대에서 수행된 반복 및 추가 연구 (미공개됨)

[0399] 표 4는 다양한 정상 비-암 인간 세포주에서의 ColoAd1 복제를 나타낸다.

인간 세포형	계놈 (세포)	대조군 (%)	계놈 (상청액)	대조군 (%)	HT29세포의 성공적인 재-감염
HT29 (+ve 대조군)	3.18E+08	100	4.29E+06	100	있음
간세포	6.83E+03	0.0021	2.47E+02	0.01	없음
사구체 내피 세포	4.78E+02	0.0002	1.22E+03	0.03	없음
피부 미세혈관 세포	1.03E+03	0.0003	1.45E+03	0.03	없음
심장 미세혈관 세포	5.36E+02	0.0002	1.29E+03	0.03	없음
각막 상피	2.51E+06	0.7889	7.06E+04	1.65	없음
기관지 상피	5.48E+05	0.1722	2.88E+04	0.67	없음
신피질 상피	3.68E+04	0.0116	3.67E+03	0.09	없음
혈관간막세포	1.18E+03	0.0004	9.71E+02	0.02	없음
장근섬유모세포	9.50E+02	0.0003	1.49E+03	0.03	없음
난소 상피	2.38E+06	0.7479	9.99E+04	2.33	없음
성상교세포	7.00E+02	0.0002	9.26E+02	0.02	없음
평활 근육 세포	8.65E+02	0.0003	9.42E+02	0.02	없음
심근 세포	1.28E+03	0.0004	7.99E+02	0.02	없음
신장근위	8.48E+05	0.2666	4.46E+03	0.10	없음
CD34+	1.59E+03	0.0005	2.84E+03	0.07	없음
PBMC	1.25E+03	0.0004	1.02E+03	0.02	없음

[0400]

[0401] 시험관내 단일층에서 성장하는 인간 세포를 72 시간 동안 ColoAd1에 노출시켰다. ColoAd1 계놈 복제의 총수는 qPCR에 의해 결정하였다. 암종 세포 양성 대조군 (HT29)에 상대적인 %로서 그리고 총 계놈 복제로서 데이터를 나타내었다. 이들 정상 인간 세포로부터 유도된 ColoAd1 물질을 이후 HT29 암종 세포에 대해 생존력에 관하여 시험하였다. 모든 경우에서 회수된 ColoAd1 물질은 HT29 세포에서 복제되는 것을 나타내지 않았다.

[0402]

### 전-임상 순환 동력학

[0403]

ColoAd1 순환 동력학을 CD-1 마우스에서 얻었다. 마우스 (그룹당 3마리)는 꼬리 정맥을 통해 바이러스 입자가 투여되었고 전혈 샘플에서의 순환 계놈을 정량적 PCR (qPCR)에 의해 결정하였다. 이 모델에서의 ColoAd1 반감기는 용량-의존적이다. 더 낮은 주입 용량 (복수 투여일에서  $1 \times 10^9 - 2 \times 10^{10}$ )에서, 평균 알파 반감기는 다른 아데노바이러스에 대해 이전에 보고된 값과 일치되는  $1.8 +/- 0.5$  분이다 (Green 2004). 더 높은 용량 ( $2 \times 10^{11}$  초과)에서, 청소능의 포화가 발생되는 것을 나타내고, 더 긴 순환 수준을 생성하였다 (평균 알파 반감기  $7.8 +/- 2$  분). 본원에 기재된 ColoAd1 연구에서의 포화는 다중 약력학적 파라미터를 통해 반영되었다.

[0404]

표 5는 ColoAd1 용량이  $2 \times 10^{11}$  초과로 투여되는 경우 30분 시점에서 유지된 입자의 백분율, 반감기 및 곡선하 면적 (AUC)에서 유의미한 증가를 입증한다. 특히 최적의 동력학 (AUC, 30분에서의 유지된 입자 백분율 및 평균 알파 t1/2)이 낮은 최초 용량 이후 고용량과 반대로 3회의 동일한 고용량이 투여시 모두 달성된 것에 주목하였다. 이 데이터로부터, 혈액 순환 시간이 마우스보다 인간에서 상당하게 길어지는 경우, 인간에서의 반감기가 더 긴 것으로 고려될 것이고 낮은 최초 용량은 하위-그룹 B 아데노바이러스에 대한 값이 아닐 수 있다는 것이 예상 되었다. 또한, 종양을 갖는 인간 환자에서, 후속 방출과 함께 암세포에서의 이 바이러스의 복제가 이후 시점에서 바이러스의 추가 증폭을 초래할 것이라는 점이 예상되었다. 임상 연구는 이에 따라 계획되었다.

[0405] 표 5: CD-1 마우스 (그룹당 3 마리 마우스)에서의 다중-정맥내 주사에 따른 ColoAd1의 순환 동력학

연구	용량	평균 알파 <b>t<sub>1/2</sub></b> (분)	평균 <b>AUC</b> mL <sup>-1</sup> 분 <sup>-1</sup>	30분에서의 주입 바이러스의 평균(%)
CD1 마우스에서의 다중- 용량연구 1일에서의 1x10 <sup>9</sup> 이후 3 및 5일에서의 1x10 <sup>10</sup>	1x10 <sup>9</sup> (d1)	2.2	1.04x10 <sup>9</sup>	0.77
	1x10 <sup>10</sup> (d3)	2.6	9.17x10 <sup>9</sup>	0.52
	1x10 <sup>10</sup> (d5)	2.6	1.20x10 <sup>10</sup>	0.42
CD1 마우스에서의 다중- 용량 연구 1일에서 1x10 <sup>10</sup> 이후 3 및 5일에서의 1x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>10</sup> (d1)	1.2	1.06x10 <sup>10</sup>	0.10
	1x10 <sup>11</sup> (d3)	1.3	9.20x10 <sup>10</sup>	0.75
	1x10 <sup>11</sup> (d5)	1.2	1.06x10 <sup>11</sup>	0.97
CD1 마우스에서의 다중- 용량연구 1일에서의 2x10 <sup>10</sup> 이후 3 및 5일에서의 2x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>10</sup> (d1)	1.7	1.71x10 <sup>10</sup>	0.29
	2x10 <sup>11</sup> (d3)	3.7	3.00x10 <sup>11</sup>	4.52
	2x10 <sup>11</sup> (d5)	4.0	6.31x10 <sup>11</sup>	13.62
CD1 마우스에서의 다중- 용량연구 1, 3 및 5일에서의 2x10 <sup>11</sup> 으로의 모든 3회 용량	2x10 <sup>11</sup> (d1)	6.5	1.09x10 <sup>12</sup>	27.43
	2x10 <sup>11</sup> (d3)	10.1	1.21x10 <sup>12</sup>	28.67
	2x10 <sup>11</sup> (d5)	6.8	7.875x10 <sup>11</sup>	10.48

## [0406] [0407] 전-임상 상호작용 연구

[0408] 바이러스 입자는 신속한 중화(neutralisation)를 야기하는 항체, 보체 및 혈구를 포함하는 인간 혈액의 성분과 상호작용할 수 있다 (Lyons 2005, Carlisle 2009). 이들 작용은 종-특이적이고 동물에서 효과적으로 모델화될 수 없다.

[0409] 인간 혈액에서의 중화를 평가하기 위해, ColoAd1을 허용된 세포 (HT29 결직장 종양 세포)를 적용하기 전에 개인으로부터 막 단리된 전체의 인간 혈액에서 배양시킬 수 있다. 바이러스 농도의 범위는 표적 임상 용량 범위 ( $2 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^9$  개의 입자/인간 혈액(mL), 및 인간 혈액량의 범위를 가정함)를 포함하도록 선택될 수 있다. 잔류 바이러스 효력을 세포독성에 의해 결정되고 인간 혈액 (매체 단독)에서의 배양이 없는 바이러스 감염과 비교될 수 있고,  $2 \times 10^6$  내지  $2 \times 10^9$  개의 바이러스 입자/mL 범위의 농도에서 효력 수준이 바람직하다.

[0410] 도 1에서의 데이터는 ColoAd1이 인간 혈액에 의해 미미한 영향만을 받는다는 것을 입증한다. 새로운 인간 혈액을 리튬 혜파린튜브를 사용하여 9 대상체 (A - I)로부터 수집하였다. ColoAd1 바이러스 입자를  $2 \times 10^9$  VP/mL로부터 10배 희석으로 혈액 샘플에 부가하였고, 이는 용량이 총 혈액량 (5L의 혈액인 것으로 가정됨)에서 완전하게 희석되는 것으로 가정하여  $1 \times 10^{13}$ 의 잠재적 동일 인간 용량을 반영한다. 37°C에서 20분 배양후, 바이러스 / 혈액 혼합물을 96-웰 플레이트에서 성장하는 A549 종양 세포에 부가하였다. 이후 남아있는 생존가능 A549 세포의 비율을 5일 후 결정하였고 백분율로서 플롯화하였다. IC<sub>50</sub>은  $2 \times 10^6$  VP/mL의 바이러스 혈액 농도와 대략 동일한 수준에서 발생했다. 따라서 바이러스의 이 수준을 인간 임상 연구에서 달성되는 최소 표적 수준으로서 결정하였다.

[0411] 다수의 시험관내 연구를 또한 ColoAd1과 인간 혈구와의 상호작용으로 수행하였다. 새로운 혈액을 4명의 개인으로부터 얻었고, 적혈구, 혈소판 및 백혈구를 설정하고 개별 실험에서 사용하기 위해 생리적 세포 농도 ( $5 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^8$  및  $6 \times 10^6$  / mL, 각각)에서 PBS에 재현탁시켰다. qPCR 분석은 80% (82% ± 8%) 초과의 ColoAd1이 인간 혈구, 주로 적혈구 및 백혈구와 연관된다는 것을 나타내었다. 5 또는 30분의 배양 이후 혈구에 결합되는 ColoAd1의 분획에서 유의미한 차이가 없었다. Ad5는 ColoAd1보다 비교적 더 높은 수준의 인간 혈구 (95.5 ± 1.2%)에 대한 결합을 나타내었다. 상대적인 형광에 기초하여, 30분 동안 인간 혈구와 함께 ColoAd1-gfp의 예비-배양은 SW480 종양 세포의 감염률 (>90%)로 유의미하게 억제하였고, 이는 더 높은 수준의 CD46, ColoAd1 세포성 수용체만을 발현한다. 더 높은 수준의 CD46을 발현하는 HT29 세포의 감염은 아마도 이를 종양 세포에서의 ColoAd1 수용체의 더 높은 발현 수준으로 인해 매우 적은 범위 (~41%)로 억제되었다. 마지막으로, 높은 수준의 CD46을 발현하고 ColoAd1에 대한 "싱크"로서 역할을 할 수 있는 백혈구의 감염을, 이식유전자 발현의 범위를 결정하기 위해 ColoAd1-gfp를 사용하여 평가하였다. 24시간 이후 어떠한 이식유전자 발현의 증거는 백혈구에서 관찰되지 않았다. 그에 반해서, 이전의 연구는 Ad5가 시험관내 동일한 조건 하에서 단핵구를 효율적으로 감염시킬 수 있음을

을 나타내었다. 요약하면, 이들 연구는 ColoAd1과 세포성 혈액 성분의 상호작용은 제한되고 Ad5의 것과 상당하게 상이함을 제시한다. 또다시, 임상 연구를 이를 고려하여 설계하였다.

#### [0412] ColoAd1의 전-임상 생체분포

[0413] ColoAd1의 청소능의 생체분포를 정상 마우스 및 일차 바이러스 수용체 CD46 (정상 마우스에서 발현되지 않은 그룹 B 아데노바이러스에 대한 수용체)을 발현하는 형질전환 마우스에서 결정하였다. 정상 마우스로의  $1 \times 10^{11}$  바이러스 입자의 꼬리 정맥 투여 이후, 바이러스 입자가 주로 24 시간 이후 간, 비장 및 폐에서 발견되었다. (도 2)는 바이러스 복제/mg를 나타내고 이와 같이 더 큰 기관은 백분율에 기초하여 총 바이러스 분포의 우세한 부위를 나타내었다). 동일한 표적 기관에 대한 유사한 분포가 CD46 형질전환 마우스 (도 3)에서 관찰되었고, 이는 CD46 수용체가 분포의 유의미한 결정인자가 아님을 나타낸다. 비-복제된 변종 (ColoAd1CJ132)의 분포는 ColoAd1의 것과 동일하였고 이는 복제가 이 임의의 분포 효과와 관련없음을 나타낸다. 그러나, 종양을 가진 인간 환자에서, 암세포에서의 이 바이러스의 복제는 후속 방출과 함께 이후 시점에서 바이러스의 추가 증폭을 야기할 것으로 예상되었고 그리하여 임상 연구가 이에 계획되었다.

#### [0414] 전-임상 바이러스 청소능

[0415] 바이러스 청소능의 완료 시점을 확인하기 위해서, 장기 입자 청소능 연구를 정상 Balbc 마우스에서 수행하였다. 바이러스 분포에 대한 지배적인 기관인 간, 비장 및 폐가 분석을 위해 선택되었다. 본원에서, 기관 당 총 바이러스 입자를 각 시점에서 주입 용량의 백분율로서 기록하여 결과가 기관 중량에 대해 정규화되지 않게 하였다. 1시간 시점에서 대다수의 주입 바이러스가 간에 이미 격리되어 있고 비장에서 5%미만, 폐에서 0.1% 미만이었다. 24시간 후 시점에서 주입 바이러스 입자는 1% 미만의 잔여 주입 바이러스 계�数으로 이들 기관으로부터 급속하게 청소되었다. 주사후 65일이 지나서, 임의의 조직에서 유의미한 수준의 바이러스가 검출되지 않았고 수준들은 주변을 유의미하게 초과하지 않았다. 투여 후 65일에서 임의의 조직으로부터 어떠한 바이러스 입자도 회수될 수 없었다. 바이러스 청소능의 동력학 (기간 당 주입 용량의 %로서 나타낸 데이터)를 도 4에 요약하였다.

[0416] CD46 형질전환 마우스로 꼬리 정맥을 통해  $1 \times 10^{10}$  vp/마우스의 용량으로 단회로 ColoAd1을 투여하였다. 시점 당 n = 3 동물. 계놈 복제 (qPCR에 의해 측정됨)를 계놈 복제의 주입 용량의 백분율로서 나타내었다.

#### [0417] 전-임상 면역성

[0418] 특이적 항-바이러스 면역 반응의 전개가 순환 동력학에 유의미하게 영향을 주는 것이 가능하다. 이 가능성을 조사하기 위해, 마우스의 그룹으로 한 군의 하이퍼-면역 혈청을 생성하기 위해 수개월에 걸쳐 ColoAd1을 반복적으로 투여하였다. 제2 그룹의 마우스를 즉, 10 또는 20u1의 주사에 의해 투여되는 상기 하이퍼-면역 혈청을 사용하여 ColoAd1에 대해 수동적으로 면역화시켰다. 이들 마우스를 이후  $5 \times 10^{10}$  ColoAd1의 투여 전에 10분 동안 휴식시켰고, 즉 혈액을 ColoAd1의 주사 후 2, 10 및 30 분에서 각 마우스로부터 수집하였고 이후 qPCR로 분석하였다. 결과를 도 5에 나타내었고 ColoAd1에 대한 면역 반응이 ColoAd1의 동력학 및 전달에 대한 유의미한 영향을 줄 것을 나타내고 있고, 이에 따라 이러한 반응이 일어나기 전에 용량을 투여하는 것의 중요성을 입증한다.

#### [0419] 전-임상 안전성 및 독성

[0421] \*CD-1 및 Balb/c 마우스, CD46 형질전환 마우스에서의 파일럿 연구를 포함하여, 다수의 안전성 및 독성 연구를 ColoAd1을 사용하여 수행하였다. 수컷 및 암컷 CD-1 마우스에서의 최종 독성 연구에서, ColoAd1을 5일 기간에 걸쳐 (1, 3 및 5일에) 3회 용량으로 투여하여 의도된 임상 투여 요법을 모델링화하였다. 수컷 및 암컷 CD-1 마우스에 ColoAd1 또는 표 6에 나타난 제형 벼파의 정맥내 볼러스 주사(용량 용적 =  $100 \mu\text{L}$ )를 투여하였고, 이는 1일째에 2개의 그룹 4 수컷의 계획되지 않은 사멸 이후 최종 연구 설계가 그 특정 그룹에서 더 낮은 용량을 초래하였음을 나타낸다.

[0422]

표 6: 독성 연구 설계

그룹 번호	주연구 동물의 수		회수 그룹 동물의 수		위성 그룹 동물의 수		시험 항목	총용량 (vp/동물)
	수컷	암컷	수컷	암컷	수컷	암컷		
1	8	8	8	8	9	9	비히클	-
2	8	8	8	8	9	9	ColoAd1	$6.6 \times 10^9$
3	8	8	8	8	9	9	ColoAd1	$6.6 \times 10^{10}$
4	2 <sup>a</sup>	-	4 <sup>b</sup>	-	2 <sup>b</sup>	-	ColoAd1	$2.2 \times 10^{11}$
	6 <sup>c</sup>	-	4 <sup>c</sup>	-	7 <sup>c</sup>	-	ColoAd1	$3.59 \times 10^{11}$
	-	-	-	-	3 <sup>d</sup>	-	ColoAd1	$2.09 \times 10^{11}$
	-	8 <sup>e</sup>	-	8 <sup>e</sup>	9 <sup>e</sup>	9 <sup>e</sup>	ColoAd1	$2.09 \times 10^{11}$

a: 치료후 1일에 사멸을 발견함;  $2.2 \times 10^{11}$  vp으로 1일에 단회 용량의 ColoAd1 을 투여함

b: 추가 투여에 대해 적합하지 않은 것으로 보이고 2일에 안락사시킴;  $2.2 \times 10^{11}$  vp으로 1일에 단회 ColoAd1 용량을 투여함

c: 1일에 단회 용량의  $2.2 \times 10^{11}$  vp ColoAd1, 이후 3 및 5일에  $6.96 \times 10^{10}$  vp의 후속 용량을 투여함

d:  $6.96 \times 10^{10}$  vp가 1, 3 및 5일에 투여된 사이토카인 평가를 위해 추가된 추가 수컷

e: 상위 용량으로  $6.96 \times 10^{10}$  vp가 1, 3 및 5일에 투여된 모든 암컷 및 위성 그룹 수컷

[0423]

[0424]

임상 징후, 체중, 혈장 사이토카인 수준, 임상 병리학 및 종합을 포함하는 표준 세트의 안전성 종료점 및 현미 경적 시험을 주기적으로 실시하였다. 조직 및 기관의 표준 목록을 6 및 17일에 검시시 수집하였다.

[0425]

임의의 치료 일자에서 그룹 1, 2 또는 3에서의 수컷 및 암컷에서 유의미한 임상 징후가 관찰되지 않았다. 역효과의 임상 징후가  $2.2 \times 10^{11}$  및  $6.96 \times 10^{10}$  vp/동물 모두의 용량에서 1일에서의 제1 용량 이후 그룹 4에서 나타났고, 그러나 3일에서의 한 그룹 4 수컷은 예외이고 추가의 부정적인 임상 징후는 나타나지 않았다. 2일에서의 용량-관련 체중 손실이 그룹 2 수컷을 제외하고 모든 ColoAd1-처리 그룹에서 나타났고, 이후 체중은 임의의 치료 그룹에서 영향이 없었다. 기록된 경우에서의 혈액학적 및 간 기능 변화들은 장 기간에 걸쳐 일어났으나 회수 기간의 종료시에 정상 범위로 회복되었다. 요약하자면, 가장 유의미한 임상 징후는 제1 용량을 따르는 것으로 보여지고 후속 용량이 보다 잘 허용된다.

[0426]

본 연구에서의 시간에 따른 사이토카인 반응을 도 6에 나타내었다. 사이토카인 MCP-1의 상승이 가장 주목되었고, 이는 그룹 3 및 4에서 제1일에 제1 치료 후 제6시간 및 제24시간에서 그리고 제5일에서의 치료 후 제6시간에서 나타났다. 임의의 다른 사이토카인에서의 일치되는 상승은 그룹 2 동물에서 나타나지 않았다. MCP-1와 비교하여 가장 일반적인 저농도에서, IL-6, IFN $\gamma$  및 TNF $\alpha$ 에서의 더 작은, 용량-관련 증가가 그룹 3 및 4 동물에서만 나타났고, 각 용량 그룹, 특히 그룹 3에서의 일부 동물에서만 나타났다.

[0427]

따라서 본 연구에서 나타나는 사이토카인 패턴은 관찰되는 임상 징후와 일치되고, 이는 제1 용량 이후, 심지어 용량이 동일하여도 각 후속 용량이 보다 잘 허용되는 것을 나타낸다.

[0428]

### 임상 연구

[0429]

출원 시점에서, 전이암을 가진 인간 대상체에 대해 정맥내로 전달되는 경우에서 ColoAd1의 안정성 및 효능을 시험하기 위해 2개의 임상 연구가 수행되었다.

[0430]

Evolve 연구 (ColoAd1-1001)은 추가 치료 선택이 없는 상피성으로 유도된 전이성 종양 (임의의 유래의 것임)을 가진 환자에게 수행된 상 I 용량 증가 요소를 사용한 상 I/II 임상 연구이다. 본 연구의 상 I 용량 증가에서의

환자에게 1, 3 및 5일 (48 시간 간격을 둠)에 3회 동등 용량의 정맥내 ColoAd1을 투여하였다. 느린 정맥내 주입이 사용되었고 초기 집단에서, 각 환자에게 30ml의 바이러스 혼탁액을 5분 기간에 걸쳐 (분당 6ml) 주입하였다. 초기에 3명의 환자의 각 집단에 용량 제한 독성이 제안된 이상 반응까지 용량당  $1 \times 10^{10}$  바이러스 입자로 출발하여 일로그 증분으로 투여하였다. 각 환자에게 또한 보충 유체 및 항-염증제 (아세트아미노펜/파라세타몰 및 이부프로펜)의 일련 요법을 포함하는 증상 예방의 요법을 수행하였다. 각 투여 수준에서의 이 투여 요법의 안전성 및 내성을 물리적 시험 (혈압, 평온 및 온도 포함)을 사용하고, 모든 이상 반응을 유도함으로써, 그리고 혈액학, 생화학 및 사이토카인 프로파일 변화를 평가하는 것에 의해 평가하였다. 바이러스 동력학 및 배출을 규칙적 혈액, 소변, 대변 및 가래 샘플을 사용하여 평가하였다. 객관적인 기준에 따라 시리즈 CT 이미지화에 의해 효능을 평가하였다. 이 연구의 나중 단계는 전이성 결장직장 암을 가진 환자에서의 정맥내 최대 용인된 용량 (MTD)의 ColoAd1의 안전성 및 효능을 조사하는 것일 것이다.

[0431] 제2 임상 연구 (ColoAd1-1002)는 새로 진단된 일차 (비-전이성) 결직장 종양을 가진 환자에서의 ColoAd1의 정맥내 전달과 직접적인 종양내 전달을 비교하기 위한 상 0 "기회의 윈도우" 연구이다. 본 연구에서 환자는 예비-수술로 ColoAd1가 투여될 것이고 절제된 종양은 이후 수술후에 2 개의 상이한 전달 및 투여 요법 이후에 바이러스 전달, 복제 및 확산의 범위가 조사될 것이다. 본 연구에서의 안전성의 측정 및 바이러스 동력학은 ColoAd1-1001의 것과 광범위하게 유사할 것이다.

[0432] 본 연구 ColoAd1-1001에서의 상 I 용량 증가 환자에게 표 7에서 나타난 바와 같이, 7개의 환자 집단 (즉, 1 내지 7 집단)에서의 최대  $1 \times 10^{13}$  바이러스 입자를 포함하는 투여 수준에서 ColoAd1을 정맥내로 투여하였다.

표 7: ColoAd1-1001 임상 연구의 상 I 용량 증가 요소에서의 1 내지 7 집단에 대한 투여 요법

투여 집단 번호	투여 요법 (1, 3 및 5일에 반복함)					용량 허용성
	용량당 투여되는 바이러스 입자 (VP)의 총수	주입 용적 (ml)	주입 기간 (분)	주입 속도 (ml/분)	바이러스 입자 전달 속도 (VP/분)	
1	$1e10 (1 \times 10^{10})$	30 ml	5 분	6 ml/분	$2e9 VP/분$	잘 허용됨
2	$1e11 (1 \times 10^{11})$	30 ml	5 분	6 ml/분	$2e10 VP/분$	잘 허용됨
3	$1e12 (1 \times 10^{12})$	30 ml	5 분	6 ml/분	$2e11 VP/분$	잘 허용됨
4	$1e13 (1 \times 10^{13})$	30 ml	5 분	6 ml/분	$2e12 VP/분$	허용되지 않음 (용량 제한 독성)
5	$3e12 (3 \times 10^{12})$	30 ml	5 분	6 ml/분	$6e11 VP/분$	잘 허용됨
6	$3e12 (3 \times 10^{12})$	30 ml	20 분	1.5ml/분	$1.5e11 VP/분$	잘 허용됨
7	$6e12 (6 \times 10^{12})$	30 ml	40 분	0.75ml/분	$1.5e11 VP/분$	잘 허용됨

[0434] [0435] 본 연구에서의 ColoAd1의 부작용 프로파일은 열병, 독감 유사 질병, 신경병증, 혈소판감소증, 호중구감소증, 설사 및 구토를 포함한다. 그러나, 5분에 걸쳐 주입된  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자의 용량 수준에서, 용량은 잘 허용되지 않았다. 특히, 2명의 환자는 이 용량에서 사이토카인 매개 급성 폐 손상을 포함하는 용량 제한 독성 (DL T)을 겪고 단회 용량 보다 더 허용될 수 없다. 한 환자는 이 질병을 치료하기 위해 스테로이드가 요구되었다. 이 용량 수준에서 환자들은 또한 시간에 따라 모두가 해결되었지만, 오한, 고혈압, 통증, 신경병증, PPT 연장, 및 D-이합체 증가를 겪었다. 이 불충분한 허용 용량에서의 이 독성 효과의 결과로서, ColoAd1의 용량이 감소되고 그 다음 느린 주입 속도를 사용하여 재상승되었다. 이 전략을 사용하여, 5 (집단 5) 또는 20분 (집단 6)에 걸친  $3 \times 10^{12}$  VP 및 40분 (집단 7)에 걸쳐 주입된  $6 \times 10^{12}$  VP의 용량이 모두 잘 허용되는 것을 나타내었다.

[0436] 이 안전성 데이터는 작성시점에서 예비적인 것이나 마우스에서 보여진 것과 매우 유사한 프로파일을 지지한다.

그러나, 일부 환자는 지속되는 투여, 인간 종양에서 진행되는 바이러스 복제와 일치되는 현상 (비-종양을 갖는 마우스에서 나타나지 않을 것인 현상)이 없음에도 두번째 주에서 지속하여 열병 및 무기력증을 가졌다. 따라서 인간에 대한 최종 최대 내성 용량은 최대  $6 \times 10^{11}$  VP/분의 주입 속도로 1, 3 및 5일에서 투여되는  $1 \times 10^{12}$  내지  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자인 것으로 예상되고 각 환자는 또한 ColoAd1-1001 프로토콜에 따라 예방적 항-염증성 약물치료 및 정맥내 유체를 투여받는다. 최종 최적의 투여 요법은 추가의 확증 연구의 주제이다.

[0437] 표 8은 ColoAd1-1001 임상 연구의 상 I 용량 증가 요소에서의 각 환자에 대한 qPCR로 측정한 주요 바이러스 약력학적 파라미터를 요약하고 있다. 이를 결과는 전-임상 데이터와 매우 일치하였다. 요약에서 용량 의존적 cMAX 및 AUC가 존재하였고, 연구된 더 높은 용량에서의 가능한 포화 동력학의 지표가 존재하지만 평균 알파 반감기는 대략 18분이었다.

표 8: 집단 1 내지 7에 대한 ColoAd1 약동\*

집단	환자 번호 *	용량 (바이러스 입자)	주입 시간 (분)	$\alpha$ - 반감기 (분)	EOI 전혈 바이러스 양 (DNA 복제/ml)	$C_{max}$ (DNA 복제/ml)	AUC (DNA 복제/ml)
1	1	$1 \times 10^{10}$	5	28.22	$1.75 \times 10^6$	$1.75 \times 10^6$	$8.08 \times 10^{10}$
	2	$1 \times 10^{10}$	5	nd	$1.20 \times 10^6$	nd	nd
	3	$1 \times 10^{10}$	5	20.2	$9.84 \times 10^5$	$9.86 \times 10^5$	$4.08 \times 10^{10}$
2	4	$1 \times 10^{11}$	5	4.913	$1.60 \times 10^7$	$1.60 \times 10^7$	$3.70 \times 10^{11}$
	5	$1 \times 10^{11}$	5	7.218	$7.42 \times 10^6$	$7.41 \times 10^6$	$2.22 \times 10^{11}$
	6	$1 \times 10^{11}$	5	6.006	$1.73 \times 10^6$	$2.67 \times 10^6$	$5.54 \times 10^{10}$
3	7	$1 \times 10^{12}$	5	26.66	$1.08 \times 10^8$	$1.20 \times 10^8$	$4.84 \times 10^{12}$
	8	$1 \times 10^{12}$	5	8.046	$1.26 \times 10^8$	$1.26 \times 10^8$	$3.42 \times 10^{12}$
	9	$1 \times 10^{12}$	5	6.031	$2.18 \times 10^8$	$2.18 \times 10^8$	$2.98 \times 10^{12}$
4	10	$1 \times 10^{13}$	5	11.7	$7.30 \times 10^8$	$7.26 \times 10^8$	$1.95 \times 10^{13}$
	11	$1 \times 10^{13}$	5	7.085	$3.27 \times 10^8$	$4.96 \times 10^8$	$4.52 \times 10^{13}$
	12	$1 \times 10^{13}$	5	67.42	$3.57 \times 10^8$	$3.47 \times 10^8$	$2.99 \times 10^{13}$
	13	$1 \times 10^{13}$	5	19.86	$1.27 \times 10^9$	$1.23 \times 10^9$	$4.82 \times 10^{13}$
5	14	$3 \times 10^{12}$	5	3.746	$4.79 \times 10^8$	$4.79 \times 10^8$	$7.61 \times 10^{12}$
	15	$3 \times 10^{12}$	5	7.754	$1.31 \times 10^8$	$1.31 \times 10^8$	$2.54 \times 10^{12}$
	16	$3 \times 10^{12}$	5	11.96	$2.06 \times 10^8$	$2.04 \times 10^8$	$1.12 \times 10^{13}$
6	17	$3 \times 10^{12}$	20	6.779	$1.10 \times 10^8$	$1.10 \times 10^8$	$6.84 \times 10^{12}$
	18	$3 \times 10^{12}$	20	9.062	$2.35 \times 10^7$	$3.37 \times 10^7$	$2.23 \times 10^{12}$
	19	$3 \times 10^{12}$	20	6.151	$2.34 \times 10^8$	$2.34 \times 10^8$	$1.12 \times 10^{13}$
7	20	$6 \times 10^{12}$	40	46.54	$1.80 \times 10^8$	$1.80 \times 10^8$	$1.21 \times 10^{13}$
	21	$6 \times 10^{12}$	40	22.72	$5.68 \times 10^7$	$5.68 \times 10^7$	$4.82 \times 10^{12}$
	22	$6 \times 10^{12}$	40	51.34	$6.16 \times 10^7$	$6.37 \times 10^7$	$5.56 \times 10^{12}$

[0439]

\* 각 환자에 대한 표시 번호

[0440] nd: 결정되지 않음

[0441] 도 7a-c는 초기 용량 증가 상(최대 용량 제한 독성 포함)에서의 ColoAd1-1001 임상 연구에서 투여된 암 환자에서 관찰된 사이토카인 패턴을 나타낸다. 마우스 연구에서와 같이, 염증성 사이토카인 반응은 ColoAd1의 제1 투여 후의 인간 피크에서 보여지고 이후 후속 투여에 대해 감소된다. 흥미롭게도, ColoAd1의 초기 점화 효과가 더 낮은 용량에서 확실하게 보여지지 않으나 더 높은 용량에서 명확하게 보여지고, 이는 동일한 용량 수준으로 반복된 고용량 요법이 인간 암 환자에 대한 하위그룹 B 아데노바이러스의 정맥내 투여에 대해 최적일 수 있다는 주장을 지지한다.

[0442] 특히 도 7a-c는 4 개의 상이한 용량 수준 (각각 1e10, 1e11, 1e12 및 1e13 바이러스 입자)으로의 1, 3 및 5일 (화살표로 명시된 투여 지점)에서의 30ml의 바이러스 혼탁액의 5분 주입으로서 투여되는 ColoAd1의 정맥내 투여 이후 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 사이토카인 수준 ( $\mu\text{g/L}$ )을 나타낸다. 각각의 환자는 또한 예방적 항-염증성 약물치료 및 정맥내 유체를 투여받는다. 최대 1e12 이하까지의 용량에서

환자들은 이들 용량이 잘 허용되나, 1e13 용량을 투여받은 4명의 환자 중 2명은 사이토카인 매개 용량 제한 독성을 경험하였고 단회 용량 초과로 투여받을 수 없었다. 개개의 환자에 대해, 상승된 TNF 및 감마 인터페론 수준은 허용성과 잘 상관되었으나, 상승된 IL6은 그렇지 않았다 (데이터를 나타내지 않음). 따라서, 분당 최대 2e11 바이러스 입자 속도가 잘-허용되는 주입 속도로서 간주될 수 있음을 결정하였다. 패널 7a: TNF; 패널 7b: 감마 인터페론; 패널 7c: IL-6.

[0444] 도 8은 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (게놈 복제 / 혈액 mL)을 나타낸다. 게놈 복제는 qPCR로 측정하였다.

[0445] 특히, 도 8a은 1, 3 및 5일 (화살표로 명시된 투여 지점)에서의 30mL의 바이러스 혼탁액의 5분 주입으로서 투여되는 ColoAd1의 동일한 정맥내 용량과 같이, 2e11 VP/분으로 투여되는 잘-허용되는 용량 (용량당 1e12 VP)으로 투여되는 ColoAd1-1001으로부터의 3명의 환자의 평균 혈장 수준을 나타낸다. 각 후속 용량으로 증가되는 바이러스 농도 피크에 대한 경향은 전형적인 것이다.

[0446] 이는 바이러스 약동학에 대해 청구되는 투여 요법의 유익한 효과를 명확하게 나타내는 것이고, 제2 및 제3 용량 이후의 바이러스의 피크 수준은 제1 용량 이후의 바이러스의 피크 수준보다 점점 더 높다. 이는 초기 용량으로 비-암성 바이러스 싱크를 점거하거나 제거하는 이점을 입증한다. 이 용량은 이들 3명의 환자에게 잘 허용되었다.

[0447] 도 8b는 ColoAd1-1001 임상 연구의 환자 집단 1 내지 4에 대한 4개의 상이한 투여 수준 (각각  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  및  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자)에서의 바이러스의 제1 용량에 따른 평균 초기 약동학 (바이러스 DNA 복제/mL)을 나타낸다. 각 경우에서 용량은 5분에 걸쳐 투여되고 이에 따라 바이러스 주입 속도는 최저 용량에서 분당  $2 \times 10^9$  개의 바이러스 입자로부터 상위 용량으로 분당  $2 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자로 증가된다. 상위의 2개 용량에서, 혈액 바이러스 농도는 연장된 기간에 대해  $2 \times 10^6$  개의 바이러스 입자/mL 수준 초과로 유지된다. 이는 종양 내의 감염의 확립시 효과적인 최소 혈액 수준 (전임상 연구로부터 예상되고 도 1에 나타난 바와 같음)이다.  $1 \times 10^{12}$  용량에 대해 이 표적 수준은 1 내지 2시간에서 달성되고, 한편  $1 \times 10^{13}$  용량에 대해 이 표적 수준은 6시간에 걸쳐 유지된다. 그러나, 분당  $2 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자로 투여되는  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자 용량은 저조하게 허용되었고, 2명의 환자는 급성 사이토카인 매개 용량 제한 독성을 겪었고 따라서 이 투여 요법은 최적의 것이 아니다. 잘 허용되는 주입 속도 (예컨대 분당  $2 \times 10^{11}$  바이러스 입자 또는 이보다 느림)를 사용하는 투여 요법은 최대  $1 \times 10^{13}$  바이러스 입자 또는 이보다 높은 용량의 투여를 가능하게 할 것이다. 이 데이터를 사용하여, 약력학적 모델링이 이후 사용되어 한 시간에 걸쳐 주입되는  $1 \times 10^{13}$  개의 바이러스 입자의 용량 (분당  $1.67 \times 10^{11}$  개의 바이러스 입자)이 대부분의 환자에서 3시간 이상에 대해  $2 \times 10^6$  표적 수준 초과로 바이러스 혈액 수준을 유지할 것을 나타낼 수 있다.

[0448] 도 9a-d는 ColoAd1-1001 임상시험에서의 환자로부터의 약동학을 나타낸다. 환자는 ColoAd1의 제1 용량을 투여받았고, 바이러스 양을 이후 qPCR을 사용하는 일련의 채혈로 평가하였다. 하기 치료 요법을 시험하였다:

[0449] 도 9a (A): 5분에 걸쳐 투여된  $1 \times 10^{10}$  (1x10<sup>10</sup>) 바이러스 입자 (집단 1); 도 9a (B): 5분에 걸쳐 투여된  $1 \times 10^{11}$  (1x10<sup>11</sup>) 바이러스 입자 (집단 2); 도 9b (C): 5분에 걸쳐 투여된  $1 \times 10^{12}$  (1x10<sup>12</sup>) 바이러스 입자 (집단 3); 도 9b (D): 5분에 걸쳐 투여된  $1 \times 10^{13}$  (1x10<sup>13</sup>) 바이러스 입자 (집단 4); 도 9c (E): 5분에 걸쳐 투여된  $3 \times 10^{12}$  ( $3 \times 10^{12}$ ) 바이러스 입자 (집단 5); 도 9c (F): 20분에 걸쳐 투여된  $3 \times 10^{12}$  ( $3 \times 10^{12}$ ) 바이러스 입자 (집단 6); 및 도 9d (G): 40분에 걸쳐 투여된  $6 \times 10^{12}$  ( $6 \times 10^{12}$ ) 바이러스 입자 (집단 7).

[0450] 각 곡선은 치료 다음 최대 약 6 시간까지 ColoAd1을 투여받기 이전 단위 시간 마다 개개의 시험 대상체에 대해 측정한 바이러스 혈액 수준을 나타낸다.

[0451] 불리한 부작용은 바이러스 혈액 수준이 약  $3 \times 10^8$  바이러스 게놈 / mL의 역치를 초과하는 경우 환자에게서 최초로 관찰되었다.

[0452] 그리하여, 약  $3 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  바이러스 게놈/mL의 범위가 이상적인 치료 범위로 결정되었고 가능한 오랫동안 이

범위 내에서 바이러스 혈액 수준을 유지하는 요법이 바이러스 혈액 수분을 최대화하고, 한편 독성 부작용을 최소화할 것이다.

[0453] 약력학적 곡선으로부터 알 수 있는 바와 같이, 도 9d (G) (40분에 걸쳐 투여된 6e12 입자)는 가장 긴 기간 동안 치료적 범위 내에서 유지되는 바이러스 혈액 수준을 가진 특히 적합한 프로파일을 나타낸다.

[0454] 도 10은 동일한 용량이 느린 주입 또는 빠른 주입으로서 ColoAd1-1001 연구에서 환자에 대해 투여되는 경우  $C_{Max}$  수준 사이에서의 비교를 나타낸다. 집단 5 및 6은 모두  $3 \times 10^{12}$  개의 바이러스 입자의 총 용량이 투여되나, 집단 5에 대해서 용량을 5분에 걸쳐 주입하였고 (빠른 주입) 집단 6에 대해서 용량을 20분에 걸쳐 주입하였다 (느린 주입). 주입 속도를 늦추는 것은  $C_{Max}$ 의 더 적은 변화 및 더 낮은 평균  $C_{Max}$  수준을 효과적으로 초래할 수 있고, 그리하여 그룹 B 아데노바이러스의 주입 속도를 제한하는 것은 더 높은  $C_{Max}$  수준이 독성과 연관되는 경우에 적절하다.

[0455] 도 11은 ColoAd1-1001 임상 연구에서 1, 3 및 5일 (화살표로 명시된 투여 지점)에 투여된 ColoAd1의 정맥내 투여 이후의 인간 암 환자에서의 시간에 따른 MCP1 수준 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )을 나타낸다. 그래프는 표 7에 나타난 상이한 투여 요법으로 각각 투여된 상이한 환자 집단 (1 내지 7) 간의 비교를 나타낸다.

[0456] MCP1 수준 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )의 측정은 하기 시점에서 선택된다: 0 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 54 시간, 60 시간, 72 시간, 96 시간, 102 시간, 108 시간, 120 시간, 168 시간 및 336 시간. 이 인간 데이터는 시험된 각 용량에 대한 각각의 투여 이후 MCP1의 수준이 감소되는 마우스에서 보여진 것과 유사한 패턴을 반영하고, 따라서 이는 청구된 투여 요법의 특정 이점을 지지한다.

[0457] 도 12에서 나타난 사이토카인 패턴은 마우스 연구 (도 6 참조)에서 앞서 관찰된 사이토카인 패턴과 일치하고, 이는 제1 용량 이후, 각 후속 용량이 각각의 3회 용량이 동일한 경우에서도 더 잘 허용됨을 나타낸다.

[0458] **유형 B 아데노바이러스에 의한 종양 감염이 IV에 의해 투여되는 바이러스 입자의 용량에 의해 확립될 수 있음을 나타내는 연구**

[0459] 도 12는 아데노바이러스에 대해 전형적인 복제 주기를 나타낸다. 90%의 바이러스 캡시드를 제조하는 아데노바이러스 구조적 단백질 예를 들면 핵손은 복제가 일어난 후 감염 과정 이후에 유일하게 발현된다. 상기 단백질은 이후 어셈블리에 대한 핵으로 다시 이송된다. 따라서, 핵은 복제 과정에서 최고 농도의 핵손 및 다른 구조 단백질을 가진다. 이에 따라, 핵 핵손 염색은 아데노바이러스의 정량화를 위해 그리고 ColoAd1로 성공적으로 감염되는 세포에 대한 마커로서 사용될 수 있다.

[0460] ColoAd1-1002 임상 연구에서, 일차 (비-전이성) 결직장 종양을 가진 환자는 종양내 (IT) 전달 또는 정맥내 (IV) 전달에 의해 ColoAd1을 투여받는다. IT 그룹에서, 바이러스는 다중 주사로서 최대  $1 \times 10^8$  VP의 용량에서 결장경을 통해 투여된다 (실제의 용량은 종양 크기에 좌우된다). IV 그룹에서, 용량은 1, 3 및 5일에서 5분에 걸친 주입으로서 투여된  $1 \times 10^{12}$  VP이었다. 이후, ColoAd1의 제1 용량 이후 7 내지 14 일에 일차 종양을 절제하였고 ColoAd1 핵손에 대한 면역조직화학 (IHC) 염색을 포함하는 병리적 시험을 위해 송부하였다.

[0461] 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 인간 종양 샘플의 절편을 항-핵손 항체 (ab8251)을 사용하여 바이러스의 존재에 대해 분석하였다.

[0462] Ventana Benchmark Ultra를 사용하는 유효한 분석법을 사용하여 염색을 수행하였다. 강한 핵 염색은 캡시드 어셈블리가 진행되는 핵손의 존재를 나타낸다.

[0463] 아이소타입 대조군을 동일한 조건 하에서 동시에 가공하였다.

[0464] 도 13은 ColoAd1로 시험판내 감염된 결장직장 암세포주의 투사 EM 이미지를 나타낸다.

[0465] 도 14 (A)는 종양내 주사 (IT) 이후 ColoAd1로 감염되고 이후 핵손에 대해 염색된 종양 샘플의 세포 염색 이미지를 나타낸다. 보여지는 바와 같이, 암종 세포에서 실질적인 핵 염색이 존재하고 반면에 기질 세포에서 핵 염색이 존재하지 않는다. 도 14 (B)는 상응하는 아이소타입 대조군을 나타낸다. 이와 함께 슬라이드는 ColoAd1이 직접적인 종양내 전달 이후 정상 세포의 감염 없이 종양 세포를 선택적으로 감염시킨 것을 나타낸다.

[0466] 도 14C (C)는 정맥내 (IV) 투여 이후 ColoAd1으로 감염되고 이후 핵손에 대해 염색된 종양 샘플의 세포 염색 이미지를 나타낸다. 보여지는 바와 같이, 암종 세포에서 실질적인 핵 염색이 존재하고 반면에 기질 세포에서 핵

염색이 존재하지 않는다. 도 14 (D)는 상응하는 아이소타입 대조군을 나타낸다.

[0467] 따라서, 이들 이미지는 ColoAd1이 청구된 정맥내 투여 요법을 사용하는 경우 종양내 전달과 동일한 방식으로 종양 세포에 선택적으로 전달될 수 있다는 분명한 증거를 제공한다.

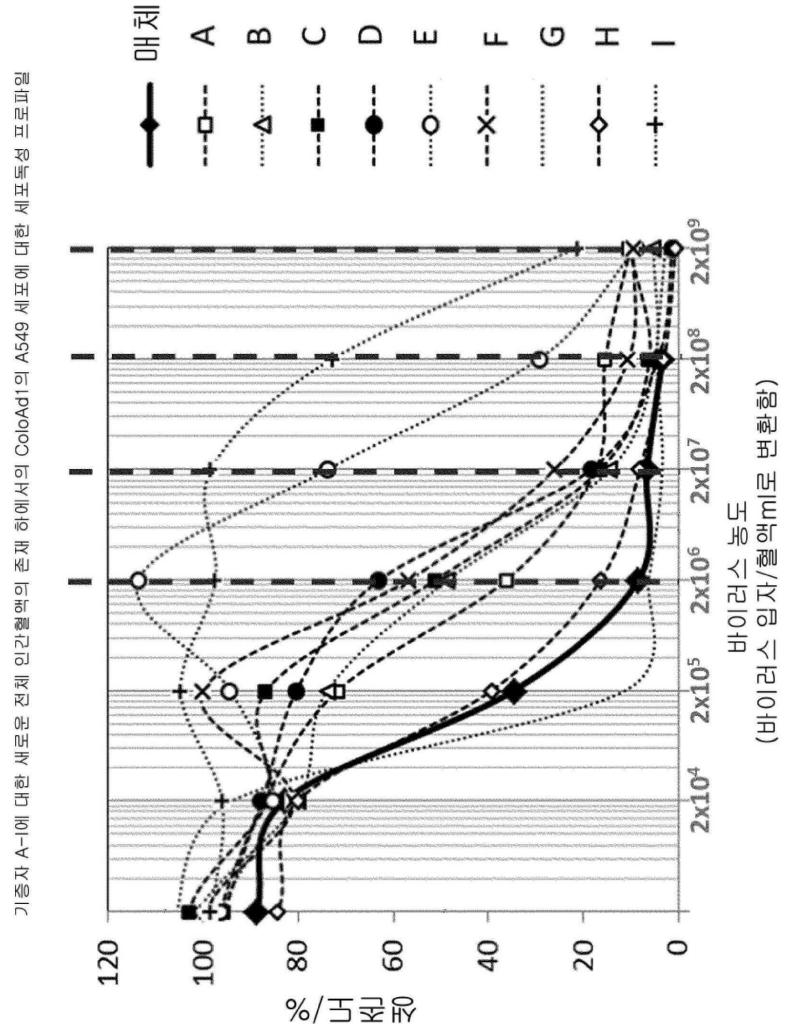
#### 실시예 2 약물 조합

[0469] 320개의 임상적으로 승인된 화합물 또는 개발 중인 화합물의 존재 하에서의 ColoAd1 바이러스 복제를 결장 암종 세포주, HT-29에서 평가하였다. HT-29 세포주를 96 웰 플레이트에서 3.0e4 세포/웰의 밀도에서 시딩하였고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 4-6시간 배양 이후 세포 매질에서 제조된 바이러스 및 약물 화합물을 혼합물을 세포 상에서 희석시켜 세포당 10 ColoAd1 바이러스 입자의 최종 용량 (ppc) 및 0.1 μM의 약물 화합물을 얻었다. 상기 세포를 18시간 동안 배양하고 이후 세포 내의 총 바이러스 게놈을 qPCR에 의해 평가하였다. ColoAd1 바이러스 단독과 비교되는 ColoAd1 복제에서의 상대적인 배수 변화를 도 15에서의 모든 화합물에 대해 플로팅하였다. 삽도는 미세소관 억제제의 존재 하에서의 18 시간 후의 바이러스 복제에서의 증가 및 토포이소머라제 억제제의 존재 하에서의 바이러스 복제의 감소를 나타낸다.

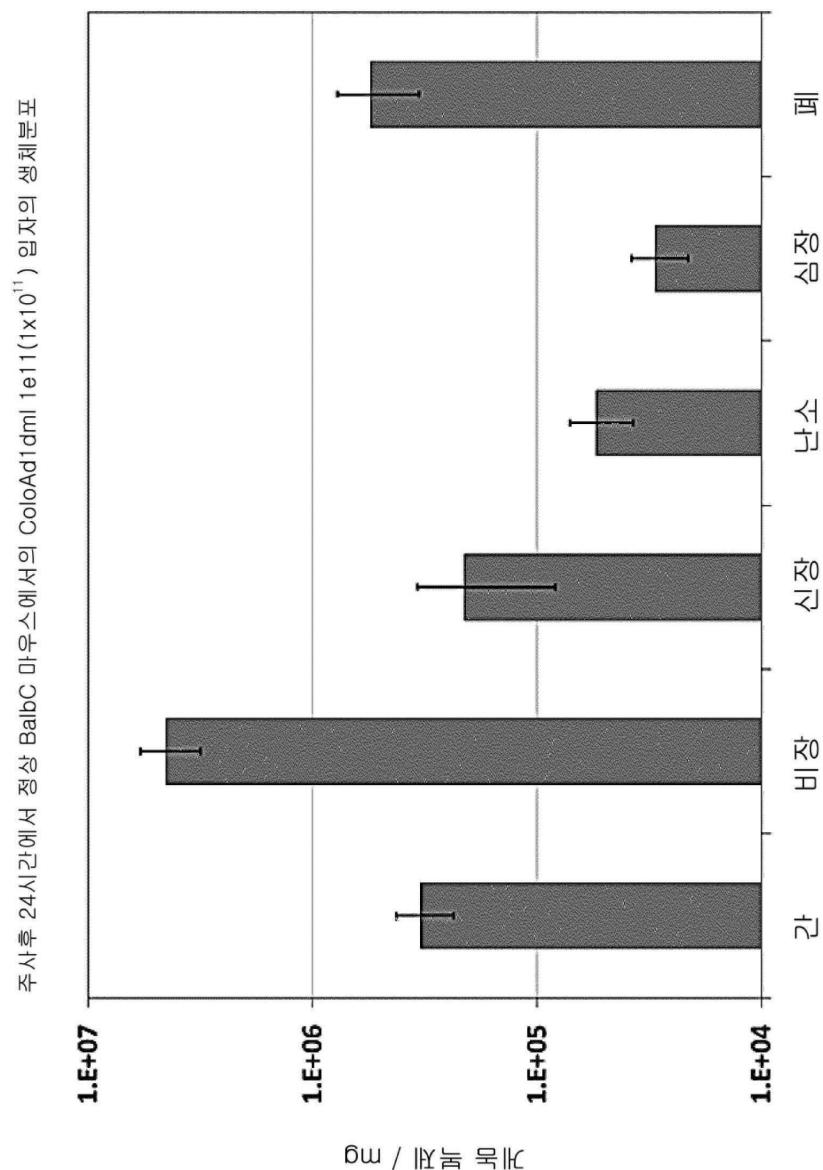
[0470] 종양 모델에서 ColoAd1 효능에 대한 파클리탁셀 또는 시스플라틴 치료의 효과를 난소암의 IP 모델에서 평가하였다. SCID 마우스에 2.5e6 루시퍼라아제-발현 SKOV-3 인간 난소 암종 세포를 이식하였다. 종양의 양을 루시퍼라아제 발현에 의해 평가하였다. 마우스를 5일, 각 세트의 치료 전날 및 연구 기간 동안 적어도 매 5-7일에 이미지화하였다. A11 ColoAd1 치료를 복막내 주사 및 병용 치료 그룹에 의해 전달되는 5e9 바이러스 입자를 사용하여 수행하였고, 파클리탁셀 (0.4mg) 또는 시스플라틴 (0.04mg)을 바이러스 치료 다음 날 전달하였다. 질병 진전을 IVIS 이미지화 시스템을 사용하는 루시퍼라아제 이미지화에 의해 평가하였다. PBS (A), 파클리탁셀 (B), ColoAd1 (C) 또는 파클리탁셀 및 ColoAd1 (D)를 IP 주사를 통해 투여된 마우스에서의 상대적인 발광 이미지를 도 16에 나타내었고 각각의 투여 그룹에 대한 시간에 따라 관찰한 상대적인 발광을 도 17에 나타내었다. PBS (그룹 1), ColoAd1 이후 시스플라틴 (그룹 2), 시스플라틴 이후 ColoAd1 (3족) 또는 파클리탁셀 및 ColoAd1 (그룹 4)를 IP 주사를 통해 투여된 마우스에서의 상대적인 발광을 도 18에 나타내었다. 투여 계획을 도 17 및 18에 상세하였다.

## 도면

## 도면1

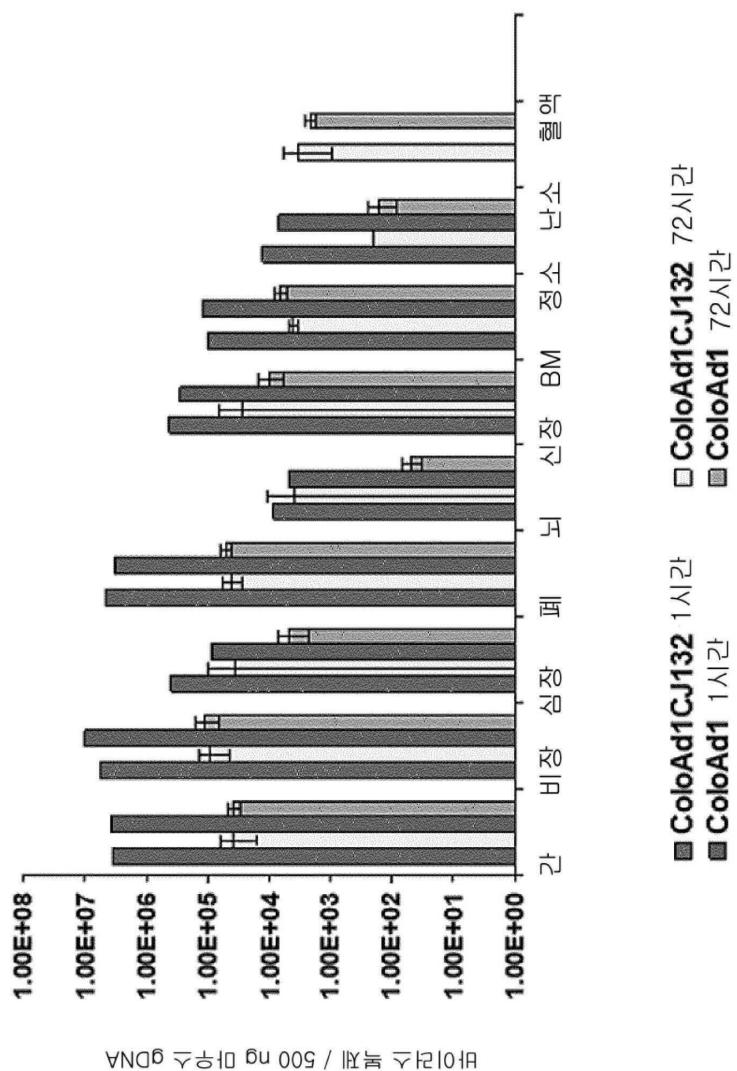


## 도면2



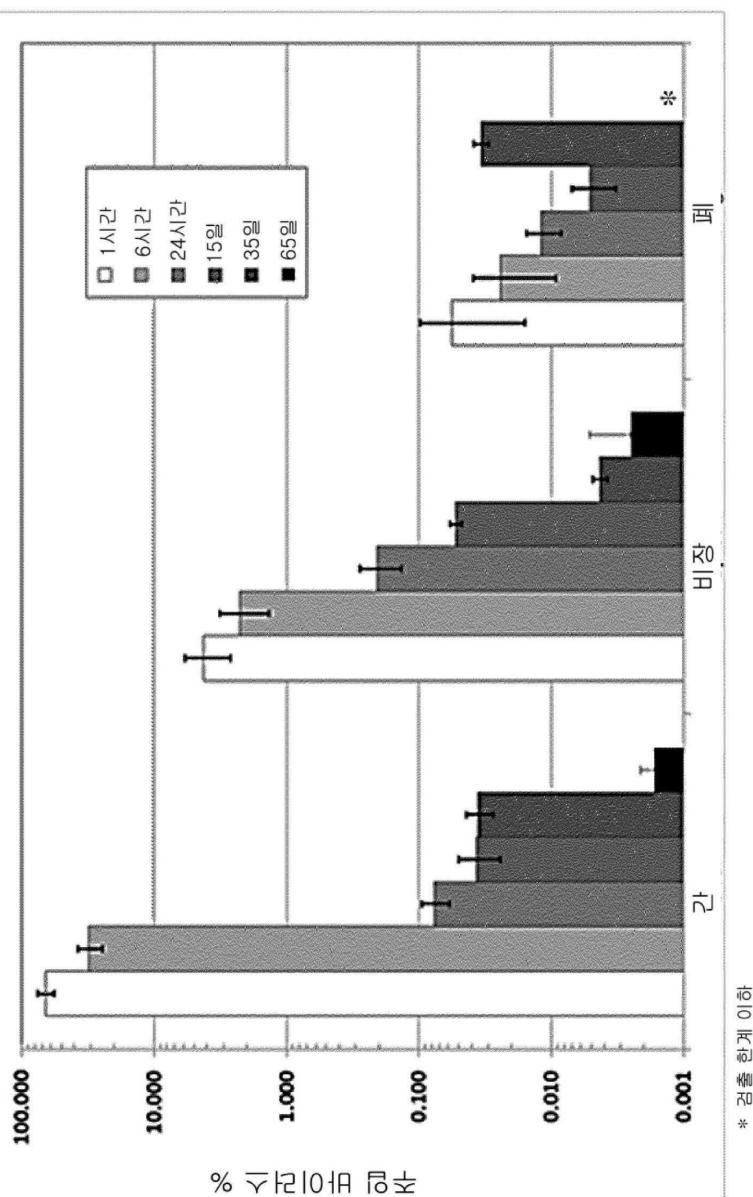
## 도면3

주사후 1시간 및 72시간에 서 CD46 형질전환 마우스에서의 ColoAd1 및 ColoAd1CJ132의 생체분포

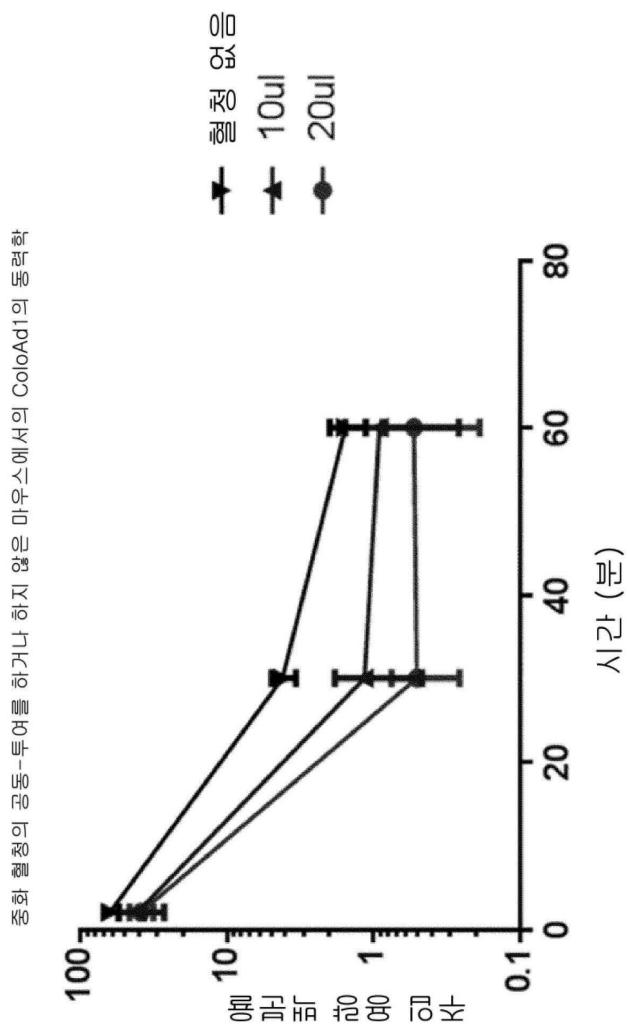


## 도면4

65일 동안 후속된 CD4G-발현 마우스의 주요 기관 간, 비정 및 폐로부터의 CodoAd1의 청소능 동력학:

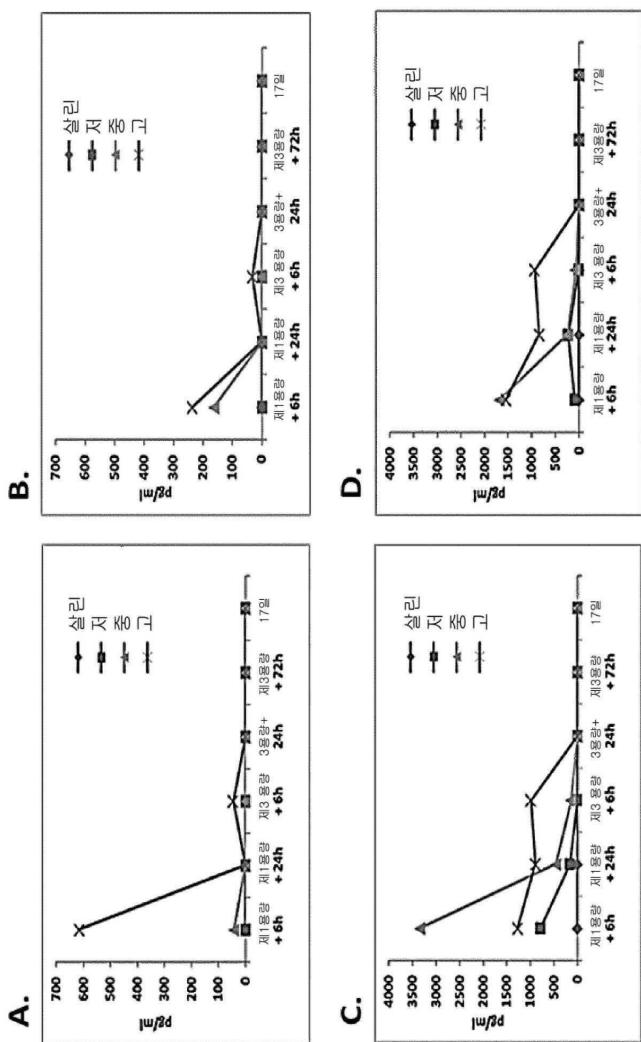


## 도면5

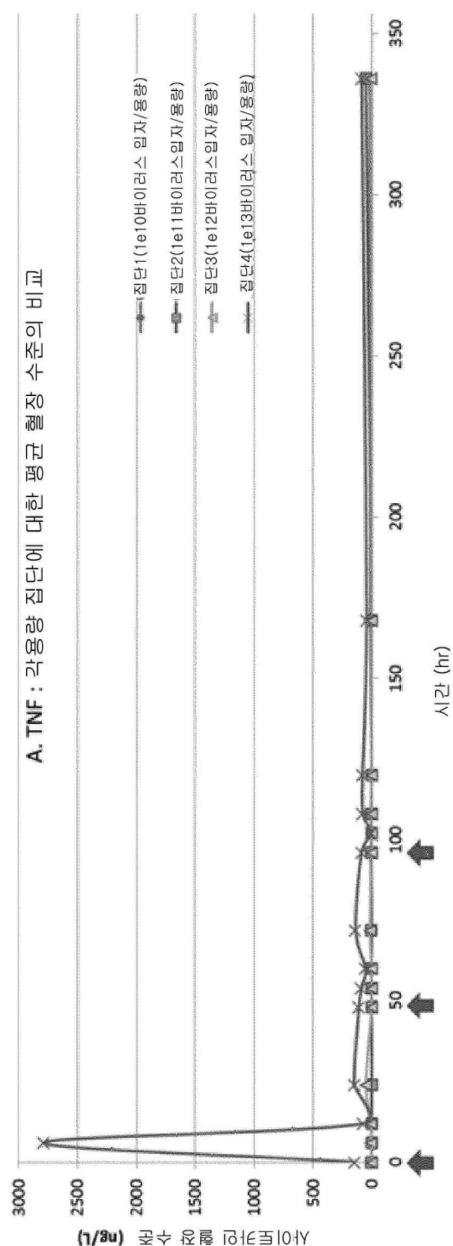


## 도면6

CD-1 마우스에서 전-임상 독성학에서의 제1 및 차후 동등한 치료적 용량 이후 사이토카인 수준



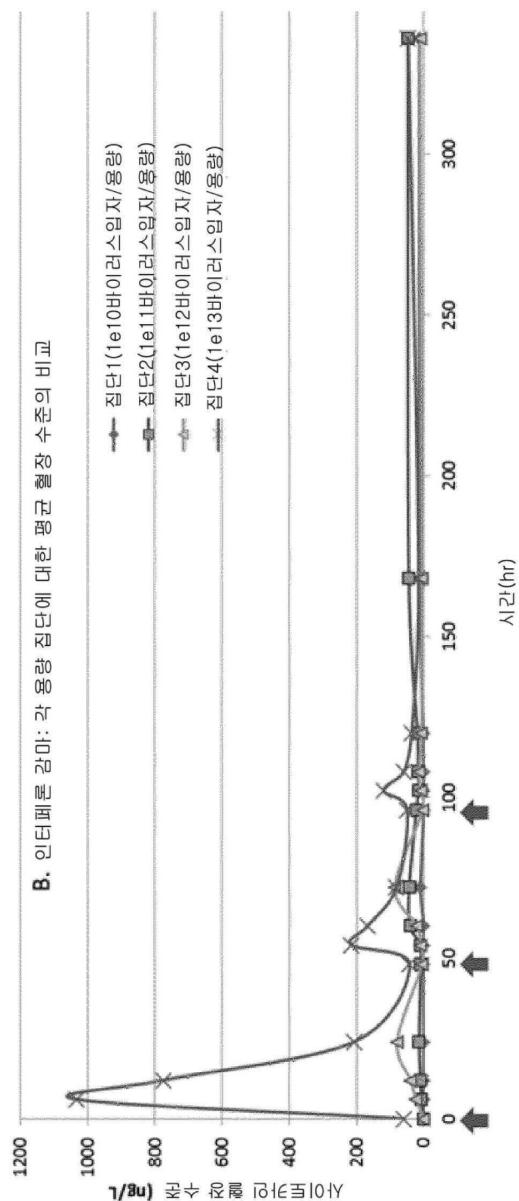
## 도면 7a



ColoAd1의 정백내 투여 이후의 전이성 고형 성피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 TNF(A) 사이토카인 수준 (ng/L)

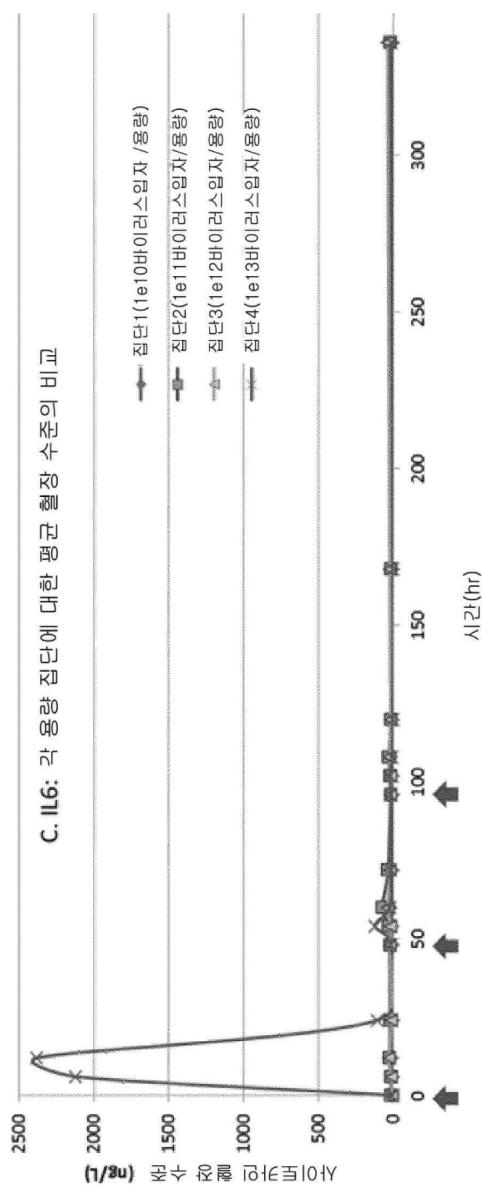
## 도면7b

ColoAd<sup>d</sup>의 정맥내 투여 이후의 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 강마 인터페론 사이토카인 수준 (ng/L)



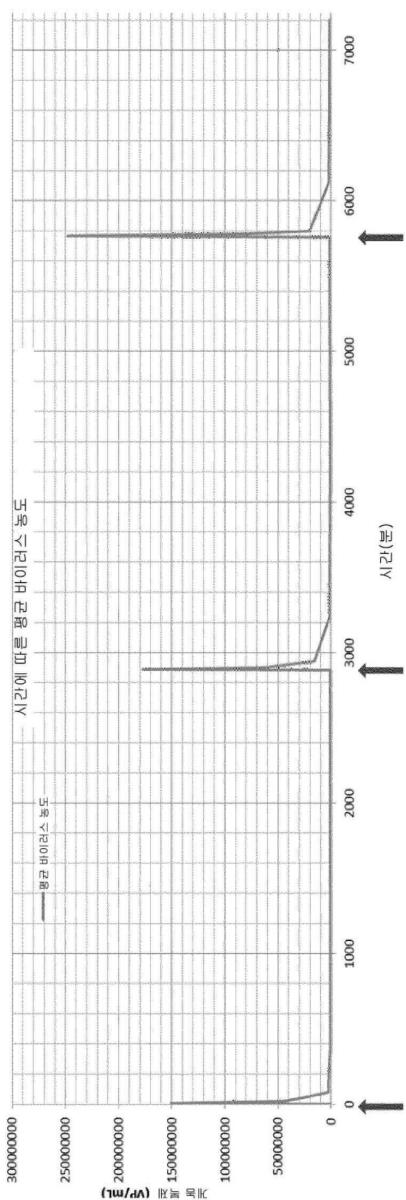
## 도면7c

ColoAd1의 정맥내 투여 이후의 전이성 고형 상피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 시간에 따른 사이토카인 수준 (ng/L)



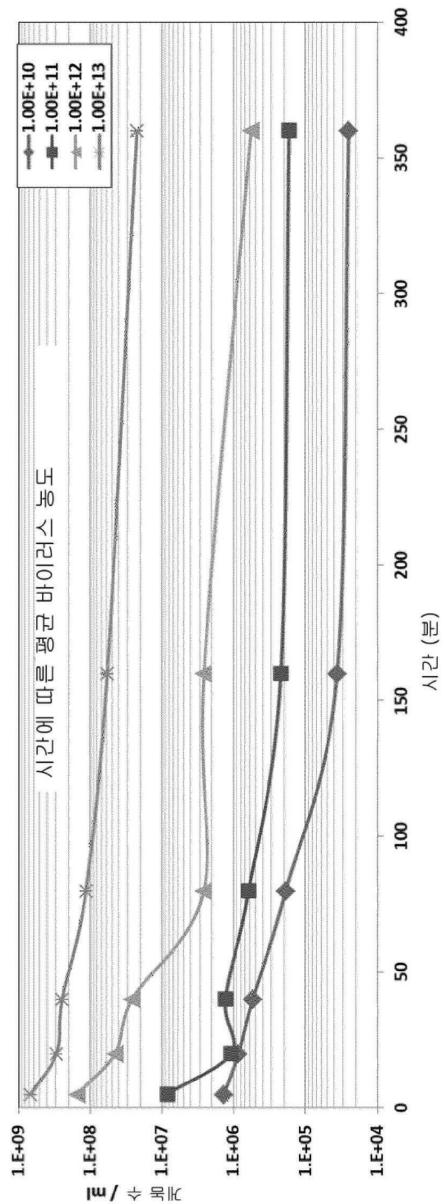
## 도면8a

천이성 고령 상피성 종양을 가진 3명 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 약동학 (평균 DNA 농도/혈액 mL). 환자는 1, 3 및 5일에  $2 \times 10^9$  바이러스 입자/분으로 투여되는 용량당  $1 \times 10^2$  바이러스 입자로 투여됨

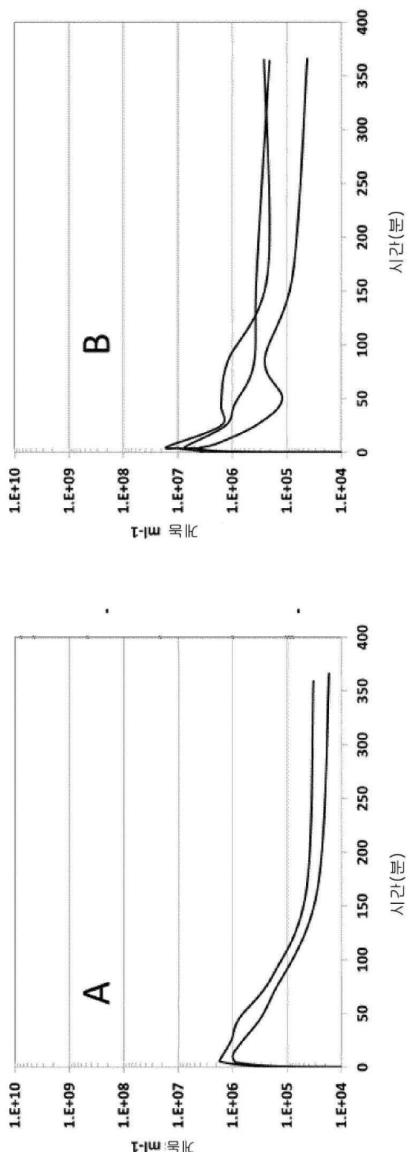


## 도면 8b

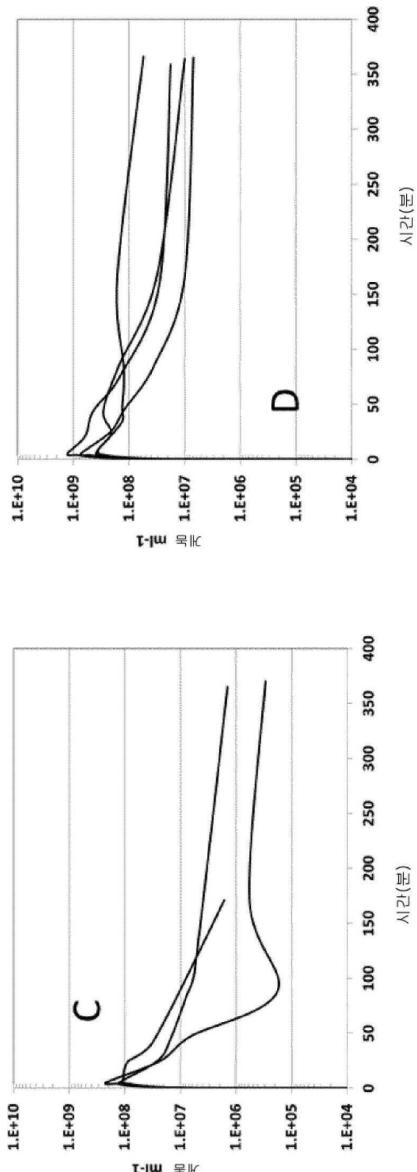
전이성 고형 성피성 종양을 가진 인간 암 환자에서의 ColoAd1의 전신 악동학 (DNA 복제/혈액 mL)



## 도면 9a

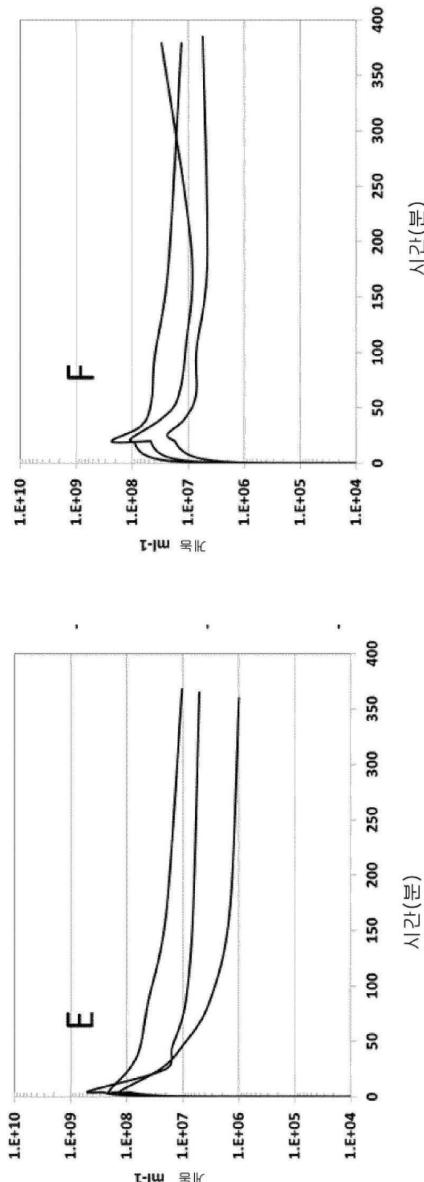
5분에 걸쳐  $1 \times 10^9$  ( $1 \times 10^9$ )(a) 및  $1 \times 10^{11}$  ( $\times 10^{11}$ )(b) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 양 혈관에서의 ColoAd1의 전신 악동학 (개농 복제/혈액 mL)

## 도면9b



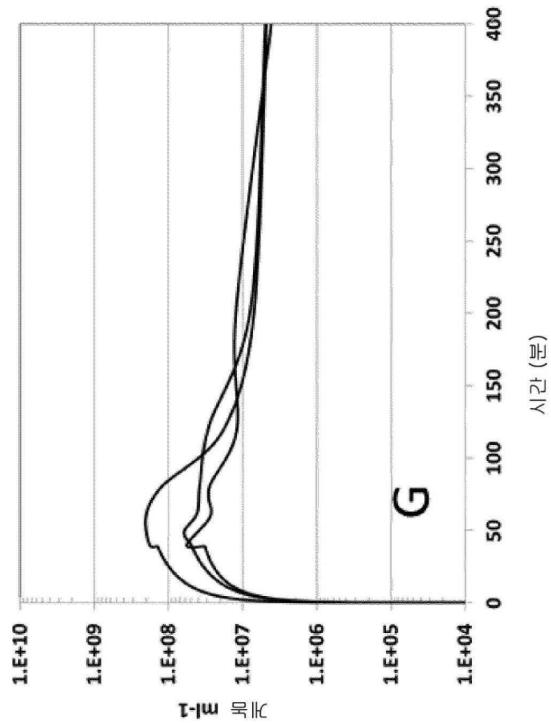
## 도면9c

5분에 걸쳐 3e12 (3x10<sup>12</sup>) 바이러스 입자 및 20분에 걸쳐 3e12 (3x10<sup>12</sup>) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간 암 혈지에서의 ColoAd1의 전신 악동학 (마우스 체/혈액 mL)



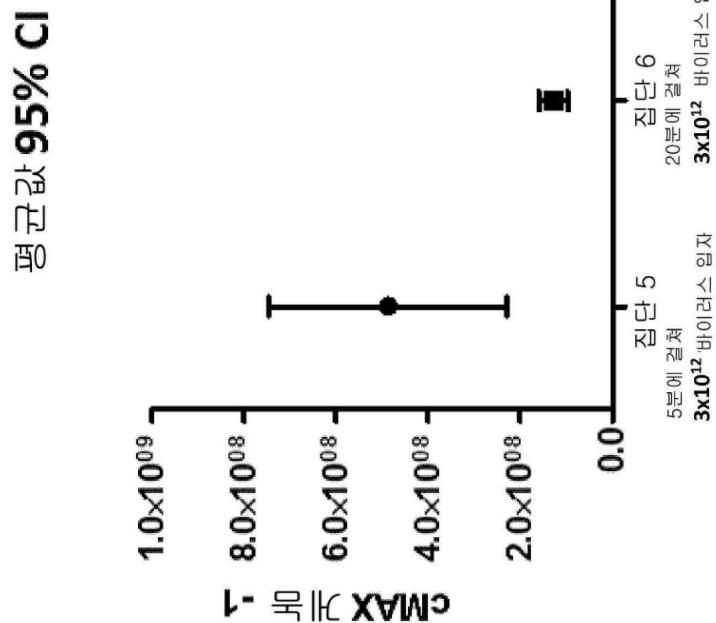
## 도면 9d

40분에 걸쳐 6e12 (6x10<sup>12</sup>) ColoAd1 바이러스 입자가 투여된 인간암 환자에서의 ColoAd1의 전신 악동학  
(기능 농도/혈액 mL)



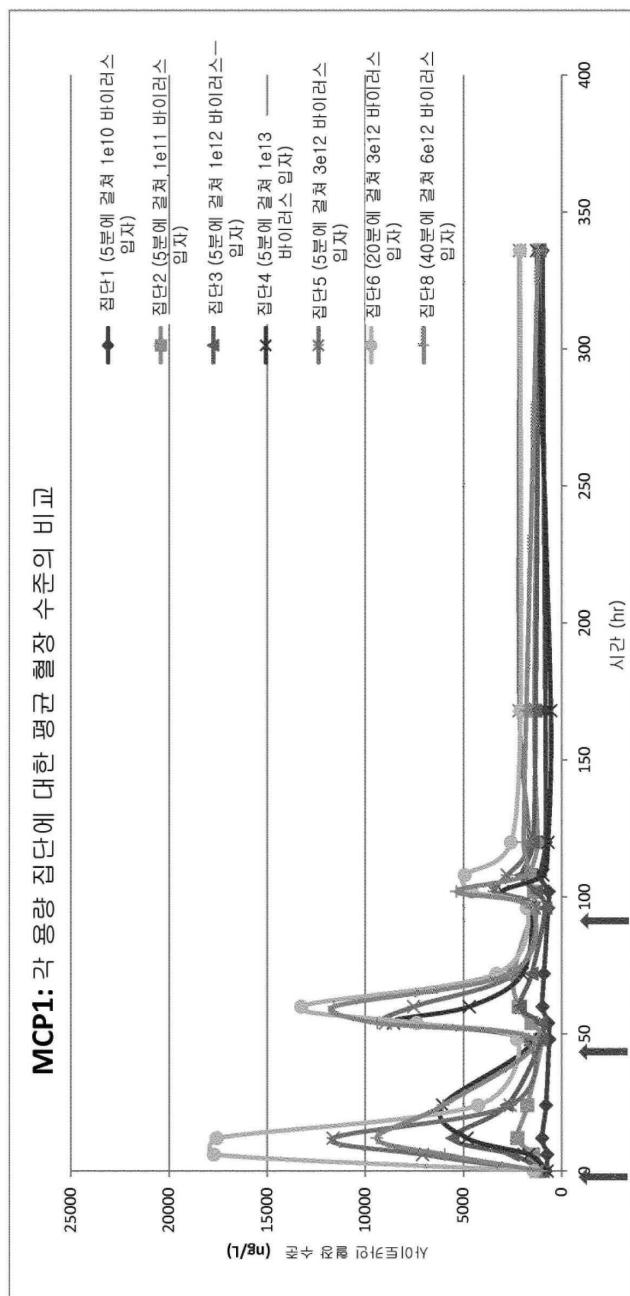
## 도면10

주입 종료시의 동일한 통량의 더 느린 주입에 따른 더 낮은 cMax 수준 (점단 5 대 6)



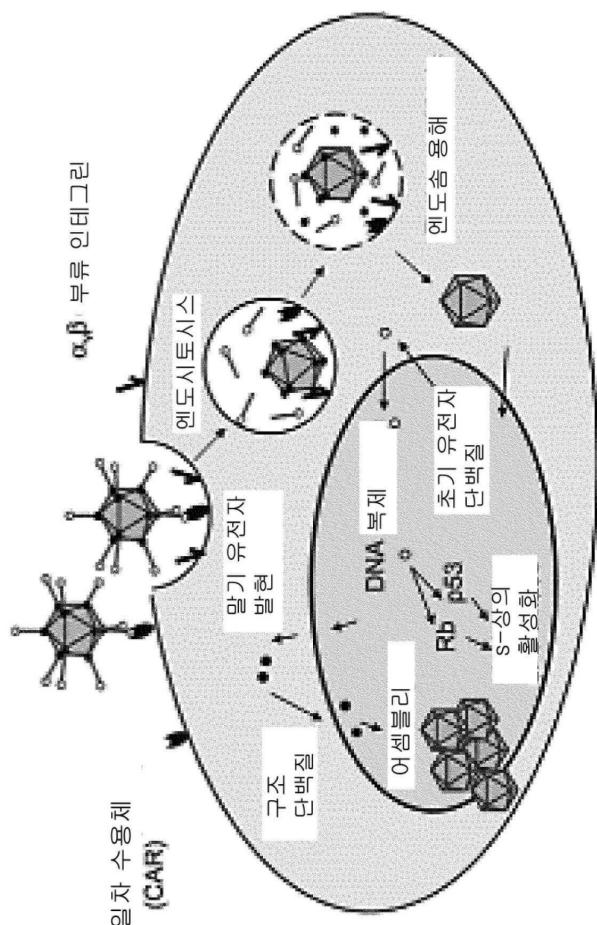
## 도면11

각 용량 집단에 대한 MCP1의 평균 혈장 수준의 비교

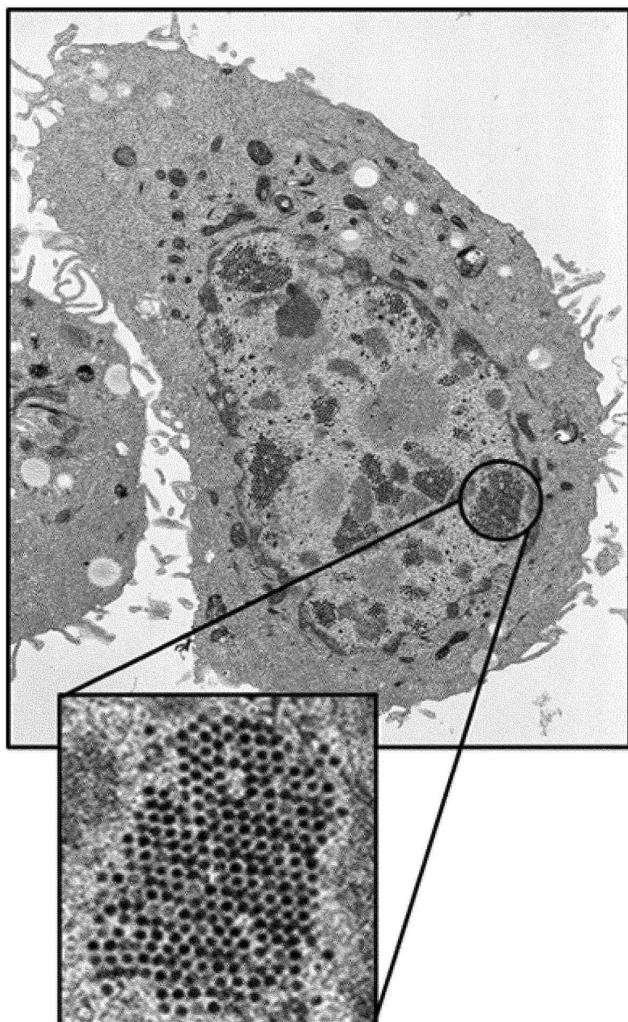


## 도면 12

ColoAd1 복제 주기

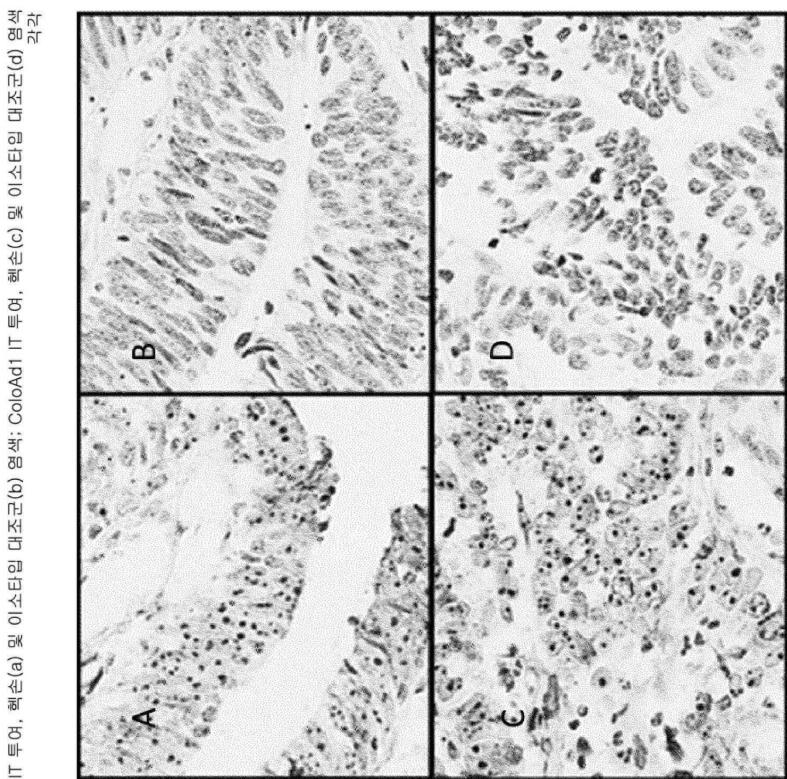


도면13



바이러스의 시험관내 감염 이후 결직장 세포주에서 핵 염색으로서 나타낸 암세포의 ColoAd1 감염

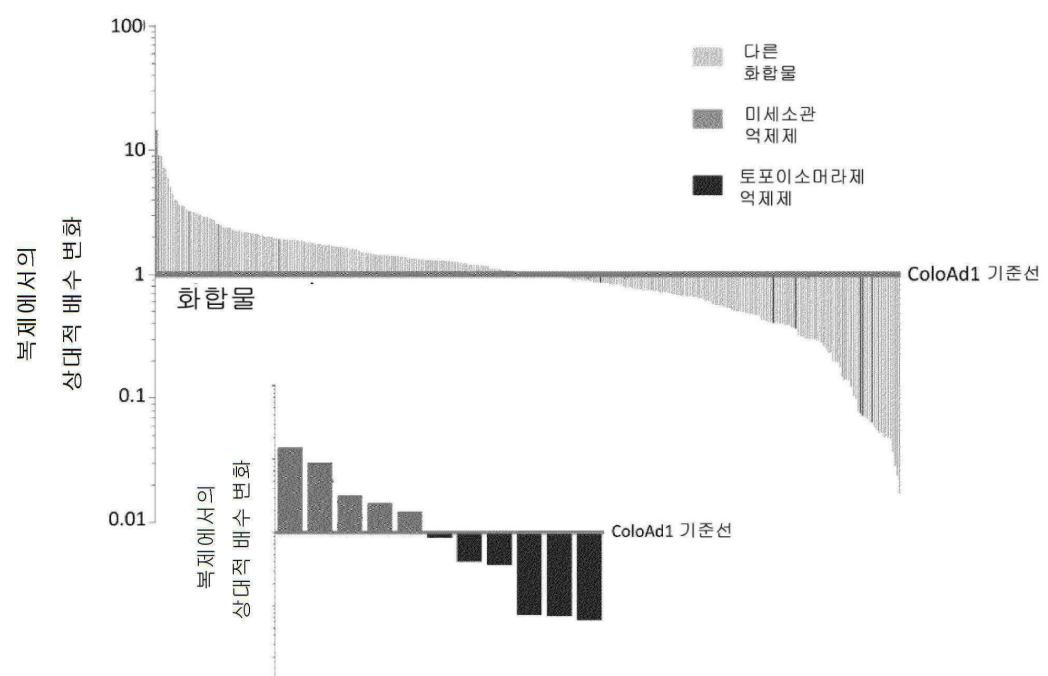
## 도면14



ColoAd1 IT 투여, 혼순(a) 및 이소타입 내조근(b) 염색; ColoAd1 IT 투여, 혼순(c) 및 이소타입 내조근(d) 염색 각각

도면 15

바이러스 복제에 대한 이의 영향에 대해 분석된 320개의 임상적으로 승인되거나 개발 중인 화합물

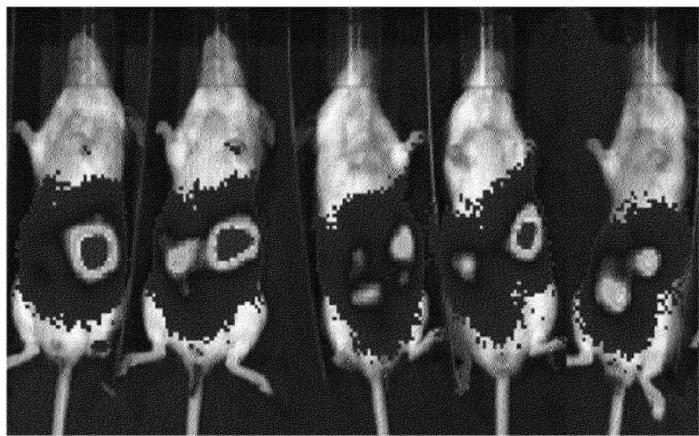


ColoAd1 바이러스 단독에 대한 복제에 있어서의 상대적 배수 변화

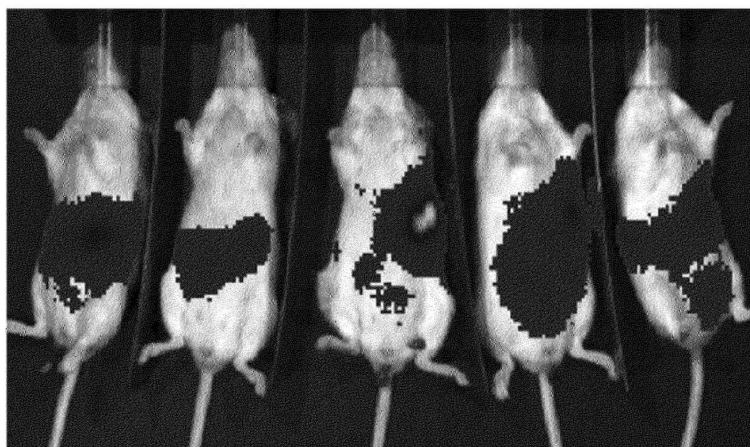
도면 16a

생체내 모델 -파클리탁셀 / ColoAd1 병용 요법 (33일)

A - PBS



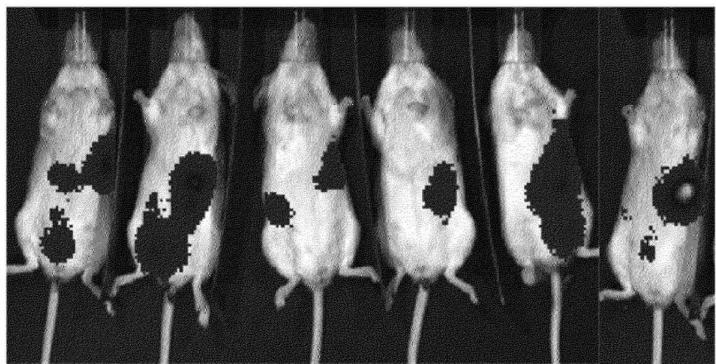
B - 파클리탁셀



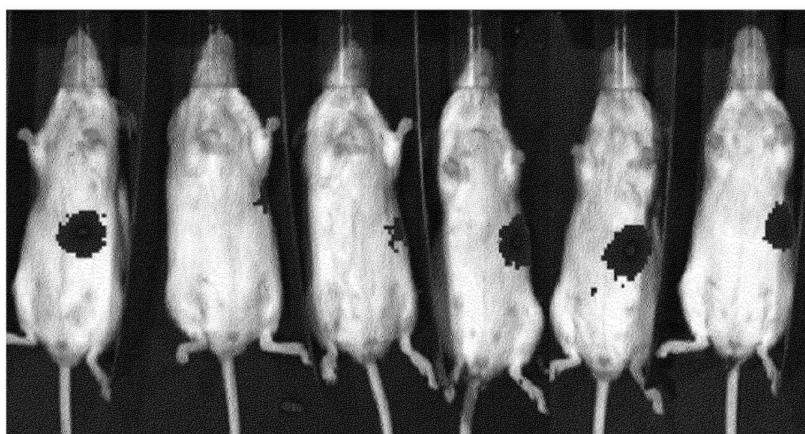
도면 16b

(계속)

C - ColoAd1

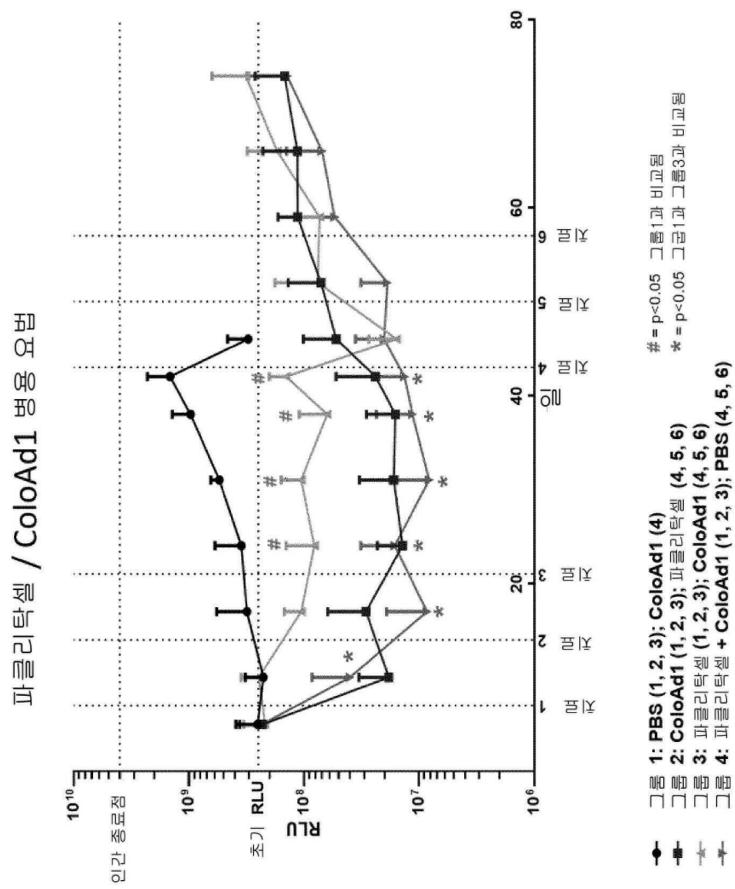


D ColoAd1 + 파클리탁셀



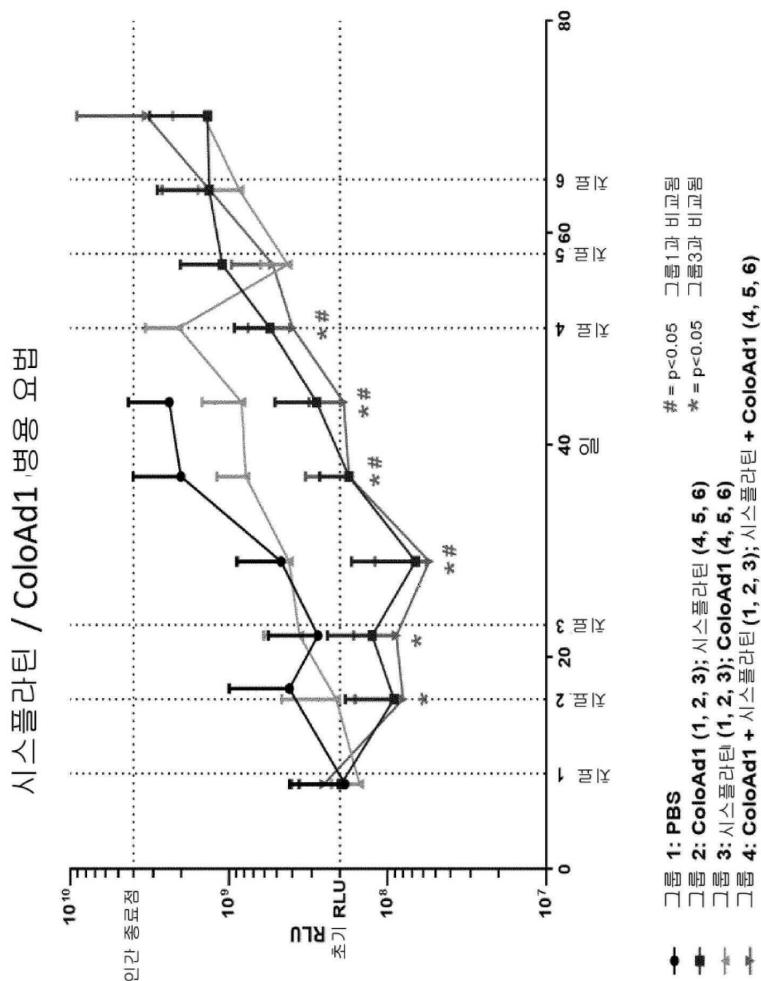
## 도면17

생체내 ColoAd1 / 화학요법 병용 연구



## 도면18

생체내 ColoAd1 / 화학요법 병용 연구



## 서 열 목록

- <110> PsiOxus Therapeutics  
 PsiOxus Therapeutics Ltd
- <120> A DOSING REGIME AND FORMULATIONS FOR TYPE B ADENOVIRUSES
- <130> P000084\_WO
- <150> GB1310698.4
- <151> 2013-06-14
- <150> GB1406509.8
- <151> 2014-04-10
- <150> GB1405140.3
- <151> 2014-03-22
- <160> 2
- <170> Kopatent In 3.0
- <210> 1

&lt;211&gt; 32326

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; ColoAd1

&lt;400&gt; 1

tctatctata taatataacct tatagatgga atgggccaa tatgtaaatg aggtgattt	60
aaaaagtgtg gatcgtgtgg tgattggctg tgggttaac ggctaaaagg ggcgggtcgaa	120
ccgtggaaa atgacgtttt gtgggggtgg agttttttg caagttgtcg cggaaatgt	180
gacgcataaa aaggctttt tctcacggaa ctacttagtt ttcccacggt atttaacagg	240
aatgaggtt gtttgaccg gatgcaagtg aaaattgttg atttcgcbc gaaaactgaa	300
tgaggaagtg ttttctgaa taatgtggta ttatggcag ggtggagttt ttgttcaggg	360
ccaggttagac ttgacccat tacgtggagg ttgcattac cgtgtttt acctgaattt	420
ccgcgtaccg tgtcaaagtc ttctgtttt acgttagtgtt cagctgatcg cttaggtatt	480
tataacctcag gtttgggtc aagaggccac tctttagtgc cagcgagaag agtttctcc	540
tctgcgcgg cagttata ataaaaaaat gagagatttgc cgatttctgc ctcagggaaat	600
aatctctgct gagactggaa atgaaatattt ggagcttgcgt gcacgccc tcatggaga	660
cgcacccggcc acctgtgc agcttttgcgc ttccctacg ctccaggaac tgtatgattt	720
agaggttagag ggatcgagg attctaattt ggaagctgtt aatggctttt ttaccgattt	780
tatgttttgcgt gctgctaattt aagggttaga atttagatccg ctttggaca ctttgatac	840
tccaggggta attgtggaaa gcggtacagg tgtaagaaaa ttacctgatt tgagttccgt	900
ggactgtgat ttgcactgct atgaagacgg gtttccctcg agtgtatgagg aggaccatga	960
aaaggagcag tccatgcaga ctgcagcggg tgagggagtg aaggctgcca atgttggttt	1020
tcagttggat tgccggagc ttccctggaca tggctgttaag tcttgcgtt ttcacagggaa	1080
aaatactgga gtaaaggaac ttttatgttc gctttttat atgagaacgc actgccactt	1140
tatttacagt aagtgtgtt aagttaaat ttaaaggaat atgtgtttt tcacatgtat	1200
attgagtgat agttttgtgc ttcttattt aggtcctgtg tctgtatgtc atgaatcacc	1260
atctcctgat tctactaccc cacccctgtt gattcaagca cctgttccgt tggacgtcg	1320
caagccccatt ccgtgtgaagc ttaaggctgg gaaacgtcca gcagtggaaa aacttgagga	1380
cttggtaacag ggtggggacg gacctttggaa cttgagtaca cggaaacgtc caagacaata	1440
agtgttccat atccgtgtt acttaagggtg acgtcaatat ttgtgtgaca gtgcaatgt	1500
ataaaaaat gttaactgtt cactggttt tattgtttt tggcggggaa ctcaggtata	1560

taagtagaag cagacctgtg tggtagctc ataggagctg gcttcatcc atggaggttt	1620
ggccatttt ggaagacctt aggaagacta ggcaactttt agagaacgct tcggacggag	1680
tctccggtt ttggagattc tggtcgcta gtgaattagc taggtagtt tttaggataa	1740
aacaggacta taaaacaagaa ttgaaaagt tggttggaga ttgcccgagga cttttgaag	1800
ctcttaattt gggccatcg gttcaactta aagaaaaagt ttatcagtt ttagactttt	1860
caaccccagg tagaactgct gctgctgtgg ctttcttac ttttatatta gataaatgga	1920
tcccgagac tcatttcagc aggggatacg ttttgattt catagccaca gcattgtgga	1980
gaacatggaa gttcgcaag atgaggacaa tcttaggtt ctggccagtgcagc cagccttgg	2040
gtgtacggg aatcctgagg catccaccgg tcatgccagc ggtctggag gaggaacagc	2100
aagaggacaa cccgagagcc ggcctggacc ctccagtggaa ggaggcggag tagctgactt	2160
gtctcctgaa ctgcaacggg tgcttactgg atctacgtcc actggacggg atagggcgt	2220
taagagggag agggcatcta gtggtaactga tgctagatct gagttggctt taagtttaat	2280
gagtcgcaga cgtcctgaaa ccatttggtg gcatgaggtt cagaaagagg gaagggatga	2340
agttctgtt ttgcaggaga aatattcaact ggaacaggtt aaaacatgtt gttggagcc	2400
tgaggatgtat tggaggtgg ccattaaaaa ttatgccaag atagcttga ggcctgataa	2460
acagataag attactagac ggattaatat ccggaatgct ttttacatat ctggaaatgg	2520
ggctgaggtt gtaatagata ctcaagacaa ggcagttatt agatgctgca tggatggat	2580
gtggcctggg gtagtcggtt tggaagcagt aactttgtt aatgttaagt ttagggaga	2640
tggttataat ggaatagtgtt ttagggccaa taccaaactt atattgcattt gtttagttt	2700
ttttggtttc aacaataacct gtgttagatgc ctggggacag gtttgtac gggatgttag	2760
tttctatgct tttggattt ccacagctgg cagaaccaag agtcaattgt ctctgaagaa	2820
atgcataattt caaagatgtt acctggcat tctgaatgaa ggcgaagcaa gggtccgcca	2880
ctgcgttctt acagatactg gatgtttt tttgattaag ggaaatgcca gcgtaaagca	2940
taacatgatt tgcgtgtt ccgtgagag gccttatcaa atgctactt gtgtggat	3000
gcattgttaat atgctggcta ctgtgcataat tggttccat caacgaaaaa aatggcctgt	3060
ttttgatcac aatgtgatga cgaagtgtac catgcatttca ggtggcgta gaggaatgtt	3120
tatgccttac cagtgttaca tgaatcatgtt gaaagtgtt tggaccatg atgccttttcc	3180
cagaatgagc ctaacaggaa ttttgacat gaacatgcaatcttggaa tcctgaggtt	3240
tgtatgatacg agatcgaggac tacgcgtat cgaatgcggaa ggcaagcatg ccagttcca	3300
ggccgtgtgtt gtagatgttga ctgaagatctt cagaccggat catttttttta ttgcccccac	3360

tggagcagag ttccgatcca gtggagaaga aactgactaa ggtgagtatt gggaaaactt	3420
tgggtggga tttcagatg gacagatga gtaaaaattt gttttctg tcttcagct	3480
gtcatgatg gaaacgcctc tttaagggg ggagtctca gcccttatct gacagggcg	3540
ctccatcct gggcaggagt tcgtcagaat gttatggat ctactgtgga tggaagaccc	3600
gtccaacccg ccaattcttc aacgctgacc tatgtactt taagttttt accttggac	3660
gcagctgcag ctgccgcgc cgcttctgtt gccgctaaca ctgtgcttgg aatgggttac	3720
tatgaaagca tcatggctaa ttccacttcc tctaataacc ctttctaccct gactcaggac	3780
aagttacttg tcctttggc ccagctggag gctttgaccc aacgtctggg tgaactttct	3840
cagcaggtgg tcgagttgcg agtacaaact gagtctgctg tcggcacggc aaagtctaaa	3900
taaaaaaatc ccagaatcaa tgaataaata aacaagctt tggtttagtt aaaatcaagt	3960
gttttattt cattttcgc gcacggatg ccctagacca ccgtatctta tcattgagaa	4020
ctcggatgat ttttccagg atcctataga ggtgggatg aatgtttaga tacatggca	4080
ttagggcgc ttiagggtgg agatagctcc attgaaggga ttcatgctcc gggtagtgt	4140
tgtaaatcac ccagtcataa caaggtcga gtgcattgtt ttgcacaata tcttttagaa	4200
gttagctgat tgccacagat aagccattgg tgttagtgg tacaaccgg ttgagctggg	4260
atgggtgcat tcgggtgaa attatgtca tttggatg gatTTTaaG ttggcaatat	4320
tgccgccaag atccgtctt gggttcatgt tatgaaggac caccaagacg gtgtatccgg	4380
tacattagg aaatttatcg tgcagcttgg atggaaaagc gtggaaaaat ttggagacac	4440
ccttgttcc tccaagattt tccatgcaact catccatgtat aatagcaatg gggccgtggg	4500
cagccgcgcg gccaacacg ttccgtggg ctgacacatc atagttatgt tcctgagtt	4560
aatcatcata agccattta atgaatttgg ggccggaggt accagattgg ggtatgaatg	4620
ttccttcggg ccccgagca tagtccctt cacagatttgc cattcccaa gcttcagtt	4680
ccgagggtgg aatcatgtcc acctgggggg ctatgaaaaa caccgttct gggccggggg	4740
tgattaattt tgatgatagc aaatttctga gcaattgaga tttgccacat ccgggtggggc	4800
cataaatgt tccgattacg ggttcaggt ggtatTTAG ggaacggcaa ctgcgtt	4860
ctcgaagcaa gggggccacc tcgttcatca ttcccttac atgcattttt tcccacca	4920
aatccattag gaggcgctt ctccttagtg atagaagttc ttgtatgtg gaaaagtttt	4980
tcagcggtt cagaccgtca gccatggca tttggagag agtttgcgaaaatctta	5040
gtctgttcca cagttcagtg atgtgttcta tggcatctcg atccagcaga ctcctcg	5100

tcgcgggtt ggacggctcc tggataggg tatgagacga tggcgcca gcgcgccag	5160
gttcggtcc ttccagggtc tcagtgtcg agtcagggtt gttccgtca cagtgaaggg	5220
gtgtgcgcct gctgggcgc ttgccagggt gcgcgtcaga ctatccgc tggtcgaaaa	5280
cttctgtcgc ttggccct gtatgtcggc caagtgcag ittaccatga gttcgtagtt	5340
gaggcctcg gctgcgtggc cttggcgcg gagcttacct ttgaaagtt tctgcatac	5400
cggcagtat aggcatca gcgcatacaa cttggcgcga aggaaaacgg attctggga	5460
gtatgcatct gcgcgcagg aggcgcaaac agttcacat tccaccagcc aggttaatc	5520
cggtcattt gggtaaaaaa caagtttcc gccatattt ttgatgcgtt tcttacctt	5580
gtctccatg agttcgtgtc ctcgttgagt gacaacagg ctgtccgtgt ccccgtagac	5640
tgatttaca ggcctttct ccagtgaggt gcctcggtct tttcgatca ggaactctga	5700
ccactctgtat acaaaggcgc gcttcaggc cagcacaaag gaggctatgt gggagggta	5760
gcgatcggtt tcaaccagggtt ggtccaccc ttccaaagta tgaaacaca tgtcaccctc	5820
ttcaacatcc aggaatgtga ttggctttaa ggtgtattt acgtgaccc gggccccgc	5880
tggggggta taaaaggggg cggttcttgc ctcttcata ctgtctccg gatcgctgtc	5940
caggaacgtc agctgttggg gtaggttattc cctctcgaag gcgggcatga cctctgcact	6000
cagggttgcata gtttctaaga acgaggaggaa tttgatattt acgtgccgg ttgagatgcc	6060
tttcatgagg tttcgtcca tctggcaga aaacacaatt ttttattgtt caagtttgg	6120
ggcaaatgtt ccatacaggc cggtggataa aagttggca atggatcgca tggttgg	6180
ctttcccttgc tcccgccgt ctggcgccgatgttgagt tggacatact cgcgtgccag	6240
gcacttccat tcgggaaga tagttttaa ttcatctggc acgattctca cttgccaccc	6300
tcgattatgc aaggttaatta aatccacact ggtggccacc tcgcctcgaa ggggttattt	6360
ggtccaaacag agcctaccc ctttcctaga acagaaagg ggaagtgggt ctagcataag	6420
ttcatcggtt gggctgtcat ccatggtaaa gattccggaa agtaatctt tatcaaaata	6480
gctgtggaa gtggggcat ctaaggccat ttgcatttct cgagctgcca gtgcgcgtc	6540
atatgggtta agggactgc cccatggcat gggatgggtt agtgcagagg catacatgcc	6600
acagatgtca tagacgtaga tggatcctc aaagatgcct atgttagttt gatagcatcg	6660
ccccctctg atacttgctc gcacatagtc atatagttca tgtgtggcg ctagcagccc	6720
cggacccaag ttggtgcgtt tgggttttgc tggatgttag acgatctggc gaaagatggc	6780
gtgagaattt gaagagatgg tgggtcttgc aaaaatgtt gaaatggcat gaggttagacc	6840
tacagagtct ctgacaaagt gggcataaga ttcttgaagc ttgggttacca gttcggcggt	6900
gacaagtacg tctagggcgc agtagtcaag tggatgttgc atgtatgtcat aacctgggtt	6960

gtttttctt tcccacagtt cgcggttag aaggattct tcgcgatcct tccagactc	7020
ttctagcga aaccgtctt tgtctgcacg gtaagatctt agcatgtaga actgattaac	7080
tgccttgaa gggcagcagc ctttcgtac gggtagagag tatgctttag cagctttcg	7140
tagcgaagcg tgagtaaggg caaagggttc tctgaccatg actttgagga attggtaattt	7200
gaagtcgatg tcgtcacagg ctccctgttc ccagagtgg aagtctaccc gtttctttaga	7260
ggcggggtttggccaaaggcga aagtaacatc attgaagaga atcttgcgg ccctgggcat	7320
gaaattgcga gtgatgcgaa aaggctgtgg tacttccgct cggttatttga taacctgggc	7380
agcttaggacg atctcgatc aaccgtttagt gtttgtcct acgtatgtata attctatgaa	7440
acgcggcgtg ccctgacgt gaggttagt actgagctca tcaaaggta ggtctgtgg	7500
gtcagataag gcgttagtggt cgagagccca ttctgtgcagg tgaggattcg cttaaggaa	7560
ggaggaccag aggtccactg ccagtgttgg tcccggtact gacgaaaatg	7620
ccgtccgact gccatTTTT ctgggggtgac gcaatagaag gttgggggt cctggcccca	7680
gcgatcccac tttagttta tggcgaggatc ataggcgatg ttgacgagcc gctggctcc	7740
agagagtttca atgaccagca tgaagggat tagctgttg ccaaaggacc ccatccaggt	7800
gttagtttcc acatcgtagg tgagaaagag ctttctgtg cgaggatgag agccaatcg	7860
gaagaactgg atccctgcc accagttggaa ggaatggctg ttgtatgtat ggaagtagaa	7920
ctccctgcga cgcggcggc attcatgttt gtgttgtac agacggccgc agtagtcga	7980
gcgttgacg gtttatctt cgtgaatgag ttgtacctgg ctcccttga cgagaaattt	8040
cagtggaaag ccgaggcctg gcgattgtat ctctgtcttt actatgttgcg tacgtcgcc	8100
ctgttcatct tctgtctcga tgggggtcat gctgacgagc cctcgccggaa ggcaagtcca	8160
gacctcggcg cggcaggggc ggagctcgag gacgagagcg cgccggctgg agctgtccag	8220
ggtcctgaga cgctgcggac tcaaggatgtt aggcaatgtc aggagattaa ctgtcatgt	8280
ctttggagg gctgtcgaaaa ggttcagata gtacttgatc tcaacgggtc cggtgggtgg	8340
gatgtcgatg gcttgacggg ttccgtgtcc ctggggctt accaccgtgc cttttttttt	8400
cattttggac ggcgggtggct ctgttgcttc ttgcatgttt agaagcgggtg tcgagggcgc	8460
gcaccggcg gcagggcgccctg ctcggaccc ggccggatgg ctggcagtgg tacgtcgcc	8520
ccgcgcgcgg gtaggttctg gtactgcgcctt ctgagaagac tcgcattgcgc gacgacgcgg	8580
cgggtgacat ctggatctg acgcctctgg gtgaaagacta cggcccccgt gagcttgaac	8640
ctgaaagaga gttcaacaga atcaatctcg gtatgttgc cggccgttgc cctaaggatt	8700
tcttgacgtt caccagagtt gtcctggtag gcgatctccg ccatgaactg ctgcattct	8760
tcctcttggaa gatctccgcg gcccgtctc tcgacgggtgg ccgcggatgtc gttggagatg	8820

cgcctaatga	gttgagagaaa	tgcattcatg	ccgcctcggt	tccagacgacg	gctgttagacc	8880
acggccccca	cgggatctct	cgcgcgcatg	accacctggg	cgagggtttag	ctccacgtgg	8940
cgggtgaaga	ccgcatagtt	gcataggcgc	tggaaaaggt	agttgagtgt	ggtggcgatg	9000
tgctcggtga	cgaagaataata	catgatccat	cgtctcagcg	gcatctcgct	gacatcgccc	9060
agagcttcca	agcgctccat	ggcctcgtag	aagtccacgg	caaaattaaa	aaactgggag	9120
tttcgcgcgg	acacggtaa	ctcctttcc	agaagacgga	taagttcggt	gatgggttgt	9180
cgcacactcg	gctcgaaagc	ccctgggatt	tttcctcaa	tcttttttc	ttccactaac	9240
atctttcttct	cttcagggtgg	ggctgcagga	ggagggggaa	cgcggcgacg	ccggcggcgcc	9300
acgggcagac	ggtcgtatgaa	tcttcaatg	acctctccgc	ggcggcggcg	catggtttca	9360
gtgacggcgc	ggccgttctc	gchggtcg	agagtaaaaa	caccgcccgc	catctcctta	9420
aagtgggtgac	tgggagggttc	tccgtttggg	agggagaggg	cgctgattat	acattttatt	9480
aattggcccg	tagggactgc	acgcagagat	ctgatcggt	caagatccac	gggatctgaa	9540
aacctttcga	cgaagcgctc	taaccagtca	cagtcacaag	gtaggctgag	tacggcttct	9600
tgtggcggg	ggtggttatg	tgttcggtct	gggtttctg	tttcttcttc	atctcgggaa	9660
ggtgagacga	tgctgctggt	gatgaaatta	aagttaggcag	ttctaagacg	gcccgtgggt	9720
gcgaggagca	ccaggtcttt	gggtccggct	tgctggatac	gcaggcgatt	ggccattccc	9780
caagcattat	cctgacatct	agcaagatct	ttgttagtagt	cttgcattgag	cggttctacg	9840
ggcacatttt	cctcaccctgt	tctgccatgc	atacggtgt	gtccaaatcc	gcccattgg	9900
tgtaccagt	ccaagtcagc	tacgactctt	tcggcgagga	tggcttgcgt	tacttgggt	9960
agggtggctt	gaaagtcatc	aaaatccaca	aagcggtgg	aagctctgt	attaatgggt	10020
taagcacagt	tggccatgac	tgaccagtt	actgtctggt	gaccaggcg	cacgagctcg	10080
tggttatttaa	ggcgcgaata	ggcgcgggtg	tcaaagatgt	aatcggttgc	ggtgcgcacc	10140
agatactgg	accctataag	aaaatgcggc	ggtggttggc	ggtagagagg	ccatcggttct	10200
gtagctggag	cggcaggggc	gaggcttcc	aacataaggc	ggtgatagcc	gtagatgtac	10260
ctggacatcc	agggtattcc	tgcggcggt	gtagaagccc	gaggaaactc	gcgtacgcgg	10320
ttccaaatgt	tgcgtagcggt	catgaagtag	ttcattgttag	gcacggtttgc	accagtgggt	10380
cgcgcgcagt	cattgtatgt	ctatagacac	ggagaaaaatg	aaagcggtca	gcccactcgac	10440
tccgtagcct	ggagggacgt	gaacgggttgc	ggtcgggtgt	tacccgggtt	cgagacttgt	10500
actcgagccg	ggccggagccg	cggctaacgt	ggtattggca	ctcccggtc	gaccggcgcc	10560

acaaaaatcc aggatacgg atcgagtcgt tttgctgg tccgaatggc agggaaagtga	10620
gtcctatccc ttttttgc cgctcagatg catcccgatc tgacgacatg ggcggcccaa	10680
caacagcccc cctcgcagca gcagcagcag caatcacaaa aggctgtccc tgcaactact	10740
gcaacigccg ccgtgagcgg tgcgggacag cccgcctatg atctggactt ggaagaggc	10800
gaaggactgg cacgtctagg tgcgcctca cccgagcggc atccgcgagt tcaactgaaa	10860
aaagattctc gcgaggcgta tgtgccccaa cagaacctat ttagagacag aagcggcag	10920
gagccggagg agatgcgagc ttcccgctt aacgcgggat gtgagctgca tcacggtttg	10980
gaccgaagac gagtggttgcg ggacgaggat ttgcgaagtgt atgaaatgac agggatcagt	11040
cctgccagg cacacgtggc tgcagccaac ctgttatcgg cttaacgagca gacagtaaag	11100
gaagagcgta acttccaaaa gtcttttaat aatcatgtgc gaaccctgtat tgcccgaa	11160
gaagttaccc ttggtttgcat gcatggatgg gatttgcgtt aagctatcat tcagaaccct	11220
actagcaaac ctctgaccgc ccagctgttt ctgggtggc aacacagcag agacaatgag	11280
gcttcagag aggccgtgtt gaaatcacc gaacccgagg ggagatgggt gtatgatctt	11340
atcaacattc tacagagttt catatgcgtt gacgggagcc tggccctggc cgagaaggta	11400
gctgccatca attactcggt ttggagcttg ggaaaatatt acgctcgcaaa aatctacaag	11460
actccatacg ttcccataga caaggagggtt aagatagatg gttctacat ggcgcacgt	11520
ctcaaggctt tgacccttagt cgtatctt ggggtgtatc gcaatgcac agatgcacgc	11580
gcgggttagcg ccagcaggag ggcgcgttta agcgacaggg aactgtatgc cagtttgc	11640
agagctctga ctggagctgg aaccgggggtt gagaattact tcgacatggg agctgacttg	11700
cagtggcagc ctatgcgtt ggctctgacgc ggcgcacgg caggatgtga gcttccttac	11760
atagaagagg cggatgaagg cgaggaggaa gagggcgagt acttggaaaga ctgtatggcac	11820
aacccgtgtt tttgctaga tggaacagca agcaccggat cccgcaatgc gggccgcgt	11880
gcagagccag ccgtccggca ttaactccctc ggacgatgg acccaggcca tgcaacgtat	11940
catggcgttg acgactcgca accccgaagc cttagacag caacccagg ccaaccgtct	12000
atcgccatc atgaaagctt tagtgccttc cgcgtttaat cccactcatg agaaggtctt	12060
ggccatcgatg aacgcgttgg tggagaacaa agctatttgtt ccagatggg ccggactgg	12120
atacaacgtt ctcttagaacat gcgtggctcg ctacaacagt agcaatgtgc aaaccaattt	12180
ggaccgtatg ataacagatg tacgcgaagc cgtgtctcag cgcgaaaggat tccagcgtga	12240
tgcacaacctg gtttcgttgg tggcgtaaa tgctttctt agtactcagc ctgcataatgt	12300
ggccgcgttgtt caacaggattt atactaactt tttaagtgtt ttgagactga tggatcaga	12360
agtacctcag agcgaagtgtt atcagtccgg tcctgattac ttcttcaga ctagcagaca	12420

gggcttgcag acggtaaatc tgagccaagg tttaaaaac cttaaagggtt tgtggggagt	12480
gcatcccccg gtaggagaaa gagcaaccgt gtctagctt ttaactccga actccgcct	12540
attattactg ttggtagctc ct当地caccga cagcggtagc atcgaccgtt attcctatt	12600
gggttaccta ctaaacctgt atcgcaagc catagggcaa agtcaggtgg acgagcagac	12660
ctatcaagaa attacccaag tcagtcgcgc tttggacag gaagacactg gcagtttggaa	12720
agccactctg aacttcttgc ttaccatcg gtctaaaag atccctcctc aatatgtctt	12780
tactgcggag gaggagagga tccttagata tgtcagcag agcgtggat tggatctgtat	12840
gcaagagggg gcaactccga ctgcagcact ggacatgaca gcgcgaaata tggagcccag	12900
catgtatgcc agtaaccgac ct当地tattaa caaactgctg gactacttgc acagagctgc	12960
cgctatgaac tctgatattt tcaccaatgc catcttaaac ccgcacttgc tgccccacc	13020
tggttctac acggcgaat atgacatgcc cgaccctaat gacggatttgc tggacgat	13080
cgtggacagc gatgttttt caccttttgc tgatcatgc acgtggaaaa aggaaggcgg	13140
cgtatagaatg cattcttgc catcgctgc cgggtcatg ggtgctaccg cggctgaggcc	13200
cgagtcgtca agtcctttc ct当地tacc ct当地tcta cacagtgtac gtgcagcga	13260
atgggtaga ataagtgcgc cgagttat gggcaagag gagtatctaa acgatccctt	13320
gctcagaccg gcaagagaaa aaaattccc aaacaatgga atagaaagtt tggatggataa	13380
aatgagtaga tggaaagactt atgctcaggta tcacagagac gagcctggta tcatggggat	13440
tacaagtaga gcgagccgtaa gaccccgaccc ccatgacaga cagagggttc ttgtgtggaa	13500
cgatgaggat tcggccgtatc atagcagcgt gctggacttgc ggtggagag gaagggcaaa	13560
cccgtttgc tatttgcgc ctcgttgggg tggatgttg taaaaaaaaaaaa taaaaaaaaaaaa	13620
actcaccaag gccatggcga cgagcgtacg tt当地tcttcc tt当地tatct gtgtcttagta	13680
taatgaggcg agtcgtgtca ggcggagcgg tggatgtatcc ggagggtctt cctccttgcgt	13740
acgagagcgt gatgcagcag cagcaggcga cggcggtgtatc gcaatccccca ctggaggctc	13800
cttggatcc tccgcatac ctggcaccta cggaggcag aaacagcatt cgttatttgcgt	13860
aactggcacc tcagtagat accaccaggt tggatctggat ggacaacaag tcggcggaca	13920
ttgcttcttctt gaactatcgt aatgaccaca gcaacttctt gaccacgggtt gtgc当地aaaaca	13980
atgactttac ccctacggaa gccagcaccc agaccattaa ct当地tgcataa cggatcgccgt	14040
ggggcggtca gctaaagacc atcatgcata ctaacatgcc aaacgtgaac gagtatatgt	14100
tttagtaacaa gttcaaaagcg cgtgtgtatgg tggatgttgc ggtccggac ggtgtgtcc	14160
ttggggatatac ttatgtatcac aagcaggata tttgaaata tggatgttgc ggttactt	14220
tgccagaagg caacttttca gttactatgtatc cttatgttgc gatgttgc ggttactt	14280

ataattactt gaaaatgggt agacagaatg gagtgcttga aagtgcattt ggtgttaagt	14340
tcgcacccag gaacctcaag ctggatggg atccgaaac caagttgatc atgcctggag	14400
tgtatacgta tgaaggcttc catcctgaca ttgttact gcctggctgc ggagtggatt	14460
ttaccgagag tcgtttgc aaccccttg gtatcagaaa aaaacagcca tttcaagagg	14520
gttttaatgttttatgaa gattttagaag gtggtaatat tccggccctc ttggatgttag	14580
atgcctatga gaacagtaag aaagaacaaa aagccaaaat agaagctgct acagctgctg	14640
cagaagctaa ggcaaacata gttgccagcg actctacaag gttgctaac gctggagagg	14700
tcagaggaga caatttgcg ccaacacctg ttccgactgc agaatcatta ttggccgatg	14760
tgtctgaagg aacggacgtg aaactcacta ttcaacctgt agaaaaagat agtaagaata	14820
gaagctataa tgttgtggaa gacaaaatca acacagccctt tcgcaggatgg tatcttcgt	14880
acaattatgg cgatccgaa aaaggagtgc gttccctggac attgctcacc acctcagatg	14940
tcacccggcgg agcagagcag gtctactgtt cgcttccaga catgtgaag gatccgtca	15000
ctttccgctc cactagacaa gtcagtaact accctgtggt gggtgcagag cttatgcccg	15060
tcttctcaaa gagttctac aacgaacaag ctgtgtactc ccagcagctc cgccagtcca	15120
cctcgcttac gcacgtcttc aaccgcttc ctgagaacca gatTTTaaTC cgtccggcgg	15180
cgcaccat taccaccgtc agtggaaaacg ttccctgtct cacagatcac gggaccctgc	15240
cgttgcccg cagtatccgg ggagtccaaat gtgtgaccgt tactgacgcc agacgccca	15300
cctgtcccta cgtgtacaag gcactggca tagtgcacc gcgcgtcctt tcaagccca	15360
ctttctaaaa aaaaaaaaaa tgtccattct tatctcgccc agaataaca ccggttgggg	15420
tctgcgcgtt ccaagcaaga tgtacggagg cgacgcggaa cgttctaccc aacatcctgt	15480
ccgtgttcgc ggacatttc ggcgtccatg gggccctc aaggccgca ctcgcgttcg	15540
aaccaccgtc gatgtgtaa tcgatcagggt gttgcccgc gcccgttaattt atactcctac	15600
tgcgcctaca tctactgtgg atgcaggat tgacagttaa gtggctgacg ctcgcacta	15660
tgctcgacgt aagagccggc gaaggcgcatt tgccagacgc caccgagacta ccactgcatt	15720
gcgcggccca agagctctgc tacgaagacgc tagacgcgtg gggcgaagag ccatgcttag	15780
ggcggccaga cgtgcagctt cggccggcagg cgccggcagg tcccgaggc aagcagccgc	15840
tgtcgacgcg gcgactattt ccgcacatggc ccaatcgca agaggcaatg tataactgggt	15900
gcgtgacgctt gccaccggc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccctc gcacttagaa	15960
gatactgagc agtctccgat gttgtgtccc agcggcggagg atgtccaagc gcaaatacaa	16020



caccactaga ccgatagccc caatggccac cgggtgatg aaaccttctc agttgcac	17940
acccgtcacc ttggatttgc cccctcccc tgctgtact gctgtacccg cttctaagcc	18000
tgtcgctgcc ccgaaaccag tcgcccgtac caggtcacgt cccggggcgc ctccctgtcc	18060
aatgcgcac tggcaaata ctctgaacag catcggtt ctaggcgtgc aaagtgtaaa	18120
acgcgcgtcgc tgcttttaat taaatatgg a tagcgccta acttgccstat ctgtgtat	18180
gtgtcattac acgcgcgtc acgcgcgcag gaaaaaagga agaggtcggt cgtcgacgc	18240
gagttacttt caagatggcc accccatcg a tgctgccc atggcatac atgcacatcg	18300
ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctgg gcagttcgcc cgcgccacag	18360
acacctactt caaatctggaa aataagtta gaaatcccac ctagcgcgc acccacatcg	18420
tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttcgt gcccgttgac cggaggaca	18480
atacataactc ttacaaagtg cggtaacacc tggcgtggg cgacaacaga gtgtggata	18540
tggccagcac gttcttgac attaggggtg tggacag aggcccagt ttcaaacctt	18600
attctggtaa ggcttacaac tccctggctc ctaaaggcgc tccaaataca tctcgttgg	18660
ttgcagaagg tgtaaaaat acaactggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata	18720
ctactactta cactttggc aatgctcctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag	18780
gactcccagt agtttggaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa	18840
catatcagcc agaacctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg	18900
aaaagtatgg aggaggcgt ctcaaaccgc atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct	18960
ttgccaacc tactaatgtg aaaggcggc aggcaaaaca aaaaacaacg gagcagccaa	19020
atcagaaagt cgaatatgtatc atcgacatgg agtttttg tgcggcatcg cagaaaacaa	19080
acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaaa ttggaaact ccagacactc	19140
atgtatgtt caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttgg ggacaacaat	19200
ctatgccaa cagacccaa tacattggct tcagagataa ctttatggc cttatgtact	19260
ataacagttac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtaagc gtctcgtt aatgcagtgg	19320
ttgacttgca ggacagaaac acagaactt cttacaaact cttgcttgac tctctggcgc	19380
acagaaccag atacttagc atgtggaatc aggctgtgga cagttatgtat cctgtatgtac	19440
gtgttattga aaatcatgtt gtggaaatgt aacttccaa ctactgtttt ccactggacg	19500
gcatagggtt tccacaacc accttacaaat caatagtcc aatggagac aatgcgccta	19560
attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatgg acaggtaat ttgtttggca	19620
tggaaattaa cttcaagcc aatctatggc gaagttcct ttattccat gtggcttat	19680
atctcccaaga ctcgtacaaa tacacccgtt ccaatgtc ac tttccagaa aacaaaaca	19740

cctacgacta catgaacggg cgggtggtgc cgccatctc agtagacacc tatgtgaaca	19800
ttggtgccag gtggctctg gatgccatgg acaatgtcaa cccattcaac caccaccgt acgctggctt gcgttaccga tccatgcttc tggtaacgg acgttatgtg ccttccaca tacaagtgcc tcaaaaattc ttcgctgtta aaaacctgct gttctccca ggctcctaca cttatgagtg gaacctttagg aaggatgtga acatggttt acagaggccc tcggtaacg acctgcgggt agatggcgc accatcgtt tacagagcat caacctctat gctactttt tccccatggc tcacaacacc gttccaccc ttgaagccat gctgcgaaat gacaccaatg atcagtcat caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctacccatt cctgccaatg	19860 19920 19980 20040 20100 20160 20220
caaccaatat tccatttcc attccttctc gcaactggc ggcttcaga ggctggcat ttaccagact gaaaacccaa gaaactccct ctttgggtc tggatttgac ccctacttg tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac actttaaga aggtttccat catgttgac tttcagtga gctggctgg aaatgacagg ttactatctc ctaacgaatt tgaataaag cgcactgtgg atggcgaagg ctacaacgt a gccaatgca acatgaccaa agactggttc ttggcacaga tgctgccaat ctaacacatc ggctatcagg gcttctacat tccagaagga tacaagatc gcatgtattc attttcaga aacttccagc	20280 20340 20400 20460 20520 20580 20640
ccatgagcag gcaggtggtt gatgaggtca attacaaga ctcaaggcc gtcgccatac cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaaggc aacccatcc cgctaactat ccctatccac tcattggAAC aactgcccgt aatagtgtta cgccggaaaaa gttttgtgt gacagaacca tgtggcgat accgttctcg agcaacttca tgtctatggg gccccttaca gacttggac agaatatgtct atgccaac tcagctcatg ctctggacat gacccctttagt gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatttctt tcgaagttt cgacgtggc agagtgcattc agccacaccc cgccatcatc gaggcagtct	20700 20760 20820 20880 20940 21000 21060
acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccacgt a agaagcttct tgcttctgc aaatagcage tcaaccatg ggctgcccgt cccaaaacgg ctccagcgag caagagtc gagccattgt ccaagacctg gggtggac cctatTTT gggAACCTAC gataagcgct tccgggggtt catggcccccc gataagctcg cctgtgcccgt tgaaataacg gccggacgtg agacgggggg agagcactgg ttggcttgc gttggaccc acgttctaac acctgctacc ttttgatcc ttggatcc tcggatgatc gtctcaaaca gattaccag tttgaatatg agggtctcct ggcggcagc gctttgcta ccaaggaccc ctgtattacg ctggaaaaat	21120 21180 21240 21300 21360 21420 21480

ctacccagac cgtgcagggt ccccgttctg ccgcctgcgg actttctgc tgcatgttc	21540
ttaacgcctt tgtgcactgg cctgaccgtc ccatggacgg aaaccccacc atgaaattgc	21600
taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctctaaagt ccagcccacc ctgtgtgaca	21660
atcaaaaagc actctaccat tttctaata cccattcgcc ttatttcgcc tcccatcgta	21720
cacacatcga aagggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaaa	21780
caacgtgttc aataaacatc actttatTTT tttacatgtt tcaaggctct gcattactta	21840
tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gacccgcagg cagtgatacg	21900
ttgcggaact gatacttggg ttgcacttg aattcggaa tcaccaactt gggAACGGT	21960
atatcgggca ggtatgtcaact ccacagctt ctggtcagct gcaaagctcc aagcaggta	22020
ggagccgaaa tcttgaatc acaatttagga ccagtgcTTT gagcgcgaga gttgcggta	22080
accggattgc agcactgaaa caccatcagc gacggatgtc tcacgcttc cagcacggta	22140
ggatctgcaa tcatgcccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cggggtcata	22200
ttgcaggctt gcctaccat ggcgggcacc caattaggct tgggttgca atcgca	22260
agggggatca gtatcatttt ggcctgatcc tgcgtgattc ctggatacac ggctctcatg	22320
aaagcatcat attgctigaa agccigtgg gctttactac cctcggtata aaacatcccg	22380
caggacactgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcggcgc	22440
tcattgttag ctattgcac cacacttctg cccagcggt tttgggtgat ttgggttcgc	22500
tcgggattct ccttaaggc tcgttgtccg ttctcgctgg ccacatccat ctgcataatc	22560
tgctccttct gaatcataat attgcatgc aggacttca gttgccttc ataatcattg	22620
cagccatgag gccacaacgc acagctgtt cattccaat tatggtgccc gatctgagaa	22680
aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcgtgtt ctgtgacta	22740
gtgaaagta actggatgcc tcgggtctcc tggttacgt actggtgaca gatgcgcctg	22800
tattgttcgt gttgctcagg cattagtttta aaagagggttca taagttcgat atccagcctg	22860
tacttctcca tcagcagaca catcaacttc atgccttct cccaaagcaga caccaggggc	22920
aagctaatacg gattcttaac agtgcaggca gcagtcctt tagccagagg gtcataatc	22980
gcgcatttttcaatgttctt cttgcattcc ttctcaacgaa tgccacggg cgggttagctg	23040
aaacccactg ctacaagttt cgcctttctt ctttcttctt cgctgtctt actgtatgtt	23100
tgcattgggaa tatgtttggt cttcccttggc ttcttttgg ggggtatcgaa aggaggagga	23160
ctgtcgctcc gttccggaga cagggaggat tggacgttt cgctcaccat taccaactga	23220
ctgtcggttag aagaacctga cccccacacgg cgacagggtgt ttctttcgaa gggcagaggt	23280
ggaggcgtt gcaagggtt gcggtccgac ctggaaaggcgtt gatgtatggc agaaccctt	23340

ccgcgttcgg gggtgtgctc cctgtggcg cgcttaact gatttccttc gggctggcc	23400
atgtgttct cctaggcaga gaaacaacag acatggaaac tcagccattt ctgtcaacat	23460
cgcacgagt gccatcacat ctcgtctca gcgacgagga aaaggagcag agctaagca	23520
ttccaccgcc cagtccgtcc accaccta ccctagaaga taaggaggc gacgcacatc	23580
atgacatgca gaataaaaaa gcgaaagagt ctgagacaga catcgacaa gaccgggct	23640
atgtgacacc ggtggaacac gaggaagagt tgaaacgctt tctagagaga gaggatgaaa	23700
actgcccata acaacgagca gataactatc accaagatgc tggaaatagg gatcagaaca	23760
ccgactacct cataggcatt gacgggaaag acgcgtcct taaacatcta gcaagacagt	23820
cgctcatagt caaggatgca ttattggaca gaactgaagt gcccatcagt gtggaaagac	23880
tcagccgcgc ctacgagctt aacctttt cacctcgat tcccccaaa cgtcagccaa	23940
acggcacctg cgagccaaat cctcgatcaa acttttatcc agtttgct gtgcagaag	24000
tactggctac ctatcacatc tttttaaaa atcaaaaaat tccagtcctcc tgccgcgcta	24060
atcgccccg cggcgatgcc ctactcaatc tgggacctgg ttcacgctt cctgatata	24120
cttccttggaa agaggttcca aagatctcg agggcttggg caataatgag actcgccgc	24180
caaatgtct gcaaaaggga gaaaatggca tggatgagca tcacagcgtt ctgggaaat	24240
tggaaggcga taatgccaga ctgcgtac tcaagcgaag catcgaggc acacactcg	24300
catatccgc tgtcaacctg cccctaaag tcatgacggc ggtcatggc cagttactca	24360
ttaagcgcgc aagtccctt tcaagaagaca tgcgtaccc agatgcctgt gatgaggta	24420
aaccagtggc cagtgtatgag cagctaaccg gatggctggg caccgactct cccaggatt	24480
tggaagagcg tcgcaagctt atgatggccg tgggtctgg taccgttagaa cttagtg	24540
tccgacgttt cttaaccat tcagaaacct tgccaaact cgaagagaat ctgcactaca	24600
cttttagaca cggctttgtg cggcaggcat gcaagatatc taacgtggaa ctcaccaacc	24660
tggtttccta catgggtatt ctgcgtatgaa atgcctagg acaaagcgtt ctgcacagca	24720
ccctgaaggg ggaagccgcg cgtgattaca tccgcgattt tgtctatctg tacctgtgc	24780
acacgtggca aaccggcatg ggtgtatggc agcaatgttt agaagaacag aacttgaag	24840
agcttgacaa gctttacag aaatcttta aggttctgtg gacagggttc gacgagcga	24900
ccgtcgcttc cgacctggca gacctcatct tcccgagcgt tctcagggtt actttgc	24960
acggattgcc tgactttatg agccagagca tgcttaacaa tttcgctt ttcatcttgg	25020
aacgctccgg tatectgccc gccacctgtt ggcgtactgcc ctccgacttt gtgcctctca	25080
cctaccgcga gtgcggcccg cgcgtatggc gtcgtatgtt cctgtccgt ctggccaact	25140
atctctcttta ccactcgatgtatggc agtgcgtatgtt agacggcttgc ctggagtgtc	25200

actgccgctg caatctgtgc acgccccacc ggtccctagc ttgcaacccc cagtttatgc	25260
gcgaaaccca gataataggc acctttgaat tgcaaggccc cagcagccaa ggcgtatgggt	25320
cttccctgg gcaaagtta aaactgaccc cgggactgtg gacctccgca tacttgcga	25380
agtttgcctcc ggaagattac cacccctatg aaatcaagtt ctatgaggac caatcacagc	25440
ctccaaaggc cgaactttcg gcctgcgtca tcacccaggg ggcaattctg gcccaattgc	25500
aagccatcca aaaatccgc caagaatttc tactgaaaaa ggtaagggg gtctaccttg	25560
accccccagac cggcgaggaa ctcaacacaa ggttccctca ggatgtccca acgacgagaa	25620
aacaagaagt tgaaggtgca gcccggccc ccagaagata tggaggaaga ttggacagt	25680
caggcagagg aggccggagga ggacagtctg gaggacagtc tggaggaaga cagtttgag	25740
gaggaaaaacg aggaggcaga ggaggtggaa gaagtaaccg ccgacaaaaca gttatctcg	25800
gctgcggaga caagcaacag cgctaccatc tccgctccga gtgcgaggaac ccggcggcgt	25860
cccagcagta gatgggacga gaccggacgc ttccgaacc caaccagcgc ttccaagacc	25920
ggtaagaagg atccggcaggg atacaagtcc tggcggggc ataagaatgc catcatctcc	25980
tgcttgcatg agtgcgggg caacatatcc ttacgcggc gctacttgct attccaccat	26040
ggggtaact ttccgcgcaa tgtttgcatt tactaccgtc acctccacag cccctactat	26100
agccagcaaa tccggcagt ctgcacagat aaagacagcg gcccgcacct ccaacagaaaa	26160
accagcagcg gcagtttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac	26220
agccaaacgag ccagcgcaaa cccgagatgt aagaaatcgg atcttccaa ccctgtatgc	26280
catcttcag cagagtccgg gtcagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg	26340
ttcgctcacc agaagttgtt tgtatcaca gagcgaagat caacttcage gcactctcga	26400
ggacgcccgg gctctttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggtagcgc	26460
cgcgttatt caaaaaaggc gggattaca tcatcctcga catgagtaaa gaaattccca	26520
gccttacat gtggagttat caacccaaa tggattggc ggcaggcgcc tccaggact	26580
actccacccg catgaattgg ctcagcgcgg ggccttctat gatttcgat gttatgata	26640
tacgcgctca cgaaaccaa atactttgg aacagtccgc tcttaccacc acgccccccc	26700
aacaccta tcccgaaaat tggcccgccg ccctagtgtc ccagggaaat cccgccttca	26760
ccactgtatt acttcctcga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcagggtgcgc	26820
agtttagtgg cggtccacc ctatgtcgac acaggcctcg gcataatata aaacgcctga	26880
tgtatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggt gagctctccg cttggctac	26940

gaccagacgg aatcttcag attgccgct gcgggagatc ttccttacc cctcgtagg	27000
ctgttctgac ttggaaagt tcgtttcgc aacccgcgc gggcgaatc gggaccgttc	27060
aatttgtgaa ggagttact ccctctgtct acttcaaccc ctctccgga tctcctggc	27120
attacccgga cgagttcata cggaaacttc acgcgattag cgagtcaatg gacggctacg	27180
attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgcg	27240
ctttcgtgc ttggcccgaa aactcatgtt gttcatctac ttcaactcc ccaaggatca	27300
ccctcaaggt ccggcccacg gagtgccgat ttctatcgaa ggcaaaatag actctcgct	27360
gcaacgaatt ttctcccagc ggcccggtct gatcgagcga gaccaggaa acaccacgg	27420
ttccatctac tgcatgttta atcacccgg attgcatgaa agccttgcgt gtcttatgt	27480
tactgagttt aataaaaact gaattaagac ttcctacgg actgccgcgtt cttcaacccg	27540
gattttacaa ccagaagaac gaaactttt ctgtcgcca ggactctgtt aacttcacct	27600
ttcctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgtt ttccagaagc atttcccta	27660
ctaatactac ttcaaaaacc ggaggtgagc tccaaggctt tcctacagaa aacccttggg	27720
tggaagcggg cttttagtgc ttaggaattc ttgcgggtgg gcttgcgttattttgt	27780
acctatacac accttgcgttc actttcttag tgggtttgtg gtattgggtt aaaaaatggg	27840
gccccatacta gtcttgcttg ttttactttc gctttggaa cgggttctg ccaattacga	27900
tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact tttgcacccg acacaagccg	27960
catctgtgga gttcatcgcc tctttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg	28020
catggtgga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta agggtttgc	28080
tcaactgtcc tgcgattcca tcgagtgcac ctacaccctg ctgaagaccc tatgcggcct	28140
aagagacctg ctaccaatga attaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaatca	28200
gcaataaggt ctctgttgaat ttttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc	28260
tggattctta aaccccggtc agcggcatac ttttccata cttaaaggatgtcaaat	28320
ttagctctt ctcctgtacc cacaatcttca atgttttcttccatgtga ccaagagatgt	28380
ccggctcgttca gactccttca accctgttca cccctatgaa gatgaaagca cttcccaaca	28440
ccctttata aacccagggt tattttcccc aaatggcttc acacaaagcc caaacggagt	28500
tcttacttta aaatgtttaa ccccaactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt	28560
gggagggggga ttacagtgg atgacaccaa cgggttttg aaagaaaaca taagtgcac	28620
cacaccactc gttaagactg gtcactctat aggtttacca ctaggagccg gattggaaac	28680
gaatgaaaat aaactttgttcaaaatttgg acaaggactt acattcaatt caaacaacat	28740
ttgcattgtt gacaatatttta acacccatgtt gacaggagtc aacccacccg aagccactg	28800

tcaaatcatg aactccagtg aatctaata ttgcaaattt attctaacac tagttaaaac	28860
tggagcacta gtcactgcat ttgtttatgt tataggagta tctaacaattt ttaatatgtc	28920
aactacacac agaaaataaa atttactgc agagctgtt ttgcattcta ctggtaattt	28980
actaactaga ctctcatccc tcaaaaactcc acttaatcat aaatcaggac aaaacatggc	29040
tactgggcc attactaatg ctaaagggtt catgcccagc acgactgcct atccttcaa	29100
tgataattct agagaaaaag aaaactacat ttacggaact tgttactaca cagctagtga	29160
tcgcactgct ttcccattt acatatctgt catgcttaac cgaagagcaa taaatgacga	29220
gacatcatat tgtattcgta taacttggtc ctggAACACA ggagatgccc cagaggtgca	29280
aacctctgct acaacccttag tcacccccc attiacctt tactacatca gagaagacga	29340
ctgacaaata aagtttaact tgtttatttgg aaaatcaattt cacaatcc gagtagttat	29400
tttgcctccc cttcccattt taacagaata caccatctc tccccacgca cagctttaaa	29460
catttggata ccatttagata tagacatgtt tttagattcc acattccaa cagttcaga	29520
gcgagccaat ctgggtcag tgatagataa aaatccatcg ggatagtctt ttaaagcgct	29580
ttcacagtcc aactgctgctgatgcgactc cggagtctgg atcacggta tctggaaagaa	29640
gaacgatggg aatcataatc cgaaaacggt atcggacgat tggatctcat caaacccaca	29700
agcagccgct gtctgcgtcg ctccgtgcga ctgctgtta tggatcagg gtccacagtg	29760
tcctgaagca tgatTTAAT agcccttaac atcaacttgc tggatcgatg cgcgcagcaa	29820
cgcattctga ttcaactcaa atctttgcag tagtacaac acattattac aatattgttt	29880
aataaaccat aattaaaagc gctccagcca aaactcatat ctgatataat cgcccccgtca	29940
tgaccatcat accaaagttt aatataattt aaatgacgtt ccctaaaaa cacactaccc	30000
acatacatga tctctttgg catgtgcata ttaacaatct gtctgtacca tggacaacgt	30060
tggtaatca tgcacccaa tataaccttc cggaaccaca ctgccaacac cgctccccca	30120
gccatgcatt gaagtgaacc ctgctgatta caatgacaat gaagaaccca attctctgca	30180
ccgtaatca ctgagaatg aaaaatatct atagtggcac aacatagaca taaatgcatt	30240
catctctca taatTTAA ctccctcaggat tttggaaaca tatcccaggaaatggaaac	30300
tcttgagaa cagtaaagct ggcagaacaa ggaagaccac gaacacaact tacactatgc	30360
atagtcatag tatcacaatc tggcaacagc ggggtgtt cagtcataga agctcggtt	30420
tcattttcct cacaacgtgg taactggct ctgggttaag ggtgatgtct ggcgcattat	30480
gtcgagcgtg cgcgcacact tgcataatg gagttgttc ctgcattct cgtatTTGT	30540
atagcaaaccg cggccctgg cagaacacac tcttctcgc ctctatctt ggcgcattac	30600
gtgttccgtg tgatagttca agtacaacca cactttaag ttggtaaaaaa gaatgctggc	30660

ttcagttgta atcaaaactc catgcatct aatcggtctg aggaatcat ccaagcaatg 30720

caactggatt gtgttcaag caggagagga gagggaaagag acggaagaac catgttaatt	30780
tttattccaa acgatctcg agtacttcaa attgttagatc gcgcagatgg catctctcg	30840
ccccactgtt ttggtaaaaa agcacagcta gatcaaaaaga aatgcgatt tcaagggtct	30900
caacggtgcc ttccagcaaa gcctccacgc gcacatccaa gaacaaaaga ataccaaaag	30960
aaggagcatt ttcttaactcc tcaatcatca tattacattc ctgcaccatt cccagataat	31020
tttcagctt ccagccttga attattcggt tcagttcttg tggttaatcc aatccacaca	31080
ttacaaacag gtcggagg ggcgcctcca ccacattct taaacacacc ctcataatga	31140

caaaatatct tgccctgtc tcacctgtg cgaattgaga atggcaacat caattgacat	31200
gcccttggct ctaagtttt cttaaggttc tagttgtaaa aactctctca tattatcacc	31260
aaactgctta gccagaagcc ccccgaaaac aagagcaggg gacgctacag tgcagtacaa	31320
ggcgcagacct ccccaattgg ctccagcaaa aacaagattt gaataagcat attggaaacc	31380
gccagtaata tcatcgaagt tgctggaaat ataatcaggc agagttttt gtaaaaattt	31440
aataaaagaa aaatttgcca aaaaaacatt caaacctct gggatgcaaa tgcaataggt	31500
taccgcgtc cgctccaaaca ttgttagttt tgaatttagtc tgcaaaaata aaaaaaaaaaa	31560

caaggctcat atcatagtag cctgacgaac agatggataa atcagtctt ccatcacaag	31620
acaagccaca gggtctccag ctcgaccctc gtaaaacctg tcatcatgat taaacaacag	31680
caccgaaagt tcctcgcgtt gaccagcatg aataattctt gatgaagcat acaatccaga	31740
catgttagca tcagtttaacg agaaaaaaaca gccaacatag ccttggta taattatgct	31800
taatcgtaag tatagcaaag ccaccctcg cgatcacaaa gtaaaaggca caggagaata	31860
aaaaatataa ttatttctt gctgcgttc aggcaacgtc gccccggtc cctctaaata	31920
cacatacaaa gcctcatcag ccatggcta ccagacaaag tacagcgggc acacaaagca	31980

caagctctaa agtgactctc caacctctcc acaatatata tatacacaag ccctaaactg	32040
acgtaatggg agtaaagtgt aaaaaatccc gccaaaccca acacacaccc cgaaactgcg	32100
tcaccaggga aaagtacagt ttcacttccg caatcccaac aggcgttaact tcctttct	32160
cacggtagt gatatccac taacttgcaa cgtcatttc ccacggtcgc accgcccctt	32220
ttagccgtta accccacagc caatcaccc acgatccaca ctttttaaaa tcaccctatt	32280
tacatattgg caccatccca tctataaggt atatttatata gataga	32326

<210> 2

<211> 5287

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric E2B

<400> 2

ctatggcatc tcgatccagg agaccctcctc gtttcgcggg tttggacggc tcctggaata 60  
gggtatgaga ccatggcggt ccagcgctgc cagggttcgg tccttccagg gtctcagtgt 120  
tcagactcagg gttgttccg tcacagtcaa ggggtgtcgcc cctgcttggg cgcttgccagg 180  
ggtgcgcttc agactcatcc tgctggtcga aaacttctgt cgcttggcgc cctgtatgtc 240  
ggccaagtag cagtttacca tgagttcgta gttgagcgcc tcggctcggtt ggcccttggc 300  
gcggagctta cctttggaag ttttcttgca taccggcag tataggcatt tcagegcata 360  
  
caacttggc gcaaggaaaa cggattctgg ggagtatgca tctgcgccgc aggaggcgca 420  
aacagttca cattccacca gccaggttaa atccggttca ttgggttcaa aaacaagtt 480  
tccgcctat ttttgcgtt gtttcttacc ttgggtctcc atgagttcgtt gtcctcggtt 540  
agtgcacaac aggctgtccg tgtccccgtaa gactgattttt acaggccctt tctccagtt 600  
agtgcctcggtt tcttctcgtt acaggaaactc tgaccactctt gatacaaagg cgccgttcca 660  
ggccagcacaa aaggaggcta tgtgggaggg gtagcgatcg ttgtcaacca ggggttccac 720  
cttttccaaa gtatgcaaac acatgtcacc ctcttcaaca tccaggaatg tgattggctt 780  
  
gttaggtgtat ttcacgtgac ctggggtccc cgctgggggg gataaaaagg gggcggttct 840  
tttgtcttcc tcactgttcc cggatcgct gtccaggaac gtcagttttt ggggttaggtt 900  
ttccctctcg aaggcgggca tgaccttgc actcagggttgc ttagtttcta agaacggagga 960  
ggatttgata ttgacagtgc cggtttagat gccttcatg aggttttctt ccattgttgc 1020  
agaaaaacaca attttttat tgtcaagttt ggtggcaaat gatccataca gggcggttggaa 1080  
taaaagttttgc gcatggatc gcatggtttgc gttttttcc ttgtcccgcc gcttttggc 1140  
ggcgatgttgc agttggacat actcggtgc caggcacttc cattcgggaa agatagttgt 1200  
  
taattcatct ggcacgattt tcacttgcca ccctcgattt tgcaaggtaa ttaaatccac 1260  
actgggtggcc acctcgctc gaagggttca attggtccaa cagagcctac ctcccttctt 1320  
agaacagaaaa gggggaaatgtt ggtcttagcat aagttcatgc ggagggtctg catccatgtt 1380  
aaagattccc ggaagtaataa ctttatcaaa atagctgtatg ggagtgggtt catctaaaggc 1440  
catttggccat tctcgagctg ccagtgcgcg ctcatatggg ttaagggac tgccccatgg 1500  
catggatgg gtgagtgcaag aggcatatcat ggcacagatg tcatagacgtt agatggatgg 1560

ctcaaagatg cctatgttagg ttggatagca tcgccccct ctgatacttg ctgcacata	1620
gtcatatagt tcatgtgatg gcgcgtacgag ccccgaccc aagttggtgc gattgggtt	1680
ttcttgtctg tagacgatct ggcgaaagat ggcgtgagaa ttgaaagaga tggtgggtct	1740
ttgaaaatg ttgaaatggg catgaggtag acctacagag tctctgacaa agtggcata	1800
agattcttga agcttggta ccagttcgcc ggtgacaagt acgtcttaggg cgccgtac	1860
aagtgttct tgaatgatgt cataacctgg ttgggttttc tttccacac gttcgccgtt	1920
gagaaggat tcttcgcgt cttccagta ctctctagc ggaaaccgt ctttgcgtc	1980
acggttaagat cctagcatgt agaactgatt aactgccttg taagggcagc agcccttc	2040
tacgggtaga gagtatgctt gagcagctt tcgttagcgaa gcgtgagtaa gggcaaagg	2100
gtctctgacc atgactttga ggaattggta tttagtgatcg atgtcgac aggctccctg	2160
ttcccagagt tggaaagtcta cccgtttctt gttagcgggg ttgggcaaaag cgaaagtaac	2220
atcattgaag agaatcttgc cggccctggg catgaaattt cgagtgtatgc gaaaaggctg	2280
tggtacttcc gtcgggtat tgataaccgtt ggcagctagg acgtatcgat cgaaaccgtt	2340
gatgttgtgt cctacgatgt ataattctat gaaacgcggc gtgcctctga cgtgaggtag	2400
cttactgagc tcatcaaagg ttaggtctgt ggggtcagat aaggcgtagt gttcgagagc	2460
ccattcggtc aggtgaggat tcgcttaag gaaggaggac cagaggtcca ctgccagtgc	2520
tgttgtaac tggccccgt actgacgaaa atgcgtccg actgcatttt ttctgggt	2580
gacgcaatag aaggtttggg ggtcctgccc ccagcgatcc cacttgagtt ttatggcgag	2640
gtcataggcg atgttgacga gccgctggc tccagagagt ttcatgacca gcatgaagg	2700
gattagctgc ttgccaaagg accccatcca ggtgttagtt tccacatcgat aggtgagaaa	2760
gagcctttt gtgcgaggat gagagccaat cgggaagaac tggatctctt gccaccagt	2820
ggaggaatgg ctgttgatgt gatgaaagta gaactccctg cgacgcgcgc agcattcatg	2880
cttgcgttg tacagacggc cgccgtacgac gcagcgttgc acgggttgta tctcgat	2940
gagttgtacc tggtttccct tgacgagaaa ttctgtggg aagccgaggc ctggcgattt	3000
tatctcgatc ttactatgt tgcgtgcattt ggcctgttca tcttctgtct cgtgggtgt	3060
catgctgacg agccctcgcc ggaggcaagt ccagacccgt ggcggcagg ggcggagctc	3120
gaggacgaga ggcgcgcaggc tggagctgtc cagggtccctg agacgctgcg gactcaggtt	3180
ataggcagt gtcaggatgt taacttgcat gatctttgg agggcgatgc ggagggttc	3240
atagtaacttgc atctcaacgg gtccgttggt ggagatgtcg atggcttgca gggttccgt	3300

tcccttggc gctaccacg tgcccttgtt ttcatttg gacggcggtg gctctgtgc	3360
ttcttgcatg tttagaagcg gtgtcgaggg cgccgcacgg gccgcagggg cggctcgaaa	3420
cccgccggca tggctggcag tggtaacgtcg gcgcgcgcg cggtaggtt ctggactgc	3480
gcccitagaa gactcgcatg cgccgacgac cgccgttga caicctggat ctgacgcctc	3540
tgggtgaaag ctacggccc cgtgagctt aacctgaaag agagttaac agaatcaatc	3600
tcggtatcgt tgacggcggc ttgcctaagg atttcttgcg cgtcaccaga gttgtctgg	3660
taggcgatct ccgccatgaa ctgctcgatc tcttcctt gaagatctcc gcccccgct	3720
ctctcgacgg tggccgcgag gtcgttggag atgcgccaa ttagttgaga gaatgcattc	3780
atgcccgcct cgttccagac gccgcgttag accacggccc ccacgggatc tctcgccgc	3840
atgaccacct gggcgagggtt gagctccacg tggcgggtga agaccgcata gttgcataagg	3900
cgttgaaaaa ggttagtttag tgggtggcg atgtgtcg tgacgaagaa atacatgatc	3960
catcgctctca gccgcatctc gctgacatcg cccagagctt ccaagcgctc catggcctcg	4020
tagaagtcca cggcaaatt aaaaaactgg gagttcgcg cggacacggt caactcctct	4080
tccagaagac ggataagttc ggcgatggtg gtgcgcacct cgcgctcgaa agccctggg	4140
atttcttcct caatctttc ttcttccact aacatcttt cctttcagg tgggctgca	4200
ggaggagggg gaacgcggcg acgcccggc cgcaacggca gacggtcgtt gaatcttca	4260
atgacctctc cggcgccgcg ggcgcatttt tcagtgcgg cgccgcgtt ctcgcgcgtt	4320
cgcagagtaa aaacaccgcg ggcgcattcc ttAAAGTGGT gactgggagg ttctccgttt	4380
gggagggaga gggcgctgtatatacattt attaattggc ccgtaggac tgacgcaga	4440
gatctgtatcg tgcaagatc cacggatct gaaaacctt cgacgaaagc gtctaaccag	4500
tcaacgtcac aaggtaggct gagtacggct tcttggcggc ggggtgggtt atgtgttcgg	4560
tctgggtctt ctgtttttc ttcatctcg gaaagggtgaga cgatgtgtct ggtgtatgaaa	4620
ttaaagttagg cagttctaa acggcggtt gtggcgagga gcaccagggtc tttgggtccg	4680
gcttgcgttacgcaggcgtt attggccatt ccccaagcat tatcctgaca tctagcaaga	4740
tctttgtatgtt agtcttgcgtt gagccgtt acggcactt cttcctcacc cggtctgcctt	4800
tgcatacgtt tgagtccaaa tccgcgcatt ggttgtacca gtgccaagtc agctacgact	4860
cttcggcgaa ggtggcttg ctgtacttgg gtaagggtgg ctgttgcgtt atcaaaatcc	4920
acaacgggtt ggttgcgttcc ttgttgcgtt gtttgcgtt gtttgcgtt gtttgcgtt	4980
ttaactgtct ggtgaccagg ggcgcacgcgc tcgggttatt taaggcgca ataggcgccgg	5040
gtgtcaaaaga tttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt	5100
ggcggtgggtt ggcggtagag aggccatgt tctgttagctg gagcgccagg ggcgaggctt	5160

tccaacataa ggccgtgata gccgttagatg tacctggaca tccaggttat tcctgcggcg	5220
gtatgtagaag cccgaggaaa ctgcgtacg cggttccaaa tgttgcgtat cggcatgaag	5280
tagttca	5287