

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

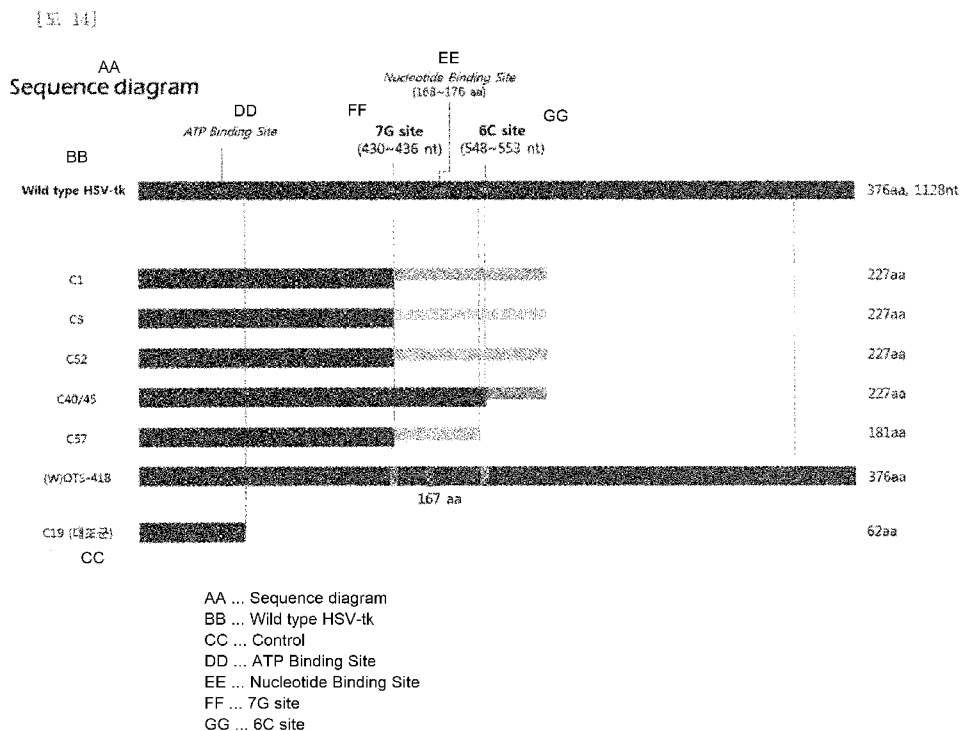
(43) 국제공개일
2020년 12월 30일 (30.12.2020) WIPO | PCT

WO 2020/263059 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 7/00* (2006.01) *A61K 35/768* (2014.01)
C12N 9/12 (2006.01) *A61K 38/45* (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/008472
- (22) 국제출원일: 2020년 6월 29일 (29.06.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0077377 2019년 6월 27일 (27.06.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 바이오녹스 (BIONOXX INC.) [KR/KR]; 13554 경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 1905호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 황태호 (HWANG, Taeho); 50613 경상남도 양산시 물금읍 청운로 181, 8층, Gyeongsangnam-do (KR).
조몽 (CHO, Mong); 50613 경상남도 양산시 물금읍 청운로 181, 8층, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 제일특허법인(유) (FIRSTLAW P.C.); 06775 서울시 서초구 마방로 60, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: ONCOLYTIC VIRUS WITH IMPROVED SAFETY AND ANTICANCER EFFECTS

(54) 발명의 명칭: 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스



(57) Abstract: The present invention relates to an oncolytic virus with improved safety and anticancer effects, and a use thereof. The oncolytic virus with improved safety and anticancer effects according to the present invention can express an HSV-TK fragment which contains an effector domain composed of a minimum amino acid sequence capable of phosphorylating GCV or ACV while having no thymidine kinase (TK) activity, or a variant thereof to phosphorylate GCV or ACV, thereby killing cancer cells infected with the oncolytic virus and even neighboring cancer cells. In addition, GCV or ACV is involved in the suppression of viral proliferation and thus, can regulate virus-induced side effects even upon the administration of a high dose of the virus. Furthermore, an anticancer effect is increased even though the number of viral particles is reduced due to suppression of GCV against viral proliferation. Therefore, the

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

oncolytic virus with improved safety and anticancer effects according to the present invention can be advantageously used for treating cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스는 TK(Thymidine kinase)의 활성은 갖지 않으면서, GCV 또는 ACV를 인산화시킬 수 있는 최소한의 아미노산 서열로 이루어진 이펙터 도메인을 포함하는 HSV-TK 단편 또는 이의 변이체를 발현함으로써 GCV 또는 ACV를 인산화시켜 항암바이러스에 감염된 암세포 및 주변 암세포까지 사멸시킬 수 있다. 아울러, GCV 또는 ACV가 바이러스 증식 억제에도 관여하여 고용량 바이러스 투여 시에도 바이러스로 인한 부작용을 통제할 수 있도록 하였다. 뿐만 아니라, GCV로 인한 바이러스 증식 억제로 인해 바이러스 입자의 수가 감소함에도 불구하고 항암효과가 증가되었다. 따라서, 본 발명의 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스는 암을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭

안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스

5

기술분야

본 발명은 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다.

10 배경기술

유전자 재조합 기술이 본격적으로 사용되면서 종양 선택성과 항암 효능이 증가된 항암바이러스를 이용한 임상연구가 시작되었다. 문헌적으로 보고된 최초의 유전자 재조합 항암바이러스는 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus)이다. 그 이후 다른 바이러스를 이용한 종양 용해에 대한 연구가 활발히

15 진행되었다.

항암바이러스의 유용성은 최근 미국과 유럽에서 허피스 바이러스 기반의 T-Vec(Talimogene laherparepvec)이 진행성 흑색종에서 상업화에 성공하면서 본격적으로 각광받게 되었다. 하지만, TK(Thymidine kinase) 유전자가 결실된 백시니아 바이러스는 임상적 유용성은 크나, 협소한 치료 범위(narrow

20 therapeutic window)로 임상적인 효과를 극대화시키기에 한계가 있었다. TK 결손 백시니아 바이러스의 치료범위가 좁다는 것은 고용량의 바이러스가 임상적 효능이 크나, 바이러스의 독성으로 인해 임상적 위험이 따른다는 것을 의미한다.

실제로 30명의 1차 간암 환자를 대상으로 진행된 신라젠사의 펙사백(JX-594)의 2상 임상시험에서 고용량 투여군(10^9 pfu)이 저용량 투여군(10^8 pfu)보다 생존율이 증가되는 임상적 결과를 보여주었다. 하지만, 종양내 투여로 진행된

25 임상 1상에서 3×10^9 pfu로 용량제한독성(Dose Limiting Toxicity, DLT)이 관찰되어 1×10^9 pfu에서 최대허용용량(Maximum Tolerable Dose, MTD)이 제한되었다. 약물과의 관련성은 없는 것으로 보고되었다. 하지만, 항암바이러스 치료 후 조기 사망이 자주 보고된 바 있었으며, 이는 바람직하지 못한

바이러스의 증식으로 인해 예측하지 못한 결과를 초래할 수 있음을 나타낸다. 이러한 용량 의존적 유효성 증가와 용량제한독성은 보다 안전하고 효과적인 백시니아 바이러스의 개발이 필요함을 의미한다.

한편, 간시클로비르(Ganciclovir, GCV)는 허피스 심플렉스 바이러스, 5 싸이토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus) 및 수두 대상포진 바이러스(varicella zoster virus)에 효과가 있는 항바이러스제이다. GCV는 허피스 심플렉스 바이러스의 TK와 결합하면 5'-말단이 인산화되어 트리포스페이트-GCV(triphosphate-ganciclovir, GCV-TP)로 전환되고, GCV-TP는 DNA 중합효소의 활성을 저해하고 DNA 3'-말단에 붙어 DNA 신장을 정지시킨다. GCV-TP는 고독성 10 물질로, 세포에서도 DNA 합성을 차단함으로써 세포독성을 나타낼 수 있다.

최근에는 HSV1-TK를 항암바이러스에 삽입하여 GCV와 함께 병용투여 함으로써 종양세포를 사멸하도록 유도하는 항암치료 연구가 진행되고 있다. 일차적으로 항암바이러스가 종양세포를 감염시켜 직접적인 항암효과를 유도하고, HSV1-TK(suicide gene)가 GCV를 인산화시켜 종양세포 증식이 억제됨으로 인해 15 항암효과가 부가적으로 나타나는 것이다(Oliver W *et al.*, *Human Gene Therapy*, Vol.10, No.16, 1999). HSV1-TK/GCV 시스템은 주로 아데노바이러스를 벡터로 하는 항암바이러스 치료에 사용되었다. 그러나, GCV를 병용투여 함으로써 기대하는 추가적인 세포독성 효과에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다.

구체적으로, 복제가능 아데노바이러스(replication-competent 20 adenovirus)에 HSV-TK 유전자를 삽입한 항암바이러스와 GCV를 함께 투여했을 때, 신경교종 세포에서의 세포독성효과가 유의미하게 증가하는 것이 관찰되었다. 반면, 복제가능 아데노바이러스에 HSV-TK를 삽입한 다른 많은 연구에서는 GCV 투여로 인해 부가되는 항암효과가 일관되게 나타나지 않고 있다(Lambright ES *et al.*, *Gene Ther*, 8: 946-53). 이는 HSV-TK/GCV 시스템이 종양세포 증식 억제뿐만 25 아니라 바이러스 증식 억제에도 관여하기 때문에 그 효과가 서로 상반되어 상쇄되기 때문인 것으로 보고되고 있다.

따라서, HSV-TK/GCV 시스템을 항암바이러스에 적용함에 있어 안전성을 확보함과 동시에 항암효과를 증대시킬 수 있는 구체적인 방법에 대해 연구가 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

이에 본 발명자들은 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스를 개발하기 위해 연구한 결과, TK(Thymidine kinase)의 활성은 갖지 않으면서, GCV 또는 ACV를 인산화시킬 수 있는 항암바이러스를 개발하였고, 이를 GCV와 병용 투여하는 경우 우수한 안전성과 항암효과를 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

10 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스를 제공한다.

15 본 발명의 다른 측면은, 상기 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항암바이러스 및 GCV(Ganciclovir) 또는 ACV(Aciclovir)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

20 본 발명의 또 다른 측면은, i) 백시니아 바이러스의 TK 유전자를 제거하고, 야생형 HSV-TK 유전자를 재조합시키는 단계; 및 ii) 상기 재조합 백시니아 바이러스를 숙주세포에서 BrdU(Bromodeoxyuridine) 존재 하, 연속 계대 배양하는 단계를 포함하는 변이된 HSV-TK를 코딩하는 유전자를 포함하는 항암 백시니아 바이러스를 제작하는 방법을 제공한다.

25 발명의 효과

본 발명의 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스는 TK(Thymidine kinase)의 활성은 갖지 않으면서, GCV 또는 ACV를 인산화시킬 수 있는 최소한의 아미노산 서열로 이루어진 이펙터 도메인을 포함하는 HSV-TK 단편 또는 이의 변이체를 발현함으로써 GCV 또는 ACV를 인산화시켜 항암바이러스에 감염된

암세포 및 주변 암세포까지 사멸시킬 수 있다. 아울러, GCV 또는 ACV가 바이러스 증식 억제에도 관여하여 고용량 바이러스 투여 시에도 바이러스로 인한 부작용을 통제할 수 있도록 하였다. 뿐만 아니라, GCV로 인한 바이러스 증식 억제로 인해 바이러스 입자의 수가 감소함에도 불구하고 함암효과가 증가되었다. 따라서, 본 발명의 안전성 및 함암효과가 개선된 함암바이러스는 암을 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- 도 1은 변이된 백시니아 바이러스를 제조하는 과정을 도식화한 도면이다.
- 10 도 2는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C1-C5)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 3은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C6-C10)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 15 도 4는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C11-C20)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 5는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C21-C30)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 6은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C31-C40)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 20 도 7은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C41-C50)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 8은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C51-C55)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 25 도 9는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C56-C60)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 10은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C61-C70)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.
- 도 11은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C71-C80)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.

도 12는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C81-C90)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.

도 13은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C91-C100)가 HSV1-TK 단편을 발현하는 것을 확인한 도면이다.

5 도 14는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C52, C40/45, C57, WOTS-418 및 C19)가 발현하는 HSV1-TK 단편을 도식화하여 나타낸 도면이다.

10 도 15는 셔틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액(supernatant)에서 루시퍼라제 활성을 확인한 그래프이다.

도 16은 셔틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 펠릿(pellet)에서 루시퍼라제 활성을 확인한 그래프이다.

15 도 17은 셔틀 플라스미드 벡터와 와이어스종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 상층액에서 루시퍼라제 활성을 확인한 그래프이다.

도 18은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C19, C45 및 C52)와 GCV를 투여함에 따라 바이러스의 증식이 감소한 것을 확인한 도면이다.

20 도 19는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, HeLa 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(C40 및 C57)와 GCV를 투여함에 따라 바이러스의 증식이 감소한 것을 확인한 도면이다.

25 도 20은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(C40 및 C57)와 GCV를 투여함에 따라 바이러스의 증식이 감소한 것을 확인한 도면이다.

도 21은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C19, C45 및 C52)와 GCV를 투여함에 따라 세포독성이 증가한 것을 확인한 도면이다.

도 22는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, HeLa 암세포주에서

변이된 백시니아 바이러스(C40 및 C57)와 GCV를 병용 투여함에 따라 세포독성이 증가한 것을 확인한 도면이다.

도 23은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(C40 및 C57)와 GCV를 병용 투여함에 따라 세포독성이 증가한 것을 확인한 도면이다.

도 24는 10종의 암세포주에 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)를 처리한 후, 각 암세포주의 세포생존율을 나타낸 그래프이다.

도 25는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, A549 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 ACV, GCV 또는 BrdU를 병용 투여함에 따라 바이러스의 증식이 감소한 것을 확인한 도면이다.

도 26은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 GCV를 병용 투여함에 따라 바이러스의 증식이 감소한 것을 확인한 도면이다.

도 27은 HCT-116 암세포주를 식립한 마우스 모델에 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 GCV를 병용투여한 후, 희생시킨 마우스의 종양조직에서 검출된 바이러스 입자 수를 나타낸 그래프이다.

도 28은 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 GCV를 병용 투여함에 따라 세포독성이 증가한 것을 확인한 도면이다.

도 29는 변이된 백시니아 바이러스의 일 실시예로서, NCI-H460 암세포주에서 변이된 백시니아 바이러스(OTS-418)와 GCV를 병용 투여함에 따라 세포독성이 증가한 것을 확인한 도면이다.

도 30은 인간 유방암세포주(MDA-MD-231)를 식립한 마우스 모델을 이용한 변이된 백시니아 바이러스와 히드록시유레아의 병용 투여에 따른 항암효과를 확인하기 위한 실험 스케줄을 도식화한 도면이다.

도 31은 인간 유방암세포주 식립 마우스에 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 히드록시유레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스의 종양의 크기를 측정한 도면이다.

도 32는 마우스 신장암세포주(Renca) 식립 마우스에 변이된 백시니아

바이러스(WOTS-418)와 히드록시유레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스의 종양의 크기를 측정한 도면이다.

도 33은 인간 대장암세포주(CT-26)를 식립한 마우스 모델을 이용한 변이된 백시니아 바이러스와 히드록시유레아의 병용 투여에 따른 항암효과를
5 확인하기 위한 실험 스케줄을 도식화한 도면이다.

도 34는 인간 대장암세포주(CT-26) 식립 마우스에 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 히드록시유레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스의 종양의 크기를 측정한 도면이다.

도 35는 인간 대장암세포주(CT-26) 식립 마우스에 변이된 백시니아
10 바이러스(WOTS-418)와 히드록시유레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스로부터 분리한 CD8+ T세포를 암세포와 공동배양하여 INF- γ 를 분비하는 CD8+ T세포수를 측정한 그래프이다.

도 36은 인간 대장암세포주(CT-26) 식립 마우스에 변이된 백시니아
15 바이러스(WOTS-418)와 히드록시유레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스로부터 분리한 CD8+ T세포를 암세포와 공동배양하여 INF- γ 를 분비하는 CD8+ T세포를 염색한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

20 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스를 제공한다.

본 발명에서 사용하는 용어 "HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)"란, 허피스 심플렉스 바이러스 내 DNA 합성 과정 중 초기 인산화 반응에
25 관여하는 효소를 의미한다. 또한, HSV-TK는 항바이러스 물질인 GCV(ganciclovir) 또는 ACV(acyclovir)의 인산화에도 관여한다. 특히, HSV1-TK는 다른 바이러스 내에 존재하는 TK보다 약 10배 정도 GCV 또는 ACV에 민감하게 반응한다. 상기 HSV는 HSV1(Herpes Simplex Virus type1) 또는 HSV2(Herpes Simplex Virus type2)일 수 있다. 구체적으로, 상기 HSV는 HSV1일 수 있다. 또한, 상기 HSV-

TK는 HSV1-TK(Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase)일 수 있다.

본 발명에서 사용하는 용어 "이펙터 도메인(effector domain)"이란, 서열번호 15로 표시되는 376개의 아미노산으로 이루어진 야생형 HSV-1TK의 1 내지 145번째의 연속적인 아미노산으로 이루어진 단백질 도메인을 의미한다.

- 5 상기 이펙터 도메인은 야생형 HSV-1TK에 비해 TK의 활성이 낮거나 없어서, 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스가 자체적으로 증식할 수 없다. 다만, 상기 이펙터 도메인은 ATP 결합 부위(ATP binding stie)를 포함하고, GCV 또는 ACV의 인산화시킬 수 있으며, 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는
- 10 항암바이러스에 감염된 세포에 GCV 또는 ACV를 처리할 경우, GCV 또는 ACV가 인산화될 수 있다.

- 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 이펙터 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 0 내지 231개의 아미노산을 더 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리펩타이드는 야생형 HSV-1TK에 비해 TK의 활성이 낮거나 없어, 상기
- 15 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스가 자체적으로 증식할 수 없다. 또한, 상기 폴리펩타이드는 GCV 또는 ACV의 인산화시킬 수 있으며, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스에 감염된 세포에 GCV 또는 ACV를 처리할 경우, GCV 또는 ACV가 인산화될 수 있다.

- 구체적으로 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 이펙터
- 20 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 0 내지 231개, 10 내지 200개, 20 내지 150개, 또는 40 내지 100개의 아미노산을 더 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 이펙터 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 36, 82 또는 231개의 아미노산을 더 가질 수 있다.

- 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9,
- 25 11 또는 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11 또는 13으로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열일 수 있다. 구체적으로, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12 또는 14로 표시되는 염기서열일 수 있다.

본 발명자들은 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스를 개발하기 위해, 야생형 HSV1-TK 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 제조한 후, TK 미존재하에 적응진화를 유도하였다. 적응진화된 백시니아 바이러스의 루시페라제(luciferase) 활성, 유전체 분석 및 GCV에 대한 민감도 실험을 통해

5 HSV1-TK 단편 또는 이의 변이체를 발현하는 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C40, C45, C52 및 C57)를 선별하였다. 또한, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열 중 일부를 변이시킨 HSV-TK 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하는 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418, OTS-418)을 제작하였다. 그 후, 상기 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C40, C45, C52, C57 및 WOTS-418)의 염기서열을

10 분석한 결과, 서열번호 15로 표시되는 야생형 HSV-1TK의 아미노산 서열 중 145번째 아미노산을 기점으로 TK의 활성은 갖지 않으면서, GCV 또는 ACV의 인산화시킨다는 점을 확인하였다.

본 발명에서 사용하는 용어 "항암바이러스"란, 암세포에 특이적으로 복제하도록 바이러스의 유전자를 조작하여 암세포를 파괴하는 재조합 바이러스를

15 의미한다. 상기 항암바이러스는 아데노바이러스(Adenovirus), 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 홍역 바이러스(Measles virus), 렌티바이러스(Lentivirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 싸이토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus), 배쿨로바이러스(baculovirus), 리오바이러스(Reovirus), 아데노부속바이러스(Adeno-associated virus), 점액종

20 바이러스(Myxoma virus), 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus), 폴리오바이러스(Poliiovirus), 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus), 파보바이러스(Parvovirus), 코사키 바이러스(Coxsackie virus), 세네카바이러스(Senecavirus), 백시니아 바이러스(Vaccinia virus) 또는 폭스바이러스(Poxvirus)로부터 유래된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기

25 항암바이러스는 백시니아 바이러스로부터 유래된 것일 수 있다.

상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, 리스터(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타쉬켄트(TashKent), 에반스(Evans), IHD-J(International Health

Division-J) 또는 IHD-W(International Health Division-White) 백시니아 바이러스 주(strain)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는
5 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

상기 약학 조성물에 유효성분으로 포함되는 항암바이러스는 상술한 바와 같다.

상기 항암바이러스의 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도,
10 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 환자에게 1×10^3 내지 1×10^{18} 의 바이러스 입자(virus particle), 감염능을 가지는 바이러스 단위(TCID₅₀) 또는 플라크 형성 단위(pfu)를 투여하는 것일 수 있다. 구체적으로는, 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 ,
15 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 1×10^{18} 또는 그 이상의 바이러스 입자, 감염능을 가지는 바이러스 단위 또는 플라크 형성 단위를 투여하는 것으로써, 상기 사이에 다양한 수 및 범위를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 항암바이러스는 1×10^3 내지 1×10^{10} pfu 용량으로 투여될 수 있다.

20 상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 비소세포성암 폐암, 결장암, 골암, 안구내 흑색종, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호치킨 병, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암,
25 음경암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수

있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구 투여를 위한 제제로서 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 종양 내(intratatumoral), 복강내(intraperitoneal), 피하(sub-cutaneous), 피내(intra-dermal), 림프절내(intra-nodal) 및 정맥 내(intra-venous) 등에 적당한 방법에 의해서 투여될 수 있다. 바람직하게는, 종양 내 투여, 복강 투여 또는 정맥 투여 일 수 있다. 한편, 상기 약학 조성물의 투여량은 투여 스케줄, 투여량 및 환자의 건강 상태 등에 따라 결정될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스 및 GCV(Ganciclovir) 또는 ACV(Acyclovir)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

상기 약학 조성물 내 포함되는 항암바이러스 및 GCV 또는 ACV는 동시에 투여되거나, 순차적, 또는 역순으로 병용 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물 내 포함되는 항암바이러스 및 GCV 또는 ACV는 동시에 투여될 수

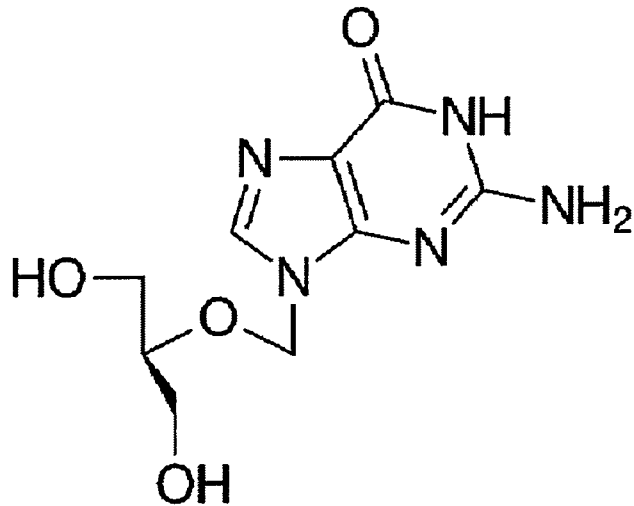
있다. 또한, 상기 약학 조성물 내 포함되는 항암바이러스가 먼저 투여된 후, GCV 또는 ACV가 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물 내 포함되는 항암바이러스가 먼저 투여된 후 GCV 또는 ACV가 투여되고, 다시 항암바이러스가 투여될 수 있다.

- 5 상기 약학 조성물에 유효성분으로 포함되는 항암바이러스는 상술한 바와 같다.

상기 항암바이러스의 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 환자에게 1×10^3 내지 1×10^{18} 의 바이러스 입자(virus particle), 감염능을
10 가지는 바이러스 단위(TCID₅₀) 또는 플라크 형성 단위(pfu)를 투여하는 것일 수 있다. 구체적으로는, 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 1×10^{18} 또는 그 이상의 바이러스
15 입자, 감염능을 가지는 바이러스 단위 또는 플라크 형성 단위를 투여하는 것으로써, 상기 사이에 다양한 수 및 범위를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 항암바이러스는 1×10^3 내지 1×10^{10} pfu 용량으로 투여될 수 있다.

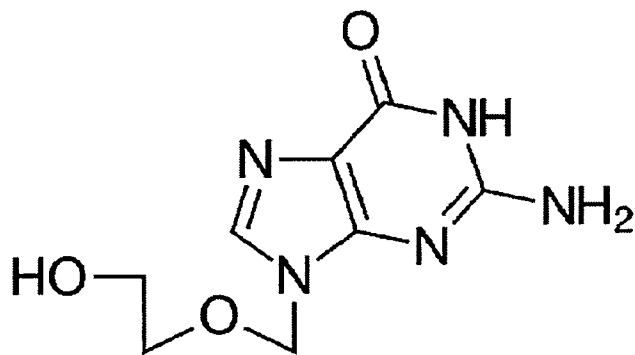
본 발명에서 사용하는 용어 "GCV"란, 간시클로비르(Ganciclovir)로 불리며 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 싸이토메갈로
20 바이러스(Cytomegalovirus) 및 수두 대상포진 바이러스(varicella zoster virus)에 효과가 있는 항바이러스제를 의미한다. 상기 GCV는 바이러스의 TK에 의해 5'-말단이 인산화되어 트리포스페이트 간시클로비르(triphosphate-ganciclovir, GCV-TP)로 전환되고, GCV-TP는 바이러스 DNA 중합효소의 활성을 저해하고 바이러스의 DNA 3'-말단에 붙어 DNA 신장을 정지시킬 수 있다. 또한,
25 인산화된 GCV는 세포 DNA 복제를 중단시켜 세포 성장을 억제시킬 수 있다. 상기 GCV는 하기 화학식 1과 같다.

[화학식 1]



본 발명에서 사용하는 용어 "ACV"란, 아시클로비르(Aciclovir)로 불리며, 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 수두 대상포진 바이러스(varicella zoster virus) 및 EB 바이러스(Epstein-Barr virus)에
5 효과가 있는 항바이러스제를 의미한다. 상기 ACV는 바이러스의 TK에 의해 인산화되어 트리포스페이트 아시클로비르(triphosphate-aciclovir, ACV-TP)로 전환되고, ACV-TP는 바이러스 DNA 중합효소의 활성을 저해하고 바이러스의 DNA 3'-말단에 붙어 DNA 신장을 정지시킬 수 있다. 상기 ACV는 하기 화학식 2과 같다.

[화학식 2]



10

또한, 상기 GCV 또는 ACV는 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 mg/kg 용량으로 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 GCV 또는 ACV의 투여량은 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 50 mg/kg, 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 40 mg/kg, 5 $\mu\text{g/kg}$ 내지 30 mg/kg, 10 $\mu\text{g/kg}$ 내지 20 mg/kg로 투여할 수 있다.

15

상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암,

담낭암, 담도암, 췌장암, 비소세포성암 폐암, 결장암, 골암, 안구내 흑색종, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호치킨 병, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포
5 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로
10 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구 투여를 위한 제제로서 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜,
15 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의
20 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 종양 내, 복강내,
25 피하, 피내, 림프절내 및 정맥 내 등에 적당한 방법에 의해서 투여될 수 있다. 바람직하게는, 종양 내 투여, 복강 투여 또는 정맥 투여 일 수 있다. 한편, 상기 약학 조성물의 투여량은 투여 스케줄, 투여량 및 환자의 건강 상태 등에 따라 결정될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes

simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스 및 GCV 또는 ACV를 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

상기 항암바이러스, GCV 및 ACV는 상술한 바와 같다.

- 5 본 발명에서 사용하는 용어 "개체"란, 본 발명의 항암바이러스 및 GCV 또는 ACV를 투여하여 질환이 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태이거나 질환을 앓고 있는 사람을 의미한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 암을 치료하기 위한 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, i) 백시니아 바이러스의 TK 유전자를 제거하고, 야생형 HSV-TK 유전자를 재조합시키는 단계; 및 ii) 상기 재조합 백시니아 바이러스를 숙주세포에서 BrdU(Bromodeoxyuridine) 존재 하, 연속 계대 배양하는 단계를 포함하는 변이된 HSV-TK를 코딩하는 유전자를 포함하는 항암 백시니아 바이러스를 제작하는 방법을 제공한다.

상기 야생형 HSV-TK 유전자는 서열번호 16으로 표시되는 염기서열일 수 있다.

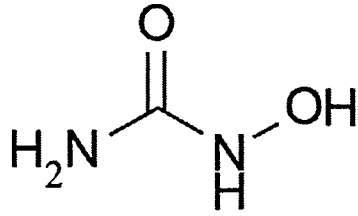
상기 항암 백시니아 바이러스는 TK 활성이 낮거나 없고, GCV 또는 ACV를 인산화시킬 수 있다.

상기 계대배양은 적어도 3회 이상 연속적으로 계대 배양시킬 수 있으며, 바람직하게는 10회 이상 연속적으로 계대 배양시킬 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스 및 히드록시우레아를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 항암바이러스는 상술한 설명을 참조한다.

본 발명에서 사용하는 용어 "히드록시우레아"란, 하기 화학식을 갖는 화합물이다.

[화학식 1]



상기 히드록시우레아의 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으나, DNA 합성을
 저해하는 항암제로 알려져 있다. 또한, 상기 히드록시우레아는 히드록시우레아를
 5 포함하는 상업화된 약제의 형태로 약학 조성물에 포함될 수 있다. 상기
 히드록시우레아 성분을 포함하는 상업화된 약제는 Hydroxyurea®, Hydrea®,
 Droxia TM, Mylocel TM, Siklos® 하이드린캡슐일 수 있으나, 이에 한정되는
 것은 아니다. 상기 히드록시우레아는 경구로 복용할 수 있으며, 비경구 투여도
 가능하다.

10 상기 약학 조성물에 포함된 항암바이러스 및 히드록시우레아는 동시,
 순차적, 또는 역순으로 병용 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 항암바이러스 및
 히드록시우레아는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 히드록시우레아를 먼저
 투여한 후 상기 항암바이러스를 투여할 수 있다. 나아가, 상기 항암바이러스를
 먼저 투여한 후 상기 히드록시우레아를 투여할 수 있다. 또한, 상기
 15 히드록시우레아를 먼저 투여한 후 상기 항암바이러스를 투여하고 다시 상기
 히드록시우레아를 투여할 수 있다.

또한, 상기 히드록시우레아는 1 mg/kg/day 내지 100 mg/kg/day 또는 10
 mg/kg/day 내지 90 mg/kg/day 용량으로 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기
 히드록시우레아의 투여량은 10 mg/kg/day 내지 90 mg/kg/day, 15 mg/kg/day 내지
 20 80 mg/kg/day, 20 mg/kg/day 내지 70 mg/kg/day, 25 mg/kg/day 내지 65
 mg/kg/day 또는 30 mg/kg/day 내지 60 mg/kg/day로 투여할 수 있다. 본 발명의
 일실시예에서는, 상기 히드록시우레아를 30 mg/kg/day 또는 60 mg/kg/day 로
 투여하였다. 투여량에 따라 하루에 여러 번 나누어 투여될 수 있다. 구체적으로,
 1일 1회 내지 4회, 또는 1일 1회 내지 2회 나누어 투여될 수 있다.

25 상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암,
 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암,

담낭암, 담도암, 췌장암, 비소세포성암 폐암, 결장암, 골암, 안구내 흑색종, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호치킨 병, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포
5 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 생리적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로
10 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구 투여를 위한 제제로서 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜,
15 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

상기 약학 조성물의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의
20 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 치료하고자 하는 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 종양 내, 복강내, 피하, 피내, 림프절내 및 정맥 내 등에 적당한 방법에 의해서 투여될 수 있다.
25 바람직하게는, 종양 내 투여, 복강 투여 또는 정맥 투여 일 수 있다. 한편, 상기 약학 조성물의 투여량은 투여 스케줄, 투여량 및 환자의 건강 상태 등에 따라 결정될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항암바이러스를 투여하는 단계를

포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 암을 치료하기 위한 상기 항암바이러스의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 암 치료용 약제를 제조하기 위한 상기 항암바
5 이러스의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 암을 치료하기 위한 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 용도를 제공한다.

10 본 발명의 또 다른 측면은, 암 치료용 약제를 제조하기 위한 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

15 실시예 1. 변이된 백시니아 바이러스 제조

실시예 1.1. 셔틀 플라스미드 벡터 제작

셔틀 플라스미드 벡터는 1형 HSVTK 유전자(pSE/L promoter)와 firefly luciferase reporter(p7.5 promoter) 유전자를 합성하여 pUC57amp^r 플라스미드(Genewiz, USA)에 재조합하여셔틀 플라스미드 벡터로 사용하였다.

20 실시예 1.2. 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C40, C45, C52 및 C57)의 제작

변이된 백시니아 바이러스를 제작하는 과정을 도 1에 나타내었다. 구체적으로, 먼저, 재조합 바이러스를 확보하기 위하여, Hela 세포(ATCC)를 6-웰 플레이트에 각 웰당 4×10^5 세포수로 분주한 후, 10% 우태아 혈청이 포함된 EMEM
25 배지를 첨가하였다. 와이어스종의 야생형 백시니아 바이러스 (NYC Department of Health strain, WR-1536, ATCC) 0.05 MOI를 처리하고, 2시간 후, 2% 우태아 혈청이 포함된 EMEM 배지로 교체하고 상기 실시예 1.1에서 제작된 셔틀 플라스미드 벡터 4 μ g을 XfectTM polymer(Clontech 631317, USA)로 세포 내에 전달하였다. 4시간 배양 후, Hela 세포를 2% 우태아 혈청이 포함된 EMEM 배지로

교체한 후 72시간 추가 배양하였다. HeLa 세포에서 루시페라제(luciferase) 활성을 확인하여 HSV1-TK 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 확보하였다.

그 후, TK-골육종(osteosarcoma 143B TK-) 세포주(ATCC)에서
 5 BrdU(Thymidine analogue, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재 하에 TK 기능이 없는 세포를 선택할 수 있는 생화학적 환경(TK-selection pressure)이 가해진 상태에서 10회의 연속 계대 배양을 통해 TK 활성이 없는 HSV1-TK의 돌연변이를 유도하였다. 루시페라아제 활성을 갖는 변이된 백시니아 바이러스 클론(clone)의 용해물을 플레이트에 분주한 후, 100개의 루시페라아제 활성을 갖는 단일
 10 플라크(plaque)를 분리하였다. 그 후, 단일 플라크들을 증폭시킨 후, 서로 다른 단백질 크기의 HSV-TK 단편을 발현하는 클론들을(S3C4#1_C1 내지 S3C4#1_C100) 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

구체적으로, 상기 100개의 클론들을 각각 15 μl 씩 처리하여 Hela 세포주에 감염시킨 후, 24시간 후에 세포를 수집하고 세포를 용해시켜 단백질을
 15 추출하였다. 추출한 단백질은 변성(denature)과정을 거친 후, 각 시료당 40 μg 을 SDS-PAGE gel에 로딩하여 전기영동하였다. 전기영동 후 PVDF 막으로 이동시켜 1차 항체인 항-HSV1-TK 항체(Bethyl A50-101P)와 반응시켰다. 그 후, PBST로 세척한 후, 2차 항체인 HRP가 표지된 항-염소 항체(SantaCruz, sc-28037)와 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 후, 발광시약(Chemiluminescent reagent)를
 20 처리하고 Chemiluminescent Image system(Davinch K)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, HSV1-TK 단편 단백질이 바이러스에서 발현되는 것을 확인하였다(도 2 내지 도 13).

상기 100개의 서로 다른 클론은 기본적으로 TK 기능이 없는 세포를 선택할 수 있는 생화학적 환경에서 배양되었기 때문에 TK 활성을 가지지 않는다.
 25 한편, GCV에 대한 민감도를 가진 클론을 스크리닝 하기 위해, 실시간 세포 관찰 분석 시스템인 Incucyte[®](Essen Biosciences)를 이용하여, 96-웰-플레이트에서 GCV 존재 하에 4일간 배양하면서 실시간 영상 촬영을 통해 세포자살이 일어나는 10개의 클론을 일차적으로 선별하였다. 통상 바이러스에 의해서 일어나는 세포 독성은 플라그를 형성하고 서서히 확대되어 가지만, GCV에 의한 세포 독성의

경우 플라그 형성 후 15시간 이내에 전반적인 세포 독성이 한번에 일어나므로, GCV에 의한 세포독성을 정성적으로 확인하였다.

상기 영상분석 결과 1차 선별된 클로니에서 GCV 투여에 따른 바이러스 증식 억제 및 세포독성을 확인한 후, S3C4#1_C1, S3C4#1_C3, S3C4#1_C40, S3C4#1_45, S3C4#1_C52 및 S3C4#1_C57 클로니의 변이된 백시니아 바이러스를 최종 선별하였다. 상기 S3C4#1_C1, S3C4#1_C3, S3C4#1_C40, S3C4#1_45, S3C4#1_C52 또는 S3C4#1_C57 클로니의 변이된 백시니아 바이러스를 각각 "C1", "C3", "C40", "C45", "C52" 및 "C57"로 명명하였다.

상기 C1, C3, C40, C45, C52 및 C57의 아미노산 서열 분석(amino acid sequencing)을 마크로젠(서울)에 의뢰하였다. 그 결과, C40과 C45의 아미노산 서열이 동일한 것으로 확인되었으며, C1, C3, C40/45, C52 및 C57가 서열번호 15, 17, 19, 21, 23 및 25의 아미노산 서열을 갖는 것을 확인하였다. 특히, 상기 선별한 변이된 백시니아 바이러스의 HSV1-TK가 N-말단의 145번째 아미노산 이후부터 돌연변이가 일어나는 것을 확인하였다(도 14).

실시예 1.3. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418/OTS-418) 제작

HSV-TK의 가장 많이 보고된 변이 부분은 430번째 내지 436번째 염기서열(7G) 및 548번째 내지 583번째 염기서열(6C) 구간에서 발생하는 염기의 삽입(insertion) 또는 삭제(deletion)로 인한 프레임 시프트(frame shift) 변이이고, 자연형 HSV-TK를 백시니아 바이러스에 삽입한 후, 98% 이상의 변이가 이곳에서 발생하였다. 이에, 상기 염기서열 부분을 침묵 돌연변이(silent mutation) 시키기 위해 430번째 내지 436번째 염기서열인 GGGGGGG를 GGTGGTG로 변경하였으며, 548번째 내지 583번째 염기서열인 CCCCCC를 CCCCTC로 변경하였다. 또한, 서열번호 15의 HSV-TK의 아미노산 서열 중 167번째 알라닌(alanine)을 티로신(tyrosine)으로 치환시킨 HSV-TK 변이체를 코딩하는 유전자와 firefly luciferase reporter(p7.5 promoter) 유전자를 합성하여 pUC57amp⁺ 플라스미드(Genewiz, USA)에 재조합하여 제작된 셔틀 플라스미드 벡터를 사용하였다. 그 후, 상기 셔틀 플라스미드 벡터 및 웨스턴 리저브종(ATCC) 또는 와이어스종의 백시니아 바이러스를 이용하여 실시예 1.2와 동일한 방법으로 변이된 백시니아 바이러스를 제조하였다. 웨스턴 리저브종 백시니아 바이러스를

이용하여 제조한 변이된 백시니아 바이러스를 “WOTS-418”로 명명하였으며, 와이어스종 백시니아 바이러스를 이용하여 제조한 변이된 백시니아 바이러스를 “OTS-418”로 명명하였다.

그 결과, 셔틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브종 백시니아 바이러스를
 5 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액(supernatant)과 펠렛(pellet)에서 모두 루시페라제 활성이 확인되었다(도 15 및 도 16). 또한, 셔틀 플라스미드 벡터와 와이어스종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액에서 루시페라제 활성이 확인되었다(도 17). 이를 통해, 상기 HSV-TK 변이체를 코딩하는 유전자가 웨스턴 리저브종 또는
 10 와이어스종 백시니아 바이러스에 도입된 것을 확인하였다.

실시에 2. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C45, C52)의 증식 억제 확인(*in vitro*)

GCV 투여에 따른 상기 실시예 1.2에서 제조한 C1, C3, C45 및 C52의 증식능 억제를 확인하였다. 이때, S3C4#1_C19 콜로니의 변이된 백시니아
 15 바이러스를 음성대조군으로 사용하였으며, 이를 "C19"로 명명하였다. 상기 C1, C3, C19, C45 또는 C52에 GCV를 처리한 후 바이러스 입자수의 차이를 확인하기 위해, 백시니아 바이러스만이 특정하게 발현하는 *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.

구체적으로, *E9L* 유전자를 인식하면서 상보적인 DNA의 두 가닥 중에서
 20 한쪽에만 결합하는 프로브(서열번호 19 및 20)를 제작하였다. 제작한 프로브는 바이러스가 한 번 증식할 때 한 번의 발광이 측정되도록 하였다. 각 웰당 1.5×10^4 개의 NCI-460 암세포주를 분주한 후, 0.01 MOI 내지 1 MOI의 C1, C3, C19, C45 또는 C52 바이러스를 감염시킨 후, 2시간 뒤 60 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 바이러스 추출용 kit(QIAamp MinElute
 25 Virus Spin, QIAGEN, 57704)를 사용해서 DNA 추출하고 1 ng/ 5 μ l 농도로 희석하여 qPCR를 진행하였다.

그 결과, C19에서는 CGV를 투여하였음에도 불구하고 바이러스 증식이 억제되지 않았다. 반면, C1, C3, C45 및 C52는 GCV를 투여함에 따라 바이러스의 증식이 억제되는 것을 확인하였다(도 18). 이를 통해, C1, C3, C45 및 C52가 GCV

투여시 증식 능력이 감소하는 것을 확인하였다.

실시에 3. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C40, C57)의 증식 능력 감소 확인 (*in vitro*)

GCV 투여시 상기 실시예 1.2에서 제조한 C40 및 C57의 증식 능력을
5 확인하였다. 상기 C40 또는 C57에 GCV를 처리한 후 증식량의 변화를 확인하기 위해, *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.

구체적으로, *E9L* 유전자를 인식하면서 상보적인 DNA의 두 가닥 중에서
10 한쪽에만 결합하는 프로브를 제작하였다. 제작한 프로브는 바이러스가 한번 증식할 때 한 번의 발광이 측정되도록 하였다. 각 웰당 1×10^4 개의 Hela 암세포주 또는 1.5×10^4 개의 NCI-460 암세포주를 분주한 후, 0.1 MOI(0.1 pfu/cells)의 C40 또는 C57 바이러스를 처리한 후, 2시간 후 50 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 바이러스 추출용 kit를 사용해서 DNA 추출하고 1 ng/ 5 μ l 농도로 희석하여 qPCR를 진행하였다.

15 그 결과, C40 및 C57는 GCV를 투여함에 따라 바이러스의 증식이 억제되는 것을 확인하였다(도 19 및 도 20). 이를 통해, C40 및 C57이 GCV 투여시 증식 능력이 감소하는 것을 확인하였다.

실시에 4. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C45, C52)의 세포독성 확인 (*in vitro*)

20 실시예 2에서 GCV에 의해 C1, C3, C45, C52의 증식이 억제됨에도 불구하고, GCV 투여시 C1, C3, C45 및 C52의 세포독성이 유지되는지를 확인하기 위해, C1, C3, C19, C45 또는 C52와 GCV를 병용 처리하여 세포독성을 비교하였다. 구체적으로, 각 웰당 1.5×10^4 개의 NCI-H460 암세포주를 분주한 후, 0.01 MOI 내지 1 MOI의 C1, C3, C19, C45 또는 C52를 감염시키고, 2시간 후 60 μ M 농도의
25 GCV를 병용 처리하였다. 72시간 동안 배양한 뒤 CCK8 키트(Cell Counting Kit 8, Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.

그 결과, C1, C3, C45, C52와 GCV를 병용 처리하는 경우, GCV에 의해 C1, C3, C45 및 C52이 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, NCI-H460 암세포주가 약 25% 이상 더 사멸되었다. 반면, C19와 GCV를 병용 처리하는 경우, C19만을

처리한 경우와 비슷한 정도의 NCI-H460 암세포주가 사멸되었다(도 21). 이를 통해, C1, C3, C45 또는 C52를 GCV와 병용 투여하는 경우 세포독성이 증가되는 것을 확인하였다.

5 실시예 5. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C40, C57)의 세포독성 확인 (*in vitro*)

실시예 3에서 GCV에 의해 C40 및 C52의 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, GCV 투여시 C40 및 C57의 세포독성이 유지되는지를 확인하기 위해, C40 및 C57와 GCV를 병용 처리하여 세포독성을 분석하였다.

구체적으로, 각 웰당 1×10^4 개의 HeLa 암세포주 또는 1.5×10^4 개의 NCI-460 암세포주를 분주한 후, 0.1 MOI(0.1 pfu/cells)의 C40 또는 C57과 50 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하여 2시간 동안 감염시켰다. 48시간 동안 배양한 후, CCK8 키트(Cell Counting Kit8)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.

그 결과, C40 및 C57과 GCV를 병용 처리하는 경우, GCV에 의해 C40 및 C57의 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, C40 또는 C57만을 처리한 경우와 비슷한 정도의 HeLa 암세포주 및 NCI-H460 암세포주가 사멸되었다(도 22 및 도 23). 이를 통해, C40 또는 C57을 GCV와 병용 투여하는 경우 세포독성이 증가되는 것을 확인하였다.

실시예 6. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)

상기 실시예 1.3에서 제조한 WOTS-418의 암세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해, 인간 폐암세포주(A549, NCI-H460), 인간 신장암세포주(A498, Caki-1), 인간 대장암세포주(HT-29, HCT116), 인간 유방암세포주(MDA-MB-231, MCF), 마우스 유방암세포주(4T1) 및 마우스 신장암세포주(Renca)의 10종의 암세포주를 각각 96-웰-플레이트에 각 웰당 3×10^3 세포수로 분주한 후, 1 MOI(1 pfu/cells)의 WOTS-418를 처리하여 72시간 동안 배양한 후, CCK8 키트(Cell Counting Kit8)를 이용하여 세포독성을 분석하였다. 이때, 상기 인간 폐암세포주(A549) 및 마우스 유방암세포주(4T1)는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 입수하였다. 또한, 인간 신장암세포주(A498), 인간 대장암세포주(HT-29, HCT-116), 인간 폐암세포주(NCI-H460), 인간

유방암세포주(MDA-MB-231, MCF), 마우스 신장암세포주(Renca)는 한국세포주은행(KCLB)로부터 입수하였다.

그 결과, 인간 폐암세포주(A549), 인간 신장암 세포주(A498, Caki-1), 인간 대장암 세포주(HT-29, HCT-116) 및 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231, MCF)에
5 대해 60%이상 세포독성이 관찰되었다(도 24).

실시에 7. ACV, GCV 또는 BrdU 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 증식 능력 감소 확인 (*in vitro*)

GCV 투여시 상기 실시예 1.3에서 제조한 WOTS-418의 증식 능력을 확인하였다. 상기 WOTS-418에 GCV를 처리한 후 바이러스 입자수의 차이를
10 확인하기 위해, *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.

구체적으로, *E9L* 유전자를 인식하면서 상보적인 DNA의 두 가닥 중에서 한쪽에만 결합하는 프로브를 제작하였다. 제작한 프로브는 바이러스가 한번 증식할 때 한 번의 발광이 측정되도록 하였다. 각 웰당 1×10^4 개의 A549
15 암세포주를 분주한 후, 0.1 MOI(0.1 pfu/cells)의 WOTS-418을 감염시킨 후 2시간 뒤 200 μ M 또는 300 μ M 농도의 ACV, GCV 또는 BrdU를 병용 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 바이러스 추출용 kit를 사용해서 DNA 추출하고 1 ng/ 5 μ l 농도로 희석하여 qPCR를 진행하였다.

그 결과, WOTS-418을 ACV, GCV 또는 BrdU를 병용 투여함에 따라
20 바이러스의 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 25).

또한, 각 웰당 1.5×10^4 개의 NCI-H460 암세포주를 분주한 후, 0.1 MOI(0.1 pfu/cells)의 WOTS-418을 감염시킨 후 2시간 뒤 100 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 바이러스 추출용 kit를 사용해서 DNA
추출하고 1 ng/ 5 μ l 농도로 희석하여 qPCR를 진행하였다.

25 그 결과, WOTS를 GCV와 병용 투여함에 따라 바이러스의 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 26). 이를 통해, WOTS-418이 ACV, GCV 및 BrdU에 대한 민감도가 있고, ACV, GCV 또는 BrdU 투여시 증식 능력이 감소하는 것을 확인하였다.

실시에 8. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 증식

능력 감소 확인 (*in vivo*)

인간 대장암 세포주(HCT-116, 5×10^6 cells/ml)을 식립한 마우스(Balb/c nu/nu) 모델에서 WOTS-418의 증식 능력을 qPCR 분석을 통해 확인하였다.

구체적으로, 코아텍(Koatech Korea)에서 분양 받은 우스(Balb/c nu/nu)를 일주일의 적응기간을 거친 후에, 5×10^6 세포수의 인간 대장암 세포주인 HCT-116 암세포주(한국세포주은행)로 이종이식(xenograft)을 수행하였다. 종양의 크기가 100 mm³ 내지 150 mm³에 도달할 때까지 관찰한 뒤 WOTS-412과 GCV를 종양 내 병용 투여하였다. 이때, WOTS-418(1×10^6 PFU)는 복강내 투여되었으며, 4일 후부터 GCV(50 mg/kg)는 3일 동안 1회/일(D5, D6, D7) 투여하였다. 5일째부터 각 그룹당 3마리의 마우스를 희생시켜 종양을 분리하였으며, 분리된 종양을 샘플 파쇄 시스템(OMNI Bead Ruptor 24)을 이용하여 균질화한 뒤 qPCR을 통해 바이러스 입자수를 수치화 하였다.

그 결과, GCV 처리에 의한 바이러스 증식 억제가 3일째부터 나타나는 것을 확인하였다(도 27).

15 실시예 9. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)

실시예 7 및 8에서 GCV에 의해 WOTS-418의 증식이 억제됨에도 불구하고, GCV 투여시 WOTS-418의 세포독성이 유지되는지를 확인하기 위해, WOTS-418과 GCV를 병용 처리하여 세포독성을 비교하였다. 구체적으로, 각 웰당 1.5×10^4 개의 NCI-H460 암세포주를 분주한 후, 0.02 MOI(0.02 pfu/cells)의 WOTS-418을 감염시키고 2시간 후 60 μ M 또는 100 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하고, 72시간 동안 배양한 뒤 CCK8 키트(Cell Counting Kit 8)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.

그 결과, WOTS-418과 GCV를 병용 처리하는 경우, GCV에 의해 WOTS-418의 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, NCI-H460 암세포주가 약 30% 이상 더 사멸되었다(도 28). 이를 통해, WOTS-418을 GCV와 병용 투여하는 경우 세포독성이 증가되는 것을 확인하였다.

25 실시예 10. 변이된 백시니아 바이러스(OTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)

OTS-418의 GCV 투여시 세포독성을 확인하기 위해, WOTS-418와 GCV를 병용 처리하여 세포독성을 비교하였다. 구체적으로, 각 웰당 3×10^3 개의 NCI-H460 암세포주를 분주한 후, 0.02 MOI(0.02 pfu/cells)의 OTS-418을 감염시키고 2시간 후 6 μ M 또는 60 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하고, 72시간 동안 배양한 뒤 CCK8
5 키트(Cell Counting Kit 8)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.

그 결과, OTS-418과 GCV를 병용 처리하는 경우, GCV에 의해 OTS-418의 세포독성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, OTS-418과 60 μ M 농도의 GCV를 병용 처리하는 경우, NCI-H460 암세포주가 약 20% 이상 더 사멸되었다(도 29). 이를 통해, OTS-418을 GCV와 병용 투여하는 경우 세포독성이 증가되는 것을
10 확인하였다.

실시에 11. 인간 유방암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시우레아의 항암치료 효과 확인: MDA-MB-231

오리엔트 바이오(Orient Bio, Busan)에서 분양 받은 Balb/c nu/nu 마우스(암컷, 8주)를 일주일의 적응기간을 거친 후 5×10^6 세포수의 인간 유방암 세포주(MDA-MB-231)로 동종이식을 수행하였다. 종양의 크기가 50 mm³에 도달할
15 때까지 관찰한 뒤 약물 투여를 시작하였으며, 31일 후 종양의 크기를 측정하였다.

상기 제작한 인간 유방암세포주 식립 마우스를 4개 그룹(n=5)으로 분류하였다. 식염수를 복강 내 투여받는 그룹을 대조군으로 설정하였으며, 히드록시우레아(HU, 30 mg/kg)를 투여 받는 그룹, WOTS-418(1×10^7 pfu)을
20 투여받는 그룹, 및 WOTS-418과 HU를 모두 투여받는 그룹을 실험군으로 분류하였다. WOTS-418은 총 2회(D0, D10) 투여하였으며, 0일째에는 복강 내 투여(intraperitoneal)한 후, 10일째에는 종양 내 투여(intratatumoral)하였다. 히드록시우레아는 하루에 2회, 매일 (6회/주) 복강 내 투여하였다(도 30).

31일 동안 종양의 크기를 측정한 결과, 대조군의 종양의 크기는 서서히
25 증가하다가 17일 이후부터 비약적으로 증가하여 31일째에 최초 종양에 비해 6배 이상 크기가 증가하였다. 또한, HU를 투여한 그룹의 마우스의 종양의 크기는 서서히 증가하여 31일째에 최초 종양에 비해 5배 이상 성장하였다.

반면, WOTS-418을 투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기는 14일째부터 종양의 성장이 억제되었고, 31일째까지 종양이 커지지 않고 유지되는 것을

관찰하였다. 또한, WOTS-418과 히드록시유레아를 투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기는 17일째부터 종양의 성장이 억제되어 크기가 감소하는 경향을 보이는 것을 관찰하였다(도 31).

이를 통해, WOTS-418은 종양의 성장을 억제하는데 효과가 있는 것을 알 수 있었으며, 히드록시유레아를 단독으로 처리하는 경우 종양의 성장이 억제되지 않았으나, WOTS-418과 히드록시유레아를 병용 투여하는 경우, WOTS-418 또는 히드록시유레아를 단독 투여에 비해 항암 효과가 개선되는 것을 확인하였다.

실시에 12. 마우스 신장암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시유레아의 항암치료 효과 확인: Renca

오리엔트 바이오(Orient Bio, Busan)에서 분양 받은 Balb/c 마우스(암컷, 8주)를 일주일의 적응기간을 거친 후 마우스 신장암 세포주(Renca, 한국세포주은행)로 이종이식을 수행하였다. 종양의 크기가 100 mm³에 도달할 때까지 관찰한 뒤 약물 투여를 시작하였으며, 28일 후 종양의 크기를 측정하였다.

상기 제작한 마우스 유방암세포 식립 마우스를 3개 그룹(n=7)으로 분류하였다. 식염수를 복강 내 투여받는 그룹을 대조군으로 설정하였으며, WOTS-418과 히드록시유레아를 단회(1×10^6 pfu, 30 mg/kg) 투여받은 그룹 및 WOTS-418과 히드록시유레아를 다회($1 \times 10^6/1 \times 10^7$ pfu, 30 mg/kg) 투여 그룹을 실험군으로 분류하였다. WOTS-418은 0일째 및 14일째에 복강 내 투여하였으며, 히드록시유레아는 하루에 2회, 매일 (6회/주) 복강 내 투여하였다.

그 결과, 대조군에 비해 WOTS-418과 히드록시유레아를 투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 현저하게 억제되는 것을 확인하였으며, WOTS-418을 단회 투여 그룹에 비해 다회 투여 그룹의 종양의 크기가 더 억제되는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 다회 투여 그룹에서 2번째 WOTS-418 투여 시 농도가 높아짐에 따라 항암효과가 향상되는 것을 확인하였다(도 32).

실시에 13. 마우스 대장암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시유레아의 항암치료 효과 확인: CT-26

실험예 13.1. 마우스 대장암세포 식립 마우스 제조 및 약물 투여

오리엔트 바이오(Orient Bio, Busan)에서 분양 받은 Balb/c 마우스(암컷, 8주)를 일주일의 적응기간을 거친 후 마우스 대장암 세포주(CT-26,

한국세포주은행)로 이중이식을 수행하였다. 종양의 크기가 100 mm³에 도달할 때까지 관찰한 뒤 약물 투여를 시작하였다.

상기 제작한 마우스 대장암세포 식립 마우스를 4개 그룹(G1, G2, and G3: n=15, G4: n=14)으로 분류하였다. 식염수를 복강 내 투여받는 그룹을 대조군으로
5 설정하였으며, 히드록시우레아를 복강 내 단독(30 mg/kg) 투여받은 그룹, WOTS-418 단독으로 복강 내 2회, 종양 내 2회 (1×10^8 pfu, i.p., D0, D3, 1×10^7 pfu, i.t., D14, D21) 투여받은 그룹, 및 같은 용량 및 용법으로 WOTS-418과 히드록시우레아를 병용 투여받은 그룹을 실험군으로 분류하였다. WOTS-418은 0일째 및 3일째에 복강 내 투여한 뒤, 14일째 및 21일 째는 종양 내 투여하였고,
10 히드록시우레아는 하루에 1회, 바이러스 투여 직전부터 26일까지 매일(6회/주) 복강 내 투여하였다(도 33).

25일째에 종양의 크기를 측정하고 마우스를 희생시킨 후 면역세포를 분리하여 인터페론-감마(interferon-gamma) 검사를 수행하였다.

실험예 13.2. 종양의 크기 변화 확인

15 실험예 13.1의 각 군의 마우스에 약물을 투여한 후 25일째에 종양의 크기를 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비해 WOTS-418를 단독 투여받은 그룹, 히드록시우레아를 단독 투여받은 그룹, WOTS-418과 히드록시우레아를 병용투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 억제되는 것을 확인하였다. 특히, WOTS-418과 히드록시우레아를 병용투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 현저하게
20 억제되는 것을 확인하였다(도 34).

실험예 13.3. 인터페론 감마(interferon-gamma) 검사

실험예 13.1의 각 군의 마우스에 약물을 투여한 후 면역세포를 분리하여 인터페론-감마(interferon-gamma) 검사를 수행하였다.

구체적으로, 각 군의 마우스의 비장 내 CD8⁺ T세포를 (Ly-2) MicroBeads
25 kit와 MACS(Magnetic-activated cell sorting)를 이용하여 분리한 후, CT-26 세포주(1×10^4 cells)와 함께 공동배양하였다. IFN- γ 를 분비하는 CD8⁺ T세포를 ELISPOT(MABTECH, Sweden) 실험을 수행하였고, LK Bioscience (Seoul)를 이용하여 스폿(spot)을 스캔하여 집계하였다.

그 결과, 대조군 마우스의 비장으로부터 분리한 CD8⁺ T세포에 비해 WOTS-

418를 단독 투여받은 그룹, 히드록시유레아를 단독 투여받은 그룹, WOTS-418과 히드록시유레아를 병용투여 받은 실험군 마우스의 비장으로부터 분리한 CD8+ T세포에서 IFN- γ 를 분비하는 CD8+ T세포가 많은 것을 확인하였다. 특히, WOTS-418과 히드록시유레아를 병용투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 35 및 도 36).

청구범위

[청구항 1]

서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스.

[청구항 2]

제 1 항에 있어서,

상기 HSV가 HSV1(Herpes simplex virus type 1)인 것인, 항암바이러스.

[청구항 3]

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 이펙터 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 0 내지 231개의 아미노산 서열을 더 갖는 것인, 항암바이러스.

[청구항 4]

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 이펙터 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 36, 82 또는 231개의 아미노산 서열을 더 갖는 것인, 항암바이러스.

[청구항 5]

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11 또는 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항암바이러스.

[청구항 6]

제 1 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열이 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12 또는 14로 표시되는 염기서열인 것인, 항암바이러스.

[청구항 7]

제 1 항에 있어서,

상기 항암바이러스는 아데노바이러스(Adenovirus), 헤피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 렌티바이러스(Lentivirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노부속바이러스(Adeno-associated virus), 백신시아 바이러스(Vaccinia virus) 또는 폭스바이러스(Poxvirus)로부터 유래된 것인, 항암바이러스.

[청구항 8]

제 1 항에 있어서,

상기 항암바이러스는 백신시아 바이러스인 것인, 항암바이러스.

[청구항 9]

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10]

제 9 항에 있어서,

상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 비소세포성암 폐암, 결장암, 골암, 안구내 흑색종, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호치킨 병, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 11]

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 항암바이러스, 및 GCV(Ganciclovir) 또는 ACV(Aciclovir)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 12]

제 11 항에 있어서,

상기 약학 조성물 내 포함되는 항암바이러스 및 GCV 또는 ACV가 동시에 투여되거나, 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 13]

제 11 항에 있어서,

상기 GCV 또는 ACV가 0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ 내지 50 mg/kg/day 용량으로 투여되는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14]

제 11 항에 있어서,

상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 비소세포성암 폐암, 결장암, 골암, 안구내 흑색종, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호치킨 병, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 백혈병, 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 15]

i) 백시니아 바이러스의 TK 유전자를 제거하고, 야생형 HSV-TK 유전자를 재조합시키는 단계; 및

ii) 상기 재조합 백시니아 바이러스를 숙주세포에서 BrdU(Bromodeoxyuridine)의 존재 하에 연속 계대 배양하는 단계를 포함하는

변이된 HSV-TK를 코딩하는 유전자를 포함하는 항암 백시니아 바이러스의 제조방법.

[청구항 16]

제 15 항에 있어서,

상기 야생형 HSV-TK 유전자는 서열번호 16으로 표시되는 염기서열인 것인, 항암 백시니아 바이러스의 제조방법.

[청구항 17]

제 15 항에 있어서,

상기 항암 백시니아 바이러스가 TK 활성이 없고, GCV 또는 ACV를 인산화시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항암 백시니아 바이러스의 제조방법.

[청구항 18]

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 항암바이러스를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.

[청구항 19]

암을 치료하기 위한 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 항암바이러스의 용도.

[청구항 20]

암 치료용 약제를 제조하기 위한 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 항암바이러스의 용도.

[청구항 21]

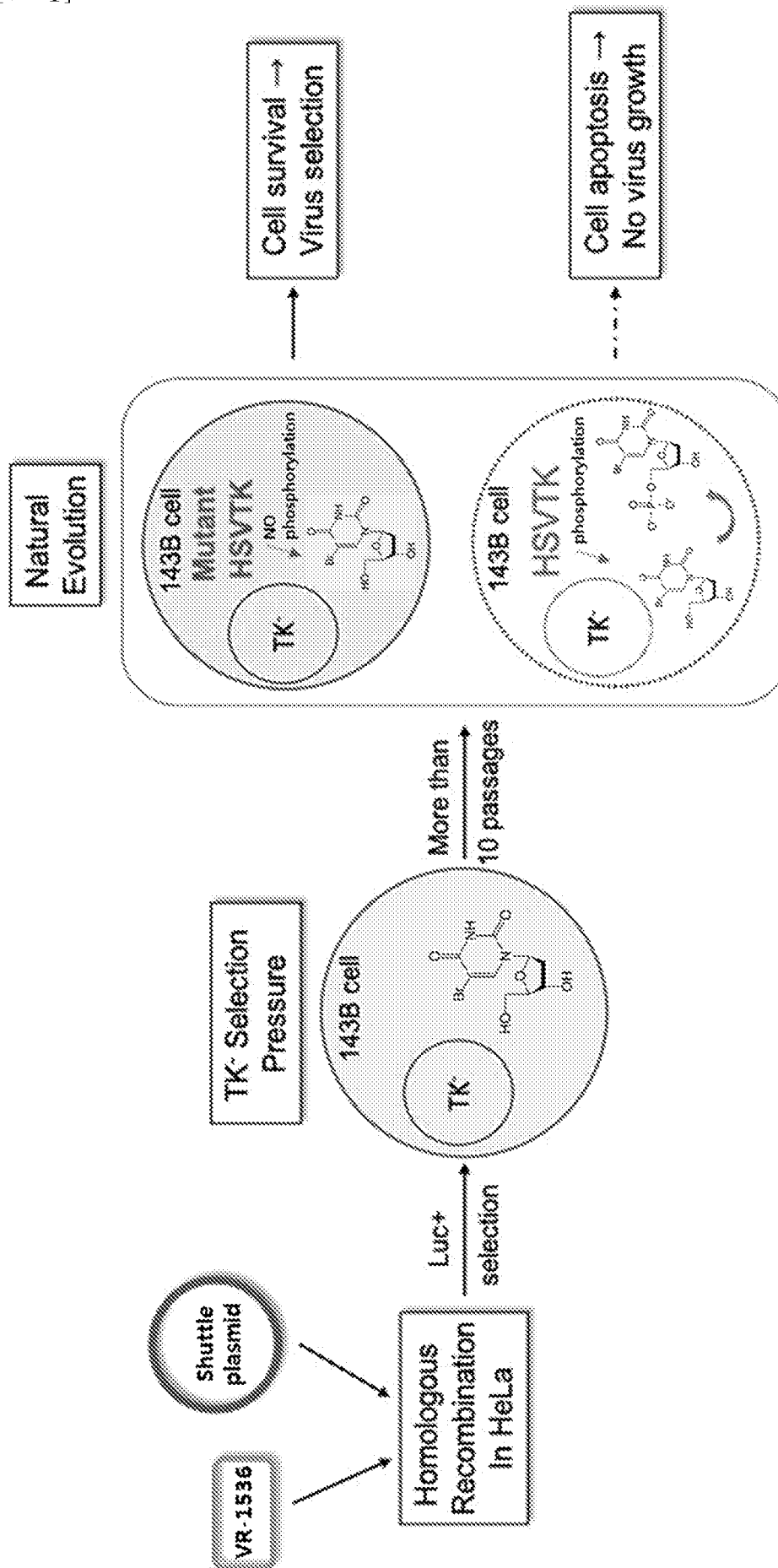
제 11 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법.

[청구항 22]

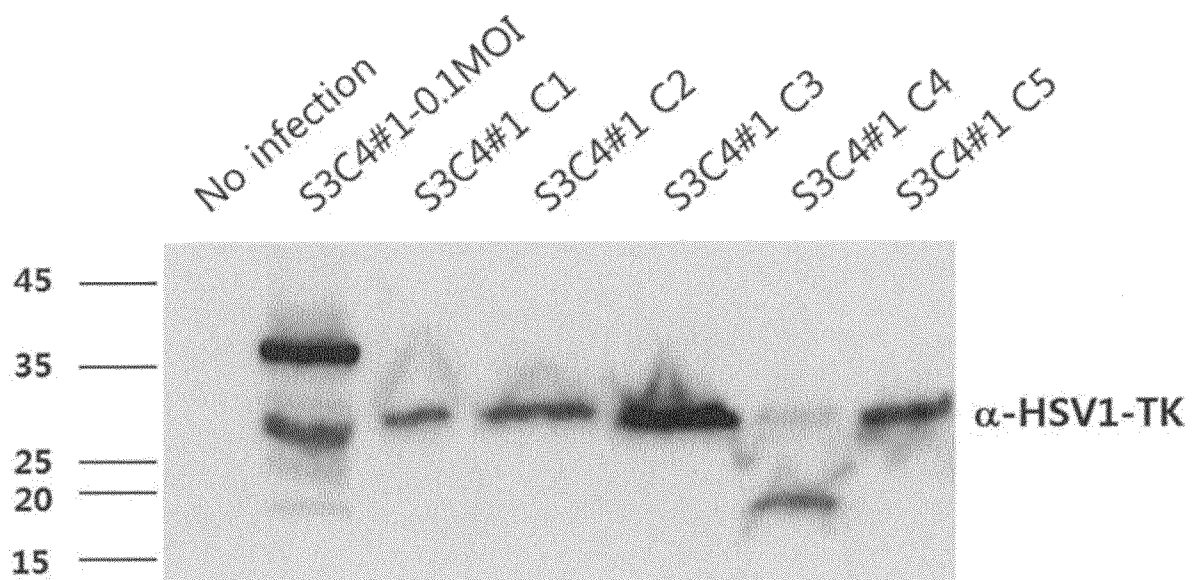
암을 치료하기 위한 제 11 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 용도.

[청구항 23]

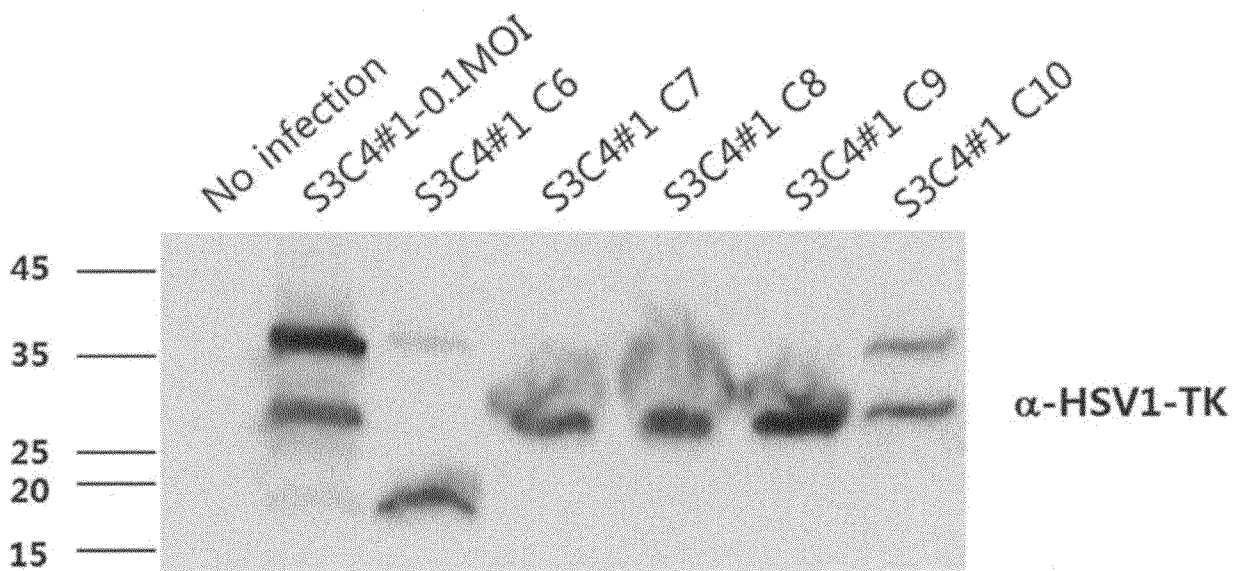
암 치료용 약제를 제조하기 위한 제 11 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 용도.



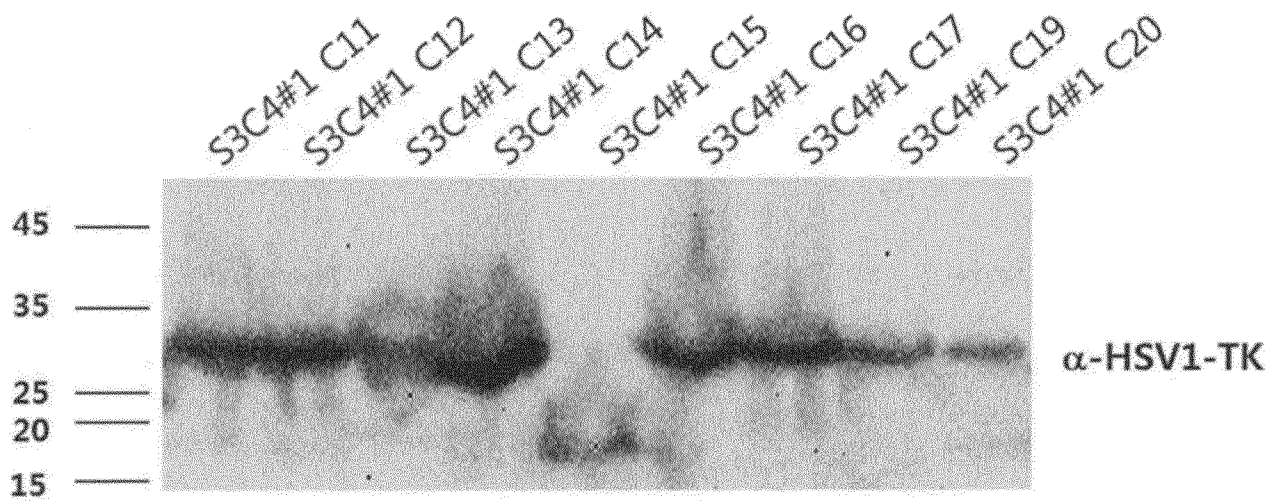
[도 2]



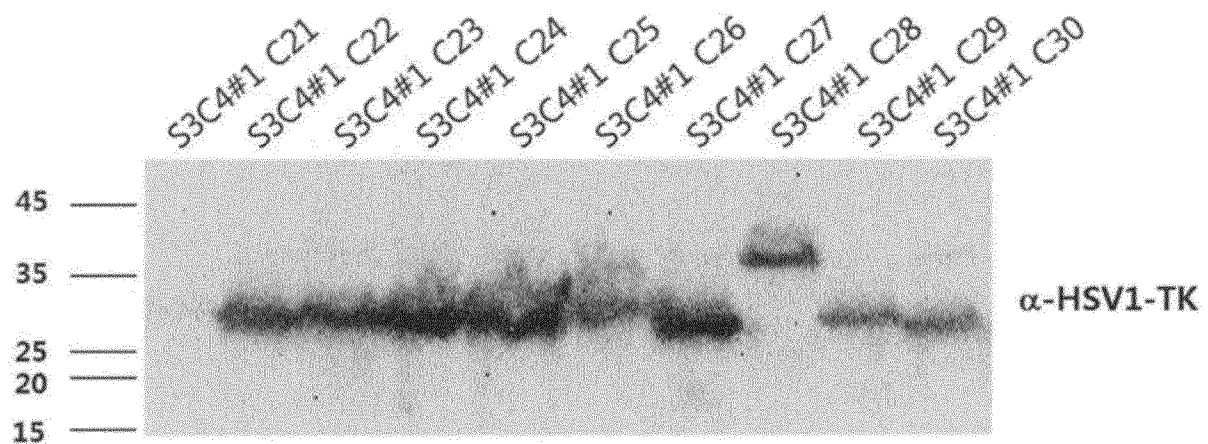
[도 3]



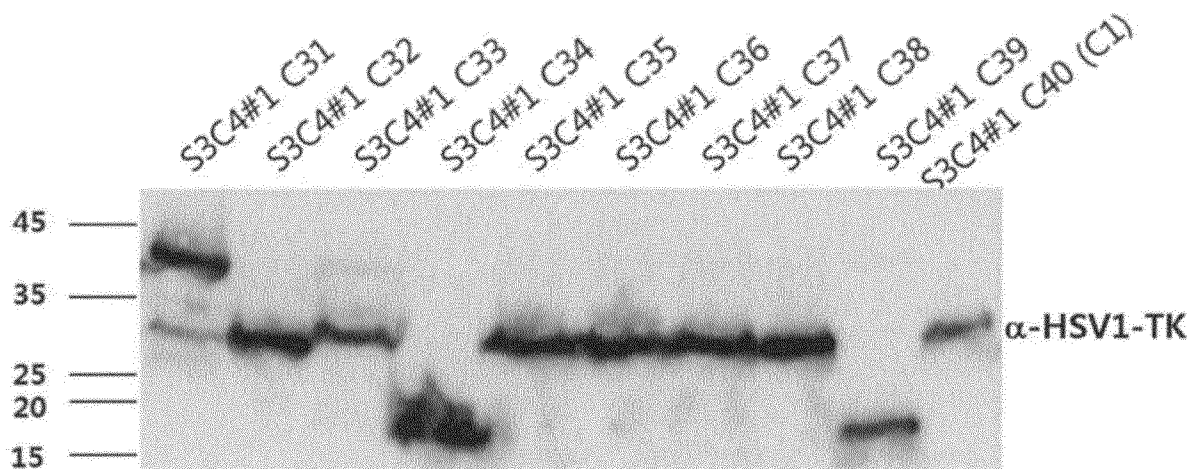
[도 4]



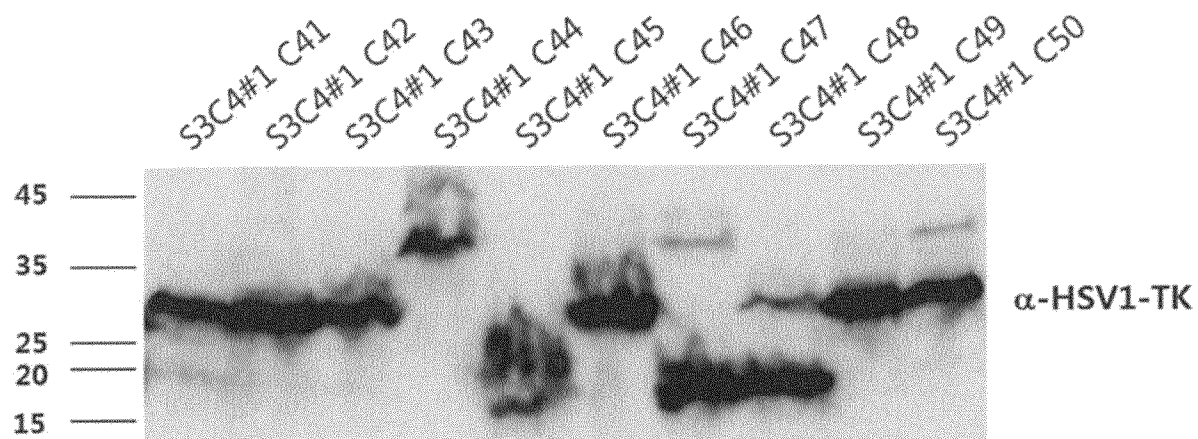
[도 5]



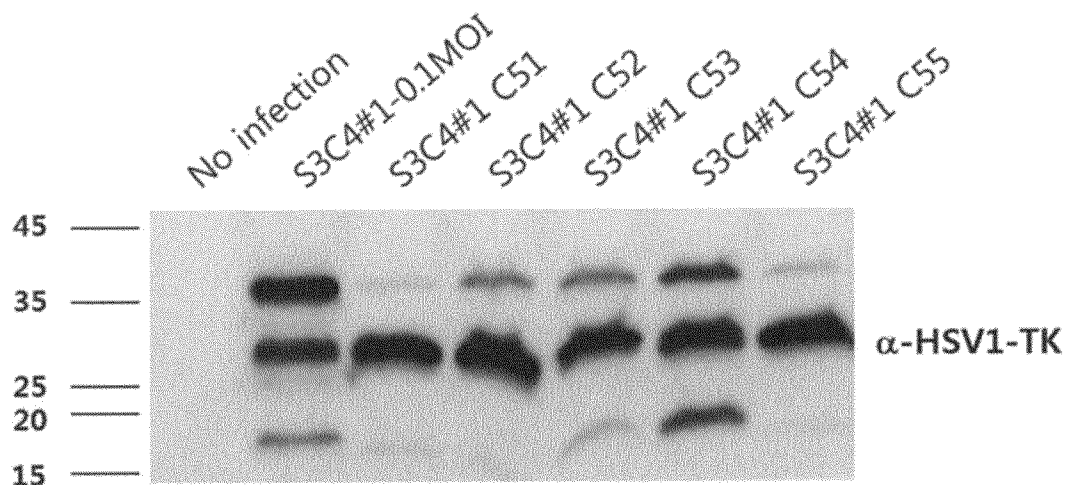
[도 6]



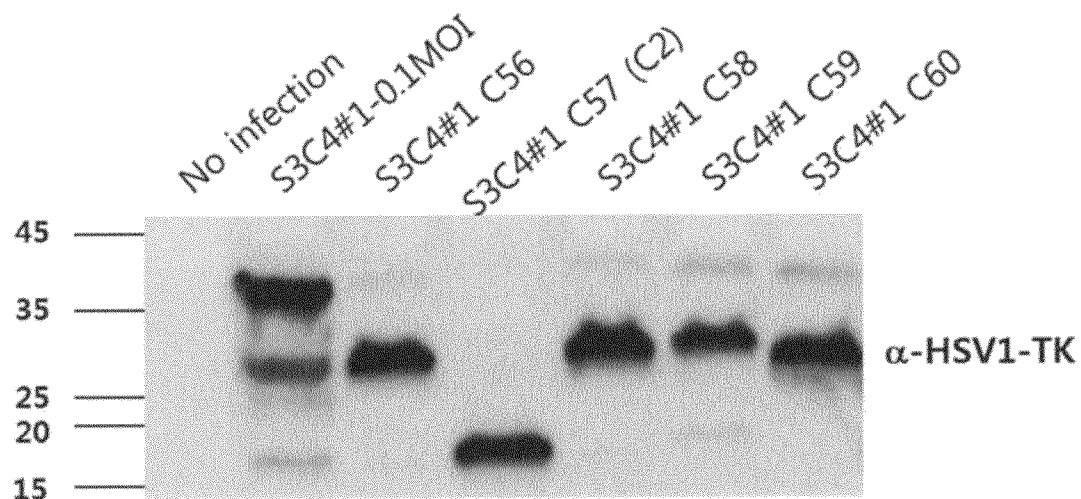
[도 7]



[도 8]



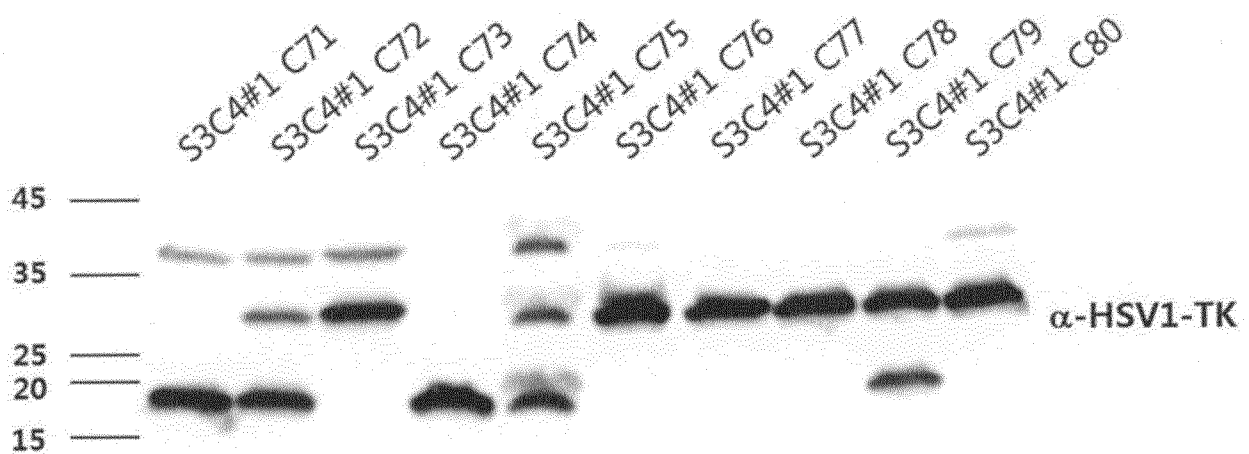
[도 9]



[도 10]



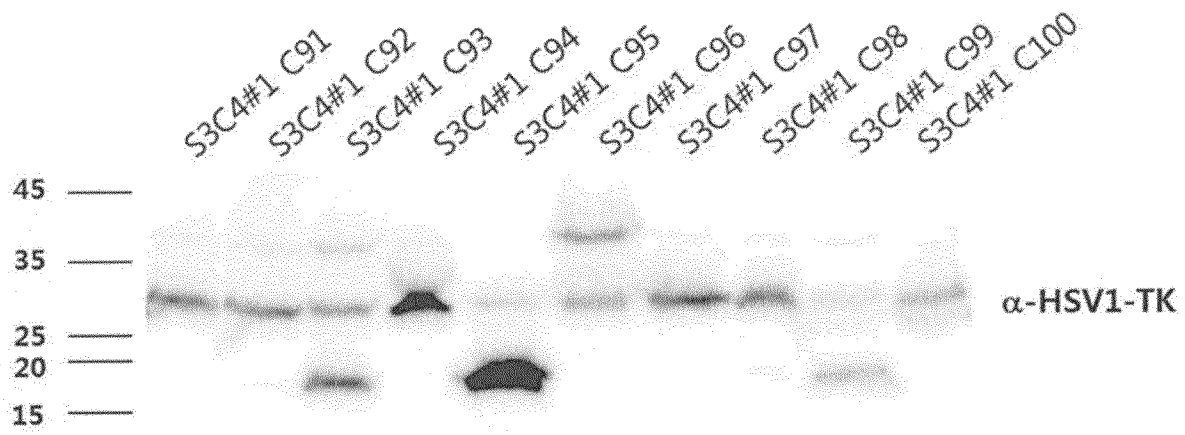
[도 11]



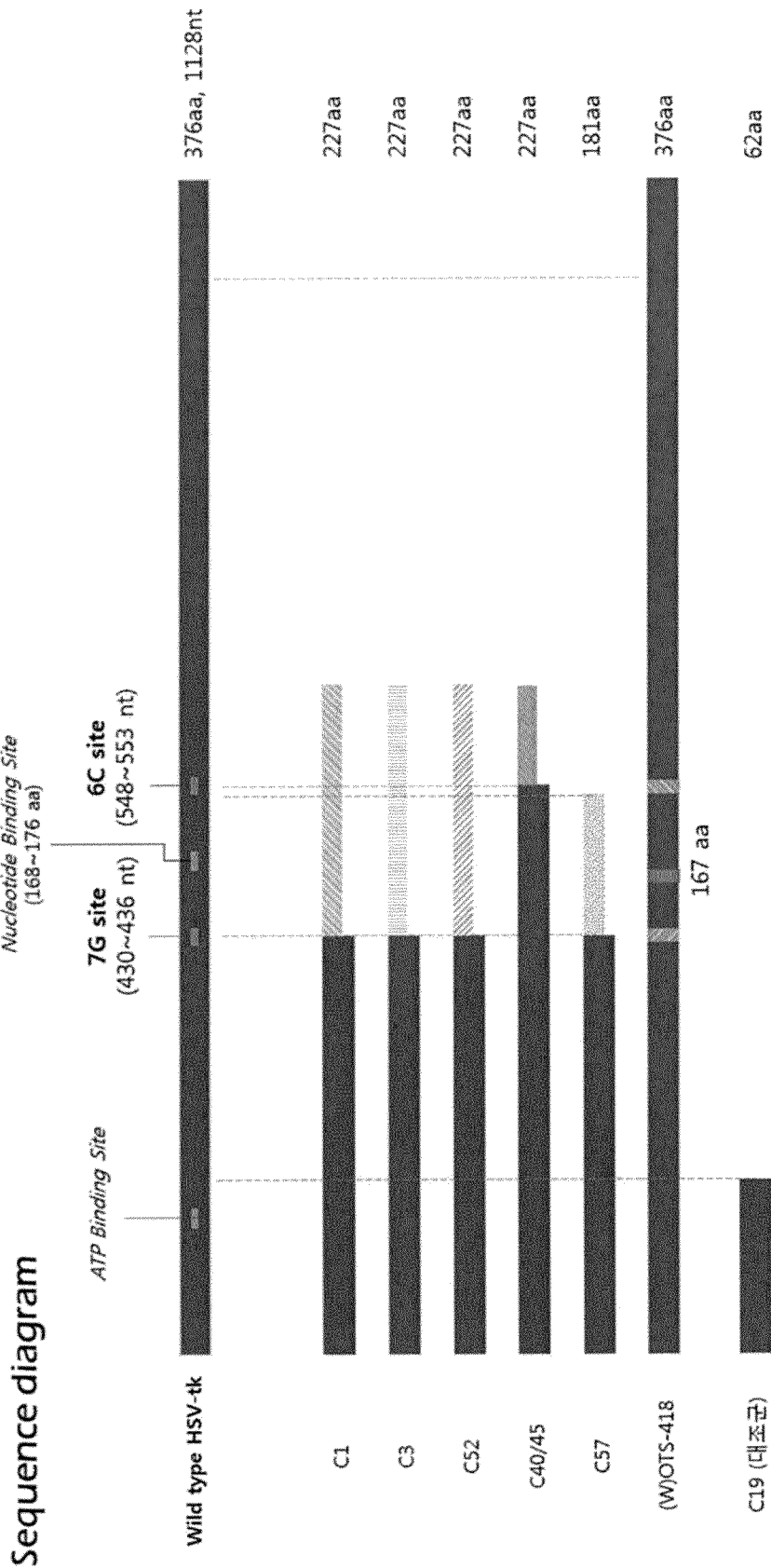
[도 12]



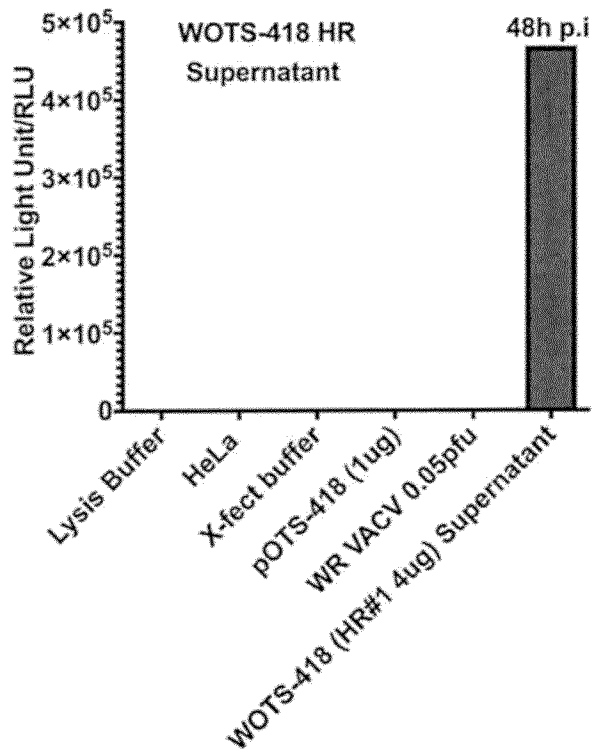
[도 13]



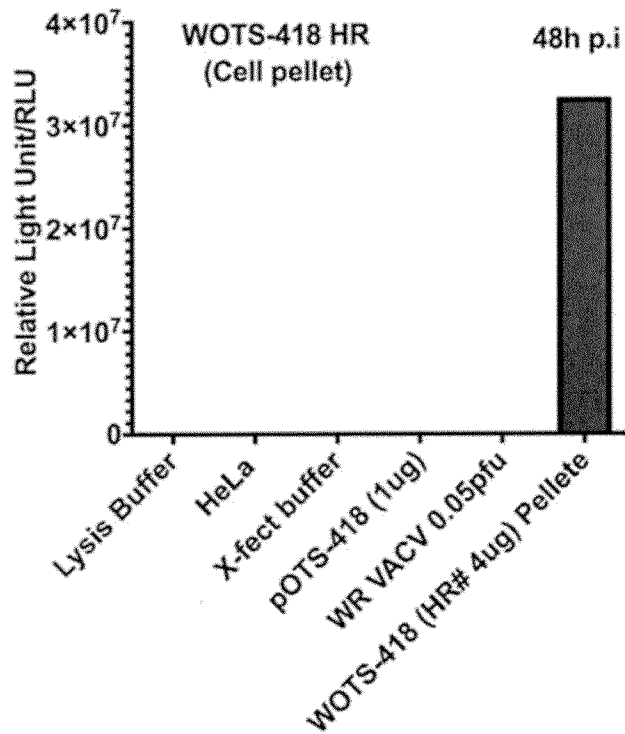
[도 14]



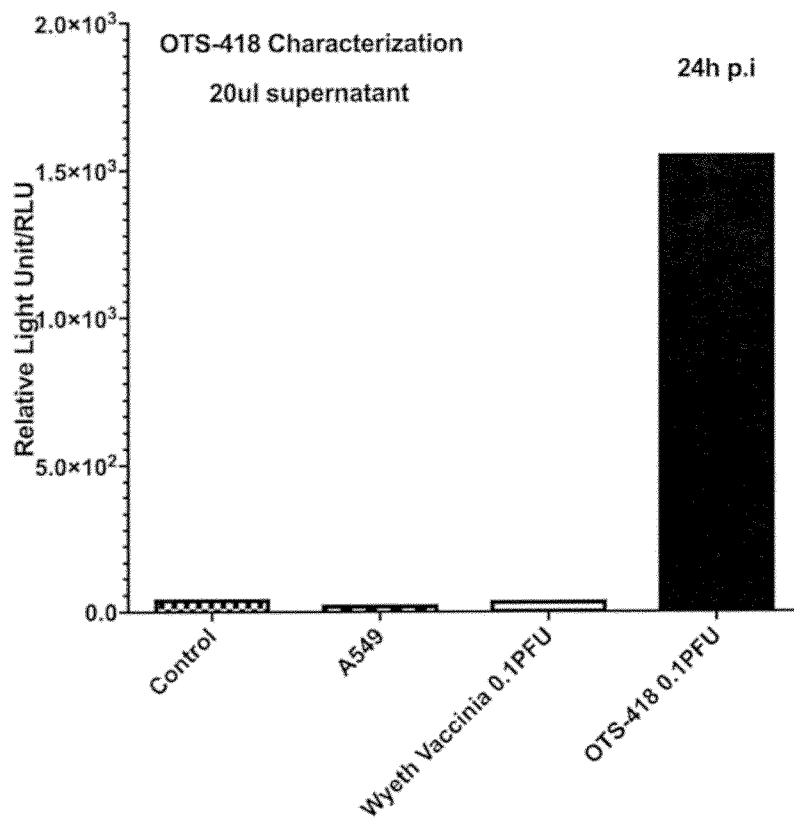
[도 15]



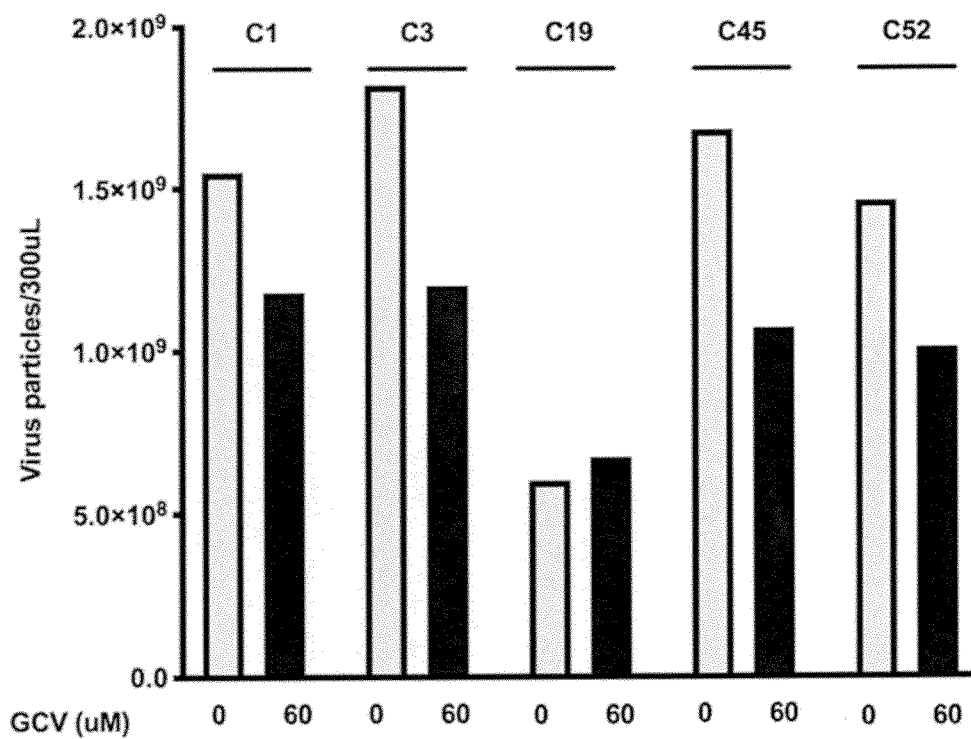
[도 16]



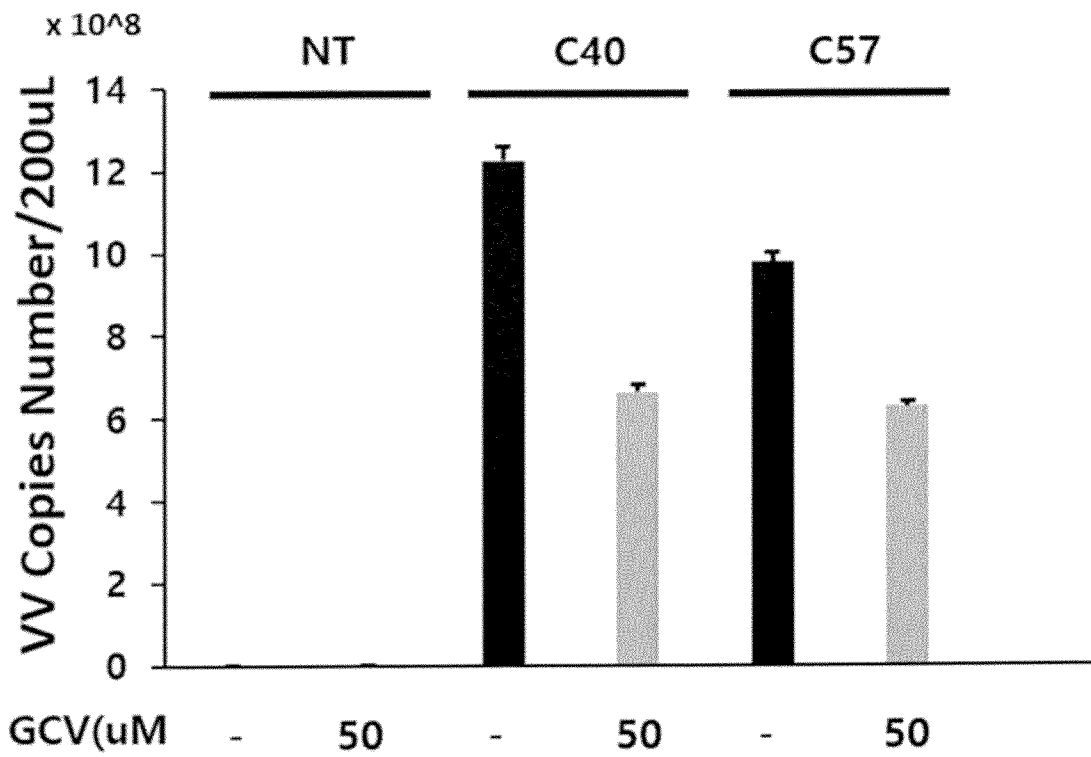
[도 17]



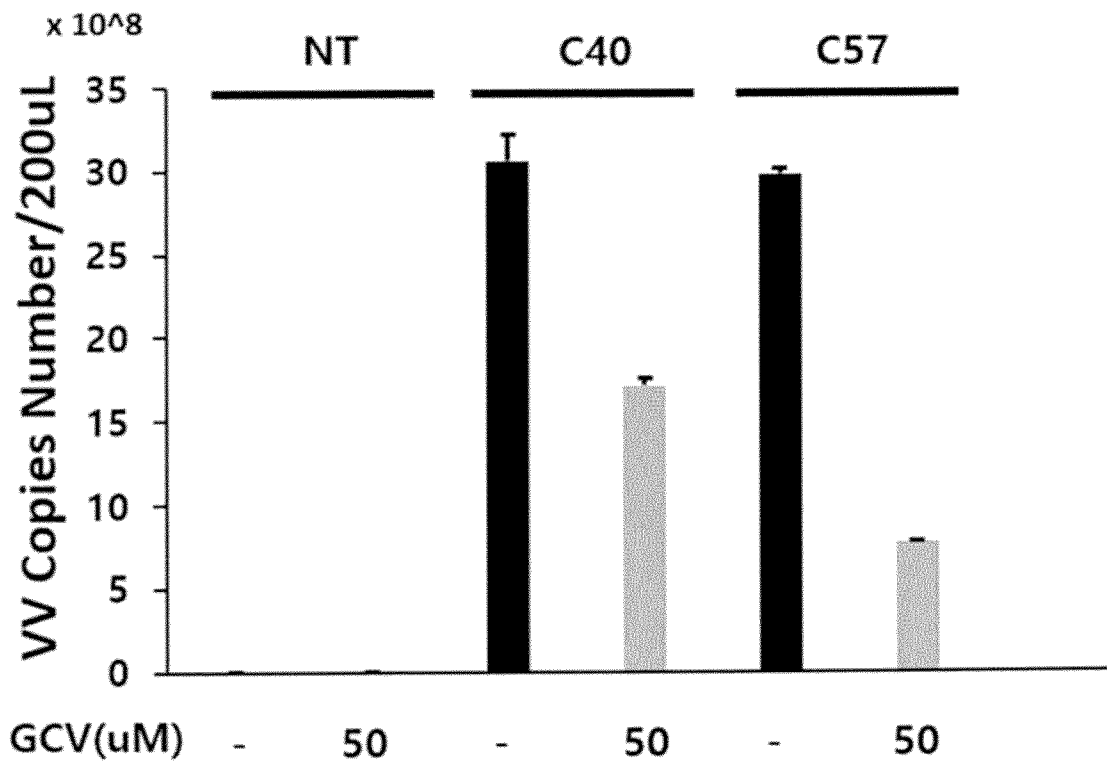
[도 18]



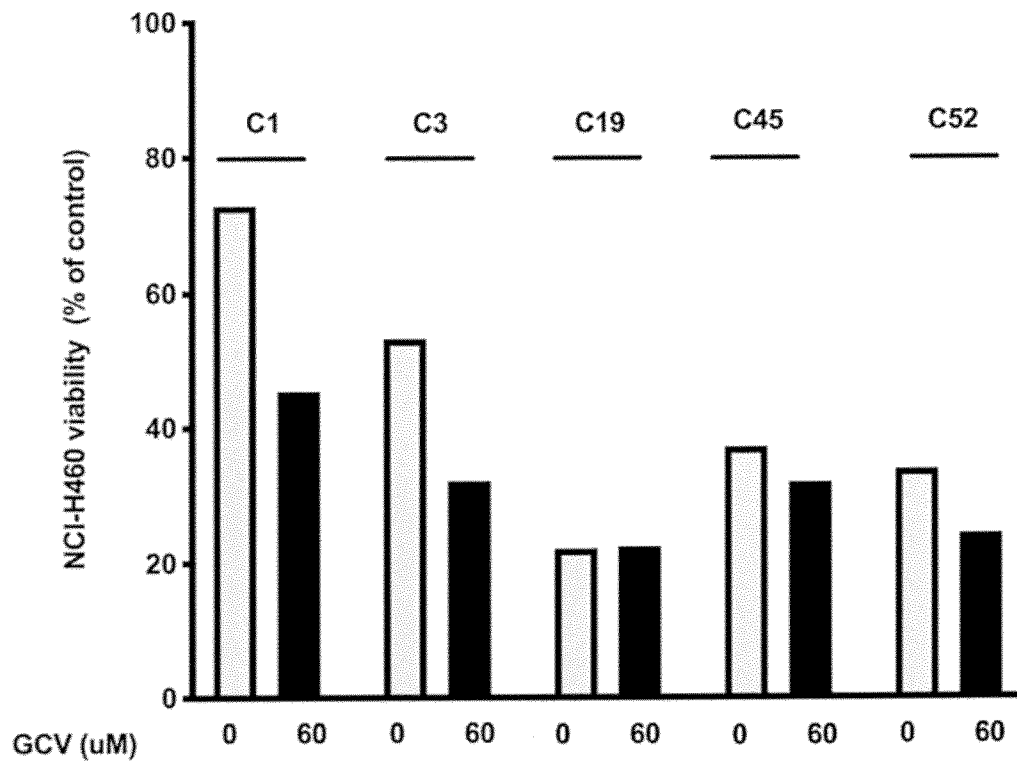
[도 19]



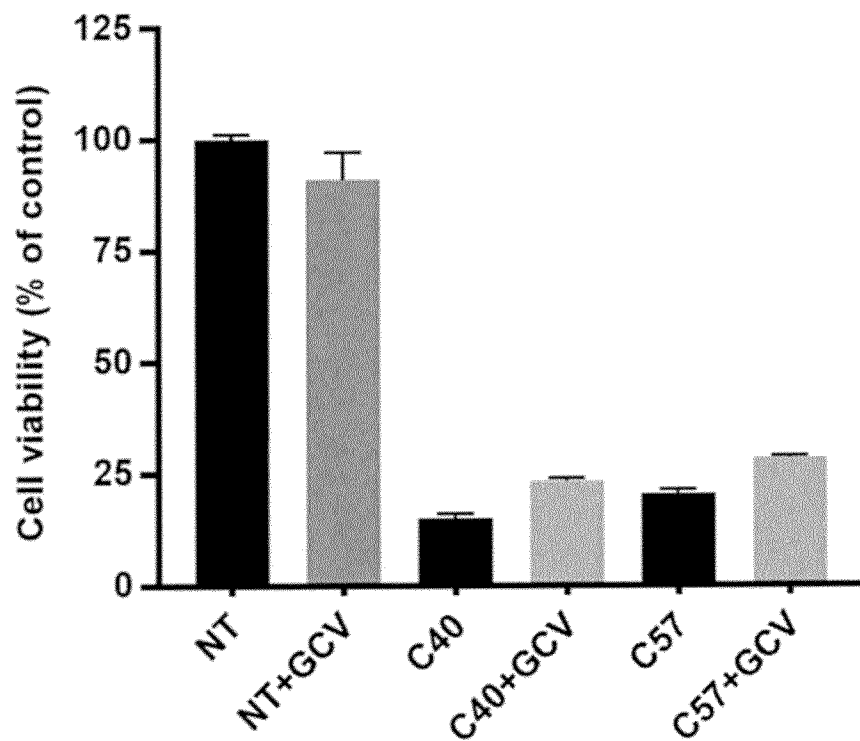
[도 20]



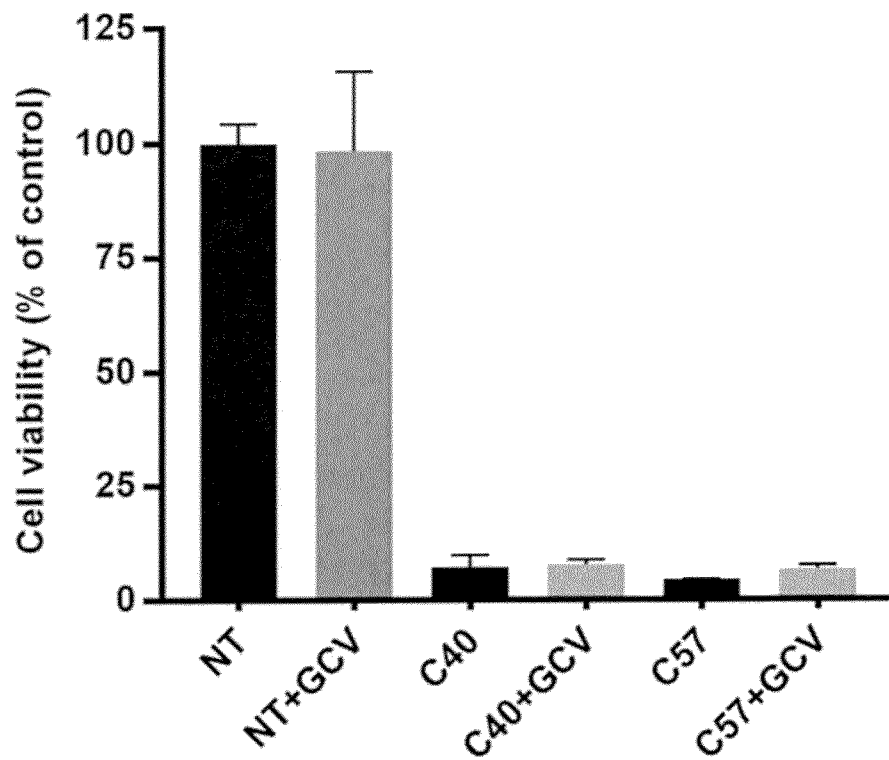
[도 21]



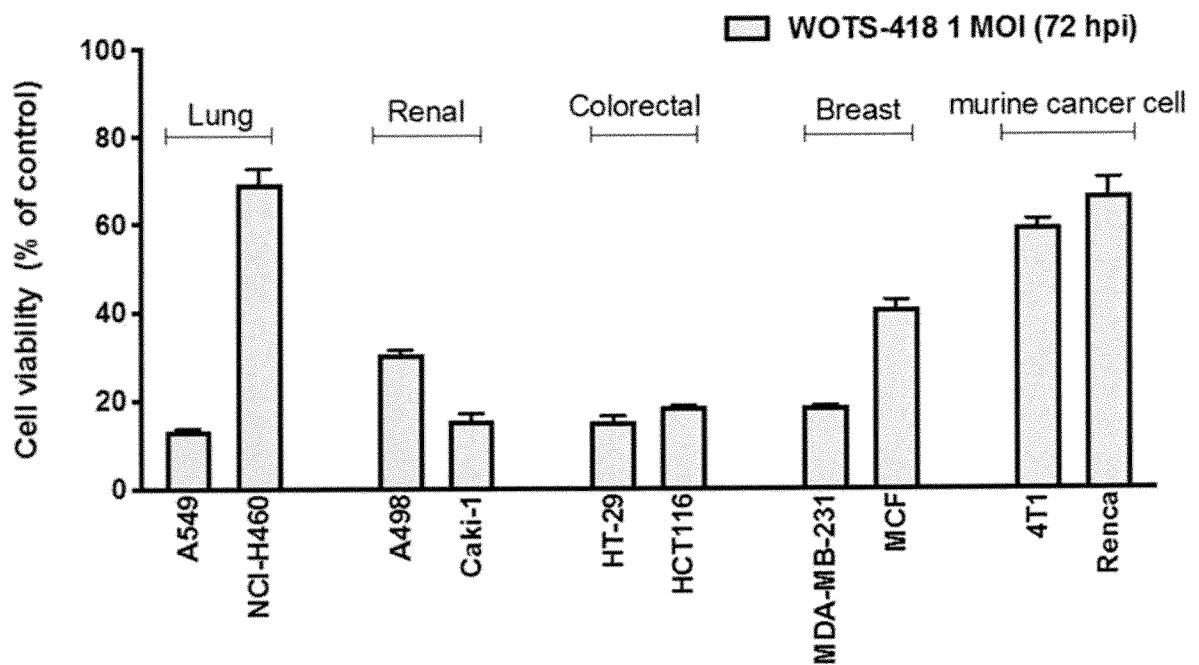
[도 22]



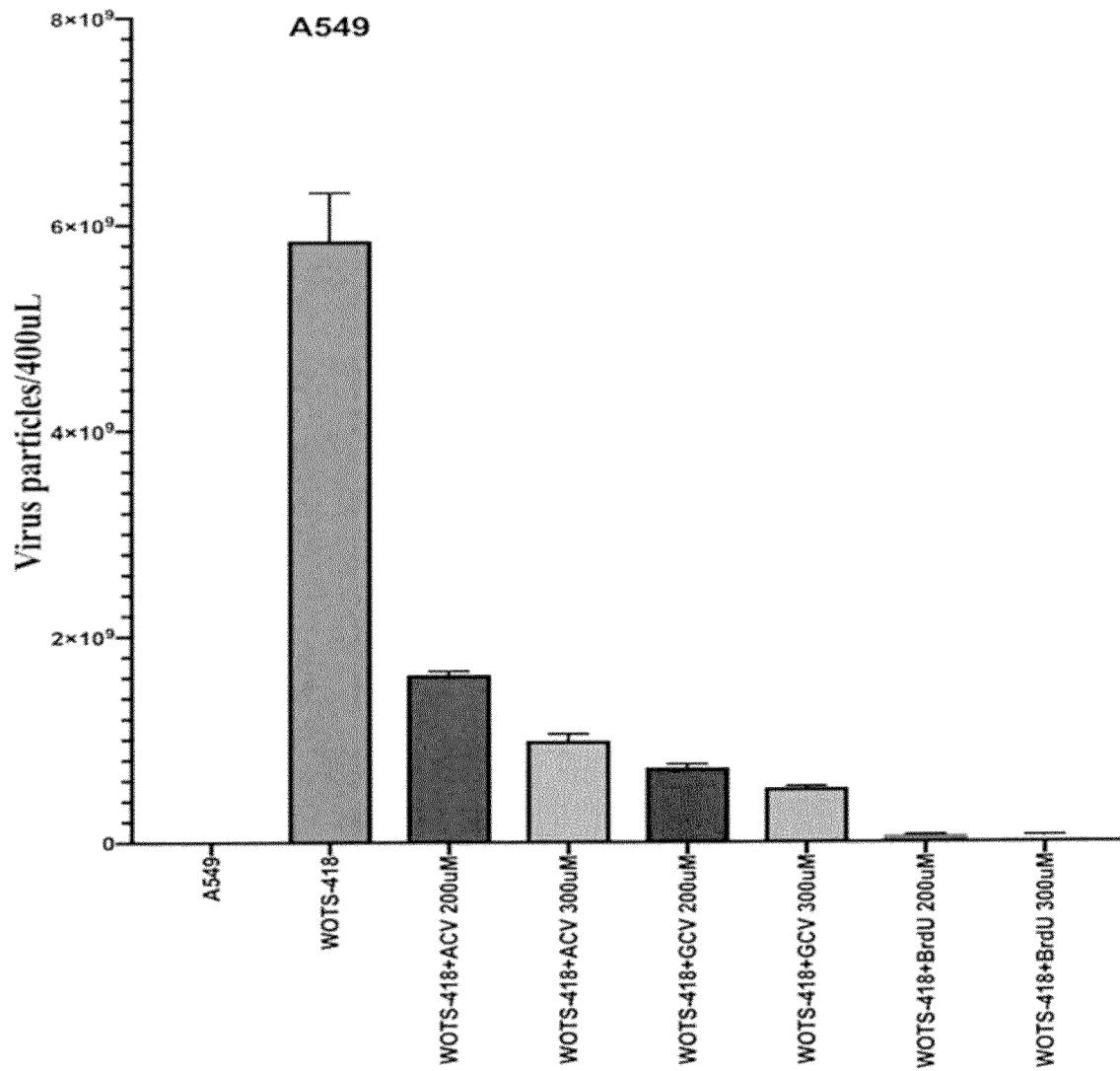
[도 23]



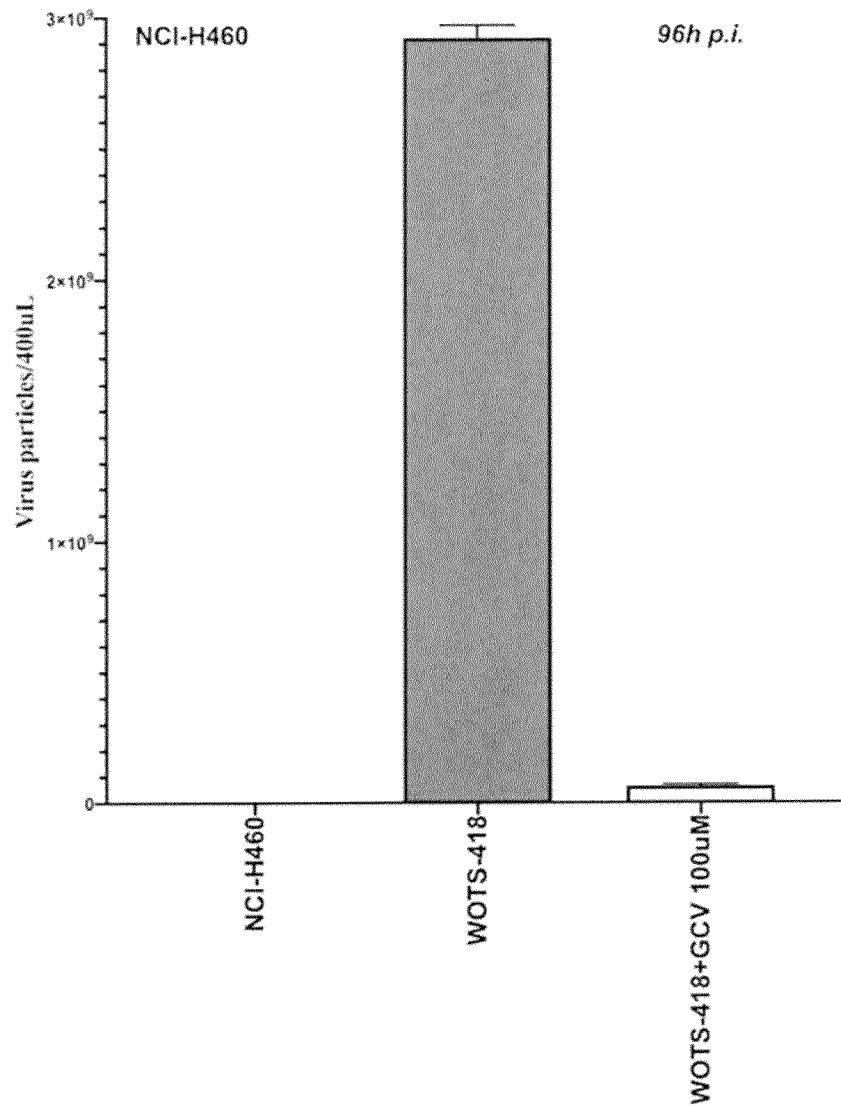
[도 24]



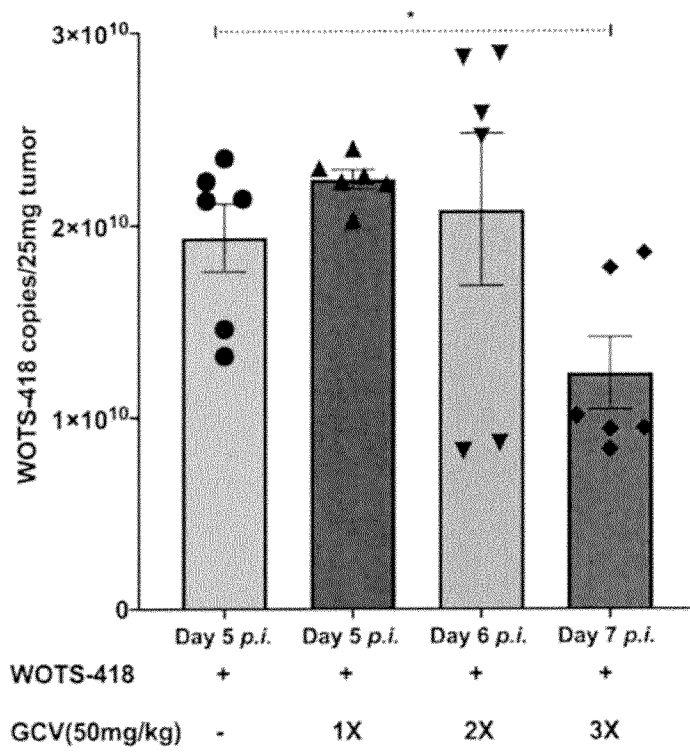
[도 25]



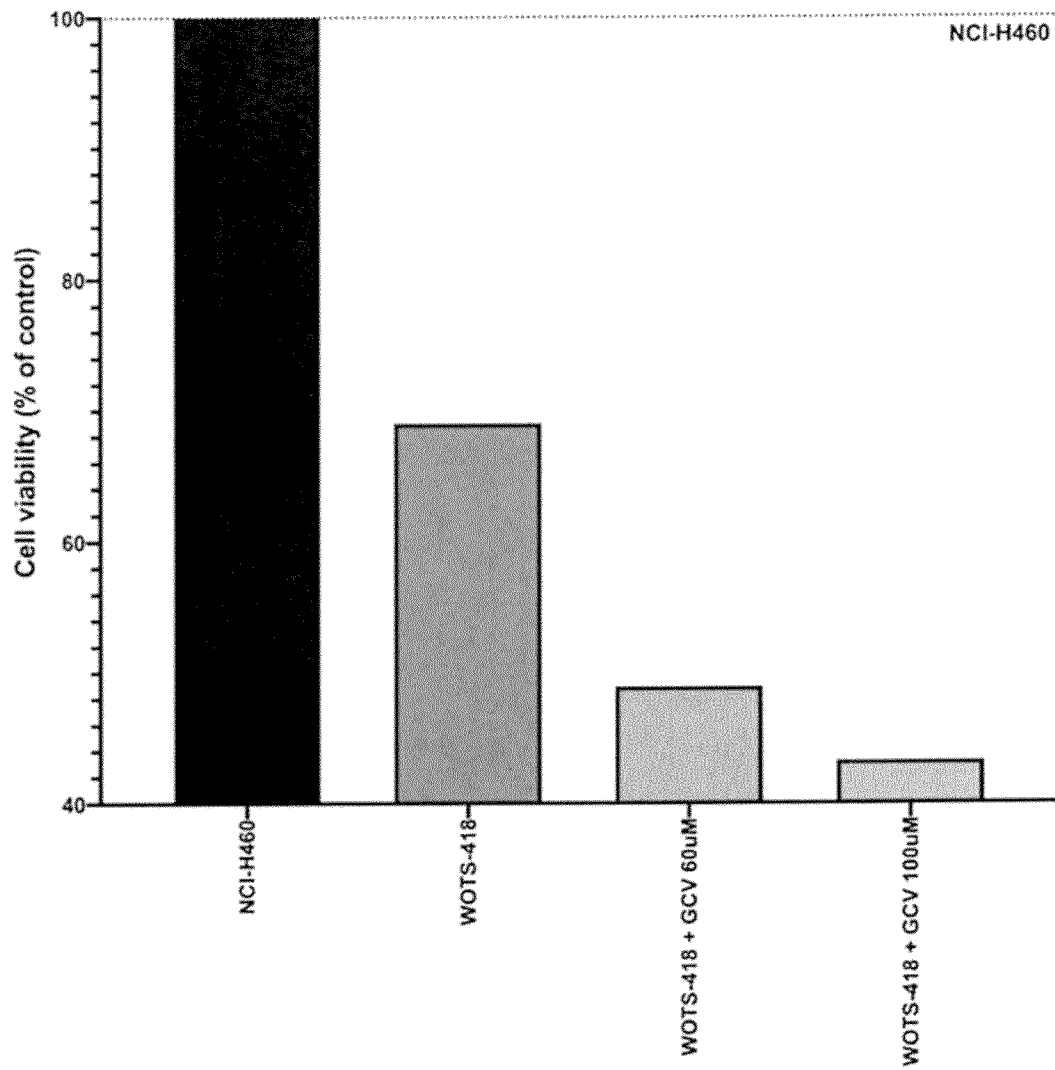
[도 26]



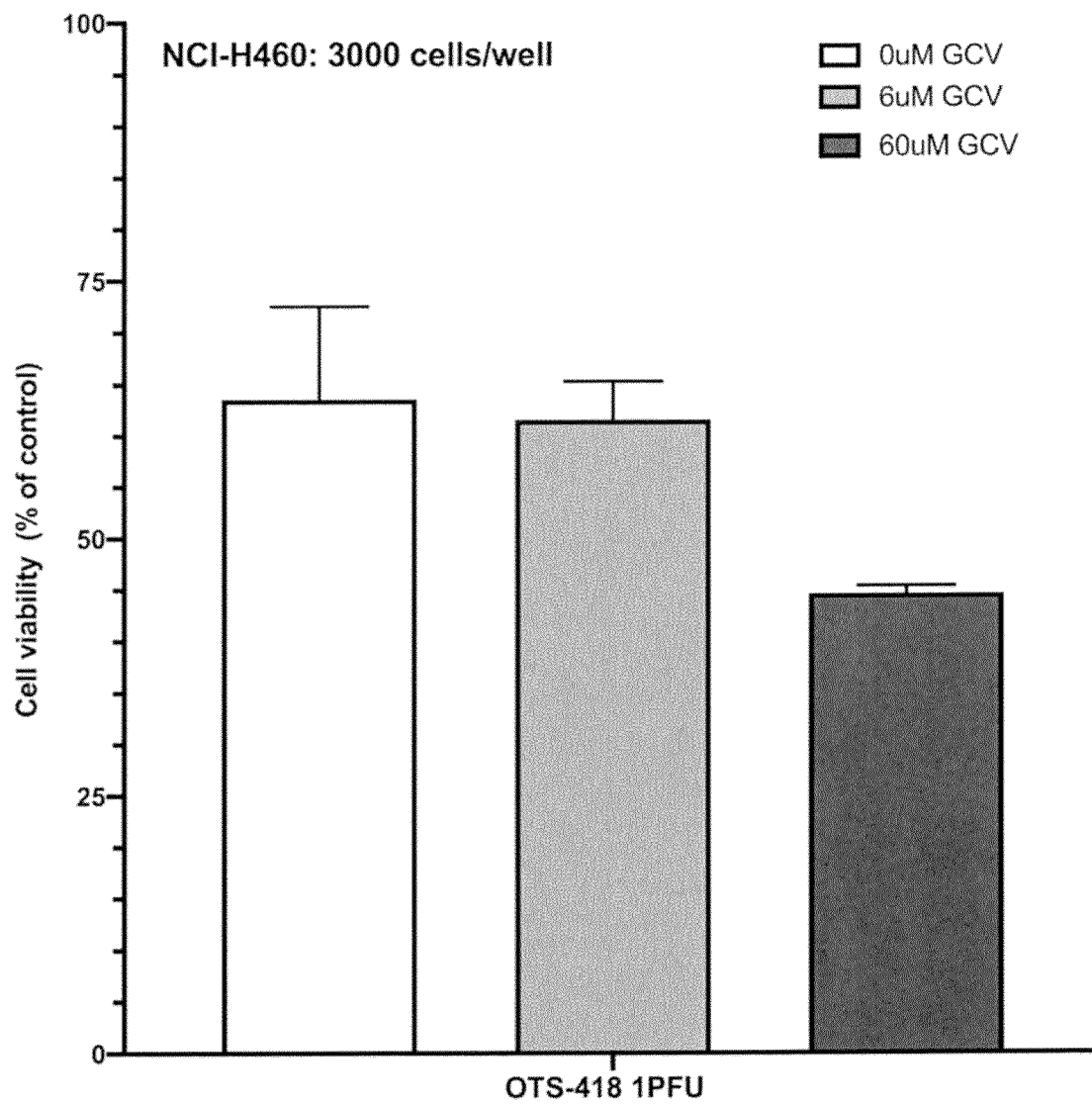
[도 27]



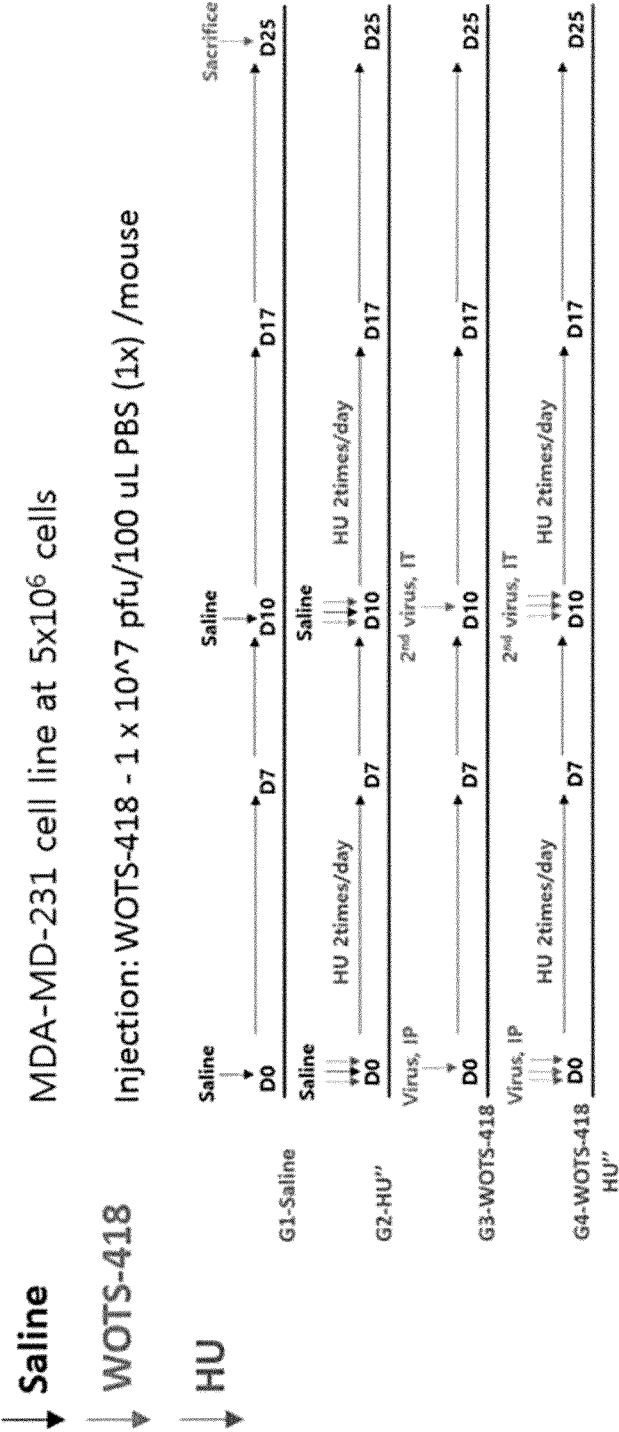
[도 28]



[도 29]

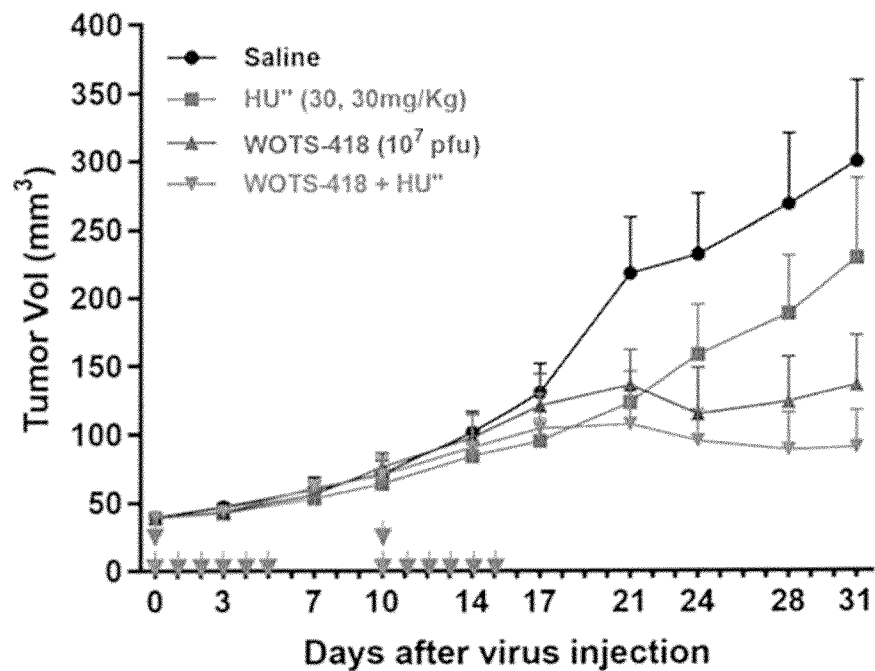


[도 30]

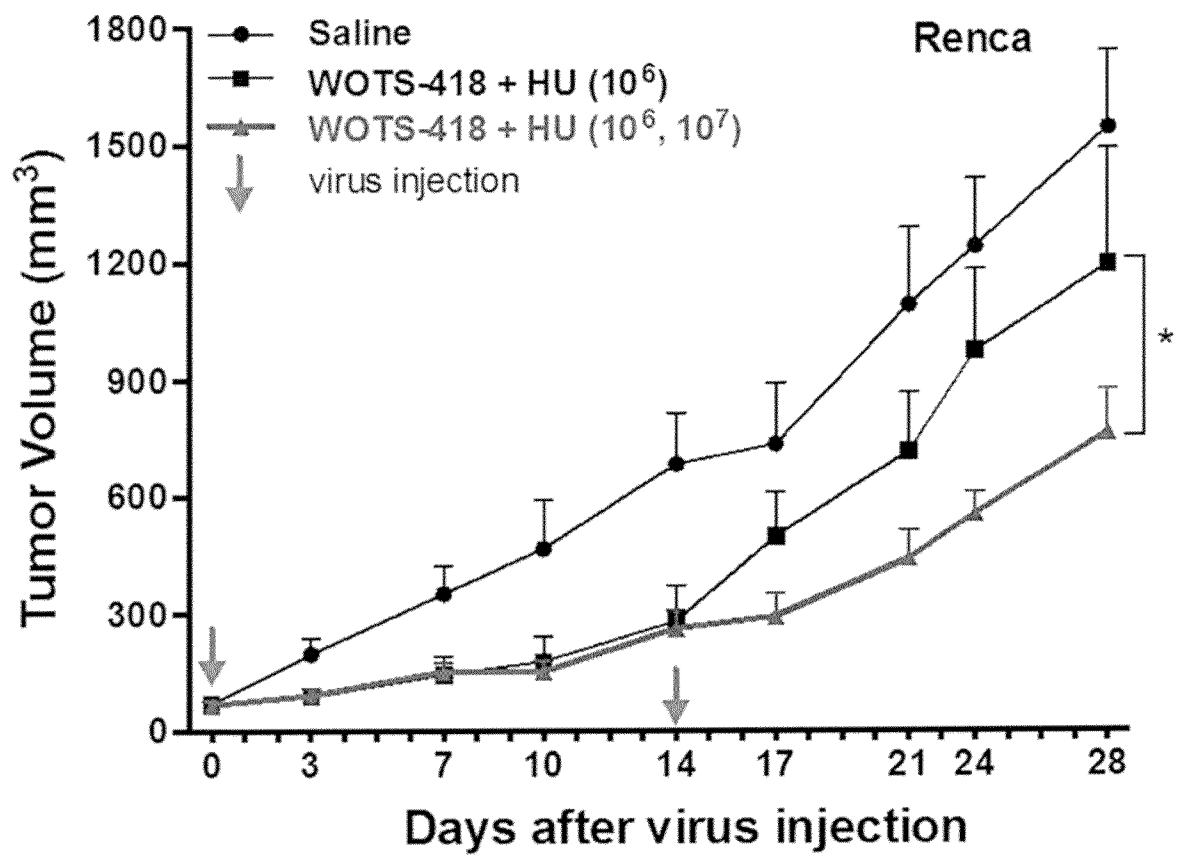


[도 31]

WOTS-418: D0; IP, D 10; IT
HU: D0-D5, D 10-D 15; 2times, IP injection
MDA-MB-231 tumor cells

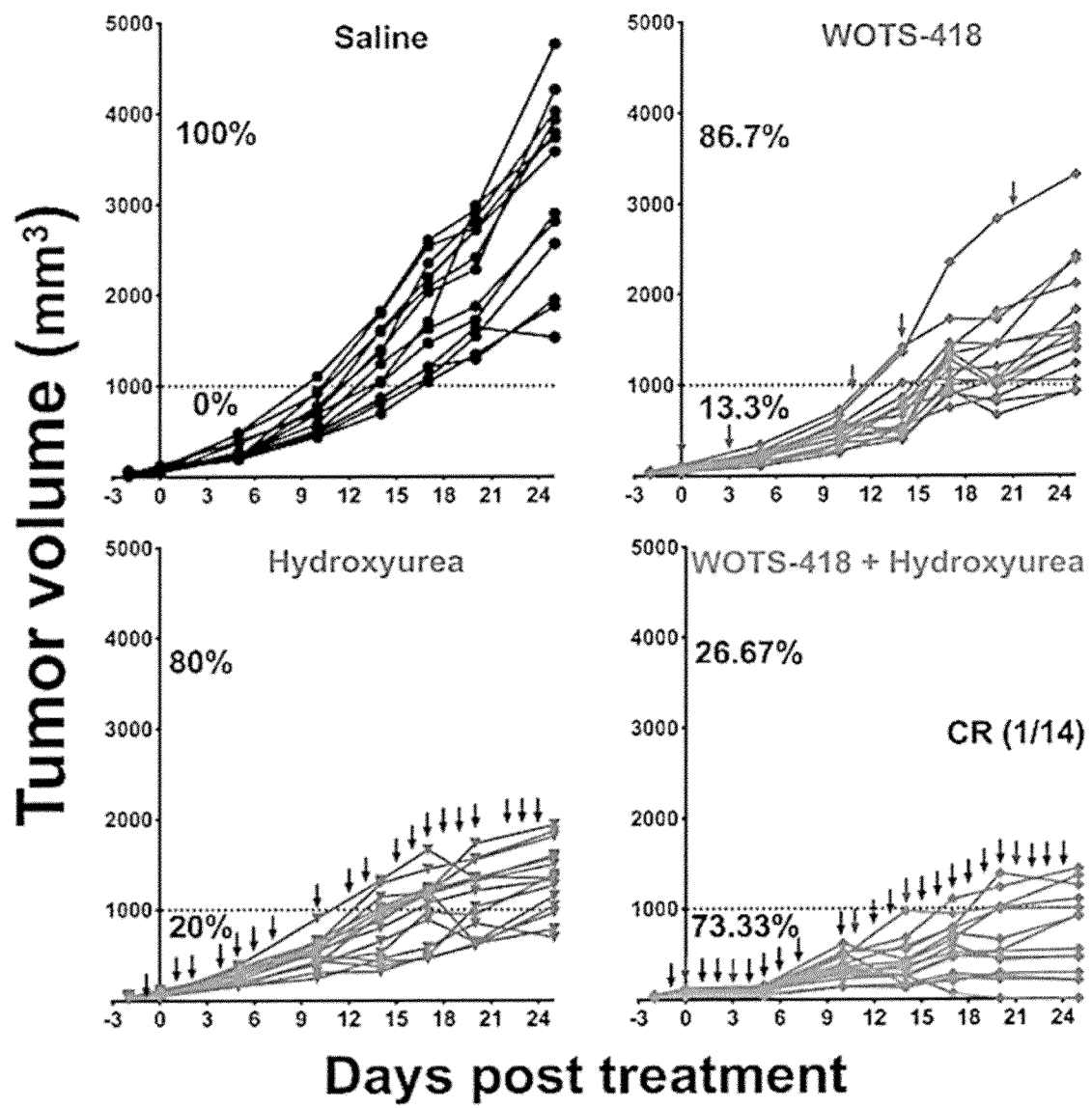


[도 32]

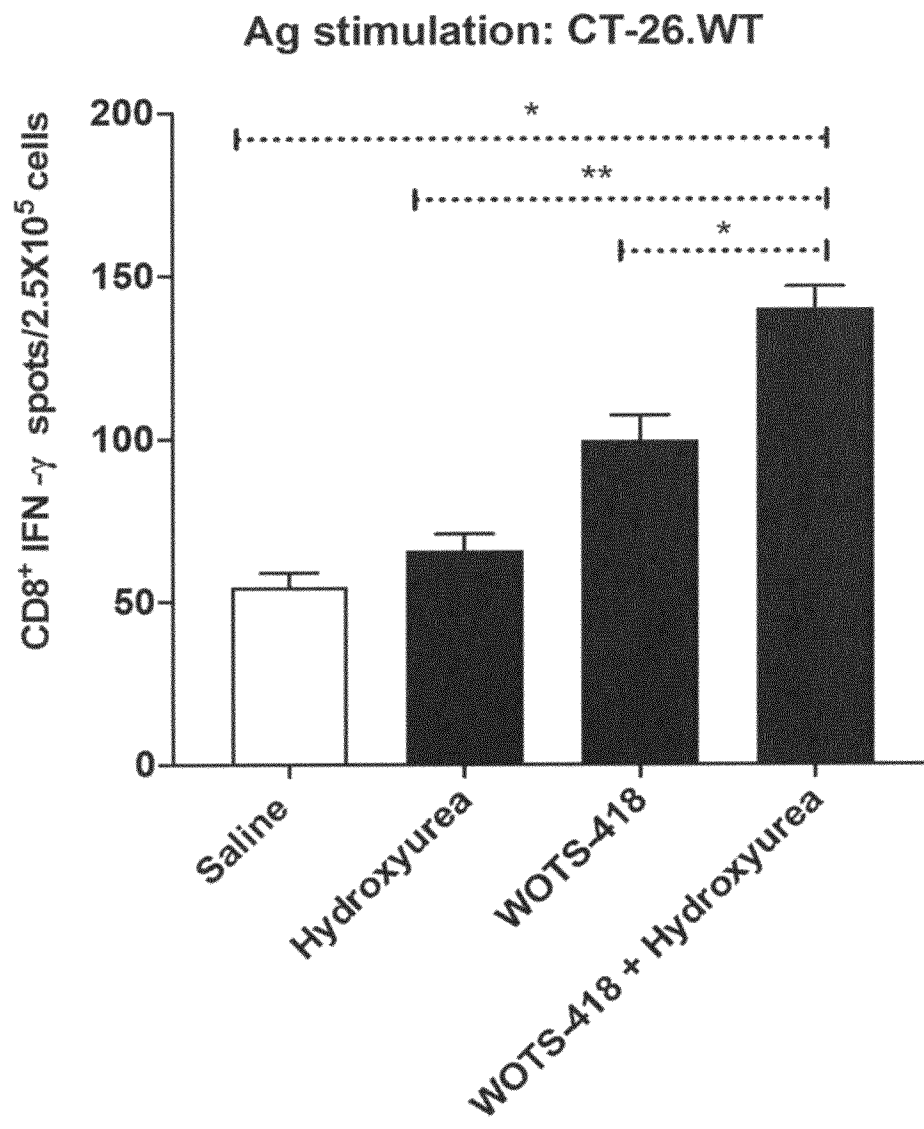




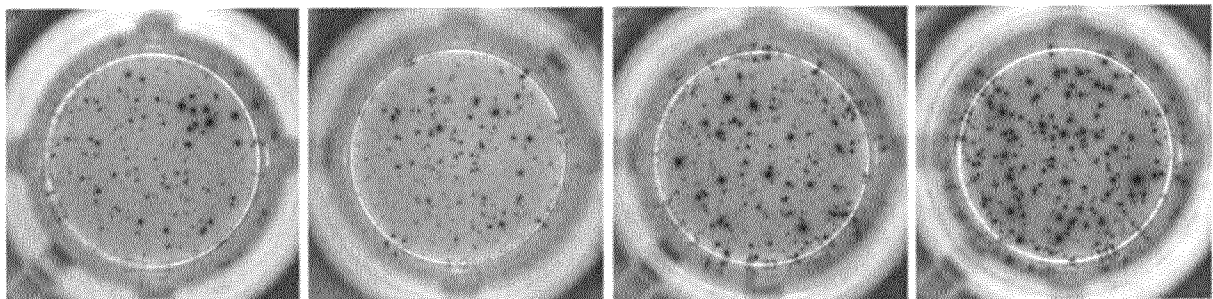
[도 34]



[도 35]



[도 36]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/00(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; A61K 31/522(2006.01)i; A61K 35/768(2014.01)i; A61K 38/45(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 7/00; A61K 35/768; A61K 48/00; C12N 15/54; C12N 9/00; C12N 9/12; A61K 31/522; A61K 38/45; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: HSV(herpes simplex virus), TK(thymidine kinase), 이펙터 도메인(effector domain), 항암바이러스(anticancer virus), GCV(ganciclovir), ACV(acyclovir), 암(cancer), 예방(prevention), 치료(treatment)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014-153258 A2 (EPEIUS BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 25 September 2014. See abstract, claims 1, 27, 45 and 52-53, paragraphs [0119], [0141] and [0292], and sequence identifier nos. 3-5.	1-14,19-20,22-23 15-17
A	NCBI. Genbank : QCY51967.1 (12 June 2019). See entire document.	1-17,19-20,22-23
A	KR 10-2007-0032786 A (MOLMED SPA) 22 March 2007. See entire document.	1-17,19-20,22-23
A	REDAELLI, M. et al. Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-armed bovine herpesvirus type 4-based vector displays enhanced oncolytic properties in immunocompetent orthotopic syngenic mouse and rat glioma models. Neuro-Oncology. 2012, vol. 14, no. 3, pp. 288-301. See entire document.	1-17,19-20,22-23
A	KR 10-2019-0059421 A (BIONOXX INC.) 31 May 2019. See entire document.	1-17,19-20,22-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2020

Date of mailing of the international search report

16 October 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea
35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008472

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2019-0080806 A (BIONOXX INC.) 08 July 2019. See claims 11-12, 18-22 and 24-30, and sequence identifier nos. 1 and 7-8.	1-14,19,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008472

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18, 21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

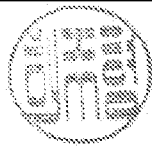
Claims 18 and 21 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/008472

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014-153258	A2	25 September 2014	CN	105246337	B	15 February 2019
				CN	110129344	A	16 August 2019
				CN	105555954	A	04 May 2016
				CN	105246337	A	13 January 2016
				CN	105555954	B	26 March 2019
				EP	2967078	B1	17 October 2018
				EP	2967078	A1	20 January 2016
				EP	2970945	A2	20 January 2016
				JP	2019-219412	A	26 December 2019
				JP	2016-524590	A	18 August 2016
				JP	2016-519570	A	07 July 2016
				US	2019-0328904	A1	31 October 2019
				US	2018-0264137	A1	20 September 2018
				US	2018-0236101	A1	23 August 2018
				US	10610603	B2	07 April 2020
				US	10350302	B2	16 July 2019
				US	2020-0179533	A1	11 June 2020
				US	2014-0294772	A1	02 October 2014
				US	2014-0288163	A1	25 September 2014
				US	9999683	B2	19 June 2018
				US	9925276	B2	27 March 2018
				WO	2014-153205	A1	25 September 2014
				WO	2014-153258	A3	08 January 2015
KR	10-2007-0032786	A	22 March 2007	CN	101010428	B	02 October 2013
				CN	101010428	A	01 August 2007
				EP	1781789	A2	09 May 2007
				EP	1781789	B1	17 August 2011
				JP	5091669	B2	05 December 2012
				JP	2008-502342	A	31 January 2008
				KR	10-1337210	B1	06 December 2013
				US	2019-0070312	A1	07 March 2019
				US	2015-0231275	A1	20 August 2015
				US	2014-0178345	A1	26 June 2014
				US	2013-0028876	A1	31 January 2013
				US	2009-0130069	A1	21 May 2009
				US	8357788	B2	22 January 2013
				US	8642311	B2	04 February 2014
				US	9005945	B2	14 April 2015
				US	10155052	B2	18 December 2018
				US	10314925	B2	11 June 2019
				WO	2005-123912	A2	29 December 2005
				WO	2005-123912	A3	04 May 2006
KR	10-2019-0059421	A	31 May 2019	WO	2019-103449	A2	31 May 2019
				WO	2019-103449	A3	18 July 2019
KR	10-2019-0080806	A	08 July 2019	KR	10-2020-0019645	A	24 February 2020
				KR	10-2077648	B1	14 February 2020
				WO	2019-132596	A1	04 July 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 7/00(2006.01)i, C12N 9/12(2006.01)i, A61K 31/522(2006.01)i, A61K 35/768(2014.01)i, A61K 38/45(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 7/00; A61K 35/768; A61K 48/00; C12N 15/54; C12N 9/00; C12N 9/12; A61K 31/522; A61K 38/45; A61P 35/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:HSV(herpes simplex virus), TK(thymidine kinase), 이펙터 도메인(effector domain), 항암바이러스(anticancer virus), GCV(ganciclovir), ACV(acyclovir), 암(cancer), 예방(prevention), 치료(treatment)																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2014-153258 A2 (EPEIUS BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 2014.09.25 요약, 청구항 1, 27, 45, 52-53, 단락 [0119], [0141], [0292], 서열번호 3-5</td> <td>1-14, 19-20, 22-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>15-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, Genbank : QCY51967.1 (2019.06.12) 전체 문헌</td> <td>1-17, 19-20, 22-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2007-0032786 A (몰메드 에스피에이) 2007.03.22 전체 문헌</td> <td>1-17, 19-20, 22-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>REDAELLI, M. 등, "Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-armed bovine herpesvirus type 4-based vector displays enhanced oncolytic properties in immunocompetent orthotopic syngenic mouse and rat glioma models", Neuro-Oncology, 2012, 제14권, 제3호, 페이지 288-301 전체 문헌</td> <td>1-17, 19-20, 22-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2019-0059421 A (주식회사 바이오녹스) 2019.05.31 전체 문헌</td> <td>1-17, 19-20, 22-23</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	WO 2014-153258 A2 (EPEIUS BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 2014.09.25 요약, 청구항 1, 27, 45, 52-53, 단락 [0119], [0141], [0292], 서열번호 3-5	1-14, 19-20, 22-23	A		15-17	A	NCBI, Genbank : QCY51967.1 (2019.06.12) 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23	A	KR 10-2007-0032786 A (몰메드 에스피에이) 2007.03.22 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23	A	REDAELLI, M. 등, "Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-armed bovine herpesvirus type 4-based vector displays enhanced oncolytic properties in immunocompetent orthotopic syngenic mouse and rat glioma models", Neuro-Oncology, 2012, 제14권, 제3호, 페이지 288-301 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23	A	KR 10-2019-0059421 A (주식회사 바이오녹스) 2019.05.31 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
X	WO 2014-153258 A2 (EPEIUS BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 2014.09.25 요약, 청구항 1, 27, 45, 52-53, 단락 [0119], [0141], [0292], 서열번호 3-5	1-14, 19-20, 22-23																					
A		15-17																					
A	NCBI, Genbank : QCY51967.1 (2019.06.12) 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23																					
A	KR 10-2007-0032786 A (몰메드 에스피에이) 2007.03.22 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23																					
A	REDAELLI, M. 등, "Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-armed bovine herpesvirus type 4-based vector displays enhanced oncolytic properties in immunocompetent orthotopic syngenic mouse and rat glioma models", Neuro-Oncology, 2012, 제14권, 제3호, 페이지 288-301 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23																					
A	KR 10-2019-0059421 A (주식회사 바이오녹스) 2019.05.31 전체 문헌	1-17, 19-20, 22-23																					
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신 에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명 은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2020년 10월 16일 (16.10.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 10월 16일 (16.10.2020)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																					

국제 조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2020/008472

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2019-0080806 A (주식회사 바이오녹스) 2019.07.08 청구항 11-12, 18-22, 24-30, 서열번호 1, 7-8	1-14, 19, 22

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 18, 21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 18, 21은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-153258 A2	2014/09/25	CN 105246337 A	2016/01/13
		CN 105246337 B	2019/02/15
		CN 105555954 A	2016/05/04
		CN 105555954 B	2019/03/26
		CN 110129344 A	2019/08/16
		EP 2967078 A1	2016/01/20
		EP 2967078 B1	2018/10/17
		EP 2970945 A2	2016/01/20
		JP 2016-519570 A	2016/07/07
		JP 2016-524590 A	2016/08/18
		JP 2019-219412 A	2019/12/26
		US 10350302 B2	2019/07/16
		US 10610603 B2	2020/04/07
		US 2014-0288163 A1	2014/09/25
		US 2014-0294772 A1	2014/10/02
		US 2018-0236101 A1	2018/08/23
		US 2018-0264137 A1	2018/09/20
		US 2019-0328904 A1	2019/10/31
		US 2020-0179533 A1	2020/06/11
		US 9925276 B2	2018/03/27
		US 9999683 B2	2018/06/19
		WO 2014-153205 A1	2014/09/25
		WO 2014-153258 A3	2015/01/08
KR 10-2007-0032786 A	2007/03/22	CN 101010428 A	2007/08/01
		CN 101010428 B	2013/10/02
		EP 1781789 A2	2007/05/09
		EP 1781789 B1	2011/08/17
		JP 2008-502342 A	2008/01/31
		JP 5091669 B2	2012/12/05
		KR 10-1337210 B1	2013/12/06
		US 10155052 B2	2018/12/18
		US 10314925 B2	2019/06/11
		US 2009-0130069 A1	2009/05/21
		US 2013-0028876 A1	2013/01/31
		US 2014-0178345 A1	2014/06/26
		US 2015-0231275 A1	2015/08/20
		US 2019-0070312 A1	2019/03/07
		US 8357788 B2	2013/01/22
		US 8642311 B2	2014/02/04
		US 9005945 B2	2015/04/14
		WO 2005-123912 A2	2005/12/29
		WO 2005-123912 A3	2006/05/04
KR 10-2019-0059421 A	2019/05/31	WO 2019-103449 A2	2019/05/31
		WO 2019-103449 A3	2019/07/18
KR 10-2019-0080806 A	2019/07/08	KR 10-2020-0019645 A	2020/02/24
		KR 10-2077648 B1	2020/02/14

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2019-132596 A1

2019/07/04