



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0026348
(43) 공개일자 2025년02월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7002985 (분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년01월09일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7022799
원출원일자(국제) 2017년01월09일
심사청구일자 2022년01월07일
- (85) 번역문제출일자 2025년01월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2017/050036
- (87) 국제공개번호 WO 2017/118864
국제공개일자 2017년07월13일
- (30) 우선권주장
1600380.8 2016년01월08일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
레플리문 리미티드
영국 옥스퍼드 4알큐 옥스퍼드 옥스퍼드셔 밀톤
파크 이노베이션 센터 69
- (72) 발명자
코핀, 로버트
영국, 옥스퍼드 옥스퍼드셔 OX14 4RQ, 밀톤 파크,
이노베이션 센터 69, 레플리문 리미티드
- (74) 대리인
공병욱

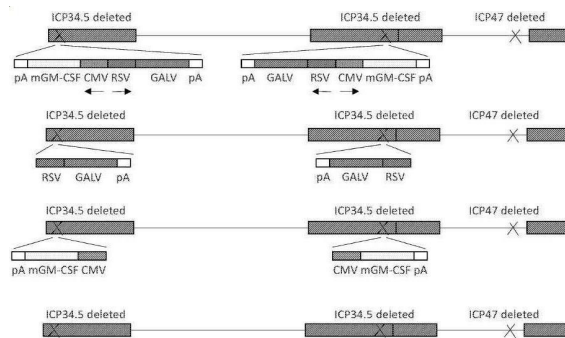
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 항종양 바이러스**

(57) 요약

본 발명은 (i) 융합유도(fusogenic) 단백질-코딩 유전자; 및 (ii) 면역 자극 분자-코딩 유전자를 포함하는 항종양 바이러스에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/535 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2710/16621 (2013.01)

C12N 2710/16633 (2013.01)

C12N 2710/16643 (2013.01)

C12N 2740/13022 (2013.01)

(30) 우선권주장

1600381.6 2016년01월08일 영국(GB)

1600382.4 2016년01월08일 영국(GB)

청구범위유예 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

이종성 융합유도 단백질 인코딩 유전자(heterologous fusogenic protein-encoding gene) 및 CTLA-4 억제제를 인코딩하는 유전자를 포함하는 항종양 바이러스(oncolytic virus).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합유도 단백질은 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus, VSV) G-단백질, 신시틴-1(syncytin-1), 신시틴-2(syncytin-2), 원숭이 바이러스 5(simian virus 5, SV5) F-단백질, 홍역 바이러스(measles virus, MV) H-단백질, MV F-단백질, 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus, RSV) F-단백질, 및

긴팔원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus, GALV), 쥐백혈병 바이러스(murine leukemia virus, MLV), 메이슨-화이저 원숭이 바이러스(Mason-Pfizer monkey virus, MPMV) 또는 말 감염성 빈혈 바이러스(equine infectious anaemia virus, EIAV)로부터의 R-펩타이드가 결실된 당단백질(glycoprotein)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 항종양 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서, 다음 중 하나 이상인, 항종양 바이러스:

(a) 융합유도 단백질이 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus, GALV)로부터 유래하고 R-막관통 펩타이드가 돌연변이되거나 결실됨(GALV-R-); 및

(b) CTLA-4 억제제가 항-CTLA-4 항체 또는 그의 단편임.

청구항 4

제1항에 있어서, 하나 이상의 면역 자극 분자를 인코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 항종양 바이러스.

청구항 5

제4항에 있어서, 하나 이상의 면역 자극 분자는 다음을 포함하는 것인, 항종양 바이러스:

(a) GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-24, 타입 I 인터페론, 인터페론 감마, 타입 III 인터페론, TNF 알파, TGF 베타 길항제, 면역 체크포인트 길항제 또는 면역 증강 경로의 작용제;

(b) CD40, ICOS, GITR, 4-1-BB, OX40 또는 flt3의 작용제인, 면역 증강 경로의 작용제;

(c) CD40 리간드(CD40L), ICOS 리간드, GITR 리간드, 4-1-BB 리간드, OX40 리간드 또는 flt3 리간드인, 면역증강 경로의 작용제; 또는

(d) PD-1 억제제, PD-L1 억제제, LAG-3 억제제, TIM-3 억제제, VISTA 억제제, CSF1R 억제제, IDO 억제제, CEACAM1 억제제, KIR 길항제, SLAMF7 억제제 또는 CD47 억제제인, 면역 체크포인트 길항제.

청구항 6

제1항에 있어서, GM-CSF를 인코딩하는 유전자를 추가적으로 포함하는 것인, 항종양 바이러스.

청구항 7

제4항에 있어서, 둘 이상의 면역 자극 분자를 인코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 면역 자극 분자는 GM-CSF; 및 CD40L, GITR 리간드, 4-1-BB 리간드, OX40 리간드, 및 ICOS 리간드 중에서 하나 이상을 포함하는 것인, 항종양 바이러스.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항종양 바이러스는 헤르페스 바이러스(herpes viruses), 폭스 바이러스(pox viruses), 아데노바이러스(adenoviruses), 레트로바이러스(retroviruses), 램도바이러스(rhabdoviruses), 파라믹소바이러스(paramyxoviruses) 및 레오바이러스(reoviruses)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 항종양 바이러스.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항종양 바이러스는 (a) 단순 헤르페스 바이러스(HSV); 또는 (b) HSV1인, 항종양 바이러스.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 HSV1은 다음에서 유래한 것인, 항종양 바이러스:

- 수탁번호 ECACC 16121904인 RH018A주;
- 수탁번호 ECACC 16121902인 RH004A주;
- 수탁번호 ECACC 16121907인 RH031A주;
- 수탁번호 ECACC 16121908인 RH040B주;
- 수탁번호 ECACC 16121903인 RH015A주;
- 수탁번호 ECACC 16121905인 RH021A주;
- 수탁번호 ECACC 16121906인 RH023A주; 또는
- 수탁번호 ECACC 16121909인 RH047A주.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 HSV1은 수탁번호 ECACC 16121904인 RH018A주인, 항종양 바이러스.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 바이러스는 HSV이고, 다음 중 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 항종양 바이러스:

- (i) 기능적 ICP34.5를 발현하지 않음;
- (ii) 기능적 ICP47을 발현하지 않음; 및
- (iii) US11 유전자를 즉각 초기 유전자(immediate early gene)로 발현함.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 바이러스는 다음 중 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 항종양 바이러스:

- (a) 융합유도 단백질 인코딩 유전자 및 CTLA-4 억제제 인코딩 유전자가 삽입, 또는 부분 결실 또는 전체 결실에 의하여 ICP34.5 인코딩 위치에 삽입됨;
- (b) 융합유도 단백질 인코딩 유전자 및 CTLA-4 억제제 인코딩 유전자가 각각 별도의 억제적 조절(regulatory control) 하에 있음; 및
- (c) 융합유도 단백질 인코딩 유전자 및 CTLA-4 억제제 인코딩 유전자가 서로 배면 배향(back to back orientation)으로 삽입됨.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 융합유도 단백질 인코딩 유전자의 서열, CTLA-4 억제제 인코딩 유전자의 서열, 또는 이들의 조합은 타겟 세포에서 발현 수준을 증가시키도록 코돈 최적화된 것인, 항종양 바이러스.

청구항 15

제1항에 있어서, 다음을 특징으로 하는, 항종양 바이러스:

- (a) 상기 바이러스는 세 가지 이종성 유전자(heterologous gene)를 발현하고,
 - (i) 각 유전자는 CMV 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR 프로모터 중에서 선택되는 서로 다른 프로모터에 의해 구동되거나;
 - (ii) BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아데닐화 서열 중 선택된 서로 다른 폴리아데닐화 서열에 의해 종결되거나; 또는
 - (iii) 각 유전자는 CMV 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR 프로모터 중에서 선택되는 서로 다른 프로모터에 의해 구동되고, BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아데닐화 서열 중 선택된 서로 다른 폴리아데닐화 서열에 의해 종결되는 것임; 또는
- (b) 상기 바이러스는 네 가지 이종성 유전자를 발현하고,
 - (i) 네 가지 유전자는 각각 CMV 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR 프로모터에 의해 구동되거나;
 - (ii) 네 가지 유전자는 BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아데닐화 서열 중에서 선택된 서로 다른 폴리아데닐화 서열에 의해 종결되거나; 또는
 - (iii) 네 가지 유전자는 각각 CMV 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR 프로모터에 의해 구동되고, BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아데닐화 서열 중에서 선택된 서로 다른 폴리아데닐화 서열에 의해 종결되는 것임.

청구항 16

다음을 포함하는 암 치료용 억제학적 조성물:

- (a) 유효 성분으로, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항종양 바이러스; 및
- (b) 억제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 암은 다음 중 하나인 약제학적 조성물:

- (a) 고형 종양;
- (b) 선암종(adenocarcinoma), 암종(carcinoma) 또는 육종(sarcoma)인 고형 종양; 또는
- (c) 두경부, 전립선, 유방, 난소, 폐, 간, 자궁내막, 방광, 담낭, 췌장, 결장, 신장, 위, 식도, 또는 자궁경부의 암, 중피종, 흑색종, 피부암, 림프종, 신경교종, 신경계의 암, 육종 또는 연조직 육종.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 치료는 항종양 바이러스를 다음 중 하나의 방법으로 투여하는 치료를 포함하는 것인, 약제학적 조성물:

- (a) 직접 종양 내 주사;
- (b) $10^4 \sim 10^{10}$ pfu 범위의 용량으로 직접 종양 내 주사;
- (c) 여러 번 직접 종양 내 주사; 또는
- (d) 3일에서 3주 간격으로 여러 번 직접 종양 내 주사.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 치료는 항종양 바이러스와 동시에, 또는 별도로 추가 항암제를 투여하는 치료를 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 추가 항암제는 다음 중 하나인, 약제학적 조성물:

- (a) 면역 동시-억제 경로 표적 제제, 면역 동시-자극 경로 표적 제제, 방사선요법, 화학요법, 방사선 및 화학요법, 종양의 특정 유전자 돌연변이를 표적으로 하는 제제, 1 이상의 종양 항원 또는 신항원에 대한 면역 반응을 유도하는 제제, T 세포 또는 NK 세포에서 유래된 세포생성물, STING, cGAS 또는 TLR을 포함한 선천성 면역 반응을 자극하기 위한 제제; 염증 경로를 자극하기 위한 제제, 제2 항종양 바이러스, IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) 경로 억제제, 및 이들의 조합;
- (b) 다음으로부터 선택된 면역 동시-억제 경로 표적 제제: CTLA-4 억제제, PD-1 억제제, PD-L1 억제제, LAG-3 억제제, TIM-3 억제제, VISTA 억제제, CSF1R 억제제, IDO 억제제, CEACAM1 억제제, KIR 억제제, SLAMF7 억제제 및 CD47 억제제;
- (c) GITR 작용제, 4-1-BB 작용제, OX40 작용제, CD40 작용제 및 ICOS 작용제로부터 선택된 면역 동시-자극 경로 표적 제제; 또는
- (d) 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항종양 면역치료제 및 암치료에 있어서 항종양 면역치료제의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 바이러스는 고효율로 세포에 들어갈 수 있는 특이 능력을 가지고 있다. 세포에 들어가면 바이러스 유전자가 발현되고 바이러스가 복제된다. 이로 인해 감염된 세포가 사멸하고 세포가 파열될 때 세포의 항원 성분이 방출된다. 결과적으로, 바이러스 매개 세포 사멸은 이들 세포 성분에 대한 면역 반응을 야기하는 경향이 있다. 상기 세포성분은 숙주 세포로부터 유래된 성분 및 바이러스 자체에 의해 암호화되거나 바이러스에 삽입되어 암호화된 성분들 모두를 포함한다. 면역 반응은 또한 숙주세포에서 면역 반응의 활성화를 돕는 소위 손상 관련 분자 패턴 (damage associated molecular patterns, DAMPs)의 인지에 기인하여 강화된다.
- [0004] 바이러스는 바이러스 감염인지에 대한 숙주 반응의 일부로서 선천성(innate) 면역 반응의 다양한 매개체와 관련된다. 예를 들어, 톨-유사 수용체(toll-like receptors), cGAS / STING 신호 전달 및 및 병원균 관련 분자 패턴(pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 인식으로 인해 인터페론 반응 면역반응 활성화가 나타난다. 이러한 면역 반응은 암 환자에게 면역적 이익을 가져올 수 있다. 즉, 종양 항원에 대한 면역 반응이 미세전이성 질환(micro-metastatic disease)을 포함한 바이러스에 감염되지 않은 종양을 치료하고, 재발에 대한 백신을 제공할 수 있다.
- [0005] 바이러스의 직접 (항종양, oncolytic) 효과, 및 종양항원에 대한 면역반응 (즉, 개별 종양의 특정 돌연변이 유전자에서 유래된 비-자기(non-self) '신생 항원(neo-antigens)'을 포함하는)에 대한 면역 반응을 조합하여 '항종양 면역요법(oncolytic immunotherapy)'이라 한다.
- [0006] 바이러스는 감염된 세포에서 바이러스 계통에 삽입된 이종성(heterologous) 유전자를 발현하는 전달 매개체 (백터)로 사용할 수도 있다. 이러한 속성때문에 바이러스는 다양한 생명 공학 및 의료 응용 프로그램에 유용하다. 예를 들어, 이종성 치료 유전자를 발현하는 바이러스가 유전자 치료에 사용될 수 있다. 종양 살상 면역 요법(oncolytic immunotherapy)과 관련하여, 전달된 유전자에는 특정 종양 항원을 코딩하는 유전자, 바이러스 복제 및 세포 사멸 후 면역 반응을 유도하거나 면역 원성을 증가시키는 유전자, 생성된 면역 반응을 형성하는 유전자, 종양의 일반적인 면역 활성화 상태를 증가시키는 유전자, 또는 바이러스의 직접적인 항종양(oncolytic) 성질 (예를들어, 세포 독성 효과)을 증가시키는 유전자가 포함될 수 있다. 중요한 것은, 바이러스는 전신 항종양 면역 반응을 종양에 직접적으로 및 선택적으로 개시, 강화 또는 형성시키는 것을 돕는 암호화된 분자를 전달하는 능력을 가진다. 즉, 바이러스는 동일한 경로를 타겟팅하는 다른 분자를 전신 투여하는 것과 비교하여, 독성 감소 효과 또는 정상(즉, 비암성) 조직에 대한 목표의(off-target) 효과보다 종양(바이러스에 감염되지 않은 종양 포함)에 대한 유익한 효과가 있을 수 있다.
- [0007] 단순 포진 바이러스 (herpes simplex virus, HSV)를 포함하는 다수의 바이러스가 암의 항종양 치료에 유용함이 증명되었다. 암의 항종양 치료에 사용하기 위한 HSV는 더 이상 병원성이 아니지만 여전히 종양 세포에 침투하여 죽일 수 있다. ICP34.5, ICP6, 및/또는 티미딘 키나아제를 암호화하는 유전자 파괴를 포함하여, HSV에 대한 다수의 무능력 돌연변이(disabling mutations)가 확인되었다. 이러한 돌연변이는 바이러스가 배양 상태(in culture) 또는 인 비보 종양 조직에서 복제되는 것을 막지 못한다. 그러나, 정상조직에서는 복제를 막는다. ICP34.5 유전자만 파괴된 HSV는 인 비트로의 많은 종양 세포 유형에서 복제되었고, 종양 조직에서 선택적으로 복제되었지만, 마우스 종양 모델에서는 주변 조직을 제외한 종양 조직에서 선택적으로 복제되었다. ICP34.5 결실된 HSV, 또는 ICP34.5 및 ICP6 결실된 HSVdml 임상시험에서는 인간 종양 조직에서 안전하고 선택적인 복제를 나타내었다.
- [0008] 상술한 바와 같이, HSV를 포함하는 항종양 바이러스는 또한 암 치료에서 치료 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. ICP47가 추가로 결실되고 GM-CSF 에 대한 이종성 유전자를 암호화하는 ICP34.5 결실된 바이러스를 이용하여 임상시험을 진행하였다. 인간에서의 안전성 및 효능이 입증된 흑색종에서의 제 3 상 시험을 포함하였다. 임상시험 데이터는 바이러스 주입된 종양에서 종양 반응이 나타날 수 있고, 바이러스 주입되지 않은 종양에서 더 적게 나타남을 보여주었다.
- [0009] 반응은 매우 오래 지속되는 경향이 있었으며 (수개월에서 수년) 반응 환자에서 생존이득(survival benefit)이 달성된 것으로 보였다. 이들 각각은 직접적인 항종양 효과 이외에 암의 치료에서 면역 체계에 관여함을 나타낸다. 그러나 항종양 바이러스에 대한 데이터와 다른 데이터는 일반적으로 모든 종양이 치료에 반응하는 것은 아니며 모든 환자가 생존 이익을 얻는 것은 아니라는 사실을 보여주었다. 결과적으로, 항종양 치료방법의 개선이 분명히 필요하다. 항종양 치료방법은 치료의 직접적인 항종양 효과, 치료의 항종양 면역 자극 효과, 또는 이 두 가지 효과를 함께 증가시키는 역할을 할 수 있다.
- [0010] 최근, 항종양 면역요법은 면역 체크 포인트 봉쇄 (즉, 면역 체크포인트 경로의 억제 또는 길항 작용)와 함께 부가적 또는 상승적 치료 효과를 나타낼 수 있으며, 이는 면역 동시억제 경로 차단(immune co-inhibitory pathway

blockade)이라고도 한다. 체크 포인트 (면역 억제 경로) 봉쇄는 자가 면역(auto-immunity)의 발생을 예방하는데 주로 도움이 되는 숙주 면역 억제 기전을 차단하기 위한 것이다. 그러나 암 환자에서 이러한 기전은 종양에 유도된 면역 반응의 잠재적으로 유익한 효과를 유도하거나 저해하는 역할을 한다. 또는, 면역 증강 경로가 활성화되지 않았거나 또는 완전히 활성화되지 않아 면역 반응이 완전히 강화되지 않을 수도 있다. 따라서, 이러한 저해(면역 공동-억제 경로를 억제하는) 또는 면역 증강 경로의 자극(즉, 면역 공동-자극 경로의 활성화 또는 "작용제")을 완화시키는 약물은 암 치료를 시험하고 개발하는데 있어 매력적이다. 승인 또는 시험중인 약물의 타겟은 CT-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, VISTA, CSF1R, IDO, CEACAM1, GITR, 4-1-BB, KIR, SLAMF7, OX40, CD40, ICOS 또는 CD47를 포함한다.

[0011] 면역-공동억제 또는 공동억제 경로를 타겟팅하는 많은 연구가 성공적으로 이루어져왔으나, 선제 면역반응을 강화시키거나 항종양 면역반응이 차단을 경감시킬 수 있는, 종양에 대한 선제(pre-existing) 면역반응의 연구가 필요하다. 그러한 지속적인 반응을 나타내는 염증이 있는 종양 미세 환경의 존재 또한 필요하다. 종양 신-항원(neo-antigens)에 대한 기존의 면역 반응은 면역 동시-억제 경로 차단 및 관련 약물의 활성화에 특히 중요하다. 일부 환자만이 신약 및/또는 염증성 종양 미세 환경을 포함하여 종양 항원에 대해 지속적인 면역 반응을 나타낼 수 있다. 이들 모두는 이들 약물의 최적 활성화에 필요하다. 따라서, 신생 항원을 포함하여 종양 항원에 대한 면역 반응을 유도 할 수 있는 항종양 제제 및/또는 염증성 종양 미세 환경을 유도할 수 있는 항종양 제제는 면역 동시-억제 경로 차단 및 면역 강화 약물과 조합하여 사용하기에 매력적이다. 이것은 지금까지 관찰된 마우스 및 인간에서 항종양(oncolytic) 제제 및 면역 동시-억제 경로 차단의 조합된 항-종양 효과를 설명한다.

[0012] 인돌아민 2,3-디옥시게나아제 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 경로는 T 세포의 직접적인 억제 및 국소 조절 T 세포(Treg)-매개 면역억제의 증강 모두에 의해, 종양 및 종양-배수 림프절에서 면역관용성(tolerogenic) 환경을 생성함으로써 종양-유도성 내성에 기여한다. IDO는 카이뉴레인(kynurenine) 경로를 따라 트립토판 분해의 속도 제한 단계를 촉매하며, 국소 트립토판 농도의 감소와 면역조절 트립토판 대사 산물의 생산은 모두 IDO의 면역 억제 효과에 기여한다. IDO는 보다 광범위한 질환과 연관된 IDO 활성화된 암 환자에서 만성적으로 활성화되어 있다. 그것은 또한 항 종양 면역의 다른 활성화제에 대한 길항제(antagonist)로서 작용할 수 있다. 따라서 IDO 경로의 억제제는 특히 CTLA-4, PD-1 또는 PDL-1을 표적으로 하는 체크포인트 차단제(checkpoint blockade agents)와 함께 항암제로 개발되고 있다.

[0013] 상기 논의는 항종양 제제 및 항종양 제제를 이용한 암 치료법을 개선하는 데 여전히 많은 영역이 있음을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 융합유도 단백질(fusogenic protein) 및 적어도 하나의 면역 자극 분자를 발현하는 항종양 바이러스(oncolytic virus)를 제공한다. 본 발명의 항종양 바이러스는 개선된 직접적인 항종양 효과, 종양을 통한 바이러스 복제 및 확산을 통해 나타나고, 융합 단백질에 의해 매개되는 암의 개선된 치료를 제공한다. 융합유도 단백질(fusogenic protein)은 (i) 항 종양 면역 반응 유도를 위해 분비되는, 신생 항원(neoantigen)을 포함한 종양 항원의 양을 증가시키고, (ii) 바이러스-암호화된 면역 자극 분자(들)의 발현을 증가시킨다. 면역 자극 분자(들)의 발현은 항종양 면역 효과를 더욱 강화시킨다. 항종양 효능은 본 발명의 항종양 바이러스가 단일 작용제로서 사용되는 경우, 및 화학 요법, 표적 제제, 방사선, 면역 체크 포인트 봉쇄에 의한 치료 및/또는 면역 증강제를 포함하는 다른 항암 요법과 함께 사용되는 경우에도 개선된다.

과제의 해결 수단

[0016] 따라서, 본 발명은 (i) 융합유도 단백질(fusogenic protein)-코딩 유전자; 및 (ii) 면역 자극 분자-코딩 유전자;를 포함하는 항종양 바이러스(oncolytic virus)를 제공한다. 상기 바이러스는 하나의 융합유도 단백질(fusogenic protein) 및/또는 하나 이상의 면역 자극 분자를 암호화할 수 있다.

[0017] 융합유도 단백질(fusogenic protein)은, 바람직하게는 GALV (gibbon ape leukemia virus)로부터의 당단백질이고, 변형되거나 제거된 R 막 관통 펩타이드 (GALV-R-)를 갖는다. 면역 자극 분자는, 바람직하게는 GM-CSF 및/또는 GITRL, 4-1-BBL, OX40L, ICOSL 또는 CD40L. 또는 이의 변형된 형태와 같은 면역 보조 경로의 작용제(agonist)이다. 변형된 형태의 예는, 막 결합된 것보다는 분비된 동시-자극 경로의 작용제, 및/또는 단백질 다

량체가 형성되도록 변형된 작용제를 포함한다. 면역 자극 분자는 CTLA-4를 통해 신호 전달을 차단할 수 있는 단백질, 예를 들어 CTLA-4에 결합하는 항체 또는 그 단편일 수 있다.

- [0018] 바이러스는 바이러스의 변형된 임상 분리물과 같은 변형된 임상 분리물(modified clinical isolate)일 수 있으며, 상기 임상 분리물은, 같은 종류의 바이러스로부터의 하나 이상의 표준 임상 분리물보다 2 종 이상의 종양 세포주를 인 비트로에서 매우 신속하게 및/또는 저용량으로 사멸시킬 수 있다.
- [0019] 바이러스는 바람직하게는 HSV1과 같은 단순 포진 바이러스 (herpes simplex virus, HSV)이다. HSV는 전형적으로 기능성 ICP34.5 및/또는 기능성 ICP47을 발현하지 않으며 및/또는 즉각초기유전자(immediate early gene)로서 US11 유전자를 발현한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0021] - 본 발명의 바이러스 및 약제학적으로 허용가능한 담체(carrier) 또는 희석제(diluent)를 포함하는 약제학적 조성물;
- [0022] - 치료요법에서 인간 또는 동물을 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 바이러스;
- [0023] - 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 바이러스로서, 상기 방법은 항암제를 투여하는 단계를 선택적으로 포함하는 치료방법;
- [0024] - 살균 바이알(vial), 앰플(ampoule) 또는 시린지(syringe) 형태의 본 발명의 바이러스를 포함하는 제품;
- [0025] - 치료학적 유효량의 바이러스 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법으로서, 상기 방법은 면역 동시-억제 경로의 길항제(antagonist) 또는 면역 동시-자극 경로 작용제(agonist)인 추가적인 항암제를 투여하는 하는 단계를 포함하는 치료방법;
- [0026] - 암 치료방법에 사용하기 위한 약제를 제조함에 있어서 본 발명의 바이러스의 용도로서, 상기 방법은 선택적으로 추가적인 항암제를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 항암제는 면역 동시-억제 경로의 길항제(antagonist) 또는 면역 동시-자극 경로 작용제(agonist)인 것인 치료방법;
- [0027] - 치료학적 유효량의 항종양 바이러스, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 경로 억제제, 및 추가적인 면역 동시-억제 경로의 길항제(antagonist) 또는 면역 동시-자극 경로 작용제(agonist)를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 ICP34.5 유전자좌에 삽입된 GM-CSF 코딩 유전자 및 GALV-R- 코딩 유전자를 포함하고, ICP47 유전자가 결실되어 US11 유전자가 ICP47 즉각초기프로모터(immediate early promoter)의 조절 하에 있는, 본 발명의 예시적인 바이러스의 구조를 나타낸다. 도 1은 또한 GALV-R- 코딩 유전자 (제 2 패널) 또는 GM-CSF- 코딩 유전자 (제 3 패널)만을 발현하는 유사 바이러스를 나타낸다. 또한 ICP34.5 유전자 및 ICP47 유전자가 결실되었지만 삽입된 유전자가 없는 바이러스를 나타낸다.

도 2는 GALV-R- 코딩 유전자, GM-CSF 코딩 유전자 및 CD40L 코딩 유전자를 포함하는 본 발명의 예시적인 바이러스의 구조를 나타낸다.

도 3은 감염 후 24 시간 또는 48 시간 동안 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 측정된 8 개의 최상위 HSV1 임상 분리 독주의 능력을 도면에 나타낸다. 도면에 도시된 바와 같이, Fadu, SK-mel- 28, A549, HT1080, MIA-PA-CA-2, HT29 및 MDA-MB-231 인간 종양 세포주 사멸을 위해 0.1, 0.01 또는 0.001의 MOI로 감염시켰다. 각 세포주에서 첫 번째와 두 번째로 랭크된 바이러스 독주를 표시하였다. RH018A 바이러스는 Fadu, HT1080, MIA-PA-CA-2 및 HT29 세포주에서 각각 1 위로, SK-mel-28, A549 및 MDA-MB-231 세포주에서 각각 2 위로 랭크되었다.

HT29 세포주에서 RH004A는 RH018A 및 RH015A와 함께 1위로 랭크되었고, SK-mel-28과 A549 세포주에서도 1위로 랭크되었으며, 그리고 Fadu 세포주에서는 2위로 랭크되었다. RH023A는 MDA-MB-231 세포주에서 1 위로, HT1080 세포주에서는 2 위로 랭크되었다. RH031A는 MIA-PA-CA-2 및 HT29 세포주에서 각각 2 위로 랭크되었다. RH040A는 HT29 세포주에서 2 위로 랭크되었다.

도 4는 시험한 모든 독주 중 1 위 독주인 RH018A와, 스크리닝에서 나타난 '평균'독주 (즉, 독주 RH065A) 간의

비교를 나타낸다. SK-mel-28, HT1080, MDA-MB-231, Fadu, MIA-PA-CA-2 및 A549 세포주에서, 0.1, 0.01 및 0.001의 MOI로 감염시키고 24 또는 48 시간 후 크리스탈 바이올렛 염색하였다. 동등한 비율의 세포를 사멸시키기 위해 RH065A 독주의 필요량보다 약 10 배 적은 RH018A 독주가 필요하였다.

도 5는 US11 유전자가 ICP457 즉각초기프로모터(immediate early promoter)의 제어하에 있고, ICP34.5 유전자 좌에 이종성(heterologous) 유전자를 포함하도록, ICP34.5 및 ICP47의 결실에 의해 변형된 HSV1 바이러스의 구조를 나타낸다. 바이러스는 도면에 달리 명시되지 않는 한 RH018A 독주를 사용하여 제작되었다.

도 6은 바이러스 16 (mGM-CSF 및 GALVR-), 바이러스 17 (hGM-CSF 및 GALVR-) 및 바이러스 19 (mGM-CSF)로 감염된 BHK 세포의 상등액(supernatants)에서 인간 또는 마우스 GM-CSF의 발현을 검출하는 ELISA의 결과를 나타낸다.

도 7은 ICP34.5이 결실되고 GALVR- 및 GFP(바이러스 10)를 발현하는 RH018A 독주와, GFP (바이러스 12)만을 발현하는 바이러스의 세포 살상 능력을 비교하였다. 3개 세포주를 크리스탈 바이올렛 염색하고 저배율에서 관찰하였다.

도 8은 ICP34.5 및 ICP47이 결실되고 GALVR- 및 GM-CSF (바이러스 17)를 발현하는 독주 RH018A와, 4 개의 세포주에서 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 결정된 것과 동일한 변형을 갖는 종래 기술의 독주 간의 세포사멸 능력을 비교한 것이다.

도 9는 양 옆구리에 A20 림프종이있는 마우스를 치료할 때 바이러스 16 (ICP34.5 및 ICP47 결실되고, GALVR- 및 mGM-CSF을 발현하는)의 효과를 나타낸다. 우측 옆구리 종양에 바이러스 또는 비히클을 주입하여 종양 크기에 미치는 영향을 30 일 동안 관찰하였다. 이 바이러스는 주입된 종양 및 주입되지 않은 종양 모두에서 모두 효과적이었다.

도 10은 크리스탈 바이올렛 (crystal violet) 염색에 의해 측정된 바와 같이, 래트 9L 세포에서 바이러스 15 (ICP34.5 및 ICP47 결실되고, GALVR- 및 GFP 발현하는) 및 바이러스 24 (ICP34.5 및 ICP47 결실되고, GFP 발현하는)의 인 비트로에서의 효과를 나타낸다. GALV를 발현하는 바이러스 (바이러스 15)는 GALV를 발현하지 않는 바이러스 (바이러스 24)와 비교하여 인 비트로에서 쥐 9L 세포의 살상능을 강화시켰다.

도 11은 좌측 및 우측 옆구리에 마우스 CT26 종양이 있는 Balb/c 마우스에서 바이러스 16의 항종양 효과를 나타낸다. 각 10 마리의 마우스 그룹들을 다음과 같이 처리하였다: 비히클 (2 일 간격으로 우측 종양에 3 회 주사); 2 일 간격으로 오른쪽 옆구리 종양에 5×10^6 pfu, Virus 16 (mRP1) 주입; 항-마우스 PD1 단독 (10 mg/kg, 3 일마다 복강내투여, BioXCell 클론 RMP1-14); 항-마우스 CTLA-4 (3 일마다, 3 mg/kg, BioXCell 클론 9D9); 항-마우스 PD1과 바이러스 16; 항-마우스 CTLA4와 바이러스 16; 1-메틸 트립토판 (1-MT; IDO 억제제 (식수 중 5 mg/ml)); 항-마우스 PD1과 1-메틸 트립토판; 또는 항-마우스 PD1, 1-메틸 트립토판 및 Virus 16. 이후 30일 동안 종양 크기에 대한 영향을 관찰하였다. 바이러스와 체크포인트 차단제의 조합으로 치료한 동물에서 단일 치료군보다 더 큰 종양 감소가 관찰되었다. 도 11a는 Virus 16과 항-PD1을 함께 사용하면 항-PD1 또는 바이러스만 사용하는 경우보다 우수한 항 종양 효과가 있음을 보여준다. 도 11b는 바이러스 16과 항-CTLA-4의 조합이, 항종양 효과가 바이러스 16 또는 항-CTLA-4 단독의 항종양 효과보다 우수함을 보여준다. 도 11c는 바이러스가 없는 경우 항-PD1 및 1-MT 억제와 비교하여, 항 PD1 및 IDO 억제와 함께 바이러스 16을 사용하는 경우 강화된 종양 감소를 보여준다. 도 12는 바이러스 단독 또는 체크 포인트 차단제 단독 (항-PD1)과 비교하여, Balb/c 마우스 양쪽 옆구리 A20 종양에서 면역 체크 포인트 차단제와 바이러스 16의 조합이 강화된 항종양 활성을 나타내었다.

도 13은 GALVR-, GM-CSF 및 코돈 최적화된 항-마우스 또는 항-인간 CTLA-4 항체 컨스트럭트(인간 또는 마우스 IgG1 Fc 영역에 연결된 분비된 scFv 분자)를 발현하는 ICP34.5 및 ICP47 결실 바이러스의 구조를 나타낸다. scFvs는 항체 9D9 (US2011044953: 마우스 버전) 및 ipilimumab (US20150283234, 인간 버전)의 연결된 ([G4S]3) 경쇄 및 중쇄 가변 체인을 포함한다. 또한 CTLA-4 억제제의 결과적인 구조를 도시한다.

도 14는 인간 이종 이식 모델 (A549)에서 바이러스 16 및 바이러스 19의 항 종양 효과를 나타낸다. 세 가지 다른 용량(N=10/그룹)으로 1 주일 이상 바이러스 16, 바이러스 19 또는 비히클을 3 회 투여하였다. 사용된 바이러스의 용량을 표시하였다. GALV를 발현하는 Virus 16의 항종양 효과는 GALV를 발현하지 않는 Virus 19의 항종양 효과보다 우수하였다.

도 15는 피셔(Fischer) 344 래트의 옆구리에 있는 9L 세포에서 GALVR-를 발현하는 본 발명의 바이러스의 효과를 나타낸다. 3 주 동안 주당 3 회 각 래트(그룹당 10 마리)의 한 쪽 옆구리에 다음을 투여하였다: 50 μ l 비히클

(vehicle); 바이러스 19 10^7 pfu/ml (mGM-CSF 발현하고, GALV R- 발현하지 않음) 50 μ l; 또는 10^7 pfu/ml의 Virus 16 (마우스 GM-CSF와 GALV-R- 모두 발현) 50 μ l. 이후 30일 간 종양 성장에 대한 영향을 관찰하였다. GM-CSF 만을 발현하는 바이러스와 비교하여, GM-CSF 및 GALV-R-를 발현하는 바이러스에서 탁월한 종양 조절 및 수축효과가 관찰되었다.

도 16은 각각 mGM-CSF 및 GALV와 함께 항-mCTLA-4 (바이러스 27), mCD40L (바이러스 32), mOX40L (바이러스 35), m4-2BBL (바이러스 33)을 발현하는 바이러스의 항종양 효과를 나타낸다. 바이러스 16 (GALV 및 mGM-CSF 발현)과 비교하였다.

서열목록의 간단한 설명

서열번호 1은 마우스 GM-CSF의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 2는 마우스 GM-CSF의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 3은 인간 GM-CSF의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 4는 인간 GM-CSF의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 5는 마우스 GM-CSF의 아미노산 서열이다.

서열번호 6은 인간 GM-CSF의 아미노산 서열이다.

서열번호 7은 GALV-R- 의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 8은 GALV-R- (처음 3개 뉴클레오타이드는 선택적임)의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 9는 GALV-R- 의 아미노산 서열이다.

서열번호 10은 CD40L 인간 막 결합 형태의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 11은 CD40L 인간 막 결합 형태의 아미노산 서열이다.

서열번호 12는 인간 CD40L 다량체 분비 형태의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 13은 인간 CD40L 다량체 분비 형태의 아미노산 서열이다.

서열번호 14는 마우스 CD40L 다량체 분비 형태의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 15는 마우스 CD40L 다량체 분비 형태의 아미노산 서열이다.

서열번호 16은 야생형(wild-type) 인간 CD40L 뉴클레오타이드 서열의 코돈 최적화된 버전이다.

서열번호 17은 야생형(wild-type) 인간 CD40L의 아미노산 서열이다.

서열번호 18은 야생형(wild-type) 마우스 CD40L 뉴클레오타이드 서열의 코돈 최적화된 버전이다.

서열번호 19는 야생형(wild-type) 마우스 CD40L의 아미노산 서열이다.

서열번호 20은 뮤린(murine) 4-1BBL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 21은 인간 4-1BBL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 22는 분비된 마우스 4-1BBL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 23은 분비된 인간 4-1BBL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 24는 뮤린(murine) GITRL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

다.

서열번호 25는 인간 GITRL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 26은 분비된 뮤린(murine) GITRL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 27은 분비된 인간 GITRL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 28은 뮤린(murine) OX40L의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 29는 인간 OX40L의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 30은 분비된 뮤린(murine) OX40L의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 31은 분비된 인간 OX40L의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 32는 뮤린(murine) ICOSL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 33은 인간 ICOSL의 코돈 최적화된 버전(codon optimized version)의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 34는 뮤린(murine) scFv CTLA-4 항체의 뉴클레오타이드 서열이다. 처음 6개 및 마지막 8개 뉴클레오타이드는 클로닝 목적으로 삽입된 제한구역(restriction sites)이다.

서열번호 35는 뮤린(murine) scFv CTLA-4 항체의 뉴클레오타이드 서열이다. 처음 6개 및 마지막 8개 뉴클레오타이드는 클로닝 목적으로 삽입된 제한구역(restriction sites)이다.

서열번호 36은 CMV 프로모터의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 37은 RSV 프로모터의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 38은 BGH polyA 의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 39는 SV40 late polyA 의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 40은 SV40 인핸서 프로모터의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 41은 래빗 베타-글로불린 (rabbit beta-globulin, RBG) polyA의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 42는 GFP의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 43은 MoMuLV LTR 프로모터의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 44는 EF1a 프로모터의 뉴클레오타이드 서열이다.

서열번호 45는 HGH polyA의 뉴클레오타이드 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 항종양 바이러스(*Oncolytic Virus*)

[0031] 본 발명의 바이러스는 항종양성(oncolytic)이다. 항종양 바이러스는 종양 세포에 감염되고 복제되어 종양 세포를 죽이는 바이러스이다. 따라서, 본 발명의 바이러스는 복제 가능하다. 바람직하게는, 상기 바이러스는 종양 조직에서 선택적으로 복제 가능하다. 비-종양(non-tumor) 조직에서보다 종양 조직에서 더 효과적으로 복제되는 경우, 바이러스는 종양 조직에서 선택적으로 복제 가능하다. 상이한 조직 유형에서 복제되는 바이러스 능력은 당 업계의 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0032] 항종양 효과는 처음에는 감염된 세포에서 복제되고 사멸시키는 바이러스에 의존하며, 복제된 비리온(progeny virions)은 다른 종양 세포를 감염시키고 죽이고, 결과적으로 종양 내에서 퍼지게 된다. 따라서, 종양 세포를 효과적으로 사멸시키고 종양 내에서 확산되는 본 발명의 바이러스의 능력은 최적의 직접 항종양 효과를 가져온다. 또한, 종양 세포의 용혈(lysis)과 관련된 바이러스의 효과적인 확산과 복제는 방출되는 종양 항원의 양을 최대화하고, 따라서 유도된 항종양 면역 반응의 효과를 최대화시킨다.

- [0033] 본 발명의 바이러스는 이러한 특성을 갖는 임의의 바이러스 일 수 있으며, 헤르페스 바이러스(herpes virus), 폭스 바이러스(pox virus), 아데노바이러스(adenovirus), 레트로바이러스(retrovirus), 램도바이러스(rhabdovirus), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 또는 레오바이러스(reovirus), 또는 이들보다 큰 그룹 내의 임의의 종(species) 또는 독주(strain)를 포함한다. 본 발명의 바이러스는 야생형 (즉, 모 바이러스 종으로부터 변형되지 않음)이거나, 유전자 파괴 또는 유전자 삽입된 것일 수 있다. 이 중 어느 것이 바이러스 종에 의존 할 것인가. 바람직하게는, 바이러스는 헤르페스 바이러스의 종이며, 더욱 바람직하게는 HSV1 및 HSV2 독주를 포함 하는 HSV 독주이며, 가장 바람직하게는 HSV1 독주이다. 특히 본 발명의 바람직한 실시예에서, 본 발명의 바이러스는 사용되는 바이러스 종의 임상 분리물(clinical isolate)에 기반한다. 임상 분리물은 암 치료에 특히 유리 한 특성을 갖는 것에 기반하여 선택할 수 있다.
- [0034] 임상 분리물은 다른 환자로부터 분리된 동일한 바이러스의 다른 독주와 비교하여 놀랄 정도로 양호한 항 - 종 양 효과를 나타낼 수 있으며, 상기 환자는 시험 할 바이러스 종을 보유하고 있는 개체이다. 본 발명에서 유용한 바이러스를 동정하는 비교에 사용된 바이러스 독주는, 환자 또는 건강한(즉, 시험할 바이러스 종을 보유하고 있지 않은) 지원자, 바람직하게는 건강한 지원자로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 바이러스를 동정하기 위해 사 용된 HSV1 독주는 전형적으로 HSV1을 보유하는 개체의 구순포진(cold sores)으로부터 전형적으로 분리되며, 전 형적으로는 예를 들어, 운송 매체를 포함하는 Virocult (Sigma) 브랜드 면봉/용기를 이용하여 면봉으로 닦아 내 어, 추가 테스트를 위한 시료로 운반된다.
- [0035] 개체에서 비교할 바이러스를 분리한 후, BHK 또는 vero 세포에서 분리된 바이러스를 배양하는 등의 방법으로 바 이러스의 스톡(stocks)을 준비한다. 바람직하게는, 샘플을 가져와 배양하는 것 사이에 3 회 이내의 동결 해동 (freeze thaw)을 수행하여, 예를 들어 BHK 또는 vero 세포의 추후 사용을 위해 바이러스 스톡을 준비할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 바이러스 샘플은 추가 사용을 위해 스톡을 준비하기 전에 2 회 또는 2 회 미만의 동 결 해동거지며, 보다 바람직하게는 동결 해동 1 회, 가장 바람직하게는 동결 해동을 거치지 않는다. 분리 후 이 러한 방식으로 준비된 바이러스로 감염된 세포주의 용해물(lysates)을 비교하였으며, 전형적으로 인 *비트로*에 서 종양 세포주를 죽일 수 있는 바이러스의 능력을 시험하였다. 또는 바이러스 스톡은 시험 전에 적절한 조건, 예를 들어 동결에 의해 저장 될 수 있다. 본 발명의 바이러스는 다른 개체로부터 분리된 동일한 바이러스의 다 른 독주와 비교하여 놀랄만큼 우수한 항 종양 효과를 나타낼 수 있다. 바람직하게는 > 5 개체, 보다 바람직하게 는 > 10 개체, 가장 바람직하게는 > 20 개체로부터 분리된 독주와 비교하였을 때, 본 발명의 바이러스는 다른 개체로부터 분리된 동일한 바이러스의 다른 독주와 비교하여 놀랄만큼 우수한 항 종양 효과를 나타낼 수 있다.
- [0036] 본 발명의 바이러스 생산을 위한 변형용 바이러스 (즉, 비교된 다른 바이러스 독주와 비교하여 종양 세포의 살 상을 위한 놀랍도록 우수한 성질을 갖는)로 확인 된 임상 분리주의 스톡은 적절한 조건하에 보관되고, 변형 전 후 추가 스톡을 적절하게 만드는데 사용될 수 있다.
- [0037] 임상 분리물은 자연 숙주로부터 분리된 바이러스 종의 독주이다. 임상 분리 물은 바람직하게는 임상 분리물을 원하는 특징을 가진 바이러스 종의 임상 분리물과 시험하고 비교할 목적으로, 특히 인간 종양 세포를 죽일 수 있는 능력에 대해 시험하고 비교할 목적으로 분리되었다. 비교를 위해 사용될 수 있는 임상 분리물은 임상 저장 소(repositories)에 존재하는 임상 샘플로부터의 분리물, 즉 임상 진단 또는 다른 목적을 위해 미리 수집된 임 상 분리물을 포함한다. 어느 경우애나, 본 발명 바이러스의 비교 및 동정에 사용되는 임상 분리물은 바람직하게 는 원하는 특성 시험을 진행하기 전에 인 *비트로*에서 최소 배양을 수행할 수 있으며, 바람직하게는 비교 실험 목적으로 충분한 스톡을 생성할 수 있는 충분한 배양만을 수행할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 바이러스를 동 정하기 위한 비교에 사용되는 바이러스는 기탁된 독주를 포함할 수 있으며, 상기 기탁된 독주는 환자로부터 분 리되고, 바람직하게는 바람직하게는 환자의 구순포진(cold sore)에서 분리된 HSV1 독주일 수 있다.
- [0038] 상기 바이러스는 변형된 임상 분리물(modified clinical isolate)일 수 있으며, 상기 임상 분리물은 동일한 바 이러스 종의 하나 이상의 표준 임상 분리주보다 인 *비트로*에서 보다 신속하게 및/또는 저용량으로 2 종 이상의 종양 세포주를 사멸시킨다. 일반적으로, 임상 분리물은 72시간 이내에 2 이상의 종양 세포주를 사멸시킬 것이고, 바람직하게는 48시간 이내에, 보다 바람직하게는 24시간 이내에, 0.1 이하의 감염 다중도 (multiplicities of infection, MOI)로 감염시, 바람직하게는 0.01 이하의 MOI, 보다 바람직하게는 0.001 이하 의 MOI로 감염시 2 이상의 종양 세포주를 사멸시킬 것이다. 바람직하게는, 임상 분리물은 광범위한 종양 세포주, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 다음의 모든 인간 종양 세포주를 사멸 시킬 수 있다: U87MG (신경교종), HT29 (대장암), LNCaP (전립선암), MDA-MB-231 (유방암), SK-MEL-28 (흑색종), Fadu (편평 상피암), MCF7 (유방암), A549 (폐암), MIAPACA-2 (췌장암), CAPAN-1(췌장암), HT1080 (섬유 육종).

- [0039] 따라서, 본 발명의 바이러스는 2 개 이상, 예컨대 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개 또는 그 이상의 세포를 죽이거나, 다른 유형의 종양, 예컨대 2 개 또는 그 이상, 예컨대 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개 또는 그 이상의 다른 유형의 고형암을 죽일 수 있으며, 상기 고형암은 대장 종양 세포, 전립선 종양 세포, 유방 종양 세포, 난소 종양 세포, 흑색 종 세포, 편평 세포 암종 세포, 폐 종양 세포, 췌장 종양 세포, 육종 세포 및/또는 섬유 육종 세포를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 종양 세포주의 살상은 임의의 적합한 방법으로 확인할 수 있다. 일반적으로, 먼저 환자로부터 샘플을 분리하고, 바람직하게는 구순포진(cold sores)으로부터의 HSV1의 경우, BHK 세포 또는 베로 세포(vero cells)와 같은 다른 적합한 세포주를 감염시키는데 사용된다. 양성 샘플은 전형적으로 감염 후 48 시간과 같은 감염 후 24-72 시간의 세포 변성 효과 (cytopathic effect, CPE)의 존재에 의해 확인되며, 예를 들어 면역조직 화학분석 또는 PCR에 의해 표적 바이러스 종(species)으로 확인된다. 이어, 바이러스 스톡(stocks)이 양성 샘플에서 생성됩니다. 바이러스 스톡으로부터의 샘플과, 면봉으로 다른 환자에서 채취한 다른 샘플을 시험하고 비교하였다. 감염의 다중도 (multiple multiplicity of infection) (MOI)의 범위와 감염 후 다양한 시점에서 달성된 CPE의 수준을 측정하여 검사를 수행할 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 80% 컨플루언시(confluency)의 세포주는 1, 0.1, 0.01 및 0.001의 MOI로 바이러스 샘플에 감염될 수 있으며, 2개(duplicate)의 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 24 시간 및 48 시간 동안 항온 배양한 후 바이러스 세포 살상범위를 측정하였다. 이것은 예를 들어 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 세포를 고정하고 표준 방법을 사용하여 크리스탈 바이올렛으로 염색함으로써 결정될 수 있다. 세포 용해(lysis) 수준은 육안 관찰, 현미경 검사 (세포 수) 및 사진 촬영과 같은 표준 방법으로 평가할 수 있다. 상기 방법은 세포 사멸이 결정되기 전에 8 시간, 12 시간 또는 16 시간과 같은 더 짧은 시간 또는 72 시간과 같은 더 긴 시간 동안 또는 0.0001 이하의 추가 MOI로 처리된 세포에 반복하여 수행할 수 있다.
- [0042] 성장 곡선 실험은 인 비트로의 종양 세포주에서 복제하기 위한 상이한 임상 적 분리물의 능력을 평가하기 위해 수행될 수도 있다. 예를 들어, 바이러스의 세포 사멸 정도를 결정하기 전에, 80 % 컨플루언시의 세포주를 1, 0.1, 0.01 및 0.001의 MOI로 감염 후 37 °C, 5 % CO₂에서 배양시키고, 감염 후 0, 8, 16, 24 및 48 시간에 일반적으로 동결/해동에 의해 용혈된 것일 수 있다. 이것은 예를 들면, 표준 플라크 분석에 의해 바이러스 titres를 측정하여 결정할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 임상적 분리물은 같은 바이러스 종, 바람직하게는 2, 3, 4, 5 또는 10 또는 그 이상의 다른 임상 분리물보다 신속하게 및/또는 낮은 MOI로 감염된 종양 세포주를 죽일 수 있다. 본 발명의 임상 분리물은, 적어도 1 이상, 바람직하게는 2, 3, 4, 5 또는 10 이상의 동일 MOI 및 시점에서 존재하는 동일한 바이러스 유형의 다른 임상 분리물보다, 일반적으로 특정 MOI 및 시점에서 존재하는 종양 세포의 10 %, 25 % 또는 50 % 이상 비율을 사멸시킨다. 본 발명의 임상 하나 이상의, 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 10 또는 15 또는 그 이상의 MOI에서 절반 또는 그 미만인 MOI에서, 일반적으로 같은 또는 그 이상 비율의 종양 세포를 사멸시킨다. 같은 시점(12, 24 및/또는 48시간)에서 비교하기 위해 사용된, 같은 바이러스 종의 다른 임상 분리물은 동일한 비율의 종양 세포를 사멸시킨다. 바람직하게는, 본 발명의 임상 분리물은, 하나 또는 그 이상의, 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 10 또는 15 그 이상의 MOI에서 보다, 5 배 또는 10배 낮은 MOI에서 같은 또는 그 이상 비율의 종양 세포를 사멸시킨다. 같은 시점에서의 비교를 위해 사용된 동일 바이러스의 다른 임상 분리물은 일반적으로 12, 24 및/또는 48 시간에서 같은 비율의 종양세포를 사멸시킨다. 본 발명 바이러스의 향상된 종양세포 사멸 능력은, 비교를 위해 사용된 동일 바이러스 종의 다른 임상분리물의 50%, 75% 또는 90%와 비교하여 달성된다. 바이러스는 바람직하게는 예를 들어 7, 9, 19, 39 또는 49개 동일 종의 다른 바이러스 독주의, 적어도 4개의 다른 바이러스 독주와 비교한다.
- [0044] 분리된 독주는 한번에 4-8 개의 바이러스 독주, 또는 예를 들어 한 번에 4-8 종양 세포주에 대해 배치(batch)로 시험 할 수 있다. 실험의 각 배치(batch)에 대해, 달성된 사멸정도는 각 세포주에서 최상위(즉, 각 시점 / MOI에서 최소 생존하는 세포)에서부터 최하위(즉, 각 시점 / MOI에 대해 대부분 살아남은 세포)의 바이러스가 랭크되었다. 시험한 종양 세포주 범위에서 가장 잘 수행하는 (즉, 세포주를 죽이는데 있어서 가장 우수한 것으로 일관되게 평가된) 각 실험의 바이러스 독주는 다른 임상 분리물 및/또는 기타 종양 세포주를 이용한 실험에서, 예를 들어 표본 추출된 20 종 이상의 바이러스 독주 중 가장 우수한 바이러스 독주를 확인하였다. 본 발명의 바이러스가 전체적으로 가장 우수한 것으로 랭크되었다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 바이러스는 다음 중에서 선택되는 독주이다:

- [0046] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121904의 독주 RH018A;
- [0047] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121902의 독주 RH004A;
- [0048] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121907의 독주 RH031A;
- [0049] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121908의 독주 RH040B;
- [0050] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121903의 독주 RH015A;
- [0051] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121905의 독주 RH021A;
- [0052] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121906의 독주 RH023A; 및
- [0053] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121909의 독주 RH047A.
- [0054] 보다 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 다음 중에서 선택되는 독주이다:
- [0055] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121904의 독주 RH018A;
- [0056] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121902의 독주 RH004A;
- [0057] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121907의 독주 RH031A;
- [0058] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121908의 독주 RH040B; 및
- [0059] 실시 수탁 번호 ECCAC 16121903의 독주 RH015A;
- [0060] 보다 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 실시 수탁 번호 ECCAC 16121904의 독주 RH018A 이다.
- [0061] 본 발명의 HSV는 인간종양과 같은 종양 내에서 선택적으로 복제 가능하다. 일반적으로, HSV 표적 종양에서 효율적으로 복제되지만 비-종양 조직에서는 효율적으로 복제되지 않는다. 이러한 HSV는 정상 조직에서 복제를 억제 하고 종양에서 복제되도록 하는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자 내에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다. 상기 돌연변이는 예를 들면 HSV 에 의한 기능적 ICP34.5, ICP6 및/또는 티미딘 키나아제(thymidine kinase)의 발현을 억제한다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, ICP34.5-코딩 유전자는 돌연변이되어 HSV에 대한 선택적인 항종양 활성을 나타낸다. 기능적 ICP34.5의 발현을 억제하는 ICP34.5-코딩 유전자의 돌연변이는 Chou et al. (1990) Science 250:1262-1266, Maclean et al. (1991) J. Gen. Virol. 72:631-639 and Liu et al. (2003) Gene Therapy 10:292-303 에 기재되어 있으며, 본 발명의 참조로서 삽입된다. 또한 ICP6-코딩 유전자 및/또는 티미딘 키나아제-코딩 유전자는 불활성화될 수 있으며, 이는 다른 유전자들이 불활성화되어 종양 내에서 바이러스 감염 또는 복제를 억제하지 못하는 것과 같다.
- [0063] HSV는 추가적인 돌연변이를 포함하거나 또는 종양 내에서 HSV의 복제를 증가시키는 돌연변이를 포함할 수 있다. 종양 내 바이러스 복제가 증가되면 바이러스에 의해 직접적인 '항종양' 종양 세포 사멸이 증가할 수 있으며, 이 종성(heterologous) (즉 바이러스에 삽입된 유전자, 본 발명의 바이러스의 경우 융합유도 단백질 및 면역 조절 분자를 코딩하는 유전자) 유전자의 발현 레벨이 증가하고, 종양 세포가 사멸할 때 분비되는 종양 항원의 양이 증가한다. 이러한 현상은 암 치료 요법의 면역성 특징(immunogenic properties)을 향상시킨다. 예를 들면, 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, ICP47-코딩 유전자의 결실은, 보통 ICP47 코딩 유전자의 발현을 조절하는 즉각초기프로모터(immediate early promoter) 조절 하의 US11 유전자를 위치시키는 방식으로 종양 내 복제를 증가시킨다(Liu et al., 2003 참조, 참조로서 삽입됨).
- [0064] HSV 후기 유전자(late gene)인 US11 코딩 서열을 위치시키는 다른 돌연변이는 바이러스 복제에 비의존적인 프로모터의 조절하에서 본 발명의 바이러스로 도입될 수 있다. 이러한 돌연변이들은 HSV 복제 전에 US11 가 발현되도록 하여 종양 내 바이러스 복제를 증가시킨다. 특히, 이러한 돌연변이들은 HSV 결여 기능적 ICP34.5-코딩 유전자의 복제를 증가시킨다.
- [0065] 따라서, 본 발명의 일 구현예에서 HSV는 작동적으로 프로모터에 결합된 US11 유전자를 포함한다. 상기 프로모터 활성은 바이러스 복제에 비의존적이다. 상기 프로모터는 포유동물에서 바람직하게는 인간의 종양 세포에서 활성화된 즉각초기 프로모터 또는 non-HSV 프로모터 일 수 있다. 프로모터는 예를 들면, 진핵동물 프로모터, 바람직하게는 포유동물의 지놈에서 유래한 프로모터일 수 있다. 프로모터는 혼한 프로모터 (베타-액틴 또는 튜블린 프로모터와 같은) 또는 종양 특이적 프로모터와 같은 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 MMLV LTR

(Moloney murine leukaemia virus long terminal repeat) 프로모터 또는 인간 또는 마우스 CMV (cytomegalovirus) IE 프로모터와 같은, 바이러스 프로모터 일 수 있다. HSV IE (immediate early) 프로모터는 당업계에 잘 알려져 있다. HSV IE 프로모터는 ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 또는 ICP47의 발현을 유도하는 프로모터일 수 있다.

[0066] 기능적 불활성화로 바이러스에 종양 특이성을 제공하는, 상기 언급된 유전자는 적절한 방법에 의해 기능적으로 불활성화될 수 있다. 예를 들어 유전자 전체 또는 일부, 또는 유전자 조절서열의 결실 또는 치환되거나, 및/또는 유전자 내로 또는 대체하여 하나 이상의 핵산 및/또는 유전자 조절서열이 삽입될 수 있다. 예를 들어, 당업계의 표준인 상동성 재조합(homologous recombination) 방법은, 본 발명의 바이러스를 제조하는데 사용될 수 있다. 또는 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC)-기반 방법이 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명에서 용어 "유전자"는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 의미하는 것으로서, 즉 유전자의 코딩 서열이다. 상술한 다양한 유전자들은 유전자 자체 또는 유전자에 인접한 조절 서열(예를 들어 프로모터 서열)을 돌연변이 시킴으로써 비기능적(non-functional) 상태로 만들 수 있다. 결실은 유전자의 1 이상 부분, 전체 유전자 또는 전체 유전자 및 전체 또는 일부 조절 서열을 제거하는 것이다. 예를 들어 유전자 내에서 단 하나의 뉴클레오타이드의 결실로서, 프레임 시프트(frame shift)가 나타날 수 있다. 그러나, 보다 큰 결실, 예를 들어 적어도 약 25%의 결실, 보다 바람직하게는 전체 코딩 및/또는 비-코딩 서열의 적어도 약 50%의 결실이 될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 기능적으로 불활성화된 유전자는 결실된다. 예를 들면, 전체 유전자 및 선택적으로 인접 서열의 몇몇 유전자는 바이러스에서 제거된다. 바이러스 지놈 내에 2 이상 유전자 카피가 존재하는 경우, 2개 유전자 카피는 기능적으로 불활성화된다.

[0068] 유전자는 다른 서열을 대체함으로써, 예를 들어 내인성(endogenous) 유전자의 전부 또는 일부를 이종(heterologous) 유전자 및 임의의 프로모터 서열로 대체함으로써 불활성화될 수 있다. 프로모터 서열이 치환되지 않은 경우, 이종 유전자는 비기능성으로 만들어진 유전자의 프로모터에 의해 조절되도록 삽입될 수 있다. 본 발명의 HSV에서, ICP34.5 코딩-유전자는 이종 유전자(들) 또는 유전자들 및 프로모터 서열 또는 상기 서열에 작동적으로 연결된 서열의 삽입에 의해 비기능적으로 될 수 있고, 선택적으로 폴리아데닐화 서열과 같은 다른 조절 서열이 각 ICP34.5-코딩 유전자좌에 삽입될 수 있다.

[0069] 본 발명의 바이러스는 융합유도 단백질 및 면역 자극 단백질의 종양 내 발현에 사용된다. 이는 일반적으로 선택적으로 복제 가능 바이러스의 지놈에, 융합유도 단백질을 코딩하는 이종성 유전자 및 면역 자극 단백질을 코딩하는 이종성 유전자를 삽입함으로써 달성되며, 각 유전자는 프로모터 서열의 조절하에 있다. 바이러스 복제가 종양 조직 내에서 선택적으로 발생하므로 바이러스에 의한 융합유도 단백질 및 면역 자극 단백질의 발현은 신체의 비-종양 조직과 비교하여 종양 조직에서 증가된다. 증가된 발현은 다른 신체 조직과 비교하여 종양 내에서 더 크게 나타난다. 따라서, 본 발명은 항종양 바이러스에 의해 제공되는 항종양 효과와 종양 내에서 융합유도 단백질과 면역 자극 단백질이 선택적으로 발현되는 이점을 제공한다.

[0070] 본 발명의 바이러스는 융합유도 단백질과 면역 자극 단백질 외에 추가적으로 하나 이상의 이종성 유전자를 포함할 수 있으며, 여기에는 추가의 융합유도 단백질 또는 면역 자극 단백질이 포함된다.

[0071] 융합유도 단백질(*Fusogenic protein*)

[0072] 본 발명의 바이러스는 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다. 융합 단백질은 본 발명의 바이러스에 감염된 세포와 다른 세포의 융합을 촉진할 수 있는 임의의 이종 단백질일 수 있다. 융합유도 단백질은, 바람직하게는 야생형 또는 변형된 바이러스 당단백질 (즉, 이의 융합유도 특성을 증가시키기 위해 변형된)일 수 있으며, 발현되는 세포의 세포간 융합 (융합세포(syncytia) 형성)을 유도할 수 있는 단백질이다.

[0073] 융합유도 당단백질은 VSV-G, syncitin-1 (HERV-W (human endogenous retrovirus-W) 유래) 또는 syncitin-2 (HERVFRDE1 유래), 파라믹소바이러스 SV5-F, 홍역바이러스-H, 홍역바이러스-F, RSV-F, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 유래의 당단백질, 예를 들어 R-막투과 펩타이드 제거된(R- versions) GALV (gibbon ape leukemia virus), MLV (murine leukemia virus), MPMV (Mason-Pfizer monkey virus) 및 EIAV (equine infectious anemia virus) 를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합유도 단백질은 GALV 유래이고, R-peptide 가 제거되었다(GALV-R-).

[0074] 본 발명의 바이러스는 융합유도 단백질 - 코딩 유전자의 다중 카피, 바람직하게는 1 또는 2 카피를 포함할 수 있다. 상기 바이러스는 상기 열거된 임의의 융합유도 단백질을 포함하는 2 종 이상의 상이한 융합유도 단백질을 포함할 수 있다.

- [0075] 바이러스에 의해 발현된 본 발명의 융합유도 단백질 또는 단백질은 자연적으로 존재하는 단백질과 동일한 것일 수 있으며, 또는 변형된 것일 수 있다.
- [0076] 융합유도-코딩 유전자 (융합유도 유전자)는 자연적으로 존재하는 핵산 서열 또는 변형된 서열을 가질 수 있다. 융합유도 서열은 예를 들면, 코딩된 단백질의 융합유도 성질을 증가시키기 위해 변형되거나 코돈 최적화를 위해 변형될 수 있으며, 이로써 코딩된 단백질의 발현효율을 증가시킨다.
- [0078] *면역 자극 분자(Immune stimulatory molecule)*
- [0079] 본 발명의 바이러스는 하나 또는 그 이상의 면역 자극 분자 및/또는 면역 자극 분자를 코딩하는 하나 또는 그 이상의 유전자를 포함한다. 면역 자극 분자는 면역 반응의 유도를 돕는 단백질, 면역 반응의 유도 또는 유효성에 대한 억제 신호를 완화시키는 단백질, 및 면역 억제 분자의 발현을 억제하는 RNA 분자(예를 들면, shRNA, 안티센스 RNA, RNAi 또는 micro RNA)를 포함한다. 면역 자극 분자는 예를 들어, IL-2, IL12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-24, CD40 리간드, GITR 리간드, 4-1-BB 리간드, OX40 리간드, ICOS 리간드, f1t3 리간드, 타입 I 인터페론(인터페론 알파 및 인터페론 베타, 인터페론 감마 포함), 타입 III 인터페론 (IL-28, IL-29), TNF 알파, GM-CSF, 또는 TGF 베타 등의 사이토카인 또는 면역 체크포인트 길항제(immune checkpoint antagonists)를 포함한다.
- [0080] 면역 체크포인트 길항제는 항체, 단일 사슬 항체 및 RNA1/siRNA/microRNA/antisense RNA 녹다운 접근법(knockdown approaches)를 포함한다. 면역 강화/동시-자극 경로의 작용제(Agonists)는 돌연변이 또는 야생형, 가용성(soluble), 분비 및/또는 막 결합 리간드, 및 단일 사슬 항체를 포함하는 작동 성 항체(agonistic antibodies)를 포함한다. 면역 동시-억제 또는 면역 동시-자극 경로의 표적과 관련하여, CTLA-4 (길항제), PD-1 (길항제), PD-L1 (길항제), LAG-3 (길항제), TIM-3 (길항제), VISTA (길항제), CSF1R (길항제), IDO (길항제), CEACAM1 (길항제), GITR (작용제), 4-1-BB (작용제), KIR (길항제), SLAMF7 (길항제), OX40 (작용제), CD40 (작용제), ICOS (작용제) 또는 CD47 (길항제)를 타겟팅하는 단백질 또는 다른 분자(경우에 따라 작용성 또는 길항성)가 특히 바람직하다.
- [0081] 본 발명의 바이러스는 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 상기 분자들을 암호화한다. 보다 바람직하게는 본 발명의 바이러스는 GM-CSF 및/또는 CD40L, ICOSL, 4-1-BBL, GITRL 또는 OX40L의 야생형 또는 변형된 버전을 암호화하며, 가장 바람직하게는 GM-CSF를 암호화한다.
- [0082] 동시-억제 경로의 억제제는 CTLA-4 억제제일 수 있다. CTLA-4 억제제는 일반적으로 CTLA-4에 결합하여, B7에 의한 활성화 감소와 같은 CTLA-4를 통한 신호 전달을 감소 또는 차단하는 펩타이드 또는 단백질과 같은 분자이다. CTLA-4 신호 전달을 감소시킴으로써, 억제제는 CTLA-4에 의한 면역 자극 경로의 차단을 감소시키거나 제거한다.
- [0083] CTLA-4 억제제는 바람직하게는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(fragment)이다. 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 항체 전체 및 항원 결합 단편(즉, 항원-결합 부위) 또는 이의 단일 사슬을 포함한다. 항체는 이 황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(*?*)(L), 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 당단백질(glycoprotein)을 나타낸다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (heavy chain variable region, VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역(heavy chain constant region)으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (light chain variable region, VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역(light chain constant region)으로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 포함한다. VH 및 VL 영역은 더욱 보존되고 프레임 워크 영역 (framework regions, FR)으로 불리는 영역이 산재된, 상보성 결정 영역 (complementarity determining regions, CDR)으로 지칭되는 과변이(hypervariability) 영역으로 세분화될 수 있다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예: 이펙터 세포) 및 고전 보체 시스템의 제 1 성분 (C1q)을 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [0084] 상기 항체는 단일클론 항체이다. 항체는 키메라 항체(chimeric antibody)일 수 있다. 항체는 바람직하게는 인간화 항체(humanised antibody)이고, 보다 바람직하게는 인간 항체(human antibody)이다.
- [0085] 본 명세서에서 용어, 항체의 "항원-결합 단편"은, CTLA-4에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 항원-결합 단편은 또한 CTLA-4를 억제하여 자극 면역 반응의 CTLA-4 차단을 감소시키거나 제거하는 능력을 가진다. 적합한 단편은 예를 들면, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fd 단편, Fv 단편, dAb 단편 및 분리된 CDR (complementarity determining region)을 포함한다. scFv 와 같은 단일 사슬

항체, 및 VHH 및 camel과 같은 중쇄 항체 또한 상기 항체의 "항원-결합 단편"의 범주에 포함될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항체는 scFv 이다. 적합한 scFv 분자는 W02007/123737 및 W02014/066532 에 개시되어 있으며, 본 명세서에 참조로서 삽입된다. scFv는 서열번호 34 또는 서열번호 35의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0086] 본 발명의 바이러스는 하나 또는 그 이상의 면역 자극 분자, 바람직하게는 1, 2, 3 또는 4 개의 면역 자극 분자, 보다 바람직하게는 1 또는 2 개의 면역 자극 분자를 코딩할 수 있다.

[0087] 면역 자극 분자를 코딩하는 유전자의 서열은 바뀌지 않은 서열을 사용한 경우와 비교하여 표적 세포에서 각 단백질의 발현 수준을 높이기 위해 코돈 최적화(codon optimized)될 수 있다.

[0088] *바이러스 제조(Production of Virus)*

[0089] 본 발명의 바이러스는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어 적절한 규제 하에 융합유도(fusogenic) 및 면역 자극 분자를 암호화하는 유전자를 포함하여, 포장될 바이러스 계놈을 암호화하는 플라스미드(소형 바이러스 및 단일 및 다중 계놈 구성 RNA 바이러스용) 또는 BAC(헤르페스 바이러스를 포함한 대형 DNA 바이러스용)는 표준 분자생물학 기술에 의해 구축될 수 있고 재조합 바이러스를 회수할 수 있는 세포로 형질 감염될 수 있다.

[0090] 또는, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 의도된 삽입 부위에 인접한 DNA 영역을 포함하는 플라스미드를 제작할 수 있고, 플라스미드 내의 표적 삽입부위 인접역역과 모 바이러스 내의 동일한 역역 사이의 상동성 재조합(homologous recombination)을 위하여, 바이러스 계놈 DNA를 세포 내로 공동 형질감염시킨다. 이어서, 재조합 바이러스는 재조합 바이러스는 변형에 사용된 플라스미드에 의해 삽입 또는 결실된 기능의 손실 또는 추가(예를 들어, 의도된 삽입 부위에서 모 바이러스로부터의 GFP 또는 lacZ와 같은 마커 유전자의 삽입 또는 결실)를 통해 선별 및 정제될 수 있다. 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 삽입 부위는 HSV의 ICP34.5 유전자좌이며, 따라서 조작을 위해 사용되는 플라스미드는 이 삽입 부위에 인접한 HSV 서열을 포함하며, 그 사이에 융합유도 단백질 및 면역 자극 분자를 코딩하는 발현 카세트가 존재한다. 이 경우, 모 바이러스(parental virus)는 ICP34.5 대신 GFP를 코딩하는 카세트를 포함할 수 있으며 GFP 발현 상실을 통해 재조합 바이러스 플라크가 선택된다. 가장 바람직한 구현예에 따르면, HSV의 US11 유전자는 또한 IE 유전자로서 발현된다. 이것은 ICP47-코딩 영역의 결실 또는 다른 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0091] 융합유도 단백질 코딩 서열 및 면역 자극 분자 코딩 서열은 적절한 조절 하에 바이러스 지놈에 삽입된다. 이는 종(species) 및 삽입 부위에 따라, 본 발명에서 사용되는 바이러스 종의 천연 프로모터 조절 하에 있을 수 있으며, 또는 바람직하게는 이종성(heterologous) 프로모터의 조절 하에 있을 수 있다. 적합한 이종성 프로모터는 IEF2a 프로모터 또는 액틴 프로모터와 같은 포유동물 프로모터를 포함한다. 보다 바람직하게는 CMV IE 프로모터, RSV LTR, MMLV LTR, 다른 레트로바이러스성 LTR 프로모터, 또는 SV40 래의 프로모터와 같은 강한 바이러스성 프로모터이다. 바람직하게는 각 외인성(exogenous) 유전자(즉, 융합유도 단백질 및 면역 조절 분자를 코딩하는)는 독립된(separate) 프로모터의 조절 하에 있을 수 있으나, 예를 들어 단백질 코딩 서열 사이의 IRES(internal ribosome entry sites)의 삽입을 통해, 단일 RNA 전사체로부터 발현될 수 있다. 각각의 프로모터로부터 유래된 RNA는 전형적으로 폴리아데닐화 서열을 이용하여 종결된다(예를 들어, 소 성장 호르몬(bovine growth hormone, BGH) 폴리아데닐화 서열, 합성 폴리아데닐화 서열, 래빗 베타글로빈 폴리아데닐화 서열과 같은 포유류 서열, 또는 SV40 초기 또는 후기 폴리아데닐화 서열).

[0092] 본 발명은 적어도 3 개의 이종 유전자를 발현하는 폭스바이러스 또는 HSV 와 같은 바이러스, 바람직하게는 HSV1 을 제공하며, 상기 3 개의 이종 유전자 각각은 CMV 프로모터, RSV 프로모터, EF1a 프로모터, SV40 프로모터 및 레트로바이러스 LTR 프로모터 중에서 선택되는 서로 다른 프로모터에 의해 유도된다. 바이러스는 예를 들어 4 개의 이종 유전자를 각각 발현할 수 있으며, 4 개의 이종 유전자 각각은 CMV 프로모터, RSV 프로모터, EF1a 프로모터, SV40 프로모터 및 레트로바이러스 LTR 프로모터 중에서 선택된 다른 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 레트로바이러스 LTR은 바람직하게는 MMLV(서열번호 43) 유래이며, 또한 MoMuLV로 알려져 있다. 이종 유전자는 폴리아데닐화 서열에 의해 종결될 수 있다. 폴리아데닐화 서열은 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직하게는 각각의 이종 유전자는 상이한 폴리아데닐화 서열에 의해 종결될 수 있으며, 바람직하게는 BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아데닐화 서열 중에서 선택될 수 있다.

[0093] 본 발명은 적어도 3 개의 이종 유전자를 발현하는 폭스 바이러스 또는 HSV, 바람직하게는 HSV1과 같은 바이러스를 제공하며, 3 개의 이종 유전자 각각은 BGH, SV40, HGH 및 RBG 중에서 선택되는 서로 다른 폴리아데닐화 서열

에 의해 종결된다. 바이러스는 예를 들어, 각각 BGH, SV40, HGH 및 RBG 폴리아테닐화 서열에 의해 종결 되는 4 개의 이중 유전자를 발현할 수 있다.

[0094] *약제학적 조성물*

[0095] 본 발명은 바이러스 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 적합한 담체 및 희석제는 등장성(isotonic) 식염수 용액, 예를 들어 인산염 완충 식염수를 포함한다. 상기 조성물은 제품의 안정성과 같은 특성을 개선하기 위해 당 또는 단백질과 같은 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또는 동결 건조된 제형이 사용될 수 있으며, 이는 사용 전에 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제로 재구성된다.

[0096] 필요한 경우 담체의 선택은 흔히 조성물 전달 경로의 기능이다. 본 발명에서, 조성물은 임의의 적합한 경로 및 투여 방법으로 제제화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제는 종양 내 투여, 정맥 내/동맥 내 투여, 뇌내 투여 또는 체강 내 투여 (예를 들어, 방광, 흉강 또는 복강 내 투여)에 적합한 조성물에 사용된다. 조성물은 임의의 적합한 형태로, 바람직하게는 액상으로 투여될 수 있다.

[0097] 본 발명은 또한 멸균 바이알, 앰플 또는 시린지로 본 발명의 바이러스를 포함하는 제조물을 제공한다.

[0099] *의약용도/치료방법*

[0100] 본 발명은 특히 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 인간 또는 동물의 신체의 치료에 사용하기 위한 바이러스를 제공한다. 암은 전형적으로 포유동물, 바람직하게는 인간에 존재한다. 이 바이러스는 감염된 종양 세포를 용해시키고 서로 융합되도록 한다. 본 발명의 바이러스는 또한 암 세포를 죽이는 면역 자극 분자의 발현을 통해 증강된 전신적 항-종양 면역 반응을 유도한다.

[0101] 본 발명은 또한 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 바이러스를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0102] 본 발명은 추가적으로 암 치료 약제의 제조에 있어 본 발명의 바이러스의 용도를 제공한다.

[0103] 본 발명의 바이러스는 특히 임의의 선암종(adenocarcinoma), 암종(carcinoma), 흑색종(melanoma) 또는 육종(sarcoma)을 포함하는 고형 종양의 치료에 특히 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 바이러스는 두경부, 전립선, 유방, 난소, 폐, 간, 자궁 내막, 방광, 담낭, 췌장, 대장, 신장, 위, 식도 또는 자궁 경부의 암(cancers), 중피종(mesothelioma), 흑색종(melanoma) 또는 다른 피부암, 림프종, 신경 교종 또는 신경계의 다른 암, 또는 연조직 육종과 같은 육종의 치료에 유용하다.

[0104] 본 발명의 바이러스는 원(original) 종양 부위에서 전이된 종양을 포함하는 악성 종양의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 바이러스는 원발성(primary) 종양 또는 하나 또는 그 이상의 이차(secondary) 종양에 투여될 수 있다.

[0105] 본 발명의 바이러스는 화학 요법제, 표적 치료제, 면역 요법제 (면역 동시-억제 경로의 하나 이상의 길항제 및/또는 면역 동시-자극 경로의 하나 이상의 작용제를 포함)을 포함하는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있으며, 및/또는 방사선 요법 및/또는 이들의 임의의 조합과 함께 사용될 수 있다. 상기 치료제는 바람직하게는 항암제이다.

[0106] 본 발명의 바이러스는 2번째 항종양 바이러스와 같은 제2 바이러스와 조합하여 투여될 수 있다.

[0107] 예를 들면, 치료제는 종양 세포, 특히 종양 신생 혈관에 대한 세포성 또는 체액성 면역 반응과 같은 면역 반응을 더욱 자극하기 위해, 면역원(immunogen)(그러한 항원 또는 이를 코딩하는 DNA 또는 RNA로 전달된 항원과의 조합을 포함하는, 재조합 또는 자연 발생 항원을 포함)을 포함 할 수 있다. 치료제는 사이토카인, 면역 체크 포인트 경로를 억제하거나 면역 증강 경로를 자극하기 위한 제제 또는 조절 T 세포 (Tregs) 또는 MDSCs (myeloid derived suppressor cells)의 활성을 저해하는 제제와 같은 면역 반응을 증가시키거나 강화시키는 제제일 수 있다.

[0108] 치료제는 현재 암 치료제에 사용되는 것으로 알려진 약제일 수 있다. 치료제는 방사선 치료 또는 화학 치료제일 수 있다. 치료제는 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide), 시스플라틴(cisplatin) 또는 멜팔란(melphalan)과 같은 알킬화-유사제, 빈크리스틴(vincristine) 또는 파클리탁셀 (paclitaxel, Taxol)과 같은 식물 알칼로이드

및 테르페노이드, 5- 플루오로우라실과 같은 항대사제(antimetabolites), 캄토테신(camptothecin) 또는 독소루비신(doxorubicin)과 같은 토포아이소머라아제 저해제 I 형 또는 II 형, 악티노마이신(actinomycin)과 같은 세포 독성 항생제, 에피루비신(epirubicin)과 같은 안트라사이클린(anthracyclines), 트리암시놀론(triamcinolone)과 같은 글루코코르티코이드, 단백질 저해제, 메토크세이트(methotrexate) 및 다카바진(dacarbazine)과 같은 DNA 및/또는 RNA 합성, 히스톤디아세틸라아제(histone deacetylase, HDAC) 저해제 또는 기타 화학 요법제로부터 선택될 수 있다.

[0109] 치료제는 하나 또는 다음의 조합일 수 있다: TLR 작용제와 같은 면역치료제 또는 면역조절제; 사이클로포스파미드와 같은 T-조절 세포를 하향 조절하는 약제; 또는 면역 체크 포인트를 차단하거나 면역 증강 경로를 자극하도록 설계된 제제로서, CTLA-4 저해제, PD-1 저해제, PD-L1 저해제, LAG-3 저해제, TIM-3 저해제, VISTA 저해제, CSF1R 저해제, IDO 저해제, CEACAM1 저해제, GITR 작용제, 4-1-BB 작용제, KIR 저해제, SLAMF7 저해제, OX40 작용제, CD40 작용제, ICOS 작용제 또는 CD47 저해제와 같은 단일클론 항체를 포함하며 이에 한정되지 않음. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 치료제는 항-CTLA-4 항체와 같은 CTLA-4 억제제, 항-PD-1 항체와 같은 PD1 억제제 또는 항-PD-L1 항체와 같은 PD-L1 억제제이다. 이러한 억제제/저해제, 작용제 및 항체는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해 생성 및 시험될 수 있다.

[0110] 면역치료제(Immunotherapeutic agents)는 또한 이중-특이성(bi-specific) 항체, 수지상 세포, NK 세포 또는 조작된 T 세포(CAR-T 세포 또는 조작된 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포) 기반의 세포기반-치료제를 포함할 수 있다. 면역치료제는 또한 종양에서 발생하는 특정 유전자 변이를 표적으로 하는 약제, 신종 항원을 포함하여 특정 종양 항원 또는 종양 항원의 조합에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약제 및/또는 STING/cGAS 경로, TLR 또는 기타 선천적 면역반응 및/또는 염증경로를 활성화하기 위한 약제(종양내 투여 약제 포함)를 포함한다.

[0111] 예를 들어, 본 발명의 바이러스는 다음과 같이 사용될 수 있다: 흑색종을 치료하기 위한 다카바진(dacarbazine), BRAF 억제제 및/또는 CTLA-4, PD1 또는 PD-L1 차단제와 조합하여; 유방암을 치료하기 위한 탁솔, 독소루비신, 비노렐빈(vinorelbine), 사이클로포스파미드 및/또는 겐시타빈(gemcitabine)과 조합하여; 대장암을 치료하기 위한 5-플루오로우라실 및 선택적으로 류코보린(leucovorin), 이리노테칸(irinotecan) 및/또는 옥살리플라틴(oxaliplatin)과 조합하여; 폐암을 치료하기 위한 탁솔, 카보플라틴(carboplatin), 비노렐빈 및/또는 겐시타빈, PD-1 또는 PD-L1 차단제와 조합하여; 두경부암을 치료하기 위한 시스플라틴 및/또는 방사선 요법과 조합하여 투여.

[0112] 치료제는 인돌아민 2,3- 디옥시게나아제 (IDO) 경로의 억제제일 수 있다. IDO 억제제는 예를 들어, 에파카도스타트(epacadostat, INCB024360), 1-메틸-트립토판, 인독시모드(1-메틸-D-트립토판), GDC-0919 또는 F001287 를 포함한다.

[0113] IDO가 항종양 면역 반응을 억제하는 작용기작은 항종양 바이러스 치료 후에 발생하는 면역 반응을 억제할 수 있다. IDO 발현은 톨 유사 수용체 (toll like receptor, TLR) 활성화 및 인터페론- γ 에 의해 유도되며, 모두 항종양 바이러스 감염에 기인한 것일 수 있다. 암 치료를 위한 항종양 바이러스 치료법의 일 실시예는 면역 자극 단백질 또는 단백질들 및/또는 융합 단백질을 발현하는 바이러스를 포함하여, 항종양 바이러스와 IDO 경로의 억제제 및 선택적으로 하나 이상의 면역 동시-억제 경로의 길항제, 및/또는 하나 이상의 면역 동시-자극 경로의 작용제와 함께(CTLA-4, PD-1 및/또는 PD-L1) 사용될 수 있다

[0114] 또한, 본 발명은 치료학적 유효량의 항종양 바이러스, 인돌아민 2,3- 디옥 시게나아제 (IDO) 경로의 억제제 및 추가적인 면역 동시억제 경로의 길항제 및/또는 면역 동시-자극 경로의 작용제를, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[0115] 항종양 바이러스는 바람직하게는 변형된 임상 분리물(modified clinical isolate)이다. 항종양 바이러스는 바람직하게는 폭스 바이러스, 보다 바람직하게는 HSV1, 및/또는 ICP34.5 및/또는 ICP47HSV1 의 기능적 불활성화를 유도하는 HSV와 같은 HSV 이다. 항종양 바이러스는 예를 들어 GM-CSF 와 같은 면역 자극 분자 및/또는 CD40L, GITRL, OX40L, 4-1-BBL or ICOSL와 같은 면역 동시-자극 경로 코딩 분자, 및/또는 CTLA-4 억제제, 및/또는 R 서열이 돌연변이되거나 결실된 GALV 융합 유도 당단백질과 같은 융합유도 단백질을 발현할 수 있다. 추가적인 면역 동시-억제 경로의 길항제는, 바람직하게는 CTLA-4 길항제, PD1 길항제 또는 PD-L1 길항제일 수 있다. 예를 들면, 추가적인 면역 동시-억제 경로의 길항제는 PD1 및 PD-L1 상호작용의 억제제일 수 있다.

[0116] 치료제 및/또는 방사선 요법이 본 발명의 바이러스와 함께 사용되는 경우, 바이러스 및 치료제 및/또는 방사선 요법의 투여는 동시 또는 시간에 따라 분리되어 이루어질 수 있다. 본 발명의 조성물은 치료제 또는 방사선 요

법의 전, 함께 또는 후에 투여될 수 있다. 암 치료방법은 본 발명의 바이러스 및/또는 치료제 및/또는 방사선 치료요법의 다중 투여를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 면역 체크 포인트 차단제 또는 다른 면역 강화제와 병용투여하는 경우, 본 발명의 바이러스는 면역 체크 포인트 차단제 또는 면역 강화제의 투여 전에 또는 그 이후에 1 회 또는 수회 투여되거나, 또는 본 발명의 바이러스를 사전 투여하지 않고 면역 체크 포인트 차단제 또는 다른 면역 강화제와 동시에 투여 할 수 있다.

[0117] 본 발명의 바이러스는 임의의 적합한 경로로 대상에게 투여 될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 바이러스는 직접적으로 종양 내 투여(intra-tumoral injection)된다. 종양 내 투여는 표면의(superficial) 피부, 피하 또는 결절성 종양으로의 직접 투여, 및 내장 기관 및 다른 곳의 침전물(deposits)을 국소화시키기 위해 더 깊거나 더 세계 투여하는 이미지 유도된 영상 (CT, MRI 또는 초음파 포함) 주입이 포함된다. 바이러스는 체강 내로, 예를 들어 흉강, 방광 또는 복강 내 투여로 투여 될 수 있다. 바이러스는 혈관, 바람직하게는 종양에 공급되는 혈관 내로 주입될 수 있다.

[0118] 본 발명의 바이러스와 조합될 수 있는 치료제는 다양한 공지된 경로 및 기술을 사용하여 인간 또는 동물의 생체 내에 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 주사 가능한 용액, 현탁액 또는 에멀전으로서 제공될 수 있고, 일반적인 바늘 및 주사기, 또는 액체 제트 투여시스템을 사용하여 비경구(parenteral), 피하, 경구, 표피, 피부내, 근육 내, 동맥 내, 복강 내, 정맥 내 주사를 통해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 비강, 점막 내, 소장, 설하, 직장 또는 질내의 피부 또는 점막 조직에 국소 투여되거나, 호흡 또는 폐 투여에 적합한 미세하게 분무되는 스프레이로 제공 될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 정맥 내, 경구, 또는 종양 내로 직접 투여된다.

[0119] 바이러스 및/또는 치료제는 치료 효과가 있는 투여 조성물과 호환가능한 양으로 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 바이러스 투여는 "치료적" 목적이다. 본 명세서에서 용어, "therapeutic(치료)" 또는 "treatment(처치)"는 그것의 목적으로서 다음 중 하나 이상을 포함한다: 전이 또는 추가 전이의 예방; 증상의 감소 또는 제거; 종양 또는 암의 감소 또는 완전한 제거, 환자 암의 진행 시간의 증가; 치료 후 재발하는 시간의 증가; 또는 생존 시간의 증가.

[0120] 치료적 처치는 암 1기, 2기, 3기 또는 4기에 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 2기, 3기 또는 4기에, 보다 바람직하게는 3기 또는 4기에, 외과적 개입 전 또는 후(즉, 수술 후 종양의 재발 또는 불완전한 제거 후)에 이루어 질 수 있고, 바람직하게는 외과적 개입(surgical intervention) 전에(원발성 또는 재발성/전이성 질환의 절제) 이루어질 수 있고, 또는 수술 후 또는 수술적 제거가 불완전한 상태, 즉 잔여 종양이 남아있는 상태에서 이루어질 수 있다.

[0121] 치료적 처치는 종양이 될 수 있는 표적 조직, 체강 또는 혈관 내로 바이러스 조성물을 직접 주사한 후에 수행될 수 있다. 지침으로서, 투여된 바이러스의 양은 HSV의 경우 10^4 내지 10^{10} pfu 이고, 바람직하게는 10^5 내지 10^9 pfu 이다. HSV의 경우 초기 낮은 용량(10^4 내지 10^7 pfu)을 환자에게 투여하여 HSV에 대해 혈청반응음성인(seronegative) 환자를 혈청전환(seroconvert)시킬 수 있으며, 혈청 양성인 환자의 면역력을 높이고, 이후에 높은 용량(10^6 내지 10^9 pfu)을 투여할 수 있다. 바이러스 및 약제학적으로 허용 가능한 적합한 담체 또는 희석제로 이루어진 약제학적 조성물을 20 ml까지 종양 내 직접 투여할 수 있으며, 체강(이것은 투여 전 적절한 희석액으로 희석될 수 있음) 내 또는 혈류에는 50 ml까지 투여할 수 있다. 그러나 일부 항종양 요법의 경우 종양과 투여 경로 및 부위에 따라 더 크거나 적은 부피를 사용할 수도 있다.

[0122] 상기 투여 경로 및 투여량은 숙련된 의사가 최적의 투여 경로 및 투여량을 용이하게 결정할 수 있다. 투여량은 다양한 파라미터에 따라, 특히 종양의 위치, 종양의 크기, 치료할 환자의 연령, 체중 및 상태 및 투여경로에 따라 결정될 수 있다. 바람직하게는 바이러스는 혈관 내 또는 체강내로 투여될 수 있다. 최적 투여 경로는 종양의 위치 및 크기에 따라 결정될 수 있다. 면역학적 또는 임상적 효과를 얻기 위해 여러 번 복용해야 할 수 있으며, 필요하다면 일반적으로 2 일에서 12 주 간격으로, 바람직하게는 3 일에서 3 주 간격으로 복용할 수 있다. 치료 받는 종양 유형의 반응 속도 및 특정 환자의 반응속도에 따라 최대 5 년 또는 그 이상까지 반복 투여가 가능하며, 바람직하게는 1 개월에서 2 년까지 투여될 수 있다.

[0123] 다음은 본 발명의 실시예를 나타낸다.

[0124] **실시예 1. 본 발명의 바이러스 구축**

[0125] 본 발명에서 사용된 바이러스 종은 HSV이고, 특히 HSV1이다. 실시예에서 사용된 HSV1 독주는, 20개 이상의 1차

임상 분리물(primary clinical isolates)의 인간 종양-유래된 세포주의 패널을 죽이는 능력을 비교하여, 신속하게 저용량으로 광범위한 범위의 세포주를 죽일 수 있는 바이러스 독주를 선택하였다. 비교에 사용된 종양 세포주는 U87MG (신경교종), HT29 (대장암), LNCaP (전립선암), MDA-MB-231 (유방암), SK-MEL-28 (흑색종), Fadu (편평상피암), MCF7 (유방암), A549 (폐암), MIAPACA-2 (췌장암), CAPAN-1(췌장암), 및 HT1080 (섬유육종)를 포함한다. 특히, HSV의 각 1차 임상분리물을 1, 0.1, 0.01 및 0.001 MOIs로 하여 각 세포주에서 적정하였고(titrated), 각 용량에서 24시간 및 48시간에 세포사멸 정도를 측정하였다. 세포 사멸 정도는 예를 들어, 각 시점에서 살아남은 세포의 비율을 현미경으로 평가하거나, MTT 분석법과 같은 대사 분석방법을 사용하여 측정하였다.

[0126] 이어서, 본 발명의 예시적인 바이러스는, GFP를 암호화하는 서열 사이에, HSV1 뉴클레오타이드 145300 내지 145582에 인접한 구역을 포함하는 플라스미드와의 상동성 재조합을 이용하여, 바이러스 게놈으로부터 ICP47을 결실시킴으로써 제작하였다(HSV1 뉴클레오타이드 145300 내지 145582는 결실될 서열이고; HSV1 독주 17 서열 Genbank 파일 NC_001806.2)

[0127] GFP 발현 바이러스 플라크(plaques)를 선택하고, 빈(empty) 인접 구역과의 상동성 재조합을 이용하여 GFP를 제거하였다. 그리고 GFP를 발현하지 않는 플라크는 선택하였다. 이것은 현재 ICP47 프로모터 제어 하에 있는 것처럼, IE 단백질로서 US11가 발현된 ICP47 결실된 바이러스를 가져온다. 이어서, GFP를 암호화하는 서열 사이에서, HSV1 뉴클레오타이드 124953 내지 125727 에 인접한 영역을 포함하는 플라스미드와의 상동성 재조합을 이용하여 ICP34.5을 제거하였다(HSV1 뉴클레오타이드 124953 내지 125727은 삭제될 서열이고; HSV1 독주 17 서열은 Genbank 파일 NC_001806.2). GFP 발현 바이러스 플라크를 다시 선택하고, 이어 배면 배향(back to back orientation)으로 배치된 CMV IE 프로모터 및 RSV 프로모터에 의해 각각 구동되는, 마우스 GM-CSF 서열의 코돈 최적화된 버전 및 GALV R- 서열의 코돈 최적화된 버전을 포함하는 발현 카세트 사이에 있는, 동일한 인접 부위에 의한 상동성 재조합에 의해 GFP를 제거하였다. 그리고, 다시 GFP를 발현하지 않는 바이러스 플라크를 선택하였다. 이 바이러스 제작은 당업계의 표준화된 방법을 이용하여 수행하였다.

[0128] 도 1은 바이러스의 구조를 나타낸다. mGM-CSF 및 GALV-R- 서열은 각각 서열 번호 2 및 8에 나타내었다. 생성된 바이러스의 구조는 PCR로 확인하였고, GM-CSF 발현은 ELISA에 의해, 그리고 인간 HT1080 종양 세포의 감염 및 융합(syncytial) 플라크의 관찰에 의해 GALV-R- 발현을 확인한다.

[0129] 또한, 바이러스는 ICP34.5에 삽입이 없거나, 마우스 GM-CSF 또는 GALV-R-에 대한 유전자만 삽입하는 유사한 과정을 사용하여 제작된다. 이 바이러스의 구조는 도 1에도 나타난다.

[0130] 인간에 사용하기 위해, hGM-CSF가 사용되며, 이의 코돈 최적화 버전은 서열 번호 4에 제시된다.

[0131] **실시예 2. 융합유도 단백질을 발현하는 바이러스에서 2 가지 면역 자극 분자의 발현**

[0132] 상술한 GALV-R- 및 mGM-CSF 발현 바이러스와 유사한 바이러스를 제작하였고, 이 바이러스는 추가적으로 CD40L를 발현하였다. 여기서, ICP34.5 인접 영역을 포함하는 플라스미드 및 CMV 및 RSV 프로모터에 의해 구동되는 GM-CSF 및 GALV-R-를 포함하는 발현 카세트 대신에, ICP34.5 인접 영역을 포함하는 플라스미드 및 CMV, RSV 및 SV40 프로모터에 의해 구동되는 GM-CSF, GALV 및 CD40L을 포함하는 발현 카세트를 GFP가 ICP34.5 에 삽입된 바이러스와의 재조합에 사용하였다. 이어서 비-GFP 발현 플라크를 다시 선택하였다.

[0133] **실시예 3. 마우스 종양 모델에서 항종양 바이러스로부터의 융합유도 단백질 및 면역 자극 분자의 조합된 발현 효과**

[0134] GALV R- 단백질은 인간 세포에서 세포 융합을 일으키지만 마우스 세포에서는 그렇지 않다. 왜냐하면 마우스에서는 세포 융합에 필요한 PiT-1 수용체가 융합이 일어나지 않는 서열을 가지고 있기 때문이다.

[0135] 결과적으로, 인간 PiT-1을 발현하는 마우스 종양 세포가 당업계의 표준 방법을 사용하여 먼저 제조된다. 인간 PiT-1은 선별 마커 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 벡터에 클로닝된다. 벡터를 표적 CT26 마우스 대장암 종양 세포에 형질감염시키고, 선별 마커에 내성을 갖는 클론을 선별하여 CT26/PiT-1 세포를 생성하였다. 형질감염되지 않은 세포 및 PiT-1 발현 렌티 바이러스로 형질 감염된 세포에서 웨스턴 블로팅으로 PiT-1 발현이 확인된다. 그리고 GALV-R-를 발현하는 플라스미드의 형질 감염 및 세포 융합의 확인으로서 PiT-1 발현이 확인된다.

[0136] 본 발명의 유용성은 CT26/PiT-1 세포를 Balb/c 마우스의 양쪽 옆구리(flank)에 주입하고 CT26/PiT-1 종양이 직경 약 0.5 cm까지 성장시킴으로써 입증된다.

- [0137] 다음으로 2 주 동안 주당 3 회만 각 마우스(그룹 당 5 마리)의 한 쪽 옆구리에 다음과 같이 처치한다:
- [0138] - 50 μ l 식염수 (1개 그룹);
- [0139] - 10^5 pfu/ml, 10^6 pfu, 또는 10^7 pfu/ml 50 μ l, 삽입유전자가 없는 HSV (3개 그룹);
- [0140] - 10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 또는 10^7 pfu/ml 50 μ l, 마우스 GM-CSF 만 삽입된 HSV (3개 그룹);
- [0141] - 10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 또는 10^7 pfu/ml 50 μ l, GALV-R- 만 삽입된 바이러스 (3개 그룹); 또는
- [0142] - 10^5 pfu/ml, 10^6 pfu/ml, 또는 10^7 pfu/ml 50 μ l, 마우스 GM-CSF 및 GALV-R- 가 모두 삽입된 바이러스 (3개 그룹).
- [0143] 종양 성장에 미치는 영향을 최대 1 개월 동안 관찰한다. GM-CSF와 GALV-R-를 발현하는 바이러스가 주입된 종양과 주입되지 않은 종양 모두에서, 개선된 용량 반응 곡선을 포함하여, 탁월한 종양 조절 및 감소가 관찰되었다.
- [0144] **실시예 4. 마우스 종양 모델에서 면역 체크 포인트 차단제의 치료 효과에 대한 항종양 바이러스의 융합유도 단백질과 면역 자극 분자의 조합 발현의 효과**
- [0145] 상기 실시예 3의 실험을 반복하고, 추가로 마우스 PD-1을 표적으로하는 항체(10 mg/kg; 바이러스 투약과 동일한 날에 Bioxcell RMP-1-14) 또는 마우스 CTLA-4를 표적으로하는 항체 (10 mg/kg; 바이러스 투약과 동일한 날에 Bioxcell 9H10)를 마우스에 복강 내 경로에 의해 격주(bi-weekly)로 투여하였다. 항체 치료를 받지 않는 마우스 그룹을 추가하였다. 보다 상세하게는, 마우스에게 다음을 투여하였다: (1) 식염수, (2) 삽입 유전자가 없는 HSV, (3) 실시예 3과 같이 GM-CSF 및 GALV-R-삽입된 HSV, (4) PD-1 항체, (5) CTLA-4 항체, (6) 삽입 유전자가 없는 HSV 및 PD-1 항체, (7) 삽입 유전자가 없는 HSV 및 CTLA-4 항체, (8) GM-CSF 및 GALV-R- 삽입된 HSV 및 PD-1 항체 또는 (9) GM-CSF 및 GALV-R- 삽입된 HSV 및 CTLA-4 항체.
- [0146] 다른 그룹과 비교하여, GM-CSF 및 GALV-R-를 발현하는 바이러스와 항-PD-1 항체를 함께 주입하거나 주입하지 않은 종양에서, 향상된 용량 반응 곡선과 함께 탁월한 종양 조절 및 감소효과가 관찰되었다.
- [0147] **실시예 5. 임상 분리물 수집**
- [0148] 본 발명의 실시예에서 사용된 바이러스 중은 HSV, 특히 HSV1이다. 재발성 구순포진이 있는 181 명의 지원자를 모집하였다. 이 지원자들은 샘플 수집 키트 (Sigma Virovult 수집 튜브 포함)를 제공받았으며, 이를 사용하여 구순포진을 면봉으로 닦은 다음이 샘플을 Replimune, Oxford UK로 발송하였다. 2016 년 6 월부터 2016 년 2 월 까지 72 명의 지원자의 샘플을 수거하였다.
- [0149] 각 면봉 샘플을 사용하여 BHK 세포를 감염시켰다. 이들 36 개의 살아있는 바이러스 샘플은 BHK 세포를 분주 및 성장시킨 후에 회수되었다. 이 샘플들은 표 1 (테스트를 거친 면봉 샘플 결과에 대한 세부 정보)에 자세히 설명되어 있다.

표 1

[0150]

샘플 번호	회수된 바이러스
RH001A	No
RH001B	
RH002A	Yes
RH003A	No
RH004A	Yes
RH004B	
RH005ARH005B	No
RH006ARH006B	No
RH007A	Yes
RH007B	
RH007C	
RH008ARH008B	No
RH008C	
RH009A	No
RH009B	

RH010A	No
RH011A RH011B RH011C	No
RH012A	No
RH013A	No
RH014A RH014B	Yes
RH015A	Yes
RH016A RH016B	No
RH017A	Yes
RH018A RH018B RH018C	Yes
RH019A RH019B RH019C	No
RH020A RH020B RH020C	Yes- RH020A only
RH021A RH021B	Yes
RH022A RH022B	Yes
RH023A	Yes
RH024A	No
RH025A RH025B	Yes -RH025B only
RH026A	Yes
RH027A RH027B RH027C	No
RH028A RH028B RH028C	No
RH029A	No
RH030A	No
RH031A RH031B RH031C RH031D RH031E RH031F	Yes - RH031A to RH031D
RH032A	No
RH033A RH033B RH033C	No
RH034A RH034B RH034C	No
RH035A	No
RH036A	Yes
RH037A	Yes
RH038A	Yes
RH039A RH039B RH039C	No
RH040A RH040B RH040C	Yes
RH041A	Yes

RH042A	Yes
RH043A	No
RH043B	
RH043C	
RH044A	No
RH045A	No
RH046A	Yes
RH047A	Yes- RH047A and RH047C
RH047B	
RH047C	
RH048A	No
RH049A	No
RH049B	
RH049C	
RH050A	No
RH051A	Yes
RH051B	
RH052ARH052B	Yes - RH052A only
RH053A	No
RH054A	No
RH055A	No
RH055B	
RH056A	Yes
RH057A	No
RH058A	Yes
RH058B	
RH059A	No
RH060A	No
RH061A	Yes
RH062A	No
RH063A	No
RH064A	Yes
RH065A	Yes
RH065B	
RH066A	No
RH067A	No
RH067B	
RH068A	No - contaminated
RH069A	No
RH069A	
RH070A	Yes
RH071A	Yes
RH072A	No
RH073A	Yes
RH073B	
RH074ARH074B	No
RH075A	No
RH076A	No
RH078A	No
RH078B	
RH079BRH079B	Yes
RH080A	No
RH081A	Yes
RH082A	No
RH082B	
RH083ARH083B	Yes

RH084A RH084B RH084C	Yes
RH085A	No
RH086A	No
RH087A RH087B	Yes - RH078B only

[0151]

A, B, C 등은 각각 동일한 지원자의 면봉을 나타낸다.

[0153]

실시예 6. 향상된 항-종양 효과를 가진 임상 분리물 동정

[0154]

인간 종양에서 유래된 세포주의 패널을 죽이기 위한 HSV1의 주요 임상 분리 물의 능력을 시험하였다. 이 시험에 사용된 종양 세포주는 HT29 (대장암), MDA-MB-231 (유방암), SK-MEL-28 (흑색종), Fadu (편평 세포 암종), MCF7 (유방암), A549 (폐), MIAPACA-2 (췌장) 및 HT1080 (섬유 육종)이다. 세포주를 사용하여 각 1차 임상 분리물의 감염 후 MOI 및 시간 범위에서 달성된 CPE 수준을 실험하였다.

[0155]

5-8 개의 새로운 바이러스 독주를 동시에 사용하여 실험을 수행하였다. 바이러스 독주는 MOI (0.001-1)의 범위에서 이중으로 처리되었고, 크리스탈 바이올렛 염색하고 감염 후 24 및 48 시간에 CPE 범위를 평가하였다.

[0156]

종양 세포주를 죽이는데 가장 효과적인 바이러스 독주를 평가하고, 5-8개 독주의 각 스크리닝에서 가장 효과적인 2 또는 3개 독주를 동정하였으며, 추가로 가장 효과적인 독주를 확인하는 실험을 하였다.

[0157]

초기 스크리닝에서는 상이한 종양 세포주를 죽이는 각 독주의 능력에 상당한 변동성을 보였다. 처음 29 종의 독주 중 8 종을 동정하여 추가 조사하였다. 이들 독주는 RH004A, RH015A, RH018A, RH021A, RH023A, RH31A, RH040A 및 RH047A 이다.

[0158]

추가 비교를 위해 8 종의 독주를 종양 세포주 패널상에서 병행하여 시험하였고, 이들 종양 세포주를 죽일 수 있는 상대적인 능력을 크리스탈 바이올렛 염색 및 CPE 측정에 따라 평가하였다. 도 3은 관찰된 표적 종양 세포주를 죽이기 위한 바이러스의 상이한 능력을 입증하는, 각 세포주상에서 각각의 바이러스에 대한 이들 바이러스에 대한 대표 시점 및 MOI를 나타낸다.

[0159]

독주 간에는 상당한 변이가 있었으며, 특정 독주가 한 세포주를 죽이는 데 특히 효과적일 수 있지만, 다른 세포주를 죽이는데 특히 효과적일 수도 있다. 이는 다른 유형의 종양 세포를 죽이는 HSV의 임상 독주 능력에 있어 변동성의 정도를 의미한다.

[0160]

도 3은 또한 각각의 세포주를 죽이는 데 있어서 바이러스 독주 중 가장 우수하고 두 번째로 우수한 바이러스 독주를 나타내며, 바이러스 독주가 세포주 패널 전체를 죽일 수 있는 전반적인 상대적 능력에 따라 서열을 정할 수 있다.

[0161]

이 분석은 RH004A, RH015A, RH018A, RH031A 및 RH040A 독주가 다른 독주보다 상대적으로 더 효과적 이었음을 입증하였으며, 이들 5 독주는 항종양 제제로서 더 발전될 수 있는 가능성을 위해 선택되었다. 이 상위 5 개의 독주 중, 세포주 패널을 가로 질러 죽일 수 있는 능력에 근거한 상대적인 순위는 RH018A> RH004A> RH031A> RH040A> RH015A이었다.

[0162]

보다 상세하게는, 본 발명의 실시예에서는 종양 세포주를 멀티-웰 조직 배양 플레이트에 분주하고, 80% 컴플루언시가 되면 바이러스 감염시켰다.

[0163]

각 종양 세포주의 대표 웰을 트립신 처리하고 웰 내의 세포의 수를 측정하였다. 이 세포 수는 1, 0.1, 0.01 및 0.001의 MOI를 제공하는데 필요한 각 임상 분리물(clinical isolate)의 부피를 결정하는데 사용된다. 이 MOI에서 종양 세포주의 분리된 웰을 임상 분리물에 감염시켰다. 모든 감염은 네 번 반복실험하였다. 이중 웰(duplicate wells)을 24 시간 동안 배양하고, 글루타르알데히드로 세포를 고정시키고 크리스탈 바이올렛으로 염색하기 전에 이중 웰을 37 °C, 5 % CO2에서 48 시간 동안 배양하였다. 세포 용해의 수준은 육안 관찰로서, 현미경(세포 수) 및 사진으로 평가되었다.

[0164]

스크리닝에서 독주 RH018A는 시험된 모든 독주 중 1 위를 차지한 독주를 평균 독주 (즉, 상위 8 위는 아니지만

가장 효과가 떨어지고 종양 세포주를 죽이는 독주)와 비교하였다. 이 비교는 종양 세포주를 죽이는데 있어서 RH018A 독주가 이 평균 독주 (RH065A 독주)보다 약 10 배 더 효과적이라는 것을 보여주었다(즉, 균등한 비율의 세포를 죽이기 위한 RH065A 독주보다 RH018A 독주가 약 10 배 적었다). 이는 도 4에 나타내었다.

[0165] 실시예 7. 임상 분리물의 변형

[0166] GFP 및 GALV-R- 융합유도 당단백질 사이에서 암호화되는, ICP34.5 코딩 유전자 (뉴클레오타이드 143680-145300 및 145,582-147,083; HSV1 독주 17 서열 Gene bank NC_001806.2)에 인접한 구역을 포함하는 플라스미드로 상동성 재조합을 사용하여 바이러스 게놈으로부터 ICP34.5를 결실시킴으로써, 실시예 6에서 선택된 임상 분리물을 변형시켰다. 이 바이러스 (Virus 10)의 구조는 도 5에 표시하였다.

[0167] ICP34.5와 ICP47 (뉴클레오타이드 123464-124953과 125727-126781을 포함하는 인접 영역을 사용; HSV1 독주 17 서열 Genbank NC_001806.2)가 결실된(ICP47 프로모터의 조절하에서 US11의 대체) 독주 RH018A에 기초한 바이러스를 추가 제작하였다. 상기 바이러스를 제작하기 위하여, ICP47 대신 GFP 발현되는, GFP 발현 바이러스 플라크를 우선 선별하였다. 이어 GFP는 빈 인접부위와의 상동성 재조합으로 제거되었고, GFP 를 발현하지 않는 플라크를 선별하였다. ICP47 프로모터의 조절 하에 IE 단백질로서 US11이 발현되는 ICP47 결실된 바이러스를 생성하였다.

[0168] 이어서, GFP 가 암호화된 위치 사이에, HSV1 (뉴클레오타이드 143680-145300 및 145,582-147,083; HSV1 독주 17 서열 Genbank NC_001806.2)에 인접한 영역을 포함하는 플라스미드로 상동성 재조합을 사용하여 ICP34.5를 제거하였다. GFP 발현 바이러스 플라크를 다시 선별하고, 삽입될 유전자를 포함하는 발현 카세트 사이에 있는 동일한 인접 영역으로 상동성 재조합하여 GFP를 제거하였다.

[0169] 제작된 바이러스를 도 1 및 도 5 에 나타내었다. 이들은 배면 배향(back to back orientation)으로 배열된 CMV IE 프로모터 및 RSV 프로모터에 의해 각각 유도되는, 마우스 GM-CSF 서열의 코돈 최적화된 버전 및 GALV R- 서열의 코돈 최적화된 버전을 포함한다. GFP를 발현하지 않는 바이러스 플라크를 다시 선별한다. 이 바이러스 구축은 당업계의 표준 방법을 사용하여 수행되었다.

[0170] mGM-CSF 및 GALV-R- 서열은 각각 서열 번호 2 및 8에 나타내었다. 생성된 바이러스의 구조를 PCR로 확인하고, ELISA로 GM-CSF 발현을 확인하였다. 인간 HT1080 종양 세포의 감염 및 융합(syncytial) 플라크는 GALV-R- 발현으로 확인하였다.

[0171] 인간에게 사용하기 위해, hGM-CSF를 사용하였으며, 이의 코돈 최적화된 서열은 서열 번호 4로 표시된다. 이 바이러스의 구조는 도 5 에 도시된다. 마우스 또는 인간 GM-CSF의 바이러스 16, 17 및 19는 도 6 에 도시된다.

[0172] 실시예 8. 항종양 용도로 변형되고 융합유도 당단백질을 발현하는 바이러스는 융합유도 당단백질을 발현하는 않는 바이러스와 비교하여 인 비트로에서 종양세포 살상능력이 향상된다

[0173] ICP34.5가 결실되고 GALV-R- 및 GFP를 발현하는 임상 독주 RH018A에 기초한 바이러스 10 (도 5 참조)를 GFP (바이러스 12)만을 발현하는 바이러스와 인 비트로에서 비교하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 바이러스 10은 바이러스 12와 비교하여 인간 종양 세포주 패널에서의 살상력이 강화되었다.

[0174] 실시예 9. 종양 살상 용도로 변형된 본 발명의 바이러스는 본 발명이 아닌 유사하게 변형된 바이러스와 비교하여 종양 세포 사멸을 증가시킨다

[0175] ICP34.5 및 ICP47이 결실되고 GALV-R- 및 GM-CSF를 발현하는 임상 독주 RH018A에 기초한 바이러스 17 (도 5 참조)을, ICP34.5 및 ICP47가 결실되고 본 발명의 독주 유래가 아니며 GM-CSF만을 발현하는 공지된 바이러스와 인 비트로에서 비교 하였다. 도 8에서 볼 수 있듯이, 바이러스 17은 이전의 바이러스와 비교하여 인간 종양 세포주 패널에서 향상된 살상능력을 나타내었다.

[0176] 실시예 10. 종양 살상 용도로 변형된 본 발명의 바이러스는 인 비보에서 마우스 종양을 효과적으로 치료한다

[0177] 왼쪽과 오른쪽 옆구리에 A20 림프종 종양이 있는 마우스에서 바이러스 16을 실험하였다. 100 만개 종양 세포를 Balb/c 마우스의 양쪽 옆구리에 이식하였고 종양이 직경 0.5-0.7 cm까지 자라도록 하였다. 오른쪽 측면의 종양에 비히클 (10 마리) 또는 5x10 exp6 pfu 바이러스 16(10 마리)를 3 회 (격일 간격) 주사하고, 종양 크기에 대한 영향을 추가로 30일간 관찰하였다. 이것은 주사 된 종양과 주사되지 않은 종양 모두가 바이러스 16으로 효과적으로 치료되었음을 입증합니다 (도 9 참조). 이는 투여 또는 미투여된 종양 모두가 바이러스 16에 의해 효과적으로 치료되었음을 나타낸다 (도 9 참조).

[0178] 실시예 11. 래트 종양 모델에서 본 발명의 항종양 바이러스로부터의 융합 단백질 및 면역 자극 분자의 조합된 발현의 효과

[0179] GALV R- 단백질은 인간 세포에서 세포 간 융합을 일으키지만, 마우스 세포에서는 그렇지 않다. 그러나, GALV R-는 래트 세포에서는 융합을 일으킨다.

[0180] 9L 세포를 피셔(Fischer) 344 래트의 옆구리에 투여하고 9L 종양을 직경 약 0.5 cm까지 성장시킴으로써 발명의 유용성을 추가로 입증하였다.

[0181] 3 주 동안 주당 3 회 래트군(그룹 당 10 마리)의 각 래트 한쪽 옆구리에 다음을 투여하였다:

[0182] - 50 µl 비히클(vehicle);

[0183] - 50 µl, 10⁷ pfu/ml Virus 19 (mGM-CSF 발현, GALV R- 발현하지 않음);

[0184] - 50 µl, 10⁷ pfu/ml Virus 16 (마우스 GM-CSF 및 GALV-R- 모두 발현).

[0185] 약 30 일 동안 종양의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. GALV-R- 발현 바이러스가 주입된 종양과 주입하지 않은 종양 모두에서 우수한 종양 조절 및 수축을 보임으로써, 전신 효과가 개선되었음을 입증하였다. 이 결과는 도 15에 나타내었다. 도 10은 GALV (바이러스 15)를 발현하는 바이러스가 GALV를 발현하지 않는 바이러스 (바이러스 24)와 비교하여 인 비트로에서 래트 9L 세포의 강화된 살상능력을 보여준다.

[0186] 실시예 12. 종양 살상 용도로 변형된 본 발명의 바이러스는 마우스 종양 모델에서 면역 체크 포인트 차단과 상승작용한다

[0187] 왼쪽과 오른쪽 옆구리에 CT26 종양이 있는 마우스에서 바이러스 16를 시험하였다. 100 만개 종양 세포를 Balb/c 마우스의 양쪽 옆구리에 이식하였고 종양이 직경 0.5-0.6 cm까지 자라도록 하였다.

[0188] 10 마리의 마우스 그룹을 다음과 같이 처리하였다:

[0189] - 비히클 (격일로 오른쪽 옆구리에 3회 주입);

[0190] - 5 x 10⁶ pfu Virus 16, 격일로 오른쪽 옆구리에 주입;

[0191] - 항-마우스 PD1 단독 (10 mg/kg 복강내 투여, 3일마다 투여, BioXCell clone RMP1-14);

[0192] - 항-마우스 CTLA-4 (3 mg/Kg 복강내 투여, 3일마다 투여, BioXCell clone 9D9);

[0193] - 항-마우스 PD1 와 Virus 16;

[0194] - 항-마우스 CTLA4 와 Virus 16;

[0195] - 1-메틸 트립토판 (IDO 억제제 (식수 내 5 mg/ml));

[0196] - 항-마우스 PD1 와 1-메틸 트립토판;

[0197] - 항-마우스 PD1 와 1-메틸 트립토판 및 Virus 16;

[0198] 이후 30 일 동안 종양의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 단일 치료 그룹으로 처치한 동물에서보다 바이러스와 체크포인트 차단제의 조합으로 치료한 동물에서 더 큰 종양 감소가 나타났다(도 11 참조). 항 PD1 및 바이러스 16 투여와 비교하여, 항-PD1 및 IDO 억제제와 함께 투여한 바이러스 16에 의한 종양 감소의 향상이 입증되었다(도 11 참조).

[0199] A20 종양에서도 면역 체크포인트 차단과 함께 바이러스 16의 강화된 활성이 나타났다(도 12).

[0201] 실시예 13. 면역 결핍 마우스 인간 이종 이식 모델에서의 본 발명의 항종양 바이러스로부터의 융합 단백질 발현 효과

[0202] GALV R- 단백질은 인간 세포에서 세포 간 융합을 일으키지만 마우스 세포에서는 나타나지 않는다. 그러나, 면역 결핍 마우스에서 자란 인간 이종 이식 종양은 항종양 효능에 대한 GALV 발현의 영향을 평가하는데 사용될 수 있다.

- [0203] 이에, 누드 마우스의 옆구리에 A549 인간 폐암 세포를 주입하고 종양이 직경 약 0.5 cm까지 성장하게함으로써 본 발명의 유용성을 더욱 입증하였다.
- [0204] 1 주일에 3 회 각 마우스 군 (그룹당 10 마리)의 옆구리에 있는 종양 내로 다음과 같이 투여하였다:
- [0205] - 50 μ l 비히클(vehicle);
- [0206] - 50 μ l, 10^7 pfu/ml Virus 16 (마우스 GM-CSF 및 GALV-R- 모두 발현);
- [0207] - 50 μ l, 10^6 pfu/ml Virus 16;
- [0208] - 50 μ l, 10^5 pfu/ml Virus 16;
- [0209] - 50 μ l, 10^7 pfu/ml Virus 19 (마우스 GM-CSF만 발현);
- [0210] - 50 μ l, 10^6 pfu/ml Virus 19;
- [0211] - 50 μ l, 10^5 pfu/ml Virus 19.
- [0212] 이후 30 일 동안 종양의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 두 종양 모델에서 GALV-R-를 발현하는 바이러스는 우수한 종양 제어 및 수축을 나타내었다(도 14 참조).
- [0213] **실시예 14. 융합유도 단백질을 발현하는 바이러스로부터의 2 개 면역 자극 분자의 발현**
- [0214] 상기 기재된 GALV-R 및 mGM- CSF 발현 바이러스(바이러스 16)과 유사한 바이러스로서, CD16L (바이러스 32), ICOSL (바이러스 36), OX40L (바이러스 35), 4-1BBL (바이러스 33) 및 GITRL (바이러스 34)의 마우스 버전을 추가로 발현하는 바이러스를 구축하였다.
- [0215] 여기서, ICP34.5 인접 영역을 포함하는 플라스미드 및 CMV 및 RSV 프로모터에 의해 구동되는 GM-CSF 및 GALV-R-를 포함하는 발현 카세트 대신에, ICP34.5 인접 영역 및 각각 CMV, RSV 및 MMLV 프로모터에 의해 구동되는 GM-CSF, GALV 및 다른 단백질을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를, ICP34.5에 삽입된 GM-CSF, GALV 및 GFP를 포함하는 바이러스와의 재조합에 사용하였다.
- [0216] 비-GFP 발현 플라크를 다시 선택하였다. 정확한 삽입은 PCR로 확인하였고 추가로 삽입된 유전자의 발현은 웨스턴 블로팅 및/또는 ELISA로 확인하였다. 이들 바이러스를 도 5에 나타내었다. 유사하게, GALV 및 mGM-CSF 과 함께 항-마우스 및 항-인간 CTLA-4를 발현하는 바이러스도 제작하였다 (도 5의 바이러스 27 및 바이러스 31, 및 도 13 참조). *인 비보*에서 mGM-CSF 및 GALVR-에 더하여 항-마우스 CTLA-4 (바이러스 27), mCD40L (바이러스 32), m4-1BBL (바이러스 33) 또는 mOX40L (바이러스 35)을 발현하는 바이러스의 효과를 도 16에 나타내었다. 도 16은 바이러스 16 (mGM-CSF 및 GALVR-을 발현함)과 비교하여 A20 종양에서 향상된 활성을 나타내었다.
- [0217] 이 실험에서 종양은 마우스의 양쪽 옆구리에 유도되었고, 바이러스 또는 비히클은 오른쪽 옆구리 종양에만 주입되었다. 사용된 바이러스의 양은 1 주일에 3 번씩 5×10^4 pfu (각 경우 1×10^6 pfu/ml 50 μ l)였다. 이 용량의 바이러스는 바이러스 16이 투여되지 않은 종양에 대한 필요량 이하의 용량(subtherapeutic)으로서, 바이러스 27, 32, 33 및 35에 의해 코딩된 추가 분자들의 전달 이점을 명확하게 나타낸다.
- [0218] 수탁정보
- [0219] 다음의 HSV1 독주를 ECACC (Culture Collections, Public Health England, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, United Kingdom) 에, 2016년 12월 19일 일자로, Replimune Limited 이름으로 기탁하였으며, 임시 수탁 번호는 다음과 같다:
- [0220] RH004A - 임시 수탁 번호 16121902
- [0221] RH015A - 임시 수탁 번호 16121903
- [0222] RH018A - 임시 수탁 번호 16121904
- [0223] RH021A - 임시 수탁 번호 16121905
- [0224] RH023A - 임시 수탁 번호 16121906

- [0225] RH031A - 임시 수탁 번호 16121907
- [0226] RH040B - 임시 수탁 번호 16121908
- [0227] RH047A - 임시 수탁 번호 16121909.

수탁번호

- [0228] 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121902
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121903
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121904
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121905
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121906
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121907
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121908
수탁일자 : 20161219

- 기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures
수탁번호 : ECACC16121909

수탁일자 : 20161219

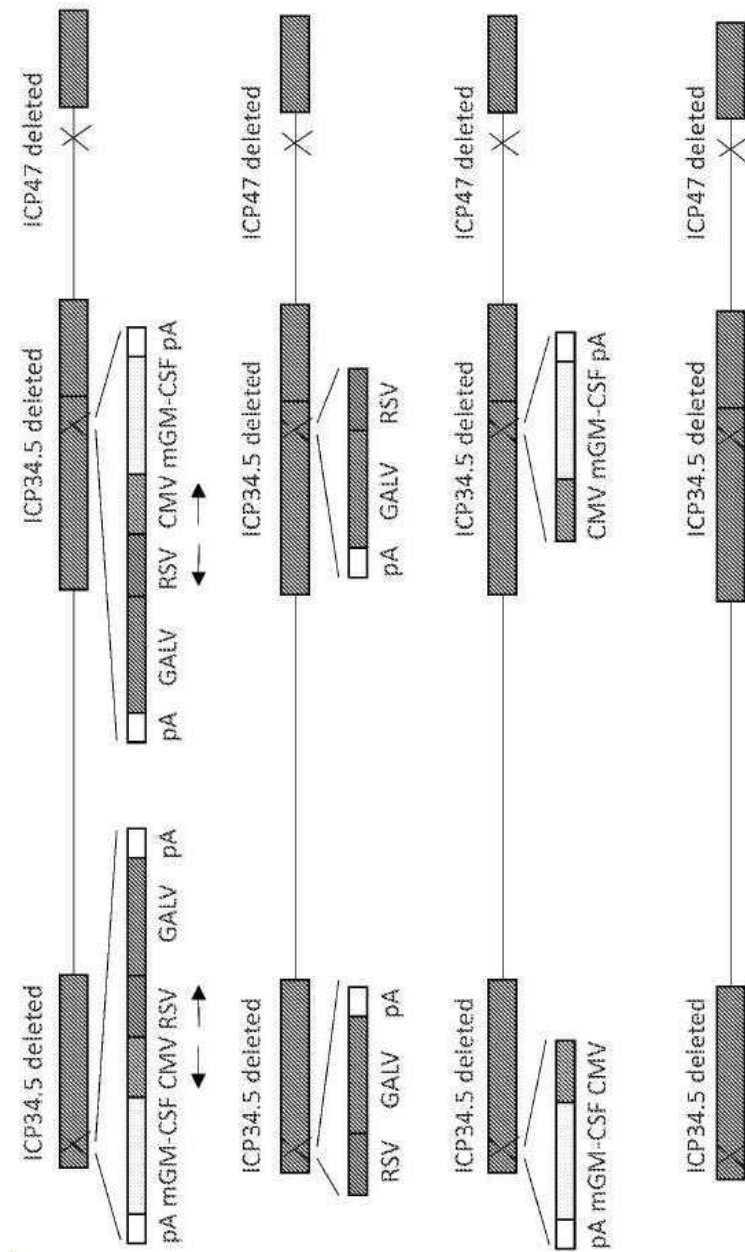
기탁기관명 : European Collection of Authenticated Cell Cultures

수탁번호 : ECACC16121910

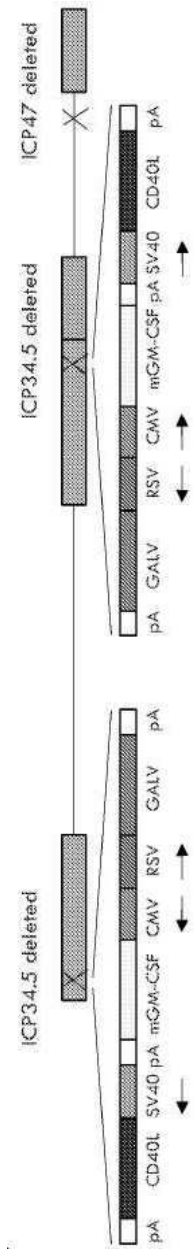
수탁일자 : 20161219

도면

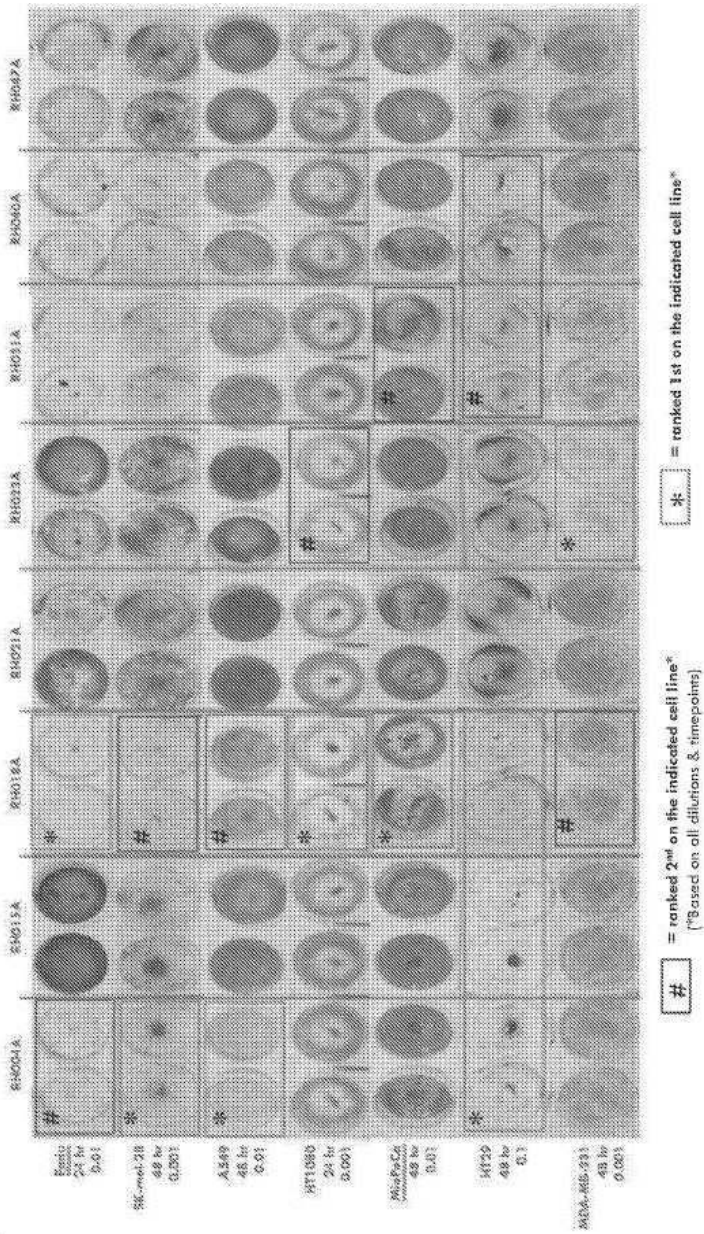
도면1



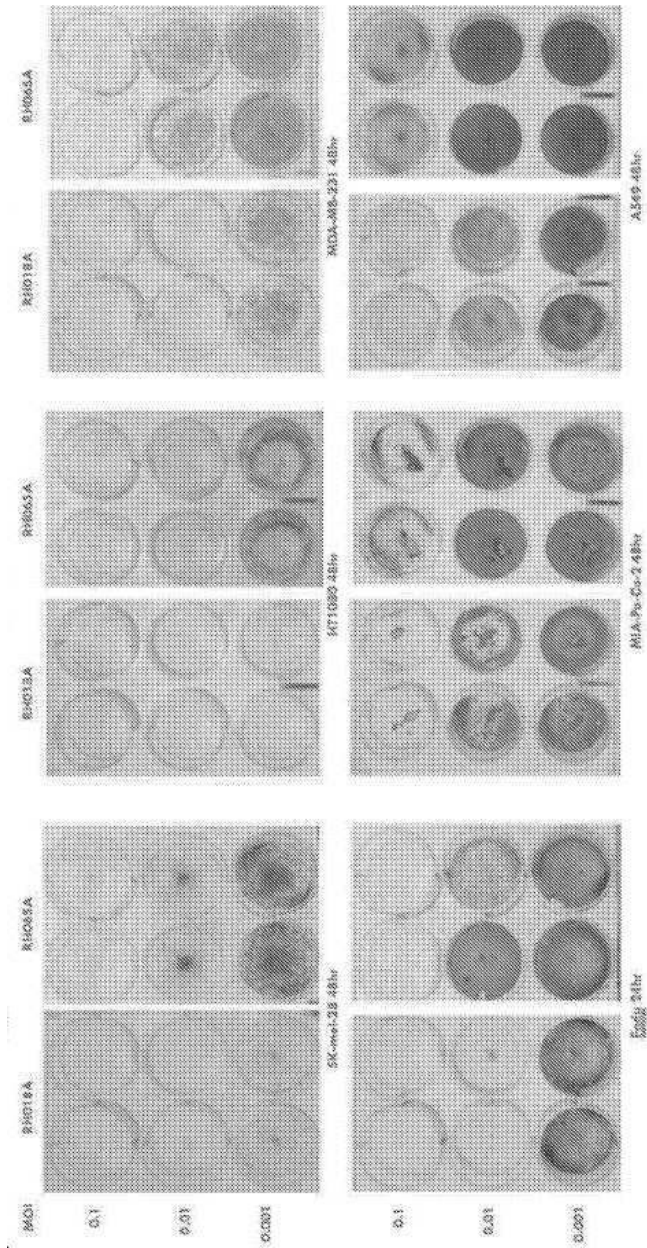
도면2



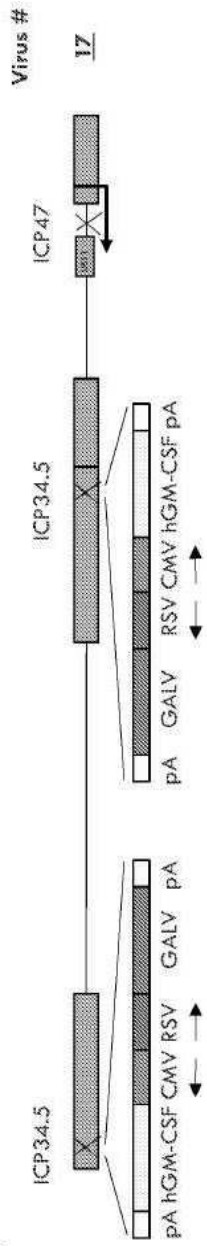
도면3



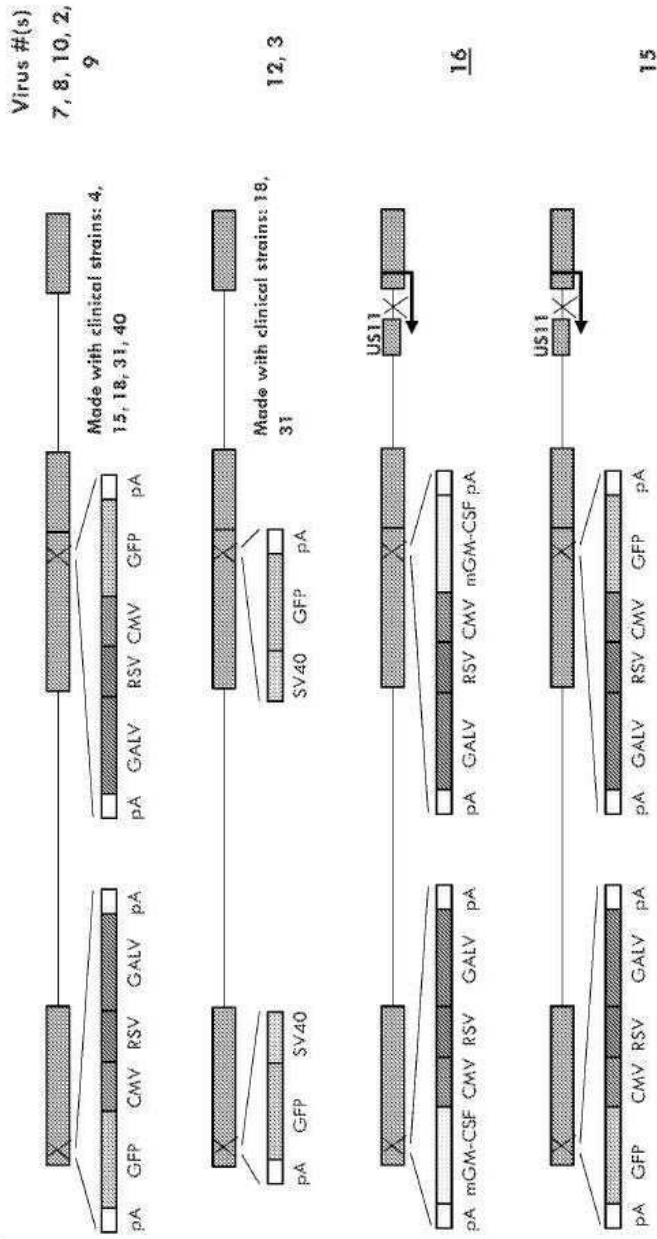
도면4



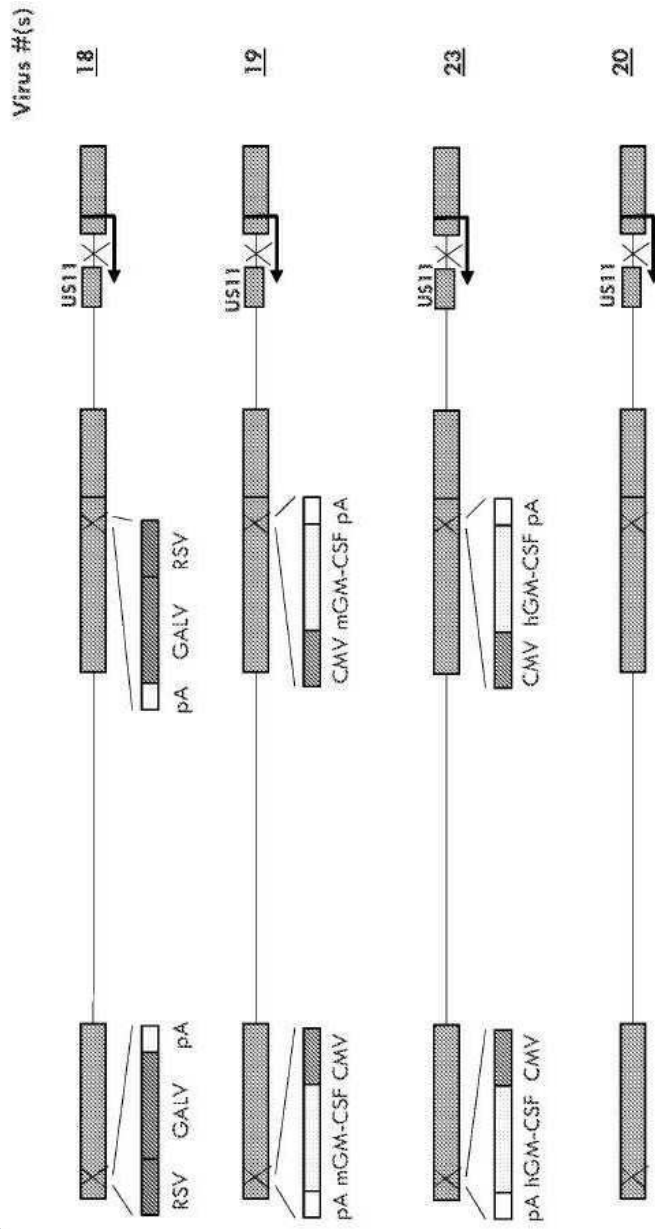
도면5a



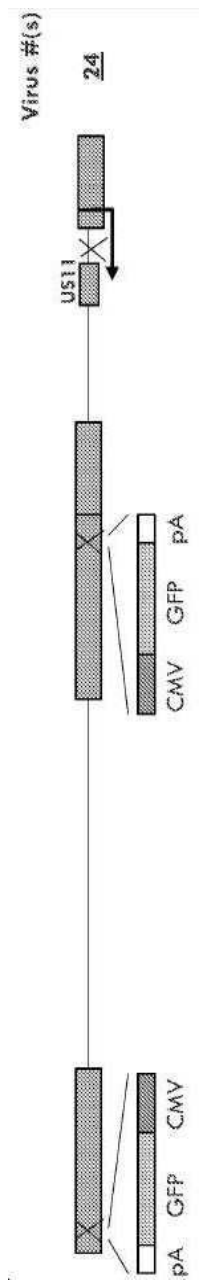
도면5b



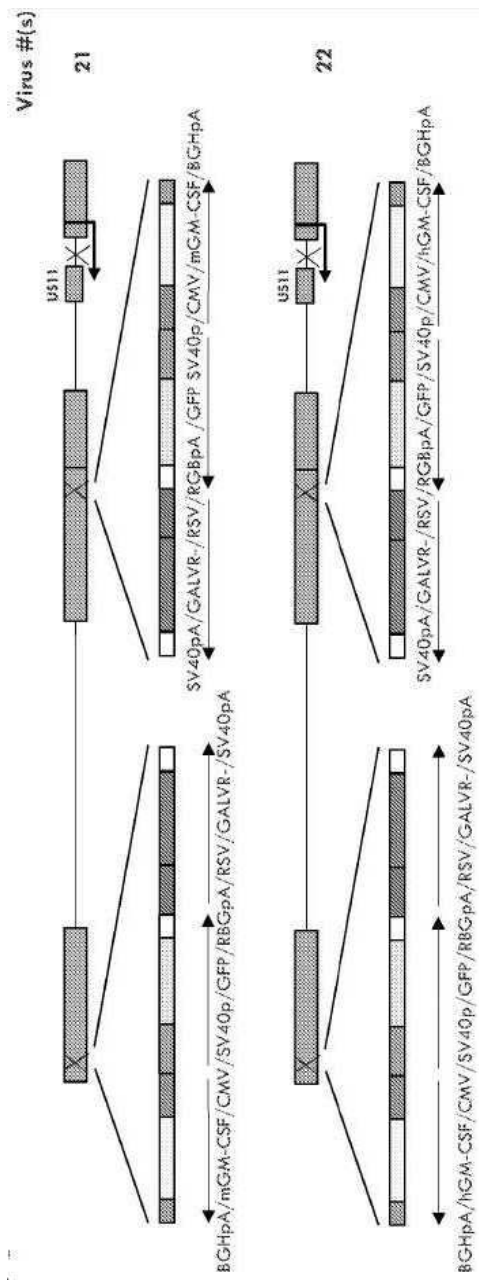
도면5c



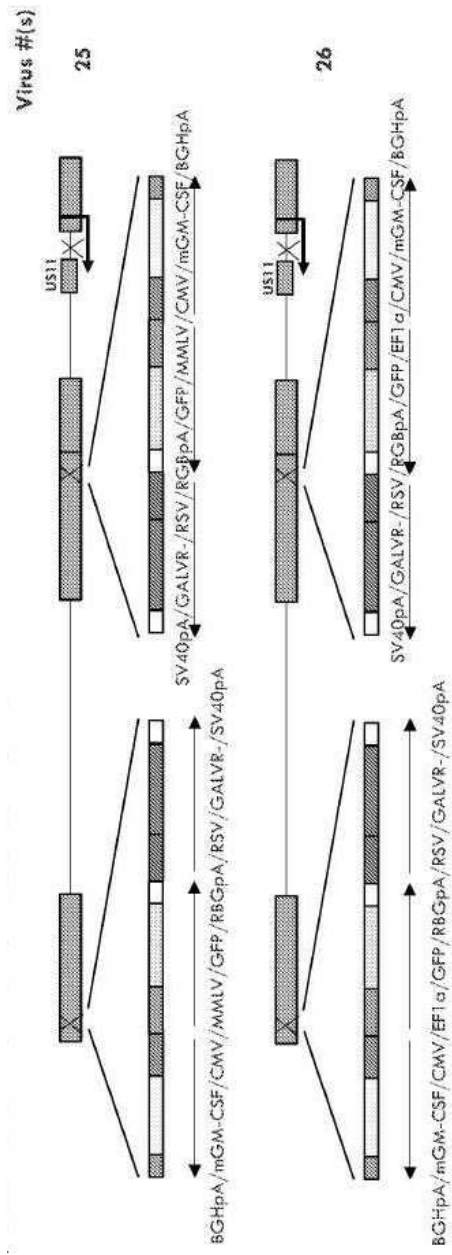
도면5d



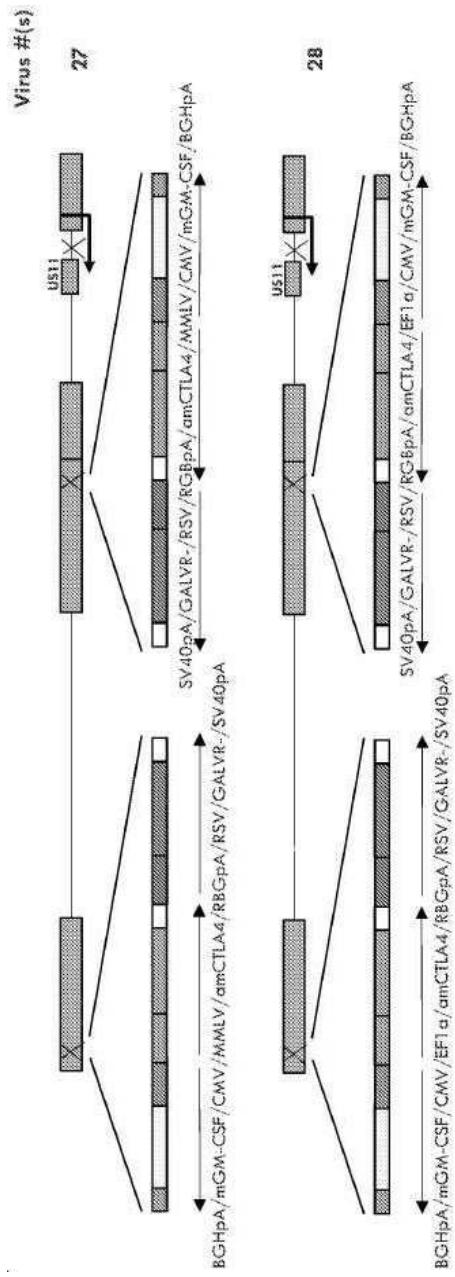
도면5e



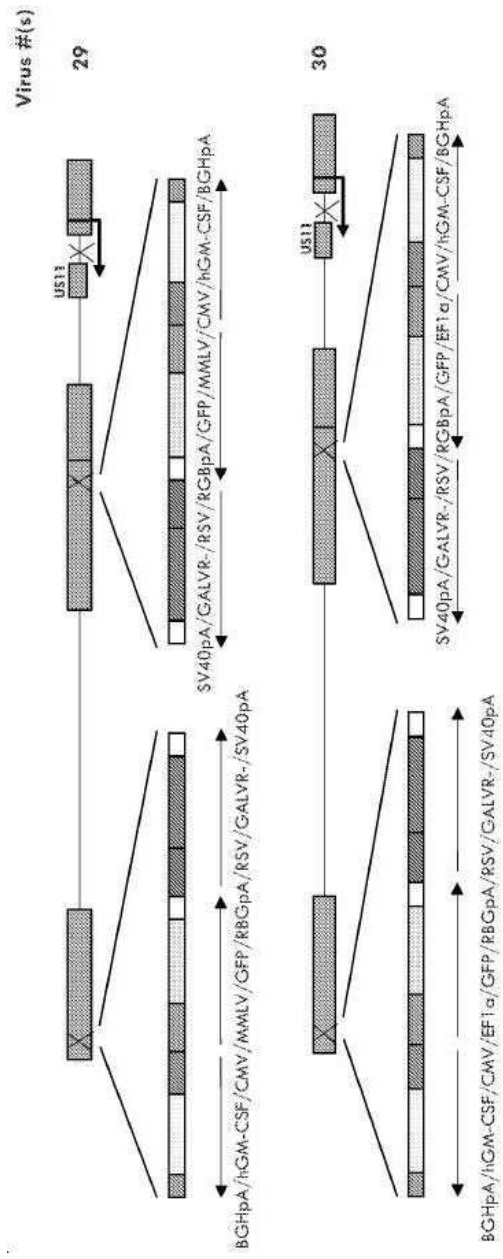
도면5f



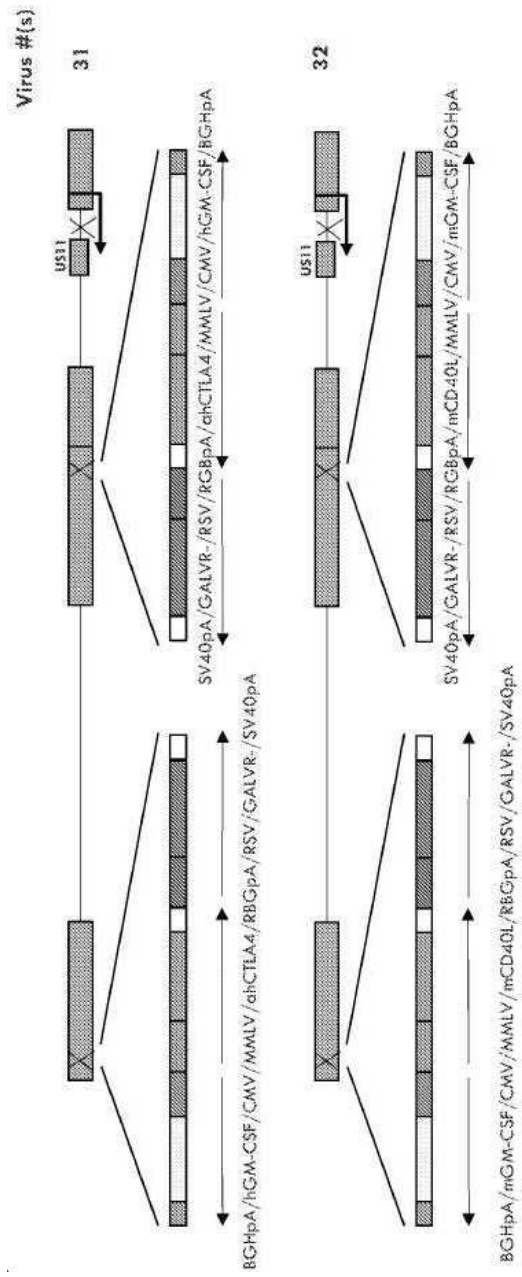
도면5g



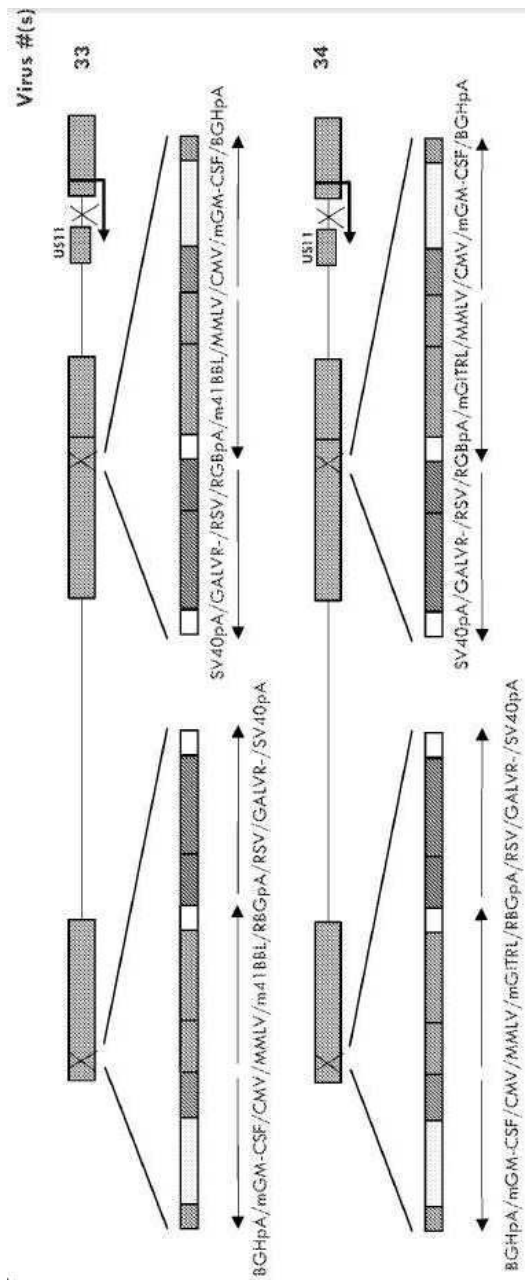
도면5h



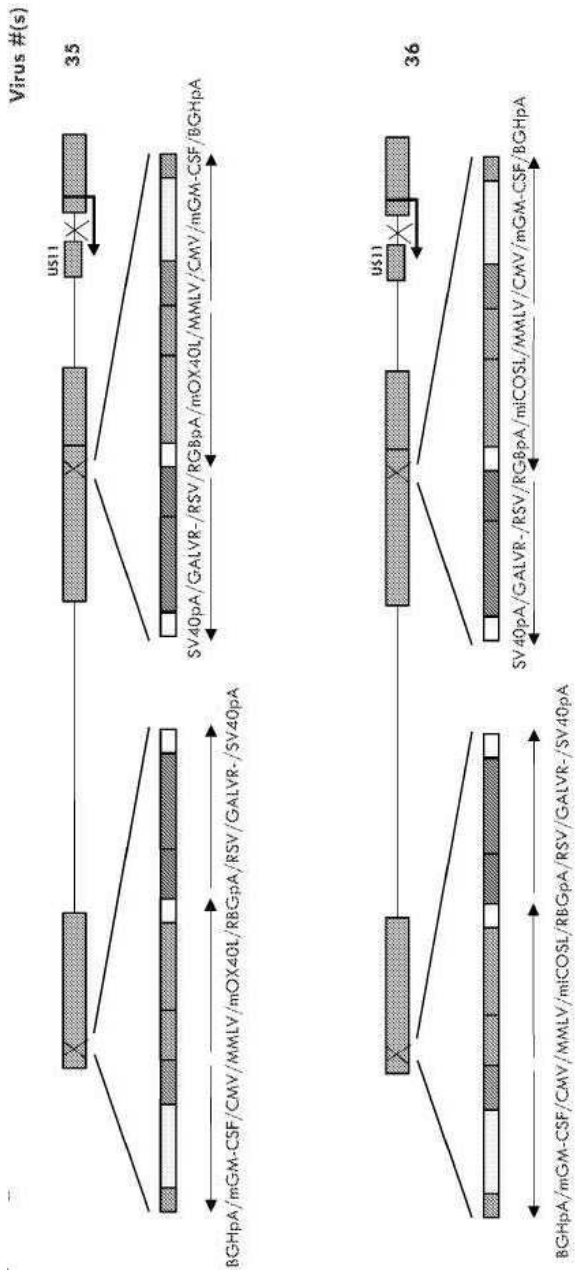
도면5i



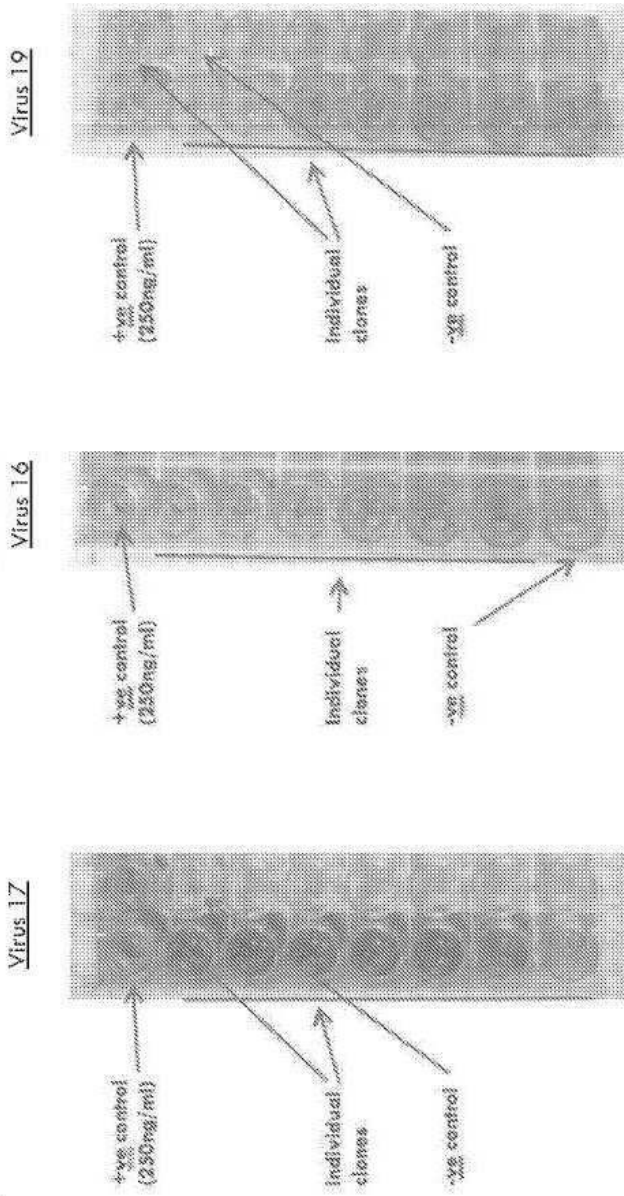
도면5j



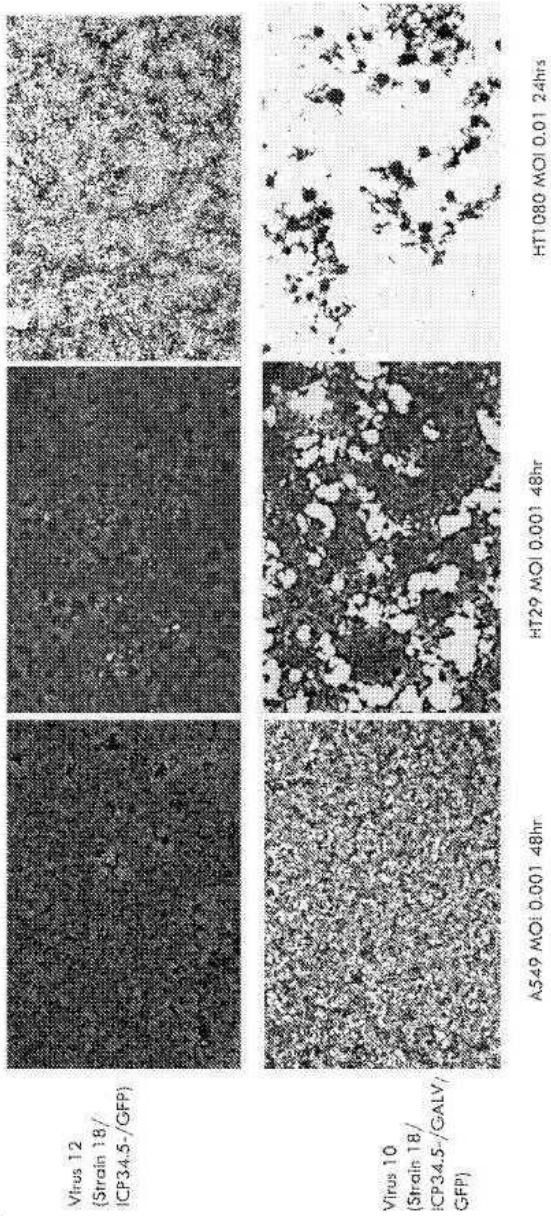
도면5k



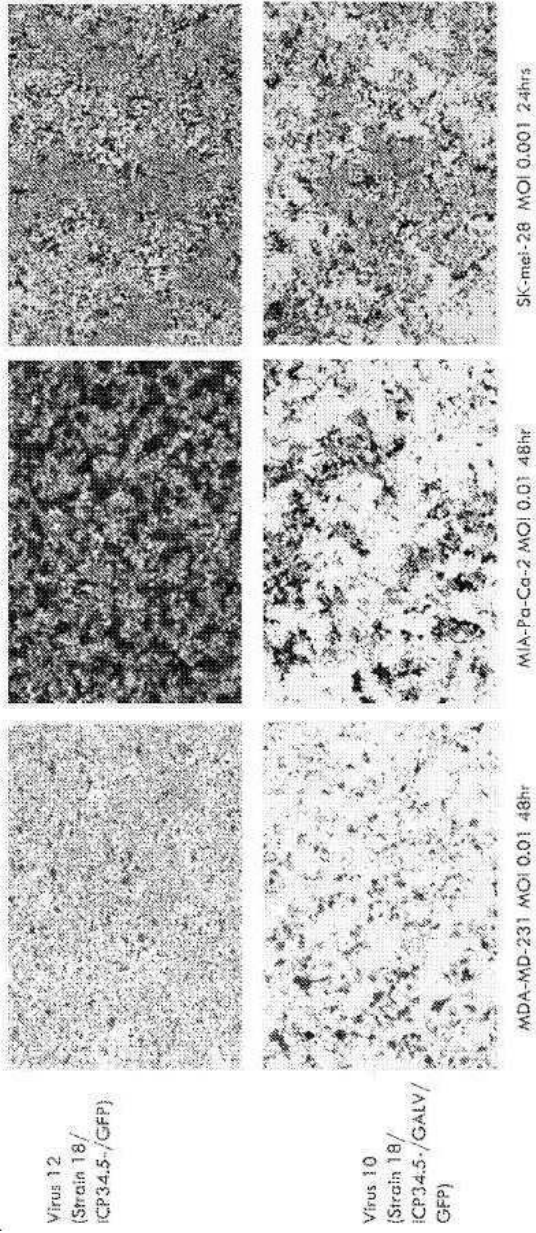
도면6



도면7a

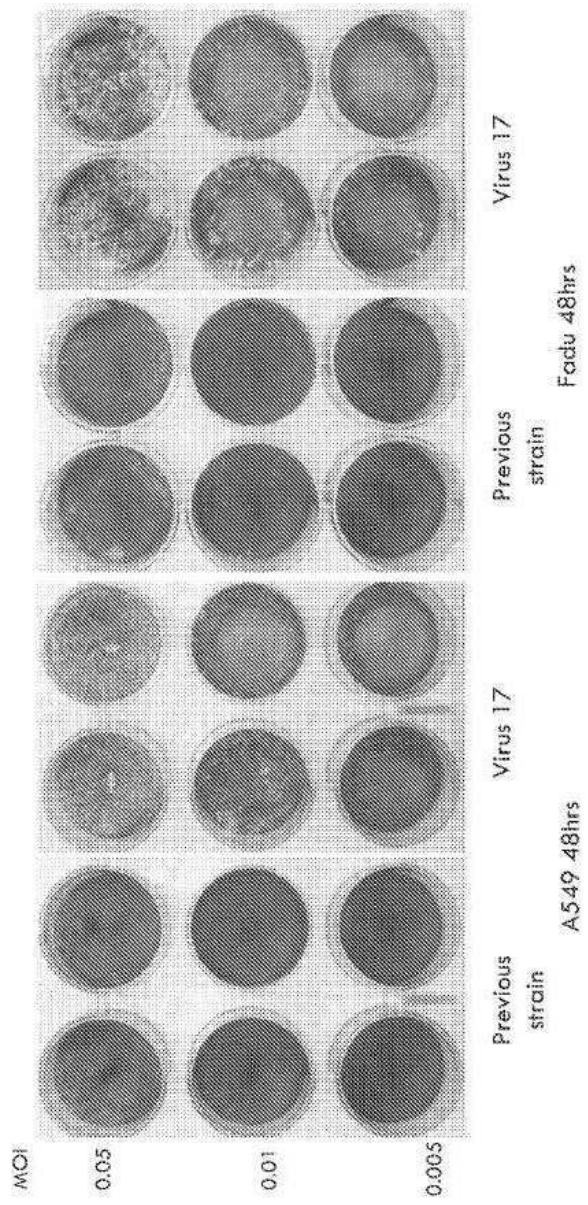


도면7b

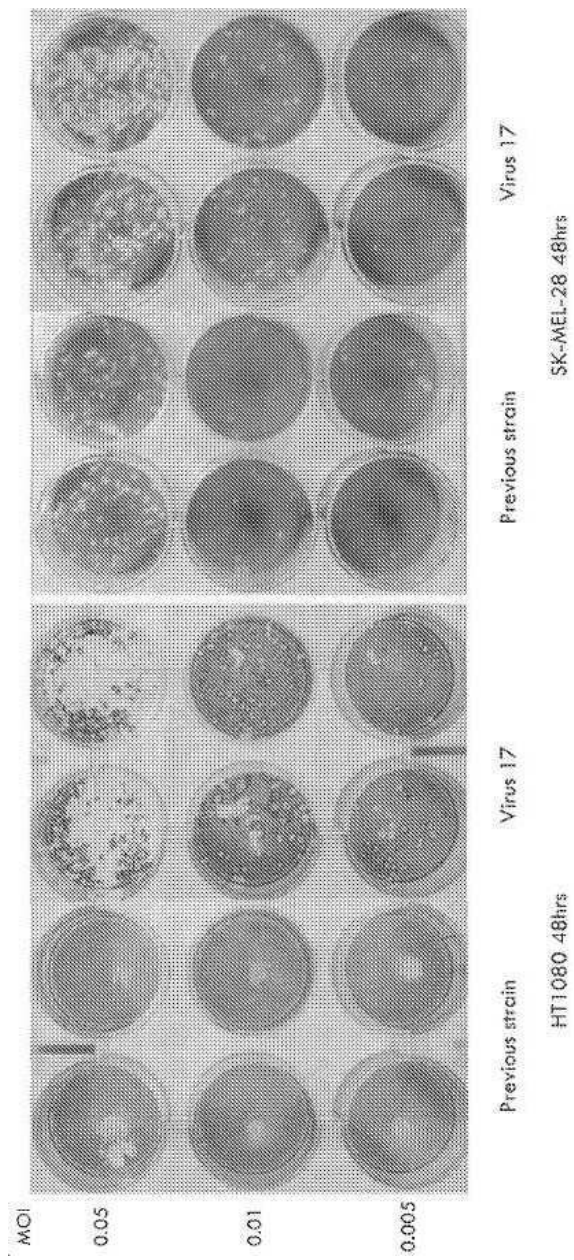


Cell death assessed by crystal violet staining; low magnification

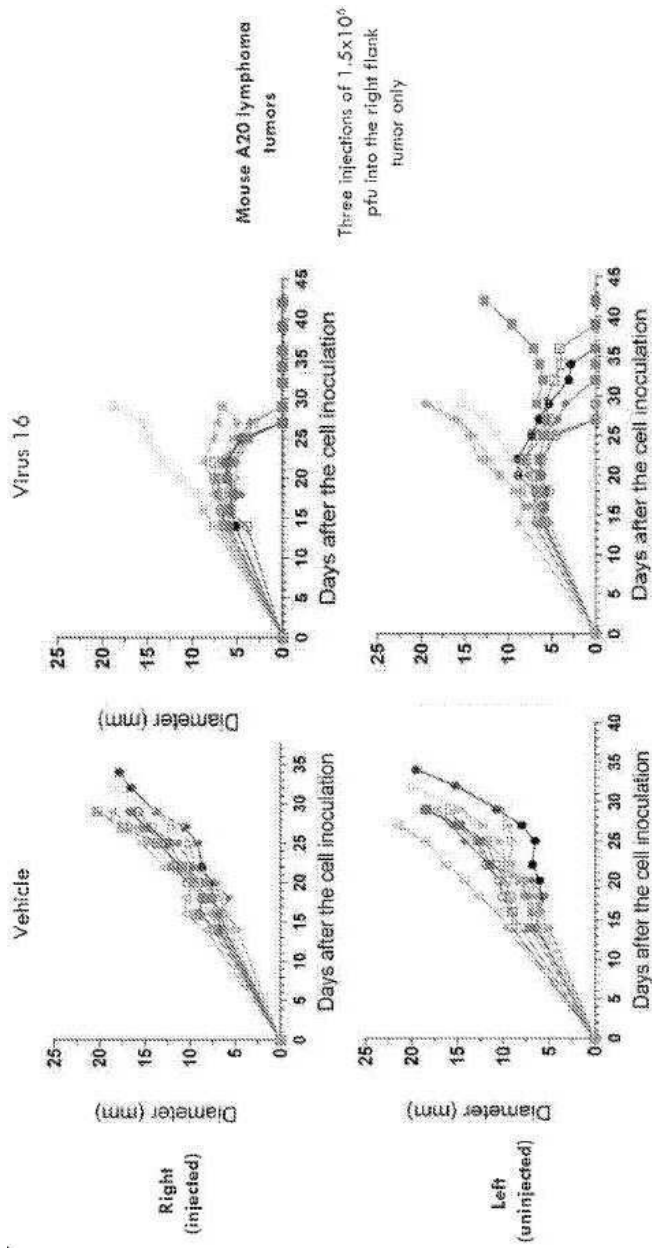
도면8a



도면8b

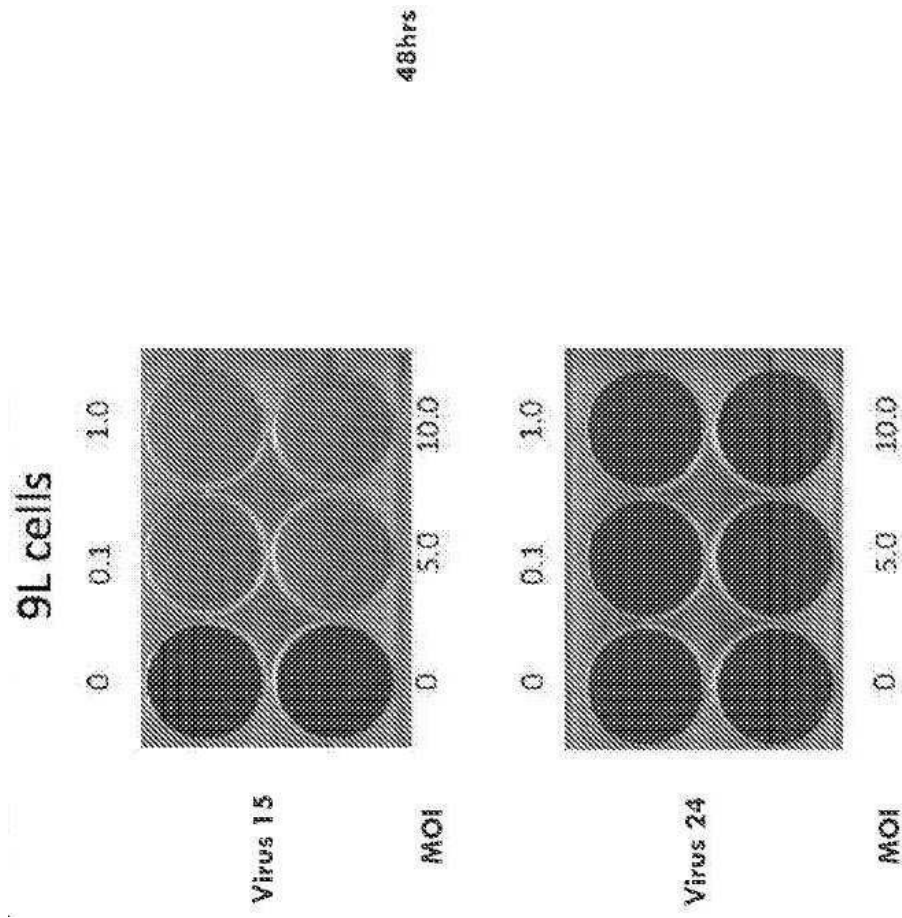


도면9

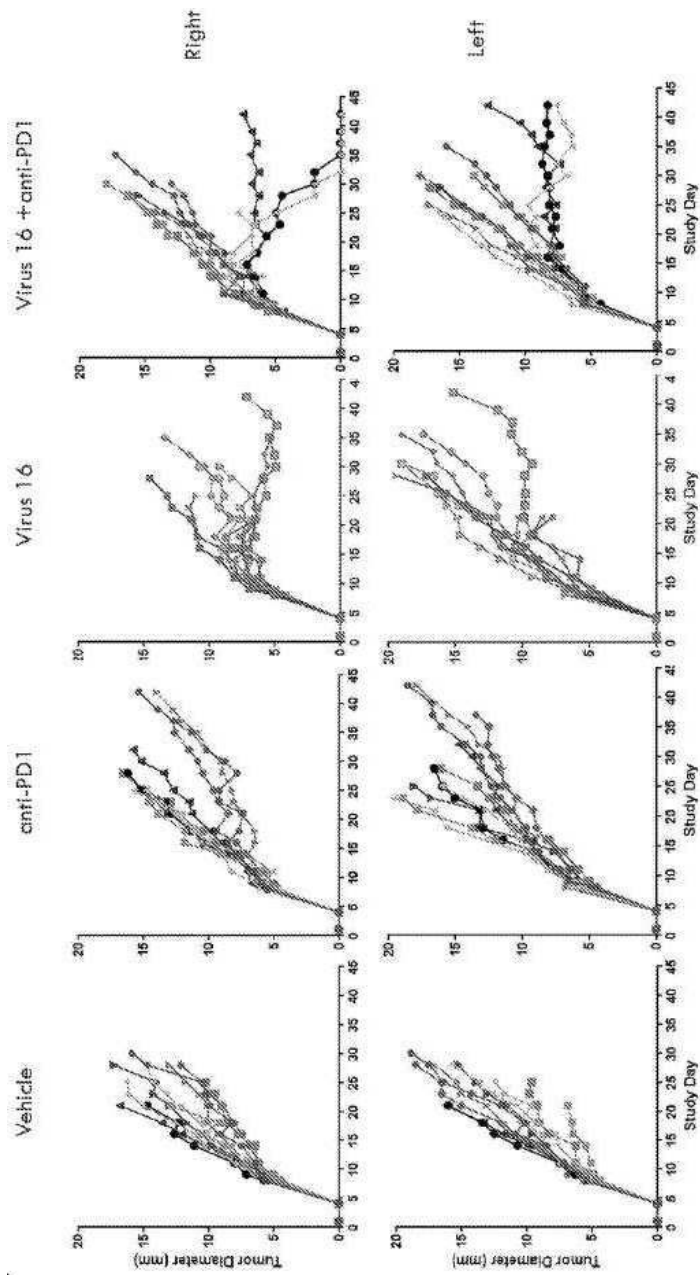


Mouse A20 lymphoma tumors
Three injections of 1.5×10^6 pfu into the right flank tumor only

도면10

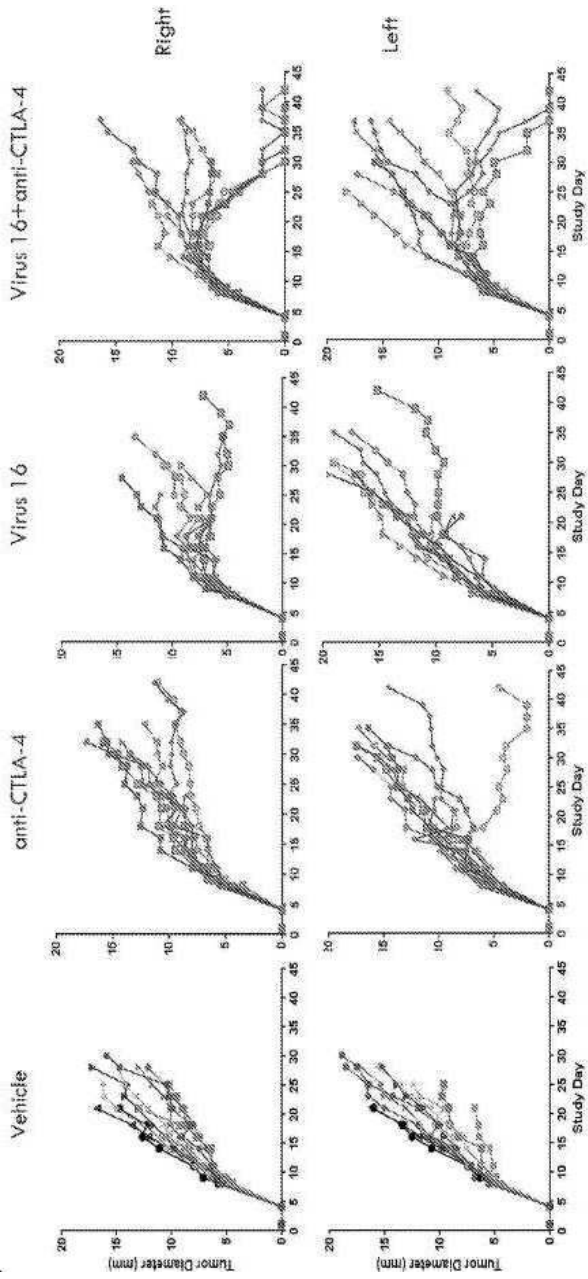


도면11a



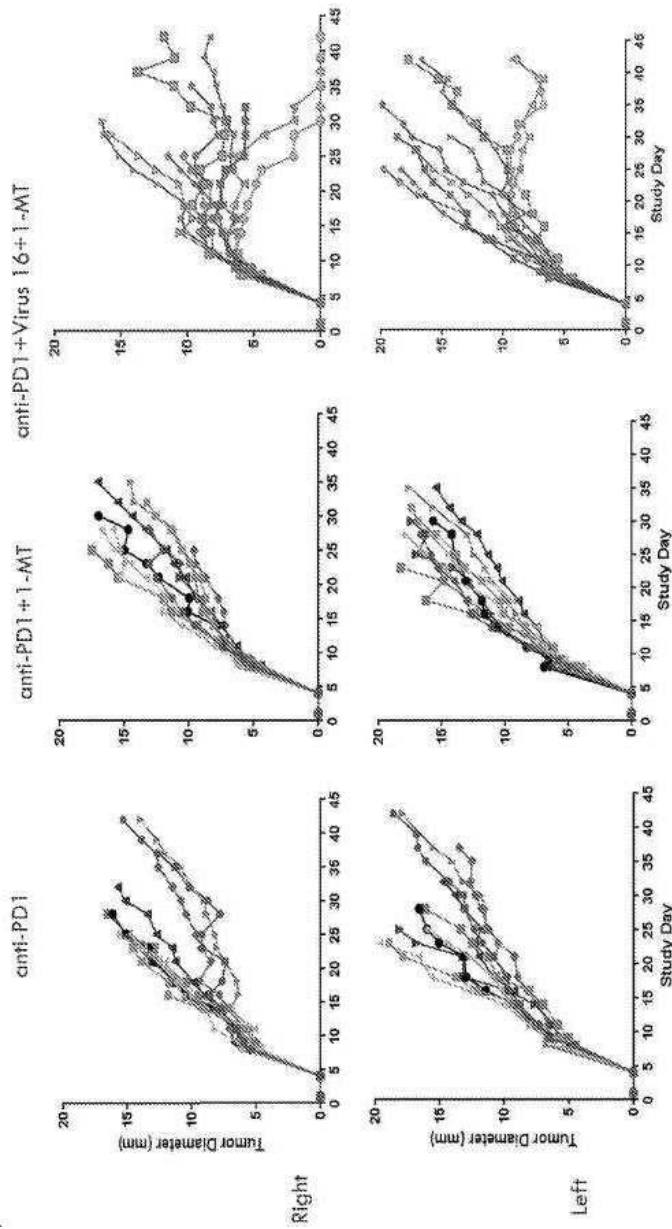
Virus: 5 injections of 5×10^6 pfu into the right flank tumor only
Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clone RMP1-14; BioXCell)

도면11b



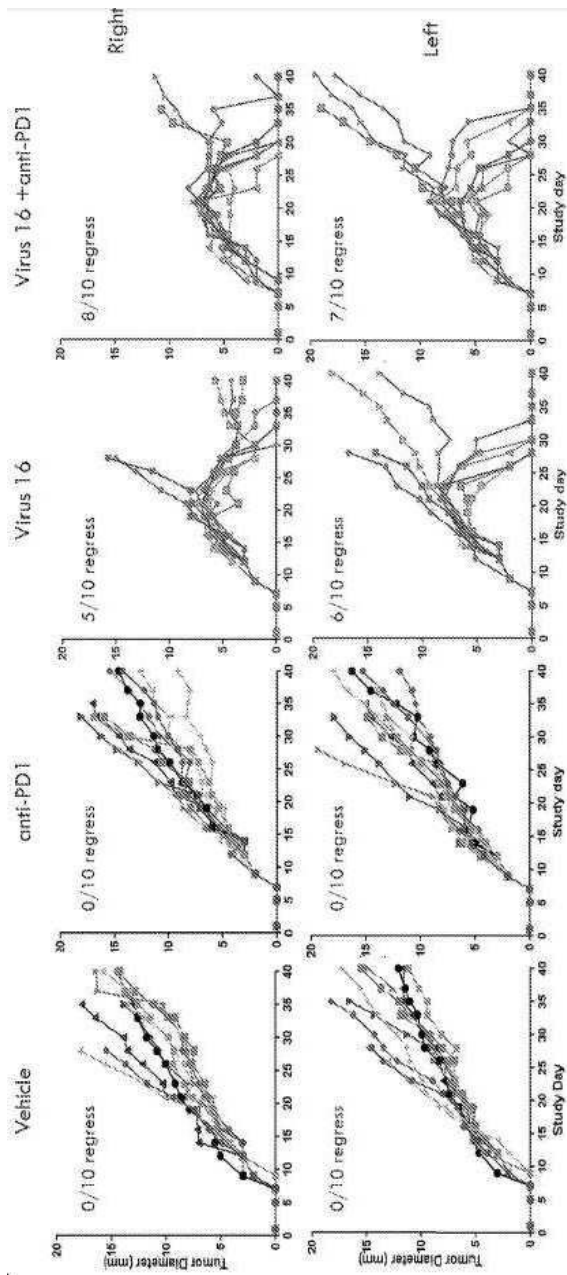
Virus: 5 injections of 5×10^6 pfu into the right flank tumor only
Anti-CTLA-4: 3mg/kg i.p. Q3Dx9 (clone 9D9; BioXCell)

도면11c



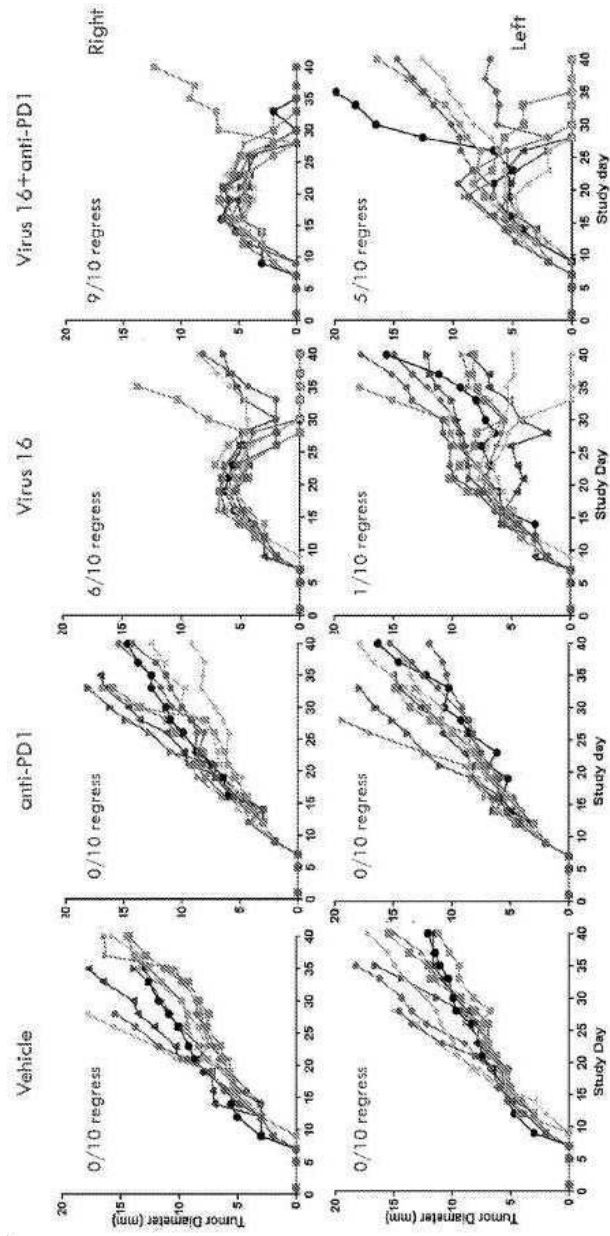
Virus: 5 injections of 5×10^6 pfu into the right flank tumor only
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clone RMP1-14; BioXCell)
 1-MT: 5mg/ml in drinking water (1-MT clone has no effect)

도면12a



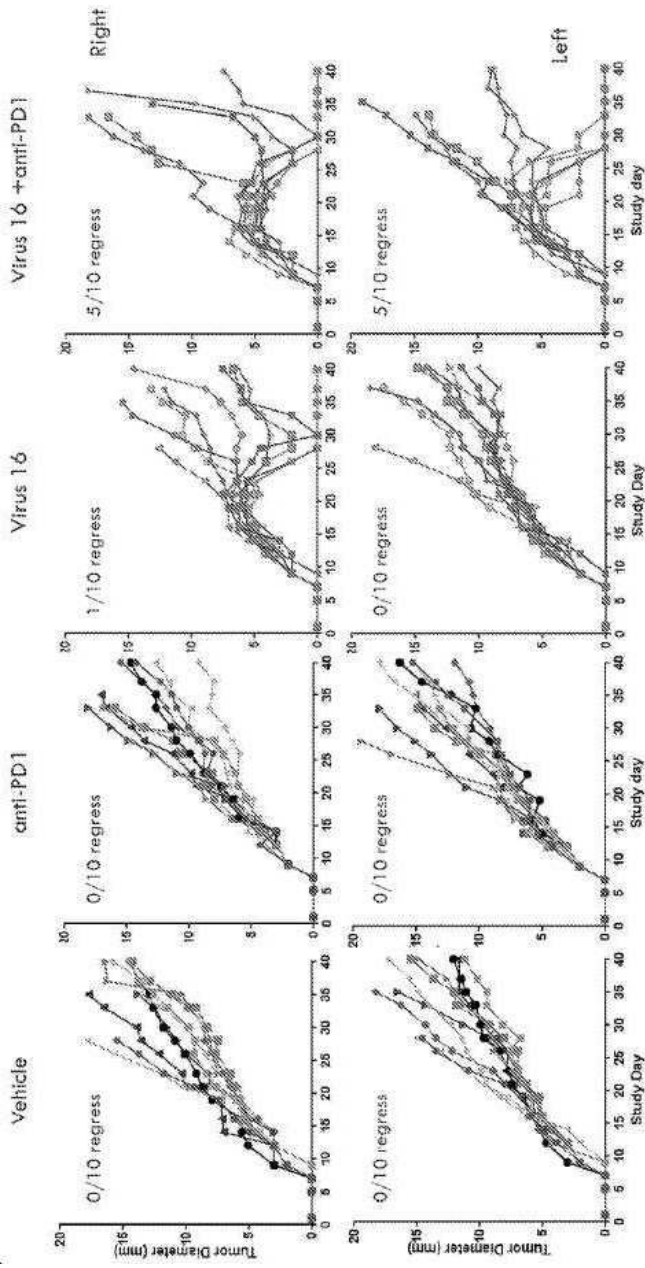
Virus: 3 injections of 5×10^6 pfu into the right flank tumor only
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. G3Dx9 (clone RMP1-14; BioXCell)

도면12b



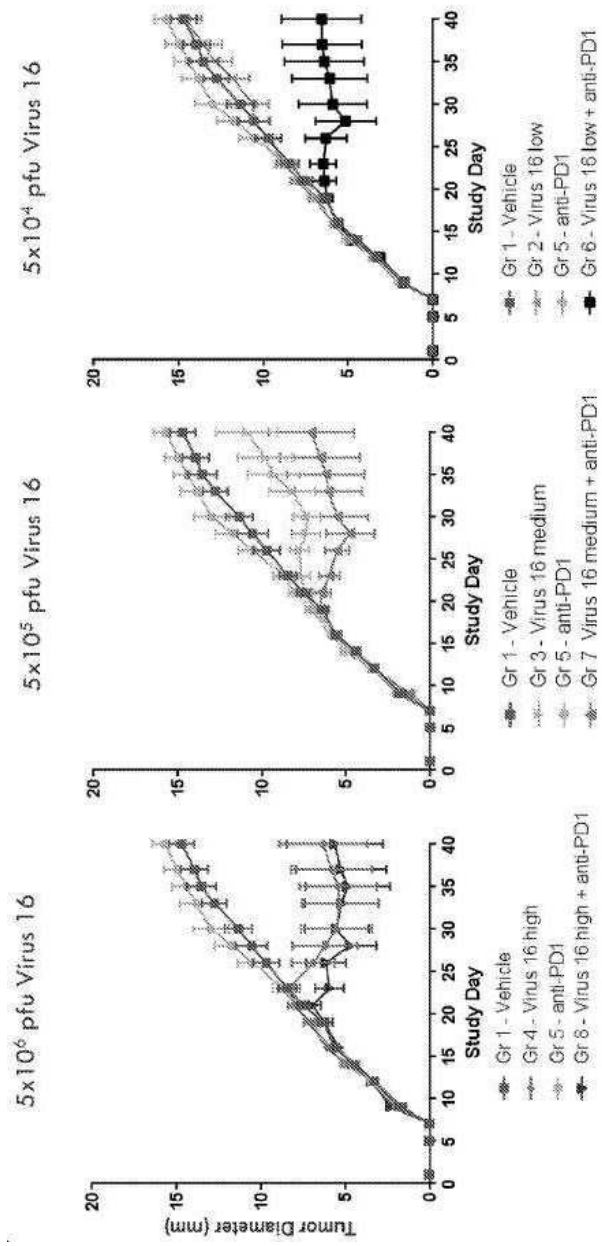
Virus: 3 injections of 5×10^5 pfu into the right flank tumor only
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clone RMP1-14; BioXCell)

도면12c



Virus: 3 injections of 5×10^4 pfu into the right flank tumor only
 Anti-PD1: 10mg/kg i.p. Q3Dx9 (clone RMP1-14; BioXCell)

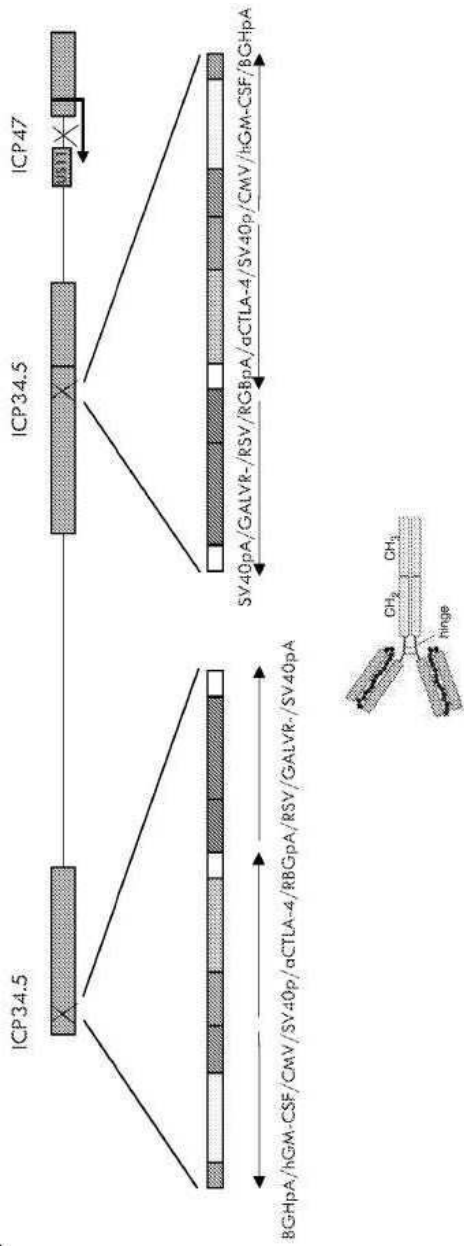
도면12d



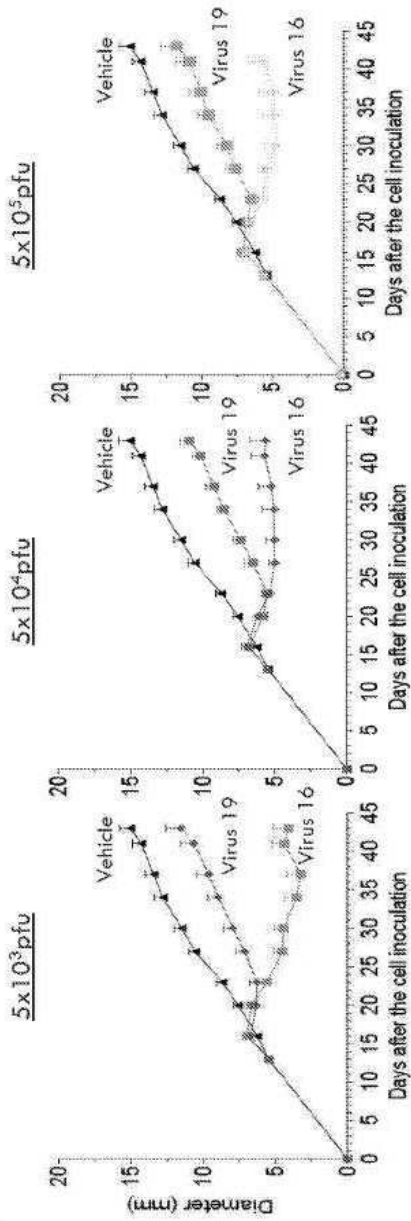
LEFT FLANK (NOT INJECTED WITH RP1) TUMORS BY GROUP

N=10/group

도면13



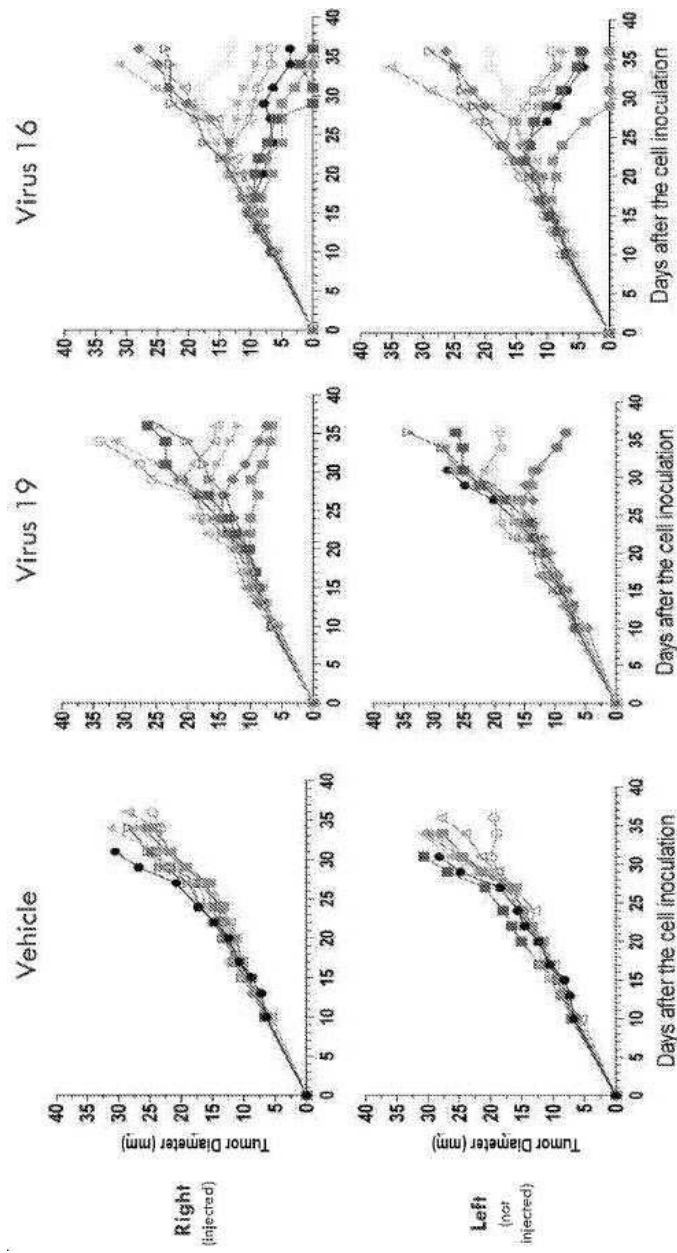
도면14



Human A549 lung cancer tumors in nude mice (no immune effect)

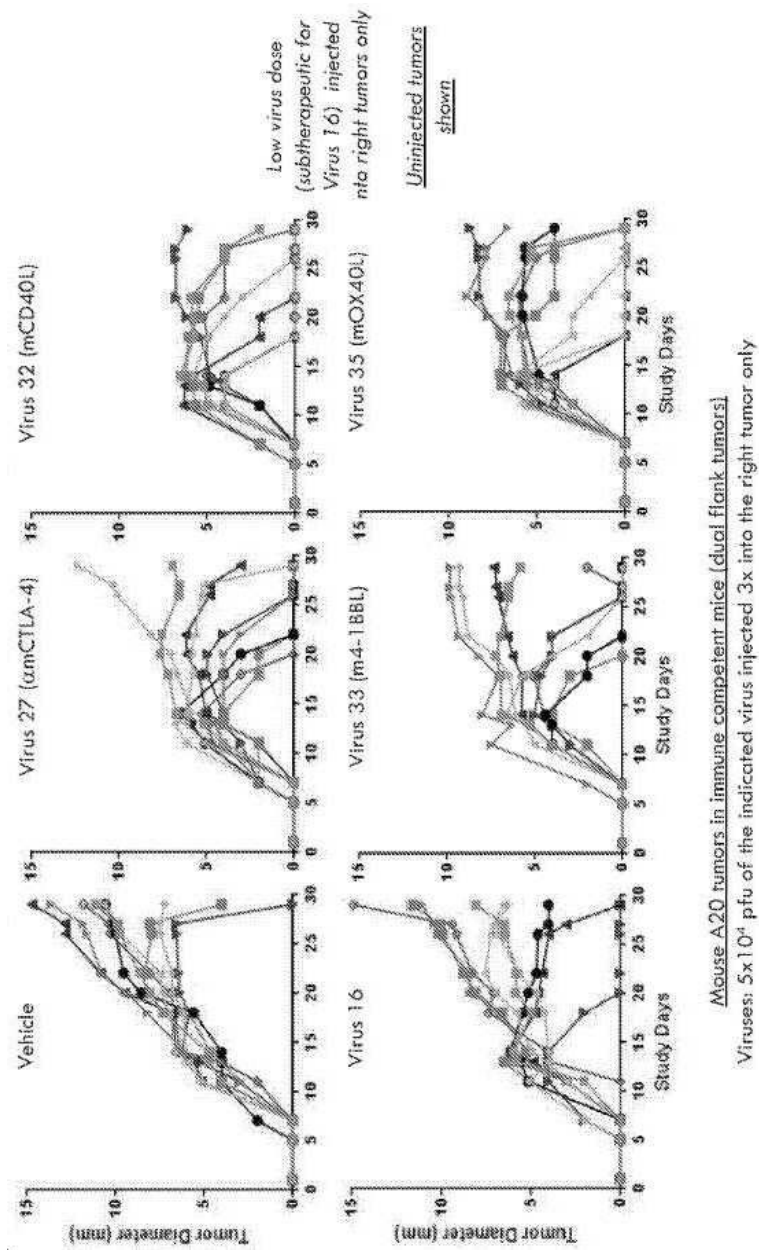
3 injections of Virus 16 or Virus 19 over 1wk of vehicle or the indicated dose of virus (N=10/group)

도면15



Rat 9L glioma tumors in immune competent rats
 Virus: 5×10^5 pfu injected 3x/wk into the right tumor only for 3 wks

도면16



서열목록

- <110> Replimune Limited
- <120> MODIFIED ONCOLYTIC VIRUS
- <130> PI180013
- <150> GB 1600380.8
- <151> 2016-01-08
- <150> GB 1600381.6
- <151> 2016-01-08
- <150> GB 1600382.4
- <151> 2016-01-08

<160> 45
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1
 atgtggctgc agaatttact tttcctgggc attgtggtct acagcctctc agcaccacc 60
 cgctcacca tcaactgtcac cggccttgg aagcatgtag aggccatcaa agaagccctg 120
 aacctcctgg atgacatgcc tgtcacattg aatgaagagg tagaagtcgt ctctaacgag 180

 ttctccttca agaagctaac atgtgtgcag acccgctga agatattcga gcagggtcta 240
 cggggcaatt tcaccaaact caagggcgcc ttgaacatga cagccagcta ctaccagaca 300
 tactgcccc caactccgga aacggactgt gaaacacaag ttaccaccta tgcggatttc 360
 atagacagcc ttaaaacctt tctgactgat atcccccttg aatgcaaaaa accagtccaa 420
 aatga 426
 <210> 2
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 atgtggctcc agaacctcct cttcctcggc atcgtcgtgt attcactctc cgcacctact 60

 cgctcaccta tcaactgtcac cagaccctgg aagcacgtgg aggccatcaa ggaggtctg 120
 aacctgctgg acgatatgcc agtgaccctg aacgaggagg tggaggtggt gagcaacgag 180
 ttctccttta agaagctgac ctgctgtcag acaaggctga agatcttcga gcagggcctg 240
 agaggaaact ttaccaagct gaagggcgcc ctgaacatga ccgcttctta ctaccagaca 300
 tactgcccc ctacccccga gacagactgt gagacacagg tgaccacata cgccgacttc 360
 attgatagcc tgaaaacatt cctgaccgac attccatttg agtgaagaa gcccgctccag 420
 aagtaa 426

 <210> 3
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcaccgcc 60
 cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgcatcca ggaggcccg 120
 cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
 tcagaaatgt ttgacctca ggagccgacc tgctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240
 cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccct tgaccatgat ggccagccac 300
 tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttctgtg caaccagat taccacctt 360

gaaagtcca aagagaacct gaaggacttt ctgctgtca tccccttga ctgctgggag 420
 ccagtccagg agtga 435

<210> 4
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgtggctgc agtccctgct gctgctgggc accgtgcct gttctattc cgcaccgca 60
 aggtcaccaa gtccatctac tcagccttgg gagcacgtga acgcaatcca ggaggcacgg 120
 cggctgctga acctgagccg ggacaccgcc gccgagatga acgagacagt ggaagtgatc 180
 agcgagatgt tcgatctgca ggagcccacc tgctgcaga caaggctgga gctgtacaag 240

cagggcctgc gcggtctct gaccaagctg aaggcccccac tgacaatgat ggccagccac 300
 tataagcagc actgcccccc tacccccag acaagctgtg ccaccagat catcacattc 360
 gagtccttta aggagaacct gaaggatttt ctgctgtca ttccatttga ttgttgggag 420
 cccgtccagg agtaa 435

<210> 5
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Trp Leu Gln Asn Leu Leu Phe Leu Gly Ile Val Val Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His
 20 25 30
 Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 130 135 140
 <210> 7
 <211> 2010
 <212> DNA
 <213> Gibbon leukemia virus
 <400> 7
 atggtattgc tgcctgggtc catgcttctc acctcaaacc tgcaccacct tcggcaccag 60
 atgagtctg ggagctggaa aagactgata atcctcttaa gctgcgtatt cggcggcggc 120
 gggacgagtc tgcaaaataa gaacccccac cagcccatga ccctcacttg gcaggtactg 180
 tcccaaactg gagacgttgt ctgggataca aaggcagtcc agcccccttg gacttgggtg 240
 cccacactta aacctgatgt atgtgccttg gcggttagtc ttgagtctg ggatatcccg 300
 ggaaccgatg tctcgtctc taaacgagtc agacctcgg actcagacta tactgccgct 360
 tataagcaaa tcacctgggg agccataggg tgcagctacc ctgggctag gactagaatg 420
 gcaagctcta cttctactg atgtccccgg gatggccgga ccctttcaga agctagaagg 480
 tgcggggggc tagaatcctc atactgtaa gaatgggatt gtgagaccac ggggaccggt 540
 tattggctat ctaaactctc aaaagacctc ataactgtaa aatgggacca aatagcgaa 600
 tggactcaaa aatttcaaca gtgtcaccag accggctggt gtaacccct taaaatagat 660
 ttcacagaca aagggaaatt atccaaggac tggataacgg gaaaaacctg gggattaaga 720
 ttctatgtgt ctggacatcc aggcgtacag ttcaccattc gcttaaaaat caccaacatg 780
 ccagctgtgg cagtaggtcc tgacctctc cttgtggaac aaggacctcc tagaacgtcc 840
 ctctctctc cacctctct tcccccaagg gaagcggcac cgccatctct ccccgactct 900
 aactccacag cctggcgac tagtgcaaaa actcccacgg tgagaaaaac aattgttacc 960
 ctaaacactc cgctcccac cacaggcgac agactttttg atcttgtgca gggggccttc 1020
 ctaaccttaa atgtaccaa cccaggggcc actgagtctt gctggctttg tttggccatg 1080
 ggccccctt attatgaagc aatagcctca tcaggagagg tcgctactc caccgacctt 1140
 gaccggtgcc gctgggggac ccaaggaaag ctaccctca ctgaggtctc aggacacggg 1200
 ttgtgcatag gaaaggtgcc ctttaccat cagcatctct gcaatcagac cctatccatc 1260
 aattcctccg gagaccatca gtatctgctc cctccaacc atagctggtg ggcttgcagc 1320

actggcctca ccccttgect ctccacctca gtttttaatc agactagaga tttctgtatc 1380
 caggtccagc tgattcctcg catctattac tatcctgaag aagttttgtt acaggcctat 1440
 gacaattctc accccaggac taaaagagag gctgtctcac ttaccctagc tgttttactg 1500
 gggttgggaa tcacggcggg aataggtact ggttcaactg ccttaattaa aggacctata 1560
 gacctccagc aaggcctgac aagcctccag atcgccatag atgctgacct ccgggcctc 1620

caagactcag tcagcaagtt agaggactca ctgacttccc tgtccgaggt agtgcctcaa 1680
 aataggagag gccttgactt gctgtttcta aaagaagggt gcctctgtgc ggcctaaag 1740
 gaagagtgtc gtttttacat agaccactca ggtgcagtac gggactccat gaaaaaactc 1800
 aaagaaaaac tggataaaag acagttagag cgccagaaaa gccaaaactg gtatgaagga 1860
 tggttcaata actccccttg gttcactacc ctgctatcaa ccatcgctgg gccctatta 1920
 ctctccttc tgttgcctat cctcgggcca tgcacatca ataagttagt tcaattcatc 1980
 aatgatagga taagtgcagt taaaatttaa 2010

- <210> 8
- <211> 2013
- <212> DNA
- <213> Gibbon leukemia virus
- <400> 8

accatggtcc tgctgcctgg gtctatgctg ctgacttcta acctgcacca cctgcgacac 60
 cagatgtctc ccggctcatg gaaacggctg atcatcctgc tgagctgcgt gttcggagga 120
 ggaggcacct cctgcagaa caagaatcct caccagccaa tgaccctgac atggcaggtg 180
 ctgtcccaga caggcgcagt ggtgtgggat accaaggcag tgcagccacc ttggacatgg 240
 tggcccacc tgaagcctga cgtgtgcgcc ctggcccct cctggagtc ttgggacatc 300
 cccggcacag acgtgagcag cagcaagagg gtgagaccac ccgactctga ttatacagcc 360

gcctacaagc agatcacctg gggcgcctac ggctgtagct atcctcgggc ccgcacaagg 420
 atggccagct ccacctttta cgtgtgceca cgcgacggaa ggaccctgtc tgaggcaagg 480
 agatgtggcg gcctggagag cctgtattgc aaggagtggg attgtgagac cacaggcaca 540
 ggctactggc tgtctaagtc tagcaaggac ctgatcaccg tgaagtggga tcagaacagc 600
 gagtggacac agaagttcca gcagtgccac cagaccgct ggtgtaatcc cctgaagatc 660
 gactttacag ataagggcaa gctgtccaag gactggatca ccggcaagac atggggcctg 720
 agattctacg tgtctggcca ccttggcgtg cagtttacia tccggctgaa gatcaccaac 780

atgccagcag tggcagtggg accagacctg gtgctggtgg agcagggacc tccacgcacc 840

tcctggccc tgccccctcc actgccccct agggaggccc cacccttag cctgcccgat 900
 tctaacagca cagccctggc cacctccgcc cagacccta cagtgcgcaa gaccatcgtg 960
 aactgaata ccccccccc taccacagge gacaggtgt tcatctggt gcagggcgcc 1020
 tttctgacac tgaacgccac caatctggc gcaaccgaga gctgctggct gtgcctggct 1080
 atgggcccac ctaactaiga ggcaatgcc tcctctggag aggtggcata ttccacagac 1140
 ctggatagat gcagatgggg caccagggc aagctgacce tgacagaggt gtctggccac 1200

 ggctgtgca tcggcaaggt gccattcaca caccagcacc tgtgcaacca gaccctgagc 1260
 atcaataget ccggcgacca ccagtacctg ctgccaagca accactctg gtgggcatgc 1320
 tccacaggac tgacccatg tctgagcacc agcgtgttca accagaccag agactttgt 1380
 atccaggtgc agctgatccc tcggatctac tattaccag aggaggtgct gctgcaggcc 1440
 tatgataatt cccaccaag aacaaaggagg gaggccgtgt ctctgacct ggccgtgctg 1500
 ctgggactgg gaatcacagc aggaatcggc acaggcagca ccgcctgat caagggacca 1560
 atcgacctgc agcagggact gacctcctg cagatcgcca tcgacgccga tctgagagcc 1620

 ctgcaggaca gcgtgtccaa gctggaggat tctctgacct ctctgagcga ggtggtgctg 1680
 cagaacagga ggggcctgga cctgtgttc ctgaaggagg gaggactgtg cggccctg 1740
 aaggaggagt gctgttttta tatcgaccac tctggcggc tgcgggatag catgaagaag 1800
 ctgaaggaga agctggataa gcgccagctg gagaggcaga agagccagaa ttggtacgag 1860
 ggctggttca acaattcccc ctggtttacc aactgctgt ctaccatgc aggacctctg 1920
 ttattactgc tctgctgct gatcctgggc ccatgtatca tcaacaagct ggtgcagttt 1980
 atcaacgacc gaatctccgc agtgaaaatc taa 2013

- <210> 9
- <211> 669
- <212> PRT
- <213> Gibbon leukemia virus
- <400> 9

Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His
 1 5 10 15
 Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu
 20 25 30
 Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn
 35 40 45

Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly
 50 55 60
 Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp
 65 70 75 80
 Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser
 85 90 95
 Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro
 100 105 110
 Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala
 115 120 125

 Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr
 130 135 140
 Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg
 145 150 155 160
 Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr
 165 170 175
 Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr
 180 185 190
 Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys

 195 200 205
 His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys
 210 215 220
 Gly Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg
 225 230 235 240
 Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys
 245 250 255
 Ile Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val
 260 265 270

 Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro
 275 280 285
 Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala

aatacccaact ccctagcca gctgtgag cagcagcca tccacctggg aggcgtgttc 660
 gagctgcagc ctggagccag cgtgttcgtg aacgtgacag acccatctca ggtgagccac 720
 ggcaccggct tcacaagctt tggcctgctg aagctgtga 759

<210> 11
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens
 <400> 11

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Asp Glu Asp Pro Gln
 100 105 110

Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val
 115 120 125

Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val
 130 135 140

Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr
 145 150 155 160

Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser
 165 170 175

Gln Ala Pro Phe Ile Val Gly Leu Trp Leu Lys Pro Ser Ser Gly Ser

	180	185	190	
Glu Arg Ile Leu Leu Lys Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu				
	195	200	205	
Cys Glu Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro				
	210	215	220	
Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His				
	225	230	235	240
Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu				
	245	250		
<210>	12			
<211>	1416			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	12			
atgctgccct ttctgagcat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggaaa cctgggagcc				60
gagatgaaga gcctgtccca gagatctgtg cctaacacct gcacactggt catgtgcagc				120
cccaccgaga atggactgcc tggaaaggac ggaagggatg gaagggaggg ccctcggggc				180
gagaagggcg acccaggact gcctggacca atgggactga gcggactgca gggaccaaca				240
ggacctgtgg gaccaaaggg agagaacgga tccgccggag agccaggccc taaggcgag				300
aggggctgt ctggccccc tggcctgcca ggcatcccag gccccgccg caaggagggc				360
ccatccgca agcagggcaa tateggccc cagggcaagc ctggccaaa gggcgaggca				420
ggaccaaagg gagaagtggg agcacctggc atgcagggat ccaccggagc aaagggatct				480
acaggaccaa agggcgagcg cggcggccca ggcgtgcagg gcgccccgg caatgcagga				540
gcagcaggac cagcaggacc tgcaggcca cagggcggcc ctggctctag gggcccacc				600
ggcctgaagg gcgacagggg agtgcctggc gataggggca tcaagggaga gagcggactg				660
ccagattccg ccgccctgag gcagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagaggctg				720
gaggtggcct tctcccacta ccagaaggcc gcctgtttc cagacggcca caggagactg				780
gacaagatcg aggatgagcg caacctgcac gaggatttcg tgtttatgaa gaccatccag				840
agatgcaaca caggcgagcg gtctctgagc ctgctgaatt gtgaggagat caagtctcag				900
ttcgagggct ttgtgaagga catcatgctg aacaaggagg agaccaagaa ggagaatagc				960
ttcgagatgc agaaggcgca tcagaatccc cagatcgag cacacgtgat cagcgaggca				1020

agctccaaga ccacatccgt gctgcagtgg gccgagaagg gctactatac catgtccaac 1080
aatctggtga cactggagaa cggcaagcag ctgaccgtga agagacaggg cctgtactat 1140
atctatgccc aggtgacatt ctgctctaata cgggaggcct ctagccaggc cccctttatc 1200
gcctctctgt gcctgaagag cccaggcaga ttcgagcgga tctgctgag ggcccacaac 1260
accactcct ctgccaagcc atgcggacag cagagcatcc acctgggagg cgtgttcgag 1320
ctgcagccag gagcctccgt gtttgtgaat gtgacagacc catcccaggt gtctcacgga 1380
accggcttca catcctttgg cctgctgaag ctgtga 1416

<210> 13
<211> 471
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Leu Pro Phe Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Val Gln Pro Leu Gly

1 5 10 15

Asn Leu Gly Ala Glu Met Lys Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Pro Asn

20 25 30

Thr Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Pro Thr Glu Asn Gly Leu Pro Gly

35 40 45

Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp

50 55 60

Pro Gly Leu Pro Gly Pro Met Gly Leu Ser Gly Leu Gln Gly Pro Thr

65 70 75 80

Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ala Gly Glu Pro Gly

85 90 95

Pro Lys Gly Glu Arg Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ile

100 105 110

Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Pro Ser Gly Lys Gln Gly Asn Ile

115 120 125

Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro Lys Gly

130 135 140

Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Thr Gly Ala Lys Gly Ser

405	410	415	
Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser			
420	425	430	
Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe			
435	440	445	
Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr			
450	455	460	
Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu			
465	470		
<210>	14		
<211>	1412		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	14		
atgctgccct tctgagcat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggcaa tctgggcgcc			60
gagatgaagt cctgtctca gaggagcgtg ccaaacacct gcacactggt catgtgctct			120
ccaaccgaga atggactgcc aggaagggac ggaagagatg gaaggagagg accaagggga			180
gagaagggcg accctggact gcctggacca atgggactgt ccggactgca gggaccaaca			240
ggccctgtgg gaccaaaggg agagaatgga agcgcggag agccaggacc taaggagag			300
aggggcctgt ccggccccc tggcctgcct ggcatcccag gccccgccg caaggagggc			360
ccttctggca agcagggcaa catcgacca cagggcaagc ctggacaaa gggagaggca			420
ggaccaaagg gagaagtggg agcacccggc atgcaggga gcaccggagc aaagggatcc			480
accggccta agggagagag aggagcacct ggagtgcagg gcgcccagg caatgcagga			540
gcagcaggac cagcaggacc tgcaggcca cagggcggc caggcagccg gggcccacc			600
ggcctgaagg gcgacaggg agtgccaggc gataggggca tcaagggaga gtccggactg			660
ccagactctg ccgccctgag gcagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagaggctg			720
gaggtggcct tctcccacta ccagaaggcc gccctgtttc cagacggaca caggagactg			780
gataaggtgg agggagggt gaacctgcac gaggatttcg tgttcatcaa gaagctgaag			840
aggtgaaca agggcgaggg cagcctgtcc ctgctgaatt gtgaggagat gcggcggcag			900
ttcgaggacc tggatgaagga tatcaccctg aacaaggagg agaagaagga gaattctttt			960
gagatgcaga ggggcgacga ggatcctcag atcgagcac acgtggtgtc cgaggcaaac			1020

tctaatgccg ccagcgtgct gcagtgggcc aagaaggct actataccat gaagtctaac 1080
 ctggtcatgc tggagaatgg caagcagctg acagtgaaga gagaggcct gtactacgtg 1140
 tacaccagg tgacattctg cagcaacaga gagcccagct cccagcggcc ttttatcgtg 1200
 ggccctgtggc tgaagccctc ttcggaagc gagaggatcc tgctgaaggc agccaatacc 1260
 cactctagct cccagctgtg cgagcagcag tccgtgcacc tgggaggcgt gttcgagctg 1320

caggcaggag caagcgtgtt cgtgaacgga cagaggccag ccaggtcacc cacagagtgg 1380
 gcttctctag ctttggcctg ctgaagctgt ga 1412

<210> 15

<211> 470

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Leu Pro Phe Leu Ser Met Leu Val Leu Leu Val Gln Pro Leu Gly

1 5 10 15

Asn Leu Gly Ala Glu Met Lys Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Pro Asn

20 25 30

Thr Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Pro Thr Glu Asn Gly Leu Pro Gly

35 40 45

Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly Asp

50 55 60

Pro Gly Leu Pro Gly Pro Met Gly Leu Ser Gly Leu Gln Gly Pro Thr

65 70 75 80

Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Glu Asn Gly Ser Ala Gly Glu Pro Gly

85 90 95

Pro Lys Gly Glu Arg Gly Leu Ser Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Ile

100 105 110

Pro Gly Pro Ala Gly Lys Glu Gly Pro Ser Gly Lys Gln Gly Asn Ile

115 120 125

Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro Lys Gly

130 135 140

Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Thr Gly Ala Lys Gly Ser

145 150 155 160

Thr Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Val Gln Gly Ala Pro
 165 170 175
 Gly Asn Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly
 180 185 190
 Ala Pro Gly Ser Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Arg Gly Val
 195 200 205
 Pro Gly Asp Arg Gly Ile Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp Ser Ala
 210 215 220
 Ala Leu Arg Gln Gln Met Glu Ala Leu Lys Gly Lys Leu Gln Arg Leu
 225 230 235 240
 Glu Val Ala Phe Ser His Tyr Gln Lys Ala Ala Leu Phe Pro Asp Gly
 245 250 255

 His Arg Arg Leu Asp Lys Val Glu Glu Glu Val Asn Leu His Glu Asp
 260 265 270
 Phe Val Phe Ile Lys Lys Leu Lys Arg Cys Asn Lys Gly Glu Gly Ser
 275 280 285
 Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Met Arg Arg Gln Phe Glu Asp Leu
 290 295 300
 Val Lys Asp Ile Thr Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Glu Asn Ser Phe
 305 310 315 320
 Glu Met Gln Arg Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val
 325 330 335
 Ser Glu Ala Asn Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys
 340 345 350
 Gly Tyr Tyr Thr Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys
 355 360 365
 Gln Leu Thr Val Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val
 370 375 380
 Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe Ile Val
 385 390 395 400

 Gly Leu Trp Leu Lys Pro Ser Ile Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Lys

405 410 415
 Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Gln Leu Cys Glu Gln Gln Ser Val
 420 425 430
 His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Val Phe Val
 435 440 445
 Asn Val Thr Glu Ala Ser Gln Val Ile His Arg Val Gly Phe Ser Ser
 450 455 460
 Phe Gly Leu Leu Lys Leu

465 470
 <210> 16
 <211> 786
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctgcgg ccaactggact gcccatcagc 60
 atgaaaattt ttatgtattt acttactgtt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca 120
 ctttttgcgt tgtatcttca tagaaggttg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat 180
 gaagattttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc 240
 ttactgaact gtgaggagat taaaagccag ttggaaggct ttgtgaagga tataatgtta 300
 aacaaagagg agacgaagaa agaaaacagc ttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct 360

 caaattgcfg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg 420
 gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtta ccctggaaaa tgggaaacag 480
 ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat 540
 cgggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga 600
 ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccacagtt cgcctaaacc ttgcgggcaa 660
 caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgcfaat 720
 gtgactgate caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtcctttgg cttactcaaa 780

ctctga 786
 <210> 17
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245

250

255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 18
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 18

atgatagaaa catacagcca accttcccc agatccgtgg caactggact tccagcgagc 60
 atgaagattt ttatgtattt acttactgtt tccttatca cccaaatgat tggatctgtg 120
 ctttttgctg tgtatcttca tagaagattg gataaggtcg aagaggaagt aaaccttcat 180
 gaagattttg tattcataaa aaagctaaag agatgcaaca aaggagaagg atctttatcc 240
 ttgctgaact gtgaggagat gagaaggcaa tttgaagacc ttgtcaagga tataacgtta 300
 aacaaagaag agaaaaaaga aaacagcttt gaaatgcaaa gaggtgatga ggatcctcaa 360

attgcagcac acgttgtaag cgaagccaac agtaatgcag catccgttct acagtgggcc 420
 aagaaaggat attataccat gaaaagcaac ttgtaatgc ttgaaaatgg gaaacagctg 480
 acggttaaaa gagaaggact ctattatgtc tacactcaag tcaccttctg ctctaategg 540
 gagccttcca gtcaacgccc attcatcgtc ggcctctggc tgaagcccag cagtggatct 600
 gagagaatct tactcaaggc ggcaataacc cacagttcct cccagctttg cgagcagcag 660
 tctgttcact tgggcggagt gtttgaatta caagctggtg cttctgtgtt tgtcaacgtg 720
 actgaagcaa gccaaagtgat ccacagagtt ggcttctcat cttttggctt actcaaactc 780

tga 783

<210> 19
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19

Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Val Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

atggatcagc acacactgga cgtggaggat accgctgacg ctaggcaccc agctggcacc 60
 tcctgcctt ctgatgccgc tctgctgcgc gacacaggac tgctggccga tgccctctg 120
 ctgtctgaca cagtgcggcc aaccaacgcc gctctgcca cccgatgctgc ttacctgct 180
 gtgaactgta gggacagaga ggctgcttgg ccacctgccc tgaacttctg cagccgccac 240
 cctaagctgt acggcctggt ggccctgggtg ctgctgctgc tgatcgtgc ttgctgcca 300
 atctttacce ggacagagcc acgccccct ctgacaatca ccacatcccc caacctgggc 360

 accagggaga acaacgccga tcaggtgaca ccagtgtctc acatcggctg ccccaacacc 420
 acacagcagg gaagcccagt gttcgccaag ctgctggcta agaaccaggc cagcctgtgc 480
 aacaccacac tgaactggca cagccaggac ggagctggaa gctcctacct gtcccagggc 540
 ctgagatacg aggaggataa gaaggagctg gtggtggact cccctggact gtactacgtg 600
 ttcttgagc tgaagctgtc tccaacctt acaaacaccg gccacaaggt gcagggatgg 660
 gtgtctctgg tgctgcaggc taagccccag gtggacgatt tcgataacct ggccctgacc 720
 gtggagctgt ttctttag catggagaac aagctggtgg acaggtcttg gagccagctg 780

 ctgctgctga agctggcca caggetgtcc gtggactga gagcctacct gcacggcgcc 840
 caggatgctt acagagactg ggagctgagc taccctaaca ccacatcctt cggactgttt 900
 ctggtgaagc ctgacaacc atgggagtga 930

<210> 21

<211> 765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggagtacg cctctgacgc cagcctggat ccagaggccc cttggccacc tgcaccaagg 60
 gcccgccct gccgcgtgct gccctgggcc ctggtggccg gcctgttatt actgctgctg 120
 ctggccgcc cctgcgccgt gttcttgcca tgccttggg ccgtgagcgg agccagagcc 180

 tccccagget ctgccgccag ccctcggctg agagaggac cagagctgic cccagacgat 240
 ccagcaggcc tgctggacct gaggcaggga atgtttgcc agctggtggc ccagaactg 300
 ctgctgatcg acggccccct gtctggttac tctgatctg gcctggccgg cgtgtctctg 360
 accggcggcc tgagctataa ggaggataca aaggagctgg tgggtggcaa ggccggcgtg 420
 tactactgt tctccagct ggagctgagg agagtgtgg caggagagg ctctggaagc 480

gtgtccctgg ccctgcacct gcagcccctg cggagcgcgg caggagccgc cgccctggcc 540
ctgaccctgg acctgccacc agccagctcc gaggcaagga attccgcctt cggctttcag 600

ggcagactgc tgcacctgtc tgccggacag aggctgggag tgcacctgca caccgaggec 660
agggcccgcc acgcatggca gctgaccag ggagcaacag tgctgggcct gttccgcgtg 720
acacctgaga tcccagcagg cctgcctagc ccacggtcgg agtga 765

<210> 22
<211> 1389
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 22

atgtgcctt tctgtccat gctggtgctg ctggtgcagc cactgggcaa cctgggagcc 60
gagatgaagt ctctgagcca gcgcagcgtg cctaacacct gcacactggt catgtgctcc 120
cctacagaga acggcctgcc aggaaggac ggaagagatg gaaggagagg accaaggga 180

gagaaggcgg accccggact gcctggacca atgggactga gcgccctgca gggaccaacc 240
ggccccgtgg gacctaagg agagaacgga tccgctggag agccaggacc taaggagag 300
agaggactgt ctggaccacc tggactgcca ggaatcccag gaccagctgg caaggaggga 360
ccatccggca agcagggaaa catcgacca cagggaaagc ctggacaaa gggagaggct 420
ggacctaagg gagaagtggg cgccccagga atgcagggt ctacaggagc taagggcagc 480
accggaccaa agggagagag gggagcccc ggagtgcagg gagcccctgg caacgctgga 540
gccgctggcc cagccggacc cgctggccct caggagccc ccggctctag gggaccacca 600

ggcctgaagg gagacagagg cgtgcccga gatcggggca tcaagggaga gagcggcctg 660
cctgactccg ccgctctgag acagcagatg gaggctctga agggcaagct gcagcggctg 720
gaggtggcct tctcccacta ccagaaggcc gctctgtttc ctgacggaag gacagagccc 780
aggcctgctc tgaccatcac cacatcca aacctgggca caagagagaa caacgccgat 840
caggtgacce cegtgtctca catcgatgc ctaaacacca cacagcagg cagccccgtg 900
tttgccaagc tgctggctaa gaaccaggcc agcctgtgca acaccacact gaactggcac 960
tcccagatg gcgccggaag ctctacctg tctcagggcc tgcggtacga ggaggacaag 1020

aaggagctgg tggtggatag cccaggcctg tactactgtt tcctggagct gaagctgtcc 1080
cccacctta caaacaccg acacaagggt cagggatggg tgagcctggt gctgcaggct 1140
aagccccagg tggacgatit cgacaacctg gcctgaccg tggagctgtt tecttgetct 1200
atggagaaca agctggtgga tagatcctgg agccagctgc tgctgctgaa ggctggacac 1260

cgctgagcg tggcctgag ggcttacctg cacggagctc aggacgctta cagggattgg 1320
 gagctgtcct accctaacac cacatctttc ggctgtttc tggtaagcc agacaacccc 1380
 tgggagtga 1389

<210> 23

<211> 1389

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgctgctgt tctgctgtc cgccctgggtg ctgctgacctc agcctctggg ctacctggag 60
 gccgagatga agacctattc tcaccggaca atgccaagcg cctgcacact ggtcatgtgc 120
 agcagcgtgg agtctggcct gccaggaagg gacggaaggg atggaaggga gggacctaga 180
 ggcgagaagg gcgaccctgg cctgccagga gcagcaggac aggcaggaat gcccggccag 240
 gccggccccg tgggacctaa gggcgacaac ggaagcgtgg gagagccagg accaaagggc 300
 gataccggcc cttccggacc acctggacca ccaggcgtgc ctggcccagc cggcagggag 360

ggccctctgg gcaagcaggg caatatcggc ccacagggca agcccggccc taagggcgag 420
 gccggcccca agggcgaagt gggcgcccct ggcatgcagg gaagcggccg agcccgcggc 480
 ctggccggac ctaagggcga gagaggcgtg cctggagaga ggggcgtgcc aggaaacaca 540
 ggcgcagcag gatctgccgg agcaatggga cccagggca gccctggcgc caggggcccct 600
 ccaggcctga agggcgacaa gggcatccca ggcgataagg gagcaaaggg agagagcggc 660
 ctgccagatg tggcctcctc gcgccagcag gtggaggccc tgcagggcca ggtgcagcac 720
 ctgcaggccc ctttctctca gtacaagaag gtggagctgt ttccaacgg cgctgcccc 780

tgggcccgtga ggggagcccc ggccctccca ggtctgccc ccagccctag gctgcgcgag 840
 ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggctgtctgg acctgagaca gggaatgttc 900
 gcccagctgg tggcccagaa tgtgtgtgtg atcgacggcc cactgtctctg gtactctgat 960
 ccaggcctgg ccggcgtgtc cctgaccggc ggccctgtctt ataaggagga tacaagagag 1020
 ctggtgggtgg ccaaggccgg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagtg 1080
 gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc cctgcggtec 1140
 gccgcaggag ccgccgccc ggccctgacc gtggacctgc cacctgcctc tagcgaggca 1200

cgcaattccg ctttcggctt tcagggcccg ctgctgcacc tgtctgccgg acagagactg 1260
 ggagtgcacc tgcaacccga ggccccggcc agacacgcct ggcagctgac ccagggagca 1320
 acagtgctgg gcctgtttag ggtgacacct gagatcccag ccggcctgcc aagccccgc 1380

tccgagtga 1389

<210> 24

<211> 522

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

atggaggaga tgcctctgag ggagagctcc ccacagaggg ccgagagatg caagaagagc 60

tggctgctgt gcatcgtggc tctgctgctg atgctgctgt gctctctggg caccctgac 120

tacacaagcc tgaagccaac cgccatcgag tctgtatgg tgaagtcca gctgtctagc 180

tccaagtggc acatgacatc cccaagcct cactgctga acaccacatc tgacggaaag 240

ctgaagatcc tgcagagcgg cacctacctg atctacggac aggtcatccc cgtggacaag 300

aagtacatca aggataacgc cctttctgtg gtgcagatct acaagaagaa cgacgtgctg 360

cagacactga tgaacgattt tcagatcctg cccatcggcg gagtgtacga gctgcacgct 420

ggcgacaaca tctacctgaa gttcaactcc aaggatcaca tccagaagac caacacatac 480

tggggaatca tctgatgcc agatctgccc tttatctctt ga 522

<210> 25

<211> 600

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atgaccctgc acccaagccc catcacatgc gagttcctgt tttctaccgc cctgatcagc 60

ccaaagatgt gcctgagcca cctggagaat atgccctgt cccactctcg gacacagggg 120

gcccagagaa gctcctggaa gctgtggctg ttctgctcta tcgtgatgct gctgttctg 180

tgcagctttt cctggctgat cttcatcttt ctgcagctgg agacagccaa ggagccttgc 240

atggccaagt ttggcctct gccatccaag tggcagatgg cctctagcga gcccccttgc 300

gtgaacaagg tgagcgactg gaagctggag atcctgcaga acggcctgta cctgatctat 360

ggccaggtgg cccccaacgc caattacaac gacgtggccc ctttcgaggt gggctgtat 420

aagaacaagg atatgatcca gacctgaca aataagtcta agatccagaa cgtgggcggc 480

acatacgagc tgcacgtggg cgacaccatc gacctgatct tcaacagcga gcaccaggtg 540

ctgaagaaca atacatattg gggcatcatc ctgctggcca acccccagtt tatctctga 600

600

<210> 26

<211> 1164

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 26

atgctgcctt tctgtctat gctggtgctg ctggtgcagc cactgggcaa cctgggagcc 60

gagatgaaga gectgtccca gagatccgtg cccaacacct gcacactggt catgtgctct 120

cctaccgaga acggcctgcc aggaaggac ggaagagatg gaaggaggagg acctcgggga 180

gagaaggcg acccaggact gcctggacca atgggactga gcggcctgca gggaccaaca 240

ggccccgtgg gacctaagg agagaacgga agcggcggag agccaggacc taagggagag 300

aggggactgt ccggaccacc tggactgcct ggaatcccag gaccagctgg caaggaggga 360

ccatccggca agcagggaaa catcggacca cagggaaagc ctggacaaa gggagaggct 420

ggaccaaagg gagaagtggg cgctcctgga atgcaggct ccaccggagc caaggctct 480

acaggaccaa aaggagagag gggagctccc ggagtgcagg gagcccctgg caacgtgga 540

gccgtggcc cagccggacc cgctggcct cagggagccc caggcagcag gggaccacc 600

ggcctgaagg gcgacaggg cgtgccagga gatagggca tcaagggaga gtctggcctg 660

ccagacagcg ccgctctgag acagcagatg gagccctga agggcaagct gcagcggctg 720

gaggtggctt tctccacta ccagaaggcc gctctgtt cagatggcag cctgaagccc 780

accgcatcg agtctgcat ggtgaagttt gagctgagct cctctaagtg gcacatgaca 840

tctccaage ctactgct gaacaccaca tctgacggca agctgaagat cctgcagagc 900

ggcacctacc tgatctacgg ccaggtcatc cccgtggaca agaagtacat caaggataac 960

gcccccttcg tgggtcagat ctacaagaag aacgacgtgc tgcagacact gatgaacgat 1020

tttcagatcc tgccaatcgg cggagtgtac gagctgcacg ctggcgacaa catctacctg 1080

aagttcaact ctaaggatca catccagaag accaacacat actggggcat catcctgatg 1140

ccagatctgc ctttatcag ctga 1164

<210> 27

<211> 1152

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgctgctgt tctgctgtc tgcctgggtg ctgctgacct agccactggg ctacctggag 60

gccgagatga agacctattc ccaccgcaca atgccttctg cctgcacact ggtcatgtgc 120

agcagcgtgg agagcggcct gccaggaagg gacggaagag atggaaggga gggaccaga 180
 ggcgagaagg gcgaccctgg cctgccagga gcagcaggac aggcaggaat gccagggcag 240
 gccggccccc tgggcccata gggcgacaat ggatccgtgg gagagccagg accaaagggc 300
 gataccggcc ctcttgacc acctggacca ccaggcgtgc ctggaccagc aggaagagag 360
 ggacctctgg gcaagcagg aaacatcgga ccacagggca agccaggccc taaggcgag 420
 gccggcccca agggcgaagt gggcggccct ggcatgcagg gatccggcgg agccaggggc 480

 ctggccggac ctaaggcgca gcgcggcgtg cctggagaga ggggcgtgcc aggaaataca 540
 ggcgcagcag gatctgccgg agcaatggga ccacagggca gccccggcgc cagaggccct 600
 ccaggcctga agggcgacaa gggaaatccct ggcgataagg gagcaaagg agagagcggc 660
 ctgccagacg tggcctcctt gaggcagcag gtggaggccc tgcagggaca ggtgcagcac 720
 ctgcaggccc ccttcagcca gtacaagaag gtggagctgt ttccaaatgg cgagacagcc 780
 aaggagccct gcatggccaa gttcggccca ctgccagca agtggcagat ggcctctagc 840
 gagccccctt gcgtgaacaa ggtgagcgat tggaaactgg agatcctgca gaacggcctg 900

 tacctgatct atggccaggt ggcccccaac gccaattaca acgacgtggc cccttttgag 960
 gtgcggctgt ataagaacaa ggatatgatc cagaccctga caaataagtc taagatccag 1020
 aacgtgggag gcacctacga gctgcacgtg ggcgacacaa tcgacctgat cttcaacagc 1080
 gagcaccagg tgctgaagaa caatacatat tggggcatca tctgctggc caaceccag 1140
 tttatctcct ga 1152

 <210> 28
 <211> 597
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 28

 atggaggcgc agggagtgca gccctggat gagaacctgg agaacggctc ccggcctcgc 60

 ttcaagtgga agaagacct gcggetggtg gtgtctggaa tcaaggcgc cggaatgctg 120
 ctgtgcttta tctacgtgtg cctgcagctg agctcctctc ccgccaagga tccccctatc 180
 cagaggctga gaggagctgt gaccaggtgc gaggacggac agctgttcat cagctcttac 240
 aagaacgagt accagacaat ggaggtgcag aacaacagcg tggatcatca gtgtgatggc 300
 ctgtacatca tctacctgaa gggatccttc tttcaggagg tgaagatcga cctgcacttt 360
 cgggaggatc acaaccaat ctctatcccc atgctgaacg acggcaggag aatcgtgttc 420
 acagtgtgg ccagcctggc ttttaaggac aaggtgtacc tgaccgtgaa cgccccagat 480

acactgtgcg agcacctgca gatcaacgac ggagagctga tctgtgtgca gctgaccct 540
 ggctactgtg ctccagaggg atcttaccac agcacagtga accaggtgcc cctgtga 597
 <210> 29
 <211> 552
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 atggagaggg tgcagccct ggagagaaac gtgggaaatg ccgcccgcc tagattcgag 60
 aggaacaagc tctgtctgtt ggccctctgt atccagggcc tgggcctgct gctgtgcttc 120
 acctacatct gtctgcactt ttctgccctg caggtgagcc acagataacc ccgcatccag 180
 agcatcaagg tgcagttcac cgagtataag aaggagaagg gctttatcct gacatcccag 240

 aaggaggacg agatcatgaa ggtgcagaac aattctgtga tcatcaactg cgatggcttc 300
 tactgatct cctgaaggg ctatcttctt caggaagtga atatcagcct gactatcag 360
 aaggacgagg agccactgtt tcagctgaag aaggtgcgga gcgtgaattc cctgatggtg 420
 gccagcctga cctacaagga caaggtgtat ctgaactga ccacagataa tacatccctg 480
 gacgatttc acgtgaacgg cggcgagctg atcctgatcc accagaatcc cggcgagttt 540
 tgcgtgctgt ga 552
 <210> 30
 <211> 1215
 <212> DNA

 <213> Mus musculus
 <400> 30
 atgtgccct tctgtccat gctggtgctg ctggtgcagc ctctgggcaa cctgggagcc 60
 gagatgaagt ctctgagcca gagatccgtg ccaaacacct gcactggt catgtgctct 120
 cccaccgaga acggcctgcc tggaaaggac ggaagagatg gaaggagagg accccgggga 180
 gagaaggcgc atcctggact gccaggacct atgggactga gcggcctgca gggaccaaca 240
 ggccccgtgg gacctaaggg agagaacgga agcgcggag agccaggacc aaaggagag 300
 aggggactgt ccggcccacc tggactgctt ggaatccctg gaccagctgg caaggagga 360
 ccttcggca agcagggaaa catcggacca cagggaaagc caggacctaa gggagaggct 420

 ggaccaaagg gagaagtggg cgctcccga atgcaggct ctaccggagc caaggcagc 480
 acaggaccta agggagagag gggagctcca ggagtgcagg gagccccgg caacgctgga 540
 gctgctggac cagctggacc agctggcct caggagccc caggctctag gggaccacca 600

ggcctgaagg gcgacagggg cgtgccagga gataggggca tcaagggaga gagcggcctg 660
 ccagattccg ccgctctgag acagcagatg gaggccctga agggcaagct gcagcggctg 720
 gaggtggctt tcagccacta ccagaaggcc gctctgtttc ctgacggcag ctctctcca 780
 gccaaaggatc ctccaatcca gcggctgcgc ggagctgtga ccaggtgcga ggatggccag 840

ctgttcatca gtcctacaa gaacgagtac cagacaatgg aggtgcagaa caactctgtg 900
 gtcatcaagt gtgacggcct gtacatcatic tacctgaagg gcagcttctt tcaggaggtg 960
 aagatcgacc tgcactttag agaggatcac aaccfaatct ccatcccat gctgaacgac 1020
 ggccagagaa tcgtgttac cgtggtggcc tctctggctt ttaaggacaa ggtgtacctg 1080
 accgtgaacg cccccgatac actgtgagag cacctgcaga tcaacgacgg cgagctgatc 1140
 gtggtgcagc tgaccctgg atactgtgct ccagaggct cctaccactc tacagtgaac 1200
 caggtgcctc tgtga 1215

- <210> 31
- <211> 1170
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 31

atgctgctgt tectgctgag cgccctgggtg ctgctgacce agccactggg ctacctggag 60
 gccgagatga agacctattc ccacagaaca atgccttctg cctgcacact ggtcatgtgc 120
 agcagcgtgg agtccggcct gccaggaagg gacggcagag atggcaggga gggccccagg 180
 ggcgagaagg gcgaccccg cctgectgga gcagcaggcc aggcggcat gccaggccag 240
 gccggcccag tgggcccac gggcgacaac ggcagcgtgg gcgagcccgg ccctaagggc 300
 gataccggcc cctccggccc ccttgccca cccggcgtgc caggaccagc aggaaggag 360

ggaccactgg gcaagcaggg caatatcgga cctcaggca agcctggacc aaaggagag 420
 gcaggaccaa agggagaagt gggcggcct ggcagcagg gatctgccgg agcccggggc 480
 ctggccggcc ccaaggcga gagaggcgtg cccggcgaga gggcgtgcc tggcaacaca 540
 ggccggccg gctccggcg cgccatggga cctcaggct ctccaggagc cagaggcct 600
 ccaggcctga agggcgaca ggaatccct ggcgataagg gagcaaagg agagagcggc 660
 ctgccagacg tggcctcct gcggcagcag gtggaggccc tgcaggcca ggtgcagcac 720
 ctgcaggccg ccttcagcca gtacaagaag gtggagctgt ttcctaatgg cgtgtctcac 780

cgctaccac ggatccagag catcaagggtg cagttaccg agtataagaa ggagaagggc 840
 tttatcctga catctcagaa ggaggacgag atcatgaagg tgcagaacaa tagcgtgatc 900

atcaactcgc atggcttcta cctgatcagc ctgaaggct attttccca ggaagtgaat 960
 atctctctgc actatcagaa ggatgaggag cctctgtttc agctgaagaa ggtgagatct 1020
 gtgaacagcc tgatggtggc ctccctgacc tacaaggaca aggtgtatct gaacgtgacc 1080
 acagataata catctctgga cgatttccac gtgaacggcg gcgagctgat cctgatccac 1140
 cagaatcccg gcgagttttg cgtgctgtga 1170

<210> 32
 <211> 969
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 32

atgcagctga agtgtccatg cttcgtgtcc ctgggaacaa gacagcccgt ctggaagaaa 60
 ctgcacgtga gctccggett ctttagcggc ctggggctgt tctgctgct gctgtctagt 120
 ctgtgcgccg cttccgcaga gactgaagtc ggagccatgg tgggcagtaa cgtggtcctg 180
 tcatgcatcg acccacaccg acggcatttc aacctgtctg gcctgtacgt gtattggcag 240
 attgagaatc ccgaagtgtc agtcacctac tatctgcctt acaagagccc agggatcaac 300
 giggactcaa gctataaaaa tagggggcac ctgtccctgg attctatgaa gcagggaaac 360

ttcagcctgt acctgaaaaa tgtgaccect caggacacac aggagtccac ttgtcgcgtc 420
 tttatgaaca ctgcaaccga actggtgaag attctggagg aagtggccg gctgagagtc 480
 gcagccaact ttagcactcc tgtgatctct accagtgatt cctctaatec aggccaggag 540
 cggacatata ctgcatgctc taagaacgga taccgccaac ctaatctgta ttggatcaac 600
 accacagaca atagtctgat tgataccgct ctgcagaaca atacagtcta cctgaacaag 660
 ctggggctgt atgacgtgat ctctactctg cggctgccat ggaccagtag aggagatgtg 720
 ctgtgctgcg tggagaacct ggccctgcac cagaatatca cctcaattag ccaggctgag 780

tcctttaccg gcaacaatac aaagaatcct caggagacac ataacaatga actgaaagtg 840
 ctggtgccag tgetggccgt cctggctgca gcagctttcg tgtctttat catctacaga 900
 aggacccgcc ctcaccgctc atacctgga cctaagaccg tgcagctgga actgacagac 960
 catgcttga 969

<210> 33
 <211> 909
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

atgcgctcgg gttcacctgg tctgctgttt ctgctgtttt caagtctgcg tgctgatact 60
 caggagaagg aagtccgggc tatggtcgga agtgacgtgg agctgtcatg cgcttgtccc 120

gaagggtccc ggttcgacct gaacgatgtc tacgtgtatt ggcagacctc tgagagtaag 180
 accgtggta caaccacat ccctcagaac tccagcctgg aaaatgtgga ttcaaggtat 240
 cggaacagag ccctgatgtc ccctctggc atgctgcggg gagacttctc tctgagactg 300
 tttaatgtga caccacagga tgagcagaaa ttccattgcc tggctctgtc acagtcctg 360
 ggatttcagg aggtgctgag tgtcgaagtg actctgcacg tcgccgctaa tttctccgtg 420
 cctgtggtea gcgcaccaca tagcccctct caggacgagc tgacctttac atgtacttcc 480
 atcaacggct acccccgcc taacgtgtac tggattaaca agactgacaa tagcctgctg 540

gatcaggcac tgcagaacga caccgtgttt ctgaatatgc gaggactgta cgatgtggtc 600
 agcgtctcgc gtatgccag gaccccatct gtgaacatcg ggtgctgtat tgagaacgtc 660
 ctgctgcagc agaatctgac agtggggagc cagactggta atgacatcgg cgagagggat 720
 aagattaccg aaaaccctgt gactacaggc gagaagaacg cagccacatg gtcaatcctg 780
 gctgtgctgt gectgctggg ggtcgtggct gtcgcaattg gctgggtgtg ccgcatcgg 840
 tgtctgcagc actcttatgc cgggtccttg gcagtgagtc cagagactga actgaccggc 900
 catgtctaa 909

- <210> 34
- <211> 1574
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 34

cttaagatgg aaactgatac tctgctgtc tgggtgctgc tectctgggt gectggttea 60
 actggggaca ttcgacgggc tgacattgtg atgaccaga ccacactgag cctgccctg 120
 tcctgggag accaggccag catctcctgc cggagctccc agtctatcgt gcacagcaac 180
 ggaaacacat acctggagtg gtatctgcag aagcctggcc agtccccaaa getgctgatc 240
 tacaaggtgt ccaacaggtt cagcggcgtg cctgaccgct tttctggaag cggctccgga 300
 acagatttea ccctgaagat cagcaggggtg gaggctgagg acctgggctg gtactactgc 360

ttccagggat cccacgtgcc ttacaccttt ggcggaggca caaagctgga gatcaagaga 420
 gccgatgctg ctccaaccgt gtctggaagc ggaggcgggg gttctggagg cgggtgggagc 480
 ggtggcggag ggtctgaggc taagctgcag gagagcggcc ccgtgctggt gaagcctgga 540
 gccagcgtga agatgtcctg taaggcttct ggatacacct tcacagacta ctacatgaac 600

tgggtgaagc agagccacgg caagtccttg gagtggatcg gagtgatcaa cccttacaac	660
ggcgacacct cttacaacca gaagtttaag ggcaaggcca ccctgacagt ggataagtct	720
agctccaccg cttacatgga gctgaacagc ctgacatccg aggattctgc cgtgtactac	780
tgtgctaggt actacggaag ctggttcgcc tactggggcc agggaacact gatcacctg	840
tccacagcca agaccacacc ccctagcgtg tacccttg ctctaggtc tagcagaggc	900
tgcaagccat gcactgtac cgtgcccgag gtgagcagcg tgttcatctt tccaccaag	960
ccaaggacg tgctgacat cactgacc ctaaggtga catgcgtggt ggtggatc	1020
agcaaggacg atccagagt gcagttctcc tggtttgg acgatgtgga ggtgcacacc	1080
gccagacac agccaagga ggagcagttc aactccacct ttagatccgt gtctgagctg	1140
cccatcatgc accaggactg gctgaacgga aaggagtca agtgccgggt gaactccgcc	1200
gcttttctg ctccaatga gaagaccatc tetaagacia agggccgccc aaaggtcca	1260
caggtgtaca ccatccctcc acccaaggag cagatggcta aggataaggt gacctgacc	1320
tgtatgatca cagacttctt tcccaggat atcacagtgg agtggcagtg gaacggacag	1380
cctgccgaga actacaagaa caccagecca atcatggaca cagatggctc ttacttctg	1440
tacagcaagc tgaacgtgca gaagtctaac tgggaggctg gcaacacctt cacctgcagc	1500
gtgctgcacg aaggtctcca taatcaccac accgaaaaga gcctcagtca cagccctggg	1560
aatgaggcg cgcc	1574
<210> 35	
<211> 1484	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
cttaagatgg aaactgacac cctgctgctg tgggtcctgc tgctgtgggt gcctggatcc	60
accggcgata tcgtgctgac ccagtctctt ggcacactga gtctgtcacc aggggagcga	120
gcaacactgt cttgtagagc cagccagtct gtgggaagct cctacctggc ttggtatcag	180
cagaagccag gccaggcacc caggctgctg atctacggag ccttcagccg gccactggc	240
attccagaca ggttctctgg aagtggctca gggaccgact tcacctgac catcagccga	300
ctggagcccc aagacttgcg cgtgtactat tgccagcagt acggtctag tccttggact	360
tttgacagc gcaccaaagt ggagatcaag cgcggcggg gaggtcttg gggagcggg	420
agtggaggcg ggggatcaca ggtccagctg gtggaaaagc gcgggggagt ggtccagcca	480
ggccggagcc tgcggctgag ctgcgccgct tcaggattca catttcaag ctataccatg	540

cactgggtcc ggcaggcacc agggaaggga ctggagtggg tgaccttcat cagctatgac 600
 ggcaacaaca agtattacgc tgattccgtg aaaggagagt ttaccattag ccgcgacaac 660
 tccaaaaata cactgtacct gcagatgaac agcctgcggg ccgaggatac tgctatctac 720
 tattgcgcaa gaaccgggtg gctgggaccc ttcgactatt ggggccaggg gactctggtc 780

accgtgtcct ctgataagac acacacatgc cctccctgtc ctgcaccaga gctgctgggc 840
 gggccatccg tgttctgtt tccaccaag cctaaagaca ccctgatgat cagccggaca 900
 cctgaagtca ctigcgtggt cgtggacgtg agtcacgagg atccagaagt caagttaac 960
 tggtagctgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaagaca aacctcgcga ggaacagtac 1020
 aatagcacat atcgagtcgt gtccgtcctg actgtgctgc atcaggattg gctgaacggc 1080
 aaagagtata agtgcaaagt gagcaataag gcactgcctg cccaatcga gaaaacaatt 1140
 tccaaggcta aaggccagcc caggaacct caggtgtaca ctctgcctcc aagtcgcgag 1200

gaaatgacca agaaccaggt gagcctgacc tgtctgtgta aagggttcta tccatcagac 1260
 attgcagtgg agtgggaaag caatggacag cccgaaaaca attacaagac cacaccacct 1320
 gtgctggaca gcgatgctc cttctttctg tattctaagc tgactgtgga taaaagtgcg 1380
 tggcagcagg ggaacgtctt tagctgttcc gtgatgatg aggctctgca caatcattac 1440
 acacagaagt ctctgagtct gtcacccggc aatgaggcg cgcc 1484

<210> 36
 <211> 632
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CMV promoter
 <400> 36

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120
 ccaacgacce ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgtg tcatatgcca agtacgccc ctattgacgt caatgacggt aatggcccc 300
 cctggcatta tgeccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcat cgctattacc atgggatgac ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420
 agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tcaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480
 tttggcacca aatcaacgg gactttcaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540

aaatgggagg taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta 600
 gagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa tt 632
 <210> 37
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RSV promoter
 <400> 37
 tgtacgggcc agatatacgc gtatctgagg ggactagggt gtgttttaggc gaaaagcggg 60
 gcttcggttg tacgcggtta ggagtcccct caggatatag tagtttcgct ttgcatagg 120
 gagggggaaa ttagtcttta tgcaatacac ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt 180
 tagcaacatg ccttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt ggaagtaagg 240
 tggtagcgtc gtccttatt aggaaggcaa cagacaggtc tgacatggat tggacgaacc 300
 actgaattcc gcattgcaga gataattgta ttaagtgcc tagctcgata caataaacgc 360
 catttgacca ttcaccacat tgggtgtcac ctcc 394
 <210> 38
 <211> 188
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BGH polyA
 <400> 38
 ctgtgecttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgacce 60
 tggaaagtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120
 tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 180
 gggaagac 188
 <210> 39
 <211> 249
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SV40 late polyA
 <400> 39
 gacatgataa gatacattga tgagtttga caaacacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa 60

tgctttatatt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatattg tgaattttgt gatgctattg 120
 ctttatattgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 180
 ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 240
 aatgtggta 249

<210> 40
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SV40 enhancer promoter
 <400> 40

gctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 60

 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc 120
 agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaacatag tcccgccct 180
 aactccgcc atcccgcc taactccgcc cagtccgcc cattctccgc cccatggctg 240
 actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgctcg gcctctgagc tattccagaa 300
 gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagct 345

<210> 41
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rabbit beta-globin polyA
 <400>

> 41
 gacctctggc taataaagga aatttatattt cattgcaata gtgtgttga atttttgtg 60
 tctctcactc ggaaggacat atgggagggc aaatcattt 99

<210> 42
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GFP
 <400> 42

accatggtga gcaaggcgca ggagctgttc accgggtgg tgeccatcct ggtcgagctg 60
 gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc 120

tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccggt gccctggccc 180

accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg cagtgtctca gccgtaccc cgaccacatg 240

aagcagcagc acttcttcaa gtccgcatg cccgaaggct acgtccagga ggcaccatc 300

ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagtcca gggcgacacc 360

ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg 420

cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag 480

aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc 540

ggcgaccact accagcagaa caccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac 600

cactacctga gcaccagtc cgccctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg 660

gtcctgctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag 720

taa 723

<210> 43

<211> 454

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MoMuLV LTR

<400> 43

ttaattaagt aacccattt tgcaaggcat ggaaaaatac ataactgaga atagagaagt 60

tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg 120

taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa 180

acaggatata tgtgtaagc agttctgcc cggctcagg gccaaagaaca gatggtcccc 240

agatgcggtc cagccctcag cagtttctag agaaccatca gatgtttcca gggtgcccca 300

aggacctgaa atgacctgt gccttatttg aactaacca tcagttcgct tctcgcttct 360

gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctcaat aaaagagccc acaaccctc actcggggcg 420

ccagtcctcc gattgactga gtcgcccgt taag 454

<210> 44

<211> 1349

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EF1alpha promoter

<400> 44

ttaattaaga gtaattcata caaaaggact cgccccctgcc ttggggaatc ccagggaccg 60
 tcgttaaact cccactaacg tagaaccag agatcgctgc gttcccgccc cctcaccgcg 120
 ccgctctcgt catcactgag gtggagaaga gcatgcgtga ggctccggtg cccgtcagtg 180
 ggacagagcg acatcgccca cagtccccga gaagtggggg ggaggggtcg gcaattgaac 240
 cgggtgctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgicgtgt actggctccg 300
 cctttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgccc tgaacgttct 360
 ttttcgaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc gtgtgtggtt cccgcgggccc 420

 tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt acttccacgc ccttggtgctg 480
 agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg gtgggagagt tcgaggcctt 540
 gcggttaagg agccccctcg cctcgtgctt gagttgaggc ctggcttggg cgctggggcc 600
 gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc tgccttcgat aagtctctag 660
 ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt ctggcaagat agtcttgtaa 720
 atgcgggcca agatctgcac actggtattt cggtttttgg ggccgcgggc ggcgacgggg 780
 cccgtgctgc ccagcgaca tgttcggcga ggccggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa 840

 tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt gcctggcctc gcgccccgt 900
 gtatgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc accagttgcg tgagcggaaa 960
 gatggccgct tccggccct gctgcaggga gctcaaaatg gaggacgcgg cgctcgggag 1020
 agcgggcggg tgagtcacc acacaaagga aaaggcctt tccgtcctca gccgtcgtt 1080
 catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct cgattagttc tcgagctttt 1140
 ggagtacgtc gtcttttagt tggggggagg ggttttatgc gatggagttt cccacactg 1200
 agtgggtgga gactgaagt aggccagctt ggcacttgat gtaattctcc ttggaatttg 1260

 ccctttttga gtttggatct tggttcattc tcaagcctca gacagtggtt caaagttttt 1320
 ttcttcatt tcaggtgtcg tgacttaag 1349

 <210> 45
 <211> 481
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HGH polyA
 <400> 45

 gacgggtggc atccctgtga cccctccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact 60
 ccagtccca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactaggtg 120
 tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag 180

acaacctgta gggcctgcgg ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt ggcacaatct 240

tggctcactg caatctccgc ctctgggtt caagcattc tctgcctca gcctcccag 300

ttgttggat tccaggcatg catgaccagg ctgagtaat tttgttttt ttgtagaga 360

cggggtttca ccatattggc caggctggc tccaactcct aatctcaggt gatctacca 420

ccttgccctc ccaaattgct gggattacag gcgtgaacca ctgctccctt cctgtcctt 480

t 481