



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월13일
(11) 등록번호 10-0802403
(24) 등록일자 2008년02월01일

(51) Int. Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7009410

(22) 출원일자 2002년07월22일

심사청구일자 2005년12월09일

번역문제출일자 2002년07월22일

(65) 공개번호 10-2002-0080383

(43) 공개일자 2002년10월23일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2001/000229

국제출원일자 2001년01월22일

(87) 국제공개번호 WO 2001/53506

국제공개일자 2001년07월26일

(30) 우선권주장

0001475.3 2000년01월21일 영국(GB)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.92,
pp.1411-1415

전체 청구항 수 : 총 7 항

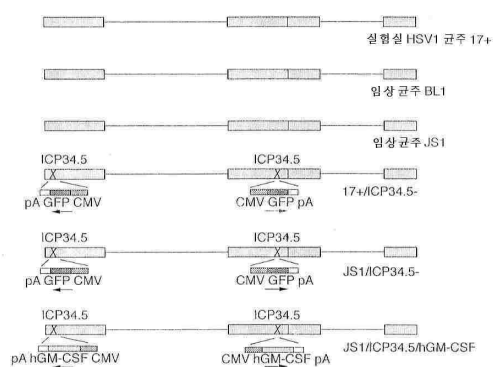
심사관 : 박정민

(54) 바이러스 주

(57) 요약

본 발명은 실험실 바이러스 주(laboratory virus strain)와 대비되는 종양분해(oncolytic) 및/또는 유전자전달(gene delivery) 능력을 제공하는 예를 들어, HSV와 같은 허피스 바이러스(herpes virus)의 비실험실 바이러스 주(non-laboratory strain)에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 시에라리온

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 모잠비크, 스와질랜드, 시에라리온, 우간다, 짐바브웨, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

(30) 우선권주장

0002854.8 2000년02월08일 영국(GB)
0100288.0 2001년01월05일 영국(GB)
0100430.8 2001년01월06일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

기탁번호(accession number) 01010209로 ECACC(European Collection of Cell Cultures)에 기탁된 HSV1 균주 JS1 또는 이들로부터 유래된 HSV1 균주인 변이된 종양분해 비실험실 허피스 단순포진 바이러스 주(modified, oncolytic, non-laboratory herpes simplex virus(HSV) strain)를 포함하는 암의 종양분해 치료제.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 HSV 균주는 기능성 ICP34.5-코딩 유전자가 결실된 것을 특징으로 하는
암의 종양분해 치료제.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 HSV 균주는 기능성 ICP47 유전자가 추가적으로 결실된 것을 특징으로 하는
암의 종양분해 치료제.

청구항 7

제 1항, 제 5항 및 제 6항의 어느 한 항에 있어서,

상기 비실험실 허피스 단순포진 바이러스 주는 과립구 마크로파지 콜로니-생성촉진인자(granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 단백질을 암호화하는 외래유전자(heterologous gene)를 추가로 포함하는
것을 특징으로 하는

암의 종양분해 치료제.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

기탁번호(accession number) 01010209로 ECACC(European Collection of Cell Cultures)에 기탁된 HSV1 균주 JS1 또는 이들로부터 유래된 HSV1 균주.

청구항 18

제 17항에 있어서,

기능성 ICP34.5 유전자 및 선택적으로, 기능성 ICP47 유전자가 결실되고; 및 선택적으로, GMCSF를 암호화하는 외래유전자를 추가적으로 포함하도록 변이되는 것을 특징으로 하는

JS1으로부터 유래된 HSV1 균주.

청구항 19

제 17항 또는 제 18항의 HSV 및 억제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 종양치료제.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 실험실 바이러스 주(laboratory virus strain)와 대비되는 종양분해(oncolytic) 및/또는 유전자전달(gene delivery) 능력을 제공하는 예를 들어, HSV와 같은 허피스 바이러스(herpes virus)의 비실험실 바이러스 주(non-laboratory strain)에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 바이러스는 많은 경우에 생명공학과 의학분야에서 다양한 응용으로 이용될 수 있다고 제시되었거나 이용이 입증되었다. 이것은 바이러스가 높은 효율로 세포내로 침투할 수 있는 독특한 능력에 기인한다. 이러한 능력은 바이러스 유전자의 발현과 복제 및/또는 삽입된 외래유전자(heterologous gene)의 발현으로의 응용으로 이어졌다. 따라서, 바이러스는 예를 들어, 유전자치료 또는 백신개발을 위해 이용될 수 있는 세포내로 유전자(바이러스 또는 다른 유전자)를 전달하고 발현할 수 있거나, 또는 예를 들어, 세포분해 복제(lytic replication)나 전달된 유전자의 작용에 의하여 암(cancer)만을 선택적으로 죽이도록 이용될 수 있다.
- <3> 허피스 단순포진 바이러스(herpes simplex virus)는 신경계와 다른 세포에서 유전자 전달백터로서, 그리고 암의 종양분해 치료(oncolytic treatment)를 위하여 이용될 수 있다고 제시되었다. 그러나, 상기 두 응용에서 바이러스는 여전히 세포내로 침투하여 바람직한 기능을 수행할 수 있지만, 더 이상 병원성은 없도록 손상되어야 한다. 따라서, HSV를 이용한 목적세포에 비독성(non-toxic) 유전자 전달을 위하여, 대부분의 경우에 급발성초기 유전자(immediate early gene)의 발현은 바이러스로부터 억제되거나/최소화되어야만 한다. 또한, 치료효과를 증진하기 위한 유전자(들)의 전달을 포함할 수 있는 암의 종양분해 치료를 위하여, 바이러스는 배양시 또는 생체내 조건에서의(*in vivo*) 활발히 분열하는 세포(종양에서와 같은)내에서는 여전히 복제할 수 있지만, 정상 조직내에서는 현저한 복제는 방지되는 HSV의 수 많은 돌연변이가 확인되었다. 상기 돌연변이는 ICP34.5, ICP6 및 티미딘 키나제(thymidine kinase)를 암호화하는 유전자의 파괴를 포함한다. 이들 중에서, ICP34.5의 돌연변이 또는 예를 들어, ICP6과 함께 ICP34.5가 돌연변이된 바이러스가 현재까지는 가장 바람직한 안전한 대상으로 나타났다. ICP34.5만이 결실된 바이러스는 실험실적 조건에서(*in vitro*) 많은 종양세포형에서 복제하고, 주위의 조직은 손상시키지 아니하면서 생쥐의 인공적으로 유도된 뇌종양에서만 선택적으로 복제함을 나타내었다. 또한, 초기 임상실험실의 결과이지만, 인간에게 역시 안전하다고 나타났다.
- <4> 그러나, HSV를 포함한 다양한 바이러스가 암의 유전자 전달/치료 또는 종양분해 치료에 대한 밝은 전망을 제시하였지만, 상기 연구는 대부분 여러 해동안 조직배양 세포내에서 유지되어온 바이러스 주를 사용하였다. 바이러스가 단순히 세포에 침투하여 유전자를 전달하는 것이 목적인 응용에서는, 바이러스의 세포배양내 유지 자체가 바이러스의 세포내 침투를 필요로 하므로, 비록 종종 다른 형 또는 종의 세포를 백터에 적합한 유사한 목적 세포(target cell)와 비교하기는 하지만, 상기 문제는 입증할 필요가 없을지 모른다. 그러나, 다른 특성이 요구되는 응용에서는, 실험실 바이러스 주의 사용으로는 특정 응용에서 바이러스의 충분한 능력을 활용하지 못할 수 있다.
- <5> HSV는 신경세포(neuron)에 침투하고 잠복하여 유지되도록 자연적으로 진화되었다는 점에서, 현재 백터로의 개발 중인 바이러스 중 독특한 능력을 갖고 있는 바이러스다. HSV는 또한, 통상 말초부위(periphery)인 감염부위로부터 통상 척추신경절(spinal ganglia)인 신경세포체(neuron cell body)로 신경을 따라 매우 효율적으로 운반되도록 진화하였다. 상기 능력은 세포배양을 필요로 하지 아니하고 HSV의 특이적 진화된 특성을 요구하는 것이

므로, 배양시 성장에 대한 점차적 적응으로, 경우에 따라 효율적인 축색돌기(axon) 운반능력이 상실되는 결과를 가져올 수 있다. 만일 축색돌기 운반특성이 최대효율로 유지된다면, 중추 또는 말초신경계에 유전자 전달을 위한 HSV 벡터는 최대효율을 나타낼 것이다. 이때, 여기서 말단부위에 접종은 말초 신경세포체에 최대효율로 유전자 전달을 가능하게 하고, 뇌에 접종은 다중연락사(multiple connected site)에 최대효율로 유전자 전달을 가능하게 한다. HSV의 실험실 주에 기초한 현재의 벡터들로는 상기 전달이 최대효율로 일어나지 않을 수 있다. 정말로, 신경을 따라 운반되어지는 HSV의 뛰어난 능력때문에, 유지되는 것이 바람직한 특성과 배양시에 보유될 것 같은 특성간에는 잠재적으로 특별히 커다란 차이가 있다.

- <6> HSV 및 아데노(aden-) 또는 레오바이러스(rheovirus)와 같은 다른 바이러스 또한 암의 종양분해 치료에 이용될 가능성이 있다. 그러나, 다시 상기 목적을 위하여 개발중인 바이러스는 이미 대규모적으로 배양되어 유지되어 왔다. 암의 종양분해 치료는 자주 상대적으로 느리게 성장하는 사람 종양세포내에서 활발한 복제를 요구하므로, 실험실 바이러스 주가 특정한 배양세포내 성장으로 적응된다면, 경우에 따라 사람 종양세포내 세포 분해 복제 또는 사람 종양세포에 감염효율의 감소가 발생할 수 있다.

발명의 상세한 설명

<7> 본 발명의 요약

- <8> 본 발명은 생체내 조건(*in vivo*)에서 향상된 유전자 전달능력 및/또는 종양세포를 세포분해로 파괴할 수 있는 바이러스를 개발하는 방법을 제공한다. 여기서, 바이러스 주는 예전부터 사용되어온 연속적으로 계대된 실험실 주(laboratory strain)이기 보다는 상기 목적에 적합하도록 적당한 바이러스의 최근의 임상 분리주(clinical isolate)에 기초하여 제작되는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 생체내 조건에서 사람세포에 감염할 수 있는 향상된 능력, 전기 세포에서 향상된 복제/세포분해능력, 및 (HSV의 경우에 한정)신경을 따라 접종부위로부터 신경세포체로 향상된 이동능력을 갖는 바이러스의 제공을 가능하게 한다. 본 발명은 HSV를 이용하여 예시화하였지만, 현재 벡터로서 개발 중인 다른 바이러스 및/또는 암세포의 종양분해 파괴를 위해서도 동일하게 응용가능하다.

- <9> 우리는 두가지 HSV의 임상 분리주(JS1 및 BL1 균주)가 HSV1 균주 17+(표준 실험실 주)와 비교하여, 사람 종양세포주에서 향상된 복제능력을 가짐을 제시하였다.

- <10> 다시, 우리는 임상 분리주 JS1 균주로부터 ICP34.5를 결실시켰고, 또한 ICP34.5가 결실된 HSV1 균주 17+(표준 실험실 주)와 비교를 통하여 사람 종양세포형에서 복제능력을 비교하였다. 상기 균주(JS1/ICP34.5-)는 임상 분리주로부터 유도된 변이주(modified strain)이고, 따라서 본 발명의 변이된 비실험실 주(modified non-laboratory strain)이다.

- <11> ICP34.5가 결실된 JS1은, 동일하게 변이된 실험실 바이러스 주인 ICP34.5가 결실된 HSV1 균주 17+와 비교하였을 때, 시험된 사람 종양세포에서 향상된 성장을 나타내었다. 그러나, 균주 17+로부터 유도된 실험실 주와 비교하였을 때, 세포를 죽이는 능력은 시험된 모든 종양세포주에서 JS1/ICP34.5- 바이러스를 갖는 경우에 향상되었다.

- <12> 따라서, 비실험실 바이러스 주의 사용은 상기 바이러스의 항종양 능력을 증진시키는 것으로 보이며, 지금까지 시험된 모든 종양세포주에서 입증되었다. 이것은 사람 환자의 암치료에 적용될 수 있을 것이다.

- <13> 이때, 상기 바이러스가 항종양 활성을 갖는 유전자를 전달하도록 이용된다면, 또한 추가적으로 향상된 항종양 활성을 기대할 수 있다. 상기 유전자는 프로드러그 활성화제(pro-drug activator), 종양억제제(tumour suppressor) 또는 프로-주사수증 인자(pro-apoptotic factor) 또는 면역촉진 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한다.

- <14> 상기 목적을 위하여, 우리는 사람 GMCSF를 발현하는 ICP34.5가 결실된 HSV1의 임상 분리주를 생산하였다. 상기 바이러스는 종양내(intra-tumoral) 접종후에 항종양 면역반응을 증진하도록 고안된다.

- <15> 본 발명은 또한 외래유전자/유전자들(heterologous gene/genes)을 운반하는 본 발명의 바이러스를 제공한다. 외래유전자(heterologous gene)라는 용어는 바이러스 게놈(viral genome)에서 발견되지 않는 어떤 유전자를 받아들이는 의미이다. 외래유전자는 야생형 유전자의 대립형질 변이체(allelic variant)이거나 돌연변이 유전자일 수 있다. 외래유전자는 생체내 조건의 세포에서 전기 외래유전자를 발현하게하는 조절서열(control sequence)에 작동가능하도록 연결되는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 바이러스는 외래유전자가 발현될

수 있는 생체내 조건의 세포에 외래유전자/유전자들을 전달하도록 사용될 수 있다. 종양분해 바이러스 치료를 위하여, 상기 유전자는 통상적으로 바이러스의 종양과괴 특성을 증진할 수 있는 단백질을 암호화한다. 상기 유전자는, 그 자체가 세포독소(cytotoxin)이거나 프로-드러그를 활성화시키거나 또는 항종양 면역반응을 촉진/항상시킬 수 있는, 단백질을 암호화할 수 있다. HSV를 이용한 말초신경계에 유전자 전달을 위하여, 외래유전자/유전자들은 고통자극에 대한 반응을 변화시키거나 만성적 고통을 감소시킬 수 있는 폴리펩티드, 예를 들어 신경성장인자(nerve growth factor), 다른 고통조절 항신경성 인자(neurotrophic factor) 또는 항신경성 인자류의 분자, 또는 물질 P(substance P) 또는 다른 신경펩티드(neuropeptide)와 같은 격리시킬 수 있는 단백질을 암호화할 수 있다. 외래유전자/유전자들은 또한 손상된 신경의 재생장을 촉진하거나 퇴행성 조건하에서 신경의 추가적인 퇴행을 방지할 수 있는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 중추신경계에서, 외래유전자는 파킨슨씨 질병(Parkinson's disease) 또는 알츠하이머 질병(Alzheimer's disease)과 같은 신경퇴행성 질병에 잠재적으로 유익한 것을 포함할 수 있고, 통상적으로 전기 질병내 잔존하는 세포의 활성을 증진시킬 수 있는 항신경성 인자 및/또는 효소를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 모든 경우에, 단일 또는 복수의 외래유전자는 단일 바이러스에 의하여 운반될 수 있다.

- <16> 따라서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- <17> 변이된 종양분해 비실험실 바이러스 주(modified, oncolytic, non-laboratory virus strain)의 암의 종양분해 치료를 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <18> 외래유전자를 포함하는 변이된 복제능력이 없는(replication incompetent) 비실험실 바이러스 주의 개체에 전기 유전자의 전달을 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <19> 유전자가 말초신경계 질병과 연관된 표현형 또는 말초신경계 질병과 관련있는 말초신경계 세포에 효과가 있는지를 측정하는 방법에 있어서, 다음을 포함하는 방법:
- <20> (i) 외래유전자를 포함하는 본 발명의 복제능력이 없는 허피스 바이러스를 말초신경에 접종하는 단계; 및,
- <21> (ii) 전기 유전자가 전기 질병과 관련된 효과가 있는지를 측정하기 위하여, 질병의 표현형 또는 유전자의 발현의 효과를 세포에서 모니터링하는 단계;
- <22> 유전자가 중추신경계 질병과 연관된 표현형 또는 중추신경계 질병과 관련있는 중추신경계 세포에 효과가 있는지를 측정하는 방법에 있어서, 다음을 포함하는 방법:
- <23> (i) 본 발명의 복제능력이 없는 허피스 바이러스를 중추신경계 세포에 접종하는 단계; 및,
- <24> (ii) 전기 유전자가 전기 세포 또는 전기 표현형에 효과가 있는지를 측정하기 위하여, 질병의 표현형 또는 유전자의 발현의 효과를 세포에서 모니터링하는 단계;
- <25> 유전자가 병원성 감염 또는 암과 관련된 항원을 암호화하는지를 측정하는 방법에 있어서, 전기 방법은 항원을 암호화하는 외래유전자를 포함하는 본 발명의 복제능력이 없는 바이러스를 수상세포(dendritic cell) 또는 매크로파지(macrophage)에 감염시키는 단계 및, 전기 유전자가 전기 감염 또는 암과 연관된 항원을 암호화하고 그 자체가 치료적 잠재력이나 치료중계를 위한 목표가 되는지를 측정하기 위하여, 유전자의 폴리펩티드 산물의 항원제시(antigen presentation), 유전자의 발현효과, 또는 병원성 감염 또는 암의 표현형을 모니터링하는 단계를 포함한다;
- <26> 다음을 포함하는 비실험실 바이러스 주의, 이하에서 정의된 변이된 균주로의 변이가 적합한지를 측정하는 방법:
- <27> (i) 선택적으로, 숙주로부터 비실험실 바이러스 주를 분리하는 단계;
- <28> (ii) 전기 비실험실 바이러스 주를 제공하는 단계;

- <29> (iii) 하나 또는 그 이상의 바람직한 특성의 측면에서 전기 바이러스의 특성을 평가하는 단계; 및, 선택적으로,
- <30> (iv) 바람직한 특성을 갖는 변이 바이러스 주를 선별하는 단계;

- <31> 다음을 포함하는 비실험실 바이러스 주의, 본 발명의 변이된 종양분해 균주로의 변이가 적합한지를 측정하는 방법:
- <32> (i) 선택적으로, 숙주로부터 비실험실 바이러스 주를 분리하는 단계;
- <33> (ii) 하나 또는 그 이상 형태의 종양세포에서 전기 바이러스의 성장을 평가하는 단계; 및 선택적으로,
- <34> (iii) 높은 성장속도 또는 세포를 죽이는 능력을 갖는 변이 바이러스 주를 선별하는 단계;

- <35> 다음을 포함하는 비실험실 바이러스 주의, 변이된 종양분해 균주로의 변이가 적합한지를 측정하는 방법:
- <36> (i) 비실험실 바이러스 주, 선택적으로 상기에서 정의된 방법에 의하여 선별된 균주를 제공하는 단계;
- <37> (ii) 종양분해를 하도록 전기 균주를 변이시키는 단계; 및
- <38> (iii) 전기 변이된 종양분해 비실험실 주가 종양세포를 죽이는 능력을 평가하는 단계; 및 선택적으로
- <39> (iv) 추가적인 변이를 위한 고종양 세포-죽이는 능력을 나타내는 균주를 선별하는 단계; 및 선택적으로,
- <40> (v) 추가적인 변이를 수행하는 단계;

- <41> 다음을 포함하는, 유전자가 바이러스의 항종양 효과를 증진시키는지를 측정하는 방법:
- <42> (i) 본 발명의 변이된 종양분해 비실험실 주를 제공하는 단계;
- <43> (ii) 전기 유전자를 외래유전자로서 전기 바이러스에 삽입하는 단계;
- <44> (iii) 단계 (i)에서 제공된 전구 균주(precursor strain)의 능력과 비교함으로써, 전기 변이된 종양분해 비실험실 주가 종양세포를 죽이는 능력을 평가하는 단계;

- <45> 다음을 포함하는, 변이된 종양분해 비실험실 바이러스 주를 생산하는 방법:
- <46> (i) 숙주로부터 바이러스의 비실험실 주를 분리하는 단계;
- <47> (ii) 선택적으로, 상기에서 정의된 변이가 적합한지를 측정하는 단계; 및
- <48> (iii) 전기 균주가 종양을 분해하도록 변이시키는 단계, 및 선택적으로
- <49> (iv) 추가적인 변이를 수행하는 단계;

- <50> 다음을 포함하는, 변이된 비실험실 바이러스 주를 생산하는 방법:
- <51> (i) 바이러스의 비실험실 주를 제공하는 단계;
- <52> (ii) 전기 균주가 복제능력이 없도록 변이시키는 단계 및,
- <53> (iii) 외래유전자를 삽입하는 단계;

- <54> 이하에서 정의된 변이된 종양분해 비실험실 바이러스 주;
- <55> 이하에서 정의된 외래유전자를 포함하는 변이된 비실험실 바이러스 주;

- <56> 상기에서 정의된 방법에 의한, 말초신경계 질병과 연관된 표현형 또는 말초신경계 질병과 관련있는 말초신경계 세포에 효과가 있음이 확인된 유전자, 또는 전기 유전자에 의하여 암호화되는 유전자 산물의 말초신경계 질병의 치료를 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <57> 상기에서 정의된 방법에 의한, 중추신경계 질병과 연관된 표현형 또는 중추신경계 질병과 관련있는 중추신경계 세포에 효과가 있음이 확인된 유전자, 또는 전기 유전자에 의하여 암호화되는 유전자 산물의 중추신경계 질병의 치료를 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <58> 상기에서 정의된 방법에 의한, 병원성 감염 또는 암과 연관된 항원을 암호화하는 것으로 확인된 유전자, 또는 전기 유전자에 의하여 암호화되는 항원의 전기 감염 또는 암의 치료 또는 예방을 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <59> 본 발명의 방법에 의하여 동정(identification)되거나 그 과정 동안에 생산된 비실험실 바이러스 주;
- <60> 상기에서 정의된 방법에 의한, 바이러스의 항종양 효과를 증진시키는 것으로 확인된 유전자, 또는 전기 유전자에 의하여 암호화되는 유전자 산물의 암의 치료 또는 예방을 위한 약물의 제조를 위한 용도;
- <61> 본 발명의 방법에 의하여 얻어지거나 얻어질수 있는 변이된 비실험실 바이러스 주;
- <62> 가기탁번호(provisional accession number) 01010209로 유럽종균협회(European Collection of Cell Cultures, ECACC)에 기탁된 HSV1 균주 JS1, 또는 이들로부터 유래된 HSV1 균주, 상기 바이러스를 포함하는 의약조성물; 상기 바이러스의 사람 또는 동물의 몸의 치료를 위한 용도;
- <63> 본 발명의 종양분해 바이러스의 유효량을 사람에게 투여하는 단계를 포함하는, 전기 사람의 종양을 치료하는 방법;
- <64> 본 발명의 종양분해 바이러스의 유효량을 사람에게 투여하는 단계를 포함하는, 유전자를 전기 사람에게 전달하는 방법; 및
- <65> 본 발명의 항신경성 바이러스의 유효량을 이를 필요로하는 사람의 말초신경에 투여하는 단계를 포함하는, 중추 말초신경계 질병을 치료하거나 예방하는 방법.

실시예

- <158> 다음의 실시예들이 본 발명을 설명한다.
- <159> 신경독성 인자(neurovirulence factor) ICP34.5가 약화된 허피스 단순포진 형-1 바이러스(herpes simplex type-1 virus, HSV)는 실험실적 조건과 생체내 조건에서 모두 종양모델의 종양특이적 세포분해를 지시하는 것으로 나타났다. 상기 바이러스는 또한 말기의 신경교종 환자에게 직접적인 대뇌 내부로의 접종으로 일단계 임상 실험실에서 안전성이 입증되었다.
- <160> 종전의 연구는, 보다 최근의 임상 분리주와 비교하여 사람 종양세포에서 세포분해능력이 약화되었다고 예상될 수 있는 HSV1의 연속적으로 계대된 실험실 분리주(HSV1 균주 17+ 또는 HSV1 균주 F로부터 유도된 바이러스)를 사용하였다.
- <161> 증진된 종양분해와 항종양능력을 갖는 ICP34.5 결실된 HSV를 생산하기 위한 목적의 연구에서, 우리는 HSV1 임상

분리주로부터 ICP34.5를 결실시켰고, HSV1 균주 17+(표준 실험실 균주)와 비교하여, 수 많은 사람 종양세포형에서 복제능력과 세포분해능력을 비교하였다.

<162> 바이러스 구조(Virus Construction)(도 1 참조)

<163> 사용된 바이러스는 HSV1 균주 17+(표준 실험실 균주) 또는 HSV1의 빈번한 재활성화제로부터 냉각통증으로부터 유도된 2가지 임상 분리주에 기초하였다. 상기 균주들에게 BL1 및 JS1이라는 이름을 붙였다. CMV-GFP 카세트의 삽입과 함께 균주 17+ 및 JS1로부터 ICP34.5를 완전히 결실시켰다. ICP34.5 유전자를 교체하기 위하여, 또한 추가적으로 사람 또는 생쥐 GM-CSF의 삽입에 의하여 JS1을 설계하였다. 따라서, BL1 및 JS1은 임상 분리주이거나 "비실험실(non-laboratory)" 주이다. 이하에서 설명되는 JS1의 유도체는 또한 비실험실 분리주, 즉 본 발명의 변이된 비실험실 주이다.

<164> 종양세포내에서 바이러스의 성장(Virus Growth in Tumour Cells)(도 2 참조)

<165> 72시간 이상의 기간동안 시험하였을 때(참조 도 2), JS1 및 BL1은 HSV1 ICP34.5 결실된 균주 17+와 비교하여 시험된 사람 종양세포에서 향상된 성장을 나타내었다. 추가적인 연구를 위하여 JS1을 선택하였고 상기에서 설명된 변이(도 1 및 상기 내용 참조)를 하였다.

<166> 바이러스의 세포분해능력(Lytic Capabilities of Viruses)(도 3 참조)

<167> 세포분해(세포 죽이는)능력이 시험된 모든 종양세포주에서 바이러스 유도된 JS1-유도된 비실험실 주로 증진되었다. 보다 구체적으로, 도 3을 참조하여, JS1/34.5-바이러스 즉, 결실에 의하여 제거된 ICP34.5를 갖는 JS1은, HT29 결장암, LNCaP.FGC 전립선암, MDA-MB-231 유방암, SK-MEL-28 악성종양 및 U-87 MG 신경아세포종 성상세포종 세포에서 증진된 세포분해능력을 나타내었다.

<168> 또한 다양한 투여량과 균주 17+와 비교하여 BL1, JS1의 감염후에, 감염된 세포의 트립판블루(trypan blue) 배척 분석에 의하여 SK-MEL-28, MDA-MB-231 및 HT29 세포에서 세포분해능력을 평가하였다. 트립판블루는 살아있는 세포로부터 배척되므로, 배양내에 남아있는 살아있는 세포의 수가 상기 방법으로 평가될 수 있다. 6개의 웰 디쉬(well dish)의 복제 웰내에서 배양된 종양세포주들, 17+, BL1 또는 JS1으로 0.1 또는 1의 MOI에서 24, 48 또는 72시간 동안 감염시키고, 살아있는 세포 수를 계산하였다. 등가의 비감염된 대조군 웰에 대한 살아있는 세포 수의 퍼센트를 도 1에 나타내었다.

<169> 따라서, 모든 경우에, 실험실 분리주 17+보다는 임상 분리주 바이러스 BL1 및 JS1이 보다 많은 종양세포를 죽였고, 증가된 종양분해 활성을 제공하기 위한 최근의 임상 바이러스 주의 용도는 암치료를 위한 사람 환자에게 사용될 때, 종양 선택적 복제(예를 들어, ICP34.5의 결실에 의한)를 제공함에 의하여 변이된 상기 바이러스의 항종양 능력을 증진시킬 것이다.

표 1

<170>

세포주	감염 후 경과시간	JS=1		17		BL1	
		MOI=0.1	MOI=1	MOI=0.1	MOI=1	MOI=0.1	MOI=1
		비감염된 대조 웰에 대한 살아있는 세포 수의 퍼센트					
SK-MEL-28	24시간 복제 시료	41	8	57.3	19	43.7	6.67
		33.7	7	62.6	19.3	39	6.33
	48시간	5.51	1.9	7.4	3.7	4.5	0.8
		5.05	0.8	7.1	2.6	4.8	1.1
	72시간	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0

MDA-MB-231	24시간	44.91	16.7	69.37	36.34	55.63	26.79
		44.02	16.96	65.8	34.55	60.45	25.27
	48시간	14.1	4.7	27.9	8.3	18	6.7
		13.5	3.8	27	8.5	20	8.3
	72시간	0	0	2.91	0.73	1.46	0
		0	0	2.91	1.27	1.64	0
HT-29	24시간	37.53	15	47.28	23.61	42.22	22.15
		39.24	15	45.76	24.24	43.04	21.33
	48시간	13.2	2.3	29.4	4.2	18.4	4.4
		14	3	27.7	4.7	21.2	3.7
	72시간	0	0	1.57	0	1.64	0
		0	0	1.89	0	1.57	0

<171> 추가적인 증진된 항종양 활성(Futher Enhanced Anti-Tumour Activity)

<172> 이때, 상기 바이러스가 항종양 활성을 갖는 유전자를 전달하는데 이용된다면, 추가적인 증진된 항종양 활성을 또한 예상할 수 있다. 상기 유전자는 프로-드러그 활성화제 또는 면역촉진 단백질을 암호화하는 것을 포함한다.

<173> 이러한 목적을 위하여, 우리는 JS1로부터 사람 또는 생쥐 GM-CSF를 발현하는 HSV1의 ICP34.5 결실된 임상 분리주를 생산하였다. 상기 바이러스는 종양내에 접종한 이후에 항종양 면역반응을 증진시키도록 고안된다.

<174> 참조(Reference)

<175> Chou *et al.*, 1990, Science 250:1262-1266

<176> Maclean *et al.*, 1991, J. Gen. Virol. 72:631-639

<177> Samaniego *et al.*, 1998, J. Virol. 72:3307-3320

<178> Krisky *et al.*, 1998, Gene Therapy 5:1593-1603

<179> Thomas *et al.*, 1999, J. Virol. 73:7399-7409

<180> MacFarlane *et al.*, 1992, J. Gen. Virol. 73:285-292

<181> Howard *et al.*, 1998, Gene Therapy 5:1137-1147

<182> Samaniego LA *et al.*, 1995, J. Virol. 69:5705-5715

<183> Ace CI *et al.*, 1989, J. Virol. 63:2260-2269

<184> Smith IL *et al.*, 1992, Virol. 186:74-86

<185> Rice, SA and Knipe DM, 1990, J. Virol. 64:1704-1715

<186> DeLuca NA *et al.*, 1985, J. Virol. 56:558-570

<187> Gossen M & Bujard H, 1992, PNAS 89:5547-5551

<188> Gossen M *et al.*, 1995, Science 268:1766-1769

<189> Smiley, J.R. & Duncan J., 1997, J. Virol. 71:6191-6193

<190> Thompson *et al.*, 1998, Virus Genes 1(3):275-286

<191> Meignier *et al.*, 1998, J. Infect. Dis. 159:602-604

<192> 기탁정보(Deposit Information)

<193> HSV1 균주 JS1이 가기탁번호 01010209로 2001년 1월 2일에 영국 윌트셔(Wiltshire) SP4 0JG 살리스버리(Salisbury) CAMR에 위치하는 유럽종균협회(European Collection of Cell Cultures, ECACC)에 기탁되었다.

도면의 간단한 설명

도 1. 바이러스

상단에서 하단으로, 도 1은 다음을 나타낸다: 실험실 HSV1 균주 17+, 임상 균주 BL1, 임상 균주 JS1, 17+/ICP34.5-, JS1/ICP34.5-, JS1/ICP34.5-/ICP47-/hGMCSF

도 2. 임상 분리주는 종양세포에서 향상된 성장을 나타낸다.

(1) 17+, BL1 및 JS1의 성장. 좌측의 도면: U87세포. 우측의 도면: LNCaP 세포

(2) 종양세포에서 ICP34.5- 17+ 및 JS1의 성장. 좌측의 도면: LNCaP 세포. 우측의 도면: MDA-MB-231 세포.

(3) JS1/34.5-는 HSV ICP34.5 돌연변이체에 대하여 복제를 허용하지 않는(non-permissive) 세포에서는 성장하지 못한다. 좌측 도면: 3T6 세포-17+, JS1. 우측 도면: 3T6 세포-17+, JS1 ICP34.5-.

도 3. ICP34.5가 제거된 HSV 임상 분리주는 시험된 모든 종양세포에서 증진된 재분해작용을 나타낸다.

지시된 MOI에서 모크(mock), HSV 균주 17+/34.5- 또는 HSV1 균주 JS1/34.5-로 종양세포주를 감염시키고, 감염 이후에 정해진 시각에 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 세포를 시각화(visualization)하였다. 각각의 사진블럭은 세포형에 관한 것이다. 상단에서 하단으로, 이들은 HT29 결장암(colorectal adenocarcinoma), LNCaP.FGC 전립선암(prostate adenocarcinoma), MDA-MB-231 유방암(breast adenocarcinoma), SK-MEL-28 악성종양(malignant melanoma) 및 U-87 MG 신경아세포종 성장세포종(glioblastoma astrocytoma)을 나타낸다. 좌측 블럭은 HSV1 균주 17+/34.5-에 대한 결과에 관한 것이다. 우측 블럭은 HSV1 균주 JS1/34.5-에 대한 결과에 관한 것이다. 중앙 블럭은 모크 감염된 세포를 나타낸다. 각각의 블럭내에서, 상단 열은 24시간 경과 후를, 2번째 열은 48시간 경과 후를, 그리고 3번째 열은 72시간 경과 후를 나타낸다. 각각의 블럭내에서, 좌측 행은 MOI=0.2를, 중앙 행은 MOI=0.1을, 그리고 우측 행은 MOI=5를 나타낸다.

발명에 대한 상세한 설명

A. 바이러스(Virus)

본 발명의 바이러스 주(Virus Strains of the invention)

본 발명은 일반적으로 바이러스에 적용가능하다. 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 허피스 바이러스(herpes virus), 아데노바이러스(adenovirus), 피코나바이러스(picornavirus), 레트로바이러스(retrovirus) 또는 알파 바이러스(alphavirus) 균주 중의 하나일 것이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 바이러스 주는 허피스 바이러스 주일 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 바이러스 주는 허피스 단순포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 균주, 통상적으로 HSV1 또는 HSV2이다.

본 발명의 바이러스가 허피스 단순포진 바이러스일때, 전기 바이러스는 예를 들어, HSV1 또는 HSV2 균주, 또는 이것의 유도체, 바람직하게는 HSV1으로부터의 유도체일 수 있다. 유도체는 HSV1 및 HSV2로부터 DNA를 포함하는 혼합형 재조합체(inter-type recombinant)를 포함한다. 상기 혼합형 재조합체는 예를 들어, 톰슨 등(참조: Thompson *et al.*, 1998) 및 메이그너 등(참조: Meignier *et al.*, 1988)에서 종래의 기술로 설명된다. 바람직하게는, 유도체는 HSV1 또는 HSV2 게놈(genome)에 최소한 70%의, 보다 바람직하게는 최소한 80%의, 가장 바람직하게는 최소한 90% 또는 95%의 서열 동일성(sequence homology)을 갖는다. 보다 바람직하게는, 유도체는 HSV1 또는 HSV2 게놈에 최소한 70%의 서열 동일성을, 보다 바람직하게는 최소한 80%의 동일성을, 가장 바람직하게는 최소한 90%, 95% 또는 98%의 동일성을 갖는다.

- <79> 예를 들어, UWGCG 패키지는 동일성을 계산하기 위하여 이용될 수 있는(예를 들어, 설정치(default) 세팅에서 사용되는) BESTFIT 프로그램을 제공한다(참조: Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research, 12:387-395). PILEUP과 BLAST 알고리즘은, 예를 들어 알취술 등(참조: Altschul, 1993, J. Mol. Evol., 36:290-300; Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410)이 설명하는 방식으로 서열 동일성 또는 정렬화(line up sequence)을 계산하기 위하여 사용될 수 있다.
- <80> BLAST 분석을 수행하는 소프트웨어는 국립생물공학정보원(National Center Biotechnology Information)을 통하여 공개적으로 이용가능하다(참조: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). 상기 알고리즘은 첫째로 데이터베이스 서열내의 동일한 길이의 단어와 정렬시켰을 때, 어떤 긍정치를 나타내는 역치 값 T와 일치하거나 만족시키는 쿼리 서열(query sequence)내 짧은 길이의 단어 W를 확인함에 의하여, 높은 측정치 서열쌍(high scoring sequence pair, HSP)을 확인하는 것이다. T는 근접단어 측정역치(neighborhood word score threshold)로 불린다(참조: Altschul *et al.*, 1990). 상기 최초의 근접단어 일치가 이들을 포함하는 HSP를 발견하기 위한 탐색을 시작하는 근원(seed)으로 작용한다. 상기 단어 일치는 누적적인 정렬 측정치가 증가할 수는 최대치로 각 서열을 따라 양 방향으로 확장된다. 양 방향에서 상기 단어 일치의 확장은 다음과 같을 때 중단된다: 누적적 정렬 측정치가 최대 달성치로부터 X 양 만큼 감소될 때; 하나 또는 그 이상의 부정적-측정 잔기의 정렬의 축적으로 인하여, 누적적 측정치가 영(0) 또는 그 이하로 될 때; 또는 어떤 서열의 말단에 도달할 때. 상기 BLAST 알고리즘 매개변수 W, T와 X가 상기 정렬의 민감도와 속도를 결정한다. 상기 BLAST 프로그램은 설정치로서 11 단어 길이(W), 50의 BLOSUM62 측정행렬(참조: Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:10915-10919) 정렬(B), 10의 기대값(E), M=5, N=4 및 양 사슬의 비교를 이용한다.
- <81> 상기 BLAST 알고리즘은 두 서열간에 유사성의 통계적 분석을 수행한다(참조: 예를 들어, Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:5873-5787). BLAST 알고리즘에 의하여 제공되는 유사성의 측정치는 가장 작은 확률함(P(N))이고, 이것은 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열간의 동일이 우연히 발생할 수 있는 확률값을 제공한다. 예를 들어, 첫번째 서열과 두번째 서열의 비교시에 가장 작은 확률함의 값이 약 1이하이고, 바람직하게는 약 0.1 이하이고, 보다 바람직하게는 약 0.01 이하이고, 가장 바람직하게는 약 0.001 이하라면, 첫번째 서열은 두번째 서열과 유사하다고 판단된다.
- <82> 유도체는 예를 들어, 1, 2 또는 3 내지 10, 25, 50 또는 100 치환되는, 뉴클레오타이드 치환에 의하여 변이되는 HSV1 또는 HSV2 계통 서열을 갖을 수 있다. 상기 HSV1 또는 HSV2 계통은 하나 또는 그 이상 뉴클레오타이드의 삽입 및/또는 결실 및/또는 한쪽 말단 또는 양방향 말단에서 확장에 의하여 다른 방식으로 또는 추가적으로 변이될 수 있다.
- <83> 본 발명의 바이러스 주의 특성(Properties of Virus Strain of the invention)
- <84> 본 발명의 바이러스는 "비실험실(non-laboratory)" 주이다. 이것은 또한 "임상(clinical)" 균주로 언급될 수 있다. 종래의 기술의 당업자라면, 실험실 주와 비실험실 주 또는 임상 균주를 쉽게 구별할 수 있을 것이다. 바이러스 주가 나타낼 것 같은 특성에 관한 추가적인 소개는 하기에 제시된다.
- <85> 실험실 및 비실험실 주 사이의 구별의 핵심은 현재 널리 사용되는 실험실 주는 장기간 동안, 몇 가지 경우에는 여러해 동안 배양되어 유지되어온 것이다. 바이러스를 성장시키고 유지하기 위하여, 바이러스를 적당한 세포에 감염시키고, 바이러스를 세포내에서 복제시킴, 이후에 바이러스를 수확한다; 그 이후에, 신선한 세포에 재감염시킨다. 상기 과정이 연속된 계대의 한 사이클을 구성한다. 상기 각 사이클은, 예를 들어 HSV의 경우에 며칠을 요구할 수 있다. 상기에서 논의한 바와 같이, 예를 들어, 선택이, HSV의 경우에 축색돌기를 따라 이동하는 능력의 유지와 같은 실질적인 적용을 위한 유용한 특성에는 반대되지만 배양시에 성장을 지지하는(예를 들어, 빠른 복제와 같은) 특성에 관하여 발생할 수 있다는 점에서, 상기 연속된 계대는 바이러스 주의 특성에 있어서 변화를 가져올 수 있다.
- <86> 본 발명의 바이러스 주는 이들이 감염된 개체로부터 최근에 분리된 균주로부터 유도된 것이라는 점에서 비실험실 주이다. 본 발명의 균주는 본래의 임상 분리주와 비교해서는 변이된 것이고 짧은 시간동안 배양된 것일 수 있지만, 배양에 소비된 시간은 비교적 단기간일 것이다. 본 발명의 균주는 실질적으로 이들이 유도된 본래의 임상 분리주의 바람직한 특성을 보유하고 있는 방식으로 제작된다.
- <87> 본 발명의 바이러스는 목적 사람세포를 효율적으로 감염시킬 수 있다. 상기의 바이러스를 감염된 개인으로부터 최근에 분리하고, 이후에 표준 실험실 바이러스와 비교하여 실험실적 조건(*in vitro*) 및/또는 생체내 조건(*in*

vivo)에서 종양 및/또는 다른 세포에서 바람직한 증진된 복제능력에 대하여, 또는 (HSV와 같은 항신경성 바이러스의 경우에) 생체내 조건모형을 이용하여 표준 실험실 주와 비교하여 신경을 따라서 이동하는 능력이 증진되는 지에 의하여, 선별(screening)하였다. 실험실 바이러스 주와 비교하여 향상된 특성을 나타내는 상기 바이러스가 본 발명의 바이러스이다. 상기 바람직한 향상된 특성을 나타내는 동정된 바이러스는 이후에 적당한 유전자(들)의 돌연변이에 의하여 선택적으로 종양세포를 죽일 수 있도록 설계될 수 있거나, 비종양분해 적용에서 독성 효과없이 목표조직에 유전자(들)를 전달할 수 있도록 돌연변이될 수 있다. 상기 변이된 바이러스 또한 본 발명의 바이러스이다. 다른 방식으로, 바이러스 주는 감염된 개인로부터 분리될 수 있고, 종양분해 치료 및/또는 유전자 전달에 적합하다고 예상되는 돌연변이가 이루어질 수 있다. 이후에 상기 변이된 바이러스는 실험실 주와 비교하여 바람직한 향상된 특성에 대하여 선별되고, 상기 향상된 특성을 갖는 바이러스 또한 본 발명이 제공하는 추가적인 바이러스이다.

- <88> 본 발명의 바이러스 주의 가능성 있는 특성에 대한 추가적인 소개는 다음과 같이 제공된다.
- <89> 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 숙주로부터 비변이된 임상 전구 균주의 분리 이후에 3년 또는 그 이하의 기간 동안 배양된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 균주는 1년 또는 그 이하의 기간 예를 들어, 9개월 또는 그 이하, 6개월 또는 그 이하, 3개월 또는 그 이하, 또는 2개월 또는 그 이하, 1개월 또는 그 이하, 2주 또는 그 이하, 또는 1주 또는 그 이하와 같은 기간 동안 배양된다. 상기의 정의에 의하여, 배양시간은 배양에 소비된 실제 시간을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 바이러스 주를 보존하기 위하여, 이들은 동결하는 것은 흔한 관행이다. 명백히, 동결에 의한 또는 등가의 방식에 의한 보존은 배양으로 균주를 유지하는 것 만큼 적합하지는 않다. 배양에서 소비된 시간은 통상적으로 원하지 않는 특성에 대한 선택이 발생할 수 있는 시간과 같이, 연속된 계대를 시행하면서 실제 소비된 시간이다.
- <90> 바람직하게는 본 발명의 바이러스 주는 숙주로부터 비변이된 임상 전구 균주의 분리이후에 1,000회 또는 그 이하의 연속된 계대를 거친다. 보다 바람직하게는 상기 균주는 500회 또는 그 이하, 100회 또는 그 이하, 90회 또는 그 이하, 80회 또는 그 이하, 70회 또는 그 이하, 60회 또는 그 이하, 50회 또는 그 이하, 40회 또는 그 이하, 30회 또는 그 이하, 20회 또는 그 이하, 또는 10회 또는 그 이하의 계대를 거친다.
- <91> 바람직하게는 본 발명의 바이러스는 표준통계시험에 의하여 측정되었을 때, 즉시 적용가능한 기능을 수행하는 등가의 변이를 갖는 참조 실험실 주보다 더 강력한 능력을 갖는다. 예를 들어, 종양치료를 위한 종양분해 바이러스의 경우에, 본 발명의 바이러스 주는 바람직하게는 어떤 종양세포를 감염시키거나 종양세포에서 복제하거나, 종양세포를 죽이거나 또는 조직내 세포간에 전파되는, 등가의 변이를 갖는 참조 실험실 주보다 더 강력한 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 더 강력한 능력은 통계적으로 현저히 강력한 능력이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 균주는 시험된 특성의 측면에서 참조균주의 능력에 비하여, 1.1배, 1.2배, 1.5배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 또는 100배까지 갖을 수 있다.
- <92> 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 즉, 즉시 적용가능한 유용한 특성의 하나 또는 그 이상의 측면에서 실질적으로 비변이된 임상 전구 균주의 능력을 보유한다. 예를 들어, 종양치료를 위한 의도의 종양분해 바이러스의 경우에, 본 발명의 바이러스는 바람직하게는 종양세포를 감염시키거나 종양세포에서 복제하거나, 종양세포를 죽이거나 또는 조직내 세포간에 전파되는, 실질적으로 비변이된 임상 전구 균주의 능력을 갖는다.
- <93> 바람직하게는, 본 발명에 따른 바이러스는 정량적 시험에서 시험된 특성의 측면에서 비변이된 임상 전구 균주의 능력의 75%, 보다 바람직하게는 80, 90, 95, 98, 99 또는 100%를 보유하는, 실질적으로 비변이된 임상 전구 균주의 특성을 보유한다. 보다 바람직하게는, 시험된 특성의 측면에서, 비변이된 임상 전구 균주와 본 발명의 변이된 균주간의 차이는 통계적으로 현저하지 않을 것이다.
- <94> 여기서 설명되는 특성의 통계적 분석은 예를 들어, t-테스트, ANOVA 또는 카이스퀘어 테스트(Chi squared test)에 의하여 수행될 수 있다. 통상적으로, 통계적 유효성은 $p=0.05(5\%)$, 보다 바람직하게는 $p=0.01$, $p=0.001$, $p=0.0001$, $p=0.000001$ 의 수준에서 측정될 것이다.
- <95> 변이(Modification)
- <96> 본 발명의 바이러스는 그의 전구 임상 균주와 비교하여 통상적으로 변이된다. 구체적으로, 어떤 유전자들은 통상적으로 비기능적으로 될 것이고, 또한 상기 바이러스는 외래유전자(들)를 포함할 수 있다. 통상적으로, 본 발명의 바이러스는 약화(attenuation)된다.

- <97> 여기서 설명되는 목적을 위하여 변화되는 바이러스 부위는 결실되거나(완전히 또는 부분적으로) 비기능적으로 되거나, 또는 다른 서열, 구체적으로 외래유전자 서열에 의하여 치환될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 유전자는 비기능적이 되거나 또는 하나 또는 그 이상의 외래유전자가 삽입될 수 있다.
- <98> 본 발명의 종양분해 바이러스(*Oncolytic Viruses of the Invention*)
- <99> 한 실시예에 있어서, 본 발명의 바이러스는 변이된 종양분해 비실험실 바이러스이다. 상기 바이러스는 암의 종양분해 치료에 유용할 것이다. 상기 바이러스는 종양세포를 감염시키고 종양세포에서 복제하며, 그 이후에 종양세포를 죽인다. 따라서, 상기 바이러스는 복제능력이 있다. 바람직하게는, 상기 바이러스는 종양세포에 선택적으로 복제능력이 있다. 이것은 상기 바이러스가 종양세포에서는 복제할 수 있지만, 비종양세포에서는 불가능하거나, 상기 바이러스가 비종양세포보다 종양세포에서 보다 효과적으로 복제함을 의미한다. 복제와 종양세포-죽이는 능력의 측정을 위하여, 선택적인 복제 적응성의 측정은 이하에서 설명되는 시험에 의하여 수행될 수 있고, 또한 바람직하다면 여기서 언급되는 통계기법에 의하여 분석될 수 있다.
- <100> 본 발명의 종양분해 바이러스는 바람직하게는 종양세포를 감염시키거나 종양세포에서 복제하거나, 종양세포를 죽이거나 또는 조직내 세포간에 전파되는, 바람직하게는 동일하게 변이된 참조 실험실 주보다 더 강력한 능력을 갖는다. 바람직하게는, 상기 능력은 이하에서 설명되는 통계적으로 현저히 강력한 능력이다. 종양세포의 측면에서, 바이러스 주의 특성은 종래의 기술로 알려진 어떤 방식으로든 측정될 수 있다.
- <101> 예를 들어, 바이러스가 종양세포를 감염시킬 수 있는 능력은 세포의 남겨진 퍼센트 예를 들어, 세포의 50% 또는 80%를 측정하기 위하여 필요로되는 바이러스의 투여량을 측정함에 의하여 정량화될 수 있다. 종양세포에서 복제할 수 있는 상기 능력은 실시예(도 2 참조)에서 수행된 것과 같은 성장측정에 의하여, 예를 들어 6, 12, 24, 36, 48 또는 72시간 또는 그 이상의 기간동안 세포내 바이러스의 성장을 측정함에 의하여, 측정될 수 있다.
- <102> 종양세포를 죽일 수 있는 바이러스의 능력은 대략 시각에 의하여 정량화되거나(도 3 참조), 보다 정확하게는 주어진 시간 간격으로 남아있는 살아있는 세포수와 주어진 세포형에 대한 MOI를 계산함에 의하여 정량화될 수 있다. 예를 들어, 24, 48 또는 72시간에 걸쳐서 어떤 알려진 종양세포형을 이용한 비교가 이루어질 수 있다. 구체적으로, HT29 결장암, LNCaP.FGC 전립선암, MDA-MB-231 유방암, SK-MEL-28 악성종양 또는 U-87 MG 신경아세포종 성상세포종 세포가 사용될 수 있다. 다른 종양세포형에서와 같이, 상기 세포형의 어느 하나 또는 세포형의 어떤 결합도 이용될 수 있다. 상기 목적을 위하여 종양세포의 표준 게시판(panel)을 구성하는 것이 바람직하다. 어느 주어진 시간에 남아있는 살아있는 세포 수를 계산함에 의하여, 트립판블루(trypan blue)-배척세포(즉, 살아있는 세포)의 수가 계산될 수 있다. 정량화는 또한 형광활성화된 세포분류법(fluorescence activated cell sorting, FACS) 또는 MTT 분석에 의하여 수행될 수 있다. 종양세포-죽이는 능력은 또한 예를 들어, 특정 바이러스에 의하여 발생된 종양부피의 감소를 측정함에 의하여, 생체내 조건에서 측정될 수 있다.
- <103> 바이러스가 조직, 구체적으로 고형조직(solid tissue)에 전파되는 능력은 본래의 감염부위에 연결된 부위에서 세포 수를 결정함에 의하여 측정될 수 있다.
- <104> 본 발명의 바이러스의 특성을 결정하기 위하여, 일반적으로 비교를 위한 표준 실험실 참조균주를 사용하는 것이 바람직할 것이다. 어떤 적당한 표준 실험실 참조균주가 사용될 수 있다. HSV의 경우에, HSV1 균주 17+, HSV1 균주 F 또는 HSV1 균주 KOS의 하나 또는 그 이상을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 참조균주는 통상적으로 시험된 본 발명의 균주의 등가적 변이체이다. 따라서, 참조균주는 통상적으로 유전자 결실 및/또는 외래유전자의 삽입과 같은 등가적으로 변이된 것이다. 예를 들어, HSV 균주의 경우에, ICP34.5 및 ICP47-코딩 유전자가 본 발명의 바이러스에 비기능성을 부여한다면, 또한 전기 유전자는 참조균주에도 비기능성을 부여할 것이다. 참조균주에 이루어진 상기 변이는 본 발명의 균주에 이루어진 변이와 동일할 것이다. 이러한 면에서, 참조균주의 유전자 파괴는 정확하게 본 발명의 균주의 유전자의 등가 위치에서 이루어지는 예를 들어, 결실은 동일한 크기와 위치에서 이루어질 것이다. 유사하게 상기 실시예에서, 외래유전자는 동일 위치에 삽입되어져 동일한 프로모터 등에 의하여 전사될 것이다. 그러나, 동일한 변이가 본질적인 것은 아니다. 중요한 것은 참조 유전자가 예를 들어, 동일 유전자가 비기능성을 부여하고/부여하거나 동일한 외래유전자 또는 유전자들이 삽입되는 것과 같은 기능적으로 등가의 변이를 갖는 것이다.
- <105> 본 발명의 종양분해 바이러스에서, 만일 자연적으로 존재하지 않는다면, 적당한 변이는 바이러스에 종양분해 활성을, 바람직하게는 선택적인 종양분해 활성을 부여할 것이다.

- <106> HSV의 경우에, 선택적 종양분해 활성을 가능하게 하는 상기 돌연변이는 ICP34.5, ICP6 및/또는 티미딘 키나제(thymidine kinase, TK)를, 바람직하게는 ICP 34.5를 암호화하는 유전자의 돌연변이를 포함한다. 비록 ICP34.5가 비기능적인 어떠한 돌연변이도 사용될 수 있지만, HSV의 실험실 주에 ICP34.5-코딩 유전자의 상기 돌연변이는 초우 등(참조: Chou *et al.*, 1990)과 맥클린 등(참조: Maclean *et al.*, 1991)에서 설명된다.
- <107> 따라서, HSV 균주에서, 상기 바이러스는 기능성 ICP34.5-코딩 유전자, 기능성 ICP6-코딩유전자, 기능성 당단백질 H-코딩 유전자, 기능성 티미딘 키나제-코딩 유전자의 하나 또는 그 이상이 결실되도록 변이됨이 바람직하다; 또는 비HSV 균주에서, 전기 바이러스는 전기 HSV 유전자의 하나와 등가물인 기능성 유전자가 결실된다.
- <108> 보다 바람직하게는, 상기 바이러스는 기능성 ICP34.5-코딩 유전자가 결실된다.
- <109> 다른 변이체가 또한 제작될 수 있다. 구체적으로, HSV의 경우에 바이러스는 기능성 ICP47 유전자가 결실되도록 변이될 수 있다. 이것은 ICP47이 통상 HSV-감염된 세포에서 항원제시를 차단하도록 기능하므로, ICP47의 파괴는 숙주의 면역계로부터 HSV 감염된 세포를 보호할 수 있는 특정 성질을 감염된 종양세포에게 부여할 수 없는 바이러스를 유도한다.
- <110> 종양분해 성질(즉, 주위조직과 비교하여 종양에서 선택적인 복제능력)을 제공하는 어떤 다른 유전자가 결실된/돌연변이된 바이러스 또한 본 발명의 바이러스이며, 종래의 기술분야의 당업자라면 상기 목록에 한정되지 아니하고 상기 바이러스 중에서 다른 유전자의 기능의 확인으로, 또한 본 발명의 바이러스인 신규한 바이러스의 제조를 제시할 수 있다.
- <111> 외래유전자(들)는 또한 종래에 알려지고/알려지거나 이하에서 설명되는 방법에 의하여 본 발명의 상기 바이러스에 삽입될 수 있다. 종양분해 바이러스에서, 외래유전자는 통상적으로 종양을 방해하는 바이러스의 능력을 증진시키는 유전자일 것이다. 따라서, 바이러스에 항종양 특성을 부여하는 어떤 유전자도 삽입될 수 있다. 구체적으로, 외래유전자는 유익한 방식으로, 구체적으로 CD40L, 과립구 마크로파지-콜로니-촉진인자(granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, GMCSF), 다른 시토카인(cytokine) 또는 케모카인(chemokine)(예를 들어, RANTES) B7.1 또는 B7.2 또는 IL12와 같은 면역촉진 폴리펩티드와 같은 종양세포에 면역반응을 변형시킬 수 있는 유전자일 것이다. 다른 방식으로, 외래유전자는 니트로환원제(nitroreductase) 또는 시토크롬 P450과 같은, 프로드러그 활성화제(pro-drug activator)를 암호화할 수 있다. 이런 문맥에서, 프로드러그 활성화제에 의하여 활성화된 프로드러그와 본 발명의 바이러스의 결합된 종양치료를 예상할 수 있다. 다른 방식으로, 외래유전자는 p53과 같은 종양억제제를 암호화할 수 있다.
- <112> 본 발명의 다른 바이러스 주(*Other Virus Strains of the Invention*)
- <113> 다른 실시예에서, 비종양분해 바이러스가 바람직하다. 상기 바이러스는 복제능력이 없는 바이러스이다. 상기 바이러스의 기능은 통상적으로 외래유전자를 개인에게 전달하는 것이다.
- <114> 구체적으로, 비종양분해 응용으로서 용도를 위하여, 바이러스의 조절 급발성초기 유전자(regulatory immediate early gene) 발현이 최소화되도록 돌연변이가 이루어질 수 있다. 따라서, ICP4, ICP27, ICP22 및/또는 ICP0를 암호화하는 유전자는 개별적으로 또는 결합하여 비활성화되거나 결실될 수 있거나, 비리온 트랜스활성화제(virion transactivator) 단백질 vmw65에 돌연변이는 트랜스-활성능력을 억제하거나/감소시킬 수 있다. 구체적으로, 비종양분해 응용을 위한 바람직한 실시예에서, ICP27, ICP0 및 ICP4를 암호화하는 유전자는 결실되거나 (ICP22 및/또는 ICP47의 추가적인 결실/비활성과 동시에 또는 없이) ICP27 및 ICP4는 vmw65에 비활성 돌연변이로 결실되거나 다시 vmw65에서 비활성 돌연변이를 갖고 ICP4가 결실된다. 상기 바이러스의 실시예는 사마니에고 등(참조: Samaniego *et al.*, 1998), 크리스키 등(참조: Krisky *et al.*, 1998) 또는 토마스 등(참조: Thomas *et al.*, 1999)에 의하여 보고된 바이러스를 포함한다.
- <115> *향신경성 바이러스 주(Neurotrophic Virus Strains)*
- <116> 향신경성 바이러스 주 및 구체적으로, HSV1 및 HSV2와 같은 허피스 단순포진 바이러스는, 본 발명에 따라 외래유전자를 신경계에 전달하기 위하여 사용될 수 있다.
- <117> 본 발명의 상기 실시예에 따른 바이러스는 통상적으로 신경세포(neuron)를 감염시키거나 신경조직내 세포간에 전파되거나 또는 축삭돌기내로 운반되는, 등가의 변이를 갖는 참조 실험실 주보다 더 강력한 능력을 갖는다.

신경세포에 감염할 수 있는 능력은 일반적으로 세포에 관하여 상기의 설정치에서 결정될 수 있다. 축색돌기내에서 운반되거나 신경조직내 세포간에 전파될 수 있는 능력은 본래의 감염부위와 연결부위에서 신경계에 세포감염을 측정하여 결정될 수 있다. 상기에서 설명한 바와 같이, 결과는 통계적으로 분석될 수 있다.

<118> 상기 실시예에서, HSV 균주에서 기능성 ICP27-코딩 유전자, 기능성 ICP4-코딩 유전자, 기능성 ICP0-코딩 유전자 또는 기능성 ICP22-코딩 유전자의 하나, 둘, 셋 또는 모든 것이 결실; 또는 비HSV 균주에서 전기 HSV 유전자의 하나와 등가물인 기능성 유전자가 결실; 및/또는 HSV 균주에서 vmw65 유전자의 돌연변이로 전기 유전자가 결실되어 전사-촉진 활성이 중단; 또는 비HSV 균주에서, vmw65 유전자와 등가물인 기능성 유전자의 돌연변이로 전기 유전자가 결실되어 전사-촉진 활성이 중단되도록, 변이되는 것이 바람직하다.

<119> 바람직하게는, ICP27, ICP4, ICP0 및 ICP22를 암호화하는 유전자의 둘 또는 그 이상이, 보다 바람직하게는 셋 이상이 및, 가장 바람직하게는 넷 모두가 비기능적이 되도록 한다. 바람직하게는, 상기 실시예에 따라, 본 발명의 바이러스는 ICP4를 암호화하는 기능성 유전자와 ICP27를 암호화하는 기능성 유전자 모두가 결실되고, vmw65를 암호화하는 유전자의 비활성화 돌연변이를 갖는 것은 전사촉진 활성이 중단된다.

<120> 상기 바이러스는 말초신경계 질병 또는 중추신경계 질병의 치료에 이용될 수 있다. 중추신경계 질병과 관련하여, ICP0, ICP4 ICP22 및 ICP27로부터 선택된 최소한 2개의 급발성초기 유전자는 비기능적이 되도록 하는 것이 특히 바람직하다.

<121> 면역치료 바이러스(Immunotherapeutic Viruses)

<122> 면역치료적 응용에서, 본 발명의 허피스 바이러스는 예를 들어, 마크로파지와 같은 수상세포(dendritic cell) 또는 면역계의 다른세포를 감염시키기 위하여 사용된다. 대개, 수상세포에 허피스 바이러스의 감염은 수상세포의 면역반응을 촉진하는 능력을 감소시킨다. 따라서, 수상세포에 의한 면역반응 촉진을 방해함이 없이 효율적으로 수상세포를 감염시킬 수 있도록, 본 발명의 바이러스는 변이된다(W000/08191). 상기 적용에서, 본 발명의 바이러스는 통상적으로 항원 유전자 산물을 암호화하는 외래유전자(들)를 포함한다. 이것은 병원성 감염 또는 암과 연관된 항원일 수 있다. 상기 유전자는 수상세포에서 발현되고, 유전자 산물은 수상세포의 표면에서 항원으로서 제시된다. 이것은 T세포를 활성화하여 항원에 대한 면역반응을 촉진하고, T세포는 표면에 항원을 나타내는 세포, 즉 종양 또는 병원성 세포 또는 병원균에 감염된 세포를 찾아서 이들을 파괴한다.

<123> 바람직하게는, HSV 균주에서 기능성 UL43 유전자, 및/또는 기능성 *vhs* 유전자의 결실, 또는 비HSV에서 UL43 및/또는 *vhs*의 기능적 등가물의 결실; 및 선택적으로 HSV 균주에서 vmw65 유전자의 돌연변이로 인한 전기 유전자의 결실로 전사-촉진 활성이 중단되거나, 비HSV 균주에서 vmw65와 등가물인 기능성 유전자의 돌연변이로 인한 전기 유전자의 결실로 전사-촉진 활성의 중단; 및 선택적으로 ICP0, ICP4, ICP22 및 ICP27로부터 선택된 최소한 하나의 기능성 급발성초기 유전자가 결실된다.

<124> 상기 문맥에서, 본 발명의 바이러스는 수상세포를 감염시키거나 면역반응을 촉진하는 등가의 변이를 갖는 참조 실험실 주보다 더 강력한 능력을 갖는 것이 바람직하다. 수상세포의 감염은 일반적으로 세포에 대하여 상기에서 설명한 바와 같이 측정될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 비실험실 바이러스 주는 통상적으로 두 균주의 투여량이 동일할 때, 참조 실험실 주보다 수상세포를 더 높은 비율로 감염시킬 것이다. 통계적인 분석이 상기에서 설명한 방법으로 수행될 수 있다.

<125> B. 상보적 세포주(Complementing cell lines)

<126> 본 발명의 바이러스가 특히 본질적인 기능의 유전자 예를 들어, ICP4 또는 ICP27을 암호화하는 유전자가 결실된 허피스 단순포진 바이러스일 때, 본 발명의 바이러스는 전기 본질적 유전자를 발현하는 세포주에서 증식된다. 예를 들어, 상기 바이러스가 기능적 ICP27 유전자를 상실하여도, 바이러스는 V27 세포(참조: Rice and Knipe, 1990), 2-2 세포(참조: Smith *et al.*, 1992) 또는 B130/2 세포(참조: Howard *et al.*, 1998)에서 증식될 수 있다. 바이러스가 기능성 ICP4 유전자를 상실하여도, 바이러스는 ICP4를 발현하는 세포주, 예를 들어 E5 세포(참조: DeLuca *et al.*, 1985)에서 증식될 수 있다. 바이러스가 기능성 ICP4 및 ICP27 유전자를 상실하여도, 바이러스는 ICP4 및 ICP27 모두를 발현하는 세포주(E26 세포와 같은; 참조: Samaniego *et al.*, 1995)에서 증식되고, 바이러스가 추가적으로 기능성 vmw65 유전자를 상실하여도, 바이러스는 또한 vmw65의 비HSV 동형체(homologue)(예를 들어, 토마스 등(참조: Thomas *et al.*, 1999)에서의 말 허피스 바이러스(equine herpes

virus)로부터 얻어진)를 포함하는 세포주에서 증식될 수 있다. vmw65의 돌연변이는 또한 바이러스 성장을 위하여 사용되는 배지(참조: MacFarlane *et al.*, 1992)내 헥사메틸렌 비스아세타미드(hexamethylene bisacetamide, HMB)의 주입에 의하여 부분적으로 상보될 수 있다.

<127> ICP27-발현하는 세포주가 포유동물 세포, 예를 들어 베로(Vero) 또는 BHK 세포에 벡터, 바람직하게는 전기 세포에서 발현될 수 있는 기능성 HSV ICP27 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 및 벡터, 바람직하게는 선택표지(selectable marker), 예를 들어 네오마이신(neomycin) 저항성을 암호화하는 플라스미드 벡터를 함께 형질전환(co-transfection)시켜서 생성될 수 있다. 이후에 선택표지를 포함한 클론이 선별되어 추가적으로 전기 클론이 예를 들어, 종래의 기술로 당업자에게 잘 알려진 방법(예를 들어, 라이스 및 크니프(참조: Rice and Knipe, 1990)에 의하여 설명된 방식으로)을 이용하여 ICP27-HSV 균주의 성장을 지원하는 능력을 기초로, 또한 기능성 ICP27를 발현하는지를 결정한다.

<128> ICP27 유전자를 포함하는 벡터가 ICP27-돌연변이 바이러스에 잔존하는 서열과 부분적으로 일치되는(즉, 동형체인) 서열을 포함하지 않도록 보장함으로써, ICP27-돌연변이 HSV 균주가 기능성 ICP27를 갖는 균주로 복귀하지 않는 세포주가 상기에서 설명한 바와 같이 생성된다.

<129> 본 발명의 HSV 균주는 다른 본질적인 유전자, 예를 들어 ICP4의 비활성화시키는 변이를 포함하여, 상보적 세포주는 ICP27에서 설명한 것과 동일한 방식으로 변이된 본질적 유전자를 보완하는 기능적 HSV 유전자를 포함할 것이다. 예를 들어, ICP27 및 ICP4 모두의 돌연변이를 포함하는 HSV 균주의 경우에, ICP27 및 ICP4 모두를 발현하는 세포주가 사용된다(사마니에고 등(참조: Samaniego *et al.*, 1995) 또는 토마스 등(참조: Thomas *et al.*, 1999)에서 설명된 방식과 같은). 다른 본질적 유전자를 발현하는 HSV 균주는 ICP27에서 설명한 것과 유사한 방식으로 제조될 수 있다. 여기서 다시, 잔존하는 바이러스 DNA간에 어떠한 부분적인 중복이 없고 바이러스 성장을 위하여 세포주내로 삽입되는 것이 확실하다면, 성장 동안에 바이러스가 덜 손상된 복귀체로 될 가능성은 최소화될 것이다.

<130> C. 돌연변이 방법(Methods of mutation)

<131> 언급된 다양한 바이러스 유전자는 종래의 기술로 알려진 여러 방법에 의하여, 기능적으로 비활성화되게 할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 유전자는 결실(들), 치환(들) 또는 삽입(들), 바람직하게는 결실에 의하여 기능적으로 비활성화되게 할 수 있다. 결실은 유전자의 일부분 또는 유전자 전체를 제거할 수 있다. 예를 들어, 단지 하나의 뉴클레오타이드의 결실이 이루어질 수 있고, 이것은 번역틀의 이동(frame shift)을 가져온다. 그러나 바람직하게는 커다란 결실 예를 들어, 총 암호화 및 비암호화(non-coding) 서열의 최소한 25%, 보다 바람직하게는 최소한 50%(또는 다른 방식으로, 절대치로서 최소한 10뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 최소한 100뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 최소한 1000뉴클레오타이드)의 결실이 이루어진다. 유전자 전체와 측면에 위치한 서열의 일부가 제거되는 것이 특히 바람직하다. 삽입된 서열은 하기에서 설명되는 외래유전자의 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다. vmw65 유전자의 경우에, 유전자 전체는 본질적 구조단백질을 암호화하므로 결실되지 않으나, IE 유전자를 전사적으로 활성화시키는 vmw65의 능력을 중단시키는 작은 비활성화 돌연변이가 이루어진다(참조: Ace *et al.*, 1989 또는 Smiley *et al.*, 1997).

<132> 당업자에게 종래의 기술로 잘 알려진 동형재조합(homologous recombination)에 의하여 허피스 바이러스에 돌연변이가 이루어진다. 예를 들어, HSV 게놈 DNA가 동형체 HSV 서열에 의하여 돌연변이된 측면서열을 포함하고, 벡터 바람직하게는 플라스미드 벡터와 함께 형질전환된다. 돌연변이된 서열은, 통상적인 기법에 의하여 이루어지는 결실(들), 삽입(들) 또는 치환(들)을 포함할 수 있다, 삽입은, 예를 들어 β -갈락토시다제(galactosidase) 활성 또는 형광(fluorescence)으로 재조합 바이러스를 선별하기 위하여, 선택표지 유전자, 예를 들어 lacZ 또는 GFP를 포함할 수 있다.

<133> D. 외래유전자 및 프로모터(Heterologous genes and promoters)

<134> 본 발명의 바이러스는 외래유전자/유전자들을 운반하기 위하여 변이될 수 있다. "외래유전자(heterologous gene)"라는 용어는 어떤 유전자도 포함할 수 있다. 비록 외래유전자가 통상적으로 허피스 바이러스의 게놈내에 존재하지 않는 유전자이기기는 하지만, 암호화 서열이 자연적으로 연관된 바이러스 조절서열에 작동가능하게 연결되어있지 않다면, 허피스 유전자/유전자들이 이용될 수 있다. 외래유전자는 야생형 유전자의 어떤 대립형질 변이체이거나, 돌연변이 유전자일 수 있다. "유전자(gene)"라는 용어는 최소한 전사될 수 있는 핵산 서열을 포함

하려는 의도이다. 따라서, mRNA, tRNA 및 rRNA를 코딩하는 서열은 상기 정의내에 포함된다. 그러나, 본 발명은 tRNA 및 rRNA 보다는 폴리펩티드의 발현에 관한 것이다. mRNA를 코딩하는 서열은 선택적으로 전사된 5' 및/또는 3'의 일부 또는 모두를 포함할 것이지만, 측면서열은 자연적으로 번역되지는 아니하거나 또는 그렇지 않다면, 번역된 암호화서열과 관련될 것이다. 이것은 선택적으로 추가적으로 전사된 서열과 보통 연관되는 전사연관 조절서열(associated transcriptional control sequence) 예를 들어, 전사중지서열(transcriptional stop signal), 폴리아데닐레이션 부위(polyadenylation site) 및 다운스트림 인핸서 엘리먼트(downstream enhancer element)를 포함한다.

- <135> 외래유전자/유전자들은 예를 들어, HSV 서열이 측면에 위치하는 외래유전자/유전자들을 운반하는 플라스미드 벡터와 HSV 균주의 동형재조합에 의하여 바이러스 게놈내로 삽입될 수 있다. 외래유전자/유전자들은 종래의 기술로 잘 알려진 클로닝 기술을 이용하여 허피스 바이러스 서열을 포함하는 적당한 플라스미드 벡터내로 도입될 수 있다. 바이러스가 여전히 증식될 수 있다면, 외래유전자/유전자들은 바이러스 게놈의 어느 위치에도 삽입될 수 있다. 외래유전자/유전자들은 필수유전자(essential gene)내로 삽입되는 것이 바람직하다. 외래유전자는 바이러스 게놈내에 복수의 부위에 삽입될 수 있다.
- <136> 외래유전자/유전자들의 전사된 서열은 포유동물 세포, 바람직하게는 종양세포 또는 신경계 세포내에서 외래유전자/유전자들을 발현하게 하는 조절서열에 작동가능하게 연결되는 것이 바람직하다. "작동가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어는 설명하려는 요소(component)가 그것의 의도된 방식으로 기능하도록 위치되는 관계로 병치(juxtaposition)되는 것을 가리킨다. 암호화서열에 "작동가능하게 연결된(operably linked)" 조절서열은 코딩서열의 발현이 조절서열과 양립되는 조건하에서 발현되는 방식으로 결합(ligation)된다.
- <137> 조절서열은 외래유전자/유전자들의 발현을 허락하는 프로모터 및 전사의 종결을 위한 신호를 포함한다. 프로모터는 포유동물, 바람직하게는 사람, 신경계의 세포 또는 종양 또는 면역계의 세포에서 기능하는 프로모터로부터 선택된다. 프로모터/프로모터들은 진핵생물 유전자의 프로모터 서열로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 외래유전자의 발현이 일어나는 세포, 바람직하게는 포유동물의, 보다 바람직하게는 사람세포의 게놈으로부터 유도될 수 있다. 진핵생물의 프로모터란 면에서, 이것은 어느 곳에서나 일어나는 방식(β -액틴(actin), 튜블린(tubulin)과 같은) 또는 다른 방식으로, 신경세포-특이적 에놀라제(neuron-specific enolase, NSE) 프로모터와 같은 조직-특이적 방식으로 기능하는 프로모터일 수 있다. 이것은 또한 특이 자극에 반응하는 프로모터, 예를 들어 스테로이드 호르몬 수용체에 결합하는 프로모터일 수 있다. 바이러스 프로모터는 또한 예를 들어, 몰로니 쥐백혈병 바이러스(Moloney murine leukaemia virus, MMLV) 장말단반복(long terminal repeat, LTR) 프로모터 또는 다른 레트로바이러스 프로모터, 사람 또는 생쥐 시토크갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) IE 프로모터, 또는 잠복기와 연관된 전사체의 발현을 유도하는 것을 포함하는 허피스 바이러스 유전자의 프로모터가 사용될 수 있다.
- <138> 외래유전자/유전자들 및 조절서열을 포함하는 발현 카세트 및 다른 적당한 구성물은 종래의 기술의 당업자에게 잘 알려진 통상적인 클로닝 기법(참조: 예를 들어, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Press)을 이용하여 제조될 수 있다.
- <139> 외래유전자의 발현수준을 세포의 성장기 동안에 조절될 수 있도록 하기 위하여, 또한 유도 프로모터(inducible promoter)를 사용하는 것이 유리할 수 있다. "유도(inducible)"는 프로모터를 이용하여 얻어지는 발현수준이 조절될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 하나 이상의 외래유전자가 HSV 게놈내로 삽입되는 바람직한 실시예에 있어서, 하나의 프로모터는 이미 알려진 테트억제제(tet repressor)/VP16 전사활성화제(transcriptional activator) 융합단백질에 반응하는 프로모터를 포함하고(참조: Gossen and Bujard, 1992, Grossen *et al.*, 1995), 조절될 수 있는 외래유전자의 발현을 유도한다. 두번째 프로모터는 테트억제제/VP16 융합단백질의 발현을 유도하는 강력한 프로모터(예를 들어, CMV IE 프로모터)를 포함한다. 따라서, 상기 실시예에서, 첫번째 외래유전자의 발현은 테트라사이클린의 존재 또는 부재에 의존한다.
- <140> 외래유전자는 통상적으로 치료용도의 폴리펩티드를 암호화할 것이다. 예를 들어, 비종양분해 응용의 신경계에서 고통을 조절할 수 있는 유전자는 신경의 재생장을 촉진하거나 신경퇴화를 예방한다. 종양분해 응용에서, 외래유전자는 그 자체가 세포독소(cytotoxin)인 단백질을 암호화하거나, 프로드러그를 활성화시키는 효소 또는 항종양 면역반응을 촉진하거나 향상시킬 수 있는 단백질을 암호화할 수 있다.
- <141> 외래유전자는 또한 표지유전자(예를 들어, β -갈락토시다제 또는 녹색형광 단백질(green fluorescent protein) 또는 다른 형광단백질) 또는 산물이 다른 유전자의 발현을 조절(예를 들어, 상기에서 설명된 테트억제제/vmw65 전사활성화제 융합단백질을 포함하는 전사조절 인자)하는 유전자를 포함할 수 있다.

- <142> 유전자 치료 및 다른 치료 응용은 당연히 복수의 유전자의 투여를 필요로 한다. 복수의 유전자의 발현은 다양한 조건에서 치료를 유리하게 할 수 있다. 허피스 바이러스는 다른 바이러스 벡터체계와 달리 패키징화 능력이 제한되지 아니하므로 독특하게 적합하다. 따라서, 복수의 외래유전자가 게놈내에 수용될 수 있다. 예를 들어, 2 내지 5 유전자가 게놈내에 삽입될 수 있다.
- <143> 예를 들어, 이것의 달성을 위해서는 최소한 2가지 방법이 있다. 예를 들어, 하나 이상의 외래유전자 및 연관된 조절서열이 바이러스 게놈내 단일부위 또는 복수의 부위에서 특정 HSV 균주내로 도입될 수 있다. 또한, 서로에서 떨어져 위치하는 반대방향으로 마주보는 프로모터 한쌍(동일 또는 다른 프로모터)을 사용하는 것이 가능하고, 이들 프로모터는 각각 상기에서 설명한 바와 같이, 외래유전자(동일하거나 다른 외래유전자)의 발현을 유도한다.
- <144> E, 치료용도(Therapeutic uses)
- <145> 본 발명의 바이러스는 치료방법에서 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 종양분해(oncolytic) 바이러스는 예를 들어, 직접적인 종양내부에 접종에 의하여, 암의 종양분해 치료를 포함하는 응용에서 이용될 수 있다. 바이러스가 프로-드러그 활성화제를 암호화하는 외래유전자를 포함할 때, 추가적인 프로-드러그 치료가 수행될 수 있다. 추가적으로, 치료는 종래에 알려진 어떤 수단에 의한 면역반응과도 결합하거나 촉진될 수 있다. 본 발명의 바이러스는 포유동물, 바람직하게는 사람에서 어떤 고형종양의 치료에 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 바이러스는 전립선암(prostate carcinoma), 유방암, 폐암, 간암, 자궁내막암(endometrial carcinoma), 방광암, 결장암 또는 경부암(cervical carcinoma); 선암(adenocarcinoma); 흑색종(melanoma); 임파종(lymphoma); 신경교종(glioma); 또는 연성조직(soft tissue)과 같은 부위의 육종(sarcoma) 및 골육종(bone sarcoma)에 걸린 개체에 투여될 수 있다.
- <146> 본 발명의 복제능력이 없는 바이러스는 유전자 치료를 필요로 하는 개인에게 유전자의 전달로 이용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 향신경성 바이러스는 중추 또는 말초신경계의 질병을 치료하는데 이용될 수 있다. 치료나 예방을 위한 바람직한 중추신경계 질병은 신경퇴행성 질병을 포함한다. 구체적으로 치료나 예방을 위한 바람직한 중추신경계 질병은 뇌졸중(stroke), 파킨슨씨 질병(Parkinson's disease), 알츠하이머씨 질병(Alzheimer's disease), 타이사치스 질병(Tay Sachs disease) 및 점막성다당류 질병(mucopolysaccharide disease)이다. 치료나 예방을 위한 바람직한 말초신경계 질병은 동력신경세포 질병(motor neuron disease), 만성 고통 및 말초신경 손상을 포함한다.
- <147> 본 발명의 면역치료 바이러스는 항원이 삽입된 외래 암호화유전자와 연관되는 병원성 감염 또는 암의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- <148> F. 투여(Administration)
- <149> 따라서, 본 발명의 바이러스는 치료가 필요한 병자, 바람직하게는 사람 환자에게 이용될 수 있다. 본 발명의 바이러스는 암의 종양분해 치료를 위하여, 그리고 본 발명의 허피스 바이러스는(종양분해 응용에 추가하여) 예를 들어, 고통, 신경계의 퇴행성 상태의 치료 또는 신경의 재생장을 촉진하기 위하여 이용될 수 있다. 치료의 목적은 환자의 상태를 호전시키는 것이다. 통상적으로 본 발명의 바이러스를 이용한 치료는 질병의 증상 또는 치료된 환자의 상태를 완화시킬 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 치료방법은 본 발명의 바이러스의 치료적 유효량을 암, 고통, 신경퇴행 상태 또는 신경손상으로 고생하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- <150> 종양으로 인하여 고통받는 환자에게 본 발명의 종양분해 바이러스의 투여는 통상적으로 종양세포를 죽일 것이므로, 종양의 크기를 감소시키고/감소시키거나 종양으로부터 악성세포의 전파를 예방한다. 고통, 퇴행성 상태 또는 신경손상과 같은 다른 질병으로 고통받는 환자에게 본 발명의 바이러스의 투여는 통상적으로 환자의 상태를 호전시킬 것이다. 예를 들어, 심각한 고통을 완화시키거나 신경조직의 퇴행을 늦추거나 또는 신경 재생장을 향상시키는 것이다.
- <151> 투여 치료의 한 방법은 바이러스를 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 결합시켜서 약학조성물을 생성하는 것과 관련된다. 적당한 담체와 희석제는, 예를 들어 인산-완충 염용액(phosphate-buffered saline)과 같은 등장의 염용액(isotonic saline)을 포함한다.
- <152> 이때, 종양분해 치료 및/또는 치료 목적을 위한 세포에 유전자 전달은 목표조직에 벡터조성물의 직접적인 접종

이후에 수행될 수 있다. 투여되는 바이러스의 양은 HSV의 경우에 10^4 내지 10^{10} pfu, 바람직하게는 10^5 내지 10^8 pfu, 보다 바람직하게는 10^6 내지 10^8 pfu 범위이다. 종양분해 또는 비종양분해 치료를 위하여 접종될 때, 본질적으로 바이러스와 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제로 구성되는 약학조성물을 통상적으로 $500\mu\text{l}$ 까지, 통상적으로 1 내지 $200\mu\text{l}$, 바람직하게는 1 내지 $10\mu\text{l}$ 이 접종을 위하여 사용된다. 그러나, 종양과 접종부위에 따라서는, 몇 종양분해 치료 응용을 위해서 10ml 까지 많은 양이 또한 사용될 수 있다.

<153> 설명된 투여경로와 양은 단지 소개를 위한 목적만을 의도한 것이고, 실질적인 기술의 당업자라면 쉽게 최적의 투여경로와 양을 결정할 것이다. 투여량은 다양한 변수(parameter)에 따라, 특히 치료될 환자의 나이, 체중 및 상태, 질병의 심각성 또는 투여조건 및 경로에 따라 결정될 것이다.

<154> 암으로 고통받는 환자에 투여의 바람직한 경로는 종양내에 직접적인 접종에 의해서이다. 바이러스는 또한 전신 또는 종양을 전달하는 혈관내에 접종하여 투여될 수 있다. 투여의 최적경로는 종양의 위치와 크기에 따를 것이다. 투여량은 다양한 변수, 특히 종양의 위치, 종양의 크기, 치료될 환자의 나이, 체중 및 상태 및 투여경로에 따라 결정될 수 있다.

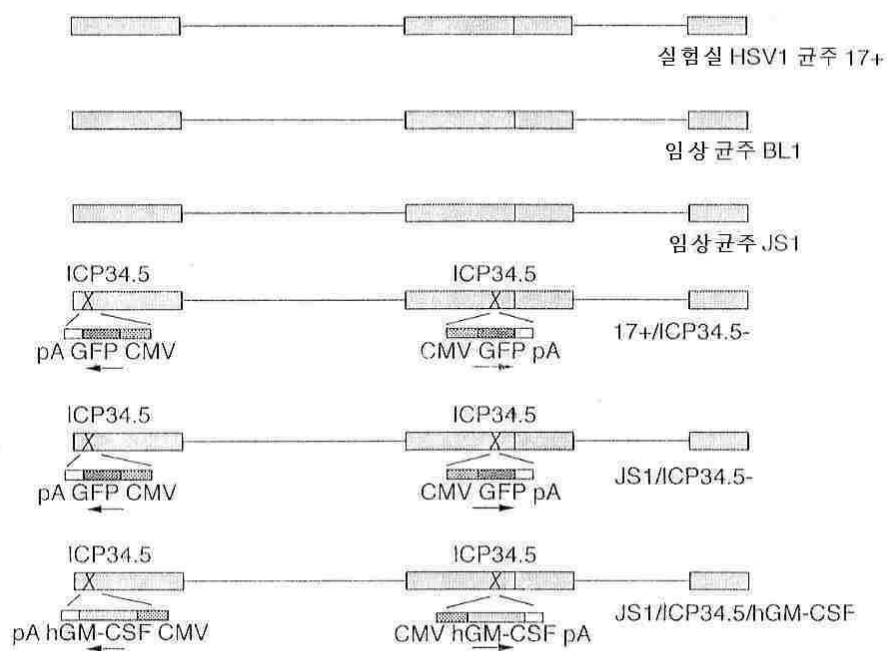
<155> G. 비치료적 측면(Non-Therapeutic aspects)

<156> 본 발명에 따라서, 또한 변이를 위한 적당한 임상 분리주를 동정(identification)하기 위한 방법을 제공한다. 추가하여, 목표 입증의 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기에서 설명된 본 발명의 치료적 응용에 있어서, 용도에 적합한 유전자의 확인에 관한 것이다.

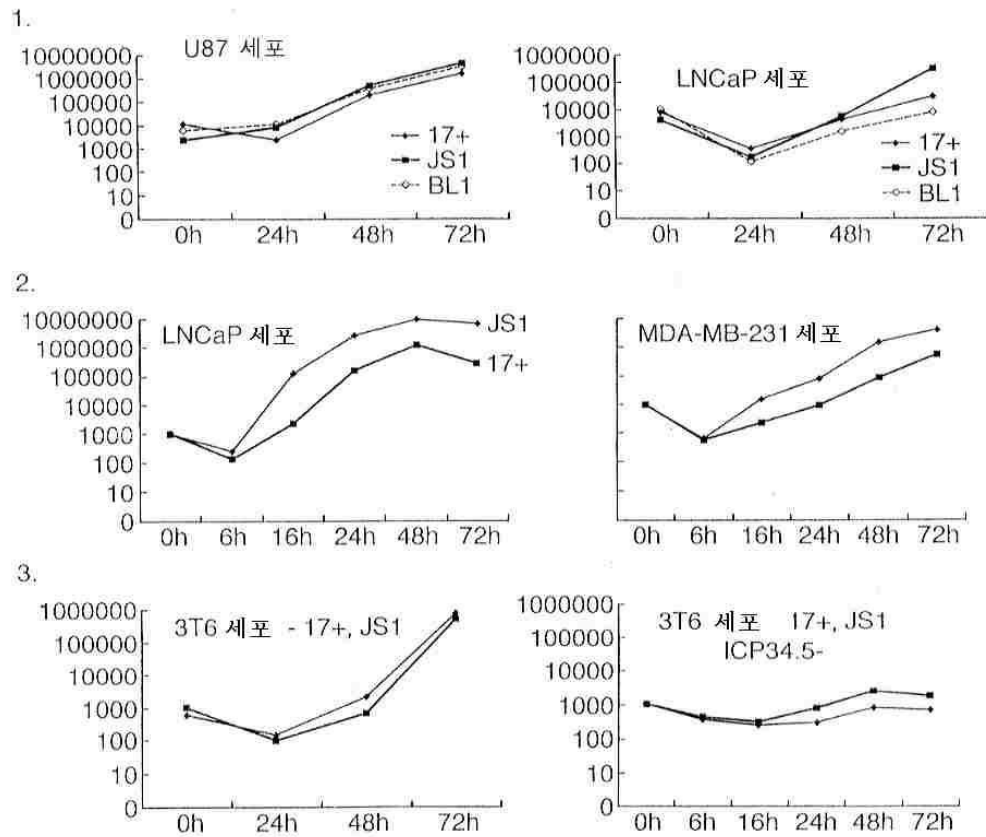
<157> 본 발명은 바이러스의 생산방법을 또한 제공한다.

도면

도면1



도면2



도면3

