



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월17일  
(11) 등록번호 10-2056066  
(24) 등록일자 2019년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/761 (2014.01) A61K 31/7068 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 35/761 (2013.01)  
A61K 31/7068 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0168434  
(22) 출원일자 2017년12월08일  
심사청구일자 2017년12월08일  
(65) 공개번호 10-2018-0066871  
(43) 공개일자 2018년06월19일  
(30) 우선권주장  
1020160167265 2016년12월09일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020090007067 A  
KR1020120010697 A

(73) 특허권자  
진메디신 주식회사  
서울특별시 성동구 왕십리로 222 10층 1008호 (사근동, 한양대학교 서울캠퍼스 정보통신관)  
(72) 발명자  
윤채욱  
서울특별시 서초구 동광로27길 47(방배동) 방배8차 상지리츠빌 301호  
안효민  
인천광역시 서구 승학로 198 105동 2203호 (삼곡동, 극동아파트)  
(74) 대리인  
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 9 항

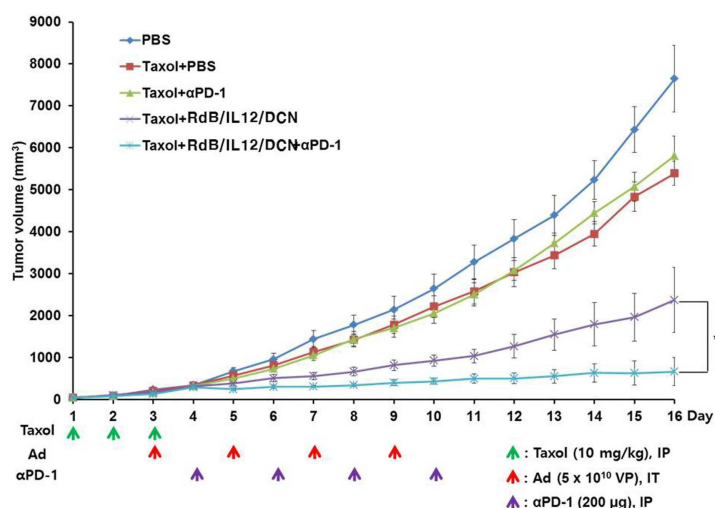
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 세포외 기질 분해 인자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 세포외 기질 분해 인자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는, 종양 조직 내 세포외 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, 엘라스틴 등을 현저히 감소시키고, 바이러스의 증식에 의해 치료 유전자를 종양 세포에서만 선택적으로 고발현시킴으로써, 우수한 항종양 효과를 나타낸다. 특히, 상기 재조합 아데노바이러스는 기존의 항암제 또는 면역 관문 억제제와 병용 투여될 경우, 기존의 항암 효과를 지니면서도, 병용 투여된 치료 물질들의 종양 조직 내 확산 및 분포를 유의적으로 증가시켜, 항종양 효과를 더욱 향상시킬 수 있는바, 본 발명은 암 치료 기술 분야의 핵심기술로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A13027811

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 도약연구(전략-후속연구지원)

연구과제명 선택적 종양 제어를 위한 나노물질 하이브리드 유전자전달체 개발

기여율 50/100

주관기관 한양대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9B5942352

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업 / 바이오·의료기술개발사업 / 차세대신약기반기술개발사업

연구과제명 체장암 치료용 종양 살상 아데노바이러스 후보물질 개발 및 실용화 연구

기여율 50/100

주관기관 한양대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.07.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

IL-12 (Interleukin 12)를 암호화하는 유전자; 및 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는, 항암제 보조용 약학적 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 E1 및 E3 영역으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 영역이 결실되어 있는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 IL-12를 암호화하는 유전자는 재조합 아데노바이러스의 E1 영역에 삽입되는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 상기 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자는 재조합 아데노바이러스의 E1 또는 E3 영역에 삽입되는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 면역 관문 억제제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 면역 관문 억제제는 PD-1(programmed cell death-1), PD-L1 (programmed cell death-ligand 1), PD-L2 (programmed cell death-ligand 2), CD27 (cluster of differentiation 27), CD28 (cluster of differentiation 28), CD70 (cluster of differentiation 70), CD80 (cluster of differentiation 80, also known as B7-1), CD86 (cluster of differentiation 86, also known as B7-2), CD137 (cluster of differentiation 137), CD276 (cluster of differentiation 276), KIRs (killer-cell immunoglobulin-like receptors), LAG3 (lymphocyte-activation gene 3), TNFRSF4 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, also known as CD134), GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein), GITRL (glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand), 4-1BBL (4-1BB ligand), CTLA-4 (cytolytic T lymphocyte associated antigen-4) 길항제, 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 암은 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 자궁경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장

암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팍대부암, 복막암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 정상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 암은 재발암 (Recurrent cancer) 또는 항암제-내성암 (Anticancer drug-resistance cancer)인 것인, 약학적 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항종양 면역성 (Antitumor immunity)을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 세포의 기질 분해 인자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암은 전 세계적으로 질병사망의 수위를 차지하는 질병으로서, 수술, 방사선치료, 항암화학요법 등 복합적인 치료에도 불구하고, 환자 중 50% 이상이 사망하는 난치의 질환이다(WHO: World Health Report, 2001). 암 치료는 외과적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료의 순으로 발전하였다. 초기의 암은 외과적 수술이 효과적이거나, 전이가 있는 대부분의 암은 수술이외 방사선 치료 또는 항암제 치료의 병용을 필요로 한다. 특히, 이러한 치료법은 정상 세포에 미치는 부작용이 크며, 암세포의 다중 약제에 대한 내성으로 완치율이 매우 낮으므로, 새로운 항암 치료법에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다. 특히, 암의 재발이나 전이에 따른 난치성 내성암을 대상으로 한 치료제의 개발이 시급하다. 이러한 현실적 필요성에 따라, 2016년 기준으로 총 2356건의 유전자 치료에 관한 임상 시험 중 암을 대상 질환으로 진행되고 있는 임상시험은 약 64.4%로서, 여러 질환들 중 가장 높은 빈도의 임상시험이 진행 중에 있다.

[0003] 전술한 바와 같이, 현재 사용되는 암의 표준 치료법에는 외과적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료가 있다. 초기, 즉, 암이 국소 및 부근 임파선까지만 전이되었을 때에는 외과적 수술만으로도 완치가 가능하지만, 그 이상 전이가 진행된 경우에는 치료에 한계가 있으므로, 외과적 수술을 통해 완치가 가능한 암 환자는 극소수에 불과하다. 따라서 대부분의 암은 외과적 수술 이외, 방사선과 항암제 치료를 병행하여야만 한다. 하지만, 방사선과 항암제 치료 모두는 표적 치료법이 아니기 때문에 암 세포와 정상 세포를 구분지어 치료할 수 없으므로, 일부 정상 세포 또한 치료시 손상을 받게 된다. 정상 세포 중에서도 빠르게 분열 및 증식이 이루어지는 세포, 즉, 골수에서 형성된 혈액세포, 구강을 포함한 위장관의 상피세포, 머리카락 세포, 그리고 정자, 난자를 만들어내는 생식 세포 등에 큰 영향을 미치게된다. 이렇게 정상 세포에 미치는 부작용이 크기 때문에 실제 종양에 대한 치료율은 극히 낮은 상황이다.

[0004] 이상적인 항암제라면 정상 세포에 손상을 입히지 않으면서 암세포를 제거할 수 있어야 한다. 불행히도 현재까지 개발된 어떠한 약물도 이와 같은 조건을 만족하는 것은 없으며, 단지 바람직한 치료를 위하여 독성과 효과를 저울질하고 있을 뿐이다. 최근에 중점적으로 개발되고 있는 화학요법제를 분류해 보면, 첫째, 신생세포의 증식능을 없애거나 종말기 세포가 되도록하여 종양 세포의 성숙을 차단할 수 있는, 분화 유도제; 둘째, 악성 종양 세포의 표면 특성을 변화시켜 침습과 전이할 수 있는 능력을 혼란시킬 수 있는, 항전이 약물; 셋째, 고형암 세포에서의 산소결핍 상태에서부터 환원 반응을 유도하는, 저산소 종양 간세포 특이성 약물; 넷째, 종양세포 특이적 방사선 약물 등이 있다.

- [0005] 이와 같은 새로운 치료 물질들은 기존의 항암 화학요법에 비해 항암 효과가 증진되었다. 특히, 보다 우수한 잠재력을 보여주고 있는 약물로는 탁산유도체(예; 도세탁셀), 캄포세틴 유도체, 타이미딜레이트 합성 저해제(예; 팔티트렉트), 뉴클레오사이드 유도체(젠티타빈), 5-FU 경구용 유도체 등이 있다. 그러나 이러한 화학요법제들의 독성은 아직도 해결해야 할 문제로 남아 있다.
- [0006] 최근, 암의 분자 생물학적 특성이 많이 규명되면서 특정 암세포만 공격하는 표적 치료제가 개발되고 있다. 표적 암 치료란 암의 성장과 발생에 관여하는 특별한 분자의 활동을 방해하여 암이 성장하고 퍼지는 것을 막는 약제를 사용하는 것을 말한다. 분자와 세포 변화에 초점을 맞추어 보면 표적 치료는 비교적 정상 세포의 손상을 최소화하면서 선택적으로 암세포만 공격하기 때문에 부작용을 최소화할 수 있는 장점이 있다. 표적 치료제들은 대부분 암세포가 특징적으로 가지고 있는 분자를 표적으로 하여 그 효과를 나타낼 수 있도록 만들어졌다. 상기 분자적 표적으로서는, 암세포의 신호전달경로 (signal transduction pathway), 혈관신생 (angiogenesis), 세포간질 (matrix), 세포주기조절인자 (cell cycle regulator), 세포사멸 (apoptosis) 등에 관여하는 분자들이 이용되고 있으나, 이들의 임상적 적용에 이르기까지는 추가 연구가 필요한 상황이다.
- [0007] 또한, 암 치료를 위한 새로운 접근법으로, 신체의 종양 특이적 면역 활성을 이용한 면역 치료에 대한 연구가 진행 중에 있다. 그러나, 암은 종양 내 면역억제 환경 (immunosuppression tumor microenvironment)을 유도함으로써, 다양한 숙주 면역반응을 교묘히 회피하고 파괴하여, 결과적으로 종양의 생존을 지속적으로 유지할 뿐만 아니라, 면역 체계가 활성화되었다라도 활성화된 항종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력을 가진다는 점에서 면역 치료에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 따라서 종양 내 면역 억제환경을 개선하여 암세포에 대한 면역 반응을 증진 시키고자, IL-12, IL-18, IL-23, IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha)와 같은 사이토카인 유전자, B7 분자와 같은 동시 자극 유발 인자, 직접적으로 항원제시세포 (antigen presenting cell; APC)의 역할을 하는 수지상 세포 (dendritic cell; DC), 종양항원으로 활성화시킨 T 세포, 자연살해세포 (natural killer cell; NK) 등을 이용한 연구가 다각적으로 진행되고 있다. 특히, IL-12는 주로 단핵세포 (monocytes), 대식세포(macrophages), DC 등과 같은 APC로부터 분비되며, 암세포를 효과적으로 제거할 수 있는 세포독성 T 세포 (cytotoxic T lymphocyte; CTL)과 NK 세포에 직접 작용하여 이들을 활성화시키고 IFN- $\gamma$ 의 분비를 유도할 뿐만 아니라 암 세포에 대한 살상 능력도 증강시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 나이브 (naive) CD4<sup>+</sup> 림프구에 작용하여, Th1 (T helper 1) 세포로의 분화를 촉진시켜 결국 항암 면역 반응에 중추적인 역할을 하는 세포 매개 면역 반응 (cell-mediated immune response)을 유도하고 증강시킴으로써 항암 면역 반응을 활성화시키는데 중요한 역할을 한다.
- [0008] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 E1B 55kDa 유전자가 소실된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 YKL-1 (Ad-E1B55)의 항종양 효과를 보고한 바 있으며, E1B 유전자의 소실과 E1A의 Rb 결합 부위가 변이되어 이보다 종양 선택적 살상능이 증진된 RdB 아데노 바이러스를 이용하여 GM-CSF의 항종양 효과 역시 보고한 바 있다 (한국 공개특허 제10-2012-0010697호). 하지만, 종양 내 면역 억제 환경이 개선될지라도, 종양의 낮은 면역원성으로 인하여 여전히 암을 완전히 치료하기에는 많은 한계점들을 드러내고 있는 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명자들은 항종양 효과를 향상시킬 수 있는 새로운 치료법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 세포의 기질 분해 인자를 발현하는 종양 선택적 살상 재조합 아데노바이러스를 제조하였으며, 상기 재조합 아데노바이러스는 기존의 항암제 또는 면역 관문 억제제와의 병용을 통해 기존의 항암제 치료의 한계를 극복함과 동시에 매우 현저한 항종양 효과를 나타내었는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은, 세포의 기질 분해 인자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는, 항암제 보조용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은, 면역 관문 억제제와 병용 투여되며, 세포의 기질 분해 인자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는, 암 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, IL-12 (Interleukin 12)를 암호화하는 유전자; 및 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는, 항암제 보조용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 재조합 아데노바이러스는 E1 및/또는 E3 영역이 결실되어 있을 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 IL-12를 암호화하는 유전자는 재조합 아데노바이러스의 E1 영역에 삽입될 수 있고, 상기 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자는 재조합 아데노바이러스의 E1 또는 E3 영역에 삽입될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 면역 관문 억제제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있고, 상기 면역 관문 억제제는 PD-1 길항제, PD-L1 길항제, CTLA-4 길항제, PD-L2 길항제, CD27 길항제, CD28 길항제, CD70 길항제, CD80 길항제, CD86 길항제, CD137 길항제, CD276 길항제, KIRs 길항제, LAG3 길항제, TNFRSF4 길항제, GITR 길항제, GITRL 길항제, 4-1BBL 길항제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 암은 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 자궁경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 복막암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 성상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 또는 재발암 또는 항암제-내성암일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 항종양 면역성 (Antitumor immunity)을 증진시킬 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 IL-12를 암호화하는 유전자; Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 항암제의 치료 효능 증진방법을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 IL-12를 암호화하는 유전자와, Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0022] 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는, 종양 조직 내 세포의 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, 또는 엘라스틴 등을 현저히 감소시키고, 바이러스의 증식에 의해 치료 유전자를 종양 세포에서만 선택적으로 고발현시킴으로써, 우수한 항종양 효과를 나타낸다. 특히, 상기 재조합 아데노바이러스는 기존의 항암제 또는 면역 관문 억제제와 병용 투여될 경우, 기존의 항암 효과를 지니면서도, 병용 투여된 치료 물질들의 종양 조직 내 확산 및 분포를 유의적으로 증가시켜, 항종양 효과를 더욱 향상시킬 수 있는바, 본 발명은 암 치료 기술 분야의 핵심기술로 활용될 수 있을 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 종양 세포 특이적 작용 기작을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포외 기질 (ECM) 분해 기작을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 유전적 구조를 모식화한 것으로, 도 3(a)는 IL-12와 Decorin (DCN)을 동시 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스(RdB/IL-12/DCN)의 유전적 구조를 나타낸 것이고, 도 3(b)는 IL-12와 Relaxin(RLX)을 동시 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스(RdB/IL-12/RLX)의 유전적 구조를 나타낸 것이다. 구체적으로, RdB는 변이된 E1A(open star - Rb 단백질 결합부위의 돌연변이)를 포함하고 있으며, E1B 19 및 55 kDa(E1B), 및 E3 영역 (E3)이 결실되어 있고; IL-12 및 DCN/RLX는 아데노바이러스 지놈의 E1 및/또는 E3 부위에 각각 삽입되었다.



도 4는 RdB/IL-12/DCN과 gemcitabine의 병용 투여에 의한 췌장암 세포주(PANC-1, MIA PaCa-2, 또는 AsPC-1)에 대한 살상능을 MTT assay로 확인한 결과이다.

도 5는 RdB/IL-12/DCN과 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 췌장암 동소이식 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 6은 RdB/IL-12/DCN과 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 조직학적으로 평가한 것으로, 각각 Hematoxylin-eosin (H & E) 염색, PCNA 면역조직염색, E1A 단백질 항체를 이용한 면역조직염색, 및 TUNEL assay를 실시한 결과이다.

도 7은 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-L1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 8은 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-L1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델의 생존율 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 9는 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 햄스터 췌장암 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 10은 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4)의 병용 투여에 의한 메모리 면역 반응(재발암 치료 효과)을 햄스터 췌장암 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 11은 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 항암제 내성 유도 동물 모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 12는 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 췌장암 세포주(MIA PaCa-2, 또는 PANC-1)에 대한 살상능을 MTT assay로 확인한 결과이다.

도 13은 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 TUNEL assay로 확인한 결과이다.

도 14는 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 세포의 기질 분해 효과를 콜라겐 I, 또는 콜라겐 III의 발현량 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 15는 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 세포의 기질 분해 효과를 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, 또는 엘라스틴의 발현량 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 16은 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 조직학적으로 평가한 것으로, 각각 MT 염색, picorosirius 염색, 및 TUNEL assay를 실시한 결과이다.

도 17은 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 췌장암 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 18은 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 세포의 기질 분해 효과를 췌장암 이종이식 동물모델에 형성된 종양 조직 내 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 피브로넥틴, 또는 엘라스틴의 발현량 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 19는 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 조직학적으로 평가한 것으로, 각각 Hematoxylin-eosin(H & E) 염색, TUNEL assay 및 cleaved caspase 3 면역염색을 실시한 결과이다.

도 20은 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-L1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 21은 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-L1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델의 생존율 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 22는 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 23은 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델의 생존율 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 24는 RdB/IL-12/RLX( $1 \times 10^9$  VP)와 면역 관문 억제제(항-PD-1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 흑색종 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 25는 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-L1, 또는 항 PD-1)의 병용 투여에 의한 메모리 면역 반응(재발암 치료 효과)을 흑색종 피하 동물모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 26은 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-1)의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 항암제 내성 유도 동물 모델에 형성된 종양의 크기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 27은 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 의한 위 종양 조직 내 항암제 침투의 증진 효과를 항암제인 trastuzumab 과 면역형광염색을 통하여 확인한 결과이다.

도 28은 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 의한 위 종양 조직 내 항암제의 분포를 평가한 것으로, 상기 도 27에 표시된 영역을 확대하여, 종양 조직 내 margin 부위를 기준으로 항암제의 분포를 확인한 것이다.

도 29는 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 의한 위 종양 조직 내 항암제의 분포를 평가한 것으로, 종양 조직 내 혈관을 기준으로 항암제의 분포를 확인한 것이다. 도 30은 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 의한 위 종양 조직 내 항암제의 체류 시간을 평가한 것으로, PET 이미징을 실시한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0026] 본 발명은 IL-12(Interleukin 12)를 암호화하는 유전자, 및 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는, 항암제 보조용 약학적 조성물; 항암제의 치료 효능을 증진시키기 위한 상기 조성물의 용도; 및 치료학적 유효량의 상기 조성물과 항암제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해(종양)에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 설치류(랫, 생쥐, 기니피그 등), 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 포유류를 의미한다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물에 의한 치료 대상 질병인 "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭한다. 본 발명에서 상기 암은 악성 종양(malignant tumor) 혹은 종양(tumor)과 동일한 의미로 사용되며, 고체 종양 및 혈액 종양(blood born tumor)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 암은 병변 부위에 따라 분류하면, 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 자궁경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팹대부암, 복막암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 성상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 또는 병리학적 특성에 따라 분류할 경우, 재발암 또는 항암제-내성암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 사용되는 용어, 항암제 보조용 약학적 조성물은 기존의 암 치료 물질과 병용되어 암의 치료 효능을 향상시키는 것을 의미한다. 일례로서, 항암제의 치료학적 유효 투여량을 감소시켜 항암제로 인한 부작용을 최소화시키거나, 종양의 성장을 유의적으로 저해시키는 것을 나타낸다. 상기 항암제 보조용 약학 조성물은 항암 보조제 또는 항암치료 보조제 등과 상호 교환적으로 사용가능하다.
- [0031] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 항암제는 대사길항제, 알킬화제, 토포아이소머라제 길항제, 미세소관 길항제, 항암 항생제, 식물유래 알칼로이드, 항체 항암제 또는 분자표적 항암제일 수 있고, 보다 구체적으로, 탁솔, 나



이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 트라스투주맙, 제피티닙, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알부민, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라실, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다라빈, 에노시타빈, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 칼티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노데칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페플로마이신, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 로무스틴 및 카르무스틴일, 이매티닙, 게피티닙, 에르토티닙, 트리스투주맙, 로실레티닙, 네시투무맙, 에버롤리무스, 라무시루맙, 다코미티닙, 포레티닙, 램브롤리주맙, 이필리루맙, 니볼루맙, 다브라페닙, 벨리파립, 세리티닙, 카무스틴, 시클로포스파미드, 이포스파마이드, 익사베필론, 멜팔란, 메르캅토푸린, 미토산트론, 티에스원일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는, 중앙 선택적 살상 재조합 아데노바이러스는, IL-12를 암호화하는 유전자; 세포외 기질 분해 인자인 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명의 재조합 아데노바이러스로는 당업계에서 널리 알려진 oncolytic 아데노바이러스가 이용될 수 있다. 한 구체예로서, 상기 재조합 아데노바이러스는 활성의 E1A 유전자 및 비활성화된 E1B 19 유전자, E1B 55 유전자 또는 E1B 19/E1B 55 유전자를 포함한다. 본 명세서에서, 유전자와 관련하여 사용되는 용어 비활성화는 그 유전자의 전사 및/또는 해독이 정상적으로 이루어지지 아니하여, 그 유전자에 의해 코딩되는 정상적인 단백질의 기능이 나타나지 않는 것을 의미한다. 예컨대, 비활성화 E1B 19 유전자는 그 유전자에 변이(치환, 부가, 부분적 결실 또는 전체적 결실)가 발생되어 활성의 E1B 19 kDa 단백질을 생성하지 못하는 유전자이다. E1B 19가 결실되는 경우에는 세포 고사능을 증가시킬 수 있고, E1B 55 유전자가 결실된 경우에는 중앙 세포 특이성을 갖게 한다(참조: 특허출원 제2002-23760호 및 도 1). 특히, 이와 같은 중앙 선택적 살상 아데노바이러스는 일차 감염세포에 대하여 치료 효과를 나타낼 뿐만 아니라 증식된 바이러스가 주변의 중앙 세포들에 이차적으로 그리고 삼차적으로 연쇄적 감염되어 중앙 세포들을 살상함으로써, 그 치료 효과가 도미노 현상과 같이 계속 퍼져 나갈 수 있어 항중앙 효과가 현저하게 증대될 수 있다. 본 명세서에서 바이러스 게놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, 결실은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 아데노바이러스는 E1A 영역을 포함하고, E1B 영역, 즉 E1B 19 및 55 kDa(E1B)이 결실되어 있으며, 및/또는 E3 영역 (E3)이 결실되어 있다. E1A 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 된다. 상기 IL-12를 암호화하는 유전자는 재조합 아데노바이러스의 결실된 E1 영역에 삽입되며, 상기 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자는 E1 또는 E3 영역에 삽입될 수 있으나, 상기의 유전자 삽입 부위는 적의 변경될 수 있다. 한편, 상기 E1A 부위는 E1A 유전자 서열에 위치한 Rb 결합 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 중에서 45번째 Glu 잔기가 Gly으로 치환된 변이 및 121-127번째 아미노산 서열이 전체적으로 Gly으로 치환된 변이를 갖는다.

[0036] 한편, 상기 아데노바이러스와 다른 바이러스도 본 발명에서 이용될 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 바이러스는, 바람직하게 아데노-관련바이러스 (Adeno associated viruses: AAV)(Lashford LS., et al., Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager (1999)), 레트로바이러스 (Gunzburg WH, et al., Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, (1999)), 렌티바이러스(Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스시플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995)), 백시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), 리오바이러스, 폭스바이러스 (GCE, NJL, Krupa M, Esteban M., The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer Curr Gene Ther 8(2):97-120(2008)), 썬리키 포리스트 바이러스, 폴리머 (Hwang et al., In vitro and In vivo Transfection Efficiency of Human Osteoprotegerin Gene using Non-Viral Polymer Carriers., Korean J. Bone Metab. 13(2):119-128(2006)), 리포솜 (Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002), 나노물질 또는 나노솜에 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 이용되는 재조합 아데노바이러스는 동물세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동 가능한 프로모터를 포함한다. 본 발명에 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지

놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, U6 프로모터 및 H1 프로모터, MLV(Murine Leukemia Virus) LTR(Long terminal repeat) 프로모터, 아데노바이러스 초기 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, inducible 프로모터, 암세포 특이적 프로모터(예컨대, TERT 프로모터, modified TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, Survivin 프로모터, E2F 프로모터, modified E2F 프로모터, AFP 프로모터, modified AFP 프로모터, E2F-AFP hybrid 프로모터, 및 E2F-TERT hybrid 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터(예컨대, 알부민 프로모터), 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 마우스 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, CMV 프로모터이다. 트랜스 유전자를 발현시키기 위한 발현 컨스트럭트에서 트랜스 유전자의 다운스트림에 폴리아데닐화 서열이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 상기 폴리아데닐화 서열은, 소성장 호르몬 터미네이터(Gimmi, E. R., et al., Nucleic Acids Res. 17:6983-6998(1989)), SV40 유래 폴리 아데닐화 서열(Schek, N, et al., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393(1992)), HIV-1 polyA(Klasens, B. I. F., et al., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876(1998)), 纖維글로빈 polyA(Gil, A., et al, Cell 49:399-406(1987)), HSV TK polyA(Cole, C. N. and T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113(1985)) 또는 폴리오마바이러스 polyA(Batt, D. B and G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15:4783-4790(1995))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 이용되는 재조합 아데노바이러스에서, IL-12 유전자 서열과, Decorin 또는 Relaxin 유전자 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[0039] 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 선택표지로서 항생제 내성 유전자 및 리포터 유전자(예컨대, GFP(green fluorescence protein), 루시페라아제 및 纖維글루쿠로니다아제)를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 항생제 내성 유전자는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 네오마이신 내성 유전자이다. 상기의 선택표지는 별도의 프로모터 또는 IRES(internal ribosome entry site), 2A system(F2A system, P2A system, T2A system) 에 의해 연결된 발현 시스템에 의해서도 발현될 수 있으며, 본 발명에서 이용될 수 있는 IRES는 몇 종의 바이러스 및 세포의 RNAs에서 발견되는 조절 서열이다.

[0040] 본 발명에서 사용되는, "IL-12를 암호화하는 유전자"는 IL-12A(p35) 유전자 서열 및 IL-12B(p40) 유전자 서열을 포함하며, Viral Protein의 효과적인 번역을 위하여, IL-12A (p35) 유전자 서열과 IL-12B(p40) 유전자 서열 사이에 IRES 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 IL-12A (p35) 유전자 서열은 서열번호 1, 상기 IL-12B(p40) 유전자 서열은 서열번호 2, 상기 IRES 서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 IL-12는 T helper 1 세포의 분화를 유도하고 세포독성 T 림프구 및 자연살상 세포의 세포독성을 활성화시킴으로써 항종양 면역을 증가시키는 역할을 한다.

[0041] 본 발명에서 사용되는, "Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자"는 바람직하게, 상기 Decorin 유전자 서열은 서열번호 4, 상기 Relaxin 유전자 서열은 서열번호 5로 이루어질 수 있다. 치료 효과가 비교적 낮은 대부분의 종양들은 세포외 기질(extra cellular matrix; ECM)의 발달로 인해 아데노바이러스가 종양 조직에 고르게 확산되지 못하고 투여한 국소 부위에 머무르게 되는 경우가 빈번하다. 상기 Decorin 또는 Relaxin은 세포외 기질의 구성 성분, 예컨대, 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, 또는 엘라스틴 등을 분해하여, 종양 조직 내 치료물질의 확산과 분포를 증가시키는 역할을 하며(도 2 참조), 추가적으로 Decorin의 경우에는, 그 자체로서 항종양 효과를 지니고 있다. 특히, 상기의 효과는 종양 선택적 살상 재조합 아데노바이러스 그 자체 뿐만 아니라 병용 투여되는 물질의 확산 및 분포에도 영향을 미칠 수 있는바, 기존의 암 치료 물질과의 병용을 통해 항종양 효과를 극대화시킴에 기여할 수 있다.

[0042] 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 이러한 일체의 구성을 포함함으로써, 재조합 아데노바이러스 자체로부터 기인하는 종양 선택적 살상 효능뿐만 아니라, 상기 조성물과 병용 투여되는 항암제의 종양 조직 내 침투를 지속적으로 향상시켜, 암의 치료 효과를 극대화시켰다는 점에 기술적 특징이 있다. 다시 말하면, 유전자 치료의 효능은 그 대로 유지하면서, 종래 항암제에 의한 치료 효능을 현저하게 증가시킴으로써, 궁극적으로 완치에 가까운 치료

효능을 얻을 수 있다.

[0043] 상기 유전자 서열들은 실질적인 동일성(substantial identity) 또는 실질적인 유사성(substantial similarity)을 나타내는 유전자 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 정렬된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 상기의 실질적인 유사성은, 하나 이상의 염기의 결손 또는 삽입과 같은 유전자 서열의 변화가 재조합 아데노바이러스 벡터와의 상동성 재조합을 최소화하는 본 발명의 목적에 영향을 미치지 않는 변화를 총칭한다. 따라서, 본 발명의 유전자 서열은 예시된 서열번호 1 내지 서열번호 5에 한정되지 않으며, 본 발명이 목적하는 최종 생성물의 활성에 실질적으로 영향을 주지 않는 한, 본 발명의 권리범위에 포함된다고 해석된다.

[0045] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 면역 관문 억제제(Immune checkpoint inhibitor)와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어, "면역 관문"은 면역세포 표면에서 면역 반응의 자극 또는 억제 신호를 유발하는데 관여하는 단백질을 총칭하며, 암세포는 이러한 면역 관문을 통해 면역반응의 자극 및 이에 따른 암세포의 억제가 제대로 진행되지 않도록 조작하여 면역체계의 감시망을 회피하게 되며, 즉, 항종양 면역반응을 무력화시킨다. 바람직하게 상기 면역 관문 단백질은 PD-1 (programmed cell death-1), PD-L1 (programmed cell death-ligand 1), PD-L2 (programmed cell death-ligand 2), CD27 (cluster of differentiation 27), CD28 (cluster of differentiation 28), CD70 (cluster of differentiation 70), CD80 (cluster of differentiation 80, also known as B7-1), CD86 (cluster of differentiation 86, also known as B7-2), CD137 (cluster of differentiation 137), CD276(cluster of differentiation 276), KIRs (killer-cell immunoglobulin-like receptors), LAG3(lymphocyte-activation gene 3), TNFRSF4 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, also known as CD134), GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein), GITRL (glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand), 4-1BBL (4-1BB ligand), 또는 CTLA-4 (cytolytic T lymphocyte associated antigen-4)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 면역 관문 억제제는 이러한 면역 관문 단백질을 표적으로 하는 길항제 또는 항체로서, 면역반응을 자극시키는 단백질을 증진시키거나 면역반응을 억제하는 단백질을 차단하여 면역반응에 의한 항종양 효과를 나타낸다. 면역 관문 억제제는 일반적인 세포 독성 항암제보다 구토나 탈모와 같은 부작용이 적고, 치료 효과가 크다는 장점이 외에도 기억능이 우수한 면역반응 체계를 이용하기 때문에 약물 투여를 중단한 후에도 치료효과가 오랫동안 지속될 수 있다. 그러나 면역 관문 억제제는 면역 억제 환경에서는 그 치료 효과가 현저하게 감소되고, 특히, 일부의 환자들에서는 종양의 재발이 보고된바 있다.

[0048] 한편, 종양에 대한 면역 유전자 치료법은 지난 수십 년 동안 유망한 접근법으로서 발전해왔으나, 종양 역시 이러한 면역의 감시 체계를 회피하기 위한 수많은 다른 전략을 만들어 왔다. 이러한 장애를 극복하고 항종양 면역의 효과를 증진시키기 위하여, 본 발명은 전술한 바와 같이, IL-12 및 세포외 기질 분해 인자를 포함하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스 시스템을 구축하였으며 (RdB/IL12/DCN, RdB/IL12/RLX), 이와 함께 면역 관문 억제제를 병용함으로써, 본 발명에 따른 시스템이 보다 효과적으로 작용할 수 있는 환경을 제공하였다. 즉, 항종양 면역반응을 무력화시키는 종양 세포의 회피 기전을 차단함으로써, 면역 유전자 치료의 효능을 극대화시켰다. 이러한 현저한 효과에 따라, 본 발명의 약학적 조성물은 원발성 암뿐만 아니라, 종래 항암제의 한계로 지적되어 왔던 재발암 및 항암제 내성암의 치료에 대해서도 유효한 효과를 나타내었다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 진분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강, 폐강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 바람직하게는 종양 내(intratumorally) 직접적으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정

도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 약학적으로 유효한 양은 의학적으로 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0053] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 IL-12 (Interleukin 12)를 암호화하는 유전자, 및 Decorin 또는 Relaxin을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하며, 면역 관문 억제제와 병용 투여되는, 암의 치료용 약학적 조성물; 암의 치료를 위한 상기 조성물의 용도; 및 상기 조성물 및 면역 관문 억제제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에 따른 암의 치료용 약학적 조성물 등은, 전술한 항암제 보조용 약학적 조성물에서 기술한 바 있는 기술적 구성을 이용하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 개체를 생략한다.

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] **[실시예]**

[0059] **실시예 1. 중앙 선택적 살상 아데노바이러스의 제작**

[0060] **1-1. RdB/IL-12/DCN 및 RdB/IL-12/RLX의 제작**

[0061] 아데노바이러스 E3 부위에 decorin 또는 relaxin을 발현하는 아데노바이러스 서플 벡터를 제작하기 위하여, decorin 또는 relaxin을 암호화하는 서열을 pSP72 E3/CMV-po1A 아데노바이러스 E3 서플 벡터(Yun CO. et al., Cancer Gene Ther, 2005. 12(1): p. 61-71)에 각각 클로닝하여, pSP72 E3/DCN와 pSP72 E3/RLX E3 서플 벡터를 제작하였다. 상동재조합을 위하여 상기 pSP72 E3/DCN와 pSP72 E3/RLX와 각각 아데노바이러스 전체 벡터인 pdE1를 대장균 BJ5183에 동시 형질전환시켜, pdE1/DCN와 pdE1/RLX 아데노바이러스 플라스미드를 제작하였다.

[0062] IL-12를 발현하는 Ad E1 서플벡터를 구축하기 위하여, pCA14/IL12(Lee YS. et al., Clin Cancer Res, 2006. 12(19): p. 5859-68)로부터 마우스 IL-12 유전자를 잘라내고, 이를 pXC1RdB E1 서플벡터에 서브클로닝하여, pXC1RdB/IL12 E1 서플벡터를 제작하였다. 상동재조합을 위하여 상기 pXC1RdB/IL12 E1 서플벡터와 pdE1/DCN 또는 pdE1/RLX를 대장균 BJ5183에 동시 형질전환시켰으며, 이로써 pRdB/IL12/DCN와 pRdB/IL12/RLX Ad 벡터를 제작하였다. 아데노바이러스의 정제, 적정(titration) 및 품질분석은 선행기술에 따라 수행하였다(Lee YS. et al., Clin Cancer Res, 2006. 12(19): p. 5859-68, Choi KJ. et al., Gene Ther, 2012. 19(7): p. 711-23).

[0064] **실시예 2. Decorin을 발현하는 중앙 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용**

[0065] **2-1. 췌장암 세포에 대한 살상능 확인**

[0066] Relaxin을 발현하는 중앙 선택적 살상 아데노바이러스(이하, RdB/IL-12/DCN으로 명명)와 췌장암 표준 치료제인 gemcitabine을 병용 투여한 경우, 췌장암 세포에 대한 살상능이 현저하게 증가할 수 있는지를 검증하고자 하였다. 이를 위하여, 사람의 췌장암 세포주인 PANC-1, MIA PaCa-2, 및 AsPC-1에 본 발명의 RdB/IL-12/DCN을 각각 0.5 또는 2 MOI의 역가로 감염시키고, 이와 함께 gemcitabine (0.05, 0.2, 1, 2, 5, 20, 또는 100 µg/ml)을 함께 처리한 후, 세포 사멸의 정도를 MTT assay를 통하여 관찰하였다.

[0067] 도 4에 나타난 바와 같이, gemcitabine을 단독으로 처리한 경우, PANC-1, MIA PaCa-2, 및 AsPC-1 모두에서, 고농도인 100 µg/ml 농도에서도 최대 30% 미만의 살상능만이 관찰되었으나, RdB/IL-12/DCN을 gemcitabine과 병용 투여한 경우, 0.2 µg/ml의 낮은 gemcitabine 농도에서도 상기 췌장암 세포주들에 대한 살상능이 현저하게 증가하였다. 특히, 이러한 효과는 RdB/IL-12/DCN을 단독 투여한 경우에 비해서도 우수하였으며, 재조합 아데노바이러스의 농도가 높아질수록(2 MOI) 그 효과는 보다 현저하였다. 따라서, 상기 실험 결과는, 기존의 항암제와 본 발명에 따른 RdB/IL-12/DCN의 병용 투여는, 항종양 치료를 위한 항암제의 투여 용량을 줄일 수 있을 뿐만 아니



라, 보다 강력한 항종양 효과를 나타냄을 시사하는 것이다.

[0069]

**2-2. 췌장암 동소이식 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0070]

**(1) 종양의 크기 변화 확인**

[0071]

췌장암 동소이식 동물모델을 구축하기 위하여 human pancreatic cancer cell line인 MIA PaCa-2-Fluc를 선정하여 실험에 사용하였다. 종양 세포를 생쥐 췌장에 주입하고, 이로부터 2주 후, IVIS 영상화 기계를 통해 종양의 생성을 확인하였다. 이후, RdB/IL-12/DCN을  $2 \times 10^{10}$  VP/500  $\mu$ L씩 2일 간격으로 복강 내로 3회 투여하였고, gemcitabine은 100mg/kg으로 일주일에 두 번씩 총 3주 동안 투여하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다. RdB/IL-12/DCN 투여 전 종양의 크기 및 photon 값을 IVIS 영상화 기계를 이용하여 확인하였으며, 투여 후 1주, 2주, 및 3주째, 종양의 크기 변화를 정량적으로 비교하였다.

[0072]

도 5에 나타낸 바와 같이, 음성 대조군(PBS) 및 gemcitabine 단독 투여 군(gemcitabine)에서는 종양 크기의 급격한 증가가 관찰되었던 반면, 병용 투여 군(Ad+ gemcitabine)에서는 이러한 종양의 성장이 둔화되었을 뿐만 아니라 (1주 및 2주), 나아가 3 주째에는 오히려 종양의 크기가 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 상기 실험 결과는, 기존의 항암제와 RdB/IL-12/DCN의 병용 투여에 따른 항종양 효과는, 이들 각각의 단독 투여에 비해 매우 현저함을 나타내는 것이다.

[0074]

**(2) 항종양 효과의 조직학적 평가**

[0075]

상기의 실험에서의 항종양 효과를 조직학적으로 평가하고자 하였다. 우선, human pancreatic cancer cell line인 MIA PaCa-2-Fluc를 마우스 췌장에 주입하여 종양의 형성을 유도한 뒤, PBS, gemcitabine, RdB/IL-12/DCN, 또는 gemcitabine+RdB/IL-12/DCN을 각각 투여하였다. 이후, 상기 종양 조직을 수거하여 Hematoxylin-eosin(H & E) 염색, PCNA 면역조직염색을 실시하였다. 또한, 종양 세포의 사멸 정도 확인하기 위하여 TUNEL assay를 실시하였고, 상기 항종양 효과가 종양 조직 내 존재하는 아데노바이러스의 복제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 아데노바이러스의 E1A 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직염색을 실시하였다.

[0076]

도 6에 나타낸 바와 같이, PBS 또는 gemcitabine 단독 투여 군에서는 세포 괴사가 거의 관찰되지 않았던 반면, RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 gemcitabine+RdB/IL-12/DCN을 병용 투여한 경우, 종양 내 세포의 괴사가 매우 활발히 진행되었다. 특히, gemcitabine과 RdB/IL-12/DCN을 병용 투여한 군은 종양의 대부분에서 세포 괴사가 일어난 것을 확인하였다. 또한, 상기 결과와 마찬가지로, PBS 또는 gemcitabine 단독 투여군에 비해, RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 gemcitabine+RdB/IL-12/DCN 투여 군에서 종양 세포의 증식이 현저하게 감소됨을 PCNA 면역조직염색을 통하여 관찰하였고, gemcitabine과 RdB/IL-12/DCN을 병용 투여한 군에서 그 효과가 가장 현저하였다. 아울러, 세포 사멸 정도도 역시 RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 gemcitabine+RdB/IL-12/DCN 투여 군, 특히, gemcitabine과 RdB/IL-12/DCN을 병용 투여한 군에서 높은 수준의 세포 사멸을 확인하였다. 끝으로, 아데노바이러스의 E1A 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직염색을 수행한 결과, PBS 또는 gemcitabine만 투여한 마우스의 종양에 비해, RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 gemcitabine+RdB/IL-12/DCN을 투여한 마우스의 종양에서 아데노바이러스의 E1A 단백질이 현저하게 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[0077]

이러한 결과를 종합해 보면, decorin에 의해 RdB/IL-12/DCN의 종양 조직 내 분포가 증가하고, 이에 따라 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 활발한 복제 및 종양 세포에 대한 살상이 유도된다. 또한, 종양 조직 내 분포하는 RdB/IL-12/DCN의 활발한 증식에 의해 decorin 유전자가 고발현됨에 따라, 다시 종양 세포의 사멸이 더욱 촉진되고, 병용 투여된 항암제의 효능을 증진시켜 강력한 항종양 효과를 야기함을 알 수 있다.

[0079]

**실시예 3. Decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 면역 관문 억제제의 병용**

[0080]

**3-1. 흑색종 피하 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0081]

흑색종 세포주인 B16-F10을 마우스 피하에 마리당  $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ L로 주입한 후, 약 10일 뒤 종양의 크기가 약  $100\text{mm}^3$ 에 도달하였을 때,  $5 \times 10^9$  VP의 RdB/IL-12/DCN를 단독, 또는 200  $\mu$ g의 역가로 면역 관문 억제제 (항-PD-L1)와 함께 병용 투여하면서, 이에 따른 종양의 크기 변화를 관찰하였다. 병용 투여시, RdB/IL-12/DCN을 1일, 3일, 및 5일째 총 3회 종양 내 투여하였고, 면역 관문 억제제는 3일, 6일, 및 9일째 총 3회 복강 내 투여하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0082]

도 7 및 도 8에 나타내 바와 같이, 종양 선택적 살상 아데노바이러스 (RdB/IL-12/DCN)를 면역 관문 억제제와 병용 투여한 경우, RdB/IL-12/DCN 또는 면역 관문 억제제 단독 투여군에 비해, 종양 크기의 증가가 현저하게 감소

되었고, 흑색종 피하 동물모델의 생존율이 크게 향상됨을 확인하였다. 따라서, 상기 실험 결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/DCN와 면역 관문 억제제의 병용 투여는 보다 강력하고 효과적인 항암 치료제로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0084] **3-2. 햄스터 체장암 피하 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0085] 체내 면역기능을 보유하면서 재조합 바이러스의 체내 복제가 가능한 햄스터 모델을 이용하여, RdB/IL-12/DCN와 면역 관문 억제제의 병용 투여에 의한 항종양 면역반응을 확인하고자 하였다. 햄스터의 체장암 세포주인 Hap-T1을 햄스터 피하에 주입한 후, 종양의 크기가 약 100mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 2×10<sup>9</sup> VP의 RdB/IL-12/DCN을 단독, 또는 700 μg의 역가로 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4)와 함께 병용 투여하면서, 이에 따른 종양의 크기 변화를 관찰하였다. 병용 투여시, RdB/IL-12/DCN을 2일 간격으로 총 3회 종양 내 투여하였고, 면역 관문 억제제는 총 3회 복강 내 투여하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0086] 도 9에 나타낸 바와 같이, 종양 선택적 살상 아데노바이러스(RdB/IL-12/DCN)를 면역 관문 억제제와 병용 투여한 결과, RdB/IL-12/DCN 또는 면역 관문 억제제 단독 투여군에 비해, 종양 크기의 증가가 현저하게 감소되었으며, 이러한 경향은 3 종류의 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4) 모두에서 동일하게 나타났다. 구체적으로, 투여 21일 경과 후, 면역 관문 억제제 단독 투여 군 각각은(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4), 음성 대조군에 비해 종양의 성장을 약 35.4%, 38.8%, 또는 7.2% 억제시킴에 그쳤으나, RdB/IL-12/DCN 단독 투여 군 각각의 경우, 종양의 성장을 약 89.8%, 57.7%, 또는 48.2%까지 억제시킬 수 있었다. 특히, RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제를 병용 투여한 경우에는 음성 대조군에 비해 종양의 성장을 각각 95.7%, 82.1%, 또는 78.1%까지 억제시킬 수 있었는데, 전술한 항종양 효과를 재차 검증할 수 있었다.

[0088] **3-3. 햄스터 체장암 피하 동물모델에서의 메모리 면역반응 확인**

[0089] 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 면역 관문 억제제의 병용 투여에 의한 항종양 메모리 면역반응을 검증하고자 하였다. 최초로 종양이 생성된 지 49일 후, 종양이 완전히 사라진 마우스(RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제의 병용 투여군)를 대상으로, 이전과 동일한 조건으로 Hap-T1 세포를 주입하여 종양을 재차 형성하였다. 이후, RdB/IL-12/DCN을 단독, 또는 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4)와 함께 병용 투여하면서, 종전과 마찬가지로 종양의 성장을 관찰하였다.

[0090] 도 10에 나타낸 바와 같이, RdB/IL-12/DCN을 단독 처리한 군에서는, rechallenge한 종양이 다시 급격하게 성장하였던 반면, RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4)를 병용 투여한 경우에는, 여전히 종양의 성장이 억제됨을 확인하였다. 따라서, 상기 실험 결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/DCN와 면역 관문 억제제의 병용 투여는 강력한 항종양 메모리 면역반응을 유도하여 재발암 치료에도 효과적임을 나타낸다.

[0092] **3-4. 항암제 내성 유도 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0093] 항암제 내성 등으로 인해 항암제에 의한 항종양 효과가 미미한 조건에서, RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제(항-PD-1 항체; αPD-1)의 병용 투여에 의한 생체 내 항종양 효과를 검증하고자 하였다. B16-F10 마우스 흑색종 세포주를 C57BL/6 마우스의 옆구리 피하에 주사(5×10<sup>5</sup> cells)한 후, 형성된 종양(day 1, 약 50mm<sup>3</sup>)에 taxol(day 1, 2, 3; 10mg/kg)을 복강 내로 주사하였고, RdB/IL-12/DCN 단독(day 3, 5, 7, 9; 5×10<sup>5</sup> VP), αPD-1 단독(day 4, 7, 8, 10; 200 μg), 또는 RdB/IL-12/DCN 및 αPD-1 병용 투여(각각 동일 조건)한 후, 종양의 성장을 관찰하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0094] 도 11에 나타낸 바와 같이, 항암제를 최초 투여한 후 15일째(day 16), PBS, taxol, 또는 αPD-1만을 단독 투여한 경우, 종양의 크기가 각각 7649.0±798.5mm<sup>3</sup>, 5394.5±288.2mm<sup>3</sup>, 또는 5814.2±471.6 mm<sup>3</sup>로, 종양의 급격한 성장을 확인하였던 반면, RdB/IL-12/DCN 단독, 또는 RdB/IL-12/DCN 및 αPD-1 병용 투여군에서는, 종양의 크기가 각각 2374.0±776.2mm<sup>3</sup> 또는 669.8±335.2mm<sup>3</sup>로, 유의적인 항종양 효과를 나타내었다. 특히, RdB/IL-12/DCN 및 αPD-1 병용 투여군은 RdB/IL-12/DCN 단독 투여 군에 비해, 종양의 크기가 약 71.8% 감소되었는데, 그 효과가 매우 현저하였다(P < 0.01). 이러한 실험결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/DCN과 면역 관문 억제제의 병용 투여는, 종래 항암제의 항종양 효과를 보다 향상시키는 수준에 그치는 것이 아니라, 항암제 내성 등의 생체 내 요인으로 인해 항암제의 효과가 미미한 경우에도 유의적인 항종양 효과를 부여하는, 현저한 효과를 보여주는 것이다.



[0096] **실시예 4. Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용**

[0097] **4-1. 췌장암 세포에 대한 살상능 확인**

[0098] Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 췌장암 표준 치료제인 gemcitabine을 병용 투여한 경우, 췌장암 세포에 대한 살상능이 현저하게 증가할 수 있는지를 검증하고자 하였다. 이를 위하여, 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2와 PANC-1에 RdB/IL-12/RLX를 각각 0.1, 0.5, 1 또는 2MOI의 역가로 감염시키고 gemcitabine 0.01 μM 또는 0.05 μM을 이와 동시에 처리한 후, 세포 사멸의 정도를 MTT assay를 통하여 관찰하였다. 한편, 음성 대조군으로는 비처리 군을 사용하였다.

[0099] 도 12에 나타낸 바와 같이, RdB/IL-12/RLX (YDC002)를 gemcitabine과 병용 투여한 경우, gemcitabine을 단독으로 처리한 경우에 비해, 췌장암 세포주에 대한 살상능이 현저하게 증가하였다. 특히, 이러한 효과는 RdB/IL-12/RLX를 단독 투여한 경우에 비해서도 우수하였으며, 재조합 아데노바이러스의 농도가 높아질수록(2 MOI) 그 효과는 보다 현저하였다. 따라서, 상기 실험 결과는, 기존의 항암제와 본 발명에 따른 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여는, 항종양 치료를 위한 항암제의 투여 용량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 보다 강력한 항종양 효과를 나타냄을 시사하는 것이다.

[0101] **4-2. 항종양 효과의 조직학적 평가**

[0102] 상기의 실험에서의 항종양 효과를 조직학적으로 평가하고자 하였다. 우선, 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 또는 PANC-1에 RdB/IL-12/RLX 단독(0.5 또는 1 MOI), gemcitabine 단독(0.02 또는 0.05 μM), 또는 RdB/IL-12/RLX 와 gemcitabine의 병용 투여한 뒤, 종양 세포의 사멸 정도 확인하기 위하여 TUNEL assay를 실시하였다. 한편, 음성 대조군으로는 비처리 군을 사용하였다. 또한, 췌장암 세포주에서 RdB/IL-12/RLX에 의한 세포외 기질(ECM: extracellular matrix)의 변화를 확인하고자 하였다. 상기 종양 세포 내 콜라겐 I, 콜라겐 III의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 qPCR을 실시하였고, 췌장암 조직(구상체) 내 세포외 기질의 변화 및 이에 따른 세포 사멸 효과를 면역조직염색, MT염색, 및 Picorosirius 염색 등을 통하여 확인하였다.

[0103] 도 13에서 나타낸 바와 같이, MIA PaCa-2 및 PANC-1 세포 모두에서, 대조군 또는 gemcitabine 단독 투여군에 비해, RdB/IL-12/RLX 단독, 또는 RdB/IL-12/RLX 및 gemcitabine 병용 투여 군에서 종양 세포의 사멸이 현저하게 증가됨을 관찰하였고, RdB/IL-12/RLX 및 gemcitabine 을 병용 투여한 군에서 그 효과가 가장 현저하였다. 인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 및 PANC-1에 RdB/IL-12/RLX를 1 MOI로 감염시킨 후 72시간 췌, 콜라겐 I 및 콜라겐 III의 mRNA 발현량을 비교한 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, RdB/IL-12/RLX 단독, 또는 RdB/IL-12/RLX 및 gemcitabine 병용 투여 군에서는 상기 mRNA 발현량이 다른 군들에 비해 현저하게 감소되었다. 이와 마찬가지로, 도 15 및 도 16에 나타낸 바와 같이, RdB/IL-12/RLX 단독, 또는 RdB/IL-12/RLX 및 gemcitabine 병용 투여 군에서, 콜라겐 I, 콜라겐 III, 피브로넥틴, 및 엘라스틴의 발현량이 크게 감소됨을 확인하였고, 이에 따라 종양 세포의 사멸이 크게 향상됨을 확인하였다.

[0104] 이러한 결과를 종합해 보면, relaxin에 의해 세포외 기질의 발현이 감소되고, 이에 따라, 종양 선택적 살상 아데노바이러스 및 병용 투여된 항암제의 효능을 증진시켜 항종양 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0106] **4-3. 췌장암 피하 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0107] RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 췌장암 피하 동물모델에서 검증하고자 하였다. PANC-1, MIA PaCa-2, 또는 BxPC-3 세포를 생쥐의 피하에 주입하여 종양의 형성을 유도한 뒤, RdB/IL-12/RLX를 단독, 또는 gemcitabine(10 mg/kg) 과 함께 병용 투여(종양 내 투여)하면서, 이에 따른 종양의 크기 변화를 관찰하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0108] 도 17에 나타낸 바와 같이, 췌장암 피하 동물모델(PANC-1, MIA PaCa-2, 또는 BxPC-3) 모두에서 공통적으로, 음성 대조군 (PBS) 및 gemcitabine 단독 투여 군(Gemcitabine)에서는 종양 크기의 급격한 증가가 관찰되었던 반면, RdB/IL-12/RLX를 단독 또는 RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine을 병용 투여한 군에서는 종양의 성장이 크게 둔화되었음을 확인하였고, 특히, 이러한 효과는 병용 투여한 경우 매우 현저하였다. 상기 실험 결과는, 기존의 항암제와 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 따른 항종양 효과는, 이들 각각의 단독 투여에 비해 매우 현저함을 나타내는 것이다.

[0110] **4-4. 췌장암 이종이식 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0111] 췌장암 이종이식 동물모델을 구축하기 위하여, 생쥐 피하에 MIA PaCa-2를  $5 \times 10^5$ 로 주입한 후, 종양의 크기가

50-100mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 2×10<sup>6</sup> pfu의 RdB/IL-12/RLX를 단독, 또는 1.5 mg/kg의 gemcitabine과 함께 병용 투여하면서, 이에 따른 세포의 기질의 변화 및 세포 사멸 효과를 관찰하였다. 병용 투여시, RdB/IL-12/RLX는 2일 간격으로 총 3회 종양 내 투여하였고, gemcitabine은 1회 복강 내 투여하였다. 이후, 면역조직염색 및 Hematoxylin-eosin(H & E) 염색을 실시하였고, 세포 사멸의 정도를 확인하기 위하여 TUNEL assay 및 cleaved caspase 3 면역염색을 실시하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0112] 도 18에 나타난 바와 같이, RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine을 병용 투여한 군에서는 다른 군들에 비해, MIA PaCa-2 종양 조직 내 콜라겐 I, 콜라겐 IV, 피브로넥틴, 및 엘라스틴 모두가 현저하게 감소되었다. 또한, 도 19에 나타내 바와 같이, 음성 대조군, gemcitabine 또는 RdB/IL-12/RLX 단독 투여 군에서는 종양 내 세포의 괴사 또는 사멸이 거의 진행되지 않거나 미약하였던 반면, RdB/IL-12/RLX와 gemcitabine을 병용 투여한 군에서는 세포 괴사 또는 사멸이 활발하게 진행됨을 알 수 있었다. 즉, 상기 실험 결과는, 상기 항암제와 본 발명에 따른 RdB/IL-12/RLX의 병용 투여에 의한 항종양 효과를 재차 검증하는 것이다.

[0114] **실시에 5. Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 면역 관문 억제제의 병용**

[0115] **5-1. 흑색종 피하 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0116] 흑색종 세포주인 B16-F10을 마우스 피하에 마리당 5×10<sup>5</sup> cells/50 μL로 주입한 후, 약 7-14일 뒤 종양의 크기가 100-150mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때, 5×10<sup>9</sup> VP의 RdB/IL-12/RLX를 단독, 또는 200 μg의 역가로 면역 관문 억제제(항-PD-L1 또는 항-PD1)와 함께 병용 투여하면서, 이에 따른 종양 크기의 변화 및 상기 동물모델의 생존율을 평가하였다. 병용 투여시, RdB/IL-12/RLX를 1일, 3일, 및 5일째 총 3회 종양 내 투여하였고, 면역 관문 억제제는 3일, 6일, 및 9일째 총 3회 복강 내 투여하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0117] 도 20 내지 도 23에 나타난 바와 같이, 종양 선택적 살상 아데노바이러스(RdB/IL-12/RLX)를 면역 관문 억제제(항-PD-L1 또는 항-PD1)와 병용 투여한 결과, RdB/IL-12/RLX 또는 면역 관문 억제제 단독 투여군보다 종양 크기의 증가가 현저하게 감소되었고, 흑색종 피하 동물모델의 생존율이 크게 향상됨을 확인하였다. 또한, 상기 실험에서 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB/IL-12/RLX 단독 투여에 따른 항종양 효과가 매우 강력하여, 병용 투여의 우수한 효과를 증명함에 어려움이 있었다. 따라서, RdB/IL-12/RLX 투여 농도를 5배 감소시켜(1×10<sup>9</sup> VP), 재실험을 진행한 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD1)를 병용 투여한 군의 항종양 효과가 RdB/IL-12/RLX 단독 투여 군에 비해 현저함을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 실험 결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제의 병용 투여는 보다 강력하고 효과적인 항암 치료제로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0119] **5-2. 흑색종 피하 동물모델에서의 메모리 면역반응 확인**

[0120] 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 면역 관문 억제제의 병용 투여에 의한 항종양 메모리 면역반응을 검증하고자 하였다. 최초로 종양이 생성된 지 50일 후, 종양이 완전히 사라진 마우스(RdB/IL-12/RLX 및 면역 관문 억제제의 병용 투여군)를 대상으로, 이전과 동일한 조건으로 B16-F10 세포를 주입하여 종양을 재차 형성하였다. 이후, RdB/IL-12/RLX를 단독, 또는 면역 관문 억제제(항-PD-1, 및 항-PD-L1)와 함께 병용 투여하면서, 종전과 마찬가지로 종양의 성장을 관찰하였다.

[0121] 도 25에 나타난 바와 같이, RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항-PD-1, 항-PD-L1)를 병용 투여한 경우에는, 종양의 성장이 현격하게 감소됨을 확인하였다. 따라서, 상기 실험 결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제의 병용 투여는 강력한 항종양 메모리 면역반응을 유도하여 재발암 치료에도 효과적임을 나타낸다.

[0123] **5-3. 항암제 내성 유도 동물모델에서의 항종양 효과 확인**

[0124] 항암제 내성 등으로 인해 항암제에 의한 항종양 효과가 미미한 조건에서, RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제(항 PD-1 항체; αPD-1)의 병용 투여에 의한 생체 내 항종양 효과를 검증하고자 하였다. B16-F10 마우스 흑색종 세포주를 C57BL/6 마우스의 옆구리 피하에 주사(5×10<sup>5</sup> cells)한 후, 형성된 종양(day 1, 약 50mm<sup>3</sup>)에 taxol(day 1, 2, 3; 10 mg/kg)을 복강 내 주사하였고, RdB/IL-12/DCN 단독(day 3, 5, 7, 9; 5×10<sup>5</sup> VP), αPD-1 단독(day 4, 7, 8, 10; 200 μg), 또는 RdB/IL-12/DCN 및 αPD-1 병용 투여(각각 동일 조건)한 후, 종양의 성장을 관찰하였다. 한편, 음성 대조군으로는 PBS 단독 투여군을 사용하였다.

[0125] 도 26에 나타낸 바와 같이, 항암제를 최초 투여한 후 15일째(day 16), PBS, taxol, 또는 αPD-1만 단독 투여한 경우, 종양의 크기가 각각  $7649.0 \pm 798.5 \text{ mm}^3$ ,  $5394.5 \pm 288.2 \text{ mm}^3$ , 또는  $5814.2 \pm 471.6 \text{ mm}^3$ 로, 종양의 급격한 성장을 확인하였던 반면, RdB/IL-12/RLX 단독, 또는 RdB/IL-12/RLX 및 αPD-1 병용 투여군에서는, 종양의 크기가 각각  $2817.1 \pm 776.2 \text{ mm}^3$  또는  $633.9 \pm 141.9 \text{ mm}^3$ 로, 유의적인 항종양 효과를 나타내었다. 특히, RdB/IL-12/RLX 및 αPD-1 병용 투여군은 RdB/IL-12/RLX 단독 투여 군에 비해, 종양의 크기가 약 77.5% 감소되었는바, 그 효과가 매우 현저하였다( $P < 0.01$ ). 이러한 실험결과는, 본 발명에 따른 RdB/IL-12/RLX와 면역 관문 억제제의 병용 투여는, 종래 항암제의 항종양 효과를 보다 향상시키는 수준에 그치는 것이 아니라, 항암제 내성 등의 생체 내 요인으로 인해 항암제의 효과가 미미한 경우에도 유의적인 항종양 효과를 부여하는, 현저한 효과를 보여주는 것이다.

[0127] **실시예 6. Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 종양 조직 내 침투 효과 확인**

[0128] 면역형광 염색을 실시하여 종양 조직 내 치료 물질의 침투 및 확산정도를 확인하고자 하였다. NCIN87 위 종양 조직에 PBS, PBS 및 trastuzumab( $150 \mu\text{g}/\text{mice}$ ), 또는 RdB/IL-12/RLX( $2.5 \times 10^{10}$  VP) 및 trastuzumab을 병용 투여한 후, Alexa488로 표지된 trastuzumab의 종양 조직 내 침투 및 분포양상을 비교하였다.

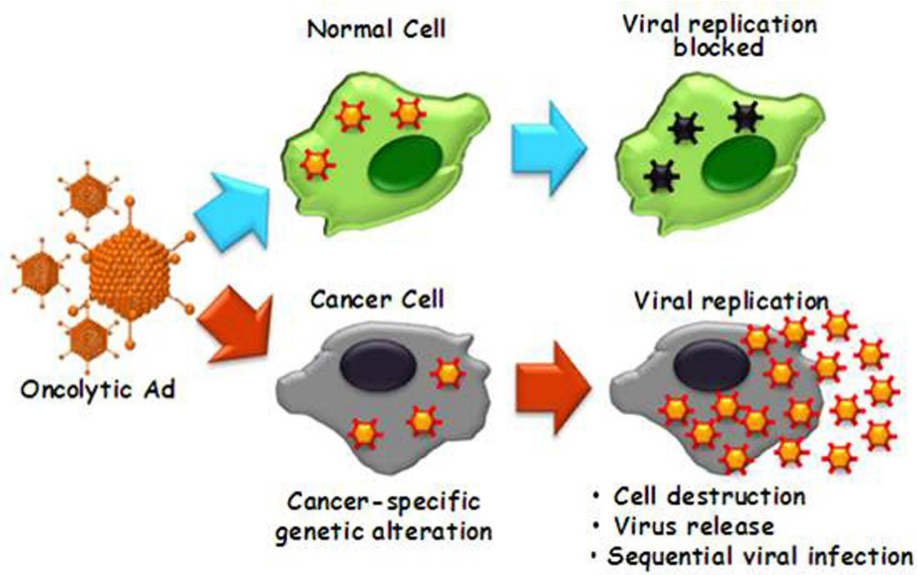
[0129] 도 27에 나타낸 바와 같이, PBS 및 trastuzumab을 투여한 종양 조직의 경우, trastuzumab의 분포가 종양 조직의 중심부보다 테두리 부위에서 집중적으로 분포되어 있었던 반면, RdB/IL-12/RLX 및 trastuzumab을 병용 투여한 경우, trastuzumab이 종양 전체에 걸쳐 고르게 분포됨 확인하였고, 특히, 종양 조직의 중심부까지 확산되어 있음을 알 수 있었다. 또한, 도 27에 표시된 영역을 확대하여 살펴보면, 도 28에 나타낸 바와 같이, PBS 및 trastuzumab을 투여한 종양 조직의 경우, 음성 대조군에 비해 trastuzumab의 침투가 증가되었으나, 종양 조직의 margin 부위에서 멀어질수록 trastuzumab의 형광이 음성 대조군 수준으로 감소되었다. 그러나, RdB/IL-12/RLX 및 trastuzumab을 병용 투여한 종양 조직의 경우, margin 부위뿐만 아니라 margin 부위에서 멀리 떨어진 중심부에서도 trastuzumab가 침투가 높은 수준으로 유지됨을 확인하였다. 아울러, 종양 조직의 혈관을 중심으로 확대하여 살펴보면, 도 29에 나타낸 바와 같이, PBS 및 trastuzumab을 투여한 종양 조직의 경우, trastuzumab이 혈관 주변에만 증가되어 있는 반면, RdB/IL-12/RLX 및 trastuzumab을 병용 투여한 종양 조직의 경우, 혈관 주변뿐만 아니라 혈관에서 멀리 떨어진 지역에도 trastuzumab가 침투되어있는 것을 확인하였다. 끝으로, trastuzumab의 종양 조직 내 표적과 머무는 시간을 알아보기 위해 trastuzumab을  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA로 표지한 후 PET 이미징을 진행하였다. 그 결과, 도 30에 나타낸 바와 같이, PBS 및 trastuzumab( $150 \mu\text{g}/\text{mice}$ )을 투여한 경우에 비해, RdB/IL-12/RLX( $2.5 \times 10^{10}$  VP) 및 trastuzumab을 병용 투여한 경우, 투여 후 15시간이 경과하기 시작하면서, 생체 내에 분포하는 trastuzumab이 종양 조직으로 집중되었으며, 투여 후 60시간이 경과할 때까지 trastuzumab이 종양 조직에 여전히 남아있는 것을 확인하였다.

[0130] 이러한 결과를 종합해 보면, RdB/IL-12/RLX에 의한 종양 조직 내 세포외 기질의 발현 저해는, trastuzumab의 종양 내 침투 및 확산 효과를 보다 증진시켜 항종양 효과를 향상시킬 수 있는바, RdB/IL-12/RLX는 기존의 항암제 등과 병용 투여하는 형태로 사용함으로써, 보다 강력한 항종양 효과를 제공한다.

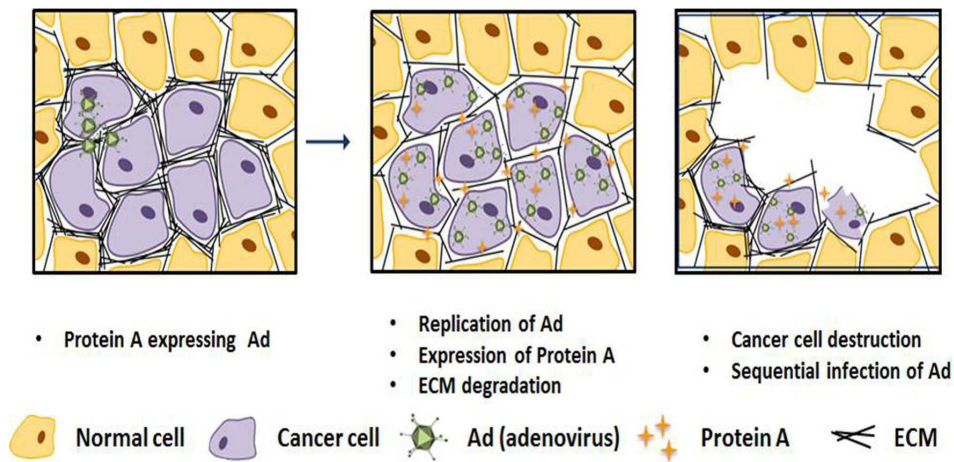
[0132] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

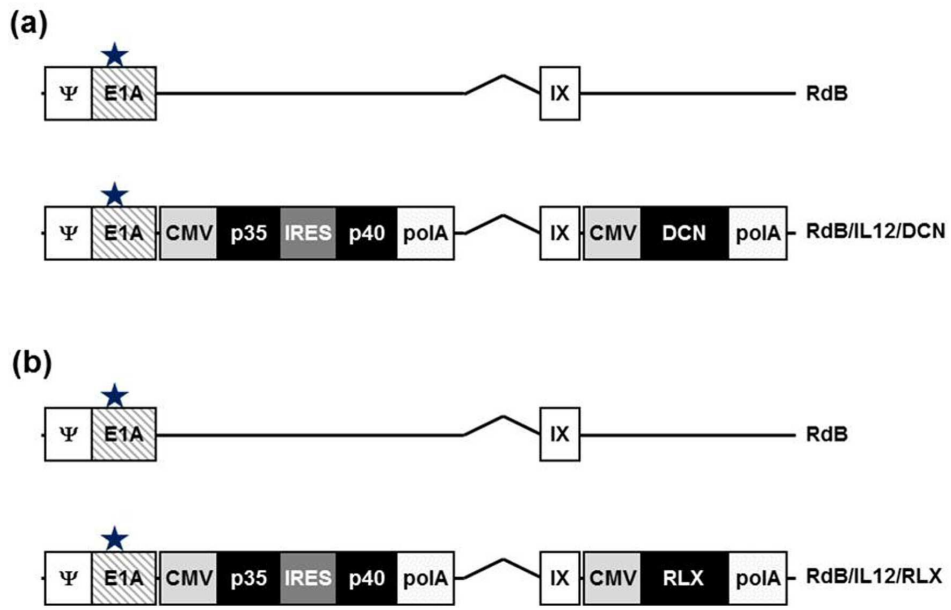
도면1



도면2

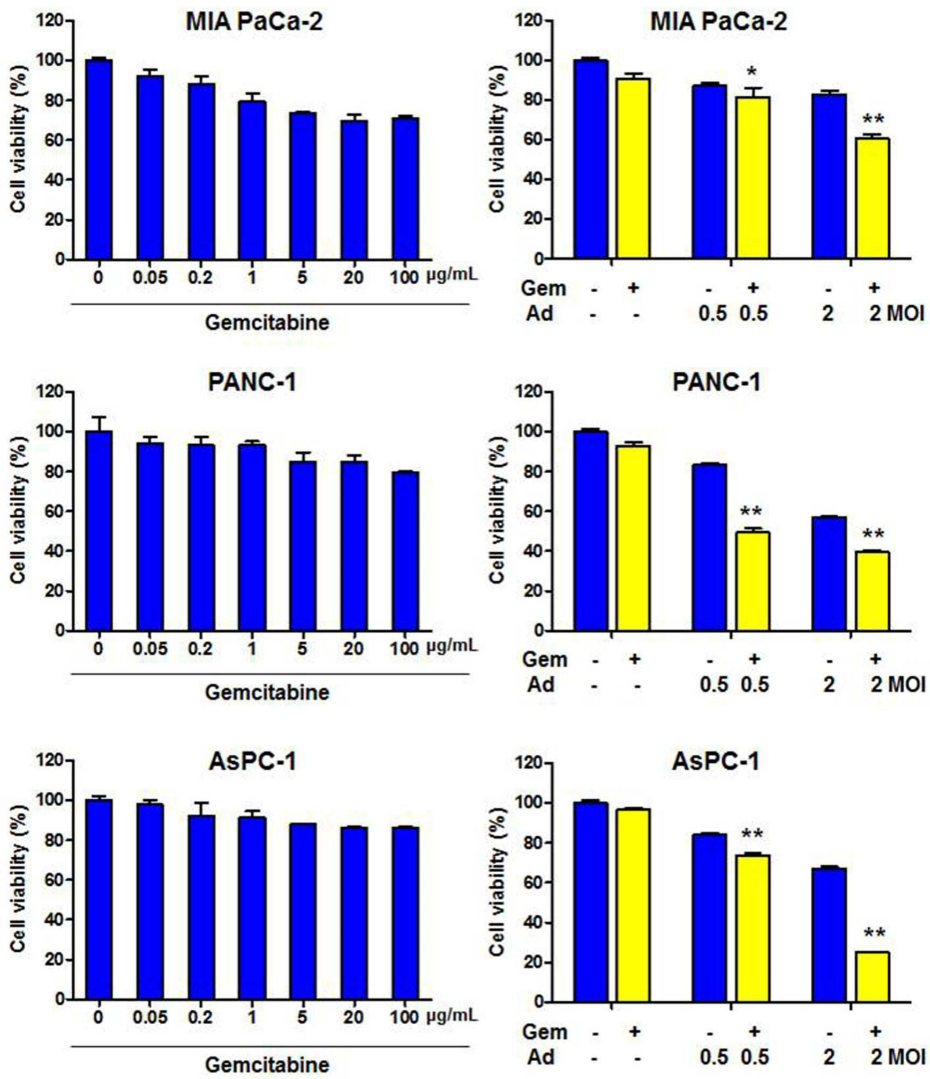


도면3



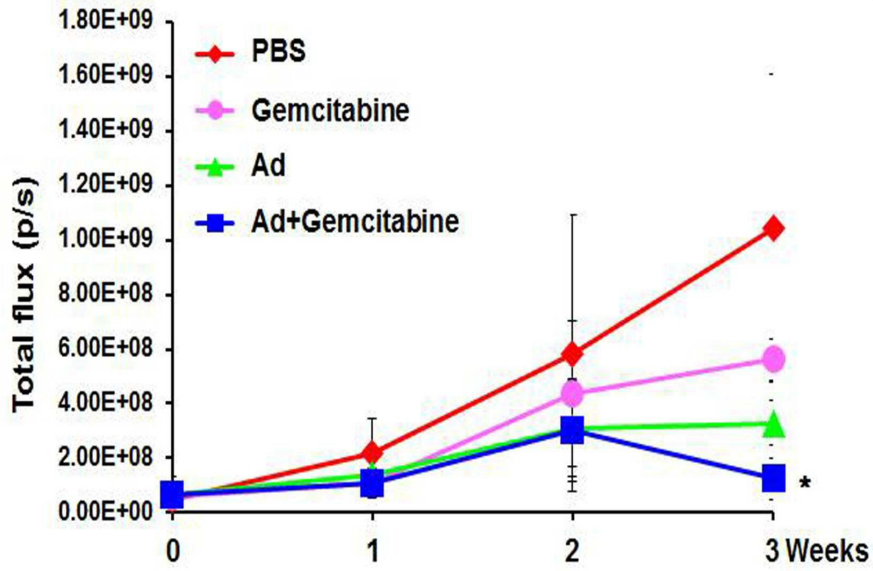
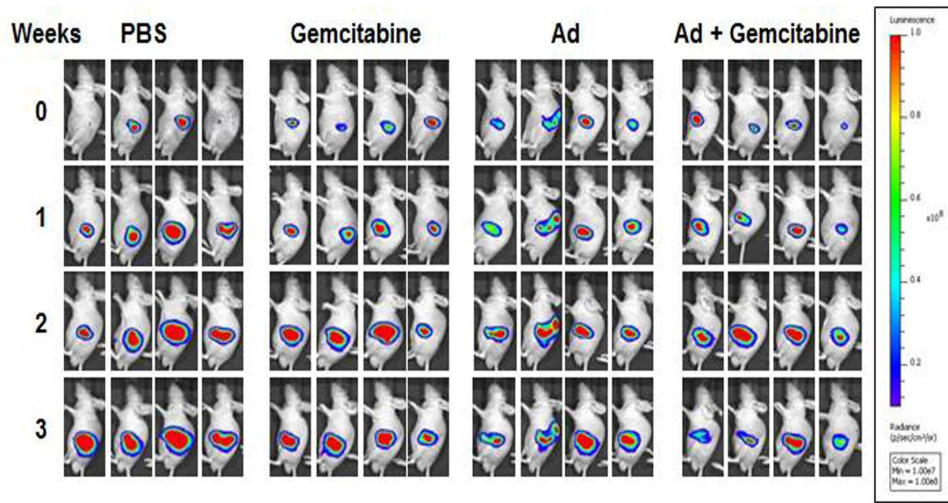


도면4

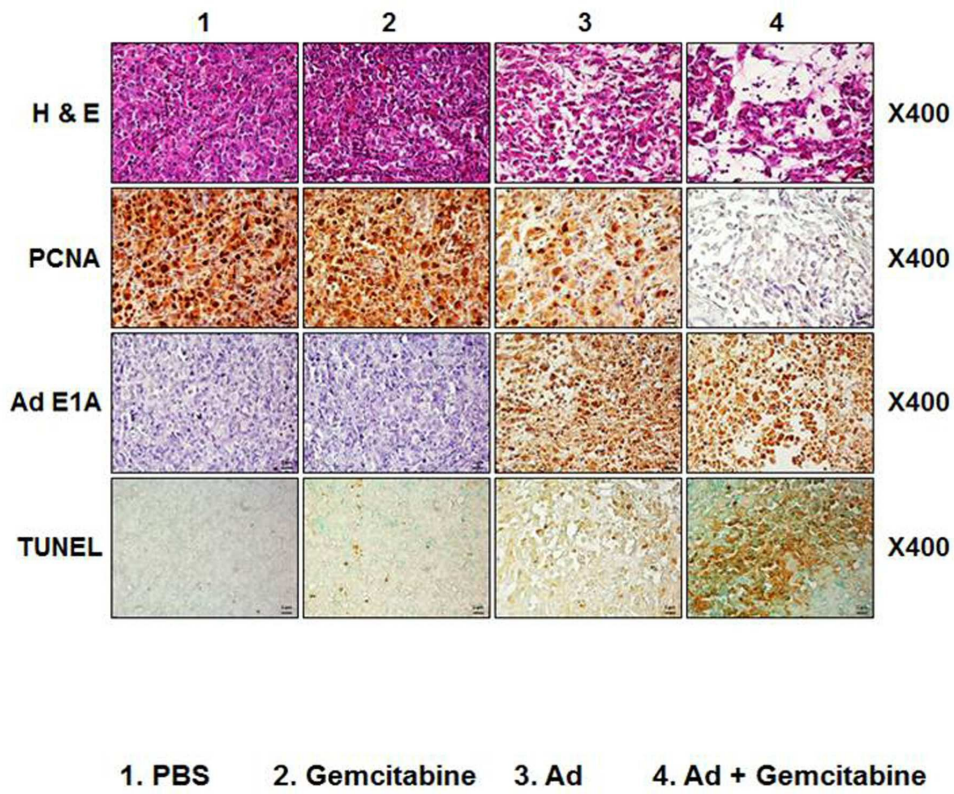




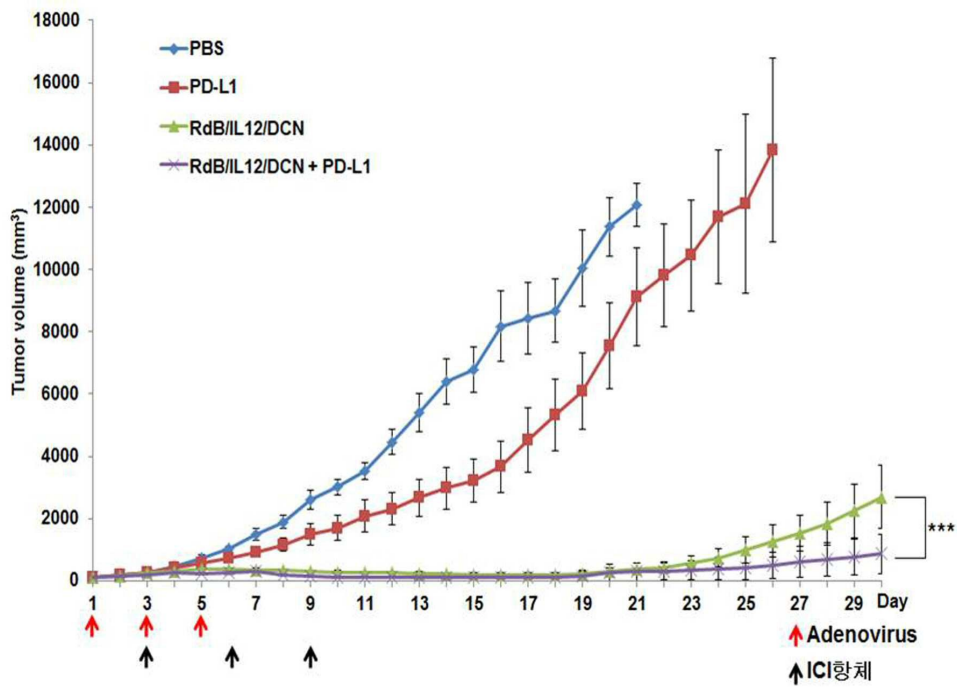
도면5



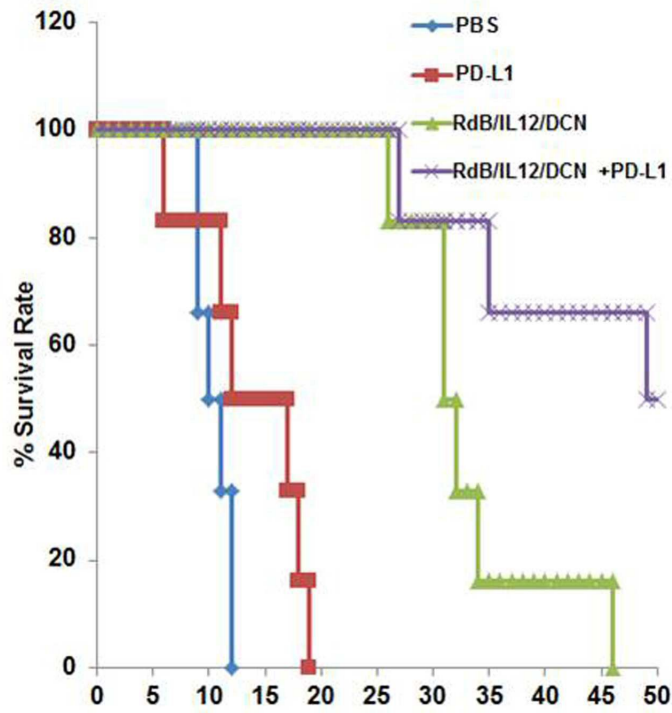
도면6



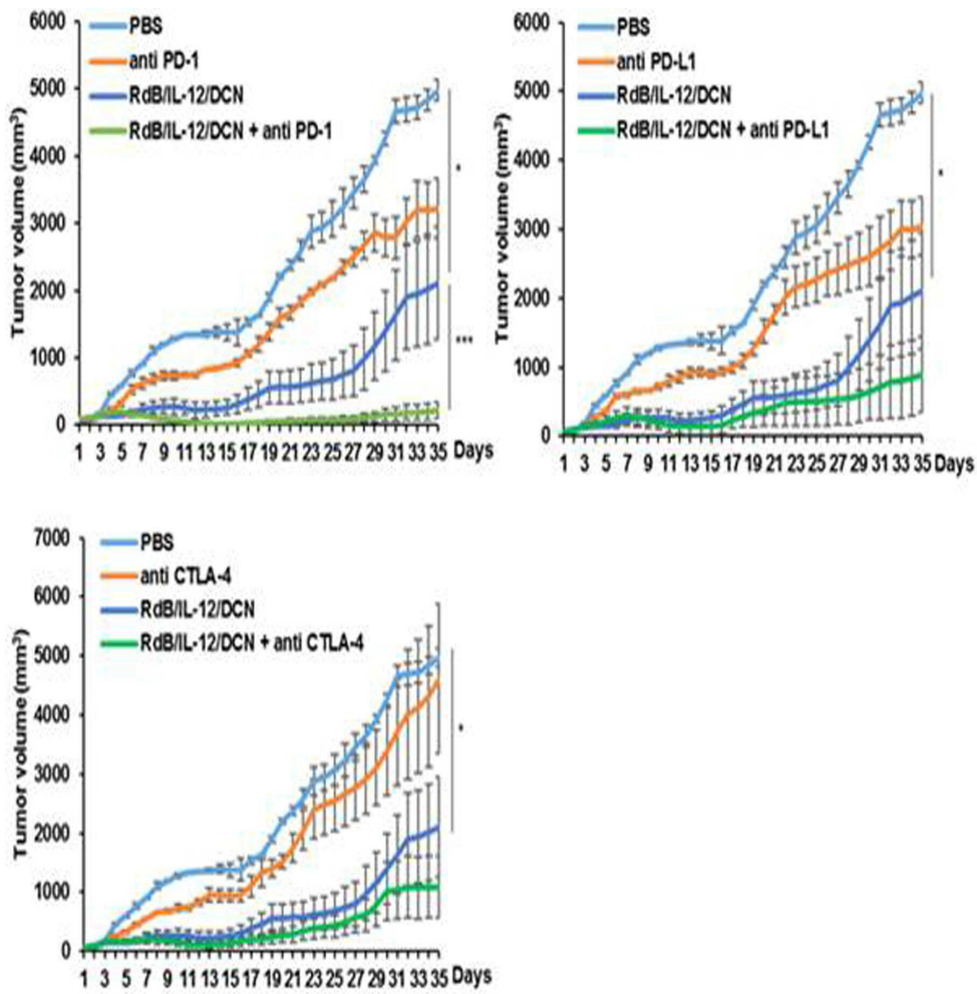
도면7



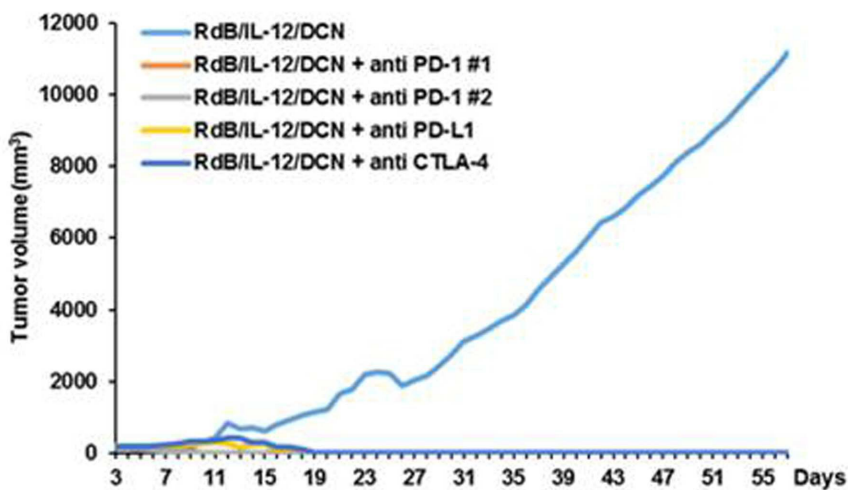
도면8



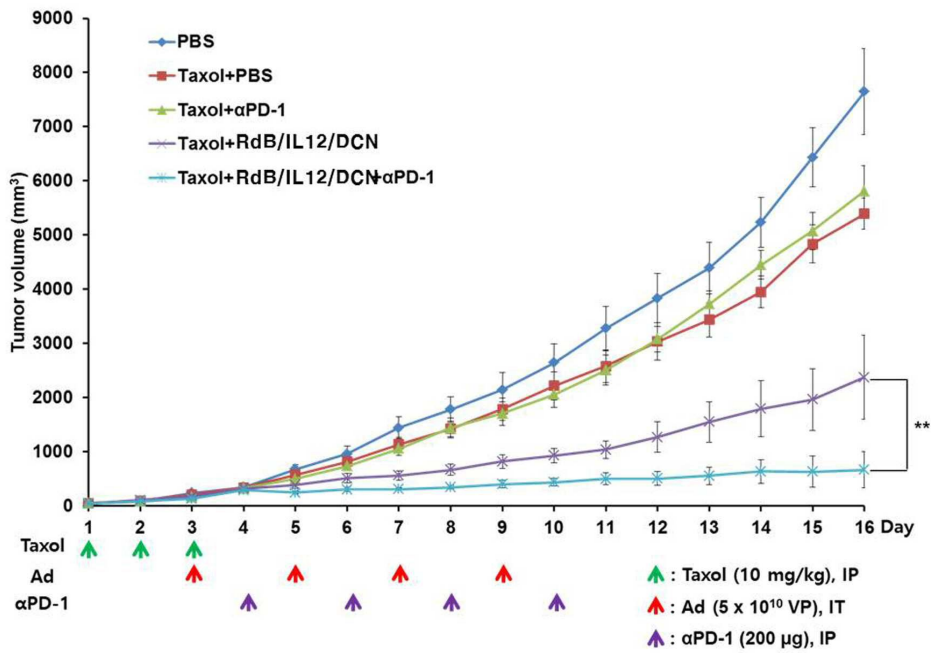
도면9



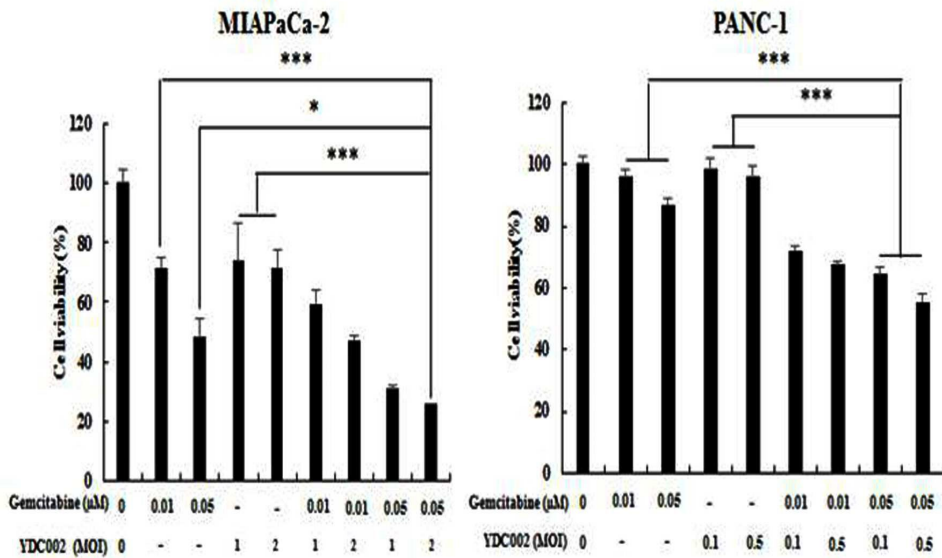
도면10



도면11

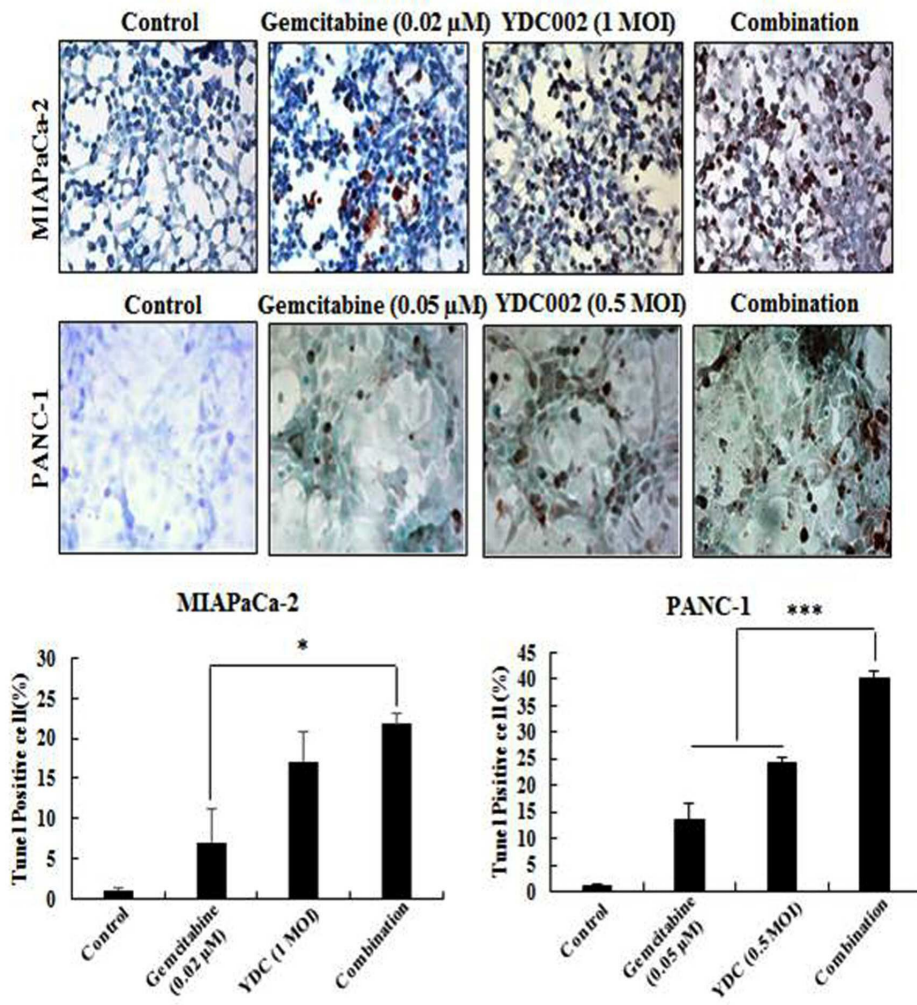


도면12



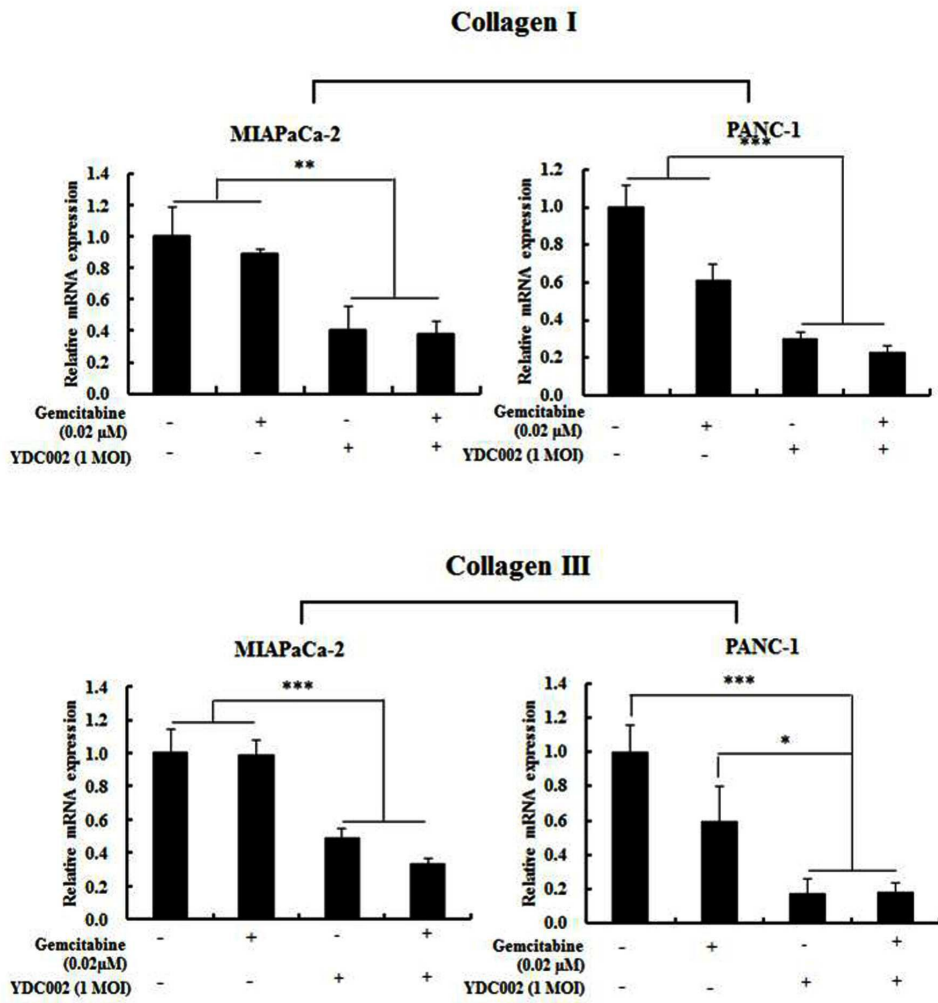


도면13

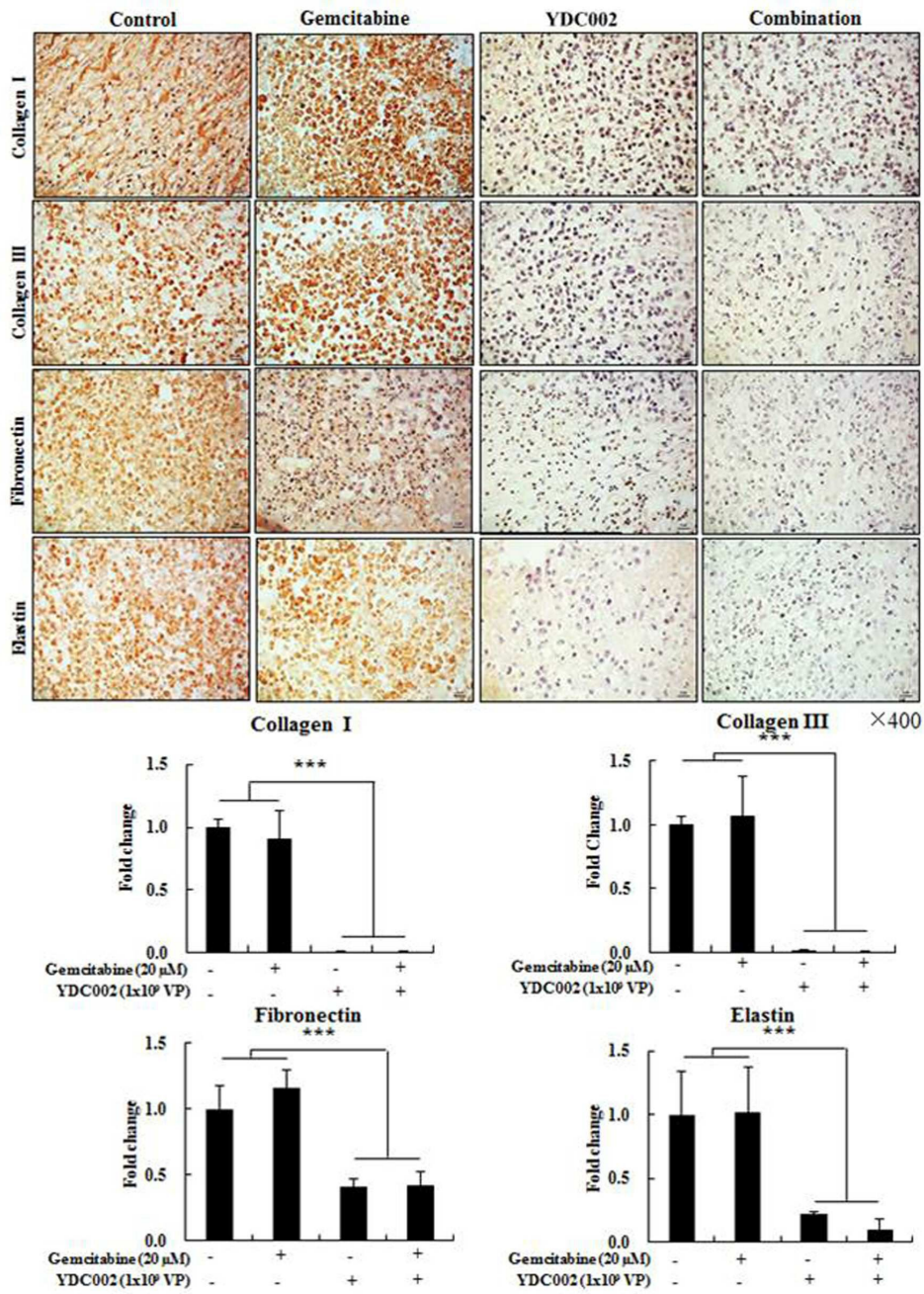




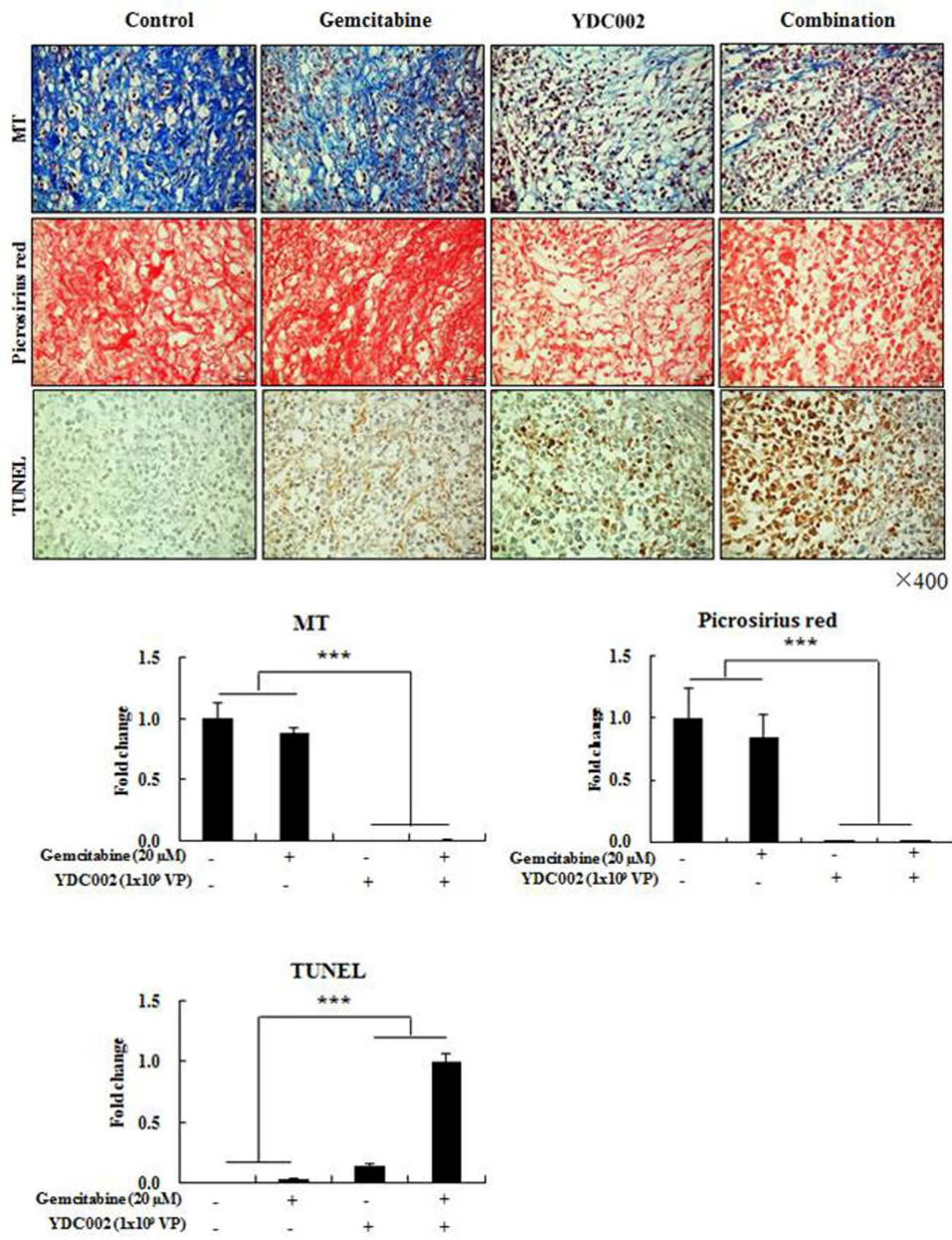
도면14



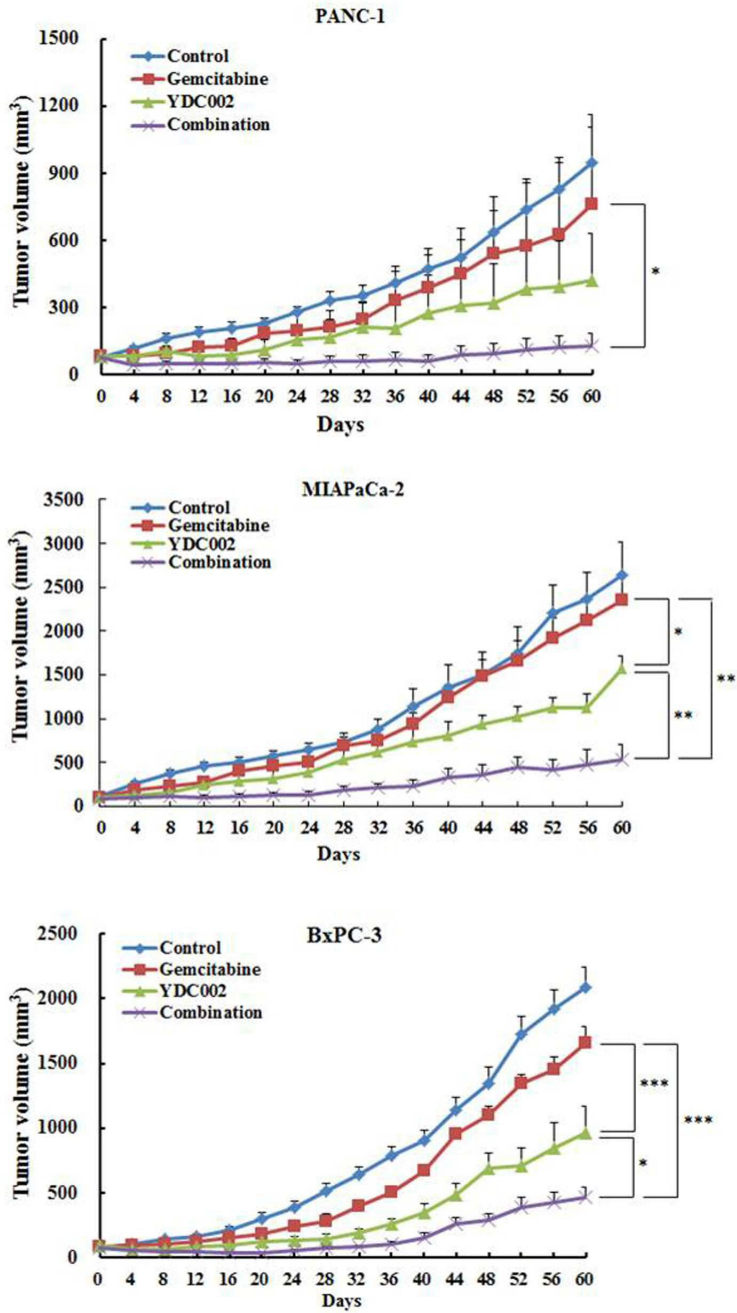
도면15



도면16

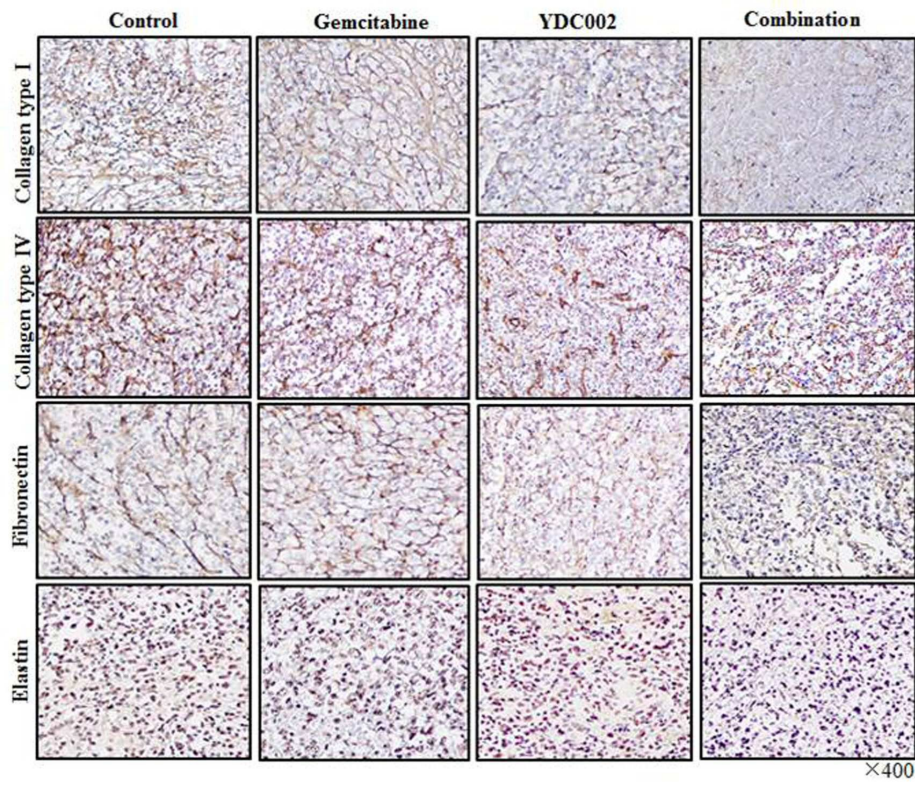


도면17

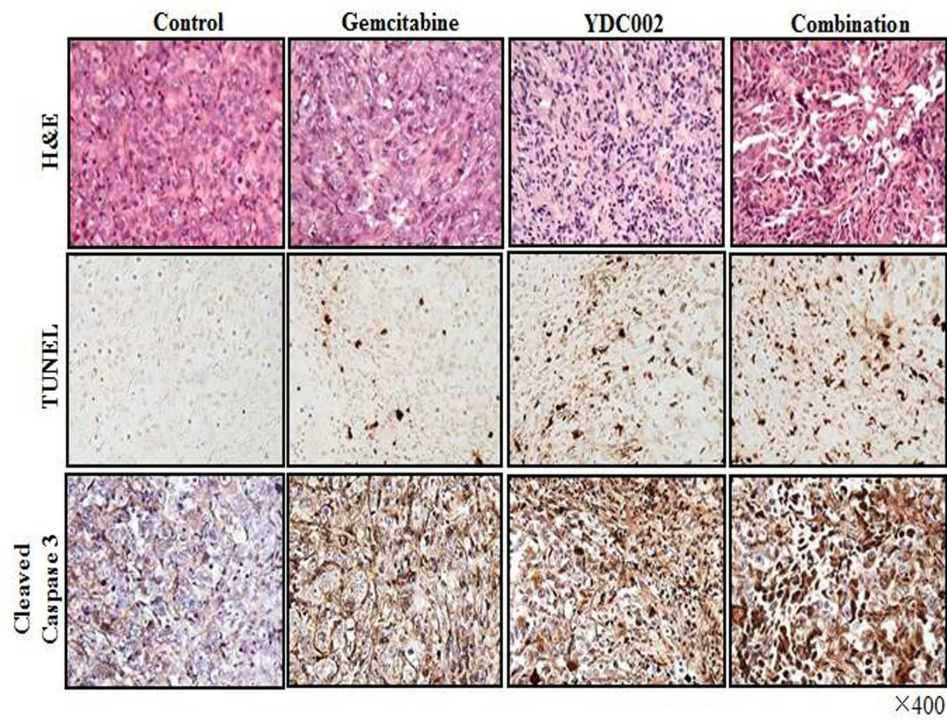




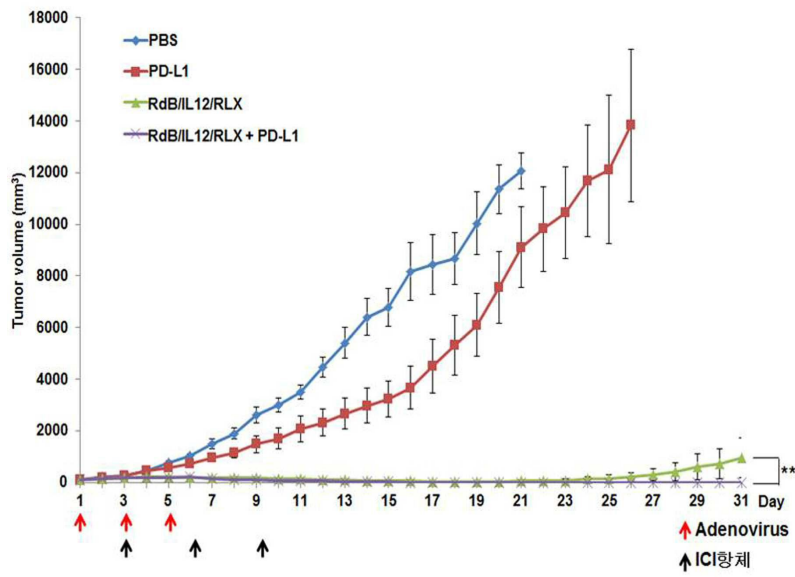
도면18



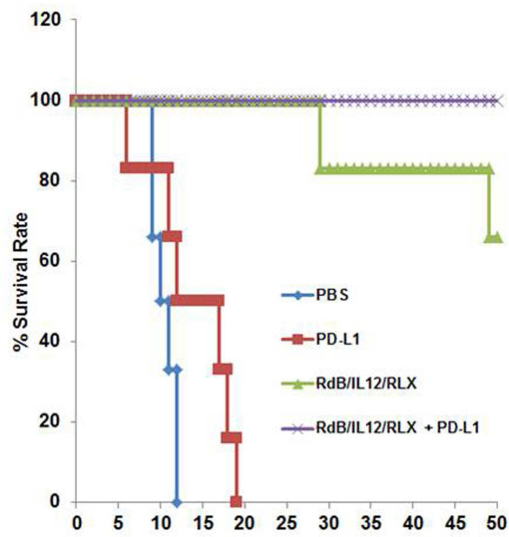
도면19



도면20

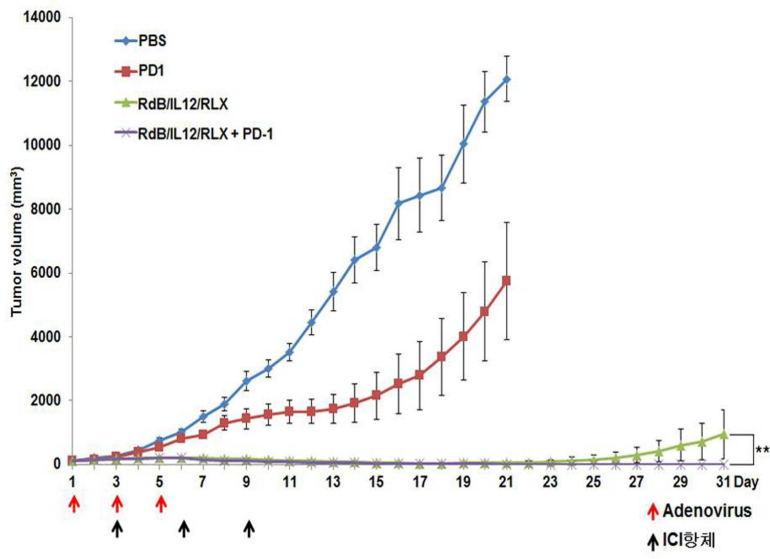


도면21

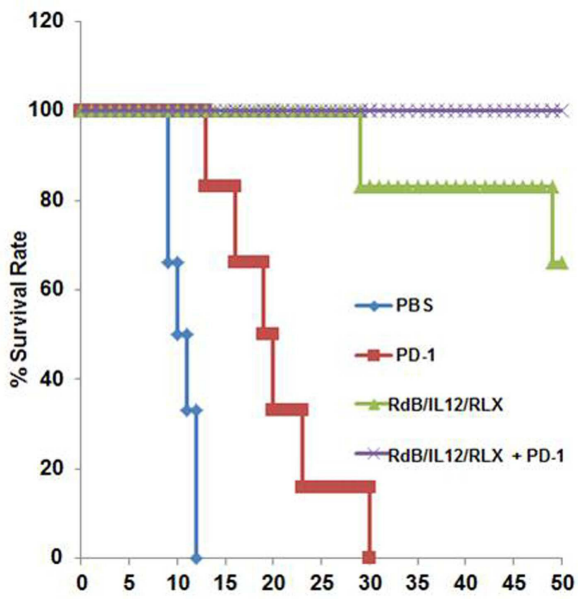




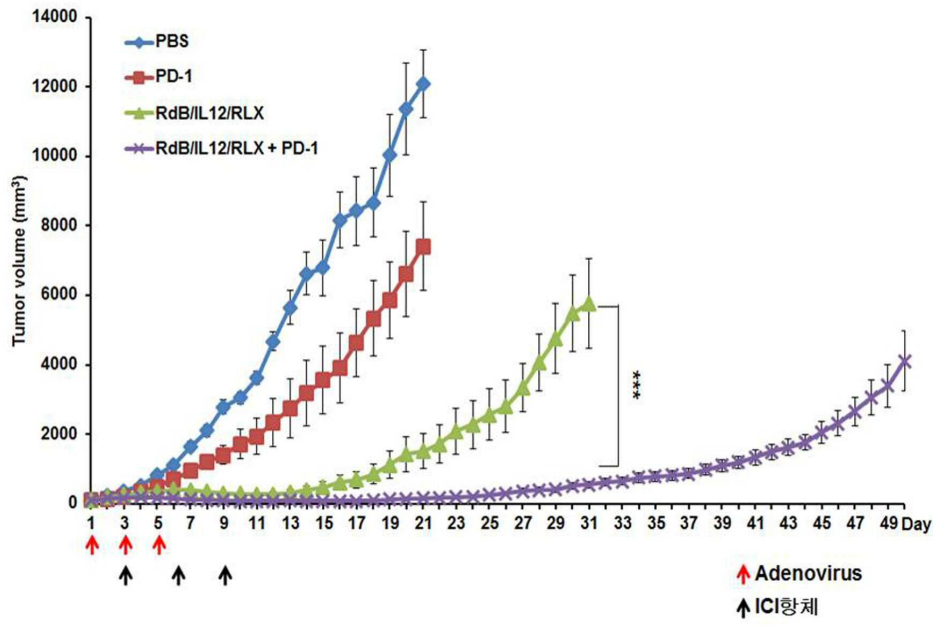
도면22



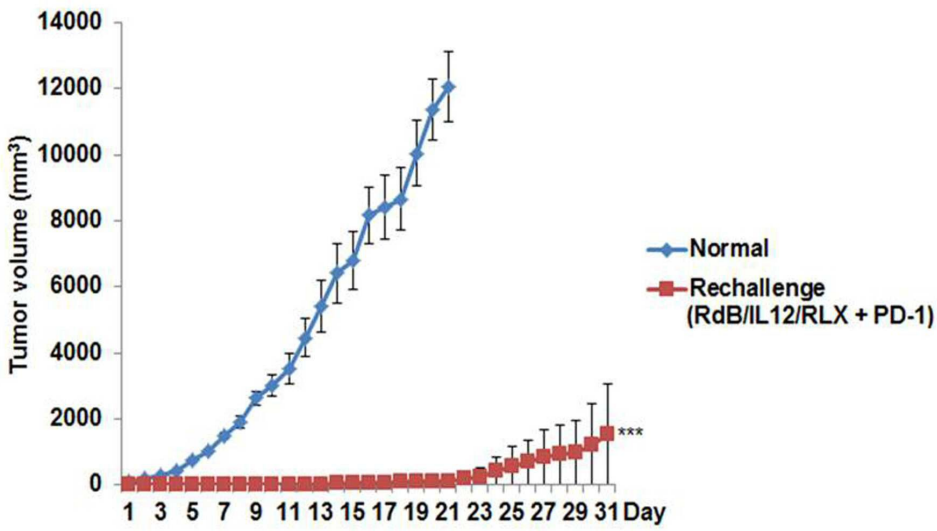
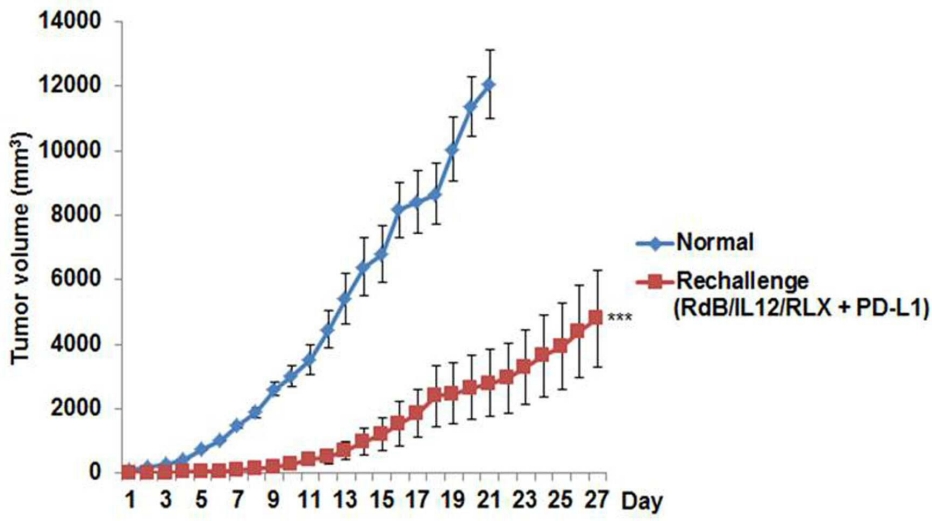
도면23



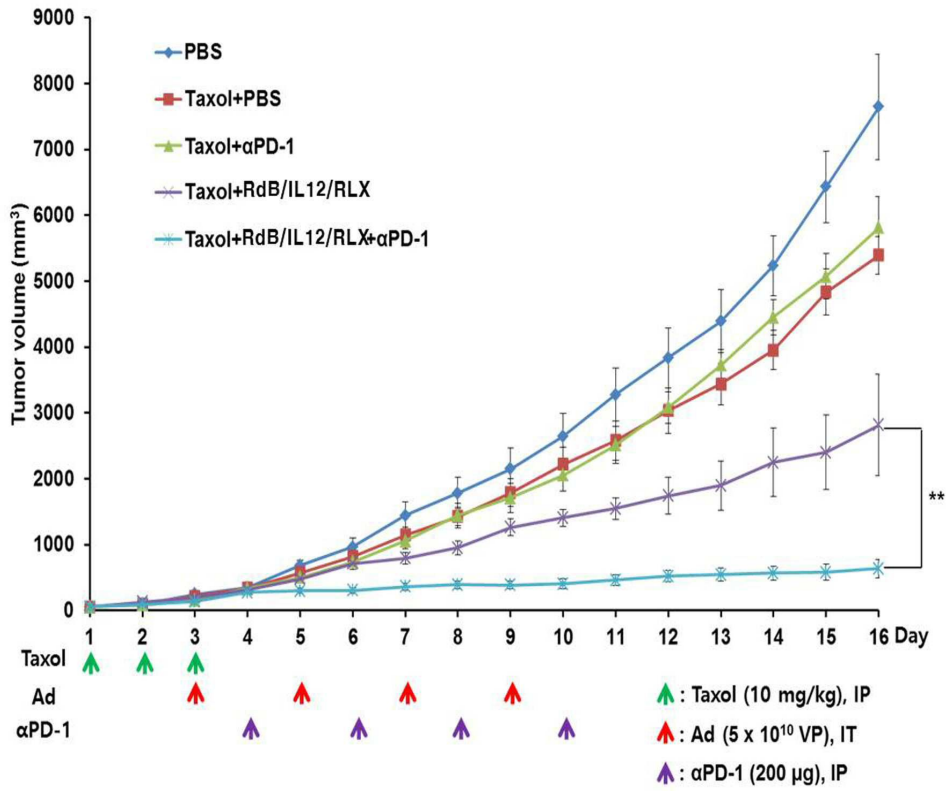
도면24



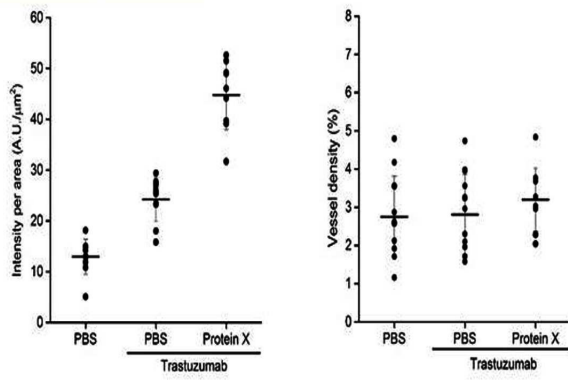
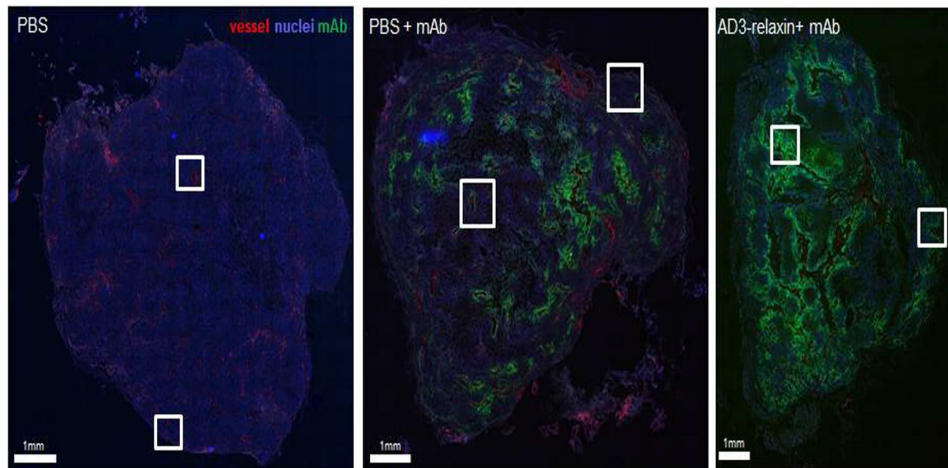
도면25



도면26

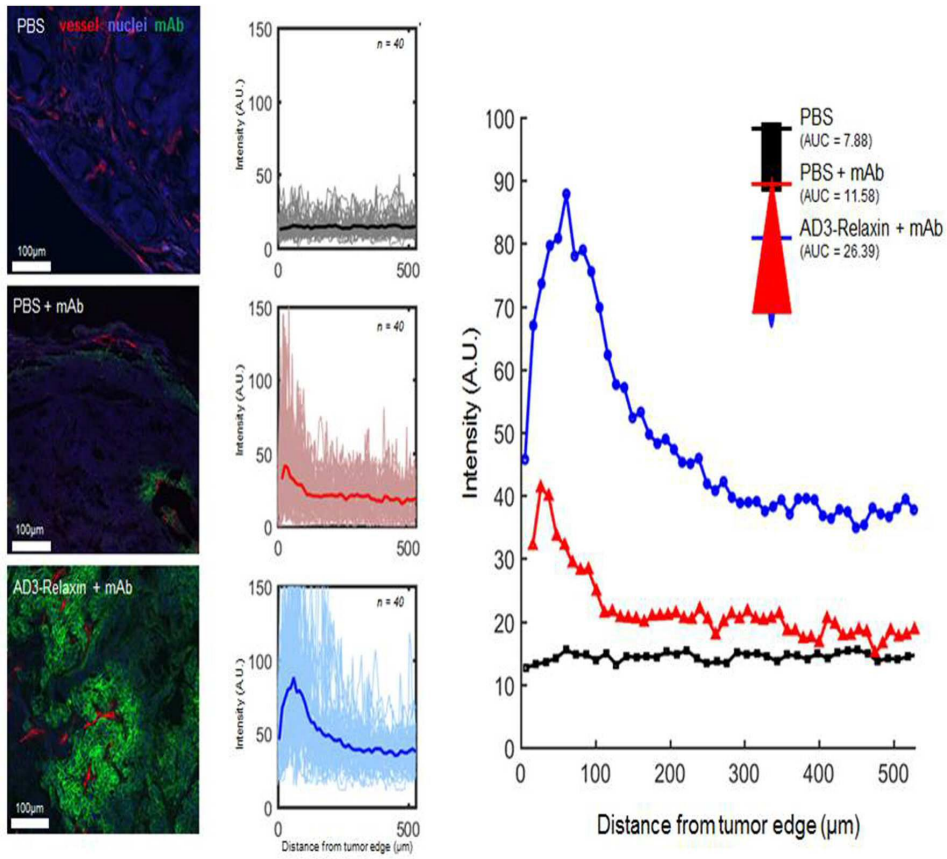


도면27

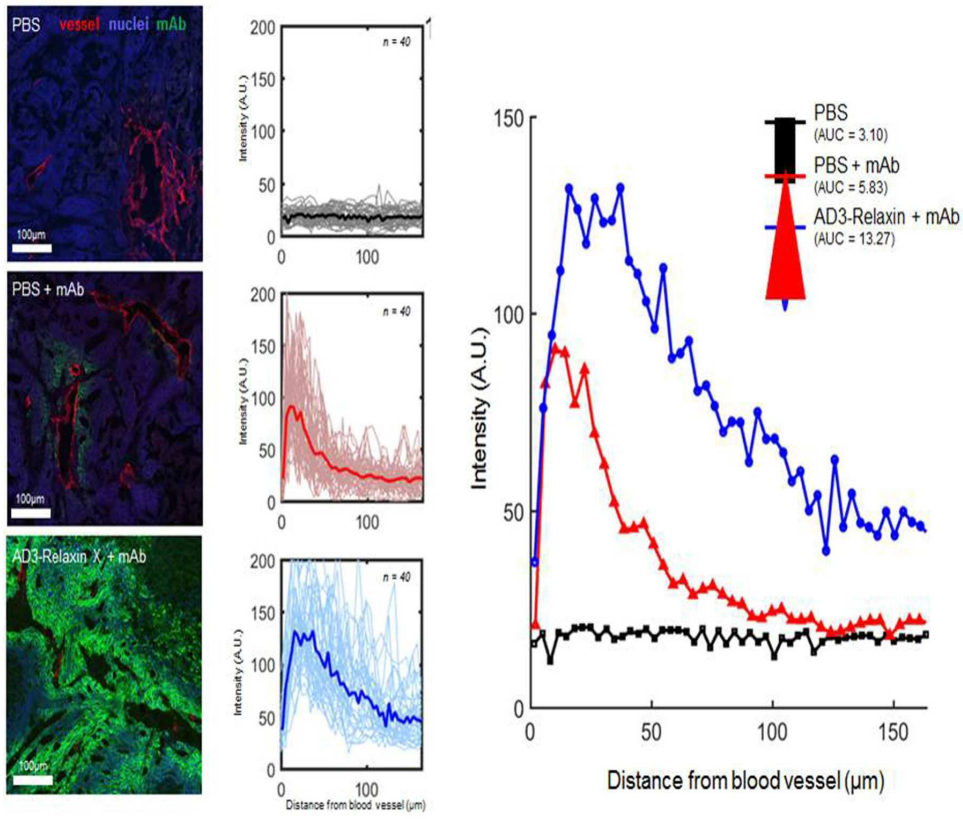




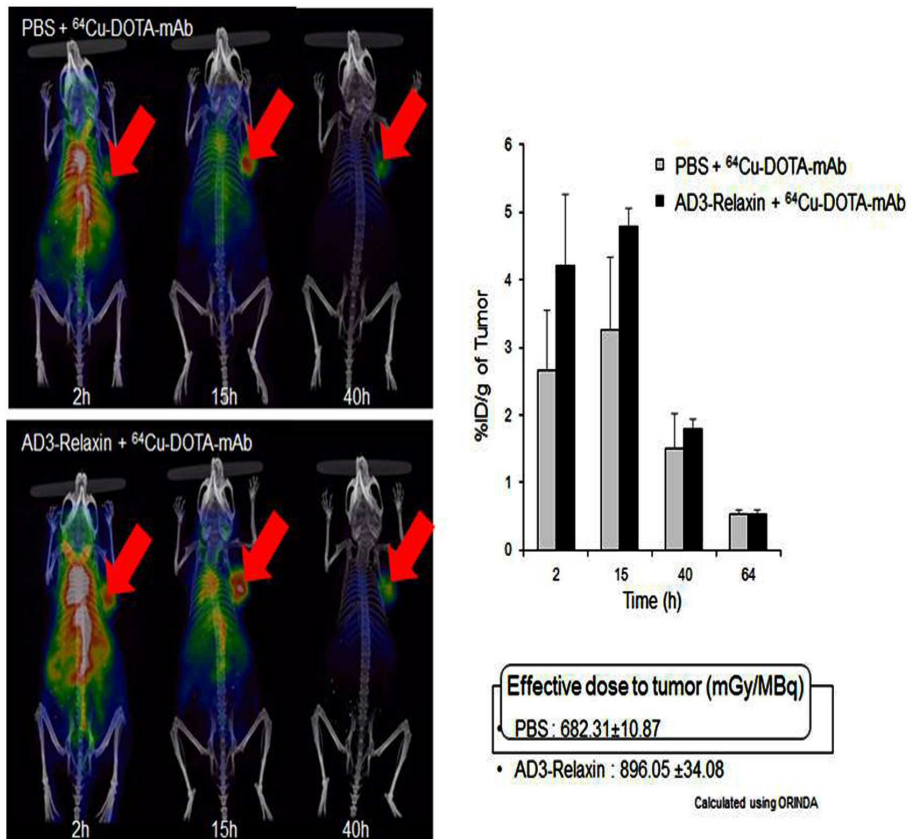
도면28



도면29



도면30



서열목록

- <110> Industry-university Cooperation Foundation Hanyang University
- <120> Anti-tumor composition comprising oncolytic recombinant adenovirus expressing extracellular matrix-degrading factor
- <130> P20170860KR\_P17U10C01455
- <150> KR 10-2016-0167265
- <151> 2016-12-09
- <160> 5
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 648
- <212> DNA
- <213> IL-12A
- <400> 1

atgtgtcaat cacgctacct cctctttttg gccacccttg ccctcctaaa ccacctcagt 60

ttggccaggg tcattccagt cctctggacct gccagggtgc ttagccagtc cggaaacctg 120

ctgaagacca cagatgacat ggtgaagacg gccagagaaa aactgaaaca ttattcctgc 180  
 actgctgaag acatcgatca tgaagacatc acacgggacc aaaccagcac attgaagacc 240  
 tgtttaccac tggaactaca caagaacgag agttgcctgg ctactagaga gactttctcc 300  
 acaacaagag ggagctgect gccccacag aagacgtctt tgatgatgac cctgtgcctt 360  
 ggtagcatct atgaggactt gaagatgtac cagacagagt tccaggccat caacgcagca 420  
 cttcagaatc acaacatca gcagatcatt ctagacaagg gcatgctggt ggccatcgat 480  
 gagctgatgc agtctctgaa tcataatggc gagactctgc gccagaaacc tcctgtggga 540

gaagcagacc cttacagagt gaaaatgaag ctctgcatcc tgcttcacgc cttcagcacc 600  
 cgcgtcgtga ccatcaacag ggtgatgggc tatctgagct ccgctga 648

<210> 2  
 <211> 1008  
 <212> DNA  
 <213> IL-12B  
 <400> 2

atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg ttttgcctgt gctccactc 60  
 atggccatgt gggagctgga gaaagacgtt tafgtttag aggtggactg gactcccgat 120  
 gccccggag aaacagtgaa cctcacctgt gacacgctg aagaagatga catcacctgg 180  
 acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga ccctgacat cactgtcaaa 240

gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaaggag gcgagactct gagccactca 300  
 catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggcca ctgaaatctt aaaaaattc 360  
 aaaaacaaga ctttctgaa gtgtgaagca ccaattact ccggacggtt cacgtgctca 420  
 tggctggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca agagcagtag cagttccct 480  
 gactctcggg cagtgcacat tggaatggcg tctctgctg cagagaaggt cacactggac 540  
 caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg atgtcacctg cccaactgcc 600  
 gaggagacc tgcccattga actggcgttg gaagcacggc agcagaataa atatgagaac 660

tacagacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag acccgccaa gaacttgacg 720  
 atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg agtacctga ctctggagc 780  
 actcccatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa tccagcga gaaagaaaag 840  
 atgaaggaga cagaggagg gtgtaaccag aaaggtgcgt tcctcgtaga gaagacatct 900  
 accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag ctcaggatcg ctattacaat 960  
 tcctcatgca gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc gatcctag 1008

<210> 3

<211> 597

<212> DNA

<213> IRES

<400> 3

tagcgatccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat 60  
aaggccggtg tgcgtttgtc tataatgttat ttccaccat attgccgtct tttggcaatg 120  
tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttccctc 180  
tcgcaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tegtgaagga agcagttcct ctggaagctt 240  
cttgaagaca aacaacgtct gtagegacc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg 300  
acaggtgcct ctgcgccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac 360  
cccagtcca cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg 420

tattcaaca ggggctgaag gatgccaga aggtaccca ttgtatggga tctgatctgg 480  
ggcctcggtc cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaaacgt ctaggccccc 540  
gaaccacggg gacgtggttt tccttttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaacc 597

<210> 4

<211> 1080

<212> DNA

<213> Decorin

<400> 4

atgaaggcca ctatcactct ccttctgctt gcacaagttt cctgggctgg accgtttcaa 60  
cagagaggct tatttgactt tatgctagaa gatgaggctt ctgggatagg cccagaagtt 120  
cctgatgacc gcgacttcca gccctcccta ggcaccagtgt gcccttccg ctgtcaatgc 180

catcttcgag tggctcagtg ttctgatttg ggtctggaca aagtgccaaa ggatcttccc 240  
cctgacacaa ctctgctaga cctgcaaac aacaaaataa ccgaatcaa agatggagac 300  
tttaagaacc tgaagaacct tcacgcattg attcttctca acaataaaat tagcaaagtt 360  
agtcctggag catttacacc tttggtgaag ttggaacgac tttatctgtc caagaatcag 420  
ctgaaggaat tgccagaaaa aatgccaaa actcttcagg agctcgtgct ccatgagaat 480  
gagatcacca aagtgcgaaa agttactttc aatggactga accagatgat tgtcatagaa 540  
ctgggcacca atccgctgaa gagctcagga attgaaaatg gggctttcca gggaatgaag 600

aagctctcct acatccgeat tgctgatacc aatataacca gcattctctca aggtcttctc 660  
ccttccctta cggaattaca tcttgatggc aacaaaatca gcagagttga tgcagctagc 720



ctgaaaggac tgaataatTT ggctaagttg ggattgagtt tcaacagcat ctctgctggt 780  
gacaatggct ctctggccaa cagcctcat ctgaggagc ttcacttgga caacaacaag 840  
cttaccagag tacctggtgg gctggcagag cataagtaca tccagttgt ctacctcat 900  
aacaacaata tcctgtagt tggatcaagt gacttctgcc cacctggaca caacacaaa 960  
aaggcttctt attcgggtgt gagtctttc agcaaccgg tccagtactg ggagatacag 1020

ccatccacct teagatggt ctactgctc tetgccattc aactcggaaa ctataagtaa 1080  
1080

- <210> 5
- <211> 558
- <212> DNA
- <213> Relaxin
- <400> 5

atgcctcgc tgttcttgt ccacctgcta gaattctgt tactactgaa ccaattttcc 60  
agagcagtc cggccaaatg gaaggacgat gttattaat tatgcggcgc cgaattagtt 120  
cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagca aaaggtctct gagccaggaa 180  
gatgctctc agacacctag accagtggca gaaattgtac catcctcat caacaaagat 240

acagaaacta taattatcat gttggaattc attgctaatt tgccaccgga gctgaaggca 300  
gccctatctg agaggcaacc atcattacca gagctacagc agtatgtacc tgcattaaag 360  
gattccaatc ttagcttga agaatttaag aaacttattc gcaataggca aagtgaagcc 420  
gcagacagca atccttcaga attaaaatac ttaggcttgg atactcattc tcaaaaaaag 480  
agacgacct acgtggcact gtttgagaaa tgtgcctaa ttggtgtac caaaaggtct 540  
cttgctaaat attgctga 558