



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0002613
(43) 공개일자 2012년01월06일

(51) Int. Cl.

C12N 7/04 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7028101(분할)

(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년08월11일

심사청구일자 2011년12월26일

(62) 원출원 특허 10-2005-7002384

원출원일자(국제출원일자) 2003년08월11일

심사청구일자 2008년08월11일

(85) 번역문제출일자 2011년11월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2003/025141

(87) 국제공개번호 WO 2004/014314

국제공개일자 2004년02월19일

(30) 우선권주장

60/402,857 2002년08월12일 미국(US)

(71) 출원인

제네텍스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아주 94105 샌프란시스코 2260 스피어 타워 마켓 스트리트 1

(72) 발명자

키른 데이비드

미국 캘리포니아주 94941 밀 밸리 라 베른 애비뉴 444

토른 스티브 에이취

미국 캘리포니아주 94301 팔로 알토 웨스턴 드라이브 257

(74) 대리인

장훈

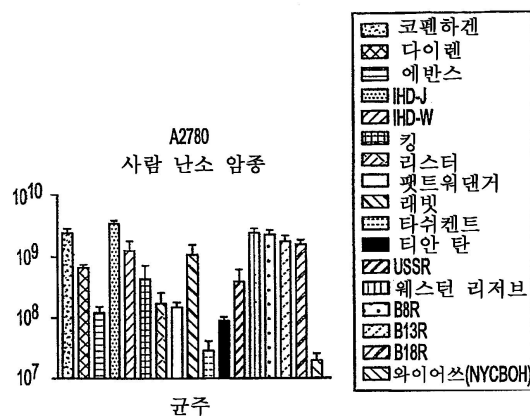
전체 청구항 수 : 총 120 항

(54) 폭스바이러스 및 암과 관련된 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 더 효율적인 치료제를 생성하기 위해 변경된 백시니아 바이러스를 포함하여 변경된 폭스바이러스를 사용하여 암 및 암 세포를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 폭스바이러스를 유전공학적으로 처리하여 정상 세포에 영향을 미치는 이들의 능력을 약독화 또는 약화시킨다. 특정의 실시양태에서, 방법 및 조성물은 돌연변이를 갖는 폭스바이러스를 포함하여 숙주에서 항바이러스성 반응을 수행하는 폭스바이러스의 능력이 감소되거나 제거된다. 이들 돌연변이를 갖는 폭스바이러스를 기타 돌연변이와 함께 배합하여 암을 더 효율적으로 치료하기 위해 사용할 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

적어도 제1 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드(여기서, 당해 인터페론-조절성 폴리펩타이드는 인터페론에 직접 결합한다)가 결합된 바이러스를 생성하는 인터페론-조절성 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서, 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 IFN- α 또는 IFN- β 에 결합하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 3

제2항에 있어서, 인터페론-결합 폴리펩타이드가 B18R에 결합하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서, 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 IFN γ 에 결합하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 5

제4항에 있어서, 인터페론-결합 폴리펩타이드가 B8R인, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 6

제1항에 있어서, 하기중 하나 이상의 제2 돌연변이를 추가로 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스:

- a) 하나 이상의 제2 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 제2 유전자내 돌연변이;
- b) 하나 이상의 기능성 보체 조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 보체 조절 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- c) 하나 이상의 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 TNF-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- d) 하나 이상의 기능성 세린 프로테아제 억제제가 결합된 바이러스를 생성하는 세린 프로테아제 억제제 암호화 유전자내 돌연변이;
- e) 하나 이상의 IL-1 β 조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 IL-1 β 조절자 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- f) A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 중 하나 이상의 기능이 결합된 바이러스를 생성하는 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이; 또는
- g) 감염성 EEV형을 증가시키는 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이.

청구항 7

제1항에 있어서, 바이러스가 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 제1 유전자내 돌연변이를 포함하는 코펜하겐(Copenhagen) 또는 웨스턴 리저브(Western Reserve) 균주인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 8

제1항에 있어서, 인터페론-결합 폴리펩타이드가 B8R 또는 B18R인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 9

제6항에 있어서, 적어도 제2 기능성 제2 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성시키는 제2 인

터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 10

제9항에 있어서, 기능성 제2 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 B8R, B18R, B 13R, E3L 또는 vC12L인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 11

제10항에 있어서, 기능성 B8R이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 12

제10항에 있어서, 기능성 B13R이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 13

제10항에 있어서, 기능성 B8R 및 B13R이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 14

제13항에 있어서, 기능성 B8R, B13R 및 vC12L이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 15

제14항에 있어서, 기능성 B28R 또는 A53R이 추가로 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 16

제15항에 있어서, 기능성 B28R 및 A53R이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 17

제14항에 있어서, 기능성 B18R이 추가로 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 18

제17항에 있어서, 기능성 B28R 또는 A53R이 추가로 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 19

제18항에 있어서, 기능성 B28R 및 A53R이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 20

제1항에 있어서, 하나 이상의 기능성 보체 조절 폴리펩타이드가 결여된 바이러스를 생성하는 보체 조절 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 21

제20항에 있어서, 기능성 보체 조절 폴리펩타이드가 VCP인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 22

제6항에 있어서, 하나 이상의 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 결여된 바이러스를 생성하는 TNF-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 23

제22항에 있어서, 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 A53R, B28R 또는 vCKBP인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 24

제6항에 있어서, 하나 이상의 기능성 세린 프로테아제 억제제가 결여된 바이러스를 생성하는 세린 프로테아제

억제제 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 25

제24항에 있어서, 세린 프로테아제 억제제가 B13R, B22R 또는 K2L인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 26

제6항에 있어서, 하나 이상의 기능성 IL-1 β 조절자가 결여된 바이러스를 생성하는 IL-1 β 조절자 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 27

제26항에 있어서, 기능성 IL-1 β 조절성 폴리펩타이드가 B13R 또는 B15R인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 28

제6항에 있어서, 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 29

제28항에 있어서, 폴리펩타이드가 B7R, vCKBP 또는 N1L인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 30

제28항에 있어서, 폴리펩타이드가 A41L, vCKBP 또는 C11R인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 31

제6항에 있어서, 백시니아 바이러스의 감염성 EEV형의 생성을 증가시키는 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 32

제31항에 있어서, 감염성 EEV형을 증가시키는 돌연변이가 A34R 또는 B5R 암호화 유전자에 있는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 33

제32항에 있어서, 감염성 EEV형을 증가시키는 돌연변이가 A34R 암호화 유전자에 있는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 34

제33항에 있어서, A34R내에서의 돌연변이가 K151D 돌연변이인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 35

제6항에 있어서, a), b), c), d), e), f) 또는 g) 중 2개 이상의 상이한 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 36

제35항에 있어서, g)에서의 돌연변이 및 a), b), c), d), e) 또는 f) 중 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 37

제1항에 있어서, 약제학적 조성물에 포함되어 있는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 38

제37항에 있어서, 조성물이 인터페론을 추가로 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 39

제37항에 있어서, 조성물이 항암제를 추가로 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 40

제39항에 있어서, 항암제가 항체, 화학요법제 또는 종양 억제제 암호화 핵산인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 41

기능성 vC12L 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 제1 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 42

제41항에 있어서, 하기 돌연변이 중 하나 이상의 제2 돌연변이를 추가로 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스:

- a) 하나 이상의 제2 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 제2 유전자내 돌연변이;
- b) 하나 이상의 기능성 보체 조절 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 보체 조절 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- c) 하나 이상의 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 TNF-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- d) 하나 이상의 기능성 세린 프로테아제 억제제가 결합된 바이러스를 생성하는 세린 프로테아제 억제제 암호화 유전자내 돌연변이;
- e) 하나 이상의 기능성 IL-1 β 조절자 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 IL-1 β 조절자 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- f) A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 중 하나 이상의 기능이 결합된 바이러스를 생성하는 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이; 또는
- g) 감염성 EEV형을 증가시키는 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이.

청구항 43

제41항에 있어서, 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 제1 유전자내 돌연변이를 포함하는 코펜하겐 또는 웨스턴 리저브 균주인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 44

제41항에 있어서, 적어도 제2 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 제2 유전자내 돌연변이를 포함하는, 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 45

제44항에 있어서, 제2 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 B8R, B13R 또는 B18R인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 46

기능성 B15R 폴리펩타이드가 결합되도록 하는 제1 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 47

제46항에 있어서, 하기 돌연변이 중 하나 이상의 제2 돌연변이를 추가로 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스:

- a) 하나 이상의 제2 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 바이러스를 생성하는 인터페론-조절성 폴

리펩타이드 암호화 제2 유전자내 돌연변이;

- b) 하나 이상의 기능성 보체 조절성 폴리펩타이드가 결여된 바이러스를 생성하는 보체 조절 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- c) 하나 이상의 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 결여된 바이러스를 생성하는 TNF-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- d) 하나 이상의 기능성 세린 프로테아제 억제제가 결여된 바이러스를 생성하는 세린 프로테아제 억제제 암호화 유전자내 돌연변이;
- e) 하나 이상의 IL-1 β 조절자 폴리펩타이드가 결여된 바이러스를 생성하는 IL-1 β 조절자 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이;
- f) A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 중 하나 이상의 기능이 결여된 바이러스를 생성하는 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이; 또는
- g) 백시니아 바이러스의 감염성 EEV형을 증가시키는 폴리펩타이드 암호화 유전자내 돌연변이.

청구항 48

제47항에 있어서, 바이러스가 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 또는 TNF-조절자 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 49

제48항에 있어서, 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 B13R이고 TNF-조절자가 B29R인 약독화된 백시니아 바이러스.

청구항 50

- a) 기능성 제1 인터페론-조절성 폴리펩타이드;
- b) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- c) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- d) 기능성 세린 프로테아제 억제제;
- e) 기능성 IL-1 β 조절성 폴리펩타이드;
- f) 기능성 비감염성 EEV형 폴리펩타이드; 또는
- g) 기능성 A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 폴리펩타이드 중 하나 이상을 발현할 수 없는 유효량의 백시니아 바이러스를 암 세포에 투여함을 포함하여, 암 세포를 치료하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 약독화된 바이러스가

- a) 기능성 제1 인터페론-조절성 폴리펩타이드;
- b) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- c) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- d) 기능성 세린 프로테아제 억제제;
- e) 기능성 IL-1 β 조절성 폴리펩타이드;
- f) 기능성 비감염성 EEV형 폴리펩타이드;
- g) 기능성 A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 폴리펩타이드; 또는
- h) 기능성 제2 인터페론-조절성 폴리펩타이드 중 하나 이상이 결여되는 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 백시니아 바이러스가 기능성 제1 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결합된 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 백시니아 바이러스가 코펜하겐 또는 웨스턴 리저브 균주인 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, 바이러스에서 결합된 기능성 제1 또는 제2 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 B18R 또는 B8R인 방법.

청구항 55

제50항에 있어서, 바이러스에서 하나 이상의 기능성 보체 조절 폴리펩타이드가 결합된 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 바이러스에서 결합된 기능성 보체 조절 폴리펩타이드가 VCP인 방법.

청구항 57

제50항에 있어서, 바이러스에서 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 결합된 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 바이러스에서 결합된 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드가 A53R, B28R 또는 vCKBP인 방법.

청구항 59

제50항에 있어서, 바이러스에서 하나 이상의 기능성 세린 프로테아제 억제제가 결합된 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 세린 프로테아제 억제제가 B13R, B22R 또는 K2L인 방법.

청구항 61

제50항에 있어서, 바이러스에서 하나 이상의 기능성 IL-1 β 조절자가 결합되는 방법.

청구항 62

제26항에 있어서, IL-1 β 조절자가 B13R 또는 B15R인 방법.

청구항 63

제50항에 있어서, 바이러스에서 하나 이상의 기능성 항감염성 EEV형 폴리펩타이드가 결합되는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 항감염성 EEV형 폴리펩타이드 A34R에서의 K151D 돌연변이 또는 B5R 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 방법.

청구항 65

제50항에 있어서, 인터페론을 세포에 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 인터페론이 IFN α , IFN β 또는 IFN γ 인 방법.

청구항 67

제50항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 약제학적으로 허용되는 조성물에 포함되는 방법.

청구항 68

제50항에 있어서, 암 세포가 종양 세포인 방법.

청구항 69

제50항에 있어서, 암 세포가 환자에 있는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 환자에게 직접, 내시경, 기관내, 종양내, 정맥내, 병변내, 근육내, 복강내, 국소, 경피 또는 피하내로 투여되는 방법.

청구항 71

제69항에 있어서, 환자에 고형 종양이 있는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 고형 종양의 전부 또는 일부를 절제함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 고형 종양 절제 이전에 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하는 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 고형 종양 절제 이후에 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하는 방법.

청구항 75

제69항에 있어서, 환자에게 화학요법 또는 방사선요법을 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 화학요법을 환자에게 1회 이상 투여하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 화학요법이 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로르암부실, 부설판, 니트로스우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탁소테레, 탁솔, 전이백금, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 겐시타빈, 옥살리플라틴, 이리노테칸, 토포테칸 또는 이의 유사체 또는 유도체 변이체인 방법.

청구항 78

제75항에 있어서, 방사선요법을 환자에게 1회 이상 투여하는 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, X선 조사, UV선 조사, γ 방사선 조사, 전자빔 방사선 또는 마이크로파를 환자에게 1회 이상 투여하는 방법.

청구항 80

제50항에 있어서, 암 세포가 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장직장, 식도, 위장관, 두부, 신장, 간, 폐, 비강인두, 경부, 난소, 췌장, 전립선, 피부, 위, 고환, 허 또는 자궁 세포인 방법.

청구항 81

제50항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 1회 이상 투여되는 방법.

청구항 82

제50항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 이중 치료학적 폴리펩타이드 암호화 핵산 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 이중 치료학적 폴리펩타이드가 종양 억제제, 면역조절제, 혈관신생 억제제, 항혈관 폴리펩타이드, 세포독성 폴리펩타이드, 아포토시스(apoptosis) 유도제, 프로드럭 활성화 효소 또는 세포독성 폴리펩타이드인 방법.

청구항 84

제50항에 있어서, 프로테아제 또는 펩티다제를 세포에 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 85

제50항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 IHD-J 균주이거나 A34R에서의 K151D 돌연변이를 포함하거나 B5R 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 방법.

청구항 86

제50항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 하나 이상의 사람 보체 억제성 단백질을 과발현하는 세포주로부터 생성되는 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 보체 억제성 단백질이 CD55, CD46 또는 CD59인 방법.

청구항 88

제50항에 있어서, 세포에 미세소관 안정화제를 투여함을 포함하는 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 미세소관 안정화제가 탁산인 방법.

청구항 90

B8R, B18R7 또는 vC12L 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스를 포함하는 유효량의 약제학적으로 허용되는 조성물을 환자에게 투여함을 포함하여, 환자에서 암을 치료하는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 조성물이 인터페론 또는 인터페론 암호화 핵산을 추가로 포함하는 방법.

청구항 92

제90항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스에서 기능성 B8R, B18R, 또는 vC12L 폴리펩타이드가 결여되는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스에서 기능성 B8R, 또는 vC12L 폴리펩타이드가 결여되고, B13R 암호화 유전자에 돌연변이를 추가로 포함함으로써 당해 바이러스에서 기능성 B13R 폴리펩타이드가 결여되는 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스에서 기능성 B8R, vC12L 및 B13R 폴리펩타이드가 결여되는 방법.

청구항 95

제92항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스에서 두 개 이상의 기능성 B8R, B18R 또는 vC12L 폴리펩타이드가 결여되는 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스에서 두 개 이상의 기능성 B8R, B18R 및 vC12L 폴리펩타이드가 결여되는 방법.

청구항 97

제92항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가

- a) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- b) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- c) 기능성 세린 프로테아제;
- d) 기능성 IL-1 β 조절자;
- e) 기능성 A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 폴리펩타이드; 또는
- f) 기능성 비감염성 EEV형 폴리펩타이드 중 하나 이상을 추가로 발현할 수 없는 방법;

청구항 98

제94항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가

- a) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- b) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- c) 기능성 세린 프로테아제;
- d) 기능성 IL-1 β 조절자;
- e) 기능성 A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 폴리펩타이드; 또는
- f) 기능성 비감염성 EEV형 폴리펩타이드 중 하나 이상을 추가로 발현할 수 없는 방법.

청구항 99

인터페론, 케모카인, 사이토킨, 보체 또는 중화 항체에 의해 매개된 항바이러스성 반응을 억제하는 능력이 감소된 약독화된 백시니아 바이러스와 암 세포를 접촉시킴을 포함하여, 암 세포를 사멸시키는 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가 B8R, B13R, B18R 또는 vC12L를 암호화하는 핵산 서열내 돌연변이를 갖는 방법.

청구항 101

제99항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스가

- a) 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드;
- b) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- c) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- d) 기능성 세린 프로테아제;
- e) 기능성 IL-1 β 조절자;

- f) 기능성 A41L, B7R, N1L, vCKBP 또는 C11R 폴리펩타이드; 또는
f) 기능성 항감염성 EEV형 폴리펩타이드 중 하나 이상을 발현할 수 없는 방법.

청구항 102

종양 부위를 치료학적 유효량의 약독화된 백시니아 바이러스 및 약독화된 백시니아 바이러스의 항종양 효율을 증가시키는 제제와 접촉시켜, 약독화된 백시니아 바이러스 및 항종양 효율을 증가시키는 제제의 발현으로 암을 치료함을 포함하는, 암 환자에서의 암 치료 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 약독화된 백시니아 바이러스의 항종양 효율을 증가시키는 제제가 인터페론, 프로테이나제, 캡티다제, 미세소관 안정화제, 화학요법, 방사선요법, 유전자 요법, 면역요법 및 면역조절성 요법인 방법.

청구항 104

- a) 보체 억제성 단백질을 과발현하는 사람 세포주를 백시니아 바이러스로 감염시키는 단계; 및
b) 백시니아 바이러스의 EEV형을 단계 a)의 감염된 세포로부터 분리시키는 단계를 포함하여, 백시니아 바이러스의 강화된 EEV형을 생성하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 백시니아 바이러스가 A34R 단백질 암호화 유전자내 돌연변이를 포함하고, 돌연변이로 인해 K151D 돌연변이가 유발되는 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 보체 억제성 단백질이 CD55, CD46 또는 CD59인 방법.

청구항 107

제104항에 있어서, 사람 세포주가 하나 이상의 보체 억제성 단백질을 과발현시키는 방법.

청구항 108

- (i) 절제가능한 종양을 가진 환자를 동정하는 단계;
(ii) 종양을 절제하는 단계; 및
(iii) 종양층을 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L 또는 vCKBP를 암호화하는 유전자에서의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 백시니아 바이러스와 접촉시키는 단계를 포함하여, 극미 잔류 암을 치료하는 방법.

청구항 109

- (i) 종양을 외과적으로 노출시키는 단계; 및
(ii) 당해 종양을 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 또는 vCKBP 기능이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스와 접촉시키는 단계를 포함하여, 종양이 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 110

종양을 연장된 기간에 걸쳐 약독화된 백시니아 바이러스로 관류시킴을 포함하여, 종양 환자를 치료하는 방법.

청구항 111

암 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여함으로써, 당해 환자에게 치료학적 이익을 부여함을 포함하여, 암 환자에서 전이성 질환을 억제하는 방법.

청구항 112

- i) 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하는 단계;
- ii) 당해 환자에게 화학요법 또는 방사선요법을 투여하여, 당해 환자에게 치료학적 이익을 부여하는 단계를 포함하여, 환자에서 다중약물 내성 종양을 치료하는 방법.

청구항 113

유효량의 약독화된 백시니아 바이러스를 환자에게 투여하고 종양의 전부 또는 일부를 절제함을 포함하여, 환자에서 절제불가능한 종양을 절제가능하게 하는 방법.

청구항 114

암이 화학요법 또는 방사선 요법에 내성인 암 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하고 화학요법 또는 방사선 요법을 투여함을 포함하여, 당해 환자를 치료하는 방법.

청구항 115

50% 이상 강화된 EEV형의 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 116

제115항에 있어서, 백시니아 바이러스가 60% 이상 강화된 EEV형인 조성물.

청구항 117

제116항에 있어서, 백시니아 바이러스가 70% 이상 강화된 EEV형인 조성물.

청구항 118

백시니아 바이러스를 포함하고 하나 이상의 보체 억제성 폴리펩타이드를 과발현시키는, 백시니아 바이러스의 강화된 EEV형의 생성을 위한 사람 세포주.

청구항 119

제118항에 있어서, 보체 억제성 폴리펩타이드가 CD55, CD46 또는 CD59인 사람 세포주.

청구항 120

제118항에 있어서, 백시니아 바이러스가

- a) 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드;
- b) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;
- c) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;
- d) 기능성 세린 프로테아제;
- e) 기능성 IL-1 β 조절자;
- f) 기능성 항감염성 EEV형 폴리펩타이드; 또는
- g) 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드 중 하나 이상을 발현할 수 없는 사람 세포주.

명세서

기술분야

본 발명은 종양학 및 바이러스학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 폭스바이러스, 특히 암 치료에 적

[0001]

합하게 하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 백시니아 바이러스를 포함하는 폭스바이러스에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 정상 조직 항상성은 세포 증식 및 세포사멸이 고도로 조절된 과정이다. 세포 증식 또는 세포사멸의 불균형은 암 상태로 진전될 수 있다 [참조: Solyanik *et al.*, 1995; Stokke *et al.*, 1997; Mumby and Walter, 1991; Natoli *et al.*, 1998; Magi-Galluzzi *et al.*, 1998]. 예를 들면, 자궁경부암, 신장암, 폐암, 췌장암, 결장직장암 및 뇌암은 발생할 수 있는 수많은 암의 몇가지 예에 지나지 않는다 [참조: Erlandsson, 1998; Kolmel, 1998; Mangray and King, 1998; Gertig and Hunter, 1997; Mouglin *et al.*, 1998]. 사실상, 암 발생은 매우 높아 미국에서만도 매년 500,000이 넘는 사망이 암으로 인한 것으로 추정된다.
- [0003] 세포 증식 및 세포사멸의 유지는 원형 종양유전자 및 종양 서프레스에 의해 적어도 부분적으로 조절된다. 원형 종양유전자 또는 종양 서프레스는 세포 증식을 유도하는 단백질(예: sis, erbB, src, ras 및 myc), 세포 증식을 억제하는 단백질(예: Rb, p16, p19, p21, p53, NF1 및 WT1) 또는 프로그램된 세포사멸을 조절하는 단백질(예: bcl-2) [참조: Ochi *et al.*, 1998; Johnson and Hamdy, 1998; Liebermann *et al.*, 1998]을 암호화할 수 있다. 그러나, 이러한 원형 종양유전자 또는 종양 서프레스의 유전자 재배열 또는 돌연변이로 인해 원형 종양유전자가 강력한 암 유발 종양유전자로 전환되거나 종양 서프레스가 비활성 폴리펩타이드로 전환된다. 종종, 단일 점 돌연변이가 형질전환을 달성하기에 충분하다. 예를 들면, p53 종양 억제제 단백질에서의 점 돌연변이로 야생형 p53 기능이 완전히 상실하게 된다 [참조: Vogelstein and Kinzler, 1992].
- [0004] 현재, 다수의 암 유형에 대해 효과적인 선택사항은 거의 없다. 소정의 개인을 위한 치료 과정은 진단, 질병의 진전 단계 및 환자의 연령, 성별 및 일반적인 건강에 의존한다. 암 치료의 가장 통상적인 선택사항은 수술, 방사선 요법 및 화학요법이다. 수술은 암 진단 및 치료에서 중추 역할을 한다. 전형적으로, 수술 방법은 생검을 필요로 하고 암 증식을 제거한다. 그러나, 암이 전이되었거나 널리 퍼진 경우, 수술로는 치유가 안 될 것이고 대체 방법이 취해져야 할 것이다. 방사선요법, 화학요법 및 면역요법은 암의 시술 치료에 대해 대체적인 것이다 [참조: Mayer, 1998; Ohara, 1998; Ho *et al.*, 1998]. 방사선요법은 고 에너지 방사선의 정확한 조준으로 암 세포를 파괴하는 것을 포함하고 수술과 아주 흡사하게, 주로 전이되지 않고 국소화된 암 세포 치료에 효과적이다. 방사선요법의 부작용은 피부 자극, 음식 삼키기가 곤란, 건조한 입, 메스꺼움, 설사, 헤어 손실 및 에너지 손실을 포함한다 [참조: Curran, 1998; Brizel, 1998].
- [0005] 화학요법, 즉 항암제로 암을 치료하는 것은 암 요법의 다른 방법이다. 소정의 항암제의 효과는 고형 종양을 통해 약물 전달을 달성하는 것이 어렵다는 사실에 의해 제한된다 [참조: el-Kareh and Secomb, 1997]. 화학요법의 전략은 암조직 성장을 기본으로 하는데, 여기서 항암제는 급격히 분열하는 암 세포를 표적으로 한다. 대부분의 화학요법의 시도는 하나 이상의 항암제의 배합을 포함하는데, 이는 광범위한 암의 반응 비율을 증가시키는 것으로 입증되었다 [참조: 본원에 참조문헌으로 인용된 미국 특허 제5,824,348호; 미국 특허 제5,633,016호 및 미국 특허 제5,798,339호]. 화학요법제의 주요한 부작용은 이들이 또한 정상 조직 세포에 영향을 미쳐, 영향받은 세포가 특정한 경우에 급속히 분열한다는 것이다 [예: 골수, 위장관, 생식계 및 모낭]. 화학요법제의 다른 독성 효과는 입안 통증, 삼키기 어려움, 건조한 입, 메스꺼움, 설사, 구토, 피곤, 출혈, 모발 손실 및 감염을 포함한다.
- [0006] 면역요법은 암 연구분야에서 급격하게 개발되고 있는 영역으로서, 특정 유형의 암을 치료하기 위한 또다른 선택 사항이다. 이론적으로, 면역계를 자극하여 암 세포를 외인성 세포로 확인하고 이들을 파괴 표적으로 하는 것이다. 불행하게도, 당해 반응은 전형적으로는, 대부분의 암 증식을 예방하기에 충분하지 않다. 그러나, 최근에 면역요법 영역에서 면역계의 천연 방어 기작을 증가시키거나 보충하는 방법을 개발하는데 집중되고 있다. 현재 조사중이거나 사용중인 면역요법은 면역 보조제 [예: 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 플라즈모디움 팔시파럼(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물] [참조: 미국특허 제5,801,005호; 미국특허 제5,739,169호; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998], 사이토킨 요법 [예: 인터페론 (IL-1, GM-CSF 및 TNF)] [참조: Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998], 및 유전자 요법 [예: TNF, IL-1, IL-2, p53] [참조: Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국특허 제5,830,880호 및 미국특허 제5,846,945호] 및 모노클로날 항체 [예: 항-강글리오사이드 GM2, 항-HER-2, 항-p185] [참조: Pietras *et al.*, 1998; Hanibuchi *et al.*, 1998; 미국특허 제5,824,311호]의 사용이다. 이러한 방법은 약간의 가능성을 보여주지만, 그 성공률이 제한되는 것으로 입증되었다.

[0007] 복제-선택적 종양분해 바이러스는 암 치료에 대한 가능성을 보유한다 [참조: Kirn *et al.*, 2001]. 이들 바이러스는 직접적인 복제-의존성 및/또는 바이러스 유전자 발현-의존성 종양분해 효과를 통해 종양 세포 죽음을 유발할 수 있다 [참조: Kirn *et al.*, 2001]. 또한, 바이러스를 사용하여 숙주 세포내에 세포-매개된 항종양 면역성을 향상시킬 수 있다 [참조: Todo *et al.*, 2001; Sinkovics *et al.*, 2000]. 이들 바이러스는 또한 유전공학적으로 처리하여 종양내에서 치료학적 형질전환유전자를 발현하여 항종양 효능을 향상시킨다 [참조: Hermiston, 2000].

[0008] 그러나, 이러한 치료 방법에는 주요한 제한이 존재한다. 천연 종양-선택성 정도가 특정 바이러스 종에 대해 입증되었지만, 새로운 방법이 안전성을 최대화시키고 바이러스의 종양 선택성을 증가시키고/또는 유전공학처리하는데 필요하다. 이들 선택성은 특히, 정맥내 투여가 사용될 경우 중요하고, 잠재적으로 독성인 치료학적 유전자를 이들 바이러스에 가하여 항종양 효능을 향상시키고; 유전자 발현은 정상 조직에서는 제한될 필요가 있다. 또한, 추가의 기작, 예를 들어 항종양 면역성 또는 종양 연관 혈관의 표적화의 유도를 통한 증가된 항종양 효능이 고도로 요망된다.

[0009] 따라서, 암 치료용으로 더 효율적이고, 덜 독성인 치료가 필요하다. 종양분해 바이러스의 사용이 개발될 수 있는 영역으로 나타나지만, 상기에서 논의된 제한이 극복될 필요가 있다. 따라서, 본 발명은 이들 제한에 중점을 두고자 한다.

발명의 내용

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명은 폭스바이러스가 변경되어 1) 상이한 세포 개체군 또는 조직 유형에서 상이하게 영향을 미치는 체제를 형성시키고/시키거나 2) 감염성이 더 크고 감염된 세포로부터의 개선된 방출에 의해 기타 세포를 감염시킬 수 있는 폭스바이러스 형태를 형성시킬 수 있다는 발견에 근거한다. 본 발명의 폭스바이러스, 예를 들면 백시니아 바이러스의 코펜하겐 종이 다른 요법(예: 화학요법)과 상승적으로 작용하고 종양 혈관을 표적화함으로써 유익한 효과를 제공할 수 있으면서도, TNF 및/또는 INF 경로에 맞서거나 이를 억제하지 않는다. 특정 종의 백시니아 바이러스를 사용할 수 있는 것이 구체적으로 고려된다. 특정 실시양태에서, 백시니아 바이러스의 코펜하겐 종 또는 이의 유도체가 또한 고려된다.

[0012] 특정 실시양태에서, 폭스바이러스는 표적 세포에 대해, 독성이거나 치료학적으로 유효하지만, 항바이러스 반응을 통해 비표적 세포로부터 척결되기때문에 기타 비표적 세포에 대해서는 상대적으로 무독성이다. 당해 체제를 사용하여 표적 세포에서 폭스바이러스 또는 이중성 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 발현하고/하거나 이러한 세포들을 치사적으로 감염시킬 수 있다. 비표적 세포 또는 조직에 대해 폭스바이러스를 약독화시키는 것이 특히 고려되는데, 이는 숙주 내인성 항바이러스성 반응을 조절할 수 있는 이의 능력을 포함하여 바이러스가 감소하고, 감축되고, 줄어들고, 억제되고 제거된 병독성을 갖는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명은 항바이러스 반응을 수행하는 능력이 감소된 세포 또는 조직을 치료하는데 유용할 수 있도록 변경하지만 유효한 항바이러스 반응을 유도할 수 있는 정상 세포 또는 조직에 대해서는 비효과적인 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 구체적으로 암 세포 또는 종양을 치료하기 위해 이러한 백시니아 바이러스를 사용하는 것을 고려한다.

[0013] 본 발명의 바이러스가 종양분해성일 수 있고 안전성이 증가되고/되거나 정상 조직으로부터의 제거를 촉진시키는 기작은 (암 세포 또는 조직과 같은) 비정상 세포와 반대로 정상 세포가 항바이러스성 반응(즉, 면역 반응을 증가, 반응 및/또는 유도)을 나타낼 수 있는 정도를 포함한다. 정상 세포 또는 조직은 이러한 능력을 갖지만, 암 세포 또는 조직은 종종 항바이러스성 반응을 유도하거나 포함된 세포성 단백질의 수준을 발현하거나 감소시키거나 발현시킨다. 이러한 세포성 단백질은 인터페론, TNF, 케모카인, 사이토킨, 및 기타 인자를 포함한다. 정상 세포 또는 조직에서, 약독화되거나 항 바이러스 면역 반응에 덜 거스르는 바이러스를 쉽게 제거할 수 있지만, 비정상 세포 및/또는 조직에서, 항 바이러스 반응은 감소되고 따라서 약화된 바이러스 조차도 효율적으로 제거되지 않는다. 본 발명의 특정 실시양태의 근거는 본원에서 논의된 바이러스가 비정상 조직과 대조적으로, 이들이 정상 세포에는 덜 효과적일 수 있듯이, 정상세포에 대한 증진된 안전성 및 감소된 독성과 같이 개선된 형태의 요법이라는 것이다. 따라서 약독화된 바이러스가 우선적으로 복제되어 인터페론 유도 또는 반응이, 예를 들어 감소하거나 부재한 암 세포에서 유전자를 발현하게 된다.

[0014] 본 발명의 조성물 및 방법은 폭스바이러스에 관한 것이다. 하기에서 논의된 바이러스는 본 발명의 조성물 및 방

법에 포함될 수 있다. 다수의 실시양태가 백시니아 바이러스를 포함하지만, 기타 폭스바이러스는 동일한 방법으로 발생되거나 수행될 수 있고, 따라서 백시니아 바이러스에 관한 실시양태는 기타 폭스바이러스나 유사한 유전자를 갖는 기타 바이러스에 대해서 적용할 수 있다는 것이 고려된다.

[0015] 본 발명은 바이러스성 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 변경된 백시니아 바이러스에 관한 것이다. 돌연변이를 유전자재조합 기술, 무작위 돌연변이유발, 바이러스의 반복적인 계대배양에 의해 바이러스에 도입할 수 있다. 바이러스성 유전자가 재조합 유전공학기술(또는 임의의 선행자의 바이러스성 유전자)을 사용하여 조작된 바이러스를 재조합 바이러스라고 언급한다. 돌연변이는 하나 이상의 핵산 잔기에 의해, 결실, 삽입, 치환일 수 있다. 돌연변이는 유전자내에서(전사 조절 서열과 같이, 암호화 또는 비암호화 서열을 포함한다) 존재할 수 있거나 그 어디에나 있을 수 있다. 암호화 영역에서는 유전자는 여기에 도입된 결실, 삽입 또는 치환된 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 유도할 수 있다. 핵산 돌연변이는 또한 프레임쉬프트(frameshift)를 돌연변이를 유도할 수 있는데 이는 변경된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 또는 절두된 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다.

[0016] 본 발명의 특정 실시양태에서, 백시니아 바이러스가 약독화되며, 이는 바이러스 게놈이 변경되어 바이러스 약독화를 유도할 것을 요구한다. 돌연변이는 기능에 따라 분류되는 상이한 폴리펩타이드에 영향을 미칠 수 있다. 돌연변이는 하기 분류의 폴리펩타이드중 하나 이상에서 발생할 수 있다: 1) 인터페론 조절성 폴리펩타이드; 2) 보체 조절 폴리펩타이드; 3) TNF 또는 케모카인-조절성 폴리펩타이드; 4) 세린 프로테아제 억제제; 5) IL-1 β 조절성 폴리펩타이드; 6) 비감염성 EEV형 폴리펩타이드; 및, 7) 세포로부터 감염 바이러스의 방출을 억제하는 작용을 하는 바이러스 폴리펩타이드(항감염성 바이러스 형 폴리펩타이드). 또한, 백시니아 바이러스(또는 기타 폭스바이러스에서 상응하는 폴리펩타이드)의 A41L 또는 C11R에서 돌연변이가 있을 수 있다. 각 부류의 폴리펩타이드는 특정한 기능을 갖는 폴리펩타이드를 직접 또는 간접적으로 동정하였다. 당해 부류는 하나의 폴리펩타이드가 동정된 기능의 하나 이상을 소유할 수 있듯이 상호 배타적이지 않다.

[0017] 인터페론-조절 폴리펩타이드는 세포의 인터페론-유도 또는 -활성화된 경로에 영향을 미치는 활성을 갖는 폭스바이러스 폴리펩타이드를 의미한다. 인터페론은 특정 세포 및 기관의 항바이러스성 기작과 관련있다. 폭스바이러스는 당해 기작을 억제하고자 시도된 인터페론-조절 폴리펩타이드를 발현시킨다. 이들 폴리펩타이드는 당해 특정 항바이러스성 반응을 억제, 감소 또는 제거하는 것으로 구체적으로 고려된다. 이들 폴리펩타이드는 인터페론의 활성 또는 기능을 직접 또는 간접적으로, 조절, 억제, 감소, 변경 또는 제거한다. 인터페론 α , β , γ 는 인터페론 조절성 펩타이드의 표적이다. 인터페론 조절성 폴리펩타이드는 또한 인터페론에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드로 아분류될 수 있고; 이러한 폴리펩타이드는 인터페론-결합 폴리펩타이드로서 언급될 수 있다. B18R는 IFN α/β 에 특이적으로 결합하는 것과 같이, 인터페론 결합 폴리펩타이드인 가용성 백시니아 바이러스 폴리펩타이드이다. B8R은 인터페론- γ 에 특이적으로 결합하는 기타 백시니아 바이러스 폴리펩타이드이다. 인터페론 조절성 펩타이드는 이에 제한되지는 않지만, B18R - 이는 다른 종에서는 B19R로서 칭해질 수 있는데, 예를 들면 백시니아 바이러스의 코펜하겐 중 - 백시니아 바이러스의 B8R, B13R, vC12L, A53R, 및 E3L, 및 유사한 활성 또는 특성이 있는 기타 바이러스성 폴리펩타이드를 포함한다. IFN 조절 폴리펩타이드는 또한 IFN α 및/또는 β 경로(백시니아 바이러스의 B18R, B8R, B13R, 및 vC12L를 포함)를 우선적으로 조절하고, IFN γ 경로(백시니아 바이러스의 B8R, B13R, 및 vC12L)를 조절하는 것의 비배타적 카테고리 분류될 수 있다. 면역 억제 기능을 갖는 임의의 다른 폴리펩타이드가 또한 포함된다.

[0018] 보체 조절 폴리펩타이드는 보체-매개된 세포 사멸 및/또는 바이러스 불활성화에 역할을 하는 폭스바이러스를 의미한다. 바이러스성 병원체를 제거하는 메커니즘은 감염된 세포의 사멸이거나 보체-의존성 기작에 의한 숙주내에서 비리온의 불활성화이다. 이들 폴리펩타이드가 당해 특이 항바이러스성 반응을 억제, 감소 또는 제거할 수 있는 것이 구체적으로 고려된다. 이들 보체 조절 폴리펩타이드는 당해 기작의 활성 또는 기능을 직접 또는 간접적으로 조절, 침범, 간섭, 억제, 감소, 변경 또는 제거한다. 보체 조절 폴리펩타이드는 이로써 제한되지 않지만, C3L 또는 C21L로서 또한 공지된 백시니아 바이러스의 VCP, 및 당해 특성 또는 기능을 갖는 기타 폴리펩타이드를 포함한다(용어 "기능" 및 "활성"은 상호교환적으로 사용가능하다).

[0019] TNF-조절성 폴리펩타이드는 TNF 수용체를 통해 활성화된 세포 면역 및 염증성 반응에 영향을 미치는 폭스바이러스 폴리펩타이드를 의미한다. 당해 반응은 아포토시스성 세포사멸을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 폭스바이러스는 이들 TNF-조절성 폴리펩타이드를 바이러스 및/또는 바이러스 감염된 세포의 TNF-매개된 제거를 대처하는 한 방법으로 발현한다. 이들 폴리펩타이드는 이들이 세포외성 TNF에 특이적으로 결합하고 격리하여, 바이러스 제거를 억제하는 기능을 갖는다. 이들 폴리펩타이드가 당해 특이 항바이러스성 반응을 억제, 감소 또는 제거할 수 있는 것이 구체적으로 고려된다. 이들 TNF-조절성 폴리펩타이드는 당해 기작의 활성 또는 기능을 직접 또는

간접적으로 조절, 침범, 간섭, 억제, 감소, 변경 또는 제거한다. 따라서, 바이러스 감염이 진행되고 바이러스성 병독성이 증가하게 된다. TNF 조절성 폴리펩타이드는 이로써 제한되지는 않지만 백신 바이러스의 A53R 및 B28R, 및 유사한 활성 및 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드를 포함한다.

[0020] 세린 프로테아제 억제제(SPI)는 세린 프로테아제를 억제할 수 있는 폭스바이러스 폴리펩타이드를 의미하는 것이다. 이러한 폴리펩타이드는 세르핀으로서 언급된다. 이들 폴리펩타이드는 이의 SPI 활성을 통해 아포토시스-유도 분자에 의한 아포토시스를 예방하여, 항바이러스성 아포토시스-유도 사이토킨, fas, 그렌자임 또는 기타 아포토시스 자극제의 존재에도 불구하고 바이러스 복제가 진행될 수 있도록 한다. SPIs는 이에 제한되지는 않지만, 백시니아 바이러스의 B13R 및 B22R, 및 유사한 활성 또는 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드를 포함한다.

[0021] IL-1 β 조절자는 변경될 IL-1에 의해 유도되는 항바이러스 반응에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 활성을 갖는 폭스바이러스 폴리펩타이드를 의미한다. IL-1은 B-세포에 직접 작용하여, 이들의 증식 및 면역글로블린의 합성을 촉진시킨다. IL-1은 또한 B-세포를 IL-5에 반응하도록 하는 프라임 인자의 하나로서 기능한다. IL-1은 NK-세포 및 섬유아세포, 홍선세포, 교묘세포종 세포의 증식 및 활성화를 자극한다. IL-18 조절자는 변경될 IL-18에 의해 유도되는 항바이러스 반응에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 활성을 갖는 폭스바이러스 폴리펩타이드를 의미한다. IL-18는 IFN γ 을 유도하고/하거나 세포독성 T-세포 및 NK 세포의 활성화를 유도한다. 이들 IL-1 β 또는 IL-18 조절자 폴리펩타이드는 당해 기작의 활성 또는 기능에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미치고, 간섭, 억제, 감소, 변경 또는 제거한다. 이들 조절자 폴리펩타이드가 이들의 특정 항바이러스성 반응을 억제, 감소, 또는 제거할 수 있는 것으로 구체적으로 고려된다. IL-1 β 조절 폴리펩타이드는 이에 제한되지는 않지만, 백시니아 바이러스의 B13R 및 B15R, 및 유사한 활성 또는 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드를 포함한다. 기타 IL-1 조절자는 본 발명의 일부로서 돌연변이될 수 있다. IL-18 조절 폴리펩타이드는 이로써 제한되지는 않지만, vC12L 및 기타 폴리펩타이드를 포함한다.

[0022] 세포로부터의 감염성 바이러스의 방출을 억제하는 바이러스성 폴리펩타이드인 항감염성 EEV형 폴리펩타이드는 감염성 EEV 형태의 백시니아 바이러스의 부재에 직접적으로 관여하는 바이러스성 폴리펩타이드를 의미한다. 예를 들면, 세포막으로부터 당해 EEV형의 방출을 구속하거나 방해하는 폴리펩타이드는 항감염성 EEV형 폴리펩타이드이다. 바이러스의 EEV형의 조절에 관련되는 폴리펩타이드는, 이로써 제한되지는 않지만, 백시니아 바이러스의 A34R 및 B5R, 및 폭스바이러스의 EEV형의 생성에 영향을 미치는 여러가지 기타 단백질을 포함한다. A34R의 코돈 151에서 리신에서 아스파르트산으로의 돌연변이(K151D 돌연변이)는 A34R 단백질이 EEV형을 세포막에 보다 덜 구속하게 한다.

[0023] 본 발명의 폭스바이러스에 포함될 수 있는 기타 돌연변이는 C11R, 바이러스성 EGF-유사 단백질 뿐만 아니라, A41L, B7R, N1L, 및/또는 vCKBP [이는 케모카인 결합 활성을 가질 수 있다 [참조: 각각 본원에서 참조문헌으로 인용되는 미국특허 제5,871,740호 및 문헌{Seet *et al.*, 2001}], vCKBP의 예는 각각 본원에 참조문헌으로 인용되는 미국특허 제5,871,740호 및 문헌{Seet *et al.*, 2001}을 참조한다] 암호화 유전자에서의 돌연변이이다. 더욱이, 본 발명의 바이러스는 또한 바이러스성 게놈에서 결실이 있어 이중성 핵산 서열을 수용할 수 있는 것이 고려된다. 이러한 결실은 비필수적 영역일 수 있거나, 헬퍼 바이러스 또는 숙주 세포에 필요한 필수적 영역일 수 있다.

[0024] 특정의 실시양태에서, 폭스바이러스, 특히 백시니아 바이러스는 제1 인터페론 조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자에서 하나 이상의 돌연변이가 있어 바이러스는 하나 이상의 제1 인터페론-조절성 기능이 결여되게 된다. 추가의 실시양태에서, 돌연변이는 인터페론을 직접 결합하는 인터페론-조절성 폴리펩타이드 암호화 유전자에 있다. 인터페론-결합 폴리펩타이드가 B8R 및/또는 B18R일 수 있는 것으로 고려된다.

[0025] 기타 더 일반적인 분류가 또한 허용된다. 돌연변이는 또한 다음의 폴리펩타이드 부류 하나 이상에서 특정화될 수 있다: 1) 면역 반응 성분을 억제하는 분비된 바이러스성 인자(예: TNF 및 기타 사이토킨; 케모카인, 보체 다단계; 인터페론 α/β 및 γ ; 인터류킨, 예를 들어 IL-1 및 IL18; A41L; N1L; vC12L; 및 C11R); 2) 아포토시스를 차단하는 세포내 바이러스성 인자(예: 세린 프로테아제 억제제) 및/또는 면역 활성화(예: B13R, B22R, 및 B7R); 및 3) 세포로부터 감염성 바이러스의 방출을 억제하는 바이러스성 폴리펩타이드(들). 당해 부류는, 하나의 폴리펩타이드가 동정된 기능 하나 이상을 소유할 수 있기 때문에, 상호배타적이지 않다.

[0026] 본원을 통해서, 표현 "바이러스는 기능성 X가 결여된다"라는 것은 단백질 X의 하나 이상의 기능이 결여된 바이러스를 의미한다. 단백질 X가 통상 2개의 기능을 갖는 경우, 기능성 X가 결여된 바이러스는 폴리펩타이드 X의 이들 기능 중 하나 이상이 결여된 바이러스를 의미한다. 기능의 결여는 여러가지 기작에 의해 달성될 수 있는데, 예를 들면 핵산 암호화 폴리펩타이드 X, 또는 당해 발현에 포함된 핵산 영역이 기능성 폴리펩타이드 X를 갖

는 바이러스에 비해 돌연변이된다. 더욱이, "적어도 X 기능이 결여된 바이러스"는 X 기능을 갖는 하나 이상의 폴리펩타이드의 X 기능 또는 활성을 상실하거나 결여된 바이러스를 의미한다. 더욱이, 당해 표현은 바이러스가 어떠한 그리고 모든 X 기능을 결여되는 것을 의미하는 것이 아니라, 그의 바이러스 계통에서 돌연변이를 가져 X 기능을 갖는 폴리펩타이드가 1) 더 이상 발현되지 않거나 2) 단지 기능 X(폴리펩타이드는 기타 고유 기능을 가질 수 있다)에 대해서만 더 이상 기능성이 없도록 함을 의미한다.

[0027] 본 발명의 백시니아 바이러스 (또는 기타 폭스바이러스)는 하나 이상의 다음 7개의 부류에서의 변경 또는 돌연변이를 가질 수 있다: 1) 인터페론-조절성 폴리펩타이드(이로써 제한되지 않지만 B8R, B18R, B13R, E3L, 및/또는 vC12L 포함) 암호화 유전자로서 바이러스는 하나 이상의 인터페론-조절성 기능을 결여하거나; 2) 보체 조절 폴리펩타이드(이로써 제한되지 않지만 VCP 포함) 암호화 유전자로서 그 결과 바이러스는 하나 이상의 보체 조절 기능이 결여되거나; 3) TNF-조절성 폴리펩타이드(이로써 제한되지 않지만 A53R 및 B28R 포함) 암호화 유전자로서 그 결과 바이러스는 하나 이상의 TNF-조절성 기능이 결여되거나; 4) 세린 프로테아제 억제제(이로써 제한되지 않지만 B13R, B22R, 및/또는 K2L 포함) 암호화 유전자로서 그 결과 바이러스는 하나 이상의 세린 프로테아제 억제제 기능이 결여되거나; 5) IL-1 β 조절자 폴리펩타이드(이로써 제한되지 않지만 B15R 포함) 암호화 유전자로서 그 결과 바이러스는 하나 이상의 IL-1 β 조절자 기능이 결여되거나; 6) 폴리펩타이드(이로써 제한되지 않지만 B5R 및/또는 A34R) 암호화 유전자로서 그 결과 백시니아 바이러스의 감염성 EEV형이 증가되거나; 또는 7) C11R, vCKBP, B7R, N1L 및/또는 A41L.

[0028] 본 발명의 기타 백시니아 바이러스는 돌연변이를 가질 수 있고 그 결과 바이러스는 vC12L IL-18-조절 기능이 결여된다. 추가로, 이러한 바이러스는 상기에서 논의된 7개 부류의 어느 하나에서의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 바이러스는 단일 부류의 폴리펩타이드로부터 하나 이상의 유전자에서 돌연변이를 가질 수 있는 것이 고려된다. 따라서, 바이러스성 계통은 당해 부류를 특징화하는 기능없이 동일 부류에서 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 폴리펩타이드를 유도하는 돌연변이를 가질 수 있다. 본 발명의 바이러스는 하나 이상의 부류의 폴리펩타이드에서 돌연변이를 가질 수 있는 것이 추가로 고려된다. 따라서, 바이러스성 계통은 8개 부류의 폴리펩타이드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 암호화 유전자에서 돌연변이를 가질 수 있고 바이러스는 암호화된 폴리펩타이드의 상응하는 기능이 결여된다. 더욱이, 본 발명의 바이러스는 동일한 부류의 폴리펩타이드로부터 및 상이한 부류의 폴리펩타이드로부터의 다수의 유전자에서 돌연변이를 가질 수 있다. 당해 출원에서 논의된 유전자 및 이의 동원 폴리펩타이드 돌연변이용 표적으로서 본 발명의 백시니아 바이러스는 이들 특정한 폴리펩타이드 및 각각의 기능이 결여되는 것으로 특이적으로 고려된다. 또한, 백시니아 바이러스에 대해 논의된 임의의 돌연변이는 부적절한 실험없이 기타 폭스바이러스에 대해 수행할 수 있다.

[0030] 하나 이상의 기능에 대하여 돌연변이되거나 무기능성일 수 있는 구체적인 폭스바이러스 폴리펩타이드는 이로써 제한되지는 않지만 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 및 vCKBP를 포함한다. 따라서, 본 발명의 폭스바이러스는 이들 상응하는 백시니아 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하는 이들 유전자 하나 이상에서 돌연변이를 가질 수 있다.

[0031] 본 발명의 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 A34R에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0032] 본 발명의 기타 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 A41L에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A34R, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다. 본 발명의 기타 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 A53R에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A34R, A41L, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0033] 본 발명의 기타 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 B5R에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A34R, A41L, A53R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

- [illegible]

E3L, K2L, vC12L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0046] 본 발명의 기타 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 vC12L에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, 및/또는 vCKBP의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0047] 본 발명의 기타 백시니아 바이러스에서, 백시니아 바이러스는 vCKBP에서 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이와 함께, 하기 폴리펩타이드 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, 및/또는 vC12L의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개중 하나 이상의 기능을 제거하는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0048] 본 발명의 특정 실시양태에서, 코펜하겐 또는 웨스턴 리저브 종을 돌연변이시켜 본 발명의 백시니아 바이러스를 생성한다. 이들 종은 상기에서 논의된 폴리펩타이드의 당해 7개의 부류의 하나 이상에서 추가로 돌연변이될 수 있다.

[0049] 본 발명의 백시니아 바이러스는 B8R, B18R, B13R, 또는 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스; B8R 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스; B13R 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스; B8R 및 B13R 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스; B8R, B13R, 또는 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스, 이들은 추가로 B28R 또는 A53R, 또는 이들 둘 다 인터페론-조절성 기능이 결여될 수 있다; B8R, B13R, 또는 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스, 이들은 추가로 B18R 인터페론-조절성 기능이 결여될 수 있다; B8R, B13R, B18R, 및 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여된 바이러스, 이들은 추가로 B28R 및/또는 A53R 인터페론-조절성 기능이 결여될 수 있다; 인터페론-조절성 기능 및 VCP 보체 조절 기능이 결여된 바이러스; 인터페론-조절성 기능 및 A53R, B28R, 및/또는 vCKBP TNF-조절성 기능이 결여된 바이러스; 인터페론-조절성 기능 및 B13R, B22R, 및/또는 K2L 세린 프로테아제 기능이 결여된 바이러스; 인터페론-조절성 기능 및 B13R 및/또는 B15R IL-1 β 조절성 기능이 결여된 바이러스; 인터페론-조절성 기능이 결여되고 A34R 또는 B5R에서의 돌연변이를 포함하여 그 결과 백시니아 바이러스의 감염성 EEV형에서의 생성에서의 증가를 가져오는 바이러스; C11R, vCKBP, B7R, N1L 및/또는 A41L 기능이 결여된 바이러스; 또는 상기에서 논의된 바와 같은 기능의 임의의 배합이 결여된 바이러스를 포함할 수 있다.

[0050] 기타 백시니아 바이러스는 돌연변이를 가져 바이러스에서 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여되게 된다. 이러한 바이러스는 추가로 상기에서 논의된 바와 같은 7개의 부류중 하나 이상에서 추가로 돌연변이를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 바이러스는 B8R, B13R, 및/또는 B18R 기능(들)이 결여되는 반면, 다른 실시양태에서, 또한 B15R IL-1 β 조절성 기능, 및/또는 상기에서 논의된 기타 기능, 예를 들어 vCKBP 및/또는 B13R 기능 및/또는 B29R TNF-조절성 기능이 결여된다.

[0051] 본 발명의 특정 실시양태에서, 폭스바이러스를 대상에게 투여하는데 사용하는데, 여기서 바이러스는 약제학적 조성물에 포함된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 인터페론(α , β 및/또는 γ) 및/또는 항암제, 예를 들어 항체, 화학요법제, 또는 치료학적 암 폴리펩타이드 암호화 핵산을 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 방법은 본원에서 논의된 폭스바이러스중 어느 하나를 사용하는 것을 포함한다. 다수의 양태는 유효량의 백시니아 바이러스를 암 세포 또는 환자에게 투여함으로써 암 세포의 치료 또는 암환자 치료를 포함한다. 특정 실시양태에서, 백시니아 바이러스는 다음 중 하나 이상을 발현할 수 없다:

[0053] a) 기능성 제1 인터페론-조절성 폴리펩타이드;

[0054] b) 기능성 보체 조절 폴리펩타이드;

[0055] c) 기능성 TNF-조절성 폴리펩타이드;

[0056] d) 기능성 세린 프로테아제 억제제;

[0057] e) 기능성 IL-1 β 조절성 폴리펩타이드;

[0058] f) 기능성 비감염성 EEV형 폴리펩타이드;

[0059] g) 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드.

- [0060] 바이러스가 a)-g) 기능성 폴리펩타이드의 하나 이상을 결여하는 것이 고려된다. "기능성 폴리펩타이드"는 동정된 기능을 함유하는 폴리펩타이드를 의미하는데, 예를 들면, 기능성 인터페론-조절성 폴리펩타이드가 결여된 바이러스는 그의 게놈이 돌연변이되어 결과적으로 바이러스는 인터페론-조절성 기능이 결여된다(모든 인터페론 조절성 폴리펩타이드 모두가 결여된 것과 반대로). 바이러스는 돌연변이된 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있는 돌연변이를 가질 수는 있지만, 생성된 폴리펩타이드가 돌연변이되어 더 이상 동정된 기능을 소유하지 못한다.
- [0061] 본 발명의 특정 방법에서, 암 세포는 종양세포이다. 더욱이, 세포에 본 발명에 조성물을 실험관내, 생체내, 또는 생체의 투여할 수 있다. 따라서, 암 세포는 환자에 있을 수 있다. 환자는 고형 종양을 가질 수 있다. 이러한 경우에, 실시양태는 추가로 종양의 모두 또는 일부를 절제함으로써 환자에 시술을 행하는 것을 포함할 수 있다. 바이러스성 조성물을 시술 전, 후 또는 동시에 환자에 투여할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 환자는 또한 직접, 내시경, 기관내, 종양내, 정맥내, 병변내, 근육내, 복강내, 국소, 경피, 국부, 동맥내, 방광내 또는 피하내로 투여할 수 있다. 바이러스 조성물을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 이상 투여할 수 있고, 이들은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24시간 마다, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5주, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개월에 투여할 수 있다.
- [0062] 암 치료 방법은 또한 환자에게 1회 이상 투여할 수 있는 화학요법 또는 방사선요법을 투여하는 것을 포함한다. 화학요법은 이로써 제한되지는 않지만, 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로르암부실, 부설판, 니트로스우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탁소테레, 탁솔, 전이백금, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토크세이트, 겐시타빈, 옥살리플라틴, 이리노테칸, 또는 이의 유사체 또는 유도체 변이체를 포함한다. 방사선요법은 이로서 제한되지는 않지만, X선 조사, UV선 조사, γ 조사, 전자빔 방사 또는 마이크로웨이브를 포함한다. 또한, 세포 또는 환자에 프로테아제 또는 펩티다제를 투여하여 세포로부터 바이러스의 감염성 EEV형의 생성을 증가시킨다. 펩티다제 또는 프로테아제는 또한 바이러스를 또한 포함하는 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 더욱이, 세포 또는 환자에 미세소관 안정화제를 투여할 수 있는데, 이로써 제한되지는 않지만, 본 발명의 방법의 일부로서 탁산을 포함한다. 폭스바이러스 또는 본원에 논의된 변형된 폭스바이러스중 어느 하나, 예를 들어 웨스턴 리저브 및 코펜하겐 백시니아 종(이의 유도체 뿐만 아니라)을 이들 배합 요법과 함께 사용할 수 있다. 예를 들면, 코펜하겐 백시니아 바이러스 종이 탁솔과 함께 사용되어 암 세포 또는 암환자에 치료효과를 달성할 수 있다.
- [0063] 특정 양태에서, 바이러스성 조성물이 투여된 암 세포는 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장직장, 식도, 위장관, 두부, 신장, 간, 폐, 비강인두, 경부, 난소, 췌장, 전립선, 피부, 위, 고환, 혀 또는 자궁 세포를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 기타 실시양태에서, 약독화된 백시니아 바이러스는 추가로 핵산 서열 암호화 이중 치료학적 펩타이드를 포함한다. 이중 치료학적 펩타이드는 본 발명의 상이한 실시양태에서 종양 억제제, 면역조절제, 혈관신생 억제제, 항혈관 폴리펩타이드, 세포독성 폴리펩타이드, 아포토시스 유도제, 프로드럭 활성화 효소, 또는 세포증식억제제를 포함한다.
- [0065] 본 발명의 방법은 IHD-J 종이거나 A34R에서 K151D 돌연변이를 포함하는 약독화된 백시니아 바이러스를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 또는, 보체 또는 보체 경로에 의한 파괴에 내성인 백시니아 바이러스를 생성하기 위해서, 바이러스는 하나 이상의 보체 억제성 단백질을 과발현하는 세포주로부터 생성될 수 있다. 보체 억제성 단백질은 CD55, CD46, 또는 CD59일 수 있다.
- [0066] 구체적인 실시양태에서, 환자에 B8R, B18R, 또는 vC12L 암호화 유전자에 돌연변이를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 포함하여 바이러스가 B8R, B18R, 또는 vC12L 인터페론 조절성 기능이 결여되게 되는 유효량의 약제학적으로 허용되는 조성물을 투여함을 포함하여 암을 치료하는 방법이 있다. "유효량"의 약제학적 조성물은 일반적으로, 암과 같은 질병 또는 그의 증후군의 정도를 탐지가능하게 및 반복적으로 경감, 감소, 최소 또는 제한 시키기에 충분한 양으로 정의된다. 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , 10^{25} , 또는 그 이상의 바이러스 입자 또는 pfus를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 회 이상 환자에게 투여할 수 있는 것이 고려된다.
- [0067] 약독화된 백시니아 바이러스는 B8R, B18R 또는 vC12L 인터페론-조절성 기능이 결여되고 또한 B13R 암호화 유전자에 돌연변이를 소유하여 당해 바이러스가 B13R 인터페론-조절성 기능이 결여되게 되는 것이 고려된다. 또 다

른 실시양태에서, 약독화된 백시니아 바이러스는 B8R, vC12L 및 B13R 인터페론-조절성 기능이 결여되지만, 기타에서, 이는 2개 이상의 B8R, B18R 또는 vC12L 인터페론 조절성 기능이 결여된다. 약독화된 백시니아 바이러스는 B8R, B18R 및 vC12L 인터페론 조절성 기능이 결여되는 것으로 구체적으로 고려된다. 또한, B8R, B18R, 또는 vC12L 인터페론 조절성 기능이 결여된 재조합 백시니아 바이러스는 하기 중 하나 이상이 추가로 결여될 수 있다:

- [0068] a) 보체 조절 폴리펩타이드 기능;
- [0069] b) TNF-조절성 기능;
- [0070] c) 세린 프로테아제 억제제 기능;
- [0071] d) IL-1 β 조절자 기능;
- [0072] e) 항감염성 EEV형 기능; 또는
- [0073] f) A41L, B7R, N1L 및/또는 vCKBP 케모카인 조절 기능 또는 C11R EGF-유사 기능.

[0074] 본 발명의 다른 실시양태는 바이러스 능력을 감소시켜 인터페론, 케모카인, 사이토킨, 보체, 또는 중화 항체에 의해 배개된 항바이러스성 반응을 억제하는 돌연변이를 포함하는 암 세포에 약독화된 백시니아 바이러스를 접촉 시킴으로써 암 세포를 사멸하는 방법을 포함한다. 특정의 실시양태는 B8R, B13R, B18R, 또는 vC12L 암호화 핵산 서열에서 돌연변이를 갖는 약독화된 백시니아 바이러스를 포함한다. 선행 단락에서 논의된 a)-f)의 하나 이상이 결여될 수 있는 것으로 추가로 고려된다.

[0075] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 약독화된 백시니아 바이러스 및 약독화된 백시니아 바이러스의 항종양 효율을 증가시키는 제제를 포함하는 치료학적 유효량의 조성물과 암을 치료하는데 유효하도록 종양 부위를 접촉함을 포함하여 암 환자에서 암을 치료하는 방법이 있다. 약독화된 백시니아 바이러스의 항종양 효율을 증가시키는 제제는 인터페론, 프로테아제, 펩티다제, 미세소관 안정화제, 화학요법제, 방사선요법, 유전자 요법 또는 면역 조절성 요법일 수 있다.

[0076] 치료학적 방법 이외에, 본 발명은 a) 백시니아 바이러스로 보체 억제성 단백질을 과발현하는 사람 세포주를 감염시키고; b) 백시니아 바이러스의 EEV형을 감염된 세포로부터 단리시킴을 포함하여 백시니아 바이러스의 강화된 EEV형을 생성하는 방법에 관한 것이다. "백시니아 바이러스의 강화된 EEV형"은 야생형 백시니아 바이러스로부터 생성된 EEV형보다 유기체의 바이러스성 분해 기작에 더 내성이거나 더 강한 백시니아 바이러스의 EEV형을 의미한다.

[0077] 특정 방법에서, 백시니아 바이러스는 A34R 단백질 암호화 유전자에서 돌연변이를 포함한다. 특정한 경우에, 돌연변이 결과 K151D 돌연변이가 일어난다. 기타 실시양태는 CD55, CD46, 또는 CD59인 보체 억제성 단백질을 포함한다. 또다른 추가의 실시양태에서, 사람 세포주는 하나 이상의 보체 억제성 단백질을 과발현한다.

[0078] 방법 이외에, 백시니아 바이러스의 강화된 EEV형을 생성하는 방법으로부터 생성된 조성물이 본 발명의 일부로서 포함된다. 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상, 또는 100% 강화된 백시니아 바이러스의 EEV형인 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물이 구체적으로 포함된다.

[0079] 유사하게, 본 발명은 백시니아 바이러스의 강화된 EEV형의 생성을 위한 사람 세포주에 관한 것이다. 이러한 세포주는 백시니아 바이러스로 감염될 수 있고, 백시니아 바이러스, 또는 백시니아 바이러스 발현 작제물을 가지고, 이는 하나 이상의 보체 억제성 폴리펩타이드를 과발현한다. 보체 억제성 폴리펩타이드는 CD55, CD46, 또는 CD59일 수 있다. 숙주 세포는 하기중 하나 이상이 결여된 백시니아 바이러스로 감염될 수 있다:

- [0080] a) 인터페론-조절성 폴리펩타이드;
- [0081] b) 보체 조절 폴리펩타이드;
- [0082] c) TNF-조절성 폴리펩타이드;
- [0083] d) 세린 프로테아제 억제제;
- [0084] e) IL-1 β 조절성 폴리펩타이드;
- [0085] f) 기능성 항감염성 EEV형 폴리펩타이드;
- [0086] g) 기능성 A41L, B7R, N1L 또는 vCKBP 케모카인 결합 폴리펩타이드 또는 C11R EGF-유사 폴리펩타이드.

- [0087] 본 발명의 다른 방법은 i) 절제가능한 종양을 가진 환자를 동정하고; (ii) 종양을 절제하고; (iii) 종양층을 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 또는 vCKBP 암호화 유전자에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 백시니아 바이러스와 접촉시킴을 포함하여 극미(microscopic) 잔류 암을 처리하는 방법을 포함한다.
- [0088] 기타 방법은 (i) 종양을 외과적으로 노출시키고; (ii) 당해 종양을 A34R, A41L, A53R, B5R, B7R, B8R, B13R, B15R, B18R, B22R, B28R, B29R, C11R, E3L, K2L, N1L, vC12L, 또는 vCKBP 기능이 결여된 약독화된 백시니아 바이러스와 접촉시킴을 포함하여 종양이 있는 환자를 치료하는 방법을 포함한다.
- [0089] 추가의 실시양태에서, 종양 환자를 치료하는 방법은 연장된 기간에 걸쳐 약독화된 백시니아 바이러스로 종양을 관류함을 포함한다. 기타 실시양태에서, 암 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하고, 이로써 환자에게 치료학적 이익을 부여함을 포함하여 암 환자에서 전이성 질환을 억제하는 방법이 있다. 본원을 통해 사용된 용어 "치료학적 이익"은 전암 및 암의 치료를 포함하여 환자의 상태의 의료학적 치료에 대해 대상의 웰빙을 촉진시키거나 증진시키는 임의의 것을 의미한다. 이의 비제한적 실시에는 특정 기간에 의한 대상의 생명 연장, 질환의 신생물질 발전의 감소 또는 지연, 과증식에서의 감소, 종양 증식의 감소, 전이의 지연, 암 세포 또는 종양 세포 증식율의 감소, 및 대상의 상태에 기인할 수 있는 대상의 통증에서의 감소를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 추가의 측면에서, i) 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하고 ii) 환자에게 화학요법 또는 방사선요법을 투여하여 대상에서 치료학적 이익을 수여함을 포함하여 환자에서 다중약물 내성 종양을 치료하는 방법이 있다. 더욱이, 유효한 양의 약독화된 백시니아 바이러스를 환자에게 투여하여 종양의 전부 또는 일부를 절제함을 포함하여 환자에서 절제불가능한 종양을 절제가능하게 하는 방법이 있다. 또는, 본 발명은 암이 화학요법 또는 방사선 요법에 내성인 암 환자에게 약독화된 백시니아 바이러스를 투여하고 화학요법 또는 방사선 요법 투여함을 포함하는 치료하는 방법을 포함한다.
- [0091] 본 발명의 기타 방법 및 조성물에 대하여 논의된 특정의 실시양태가 특정 방법 또는 조성물이 수행될 수 있는 것이 구체적으로 고려된다.
- [0092] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"와 관련하여 사용될 경우 관사(a 또는 an)의 사용은 "하나(one)"를 의미할 수 있지만, 이는 "하나 이상의(one or more, at least one, one or more than one)"의 의미와 또한 일치한다.
- [0093] 본 발명의 다른 목적, 특질 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 명백할 수 있다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 본 발명의 구체적인 실시양태를 지시하지만 단지 예시만을 위한 것이고, 본 발명의 취지 및 범주 내에서 여러가지 변화 및 변형이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 하기 도면은 본 발명의 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 존재하는 구체적인 실시양태의 상세한 설명과 함께 이들 하나 이상의 도면을 참조로 더욱 잘 이해될 것이다.
- 도 1A 및 도 1B는 A2780 사람 난소 암종 세포주(도 1A) 및 HCT116 사람 결장 암종 세포주(도 1B)에서 백시니아 바이러스 중 복제의 예를 도시한 것이다. (x축은 종이고 y축은 ml +/- S.E.당 플라크 형성 단위이다.)
- 도 2는 정상 사람 기관지상피 세포(NHBE)에서의 백시니아 바이러스 중 복제의 예를 도시한 것이다.(x축은 종이고 y축은 ml +/- S.E.당 플라크 형성 단위이다.)
- 도 3은 백시니아 바이러스 종에 대해 암 세포(A2780)에서의 발병율과 정상 세포(NHBE)에서의 (발병율)예를 도시한 것이다.(x축은 종이고 y축은 ml +/- S.E.당 플라크 형성 단위이다.)
- 도 4는 백시니아 바이러스 종에 대해 암 세포(HCT116)에서의 발병율과 정상 세포(NHBE)에서의 (발병율)예를 도시한 것이다.(x축은 종이고 y축은 ml +/- S.E.당 플라크 형성 단위이다.) 발병율은 정상 또는 비정상 종양 세포에 대해 PFU에 비교된 종양 세포용 PFU 사이의 비율이다.
- 도 5A 및 도 5B는 HCT116(도 5B) 및 LNCaP(도 5A) 세포주에서 백시니아 바이러스(코펜하겐 종) 및 파클리탁셀 사이의 상승작용을 예시하는 도 6, 7, 8 및 9에서 존재하는 데이터로부터 유도된 예시적인 이소볼로그래프 분석을

도시한 것이다.

도 6은 파클리탁셀 및 백시니아 바이러스의 배합물을 사용한 예시적인 MTS 검정으로부터 유도된 예시적인 HCT116 세포 증식 데이터를 도시한 것이다.

도 7은 파클리탁셀 및 백시니아 바이러스의 배합물을 사용한 예시적인 MTS 검정으로부터 유도된 예시적인 HCT116 세포 증식 데이터를 도시한 것이다.

도 8은 파클리탁셀 및 백시니아 바이러스의 배합물을 사용한 예시적인 MTS 검정으로부터 유도된 예시적인 LNCaP 세포 증식 데이터를 도시한 것이다.

도 9는 파클리탁셀 및 백시니아 바이러스의 배합물을 사용한 예시적인 MTS 검정으로부터 유도된 예시적인 LNCaP 세포 증식 데이터를 도시한 것이다.

도 10은 IFN-내성 및 IFN-민감성 세포가 WR 또는 WR-B18R(-) +/- IFN 처리 (IFN-알파로 감염후 5시간 처리됨) 로 감염된 예시적인 연구를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095]

예시적인 실시양태의 설명

[0096]

본 발명은 암 치료를 위한 종양분해성 (oncolytic) 폭스바이러스에 관한 것이다. 폭스 바이러스를 유전공학적으로 처리하여 더 효율적이거나 더 효과적으로 암 세포를 사멸시키고/시키거나 비-암세포에 덜 독성이거나 손상이 덜하도록 한다. 더 구체적으로, 폭스바이러스를 유전자 산물이 변형되도록 돌연변이시킴으로써 바이러스가 숙주를 더 잘 감염시킬 수 있고 암 세포를 더 잘 감염시킬 수 있도록 할 수 있다.

[0097]

I. 폭스바이러스

[0098]

바이러스는 종종 면역조절성 분자, 예를 들어 인터페론($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$) 및 종양 괴사 인자- α (TNF)에 의해 불활성화되거나 억제되거나 또는 제거된다 [참조: Moss, 1996]. 숙주 조직 및 염증성/면역 세포는 종종 이들 분자를 바이러스성 감염에 반응하여 분비한다. 이들 분자는 염증성 세포 및 림프구의 보충 및/또는 활성화를 통해 직접적인 항바이러스 효과 및/또는 간접적인 효과를 갖는다. 이들 면역학적 제거 기작의 중요성으로 인해, 바이러스는 이들 사이토킨/케모카인 및 인터페론의 유도 및/또는 기능을 억제하는 유전자 산물을 발현하도록 발전되어 왔다. 예를 들면, 백시니아 바이러스(VV; 및 특정의 기타 폭스바이러스)는 분비된 단백질 vCKBP (B29R)를 암호화하고 이는 CC 케모카인을 결합하고 억제한다(예: RANTES, 예오탁신, MIP-1-알파) [참조: Alcamì *et al.*, 1998]. 특정의 VV 종은 TNF를 결합하고 불활성화하는 분비된 바이러스성 단백질을 또한 발현한다(예: Lister A53R) [참조: Alcamì *et al.*, 1999]. 대부분의 폭스바이러스 종은 인터페론- α/β (예: B18R) 또는 인터페론- γ (B8R)의 기능을 결합하고 억제하는 분비된 단백질을 암호화하는 유전자를 갖는다. vC12L은 IL-18-결합 단백질이고 이는 IL-18이 IFN- γ 및 NK 세포/세포독성 T-세포 활성화되는 것을 예방한다.

[0099]

대부분의 폭스바이러스 병독성 조사는 마우스를 대상으로 수행되어왔다. 그러나 이들 단백질의 다수, 전부는 아니지만(예를 들어, B18R은 아니다), 마우스에서 활성이다. 이들 단백질이 표적 사이토킨의 마우스 버전에 대해 활성인 상황에서, 이들 유전자의 결실로, 이들 유전자에서의 결실 또는 기능성 돌연변이와 함께 VV 돌연변이체로 감소된 병독성 및 증가된 안전성이 유도된다. 또한, 이들 돌연변이체에 대한 염증/면역 반응 및 바이러스성 제거는 종종 억제성 단백질을 발현하는 모(parental) 바이러스 종에 비해 증가하였다. 예를 들면, 폭스바이러스-분비된 단백질의 T1/35kDa과(family)(케모카인-결합/-억제성 단백질)는 바이러스 감염된 조직으로의 백혈구 침윤에서 현저한 증가를 유도할 수 있다 [참조: Graham *et al.*, 1997]. VV에서의 vC12L 유전자 결실은 감소된 바이러스성 역가/독성 이어서 마우스에서의 비내 투여를 유도하고; 또한, NK 세포 및 세포독성 T-림프구 활성이 IFN- γ 유도와 함께 증가한다 [참조: Smith *et al.*, 2000].

[0100]

믹소마 바이러스 T7 유전자(IFN- γ 에 결합할 수 있음 및 광범위한 케모카인)의 결실은 병독성을 감소시키고 독성 모델 [참조: Upton *et al.*, 1992; Mossman *et al.*, 1996]에서 조직 염증/침윤을 현저하게 증가시킨다. 믹소마 바이러스로부터 M-T2 유전자의 결실은 또한 래빗 모델에서 병독성을 감소시켰다 [참조: Upton *et al.*, 1991]. B18R 항-인터페론- α/β 유전자 산물의 결실은 또한 IFN-매개된 제거에 대한 증가된 바이러스 민감성, 정상 조직에서의 감소된 역가 및 감소된 병독성을 유도한다 [참조: Symons *et al.*, 1995; Colamonici *et al.*, 1995; Alcamì *et al.*, 2000]. 요약하면, 이러한 바이러스 유전자 산물은 항바이러스 면역 반응 및 바이러스-감

염된 조직내로의 염증 세포 침윤을 감소시키도록 기능한다. 결실/돌연변이를 통한 단백질 기능의 상실은 숙주 조직내의 바이러스의 감소된 병독성 및/또는 증가된 염증 촉진 특성을 유도한다.

[0101] 사이토킨 및 케모카인은 강력한 항종양 효과를 가질 수 있다 [참조: Vicari *et al.*, 2002; Homey *et al.*, 2002]. 이러한 효과는 종양 세포 자체에 직접적으로(예: TNF) 가해질 수 있거나 비-암성 세포에 대한 효과를 통해 간접적일 수 있다. 후자의 예는 종양-관련 혈관에 대한 독성을 유발함으로써 항종양 효과를 가질 수 있는 TNF이며, 이는 종양을 향하는 혈류의 상실에 이어서 종양 괴사를 유도한다. 또한, 케모카인은 호중구, 호산구, 대식세포 및/또는 림프구와 같은 면역 이펙터 세포를 동원시키도록(및 일부 경우에는 활성화시키도록) 작용할 수 있다. 이러한 면역 이펙터 세포는 다수의 기작에 의해 종양 파괴를 유발할 수 있다. 상기 기작에는 항종양 사이토킨(예: TNF)의 발현, fas-리간드의 발현, 퍼포린과 그랜자임의 발현, 천연살해세포(natural killer cell) 등의 동원이 포함된다. 염증 반응은 결국에는 전신의 종양-특이적 면역을 유도할 수 있다. 마지막으로, 이러한 사이토킨(예: TNF) 또는 케모카인 중 다수는 화학요법 또는 방사선 요법과 상승작용적으로 작용하여 종양을 파괴할 수 있다.

[0102] 이들 면역자극 단백질의 재조합 형태의 임상적으로 효과적인 전신 투여는 (1) 전신 투여시의 심각한 독성의 유도 및 (2) 종양 조직내의 국소 발현이 국소 침윤과 항종양 효과를 자극하는 것을 필요로 한다는 사실에 의해 실행 불가능하다. 접근법은 종양 덩어리내의 이들 분자의 높은 국소 농도를 달성하면서 전신 순환계 중의 수준은 최소화해야 할 필요가 있다. 사이토킨 또는 케모카인의 효능을 증진시키고자 하는 시도로서 바이러스를 사이토킨 또는 케모카인 유전자를 발현하도록 조작할 수 있다. 복제-선택성 벡터로부터의 이들 유전자의 발현은 비-복제 바이러스로부터의 발현에 비해서 많은 잠재적 잇점을 갖고 있다. 복제 바이러스로부터의 발현은 종양 덩어리내의 보다 높은 국소 농도를 초래할 수 있으며, 또한 복제 바이러스는 종양 세포 파괴/종양용해 및 염증 촉진 환경하의 종양 항원의 방출을 통해 항종양 면역을 유도하는데 도움이 될 수 있다. 그러나, 이러한 접근법에는 몇가지 제한이 있다. 높은 국소 농도로 발현되는 경우, 독성일 수 있는 유전자를 갖는 복제 능력이 있는 (replication-competent) 바이러스(그럼에도 불구하고 종양-선택성)의 환경으로의 방출 가능성으로부터 심각한 안정성 문제가 발생한다. 따라서, 계놈으로부터 강력한 염증 촉진 유전자를 발현하는 바이러스는 처리된 환자 및 일반 대중에 대한 안정성 문제에 직면할 수 있다. 상기 유전자를 발현하는, 종양 표적화 복제-선택성 바이러스의 경우라도, 유전자 발현은 정상 조직에서 발생하여 독성을 초래할 수 있다. 또한, 크기 제한은 아데노바이러스와 같은 바이러스로부터 다수의 및/또는 거대 유전자의 발현을 방지하며, 이들 분자는 분명히 배합되어 보다 효과적으로 작용할 것이다. 마지막으로, 유용한 다수의 종양용해성 바이러스는 소염 단백질을 발현하므로 이러한 바이러스는 감염된 종양 덩어리내의 염증 촉진 환경의 유도를 길항시킬 것이다. 그 결과는 항종양 면역, 항혈관 효과 및 화학요법-방사선요법-면감화의 유도를 억제하는 것일 수 있다.

[0103] A. 백시니아 바이러스

[0104] 1. 인터페론-조절성 폴리펩타이드

[0105] 인터페론- α / β 는 몇가지 기작을 통해 바이러스 복제를 차단한다. 인터페론- γ 는 미약한 직접적 바이러스 억제 효과를 갖지만, 몇가지 기작을 통해 세포-매개성 면역의 강력한 유도인자이다. 바이러스는 인터페론의 항바이러스 효과를 길항시킬 수 있는 분비된 유전자 산물을 발현시키도록 발전되어 왔다. 예를 들어, 백시니아 바이러스(및 기타 폭스바이러스)는, 각각 인터페론- γ 및 α / β 에 결합하는 분비된 단백질을 암호화한다 [참조: Smith *et al.*, 1997; Symons *et al.*, 1995; Alcamì *et al.*, 2000]. 인터페론 유도를 감소시키는 백시니아 유전자 유전자 산물의 추가 예는 인터페론- γ -유도 인자 IL-18의 활성화를 억제하는 카스파제-1 억제제 B13R이다. 인터페론 조절성 폴리펩타이드에는 백시니아 바이러스의 코펜하겐 종과 같은 기타 바이러스 종에서는 B19R과 명명될 수 있는 B18R; B8R; B13R; vC12L; A53R; E3L 및 유사한 활성 또는 특성을 갖는 기타 바이러스 폴리펩타이드가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. IFN 조절성 폴리펩타이드는 IFN α 및/또는 IFN β 경로를 우선적으로 조절하는 폴리펩타이드(예: B18R, B8R, B13R 또는 vC12L) 및 IFN γ 경로를 조절하는 폴리펩타이드(예: B8R, B13R 또는 vC12L)의 비배타적 부류로 분류될 수 있다.

[0106] 암 세포는 흔히 인터페론의 효과에 대해 내성이 있다. 수많은 기작이 관여한다. 이는 암 세포의 공통된 특징인 ras 시그널 형질도입 경로 활성화(예를 들어, ras 돌연변이, 상부 성장 인자 수용체 과발현/돌연변이 등에 의해)가 PKCR 억제를 유도한다는 사실을 포함한다. 또한, 림프구는 종양 세포에 의한 IL-10 생산 및 fas-L 발현을 포함하는 다양한 기작에 의해 종양 덩어리내에서 종종 억제된다. 림프구가 인터페론- γ 생산의 주요 공급원이기 때문에, 림프구 억제는 종양에서의 인터페론- γ 생산의 감소를 유도한다. 따라서, 종양 덩어리는 인터

페론의 효과로부터의 보호소가 되는 경향이 있다. 또한, 인터페론은 그 자체로 항종양 효과를 가질 수 있다. 예를 들어, 인터페론- γ 은 MHC I형-관련 항원 제시를 증가시킬 수 있으며, 이는 종양 세포의 보다 효과적인 CTL-매개된 치사를 가능하게 할 것이다. 예를 들어, IFN- α/β 는 종양 덩어리내의 혈관신생을 차단하여 종양 성장을 차단할 수 있다.

[0107] 2. 보체 조절 폴리펩타이드

[0108] 바이러스 병원체의 제거에 대한 주요 기작은 보체-의존적 조절에 의한 숙주내의 감염된 세포 또는 유기체내의 비리온의 치사이다. 감염된 세포가 사멸함에 따라 지속적으로 감염성 바이러스를 생산하는 것은 불가능하다. 또한, 아포토시스 동안 DNA를 분해시키는 세포내 효소가 방출된다. 상기 효소는 바이러스 DNA 분해 및 바이러스 불활성화를 유도할 수 있다. 아포토시스는 활성화된 보체의 결합 및 보체 막 공격 복합체(complement membrane attack complex)를 포함하는 수많은 기작에 의해 감소될 수 있다. 백시니아 바이러스와 같은 폭스바이러스는 바이러스 및/또는 바이러스-감염된 세포의 보체-매개된 제거를 길항시킬 수 있도록 발전되어 왔다. 따라서, 이러한 유전자는 보체-의존적 기작에 의해 아포토시스를 방지하고 바이러스 제거를 억제함으로써, 바이러스 감염을 진행시키고 바이러스 병독성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 백시니아 바이러스 보체 조절 단백질(VCP; 예: C2IL)은 보체-매개성 세포 치사 및/또는 바이러스 불활성화를 예방하는 역할을 한다 [참조: Isaacs *et al.*, 1992]. VCP는 소염 효과도 갖고 있는데, 이는 이의 발현이 바이러스에 의해 감염된 조직내로의 백혈구 침윤을 감소시키기 때문이다. 보체 조절 폴리펩타이드에는 C3L 또는 C2IL로서도 공지된 VCP가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0109] 암 세포는 흔히 세포성 항-보체 단백질을 과발현하며, 이는 암 세포가 보체 공격 +/- 종양-특이적 항체보다 오래 생존하도록 한다 [참조: Caragine *et al.*, 2002; Durrant *et al.*, 2001; Andoh *et al.* 2002]. 따라서, 보체-매개된 치사에 대한 고유한 내성으로 인해 종양 세포를 우선적으로 표적화하는 제제는 광범위한 사람 암에서 선택성과 잠재적 효능을 가질 것이다 [참조: Durrant *et al.*, 2001]. 또한, 암 세포의 특징 중 하나는 정상적인 아포토시스 기작의 상실이다 [참조: Gross *et al.*, 1999]. 아포토시스에 대한 내성 뿐만 아니라 면역학적 화학요법제 및 방사선요법제를 포함하는 항종양제에 대한 내성은 발암을 촉진한다 [참조: Eliopoulos *et al.*, 1995]. 아포토시스 억제는 아포토시스-촉진성 분자 기능(예: bax)의 상실, 항-아포토시스 분자(예: bcl-2)의 수준/기능의 증가 및 마지막으로 보체 민감성의 상실에 의해 매개될 수 있다.

[0110] 3. TNF-조절성 폴리펩타이드

[0111] 바이러스 병원체의 제거에 대한 각종 기작 중 하나는 상기한 바와 같은 아포토시스의 유도체 의한 숙주내 감염된 세포의 치사이다. 아포토시스는 세포내 시그널전달 단단계를 촉발하는 세포 TNF 수용체에 대한 TNF 및 림프 독소-알파(LT α)의 결합을 포함할 뿐만 아니라 아포토시스성 세포 사멸을 유도하는 수많은 기작에 의해 유도될 수 있다 [참조: Wallach *et al.*, 1999]

[0112] 일부 백시니아 바이러스 종을 포함하는 폭스바이러스의 다양한 종은 바이러스 및/또는 바이러스-감염된 세포의 TNF-매개된 제거를 길항시킬 수 있는 유전자 산물을 발현하도록 발전되어 왔다. 이러한 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 세포의 TNF에 결합하여 격리시킴으로써 TNF의 염증 촉진 및 아포토시스 유도 활성을 우회시켜 바이러스 제거를 억제한다. 바이러스가 제거되지 않기 때문에 바이러스 감염이 진행되어 바이러스 병독성이 증가하게 된다. 폭스바이러스 과의 다양한 구성원은 분비된 바이러스 TNF 수용체(vTNFR)를 발현한다. 예를 들어, 몇가지 폭스바이러스는 믹소마(T2 단백질)와 같은 vTNFR를 암호화하며, 우두 및 백시니아 바이러스 종(예: 리스트어(Listeria))은 CrmB, CrmC (A53R), CrmD, CrmE, B28R 단백질 및/또는 이의 등가물 중 하나 이상을 암호화할 수 있다. 이러한 vTNFR는 TNF-매개된 세포 치사 및/또는 바이러스 불활성화를 예방하는 역할을 한다 [참조: Saraiva and Alcamí, 2001]. TNF 조절성 폴리펩타이드에는 A53R, B28R(이 단백질은 존재하지만 백시니아 바이러스의 코펜하겐 종에서는 불활성일 수 있다) 및 유사한 활성이나 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0113] 암 세포의 특징 중 하나는 TNF의 항암 활성에 대한 민감성과 같은 성장 조절에 대한 다수의 분자 기작에 대한 민감성의 상실을 유도할 수 있는 비정상적 유전자 발현이다.

[0114] 4. 세린 프로테아제 억제제

[0115] 바이러스 병원체의 제거에 대한 주요 기작은 숙주내 감염된 세포에서의 아포토시스의 유도이다. 감염된 세포가 사멸함에 따라 지속적으로 감염성 바이러스를 생산하는 것은 불가능하다. 또한, 아포토시스 동안 DNA를 분해시키는 세포내 효소가 방출된다. 상기 효소는 바이러스 DNA 분해 및 바이러스 불활성화를 유도할 수 있다. 아포토시스는 사이토킨(예: 종양 괴사 인자)의 결합, 세포독성 T-림프구에 의한 그랜자임 생산 또는 fas-리간드 결합을 포함하는 수많은 기작에 의해 유도될 수 있으며, 카스파제 활성화는 마지막의 공통된 아포토시스 경로의 결정적 부분이다. 바이러스는 fas-리간드 또는 종양 괴사 인자(TNF)/TNF-관련 분자(예: 아데노바이러스의 E3 10.4/ 14.5, 14.7 유전자, 참조: Wold *et al.*, 1994; 아데노바이러스의 E1B-19kD, 참조 Boyd *et al.*, 1994; 우두바이러스의 crmA; 백시니아 바이러스로부터의 B13R)를 포함하는 분자에 의해 유도된 세포내 시그널전달 다단계를 길항시킬 수 있는 유전자 산물을 발현하도록 발전되어 왔다 [참조: Dobbstein *et al.*, 1996; Kettle *et al.*, 1997]. 이러한 유전자 산물은 아포토시스-유도 분자에 의한 아포토시스를 방지하여, 사이토킨, fas, 그랜자임 또는 기타 아포토시스 자극인자의 존재에도 불구하고 바이러스 복제를 진행할 수 있도록 한다.

[0116] VV SPI-2/ B13R는 우두 CrmA에 매우 상동성이며, SPI-1(VV)는 CrmA에 대해 약간 상동성이다 [참조: Dobbstein *et al.*, 1996]. 상기 단백질들은 세르핀(세린 프로테아제 억제제)이며, CrmA와 SPI-2는 둘다 각종 형태의 아포토시스를 방지하는 역할을 한다. 예를 들어, 인터류킨-1 β -전환 효소(ICE)와 그랜자임의 억제는 감염된 세포의 아포토시스를 방지할 수 있다. 이러한 유전자 산물은 또한 소염 효과를 갖는다. 이들 유전자 산물은 IL-18의 활성화를 억제할 수 있으며, 이는 이어서 IFN- γ 의 IL-18-매개성 유도를 감소시킬 수 있다. 이로써, 세포-매개성 면역에 미치는 IFN- γ 의 면역자극 효과가 억제된다 [참조: Kettle *et al.*, 1997]. SPI에는 B13R, B22R 및 유사한 활성이나 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0117] 암 세포의 특징 중 하나는 정상적인 아포토시스 기작의 상실이다 [참조: Gross *et al.*, 1999]. 아포토시스에 대한 내성 뿐만 아니라 면역학적 화학요법제 및 방사선요법제를 포함하는 항종양제에 대한 내성은 발암을 촉진한다 [참조: Eliopoulos *et al.*, 1995]. 아포토시스 억제는 아포토시스-촉진성 분자 기능(예: bax)의 상실, 항-아포토시스 분자(예: bcl-2)의 수준/기능의 증가 및 마지막으로 보체 민감성의 상실에 의해 매개될 수 있다.

[0118] 5. IL-1 β -조절성 폴리펩타이드

[0119] IL-1 β 는 국소적으로 및 또한 전신계적으로 작용하는 생물학적 활성 인자이다. IL-1 β 와 IL-1 α 간의 단지 소수의 기능적 차이가 기술되어 있다. IL-1 β 의 수많은 생물학적 활성은 IL-1이 기술된 다수의 상이한 약어로 예시된다. IL-1은 돼지 세포에서 불활성인 사람 IL-1 β 를 제외하고는 중 특이성을 나타내지 않는다. IL-1의 생물학적 활성 중 일부는 ACTH(코르티코트로핀), PGE2(프로스타글란딘 E2), PF4(혈소판 인자-4), CSF(콜로니 자극 인자), IL-6 및 IL-8를 포함하는 기타 매개인자의 합성을 유도함으로써 간접적으로 매개된다. IL-1의 합성은 TNF- α , IFN- α , IFN- β 및 IFN- γ 를 포함하는 기타 사이토킨에 의해 유도될 수 있으며 또한 세균 내독소, 바이러스, 유사분열촉진물질 및 항원에 의해서도 유도될 수 있다. IL-1의 주요한 생물학적 활성은 IL-2를 분비하고 IL-2 수용체를 발현하도록 유도되는 T-헬퍼 세포의 자극이다. 바이러스로 감염된 대식세포는 T-세포 성숙에 결합이 있는 환자에서 기회성 감염 및 세포의 형질전환을 원조할 수 있는 다량의 IL-1 억제제를 생산한다. IL-1에 B-세포에 직접적으로 작용하여 B-세포의 증식 및 면역글로불린의 합성을 촉진한다. IL-1은 또한 B-세포가 IL-5에 반응성이 되도록 하는 시발 인자(priming factor) 중 하나로서 작용한다. IL-1은 NK-세포와 섬유모세포, 흉선세포, 아교모세포종 세포의 증식 및 활성화를 자극한다.

[0120] 바이러스의 단백질에 의해서 IL-1 β 합성을 차단하는 것은 IL-1에 의해 유도된 전신의 항바이러스 반응이 억제되거나 감소되도록 하는 바이러스 전략으로서 간주된다. B15R과 유사한 활성을 갖는 IL-1의 기능을 효과적으로 차단하는 결합 단백질은 우두 바이러스의 유전자에 의해 암호될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 백시니아 바이러스는 또한 사이토킨에 대한 수용체와 유사하게 행동하는 B8R로 명명된 또 다른 단백질을 암호화한다 [참조: Alcamí and Smith, 1992; Spriggs *et al.*, 1992]. IL-1 조절성 단백질에는 B13R, B15R 및 유사한 활성이나 특성을 갖는 기타 단백질이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0121] 암 세포의 특징 중 하나는 IL-1의 항암 활성에 대한 민감성과 같은 성장 조절에 대한 수많은 분자 기작에 대한 민감성의 상실을 유도할 수 있는 비정상적 유전자 발현이다. 따라서, 바이러스의 면역조절성 기작은 종양 미세환경내의 바이러스 증식을 위해 요구되지 않을 수 있다.

[0122] 6. EEV형

[0123] 전이성 종양 부위로의 바이러스 확산 및 심지어 감염된 고형 종양 덩어리내에서의 바이러스 확산은 일반적으로 비효과적이다 [참조: Heise *et al.*, 1999]. 정맥내 투여는 전형적으로 항체(예: 아데노바이러스의 경우) [참조: Kay *et al.*, 1997] 및/또는 보체계(예: HSV의 경우) [참조: Ikeda *et al.*, 1999]에 의한 바이러스 제거 또는 불활성화를 야기한다. 이러한 면역 매개성 기작 이외에도, 이들 바이러스의 생분포는 종양 덩어리내가 아니라 정상 조직내에 대다수의 정맥내 바이러스가 축적되도록 한다. 예를 들어, 정맥내 아데노바이러스는 주로 간과 비장내에서 치사되며; 심지어 면역결핍 마우스에서도 주사된 바이러스의 0.1%만이 종양내에 축적된다 [참조: Heise *et al.*, 1999]. 따라서, 면역결핍 마우스 종양 모델에서 극히 높은 상대적 용량을 사용하여 일부 적당한 항종양 효능이 입증될 수 있다 해도, 정맥내 전달은 극히 비효과적이며 효능이 상당히 제한된다.

[0124] 백시니아 바이러스는 고형 종양내에서 복제하여 괴사를 유발하는 능력을 갖고 있다. 또한, 티미딘 키나제-결실 돌연변이체는 종양 덩어리와 난소 조직에 감염되어 마우스 종양 모델 시스템에서 우선적으로 마커 유전자를 발현할 수 있다 [참조: Gnant *et al.*, 1999]. 그러나, 상기 연구에서는 일반적으로 5일 이상이 경과한 후에 마커 유전자 발현에 기초하여 종양 표적화를 측정하였기 때문에, 바이러스가 종양/난소 조직내에 우선적으로 축적되거나, 유전자를 발현하거나 복제하는지는 불확실하다 [참조: Puhlmann *et al.*, 2000]. 기작에 관계없이, 추가의 형질전환유전자를 함유하지 않는 상기 바이러스의 항종양 효과는 통계학적으로 유의적이지 않았다 [참조: Gnant *et al.*, 1999]. 대조적으로, 종양내 바이러스 주사는 유의적인 항종양 효과를 지녔다 [참조: McCart *et al.* 2000]. 따라서, 종양으로의 정맥내 전달이 개선되었다면 정맥내 효과는 개선될 수 있었을 것이다.

[0125] 백시니아 바이러스는 세포내에서 복제하고 세포내 바이러스(IMV, 세포내 성숙 바이러스 (intracellular mature virus); IEV, 세포내 외피 바이러스 (intracellular enveloped virus))와 세포외 바이러스(EEV, 세포외 외피 바이러스 (extracellular enveloped virus); CEV, 세포 부착성 세포외 바이러스 (cell-associated extracellular virus)) 둘다를 생산한다 [참조: Smith *et al.*, 1998]. IMV는 야생형 백시니아 바이러스에 의한 복제 후에 바이러스 생산량의 약 99%를 차지한다. 상기 바이러스 형태는 환경에서 비교적 안정하여 개체 간의 확산에 대한 주된 원인이 되고, 대조적으로 상기 바이러스는 세포로부터의 비효율적 방출 및 보체 및/또는 항체 중화에 대한 민감성 때문에 감염된 숙주내에서 효과적으로 확산되지 못한다. 대조적으로, EEV는 세포의 환경으로 방출되고 전형적으로는 바이러스 생산량의 약 1%만을 차지한다 [참조: Smith *et al.*, 1998]. EEV는 감염된 숙주내에서의 바이러스 확산의 원인이 되며 숙주 외부에서 비교적 쉽게 분해된다. 중요한 것은, EEV가 혈류내에서 이의 중화를 억제하도록 발달된 몇가지 기작을 갖고 있다는 것이다. 먼저, EEV는 보체에 대해 비교적 내성인데 [참조: Vanderplasschen *et al.*, 1998], 이러한 특징은 이의 외부 막 층내로의 보체의 숙주 세포 억제제의 혼입 및 국소 세포외 환경으로의 백시니아 바이러스 보체 조절 단백질(VCP)의 분비로 인한 것이다. 둘째로, EEV는 IMV에 비해서 중화 항체 효과에 대해 비교적 내성이 있다 [참조: Smith *et al.*, 1997]. 또한, EEV는 감염 후에 IMV(이는 세포 사멸 동안에만/후에만 방출된다)에 비해서 이른 시점(예: 4 내지 6 시간)에서 방출되므로, EEV형의 확산은 보다 신속하다 [참조: Blasco *et al.*, 1993].

[0126] 그러나, 불행히도, 야생형 백시니아 바이러스는 비교적 매우 소량의 EEV만을 생산한다. 또한, 이제까지 백시니아 바이러스(즉, 바이러스의 주사량) 처리는 세포내 바이러스 형태로 제한되었다. 표준 백시니아 바이러스(VV) 제조 및 정제 과정은 EEV 불활성화를 유도하였으며 [참조: Smith *et al.*, 1998], 상기 바이러스를 제조하기 위해 흔히 비-사람 세포주가 사용되며, 비-사람 세포주로부터의 EEV는 보체 매개성 제거(EEV에 의해 세포로부터 획득된 보체 억제성 단백질은 중 제한적 효과를 갖는다)로부터 보호되지 않을 것이다. 따라서, 백시니아 바이러스 효능은 중화에 대한 IMV형태의 상대적 민감성 및 고형 종양 덩어리내의 이의 비효율적 확산에 의해 제한되어 왔으며, 이러한 확산은 전형적으로 세포로부터 인접 세포까지이다. 혈류 또는 림프관을 통한 원위 종양 덩어리로의 IMV 확산도 또한 비효율적이다.

[0127] 따라서, 백시니아 바이러스의 드문 EEV형은 이제까지 환자에서 사용된 백시니아 바이러스 형태보다 우수하도록 하는 천연적으로 획득된 특징을 갖고 있으며; EEV는 국소적으로 고형 종양을 통한 국소적 또는 원위 종양 부위로의 신속하고 효율적인 확산을 위해 최적화된다. EEV가 보체 효과에 대해 비교적 내성이 있기 때문에, EEV를 동일한 종의 세포 유형에서 성장시킨 경우, 이러한 바이러스 형태는 안정성이 증진되고, 정맥내 투여 후에 표준 백시니아 바이러스 제제(이는 거의 전적으로 IMV만을 함유한다)에 비해서 혈중에서 보다 장기간 활성을 보유할 것이다 [참조: Smith *et al.*, 1998]. EEV는 항체 매개성 중화에 대해 내성이 있기 때문에, 이러한 바이러스 형태는 정맥내 투여 후에 표준 백시니아 바이러스 제제(이는 거의 전적으로 IMV만을 함유한다)에 비해서 혈중에서 보다 장기간 활성을 보유할 것이다 [참조: Vanderplasschen *et al.*, 1998]. 이러한 특징은 일단 중화 항체 수준이 증가된 후에 반복적 투여를 위해 특히 중요할 수 있으며, 모든 승인된 항암 요법은 반복 투여를 필요로 한

다. 따라서, 백시니아 및 기타 포크스바이러스의 EEV형은 혈류를 통해서 치료학적 바이러스 및 이의 유전적 하중을 종양으로 우수하게 전달할 것이다. 이는 표준 포크스바이러스 제제에 비해서 증진된 전신성 효과를 유도할 것이다. 마지막으로, EEV가 신체 외부에서는 극히 불안정하기 때문에, 일반 대중에서 개체에의 감염 위험이 현저하게 감소될 것이다. 바이러스의 EEV 형태의 조절에 관여하는 폴리펩타이드에는 A34R, B5R, 및 포크스바이러스의 EEV형의 생산에 영향을 미치는 다양한 기타 단백질이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. A34R의 코돈 151에서 리신으로부터 아스파르트산으로의 돌연변이(K151D 돌연변이)는 A34R 단백질이 더욱 더 EEV형을 세포 막에 속박할 수 없도록 만든다. B5R는 보체에 결합할 수 있는 EEV-막 결합형 폴리펩타이드이다. A43R의 전체 결실은 증가된 EEV 방출을 유도할 수 있지만, 바이러스의 감염력을 현저하게 감소시킬 수 있으며, K151D 돌연변이는 방출된 바이러스의 감염력은 유지하면서 EEV 방출을 증가시킨다. B5R는 VCP(항-보체)와 상동성인 서열을 갖고 있지만, 보체 억제제는 아직 증명되지 않았다.

[0128] 간략하게 언급하면, 강화된 EEV형을 동정하는 한가지 방법은 다음과 같다. EEV를 빙냉 MEM 속에 회석시키고, 빙냉 MEM 속에 회석된 활성 또는 열-불활성화된(56°C, 30분, 대조군) 혈장과 혼합(1:1 용적)한다(혈장의 최종 회석율 1/10, 1/20 또는 1/30). 7°C에서 75분 동안 항온처리한 후, 샘플을 빙상에서 냉각시키고 mAb 5B4/2F2를 신선한 EEV 샘플에 첨가하여 모든 오염물질(IMV 및 파열된 EEV)을 중화시킨다. 이어서, 비리온을 빙상에서 1시간 동안 RK13 세포에 결합시키고, 보체와 미결합된 비리온을 세척 제거하고, 2일 후에 플라크의 수를 계수한다. 플라크의 수가 많을수록 보체에 대한 내성이 더 크다 [참조: Vanderplasschen *et al.* PNAS 1998; 95(13): 7544-7549, 이는 본원에서 참조로 인용된다]. 백시니아 바이러스의 EEV형의 동정을 기술하는 예시적 방법은 문헌 [참조: Blasco *et al.* 1992 (본원에서 참조로 인용됨)]에서 찾아볼 수 있다.

[0129] 7. 기타 폴리펩타이드

[0130] 기타 바이러스 면역조절성 폴리펩타이드는 면역 반응의 기타 매개인자에 결합하고/하거나 면역 반응과 관련된 분자 경로를 조절하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, B29R(이 단백질은 존재하지만, 백시니아 바이러스의 코펜하겐 종에서는 불활성일 수 있다), C23L, vCKBP, A41L 및 유사한 활성이나 특성을 갖는 폴리펩타이드와 같은 케모카인 결합 폴리펩타이드. 바이러스 EGF-유사 성장인자인 백시니아 바이러스 성장 인자(예: C11L)와 같은 기타 백시니아 바이러스 단백질도 본 발명의 일부 양태에서 변경에 대한 표적일 수 있다. 바이러스 면역조절성 인자로서 분류될 수 있는 기타 폴리펩타이드에는 B7R, N1L 또는 포크스바이러스의 병독성을 증가시키는 활성 또는 특성을 갖는 기타 폴리펩타이드가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0131] 8. 백시니아 바이러스-유도된 세포 융합

[0132] 본 발명의 특정 양태에서, A56R 또는 K2L 암호화 핵 유전자의 변경, 결실 또는 돌연변이는 VV 감염에 의해 유도된 세포-세포 융합 또는 합포체 형성을 유도할 수 있다. 백시니아 바이러스-유도된 세포 융합은 전형적으로 종양내 바이러스 확산으로 인해 VV의 항종양 효능을 증가시킬 수 있다. 감염되지 않은 인접 세포의 치사 및 감염(즉, 관중 효과(bystander effect))는 이들 유전자 중 하나 또는 둘다에서의 돌연변이를 갖는 VV에서 보다 효과적일 수 있으며, 이는 개선된 국소 항종양 효과를 초래할 수 있다.

[0133] B. 기타 포크스바이러스

[0134] 백시니아 바이러스는 포크스바이러스 과, 코르도포크스비리네(*Chordopoxvirinae*) 아과 및 오르토포크스바이러스(*Orthopoxvirus*) 속의 구성원이다. 오르토포크스바이러스 속은 코르도포크스비리네 아과의 다른 구성원에 비해서 비교적 균일하며, 백시니아 바이러스, 마리오라 바이러스(천연두의 병원체), 우두 바이러스, 머팔로포크스, 원숭이포크스 바이러스, 마우스포크스 및 말포크스 바이러스 등을 포함하는 11개의 개별적이나 밀접하게 관련되는 종을 포함한다 [참조: Moss, 1996]. 본원에서 기술하는 바와 같은 본 발명의 특정 양태는 오르토포크스바이러스 속의 다른 구성원 뿐만 아니라 파라포크스바이러스(*Parapoxvirus*), 아비포크스바이러스(*Avipoxvirus*), 카프리포크스바이러스(*Capripoxvirus*), 레포리포크스바이러스(*Leporipoxvirus*), 수이포크스바이러스(*Suipoxvirus*), 몰루시포크스바이러스(*Molluscipoxvirus*) 및 야타포크스바이러스(*Yatapoxvirus*) 속으로 확장될 수 있다. 포크스바이러스 과의 속은 일반적으로 실험실 동물에서의 중화 및 교차-반응성을 포함하는 혈청학적 의미로 정의된다. 오르토포크스바이러스 속의 다양한 구성원 뿐만 아니라 코르도비리네 아과의 다른 구성원은 면역조절성 분자(이의 예는 본원에 제공되어 있다)를 사용하여 숙주 유기체의 면역 반응을 길항시킨다. 따라서, 본원에서 기술하는 본 발명은 백시니아

바이러스로 제한되지 않을 뿐 아니라 바이러스의 구성원에도 적용될 수 있다.

[0135] C. 바이러스 증식

[0136] 백시니아 바이러스는 얼(Earl)과 모스(Moss)에 의해 문헌 [참조: Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, pages 16.15.1 to 16.18.10, 이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기재된 방법을 사용하여 증식시킬 수 있다.

[0137] II. 단백질성 조성물 및 핵산 조성물

[0138] 본 발명은 환자에서 암 세포와 암의 연구 및 치료에 유익한 폭스바이러스에 관한 것이다. 본 발명은 폭스바이러스, 특히 야생형과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 갖도록 작제됨으로써, 당해 바이러스가 암 세포에 대해 사용하기에 바람직한 특성을 갖는 한편, 비-암 세포에 대해 독성이 덜하거나 독성이 없는 백시니아 바이러스에 관한 것이다. 하기하는 교시는 본 발명의 방법 및 조성물을 수행하는 다양한 프로토콜을 예를 들어 제공한다. 이는 재조합 DNA 기술의 사용을 통해 돌연변이된 바이러스에 대한 배경을 제공한다.

[0139] A. 단백질성 조성물

[0140] 특정 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 기능성 폴리펩타이드 또는 단백질이 결합된 폭스바이러스의 제조 및/또는 감염성 EEV형과 같은 바이러스의 특정 형태를 보다 많이 방출하는 능력을 갖는 폭스바이러스의 제조에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 폭스바이러스, 및 약제학적으로 허용되는 제형의 일부분으로서 단백질성 조성물과 이의 병용에 관한 것이다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단백질" 또는 "폴리펩타이드"는 하나 이상의 아미노 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. 일부 양태에서는 단백질 또는 폴리펩타이드의 야생형 형태가 사용되지만, 본 발명의 다수의 양태에서 바이러스 단백질 또는 폴리펩타이드는 환자에서 암 세포 또는 암의 치료에 보다 유용한 바이러스가 되도록 부재이거나 변경된다. 상기한 용어들은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. "변형된 단백질" 또는 "변형된 폴리펩타이드"는 화학적 구조가 야생형 단백질 또는 폴리펩타이드와 관련하여 변경된 단백질 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 일부 양태에서, 변형된 단백질 또는 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형된 활성 또는 기능(단백질 또는 폴리펩타이드가 다수의 활성 또는 기능을 가질 수 있음을 인지한다)을 갖는다. 변형된 활성 또는 기능은 야생형 단백질 또는 폴리펩타이드의 활성 또는 기능과 관련하여 몇가지 다른 방식(예를 들어, 특이성)으로 감소, 축소, 제거, 증진, 개선 또는 변경될 수 있다. 특히, 변형된 단백질 또는 폴리펩타이드는 하나 이상의 활성 또는 기능과 관련하여 변경되지만 다른 점에서는 야생형 활성 또는 기능을 유지할 수 있는 것으로 의도된다. 또는, 변형된 단백질이 완전히 비기능성이거나 이의 동족 핵산 서열이 변경되어 폴리펩타이드가 더이상 발현되지 않거나, 절두되지 않거나, 프레임쉬프트(frameshift)의 결과로서 상이한 아미노산 서열을 발현할 수 있다.

[0142] 특정 양태에서, 돌연변이된 단백질 또는 폴리펩타이드의 크기는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250 또는 2500개 이상의 아미노 분자 잔기 및 이로부터 유도될 수 있는 임의의 범위를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리펩타이드는 절두에 의해 돌연변이됨으로써, 상응하는 야생형 형태에 비해 짧아질 수 있는 것으로 의도된다.

[0143] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아미노 분자"는 당해 분야의 숙련가에게 공되어 있는 모든 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 유사체를 의미한다. 특정 양태에서, 단백질성 분자의 잔기는 어떠한 비-아미노 분자에 의해서도 아미노 분자의 잔기의 서열이 중단됨이 없이 연속적이다. 다른 양태에서, 서열은 하나 이상의 비-아미노 분자 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 단백질성 분자의 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노 분

자 잔기에 의해 중단될 수 있다.

[0144] 따라서, "단백질성 조성물"이란 용어는 천연적으로 합성된 단백질내의 20개의 공통 아미노산 중 하나 이상 또는 하나 이상의 변형되거나 비통상적인 아미노산을 포함하는 아미노 분자 서열을 포함한다.

[0145] 단백질성 조성물은 표준 분자생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현, 천연 공급원으로부터 단백질성 화합물의 분리 또는 단백질성 물질의 화학적 합성을 포함하여 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 기술을 하용하여 제조할 수 있다. 다양한 유전자에 대한 뉴클레오타이드 및 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드 서열은 이미 기술된 바 있으며 당해 분야의 숙련가에게 공지된 컴퓨터화된 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 한가지 이러한 데이터베이스는 기관 [National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept] 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)이다. 이러한 공지된 유전자의 암호화 영역은 본원에서 기술하고 있거나 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있는 기술을 사용하여 증폭 및/또는 발현시킬 수 있다.

[0146] 1. 기능적 측면

[0147] 본 출원이 바이러스 단백질 또는 폴리펩타이드의 기능 또는 활성을 인용하는 경우, 이는 달리 명시하지 않는 한 생리학적 조건하의 바이러스 단백질 또는 폴리펩타이드의 활성 또는 기능을 인용하는 것으로 의미된다. 예를 들어, 인터페론 조절성 폴리펩타이드는 하나 이상의 인터페론 및 이의 활성에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 주는 폴리펩타이드를 의미한다. 폴리펩타이드는 인터페론의 활성을 직접적으로 또는 간접적으로 유도, 증진, 상승, 증가, 축소, 약화, 감소, 억제 또는 차단할 수 있다. 인터페론에 직접적으로 영향을 주는 폴리펩타이드의 예는, 일부 양태에서, 인터페론에 특이적으로 결합하는 인터페론 조절성 폴리펩타이드를 포함한다. 분자가 이러한 활성을 지니고 있는지는 당해 분야의 숙련가에게 친숙한 검정법을 사용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 인터페론을 조절하는 산물 또는 이의 변이체를 암호화하는 유전자를 이러한 유전자가 전달된 세포와 비교하여 인터페론 활성이 도입된 세포내로 전달된 것은 상이한 인터페론 반응 수준에 의해 동정할 수 있으며, 여기서 당해 분야의 인터페론 조절 기능을 갖는다.

[0148] 특히, 조절자는 예를 들어, 인터페론-암호화 전사체에 결합함으로써, 표적화된 분자의 경로에 관여하는 발현 단백질성 조성물에 영향을 주는 분자일 수 있는 것으로 의도된다. 분자가 인터페론, IL-1 β , TNF 또는 치료학적으로 유익한 기타 분자의 적합한 조절자인지는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 검정법을 사용하여 결정할 수 있으며, 이러한 검정법의 일부는 본원에 기술되어 있으며, 예를 들어, 천연 및/또는 재조합 바이러스 단백질의 사용을 포함할 수 있다.

[0149] 2. 바이러스 폴리펩타이드의 변이체

[0150] 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 치환성, 삽입성 또는 결실 변이체일 수 있다. 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자에서의 돌연변이는 야생형과 비교하여 폴리펩타이드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 또는 500개 이상의 비연속적 또는 연속적 아미노산에 영향을 줄 수 있다. 백시니아 바이러스에 의해 암호화되는 각종 폴리펩타이드는 문헌 [참조: Rosel *et al.*, 1986, Goebel *et al.*, 1990 and Genbank Accession Number NC_001559, 이들 각각은 본원에서 참조로 인용된다]을 참조로 하여 동정할 수 있다.

[0151] 결실 돌연변이체에는 천연 또는 야생형 단백질의 하나 이상의 잔기가 결여되어 있다. 단일 잔기가 결실될 수 있거나 도메인(예: 촉매성 도메인 또는 결합 도메인)의 모두 또는 일부가 결실될 수 있다. 종결 코돈을 (치환 또는 삽입에 의해) 암호화 핵산 서열내로 도입시켜 절두된 단백질을 제조할 수 있다. 삽입성 돌연변이체는 전형적으로 폴리펩타이드내의 비-말단 지점에서의 물질의 첨가를 포함한다. 이는 번역반응성 에피토프 또는 단순히 하나 이상의 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 융합 단백질로 지칭되는 말단 첨가가 또한 생성될 수 있다.

[0152] 치환성 변이체는 전형적으로 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 다른 아미노산으로의 교환을 함유하며, 다른 기능이나 특성이 상실시키거나 또는 상실시키지 않으면서 폴리펩타이드의 하나 이상의

특성을 조절하도록 디자인될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있는데, 즉 하나 이상의 아미노산은 유사한 모양과 전하의 아미노산으로 대체된다. 보존적 치환은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 예를 들어, 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 라이신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파르테이트로부터 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파르테이트로; 글리신에서 프롤린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 이소류신으로; 라이신에서 아르기닌으로; 메티오닌에서 류신 또는 이소류신으로; 페닐알라닌에서 티로신, 류신 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 및 발린에서 이소류신 또는 류신으로의 변화를 포함한다. 또는, 치환은 비-보존적이어서 폴리펩타이드 또는 활성에 영향을 줄 수 있다. 비-보존적 치환은 전형적으로 잔기를 화학적으로 다른 잔기로 치환하는 것, 예를 들어, 극성 또는 하전된 아미노산을 비극성 또는 비하전된 아미노산으로 치환 및 그 반대로 치환하는 것을 포함한다.

[0153] "기능상 등가인 코돈"이란 용어는 본원에서, 아르기닌 또는 세린에 대한 6개의 코돈과 같이 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈을 의미하고, 또한 생물학적으로 등가인 아미노산을 암호화하는 코돈을 의미하기 위해 사용된다 (하기 표 1 참조).

[0154] [표 1]

코돈 표

아미노산			코돈
알라닌	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
시스테인	Cys	C	UGC UGU
아스파르트산	Asp	D	GAC GAU
글루탐산	Glu	E	GAA GAG
페닐알라닌	Phe	F	UUC UUU
글리신	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
히스티딘	His	H	CAC CAU
이소류신	Ile	I	AUA AUC AUU
라이신	Lys	K	AAA AAG
류신	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
메티오닌	Met	M	AUG
아스파라긴	Asn	N	AAC AAU
프롤린	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
글루타민	Gln	Q	CAA CAG
아르기닌	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
세린	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
트레오닌	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
발린	Val	V	GUA GUC GUG GUU
트립토판	Trp	W	UGG
티로신	Tyr	Y	UAC UAU

[0155] 또는, 아미노산 및 핵산 서열은 추가의 N- 또는 C-말단 아미노산과 같은 추가의 잔기 또는 5' 또는 3' 서열을 포함할 수 있으며, 단백질 발현이 관련되는 생물학적 단백질 활성의 유지를 포함하는 상기 제시한 기준에 상기 서열이 부합되는 한, 본질적으로 본원에서 기술하는 서열 중 하나에 제시된 바와 여전히 같음이 이해될 것이다. 특히, 말단 서열의 첨가는 예를 들어, 암호화 서열의 5' 또는 3' 부위에 플랜킹되어 있는 다양한 비-암호화 서열을 포함할 수 있거나 유전자내에서 발생하는 것으로 공지된 다양한 내부 서열, 즉 인트론을 포함할 수 있는 핵산 서열에 적용된다.

[0157] 하기에서는 등가의 또는 심지어 개선된 2세대 분자를 제조하기 위한 단백질의 아미노산의 변화에 기초하여 논의된다. 예를 들어, 특정 아미노산은, 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자상의 결합 부위와 같은 구조와의 상호교환적 결합 성능이 상당히 상실되지 않으면서 단백질 구조내의 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 생물학적 기능상 활성을 한정하는 것은 단백질의 상호교환적 성능 및 성질이기 때문에, 특정 아미노산 치환은 단백질 서열 및 이의 기초가 되는 DNA 암호화 서열내에서 이루어질 수 있으며 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 의해서, 하기에 논의하는 바와 같이 DNA 서열의 생물학적 용도 또는 활성이 상당히 상실되지 않으면서 유전자의 DNA 서열내에서 다양한 변화가 이루어질 수 있는 것으로 의도된다. 표 1은 특정 아미노산을 암호화하는 코돈을 제시한 것이다.

- [0158] 이러한 변화를 이루는데 있어, 아미노산의 하이드로패틱(hydrophobic) 지수를 고려할 수 있다. 단백질에 상호 작용적 생물학적 작용을 부여하는데 있어 수치로 아미노산 지수의 중요성은 당해 분야에서 널리 이해되고 있다 [참조: Kyte & Doolittle, 1982]. 아미노산의 상대적 하이드로패틱 특징이 단백질과 다른 분자, 예를 들어, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 한정하는 단백질의 2차 구조에 기여한다는 것은 채택되어 있다.
- [0159] 또한, 당해 분야에서는 유사한 아미노산의 치환이 친수성에 기초하여 효과적으로 이루어질 수 있음이 이해되고 있다. 본원에서 참조로 인용되는 미국 특허 제4,554,191호에는, 인접 아미노산의 친수성에 의해 좌우되는 단백질의 가장 큰 국소적 평균 친수성은 당해 단백질의 생물학적 특성과 상호관련된다는 것이 언급되어 있다. 미국 특허 4,554,101호에 상세히 기재된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 아미노산 잔기에 할당되었다: 아르기닌 (+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트 (+3.0 ±1); 글루타메이트 (+3.0±1); 세린 (+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5±1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 *-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0160] 아미노산이 유사한 친수성 값을 갖는 다른 아미노산으로 치환되고 여전히 생물학적으로 등가이며 번역학적으로 등가인 단백질을 생산할 수 있음이 이해된다. 이러한 변화에서, 친수성 값이 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하며, 친수성 값이 ±1 이내인 아미노산의 치환이 특히 바람직하고, 친수성 값이 ±0.5 이내인 아미노산의 치환이 보다 특히 바람직하다.
- [0161] 상기 요약한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환의 상대적 유사성, 예를 들어, 이의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 상기 다양한 특징들을 고려하는 예시적 치환은 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있으며 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.
- [0162] III. 핵산 분자
- [0163] A. 천연 단백질 또는 변형된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드
- [0164] 본 발명은 단백질 또는 폴리펩타이드의 모두 또는 일부분을 발현할 수 있는, 세포로부터 분리될 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명은 특정한 기능성 바이러스 폴리펩타이드가 결합된 단백질을 제조하기 위해 특이적으로 돌연변이된 바이러스 게놈에 관한 것이다. 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 아미노산 서열의 모두 또는 일부분을 함유하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호할 수 있거나, 이러한 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하지 않도록 또는 하나 이상의 기능 또는 활성이 감소되었거나 축소되었거나 부재인 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하도록 조작할 수 있다. 재조합 단백질을 발현 세포로부터 정제하여 활성 단백질을 수득할 수 있다. 게놈 뿐만 아니라 백시니아 바이러스의 암호화 영역의 정의는 문헌 [참조: Rosel *et al.*, 1986, Goebel *et al.*, 1990, 및/또는 Genbank Accession Number NC_00159; 이들 각각은 본원에서 참조로 인용된다]에서 찾아볼 수 있다.
- [0165] 본원에서 사용되는 바와 같이, "DNA 분절"이란 용어는 특정 종의 전체 게놈 DNA로부터 유리되어 분리된 DNA 분자를 의미한다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 분절은 야생형, 다형성 또는 돌연변이 폴리펩타이드-암호화 서열을 함유하며 여전히 전체 포유동물 또는 사람 게놈 DNA로부터 분리되어진 또는 유리되어 정제된 DNA 분절을 의미한다. "DNA 분절"이란 용어내에는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들 또는 폴리펩타이드보다 작은 DNA 분절 및 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 파지, 바이러스 등을 포함하는 재조합 벡터가 포함된다.
- [0166] 본 출원에서 사용되는 바와 같이, "폭스바이러스 폴리펩타이드"란 용어는 전체 게놈 핵산으로부터 유리되어 분리된 폭스바이러스 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 의미한다. 마찬가지로, "백시니아 바이러스 폴리뉴클레오타이드"는 전체 게놈 핵산으로부터 유리되어 분리된 백시니아 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 의미한다. "폭스바이러스 게놈" 또는 "백시니아 바이러스 게놈"은 숙주 세포에게 제공됨으로써 헬퍼 바이러스의 존재 또는 부재하에 바이러스 입자를 생산할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 게놈은 야생형 바이러스와 비교하여 재조합에 의해 돌연변이 되었거나 돌연변이되지 않을 수 있다.
- [0167] "cDNA"란 용어는 주형으로서 메신저 RNA(mRNA)를 사용하여 제조된 DNA를 의미한다. 게놈 DNA 또는 DNA 증합된 형태, 부분적으로 프로세싱되었거나 프로세싱되지 않은 게놈 RNA 주형과는 대조적으로 cDNA를 사용할 경우의 것

점은 cDNA가 상응하는 단백질의 암호화 서열을 주로 함유한다는 점이다. 비-암호화 영역이 최적의 발현을 위해 요구되는 경우 또는 인트론과 같은 비-암호화 영역이 안티센스 전략에서 표적화되는 경우와 같이 전체 또는 부분적 게놈 서열이 바람직할 때가 여러번 있을 수 있다.

[0168] 또한, 소정의 종으로부터의 특정 폴리펩타이드가 약간 상이한 핵산 서열을 갖는 천연 변이체에 의해 대표되지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고 동일한 단백질을 암호하는 것으로 의도된다(상기 표 1 참조).

[0169] 마찬가지로, 분리된 또는 정제된 야생형 또는 돌연변이 폴리뉴클레오타이드 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 야생형 또는 돌연변이 폴리펩타이드 암호화 서열 및 특정 양상에서 다른 천연 유전자 또는 단백질 암호화 서열로부터 실질적으로 분리된 조절성 서열을 포함하는 DNA 분절을 의미한다. 이와 관련하여, "유전자"란 용어는 단순화를 목적으로, 기능성 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 암호화 단위(적절한 전사, 전사후 변형 또는 국제화를 위해 요구되는 모든 서열을 포함함)를 의미하기 위해 사용된다. 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 이러한 기능상 용어는 게놈 서열, cDNA 서열, 단백질, 폴리펩타이드, 도메인, 펩타이드, 융합 단백질 및 돌연변이체를 발현하거나 이러한 것들을 발현하도록 적합될 수 있는 보다 소형의 조각된 유전자 분절을 포함한다. 천연 또는 변형된 폴리펩타이드의 모두 또는 일부분을 암호화하는 핵산은 다음 길이의 상기 폴리펩타이드의 모두 또는 일부분을 암호화하는 연속적 핵산 서열을 함유할 수 있다: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000 또는 10000개 이상의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 또는 염기쌍.

[0170] 특정한 양태에서, 본 발명은 야생형 포스바이러스 폴리펩타이드 또는 펩타이드, 또는 아미노산 서열내에 천연 폴리펩타이드와 부합되거나 또는 본질적으로 이에 상응하는 연속적 아미노산 서열을 포함하는 돌연변이 포스바이러스 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 혼입되어진 분리된 DNA 분절 및 재조합 벡터에 관한 것이다. 따라서, 분리된 DNA 분절, 또는 DNA 분절을 함유하는 벡터는 예를 들어, TNF 활성을 억제하거나 감소시킬 수 있는 TNA 조절자 또는 TNF 조절성 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. "재조합"이란 용어는 폴리펩타이드 또는 특정 폴리펩타이드의 명칭과 함께 사용될 수 있으며, 이는 일반적으로 시험관내에서 조작되었거나 이러한 핵산 분자의 복제된 산물인 핵산 분자로부터 생성된 폴리펩타이드를 의미한다.

[0171] 다른 양태에서, 본 발명은 아미노산 서열내에 천연 폴리펩타이드와 부합되거나 또는 본질적으로 이에 상응하는 연속적 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 혼입되어진 분리된 DNA 분절 및 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0172] 본 발명에서 사용되는 핵산 분절은, 이의 암호화 서열의 길이와 관계없이 프로모터, 폴리아데닐화 시그널, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 다른 암호화 분절 등과 같은 다른 핵산 서열과 조합되어 이의 전체 길이 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용될 수 있으며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합 DNA 프로콜에서의 제조 및 사용 용이성에 의해 제한되는 것으로 의도된다.

[0173] 본 발명의 핵산 작제물은 임의의 공급원으로부터의 전체길이 폴리펩타이드를 암호화하거나, 폴리펩타이드의 절두된 형태, 예를 들어, 절두된 백시니아 바이러스 폴리펩타이드를 암호화하여 암호화 영역의 전사체가 절두된 형태를 대표할 수 있다. 이어서, 절두된 전사체는 절두된 단백질로 해독될 수 있다. 또는, 핵산 서열이 추가의 이중 암호화 서열을 갖는 전체길이 폴리펩타이드 서열을 암호화하여, 예를 들어, 폴리펩타이드의 정제, 수송, 분비, 전사후 변형이 가능하거나 표적화 또는 효능과 같은 치료학적 이득이 가능하게될 수 있다. 상기 논의한 바와 같이, 태그 또는 기타 이중 폴리펩타이드가 변형된 폴리펩타이드-암호화 서열에 첨가될 수 있으며, 여기서 "이중"은 변형된 폴리펩타이드와 동일하지 않은 폴리펩타이드를 의미한다.

[0174] 비제한적 예로서, B18R 유전자와 같은 특정 유전자와 동일하거나 상보적인 뉴클레오타이드의 연속적 신장부를 포함하는 하나 이상의 핵산 작제물을 제조할 수 있다. 효모 인공 염색체와 같은 핵산 작제물의 출현이 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있음을 고려한다면, 핵산 작제물은 길이가 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 15,000, 20,000, 30,000, 50,000, 100,000, 250,000, 500,000, 750,000개 내지 적어도 1,000,000개의 뉴클레오타이드일 수 있을 뿐만 아니라 최

대 염색체 크기(모든 중간체 길이 및 중간체 범위를 포함)를 포함하는 보다 큰 크기의 작제물일 수 있다. 본원에서 사용되는 "중간체 길이" 및 "중간체 범위"가 인용된 값을 포함하거나 인용된 값 사이에 있는 모든 길이 또는 범위(즉, 이러한 값을 포함하고 이러한 값 사이에 있는 모든 정수)를 의미한다는 것이 쉽게 이해될 것이다.

[0175] 본 발명에서 사용되는 DNA 분절은 생물학적 기능상 등가인, 변형된 폴리펩타이드 및 펩타이드, 예를 들어, 변형된 겔로닌 독소를 포함한다. 이러한 서열은 천연 서열 및 이로써 암호화된 단백질내에서 천연적으로 발생하는 것으로 공지된 코돈 과잉 및 기능상 등가의 결과로서 유발될 수 있다. 또는, 기능상 등가인 단백질 또는 펩타이드는 단백질 구조의 변화를 교환되는 아미노산의 특성을 고려하여 조작하는 재조합 DNA 기술의 적용을 통해 제조할 수 있다. 사람이 디자인한 변화를 부위-지시된 돌연변이유발 기술의 적용을 통해 도입하여, 예를 들어, 단백질의 항원성에 대해 개선을 도입시키거나 단백질이 투여된 피험자에 대한 생체내 단백질의 독성 효과를 감소시키거나 단백질이 관여하는 임의의 치료의 효능을 증가시킬 수 있다.

[0176] 특정 양태에서, 본 발명은 서열내에 본원에서 확인된 서열에 제시된(및/또는 참조로 인용된) 연속적 아미노산 서열을 포함하는 분리된 DNA 분절 및 재조합 벡터에 관한 것이다. 그러나, 이러한 서열은 돌연변이되어, 활성이 야생형과 관련하여 변경된 단백질 산물을 산출할 수 있다.

[0177] 본 발명이 이러한 확인된 서열의 핵산 및 아미노산 서열로 제한되지 않는다는 것이 또한 이해될 것이다. 따라서, 재조합 벡터 및 분리된 DNA 분절은 포스바이러스-암호화 영역 자체, 기본적 암호화 영역내에 선택된 변경 또는 변형을 보유한 암호화 영역을 다양하게 포함할 수 있거나, 변이체 아미노산 서열을 갖는 생물학적 기능상 등가인 단백질 또는 펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0178] 본 발명의 DNA 분절은 생물학적 기능상 등가인 포스바이러스 단백질 및 펩타이드를 포함한다. 이러한 서열은 천연 서열 및 이로써 암호화된 단백질내에서 천연적으로 발생하는 것으로 공지된 코돈 과잉 및 기능상 등가의 결과로서 발생할 수 있다. 또는, 기능상 등가인 단백질 또는 펩타이드는 단백질 구조의 변화를 교환되는 아미노산의 특성을 고려하여 조작하는 재조합 DNA 기술의 적용을 통해 제조할 수 있다. 사람이 디자인한 변화를 부위-지시된 돌연변이유발 기술의 적용을 통해 도입하여, 예를 들어, 단백질의 항원성에 대해 개선을 도입시키거나 단백질이 투여된 피험자에 대한 생체내 단백질의 독성 효과를 감소시키거나 단백질이 관여하는 임의의 치료의 효능을 증가시킬 수 있다.

[0179] B. 포스바이러스 폴리뉴클레오타이드의 돌연변이유발

[0180] 다양한 양태에서, 포스바이러스 폴리뉴클레오타이드가 변경되거나 돌연변이화될 수 있다. 변경 또는 돌연변이는 삽입, 결실, 점 돌연변이, 역위 등을 포함할 수 있으며, 특정 경로 또는 분자 기작의 조절, 활성화 및/또는 불활성화를 초래할 수 있을 뿐만 아니라, 유전자 산물의 기능, 위치 또는 발현을 변경, 특히 유전자 산물이 비기능성이 되도록 할 수 있다. 사용되는 경우, 포스바이러스의 모두 또는 일부분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 돌연변이유발은 다양한 표준 돌연변이유발 방법 [참조: Sambrook *et al.*, 1989]에 의해 성취될 수 있다. 돌연변이는 유기체의 양 또는 구조에서의 변화를 유발하는 과정이다. 돌연변이에는 단일 유전자의 뉴클레오타이드 서열의 변형, 유전자 또는 전체 염색체의 차단이 관여할 수 있다. 단일 유전자에서의 변화는 DNA 서열내의 단일 뉴클레오타이드 염기의 제거, 첨가 또는 치환이 관여하는 점 돌연변이의 결과일 수 있거나, 다수의 뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실이 관여하는 변화의 결과일 수 있다.

[0181] 돌연변이는 화학적 또는 물리적 돌연변이유발제로의 노출 후에 유도될 수 있다. 이러한 돌연변이-유도 제제에는 이온화 방사선, 자외선 광 및 알킬화제와 폴리사이클릭 방향족 탄화수소와 같은 광범위한 화학물질이 포함되며, 이들 모두는 (일반적으로 일부 대사성 생체내변화(biotransformation) 후에) 핵산과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용할 수 있다. 이러한 제제에 의해 유도된 DNA 손상은 영향을 받은 DNA가 복제되거나 복구된 경우에 염기 서열의 변형을 유도함으로써 돌연변이를 유도할 수 있다. 돌연변이는 또한 특정 표지화 방법의 사용을 통해서 부위-지시될 수 있다.

[0182] 1. 무작위적 돌연변이유발

[0183] (a) 삽입성 돌연변이유발

[0184] 삽입성 돌연변이유발은 공지된 DNA 단편의 삽입을 통한 유전자의 불활성화에 기초한다. 이러한 돌연변이에는 몇가지 DNA 단편 유형의 삽입이 관여하기 때문에, 생성된 돌연변이는 일반적으로 기능 획득 돌연변이가 아니라

기능의 상실이다. 그러나, 기능 획득 돌연변이를 생성시키는 삽입의 몇가지 예가 있다. 삽입 돌연변이유발은 세균 및 초파리 [참조: Cooley *et al.* 1988]에서 매우 성공적이었으며, 최근에는 옥수수(아라비도프시스; 참조: Marks *et al.*, 1991; Koncz *et al.* 1990; 및 안티리눔(Antirrhinum; 참조: Sommer *et al.* 1990)에서 강력한 도구가 되었다. 삽입성 돌연변이유발은 표준 분자생물학 기술을 사용하여 달성할 수 있다.

[0185] (b) 화학적 돌연변이유발

[0186] 화학적 돌연변이유발은 표현형적 심각성 정도(phenotypic severity)를 이용하여 전체 범위의 돌연변이를 찾아내는 능력과 같은 특정한 잇점을 제공하며, 수행하기가 용이하고 저렴하다. 대다수의 화학적 발암물질이 DNA의 돌연변이를 유발한다. 벤조[a]피렌, N-아세톡시-2-아세틸 아미노플루오렌 및 아플록시 B1은 세균 및 포유동물 세포에서 GC에서 TA로의 변위를 유발한다. 벤조[a]피렌은 또한 AT에서 TA로의 치환과 같은 염기 치환을 유발할 수 있다. N-니트로소 화합물은 GC에서 AT로의 변화를 유발할 수 있다. n-니트로소우레아에의 노출에 의해 유도된 티미딘의 O4 위치의 알킬화는 TA에서 CG로의 변화를 초래한다.

[0187] (c) 방사선 돌연변이유발

[0188] 생물학적 분자는 이온화 방사선에 의해 분해된다. 유발적 에너지의 흡수는 이온과 유리 라디칼의 형성 및 일부 공유결합의 파괴를 유도한다. 방사선 손상에 대한 감수성은 분자들 간 및 동일한 분자의 상이한 결정 형태 간에 매우 가변적인 것으로 보인다. 이는 전체 축적된 선량 및 선량률에 따라 좌우된다(일단 유리 라디칼이 존재한다면, 유리 라디칼에 의해 유발된 분자적 손상은 유리 라디칼의 천연 확산률에 따라 실시간적으로 좌우된다). 손상은 샘플을 가능한 차갑게 만듦으로서 감소 및 조절할 수 있다. 이온화 방사선은 일반적으로 선량률에 비례하여 DNA 손상을 유발한다.

[0189] 본 발명에서, "이온화 방사선"이란 용어는 충분한 에너지를 갖거나 이온화(에너지의 획득 또는 손실)를 생성시키기에 충분한 에너지를 생성시킬 수 있는 입자 또는 광자를 포함하는 방사선을 의미한다. 예시적 및 바람직한 이온화 방사선은 x-방사선이다. 소정의 세포에서 필요하거나 특정 분자를 위해 필요한 이온화 방사선량은 일반적으로 세포 또는 분자의 성질과 돌연변이 표적의 성질에 따라 좌우된다. 효과적 방사선량을 결정하기 위한 수단은 당해 분야에 익히 공지되어 있다.

[0190] (d) 시험관내 스캐닝 돌연변이유발

[0191] 무작위적 돌연변이유발은 또한 오류 유발성 PCR을 사용하여 도입시킬 수 있다. 돌연변이유발물은 중형의 희석액을 함유한 다수의 시험관에서 PCR을 수행함으로써 증가시킬 수 있다.

[0192] 한가지 특히 유용한 돌연변이유발 기술은 다수의 잔기를 개별적으로 아미노산 알라닌으로 치환시키는 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis)로서, 단백질 입체형태의 대규모 교란의 위험성을 최소화하면서 측쇄 상호작용을 상실하는 효과를 결정할 수 있다 [참조: Cunningham *et al.*, 1989].

[0193] 시험관내 스캐닝 포화 돌연변이유발은 (i) 리간드 결합 특이성을 조절하는 잔기의 동정, (ii) 활성을 보유하는 아미노산 및 소정의 위치에서 활성을 소멸시키는 아미노산의 동정에 기초하는 리간드 결합의 보다 충분한 이해, (iii) 활성 부위 또는 단백질 서브도메인의 전반적 형성성의 평가, (iv) 결합을 증가시키는 아미노산 치환의 동정을 포함하는 다량의 구조-기능 정보를 신속하게 획득하기 위한 방법을 제공한다.

[0194] 2. 부위-지시된 돌연변이유발

[0195] 구조에 근거한 부위-특이적 돌연변이유발은 단백질-리간드 상호작용을 조사 및 조작하기 위한 강력한 도구를 대표한다 [참조: Wells, 1996; Braisted *et al.*, 1996]. 상기 기술은 선택된 DNA내로 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화를 도입시킴에 의한 서열 변이체의 제조법 및 시험법을 제공한다.

[0196] 부위-특이적 돌연변이유발은 목적하는 돌연변이의 DNA 서열을 암호화하는 특이적 올리고뉴클레오타이드 서열 뿐만 아니라 충분한 수의 변형되지 않은 인접 뉴클레오타이드를 사용한다. 이러한 방식으로, 통과될 결실 접합부의 양쪽 측면에 안정한 이분체를 형성하기에 충분한 크기와 복잡성을 갖는 프라이머 서열이 제공된다. 길이가

약 17개 내지 25개 뉴클레오타이드이고 변경될 서열의 접합부의 양쪽 측면에 약 5개 내지 10개의 잔기를 갖는 프라이머가 바람직하다.

[0197] 상기 기술은 전형적으로 일본쇄 및 이본쇄 형태 둘다에 존재하는 박테리오파지 벡터를 사용한다. 부위-지시된 돌연변이유발에서 유용한 벡터에는 M13 파지와 같은 벡터가 포함된다. 이러한 파지 벡터는 시판되고 있으며 이의 사용은 일반적으로 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있다. 부위-지시된 돌연변이유발에서는 이본쇄 플라스미드도 또한 통상적으로 사용되며, 이는 파지로부터 관심대상의 유전자를 플라스미드로 전달하는 단계를 제거한다.

[0198] 일반적으로, 먼저 일본쇄 벡터를 수득하거나, 서열내에 목적하는 단백질 또는 유전 요소를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 이본쇄 벡터의 2개의 쇄를 용융시킨다. 이어서, 하이브리드화 조건을 선택할 경우에 미스매치의 정도를 고려하여, 합성에 의해 제조한 목적하는 돌연변이된 서열을 보유한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 일본쇄 DNA 제제와 어닐링(annealing)시킨다. 하이브리드화된 산물을 이. 콜라이 폴리머라제 I(클레나우 단편)과 같은 DNA 중합 효소에 도입시켜 돌연변이를 보유한 쇄의 합성을 완결시킨다. 이로써 하나의 쇄가 본래의 돌연변이되지 않은 서열을 암호화하고 두번째 쇄가 목적하는 돌연변이를 보유하는 이중이본쇄가 형성된다. 이어서, 상기 이중이본쇄 벡터를 사용하여 이. 콜라이과 같은 적절한 숙주 세포를 형질전환시키고, 돌연변이된 서열 배열을 보유한 재조합 벡터를 포함하는 클론을 선택한다.

[0199] 단백질의 소정의 잔기의 기능상 중요성과 정보량에 관한 포괄적 정보는 모든 19개의 아미노산 치환을 검사하는 포화 돌연변이유발에 의해 가장 적절히 수득될 수 있다. 상기 접근법의 단점은 다중잔기 포화 돌연변이유발의 수행이 힘들다는 점이다 [참조: Warren *et al.*, 1996, Zeng *et al.*, 1996; Burton and Barbas, 1994; Yelton *et al.*, 1995; Hilton *et al.*, 1996]. 수백개, 가능하게는 심지어 수천개의 부위 특이적 돌연변이체가 연구되어야 한다. 그러나, 개선된 기술은 돌연변이체의 제조 및 신속한 스크리닝을 보다 간단하게 만든다 [참조: 미국 특허 제5,220,007호; 제5,284,760호; 제5,354,670호; 제5,366,878호; 제5,389,514호; 제5,635,377호; 및 제5,789,166호].

[0200] C. 벡터

[0201] 폭스바이러스 계통에 돌연변이를 생성시키기 위해서, 천연 및 변형된 폴리펩타이드가 벡터내에 포함된 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. "벡터"란 용어는 벡터가 복제될 수 있는 세포내로 도입시키기 위해 내인성 핵산 서열이 삽입될 수 있는 운반체 핵산 분자를 의미하기 위해 사용된다. 핵산 서열은 "외인성"일 수 있는데, 이는 이러한 핵산 서열이 벡터가 도입되어지는 세포에 외래물질임을 의미하거나 이러한 서열이, 이러한 서열이 본래 발견되지 않는 숙주 세포 핵산의 위치를 제외한 세포내의 서열에 상동성임을 의미한다. 벡터에는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스) 및 인공 염색체(예: YAC)가 포함된다. 당해 분야의 숙련가는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제하는 방법을 잘 알고 있으며, 이는 문헌 [참조: Sambrook *et al.*, (1989) and Ausubel *et al.*; 둘다 본원에서 참조로 인용된다]에 기재되어 있다. 변형된 겔로닌과 같은 변형된 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 것 이외에도, 벡터는 태그 또는 표적화 분자와 같은 변형되지 않은 폴리펩타이드를 서열을 암호화할 수 있다. 이러한 융합 단백질을 암호화하는 유용한 벡터에는 pIN 벡터 [참조: Inouye *et al.*, 1985], 히스티딘의 신장부를 암호화하는 벡터 및 나중의 정제 및 분리 또는 분해를 위한 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 가용성 융합 단백질에서 사용하기 위한 pGEX 벡터가 포함된다. 표적화 분자는 변형된 폴리펩타이드를 특정 기관, 조직, 세포 또는 피험자의 체내의 다른 위치로 지시하는 분자이다.

[0202] "발현 벡터"란 용어는 전사될 수 있는 유전자 산물의 적어도 일부분을 암호화하는 핵산 분자를 함유하는 벡터를 의미한다. 일부 경우에는, RNA 분자는 후속적으로 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드로 해독된다. 다른 경우에는, 이들 서열은 안티센스 분자 또는 리보자임의 생산시에 해독되지 않는다. 발현 벡터는, 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 암호화 서열의 전사 및 가능하게는 해독에 필수적인 핵산 서열을 의미하는 다양한 "조절 서열"을 함유할 수 있다. 전사 및 전사를 통제하는 조절 서열 이외에, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능도 제공하는 서열 및 하기하는 서열을 함유할 수 있다.

[0203] 1. 프로모터와 인핸서

[0204] "프로모터"는 전사의 개시와 속도가 조절되는 핵산 서열의 영역인 조절 서열이다. 이는 조절 단백질과 분자가 결합하여 특정 핵산 서열에서 전사를 개시하는 유전자 요소, 예를 들면 RNA 폴리머라제 및 다른 전사인자를 포

함할 수 있다. "작동하게 위치하는", "작동가능하게 연결된", "조절하에", "전사 조절하에"란 어구는 프로모터가 핵산 서열과 관련하여 정확한 기능적 위치 및/또는 배향으로 존재하여 상기 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 조절하는 것을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사적 활성화에 관여하는 시스(cis)-작용 조절성 서열을 의미하는 "인핸서"와 함께 사용될 수 있거나 사용되지 않을 수 있다.

[0205] 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 상부에 위치하는 5' 비-암호 서열을 분리함으로써 수득되는 핵산 서열과 통상적으로 연결된 프로모터일 수 있다. 이런 프로모터는 "내인성"이라고 말할 수 있다. 유사하게, 인핸서는 핵산 서열의 하부 또는 상부에 위치하고 상기 핵산 서열과 통상적으로 연결된 인핸서일 수 있다. 또는, 암호화 핵산 분절을 재조합 또는 이중 프로모터의 조절하에 위치시킴으로써 여러 잇점을 얻을 수 있는데, 상기 프로모터는 자연 환경에서 핵산 서열과 통상적으로 연결되지 않는 프로모터를 의미한다. 재조합 또는 이중 인핸서는 또한 이의 천연 환경에서 정상적으로는 핵산 서열과 연합되지 않는 인핸서를 의미한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서에는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 바이러스 또는 원핵 또는 진핵 세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서, 및 자연적으로 발생하지 않는, 즉 서로 다른 전사 조절 영역의 상이한 요소 및/또는 발현을 변화시키는 돌연변이를 보유하는 프로모터 또는 인핸서 등이 포함될 수 있다. 프로모터와 인핸서의 핵산 서열의 합성에 의한 생산 이외에, 서열은 본원에 개시된 조성물과 관련하여 PCRTM을 포함한 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술로 생산할 수 있다 [참조: 미국 특허 제4,683,202호 및 제 5,928,906호]. 게다가, 비-핵 세포소기관, 예를 들면 미토콘드리아, 엽록체 등에서 서열의 전사 및/또는 발현을 조절하는 조절 서열을 사용할 수도 있는 것으로 의도된다.

[0206] 자연적으로, 발현용으로 선택된 세포형, 세포소기관 또는 유기체에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요할 수 있다. 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포형 조합의 사용은 분자 생물학 분야의 숙련가에게 공지되어 있다 [참조: Sambrook et al, 1989, 이는 본원에서 참조로 인용된다]. 사용되는 프로모터는 유전자 요법, 또는 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대규모 생산시에 유리한, 도입된 DNA 분절의 고수준 발현을 지시하는 적절한 조건하에서 구성적이거나, 조직-특이적이거나, 유도성이거나 또는 유용하다. 프로모터는 이중이거나 내인성이다.

[0207] 표 2에는 본 발명의 범주에서 RNA의 발현을 조절하는데 사용될 수 있는 몇가지 요소/프로모터의 비제한적 예를 제시한다. 이 목록은 발현의 촉진에 관여하는 모든 가능한 요소를 포괄하기 위함은 아니며, 단지 이를 예시하기 위함이다. 표 3에는 특정 자극에 반응하여 활성화될 수 있는 핵산 서열의 영역인 유도성 요소의 비제한적 예를 제공한다.

[0208] [표 2aA]

프로모터 및/또는 인핸서	참조문헌
면역글로불린 중쇄	Banerji et al., 1983; Gilles et al., 1983 ; Grosschedl et al., 1985; Atchinson et al., 1986, 1987; Imler et al., 1987; Weinberger et al., 1984; Kiledjian et al., 1988; Porton et al. ; 1990
면역글로불린 경쇄	Queen et al., 1983; Picard et al., 1984
T-세포 수용체	Luria et al., 1987; Winoto et al., 1989; Redondo et al. ; 1990
HLA DQ α 및/또는 DQ β	Sullivan et al., 1987
β -인터페론	Goodbourn et al., 1986 ; Fujita et al., 1987; Goodbourn et al., 1988
인터류킨-2	Greene et al., 1989
인터류킨-2 수용체	Greene et al., 1989; Lin et al., 1990
MHC 제II형 5	Koch et al., 1989
MHC 제II형 HLA-Dra	Sherman et al., 1989
β -액틴	Kawamoto et al., 1988; Ng et al., ; 1989
근육 크레아틴 키나제(MCK)	Jaynes et al., 1988; Horlick et al., 1989 ; Johnson et al., 1989
전구알부민(트랜스티레틴)	Costa et al., 1988
엘라스타제 1	Omitz et al., 1987
메탈로티오네인 (MTII)	Karin et al., 1987; Culotta et al., 1989
콜라게나제	Pinkert et al., 1987; Angel et al., 1987
알부민	Pinkert et al., 1987; Tronche et al., 1989, 1990
α -태아단백	Godbout et al., 1988; Campere et al., 1989
γ -글로빈	Bodine et al., 1987; Perez-Stable et al., 1990
P-글로빈	Trudel et al., 1987
c-fos	Cohen et al., 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps et al., 1985
인슐린	Edlund et al., 1985
신경 세포 부착 분자(NCAM)	Hirsh et al., 1990
α_1 -안티트리파인	Latimer et al., 1990
H2B (TH2B) 히스톤	Hwang et al., 1990
마우스 및/또는 I형 콜라겐	Ripe et al., 1989

[0209]

[0210] [표 2B]

프로모터 및/또는 인핸서	
프로모터/인핸서	참조문헌
글루코스-조절된 단백질 (GRP94 및 GRP78)	Chang et al., 1989
랫트 성장 호르몬	Larsen et al., 1986
사람 혈청 아밀로이드 A (SAA)	Edbrooke et al., 1989
트로포닌 I (TN I)	Yutzev et al., 1989
혈소판 유래의 성장 인자 (PDGF)	Pech et al., 1989
뒤시엔느 근이영양증 SV40	Klamut et al., 1990
폴리오마	Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981; Sleight et al., 1985; Firak et al., 1986; Herr et al., 1986; Imbra et al., 1986; Kadesch et al., 1986; Wang et al., 1986; Ondek et al., 1987; Kuhl et al., 1987; Schaffner et al., 1988
레트로바이러스	Swartzendruber et al., 1975; Vasseur et al., 1980; Katinka et al., 1980, 1981; Tyndell et al., 1981; Dandolo et al., 1983; de Villiers et al., 1984; Hen et al., 1986; Satake et al., 1988; Campbell et al., 1988
파필로마 바이러스	Kriegler et al., 1982, 1983; Levinson et al., 1982; Kriegler et al., 1983, 1984a, b, 1988; Bosze et al., 1986; Miksicek et al., 1986; Celander et al., 1987; Thiesen et al., 1988; Celander et al., 1988; Chol et al., 1988; Reisman et al., 1989
B형 간염 바이러스	Campo et al., 1983; Lusky et al., 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz et al., 1985; Lusky et al., 1986; Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1987; Hirochika et al., 1987; Stephens et al., 1987
사람 면역결핍 바이러스	Bulla et al., 1986; Jameel et al., 1986; Shaul et al., 1987; Spandau et al., 1988; Vannice et al., 1988
사이토메갈로바이러스(CMV)	Muesing et al., 1987; Hauber et al., 1988; Jakobovits et al., 1988; Feng et al., 1988; Takebe et al., 1988; Rosen et al., 1988; Berkhout et al., 1989; Laspia et al., 1989; Sharp et al., 1989; Braddock et al., 1989
기본 원숭이 백혈병 바이러스	Weber et al., 1984; Boshart et al., 1985; Foelcking et al., 1986
	Holbrook et al., 1987; Quinn et al., 1989

[0211]

[0212] [표 3]

유도성 요소		
요소	유도제	참조문헌
MT II	포르볼 에스테르(TFA) 중금속	Palmiter et al., 1982; Haslinger et al., 1985; Searle et al., 1985; Stuart et al., 1985; Imagawa et al., 1987, Karin et al., 1987; Angel et al., 1987b; McNeill et al., 1989
MMTV(마우스 유선 종양 바이러스)	글루코코르티코이드	Huang et al., 1981; Lee et al., 1981; Majors et al., 1983; Chandler et al., 1983; Lee et al., 1984; Ponta et al., 1985; Sakai et al., 1988
β -인터페론	폴리(rl)x 폴리(rc)	Tavaernier et al., 1983
아데노바이러스 5 E2	E1A	Imperiale et al., 1984
콜라게나제	포르볼 에스테르(TPA)	Angel et al., 1987a
스토로멜리신	포르볼 에스테르(TPA)	Angel et al., 1987b
SV40	포르볼 에스테르(TPA)	Angel et al., 1987b
쥐 MX 유전자	인터페론 뉴캐슬병 바이러스	Hug et al., 1988
GRP78 유전자	A23187	Resendez et al., 1988
α -2-마크로글로불린	IL-6	Kunz et al., 1989
비덴틴	혈청	Rittling et al., 1989
MHC I형 유전자 H-2Kb	인터페론	Blanar et al., 1989
HSP70	E1A, SV40 대형 T 항원	Taylor et al., 1989, 1990a, 1990b
프로리페린	포르볼 에스테르-TPA	Mordacq et al., 1989
종양 괴사 인자	PMA	Hensel et al., 1989
갑상선 자극 α 유전자	갑상선 호르몬	Chatterjee et al., 1989

[0213]

[0214] 조직-특이적 프로모터 또는 요소의 확인 및 이들을 활성을 특성화하는 분석은 당해 분야의 숙련자에게 익히 공지되어 있다. 이런 영역의 비제한적 예는 사람 LIMK2 유전자 [참조: Nomoto et al., 1999], 소마토스타틴 수용체 2 유전자 [참조: Kraus et al., 1998], 쥐 부고환 레티논산-결합 유전자 [참조: Lareyre et al., 1999], 사람 CD4 [참조: Zhao-Emonet et al., 1998], 마우스 알파2 (XI) 콜라겐 [참조: Tsumaki, et al., 1998], D1A 도파민 수용체 유전자 [참조: Lee, et al., 1997], 인슐린-유사 성장 인자 II [참조: Wu et al., 1997], 사람 혈소판 내피세포 부착 분자-1 [참조: Almendro et al., 1996] 및 SM22 α 프로모터이다.

[0215] 또한, 텍틴-1 프로모터와 텍틴-2 프로모터가 본 발명에서 유용한 것으로 의도된다. 본 발명과 함께 사용될 수 있는 추가의 바이러스 프로모터, 세포 프로모터/인핸서 및 유도성 프로모터/인핸서는 표 2 및 3에 열거되어 있다. 추가로, 어떠한 프로모터/인핸서 조합(진핵 프로모터 데이터 베이스 EPDB에 관해)이라도 사용하여 올리고사카라이드 프로세싱 효소, 단백질 폴딩 보조 단백질, 선택가능한 마커 단백질 또는 관심대상의 이중 단백질을 암호화하는 구조 유전자의 발현을 유도할 수도 있다. 또는, 암 유전자 요법(표 4) 또는 종양의 표적화(표 5)를 위한 조직-특이적 프로모터를 본 발명의 핵산 분자와 함께 사용할 수 있다.

[0216] [표 4]

암 유전자 요법을 위한 후보 조직-특이적 프로모터

조직-특이적 프로모터	프로모터가 활성화된 암	프로모터가 활성화된 정상 세포
암성배아 항원(CEA)*	대부분의 직장결장 암종; 폐 암종의 50%; 위 암종의 40 내지 50%; 대부분의 췌장 암종; 다수의 유방 암종	결장 점막; 위 점막; 폐 상피; 에크린 땀샘; 고환내의 세포
전립선-특이적 항원(PSA)	대부분의 전립선 암종	전립선 상피
혈관활성 장 펩타이드(VIP)	대다수의 비소세포 폐암	신경세포; 림프구; 비만 세포; 호산구
표면활성 단백질 A(SP-A)	다수의 폐 선암종 세포	II형 폐세포; 클라라(Clara) 세포
사람 아카에트-스큐트 동족체(human achaete-scute homolog; hASH)	대부분의 소세포 폐암	폐내의 신경내분비 세포
뮤신-1(MUC1)**	대다수의 선암종(임의의 조직으로부터 기원함)	유방, 호흡기, 위장관 및 비뇨생식관내의 샘상피 세포
α-태아단백	대부분의 간세포 암종; 가능하게는 다수의 고환 암	간세포(특정 조건하에); 고환
알부민	대부분의 간세포 암종	간세포
티로시나제	대부분의 흑색종	멜라닌세포; 성상교세포; 슈만 세포; 일부 신경세포
티로신-결합 단백질(TRP)	대부분의 흑색종	멜라닌세포; 성상교세포; 슈만 세포; 일부 신경세포
케라틴 14	아마도, 다수의 편평세포 암종(예: 두경부 암)	각질세포
EBV LD-2	두경부의 다수의 편평세포 암종	상부 소화관의 각질세포, 하부 소화관의 각질세포
아교 섬유상 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein; GFAP)	다수의 성상교세포종	성상교세포
미엘린 염기성 단백질(MBP)	다수의 신경아교종	희소돌기아교세포
고환-특이적 안지오텐신-전환 효소(고환-특이적 ACE)	가능하게는 다수의 고환 암	정자
오스테오칼신	가능하게는 다수의 골육 종	골모세포

[0217]

[0218] [표 5]

종양의 조직-특이적 표적화와 함께 사용하기 위한 후보 프로모터

프로모터	프로모터가 활성화인 암	프로모터가 활성화인 정상 세포
E2F-조절된 프로모터	대부분의 암 세포	증식성 세포
HLA-G	다수의 직장결장 암종; 다수의 흑색종; 가능하게는 다수의 기타 암	림프구; 단핵구; 정모세포; 영양배엽
FasL	다수의 흑색종; 다수의 폐암종; 다수의 성상교세포; 가능하게는 다수의 기타 암	활성화된 림프구; 신경세포; 내피세포; 각질세포; 면역특별격리(immunoprivileged) 조직; 폐, 난소, 간 및 전립선내의 일부 세포
Myc-조절된 프로모터	대부분의 폐 암종(소세포 및 비소세포 둘다); 대부분의 직장결장 암종	증식성 세포(오직 일부 세포 유형); 포유동물 상피 세포(비증식성 세포를 포함)
MAGE-1	대부분의 흑색종; 일부 비소세포 폐암종; 일부 유방암종	고환
VEGF	모든 암종 70%(다수의 암에서의 구성적 과발현)	신생형관형성 부위의 세포(그러나, 종양에서와는 달리, 발현은 일시적이며 덜 강력하고 구성적이지 않다)
bFGF	아마도 다수의 상이한 암, bFGF 발현이 허혈성 조건에 의해 유도되기 때문	허혈 부위의 세포(그러나, 종양에서와는 달리, 발현은 일시적이며 덜 강력하고 구성적이지 않다)
COX-2	대부분의 직장결장암종; 다수의 폐암종; 가능하게는 다수의 기타 암	염증 부위의 세포
IL-10	다수의 직장결장암종; 다수의 폐암종; 두경부의 다수의 편평세포암종; 가능하게는 다수의 기타 암	백혈구
GFP78/BiP	아마도, 다수의 상이한 암, GRP78 발현이 종양-특이적 조건에 의해 유도되기 때문	허혈 부위의 세포
Egr-1로부터의 CarG 요소	이온화 방사선에 의해 유도, 따라서 방사선 조사시 생각될 수 있는 대부분의 종양	이온화 방사선에 노출된 세포; 백혈구

[0219]

[0220]

2. 개시 시그널 및 내부 리보솜 결합 부위

[0221]

암호화 서열의 효과적 전사를 위해 특정 개시 시그널이 또한 요구될 수 있다. 이러한 시그널에는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열이 포함된다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 전사 조절 시그널이 제공될 필요가 있다. 당해 분야의 숙련가라면 이를 용이하게 결정하여 필수적 시그널을 제공할 수 있을 것이다. 전체 삽입부의 전사를 보장하기 위해 개시 코돈이 바람직한 암호화 서열의 관독 프레임과 함께 "프레임내(in-frame)"에 존재해야한다는 것은 익히 공지되어 있다. 외인성 전사 조절 시그널 및 개시 코돈은 천연 또는 합성의 것일 수 있다. 발현 효율성을 적절한 전사 인핸서 요소를 포함시켜 증진시킬 수 있다.

[0222]

본 발명의 특정 양태에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 사용하여 다중유전자 또는 다시스트론성(polycistronic) 메세지를 생성시킨다. IRES 요소는 또한 5'- 메틸화 캡(Cap) 의존적 전사의 리보솜 스캐닝 모델을 우회하여 개시 부위에서 전사를 개시할 수 있다 [참조: Pelletier and Sonenberg, 1998]. 피코나바이러스과(폴리오 및 뇌심근염)의 두 구성원으로부터의 IRES 요소 [참조: Pelletier and Sonenberg, 1998] 뿐만 아니

라 포유동물 메세지로부터의 IRES [참조: Macejak and Sarnow, 1991]는 기술되어 있다. IRES 요소는 이중 개방 관독 프레임에 연결시킬 수 있다. 각각 IRES에 의해 분리된 다수의 개방 관독 프레임을 함께 전사시켜 다시 스트론성 메세지를 생성시킬 수 있다. IRES 요소로 인해, 각각의 개방 관독 프레임은 효율적 전사를 위해 리보솜에 접근가능해 진다. 다수의 유전자를 단일 메세지를 전사시키는 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현시킬 수 있다 [참조: 미국 특허 제5,925,565호 및 제5,935,819호; 이는 본원에서 참조로 인용된다].

[0223] 3. 다중 클로닝 부위

[0224] 벡터는 어떠한 것이라도 벡터를 분해시키기 위해 표준 재조합 기술과 병용하여 사용할 수 있는 다수의 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있다 [참조: Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997; 이는 본원에서 참조로 인용된다]. "제한 효소 분해"란 핵산 분자내의 특정 부위에서만 작용하는 효소를 이용한 핵산 분자의 촉매적 절단을 의미한다. 이러한 제한 효소 중 다수가 시판되고 있다. 이러한 효소의 사용은 당해 분야의 숙련가에 의해 널리 이해되고 있다. 흔히 벡터는 MCS 내부를 절단하여 내인성 서열이 당해 벡터에 연결될 수 있게 하는 제한 효소를 사용하여 선형화시키거나 단편시킬 수 있다. "연결"은 서로 연속적이거나 연속적이지 않을 수 있는 두 핵산 단편 간에 인산디에스테르 결합을 형성시키는 과정을 의미한다. 제한 효소와 연결 반응이 관여하는 기술은 재조합 기술 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있다.

[0225] 4. 스플라이싱 부위

[0226] 대부분의 전사된 진핵 RNA 분자는 RNA 스플라이싱에 도입되어 1차 전사체로부터 인트론이 제거될 수 있다. 게놈 진핵 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현을 위해 전사체의 적절한 프로세싱을 보장하기 위해 공여체 및/또는 수용체 스플라이싱 부위를 필요로 할 수 있다 [참조: Chandler et al., 1997, 이는 본원에서 참조로 인용된다].

[0227] 5. 종결 시그널

[0228] 본 발명의 벡터 또는 작제물은 일반적으로 하나 이상의 종결 시그널을 포함할 수 있다. "종결 시그널" 또는 "터미네이터"는 RNA 폴리머라제에 의한 RNA 전사체의 특이적 전사에 관여하는 DNA 서열로 이루어진다. 따라서, 특정 양태에서 RNA 전사체의 생산을 종결시키는 종결 시그널이 의도된다. 터미네이터는 목적하는 메세지 수준을 달성하기 위해 생체내에서 필수적일 수 있다.

[0229] 진핵 시스템에서, 터미네이터 영역은 또한 새로운 전사체가 부위-특이적 절단되어 폴리아데닐화 시그널에 노출되도록 하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이는 특수화된 내인성 폴리머라제에 시그널을 보내서 상기 전사체의 3' 말단에 약 200개의 A 잔기(폴리A)의 신장부가 첨가된다. 따라서, 진핵생물이 관여하는 다른 양태에서는, 터미네이터가 RNA의 절단에 대한 시그널을 포함하는 것이 바람직하고 터미네이터 시그널이 메세지의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이 보다 바람직하다. 터미네이터 및/또는 폴리아데닐화 부위 요소는 메세지 수준을 증진시키고/시키거나 카세트로부터 다른 서열내로의 관독을 최소화시키도록 작용할 수 있다.

[0230] 본 발명에서 사용하기 위해 의도된 터미네이터에는 예를 들어, 소 성장 인자 터미네이터와 같은 유전자의 종결 서열 또는 바이러스 종결 서열(예: SV40 터미네이터)를 포함하나 이에 제한되지 않는, 본원에서 기술하거나 당해 분야의 숙련가에게 공지된 전사의 모든 공지된 터미네이터가 포함된다. 특정 양태에서, 종결 서열에는 예를 들어, 서열 절두로 인해 전사가능한 또는 해독가능한 서열이 결여되어 있을 수 있다.

[0231] 6. 폴리아데닐화 시그널

[0232] 발현, 특히 진핵생물의 발현시에, 전형적으로 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 개시하는 폴리아데닐화 시그널이 포함될 수 있다. 폴리아데닐화 시그널의 성질이 본 발명의 성공적 실행에 결정적인 것으로 사료되지 않고/않거나 모든 이러한 서열을 사용할 수 있다. 바람직한 양태는 다양한 표적 세포에서 작용하기에 편리한 및/또는 작용하는 것으로 공지된, SV40 폴리아데닐화 시그널 및/또는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 시그널을 포함한다. 폴리아데닐화는 전사체의 안정성을 증가시킬 수 있거나 세포질내 수송을 촉진할 수 있다.

[0233] 7. 복제 오리진

[0234] 숙주 세포내에서 바이러스를 증식시키기 위해, 벡터는 복제가 개시되는 특이적 서열인 하나 이상의 복제 오리진 부위(흔히 "ori"로 명명됨)를 함유할 수 있다. 또는, 숙주 세포가 효모인 경우에는 자율 복제 서열(ARS)이 사용될 수 있다.

[0235] 8. 선택가능한 및 스크리닝가능한 마커

[0236] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 핵산 작제물을 함유하는 세포는 발현 벡터에 마커를 포함시킴으로써 시험 관내 또는 생체내에서 동정할 수 있다. 이러한 마커는 세포에 동정가능한 변화를 부여하여 발현 벡터를 함유하는 세포를 용이하게 동정할 수 있도록 한다. 일반적으로, 선택가능한 마커는 선택을 가능하게 하는 특성을 부여하는 마커이다. 양성 선택가능한 마커는 이러한 마커의 존재함으로써 이의 선택을 가능하게 하는 마커이다. 양성 선택가능한 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0237] 통상적으로, 약물 선택 마커의 포함은 형질전환체의 클로닝과 동정에 도움을 주며, 예를 들어, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선택가능한 마커이다. 조건의 이행에 기초하여 형질전환체를 식별할 수 있게 하는 표현형을 부여하는 마커 이외에, 그 기초가 비색정량 분석인 GFP와 같은 스크리닝가능한 마커를 포함하는 다른 종류의 마커도 또한 의도된다. 또는, 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 스크리닝가능한 효소를 사용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가라면, 가능하게는 FACS 분석과 함께 면역 마커를 사용하는 방법을 또한 알 것이다. 사용되는 마커는 유전자 산물을 암호화하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 것이라면, 중요한 것으로 사료되지 않는다. 선택가능한 및 스크리닝가능한 마커의 추가 예는 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있다.

[0238] D. 숙주 세포

[0239] 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"이란 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 용어들 모두는 임의의 모든 후속적 세대인 이의 자손을 포함한다. 모든 자손은 계획적 또는 우연한 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 이중 핵산 서열을 발현한다는 맥락에서, "숙주 세포"는 원핵 또는 진핵 세포를 의미하며, 벡터를 복제할 수 있고/있거나 벡터에 의해 암호화된 이중 유전자를 발현할 수 있는 모든 형질가능한 유기체를 포함한다. 숙주 세포는 벡터 또는 바이러스(이는 외인성 폴리펩타이드를 발현하지 않는다면 벡터로서의 자격이 없다)에 대한 수용체로서 사용할 수 있으며 이러한 수용체로서 사용되어 왔다. 숙주 세포는 "형질감염" 또는 "형질전환"될 수 있으며, 이는 변형된 단백질-암호화 서열과 같은 외인성 핵산이 숙주 세포내로 전이되거나 도입되도록 하는 과정을 의미한다. 형질전환된 세포는 1차 대상 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0240] 숙주 세포는 목적하는 결과가 벡터의 복제인지 또는 벡터-암호화된 핵산 서열의 일부분 또는 모두의 발현인지에 따라서 원핵생물 또는 효모 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포를 포함하는 진핵생물로부터 유래될 수 있다. 수많은 세포주와 세포 배양물이 숙주 세포로서 이용가능하며, 살아있는 배양물 및 유전 물질의 보관소로서 사용되는 기탁기관인 아메리칸 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection (ATCC)(www.atcc.org)을 통해서 입수할 수 있다. 적절한 숙주는 벡터 주쇄와 목적하는 결과에 기초하여 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 플라스미드 또는 코스미드를 예를 들어, 다수의 벡터의 복제를 위해 원핵 숙주 세포내로 도입시킬 수 있다. 벡터 복제 및/또는 발현용 숙주 세포로서 사용되는 세균 세포에는 DH5 α , JM109 및 KC8 뿐만 아니라, SURE^R Competent Cell 및 SOLOPACKTM Gold Cells(STRATAGENE^R, La Jolla, CA)와 같은 수많은 시판용 세균 세포가 포함된다. 또는, 이. 콜라이 LE392와 같은 세균 세포를 파지 바이러스용 숙주 세포로서 사용할 수 있다. 적절한 효모 세포에는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 폼베(*Saccharomyces pombe*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)가 포함된다.

[0241] 벡터 복제 및/또는 발현용 진핵 숙주 세포의 예에는 HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos 및 PC12가 포함된다. 다양한 세포 유형 및 유기체로부터의 다수의 숙주 세포가 이용가능하며 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 마찬가지로, 바이러스 벡터, 특히 벡터의 복제 또는 발현을 허용하는 바이러스 벡터를 진핵 또는

원핵 숙주 세포와 함께 사용할 수 있다.

[0242] 일부 박터는 당해 박터가 원핵 세포와 진핵 세포 둘다에서 복제 및/또는 복제되도록 하는 조절 서열을 사용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가라면 상기한 숙주 세포 모두를 배양하여 이를 유지하고 박터의 복제를 가능하게 하는 조건을 추가로 알고 있을 것이다. 또한, 박터의 대규모 생산 뿐만 아니라, 박터에 의해 암호화된 핵산, 이의 동족 폴리펩타이드, 단백질 또는 펩타이드의 생산을 가능하게 하는 기술과 조건이 이해되고 있으며 공지되어 있다.

[0243] E. 발현 시스템

[0244] 상기 논의한 조성물의 적어도 일부분 또는 모두를 포함하는 수많은 발현 시스템이 존재한다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 원핵생물계 및/또는 진핵생물계 시스템을 사용하여 핵산 서열 또는 이의 동족 폴리펩타이드, 단백질 및 펩타이드를 생산할 수 있다. 다수의 이러한 시스템은 시판되고 있으며 널리 입수가능하다.

[0245] 곤충 세포/배콜로바이러스 시스템은 미국 특허 제5,871,986호 및 제4,879,236호 [이들 둘다는 본원에서 참조로 인용된다]에 기재된 바와 같이 이중 핵산 분자의 고수준의 단백질 발현을 산출할 수 있으며 MAXBAC^R 2.0(제조원: INVITROGEN^R) 및 BACPACKTM BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM(제조원: CLONTECH^R)란 상표명하에 구입할 수 있다.

[0246] 본 발명에서 기재한 발현 시스템 이외에, 발현 시스템의 다른 예에는 합성 엑디손(ecdysone)-유도성 수용체를 포함하는 STRATAGENE^R's COMPLETE CONTROLTM 유도성 포유동물 발현 시스템 또는 이의 pET 발현 시스템인 이. 콜라이 발현 시스템이 포함된다. 유도성 발현 시스템의 또 다른 예에는 전체길이 CMV 프로모터를 사용하는 유도성 포유동물 발현 시스템인 T-REXTM(테트라사이클린-조절된 발현) 시스템을 보유한 INVITROGEN^R로부터 입수가능한 것이 포함된다. INVITROGEN^R은 또한 메틸요구성 효모 피치아 메타놀리카(*Pichia methanolica*)에서의 재조합 단백질의 고수준 생산용으로 디자인된 피치아 메타놀리카 발현 시스템으로 불리는 효모 발현 시스템을 제공한다. 당해 분야의 숙련가라면 발현 작제물과 같은 박터를 발현시켜 핵산 서열 또는 이의 동족 폴리펩타이드, 단백질 또는 펩타이드를 생산하는 방법을 알고있을 것이다.

[0247] F. 핵산 검출

[0248] 폭스바이러스 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드의 발현을 지시하는데 있어서의 이의 용도 이외에도, 본원에서 기술하는 핵산 서열은 다양한 다른 용도를 갖고 있다. 예를 들어, 당해 핵산은 핵산 하이브리드화를 포함하는 양태를 위한 프로브 또는 프라이머로서의 용도를 갖고 있다. 당해 핵산은 본 발명의 진단 또는 스크리닝 방법에서 사용할 수 있다. 폭스바이러스 또는 폭스바이러스 폴리펩타이드 조절자를 암호화하는 핵산의 검출이 본 발명에 포함된다.

[0249] 1. 하이브리드화

[0250] 길이가 13개 내지 100개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 17개 내지 100개의 뉴클레오타이드이거나 본 발명의 일부 측면에서 길이가 최대 1 내지 2킬로베이스 이상인 프로브 또는 프라이머의 사용하면, 안정하며 선택성인 이분쇄 분자를 형성시킬 수 있다. 수득된 하이브리드 분자의 안정성 및/또는 선택성을 증가시키기 위해서는, 길이가 20개 베이스 이상인 연속적 신장부보다 긴 상보 서열을 갖는 분자가 일반적으로 바람직하다. 일반적으로, 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드 또는 경우에 따라서는 보다 긴 상보 상보 서열 하나 이상을 갖는 하이브리드화용 핵산 분자를 디자인하는 것이 바람직하다. 이러한 단편은 예를 들어, 화학적 수단에 의해 단편을 직접적으로 합성하거나 선택된 재조합 서열을 재조합 생산용 재조합 박터내로 도입시켜 용이하게 제조할 수 있다.

[0251] 따라서, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 DNA 및/또는 RNA의 상보적 신장부와의 이분쇄 분자를 선택적으로 형성하거나 샘플로부터의 DNA 또는 RNA의 증폭용 프라이머를 제공하는 이의 능력으로 인해 사용할 수 있다. 고려되는 적용에 따라서, 다양한 하이브리드화 조건을 사용하여 표적 서열에 대한 프로브 또는 프라이머의 다양한 선택성 정도를 달성하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0252] 높은 선택성이 요구되는 적용의 경우, 전형적으로, 비교적 높은 엄격성 조건을 사용하여 하이브리드를 형성하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 약 50℃ 내지 약 70℃의 온도에서 약 0.02M 내지 약 0.10M NaCl에 의해 제공되는 바와 같은 비교적 낮은 염 및/또는 높은 온도 조건이 있다. 이러한 높은 엄격성 조건은 경우에 따라 프로브 또는 프라이머와 주형 또는 표적 채 간의 미스매치(mismatch)를 거의 용인하지 않으며 특정 유전자를 동정하거나 특정 mRNA 전사체를 검출하는데 특히 적합할 수 있다. 일반적으로, 조건은 포름아미드의 양으로 증가시키면서 첨가함으로써 보다 엄격해질 수 있는 것으로 이해된다.
- [0253] 특정 적용, 예를 들어, 부위-지시된 돌연변이유발의 경우, 보다 낮은 엄격성 조건이 바람직한 것으로 이해된다. 이러한 조건하에, 하이브리드화는 하이브리드화 채의 서열이 완벽하게 상보적이지 않을뿐 아니라 하나 이상의 부위에서 미스매치되는 경우라도 일어날 수 있다. 조건은 염 농도를 증가시키고/시키거나 온도를 감소시킴으로써 엄격성이 보다 덜해질 수 있다. 예를 들어, 중간정도의 엄격성 조건은 약 37℃ 내지 약 55℃의 온도에서 약 0.1 내지 0.25M NaCl에 의해 제공될 수 있는 반면, 낮은 엄격성 조건은 약 20℃ 내지 약 55℃ 범위의 온도에서 약 0.15M 내지 약 0.9M에 의해 제공될 수 있다. 하이브리드화 조건은 목적하는 결과에 따라서 용이하게 조작할 수 있다.
- [0254] 다른 양태에서, 하이브리드화는 예를 들어, 약 20℃ 내지 약 37℃의 온도에서의 50mM Tris-HCl(pH 8.3), 75mM KCl 3mM MgCl₂, 1.0 mM 디티오프레이톨의 조건하에 달성될 수 있다. 사용되는 다른 하이브리드화 조건은 약 40℃ 내지 약 72℃ 범의 온도에서의 약 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂를 포함한다.
- [0255] 특정 양태에서, 본 발명의 정의된 서열의 핵산을 하이브리드화를 결정하기에 적절한 수단, 예를 들어, 표지와 병용하여 사용하는 것이 유리할 수 있다. 형광성, 방사성, 효소적 리간드 또는 검출될 수 있는 기타 리간드, 예를 들어, 아비딘/바이오틴을 포함하는 광범위한 적절한 지시제가 당해 분야에 공지되어 있다. 바람직한 양태에서는, 방사성 또는 환경적으로 바람직하지 않은 기타 시약 대신에 형광성 표지 또는 우레아, 알칼리성 포스포타제 또는 퍼옥시다제와 같은 효소 태그를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 효소 태그의 경우, 가시적으로 또는 분광광도계에 의해 검출할 수 있는 검출 수단을 제공하여 상보적 핵산 함유 샘플과의 특이적 하이브리드화를 동정하기 위해 사용할 수 있는 비색정량 지시제 기질이 공지되어 있다.
- [0256] 일반적으로, 본원에서 기술하는 프로브 또는 프라이머는 상응하는 유전자의 발현을 검출하기 위한 PCR[™]과 같은 용액 하이브리드화에서 뿐만 아니라, 고체 상을 사용하는 양태에서 시약으로서 유용할 수 있다. 고체 상을 포함하는 양태에서, 시험 DNA(또는 RNA)는 선택된 매트릭스 또는 표면에 흡착되거나 또는 부착된다. 이어서, 상기 고정된 일본채 핵산은 바람직한 조건하에 선택된 프로브와 하이브리드화된다. 선택된 조건은 특정 상황(예를 들어, G+C 함량, 표적 핵산의 유형, 핵산 공급원, 하이브리드화 프로브의 크기 등에 의존함)에 따라 좌우될 수 있다. 관심대상의 특정 적용을 위한 하이브리드화 조건의 최적화는 당해 분야의 숙련자에게 익히 공지되어 있다. 하이브리드화된 분자를 세척하여 비-특이적으로 결합된 프로브 분자를 제거한 후, 결합된 표지의 양을 측정함으로써 하이브리드화를 검출 및/또는 정량화한다. 대표적 고체 상 하이브리드화 방법은 미국 특허 제 5,843,663호, 제5,900,481호 및 제5,919,626호에 기재되어 있다. 본 발명의 실행할 경우에 사용할 수 있는 다른 하이브리드화 방법은 미국 특허 제5,849,481호, 제5,849,486호 및 제5,851,772호에 기재되어 있다. 본 명세서의 본 단락에서 언급된 상기 참조문헌과 다른 참조문헌은 본원에서 참조로 인용된다.
- [0257] 2. 핵산의 증폭
- [0258] 증폭을 위한 주형으로 사용되는 핵산은 표준 방법학에 따라 세포, 조직 또는 다른 샘플로부터 분리할 수 있다 (문헌 [참조: Sambrook et al., 1989]). 특정 양태에서, 분석은 주형 핵산의 실질적인 정제 없이 전체 세포 또는 조직 균질물 또는 생물학적 유동 샘플 상에서 수행한다. 당해 핵산은 유전자 DNA 또는 분획된 세포 RNA 또는 전체 세포 RNA일 수 있다. RNA가 사용된 경우, 우선 RNA를 상보적 DNA로 전환시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0259] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프라이머"는 주형-의존적 방법에서 신생 핵산의 합성을 기폭시킬 수 있는 임의의 핵산을 포함함을 의미한다. 통상, 프라이머는 10 내지 20bp 및/또는 30bp 길이의 올리고뉴클레오타이드이지만, 보다 긴 서열을 사용할 수 있다. 프라이머는 이분쇄 및/또는 일본쇄 형태로 제공될 수 있지만, 일본쇄 형태가 바람직하다.
- [0260] 본원에서 동정된 유전자의 서열에 상응하는 핵산에 선택적으로 하이브리드화하도록 설계된 프라이머의 쌍을 선

택적 하이브리드화가 가능한 조건하에 주형 핵산과 접촉시킨다. 목적하는 적용에 따르면, 오직 프라이머에 완전히 상보적인 서열에만 하이브리드화되도록 하는 고도의 긴축형 하이브리드화 조건을 선택할 수 있다. 다른 양태에서, 하이브리드화는 감소된 긴축형 조건하에서 발생하여 프라이머 서열과의 하나 이상의 미스매치를 함유하는 핵산을 증폭시킬 수 있다. 일단 하이브리드화되면, 주형-프라이머 복합체를 주형-의존성 핵산 합성을 촉진시키는 하나 이상의 효소와 접촉시킨다. 다회의 증폭(또한 "주기"로 지칭되는)을 충분한 양의 증폭 생성물이 생산될 때까지 수행한다.

[0261] 증폭 생성물을 검출 또는 정량화할 수 있다. 특정 적용에서, 검출은 시각적 방법에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 검출은 화학발광법, 삽입된 방사선 표지 또는 형광 표지의 방사선 섬광그래프법 또는 심지어 전기적 및/또는 열적 충격 시그널을 사용하는 시스템을 통한 생성물의 간접적 확인을 포함할 수 있다 (문헌 [참조: Bellus, 1994]).

[0262] 다수의 주형 의존성 방법을 사용하여 주어진 주형 샘플에 존재하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 증폭시킬 수 있다. 가장 잘 공지된 증폭 방법 중 하나는 각각 전문이 본원에 참조로서 인용되어 있는 문헌, 미국 특허 제 4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호 및 문헌 [참조: Innis et al., 1988]에 상세히 기술되어 있는 폴리머라제 연쇄 반응(PCRTM으로 지칭됨)이다.

[0263] 역전사효소 PCRTM 증폭 과정을 수행하여 mRNA의 증폭량을 정량화할 수 있다. RNA의 cDNA로의 역전사 방법이 널리 공지되어 있다 (문헌 [참조: Sambrook et al., 1989]). 역전사를 위한 대안적 방법은 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한다. 이들 방법은 국제공개공보 제WO 90/07641호에 기술되어 있다. 폴리머라제 연쇄 반응 방법학은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. RT-PCR의 대표적 방법은 미국 특허 제5,882,864호에 기술되어 있다.

[0264] 증폭을 위한 다른 방법은 유럽 특허출원 제320 308호에 개시된 리가제 연쇄 반응("LCR")이며, 이의 전문은 본원에 참조로서 인용되어 있다. 미국 특허 제4,883,750호는 표적 서열에 대한 프로브 쌍의 결합에 대한 LCR과 유사한 방법을 기술한다. 또한 미국 특허 제5,912,148호에 개시된 PCRTM 및 올리고뉴클레오타이드 리가제 검정(OLA)를 기초로 하는 방법을 사용할 수 있다.

[0265] 본 발명의 실행에 사용될 수 있는 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 대안적 방법은 미국 특허 제5,843,650호, 제5,846,709호, 제5,846,783호, 제5,849,546호, 제5,849,497호, 제5,849,547호, 제5,858,652호, 제5,866,366호, 제5,916,776호, 제5,922,574호, 제5,928,905호, 제5,928,906호, 제5,932,451호, 제5,935,825호, 제5,939,291호 및 제5,942,391호, 영국 특허출원 제2 202 328호 및 PCT 출원 제PCT/US89/01025호에 기재되어 있으며, 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되어 있다.

[0266] 또한, PCT 출원 제PCT/US87/00880호에 기술되어 있는 큐베타(Qbeta) 레플리카제를 본 발명 중 증폭 방법으로 사용할 수 있다. 당해 방법에서, 표적의 서열에 대한 영역 상보성을 갖는 RNA의 복제 서열을 RNA 폴리머라제의 존재하에 샘플에 첨가한다. 당해 폴리머라제는 이어서 검출될 수 있는 복제 서열을 복사할 것이다.

[0267] 또한, 제한 엔도뉴클레아제 및 리가제를 사용하여 제한 위치의 한 쇠에 뉴클레오타이드 5'-[알파-티오]-트리포스페이트를 함유하는 표적 분자의 증폭을 수행하는 등온성 증폭 방법을 본 발명의 핵산의 증폭에 사용할 수 있다 (문헌 [참조: Walker et al., 1992]). 미국 특허 제5,916,779호에 개시되어 있는 쇠 치환 증폭(SDA)는 다회의 쇠 치환 및 합성, 즉, 틸(nick) 번역을 포함하는 등온성 핵산 증폭을 수행하는 다른 방법이다.

[0268] 다른 핵산 증폭 과정은 핵산 서열 기초 증폭(NASBA) 및 3SR (문헌 [참조: Kwoh et al., 1989; PCT 출원 제WO 88/10315호], 본원에 참조로서 인용되어 있음)을 포함하는 전사-기초 증폭 시스템(TAS)을 포함한다. 유럽 특허 제329 822호는 일본쇄 RNA("ssRNA"), ssDNA 및 이본쇄 DNA("dsDNA")를 순환적으로 합성함을 포함하는 핵산 증폭 방법을 개시하며, 이는 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0269] PCT 출원 제WO 89/06700호(이의 전문이 본원에 참조로서 인용되어 있음)는 프로모터 영역/프라이머 서열의 표적 일본쇄 DNA("ssDNA")에 대한 하이브리드화 및 이에 이은, 서열의 다수의 RNA 복사체의 전사를 기초로 한 핵산 서열 증폭 도식을 개시한다. 당해 도식은 순환적이지 않다(즉, 신규한 주형은 수득된 RNA 전사체로부터 생산되지 않는다). 다른 증폭 방법은 "RACE" 및 "단면 PCR"을 포함한다 (문헌 [참조: Frohman, 1990; Ohara et al., 1989]).

[0270] 3. 핵산의 검출

- [0271] 임의의 증폭 후, 주형 및/또는 과량의 프라이머로부터 증폭 생성물을 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 한 양태에서, 증폭 생성물을 표준 방법 (문헌 [참조: Sambrook et al., 1989])를 사용하는 아가로스, 아가로스-아크릴아미드 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리한다. 분리된 증폭 생성물을 추가의 조작을 위해 겔로부터 절단해 내고 용출시킬 수 있다. 저융점 아가로서 겔을 사용하여, 겔을 가열한 후 핵산을 추출함으로써 분리된 밴드를 제거할 수 있다.
- [0272] 또한, 핵산의 분리는 당해 분야에 공지된 크로마토그래프 기법에 의해 영향을 받을 수 있다. 본 발명의 실행에 사용될 수 있는 많은 종류의 크로마토그래피(흡착, 분배, 이온-교환, 수산화인회석, 분자체, 역상, 칼럼, 제지, 박층 및 기체 크로마토그래피 및 HPLC를 포함)가 있다.
- [0273] 특정 양태에서, 증폭 생성물을 가시화할 수 있다. 통상의 가시화 방법은 브롬화예티디움을 사용한 겔의 염색 및 UV 광하에서의 밴드의 가시화를 포함한다. 대안적으로, 증폭 생성물이 방사선- 또는 형광계수적으로 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 완전히 표지된 경우, 분리된 증폭 생성물을 x-선 필름에 노출시키거나 적합한 흥분성 스펙트럼하에 가시화시킬 수 있다.
- [0274] 한 양태에서, 증폭 생성물의 분리 후, 표지된 핵산 프로브를 증폭된 마커 서열과 접촉시킨다. 당해 프로브는 바람직하게는 발색단에 접합되지만 방사선표지될 수 있다. 다른 양태에서, 당해 프로브는 항체 또는 비오티인과 같은 결합 파트너 또는 검출이능한 잔기를 수반하는 다른 결합 파트너에 접합된다.
- [0275] 특정 양태에서, 표지된 프로브를 사용한 서던 블롯팅 및 하이브리드화에 의해 검출한다. 서던 블롯팅에 포함되는 기법은 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있다 (문헌 [참조: Sambrook et al., 1989]). 상술한 한 예는 본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허 제5,279, 721호에 기술되어 있으며, 이는 자동화 전기영동 및 핵산의 전달을 위한 기구 및 방법을 개시한다. 당해 기구는 겔의 외부적 조작 없이 전기영동 및 블롯팅을 가능하게 하며 본 발명에 따르는 방법을 수행하기에 이상적으로 적합하다.
- [0276] 본 발명의 실행에 사용될 수 있는 핵산 검출의 다른 방법은 미국 특허 제5,840,873호, 제5,843,640호, 제5,843,651호, 제5,846,708호, 제5,846,717호, 제5,846,726호, 제5,846,729호, 제5,849,487호, 제5,853,990호, 제5,853,992호, 제5,853,993호, 제5,856,092호, 제5,861,244호, 제5,863,732호, 제5,863,753호, 제5,866,331호, 제5,905,024호, 제5,910,407호, 제5,912,124호, 제5,912,145호, 제5,919,630호, 제5,925,517호, 제5,928,862호, 제5,928,869호, 제5,929,227호, 제5,932,413호 및 제5,935,791호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 인용되어 있다.
- [0277] 4. 다른 검정
- [0278] 예를 들면, 유전자 DNA, cDNA 및/또는 RNA 샘플내의 돌연변이를 검출하기 위해, 다른 유전자 스크리닝 방법을 본 발명의 영역 내에서 사용할 수 있다. 점돌연변이를 검출하기 위해 사용되는 방법은 변성 구배 겔 전기영동 ("DGGE"), 제한단편길이다형성 분석("RFLP"), 화학적 또는 효소적 절단 방법, PCRTM (상기 참조)에 의해 증폭된 표적 영역의 직접 서열화, 일본쇄형태다형성분석("SSCP") 및 당해 분야에 공지된 다른 방법을 포함한다.
- [0279] 점 돌연변이를 스크리닝하기 위한 한가지 방법은 RNA/DNA 또는 RNA/RNA 이중이본쇄 내의 염기쌍 미스매치의 RNase 절단을 기초로 한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "미스매치"는 이본쇄 RNA/RNA, RNA/DNA 또는 DNA/DNA 분자내의 하나 이상의 결합되지 않거나 잘못 결합된 뉴클레오타이드의 영역으로서 정의된다. 따라서 이러한 정의는 삽입/결실 돌연변이 및 단일 또는 다중 염기 점돌연변이에 기인한 미스매치를 포함한다.
- [0280] 미국 특허 제4,946,773호는 일본쇄 DNA 또는 RNA 시험 샘플의 RNA 프로브로의 어닐링 및 이에 이은 핵산 이본쇄의 RNase A로의 처리를 포함하는 RNase A 미스매치 절단 검정을 기술한다. 미스매치의 검출을 위해, 크기에 따라 전기영동적으로 분리된 RNase A 처리의 일본쇄 생성물을 유사하게 처리된 대조군 이본쇄와 비교한다. 대조군 이본쇄에 나타나지 않은 보다 작은 단편(절단 생성물)을 함유하는 샘플을 양성으로 기록한다.
- [0281] 다른 조사자는 미스매치 검정에서 RNase I의 사용을 기술하였다. 미스매치 검출을 위한 RNase I의 용도는 제조원 [Promega Biotech]으로부터의 문헌에 기술되어 있다. Promega는 4개의 공지된 미스매치 중 3개를 절단한다고 보고된 RNase I을 함유하는 키트를 시판하고 있다. 다른 조사자는 단일-염기 미스매치의 검출을 위한 MutS 단백질 또는 다른 DNA-복구 효소의 사용을 기술한다.
- [0282] 본 발명의 실행에 사용될 수 있는 결실, 삽입 또는 치환 돌연변이의 검출을 위한 대안적 방법이 미국 특허 제

5,849,483호, 제5,851,770호, 제5,866,337호, 제5,925,525호 및 제5,928,870호에 개시되어 있으며, 이들 각각의 전문이 본원에 참조로서 인용되어 있다.

[0283] G. 유전자 전달 방법

[0284] 본 발명의 조성물의 발현을 수행하기 위한 적합한 핵산 전달 방법은 실질적으로 본원에 기술되거나 당해 분야의 통상의 숙련가에게 공지된 바와 같은, 핵산(예를 들면, 바이러스 및 비바이러스 벡터를 포함하는 DNA)을 기관, 세포, 조직 또는 개체내로 도입할 수 있는 임의의 방법을 포함한다고 사료된다. 이러한 방법은 현미주사 (문헌 [참조: Harlan and Weintraub, 1985; 미국 특허 제5,789,215호], 본원에 참조로서 인용되어 있음)를 포함하는 주사(미국 특허 제5,994,624호, 제5,981,274호, 제5,945,100호, 제5,780,448호, 제5,736,524호, 제5,702,932호, 제5,656,610호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호, 각각 본원에 참조로서 인용되어 있음); 전기 충격법(미국 특허 제5,384,253호, 본원에 참조로서 인용되어 있음); 인산칼륨 침전법 (문헌 [참조: Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990]; DEAE-덱스트란 및 이에 이은 폴리에틸렌 글리콜의 사용 (문헌 [참조: Gopal, 1985]); 직접 음향 부하 (문헌 [참조: Fechheimer et al., 1987]); 리포솜 매개된 형질감염 (문헌 [참조: Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991]); 유전자 총(PCT 출원 제WO 94/09699호 및 제95/06128호; 미국 특허 제5,610,042호; 제5,322,783호, 제5,563,055호, 제5,550,318호, 제5,538,877호 및 제5,538,880호, 각각 본원에 참조로서 인용되어 있음); 탄화실리콘 섬유를 사용한 교반 (문헌 [참조: Kaeppler et al., 1990; 미국 특허 제5,302,523호 및 제5,464,765호], 본원에 참조로서 인용되어 있음); 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)-매개된 형질전환(미국 특허 제5,591,616호 및 제5,563,055호, 본원에 참조로서 인용되어 있음); 또는 원형질체의 PEG-매개된 형질전환 (문헌 [참조: Omirulh et al., 1993; 미국 특허 제4,684,611호 및 제4,952,500호], 각각 본원에 참조로서 인용되어 있음); 건조/억제-매개된 DNA 수용 (문헌 [참조: Potrykus et al., 1985])와 같은 방법에 의한 DNA의 직접 전달을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 기법의 적용을 통해, 기관(들), 세포(들), 조직(들) 또는 개체(들)을 안정적으로 또는 일시적으로 형질전환시킬 수 있다.

[0285] H. 지질 성분 및 잔기

[0286] 특정 양태에서, 본 발명은 핵산과 관련된 하나 이상의 지질, 아미노산 분자(예: 펩타이드) 또는 다른 소분자 화합물을 포함하는 조성물에 관련된다. 본원에 개시된 임의의 양태에서, 당해 분자는 폭스바이러스 폴리펩타이드 또는 폭스바이러스 폴리펩타이드 조절제, 예를 들면, 폭스바이러스 폴리펩타이드 전부 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산일 수 있거나, 대안적으로, 폭스바이러스 폴리펩타이드 조절제 전부 또는 이의 일부를 암호화하는 아미노산 분자일 수 있다. 지질은 불수용성이고 유기 용매로 추출가능함을 특징으로 하는 물질이다. 본원에 명확히 기술한 화합물 이외의 화합물들이 당해 분야의 숙련가에 의해 지질로서 이해되며, 본 발명의 조성물 및 방법에 포함된다. 지질 성분 및 비지질은 다른 화합물에, 공유적으로 또는 비공유적으로 결합될 수 있다.

[0287] 지질은 자연 발생적이거나 합성적(즉, 사람에게 의해 설계되거나 제조되는)일 수 있다. 그러나, 지질은 일반적으로 생물학적 물질이다. 생물학적 지질은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들면, 중성 지방, 인지질, 포스포글리세리드, 스테로이드, 터펜, 리소지질, 글리코스핑고지질, 글루코지질, 설��파티드, 에테르 및 에스테르-연결 지방산을 갖는 지질 및 중합체화 지질 및 이의 배합물을 포함한다.

[0288] 지질과 관련된 핵산 분자 또는 아미노산 분자(예: 펩타이드)는 지질을 함유하는 용액에 분산되고, 지질에 용해되고, 지질에 유화되고, 지질과 혼합되고, 지질과 배합되고, 지질에 공유적으로 결합되고, 지질에 현탁체로서 함유되거나 이와 달리 지질과 관련될 수 있다. 본 발명의 지질 또는 지질/폭스바이러스-관련 조성물은 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들면, 이들은 또한 단순히 용액에 분산되어, 크기 또는 모양에 있어서 단일 형태가 아닌 집합체를 형성할 수 있다. 다른 예에서, 이들은 미셀과 같은 이중층 구조 또는 "붕괴" 구조로 존재할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 리포펙타민(Gibco BRL)-폭스바이러스 또는 슈퍼펙트(Qiagen)-폭스바이러스 복합체가 또한 고려된다.

[0289] 특정 양태에서, 지질 조성물은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 약 30%, 약 31%, 약 32%, 약 33%, 약 34%, 약 35%, 약 36%, 약

37%, 약 38%, 약 39%, 약 40%, 약 41%, 약 42%, 약 43%, 약 44%, 약 45%, 약 46%, 약 47%, 약 48%, 약 49%, 약 50%, 약 51%, 약 52%, 약 53%, 약 54%, 약 55%, 약 56%, 약 57%, 약 58%, 약 59%, 약 60%, 약 61%, 약 62%, 약 63%, 약 64%, 약 65%, 약 66%, 약 67%, 약 68%, 약 69%, 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 100% 또는 이로부터 유도될 수 있는 임의의 범위의 특정 지질, 지질 유형 또는 비지질 성분(예: 약물, 단백질, 당, 핵산 또는 본원에 개시되거나 당해 분야의 숙련가에게 공지될 다른 물질)을 포함할 수 있다. 비제한적 실시예에서, 지질 성분은 약 10% 내지 약 20%의 중성 지질 및 약 33% 내지 약 34%의 세레브로시드 및 약 1%의 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 리포솜은 약 4% 내지 약 12%의 테르펜(여기서, 약 1%의 미셀은 구체적으로 리코펜이고, 나머지 3% 내지 약 11%는 다른 테르펜을 포함한다); 및 약 10% 내지 약 35%의 포스파티딜 콜린 및 약 1%의 약물을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 지질 조성물은 임의의 지질, 지질 유형 또는 다른 성분을 임의의 배합 또는 퍼센트 범위로 포함할 수 있다고 사료된다.

[0290] IV. 약제학적 제형, 전달 및 치료 요법

[0291] 본 발명의 양태에서, 백시니아 바이러스와 같은 변형된 폭스바이러스의 전달에 의한 암과 같은 과다증식성 장애의 치료방법이 고려된다. 치료를 위해 고려되는 암의 예에는 폐암, 두부 및 경부암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 골암, 고환암, 자궁암, 위장관암, 림프종, 폐내의 전신생물적 손상, 결장암, 흑색종, 방광암 및 치료될 수 있는 임의의 다른 암 또는 종양이 포함된다.

[0292] 약제학적 조성물의 유효량은 일반적으로 당해 질병 또는 이의 증상의 정도를 검출가능하고 반복가능하게 개선하거나, 감소시키거나, 최소화하거나 제한하기에 충분한 양으로 정의된다, 질병의 제거, 근절 또는 치료를 포함하는 보다 엄격한 정의가 적용될 수 있다.

[0293] 바람직하게는, 환자는 적합한 골수 기능($2,000/\text{mm}^3$ 초과)의 말초 절대 과립구수 및 $100,000/\text{mm}^3$ 의 혈소판 수로 정의됨), 적합한 간 기능(빌리루빈 $<1.5\text{mg/dl}$) 및 적합한 신장 기능(크레아티닌 $<1.5\text{mg/dl}$)을 가질 것이다.

[0294] A. 투여

[0295] 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하는, 세포 치사, 세포 성장 억제, 전이 억제, 종양 또는 조직 크기 감소 및 이와 달리는 종양 세포의 악성 표현형의 역전 또는 감소를 위해 일반적으로 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 작제물과 같은 치료적 화합물과 과다증식성 세포를 접촉시킬 것이다. 투여 경로는 손상의 위치 및 성질에 따라 자연적으로 다양할 것이며 예를 들면, 피내, 경피(transdermal), 비경구, 정맥내, 근육내, 비강내, 피하, 국부, 경피(percutaneous), 기관내, 복강내, 동맥내, 방광내, 종양내, 흡입, 관류, 세척, 직접 주사 및 경구 투여 및 제형을 포함한다.

[0296] 혈관 상태 또는 질병과 관련하여 치료적 이익을 달성하기 위해, 혈관 세포와 치료적 화합물을 접촉시킬 것이다. 암의 치료 또는 진단과 관련하여 논의된 임의의 제형 및 투여 경로를 또한 혈관 질병 및 상태와 관련하여 사용할 수 있다.

[0297] 종양내 주사 또는 종양 혈관계로의 주사는 별개의 고휘 접근가능 종양에 대해 특히 고려되고 있다. 국소, 국부 또는 전신계적 투여 또한 적용가능하다. 4cm 초과 종양에 대해, 투여될 용적은 약 4 내지 10ml(바람직하게는 10ml)일 것인 반면, 4cm 미만의 종양에 대해서는 약 1 내지 3ml의 양이 사용될 것이다(바람직하게는 3ml). 단일 용량으로서 전달되는 다중 주사는 약 0.1 내지 약 0.5ml 용적을 포함한다. 바이러스 입자는 다중 주사제를 투여함으로써 약 1cm 간격으로 위치해 있는 종양에 유리하게 접촉될 수 있다.

[0298] 외과수술적 발명의 경우, 본 발명은 수술불가능한 종양을 절제술에 대해 적용하도록 하기 위해 수술 전에 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명은 수술, 및/또는 수술 후에 잔류 질병 또는 전이성 질병을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들면, 폭스바이러스 폴리펩타이드 또는 폭스바이러스가 암 또는 암 세포의 치료에 유리하게 되도록 하는 돌연변이를 포함하는 폭스바이러스를 포함하는 제형을 절제된 종양상에 주사하거나 이로 관류시킬 수 있다. 당해 관류는 절제 후, 예를 들면, 수술 위치에 삽입된 도관을 남겨둠으로써 계속될 수 있다. 주기적 수술후 치료 또한 고려된다.

- [0299] 또한, 바람직한 경우(예를 들면, 종양이 제거되고 종양상이 치료되어 잔류, 미세 질병이 제거된 경우), 계속적 투여를 적용할 수 있다. 주사 또는 도관을 통한 전달이 바람직하다. 이러한 계속적 관류는 치료 개시 후 약 1 내지 2시간, 약 2 내지 6시간, 약 6 내지 12시간, 약 12 내지 24시간, 약 1 내지 2일, 약 1 내지 2주 또는 보다 장기간에 걸쳐 발생할 수 있다. 일반적으로, 계속적 관류를 통한 치료적 조성물의 용량은 관류가 발생하는 동안의 시간에 걸쳐 조정된 단일 또는 다중 주사에 의해 제공되는 것과 동량일 것이다. 추가로 특히 흑색종 및 육종의 치료에 본 발명의 치료적 조성물을 투여하기 위해 사지 관류를 사용할 수 있다.
- [0300] 치료 요법은 흔히 종양 유형, 종양 위치, 질병 진행 및 환자의 건강 및 연령에 따라 다양할 수 있다. 명백하게는, 종양의 특정 유형은 보다 공격적인 치료를 필요로 할 것인 반면, 동시에, 특정 환자는 보다 힘든 프로토콜을 견딜 수 없다. 임상의학자는 치료학적 제형의 공지된 효능 및 독성(만약 있다면)을 기준으로 하여 이러한 결정을 내리는 데 가장 적합할 것이다.
- [0301] 특정 양태에서, 치료될 종양은 최소한 초기에 절제될 수 없다. 치료적 바이러스 작제물을 사용한 치료는 경계에서의 수축 또는 특정한 두드러진 침략적 부위의 제거에 기인하여 종양의 절제가능성을 증가시킬 수 있다. 치료 후, 절제가 가능할 수 있다. 종양 위치에서 극미 잔류 질병을 제거하기 위해 절제에 이은 추가의 치료가 제공될 것이다.
- [0302] 원발성 종양 또는 절제 후 종양상에 대한 통상의 치료 과정은 다중 용량을 포함할 것이다. 통상의 원발성 종양 치료는 2주에 걸친 6회의 용량 적용을 포함한다. 2주간의 섭생을 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 그 이상 반복할 수 있다. 치료 과정 중, 계획된 투여를 완료하기 위해 재평가가 필요할 수 있다.
- [0303] 치료는 각종 "단위 용량"을 포함할 수 있다. 단위 용량은 치료적 조성물의 예비측정량을 함유하는 것으로 정의된다. 투여될 양 및 특정 경로 및 제형이 임상 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 단위 용량은 단일 주사로 투여될 필요는 없지만, 기간 세트에 걸친 계속적 주사를 포함할 수 있다. 본 발명의 단위 용량은 통상 바이러스 작제물에 대한 플라크 형성 단위(pfu)의 용어로 기술될 수 있다. 단위 용량은 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu 및 그 이상의 범위이다. 대안적으로, 바이러스의 종류 및 역가 획득가능성에 따라, 환자 또는 환자의 세포에 1 내지 100, 10 내지 50, 100 내지 1000 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} 또는 1×10^{15} 또는 그 이상의 감염성 바이러스 입자(vp)를 전달할 것이다.
- [0304] B. 주사가 가능한 조성물 및 제형
- [0305] 본 발명에서 폭스바이러스 계통 전부 또는 이의 일부를 암호화하는 발현 작제물 또는 바이러스의 암 또는 종양 세포로의 전달을 위한 바람직한 방법은 종양내 주사를 통해 이루어진다. 그러나, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 대안적으로 미국 특허 제5,543,158호; 미국 특허 제5,641,515호 및 미국 특허 제5,399,363호(각각 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되어 있음)에 개시되어 있는 바와 같이, 비경구, 정맥내, 피내, 근육내, 경피 또는 심지어 복강내로 투여될 수 있다.
- [0306] 핵산 작제물의 주사는 발현 작제물이 주사를 위해 필요한 특정 게이지의 바늘을 통해 통과될 수 있는 한 주사기 또는 용액의 주사를 위해 사용되는 임의의 다른 방법에 의해 전달될 수 있다. 용액을 저장하기 위한 앰플 챔버를 한정하기 위한 노즐 및 용액을 노즐로부터 전달 위치로 밀어내기 위한 에너지 장치를 갖는 신규한 무바늘 주사 시스템이 최근에 기술되어 있다(미국 특허 제5,846,233호). 또한 주사기 시스템은 임의의 깊이에서 정확하게 미리 측정된 양의 용액을 다중 주사할 수 있는 유전자 요법에서의 용도에 대해 기술되어 있다(미국 특허 제5,846,225호).
- [0307] 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 또한 분산제는 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 일반적인 조건하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 예방하기 위한 보존제를 함유한다. 주사가 가능한 용도에 적합한 약제학적 형태는 멸균 주사액 또는 분산제의 즉석 제조용 멸균 수용액 또는 분산제 및 멸균 산제를 포함한다(미국 특허 제5,466,468호, 이의 전문이 본원에 참조로서 명확히 인용되어 있음). 모든 경우에, 당해 형태는 멸균되어야 하며 용이한 주사가 가능성이 존재하는 범위로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건하에서 안정적이어야 하며 세균 및 진균과 같은 미생물의 오

염 작용에 대항하여 보존되어야 한다. 담체는 용매 또는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하는 분산 매질, 적합한 이의 혼합물 및/또는 식물성 오일일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복물의 사용, 분산제의 경우 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 각종 항세균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 수행될 수 있다. 많은 경우, 등장제, 예를 들면, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 당해 조성물에 흡수를 지연시키는 제제(예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 사용함으로써 주사가능한 조성물을 지속적으로 흡수시킬 수 있다.

[0308] 예를 들면, 수용액 중의 비경구 투여를 위해, 당해 용액은 필요에 따라 적합하게 완충되거나 액체 희석제는 우선 적합한 염수 또는 글루코스로 등장성이 되어야 한다. 이들 특정 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하, 종양내 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본원을 고려하여 당해 분야의 숙련자에게 공지될 것이다. 예를 들면, 하나의 투여량은 등장성 NaCl 용액 1ml에 용해될 수 있으며 피하주사 용액 1000ml에 첨가되거나 제안된 주사 위치로 주사될 수 있다(예를 들면, 문헌 [참조: Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 및 1570-1580]). 치료될 피검체의 상태에 따라 투여량에 일부 변형이 필요할 것이다. 투여를 담당하는 사람은 어떠한 경우에도 개별 피검체에 대한 적합한 용량을 결정할 것이다. 추가로, 사람 투여를 위해, 생물학적 표준의 FDA 관청에 의해 요구되는 바와 같은 멸균성, 발열성, 일반적 안정성 및 순도 표준을 충족시켜야 한다.

[0309] 멸균 주사액은 필요에 따라, 상기한 각종 다른 성분과 적합한 용매의 요구량의 활성 화합물을 혼입시킨 후 여과 멸균하여 제조한다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기한 바로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클로 각종 멸균된 활성 성분을 흡입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우, 바람직한 제조방법은 활성 성분의 산제와 임의의 추가의 바람직한 성분을 미리 멸균-여과시킨 이의 용액으로부터 생성시키는 진공-건조 및 동결-건조 기법이다.

[0310] 본원에 개시된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염(단백질의 유리 아미노 그룹으로 형성된)을 포함하며 이는 예를 들면, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된다. 유리 카복실 그룹으로 형성된 염은 또한 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래할 수 있다. 제형에 따라, 용액은 투여량 제형과 혼화가능한 방식 및 치료학적으로 유효한 양으로 투여될 것이다. 당해 제형은 주사액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 각종 투여 형태로 용이하게 투여된다.

[0311] 본원에 사용된 바와 같은 "담체"는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 피복물, 희석제, 항세균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 용도가 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 물질과 비혼화적임을 제외하는 한에서, 치료적 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 또한 추가의 활성 성분을 당해 조성물에 혼입시킬 수 있다.

[0312] 구 "약제학적으로 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는"은 사람에게 투여될 시, 알리지 또는 유사한 바람직하지 않은 반응을 유발하지 않는 분자 물질 및 조성물을 지칭한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제조가 당해 분야에서 널리 이해되고 있다. 통상, 이러한 조성물은 주사용, 액체 용액 또는 현탁액; 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태로 제조되며, 주사 전 액체로도 또한 제조될 수 있다.

[0313]

[0314] C. 배합 치료

[0315] 본 발명의 화합물 및 방법은 암 및 죽상경화증을 포함하는 과다증식성 질병/상태와 관련하여 사용될 수 있다. 약독화된 백시니아 바이러스와 같은 본 발명의 조성물을 사용한 치료의 유효성을 증가시키기 위해, 이들 질병 및 상태의 치료에 유효한 다른 제제와 이들 조성물을 배합하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 암의 치료는 본 발명의 치료적 화합물 및 다른 항암 요법(예: 항암제 또는 수술)를 사용하여 수행할 수 있다.

[0316] 각종 배합이 사용될 수 있다; 예를 들면, 약독화된 폭스바이러스(예: 백시니아 바이러스)는 "A"이고 제2의 항암 요법은 "B"이다:

[0317] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0318] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0319] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0320] 본 발명의 치료적 발현 작제물의 환자로의 투여는 폭스바이러스 치료의 독성(만약 있다면)을 고려하여, 특정한 제2의 치료의 투여에 대한 일반적 프로토콜을 따를 것이다. 치료 주기는 필요에 따라 반복될 것으로 기대된다. 또한 각종 표준 치료 및 수술 중재가 기술된 암 또는 종양 세포 치료와 함께 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

[0321] 1. 항암 요법

[0322] "항암"제는 예를 들면, 암 세포의 아폽토시스를 포함하여 암 세포를 치사시키고, 암 세포의 성장률을 억제하고, 전이의 발생 또는 횡수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 감소시키고, 종양 또는 암 세포로의 혈액 공급을 감소시키고, 암 세포 또는 종양에 대항하는 염증 반응을 촉진시키고, 암의 진행을 예방 또는 억제함으로써 피검체의 암에 음성적으로 영향을 주거나 암으로 투병중인 피검체의 수명을 연장시킬 수 있다. 항암제는 생물학적 제제(생물치료), 화학요법제 및 방사선요법제를 포함한다. 보다 일반적으로는, 이들 다른 조성물은 세포를 치사시키거나 세포의 증식을 억제하는 데 유효한 배합량으로 제공될 것이다. 이러한 방법은 세포를 발현 작제물 및 제제(들) 또는 다중 인자(들)과 동시에 접촉시킴을 포함할 수 있다. 이들은 세포를 단일 조성물 또는 둘 다의 약제를 포함하는 약리학적 제형과 접촉시키거나, 세포와 2개의 개별 조성물 또는 제형을 동시에 접촉시킴으로써 수행될 수 있다(여기서, 하나의 조성물은 발현 작제물이고 다른 하나는 제2의 제제(들)을 포함한다).

[0323] 화학요법 및 방사선요법에 대한 종양 세포 내성은 임상 종양학의 주된 문제를 나타낸다. 현재의 암 조사의 한 가지 목적은 유전자 요법과 화학- 및 방사선요법을 병용함으로써 이의 효능을 개선시키는 방법을 찾는 것이다. 예를 들면, 단순포진-티미딘 키나제(HS-tK) 유전자는 레트로바이러스 벡터 시스템에 의해 뇌 종양에 전달된 경우, 항바이러스 제제 간시클로비어에 대한 감수성을 성공적으로 유도하였다 (문헌 [참조: Culver et al., 1992]). 본 발명의 문맥에서, 폭스바이러스 치료는 유사하게 다른 전구-아폽토시스 또는 세포 주기 조절 제제 외에, 화학요법, 방사선요법, 면역요법 또는 다른 생물학적 중재와 함께 사용될 수 있었던 것으로 사료된다.

[0324] 대안적으로, 유전자 요법은 수분 내지 수주에 걸친 간격으로 다른 제제 치료를 선행하거나 뒤따를 수 있다. 다른 제제 및 발현 작제물이 세포에 개별적으로 적용되는 양태에서, 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 현저한 시간이 경과되지 않았기 때문에, 당해 제제 및 발현 작제물은 여전히 세포상에 유리한 배합 효과를 유발할 수 있을 것임이 입증될 것이다. 이러한 예에서, 세포를 각각 서로 약 12시간 내지 24시간 내에, 보다 바람직하게는 6 내지 12시간 내에 둘 다의 양식을 사용하여 접촉시킬 수 있는 것으로 사료된다. 그러나 일부 상황에서는, 치료 시간을 각각의 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8) 기간으로 현저히 연장시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0325] a. 화학요법

[0326] 암 요법은 또한 화학 및 방사선 기초 치료 둘 다를 사용한 각종 배합 요법을 포함한다. 배합 화학요법제는 예를 들면, 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로르암부실, 부설판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드(VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스트로겐 수용체 결합 제제, 탁솔, 겐시타비엔, 나벨빈, 파네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 전이백금, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토트렉세이트. 테마졸로미드(DTIC의 수성 형태) 또는 전술한 화합물의 임의의 유사체 또는 유도적 변형체를 포함한다. 생물학적 요법과 화학요법의 병용은 생화학요법으로서 공지되어 있다.

[0327] b. 방사선요법

[0328] DNA 손상을 유도하고 광범위하게 사용되는 다른 인자는 통상 γ -선, X-선 및/또는 종양 세포로의 방사선동위원소의 지시적 전달로서 공지된 것을 포함한다. 마이크로파 및 UV-방사와 같은 DNA 손상 인자의 다른 형태가 또한 고려된다. 이들 인자 모두 필시 DNA, DNA 전구체, DNA의 복제 및 복구 및 염색체의 조합 및 유지에 대한 넓

은 범위의 손상에 영향을 준다. X-선에 대한 선량 범위는 지속 기간(3주 내지 4주) 동안 50 내지 200뢴트겐의 일일 선량 내지 2000 내지 6000 뢰트겐의 단일 선량에 이른다. 방사선동위원소에 대한 선량 범위는 매우 다양하며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 따른다.

[0329] 용어 "접촉된" 및 "노출된"(세포에 적용된 경우)은 본원에 사용되어 치료적 작제물 및 화학요법제 또는 방사선 요법제가 표적 세포에 전달되거나 표적 세포와 직접으로 위치하는 방법을 기술한다. 세포 치사 또는 정체를 성취하기 위해, 둘 다의 제제를 세포를 치사시키거나 분열을 방지하는데 유효한 배합량으로 세포에 전달한다.

[0330] c. 면역요법

[0331] 일반적으로, 면역요법은 암 세포를 표적으로 하거나 파괴하기 위한 면역 효과기 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 면역 효과기는 예를 들면, 종양 세포의 표면상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 단독의 항체는 치료의 효과기로서 제공될 수 있거나 세포를 치사시키는 데 실질적으로 효과를 주기 위해 다른 세포를 모집할 수 있다. 또한 항체는 약물 또는 독소(화학치료적, 방사선뉴클리드, 리신 A쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)와 접합되거나 단지 표적화 제제로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 효과기는 종양 세포 표적과 직간접적으로 상호작용하는 표면 물질을 수반하는 림프구일 수 있다. 각종 효과기 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다. 치료적 양식의 배합, 즉, 직접적 세포독성 활성화 및 특정 폭스바이러스 폴리펩타이드의 억제 또는 감소는 암의 치료에 치료적 이익을 제공할 것이다.

[0332] 면역요법은 또한 배합된 치료의 일부로서 사용될 수 있다. 배합 치료를 위한 일반적 접근이 아래에 개시되어 있다. 면역요법의 한 측면에서, 종양 세포는 표적화되기 쉬운(즉, 주된 다른 세포 상에 존재하지 않는) 일부 마커를 포함해야 한다. 다수의 종양 마커가 존재하며 이들 중 일부는 본 발명과 관련하여 표적화에 적합할 수 있다. 통상의 종양 마커는 암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 비뇨기 종양 관련 항원, 태아 항원, 타이로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMGF, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 에스트로겐 수용체, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적 측면은 면역 자극 효과를 갖는 항암 효과이다. IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, IFN γ 와 같은 사이토카인, MIP-1, MCP-1, IL-8과 같은 키모카인 및 FLT3 리간드와 같은 성장 인자를 포함하는 면역자극 분자가 또한 존재한다. 단백질로서의 면역 자극 분자를 배합하거나 mda-7과 같은 종양 억제제와 함께 유전자 전달을 사용하는 것이 항종양 효과를 증강시키는 것으로 나타났다(문헌 [참조: Ju et al., 2000]).

[0333] 상기한 바와 같이, 현재 조사하고 있거나 사용중에 있는 면역요법의 예는 면역 보조제(예를 들면, 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 디니트로콜로벤젠 및 방향족 화합물)(미국 특허 제5,801,005호; 미국 특허 제5,739,169호; 문헌 [참조: Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998]), 사이토카인 치료(예를 들면, 인터페론 α , β 및 γ ; IL-1, GM-CSF 및 TNF)(문헌 [참조: Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998]), 유전자 요법(예를 들면, TNF, IL-1, IL-2, p53)(문헌 [참조: Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호) 및 모노클로날 항체(예를 들면, 항-강글리오시드 GM2, 항-HER-2, 항-p185)(문헌 [참조: Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; 미국 특허 제5,824,311호])이다. 헤르셉틴(트라스투주맵)은 HER2-neu 수용체를 막는 키메라성(마우스-사람) 모노클로날 항체이다. 이는 항종양 활성을 가지며 악성 종양의 치료에의 사용을 승인받았다(문헌 [참조: Dillman, 1999]). 헤르셉틴 및 화학요법을 사용한 암의 배합 요법은 개별 치료보다 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 하나 이상의 항암 치료는 본원에 기술한 폭스바이러스-관련 치료를 사용하여 수행할 수 있는 것으로 사료된다.

[0334] i) 수동적 면역요법

[0335] 암의 수동적 면역요법을 위한 다수의 상이한 접근방법이 존재한다. 이들은 다음과 같이 넓게 범주화될 수 있다: 항체만의 주사; 독소 또는 화학요법제와 커플링된 항체의 주사; 방사선 동위원소와 커플링된 항체의 주사; 항-유전형 항체의 주사; 및 마지막으로, 골수내의 종양 세포의 제거.

[0336] 바람직하게는, 사람 모노클로날 항체는 환자에게 부작용을 거의 유발하지 않거나 전혀 유발하지 않기 때문에 수동적 면역요법에 사용될 수 있다. 그러나, 이들의 적용은 희귀성에 의해 다소 제한적이며 지금까지 오직 손상 부위내로만 투여되었다. 강글리오시드 항원에 대한 사람 모노클로날 항체는 피부제발혹생종으로 투병중인 환자에 손상부위내적으로 투여된다(문헌 [참조: Irie and Morton, 1986]). 손상부위내적 주사 후 매일 또는 주간

위로, 10명 중 6명의 환자에게서 퇴행이 관찰되었다. 다른 연구에서, 2개의 사람 모노클로날 항체의 손상부위 내적 주사로부터 중간정도의 성공이 성취되었다 (문헌 [참조: Irie et al., 1989]).

[0337] 2개의 상이한 항원 또는 심지어 다중 항체 특이성을 갖는 항체에 대해 지시된 1개 이상의 모노클로날 항체를 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 치료 프로토콜은 또한 문헌 [참조: Bajorin et al., (1988)]에 기술된 바와 같이 림포카인 또는 다른 면역 증진제의 투여를 포함할 수 있다. 사람 모노클로날 항체의 개발은 본 명세서의 다른 곳에 추가로 상세히 기술되어 있다.

[0338] ii) 능동적 면역요법

[0339] 능동적 면역요법에서는, 일반적으로 항원성 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질, 또는 자가 또는 동종 종양 세포 조성물 또는 "백신"을 독특한 세균성 보조제와 함께 투여한다 (문헌 [참조: Ravindranath and Morton, 1991; Morton et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Mitchell et al., 1993]). 흑색종 면역요법에서, 고도의 IgM 반응을 유발하는 이들 환자는 흔히 IgM 항체를 전혀 유발하지 않거나 낮게 유발하는 환자보다 더 잘 생존한다 (문헌 [참조: Morton et al., 1992]). IgM 항체는 흔히 일과성 항체이며 항-갱글리오시드 또는 항탄수화물 항체에 대해서는 당해 규칙에 대한 예외가 나타난다.

[0340] iii) 입양 면역요법

[0341] 입양 면역요법에서, 환자의 순환 림프구 또는 종양 침투 림프구를 IL-2와 같은 림포카인으로 활성화시키거나 종양 괴사에 대한 유전자로 형질도입시켜 시험관내에서 분리하고 재투여했다 (문헌 [참조: Rosenberg et al., 1988; 1989]). 이를 수행하기 위해, 동물 또는 사람 환자에, 본원에 기술된 바와 같은 보조제-혼입된 항원성 펩타이드 조성물과 배합된 면역학적 유효량의 활성화 림프구를 투여할 것이다. 활성화된 림프구는 가장 바람직하게는 혈액 또는 종양 샘플로부터 초기에 분리되고 시험관내에서 활성화된(또는 "확장된") 환자 자신의 세포일 것이다. 이러한 면역요법의 형태는 여러 경우의 흑색종 및 신장 암종의 퇴행을 유발하였지만, 반응체의 퍼센트는 반응하지 않는 사람과 비교하여 매우 작았다.

[0342] d. 유전자

[0343] 다른 양태에서, 제2의 치료는 치료적 폴리뉴클레오타이드를 약독화된 폭스바이러스를 투여하기 전, 후 또는 동시에 투여하는 유전자 요법이다. 다음의 유전자 생성물 중 하나를 암호화하는 벡터와 접합된 폭스바이러스의 전달은 표적 조직상에 배합된 항암 효과를 가질 것이다. 대안적으로, 폭스바이러스는 치료적 폴리뉴클레오타이드를 포함하도록 바이러스 벡터로서 설계될 수 있다. 각종 단백질이 본 발명에 포함되며, 이들 중 일부는 아래에 기술되어 있다. 표 7은 본 발명과 함께 하는 임의의 형태의 유전자 요법에 대해 표적화될 수 있는 각종 유전자를 나열한다.

[0344] i) 세포 증식의 유도제

[0345] 추가로 세포 증식을 유도하는 단백질을 기능에 따라 각종 범주로 묶는다. 모든 이들 단백질의 공통점은 세포 증식을 조절할 수 있는 능력이다. 예를 들면, PDGF의 형태, 시스(sis) 종양유전자는 방출된 성장 인자이다. 종양유전자는 성장 인자를 암호화하는 유전자로부터 거의 발생하지 않으며, 현재, 시스는 유일하게 공지된 자연 발생적 종양유전성 성장 인자이다. 본 발명의 한 양태에서는, 세포성 증식의 특정 유도체로 지시된 안티-센스 mRNA를 세포 증식의 유도체의 발현을 억제하기 위해 사용하고자 한다.

[0346] 단백질 FMS, ErbA, ErbB 및 neu는 성장 인자 수용체이다. 이들 수용체의 돌연변이는 조절 기능의 손실을 초래한다. 예를 들면, Neu 수용체 단백질의 경막 도메인에 영향을 주는 점돌연변이는 neu 종양유전자를 초래한다. erbA 종양유전자는 갑상선 호르몬에 대한 세포내 수용체로부터 유래한다. 변형된 종양유전자성 ErbA 수용체는 내인성 갑상선 호르몬 수용체와 경쟁하여 비제어된 성장을 유도하는 것으로 사료된다.

[0347] 종양유전자의 가장 큰 부류는 시그널 변환 단백질(예를 들면, Src, Abl 및 Ras)을 포함한다. 단백질 Src는 세포질 단백질-티로신 키나제이며, 몇몇 경우에 원발성-종양유전자의 종양유전자로의 형질전환이 티로신 잔기 527

에의 돌연변이를 통해 발생한다. 대조적으로, 한가지 예에서, GTPase 단백질 ras의 원발성-종양유전자에서 종양유전자로의 형질전환은 서열 중 아미노산 12에서 발린의 글라이신으로의 돌연변이에 의해 초래되며, 이는 ras GTPase 활성을 감소시킨다.

[0348] 단백질 Jun, Fos 및 Myc는 전사 인자로서 핵 기능에 대한 이들의 영향을 직접적으로 발휘하는 단백질이다.

[0349] ii) 세포 증식의 억제제

[0350] 종양 억제제 종양유전자는 과도한 세포 증식을 억제하는 기능을 한다. 이들 유전자의 불활성화는 이들의 억제 활성을 파괴하며, 조절되지 않은 증식을 초래한다. 종양 억제제 p53, p16 및 C-CAM은 아래에 기술되어 있다.

[0351] 아래에 기술되어 있는 p53외의 다른 세포 증식 억제제는 p16이다. 진핵세포 주기의 주된 변이는 사이클린-의존성 키나제 또는 CDK에 의해 유발된다. 한 CDK, 사이클린-의존성 키나제 4(CDK4)는 G₁기를 통해 진행을 조절한다. 당해 효소의 활성은 G₁ 만기에 Rb를 인산화시키는 것일 수 있다. CDK4의 활성은 활성화 아단위, D-형 사이클린 및 억제성 아단위에 의해 제어되며, p16^{INK4}는 CDK4에 특이적으로 결합하여 이를 억제하는 단백질로서 생화학적으로 특징화되었고, 따라서 Rb 인산화를 조절할 수 있다 (문헌 [참조: Serrano et al., 1993; Serrano et al., 1995]). p16^{INK4} 단백질이 CDK4 억제제이기 때문에(Serrano, 1993), 이들 유전자의 결실은 CDK4의 활성을 증가시켜 Rb 단백질의 과다인산화를 초래할 수 있다. p16은 또한 CDK6의 기능을 조절하는 것으로 공지되어 있다.

[0352] p16^{INK4}는 또한 p16^B, p19, p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1}을 포함하는 CDK-억제성 단백질의 신규히 기술된 부류에 속한다. p16^{INK4} 유전자는 많은 종양 유형에서 빈번히 결실된 유전자 영역인 9p21에 대해 맵핑된다. p16^{INK4} 유전자의 동종 접합 결실 및 돌연변이는 사람 종양 세포주에서 빈번하다. 이러한 증거는 p16^{INK4} 유전자가 종양 억제 유전자임을 제안한다. 그러나 이러한 해석은 p16^{INK4} 유전자 치환의 빈도가 배양된 세포주에서보다 원발성 비배양 종양에서 매우 낮다는 관찰에 의해 도전을 받아왔다 (문헌 [참조: Caldas et al., 1994 ; Cheng et al., 1994; Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994; Kamb et al., 1994; Mori et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Nobori et al., 1994; Orloff et al., 1994; Arap et al., 1995]). 플라스미드 발현 벡터를 사용한 형질 감염에 의한 야생형 p16^{INK4} 기능의 복구는 일부 사람 암 세포주에 의한 콜로니 형성을 감소시켰다 (문헌 [참조: Okamoto, 1994; Arap, 1995]).

[0353] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 유전자는 Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zc1, p73, VHL, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, p27/p16 융합, p21/p27 융합, 항혈전 유전자(예를 들면, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, 혈관형성에 포함되는 유전자(예를 들면, VEGF, FGF, 트롬보스폰딘, BAI-1, GDAIF 또는 이들의 수용체) 및 MCC를 포함한다.

[0354] iii) 프로그램된 세포사멸의 조절자

[0355] 아폽토시스 또는 프로그램된 세포사멸은 정상 배아 발달, 성숙한 조직에서의 항상성 유지 및 발암 억제를 위한 필수 과정이다 (문헌 [참조: Kerr et al., 1972]). 단백질의 Bcl-2 계열 및 ICE-유사 프로테아제는 다른 시스템에서 중요한 조절자 및 아폽토시스의 효과기인 것으로 입증되어 왔다. 소포 림프종과 관련되어 발견된 Bcl-2 단백질은 다양한 아폽토시스성 자극에 대한 반응에 대한 아폽토시스 조절 및 세포 생존 증진에서 중요한 역할을 수행한다 (문헌 [참조: Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto and Croce, 1986]). 현재 진화적으로 유지된 Bcl-2 단백질은 관련 단백질계의 구성원인 것으로 인지되며, 이는 치사 효능제 또는 치사 길항제로서 범주화될 수 있다.

[0356] 이의 발견에 이어, Bcl-2는 각종 자극에 의해 유발된 세포 치사를 억제하기 위해 작용하는 것으로 나타났다. 또한, 현재 공통적 구조 및 서열 상동성을 공유하는 Bcl-2 세포 치사 조절 단백질의 계열임이 명백하다. 이들 상이한 계열 구성원은 Bcl-2와 유사한 기능을 갖거나(예를 들면, Bcl_{XL}, Bcl_W, Bcl_S, Mcl-1, A1, Bfl-1) Bcl-2 기능에 역으로 작용하거나 세포 치사를 증진시키는 것으로 나타났다(예를 들면, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

- [0357] e. 수술
- [0358] 암으로 투병 중인 환자 중 약 60%는 예방, 진단 또는 시기결정, 치료 및 완화 수술을 포함하는 임의의 유형의 수술을 받을 것이다. 치료 수술은 본 발명의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 치료와 같은 다른 치료와 함께 사용될 수 있는 암 치료이다.
- [0359] 치료 수술은 종양 조직 모두 또는 이의 일부를 물리적으로 제거, 삭제 및/또는 파괴하는 절제를 포함한다. 종양 절제는 최소한 종양의 일부의 물리적 제거를 지칭한다. 종양 절제 외에, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 저온수술, 전자수술 및 현미경에 의해 조절되는 수술(모즈 수술)을 포함한다. 또한, 본 발명은 표면 암, 전암 또는 수반되는 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있는 것으로 사료된다.
- [0360] 모든 암 세포, 조직 또는 종양 중 일부의 절제에 따라, 체내에 공동이 형성될 수 있다. 추가의 항암 치료와 함께 당해 영역의 관류, 직접 주사 또는 국소 적용에 의해 치료를 수행할 수 있다. 이러한 치료는 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 또는 1, 2, 3, 4 및 5주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12달마다 반복할 수 있다. 이들 치료는 또한 다양한 투여량으로 수행할 수 있다.
- [0361] f. 다른 제제
- [0362] 치료의 치료 효능을 개선시키기 위해 본 발명과 함께 다른 제제를 사용하고자 한다. 이들 추가 제제는 면역조절제, 세포 표면 수용체 및 GAP 접합의 상향조절에 영향을 주는 제제, 세포증식 및 분화 제제, 세포 부착의 억제제, 아포토시스 유도체에 대한 과다증식성 세포의 감수성을 증가시키는 제제 또는 다른 생물학적 제제를 포함한다. 면역조절제는 종양괴사인자; 인터페론 α , β 및 γ ; IL-2 및 다른 사이토카인; F42K 및 다른 사이토카인 유사체; 또는 MIP-1, MIP-1 β , MCP-1, RANTES 및 다른 키모카인을 포함한다. 또한, 세포 표면 수용체 또는 이들의 리간드(예를 들면, Fas/Fas 리간드, DR4 또는 DR5/TRAIL(Apo-2 리간드))의 상향조절은 과다증식성 세포에 대한 자가분비 또는 외분비 효과의 성취에 의한 본 발명의 아포토시스 유도 능력을 강화하는 것으로 사료된다. 다수의 GAP 접합의 상승에 의한 증가된 세포내 시그널전달은 인접한 과다증식성 세포 집단에 대한 항과다증식성 효과를 증가시킬 것이다. 다른 양태에서, 세포증식 또는 분화 제제는 본 발명과 함께 사용되어 당해 치료의 항과다증식성 효능을 개선시킬 수 있다. 세포 부착의 억제제는 본 발명의 효능을 개선시키는 것으로 사료된다. 세포 부착 억제제의 예는 병소 부착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 또한, 아포토시스에 대한 과다증식성 세포의 감수성을 증가시키는 다른 제제(예: 항체 c225)가 본 발명과 함께 사용되어 치료 효능을 개선시킬 수 있는 것으로 사료된다.
- [0363] Apo2 리간드(Apo2L, 또한 TRAIL로 지칭됨)는 종양괴사인자(TNF) 사이토카인 계열의 구성원이다. TRAIL은 많은 유형의 암 세포에서 급속한 아포토시스를 활성화시키지만, 정상 세포에는 유해하지 않다. TRAIL mRNA는 매우 다양한 조직에서 발생한다. 대부분의 정상 세포는 TRAIL 세포독성 작용에 내성인 것으로 나타나며, 이는 TRAIL에 의한 아포토시스 유도에 대해 방어할 수 있는 메커니즘의 존재를 제안한다. TRAIL에 대해 기술된 제1 수용체(치사 수용체 4(DR4)로 지칭됨)는 세포질 "치사 도메인"을 함유하고; DR4는 TRAIL에 의해 운반되는 아포토시스 시그널을 전파한다. 추가의 수용체가 TRAIL에 결합하는 것으로 확인되었다. DR5로 지칭되는 한 수용체는 DR4와 같은 세포질 치사 도메인 및 시그널 아포토시스를 함유한다. DR4 및 DR5 mRNA는 많은 정상 조직 및 종양 세포주에서 발현된다. 최근, DcR1 및 DcR2와 같은 유인 수용체가 TRAIL이 DR4 및 DR5를 통해 아포토시스가 유도되는 것을 억제함이 확인되었다. 따라서 이들 유인 수용체는 세포 표면에서 직접적으로 전구-아포토시스 사이토카인에 대한 감수성을 조절하는 신규한 메커니즘을 나타낸다. 정상 조직에서의 이들 억제제 수용체의 우선적 발현은 TRAIL이 정상 세포에는 해를 끼치지 않는 반면, 암 세포에서는 아포토시스를 유도하는 항암제로서 유용할 수 있음을 제안한다 (문헌 [참조: Marsters et al., 1999]).
- [0364] 세포독성 화학요법 약물의 도입 후 암 치료에는 많은 발전이 있어왔다. 그러나, 화학요법의 결과 중 하나는 약물-내성 표현형의 발달/획득 및 다중 약물 내성의 발달이다. 약물 내성의 발달은 이러한 종양의 치료에 주요한 장애를 유지하며 따라서, 유전자 요법과 같은 대안적 접근에 대한 명백한 필요성이 있다.
- [0365] 화학요법, 방사선요법 또는 생물학적 요법과 함께 사용하기 위한 다른 치료 형태는 고체온증을 포함하며, 이는 환자의 조직을 높은 온도(106°F 이하)에 노출시키는 과정이다. 외부 또는 내부 가열 장치는 국소, 국부 또는 전신 고체온증의 적용에 포함될 수 있다. 국소 고체온증은 종양과 같은 작은 영역에 대한 열 적용을 포함한다.

열은 신체 외부의 장치로부터 종양을 표적으로 하는 고주파를 사용하여 외부적으로 발생시킬 수 있다. 내부 열은 얇은 가열된 철사 또는 온수로 채워진 공동 튜브를 포함하는 멸균 프로브, 이식된 극초단파 안테나 또는 방사선주파수 일렉트로드를 포함할 수 있다.

[0366] 환자의 기관 또는 사지를 국부 치료를 위해 자석과 같은 고에너지를 발생시키는 장치를 사용하여 가열시킨다. 대안적으로, 환자의 혈액 중 일부를 제거하고 가열 한 후 내부적으로 가열될 영역으로 관류시킬 수 있다. 또한 암이 전신에 퍼져있는 경우 전신 가열기를 삽입시킬 수 있다. 온수 블랭킷, 고온 왁스, 유도 코일 및 열 챔버를 이러한 목적을 위해 사용할 수 있다.

[0367] 또한 호르몬 요법을 본 발명과 함께 또는 상기한 임의의 다른 암 치료와 함께 사용할 수 있다. 호르몬을 유방, 전립선, 난소 또는 자궁암과 같은 특정 암의 치료에 사용하여 테스토스테론 또는 에스트로겐과 같은 특정 호르몬의 효과의 수준을 낮추거나 차단할 수 있다. 이러한 치료는 흔히 치료 옵션으로서 또는 전이의 위험을 감소시키기 위해 하나 이상의 다른 암 치료와 함께 사용된다.

[0368] [표 6a]

종양유전자

유전자	근원	사람 질병	기능
성장 인자			FGF 계열 구성원
HST/KS	형질감염		FGF 계열 구성원
INT 2	MMTV 프로모터 삽입		인자-유사
INT1/WNT1	MMTV 프로모터 삽입		PDGF B
SIS	유인원 육종 바이러스		
수용체 타이로신 키나제			
ERBB/HER	조류 적혈모구증 바이러스; ALV 프로모터 삽입; 증폭된 사람 종양	증폭된, 결실된 편평세포 암; 아교모세포종	EGF/TGF- α / 암피레굴린/ 헤타셀룰린 수용체
ERBB 2/NEU/HER 2	랫트 아교모세포종으로부터 형질감염됨	증폭된 유방, 난소, 위암	NDF/헤레굴린 및 EGF-관련 인자에 의해 조절됨 CSF-1 수용체
FMS	SM 고양이 육종 바이러스		MGF/스틸 수용체
KIT	HZ 고양이 육종 바이러스		조혈
TRK	사람 결장암으로부터 형질감염		NGF(신경성장인자) 수용체
MET	사람 골육종으로부터 형질감염		산란 인자/HGF 수용체
RET	전위 및 점돌연변이	산발성 갑상선암; 가족수질 갑상선암; 다중 내분비 신생물 2A 및 2B	오르판 수용체 Yyr 키나제 TEL(STS-유사 전사인자)/PDGF 수용체 유전자 융합
ROS	URII 조류 육종 바이러스		
PDGF 수용체	전위	만성 골수단핵구백혈병	
TGF- β 수용체		결장 암종 미스매치 돌연변이 표적	
비수용체 타이로신 키나제			

[0369]

[0370] [표 6b]

ABI.	아벨손 Mu1.V	BCR을 갖는 만성 골수백혈병 전위	RB, RNA, 폴리머라제, CRK, CBL 과의 상호작용
FPS/FES	조류 푸지나미 SV; GA FeSV		Src 계열; T 세포 시그널전달; CD4/CD8 T 세포와의 상호작용
LCK	Mu1.V(쥐 백혈병 바이러스) 프로모 터 삽입		시그널전달 기능을 갖는 막관련 Tyr 키나제; 수용체 키나제에 의 해 활성화됨
SRC	조류 로스 육종 바 이러스		Scr 계열; 시그널전달
YES	조류 Y73 바이러스		
SER/THR 단백질 키나제			
AKT	AKT8 쥐 레트로바 이러스		PI(3)K?에 의해 조절됨; 70-kd S6 k?를 조절함
MOS	말로니 쥐 SV		GVBD; 세포증식 인자; MAP 키나 제 키나제
PIM-1	프로모터 삽입 마 우스		RAS 경로 중 시그널전달
RAF/MIL	3611 쥐 SV; MH2 조류 SV		
기타 세포 표면			
APC	종양 억제제	결장암	카테닌과의 상호작용
DCC	종양 억제제	결장암	CAM 도메인
E-카드헤린	후보 종양 억제제	유방암	세포외 동종 결합; 카테닌과의 세포내 상호작용
PTC/NBCCS	종양 억제제 및 초 파리 상동성	모반 기저 세포 암 증후군(고글 린 증후군)	12개의 경막 도메인; 헛지호그 경로를 길항하기 위해 Gli 상동 성 CI를 통해 시그널전달
TAN-1 홈 상동성	전위	T-ALL	시그널전달

[0371]

[0372]

[표 6c]

기타 시그널전달			
BCL-2 CBL	전위 Mu Cas NS-1 V	B-세포 림프종	아폽토시스 타이로신- 인산화된 RING 핑거는 Ab1과 상호작용 적용된 SH2/SH3는 Ab1 과 상호작용
CRK	CT1010 ASV		TGF- β -관련 시그널전 달 경로
DPC4	종양 억제제	폐장암	가능한 안지오텐신 수 용체
MAS	형질감염 및 종양원성		적용기 SH2/SH3
NCK			
구아닌 뉴클레오타이드 교환기 및 결합 단백질			
BCR		CML에서 ABL로 전위됨	교환기; 단백질 키나제 교환기
DBL	형질감염		
GSP NF-1	유전성 종양 억제제	종양 억제제 신경섬유종증	RAS GAP
OST 하비-키르스텐 N-RAS	형질감염 HaRat SV; Ki RaSV; Balb-MoMuSV; 형질감염	많은 사람 종양 중의 점 돌연변이	교환기 시그널 다단계
VAV	형질감염		S112/S113; 교환기
핵 단백질 및 전사 인자			

[0373]

[0374] [표 6d]

BRCA1 BRCA2 ERBA	유전성 억제제 유전성 억제제 조류 적혈모구혈정 바이러스	유방암/난소암 유방암	국소화 중요 기능 비공지 갑상선 호르몬 수용체(전사)
ETS EVII FOS	조류 E26 바이러스 MuLV 프로모터 삽입 FBI/FBR 쥐 골육종 바이러스	AML	DNA 결합 전사 인자 c-JUN을 갖는 전사 인자
GLI	증폭된 신경아교종	신경아교종	아연 핑거; 팔꿈치 인터럽투스 상동성이 헛지호그 시그널전달 경로에 있다; 억제성 연결 PTC 및 헛지호그 유전자 융합 고 이동성 그룹
HMGI /LIM	전위 t(3:12) t(12:15)	림프종	HMGI-C(XT-혹) 및 전사 인자 LIM 또는 산성 도 메인
JUN	ASV-17		FOS를 갖는 전사 인자 AP-1
MLL/VHRX + ELI/MEN	전위/ELL과 MLL의 융합 트리토락스-유사 유전 자	급성 골수 백혈병	DNA-결합의 유전자 용 합 및 ELI RNA pol II 연장 인자를 갖는 메틸 트랜스퍼라제 MLL DNA 결합
MYB	조류 골수보구증 바이 러스		MAX 파트너와 DNA 결합; 사이클린 조절; RB?와 상호작용; 아포 토시스 조절?
MYC	조류 MC29; 전위 B-세 포 림프종; 프로모터 삽입 조류 백혈증 바이 러스 증폭됨	버킷 림프종	
N-MYC L-MYC REL	조류 레트리쿨로엔도텔 리오시스 바이러스	신경모세포종 폐암	NF-κB 계열 전사 인자 전사 인자
SKI	조류 SKV770 레트로바 이러스		음성 조절자 또는 연장 자; 전사 연장 복합체 전사 인자
VHL	유전성 억제제	폰 히펠-란다우 증후군	
WT-1		윌름 종양	

[0375]

[0376] [표 6e]

유전자	근원	사람 질병	기능
세포 주기 상해 반응			
ATM	유전성 장애	모세혈관확장성조화 운동불능	단백질/지질 키나제 상동성; DNA 상해는 P53 경로 중 상류에서 반응한다 아포토시스
BCL-2 FACC	전위 점돌연변이	소포 림프종 관코니 빈혈 그룹 C(소인 백혈병)	
FHIT	취약 위치 3p14.2	폐 암종	히스티딘 세징후-관련 디아데노신 5',3''''-P ¹ .P ⁴ 테트라포스페이트 비대칭 하이드롤라제
hMLI/MutL		HNPCC	미스매치 복구; MutL 상동성
HMSH2/MutS		HNPCC	미스매치 복구; MutS 상동성
HPMS1		HNPCC	미스매치 복구; MutL 상동성
hPMS2		HNPCC	미스매치 복구; MutL 상동성
INK4/MTS1	9p21에서의 인접 INK-4B; CDK 복합체	후보 MTS1 억제제 및 MLM 흑색 종 유전자	p16 CDK 억제제
INK4B/MTS2		후보 억제제	p15 CDK 억제제
MDM-2	증폭됨	육종	음성 조절제 p53
p53	SV40 T 항원과 관련	유전성 Li-프라우메니 증후군을 포함한, 사람 종양의 50% 초과가 변이됨	전사 인자; 확인점 조절; 아포토시스
PRAD1/BCL1	부갑상선 호르몬 또는 IgG로 전위	부갑상선 부종; B-CLL	사이클린 D
RB	유전성 망막모세포종; 많은 DNA 바이러스 종양 항원과 관련	망막모세포종; 골육종; 유방암; 다른 산발성 암	사이클린/cdk와 상호작용; E2F 전사 인자 조절
XPA		색소성 피부건조증; 피부암 소인	삭제 복구; 광생성물 인지; 아연 핑거

[0377]

[0378] 실시예

[0379] 다음의 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 입증하기 위해 포함시켰다. 본 발명의 실행에서 잘 작용하도록 본 발명자에 의해 발견된, 실시예에 개시된 대표적 기법은 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 수 있으며, 따라서 이의 실행을 위한 바람직한 양식을 구성하도록 고려될 수 있다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는 본원을 고려하여, 개시된 특정 양태에 많은 변화가 있을 수 있으며 본 발명의 정신 및 영역에서 벗어나지 않으면서도 여전히 같거나 유사한 결과를 수득할 수 있음을 이해해야 한다.

[0380] 실시예 1:

[0381] 세포주에서의 백시니아 바이러스 증식

[0382] 16개의 상이한 일상적으로 입수가 가능한 백시니아 바이러스 실험용 종/입수가 가능한 돌연변이체(및 토끼폭스 및 기

타 폭스바이러스)의 패널을 평가하였다: 코펜하겐, 다이렌, 에반스, USSR, 타쉬켄트, 티안 탄, WR, IHD-J, IHD-W, 리스터, NYCBOH, 파트와단가르, 킹 및 WR 돌연변이체 B8R, B18R 및 B13R. 암 세포 및 정상 세포 둘 다에서 복제를 평가하였다. 바람직한 바이러스는 암 세포에서 상대적으로 고도로 복제될 것이며 정상 세포에서의 복제는 감소될 것이다(즉, 종양 및 정상 세포 사이의 보다 큰 치료 비율 또는 지수). 2가지의 사람 종양 세포주를 시험하였다: A2780 결장 암종 및 HCT116 결장암종(아메리칸 타입 컬처 콜렉션). 정상 세포는 정상 사람 기관지 상피(NHBE) 세포를 포함하였다. 증식중인 세포를 사용한 세포변성 효과 검정을 위해, 세포를 70% 합류(2% FBS를 갖는 DMEM)에서 배양하고, 이 때 세포를 0.001 내지 10의 다중감염(MOI)으로 감염시켰다. 5일 내지 6일 후, 플레이트를 MTT(Promega)로 염색하고 흡수율을 정량화하였다. 정상 세포는 합류를 완료하도록 성장시키고 이어서 0.2% FBS를 갖는 DMEM에서 배양시킨 후에 비증식성이었다. 증식의 결핍은 세포 주기 검정 및 세포 계수에 의해 확증되었다. 각각의 샘플을 4회 검정하였고 2회 이상 반복하였다. 바이러스 복제 검정을 위해, 세포를 70% 합류(37°C, 5% CO₂, NHBE 세포를 위한 추가의 성장 인자를 보충한 2% FBS를 갖는 DMEM-문헌 [참조: Heise et al., (2000)]에서와 같이)로 배양하였고, 이 시기에 세포를 각각의 바이러스를 사용한 1 또는 10의 다중감염(MOI, 세포당 입자 비율)으로 감염시켰다. 3시간 항온처리한 후, 배지를 제거하고 신선한 보충 배지로 교체하였다. 48시간 후(이전 데이터는 백시니아 복제가 당해 시점에 최고치를 기록하였음을 입증하였다), 세포 및 상등액 둘 다를 바이러스 적정 분석을 위해 수거하였다. 세포 용해물을 동결 및 해동의 3주기에 적용시킨 후, 초음파기/수욕에서 30초간 펄스시켰다. 이어서 슈크로스 쿠션을 통해 바이러스를 정제하고 상등액을 연속 희석시키고 용해물을 BSC-1 세포 상에서 적정하였다 (문헌 [참조: Alcamì and Smith(1995)]에 기술된 바와 같은 정제 및 적정).

[0383] 예시 결과는 도 1 내지 4에 나타내져 있다. 2개의 암종 주에서의 코펜하겐 바이러스의 복제는 당해 검정에서 모든 다른 바이러스와 동등하거나 보다 우세하였다(도 1A 및 1B; y-축은 ml +/-S.E.당 플라크-형성 단위이다). 대조적으로, 정상 사람 세포에서 코펜하겐은 다른 바이러스에 비해 약독화되었다(도 2). 마지막으로, 정상 세포에 대한 암 세포에서의 과열비는 도 3(A2780:NHBE) 및 도 4(HCT116:NHBE)에 모든 바이러스에 대해 나타내져 있다. 코펜하겐은 A2780(P<0.001) 및 HCT116(p<0.001) 둘 다에서 현저히 큰 과열비를 가졌다. 코펜하겐에 대한 과열비는 각각 약 20,000 및 30,000이었던 반면, 모든 다른 바이러스는 5000 미만의 과열비를 가졌고, 대부분은 2000 미만의 과열비를 가졌다(예를 들면, 리스터(Lister) 및 와이어쓰(Wyeth)). 유사하게, A2780 및 HCT116에서의 시험관내 세포변성 효과 검정 중 코펜하겐에 의해 치사된 종양 세포는 리스터 및 NYCBOH 중 이상이었다.

[0384] 실시예 2:

[0385] 파클리탁셀과 배합된 백시니아 바이러스

[0386] 아테노바이러스 및 HSV와 같은 바이러스를 화학요법과 함께 시험하여 왔지만, 백시니아 바이러스는 시험하지 않았다(코펜하겐 종을 포함하여). 프로드럭-활성화 효소(예를 들면, 티미드 키나제)를 발현하도록 조작된 VV를 프로드럭-활성화 유전자 생성물에 의한 활성화 후 독성이 된 상대적으로 독성이 없는 프로드럭과 함께 시험하였다 (문헌 [참조: Puhlmann et al., 2000]).

[0387] 암 환자 및 백시니아 바이러스의 치료에 승인된 표준 세포독성 화학요법 사이의 상승효과는 백시니아 및 구체적으로는 코펜하겐 종을 포함한, 폭스바이러스에 대해 우호적 특성이 될 것이다. 파클리탁셀(a.k.a. 탁솔)은 미국 및 유럽에서 암 환자에 사용되도록 승인되어 있다. VV 코펜하겐을 HCT116 및 LNCaP 암 세포주 둘 다에서 탁솔과 함께 시험하였다. 이소볼로그람 생성 및 분석은 탁솔과 함께 한 VV의 상승효과를 나타내었다(도 5). 이소볼로그람은 도 6, 7, 8 및 9에 예시된 세포 생존에 대한 MTS 검정(예: CellTiter96^R 수성 비방사선 세포 증식 검정(카탈로그 제G5421호, Promega Corp., Madison, WI))으로부터 유래한 데이터를 사용하여 생성되었다. 도 5에서의 모든 데이터의 점은 (어떠한 상승효과도 길항작용도 존재하지 않는 경우) 데이터점의 예상되는 위치를 상징화하는 줄 아래에 놓여있고; 따라서 이들 데이터는 이들 암종 세포주의 치사에서 상승효과적 상호작용을 지지한다.

[0388] 당해 방법은 37°C에서 5% CO₂, 10% FCS를 갖는 DMEM 중 96 웰 디쉬에서 세포주를 배양함을 포함한다. 일단 세포가 50% 합류에 도달하면, 배지를 2% FCS를 갖는 DMEM으로 교환하고 이들을 파클리탁셀(용량 범위 3x10⁻⁸ 내지 3x10⁻⁴ nM, 로그 증가) 및/또는 바이러스(셀당 10⁻⁶ 내지 10⁵ 입자의 MOI에서의 VV 코펜하겐)로 처리하였다. 세포

를 1) 목크-처리, 2) 오직 바이러스-처리, 3) 오직 탁솔-처리, 4) 바이러스 처리 후 탁솔 처리하였다. 세포를 총 6일 동안 감염시킨 후 MTS 검정(Promega, WI, USA, 제조 지침 참조)에 적용시켰다. 세포를 총 6일 동안 탁솔에 노출시킨 후 MTS 검정(제조 지침 참조)에 적용시켰다. 당해 배합물로 처리한 세포를 동일한 방식으로 바이러스만으로 처리한 그룹에 감염시킨 후 즉시 상기한 바와 같이 탁솔로 처리하였다(바이러스:탁솔 고정비로). 이어서 세포를 상기한 바와 같이 검정하였다. MTS 세포 생존 데이터를 도 6, 7, 8 및 9에서와 같이 대조군 세포 생존 퍼센트로 표현하였다. 상승효과의 평가를 위한 데이터 분석(이소볼로그그램 생성 및 분석)은 문헌 [참조: Nielsen et al., (1997, 1998)]에 기술되어 있다. 요약하면, 용량 반응 곡선을 산출하여 각각의 세포(즉, 및 모든 시험 조건)에 대해 각각의 세포주(비처리 세포와 비교하여)에 대한 EC_{50} 값을 계산하였다. 각각의 제제의 9가지의 농도를 단독 및 배합하여 사용하였다(상기 참조). VV/파클리탁셀에 대한 4가지 상이한 희석비가 각각의 실험(3, 33, 333, 3333)에 포함되었다. 이소볼로그그램을 생성하여 상승효과 또는 길항 효과를 측정하였다. 각각의 데이터점은 3회의 샘플을 나타내었다.

[0389] 실시예 3:

[0390] 백시니아 바이러스 투여로부터 기인한 종양 퇴행

[0391] PBS $100\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 5×10^5 CMT-64 세포 또는 10^6 CMT-93 세포(쥐 직장 암종)를 C57B/6 마우스의 옆구리로 피하 주사하여 피하 쥐 종양 이종이식체를 형성하였다. 제1 실험에서, B8R 및 B18R 중 VV WR 중 돌연변이체를 1, 3 및 5일에 일일당 $40\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 10^4 내지 10^8 입자의 용량으로 면역적격 C57/B6 마우스의 옆구리에서 피하 CMT-93 종양(조정된 기저 종양 크기 $40\text{--}100\mu\text{l}$)으로 주사하였다. 단일 바늘 천공을 종양의 중앙에 제조하고 4개의 바늘 트랙을 각각의 종양 사분원으로 제조하였다. 당해 용액 중 약 1/4을 바늘을 빼면서 각각의 트랙으로 주사하였다. 대조군은 프소랄렌-UV 불활성화 바이러스 또는 PBS를 사용하여 동일한 처리를 하였다. 양차원의 종양 측정을 2주마다 수행하였고 다음의 공식에 의해 종양 부피를 계산하였다: (길이)(너비)(깊이)(3.14/6).

[0392] 현저한 항종양 효과 및 증가된 생존이 비히클 또는 불활성화된 바이러스 대조군-주사 종양에 비교하여 입증되었고, 용량-반응 관계가 나타났다. 10^8 또는 10^{10} B8R 돌연변이체-VV로 처리한 10마리의 마우스 중 8마리는 완전한 종양 퇴행을 나타내었고 추적조사 중(총 3개월) 종양이 없는 채로 유지되었다. B18R을 동일한 용량 수준으로 주사받은 10마리의 마우스 중 9마리는 완전한 퇴행을 가졌으며 동일한 후속조사 기간 동안 종양이 없는 채로 유지되었다. 오직 하나의 영속적 완전 퇴행이 대조군 그룹에서 보고되었다. 평균 생존은 2주였으며 모든 마우스는 처리 개시 24일 후에 치사시켰다. 생존은 10^8 내지 10^{10} 입자 처리 그룹에서 현저히 증가하였다(KM 생존 분석, 로그 등급 시험; $p < 0.01$). 동물을 전체적 외양(예를 들면, 활성, 주름진 털)에 대해 관찰하였고 주마다 2회 체중을 재었으며; 어떠한 현저한 체중 또는 외양 변화도 보고되지 않았다.

[0393] 이어서 동일한 처리/주사 요법을 CMT-64 쥐 종양 이종이식체 모델에서 B18R 및 비히클 대조군을 사용하여 수행하였다. 비록, 어떠한 완전한 반응도 입증되지 않았지만, 치사를 필요로 하는 종양 진행에 대한 시간의 연장이 B18R-처리 그룹 대 PBS 또는 프소랄렌-UV-불활성화 바이러스에 대해 매우 현저하였다(평균 대략 2주 대 4주; $p < 0.05$, 로그 등급 시험, 종양 진행에 기인한 치사에 대한 시간의 Kaplan-Meier 분석).

[0394] 실시예 4:

[0395] 쥐 종양 이종이식체에 관한 EEV-증강된 효능

[0396] PBS $100\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 5×10^5 JC 쥐 유방 암종 세포를 면역적격 BALB/c 마우스의 옆구리에 주사하여 피하 쥐 종양 이종이식체를 형성하였다. 일단 이들이 주사가 가능한 크기에 도달하면(기저 종양 크기 40 내지 $100\mu\text{l}$), 웨스턴 리저브(IHD-J 돌연변이가 없는 WR), WR의 IHD-J 돌연변이체(A34R/K151D 돌연변이체) 바이러스 또는 PBS를 피하 JC 종양으로 주사하였다. 1, 3 및 5일에 PBS $40\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 바이러스 용량은, 일일 10^{10} 입자였다(치료 그룹 당 $n=8$ 마리 마우스). PBS 대조군을 유사한 요법으로 주사하였다. 단일 바늘 천공을 종양의 중앙에 제조하고 4개의 바늘 트랙을 각각의 종양 사분원으로 제조하였다. 당해 용액 중 약 1/4을 바늘을 빼면서 각각의 트랙으로 주사하였다. 대조군은 PBS를 사용하여 동일한 처리를 하였다. 양차원의 종양 측정을 2주마다 수행하였고 다음의 공식에 의해 종양 부피를 계산하였다: (길이)(너비)(깊이)(3.14/6).

- [0397] PBS-처리 또는 웨스턴 리저브-처리 그룹에 비교하여 IHD-J-처리 그룹은 현저한 항종양 효과(종양 성장 지연 및 종양 축소) 및 증가된 치사를 요하는 시간-대-종양-성장(즉, 생존)을 입증하였다. 카플란-메이어 생존 분석을 기준으로 하여, IHD-J 그룹의 치사를 요하는 시간-대-종양-진행(생존)은 로그 등급 통계 시험(생존 곡선을 비교하기 위해 사용한)을 기준으로 하여 PBS($p < 0.05$) 및 WR($p < 0.05$) 둘 다에 비해 현저히 우수하였다. 평균 생존 시간은 2개의 대조군 그룹은 2주였고 IHD-J는 4.5주였다. 임의의 치료 그룹 중의 마우스 중 어느 것도 임의의 현저한 전체적 독성이 입증되지 않았으며 어떠한 처리-관련 동물 치사도 발생하지 않았다. IHD-J 돌연변이체는 증가된 독성 없이 항종양 효능(IHD-J 돌연변이체가 없는 WR 바이러스와 비교하여)에 현저한 개선을 초래하였다. 종양은 피하에서 성장할 것이며 치료는 이들이 직경 2 내지 6mm에 이를 때 개시될 것이다.
- [0398] 실시예 5:
- [0399] 인터페론-결합 유전자의 결실 및 IFN-내성 암 세포 대 정상 세포에 대한 증가된 선택성
- [0400] 인터페론(IFN)-결합 유전자에 결실이 있는 폭스바이러스가 야생형 대조군 폭스바이러스에 비교하여 보다 큰 종양-선택성을 가지며 정상 세포에서 복제가 감소되는지의 여부를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. WR(웨스턴 리저브) 및 B18R 유전자(B18R)에 결실이 있는 WR 돌연변이체를 IFN-알파의 존재 또는 부재하에 복제에 대해 비교하였다(1,000단위/ml을 시험관내 감염 5시간 후에 적용하였다)(도 10). 시험된 세포는 정상 기관지 상피 세포(NHBE, Clonetics Corp., USA), C33A 사람 자궁 암종 세포(ATCC) 및 HCT116 사람 결장 암종 세포(ATCC)였다. 안내 시험에서, 이들 세포를 24시간 동안 IFN(5,000단위/ml)으로 초기에 예비처리한 후 이들 바이러스로 감염시켜 바이러스 복제에 대한 인터페론 효과에 대한 이들의 선택성을 측정하였다. 예상된 바와 같이, 둘 다의 바이러스는 인터페론 예비-처리에 의한 억제에 동등하게 감수성이었다. NHBE 및 HCT116 세포는 바이러스 복제가 IFN 처리의 존재하에서 현저히 감소되었기 때문에 IFN-감수성인 것으로 입증되었고; C33A 세포는 IFN-예비처리가 바이러스 복제에 어떠한 현저한 영향을 주지 않았기 때문에 IFN-내성이었다.
- [0401] 암 세포는 10% FCS를 갖는 DMEM에 배양하였고; 정상 세포는 공급원의 지침서에 기술되어 있는 바와 같은 혈청 보충물을 갖는 DMEM에서 배양하였다. 세포가 약 70% 합류에 도달했을 때, 세포를 세포당 10개 입자의 다중감염(moi)으로 감염시켰다. 감염 5시간 후, IFN을 1,000단위/ml(IFN+세포)의 농도로 배지에 첨가하거나 첨가하지 않았다(IFN-세포). 세포 및 용해물을 감염 48시간 후 수거하였고 표준 VV 분리 및 바이러스 적정(플라크-형성 단위 측정)을 수행하였다(본원에 참조로서 인용되어 있는 문헌 [참조: Tscharke et al., 2002]에 기술되어 있는 바와 같은 BS-C-1 세포상에서의 적정). 도 10에 나타낸 바와 같이, B18R에 돌연변이를 갖는 VV는 NHBE($p < 0.01$, 학생의 t-시험 대 IFN의 부재하에서의)를 포함하는, 2가지의 IFN-감수성 세포 유형에서 IFN의 존재하에 복제를 현저히 억제하였다. 대조적으로, 이러한 돌연변이체 바이러스는 IFN-내성 C33A 암종 세포에서는 억제되지 않았다. 예상한 바와 같이, 야생형 WR은 기능적 B18R 유전자 생성물($P = 0.8$)의 존재에 기인하여 IFN 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 유사한 결과가 다른 IFN-내성 암종 세포주를 사용하여 획득되었다. 따라서, IFN-결합 유전자 B18R의 결실은 증가된 치료 지수 및 야생형 바이러스에 비교되는 정상 세포 보호를 초래하였다.
- [0402] B8R 및 B18R에서의 IFN-결합 돌연변이체는 또한 쥐 종양 이종이식체 모델에서 항종양 효능을 입증하였다. B18R 및/또는 B8R 결실로부터 초래된 상대적 안정성 향상은 표적 IFN 분자의 쥐 유형이 현저히 감소된 친화력으로 결합되기 때문에 마우스에서는 경시될 것이다 (문헌 [참조: Symons et al., 2002]). 추가의 연구는 문헌 [참조: Symons et al.]에 기술된 방법을 사용한 토끼 또는 사람이 아닌 영장류에서 수행된 피내 주사 연구를 사용하여 수행될 수 있으며 결과는 토끼에 대해 당해 문헌에 보고된 결과와 유사하게 획득될 것이다(B8R 돌연변이체 VV는 증가된 염증 세포 점증 및 이의 결과로서 야생형 대조군과 비교하여 피부 손상으로부터 바이러스의 가속화된 제거를 입증하였다). 따라서, 항종양 효능 및 정상 세포로부터의 가속화된 바이러스 제거 둘 다는 시험관 내에서 입증되었으며 생체내에서 입증될 수 있다 (문헌 [참조: Symons et al.]).
- [0403] 실시예 6:
- [0404] TNF-조절 기능의 손실 효과를 나타내기 위한 전조 실시예
- [0405] 하나 이상의 사이토카인- 또는 키모카인-억제성 유전자(예를 들면, 야생형 WR 백시니아 및 B29R/vCKBP에 결실을 갖는 돌연변이체)의 결실/불활성화의 유무하의 대적 바이러스를 면역 적격(C57B/6 또는 BALB/c) 마우스에서 쥐 종양(예를 들면, CMT-93, CMT-64 또는 JC)을 감염시키기 위해 사용할 것이다. 이러한 비교는 바이러스 유전자

생성물이 쥐 사이토카인/키모카인을 사람 유형과 비슷한 정도로 억제할 수 있을 경우에만 가치가 있을 것이다. 정맥내 및/또는 종양내 투여(10^5 내지 10^{10} 의 바이러스 입자, 1 내지 6회 용량으로 투여함) 후, 바이러스 복제(시간경과에 따른 플라크-형성 단위), CC 키모카인 수준(예를 들면, 면역조직화학 염색 또는 ELISA 검정), 사이토카인 수준(예를 들면, 면역조직화학(IHC) 염색 또는 ELISA 검정) 및 염증성 세포 침투(H 및 E 또는 IHC 염색)를 종양 조직 및 정상 조직에서 평가할 것이다. 추가로, 바이러스 둘 다의 항종양 효능(카플란-메이에르 종양 퇴행/생존 곡선) 및 독성(중량 손실; 혈액학; 및 혈청 화학 시험)을 평가하였다. 당해 결과는 돌연변이체 바이러스(들)이 1) 증강된 효능 및 종양 내의 염증 유도(예를 들면, 증가된 면역 효과기 세포 침투); 2) 정상 조직(예를 들면, 간, 비장, 폐 및/또는 뇌)에서의 유사하거나 감소된 복제 및 독성; 및 3) 종양-특이적 세포-매개된 면역의 증강되거나 유지된 유도를 입증할 것이다. 마지막으로, 화학요법 및/또는 방사선요법과 배합된 항종양 효능은 야생형 바이러스에서보다 돌연변이 바이러스(들)에서 보다 더 클 것으로 기대된다. 독성 연구는 또한 토끼 또는 사람이 아닌 영장류에서 수행되어 본 발명의 바이러스를 추가로 특정화할 수 있다(본원에 참조로서 인용되어 있는 문헌 [참조: Tschärke et al., 2002]).

[0406] 실시예 7:

[0407] 인터페론-조절 기능의 손실 효과를 나타내기 위한 전조 실시예

[0408] 하나 이상의 인터페론-결합 폴리펩타이드의 결실/불활성화의 유무하의 대적 바이러스(예를 들면, 야생형 WR 백시니아 및 B18R에 결실을 갖는 돌연변이체)를 상기 실시예에 개시된 바와 같이, 표적 IFN 분자가 백시니아 바이러스 유전자 생성물에 의해 효과적으로 결합된 면역 적격 동물에서 종양을 감염시키기 위해 사용할 것이다. 알려진 바와 같이, 쥐 인터페론이 사람 인터페론에 비하여 VV 폴리펩타이드(들)에 상대적으로 내성이기 때문에, 마우스에서의 결과는 이들이 사람에게 있게 되었을 경우의 결과보다 보다 덜 현저할 것으로 예상된다. 상기한 바와 같이, 정맥내 및/또는 종양내 투여 후, 종양 조직 및 정상 조직에서의 바이러스 복제 및 확산을 평가할 것이다. 추가로, 둘 다의 바이러스의 항종양 효능 및 독성을 상기한 바와 같이 평가할 것이다. 예상되는 결과는 돌연변이체 바이러스(들)이 정상 조직(예를 들면, 간, 비장, 폐 및/또는 뇌)에서 감소된 복제 및 독성을 입증하지만 복제 및 괴사 유도가 여전히 종양에서 발생할 것이라는 것이다. 야생형 백시니아(예를 들면, WR)는 정상 및 종양 조직 사이에 보다 적은 차별적 복제/괴사 유도를 입증할 것이다. 추가로, 돌연변이체 바이러스(들)로 처리한 종양은 염수-처리된 대조군 및 야생형 바이러스-처리된 대조군 종양에 비교하여 감소된 혈관분포(예를 들면, H 및 E 염색, 등가의 혈관분포 마커상의 CD31에 대한 IHC)를 가질 것이다. 마지막으로, 면역-매개된 항종양 효능 및 화학치료 및/또는 방사선과 배합된 효능은 야생형 바이러스보다 돌연변이체 바이러스(들)에서 보다 클 것으로 예상된다. 또한 토끼 또는 사람이 아닌 영장류에서 독성 연구를 수행하여 본 발명의 바이러스를 추가로 특정화할 수 있다(본원에 참조로서 인용되어 있는 문헌 [참조: Tschärke et al., 2002]).

[0409] 실시예 8:

[0410] 세린 프로테아제 억제제 기능의 손실 효과를 나타내기 위한 전조 실시예

[0411] 상기한 바와 같이, 항-아포토시스 유전자의 결실/불활성의 유무하의 대적 바이러스를 면역 적격 마우스에서 종양을 감염시키기 위해 사용할 수 있다. 바이러스는 B13R(SPI-2)를 발현하거나 발현하지 않는 백시니아 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기한 바와 같이, 정맥내 투여 후, 종양 조직 및 정상 조직내에서의 바이러스 복제 및 확산을 평가할 것이다. 추가로, 돌연변이체 바이러스의 항종양 효능 및 독성을 상기한 바와 같이, 종양내 및/또는 정맥내 투여 후에 평가할 것이다. 예상되는 결과는 돌연변이체 바이러스가 정상 조직에서 감소된 복제 및 독성을 입증하고/거나, 종양 조직과 비교하여 정상 조직으로부터 보다 빠르게 제거될 것이라는 것이다. 야생형 바이러스는 종양 조직과 비교하여 정상 조직에서의 복제 및 독성 사이에 보다 적은 차별성(만약 있다면)을 나타낼 것이다. 종양내, 복강내, 정맥내 또는 다른 경로의 투여 후, 돌연변이체 바이러스(들)의 항종양 효능은 야생형 바이러스를 사용한 효능과 동등하거나 이보다 우세할 것으로 예상된다. 배합 화학치료 연구는 동일한 모델 시스템을 사용할 것이다. 마우스는 비히클(플라세보), 오직 화학치료만, 오직 바이러스만(야생형 또는 돌연변이체) 또는 바이러스와 화학치료를 함께 받게 될 것이다. 돌연변이체 바이러스와 화학치료를 함께 사용한 효능은 오직 화학치료만을 사용하거나 야생형 바이러스와 화학치료를 함께 사용한 것보다 우세할 것으로 예상된다. 유사한 발견이 방사선 치료와 함께 예상된다.

- [0412] 실시예 9:
- [0413] 상보적 대조군 기능의 손실 효과를 나타내기 위한 전조 실시예
- [0414] VCP 유전자의 결실/불활성화의 유무하의 대적 바이러스를 상기한 바와 같이 면역 적격 마우스에서 종양을 감염시키기 위해 사용할 수 있다. 상기한 바와 같이, 정맥내 또는 다른 경로의 투여 후, 종양 조직 및 정상 조직에서의 바이러스 복제 및 확산을 평가할 것이다. 추가로, 돌연변이체 바이러스의 항종양 효능 및 독성은 종양내 및/또는 정맥내 투여 후, 상기한 바와 같이 평가할 것이다. 예상되는 결과는 돌연변이체 바이러스가 정상 조직에서 감소된 복제 및 독성을 입증할 것이고/거나, 종양 조직과 비교하여 정상 조직으로부터 보다 효율적으로 제거될 것이라는 것이다. 야생형 바이러스는 종양 조직에 비교하여 정상 조직에서 복제 및 독성 사이에 보다 적은 차별성을(만약 있다면) 나타낼 것이다. 종양내, 복강내, 정맥내 또는 다른 경로의 투여 후, 돌연변이체 바이러스(들)의 항종양 효능은 야생형 바이러스를 사용한 것과 동등하거나 이보다 우세할 것이다. 배합 치료 연구는 동일한 모델 시스템을 사용할 것이다. 예를 들면, 마우스는 비히클(플라세보), 오직 화학치료만, 오직 바이러스만(야생형 또는 돌연변이체) 또는 바이러스와 화학치료를 함께 받게될 것이다. 돌연변이체 바이러스와 화학치료를 함께 사용한 효능은 오직 화학치료만을 사용하거나 야생형 바이러스와 화학치료를 함께 사용한 것보다 우세할 것으로 예상된다. 유사한 결과가 이들 바이러스와 함께 종양-표적화 모노클로날 항체를 사용하여 입증될 것이다.
- [0415] 본원에 개시되거나 청구된 모든 조성물 및 방법을 본원을 고려하여 적합하지 않은 실험 없이 제조하고 실행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 바람직한 양태의 관점에서 기술하여 왔고, 본 발명의 개념, 정신 및 영역으로부터 벗어나지 않으면서 본원에 기술된 조성물 및/또는 방법 및 방법의 단계 또는 단계 순서에 변형을 적용할 수 있음이 당해 분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 보다 명확하게는, 동일하거나 유사한 결과를 성취하면서, 본원에 기술된 제제를 화학적 및 생리학적 둘 다로 관련된 특정 제제로 대체시킬 수 있음이 명백해질 것이다.
- [0416] 당해 분야의 숙련자에게 명백한 모든 이러한 유사한 대체 및 변형은 첨부된 청구항에 의해 정의된 본 발명의 정신, 영역 및 개념 내에 속하는 것으로 사료된다.
- [0417] 참조문헌
- [0418] 다음 참고문헌들이 특히 본원에서 참조로 인용된다.
- [0419] 미국 특허 제4,554,101호
- [0420] 미국 특허 제4,683,195호
- [0421] 미국 특허 제4,683,202호
- [0422] 미국 특허 제4,684,611호
- [0423] 미국 특허 제4,800,159호
- [0424] 미국 특허 제4,879,236호
- [0425] 미국 특허 제4,883,750호
- [0426] 미국 특허 제4,946,773호
- [0427] 미국 특허 제4,952,500호
- [0428] 미국 특허 제5,220,007호
- [0429] 미국 특허 제5,279,721호
- [0430] 미국 특허 제5,284,760호
- [0431] 미국 특허 제5,302,523호
- [0432] 미국 특허 제5,322,783호

[0433]	미국 특허 제5,354,670호
[0434]	미국 특허 제5,366,878호
[0435]	미국 특허 제5,384,253호
[0436]	미국 특허 제5,389,514호
[0437]	미국 특허 제5,399,363호
[0438]	미국 특허 제5,464,765호
[0439]	미국 특허 제5,466,468호
[0440]	미국 특허 제5,538,877호
[0441]	미국 특허 제5,538,880호
[0442]	미국 특허 제5,543,158호
[0443]	미국 특허 제5,550,318호
[0444]	미국 특허 제5,563,055호
[0445]	미국 특허 제5,580,859호
[0446]	미국 특허 제5,589,466호
[0447]	미국 특허 제5,591,616호
[0448]	미국 특허 제5,610,042호
[0449]	미국 특허 제5,633,016호
[0450]	미국 특허 제5,635,377호
[0451]	미국 특허 제5,641,515호
[0452]	미국 특허 제5,656,610호
[0453]	미국 특허 제5,702,932호
[0454]	미국 특허 제5,736,524호
[0455]	미국 특허 제5,739,169호
[0456]	미국 특허 제5,780,448호
[0457]	미국 특허 제5,789,166호
[0458]	미국 특허 제5,789,215호
[0459]	미국 특허 제5,798,208호
[0460]	미국 특허 제5,798,339호
[0461]	미국 특허 제5,801,005호
[0462]	미국 특허 제5,824,311호
[0463]	미국 특허 제5,824,348호
[0464]	미국 특허 제5,830,650호
[0465]	미국 특허 제5,830,880호
[0466]	미국 특허 제5,840,873호
[0467]	미국 특허 제5,843,640호
[0468]	미국 특허 제5,843,650호

[0469]	미국 특허 제5,843,651호
[0470]	미국 특허 제5,843,663호
[0471]	미국 특허 제5,846,225호
[0472]	미국 특허 제5,846,233호
[0473]	미국 특허 제5,846,708호
[0474]	미국 특허 제5,846,709호
[0475]	미국 특허 제5,846,717호
[0476]	미국 특허 제5,846,726호
[0477]	미국 특허 제5,846,729호
[0478]	미국 특허 제5,846,783호
[0479]	미국 특허 제5,846,945호
[0480]	미국 특허 제5,849,481호
[0481]	미국 특허 제5,849,483호
[0482]	미국 특허 제5,849,486호
[0483]	미국 특허 제5,849,487호
[0484]	미국 특허 제5,849,497호
[0485]	미국 특허 제5,849,546호
[0486]	미국 특허 제5,849,547호
[0487]	미국 특허 제5,851,770호
[0488]	미국 특허 제5,851,772호
[0489]	미국 특허 제5,853,990호
[0490]	미국 특허 제5,853,992호
[0491]	미국 특허 제5,853,993호
[0492]	미국 특허 제5,856,092호
[0493]	미국 특허 제5,858,652호
[0494]	미국 특허 제5,861,244호
[0495]	미국 특허 제5,863,732호
[0496]	미국 특허 제5,863,753호
[0497]	미국 특허 제5,866,331호
[0498]	미국 특허 제5,866,337호
[0499]	미국 특허 제5,866,366호
[0500]	미국 특허 제5,871,740호
[0501]	미국 특허 제5,871,986호
[0502]	미국 특허 제5,882,864호
[0503]	미국 특허 제5,900,481호
[0504]	미국 특허 제5,905,024호

[0505]	미국 특허 제5,910,407호
[0506]	미국 특허 제5,912,124호
[0507]	미국 특허 제5,912,145호
[0508]	미국 특허 제5,912,148호
[0509]	미국 특허 제5,916,776호
[0510]	미국 특허 제5,916,779호
[0511]	미국 특허 제5,919,626호
[0512]	미국 특허 제5,919,630호
[0513]	미국 특허 제5,922,574호
[0514]	미국 특허 제5,925,517호
[0515]	미국 특허 제5,925,525호
[0516]	미국 특허 제5,925,565호
[0517]	미국 특허 제5,928,862호
[0518]	미국 특허 제5,928,869호
[0519]	미국 특허 제5,928,870호
[0520]	미국 특허 제5,928,905호
[0521]	미국 특허 제5,928,906호
[0522]	미국 특허 제5,928,906호
[0523]	미국 특허 제5,929,227호
[0524]	미국 특허 제5,932,413호
[0525]	미국 특허 제5,932,451호
[0526]	미국 특허 제5,935,791호
[0527]	미국 특허 제5,935,819호
[0528]	미국 특허 제5,935,825호
[0529]	미국 특허 제5,939,291호
[0530]	미국 특허 제5,942,391호
[0531]	미국 특허 제5,945,100호
[0532]	미국 특허 제5,981,274호

[0533]

미국 특허 제5,994,624호

- Alcami and Smith, *Cell.*, 71(1):153-67, 1992.
 Alcami *et al.*, *Sem. Virol.*, 5:419-427, 1998.
 Alcami *et al.*, *Virology*, 74(23):11230-9, 2000.
 Almendro *et al.*, *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.
 Andoh *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(12):663-72, 2002.
 Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987.
 Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.
 Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
 Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.
 Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
 Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
 Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998.
 Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1994.

[0534]

- Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
 Bakhshi *et al.*, *Cell.*, 41(3):899-906, 1985.
 Banerji *et al.*, *Cell.*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
 Banerji *et al.*, *Cell.*, 33(3):729-740, 1983.
 Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
 Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
 Blonar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
 Blasco and Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.
 Blasco *et al.*, *J. Virology*, 67(6):3319-3325, 1993.
 Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
 Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
 Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
 Boyd *et al.*, *Cell.*, 79:341-351, 1994.
 Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
 Braisted and Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12):5688-5692, 1996.
 Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4):237-246, 1998.
 Bukowski *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.
 Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
 Burton and Barbas, *Adv. Immunol.*, 57:191-280, 1994.
 Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):27-32, 1994.
 Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
 Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
 Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
 Caragine *et al.*, *Cancer Res.*, 62(4):1110-5, 2002.
 Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
 Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
 Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
 Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
 Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
 Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
 Chatterjee *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 86:9114, 1989.
 Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
 Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.

[0535]

- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985.
- Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Colamonici *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:15974-15978, 1995.
- Cooley *et al.*, *Science*, 239(4844):1121-1128, 1988.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Culver *et al.*, *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.
- Cunningham and Wells, *Science*, 244(4908):1081-1085, 1989.
- Curran, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4 Suppl 1):2-4, 1998.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dobbelstein and Shenk, *J. Virology*, 70:6479-6485, 1996.
- Durrant and Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7):959-66, 2001.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Eliopoulos *et al.*, *Oncogene*, 11(7):1217-28, 1995.
- el-Kareh and Secomb, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 25(6):503-571, 1997.
- Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1):1-18, 1998.
- European Appl. 320 308
- European Appl. 329 822
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

[0536]

- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
- GB Application 2 202 328
- Genbank Accession Number NC_001559
- Gertig *et al.*, *Semin. Cancer Biol.*, 8(4): 285-98, 1998.
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Goebel *et al.*, *Virology*, 179(1): 247-66 and 517-63, 1990.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham *et al.*, *Virology*, 229(1):12-24, 1997.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Gross *et al.*, *Genes Dev.*, 13(15):1899-911, 1999.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-5, 1998.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Heise *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6(6):499-504, 1999.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermiston, *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172, 2000.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(9):4699-4708, 1996.
- Hirochika *et al.*, *J. Virology*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Ho *et al.*, *Environ Health Perspect*, 106(5):1219-1228, 1998.

[0537]

- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- Homey *et al.*, *Nature. Rev. Immunol.*, 2:175-184, 2002.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Huang *et al.*, *Cell.*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Hussussian *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Ikeda *et al.*, *Nat. Med.*, 5(8):881-7, 1999.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie and Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.
- Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.
- Isaacs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):628-32, 1992.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson and Hamdy, *Oncol. Rep.*, 5(3):553-7, 1998.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Ju *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(3):241-50, 2000.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaeppeler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9: 415-418, 1990.
- Kamb *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):23-2, 1994.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.

[0538]

- Kay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4686-91, 1997.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kettle *et al.*, *J. Gen. Virology*, 78:677-685, 1997.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kirn *et al.*, *Nat. Med.*, 7(7):781-787, 2001.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38(2-3):121-5, 1998.
- Koncz *et al.*, *EMBO J.*, 9(5):1337-1346, 1990.
- Kraus *et al.*, *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kriegler and Botchan, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (ed), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988.
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kwoh *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.
- Lareyre *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lee *et al.*, *DNA Cell. Biol.*, 16(11):1267-75, 1997.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Levenson *et al.*, *Hum Gene Ther.* 20;9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Liebermann, *Oncogene*, 17(10):1189-94, 1998.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:1108, 1983.

[0539]

- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Magi-Galluzzi *et al.*, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20(5):343-50, 1998.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Mangray and King, *Front Biosci.*, 3:D1148-60, 1998.
- Marks *et al.*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 45:77-87, 1991.
- Marsters *et al.*, *Recent Prog Horm Res*, 54:225-234, 1999.
- Mayer *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, 6(6):281-288, 1998.
- McCart *et al.*, *Gene Ther.*, 7(14):1217-23, 2000.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mitchell *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54(13):3396-3397, 1994.
- Morton *et al.*, *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992.
- Moss, In: *Fields Virology*, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3:3637,2672, 1996.
- Moss, In: *Fields Virology*, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3:3637-2672, 1996.
- Mossman *et al.*, *Virology*, 215(1):17-30, 1996.
- Mougin *et al.*, *Ann. Biol. Clin.*, (Paris) 56(1): 21-8, 1998.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Mumby and Walter, *Cell Regul.*, 2(8):589-98, 1991.
- Natoli *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8):915-20, 1998.
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nielsen *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 4(6):S12, 1997.
- Nielsen *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(4):835-846, 1998.
- Nobori *et al.*, *Nature*, 368(6473):753-6, 1994.
- Nomoto *et al.*, *Gene*, 236(2):259-71, 1999.
- Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8): 1366-8, 1998.
- Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8):1366-1368, 1998.
- Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.

[0540]

- Ohara, *Gan To Kagaku Ryoho*, 25(6): 823-8, 1998.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1(23):11045-11049, 1994.
- Omirlulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54(11):2848-2851, 1994.
- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982.
- PCT Appl. PCT/US87/00880
- PCT Appl. PCT/US89/01025
- PCT Appl. WO 88/10315
- PCT Appl. WO 89/06700
- PCT Appl. WO 90/07641
- PCT Appl. WO 94/09699
- PCT Appl. WO 95/06128
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Puhlmann, *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 7(1):66-73, 2000.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.

[0541]

- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Rosel *et al.*, *J. Virology*, 60(2):436-449, 1986.
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook *et al.*, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Saraiva and Alcamí, *J. Virology*, 75(1):226-33, 2001.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Seet *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(16):9008-13, 2001.
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sinkovics and Horvath, *J. Clin. Viro.*, 16:1-15, 2000.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith and Vanderplasschen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 440:395-414, 1998.
- Smith *et al.*, *Immunol. Rev.*, 159:137-154, 1997.
- Solyanik *et al.*, *Cell. Prolif.*, 28(5):263-78, 1995.
- Sommer *et al.* *EMBO J.*, 9(3):605-613, 1990.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Spriggs *et al.*, *Cell*, 71(1):145-52, 1992.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stokke *et al.*, *Cell. Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.

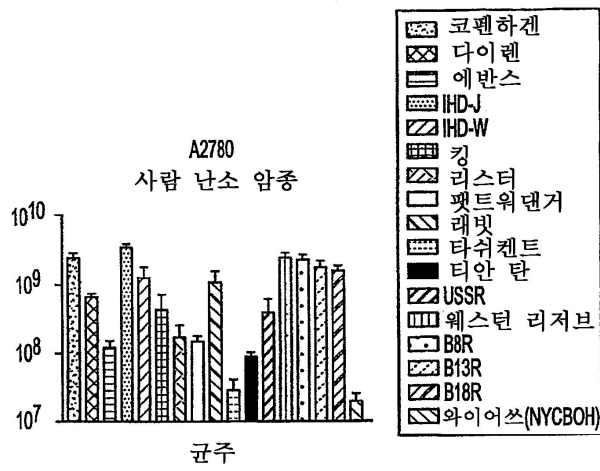
[0542]

- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Symons *et al.*, *Cell*, 81:551-560, 1995.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Todo *et al.*, *Cancer Res.*, 61:153-161, 2001.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.* 6:954, 1987.
- Tsujimoto and Croce, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- Tsumaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-4, 1998.
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Upton *et al.*, *Virology*, 184(1):370-82, 1991.
- Vanderplasschen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13):7544-9, 1998.
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:1068, 1980.
- Vicari and Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:143-154, 2002.
- Vogelstein and Kinzler, *Cell*, 70(4):523-6, 1992.
- Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- Wallach *et al.*, In: *The cytokine network and immune functions*, Theze (ed.), Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 51-84, 1999.
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Warren *et al.*, *Biochemistry*, 35(27):8855-8862, 1996.
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Winoto and Baltimore, *Cell* 59:649, 1989.
- Wold *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2:437-443, 1994.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

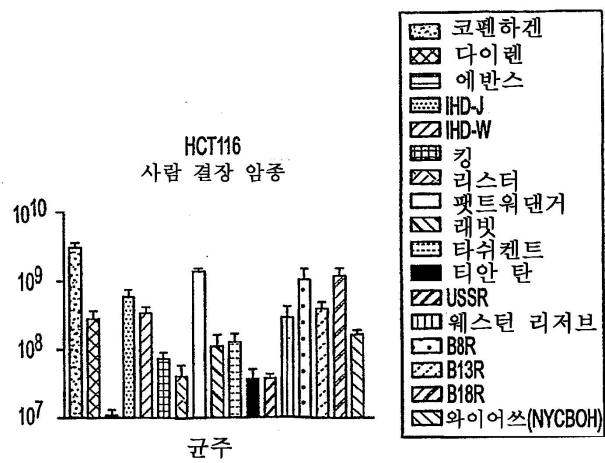
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Yelton *et al.*, *J. Immunol.*, 155(4):1994-2004, 1995.
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zeng *et al.*, *Biochemistry*, 35(40):13157-13164, 1996.
- Zhao-Emonet *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.

도면

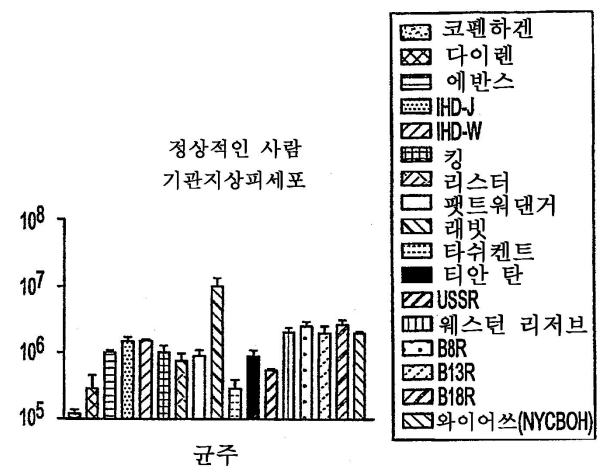
도면1a



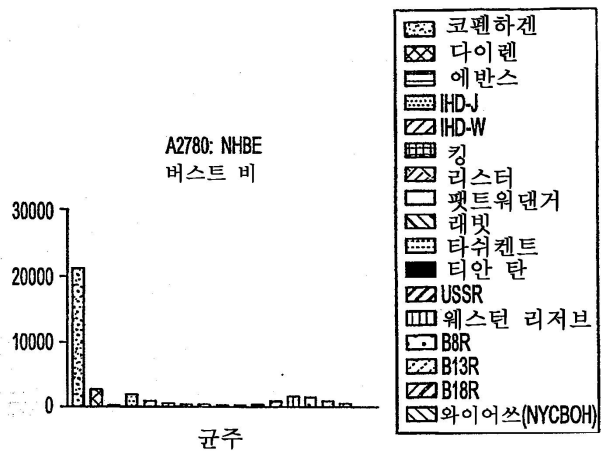
도면1b



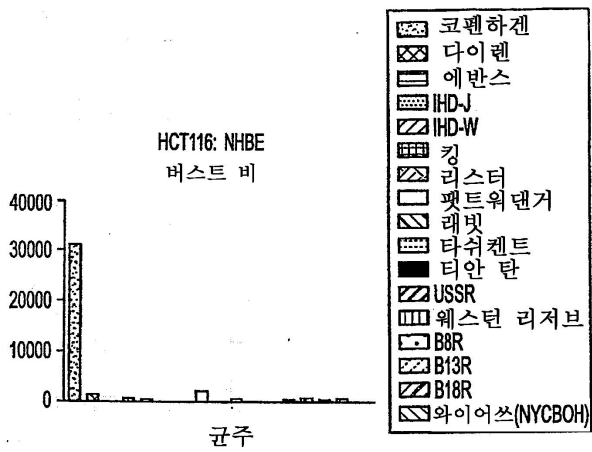
도면2



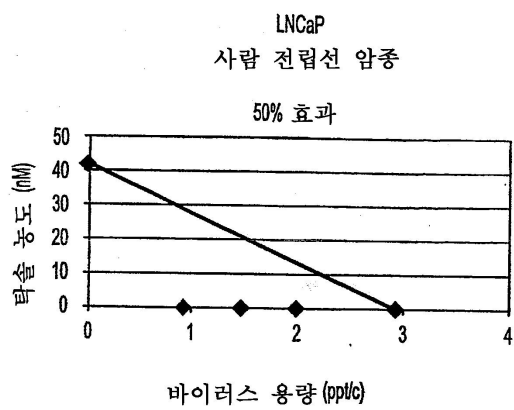
도면3



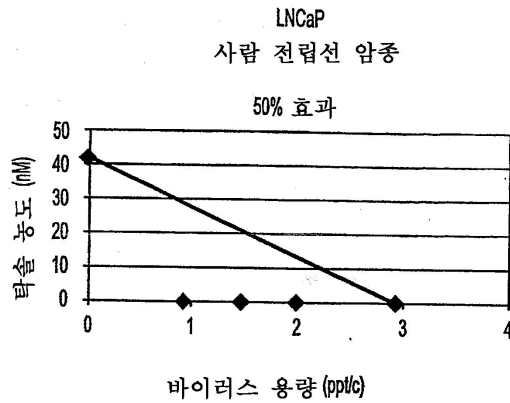
도면4



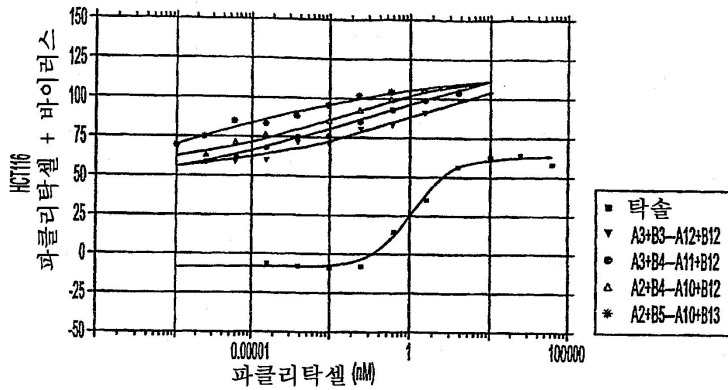
도면5a



도면5b



도면6a



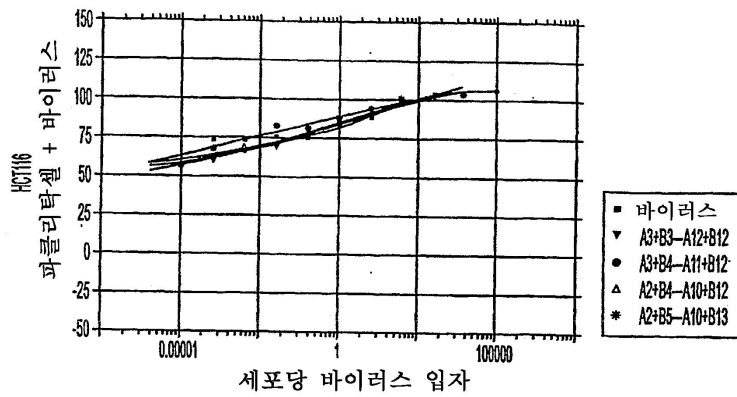
도면6b

용량	타셀			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
3000.0	58.10	57.23	54.26												
300.0	62.71	61.94	63.96												
30.0	64.65	62.23	57.90	102.18	102.62	102.87									
3.0	58.74	52.84	53.33	99.64	98.81	98.14	103.47	101.59	103.33	104.91	103.57	105.02			
0.3	41.57	31.58	27.36	90.31	91.36	90.39	99.20	98.15	98.71	104.01	102.91	104.61	103.17	102.72	103.58
0.03	18.63	13.91	6.47	84.06	82.50	82.03	92.25	91.59	91.47	99.35	97.96	99.53	104.31	101.87	103.74
3.0e-02	-9.12	-7.21	-12.01	80.48	78.11	78.74	85.84	84.33	81.36	92.15	89.85	92.19	101.68	99.18	101.53
3.0e-03	-9.12	-8.91	-15.71	68.62	70.19	70.78	75.82	77.69	73.97	85.55	83.72	84.54	95.13	93.86	93.88
3.0e-04	-9.32	-5.14	-13.19	73.24	68.31	71.55	75.87	75.61	75.66	77.31	75.28	73.09	88.43	86.93	86.95
3.0e-05	-10.46	-7.68	-4.31	57.15	62.41	58.16	65.94	66.89	67.14	74.43	76.74	76.64	83.31	80.47	82.59
3.0e-06				52.88	58.22	61.70	61.87	62.18	58.46	71.45	68.59	70.99	83.11	83.25	83.62
3.0e-07				54.02	57.61	61.39	54.22	59.54	60.21	63.70	61.94	59.34	72.19	76.04	72.89
3.0e-08													65.74	66.66	70.99

도면6c

	타셀	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
방정식 1					
최적적합값					
최하	-10.33	50.03	40.11	54.13	36.77
최상	60.85	121.9	133.3	115.1	115.8
LOGEC50	0.08336	-0.2865	-1.226	-2.631	-5.082
기울기	0.7012	0.1629	0.1211	0.1852	0.1208
EC50	1.212	0.5170	0.05942	0.002340	8.2790e-07
적합도					
자유도	26	26	23	23	23
R-제곱	0.9804	0.9696	0.9789	0.9724	0.9617
제곱의 절대합	571.9	231.9	135.0	159.1	155.0
Syx	4.690	2.986	2.423	2.630	2.596

도면7a



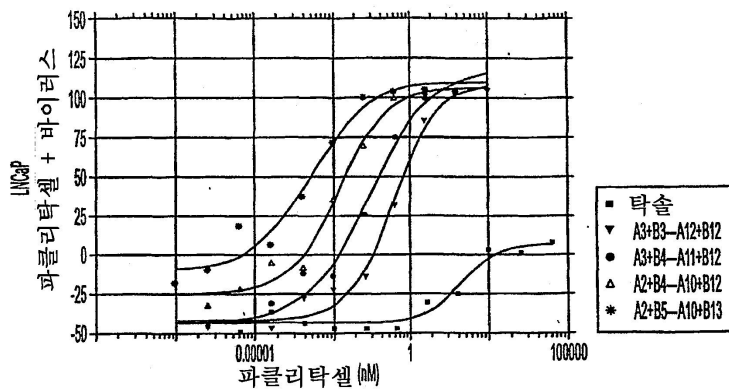
도면7b

바이러스의 농도 (ppc)	바이러스			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
100000.0	105.40	105.41	107.43												
10000.0	104.91	104.51	106.72												
1000.0	104.71	103.24	105.48												
100.0	98.10	98.71	98.61	102.18	102.62	102.87	103.47	101.59	103.33	104.01	102.91	104.61	104.31	101.87	103.74
10.0	88.97	89.52	88.54	90.31	91.36	90.39	92.25	91.59	91.47	92.15	89.85	92.19	95.13	93.86	93.86
1.0	83.61	83.06	83.51	84.06	82.50	82.03	85.84	84.33	81.36	85.55	83.72	84.54	88.43	86.93	86.95
0.1	76.96	75.90	73.45	80.48	78.11	78.74	75.82	77.69	73.97	77.31	75.28	73.09	83.31	80.47	82.39
1.0e-02	74.82	77.92	74.99	68.62	70.19	70.78	75.87	75.61	75.66	74.43	76.74	76.64	83.11	83.25	83.62
1.0e-03	72.89	75.57	74.27	73.24	68.31	71.55	65.94	66.89	67.14	71.45	68.59	70.99	72.19	76.04	72.89
1.0e-04	71.50	75.47	73.92	57.15	62.41	58.16	61.87	62.18	58.46	63.70	61.94	59.34	65.74	66.66	70.99
1.0e-05				52.98	58.22	61.70									
1.0e-06				54.02	57.61	61.39									

도면7c

방정식 1	타솔	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
최적적합값					
최하	73.90	50.03	40.11	54.17	36.75
최상	106.7	121.9	133.3	115.1	115.8
LOGEC50	1.016	0.2394	0.2868	-0.1062	-2.551
기울기	0.4936	0.1629	0.1211	0.1855	0.1208
EC50	10.37	1.723	1.981	0.7830	0.002751
적합도					
자유도	26	26	23	23	23
R-제곱	0.9890	0.9696	0.9789	0.9724	0.9617
제곱의 절대합	57.66	231.9	135.0	159.1	155.0
Syx	1.489	2.985	2.423	2.630	2.596

도면8a



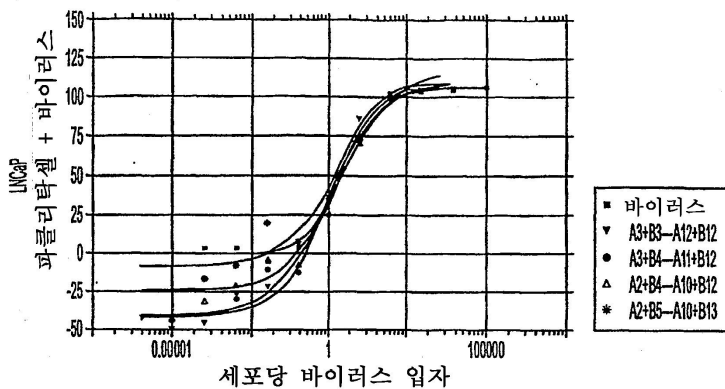
도면8b

용량	타솔			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
30000.0	26.83	1.16	1.47												
30000.0	12.11	-2.63	-6.45												
3000.0	10.92	-3.56	5.34	101.81	106.39	106.09	102.21	105.85	108.55	99.76	106.54	107.67	102.67	105.07	108.81
300.0	-18.32	-30.20	-28.01	96.24	105.54	104.85	95.51	101.59	103.09	98.10	106.00	107.49	101.35	105.23	106.79
30.0	-32.24	-34.53	-22.47	88.28	89.43	80.39	95.51	101.59	103.09	94.59	104.45	101.51	92.20	103.99	105.56
3.0	-44.71	-43.90	-48.95	38.76	34.15	24.70	76.42	63.00	67.37	76.95	74.84	60.24	41.35	44.06	28.30
0.3	-38.17	-53.12	-52.30	3.16	-23.54	-18.42	37.10	35.00	5.69	46.45	34.07	31.12	72.91	72.24	73.00
3.0e-02	-35.69	-50.33	-52.82	-17.99	-22.30	-25.72	-6.32	-11.15	-19.74	11.71	-23.54	-12.88	14.03	1.39	6.92
3.0e-03	-33.57	-45.61	-48.78	-25.55	-25.40	-32.59	-11.96	-8.75	-12.35	-1.55	-4.03	-6.72	26.70	16.88	14.93
3.0e-04	-28.86	-45.61	-31.79	-44.51	-47.93	-45.17	-27.07	-34.69	-28.98	-20.11	-26.95	-18.16	-5.86	-5.42	-14.37
3.0e-05				-44.31	-47.62	-56.34	-47.78	-48.47	-53.88	-31.05	-23.38	-40.42	-16.80	-18.04	-17.36
3.0e-06				-28.86	-48.47	-52.56	-35.43	-46.07	-52.21						
3.0e-07															
3.0e-08															

도면8c

	타솔	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
방정식 1					
최적적합값					
최하	-42.74	-41.46	-43.08	-24.95	-9.544
최상	8.087	110.7	119.2	107.9	111.3
LOGEC50	1.618	-0.5616	-1.359	-2.352	-3.224
기울기	0.7578	0.5825	0.4286	0.5454	0.4660
EC50	41.48	0.2744	0.04376	0.004447	0.0005973
적합도					
자유도	26	26	23	23	23
R-제곱	0.8472	0.9796	0.9712	0.9716	0.9628
제곱의 절대합	2320	2242	2662	2253	2241
Syx	9.447	9.286	10.76	9.898	9.871

도면9a



도면9b

바이러스의 용량 (ppc)	바이러스			A3+B3-A12+B12			A3+B4-A11+B12			A2+B4-A10+B12			A2+B5-A10+B13		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
100000.0	102.94	108.63	110.84												
10000.0	99.03	108.71	110.40												
1000.0	96.70	108.17	109.52	101.81	106.39	106.09	102.21	105.85	108.55	99.76	106.54	107.67	102.67	105.07	108.81
100.0	97.30	103.52	95.44	96.24	105.54	104.85	95.51	101.59	103.09	94.59	104.45	101.51	92.20	103.99	105.56
10.0	81.46	79.60	63.50	88.28	89.43	80.39	76.42	63.00	67.37	76.95	74.84	60.24	41.35	44.06	28.30
1.0	49.04	30.43	26.81	38.76	34.15	24.70	37.10	35.00	5.69	46.45	34.07	31.12	41.35	44.06	28.30
0.1	7.07	13.24	-8.65	3.16	-23.54	-18.42	-6.32	-11.15	-19.74	11.71	-23.54	-12.88	14.03	1.39	6.92
1.0e-02	1.97	4.41	-22.64	-17.99	-22.30	-25.72	-11.96	-8.75	-12.35	-1.55	-4.03	-6.72	26.70	16.88	14.93
1.0e-03	6.14	10.61	-5.84	-25.55	-25.40	-32.59	-27.07	-34.69	-28.98	-20.11	-26.95	-18.16	-5.86	-5.42	-14.37
1.0e-04	12.24	-4.49	2.26	-44.51	-47.93	-45.17	-47.78	-48.47	-53.88	-31.05	-23.38	-40.42	-16.80	-18.04	-17.36
1.0e-05				-44.31	-47.62	-56.34	-47.78	-48.47	-53.88	-31.05	-23.38	-40.42	-16.80	-18.04	-17.36
1.0e-06				-28.86	-48.47	-52.56	-35.43	-46.07	-52.21						

도면9c

바이러스	A3+B3-A12+B12	A3+B4-A11+B12	A2+B4-A10+B12	A2+B5-A10+B13
방향성 1				
최적적 합값				
최하	-0.5588	-41.46	-43.08	-24.96
최상	106.5	110.7	119.2	107.9
LOGEC50	0.4635	-0.03873	0.1640	0.1709
기울기	0.7343	0.5825	0.4296	0.5453
EC50	2.907	0.9147	1.459	1.482
적합도				
자유도	26	26	23	23
R-제곱	0.9712	0.9796	0.9712	0.9716
제곱의 절대합	1964	2242	2662	2253
Syx	8.691	9.286	10.76	9.898
iRES				

도면10

