(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079551
(43) 공개일자 2022년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/761 (2014.01) *A61K 31/496* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/761 (2013.01)
A61K 31/496 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7011226
(22) 출원일자(국제) 2020년09월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년04월05일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/074980
(87) 국제공개번호 WO 2021/044061
국제공개일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
19000396.2 2019년09월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
19000406.9 2019년09월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
클리니쿰 레히츠 데어 이자르 데어 테크니쉔 우니베르지테트 뮌헨
독일, 뮌헨 81675, 이스마닝거 스트라세 22
(72) 발명자
홀름, 페르 손네
독일 82256 퓌르스텐펠드브루크, 메이센스트라쎄 27
내로스, 로만
독일 82239 알링, 그레펜스트라쎄 54
(74) 대리인
김해중

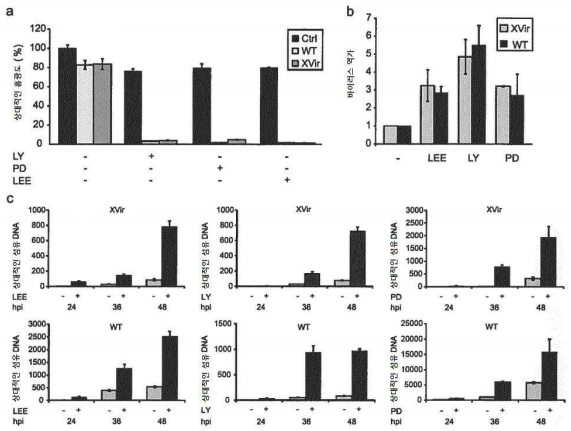
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **종양 세포 붕괴성 아데노바이러스, CDK4/6 억제제 및 추가의 치료 활성제의 조합물에 의한 종양의 치료**

(57) 요 약

본 발명은 아데노바이러스, CDK4/억제제 및 PARP 억제제, 및 PARP 억제제, 브로모도메인 억제제, 누틀린 또는 누틀린의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 작용제의 조합물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/506 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

아데노바이러스(adenovirus)와 CDK4/억제제, 및 PARP 억제제, 브로모도메인 억제제(bromodomain inhibitor), 누틀린(nutlin) 또는 누틀린의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 작용제를 포함하는 조합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

조합물이 PARP 억제제를 추가로 포함하는 조합물.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

조합물이 브로모도메인 억제제(bromodomain inhibitor)를 추가로 포함하는 조합물.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

조합물이 누틀린 또는 누틀린 유도체를 추가로 포함하는 조합물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

종양 또는 암의 치료를 위한 방법에서 사용하기 위한 조합물.

청구항 6

대상체에서의 종양 또는 암의 치료를 위한 방법에서 사용하기 위한 아데노바이러스로서, 방법이 대상체에 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제, 및 PARP 억제제, 브로모도메인 억제제, 누틀린 또는 누틀린의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 작용제를 투여함을 포함하는, 아데노바이러스.

청구항 7

대상체에서의 종양 또는 암의 치료를 위한 방법에서 사용하기 위한 CDK4/6 억제제로서, 방법이 대상체에 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, 및 PARP 억제제, 브로모도메인 억제제, 누틀린 또는 누틀린의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 작용제를 투여함을 포함하는, CDK4/6 억제제.

청구항 8

청구항 1, 및 청구항 5 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스(oncolytic adenovirus)인, 조합물, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 9

청구항 1 및 청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, Ad Δ24, Ad Δ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브(Enadenotucirev) 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 10

청구항 1, 및 청구항 5 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

아데노바이러스가 XVir-N-31인 조합물, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 11

청구항 1, 및 청구항 5 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

CDK4/6 억제제가 세포를 G1 기에서 정지시키고 E2F1을 억제하는 CDK4/6 억제제인, 조합물, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 12

청구항 1, 및 청구항 5 내지 청구항 111 중 어느 한 항에 있어서,

CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립(palbociclib), LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립(abemaciclib), LEE011로도 일컬어지는 리보시클립(ribociclib), G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립(Trilaciclib), 및 디나시클립(Dinaciclib)을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 13

청구항 5 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

질환 종양 또는 암이 Rb-음성인, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 14

청구항 5 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

질환 종양 또는 암이 Rb를 발현하거나 Rb-양성인, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 15

청구항 5 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 16

청구항 5 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

종양 또는 암이 세포 사이클에 독립적인 세포 핵에 YB-1을 함유하는, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

청구항 17

청구항 5 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

질환이 방광암(bladder cancer), 유방암(breast cancer), 전이성 유방암(metastatic breast cancer: mBC), 흑색종(melanoma), 신경아교종(glioma), 췌장암(pancreatic cancer), 간세포암종(hepatocellular carcinoma), 폐선암종(lung adenocarcinoma), 육종(sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 신장암(renal cancer), 전립선암(prostate cancer), 및 백혈병(leukemia)을 포함하는 군으로부터 선택되는, 사용하기 위한 조합물, 사용하기 위한 아데노바이러스, 및 사용하기 위한 CDK4/6 억제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양 세포 붕괴성 바이러스와 CDK4/억제제의 조합물; 종양과 같은 질환의 치료에서의 그러한 조합물의 용도; CDK4/6 억제제와 함께 종양과 같은 질환의 치료에서 사용하기 위한 종양 세포 붕괴성 바이러스, 바람직하게는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스; 및 종양 세포 붕괴성 바이러스, 바람직하게는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스와 함께 종양과 같은 질환의 치료에 사용하기 위한 CDK4/6 억제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 많은 치료학적 개념이 현재 종양의 치료에서 사용된다. 수술을 이용하는 것과는 달리, 화학 요법 및 방사선 요법이 우세하다. 그러나, 모든 이들 기술은 상당한 부작용과 연관되어 있다. 복제 선택적 종양 세포 붕괴성 바이러스의 사용은 종양의 치료를 위한 새로운 플랫폼을 제공한다. 그와 관련하여, 바이러스성 제제의 선택적 종양 내 복제가 개시되며, 이는 바이러스 복제, 감염된 종양 세포의 용해 및 인접 종양 세포로의 바이러스의 확산을 초래한다. 바이러스의 복제 능력은 종양 세포로 제한되며, 정상 조직은 복제로부터 피해를 입지 않으며, 그에 따라서, 바이러스에 의한 용해로부터 피해를 입지 않는다.

발명의 내용

[0003] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는, 특히 종양 세포 붕괴성 바이러스 및 아데노바이러스를 기반으로 하는 종양 치료법의 효능을 증가시키기 위한 수단을 제공하는 것이다.

[0004] 이들 및 그외의 문제는 첨부된 독립항의 주제에 의해서 해결되며; 바람직한 구체예는 첨부된 종속항으로부터 알 수 있다.

[0005] 본 발명에 의해서 해결하고자 하는 문제는 제1 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제, 및 PARP 억제제, 브로모도메인 억제제 및 누틀린(nitlin) 또는 누틀린 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 작용제를 포함하는 조합물에 의한 그러한 제1 양태의 제1 구체예이다.

[0006] 이하에서는, 그러한 제1 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0007] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 조합물.

[0008] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 조합물.

[0009] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 조성물.

[0010] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진(transactivate)하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0011] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 조합물.

[0012] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 조합물.

[0013] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 조합물.

[0014] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 조합물.

[0015] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 조합물.

[0016] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 조합물.

[0017] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 조합물.

[0018] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위

에서의 삭제인, 조합물.

[0019] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 조합물.

[0020] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 조합물.

[0021] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0022] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0023] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0024] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 조합물.

[0025] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 조합물.

[0026] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, dl520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, dl922-947, E1Ad/01/07, dl1119/1131, CB 016, VCN-01, E1Adl1107, E1Adl1101, ORCA-010, 에나데노툭시레브(Enadenotucirev) 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0027] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 조합물.

[0028] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 dl520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 조합물.

[0029] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 dl520이고, dl520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 조합물.

[0030] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 dl520인, 조합물.

[0031] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 조합물.

[0032] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 조합물.

[0033] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기(late) 프로모터인, 조합물.

[0034] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 조합물.

[0035] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 조합물.

[0036] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립(palbociclib), LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립(abemaciclib), LEE011로도 일컬어지는 리보시클립(ribociclib), G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립(Trilaciclib) 및 디나시클립(Dinaciclib)을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0037] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 조합물.

[0038] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 조성물이 PARP 억제제를 추가로 포함하는, 조합물.

[0039] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립(olaparib), 벨리파립(veliparib), 루카파립

(rucaparib) 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는 조합물.

[0040] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 조성물이 브로모도메인 억제제를 추가로 포함하는, 조합물.

[0041] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0042] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 조성물이 누틀린 또는 이의 유도체를 추가로 포함하는, 조합물.

[0043] 구체예 38: 구체예 37에 있어서, 누틀린이 누틀린-3인, 조합물.

[0044] 구체예 39: 구체예 37 또는 구체예 38에 있어서, 누틀린의 유도체가 NVP-HDM201, 이다사누틀린(Idasanutlin), AM-8553, SAR405838, 누틀린-3a(Nutlin-3a), AMG232를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0045] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 39 중 어느 한 구체예에 있어서, 조합물의 구성이 별도의 투여를 위한 것인, 조합물.

[0046] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 39 중 어느 한 구체예에 있어서, 조합물의 구성이 조합 투여를 위한 것인, 조합물.

[0047] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 또한 제2 양태에서 해결되며, 이는 또한, 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제를 포함하는, 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료에서 사용하기 위한, 제1 양태 및 이의 어떠한 구체예들에 따른 조합물에 의한 제2 양태의 제1 구체예이다.

[0048] 이하에서, 그러한 제2 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0049] 구체예 1: 질환, 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지를 위한 방법에서 사용하기 위한 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제를 포함하는 조합물.

[0050] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 조합물.

[0051] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 조합물.

[0052] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 조성물.

[0053] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진(transactivate)하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0054] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 조합물.

[0055] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 조합물.

[0056] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 조합물.

[0057] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 조합물.

[0058] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 조합물.

[0059] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 조합물.

[0060] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 조합물.

[0061] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, 조합물.

[0062] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 조합물.

[0063] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 조합물.

[0064] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0065] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0066] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 조합물.

[0067] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 조합물.

[0068] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 조합물.

[0069] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0070] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 조합물.

[0071] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 조합물.

[0072] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 조합물.

[0073] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, 조합물.

[0074] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 조합물.

[0075] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 조합물.

[0076] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, 조합물.

[0077] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 조합물.

[0078] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 조합물.

[0079] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0080] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 조합물.

[0081] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 조성물이 PARP 억제제를 추가로 포함하는, 조합물.

[0082] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는 조합물.

[0083] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 조성물이 브로모도메인 억제제를 추가로 포

함하는, 조합물.

[0084] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0085] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 조합물의 구성이 별도의 투여를 위한 것인, 조합물.

[0086] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, 조합물.

[0087] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, 조합물.

[0088] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, 조합물.

[0089] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, 조합물.

[0090] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0091] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, 조합물.

[0092] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0093] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 조합물.

[0094] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, 조합물.

[0095] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터(transporter)에 의해서 매개되는, 조합물

[0096] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

[0097] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성(multiple 내성) 또는 다중 내성(poly내성), 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, 조합물.

[0098] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, 조합물.

[0099] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, 조합물.

[0100] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, 조합물.

[0101] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, 조합물.

[0102] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, 조합물.

[0103] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종(glioma), 췌장암, 간세포암종(hepatocellular 암종), 폐 선암종(lung 선암종), 육종(sarcoma), 난소암, 신장암(renal cancer), 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, 조합물.

[0104] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제3 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 아데노바이러스에 의한 그러한 제3 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제를 대상체에 투여함을 포함한다.

[0105] 이하에서, 그러한 제3 양태의 추가 구체예가 개시된다.

[0106] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0107] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 아데노바이러스.

[0108] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 아데노바이러스.

[0109] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0110] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 아데노바이러스.

[0111] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 아데노바이러스.

[0112] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 아데노바이러스.

[0113] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 아데노바이러스.

[0114] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 아데노바이러스.

[0115] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 아데노바이러스.

[0116] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 아데노바이러스.

[0117] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, 아데노바이러스.

[0118] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 아데노바이러스.

[0119] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0120] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0121] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0122] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0123] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 아데노바이러스.

[0124] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 아데노바이러스.

[0125] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0126] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 아데노바이러스.

[0127] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 아데노바이러스.

[0128] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 아데노바이러스.

[0129] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, 아데노바이러스.

[0130] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 아데노바이러스.

[0131] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 아데노바이러스.

[0132] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, 아데노바이러스.

[0133] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 아데노바이러스.

[0134] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 아데노바이러스.

[0135] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0136] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 아데노바이러스.

[0137] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, 아데노바이러스.

[0138] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0139] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, 아데노바이러스.

[0140] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0141] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제제 및/또는 브로모도메인 억제제가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, 아데노바이러스.

[0142] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, 아데노바이러스.

[0143] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, 아데노바이러스.

[0144] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, 아데노바이러스.

[0145] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, 아데노바이러스.

[0146] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선

택되는, 아데노바이러스.

[0147] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, 아데노바이러스.

[0148] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0149] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 아데노바이러스.

[0150] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, 아데노바이러스.

[0151] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, 아데노바이러스.

[0152] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, 아데노바이러스.

[0153] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, 아데노바이러스.

[0154] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, 아데노바이러스.

[0155] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, 아데노바이러스.

[0156] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, 아데노바이러스.

[0157] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, 아데노바이러스.

[0158] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, 아데노바이러스.

[0159] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, 아데노바이러스.

[0160] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제4 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 CDK4/6 억제제에 의한 그러한 제4 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스와 CDK4/6 억제제를 대상체에 투여함을 포함한다.

[0161] 이하에서, 그러한 제4 양태의 추가 구체예가 개시된다.

[0162] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0163] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, CDK4/6 억제제.

[0164] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, CDK4/6 억제제.

[0165] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0166] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, CDK4/6 억제제.

[0167] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, CDK4/6 억제제.

[0168] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, CDK4/6 억

제제.

[0169] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, CDK4/6 억제제.

[0170] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, CDK4/6 억제제.

[0171] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, CDK4/6 억제제.

[0172] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, CDK4/6 억제제.

[0173] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, CDK4/6 억제제.

[0174] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, CDK4/6 억제제.

[0175] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0176] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0177] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0178] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0179] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, CDK4/6 억제제.

[0180] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, CDK4/6 억제제.

[0181] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, dl520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, dl922-947, E1Ad/01/07, dl1119/1131, CB 016, VCN-01, E1Adl1107, E1Adl1101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0182] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, CDK4/6 억제제.

[0183] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 dl520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, CDK4/6 억제제.

[0184] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 dl520이고, dl520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, CDK4/6 억제제.

[0185] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 dl520인, CDK4/6 억제제.

[0186] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, CDK4/6 억제제.

[0187] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, CDK4/6 억제제.

[0188] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, CDK4/6 억제제.

[0189] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, CDK4/6 억제제.

[0190] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, CDK4/6 억제제.

[0191] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0192] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, CDK4/6 억제제.

[0193] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, CDK4/6 억제제.

[0194] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0195] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, CDK4/6 억제제.

[0196] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0197] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제제 및/또는 브로모도메인 억제제가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, CDK4/6 억제제.

[0198] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, CDK4/6 억제제.

[0199] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, CDK4/6 억제제.

[0200] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, CDK4/6 억제제.

[0201] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, CDK4/6 억제제.

[0202] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0203] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, CDK4/6 억제제.

[0204] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0205] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, CDK4/6 억제제.

[0206] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, CDK4/6 억제제.

[0207] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, CDK4/6 억제제.

[0208] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, CDK4/6 억제제.

[0209] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, CDK4/6 억제제.

[0210] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, CDK4/6 억제제.

[0211] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, CDK4/6 억제제.

[0212] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, CDK4/6 억제제.

[0213] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, CDK4/6 억제제.

[0214] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, CDK4/6 억제제.

[0215] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, CDK4/6 억제제.

[0216] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제5 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 PARP 억제제에 의한 그러한 제5 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스, CDK4/6 억제제 및 PARP 억제제를 대상체에 투여함을 포함한다.

[0217] 이하에서, 추가의 그러한 제5 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0218] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, PARP 억제제.

[0219] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, PARP 억제제.

[0220] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, PARP 억제제.

[0221] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0222] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, PARP 억제제.

[0223] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, PARP 억제제.

[0224] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, PARP 억제제.

[0225] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, PARP 억제제.

[0226] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, PARP 억제제.

[0227] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, PARP 억제제.

[0228] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, PARP 억제제.

[0229] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, PARP 억제제.

[0230] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, PARP 억제제.

[0231] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데

노바이러스인, PARP 억제제.

[0232] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, PARP 억제제.

[0233] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, PARP 억제제.

[0234] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, PARP 억제제.

[0235] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, PARP 억제제.

[0236] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, PARP 억제제.

[0237] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0238] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, PARP 억제제.

[0239] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, PARP 억제제.

[0240] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, PARP 억제제.

[0241] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, PARP 억제제.

[0242] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, PARP 억제제.

[0243] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, PARP 억제제.

[0244] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, PARP 억제제.

[0245] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, PARP 억제제.

[0246] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, PARP 억제제.

[0247] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0248] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, PARP 억제제.

[0249] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, PARP 억제제.

[0250] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0251] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, PARP 억제제.

[0252] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0253] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제제 및/또는 브로모도메인 억제제가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, PARP 억제제.

[0254] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, PARP 억제제.

[0255] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, PARP 억제제.

[0256] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, PARP 억제제.

[0257] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, PARP 억제제.

[0258] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0259] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, PARP 억제제.

[0260] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0261] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, PARP 억제제.

[0262] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, PARP 억제제.

[0263] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, PARP 억제제.

[0264] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, PARP 억제제.

[0265] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, PARP 억제제.

[0266] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, PARP 억제제.

[0267] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, PARP 억제제.

[0268] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, PARP 억제제.

[0269] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, PARP 억제제.

[0270] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, PARP 억제제.

[0271] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, PARP 억제제.

[0272] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제6 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지에 사용하기 위한 브로모도메인 억제제에 의한 그러한 제6 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스, CDK4/6 억제제 및 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 포

함한다.

[0273] 이하에서, 그러한 제6 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0274] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0275] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 브로모도메인 억제제.

[0276] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 브로모도메인 억제제.

[0277] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0278] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 브로모도메인 억제제.

[0279] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 브로모도메인 억제제.

[0280] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 브로모도메인 억제제.

[0281] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 브로모도메인 억제제.

[0282] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 브로모도메인 억제제.

[0283] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 브로모도메인 억제제.

[0284] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 브로모도메인 억제제.

[0285] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, 브로모도메인 억제제.

[0286] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 브로모도메인 억제제.

[0287] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0288] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0289] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0290] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0291] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 브로모도메인 억제제.

[0292] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 브로모도메인 억제제.

[0293] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결

여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0294] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 브로모도메인 억제제.

[0295] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 브로모도메인 억제제.

[0296] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 브로모도메인 억제제.

[0297] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, 브로모도메인 억제제.

[0298] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 브로모도메인 억제제.

[0299] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코딩하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 브로모도메인 억제제.

[0300] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, 브로모도메인 억제제.

[0301] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 브로모도메인 억제제.

[0302] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 브로모도메인 억제제.

[0303] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0304] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 브로모도메인 억제제.

[0305] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, 브로모도메인 억제제.

[0306] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0307] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, 브로모도메인 억제제.

[0308] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0309] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제제 및/또는 브로모도메인 억제제가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, 브로모도메인 억제제.

[0310] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0311] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0312] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0313] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0314] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0315] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, 브로모도메인 억제제.

[0316] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0317] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 브로모도메인 억제제.

[0318] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, 브로모도메인 억제제.

[0319] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, 브로모도메인 억제제.

[0320] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0321] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, 브로모도메인 억제제.

[0322] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, 브로모도메인 억제제.

[0323] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0324] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, 브로모도메인 억제제.

[0325] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, 브로모도메인 억제제.

[0326] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, 브로모도메인 억제제.

[0327] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, 브로모도메인 억제제.

[0328] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제7 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체에 의한 그러한 제6 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스, CDK4/6 억제제 및 브로모도메인 억제제(bromodomain inhibitor)를 대상체에 투여함을 포함한다.

[0329] 이하에서, 그러한 제6 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0330] 구체예 2: 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 구체예 1에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0331] 구체예 3: 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0332] 구체예 4: 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 구체예 3에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0333] 구체예 5: 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도

체.

[0334] 구체예 6: 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 구체예 5에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0335] 구체예 7: E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 구체예 6에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0336] 구체예 8: E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 구체예 6에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0337] 구체예 9: E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0338] 구체예 10: 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0339] 구체예 11: 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 구체예 10에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0340] 구체예 12: E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0341] 구체예 13: E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0342] 구체예 14: E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 구체예 13에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0343] 구체예 15: 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0344] 구체예 16: 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0345] 구체예 17: 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0346] 구체예 18: 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0347] 구체예 19: 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0348] 구체예 20: 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0349] 구체예 21: 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0350] 구체예 22: 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 구체예 21에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0351] 구체예 23: 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 구체예 21에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0352] 구체예 24: 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0353] 구체예 25: 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0354] 구체예 26: 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누

틀린 또는 누틀린 유도체.

[0355] 구체예 27: YB-1에 대해서 코딩하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 구체예 26에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0356] 구체예 28: YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, 구체예 27에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0357] 구체예 29: CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0358] 구체예 30: CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0359] 구체예 31: CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0360] 구체예 32: CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0361] 구체예 33: 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0362] 구체예 34: PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립, 탈라조파립(Talazoparib) 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 33에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0363] 구체예 35: 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0364] 구체예 36: 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 35에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0365] 구체예 37: 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제제 및/또는 브로모도메인 억제제 및 또는 누틀린 또는 누틀린 유도체가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0366] 구체예 38: 누틀린 유도체가 NVP-HDM201, 이다사누틀린, AM-8553, SAR405838, 누틀린-3a 및 AMG232를 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0367] 구체예 39: 누틀린 유도체가 누틀린-3a와 다른, 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0368] 구체예 40: 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, 구체예 1 내지 구체예 39 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0369] 구체예 41: 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, 구체예 1 내지 구체예 40 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0370] 구체예 42: 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, 구체예 1 내지 구체예 40 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0371] 구체예 43: 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, 구체예 1 내지 구체예 40 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0372] 구체예 44: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 43에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0373] 구체예 45: 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, 구체예 43에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0374] 구체예 46: 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 45에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0375] 구체예 47: 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 구체예 1 내지 구체예 46 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0376] 구체예 48: 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, 구체예 47에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0377] 구체예 49: 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, 구체예 48에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0378] 구체예 50: ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, 구체예 49에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0379] 구체예 51: 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, 구체예 47 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0380] 구체예 52: 종양의 세포가 Rb-음성인, 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0381] 구체예 53: 종양의 세포가 Rb-양성인, 구체예 1 내지 구체예 52 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0382] 구체예 54: 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, 구체예 1 내지 구체예 53 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0383] 구체예 55: 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, 구체예 1 내지 구체예 54 중 어느 한 구체예에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0384] 구체예 56: 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, 구체예 55에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0385] 구체예 57: 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, 구체예 56에서 사용하기 위한 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0386] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제8 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한 조합 요법에 의한 그러한 제7 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 그러한 조합 요법은, 다른 것들 중에에서, 이를 필요로 하는 대상체에 대한 이하의 투여를 포함한다:

[0387] a) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 및 PARP 억제제, 특히, 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 PARP 억제제;

[0388] b) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 및 브로모도메인 억제제, 특히, 제5 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 브로모도메인 억제제;

[0389] c) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 및 누틀린 또는 누틀린 유도체, 특히, 제6 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 누틀린 또는 누틀린 유도체;

[0390] d) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 브로모도메인 억제제, 브로모도메인 억제제, 특히, 제5 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 브로모도메인 억제제; 및 누틀린 또는 누틀린 유도체, 특히, 제6 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 누틀린 또는 누틀린 유도체;

[0391] e) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 브로모도메인 억제제, 브로모도메인 억제제, 특히, 제5 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 브로모도메인 억제제; 및 PARP 억제제, 특히, 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 PARP 억제제; 및

[0392] f) 아데노바이러스, 특히, 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 아데노바이러스; CDK4/6 억제제, 특히, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 CDK4/6 억제제, 브로모도메인 억제제, 브로모도메인 억제제, 특히, 제5 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 브로모도메인 억제제; PARP 억제제, 특히, 제4 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 PARP 억제제; 및 누틀린 또는 누틀린 유도체, 특히, 제6 양태에 따른 본원에 정의된 바와 같은 누틀린 또는 누틀린 유도체.

[0393] 제3 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제3 양태, 제4 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제4 양태, 제5 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제5 양태, 제6 양태의 어떠한 구체예를 포함한 제6 양태와 관련하여 기재된 다양한 구체예가 다양한 형태의 제8 양태에 따른 조합 요법, 특히 a), b), c), d), e) 및 f)로서 상기 정의된 바와 같은 조합 요법의 구체예들일 수 있음이 본 발명 내에 있다.

[0394] 본 발명에서 해결하고자 하는 문제는 제9 양태에서 또한 해결되며, 이는 또한, 대상체에서의 질환, 더욱 바람직하게는 종양 또는 암의 치료 및/또는 방지를 위한 방법에 의한 그러한 제7 양태의 제1 구체예이며, 여기에서, 방법은 아데노바이러스 및 CDK4/6 억제제를 대상체에 투여함을 포함한다.

[0395] 이하에서, 그러한 제9 양태의 추가의 구체예가 개시된다.

[0396] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 아데노바이러스가 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인, 방법.

[0397] 구체예 3: 구체예 1 및 구체예 2 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 YB-1 의존적 방식으로 복제하는, 방법.

[0398] 구체예 4: 구체예 3에 있어서, 아데노바이러스가 핵에 YB-1가 결여되는 세포에서 복제 겹핍이지만, 핵에 YB-1를 갖는 세포에서 복제하는, 방법.

[0399] 구체예 5: 구체예 2 내지 구체예 4 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 종양 유전자 단백질을 인코팅하고, 종양 유전자 단백질이 적어도 하나의 아데노바이러스성 유전자를 전사촉진하고, 아데노바이러스성 유전자가 E1B55kDa, E4orf6, E4orf3 및 E3ADP를 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0400] 구체예 6: 구체예 5에 있어서, 종양 유전자 단백질이 E1A 단백질인, 방법.

[0401] 구체예 7: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는, 방법.

[0402] 구체예 8: 구체예 6에 있어서, E1A 단백질이 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 없는, 방법.

[0403] 구체예 9: 구체예 6 내지 구체예 8 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 핵 내로의 YB-1의 편재화를 유도하지 않는, 방법.

[0404] 구체예 10: 구체예 5 내지 구체예 9 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 유전자 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질 E1A에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 나타내는, 방법.

[0405] 구체예 11: 구체예 10에 있어서, 삭제가 CR3 스트래치의 삭제 및 N-말단의 삭제 및 C-말단의 삭제를 포함하는 군으로부터 선택된 하나인, 방법.

[0406] 구체예 12: 구체예 6 내지 구체예 11 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합할 수 있는, 방법.

[0407] 구체예 13: 구체예 6 내지 구체예 12 중 어느 한 구체예에 있어서, E1A 단백질이 야생형 종양 유전자 단백질에 비해서 하나 또는 여러 개의 돌연변이 또는 삭제를 포함하고, 삭제가 바람직하게는 CR1 부위 및/또는 CR2 부위에서의 삭제인, 방법.

[0408] 구체예 14: 구체예 13에 있어서, E1A 단백질이 Rb에 결합될 수 없는, 방법.

[0409] 구체예 15: 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A12 S 단백질을 발현하는 아데노바이러스인, 방법.

[0410] 구체예 16: 구체예 1 내지 구체예 15 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1A13S 단백질의 발현이 결여된

아데노바이러스인, 방법.

[0411] 구체예 17: 구체예 1 내지 구체예 16 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 기능적 활성 아데노바이러스성 E3 부위가 결여된 아데노바이러스인, 방법.

[0412] 구체예 18: 구체예 1 내지 구체예 17 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여된 아데노바이러스인, 방법.

[0413] 구체예 19: 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 아데노바이러스인, 방법.

[0414] 구체예 20: 구체예 1 내지 구체예 19 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 아데노바이러스 혈청형 5인, 방법.

[0415] 구체예 21: 구체예 1 내지 구체예 20 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31, d1520, AdΔ24, AdΔ24-RGD, d1922-947, E1Ad/01/07, d11119/1131, CB 016, VCN-01, E1Ad11107, E1Ad11101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스를 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0416] 구체예 22: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 XVir-N-31인, 방법.

[0417] 구체예 23: 구체예 21에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, 아데노바이러스성 E3 부위가 기능적으로 불활성인, 방법.

[0418] 구체예 24: 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 d1520이고, d1520가 E1B 19 kDa 단백질의 발현이 결여되는, 방법.

[0419] 구체예 25: 구체예 21 내지 구체예 24 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스가 섬유에서 RGD 모티프를 발현하는 d1520인, 방법.

[0420] 구체예 26: 구체예 1 내지 구체예 25 중 어느 한 구체예에 있어서, 바이러스가 YB-1을 인코딩하는, 방법.

[0421] 구체예 27: 구체예 26에 있어서, YB-1에 대해서 코팅하는 유전자가 조직-특이적 프로모터, 종양-특이적 프로모터 및/또는 YB-1 의존적 프로모터의 조절 하에 있는, 방법.

[0422] 구체예 28: 구체예 27에 있어서, YB-1 의존적 프로모터가 아데노바이러스성 E2 후기 프로모터인, 방법.

[0423] 구체예 29: 구체예 1 내지 구체예 28 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 포스포릴화를 감소시키는 화합물인, 방법.

[0424] 구체예 30: 구체예 1 내지 구체예 29 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포, 바람직하게는 종양 세포에서의 Rb 발현을 감소시키는 화합물인, 방법.

[0425] 구체예 31: 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 PD 0332991로도 일컬어지는 팔보시클립, LY-2835219로도 일컬어지는 아베마시클립, LEE011로도 일컬어지는 리보시클립, G1T28로도 일컬어지는 트릴라시클립 및 디나시클립을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0426] 구체예 32: 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 한 구체예에 있어서, CDK4/6 억제제가 세포에서의 G1기 정지를 유발시키고 E2F1를 억제하는, 방법.

[0427] 구체예 33: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 대상체에 PARP 억제제를 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

[0428] 구체예 34: 구체예 33에 있어서, PARP 억제제가 올라파립, 벨리파립, 루카파립 및 BMN673을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0429] 구체예 35: 구체예 1 내지 구체예 32 중 어느 한 구체예에 있어서, 방법이 브로모도메인 억제제를 대상체에 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

[0430] 구체예 36: 구체예 35에 있어서, 브로모도메인 억제제가 JQ-1, OTX-015, I-BET151, CPI-0610, I-BET762, CPI203, PFI-1 및 MS 436을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0431] 구체예 37: 구체예 1 내지 구체예 36 중 어느 한 구체예에 있어서, 아데노바이러스, CDK4/6 억제제, PARP 억제

제 및/또는 브로모도메인 억제제가 별도로 또는 어떠한 조합으로 투여되는, 방법.

[0432] 구체예 38: 구체예 1 내지 구체예 37 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 CDK4/6 신호전달 경로의 파괴를 갖는, 방법.

[0433] 구체예 39: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 세포 사이클의 비조절된 G1-S기 전이를 갖는, 방법.

[0434] 구체예 40: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자, CDKN2A 유전자 및 CDKN2B 유전자를 포함하는 군으로부터 선택된 유전자에서 삭제를 갖는, 방법.

[0435] 구체예 41: 구체예 1 내지 구체예 38 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유전자의 증폭 및/또는 유전자에서의 활성화 돌연변이를 갖는, 방법.

[0436] 구체예 42: 구체예 41에 있어서, 유전자가 CCND1, E2F1, E2F2, E2F3, CDK4 및 CDK6을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0437] 구체예 43: 구체예 41에 있어서, 유전자가 유사분열촉진 신호전달 경로의 성분에 대해서 코딩하는 하나인, 방법.

[0438] 구체예 44: 구체예 43에 있어서, 유사분열촉진 신호전달 경로가 PI3K 경로 및 MAPK 경로를 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0439] 구체예 45: 구체예 1 내지 구체예 44 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양 세포의 세포가 하나 또는 여러 약제학적 활성제 및/또는 방사선에 내성이거나 그에 무감각한, 방법.

[0440] 구체예 46: 구체예 45에 있어서, 약제학적 활성제가 세포 증식 억제제인, 방법.

[0441] 구체예 47: 청구항 46에 있어서, 내성이 ABC 트랜스포터에 의해서 매개되는, 방법.

[0442] 구체예 48: 청구항 47에 있어서, ABC 트랜스포터가 MRP 및 MDR, 특히 MDR-1을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

[0443] 구체예 49: 구체예 45 내지 구체예 48 중 어느 한 구체예에 있어서, 내성이 복수 내성 또는 다중 내성, 특히, 세포 증식 억제성 및/또는 방사선에 대한 복수 내성 또는 다중 내성인, 방법.

[0444] 구체예 50: 구체예 1 내지 구체예 49 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 Rb-양성인, 방법.

[0445] 구체예 51: 구체예 1 내지 구체예 50 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 핵 내에 YB-1을 갖는, 방법.

[0446] 구체예 52: 구체예 1 내지 구체예 51 중 어느 한 구체예에 있어서, 종양의 세포가 유도 후 핵 내에 YB-1을 갖는, 방법.

[0447] 구체예 53: 구체예 52에 있어서, 핵 내로의 YB-1의 수송이 조사(irradiation), 세포 증식 억제제의 투여 및 온열요법(hyperthermia)을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 조치에 의해서 촉발되는, 방법.

[0448] 구체예 54: 구체예 53에 있어서, 조치가 세포, 기관 또는 유기체, 바람직하게는 이를 필요로 하는 유기체, 더욱 바람직하게는 종양을 앓고 있는 유기체에 적용되는, 방법.

[0449] 구체예 55: 청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 방광암, 유방암, 전이성 유방암(mBC), 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암, 및 백혈병을 포함하는 군으로부터 선택선택되는, 방법.

[0450] 제10 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 조성물의 용도로서, 조성물이 본 발명의 제1 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 조성물이고, 약제는 본 발명의 제2 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

[0451] 제11 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 아데노바이러스의 용도로서, 아데노바이러스가 본 발명의 제3 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 아데노바이러스이고, 약제는 본 발명의 제3 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

[0452] 제12 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 CDK4/6 억제제의 용도로서, CDK4/6 억제제가 본 발명의 제4 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 CDK4/6 억제제이고, 약제는 본 발명의 제4 양태 및 이의

어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

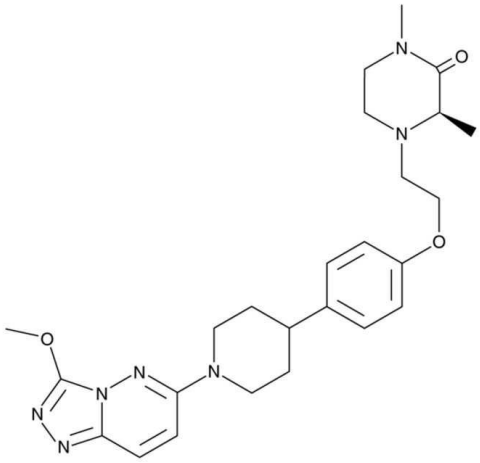
[0453] 제13 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 PARP 억제제의 용도로서, PARP 억제제가 본 발명의 제5 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 PARP 억제제이고, 약제는 본 발명의 제5 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

[0454] 제14 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 브로모도메인 억제제의 용도로서, 브로모도메인 억제제가 본 발명의 제6 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 브로모도메인 억제제이고, 약제는 본 발명의 제6 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

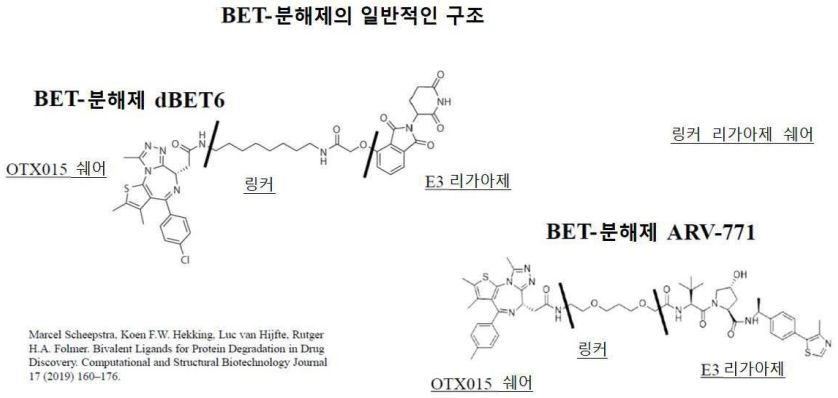
[0455] 제15 양태에서, 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한 누틀린 또는 이의 유도체의 용도로서, 누틀린 또는 누틀린 유도체가 본 발명의 제7 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 개시된 바와 같은 누틀린 또는 누틀린 유도체이고, 약제는 본 발명의 제7 양태 및 이의 어떠한 구체예와 함께 특정된 질환의 치료 및/또는 방지를 위한 것인 용도에 관한 것이다.

[0456] 본원에 개시된 각각 및 어떠한 양태, 및 이의 어떠한 구체예의 구체예에서, CDK4/6 억제제는 CDK4/6를 억제하거나 억제할 수 있어서, G1기에서 처리된 세포의 정지시키는 작용제이다.

[0457] 본 발명의 각각 및 어떠한 양태, 및 이의 어떠한 구체예의 구체예에서, 브로모도메인 억제제는 이가 브로모도메인 억제제이고, 특히, 브로모도메인 억제제는 이하 화학식의 AZD5153이다:

[0458] 

[0459] 본 발명의 각각 및 어떠한 양태, 및 이의 어떠한 구체예의 구체예에서, 브로모도메인 억제제는 BET 분해제이고, 바람직하게는 브로모도메인 억제제는 이하 화학식의 dBET6 및 이하 화학식의 ARV771을 포함하는 군으로부터 선택된다:

[0460] 

[0461] (참조예, Scheepstra M et al. (Computational and Structural Biotechnology Journal 17(2019) 160-179).

[0462] 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 본 발명의 제1 양태의 각각 및 어떠한 구체예가 또한 본 발명의 다른 양태의 각각 및 어떠한 양태의 구체예 및 이의 어떠한 구체예이라는 것을 알 수 있을 것이다.

[0463] 어떠한 이론으로 한정하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 종양 세포 붕괴성 바이러스,

바람직하게는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스를 CDK4/6 억제제와 조합하는 것이 그러한 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스를 기반으로 하는 종양 치료요법의 효능을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 더욱 특히, CDK4/6 억제제는 E2F1(본원에서 E2F-1로도 일컬어짐)를 억제하고, 그에 따라서, 이의 유효 농도, 바람직하게는 종양 세포에서의 이의 유효 농도를 감소시키고, 세포에서의 G1기 정지를 동시에 나타나게 하는 것으로 추정된다. 이 때문에, 더욱 감염된 세포가 전체 바이러스성 생활 주기를 완료할 수 있다.

[0464] 본원에서 제공된 증거 및 통찰을 기반으로 하여, 본 기술분야에서의 통상의 기술자는 어떠한 - 돌연변이 - 아데노바이러스가 본 발명의 실행에서 사용하기에 적합함을 이해할 것이며, 그러한 본 발명은 적어도 10%, 20% 또는 30%의 야생형 발현 및 E1B55K 및 E4orf6의 각각의 활성이 그러한 아데노바이러스에 의해서 달성되는 것을 가능하게 한다는 것을 이해할 것이다. 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 그러한 돌연변이 아데노바이러스가 E1A을 개질시킴으로써 생성될 수 있음이 이해될 것이다. 예시적인 돌연변이 아데노바이러스는 아데노바이러스 XVir-N-31, dl520, Ad Δ 24, Ad Δ 24-RGD, dl922-947, E1Ad/01/07, dl1119/1131, CB 016, VCN-01, E1Adl1107, E1Adl1101, ORCA-010, 에나데노툭시레브 및 기능성 Rb 종양 억제 유전자 생성물과 결합할 수 있는 발현된 바이러스성 종양 유전자가 결여된 바이러스이다.

[0465] 아데노바이러스의 원조는 Wallace P. Rowe 및 Robert J. Huebner에 의한 1953년에 인간 편도선 및 아데노이드 조직에서의 바이러스의 첫 번째 분리이다(Rowe et al., 1953). 아데노바이러스과의 패밀리는 5개의 속, 즉, 마스트아데노바이러스(Mastadenovirus), 아비아데노바이러스(Aviadenovirus), 시아데노바이러스(Siadenovirus), 에트아데노바이러스(Atadenovirus) 및 이타아데노바이러스(Ichtadenovirus)를 포함한다(Modrow, 2013). 신생설치류에서이 이들의 발암성으로 인해서, 이들은 모두 62개의 혈청형으로 7 가지의 서브그룹 HAdV-A 내지 HAdV-G(Boulanger and Blair, 1991)으로 분류도리 수 있다. 그리하여, 종양 세포 붕괴성 바이러스 요법에 대한 연구는 주로 마스트아데노바이러스 타입 C 혈청형 5에 촛점을 맞추고 있다.

[0466] 80 내지 110 nm의 크기를 갖는 미코팅된 정이십면체 캡시드(uncoated icosahedral capsid)는 12개의 펜톤(penton)으로 이루어진 252개의 캡소머(capsomer)로 구성되고, 이러한 캡소머는 캡시드의 꼭지점과 헥손으로 일컬어지는 249개의 면 상에 섬유로 일컬어지는 펜톤 기본과 스파이크-유사 단백질 구조로 조립된다(Modrow, 2013). 아데노바이러스의 전체 수명주기는 세포 진입, 바이러스성 게놈의 핵 전좌(nuclear translocation), 및 초기 유전자의 전사 및 번역의 초기 상(early phase) 및 후기 유전자의 전사 및 번역의 후기 상(late phase)으로 세분될 수 있다. 그리하여, 후기 단백질은 주로 구조 단백질의 조립 및 비리온(virion)의 성숙에 책임이 있다(Russell, 2000). 수용 세포(permissive cell)에서, 초기 상은 약 6 내지 8 시간이 소요되며, 다른 후기 상은 약 4 내지 6 시간이 소요된다. 부착은 적어도 아데노바이러스 HAdV-A, -C, -E 및 -F에 대한 표적 세포 상의 수용체와의 섬유 구조의 모든 말단 상에 존재하는 노브 구조(knob structure)의 상호작용을 통해서 발생한다. 이러한 수용체는 콕사키 B 바이러스 흡착을 담당하는 동일한 수용체로서 검출되었으므로, 수용체는 콕사키바이러스 및 아데노바이러스 수용체(CAR)로 일컬어진다(Bergelson, 1997). 추가로, 표적 세포의 표면 상의 결합은, 특정의 아데노바이러스 타입의 섬유 단백질의 결합을 매개하는, 혈액 응고 인자 VII 및 X와 같은 체액 내의 가용성 단백질인 "브릿지 분자(bridge molecule)"에 의해서 지지된다(Modrow, 2013). 이러한 흡착 단계 후에, 펜톤 베이스(penton base) 내의 RGD-모티프(아르기닌-글리신-아스파르트산)가, 이러한 과정에서 공동-수용체로서 기능하는, 이종이량체 인테그린 αvβ3 또는 αvβ5(이종 이량체 integrins αvβ3 or αvβ5)와 상호작용한다. 이러한 상호작용은 바이러스의 내재화를 초래한다(Wickham et al., 1993). 후속하여, 세포질 막에서의 클라트린-매개된 내재화(clathrin-매개된 internalization)를 통한 엔도시토시스(endocytosis)가 발생하고, 바이러스가 엔도솜(endosome)에 존재한다. 식작용 베지클의 산성화 후에, 바이러스성 섬유 단백질은 엔도솜 막의 파괴에 의해서 그 형태를 변화시킨다(Greber et al., 1996). 바이러스성 입자는 이제 세포질에서 자유롭다. 미소관(microtubule)의 다이닌(dynein) 상의 잔류 입자의 결합을 통해서, 바이러스성 게놈이 핵에 전달된다(Modrow, 2013).

[0467] 아데노바이러스의 게놈은 36-38 kb 길이의 이중-가닥 선형 DNA로 이루어진다. 양 5' 말단에 공유 결합되는 두 말단 단백질(TP) 분자의 상호작용에 의해서, 준-원형 상태가 형성된다(Modrow, 2013). 일반적으로, 아데노바이러스성 게놈의 5개의 코딩 부위가 감염의 초기 상에서 주로 활성인 초기 유전자 E1-E4 및 바이러스성 입자 형성에 주로 필요한 단백질을 인코딩하는 후기 유전자(L1-L5)로 세분될 수 있다(Modrow, 2013).

[0468] 아데노바이러스 복제는 큰 E1A 단백질 (E1A13S)에 의해서 강하게 유도되는 초기 바이러스성 유전자 E2의 발현에 특별히 의존적이다. 전사되는 감염 후 첫 번째 바이러스성 유전자는 초기 부위 1A(E1A)이다. 일차 E1A 전사체는 차별적 스플라이싱(differential splicing)에 의해서 처리되어 13S, 12S 11S, 10S, 및 9S의 침강 계수로 5개의 고유한 메시지를 생성시킨다. 13S 및 12S mRNA는 감염 동안에 초기에 가장 풍부한 반면에, 9S mRNA는 후기에 가

장 풍부하다. 11S 및 10S mRNA는 감염 후 후기에 더 풍부해지는 마이너 종이다. 13S, 12S, 11S, 10S 및 9S E1A mRNA는 289개의 잔기(R), 243R, 217R, 171R 및 55R 단백질를 각각 코딩하고, 이의 모두는 단지 시험관 내에서 검출되는 9S 생성물을 제외하고는 생체 내에서 검출 가능하다. 일반적으로, 아데노바이러스성 유전자 발현은 감염 과정에서 고도의 복잡성으로 고도로 조절된다. 그에 의해서, 그 생성물이 바이러스성 DNA 중합효소 및 효율적인 바이러스 복제에 필요한 그 밖의 단백질을 인코딩하는 E2 유전자의 전사는 두 프로모터, 즉, E2-초기 및 E2-후기 프로모터의 조절 하에 있다.

[0469] 이의 두 중첩 전사 조절 부위로 인해서, E2-초기 프로모터는 위치 +1에서 시작하는 주요 프로모터와 위치 -26에서 시작하는 마이너 프로모터로 세분되고, 이들 둘 모두는 TATA 모티프를 함유한다(Swaminathan and Thimmapaya, 1996). 이들 모티프는 TATA 박스-결합 단백질(TBP)을 위한 결합 부위로서 작용한다. 더욱이, 서로에 대해서 역전된 배향으로 정렬된, 위치 -68과 -77 사이의 활성화 전사인자(ATF)를 위한 하나의 결합 부위 및 두 개의 E2F1/DP-1 결합 부위(TTTCGCGC)가 주요 E2-초기 프로모터의 위치 -35와 -63에 자리한다(Swaminathan and Thimmapaya, 1996). E1A를 통한 E2-초기 프로모터의 활성화는 주요 프로모터 부분에 편재된 두 E2F1-결합 부위에 주로 의존적이다.

[0470] 감염의 중간 단계에서, 약 6 hpi(감염 후 시간) 후에, E2 유전자의 발현이 E2-후기 프로모터에 의해서 조절된다. 이의 157-bp 서열의 -33 내지 -22에서의 위치에서, 세포성 TBP에 의해서 결합되고 활성화될 수 있는 TATA 박스(TATA box)가 있다(Swaminathan and Thimmapaya, 1996). 더욱이, 두 개의 SP1 인식 부위 및 세 개의 CCAAT 박스가 E2-후기 프로모터에 대해서 특성적이다.

[0471] 세포성 인자 YB-1가 역전된 CCAAT 박스에 결합할 수 있음이 밝혀졌기 때문에, Y-박스 결합 단백질 1(YB-1)과 E2-후기 프로모터 사이의 상호작용이 조사되었다. Holm 등은 2002년에, 사실, 이러한 프로모터의 활성을 조절하는 능력을 갖는 E2-후기 프로모터에 존재하는 Y-박스(역전된 CCAAT-박스)와의 YB-1의 특이적 상호작용이 존재함을 밝혀냈다(Holm et al., 2002). 이의 전사촉진 활성을 발휘하기 위해서는, YB-1는 아데노바이러스성 복합체 E1B-55k/E4-orf6를 통해서 핵 내로 전좌되어야 한다. 이들 초기 바이러스성 유전자는 E1A-13S의 전사촉진(transactivation) 후에 발현된다(Frisch and Mymryk, 2002).

[0472] YBX1 유전자에 의해서 인코딩된 세포 인자 YB-1은 전사, 스플라이싱, 번역 제어 및 DNA 손상의 복구에서 복수의 기능을 갖는 DNA-결합 단백질을 보유하는 저온 충격 도메인이다(Kohno et al., 2003). 더욱이, 그것은 암 세포 내의 다중약물-내성 표현형의 발생과 연루되는 MDR1 및 MRP1 유전자의 활성화로 인해서, 약물-내성에 중요한 역할을 한다(Mantwill et al., 2006). YB-1 발현은 아데노바이러스성 감염, 화학요법 또는 UV 방사선과 같은 외인성 스트레스 인자의 노출을 통해서 후속 핵 수송으로 유도된다(Mantwill et al., 2006).

[0473] 아데노바이러스 초기 유전자 및 후기 유전자의 전사 활성화는 바이러스 생활 주기에 핵심이다. 요약하면, 바이러스 생활 주기는 E1A 전사의 활성화에 의해서, 이어서, E2, E3 및 E4 유전자의 활성화의 캐스케이드에 의해서 개시된다. 마지막으로, 주요 후기 프로모터(MLP)는 주로 게놈 캡슐화에 관여하는 캡시드 및 부속 단백질(accessory protein)의 발현을 배위하도록 활성화된다(Turner et al 2015). 비-증식성 세포에 존재하는 바이러스 DNA 복제에 대한 차단을 극복하기 위해서, 바이러스는 초기 1A 단백질(E1A)을 발현한다. 이들 즉각적인 초기 단백질은 세포를 S-기로 유도하고 모든 다른 바이러스성 초기 유전자의 발현을 유도한다. 감염 동안에, 여러 E1A 이소폼(E1A isoform)이 인간 아데노바이러스 타입 5에 대해서 존재하는 289, 243, 217, 171, 및 55 잔기의 단백질에 의해서 발현된다. 감염의 상황에서, 바이러스성 유전자 발현의 주요 원동력은 큰 E1A 289R 단백질이다(Radko et al 2015).

[0474] 감염 시에, 아데노바이러스성 E1A 단백질의 발현은 인간 아데노바이러스의 주요 표적인 말단 분화된 상피 세포에서도 G0/G1기에서 S-기로의 세포 사이클 진행 및 바이러스 복제를 촉진시킨다. 이러한 과정은 아데노바이러스 생활 주기에 필수적인 것으로 사료된다.

[0475] 아데노바이러스는 정상 세포를 남겨두면서 암 세포를 감염시키고, 복제하고 치사시키도록 설계되었다. 종양 세포에서의 감염 및 복제 후에, 종양 세포 붕괴성 바이러스는 세포를 치사시켜, 후속 증폭 사이클을 위한 비리온을 방출시킨다. 종양 세포 내로만의 복제를 달성시키기 위해서, 두 종류의 유전적 변화가 이루어져서, 세 가지 하위 부류의 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스(본원에서 CRAd로도 일컬어짐)가 설계되게 하고, 이들 모두는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 실행에서 사용하기에 적합한 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스는, 다른 것들 중에서도, WO 2003/099859호에 기재되어 있다.

[0476] 타입 I CRAd는, 세포 사이클 조절자, 예컨대, p53 및 망막모세포종 단백질 (Rb)의 불활성화를 방해하는, 게놈의

E1 부위에서의 돌연변이 또는 삭제를 특징으로 한다. 결과적으로, 타입 I CRAd는 활발하게 분열하는 종양 세포에서 복제된다. 예를 들어, E1B-55 kDa 단백질을 발현할 수 없는 dl1520으로도 공지된 Onyx-015는 p53을 불활성화시킬 수 없고 p53-유도된 세포 사이클 정지를 피할 수 없다. 여러 연구는 p53 또는 p53 경로에 관여하는 유전자 중 하나의 발현의 결여에 대한 Onyx-015 선택성의 분자적 기반에 기인하였다. 그러나, O'Shea 등은 p53 불활성화보다는 후기 바이러스성 RNA 익스포트(late viral RNA export)가 Onyx-015 바이러스 선택성을 결정함을 밝혀냈다. E1A 부위에서의 삭제를 갖는 다른 타입 I CRAd는 Rb를 결합시킬 수 없고 S 기 진입을 촉발시킬 수 없다. 예를 들어, dl922-947 및 Δ24는 E1A 부위의 CR2 도메인에서의 24 뉴클레오티드 삭제를 함유하여 E1A-Rb 상호작용을 없앤다. 그 결과, 이들 바이러스는 자유롭고 결합되지 않은 E2F1가 이용 가능한 종양 세포에서 주로 복제한다.

[0477] 아데노바이러스 복제를 종양 세포로 제한하는 또 다른 방법은 바이러스 복제에 요구되는 바이러스성 유전자의 전사를 조절하는 것이다. 타입 II CRAd에서, 게놈은 종양-특이적 프로모터의 조절 하에 위치된다. 이들 프로모터는 정상 조직에 비해서 일부 종양에서 우선적으로 발현되는 것으로 공지된 유전자(예, 텔로머라제 또는 사이클로-옥시게나아제 II); 또는 정상 조직에 비해서 종양에서 과발현되는 것들(예, 전립선 특이 항원, PSA 또는 α-태아단백질, AFP)로부터 유도된다. 타입 III CRAd, 예컨대, XVir-N-31(Ad-Delo3-RGD)은 E1A13S 단백질 내의 전사촉진 도메인 CR3의 삭제를 특징으로 한다. XVir-N-31은 정상 세포 내의 복제 결함 아데노바이러스이다. XVir-N-31은 핵에서의 세포성 다기능성 단백질 YB-1의 존재에 의해서 그의 복제 능력을 회복한다. 따라서, CRAd는 단지 종양 세포에서 복제할 수 있으며, 그에 따라서, 궁극적으로는 그들을 용해시킨다. p53의 돌연변이 뿐만 아니라 ras 또는 RB도 XVir-N-31 복제 결핍을 보완하기에 효과적이지 않다. XVir-N-31 결여 E1A13S, 그 결과, E1B55k 단백질 및 E4orf6 단백질이 발현되지 않는다. 이러한 결핍은 E1A13S와는 독립적으로 E1B55k 및 E4orf6의 발현을 촉발시키는 종양 세포의 핵에서의 YB-1의 존재에 의해서 보완된다. 핵에서 YB-1의 존재에 의해서 유도되면, E1B55k 및 E4orf6은 추가로 세포성 YB-1를 핵내로 전달하여 바이러스 복제를 추진한다.

[0478] 세포 사이클은 갭 1(G1), 합성(S), 갭 2(G2) 및 유사분열(M) 단계를 통해서 순차적으로 진행된다. 이러한 진행은 복잡한 신호 네트워크를 통해 조절된다. CDK (사이클린-의존적 키나아제) 단백질, CDK1, CDK2, CDK4 및 CDK6은, 특이적 사이클린 단백질과 복합될 때에, 세포 사이클 진행의 주요 조절자이다. CDK의 구성적 발현 및 다양한 사이클린의 시간적 제어는 별개의 사이클린-CDK 복합체에 의한 특이적 세포 사이클린 상의 조절을 가능하게 한다. CDK 활성은 여러 억제성 단백질에 의해서 음으로 조절된다. CDK 생물학 및 기능의 다양한 양태가 이전에 포괄적으로 검토되었다.

[0479] 구조적 및 기능적 상동을 나타내는 CDK4 및 CDK6은, 사이클린 D 단백질과 복합되는 때에, G1기에서의 정지 세포의 S 기로의 전이를 조절한다. 사이클린 D 단백질은 세 가지 서브타입, 즉, 사이클린 D1-3을 가지며, 유사분열 촉진 자극 하에 축적된다. CDK4/6의 음성 조절자는 CDK4 (INK4) 단백질의 억제제, p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C 및 p19INK4D를 포함하며, 이들은 CDK4/6 활성을 사이클린 D1와의 이들의 결합을 감소시킴으로써 또는 이들의 촉매성 도메인을 직접 점유함으로써 억제한다.

[0480] CDK4/6의 키나아제 활성은 Rb, p107 및 p130를 포함하는 망막모세포종(Rb) 단백질 패밀리의 구성원의 포스포릴화를 유도하고, 이는 이들의 기능성 불활성화를 초래한다. 정지 세포에서, 활성 하이포포스포릴화된 Rb는 다른 공동-억제제와 함께 DP-1/2과의 복합체를 형성하는 E2F1 전사인자 패밀리의 구성원에 결합하고, E2F1 기능을 억제한다(Rubin et al 2005). 포스포릴화되면, Rb는 이러한 복합체로부터 해리되고, 다른 것들 중에서도 사이클린 A, 사이클린 E 및 DHFR을 포함한 E2F1 표적 유전자의 전사를 허용하고, 이는 S 기로의 세포 사이클의 전이에 요구된다. 따라서, CDK4/6 활성의 억제는 Rb 탈포스포릴화 및 E2F1 활성의 억제를 유도하고, 이는 G0/G1기 정지를 촉진한다. 이는 암 세포에서의 표적 요법으로서 CDK4/6 억제제의 발생을 촉진하였다.

[0481] CDK4/6-Rb 신호전달 경로의 파괴와 세포 사이클의 비조절된 G1-S 전이는 암 세포의 일반적인 특징이다. 이는 기능 돌연변이의 상실 또는 RB1 유전자(Rb를 인코딩함), CDKN2A(p16INK4A 및 p14ARF를 인코딩함) 또는 CDKN2B(p15INK4B를 인코딩함)의 삭제를 포함한 다양한 분자상의 변경에 기인하여 발생할 수 있다. 그러한 변동은 또한 CCND1(사이클린 D1를 인코딩함), E2F1-3, CDK4, CDK6 또는 다양한 유사분열촉진 신호전달 경로, 예컨대, PI3K 또는 MAPK 경로의 성분들에서의 증폭 또는 활성화 돌연변이로부터 초래할 수 있다.

[0482] 여러 ATP-경쟁 소분자 CDK 억제제가 개발되었다. 그러나, 제1 세대 억제제, 예컨대, 플라보피리돌(flavopiridol)은 비-선택적이며, 복수의 CDK를 억제할 수 있으며, 이는 제한된 효능 및 높은 독성을 생성시킬 수 있다. 차세대 CDK4/6 억제제는 높은 선택성을 나타내며, 팔보시클립 (Pfizer로부터의 PD-0332991), 아베마시클립(Eli Lilly로부터의 LY-2835219) 및 리보시클립 (Novartis로부터의 LEE011) 및 트릴라시클립(G1T28)을 포

함한다. 이들 CDK4/6 억제제는 백혈병, 유방암, 흑색종, 신경아교종, 췌장암, 간세포암종, 폐 선암종, 육종, 난소암, 신장암, 전립선암 및 전이성 유방암(mBC)을 포함한 여러 암 실체의 시험관내 및 생체내 모델에서 전임상 시험되었다. 대부분의 연구에서, 이들은 Rb 포스포릴화, 단백질 발현 및 E2F1 표적 유전자의 전사에서 용량-의존적 감소를 갖는 일관된 분자 및 기능성 표현형을 입증하였으며, 이는 G0/G1기 정지 및 세포 증식의 억제와 연관된다. 추가로, 모든 이들 보고서는 Rb 발현이 이들 억제제에 대한 민감성에 대한 전제조건임을 입증하고 있다.

[0483] CDK4/6 억제제, 예컨대, PD-0332991는 포스포릴화된 Rb의 감소와 관련된 전체 Rb 단백질에서의 용량 의존적 감소를 초래한다. 전체 Rb에서의 이러한 감소는 RB1 전사 수준 및 E2F1 표적 유전자 CCNA2 및 CCNE2의 전사에서의 감소와 부분적으로 관련이 있다. 또한, E2F1 발현 수준이 현저하게 하향 조절된다.

[0484] 본 발명의 실행에 사용하기에 적합한 CDK4/6 억제제는 도 25에 개시되어 있다.

[0485] 실시예 부분으로부터 명백한 바와 같이, 어떠한 CDK4/6 억제제는 바이러스, 바람직하게는 아데노바이러스 및 더욱 바람직하게는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스와 함께 사용하기에 적합하고, 여기에서, CDK4/6 억제제는 세포의 G1기 정지를 유발시키고, E2F1, 더욱 특히, E2F1 활성을 억제한다.

[0486] 본 기술분야에서의 통상의 기술자는 어떠한 CDK4/6 억제제가 치료 유효 농도로 사용된다는 것을 알 수 있을 것이다.

[0487] PARP1은 단일-가닥 파괴(DNA에서의 "닉스(nicks)')를 복구하기에 중요한 단백질이다. 포유동물에서, 17 가지의 패밀리 구성원이 발견되었고, 이들 중 단지 6 가지가 폴리 ADP-리보오스(pADPr)를 합성한다. PARP1, PARP2, 및 PARP3은 DNA 복구에서 역할을 한다. PARP1은 단일-가닥 파괴(single-stranded break: SSB) 및 이중-가닥 파괴(DSB)를 갖는 DNA에 결합된다. 이어서, PARP1은 활성 부위에서 핵심적인 아미노산 잔기를 정렬시키는 형태적 변화를 진행하여, 그의 활성을 증가시킨다. PARP1가 활성화되면, 그것은 pADPr을 합성하고, 이는 단백질에 결합하고 그들의 기능을 변경시킨다. pADPr은 pADPr 글리코하이드롤라아제에 의해서 신속하게 분해되어, pADPr의 수준이 DNA 손상을 반영하고 pADPr에 대한 반응이 DNA 복구 후 종료되는 것을 확실히 한다.

[0488] DNA 복구 경로를 억제함으로써, PARP1 억제제는 DNA 내의 단일-가닥 파괴의 증가를 유발시킨다. 이러한 DNA 손상은 복구되지 않으며 복제 후의 딸 세포에 전달되는데, 그 이유는 BER이 더 이상 발생하지 않기 때문이다. 이는 BRCA1 및 BRCA2 돌연변이를 갖는 종양에서의 DSB의 증가를 유도한다(Scott et al. 2015, J Clin Oncol., 33(12): 1397-140). 모든 PARP 억제제 구조를 특성화하는 벤즈아미드 모이어티를 포함한, PARP 약물 후보, 루카파립, 벨리파립 및 올라파립을 포함한 PARP 억제제의 화학적 구조가 도 26에 도시되어 있고, 문헌[Antolin and Mestres 2014, Oncotarget, 30;5(10):3023-8]에 기재되어 있다.

[0489] 또한, YB-1이 PARP 활성을 강화하고 PARP1 억제제의 효능을 감소시킨다는 것은 잘 알려져 있고, 이는 CDK 4/6 억제제 및 PARP-억제제 둘 모두와 함께 YB-1 의존적 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스가 암 세포 치사에서 시너지 효과를 발휘함을 암시한다. 올라파립 및 BMN673(Talazolarib developed from Pfizer, USA, Clin Cancer Res. 2013, 15;19(18):5003-15)이 PARP-억제제의 예이다.

[0490] 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 PARP 억제제가 치료 유효 농도로 사용된다는 것이 인식될 것이다.

[0491] 본 발명의 실행에서 사용하기에 적합한 CDK4/6 억제제가 도 25에 개시되어 있다.

[0492] 후성유전학적 지형(epigenetic landscape)에서의 수차(aberration)가 암의 특징이며, 라이신 잔기의 아세틸화는 세포 신호 전달 및 질환 생물학과 광범위한 관련을 갖는 번역 후 변형이다. 아세틸화 부위를 '작성하고'(히스톤 아세틸트랜스퍼레이스: HAT) '지우는'(히스톤 데아세틸라아제: HDAC) 효소는 현재 약물 개발에 대한 광범위한 연구 분야이다. 아세틸화된 라이신 잔기에 의한 거대분자 복합체에 대한 단백질의 동원은 ε-N-라이신 아세틸화 모티프를 인식하는 진화론적으로 고도로 보존된 단백질-상호작용 모듈인 브로모도메인(bromodomain: BRD)에 의해서 매개된다. 보존된 BRD 폴드(conserved BRD fold)는 깊고 대체로 소수성인 아세틸 라이신 결합 부위를 함유하고, 이는 작은 약제학적 활성 분자의 개발에 대한 매력적인 포켓을 나타낸다. BRD를 함유하는 단백질은 매우 다양한 질환의 발생과 관련이 있다.

[0493] 최근, BET(브로모도메인 및 엑스트라-말단) 패밀리의 BRD를 표적하는 두 가지의 높은 효능적 및 선택적 억제제는 암에서 이들 BRD의 표적화를 지지하는 강력한 데이터를 제공했다. BRD2, BRD3, BRD4, 및 BRDT로 구성된 브로모도메인 단백질의 BET(브로모도메인 및 엑스트라 말단 도메인) 서브패밀리는 RNA 폴리머라아제 II (POLII)에 의한 전사를 조절하는데 다양한 역할을 수행하며, 흥미로운 새로운 부류의 후성유전학적 약물 표적(epigenetic

drug target)이다. 이들 단백질은 아세틸화된 라이신 잔기에서의 활성화된 염색질에 결합함으로써 전사의 개시 및 신장 단계를 촉진한다. 이들 소위 후성유전학적 "리더(reader)"에 의한 활성화된 염색질의 인식은 활성 전사 부위에 대한 RNA 폴리머라아제 II 복합체의 동원을 촉진한다. BRD4/P-TEFb 상호작용은 유사분열 후의 신속한 전사 재-억제에 중요하다(Muller et al., 2011, Expert Rev. Mol. Medicine, 13, e19). P-TEFb는 초파리 세포로부터 유도된 시험관내 전사 시스템을 사용한 긴 런-오프 전사체(run-off transcript)의 생성에 필요한 인자로서 확인되어 정제되었다. 그것은 초파리의 촉매성 서브유닛, Cdk9, 및 조절성 서브유닛, 사이클린 T를 함유하는 사이클린 의존성 키나아제이다. 인간에서, Cdk9 및 여러 사이클린 서브유닛, 사이클린 T1, T2, 및 K 중 하나를 함유하는 P-TEFb의 복수의 형태가 있다. P-TEFb는 브로모도메인 단백질 BRD4을 포함하는 그 밖의 인자와 연관되며, 수퍼 신장 복합체(super elongation complex)로 일컬어지는 단백질의 큰 복합체와 관련있는 것으로 발견된다(Yang Z, et al.,2005. Mol Cell; 19:535-45; Fu et al., 1999, J Biol Chem., 274:34527-30).

[0494] JQ-1(티에노-트리아졸로-1-4-디아제핀)은 BRD2, BRD3, BRD4를 포함하는 브로모도메인 단백질의 BET 패밀리의 효능적인 억제제이다(Filippakopoulos et al., 2010 Nature 468, 1067-1073). JQ-1은 브로모도메인과 아세틸기 사이의 상호작용을 방지하여 특정의 유전자의 하향 조절을 유발시킨다. 추가로, OTOX15, BAY1238097, GSK2820151, I-BET762 및 PLX51107을 포함하는 BET 브로모도메인 억제제가 문헌에 기재되어 있다(Perez-Salvia and Esteller 2017, EPIGENETICS, 12, 323-339; Brandt et al., 2015ACS Chem. Biol., 10, 22-39). JQ-1은 벤조디아제핀과 구조적으로 관련되어 있다. 화학식은 C23H25ClN4O2S이다.

[0495] 최근, BET 억제제 JQ-1은 아데노바이러스 감염 및 아데노바이러스성 벡터-매개된 유전자 전달을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. JQ-1에 의한 세포의 처리는 전사 신장의 P-TEFb의 서브유닛인 CDK9와의 BRD4 회합의 증가를 유도한다. 그러나, 논문에 언급된 바와 같이, 추가의 연구는 BED4가 아데노바이러스 감염 및 이식유전자 발현을 조절하기 위해서 사용하는 기전을 섬세하게 하는 것을 필요로 한다(Baojie Lv et al 2018, Scientific reports, 8, 11554). 중요하게는, 바이러스 복제 및 바이러스 전사는 조사되지 않았다. 그러나, CDK9가 일시 정지된 폴리머라아제의 방출을 자극하고 전사 폴리머라아제의 수 및 그에 따른 시간 당 mRNA 합성의 양을 증가시킴으로써 전사를 활성화하는 것으로 공지되어 있다(Gressel et al. 2017, eLife, 6, e29736). 또한, BET 억제제 내성은 CDK 4/6 억제제에 의해서 극복될 수 있다는 것이 밝혀졌다(Jin et al. 2018, Mol Cell;71(4):592-605). 최근에, 세포 사이클의 후기 유사분열로부터 초기 G1 기까지의 P-TEFb-Brd4 상호작용에서의 극적인 증가 및 염색체로의 P-TEFb의 능동적 동원에 이어진 G1 진행을 위한 핵심 유전자의 전사의 개시가 입증되었다. 중요하게는, Brd4의 고갈은 필수 G1 유전자의 전사를 감소시킴으로써 전체 과정을 제거하여, G1 세포 사이클 정지 및 아폽토시스(apoptosis)를 유도하였다(Yang et al., 2008, Mol Cell Biol., 28:967-976, Kohoutek, 2009, Cell Division, 4. 19).

[0496] 그러나, CDK 4/6 억제제 및 BET 억제제와 함께 YB-1 의존적 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스를 사용하는 것에 대해서는 알려진 것이 없다.

[0497] 다른 브로모도메인 억제제가 바이러스, 바람직하게는 아데노바이러스, 더욱 바람직하게는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스, 예컨대, XVir-N-31, 및 CDK4/6 억제제를 사용한 삼중 요법에서 사용하기에 동일하게 적합할 것이라는 것이 인식될 것이고 본 발명 내에 있다.

[0498] 본 기술분야에서 통상의 기술자에게는 어떠한 브로모도메인(Bet) 억제제가 치료 유효 농도로 사용됨이 이해될 것이다.

[0499] 본 발명의 실행에서 사용하기에 적합한 브로모도메인 억제제는 도 27에 개시되어 있다.

[0500] **p53 및 E2F1에 대한 MDM2의 역할**

[0501] p53 및 망막모세포종(Rb) 단백질은 두 가지의 주요 종양 억제자이다. 이들 중 하나 또는 둘 모두에서의 돌연변이가 모든 인간 암 종양에서 발견되며, 둘 모두는 약물 개발 프로그램에서 잠재적인 치료 표적으로서 광범위하게 연구되고 있다. p53 및 E2F1가 세포 증식 및 생존 능력(세포 치사)의 중심이 되는 조절자이기 때문에, 이들의 풍부함과 활성은 엄격히 조절된다. E3 유비퀴틴-단백질 리가아제로도 공지된 마우스 쌍염색체(Mouse Double Minute) 2 단백질(MDM2)은 MDM2-p53 및 Rb-E2F1 경로 둘 모두를 조절하는 듯하다. Rb와 p53은 직접적으로 상호작용할 수 없기 때문에, MDM2가 Rb와 p53 사이의 브릿지인 것으로 제안되고 있다(Polager and Ginsberg, Nat Rev Cancer 2009, 9, 738-48). 종양유전자로서의 MDM2의 역할을 추가로 뒷받침하는, 유방 종양뿐만 아니라 연조직 육종 및 골육종을 포함한 여러 인간 종양 유형이 MDM2의 증가된 수준을 갖는 것으로 밝혀졌다. MDM2 종양단백질은 p53을 유비퀴틴화하고 길항하지만, p53-독립적 기능을 수행할 수도 있다. MDM2는 p53에 직접적으로 결합

하고 그의 전사 활성을 억제한다. 또한 p53-선택적 E3 유비퀴틴 리가아제로서, MDM2는 p53 유비퀴틴화를 촉진하고 프로테아좀 분해를 위해서 그것을 표적으로 한다(Eischem et al, Hum. Mutant. 20014, 35, 728-737). 그러나, MDM2가 p53-결핍 암세포의 생존에도 필요하다는 증거가 있다(Feeley et al, Cancer Res 2017, 77, 3823-3833).

[0502] E2F1 경로에 대한 MDM2의 긍정적인 효과와 일치되게, MDM2는 Rb, E2F1 및 E2F1의 이종 이량체 파트너인 DP1과 물리적으로 상호 작용하여 G1/S 세포 주기 전환을 촉진할 수 있다. 따라서, E2F1 또는 DP1과의 MDM2 상호작용은 세포 주기 진행에 관여하는 E2F1 표적 유전자의 전사를 자극할 수 있다. 더욱이, F-box 단백질 SKP2에 의한 분해를 위한 E2F1의 표적화는 MDM2의 결합에 의해 길항된다. 따라서, MDM2 결합이 E2F1 안정성을 증가시킨다는 증거가 존재하는 반면에(Zhang et al. Oncogene 2005, 24, 7238-7247), MDM2 억제는 E2F1 단백질 수준의 감소와 관련이 있다. MDM2는 다른 많은 종양단백질과 마찬가지로 저인산화된 Rb에 선택적으로 결합한다. MDM2와 Rb 사이의 상호작용은 Rb-E2F1 복합체 형성을 억제하여 Rb 기능을 억제한다. 또한, RB와 MDM2 사이의 상호 작용은 MDM2-매개된 Rb 분해를 유발한다. 현재의 사실은 MDM2도(p53 외에) Rb의 주요 네거티브 조절자(key negative regulator)임을 확인시켜 주는 듯하다(Shi and Gu, Genes Cancer. 2012, 3: 240-248; Yap et al., Oncogene 1999, 18, 7681-7689, Wu et al., JBC 2009, 284, 26315-26321).

[0503] **누틀린-3**

[0504] 누틀린은 시스-이미다졸린 유사체이며, 이는 MDM2와 종양 억제자 p53 사이의 상호작용을 억제한다. 누틀린-3은 항암 연구에서 가장 일반적으로 사용되는 화합물이다. 누틀린 소분자는 MDM2의 p53 결합 포켓을 점유하고 p53 야생형 세포에서 p53 경로의 활성화로 이어지는 p53-MDM2 상호작용을 효과적으로 방해한다. 누틀린-3 치료에 대한 반응으로, p53 암세포는 세포 주기 정지(G0/G1 또는 G2/S) 또는 아폽토시스(apoptosis)를 진행한다. 또한, 누틀린-3은 분화 및 세포 노화를 유도할 수 있다. MDM2, MDM4, p73, ATM 및 E2F1의 단일 뉴클레오티드 다형성을 포함한, 일련의 인자가 누틀린-3 치료의 결과에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. p53의 활성화는 p21과 MDM2를 상향 조절하며, 이들 둘 모두는 Rb의 중요한 조절자이다. 최근에, 누틀린-3은 Rb 및 E2F1 단백질 수준과 Rb 인산화 둘 모두에 부정적인 영향을 미치며, 이는 누틀린-3에 대한 세포 반응에 상당한 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(Du et al., JBC 2009, 284, 26315-26321).

[0505] 비록, 이전 연구는 MDM2의 종양 발생성이 이의 p53의 음성 조절에 기인하는 것으로 제안했지만, p53-독립적 상호작용도 마찬가지로 중요할 수 있다. MDM2 억제제를 사용한 최근 연구 동안에, E2F 전사 인자 1(E2F1)이, 암의 p53 상태와 무관하게, MDM2 억제시에 하향 조절된다는 것이 주목되었다. 한 공보에서는 MDM2 기능을 억제하기 위한 안티센스 RNA의 사용을 설명하고 있다. 그들은 MDM2가 p53-의존적 및 p53-독립적 기전을 통해 전립선암 성장에 역할을 한다고 결론지었다. 더욱이, 그들은 Bcl2, Rb, pRb 및 E2F1 단백질 수준은 감소한 반면에, p21은 증가되었음을 입증하고 있다(Zhang et al 2003, PNAS 2003,100, 11636-11641). 그러나, MDM2가 E2F1 단백질의 유비퀴틴화를 억제하여 E2F1 단백질의 반감기를 연장시킨다는 것이 밝혀졌다. MDM2는 E2F1 E3 리가제인 SCF(SKP2)를 대체한다. MDM2와 E2F1 사이의 직접 결합은 E2F1 유비퀴틴화에 대한 MDM2의 부정적인 영향에 필요하며, MDM2 핵 국소화 신호의 삭제는 E2F1 단백질 수준을 증가시키는 능력의 손실을 초래하지 않는다. MDM2 억제시의 E2F1의 하향 조절은 pRB 또는 p14(Arf)에 기인되지 않았다. 또한, E2F1은 MDM2 녹다운(MDM2 knockdown)에 의해 유도된 세포 증식의 억제의 적어도 일부를 담당했다. 결론적으로, 본 연구는 E2F1 단백질의 안정화가 MDM2-매개된 종양형성의 또 다른 p53-독립적 구성요소일 수 있다는 증거를 제공한다(Zhang et al., Oncogene 2005, 24, 7238-7247).

[0506] 분명하게는, Rb-E2F1 및 MDM2-p53 경로는, 이들 사이의 다면적인 누화(multifaceted crosstalk)와 함께, 세포 주기 진행 및 생존력의 중요한 조절자이다. 그러나, MDM2-표적 약물을 사용한 임상 연구는 현재 초기 기대치를 충족하지 못했으며, 적어도 단일 약물로서 사용될 때에는 그렇지 않다. 이는 MDM2 억제제와 다른 암 약물의 최적화된 조합에 대한 검색에 자극을 주었다.

[0507] 누틀린의 여러가지 유도체가 개발되어 인체 연구로 진행되었다(도 1). 이들 화합물은 정상 또는 "야생형" p53을 함유하는 종양에 가장 잘 작용하는 것으로 생각된다. 그러나, 최근의 결과는 E2F1 전사 활성이 중요 결정 인자 MDM2 길항제-유도 아폽토시스이고 p73이 누틀린-3에 의해 유도된 E2F1-매개된 아폽토시스에 중요하다는 것을 시사하고 있다(Burgess et al., Frontiers in Oncology 2016, 6, article 7; Skalniak et al., 2019, 29, 151-170; Kitagawa et al., Oncogene 2008, 27, 5303-5314).

[0508] 누틀린 및 이의 유도체(NVP-HDM201, 이다사누틀린, AM-8553, SAR405838, 누틀린-3a, AMG232)이 도 43에 도시되어 있다.

[0509] 바이러스에 의해서 그리고 그에 따라서 본원에서 기재된 본 발명의 조합에 의해서 특별히 치료될 수 있는 종양은 바람직하게는 신경계의 종양, 눈 종양(ocular tumour), 피부의 종양, 연조직의 종양, 위장 종양, 호흡기계의 종양, 골격의 종양, 내분비계의 종양, 여성 생식기계의 종양, 유선의 종양, 남성 생식기계의 종양, 요배출계(urinary outflow system)의 종양, 혼합 및 배아 종양을 포함한 조혈계의 종양, 및 백혈병를 포함한 군으로부터 선택되는 종양이다. 이들 종양이 본원에서 특별히 정의된 바와 같은 특별히 내성 종양인 것이 본 발명 내에 있다.

[0510] 신경계 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0511] 1. 두개골 뿐만 아니라 뇌(두개 내)의 종양, 바람직하게는 별아교세포종(astrocytoma), 희소돌기아교세포종(oligodendroglioma), 수막종(meningioma), 신경모세포종(neuroblastoma), 신경절신경종(ganglioneuroma), 뇌실막종(ependymoma), 신경초교종(schwannoglioma), 신경섬유종(neurofibroma), 혈관모세포종(haemangioblastoma), 지방종(lipoma), 머리인두종(craniopharyngioma), 기형종(teratoma) 및 척삭종(chordoma);

[0512] 2. 척수 및 척주관(vertebral canal)의 종양, 바람직하게는 아교모세포종(glioblastoma), 수막종, 신경모세포종, 신경섬유종, 뼈육종, 연골육종, 혈관육종, 섬유육종 및 다발성 골수종(multiple myeloma); 및

[0513] 3. 말초 신경의 종양, 바람직하게는 신경초교종, 신경섬유종, 신경섬유육종(neurofibrosarcoma) 및 신경 주위 섬유모세포종(perineural fibroblastoma).

[0514] 눈 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0515] 1. 눈꺼풀 및 눈꺼풀 샘(lid glands)의 종양, 바람직하게는 선종, 선암종, 유두종(papilloma), 조직구종(histiocytoma), 비만 세포 종양, 기저-세포(basal-cell) 종양, 흑색종, 편평세포 암종(squamous-cell carcinoma), 섬유종 및 섬유육종;

[0516] 2. 결막과 깜박임막(nictitating membrane)의 종양, 바람직하게는 편평세포 암종, 혈관종, 혈관육종, 선종, 선암종, 섬유육종, 흑색종 및 유두종; 및

[0517] 3. 안와(orbita), 시각 신경(optic nerve) 및 안구(eyeball)의 종양, 바람직하게는 망막모세포종, 뼈육종, 비만 세포 종양, 수막종, 망상 세포(reticular cell) 종양, 신경아교종, 신경초교종, 연골종(chondroma), 선암종, 편평세포 암종, 형질 세포(plasma cell) 종양, 림프종, 횡문근육종(rhabdomyosarcoma) 및 흑색종.

[0518] 피부 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0519] 조직구종의 종양, 지방종, 섬유육종, 섬유종, 비만 세포 종양, 악성 흑색종, 유두종, 기저-세포 종양, 각질가시세포종(keratoacanthoma), 혈관주위세포종(haemangiopericytoma), 모낭(hair follicle)의 종양, 땀샘(sweat gland)의 종양, 피지선(sebaceous gland)의 종양, 혈관종, 혈관육종, 지방종(lipoma), 지방육종(liposarcoma), 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma), 형질세포종(plasmacytoma) 및 림프관종(lymphangioma).

[0520] 연조직의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0521] 포상 연조직 육종(alveolar soft tissue sarcoma)의 종양, 상피 세포 육종(epithelioid cell sarcoma), 연조직의 연골육종, 연조직의 뼈육종, 연조직의 유잉육종(Ewing's sarcoma), 원시신경외배엽종양(primitive neuroectodermal tumor: PNET), 섬유육종, 섬유종, 평활근육종, 평활근종, 지방육종, 악성 섬유성 조직구종, 악성 혈관주위세포종, 혈관종(haemangioma), 혈관육종, 악성 간엽종(malignant mesenchymoma), 말초 신경의 악성 종양(malignant peripheral nerve sheath tumor: MPNST), 악성 신경초교종, 악성 멜라닌세포 신경초교종(malignant melanocytic schwannoglioma), 횡문근육종, 활막 육종(synovial sarcoma), 림프관종 및 림프관 육종(lymphangiosarcoma).

[0522] 위장 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0523] 1. 구강 및 혀의 종양, 바람직하게는 편평세포 암종, 섬유육종, 메르켈 세포 종양(Merkel cell tumor), 유도성 섬유소사기질모세포종(inductive fibroameloblastoma), 섬유종, 섬유육종, 바이러스성 유두종증, 특발성 유두종증, 코인두 폴립(nasopharyngeal polyp), 평활근육종, 근모세포종(myoblastoma) 및 비만 세포 종양;

[0524] 2. 침샘의 종양, 바람직하게는 선암종(adenocarcinoma);

[0525] 3. 식도의 종양, 바람직하게는 편평세포 암종, 평활근육종, 섬유육종, 뼈육종(osteosarcoma), 바레트 암종(Barrett carcinoma) 및 식도 주위(paraoesophageal) 종양;

[0526] 4. 외분비 췌장의 종양, 바람직하게는 선암종; 및

[0527] 5. 위(stomach)의 종양, 바람직하게는 선암종, 평활근종, 평활근육종(leiomyosarcoma) 및 섬유육종(fibrosarcoma).

[0528] 호흡기계의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0529] 1. 코 및 비강, 후두 및 기관(trachea)의 종양, 바람직하게는 편평세포 암종, 섬유육종, 섬유종(fibroma), 림프육종(lymphosarcoma), 림프종(lymphoma), 혈관종, 혈관육종, 흑색종, 비만 세포 종양, 뼈육종, 연골육종, 호산과립세포종(oncocytoma)(횡문근종: rhabdomyoma), 선암종 및 근모세포종; 및

[0530] 2. 폐의 종양, 바람직하게는 편평세포 암종, 섬유육종, 섬유종, 림프육종, 림프종, 혈관종, 혈관육종(haemangiosarcoma), 흑색종, 비만 세포 종양, 뼈육종, 연골육종(chondrosarcoma), 호산과립세포종(횡문근종), 선암종, 근모세포종, 소세포 암종, 비-소세포 암종, 기관지 선암종, 기관지 폐포 선암종(bronchoalveolar adenocarcinoma) 및 폐포 선암종(alveolar adenocarcinoma).

[0531] 골격 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0532] 뼈육종, 연골육종, 골막성 뼈육종(parosteal osteosarcoma), 혈관육종, 윤활 세포 육종(synovial cell sarcoma), 혈관육종, 섬유육종, 악성 간엽종, 거대 세포 종양, 뼈종(osteoma) 및 다엽성 뼈종(multilobular osteoma).

[0533] 내분비계의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0534] 1. 갑상선(thyroid gland)/부갑상선(parathyroid)의 종양, 바람직하게는 선종 및 선암종;

[0535] 2. 콩팥위샘(suprarenal gland)의 종양, 바람직하게는 선종, 선암종 및 크롬 친화 세포종(pheochromocytoma)(수질성 부신종: medullosuprarenoma);

[0536] 3. 시상하부(ypothalamus)/뇌하수체(hypophysis)의 종양, 바람직하게는 선종 및 선암종;

[0537] 4. 내분비 췌장(endocrine pancreas)의 종양, 바람직하게는 인슐린종(insulinoma)(베타 세포 종양, 아푸도마(APUDoma)) 및 졸링거-엘리슨 증후군(Zollinger-Ellison syndrome)(췌장의 델타 세포의 가스트린 분비성 종양(gastrin secernent tumor)); 및

[0538] 5. 또한, 다발성 내분비샘 종양(multiple endocrine neoplasia: MEN) 및 화학 수용체종(chemodectoma).

[0539] 여성 성 계통 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0540] 1. 난소의 종양, 바람직하게는 선종, 선암종, 낭선종(cystadenoma), 및 미분화(undifferentiated) 암종;

[0541] 2. 자궁의 종양, 바람직하게는 평활근종, 평활근육종, 선종, 선암종, 섬유종, 섬유육종 및 지방종;

[0542] 3. 자궁경부의 종양, 바람직하게는 선암종, 선종, 평활근육종 및 평활근종;

[0543] 4. 질(vagina) 및 외음(vulva)의 종양, 바람직하게는 평활근종, 평활근육종, 섬유평활근종(fibroleiomyoma), 섬유종, 섬유육종, 폴립 및 편평세포 암종.

[0544] 유선의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0545] 섬유선종(fibroadenoma), 선종, 선암종, 중간엽 종양, 암종, 암육종(carcinosarcoma).

[0546] 남성 성 계통의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0547] 1. 고환의 종양, 바람직하게는 고환종(seminoma), 간질-세포(interstitial-cell) 종양 및 세르톨리 세포(Sertoli cell) 종양;

[0548] 2. 전립선의 종양, 바람직하게는 선암종, 미분화 암종, 편평세포 암종, 평활근육종 및 이행 세포 암종(transitional cell carcinoma); 및

[0549] 3. 음경 및 외부 생식기의 종양, 바람직하게는 비만 세포 종양 및 편평세포 암종.

[0550] 요 배출 계통의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0551] 1. 신장의 종양, 바람직하게는 선암종, 이행 세포 암종(상피성 종양), 섬유육종, 연골육종(중간엽 종양), 윌름 종양(Wilm's tumor), 콩팥 모세포종(nephroblastoma) 및 배아 신종(embryonal nephroma)(배아 다능성 모세포종(embryonal pluripotent blastoma));

[0552] 2. 요관의 종양, 바람직하게는 평활근종, 평활근육종, 섬유유두종(fibropapilloma), 이행 세포 암종;

[0553] 3. 방광의 종양, 바람직하게는 이행 세포 암종, 편평세포 암종, 선암종, 포도상(배아 횡문근육종), 섬유종, 섬유육종, 평활근종, 평활근육종, 유두종 및 혈관육종; 및

[0554] 4. 요도의 종양, 바람직하게는 이행 세포 암종, 편평세포 암종 및 평활근육종.

[0555] 조혈계의 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0556] 1. 림프종, 림프성 백혈병, 비-림프성 백혈병, 골수증식성 백혈병(myeloproliferative leukaemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비-호지킨 림프종.

[0557] 혼합 및 배아 종양의 군은 바람직하게는 다음을 포함한다:

[0558] 혈관육종, 흉선종(thymoma) 및 중피종(mesothelioma).

[0559] 바람직하게는, 이들 종양은 유방암, 난소 암종, 전립선 암종, 뼈육종, 아교모세포종, 흑색종, 소세포 폐 암종 및 직장결장 암종을 포함하는 군으로부터 선택된다. 추가의 종양은 본원에서 기재되는 바와 같은 내성의 것들, 바람직하게는 특히 복수 내성인 것들, 특히, 또한 상기 기재된 군의 종양이다.

[0560] 본 발명의 조합물이 투여되는 대상체가 각각 확인되고 선별되는 것이 또한 본 발명 내에 있다. 다양한 양태에서 본 발명으로부터 이익을 얻을 수 있는 그러한 환자의 확인은 대상체의 샘플의 핵에서의 YB-1의 검출을 기반으로 한다.

[0561] 구체예에서, 종양 조직의 시험은 YB-1에 대한 항체, YB-1에 대한 앱타머(aptamer) 및 YB-1에 대한 스피에겔머(spiegelmer) 뿐만 아니라 YB-1에 대한 안티칼린(anticaline)을 포함하는 군으로부터 선택되는 작용제를 사용함으로써 수행된다. 기본적으로는, 동일한 수단이 상응하는 마커(marker)에 대해서 생산될 수 있고, 그에 따라서 사용될 수 있다. 항체, 특히, 단클론성 항체의 제조는 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 공지되어 있다. YB-1 또는 마커의 특이적 검출을 위한 추가의 수단은 표적 구조, 본 경우에서, YB-1 또는 상기 마커에 높은 친화성으로 결합하는 펩티드이다. 종래 기술에서, 그러한 펩티드를 생성시키기 위한 방법, 예컨대, 파아지-디스플레이(phage-display)는 공지되어 있다. 전형적으로는, 펩티드 라이브러리(library)가 출발점으로서 취해지고, 개별적인 펩티드는 8 내지 20개의 아미노산의 길이를 가지며, 라이브러리의 크기는 약 102 내지 1018, 바람직하게는 108 내지 1015의 상이한 펩티드이다. 표적 분자 결합 폴리펩티드의 특수한 형태는, 예를 들어, 독일 특허 출원 DE 197 42 706호에 기재된 소위 안티칼린이다.

[0562] YB-1 또는 본원에 개시된 상응하는 마커의 특이적 결합을 위한 및 그에 따른 세포 핵 내의 YB-1의 세포 주기 독립적 편재화의 검출을 위한 추가의 수단은 소위 앱타머, 즉, 단일 가닥 또는 이중 가닥으로서 RNA 또는 DNA로서 존재하고 표적 분자에 특별히 결합하는 D-핵산이다. 앱타머의 생성은, 예를 들어, 유럽특허 EP 0 533 838호에 기재되어 있다. 앱타머의 특수한 형태는, 예를 들어, 문헌[Piganeau, N. et al. (2000), Angew. Chem. Int. Ed., 39, no. 29, pages 4369 - 4373]에 기재되어 있는 소위 앱타자임(aptazyme)이다. 이들은 앱타머의 특수의 구체예이며, 이는 이들이 앱타머 부분과는 별도로 리보자임 부분을 포함하고 앱타머 부분에 결합하는 표적 분자의 결합 또는 방출시에 촉매적 활성을 가지며 신호의 생성에 동조하는 핵산 기질을 분해함을 단서로 한다.

[0563] 앱타머의 추가의 형태는 소위 스피에겔머, 즉, L-핵산으로 이루어진 표적 분자 결합 핵산이다. 그러한 스피에겔머의 제조에 대한 방법은, 예를 들어, WO 98/08856호에 기재되어 있다.

[0564] 종양 조직의 샘플은 천자(puncture)에 의해서 또는 수술을 통해서 얻어질 수 있다. YB-1이 세포 사이클과는 별도로 핵 내의 편재되는 지의 분석은 흔히 현미경 기술 및/또는 면역 조직분석(immuno histoanalysis)을 이용하여, 바람직하게는 항체 또는 다른 상기 언급된 수단 중 어떠한 수단을 이용하여 수행될 수 있다. 핵 내에서의 YB-1를 분석하기 위한, 특히, YB-1가 세포 사이클과는 별도로 거기에 위치한다는 것을 검출하기 위한 추가의 수단은 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 공지되어 있다. 예를 들어, YB-1의 편재는 염색된 조직 섹션를 스크리닝하는 때에 그들에서 용이하게 검출될 수 있다. 핵에서의 YB-1의 존재의 빈도는 이미 편재가 세포 사이클과는 독립적임을 나타낸다. 핵 내의 YB-1의 세포 사이클 독립적 검출을 위한 추가의 옵션은 YB-1에 대한 염색,

YB-1가 핵에 존재하는 지의 검출 및 세포의 단계의 측정에 있다. 이것 뿐만 아니라 YB-1의 검출은 또한 YB-1에 대한 상기 언급된 수단을 사용하여 수행될 수 있다. 그러한 수단에 의한 검출은 본 기술분야에서의 통상의 기술자에 공지된 방법에 의해서 수행된다. 분석하고자 하는 샘플, 특히, 세포 내의 어떠한 다른 구조가 아니라 YB-1에 특이적으로 결합하는 상기 작용제, 및 이들의 편재에 의해서, 그리고 YB-1에의 이들의 특이적 결합 때문에, 또한, YB-1의 편재가 수단의 적합한 표지화에 의해서 검출되고 확립될 수 있다. 상기 수단의 표지화를 위한 방법은 본 기술분야에서의 통상의 기술자에게는 공지되어 있다.

[0565] 이하에서는, 본 발명이 새로운 특징, 구체예 및 이점이 있을 수 있는 도면 및 샘플을 참조로 하여 추가로 예시될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0566] 도 1의 a는 CDK4/6 억제제 LY(LY-2835219), PD (PD-032991) 또는 LEE (LEE011)와 함께 사용되는 때의 XVir-N-31(XVir), 야생형 아데노바이러스(WT) 및 대조군(Ctrl)에 대한 세포 생존성의 지표로서의 상대적인 흡광도를 나타내는 막대 그래프이다.

도 1의 b는 CDK4/6 억제제 LY(LY-2835219), PD(PD-032991) 또는 LEE(LEE011)와 조합되는 때의 XVir-N-31(XVir) 및 야생형 아데노바이러스(WT)의 바이러스성 역가를 나타내는 막대 그림표이다.

도 1의 c는 CDK4/6 억제제 LY(LY-2835219), PD(PD-032991) 또는 LEE(LEE011)와 조합되는 때의 XVir-N-31(XVir) 및 야생형 아데노바이러스(WT)에 대한 상대적인 섬유 DNA를 나타내는 막대 그림표이다.

도 2는 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)의 결과를 도시하고 있다.

도 3의 a 내지 d는 막대 그림표이다.

도 4의 a 내지 d는 막대 그림표이다.

도 5는 막대 그림표이다.

도 6은 일련의 현미경 사진이다.

도 7은 팔보시클립 처리를 갖는 및 그러한 처리 없는 GFP를 발현하는 E1-삭제된 아데노바이러스로 감염된 T24 세포의 형광 현미경 이미지이다.

도 8은 화합물, Nutlin 3a, Lee, C11040 및 로스코베르틴(Roscovertine)을 사용한 48 시간 후의 아데노바이러스 d1703의 바이러스 DNA 복제를 나타내는 막대 그림표이다.

도 9a 내지 도 9c는 지시된 농도의 Nutlin-3a 및 LEE011(리보시클립)(도 9a), 로스코비틴(Roscovitine)(도 9b) 및 CI-1040(도 9c)으로 처리된 UMUC 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타내고; Rb는 망막모세포종 단백질을 의미하고; phRB는 포스포릴화된 망막모세포종 단백질을 의미하고; E2F1은 전사인자 E2F1를 의미하고; GAPDH는 로딩 대조군(loading control)으로서 작용한다.

도 10은 처리 후 48 시간에 측정된 UMUC3 세포 내의 세포 사이클 분포를 나타내는 막대 그림표이고, 여기에서, CDK4/6 억제제의 농도는 다음과 같다: 로스코베틴(Roscovetine): 10 μM, CI-1040: 1 μM, Nutlin-3a: 10 μM, 및 LEE011: 10 μM.

도 11은 팔보시클립 처리에 의한 및 그러한 처리 없는 아데노바이러스 헥손 유전자 발현을 나타내는 현미경 이미지의 패널이다.

도 12 는 세포 생존 백분율로서, 15 nM PARP 억제제 PARPi, 500 nM PD (팔보시클립) 또는 15 nM PARPi와 500 nM PD의 조합에 의한, XVir-N-31 단독에 노출될 T24 세포의 효능 분석의 결과를 나타내는 막대 그림표이고, 여기에서, 세포는 감염되지 않거나(좌측 컬럼), 10의 MOI(중간 컬럼) 또는 50의 MOI(우측 컬럼)으로 감염된다.

도 13은 XVir-N-31(20 MOI), XVir-N-31 및 15 nM PARPi, XVir-N-31 및 500 nM PD, 및 XVir-N-31, 15 nM PARPi 및 500 nM PD, 1 dpi, 2 dpi, 3 dpi, 4 dpi, 5 dpi 및 6 dpi에 의한 처리 후의 SRB-오염된 T24 세포의 배양을 나타내는 사진의 패널이다.

도 14는 XVir-N-31(10 MOI), XVir-N-31 및 160 nM PARPi, XVir-N-31 및 400 nM PD, 및 XVir-N-31, 160 nM PARPi 및 400 nM PD, 1 dpi, 2 dpi, 3 dpi, 4 dpi, 5 dpi 및 6 dpi에 의한 처리 후의 SRB-오염된 UMUC 세포의 배양을 나타내는 사진의 패널이다.

도 15는 XVir-N-31, CDK 4/6 억제제 팔보시클립 및 브로모도메인 억제제 JQ-1에 의한 감염 5일 후 T24 세포에 대한 효능 분석의 결과를 나타내는 막대 그림표이고; Y-축은 %로의 세포 생존율이다.

도 16은 세포 생존율로서, 200 nM 아베마시클립, 500 nM JQ-1 또는 200 nM 아베마시클립과 500 nM JQ-1의 조합에 의한, XVir-N-31 단독에 대한 5일 노출 후의 SK-N-MC 세포의 효능 분석의 결과를 나타내는 막대 그림표이고, 여기에서, 세포는 5, 10 또는 20의 MOI로 감염되지 않거나 감염된다.

도 17은 처리 24 및 48 시간 후의 지시된 농도의 CDK 4/6 억제제 LY-2835219(아베마시클립) 및 Wee-억제제 MK-1775(아다보세르팁(Adavosertib))로 처리된 SK-N-MC 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타내고; Rb는 망막모세포종 단백질을 의미하고; phRB는 포스포릴화된 망막모세포종 단백질을 의미하고; E2F1은 전사인자 E2F1를 의미하고; GAPDH는 로딩 대조군으로서 작용한다.

도 18은 살아있는 세포의 백분율로서 표현된 XVir-N-31, CDK 4/6 억제제 아베마시클립 및 아다보세르팁(Wee-억제제 MK-1775)에 의한 감염 5일 후의 SK-N-MC 세포에 대한 효능 분석의 결과를 나타낸다.

도 19는 지시된 억제제에 의한 SK-N-MC 세포의 처리 후의 세포 사이클 분포를 나타낸다.

도 20은 다양한 세포주에서의 E2F1 발현에 대한 E2F1 유도된 siRNA의 효과를 나타내는 막대 그림표이고; Y 축은 siCTRL 형질 감염된 세포의 %로서의 액틴에 대해서 표정된 E2F1 발현이다.

도 21은 E2F1 억제가 siRNA-E2F1에 의해서 처리된 T24 세포에서 증가된 E2-초기 발현을 유발시킴을 나타내는 막대 그림표이고; Y 축은 액틴에 대해서 표정된 아데노바이러스성 유전자 발현이다(siCTRL의 %로).

도 22는 아데노바이러스 E2-초기 발현을 측정하기 위한 프라이머의 위치를 나타내는 도식이다.

도 23은 야생형 E2 초기 프로모터 아데노바이러의 뉴클레오티드 서열(위) 및 E2F1-결합 부위에서 돌연변이를 갖는 돌연변이 E2 초기 프로모터(아래)의 표현이다.

도 24는 감염 후 24 시간에서 RT-qPCR에 의해서 AdWT-RGD 및 AdE2Fm(또한, 섬유에서 RGD 모티브(RGD motive)를 함유함) 감염된 T24 세포 내의 RNA 발현을 나타내는 막대 그림표이고; AD-WT 유전자 발현은 100%로 설정되었다.

도 25는 본 발명에서 사용하기에 적합한 다양한 CDK4/6 억제제이다.

도 26은 본 발명에서 사용하기에 적합한 다양한 PARP 억제제를 나타낸다.

도 27a 내지 도 27c는 본 발명에서 사용하기에 적합한 다양한 Bet 억제제를 나타낸다.

도 28은 E1A 유전자의 CR3-도메인의 삭제를 통해서 단지 E1A12 단백질을 발현하는 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스인 WT-Ad5 및 아데노바이러스 dl520의 구조를 나타낸다.

도 29는 E1B19K 단백질의 삭제, E3-부위에서의 2 kb의 삭제, E1A13S 단백질의 삭제, 및 RGD 모티프 섬유 단백질의 도입이 특징인 XVir-N-31의 구조를 나타낸다.

도 30은 Kleijn 등에 의해서 또한 기재(Kleijn et al., PLoS One. 2014; 9(5): e97495)되고, E1A 유전자의 CR2-도메인의 삭제가 특징인 Ad-델타 24 및 Ad-델타 24-RGD의 구조를 나타내고; 그것은 탈조절된 망막모세포종-경로(Rb)에 의해서 종양 세포에서만 복제된다. Ad-델타 24-RGD는 추가로, XVir-N-31에서 나타낸 바와 같이, 섬유 노드에서 RGD 모티브를 함유한다. 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 dl922-947은 델타24와 유사한데, 그 이유는 이러한 바이러스에서의 삭제가 또한 E1A-CR2 도메인에 위치되고 RB-결합(망막모세포종 단백질)에 영향을 주기 때문임을 주지해야 한다.

도 31은 결함 RB 경로에 의해서 종양에서 복재되도록 특별히 조작된 복제-컴피턴트 아데노바이러스(replication-competent adenovirus)이고, 개질된 서유를 통한 향상된 전염성 및 가용성 히알루로니다아제(hyaluronidase)의 발현을 나타내는 VCN-01의 구조를 나타낸다(Pascual-Pasto et al. Sci Transl Med. 2019,11 476). VCN-01 내의 E1A에서의 삭제는 델타24의 삭제(E1A에서의 CR2-도메인의 삭제)와 유사하다. 추가로, 이러한 E1A 단백질의 발현은 E1A 프로모터에서 E2F1 결합 부위를 도입함으로써 조절된다. 또한, 그것은 섬유 노브에서 RGD 모티프를 함유하고, 가용성 히알루로니다제를 발현한다(Martínez-Velez et al. 2016, Clin Cancer Res. 1;22(9):2217-25). The Oncolytic Adenovirus VCN-01 as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma).

도 32는 E1Adl1107 및 E1Adl1101의 구조를 나타내고 여기에서, 이들 두 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스는

p300(p300 HAT로서도 공지된 히스톤 아세틸트랜스퍼레이스 p300 또는 E1A-연관된 단백질 p300) 또는 pRb(망막모세포종 단백질. (Howe et al., MOLECULAR THERAPY 2000, 2, 485-495)에의 결합에 영향을 준다.

도 33은 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 CB016(및 야생형 아데노바이러스 5 (WT-Ad5) 중 하나의 구조를 나타내고, 여기에서, E1A-CR2 도메인에서의 삭제는 Ad-델타 24에서와 유사하다. 또한 CB016은 CR1 도메인에서의 삭제를 함유한다. 또한 그것은 섬유 내의 RGD 모티프 또는 혈청형 3으로부터의 섬유를 함유한다(LaRocca et al., Oral Oncol. 2016, 56, 25-31).

도 34는 E1A CR2-도메인에서의 E1AΔ24 삭제, E3/19K 단백질에서의 효능-향상 T1 돌연변이, 및 감염성-향상 섬유 RGD 변화를 함유하는 아데노바이러스 ORCA-010의 구조를 나타낸다(Dong et al., Hum Gene Ther. 2014 Oct 1; 25(10): 897-904).

도 35는 감염 5일 후(5 days post infection: 5 dpi) UMUC-3 세포에서의 XVir-N-31 단독, 또는 팔보시클립 단독과의 조합, 탈라조파립 단독과의 조합, 또는 팔보시클립과 탈라조파립("조합") 둘 모두와의 조합의 세포 사멸 효과를 측정하기 위해 세포 생존율(%)로 표시한 역가 분석의 결과를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 10, 20 또는 50이었다.

도 36은 감염 4일 후(4 dpi) T24 세포에서의 XVir-N-31 단독, 또는 팔보시클립 단독과의 조합, 탈라조파립 단독과의 조합, 또는 팔보시클립과 탈라조파립("조합") 둘 모두와의 조합의 세포 사멸 효과를 측정하기 위해 세포 생존율(%)로 표시한 역가 분석의 결과를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 10, 50 또는 100이었다.

도 37은 감염 5일 후(5 dpi) 253J 세포에서의 XVir-N-31 단독, 또는 팔보시클립 단독과의 조합, 탈라조파립 단독과의 조합, 또는 팔보시클립과 탈라조파립("조합") 둘 모두와의 조합의 세포 사멸 효과를 측정하기 위해 세포 생존율(%)로 표시한 역가 분석의 결과를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 10, 20 또는 50이었다.

도 38은 탈라조파립 단독, 팔보시클립 단독 또는 탈라조파립과 팔보시클립 둘 모두("조합")에 의한 감염 48 시간 후 T24 세포(좌측) 및 UMUC-3 세포(우측)의 세포 주기 G0/G1, S 및 G2에서의 세포의 %로 나타내는 막대 도표이다.

도 39는 5, 10 및 20 MOI에서의 XVir-N-31, 200 nM에서의 CDK 4/6 억제제 CDK 4/6 억제제 아베마시클립 및 200 nM에서의 브로모도메인 억제제 JQ-1에 의한 감염 4일 후 A673 세포에 대한 역가 분석에서의 생존 세포의 백분율을 나타내는 막도 도표이다.

도 40은 감염 4일 후 XVir-N-31(1, 5 및 10 MOI), 100 nM 팔보시클립 단독, 100 nM JQ-1 단독 또는 조합(팔보시클립과 JQ-1 둘 모두)에 의한 처리 후의 SRB-염색된 Cal-33의 배양물을 나타내는 사진들의 패널이다.

도 41은 100 nM 팔보시클립, 100 nm JQ-1 또는 팔보시클립과 JQ-1 둘 모두의 조합을 사용한 5 MOI의 XVir-N-31에서의 Cal-33 세포의 감염 4일 후 %로의 세포 생존율로서 표현된 도 40에 도시된 바와 같은 역가 시험의 결과를 나타내는 막대 도표이다.

도 42(도 42a, 도 42b)는 감염 24시간 후 (도 42a) 및 감염 48시간 후(도 42b) Cal-33에서의 "상대적인 섬유(relative fibre)"로서 표현된 XVir-N-31 복제를 나타내는 막대 도표이다. MOI는 10이었고, 팔보시클립 농도는 100 nM이었고, JQ-1 농도는 동일하게 100 nM이었다.

도 43a 내지 도 43d는 누틀린 및 이의 유도체, 즉, NVP-HDM201, 이다사누틀린, AM-8553, SAR405838, 누틀린-3a, AMG232를 도시하고 있다.

도 44는 XVir-N-31 단독, XVir-N-1과 30μM 누틀린-3a, XVir-N-31과 500 nM 팔보시클립, 및 XVir-N-31과 누틀린-3a 및 팔보시클립 둘 모두에 의한 처리 후 SRB-염색된 T24 세포의 배양물을 나타내는 사진의 패널이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 0, 1, 5, 10, 20 또는 30이다.

도 45는 %로의 대조군에 비한 생존 세포로 표현된 도 44에 도시된 바와 같은 역가 시험의 결과를 나타내는 막대 도표이다.

도 46은 XVir-N-31 단독, XVir-N-1과 30μM 누틀린-3a, XVir-N-31과 500 nM 팔보시클립, 및 XVir-N-31과 누틀린-3a 및 팔보시클립 둘 모두에 의한 SRB-염색된 T24shRb 세포의 배양물을 나타내는 사진의 패널이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 0, 1, 5, 10, 20 또는 30이다.

도 47은 %로의 대조군에 비한 생존 세포로 표현된 도 46에 도시된 바와 같은 역가 시험의 결과를 나타내는 막대 도표이다.

도 48은 XVir-N-31 단독, XVir-N-1과 10μM 이사다누틀린(Isadanutlin), XVir-N-31과 500 nM 팔보시클립, 및 XVir-N-31과 이사다누틀린 및 팔보시클립 둘 모두에 의한 SRB-염색된 T24 세포의 배양물을 나타내는 사진의 패널이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 0, 5, 10, 20, 40 및 60이다.

도 49은 %로의 대조군에 비한 생존 세포로 표현된 도 48에 도시된 바와 같은 역가 시험의 결과를 나타내는 막대 도표이다.

도 50은 XVir-N-31 단독, XVir-N-1과 10μM 이다사누틀린, XVir-N-31과 500 nM 팔보시클립, 및 XVir-N-31과 이다사누틀린 및 팔보시클립 둘 모두에 의한 SRB-염색된 T24shRb 세포의 배양물을 나타내는 사진의 패널이고, 여기에서, XVir-N-31의 MOI는 0, 5, 10, 20, 40 및 60이다.

도 51은 %로의 대조군에 비한 생존 세포로 표현된 도 50에 도시된 바와 같은 역가 시험의 결과를 나타내는 막대 도표이다.

도 52는 각각 감염 24 시간 및 48 시간 후 T24shRb 세포(좌측) 및 T24 세포(우측)에서의 상대적인 섬유로서 표현된 XVir-N-31 복제를 나타내는 막대 도표이다. MOI는 20이었고, 팔보시클립 농도는 500 nM이었고, 누틀린-3a 농도는 30 μM이었다.

도 53은 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다.

도 54는 팔보시클립, 누틀린-3a 또는 이들 둘 모두에 대한 T24shRB 세포의 노출시의 E2F1 단백질의 상대적인 양을 나타내는 막대 도표이다.

도 55a 내지 도 55d는 지시된 농도에서의 팔보시클립, 누틀린-3a 또는 이들 둘 모두의 조합에 대한 세포 노출시의 T24 세포(도 5a), T24shRb 세포(도 5b), UMUC-3 세포(도 5c) 및 RT112 세포(도 5d)의 세포 주기 G0/G1, S 및 G2에서의 세포의 %를 나타내는 막대 도표이다.

도 56a 내지 도 56d는 지시된 농도에서의 팔보시클립, 누틀린-3a 또는 이들 둘 모두의 조합에 대한 세포 노출시의 T24 세포(도 6a), T24shRb 세포(도 6b), UMUC-3 세포(도 6c) 및 RT112 세포(도 6d)의 세포 주기 G1에서의 세포의 %를 나타내는 막대 도표이다.

도 57은 100nM 리보시클립(LEE011으로도 일컬어지는 LEE), 100 nM JQ1, 및 100nM 리보시클립(LEE)과 100 nM JQ1 둘 모두에 의한 XVir-N-31 감염 후 U87 세포의 상대적인 생존율을 나타내는 막대 도표이고, XVir-N-31에 대한 MOI는 5이다.

도 58은 100nM 리보시클립(LEE011으로도 일컬어지는 LEE), 200 nM JQ1, 및 100nM 리보시클립(LEE)과 200 nM JQ1 둘 모두에 의한 XVir-N-31 감염 후 LN229 세포의 상대적인 생존율을 나타내는 막대 도표이고, XVir-N-31에 대한 MOI는 20이다.

도 59는 1 μM 리보시클립(LEE011으로도 일컬어지는 LEE), 200 nM JQ1, 및 100nM 리보시클립(LEE)과 200 nM JQ1 둘 모두에 의한 XVir-N-31 감염 후 T98G 세포의 상대적인 생존율을 나타내는 막대 도표이고, XVir-N-31에 대한 MOI는 50이다.

도 60은 XVir-N-31에 의한 감염 24 시간 후(h.p.i.) 리보시클립(LEE) (500 nM), JQ1(50 nM), 또는 리보시클립(500 nM)과 JQ1 24(50 nM)의 조합에 노출되는 때에 U87 세포에서의 아데노바이러스 XVir-N-31 섬유 DNA의 상대적인 양을 나타내는 막대 도표이다.

도 61은 XVir-N-31에 의한 감염 48 시간 후(h.p.i.) 리보시클립(LEE)(500 nM), JQ1(100 nM), 또는 리보시클립(500 nM)과 JQ1(100 nM)의 조합에 노출되는 때에 LN229 세포에서의 아데노바이러스 XVir-N-31 섬유 DNA의 상대적인 양을 나타내는 막대 도표이다.

도 62은 XVir-N-31에 의한 감염 48 시간 후(h.p.i.) 리보시클립(LEE)(1 μM), JQ1 (100 nM), 또는 리보시클립(1 μM)과 JQ1(100 nM)의 조합에 노출되는 때에 T98G 세포에서의 아데노바이러스 XVir-N-31 섬유 DNA의 상대적인 양을 나타내는 막대 도표이다.

도 63은 500 nM LEE, 200 nM JQ-1, 또는 500 nM LEE와 200 nm JQ-1 둘 모두의 조합에 대한 노출 시의 XVir-N-31(MOI 20)에 의한 감염 24시간 후 LN229 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다.

도 64는 500 nM LEE, 200 nM JQ-1, 또는 500 nM LEE와 200 nm JQ-1 둘 모두의 조합에 대한 노출 시의 XVir-N-31(MOI 20)에 의한 감염 48시간 후 LN229 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다.

도 65는 500 nM LEE, 200 nM JQ-1, 또는 500 nM LEE와 200 nm JQ-1 둘 모두의 조합에 대한 노출 시의 XVir-N-31(MOI 20)에 의한 감염 72시간 후 LN229 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다.

도 66는 500 nM LEE, 200 nM JQ-1, 또는 500 nM LEE와 200 nm JQ-1 둘 모두의 조합에 대한 노출 시의 XVir-N-31(MOI 20)에 의한 감염 72시간 후 LN229 세포의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타낸다.

도 67은 E1A의 상호작용 파트너 및 보존된 영역 CR1-CR4의 위치의 예시이다.

도 68은 JQ-1 처리(200 nm) 시의 아데노바이러스 AdWT, dl1119, Ad 델타 24, XVir-N-31 및 AdWT/E2Fm(MOI 20)의 감염 24 시간 후(post infection: PI) LN229 세포에서의 아데노바이러스 DNA의 상대적인 증가를 나타내는 막대 도표이다.

도 69는 JQ-1 처리(200 nm) 시의 아데노바이러스 AdWT, dl1119, Ad 델타 24, XVir-N-31 및 AdWT/E2Fm(MOI 20)의 감염 48 시간 후(PI) LN229 세포에서의 아데노바이러스 DNA의 상대적인 증가를 나타내는 막대 도표이다.

도 70은 100 nM JQ-1(좌측) 또는 500 nM JQ-1(우측)에 의한 프라이밍 또는 동시 처리 후의 XVir-N-31에 의한 감염 24 시간 후 4 시간에서의 섬유로 정규화된 XVir-N-31 세포(섬유/액틴으로 표현됨)에서의 정량된 섬유 DNA를 나타내는 다이어그램이다.

도 71은 500 nM JQ-1와 함께 또는 그것 없이 감염 39, 49, 62 또는 72 시간 후 UMUC-3 세포에서의 XVir-N-31(PFU/ml로 표현됨)의 입자 형성을 나타내는 다이어그램이다.

도 72는 500 nM JQ-1 없이(윗 줄) 및 그 것과 함께(아랫 줄) 시험 39, 49, 62 또는 72 시간 후 헥손 역가 시험 후의 XVir-N-31 감염된 세포(10의 MOI)의 명시야 현미경 사진(bright-field photomicrograph)의 패널이다.

도 73은 정량화된 바이러스 발현 역학(quantified viral expression kinetics)을 예시하는 감염 12 시간 후, 감염 24 시간 후, 감염 36 시간 후 및 감염 48 시간 후 500 nM JQ-1과 함께 또는 그것 없이 XVir-N-31에 의한 처리 시의 UMUC-3 세포의 웨스턴 블롯 분석이다.

도 74는 100 nM JQ-1, 300 nM JQ-1, 500 nM 팔보시클립, 100 nM JQ-1과 500 nM 팔보시클립의 조합, 및 300 nM JQ-1과 500 nM 팔보시클립의 조합의 영향 하의 G0/G1 기, S 기 및 G2 기에서의 UMUC-3 세포(좌측) 및 RT112 세포(우측)의 백분율을 나타내는 막대 도표이다.

도 75는 처리 24 시간 후 0, 0.2 μM, 및 0.5μM에서의 JQ-1 및/또는 팔보시클립에 대한 노출 시의 UMUC-3 세포(좌측) 및 RT-112 세포(우측)의 웨스턴 블롯 분석의 결과는 나타낸다.

도 76은 각각 감염 5일 후 200 nM JQ-1, 100 nM 팔보시클립, 및 200 nM JQ-1과 100 nM 팔보시클립의 조합에 의한 처리 시의 UMUC-3 세포의 치사에 대한 XVir-N31(5의 MOI)의 효과를 나타내는 막대 도표이다.

도 77은 각각 감염 5일 후 200 nM JQ-1, 300 nM 팔보시클립, 및 200 nM JQ-1과 300 nM 팔보시클립의 조합에 의한 처리 시의 RT112 세포의 치사에 대한 XVir-N31(40의 MOI)의 효과를 나타내는 막대 도표이다.

도 78은 각각 감염 5일 후 100 nM JQ-1, 200 nM 팔보시클립, 및 100 nM JQ-1과 200 nM 팔보시클립의 조합에 의한 처리 시의 T24 세포의 치사에 대한 XVir-N31(40의 MOI)의 효과를 나타내는 막대 도표이다.

도 79는 JQ-1(300 nM), 팔보시클립(100 nM), 또는 JQ-1(300 nM)과 팔보시클립(100 nM) 둘 모두의 조합에 의한 프라이밍 또는 동시 처리 후의 XVir-N-31(10의 MOI)에 의한 감염 24 시간 후 UMUC-3 세포에서의 XVir-N-31의 복제를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 복제는 상대적인 섬유 DNA 수준으로 정량화된다.

도 80은 JQ-1(100 nM), 팔보시클립(200 nM), 또는 JQ-1(100 nM)과 팔보시클립(200 nM) 둘 모두의 조합에 의한 프라이밍 또는 동시 처리 후의 XVir-N-31(50의 MOI)에 의한 감염 24 시간 후 T24 세포에서의 XVir-N-31의 복제를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 복제는 상대적인 섬유 DNA 수준으로 정량화된다.

도 81는 JQ-1(200 nM), 팔보시클립(300 nM), 또는 JQ-1(200 nM)과 팔보시클립(300 nM) 둘 모두의 조합에 의한 프라이밍 또는 동시 처리 후의 XVir-N-31(20의 MOI)에 의한 감염 24 시간 후 RT112 세포에서의 XVir-N-31의 복제를 나타내는 막대 도표이고, 여기에서, XVir-N-31의 복제는 상대적인 섬유 DNA 수준으로 정량화된다.

도 82는 200 nM JQ-1, 500 nM 팔보시클립, 또는 200 nM JQ-1과 500 nM 팔보시클립 둘 모두의 조합과 함께

XVir-N-31(9의 MOI)로 감염된 UMUC-3 세포를 생성시키는 바이러스의 정량적 평균 생성율을 예시하는 막대 도표이고, 여기에서, 평균 생성율의 정량화는 시야(field of view: f.o.v) 당 염색된 세포로서 나타내어 진다.

도 83은 헥손 역가 시험(hexon titer test) 후의 XVir-N-31 감염된 UMUC-3 세포(9의 MOI)의 명시야 현미경 사진의 패널이고, 여기에서, 세포는 XVir-N-31 단독, XVir-N-31과 200 nM JQ-1의 조합, XVir-N-31과 500 nM 팔보시클립의 조합, 또는 XVir-N-31, 200 nM의 JQ-1 및 500 nM의 팔보시클립의 조합에 의해서 감염된다.

도 84는 표시된 BET 억제제 OTX(300 nM), AZD(5 nM), dBet6(50 nM) 및 ARV(50 nM)와 조합으로 XVir-N-31(0, 5 및 10의 MOI에서)에 의한 감염 후 UMUC-3 세포의 상대적인 생존율을 나타내는 막대 도표이다.

도 85는 표시된 BET 억제제 OTX(130 nM), AZD(10 nM), dBet6(150 nM) 및 ARV(10 nM)와 조합으로 XVir-N-31(0, 20 및 50의 MOI에서)에 의한 감염 후 RT112 세포의 상대적인 생존율을 나타내는 막대 도표이다.

도 86은 표시된 BET 억제제(OTX: 50 nM; AZD: 50 nM, dBet: 50 nM, 및 ARV: 50 nM)와 조합으로 XVir-N-31(10의 MOI)에 의한 감염 24 시간 후 UMUC-3 세포에서의 바이러스 복제를 나타내는 막대 도표이다.

도 87은 표시된 BET 억제제(OTX: 40 nM; AZD: 15 nM, dBet: 25 nM, 및 ARV: 15 nM)와 조합으로 XVir-N-31(50의 MOI)에 의한 감염 24 시간 후 RT112 세포에서의 바이러스 복제를 나타내는 막대 도표이다.

도 88은 XVir-N-31과 리보시클립의 투여 및 계획된 적용을 나타내는 동물 연구의 예시이다. 리보시클립 석시네이트(LEE011)는 전체 5일 동안(X+4까지의 X 일) 경구 섭식에 의한 200 mg/kg/체중으로 매일 투여되었다. LEE011 없는 용해제(dissolvent)는 PBS 및 XVir-N-31 단지 동물에 적용되었다. XVir-N-31은 X+1 및 X+3 일에 종양에 두 번 주입되었다. XVir-N-31이 투여되지 않은 모든 대조군 동물에게 각각 PBS를 i.t. 투여하였다.

도 89는 다양한 처리 군(PBS, LEE, 단지 XVir 및 조합)의 부피 성장 곡선을 나타내는 다이어그램이고; 각각의 데이터 점은 처리 개시 후의 나타낸 일자에서의 평균 ± 종양 크기를 나타낸다.

도 90은 처리 개시 후 12 내지 21일에서의 다양한 처리 군(PBS 동물의 수 = 5), LEE(PBS 동물의 수 = 6), 단지 XVir(PBS 동물의 수 = 7) 및 조합(PBS 동물의 수 = 7))에 대한 종양 부피[mm^3]를 나타내는 박스 플롯 다이어그램(box plot diagram)이다.

도 91은 단지 XVir-N-31 처리와 비교한 조합 처리를 받은 대표적인 동물의 종양(섬유/1000 액틴으로서 표현됨)에서의 바이러스 게놈을 나타내는 막대 도표이며; XVir-N31의 제2 i.t. 주입 2일 후 평가.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0567] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0568] **세포 배양**

[0569] 인간 방광암 세포주를, 10% FBS(Biochrom AG) 및 1% NEA(Biochrom AG)로 각각 보충된, 5% 또는 10% CO_2의 RPMI 또는 DMEM 배지(Biochrom AG)에서 서브컨플루언트(subconfluent) 조건 하에 배양하였다. 세포주 및 실험 조건에 따라서, 0.2-1x106, 0.5-1x105, 0.25-0.5x105, 및 500-700 세포를 각각 10 cm, 6-웰, 12-웰 및 96-웰 포맷(format)에 시딩하였다.

[0570] **세포주**

[0571] **HeLaP**

[0572] HeLa P 세포(ATCC CCL-2)는 환자 헨리에타 랙스(Henrietta Lacks) 후에 명명된 경부 선암종으로부터 상피 세포이다. 이러한 세포주는 가장 광범위하게 분포되고 가장 오래된 세포주(Rahbari et al., 2009)인데, 그 이유는 그것이 1951년에 확립된(Gey et al., 1952) 첫 번째 영구 세포주이었기 때문이다. 배양은 37℃의 10% CO2 조건 하에 DMEM(10% FBS, 1% PS)에서 수행된다.

[0573] **HeLaRDB**

[0574] HeLaRDB은 당단백질 P의 과발현을 기반으로 하는 다우노블라스틴에 대한 내성을 갖는 HeLaP-세포주의 서브-세포주이다. 내성은 이러한 안트라사이클린을 함유하는 배지로 배양을 통해서 달성되었다. 이러한 세포 증식 억제제는 이중-가닥 DNA 서열에 삽입되며, 세포성 전사 및 복제를 억제한다(Mizuno et al., 1975). 다우노블라스틴 처리에 의해서 유발된 스트레스 반응의 결과로서, 세포성 인자 YB-1은 모 세포주에 비해서 더 높은 핵 편재화를

나타낸다(Holm et al., 2004). 다우노블라스틴에 대한 내성을 유지시키기 위해서, 세포를 14일 마다 37℃의 10% CO2 조건 하에 0.25 μg/ml 다우노블라스틴를 함유하는 DMEM(10% FBS, 1% PS)에서 배양하였다.

[0575] **A549**

[0576] A549 세포(ATCC CCL-185)는 인간 폐포 기저내의 선암종으로부터 1972년에 분리되었다(Giard et al., 1973). 배양은 둘베코의 MEM (10% FBS and 1% PS) at 37 ℃ 및 10% CO2에서의 둘베코의 MEM(10% FBS 및 1% PS) 중에서 수행되었다.

[0577] **T24**

[0578] T24 세포(ATCC HTB-4)는 일차 인간 방광 암종으로부터 1970년에 유도되었다(Bubenik, Baresova et al., 1973). HRAS 유전자에서의 점 돌연변이로 인해서(Reddy et al., 1982), MAPK 및 PI3K 경로가 활성화된다. 더욱이, 종양 억제제 유전자 p53의 유전자좌에서의 추가의 돌연변이가 이러한 세포주에 존재한다(Pinto-Leite et al., 2014). 세포는 5% CO2 조건 하에 37℃의 10% FCS, 1% PS 및 1% 비-필수 아미노산을 함유하는 RPMI와 함께 배양되었다.

[0579] **HEK293**

[0580] HEK293 세포(ATCC CRL-1573)는 1973에 분리된 인간 배아 신장 세포이다. E1 부위를 포함하는 아데노바이러스성 혈청형 5의 게놈의 4.5 kb-크기 부분의 안정한 형질감염으로 인해서(Graham and Smiley, 1977), 이러한 세포주는 E1-결핍 아데노바이러스의 생산 및 바이러스 역가의 측정을 위해서 사용된다.

[0581] 표 1: 프라이머

[0582] 명칭 정방향 프라이머 역방향 프라이머

[0583] 회사

[0584] 섬유

[0585] 유로핀(Eurofin) AAGCTAGCCCTGCAAACATCA CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA(SEQ ID NO: 1)

[0586] E2 초기

[0587] Invitrogen

[0588] CCGTCATCTCTACAGCCCAT GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC(SEQ ID NO: 2)

[0589] E2 후기

[0590] Invitrogen CTTCCTAGCGACTTTGTGCC GTCAGAGTGGTAGGCAAGGT(SEQ ID NO: 3)

[0591] E1A 12S

[0592] Metabion CGACGAGGATGAAGTCCTGTGTCTG CTCAGGATAGCAGGCGCCAT(SEQ ID NO: 4)

[0593] E1A 12S 쇼트(short)

[0594] Metabion GAGGATGAAGTCCTGTGT CTCAGGATAGCAGGCGCCAT(SEQ ID NO: 5)

[0595] E1A 13S

[0596] Metabion TGTTTGTCTACAGTCCTGTGTCTG CTCAGGATAGCAGGCGCCAT(SEQ ID NO: 6)

[0597] E1A 13S 쇼트

[0598] Metabion TTGTCTACAGTCCTGTGT CTCAGGATAGCAGGCGCCAT(SEQ ID NO: 7)

[0599] E4orf6 Metabion TCCCTCCCAACA CACAGAGT GACAGGAAACCG TGTGGAAT(SEQ ID NO: 8)

[0600] Rb

[0601] Life Techno. AGCAACCCTCCTAAACCACT TGTTTGAGGTATCCATGCTATCA(SEQ ID NO: 9)

[0602] E2F1

[0603] Life Technology ACGCTATGAGACCTCACTGAA TCCTGGGTCAACCCCTCAAG(SEQ ID NO: 10)

[0604] E2F2

[0605] Life Technology CGTCCCTGAGTTCCCAACC GCGAAGTGTCATACCGAGTCTT(SEQ ID NO: 11)

[0606] GAPDH

[0607] MWG TGGCATGGACTGTGGTCATGAG ACTGGCGTCTTCACCACCATGG(SEQ ID NO: 12)

[0608] 액틴

[0609] Eurofins TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGA AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG(SEQ ID NO: 13)

[0610] L4 33K

[0611] Eurofins GAACCAGGGCCGCCCATACTG GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC(SEQ ID NO: 14)

[0612] L4 22 K

[0613] Eurofins CCGTTAGCCCAAGAGCAAC CGGCCGTGATGGTAGAGAAG(SEQ ID NO: 15)

[0614] L4HexAss

[0615] Eurofins CTGTGGTACTTCCCAGAGAC CAGGTGAGTTATACCCTGCC(SEQ ID NO: 16)

[0616] **바이러스 특성**

[0617] Ad-WT+AdWT-RGD 야생형 마스트아데노바이러스, 타입 C, 혈청형 5 및 추가의 RGD-섬유 모티프를 갖는 ADWT

[0618] AdWT-E2F1mut. 마스트아데노바이러스, 타입 C, 혈청형 5, 추가의 RGD-섬유 모티프와 함께 E2-초기 프로모터의 E2F1 결합 부위의 둘 모두에서의 돌연변이 및 E3 부위(ΔE3)에서의 2,7 kb-크기 삭제

[0619] XVir-N-31 마스트아데노바이러스, 타입 C, E1B-부위(1.716-1915, 200 bp), E3-부위(28.132-30.813)에서의 삭제 및 E1A-부위에서의 12 염기 삭제를 갖는 혈청형 5. 단지 핵 YB-1 발현을 디스플레이하는 암 세포에서의 복사체.

[0620] XVir-N-31/E2F1M 마스트아데노바이러스, 타입 C, E1B-부위(1.716-1915, 200 bp), E3-부위(28.132-30.813)에서의 삭제 및 E1A-부위에서의 12 염기 삭제를 갖는 혈청형 5. 단지 핵 YB-1 발현을 디스플레이하는 암 세포에서의 복사체. 추가의 RGD-섬유 모티프와 함께 E2-초기 프로모터의 E2F1 결합 부위 둘 모두에서의 돌연변이 및 E3 부위(ΔE3)에서의 2,7 kb-크기 삭제.

[0621] 표적 유전자 siRNA 구조물 제조자

[0622] 대조군 대조군(비-sil.) siRNA, 20 μM Qiagen, the Netherlands

[0623] E2F1 E2F1(SASI_Hs01_00162220), 10 μM Sigma, Merck, Germany

[0624] YB-1 YBX1 siRNA FlexiTube, 10μM Qiagen, the Netherlands

[0625] **방법**

[0626] **siRNA 형질감염**

[0627] 특정 유전자의 하향 조절은 siRNA 형질감염을 이용하여 수행되었다. 그에 의해서, 5 μl 리포펙타민 RNAiMAX(Thermo Fischer) 시약을 한 튜브에서 150 μl의 Opti-MEM에 첨가하였고, 36 pmol의 siRNA를 또 다른 튜브에서 150 μl의 Opti-MEM와 조합하였다. 양 튜브의 내용물을 조합하고 간단히 와동(vortexing)시킨 후에, 용액을 실온에서 5 분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 250 μl의 siRNA-지질 복합체를 250.000 - 1.000.000 세포에 첨가하고, 배지를 변경하지 않고 전날에 6-웰 플레이트에 시딩하여 웰 당 30 pmol의 siRNA의 최종 농도에 도달하게 하였다. 10% CO2 조건에서 그리고 37℃에서 48 시간 동안 인큐베이션한 후에, 감염 또는 용해를 수행하였다.

[0628] **siRNA에 의한 RNA-정량화**

[0629] RNA를 세포에서 또한 정량화하였고, 바이러스를 siRNA 형질감염과 조합하였다. 그리하여, 125.000 세포를 시딩하였고, 다음날에 30 pmol의 Ctrl-, YB-1-, 및 E2F1-siRNA의 siRNA-구성물로 형질감염시켰다. 48 시간 동안의

인큐베이션 후에, 감염을 수행하였고, 용해를 감염 24 시간 후에 수행하였다. 용해물을 -20℃에서 저장하였다.

[0630] **RNA 분리**

[0631] 세포를 PBS으로 세정하고, 용해 완충액(mirVana miRNA 분리 키트, Life Technologies)으로 용해시키고, 1.5 ml 반응 튜브 내로 옮겼다. 50 μl의 균질액 첨가제(mirVana miRNA 분리 키트, Life Technologies)를 용해물에 첨가하고, 재현탁시키고, 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 500 μl의 산-페놀-클로로포름을 첨가하고, 개략 30초 동안 와동시키고, 얼음 상에서 2분 동안 인큐베이션시켰다. 14.000 g에서 실온에서 5분 동안 원심분리 후에, 수성 및 유기 상을 분리하였다. 상부 수성 상을 새로운 스냅 캡(snap cap)에 옮기고, 조합하고, 동일한 양의 이소프로판올로 뒤집었다. 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후에, 샘플을 4℃ 및 14.000 g에서 30분 동안 원심분리하였다. 후속하여, 상청액을 제거하고, RNA 펠릿을 1 ml 75% 에탄올로 세척하였다. 샘플을 4℃에서 5분 동안 7500 g에서 간단히 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후에, 공기 건조된 펠릿을 20 μl 뉴클레아제-비함유 물에 용해시키고, 써모믹서(thermomixer)내에서 55℃ 및 500 rpm에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 후속하여, RNA 농도를 분광광도 측정을 통해서 측정하였다. DNA의 러트(rut)의 증폭을 피하기 위해서, DNAse 분해를 수행하였다. 그리하여, life technologies로부터의 Invitrogen에 의한 데옥시리보뉴클레아제 I, Amplification Grade-Kit를 사용하였다. 1 μg RNA에, 1 μl 10x DNAse I 반응 완충액 및 1 μl DNAse I을 첨가하고, DEPC-처리된 물로 10 μl의 최종 부피로 충전시키고, 실온에서 정확하게 15분 동안 인큐베이션시켰다. 1 μl의 25 mM EDTA 용액을 첨가함으로써, DNase I이 불활성화되며, 그리하여 DNAse 분해의 과정이 정지되었다. 샘플을 65℃에서 10분 동안 인큐베이션시키고, 이어서, 역전사를 위해서 사용하였다.

[0632] **역전사**

[0633] RNA를 cDNA로 다시 작성하기 위해서, 고용량 cDNA 역전사 키트(Thermo Scientific)를 사용하였다. DNA 분해된 샘플의 2 μg RNA를 연질 튜브 중의 전사 완충액, 100 mM dNTPs 및 RNAse 억제제를 함유하는 마스터믹스(Mastermix)에 첨가하였다. 그리하여, E2-초기 및 E2-후기 프로모터를 통해서 전사된 RNA가 역전사에 일반적으로 사용되는 랜덤 프라이머에 의해서 재작성될 수 없는 것으로 여겨져야 하는데, 그 이유는 이들 랜덤 프라이머가 이중-가닥 아데노바이러스성 게놈의 가닥 둘 모두에 결합할 것이기 때문이다. 이를 위해서, E2-초기 및 E2-후기 정량화에 사용된 샘플에 대한 RNA로부터 cDNA로의 재작성을 특이적 E2-초기 역 프라이머(표 1)를 사용하여 수행하였다. 결과를 표정하기 위해서 사용되었던 하우스키핑 유전자 액틴(housekeeping gene actin)의 경우에, 랜덤 프라이머를 사용하였다.

[0634] **DNA-복제 분석**

[0635] 감염된 세포 내의 바이러스 복제를 조사하기 위해서, DNA-복제 분석을 수행하였다. 125.000 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하였고, 10-20 MOI로 감염시켰다. 감염 후 2, 8, 12, 24, 36 및 48 시간 후에, 용해를 수행하였다. 그리하여, 배지를 제거하고, 부착 세포를 1 ml PBS로 세척하였다. 200 μl DNA-용해 완충액을 첨가한 후에, 부착 세포를 세포 스크레퍼(cell scraper)를 사용하여 플레이트로부터 탈착시켰다. 이어서, 용해물을 스냅 캡 내로 옮겼다. 3 μl의 효소 프로테이나제 K를 첨가하고, 써모믹서에서 56℃ 및 550 rpm에서 밤새 인큐베이션시켰다. 다음날에, DNA 분리를 수행하였다.

[0636] **DNA 분리**

[0637] DNA의 정제를 위해서, 200 μl 페놀-클로로포름-이소아밀알코올을 용해물을 첨가하였다. 와동(vortexing) 및 얼음 상에서의 5분 동안의 후속 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g에서 3분 동안 원심분리에 의해서 상 분리를 달성하였다. 상부 수성 상을 상의 더 우수한 가시화를 위한 10 mM TrisCl 중의 200 μl 클로로포름 및 20 μl 크레졸 레드(cresol red)를 함유하는 새로운 스냅 캡에 옮겼다. 와동 및 얼음 상에서의 5분 동안의 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g에서 3분 동안 원심분리를 수행하였다. 다시, 상부 수성 상을 800 μl 에탄올 및 50 μl 3M 소듐 아세테이트 용액과 조합하였다. 2 μl 글리코겐을 첨가하여 더 우수한 침전을 달성시켰다. 튜브의 짧은 역전 후에, 용액을 4℃에서 16430 g에서 30분 동안 원심분리하였다. 후속하여, DNA 펠릿을 400 μl 70% 에탄올에 의해서 덮고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실온 및 4760 g에서의 7분 동안의 원심분리 후에, DNA 펠릿을 37℃에서 약 5 내지 10분 동안 건조시켰다. 후속하여, 펠릿을 100 μl 0,1xTE-완충액에 용해시키고, 대략 3시간 동안 40℃ 및 400 rpm에서 진탕시켰다. DNA가 완전히 용해되었을 때에, DNA 농도를 측정을 위한 2 μl의 DNA 용액 및 블랭크 용액으로서의 0,1xTE-완충액을 사용하여 분광광도계에 의해서 측정하였다. 이어서, DNA를 4℃에서 저장하였다.

[0638] **qPCR**

[0639] 추가의 정량화를 위해서, 실시간 정량적 PCR을 사용하였다. 5 μl의 주형 DNA 각각 cDNA를 10 ng/μl의 최종 농도로 사용하였다. 이중으로 피펫 채취한 96-웰 플레이트 내의 10 μl 마스터믹스 GoTaq qPCR (Promega Corporation)(7,5 μl 마스터믹스, 1,5 μl 프라이머, 1 μl H2O) 및 5 μl DNA 주형을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 상대적인 정량화를 두 표준화 유전자와 함께 비교 CT 방법을 사용하여 수행하였다. 플레이트를 호일을 통해서 밀봉하고 실온에서 2분 동안 220 g에서 원심분리하였다. 이어서, 플레이트를 열 사이클러(thermal cycler)에서 특정의 온도-시간-프로그램에 따라서 인큐베이션하였다. 사용된 프라이머는 표 1에 열거되어 있다. 반응을 CFX96 실시간 PCR 분석 시스템(Bio-Rad Laboratories) 상에서 수행하였다.

[0640] **qPCR 사이클링 조건**

[0641] 섬유: 2분 동안 94℃, 15초 동안 94℃, 15초 동안 60℃ 및 15초 동안 72 ℃, 45 사이클에 대해서

[0642] 다른 바이러스성 유전자: 1,5 분 동안 94℃, 15초 동안 94℃, 15초 동안 58 ℃ 및 15초 동안 72℃, 45 사이클에 대해서

[0643] Rb: 2분 동안 94℃, 15초 동안 94℃, 30초 동안 60℃ 및 1분 동안 72℃, 44 사이클에 대해서

[0644] E2F1s: 2분 동안 95℃, 15초 동안 95℃, 30초 동안 60℃ 및 30초 동안 72℃, 40 사이클에 대해서

[0645] **단백질 분리**

[0646] 세포를 1% SDS 완충액을 사용하여 용해시켜서, 핵막의 파괴를 달성하였다. 단백질의 변성을 피하기 위해서, 전체 과정을 얼음 상에서 수행하였다. 배지를 흡인시킨 후에, 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 이중 접근법의 한 웰의 부착 세포를 200 μl의 1% SDS 완충액으로 용해시키고, 세포 스크레퍼에 의해서 스크레핑(scraping)하였다. 이어서, 용해물을 이중 접근법의 다른 웰에 옮기고, 다시 스크레핑하였다. 두 웰의 용해물을 합하고, 이어서, 스냅 캡 튜브에 옮겼다. 후속하여, 용해물을 주사기로 처리하여 점성 DNA를 파괴시키고, 30분 동안 4℃에서 31000 rpm으로 원심분리하였다. 단백질은 상청액에 존재하기 때문에, 상청액을 새로운 스냅 캡 튜브에 옮기고, 추가의 단계를 위해서 사용하였다.

[0647] **단백질 정량화**

[0648] 단백질의 양을 정량화하기 위해서, 피어스 TM BCA 단백질 키트(Pierce TM BCA Protein Kit)에 의한 비시초닌산(bicinchoninic acid: BCA) 분석을 수행하였다. 그리하여, 112,5 μl의 BCA 용액 A+B(50:1) 및 12,5 μl의 샘플을 96-웰 플레이트의 한 웰에 첨가하고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 단백질 농도에 따라서, 용액의 염색이 생성되었다. 공지된 단백질 농도의 표준 시리즈에 의해서, 샘플의 단백질 농도를 마이크로플레이트 판독기에서 562 nm에서 광도계 측정에 의해서 측정하였다.

[0649] **SDS 겔 전기영동**

[0650] 후속 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질을 분리하기 위해서, 계산된 양의 용해물 및 용해 완충액을 15 μl 로딩 완충액-DDT-혼합물(6:1)과 혼합하였다. 이어서, 단백질 로딩 물질을 100℃에서 5분 동안 익혔다. 이어서, 5 μl의 색상 단백질 표준 및 40 μl의 샘플을 겔 상으로 로딩하였다. 바이러스성 단백질의 검출과 함께 단백질 분리를 위해서, 10% 겔을 사용하였다. siRNA를 통해서 하향 조절된 유전자를 연구하기 위해서, 12% 겔을 사용하였다. 용해 및 스태킹 겔의 조성이 섹션 완충액 및 용액에 나열되어 있다. 대략 20분 동안, 겔을 90V에서 TGS-완충액 중에서 진행시켜 모든 단백질을 하나의 밴드에 농축시켰다. 후속하여, 겔을 TGS-완충액 중에서 150V에서 대략 60분 동안 진행시켜 단백질을 크기별로 분리하였다.

[0651] **웨스턴 블롯(Western Blot)**

[0652] 겔로부터의 단백질을 막 상으로 전달하기 위해서, 그것을 웨스턴 블롯 기술을 이용하여 블롯팅하였다. 소수성 PVDF-막을 활성화시키기 위해서, 그것을 메탄올 중에서 약 2분 동안 인큐베이션하였다. 후속하여, 막을 스펀지, 필터 페이퍼 및 겔과 함께 블롯팅 완충액에 침착시켰다. 4℃에서 그리고 100V에서 대략 2시간 동안 전기영동시킴으로써, 단백질을 블롯팅 완충액 중의 막 상에 전달하였다. 비특이적 항체 결합을 피하기 위해서, 바이러스성 단백질을 검출하는 항체의 후속 사용을 위한 5 ml 5% BSA-TBST 중의 세포성 단백질을 각각 분석하기 위해 TBST 중의 10 ml 5% 분유 중에서 실온에서 1 시간 동안 회전시키면서 막을 차단시켰다. 각각 5분 동안 TBST 중에서 막을 5회 세척한 후에, 막을 밤새 회전시키면서 4℃에서 일차 항체 용액과 함께 인큐베이션시켰다. 항체 GAPDH, E1A, E1B55K, E2A 및 E4orf6의 경우에, 이러한 단계는 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 그리하여, 항체를 0,02% 소듐 아지드를 함유하는 TBST 중의 5% BSA에서 상이한 인자로 희석시켰다. 추가의 5회 세척 단계 후에,

막을 이차 항체의 1:10.000 희석액 중에서 실온에서 30분 동안 회전시킴녀서 인큐베이션하였다. 바이러스성 항체의 이차 항체(항-마우스)를 5% BSA-TBST에 희석시켰고, 모든 다른 것들은 TBST 중의 5% 분유에 희석시켰다. 그들 이차 항체를 겨자무 과산화효소로 컨주게이션시켰다. 5회의 최종 세척 단계 후에, 막을 증강-화학-발광(Enhanced-Chemi-Luminescence: ECL) 용액에서 5분 동안 인큐베이션시켜 과산화효소의 신호를 가시화시켰다. 일차 항체 DP-1 및 E2F-1와 함께 배양된 막의 경우에, GE-Healthcare에 의한 Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent을 사용하여 더 밝은 신호를 달성하였으며, 모든 다른 것들의 경우에, 실험실에서 생산된 ECL 용액을 사용하였다. 사용 전에 1:1로 간단히 혼합되는 ECL A 및 ECL B의 조성이 섹션 완충액 및 용액에서 나열되어 있다. 마지막으로, 단백질은 필름 상에 신호를 전개시킴으로써 검출될 수 있다.

[0653] **항체:**

[0654] 체크포인트 키나아제 1(Checkpoint kinase 1)(sc-377231, Santa Cruz Biotechnology)

[0655] 전체 RB(554136, BD Biosciences)

[0656] 포스포 RB Ser 780(8180, Cell Signaling Technology)

[0657] E2F1(sc-251, Santa Cruz Biotechnology)

[0658] E2F2(ab138515, abcam)

[0659] E2F3(PG37, Thermo FisherScientific)

[0660] E2F4 (WUF10, Thermo Fisher Scientific)

[0661] E2F5(sc-999, Santa Cruz Biotechnology)

[0662] 사이클린 D1(92G2, Cell Signaling Technology)

[0663] 사이클린 E2(4132, Cell Signaling Technology)

[0664] CDK2(78B2, Cell Signaling Technology)

[0665] GAPDH(14C10, Cell Signaling Technology)

[0666] 액틴(A2066, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

[0667] E1A(sc-25, Santa Cruz Biotechnology)

[0668] E1B55k(M. Dobbelstein에 의해서 친절하게 제공됨)

[0669] E4orf6(M. Dobbelstein에 의해서 친절하게 제공됨)

[0670] E2A(DBP, M. Dobbelstein에 의해서 친절하게 제공됨)

[0671] 헥손(ABIN2686029, Antibodies online)

[0672] **소분자 억제제 처리**

[0673] PD-0332991 이세티오네이트(팔보시클립, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) 및 LY-2835219(아베마시클립, Selleck Chemicals)를 10mM 원액으로서 무균수(sterile water)에 용해시켰다. LEE011(리보시클립, MedChem Express) 및 Nutlin-3a(Sigma)를 각각 10mM 및 5μM 원액으로서 DMSO에 용해시켰다. 작업 농축액을 즉시 사용을 위해서 신선하게 제조하였다.

[0674] **바이러스 감염 및 조합 처리**

[0675] 바이러스 유도된 세포 치사의 측정을 위해서, 세포를 12-웰 플레이트에 시딩하였다. PD-033299, LY-2835219, 및 LEE011에 의한 조합 처리를 위해서, 세포를 억제제로 24 시간 동안 전처리 하였다. 세포를 FBS를 함유하지 않은 200-400μl 배지 중의 표시된 MOI의 표시된 바이러스로 감염시켰다. 1 hpi에서, 소분자 억제제를 함유하거나 함유하지 않는 완전 배지를 세포에 첨가하였다.

[0676] **세포 생존성(SRB 분석)**

[0677] 세포를 4℃에서 1시간 동안 10% TCA로 고정시키고, 1% 아세트산 중의 0.5% 설포로다민 B(SRB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)로 실온에서 30분 동안 염색시킨 다음, 1% 아세트산으로 세척하여 과량의 SRB를 제거하였다. 건조

된 SRB를 10mM 트리스 완충액에 용해시키고, 590nm에서의 광도계 측정에 의해서 정량화를 수행하였다.

[0678] **역가 시험**

[0679] 감염성 바이러스성 입자 생산의 측정을 위해서, 감염된 세포 및 상청액을 세포 스크레버를 사용하여 3 dpi에서 수거하였다. 바이러스를 복수의 동결-융해 사이클에 이어진 1600 rcf에서의 원심분리에 의해서 온전한 세포로부터 방출시켰다. 세포 용해물의 상청액을 AdEasy Viral Titer Kit instruction manual(972500)에 기재된 바와 같이 Hek293 세포를 사용하여 바이러스성 입자 생산에 대해서 시험하였다. 다음 시약을 사용하였다: 염소-항-헥손 항체(1056, Chemicon), 토끼-항-염소 항체 (P0449, Dako), DAB 용액(Dako).

[0680] **실시예 2: E1-마이너스 아데노바이러스의 복제에 대한 CDK4/6 억제제 PD0332991의 효과**

[0681] E1-삭제된 아데노바이러스가 매우 낮은 효능이기는 하지만 암 세포에서 복제되는 것으로 밝혀졌다. T24 세포를 그린 형광 단백질을 발현하는 100 MOI의 E1-마이너스 아데노바이러스(Ad-GFP)로 감염시켰고, 감염 1일 전에 인큐베이션 시간 동안에 500 nM PD0332991로 처리하였다. 그러한 조건 하에, GFP 발현의 증가가 관찰되어서, 아데노바이러스 E2-초기 프로모터의 활성화에 의해서 매개된 E1A-독립적 바이러스 복제 및 유전자 발현을 나타냈다.

[0682] **실시예 3: 상이한 CDK4/6 억제제와 함께 야생형 아데노바이러스 또는 XVir-N-31의 조합 사용**

[0683] PD0332991와 조합된 E2-초기 돌연변이된 아데노바이러스 Ad-WT/E2M 및 Ad-GFP를 사용한 결과를 기반으로 하여, 야생형 아데노바이러스 Ad-WT 또는 XVir-N-31과 함께 상이한 CDK4/6 억제제를 사용한 실험을 수행하였다. 이들 작용제는 세포를 G1 기에서 정지시켰기 때문에, 모든 억제제가 바이러스 복제를 지지할 수 있었다는 것을 발견한 것은 놀라웠다.

[0684] 세 가지 임상적으로 진보된 CDK4/6 억제제 PD-033299, LY-2835219 및 LEE011에 의한 세포의 처리가 세포 생존성, 바이러스 복제 및 바이러스성 역가 생산에 대한 감염 시의 효과에 영향을 미칠 수 있는 지를 추가로 시험하였다.

[0685] 처리시에, 모든 세 가지 억제제는 RB의 발현 및 포스포릴화 수준에 대한 유사한 효과를 나타내고, 이는 이전에 많은 공보에서 기재되었다. 거의 완전한 탈포스포릴화 및 또한 전체 단백질의 하향 조절 24 시간 후에, 포스포릴화 수준이 시간에 따라서 부분적으로 회복된다. CDK2 수준은 처리 시에 상향 조절되었고, 사이클린 D2 뿐만 아니라, 사이클린 E2 수준이 하향 조절되었다.

[0686] **실시예 4: CDK4/6 억제제와 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스의 조합으로부터 발생하는 상승 효과**

[0687] CDK4/6 억제제 PD-033299, LY-2835219 및 LEE011을 아데노바이러스에 의한 세포의 감염과 조합하였다. 세포의 감염은 처리 24 시간 후에 수행되었는데, 그 이유는 표적 분자에 대한 하류 효과가 처리 후 8 내지 24 시간에만 검출될 수 있기 때문이다.

[0688] 결과가 도 1에 도시되어 있다.

[0689] CDK4/6 억제제는 세포 생존성, 바이러스 복제 and 바이러스성 역가에 대한 상승 효과를 유도하였다. (a) 세포를 세 가지의 CDK4/6 억제제 PD-033299, LY-2835219 및 LEE011로 24 시간 동안 전처리하였고, XVir-N-31(Moi 60) 또는 야생형 아데노바이러스(Moi 80)로 감염시켰다. 감염 4일 후에, 세포 생존성을 SRB 분석에 의해서 측정하였다. 그래프는 최소 3회의 독립적 실험의 평균을 나타낸다. (b) 감염 3일 후에, 용해물을 세포로부터 세조하고, 역가 시험을 HEK293 세포에 대해서 수행하였다. 바이러스 역가는 대조군에 대한 폴드 변화(fold change)로서 나타내어진다. (c) DNA를 4, 24, 36 및 48 hpi에서 감염된 세포로부터 추출하였고, 섬유 cDNA를 위한 qPCR을 사용함으로써 바이러스 복제에 대해서 분석하였다. 값은 4 hpi에서 GAPDH에 대해서 표정된다. 그래프는 적어도 2회의 독립적 실험의 대표를 나타낸다. 오차 막대를 표준 오차를 나타낸다.

[0690] 도 1로부터 입증되는 바와 같이, 모든 3 가지의 CDK4/6 억제제가 세포 용해 (도 1a), 세포 내의 복제(도 1B) 및 바이러스성 입자의 형성(도 1b)을 극적으로 지지하였다.

[0691] **실시예 5: 선택된 바이러스성 단백질의 발현 수준에 대한 CDK4/6 억제제 팔보시클립(PD-033299)의 효과**

[0692] 이들 효과를 더욱 상세하게 분석하기 위해서, 선택된 바이러스성 단백질의 발현 수준을 처리 또는 비-처리 세포에서 측정하였다. 본 실험의 경우에, 억제제 팔보시클립(PD-033299)을 대표적인 CDK4/6 억제제로서 사용하였다. 세포를 15의 MOI로 감염시켰다. 500 nM로의 PD 처리를 감염 24 시간에 단백질 분리가 수행될 때까지 수행하였다. 12, 24 및 36 시간 후에, 단백질 분리를 1% SDS-완충액을 사용하여 수행하였다. 액틴이 양성 대조

군으로서 포함되었다. 로딩 대조군이 모든 라인에서 세포성 액틴의 동일한 단백질 수준을 나타내기 때문에, 라인들 사이의 적절한 비교가 보장된다. hpi: 감염 후 시간.

[0693] 결과는 CDK4/6 억제제 PD0332991(PD)와 함께 Ad-WT 및 XVir-N-31 감염된 T24 세포의 바이러스성 단백질 발현의 결과를 나타내는 도 2에 나타내어져 있다. 본 실험 (E1A, E1B-55k, DBP (E2A) 및 헥손)에서 조사된 바이러스성 단백질들은 모두 아데노바이러스 야생형 바이러스에 비해서 CDK4/6 억제제 PD-0332991로 처리된 세포에서 더 높은 수준으로 발현되었다. 이러한 효과는 E1A의 경우에 12 hpi만큼 초기에 그리고 다른 단백질의 경우에 24 hpi만큼 초기에 관찰될 수 있다.

[0694] **실싱예 6: CDK4/6 억제제에 의해서 매개된 효과의 특이성**

[0695] 실시예 5에 따른 CDK4/6 억제제의 부류는 RB의 발현을 필요로 한다. 그에 따라서, 세 가지의 RB 양성 및 두 가지의 RB 음성 방광암 유도된 세포주를 사용하였고, 세포를 조합 요법으로 처리하였다. 세포주를 IC50 농도의 PD-0332991 (T24: 500 nM, RT112: 2000 nM, 253J: 100nM)으로 24 시간 동안 전처리하였고, XVir-N-31(T24 MOI50, 253J MOI 25, RT112 MOI450)로 감염시켰다. 값은 적어도 2회의 독립적 실험의 평균이다. 오류 막대는 표준 오차를 나타낸다. 4 dpi에서, 세포 생존성을 SRB 분석(a, c)을 사용하여 측정하였다. 세포의 (b, d) 용해물을 3 dpi에서 제조하였고, 역가 시험을 Hek293 세포에 대해서 수행하였다. 바이러스성 역가는 대조군에 대한 폴드 변화로서 나타내어진다.

[0696] 결과가 도 3에 나타내어져 있다.

[0697] 도 3으로부터 입증되는 바와 같이, 단지 RB에 대한 양성 세포주가 각각 세포 성장 및 세포 생존성의 유의한 감소를 나타냈다(도 3의 a, c). 또한, 바이러스성 입자 형성은 단지 PD-0332991 처리시의 RB 양성 세포주에서 증가되었다(도 3의 b, d).

[0698] **실시예 7: XVir-N-31와의 CDK4/6 억제제 PD-0332991의 조합 처리의 효과**

[0699] RB 양성 세포주에서의 바이러스 복제에 대한 PD-0332991의 효과를 조사하기 위해서, 섬유 DNA 복사체의 상대적인 정량화를 qPCR를 사용하여 수행하였다. 방광암 세포주를 24 시간 동안 전처리하였고, XVir-N-31 (T24 MOI 40, UMUC3 및 253J MOI 20, RT112 MOI 400)로 감염시켰다. DNA를 24-48 hpi에서 추출하였고, qPCR을 사용하여 바이러스성 섬유에 대해서 분석하였다. 값을 GAPDH에 대해서 표정하였고, 데이터는 적어도 2회의 독립적 실험의 대표값이며; 오류 막대 S.D.

[0700] 결과가 도 4에 도시되어 있다.

[0701] 도 4로부터 알 수 있는 바와 같이, XVir-N-31와의 CDK4/6 억제제 PD-0332991의 조합 처리는 바이러스 복제를 극적으로 증가시킨다.

[0702] **실시예 8: CDK4/6 억제제의 시간 역학**

[0703] RB의 탈포스포릴화 및 분해에 대한 CDK4/6 억제제의 시간 역학은 세포 처리 후 약 10 시간이다. 또한, 상기 나타낸 결과는 시간에 따른 RB 하류 표적의 부분적 회복을 나타냈다(도 1). 이러한 관찰은 CDK4/6 억제제의 시간 역학 및 바이러스 유도된 세포 치사에 대한 효과가 실시예 7에서 예시된 바와 같은 이러한 병용 요법에 대한 중요한 파라미터임을 암시한다. 조합 요법의 적용의 경우에, 세포 전처리에 대한 상이한 시점이 험되었다. 이에 따라서, 세포를 감염 전(감염 전 일/시간, dai/hai) 또는 감염 후 1시간에 처리하였고, 세포 성장을 SRB 분석을 사용하여 측정하였다. 오류 막대는 S.E.를 나타내며, 값은 3회의 독립적인 실험의 평균이다.

[0704] 결과가 도 5에 도시되어 있다.

[0705] 도 5로부터 입증되는 바와 같이, 병행 처리는 이미 세포 사망에서의 증가에 충분하였다.

[0706] **실시예 9: CDK4/6 억제제 PD0332991와의 상이한 아데노바이러스의 조합 처리**

[0707] 본 실시예는 상이한 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스가 세포 치사를 위해서 CDK4/6 억제제, 예컨대, PD0332991와 함께 사용될 수 있고, 바이러스 복제 및 세포 치사에서의 관찰된 증가는 XVir-N-31로 제한되지 않았다는 실험 증거를 제공하기 위해서 수행되었다. 그에 따라서, 다음과 같은 Ad-델타24 및 Onyx-015를 갖는 T24 암 세포: T24 방광암 세포를 20 MOI의 지시된 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스로 감염시켰다. 500 nM CDK4/6 억제제 PD0332991에 의한 처리를 감염 1일 전 및 감염 4일 후에 수행하였다. 감염 4일 후에 사진을 촬영하였다. 세포병변 효과(cytopathic effect: CPE)의 발생은 바이러스 복제 및 세포 치사를 나타낸다.

[0708] 결과가 도 6에 도시되어 있다.

[0709] 도 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, RB 포스포릴화를 감소시키는 CDK4/6 억제제의 대표적인 예로서의 CDK4/6 억제제 PD0332991는 다른 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스, 예컨대, Ad-델타24 및 Onyx-015와 조합되는 때에 세포 치사를 증가시켰다.

[0710] **실시예 10: 팔보시클립과 함께 GFP를 발현하는 재조합 E1-삭제된 아데노바이러스(Ad-마이너스/GFP)에 의한 T24 세포의 감염은 GFP 발현의 증가를 유발시킨다**

[0711] 100.000 T24 세포/웰을 6-웰 플레이트에 시딩하였고, 37℃에서 5% CO2에서 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지에서 성장시켰다. T24 세포를 감염 전 24시간 및 다시 감염 후 1 시간에 500 nM 팔보시클립으로 처리하였다. GFP을 발현하는 E1-삭제된 아데노바이러스(Ad-마이너스/GFP)의 감염을 혈청을 함유하지 않는 400 μl 배지에서 수행하였다. 10x 배율을 갖는 형광 현미경을 사용하여 감염 후 48시간에 사진을 촬영하였다.

[0712] 팔보시클립으로 처리된 그리고 팔보시클립으로 처리되지 않은 GFP 발현의 형광 현미경 분석의 결과가 도 7에 도시되어 있다.

[0713] 결과는 팔보시클립에 의한 T24 세포의 처리가 팔보시클립에 의해서 유도된 바이러스 DNA 복제에 의해서 매개되는 GFP 발현의 강한 증가를 유발시킴을 나타낸다.

[0714] **실시예 11: 다양한 세포 사이클 억제제로 처리된 UMUC 세포에서의 E1A-독립적 바이러스 복제**

[0715] 상이한 처리 조건 하에 dl703(Mantwill et al. 2013, Journal of Translational Medicine, 11, 216)의 복제에서의 차이를 조사하기 위해서, DNA-복제 분석을 수행하였다. 100.000 UMUC 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하였고, 37℃에서 5% CO2 조건 조건 중의 10% FCS를 함유하는 DMEM 배지에서 성장시켰다. 시딩 24 시간 후에, 세포를 10 μM Lee(리보시클립), 1 μM CI-1040, 10 μM Nutlin-3a 및 10 μM 로스코베르틴으로 24 시간 동안 처리하였고, 다시, 감염 후에, 적절한 양의 억제제를 배지에 첨가하였다. 50 MOI dl703(마스트아데노바이러스, 타입 C, E1 부위에서 3.2 kb 크기 삭제를 갖는 혈청형 5)에 의한 감염을 처리 후 24 시간에 수행하였다. 감염 4 및 48 시간 후에, DNA를 분리하고, qPCR을 바이러스성 섬유 유전자에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 수행하였다. 섬유 정방향 5'-AAGCTAGCCCTGCAAACATCA-3'(SEQ ID NO: 17); 섬유 역방향 5`-CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA-3'(SEQ ID NO: 18).

[0716] 결과가 도 8에 도시되어 있다.

[0717] 도 8로부터 입증되는 바와 같이, CDK 4/6 억제제 LEE011(리보시클립)에 의한 UMUC 세포의 처리는 E1-마이너스 아데노바이러스 dl703(거의 100-배)의 바이러스 DNA 복제의 극적인 증가(거의 100-배)를 유발시켰다. 이러한 증가는 E2F1 발현의 억제와 결부된 리보시클립에 의한 특이적 유도된 G1-정지가 E1-독립적 아데노바이러스 복제를 촉진시킨다는 것을 강하게 제안한다. 결과적으로, E1A 유전자에서의 특이적 삭제를 갖는 바이러스가 CDK 4/6 처리 하에 향상된 아데노바이러스 DNA 복제를 나타낼 뿐만 아니라, E1A 유전자의 완전한 삭제를 갖는 아데노바이러스도 바이러스 DNA 복제에서의 증가를 나타낸다.

[0718] 비록, Mek-억제제 GI-1040가 E2F1 발현의 억제 및 G1-정지와 관련하여 유사한 특성을 나타내지만, 복제는 리보시클립 처리된 세포에 비해서 훨씬 더 낮았다. 이는 동시에 다른 중요한 세포 사이클 관련된 경로, 예컨대, 바이러스 복제에 필요한 MEK/ERK가 억제된다는 사실에 기인될 수 있다. 또한, MEK/ERK-경로의 억제가 입자 형성을 100-배 이상 감소시켜서, 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 복제와의 병용 요법을 위한 임상 설정에서 그것을 적합하지 않게 한다는 것이 밝혀졌다(Schumann and Doppelstein 2016, 암 Research, 66, 1282-1288).

[0719] **실시예 12: 지시된 세포 사이클 억제제로 처리된 UMUC 세포의 웨스턴 블롯 분석**

[0720] 지시된 농도의 CI-1040, 로스코비틴, Nutlin-3a 및 LEE011(리보시클립)으로 처리된 UMUC 세포의 웨스턴 블롯 분석. 1 x 106 세포를 10 cm 디쉬(dish)에 시딩하였다. 처리 후 24 시간에, 단백질을 1% SDS 완충액을 사용하여 분리하여, 핵막의 파괴를 달성시켰다. 모든 샘플을 주사기 내로 여러번 흡인하여 DNA를 파괴하고, 후속하여 4℃에서 30분 동안 30000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 새로운 반응 튜브에 전달하고, 추가의 단계 동안 직접 사용하거나 -80℃에서 저장하였다. 단백질을 분리하기 위해서, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 4℃에서 및 100V에서 대략 2 시간 동안의 전기영동에 의해서, 40 μg의 전체 단백질을 로딩하고 특이적 지시된 항체에 대해서 프로빙(probing)하였다.

[0721] 결과가 도 9a, 9b 및 9c에 도시되어 있다.

[0722] 도 9로부터 입증되는 바와 같이, 로스코비틴 및 Nutlin-3a는 Rb, phRB 및 E2F1 발현에 대한 뚜렷한 효과를 나타내지 못하는 반면에, 10 μM의 LEE-011(리보시클립) 및 1 μM의 MI-1040은 E2F1 뿐만 아니라, Rb 및 phRb 발현의 억제를 유도하였다.

[0723] **실시예 13: E1-삭제된 복제 결함 아데노바이러스 d1703의 바이러스 DNA 복제에 대한 CDK 4/6 억제제의 분석**

[0724] 세포 사이클 분석을 위해서, 세포를 6 웰 플레이트(2,5x10E4 c/웰)에 시딩하였다. d1703에 의한 감염 8 시간 전에, 세포를 지정된 농도의 세포 사이클 억제제로 처리하였다. 10 MOI d1703에 의한 감염 후에, 세포를 다시 48 시간 동안 처리하였다. 미처리된 세포 및 단지 d1703 감염된 세포를 대조군으로 하였다. 감염 48 시간 후에, 세포를 트립신화에 의해서 수거하고, 와동시키면서 80 % 에탄올로 고정시켰다. 세포 사이클 상태를 조사하기 위해서, 고정된 세포를 RT 및 300g에서 5분 동안 원심분리하였고, 에탄올을 흡인해 냈다. 세포를 재현탁시키고, 1% BSA-PBS(소혈청 알부민)로 세척하고, 다시 원심분리하였다. 세포를 EDU로 염색시키고, 세포 사이클 분석을 Thermo Fischer로부터의 Click-iT™ Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits, Catalog nos. C10632를 사용하여 수행하였다. 또한, 1% BSA/PBS에 의한 3회 세척 후에, 세포를 PI(Propidium Iodine, 50 μg/ml)로 염색시켰다. FACScalibur Flow Cytometry System에 의한 염색 후에 측정을 직접적으로 수행하였다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[0725] CDK4/6 억제제의 특성

[0726] CI1040: 이중 특이적 트레오닌/티로신 키나아제, map 키나아제 키나아제(MEK)는 인간 종양에서 흔히 활성화되는 RAS/RAF/MEK/ERK 신호전달 경로의 주요 성분이다. CI-1040은 MEK를 효능적으로 억제하는 벤즈하이드록사메이트 화합물이고(Allen et al. 2003, Semin Oncol. (5 Suppl 16):105-16), G1기 정지를 유발시킨다.

[0727] Nutlin-3a: Nutlin-3, 즉, MDM2의 소분자 길항제는 야생형 p53을 갖는 정상 MDM2 발현 및 MDM2 과발현 세포주 둘 모두에서의 p53 기능을 효과적으로 회복시켜서, 세포 사이클 정지 및 아폽토시스(apoptosis)를 유도한다(Wang et al 2012, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Volume 44, Issue 8, 1 August 2012, Pages 685-691).

[0728] 로스코비틴(셀리시클리브(Seliciclib) 또는 CYC202)은, 처리된 세포의 세포 사이클 내에서 성장 단계 또는 상태를 변경시키는, CDK2, CDK7 및 CDK9를 포함한 복수의 효소 표적을 우선적으로 억제하는 약학적 사이클린-의존적 키나아제(CDK) 억제제의 패밀리에 있는 실험 약물 후보이다(Whitaker et al. 2004, Cancer Research 64, 262-272).

[0729] LEE011(리보시클립; 상품명 Kisqali])은 사이클린 D1/CDK4 및 CDK6의 억제제이고, 특정 종류의 유방암의 치료에 사용된다. CDK 4/6의 억제는 G1 세포 사이클 정지 및 E2F1 발현의 억제를 유발시킨다(Kim S. et al, Oncotarget. 2018 Oct 16;9(81):35226-35240; Yang C et al., Oncogene (2017)36,2255-2264).

[0730] 결과가 도 10에 도시되어 있다.

[0731] CDK 4/6 억제제 LEE011(리보시클립) 및 CI-1040는 투명 G1-정지(clear G1-arrest)를 유도한다. 로스코비틴에 의한 처리는 G2/m 정지된 세포의 약간의 증가를 나타냈다. Nutlin-3a는 단지 사용된 농도에서 세포 사이클에 대한 효과가 거의 없거나 없다. 재조합 E1-삭제된(E1A 단백질을 갖지 않음) 아데노바이러스 d1703에 의한 UMUC 세포의 감염은 세포 사이클 분포를 유의하게 변화시키지 않았다.

[0732] **실시예 14: 팔보시클립은 처리 후 시험관내 아데노바이러스 헥손 염색을 증가시켰다**

[0733] 방광 세포주 RT112, T24 및 UMUC를 6-웰 플레이트(2 x105 세포/웰)에 시딩하였다. 시딩 후 1일에, 세포를 감염 전 24 시간 동안 및 다시 감염 후 1 시간 동안 500 nM 팔보시클립으로 처리하였다. 지시된 MOI의 AD-WT에 의한 감염을 혈청을 함유하지 않는 400 μl DMEM-배지에서 수행하였다. 헥손 염색을 감염 2일 후에 Agilent로부터의 Adeasy Viral Titer Kit(cat: 972500)를 사용하여 제조자 지시에 따라서 수행하였다.

[0734] 결과가 도 11에 도시되어 있다.

[0735] 도 11로부터 입증되는 바와 같이, 예시적인 CDK4/6 억제제로서의 팔보시클립 (500 nM)의 처리는 갈색/적색에 의해서 표시된 바와 같이 감염 48 시간 후에 팔보시클립 처리된 세포에서 헥손 양성 세포를 유의하게 증가시켰다. 팔보시클립 처리 하의 세포가 바이러스성 입자를 더 생산할 수 있고 바이러스 DNA 복제의 증가를 나타내는데, 그 이유는 아데노바이러스 헥손 발현이 바이러스 복제의 개시와는 별개로 발생하기 때문이라는 결론에 이른다.

[0736] 실시예 10 내지 14에 따른 결과로부터, 다른 세포 사이클 억제제 없이 단지 CDK4/6 억제제가 복제 결함 아데노

바이러스(E1 유전자가 결여된 dl703) 및 Ad-GFP의 복제 및 유전자 발현을 증가시킬 수 있었다는 것이 입증된다. 더욱이, 그러한 증가된 바이러스 복제 및 유전자 발현을 제공하기 위한 CDK4/6 억제제는 (감염된) 세포의 G1기 정지 및 F2F1 발현의 억제를 유발시켜야 한다.

[0737] **실시예 15: XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제를 포함하는 삼중 요법을 사용한 T24 세포의 처리**

[0738] XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제(BMN673(탈라졸라립: Talazolarib))을 포함하는 삼중 요법을 사용한 T24 세포의 삼중 요법의 효능을 보여주기 위해서, 효능 분석을 수행하였다.

[0739] 12.500 T24 세포를 12-웰 플레이트에 웰 당 시딩하였고, 37℃에서 10 % FCS를 함유하는 RPMI 배지에서 밤새 성장시켰다. 세포의 억제제-처리를 세포 시딩 후 24 시간에 그리고 다시 감염 1 시간 후에 지시된 농도를 배지에 첨가함으로써 수행하였다. 세포의 감염을 혈청을 함유하지 않는 250 μl 배지에서 억제제-처리 후 24시간에 수행하였다. 고정 및 SRB-염색을 감염 4일 후에 수행하였다. PD, 팔보시클립; PARPi: BMN673.

[0740] SRB 염색을 위해서, 배지를 흡인에 의해서 제거하였다. 세포를 1 ml(웰 당) 10 %의 차가운 TCA로 4℃에서 1 시간 동안 고정시켰다. TCA를 흡인에 의해서 제거하였고, 세포 층을 수돗물로 4회 세척하였다. 세포를 1% 아세트산 중의 1 ml(웰 당) 0.5% SRB(sulforhodamine B)로 30분 동안 염색시켰다. 미결합된 SRB를 1 ml 1% 아세트산/웰로 5회의 세척 단계로 제거하였고; 각각의 세척 단계 후에, 아세트산을 흡인에 의해서 제거하였다. 플레이트를 2 시간 동안 공기-건조시켰다. SRB 염색된 세포를 용해시키기 위해서, 200 μl의 10 mM 트리스 염기를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 뒤에, 각각 20 μl를 96 웰 플레이트의 웰 내로 분배하였다. 96 웰 플레이트를 Elisa-플레이트 판독기 내로 로딩하고, 샘플의 흡착을 560 nm에서 측정하였다. Mock 처리된 세포를 100 % 세포 생존율로 설정하였다.

[0741] 결과가 도 12에 도시되어 있다.

[0742] 도 12에 나타낸 결과는 명확하게, 팔보시클립, BMN673 및 XVir-N-31로 이루어진 삼중 요법이 세포 치사와 관련하여 단독- 또는 병용 요법에 비해서 우수한 성능을 나타냈음을 입증하고 있다. 거의 90% 세포 치사가 PARP 억제제 PARPi(BMN673) 및 CDK4/6 억제제 팔보시클립(PD)과 함께 10 MOI의 XVir-N-31을 사용하여 달성될 수 있다. XVir-N-31 없이 PARPi와 팔보시클립의 조합은 단지 65%의 세포를 차사시켰다. T24 세포와 UMUC 세포는 CDK 4/6-억제제에 민감하다(E2F1 하향-조절과 함께 G1기 정지를 제공함).

[0743] **실시예 16: XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제를 포함하는 삼중 요법의 역학**

[0744] XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제(BMN673(탈라졸라립))을 포함하는 삼중 요법을 이용한 T24 세포의 삼중 요법의 역학을 보여주기 위해서, 효능 분석을 수행하였고, 효능을 상이한 시점에서 분석하였다.

[0745] 3000 T24 세포를 12-웰 플레이트에 웰 당 시딩하였고, 37℃에서 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지에서 밤새 성장시켰다. 세포의 억제제-처리를 세포 시딩 후 24 시간에 그리고 다시 감염 1 시간 후에 지시된 농도를 배지에 첨가함으로써 수행하였다. 세포의 감염을 혈청을 함유하지 않는 250 μl 배지에서 억제제-처리 후 24시간에 수행하였다. 고정 및 SRB-염색을 감염 1-5일 후에 수행하였다(dpi: 감염 후 일수). 15 nM PARPi는 T24 세포에서의 IC-80 값에 상응한다.

[0746] 결과가 도 13에 도시되어 있다.

[0747] 도 13으로부터 입증되는 바와 같이, XVir-N-31 외에 CDK4/6 억제제(팔보시클립 (PD) 및 PARP 억제제 PARPI(BMN673)를 사용하는 삼중 요법은, 또한 역학적 관점에서, XVir-N-31만을 사용하는 단일요법 또는 XVir-N-31와 PARP 억제제 또는 CDK4/6 억제제를 사용하는 병용 요법보다 훨씬 더 효과적이다. 중요하게는, 종양 세포의 재-성장은 CDK 4/6 민감성 세포주 UMUC 및 T24에서 4 및 5일에 유의하게 감소되었다(dpi: 감염 후 일수).

[0748] **실시예 17: XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제를 포함하는 삼중 요법의 역학**

[0749] XVir-N-31, 팔보시클립 및 PARP 억제제(BMN673(탈라졸라립))를 포함하는 삼중 요법을 이용한 UMUC 세포의 삼중 요법의 역학을 보여주기 위해서, 효능 분석을 수행하엿고, 효능을 상이한 시점에서 분석하였다.

[0750] UMUC-3의 시딩: 3000 세포를 12-웰 플레이트에 웰 당 시딩하였고, 37℃에서 10% FCS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 성장시켰다. 세포의 억제제-처리를 세포 시딩 후 24 시간에 그리고 다시 감염 1 시간 후에 지시된 농도를 배지에 첨가함으로써 수행하였다. 세포의 감염을 억제제-처리 후 24시간에 수행하였다. 고정 및 SRB-염색을 감염 1-6일 후(dpi: 감염 후 일수)에 수행하였다. 160 nM PARPi는 UMUC3 세포에서의 IC-80 값에 상응한다.

[0751] 결과가 도 14에 도시되어 있다.

[0752] 도 14에 도시된 결과는, 팔보시클립, BMN673 및 XVir-N-31로 이루어진 삼중 요법이 단독- 또는 병용 요법에 비해서 우수한 성능을 나타냄을 명확히 입증하고 있다. 중요하게는, 종양 세포의 재-성장이 CDK 4/6 민감성 세포주 UMUC 및 T24에서 4 및 5일에 유의하게 감소되었다(dpi: 감염 후 일수).

[0753] **실시예 18: XVir-N-31, CDK4/6 억제제 및 브로모도메인 억제제을 포함하는 삼중 요법**

[0754] 5000 T24 세포를 12 웰 플레이트에 시딩하고 10% FCS를 함유하는 1 ml RPMI-배지에서 성장시켰다. 다음날, 세포를 500 nM 팔보시클립 및 300 nM JQ-1로 처리하였다. 처리 24 시간 후에, 세포를 FCS를 함유하지 않는 200 µl RPMI-배지 중의 지시된 MOI의 XVir-N-31로 감염시켰다. 1 시간 후에, 10% FCS를 함유하는 800 µl RPMI-배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 또한, 500 nM 팔보시클립 및 300 nM JQ-1을 배지에 첨가하였다. SRB-염색을 감염 5일 후에 수행하였다. Mock 처리된 세포를 100 % 세포 생존율로 설정하였다.

[0755] 결과가 도 15에 도시되어 있다.

[0756] 도 15로부터 입증되는 바와 같이, 브로모도메인 억제제 JQ-1은 낮은 MOI의 CDK 4/6 억제제 팔보시클립과 함께 XVir-N-31의 세포 치사 용량을 증가시켰다. 감염 48 시간 후의 광학-현미경 분석은 이미 JQ-1/팔보시클립/XVir-N-31 처리된 세포에서의 상당한 세포 치사를 나타냈다. JQ-1이 팔보시클립 처리된 세포에서 바이러스 전사 및 그에 의한 바이러스 복제를 증가시켰고, 그 이유는 300 nM JQ1 단독에 의한 단일-요법이 10 및 20 MOI에서의 XVir-N-31의 세포 치사를 증가시키지 않았기 때문이라는 결론에 이른다.

[0757] 아데노바이러스 감염된 암 세포에서의 JQ-1의 관찰된 향상을 위한 전제조건은 G1-정지를 유도하기 위한 팔보시클립의 능력이다. 팔보시클립에 대해서 내성인 세포에서(실시예 18 참조, 동일한 처리 과정), 세포 치사의 증가가 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 세포가 JQ-1의 농도로 처리되어 G1-정지를 유발시키지 않고 팔보시클립이 함께 사용되지 않은 문헌[Baojie Lv et al 2018, Scientific reports, 8, 11554]와 매우 대조적이었다.

[0758] **실시예 19: XVir-N-31, CDK4/6 억제제 및 브로모도메인 억제제를 포함하는 삼중 요법**

[0759] 100.000 SK-N-MC 세포/웰을 12-웰 플레이트에 시딩하였고, 37℃에서 및 5% CO2에서 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지 중에서 성장시켰다. 세포를 감염 24 시간 전에 그리고 감염 1 시간 후에 적절한 양을 배지에 첨가함으로써 200 nM 아베마시클립 + 500 nM JQ-1으로 처리하였다. XVir-N-31의 감염을 혈청을 함유하지 않는 500 µl의 RPMI 배지에서 수행하였다. SRB-염색을 감염 5일 후에 수행하였다. Mock 처리된 세포를 100% 세포 생존율로 설정하였다.

[0760] 결과가 도 16에 도시되어 있다.

[0761] SK-N-MC 세포는 CDK 4/6 억제제에 내성이고, 그에 따라서 이는 G1-정지를 유발시키지 않는 것으로 확립되었다. JQ-1의 첨가는 CDK 4/6(아베마시클립) 내성 SK-N-MC 세포의 세포 치사를 증가시키지 않았으며, 이는 CDK 4/6 매개된 G1-정지가 세포 치사에 대한 JQ-1-매개된 효과의 전제조건임을 나타낸다.

[0762] 따라서, 도 16(뿐만 아니라 도 15)는, CDK 4/6 억제제가 처리된 세포에서 G1-정지를 유도한다는 추가의 전제하에도, BRD2, BRD3, BRD4를 표적하는 브로모도메인 억제제가 XVir-N-3의 세포 치사 효과를 증사시킨다는 것을 나타내고 있다.

[0763] **실시예 20: CDK 4/6 억제제 LY-2835219(아베마시클립) 및 Wee-억제제 MK-1775(아다보세르팁)로 처리된 SK-N-MC 세포의 웨스턴 블롯 분석**

[0764] 1 x 10^6 세포를 10 cm 디쉬에 시딩하였다. 처리 24 시간 후에, 단백질을 1% SDS 완충액를 사용하여 분리하여, 핵막의 파괴를 달성하였다. 모든 샘플을 주사기 내로 여러번 흡인하여 DNA를 파괴하고, 후속하여 4℃에서 30분 동안 30000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 새로운 반응 튜브에 전달하고, 추가의 단계 동안 직접 사용하거나 -80℃에서 저장하였다. 단백질을 분리하기 위해서, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 수행하였다. 4℃에서 및 100V에서 대략 2 시간 동안의 전기영동에 의해서, 40 µg의 전체 단백질을 로딩하고 특이적 지시된 항체에 대해서 프로빙(probing)하였다.

[0765] 결과가 도 17에 도시되어 있다.

[0766] SK-N-MC 세포는 아베마시클립(Abenaciclib) 처리에 내성인 것으로 공지되어 있다(Dowless M et al.,2018, Clin Cancer Res: 24, 6028-6039). Wee1은 G2/M 세포 사이클 체크포인트 제어의 중요 성분이고, CDC2의 포스포릴화

를 조절함으로써 세포 사이클 정지를 매개한다. MK1775에 의한 Wee1의 억제는 상이한 유형의 암종에서의 DNA 손상제(DNA damaging agen)의 세포 독성 효과를 향상시키는 것으로 보고되었다. 몇몇의 연구는 소분자 키나아제 억제제 MK-1775에 의한 Wee1의 약리적 억제가 종양 세포 내의 Tyr15에서의 CDC2 포스포릴화의 제거를 유도함을 입증하였다. (Kreahling et al 2013, PLoS One. 8(3), e 57523). 비록, 강한 G1-정지가 조합 처리에서 관찰되었지만, Rb 및 E2F1 발현에서의 변화가 관찰되지 않는다.

[0767] **실시예 21: XVir-N-31, CDK4/6 억제제 아베마시클립 및 아다보세르팁(Wee-억제제 MK-1775)를 포함하는 삼중 요법**

[0768] 100.000 SK-N-MC 세포/웰를 12 웰 플레이트에 시딩하고 5% CO2에서 및 37℃에서 10% FCS를 함유하는 RPMI-배지에서 성장시켰다. 세포를 200 nM 아베마시클립으로 감염 24 시간 전에 그리고 다시 감염 1 시간 후에 적절한 양을 배지에 첨가함으로써 처리하였다. XVir-N-31의 감염을 혈청을 함유하지 않는 500 μl의 RPMI 배지에서 수행하였다. SRB-염색을 감염 5일 후에 수행하였다. Mock 처리된 세포를 100 % 세포 생존율로 설정하였다.

[0769] 결과가 도 18에 도시되어 있다.

[0770] 도 17(및 도 18)은 CDK 4/6 억제제 아베마시클립 및 Wee-억제제 MK-1775의 조합이 E2F1의 억제 없이 G1기 정지를 유도함을 입증한다. 도 18에서의 효능 분석은 이러한 조합이 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 XVir-N-31의 세포 치사 효과를 향상시키지 않았음을 나타낸다. 이들 결과는 CDK 4/6 억제제 아베마시클립과 Wee-억제제 MK-1775의 조합에 의해서 유도된 G1-정지가 XVir-N-31 세포 치사 능력을 촉진시키지 않았음을 명확하게 입증하고 있다. 따라서, E2F1 발현의 억제는 바이러스 종양 용해를 향상시키는 추가의 요건이다.

[0771] **실시예 22: E2F1 억제와 함께 G1기 정지는 CDK 4/6 억제제와 함께 XVir-N-31의 향상된 세포 치사를 위한 전제조건이다**

[0772] 처리 48 시간 후에, 세포를 PBS(RNase A를 함유함, 100 U/ml)로 2회 세척하였다. 세포를 트립신화시키고, 1500 rpm, 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포를 1 ml의 빙-냉 80% 에탄올을 한방울씩 펠릿에 서서히 첨가함으로써 고정시키고, 밤새 인큐베이션시켰다. 염색을 1ml의 염색 용액(프로피듐 요오딘(Propidium Iodine), 50 μg/ml)을 세포에 첨가하고 가볍게 흔들면서 실온에서 30 내지 60분 동안 인큐베이션함으로써 수행하였다. MK: MK-1775; LY: LY-2835219.

[0773] 결과가 도 19에 도시되어 있다.

[0774] 도 19로부터 입증되는 바와 같이, LY(아베마시클립)에 의한 SK-M-NC 세포의 처리는 세포 사이클에 영향이 없었다. MK-1775 처리 단독은 500 nM에서 G2/M에서의 세포의 증가를 유발시켰다. 둘의 조합은 강한 G1-정지를 유발시켰다.

[0775] **실시예 23: 바이러스 DNA 복제에 대한 E2F1 발현의 역할**

[0776] I.

[0777] 2 x 10^5 T24, A549, 및 HeLa 세포를 6 웰 플레이트에 웰 당 시딩하고, 10 % FBS, 페니실린/스트렙토마이신 및 비-필수 아미노산을 함유하는 1.5 ml RPMI 1640 배지(또는 DMEM-배지)에서 성장시켰다. 다음날에, 30 pmol siRNA - 음성 대조군 siRNA (Qiagen #1022076) 또는 siE2F1(Sigma # NM_005225, siRNA ID SASI_Hs01_00162220)을 150 μL Opti-MEM 배지에 희석시켰고, 9 μl 리포펙타민 RNAiMAX를 150 μL Opti-MEM에 제조하였다. siRNA-용액 및 리포펙타민 RNAiMAX 용액을 혼합하고 5분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 세포에 적가하였다. 48 시간 후에, RNA를 분리하고, RT-qPCR을 수행하였다.

[0778] 결과를 도 20에 도시한다. 도 20으로부터 입증되는 바와 같이, E2-초기 발현이 감소된다.

[0779] II.

[0780] 6 웰 플레이트의 각각의 웰을 위해서, 2 x 10^5 T24 세포를 10 % FBS, 페니실린/스트렙토마이신 및 비-필수 아미노산을 함유하는 1.5 ml RPMI 1640 배지에 시딩하였다. 다음날에, 30 pmol siRNA - 음성 대조군 siRNA (Qiagen #1022076) 또는 siE2F1(Sigma # NM_005225, siRNA ID SASI_Hs01_00162220)을 150 μL Opti-MEM 배지에 희석시켰고, 9 μl 리포펙타민 RNAiMAX를 150 μL Opti-MEM에 제조하였다. siRNA-용액 및 리포펙타민 RNAiMAX 용액을 혼합하고 5분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 T24 세포에 적가하였다. 감염을 48 시간 후에 세포를 400 μl의 혈청 비함유 배지 중의 10 MOI의 ADWTRGD와 함께 인큐베이션하고 플레이트를 10-15분 마다 흔들어 주는 동

안에 수행하였다. 1 시간 후에, 1.6 ml의 전체 배지를 첨가하였다. RNA 분리를 감염 24 시간 후에 수행하였다.

[0781] 결과가 도 21에 도시되어 있다.

[0782] III.

[0783] 세포를 차가운 PBS로 세정하고, MirVana Kit, Thermo Fisher catalog number AM1560로부터의 500 μl 용해 완충액을 첨가함으로써 파괴시키고, 용해물을 스파튤라(spatula)로 수거하고, 피펫으로 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 유기 추출을 위해서, 50 μl 균질액 첨가제를 첨가하고, 샘플을 얼음 상에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 500 μl의 산-페놀:클로로포름을 첨가하고, 샘플을 60초 동안 와동시키고, 얼음 상에서 2분 동안 인큐베이션시켰다. 샘플을 14 000 x g에서 그리고 실온에서 5분 동안 원심분리하여 수성상과 유기상을 분리하였다. 상부 상을 새로운 튜브로 주의해서 옮기고, 동일한 양의 이소프로판올을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후에, RNA를 침전(14 000 x g, 4℃, 30분)시키고, 1 mL의 75% 에탄올(원심분리기 7500 x g, 4℃, 5분)로 2회 세척하였다. RNA를 5 내지 10 분 동안 건조시키고 20-50μl RNase-비함유 물에 재현탁시키고, 500rpm, 55℃에서 10분 동안 진탕시킴으로써 재용해시키고, Nanodrop에 의해서 측정하였다. 1 μl 10 x DNAse I 반응 완충액, 9 μl 부피까지의 뉴클레아제 비함유 물, 1 μl DNaseI(1 U/μl)과 함께 1 μg RNA 샘플을 사용한 DNA 분해(데옥시리보뉴클레아제 I, Invitrogen Cat.No. 18068-015) 후에, 실온에서 15분 동안의 인큐베이션시키고, 1 μl 25 mM EDTA 용액의 첨가에 의해서 DNAseI를 불활성화시키고, 65 ℃에서 10분 동안의 가열하였다. 역전사를 고용량 cDNA 역전사 키트(Thermo Fisher/ Applied Biosystems™ Catalog number: 4368814)를 사용하여 수행하였다. 섬유 및 액틴 PCR을 위한 전사를 위한 무작위 헥사머의 사용, 및 E2 초기-PCR을 위한 전사를 위한 E2 초기 프라이머의 사용.

[0784] **사용된 프라이머 및 siRNA**

[0785] E2 초기 정방향: CCGTCATCTCTACAGCCCAT(SEQ ID NO: 19)

[0786] E2 초기 역방향: GGGCTTTGTCAGAGTCTTGC(SEQ ID NO: 20)

[0787] 섬유 정방향 : AAGCTAGCCCTGCAAACATCA(SEQ ID NO: 21)

[0788] 섬유 역방향: CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA(SEQ ID NO: 22)

[0789] 액틴 정방향: TCACCCACACTGTGCCCATCTACG(SEQ ID NO: 23)

[0790] 액틴 역방향: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG(SEQ ID NO: 24)

[0791] E2F1 정방향: CATCCCAGGAGGTCACTTCTG(SEQ ID NO: 25)

[0792] E2F1 역방향: GACAACAGCGGTTCTTGCTC(SEQ ID NO: 26)

[0793] 대조군 siRNA

[0794] 센스(Sense) UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT(SEQ ID NO: 27)

[0795] 안티센스(Antisense): ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT(SEQ ID NO: 28)

[0796] E2F1 siRNA

[0797] CUGAGGAGUUCAUCAGCCU[dT][dT](SEQ ID NO: 29)

[0798] AGGCUGAUGAACUCCUCAG[dT][dT](SEQ ID NO: 30)

[0799] RT-qPCR의해서 E2-초기 발현의 역할을 입증하기 위해서, 우측 프라이머를 선택하는 것이 절대적으로 필요하다. 프리이머 위치는 E2-초기와 E2-후기 프로모터 사이 이어야 한다. 그렇지 않으면, E2-후기 프로모터가 결과에 강하게 영향을 받을 수 있다. 프라이머의 위치가 도 22에 도시되어 있다.

[0800] 도 20 및 도 21로부터 입증되는 바와 같이, siRNA에 의한 E2F1의 하향-조절은 E2-초기 발현의 증가를 유발시킨다. 이는 E2-초기 발현에서의 E2F1의 억압적인 역할에 의해서 단지 설명될 수 있다. E2F1가 활성화제라면, E2-초기 발현의 감소가 발생할 것이다. 또한, E2F1에 대한 siRNA는 CDK 4/6 억제제의 효과를 의태하며, 이는 또한 E2F1 발현을 억제한다(Yang C et al., Oncogene 2017, 36,2255-2264).

[0801] **실시예 24: 아데노바이러스 E2-초기 프로모터에서의 두 E2F1-결합 부위의 돌연변이를 갖는 재조합 아데노바이러스는 증가된 E2-초기 발현을 나타낸다**

[0802] 아데노바이러스성 E2 초기 프로모터의 두 E2F1-결합 부위에서 돌연변이를 갖는 돌연변이 아데노바이러스를 생성시켰다. 야생형 E2 초기 프로모터와 돌연변이 E2 초기 프로모터 둘 모두의 프로머터가 도 23(SEQ ID Nos 44, 45, 46 및 47)에 도시되어 있다.

[0803] RNA-발현 분석을 감염 후 24시간에 RT-qPCR에 의해서 얻은 AdWT-RGD 및 AdE2Fm(또한 RGD 모티브를 함유함) 감염된 T24 세포에서 수행하였다. AD-WT 유전자 발현을 100%로 설정하였다. 방법은 실시예 23의 섹션 III에서 기재된 방법과 동일하였다.

[0804] 결과가 도 24에 도시되어 있다.

[0805] 도 24로부터 입증되는 바와 같이, E2-초기 유전자 발현의 발현은 AD-WT 감염된 세포에 비해서 AdE2Fm 감염된 세포에서 더 높았다. 따라서, E2F1이 E2-초기 프로모터 활성화에서 억제 역할을 하는 것으로 결론지어져야 한다. 이것은 E2F1이 활성화제인 것으로 가정되는 현재의 이해와 매우 대조적이다(DeCaprio JA, Virology. 2009 Feb 20;384(2):274-84).

[0806] 모든 현재 공지된 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 내의 E2-부위의 구조는 도 22에 도시된 바와 같이 형성되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, E2F1의 작용 방식은 본원에서 기재된 바와 동일하다. 결과적으로, 이들, 즉, 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스의 모두는 ColoAd1 및 델타-24-RGD를 포함한 CDK 4/6 억제제와 함께 사용될 수 있다.

[0807] ColoAd1은 다음과 같이 특성화될 수 있다:

[0808] 에나데노툭시레브(이전에는 ColoAd1)는 입증된 전임상 활성을 갖는 종양-선택적 키메라 아데노바이러스이다. ColoAd1의 캡시드(capsid)는 Ad11p, 즉, 인간에서의 제한된 혈청 유병율(seroprevalence)을 갖는 형청형이다. EnAd는 CD46 및/또는 데스모글레인 2,6에 결합됨으로써 세포를 감염시키며, 둘 모두는 많은 암종 세포에서 광범위하게 발현된다. EnAd 게놈의 대부분은 E3에서 큰 삭제 및 E4에서 더 작은 삭제를 갖는 Ad11p로부터 유도된다. 또한, E2B 부위는 Ad11p로부터의 서열들의 키메라 및 Ad3으로 이루어진다. EnAd에서의 E4 삭제는 E4ORF4 내에 있으며, 이는 Ad5에서 단백질을 인코딩하고, 그러한 단백질은 단백질 포스파타제 2A를 불활성화시키고, 그에 의해서, 단백질 번역 기계를 활성화시킬 뿐만 아니라, 피드백 억제 루프에서의 E1A 단백질의 활성을 조절한다. 아마도 키메라 E2B 부위와 조합된 이들 삭제는, 가능하게는 EnAd의 두드러진 암-선택적 복제에 기여한다(Deyer et al., Mol Ther Oncolytics. 2017, 16; 5: 62-74).

[0809] 델타-24-RGD(DNX-2401)은 다음과 같이 특성화될 수 있다:

[0810] 델타-24-RGD(DNX-2401)는 p16/RB/E2F1 경로의 이상(abnormality)을 갖는 종양 세포를 우선적으로 복제하거나 그를 용해시키도록 조작된 조건부 복제-컴피턴트 종양 세포 붕괴성 바이러스이다(Fueyo et al., Oncogene. 2000 Jan 6;19(1):2-12). Rb 경로를 표적화하는 돌연변이 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스는 생체내에서 항-신경아교종을 생성시킨다(Dai B. et al. Mol Cancer Therapy. 2017 Apr;16(4):662-670).

[0811] **실시예 25:XVir-N-31, CDK4/6 억제제 팔보시클립 및 PARP 억제제 탈라조파립을 포함한 삼중 요법 및 T24 및 UMUC-3 세포의 FACS 분석**

[0812] **효능-분석/SRB-염색**

[0813] 단독 및 소분자 억제제 팔보시클립 및 탈라조파립과의 조합에 의한 바이러스 감염된 세포 치사의 효과를 12-웰 플레이트에서 분석하였다. 이를 위해서, 12.5x10^3 T24 또는 6.3 x10^3 UMUC-3/253J 세포를 씨딩하고 24 시간 후에 XVir-N-31의 증가하는 농도(감염 다중도(multiplicity of infection: MOI))로 감염시켰다. 지시된 소분자 억제제와의 조합 치료를 위해서, 세포를 각각의 농도의 탈라조파립, 팔보시클립 및 이들 둘 모두의 약물의 조합물로 감염 24 시간 전 및 감염 1 시간 후(hour post infection: hpi) 처리하였다. 세포를 소 태아 혈청(fetal bovine serum: FBS) 없이 200 μl 배지 중에서 지시된 바이러스로 삼중으로 감염시켰다. 1 hpi에서, 소분자 억제제를 함유하거나 함유하지 않은 완전 배지를 세포에 첨가하였다. 감염 4일(T24) 또는 5일(UMUC-3/253J) 후(days post infection: dpi)에, 세포를 4℃에서 1 시간 동안 10% 트리클로로아세트산(TCA)으로 고정시키고, 실온에서 30 분 동안 설포로다민 B(SRB)로 염색한 다음, 1% 아세트산으로 세척하여 과량의 SRB를 제거하였다. 건조된 SRB를 10mM 트리스 염기에 용해시키고, 정량화를 562 nm에서 다중라벨 플레이트 리더(multilabel plate reader)(PerkinElmer Victor X3)을 사용한 측광 측정(photometric measurement)에 의해서 수행하였다.

[0814] 결과를 도 35, 36 및 37에 나타낸다.

[0815] **FACS-분석**

[0816] 방광 암 세포주 T24 및 UMUC-3의 세포 사이클에 지시된 농도로 적용된 소분자 억제제의 영향을 DNA 염색 후 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 통해서 분석하였다. $5x10^4$ 세포를 6-웰 플레이트에 씨딩하고, 24 시간 후에, 적절한 억제제로 처리하였다. 2일 후에, 약 80% 컨플루언시(confluency)에서, 세포를 PBS로 세척하고, 트립신화시키고, 다시 세척하고, 빙냉 80 % 에탄올로 고정시켰다. 세포 사이클 분석을 위해서, 샘플을 DNA-삽입성 염료 7-아미노액티노마이신 D(7-AAD)와 함께 인큐베이션하고, FACS 분석을 통해서 측정하였다. 측정된 데이터의 평가를 소프트웨어 FlowJo를 통해서 수행하였다.

[0817] 결과를 도 38에 나타낸다.

[0818] 도 35, 36 및 37에 도시된 결과는 팔보시클립, 탈라조파립 및 XVir-N-31로 이루어진 삼중 요법이 세포 치사와 관련하여 단일 요법 또는 조합 요법에 비해서 우수한 성능을 나타냈음을 명확하게 입증하고 있다.

[0819] 도 38에 도시된 처리된 방광 세포 T24 및 UMUC-3의 FACS 분석은 증가된 바이러스 복제에 요구되는 G1 정지가 PARP 억제제 탈라조파립의 첨가에 의해서 영향을 받지 않음을 나타낸다.

[0820] **실시예 26:XVir-N-31, CDK4/6 억제제 팔보시클립 및 브로모도메인 억제제 JQ-1를 포함한 삼중 요법**

[0821] **효능 분석**

[0822] 바이러스 단독 및 소분자 억제제와 조합에 의한 바이러스 감염된 세포 치사의 효과를 12-웰 플레이트에서 분석하였다. 이를 위해서, $2x10^4$ 세포(Cal-33)를 씨딩하고 24 시간 후에 XVir-N-31의 세포 당 5개의 감염성 바이러스 입자(감염 다중도(multiplicity of infection: MOI))로 감염시켰다. 지시된 소분자 억제제와의 조합 치료를 위해서, 세포를 100 nM 팔보시클립, 100 nM JQ-1 및 이들 둘 모두의 약물의 조합물로 감염 24 시간 전 및 감염 1 시간 후(hpi) 처리하였다. 세포를 FBS 없이 200 μl 배지 중에서 지시된 바이러스로 삼중으로 감염시켰다. 1 hpi에서, 소분자 억제제를 함유하거나 함유하지 않은 완전 배지를 세포에 첨가하였다. 감염 4일 후(days post infection: dpi)에, 세포를 4℃에서 1 시간 동안 10% 트리클로로아세트산(TCA)으로 고정시키고, 실온에서 30 분 동안 설포로다민 B(SRB)로 염색한 다음, 1% 아세트산으로 세척하여 과량의 SRB를 제거하였다. 건조된 SRB를 10mM 트리스 염기에 용해시키고, 정량화를 562 nm에서 다중라벨 플레이트 리더(PerkinElmer Victor X3)을 사용한 측광 측정에 의해서 수행하였다.

[0823] **아데노바이러스 복제 분석**

[0824] **섬유 qPCR**

[0825] **DNA 분리**

[0826] DNA의 정제를 위해서, 배지를 흡출시키고, 200 μl 용해-완충액을 웰에 첨가하였다. 프로테이나아제 K를 용액에 첨가한 후에, 56℃에서 10분 동안 인큐베이션을 수행하였다. 200 μl 페놀-클로로포름-이소아밀알코올을 바이러스-세포-용해물에 첨가하였다. 와동(vortexing) 및 얼음 상에서의 5분 동안의 후속 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g로 3분 동안 원심분리하여 상을 분리하였다. 상부 수성 상을 상의 더 우수한 가시화를 위한 10 mM TrisCl 중의 200 μl 클로로포름 및 20 μl 크레졸 레드(cresol red)를 함유하는 새로운 스냅 컵(snap cap)에 옮겼다. 와동 및 얼음 상에서의 5분 동안의 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g로 3분 동안 원심분리를 수행하였다. 다시, 상부 수성 상을 800 μl 에탄올 및 50 μl 3M 소듐 아세테이트 용액과 조합하였다. 2 μl 글리코겐 용액을 첨가하여, 더 우수한 침전을 달성시켰다. 튜브의 짧은 역전 후에, 용액을 4℃에서 16430 g로 30분 동안 원심분리하였다. 후속하여, DNA 펠릿을 400 μl 70% 에탄올에 의해서 덮고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실온에서 4760 g로 7분 동안 원심분리 후에, DNA 펠릿을 37℃에서 약 5 내지 10분 동안 건조시켰다. 후속하여, 펠릿을 100 μl 0,1xTE-완충액에 용해시키고, 40℃에서 400 rpm으로 약 3 시간 동안 진탕시켰다. DNA가 완전히 용해되면, DNA 농도를 측정을 위한 2 μl의 DNA 용액 및 블랭크 용액으로서의 0,1xTE-완충액을 사용하여 분광 광도계에 의해서 측정하였다. 이어서, DNA를 4℃에서 저장하였다.

[0827] **실시간 PCR**

[0828] 바이러스 복제를 아데노바이러스 특이적 섬유-정량적 PCR(qPCR)에 의해서 분석하였다. ΔΔCT 방법을 사용하여, XVir-N-31의 복제를 세포에 대한 바이러스의 진입 수준(4 hpi 값)과 관련한 세포 당 바이러스성 DNA 복사체(세포성 β-액틴으로 표준화)로부터 계산하였다. Cal-33 세포를 6-웰 플레이트(웰 당 $1,5x10^5$)에 씨딩하고, 지시된

억제제로 24 시간 동안 전처리하였다. 다음날, 세포를 FBS 없이 400 μl 배지 중의 10 MOI의 XVir-N-31로 감염시켰다. 1 hpi에서, 소분자 억제제를 함유하거나 함유하지 않은 완전 배지를 세포에 첨가하였다. DNA 추출을 위해서, 세포를 4, 24 및 48 hpi에서 수거하였다. 이어서, DNA를 페놀 클로로포름 추출 방법을 이용하여 분리하였다. 대조군 샘플(추가의 소분자 억제제 없이 10 MOI XVir-N-31)의 배수-변화(fold-change)의 via qPCR 측정된 값을 1.0으로 설정하였고, 추가의 샘플의 배수 변화를 그들과 관련하여 플롯팅하였다. 정량적 PCR을 이하 사이클링 조건 하에 SYBR Green Mastermix(Eurogentec)으로 96-웰 플레이트 상에서 수행하였다: 2분 및 45 사이클 동안 95℃ 15초 동안 94℃, 15초 동안 60℃, 15초 동안 72℃. 유전자 발현을 ΔΔCT-방법을 이용하여 계산하였다.

[0829] 바이러스성 DNA의 검출을 위해서, 이하 특이적 프라이머를 사용하였다:

[0830] 액틴 fwd. 5`-TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTG-3` (SEQ ID NO: 31)

[0831] 액틴 rev. 5`-AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG-3` (SEQ ID NO: 32)

[0832] 섬유 fwd. 5`-AAGCTAGCCCTGCAAACATCA-3` (SEQ ID NO: 33)

[0833] 섬유 rev. 5`-CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA-3` (SEQ ID NO: 34)

[0834] A673 세포(ATCC CRL 1598): 1973년에 확립된 유잉 육종 세포주(Ewing sarcoma cell line). 문헌[Martinez-Ramirez et al. 2003]. 분자 세포 유전학에 의한 A673 세포주(유잉 종양)의 특성화. 문헌[Cancer Genet Cytogenet. Mar;141(2):138-42].

[0835] Cal-33 세포: 혀 편평 상피 세포 암종. CAL 33은 치료제의 시험을 위한 광범위하게 사용되는 두경부 편평 상피 세포 암(head and neck squamous cell cancer: HNSCC) 세포주이다.

[0836] **결과**

[0837] 5, 10 및 20의 MOI로의 Xvir-N-31 단독, CDK4/6 억제제 아베마시클립과의 조합, 브로모도메인 억제제 JQ-1와의 조합 또는 CDK4/6 억제제 아베마시클립 및 브로모도메인 억제제 JQ-1과의 조합을 사용한 유잉 육종 세포주 A673에 대한 효능 분석의 결과가 도 39에 도시되어 있다.

[0838] 두경부 편평 상피 세포 암종(HNSCC) 세포 Cal-33에 대한 효능 분석의 결과가 도 40 및 도 41에 도시되어 있다.

[0839] QPCR을 이하 처리 조건 하에 바이러스 복제를 분석하기 위해서 수행하였다: XVir-N-31 MOI:10; 100 nM 팔보시클립, 100 nM JQ-1; 세포주: Cal-33; 감염 24 시간 후 및 감염 48 시간 후 분석). 감염을 JQ-1, 팔보시클립 또는 이들 둘 모두(조합)에 의한 처리 24 시간 후에 10 MOI의 XVir-N-31로 수행하였다. 4, 24 및 48 시간 후, DNA를 분리하고, 바이러스 복제를 측정하기 위한 실시간 PCR을 수행하였다. 얻은 결과를 β-액틴 및 4 시간 값으로 표준화하였다.

[0840] 결과가 도 42a 및 도 42b에 도시되어 있다. 모든 세포주에서 삼중 요법은 단일요법 도는 어떠한 이중 요법, 즉, XVir-N-31 + CDK4/6 억제제; XVir-N-31 + 브로모도메인 억제제; 및 CDK4/6 억제제 + 브로모도메인 억제제보다 우수하였다.

[0841] **실시예 27:XVir-N-31, CDK4/6 억제제 팔보시클립 및 누틀린 및 누틀린-유도체를 포함한 삼중 요법**

[0842] **실시예 27.1방법 및 재료**

[0843] **효능-분석/SRB-염색**

[0844] XVir-N-31 단독 및 소분자 억제제와의 조합을 사용한 세포 치사를 12-웰 플레이트에서 분석하였다. 이를 위해서, 20.000 T24 또는 25.000 UMUC-3 세포를 씨딩하고, 24 시간 후에 XVir-N-31의 증가하는 농도(감염 다중도(multiplicity of infection: MOI))로 감염시켰다. 지시된 소분자 억제제와의 조합 치료를 위해서, 세포를 감염 24 시간 전에 각각의 농도의 누틀린-3a 또는 이다사누틀린, 팔보시클립 및 이들 둘 모두의 약물의 조합으로 처리하였다. 세포를 FBS 없이 250 μl 배지 중에서 지시된 바이러스로 삼중으로 감염시켰다. 1 hpi에서, 팔보시클립을 함유하는 완전 배지를 팔보시클립으로 전처리된 세포에 첨가하였다. 대조군 뿐만 아니라 누틀린 처리된 세포에, 억제제를 함유하지 않는 완전 배지를 첨가하였다. 감염 4일 후(dpi)에, 세포를 4℃에서 1 시간 동안 10% 트리클로로아세트산(TCA)으로 고정시키고, 실온에서 적어도 30 분 동안 1% 아세트산 중의 0,05% 설포로다민 B(SRB)로 염색한 다음, 1% 아세트산으로 세척하여 과량의 SRB를 제거하였다. 플레이트를 사진 촬영한 후에, 건조된 SRB를 10mM 트리스 염기에 용해시키고, 정량화를 562 nm에서 다중라벨 플레이트 리더(PerkinElmer Victor

X3)을 사용한 측광 측정에 의해서 수행하였다.

[0845] **FACS-분석**

[0846] 방광 암 세포주 T24 T24shRb, UMUC-3 및 RT112의 세포 사이클에 지시된 농도로 적용된 소분자 억제제의 영향을 DNA 염색 후 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 통해서 분석하였다. 이를 위해서, $5x10^4$ 세포를 6-웰 플레이트에 씨딩하고, 24 시간 후에, 적절한 억제제로 처리하였다. 2일 후에, 약 80% 컨플루언시(confluency)에서, 세포를 PBS로 세척하고, 트립신화시키고, 다시 세척하고, 빙냉 80% 에탄올로 고정시켰다. 세포 사이클 분석을 위해서, 샘플을 프로포듐 요오딘(propodium iodine: PI)과 함께 인큐베이션하고, FACS 분석을 통해서 측정하였다. 측정된 데이터의 평가를 소프트웨어 FlowJo를 통해서 수행하였다.

[0847] **아데노바이러스 복제**

[0848] **섬유 qPCR**

[0849] **DNA 분리**

[0850] DNA의 정제를 위해서, 배지를 흡출시키고, 200 μl 용해-완충액을 웰에 첨가하였다. 프로테이나아제 K를 용액에 첨가한 후에, 56℃에서 10분 동안 인큐베이션을 수행하였다. 200 μl 페놀-클로로포름-이소아밀알코올을 바이러스-세포-용해물에 첨가하였다. 와동 및 얼음 상에서의 5분 동안의 후속 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g로 3분 동안 원심분리하여 상을 분리하였다. 상부 수성 상을 상의 더 우수한 가시화를 위한 10 mM TrisCl 중의 200 μl 클로로포름 및 20 μl 크레졸 레드를 함유하는 새로운 스냅 컵에 옮겼다. 와동 및 얼음 상에서의 5분 동안의 인큐베이션 후에, 4℃에서 16430 g로 3분 동안 원심분리를 수행하였다. 다시, 상부 수성 상을 800 μl 에탄올 및 50 μl 3M 소듐 아세테이트 용액과 조합하였다. 2 μl 글리코겐 용액을 첨가하여, 더 우수한 침전을 달성시켰다. 튜브의 짧은 역전 후에, 용액을 4℃에서 16430 g로 30분 동안 원심분리하였다. 후속하여, DNA 펠릿을 400 μl 70% 에탄올에 의해서 덮고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 실온에서 4760 g로 7분 동안 원심분리 후에, DNA 펠릿을 37℃에서 약 5 내지 10분 동안 건조시켰다. 후속하여, 펠릿을 100 μl 0,1xTE-완충액에 용해시키고, 40℃에서 400 rpm으로 약 3 시간 동안 진탕시켰다. DNA가 완전히 용해되면, DNA 농도를 측정을 위한 2 μl의 DNA 용액 및 블랭크 용액으로서의 0,1xTE-완충액을 사용하여 분광 광도계에 의해서 측정하였다. 이어서, DNA를 4℃에서 저장하였다.

[0851] **실시간 PCR**

[0852] 바이러스 복제를 아데노바이러스 특이적 섬유-정량적 PCR(qPCR)에 의해서 분석하였다. ΔΔCT 방법을 사용하여, XVir-N-31의 복제를 세포에 대한 바이러스의 진입 수준(4 hpi 값)과 관련한 세포 당 바이러스성 DNA 복사체(세포성 β-액틴으로 표준화)로부터 계산하였다. T24 및 T24shRb 세포를 6-웰 플레이트(웰 당 $5x10^5$)에 씨딩하고, 지시된 억제제로 24 시간 동안 전처리하였다. 다음날, 세포를 FBS 없이 400 μl 배지 중의 20 MOI의 XVir-N-31로 감염시켰다. 1 hpi에서, 팔보시클립을 함유하는 완전 배지를 팔보시클립으로 이미 전처리된 세포에 첨가하였다. 대조군 및 누틀린으로 처리된 세포에, 억제제를 함유하지 않는 완전 배지를 첨가하였다. DNA 추출을 위해서, 세포를 4 및 48 hpi에서 수거하였다. 이어서, DNA를 페놀 클로로포름 추출 방법을 이용하여 분리하였다. 대조군 샘플(추가의 소분자 억제제 없이 20 MOI XVir-N-31)의 배수-변화(fold-change)의 via qPCR 측정된 값을 1.0으로 설정하였고, 추가의 샘플의 배수 변화를 그들과 관련하여 플롯팅하였다. 정량적 PCR을 이하 사이클링 조건 하에 SYBR Green Mastermix(Eurogentec)으로 96-웰 플레이트 상에서 수행하였다: 2분 및 45 사이클 동안 95℃ 15초 동안 94℃, 15초 동안 60℃, 15초 동안 72℃. 유전자 발현을 ΔΔCT-방법을 이용하여 계산하였다.

[0853] 바이러스성 복사체의 검출을 위해서, 이하 특이적 프라이머를 사용하였다:

[0854] 액틴 fwd. 5`-TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTG-3` (SEQ ID NO: 35)

[0855] 액틴 rev. 5`-AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG-3` (SEQ ID NO: 36)

[0856] 섬유 fwd. 5`-AAGCTAGCCCTGCAAACATCA-3` (SEQ ID NO: 37)

[0857] 섬유 rev. 5`-CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA-3` (SEQ ID NO: 38)

[0858] **실시예 27.2 T24 세포에 대한 XVir-N-31, 누틀린-3a 및 팔보시클립을 포함하는 삼중 요법**

[0859] T24 세포를 사용한 효능 분석을 XVir-N-31 단독, XVir-N-31과 누틀린-3a, XVir-N-31과 팔보시클립, 및 누틀린-

3a과 팔보시클립 둘 모두와의 XVir-N-31의 세포 치사 효과를 측정하기 위해서 수행하였다.

[0860] 결과가 도 44 및 도 45에 도시되어 있다.

[0861] 도 44 및 도 45로부터 입증되는 바와 같이, 팔보시클립에 의한 T24 세포의 전처리가 XVir-N-31에 의한 세포 치사를 증가시켰다. 팔보시클립 및 누틀린-3a와의 조합 치료는 이러한 효과를 향상시켰다. 또한, 누틀린-3a 처리는 XVir-N-31 및 팔보시클립의 조합에 대해서 관찰된 세포 치사를 향상시켰다.

[0862] **실시예 27.3 T24 shRB 세포에 대한 XVir-N-31, 누틀린-3a 및 팔보시클립을 포함하는 삼중 요법**

[0863] 실시예 27.2에 대한 대상과 동일한 효능 분석을 T24shRB 세포를 사용하여 수행하였다. T24shRB 세포는 Rb 발현이 없는 T24 세포이다. 그러한 결핍 Rb 발현은 렌티바이러스 트랜스펙션(lentiviral transfection)에 의해서 생성되었고, 렌티바이러스는 Rb에 대한 shRNA에 대해서 코팅하였다. 사용된 렌티바이러스 벡터는 pLKO-RB1-shRNA19(Watertown, MA 02472, USA 소재의 Addgene로부터 얻음)이었고, shRNA의 서열은 다음과 같았다: CAGAGATCGTGTATTGAGATTCTCGAGAATCTCAATACACGATCTCTG (SEQ ID NO: 39). 절차는 또한 문헌[Michaud K et al. (Cancer Res. 2010 Apr 15. 70(8):3228-38)]에 기재되어 있다.

[0864] 결과는 도 46 및 도 47에 도시되어 있다.

[0865] 도 46 및 도 47로부터 입증되는 바와 같이, 누틀린-3a 또는 팔보시클립 단독에 의한 처리는 XVir-N-31에 의한 Rb-음성 세포(T24shRb)의 치사에서 효과가 없었다. 단지 팔보시클립과 누틀린-3a의 조합이 XVir-N-31 매개된 세포 치사에서 증가를 나타냈다. 이를 위해서, 누틀린-3a는 Rb-음성 세포를 위해서 처리된 XVir-N-31 및 팔보시클립을 사용한 이중 조합 요법의 종양 세포 붕괴성 효과를 향상시켰다.

[0866] **실시예 27.4 T24 세포 및 T24shRb 세포에 대한 XVir-N-31, 이다사누틀린 및 팔보시클립을 포함한 삼중 요법**

[0867] T24 세포를 사용한 효능 분석을 XVir-N-31, 이다사누틀린과의 XVir-N-31, XVir-N-31과 팔보시클립, 및 XVir-N-31, 이다사누틀린 및 팔보시클립의 세포 치사 효과를 측정하기 위해서 수행하였다.

[0868] 결과는 도 48 및 도 49에 도시되어 있다.

[0869] T24shRb 세포를 사용한 유사한 효능 분석을 XVir-N-31, 이다사누틀린과의 XVir-N-31, XVir-N-31과 팔보시클립, 및 XVir-N-31, 이다사누틀린 및 팔보시클립의 세포 치사 효과를 측정하기 위해서 수행하였다.

[0870] 결과는 도 50 및 도 51에 도시되어 있다.

[0871] 도 48 내지 도 51로부터 입증되는 바와 같이, 이다사누틀린은 XVir-N-31 및 CDK4/6 억제제를 사용한 삼중 요법에서 누틀린-3a와 유사한 효과를 가졌다.

[0872] **실시예 27.5: 실시예 27.2 내지 실시예 27.4에 주어진 조건 하에 XVir-N-31의 복제의 분석**

[0873] T24shRb 세포 및 T24 세포에서의 XVir-N-31의 복제를 ΔΔCT 방법을 사용하여 바이러스성 DNA를 측정함으로써 분석하였다.

[0874] 실험 셋업은 다음과 같다:

[0875] 바이러스 복제를 24 시간 및 48 시간 후에 측정하였다. 감염을 누틀린-3a, 팔보시클립 또는 이들 둘 모두(조합)로 처리 24 시간 후에 20 MOI의 XVir-N-31로 수행하였다. 4 시간 및 48 시간 후에, DNA를 분리하고, 실시간 PCR을 수행하여 바이러스 복제를 측정하였다. 얻은 결과를 ΔΔCT 방법에 따라서 ß-액틴 및 4 시간 값으로 표준화하였다.

[0876] 결과는 도 52에 도시되어 있다.

[0877] 도 52로부터 입증되는 바와 같이, 누틀린-3a는 팔보시클립과의 조합에서 바이러스성 DNA에서의 증가를 나타냈다. 상대적인 섬유 DNA가 팔보시클립 처리된 T24 세포에서 이미 놓았지만, 누틀린-3a과의 조합은 미처리 대조군보다 거의 10x 더 높은 값을 나타냈다. Rb-음성 T24shRb 세포에서, 효과는 단지 누틀린-3a, 팔보시클립 및 XVir-N-31를 조합하는 때에 발생했다. 여기에서, 팔보시클립 단독은 대조군에 비해서 바이러스성 DNA에 대한 덜 두드러진 효과를 가졌다.

[0878] 웨스턴 블롯 분석을 누틀린-3a(5 μM, 10 μM 또는 30 μM), 팔보시클립 (500 μM) 또는 둘 모두(조합으로)로 처리된 T24shRb 세포에 대해서 수행하였다. 결과는 도 53에 도시되어 있다.

[0879] 팔보시클립 및/또는 누틀린-3a(누틀린-3a(5 μM 10 μM 또는 30 μM), 팔보시클립(500 μM) 또는 이들 둘 모두(조합으로))에 의한 치료 후의 도 53에 도시된 E2F1 단백질 수준이 도 54에 도시되어 있다. 미처리 세포의 E2F1 단백질 수준을 "1"로 설정하였다.

[0880] 도 53 및 도 54로부터 입증되는 바와 같이, 30 μM 누틀린-3a 및 500 nM 팔보시클립과의 조합 치료는 단일요법에 비해서 E2F1의 상대적인 양을 감소시켰다.

[0881] **실시예 27.6: 실시예 27.5의 처리로부터 얻은 세포의 FACS 분석**

[0882] 실시예 27.5에 개괄된 바와 같이 처리된 세포를 FACS 분석에 가하였다. 추가로, UMUC 세포 및 RT112 세포를 실시예 27.5에서 기재된 바와 동일한 치료 요법에 가하였다.

[0883] 결과가 T24 세포의 경우 도 55a에, T24shRb 세포의 경우 도 55b에, UMUC-3 세포의 경우에 도 55c에 및 RT112 세포의 경우에 도 55d에 도시되어 있다.

[0884] G1에서의 세포 백분율에 초점을 둔 도 55a 내지 도 55d에 도시된 결과의 추가의 분석 결과가 T24 세포의 경우 도 56a에, T24shRb 세포의 경우 도 56b에, UMUC-3 세포의 경우에 도 56c에 및 RT112 세포의 경우에 도 56d에 도시되어 있다.

[0885] 상기 도 55a 내지 도 55d 및 도 56a 내지 도 56d로부터 입증되는 바와 같이, 모든 세포주에서의 G0/G1 정지에 대한 효과가 조합으로의 누틀린-3a와 팔보시클립에 의해서 처리되는 때에 가장 두드러졌다.

[0886] **실시예 28:처리 아교모세포종에서의 브로모도메인 억제제 JQ1 및 XVir-N-31을 포함한 조합 요법**

[0887] $2x10^4$ 세포(U87 세포, LN229 세포 또는 T98G 세포)를 DMEM 배지 내의 12 웰 플레이트에 씨딩하고, 다음날에 억제제로 처리하였다. 씨딩 48 시간 후에, 세포를 XVir-N-31로 감염시켰다. 4일 후에, 세포를 10% TCA를 사용하여 고정시켰다. 플레이트를 0,1% SRB 용액을 사용하여 염색시켰다. 과량을 제거하고, 플레이트를 1% 아세트산으로 세척하였다. 아세트산을 제거한 후에, 플레이트를 밤새 공기 건조시켰다. SRB를 1 ml의 10mM 트리스 염기 용액에 용해시키고, 1:10 희석액을 560nm에서 광도계를 사용하여 측정하였다.

[0888] 결과는 도 57, 도 58 및 도 59에 도시되어 있다.

[0889] 도 57, 도 58 및 도 59로부터 입증되는 바와 같이, JQ1 및 XVir-N-31의 조합은 강하게 향상된 세포 치사를 유도한다. CDK4/6 억제제 LEE011을 사용하여, 세포 치사는 모든 세 가지의 아교모세포종 세포주에서 심지어 더 증가될 수 있다.

[0890] **실시예 29: JQ1과 리보시클립의 조합에 대한 노출 시의 XVir-N-31의 복제**

[0891] $1x10^5$ 세포를 DMEM 배지 중에 6 웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음 날, 세포를 500 nM LEE011 및 50 nM JQ1로 처리하였다. 다음날 아침에, 세포를 각각 U87 및 LN229에 대해서 20 MOI로 감염시켰고, T98G에 대해서 50 MOI로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, 억제제를 함유하는 DMEM 배지를 세포 상에 첨가하였다. 각각의 시점(4, 24, 48 시간) 후에, 세포를 PBS로 한번 세척하고, 200μl의 SDS DNA 용해 완충액을 첨가하였다. 세포를 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 정제를 수행하기 전에 1 시간 동안 프로테이나아제 K와 함께 인큐베이션하였다. DNA를 1xTE 완충액에 희석시키고, DNA의 농도를 Nanodrop을 사용하여 측정하였다. 각각의 샘플에 대해서, 10 ng/μl의 용액을 제조하고, RT-qPCR은 50 ng의 DNA 및 GoTaq Master mix를 사용한다. 특이적 섬유 정방향 및 역방향 프라이머(Specific Fiber forward and reverse primer)를 사용하였고, Δct 값의 계산을 위해서, 특이적 액틴 프라이머를 또한 사용하였다. 각각의 샘플에 대해서, 3개의 섬유 및 2개의 액틴 값을 측정하였다. 계산은 엑셀에서 수행되었고, 각각 24 시간 및 48 시간이 이의 4 시간 값(복제 전 초기 바이러스 진입)을 기반으로 하여 계산되었다.

[0892] 결과가 도 60, 도 61 및 도 62에 도시되어 있다.

[0893] 도 60, 도 61 및 도 62로부터 입증되는 바와 같이, XVir-N-31은 JQ1에 노출되는 때에 복제에서 높은 증가를 나타냈다. 두 가지 세포주에서, 이러한 효과는 CDK4/6 억제제 LEE011(LEE)의 사용에 비해서 훨씬 높았다. 모든 세 가지 세포주에서, 바이러스 복제의 증가는 JQ1 및 LEE011(LEE) 둘 모두의 조합이 사용되는 때에 가장 높았다.

[0894] **실시예 30:XVir-N-31 감염된 암 세포의 웨스턴 블롯 분석**

[0895] $2,5x10^5$ LN229 세포를 DMEM 배지 중의 10 cm 플레이트에 씨딩하였다. 다음 날에, 세포를 500 nM LEE011 및 200

nM JQ1, 또는 이들 둘 모두의 조합으로 처리하였다. 다음날 아침에, 세포를 20 MOI로 XVir-N-31로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, 억제제를 함유하는 DMEM 배지를 세포 상에 첨가하였다. 각각의 시점(24, 48, 72 시간) 후에, 세포를 얼음상에 올려놓고, 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 300㎕의 SDS 단백질 용해 완충액을 첨가하였다. 세포를 반응 튜브에 옮기고, DNA를 주사기 및 바늘로 공유시키고, 상등액을 원심분리 후에 추가의 사용을 위해서 옮겼다. 단백질 농도를 BCA 분석으로 측정하였고, 4x Lammli:DTT 6:1 및 20㎍의 농도를 갖는 샘플을 생성시키고, 10% SDS 겔에 옮겼다. 겔 전기영동을 90V에서 시작하였고, 사다리(ladder)가 분리되기 시작한 후에 150V로 증가시켰다. 겔 상의 단백질을 100V에서 2 시간 동안 막에 블로팅(blotting)하고, RT에서 1 시간 동안 TBS-T 중의 5% 우유 중에서 블로킹(blocking)하였다. TBS-T에서 세척한 후에, 첫 번째 항체를 4℃에서 밤새 제조자 정보에 따라서 첨가하였다. 사용된 항체는 모든 시점에 대해서 GAPDH, E1A, DBP, E2F1, Rb, pRb에 대해서 지시되었고, 추가로 72 시간 샘플에 대해 카스파제 3(caspase 3) 및 PARP의 전장 및 절단된 버전에 대해서 지시되었다. 다음날, 세척을 반복하였고, 이차 항체를 RT에서 1 시간 동안 첨가하였다. 세척 후에, ECL을 사용하여 ChemiDocTM MP Imaging System에 의해 화학 발광을 영상화하였다.

[0896] 결과가 도 63, 도 64, 도 65 및 도 66에 도시되어 있다.

[0897] 도 63에 도시된 바와 같이, 바이러스성 단백질 E1A 및 DBP는 500 nM LEE011 또는/및 200 nM JQ-1와의 XVir-N-31의 조합 처리에 의해서 증가되었다. 세포성 단백질 Rb 및 pRb는 이들 샘플에서 억제되어 유지되었다(레인 5, 6 및 7).

[0898] 도 64에 도시된 바와 같이, 바이러스성 단백질 E1A 및 DBP는 LEE011 또는/및 JQ-1와의 XVir-N-31의 조합 처리에 의해서 증가되었다. 세포성 단백질 Rb 및 pRb는 이들 샘플에서 억제되어 유지되었고, E2F-1은 이들 샘플에서 안정화되었다(레인 5, 6 및 7).

[0899] 도 65에 도시된 바와 같이, 단백질 E1A 및 DBP는 LEE011 또는/및 JQ-1와의 XVir-N-31의 조합 처리에 의해서 증가되는 반면에, 세포성 단백질 Rb는 감소되었고, E2F1는 이들 샘플에서 향상되었다. 더욱이, 48 kDa에서 가시적인 Rb의 절단 생성물이 있었으며, 이는 아폽토시스를 나타낸다[문헌: Fattman, Cheryl L.; Delach, Scott M.; Dou, Qing Ping; Johnson, Daniel E. (2001): Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. In: Oncogene 20 (23), S. 2918-2926.].

[0900] 도 66에 도시된 바와 같이, 카스파제 3 및 PARP는 모든 세포 용해물에서, 심지어 대조군에서 존재하였다. 절단된 PARP는 절단된 PARP 항체에 의해서 뿐만 아니라, 전장 PARP 항체에 의해서 검출되었다. 절단된 PARP는 단지 감염된 세포에서 가시적이며, 이의 존재는 LEE011 및 JQ1에 의한 처리에 의해서 증가된다. 이러한 절단은 아폽토시스의 징후였다[문헌: Chaitanya et al.: PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. Cell Communication and Signaling 2010 8:31].

[0901] **실시예 31:아교모세포종에서의 상이한 아데노바이러스에 대한 JQ1의 효과**

[0902] 아데노바이러스 E1A는 다양한 세포성 단백질과 결합하고 이들의 기능을 방해하는 상이한 보존 영역(conserved region: CR)들로 이루어진다. CR1은 p300/CBP와 결합하고, 이는 또한 CR3에 의해서 결합될 수 있다. CR3의 다른 영역은 상이한 매개자 복합체 서브단위, 예컨대, MED23와 결합할 수 있고, 그에 따라서, E1A에 의한 다른 바이러스 조기 유전자의 전사활성화에서 역할을 한다. 아데노바이러스 영역 CR1, 및 또한 CR2는 RB와 결합할 수 있다. 이러한 상호작용은 E2F의 방출 및 후속 세포 사이클 진행을 초래한다. 더욱이, E2F는 아데노바이러스 E2의 조기 프로모터와 결합하고, 이의 전사를 활성화한다.

[0903] E1A의 상호작용 파트너 및 보존 영역 CR1-CR4의 위치가 도 67에 도시되어 있다.

[0904] E1A의 어느 보존 영역이 바이러스 복제를 향상시키기 위한 JQ1의 효과에 필수적인지를 찾아내기 위해서, 상이한 삭제 및 돌연변이를 갖는 아데노바이러스를 사용하였다. 더 우수한 감염성을 위한 RGD 모티프 및 손상되지 않은 항바이러스 반응을 위한 E3 삭제를 함유하는 야생형 아데노바이러스를 대조군으로서 사용하였다. 다른 바이러스는 N-말단 및 CR1 및 CR2가 삭제되어 있는 dl119 및 CMV 프로모터의 제어 하에 있고 CR2가 결여된 Ad 델타24이었다. CR3-삭제된 바이러스로서, RGD 모티프 및 E3 삭제 뿐만 아니라 E1B-19k 삭제를 함유하여 아폽토시스를 향상시키는 XVir-N-31을 사용하였다. 또 다른 사용된 바이러스는 ADWT/E2Fm이었다. 이러한 바이러스는, E2F의 결합을 차단하는, E2-조기 프로모터에서의 E2F 결합 부위에 돌연변이를 함유한다. 이들 특성이 이하 다시 요약되어 있다:

[0905] ADWT: 야생형 E1A

[0906] XVir-N-31: △CR3 E1A

[0907] D1119: △CR1 및 △CR2 E1A

[0908] Ad델타24: △CR2 E1A

[0909] ADWT/E2Fm: 야생형 E1A

[0910] $1x10^5$ LN229 세포를 DMEM 배지내의 6웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 20 MOI의 상이한 바이러스(AdWt, d1119, Ad델타24, XVir-N-31, AdWt/E2Fm)로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, DMEM 배지 또는 200nM JQ1을 함유하는 DMEM 배지를 세포에 첨가하여, 세포가 JQ1 처리 없이 또는 그와 함께 감염되게 하였다. 각각의 시점(4, 24, 48 시간) 후에, 세포를 PBS로 한번 세척하고, 200㎕의 SDS DNA 용해 완충액을 첨가하였다. 세포를 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 정제를 수행하기 전에 56℃에서 15분 동안 프로테이나아제 K와 함께 인큐베이션하였다. DNA를 AE 완충액에 희석시키고, DNA의 농도를 Nanodrop을 사용하여 측정하였다. 각각의 샘플에 대해서, 10 ng/㎕의 용액을 제조하고, 50 ng의 DNA 및 GoTaq Master mix를 사용한 qPCR. 특이적 섬유 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하였고, Δct 값의 계산을 위해서, 특이적 액틴 프라이머를 또한 사용하였다. 각각의 샘플에 대해서, 3개의 섬유 및 2개의 액틴 값을 측정하였다. 계산은 엑셀에서 수행되었고, 각각 24 시간 및 48 시간이 이의 4 시간 값(복제 전 초기 바이러스 진입) 및 미처리 감염된 샘플에 관한 JQ1를 통한 복제의 증가를 기반으로 하여 계산되었다.

[0911] 다양한 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같았다:

[0912] b-액틴rtfw TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGA (SEQ ID NO: 40)

[0913] b-액틴rtrev AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG (SEQ ID NO: 41)

[0914] 섬유fw AAGCTAGCCCTGCAAACATCA (SEQ ID NO: 42)

[0915] 섬유rev CCCAAGCTACCAGTGGCAGTA (SEQ ID NO: 43)

[0916] 결과가 도 68 및 도 69에 도시되어 있다.

[0917] 다양한 바이러스 중에, XVir-N-31은 48 후에 JQ1의 영향 하에 바이러스 복제에서의 가장 높은 증가를 나타내어, CR3 삭제를 갖는 바이러스가 JQ1에 의한 처리로부터 가장 강한 이익을 주는 것을 나타냈다.

[0918] **실시예 32:방광 암에서의 XVir-N-31 및 JQ-1의 이중 치료법**

[0919] 첫 번째 양태로서, XVir-N-31의 복제를 분석하였다.

[0920] $2.5x10^4$ UMUC-3 세포를 DMEM 배지 내의 12 웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 JQ-1(프라이밍) 또는 DMEM 배지로 처리하였다. 다음날 아침에, 세포를 10 MOI XVir-N-31로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, JQ-1를 함유하는 DMEM 배지를 세포에 첨가하였다(동시 처리). 각각 4 및 24 시간 후에, 세포를 PBS로 한번 세척하고, 200㎕의 SDS DNA 용해 완충액을 첨가하였다. 세포를 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 정제를 수행하기 전에 1 시간 동안 프로테이나아제 K와 함께 인큐베이션하였다. DNA를 1xTE 완충액에 희석시키고, DNA의 농도를 Nanodrop을 사용하여 측정하였다. 각각의 샘플에 대해서, 15 ng/㎕의 용액을 제조하고, RT-qPCR은 75 ng의 DNA 및 GoTaq Master mix를 사용한다. 특이적 섬유 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하였고, Δct 값의 계산을 위해서, 특이적 액틴 프라이머를 또한 사용하였다. 각각의 샘플에 대해서, 3개의 섬유 및 2개의 액틴 값을 측정하였다. 계산은 엑셀에서 수행되었고, 각각 24 시간 값을 이의 4 시간 값(복제 전 초기 바이러스 진입)을 기반으로 하여 계산되었다.

[0921] 결과는 도 70에 도시되어 있다.

[0922] 도 70으로부터 입증되는 바와 같이, 프라이밍 자체는 XVir-N-31 복제에 유리한 효과가 없었다. 도시된 도면에서의 프라이밍의 약간의 긍정적인 효과는 실험 셋업에서의 불충분한 세척으로부터 발생했다. JQ-1과의 동시 처리는 이중 치료법 성공에 중요한 반면에, JQ-1(프라이밍)의 선행 첨가는 동시 처리에 비해서 감소된 효율을 초래했다.

[0923] 두 번째 양태로서, XVir-N-31의 입자 형성을 분석하였다.

[0924] 바이러스 입자의 생성을 헥손 단백질의 면역조직화학-염색(헥손 역가 시험)을 통해서 분석하였다. 이를 위해서,

웰 당 2 x 10^5 부착성 HEK293 세포를 24-웰 플레이트에 씨딩하였다. 세포 배양물 샘플을 감염 후 지정된 시점 후에 수거하고, JQ-1에 의한 지시된 동시-처리물을 3 사이클의 해동-냉동으로 전처리하여 세포로부터 바이러스 입자를 방출시키고, 이어서 연속하여 희석시켰다. HEK293 세포를 샘플 당 50 μl 또는 10 μl의 부피로 감염시켰다. 이어서, 검출 가능한 세포 변성 효과에 대해서 검사하기 전에, 플레이트를 37℃ 및 10% CO_2에서 40 시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 흡출하고, 플레이트를 -20℃에서 10 분 동안 빙냉 메탄올을 첨가함으로써 세포를 고정시키기 전에 5 내지 10 분 동안 건조시켰다. 웰을 PBS + 1% BSA로 2회 세척하였다. 일차 항체(염소 항-헥손, 1:500)를 첨가하고, 플레이트를 PBS + 1% BSA로 2회 세척하기 전에 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 이차 항체 (토끼 항-염소 HRP 컨주게이트, 1:1000)를 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 다시, DAB 용액을 첨가하기 전에, 웰을 1% BSA를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. 30 분 동안의 인큐베이션 후에, 웰 당 10 개의 상이한 무작위 시야(random field of view: f.o.v.)를 20x 대물렌즈 현미경 하에 계수하였다. 반복된 계수를 평균화하고, 이러한 식에 따라서, ml 당 감염 입자를 계산하였다:

[0925] $$역가\,(PFU/ml) = \frac{f.o.v.\text{당 염색된 세포의 평균 수} \times \text{웰 당} f.o.v.\text{의 전체 수}}{\text{첨가된 바이러스 샘플의 부피} \times \text{희석 인자}}$$

[0926] 결과는 도 71 및 도 72에 도시되어 있다.

[0927] 도 71로부터 입증되는 바와 같이, XVir-N-31의 입자 형성은 500 nM JQ-1의 첨가시의 UMUC-3 세포에서 유의미하게 증가되었다. 더욱이, XVir-N-31의 입자 형성의 키네틱(kinetic)은 500 nM JQ-1와의 동시 처리에 의해서 고도로 가속된다.

[0928] 세 번째 양태로서, 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0929] 1x10^6 UMUC-3 세포를 DMEM 배지내의 10 cm 플레이트에 씨딩하고, 씨딩 24 시간 후에, 10 MOI XVir-N-31로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, 배양 배지를 DMEM 또는 500 nM JQ-1로 스파이킹된(spiked) DMEM에 의해서 재충전하였다. 12, 24, 36 및 48 h.p.i에서, 전체 단백질의 용해물을 SDS-완충액을 사용하여 취하였다. BCA 분석을 적용하여 동등한 단백질 농도를 조절하였다. 이어서, 단백질 샘플을 Lammli 완충액으로 보충하고, 10 % PA-겔 상의 SDS-PA 겔전기영동을 통해서 분리하였다. 샘플을 BioRAD Wet Tank System을 사용하여 PVDF 막 상에 블로팅하였다. 이들 막을 실온에서 1 시간 동안 5 % 탈지 분유를 함유하는 TBS-Tween 완충액으로 블로킹하였다. 일차 항체와의 인큐베이션을 4 ℃에서 밤새 수행하고, 실온에서 1 시간 동안 HRP-컨주게이티드 이차 항체와 함께 수행하였다. 화학 발광을 ChemiDoc Imaging System (BioRad)으로 ECL 프라임(Pierce)을 사용하여 검출하였다. 도면들은 Adobe® Illustrator에서 설계되었고, 평가는 ImageLab으로 수행되었다.

[0930] 결과가 도 73에 도시되어 있다.

[0931] 도 73으로부터 입증되는 바와 같이, XVir-N-31 바이러스성 단백질(E1A, E1B55k, DBP 및 E40rf6)의 절대 바이러스성 단백질 발현 및 가장 중요한 키네틱은 JQ-1 동시 처리에 의해서 고도로 가속되었다. JQ-1 처리로 인해서, 특히, 헥손과 같은 후기 바이러스 단백질은 XVir-N-31에 의한 감염 후에 조기 시점에서 높은 수준으로 발현되었다.

[0932] **실시예 33:XVir-N-31, 팔보시클립 및 JQ-1을 사용한 방광 암의 삼중 치료법**

[0933] 첫 번째 양태로서, 방광 암 세포주 UMUC-3 및 RT112의 세포 사이클에 대한 지시된 농도에서의 적용된 소분자 억제제의 영향을 DNA 염색 후에 유세포 분석을 통해서 분석하였다.

[0934] 그러한 목적을 위해서, 각각 5x10^4 세포 UMUC-3 및 RT112를 6-웰 플레이트에 씨딩하고, 24 시간 후에, 적절한 억제제로 처리하였다. 1일 후에, 대략 80% 컨플루언시에서, 세포를 PBS로 세척하고, 트립신화시키고, 다시 세척하고, 빙냉 80% 에탄올로 고정시켰다. 세포 사이클 분석을 위해서, 샘플을 DNA-삽입성 염료 7-아미노액티노마이신 D(7-AAD)과 함께 인큐베이션하고, FACS 분석을 통해서 측정하였다. 측정된 데이터의 평가를 소프트웨어 FlowJo를 통해서 수행하였다.

[0935] 결과가 도 74에 도시되어 있다.

[0936] 도 74로부터 입증되는 바와 같이, 팔보시클립은 세포 사이클의 G1-기에서의 강력한 정지를 유도했다. JQ-1은 단일요법으로서 또는 팔보시클립과 조합으로 세포 사이클에 대해서 유의미한 영향을 나타냈다. 특히, JQ-1은 XVir-N-31의 종양 세포 붕괴 잠재성을 강하게 향상시키기에 여전히 충분한 비교적 낮은 농도로 적용되었다. G1- 또는 G2-정지를 유도하는 JQ-1의 더 높은 용량에 대한 불확실한 데이터가 공개된 과학 문헌에서 밝혀졌다. 그러

나, JQ-1의 낮은 용량은 세포 사이클에 영향을 주지 않았다.

[0937] 두 번째 양태로서, JQ-1 및 팔보시클립 둘 모두에 의한 처리 후의 특이적 세포 표적 단백질에 대한 발현 수준을 정량화하였다.

[0938] 1-2x10^6 UMUC-3 또는 RT-112 세포를 DMEM 배지내의 10 cm 플레이트에 씨딩하고, 씨딩 24 시간 후에, 각각의 소분자 억제제로 처리하였다. 처리 24 시간 후에, 전체 단백질의 용해물을 SDS-완충액을 사용하여 취하였다. BCA 분석을 적용하여 동등한 단백질 농도를 조절하였다. 이어서, 단백질 샘플을 Lammli 완충액으로 보충하고, 10 % PA-겔 상의 SDS-PA 겔전기영동을 통해서 분리하였다. 샘플을 BioRAD Wet Tank System을 사용하여 PVDF 막 상에 블로팅하였다. 이들 막을 실온에서 1 시간 동안 5 % 탈지 분유를 함유하는 TBS-Tween 완충액으로 블로킹하였다. 일차 항체와의 인큐베이션을 4 ℃에서 밤새 수행하고, 실온에서 1 시간 동안 HRP-컨주게이티드 이차 항체와 함께 수행하였다. 화학 발광을 ChemiDoc Imaging System(BioRad)으로 ECL 프라임(Pierce)을 사용하여 검출하였다. 도면들은 Adobe® Illustrator에서 설계되었고, 평가는 ImageLab으로 수행되었다.

[0939] 결과가 도 75에 도시되어 있다.

[0940] 도 75로부터 입증되는 바와 같이, JQ-1은 단독요법에서도 팔보시클립과의 조합으로도 세포 사이클 조절자 RB, 포스포-RB 또는 E2F-1 단백질 수준에 대해서 지시된 농도에서 어떠한 효과를 나타내지 않았다. RNA-폴리머라제 II 억제자 Hexim1은 JQ-1 처리 후에 하향 조절되지만, 팔보시클립과의 조합에서 회복된다. 따라서, 세포 사이클 단백질 RB 및 E2F-1은 JQ-1 처리 하의 XVir-N-31의 복제 능력의 증가에 대한 원인이 아니다.

[0941] 세 번째 양태로서, 삼중 요법의 세포 치사 효능을 효능 분석을 이용하여 측정하였다.

[0942] 1-3x10^4 세포를 DMEM 또는 RPMI 배지내의 12 웰 플레이트에 씨딩하고, 억제제를 다음날에 처리하였다. 씨딩 48 시간 후에, 세포를 XVir-N-31로 감염시켰다. 4일 후에, 세포를 10% TCA를 사용하여 고정시켰다. 플레이트를 0,1% SRB 용액을 사용하여 염색하였다. 과량을 제거하고, 플레이트를 1% 아세트산으로 세척하였다. 아세트산을 제거한 후에, 플레이트를 밤새 공기 건조시켰다. SRB를 1ml의 10mM 트리스 염기 용액에 용해시키고, 1:10 희석액을 560nm에서 광도계를 사용하여 측정하였다.

[0943] 결과가 도 76, 도 77 및 도 78에 도시되어 있다.

[0944] 도 76, 도 77 및 도 78로부터 입증되는 바와 같이, 낮은 용량의 팔보시클립 및 JQ-1과 함께 한 처리는, XVir-N-31가, 낮은 MOI에서도, 방광 암 세포 UMUC-3, RT112 및 T24의 각각 및 이의 어느 하나에서 나타난 각각의 효과에 의해서 예시되는 바와 같이, 시험관내 방광 암 세포가 완전히 생존하지 못하게 할 수 있다.

[0945] 네 번째 양태로서, 바이러스 복제에 대한 이러한 삼중 요법의 영향을 분석하였다.

[0946] 2-5x10^4 UMUC-3, T24 또는 RT112 세포를 DMEM 또는 RPMI 배지내의 12 웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 JQ1, 팔보시클립(프라이밍) 또는 배지로 처리하였다. 다음날에, 세포를 10, 20 또는 50 MOI XVir-N-31로 감염시켰다. 감염 1 시간 후에, JQ-1 또는 팔보시클립을 함유하는 배지를 세포에 첨가하였다. 4 및 24 시간 후에, 세포를 PBS로 한번 세척하고, 200㎕의 SDS DNA 용해 완충액을 첨가하였다. 세포를 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 정제를 수행하기 전에 적어도 1 시간 동안 프로테이나아제 K와 함께 인큐베이션하였다. DNA를 1xTE 완충액에 희석시키고, DNA의 농도를 Nanodrop을 사용하여 측정하였다. 각각의 샘플에 대해서, 15 ng/㎕의 용액을 제조하였고, RT-qPCR은 75 ng의 DNA 및 GoTaq Master mix를 사용한다. 특이적 섬유 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하였고, Δct 값의 계산을 위해서, 특이적 액틴 프라이머를 또한 사용하였다. 각각의 샘플에 대해서, 3개의 섬유 및 2개의 액틴 값을 측정하였다. 계산은 엑셀에서 수행되었고, 각각 24 시간 값을 이의 4 시간 값(복제 전 초기 바이러스 진입)을 기반으로 하여 계산되었다.

[0947] 결과가 도 79, 도 80 및 도 81에 도시되어 있다.

[0948] 도 79, 도 80 및 도 81로부터 입증되는 바와 같이, 낮은 용량의 팔보시클립 및 JQ-1에 의한 추가의 처리는 XVir-N-31 복제를 최대 200-배까지 가속시켰다.

[0949] 다섯 번째 양태로서, 생산적으로 감염된 종양 세포에 대한 이러한 삼중 요법의 영향을 분석하였다.

[0950] 생산적으로 감염된 종양 세포의 수를 감염된 UMUC-3 세포의 헥손 단백질의 직접적인 면역조직화학-염색을 통해서 분석하였다(슈도-헥손 역가 시험(Pseudo-Hexon Titer test)). 이를 위해서, 웰 당 5 x 10^5 UMUC-3 세포를

12-웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 낮은 용량의 JQ-1 및 팔보시클립을 프라이밍하였다. 씨딩 48 시간 후에, 이어서, 세포를 XVir-N-31(9 MOI)로 감염시키고, 1 시간 후에, 각각의 억제제들로 동시에 처리하였다. 이어서, 검출 가능한 세포 변성 효과에 대해서 검사하기 전에, 플레이트를 37℃ 및 10% CO_2에서 40 시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 흡출시키고, -20℃에서 10분 동안 빙냉 메탄올을 첨가함으로써 세포를 고정시키기 전에, 플레이트를 5 내지 10분 동안 건조시켰다. 웰을 PBS + 1% BSA로 2회 세척하였다. 일차 항체(염소 항-헥손, 1:500)를 첨가하고, 플레이트를 PBS + 1% BSA로 2회 세척하기 전에 이를 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 이차 항체(토끼 항-염소 HRP 컨주게이트, 1:1000)를 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 다시, DAB 용액을 첨가하기 전에, 웰을 1% BSA를 함유한 PBS로 2회 세척하였다. 30 분 인큐베이션 후에, 웰 당 10 개의 상이한 무작위 시야(f.o.v.)를 20x 대물렌즈 현미경 하에 계수하였다.

[0951] 결과는 도 82 및 도 83에 도시되어 있다.

[0952] 도 82 및 도 83으로부터 입증되는 바와 같이, 낮은 용량의 팔보시클립 및 JQ-1에 의한 추가의 처리는 XVir-N-31 생산 감염을 통과한 종양 세포의 수를 고도로 증가시켰다.

[0953] **실시예 34:UMUC3- 및 RT112 세포주에서의 XVir-N-31과의 조합으로의 상이한 BET 억제제 및 BET-분해제(BET-degrader)의 효과**

[0954] 연구의 목적은 분해제를 포함한 상이한 BET(브로모도메인 및 엑스트라-말단 모티브(extra-terminal motive)) 억제제와의 조합으로의 XVir-N-31의 효능을 측정하기 위한 것이다. BET 억제제(BETi): OTX015(일가), AZD5153(이가)가 경쟁적으로 BET를 억제하고; BET 분해제(BETd): dBet6, ARV55가 BET 분해를 유도한다. [참조예: Rhyasen GW, et al. AZD5153: A Novel Bivalent BET Bromodomain Inhibitor Highly Active against Hematologic Malignancies. Mol Cancer Ther. 2016 Nov;15(11):2563-2574; J. Kay Noel, et al. Abstract C244: Development of the BET bromodomain inhibitor OTX015. Mol Cancer Ther. November 2013 12; C244; Winter GE, et al.: BET Bromodomain Proteins Function as Master Transcription Elongation Factors Independent of CDK9 Recruitment. Mol Cell. 2017 Jul 6;67(1):5-18.e19). Raina K, et al.: PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jun 28;113(26):7124-9]. 이들 문헌의 개시내용은 본원에서 참조로 통합된다.

[0955] 첫 번째 양태로, BETi 및 BETd 처리와의 조합으로의 XVir-N-31 감염 후의 UMUC3 및 RT112 세포의 세포 생존율을 효능 분석에 의해서 분석하였다.

[0956] $1.3x10^4$ UMUC-3 세포 및 $3 x10^4$ RT112 세포를 DMEM 및 RT112 배지내의 12 웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 지시된 농도의 BETi 및 BETd로 전처리 하였다. 씨딩 48 시간 후에, 세포를 종양 세포 붕괴성 아데노바이러스 XVir-N-31로 감염시키고, BETi 및 BETd로 처리하였다. 5일 후에, 세포를 10% TCA를 사용하여 고정시켰다. 플레이트를 0,05% SRB 용액을 사용하여 염색시켰다. 과량을 제거하고, 플레이트를 1% 아세트산으로 세척하였다. 아세트산을 제거한 후에, 플레이트를 밤새 공기 건조시켰다. SRB를 500㎕의 10mM 트리스 염기 용액에 용해시키고, 1:10 희석액을 562 nm에서 광도계를 사용하여 측정하였다.

[0957] 결과는 도 84 및 도 85에 도시되어 있다.

[0958] 도 84 및 도 85로부터 입증되는 바와 같이, XVir-N-31 바이러스와의 BETi 및 BETd의 조합은 둘 모두의 세포주에서 상승 작용적이었으며, 강하게 감소된 세포 생존율을 유도하였다.

[0959] 두 번째 양태에서, UMUC-3 및 RT112 세포주에서의 섬유 DNA의 바이러스 복제에 대한 BETi 및 BETd의 효과를 qPCR에 의해서 분석하였다.

[0960] $3x10^4$ UMUC-3 세포 및 $4x10^4$ RT112 세포를 DMEM 및 RPMI 배지내의 12 웰 플레이트에 씨딩하였다. 다음날에, 세포를 BETi 및 BETd로 전처리하였다. 씨딩 48 시간 후에, 세포를 UMUC-3의 경우에 10 MOI로 그리고 RT112의 경우에 50 MOI로 감염시키고, 지시된 농도의 BETi 및 BETd로 처리하였다. 각각의 시점(4, 24 시간) 후에, 세포를 PBS로 1회 세척하고, 200㎕의 SDS DNA 용해 완충액을 첨가하였다. 페놀-클로로포름-이소아밀알코올 정제를 수행하기 전에, 세포를 프로테이나아제 K와 함께 인큐베이션하였다. DNA를 DNase 비함유 물로 희석시키고, DNA의 농도를 Nanodrop를 사용하여 측정하였다. 각각의 샘플에 대해서, 15 ng/㎕의 용액을 제조하였고, RT-qPCR은 75 ng의 DNA 및 GoTaq Master mix를 사용한다. 특이적 섬유 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하였고, Δct 값의 계산을 위해서, 특이적 액틴 프라이머를 또한 사용하였다. 각각의 샘플에 대해서, 3개의 섬유 및 3개의 액틴 값을 측정하였다. 계산은 엑셀에서 수행되었고, 각각 24 시간 값을 이의 4 시간 값(복제 전 초기 바이러스 진입)

을 기반으로 하여 계산되었다.

[0961] 결과는 도 86 및 도 87에 도시되어 있다.

[0962] 도 86 및 도 87로부터 입증되는 바와 같이, BETi 및 BETd에 의한 처리는 감염 24 시간 후에 XVir-N-31의 복제를 고도로 증가시켰다. 세포주 둘 모두에서, 바이러스 복제에서의 증가는 이가 BETi AZD5153과의 조합에서 가장 높아서, 이가 억제제가 일반적으로 XVir-N-31와의 조합에서 더욱 적합함을 나타냈다.

[0963] **실시예 35:육종 이종 이식 누드 마우스 모델에서의 XVir-N-31와의 CDK 4/6 억제제 리보시클립의 조합**

[0964] **방법**

[0965] **동물 연구**

[0966] 인간 육종 이종 이식 모델을 위해서, 주령 10 내지 20주의 마우스에게 PBS 중의 3 x 10^6 A673 종양 세포를 우측 옆구리에 피하(s.c.) 주사하였다. 종양 크기를 2 내지 3일마다 측정하였다 종양 부피를 *부피 = 0.5 x 길이 x 폭*^{2}의 식으로 계산하였다. 종양 부피가 100 내지 150 mm^3을 초과한 후에, 마우스를 지시된 치료군/대조군으로 무작위로 나누었다: *PBS*(즉, LEE011 및 PBS 없이 0.5 % 메틸셀룰로오스 종양내[i.t.]), *LEE*(즉, LEE011 및 PBS를 함유한 0.5 % 메틸셀룰로오스 i.t.), 단지 *XVir*(즉, LEE011 및 XVir-N-31 없이 0.5 % 메틸셀룰로오스 i.t.) 및 조합(즉, LEE011 및 XVir-N-31를 함유한 0.5 % 메틸셀룰로오스 i.t.). 이어서, 각각의 동물에게 경구 섭식을 통해서 X+4 일(DX+4)까지 X (DX)일에 리보시클립 석시네이트(LEE011) 200 mg/kg 체중(0.5 % 메틸셀룰로오스에 용해됨)을 투여하였고, 가짜 대조군의 경우에는 LEE011 없이 0.5 % 메틸셀룰로오스를 투여하였다. 1 x 10^{11} VP의 XVir-N-31 또는 PBS(각각 50 µL 중)를 X+1일(DX+1) 및 X+3일(DX+3)에 i.t. 주사하였다. X+5일에, 단지 XVir 처리군 및 조합으로부터의 3 마리의 대표적인 동물을 외식된 종양에서의 바이러스 복제의 조직병리학적 평가 및 정량화를 위해서 희생시켰다. 나머지 마우스의 종양 크기를 종양 부피가 1000 mm^3을 초과할 때까지 측정하였고, 마우스를 희생시켰다.

[0967] 동물 연구의 실험 설계가 도 88에 예시되어 있다.

[0968] **통계학적 분석**

[0969] 생체내 종양 성장을 개방형 웹 툴(open access web tool) TumGrowth (https://kroemerlab.shinyapps.io/TumGrowth)로 분석하였다. 요약하면, 측정된 종양 부피의 데이터를 선형 혼합-효과 모델링(linear mixed-effect modelling)에 가하여, 요망되는 시점에서의 세로 종양 성장 기울기 비교(longitudinal tumor growth slope comparison) 뿐만 아니라 치료 반응 평가(treatment response evaluation)를 가능하게 하였다(횡단면 분석). P 값을 타입 II ANOVA를 사용한 소프트웨어 및 세로 및 횡단면 분석(지시된 때의 홈 조절(holm adjustment))에 대해서 선택된 쌍별 비교(selected pairwise comparison)에 의해서 계산하였다. 종양 성장 곡선을 프리즘 5(Prism 5)(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)로 생성시켰다. 종양 성장 곡선을 평균 종양 부피 및 평균의 표준 오차(standard error of the mean: sem)를 사용하여 작도하였다. P 값 < 0.05가 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

[0970] **이종 이식된 누드 마우스 모델에서의 조합 요법 및 단일요법의 결과-효과**

[0971] 제안된 조합 전략의 생물학적 관련 이점이 또한 가능한 치료 이익으로 이전될 수 있는지를 검사하기 위해서, 이종 이식된 A673 육종 세포의 종양 제어를 면역 약화된 누드 마우스에서 분석하였다. 개방형 웹 툴 TumGrowth을 적용하면, 종양 성장 제어가 단일요법(단지 LEE 또는 XVir)으로 치료된 동물 또는 대조군(PBS)에 비해서 조합 치료(조합)를 받은 동물에서 유의미하게 증가하였다. 치료 반응 중간 군(treatment response in-between group)에서의 최대 차이가 치료 시작 후 12 내지 21일에서 관찰되었다. (흥미롭게도, 바이러스 복제는 XVir-N-31에 비해서 조합을 수용한 대표적인 동물의 외식된 종양에서 유의미하게 증가하였다).

[0972] 결과가 도 89, 도 90 및 도 91에 도시되어 있다. 세포 분석에 대한 선택된 쌍별 비교를 이하 표에 나타낸다:

선택된 쌍별 비교						
P-값 조절(Adj): 홈						
군 1	군 2	차이	P-값	P-값 Adj	Wilcox P-값	Wilcox P-값 Adj
LEE	PBS	-257.110 [-452.801;-61.420]	0,0007	0,0015	0,0173	0,042
단지 XVir	PBS	-518.429 [-707.660;-329.199]	<0.0001	<0.0001	0,0025	0,0126
조합	PBS	-684.618 [-873.848;-495.387]	<0.0001	<0.0001	0,0025	0,0126
단지 XVir	LEE	-261.319 [-441.115;-81.522]	0,0002	0,0006	0,014	0,042
조합	LEE	-427.507 [-607.304;-247.711]	<0.0001	<0.0001	0,0012	0,007
조합	단지 XVir	-166.189 [-338.932;6.554]	0,0134	0,0134	0,0262	0,042

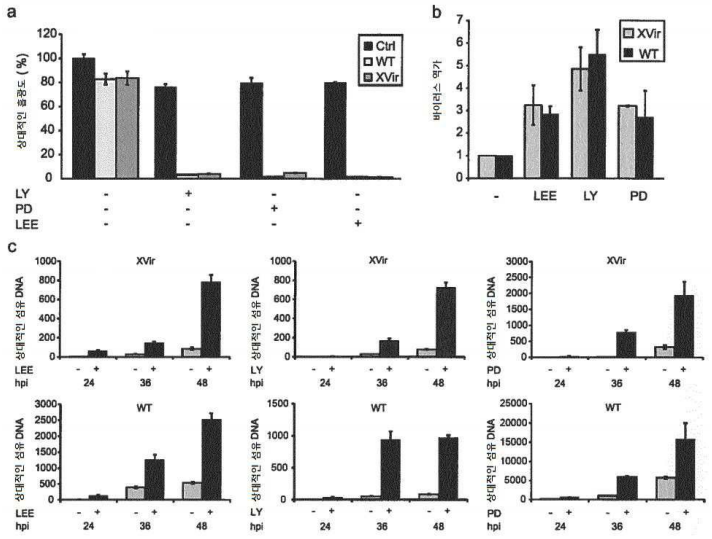
[0973]

[0974] 도 29, 도 30 및 도 31에서 나타낸 결과는 명확하게는 XVir-N-31 및 리보시클립을 포함하는 조합 요법이 XVir-N-31 또는 리보시클립 단독보다 더욱 효과적임을 입증하고 있다.

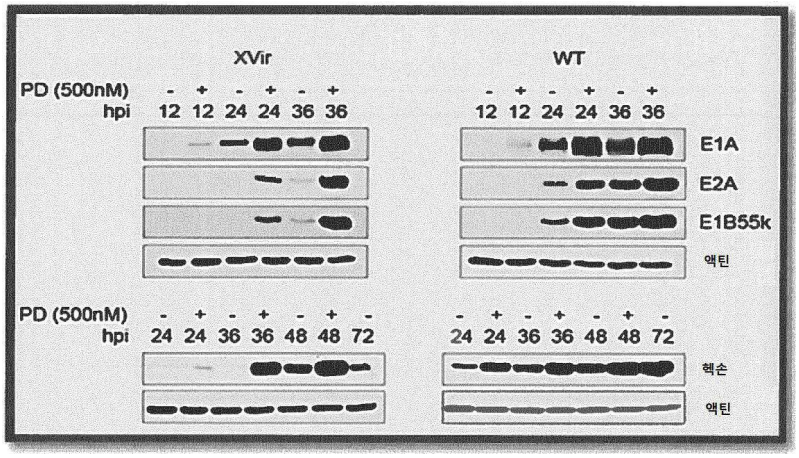
[0975] 상기 명세서, 청구범위 뿐만 아니라 도면에 개시된 본 발명의 특징이 개별적으로 뿐만 아니라 어떠한 조합으로 이의 다양한 구체예에서 본 발명의 실현에 중요할 수 있다.

도면

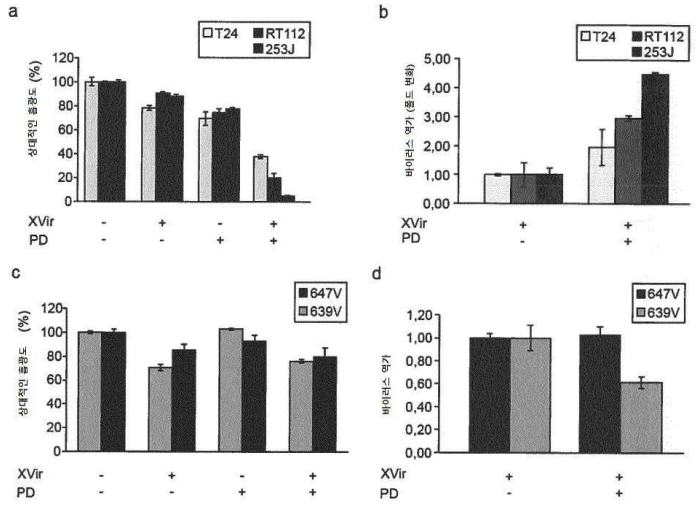
도면1



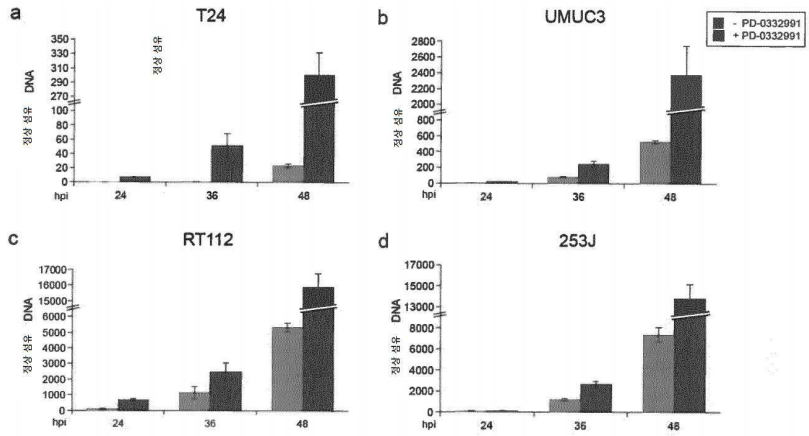
도면2



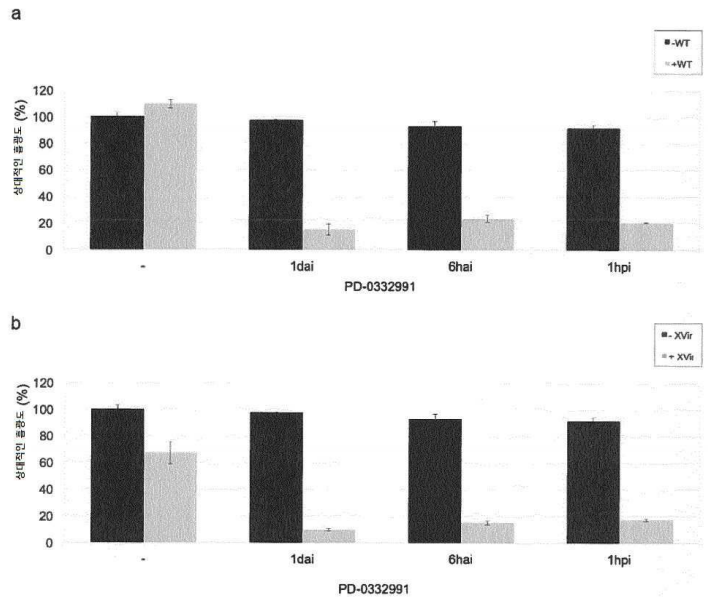
도면3


a
T24
RT112
253J
상대적인 흡광도 (%)
XVir
PD
b
바이러스 역가 (폴드 변화)
c
647V
639V
d
바이러스 역가

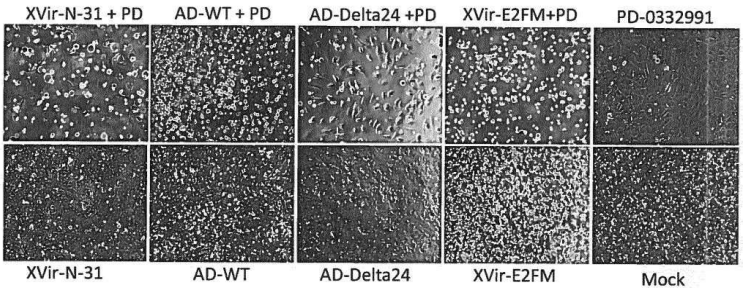
도면4


a
T24
b
UMUC3
- PD-0332991
+ PD-0332991
c
RT112
d
253J
DNA
정상 섬유
hpi
24
36
48

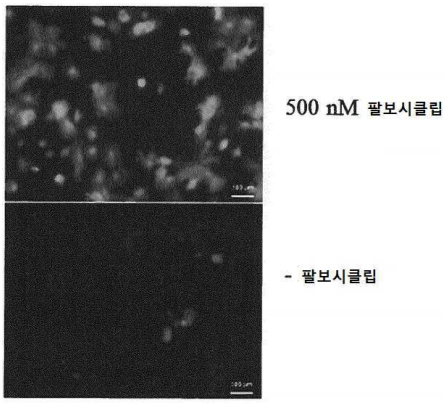
도면5


a
-WT
+WT
상대적인 흡광도 (%)
-
1dai
6hai
1hpi
PD-0332991
b
- XVir
+ XVir
PD-0332991

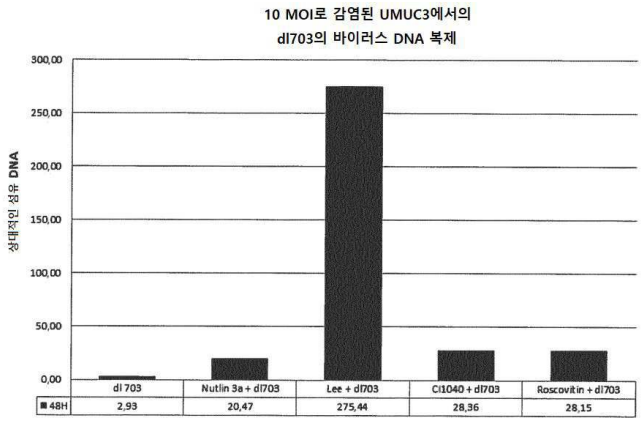
도면6



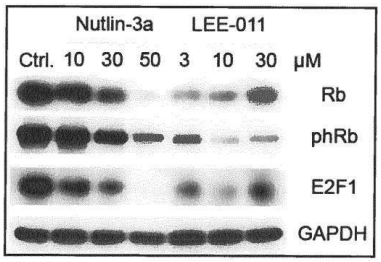
도면7



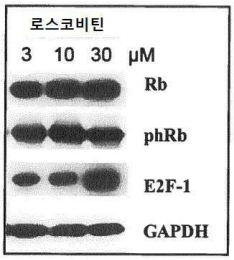
도면8



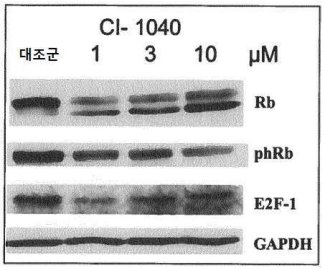
도면9a



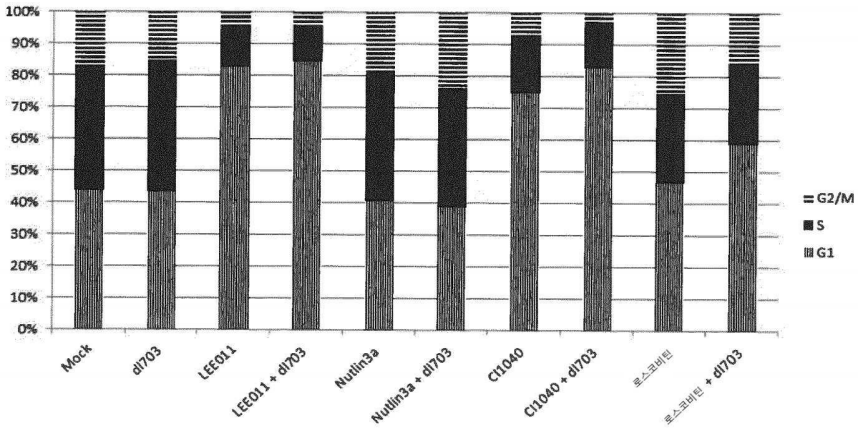
도면9b



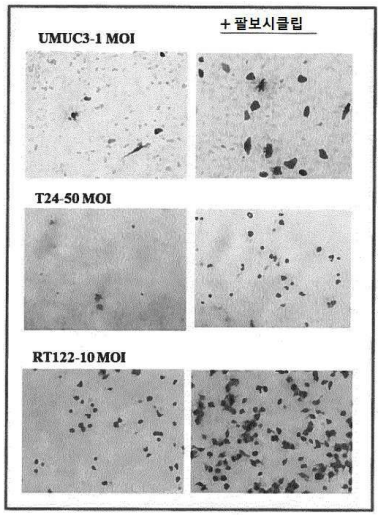
도면9c



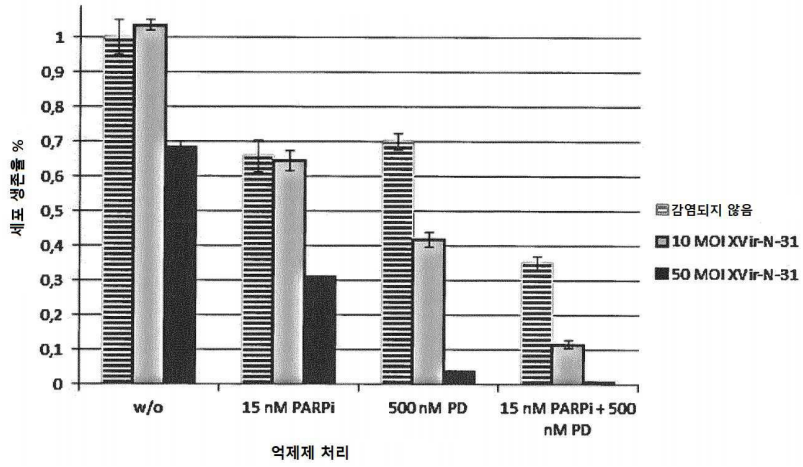
도면10



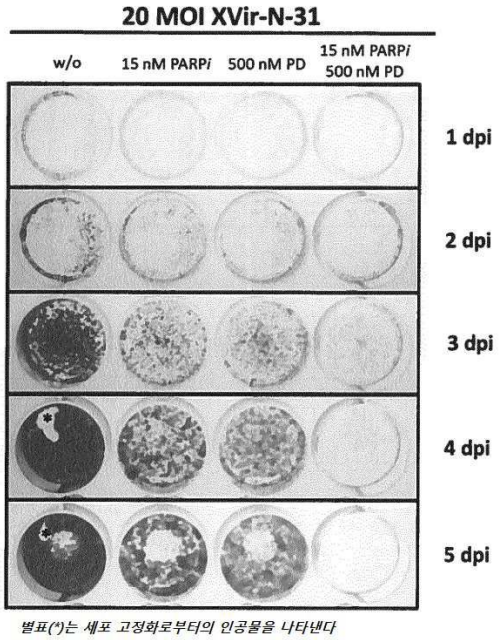
도면11



도면12

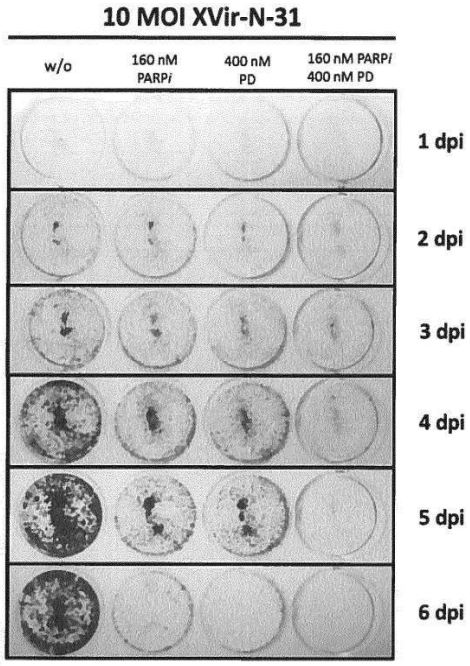


도면13

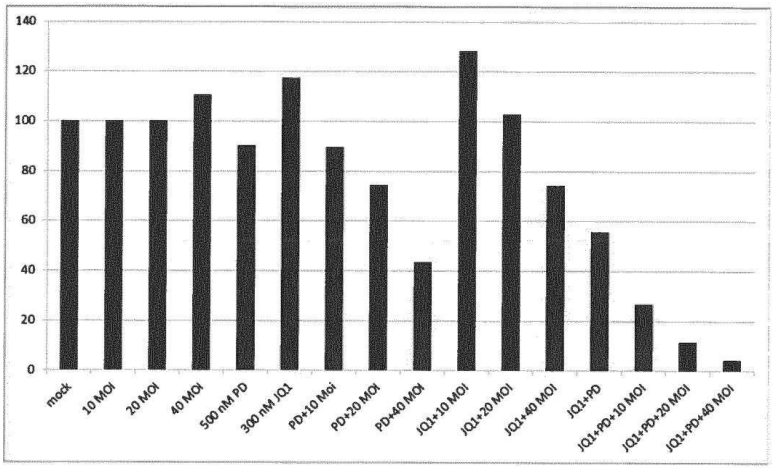


별표(*)는 세포 고정화로부터의 인공물을 나타낸다

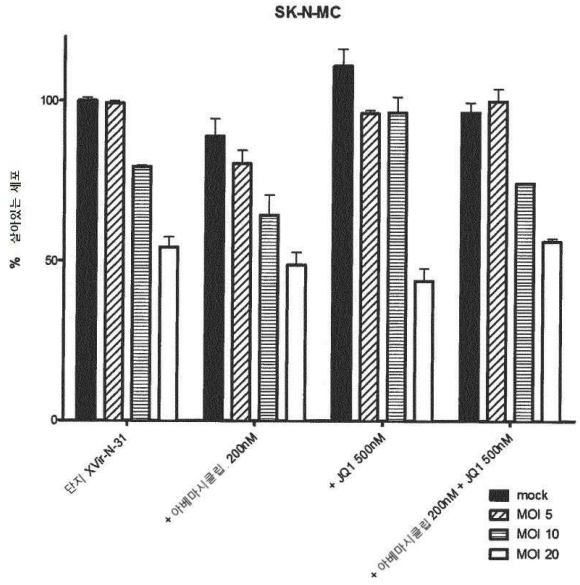
도면14


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

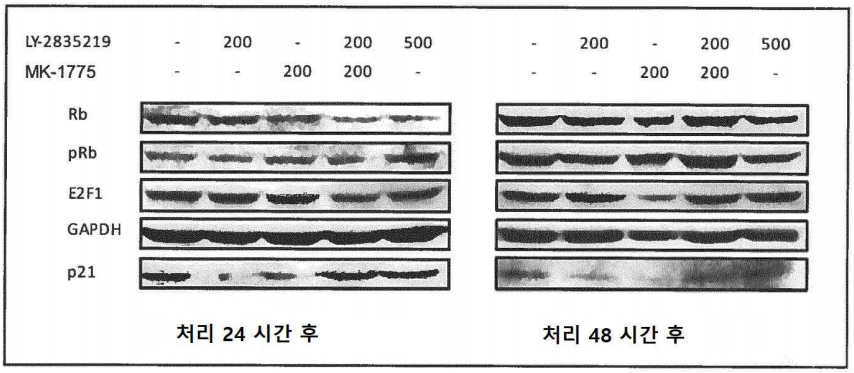
도면15


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

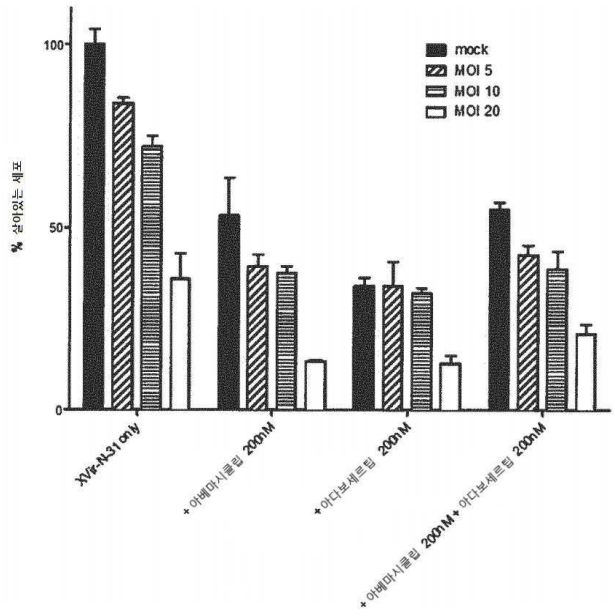
도면16



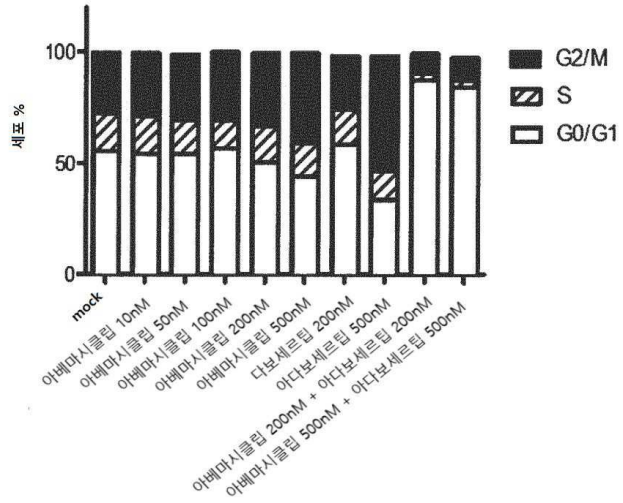
도면17



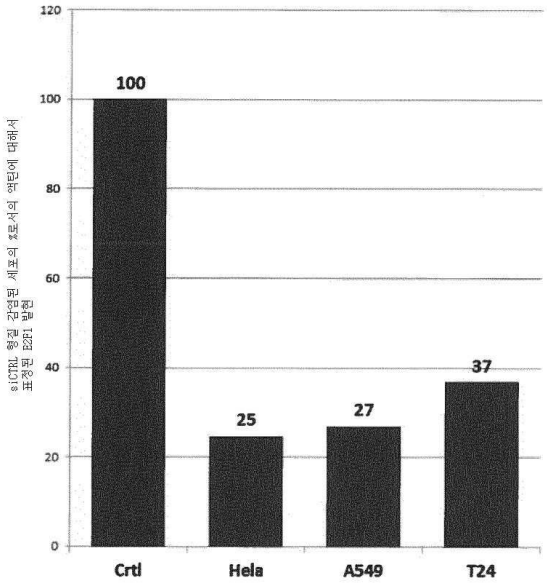
도면18



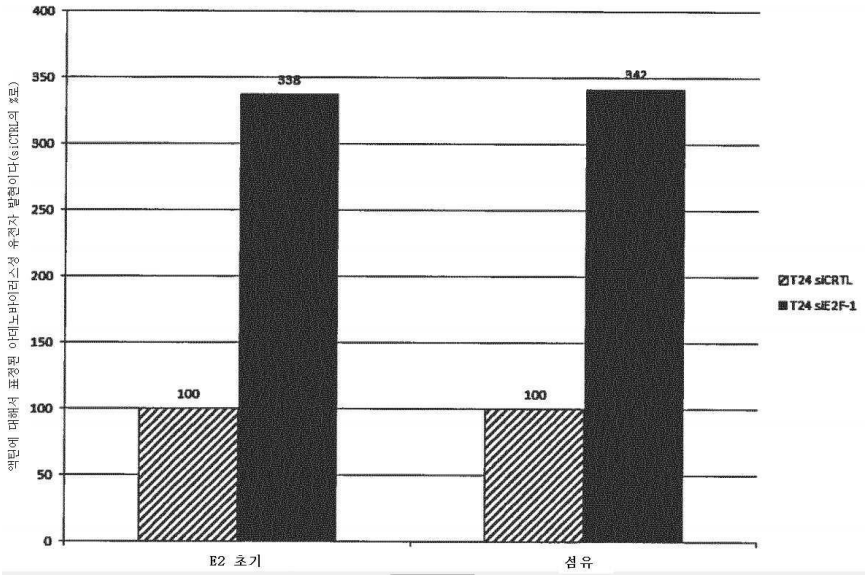
도면19


100
50
0
세포 %
G2/M
S
G0/G1
mock
아베마시클립 10nM
아베마시클립 50nM
아베마시클립 100nM
아베마시클립 200nM
아베마시클립 500nM
다보세르팁 200nM
아다보세르팁 500nM
아베마시클립 200nM + 아다보세르팁 200nM
아베마시클립 500nM + 아다보세르팁 500nM

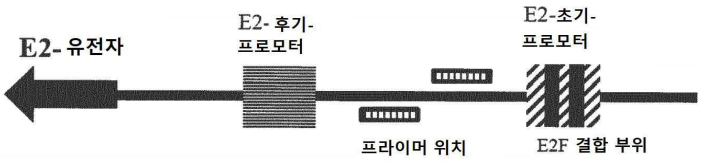
도면20


120
100
80
60
40
20
0
siCTRL 형질 감염된 세포의 조로서의 역턴에 대해서
표정된 E2F1 낱현
100
25
27
37
Crtl
Hela
A549
T24

도면21



도면22



도면23

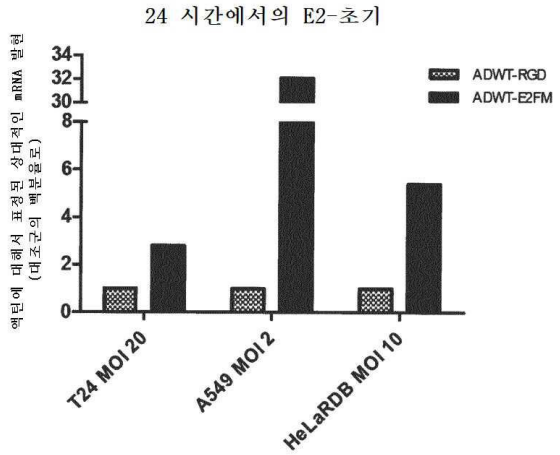
야생형 E2-초기-프로모터

5-AGTTTTCGCGCTTAAATTTGAGAAAGGGCGCGAAACTAGTCCTT
3-TCAAAAGCGCGAATTTAAACTCTTTCCCGCGCTTTGATCAGGAA

5-AGGAGTCGGATTTAAATTTGAGAAAGTAATAGGTACTAGTCCTT
3-TCCTCAGCCTAAATTTAAACTCTTTCATTATCCATGATCAGGAA

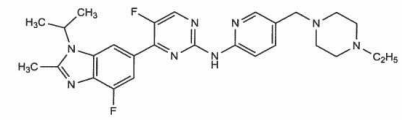
돌연변이된 E2-초기-프로모터

도면24

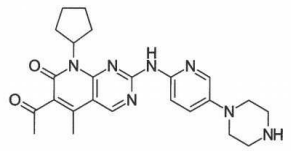


도면25

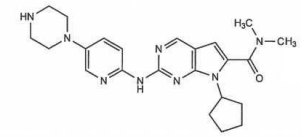
아베마시클립



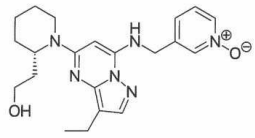
팔보시클립



리보시클립

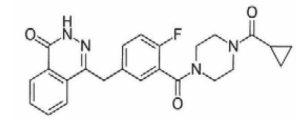


디나시클립

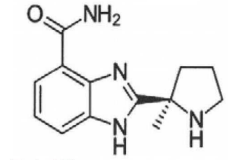


도면26

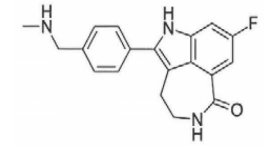
올라파립



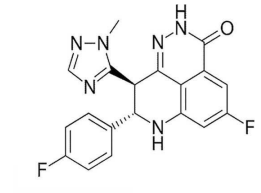
벨리파립



루카파립



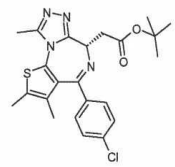
탈라조파립



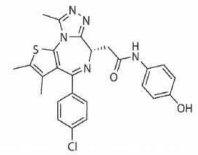
도면27a

(Montserrat Perez-Savia and Manel Esteller로부터 얻음:
브로모도메인 억제제 및 암 요법:
From structure to applications. EPIGENTCS 2017, 12, 323-339)

JQ1

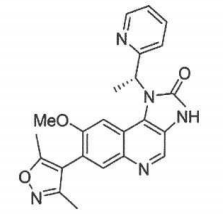


OTX-015

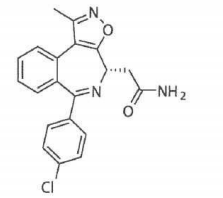


도면27b

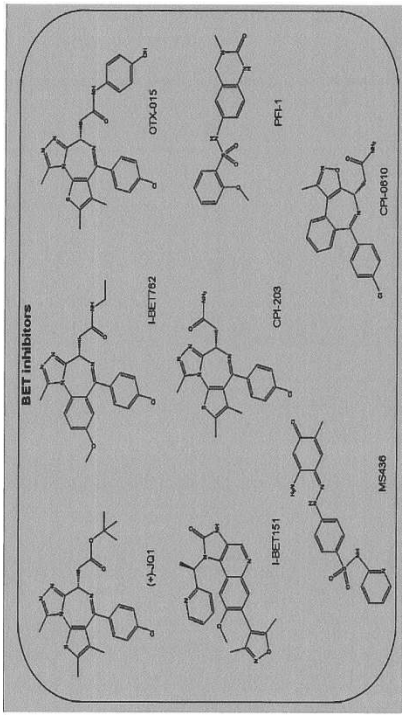
I-BET151



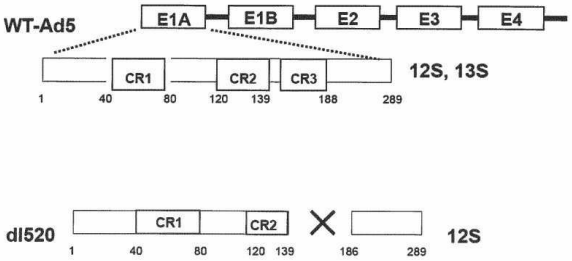
CPI-0610



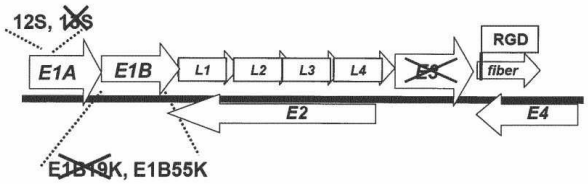
도면27c



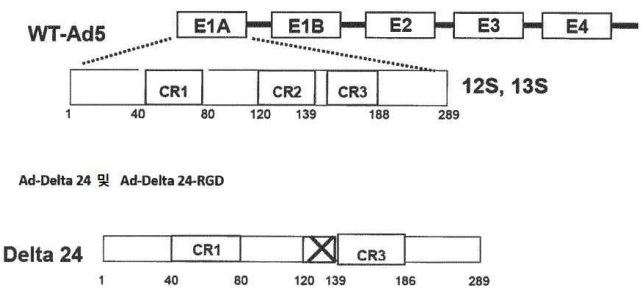
도면28



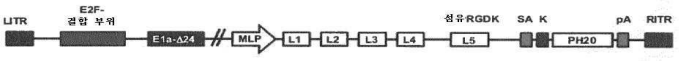
도면29



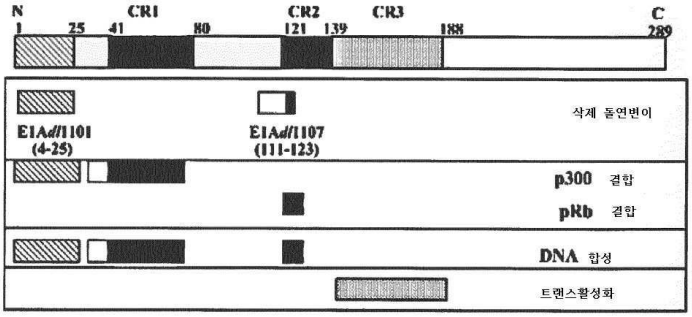
도면30



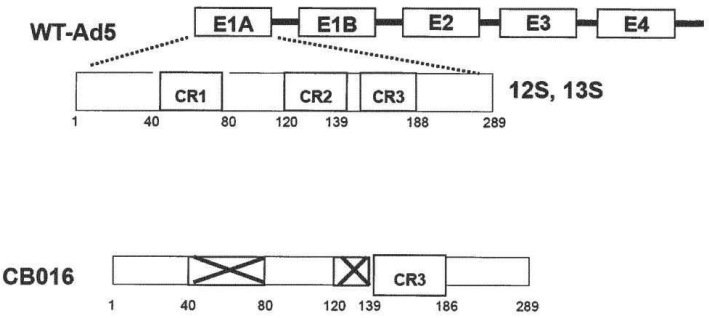
도면31



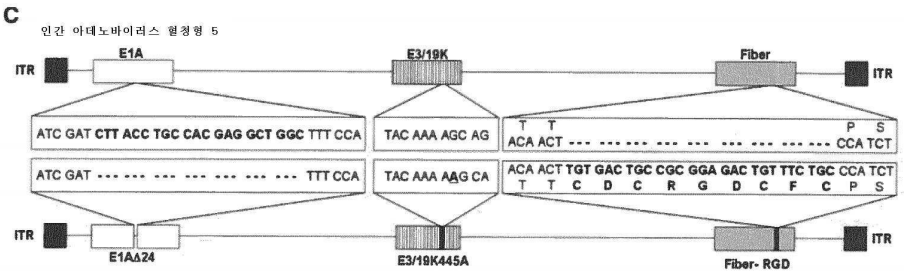
도면32



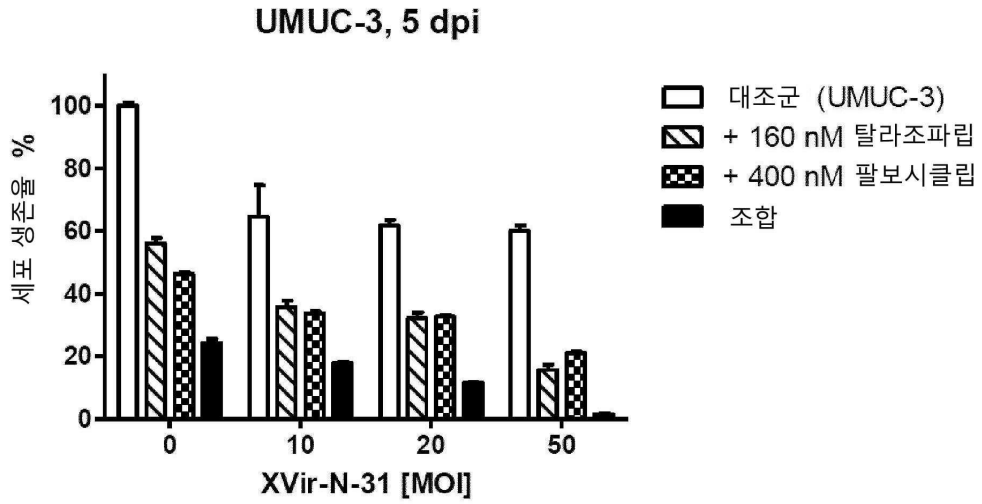
도면33



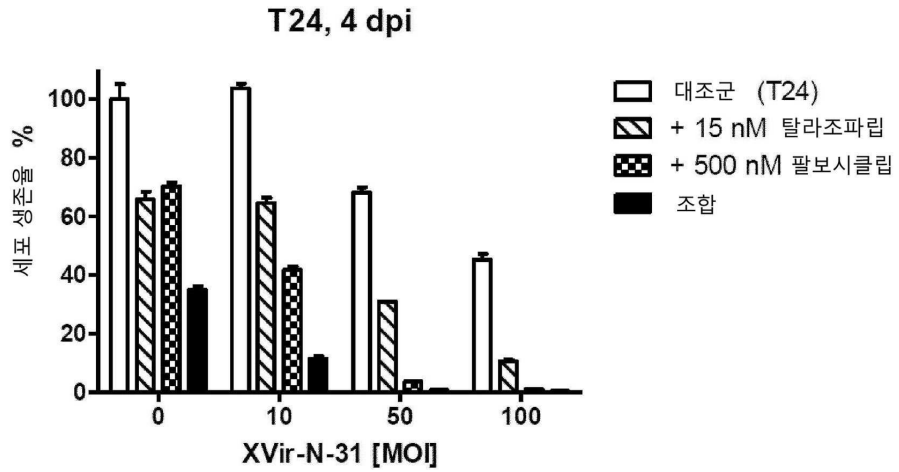
도면34



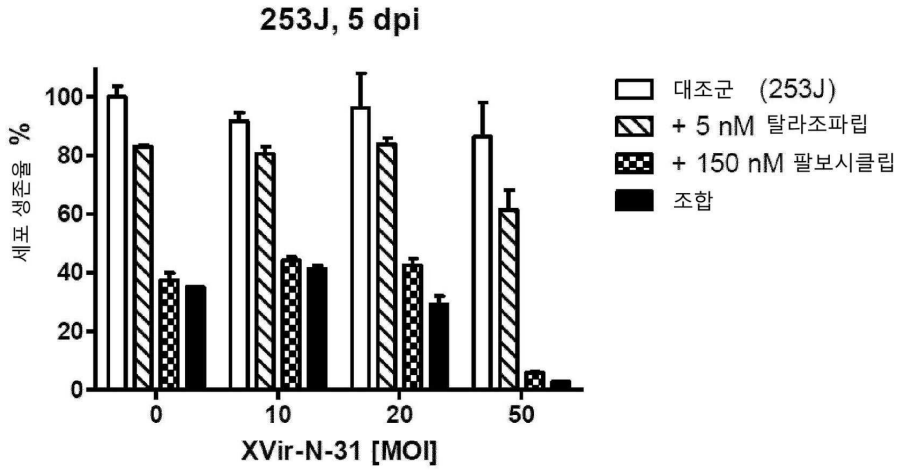
도면35



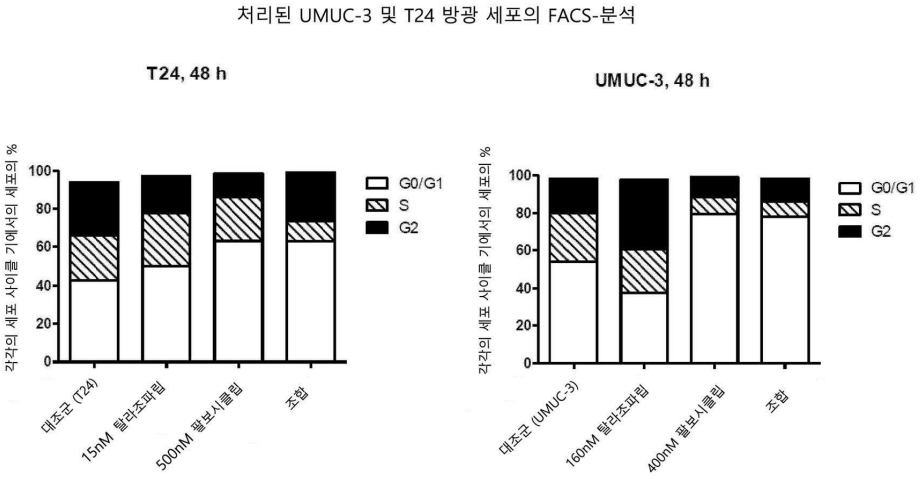
도면36



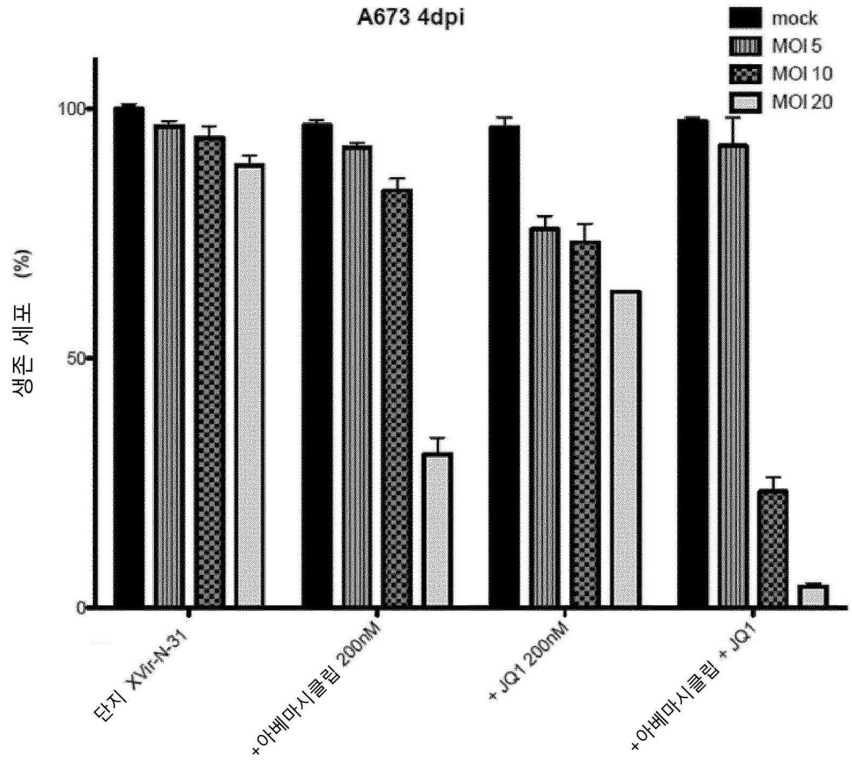
도면37



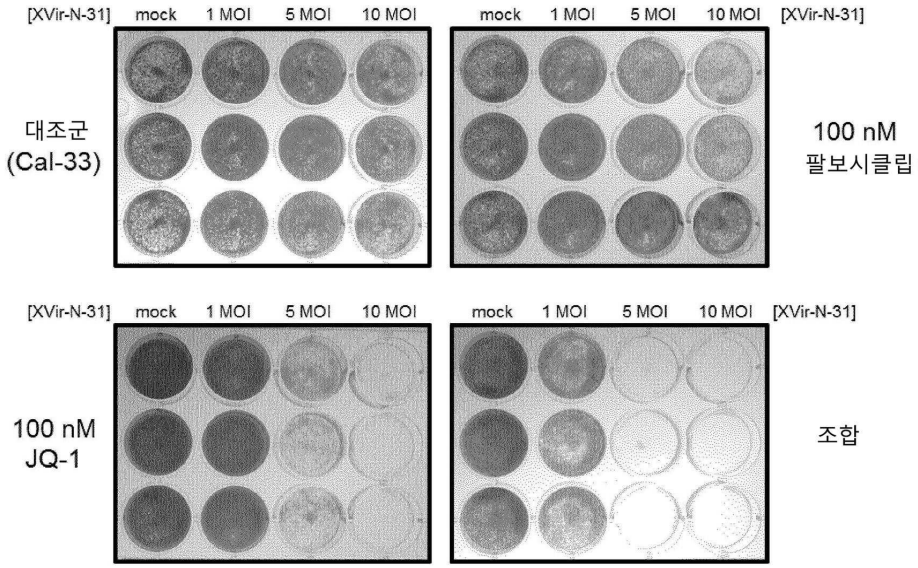
도면38


처리된 UMUC-3 및 T24 방광 세포의 FACS-분석
T24, 48 h
UMUC-3, 48 h
각각의 세포 사이클 기에서의 세포의 %
100
80
60
40
20
0
G0/G1
S
G2
대조군 (T24)
15nM 탈라조파립
500nM 팔보시클립
조합
대조군 (UMUC-3)
160nM 탈라조파립
400nM 팔보시클립
조합

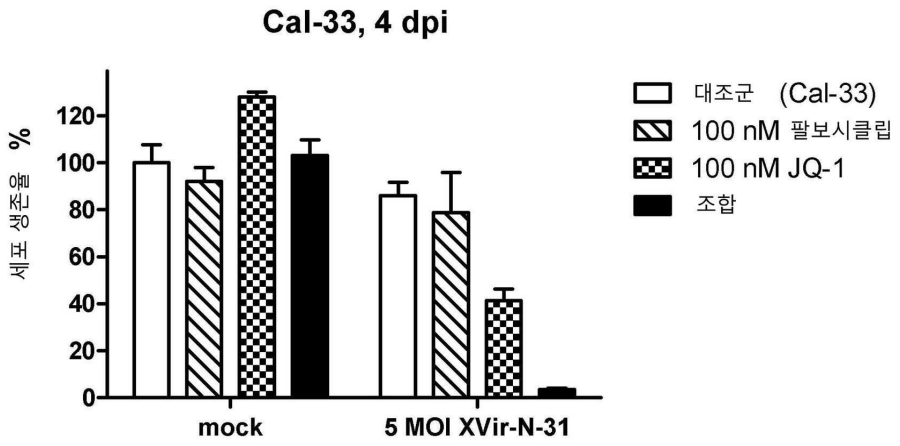
도면39


A673 4dpi
mock
MOI 5
MOI 10
MOI 20
생존 세포 (%)
100
50
0
단지 XVir-N-31
+아베마시클립 200nM
+ JQ1 200nM
+아베마시클립 + JQ1

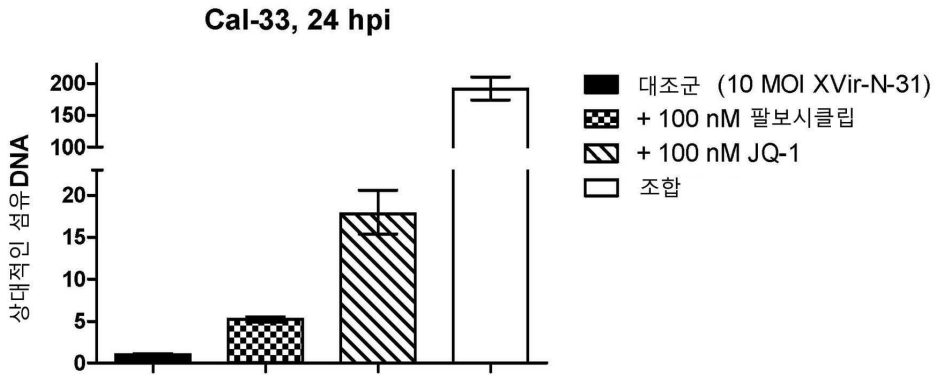
도면40



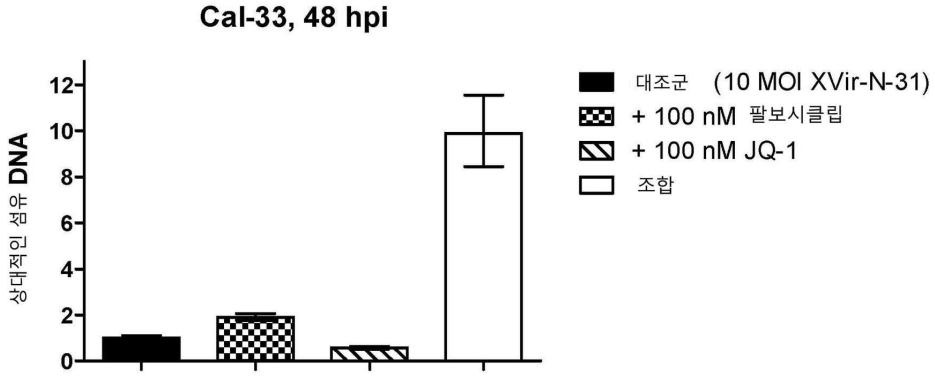
도면41



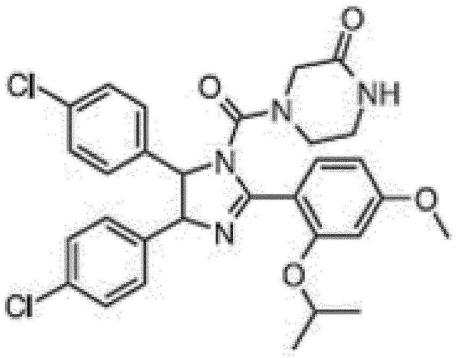
도면42a



도면42b

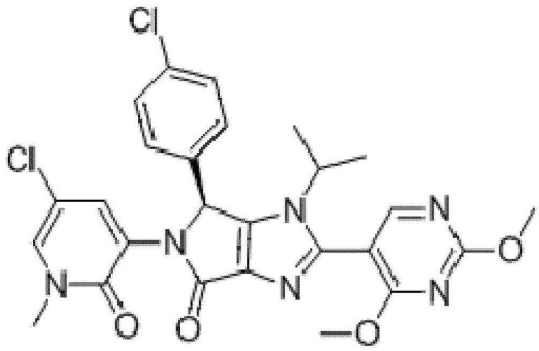


도면43a



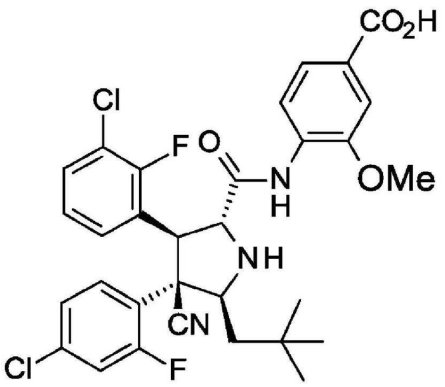
누틀린 3

NVP-HDM201 (HDM-201)

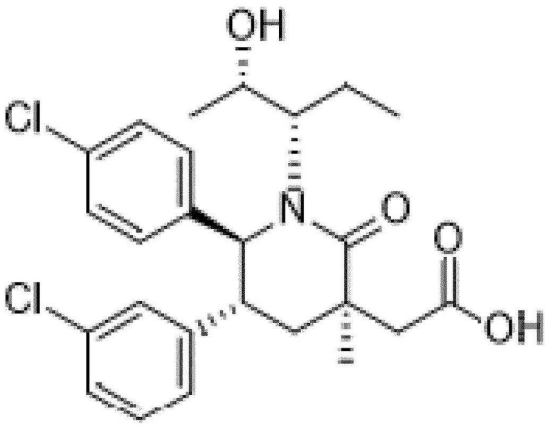


도면43b

이사다누틀린(RG-7388)

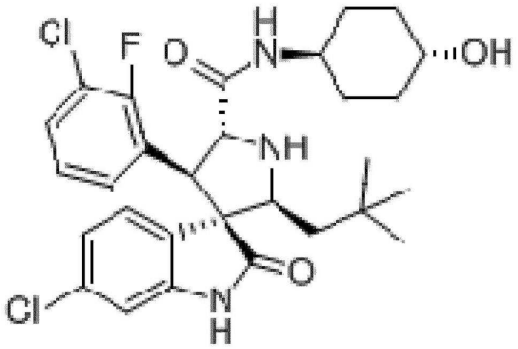


AM-8553

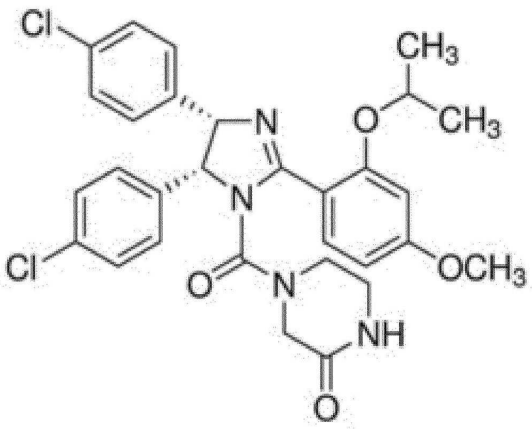


도면43c

SAR405838 (MI-773)

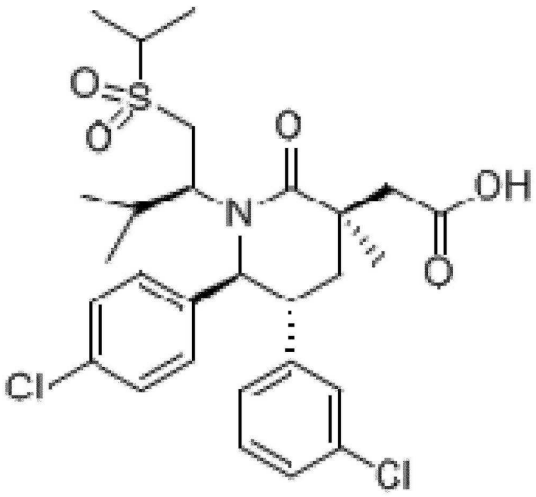


Nutlin-3a

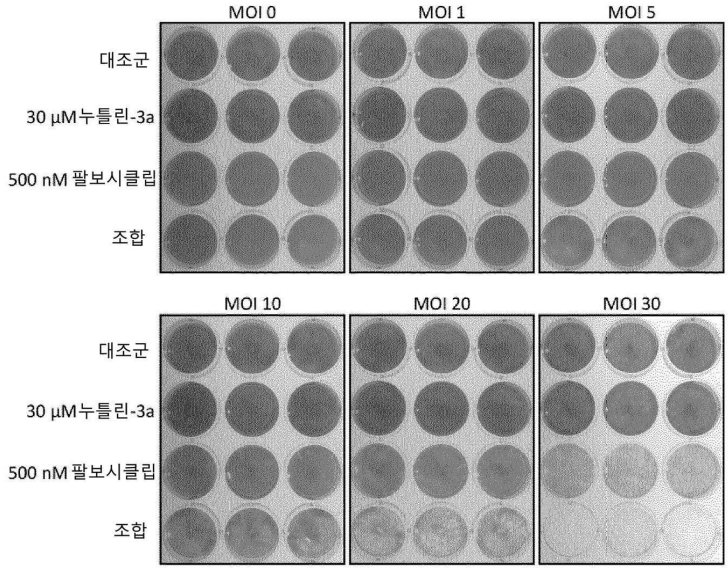


도면43d

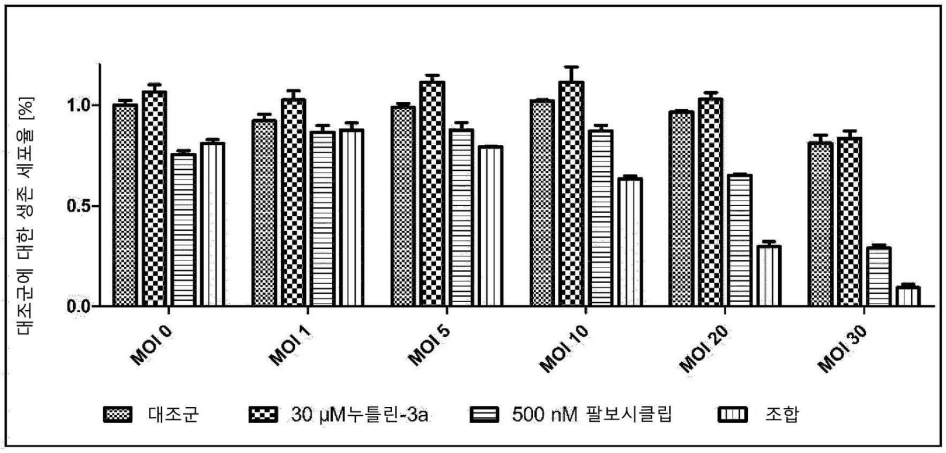
AMG232



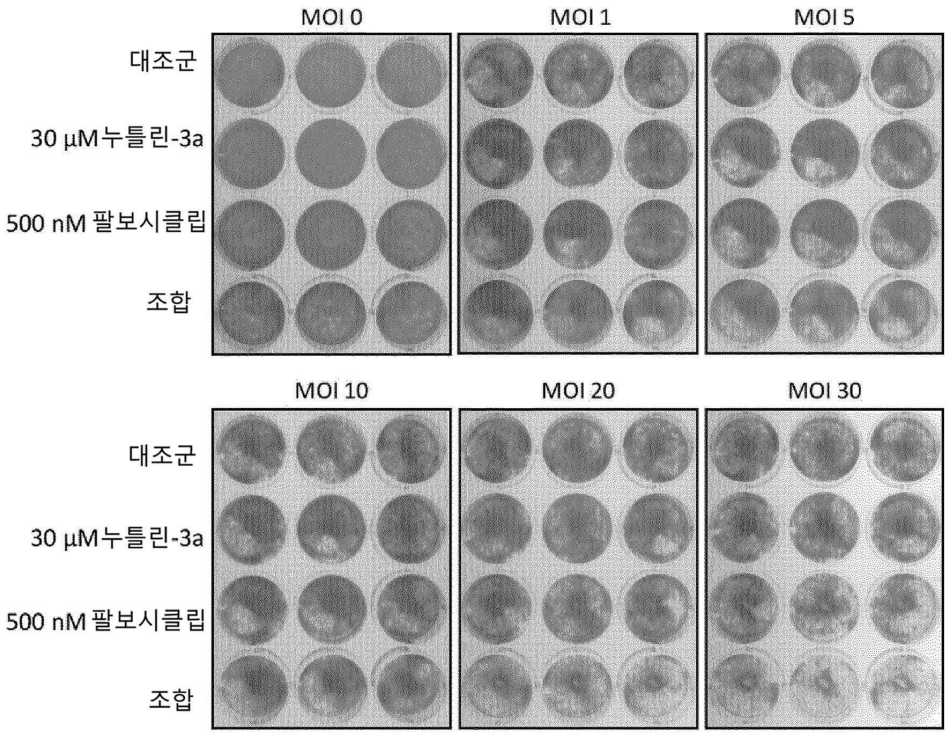
도면44


MOI 0
MOI 1
MOI 5
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합
MOI 10
MOI 20
MOI 30
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합

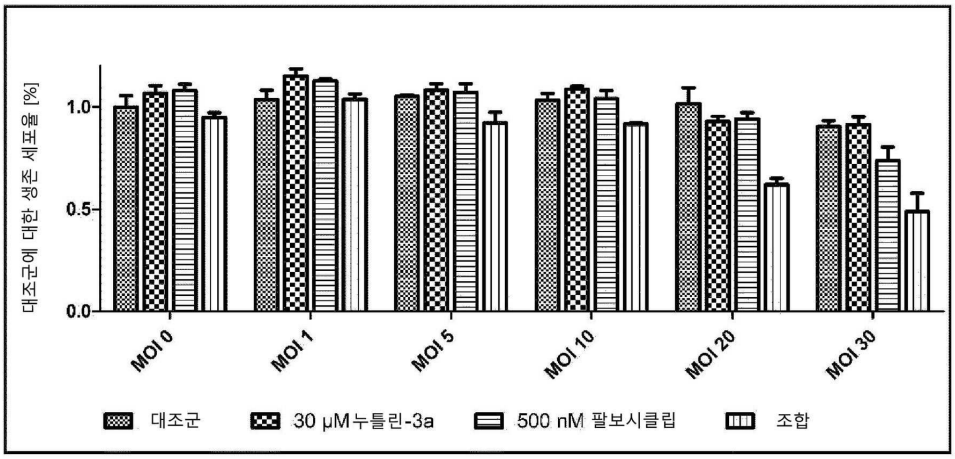
도면45


대조군에 대한 생존 세포율 [%]
1.0
0.5
0.0
MOI 0
MOI 1
MOI 5
MOI 10
MOI 20
MOI 30
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합

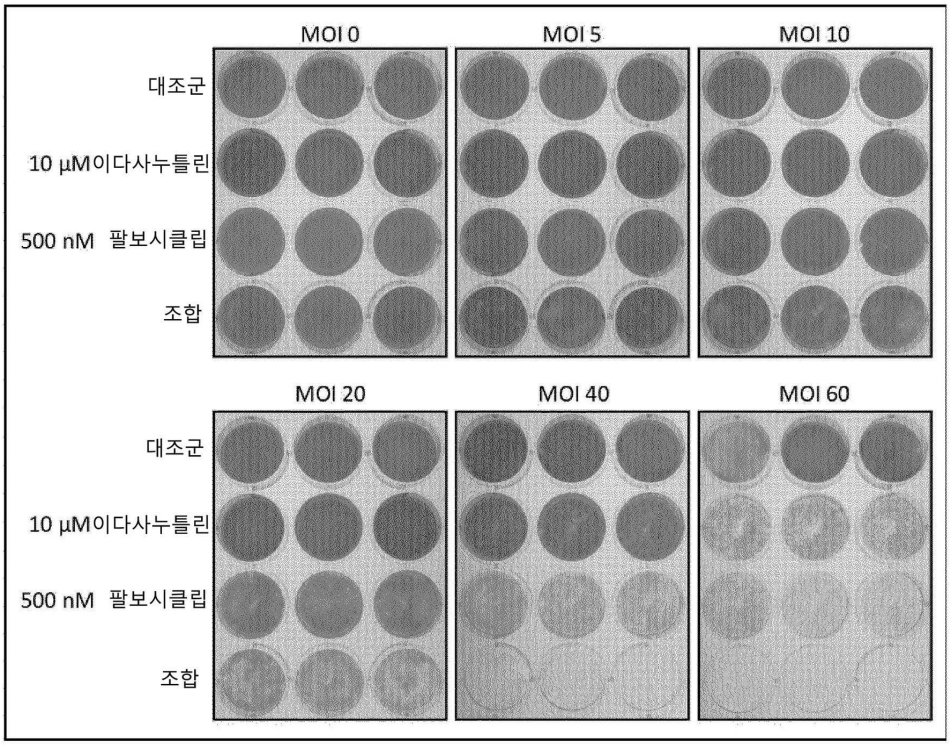
도면46


MOI 0
MOI 1
MOI 5
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합
MOI 10
MOI 20
MOI 30
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합

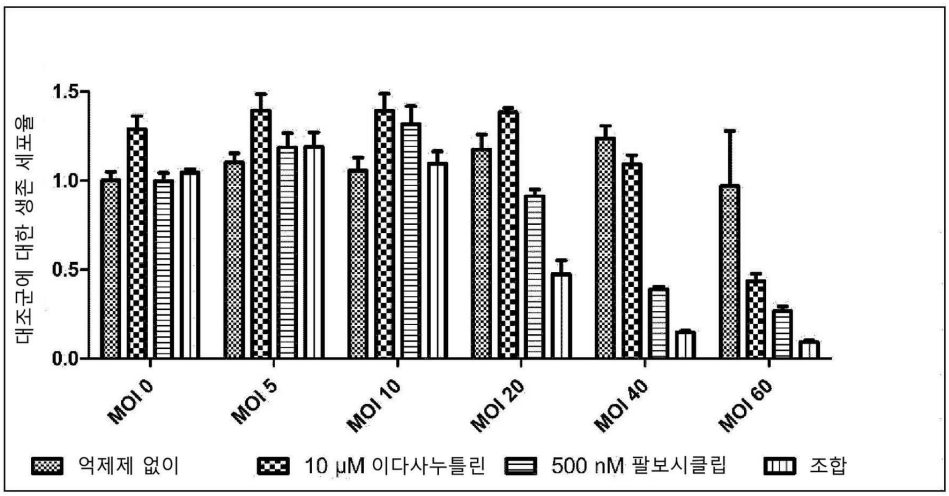
도면47


대조군에 대한 생존 세포율 [%]
1.0
0.5
0.0
MOI 0
MOI 1
MOI 5
MOI 10
MOI 20
MOI 30
대조군
30 μM누틀린-3a
500 nM 팔보시클립
조합

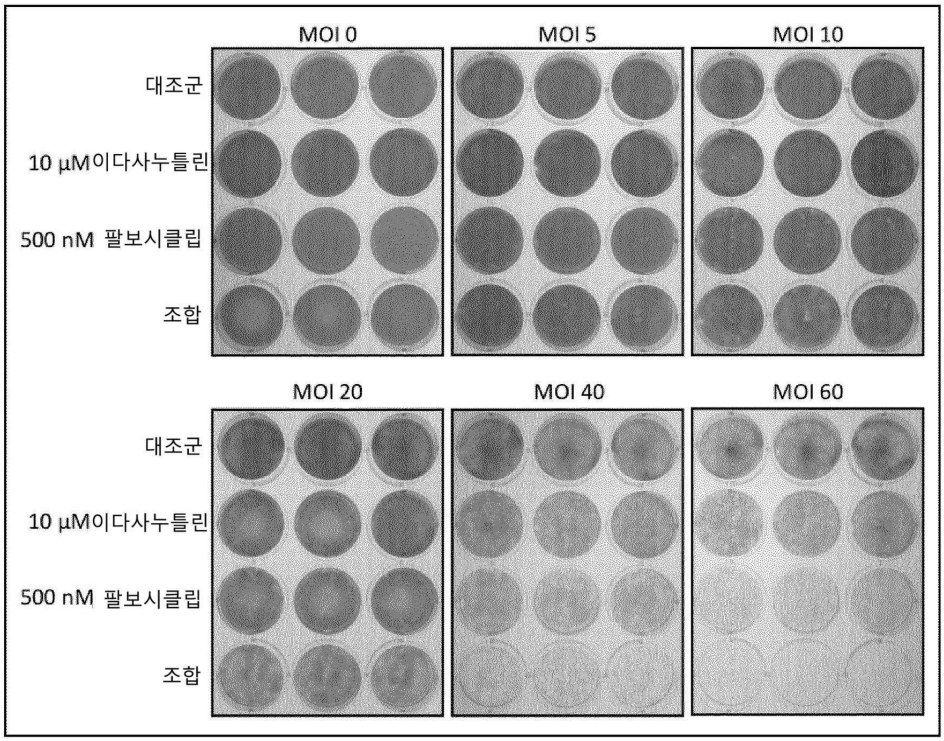
도면48


MOI 0
MOI 5
MOI 10
대조군
10 μM이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합
MOI 20
MOI 40
MOI 60
대조군
10 μM이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합

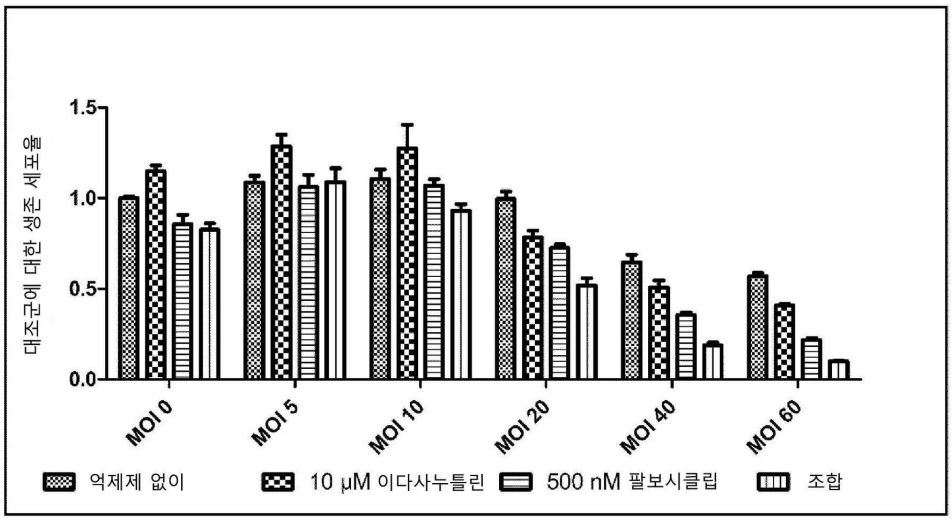
도면49


대조군에 대한 생존 세포율
1.5
1.0
0.5
0.0
MOI 0
MOI 5
MOI 10
MOI 20
MOI 40
MOI 60
억제제 없이
10 μM 이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합

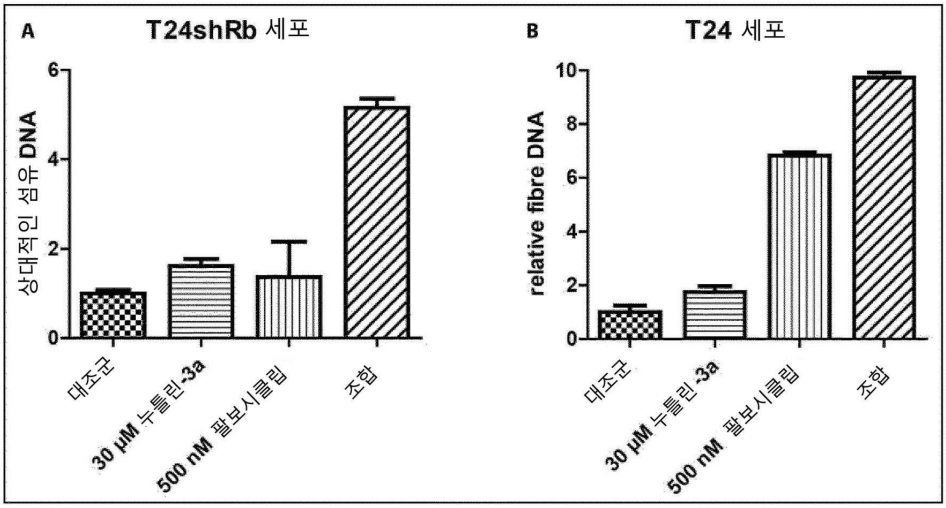
도면50


MOI 0
MOI 5
MOI 10
대조군
10 μM이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합
MOI 20
MOI 40
MOI 60
대조군
10 μM이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합

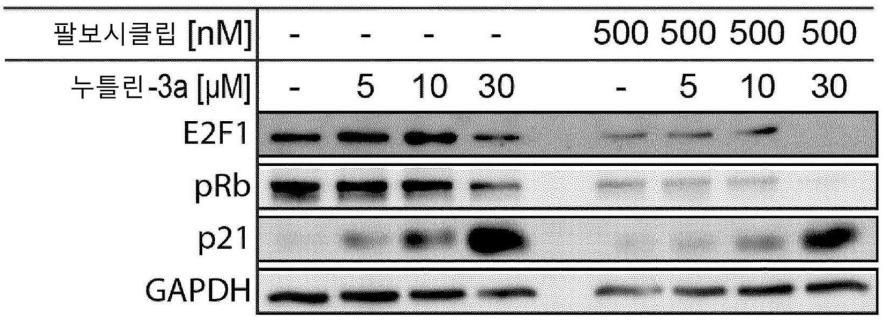
도면51


대조군에 대한 생존 세포율
1.5
1.0
0.5
0.0
MOI 0
MOI 5
MOI 10
MOI 20
MOI 40
MOI 60
억제제 없이
10 μM 이다사누틀린
500 nM 팔보시클립
조합

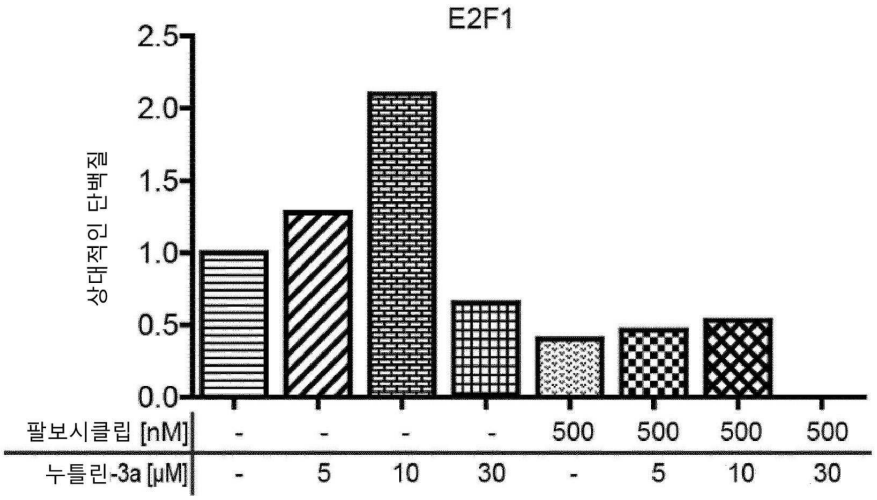
도면52



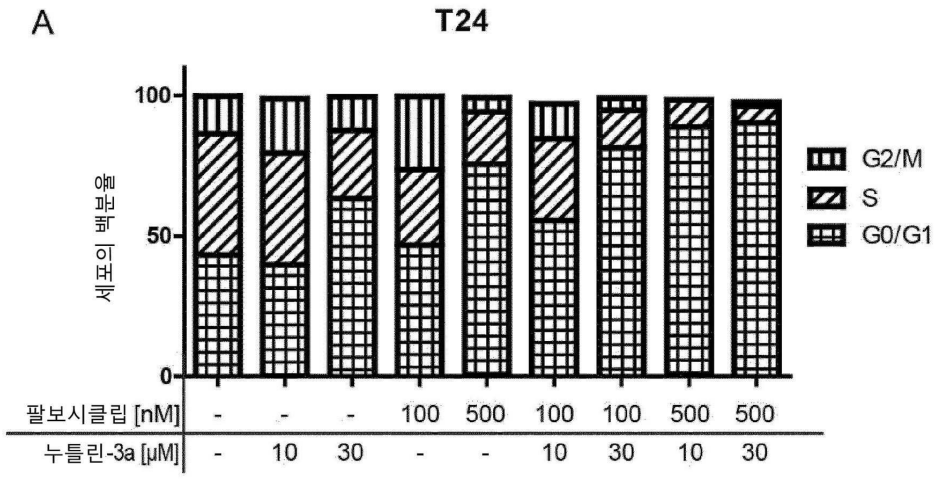
도면53



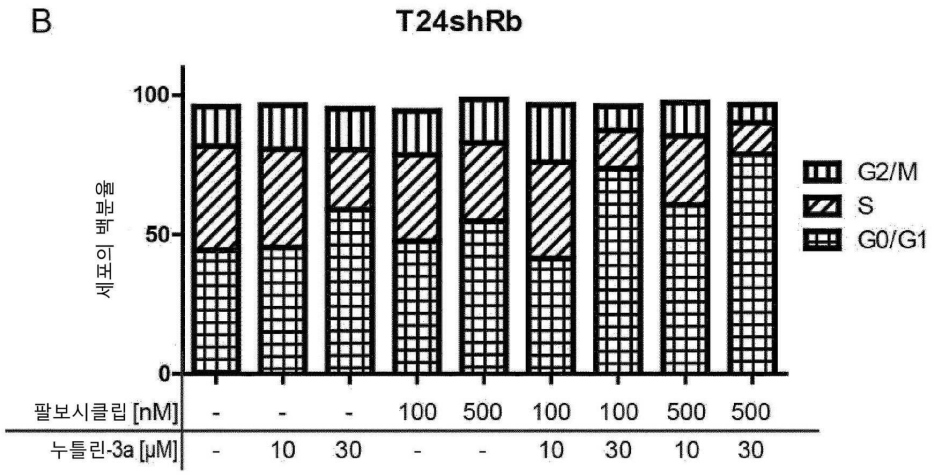
도면54



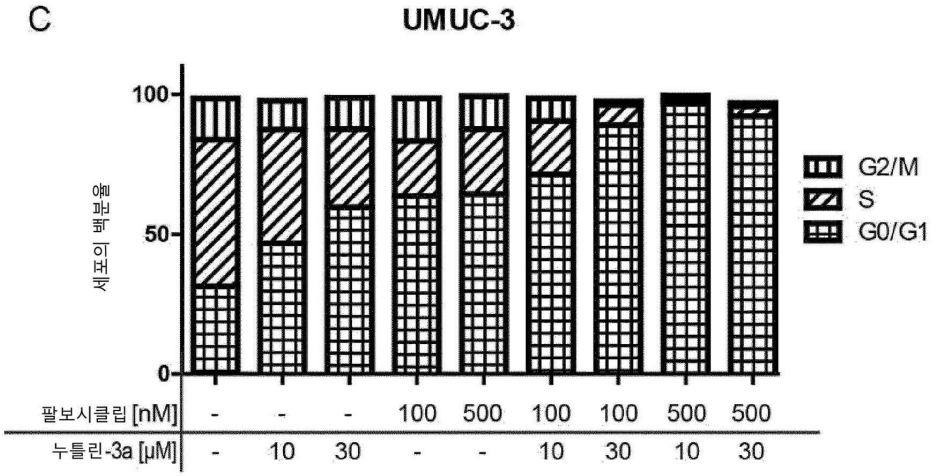
도면55a



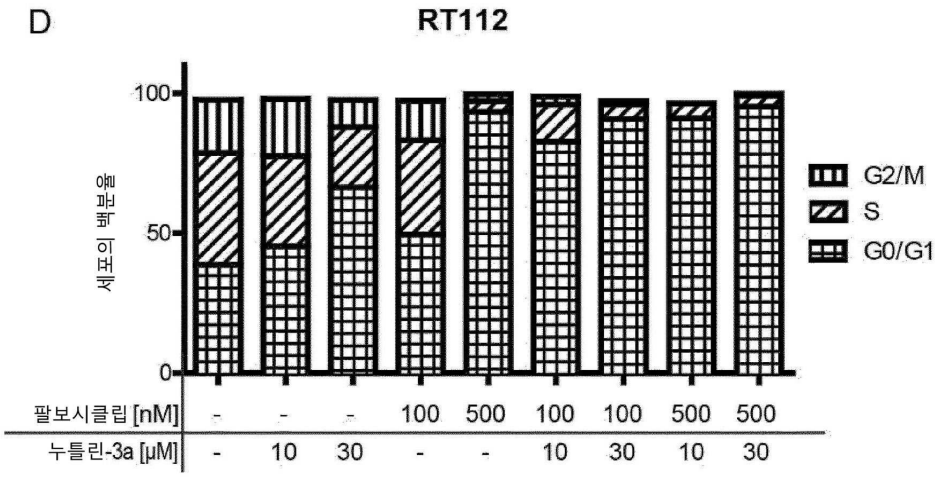
도면55b



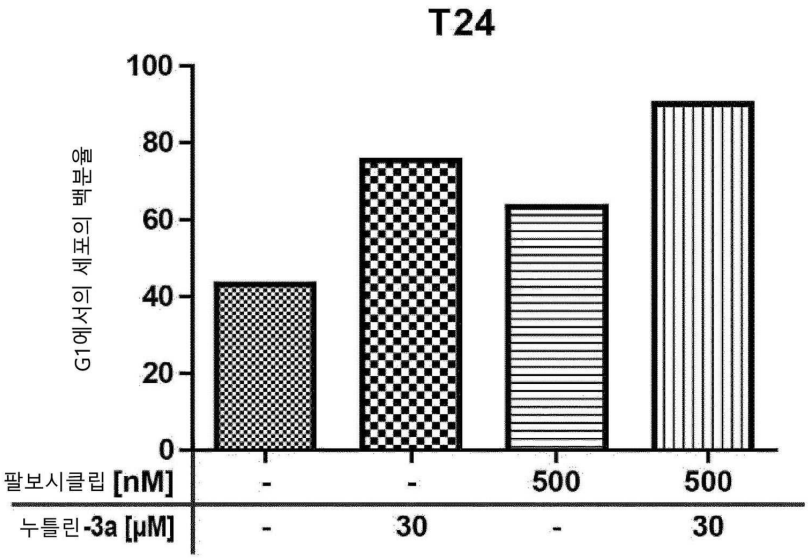
도면55c



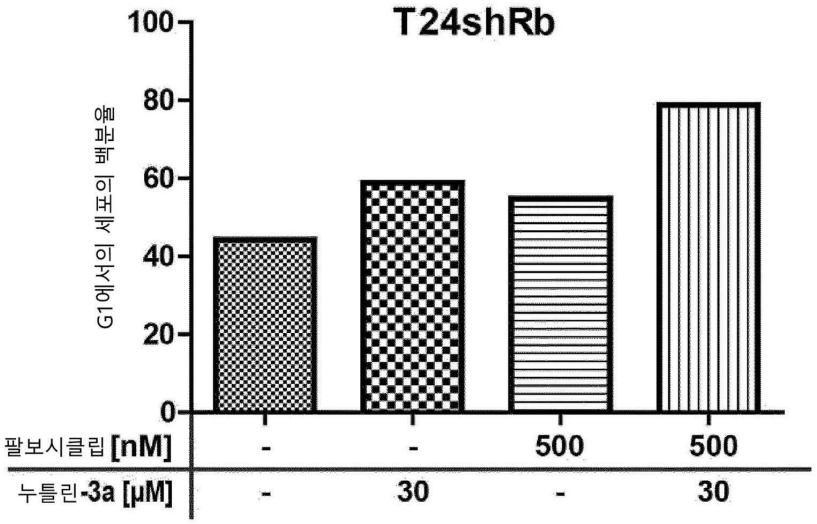
도면55d


D
RT112
100
50
0
세포의 비율
G2/M
S
G0/G1
팔보시클립 [nM] - - - 100 500 100 100 500 500
누틀린-3a [μM] - 10 30 - - 10 30 10 30

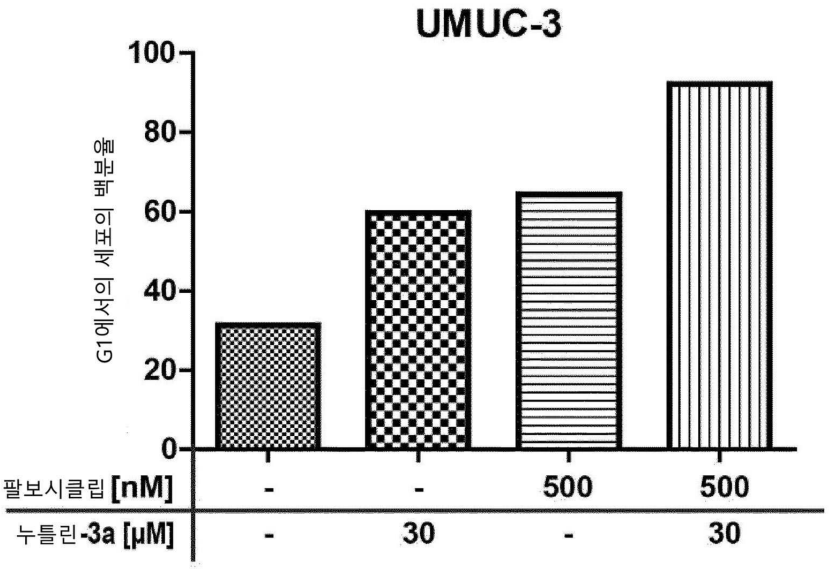
도면56a


T24
100
80
60
40
20
0
G1에서의 세포의 백분율
팔보시클립 [nM] - - 500 500
누틀린-3a [μM] - 30 - 30

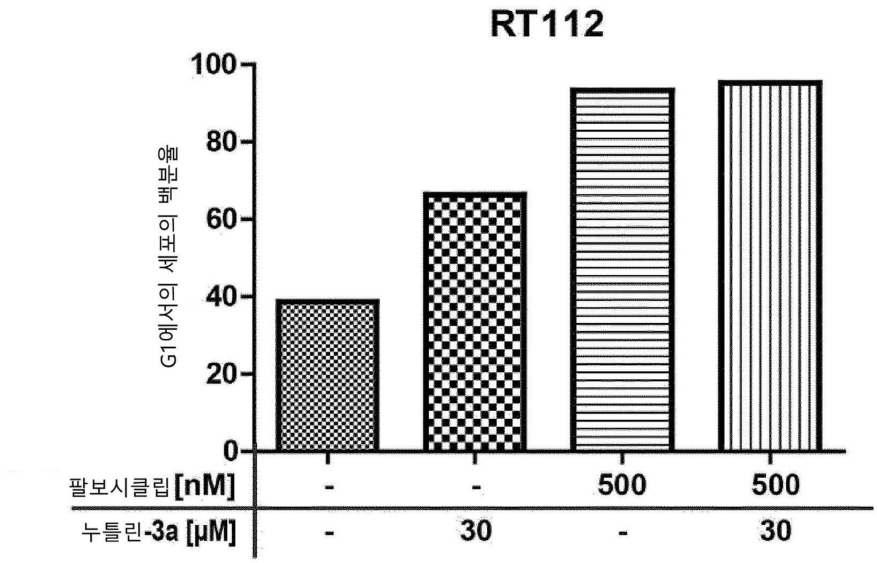
도면56b


T24shRb
G1에서의 세포의 백분율
100
80
60
40
20
0
팔보시클립 [nM]
누틀린-3a [μM]
-
-
500
500
-
30
-
30

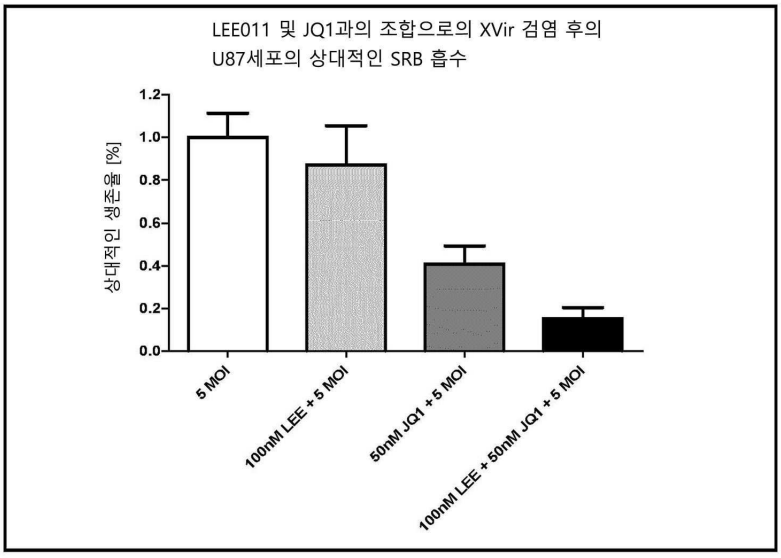
도면56c


UMUC-3
G1에서의 세포의 백분율
100
80
60
40
20
0
팔보시클립 [nM]
누틀린-3a [μM]
-
-
500
500
-
30
-
30

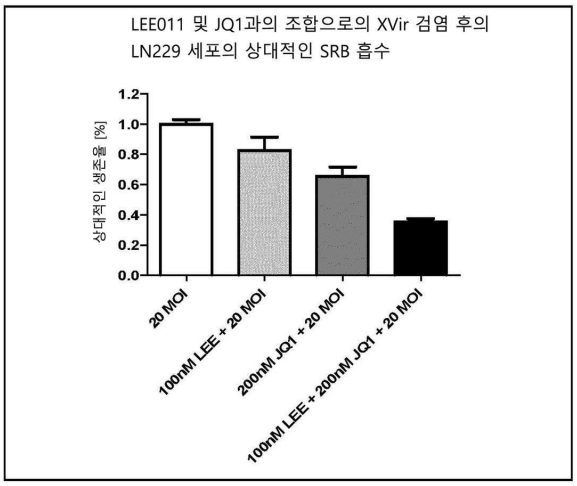
도면56d


RT112
G1에서의 세포의 백분율
100
80
60
40
20
0
팔보시클립 [nM]
누틀린-3a [μM]
-
-
500
500
-
30
-
30

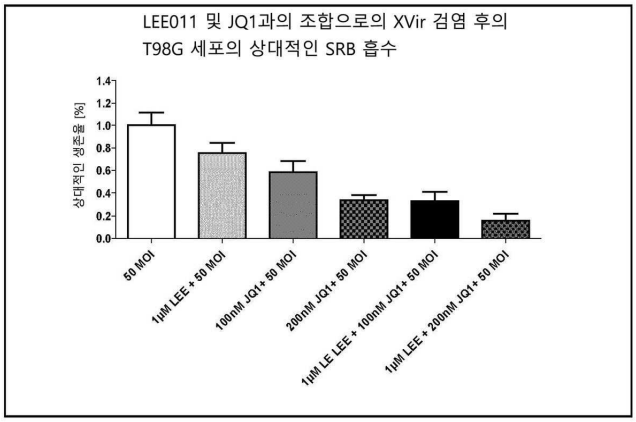
도면57


LEE011 및 JQ1과의 조합으로의 XVir 검염 후의
U87세포의 상대적인 SRB 흡수
상대적인 생존율 [%]
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
5 MOI
100nM LEE + 5 MOI
50nM JQ1 + 5 MOI
100nM LEE + 50nM JQ1 + 5 MOI

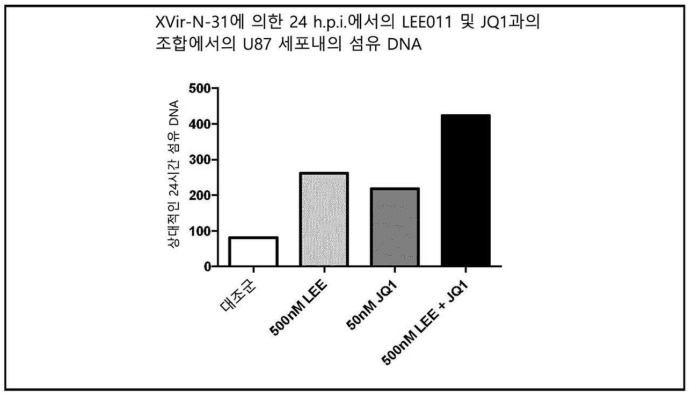
도면58



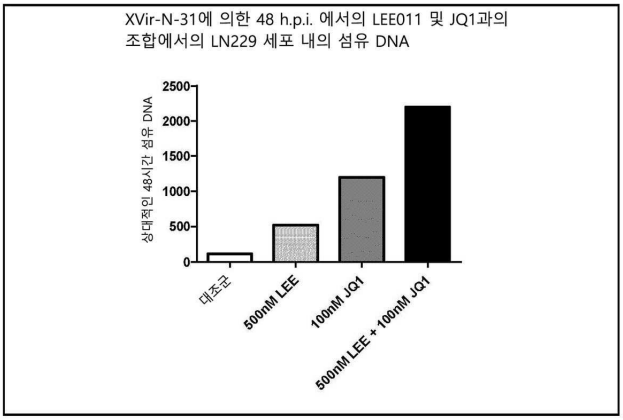
도면59



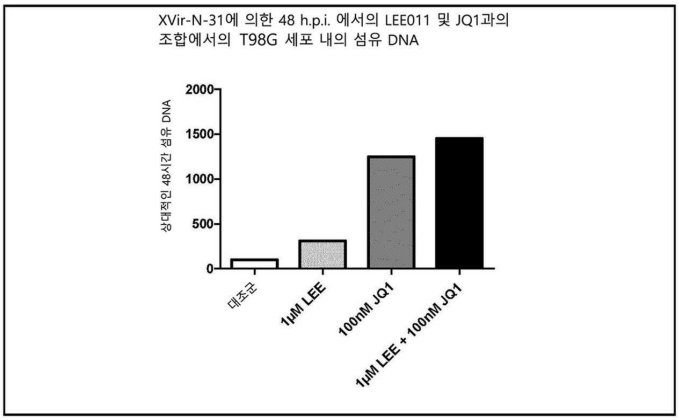
도면60



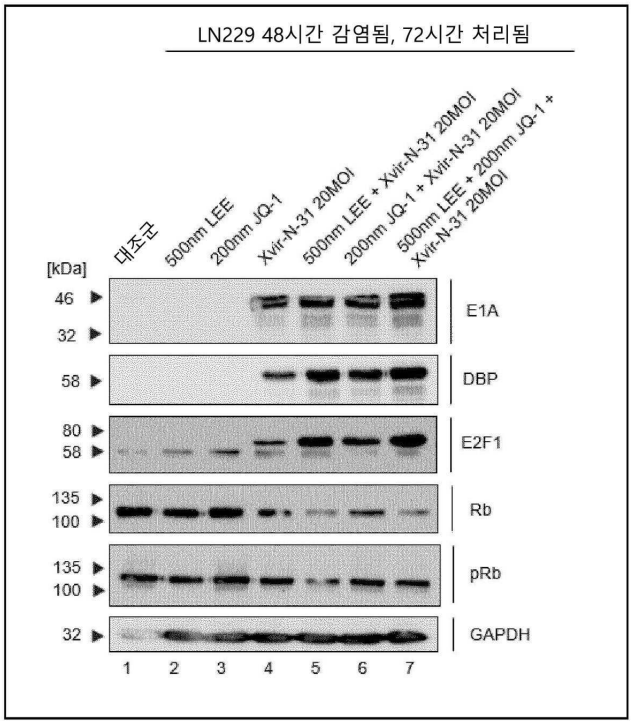
도면61



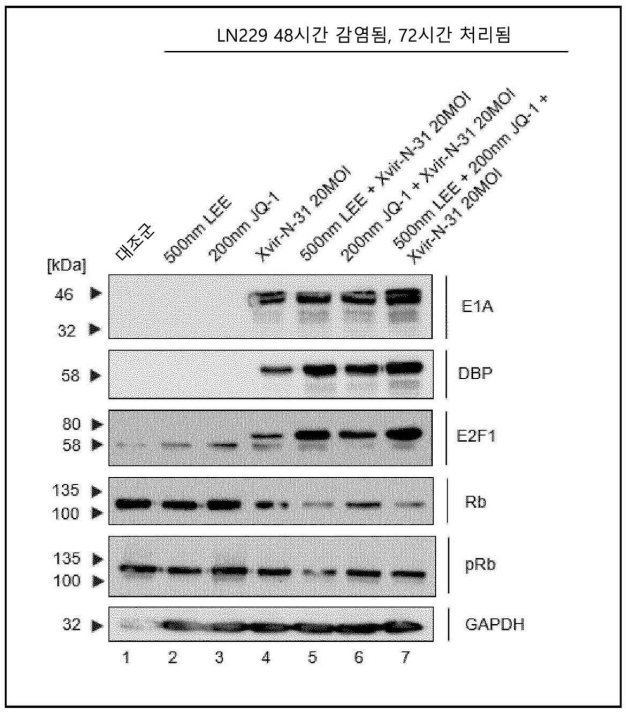
도면62



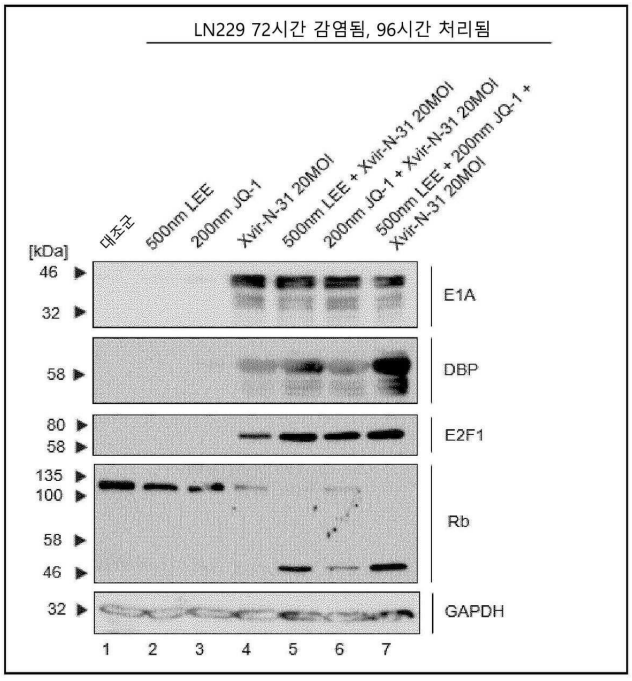
도면63



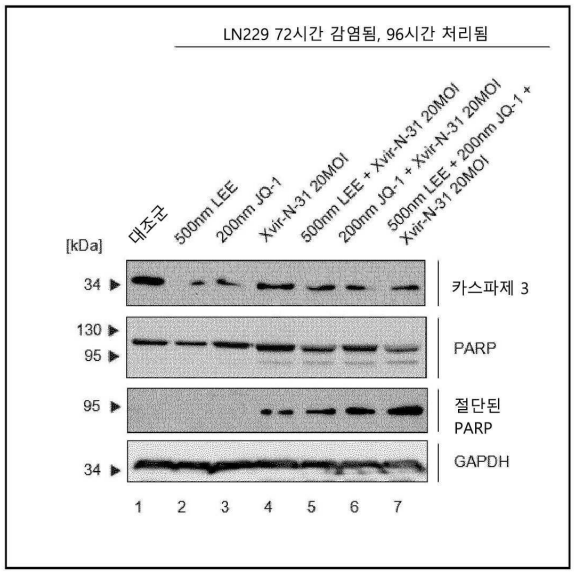
도면64


LN229 48시간 감염됨, 72시간 처리됨
대조군
500nm LEE
200nm JQ-1
Xvir-N-31 20MOI
500nm LEE + Xvir-N-31 20MOI
200nm JQ-1 + Xvir-N-31 20MOI
500nm LEE + 200nm JQ-1 + Xvir-N-31 20MOI
[kDa]
46
32
E1A
58
DBP
80
58
E2F1
135
100
Rb
135
100
pRb
32
GAPDH
1 2 3 4 5 6 7

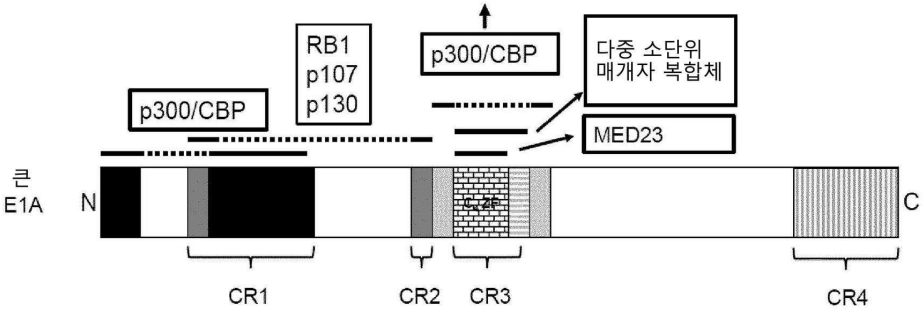
도면65


LN229 72시간 감염됨, 96시간 처리됨
대조군
500nm LEE
200nm JQ-1
Xvir-N-31 20MOI
500nm LEE + Xvir-N-31 20MOI
200nm JQ-1 + Xvir-N-31 20MOI
500nm LEE + 200nm JQ-1 + Xvir-N-31 20MOI
[kDa]
46
32
E1A
58
DBP
80
58
E2F1
135
100
58
46
Rb
32
GAPDH
1 2 3 4 5 6 7

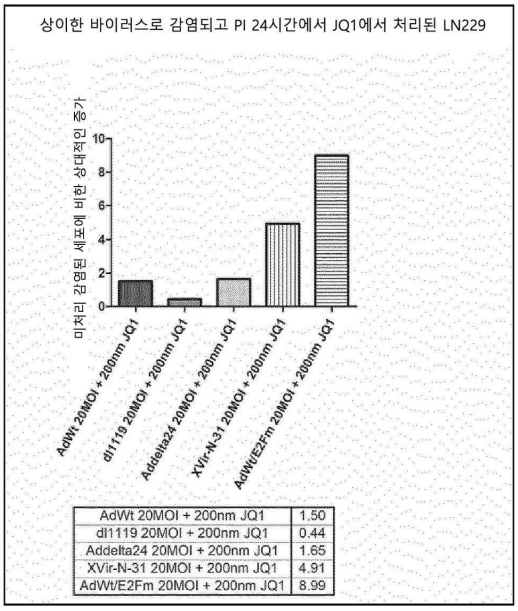
도면66



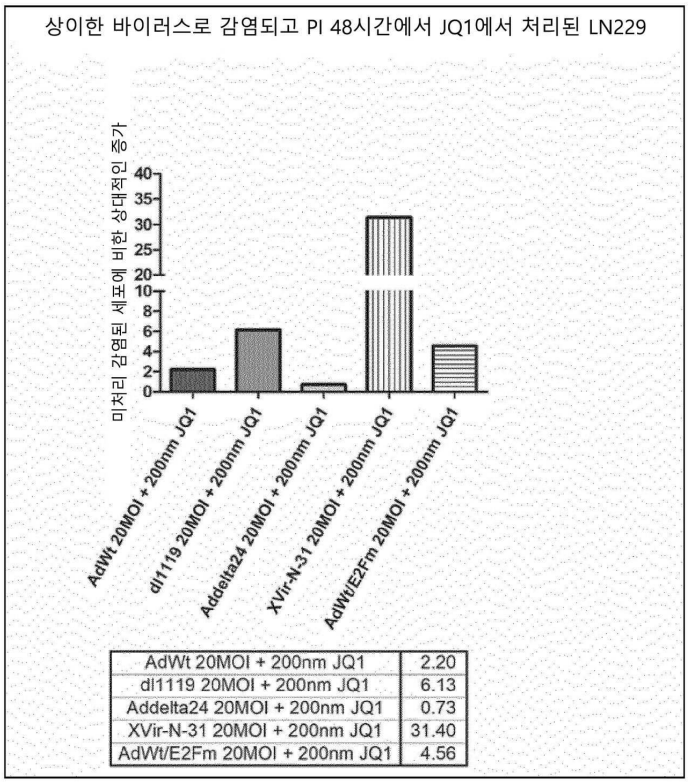
도면67



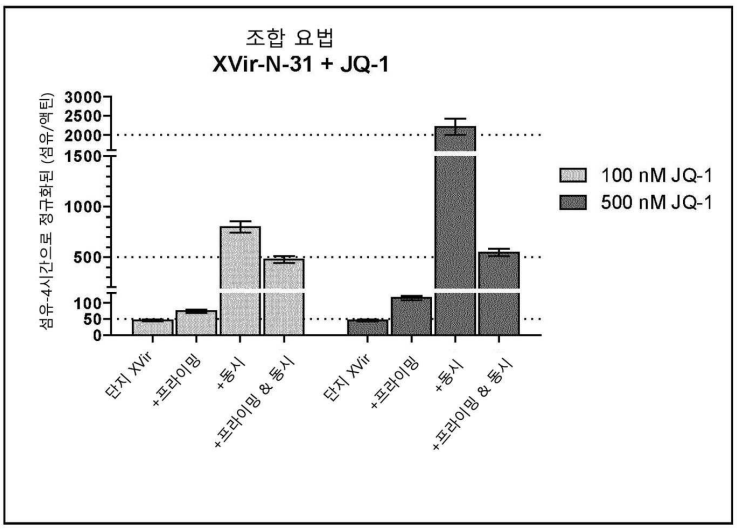
도면68



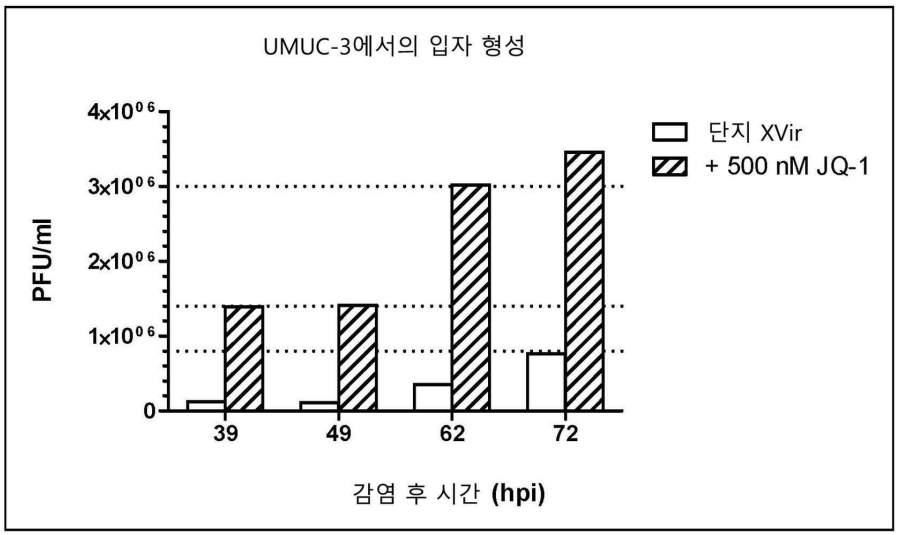
도면69


상이한 바이러스로 감염되고 PI 48시간에서 JQ1에서 처리된 LN229
미처리 감염된 세포에 비한 상대적인 증가
40
35
30
25
20
10
8
6
4
2
0
AdWt 20MOI + 200nm JQ1
dl1119 20MOI + 200nm JQ1
Addelta24 20MOI + 200nm JQ1
XVir-N-31 20MOI + 200nm JQ1
AdWt/E2Fm 20MOI + 200nm JQ1
AdWt 20MOI + 200nm JQ1 2.20
dl1119 20MOI + 200nm JQ1 6.13
Addelta24 20MOI + 200nm JQ1 0.73
XVir-N-31 20MOI + 200nm JQ1 31.40
AdWt/E2Fm 20MOI + 200nm JQ1 4.56

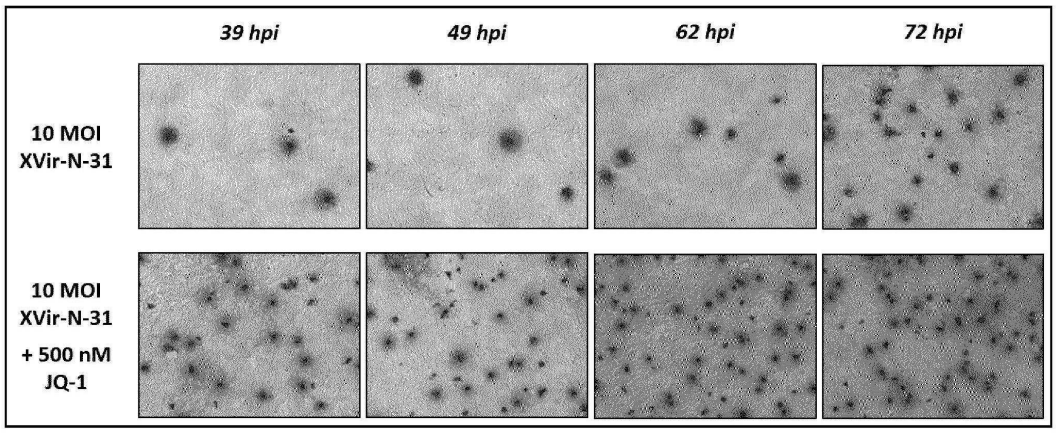
도면70


조합 요법
XVir-N-31 + JQ-1
섬유-4시간으로 정규화된 (섬유/액틴)
3000
2500
2000
1500
1000
500
100
50
0
100 nM JQ-1
500 nM JQ-1
단지 XVir
+프라이밍
+동시
+프라이밍 & 동시
단지 XVir
+프라이밍
+동시
+프라이밍 & 동시

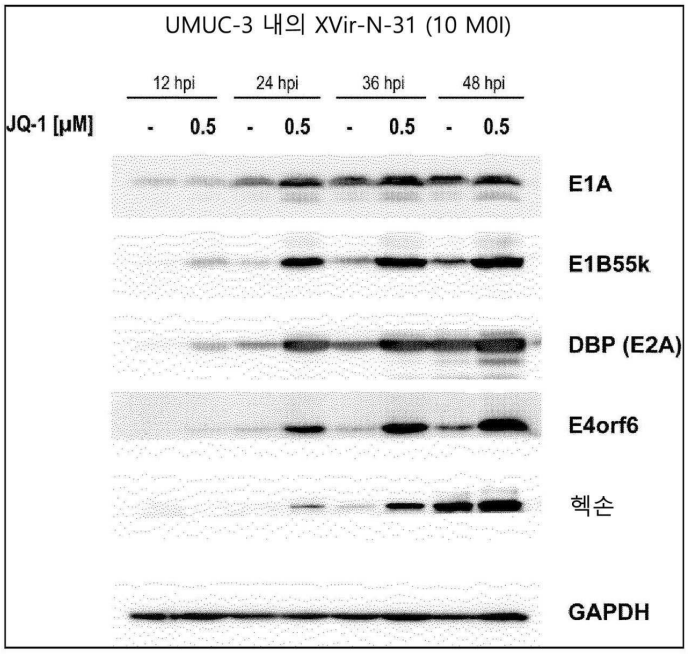
도면71


UMUC-3에서의 입자 형성
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
PFU/ml
39
49
62
72
감염 후 시간 (hpi)
단지 XVir
+ 500 nM JQ-1

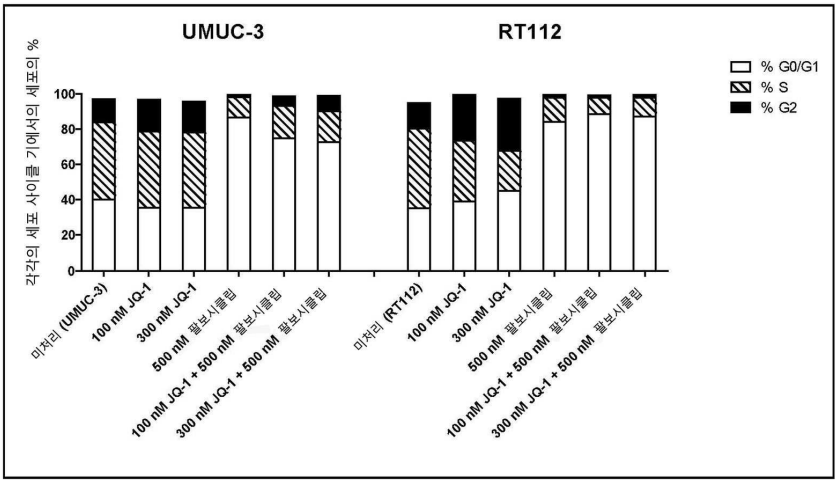
도면72


39 hpi
49 hpi
62 hpi
72 hpi
10 MOI XVir-N-31
10 MOI XVir-N-31 + 500 nM JQ-1

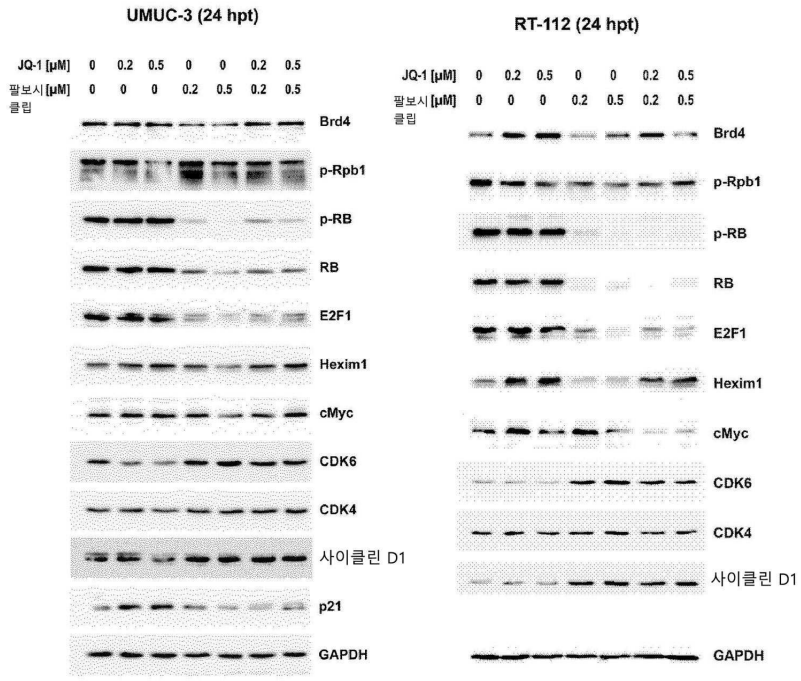
도면73


UMUC-3 내의 XVir-N-31 (10 M0I)
12 hpi
24 hpi
36 hpi
48 hpi
JQ-1 [μM]
- 0.5 - 0.5 - 0.5 - 0.5
E1A
E1B55k
DBP (E2A)
E4orf6
헥손
GAPDH

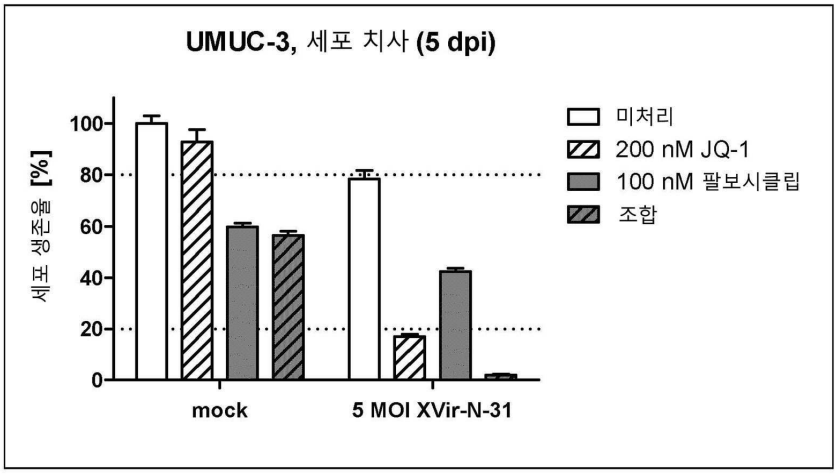
도면74


UMUC-3
RT112
% G0/G1
% S
% G2
각각의 세포 사이클 기에서의 세포의 %
100
80
60
40
20
0
미처리 (UMUC-3)
100 nM JQ-1
300 nM JQ-1
500 nM 팔보시클립
100 nM JQ-1 + 500 nM 팔보시클립
300 nM JQ-1 + 500 nM 팔보시클립
미처리 (RT112)
100 nM JQ-1
300 nM JQ-1
500 nM 팔보시클립
100 nM JQ-1 + 500 nM 팔보시클립
300 nM JQ-1 + 500 nM 팔보시클립

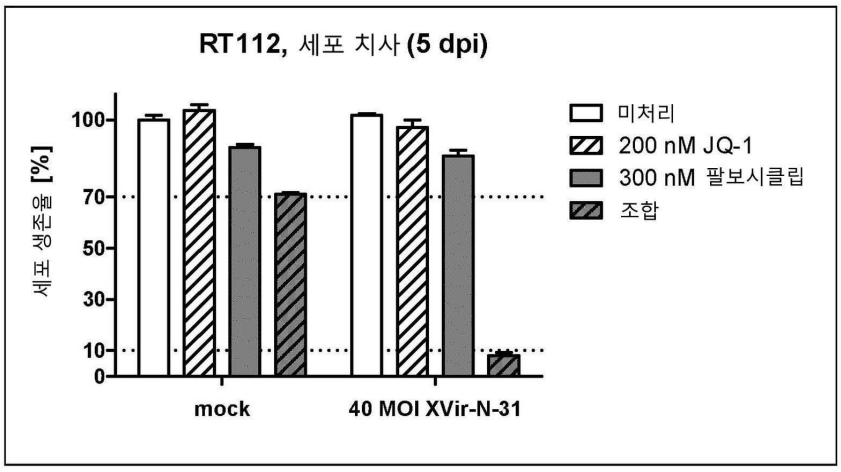
도면75


UMUC-3 (24 hpt)
JQ-1 [μM] 0 0.2 0.5 0 0 0.2 0.5
팔보시클립 [μM] 0 0 0 0.2 0.5 0.2 0.5
Brd4
p-Rpb1
p-RB
RB
E2F1
Hexim1
cMyc
CDK6
CDK4
사이클린 D1
p21
GAPDH
RT-112 (24 hpt)
JQ-1 [μM] 0 0.2 0.5 0 0 0.2 0.5
팔보시클립 [μM] 0 0 0 0.2 0.5 0.2 0.5
Brd4
p-Rpb1
p-RB
RB
E2F1
Hexim1
cMyc
CDK6
CDK4
사이클린 D1
GAPDH

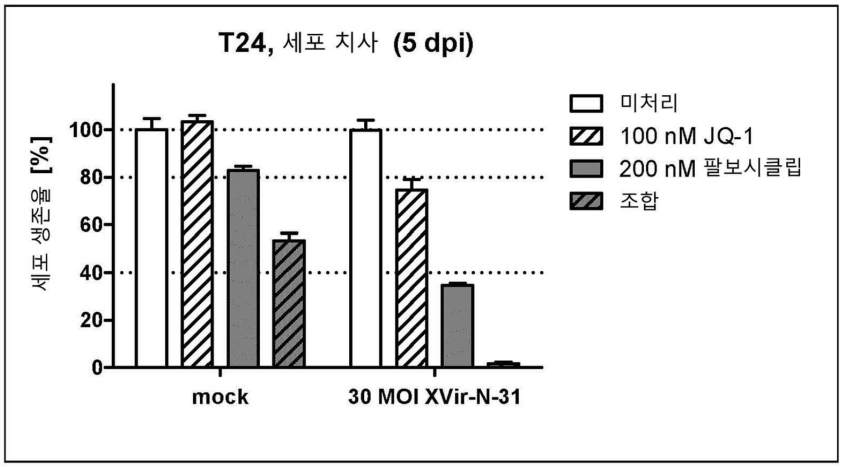
도면76


UMUC-3, 세포 치사 (5 dpi)
세포 생존율 [%]
100
80
60
40
20
0
mock
5 MOI XVir-N-31
미처리
200 nM JQ-1
100 nM 팔보시클립
조합

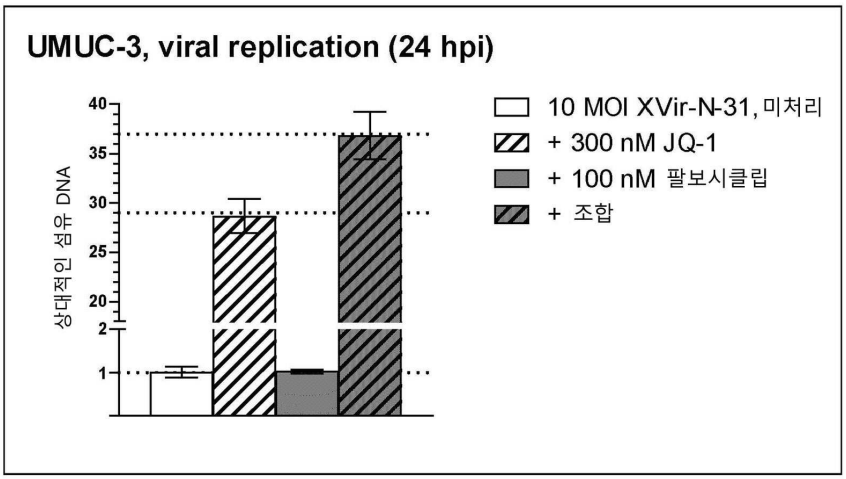
도면77



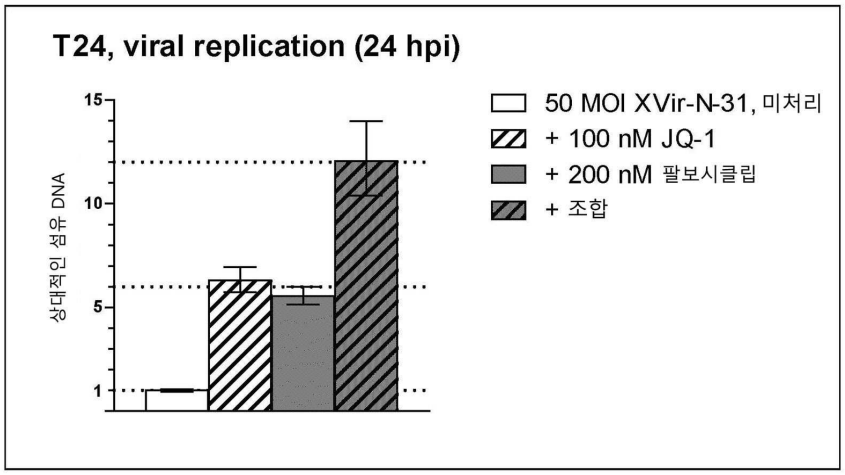
도면78



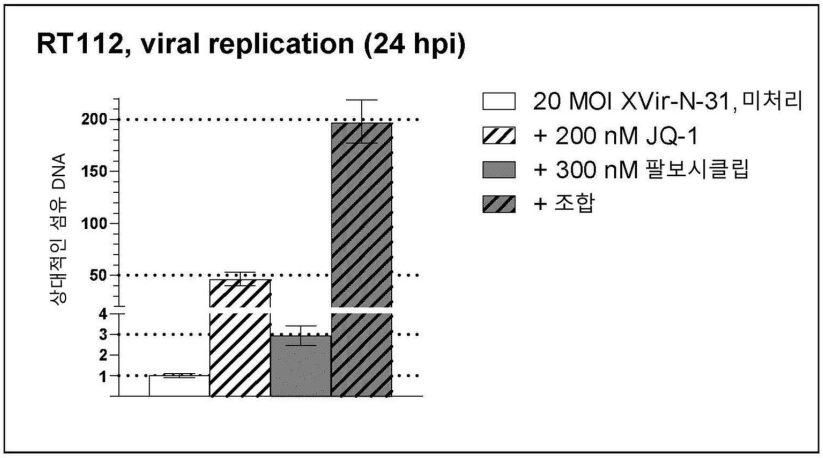
도면79



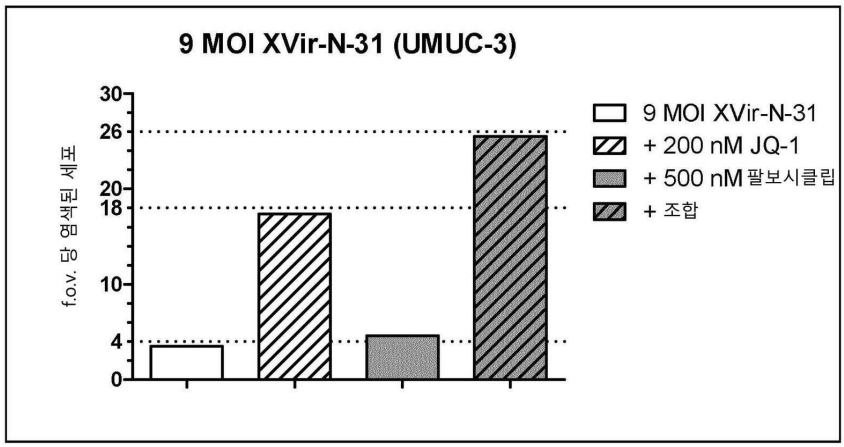
도면80



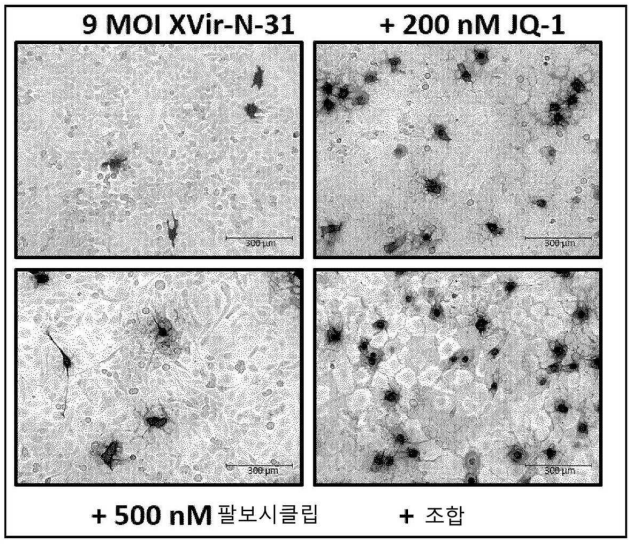
도면81



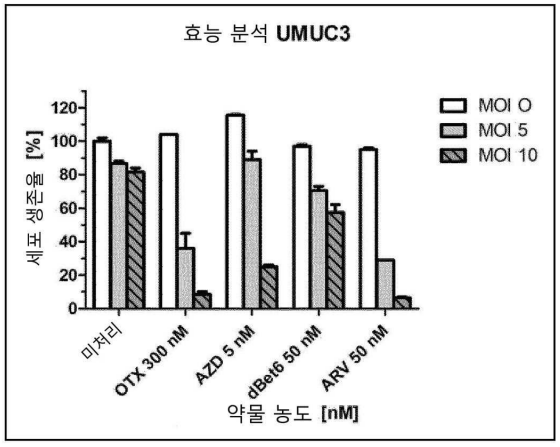
도면82



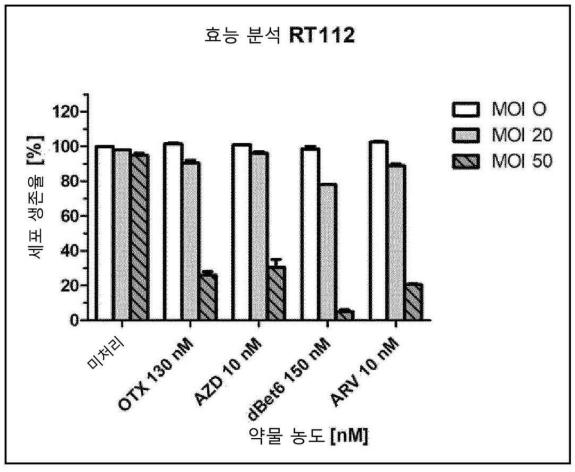
도면83



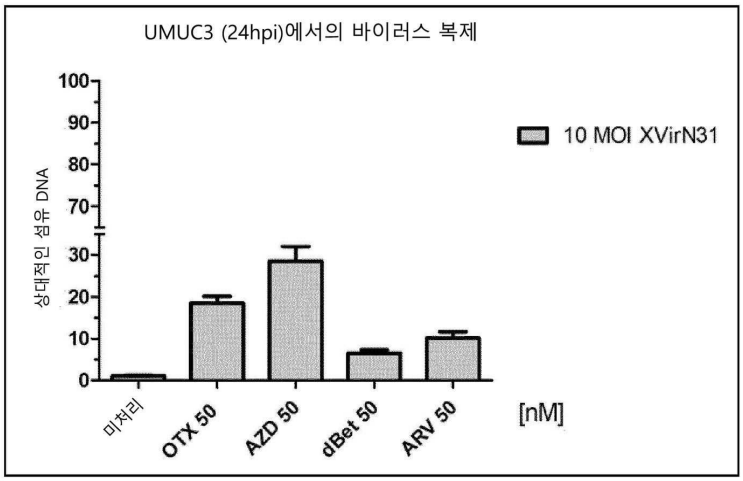
도면84



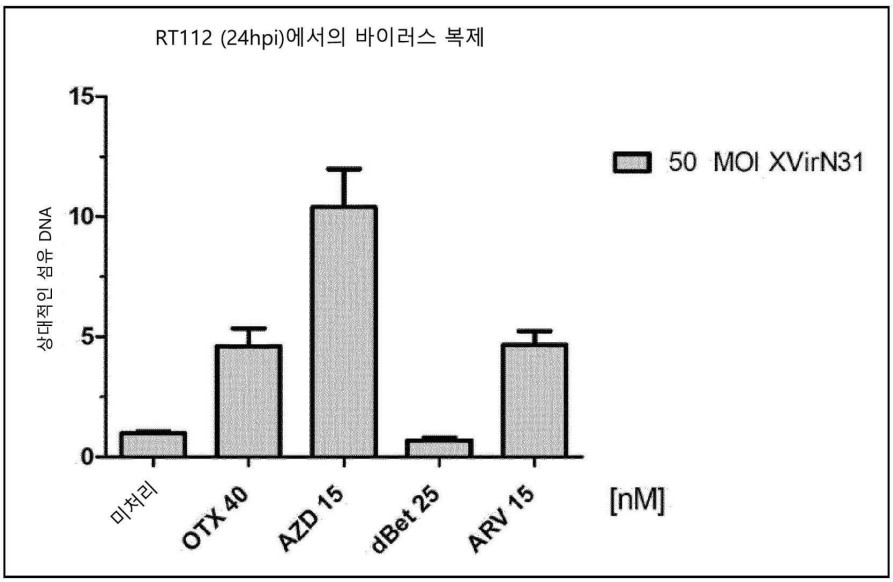
도면85



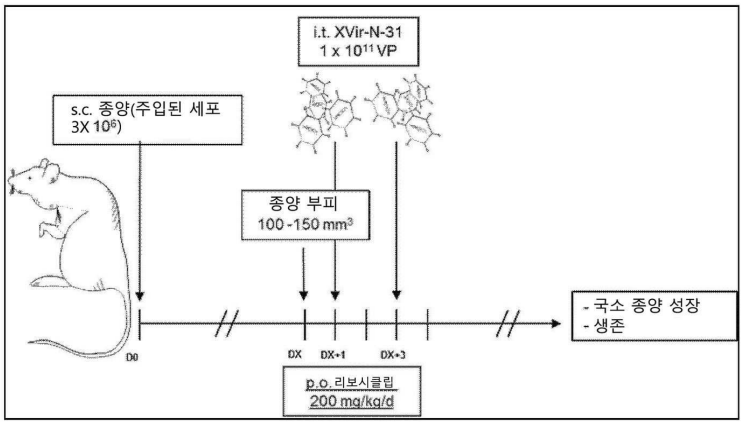
도면86



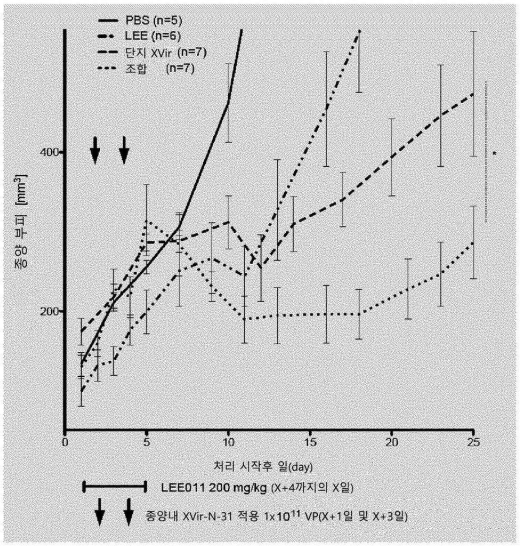
도면87



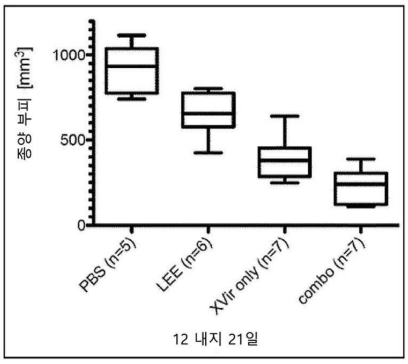
도면88



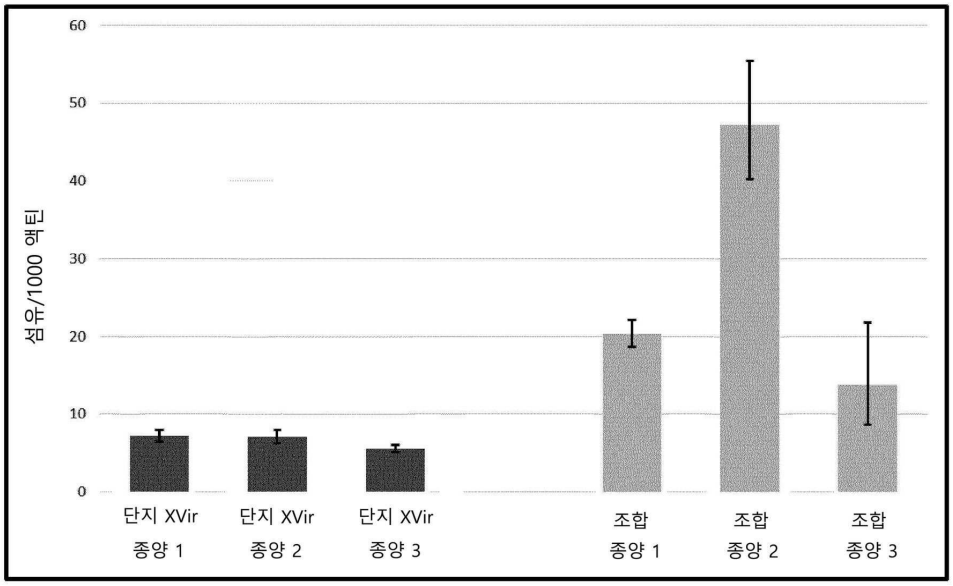
도면89



도면90



도면91



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> KLINIKUM RECHTS DER ISAR DER TECHNISCHEN UNIVERSITAT MUNCHEN

<120> Treatment of tumors by a combination of an oncolytic adenovirus, a CDK4/6 inhibitor and a further therapeutically active agent

<130> H 10073 PCT

<150> EP 19 000 406.9

<151> 2019-09-12

<150> EP 19 000 396.2

<151> 2019-09-05

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 1

aagctagccc tgcaaacatc acccaagcta ccagtggcag ta 42

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

ccgtcatctc tacagcccat gggctttgtc agagtcttgc 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

cttcctagcg actttgtgcc gtcagagtgg taggcaaggt 40

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 4

cgacgaggat gaagtcctgt gtctgctcag gatagcaggc gccat 45

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

gaggatgaag tcctgtgtct caggatagca ggcgccat 38

<210> 6

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

tgtttgtcta cagtcctgtg tctgctcagg atagcaggcg ccat 44

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

ttgtctacag tcctgtgtct caggatagca ggcgccat 38

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

tccctcccaa cacacagagt gacaggaaac cgtgtggaat 40

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

agcaaccctc ctaaaccact tgtttgaggt atccatgcta tca 43

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

acgctatgag acctcactga atcctgggtc aacccctcaa g 41

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

cgtccctgag ttcccaaccg cgaagtgtca taccgagtct t 41

<210> 12

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

tggcatggac tgtggtcatg agactggcgt cttcaccacc atgg 44

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

taagtaggtg cacagtaggt ctgaaaagtg caaagaacac ggctaag 47

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

gaaccagggc cgcccatact ggggctttgt cagagtcttg c 41

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

ccgttagccc aagagcaacc ggccgtgatg gtagagaag 39

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

ctgtggtact tcccagagac caggtgagtt ataccctgcc 40

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

aagctagccc tgcaaacatc a 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

ccgtcatctc tacagcccat 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

gggctttgtc agagtcttgc 20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

aagctagccc tgcaaacatc a 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

tcacccacac tgtgcccatc tacg 24

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

cagcggaacc gctcattgcc aatgg 25

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

catcccagga ggtcacttct g 21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

gacaacagcg gttcttgctc 20

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

acgugacacg uucggagaat t 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

cugaggaguu caucagccut t 21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

aggcugauga acuccucagt t 21

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

taagtaggtg cacagtaggt ctg 23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

aaagtgcaaa gaacacggct aag 23

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

aagctagccc tgcaaacatc a 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

taagtaggtg cacagtaggt ctg 23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

aaagtgcaaa gaacacggct aag 23

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

aagctagccc tgcaaacatc a 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 39

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

cagagatcgt gtattgagat tctcgagaat ctcaatacac gatctctg 48

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

taagtaggtg cacagtaggt ctga 24

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

aaagtgcaaa gaacacggct aag 23

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

aagctagccc tgcaaacatc a 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

cccaagctac cagtggcagt a 21

<210> 44

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

agttttcgcg cttaaatttg agaaagggcg cgaaactagt cctt 44

<210> 45

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

aaggactagt ttcgcgccct ttctcaaatt taagcgcgaa aact 44

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

aggagtcgga tttaaatttg agaaagtaat aggtactagt cctt 44

<210> 47

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

aaggactagt acctattact ttctcaaatt taaatccgac tcct 44

<210> 48

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

atcgatctta cctgccacga ggcttttcca 30

<210> 49

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

tacaaaagca g 11

<210> 50

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

acaactccat ct 12

<210> 51

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

atcgattttc ca 12

<210> 52

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

tacaaaaagc a 11

<210> 53

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

acaacttgtg actgccgcgg agactgtttc tgcccatct 39

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

Thr Thr Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Ser

1 5 10