



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0006582
(43) 공개일자 2012년01월18일

(51) Int. Cl.

C12N 7/00 (2006.01) *C12N 15/869* (2006.01)

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

(21) 출원번호 10-2012-7000220(분할)

(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년07월26일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2006-7001697

원출원일자(국제출원일자) 2004년07월26일

심사청구일자 2009년03월17일

(85) 번역문제출일자 2012년01월04일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/003217

(87) 국제공개번호 WO 2005/011715

국제공개일자 2005년02월10일

(30) 우선권주장

0317511.4 2003년07월25일 영국(GB)

(71) 출원인

바이오벡스 리미티드

영국 OX14 4RX 옥스포드 애빙턴 밀튼 파크 70번지

(72) 발명자

코핀, 로버트 스튜어트

영국 옥스14 4알엑스 옥스포드셔 애빙턴 밀튼 파크 7

심슨, 가이 리처드

영국 옥스14 4알엑스 옥스포드 애빙턴 밀튼 파크 70

(74) 대리인

양영준, 양영환

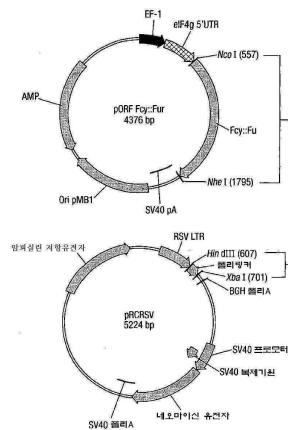
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 바이러스 벡터

(57) 요약

본 발명은 기능적인 ICP34.5 유전자가 결실되고, (i) 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자, (ii) 세포융합을 가능하게 하는 단백질을 암호화하는 유전자 및 (iii) 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자 중의 둘 또는 그 이상을 포함하는 헤르페스 바이러스를 제공한다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

암 치료를 위한 의약제조에 있어서의 헤르페스 바이러스의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 종래의 공지된 변종에 비하여 향상된 항암활성을 가지는 헤르페스 바이러스 변종에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이러스는 생명과학과 의학의 여러 경우에서 다양한 응용이 가능함을 보여왔다. 이것은 바이러스가 세포 내로 높은 효율로 들어가는 독특한 능력을 가지고 있기 때문이다. 이러한 성질을 이용하여 바이러스 유전자를 발현, 복제시키거나 또는 삽입된 이종의(heterologous) 유전자를 발현시키는 데에도 사용이 가능하게 되었다. 따라서, 바이러스는 예를 들어, 유전자 치료나 백신의 개발에 유용한 유전자들(바이러스 유전자 또는 다른 유전자)을 세포내로 전달하여 발현시키거나, 또는 암 등의 경우에서 용균성 복제나 전달된 유전자의 작용에 의하여 세포를 선택적으로 죽이는 데 유용하다.

[0003] 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus, HSV)는 암을 암세포파괴(oncolytic)로 치료하는 데 유용하다고 제안되어왔다. 하지만 이때, 바이러스는 더 이상 병원성이 없지만, 다시 말해, 정상(non-tumor) 세포에서는 복제하지 않고 세포를 죽이지도 않지만, 종양세포인 경우에는 세포 내로 침투하여 세포를 죽일 수 있도록 되어야 한다. 암세포파괴 치료에서는 치료효과를 높이는 유전자의 전달을 포함할 수 있는데, 이를 위하여 바이러스가 배양세포나 생체내(in vivo)에서 활발하게 분열하는 세포(예, 종양세포)에서는 복제가 가능하지만, 정상 조직에서는 유의미한 복제가 차단되는 다수의 돌연변이 헤르페스 심플렉스 바이러스가 밝혀졌다. 이러한 변이에는 ICP34.5, ICP6 및 티미딘 인산화효소(thymidine kinase)를 암호화하는 유전자의 파괴가 포함된다. 이 중 ICP34.5, 또는 ICP6와 ICP34.5가 함께 돌연변이된 바이러스가 지금까지 안전성에 있어서 가장 선호되어 왔다. ICP34.5만이 제거된 바이러스는 실험실적 조건(in vitro)에서 다수의 암세포에서 복제하고, 마우스(mouse)에서 인공적으로 유발한 뇌종양에서는 주위의 조직은 손상시키지 않고 암세포에서만 선택적으로 복제하는 것으로 나타났다. 또한, 인간을 대상으로 한 임상시험 초기단계에서도 안전성을 나타내었다.

[0004] 그러나, HSV를 포함한 다양한 바이러스가 암세포파괴 치료에 이용될 수 있음이 유망함을 보여주었지만, 이 일은 항암효과를 높일 수 있는 이종의 유전자를 가지고 있지 않은 바이러스 주를 사용한 것이 대부분이었다. 본 발명자들은 ICP34.5를 암호화하는 유전자의 불활성 돌연변이와, 무능력하게 된 바이러스 유전자에서 암호화되는 과립구 대식세포 집락 자극인자(GM-CSF) 등의 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자를 가진 HSV를 조합적으로 이용함으로써, 특히 일반적으로 HSV에 감염된 세포에 대하여 면역반응을 감소시키는 바이러스의 작용이 불활성화된다면, 치료 대상 종양에 대하여 최적의 면역자극 특성을 이끌어낼 수 있다는 것을 제안한다. 예를 들어, HSV ICP47 단백질은 HSV에 감염된 세포에서 항원 표시를 특이적으로 막으며(참조: Hill et al., 1995), UL43 유전자 산물과 vhs 단백질은 HSV에 감염된 수지상 세포(dendritic cell)의 면역자극 능력을 감소시킨다. 따라서, 특히 GM-CSF나 다른 면역자극 사이토카인(cytokine) 또는 케모카인(chemokine)을 사용함으로써 면역 효과가 증강될 수 있다면, 일반적으로 ICP47 및/또는 수지상 세포를 불활성화시키는 유전자를 암치료에 사용되는 암세포파괴 HSV 돌연변이 바이러스에서 제거할 수 있다. GM-CSF는 전신에 투여되었을 때보다 종양세포 내에서 발현되었을 때 증강된 항암 면역효과를 갖는 것이 최근 밝혀졌다(참조: Shi et al., 1999). 따라서, 이때, 암세포파괴 HSV 돌연변이는 종양의 복제 및 용균성 파괴가 일어나는 일차 또는 이차 종양에 집중될 것이다. 면역반응은 HSV에 감염된 세포 뿐만 아니라, 전기 일차 종양 부위로부터 퍼져 나온 다른 곳의 종양세포에 대해서도 유발될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 발명의 요약
- [0006] 본 발명은 생체내 조건(in vivo)에서 향상된 종양세포 파괴능력을 가진 바이러스를 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 바이러스는 ICP34.5를 암호화하는 유전자에 불활성화된 돌연변이를 포함하고, 치료효과를 강화하는 두 개의 유전자를 조합된 형태로 전달할 수 있다. 바이러스는 다음의 타입들 중 둘 또는 그 이상으로부터의 유전자를 포함한다:
- [0007] 불활성화된 또는 활성이 약한 프로드러그(prodrug)를 활성화된 또는 보다 활성적인 형태로 전환시킬 수 있는 프로드러그 활성화 효소를 암호화하는 유전자. 그러므로, 바이러스에 의한 종양의 치료는 프로드러그의 투여를 동반한다.
- [0008] 세포를 융합시킬 수 있는(다시말해, 합포체(syncytia) 형성을 유도할 수 있는) 단백질을 암호화하는 유전자. 이것은 그 자체로 면역반응 유도에 의해 매개될 수 있는 항종양 효과를 제공한다. 그러나, 프로드러그 활성화와 공동하여 항종양 효과를 증강시킨다. 이러한 융해성(fusogenic) 유전자는 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(gibbon ape leukaemia virus) 또는 인간 내인성 레트로바이러스 W로부터의 단백질, 홍역 바이러스(measles virus)의 융해성 F와 H 단백질 또는 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus) G 단백질 같은 변형된 레트로바이러스 외피(envelope) 당단백질을 포함하지만, 세포융합을 유도할 수 있는 단백질을 암호화하는 다른 유전자도 이용될 수 있다.
- [0009] 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자. 면역조절 단백질은 항종양 면역반응을 촉진한다. 그러한 유전자는 GM-CSF, TNF α , CD40L 또는 다른 사이토카인 또는 보조-자극성(co-stimulatory) 분자 같은 면역 조절자를 포함한다. 면역조절 단백질은 프로드러그 활성화 유전자 및/또는 단독으로 세포융합을 일으킬 수 있는 단백질의 효과를 증강시킨다. 따라서, 본 발명의 바이러스는 프로드러그 활성화 유전자와 면역조절 유전자를 암호화하지만, 세포융합을 유도하는 단백질은 암호화하지 않는 바이러스 및 세포융합을 유도하는 단백질을 암호화하지만 프로드러그 전환 유전자는 암호화하지 않는 바이러스를 포함한다.
- [0010] 그러므로, 본 발명은 선택적으로 프로드러그와 조합하여 환자에게 투여되었을 때, 활성화된 프로드러그와 바이러스 유전체(genome)로부터 발현된 융해성 및/또는 면역조절 단백질의 조합된 활성화에 의하거나, 또는 바이러스 유전체로부터 발현된 융해성 단백질과 면역조절 단백질의 조합된 활성화에 의해 항종양 특성이 증강되는, 종양세포를 파괴(oncolytic destruction)할 수 있는 바이러스를 제공한다.
- [0011] 따라서, 본 발명은 기능성 ICP34.5를 암호화하는 유전자가 결핍되고, 아래 유전자들 중 둘 이상을 포함하는 헤르페스 바이러스(herpes virus)를 제공한다:
- [0012] (i) 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자;
- [0013] (ii) 세포융합을 유도할 수 있는 단백질을 암호화하는 유전자; 및
- [0014] (iii) 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자.
- [0015] 바람직하게는, 헤르페스 바이러스는 기능성 ICP34.5를 암호화하는 유전자가 결핍되고 아래 유전자를 포함하는 바이러스이다:
- [0016] (i) 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자; 및
- [0017] (ii) 세포융합을 유도할 수 있는 단백질을 암호화하는 유전자.
- [0018] 본 발명은 또한 다음을 제공한다:
- [0019] - 치료에 의한 인간 또는 동물의 치치방법에 있어서의 용도를 위한 본 발명의 헤르페스 바이러스
- [0020] - 암 치료를 위한 의약제조에 있어서의 본 발명의 헤르페스 바이러스의 용도
- [0021] - 유효성분으로서의 본 발명에 따른 헤르페스 바이러스와 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물
- [0022] - 본 발명에 따른 헤르페스 바이러스의 유효량을 개체에 투여함으로써, 개체의 종양을 치료하는 방법.

과제의 해결 수단

[0023] A. 바이러스

[0024] 본 발명의 헤르페스 바이러스는 표적 종양세포를 효과적으로 감염시킬 수 있다. ICP34.5를 암호화하는 유전자는 이 바이러스에서 불활성화된다. ICP34.5의 돌연변이는 선택적인 종양파괴 활성을 허용한다. ICP34.5를 비기능적으로 만드는 어떤 돌연변이도 이용될 수 있지만, ICP34.5 유전자의 적절한 돌연변이가 추 등과 맥클린 등에 기재되어 있다(참조: Chou et al., 1990, Science, 250:1262-1266; Maclean et al., 1991, J. Gen. Virol., 72:631-639). ICP47, ICP6 및/또는 티미딘 키나아제를 암호화하는 유전자들이 추가적으로 불활성화될 수 있고, 그런 불활성화가 종양파괴 효과를 심각하게 저해하거나 또는 그런 결실이 바이러스의 종양파괴 또는 다른 바람직한 특성을 증강시킨다면 다른 유전자들도 불활성화될 수 있다. ICP47을 암호화하는 유전자가 돌연변이된 경우, 그것은 근접한 US11 유전자가 HSV의 복제주기에서 일반적인 경우에서보다 보다 이른 시간에 발현되는 경향으로 돌연변이 될 수 있다. 그러한 돌연변이는 리우 등에 의해 발표되었다(참조: Liu et al. 2003, Gene Therapy, 10:292-303). 본 발명의 바이러스는 프로드러그 활성화 효소, 세포융합을 유도하는 단백질 및 면역조절 단백질 중 둘 이상을 추가적으로 암호화한다.

[0025] 헤르페스 바이러스 유전자와 관련하여 본 발명에서 사용되는 용어는 HSV의 유전자에 있어 통상적으로 사용되는 것이다. 본 발명의 헤르페스 바이러스가 비-HSV 헤르페스 바이러스로부터 유래된 경우, 언급된 각 HSV 유전자의 기능적 동등체(functional equivalent)가 불활성화된다. HSV 유전자의 기능적 동등체인 비-HSV 유전자는 HSV 유전자와 같은 기능을 수행하고, HSV 유전자와 서열 상동성을 가진다. 기능적 동등체는 HSV 유전자와 적어도 30%, 예를 들면 적어도 40% 또는 적어도 50%의 상동성을 가진다. 상동성은 아래에 기재된 바에 따라 결정될 수 있다.

[0026] 상기 기재된 목적을 위해 변형된 바이러스 영역은 (완전히 또는 부분적으로) 제거되거나 또는 비기능적으로 되거나 또는 다른 서열, 특히 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자, 세포융합을 유도하는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자에 의해 치환될 수 있다.

[0027] 본 발명의 바이러스는 헤르페스 심플렉스 바이러스 HSV 변종으로부터 유래될 수 있다. HSV 변종은 HSV1 또는 HSV2 변종, 또는 그의 유도체인 수 있고, 바람직하게는 HSV1이다. 유도체는 HSV1 또는 HSV2로부터의 DNA를 포함하는 인터-타입 재조합체를 포함한다. 그러한 인터-타입 재조합체는 당업계에 알려져 있다(참조: Thompson et al., 1998, Virus Genes, 1(3):275-286; Meignier et al., 1988, Infect. Dis., 159:602-614). 유도체는 HSV1 또는 HSV2 유전체와 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 그보다 바람직하게는 적어도 90% 또는 95%의 상동성을 가진다. 보다 바람직하게는, 유도체는 HSV1 또는 HSV2 유전체와 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 그보다 바람직하게는 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가진다.

[0028] 예를 들면, UWGCG 패키지는 상동성 계산(예를 들면, 디폴트 세팅에서 이용되는)에 이용될 수 있는 BESTFIT 프로그램 제공한다(참조: Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research, 12:387-395). PILEUP과 BLAST 알고리즘은 상동성을 계산하거나 또는 서열을 정렬(전형적으로 디폴트 세팅에서)하는데 이용될 수 있다(참조: Altschul, 1993, J. Mol. Biol., 36:290-300; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410).

[0029] BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생명공학정보센터(National Centre for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공개적으로 입수가능하다. 이 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 같은 길이의 워드(word)와 정렬되었을 때, 파지티브-수치의 한계 스코어(threshold score) T와 매치되거나 그것을 만족시키는 주어진 서열에서 짧은 워드의 길이 W를 확인함으로써 하이스코어서열쌍(high scoring sequence pair, HSPs)을 일차적으로 확인하는 것과 관련된다. T는 네이버후드 워드 스코어 한계로서 인용된다(참조: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410). 이들 초기 네이버후드 워드 히트(hits)는 그들을 포함하는 HSPs를 발견하기 위한 검색을 개시하기 위한 씨드(seed)로서 작용한다. 워드 히트는 반복 알고리즘이 증가될 수 있는 만큼 멀리 각 서열을 따라 양방향으로 신장된다. 양방향으로의 워드 히트의 신장은 반복 알고리즘 스코어가 그의 최대획득수치에서 양(quantity) X 까지 떨어진 경우, 반복 스코어가 하나 또는 그 이상의 네가티브-스코어링 레지듀 정렬(negative-scoring residue alignment)의 축적에 의해 제로 또는 그 이후로 떨어진 경우, 또는 각 서열의 말단에 도달한 경우 정지한다. BLAST 알고리즘의 매개변수(parameter) W, T 및 X는 정렬의 감도(sensitivity)와 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 워드 길이(W) 11, BLOSUM62 스코어링 매트릭스 정렬치(B) 50, 기대치(E) 10, M=5, N=4 및 양 가닥 비교를 디폴트로 하여 이용된다(참조: Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:10915-10919).

[0030] BLAST 알고리즘은 두 서열 사이의 유사성의 통계적 분석을 수행한다(참조: Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:5873-5787). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성 측정의 하나는 최소합계가능

성(the smallest sum probability(P(N)))이며, 이것은 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 매치가 우연에 의해 일어날 가능성의 표식을 제공한다. 예를 들면, 제 1 서열과 제 2 서열의 비교에 의한 최소합계가능성이 약 1 이하, 바람직하게는 약 0.1 이하, 보다 바람직하게는 0.01 이하, 가장 바람직하게는 0.001 이하라면, 그 서열은 다른 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0031] 유도체는 뉴클레오타이드 치환, 예를 들면, 1, 2 또는 3개에서 10, 25, 50 또는 100개의 치환에 의해 변형된 HSV1 또는 HSV2 유전체의 서열을 가질 수 있다. HSV1 또는 HSV2 유전체는 하나 이상의 삽입 및/또는 결실 또는 양쪽 말단의 신장에 의해 대안적 또는 추가적으로 변형될 수 있다.

[0032] 본 발명의 바이러스 변종은 "비실험용(non-laboratory)" 변종일 수 있다. 이들은 또한 "임상용(clinical)" 변종으로 언급될 수 있다. 당업계의 숙련가는 실험용 변종과 비실험용 변종 또는 임상용 변종을 쉽게 구별할 수 있을 것이다. 바이러스 변종에 의해 나타날 수 있는 특성들에 대한 추가적인 사항은 아래와 같다.

[0033] 실험용과 비실험용 변종의 가장 큰 차이는 일반적인 실험용 변종은 배양시 어떤 경우에도 수 년의 오랜 기간동안 유지된다는 점이다. 모든 실험용 HSV 변종은 감염된 개체로부터 최초로 분리되었고, 임상용 변종으로부터 유래되었다. HSV 같은 바이러스의 배양은 시리얼 패시지(serial passage)로 알려진 기술과 관련되어 있다. 바이러스를 생산하고 유지시키기 위해, 적절한 세포가 바이러스로 감염되고, 세포 내에서 바이러스가 복제되고 수집된다; 신선한 세포가 재감염되고, 이 과정은 시리얼 패시지의 한 주기를 구성한다. 이러한 각 주기는 예를 들면, HSV의 경우에는 며칠이 걸린다. 상기에서와 같이, 이러한 시리얼 패시지는 바이러스 변종의 특성에 있어서의 변화를 유도할 수 있으며, 실질적인 적용에 유용한 특성, 예를 들면, HSV의 경우 엑손을 따라 이동하거나 인간 세포를 감염시킬 수 있는 능력의 유지에 대비되는 것과 같은, 배양시의 바람직한 생장이라는 특성(예를 들면, 빠른 복제)이 선별을 통해 일어날 수 있는 것이다.

[0034] 일반적으로 이용되는 실험용 변종은 HSV-1 변종 F, HSV-1 변종 17+ 및 HSV-1 변종 KOS를 포함한다. 본 발명에서 이용되는 비실험용 변종은 전형적으로 HSV-1 변종 F, 17+ 및 동등의 변형을 갖는 KOS 변종과 비교하여 향상된 종양과괴 활성을 가진다.

[0035] 비실험용 변종은 감염된 개체로부터 최근에 분리된 것이다. 본 발명의 비실험용 변종은 최근에 분리된 변종으로, ICP34.5를 암호화하는 유전자가 불활성화되도록 변형되어 기능성 ICP34.5 단백질이 발현되지 않고, 프로드러그 활성화 단백질을 암호화하는 유전자, 세포융합을 유도하는 단백질을 및/또는 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한다. 본 발명의 바이러스는 만들어진 변형에 적용될 수 있도록 특정의 시간을 소비할 것이지만, 배양에 걸리는 시간은 비교적 짧을 것이다. 임상용 분리체(isolate)는 저장을 위해 변형에 앞서 또는 변형 후에 동결될 수 있다. 본 발명의 변종은 본래의 임상용 분리체의 바람직한 특성들이 유래된 그대로 실질적으로 유지될 수 있도록 하는 방식으로 준비된다.

[0036] 본 발명의 바이러스 변종은 양친 변종(parental strain)이 본 발명의 바이러스를 생산하도록 돌연변이된 경우 양친 바이러스 변종으로부터 유래된다. 예를 들면, 본 발명의 바이러스는 임상용 분리체 JS1으로부터 유래될 수 있다. JS1-유래 바이러스의 양친 변종은 JS1 또는 JS1으로부터 유래된 다른 HSV1 변종일 수 있다. 그러므로, 본 발명의 바이러스는 기능성 ICP34.5를 암호화하는 유전자가 결핍되고, 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자, 세포융합을 유도하는 단백질을 암호화하는 유전자 및 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자 중 둘 또는 그 이상을 포함하는 JS1 바이러스일 수 있다. 추가로, 그러한 바이러스는 예를 들면, 여기에 언급된 바와 같은 어떤 다른 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 바이러스는 표적 인간 암세포를 효과적으로 감염시킬 수 있다. 그러한 바이러스가 비실험용 또는 임상용 변종인 경우, 그것은 HSV에 감염된 개체로부터 최근에 분리되어 HSV-1 변종 F, KOS 및 17+ 같은 표준 실험실용 변종과 비교할 때 실험실적 조건 및/또는 생체내 조건에서 증강된 복제능, 감염능 또는 종양 및/또는 다른 세포의 사멸능 등의 바람직한 능력의 조사를 위해 스크리닝된다. 실험용 바이러스 변종과 비교하여 향상된 특성을 갖는 본 발명의 바이러스는 기능성 ICP34.5 유전자가 결핍되고, 적합한 프로모터에 의한 조절 하에 프로드러그 활성화 효소의 유전자, 세포융합을 유도하는 단백질을 유전자 및 면역조절 단백질을 암호화하는 유전자 중 둘 또는 그 이상을 암호화하도록 조작된다. 바이러스 변종은 최근에 분리되었고, 숙주로부터 변형되지 않은 임상용 양친 변종을 분리한 이래 배양에 있어서 3년 또는 그 이하가 걸리고 있다. 보다 바람직하게는, 변종은 배양에 있어 1년 또는 그 이하, 예를 들면, 9개월 또는 그 이하, 6개월 또는 그 이하, 3개월 또는 그 이하, 2개월 또는 그 이하, 1개월 또는 그 이하, 2주 또는 그 이하, 또는 1주 또는 그 이하가 걸리고 있다. 이러한 배양에 있어서의 시간의 특징은 배양에 실질적으로 소비되는 시간을 의미한다. 그러므로, 예를 들면, 바이러스 변종을 보존하기 위해 동결하는 것은 일반적인 방법이다. 분명히, 동결 또는 동등한 방식으로의 보존은 배양에서 변종

을 유지하기 위한 것으로 평가되지는 않는다. 그러므로, 동결시간 또는 다른 보존시간은 상기 언급한 배양에 소비되는 시간에 포함되지 않는다. 배양에 소비되는 시간은 전형적으로 시리얼 패시지를 수행하는데 실질적으로 소비되는 시간, 다시 말해, 바람직하지 않은 특성을 위한 선별이 일어날 수 있는 동안의 시간이다.

[0038] 바람직하게는, 비실험용 바이러스 변종은 숙주로부터 변형되지 않은 임상용 전구체 변종의 분리 이후, 1,000 또는 그 이하의 주기 또는 시리얼 패시지를 경험하게 된다. 보다 바람직하게는, 바이러스는 500 또는 그 이하, 100 또는 그 이하, 90 또는 그 이하, 80 또는 그 이하, 70 또는 그 이하, 60 또는 그 이하, 50 또는 그 이하, 40 또는 그 이하, 30 또는 그 이하, 20 또는 그 이하, 10 또는 그 이하, 5 또는 그 이하, 4 또는 그 이하, 3 또는 그 이하, 2 또는 1 주기를 경험하게 된다.

[0039] 바람직하게는, 비실험용 바이러스는 표준의 통계적 조사에 의해 측정된 바와 같이, 실질적인 적용에 유용한 특정 기능을 수행하기 위한 동등의 변형을 가진 기준 실험용 변종보다 우수한 능력을 가진다. 종양치료를 위한 종양과괴 바이러스의 경우, 바람직하게는, 본 발명의 비실험용 바이러스 변종은 종양세포에 감염되거나 세포내에서 복제하기 위해, 종양세포를 사멸시키기 위해, 또는 조직내 세포 사이에 퍼지기 위해 동등한 변형을 갖는 기준 실험용 변종보다 우수한 능력을 가질 것이다. 보다 바람직하게, 그러한 우수한 능력은 통계적으로 현저히 우수한 능력이다. 예를 들면, 본 발명에 따르면, 비실험용 변종은 조사된 특성과 관련하여 기준 변종의 능력의 1.1배, 1.2배, 1.5배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 또는 10배 이상의 능력을 가질 수 있다. 바람직하게는, 기준 변종은 HSV-1 변종 17+, HSV-1(F) 및 HSV-1 KOS로부터 선택된다.

[0040] 여기에 언급된 특성의 통계적 분석은 표준조사, 예를 들면, t-검정법, ANOVA 또는 카이 제곱 검정법(chi-squared test)에 의해 수행될 수 있다. 전형적으로, 통계적인 중요성(statistical significance)은 $p=0.05(5\%)$, 보다 바람직하게는 $p=0.01$, $p=0.001$, $p=0.0001$, $p=0.000001$ 의 수치로 측정될 것이다.

[0041] 본 발명의 바이러스는 종양 세포에 감염되고 복제되어, 최종적으로 종양세포를 사멸시킨다. 그러므로, 그러한 바이러스는 복제능력이 있다. 바람직하게는, 그들은 종양세포에서 선택적으로 복제능을 갖는다. 이것은 그들이 종양세포에서는 복제하고 비종양세포에서는 복제하지 않거나 또는 그들이 비종양 세포에서보다 종양세포에서보다 효율적으로 복제한다는 것을 의미한다. 예를 들면, 바이러스가 중추신경계의 종양을 치료하기 위해 이용된 경우, 바이러스는 종양세포에서는 복제될 수 있지만, 주변의 신경세포에서는 복제되지 않는다. 바이러스가 복제될 수 있는 세포는 복제를 허용하는 퍼미시브(permissive) 세포이다. 선택적인 복제능의 측정은 복제능과 종양세포 사멸능의 측정을 위해 여기에 기재된 분석법에 의해 수행될 수 있고, 필요하다면 여기에 언급된 통계적 기술로 분석될 수 있다.

[0042] 종양세포와 관련된 바이러스 변종의 특성은 당업계에 알려진 어떤 방법으로도 측정될 수 있다. 예를 들면, 바이러스의 종양세포로의 감염능은 세포의 특정 퍼센티지, 예를 들면, 세포의 50% 또는 80%를 측정하기 위해 요구되는 바이러스의 양(dose)를 측정함으로써 정량화될 수 있다. 종양세포에서의 복제능은 실시예에서 수행된 것과 같이, 예를 들면 6, 12, 24, 36, 48 또는 72 시간 또는 그 이상의 기간동안 세포에서의 바이러스 성장을 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0043] 바이러스의 종양세포 사멸능은 육안을 통해 대략적으로 측정할 수도 있고, 보다 정확하게는 주어진 시간이 경과한 후에도 주어진 세포 타입의 MOI를 유지하고 있는 살아 있는 세포의 수를 카운팅함으로써 측정할 수도 있다. 예를 들면, 비교는 24, 48, 72 시간의 경과 후에 알려진 종양세포 타입을 이용하여 이루어진다. 특히, HT29 결장선암, LNCaP.FGC 전립선 선암, MDA-MB-231 유방 선암, SK-MEL-28 악성흑색종 또는 U-87 MG 신경교아세포종성상세포종 세포가 이용될 수 있다. 이들 세포 타입 중 어느 하나 또는 어떤 조합도 이용될 수 있고, 다른 종양세포 타입일 수도 있다. 본 목적을 위한 종양세포 타입의 표준패널을 제작하는 것이 바람직할 것이다. 주어진 특정 시간에 유지된 살아 있는 세포의 수를 카운팅하기 위해, 트립판 블루-배제 세포(다시 말해, 살아 있는 세포)의 수가 측정될 수 있다. 정량화는 또한 FACS(fluorescence activated cell sorting) 또는 MTT 분석에 의해 수행될 수 있다. 종양세포-사멸능은 또한 생체내 조건에서 예를 들면, 특정 바이러스에 의해 야기된 종양 부피의 감소를 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0044] 본 발명의 바이러스의 특성을 결정하기 위하여, 비교를 위한 표준 실험용 기준 변종을 이용하는 것이 일반적으로 바람직할 것이다. 어떤 적합한 표준 실험용 기준 변종이라도 이용될 수 있다. HSV의 경우, HSV 1 변종 17+, HSV1 변종 F 또는 HSV1 변종 KOS 중 하나 이상을 이용하는 것이 바람직하다. 기준 변종은 전형적으로 조사될 본 발명의 변종에 대해 동등한 변형을 가질 것이다. 그러므로, 기준 변종은 전형적으로 유전자 결실 및 이형적인 유전자 삽입 같은 동등한 변형을 가질 것이다. 본 발명의 바이러스에 있어서, ICP34.5를 암호화하는 유전자가 비기능성인 경우, ICP34.5를 암호화하는 유전자는 기준 변종에서 또한 비기능성일 것이다. 기준 변종

에 대해 만들어진 변형들은 본 발명의 변종에 대해 만들어지는 것과 동일할 수 있다. 이에 의하여, 기준 변종에서의 유전자 붕괴는 본 발명의 변종에서도 정확히 동등한 자리에 있을 것이고, 예를 들면, 결실이 같은 크기로 같은 자리에 있을 것이라는 것이다. 유사하게, 실시태양에서 이형 유전자들은 같은 자리에 삽입되고, 같은 프로모터에 의해 조절되는 등의 일들이 일어날 것이다. 그러나, 동일한 변형이 만들어지는 것이 필수적이지는 않다. 중요한 것은 기준 유전자가 기능적으로 동등한 변형을 갖는다는 것이고, 예를 들면, 같은 유전자가 비기능적이고 및/또는 같은 이형 유전자 또는 유전자들이 삽입된다는 것이다.

[0045] B. 돌연변이 방법

[0046] 다양한 유전자들이 당업계에 잘 알려진 여러 기술에 의해 기능적으로 불활성화될 수 있다. 예를 들면, 그들은 결실, 치환 또는 삽입, 바람직하게는 결실에 의해 기능적으로 불활성화될 수 있다. 결실은 유전자의 하나 이상의 부분 또는 전체 유전자를 제거할 수 있다. 예를 들면, 오직 하나의 뉴클레오타이드의 결실은 프레임 이동을 야기한다. 그러나, 바람직하게는 큰 부분의 결실, 예를 들면 암호화 및 비암호화 서열의 적어도 25%, 보다 바람직하게는 50%(또는 대안적으로, 절대적인 조건으로 적어도 10개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 100개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 1000개 뉴클레오타이드)의 결실이 만들어진다. 전체 유전자 및 측방향에 접한 서열의 일부를 제거하는 것이 특히 바람직하다. 유전자의 둘 이상의 카피(copy)가 바이러스 유전체 내에 존재하는 경우, 그 유전자의 두 카피 모두 기능적으로 불활성화되는 것이 바람직하다.

[0047] 돌연변이는 당업계의 숙련가들에게 잘 알려진 동형 재조합 방법에 의해 헤르페스 바이러스에서 만들어진다. 예를 들면, HSV 유전체 DNA는 상동적인 HSV 서열을 양측에 접한 변이된 서열을 포함하는 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터와 함께 세포감염된다. 변이된 서열은 통상의 기술에 의해 제작될 수 있는 모든 결실, 삽입 또는 치환을 포함할 수 있다. 삽입은 예를 들면, 베타-갈락토시다제 활성 또는 형광으로 재조합 바이러스를 스크리닝하기 위해 이용될 수 있는 선택적인 마커 유전자, 예를 들면, lacZ 또는 녹색형광 단백질(GFP)을 포함할 수 있다.

[0048] C. 이형 유전자와 프로모터

[0049] 본 발명의 바이러스는 프로드러그 활성화 효소를 암호화하는 이형 유전자, 세포통합을 유도하는 단백질을 암호화하는 이형 유전자 및 면역조절 단백질을 암호화하는 이형 유전자 중 둘 이상을 운반한다. 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 프로드러그 활성화 효소를 암호화하는 이형 유전자 및 용해성 단백질을 암호화하는 이형 유전자와 면역조절 단백질을 암호화하는 이형 유전자 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다. 용해성 단백질은 또한 면역조절 단백질로서 기능할 수도 있다.

[0050] 바람직하게는, 프로드러그 활성화 단백질은 사이토신 디아미나제 효소이다. 사이토신 디아미나제 유전자는 불활성의 프로드러그 5-플루오로사이토신을 활성의 드러그(drug) 5-플루오로우라실로 전환시킬 수 있다. 박테리아 유래 및 효모 유래의 것을 포함하여 다양한 사이토신 디아미나제 유전자가 이용가능하다. 제 2 유전자, 전형적으로 제 2 효소를 암호화하는 유전자는 사이토신 디아미나제 유전자의 프로드러그 전환 활성을 증강시키기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 제 2 유전자는 도 2에서 언급한 바이러스처럼 우라실 포스포리보실트랜스퍼라제를 암호화할 수 있다.

[0051] 세포융합을 유도하는 단백질을 암호화하는 어떤 적합한 용해성 유전자라도 이용될 수 있다. 바람직하게는, 세포융합을 유도하는 단백질은 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(GALV) 또는 인간 내인성 레트로바이러스 W로부터 유래된 외피 당단백질, 홍역 바이러스로부터의 용해성 F 또는 H 단백질 및 수포성 구내염 바이러스 G 단백질 같은 변형된 레트로바이러스성 외피 당단백질로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 세포융합을 유도하는 단백질은 GALV 용해성 당단백질이다.

[0052] 면역조절 유전자는 면역반응을 조절할 수 있는 단백질을 암호화하는 어떤 유전자일 수 있다. 면역반응을 조절하는 단백질은 GM-CSF, TNF α 같은 사이토카인, 인터류킨(예를 들면, IL 12), RANTES 같은 케모카인 또는 대식세포 염증성 단백질(예를 들면, MIP-3) 또는 B7.1, B7.2 또는 CD40L 같은 다른 면역조절 분자일 수 있다. 세포융합을 유도하는 단백질은 또한 면역반응을 조절할 수 있다. 예를 들면, GALV는 면역반응을 조절할 수 있다.

[0053] 본 발명의 바이러스는 생체내 조건에서 유전자를 그들이 발현되는 세포로 전달하는데 이용될 수 있다.

[0054] 프로드러그 활성화 유전자, 세포융합을 유도하는 단백질을 암호화하는 유전자 및/또는 면역조절 단백질을 암호

화하는 유전자는 적절한 기법, 예를 들면, HSV 서열을 양측에 접한 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터를 이용한 HSV 변종의 동형 재조합에 의해 바이러스 유전체로 삽입될 수 있다. 유전자는 예를 들면, ICP34.5를 암호화하는 유전자를 교체할 수 있도록 HSV 유전체 내 동일한 자리에 삽입되거나 다른 자리에 삽입된다. 유전자는 CMV 프로모터와 RSV 프로모터 같은 분리된 프로모터 또는 단일 프로모터로부터 발현될 수 있다. 유전자가 단일 프로모터로부터 발현되는 경우, 유전자는 내재성 리보솜 유입자리(internal ribosome entry site, cRES)에 의해 분리될 수 있다. 유전자는 또한 번역적 융합체(translational fusion)로서 발현될 수 있는데, 융합된 단백질은 분리 유전자의 활성 모두(다시 말해, 프로드러그 활성화와 세포융합, 프로드러그 활성화와 면역조절 활성 또는 세포융합과 면역조절 활성)를 유지하고, 융합된 단백질은 발현 후에 프로테아제에 의해 시스 또는 트랜스 형태(in cis 또는 in trans)로 절단된다. 바람직한 실시태양에서, 두 단백질 또는 세 단백질 중 둘은 서로에 대해 각각 백-투-백(back-to-back) 방향으로 위치한 RSV와 CMV 프로모터로부터 발현되고, ICP34.5를 암호화하는 유전자를 교체할 수 있도록 HSV 유전체로 삽입된다. 이러한 바이러스가 도 2에 언급되어 있다. 그러나, 그 유전자는 종양과괴 특성이 유지된다면 유전체 내 어떤 자리로도 삽입될 수 있다.

[0055] 삽입된 유전자의 전사된 서열은 바람직하게는 종양세포에서 유전자의 발현을 허용하는 대조 서열과 작동가능하게 연결된다. "작동가능하게 연결된(operably linked)"이란 기재된 구성요소들이 의도된 방식으로 작동하도록 허용하는 관계에 있는 병렬구조를 말한다. 암호화 서열과 "작동가능하게 연결된" 대조 서열은 암호화 서열의 발현이 대조 서열과 양립할 수 있는 조건 하에서 이루어지는 방식으로 연결된다.

[0056] 대조 서열은 전형적으로 그에 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 허용하는 프로모터와 전사종결 시그널을 포함한다. 프로모터는 포유동물, 바람직하게는 인간 종양세포에서 기능적인 프로모터로부터 선택된다. 프로모터는 진핵성 유전자의 프로모터 서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 프로모터는 이형 유전자의 발현이 일어날 수 있는 세포, 바람직하게는 포유동물의 종양세포, 보다 바람직하게는 인간 종양세포의 유전체로부터 유래될 수 있다. 진핵 프로모터와 관련하여, 그것은 편재적으로 기능하는 (베타-액틴, 튜블린의 프로모터 같은) 프로모터 또는 대안적으로, 종양-특이적으로 기능하는 프로모터일 수 있다. 또한, 그들은 특이적인 자극에 반응하는 프로모터, 예를 들면, 스테로이드 호르몬 수용체에 결합하는 프로모터일 수 있다. 바이러스 프로모터 또한 이용될 수 있는데, 예를 들면, 몰로니 마린 백혈병 바이러스 롱 터미널 리피트(moloney murine leukaemia virus long terminal repeat, MMLV LTR) 프로모터 또는 RSV로부터 유래된 것과 같은 다른 레트로바이러스성 프로모터, 인간 또는 마우스 거세포바이러스(cytomegalovirus) IE 프로모터 또는 잠복관련 전사체(latency associated transcript)의 발현을 유도하는 헤르페스 바이러스 유전자의 프로모터일 수 있다.

[0057] 프로드러그 전환 효소를 암호화하는 유전자, 세포융합을 촉진하는 단백질을 암호화하는 유전자 및/또는 면역조절 유전자 및 대조 서열을 포함하는 발현 카세트와 그 외 적합한 구조물(construct)은 당업계의 숙련자에게 알려진 통상의 클로닝 기술을 이용하여 제작될 수 있다(참조: 예를 들면, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press).

[0058] 유전자의 발현수준을 종양세포의 수명시간 동안 조절할 수 있도록 유도성의 프로모터를 사용함이 유리하다. 유도성이란 프로모터를 이용하여 발현정도를 조절할 수 있는 것을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 바이러스는 강력한 프로모터(예를 들면, CMV IE 프로모터)의 조절 하에 테트 억제자(tet repressor)/VP16 전사 활성인자 융합 단백질을 암호화하는 이형 유전자를 추가로 포함할 수 있고, 프로드러그 전환, 세포융합 또는 면역조절 또는 다른 유전자는 이전에 보고된 테트 억제자/VP16 전사 활성인자 융합 단백질에 반응하는 프로모터의 조절 하에 있을 수 있다(참조: Gossen M. and Bujard H., 1992, PNAS, 89:5547-5551; Gossen M. et al., 1995, Science, 268:1766-1769). 그러므로, 이러한 예에서 유전자의 발현은 테트라사이클린의 존재 또는 부재에 의존적일 것이다.

[0059] 본 발명의 바이러스는 다중 이형 유전자를 암호화한다. 본 발명의 바이러스는 하나 또는 그 이상, 예를 들면, 1, 2에서 3, 4 또는 5개의 추가적인 유전자를 포함할 수 있다. 추가적인 유전자는 프로드러그 전환 유전자, 융해성 유전자 및/또는 면역조절 유전자의 추가 카피일 수 있다. 추가적인 유전자는 하나 또는 그 이상의 다른 프로드러그 전환 유전자, 하나 또는 그 이상의 다른 융해성 유전자 및/또는 하나 또는 그 이상의 다른 면역조절 유전자를 암호화할 수 있다. 추가적인 유전자는 치료효과를 증강시키기 위하여 의도된 다른 유전자를 암호화할 수 있다.

[0060] 하나 이상의 유전자와 관련 대조 서열은 특정의 HSV 변종의 바이러스 유전체 내 단일 자리 또는 다중 자리로 도입될 수 있었다. 대안적으로, 반대방향으로 마주보는 프로모터(동일 또는 다른 프로모터) 쌍은 서로 떨어져 있고, 각각 유전자의 발현을 유도하기 위해 이용될 수 있다.

[0061] **D. 치료적 용도**

[0062] 본 발명의 바이러스는 인간 또는 동물체의 치료방법에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 바이러스는 암 치료방법에 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 암의 종양파괴적 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 바이러스는 d포유동물, 바람직하게는 인간의 어떤 고형 종양의 치료에 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 바이러스는 전립선, 유방, 폐, 간, 신장세포, 자궁내막, 방광, 대장 또는 자궁 암종; 선암; 흑색종; 림프종; 신경교종; 연부조직 육종과 골육종 같은 육종; 또는 머리와 목의 암을 가진 개체로 투여될 수 있다.

[0063] **E. 투여**

[0064] 본 발명의 바이러스는 치료를 요하는 환자, 바람직하게는 인간 환자에게 이용될 수 있다. 치료를 요하는 환자는 암으로 고통받는 개체, 바람직하게는 고형 종양을 가진 개체이다. 치료적 처치의 목적은 환자의 상태를 개선하기 위한 것이다. 전형적으로, 본 발명의 바이러스를 이용한 치료적 처치는 암의 증상을 완화시킨다. 본 발명에 따른 암 치료방법은 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 바이러스의 암으로 고통받는 환자로의 투여를 포함한다. 본 발명의 종양파괴적 바이러스의 종양으로 고통받는 개체로의 투여는 전형적으로 종양세포를 사멸시켜, 종양의 크기를 감소시키고 및/또는 종양으로부터 악성세포가 퍼지는 것을 방지한다.

[0065] 치료를 실행하는 하나의 방법은 바이러스와 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와의 조합에 의한 약학적 조성물의 생산과 관련된다. 적절한 담체 또는 희석제는 등장염액(isotonic saline solution), 예를 들면, PBS(phosphate-buffered saline)를 포함한다.

[0066] 치료적 처치는 바이러스 조성물의 표적 조직으로의 직접 주사로 수행될 수 있다. 표적 조직은 종양 또는 종양으로 공급되는 혈관일 수 있다. 투여되는 바이러스의 양은 HSV의 경우, 10^4 에서 10^{10} pfu, 바람직하게는 10^5 에서 10^8 pfu, 보다 바람직하게는 약 10^6 에서 10^9 pfu이다. 전형적으로 1에서 4ml, 바이러스와 약학적으로 허용가능한 적절한 담체 또는 희석제로 필수적으로 구성된 약학적 조성물의 2에서 3ml가 종양으로의 직접 주사에 사용될 수 있다. 그러나, 종양파괴적 치료의 어떤 적용에 있어서는, 종양의 종류, 종양 크기 및 주사 위치에 따라 10ml 이상의 많은 양이 사용될 수 있다. 마찬가지로, 1ml 이하의 적은 양이 사용될 수 있다.

[0067] 기재된 투여경로와 양은 오직 참고만을 위한 것으로, 숙련된 실행자라면 최적의 투여경로와 투여량을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 투여량은 다양한 매개변수에 따라, 특별히, 종양의 위치, 종양의 크기, 처치되는 환자의 나이, 몸무게와 상태 및 투여경로에 따라 결정될 수 있다. 바람직하게는, 바이러스는 종양으로의 직접 주사에 의해 투여된다. 바이러스는 또한 전신으로 투여되거나 또는 종양으로 공급되는 혈관으로의 주사에 의해 투여될 수 있다. 최적의 투여경로는 종양의 위치와 크기에 의존적일 것이다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 본 발명의 바이러스를 제작하는데 이용된 플라스미드와 그 플라스미드가 어떻게 제작되었는지를 보여준다. 플라스미드는 사이토신 디아미나제(cytosine deaminase) 유전자 또는 긴팔원숭이 유인원 백혈병(GALV) 용해성 당단백질, 또는 ICP34.5를 암호화하는 유전자에 근접(flanking)한 HSV1 서열에 근접하고 있는 두 유전자 모두를 암호화한다. 플라스미드는 ICP34.5를 암호화하는 유전자를 사이토신 디아미나제 유전자, GALV 당단백질 유전자 또는 두 유전자 모두로 교체하기 위하여 HSV1 유전자로의 상동적 재조합에 이용될 수 있다. 이 플라스미드는 도 2에서 보여지는 바이러스를 제작하는데 이용된다.

도 1a는 pORF Fcy::Fur(Invivogen)로부터 pRCRSV(Invitrogen)로의 Fcy:Fur 유전자의 서브클로닝을 보여준다. Fcy:Fur 유전자는 제한효소 분해(Nhe I과 Nco I)에 의해 제거되었다(T^4 폴리머라제로 평활화되었다). 이 단편은 Xba I과 Hind III로 절단된(T^4 폴리머라제로 평활화된) pRCRSV(Invitrogen)로 연결되었다.

도 1b는 제한효소 분해(Pvu II, Nru I)에 의한 pRCRSV로부터 p-34.5로의 RSV Fcy:Fur pA 카세트의 서브클로닝을 보여준다. 이 단편은 Not I으로 절단된(T^4 폴리머라제로 평활화된) 서플렉터 p-34.5로 연결되었다. p-34.5 플라스미드는 pSP72(Promega)에 기초하며, HSV-1 ICP34.5 유전자(HSV-1 17+ 변종(123462-124958bp, 125713-126790bp) Genbank X14112에 기초)의 두 근접영역 중 어느 한쪽을 포함한다.

도 1c는 RT-PCR에 의해 바이러스 생산 세포주(MLV 144)(참조: Rangan *et al.*, 1979)로부터 획득한 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(Genbank NC_001885, 5552-7555bp)의 절단된 외피(*env*)를 보여준다. 외피(GALV *env* R-)는 (Eco RI, Not I으로의 제한효소 분해에 의해) 포유동물 발현벡터인 pcDNA3(Invitrogen)로 클로닝되었고, 클론 중 3개가 합포체 생성을 위해 조사되었다.

도 1d는 Not I으로 분해되고 T4 폴리머라제로 평활화된 후 재연결된 pcDNA3 GALV *env* R-에서의 Not I 사이트의 녹아웃(knock out)을 보여준다.

도 1e는 pcDNA3(Invitrogen)로부터 pGEM T Easy by PCR(Promega)로의 GALV *env* R- 바이러스(Genbank NC_001885, 5552-7555bp)의 서브클로닝을 보여준다.

도 1f는 제한효소 분해(Not I)에 의한 pGEM T Easy by PCR(Promega)로부터 p-34.5로의 GALV *env* R-의 서브클로닝을 보여준다. p-34.5 플라스미드는 pSP72(Promega)에 기초하며, HSV-1 ICP34.5 유전자(HSV-1 17+ 변종(123462-124958bp, 125713-126790bp) Genbank X14112에 기초)의 두 근접영역 중 어느 한쪽을 포함한다.

도 1g는 ICP34.5 근접영역(HSV-1 17+ 변종(123462-124958bp, 125713-126790bp) Genbank X14112에 기초)을 포함하고, CMV 프로모터와 BGH 폴리A(Invitrogen) 조건에서 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(Genbank NC_001885, 5552-7555bp)의 절단된 외피(*env*)를 발현하는 최종 서플렉터를 보여준다.

도 1h는 제한효소 분해(Pvu II, Nru I)에 의한 pRcRSV로부터 p-34.5 GALV(**)로의 RSV:Fcy:Fur pA 카세트의 서브클로닝을 보여준다. 이 단편은 Nru I으로 절단된 서플렉터 p-34.5 GALV로 연결된다. p-34.5 플라스미드는 pSP72(Promega)에 기초하며, HSV-1 ICP34.5 유전자(HSV-1 17+ 변종(123462-124958bp, 125713-126790bp) Genbank X14112에 기초)의 두 근접영역 중 어느 한쪽을 포함하고, CMV 프로모터와 BGH 폴리A(Invitrogen) 조건에서 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(Genbank NC_001885, 5552-7555bp)의 절단된 외피(*env*)를 발현한다.

도 2는 본 연구에 이용되는 바이러스 벡터들의 도식도이다. HSV-1 변종 JS1은 다른 건강한 지원자의 발진으로부터 분비물(swab)을 취함으로써 분리되었다(참조: Liu *et al.*, 2003, Gene Therapy, 10:292-303). JS1/34.5-/47-는 두 개의 결실을 가진다. 그 첫 번째는 ICP34.5 유전자(서열 HSV-1 변종 17+에 기초한 124948-125713bp)의 암호화 영역의 제거와 관련되고, 그 두 번째는 ICP47(서열 HSV-1 변종 17+에 기초한 145570-145290bp)의 280bp 결실과 관련된다(참조: Liu *et al.*, 2003, Gene Therapy, 10:292-303). JS1/34.5-/GALV *env* R-/47-는 CMV 프로모터 하에서 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스의 레트로바이러스성 외피, R-펩타이드(Genbank NC_001885, 5552-7555bp)를 발현한다(참조: Bateman *et al.*, 2000, Cancer Research, 60:1492-1497; Galania *et al.*, 2001, Human Gene Therapy, 12:811-821). JS1/34.5-/RSV/Fcy:Fur/47-는 RSV 프로모터 하에서 우라실 포스포-리보실트랜스퍼라제(Invivogen)로의 효소 프로드러그 활성화인자 효모 사이토신 이다미나제 융합체를 발현한다. JS1/34.5-/GALV/*env* R-/Fcy:Fur/47-는 용해성 레트로바이러스 외피와 효소 프로드러그 활성화인자를 모두 포함한다.

도 3은 GALV *env* R-에 의한 종양세포의 융합을 보여준다. 플라크(plaque)는 JS1/34.5-/47-(A)와 JS1/34.5-/47-/GALV(B)를 쥐의 RG2 세포에 감염시킨 후 크리스탈 바이올렛에 의한 염색으로 보여진다.

도 4는 5-플루오로사이토신(5-FU)의 존재 또는 부재시의 대조 바이러스, JS1/34.5-/47-, JS1/34.5-/47-/Fcy:Fur 또는 JS1/34.5-/47-/GALV/Fcy:Fur로의 감염 후 48시간이 경과한 HT1080 세포로부터의 상청액(supernatant)의 효과를 보여준다. 이들 상청액은 열로 불활성화되고, 신선한 HT1080 세포로 72시간동안 첨가되었다. 오른쪽 아래의 두 패널은 거의 약화된 세포죽음을 나타내는데, 5-플루오로사이토신이 Fcy:Fur을 포함하는 바이러스에 의해 5-플루오로우라실로 전환되었음을 보여준다.

도 5는 쥐에 이식된 수축종양(shrinking tumour)에서의 JS1/34.5-/47-, JS1/34.5-/47-/GALV, JS1/34.5-/47-/Fcy:Fur 바이러스의 효과를 나타낸다. 쥐의 9L 종양세포를 피셔 쥐(Fischer rat)의 옆구리로 이식하여, 약 4-5mm 직경의 종양이 될 때까지 진행시켰다. 5마리의 그룹으로 1x10⁸ pfu/ml의 상기 바이러스 50μl를 7, 10, 13, 17 및 20일째에 종양 내부로 주사하였다. 500mg/kg의 5-플루오로사이토신을 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26일째에 복막내로 투여하고, 종양의 직경을 측정하였다. 예러바는 기준편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

다음의 실시예는 본 발명을 설명한다.

[0069]

- [0070] 증강된 종양과괴 및 항종양 잠재능을 가지며 ICP34.5가 결실된 HSV를 생산하기 위하여, 본 발명자들은 HSV1 변종으로부터 ICP47과 ICP34.5를 결실시키고, 프로드러그 활성화 유전자(사이토신 디아미나제/우라실 포스포리보실트랜스퍼라제 융합 유전자) 및/또는 GALV 용해성 당단백질의 유전자를 삽입하였다.
- [0071] 실시예 1: 바이러스 제작(참조: 도 1 및 2)
- [0072] 사용된 바이러스는 임상용 또는 "비실험용", HSV1 변종, JS1에 기초한 것이다. ICP34.5와 ICP47은 변종 JS1으로부터 완전하게 결실되었다. 이 바이러스는 Liu 등에 의해 공개되었다(참조: Liu et al., 2003, Gene Therapy, 10:292-303). GALV env R- 및/또는 사이토신 디아미나제/우라실 포스포리보실트랜스퍼라제 융합 유전자(Fcy:Fur; Invitrogen)는 각각 CMV와 RSV 프로모터의 조절 하에 ICP34.5를 암호화하는 유전자의 자리로 삽입되었다(참조: Bateman et al., 2000, Cancer Research, 60:1492-1497; Galanis et al., 2001, Human Gene Therapy, 12:811-821). 도 1a에서 1h는 바이러스 제작에 이용된 플라스미드의 단계별 제작을 보여준다:
- [0073] 단계 1(도 1a): Fcy::Fur 유전자는 Nco I과 Nhe I에 의해 pORF Fcy::Fur로부터 절단되고, Hind III와 Xba I으로 처리된 pRCRSV로 삽입되었다;
- [0074] 단계 2(도 1b): pRcRSV Fcy::Fur로부터의 프로모터/Fcy::Fur/BGHpA 카세트는 ICP34.5에 접해 있는 영역 사이로 삽입되어 p-34.5 Fcy::Fur를 생성하였다;
- [0075] 단계 3(도 1c): GALV env R-는 통합된 프로바이러스를 포함하는 세포로부터 PCR에 의해 증폭되고, pcDNA3의 Not I과 EcoR I 자리 사이에 클로닝되어, pcDNA3 kGALV env R-를 생성하였다;
- [0076] 단계 4(도 1d에서 1e): 불필요한 제한효소 자리를 제거하기 위한 조작;
- [0077] 단계 5(도 1g): CMV 프로모터/GALV R-/BGHpA 카세트는 ICP34.5에 접해 있는 영역으로 삽입되어, p-34.5 CMV GALV env R-를 생성하였다;
- [0078] 단계 6(도 1h): ICP34.5 위치로의 삽입을 허용하고 GALV env R-와 Fcy::Fur 유전자 모두를 포함하는 플라스미드를 생성하기 위하여, pRcRSV Fcy::Fur로부터의 RSV 프로모터/Fcy::Fur/pA 카세트를 절단하고, p-34.5 CMV GALV env R-로 삽입하여 p-34.5 GALV FCY를 생성하였다.
- [0079] 플라스미드 p-34.5 Fcy::Fur, p-34.5 CMV GALV env R- 및 p-34.5 GALV FCY는 ICP34.5를 대체하는 GFP 서열을 교체할 수 있도록 동형 재조합에 의해 바이러스 변종 JS1/34.5-/47-/CMV GFP로 삽입되었다(참조: Liu et al., 2003, Gene Therapy 10:292-303). 재조합의 비-GFP 발현 플라크는 3 종류의 바이러스(JS1/34.5-/47-/Fcy::Fur, JS1/34.5-/47-/GALV 및 JS1/34.5-/47-/GALV/Fcy::Fur)를 생산하는 것으로 선택되었다. 이들은 도 2에 보여진다.
- [0080] 실시예 2: 세포융합을 매개하는 GALV env R-를 발현하는 바이러스
- [0081] GALV 단독발현 바이러스는 (i) 실험실적 조건에서 GALV 단백질의 발현에 의해 매개되는 1080, Fadu와 U87MG를 포함하는 많은 인간 종양세포의 세포융합을 유도하고, (ii) GALV 단백질을 발현하지 않는 동등 바이러스와 비교할 때, 생체내 조건에서 마우스 모델(Fadu와 HT1080)에서의 증가된 항종양 활성을 제공한다.
- [0082] 세포융합은 도 3에서 보여진다. 쥐 RG2 신경교종 세포는 JS1/34.5-/47- 또는 JS1/34.5-/47-/GALV 중 어느 하나에 의해 감염되고, 플라크 형태에 대한 효과가 관찰되었다. 그것은 GALV 발현 바이러스가 쉽게 관찰되는 합포(세포융합)효과의 신호를 가진 매우 거대해진 플라크를 생성한다는 것을 보여준다.
- [0083] 실시예 3: 사이토신 디아미나제 활성을 가지는 Fcy::Fur 발현 바이러스
- [0084] 사이토신 디아미나제/우라실 포스포리보실트랜스퍼라제 융합 유전자를 포함하는 바이러스는 그것이 실험실적 조

건에서 5-플루오로사이토신의 5-플루오로우라실로의 전환을 유도하고, 그에 의해 5-플루오로우라실 매개의 세포 사멸이 일어난다는 것이 증명되었다. 이것은 도 4에서 보여지며, 여기에서 HT1080 세포는 5-플루오로사이토신의 존재 또는 부재 조건에서 3 종류의 바이러스로 감염되었다. 이들 세포로부터의 상청액은 상청액에 존재하는 바이러스를 불활성화시키기 위해 열처리되었다. 상청액은 새로운 세포를 뒤덮는데 이용되었다. 5-플루오로사이토신이 독성의 5-플루오로우라실로 전환된 경우, 이들 새로운 세포는 사멸되었다. 도 4로부터, Fcy::Fur 유전자가 포함된 본래의 HT1080 세포를 감염시키기 위하여 바이러스를 이용한 경우, 상청액으로 뒤덮힌 세포들은 사멸되었고 이것은 Fcy::Fur 유전자의 생물학적 활성을 증명하는 것임을 확인할 수 있었다.

[0085] 실시예 4: 각 유전자를 단독으로 이용한 경우와 비교하였을 때, 생체내 조건에서 증강된 항종양 활성을 제공하는 GALV env R- 및 5-플루오로사이토신 발현과 결합된 Fcy::Fur 발현의 조합

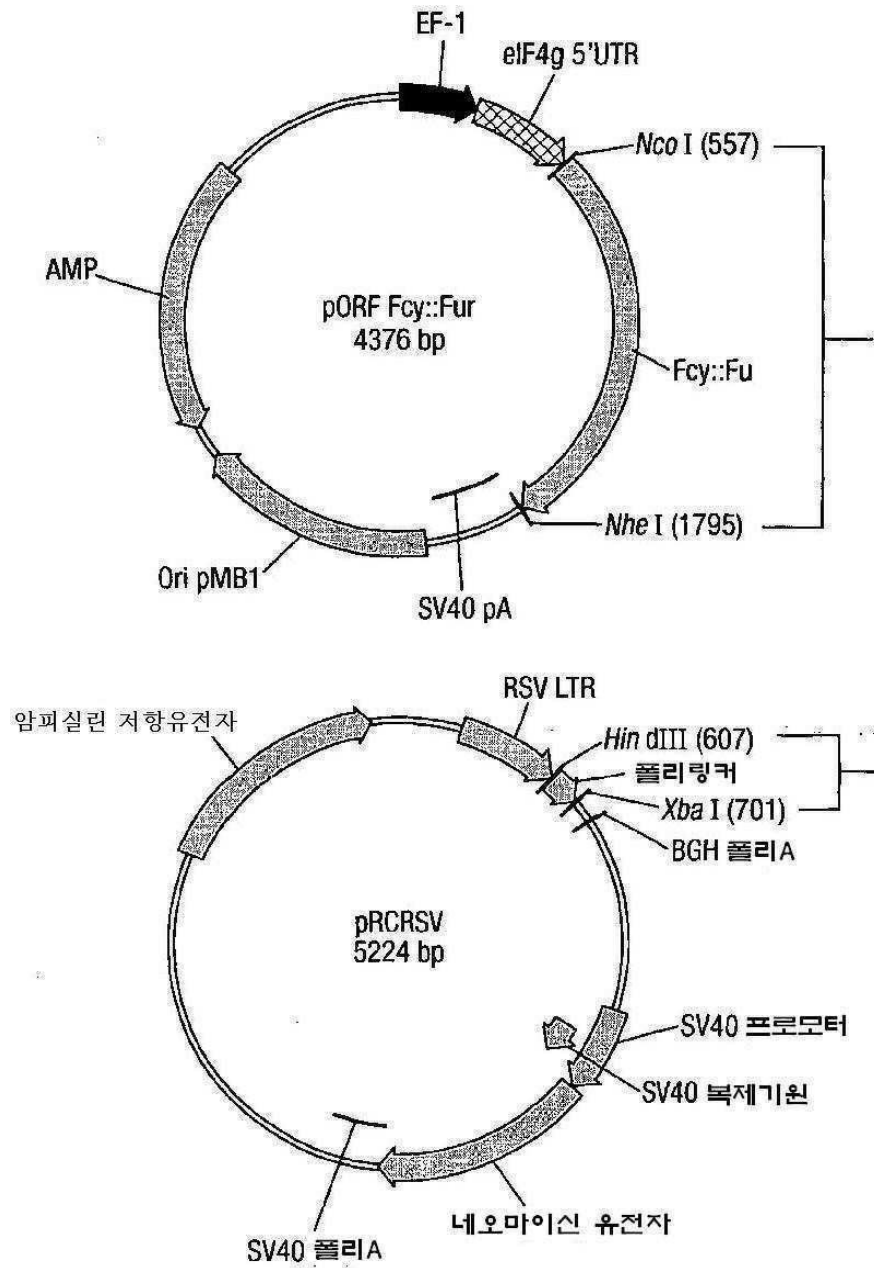
[0086] 도 5는 쥐의 옆구리로 이식된 수축종양(shrinking tumour)에 대한 세 종류의 바이러스(JS1/34.5-/47-/GALV, JS1/34.5-/47-/Fcy::Fur 및 JS1/34.5-/47-/GALV/Fcy::Fur)와 "공백터(empty vector)" 대조군(JS1/34.5-/47-)의 효과를 보여준다. 바이러스들은 5-플루오로사이토신과 조합하여 투여되었다. 도 5로부터, 각 바이러스가 감염된 종양의 수축을 야기함을 확인할 수 있었다. 그러나, GALV env R- 또는 단독의 Fcy::Fur의 전달이 공백터 대조군과 비교하였을 때 향상된 종양 수축을 보여주는 반면, GALV env R-와 Fcy::Fur의 조합전달은 치료되는 경우 모든 종양에서 보다 향상된 종양 수축효과를 나타낸다. 따라서, 프로드러그 활성화 유전자와 용해성 당단백질의 공동전달은 단독으로 이용한 각 시도와 비교하여 종양치료의 향상을 가져온다고 할 수 있다.

[0087] 기탁정보

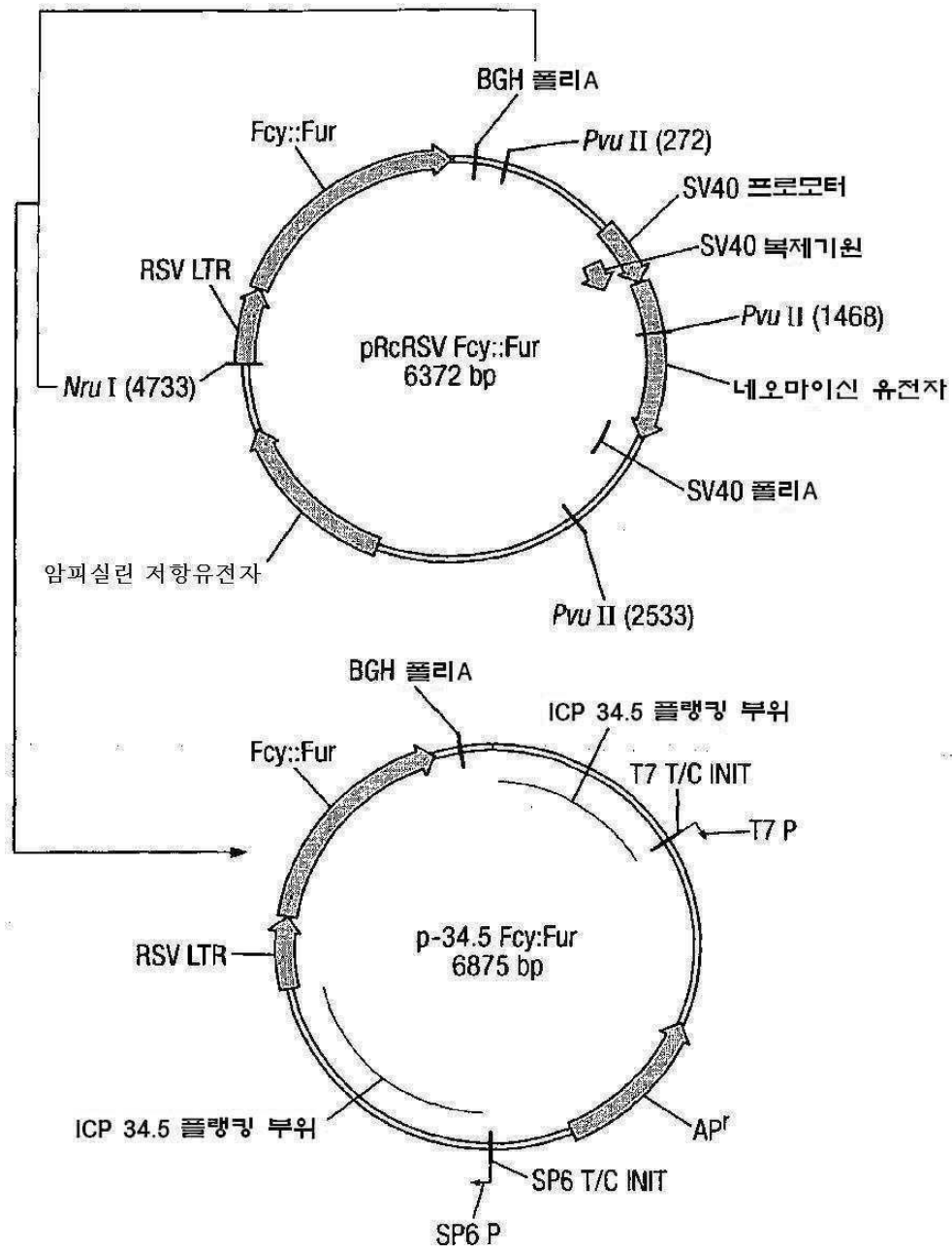
[0088] HSV1 변종 JS1은 영국 SP4 OJG 윌트셔 세일스버리 CAMR의 유럽종균협회(ECACC)에 임시승인번호 01010209로서 2001년 1월 2일자로 기탁되었다.

도면

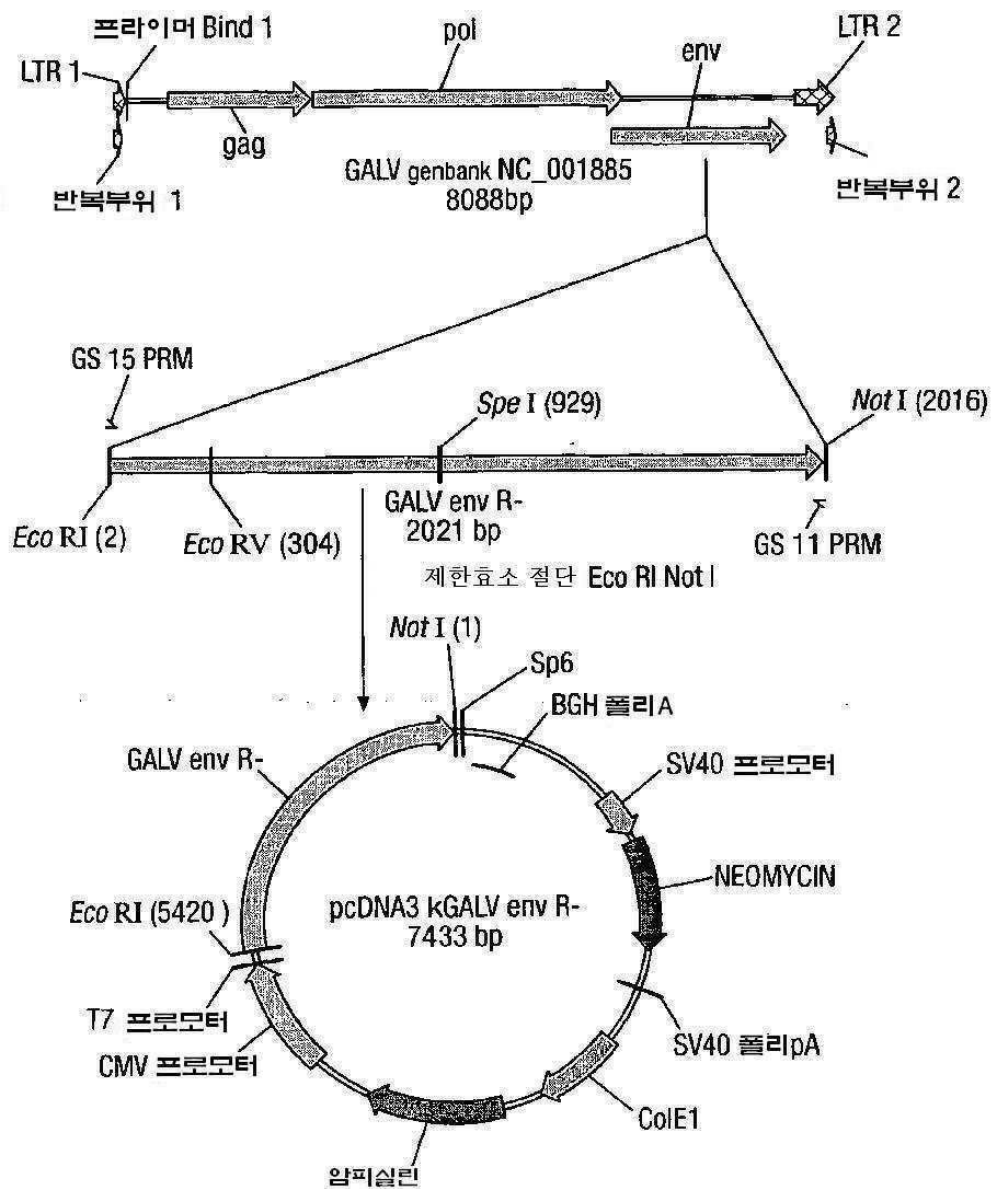
도면1a



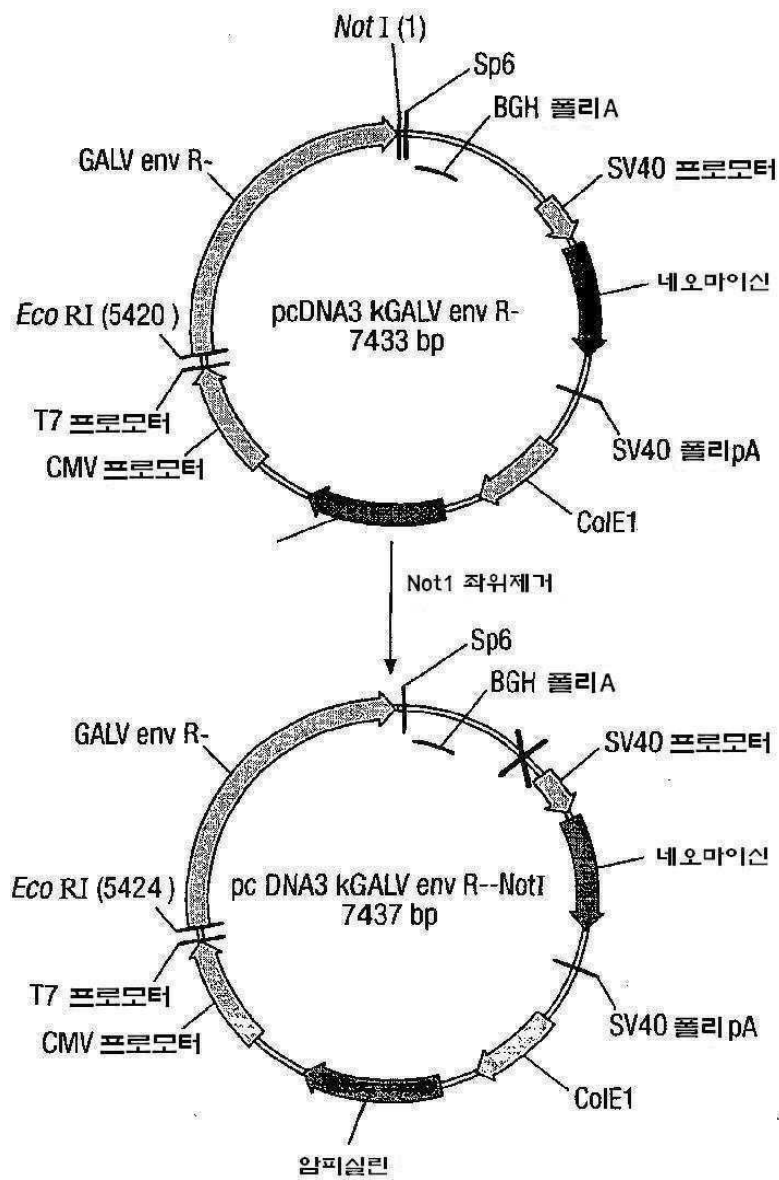
도면1b



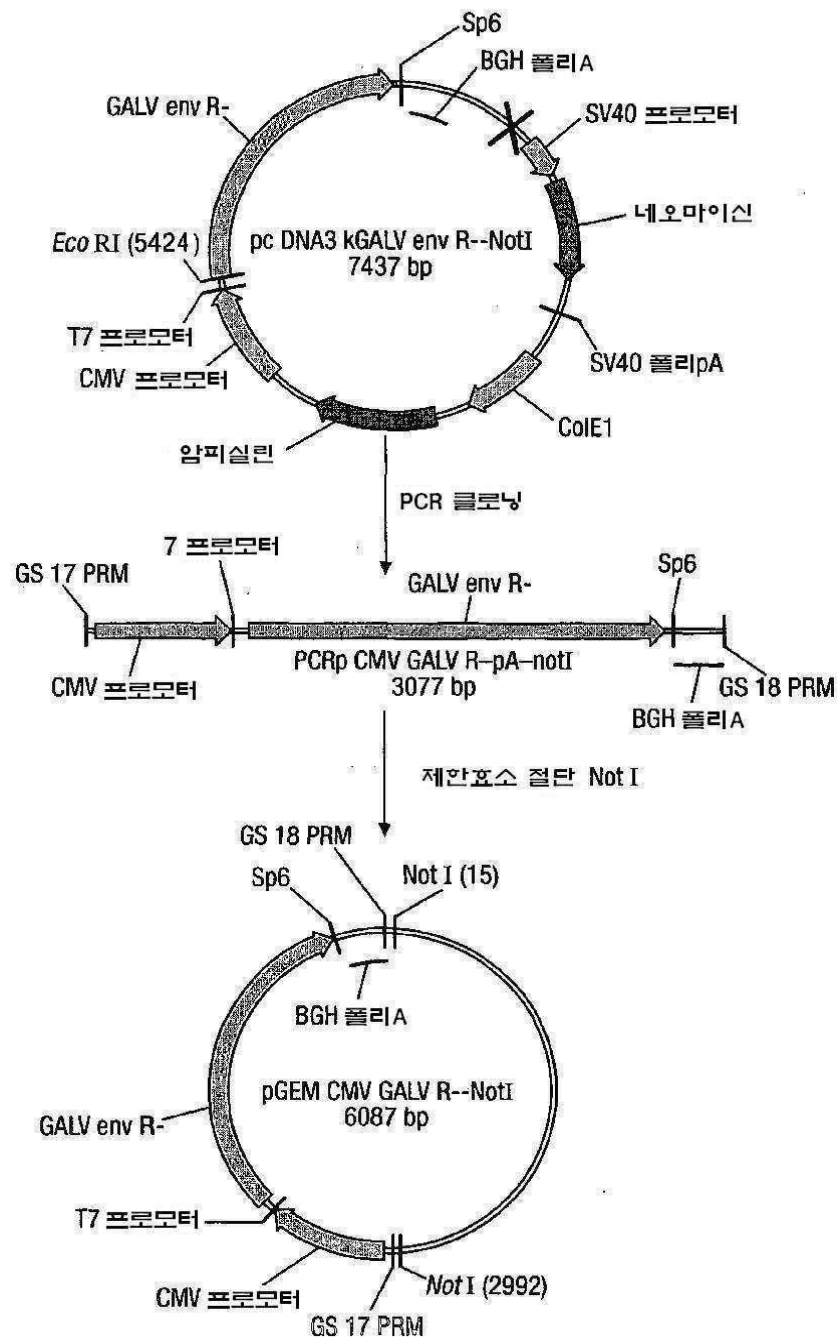
도면1c



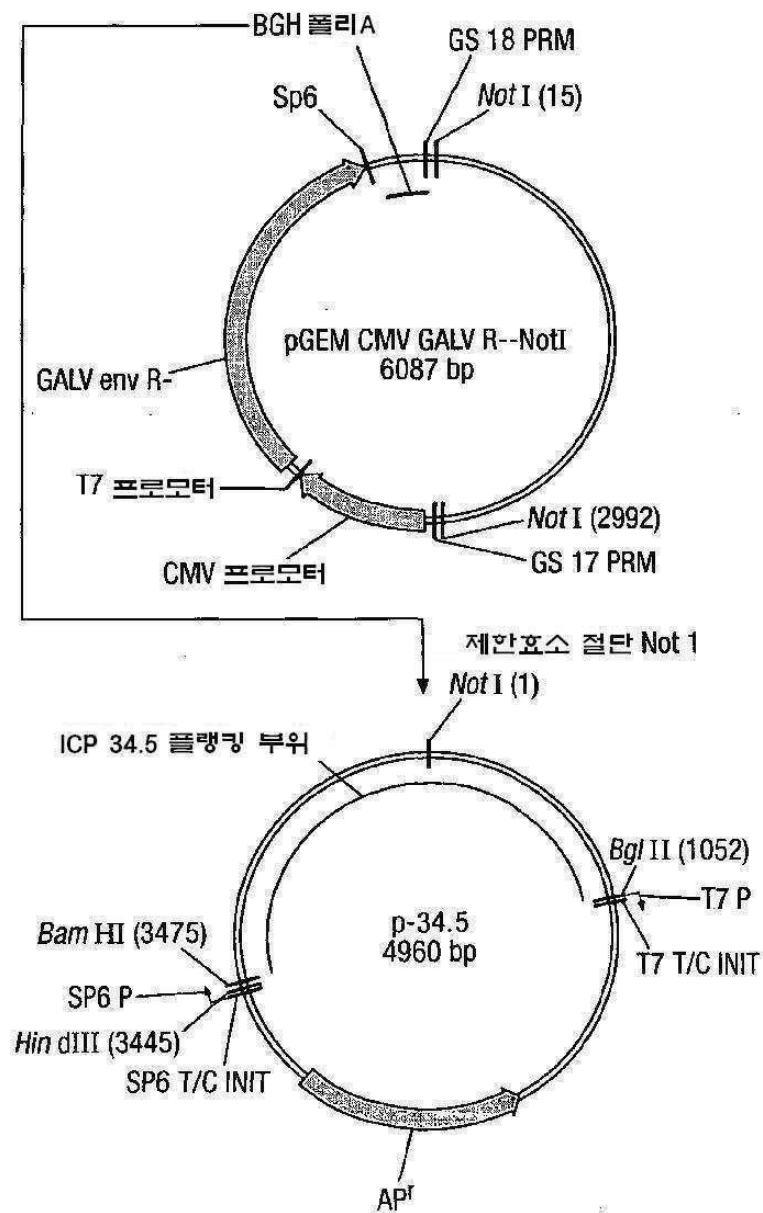
도면1d



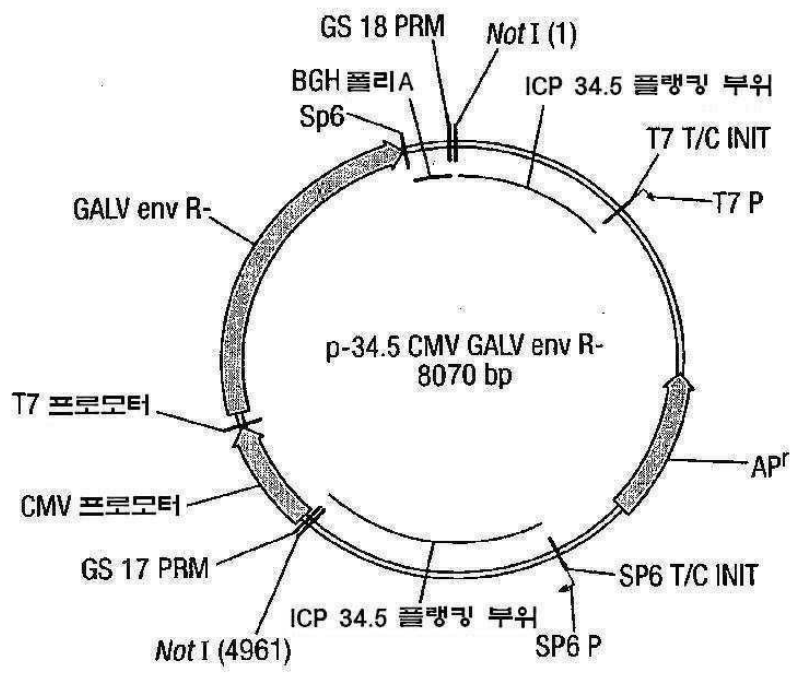
도면1e



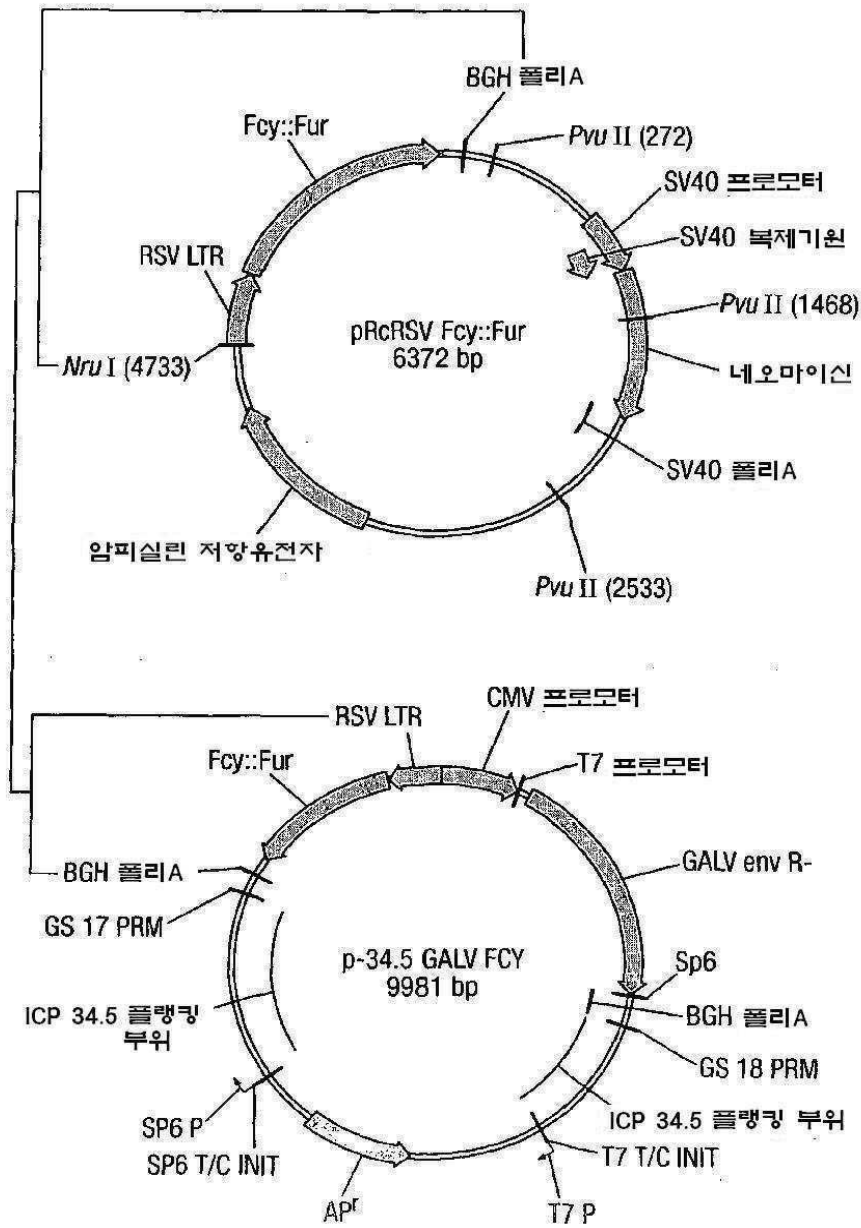
도면1f



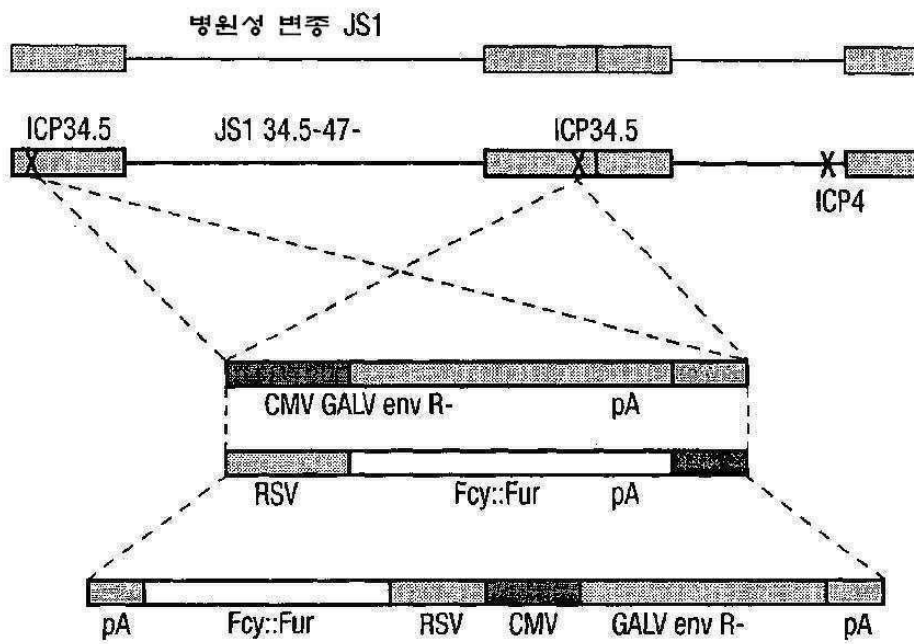
도면1g



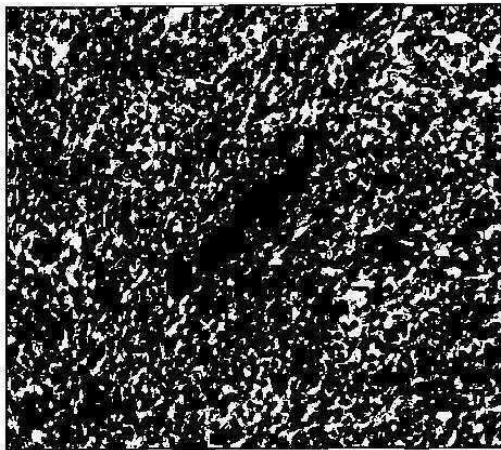
도면1h



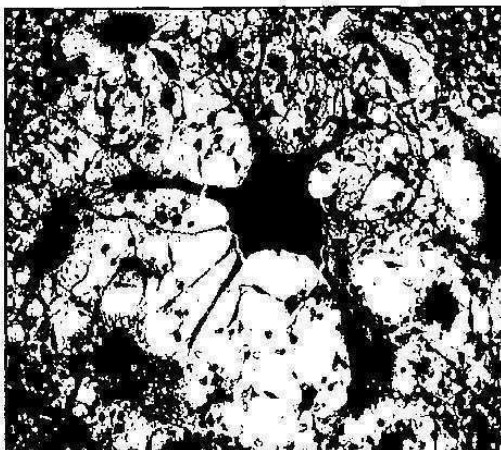
도면2



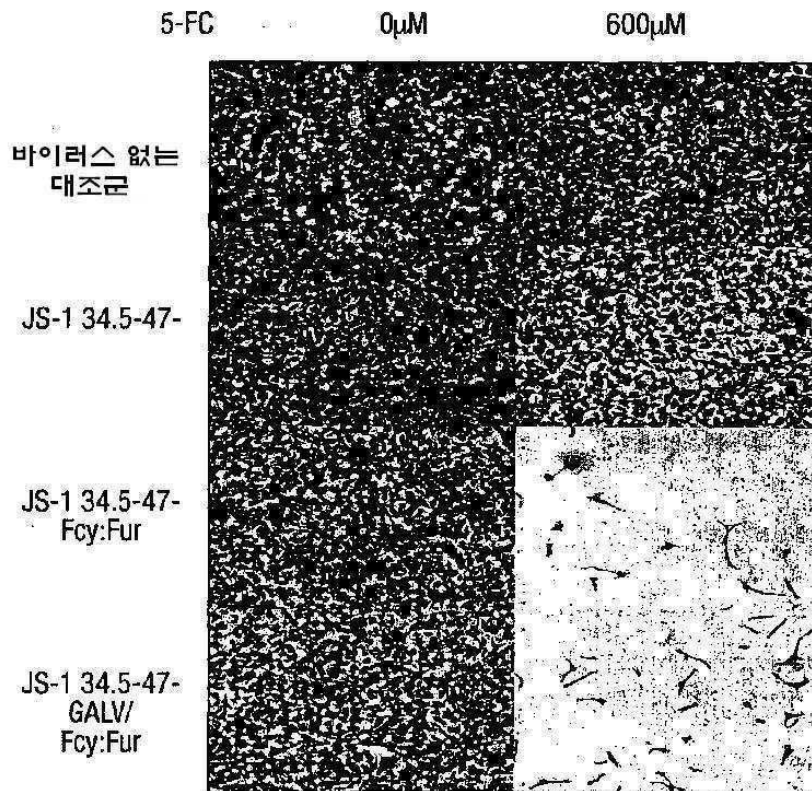
도면3a



도면3b



도면4



도면5

