



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월17일

(11) 등록번호 10-2625842

(24) 등록일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 31/522 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01) A61K 38/45 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 31/522 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0079617

(22) 출원일자 2020년06월29일

심사청구일자 2021년06월25일

(65) 공개번호 10-2021-0002056

(43) 공개일자 2021년01월06일

(30) 우선권주장
1020190077377 2019년06월27일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
W02014153258 A2*
Proc. Natd Acad. Sci. USA, 1982, Vol. 79, pp.
4927-4931.*

KR1020070032786 A

KR1020190059421 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 바이오녹스

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 1905호(정자동, 파크뷰)

(72) 발명자

황태호

경상남도 양산시 물금읍 청운로 181 조양타워2, 8층 (주)바이오녹스 연구실

조몽

경상남도 양산시 물금읍 청운로 181 조양타워2, 8층 (주)바이오녹스 연구실

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 11 항

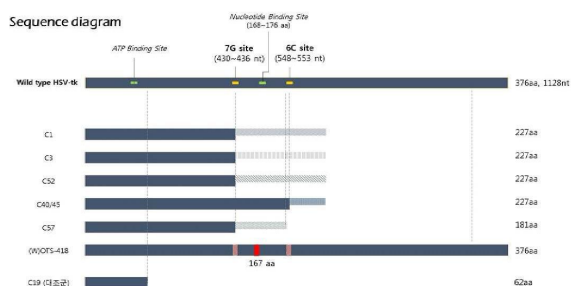
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스

(57) 요약

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 이팩터 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.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/768 (2013.01)
A61K 38/45 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 9/1211 (2013.01)
C12Y 207/01021 (2013.01)
C12N 2710/24132 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465025228
과제번호	HA16C0013010018
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	국립암센터
연구사업명	암연구소 및 국가암관리사업본부운영
연구과제명	항암 바이러스 제작 및 최적화 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부산대학교 산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711048497
과제번호	2015R1A5A2009656
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	혈관성 질환 유전자세포치료 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부산대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

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

상기 항암바이러스는 백시니아 바이러스(Vaccinia virus)이고,

상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 하기 (a) 내지 (f)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항암바이러스:

- (a) 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 181의 아미노산 서열; 및
- (f) 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 181의 아미노산 서열.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서,

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

청구항 6

제 1 항에 있어서,

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

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항, 제 5 항 및 제 6 항 중 어느 한 항의 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약

학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 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, 수노관암, 신장세포 암종, 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, 제 5 항 및 제 6 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, 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, 수노관암, 신장세포 암종, 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

백시니아 바이러스에 변이된 HSV-TK를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 항암 백시니아 바이러스의 제조방법으로서,

상기 변이된 HSV-TK는 하기 (a) 내지 (f)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드인, 제조방법:

- (a) 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (b) 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (c) 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (d) 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 227의 아미노산 서열;
- (e) 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 181의 아미노산 서열; 및

(f) 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 위치 146 내지 181의 아미노산 서열.

청구항 16

삭제

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.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안전성 및 항암효과가 개선된 항암바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 진행되었다.

[0003] 항암바이러스의 유용성은 최근 미국과 유럽에서 허피스 바이러스 기반의 T-Vec(Talimogene laherparepvec)이 진행성 흑색종에서 상용화에 성공하면서 본격적으로 각광받게 되었다. 하지만, TK(Thymidine kinase) 유전자가 결실된 백시니아 바이러스는 임상적 유용성은 크나, 협소한 치료 범위(narrow 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.

[0004] 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 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.

[0005] 한편, 간시클로비르(Ganciclovir, GCV)는 허피스 심플렉스 바이러스, 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 물질로, 세포에서도 DNA 합성을 차단함으로써 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0006] 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 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.

[0007] 구체적으로, 복제가능 아데노바이러스(replication-competent 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 아니라 바이러스 증식 억제에도 관여하기 때문에 그 효과가 서로 상반되어 상쇄되기 때문인

것으로 보고되고 있다.

- [0008] 따라서, HSV-TK/GCV 시스템을 항암바이러스에 적용함에 있어 안전성을 확보함과 동시에 항암효과를 증대시킬 수 있는 구체적인 방법에 대해 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Oliver W et al., Human Gene Therapy, Vol.10, No.16, 1999
(비특허문헌 0002) Lambright ES et al., Gene Ther, 8: 946-53

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 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.

과제의 해결 수단

- [0011] 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.
- [0012] 본 발명의 다른 측면은, 상기 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 항암바이러스 및 GCV(Ganciclovir) 또는 ACV(Aciclovir)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 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.

발명의 효과

- [0015] 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.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 변이된 백시니아 바이러스를 제조하는 과정을 도식화한 도면이다.
- 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.

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.

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.

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.

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.

도 15는 서틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브중 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액(supernatant)에서 루시페라제 활성을 확인한 그래프이다.

도 16은 서틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브중 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 펠릿(pellet)에서 루시페라제 활성을 확인한 그래프이다.

도 17은 서틀 플라스미드 벡터와 와이어스중 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 상층액에서 루시페라제 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.

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.

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 히드록시우레아의 병용 투여에 따른 항암효과를 확인하기 위한 실험 스케줄을 도식화한 도면이다.

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

도 32는 마우스 신장암세포주(Renca) 식립 마우스에 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)와 히드록시우레아를 단일 또는 병용 투여한 후, 마우스의 종양의 크기를 측정한 도면이다.

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

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

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

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0018]

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.

[0019]

본 발명에서 사용하는 용어 "HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)"란, 허피스 심플렉스 바이러스 내 DNA 합성 과정 중 초기 인산화 반응에 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.

[0020]

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. 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 site)를 포함하고, GCV 또는 ACV의 인산화시킬 수 있으며, 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스에 감염된 세포에 GCV 또는 ACV를 처리할 경우, GCV 또는 ACV가 인산화될 수 있다.

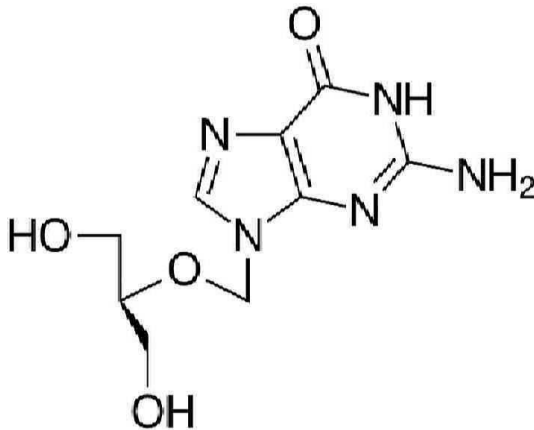
- [0021] 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 이펙터 도메인의 C-말단 쪽으로 연결된 0 내지 231개의 아미노산을 더 가질 수 있다. 이때, 상기 폴리펩타이드는 야생형 HSV-1TK에 비해 TK의 활성이 낮거나 없어, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스가 자체적으로 증식할 수 없다. 또한, 상기 폴리펩타이드는 GCV 또는 ACV의 인산화시킬 수 있으며, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스에 감염된 세포에 GCV 또는 ACV를 처리할 경우, GCV 또는 ACV가 인산화될 수 있다.
- [0022] 구체적으로 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 이펙터 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.
- [0023] 상기 이펙터 도메인을 포함하는 폴리펩타이드는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 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.
- [0024] 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 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)를 제작하였다. 그 후, 상기 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C40, C45, C52, C57 및 WOTS-418)의 염기서열을 분석한 결과, 서열번호 15로 표시되는 야생형 HSV-1TK의 아미노산 서열 중 145번째 아미노산을 기점으로 TK의 활성은 갖지 않으면서, GCV 또는 ACV의 인산화시킨다는 점을 확인하였다.
- [0025] 본 발명에서 사용하는 용어 "항암바이러스"란, 암세포에 특이적으로 복제하도록 바이러스의 유전자를 조작하여 암세포를 파괴하는 재조합 바이러스를 의미한다. 상기 항암바이러스는 아데노바이러스(Adenovirus), 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 홍역 바이러스(Measles virus), 렌티바이러스(Lentivirus), 레트로바이러스(Retrovirus), 싸이토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus), 배큘로바이러스(baculovirus), 리오바이러스(Reovirus), 아데노부속바이러스(Adeno-associated virus), 점액종 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 포क्स바이러스(Poxvirus)로부터 유래된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 항암바이러스는 백시니아 바이러스로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0026] 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.
- [0027] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1로 표시되는 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)로부터 유래된 이펙터(effector) 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 염기서열을 포함하는 항암바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 약학 조성물에 유효성분으로 포함되는 항암바이러스는 상술한 바와 같다.
- [0029] 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 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 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.

- [0030] 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, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0031] 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.
- [0032] 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.
- [0033] 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.
- [0034] 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.
- [0035] 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.
- [0036] 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.
- [0037] 상기 약학 조성물에 유효성분으로 포함되는 항암바이러스는 상술한 바와 같다.
- [0038] 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 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 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.
- [0039] 본 발명에서 사용하는 용어 "GCV"란, 간시클로비르(Ganciclovir)로 불리며 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus), 싸이토메갈로 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, 인산화된 GCV는 세포 DNA

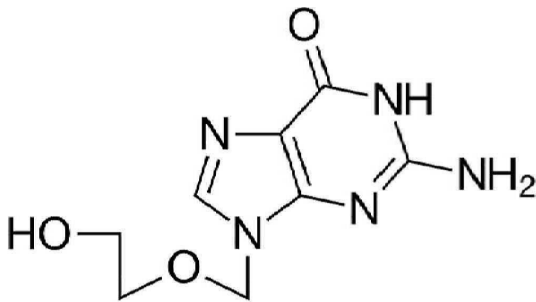
복제를 중단시켜 세포 성장을 억제시킬 수 있다. 상기 GCV는 하기 화학식 1과 같다.

[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 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]



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.

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 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 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 위텝솔(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 양

으로 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 생리학 적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

[0050] 상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 종양 내, 복강내, 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.

[0051] 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.

[0052] 상기 항암바이러스, GCV 및 ACV는 상술한 바와 같다.

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] 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.

[0056] 상기 야생형 HSV-TK 유전자는 서열번호 16으로 표시되는 염기서열일 수 있다.

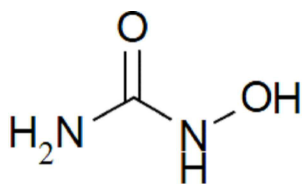
[0057] 상기 항암 백시니아 바이러스는 TK 활성이 낮거나 없고, GCV 또는 ACV를 인산화시킬 수 있다.

[0058] 상기 계대배양은 적어도 3회 이상 연속적으로 계대 배양시킬 수 있으며, 바람직하게는 10회 이상 연속적으로 계대 배양시킬 수 있다.

[0059] 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.

[0060] 본 발명에서 사용하는 용어 "히드록시우레아"란, 하기 화학식을 갖는 화합물이다.

[0061] [화학식 3]



[0062]

[0063] 상기 히드록시우레아의 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으나, DNA 합성을 저해하는 항암제로 알려져 있다. 또한, 상기 히드록시우레아는 히드록시우레아를 포함하는 상업화된 약제의 형태로 약학 조성물에 포함될 수 있다. 상기 히드록시우레아 성분을 포함하는 상업화된 약제는 Hydroxyurea®, Hydrea®, Droxia™, Mylocel™, Siklos® 하이드린캡슐일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 히드록시우레아는 경구로 복용할 수 있으며, 비경구 투여도 가능하다.

[0064] 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 히드록시우레아를 먼저 투여한 후 상기 항암바이러스를 투여하고 다시 상기 히드록시우레아를 투여할 수 있다.

- [0065] 또한, 상기 히드록시유레아는 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 히드록시유레아의 투여량은 10 mg/kg/day 내지 90 mg/kg/day, 15 mg/kg/day 내지 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 히드록시유레아를 30 mg/kg/day 또는 60 mg/kg/day 로 투여하였다. 투여량에 따라 하루에 여러 번 나누어 투여될 수 있다. 구체적으로, 1일 1회 내지 4 회, 또는 1일 1회 내지 2회 나누어 투여될 수 있다.
- [0066] 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, 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0067] 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.
- [0068] 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0069] 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 공인된 다른 약물 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.
- [0070] 상기 약학 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 종양 내, 복강내, 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.
- [0071] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0072] **실시예 1. 변이된 백시니아 바이러스 제조**
- [0073] **실시예 1.1. 셔틀 플라스미드 벡터 제작**
- [0074] 셔틀 플라스미드 벡터는 1형 HSVTK 유전자(pSE/L promoter)와 firefly luciferase reporter(p7.5 promoter) 유전자를 합성하여 pUC57amp⁺ 플라스미드(Genewiz, USA)에 재조합하여셔틀 플라스미드 벡터로 사용하였다.
- [0075] **실시예 1.2. 변이된 백시니아 바이러스 (C1, C3, C40, C45, C52 및 C57) 제작**
- [0076] 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 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(Clonetech 631317, USA)로 세포 내에 전달하였다. 4 시간 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.
- [0077] 그 후, TK-골육종(osteosarcoma 143B TK-) 세포주(ATCC)에서 BrdU(Thymidine analogue, 15 μ g/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 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.

[0078] 구체적으로, 상기 100개의 클론들을 각각 15 μ l씩 처리하여 Hela 세포주에 감염시킨 후, 24시간 후에 세포를 수집하고 세포를 용해시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 변성(denature)과정을 거친 후, 각 시료당 40 μ g을 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 처리하고 Chemiluminescent Image system(Davinch K)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, HSV1-TK 단편 단백질이 바이러스에서 발현되는 것을 확인하였다(도 2 내지 도 13).

[0079] 상기 100개의 서로 다른 클론은 기본적으로 TK 기능이 없는 세포를 선택할 수 있는 생화학적 환경에서 배양되었기 때문에 TK 활성을 가지지 않는다. 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.

[0080] 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 콜로니의 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 콜로니의 변이된 백시니아 바이러스를 각각 "C1", "C3", "C40", "C45", "C52" 및 "C57"로 명명하였다.

[0081] 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 서열 번호 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).

[0082] 실시예 1.3. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418/OTS-418) 제작

[0083] 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 GGGGGG를 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 서틀 플라스미드 벡터를 사용하였다. 그 후, 상기 서틀 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.

[0084] 그 결과, 서틀 플라스미드 벡터와 웨스턴 리저브종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액(supernatant)과 펠릿(pellet)에서 모두 루시퍼라제 활성이 확인되었다(도 15 및 도 16). 또한, 서틀 플라스미드 벡터와 와이어스종 백시니아 바이러스를 처리한 HeLa 암세포주의 배양액으로부터 분리한 상층액에서 루시퍼라제 활성이 확인되었다(도 17). 이를 통해, 상기 HSV-TK 변이체를 코딩하는 유전자가 웨스턴 리저브종 또는 와이어스종 백시니아 바이러스에 도입된 것을 확인하였다.

[0085] 실시예 2. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C45, C52)의 증식 억제 확인(*in vitro*)

[0086] GCV 투여에 따른 상기 실시예 1.2에서 제조한 C1, C3, C45 및 C52의 증식능 억제를 확인하였다. 이때, S3C4#1_C19 콜로니의 변이된 백시니아 바이러스를 음성대조군으로 사용하였으며, 이를 "C19"로 명명하였다. 상기 C1, C3, C19, C45 또는 C52에 GCV를 처리한 후 바이러스 입자수의 차이를 확인하기 위해, 백시니아 바이러스

만이 특정하게 발현하는 *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.

- [0087] 구체적으로, *E9L* 유전자를 인식하면서 상보적인 DNA의 두 가닥 중에서 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-H460 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 Virus Spin, QIAGEN, 57704)를 사용해서 DNA 추출하고 1 ng/ 5 μ l 농도로 희석하여 qPCR를 진행하였다.
- [0088] 그 결과, C19에서는 GCV를 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.
- [0089] **실시예 3. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C40, C57)의 증식 능력 감소 확인 (*in vitro*)**
- [0090] GCV 투여시 상기 실시예 1.2에서 제조한 C40 및 C57의 증식 능력을 확인하였다. 상기 C40 또는 C57에 GCV를 처리한 후 증식량의 변화를 확인하기 위해, *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.
- [0091] 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 HeLa 암세포주 또는 1.5×10^4 개의 NCI-H460 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.
- [0092] 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.
- [0093] **실시예 4. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C1, C3, C45, C52)의 세포독성 확인 (*in vitro*)**
- [0094] 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 GCV를 병용 처리하였다. 72시간 동안 배양한 뒤 CCK8 키트(Cell Counting Kit 8, Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.
- [0095] 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.
- [0096] **실시예 5. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(C40, C57)의 세포독성 확인 (*in vitro*)**
- [0097] 실시예 3에서 GCV에 의해 C40 및 C57의 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, GCV 투여시 C40 및 C57의 세포독성이 유지되는지를 확인하기 위해, C40 및 C57와 GCV를 병용 처리하여 세포독성을 분석하였다.
- [0098] 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.
- [0099] 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.
- [0100] **실시예 6. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)**
- [0101] 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.

[0102] 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 대해 60%이상 세포독성이 관찰되었다(도 24).

[0103] **실시예 7. ACV, GCV 또는 BrdU 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 증식 능력 감소 확인 (*in vitro*)**

[0104] GCV 투여시 상기 실시예 1.3에서 제조한 WOTS-418의 증식 능력을 확인하였다. 상기 WOTS-418에 GCV를 처리한 후 바이러스 입자수의 차이를 확인하기 위해, *E9L* 유전자를 이용하여 정량적 중합 효소 연쇄 반응 분석(qPCR)을 수행하였다.

[0105] 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 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.

[0106] 그 결과, WOTS-418을 ACV, GCV 또는 BrdU를 병용 투여함에 따라 바이러스의 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 25).

[0107] 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.

[0108] 그 결과, WOTS-418를 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.

[0109] **실시예 8. GCV 투여에 따른 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 증식 능력 감소 확인 (*in vivo*)**

[0110] 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.

[0111] 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-418과 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.

[0112] 그 결과, GCV 처리에 의한 바이러스 증식 억제가 3일째부터 나타나는 것을 확인하였다(도 27).

[0113] **실시예 9. 변이된 백시니아 바이러스(WOTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)**

[0114] 실시예 7 및 8에서 GCV에 의해 WOTS-418의 증식이 억제됨에도 불구하고, GCV 투여시 WOTS-418의 세포독성이 유지되는지를 확인하기 위해, WOTS-418와 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.

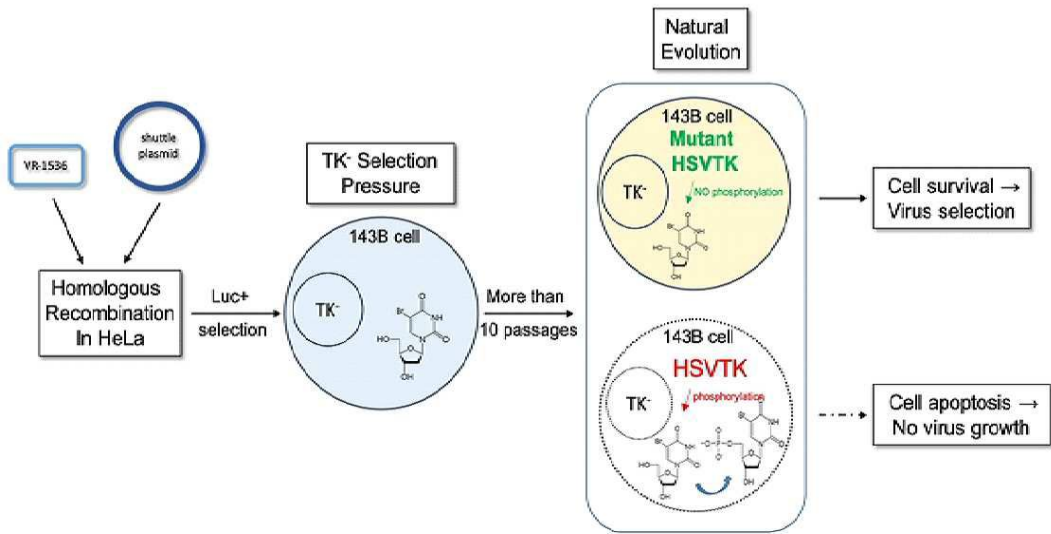
- [0115] 그 결과, WOTS-418과 GCV를 병용 처리하는 경우, GCV에 의해 WOTS-418의 바이러스 증식이 억제됨에도 불구하고, NCI-H460 암세포주가 약 30% 이상 더 사멸되었다(도 28). 이를 통해, WOTS-418을 GCV와 병용 투여하는 경우 세포독성이 증가되는 것을 확인하였다.
- [0116] **실시예 10. 변이된 백시니아 바이러스(OTS-418)의 세포독성 확인 (*in vitro*)**
- [0117] OTS-418의 GCV 투여시 세포독성을 확인하기 위해, WOTS-418과 GCV를 병용 처리하여 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 키트(Cell Counting Kit 8)를 이용하여 세포독성을 분석하였다.
- [0118] 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 확인하였다.
- [0119] **실시예 11. 인간 유방암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시유레아의 항암치료 효과 확인: MDA-MB-231**
- [0120] 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 때까지 관찰한 뒤 약물 투여를 시작하였으며, 31일 후 종양의 크기를 측정하였다.
- [0121] 상기 제작한 인간 유방암세포주 식립 마우스를 4개 그룹(n=5)으로 분류하였다. 식염수를 복강 내 투여받는 그룹을 대조군으로 설정하였으며, 히드록시유레아(HU, 30 mg/kg)를 투여 받는 그룹, WOTS-418(1×10^7 pfu)을 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(intratumoral)하였다. 히드록시유레아는 하루에 2회, 매일 (6회/주) 복강 내 투여하였다(도 30).
- [0122] 31일 동안 종양의 크기를 측정한 결과, 대조군의 종양의 크기는 서서히 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.
- [0123] 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).
- [0124] 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.
- [0125] **실시예 12. 마우스 신장암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시유레아의 항암치료 효과 확인: Renca**
- [0126] 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.
- [0127] 상기 제작한 마우스 신장암세포 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.
- [0128] 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 향상

되는 것을 확인하였다(도 32).

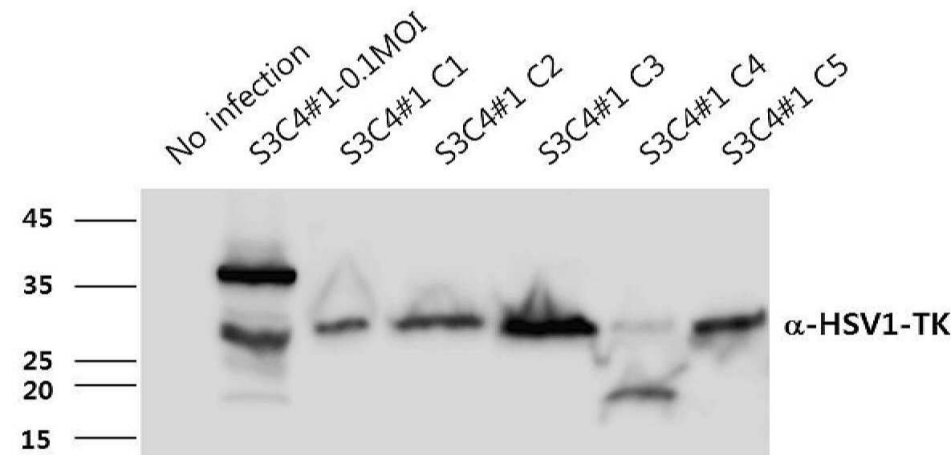
- [0129] 실시예 13. 마우스 대장암세포주 식립 마우스에서의 재조합 백시니아 바이러스(WOTS-418) 및 히드록시유레아의 항암치료 효과 확인: CT-26
- [0130] 실험예 13.1. 마우스 대장암세포 식립 마우스 제조 및 약물 투여
- [0131] 오리엔트 바이오(Orient Bio, Busan)에서 분양 받은 Balb/c 마우스(암컷, 8주)를 일주일의 적응기간을 거친 후 마우스 대장암 세포주(CT-26, 한국세포주은행)로 이종이식을 수행하였다. 종양의 크기가 100 mm³에 도달할 때까지 관찰한 뒤 약물 투여를 시작하였다.
- [0132] 상기 제작한 마우스 대장암세포 식립 마우스를 4개 그룹(G1, G2, and G3: n=15, G4: n=14)으로 분류하였다. 식염수를 복강 내 투여받은 그룹을 대조군으로 설정하였으며, 히드록시유레아를 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 히드록시유레아를 병용 투여받은 그룹을 실험군으로 분류하였다. WOTS-418은 0일째 및 3일째에 복강 내 투여한 뒤, 14일째 및 21일 째는 종양 내 투여하였고, 히드록시유레아는 하루에 1회, 바이러스 투여 직전부터 26일까지 매일(6회/주) 복강 내 투여하였다(도 33).
- [0133] 25일째에 종양의 크기를 측정하고 마우스를 희생시킨 후 면역세포를 분리하여 인터페론-감마(interferon-gamma) 검사를 수행하였다.
- [0134] 실험예 13.2. 종양의 크기 변화 확인
- [0135] 실험예 13.1의 각 군의 마우스에 약물을 투여한 후 25일째에 종양의 크기를 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비해 WOTS-418를 단독 투여받은 그룹, 히드록시유레아를 단독 투여받은 그룹, WOTS-418과 히드록시유레아를 병용 투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 억제되는 것을 확인하였다. 특히, WOTS-418과 히드록시유레아를 병용 투여 받은 실험군 마우스의 종양의 크기가 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(도 34).
- [0136] 실험예 13.3. 인터페론 감마(interferon-gamma) 검사
- [0137] 실험예 13.1의 각 군의 마우스에 약물을 투여한 후 면역세포를 분리하여 인터페론-감마(interferon-gamma) 검사를 수행하였다.
- [0138] 구체적으로, 각 군의 마우스의 비장 내 CD8⁺ T세포를 (Ly-2) MicroBeads 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.
- [0139] 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).

도면

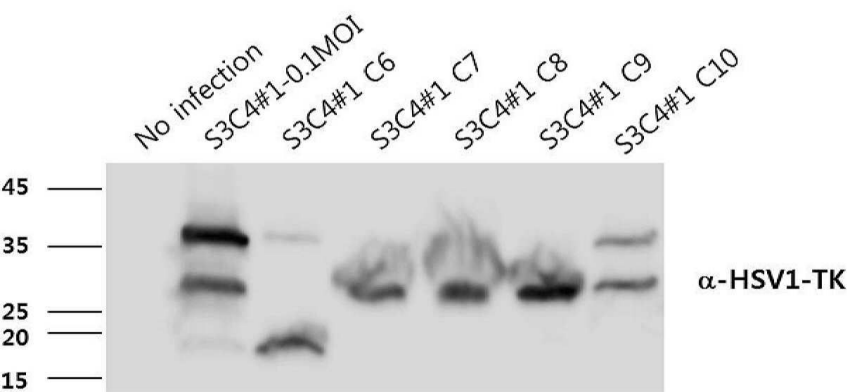
도면1



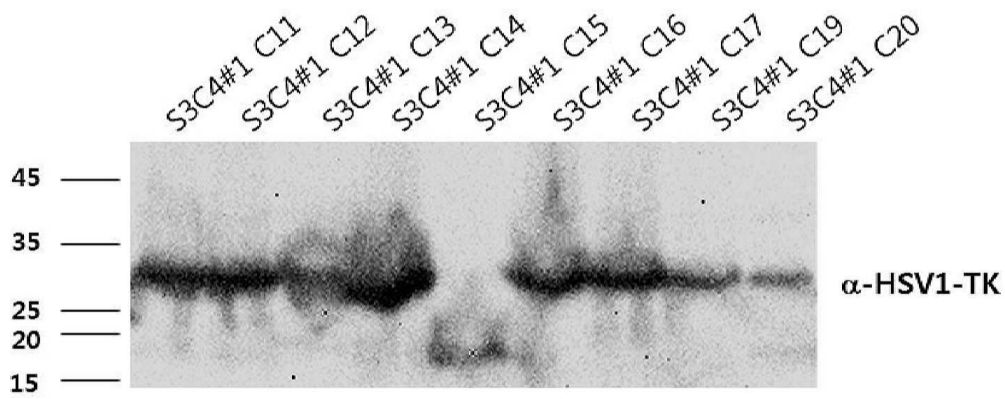
도면2



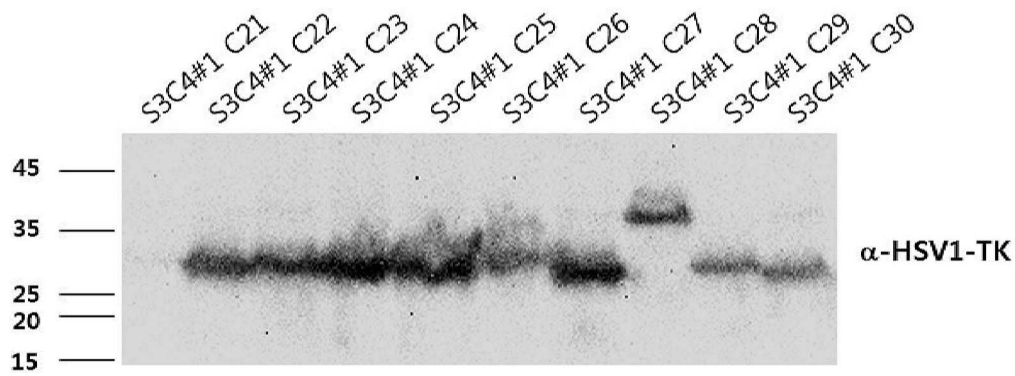
도면3



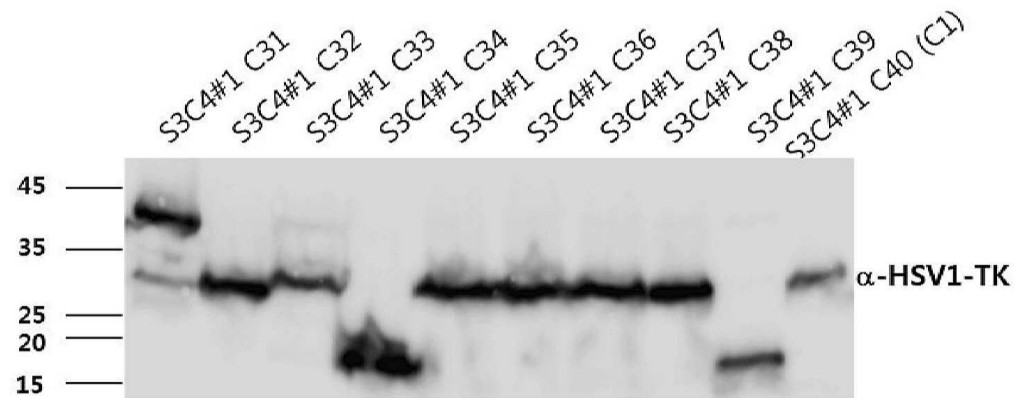
도면4



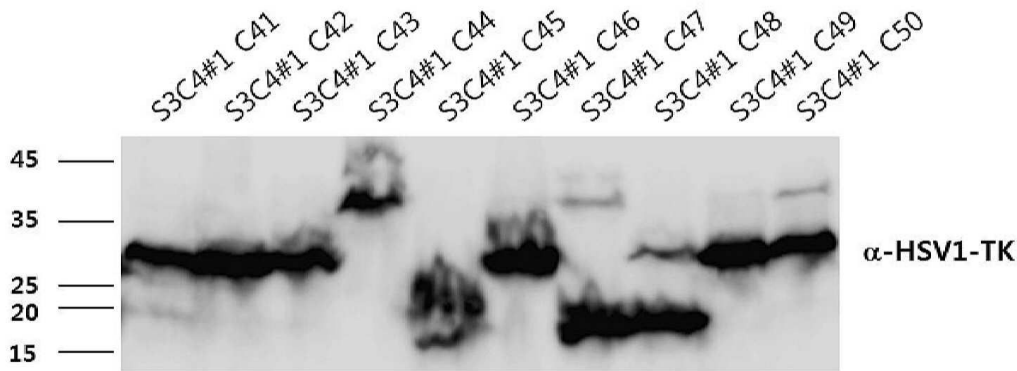
도면5



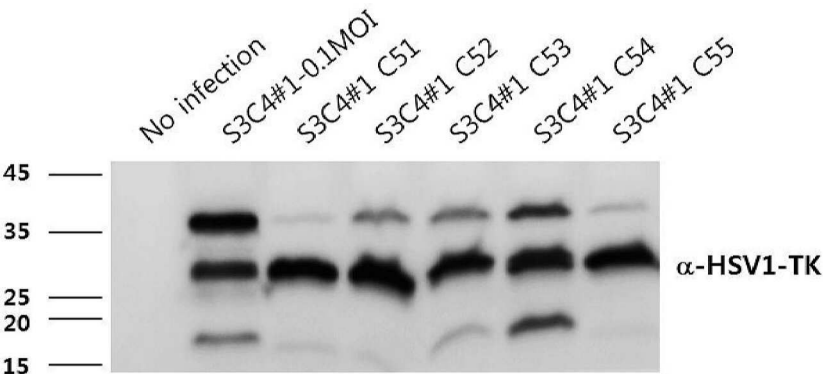
도면6



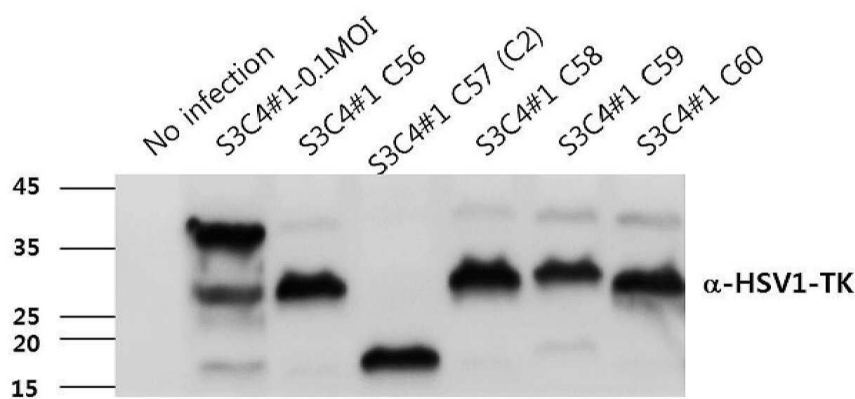
도면7



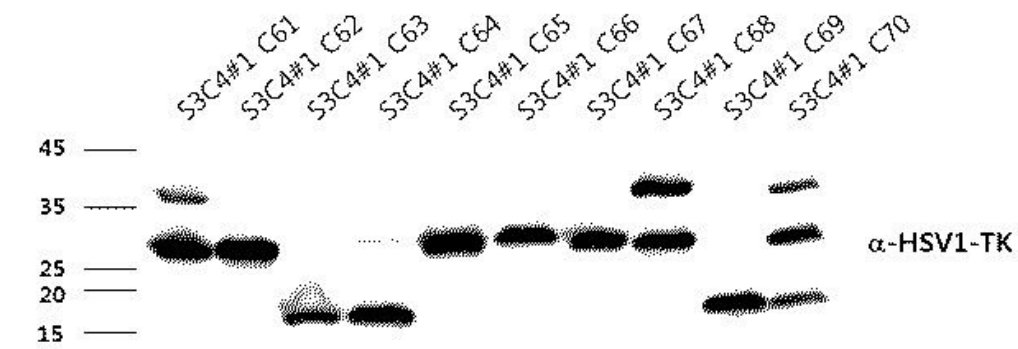
도면8



도면9



도면10



도면11



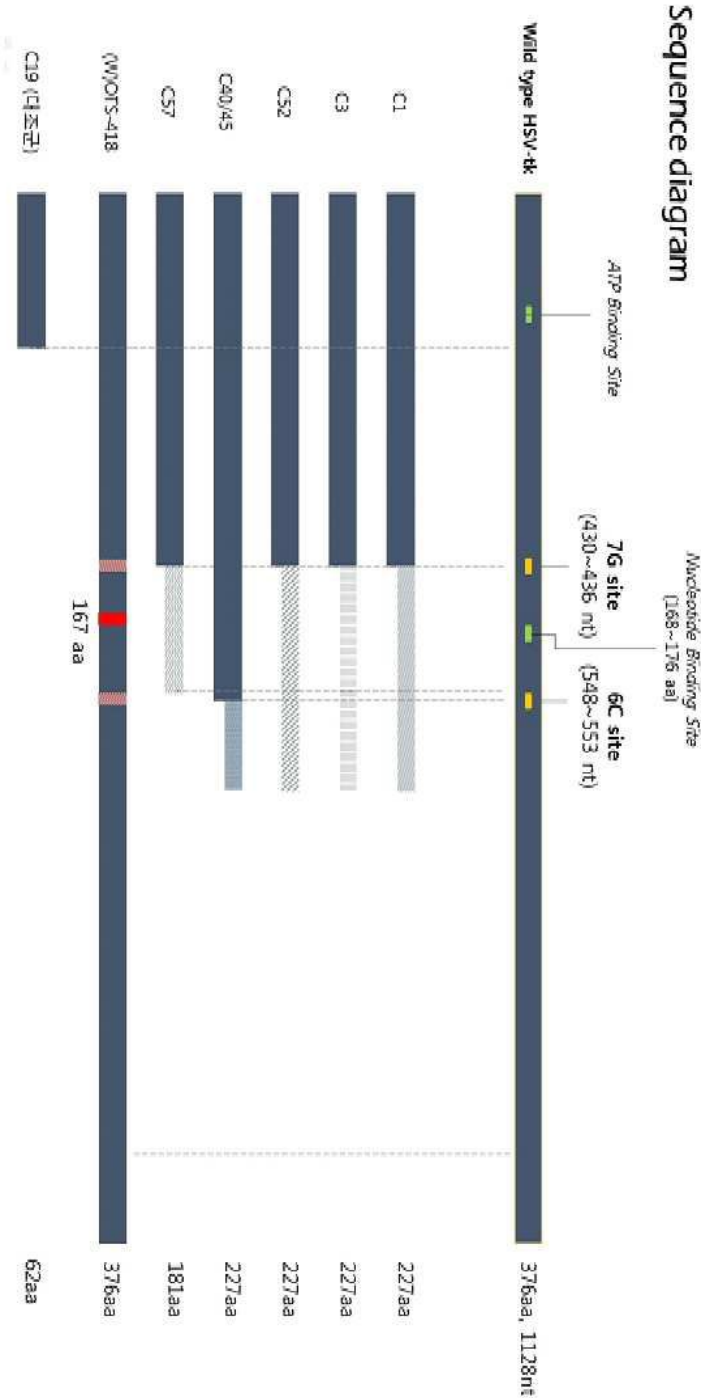
도면12



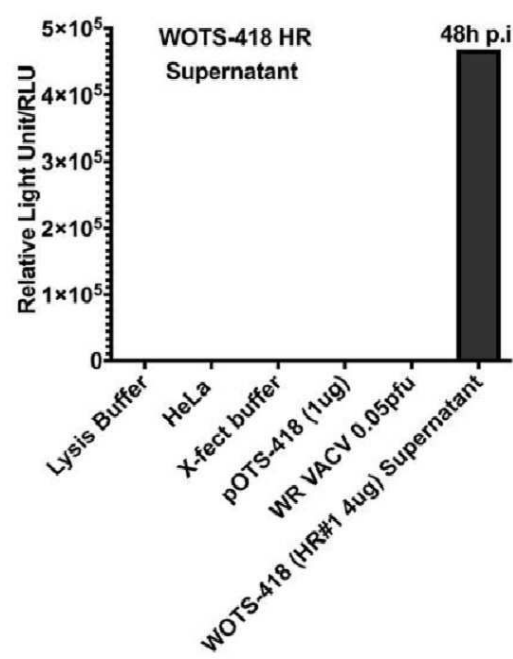
도면13



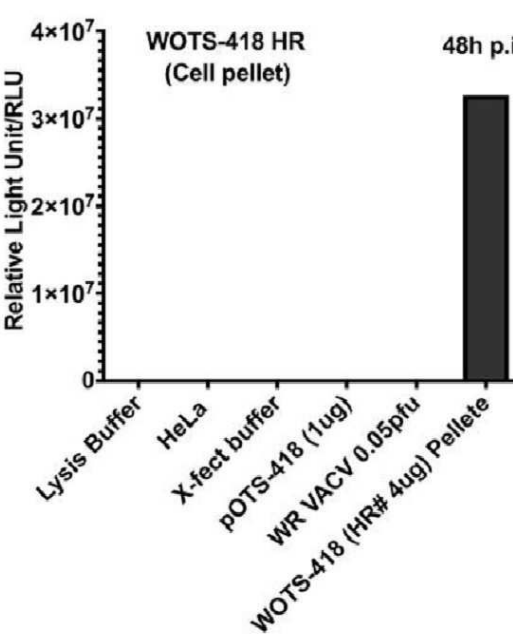
도면14



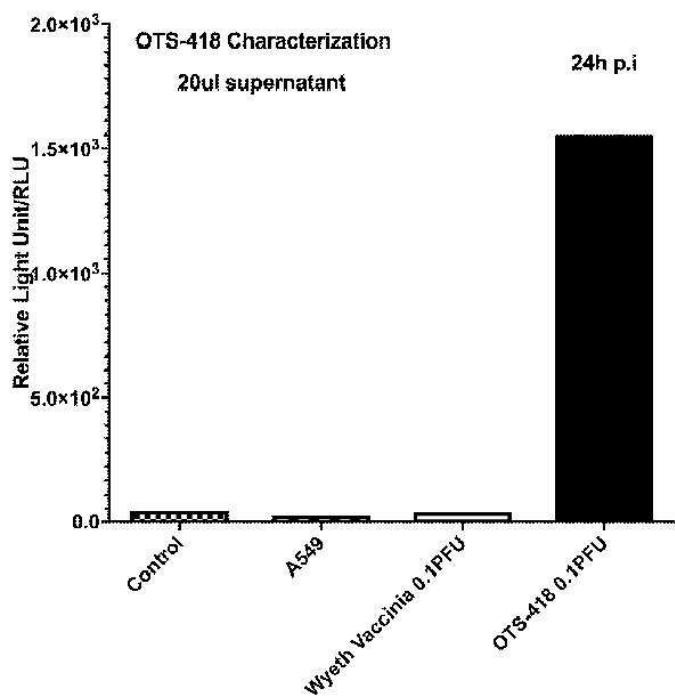
도면15



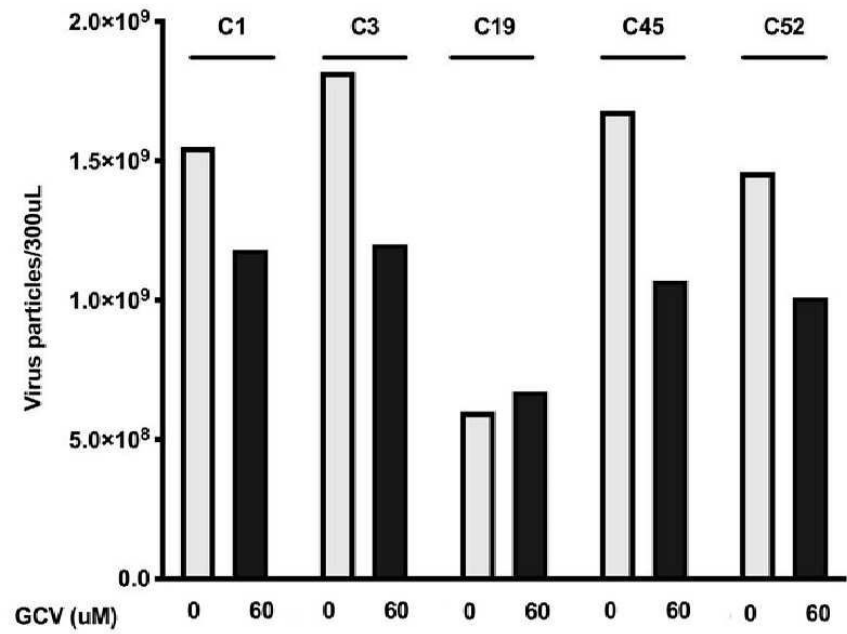
도면16



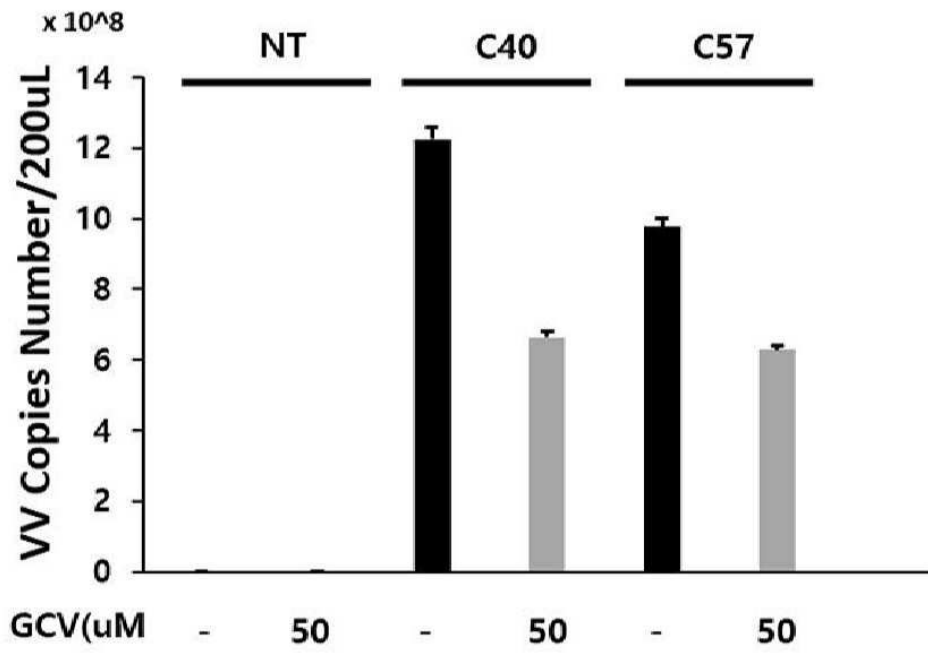
도면17



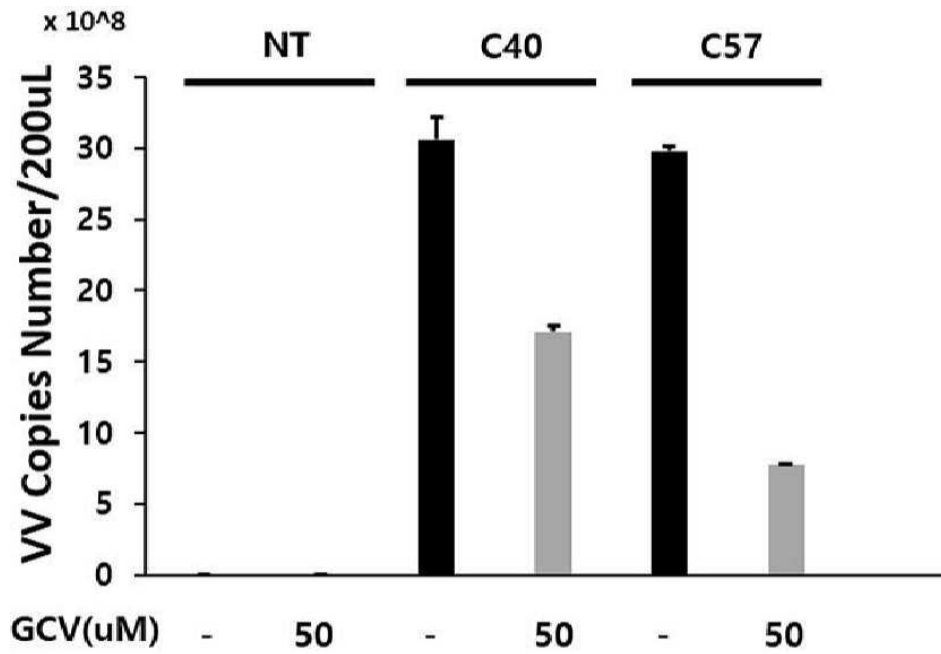
도면18



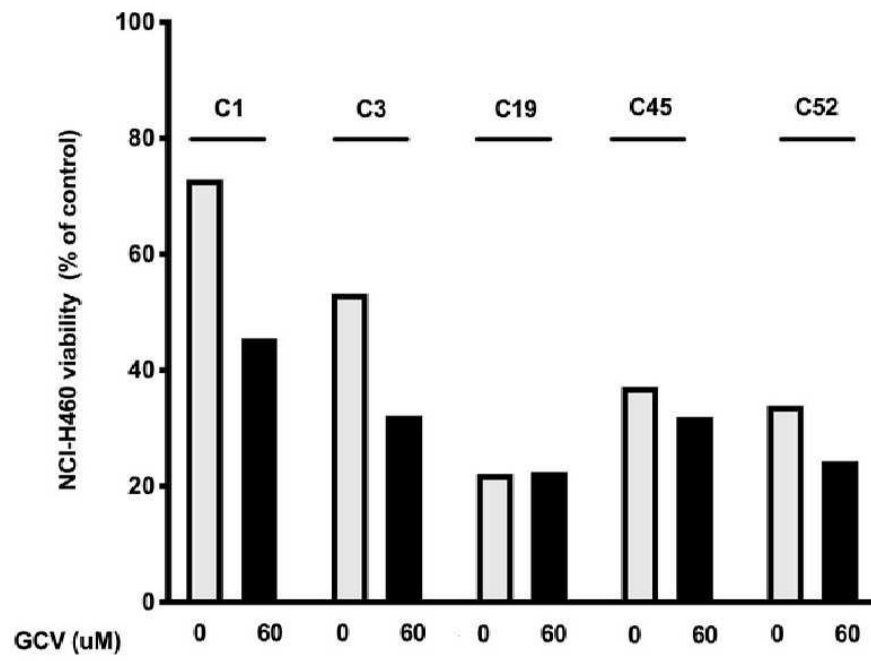
도면19



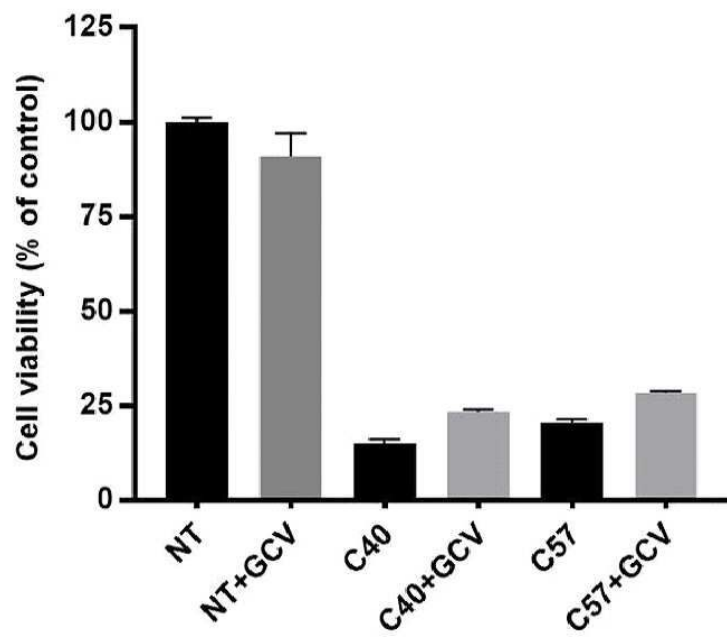
도면20



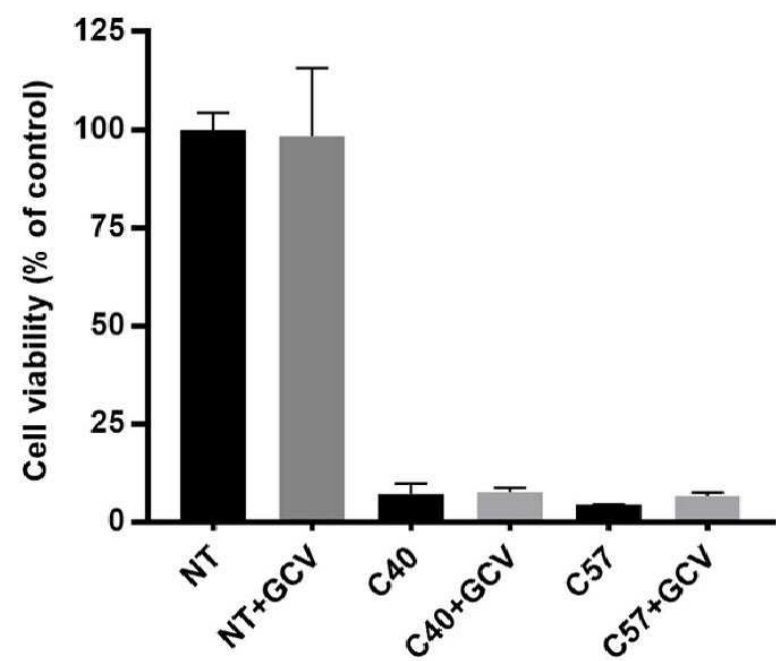
도면21



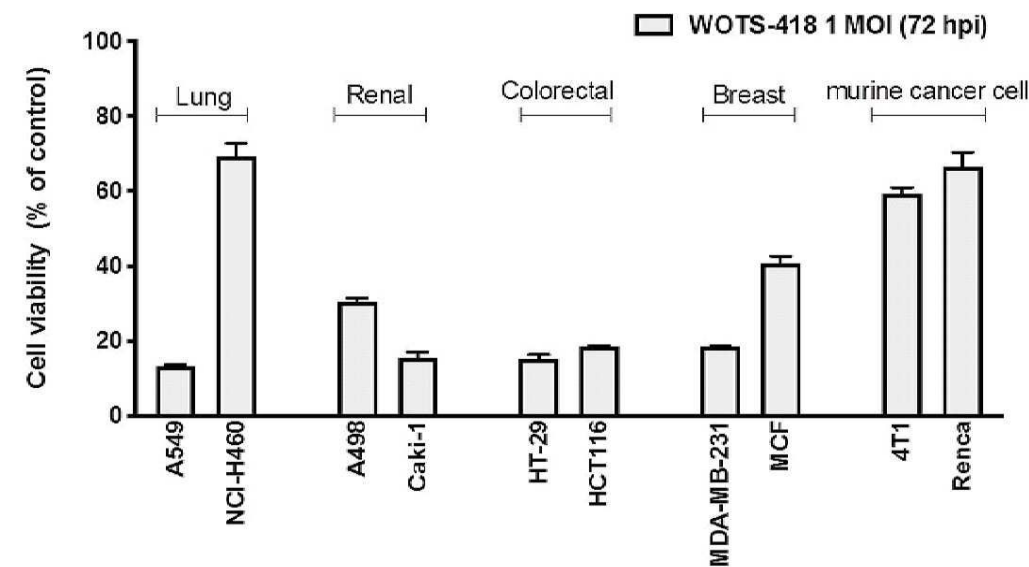
도면22



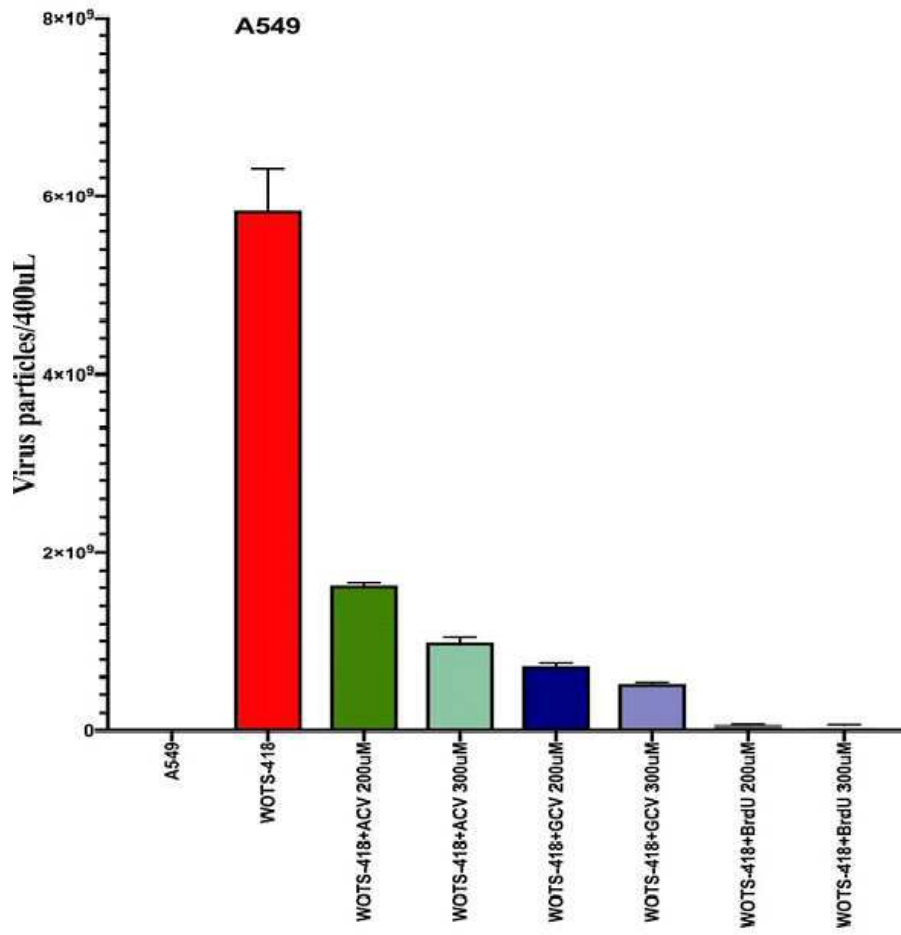
도면23



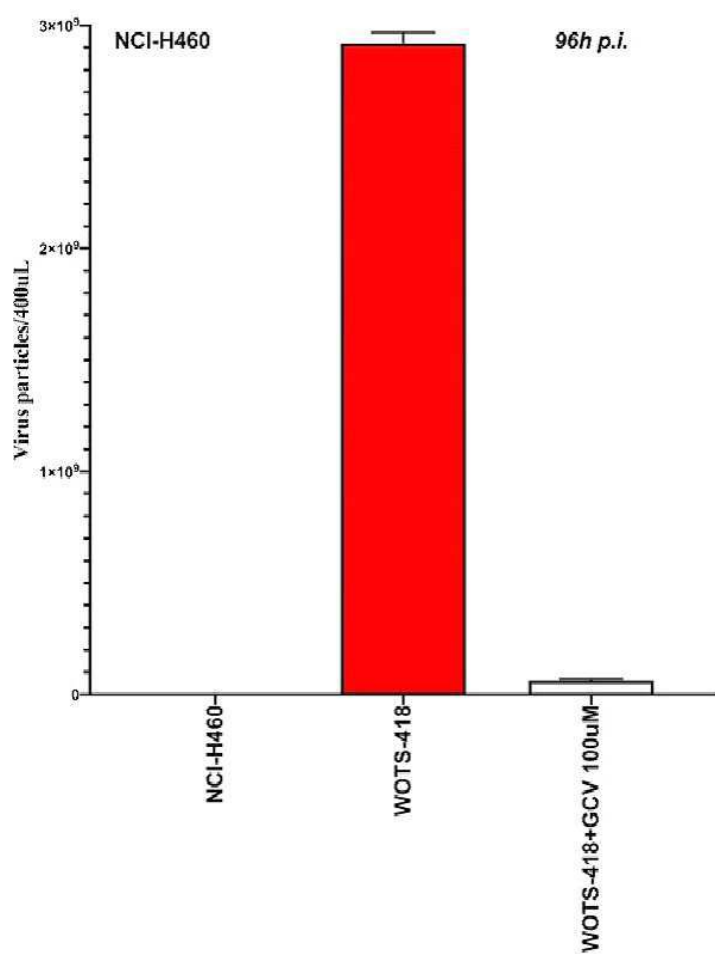
도면24



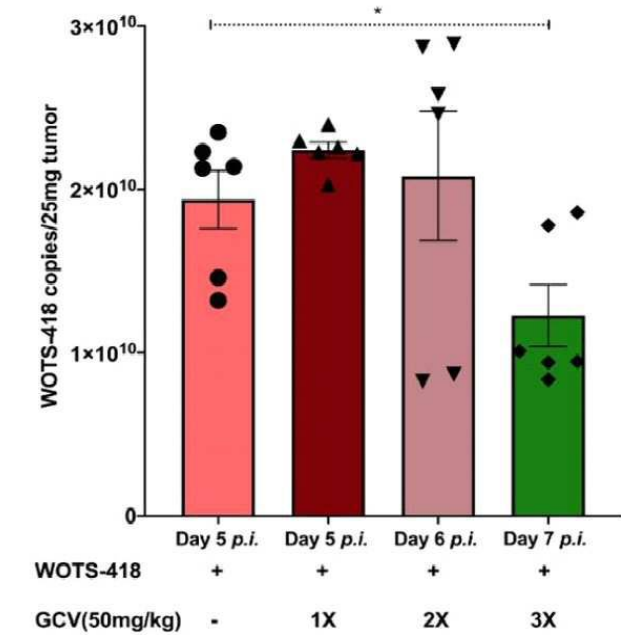
도면25



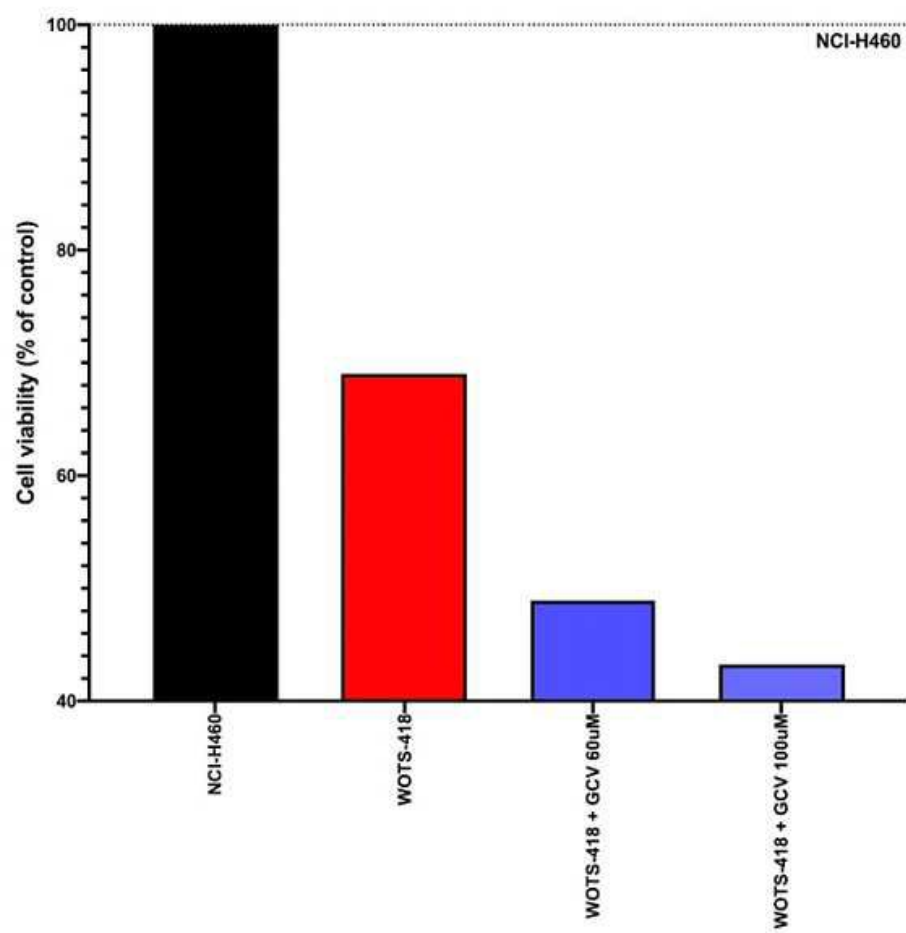
도면26



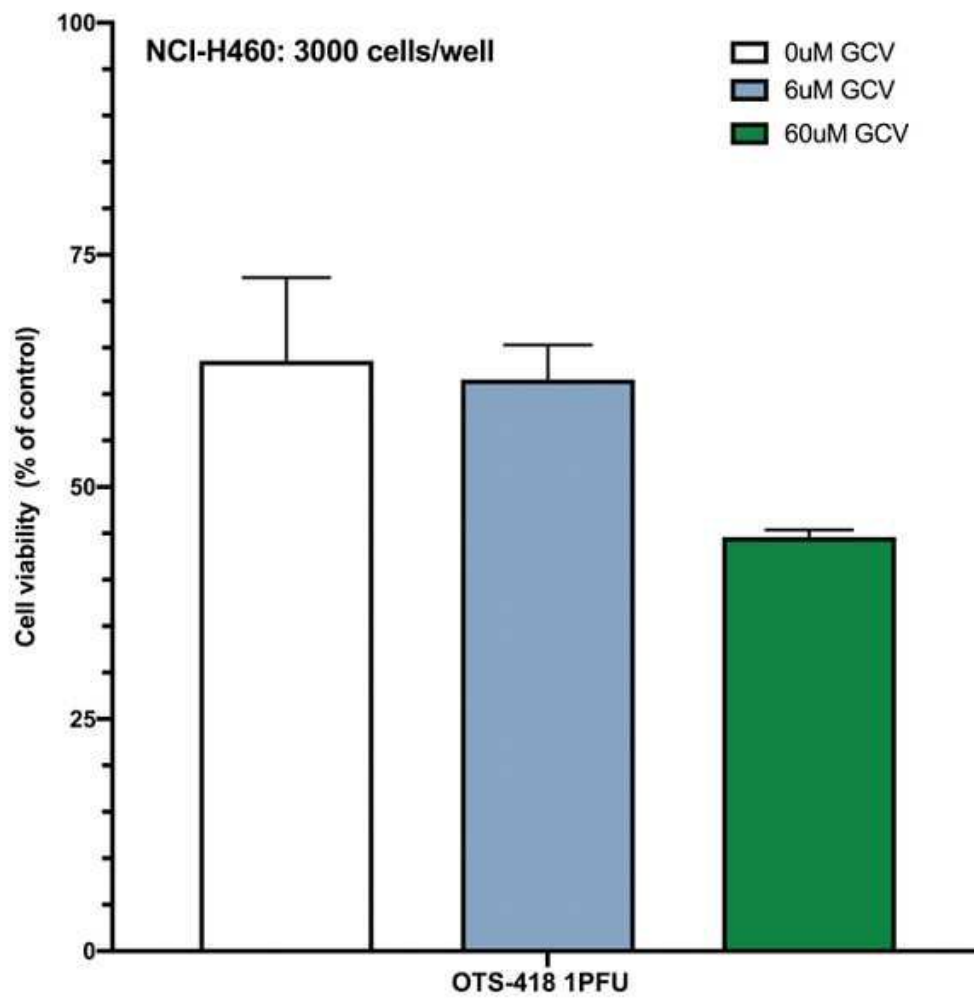
도면27

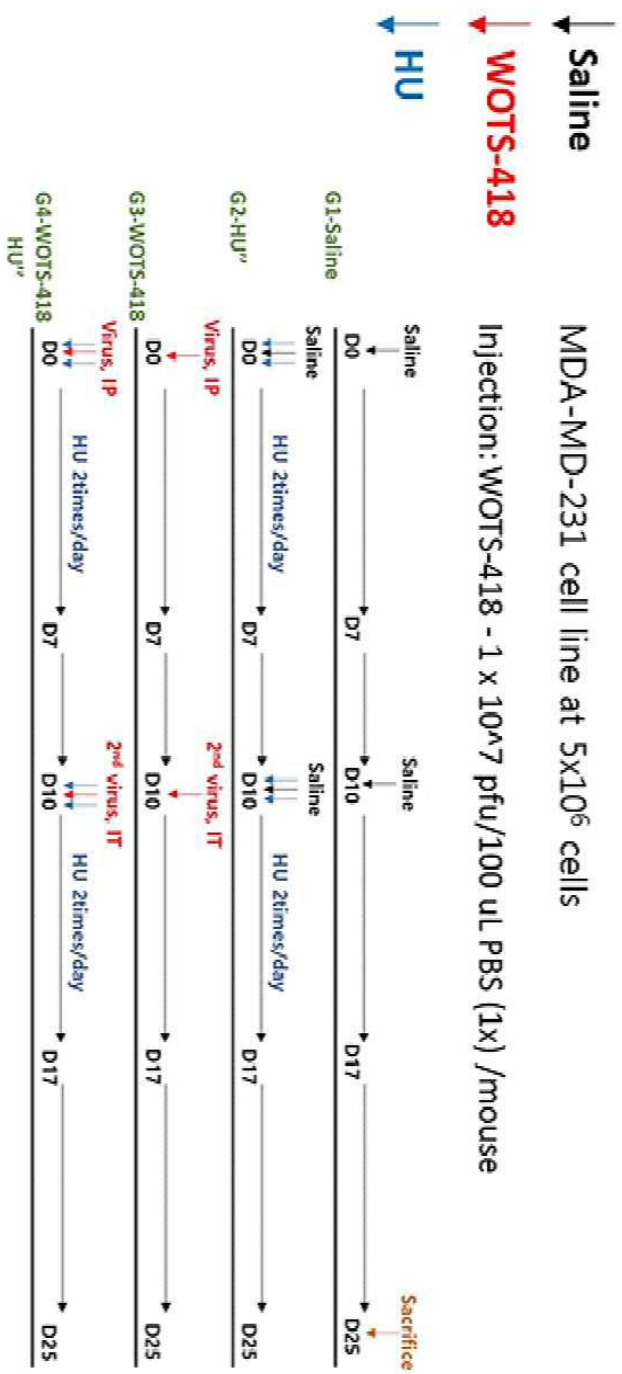


도면28



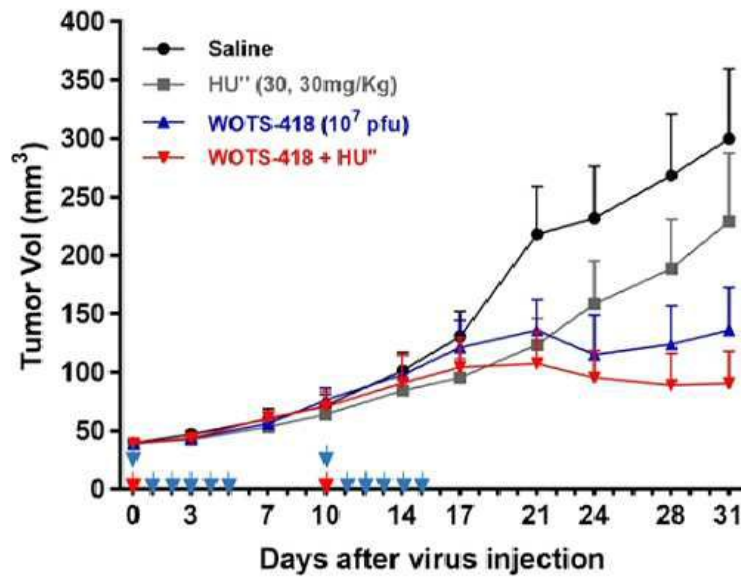
도면29



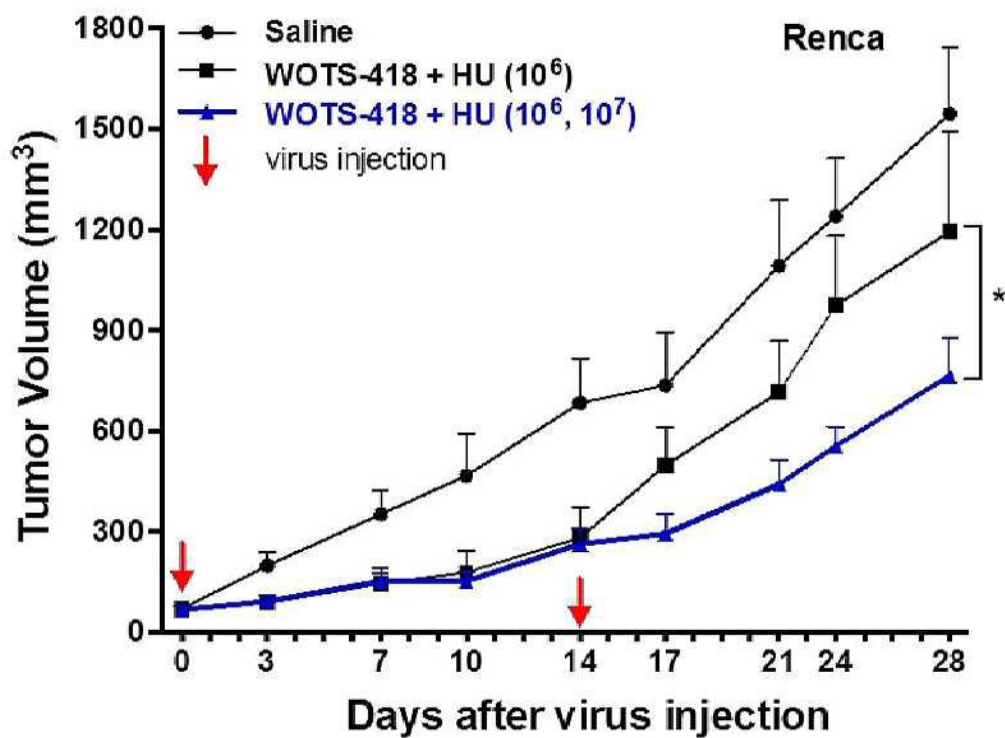


도면31

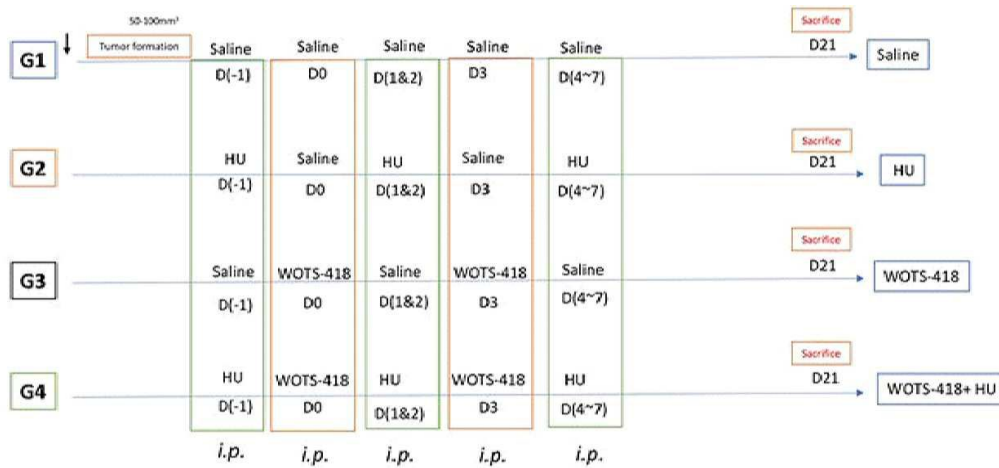
WOTS-418: D0; IP, D10; **IT**
 HU: D0-D5, D10-D15; 2times, IP injection
MDA-MB-231 tumor cells



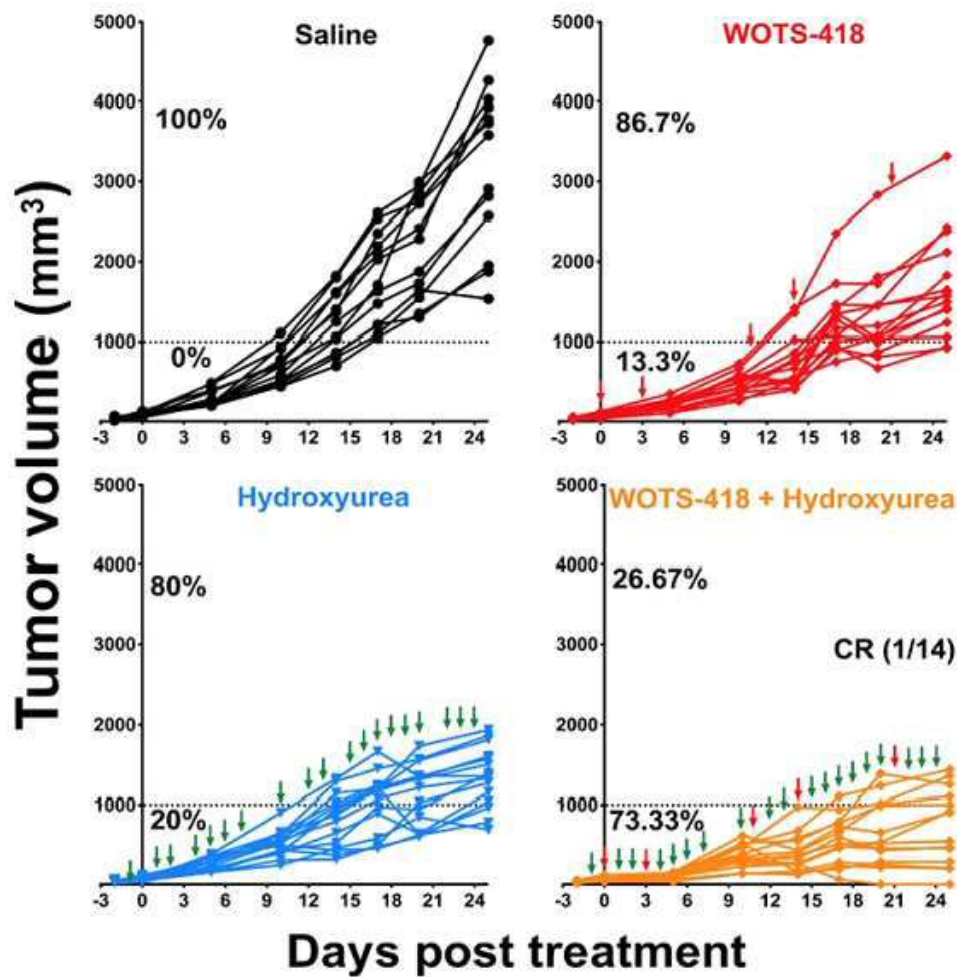
도면32



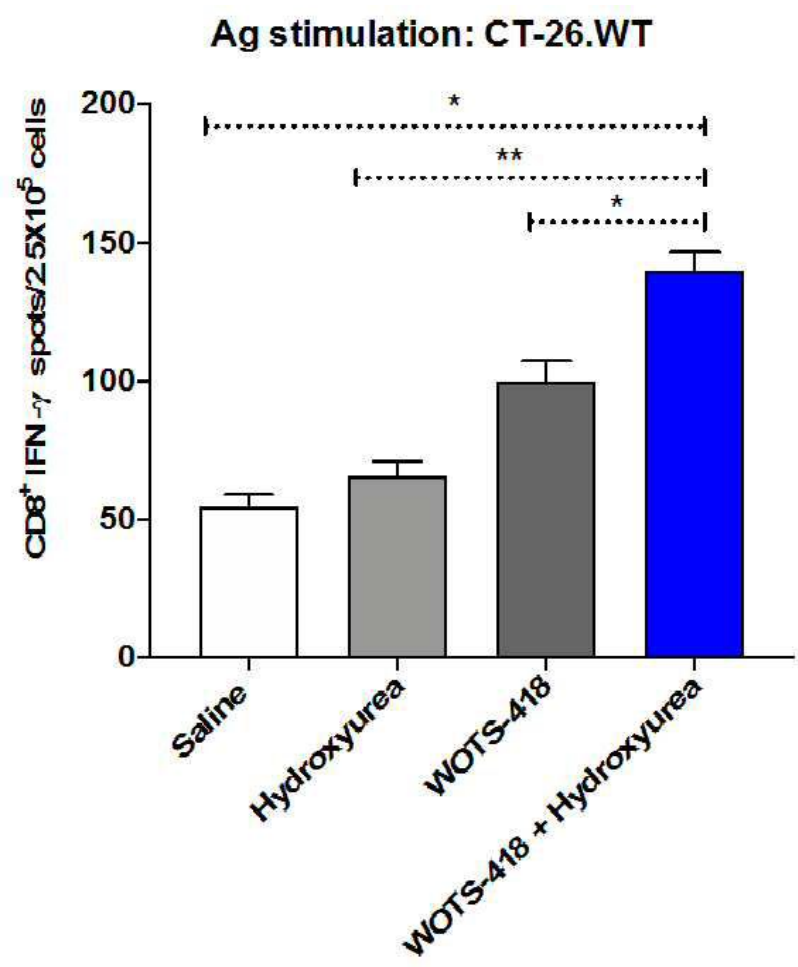
도면33



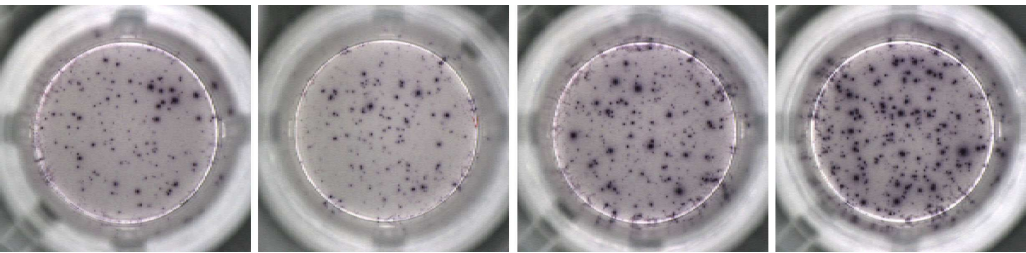
도면34



도면35



도면36



서열 목록

- <110> Bionxxx Inc.
- <120> ONCOLYTIC VIRUS WITH IMPROVED SAFETY AND ANTICANCER EFFECT
- <130> FPD/202006-0025
- <150> KR 10-2019-0077377
- <151> 2019-06-27
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acid sequence for effector domain
 <400> 1

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30
 Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
 50 55 60
 Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
 65 70 75 80
 Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
 85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
 100 105 110
 Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
 115 120 125
 Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
 130 135 140

Gly
 145

<210> 2
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for effector domain
 <400> 2

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc

60

ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgcttgagc agaaaatgcc cagctactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctgttg gccctgggtt cgcgcgacga tategtctac 240
 gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
 tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccgggggacgc ggcggttgta 360
 atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420

cctcatgtcg gggggtaa 438

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK of C1

<400> 3

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr

35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr

50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr

65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr

85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile

100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met

115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Trp Glu Phe Thr Cys Pro Ala Pro Gly Pro His Pro His

145 150 155 160
 Leu Arg Pro Pro Ser His Arg Arg Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Ala
 165 170 175
 Ile Pro Tyr Gly Gln His Asp Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly

 180 185 190
 Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro
 195 200 205
 Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg
 210 215 220
 Arg Ala Ala

225

<210> 4

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C1

<400> 4

atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60

ggccatagca accgacgtac ggcggttcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120

cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgttc tcacgggatg 180

gggaaaacca ccaccacga actgctggtg gcctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240

gtaccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300

tacaccacac aacaccgctt cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcgggtgta 360

atgacaagc cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggt 420

cctcatgtcg gggggggagg ctgggagttc acatgcccc cccccggccc tcacctcat 480

cttcgaccgc catcccatcg ccgcctcct gtgctaccg gccgcgat accttatggg 540

cagcatgacc cccaggcgg tcttggtt cgtggccctc atcccgccga cttgcccgg 600

cacaaacatc gtgttgggg cccttcggga ggacagacac atcgaccgcc tggccaaacg 660

ccagcggccc ggcgagcggc t 681

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C3

<400> 5

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15
Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30
Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr

35 40 45
Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr

50 55 60
Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr

65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
130 135 140

Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile

145 150 155 160
Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg

165 170 175
Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly

180 185 190
Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro

195 200 205
Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg

210 215 220

Arg Ala Ala

225

<210> 6

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C3

<400> 6

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60
ggccatagca accgacgtac ggcgttcgcg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120
cgcttgagc agaaaatgcc cagctactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg	180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac	240
gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcgggtgta	360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420
cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc	480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctctg tctaccgg cgcgcgata ccttatgggc	540
agcatgaccc cccaggccg tctggcggtt cgtggccctc atcccgccga ccttgcccg	600
cacaaacatc gtgttggggg ccttccgga ggacagacac atcgaccgcc tggccaaacg	660
ccagcgcccc ggcgagcggc t	681

<210> 7

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK of C40/45

<400> 7

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr

35 40 45

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

115 120 125
 Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Trp Glu Phe Thr Cys Pro Ala Pro Gly Pro His Pro His
 145 150 155 160
 Leu Arg Pro Pro Ser His Arg Arg Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Ala
 165 170 175
 Ile Pro Tyr Gly Gln His Asp Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly
 180 185 190

Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro
 195 200 205
 Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg
 210 215 220

Arg Ala Ala

225

<210> 8

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C40/45

<400> 8

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggtcgc gcgttctcgc 60

ggccatagca accgacgtac ggcgttcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120

cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
gggaaaacca ccaccacga actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcgggtgta 360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggtt 420
cctcatgtcg ggggggagcg tgggagtcca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
ttcgaccgac atcccatcgc cgccctcctg tgctaccggg ccgcgcgata ccttatgggc 540

agcatgacc cccaggccgt gctggcggtt gtggccctca tcccgcgac ctgcccggc 600
acaaacatcg tgttgggggc ctttcgggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
cagcgccccg gcgagcggct t 681

<210> 9

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK ofC52

<400> 9

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr

85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly

130 135 140

Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile

145 150 155 160

Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg

165 170 175

Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly

180 185 190

Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro

195 200 205

Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg

210 215 220

Arg Ala Ala

225

<210> 10

<211> 1132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C52

<400> 10

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
ggccatagca accgacgtac ggcggttcgc cctgcgccgc agcaagaagc cacggaagtc 120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgttcc tcacgggatg 180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gcctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
gtaccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300

tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcgggtgta 360
atgacaagcg ccagataaac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
cctcatgtcg ggggggagcg tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccgg ccgcgcgata ctttatgggc 540
agcatgacc cccagggcg tgctggcgtt cgtggccctc atcccgccga ctttgcccg 600
cacaacatc gtgttggggg cccttccgga ggacagacac atcgaccgcc tggccaaacg 660

ccagcgcccc ggcgagcggc ttgacctggc tatgctggcc gcgattcgcc gcgtttacgg 720

gctgcttgcc aatacgggtgc ggtatctgca gggcggcggg tcgtggtggg aggattgggg 780

acagctttcg gggacggccg tgccgcccc aagggtgcgag cccagagca acgcgggccc 840

acgaccccat atcggggaca cgttatttac cctgtttcgg gccccgagt tgctggcccc 900

caacggcgac ctgtataacg tgtttgctg ggccttgac gtcttgcca aacgcctccg 960

tcccatgcac gtctttatcc tggattacga ctaatcgccc gccggctgcc gggacgccct 1020

gctgcaactt acctccggga tggccagac ccacgtcacc acccaggct ccataccgac 1080

gatctgcgac ctggcgcgca cgtttgcccg ggagatgggg gaggctaact aa 1132

<210> 11

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK of C57

<400> 11

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr

35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr

50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr

65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr

85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile

100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met

115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly

130 135 140
 Gly Arg Leu Gly Val His Met Pro Arg Pro Arg Pro Ser Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Ser Thr Ala Ile Pro Ser Pro Pro Ser Cys Ala Thr Arg Pro Arg Asp
 165 170 175
 Thr Leu Trp Ala Ala

180

<210> 12

<211> 543

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C57

<400> 12

tgctgcccat aaggatcgc gcggccgggt agcacaggag ggcgcgatg ggatggcgg 60
 cgaagatgag ggtgagggcc gggggcgggg catgtgaact ccagcctcc cccgacatg 120
 aggagccaga acggcgctcg tcacggcata aggcattgcc attgttatct gggcgcttgt 180
 cattaccacc gccgcgtccc cgccgatat ctaccctgg tcgaggcggt gttgtgtgtg 240
 gtagatgttc gcgattgtct cggaagcccc cagcacctgc cagtaagtca tcggctcggg 300
 tacgtagacg atatcgtcgc gcgaaccag ggccaccagc agttgcgtgg tgggtgtttt 360

ccccatcccg tgaggaccgt ctatataaac ccgagtagc gtgggcattt tctgctccag 420
 gcggacttcc gtggcttctt gctgccggcg agggcgcaac gccgtacgtc ggttgctatg 480
 gccgcgagaa cgcgagcct ggtcgaacgc agacgcgtgt tgatggcagg ggtacgaagc 540
 cat 543

<210> 13

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK of WOTS-418

<400> 13

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15
 Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30
 Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
 50 55 60
 Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
 65 70 75 80

 Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
 85 90 95
 Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
 100 105 110
 Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
 115 120 125
 Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
 130 135 140
 Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile

 145 150 155 160
 Phe Asp Arg His Pro Ile Tyr Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
 165 170 175
 Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala
 180 185 190
 Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu
 195 200 205
 Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly
 210 215 220

 Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp
 245 250 255
 Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala
 260 265 270
 Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu

275	280	285	
Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu			
290	295	300	
Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg			
305	310	315	320
Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys			
325	330	335	
Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val			
340	345	350	
Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe			
355	360	365	
Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn			
370	375		
<210>	14		
<211>	1131		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	nucleotide sequence for mutated HSV-TK of WOTS-418		
<400>	14		
atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60		
ggccatagca accgacgtac ggcgttcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120		
cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180		
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccttgggtt cgcgcgacga tatcgtctac	240		
gtaccggagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300		
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg	360		
atgacaagc cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420		
cctcatgtcg gtggtgagc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc	480		
ttcgaccgcc atcccatcta cgccctcctg tctaccgg ccgcgcgata cttatgggc	540		
agcatgacc ctcaggccgt gctggcggtc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc	600		
acaaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc	660		
cagcgcctcg gcgagcggtg tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg	720		

ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc 840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggccccc 900
aacggcgacc tgiataacgt gtttgccctgg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt 960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg cgggtgccg ggacgccctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca ccccaggctc cataccgacg 1080

atctgcgacc tggcgcgcac gtttccccgg gagatggggg aggctaacta a 1131

<210> 15

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for Herpes simplex virus 1 Thymidine kinase

<400> 15

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

20 25 30

Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr

35 40 45

Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr

50 55 60

Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr

65 70 75 80

Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr

85 90 95

Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile

100 105 110

Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met

115 120 125

Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly

130 135 140

Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile

145 150 155 160
 Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
 165 170 175
 Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala

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

 Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala
 260 265 270
 Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
 275 280 285
 Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu
 290 295 300
 Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
 305 310 315 320
 Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys

 325 330 335
 Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
 340 345 350
 Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
 355 360 365
 Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
 370 375
 <210> 16
 <211> 1134
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for Herpes simplex virus 1 Thymidine kinase

<400> 16

atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60
ggccatagca accgacgtac ggctgtgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120
cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac	240
gtaccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg	360
atgacaagcg ccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420

cctcatgtcg ggggtaaga ggctgggagt tcacatgccc cgccccggc cctcacctc	480
atcttcgacc gccatcccat cgccgccctc ctgtgctacc cggccgcgcg atacctatg	540
ggcagcatga cccccaggc cgtgtgtggc ttcgtggccc tcatcccgcg gaccttgccc	600
ggcacaaca tcgtgttggg ggcccttcg gaggacagac acatcgaccg cctggccaaa	660
cgccagcgcc ccggcgagcg gcttgacctg gctatgttgg ccgcgattcg ccgcgtttac	720
gggctgcttg ccaatacgtt gcggtatctg caggcgggcg ggtcgtggtg ggaggattgg	780
ggacagcttt cggggacggc cgtgccgcc cagggtgccg agccccagag caacgcgggc	840

ccacgacccc atacgggga cagttatatt accctgtttc gggccccga gttgctggcc	900
cccaacggcg acctgtataa cgtgtttgcc tgggccttgg acgtcttggc caaacgcctc	960
cgteccatgc acgtctttat cctggattac gaccaatcgc ccgcccgtg ccgggacgcc	1020
ctgctgcaac ttacctcgg gatgtccag acccacgtca ccacccagg ctccataccg	1080
acgatctgcg acctggcgcg cagtttgcc cgggagatgg gggaggctaa ctaa	1134

<210> 17

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence for mutated HSV-TK of C19

<400> 17

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

	20	25	30	
	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr			
	35	40	45	
	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys			
	50	55	60	
<210>	18			
<211>				
	186			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	nucleotide sequence for mutated HSV-TK of C19			
<400>	18			
	atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60		
	ggccatagca accgacgtac ggcgttcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120		
	cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg	180		
	gggaaa	186		
<210>	19			
<211>	16			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	nucleotide sequence for probe (E9L)			
<400>	19			
	caggctacca gttcaa	16		
<210>	20			
<211>	16			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	nucleotide sequence for probe (E9L)			
<400>	20			
	caggctacca gttcaa	16		