



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월09일
(11) 등록번호 10-2475845
(24) 등록일자 2022년12월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/225 (2006.01) A61K 35/768 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07C 69/60 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/225 (2013.01)
A61K 35/768 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7016003
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월23일
심사청구일자 2020년06월03일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월03일
- (65) 공개번호 10-2020-0085816
- (43) 공개일자 2020년07월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2018/051492
- (87) 국제공개번호 WO 2019/100163
국제공개일자 2019년05월31일
- (30) 우선권주장
62/590,456 2017년11월24일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20120230958 A1*
Molecular Cancer Therapeutics, 16(3),
529-529, 2017.*
Molecular Therapy, 25(8), 1900-1916, 2017.*
Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm, 3,
e203/1-2, 2016.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
오타와 하스피털 리서치 인스티튜트
캐나다 케이1에이치 8엘6 온타리오, 오타와 스피
스 로드 501
- (72) 발명자
디알로 장 시몬
350 트워드스무어 애비뉴, 오타와, 온타리오 K1Z
5N4 캐나다
셀맨 모하메드
1519 샤플로 앤아버, 미시간 48103 미국
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 태웅

전체 청구항 수 : 총 17 항

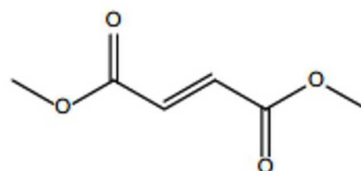
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 성장, 확산 또는 암 살상 및 면역치료 효능을 향상시키기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본원에는 푸마르산 및 말레산 함유 화합물, 이 화합물을 포함하는 조성물, 그리고 세포, 구체적으로 암세포 및 종양 세포에서 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 성장, 확산 또는 역가를 향상시키기 위하여 이러한 화합물을 사용하는 방법이 제공된다. 이 화합물과 조성물을 투여함으로써 대상체에서 종양 또는 암을 치료하는 방법도 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



푸마르산디메틸 (DMF)

(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07C 69/60 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2710/10332 (2013.01)

C12N 2710/10351 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

C12N 2740/16134 (2013.01)

(72) 발명자

아루라난담 로잔

151 위스퍼링 윈즈 웨이, 올리언스, 온타리오 K1W

0B6 캐나다

폴베스 니콜 엘리스

805 스미스로드, 오타와, 온타리오 K1G 1P2 캐나다

크리시난 랍야

1160 메도우크로프트 크레센트, 오타와, 온타리오

K1J 1A8 캐나다

명세서

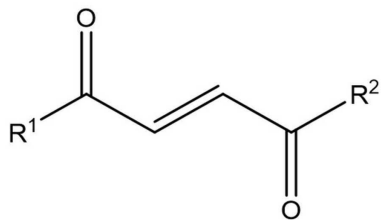
청구범위

청구항 1

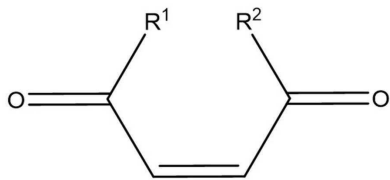
하기 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물로서, 무한 증식된 세포, 암세포 또는 종양 세포에서 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 성장, 확산 또는 역가를 향상시키기 위한 조성물로서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, MG-1과 같은 마라바 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 뎅기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 랩도바이러스이거나, 이의 조작된 (engineered) 변이체인 조성물:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기에서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 OH 또는 (C₁₋₁₀)알콕시이고,

또 상기에서 R1 및 R2 중 하나가 OH일 때, R1 및 R2 중 다른 하나는 OH가 아님.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 유전적으로 인터페론 감수성으로 만들어진 인터페론 비 감수성 바이러스, 약독화된 인터페론 감수성 바이러스, 인터페론 감수성 암 살상 바이러스 또는 비 복제성 인터페론 감수성 바이러스인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 암세포 또는 상기 종양 세포내 상기 인터페론 감수성 암 살상 바이러스의 암 살상 활성, 세포 사멸 활성 또는 세포독성 활성이 향상 또는 증가되는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 암세포 또는 상기 종양 세포내 상기 인터페론 감수성 암 살상 바이러스의 면역치료 활성은, 바이러스에 의해 암호화되는 이식유전자 또는 사이토카인이 상향 조절되는 것을 비롯하여 향상, 증가 또는 증강되는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 푸마르산디메틸(DMF), 푸마르산디에틸(DEF), 말레산디메틸(DMM), 말레산디에틸(DEM), 말레산모노에틸, 말레산모노메틸, 푸마르산모노에틸 또는 푸마르산모노메틸(MMF)이거나, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 수화물인 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 인터페론 감수성 암 살상 바이러스는 수포성 구내염 바이러스인 램도바이러스 또는 이의 조작된(engineered) 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 특정의 성장 조건하에서 선택된 바이러스, 1개 이상의 선택압이 적용된 바이러스, 당 분야에 공지된 재조합 기법이 사용되어 유전적으로 변형된 바이러스 또는 이의 임의의 조합인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 세포는 포유류인 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 세포는 인간인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 무한증식된 세포, 암세포 또는 종양 세포는 293-T 세포, BHK21 세포, MDCK 세포, Vero 세포, HEK-293 세포, EB-66 세포, EB-bX 세포, PER-.C6 세포, AGE1.CR 세포, Age1.CS 세포, Age1.HN 세포, Age1.RO 세포, QOR2/2E11 세포, UMNSAH-DF1 세포, CHO 세포, 하이브리도마 세포, sf9 세포, R4 세포. 293-T 세포, BHK21 세포 또는 MDCK 세포와, 림프모구성백혈병, 골수성백혈병, 부신피질암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암,

충수암, 성상세포종, 비정형 기형종/간상종양, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 골육종, 악성 섬유성조직구증, 뇌간신경교종, 뇌종양, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성신경교종, 두개인두종, 뇌실막모세포종, 수모세포종, 중간 분화의 송과체 실질종양, 천막위 원시 신경외배엽종양 및 송과체 모세포종, 시각경로 및 시상하부 신경교종, 척수 종양, 유방암, 기관지종양, 버킷 림프종, 유암종, 중추신경계림프종, 자궁경부암, 척색종, 만성 림프구성백혈병, 만성 골수성백혈병, 만성 골수증식성장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 배아성종양, 자궁내막암, 뇌실막모세포종, 뇌실막종, 식도암, 두개의생식세포종양, 성선의생식세포종양, 간외담관암, 눈암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위장암, 위장관 유암종, 위장관 간질종양, 위장관 간질세포종양, 생식세포종양, 두개의, 성선의, 난소, 융모상피성 종양, 신경교종, 모양세포백혈병, 두경부암, 간세포암, 조직구증, 랑게르한스세포암, 호지킨림프종, 하인두암, 섬세포종양, 카포시육종, 신장암, 후두암, 림프구성백혈병, 모양세포백혈병, 구순 및 구강의 암, 간암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 뼈의 악성 섬유성 조직구증 및 골육종, 수모세포종, 수질상피종, 흑색종, 안내 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 전이성 편평경부암, 구암, 다발성내분비선종증, 다발성골수종/형질세포신생물, 비강 및 부비강 암, 비인두암, 신경모세포종, 구강암, 구인두암, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체 실질종양, 송과체 모세포종 및 천막위 원시 신경외배엽종양, 뇌하수체종양, 형질세포 신생물형성/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 원발성 중추신경계림프종, 전립선암, 직장암, 신세포암, 신우 및 요관 암, 이행세포암, 기도암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 자궁육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포암종, 편평경부암, 위암, 천막위 원시 신경외배엽종양, T 세포 림프종, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 영양막종양, 요도암, 자궁암, 자궁내막암, 자궁육종, 질암, 외음부암 또는 빌름 종양의 세포를 포함하는 조성물.

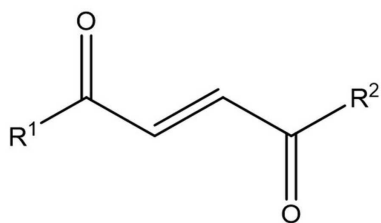
청구항 12

하기 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 인터페론 감수성 바이러스를 대상체에 투여하기 이전이나 이후 또는 동시에 그 대상체에 투여하기 위한 조성물로서,

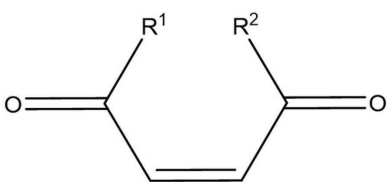
상기 인터페론 감수성 바이러스는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, MG-1과 같은 마라바 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 탕기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렐티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 랩도바이러스이거나, 이의 조작된 (engineered) 변이체인,

종양 또는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양 또는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기에서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 OH 또는 (C₁₋₁₀)알콕시이고,

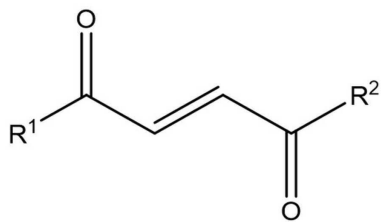
또 상기에서 R1 및 R2 중 하나가 OH일 때, R1 및 R2 중 다른 하나는 OH가 아님.

청구항 13

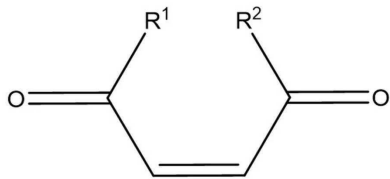
적어도 하나의 하기 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물 또는 그것의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고 또한 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 인터페론 감수성 바이러스의 시험관 내(in vitro) 바이러스 증강에 사용하기 위한 조성물로서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, MG-1과 같은 마라바 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 탕기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 램도바이러스이거나, 이의 조작된(engineered) 변이체인 조성물:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기에서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 OH 또는 (C₁₋₁₀)알콕시이고,

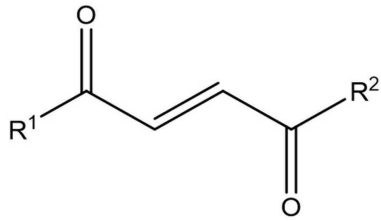
또 상기에서 R1 및 R2 중 하나가 OH일 때, R1 및 R2 중 다른 하나는 OH가 아님.

청구항 14

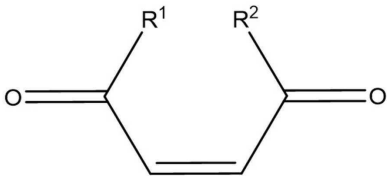
인터페론 감수성 바이러스와 적어도 하나의 하기 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물이나 그것의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 성장, 확산 또는 역가를 향상시키기 위한 조성물로서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, MG-1과 같은 마라바 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 탕기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 램도바이러스이거나, 이의 조작된(engineered) 변이체인 조성물:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기에서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 OH 또는 (C₁₋₁₀)알콕시이고,

또 상기에서 R1 및 R2 중 하나가 OH일 때, R1 및 R2 중 다른 하나는 OH가 아님.

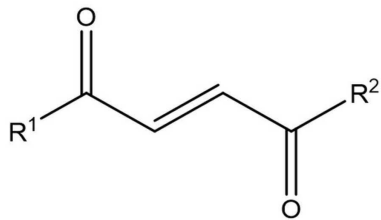
청구항 15

무한증식된 세포, 암세포 또는 종양 세포를, 적어도 하나의 하기 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물이나 그것의 약학적으로 허용 가능한 염의 존재하에 적당한 배지에서 인터페론 감수성 바이러스 또는 이의 구성성분과 함께 배양하는 단계; 및

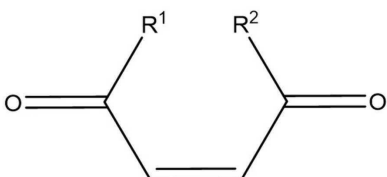
그 무한증식된 세포, 그 암세포 또는 그 종양 세포에서 인터페론 감수성 바이러스를 제조하는 단계를 포함하는, 인터페론 감수성 바이러스를 제조하기 위한 방법으로서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, MG-1과 같은 마라바 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 탕기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 랩도바이러스이거나, 이의 조작된 (engineered) 변이체인 방법:

[화학식 I]



[화학식 II]



상기에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 OH 또는 (C_{1-10}) 알콕시이고,

또 상기에서 $R1$ 및 $R2$ 중 하나가 OH일 때, $R1$ 및 $R2$ 중 다른 하나는 OH가 아님.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 약독화된 바이러스, 유전적으로 변형된 바이러스, 비 복제성 바이러스 또는 암 살상 바이러스인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 인터페론 감수성 바이러스는 암 백신을 제조하는데 사용되되, 단 상기 바이러스는 백신이거나, 상기 백신은 상기 바이러스로 감염된 세포를 포함하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

제조된 바이러스는 인터페론 감수성 바이러스 기반 암 유전자치료용 벡터인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인터페론 감수성 바이러스 생산, 감염, 성장 및/또는 확산을 향상시키고/향상시키거나, 암 살상 바이러스의 암 살상 및 면역치료 활성을 증강시키는 화합물, 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전적으로 약독화된 바이러스는 증가하고 있는 생물공학 및 약학 플랫폼의 근간을 이룬다. 유전적으로 약독화된 바이러스는 유전자 조작에 의해 직접 제조될 수 있거나, 또는 유전자 선택을 통해 간접적으로 제조될 수 있다. 제한하고자 하는 것은 아닌 예를 들자면, 약독화는 종 특이적일 수 있는데, 즉 일련의 계대 배양에 의해 하나의 숙주(예컨대 알)에서 성장하도록 순응된 바이러스는 순응불량(maladaptation)을 일으키게 되고, 그 결과 다른 숙주(예컨대 인간)에서의 약독화로 이어진다. 이와 유사하게, 바이러스의 유전적 선택은 암세포 내에서 이루어질 수 있는데, 그 결과 바이러스는 정상 세포에서의 복제에 대해 순응하지 않게 된다. 이와 같이 정상 세포에서 약독화되되, 암세포에서는 최적으로 성장하도록 순응되었거나 또는 유전적으로 조작된 복제성 바이러스는 종종 암 살상 바이러스라 지칭된다. 약독화는 종종 선택 또는 조작된 바이러스가, 대상 숙주 세포의 항 바이러스 방어 기작(단, 이러한 방어 기작의 핵심 매개체는 항 바이러스성 사이토카인 인터페론(IFN)임)을 극복 불가능하게 되는 것을 수반할 것이다. 다양하고 폭넓은 약독화 바이러스가 존재하며, 이러한 약독화 바이러스는 다수의 응용예와 목적을 위해 사용된다. 약독화 바이러스는 약독화 생백신 또는 비활성화 백신 중 어느 하나의 생산에 대해 안전하도록 만들어진 바이러스 균주(예컨대 인플루엔자, 변형 백시니아 앙카라)를 포함한다. 약독화 바이러스는 또한 바이러스 유전자의 부분적 제거(예컨대 아데노바이러스(Adenovirus)) 또는 전체 제거(예컨대 렌티바이러스(Lentivirus) 또는 레트로바이러스(retrovirus)) 중 어느 하나로 말미암아 그 복제가 불가능하게 되어, 바이러스가 자신의 필수 바이러스 유전자/기능을 트랜스 방식(in trans)으로 보충하는 것에 의존하게 되었을 때의(예컨대 공동형질감염된 플라스미드로부터 바이러스 단백질을 발현시키게 되었을 때의) 바이러스 벡터를 포함한다. 이러한 바이러스는 종종 치료적 이식유전자의 몇 가지 형태를 운반하는 유전자치료용 벡터로서 사용된다. 복제 불능 바이러스 또는 복제 결함 바이러스라고 지칭되기도 하는 비 복제성 바이러스는, 비 바이러스 구성성분, 예컨대 제2 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자의 생성을 궁극적으로 유도하는 플라스미드(이에

한정되는 것은 아님)의 도움을 받아 제1 세포에서는 생산될 수 있지만, 추후 제2 세포에서는 복제할 수 없는 바이러스로서 정의된다.

[0003] 암 치료 분야에서 급부상중인 암 살상 바이러스치료법은 지난 10년간 유의미한 가능성을 보여주었다. 소형 RNA 바이러스(예컨대 랩도바이러스(rhabdovirus))로부터 대형 DNA 바이러스(예컨대 폭스바이러스, 포진 바이러스)에 이르기까지 다양하고 폭넓은 바이러스 백본(backbone)을 기반으로 한 암 살상 바이러스(OV) 다수가 현재 임상 실험을 통해 다양한 유형의 암을 치료할 수 있는지에 대해 평가되고 있다. 이러한 형태의 암 치료법에 대한 부푼 기대감에 부응하여 반갑게도 단순 포진 바이러스-1(HSV-1)을 기반으로 한 혁신 신약 OV가 흑색종 치료용으로 2015년 FDA에 의해 승인을 받게 되었다.

[0004] 암 살상 바이러스(OV)는 암세포를 우선적으로 감염시켜 이를 사멸하도록 선택 또는 조작된, 자기 증식성 생물치료 제제이다. OV는 그 활동성이 유효할 때, 암세포의 직접적인 용해에 의해서뿐 아니라, 항암 면역 반응의 후속 발현, 혈관의 활동정지 및 치료적 이식유전자 발현을 통해서도 종양을 없앨 수 있다. 이러한 이유로 OV는 면역 치료제로서 간주된다. OV는 암 선택에 대한 기반으로서 암성 표현형에 고유한 세포 결함을 이용한다. 암성 표현형으로서는 제 기능을 하지 못하는 항 바이러스 반응, 예컨대 I형 인터페론 반응, 면역 회피, 증가한 세포 증식 및 대사, 그리고 누설성(leaky) 종양 혈관조직을 포함한다. 종양발생에 따라 수반되어 조성되는 생물 환경은 유전적으로 약독화된 OV(단, 이러한 OV는 유전적으로 약독화되지 않을 경우 정상 세포에 유해함)의 성장을 지원하기에 매우 적합하다.

[0005] OV의 치유 잠재성과 OV의 비교적 약한 부작용(급성 독감과 유사한 증상)으로 말미암아, OV는 암에 대한 매력적인 치료 수단으로서 자리매김하였다. 그러나 인간을 대상으로 한 몇몇 임상 실험에서 입증된 바와 같이, OV에 대한 임상 반응의 이질성은 넘어야 할 큰 장애물로 남아있다. 이러한 반응의 이질성은, OV의 종양으로의 유효한 전달과 종양내 확산을 방해하는 요인들로 말미암을 수 있다.

[0006] 비록 약독화 바이러스와 암 살상 바이러스는 독립적인 제제로서 작용을 할 수 있고, 작용을 하고 있지만, 다수의 연구는 약리학적 화합물이 사용될 때 바이러스 확산, 전체적인 효능 및/또는 암 살상능이 개선될 수 있음을 보여주었다[1-3]. OV는 또한 종양 세포에 대한 암 살상 효과 이외에도, 종양에 대해 면역 반응을 유도함으로써 항종양 면역성을 증강시킬 수 있다[4-7]. 이러한 면역자극 효과는, 면역자극 유전자가 바이러스 게놈[6-9]에 통합됨으로써 더욱 향상될 수 있으며, 예컨대 T-VEC, 즉 1형 단순 포진 바이러스 기반 OV가 최근 미 식품의약품국(FDA)에 의해 흑색종 치료에 대하여 승인받았다[10-12]. OV와 기타 형태의 면역치료제의 조합은 현재 인간 환자를 대상으로 하는 접근법으로서, 전도유망한 것으로 부상하였다[5-7].

[0007] 푸마르산 에스테르(FAE), 예컨대 푸마르산디메틸(DMF)은 푸마르산의 에스테르 유도체이다[13]. 푸마르산은 미토콘드리아에서 에너지를 발생시키는 기본적인 세포내 과정인 시트르산 회로의 중간체이다. 푸마르산 에스테르(FAE)는 공지의 소염 및 신경보호 효과를 가지는 화합물 군이다[14, 15, 17]. 이에 수반되는 기작들은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 항산화 전사 인자 핵 인자(적혈구 유래 2)-유사 2(NRF2) 경로의 활성화[15], NF-κB의 억제[16], 그리고 글루타치온(GSH)의 기능 고갈(depletion)[18-19]을 통해 매개되는 것으로 생각되고 있다.

[0008] FAE(Fumaderm®, Psorinovo®으로 시판됨)는 건선 치료제로서 독일에서 처음 승인을 받았다. 최근 들어, 푸마르산디메틸(DMF), 즉 Tecfidera®로서 시판되고 있는 FAE는 다발성 경화증의 재발성 형태 및 다발성 경화증의 재발-감퇴성(relapsing-remitting) 형태의 치료에 대해 미 식품의약품국(FDA) 및 유럽 의약청에 의하여 승인을 받았다[20]. DMF의 장기 사용에 대한 임상 연구는 몇몇 임의의 만성 부작용을 규명하지 못하였다[20-22]. 최근의 보고는, DMF는 항암 잠재성을 가지고 있으며, 화학치료법에 대해 종양을 감각화하는 것[26, 29]에 더하여 종양의 성장과 전이를 억제하는 것[23-28]으로 보인다고 제안하고 있다. 더욱이 DMF는 현재 만성 림프구성 백혈병 치료와 피부 T 세포 림프종 치료에 대하여 임상 평가중에 있다(예컨대 NCT02546440, NCT02784834).

[0009] 당 분야에는 바이러스 성장 및 확산을 향상시키는 화합물과 조성물을 찾을 필요가 있다. 당 분야에는 바이러스 치료의 항암 효능을 향상시키는 화합물과 조성물을 찾을 필요도 또한 있다. 더욱이 당 분야에는 시험관내 및/또는 생체내 암세포를 치료하기 위한 신규 방법을 찾을 필요도 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 인터페론 감수성 바이러스 생산, 감염, 성장 및/또는 확산을 향상시키고/향상시키거나, 암 살상 바이러스의 암 살상 활성 및/또는 면역치료 활성을 증강시키는 조성물과 방법에 관한 것이다.

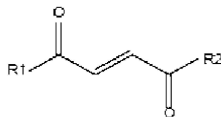
[0011] 본원에 기술된 결과들은 이전에는 보고되지 않았던 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE)의 효과 1가지 이상, 즉 복제성 및 비 복제성 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 성장 및/또는 확산을 향상시키는 능력과; 예를 들어 암세포의 선천적 항 바이러스 반응을 억제하는 것을 수반할 수 있는, 또 다른 내성의 암에서 암 살상 바이러스의 치료 효능을 증가시키는 능력을 관찰한 결과이다.

[0012] 구현예에서, 본원에는 무한증식된 세포, 암세포 또는 종양 세포에서 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 성장, 감염, 확산 또는 역가를 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 무한증식된 세포, 암세포 또는 종양 세포를 인터페론 감수성 바이러스로 감염시키기 이전, 동시 또는 이후에, FMAE 화합물을 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0013] 다른 구현예에서, 본원에는 암세포 또는 종양 세포에서 암 살상 바이러스의 생산, 감염, 확산, 역가 또는 암 살상 활성을 향상, 증가 또는 증강시키는 방법으로서, 푸마르산디메틸(DMF), 푸마르산디에틸(DEF), 말레산디메틸(DMM), 말레산디에틸(DEM), 말레산모노에틸, 말레산모노메틸, 푸마르산모노에틸, 푸마르산모노메틸(MMF) 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 FMAE 함유 화합물 1개 이상을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

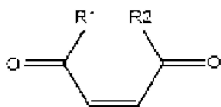
[0014] 임의의 구현예에서, 바이러스 향상(viral enhancement)을 도모하기 위한 화합물은, R1 및 R2가 동일하거나 상이할 수 있고, 예를 들어 OH, O⁻ 및 (C₁₋₆)알콕시로부터 독립적으로 선택될 수 있는, 하기 화학식 I, 화학식 II에 의해 정의되는 화합물, 이의 조합, 푸마르산 에스테르 또는 말레산 에스테르, 이의 약학적으로 허용 가능한 부가염, 또는 이의 라세미 또는 입체화학적 이성체 형태, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다:

[0015] [화학식 I]



[0016]

[0017] [화학식 II]



[0018]

[0019] 또 다른 비제한적 구현예에서, R1 및 R2는 동일하거나 상이할 수 있고, 선형, 분지형 또는 사이클릭 포화 또는 불포화 (C₁₋₂)알콕시 또는 (C₃₋₂₀)알콕시로부터 독립적으로 선택될 수 있으며, 상기 라디칼은, 예컨대 할로겐, 하이드록시, (C₁₋₄)알킬, 니트로 또는 시아노로 선택적으로 치환될 수 있는, 화학식 I 및/또는 화학식 II에 의해 정의되는 화합물 1개 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 임의의 비제한적 구현예에서, 화학식 I 및/또는 화학식 II의 화합물은 또한 에놀 형, 케토 형 및 이의 혼합물을 비롯하여 몇몇 호변이성체 형태로서 존재할 수 있다. 따라서 본원에 묘사된 화학 구조는 있을 수 있는 호변이성체 형태 모두를 포함한다.

[0021] 비제한적 구현예에서, 화학식 I 및/또는 화학식 II의 화합물로부터 선택된 화합물은 동위원소 표지화된 화합물, 즉 1개 이상의 원자가 자연에서 통상적으로 발견되는 원자량과 상이한 원자량을 가지는 화합물을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예로서는 ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0022] 또 다른 비제한적 구현예에서, 예시적 화합물로서는 R1 및 R2 둘 다 OH 또는 O⁻인, 화학식 I 및/또는 화학식 II에 의해 정의되는 화합물을 포함할 수 있다.
- [0023] 임의의 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 화합물, 또는 본원에 기술된 바와 같은 화합물 1개 이상의 조합, 또는 본원에 기술된 바와 같은 화합물 적어도 1개를 포함하는 조성물은, 세포가 바이러스로 감염되기 이전, 동시 또는 이후에 세포에 투여될 수 있다. 그 다음, 세포, 1개 이상의 화합물 및 바이러스는 성장 또는 배양될 수 있다.
- [0024] 본원에 기술된 방법 또는 방법들 중 임의의 하나에 관한 또 다른 구현예에서, FMAE 함유 화합물 또는 이러한 화합물들의 조합은 화합물(들)과, 1개 이상의 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물 중에 존재할 수 있다.
- [0025] 또 다른 구현예에서, 본원에는 FMAE 함유 화합물 1개 이상과, a) 인터페론 감수성 바이러스, 유전적으로 변형된 인터페론 감수성 바이러스, 약독화 인터페론 감수성 바이러스, 암 살상 인터페론 감수성 바이러스, 인터페론 감수성 바이러스 기반 암 백신 또는 암 유전자치료용 벡터, b) 암세포 1개 이상, c) 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, d) 비 암세포; e) 세포 배양 배지; f) 1개 이상의 암 치료제 중 하나 이상; 또는 a) ~ f)의 임의의 조합을 포함하는 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한 a) ~ f) 중 임의의 하나 또는 이의 조합이 조성물이나 키트로부터 특별히 배제된 구현예들도 고려한다. 임의의 구성성분 또는 구성성분들의 군은 원한다면 배제될 수 있다.
- [0026] 또 다른 구현예에서, 본원에는 FMAE 함유 화합물 1개 이상과, a) 인터페론 감수성 바이러스, 유전적으로 변형된 인터페론 감수성 바이러스, 약독화된 인터페론 감수성 바이러스, 암 살상 인터페론 감수성 바이러스, 인터페론 감수성 바이러스 기반 암 백신 또는 암 유전자치료용 벡터, b) 암세포 1개 이상, c) 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, d) 비 암세포, e) 세포 배양 배지, f) 암 치료제 1개 이상, g) 세포 배양 평판 또는 다중 웰 디쉬(dish), h) 화합물을, 세포, 배지 또는 대상체에 전달하는 장치, i) 키트 내 화합물 또는 임의의 구성성분 사용에 관한 지침 중 하나 이상; 또는 a) ~ i)의 임의의 조합을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 본 발명은 또한 a) ~ i) 중 임의의 하나 또는 이의 조합이 특별히 배제된 키트도 고려한다.
- [0027] 다른 구현예에서, 세포는 생체내 또는 시험관내 암세포일 수 있다.
- [0028] 추가의 구현예에서, 생체내 암세포는 포유류 대상체로부터 유래할 수 있다.
- [0029] 또 다른 추가의 구현예에서, 포유류 대상체는 인간 대상체일 수 있다.
- [0030] 다른 구현예에서, 세포는 시험관내 비 암세포일 수 있다.
- [0031] 또 다른 구현예에서, 본원에는 암세포 또는 종양 세포에서 암 살상 인터페론 감수성 암 살상 바이러스의 암 살상 활성을 증가시키는 방법으로서, 암 살상 바이러스 감염 이전, 동시 또는 이후에 FMAE 함유 화합물, 또는 FMAE 함유 화합물들의 조합을 상기 암세포 또는 종양 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0032] 또 다른 구현예에서, 암세포 또는 종양 세포는 생체내 또는 시험관내의 것일 수 있다.
- [0033] 또 다른 구현예에서, 생체내 암세포 또는 종양 세포는 포유류 대상체로부터 유래할 수 있다.
- [0034] 또 다른 구현예에서, 포유류 대상체는 인간 대상체이다.
- [0035] 또 다른 구현예에서, 본원에는 암세포 또는 종양 세포내에서 암 살상 인터페론 감수성 바이러스의 감염, 확산, 역가, 세포독성 또는 면역치료 활성을 향상 또는 증가시키기 위한 의약의 제조에 있어 FMAE 함유 화합물의 용도가 제공된다.
- [0036] 또 다른 구현예에서, 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 조성물 또는 방법 중 임의의 것에 있어 FMAE 함유 화합물은 감염 내성 세포내 인터페론 감수성 바이러스의 감염, 성장, 확산 또는 이의 임의의 조합을 향상 또는 증가시킨다.
- [0037] 또 다른 구현예에서, 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 조성물 또는 방법 중 임의의 것에 있어 FMAE 함유 화합물은 주요 장기로의 바이러스 확산을 유도하지 않고 암세포 또는 종양내 인터페론 감수성 바이러스의 감염, 성장, 확산 또는 이의 임의의 조합을 생체내에서 향상 또는 증가시킨다.
- [0038] 추가의 구현예에서, 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 조성물 또는 방법 중 임의의 것에 있어 FMAE 함유 화합물은 바이러스에 의해 유도되는 생체내 및/또는 시험관내 암세포 사멸을 향상시킨다.

[0039] 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 방법 중 임의의 것에 관한 구현예에서, 인터페론 감수성 바이러스는 인터페론 감수성이거나 인터페론에 감수성이 되도록 만들어진, 당 분야에 공지된 임의의 적합한 바이러스일 수 있으며, 그 예로서는 복제성 또는 비 복제성 바이러스, 예컨대 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 마라바(Maraba) 바이러스(예컨대 MG-1), 광견병 바이러스, 로타 바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 뎅기열 바이러스, 치쿤구니아(Chikungunya) 바이러스, 호흡기 융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 램도바이러스, 또는 이것들의 변이체나 유도개체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 방법 중 임의의 것에 관한 구현예에서, 인터페론 감수성 바이러스는 암 살상 인터페론 감수성 바이러스이다. 그 대표적인 예는 비 암세포 또는 정상 세포에 비해 암세포 또는 종양 세포를 우선적으로 감염시켜 이를 용해하는, 당 분야에 공지된 임의의 적합한 암 살상 바이러스일 수 있다. 암 살상 바이러스로서 사용되도록 조작될 수 있는, 당 분야에 공지된 바이러스의 예가 본원에 사용될 수 있으며, 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 램도바이러스, 예컨대 수포성 구내염 바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스 및 이의 유도개체/변이체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구현예에서, 바이러스는, 예컨대 특정의 성장 조건하에서 선택된 수포성 구내염 바이러스(VSV) 또는 이와 관련된 램도바이러스 변이체/유도개체로서, 다양한 선택압이 적용된 것, 당 분야에 공지된 재조합 기법이 사용되어 유전적으로 변형된 것 또는 이의 조합이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 바이러스는 VSV Δ51일 수 있다[30]. 기타 유도개체 또는 변이체는, 예컨대 마라바 바이러스(예를 들어 MG-1), 광견병 바이러스, 로타 바이러스, 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 레오바이러스, 뎅기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기 융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스 또는 복제성 레트로바이러스와 같은 바이러스를 기반으로 할 수 있다.

[0041] 상기 기술되었거나 본원 전체에 기술된 임의의 방법에 관한 일 구현예에서, 무한증식된 세포의 유형 1가지 이상은 인간, 랫트, 마우스, 고양이, 개, 돼지, 영장류 및 말 등(이에 한정되는 것은 아님)의 임의의 세포, 세포주, 조직 또는 장기로부터 유래하는 시험관내 또는 생체내 무한증식된 세포, 예컨대 Vero, HEK-293 세포, EB-66 세포, EbX 세포, PER.C6 세포, AGE1.CR, Age1.CS, Age1.HN, Age1.RO, QOR2/2E11, UMNSAH-DF1, CHO, 하이브리도마 세포, sf9 세포 또는 R4 세포(이에 한정되는 것은 아님)일 수 있다.

[0042] 다른 구현예에서, 암세포 또는 종양 세포의 유형 1가지 이상은, 예컨대 인간, 랫트, 마우스, 고양이, 개, 돼지, 영장류 및 말 등(이에 한정되는 것은 아님)의 임의의 세포, 세포주, 조직 또는 장기로부터 유래하는 시험관내 또는 생체내 암세포 또는 종양 세포, 예컨대 종양 형성 세포, 예컨대 293-T 세포, BHK21 세포 또는 MDCK 세포 (이에 한정되는 것은 아님)일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 암세포 또는 종양 세포 1개 이상은 인간의 암세포 또는 종양 세포, 예컨대 림프구성백혈병, 골수성백혈병, 부신피질암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 비정형 기형종/간상종양, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 골육종, 악성 섬유성조직구증, 뇌간신경교종, 뇌종양, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성신경교종, 두개인두종, 뇌실막모세포종, 수모세포종, 중간 분화의 송과체 실질종양, 천막위 원시 신경외배엽종양 및 송과체 모세포종, 시각경로 및 시상하부 신경교종, 척수 종양, 유방암, 기관지종양, 버킷(Burkitt) 림프종, 유암종, 중추신경계림프종, 자궁경부암, 척색종, 만성 림프구성백혈병, 만성 골수성백혈병, 만성 골수증식성장장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 배아성종양, 자궁내막암, 뇌실막모세포종, 뇌실막종, 식도암, 두개의생식세포종양, 성선의생식세포종양, 간의담관암, 눈암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위장암(위암), 위장관 유암종, 위장관 간질종양(GIST), 위장관 간질세포종양, 생식세포종양, 두개의, 성선의, 난소, 용모상피성 종양, 신경교종, 모양세포백혈병, 두경부암, 간세포암(간암), 조직구종, 랑게르한스세포암, 호지킨림프종, 하인두암, 섬세포종양, 카포시육종, 신장암, 후두암, 림프구성백혈병, 모양세포백혈병, 구순 및 구강의 암, 간암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 뼈의 악성 섬유성 조직구종 및 골육종, 수모세포종, 수질상피종, 흑색종, 안내 흑색종, 메르켈(Merkel) 세포 암종, 중피종, 전이성 편평경부암, 구암(mouth cancer), 다발성내분비선종증, 다발성골수종/형질세포신생물, 비강 및 부비강 암, 비인두암, 신경모세포종, 구강암(oral cancer), 구인두암, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체 실질종양, 송과체 모세포종 및 천막위 원시 신경외배엽종양, 뇌하수체종양, 형질세포 신생물형성/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 원발성 중추신경계림프종, 전립선암, 직장암, 신세포암(신장암), 신우 및 요관 암, 이행세포암, 기도암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 자궁육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포암종, 편평경부암, 위암(위장암), 천막위 원시 신경외배엽종양, T 세포 림프종, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 영양막종양, 요도암, 자궁암, 자궁내막암, 자궁육종, 질암, 외음부암 또는 빌름(Wilm) 종양의 세포를

포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나 본원에 기술된 화합물과 조성물은 가능하게는 생체내 또는 시험관내 기타 암 또는 종양을 치료하는데 사용될 수 있다.

- [0043] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물(들)과, 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 구현예에서, 담체는 약학적으로 허용 가능한 담체이다.
- [0044] 세포내에서 바이러스의 감염, 확산 및/또는 역가, 그리고/또는 세포독성을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 바이러스 이전, 이후 또는 동시에 본원에 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물(들)을 세포에 투여하는 단계와, 바이러스와 세포를 배양하여 상기 세포에서 바이러스의 감염, 확산 및/또는 역가, 또는 세포독성을 향상 또는 증가시키는 단계를 포함하는 방법도 또한 제공된다. 바람직하게 세포는 암세포, 종양 세포 또는 무한증식된 세포이다. 더욱 바람직하게 세포는 포유류, 더욱더 바람직하게는 인간 대상체로부터 유래하는 생체내 암세포이고, 이 방법은 생체내에서 수행된다. 또 다른 별도의 구현예에서, 세포는 시험관내 무한증식된 세포이다.
- [0045] 암세포내 암 살상 바이러스의 암 살상 활성을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 암 살상 바이러스 이전, 동시 또는 이후에 본원에 기술된 바와 같은 화합물(들)을 암세포 또는 대상체에 투여하는 단계와, 암 살상 바이러스 및 암세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법도 또한 제공된다. 추가의 구현예에서, 암세포는 생체내 암세포이다. 별도의 구현예에서, 암세포는 시험관내 암세포이다. 세포는 포유류 대상체, 바람직하게 인간 대상체로부터 유래할 수 있다.
- [0046] 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것은 아닌 특정의 구현예에서, FMAE 함유 화합물과, 바이러스로 세포를 감염시키거나, 바이러스와 함께 세포를 성장시키거나 배양하기 위한 배지, 그리고 선택적으로는 바이러스에 의해 감염될 수 있는 세포 1개 이상, 그리고/또는 바이러스 1개 이상을 포함하는 키트가 제공된다. 이 키트는 또한 임의의 구성성분 또는 이 구성성분들의 조합을 사용하는 것, 그리고/또는 본원에 기술된 바와 같은 임의의 방법을 수행하는 것에 관한 지침을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또한 세포내 바이러스의 감염, 확산 및/또는 역가, 또는 암 살상 활성을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 바이러스 이전, 이후 또는 동시에 본원에 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물을 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이 방법은 생체내 또는 시험관내에서 수행될 수 있다.
- [0048] 본 발명은 또한 종양 세포나 암세포내 암 살상 바이러스의 확산을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 암 살상 바이러스 이전, 이후 또는 동시에 상기 기술된 바와 같은 화합물을 암세포 또는 종양 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 암세포 또는 종양 세포는 생체내 또는 시험관내의 것일 수 있으며, 바람직하게는 포유류 대상체, 예컨대 인간 대상체(이에 한정되는 것은 아님)로부터 유래한 생체내의 것일 수 있다.
- [0049] 암세포 또는 종양 세포내 암 살상 바이러스의 암 살상 활성을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 암 살상 바이러스 이전, 동시 또는 이후에 암세포 또는 종양 세포에 상기 기술된 바와 같은 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 방법도 또한 제공된다. 암세포 또는 종양 세포는 생체내 또는 시험관내의 것일 수 있으며, 바람직하게는 포유류 대상체, 예컨대 인간 대상체(이에 한정되는 것은 아님)로부터 유래한 것일 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 바이러스를 제조하는 방법도 고려한다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 약독화된 인테페론 감수성 바이러스를 제조하는 방법도 고려한다.
- [0052] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 유전적으로 변형된 바이러스를 제조하는 방법도 고려한다.
- [0053] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 암 살상 바이러스를 제조하는 방법도 고려한다.
- [0054] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 바이러스 생백신을 제조하는 방법도 고려한다.
- [0055] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물의 존재하에 적당한 배지에서 바이러스를 성장시킴으로써, 바이러스 기반 유전자치료용 벡터를 제조하는 방법도 고려한다.
- [0056] 이와 같은 본 발명의 "과제의 해결 수단"은 반드시 본 발명의 특징 모두를 기술하여야 하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0057]

본 발명의 이와 같은 특징들 및 기타 특징들은 첨부된 도면이 참조될 때 하기 설명으로부터 더욱 분명해질 것이다.

도 1은, DMF가 암세포주에서 바이러스 감염 및 암 살상 활성을 향상시켰음을 보여준다. **도 1a**: 푸마르산디메틸의 구조. **도 1b ~ 도 1f**: 내성인 인간 신장 암세포주 786-0(**도 1b** 및 **도 1d**)과, 다양한 인간 및 마우스 세포주는 DMF로 4시간 동안 전처리된 후, VSV51(MOI = 0.01)로 감염되었거나(**도 1b ~ 도 1d**), HSV(MOI = 0.01)로 감염되었거나(**도 1e**), 또는 신드비스(Sindbis)(MOI = 10)로 감염되었다(**도 1f**). **도 1b**: 감염 후 24시간 경과시, 감염된 암세포의 형광 영상이 촬영되었다. **도 1c ~ 도 1f**: 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시 상청액으로부터 측정되었다(N = 3 ~ 4; 오차 막대는 SD(표준 편차)를 나타내고; **도 1d ~ 도 1f**는 양측 꼬리 t-검정으로 분석된 결과로서; 각각의 세포주에 대한 미처리 대응개체(counterpart)와 비교됨(p < 0.05); **도 1c**는 일원 ANOVA로 분석된 결과로서; *p<0.05, *** p<0.001, 미처리 조건의 대응개체와 비교). **도 1g**: **도 1b**에서와 같이 전처리되었고, 반딧불이 루시페라아제를 발현하는 아데노바이러스(Ad5) MOI 1만큼으로 감염된 인간 종양 세포주 A549. 루시페라아제 활성은 7일의 기간에 걸쳐 측정되었다. 결과는 상대적 발광 단위로 표시되어 있고, 백그라운드는 검정 선으로 표시되어 있다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타내고; 2일차 ~ 5일차 동안 유의미성이 증가함; p<0.05, 2원 ANOVA에 의해 분석), **도 1h**: DMF로 전처리되고, VSV51(MOI = 0.001, 0.01 또는 3)로 감염된 786-0의 다단계 및 일단계 성장 곡선으로서; 상청액은 플라크 검정에 의해 역가 분석되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 1i**: 786-0은 DMF로 4시간 동안 전처리되었고, VSV51(MOI = 0.0001)로 감염되었으며, 감염 후 1시간 경과시, 아가로스 오버레이(agarose overlay)가 놓였다. 감염 후 48시간 경과시의 대표적인 플라크 형광 현미경사진. 전체 웰을 쿠마시 블루로 염색하였을 때 그에 따른 영상과, DMF 존재시 플라크 직경이 증가함을 설명해주는 평균 플라크 직경(N = 20; 막대는 평균을 나타냄; 1원 ANOVA; *p<0.05, *** p<0.001, 대응하는 모의 조건과 비교). **도 1j**: 786-0, CT26WT 및 B16F10 세포주는 **도 1b**에서와 같이 전처리 및 감염되었다. 세포 생존능은 감염 후 48시간 경과시에 측정되었다. 결과는, 대응하는 미감염, 미처리 세포에 대해 얻어진 값의 평균에 대해 정규화되었다(N = 8; 오차 막대는 SD를 나타냄; ****p<0.001, 1원 ANOVA에 의해 분석; VSV51 조건과 비교). **도 1k**: VSV51(MOI = 0.01)에 의한 감염전 또는 감염 후 여러 시점에서 DMF 150 μM로 처리된 786-0 세포, 또는 미처리된 모의개체의 상청액은 감염 후 24시간 경과시에 수집되었으며, 플라크 검정에 의해 역가 분석되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄; 양측 꼬리 t-검정; * p<0.05, ** p<0.01, 대응하는 모의 조건과 비교).

도 2는, DMF가 생체외에서, 그리고 인간의 임상 시료에서 암 살상 바이러스의 감염을 선택적으로 향상시켰음을 보여준다. **도 2a** 및 **도 2b**: CT26WT 및 B16F10 종양은 각각 BALB/c 및 C57BL/6 마우스의 피하에서 성장된 다음, 절개되었다. BALB/c 및 C57BL/6 마우스의 비장, 근육, 폐 및 뇌 조직도 또한 수집되었으며, 이것들의 코어부(core)가 채취되었다. 종양과 정상 조직의 코어부는 150 μM의 DMF로 4시간 동안 전처리되었고, 이후 GFP를 발현하는 암 살상 VSV51 1 x 10⁴ PFU로 감염되었다. 인간 종양 조직의 코어부(**도 2c** 및 **도 2d**). 인간 정상 조직의 코어부(**도 2f**) 또는 환자 유래 세포주(**도 2e**)는 4시간 동안 DMF로 처리되었고, 이후에는 GFP 발현 암 살상 VSV51 1 x 10⁴ PFU(**도 2c, 도 2d** 및 **도 2f**) 또는 0.01 MOI(**도 2e**)로 감염되었다. **도 2a** 및 **도 2d**: 감염 후 24시간 경과시, 종양 또는 정상 조직의 코어부에 대한 형광 영상이 획득되었다. 3회 1세트 각각으로부터 얻은 대표적 영상들이 제시되어 있다. **도 2b, 도 2c, 도 2e, 도 2f**: 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시에 측정되었다(N = 3 ~ 4; 오차 막대는 SD를 나타냄; 양측 꼬리 t-검정; ns = 통계적 유의미성이 보이지 않음; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 미처리 대응개체의 경우와 비교).

도 3은, 다양한 푸마르산 및 말레산 에스테르가 암 살상 바이러스 VSV Δ51의 감염을 촉진하였음을 보여준다. **도 3a**: 푸마르산 에스테르(DEF, DMF) 및 말레산 에스테르(DEM, DMM)의 구조가 제시되어 있다. **도 3b**: DMF의 대사. DMF는 푸마르산모노메틸(MMF)로 가수분해되는데, 이는 추후 푸마르산(FA)으로 대사된다. 그 다음, FA는 TCA 회로에 도입된다. 786-0 세포(**도 3c**) 또는 CT26WT(**도 3d**)의 생체외 종양 코어부는 다양한 FMAE와 유사체로 4시간 동안 전처리된 다음, GFP 발현 암 살상 VSV51 0.01 MOI만큼(**도 3c**) 또는 1 x 10⁴ PFU만큼(**도 3d**)으로 감염되었다. 감염 후 24시간 경과시, 감염된 786-0 세포 또는 CT26WT 종양 코어부의 형광 영상이 촬영되었다. 감염 후 48시간 경과시 상청액을 대상으로 대응 바이러스 역가가 측정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄; 1원 ANOVA; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, 미처리 대응개체와 비교). **도 3e**: 786-0 세포 및 CT26WT 세포는 명시된 농도만큼의 다양한 FMAE로 4시간 동안 처리된 후, VSV51(MOI = 0.01)로 감염되었으며, 감염 후 48시간 경과시 상청액이 수집되었고, 플라크 검정으로 그 역가가 분석되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 3f**: 786-0은 다양한 FMAE로 4시간 동안 전처리된 후, GFP 발현 VSV51로 감염되었으며, 감염 후 1시간 경과시 아가로

스 오버레이가 놓였다. 감염 후 24시간 경과시 각각의 플라크에 대한 형광 현미경사진. 전체 웰에 대한 쿠마시 블루 염색에 따른 영상과, DMF가 존재할 때 플라크 직경이 증가함을 설명해주는 평균 플라크 직경(N = 20; 막대는 평균을 나타냄; 1원 ANOVA; *** p<0.001, 대응하는 모의 조건과 비교).

도 4는, 동계 및 이중이식 종양 모델에 있어 푸마르산디메틸은 VSV51의 치료 효능을 향상시켰음을 보여준다. **도 4a ~ 도 4c**: CT26WT, B16F10 및 HT29 종양 보유 마우스들의 종양내에 비이클(DMSO), 또는 (**도 4a**에 보인 바와 같이) DMF 50 mg/kg 또는 200 mg/kg이 4시간 동안 처리된 다음, 반딧불이-루시페라아제 발현 암 살상 VSV51 1×10^8 PFU 또는 비이클(PBS)이 종양내 주사되었다. **도 4c**에 화살표로 표시된 바와 같이, 이러한 처리는 2회 또는 3회 행하여졌다. 감염 후 24시간 경과시 바이러스 복제가 모니터링되었다. **도 4a**: 마우스의 대표적 생물발광 영상이 제시되었다. **도 4b**: 발광에 대한 정량 결과. 눈금은 광자 수로 표시되었다(N = 10 ~ 18. 막대는 평균을 나타냄; ns = 통계적 유의미성이 보이지 않음; **p < 0.01, 양측 꼬리 t-검정으로 분석; VSV51 감염 조건과 비교). **도 4c**: 그래프로 제시된 종양 부피(N = 9 ~ 15. 오차 막대는 SEM을 나타냄; *p < 0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, 2원 ANOVA에 의해 분석; DMF + VSV51 처리 조건 대 DMSO 단독 처리 조건과 비교). **도 4d**: 생존률은 경시적으로 모니터링되었다. 로그 순위(Mantel-Cox) 검정은, 조합 처리가 VSV51 단독 처리에 비하여 생존률을 유의미하게 증가시켰음을 나타낸다(CT26WT N = 10 ~ 13, p=0.0008; B16F10의 N = 9 ~ 14, p=0.0039; HT29의 N = 10 ~ 15, p=0.0003). **도 4e**: **도 4d**의 완치(cured) 마우스 및 처녀(naive) 마우스에 CT26WT가 재이식된 후, 종양 부피와 생존률이 모니터링되었다(N = 3 ~ 5, 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 4f**: CT26WT-완치 및 처녀 마우스에 4T1 세포가 이식된 후 종양 부피가 모니터링되었다(N = 3, 오차 막대는 SD를 나타냄).

도 5는, 푸마르산 및 말레산 에스테르가 항 바이러스성 사이토카인 생산 및 I형 인터페론에 대한 반응을 억제하였음을 보여준다. **도 5a ~ 도 5e**: FMAE로 처리되었고, GFP 발현 VSV51로 감염된 786-0의 세포 용해물이 감염 후 24시간 경과시 수집되었고, 이로부터 RNA 또는 단백질이 추출되었다. **도 5a**: DMF가 존재할 때 또는 존재하지 않을 때의 감염 786-0 사이에서 차등 발현된 유전자의 발현 수준을 보여주는 산포도. **도 5b**: 유전자 온톨로지(ontology) 관계에 관한 요약. **도 5c**: 바이러스 감염된 상태일 때 FMAE에 의해 하향조절된 GO텀(GOterm) 중 상위를 차지하는 것의 목록. **도 5d**: 차등 발현된 "바이러스에 대한 반응" GO텀 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵(heatmap). **도 5e**: 단백질은 추출되어, 웨스턴 블롯팅(western blotting)에 의해 명시된 단백질에 대해 프로빙(probing)되었다. **도 5f**: 786-0 세포는 4시간 동안 DMF로 전처리되었거나, 또는 모의 처리된 후, VSV51 또는 wtVSV(MOI = 0.01)로 감염되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시에 상청액으로부터 확정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 5g**: 786-0 세포는 4시간 동안 DMF, MMF로 처리되었거나, 또는 모



의 처리된 후, VSV $\Delta 51 \Delta G$ (MOI = 1)로 감염되었다. 감염 후 12시간 또는 16시간 경과시 상청액이 수집되었고, 이 상청액은 786-0 세포를 4시간 동안 예비 조건 형성(proconditioning)하는데 사용되었으며, 이후에는 VSV51 또는 wtVSV로 감염되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시 상청액으로부터 확정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 5h** 및 **도 5i**: 786-0는 **도 5a**에서와 같이 처리되었다. **도 5h**: 감염 후 16시간 경과시 상청액은 수집되었으며, 이후에는 IFN β 에 대해 ELISA로 검정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 5i**: 감염 후 36시간 경과시 상청액이 수집되었으며, 이후에는 IFN α 에 대해 ELISA로 검정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 5j**: 786-0 세포는 FMAE로는 6시간 동안, 그리고 IFN β 또는 IFN α 로는 4시간 동안 처리되었으며, 이후에는 VSV $\Delta 51$ (MOI = 0.1)로 감염되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시에 상청액으로부터 확정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 5k**: 786-0 세포는 DMF 200 μ M로 1시간 또는 4시간 동안 전처리되었고, IFN β (250 U/mL)로 30분 동안 처리되었다. 단백질이 추출되었으며, 이후에는 pSTAT1, STAT1 및 액틴에 대해 웨스턴 블롯팅으로 프로빙되었다.

도 6은, 감염시 DMF가 NF- κ B의 전위(translocation)를 억제하였음을 보여준다. **도 6a**: DMS, MMS, S의 구조. **도 6b** 및 **도 6c**: 786-0는 명시된 DMF 유사체로 4시간 동안 전처리되었으며, 이후에는 GFP 발현 암 살상 VSV51(MOI 0.01)로 감염되었다. **도 6b**: 감염 후 24시간 경과시, 감염이 된 786-0 세포의 형광 영상이 촬영되었다. **도 6c**: 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시 상청액으로부터 확정되었다(N = 3; 오차 막대는

SD를 나타냄; 1원 ANOVA; *** $p < 0.001$, 미처리 대응개체와 비교). **도 6d**: GSH 수준은 FMAE 처리 4시간 후에 786-0 세포에서 측정되었다(N = 4; 오차 막대는 SD를 나타냄; 1원 ANOVA; *** $p < 0.001$, 미처리 대응개체와 비교). **도 6e**: 차등 발현된 산화 스트레스 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 유전자 발현은 미처리 감염 대조군에 대해 얻어진 값에 대해 정규화되었다. **도 6f**: FMAE로 6시간 처리 후 786-0 세포로부터 qPCR에 의해 정량된 *hmox1* 발현 수준(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 6g**: 786-0은 BSO(2 mM) 존재하에 7일 동안 성장하였으며, DMF(200 μ M)로 4시간 동안 전처리된 다음, GFP 발현 암 살상 VSV51(MOI 0.01)로 감염되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 48시간 경과시에 상청액으로부터 측정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 6h**: siNRF2 녹다운(knockdown) 786-0 세포는 **도 6g**에서와 같이 DMF로 처리된 후, 감염되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 24시간 경과시에 상청액으로부터 측정되었다. RNA가 추출되었으며, *nrf2* 및 *ifitm1* 유전자의 발현은 qPCR에 의해 정량되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄). **도 6i** 및 **도 6j**: DMF(200 μ M)로 4시간 동안 처리된 786-0 세포로부터 세포질내 및 핵내 단백질 분획이 추출되었으며, 이후에는 GFP 발현 암 살상 VSV51(MOI = 1)로 8시간 동안 감염되었거나(**도 6i**), 또는 TNF α (30 ng/ml)로 30분 동안 처리되었다(**도 6j**). 세포 용해물은 명시된 바와 같은 다수의 단백질에 대해 웨스턴 블롯팅으로 프로빙되었다. **도 6k**: 786-0은 4시간 동안 NF- κ B 억제제(IKK16[10 μ M], TPCA1[40 μ M])로 전처리되었으며, 이후에는 DMF(150 μ M) 및 GFP 발현 암 살상 VSV51(MOI = 0.01)로 공동 처리되었다. 대응하는 바이러스 역가는 감염 후 24시간 경과시에 상청액으로부터 측정되었다(N = 3; 오차 막대는 SD를 나타냄; 1원 ANOVA; *** $p < 0.001$, 미처리 대응개체와 비교).

도 7은, MMF가 293-T 세포로부터 생산되는 렌티바이러스를 증가시켰음을 보여준다. 293-T 세포는 DMEM + 10% FBS + 35mM HEPES이 사용되면서 96웰 평판에 접종되었고, 37°C 및 5% CO₂에서 항온처리되었다. 3개의 웰 내에서 세포는 MMF로 처리되었거나, 비이클(DMSO) 단독 처리되었거나, 아니면 배지로 모의 처리된 다음, PEIpro(Polyplus Transfection, France)가 사용되어 4-플라스미드 3세대 렌티바이러스 루시페라아제 리포터 유전자 시스템으로 형질감염된 후, 37°C 및 5% CO₂에서 48시간 동안 항온처리되었다. 항온처리 후, 상청액은 새로 마련된 96웰 평판에 옮겨졌으며, 이 96웰 평판은 접착성 평판 밀봉제로 밀봉된 직후에 -80°C에서 동결되었다. 생산된 LV의 수를 측정하기 위해, HT1080 세포는 DMEM + 10% FBS + 35mM HEPES가 사용되면서 웰당 5e3개 세포(부피 100 μ l)로 96웰 평판에 접종된 다음, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 항온처리되었다. 다음날 아침, 성장 배지 80 μ l가 제거되었고, 그 대신 해동된 LV 함유 상청액 30 μ l가 두 번에 걸쳐 채워졌다. 평판은 890 G에서 10분 동안 회전되었으며, 이후 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 항온처리되었다. 그 다음, 세포에 100 μ l DMEM + 10% FBS + 35 mM HEPES가 보충되었고, 이 세포는 37°C 및 5% CO₂에서 72시간 동안 항온처리되었다. 각각의 웰에 루시페린이 첨가된 후(2 mg/ml; 웰당 25 μ l씩), Biotek 평판 판독기가 사용되어 루시페라아제 발현이 측정되었다. 데이터는, 조건당 6개씩의 웰로부터 산정된 평균 RLU의 배수 변화 대 모의 처리시 산정된 평균 RLU의 배수 변화를 나타낸다. ANOVA에 따르면 모의 처리 조건 대 MMF 처리 조건 사이의 차이는 유의하였다($p < 0.0001$).

도 8은, VERO-SF 세포에 있어서 인플루엔자 A/FM/1/47 역가에 미치는 DMF의 영향력을 ELISA에 의해 보여준다. VeroSF 세포(무혈청 배지에 적응된 Vero 세포)는 96웰 평판에 접종된 후, 비이클 단독 처리 및 DMF 처리가 행하여졌고, 인플루엔자 A/FM/1/47(MOI = 0.01)로 감염되었다. 이로부터 3일 후, 감염성 상청액이 수집되어, 풀링(pooling)된 다음(N = 조건당 3개 웰), 이를 대상으로 ELISA가 수행되었는데(Cat# IAV142, Virusys), 여기서 흡광도 값은, 플라크 검정에 의해 앞서 역가 분석된 FM/1/47 스톡(stock)으로부터 얻어진 표준 곡선을 기반으로 "pfu/ml"로 전환되었다. 데이터는 2회 ~ 4회 실험의 평균을 나타낸다.

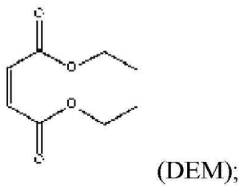
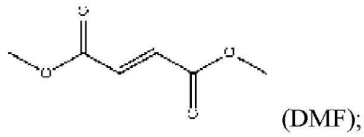
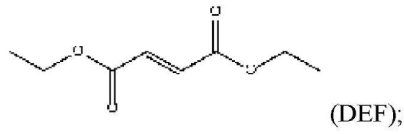
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 하기 발명의 설명은 1개 이상의 바람직한 구현예에 관한 것이다. 몇몇 발명은, 동일하거나, 유사하거나, 변별적인 용도와 함께 제공된 키트, 조성물 또는 사용 방법과 함께 본원에 기술될 수 있다.
- [0059] 제1 양태에서, 본원에는 세포 내에서 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 확산 또는 역가, 그리고/또는 암 살상 또는 면역치료 활성 중 1가지 이상을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 바이러스로 세포를 감염시키기 이전, 이후 또는 동시에 상기 세포에 FMAE 함유 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0060] 제한하고자 하는 것은 아닌 다른 양태에서, 본원에는 무한증식된 세포 내에서 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 확산 또는 역가를 시험관내 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 바이러스로 세포를 감염시키기 이전, 이후 또는 동시에 상기 세포에 FMAE 함유 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

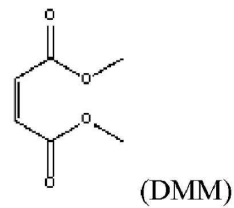
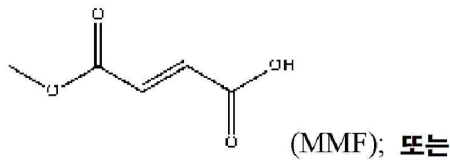
- [0061] 제한하고자 하는 것은 아닌 추가의 양태에서, 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 확산, 역가는 FMAE 함유 화합물이 존재하지 않을 때의 이 바이러스의 감염, 확산, 역가에 비하여 증강된다.
- [0062] 추가의 양태에서, 본원에는 암세포 또는 종양 세포에서 암 살상 인터페론 감수성 바이러스의 생산, 감염, 확산, 역가, 또는 암 살상 활성이나 면역 치료 활성을 향상 또는 증가시키는 방법으로서, 바이러스로 세포를 감염시키기 이전, 이후 또는 동시에 상기 세포에 FMAE 함유 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0063] 제한하고자 하는 것은 아닌 추가의 양태에서, 암 살상 바이러스의 암 살상 활성은, 암세포 또는 종양 세포에서 바이러스 단독의 암 살상 활성 또는 FMAE 함유 화합물 단독의 치료 활성에 비하여 증강된다.
- [0064] 상기 기술된 조성물, 방법 또는 방법들 중 임의의 것에 관한 또 다른 구현예에서, FMAE 함유 화합물은 감염 내성 세포내에서 인터페론 감수성 바이러스의 감염, 성장 또는 확산을 향상시킨다.
- [0065] 본 발명은 바이러스 향상, 즉 처리 결과가, 바이러스의 감염(형질도입 포함) 능력, 또는 세포내에서의 성장 또는 복제 능력, 1개 이상의 조직 내에서의 확산 능력, 세포에서의 바이러스 암호화 이식유전자 생산 능력, 감염된 세포 또는 이와 이웃하는 미감염 세포를, 직접적으로는 바이러스에 의해 암호화된 구성성분에 의하거나 간접적으로는 면역 반응을 통하여 사멸시키는 능력의 증가로 이어지는 때를 고려한다. 바이러스 향상이란, 그 처리가, 바이러스 고유의 감염, 복제 또는 확산 능력을 증가시키거나, 또는 트랜스 방식으로 제공되는 추가 구성성분(예컨대 형질감염된 플라스미드)의 도움으로 제공되는 바이러스 능력 증가로 말미암아 세포로부터 생산되는 바이러스 생산량(yield) 증가의 유도로 이어지는 때를 또한 의미하기도 한다.
- [0066] 상기 기술된 조성물, 방법 또는 방법들 중 임의의 것에 관한 또 다른 구현예에서, FMAE 함유 화합물은 주요 장기로의 바이러스 확산을 유도하지 않고 암세포 및 종양에서 인터페론 감수성 암 살상 바이러스의 감염, 성장 또는 확산을 생체내 향상 또는 증가시킨다.
- [0067] 상기 기술된 조성물, 방법 또는 방법들 중 임의의 것에 관한 추가의 구현예에서, FMAE 함유 화합물은 바이러스에 의해 유도된 생체내 및 시험관내 암세포 사멸을 향상 또는 증가시킨다.
- [0068] 제한하고자 하는 것은 아닌 또 다른 추가의 구현예에서, FMAE 함유 화합물 1개 이상과, a) 인터페론 감수성 바이러스, 유전적으로 변형된 인터페론 감수성 바이러스, 약독화 인터페론 감수성 바이러스, 암 살상 인터페론 감수성 바이러스, 인터페론 감수성 바이러스 기반 백신 또는 유전자치료용 벡터, b) 암세포 1개 이상, c) 담체, 희석제 또는 부형제, d) 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, e) 비 암세포, f) 세포 배양 배지, g) 1개 이상의 암 치료제 중 하나 이상; 또는 a) ~ g)의 임의의 조합을 포함하는 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한 a) ~ g) 중 임의의 하나 또는 이의 조합이 조성물이나 키트로부터 특별히 배제되는 구현예도 고려한다. 임의의 구성성분 또는 구성성분들의 군은 원한다면 배제될 수 있다.
- [0069] 또 다른 구현예에서, 본원에는 FMAE 함유 화합물 1개 이상과, a) 인터페론 감수성 바이러스, 유전적으로 변형된 인터페론 감수성 바이러스, 약독화 인터페론 감수성 바이러스, 암 살상 인터페론 감수성 바이러스, 인터페론 감수성 바이러스 기반 백신 또는 유전자치료용 벡터, b) 암세포 1개 이상, c) 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제, d) 비 암세포, e) 세포 배양 배지, f) 암 치료제 1개 이상, g) 세포 배양 평판 또는 다중 웰 디쉬, h) 화합물을, 세포, 배지 또는 대상체에 전달하는 장치, i) 키트 내 화합물 또는 임의의 구성성분을 사용하는 것에 관한 지침, j) 담체, 희석제 또는 부형제 중 하나 이상; 또는 a) ~ j)의 임의의 조합을 포함하는 키트가 제공된다. 본 발명은 또한 a) ~ j) 중 임의의 하나 또는 이의 조합이 특별히 배제된 키트도 고려한다.
- [0070] 바이러스 활성, 생산, 암 살상 활성 또는 세포독성을 향상 또는 증가시키는 것은, 바이러스 감염 및/또는 감염률, 바이러스 생산 및/또는 이의 생산률, 바이러스 역가 및/또는 전체 역가가 달성될 수 있을 때의 비율, 바이러스 확산 및/또는 확산률, 세포 용해 및/또는 용해율, 바이러스 세포독성 및/또는 세포독성률, 또는 이의 임의의 조합을, 1개 이상의 화합물이 사용되지 않을 때에 비하여 향상 또는 증가시키는 것을 포함할 수 있음은 본원에 교시된 사항을 유념하는 당 업자에 의해 이해될 것이다.
- [0071] 암 살상 바이러스의 면역치료 활성을 향상 또는 증가시키는 것은, 다수의 사이토카인의 상향조절, 예컨대 FMAE 함유 화합물이 존재할 때 바이러스에 의해 유도 또는 발현되는 사이토카인의 더 많은 발현을 통하여 전신 항종양 면역 반응을 향상 또는 증가시키는 것을 포함할 수 있음은 본원에 교시된 사항을 유념하는 당 업자에 의해 이해될 것이다.
- [0072] 이해될 바와 같이, 임의의 구현예에서, FMAE 함유 화합물은 말레산 또는 푸마르산의 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르의 시스형 또는 트랜스형 이성체일 수 있는 유기 화합물들을 포함할 수 있다. 시스형 및 트랜스형 이성

체의 혼합물도 또한 고려된다.

[0073] 임의의 구현예에서, 적합한 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE) 화합물의 구체적인 예로서는 이하의 것들, 즉



[0074]

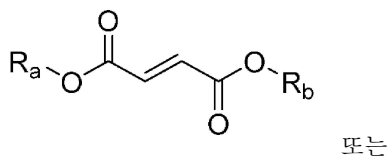


[0075]

[0076] 을 포함할 수 있다.

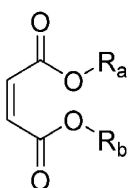
[0077] 이해될 바와 같이, 임의의 구현예에서, 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE) 화합물은, 에스테르기 적어도 1개와 α - β 불포화 탄소를 함유하는 임의의 적합한 푸마르산 또는 말레산 유도체를 포함할 수 있다. 임의의 구현예에서, FMAE 화합물은 하기 화학식 III 또는 하기 화학식 IV의 화합물, 즉

[0078] [화학식 III]



[0079]

[0080] [화학식 IV]

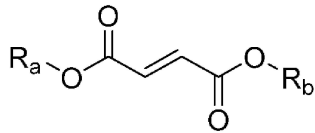


[0081]

[0082] 을 포함할 수 있되, 식 중, R_a 및 R_b 는 동일하거나 상이할 수 있고, R_a 및 R_b 중 1개 이상은 생체내 가수분해될 수 있는 에스테르 작용기를 제공하도록 선택된다.

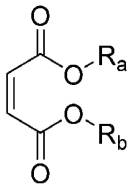
[0083] 임의의 구현예에서, FMAE 화합물은 하기 화학식 III 또는 화학식 IV의 화합물, 즉

[0084] [화학식 III]



[0085] 또는

[0086] [화학식 IV]



[0087] 을 포함할 수 있되, 식 중, R_a 및 R_b 는 동일하거나 상이할 수 있고, R_a 및 R_b 는 각각 독립적으로 수소; (예를 들어 1개 이상의 할로겐, 하이드록실, 니트로 또는 시아노로) 선택적으로 치환될 수 있거나, 또는 존재하지 않을 수 있는(즉 화학식 III 또는 화학식 IV에 카복실산염을 제공할 수 있는) 선행, 분지형 또는 사이클릭 포화 또는 불포화 알킬(예컨대 C_1 - C_{10} 알킬)로부터 선택되며;

[0089] R_a 및 R_b 중 어느 하나가 존재하지 않거나 수소일 때, 다른 하나는 존재하되 수소는 아니다.

[0090] 이해될 바와 같이, 임의의 구현예에서, FMAE 화합물은 또한 이 FMAE 화합물의 임의의 적합한 염, 에스테르, 전구약물, 기능성 모의체, 전구체 또는 기타 적합한 유도체를 포함할 수도 있다.

[0091] 암 살상 바이러스는 비 암세포 또는 정상 세포에 비하여 암세포 또는 종양 세포(종양을 형성할 수 있는 임의의 세포 포함)를 우선적으로 감염시켜 용해하는 바이러스를 포함할 수 있다. 당 분야에 공지된 암 살상 바이러스의 예로서는 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 아데노바이러스, 포진 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 백시니아 바이러스, 램도바이러스, 예컨대 수포성 구내염 바이러스 및 이의 유도개체/변이체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물 또는 이의 유도체가 존재할 때 바이러스는, 바이러스만이 단독으로 감염을 진행할 때에 비하여, 그리고 정상 세포만이 단독으로 존재할 때 또는 FMAE 함유 화합물 또는 유도체만이 존재할 때에 비하여, 암세포 또는 종양 세포를 우선적으로 감염시켜 용해한다.

[0092] 인터페론 감수성 바이러스는 당 분야에 공지된 임의의 적합한 바이러스로서, 인터페론 감수성이거나 인터페론 감수성으로 만들어진 바이러스, 예컨대 복제성 또는 비 복제성 바이러스, 예컨대 뉴캐슬병 바이러스, 소아마비 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 마라바 바이러스(예컨대 MG-1), 광견병 바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 풍진 바이러스, 뎅기열 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기융합 바이러스, LCMV, 렌티바이러스, 복제성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순포진바이러스 또는 램도바이러스, 아니면 이의 변이체 또는 유도개체(이에 한정되는 것은 아님)일 수 있음이 고려된다. 바람직한 구현예에서, 바이러스는 본원에 기술된 바와 같은 FMAE 함유 화합물 또는 이의 유도체의 존재하에 감염을 진행한다.

[0093] 임의의 구현예에서, 인터페론 감수성 바이러스는 정상 세포 또는 인터페론 반응성 암세포에서 자체의 복제가 I형 또는 III형 항 바이러스성 인터페론의 작용에 의해 제어 또는 억제되는 바이러스를 포함할 수 있다.

[0094] 인터페론 감수성이란, 상기 인터페론 처리에 반응하여 정상적인 능력을 보이고, 그렇지 않을 경우에는 상기 바이러스에 관용하던 세포가 생물학적으로 유관한 인터페론으로 처리된 후, 바이러스(즉 야생형이거나, 또는 유전자 조작 및/또는 선택을 통하여 약독화되도록 유도된 균주 중 어느 하나일 수 있는 바이러스)가, 상기 세포에 형질도입되는 능력, 상기 세포를 감염시키는 능력, 상기 세포에서 복제, 성장, 확산하는 능력, 상기 세포를 이용하여 이식유전자를 발현하는 능력, 상기 세포에서 바이러스 자손을 생산하는 능력 또는 상기 세포를 사멸하는

능력의 감소를 경험하게 되는 경우를 의미한다. 도 5j는 바이러스의 인터페론 감수성을 시험하는 방법의 예로서, 감염된 세포내에서 인터페론 존재하 또는 부재하에 이루어진 생 바이러스의 성장 여부가 바이러스의 인터페론 감수성을 결정해 주는 것인 방법을 제공한다. 예를 들어 임의의 인터페론, 예컨대 I형 IFN(이에 한정되는 것은 아님)으로 전처리된 세포에서는 성장하지 않지만, 미처리 세포에서는 잘 성장하는 바이러스는 인터페론 감수성인 것으로 간주될 것이다. 인터페론 처리 후, 인터페론 감수성 세포에 있어서의 바이러스 성장 감소는 임의의 검출 가능한 감소, 더 약한 효과와 연관된 더 작은 감소, 그리고 더 강한 효과와 연관된 더 큰 감소로서 나타날 수 있다.

[0095] 바이러스의 세포독성/암 살생 활성은 시험관내, 생체내 또는 이 둘 다에서 발휘될 수 있거나, 관찰될 수 있거나 또는 입증될 수 있다. 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것은 아닌 구현예에서, 바이러스는 세포독성/암 살생 활성을 생체내에서 보인다.

[0096] 바이러스의 유도개체 또는 변이체란, 상이한 성장 조건하에서 바이러스를 선택함으로써 얻어진 바이러스로서, 다양한 선택압이 적용된 것, 당 분야에 공지된 재조합 기법을 사용하여 유전적으로 변형된 것, 또는 복제 결합성이 되도록 조작되었고/조작되었거나 이식유전자를 발현하도록 조작된 것, 또는 이의 임의의 조합을 의미한다. 이러한 바이러스의 예는, 예컨대 미국 특허출원 제20040115170호, 동 제20040170607호, 동 제20020037543호, WO 00/62735; 미국 특허 제7,052,832호, 동 제7,063,835호, 동 제7,122,182호(이 문헌들은 본원에 참조로서 인용되어 있음) 및 기타 문헌들에 기술된 바와 같이 당 분야에 공지되어 있다. 바람직하게 바이러스는 수포성구내염 바이러스(VSV) 또는 이의 관련 랩도바이러스 변이체/유도개체, 예컨대 특정의 성장 조건하에서 선택된 것, 다양한 선택압이 적용된 것, 당 분야에 공지된 재조합 기법을 사용하여 유전적으로 변형된 것 또는 이의 임의의 조합이다. 바람직한 구현예에서, 바이러스는 VSV Δ51이다[30].

[0097] 암세포 또는 종양 세포의 유형 1가지 이상은, 예컨대 인간, 랫트, 마우스, 고양이, 개, 돼지, 영장류 및 말 등 (이에 한정되는 것은 아님)의 임의의 세포, 세포주, 조직 또는 장기로부터 시험관내 또는 생체내 얻어진 암세포 또는 종양 세포, 또는 예컨대 293-T 세포, BHK21 세포 또는 MDCK 세포와 같은 종양 형성 세포(이에 한정되는 것은 아님)일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 암세포 또는 종양 세포 1개 이상은 인간의 암세포 또는 종양 세포, 예컨대 림프모구성백혈병, 골수성백혈병, 부신피질암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 비정형 기형종/간상종양, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 골육종, 악성 섬유성조직구종, 뇌간 신경교종, 뇌종양, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성신경교종, 두개인두종, 뇌실막모세포종, 수모세포종, 중간 분화의 송과체 실질종양, 천막위 원시 신경외배엽종양 및 송과체 모세포종, 시각경로 및 시상하부 신경교종, 척수 종양, 유방암, 기관지종양, 버킷 림프종, 유암종, 중추신경계림프종, 자궁경부암, 척색종, 만성 림프구성백혈병, 만성 골수성백혈병, 만성 골수증식성장장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 배아성종양, 자궁내막암, 뇌실막모세포종, 뇌실막종, 식도암, 두개의생식세포종양, 성선의생식세포종양, 간외담관암, 눈암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위장암(위암), 위장관 유암종, 위장관 간질종양(GIST), 위장관 간질세포종양, 생식세포종양, 두개의, 성선의, 난소, 융모상피성 종양, 신경교종, 모양세포백혈병, 두경부암, 간세포암(간암), 조직구종, 랑게르한스세포암, 호지킨림프종, 하인두암, 섬세포종양, 카포시육종, 신장암, 후두암, 림프구성백혈병, 모양세포백혈병, 구순 및 구강의 암, 간암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 뼈의 악성 섬유성 조직구종 및 골육종, 수모세포종, 수질상피종, 흑색종, 안내 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 전이성 편평경부암, 구암, 다발성내분비선종증, 다발성골수종/형질세포신생물, 비강 및 부비강 암, 비인두암, 신경모세포종, 구강암, 구인두암, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체 실질종양, 송과체 모세포종 및 천막위 원시 신경외배엽종양, 뇌하수체종양, 형질세포 신생물형성/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 원발성 중추신경계림프종, 전립선암, 직장암, 신세포암(신장암), 신우 및 요관 암, 이행세포암, 기도암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 자궁육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포암종, 편평경부암, 위암(위장암), 천막위 원시 신경외배엽종양, T 세포 림프종, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 영양막종양, 요도암, 자궁암, 자궁내막암, 자궁육종, 질암, 외음부암 또는 빌름 종양의 세포(이에 한정되는 것은 아님)를 포함한다. 그러나 본원에 기술된 화합물과 조성물은 생체내 또는 시험관내 기타 암 또는 종양을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0098] 생체내 치료적 응용을 위한 것으로서, 바람직하게는 FMAE 함유 화합물 1개 이상과, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하고, 선택적으로는 다른 용질, 예컨대 용해된 염 등을 함유하는 약학 조성물이 제공된다. 바람직한 구현예에서, 용액은, 용액을 등장성으로 만들기예 충분한 염수 또는 글루코스 등을 포함한다. 약학 조성물과, 약학 조성물을 제조하는 방법은 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 본원에 참고문헌으로서 인용된 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy](구 "Remingtons Pharmaceutical

Sciences"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philidelphia, PA (2000)]에 기술되어 있다.

- [0099] 이러한 조성물의 투여는 국소 치료 및/또는 전신 치료 중 어느 것이 요망되는지와, 치료될 부위에 따라서 임의의 수만개의 경로를 통해 이루어질 수 있다. 제한하고자 하는 것은 아닌 제1 구현예에서, 화합물은 치료될 부위에 국소 투여된다. 투여는 국부(안내 및 점막, 예컨대 질 및 직장 전달 포함), 폐(예컨대 분무기에 의한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 흡기), 기관내, 비내, 상피 및 경피, 경구 또는 비경구로 이루어질 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 동맥내, 피하, 복막내 또는 근육내 주사 또는 주입, 아니면 두개내, 예컨대 척수강내 또는 뇌실내 투여를 포함한다. 종양내 주사, 일반적으로 종양 근처로의 관류 또는 전달, 또는 종양을 지지하는 혈관조직으로의 주사도 또한 고려된다. 대안적으로 FMAE 함유 화합물은 경구 투여용 정제 또는 캡슐로 제제화될 수 있다. 당 분야에 공지된 바와 같은 대안적 투여형, 예컨대 서방형, 지연 방출형, 연장 방출형 투여형도 또한 고려된다.
- [0100] 본 화합물은 흡입 또는 흡기에 의한 투여를 위해 주후 에어로졸의 형태로 활용될 수 있는 수용액 또는 부분 수용액으로 제제화될 수 있다. 조절제는 국소 이용을 위해 약학적으로 허용 가능한 비이클 중 로션, 크림 또는 살포제(dusting powder)로 제제화되어, 피부의 발병 부위에 적용될 수 있다.
- [0101] 제한적이기를 바라지 않을 때, 본 발명의 FMAE 함유 화합물의 투여량 요건은 적용된 구체적인 조성, 투여 경로 및 처리되는 특성의 대상체에 따라서 달라질 수 있다. 투여량 요건은 당 업자에게 공지된 표준 임상 기법에 의해 결정될 수 있다. 통상적으로 처리는 보통 화합물 또는 화합물/바이러스의 최적 용량에 못미치는 소량에서부터 개시될 것이다. 그 다음, 어떤 상황에서 최적이거나 만족스러운 효과가 달성될 때까지 투여량은 증량된다. 일반적으로 FMAE 함유 화합물, 또는 FMAE 함유 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 일반적으로 유의미하게 해롭거나 유해한 부작용을 일으키지 않고 유효한 결과를 달성할 농도만큼 투여된다. 투여는 단일의 단위 용량으로서 이루어질 수 있거나, 원한다면 투여량은 하루라는 시간을 통틀어서 적합한 시간에 투여되는, 편리한 종속 단위들로 분할될 수 있다.
- [0102] FMAE 함유 화합물은 순차적 투여, 예컨대 인터페론 감수성 바이러스, 예컨대 약독화 바이러스, 유전적으로 변형된 바이러스, 백신 바이러스, 유전자치료용 벡터 또는 암 살상 바이러스(이에 한정되는 것은 아님) 투여 이전, 이후 또는 이전과 이후 둘 다에서 사용될 수 있다. 대안적으로 FMAE 함유 화합물은 상기 기술된 바와 같이 바이러스와 동시에 또는 조합하여(예컨대 암 살상 바이러스와 조합하여) 투여될 수 있다. 뿐 아니라, FMAE 함유 화합물은 상기 기술된 바와 같이 암 살상 바이러스와 함께, 그리고 당 업자에게 공지된 바와 같은 암 치료제 또는 암 치료법 1가지 이상, 예컨대 인터페론 치료법, 인터루킨 치료법, 콜로니 자극 인자 치료법, 면역치료법, 면역관문 억제제 치료법(이에 한정되는 것은 아님), 화학치료법용 약물, 예컨대 5-플루오로데옥시우리딘 암사크린, 블레오마이신, 부셀판, 카페시타빈, 카보플라틴, 카머스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로파라빈, 크리산타스파제, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진, 닥티노마이신, 도노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 겐시타빈, 글리아텔, 하이드록시카바미드, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 루코보린, 로머스틴, 멜파란, 머캅토포린, 메스나, 메토티렉세이트, 미토마이신, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉시드, 펜토스타틴, 프로카바진, 랄티트렉시드, 사트라플라틴, 스트렙토조신, 테가퍼-우라실, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오테파, 티오구아닌, 토포테칸, 트레오셀판, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 또는 이것들의 조합(이에 한정되는 것은 아님)과 조합하여 사용될 수 있다. 뿐 아니라, 항암 생물의약품, 예컨대 모노클로날 항체 등(이에 한정되는 것은 아님)도 또한 사용될 수 있다.
- [0103] 본 발명은 또한 인터페론 감수성 바이러스, 예컨대 유전적으로 변형된 바이러스, 약독화된 바이러스, 백신 바이러스, 유전자치료용 벡터 또는 암 살상 바이러스의 1개 이상의 세포, 예컨대 무한증식된 암세포 또는 종양 세포(이에 한정되는 것은 아님) 중 1개 이상의 유형 내에서의 확산을 증가 또는 향상시키기 위하여, 암 살상 바이러스의 세포독성/암 살상 활성을 1개 이상의 암세포 또는 종양 세포에 대하여 증가 또는 향상시키기 위하여, 바이러스, 예컨대 유전적으로 변형된 바이러스, 약독화된 바이러스, 백신 바이러스, 유전자치료용 벡터, 암 살상 바이러스의 생산, 생산량 또는 생식능을 증가 또는 향상시키기 위하여, 또는 상기의 것들의 임의의 조합을 달성하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 방법과 조성물의 용도도 고려한다. 어떠한 방식으로든 제한하고자 하는 것은 아닌 구현예에서, 본 조성물은 암세포 또는 종양 세포를 사멸하거나, 또는 이의 성장을 일정 기간 동안 제한함으로써 암세포 또는 종양 세포의 생존능을 감소시킨다.
- [0104] 다른 구현예에서, 세포는 생체내 또는 시험관내 암세포일 수 있다. 추가의 구현예에서, 생체내 암세포는 포유류 대상체로부터 유래될 수 있다. 또 다른 추가의 구현예에서, 포유류 대상체는 인간 대상체일 수 있다. 다른 구현

에에서, 세포는 시험관내에서 무한증식된 세포이다.

[0105] 본 발명은 또한 1개 이상의 세포, 예컨대 무한증식된 암세포 또는 종양 세포(이에 한정되는 것은 아님) 중 1개 이상의 유형 내에서의 인터페론 감수성 바이러스, 예컨대 유전적으로 변형된 바이러스, 약독화된 바이러스, 백신 바이러스, 유전자치료용 벡터 또는 암 살상 바이러스의 생산, 감염, 성장 및 확산을 증가 또는 향상시키거나, 바이러스, 예컨대 유전적으로 변형된 바이러스, 약독화된 바이러스, 백신 바이러스, 유전자치료용 벡터, 암 살상 바이러스의 생산, 생산량 또는 생식능을 증가 또는 향상시키기 위하여, 또는 상기의 것들의 임의의 조합을 달성하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 방법과 조성물의 용도를 고려한다.

[0106] 이하 실시예들에는 DMF와 다양한 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE)가, 암세포주뿐 아니라, 인간 종양 생검편에서 몇몇 암 살상 바이러스(OV)의 바이러스 감염을 향상시키고, 내성을 보이는 동계 및 이중이식 종양 모델에서 치료 결과를 개선하는 것으로 관찰되었다. OV 및 약물의 단독치료법이 그 효능을 보이지 않는 예시적 모델에서조차 지속적인 반응, 예컨대 향상된 확산 및 암 살상이 관찰되었다. 이론에 의해 국한되기를 바라지 않을 때, DMF가 바이러스 확산을 향상시키는 것으로 관찰된 능력은, 이 DMF가 I형 IFN 생산 및 반응을 억제하는 능력으로 말미암을 수 있는데, 이는 전사 인자 NF- κ B의 핵내 전위를 차단함으로써 선천적 암세포 면역 반응을 피하는 것을 도와주는 능력과 연관되어 있을 수 있다. 실험 결과에 관한 임의의 비제한적 구현예에서, FMAE는 정상 조직에서의 바이러스 성장에 비하여 종양 세포에서의 바이러스 확산/성장을 개선시켰는데, 이는, 예를 들어 암을 표적화하는데 유리할 수 있다. 이하 연구들에서, FMAE 처리는 암 살상 바이러스 감염에 대한 선천적 면역 반응을 감소시킴으로써 바이러스 효능을 향상시키는 것으로 관찰되었다.

[0107] 추가의 예들은, DMF와 다양한 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE), 예컨대 MMF가 무한증식된 비 암세포에서 바이러스의 생산, 생산량 또는 생식 능력을 증가 또는 향상시킬 수 있음을 보여준다. 일 구현예에서, DMF 처리는 약독화된 복제 가능 인터페론 감수성 인플루엔자 A H1N1 FM/1/47 바이러스의 무한증식된 비 암성 Vero 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포내 생산성을 향상시키는 것으로 확인되었다. 다른 구현예에서, MMF는, 바이러스 패키징(packaging) 단백질을 암호화하는 플라스미드로 293T 세포가 형질감염된 후, 복제 결합성 렌티바이러스의 생산을 향상시키는 것으로 관찰되었다.

[0108] 본 발명은 하기 실시예들에서 추가로 설명될 것이다.

[0109] **실시예**

[0110] *실시예 1: 푸마르산디메틸은 시험관내에서 종양 특이적 바이러스 확산 및 암 살상을 향상시킨다.*

[0111] 본 발명자들은 처음에 암 살상 수포성 구내염 바이러스(VSV Δ 51) 성장에 대한 DMF(도 1a에 도시된 구조를 가지는 화합물)의 영향력을 관찰하였다. 특히 VSV 및 이와 밀접하게 관련된 마라바는 현재 임상 평가중에 있지만, 암들 중 대략 3분의 1은 감염에 내성을 보이고 있다[30-31]. 786-0 신 암종 세포는 VSV Δ 51 감염에 대해 내성을 크게 보이지만, 이 세포에 50 μ M 내지 200 μ M의 용량만큼의 DMF가 4시간 동안 전처리되었을 때 낮은 감염다중도(MOI)에서도 VSV Δ 51 바이러스 성장은 100배 넘게 증가하였다(도 1c). 현미경에 의해 가시화되는 바와 같이 바이러스 암호화 GFP 발현도 또한 크게 향상되었다(도 1b). 이러한 효과는, 전처리 시간이 감염전 24시간 이하, 그리고 감염 후 8시간 이하일 때 관찰되었다(도 1k). 한발 더 나아가, DMF는 VSV Δ 51에 대한 감수성이 광범위한 인간 및 마우스 암세포주(육종, 골육종, 유방암, 결장암, 흑색종, 난소암) 패널에서 감염을 확고하게 향상시켰다(도 1d). DMF는 또한 786-0 세포에 처리된 후, 암 살상 포진 바이러스(HSV-1 돌연변이 N212) 및 신드비스 바이러스의 바이러스 아웃풋(viral output)을 개선하였다(도 1e 및 도 1f). 더욱이 본 발명자들은 또한 암 살상 바이러스치료법에 더하여 유전자치료용 벡터로서 광범위하게 사용되어 온 아데노바이러스에 대한 DMF의 효과를 시험하였다[32]. 인간 폐 선암종 A549 세포를 DMF로 전처리하였을 때, 7일에 걸친 비복제성 아데노바이러스, 즉 E1A-결실 Ad5의 루시퍼라아제 이식유전자 발현은 20배 이하로 증가하였다(도 1g). 786-0 세포를 통해 얻어진 1 단계 및 다단계 성장 곡선은, VSV Δ 51이 낮은 MOI로 사용되었을 때 DMF가 이 VSV Δ 51의 바이러스 아웃풋을 향상시켰지만, 높은 MOI로 사용되었을 때에는 그렇지 않았음을 규명하였는데(도 1h), 이 점은 DMF가 감염된 세포당 바이러스 아웃풋보다는 바이러스 확산에 (약)영향을 미치는 기작을 억제함을 나타낸다. 바이러스 확산에 대한 DMF의 효과를 더 탐구하기 위하여, 786-0 세포 단일층을 VSV Δ 51로 감염시키고, 그 위에 아가로스를 덮어, 바이러스 복제 초점(virus replication foci)의 한정된 플라크를 형성시켰다. 감염된 세포 단일층의 형광 영상화와 쿠마시 블루 염색 결과를 바탕으로 보았을 때, DMF는 VSV Δ 51의 플라크 평균 직경을 상당히 증가시켰다(도 1i). DMF가 존재할 때 VSV Δ 51의 암 살상 효과를 더 평가하기 위해, 본 발명자들은 암세포를 DMF로 전처리한 후, 낮은 MOI의 VSV Δ 51로 감염시켰으며, 감염 후 48시간 경과시에 대사 염료인 alamarBlue®로 세포의 생존능을 평가하였다. DMF 및 VSV Δ 51의 조합 처리는 인간 786-0 세포뿐 아니라, 마우스 CT26WT 및 B16F10 세포에서도 세포

생존능의 상승적 감소를 초래하였다(도 1j).

[0112] 실시예 2: 푸마르산디메틸은 생체외에서, 그리고 인간의 임상 시료에서 종양 특이적 감염을 향상시킨다.

[0113] 본 발명자들은, DMF가 마우스 유래 조직에서의 VSVΔ51 감염을 생체외에서 향상시키는 능력을 추가로 검증하였다. CT26WT 마우스 결장암세포 또는 B16F10 마우스 흑색종 암세포가 피하 이식된 마우스로부터 얻은 종양 코어 부분 아니라, 정상 폐, 근육, 비장으로부터 얻은 코어부를 수집한 후, 이를 150 μM의 DMF 존재시 또는 부재시에 VSVΔ51-GFP로 감염시켰다. DMF는 종양 CT26WT 및 B16F10 코어부에서 바이러스 성장을 각각 31배 및 13배 만큼 확고하게 증가시켰지만, 정상 조직의 코어부에서는 바이러스 성장을 증가시키지 못하였다(도 2a 및 도 2b). 게다가, 플라크 검정과 현미경에 의해 관찰된 바에 따르면, DMF는 원발성 인간 흑색종, 폐, 전립선 및 난소 종양 시료에서(도 2c 및 도 2d)뿐 아니라, 다양한 흑색종 및 난소암 환자 유래 암세포주에서도(도 2e) VSVΔ51 감염을 10배 초과하여 생체외 증가시켰다. DMF는, 마우스 정상 조직의 코어부에서와 유사하게, 다양한 인간 환자로부터 유래하되 정상인 인간의 폐와 근육 조직에서도 바이러스 성장을 개선하지 못하였다(도 2f).

[0114] 실시예 3:

[0115] DMF에 더하여, 다양한 푸마르산 및 말레산 에스테르(FMAE)는 소염 특성 및 면역조절 특성을 보이는 것으로 확인되었다[33]. 따라서 본 발명자들은, 기타 FAE와 이의 시스형 및 트랜스형 이성체(말레산 에스테르)(도 3a 및 도 3b)가, 암세포의 바이러스 감염에 대한 DMF의 영향력과 유사한 영향력을 가지는지 여부를 시험하였다. 실상, 세포 투과성 FAE, 예컨대 푸마르산디에틸(DEF)과 말레산 에스테르 말레산디메틸(DMM), 그리고 말레산디에틸(DEM)은 786-0 세포 및 CT26WT 세포에서의 VSVΔ51 감염, 확산 및 암 살상을 확고하게 시험관내에서 향상시켰다(도 3c, 도 3e, 도 3f). 생체외 감염된 CT26WT 종양 코어부에서도 또한 FMAE로 말미암아 감염이 향상되는 것이 관찰되었다(도 3d). DMF는 (도 3b에 보인 바와 같이) 에스테라아제에 의해 생체내에서 신속하게 푸마르산모노메틸(MMF)로 가수분해된 후, 푸마르산(FA)으로 가수분해되었다[34]. 실상, MMF는 다발성 경화증의 치료에 있어서 DMF의 활성 대사물질인 것으로 생각된다[34]. 786-0 세포에서 MMF는 또한 실질적으로 (그 유효 용량은 더 많았지만) VSVΔ51의 감염을 DMF에 의한 경우와 유사한 정도로 향상시켰다. 세포 투과성 에스테르인 MMF 및 DMF와는 대조적으로 푸마르산(FA)은 바이러스 성장에 영향을 미치지 않았다(도 3c 및 도 3e). 종합하여 보았을 때, 본 발명자들의 데이터는, DMF 및 기타 세포 투과성 FMAE가 마우스 및 인간 세포주와, 암 조직 이식편 둘 다에서 OV의 확산을 극적으로 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0116] 실시예 4: 푸마르산디메틸은 마우스 전임상 모델에서 암 살상 랩도바이러스의 치료 효능을 개선한다.

[0117] DMF는 임상 승인을 받은 약물이고, 본원에 기술된 연구들에 의하면 인간 종양 외식편 및 마우스 종양 외식편 둘 다에서 VSVΔ51의 성장과 활성을 광범위하고도 확고하게 시험관내 향상시켰으며, 정상 조직과는 반대되게 종양에서 우선적으로 그렇게 작용을 하였으므로, 이후 본 발명자들은 DMF와 암 살상 VSVΔ51을 조합 사용하였을 때의 생체내 잠재적 치료 이익을 평가하였다. 이를 위하여, 본 발명자들은 동계 마우스 종양 모델 및 이중이식 마우스 종양 모델 둘 다를 사용하였는데, 단 본 발명자들은 앞서 VSVΔ51이 단독치료수단으로서는 유효하지 않음을 보였다[35-38]. 마우스 CT26WT, B16F10 및 인간 결장암 HT29 세포를 Balb/c, C57BL/6 또는 누드 마우스 각각의 피하에서 성장시켰다. 마우스의 종양 내에 DMF를 4시간에 걸쳐 주사한 후, 루시페라아제 발현 VSVΔ51을 감염시켰다. 생체내 영상화 시스템(IVIS)을 사용하여 평가된 바에 따르면, DMF는 특히 바이러스 1차 주사후 24시간 경과시에 B16F10 모델을 제외한 종양에서 바이러스 연관 루시페라아제 유전자 발현을 향상시켰다(도 4a 및 도 4b). 그럼에도 불구하고, 모델 3개 모두에 있어서 조합 치료법은 종양 진행의 상당한 지연을 유도하였을뿐더러(도 4c), 어느 한 가지를 사용하는 단독치료법에 비하여 생존률도 유의미하게 연장시켰다(도 4d). 조합 치료법은 CT26WT 모델 및 B16F10 모델 둘 다의 대략 20%의 마우스에서 완전 관해를 유도하였다. 이후, 완치된 CT26WT 보유 마우스로서, 조합 치료계획이 수행되었던 마우스는 동일한 암세포에 의한 면역 재공격에 대해 면역성을 보이게 되었다(도 4e). 그러나 완치된 CT26WT 보유 마우스가 외래 종양(마우스 4T1 유방암)으로 공격되었을 때, 이 완치되었던 CT26WT 마우스에서는 4T1 종양이 처녀 마우스에서와 유사한 비율로 성장하였다(도 3f). 종합하여 보았을 때, 이는 특이적이고 장기간 지속되는 항 종양 면역성이 유효하게 달성됨을 나타낸다.

[0118] 실시예 5: 푸마르산 및 말레산 에스테르는 항 바이러스 반응을 억제한다.

[0119] DMF 및 기타 FMAE에 의해 OV의 향상을 매개하는, 일어날 수 있는 기작에 대한 추가의 통찰력을 얻기 위해, DMF, DEM, DEF, DMM의 존재하 또는 부재하에서 VSVΔ51로 인한 감염 후 24시간 경과시에 786-0 세포를 대상으로 마이크로어레이 유전자 발현 분석을 수행하였다. VSVΔ51 감염이 진행되었을 때, 예상대로 다수의 항 바이러스 유전자가 상향조절되었지만; DMF는 이러한 항 바이러스 유전자 다수(*ifit1*, *mx2*, *gpb4*, *ifi27*, *ifna*, *cxc110*)와,

상향조절된 다양한 유전자, 예컨대 산화환원 반응 유전자 다수(*cyp4f11*, *cdk5rap2*, *anxa10* *hmox1*, *osgin1*, *txnrd1*, *akr1b10*, *akr1b15*, *akr1c1*, *akr1c2*)의 억제를 유도하였다(도 5a 및 도 5d). GO텀 분석은, 감염된 786-0 세포에의 FMAE 처리가 바이러스에 대한 반응의 억제뿐 아니라, I형 IFN 신호전달의 억제를 유도하였음을 규명하였다(도 5b, 도 5c 및 도 5d). I형 IFN 반응의 억제와 일치되게도, 감염 후 24시간 경과시, DMF는 STAT1 및 STAT2 둘 다의 활성화(인산화)를 감소시켰다(도 5e). 이에 더하여, 항 바이러스성 단백질 IFITM1의 발현 수준은 DMF에 의해 강력하게 억제되었던 반면에, VSV 바이러스 단백질은 증가하였다(도 5e). 게다가, DMF는 VSV Δ51의 감염을 향상시켰지만, 야생형 VSV(wtVSV)에 의한 786-0 세포의 감염에는 영향을 미치지 못하였다(도 5f). VSV Δ51과는 달리, wtVSV는 I형 IFN 생산을 확고하게 억제하는 것으로 공지되어 있으므로, DMF의 효과는, 만일 I형 IFN 반응이 실제로 DMF의 항 바이러스 효과(pro-viral effect)를 이끌어내는데 관여한다면, wtVSV의 환경에서 왕성하게 발휘될 것으로 예상될 수 있다. FMAE가 항 바이러스 반응에 미치는 효과에 대한 기계적 통찰력을 얻기 위해, 본 발명자들은 바이러스 공격 및 IFN 매개 항 바이러스 신호전달에 대한 FMAE의 방어 능력을 검사하였다. FMAE(또는 모의체) 처리 이후, 본 발명자들은 바이러스 G 단백질(바이러스 출아(virus budding), 숙주 세포에의 결합 및 바이러스 도입에 관여하는 당단백질)을 암호화하지 않는 확산 불능 VSV Δ51 개체(VSV Δ51 ΔG)로 세포를 감염시켜, 새로운 비리온이 생성되는 것을 막았다[39]. 감염 후 12시간 또는 16시간 경과시에 세포 상청액을 수집한 다음, VSV Δ51 또는 wtVSV에 의한 감염을 실시하기 이전에 표적 세포를 전처리하는데 사용하였다. 본 발명자들이 얻은 결과들은, VSV Δ51 ΔG로 감염된 세포의 상청액은 VSV Δ51 또는 wtVSV에 의한 추후 바이러스 감염에 대해 방어 작용을 보일 수 있었던 반면에, DMF 또는 MMF가 첨가되면 VSV Δ51 및 wtVSV 둘 다에 대한 이러한 억제 효과가 완전히 극복될 수 있었음을 보여준다(도 5g). 실제로, 본 발명자들은 FMAE 존재하에 감염이 이루어진 후에는 IFNβ 및 IFNα의 생산이 감소한다는 것을 ELISA를 통해 관찰하였다(도 5h 및 도 5i). 또한, DMF 및 기타 FMAE에 의한 세포 처리는 I형 IFN 전처리의 VSV Δ51 감염에 대한 항 바이러스 효과를 길항시켰다(도 5j). 종합하여 보았을 때, 이 데이터는 FMAE가, I형 IFN 생산 및 JAK-STAT 경로를 통한 후속 신호전달을 억제하는 항 바이러스 신호전달에 영향을 미침을 암시한다. 이와 일치되게, 웨스턴 블롯팅 실험은, VSV Δ51 감염을 향상시켰던 용량만큼의 IFNβ로 조건 형성된 세포에서 DMF 및 DEM이, 바이러스 감염 후 I형 IFN의 전사 및 이에 대한 반응에 수반되는 STAT1 인산화를 억제하였음을 규명하였다(도 5k).

[0120] 실시예 6: 푸마르산 및 말레산 에스테르는 GSH 고갈과는 독립적으로 NF-κB 억제를 통하여 감염을 촉진한다

[0121] 본 발명자들의 데이터는, 항 바이러스 반응에 대한 FMAE 다수의 효과를 명확하게 시사하므로, 본 발명자들은 이러한 효과를 유도하는 현상들의 분자적 연쇄과정을 추가로 연구하였다. DMF, DEM, DEF 및 MMF는, Michael 첨가 반응에서 GSH에 의해 공격당하고, 세포내 GSH를 고갈시키며, 항산화 반응을 활성화하는 이들 화합물의 능력에 연루된, 공통의 α, β-불포화 탄소를 공유한다[40]. 그러므로 본 발명자들은 이 작용기가 결여된 숙신산디메틸(DMS)(도 6a)의 영향력을 시험하였다. 본 발명자들은 DMS 뿐 아니라, DMS의 가수분해된 형태인 숙신산염(S)도 바이러스 아웃풋에 영향을 미치지 않음을 발견하였다(도 6b 및 도 6c). FA, DMS 및 S와는 대조적으로, FMAE 모두는 GSH를 고갈시킬 수 있었다(도 6d). 그러나 DMF의 항 바이러스 활성화, GSH 합성에 필요한 글루탐산염 시스템인 리가아제(GCL) 억제제인 부티오닌설폭시민(BSO)의 존재하에 세포를 10일 동안 배양하여 GSH의 세포내 수준을 예비 고갈 상태로 만든 후에도 여전히 분명하였다(도 6g). 마이크로어레이에 의한 항 바이러스성 유전자 발현에 대한 FMAE의 영향력에 더하여, 이 FMAE는 또한 항산화 반응에 수반되는 다수의 유전자의 확고한 발현을 유도하였다(도 6e). 구체적으로, 실시간 PCR에 의해 측정되는 바에 따르면 *hmox1* 발현은 일관되게 FMAE에 의해 100배 이상 잘 상향조절되었지만(도 6f), FA, DMS 또는 S가 처리되었을 때에는 그렇지 않았다(도 6f). DMF와 기타 FMAE는, 항산화 유전자의 유도를 달성하는 KEAP1의 공유 변형을 통해 NRF2의 핵내 전위를 유도하는 것으로 보였다[41]. 이 점은, 본 발명자들의 관찰 결과, 즉 FMAE에 의해서는 *hmox1* 및 기타 NRF2 표적 유전자가 유도되지만, FA, DMS 또는 S에 의해서는 그렇지 않다는 결과와 일치하였다(도 6e 및 도 6f). DMF의 항 바이러스 효과가 NRF2 활성화에 의존적인지 여부를 확정하기 위하여, NRF2에 대한 siRNA 녹아웃을 수행하였다. 본 발명자들은, NRF2에 대한 녹다운(knockdown)이 DMF의 능력, 즉 VSV Δ51 감염을 향상시키는 능력을 차단하지 않았을 뿐 아니라, 항 바이러스성 인자 *ifitm1*도 억제하지 않았음을 발견하였다(도 6h). 게다가, DMF는 KEAP1 돌연변이를 포함하는 다수의 세포주(A549[42], CT26WT[43])에서 감염을 향상시킬 수 있었다(도 1d). 종합하여 보았을 때, 이러한 데이터는, FMAE의 능력, 즉 감염을 향상시키는 능력은 GSH 고갈에 수반되는 α, β-불포화 탄소를 필요로 하지만, GSH 고갈 또는 NRF2 활성화 그 어떤 것도 이러한 현상의 핵심 매개체일 것 같지는 않음을 암시한다. 앞서 DMF는 LPS 자극시 NF-κB 핵내 도입의 억제를 통해 사이토카인 생산을 억제하는 것으로 보였다는 점을 고려하여 [44-45], 본 발명자들은 감염된 세포의 핵 및 세포질 분획들을 살펴보았다. NF-κB 서브유닛 p65을 프로빙한 결과, DMF는 감염시 또는 TFNα 자극시 특히 IFNβ의 전사에 관여할 뿐만 아니라 I형 IFN에 대한 반응에도 관여하는, 이러한 전사 인자의 인산화 및 전위를 억제하였음이 규명되었다(도 6i 및 도 6j).

[0122] 실시예 7: MMF는 293-T 세포로부터 생산되는 렌티바이러스를 증가시킨다.

[0123] 도 7은, 4-플라스미드 3세대 복제 불능 렌티바이러스 시스템(단 이 렌티바이러스는 루시퍼라아제를 암호화함)으로 형질감염된 293T 세포가 MMF로 처리되었을 때에는 배지 또는 비이클(DMSO)만이 단독으로 존재할 때에 비하여 바이러스 생산량이 2.4배 증가하였음을 보여준다. 바이러스 역가는 렌티바이러스 함유 상청액을 관용성 HT1080 세포에 옮긴 후의 루시퍼라아제 발현에 의해 확인되었다. 이는, 플라스미드의 무한증식된 세포로의 공동형질감염에 의해 만들어진 복제 불능 렌티바이러스의 생산을 MMF가 유의미하게 증가시킴을 나타낸다.

[0124] 실시예 8: DMF는 VeroSF 세포에서 인플루엔자 바이러스의 역가를 증가시킨다.

[0125] 도 8은, VeroSF 세포(무혈청 배지에서 성장에 적응한 Vero 세포)에의 DMF 처리는 (DMSO 비이클 및 배지 각각의 단독 처리시에 비하여) 인플루엔자 A H1N1 FM/1/47 생산량을 3.0배 ~ 3.8배 증가시켰음을 보여준다. 이 실시예에서, 바이러스의 핵단백질 항원을 표준 대조군과 비교하여 ELISA에 의해 정량하였으며, 이 데이터를 바이러스 역가 추산에 사용하였다. 이 데이터는, 직접적으로는 DMF가 인플루엔자 바이러스 단백질 항원 생산을 향상시켰음을, 그리고 간접적으로는 인플루엔자 바이러스 생산량을 유사하게 개선하였음을 나타낸다.

[0126] 재료 및 방법

[0127] **약물, 화학물질 및 사이토카인.** 본 연구에 사용된 약물, 화학물질 및 사이토카인과, 이것들 각각의 공급처, 그리고 용매는 이하와 같다.

명칭	약어	용매	공급처
말레산디에틸	DEM	DMSO	Sigma-Aldrich
푸마르산디에틸	DEF	DMSO	Sigma-Aldrich
말레산디메틸	DMM	DMSO	Sigma-Aldrich
푸마르산디에틸	DMF	DMSO	Sigma-Aldrich
푸마르산모노메틸	MMF	물	Sigma-Aldrich
푸마르산	FA	DMSO	Sigma-Aldrich
숙신산디에틸	DMS	DMSO	Sigma-Aldrich
숙신산나트륨 이염기성 6수화물	S	물	Sigma-Aldrich
IKK16	IKK16	DMSO	Cayman Chemical
TPCA1	TPCA1	DMSO	Abcam
L-글루타치온(환원)	GSH	물	Cayman Chemical
N-아세틸-L-시스테인	NAC	물	Sigma-Aldrich
L-부티오닌-설희시민	BSO	물	Sigma-Aldrich
D-루시페린(칼륨염)	루시페린	PBS	Biotium
인간 IFN 2α 알파	IFNα	PBS	Sigma-Aldrich
인간 IFN 베타	IFNβ	PBS	PBL
인간 TNF 알파	TNFα	PBS	R&D Systems

[0128]

[0129] **세포주.** B16F10(흑색종), CT26WT(결장), 76-9(육종), 293-T 세포, EMT6(유방), K7M2(골육종) 마우스 암세포주; Vero 원숭이 신장 세포(무혈청 배지에 적응시킨 Vero 세포); 및 786-0(결장), A549(폐), HT29(결장), M14(흑색종), OVCA433(난소), SKOV3(난소), EK VX(폐), HT1080(육종) 인간 암세포를 HyQ 고 글루코스 Dulbecco 개질 Eagle 배지(DMEM)(Hyclone), 또는 10 % 소 태아 혈청(CanSera), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco) 보충 로즈웰

파트 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute; RPMI)-1640 배지(Corning)에서 배양하였다. 모든 세포주를 37°C 및 5% CO₂의 가습 항온처리기 내에서 항온처리하였다. 세포 모두가 마이코플라스마 오염이 일어나지 않았는지 확인하기 위해 모든 세포를 시험하였다.

[0130] **인간 유래 세포주.** Ottawa Health Science Network 연구 윤리 위원회(OHSN-REB) 프로토콜(번호: 20140075-01H)에 따라서 일상적인 천자가 수행되는 동안, 난소암 개체의 복수로부터 난소암 1차 배양액을 구하였다. 이 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 완전 Dulbecco 개질 Eagle 배지에 유지시켰다. 이 배양액을 특성 규명하였으며, 실험 모델로 사용하기 위해 저온보존하여 두었다. 수술에 의해 절제한 표본으로부터 흑색종 1차 배양액을 구하였다. 수술은 Ottawa 병원에서 수행하였으며, 표본은 OHSN-REB # 20120559-01에 따라서 환자의 동의를 받은 이후에 채취하였다. 1차 배양액을, 10% 소 태아 혈청이 보충된 로즈웰 파트 메모리얼 인스티튜트(RPMI)-1640 배지에 유지시켰다. 종양 표본을 매스를 사용하여 균질화한 다음 이 균질화물을 70 µm 나일론 메쉬 세포 스트레이너(cell strainer)(ThermoFisher Scientific)에 통과시켜 여과함으로써 1차 배양액을 확립하였다. 실험 목적에 충분한 세포 증식이 일어날 때까지, 배지를 주기적으로 새것으로 바꾸어주면서 균질화물을 배양액중에 유지시켰다. 흑색종 1차 배양액 둘 다를 특성 규명하였으며, 실험 모델로 사용하기 위해 저온보존하여 두었다.

[0131] **바이러스 및 정량.** *렙도바이러스.* 본 연구를 통틀어 VSV(VSVΔ51 또는 야생형)의 인디애나(Indiana) 혈청형을 사용하였으며, 이를 Vero 세포에서 증식시켰다. GFP 또는 반딧불이 루시페라아제 발현 VSVΔ51은 이전에 기술된 VSVΔ51의 재조합 유도개체이다[30]. 모든 바이러스를 Vero 세포에서 증식시키고, 5% ~ 50% Optiprep(Sigma, St Louis, MO) 구배하에 정제하였으며, 이전에 기술된 바와 같이 표준 플라크 검정에 의해 Vero 세포상 모든 바이러스 역가를 정량하였다[46]. 감염성 바이러스 입자의 수를 밀리리터(ml)당 플라크 형성 단위(Plaque-Forming Unit; PFU)로서 표현하였다. *아데노바이러스.* 이 연구에서는 Ad5-루시페라아제(반딧불이 루시페라아제를 발현하는 아데노바이러스 혈청형 5)를 사용하였다. *단순 포진 바이러스.* GFP를 발현하는 HSV-1 N212. HSV 바이러스 역가를, 이전에 기술된 바와 같이 표준 플라크 검정으로 Vero 세포상에서 정량하였다. *신드비스 바이러스.* 신드비스 바이러스를, 표준 플라크 검정으로 Vero 세포상에서 정량하였다. 감염 후 3일 경과시 플라크를 계수하였다. *렌티바이러스.* 루시페린을 상청액에 첨가하고 나서, Biotek 평판 판독기를 사용하여 루시페라아제 리포터 유전자 시스템을 가지는 렌티바이러스를 정량하였다. *인플루엔자.* 인플루엔자 A/FM/1/47 바이러스를 사용하였으며, ELISA에 의해 흡광도 값을 구하였다.

[0132] **세포 생존능 검정.** 제조자의 프로토콜에 따라 alamarBlue®(Bio-Rad)를 사용하여 세포의 대사 활성을 평가하였다. Fluoroskan Ascent FL(Thermo LabSystems)을 사용하여 530 nm에서 여기되었을 때의 형광도(590 nm)를 측정하였다.

[0133] **마이크로어레이 및 분석.** 786-0 세포를, 6웰 디쉬 중 밀도 1 x 10⁶개가 되도록 도말하고 나서, 밤새도록 부착시켰다. 다음날, 세포를 DEM(350 µM), DEF(350 µM), DMM(300 µM), DMF(200 µM) 또는 비이클로 4시간 동안 전처리하였다. 전처리 후, 세포를 VSVΔ51(MOI = 0.01)로 감염시키거나 또는 모의 감염시켰다. 감염 후 24시간 경과시, RNAeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 RNA를 수집하였다. 이후 생물물질 3개씩을 풀링한 다음, Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies)를 사용하여 RNA 품질을 측정 한 후, Affymetrix Human PrimeView 어레이(The Centre for Applied Genomics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada)에 잡종화시켰다. 유전자 수준 차등 발현 분석(Gene Level Differential Expression Analysis)의 디폴트 매개변수 적용하에 TAC(Transcriptome Analysis Console) 3.0을 사용하여 마이크로어레이 데이터를 가공하였다. 미감염, 미처리 대조군과 관련된 각각의 유전자에 대한 유전자 발현 배수 변화를 산정하였다. 정규화한 발현 값의 히트맵을, R 패키지 피트맵(heatmap)을 이용하여 작성하였다. 유전자 발현 값의 볼케이노 플롯(Volcano plot)을, R을 사용하여 작성하였다. 다수의 가설 검정(Benjamini-Hochberg)에 대하여 교정을 수행한 후 Gorilla를 이용하여 유전자 온톨로지 강화 분석을 평가하였다[47]. 미가공 및 가공 마이크로어레이 데이터를 NCBI-유전자 발현 유니버시티 데이터베이스(GSE97328)에 저장하여 두었다.

[0134] **마우스 종양 모델.** *CT26WT 모델.* Charles River Laboratories에서 입수한 6주령 암컷 BALB/c 마우스에, 100 µl PBS 중 현탁한 5 x 10⁵개의 동계 CT26WT 세포를 피하 주사하여 종양을 이식하였다. 이식후 11일차에 종양 내부에 (DMSO 중에 용해한) DMF 200 mg/kg 또는 비이클(단독)을 1회 처리(i.t.)하였다. 4시간 후 종양 내부에 (25 µl PBS 중) 반딧불이 루시페라아제 발현 VSVΔ51 1 x 10⁸ PFU 만큼을 주사하였다. *HT29 모델.* 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스에, 100 µl Geltrex(Thermo Fisher) 및 100 µl 무혈청 DMEM 중에 현탁한 5 x 10⁶개의 동계 HT29 세포를 피하 주사하여 종양을 이식하였다. 종양이 대략 5 mm x 5 mm로 성장하였을 때(이식후 11일차),

마우스의 종양 내부에 명시된 바와 같은 비이클 또는 (DMSO 중에 용해한) DMF 200 mg/kg을 1회 처리하였다. 4시간 후, 종양 내부에 반딧불이 루시페라아제 발현 VSV Δ 51 1×10^8 PFU 만큼을 주사하였다. B16F10 모델. Charles River Laboratories로부터 입수한 6주령 암컷 C57BL/6 마우스에, 100 μ l PBS 중 현탁한 5×10^5 개의 동계 B16F10 세포를 피하 주사하여 종양을 이식하였다. 이식후 11일 차에 종양 내부에 (DMSO 중에 용해한) DMF 50 mg/kg 또는 비이클(단독)을 1회 처리(i.t.)하였다. 4시간 후 종양 내부에 (25 μ l PBS 중) 반딧불이 루시페라아제 발현 VSV Δ 51 1×10^8 PFU 만큼을 주사하였다. 종양 크기를 전자식 캘리퍼를 사용하여 이틀에 한 번씩 측정하였다. 종양 부피를 (길이² x 폭)/2로서 산정하였다. 생존률 연구를 위해, 종양이 1,500mm³에 도달하였을 때 마우스를 도태시켰다. 생체내 영상화를 위해 이미 기술된 바와 같이 IVIS(Perkin Elmer)를 사용하였다[36]. Living Image® v2.50.1 소프트웨어를 사용하여 각각의 마우스에 있어서 생물발광 신호의 세기를 정량하였다. 모든 동물 실험에 있어서의 표본의 크기(n)는 5 이상이었다. 모든 실험에서의 종양 크기에 따라 마우스를 무작위로 상이한 처리 군들에 할당하였다. 초기 치료일에 종양이 만져지지 않는 마우스는 연구에서 배제하였다. 연구자들은 어느 처리 군에 어느 마우스를 할당하였는지 모르는 상태에서 실험 및 결과에 대한 평가를 수행하였다. 모든 실험은 동물 보호에 관한 오타와 대학교 동물 복지 및 수의학 서비스 가이드라인에 따라서 프로토콜 OHRI-2265 및 OHRI-2264 하에 수행하였다.

[0135] **생체의 마우스 모델.** BALB/c 마우스에 CT26WT를 피하 이식하였다. 종양 크기가 적어도 10 mm x 10 mm에 이르렀을 때 마우스를 죽였다. 종양, 폐, 비장 및 뇌 조직을 마우스로부터 추출하여, 두께 2 mm의 박편으로 자른 다음, 펀치 생검(punch biopsy)을 이용하여 이의 코어부를 2 mm x 2 mm의 조각으로 채취하였다. 각각의 조직 코어부를, 10% 소 태아 혈청, 30 mM HEPES가 보충된 Dulbecco 개질 Eagle 배지(DMEM) 1 mL 중에서 항온처리하고 나서, 37°C 및 5% CO₂의 가슴 항온처리기 내에서 항온처리하였다. 명시된 농도만큼의 화학적 화합물로 4시간 동안 코어부를 처리하였다. 그 다음, 코어부를 VSV Δ 51-GFP로 감염시켰다. 감염 후 24시간 경과시 각각의 코어부에 대해 GFP 사진을 촬영하였다.

[0136] **생체의 인간 시료.** 수술중 동의 의사를 밝힌 개체들로부터 종양 시료를 획득하였으며, 표본을 이전에 서사된 바와 같이 다루었다[48]. 인간 조직 시료를 필요로 하는 모든 연구에 대하여 Ottawa Health Science Network 연구 윤리 위원회(OHSN-REB # 2003109-01H 및 OHSN-REB # 20120559-01)의 승인을 얻었다. 헬싱키 선언 가이드라인에 따라 사전고지 서면동의서를 환자로부터 제공받았다.

[0137] **면역블롯팅.** 세포를 펠릿으로 만든 다음, 50mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Na₂P₂O₇, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 프로테아제 억제제 콕테일(Roche) 및 1% Triton X-100를 사용하여 이 펠릿으로 만들어진 시료를 얼음상에서 30분 동안 용해하였다. 핵 추출 및 세포질 추출을 위해, 제공된 프로토콜에 따라서 NE-PER 핵-세포질 추출 키트(ThermoFisher Scientific, Rockford IL)를 사용하였다. Bradford 검정(Bio-Rad Protein Assay Solution)에 의한 단백질 확정 후, 청징화된 세포 용해물 20 μ g을 XCell SureLock® 미니-셀 시스템(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris 예비성형 겔(ThermoFisher Scientific) 상에서 전기영동한 다음, 니트로셀룰로스 막(Hybond-C, Bio-Rad)에 옮겼다. 블롯을 5% BSA 또는 밀크로 차단한 다음, 포스포-Stat1(Tyr701, #9171, Cell Signalling Technology, 1:1000으로 사용) 및 Stat1(#9172, Cell Signalling Technology, 1:1000으로 사용), Stat2(#72604, Cell Signalling Technology, 1:1000으로 사용), 포스포-Stat2(#88410S, Cell Signalling Technology, 1:1000으로 사용), IFITM1(#60074-1-Ig, Proteintech Group, 1:1000으로 사용, 5% 밀크 중), VSV(Earl Brown 박사 기증, 1:2000으로 사용), HMOX1(#70081, Cell Signalling Technology, 1:2000으로 사용) 또는 β -액틴(#4970, Cell Signalling Technology, 1:1000으로 사용)에 특이적인 항체로 프로빙하였다. 그 다음, 블롯을 염소 항 토끼 또는 마우스 퍼옥시다아제 접합 항체(Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA)로 프로빙하였다. Supersignal West Pico 화학발광 기질(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 밴드를 가시화하였다.

[0138] **ELISA.** 12웰 디쉬에 도달한 786-0 세포를 화학물 또는 비이클로 4시간 동안 전처리한 다음, 명시된 MOI만큼의 VSV Δ 51-GFP로 감염시키거나, 또는 미감염된 상태로 놔두었다. 감염 후 명시된 바와 같은 상이한 시점에서 세포 상청액을 수집하였다. 제조자의 지침에 따라서 Verikine 인간 IFN 알파 또는 IFN 베타 ELISA 키트(PBL Assay Science)를 사용하여 IFN 알파 및 IFN 베타의 정량을 수행하였다. Multiskan Ascent 미세평판 판독기(MXT Lab Systems) 상에서 450 nm에서의 흡광도 값을 측정하였다.

[0139] **정량적 실시간 PCR.** 786-0 세포를, 명시된 화학적 화합물 또는 비이클로 6시간 동안 처리하였다. 세포를 수집한

다음, Qiagen RNeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 RNA 추출을 수행하였다. NanoDrop ND-1000 분광분석계(Thermo Scientific)를 사용하여 RNA의 양과 순도를 평가하였다. RevertAid H Minus First Strand cDNA 합성 키트(Thermo Scientific)에 의해 RNA를 cDNA로 전환시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라 7500 신속 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems) 상에서 QuantiTect SYBR Green PCR 키트(Qiagen)에 의해 실시간 PCR 반응을 수행하였다. GAPDH 또는 b-액틴에 상대적인 유전자 발현. 미처리/미감염 시료를 기준으로 각각의 유전자에 대한 유도 배수를 산정하였다. 사용된 qPCR 프라이머의 목록:

gapdh (정 -ACAGTCAGCCGCATCTTCTT (서열 번호 1);
역 -GTTAAAAGCAGCCCTGGTGA) (서열 번호 2)

hmx1 (정 -ACTGCGTTCCTGCTCAACAT (서열 번호 3);
역 -GGGGCAGAATCTTGCACTTT) (서열 번호 4)

nrf2 (정 -CAACTACTCCCAGGTTGCC (서열 번호 5);
역 -AGTGACTGAAACGTAGCCGA) (서열 번호 6)

ifit1 (정 -CCGTGAAGTCTAGGGACAGG (서열 번호 7);
역 -GGTAGACTGTACAGAGCCG) (서열 번호 8)

[0140]

[0141]

상청액 운반 실험. 12웰 디쉬에 도달한 786-0 세포를 FMAE 또는 비이클로 4시간 동안 전처리한 다음, VSVΔ51Δ G-GFP(MOI = 1)로 감염시켰다. 이 바이러스는 세포를 감염시켜 자신의 게놈을 복제할 수 있지만, 바이러스 G 단백질이 결여되었기 때문에 더 이상 출아한다거나 확산한다거나 하지는 못하였던 관계로, 상청액 중 바이러스 입자의 방출은 방지될 수 있었다. 감염 후 1시간 경과시 상청액을 따라내어 잔여 약물 및 바이러스를 제거하였으며, 10% 소 태아 혈청이 보충된 성장 배지를 다시 공급하였다. 감염 후 12시간 또는 16시간 경과시 상청액을 수집한 다음, 이를 새로 공급한 786-0 세포에 옮긴 후, 추가의 분석을 위해 처리하였다.

[0142]

siRNA. 12웰 디쉬에 도달한 786-0 세포를, NRF2에 대한 소형 간섭 RNA(100 nM)(ON-TARGETplus NFE2L2 siRNA #L-003755-00-0005, GE Dharmacon) 또는 비 표적화 스크램블 siRNA(scramble siRNA)(GE Dharmacon)로 형질감염시켰다. 제조자의 프로토콜에 따라서 형질감염을 수행하였다(Oligofectamine, Life Technologies).

[0143]

글루타치온 검정 96웰 디쉬에 도달한 786-0 세포를 FMAE 또는 비이클로 4시간 동안 전처리한 다음, 제조자의 지침에 따라 GSH-GloTM 글루타치온 검정 키트(Promega)를 사용하여 글루타치온 수준을 확정하였다. 발광 기반 검정은, 글루타치온 존재하에 글루타치온 S 트랜스퍼라아제(GST)에 의해 촉매화되는 과정, 즉 루시페린 유도체가 루시페린으로 전환되는 과정을 바탕으로 한다. 반딧불이 루시퍼라아제와 쌍을 이루어 진행된 반응에서 발생한 신호는 시료 중에 존재하는 글루타치온의 양에 비례하였다. 검정 결과는, 키트로 제공된 GSH 표준 용액을 사용하여 정규화되었다. 이후, SynergyMx 미세평판 판독기(BioTek) 상에서 루시퍼라아제 발현을 측정하였다.

[0144]

통계. 도면의 설명에 명시된 바와 같이, Welch 교정, 1원 또는 2원 ANOVA 검정을 수행함과 아울러 스튜던트 t-검정을 이용하여 통계적 유의미성을 산정하였다. 모든 통계적 분석에 있어서, *p*-값이 0.05 이하이면 차이는 유의미한 것으로 간주하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. 로그 순위(Mantel-Cox) 검정을 사용하여, 플롯에서의 유의미한 차이를 확정함으로써 생존률 연구를 수행하였다. GraphPad Prism 6.0 및 Microsoft Excel을 이용하여 통계적 분석을 수행하였다.

[0145] 참고문헌

- [1] Anulanandam, R., et al., Microtubule disruption synergizes with oncolytic virotherapy by inhibiting interferon translation and potentiating bystander killing. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 6410.
- [2] Forbes, N.E., R. Krishnan, and J.S. Diallo, Pharmacological modulation of anti-tumor immunity induced by oncolytic viruses. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 191.
- [3] Liu, T.C. and D. Kirn, Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, 2008. 15(12): p. 877-84.
- [4] Zamarin, D., et al., Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med*, 2014. 6(226): p. 226ra32.
- [5] Russell, S.J., K.W. Peng, and J.C. Bell, Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 2012. 30(7): p. 658-70.
- [6] Coffin, R.S., From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Curr Opin Virol*, 2015. 13: p. 93-100.
- [7] Lichty, B.D., et al., Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(8): p. 559-67.
- [8] Zhang, J., et al., Maraba MG1 virus enhances natural killer cell function via conventional dendritic cells to reduce postoperative metastatic disease. *Mol Ther*, 2014. 22(7): p. 1320-32.
- [9] Workenhe, S.T. and K.L. Mossman, Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Mol Ther*, 2014. 22(2): p. 251-6.
- [10] Andtbacka, R.H., et al., Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*, 2015. 33(25): p. 2780-8.
- [11] Lawler, S.E. and E.A. Chiocca, Oncolytic Virus-Mediated Immunotherapy: A Combinatorial Approach for Cancer Treatment. *J Clin Oncol*, 2015. 33(25): p. 2812-4.
- [12] Hu, J.C., et al., A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(22): p. 6737-47.
- [13] Fumaric Acid Esters in the management of psoriasis, Balak, *Psoriasis: Targets and Therapy*, 2015, 5, 9-23

[0146]

- [14] L. Kappos, et al., BG-12 Phase IIb Study Investigators, Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study, *Lancet* 372, 1463–1472 (2008).
- [15] R. A. Linker, D.-H. Lee, S. Ryan, A. M. van Dam, R. Conrad, P. Bista, W. Zeng, X. Hronowsky, A. Buko, S. Chollate, G. Ellrichmann, W. Brück, K. Dawson, S. Goelz, S. Wiese, R. H. Scannevin, M. Lukashev, R. Gold, Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway, *Brain* 134, 678–692 (2011).
- [16a] R. Loewe, W. Holnthoner, M. Gröger, M. Pillinger, F. Gruber, D. Mechtcheriakova, E. Hofer, K. Wolff, P. Petzelbauer, Dimethylfumarate Inhibits TNF-Induced Nuclear Entry of NF- κ B/p65 in Human Endothelial Cells, *The Journal of Immunology* 168, 4781–4787 (2002).
- [17] P. Albrecht, et al., Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation, *J. Neuroinflammation* 9, 163 (2012)
- [18] J. C. U. Lehmann, J. J. Listopad, C. U. Rentzsch, F. H. Igney, A. von Bonin, H. H. Hennekes, K. Asadullah, W.-D. F. Docke, Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1, *J. Invest. Dermatol.* 127, 835–845 (2007).
- [19] S. X. Lin, L. Lisi, C. Dello Russo, P. E. Polak, A. Sharp, G. Weinberg, S. Kalinin, D. L. Feinstein, The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1, *ASN Neuro* 3 (2011), doi:10.1042/AN20100033.
- [20] C. B. Burness, E. D. Deeks, Dimethyl fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *CNS Drugs* 28, 373–387 (2014).
- [21] J. J. Hoefnagel, H. B. Thio, R. Willemze, Long- term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis, *British Journal of* (2003) (available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2133.2003.05433.x/full>).
- [22] A. Atwan, J. R. Ingram, R. Abbott, M. J. Kelson, T. Pickles, A. Bauer, V. Piguat, in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2015).
- [23] 8. X. Xie, Y. Zhao, C.-Y. Ma, X.-M. Xu, Y.-Q. Zhang, C.-G. Wang, J. Jin, X. Shen, J.-L. Gao, N. Li, Z.-J. Sun, D.-L. Dong, Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway, *Br. J. Pharmacol.* 172, 3929–3943 (2015).
- [24] N. E. B. Saidu, G. Noé, O. Cerles, L. Cabel, N. Kavian-Tessler, S. Chouzenoux, M. Bahuaud, C. Chéreau, C. Nicco, K. Leroy, B. Borghese, F. Goldwasser, F. Batteux, J. Alexandre, Dimethyl Fumarate Controls the NRF2/DJ-1 Axis in Cancer Cells: Therapeutic Applications, *Mol. Cancer Ther.* 16, 529–539 (2017).

[0147]

- [25] R. Loewe, T. Valero, S. Kremling, B. Pratscher, R. Kunstfeld, H. Pehamberger, P. Petzelbauer, Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis, *Cancer Res.* 66, 11888–11896 (2006).
- [26] T. Valero, S. Steele, K. Neumüller, A. Bracher, H. Niederleithner, H. Pehamberger, P. Petzelbauer, R. Loewe, Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis, *J. Invest. Dermatol.* 130, 1087–1094 (2010).
- [27] I. Kaluzki, I. Hrgovic, T. Hailemariam-Jahn, M. Doll, J. Kleemann, E. M. Valesky, S. Kippenberger, R. Kaufmann, N. Zoeller, M. Meissner, Dimethylfumarate inhibits melanoma cell proliferation via p21 and p53 induction and bcl-2 and cyclin B1 downregulation, *Tumour Biol.* 37, 13627–13635 (2016).
- [28] I. Kastrati, M. I. Siklos, E. L. Calderon-Gierszal, L. El-Shennawy, G. Georgieva, E. N. Thayer, G. R. J. Thatcher, J. Frasor, Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein, *J. Biol. Chem.* 291, 3639–3647 (2016).
- [29] B. Gu, L. M. DeAngelis, Enhanced cytotoxicity of bioreductive antitumor agents with dimethyl fumarate in human glioblastoma cells, *Anticancer Drugs* 16, 167–174 (2005).
- [30] D. F. Stojdl, B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott, J. C. Bell, VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents, *Cancer Cell* 4, 263–275 (2003).
- [31] F. Le Boeuf, M. Selman, H. Hee Son, A. Bergeron, A. Chen, J. Tsang, D. Butterwick, R. Arulanandam, N. E. Forbes, F. Tzelepis, J. C. Bell, J. Werier, H. Abdelbary, J.-S. Diallo, Oncolytic Maraba virus MG1 as a treatment for Sarcoma, *Int. J. Cancer* (2017), doi:10.1002/ijc.30813.
- [32] C. Sheridan, Gene therapy finds its niche, *Nat. Biotechnol.* 29, 121–128 (2011).
- [33] D. Moharreggh-Khiabani, R. A. Linker, R. Gold, M. Stangel, Fumaric Acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis, *Curr. Neuropharmacol.* 7, 60–64 (2009).
- [34] R. Bomprezzi, Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview, *Ther. Adv. Neurol. Disord.* (2015), doi:10.1177/1756285614564152.
- [35] C. G. Lemay, J. L. Rintoul, A. Kus, J. M. Paterson, V. Garcia, T. J. Falls, L. Ferreira, B. W. Bridle, D. P. Conrad, V. A. Tang, J.-S. Diallo, R. Arulanandam, F. Le Boeuf, K. Garson, B. C. Vanderhyden, D. F. Stojdl, B. D. Lichty, H. L. Atkins, K. A. Parato, J. C. Bell, R. C. Auer, Harnessing oncolytic virus-mediated antitumor immunity in an infected cell vaccine, *Mol. Ther.* 20, 1791–1799 (2012).

[0148]

- [36] M. H. Dornan, R. Krishnan, A. M. Macklin, M. Selman, N. El Sayes, H. H. Son, C. Davis, A. Chen, K. Keillor, P. J. Le, C. Moi, P. Ou, C. Pardin, C. R. Canez, F. Le Boeuf, J. C. Bell, J. C. Smith, J.-S. Diallo, C. N. Boddy, First-in-class small molecule potentiators of cancer virotherapy, *Sci. Rep.* 6, 26786 (2016).
- [37] M.-C. Bourgeois-Daigneault, D. G. Roy, T. Falls, K. Twumasi-Boateng, L. E. St-Germain, M. Marguerie, V. Garcia, M. Selman, V. A. Jennings, J. Pettigrew, S. Amos, J.-S. Diallo, B. Nelson, J. C. Bell, Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- σ has enhanced therapeutic activity, *Molecular Therapy - Oncolytics* 3, 16001 (2016).
- [38] M. Selman, C. Rousso, A. Bergeron, H. H. Son, R. Krishnan, N. A. El-Sayes, O. Varette, A. Chen, F. Le Boeuf, F. Tzelepis, J. C. Bell, D. Crans, J.-S. Diallo, Multi-Modal Potentiation of Oncolytic Virotherapy by Vanadium Compounds, *Mol. Ther.* 0 (2017), doi:10.1016/j.ymthe.2017.10.014.
- [39] C. S. Robison, M. A. Whitt, The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly, *J. Virol.* 74, 2239–2246 (2000).
- [40] L. B. Sullivan, E. Martinez-Garcia, H. Nguyen, A. R. Mullen, E. Dufour, S. Sudarshan, J. D. Licht, R. J. Deberardinis, N. S. Chandel, The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling, *Mol. Cell* 51, 236–248 (2013).
- [41] M. S. Brennan, M. F. Matos, B. Li, X. Hronowski, B. Gao, P. Juhasz, K. J. Rhodes, R. H. Scannevin, Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro, *PLoS One* 10, e0120254 (2015).
- [42] B. E. Hast, E. W. Cloer, D. Goldfarb, H. Li, P. F. Siesser, F. Yan, V. Walter, N. Zheng, D. N. Hayes, M. B. Major, Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination, *Cancer Res.* 74, 808–817 (2014).
- [43] J. C. Castle, M. Loewer, S. Boegel, J. de Graaf, C. Bender, A. D. Tadmor, V. Boisguerin, T. Bukur, P. Sorn, C. Paret, M. Diken, S. Kreiter, Ö. Tureci, U. Sahin, Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma, *BMC Genomics* 15, 190 (2014).
- [44] V. A. McGuire, T. Ruiz-Zorrilla Diez, C. H. Emmerich, S. Strickson, M. S. Ritorto, R. V. Sutavani, A. Weiß, K. F. Houslay, A. Knebel, P. J. Meakin, I. R. Phair, M. L. J. Ashford, M. Trost, J. S. C. Arthur, Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation, *Sci. Rep.* 6, 31159 (2016).
- [45] H. Peng, M. Guerau-de-Arellano, V. B. Mehta, Y. Yang, D. J. Huss, T. L. Papenfuss, A. E. Lovett-Racke, M. K. Racke, Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor κ B (NF- κ B) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling, *J. Biol. Chem.* 287, 28017–28026 (2012).
- [46] J.-S. Diallo, M. Vähä-Koskela, F. Le Boeuf, J. Bell, Propagation, purification, and in vivo testing of oncolytic vesicular stomatitis virus strains, *Methods Mol. Biol.* 797, 127–140 (2012).
- [47] E. Eden, R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson, Z. Yakhini, GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists, *BMC Bioinformatics* 10, 48 (2009).
- [48] J.-S. Diallo, D. Roy, H. Abdelbary, N. De Silva, J. C. Bell, Ex vivo infection of live tissue with oncolytic viruses, *J. Vis. Exp.* (2011), doi:10.3791/2854.

[0149]

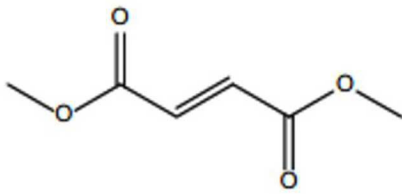
[0150]

[0151]

본원과 본 발명의 설명 어딘가에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 참고문헌으로서 본원에 인용되어 있는 것이다.

도면

도면1a

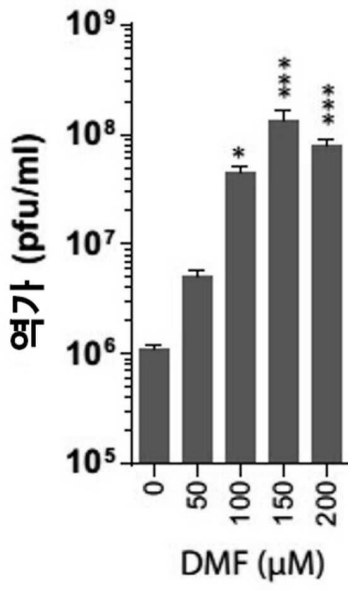


푸마르산디메틸 (DMF)

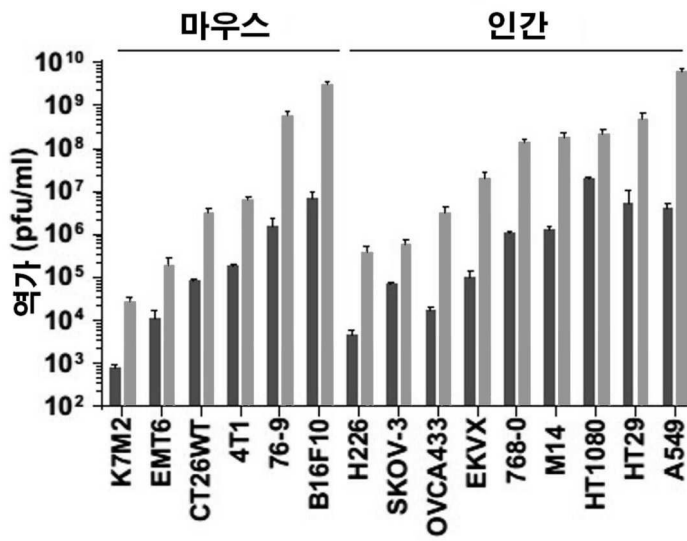
도면1b

		VSVΔ51	
		미처리	DMF
786-0			 150 μM
B16F10			 250 μM
HT29			 200 μM
CT26wt			 200 μM

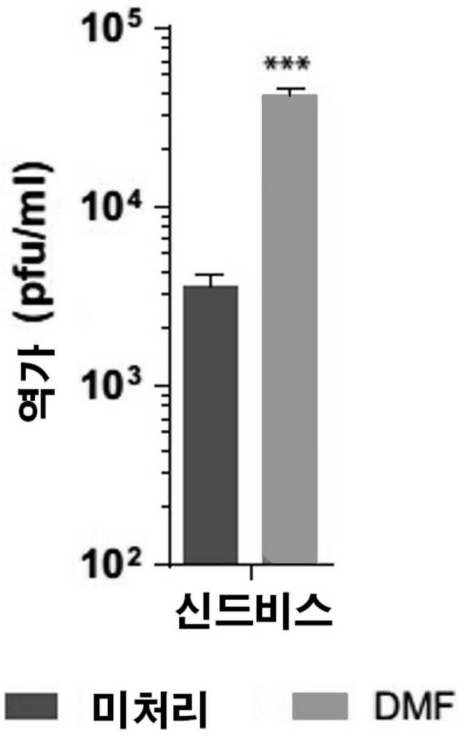
도면1c



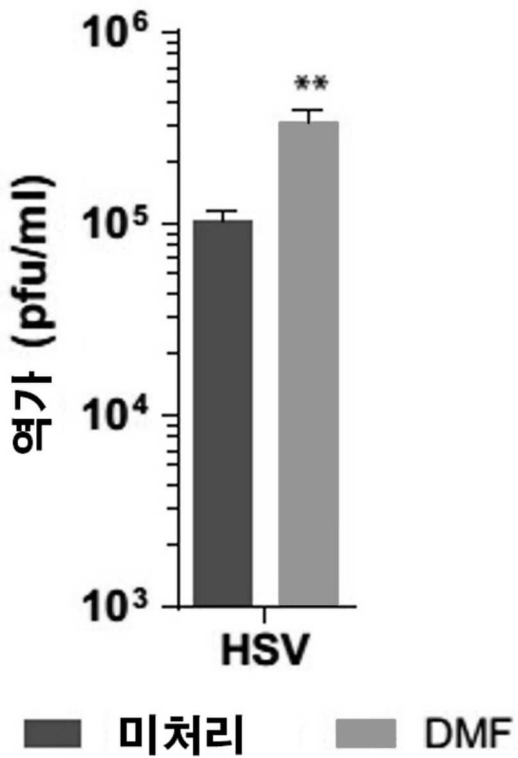
도면1d



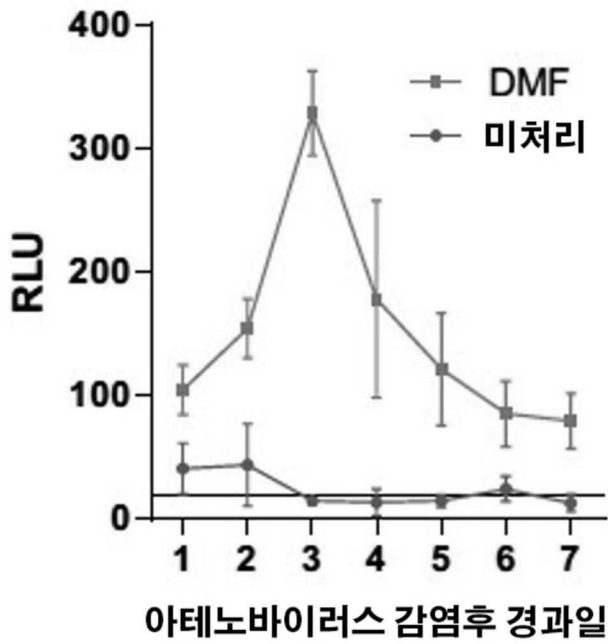
도면1e



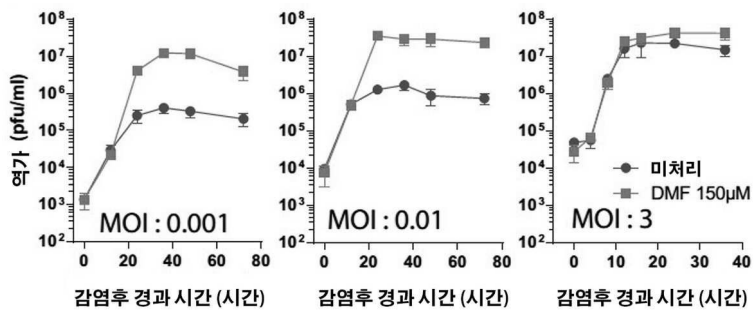
도면1f



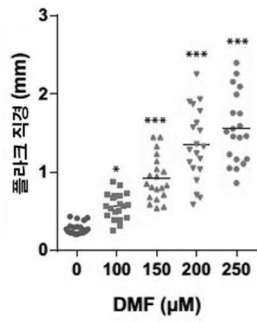
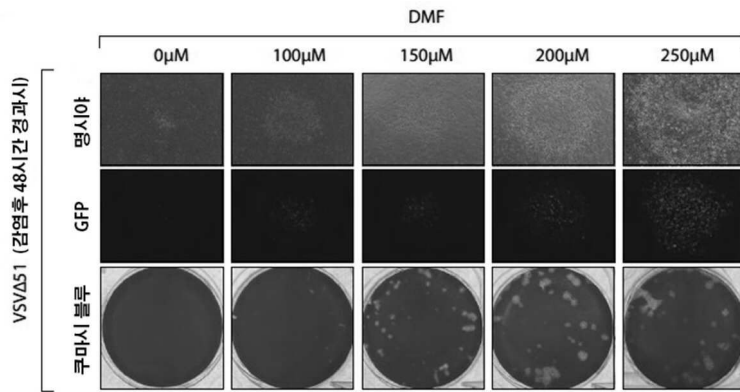
도면1g



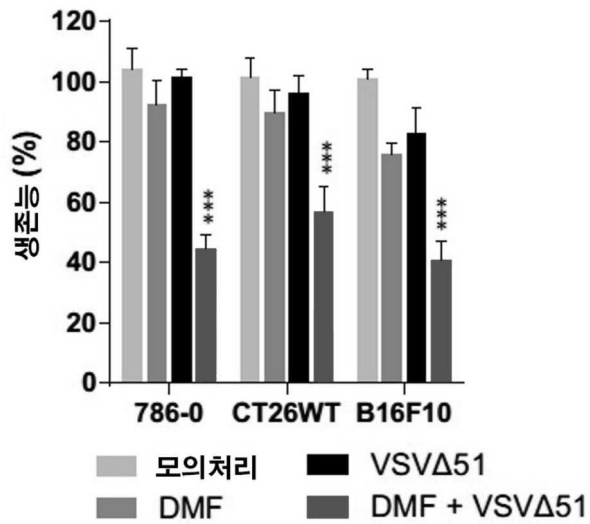
도면1h



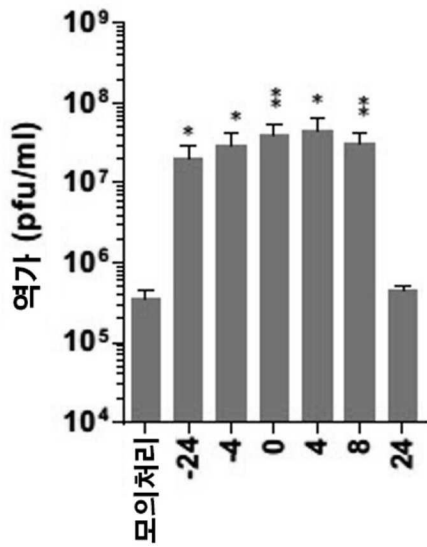
도면1i



도면1j

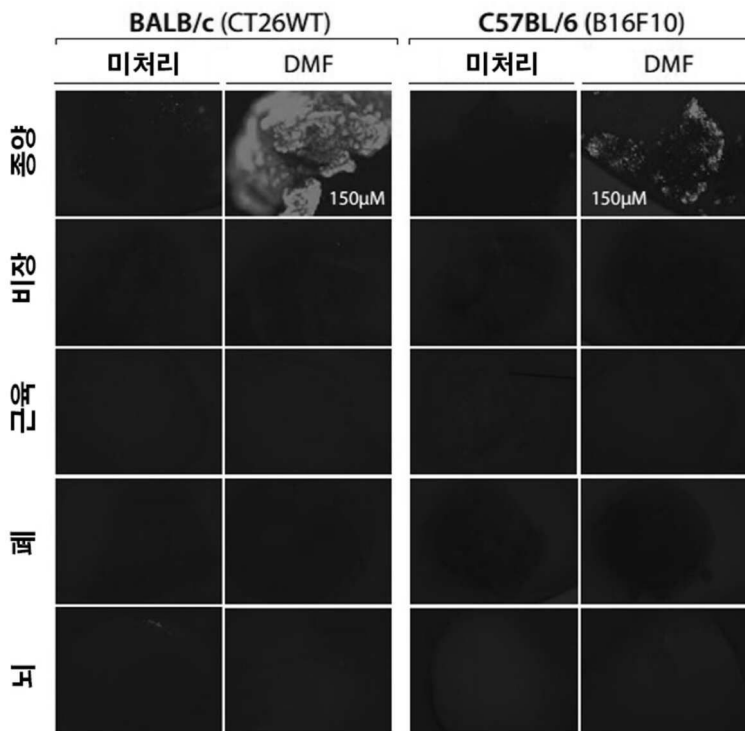


도면1k

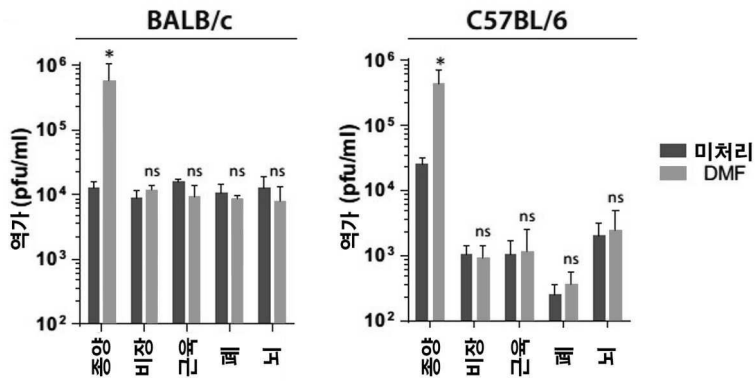


감염시(0)를 기준으로 한 처리시간(시간)

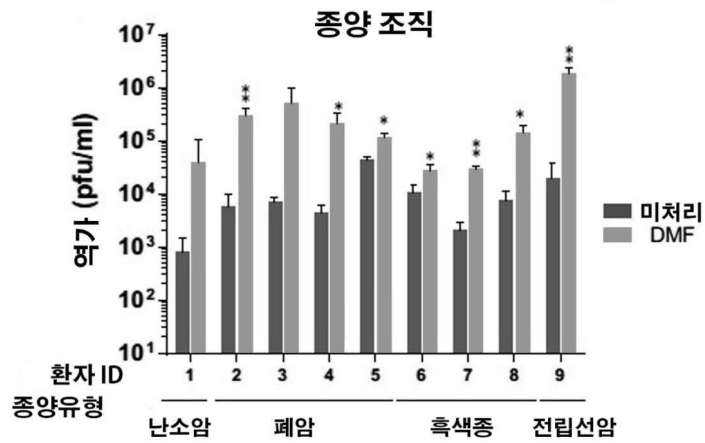
도면2a



도면2b

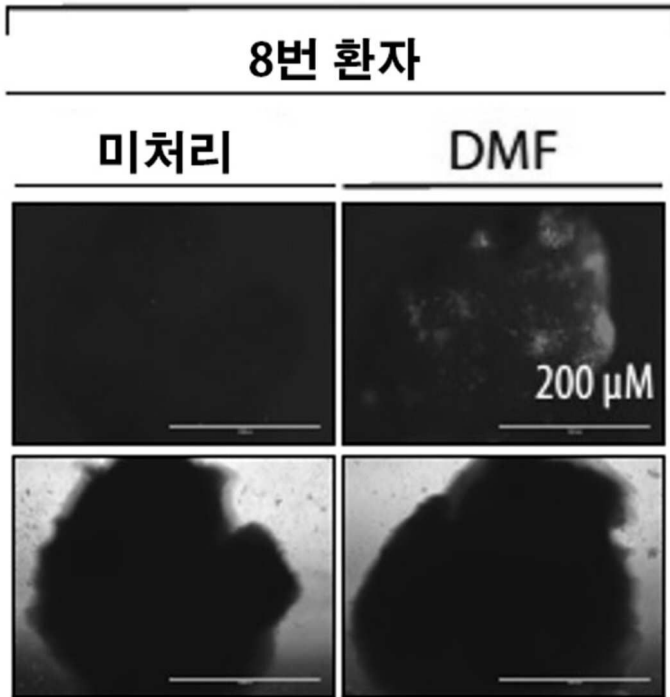


도면2c

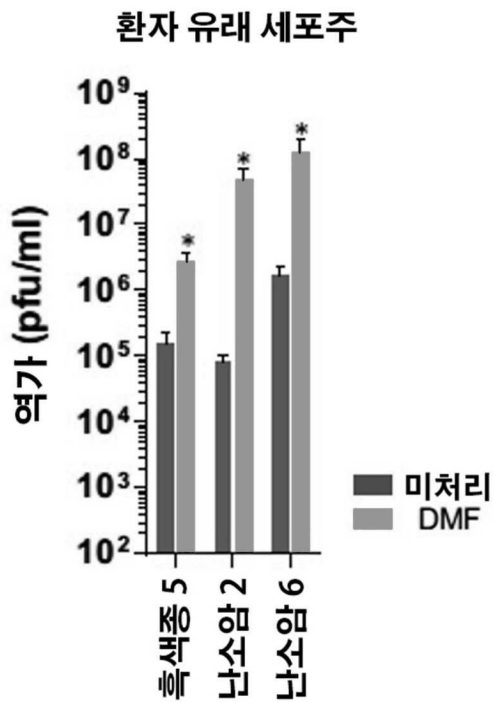


도면2d

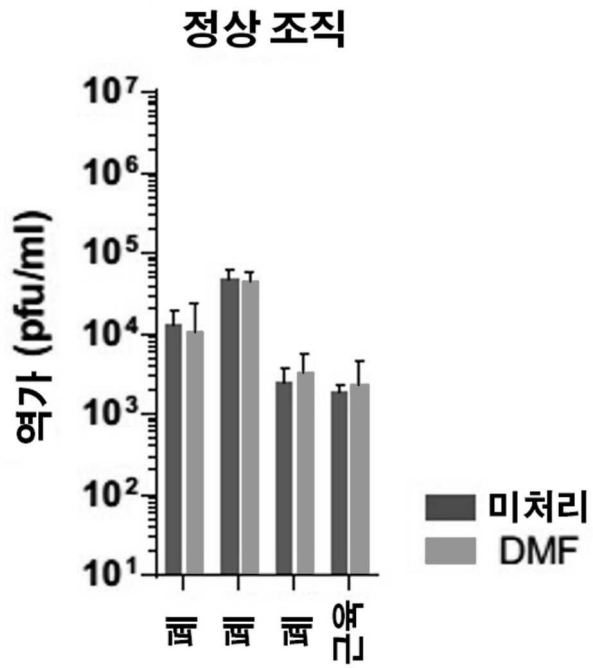
인간 암 환자로부터 얻은 코어부



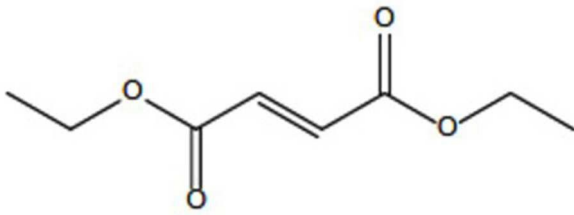
도면2e



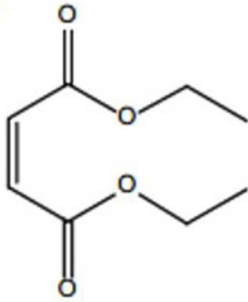
도면2f



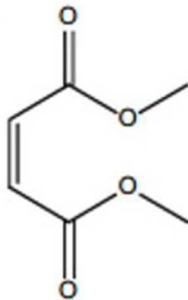
도면3a



푸마르산디에틸 (DEF)

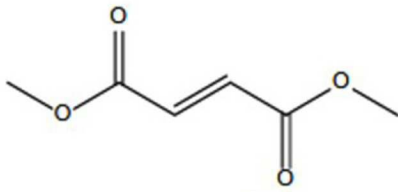


말레산디에틸 (DEM)

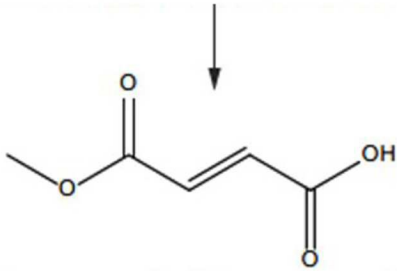


말레산디메틸 (DMM)

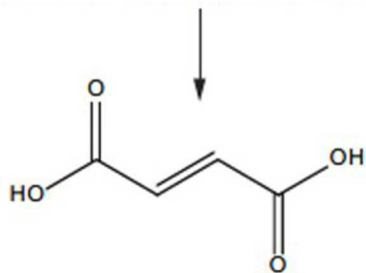
도면3b



푸마르산디메틸 (DMF)



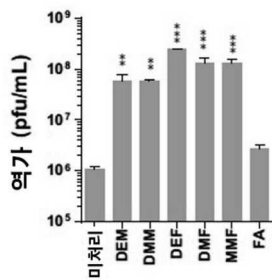
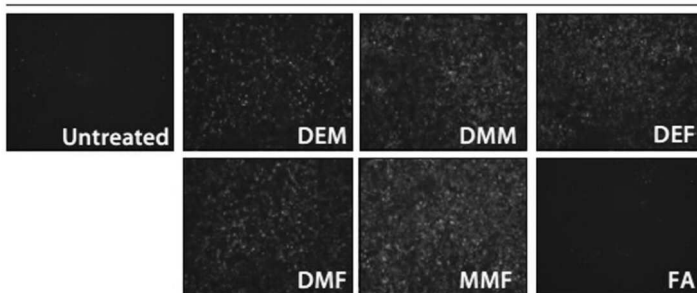
푸마르산모노메틸 (MMF)



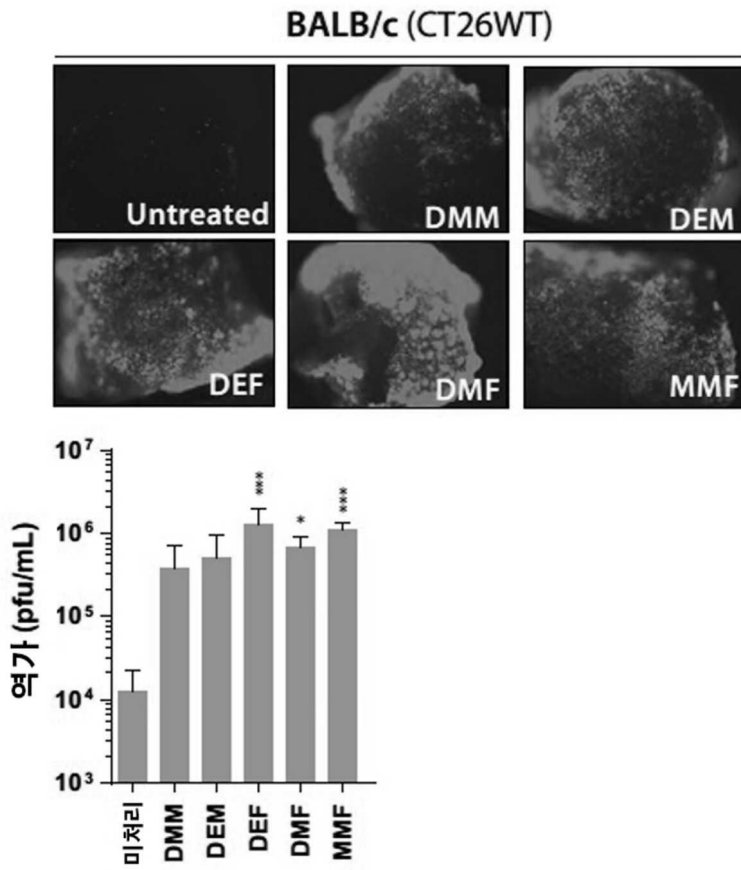
푸마르산 (FA)

도면3c

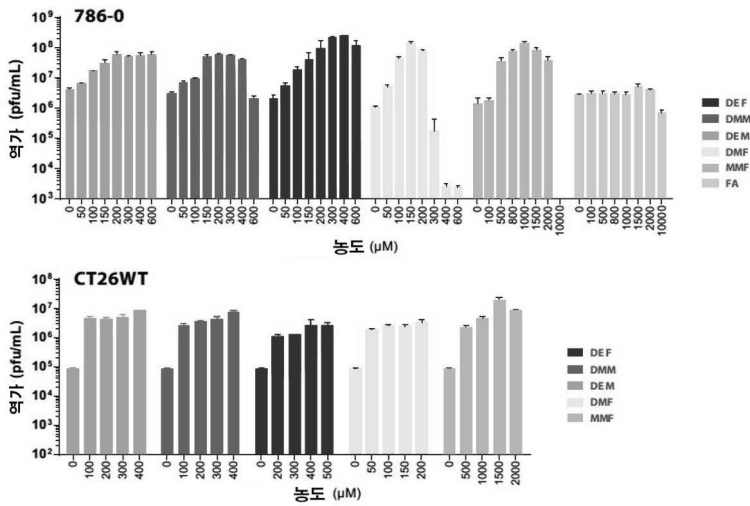
786-0



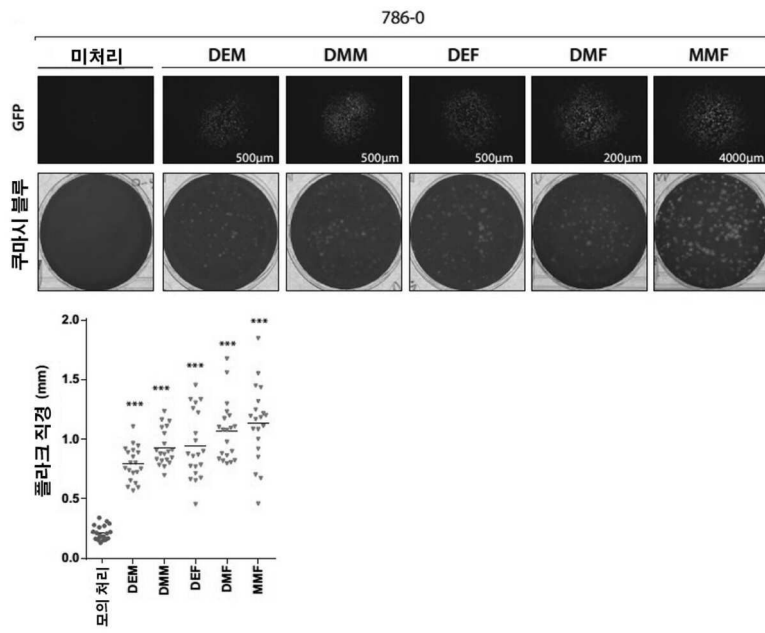
도면3d



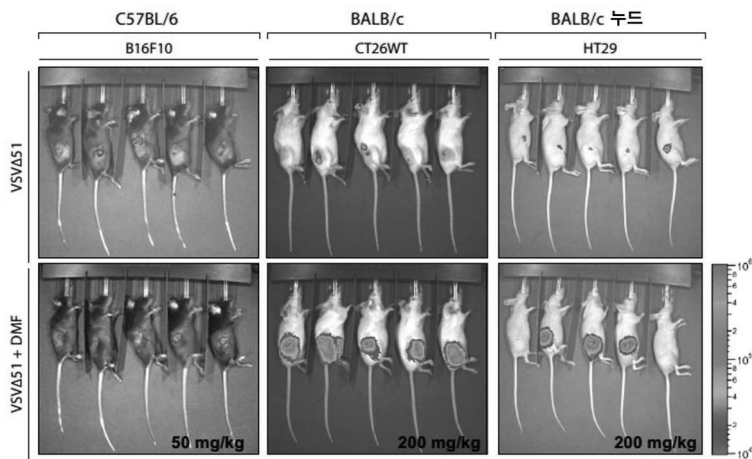
도면3e



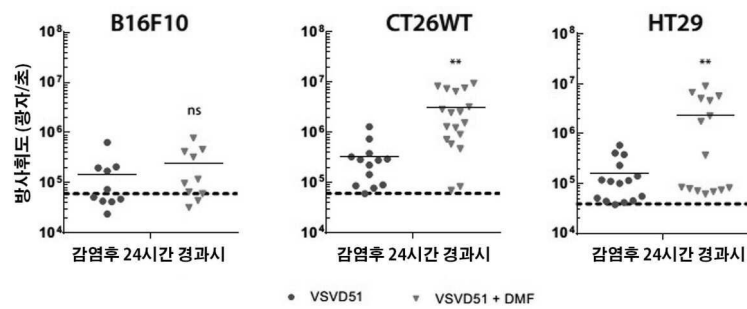
도면3f



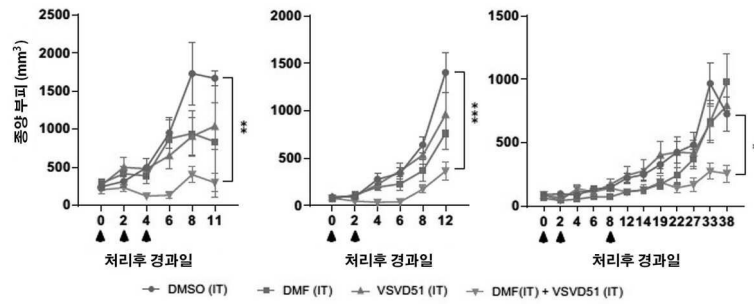
도면4a



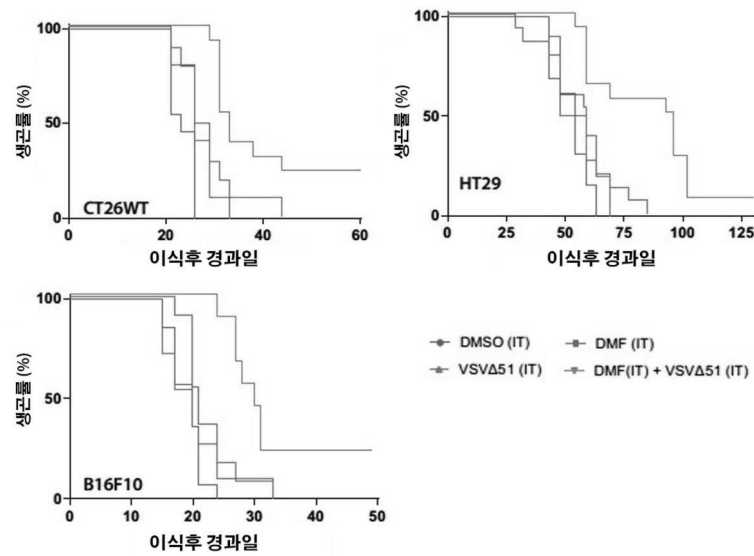
도면4b



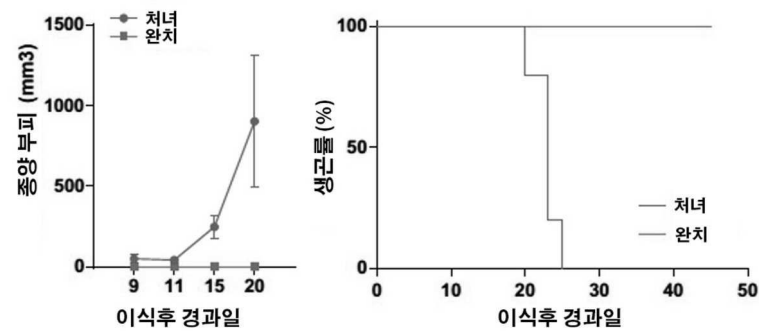
도면4c



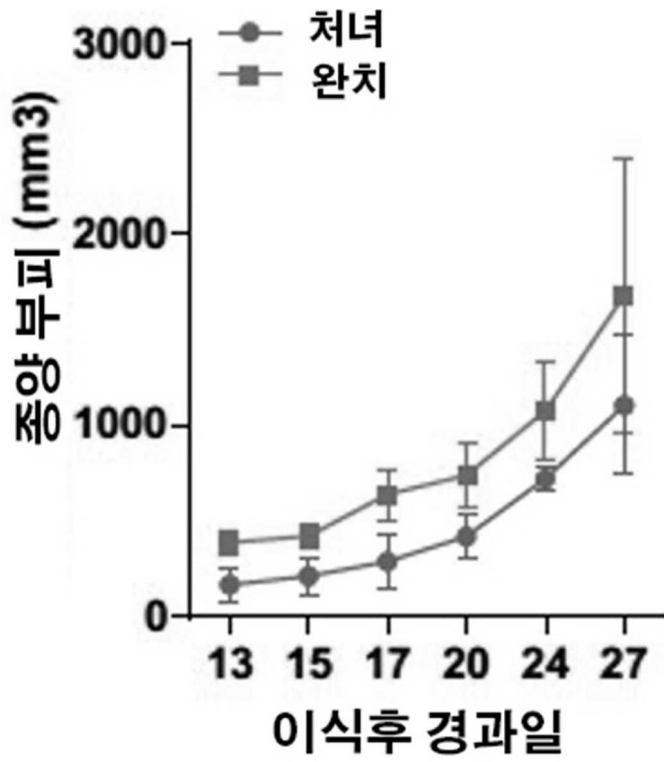
도면4d



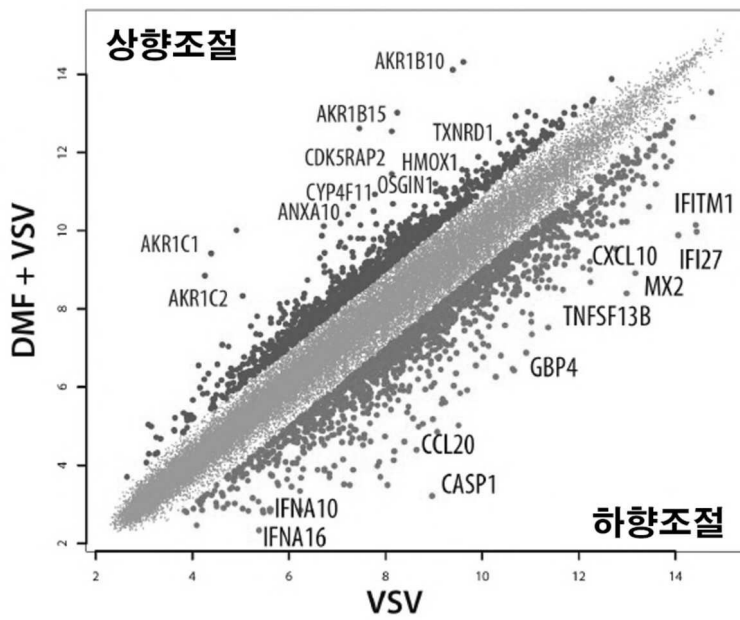
도면4e



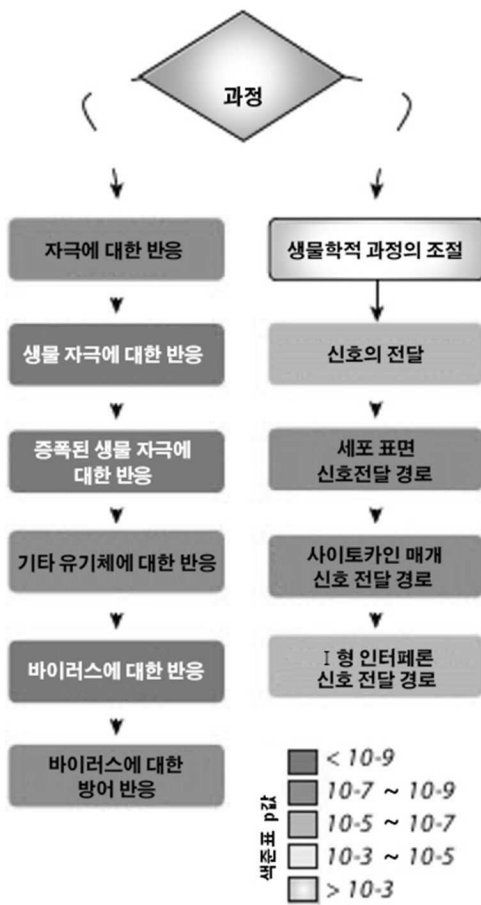
도면4f



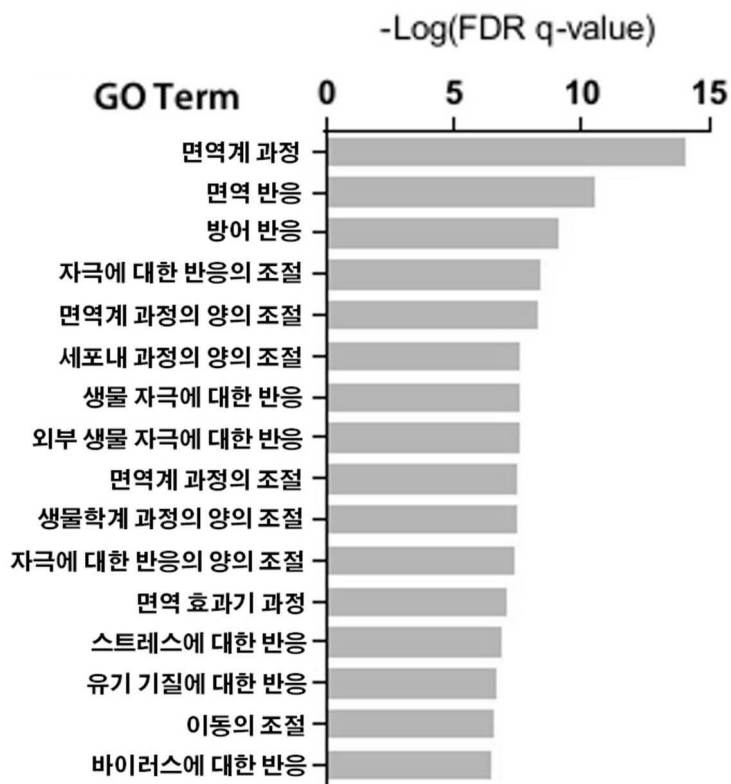
도면5a



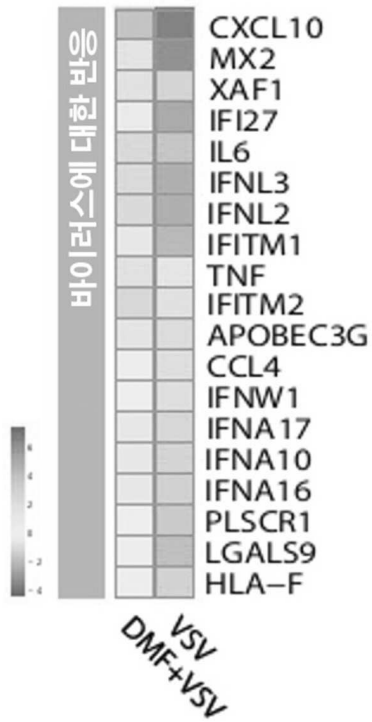
도면5b



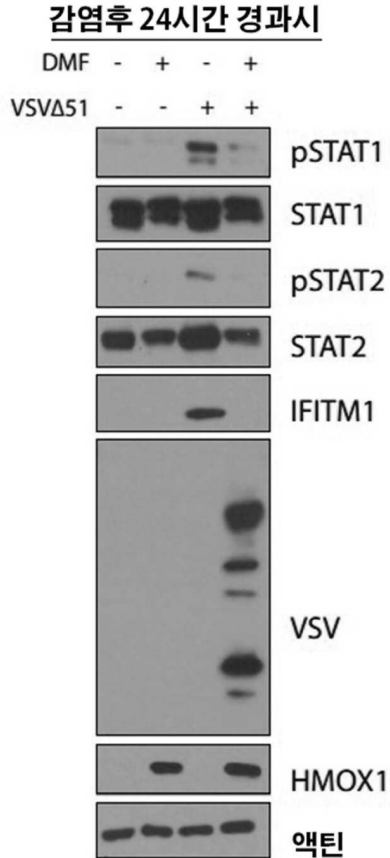
도면5c



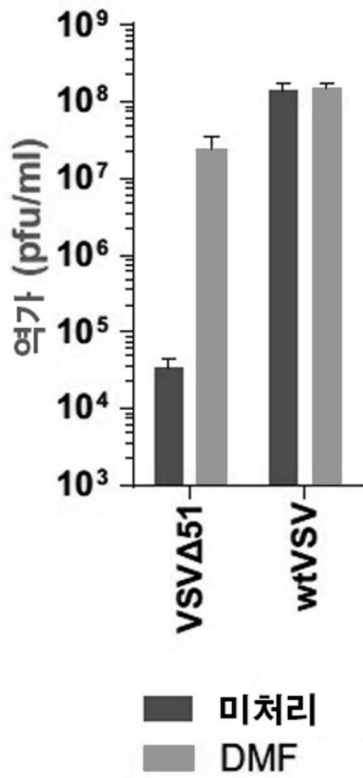
도면5d



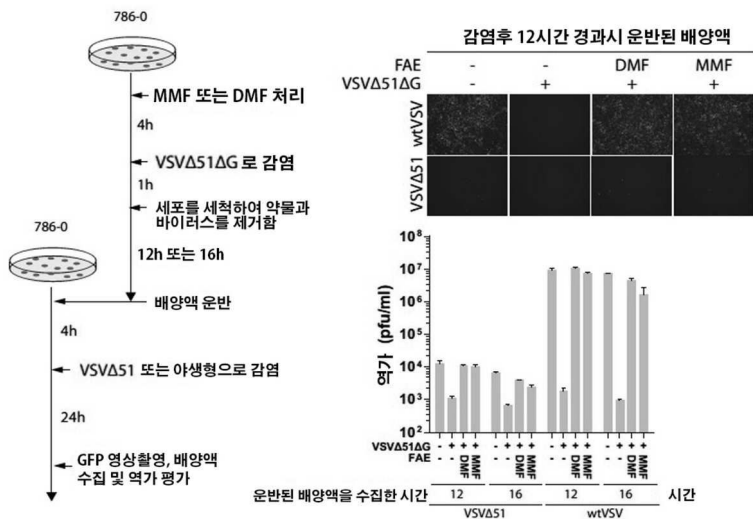
도면5e



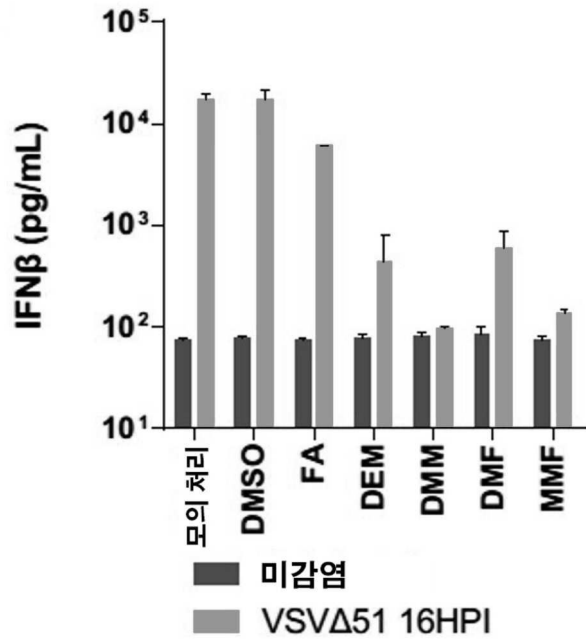
도면5f



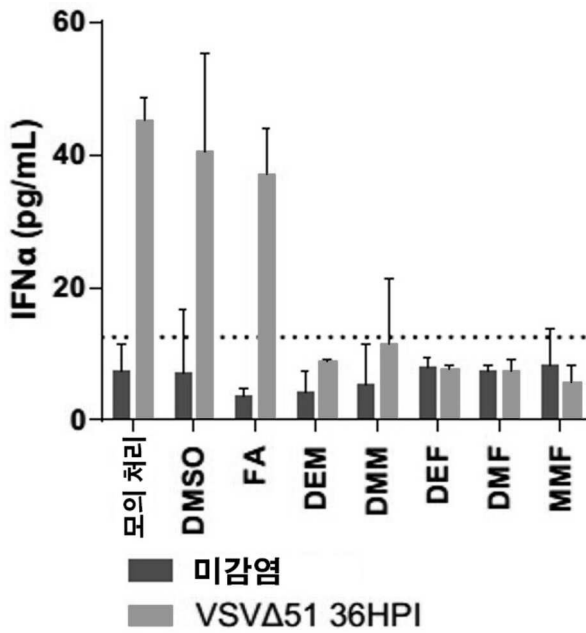
도면5g



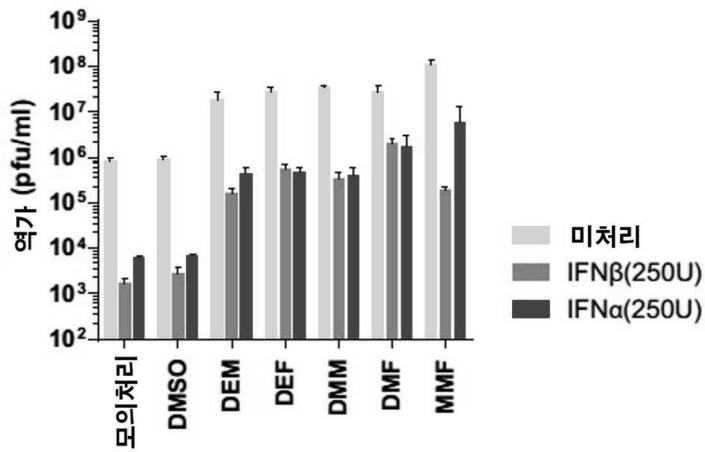
도면5h



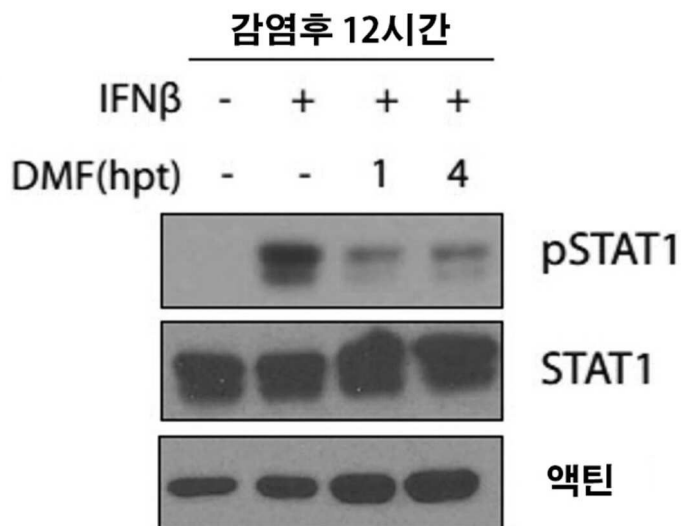
도면5i



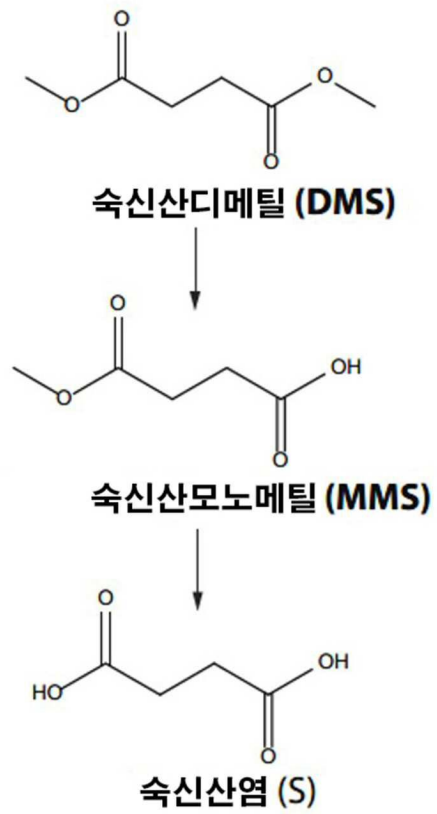
도면5j



도면5k

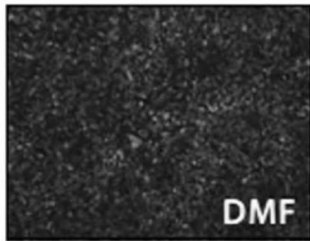
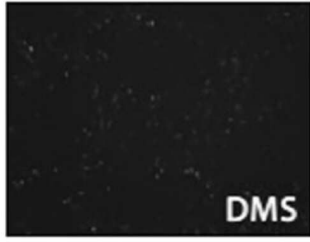


도면6a

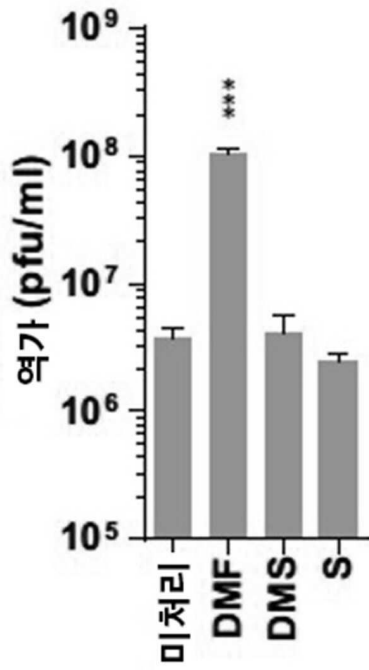


도면6b

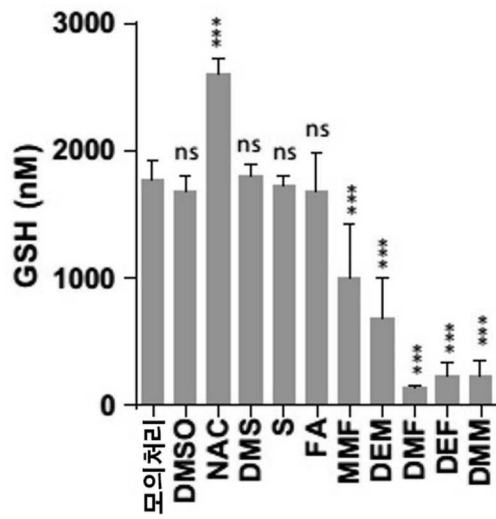
786-0



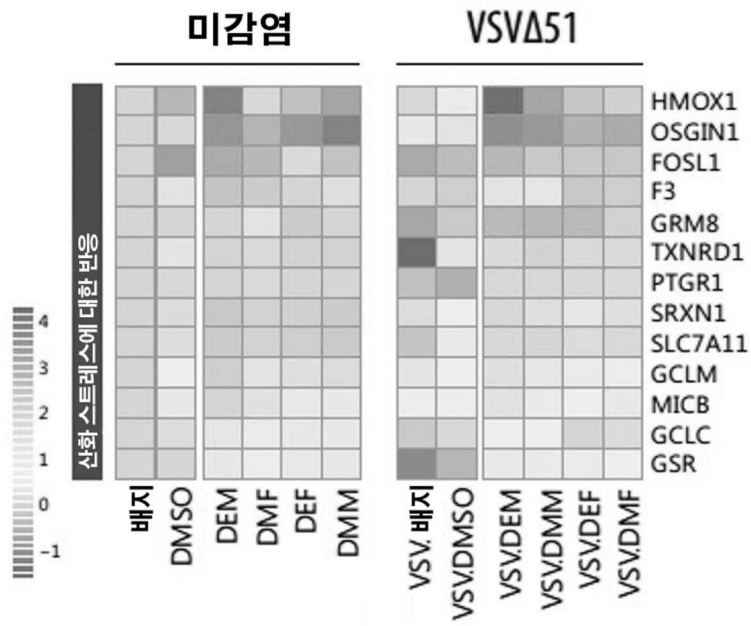
도면6c



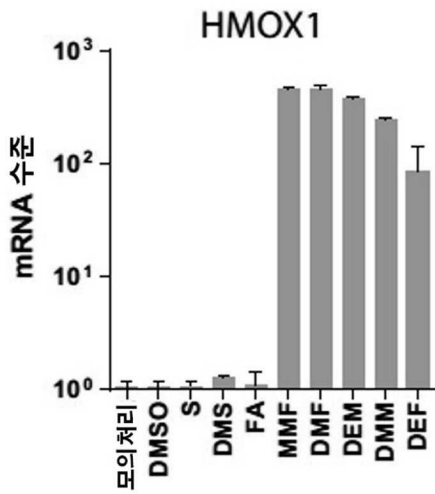
도면6d



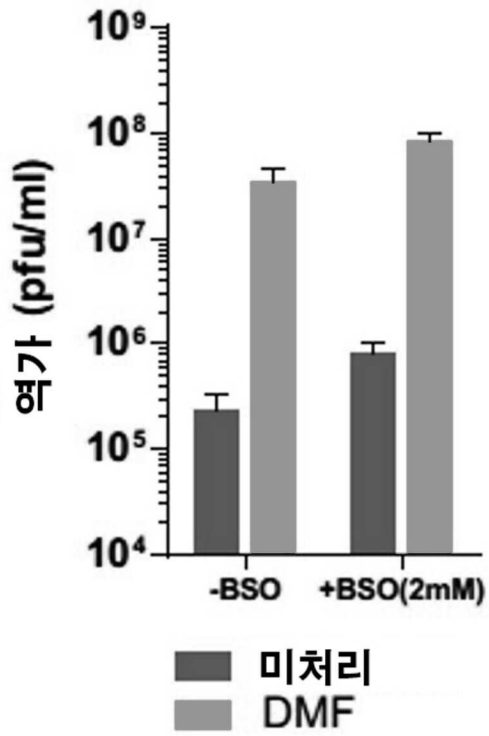
도면6e



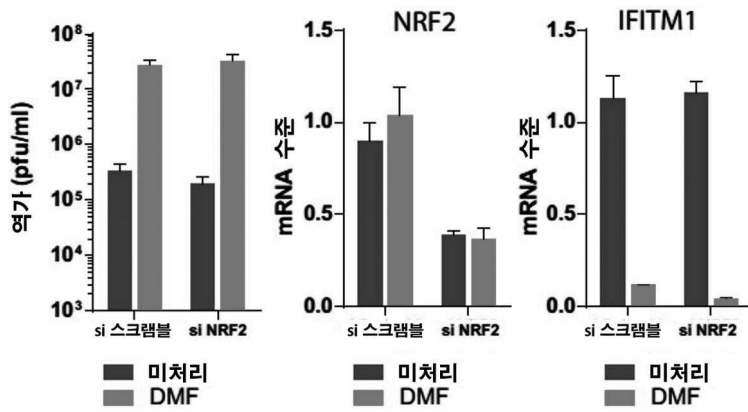
도면6f



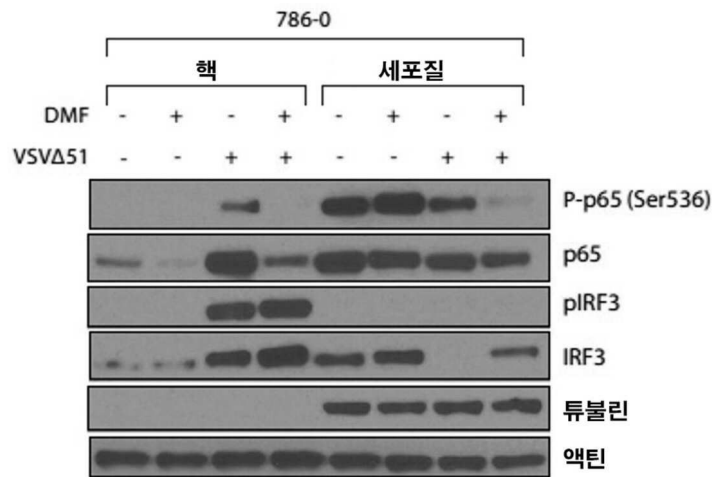
도면6g



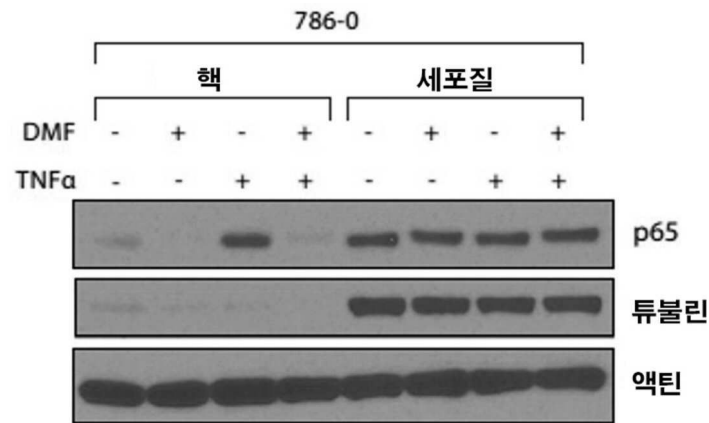
도면6h



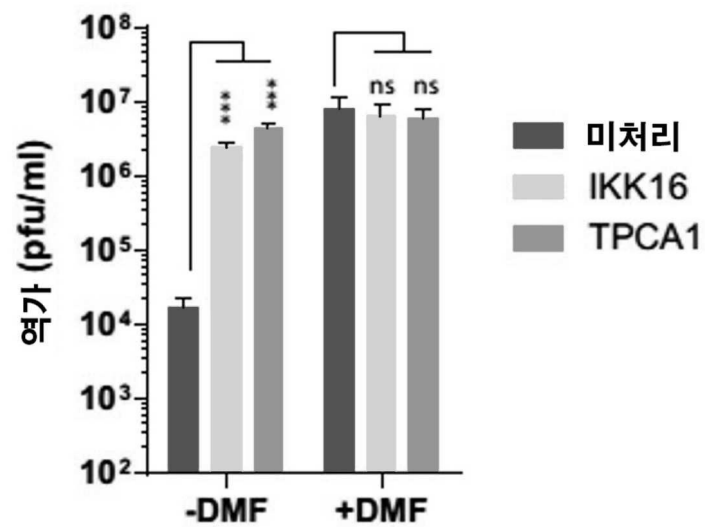
도면6i



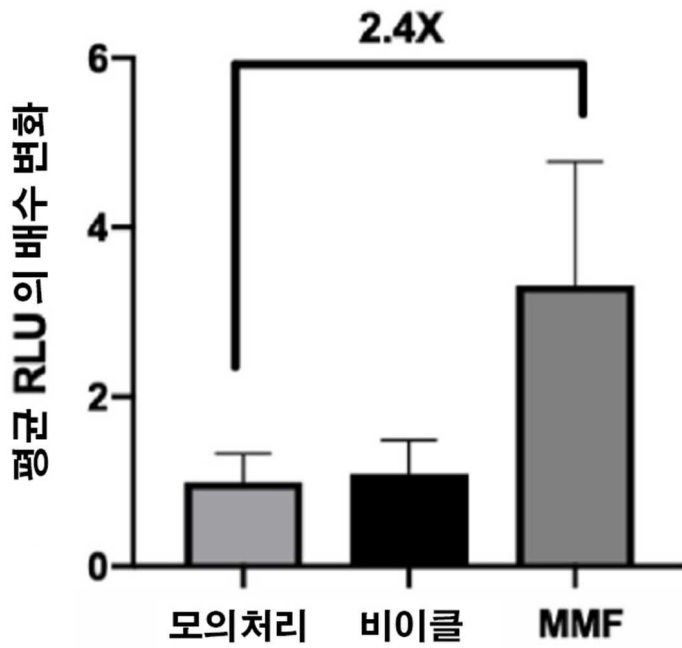
도면6j



도면6k



도면7



도면8

VERO-SF 세포내 인플루엔자 A/FM/1/47의 역가에 대한 DMF의 영향력(ELISA)

