

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0163505
(43) 공개일자 2022년12월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7040992(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년02월23일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2021-7016040
 원출원일자(국제) 2017년02월23일
 심사청구일자 2021년05월31일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/019086
- (87) 국제공개번호 WO 2017/147269
 국제공개일자 2017년08월31일
- (30) 우선권주장
 62/298,653 2016년02월23일 미국(US)
- (71) 출원인
 솔크 인스티튜트 포 바이올로지칼 스터디즈
 미국 캘리포니아 92037-1002 라졸라 노쓰 토리 파
 인즈 로드10010
- (72) 발명자
 오' 시어, 클로다그
 미국, 92037-1002 캘리포니아, 라 졸라, 노쓰 토
 리 파인즈 로드 10010
 패틀로, 윌리엄
 미국, 92037-1002 캘리포니아, 라 졸라, 노쓰 토
 리 파인즈 로드 10010
 파워스, 콜린
 미국, 92037-1002 캘리포니아, 라 졸라, 노쓰 토
 리 파인즈 로드 10010
- (74) 대리인
 이원희

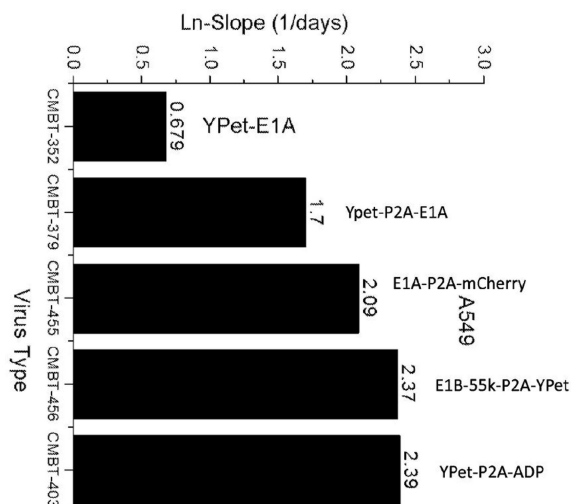
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 바이러스 동역학에 미치는 영향 최소화를 위한 치료용 아데노바이러스의 외인성 유전자 발현

(57) 요약

외인성 오픈 리딩 프레임(ORF) 및 자가-절단 펩타이드 암호화 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 게놈이 기술된다. 바이러스 동역학에 최소한의 영향을 위한 외인성 유전자의 최적의 배치가 추가로 개시된다. 상기 재조합 아데노바이러스의 치료법의 적용 또한 기술된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2710/10021 (2013.01)

C12N 2710/10043 (2013.01)

C12N 2710/10051 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이종의(heterologous) 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 및 자가-절단(self-cleaving) 펩타이드 암호화 서열을 포함하고, 둘은 작동 가능하게 연결되고 내인성(endogenous) 아데노바이러스 ORF와 동일한 리딩 프레임 내에 있으며, 상기 자가-절단 펩타이드 암호화 서열은 상기 이종의 ORF와 상기 내인성 ORF 사이에 위치하는 재조합 아데노바이러스 게놈, 여기서:

상기 내인성 ORF는 E1B-55k이고 상기 이종의 ORF는 E1B-55k의 3'임;

상기 내인성 ORF는 DNA 중합효소(polymerase)이고 상기 이종의 ORF는 DNA 중합효소의 5'임;

상기 내인성 ORF는 DNA-결합 단백질(DNA-binding protein (DBP))이고 상기 이종의 ORF는 DBP의 3'임;

상기 내인성 ORF는 아데노바이러스 사멸 단백질(adenovirus death protein(ADP))이고 상기 이종의 ORF는 ADP의 5'임;

상기 내인성 ORF는 E3-14.7k이고 상기 이종의 ORF는 E3-14.7k의 3'임;

상기 내인성 ORF는 E4-ORF2이고 상기 이종의 ORF는 E4-ORF2임; 또는

상기 내인성 ORF는 파이버(fiber)이고 상기 이종의 ORF는 파이버의 3'임,

여기서, 상기 이종의 ORF는 치료용 단백질을 암호화함.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 치료용 단백질은 면역조절제(immunomodulator)를 포함하는, 재조합 아데노바이러스 게놈.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 자가-절단 펩타이드는 2A 펩타이드 또는 이의 변이체인, 재조합 아데노바이러스 게놈.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 2A 펩타이드는 돼지 테스코바이러스-1(porcine teschovirus-1 (PTV1)) 2A (P2A) 펩타이드, 수족구병(foot and mouth disease virus(FMDV)) 2A (F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(equine rhinitis A virus(ERAV)) 2A (E2A) 펩타이드 또는 토세어 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus(TaV)) 2A (T2A) 펩타이드 또는 이의 변이체인, 재조합 아데노바이러스 게놈.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 자가-절단 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 14 내지 21 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80%,

적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한, 재조합 아데노바이러스 게놈.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 자가-절단 펩타이드는 서열번호 14 내지 21 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노바이러스 게놈.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈을 포함하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 9

제8항의 재조합 아데노바이러스 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈, 제8항의 재조합 아데노바이러스 또는 제7항 또는 제9항의 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상에 치료용 단백질을 전달하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈, 제8항의 재조합 아데노바이러스 또는 제7항 또는 제9항의 조성물과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포 생존을 및/또는 종양 세포 성장을 억제하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 방법은 시험관 내(*in vitro*) 방법인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 방법은 생체 내(*in vivo*) 방법이고 상기 종양 세포를 접촉시키는 단계는 상기 재조합 아데노바이러스 게놈, 재조합 아데노바이러스, 또는 조성물을 종양을 가진 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈, 제8항의 재조합 아데노바이러스, 또는 제7항 또는 제9항의 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하여, 대상의 종양 진행을 억제하거나 종양 부피를 감소시키는, 대상의 종양 진행을 억제하거나 종양 부피를 감소시키는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈, 제8항의 재조합 아데노바이러스, 또는 제7항 또는 제9항의 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하여, 대상의 암을 치료하는, 대상의 암을 치료하는 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 추가 치료용 제제를 대상에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 17

- (i) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스 게놈, 제8항의 재조합 아데노바이러스, 또는 제7항 또는 제9항의 조성물; 및
- (ii) 하나 이상의 추가 치료용 제제 및/또는 하나 이상의 진단 제제를 포함하는, 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료용 제제는 화학요법(chemotherapeutic), 생물학적(biologic), 또는 이의 조합을 포함하는, 키트.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 진단 제제는 종양 마커에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함하는, 키트.

청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 진단 제제는 종양 마커에 특이적인 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2016년 2월 23일자로 출원된 미국 가출원 제62/298,653호의 이익을 주장하며, 이는 본원에 참조로서 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시는 재조합 아데노바이러스 컨스트럭트(construct) 내 외인성(exogenous) 오픈 리딩 프레임(open reading

frame)의 최적 배치 및 상기 재조합 바이러스의 치료법의 적용에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 아데노바이러스 항원형 5(adenovirus serotype 5, Ad5)는 기본적인 연구 응용, 쥐(murine) 폐암 모델, 및 인간 유전자 치료 시험에서 선택되는 벡터이다. 아데노바이러스는 특정 세포 유형의 수용체에 대해 감염을 표적으로 하는 Ad 파이버(fiber) 단백질 스파이크(spike)로 장식된 단백질 캡시드(capsid)에 의해 보호되는 안정한 36 kb 이중-가닥의 DNA 게놈을 가진다. 아데노바이러스는 숙주 DNA에 삽입되지 않고 확립된 프로토콜을 이용하여 높은 역가(titer)로 생산될 수 있으며, 인간 유전자 치료 및 암 적용에 입증된 안전성을 가진다. 따라서, Ad-기반의 벡터는 암 진단 및 치료법에 엄청난 유망성을 가지고 있다.

발명의 내용

[0008] 요약

- [0009] 본원에 이중의(heterologous) 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 및 자가-절단(self-cleaving) 펩타이드 암호화 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 게놈이 개시되어 있다. 상기 이중의 ORF는 예를 들어 치료용 단백질을 암호화할 수 있다. 상기 재조합 아데노바이러스 게놈 및 개시된 게놈에 의해 생산되는 재조합 바이러스는 예를 들어, 암 치료와 같은 치료법의 적용에 사용될 수 있다.
- [0010] 이중의 ORF 및 자가-절단 펩타이드 암호화 서열을 포함하고, 둘은 작동 가능하게 연결되고 내인성(endogenous) 아데노바이러스 ORF와 동일한 리딩 프레임 내에 있는 재조합 아데노바이러스 게놈이 본원에 제공된다. 상기 자가-절단 펩타이드 암호화 서열은 상기 이중의 ORF와 상기 내인성 ORF 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 내인성 ORF는 E1B-55k이고 상기 이중의 ORF는 E1B-55k의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 DNA 중합효소(polymerase)이고 상기 이중의 ORF는 DNA 중합효소의 5'이다; 상기 내인성 ORF는 DNA-결합 단백질(DNA-binding protein (DBP))이고 상기 이중의 ORF는 DBP의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 아데노바이러스 사멸 단백질(adenovirus death protein(ADP))이고 상기 이중의 ORF는 ADP의 5'이다; 상기 내인성 ORF는 E3-14.7k이고 상기 이중의 ORF는 E3-14.7k의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 E4-ORF2이고 상기 이중의 ORF는 E4-ORF2이다; 또는 상기 내인성 ORF는 파이버(fiber)이고 상기 이중의 ORF는 파이버의 3'이다. 일부 실시예에서, 상기 이중의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다.
- [0011] 본원에 개시된 재조합 아데노바이러스 게놈을 포함하는 재조합 아데노바이러스가 본원에 추가로 제공된다. 재조합 아데노바이러스 게놈 또는 본원에 개시된 재조합 바이러스 및 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물 또한 제공된다.
- [0012] 대상에 재조합 아데노바이러스 게놈 또는 본원에 개시된 재조합 아데노바이러스 (또는 이의 조성물)를 투여함으로써 대상에 치료용 단백질을 전달하는 방법 또한 제공된다. 이러한 방법에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스 게놈 또는 재조합 아데노바이러스의 이중의 ORF는 상기 치료용 단백질을 암호화한다.
- [0013] 재조합 아데노바이러스 게놈 또는 본원에 개시된 재조합 바이러스 (또는 이의 조성물)를 투여함으로써 종양 세포 생존율을 억제하고, 종양 세포 성장을 억제하고, 종양 진행을 억제하고, 종양 부피를 감소시키고, 암을 가진 대상을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 이러한 방법에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스 게놈 또는 재조합 아데노바이러스의 이중의 ORF는 암 치료에 적합한 치료용 단백질을 암호화한다.
- [0015] 본 개시의 상기 및 다른 목적과 특징은 첨부된 도면을 참조하여 진행되는 하기 상세한 설명으로부터 보다 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 아데노바이러스 컨스트럭트를 시험하기 위한 예시적인 작업 흐름의 개략도이다. 전체 바이러스 게놈 플라스미드를 생산하고 다중(multi)-웰 플레이트에 있는 293-E4 세포와 같은 적절한 세포에 형질감염시킨다. 형질

감염된 세포가 증식됨에 따라, 동결/해동시켜 바이러스 입자를 방출시킨 후 원심분리에 의해 세포 찌꺼기(debris)를 펠렛화한다. (바이러스 입자를 포함하는) 상층액을 다중의, 더 큰 배양 플레이트에 옮긴다. 형질감염된 세포로부터 바이러스 입자를 수확하고, CsCl는 정제하고 감염성 바이러스 역가는 ELISA에 의해 측정된다. 관심 세포 유형은 정제된 바이러스의 알려진 MOI로 감염된다. 감염 후 48 또는 72시간 후에, 아데노바이러스 후기(late) 단백질, 아데노바이러스 게놈 또는 플라크는 각각 웨스턴 블롯(Western blot), q-PCR 또는 플라크 어세이에 의해 측정된다.

도 2는 기하급수적(exponential) 바이러스 성장을 보여주는 개략도이다. 종양 내 모든 세포의 종양 살상(oncolytic killing)은 기하급수적 바이러스 성장을 필요로 한다. 그러나, 대부분의 경우, 종양 세포의 작은 부분만 초기에 감염된다. 따라서, 복제 라운드(round) 당 자손수의 작은 차이는 단 몇 번의 복제 라운드 후에 입자 전체 수에 큰 차이를 초래한다. 사이클 당 3 비리온(virion)을 생산하는 바이러스와 사이클 당 5 비리온을 생산하는 바이러스 간의 비교를 나타낸다. 그래프에서 볼 수 있듯이, 5-6 라운드의 복제 후, 두 바이러스의 바이러스 역가가 유의하게 다르다.

도 3은 형광에 기초한 바이러스 동역학(fluorescence-based viral kinetic (FBVK)) 어세이의 예시적인 작업 흐름도를 보여주는 개략도이다. (예를 들어, Adsembly 또는 AdSLIC에 의해) 전체 바이러스 게놈 플라스미드를 생산하고 다중-웰 플레이트에 있는 관심 세포 유형을 형질감염시키는 데 사용한다. 대안적으로, 세포를 재조합 아데노바이러스 입자로 감염시킨다. 상기 아데노바이러스 게놈은 실질적으로 바이러스 복제 동역학을 변화시키지 않는 바이러스 게놈 내의 위치에서 형광 단백질을 암호화하는 하나 이상의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함한다. 시간에 따른 형광을 모니터링하여 바이러스 복제 동역학을 계산한다. 종양살상(oncolytic) 바이러스 후보는 종양 세포와 정상 세포 사이의 바이러스 동역학에서 가장 큰 차이를 나타내는 것이다.

도 4a-4b는 아데노바이러스 게놈 플라스미드로 시작할 때 동역학 어세이 설정을 개략적으로 설명한다. 이 어세이는 초기 형질감염 효율에 대한 정확한 지식을 필요로 하지 않는다. 형질감염 조건을 초기에 형질감염된 세포의 약 5-10%가 되도록 선택한다. 나타낸 실시예에서, 48-웰 플레이트가 사용되며, 이는 3개의 거짓(mock)-감염된 웰과 FLUORESBRITETM 비드를 가진 3개의 웰과 함께, 14개의 상이한 바이러스 컨스트럭트를 3회 시험 가능하게 하여 도구 민감성 편차(drift)를 보완한다 (도 4a). 48-웰 플레이트의 상부 절반의 웰은 6개의 상이한 바이러스의 게놈 플라스미드, 거짓-감염된 세포 및 블랭크(FLUORESBRITETM 비드)로 형질감염된 세포를 각 3개씩 포함한다 (도 4b). 48-웰 플레이트의 하부 절반의 웰은 8개의 상이한 바이러스의 게놈 플라스미드로 형질감염된 세포를 포함한다. 연속적인 형광 모니터링을 위해 다중-웰 플레이트를 플레이트 리더(예를 들어 TECAN 플레이트 리더)에 놓는다.

도 5는 재조합 바이러스로 시작할 때 동역학 어세이 설정을 개략적으로 설명한다. 이 어세이는 바이러스 역가에 대한 정확한 지식을 필요로 하지 않는다. 재조합 바이러스를 연속적으로 희석하여 다중-웰 플레이트에 놓인 세포를 감염시키는 데 사용한다. 나타낸 실시예에서, 96-웰 플레이트가 사용되며 각 바이러스는 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24,300, 1:72,900 및 1:218,700로 희석하여 동시에 11개의 바이러스를 시험 가능하게 한다. 4개의 웰을 거짓-형질감염되고 FLUORESBRITETM 비드를 4개의 웰에 놓아 도구 민감성 및 편차를 보완한다. 연속적인 형광 모니터링을 위해 다중-웰 플레이트를 플레이트 리더(예를 들어 TECAN 플레이트 리더)에 놓는다.

도 6a-6c는 재조합 아데노바이러스의 조합 어셈블리에 대한 Adsembly 및 AdSLIC 기술의 개략적인 개요를 제공한다 (도 6a). 아데노바이러스 게놈은 4개의 모듈 - E1, 코어(core), E3 및 E4로 분리된다 (도 6b). Adsembly는 다중-부위 게이트웨이(Gateway) 반응을 사용하는 게놈 재-어셈블리를 포함한다 (도 6c). AdSLIC는 서열 및 라이게이션 독립적인 클로닝(sequence and ligation independent cloning (SLIC))을 이용하여 아데노바이러스 모듈을 어셈블한다.

도 7은 E1 영역의 형광 단백질을 암호화하는 재조합 아데노바이러스에 대한 ln-슬로프 값을 나타내는 막대 그래프이다. 각각 P2A 부위를 포함하는 직접적인 융합 컨스트럭트 YPet-E1A, 및 YPet-P2A-E1A, E1A-P2A-mCherry 및 E1B-55k-P2A-YPet 컨스트럭트에 대한 값을 나타낸다. YPet-P2A-ADP 컨스트럭트를 비교를 위해 나타낸다.

도 8은 형광에 기초한 바이러스 동역학 어세이에 대한 동역학 데이터 분석 및 해석의 개략도이다.

도 9a-9c는 Ad5, Ad9 또는 Ad34로부터 유래되고 이중의 ORF E3-14.7k ORF의 3' (또는 Ad9 및 Ad34에서 이의 등가물)를 포함하는 재조합 아데노바이러스에 대한 ln-슬로프 값을 나타내는 막대 그래프이다. 293 세포(도 9A), A549 세포(도 9B) 및 U2OS 세포(도 9C)의 Ad5 (E3-14.7k-P2A-YPet; PCMN-887), Ad9 (E3-15k-P2A-YPet; PCMN-

888) 및 Ad34 (E3-14.8k-P2A-YPet; PCMN-889)에 대한 값을 나타낸다. 또한 각 도면에 (E3-14.7k-P2A-YPet을 포함하는) Ad5 코어 및 Ad9 (Ad5/Ad9) 또는 Ad34 (Ad5/Ad34)의 파이버 샤프트/손잡이(shaft/knob)를 포함하는 키메라 바이러스에 대한 값이 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열목록

첨부되는 서열목록에 열거된 핵산 및 아미노산 서열은 C.F.R. 1.822에 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 염기에 대한 문자 약어 및 아미노산에 대한 3문자 코드를 이용하여 나타낸다. 각 핵산 서열의 단 하나의 가닥만 나타내지만, 상보적 가닥은 표시된 가닥에 대한 임의의 참고에 의해 포함되는 것으로 이해된다. 상기 서열 목록은 2017년 2월 21일에 생성된 730 KB의 ASCII 텍스트 파일로 제출되며, 이는 본원에 참고로 포함된다. 첨부된 서열 목록에서:

- [0020] 서열번호 1은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-379 (YPet-P2A-E1A)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0021] 서열번호 2는 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-432 (E1A-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0022] 서열번호 3은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-456 (E1B-55k-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0023] 서열번호 4는 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-499 (E1B-55k-P2A-mCherry)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0024] 서열번호 5는 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-530 (YPet-P2A-(DNA Poly))의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0025] 서열번호 6은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-886 (DBP-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0026] 서열번호 7은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-403 (YPet-P2A-ADP)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0027] 서열번호 8은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-429 (ADP-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0028] 서열번호 9는 합성 아데노바이러스 게놈 PCMN-887 (E3-14.7k-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0029] 서열번호 10은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-457 (YPet-P2A-E4-ORF2)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0030] 서열번호 11은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-633 (mCherry-P2A-E4-ORF2)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0031] 서열번호 12는 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-407 (YPet-P2A-Fiber)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0032] 서열번호 13은 합성 아데노바이러스 게놈 CMBT-445 (Fiber-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0033] 서열번호 14는 P2A의 아미노산 서열이다.
- [0034] 서열번호 15는 F2A의 아미노산 서열이다.
- [0035] 서열번호 16은 E2A의 아미노산 서열이다.
- [0036] 서열번호 17은 T2A의 아미노산 서열이다.
- [0037] 서열번호 18은 N-말단에 GSG를 포함하는 변형된 P2A의 아미노산 서열이다.
- [0038] 서열번호 19는 N-말단에 GSG를 포함하는 변형된 F2A의 아미노산 서열이다.
- [0039] 서열번호 20은 N-말단에 GSG를 포함하는 변형된 E2A의 아미노산 서열이다.
- [0040] 서열번호 21은 N-말단에 GSG를 포함하는 변형된 T2A의 아미노산 서열이다.
- [0041] 서열번호 22는 합성 아데노바이러스 게놈 PCMN-888 (Ad9 E3-15k-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.
- [0042] 서열번호 23은 합성 아데노바이러스TM 게놈 PCMN-889 (Ad34 E3-14.8k-P2A-YPet)의 뉴클레오티드 서열이다.

상세한 설명

I. 약어

Ad 아데노바이러스

[0047]	ADP	아데노바이러스 사멸 단백질(adenovirus death protein)
[0048]	BFP	청색 형광 단백질(blue fluorescent protein)
[0049]	E2A	마 비염 A 바이러스 2A(equine rhinitis A virus 2A)
[0050]	ELISA	효소결합 면역흡착 어세이(enzyme-linked immunosorbent assay)
[0051]	ERAV	마 비염 A 바이러스(equine rhinitis A virus)
[0052]	F2A	수족구병 바이러스 2A(foot and mouth disease virus 2A)
[0053]	FACS	형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cells sorting)
[0054]	FMDV	수족구병 바이러스(food and mouth disease virus)
[0055]	GFP	녹색 형광 단백질(green fluorescent protein)
[0056]	MOI	감염 다중도(multiplicity of infection)
[0057]	OD	광학 밀도(optical density)
[0058]	ORF	오픈 리딩 프레임(open reading frame)
[0059]	P2A	돼지 테스코바이러스-1 2A(porcine teschovirus-1 2A)
[0060]	pIX	단백질 IX(protein IX)
[0061]	PTV1	돼지 테스코바이러스-1(porcine teschovirus-1)
[0062]	RFP	적색 형광 단백질(red fluorescent protein)
[0063]	SLIC	서열 및 라이게이션 독립적인 클로닝 (sequence and ligation independent cloning)
[0064]	T2A	토세어 아시그나 바이러스 2A(Thosea asigna virus 2A)
[0065]	TaV	토세어 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus)
[0066]	YFP	황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein)

[0068] **II. 용어 및 방법**

[0069] 달리 명시하지 않는 한, 기술적 용어는 일반적인 사용법에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 일반적인 용어의 정의는 Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press에 의해 게재, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew 등 (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd.에 의해 게재 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc.에 의해 게재, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)에서 발견될 수 있다.

[0070] 본 개시의 다양한 실시양태의 검토를 용이하게 하기 위해, 구체적인 용어의 하기 설명이 제공된다:

[0071] **2A 펩타이드(2A peptide):** 피코르나바이러스(picornaviruse)와 같은 일부 RNA 바이러스에 의해 암호화된 자가-절단 펩타이드의 유형. 2A 펩타이드는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 형성을 거치지 않도록 함으로써 기능을 하며, 2A 서열의 말단과 하류 펩타이드 사이에서 분리를 유도한다 (Kim 등, PLoS One 6(4):e18556, 2011). "절단"은 상기 2A 펩타이드의 C-말단에서 발견되는 글리신 및 프롤린 잔기 사이에서 발생한다. 예시적인 2A 펩타이드는 본원에 서열번호 14-17로 기재되는 토세어 아시그나 바이러스(TaV), 마 비염 A 바이러스(ERAV), 돼지 테스코바이러스-1(PTV1) 및 수족구병 바이러스(FMDV)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 2A 펩타이드는 절단 효율을 향상시키기 위해 N-말단에 있는 Gly-Ser-Gly를 포함한다 (서열번호 18-21).

[0072] **아데노바이러스(Adenovirus):** 선형, 이중-가닥의 DNA 게놈 및 정20면체(icosahedral) 캡시드를 갖는 비-피막 바이러스(non-enveloped virus). 현재 68개의 알려진 인간 아데노바이러스의 항원형이 있으며, 이는 7개의 종(A, B, C, D, E, F 및 G 종)으로 나누어진다. 상이한 아데노바이러스의 항원형은 상이한 질환의 종류, 호흡기 질환 (주로 B 및 C 종), 결막염(conjunctivitis) (B 및 D 종) 및/또는 위장염(gastroenteritis) (F 및 G 종)을 일으

키는 일부 항원형과 관련된다.

- [0073] **아데노바이러스 사멸 단백질(Adenovirus death protein, ADP)**: 세포의 용해 및 다른 세포를 감염시키는 아데노바이러스의 방출을 매개하는 아데노바이러스 감염의 후기 단계에서 합성된 단백질. ADP는 핵막(nuclear membrane), 소포체(endoplasmic reticulum) 및 골지(Golgi)에 국한되는 101개 아미노산의 내재 막 당단백질(integral membrane glycoprotein)이다. ADP는 이전에 E3-11.6K로 명명했다.
- [0074] **투여(Administration)**: 임의의 효과적인 경로에 의해 개체에 치료용 제제(예, 재조합 바이러스)와 같은 제제를 제공 또는 주는 것. 예시적인 투여 경로는 주사(예를 들어, 피하(subcutaneous), 근육 내(intramuscular), 피내(intradermal), 복강 내(intraperitoneal), 종양 내(intratumoral) 및 정맥 내(intravenous)), 경구(oral), 관내(intraductal), 설하(sublingual), 직장(rectal), 경피(transdermal), 비강 내(intranasal), 질(vaginal) 및 흡입(inhalation) 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0075] **키메라(chimeric)**: 다른 기원을 적어도 두 부분으로 구성됨. 본 개시의 내용에서, "키메라 아데노바이러스"는 상이한 항원형 2개(예를 들어, Ad5 및 아데노바이러스의 제2 항원형으로부터) 이상으로부터 유래된 유전 물질 및/또는 단백질을 갖는 아데노바이러스이다. 이러한 맥락에서, "캡시드-교환된(capsid-swapped)" 아데노바이러스는 캡시드 단백질이 아데노바이러스의 하나의 항원형으로부터 유래되고 나머지 단백질이 다른 아데노바이러스 항원형으로부터 유래된 키메라 아데노바이러스를 의미한다. 유사하게, "키메라 파이버(fiber)"는 2개 이상의 다른 아데노바이러스의 항원형으로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 파이버 단백질이다. 예를 들어, 키메라 파이버는 Ad5의 파이버 샤프트(fiber shaft) 및 아데노바이러스 제2 항원형의 파이버 손잡이(fiber knob)으로 구성될 수 있다. 다른 실시예에서, 키메라 파이버는 Ad5 꼬리 및 아데노바이러스 제2 항원형(예를 들어, Ad9 또는 Ad34)의 파이버 샤프트 및 손잡이로 구성된다.
- [0076] **접촉(contacting)**: 직접적인 물리적 군집(association)에서의 배치(placement); 는 고체 및 액체 형태 모두를 포함한다.
- [0077] **퇴화된 변이(degenerate variant)**: 본 개시의 맥락에서, "퇴화된 변이"는 유전 코드의 결과로서 퇴화된 서열을 포함하는 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 20개의 천연 아미노산이 있고, 대부분이 하나 이상의 코돈으로 지정된다. 따라서, 뉴클레오티드에 의해 암호화되는 펩타이드의 아미노산 서열이 변하지 않는 한, 펩타이드를 암호화하는 모든 퇴화된 뉴클레오티드 서열이 포함된다.
- [0078] **결실된(deleted)**: "결실된" 단백질(예를 들어, E4orf1 또는 E4orf6/7 단백질)을 암호화하는 아데노바이러스 게놈은 단백질 발현의 부재를 초래하는 단백질 암호화 서열의 완전한 결실, 또는 부분적 결실을 갖는 아데노바이러스를 의미한다.
- [0079] **E2F의 탈조절(deregulation)**: E2F 전사 인자 및 하류 표적 유전자의 활성 증가를 의미하며, 이는 인간 암의 거의 모든 종류에서 발생한다. E2F 경로 활성 및 전사의 탈조절은 예를 들어 Rb, p107 및 p130 종양 억제인자의 기능 상실 돌연변이 및 결실과 같이, 경로 중 임의의 상류 구성요소에서 다양한 상이한 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. Rb는 확인된 최초의 종양 억제인자였고 인간 종양의 적어도 1/3에서 부재하거나 돌연변이되어 있다. 또한, p16 돌연변이 및/또는 후성적 침묵(epigenetic silencing)은 종양 세포에서 E2F를 활성화시킬 수 있다. 사이클린(cyclin) D 및 CDK4 돌연변이, 유전자 증폭 또는 과발현은 인간 종양에서 탈조절된 E2F 활성을 또한 초래할 수 있다. 또한 E2F는 EGFR, RTKs, RAS, RAF, PI-3K, PTEN, RAF, MYC을 포함하는 성장 인자 수용체(growth factor receptor) 경로 돌연변이에 의해 활성화된다. p16INK4a-사이클린 D:cdk4/6-RB-E2F 경로의 돌연변이는 일반적으로 상호 배타적(mutually exclusive) 방식으로 일어나므로, 하나의 '히트(hit)' (예를 들어, p16)는 다른 것들(예를 들어, Rb 돌연변이 또는 cyclin D:cdk 과발현)에 의해 동반되지 않는다. 그러나, 대부분 현재의 화학요법은 E2F 전사 표적을 억제하는 증식성 독이지만, 정상 세포에도 독성을 가지며 종종 치명적인 의원성(iatrogenic) 합병증을 가진다. 본원에 개시된 바와 같이, 대안적인 치료적 접근법은 p16-사이클린 D:cdk4-RB-E2F 경로를 탈조절하는 암세포 병변에서 선택적 용균 복제를 수행하는 바이러스를 이용하는 것이다.
- [0080] **DNA-결합 단백질(DNA-binding protein, DBP)**: 이 아데노바이러스 단백질은 이중-가닥의 DNA 뿐만 아니라 단일-가닥의 DNA 및 RNA에 결합한다. 72-kD 단백질인 DBP는 아데노바이러스 DNA의 복제에 필수적이다.
- [0081] **E1A**: 아데노바이러스 초기 영역(E1A) 유전자 및 상기 유전자로부터 발현된 폴리펩타이드. 상기 E1A 단백질은 세포를 세포주기로 유도함으로써 바이러스 게놈 복제에 중요한 역할을 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "E1A 단백질"은 E1A 유전자로부터 발현된 단백질을 의미하며, 상기 용어는 임의의 아데노바이러스 항원형에 의해 생산된 E1A 단백질을 포함한다.

- [0082] **E3-RID α /RID β 및 E3-14.7k**: E3 유전자로부터 생산된 초기-발현된 단백질. E3-RID α , E3-RID β , 및 E3-14.7k 단백질은 수용체 내재화 및 분해(receptor internalization and degradation) 복합체를 구성하며, 핵막에 국한되고 숙주 항바이러스 반응으로부터 감염된 세포를 보호하기 위해 CD95 (FasL 수용체), 및 TNFR1 및 2 (TNF/TRAIL 수용체)를 포함하는 다양한 수용체의 내포 작용(endocytosis) 및 분해를 일으킨다. E3-RID α , E3-RID β , 및 E3-14.7k 암호화 서열은 이 순서대로 서로 인접한다.
- [0083] **E4orf1**: E4 유전자로부터 생산된 아데노바이러스 단백질. 용어 "E4orf1 단백질"은 임의의 아데노바이러스 항원형의 E4 유전자에 의해 생산된 E4orf1 단백질을 포함한다.
- [0084] **E4orf6/7**: 아데노바이러스 E4 유전자에 의해 암호화되는 단백질. 용어 "E4orf6/7 단백질"은 임의의 아데노바이러스 항원형의 E4 유전자에 의해 생산된 E4orf6/7 단백질을 포함한다.
- [0085] **파이버(fiber)**: 아데노바이러스 파이버 단백질은 세포 표면 수용체에 결합을 매개하는 삼량체 단백질이다. 파이버 단백질은 긴 N-말단 샤프트 및 구형 C-말단 손잡이(knob)로 구성된다.
- [0086] **형광 단백질(Fluorescent protein)**: 특정 파장의 빛에 노출될 때 특정 파장의 빛을 방출하는 단백질. 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(예, GFP, EGFP, AcGFP, Emerald, Superfolder GFP, Azami Green, mWasabi, TagGFP, TurboGFP 및 ZsGreen), 청색 형광 단백질(EBFP, EBFP2, Sapphire, T-Sapphire, Azurite 및 mTagBFP), 청록색 형광 단백질(cyan fluorescent protein) (예, ECFP, mECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midori-Ishi Cyan, mTurquoise 및 mTFP1), 황색 형광 단백질(EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, TagYFP, PhiYFP, ZsYellow1 및 mBanana), 주황색 형광 단백질(orange fluorescent protein) (Kusabira Orange, Kusabira Orange2, mOrange, mOrange2 및 mTangerine), 적색 형광 단백질 (mRuby, mApple, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, HcRed1, mRaspberry, dKeima-Tandem, HcRed-Tandem, mPlum, AQ143, tdTomato 및 E2-Crimson), 주황색/적색 형광 단백질 (dTomato, dTomato-Tandem, TagRFP, TagRFP-T, DsRed, DsRed2, DsRed-Express (T1) 및 DsRed-Monomer) 및 이의 변형된 버전을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0087] **융합 단백질(Fusion protein)**: 2개 이상의 상이한(이종의) 단백질 또는 펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 단백질. 융합 단백질은 예를 들어, 2개의 상이한(이종의) 단백질의 부분을 암호화하는 핵산 서열로부터 조작된 핵산 서열의 발현에 의해 생성될 수 있다. 융합 단백질을 생성하기 위해, 상기 핵산 서열은 동일한 리딩 프레임 안에 있어야 하고 내부 정지 코돈을 포함하지 않아야 한다. 융합 단백질, 특히 짧은 융합 단백질은 또한 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0088] **이종(heterologous)**: 이종의 단백질 또는 폴리펩타이드는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 단백질 또는 폴리펩타이드를 말한다.
- [0089] **헥손(Hexon)**: 주요 아데노바이러스 캡시드 단백질.
- [0090] **면역조절제(immunomodulator)**: 면역계를 변화(예, 활성화, 향상 또는 억제)시키는 제제. 면역조절제는 사이토카인(cytokine) (예, 인터루킨 2(IL-2), IL-7, IL-12, GM-CSF, FLT3 리간드 또는 인터페론), 케모카인(chemokine) (예, CCL3, CCL26, CXCL7, CXCL9 및 CXCL10), T 세포 활성화 리간드(T cell activating ligand) (예, 항-CD3 Ab 또는 동종항원(alloantigen)), 동시-자극 분자(co-stimulatory molecule) (예, B7.1/B7.2, OX40L, 4-1-BBL 또는 CD40L), 면역관문 차단 억제제(checkpoint blockade inhibitor) (예, 항-PD-1 또는 항-CTLA4 Ab), 및 소분자 면역조절제(small molecule immunomodulator)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0091] **분리된(isolated)**: "분리된" 생물학적 구성요소(핵산 분자, 단백질, 바이러스 또는 세포)는 다른 염색체 및 과잉-염색체(extra-chromosomal)의 DNA 및 RNA, 단백질 및 세포와 같은 구성요소가 자연적으로 발생하는, 유기체의 세포 또는 조직에서 다른 생물학적 구성요소, 또는 유기체 그 자체로부터 실질적으로 분리 또는 정제되었다. "분리된" 핵산 분자 및 단백질은 표준 정제 방법에 의해 정제된 것들을 포함한다. 상기 용어는 또한 화학적으로 합성된 핵산 분자 및 단백질 뿐만 아니라 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 분자 및 단백질을 포함한다.
- [0092] **변형(Modification)**: 핵산 또는 단백질 서열의 서열 변화. 예를 들어, 아미노산 서열 변형은 예를 들어, 치환, 삽입 및 결실, 또는 이의 조합을 포함한다. 삽입은 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내(intrasequence) 삽입 뿐만 아니라 아미노 및/또는 카르복실 말단 융합을 포함한다. 결실은 단백질 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기를 제거하는 것을 특징으로 한다. 본원의 일부 실시양태에서, 상기 변형(예, 치환, 삽입 또는 결실)은 단백질 특정 활성의 감소 또는 증진과 같은 기능의 변화를 초래한다. 본원에 사용된 바와 같이, " Δ " 또는 "델

타(delta)"는 결실을 의미한다. 치환 변형은 하나 이상의 잔기가 제거되고 그 자리에 다른 잔기가 삽입된 것이다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기이나, 한 번에 많은 상이한 위치에서 발생할 수 있다. 치환, 결실, 삽입 또는 이의 임의의 조합을 조합하여 최종 돌연변이 서열을 얻을 수 있다. 이러한 변형은 단백질을 암호화하는 DNA에서 뉴클레오티드의 변형에 의해 제조될 수 있으며, 그렇게 함으로써 상기 변형을 암호화하는 DNA를 생산할 수 있다. 공지된 서열을 갖는 DNA 내 미리 결정된 부위에서 삽입, 결실 및 치환 돌연변이를 만드는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. "변형된" 단백질, 핵산 또는 바이러스는 상기 요약된 바와 같이 하나 이상의 변형을 갖는 것이다.

[0093] **신생물(neoplasia), 악성 종양(malignancy), 암(cancer) 및 종양(tumor):** 신생물(neoplasm)은 과도한 세포 분열로 인한 조직 또는 세포의 비정상적인 성장이다. 신생물의 성장은 종양을 생산할 수 있다. 개체(individual)의 종양의 양은 종양의 수, 부피, 또는 무게로 측정될 수 있는 "종양 부담(tumor burden)"이다. 전이하지 않은 종양을 "양성(benign)"이라 칭한다. 주변 조직을 침입 및/또는 전이할 수 있는 종양을 "악성(malignant)"이라 칭한다. 또한 악성 종양을 "암(cancer)"이라 칭한다.

[0094] 혈액 암(hematologic cancer)은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액 (또는 혈행(hematogenous)) 암은 급성 백혈병(acute leukemia) (예, 급성 림프성 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 골수세포 백혈병(acute myelocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia) 및 골수아구성(myeloblastic), 전골수구(promyelocytic), 골수단핵구(myelomonocytic), 단핵구(monocytic) 및 적백혈병(erythroleukemia)), 만성 백혈병(chronic leukemia) (예, 만성 골수세포(chronic myelocytic) (과립구) 백혈병, 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia), 및 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)), 진성 적혈구증가증(polycythemia vera), 림프종(lymphoma), 호지킨병(Hodgkin's disease), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma) (무통성 및 고도), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 중쇄병(heavy chain disease), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 털세포 백혈병 및 골수이형성증(and myelodysplasia)을 포함하는 백혈병을 포함한다. 일부 경우에, 림프종(lymphoma)이 고형 종양으로 간주된다.

[0095] 고형 종양은 낭종 또는 액체 영역을 일반적으로 포함하지 않는 조직의 비정상 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 고형 종양의 다른 유형은 이들을 형성하는 세포의 유형으로 명명된다 (예, 육종(sarcomas), 암종(carcinomas), 및 림프종(lymphomas)). 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예는 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골육종(osteosarcoma) 및 다른 육종, 활막종(synovioma), 중피종(mesothelioma), 유잉종양(Ewing's tumor), 평활근육종(leiomyosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 결장암(colon carcinoma), 림프성 종양(lymphoid malignancy), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 편평세포 암종(squamous cell carcinoma), 기저세포 암종(basal cell carcinoma), 선암종(adenocarcinoma), 한선 암종(sweat gland carcinoma), 갑상선 수질암(medullary thyroid carcinoma), 유두 갑상선 암종(papillary thyroid carcinoma), 갈색세포종 피지선 암종(pheochromocytomas sebaceous gland carcinoma), 유두 암종(papillary carcinoma), 인유두종 바이러스(human papilloma virus (HPV))-감염된 신생물, 유두 선암종(papillary adenocarcinomas), 수질암종(medullary carcinoma), 기관지 암종(bronchogenic carcinoma), 신장암(renal cell carcinoma), 간암(hepatoma), 담도암(bile duct carcinoma), 융모암(choriocarcinoma), 윌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암(cervical cancer), 고환 종양(testicular tumor), 정소피종(seminoma), 방광암(bladder carcinoma), 흑색종(melanoma), 및 CNS 종양 (예, 신경교종(glioma) (예 뇌간 신경교종(brainstem glioma) 및 혼합교종(mixed gliomas)), 교모세포종(glioblastoma) (또한 다형성 신경교종이라 알려짐) 별아 교세포종(astrocytoma), CNS 림프종(CNS lymphoma), 배아세포종(germinoma), 수모세포종(medulloblastoma), 신경초종(Schwannoma) 두개인두종(craniopharyngioma), 상의세포종(ependymoma), 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 청신경 종양(acoustic neuroma), 핍지교종(oligodendroglioma), 수막종(meningioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 망막모세포종(retinoblastoma) 뇌 전이(brain metastasis))을 포함한다.

[0096] **종양살상 바이러스(Oncolytic virus):** 증식성 질환, 예를 들어, 암/종양 세포의 세포를 선택적으로 사멸시키는 바이러스. 암세포의 사멸은 살아있는 세포 수를 결정, 또는 세포병변 효과(cytopathic effect), 세포사멸(apoptosis), 또는 암세포 내 바이러스성 단백질의 합성 (예, 대사 표식, 면역블롯, 또는 복제에 필수적인 바이러스 유전자의 RT-PCR), 또는 종양의 크기를 검출하는 것과 같이 당업계에서 확립된 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다.

- [0097] **작동가능하게 연결된(Operably linked)**: 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 또는 발현에 영향을 준다면 프로모터는 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 연속적이며, 필요한 경우 두 개의 단백질-암호화 영역을 동일한 리딩 프레임에서 결합시킨다.
- [0098] **약학적으로 허용 가능한 담체(Pharmaceutically acceptable carrier)**: 본 개시에서 유용한 약학적으로 허용 가능한 담체(비히클)는 통상적이다. E. W. Martin에 의한 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)는 하나 이상의 치료용 화합물, 분자 또는 제제(예를 들어, 본원에 개시된 재조합 바이러스)의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제제를 기술한다.
- [0099] 일반적으로, 담체의 성질은 사용되는 특정 투여 방식에 의존할 것이다. 예를 들어, 비경구용 제제는 보통 비히클로서 물, 생리 식염수, 평형 염액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등과 같이 약학적으로 및 생리학적으로 허용 가능한 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예를 들어, 분말, 환제(pill), 정제(tablet), 또는 캡슐(capsule) 형태)의 경우, 통상적인 비독성 고체 담체는 예를 들어, 만니톨, 락토오스, 전분, 또는 마그네슘 스테아레이트의 약학적 등급을 포함할 수 있다. 생물학적으로-중성인 담체 이외에, 투여될 약학적 조성물은 습윤 또는 유화제, 방부제, 및 pH 완충제 등과 같은 소량의 비-독성 보조 물질, 예를 들어 소듐 아세테이트(sodium acetate) 또는 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate)를 포함할 수 있다.
- [0100] **폴리펩타이드, 펩타이드 또는 단백질(Polypeptide, peptide or protein)**: 단백질이 아미드 결합을 통해 함께 결합된 아미노산 잔기인 중합체. 아미노산이 α -아미노산인 경우, L-광학 이성질체 또는 D-광학 이성질체가 사용될 수 있다. 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다. 이 용어는 자연적으로 발생하는 아미노산 중합체 및 비-자연적으로 발생하는 아미노산 중합체 뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연적으로 발생하는 아미노산의 인공적인 화학 모방체인 아미노산 중합체에 적용된다. 용어 "잔기" 또는 "아미노산 잔기"는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 혼입된(incorporated) 아미노산에 대한 참조를 포함한다.
- [0101] 폴리펩타이드에서의 보존적 치환은 유사한 생화학적 특성을 갖는 상이한 아미노산 잔기에 대한 단백질 서열 내에서의 하나의 아미노산 잔기의 치환이다. 전형적으로, 보존적 치환은 생성된 폴리펩타이드의 활성에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는다. 예를 들어, 하나 이상의 보존적 치환 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 이하의 치환)을 포함하는 단백질 또는 펩타이드는 야생형 단백질 또는 펩타이드의 구조 및 기능을 유지한다. 폴리펩타이드는 부위-특이적 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis) 또는 PCR과 같이 표준 절차를 이용하여 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 조작함으로써 하나 이상의 보존적 치환을 포함하도록 생성될 수 있다. 일 실시예에서, 이러한 변이체는 항체 교차-반응성(cross-reactivity) 또는 면역 반응을 유도하는 능력을 시험함으로써 용이하게 선택될 수 있다. 보존적 치환의 예는 하기와 같다.

본래 잔기	보존적 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0102]

[0103]

보존적 치환은 일반적으로 (a) 치환 영역 내 폴리펩타이드 백본의 구조, 예를 들어, 시트(sheet) 또는 나선(helical) 형태(conformation), (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지한다.

[0104]

일반적으로 단백질 성질에서 가장 큰 변화를 가져올 것으로 예상되는 치환은 비-보존적일 것이며, 예를 들어, (a) 친수성 잔기, 예를 들어, 세릴(seryl) 또는 트레오닐(threonyl)은 소수성 잔기, 예를 들어, 류실(leucyl), 이소류실(isoleucyl), 페닐알라닐(phenylalanyl), 발릴(valyl) 또는 알라닐(alanyl)로 (또는 에 의해) 치환; (b) 시스테인 또는 프롤린은 다른 잔기로 (또는 에 의해) 치환; (c) 전기 양성(electropositive) 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어, 리실(lysyl), 아르기닐(arginyl) 또는 히스타딜(histadyl)은 전기 음성(electronegative) 잔기, 예를 들어, 글루타밀(glutamyl) 또는 아스파틸(aspartyl)로 (또는 에 의해) 치환; 또는 (d) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌은 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들어 글리신으로 (또는 에 의해) 치환인 변화이다.

[0105]

질환의 예방, 치료 또는 완화(Preventing, treating or ameliorating a disease): 질환을 "예방"하는 것은 질환의 완전한 발달을 억제하는 것을 의미한다. "치료"는 질환이나 병리학적 상태의 징후 또는 증상이 발달한 후, 질환이나 병리학적 상태의 징후 또는 증상을 완화시키는 치료적 개입을 의미한다. "완화"는 질환의 징후 또는 증상의 수 또는 중증도의 감소를 의미한다.

[0106]

프로모터(Promoter): 핵산 (예, 유전자)의 전사를 지시/개시하는 DNA 영역. 프로모터는 전사의 개시 부위 부근에 필요한 핵산 서열을 포함한다. 전형적으로, 프로모터는 그들이 전사하는 유전자 근처에 위치한다. 프로모터는 선택적으로 원거리(distal) 인핸서 또는 전사의 개시 부위로부터 수천 염기쌍만큼 위치할 수 있는 억제자(repressor) 요소를 또한 포함한다. "구성적 프로모터(constitutive promoter)"는 연속적으로 활성화고 외부 신호 또는 분자에 의해 조절을 받지 않는 프로모터이다. 대조적으로, "유도성 프로모터(inducible promoter)"의 활성화는 외부 신호 또는 분자 (예, 전사 인자 또는 테트라사이클린(tetracycline))에 의해 조절된다.

[0107]

단백질 IX (Protein IX, pIX): 핵산 단백질과 연관된 아데노바이러스 캡시드의 부수적인 구성요소

[0108]

정제된(Purified): 용어 "정제된"은 절대적인 순도를 요구하지 않는다; 오히려 그것은 상대적 용어로 의도된다. 따라서, 예를 들어, 정제된 펩타이드, 단백질, 바이러스 또는 다른 활성 화합물은 자연적으로 연관된 단백질 및 다른 오염물로부터 전체 또는 부분적으로 분리된 것이다. 특정 실시양태에서, 용어 "실질적으로 정제된"은 세포, 세포 배양 배지, 또는 다른 조제물(crude preparation)으로부터 분리된 펩타이드, 단백질, 바이러스 또는 다른 활성 화합물을 의미하고 초기 제제의 다양한 구성요소, 예를 들어 단백질, 세포 찌꺼기 및 다른 구성요소를 제거하기 위해 분획화되었다.

[0109]

재조합(Recombinant): 재조합 핵산 분자, 단백질 또는 바이러스는 자연적으로 발생하지 않는 서열을 갖거나 그

렇지 않으면 분리된 2개 서열의 인위적인 조합에 의해 만들어진 서열을 갖는 것이다. 이 인위적 조합은 화학적 합성 또는 유전적 조작 기술에 의한 것과 같이 핵산 분자의 분리된 부분의 인공적인 조작에 의해 달성될 수 있다. 용어 "재조합체"는 또한 천연 핵산 분자, 단백질 또는 바이러스의 일부의 첨가, 치환 또는 결실에 의해서만 변경된 핵산, 단백질 및 바이러스를 포함한다.

[0110] **복제 결함(Replication defects)**: (종양 세포와 비교하여) 비-종양 세포에서 "복제 결함"을 나타내는 아데노바이러스는 종양 세포와 비교하여 정상 세포에서 감소된 바이러스 복제를 나타내는 아데노바이러스를 의미한다. 복제 결함은 예를 들어, 바이러스 후기 단백질 발현의 결핍, 바이러스 DNA 합성의 감소, E2F 표적 유전자(예, 사이클린 A 및 B)를 유도하는 능력 감소, S 단계 진입을 유도하는 능력 감소 및/또는 종양 세포와 비교하여 정상 세포에서 세포 사멸을 유도하는 능력 감소에 의해 입증된다.

[0111] **복제 결함 바이러스(Replication deficient virus)**: 주어진 표현형을 갖는 미리 결정된 세포 집단 (예, 탈조절된 E2F 경로를 갖는 종양 세포)에서 우선적으로 세포 증식을 억제하거나, 세포 용해를 일으키거나 세포사멸 (집합적으로 세포사멸로 간주됨)을 유도하는 바이러스. 이러한 바이러스는 세포 증식을 억제하거나, 세포 용해를 일으키거나 세포사멸을 유도하는 것을 할 수 없거나 제한되어 있거나 그렇지 않으면 미리 결정된 세포 표현형 (예, 정상, 비-정상 세포)을 갖지 않는 세포에서 복제한다.

[0112] **자가-절단 펩타이드(Self-cleaving peptide)**: 리보솜이 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너 뛰도록 유도하는 펩타이드는 펩타이드 서열 및 하류 폴리펩타이드의 분리를 유도한다. 바이러스에 의해 암호화된 2A 펩타이드는 자가-절단 펩타이드의 일종이다. 바이러스에 의해 암호화된 2A 펩타이드는 예를 들어, 돼지 테스코바이러스-1 2A(PTV1), 수족구병 바이러스(FMDV), 마 비염 A 바이러스(ERAV) 및 토세어 아시그나 바이러스(TaV)를 포함한다.

[0113] **서열 상동성(Sequence identity)**: 2개 이상의 핵산 서열 또는 2개 이상의 아미노산 서열 사이의 동일성 또는 유사성은 서열 간의 동일성 또는 유사성의 관점에서 표현된다. 서열 상동성은 퍼센트 동일성의 관점에서 측정될 수 있다; 퍼센트가 높을수록, 동일한 서열이 더 많다. 서열 유사성은 (보존적 아미노산 치환을 고려한) 퍼센트 유사성의 관점에서 측정될 수 있다; 퍼센트가 높을수록, 유사한 서열이 더 많다. 핵산 또는 아미노산 서열의 상동체(homolog) 또는 오솔로그(ortholog)는 표준 방법을 사용하여 정렬될 때 비교적 높은 정도의 서열 상동성/유사성을 갖는다. 이 상동성은 오솔로그 단백질(orthologous protein) 또는 cDNA가 (인간 및 *C. elegans* 서열과 같이) 더 먼 관련이 있는 종과 비교하여, (인간 및 마우스 서열과 같이) 더 밀접하게 관련이 있는 종으로부터 유도될 때 더 중요하다.

[0114] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘은 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; 및 Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990에 설명되어 있고, 서열 정렬 방법 및 상동성 계산에 대한 자세한 고려사항을 제시한다.

[0115] BLAST(NCBI Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)는 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 연결하기 위한 용도로 국립 생물 정보 센터(NCBI, National Center for Biological Information)와 인터넷을 포함한 몇몇 출처로부터 이용할 수 있다. 추가 정보는 NCBI 웹 사이트에서 찾을 수 있다.

[0116] **항원형(Serotype)**: 항원의 특징적인 세트에 의해 구별되는 밀접하게 관련된 미생물 그룹 (예, 바이러스).

[0117] **대상(Subject)**: 인간과 비-인간 포유 동물을 포함하는 범주인 살아있는 다세포 척추 동물.

[0118] **합성(Synthetic)**: 실험실에서 인위적인 방법으로 생산됨, 예를 들어 합성 핵산 또는 단백질은 실험실에서 화학적으로 합성될 수 있다.

[0119] **치료제(Therapeutic agent)**: 대상에게 적절하게 투여될 때 원하는 치료 또는 예방 효과를 유도할 수 있는 임의의 제제. 치료제는 화학적 화합물, 소분자, 재조합 바이러스, 안티센스 화합물, 항체 (또는 이의 항원-결합 단편), 펩타이드 또는 핵산 분자를 포함 하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 암을 치료하기 위한 치료제는 종양 성장, 종양 발생, 또는 종양 전이를 예방 또는 억제하는 제제를 포함한다. "치료용 단백질"은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 단백질 또는 펩타이드인 치료제이다. 본원의 일부 실시양태에서, 상기 치료용 단

백질은 면역조절제이다. 다른 실시양태에서, 상기 치료용 단백질은 독소, Fas 또는 FasL, 가용성 사멸 인자, 방관자 파괴(bystander destruction)의 매개체, 종양 항원, 신 항원(neo antigen) 또는 동종항원을 포함한다.

[0120] **치료학적으로 유효한 양(Therapeutically effective amount):** 제제로 치료되는 대상 또는 세포에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 특정 약학적 또는 치료제 (예를 들어, 재조합 바이러스)의 양. 제제의 유효한 양은 치료 받는 대상 또는 세포 및 치료용 조성물의 투여 방식을 포함하나 이에 한정되지 않는 여러 인자에 좌우될 수 있다.

[0121] **유엑손(Uexon):** 초기 E3 영역과 파이버 유전자 (Tollefson *et al.*, *J Virol* 81(23):12918-12926) 사이의 1 가닥 (좌측 전사)에 위치한 오픈 리딩 프레임.

[0123] 달리 설명되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수의 용어 "하나(a, an 및 the)"는 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한 복수 대상을 포함한다. "A 또는 B를 포함"은 A, 또는 B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 또는 폴리펩타이드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량(molecular weight) 또는 분자량(molecular mass) 값은 근사치이며 설명을 위해 제공되는 것으로 이해해야 한다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 개시의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기에 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참고 문헌으로 인용된다. 충돌이 있는 경우, 용어의 설명을 포함하는 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것은 아님이 산 또는 폴리펩타이드에 대해 주어진 것은 대략적인 것이며 설명을 위해 제공된다. 또한, 재료, 방법 및 실시예가 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것은 아니다.

[0125] III. 실시양태의 개요

[0126] 이종의 오픈 리딩 프레임(open reading frame (ORF)) 및 자가-절단 펩타이드 암호화 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 게놈이 본원에 개시되어 있다. 상기 이종의 ORF는 예를 들어, 치료용 단백질 (예: 면역조절제)을 암호화할 수 있다. 상기 개시된 게놈에 의해 생성되는 재조합 아데노바이러스 게놈 및 재조합 아데노바이러스는 예를 들어, 암의 치료와 같은 다양한 상이한 치료법의 적용에 사용될 수 있다.

[0127] 이종의(heterologous) 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 및 자가-절단(self-cleaving) 펩타이드 암호화 서열을 포함하고, 둘은 작동 가능하게 연결되고 내인성(endogenous) 아데노바이러스 ORF와 동일한 리딩 프레임 내에 있는 재조합 아데노바이러스 게놈이 본원에서 제공된다. 상기 자가-절단 펩타이드 암호화 서열은 상기 이종의 ORF와 상기 내인성 ORF 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 내인성 ORF는 E1B-55k이고 상기 이종의 ORF는 E1B-55k의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 DNA 중합효소(polymerase)이고 상기 이종의 ORF는 DNA 중합효소의 5'이다; 상기 내인성 ORF는 DNA-결합 단백질(DNA-binding protein (DBP))이고 상기 이종의 ORF는 DBP의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 아데노바이러스 사멸 단백질(adenovirus death protein(ADP))이고 상기 이종의 ORF는 ADP의 5'이다; 상기 내인성 ORF는 E3-14.7k이고 상기 이종의 ORF는 E3-14.7k의 3'이다; 상기 내인성 ORF는 E4-ORF2이고 상기 이종의 ORF는 E4-ORF2이다; 또는 상기 내인성 ORF는 파이버(fiber)이고 상기 이종의 ORF는 파이버의 3'이다.

[0128] 일부 실시양태에서, 상기 이종의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다.

[0129] 일부 실시양태에서, 상기 자가-절단 펩타이드는 2A 펩타이드 또는 이의 변이체이다. 일부 실시예에서, 상기 2A 펩타이드는 돼지 테스코바이러스-1(PTV1) 2A (P2A) 펩타이드, 수족구병(FMDV) 2A (F2A) 펩타이드, 마 비염 A 바이러스(ERAV) 2A (E2A) 펩타이드 또는 토세어 아시그나 바이러스(TaV) 2A (T2A) 펩타이드 또는 이의 변이체이다. 특정 실시예에서, 상기 P2A 펩타이드 서열은 서열번호 14 또는 서열번호 18의 아미노산 서열과 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다. 일부 실시예에서, 상기 2A 펩타이드 변이체는 N-말단에 부가적인 아미노산 서열 (예, GSG)을 포함한다.

[0130] 특정 실시예에서, 상기 F2A 펩타이드 서열은 서열번호 15 또는 서열번호 19의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다. 특정 실시

예에서, 상기 E2A 펩타이드 서열은 서열번호 16 또는 서열번호 20의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일하다. 특정 실시예에서, 상기 T2A 펩타이드 서열은 서열번호 17 또는 서열번호 21의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다. 구체적인 비-제한적인 실시예에서, 상기 자가-절단 펩타이드는 서열번호 14 내지 21 중 어느 하나의 아미노산 서열을(로) 포함하거나 구성된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 5형 (Ad5)이다. 다른 실시양태에서, 상기 아데노바이러스는 Ad2, Ad3, Ad9, Ad11, Ad12 또는 Ad34이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 아데노바이러스는 키메라 아데노바이러스, 예를 들어 Ad5/Ad9 또는 Ad5/Ad34 키메라 아데노바이러스이나, 이에 제한되지 않는다.

[0132] 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통을 포함하는 제조합 아데노바이러스가 본원에 추가로 제공된다.

[0133] 본원에서 제공되는 제조합 아데노바이러스 (및 제조합 아데노바이러스 계통)는 예를 들어 특정 세포 유형으로 상기 바이러스를 표적화하고, 간에서의 표적화 및 복제를 억제하고, 종양 세포에서 선택적 복제를 허용하고, 일반적인 아데노바이러스 항원형에 대해 기존의 중화 항체를 회피하는 추가적인 변형을 선택적으로 포함한다. 상기 추가적인 변형은 상기 제조합 아데노바이러스의 바람직한 용도에 따라 달라질 수 있다. 아데노바이러스 변형은 예를 들어, PCT 출원번호 PCT/US2015/051745 (2015년 9월 23일 출원), WO 2012/024350, WO 2013/138505 및 WO 2014/153204에 기술되어 있고, 이는 본원에 그 전체가 참고 문헌으로 인용된다.

[0134] 제조합 아데노바이러스 계통, 또는 제조합 아데노바이러스 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물 또한 본 개시에 의해 제공된다.

[0135] 또한, 치료용 단백질을 대상에게 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 아데노바이러스 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 방법에 있어서, 상기 제조합 아데노바이러스 또는 제조합 아데노바이러스 계통의 이중의 ORF는 상기 치료용 단백질을 암호화한다.

[0136] 종양 세포 생존을 및/또는 종양 세포 성장을 감소 또는 억제(예를 들어 상기 개시된 치료법의 부재와 비교하여, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%의 감소)하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 아데노바이러스, 또는 조성물과 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법에서, 상기 이중의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 시험관 내(*in vitro*) 방법이다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 생체 내(*in vivo*) 방법이고 종양 세포를 접촉시키는 단계는 상기 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 아데노바이러스, 또는 조성물을 종양을 가진 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0137] 종양 진행을 감소 또는 억제하는 방법, 예를 들어 대상에서 전이의 수 및/또는 크기를 감소시키거나 종양 부피를 감소시키는 방법(예를 들어 상기 개시된 치료법의 부재와 비교하여, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%의 감소)이 본원에 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 아데노바이러스 또는 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법에 있어서, 상기 이중의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다.

[0138] 대상에서 암을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 아데노바이러스, 또는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법에 있어서, 상기 이중의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다.

[0139] 본원의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가 치료용 제제를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 추가 치료용 제제는 항암제, 예를 들어 화학요법 제제(chemotherapeutic agent), 생물학적 (예를 들어 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 모노클로날 항체), 또는 핵산 분자, 예를 들어 억제성 핵산 분자) 또는 다른 치료법의 치료, 예를 들어 종양의 외과적 절제술 또는 종양의 방사선 조사를 포함할 수 있다.

[0140] 또한, 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 계통, 제조합 바이러스, 또는 조성물; 및 하나 이상의 추가적인 치료용 제제 및/또는 하나 이상의 진단 제제를 포함하는 키트가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료용 제제는 화학요법(chemotherapeutic), 생물학적(biologic), 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 하나 이상의 진단 제제는 종양 마커에 특이적인 하나 이상의 항체 또는 핵산 분자, 또는 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 상기 바이러스 또는 종양 세포를 추적하는데 사용될 수

있는 이미징 프로브를 포함한다.

[0142] **IV. 외인성 ORF의 최적 배치**

[0143] 36kb의 아데노바이러스 게놈은 작고, 다양한 유전자의 코딩을 위해 상단 및 하단 가닥 모두를 사용한다. 아데노바이러스 게놈 내의 많은 위치에서, 상부 및 하부 가닥 모두가 개별 유전자 암호화를 위해 동시에 사용된다. 상기 게놈 크기는 캡시드에 삽입하기에 최적으로 진화했다. 결과적으로, 상기 외인성 핵산의 과도한 첨가는 캡시드 내로의 불완전한 게놈 로딩 및 바이러스 동역학의 감소를 유도하므로, 상기 외인성 유전자의 삽입은 캡시드의 크기 용량에 의해 제한된다.

[0144] 아데노바이러스 게놈에서 제한된 사용 가능한 공간에 의해 나타나는 과제에 대한 해결책은 천연 아데노바이러스 ORF 내에서 융합 생성물로서 외인성 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 위치시키는 것이다. 이 전략은 게놈에서 이미 암호화된 아데노바이러스 프로모터, 5'UTR 및 polyA 테일을 사용한다. 그러나, 천연 아데노바이러스 단백질과 외인성 단백질 사이에서 융합의 발현은 하나 또는 두 단백질 기능에 해로울 수 있으며, 아데노바이러스 복제 동역학을 현저히 감소시킬 수 있다.

[0145] 본 개시는 천연 (외인성) ORF와 외인성 (이종의) ORF 사이에 배치된 자가-절단 펩타이드 서열을 사용함으로써 이 문제에 대한 해결책을 제공한다. 단일 mRNA 상에 있는 두 개의 ORF 사이에 위치할 때, 상기 자가-절단 펩타이드 서열의 존재는 리보솜 건너뛰기(skipping) 및 제2 단백질로부터 분리된 제1 단백질의 방출을 초래한다. 본원에 개시된 일부 실시양태에서, 상기 자가-절단 펩타이드는 2A 펩타이드(P2A)이다.

[0146] 또한 상기 아데노바이러스 게놈 내 이종의 ORF에 대한 최적 배치 위치의 확인이 본원에 개시된다. 상기 자가-절단 펩타이드 서열 및 상기 이종의 ORF의 신중한(judicious) 배치는 높은 발현을 유도하고 바이러스 동역학에 최소한의 영향을 미치지 않는다.

[0147] 하기 실시예 1에 기재된 바와 같이, 아데노바이러스 복제 동역학을 억제하지 않는 이종성 ORF의 삽입시, 아데노바이러스 게놈 내 몇몇 부위들이 확인되었다. 특히, 이종의 ORF는 E1B-55k ORF의 C-말단, DNA 중합효소 ORF의 N-말단, DBP ORF의 C-말단, ADP ORF의 N-말단, E3-14.7k ORF의 C-말단 또는 E4-ORF2의 N-말단에 삽입될 수 있는 것으로 확인되었다. 각 경우에, 자가-절단 펩타이드 서열 (P2A 부위)은 상기 아데노바이러스 ORF와 상기 이종의 ORF 사이에 삽입되었다. 파이버의 C-말단에 이종의 ORF를 삽입하는 것은 복제 결함이 있는 아데노바이러스를 생산함이 본원에 추가로 개시된다; 그러나, 상기 재조합 바이러스는 감염된 세포에서 매우 높은 수준의 이종의 단백질을 생성할 수 있었으며, 이는 많은 치료법의 적용에서 유용함을 증명할 수 있었다.

[0148] 따라서, 본 개시는 치료법의 적용 (여기서 "SC"는 P2A와 같은 자가-절단 펩타이드를 암호화하는 서열을 지칭함)을 위해 하기의 재조합 아데노바이러스의 용도를 고려한다:

[0149] E1B-55k-SC-이종의 ORF

[0150] 이종의 ORF-SC-(DNA 중합효소)

[0151] DBP-SC-이종의 ORF

[0152] 이종의 ORF-SC-ADP

[0153] E3-14.7k-SC-이종의 ORF

[0154] 이종의 ORF-SC-E4-ORF2

[0155] 파이버-SC-이종의 ORF

[0157] 본원의 일부 실시양태에서, 상기 자가-절단 펩타이드는 바이러스성 암호화된 2A 펩타이드이거나 하기에 더 기술된 바와 같이 이의 변형된 버전이다.

[0159] **V. 자가-절단 펩타이드 서열**

[0160] 자가-절단 펩타이드는 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰는 리보솜을 유도하는 펩타이드이며, 이는 상

기 펩타이드 서열과 하류 폴리펩타이드의 분리를 유도한다. 자기-절단 펩타이드의 사용은 단일 ORF로부터 자기-절단 펩타이드를 플랭킹(flanking)하는 다수의 단백질의 발현을 허용한다. 바이러스성 암호화된 2A 펩타이드는 자기-절단 펩타이드의 한 유형이다.

[0161] 다른 자기-절단 펩타이드와 마찬가지로, 2A 펩타이드는 리보솜이 2A 요소의 C 말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰게 하는 기능을 하여, 2A 서열의 말단과 하류 펩타이드 사이의 분리를 유도한다 (Kim 등, *PLoS One* 6(4):e18556, 2011). "절단"은 2A 펩타이드의 C- 말단에 있는 글리신과 프롤린 잔기 사이에서 발생한다. 예시적인 2A 펩타이드는 토세어 아시그나 바이러스 (TaV), 마 비염 A 바이러스 (ERAV), 돼지 테스코바이러스-1 (PTV1) 및 수족구병 바이러스 (FMDV)에 의해 암호화되는 2A 펩타이드 또는 이의 변형된 버전들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0162] 본원의 특정 실시예에서, 상기 2A 펩타이드는 PTV1 2A (P2A), FMDV 2A (F2A), ERAV 2A (E2A) 또는 TaV 2A (T2A)를 포함하며, 이들의 서열은 하기에 나타내며 서열번호 14-17로 기재된다.

[0164] P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 14)

[0165] F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열번호 15)

[0166] E2A: QCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열번호 16)

[0167] T2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (서열번호 17)

[0169] 일부 실시예에서, 상기 2A 펩타이드는 절단 효율을 향상시키기 위해 N-말단에 Gly-Ser-Gly를 포함하도록 변형된다. 변형된 P2A, F2A, E2A 및 T2A의 서열을 하기에 나타내었으며 서열번호 14-17로 본원에 기재된다.

[0171] 변형된 P2A: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 18)

[0172] 변형된 F2A: GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열번호 19)

[0173] 변형된 E2A: GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열번호 20)

[0174] 변형된 T2A: GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (서열번호 21)

[0176] 일부 실시양태에서, 상기 2A 폴리펩타이드는 본원에 개시된 2A 펩타이드의 변이체이다. 변이체는 본원에 개시된 야생형 또는 변형된 2A 폴리펩타이드와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 그 이상의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 변이체는 예를 들어, 서열번호 14-21 중 임의의 하나의 2A 폴리펩타이드로부터 적어도 하나의 N-말단 아미노산의 결실, 예를 들어 열거된 값 중 임의의 2개 사이의 범위를 포함하는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다. 변이체는 서열번호 14-21 중 임의의 하나의 2A 폴리펩타이드로부터 적어도 하나의 C-말단 아미노산의 결실, 예를 들어 열거된 값 중 임의의 2개 사이의 범위를 포함하는 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다. 변이체는 예를 들어, 적어도 보존적 아미노산 치환과 같은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 또한 포함할 수 있다.

[0178] VI. 약학적 조성물

[0179] 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 아데노바이러스 계통을 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다. 상기 조성물은 시험관 내에서(*in vitro*) 또는 생체 내에서(*in vivo*), 선택적으로 제제(formulation) 및 투여에 적합하다. 선택적으로, 상기 조성물은 하나 이상의 제공되는 제제(agent) 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 적합한 담체 및 이의 제제(formulation)는 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition*, Loyd V. Allen *et al.*, editors, Pharmaceutical Press (2012)에 기술되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 생물학적으로 또는 그렇지 않으면 바람직하지 않은 물질을 포함한다. 즉, 상기 물질은 바람직하지 않은 생물

학적 효과를 일으키지 않거나 포함되어 있는 약학적 조성물의 다른 성분과 해로운 방식으로 상호작용하지 않고 대상에 투여된다. 대상에게 투여된 경우, 상기 담체는 선택적으로 활성 성분의 분해를 최소화하고 대상에서 부작용을 최소화하도록 선별된다.

[0180] 제조합 바이러스 (또는 제조합 아데노바이러스를 암호화하는 하나 이상의 핵산 또는 벡터)는 공지된 방법에 따라, 예를 들어 볼루스(bolus) 또는 일정 시간 동안의 연속적인 주입에 의한 정맥내 투여(intravenous administration), 근육 내(intramuscular), 복강 내(intraperitoneal), 뇌척수 내(intracerebrospinal), 피하(subcutaneous), 관절 내(intra-articular), 활액막 내(intrasynovial), 척수강내(intrathecal), 경구(oral), 국소(topical), 종양 내(intratatumoral) 또는 흡입(inhalation) 경로에 의한 공지된 방법에 따라 투여된다. 투여는 국소적 또는 전신일 수 있다. 상기 조성물은 국소, 경구, 비경구, 정맥 내, 관절 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 강 내(intracavity), 경피흡수, 간 내(intrahepatically), 두개 내(intracranially), 분무(nebulization)/ 흡입(inhalation)을 포함하는 몇몇 임의의 투여 경로 또는 내시경을 통한 설치에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지의 여부 및 치료할 영역에 따라 많은 방법으로 투여된다.

[0181] 일부 실시양태에서, 투여를 위한 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체에 용해된 본원에 개시된 제조합 아데노바이러스 (또는 제조합 게놈)를 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등을 사용할 수 있다. 이러한 용액은 멸균되고 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이러한 조성물은 통상의 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 상기 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하는데 필요한 약학적으로 허용 가능한 보조 물질, 예를 들어 아세트산 나트륨(sodium acetate), 염화 나트륨(sodium chloride), 염화 칼슘(potassium chloride), 염화 칼슘(calcium chloride), 락트산 나트륨(sodium lactate) 등을 포함할 수 있다. 이들 제제 중의 활성제의 농도는 광범위하게 다양할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식 및 대상의 요구에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다.

[0182] 약학적 제제, 특히 제조합 바이러스의 약학적 제제는 원하는 순도를 갖는 제조합 아데노바이러스 (또는 제조합 아데노바이러스를 암호화하는 하나 이상의 핵산)를 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 제제는 동결건조된 제제 또는 수용액일 수 있다.

[0183] 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용된 용량과 농도에서 수혜자에게 독성이 없다. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 아세테이트(acetate), 인산염(phosphate), 구연산염(citrate) 및 기타 유기산; 산화 방지제 (예, 아스코르브산) 방부제, 저분자량 폴리펩타이드; 혈청 알부민 또는 젤라틴과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 및 아미노산, 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제(chelating agent); 및 이온성 및 비이온성 계면활성제 (예, 폴리소르베이트); 나트륨과 같은 염-형성 반대 이온(salt-forming counter-ion); 금속 착물 (예, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 상기 제조합 아데노바이러스 (또는 제조합 아데노바이러스를 암호화하는 하나 이상의 핵산)는 임의의 적절한 농도의 감염 단위로 제제화될 수 있다.

[0184] 경구 투여에 적합한 제제는 (a) 물, 식염수 또는 PEG 400과 같은 희석제 중에 현탁된 제조합 아데노바이러스의 유효한 양과 같은 액체 용액; (b) 액체, 고체, 과립 또는 젤라틴과 같이 활성 성분의 미리 결정된 양을 각각 포함하는 캡슐, 사렛 또는 정제; (c) 적절한 액체의 현탁액; 및 (d) 적합한 에멀전으로 구성될 수 있다. 정제 형태는 하나 이상의 락토오스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 인산 칼슘, 옥수수 전분, 감자 전분, 미세 결정질 셀룰로오스, 젤라틴, 콜로이드성 이산화 규소, 활석, 마그네슘 스테아레이트, 스테아린산 및 기타 부형제, 착색제, 충전제, 바인더, 희석제, 완충제, 습윤제, 방부제, 향료, 염료, 봉해제 및 약학적으로 호환되는 담체를 포함할 수 있다. 로젠지(lozenge) 형태는 활성 성분 이외에, 당업계에 알려진 담체를 포함하는 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 에멀전, 젤 등과 같이 불활성 염기 내 활성 성분을 포함하는 캔디 뿐만 아니라 수크로스와 같이 향료 내 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0185] 단독으로 또는 다른 적합한 성분과 조합된 제조합 아데노바이러스 (또는 제조합 아데노바이러스를 암호화하는 하나 이상의 핵산)는 흡입을 통해 투여될 수 있는 에어로졸 제제로 제조될 수 있다 (즉, 이들은 "분무될 수 있다"). 에어로졸 제제는 디클로로디플루오로메탄(dichlorodifluoromethane), 프로판(propane), 질소(nitrogen) 등과 같은 가압된 허용 가능한 추진제에 배치될 수 있다.

[0186] 관절 내 (관절(joint) 내), 정맥 내, 근육 내, 종양 내, 피 내, 복강 내 및 피하 경로와 같은 비경구 투여에 적합한 제제는 수성 및 비-수성, 항산화제, 완충액, 정균제 및 의도된 수혜자의 혈액으로 제제를 등장성으로 만드

는 용질(solute)을 포함하는 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁화제, 용해제, 증점제, 안정화제 및 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제공된 방법에서, 조성물은 예를 들어, 정맥 내 주입, 경구, 국소, 복강 내, 방광 내, 종양 내 또는 척수강 내(intrathecally)로 투여될 수 있다. 비경구 투여, 종양 내 투여 및 정맥 내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 화합물 제제는 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 다중-용량 밀폐 용기로 제공될 수 있다.

[0187] 주사 용액 및 현탁액은 전술한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다. 생체 외 치료를 위해 아데노바이러스에 의해 형질도입되거나 형질감염되거나 핵산으로 형질감염된 세포는 전술한 바와 같이 정맥 내 또는 비경구 투여될 수 있다.

[0188] 일부 실시예에서, 상기 약학적 조제(preparation)는 단위-투약 형태이다. 이러한 형태에서, 조제는 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 투여량으로 세분된다. 따라서, 약학적 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여에 적합한 단위 투약 형태는 분말, 정제, 환제, 캡슐 및 로젠지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0190] VII. 치료 방법

[0191] 본원에 개시된 상기 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 게놈 및 조성물은 치료 또는 예방 치료를 위해 투여될 수 있다. 특히, 대상 내 종양 세포 생존율 또는 성장을 감소 또는 억제, 대상 내 종양 진행을 감소 또는 억제, 전이 수를 감소, 전이의 크기 및/또는 부피를 감소, 대상 내 종양 크기 및/또는 부피를 감소 및/또는 대상 내 암을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 아데노바이러스 게놈 (또는 이의 조성물)의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 전체적으로 기술된 바와 같이, 상기 아데노바이러스 또는 약학적 조성물은 정맥 내, 혈관 내, 척수강 내 근육 내, 피하, 종양 내, 복강 내 또는 구강을 포함하는 임의의 많은 방법으로 투여된다. 선택적으로, 상기 방법은 화학요법 제제, 생물학적 및/또는 방사선과 같은 하나 이상의 추가적인 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0192] 일부 실시양태에서, 암 또는 종양은 폐, 전립선, 결장 직장, 유방, 갑상선, 신장, 췌장, 뼈, 두경부 또는 간 암 또는 종양이거나 또는 일종의 백혈병이다. 일부 경우에서, 상기 암은 전이성이다. 일부 실시예에서, 종양은 유방(mammary), 뇌하수체(pituitary), 갑상선(thyroid) 또는 전립선(prostate gland)의 종양; 뇌(brain), 간(liver), 뇌막(meninges), 뼈(bone), 난소(ovary), 자궁(uterus) 또는 자궁 경부(cervix)의 종양; 단핵 세포(monocytic) 또는 골수성 백혈병(myelogenous leukemia); 선암(adenocarcinoma), 선종(adenoma), 별아교세포종(astrocytoma), 방광 종양(bladder tumor), 뇌 종양(brain tumor), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 유방암(breast carcinoma), 자궁경부암(cervical carcinoma), 결장암(colon carcinoma), 신장암(kidney carcinoma), 간암(liver carcinoma), 폐암(lung carcinoma), 난소암(ovarian carcinoma), 췌장암(pancreatic carcinoma), 전립선암(prostate carcinoma), 직장암(rectal carcinoma), 피부암(skin carcinoma), 위암(stomach carcinoma), 고환암(testis carcinoma), 갑상선암(thyroid carcinoma), 연골 육종(chondrosarcoma), 융모암(choriocarcinoma), 섬유종(fibroma), 섬유육종(fibrosarcoma), 교모세포종(glioblastoma), 신경교종(glioma), 간종양(hepatoma), 조직구종(histiocytoma), 평활근모세포종(leiomyoblastoma), 평활근육종(leiomyosarcoma), 림프종(lymphoma), 지방육종 세포(liposarcoma cell), 유방 육종(mammary tumor), 수모세포종(medulloblastoma), 골수종(myeloma), 형질세포종(plasmacytoma), 신경아세포종(neuroblastoma), 신경아교종(neuroglioma), 골육종(osteogenic sarcoma), 췌장 종양(pancreatic tumor), 뇌하수체 종양(pituitary tumor), 망막모세포종(retinoblastoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 육종(sarcoma), 고환 종양(testicular tumor), 흉선종(thymoma) 또는 윌름스 종양(Wilms tumor)이다. 종양은 혈관종(hemangiomas), 흑색종, 육종(카포시 육종(Kaposi's sarcoma) 뿐만 아니라 뼈 및 연조직에서 발생하는 것 포함) 및 뇌, 신경, 눈 및 뇌막(성상 세포종(astrocytomas), 신경 교종(gliomas), 교모세포종(glioblastomas), 망막아종(retinoblastomas), 신경종(neuromas), 신경아세포종(neuroblastomas), 신경초종(Schwannomas) 및 수막종(meningiomas)을 포함)의 종양 뿐만 아니라 유방, 결장, 직장, 폐, 구강인두(oropharynx), 하인두(hypopharynx), 식도(esophagus), 위, 췌장, 간, 담낭 및 담관(gallbladder and bile duct), 소장, 요로 (신장, 방광 및 요로상피 포함), 여성 생식기 관(융모암(choriocarcinoma) 및 임신영양막 질환(gestational trophoblastic disease) 뿐만 아니라 경부, 자궁 및 난소를 포함), 남성 생식기 관(전립선, 정낭, 고환 및 세균 세포 종양 포함), 내분비샘(갑상선, 부신 및 뇌하수체 포함), 및 피부의 암종을 포함하는 원발성 및 전이성 고형 종양을 모두 포함한다.

[0193] 치료법의 적용에서, 재조합 아데노바이러스 또는 이의 조성물은 대상에게 치료학적으로 유효한 양 또는 용량의

로 투여된다. 이 사용에 효과적인 양은 질병의 중증도와 환자의 건강 상태에 따라 다르다. 상기 조성물의 단일 또는 다중 투여는 환자에 의해 요구되고 허용되는 투여량 및 빈도에 따라 투여될 수 있다. "환자" 또는 "대상"은 사람과 다른 동물, 특히 포유동물을 포함한다. 따라서, 상기 방법은 인간 치료법 및 마우스, 랫트, 토끼, 고양이, 개, 소, 말, 돼지, 닭 등과 같은 수의학 적용 모두에 적용 가능하다.

[0194] 변형된 서열을 갖는 아데노바이러스의 유효한 양은 개별적으로 결정되며 사용되는 특정 제조합 아데노바이러스; 개인의 크기, 나이, 성별; 및 증식하는 세포의 크기 및 다른 특성에 적어도 부분적으로 기초한다. 예를 들어, 인간의 치료를 위해, 적어도 10^4 , 적어도 10^5 , 적어도 10^6 , 적어도 10^7 , 적어도 10^8 , 적어도 10^9 , 적어도 10^{10} , 10^{11} , 또는 적어도 10^{12} 와 같이 적어도 10^3 플라크 형성 단위(plaque forming units, PFU)의 제조합 바이러스가 사용되고, 예를 들어 대략 10^3 내지 10^{12} PFU의 제조합 바이러스가 존재하는 증식 세포 또는 신생물(neoplasms)의 유형, 크기 및 수에 따라 사용된다. 유효량은 약 1.0 pfu/kg 체중 내지 약 10^{15} pfu/kg 체중 (예를 들어, 약 10^2 pfu/kg 체중 내지 약 10^{13} pfu/kg 체중) 일 수 있다. 제조합 아데노바이러스는 단일 투여량 또는 다중 투여량 (예를 들어, 2, 3, 4, 6회 또는 그 이상의 투여량)으로 투여된다. 다중 투여량을 동시에 또는 연속적으로 투여할 수 있다 (예를 들어, 며칠 또는 수주의 기간 동안).

[0195] 일부 실시양태에서, 상기 제공되는 방법은 항암제 또는 다른 치료법의 치료 (예, 종양의 외과적 절제)와 같이 하나 이상의 추가적인 치료제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 예시적인 항암제는 예를 들어, 유사분열 억제제(mitotic inhibitor), 알킬화제(alkylating agent), 항 대사물질(anti-metabolite), 삽입성 항생제 (intercalating antibiotics), 성장 인자 억제제(growth factor inhibitor), 세포 주기 억제제(cell cycle inhibitor), 효소(enzyme), 토포아이스머라제 억제제(topoisomerase inhibitor), 항생제(anti-survival agent), 생물 반응 조절 물질(biological response modifier), 항 호르몬(anti-hormone, 예를 들어, 항-안드로겐(anti-androgen)), 항 혈관신생제(anti-angiogenesis agent) 및 CDK 억제제(CDK inhibitor)와 같은 화학요법 제제를 포함하나, 제한되지 않는다. 다른 항암 치료는 방사선 치료 및 암세포를 특이적으로 표적화하는 다른 항체를 포함한다.

[0196] 알킬화제의 비-제한적인 예로는 니트로젠 머스타드(nitrogen mustards) (예를 들어, 메클로레타민 (mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 우라실 머스타드(uracil mustard), 또는 클로람부실(chlorambucil)), 알킬 설포네이트(alkyl sulfonate) (예를 들어, 부설판 (busulfan)), 니트로소요소(nitrosoureas) (예, 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴 (semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 또는 다카바진(dacarbazine))를 포함한다.

[0197] 항 대사물질의 비-제한적인 예로는 엽산 유사체 (예를 들어, 메토틱렉세이트(methotrexate)), 피리미딘 유사체 (예를 들어, 5-FU 또는 사이타라빈(cytarabine)), 및 퓨린 유사체, 예를 들어 메르캅토피린(mercaptopurine) 또는 티오구아닌(thioguanine)을 포함한다.

[0198] 천연물(natural product)의 비-제한적인 예로는 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids) (예를 들어 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 또는 빈데신(vindesine)), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin) (예를 들어 에토포시드(etoposide) 또는 테니포시드(teniposide)), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신 (dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리마이신(plicamycin) 또는 미토마이신 C(mitomycin C)) 및 효소(예를 들어 L-아스파라기나제(L-asparaginase))를 포함한다.

[0199] 기타 제제(miscellaneous agent)의 비-제한적인 예로는 백금 배위 착물(platinum coordination complexe) (예를 들어, 시스플라틴(cisplatin)으로 도 알려진 시스-디아민-디클로로플라티늄 II (cis-diamine-dichloroplatinum II)), 치환된 요소(예를 들어 하이드록시우레아(hydroxyurea)), 메틸 하이드라진 유도체(예를 들어, 프로카바진(procarbazine)) 및 부신피질 억제제 (예를 들어 마이토테인(mitotane) 및 아미노글루테티미드(aminoglutethimide))를 포함한다.

[0200] 호르몬 및 길항제(antagonist)의 비-제한적인 예로는 부신피질 스테로이드(adrenocorticosteroid) (예를 들어 프리드니손(prednisone)), 프로게스틴(progestin) (예를 들어 하이드록시프로게스테론 카프로에이트 (hydroxyprogesterone caproate), 메드록시프로게스테론 아세테이트(medroxyprogesterone acetate) 및 메게스트롤 아세테이트(magestrol acetate)), 에스트로겐(estrogen) (예를 들어 디에틸stil베스트롤 (diethylstilbestrol) 및 에티닐 에스트라디올(ethinyl estradiol)), 항에스트로젠(antiestrogen) (예를 들어

테스테론 프로프리오네이트(testerone proprionate) and 플루옥시메스테론(fluxymesterone))을 포함한다.

[0201] 가장 일반적으로 사용되는 화학요법 약물의 예는 아드리아마이신(Adriamycin), 알케란(Alkeran), 아라-C(Ara-C), 비아이씨엔유(BiCNU), 부설판(Busulfan), CCNU, 카보플라티늄(Carboplatinum), 시스플라티늄(Cisplatinum), 사이토산(Cytoxan), 다우노루비신(Daunorubicin), 다카바진(DTIC), 5-플루오로우라실(5-FU), 플루다라빈(Fludarabine), 히드리아(Hydrea), 아이다루비신(Idarubicin), 이포스파마이드(Ifosfamide), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미스라마이신(Mithramycin), 미토마이신(Mitomycin), 미톡산트론(Mitoxantrone), 나이트로젠 머스타드(Nitrogen Mustard), 택솔(Taxol) (또는 다른 타산, 예를 들어 도세탁셀(docetaxel)), 벨반(Velban), 빈크리스틴(Vincristine), VP-16을 포함하며, 일부 더 새로운 약물은 겐시타빈(Gemcitabine) (젠티주(Gemzar)), 허셉틴(Herceptin), 이리노테칸(Irinotecan) (캠토사(Camptosar), CPT-11), 류스타틴(Leustatin), 나벨빈(Navelbine), 리투산(Rituxan) STI-571, 탁소텔(Taxotere), 토폠테칸(Topotecan) (하이캄틴(Hycamtin)), 젤로다(Xeloda) (카페시타빈(Capecitabine)), 제벨린(Zevelin) 및 칼시트리올(calcitriol)을 포함한다.

[0202] 사용될 수 있는 면역조절제의 비-제한적인 예로는 AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), 브로피리민(bropirimine) (Upjohn), 감마 인터페론(gamma interferon) (Genentech), GM-CSF (과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor); Genetics Institute), IL-2 (Cetus or Hoffman-LaRoche), 인간 면역 글로불린(human immune globulin) (Cutter Biological), IMREG (from Imreg of New Orleans, La.), SK&F 106528, 및 TNF (종양 괴사 인자(tumor necrosis factor); Genentech)를 포함한다.

[0203] CDK(Cyclin-dependent kinase, 사이클린-의존성 인산화효소) 억제제는 CDK의 기능을 억제하는 제제이다. 상기 제공되는 방법에서의 사용을 위한 CDK 억제제의 비-제한적인 예는 AG-024322, AT7519, AZD5438, 플라보피리돌(flavopiridol), 인디설파람(indisulam), P1446A-05, PD-0332991, 및 P276-00 (예를 들어, Lapenna et al., Nature Reviews, 8:547-566, 2009를 참조)를 포함한다. 다른 CDK 억제제는 LY2835219, 팔보시클립(Palbociclib), LEE011 (Novartis), pan-CDK 억제제 AT7519, 셀리시클립(seliciclib), CYC065, 부티로락톤 I(butyrolactone I), 하이메니알디신(hymenialdisine), SU9516, CINK4, PD0183812 또는 파스카프라이신(fascaplysin)을 포함한다.

[0204] 일부 실시예에서, 상기 CDK 억제제는 광범위한 범위의 억제제(예를 들어, 플라보피리돌(flavopiridol), 올로뮤신(olomoucine), 로스코비틴(roscovitine), 켄파울론(kenpaullone), SNS-032, AT7519, AG-024322, (S)-Roscovitine 또는 R547이다. 다른 실시예에서, 상기 CDK 억제제는 특이적인 억제제(예를 들어, 파스카프라이신(fascaplysin), 류비딘(ryuvidine), 퓨르발라놀 A(purvalanol A), NU2058, BML-259, SU 9516, PD0332991 또는 P-276-00)이다.

[0205] 일부 실시양태에서, 상기 제공되는 방법은 치료학적으로 유효한 양의 면역요법을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 사용될 수 있는 면역조절제의 비-제한적인 예는 AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), 브로피리민(bropirimine) (Upjohn), 감마 인터페론(gamma interferon) (Genentech), GM-CSF (과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor); Genetics Institute,) IL-2 (Cetus or Hoffman-LaRoche), 인간 면역 글로불린(human immune globulin) (Cutter Biological), IMREG (from Imreg of New Orleans, La.), SK&F 106528, 및 TNF (종양 괴사 인자(tumor necrosis factor); Genentech)를 포함한다. 면역치료제는 예를 들어, 아테졸리주맵(Atezolizumab), MPDL3280A, BNS-936558 (니볼루맵(Nivolumab)), 펌브로리주맵(Pembrolizumab), 피딜리주맵(Pidilizumab), CT011, AMP-224, AMP-514, MEDI-0680, BMS-936559, BMS935559, MEDI-4736, MPDL-3280A, MSB-0010718C와 같이 PD-1 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 PD-1 길항제 또는 PD-L1 길항제일 수 있다. 상기 면역치료제는 트레멜리무맵(Tremelimumab), BMS-986016, 및 MGA271과 같은 CTLA-4, LAG-3, 또는 B7-H3 길항제일 수 있다.

[0206] 일부 실시양태에서, 상기 제공되는 방법은 하나 이상의 항-혈관신생 제제, 예를 들어 혈관 성장을 감소시키거나 심지어 억제하는 기능을 하는 단백질, 효소, 다당류, 올리고뉴클레오타이드, DNA, RNA, 및 재조합 벡터 및 소분자의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 적절한 혈관신생 억제제의 예로는 안지오스타틴 K1-3(angiotatin K1-3), 스타우로스포린(staurosporine), 제니스테인(genistein), 푸마길린(fumagillin), 메드록시프로게스테론(medroxyprogesterone), 수라민(suramin), 인터페론-알파(interferon-alpha), 금속단백분해효소 억제제(metalloproteinase inhibitor), 혈소판 인자 4(platelet factor 4), 소마토스타틴(somatostatin), 트롬보스폰딘(thrombospondin), 엔도스타틴(endostatin), 탈리도마이드(thalidomide), 및 이의 유도체 및 유사체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 상기 항-혈관신생

제제는 VEGF에 특이적으로 결합하는 항체 (예, AVASTIN®, Roche) 또는 VEGF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 (예, VEGFR2 항체)이다. 일 실시예에서, 상기 항-혈관신생 제제는 VEGFR2 항체, 또는 DMXAA (Vadimezan 또는 ASA404로도 알려짐; 예를 들어 Sigma 사로부터 상업적으로 이용 가능함, St. Louis, MO) 또는 모두를 포함한다. 상기 항-혈관신생 제제는 베바시주맵(bevacizumab), 서니티닙(sunitinib), 서니티닙, 시티닙(xitinib), 다사티닙(dasatinib)과 같은 항-혈관신생 티로신 인산화 억제제(tyrosine kinase inhibitors (TKI))일 수 있다. 이들은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 상기 제공되는 방법은 하나 이상의 인산화 억제제, 예를 들어 성장 인자의 인산화 및 활성화를 방지하는 글리백®(Gleevec®), 이레사®(Iressa®), 및 타세바®(Tarceva®), 서니티닙(sunitinib), 소라페닙(sorafenib), 아니티닙(anitinib), 및 다사티닙(dasatinib)의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 사용될 수 있는 항체는 성장 인자 및 혈관신생 경로를 차단하는 허셉틴®(HERCEPTIN®) 및 아바스틴®(AVASTIN®)을 포함한다. 이들은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 상기 제공되는 방법은 하나 이상의 모노클로날 항체, 예를 들어, 3F8, 아바고보맵(Abagovomab), 아테카투무맵(Adecatumumab), 아푸투주맵(Afutuzumab), 알라시주맵(Alacizumab), 알렘투주맵(Alentuzumab), 알투모맵 펜테테이트(Altumomab pentetate), 아나투모맵 마페나톡스(Anatumomab mafenatox), 아폴리주맵(Apolizumab), 아르시투모맵(Arcitumomab), 바비투시맵(Bavituximab), 베크투모맵(Bectumomab), 벨리무맵(Belimumab), 베실레소맵(Besilesomab), 베바시주맵(Bevacizumab), 비바투즈맵 메르탄신(Bivatuzumab mertansine), 블리나투모맵(Blinatumomab), 브렌투시맵 베도틴(Brentuximab vedotin), 칸투주맵 메르탄신(Cantuzumab mertansine), 카르포맵 펜디타이드(Capromab pendetide), 카투마소맵(Catumaxomab), CC49, 세톡시맵(Cetuximab), 시타투주맵 보가톡스(Citatzumab bogatox), 시수투무맵(Cixutumumab), 클리바투주맵 테트라세탄(Clivatumumab tetraxetan), 코나투무맵(Conatumumab), 다세투주맵(Dacetuzumab), 데투모맵(Detumomab), 에크로멕시맵(Ecromeximab), 에큐리주맵(Eculizumab), 에드레콜로맵(Edrecolomab), 에프라투주맵(Epratuzumab), 에르투막소맵(Ertumaxomab), 에타라시주맵(Etaracizumab), 파를레투주맵(Farletuzumab), 피기투무맵(Figitumumab), 갈릭시맵(Galiximab), 겐투주맵 오조가미신(Gemtuzumab ozogamicin), 기렌투시맵(Girentuximab), 글렘바투무맵 베도틴(Glembatumumab vedotin), 이브리투모맵 튜세탄(Ibritumomab tiuxetan), 이고보맵(Igovomab), 임시로맵(Imciromab), 인테투무맵(Intetumumab), 이노투주맵 오조가미신(Inotuzumab ozogamicin), 이필리무맵(Ipilimumab), 이라투무맵(Iratumumab), 라베투주맵(Labetuzumab), 렉사투무맵(Lexatumumab), 린투주맵(Lintuzumab), 로보투주맵 메르탄신(Lorvotuzumab mertansine), 루카투무맵(Lucatumumab), 루밀릭시맵(Lumiliximab), 마파투무맵(Mapatumumab), 마투주맵(Matuzumab), 메폴리주맵(Mepolizumab), 메텔리무맵(Metelimumab), 밀라투주맵(Milatuzumab), 미투모맵(Mitumomab), 모롤리무맵(Morolimumab), 나콜로맵 타페나톡스(Nacolomab tafenatox), 나프투모맵 에스타페나톡스(Naptumomab estafenatox), 네시투무맵(Necitumumab), 니모투주맵(Nimotuzumab), 노페투모맵 메르펜탄(Nofetumomab merpentan), 오파투무맵(Ofatumumab), 올라라투맵(Olaratumab), 오포투주맵 모나톡스(Oportuzumab monatox), 오레고보맵(Oregovomab), 파니투무맵(Panitumumab), 펜투모맵(Pentumomab), 페르투주맵(Pertuzumab), 핀투모맵(Pintumomab), 프리투무맵(Pritumumab), 라무시투맵(Ramucirumab), 리로투무맵(Rilotumumab), 리톡시맵(Rituximab), 로바투무맵(Robatutumumab), 사투모맵 펜테타이드(Satumomab pendetide), 시브로투주맵(Sibrotuzumab), 소넵시주맵(Sonepcizumab), 타카투주맵 테트라세탄(Tacatumumab tetraxetan), 타플리투모맵 팜톡스(Taplutumomab paptox), 테나투모맵(Tenatumomab), TGN1412, 티칠리무맵(Ticilimumab) (트레멜리무맵, tremelimumab), 티가투주맵(Tigatumumab), TNX-650, 트라스투주맵(Trastuzumab), 트레멜리무맵(Tremelimumab), 투코투주맵 셀모루킨(Tucotuzumab celmoleukin), 벨투주맵(Veltuzumab), 볼로시지맵(Volociximab), 보투무맵(Votumumab), 또는 잘루투무맵(Zalutumumab)의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 이종의 ORF는 이들 치료용 항체 중 하나를 암호화한다.

[0209] 일부 유형의 암을 위한 또 다른 일반적인 치료는 외과적 치료, 예를 들어 암 또는 그의 일부의 외과적 절제술이다. 치료의 또 다른 예는 방사선 치료, 예를 들어 방사성 물질 또는 에너지(예를 들어, 외부 광선 요법(external beam therapy))를 종양 부위에 투여하여 외과적 절제술 이전에 종양을 근절하거나 수축시키는 것을 돕는 것이다.

[0210] 제제 및 투여량의 선택은 치료되는 주어진 질환에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 제제 또는 조성물의 조합은 부수적으로, 개별적으로 그러나 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서, 용어 조합은 2개 이상의 제제 또는 조성물의 부수적이거나 동시적이거나 순차적인 투여를 지칭한다.

- [0211] 본원에 개시된 방법에 따라, 상기 대상에게 본원에 제공되는 하나 이상의 제제의 유효한 양을 투여한다. 상기 유효한 양은 원하는 생리적 반응(예, 암 세포의 사멸)을 생산하는데 필요한 임의의 양으로 정의된다. 치료제는 전형적으로 매일 약 0.001 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg의 초기 투여량으로 투여된다. 약 0.01 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 200 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 투여량 범위가 사용될 수 있다. 그러나, 투여량은 대상의 필요조건, 치료되는 상태의 중증도, 및 사용되는 화합물에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 투여량은 특정 대상에서 진단된 암의 유형 및 단계를 고려하여 투여량을 경험적으로 결정할 수 있다. 상기 제공되는 방법과 관련하여, 대상에게 투여되는 투여량은 시간 경과에 따라 환자에게 유익한 치료 반응에 영향을 미치기에 충분해야 한다. 특정 상황에 대한 적절한 투여량의 결정은 의사의 기술 범위 내에 있다. 따라서, 제제를 투여하기 위한 유효한 양 및 일정은 당업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 투여량은 원하지 않는 교차-반응(cross-reaction), 아나필락시 반응(anaphylactic reaction) 등과 같은 실질적인 유해한 부작용을 유발할 정도로 커서는 안된다. 투여량은 임의의 금기의 이벤트 시 개별 의사에 의해 조정될 수 있다. 가이드라인은 의약품의 주어진 부류에 적절한 투여량에 대한 문헌에서 발견될 수 있다.
- [0212] 본원에 개시된 바와 같이, 재조합 아데노바이러스, 재조합 아데노바이러스 게놈, 또는 이의 조성물과 종양 세포를 접촉시킴으로써 종양 세포 생존을 및/또는 성장을 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 시험관 내(in vitro) 방법이다. 다른 실시양태에서, 상기 방법은 생체 내(in vivo) 방법이고 종양 세포를 접촉시키는 단계는 상기 재조합 아데노바이러스 게놈, 재조합 아데노바이러스, 또는 조성물을 종양을 가진 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0213] 본원에 개시된 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 아데노바이러스 게놈 (또는 이의 조성물)의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여함으로써, 대상의 종양 진행을 억제하거나 종양 부피를 감소시키는 방법이 추가로 제공된다.
- [0214] 본원에 개시된 재조합 아데노바이러스 또는 재조합 아데노바이러스 게놈 (또는 이의 조성물)의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여함으로써, 대상의 암을 치료하는 방법도 제공된다.
- [0216] **VIII. Adsembly 및 AdSLIC**
- [0217] 상기 아데노바이러스 게놈은 E1, E2, E3, E4 및 L1-5로 라벨링된 여러 기능적 그룹으로 분류된다. E1 영역은 모든 다른 바이러스 유전자의 전사를 조절하고 숙주 세포에서 S-단계(phse)를 유도하는 단백질을 암호화한다. E2 영역은 바이러스 DNA 복제를 유도하는 단백질을 암호화한다. E3 영역은 숙주 세포 면역 반응을 조절하고 세포 배양액에서 불필요할 수 있는 단백질을 암호화한다. E4 영역은 서로 전혀 다른 기능의 세트에 대한 유전자를 포함한다. 그리고 L1-5 영역은 바이러스 입자 구조적 단백질을 암호화한다.
- [0218] 이 자연적인 기능의 분리를 이용하여, 본 발명자들은 도 6a에 도시된 바와 같이, 4개의 플라스미드, E1, E3, E4 및 코어(Core)로 분리함으로써, 36 kb Ad 게놈의 신속하고 용이한 조작을 가능하게 하는 재조합 아데노바이러스 어셈블리의 방법을 이전에 개발하였다 (Adsembly 및 AdSLIC; WO 2012/024351를 참조, 이는 본원에 참조로 통합됨). 이들의 보다 합리적인 크기 때문에, 이러한 더 작은 플라스미드의 조작은 표준 기술을 이용하여 간단하다.
- [0219] Adsembly 및 AdSLIC는 4시간만에 호환 가능한 게놈 라이브러리 부분으로부터 새로운 특성을 가진 아데노바이러스의 조합의 시험관 내 어셈블리를 가능하게 한다. Adsembly 및 AdSLIC는 기능적 부분의 4개의 라이브러리를 이용하여 새로운 특성을 갖는 합성 바이러스가 어셈블될 수 있게 하는 일반적인 게놈 설계 플랫폼을 제공한다 (도 6a). 이러한 부분의 라이브러리는 다중-부위 특이적 재조합 부위(Adsembly; 도 6b) 또는 서열 독립적인 심리스(seamless) 클로닝(AdSLIC; 도 6c)을 이용하여 가능한 모든 조합으로 재조합될 수 있다.
- [0220] Adsembly 및 AdSLIC 기술은 독특한 기능을 가진 아데노바이러스의 모듈식 설계 및 생산을 가능하게 한다. 자동화된 고-처리량(high-throughput) 방식에서 바이러스를 설계하고, 제조하고, 테스트하는 능력의 개발은 치료, 진단 및 리서치 연구를 위한 새로운 바이러스의 개발을 가속화하고 확장할 것이다.
- [0221] 클로닝 단계가 한 때 새로운 바이러스 컨스트럭트를 생산하기 위한 병목이었지만, Adsembly 및 AdSLIC의 출현은 그것을 만들어, 바이러스 게놈을 구축하는 능력이 그것들을 테스트하는 능력을 앞질렀다. 동등하게 고처리량 동역학 어세이는 Adsembly 및 AdSLIC 방법을 이용하여 합성 및 개인화된 바이러스 치료 및 진단의 풍부한 잠재력과 많은 내용의 어셈블리를 활용하는 데 중요하다.

- [0223] 하기의 실시예에는 어떤 특정한 특징 및/또는 실시양태를 예시하기 위해 제공된다. 이 실시예들은 기술된 특정 특징 또는 실시양태로 본 개시를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0225] **실시예**
- [0226] **실시예 1: 외인성 ORF를 위한 아데노바이러스 게놈 내 최적 위치의 확인**
- [0227] 이 실시예는 바이러스 동역학 방해없이, 자가-절단 펩타이드 서열과 함께 외인성 ORF가 삽입될 수 있는 아데노바이러스 게놈 내에서 특정 위치의 확인을 기술한다.
- [0228] 아데노바이러스 벡터 내 외인성 유전자의 삽입은 아데노바이러스 캡시드의 크기 용량에 의해 제한된다. 외인성 핵산의 과도한 첨가는 캡시드 내로의 불완전한 게놈 로딩 및 감소된 바이러스 동역학으로 이어진다. 아데노바이러스 게놈 내 제한된 사용 가능한 공간에 의해 제시된 과제에 대한 해결책은 천연 아데노바이러스 ORF 내에서 융합 생성물로서 외인성 오픈 리딩 프레임(ORF)을 위치시키는 것이다. 이 전략은 게놈 내 이미 암호화된 아데노바이러스 프로모터, 5'UTR 및 polyA 테일을 사용한다. 그러나, 천연 아데노바이러스 단백질과 외인성 단백질 사이의 융합체의 발현은 하나 또는 두 단백질 기능에 해로울 수 있고 아데노바이러스 복제 동역학에 현저한 감소로 이어질 수 있다. 실제로, 본원에 개시된 연구는 아데노바이러스 E1A, DNA 중합효소 또는 ADP ORF에 대한 외인성 ORF의 직접적인 융합은 아데노바이러스 복제 동역학을 현저하게 억제함을 입증한다. 또한, 본 발명자들은 이전에 내부 리보솜 도입 부위(internal ribosomal entry site, IRES)을 이용하여 외인성 ORF를 삽입하기 위해 시도했고, 이는 또한 야생형 동역학을 갖는 재조합 바이러스를 생산하지 못했다.
- [0229] 이 실시예는 천연 아데노바이러스 ORF 및 외인성 ORF 사이에 배치된 자가-절단 펩타이드 서열을 이용함으로써 이 문제에 대한 해결책을 설명한다. 단일 mRNA 상에 두 개의 ORF 사이에 위치할 때, 자가-절단 펩타이드 서열의 존재는 리보솜 건너뛰기 및 제2 단백질로부터 분리된 제1 단백질의 방출을 유도한다. 이 실시예에서 생성된 아데노바이러스 컨스트럭트는 이중의 ORF로서 자가-절단 펩타이드 P2A 및 형광 단백질(예, YPet, mCherry)을 이용한다.
- [0230] 하기의 표는 생성된 컨스트럭트의 목록을 제공하고 두 개의 다른 세포주 (293-E4 세포 및 A549 세포)에서 이중의 ORF의 발현 수준 (낮음, 중간 또는 높음) 및 바이러스 복제 동역학의 수준 (낮음, 중간 또는 높음)을 나타낸다.

컨스트럭트(Construct)	명칭 (Designation)	서열번호	발현수준 (Expression Level)	293-E4 세포에 서의 동역학 (Kinetics in 29 3-E4 cells)	A549 세포에 서의 동역학 (Kinetics in A549 cells)
YPet-GS-E1A	CMBT-352		낮음	높음	낮음
YPet-P2A-E1A	CMBT-379	1	높음	높음	중간
E1A-P2A-YPet	CMBT-432	2	중간	높음	중간
E1A-P2A-YPet-PEST	CMBT-569		중간	높음	중간
E1A-P2A-mCherry	CMBT-455		중간	높음	중간
E1B-55k-P2A-YPet	CMBT-456	3	높음	높음	높음
E1B-55k-P2A-mCherry	CMBT-499	4	높음	높음	높음
YPet-P2A-(DNA Poly)	CMBT-530	5	중간	높음	높음
YPet-(DNA Poly)	CMBT-590		중간	없음	테스트 안함
DBP-GS-BFP	CMBT-612		높음	높음	테스트 안함
DBP-P2A-YPet	CMBT-886	6	높음	높음	높음
mCherry-GS-ADP	CMBT-402		높음	중간	테스트 안함
Δ ADP[mCherry]	CMBT-599		높음	높음	중간
YPet-P2A-ADP	CMBT-403	7	높음	높음	높음
ADP-P2A-YPet	CMBT-429	8	높음	낮음	없음
E3-14.7k-P2A-YPet	PCMN-887	9	높음	높음	높음
Fiber-GS-mCherry	CMBT-368		높음	중간	없음
Fiber-GS-tdTomato	CMBT-369		높음	없음	테스트 안함
YPet-P2A-Fiber	CMBT-407	12	높음	없음	테스트 안함
Fiber-P2A-YPet	CMBT-445	13	매우 높음	중간	없음
Fiber-P2A-BFP	CMBT-632		매우 높음	중간	없음
Fiber-GS-P2A-YPet	CMBT-446		매우 높음	중간	없음
YPet-P2A-E4-ORF2	CMBT-457	10	중간	높음	높음
mCherry-P2A-E4-ORF2	CMBT-633	11	중간	높음	높음

[0231]

[0233]

두 개의 세포 유형에서 "높은" 복제 동역학(즉, 야생형 아데노바이러스에 필적하는 복제 동역학)을 나타내는 컨스트럭트는 치료용 아데노바이러스 컨스트럭트(굵게 표시)를 생성하기 위한 후보 물질로 간주된다. 또한, 상기 파이버-P2A-이종의 ORF(fiber-P2A-heterologous ORF) 컨스트럭트는 바이러스 복제에서 유의한 결함을 나타냈지만, 이종의 단백질의 엄청나게 높은 발현 수준을 나타냈다. 따라서, 이러한 파이버 컨스트럭트는 또한 복제 결함이 있는 아데노바이러스의 맥락에서 치료용 단백질의 높은 수준의 생산을 위한 치료법 적용에 사용될 수 있다.

[0235]

P2A 부위의 직접적인 융합 및 삽입의 비교

[0236]

형광 단백질이 아데노바이러스 ORF에 직접적으로 융합된 몇몇 컨스트럭트가 생성되었다. 특히, 하기의 직접적인 융합체가 생성되었다: YPet-E1A, YPet-(DNA 중합효소(polymerase)) 및 mCherry-ADP.

[0237]

YPet-E1A 아데노바이러스는 바이러스 동역학에 심각한 손상을 나타냈다. YPet과 E1A (YPet-P2A-E1A) 사이의 P2A 부위의 삽입은 바이러스 동역학을 향상시켰지만, 바이러스 동역학을 야생형 수준으로 회복하지 못했다. E1A(E1A-P2A-YPet)의 C-말단에 대한 P2A 및 YPet의 융합을 시험하기 위해 또 다른 컨스트럭트를 생성하였다. 이 컨스트럭트는 바이러스 동역학을 더 향상시켰지만, 야생형 아데노바이러스의 수준으로 동역학을 회복하지 못하였다.

[0238]

YPet-(DNA-poly) 게놈 플라스미드를 형질감염시키려는 여러 시도가 생존 가능한 바이러스를 생산하지 못했다(플라크가 형성되지 않았다). 그러나, DNA 중합효소의 N-말단에 YPet-P2A의 융합(YPet-P2A-(DNA poly)) 상기 표에서 볼 수 있듯이 야생형 동역학을 지닌 바이러스를 생산했다.

[0239] 또한, ADP에 대한 mCherry의 직접적인 융합 (mCherry-ADP)은 현저하게 손상된 동역학을 가진 바이러스를 생산했다. 그러나, mCherry ORF와 ADP ORF 사이에 P2A 부위의 삽입은 야생형 동역학을 가진 바이러스 (mCherry-P2A-ADP)를 만들었다. 다른 형광 단백질을 이용하여 동일한 결과를 얻었다; YPet-P2A-ADP 컨스트럭트는 야생형 바이러스 동역학을 나타냈다. 그러나, ADP의 C-말단 측에 P2A과 이종의 ORF의 배치는 복제되지 않은 바이러스를 생산하였다. 따라서, ADP의 경우, 이종의 ORF는 N-말단에 위치해야 한다.

[0240] 파이버에 대한 직접적인 융합 및 파이버와 이종의 ORF 사이의 P2A 부위의 삽입은 모두 현저하게 손상된 복제 동역학을 가진 바이러스를 생산했다. 그러나, 파이버-P2A-이종의 ORF를 포함하는 재조합 아데노바이러스는 엄청나게 높은 이종의 단백질의 발현 수준을 나타냈다 (이 실시예에서 YPet 또는 청색 형광 단백질(BFP)).

[0242] 야생형 바이러스 동역학을 가진 추가적인 컨스트럭트

[0243] 도 7은 6개의 상이한 컨스트럭트의 Ln-슬로프의 비교를 나타낸다: YPet-E1A, YPet-P2A-E1A, E1A-P2A-mCherry, E1B-55k-P2A-YPet, YPet-P2A-ADP 및 Fiber-P2A-YPet. 상기 논의된 바와 같이, E1A에 대한 YPet의 직접적인 융합은 현저하게 손상된 동역학을 가진 바이러스를 생산했고, N-말단(YPet-P2A-E1A) 또는 C-말단(E1A-P2A-mCherry)에 P2A 부위의 첨가는 야생형 수준은 아니지만 바이러스 동역학을 개선했다. 그러나, E1B-55k의 C-말단 (E1B-55k-P2A-YPet) 또는 ADP의 N-말단(YPet-P2A-ADP)에서의 P2A 부위 및 이종의 ORF를 삽입하는 것은 야생형 바이러스 동역학을 가진 재조합 바이러스를 생성했다.

[0244] DBP의 C-말단(DBP-P2A-YPet) 또는 E3-14.7k의 C-말단(E3-14.7k-P2A-YPet)에 P2A 부위 및 이종의 ORF를 가지거나, E4-ORF2의 N-말단 (YPet-P2A-E4-ORF2 및 mCherry-P2A-E4-ORF2)에 P2A 부위 및 이종의 ORF를 가진 컨스트럭트에 대한 바이러스 동역학의 평가는 야생형 복제 동역학을 가진 바이러스를 생산했다.

[0245] 이 데이터의 결과는 적어도 하기의 아데노바이러스 게놈 컨스트럭트가 치료용 아데노바이러스 컨스트럭트를 개발하는 데에 사용될 수 있음을 입증한다:

[0246] E1B-55k-P2A-이종의 ORF

[0247] 이종의 ORF-P2A-(DNA 중합효소)

[0248] DBP-SC-이종의 ORF

[0249] 이종의 ORF-SC-ADP

[0250] E3-14.7k-SC-이종의 ORF

[0251] 이종의 ORF-P2A-E4-ORF2

[0252] fiber-P2A-이종의 ORF

[0254] 치료법의 적용을 위해, 상기 이종의 ORF는 치료용 단백질을 암호화한다.

[0256] 다른 아데노바이러스 항원형

[0257] 이전에 기술된 바이러스 동역학을 측정하는 방법은 모두 세포형 특이적 어세이에 크게 의존하며, 각 아데노바이러스 항원형의 발산(divergent) 향성(tropism) 때문에 항원형 특이적이다. 본원에 개시된 아데노바이러스 동역학 어세이는 임의의 하나의 세포 유형에 의존하지 않으므로 Ad5보다 다른 항원형으로 확장될 수 있다. 모든 아데노바이러스 항원형은 Ad5 E3-14.7k와 동등한 ORF를 포함한다. 따라서, Ad5 E3-14.7k-P2A-YPet (PCMN-887; 서열번호 9)와 동등한 바이러스를 Ad9 (E3-15k를 포함) 및 Ad34 (E3-14.8k를 포함)을 이용하여 생성했다: PCMN-888 (Ad9 E3-15k-P2A-YPet; 서열번호 22) 및 PCMN-889 (Ad34 E3-14.8k-P2A-YPet; 서열번호 23). Ad5 코어 및 Ad9 또는 Ad34의 파이버 샤프트(shaft) 및 손잡이(knob)를 포함하는 키메라 바이러스도 생성되었다. 4개의 재조합 바이러스를 FBVK 어세이에서 293 세포(도 9a), A549 세포(도 9b) 및 U2OS 세포(도 9c)를 이용하여 테스트하였다. 4개의 모든 재조합 바이러스는 이종의 ORF의 삽입으로부터 인한 바이러스 동역학에 대한 최소한의 영향을 가지고 높은 수준의 YPet 발현을 나타냈다.

[0259] **실시예 2: 아데노바이러스 복제 동역학을 평가하는 방법**

[0260] 재조합 아데노바이러스를 어셈블하기 위한 Adsembly 및 AdSLIC 방법은 단기간에 수많은 재조합 바이러스 게놈 및 바이러스를 생성하는 수단을 제공한다. 그러나, 임상적 및 치료법의 용도로 설계된 재조합 아데노바이러스의 복제 동역학을 평가하기 위한 신속하고 고-처리량 방법이 필요하다. 이 실시예는 재조합 아데노바이러스의 바이러스 복제 동역학을 시험하는데 사용될 수 있는 형광-기반의 바이러스 동역학 어세이를 설명한다 (도 3). 어세이는 재조합 아데노바이러스 게놈 플라스미드 또는 재조합 아데노바이러스 입자를 출발 물질로 하여 수행될 수 있다.

[0261] 재조합 아데노바이러스 게놈으로 시작하는 경우, 상기 어세이는 세포를 아데노바이러스 게놈 플라스미드 (예, 실시예 1에서 상기 기재된 것들)로 형질감염시키고 시간에 따른 형광 발현을 모니터링하는 것을 포함한다 (도 4a-4b). 형질감염 조건은 세포의 약 5-10%가 초기에 형질감염되도록 선택된다. 초기에 형질감염되지 않은 세포는 초기 형질감염으로 생성된 바이러스 입자에 의한 2차 감염에 이용 가능하다. 로그-슬로프(Log-slope)는 2차, 3차 및 4차(등) 감염에 기초한 동역학의 척도로 사용되므로, 초기에 형질감염된 세포의 백분율을 알 필요가 없다. 도 4a 및 4b는 재조합 아데노바이러스 게놈 플라스미드로 시작하는 예시적인 바이러스-기반 동역학 어세이를 나타낸다. 이 실시예에서, 48-웰 플레이트가 사용되며, 이는 14개의 다른 바이러스 컨스트럭트(3개씩)의 검사를 동시에 가능하게 한다. 48-웰 플레이트의 상반부(도 4a)는 6개의 다른 바이러스의 3중(triplicate) 웰, 3개의 거짓(mock)-감염된 웰 및 FLUORESBRITETM 비드를 가진 3개의 "블랭크(blank)" 웰을 포함한다. 이는 민감성 편차를 보상한다. 48-웰 플레이트의 하반부(도 4b)는 8개의 다른 바이러스 컨스트럭트의 3중 웰을 포함한다. 일단 세포가 형질감염되면, 플레이트를 지속적인 형광 모니터링을 위한 TECANTM 플레이트 리더기에 배치한다. 수집된 데이터는 각 컨스트럭트의 ln-슬로프 계산을 위해 사용된다 (도 8).

[0262] 상기 어세이는 또한 재조합 바이러스 입자로 세포를 감염시킴으로써 수행될 수 있다. 어세이의 이 버전에서, 세포를 재조합 바이러스 입자로 감염시키고 발색단 발현을 시간에 따라 모니터링한다 (도 5). 어세이의 게놈 플라스미드 버전과 마찬가지로, 시작 바이러스 스탁(stock)의 정확한 역가를 알 필요가 없다. 전형적으로, 희석 시리즈(dilution series)는 도 5에 개시된 바와 같이, 1:100 내지 1:218,700의 범위의 희석 시리즈와 같이 초기 감염을 위해 사용된다. 1:100의 희석은 일반적으로 모든 세포의 감염을 초래하지만, 1:218,700의 희석은 일반적으로 매우 적은 세포의 초기 감염을 유도한다. 이 실시예에서, 96-웰 플레이트를 사용하고, 11개의 상이한 바이러스 컨스트럭트를 8개의 상이한 희석액 (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24,300, 1:72,900 및 1:218,700)에서 동시에 시험한다. 플레이트는 또한 4개 웰의 거짓-감염된 세포 및 4개 웰의 FLUORESBRITETM 비드를 포함한다. 일단 세포가 감염되면, 플레이트를 지속적인 형광 모니터링을 위해 TECANTM 플레이트 리더기에 배치한다. 수집된 데이터는 각 컨스트럭트의 ln-슬로프를 계산하기 위해 사용된다 (도 8).

[0263] TECANTM 플레이트 리더기는 또한 (CO₂ 및 O₂ 수준뿐만 아니라 적절한 온도를 유지하는) 배양 기능을 제공한다. ln-슬로프를 계산하기 위해 15분마다 데이터 포인트를 취한다. 이러한 방법을 사용하여, 다양한 바이러스 사이 및 다른 세포 유형 사이의 동역학을 신속하고 효율적으로 비교할 수 있다. 예를 들어, 특정 재조합 아데노바이러스가 종양살상(oncolytic) 바이러스로서 치료용으로 사용될 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 이 어세이는 종양 세포에서 높은 복제 동역학을 나타내지만, 비-종양 세포에서 트린 바이러스 동역학을 나타내는 바이러스를 발견하는데 이용될 수 있다. 또한, 재조합 바이러스의 바이러스 동역학은 이 어세이에서 관심 종양 세포 유형을 감염시키거나 형질감염시킴으로써 평가될 수 있다.

[0265] **로그-슬로프(log-slope) 계산**

[0266] 로그-슬로프를 측정하기 위해, 형광 강도 대 시간의 선형 플롯을 각 시간 포인트에서 측정된 형광 강도의 자연 로그를 취하여 세미-로그 플롯으로 변환시킨다. 형광 강도는 바이러스 복제 동안 지수의 성장을 나타내기 때문에, ln (형광 강도) 대 시간을 플로팅할 때, 이 변환은 직선을 나타낸다. 그런 다음 이 직선을 표준 최소-제곱법을 사용하여 맞춘다. 이 피팅에 의해 생성된 결과 슬로프는 형광 대 시간의 ln-슬로프이고, 따라서 바이러스 성장 대 시간의 ln-슬로프이다. 방정식은 아래와 같다.

[0268] $FI(t) = F_0 e^{\alpha(t-t_0)}$; 여기서 FI는 측정된 형광 강도이고, t는 시간이며, F_0 은 시간 = t_0 일 때의 초기 형광 강도이고, α 는 ln-슬로프이다.

[0270] 양 변에 자연 대수를 취하라:

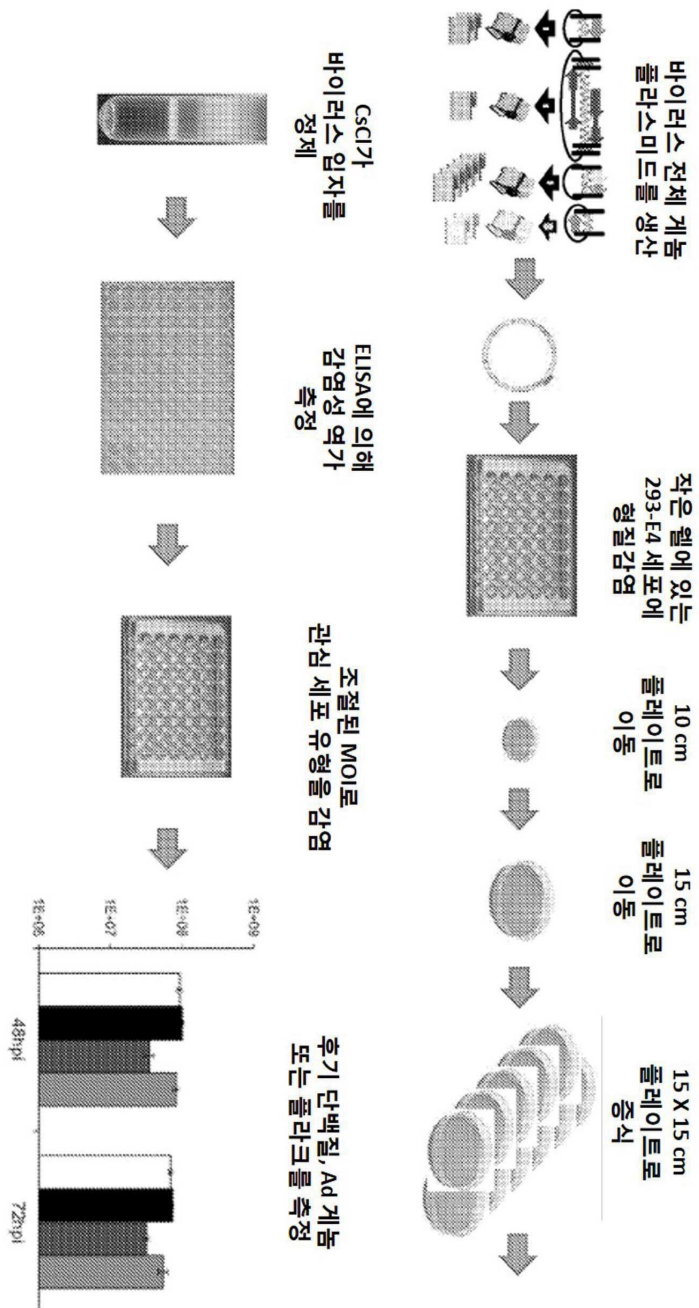
[0271] $\ln[FI(t)] = \ln[F_0 e^{\alpha(t-t_0)}] = \ln(F_0) + \alpha(t-t_0)$

[0273] 우변은 이제 α 의 ln-슬로프를 가진 직선 방정식이다.

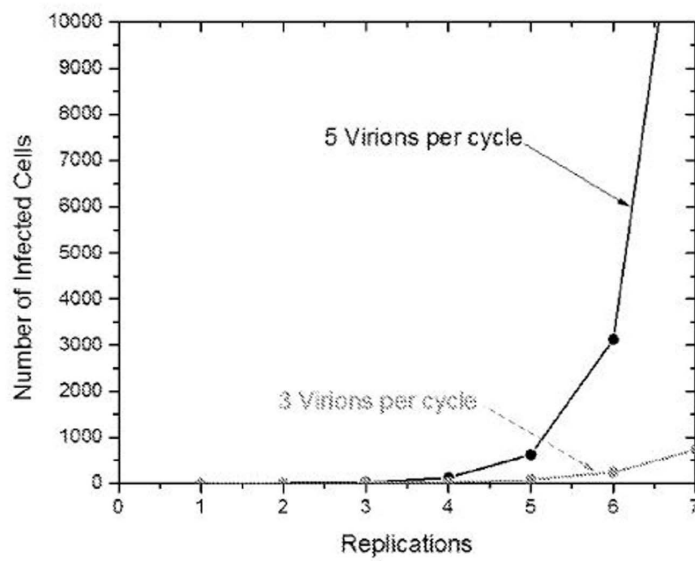
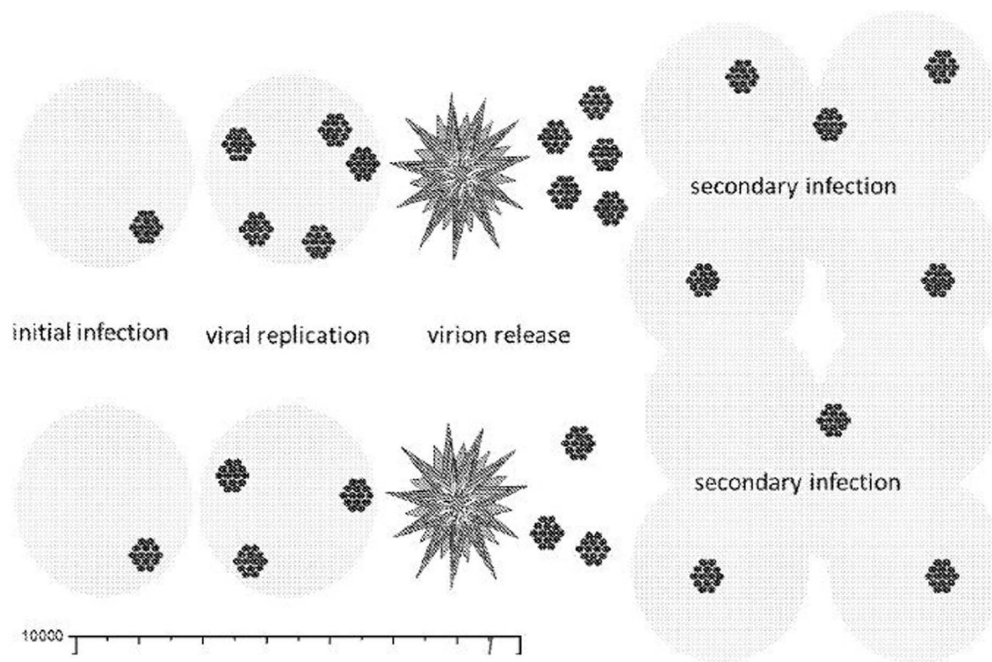
[0274] 본 개시의 원리에 대한 많은 가능한 실시양태가 적용될 수 있다는 관점에서, 도시된 실시양태는 오직 본 발명의 실시예일 뿐이고 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 받아들여서는 안된다. 오히려, 본 발명의 범위는 하기 청구 범위에 의해 정의된다. 따라서 우리는 이 청구범위의 범위 및 사상 내에서 나오는 모든 것을 우리의 발명으로 청구한다.

도면

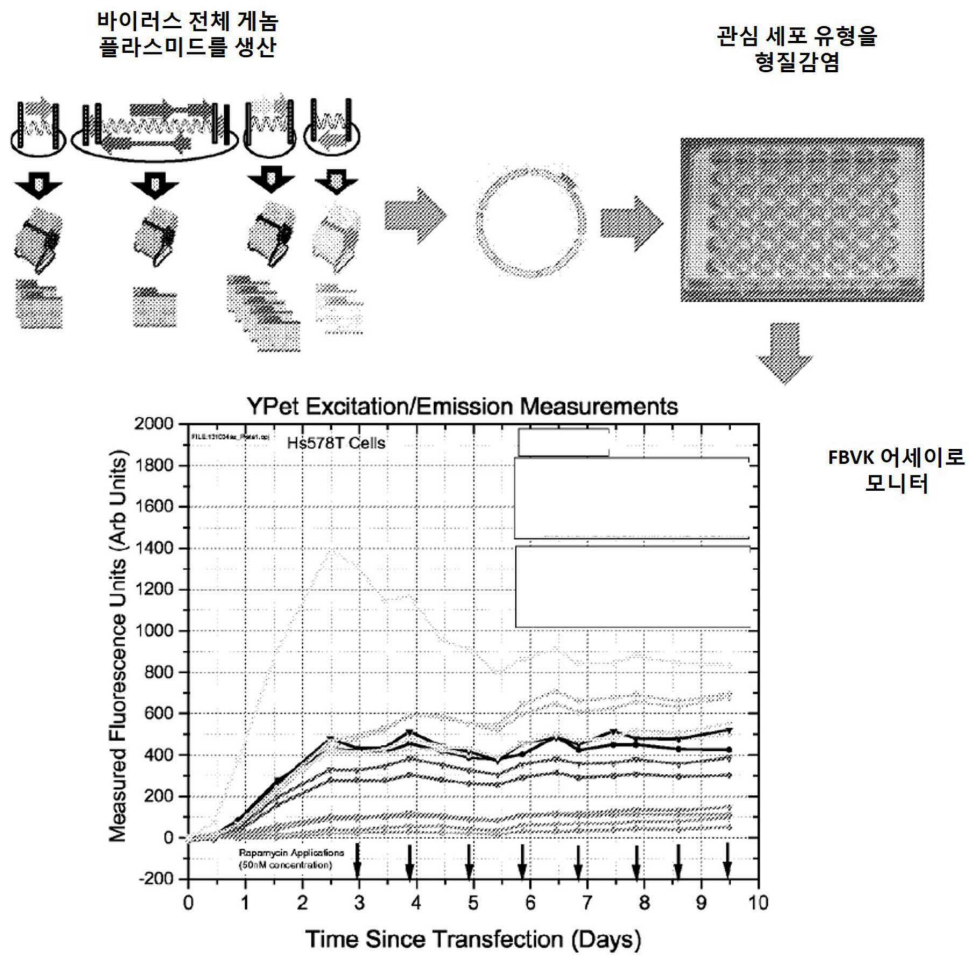
도면1



도면2



도면3



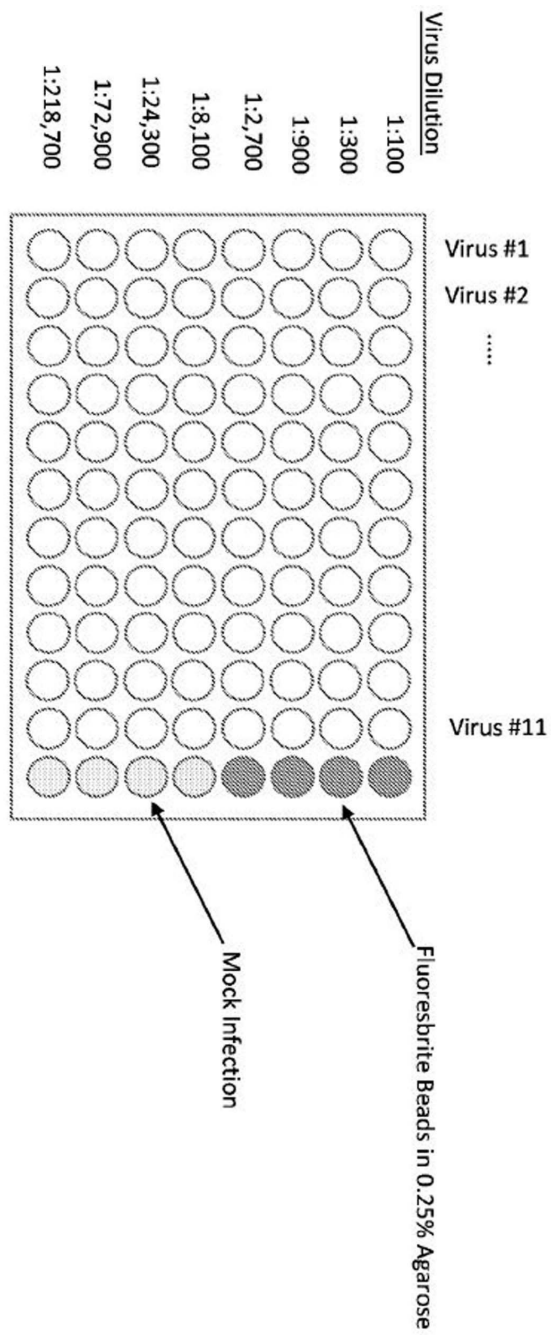
도면4a

Date: 140509	1	2	3	4	5	6	7	8
48 WELL PLATE NO: 2								
Upper Half								
Ratio of Xtreme Gene to DNA (ul : ug): 2								
Dilution factor for Xtreme Gene to media: 0.03								
Source DNA concentration (ng/ul):	77.0	107.0	138.0	110.0	165.0	94.0	0.0	N/A
Mass of DNA per tube A (ng):	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	N/A
Volume of DMEM + 0% FBS per tube A (ul):	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	N/A
Volume of Xtreme Gene solution per tube A (ul):	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	N/A
Volume of DNA per tube A (ul):	26.0	18.7	14.5	18.2	12.1	21.3	26.0	N/A
Concentration of DNA in tube A (ng/ul):	12.2	12.8	13.2	12.9	13.4	12.6	12.2	N/A
Total volume in tube A (ul):	163.3	156.0	151.8	155.5	149.5	158.6	163.3	N/A
	Vortex							
	Incubate at room temperature for 15-30 minutes							
Volume of DMEM + 2% FBS per tube B (ul):	557.1	563.5	567.2	563.9	569.2	561.2	557.1	N/A
Volume of tube A added to tube B (ul):	142.9	136.5	132.8	136.1	130.8	138.8	142.9	N/A
Effective Percentage FBS:	1.59	1.61	1.62	1.61	1.63	1.60	1.59	N/A
Total volume in tube B (ul):	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	N/A
	Vortex							
Total DNA needed (ng):	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	0.0	N/A
Mass of DNA per well (ng):	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	0.0	N/A
Volume per well (ul):	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	N/A
	1	2	3	4	5	6	7	8
Total volume in wells (ul):	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	0
(Media after trans: DMEM + 10% FBS)	B	1300	1300	1300	1300	1300	1300	0
	C	1300	1300	1300	1300	1300	1300	0

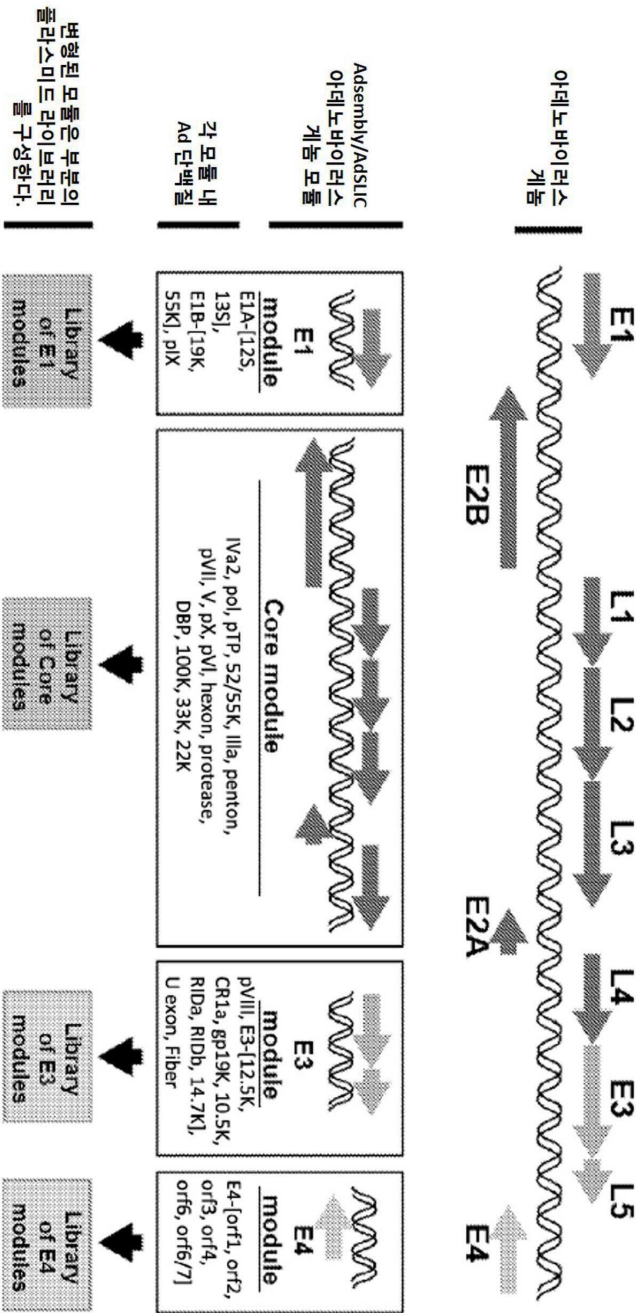
도면4b

Date: 140509	1	2	3	4	5	6	7	8
48 WELL PLATE NO: 2								
Lower Half								
Ratio of Xtreme Gene to DNA (ul : ug): 2								
Dilution factor for Xtreme Gene to media: 0.03								
Source DNA concentration (ng/ul):	106.0	188.0	314.0	305.0	304.0	101.0	103.0	187.0
Mass of DNA per tube A (ng):	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0	2000.0
Volume of DMEM + 0% FBS per tube A (ul):	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3	133.3
Volume of Xtreme Gene solution per tube A (ul):	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Volume of DNA per tube A (ul):	18.9	10.6	17.5	19.0	19.2	19.6	19.4	10.7
Concentration of DNA in tube A (ng/ul):	12.8	13.5	12.9	12.8	12.8	12.7	12.8	13.5
Total volume in tube A (ul):	156.2	148.0	154.9	156.4	156.6	157.1	156.8	148.0
	Vortex							
	Incubate at room temperature for 15-30 minutes							
Volume of DMEM + 2% FBS per tube B (ul):	563.3	570.5	564.5	563.2	563.0	562.5	562.8	570.5
Volume of tube A added to tube B (ul):	136.7	129.5	135.5	136.8	137.0	137.5	137.2	129.5
Effective Percentage FBS:	1.61	1.63	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.63
Total volume in tube B (ul):	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0	700.0
	Vortex							
Total DNA needed (ng):	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0	1750.0
Mass of DNA per well (ng):	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0
Volume per well (ul):	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
	1	2	3	4	5	6	7	8
Total volume in wells (ul):	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300
(Media after trans: DMEM + 10%FBS)	E							
	F							

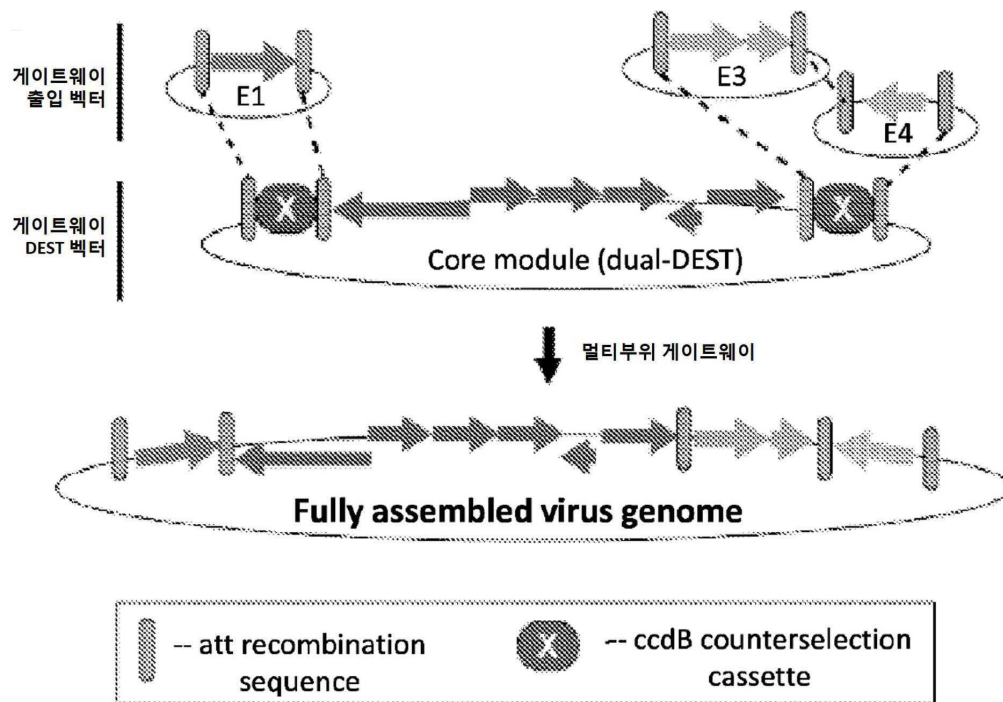
도면5



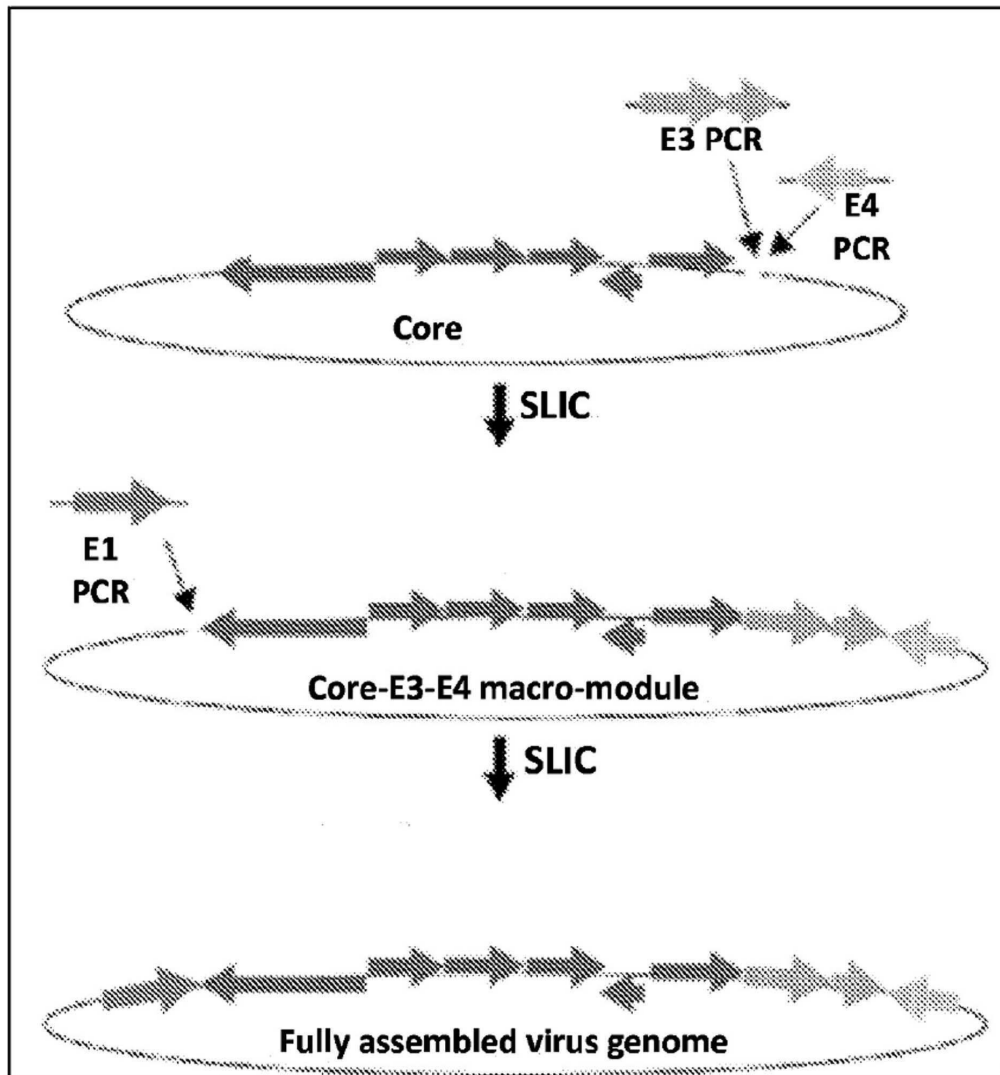
도면6a



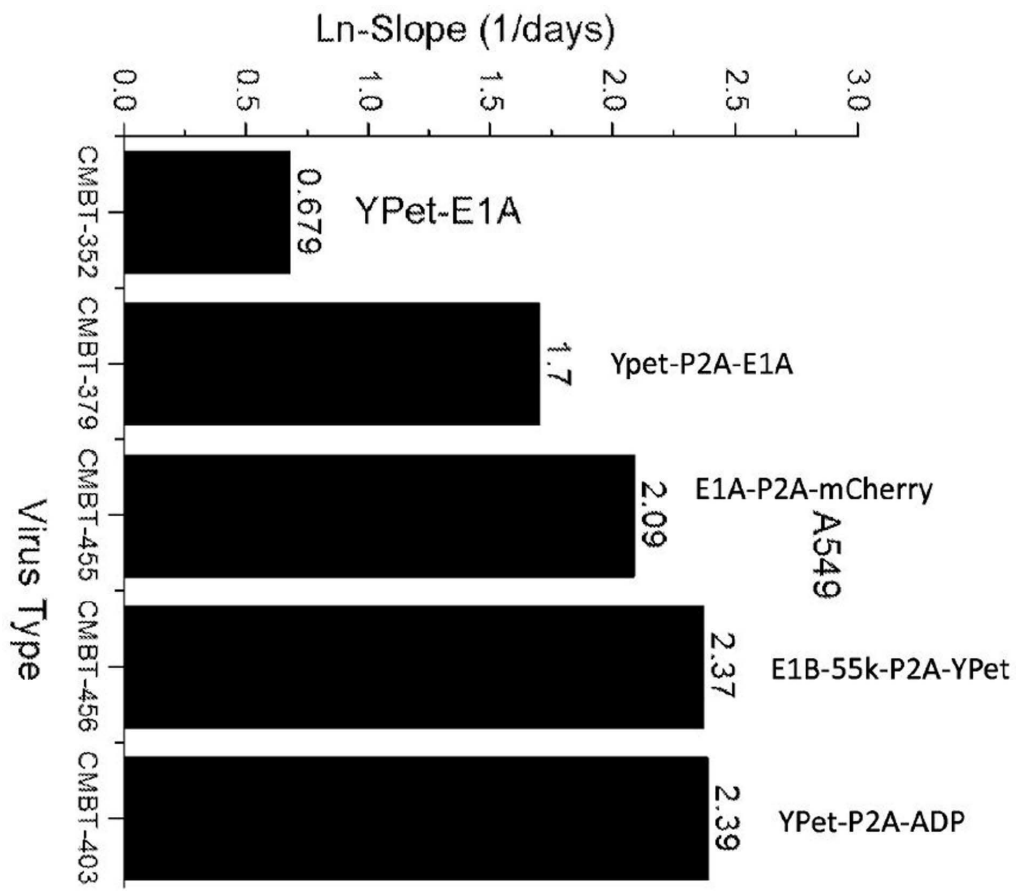
도면6b



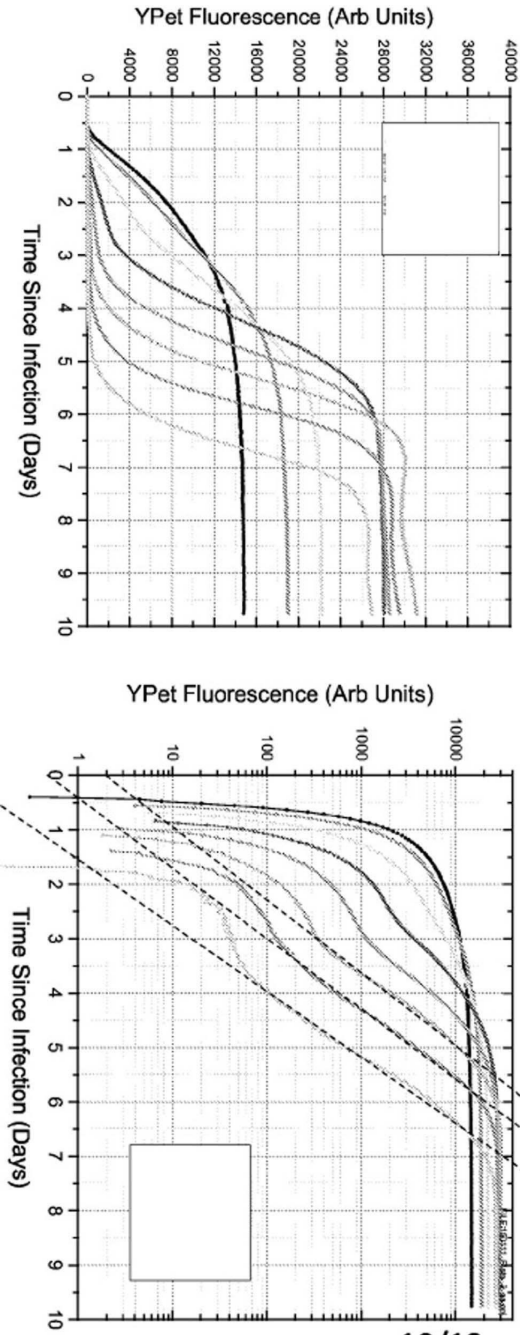
도면6c



도면7



도면8

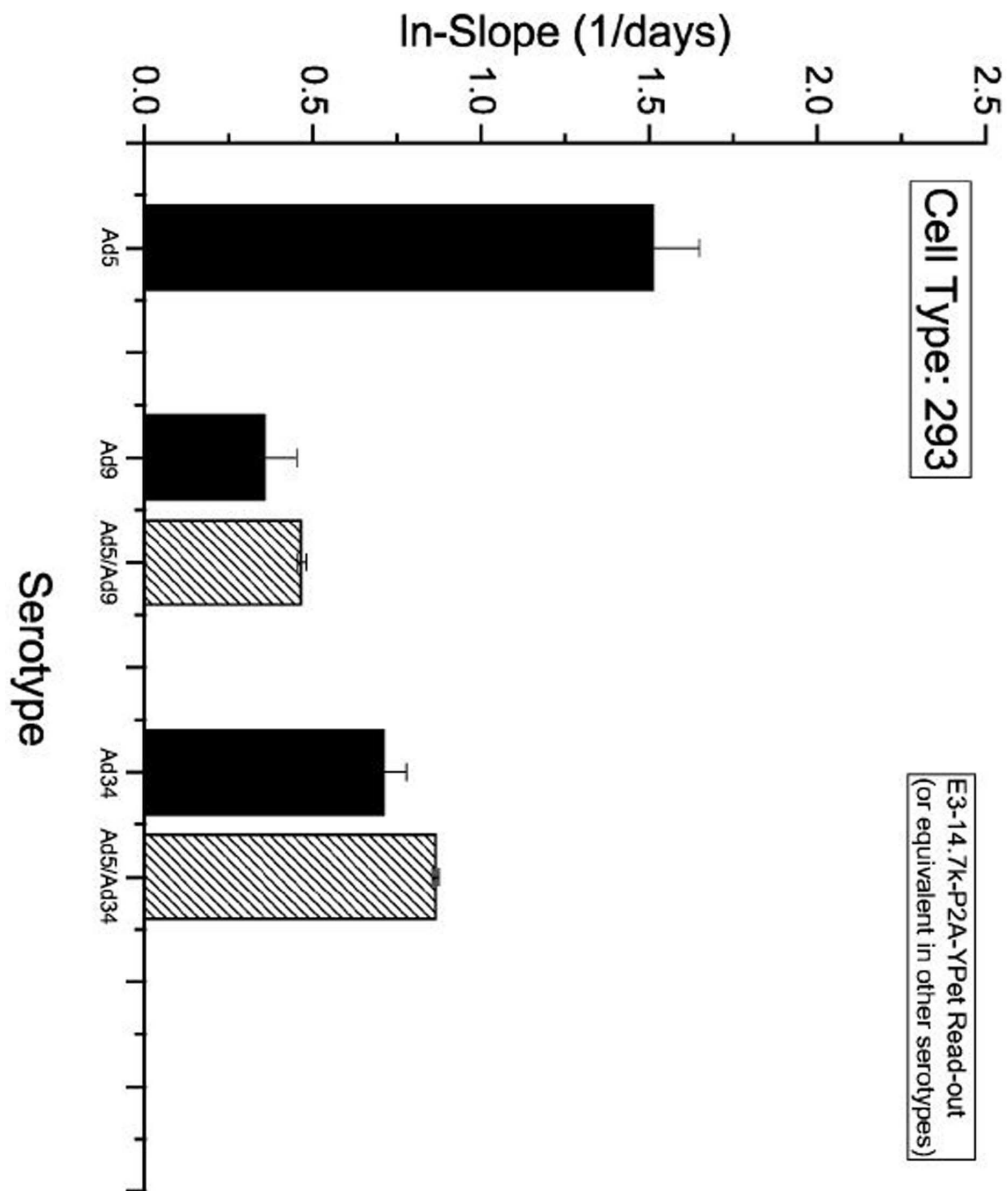


Kinetics Data Analysis and Interpretation

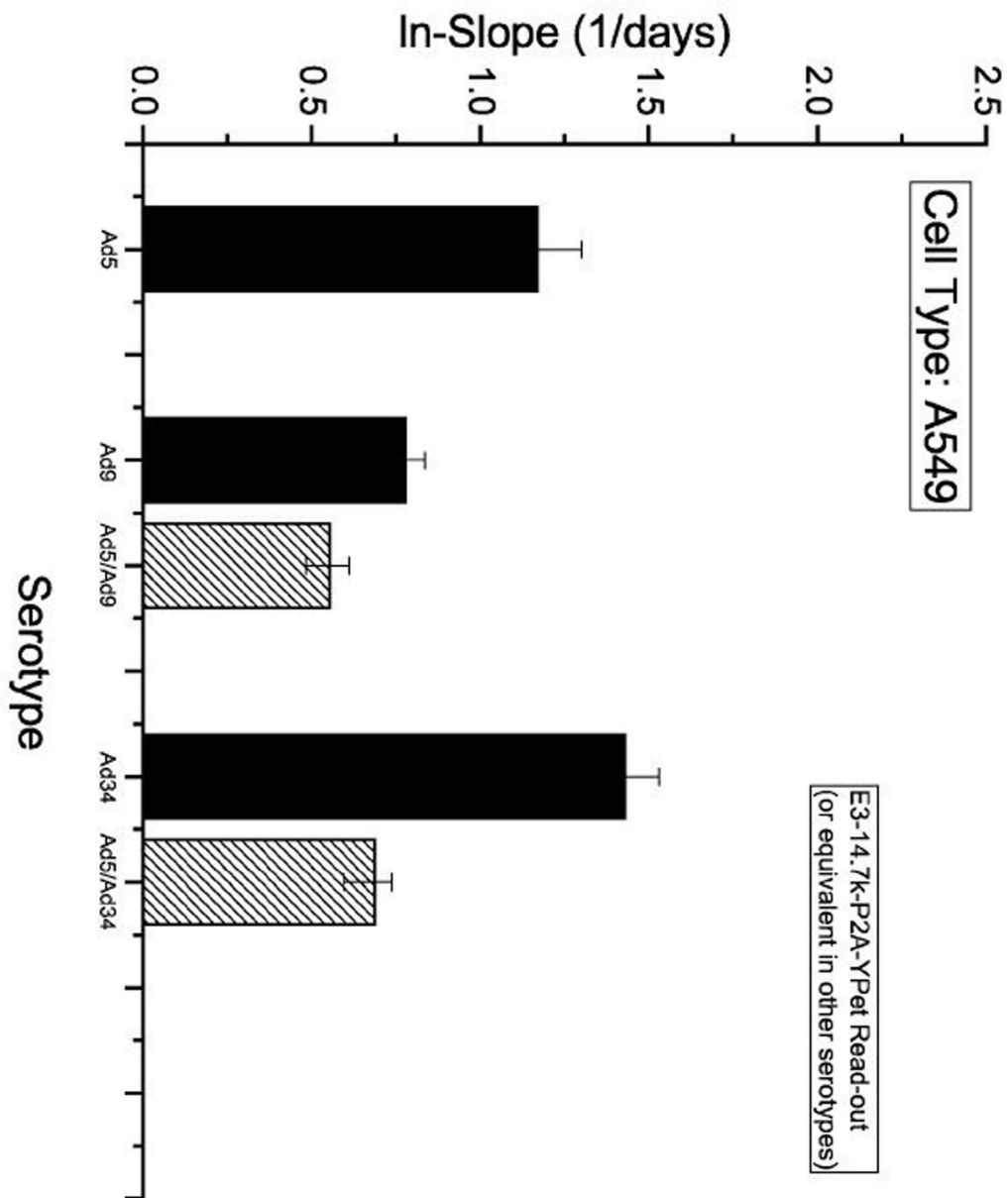
- Fluorescence measured over multiple viral replication cycles
- Semi-log graph provides ln-slope
 - Similar analysis to yeast or bacteria growth curves
- Kinetics across viruses and cell lines can be compared

$$F(t) = Ae^{\alpha(t-t_0)} \quad \longrightarrow \quad \ln[F(t)] = \ln(A) + \alpha t - \alpha t_0$$

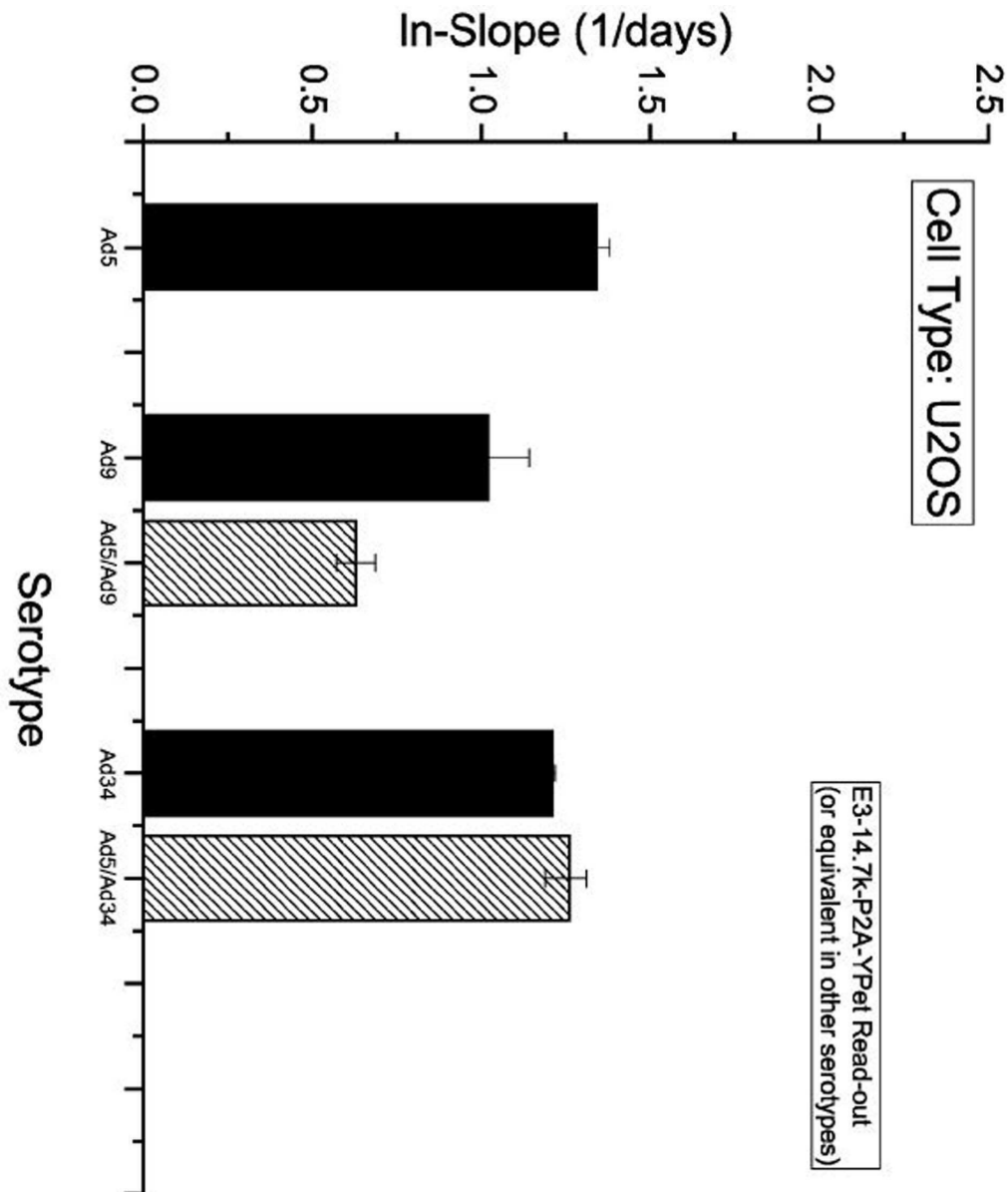
도면9a



도면9b



도면9c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.