(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0155337
(43) 공개일자 2021년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0022781
(22) 출원일자 2021년02월19일
심사청구일자 2021년02월19일
(30) 우선권주장
1020200071873 2020년06월12일 대한민국(KR)
1020200072979 2020년06월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 젠셀메드
서울특별시 노원구 노원로 75 제3연구동 302호 (공릉동,한국원자력의학원 방사선의학연구소)
(72) 발명자
권희충
경기도 남양주시 다산순환로 111, 3206동 803호(다산동, 다산 한양수자인리버파크)
백현정
경기도 의정부시 녹양로62번길 12, 108동 701호(녹양동, 녹양힐스테이트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

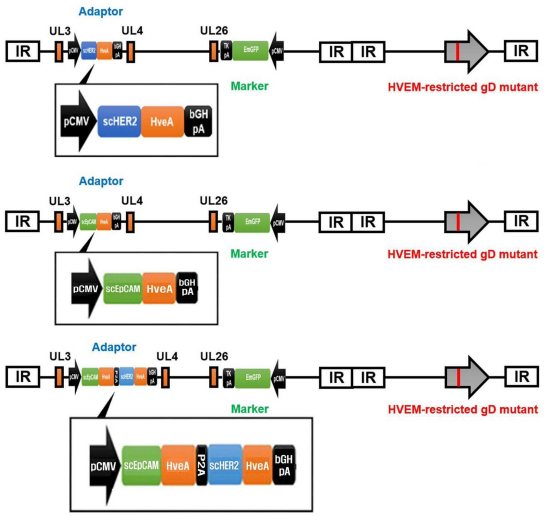
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **다중 표적화 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 다중 표적화 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 그 용도를 개시한다. 구체적으로 본 발명은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 다중으로 발현함으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스와 또 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 발현할 수 있는 이외에 또 재표적화가 가능하도록 변형된 당단백질을 가짐으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스 그리고 이들 바이러스 항염 치료 용도를 개시한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 2317/622 (2013.01)
C12N 2710/16033 (2013.01)
(72) 발명자
주현유
서울특별시 노원구 공릉로 213, 106동 402호 (공릉동, 동신아파트)
김혜리
서울특별시 노원구 공릉로46길 32, 107동 1402호(공릉동, 삼익아파트)
한미희
경기도 남양주시 식송1로 265-30, 201호(별내동)
박은란
서울특별시 노원구 노원로 58, 403동 1401호 (공릉동, 우방아파트)
이수정
경기도 의정부시 평화로190번길 16, 1506호(호원동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 그 게놈에, 암세포 표적분자에 특이적으로 결합하는 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질이 다중으로 발현될 수 있도록 그 융합 단백질의 발현 카세트가 하나 이상 삽입되어 있는, 다중 표적화 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질의 발현 카세트는 2개 이상의 융합 단백질 유전자를 포함하고 이들 유전자 사이에 IRES(Internal Ribosome Entry Site) 또는 2A 펩타이드 암호화하는 핵산 서열이 위치하는 폴리시스트론(polycistron) 구성을 갖는, 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질의 발현 카세트는 모노시트론(monocistron) 구성을 가지고 2개 이상 상기 바이러스 게놈에 삽입되어 있는, 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 다중으로 발현되는 융합 단백질은 (i) 모두 동일한 표적분자에 특이적으로 결합하는 표적화 영역을 갖거나, (ii) 서로 다른 표적분자에 특이적으로 결합하는 서로 다른 표적화 영역을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 HVEM의 세포외 도메인은 서열번호 8 또는 9의 아미노산 서열로 이루어진 HveA82, 서열번호 10또는 11의 아미노산 서열로 이루어진 HveA87, 서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열로 이루어진 HveA102 또는 서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열로 이루어진 HveA107인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 그 암세포 표적화 영역과 그 HVEM(HveA)의 세포외 도메인은 1 내지 30개 아미노산으로 이루어진 링커 펩티드에 의해 연결되어 있는 융합 단백질이고,

상기 링커 펩티드의 아미노산은 Ser, Gly, Ala 및 Thr 중 하나 이상의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 표적분자는 암세포에서만 발현되거나 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 암세포 표면의 항원 또는 수용체인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항원 또는 수용체는 EGFRvⅢ, EGFR, 메타스틴 수용체(Metastin receptor), 수용체 타이로신 카이나제(Receptor tyrosine kinases), HER2(Human epidermal growth factor receptor 2), 타이로신 카이나제-18-수용체(c-Kit), HGF 수용체 c-Met, CXCR4, CCR7, 엔도테린-A 수용체, PPAR-δ(peroxisome proliferator activated receptor δ), PDGFR-α(Platelet-derived growth factor receptor α), CD133, CEA(carcinoembryonic antigen), EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), MSLN(Mesothelin), GD2(disialoganglioside), GPC3(Glypican 3), PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), TAG-72(tumor-associated glycoprotein 72), GD3(disialoganglioside), HLA-DR(human leukocyte antigen-DR), MUC1(Mucin 1), NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1), LMP1(Latent membrane protein 1), TRAILR2(tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor), VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2), HGFR(hepatocyte growth factor receptor), CD44 또는 CD166인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 표적분자는 HER2이고,

상기 표적화 영역은 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 링커 펩티드를 매개로 VH, 링커 펩티드, VL 순서로 연결된 scFv인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 표적분자는 EpCAM이고,

상기 표적화 영역은 서열번호 6의 VL와 서열번호 7의 VH이 링커 펩티드를 매개로 VL, 링커 펩티드, VH 순서로 연결된 scFv인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 서열번호 16의 gD(glycoprotein D) 아미노산 서열 222번 위치의 아르기닌(arginine, R)과 223번 위치의 페닐알라닌(phenylalanime, F)이 각각 아스파라긴(asparagine, N)과 이소루신(isoleucine, I)로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 재조합 HSV-1 바이러스, 재조합 HSV-2 바이러스, 또는 HSV-1와 HSV-2 키메라 바이러스인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 HSV-1 KOS 균주로부터 유래된 재조합 HSV-1인 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스에는 헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 그 게놈에, (i) 사이토카인, (ii) 케모카인, (iii) 면역관문(immune checkpoint)에 대한 길항제, (iv) 면역세포의 활성화를 유도할 수 있는 보조 자극 인자(co-stimulatory factor), (v) 암세포에 대한 면역반응을 억제하는 TGFβ에 대항 길항제, (vi) 고형암 종양미세환경을 구성하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)을 분해할 수 있는 헤파라나아제(heparanase), (vii) 혈관 신생 인자 수용체인 VEGFR-2(VEGF receptor-2)의 기능을 저해할 수 있는 길항제, 및 (viii) 프로드럭(prodrug)을 암세포에 독성을 나타내는 약물(drug)으로 전환시켜주는 프로드럭 활성화 효소(prodrug-activating enzymes) 중에 선택된 것을 발현하는 발현 카세트가 추가로 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 사이토카인은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-24 등의 인터류킨, IFNα, IFNβ, IFNɣ 등의 인터페론, TNFα 등의 종양 괴사 인자, GM-CSF, G-CSF 및 FLT3L 중 하나 이상이고,

상기 케모카인은 CCL2, RANTES, CCL7, CCL9, CCL10, CCL12, CCL15, CCL19, CCL21, CCL20 및 XCL-1 중 하나 이상이며,

상기 면역관문은 PD-1(programmed cell death-1), PD-L1(programmed cell deathligand 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), CD86(cluster of differentiation 86), CD137(cluster of differentiation 137), CD276(cluster of differentiation 276), KIRs(killer-cell immunoglobulin-like receptors), LAG3(lymphocyte-activation gene 3), GITR(glucocorticoid-induced TNFR-related protein), GITRL(glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand) 및 CTLA-4(cytolytic T lymphocyte associated antign-4) 중 하나 이상이며,

상기 보조 자극 인자는 CD2, CD7, LIGHT, NKG2C,CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, LFA-1(림프구 기능 연관 항원-1), ICOS(유도성 T 세포 공동자극인자), CD3ɣ, CD3δ 및 CD3ε 중 하나 이상이며,

상기 프로드럭 활성화 효소(prodrug-activating enzymes)는 시토신 디아민나아제(Cytosine deaminase), 랫드 사이토크롬 P450(rat cytochrome P450, CYP2B1), 카르복실에스터라제(carboxylesterase), 세균 니트로리덕타아제(bacterial nitroreductase) 및 대장균에서 분리된 PNP(purine nucleoside phosphorylase) 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질의 발현 카세트는 상기 바이러스 게놈에, UL3와 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 발현 카세트가 상기 바이러스 게놈에, UL3와 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 사이에 삽입되어 있되, 상기 융합 단백질의 발현 카세트와는 다른 위치에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 NH_2-암세포 표적화 도메인-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인이 링커 펩타이드를 매개로 연결되고, 상기 융합 단백질은 NH_2-암세포 표적화 영역-링커 펩타이드-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 20

헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 (i) 그 게놈에, 암세포 표적분자에 특이적으로 결합하는 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 발현할 수 있는 발현 카세트가 하나 이상 삽입되어 있고, 또한 (ii) 그 당단백질에, 암세포 표적분자에 특이적으로 결합하는 표적화 영역이 삽입되어 융합되어 있는, 다중 표적화 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gB, gC, gD 또는 gH인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 22

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gB이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 1의 gB 아미노산 서열에서, N-말단, 아미노산 31번 내지 78번 영역 내의 임의의 위치, 아미노산 80번 내지 363번 영역 내의 임의의 위치 또는 아미노산 408번 내지 896번 영역 내의 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 23

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gB이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 1의 gB 아미노산 서열에서 N-말단, 43번 아미노산 다음 위치, 52번 아미노산 다음 위치, 70번 아미노산 다음 위치, 76번 아미노산 다음 위치, 80번 아미노산 다음 위치, 81번 아미노산 다음 위치, 95번 아미노산 다음 위치, 100번 아미노산 다음 위치, 137번 아미노산 다음 위치, 185번 아미노산 다음 위치, 187번 아미노산 다음 위치, 241번 아미노산 다음 위치, 261번 아미노산 다음 위치, 265번 아미노산 다음 위치, 304번 아미노산 다음 위치, 334번 아미노산 다음 위치, 361번 아미노산 다음 위치, 408번 아미노산 다음 위치, 419번 아미노산 다음 위치, 430번 아미노산 다음 위치, 458번 아미노산 다음 위치, 470번 아미노산 다음 위치, 481번 아미노산 다음 위치, 495번 아미노산 다음 위치, 497번 아미노산 다음 위치, 546번 아미노산 다음 위치, 608번 아미노산 다음 위치, 630번 아미노산 다음 위치, 663번 아미노산 다음 위치, 664번 아미노산 다음 위치, 665번 아미노산 다음 위치, 671번 아미노산 다음 위치, 673번 아미노산 다음 위치, 690번 아미노산 다음 위치, 725번 아미노산 다음 위치, 730번 아미노산 다음 위치, 732번 아미노산 다음 위치, 742번 아미노산 다음 위치, 772번 아미노산 다음 위치, 868번 아미노산 다음 위치, 869번 아미노산 다음 위치, 886번 아미노산 다음 위치, 893번 아미노산 다음 위치, 894번 아미노산 다음 위치, 895번 아미노산 다음 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 24

상기 당단백질은 gC이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 2의 gC 아미노산 서열에서 33번 내지 154번 영역 내의 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 25

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gC이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 2의 gC 아미노산 서열에서

33번 아미노산 다음 위치, 82번 아미노산 다음 위치, 148번 아미노산 다음 위치, 149번 아미노산 다음 위치, 153번 아미노산 다음 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 26

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gH이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 3의 gD 아미노산 서열에서, N-말단, 아미노산 12번 내지 88번 영역 내의 위치, 아미노산 116번 내지 137번 영역 내의 위치 또는 아미노산 209번 내지 839번 영역 내의 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 27

제20항에 있어서,

상기 당단백질은 gH이고,

상기 당단백질에 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 서열번호 3의 gD 아미노산 서열에서, N-말단, 아미노산 12번 내지 49번 영역 내의 위치 또는 아미노산 116번 내지 137번 영역 내의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 12번 아미노산 다음 위치, 22번 아미노산 다음 위치, 23번 아미노산 다음 위치, 29번 아미노산 다음 위치, 83번 아미노산 다음 위치, 116번 아미노산 다음 위치, 209번 아미노산 다음 위치, 215번 아미노산 다음 위치, 225번 아미노산 다음 위치, 277번 아미노산 다음 위치, 386번 아미노산 다음 위치, 437번 아미노산 다음 위치, 447번 아미노산 다음 위치, 472번 아미노산 다음 위치, 636번 아미노산 다음 위치, 637번 아미노산 다음 위치, 666번 아미노산 다음 위치, 731번 아미노산 다음 위치, 763번 아미노산 다음 위치, 764번 아미노산 다음 위치, 775번 아미노산 다음 위치, 806번 아미노산 다음 위치, 824번 아미노산 다음 위치, 838번 아미노산 다음 위치에 삽입되어 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 28

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질의 표적화 영역과 상기 삽입되어 융합되어 있는 표적화 영역은 (i) 모두 동일한 표적분자에 특이적으로 결합하는 표적화 영역을 갖거나, (ii) 서로 다른 표적분자에 특이적으로 결합하는 서로 다른 표적화 영역을 가진 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 29

제20항에 있어서,

상기 HVEM의 세포외 도메인은 서열번호 8 또는 9의 아미노산 서열로 이루어진 HveA82, 서열번호 10또는 11의 아미노산 서열로 이루어진 HveA87, 서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열로 이루어진 HveA102 또는 서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열로 이루어진 HveA107인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 30

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질은 그 암세포 표적화 영역과 그 HVEM(HveA)의 세포외 도메인은 1 내지 30개 아미노산으로 이루어진 링커 펩티드에 의해 연결되어 있는 융합 단백질이고,

상기 링커 펩티드의 아미노산은 Ser, Gly, Ala 및 Thr 중 하나 이상의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 31

제20항에 있어서,

상기 표적분자는 암세포에서만 발현되거나 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 암세포 표면의 항원 또는 수용체인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 항원 또는 수용체는 EGFRvⅢ, EGFR, 메타스틴 수용체(Metastin receptor), 수용체 타이로신 카이나제(Receptor tyrosine kinases), HER2(Human epidermal growth factor receptor 2), 타이로신 카이나제-18-수용체(c-Kit), HGF 수용체 c-Met, CXCR4, CCR7, 엔도테린-A 수용체, PPAR-δ(peroxisome proliferator activated

receptor δ), PDGFR-α(Platelet-derived growth factor receptor α), CD133, CEA(carcinoembryonic antigen), EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), MSLN(Mesothelin), GD2(disialoganglioside), GPC3(Glypican 3), PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), TAG-72(tumor-associated glycoprotein 72), GD3(disialoganglioside), HLA-DR(human leukocyte antigen-DR), MUC1(Mucin 1), NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1), LMP1(Latent membrane protein 1), TRAILR2(tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor), VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2), HGFR(hepatocyte growth factor receptor), CD44 또는 CD166인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 33

제20항에 있어서,

상기 당당단백질에 삽입되어 융합되는 표적화 영역이 특이적으로 결합하는 표적분자는 HER2이고,

상기 당당단백질에 삽입되어 융합되는 표적화 영역은 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 링커 펩티드를 매개로 VH, 링커 펩티드, VL 순서로 연결된 scFv인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 34

제20항에 있어서,

상기 당당단백질에 삽입되어 융합되는 표적화 영역이 특이적으로 결합하는 표적분자는 EpCAM이고,

상기 표적화 영역은 서열번호 6의 VL와 서열번호 7의 VH이 링커 펩티드를 매개로 VL, 링커 펩티드, VH 순서로 연결된 scFv인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 35

제20항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 서열번호 16의 gD(glycoprotein D) 아미노산 서열 222번 위치의 아르기닌(arginine, R)과 223번 위치의 페닐알라닌(phenylalanime, F)이 각각 아스파라긴(asparagine, N)과 이소루신(isoleucine, I)로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 36

제20항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 재조합 HSV-1 바이러스, 재조합 HSV-2 바이러스, 또는 HSV-1와 HSV-2 키메라 바이러스인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 37

제20항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스는 HSV-1 KOS 균주로부터 유래된 재조합 HSV-1인 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 38

제20항에 있어서,

상기 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스에는 헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 그 게놈에, (i) 사이토카인, (ii) 케모카인, (iii) 면역관문(immune checkpoint)에 대한 길항제, (iv) 면역세포의 활성화를 유도할 수 있는 보조 자극 인자(co-stimulatory factor), (v) 암세포에 대한 면역반응을 억제하는 TGFβ에 대항 길항제, (vi) 고형암 종양미세환경을 구성하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)을 분해할 수 있는 헤파라나아제(heparanase), (vii) 혈관 신생 인자 수용체인 VEGFR-2(VEGF receptor-2)의 기능을 저해할 수 있는 길항제, 및 (viii) 프로드럭(prodrug)을 암세포에 독성을 나타내는 약물(drug)으로 전환시켜주는 프로드럭 활성화 효소(prodrug-activating enzymes) 중에 선택된 것을 발현하는 발현 카세트가 추가로 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 사이토카인은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-24 등의 인터류킨, IFNα, IFNβ, IFNɣ 등의 인터페론, TNFα 등의 종양 괴사 인자, GM-CSF, G-CSF 및 FLT3L 중 하나 이상이고,

상기 케모카인은 CCL2, RANTES, CCL7, CCL9, CCL10, CCL12, CCL15, CCL19, CCL21, CCL20 및 XCL-1 중 하나 이상이며,

상기 면역관문은 PD-1(programmed cell death-1), PD-L1(programmed cell deathligand 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), CD86(cluster of differentiation 86), CD137(cluster of differentiation 137), CD276(cluster of differentiation 276), KIRs(killer-cell immunoglobulin-like receptors), LAG3(lymphocyte-activation gene 3), GITR(glucocorticoid-induced TNFR-related protein), GITRL(glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand) 및 CTLA-4(cytolytic T lymphocyte associated antign-4) 중 하나 이상이며,

상기 보조 자극 인자는 CD2, CD7, LIGHT, NKG2C,CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, LFA-1(림프구 기능 연관 항원-1), ICOS(유도성 T 세포 공동자극인자), CD3ɣ, CD3δ 및 CD3ε 중 하나 이상이며,

상기 프로드럭 활성화 효소(prodrug-activating enzymes)는 시토신 디아민나아제(Cytosine deaminase), 랫드 사이토크롬 P450(rat cytochrome P450, CYP2B1), 카르복실에스터라제(carboxylesterase), 세균 니트로리덕타아제(bacterial nitroreductase) 및 대장균에서 분리된 PNP(purine nucleoside phosphorylase) 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 40

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질의 발현 카세트는 상기 바이러스 게놈에, UL3와 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 41

제38항에 있어서,

상기 발현 카세트가 상기 바이러스 게놈에, UL3와 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 사이에 삽입되어 있되, 상기 융합 단백질의 발현 카세트와는 다른 위치에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 42

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질은 NH_2-암세포 표적화 도메인-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 43

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인이 링커 펩타이드를 매개로 연결되고, 상기 융합 단백질은 NH_2-암세포 표적화 영역-링커 펩타이드-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순인 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 44

제20항에 있어서,

상기 융합 단백질의 발현 카세트는 2개 이상의 융합 단백질 유전자를 포함하고 이들 유전자 사이에 IRES(Internal Ribosome Entry Site) 또는 2A 펩타이드 암호화하는 핵산 서열이 위치하는 폴리시스트론(polycistron) 구성을 갖고, 1개가 사입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항의 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스를 유효성분으로 포함하는 항암용 약제학적 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 조성물은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인이 융합된 재조합 어댑터 분자를 추가로 포함하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다중 표적화 재조합 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 암 치료에는 현재까지 수술 요법, 항암 화학 요법, 방사선 요법 등이 널리 이용되어 있으나 대부분이 부작용을 수반하고 불완전한 치료 효과, 암 재발과 전이 등의 문제점을 가지고 있다. 따라서 새롭고 효과적인 암 치료법 개발이 지속적으로 요구되어 왔으며, 최근 몇년 사이 항암 바이러스, CAR-T 세포 치료법(chimeric antigen receptor T cell therapy) 등 항암 면역 요법에 있어 급속한 발전이 있었다.

[0004] 항암 면역 요법 중 항암 바이러스는 살아있는 바이러스의 유전자를 조작해 암세포에서 선택적으로 증식하여 암

세포를 용해하는 특성을 가진 바이러스로서, 정상세포에서의 증식은 제한적이다. 암세포를 용해하여 방출된 바이러스는 주변 암세포를 계속 감염시킴으로써 지속적이고 상승적인 치료 효과를 낼 수 있다. 또한 항암 바이러스는 암세포를 용해하는 과정에서 면역원성을 가진 종양 항원이 방출되어 인체의 면역반응을 자극시킴으로써 항암 효과를 높일 수 있으며, 또 이러한 항암 효과는 사이토카인, 케모카인 등을 발현하도록 인위적으로 조작함으로써 증진될 수도 있다.

[0005] 현재의 개발되는 항암 바이러스는 아데노 바이러스와 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes Simplex Virus, HSV), 백시니아 바이러스를 포함하여 10종 이상으로 나눌 수 있는데, 이중 HSV는 152kb 크기의 선상의 이중가닥 DNA를 포함하는 다면체성 바이러스(enveloped icosahedral virion)로서, HSV-1형과 HSV-2형으로 나뉜다. HSV는 많은 비필수 유전자(non-essential genes)를 가지고 있고 게놈의 크기가 커서 외부 유전자의 조작이나 운반이 용이하고, 복제 주기가 짧으며, 또 감염 효율이 높고, 세포 부착과 감염에 관여하는 당단백질의 조작이 용이하여 암세포에 대한 표적화를 개선시킬 수 있는 장점을 가진다.

[0006] 2015년 10월 미국 FDA의 승인을 받은 T-VEC(Talimogene Laherparepvec, 제품명: 임리직)은 HSV-1을 이용한 악성 흑색종에 대한 항암 바이러스 치료제이다. T-VEC은 병원성을 약화시키기 위하여 ICP34.5와 ICP47 유전자가 결실되어 있고, 인체 면역 반응을 촉진시키기 위한 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)를 발현하는 약화된(attenuated) HSV-1형 바이러스이다. 그러나 T-VEC은 일부 유전자가 소실됨에 따라 바이러스 증식이 제한되어 치료 효능이 낮은 한계점을 갖고 있다.

[0007] HSV는 외피(envelope)를 가진 바이러스로, HSV의 세포 진입은 외피에 존재하는 당단백질 gD, gB, gH/gL 및 gC의 복잡한 상호 작용에 의해 이루어진다. 먼저 gB와 gC가 세포 표면의 3-*O*-S HS(3-*O*-sulfated heparan sulfate)에 부착하면, gD가 세포 수용체인 HVEM(herpesvirus entry mediator, HveA), 넥틴-1(nectin-1, HveC), 넥틴-2(nectin-2, HveB) 중 적어도 하나의 수용체 결합하여 바이러스와 세포막 사이의 융합을 유도함으로써 HSV가 세포로 진입한다(Hiroaki Uchida et al., Generation of Herpesvirus Entry Mediator (HVEM)-restricted Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Viruses: Resistance of HVEM-expressing Cells and Identification of Mutations That Rescue nectin-1 Recognition. J Virol. 2009 Apr;83(7):2951-61).

[0008] 2015년 10월 미국 FDA의 승인을 받은 T-VEC(Talimogene Laherparepvec, 제품명: 임리직)은 HSV-1을 이용한 악성 흑색종에 대한 항암 바이러스 치료제이다. T-VEC은 병원성을 약화시키기 위하여 ICP34.5와 ICP47 유전자가 결실되어 있고, 인체 면역 반응을 촉진시키기 위한 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)를 발현하는 약화된(attenuated) HSV-1형 바이러스이다. 그러나 T-VEC은 일부 유전자가 소실됨에 따라 바이러스 증식이 제한되어 치료 효능이 낮은 한계점을 갖고 있다.

[0009] 이러한 한계를 극복하기 위하여, 바이러스를 약화시키지 않으면서 HSV의 세포 진입에 관여하는 외피 당단백질 gD, gB, gH, gC를 조작하여 암세포를 특이적으로 표적화하기 위한 재표적화(retargeting)가 시도되었다. 이러한 재표적화는 암세포 표적분자에 대한 표적화 도메인을 암호화하는 외인성 서열을 당단백질 gD, gB, gH, gC 서열에 도입하는 것으로서 야생형 당단백질 대신에 당단백질에 외인성 서열의 표적화 도메인(리간드라고도 함)이 삽입되어 있는 키메라 당단백질을 갖는 재조합 바이러스를 이용하는 방법이다. 이러한 재조합 바이러스는 표적화 영역이 특이적으로 인식하여 결합하는 표적분자를 갖는 암세포로의 진입이 가능하다. 이러한 표적화 영역은 일반적으로 scFv(single-chain variable fragment)가 사용되고, 현재 재표적화가 시도된 표적 분자는 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), HER2(Human epidermal growth factor receptor 2) 등이며, 당단백질로서 gB, gH, gC 등의 변형이 이루어졌다.

[0010] 한편 HSV의 세포 수용체 중 HVEM은 종양괴사인자 수용체 단백질 패밀리(tumor necrosis factor receptor protein family, TNFR family)에 속하며, 주로 T, B 림프구, 마크로페이지, DC 세포, 감각 신경 세포(sensory neuron), 점막 상피 세포(mucosal epithelial cell)에서 발현되지만(Shui JW, Kronenberg M. 2013. Gut Microbes 4(2):146-151), B, T 림프종, 흑색종, 직장암(colorectal cancer), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 유방암(breast cancer), 난소의 장액 선암종(ovarian serous adenocarcinoma), 투명신세포암(clear renal cell carcinoma), 교모세포종(glioblastoma) 같은 여러 종양조직에서도 많이 발현되는 것으로 알려져 있다 (Pasero C et al., Curr Opin Pharmacol. 2012. 2(4):478-85, Malissen N et al., ONCOIMMUNOLOGY 2019, VOL. 8(12):e1665976) HVEM은 TNFR 패밀리의 특징인 4개의 CRD(cystein-rich domain)를 가지며, 이 중 2개의 CRD가 HSV의 gD와 결합하여 HSV-1과 HSV-2의 세포 진입을 유도하는 것으로 보고 있다(Sarah A Connolly et al., Structure-based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HveA (HVEM). J Virol. 2002 Nov;76(21):10894-904.).

[0011] 본 발명자들은 이전에 CEA(carcinoembryonal antigen)에 대한 scFv(single-chain variable fragment)와 HSV 세포 표면 수용체의 하나인 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질(CEAscFv-HveA)을 제작하여, 그 융합 단백질을 HSV와 함께 CEA을 발현하는 세포주에 처리할 경우, 그 융합 단백질이 어댑터(adapter)로 작용하여 HSV가 해당 세포주를 표적하여 감염시키도록 유도함을 이전에 보고한 바 있다(한국 등록특허 제10-0937774호 및 미국 등록특허 제8318662호 참조).

[0012] 본 발명자들은 HER2(Human epidermal growth factor receptor 2) 또는 EpCAM를 표적화할 수 있는 어댑터인 융합 단백질(HER2scFv-HveA, EpCAM2scFv-HveA)을 암호화하는 유전자를 HSV의 게놈에 발현 가능하게 삽입하여 그 융합 단백질이 HSV에 감염된 세포 내에서 발현되도록 할 경우, 그 융합 단백질이 HSV를, HER2 또는 EpCAM을 발현하는 세포주를 표적하여 감염시키도록 유도함을 확인하였으며, 나아가 어댑터에 의한 다중 표적화가 가능하도록, HER2에 대한 표적화 기능을 가지는 어댑터인 융합 단백질(HER2scFv-HveA)을 발현할 수 있는 그 발현 카세트와 EpCAM에 대한 표적화 기능을 가지는 어댑터인 융합 단백질(EpCAM-HveA)을 발현할 수 있는 그 발현 카세트를 HSV의 게놈에 다중(dual)으로 삽입하여 그 융합 단백질들이 HSV에 감염된 세포 내에서 발현되도록 할 경우, 그 융합 단백질들이 HSV 비리온을, HER2 및/또는 EpCAM을 발현하는 세포주에 대해 다중으로 표적하여 감염시키도록 유도함을 확인하는 한편, 이러한 어댑터의 발현 카세트를 HSV의 게놈에 삽입하고 추가로는 당단백질을 변형하여 HER2 및/또는 EpCAM에 대한 재표적화가 가능하도록 한 재조합 HSV가 HER2 및/또는 EpCAM를 발현하는 세포주에 대해 다중으로 표적하여 감염시킴을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 전술한 바를 고려할 때, 본 발명의 목적은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 다중으로 발현함으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 발현할 수 있는 이외에 또 재표적화가 가능하도록 변형된 당단백질을 가짐으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV를 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 HSV를 유효성분으로 포함하는 항암 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약제학적 조성물을 유효량으로 환자 등 대상체에 투여하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명은 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV에 관한 것으로서, 본 발명의 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV는 일 측면에 있어서, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 그 게놈에, 암세포 표적화 영역(즉 암세포 표면의 표적분자에 특이적으로 결합하는 도메인임)과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질(즉 어댑터)이 2개 이상 다중으로 발현될 수 있도록 그 융합 단백질 발현 카세트가 1개 이상 삽입된 구성을 가짐으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV로 파악할 수 있다.

[0021] 이러한 본 발명의 다중 표적화 재조합 HSV에서 2개 이상 즉 다중으로 융합 단백질이 발현됨으로써 그 다중으로 발현된 융합 단백질은 그 표적화 영역이 동일 표적분자를 다중으로 표적화하거나 서로 다른 표적분자를 다중으로 표적화하는 것일 수 있다. 상기 표적분자는 융합 단백질의 표적화 영역이 특이적으로 인식하여 결합하는 암세포의 표면에 존재하는 임의의 항원 또는 임의의 수용체를 말하는데, 본 발명의 재조합 HSV는 하나의 표적분자로서 예컨대 HER2를 표적화할 수 있는 융합 단백질을 다중으로 발현할 수 있는 발현 카세트가 1개 이상 그 게놈에 삽입된 것이거나, 서로 다른 표적분자로서 예컨대 HER2와 EpCAM를 각각 표적화할 수 있는 융합 단백질을 발현할 수 있는 발현 카세트가 1개 이상 그 게놈에 삽입된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 재조합 HSV가 암세포인 표적세포를 감염시켜 표적세포 내로 들어가게 되면, HSV가 증식됨과 함께 2개

이상 다중의 융합 단백질인 어댑터가 세포 내에서 발현되어 세포 용해에 의하여 증식된 HSV 비리온과 함께 세포 외부로 방출되거나 어댑터가 리더 서열을 가질 경우에는 세포 용해에 의한 비리온 방출 이전에도 방출되게 되는데, 그러면 이 세포 외부로 방출된 다중의 어댑터는 HSV 비리온을, 어댑터의 암세포 표적화 영역이 인식하는 표적분자를 발현하는 주변 암세포로 감염을 다중으로 유도함으로써 단일 표적화 재조합 HSV(즉 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질을 발현할 수 있는 발현 카세트를 하나만 포함하는 재조합 HSV)에 비해 그 감염 효율을 보다 높이고 주변 암세포로의 지속적인 확산 효율을 보다 높이는 작용을 하게 된다. 이는 결과적으로 보다 효과적인 암세포의 사멸로 이어지게 된다.

[0023] 다른 측면에 있어서, 본 발명의 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV는 (i) 헤르페스 심플렉스 바이러스의 증식을 저해하지 않으면서 그 게놈에, 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 발현할 수 있는 발현 카세트가 1개 이상 삽입되어 있고, 또한 (ii) 그 당단백질에 암세포 표적화 영역이 삽입되어 융합됨으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV로 파악될 수 있다.

[0024] 이러한 본 발명의 다중 표적화 재조합 HSV는 암세포 표적화 영역이 삽입되어 융합됨에 의해 재표적화가 가능한 변형된 당단백질을 가짐으로써 어댑터에 의한 표적화 이외에 당단백질에 의해 추가적인 표적화가 가능하게 된다. 이러한 다중 표적화 재조합 HSV도 전술한 바의 다중의 어댑터 발현 카세트를 가진 재조합 HSV와 같이 비리온의 암세포의 감염 효율이나 비리온의 주변 암세포로의 지속적인 확산 효율, 암세포 사멸 효율에서 있어서 보다 효과적이다.

[0025] 일반적으로 재조합 HSV는 야생형 HSV 바이러스와 비교할 때 인위적인 돌연변이가 도입됨으로써(즉 일부 핵산 서열이 결실, 치환 또는 삽입됨으로써) 일정 기능이 상실 또는 변경되거나 의도한 목적 단백질을 발현할 수 있도록 유전적으로 조작된 HSV를 의미하는데, 본 발명에서 재조합 HSV는 HSV 게놈에, HSV의 증식을 저해하지 않으면서, 어댑터의 발현 카세트(adapter expressionl cassette)(즉 어댑터 유전자가 이의 발현을 가능하게 하는 프로모터 서열 및 폴리아데닐화 시그널 서열과 작동가능하게 연결된 구성체)를 도입(즉 삽입)함으로써 그 재조합 HSV가 감염된 암세포 내에서 어댑터를 발현할수 있고, 또한 재표적화를 위하여 변형된 당단백질을 갖는 HSV를 의미한다.

[0026] 이러한 바이러스의 유전자 조작과 비리온의 생산 등 재조합 바이러스 제조 기술은 당업계에 매우 잘 공지되어 있으며, 구체적으로는 문헌[Sandri-Goldin RM et al, Alpha Herpesviruses: Molecular and Cellular Biology, Caister Academic Press, 2006], 문헌[Robin H Lachmann, Herpes simplex virus-based vectors, Int J Exp Pathol. 2004 Aug; 85(4): 177-190] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌을 포함하여 본 명세서에서 인용되는 문헌들은 모두 본 명세서의 일부로 간주된다.

[0027] 본 발명의 재조합 HSV는, 특히 이러한 어댑터를 발현하도록 조작되는 이외에, 진입 수용체(entry receptor)로서 넥틴-1(nectin-1)을 통하여 세포 내로 진입하지 못하고 오직 HVEM 수용체를 통해서만 세포 내로 진입하도록 추가로 조작될 수 있다. 본 발명은 아래의 실시예에서 HSV 당단백질(envelope glycoprotein) gD의 서열을 조작하여 HVEM 수용체를 통해서만 HSV가 세포 내로 진입하도록 하였다. 구체적으로 gD의 222번 위치의 아르기닌(arginine, R)과 223번 위치의 페닐알라닌(phenylalanime, F)을 각각 아스파라긴(asparagine, N)과 이소루신(isoleucine, I)로 치환시켜 gD의 기능이 변경되도록 조작하였으며, 이러한 gD 기능이 변경된 재조합 HSV는 오직 HVEM(HveA) 수용체를 통해서만 숙주세포 내로 들어갈 수 있다(Hiroaki Uchida et al. Generation of Herpesvirus Entry Mediator (HVEM)-restricted Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Viruses: Resistance of HVEM-expressing Cells and Identification of Mutations That Rescue nectin-1 Recognition. J Virol. 2009 Apr;83(7):2951-61). HVEM(HveA) 수용체는 정상세포에는 거의 존재하지 않고 림프종 등에만 존재하는데 반해, 넥틴-1은 대부분의 정상세포에 존재하므로, HVEM 수용체를 통해서만 세포 진입이 가능하고 넥틴-1 수용체를 통해서는 세포 진입이 불가한, 상기 gD 기능이 변경된 재조합 HSV는 정상세포를 감염시키지 못하므로 안전성 측면에서 유리한 특성을 가지게 된다.

[0028] 또한 본 발명의 재조합 HSV는 어댑터를 통한 표적화 이외에 당단백질에의 암세포 표적화 영역의 삽입과 융합을 통해 추가적인 표적화가 가능하도록 조작되는데, 추가적인 표적화에 사용될 수 있는 당단백질로서는 gB, gC, gH 등이 사용될 수 있으며, 당단백질에의 암세포 표적화 영역이 삽입·융합된 HSV는 그 당단백질 유전자가 일부 결실되거나 결실되지 않고, 암세포의 표적화 영역에 대한 유전자가 오픈 리딩 프레임(open reading frame)으로 삽입됨으로써 제조될 수 있다. 이러한 당단백질 유전자에 암세포 표적화 영역의 유전자가 삽입될 경우 암세포 표적화 영역은, 당단백질에 융합된 형태로 재조합 HSV가 세포내에서 생산될 때 비리온의 외피에 통합되게 된다.

[0029] 암세포 표적화 영역의 당단백질에의 삽입과 융합은 gB, gC, gD, gH 등의 당단백질에, 그 당단백질의 아미노산

서열이 결실되지 않고 그 아미노산 서열의 임의의 위치에서 이루어지거나, 일부 길이(특히 1개의 아미노산 내지 40의 연속된 아미노산)의 아미노산 서열이 결실되고 그 결실된 위치에서 이루어지거나, 일부 길이의 아미노산 서열이 결실, 치환되지만 결실, 치환되지 않은 아미노산 서열의 임의의 위치에서도 이루어질 수 있다. 여기서 일부 길이의 아미노산의 결실, 치환은 당단백질의 특정 세포 수용체 예컨대 HVEM, 넥틴-1 등과의 결합 부위를 불활성화시키기 위하여 이루어질 수 있다.

[0030] gB 당단백질에 암세포 표적화 영역이 삽입되어 융합될 경우 N-말단(N-terminus)을 포함한 임의의 위치일 수 있으나, HSV-1에 있어서 바람직한 위치는 gB의 아미노산 서열(서열번호 1, GenBank Accession No. ASM47779)에서, 아미노산 9번 내지 896번 영역 내의 임의의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 아미노산 31번 내지 78번 영역 내의 임의의 위치, 아미노산 80번 내지 363번 영역 내의 임의의 위치 또는 아미노산 408번 내지 896번 영역 내의 임의의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 gB의 43번 아미노산 다음 위치, 52번 아미노산 다음 위치, 70번 아미노산 다음 위치, 76번 아미노산 다음 위치, 80번 아미노산 다음 위치, 81번 아미노산 다음 위치, 95번 아미노산 다음 위치, 100번 아미노산 다음 위치, 137번 아미노산 다음 위치, 185번 아미노산 다음 위치, 187번 아미노산 다음 위치, 241번 아미노산 다음 위치, 261번 아미노산 다음 위치, 265번 아미노산 다음 위치, 304번 아미노산 다음 위치, 334번 아미노산 다음 위치, 361번 아미노산 다음 위치, 408번 아미노산 다음 위치, 419번 아미노산 다음 위치, 430번 아미노산 다음 위치, 458번 아미노산 다음 위치, 470번 아미노산 다음 위치, 481번 아미노산 다음 위치, 495번 아미노산 다음 위치, 497번 아미노산 다음 위치, 546번 아미노산 다음 위치, 608번 아미노산 다음 위치, 630번 아미노산 다음 위치, 663번 아미노산 다음 위치, 664번 아미노산 다음 위치, 665번 아미노산 다음 위치, 671번 아미노산 다음 위치, 673번 아미노산 다음 위치, 690번 아미노산 다음 위치, 725번 아미노산 다음 위치, 730번 아미노산 다음 위치, 732번 아미노산 다음 위치, 742번 아미노산 다음 위치, 772번 아미노산 다음 위치, 868번 아미노산 다음 위치, 869번 아미노산 다음 위치, 886번 아미노산 다음 위치, 893번 아미노산 다음 위치, 894번 아미노산 다음 위치, 895번 아미노산 다음 위치일 수 있다. 상기 위치는 gB의 서열번호 1의 아미노산 서열을 기준으로 한 것이나, gB의 서열에서 일부 차이가 있는 변이 균주에 있어서는 이에 상응하는 상동 서열(homologous sequence)을 기준으로 한다.

[0031] gC 당단백질에 세포 표적화 영역이 추가로 삽입되어 융합될 경우도 그 N-말단(N-terminus)을 포함한 임의의 위치일 수 있으나, HSV-1에 있어서 바람직한 위치는 gC의 아미노산 서열(서열번호 2, GenBank Accession No. ASM47796)에서, 아미노산 1번 내지 442번 영역 내의 임의의 위치, 또 바람직한 위치는 아미노산 33번 내지 154번 영역 내의 임의의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 gC의 33번 아미노산 다음 위치, 82번 아미노산 다음 위치, 148번 아미노산 다음 위치, 149번 아미노산 다음 위치, 153번 아미노산 다음 위치일 수 있다. 상기 위치는 gC의 서열번호 3의 아미노산 서열을 기준으로 한 것이나, gC의 서열에서 일부 차이가 있는 변이 균주에 있어서는 이에 상응하는 상동 서열(homologous sequence)을 기준으로 한다.

[0032] gH 당단백질에 암세포 표적화 영역이 삽입되어 융합될 경우, N-말단(N-terminus), H1A 도메인의 N-말단 등을 포함한 임의의 위치일 수 있으나, HSV-1에 있어서 바람직한 위치는 gH의 아미노산 서열(서열번호 3, GenBank Accession No. ASM47773)에서, 아미노산 12번 내지 88번 영역 내의 위치, 아미노산 116번 내지 137번 영역 내의 위치 또는 아미노산 209번 내지 839번 영역 내의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 아미노산 12번 내지 49번 영역 내의 위치 또는 아미노산 116번 내지 137번 영역 내의 위치일 수 있다. 또 바람직한 위치는 12번 아미노산 다음 위치, 22번 아미노산 다음 위치, 23번 아미노산 다음 위치, 29번 아미노산 다음 위치, 83번 아미노산 다음 위치, 116번 아미노산 다음 위치, 209번 아미노산 다음 위치, 215번 아미노산 다음 위치, 225번 아미노산 다음 위치, 277번 아미노산 다음 위치, 386번 아미노산 다음 위치, 437번 아미노산 다음 위치, 447번 아미노산 다음 위치, 472번 아미노산 다음 위치, 636번 아미노산 다음 위치, 637번 아미노산 다음 위치, 666번 아미노산 다음 위치, 731번 아미노산 다음 위치, 763번 아미노산 다음 위치, 764번 아미노산 다음 위치, 775번 아미노산 다음 위치, 806번 아미노산 다음 위치, 824번 아미노산 다음 위치, 838번 아미노산 다음 위치일 수 있다. 상기 위치는 gH의 서열번호 3의 아미노산 서열을 기준으로 한 것이나, gH의 서열에서 일부 차이가 있는 변이 균주에 있어서는 이에 상응하는 상동 서열(homologous sequence)을 기준으로 한다.

[0033] 당단백질의 바람직한 삽입 위치와 관련해서 더 구체적인 것은 문헌[JOHN R. GALLAGHER et al., Functional Fluorescent Protein Insertions in Herpes Simplex Virus gB Report on gB Conformation before and after Execution of Membrane Fusion, PLoS Pathog, 2014, Sep 18, 10(9):e1004373], 문헌[Gatta V et al, The Engineering of a Novel Ligand in gH Confers to HSV an Expanded Tropism Independent of gD Activation by Its Receptors, PLoS Pathog. 2015 May 21;11(5):e1004907], 문헌[Tina M. Cairns et al., Structure-Function Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 gD and gH-gL: Clues from gDgH Chimeras, JOURNAL OF

VIROLOGY, June 2003, p.6731-6742], 문헌[E.U. Lorentzen et al., Replication-Competent Herpes simplex Virus Type 1 Mutant Expressing an Autofluorescent Glycoprotein H Fusion Protein, Intervirology 2001;44:232-242], 문헌[Qing Fan et al., Differential Effects on Cell Fusion Activity of Mutations in Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein B (gB) Dependent on Whether a gD Receptor or a gB Receptor Is Overexpressed, JOURNAL OF VIROLOGY, Aug. 2009, 83(15):7384-7390], 문헌[Erick Lin et al., Random linker-insertion mutagenesis to identify functional domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B, Proc Natl Acad Sci U S A. Aug. 2007, 104(32):13140-13145], 문헌[Julia O. Jackson et al., Insertion Mutations in Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein H Reduce Cell Surface Expression, Slow the Rate of Cell Fusion, or Abrogate Functions in Cell Fusion and Viral Entry, JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 2010, 84(4):2038-2046], 문헌[Guoying Zhou et al., Engineered herpes simplex virus 1 is dependent on IL13R*2 receptor for cell entry and independent of glycoprotein D receptor interaction, Proc Natl Acad Sci U S A. Nov. 2002, 99(23):15124-15129], 문헌[AR Frampton Jr et al., HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system, Gene Therapy, 2005, 12:891-901], 문헌[Paola Grandi et al., HSV-1 Virions Engineered for Specific Binding to Cell Surface Receptors, MOLECULAR THERAPY, Mar. 2004, 9(3):419-427], 문헌[William F Goins et al., Retargeting of Herpes Simplex Virus (HSV) Vectors, Curr Opin Virol, 2016 Dec, 21:93-101], 문헌[Xiaodan Wang et al., Targeted gene transfer to nigrostriatal neurons in the rat brain by helper virus-free HSV-1 vector particles that contain either a chimeric HSV-1 glycoprotein C-GDNF or a gC-BDNF protein, Brain Res Mol Brain Res. 2005 Sep, 139(1):88-102] 등을 참조할 수 있다.

[0034] 당단백질에 암세포 표적화 영역이 삽입되어 융합될 경우 그 암세포 표적화 영역의 N 말단과 C 말단에는 링커 펩티드가 존재할 수 있다. 이러한 링커 펩티드는, 당단백질에 융합되는 암세포 표적화 영역이 당단백질과의 융합됨에 의하여 그 고유 3차원 구조를 형성하는데 방해를 받지 않도록, 암세포 표적화 영역과 당단백질 사이에 거리를 두기 위한 것으로, 그것의 표적분자와의 특이적인 결합 능력을 가지도록 하는 한, 임의의 길이, 임의의 서열의 링커 펩티드일 수 있다. 링커는 유연성(flexibility), 용해성(solubility), 단백분해에 대한 저항성 등을 고려할 때, Ser, Gly, Ala, Thr 등의 아미노산 중 한 종류 이상의 아미노산으로 이루어지는 것이 바람직하며, 길이는 1~30개 아미노산, 바람직하게는 3~25개 아미노산, 더 바람직하게는 8~20개 아미노산일 수 있다.

[0035] 본 발명의 재조합 HSV는 HSV의 증식(즉 생존과 복제)에 필요하지 않은 비필수 유전자(non-essential genes)가 결실되거나 기능을 발휘하지 않도록(즉 전사나 번역이 방해를 받도록) 돌연변이(mutation) 될 수도 있다. 구체적으로 그러한 비필수 유전자는 UL3 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62830.1 참조), UL4 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62831.1 참조), UL14 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62841.1), UL16 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62843.1 참조), UL21 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62848.1 참조), UL24 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62851.1 참조), UL31 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62859.1 참조), UL32 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62860.1 참조), US3 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62891.1 참조), UL51 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62880.1 참조), UL55 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62884.1 참조), UL56 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62885.1 참조), US2 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62890.1), US12 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62901.1; 즉, ICP47 유전자 참조), LAT 유전자(예컨대, Genbank Accession No. JQ673480.1 참조), gB 유전자(예컨대, Genbank Accession No. GU734771.1의 52996과 55710 사이 서열), gL 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62828.1 참조), gH 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62849.1 참조), gD 유전자(예컨대, Genbank Accession No. AFE62894.1 참조) 1) 등을 들 수 있다.

[0036] HSV 바이러스의 비필수 유전자에 대해 더 구체적인 것은 문헌[DM Knipe and PM Howley(ed.) Fields virology(vol.2) Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001. p.2399-2460)], 문헌[Subak-Sharpe J H, Dargan D J HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology Virus Genes, 1998, 16(3): 239-251], 문헌[Travis J. Taylor 및 David M. Knipe, Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments: Association of Cellular DNA Replication, Repair, Recombination, and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8, J Virol. 2004 Jun; 78(11): 5856-5866] 등을 참조할 수 있다.

[0037] 본 발명의 재조합 HSV는 재조합 HSV-1 바이러스, 재조합 HSV-2 바이러스, 또는 HSV-1/HSV-2 키메라 바이러스(즉, 게놈이 HSV-1로부터 유래된 DNA 및 HSV-2로부터 유래된 DNA 둘 모두를 포함하는 재조합 HSV 바이러스임)일 수 있으며, 바람직하게는 재조합 HSV-1 바이러스, 더 바람직하게는 HSV-1 KOS 균주로부터 유래된 재

조합 HSV-1이다. HSV-1 KOS 균주는 ATCC(Cat No VR-1493TM)로부터 구입이 가능하고 그 균주의 게놈 서열은 전체 서열 분석이 완료되어 GenBank Accession No. JQ673480.1에 제시되어 있다(Stuart J Macdonald et al. Genome Sequence of Herpes Simplex Virus 1 Strain KOS. J Virol. 2012 Jun;86(11):6371-2).

[0038] HSV-1 바이러스의 게놈은 총 84개의 유전자를 암호화하는 152 kb의 이중가닥 선형 DNA로 구성되어 있으며, 이는 서로 연결된 두 개의 단편 즉 긴 단편(L 영역)와 짧은 단편(S 영역)으로 구성된다. 긴 단편(L 영역)은 게놈의 약 82%를 차지하고, 짧은 단편(S 영역)은 게놈의 약 18%를 차지하며, 긴 단편과 짧은 단편은 접합 영역인 2개의 IRL((intermediate inverted repeat sequence) 의해 결합되며, 각 단편의 말단에는 TRL(terminal inverted repeat segment)이 존재한다. L 영역(UL)에는 56개의 UL1~UL56 유전자와 10개의 유전자(UL8.5, 9.5, 10.5, 12.5, 15.5, 20.5, 26.5, 27.5, 43.5, 49.5)가 존재하고, S 영역(US)에는 12개의 US1~US12 유전자와 2개의 유전자(US1.5, 8.5)가 존재하며, 접합 영역인 2개의 IRL에 4개의 유전자(ICP4, ICP34.5, ICP0 및 LAT)가 포함되어 있다.

[0039] 본 발명에서, 어댑터 발현 카세트는 어댑터 유전자가 그것의 발현을 가능하게 하기 위한 프로모터 서열과 전사 종결 신호 서열인 폴리아데닐화 시그널(polyadenylation signal) 서열과 작동 가능하게 연결되어 구성된다. 여기서 "작동 가능하게 연결된다"는 것은 발현되는 어댑터 유전자의 전사 및/또는 번역이 가능하도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어댑터 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터는 그 어댑터 유전자에 작동 가능하게 연결된 것이다.

[0040] 일반적으로 프로모터는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상위(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 진핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상위에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 인핸서, 전사 인자 결합 부위 등을 포함한다.

[0041] 프로모터는 그것에 연결된 목적유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(상시적으로 유전자의 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터), 조직 특이성 프로모터(특징 조직이나 세포에서 유전자의 발현을 유도하는 프로모터), 조직 비특이적 프로모터(모든 조직이나 세포에서 유전자의 발현을 유도하는 프모모터), 내인성 프로모터(바이러스가 감염되는 세포에서 유래된 프로모터), 외인성 프로모터(바이러스가 감염되는 세포 이외의 세포에서 유래된 프로모터) 모두 사용이 가능하다. 이러한 프로모터는 당업계에 많은 것이 공지되어 있으며 공지된 것 중 적절한 것을 선택하여 사용할 수 있다. 예컨대 CMV(cytomegalovirus) 프로모터 promotor), 라우스 육종 바이러스(RSV, rous sarcoma virus) 프로모터, HSV(herpes simplex virus) TK(thymidine kinase) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 75K 프로모터, SV40 프로모터, 메탈로티오닌(metallothionein) 프로모터, CD45 프로모터(조혈모세포 특이적 프로모터), CD14 프로모터(단핵구세포 특이적 프로모터), 서비빈(Survivin), 미드킨(Midkine), TERT, CXCR4 등의 암세포 특이적 프로모터(tumor specific promoter) 등을 사용할 수 있다. 특히 암세포 특이적 프로모터를 사용할 경우 암세포에서만 어댑터의 발현을 유도함으로써 어댑터가 정상세포에서 발현되는 것을 억제하여 본 발명의 재조합 HSV의 안전성을 높일 수 있다.

[0042] 상기 어댑터 발현 카세트는 프로모터 이외에 전사 종결 신호 서열을 포함하여 구성되는데, 전사 종결 신호 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 많은 전사 종결 신호 서열이 당업계에 공지되어 있으며, 이중에서 적절한 것 예컨대 SV40 전사 종결 신호 서열, HSV TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)의 전사 종결 신호 서열 등을 선택하여 사용할 수 있다.

[0043] 상기 어댑터 발현 카세트는 HSV의 증식을 저해하지 않으면서 HSV 게놈에 발현 가능하도록 삽입되는데, 그러한 삽입은 HSV 게놈의 결실 없이 삽입되거나, 또는 HSV 게놈 중 비필수 유전자가 일부 또는 전부 결실되고 그 결실된 위치에 삽입될 수 있다. 어댑터 발현 카세트가 HSV 게놈의 결실 없이 삽입될 경우 각 유전자 사이에 삽입될 수 있는데, 삽입되는 위치로서 바람직한 위치는 예컨대 UL3과 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 유전자 사이 등을 들 수 있다.

[0044] 어댑터 발현 카세트가 HSV 게놈에 비필수 유전자가 일부 또는 전부 결실되고 그 결실된 위치에 삽입될 경우, 결실되는 비필수 유전자는 앞서 예시한 바의 임의의 비필수 유전자일 수 있다.

[0045] 어댑터를 다중으로 발현하기 위해서, 폴리시스트론(polycistron) 구성을 가진 어댑터 발현 카세트가 1개 이상 HSV 게놈에 삽입되거나, 모노시스트론(monocistron) 구성을 가진 어댑터 발현 카세트가 2개 이상 HSV 게놈에 삽입될 수 있다.

[0046] 폴리시스트론 구성을 가진 어댑터 발현 카세트는 프로모터와 전사 종결 신호 서열 이외에 그 사이에 2개 이상의 어댑터 유전자를 포함하고, 이들 유전자 사이에는 각각 단백질이 발현될 수 있도록 IRES(Internal Ribosome Entry Site, 내부 리보솜 유입 부위)나 2A 펩타이드 암호화하는 핵산 서열이 위치하게 된다. 여기서 2A 펩타이드는 피코르나바이러스(Picornavirus), 곤충 바이러스. 유형 C 로타바이러스(Type C rotavirus)로부터 확인된 것으로, 바람직한 2A 펩타이드는 토세아아시그나 바이러스(Thoseaasigna virus)의 2A(T2A), 돼지 테스코바이러스-1(Pocine Teschovirus-1)의 2A(P2A), ERAV(Equine Rhinitis A Virus)의 2A(E2A), FMDV(Foot-and-mouth disease virus)의 2A(F2A) 등이 예시될 수 있다. IRES나 2A 펩타이드에 대해 더 구체적인 것은 문헌[Edith Renaud-Gabardos et al., Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy, World J Exp Med. 2015 Feb 20; 5(1): 11-20], 문헌[Szymczak et al., Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors, (2005) Expert Opin Biol Ther 5:627-638], 문헌[Kim et al., High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice, (2011) PLosONE 6(4):e18556] 등을 참조할 수 있다.

[0047] 어댑터를 다중으로 발현하기 위해서, 어댑터 발현 카세트가 모노시스트론 구성을 가질 경우 그러한 어댑터 발현 카세트는 HSV 게놈에 2개 이상 삽입되게 되는데, 이 경우 2개 이상의 어댑터 발현 카세트는 HSV 게놈에서 동일 위치에 연속하여 삽입되거나, 각각 다른 위치에 삽입될 수 있다. 예컨대 HER2를 표적분자를 하는 어댑터 발현 카세트와 EpCAM을 표적분자로 하는 어댑터 발현 카세트가 모두 동일 위치인 UL3과 UL4 유전자 사이에 삽입되거나 또는 서로 다른 위치로서 HER2를 표적분자를 하는 어댑터는 UL3과 UL4 유전자 사이에 삽입되고, EpCAM을 표적분자로 하는 어댑터는 UL26과 UL27 유전자 사이에 삽입될 수 있다. 2개 이상 삽입되는 어댑터 발현 카세트가 동일 위치에 연속하여 삽입될 경우 발현 카세트 사이에는 비암호 영역이 게재될 수 있다. 이러한 비암호 영역은 2개 이상의 발현 카세트가 서로 그 발현(전사 및/또는 번역)에 방해를 받지 않도록 하기 위한 것으로, 이러한 비암호영역은 3~60개 뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.

[0048] 본 발명에서 3종류의 이상의 어댑터를 다중으로 발현할 필요가 있을 때 2종류의 어댑터를 발현할 수 있는 폴리시스트론(polycistron) 구성을 가진 어댑터 발현 카세트와 나머지 어댑터를 발현할 수 있는 모노시스트론(monocistron) 구성을 가진 어댑터 발현 카세트가 함께 HSV의 게놈의 동일 위치나 서로 다른 위치에 삽입될 수 있다.

[0049] 본 발명의 재조합 HSV에서, 어댑터의 암세포 표적화 영역은 표적세포인 암세포의 표적분자를 특이적으로 인식하여 결합하는 부분으로서, 이러한 암세포 표적화 영역이 인식하는 표적분자는 암세포의 표면에 존재하는 임의의 항원 또는 임의의 수용체이다.

[0050] 이러한 항원 또는 수용체는 바람직하게는 암세포에서만 발현되거나 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 항원 또는 수용체를 말한다. 예컨대 교모세포종(glioblastoma)에서 발현되는 EGFRvⅢ(epidermal growth factor receptor variantⅢ), 역형성 갑상선암이나 유방암, 폐암, 신경교종(glioma) 등에 과발현되는 EGFR(Epidermal growth factor receptor), 유두성 갑상선 암(papillary thyroid cancer) 등에서 과발현 메타스틴 수용체(Metastin receptor), 유방암 등에서 과발현되는 ErbB 계열의 수용체 타이로신 카이나제(Receptor tyrosine kinases), 유방암, 방광암, 담낭암(Gallbladder cancers), 담관암(Cholangiocarcinomas), 위식도접합부암(esophagogastric junction cancers) 등에서 과발현되는 HER2(Human epidermal growth factor receptor 2), 육두성 신암종 등에서 과발현되는 타이로신 카이나제-18-수용체(c-Kit), 식도 선암 등에 과발현되는 HGF 수용체 c-Met, 유방암 등에서 과발현되는 CXCR4 또는 CCR7, 전립선암에서 과발현되는 엔도테린-A 수용체, 직장암 등에서 과발현되는 PPAR-δ(peroxisome proliferator activated receptor δ), 난소암 등에서 과발현되는 PDGFR-α(Platelet-derived growth factor receptor α), 간암, 다발성 골수종 등에서 과발현되는 CD133, 폐암, 대장암, 위암, 췌장암, 유방암, 직장암, 결장암, 갑상선 수질암 등에서 과발현되는 CEA(carcinoembryonic antigen), 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 유방암 등에서 과발현되는 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule), 폐암, 유방암, 췌장암, 난소암 등에서 과발현되는 MSLN(Mesothelin), 신경모세포종 등에서 과발현되는 GD2(disialoganglioside), 간세포암 등에서 과발현되는 GPC3(Glypican 3), 전립선암 등에서 과발현되는 PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), 난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암 등에서 과발현되는 TAG-72(tumor-associated glycoprotein 72), 흑색종 등에서 과발현되는 GD3(disialoganglioside), 혈액암, 고형암 등에서 과발현되는 HLA-DR(human leukocyte antigen-DR), 진행성 고형암 등에서 과발현되는 MUC1(Mucin 1), 진

행성 폐암(advanced non-small-cell lung cancer) 등에서 과발현되는 NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1), 비인두종양(Nasopharyngeal neoplasms) 등에서 과발현되는 LMP1(Latent membrane protein 1), 폐암, 비호지킨 림프종, 난소암, 결장암, 대장암, 췌장암 등에서 과발현되는 TRAILR2(tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor), 혈관 신생 인자 수용체인 VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2), 간세포암 등에서 과발현되는 HGFR(hepatocyte growth factor receptor) 등이 표적분자일 수 있으며, 또한 암 줄기세포의 표면 항원인 CD44, CD166 등이 또한 표적 분자일 수 있다. 당업계에는 정상세포에 비해 암세포에서 과발현되는 많은 표적분자가 알려져 있으며, 상기 예시된 것 이외의 기타의 표적분자와 관련해서 더 구체적인 것은 문헌[Anne T Collins et al. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10946-51], 문헌[Chenwei Li et al. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7], 문헌[Shuo Ma et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. Int J Biol Sci. 2019 Sep 7;15(12):2548-2560], 문헌[Dhaval S Sanchala et al. Oncolytic Herpes Simplex Viral Therapy: A Stride Toward Selective Targeting of Cancer Cells. Front Pharmacol. 2017 May 16;8:270] 등을 참조할 수 있다.

[0051] 특히 본 발명에서 표적분자는 바람직하게는 HER2 또는 EpCAM이다.

[0052] 본 발명의 재조합 HSV가 어댑터에 의해 표적화하는 표적세포는 본 발명에서의 어댑터의 암세포 표적화 영역이 표적할 수 있는 표적분자를 가지는 임의의 암세포이다. 암세포라면 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁 경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 흑색종, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 다발성 골수종, 혈액암 등 암종을 불문한다.

[0053] 본 발명에서, 어댑터의 세포 표적화 영역은 표적분자와 특이적 결합능을 가지는 완전한 항체 이외에도 항체 유도체, 항체 유사체일 수 있다. 항체 유도체는 표적분자와 특이적 결합능을 가지는 항체 가변 영역을 적어도 하나 이상 포함하는 완전한 항체의 단편 또는 변형 항체을 의미한다. 이러한 항체 유도체로서는 Fab, scFv, Fv, VhH, VH, VL 등의 항체 단편, Fab2, Fab3, 미니바디, 디아바디, 트리바디, 테트라바디, 비스-scFv 등의 다가성 또는 다중특이적 변형 항체 등을 들 수 있다. 항체 유사체는 항체와 마찬가지로 표적분자와 특이적 결합능을 갖지만 구조상 항체와는 다르고 일반적으로 항체보다 낮은 분자량을 갖는 인위적 펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 항체 유사체로서 ABD, 애드히론 (adhiron), 애피바디(affibody), 애필린(affilin), 애피머(affimer), 알파바디(alphabody), 안티칼린(anticalin), 아르마딜로(armadillo) 반복 단백질, 센티린(centyrin), 달핀(DARPin), 피노머(fynomer), Kunitz 영역, 프로넥틴 (pronectin), 리피바디(repebody) 등을 들 수 있다.

[0054] 이러한 항체, 항체 유도체, 항체 유사체, 그 제조와 관련해서는 당업계에 상당히 많은 문헌이 축적되어 있으며, 그러한 문헌으로서는 예컨대 문헌[Renate Kunert & David Reinhart, Advances in recombinant antibody manufacturing. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Apr;100(8):3451-61], 문헌[Holliger P1, Hudson PJ., Engineered antibody fragments and the rise of single domains, Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36], 문헌[Xiaowen Yu et al., Beyond Antibodies as Binding Partners: The Role of Antibody Mimetics in Bioanalysis, Annual Review of Analytical Chemistry, 2017, 10:293-320], 문헌[Abdul Rasheed Baloch et al., Antibody mimetics: promising complementary agents to animal-sourced antibodies, Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36:268-275] 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 어댑터의 세포 표적화 영역은 바람직하게는 scFv(Single-chain variable fragment)이다. scFv는 면역글로불린의 중쇄(VH)의 가변 영역과 경쇄(VL)의 가변 영역의 짧은 링커 펩티드를 매개로 연결된 단일사슬항체를 말한다. scFv에서 VH의 C-말단은 VL의 N-말단과 연결되거나, 또는 VL의 C-말단은 VH의 N-말단과 연결된다. scFv에서 링커 펩티드는 중쇄와 경쇄의 고유 3차원 구조를 방해하지 않으면서 이들 중쇄와 경쇄가 공간적으로 인접하여 표적분자와의 특이적인 결합 능력을 가지도록 하는 한, 임의의 길이, 임의의 서열의 링커 펩티드일 수 있다. 바람직하게는 링커는 유연성(flexibility), 용해성(solubility), 단백분해에 대한 저항성 등을 고려할 때, Ser, Gly, Ala, Thr 등의 아미노산 중 한 종류 이상의 아미노산으로 이루어지는 것이 바람직하며, 길이는 1~30개 아미노산, 바람직하게는 3~25개 아미노산, 더 바람직하게는 8~20개 아미노산일 수 있다.

[0056] 본 발명에서 특히 scFv는 표적분자를 HER2 또는 EpCAM을 표적분자로 하고, HER2에 대한 scFv는 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 링커 펩티드를 매개로, VH, 링커 펩티드 VL 순서로 연결된 것(즉 VH의 C-말단이 VL의 N-말단과 링커 펩티드를 매개로 연결된 것)이 바람직하고, EpCAM에 대한 scFv는 서열번호 6의 VL와 서열번호 7의

VH이 링커 펩티드를 매개로 VL, 링커 펩티드, VH 순서로 결합된 것(즉 VL의 C-말단이 VH의 N-말단과 링커 펩티드를 매개로 연결된 것)이 바람직하다.

[0057] 본 발명에서 HVEM의 세포외 도메인은 아래의 실시예에서 사용된, 서열번호 8의 HveA82(리더 서열까지 포함된 HveA82 서열은 서열번호 9에 개시되어 있음) 이외에 한국 등록특허 제10-0937774호 및 미국 등록특허 제8318662호(본 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다)가 개시하는 서열번호 10의 HveA87(리더 서열까지 포함된 HveA87 서열은 서열번호 11에 개시되어 있음), 서열번호 12의 HveA102(리더 서열까지 포함된 HveA102 서열은 서열번호 13에 개시되어 있음) 또는 서열번호 14의 HveA107(리더 서열까지 포함된 HveA107 서열은 서열번호 15에 개시되어 있음)일 수도 있다. 서열번호 9, 11, 13 및 15의 서열에 포함된 리더 서열은 HveA의 신호 펩티드 서열이다. HveA87, HveA102, HveA107은 각각 HveA82보다 5, 20, 25개 아미노산을 더 포함하고 있으며, 상기 한국 등록특허 및 미국 등록특허에서 모두 어댑터의 HSV 리셉터로 사용 가능함을 확인한 바 있다.

[0058] 또 본 발명에서 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인 사이에 링커 서열이 게재될 수 있는데, 이 링커 서열은 이들 어댑터의 각 도메인의 기능을 저해 하지 않는 한 임의의 길이, 임의의 서열의 링커일 수 있다. 바람직하게는 링커는 Ser, Gly, Ala, Thr 4가지 아미노산 중 한 종류 이상의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 길이는 1~30개, 아미노산, 바람직하게는 3~25개 아미노산, 더 바람직하게는 8~20개 아미노산일 수 있다.

[0059] 또 본 발명의 어댑터는 NH_2-암세포 표적화 도메인-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순의 구성을 가질 수 있다. 링커 펩티드가 매개될 경우는 NH_2-암세포 표적화 영역-링커 펩타이드-HVEM 세포외 도메인-COOH 순이거나 그 역순의 구성일 수 있다.

[0060] 본 발명의 어댑터는 그 N-말단에, 구체적으로 어댑터의 구성이 NH_2-암세포 표적화 영역-링커 펩타이드-HVEM 세포외 도메인-COOH 순일 경우는 암세포 표적화 도메인의 N-말단(scFv가 사용될 경우 VH나 VL의 N-말단)에, 어댑터의 구성이 NH_2-HVEM 세포외 도메인-링커 펩타이드-암세포 표적화 도메인-COOH 순일 경우에는 HVEM 세포외 도메인의 N-말단에 리더 서열(즉 분비 유도 신호 서열)이 더 포함될 수 있다. 리더 서열은 세포질에서 발현된 단백질이 세포막을 투과하여 세포 외부로 분비되도록 유도하는 기능을 가진 서열로 통상적으로 약 15 내지 30개의 연속적인 소수성 아미노산 잔기를 포함한다. 사용될 수 있는 리더 서열은 특별한 제한이 없으나 HveA의 리더서열, 항체 가변부 VL(kaapa)의 리더서열, t-PA(tissue plasminogen activator)의 리더 서열, 혈청 알부민의 리더 서열, 락토페린의 리더 서열, α- 카제인의 리더 서열, 인간성장호르몬을 포함한 여러 호르몬의 리더 서열, 효모나 세균에서 분비되는 폴리펩티드의 리더 서열 등 세포막 외부로 분비되는 단백질의 N-말단에 존재하는 임의의 서열일 수 있다.

[0061] 이러한 리더 서열은 표적세포에서 어댑터가 발현되어 세포 밖으로 어댑터가 유출되도록 유도하는 작용을 하는 서열로, 표적세포가 용해되어 HSV 바이러스가 방출된 후에야 어댑터가 HSV 바이러스를 인접 표적세포로 감염되도록 유도하는 작용을 하기 때문에 생략될 수도 있다.

[0062] 또 본 발명에서 세포 표적화 영역으로 표적분자에 대한 scFv을 사용할 경우, VH와 VL 사이에, VH와 VL 사이에 링커 펩타이드가 매개될 경우는 VH 또는 VL와 링커 펩타이드 사이, scFv와 HVEM 사이, scFv와 HVEM 사이에 링커 펩타이드가 매개될 경우에는 scFv와 링커 사이, 링커와 HVEM 사이에, 클로닝을 용이하게 하기 위하여 임의의 제한효소 작용 부위에 해당하는 아미노산이 게재될 수 있다. 예컨대 제한효소 EcoRI가 작용하는 EF(염기서열: GAATTC), BamHI이 작용하는 GS((염기서열: GGATCC), XhoI이 작용하는 LEEL(염기서열: CTCGAGGAGCTC) 등이 게재될 수 있다.

[0063] 본 발명에서, 재조합 HSV는 암세포에 대한 면역반응을 유도 또는 증진시키기 위한 인자들을 단독으로 또는 임의의 조합으로 발현하도록 해당 인자에 대한 유전자가 HSV 게놈에 삽입될 수 있다. 그러한 인자들은 사이토카인, 케모카인, 면역관문(immune checkpoint)에 대한 길항제(예컨대 항체, 항체 유도체 또는 항체 유사체, 특히 scFv), 면역세포(T 세포 또는 NK 세포)의 활성화를 유도할 수 있는 보조 자극 인자(co-stimulatory factor), 암세포에 대한 면역반응을 억제하는 TGFβ의 기능을 저해할 수 있는 길항제(예컨대 항체, 항체 유도체 또는 항체 유사체, 특히 scFv), 고형암 종양미세환경을 구성하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)을 분해할 수 있는 헤파라나아제(heparanase), 혈관 신생 인자 수용체인 VEGFR-2(VEGF receptor-2)의 기능을 저해할 수 있는 길항제(예컨대 항체, 항체 유도체 또는 항체 유사체, 특히 scFv) 등을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0064] 사이토카인은 예컨대 IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-24 등의 인터류킨, IFNα, IFNβ,

IFNγ 등의 인터페론, TNFα 등의 종양 괴사 인자, GM-CSF, G-CSF, FLT3L 등의 콜로니 자극 인자 등이 단독으로 또는 2 이상의 임의의 조합으로 재조합 HSV에서 발현되도록 사용될 수 있다.

[0065] 케모카인은 예컨대 CCL2(C-C Motif Chemokine Ligand 2), CCL5(RANTES), CCL7, CCL9, CCL10, CCL12, CCL15, CCL19, CCL21, CCL20, XCL-1((X-C Motif Chemokine Ligand 1)) 등이 단독으로 또는 조합함으로 재조합 HSV에서 발현되도록 사용될 수 있다.

[0066] 면역관문에 대한 항체는 PD-1(programmed cell death-1), PD-L1(programmed cell deathligand 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), CD86(cluster of differentiation 86), CD137(cluster of differentiation 137), CD276(cluster of differentiation 276), KIRs(killer-cell immunoglobulin-like receptors), LAG3(lymphocyte-activation gene 3), GITR(glucocorticoid-induced TNFR-related protein), GITRL(glucocorticoid-induced TNFR-related protein ligand), CTLA-4(cytolytic T lymphocyte associated antign-4) 등에 대한 길항제가 단독으로 또는 조합으로 재조합 HSV에서 발현되도록 사용될 수 있다.

[0067] 보조 자극 인자는 CD2, CD7, LIGHT, NKG2C,CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, LFA-1(림프구 기능 연관 항원-1), ICOS(유도성 T 세포 공동자극인자), CD3γ, CD3δ, CD3ε 등이 단독으로 또는 조합으로 재조합 HSV에서 발현되도록 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명에서, 재조합 HSV는 프로드럭(prodrug)을 암세포에 독성을 나타내는 약물(drug)으로 전환시켜주는 프로드럭 활성화 효소(prodrug-activating enzymes)를 발현하도록 조작될 수 있다. 이러한 프로드럭 활성화 효소로서는, 프로드럭인 5-FC(5-fluorocytosine)을 5-FU(5-fluorouracil)인 약물로 전환시켜 주는 시토신 디아민나아제(Cytosine deaminase), 프로드럭인 CPA(cyclophosphamide)를 PM(phosphoramide mustard)인 약물로 전환시키주는 랫드 사이토크롬 P450(rat cytochrome P450, CYP2B1), 프로드럭인 이리노테칸(irinotecan, SN-38150)을 SN-38인 약물로 전환시켜주는 카르복실에스터라제(carboxylesterase), 프로드럭인 BC1954를 DNA 교차결합제인 4-하이드록시아민151(4-hydroxylamine151)로 전환시켜주는 세균 니트로리덕타아제(bacterial nitroreductase), 프로드럭인 6-메틸퓨린-2'-디옥시리보시드(6-methypurine-2'-deoxyriboside)를 6-메틸퓨린(6-methylpurine)으로 전환시켜주는 대장균에서 분리된 PNP(purine nucleoside phosphorylase) 등을 들 수 있다.

[0069] 또한 본 발명에서, 재조합 HSV는 TRAIL(TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)를 발현하도록 조작될 수도 있다. TRAIL는 암세포에서 과발현되는 그것의 수용체에 결합하여 암세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다(Kaoru Tamura et al. Multimechanistic Tumor Targeted Oncolytic Virus Overcomes Resistance in Brain Tumors. Mol Ther. 2013 Jan;21(1):68-77).

[0070] 이러한 면역반응을 유도 또는 증진시키기 위한 인자들이나 프로드럭 활성화 효소의 사용과 관련해서 더 구체적인 것은 문헌[Michele Ardolino et al., Cytokine treatment in cancer immunotherapy, J. Oncotarget, Oncotarget. 2015 Aug 14;6(23):], 문헌Bernhard Homey et al. Chemokines: Agents for the Immunotherapy of Cancer. Nat Rev Immunol. 2002 Mar;2(3):175-84], 문헌[Marianela Candolfi et al, Evaluation of proapototic transgenes to use in combination with Flt3L in an immune-stimulatory gene therapy approach for Glioblastoma multiforme(GBM), J. FASEB J, 2008, 22:107713], 문헌[Danny N Khalil et al. The Future of Cancer Treatment: Immunomodulation, CARs and Combination Immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol. 2016 May;13(5):273-90], 문헌[Paul E Hughes et al. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer. Trends Immunol. 2016 Jul;37(7):462-476], 문헌[Cole Peters1, Samuel D Rabkin, Designing herpes viruses as oncolytics, Mol Ther Oncolytics. 2015;2:15010] 등을 참조할 수 있다.

[0071] 본 발명에서, 면역반응을 유도 또는 증진시키기 위한 인자들이나 프로드럭 활성화 효소는 전술한 바의 어텝터에서와 같이, 그 유전자의 발현 카세트(즉 그 유전자가 이의 발현을 가능하게 하는 프로모터 서열 및 폴리아데닐화 시그널 서열과 작동가능하게 연결된 구성체)가 HSV의 증식을 저해하지 않으면서 HSV 게놈에 삽입되는데, 그러한 삽입은 HSV 게놈의 결실 없이, 또는 HSV 게놈 중 비필수 유전자가 일부 또는 전부 결실되고 그 결실된 위치에 삽입될 수 있다. 이때 HSV 게놈의 결실 없이 삽입될 경우 각 유전자 사이에 삽입될 수 있으며 바람직한 삽입 위치는 예컨대 UL3과 UL4 유전자 사이, UL26과 UL27 유전자 사이, UL37과 UL38 유전자 사이, UL48과 UL49 유전자 사이, UL53과 UL54 유전자 사이, US1과 US2 사이 등을 들 수 있다. 비필수 유전자가 결실되고 그 결실된 위치에 삽입되거나 비필수 유전자의 결실 없이 그 유전자 중에 삽입될 경우, 그러한 비필수 유전자는 전술한

바의 임의의 비필수 유전자 중에서 선택될 수 있다.

[0072] 다른 측면에 있어서 본 발명은 전술한 바의 재조합 HSV를 유효성분으로 포함하는 항암용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0073] 본 발명의 약제학적 조성물은 재조합 HSV이 발현하는 어댑터의 표적화 영역이 표적하는 표적분자를 발현하는 암종에 대해 항암 용도를 갖는다. 그러한 암종은 앞서 표적분자와 관련하여 설명한 바와 같다.

[0074] 특히 본 발명의 조성물은 HER2나 EpCAM을 발현하는 종양세포를 갖는 암종에 대해 항암 용도를 갖는 것이 바람직하다. 예컨대 HER2를 발현하는 종양세포는 유방암 세포, 난소암 세포, 위암 세포, 폐암 세포, 두경부암 세포, 골육종 세포, 다형성 신경교모종 세포(glioblastoma multiforme), 침샘 종양(salivary gland tumor) 세포 등을 들 수 있다. 또 예컨대 EpCAM을 발현하는 종양세포는 간암 세포, 전립선암 세포, 유방암 세포, 대장암 세포, 폐암 세포, 담낭암 세포, 췌장암 세포, 위암 세포 등을 들 수 있다.

[0075] 본 발명에서 항암은 암세포의 사멸, 암세포의 생존능 저하, 암세포의 증식 억제에 따른 암이 가지는 병리적 증상의 억제나 지연, 그러한 병리적 증상의 발병 억제나 지연, 암 전이 억제, 암 재발 억제를 포함하는 의미이다.

[0076] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분인 전술한 바의 재조합 HSV 이외에, 재조합 어댑터 분자를 추가로 포함할 수 있다. 재조합 어댑터 분자는 전술한 바의 재조합 HSV가 발현하는 어댑터 즉 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질과 동일하게 암세포 표적화 영역을 가지는 융합 단백질이 재조합 방법으로 제조된 것을 말한다. 여기서 재조합 HSV가 발현하는 어댑터와 동일하게 암세포 표적화 영역을 가진다는 것은 HSV가 발현하는 어댑터의 암세포 표적화 영역이 HER2를 표적 분자로 하는 경우, 어댑터 분자의 암세포 표적화 영역도 HER2를 표적 분자로 한다는 것을 의미한다. 재조합 방법에 의해 의도하는 목적 단백질의 제조 방법은 일반적으로 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현벡터를 제조하여, 대장균, 효모, 동물세포(CHO 세포, NSO 세포, BHK 세포, Sp2 세포, HEK-293 세포) 등 숙주세포에 형질전환시키고 배양한 후 목적 단백질을 분리하는 단계 등으로 이루어지는데, 이러한 재조합 방법에 의한 목적 단백질의 제조 방법은 당업계에 매우 잘 공지되어 있으며(Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)), 특히 본 발명에 사용되는 재조합 어댑터 분자의 제조와 관련해서는 한국 등록특허 제10-0937774호 및 미국 등록특허 제8318662호를 참조할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 이러한 재조합 어댑터 분자를 추가로 포함될 경우, 본 발명의 유효성분인 재조합 HSV과 재조합 어댑터 분자가 함께 환자에 투여될 경우 재조합 HSV의 암세포 초기 감염 효율이 증가되는 효과가 있다.

[0077] 또 본 발명의 약제학적 조성물은 허가된 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용될 수 있다. 그러한 항암제로는 대사길항제, 알킬화제, 토포아이소머라제 길항제, 미세소관 길항제, 식물유래 알칼로이드 등 암세포에 세포독성을 나타내는 임의의 항암제, 임의의 사이토카인 의약품, 임의의 항체 의약품, 임의의 면역관문 억제제 의약품, 임의의 세포 치료제(car-T cell therarpy, car-NK cell therapy) 의약품 등을 포함한다. 구체적으로 탁솔, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 제피티닙, 보르테조밉, 수니티닙, 카보플라틴, 시스플라틴, 리툭시맙, 엘로티닙, 소라페닙, IL-2 의약품, INF-α 의약품, INF-ɣ 의약품, 트라스투주맙, 블리나투모맙, 이필리무맙, 펨브롤리주맙, 니볼리주맙, 아테졸리주맙(Atezolizumab), 두발루맙(Durvalumab), 베바시주맙, 세툭시맙, 티사젠렉루셀(Tisagenlecleucel, 킴리아), 액시캡타젠 실로루셀(Tisagenlecleucel Axicabtagene Ciloleucel, 예스카타) 등이 예시될 수 있으며, 이들 예시된 항암제 이외에도 당업계에 공지된 여타의 항암제도 제한없이 본 발명의 약제학적 조성물과 혼합되어 사용되거나 병용 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하여 투여 경로에 따라 당업계에 공지된 통상의 방법으로 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다.

[0079] 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 인체에 특별한 독성을 가지지 않으면서 약물의 활성이나 특성을 저해하지 않는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물(예를 들면, 식염수 및 멸균수), 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산마그네슘, 미네랄 오일, 링거액, 완충제, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 덱스트란, 알부민, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 특히 본 발명의 약제학적 조성물이 액상 용액으로 제제화될 경우 적합한 담체 또는 부형제로서는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등의 성분 중에서 하나 이상의 성분을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 의약품 첨가제 등을 첨가하여 사용할 수 있다.

[0080] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구 투여제로 제제될 경우는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있고, 비경구 투여제 특히 주사제로 제제화 경우 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등의 형태로도 제조화할 수 있다.

[0081] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구 투여 경로나, 또는 피부, 병변 내(intralesional), 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내, 직장 경로 등 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있다.

[0082] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량(유효량)은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 결정할 수 있다. 바람직한 양태에 있어 본 발명의 약제학적 조성물은 단위 용량 형태의 주사제로 제조되며, 단위 용량 형태의 주사제로 제조될 경우 본 발명의 약제학적 조성물의 단위 용량 당 포함되는 재조합 HSV 바이러스의 양은 10^{2}-10^{14} pfu 범위, 특히 10^{4}-10^{11} pfu 범위일 수 있다.

[0083] 다른 양태에 있어서, 본 발명은 전술한 바의 재조합 HSV를 포함하는 약제학적 조성물을 유효량으로 환자 등의 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 또는 예방 방법(즉 종양 치료 또는 예방 방법)에 관한 것이다.

[0084] 이러한 암 치료 방법은 재조합 HSV가 그 어댑터의 암세포 표적화 영역이 표적하는 표적분자를 가진 암세포를 용해하여 사멸시킴으로써 가능해진다. 따라서 본 발명의 치료 방법은 그러한 표적분자를 가진 임의의 암종에 대해서 적용이 가능하다. 특히 본 발명의 치료 방법은 HER2나 EpCAM을 발현하는 암종에 적용되는 것이 바람직하다.

[0085] 본 발명의 치료 방법은 상기 다른 암 치료법과 제한없이 병용되어 사용될 수 있다. 예컨대 앞서 예시된 세포독성 항암제, 사이토카인 의약품, 항체 의약품, 면역관문 억제제 의약품, 세포 치료제(car-T cell therarpy, car-NK cell therapy) 의약품, 방사선 치료 요법, 수술 요법 등이 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 전·후나 동시 투여 방식으로 병용 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 치료 방법에서 유효량은 그 적용 대상인 환자 등에 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 약제학적 조성물이 투여될 때, 암 치료 또는 예방 효과 등 의도한 의학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 약제학적 조성물이 투여되는 양을 말한다. 이러한 유효량은 전술한 바와 같이 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태 등에 따라 의료 전문가 등 당업자가 적절히 결정할 수 있다.

[0087] 본 발명의 치료 방법에서, 그 약제학적 조성물은 바람직하게는 환자 등에 주사제로, 비경구 투여 경로에 의하여 예컨대 병변 내(intralesional, 종양 내), 정맥 내, 근육 내, 동맥 내 등에 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0089] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 다중으로 발현함으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV를 제공할 수 있고, 또 암세포 표적화 영역과 HVEM의 세포외 도메인의 융합 단백질인 어댑터를 발현할 수 있는 이외에 또 재표적화가 가능하도록 변형된 당단백질을 가짐으로써 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV를 제공할 수 있다.

[0090] 또 본 발명에 따르면 상기 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV를 유효성분으로 포함하는 항암 치료 또는 예방용 약제학적 조성물과 이러한 약제학적 조성물을 유효량으로 환자 등 대상체에 투여하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다.

[0091] 본 발명의 다중 표적화가 가능한 재조합 HSV는 단일 표적화 HSV에 비해 암세포에서 대해 높은 감염 효율과 높은 사멸 기능을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 KOS-37 BAC 게놈 구조의 개요도이다.

도 2는 HVEM-제한 HSV-1 바이러스의 게놈 구조의 개요도이다.

도 3은 EmGFP를 발현하는 HVEM-제한 HSV-1 바이러스의 게놈 구조의 개요도이다.

도 4는 EmGFP를 발현하는 HVEM-제한 HSV-1 바이러스의 형광 발현 및 HVEM 수용체를 가진 세포에의 특이점 감염을 보여주는 결과이다.

도 5는 HER2 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스, EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스 그리고 HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스의 게놈 구조의 개요도이다.

도 6은 HER2scFv-HveA 어댑터와 EpCAMscFv-HveA 어댑터의 전체 서열과 해당 서열의 구성을 도시한 것이다.

도 7는 (i) HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖는 단일 표적화 바이러스와 (ii) HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 또 HER2 표적화 어댑터를 발현하는 HER2 이중 표적화 HSV-1 바이러스의 게놈 구조의 개요도이다.

도 8은 gH에 삽입·융합된 HER2scFv 리간드의 전체 아미노산 서열과 해당 서열의 구성을 도시한 것이다.

도 9는 (i) EpCAM 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖는 단일 표적화 바이러스와 (ii) EpCAM 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 또 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 EpCAM 이중 표적화 HSV-1 바이러스의 게놈 구조의 개요도이다.

도 10은 gH에 삽입·융합된 EpCAMscFv 리간드의 전체 아미노산 서열과 해당 서열의 구성을 도시한 것이다.

도 11은 Vero-HVEM 세포와 SK-OV-3 세포에서, 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(HADa-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스(HgH-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)의 확산을 측정한 결과이다.

도 12는 Vero-HVEM 세포에서, 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(HADa-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스(HgH-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)의 증폭을 측정한 결과이다.

도 13은 Vero-HVEM 세포와 SK-OV-3 세포에서, 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(HADa-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스(HgH-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)의 HER2scFv-HveA 어댑터 발현 정도를 측정한 결과이다.

도 14는 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(HADa-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스(HgH-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)가 SK-OV-3 세포 등에서 HER2 발현 여부에 따른 특이적 감염을 보여주는 결과이다.

도 15는 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(HADa-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스(HgH-S), gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)가 SK-OV-3 세포 등에서 HER2 발현 여부에 따른 특이적 세포 사멸을 보여주는 결과이다.

도 16은 동물실험에서 gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)에 의한 종양 억제를 나타낸 결과이다.

도 17은 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), EpCAMscFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(EADa-S), gH에 EpCAMscFv를 리간드 갖는 바이러스(EgH-S), gH에 EpCAMscFv를 리간드 갖고 EpCAMscFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(EADa-EgH-D)가 BT-474 세포 등에서 EpCAM 발현 여부에 따른 특이적 감염을 보여주는 결과이다.

도 18은 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스(gDm), EpCAMscFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스(EADa-S), gH에 EpCAMscFv를 리간드 갖는 바이러스(EgH-S), gH에 EpCAMscFv를

리간드 갖고 EpCAMscFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스(EADa-EgH-D)가 BT-474 세포 등에서 EpCAM 발현 여부에 따른 특이적 세포 사멸을 보여주는 결과이다.

도 19는 HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 이중(dual) 표적화 HSV-1 바이러스(EADa-HgH-D)의 게놈 구조의 개요도이다.

도 20은 HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 이중(dual) 표적화 HSV-1 바이러스(EADa-HgH-D)가 CHO-K1 세포 등에서 HER2와 EpCAM 발현 여부에 따라 이중 표적화가 가능함을 보여주는 결과이다. .

도 21은 HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스(EADa-HADa-D)가 CHO-K1 세포 등에서 HER2와 EpCAM 발현 여부에 따라 이중 표적화가 가능함을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0096] **<실시예 1> HVEM 제한 HSV-1(HVEM-restricted HSV-1) 바이러스 제작**

[0097] HSV-1 유전자는 약 152kb에 달하는 커다란 유전자로 구성이 되어 있어, 외래 유전자를 삽입하거나 특정 위치에서의 변이를 삽입하기 위해서 KOS-37/BAC(Genbank Accession No. MF156583)(Gierasch WW et al. J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)을 사용하였다. HSV-1 KOS 스트레인(HSV-1 KOS strain)은 그 특성이 잘 알려져 있고, 유전자의 기능 및 병인 조사에 유용하여 실험실에서 주로 사용되는 HSV-1 스트레인의 일종이다(Smith KO. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1964. 115:814-816). KOS 게놈에 BAC 플라스미드 삽입을 통해서 제작된 KOS-37/BAC은 DH10B 박테리아(Invitrogen)에 형질 전환(transformation)을 통해 박테리아 수준에서 클로닝을 가능케 한다(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206). KOS-37/BAC는 HSV-1 KOS 게놈의 UL37과 UL38 사이의 위치에 BAC(bacterial artificial chromosomes)가 양쪽에 LoxP 사이트와 함께 삽입되어 있다. 차후 Cre-Lox system을 이용하여 BAC 유전자를 제거할 수 있게 제작됐다. 그 개요도를 도 1에 나타내었다.

[0098] HVEM 세포 수용체를 통해서만 세포 진입하는 HVEM 제한 HSV-1 제작하기 위하여, HSV-1 gD 아미노산 서열(GenBank Accession No. ASM47818, 서열번호 16)의 222번 위치의 아르기닌(arginine, R)과 223번 위치의 페닐알라닌(phenylalanime, F)을 각각 아스파라긴(asparagine, N)과 이소루신(isoleucine, I)로 치환한 gD-R222N/F223I HSV-1 바이러스를 제작하였다.

[0099] 이러한 돌연변이에 의해 만들어진 gD-R222N/F223I HSV-1 바이러스는 세포 감염 수용체(entry receptor)로 넥틴-1(nectin-1)을 사용하지 못하고 오직 HVEM(HveA)을 통해서만 숙주세포 내로 감염이 가능하기 때문에(Uchida H et al., J Virol. 2009. 83(7):2951-2961), 넥틴-1(nectin-1) 수용체를 가진 정상세포를 감염시키지 못하여 안전성에 있어서도 유리하다.

[0100] HVEM 제한 KOS-gD-R222N/F223I 바이러스의 게놈 구조의 개요도를 도 2에 나타내었다.

[0101] KOS-gD-R222N/F223I HSV-1 바이러스를 제작을 위하여, 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(Counter selection BAC modification kit; GeneBridges, Inc.)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 KOS-37/BAC의 gD 부분에 R222N/F223I 돌연변이를 도입하였다.

[0102] 구체적으로 KOS-37/BAC이 들어있는 *E.coli* 클론에, 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행할 수 있는 RecE와 RecT를 발현할 수 있는 pRed/ET 플라스미드를 형질 전환하였다(Muyrers JP et al.; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). gD에 돌연변이를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 gD-rpsL For: 서열번호 17, 역방향 프라이머 gD-rpsL Rev: 서열번호 18)를 사용하여 gD-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다. gD-rpsL-neo/kan 카세트는 삽입할 위치의 gD 상동 영역과 스트렙토마이신(streptomycin)에 민감성을 갖게 하는 선별마커(selective marker)인 rpsL 유전자와 카나마이신(kanamycin) 저항성을 갖게 하는 neo/kan 유전자로 구성되게 된다. gD-rpsL-neo/kan 카세트가 삽입되면, rpsL 유전자에 의하여 스트렙토마이신 항생제에 민감하게 되고, neo/kan 유전자에 의하여 카나마이신 저항성을 갖는 *E.coli*가 만들어지게 된다. KOS-37/BAC과 pRed/ET가 들어있는 *E.coli* 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 pRed/ET의 기능을 활성화시켜 상동 재조합이 가능하도록 RecE와 RecT의 발현을 유도한 후(Muyrers JP et al.; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557), 제작한 gD-

rpsL-neo/kan 카세트 200 ng을 형질전환(transformation)하였다. 상동 재조합에 의하여 gD-rpsL-neo/kan 카세트가 KOS-37/BAC의 gD 위치에 삽입되게 된다. KOS-37/BAC에 gD-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자 때문에 차단된 상태이다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는 gD-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 최종적인 유전자를 삽입하는 단계로 진행하였다. KOS 37-BAC gD-rpsL-neo/kan 클론이 있는 *E.coli*에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 pRed/ET의 기능을 활성화시켜 상동 재조합이 가능하도록 RecE와 RecT의 발현을 유도한 후, gD에서 222번 위치의 R 및 223번 위치의 F에서 각각 N 및 I를 치환해 준 올리고뉴클레오티드인 R222N_F223I_mutant(서열번호 19)을 100 pmol을 넣고 형질 전환하였다. 기존 gD-rpsL-neo/kan 카세트와 삽입된 올리고뉴클레오티드가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), gD에서 222번 위치 및 223번 위치에서 각각 N 및 I가 도입 여부를 PCR (ploymerase chain recation)과 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

[0103] 다음 바이러스 제작은 상기 완성된 KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 DNA 1 ug을 형질주입(transfection)하였다. DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Welgene)에 100 U/ml 페니실린(penicillin)/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS(fetal bovine serum, Wellgen)를 이용하여 세포 배양을 하였다. 상기 Cre-Vero-HVEM 세포주는 Cre-Vero 세포주(Gierasch et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)에 HVEM 유전자를 삽입시켜 HVEM 단백질 발현을 유도한 세포주이다. Cre-Vero-HVEM을 사용한 이유는 세포의 Cre 재조합 효소(recombinase)를 이용하여 KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I의 BAC 유전자를 제거할 수 있으며, HVEM 과발현에 의한 KOS-gD-R222N/F223I 바이러스의 감염이 효과적이어서 차후 바이러스 대량생산이 용이하기 때문이다. 유전자 도입 3~4일 경과 후, 플라크 (plaque)의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)을 통해 최종적으로 KOS-gD-R222N/F223I 바이러스를 획득하였다.

[0104] **<실시예 2> EmGFP를 발현하는 HVEM-제한 HSV-1 바이러스 제작**

[0105] EmGFP를 발현하는 HVEM-제한 HSV-1 제작을 위하여 상기 실시예 1에서 제작된 KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I DNA의 UL26/UL27 위치에, EmGFP(Emerald Green Fluorescent Protein)를 발현할 수 있는 발현 카세트(expression cassette)를 삽입하였다(Tiffany A et al., J Virol Methods. 2015. 231:18-25). 이는 마커로서 EmGFP를 이용하여 바이러스의 생산과 감염 정도의 관찰을 용이하게 하기 위한 것이다. EmGFP 카세트 제작에는 pCDNA6.2-GW/EmGFP-miR 플라스미드(Invitrogen)를 이용하였다.

[0106] EmGFP를 발현하는 KOS-EmGFP-gD-R222N/F223I의 지놈 개요도는 도 3에 나타내었다.

[0107] EmGFP 발현을 위하여 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)의 유전자 프로모터인 pCMV와 HSV TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)의 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal)인 tkpA를 이용하여 pCMV-EmGFP-tkpA의 구조로 KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I DNA에 삽입하였다.

[0108] 모든 삽입 방법은 상기 실시예 1에서 같이 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(counter selection BAC modification kit; GeneBridges. Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0109] 구체적으로 KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I이 들어있는 클론에 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행할 수 있는 RecE와 RecT를 발현할 수 있는 pRed/ET 플라스미드를 형질 전환하였다(Muyrers JP et al.; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). UL26와 UL27 사이에 타겟 유전자를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 UL26/27-rpsL_For: 서열번호 20, 역방향 프라이머 UL26/27-rpsL_Rev: 서열번호 21)를 사용하여 UL26/27-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다. KOS-37/BAC-gD-R222N/F223I DNA와 pRed/ET가 들어있는 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, 제작한 UL26/27-rpsL-neo/kan 카세트 200 ng을 형질 전환하였다. 이러한 상동 재조합에 의하여 UL26/27-rpsL-neo/kan 카세트가 KOS-37/BAC의 UL26/27 위치에 삽입되게 된다. UL26/27-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자로 인해 차단된 상태이다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는

UL26/27-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 마지막 단계인 타겟 유전자를 삽입하는 단계로 진행하였다.

[0110] UL26/27-rpsL-neo/kan 카세트가 있는 *E.coli*에 pRed/ET의 기능을 활성화시키는 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도하고, 그 다음 UL26/27-tkpA-EmGFP-pCMV 카세트 200 ng을 형질 전환하였다. UL26/27-tkpA-EmGFP-pCMV 카세트는 pCDNA6.2-GW/EmGFP-miR 플라스미드(Invitrogen)를 주형(Template)으로 사용하고 정방향 프라이머 UL26/27-tkpA_For(서열번호 22)와 역방향 프라이머 UL26/27-pCMV_Rev(서열번호 23)를 사용하여 제작한 것이다.

[0111] 기존 UL26/27-rpsL-neo/kan 카세트와 삽입된 UL26/27-tkpA-EmGFP-pCMV가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), UL26/27에서 tkpA-EmGFP-pCMV의 도입 여부를 제한효소 EcoRI, XhoI 처리와 PCR (ploymerase chain recation)를 수행으로 확인했고, PCR 산물을 시퀀싱하여 정확한 유전자 서열을 확인하였다.

[0112] 형광단백질의 정상적인 발현과 바이러스의 생산을 위하여 실험을 진행하였다. 완성된 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후, Cre 재조합 효소(recombinase)를 이용하여 BAC 유전자를 제거하기 위하여 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 DNA 1 ug을 형질주입하였다. 형질주입 3일 후, EmGFP 단백질의 발현을 형광현미경을 통하여 관찰하고, Cre-Vero-HVEM 세포의 플라크(plaqe) 형성을 통해 바이러스 생산을 관찰하였다. 플라크의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)을 통해 KOS-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(gDm) 획득하였다.

[0113] KOS-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스의 감염과 형광 발현은 HVEM가 없는 세포주(J1 및 J-Nectin)와 HVEM이 발현되는 세포주(J-HVEM)를 사용하였다. J1 세포는 어린 햄스터 신장세포주로 바이러스 HSV-1 리셉터인 HVEM와 Nectin-1이 결핍되어 있는 세포주이다(Petrovic B *et al.*, 2017. PLoS Pathog. 19;13(4):e1006352). J-Nectin, J-HVEM 세포주는 J1세포에 각각 Nectin-1과 HVEM을 과발현하는 세포주이다(Petrovic B *et al.*, 2017. PLoS Pathog. 19;13(4):e1006352). 각 세포주는 DMEM 배지(Welgene)에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS(fetal bovine serum)를 이용하여 배양하였다. 1×10^4의 세포에, 상기 얻어진 KOS-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스를 10 MOI (multiplicity of infection)로 감염시키고 24시간 후, 형광단백질 발현 및 바이러스 감염 정도를 형광현미경을 통하여 관찰하였다(BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514).

[0114] 결과를 도 4에 형광현미경 모드로 촬영한 사진과 광학현미경 모드로 촬영한 사진을 각각 상하에 나타내었다. 도 4의 윗쪽 형광현미경 사진을 참조하여 보면, JI 세포주와 J-Nectin 세포주는 감염되지 않고, J-HVEM 세포주만 감염됨을 알 수 있다.

[0115] 이러한 결과를 통하여, 의도한 바와 같이 KOS-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(gDm)가 형광단백질의 발현으로 바이러스 증식의 관찰이 용이하고 진입 경로로 Nectin-1을 사용하지 못하고 HVEM만을 사용하여 진입하는 것을 확인하였다.

[0116] **<실시예 3> HER2 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1, EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 및 HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스의 제작**

[0117] 상기 실시예 2에서 제작된, EmGFP 발현 카세트(pCMV-EmGFP-tkpA)가 삽입된 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA의 UL3/UL4 위치에, HER2scFv-HveA 어댑터 발현 카세트와 EpCAM-HveA 어댑터 발현 카세트 그리고 HER2scFv-HveA와 EpCAM-HveA를 같이 발현하는 어댑터 발현 카세트 삽입하였다.

[0118] HER2scFv-HveA 어댑터 발현 카세트인 pCMV-HER2scFv-HveA-bGHpA가 삽입된 KOS-UL3/4-HER2scFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 게놈 개요도와 EpCAMscFv-HveA 어댑터 발현 카세트인 pCMV-EpCAMscFv-HveA-bGHpA이 삽입된 KOS-UL3/4-EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 게놈 개요도 그리고 EpCAM-HveA과 HER2scFv-HveA를 같이 발현하는 어댑터 발현 카세트 pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-bGHpA가 삽입된 KOS-UL3/4-EpCAMscFv-HveA-HER2scFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 게놈 개요도를 도 5에 나타내었으며, 또 도 6에 HER2scFv-HveA 어댑터와 EpCAMscFv-HveA 어댑터의 전체 서열과 해당 서열의 구성을 나타내었다.

[0119] 여기서 HER2에 대한 scFv는 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 서열번호 24의 링커 펩티드를 매개로 연결된 구성이고, EpCAM에 대한 scFv는 서열번호 6의 VL과 서열번호 7의 VH가 서열번호 25의 링커 펩티드를 매개로 연결된 구성이며, HveA는 HER2scFv-HveA 어댑터 및 EpCAMscFv-HveA 어댑터에서 HVEM은 서열번호 8의 HveA82이 사용되었다. 또 HER2scFv-HveA 어댑터 및 EpCAMscFv-HveA 어댑터에 있어서는 그 N 말단 즉 HER2scFv의 VH의 앞부분과 EpCAMscFv 의 VL 앞부분에 서열번호 26의 리더 서열이 포함되어 있다.

[0120] HER2 또는 EpCAM에 대한 scFv 서열과 HveA 서열의 링커 서열인 NH_2-GGGGS 서열 다음에는 클로닝을 용이하게 하기 위한 제한효소 EcoRI 작용 부위인 EF(염기서열: GAATTC) 추가되어 있다. 그리고 pCMV는 상기 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)의 유전자 프로모터이고, bGH-pA는 bGH-PolyA(bovine growth hormone polyadenylation) 시그널 서열이며, HER2scFv-HveA와 EpCAM-HveA를 같이 발현하는 어댑터 발현 카세트 pCMV-HER2scFv-HveA-P2A-EpCAMscFv-HveA-bGHpA에서 **P2A는** 돼지 테스코바이러스-1(Pocine Teschovirus-1)의 2A(P2A)이다.

[0121] 본 실시예에서 사용된, 리더 서열까지 포함한 HER2scFv-HveA 어댑터 전장의 아미노산 서열과 유전자 서열은 각각 서열번호 27과 서열번호 28에 개시되어 있고, 또 리더 서열까지 포함한 EpCAMscFv-HveA 어댑터 전장의 아미노산 서열과 유전자 서열은 각각 서열번호 29와 서열번호 30에 개시되어 있다.

[0122] HER2scFv-HveA 어댑터 발현 카세트와 EpCAMscFv-HveA 어댑터 발현 카세트 그리고 EpCAM-HveA-HER2scFv-HveA 듀얼(dual) 어댑터 발현 카세트의 삽입은 상기 실시예 1과 2와 마찬가지로 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(counter selection BAC modification kit; GeneBridges. Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0123] 구체적으로 상기 실시예 2에서 제작된 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I 유전체가 들어있는 *E.coli* 클론에 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행하는 RecE와 RecT를 발현하는 pRed/ET 플라스미드를 형질 전환하였다(Muyrers JP *et al.*; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). UL3와 UL4 사이에 타겟 유전자를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 UL3/4-rpsL-neo_for: 서열번호 31, 역방향 프라이머 UL3/4-rpsL-neo_rev: 서열번호 32)를 사용하여 UL3/4-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다. KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I와 pRedET가 들어있는 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, 상기 제작한 UL3/4-rpsL-neo/kan 카세트 200 ng 를 형질 전환한다. 이러한 상동 재조합에 의하여 UL3/4-rpsL-neo/kan 카세트가 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I의 UL3/4 위치에 삽입되게 된다. UL3/4-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자로 인해 차단된다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는 UL3/4-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 마지막 단계인 타겟 유전자를 삽입하는 단계로 진행하였다.

[0124] UL3/4-rpsL-neo/kan카세트가 있는 *E.coli*에 pRed/ET의 기능을 활성화시키는 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, UL3/4-pCMV-HER2scFv-HveA-bGHpA 카세트와 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-bGHpA 카세트 그리고 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-bGHpA 카세트 200 ng을 형질 전환 시켰다. 상기 UL3/4-pCMV-HER2scFv-HveA-bGHpA 카세트와 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-bGHpA 카세트 그리고 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-bGHpA는 pCDNA3.1-HER2scFv-HveA 플라스미드와 pCDNA3.1-EpCAMscFv-HveA 플라스미드 그리고 pCDNA3.1-pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA(BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514; Carter. p et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 15;89(10):4285-9, Willuda J et al., Cancer Res. 1999, 15;59(22):5758-67)를 주형으로 사용하여 정방향 프라이머 UL3/4_pCMV_For(서열번호 33)와 역방향 프라이머 UL3/4_bGH_poly_R(서열번호 34)를 사용하여 제작하였다.

[0125] 기존 삽입된 UL3/4-rpsL-neo/kan 카세트와 앞서 삽입된 UL3/4-pCMV-HER2scFv-HveA-bGHpA와 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-bGHpA 그리고 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-bGHpA가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), UL3/4에서 UL3/4-pCMV-HER2scFv-HveA-bGHpA와 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-bGHpA 그리고 UL3/4-pCMV-EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-bGHpA의 도입 여부를 도입 여부를 제한효소 EcoRI, XhoI 처리와 PCR (ploymerase chain recation)를 수행으로 확인했고, PCR 산물을 시퀀싱하여 정확한 유전자 서열을 확인하였다.

[0126] 완성된 KOS-37/BAC-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I와 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 그리고 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후, Cre recombinase를 이용하여 BAC 유전자를 제거하기 위하여 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 DNA 1ug을 형질주입 하였다. 형질주입 3일 후, 형광현미경을 이용하여 EmGFP 단백질의 형광발현과 세포의 플락(plaque) 형성을 관찰하였다. 플라크의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)을 통해, HER2 표적화 어댑터를 발현하는 KOS-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(HADa-S)와 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스(EADa-S) 그리고 HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 어댑터를 발현하는 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-P2A-HER2scFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스(EADa-HADa-D)를 획득하였다.

[0127] **<실시예 4> HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖는 HSV-1과 HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 HER2 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스 제작**

[0128] 특정 암에서 발현하는 표적분자를 표적화할 수 있는 재표적화 HSV의 제작을 위하여, HSV-1의 당단백질인 gH 아미노산 서열(GenBank Accession No. ASM47773, 서열번호 3)의 29번과 30번째 아미노산 사이에 암세포에 특이적으로 발현하는 HER2를 인지하는 리간드(HER2 scFv)를 삽입하였다. 상기 실시예 2, 3에서 제작된, KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 KOS-37/BAC-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I DNA에 있는 당단백질 gH의 아미노산 29번과 30번 사이에 HER2scFv를 발현할 수 있는 유전자를 삽입하였다.

[0129] HSV-1의 gH에 HER2scFv 리간드가 삽입된 KOS-gH/HER2scFv-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 (HgH-S)와 KOS-UL3/4_HER2scFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 (HADa-HgH-D) 게놈 개요도를 도 7에 나타내었으며, 또 도 8에 gH-HER2scFv 리간드의 전체 서열과 해당 서열의 구성을 나타내었다. 여기서 HER2에 대한 scFv는 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 서열번호 24의 링커 펩티드를 매개로 연결된 구성이고, 이 scFv의 N-말단에 서열번호 35의 링커 펩티드가 연결되어 있고 또 C-말단에 서열번호 36의 링커 펩티드가 연결되어 있다.

[0130] 본 실시예에서 사용된 전장의 HER2scFv의 아미노산 서열과 유전자 서열은 각각 서열번호 37와 서열번호 38에 개시되어 있다.

[0131] gH-HER2scFv 리간드의 삽입은 상기 실시예 1, 2, 3과 마찬가지로 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(counter selection BAC modification kit; GeneBridges. Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0132] 구체적으로 상기 실시예 2, 3에서 제작된 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I *DNA*와 KOS-37/BAC-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA가 들어있는 *E.coli* 클론에 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행하는 RecE와 RecT를 발현하는 pRed/ET 플라스미드를 형질전환하였다(Muyrers JP *et al.*; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이에 타겟 유전자를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_for: 서열번호 39, 역방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_rev: 서열번호 40)를 사용하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다. 각각의 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 KOS-37/BAC-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA에 pRed/ET가 들어있는 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, 상기 제작한 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트 200 ng를 형질 전환한다. 이러한 상동 재조합에 의하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트가 gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이 위치에 삽입되게 된다. gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자로 인해 차단된다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는 gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 마지막 단계인 타겟 유전자를 삽입하는 단계로 진행하였다.

[0133] gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트가 있는 *E.coli*에 pRed/ET의 기능을 활성화시키는 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, gH29/30-HER2scFv 리간드 200 ng을 형질 전환하였다. 상기 gH29/30-HER2scFv 리간드는 pCAGGSMCS-gH-HER2scFv 플라스미드를 주형으로 사용하여 정방향 프라이머 gH29/30-scFv_For(서열번호 41)와 역방향 프라이머 gH29/30-scFv_Rev(서열번호 42)를 사용하여 제작하였다. 상기 pCAGGSMCS-gH-HER2scFv 플라스미드는 pCAGGSMCS 플라스미드(Atanasiu D, et al., J. Virol. 2013, Nov. 87(21):11332-11345)에 HER2scFv를 삽입하여 제작한 것으로,

구체적으로 pCAGGSMCS 플라스미드와 PCR로 증폭한 HER2scFv(Carter. p et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1992, 15;89(10):4285-9)에 *NotI* 제한효소(NEB, R3189)를 처리하고 *NotI*으로 잘려진 pCAGGSMCS 플라스미드와 HER2scFv를 T4 DNA ligase(NEB, M0202)를 이용하여 결합시켜 제작하였다.

[0134] 기존 삽입된 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트와 앞서 삽입된 gH29/30-HER2scFv가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), gH29/30에서 HER2scFv의 도입 여부를 도입 여부를 제한효소 EcoRI, XhoI 처리와 PCR (ploymerase chain recation)를 수행으로 확인했고, PCR 산물을 시퀀싱하여 정확한 유전자 서열을 확인하였다.

[0135] 완성된 KOS-37/BAC-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I *DNA*와 KOS-37/BAC-UL3/4_HER2scFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후, Cre 재조합 효소(recombinase)를 이용하여 BAC 유전자를 제거하기 위하여 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 각각의 DNA 1 ug을 형질주입하였다. 형질주입 3일 후, 형광현미경을 이용하여 EmGFP 단백질의 형광 발현과 세포의 플락(plaque) 형성을 관찰하였다. 플라크의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006.135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)을 통해 KOS-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(HgH-S)와 KOS-UL3/4_HER2scFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(HADa-HgH-D)를 획득하였다.

[0136] **<실시예 5> EpCAM 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖는 HSV-1과 EpCAM 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 바이러스 제작**

[0137] 특정 암에서 발현하는 표적분자를 표적화할 수 있는 재표적화 HSV의 제작을 위하여, HSV-1의 당단백질인 gH 아미노산 서열(GenBank Accession No. ASM47773, 서열번호 35)의 29번과 30번째 아미노산 사이에 암세포에 특이적으로 발현하는 EpCAM를 인지하는 리간드(EpCAM scFv)를 삽입하여 하였다. 상기 실시예 2와 3에서 제작된, KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I (EADa-S) DNA에 있는 당단백질 gH의 아미노산 29번과 30번 사이에 EpCAMscFv를 발현할 수 있는 유전자를 삽입하였다.

[0138] HSV-1의 gH에 EpCAMscFv 리간드가 삽입된 KOS-gH/EpCAMscFv-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 (EgH-S)와 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-gH/EpCAMscFv-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 (EADa-EgH-D) 게놈 개요도를 도 9에 나타내었으며, 또 도 10에 gH-EpCAMscFv 리간드의 전체 서열과 해당 서열의 구성을 나타내었다. 여기서 EpCAM에 대한 scFv는 서열번호 6의 VL와 서열번호 7의 VH이 서열번호 25의 링커 펩티드를 매개로 연결된 구성이고, 이 scFv의 N-말단에 서열번호 43의 링커 펩티드와 C-말단에 서열번호 44의 링커 펩티드가 연결되어 있다.

[0139] 본 실시예에서 사용된 HER2scFv의 아미노산 서열과 유전자 서열은 각각 서열번호 45와 서열번호 46에 개시되어 있다.

[0140] gH-EpCAMscFv 리간드의 삽입은 상기 실시예 4와 마찬가지로 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(counter selection BAC modification kit; GeneBridges. Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0141] 구체적으로 상기 실시예 2와 3에서 제작된 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA가 들어있는 *E.coli* 클론에 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행하는 RecE와 RecT를 발현하는 pRed/ET 플라스미드를 형질 전환하였다(Muyrers JP *et al.*; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이에 타겟 유전자를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_for: 서열번호 40, 역방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_rev: 서열번호 41를 사용하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다. 각각의 KOS-37/BAC-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA에 pRed/ET가 들어있는 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, 상기 제작한 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트 200 ng 를 형질 전환한다. 이러한 상동 재조합에 의하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트가 gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이에 삽입되게 된다. gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자로 인해 차단된다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는 gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 마지막 단계인 타겟 유전자를 삽

입하는 단계로 진행하였다.

[0142] gH29/30-rpsL-neo/kan카세트가 있는 *E.coli*에 pRed/ET의 기능을 활성화시키는 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, gH29/30-EpCAMscFv 리간드 200 ng을 형질 전환하였다. 상기 gH29/30-EpCAMscFv 리간드는 pCAGGSMCS-gH-EpCAMscFv 플라스미드를 주형으로 사용하여 정방향 프라이머 gH29/30-scFv_For(서열번호 42)와 역방향 프라이머 gH29/30_scFv_Rev(서열번호 43)를 사용하여 제작하였다. 상기 pCAGGSMCS-gH-EpCAMscFv 플라스미드는 pCAGGSMCS 플라스미드(Atanasiu D, et al., J. Virol. 2013, Nov. 87(21):11332-11345)에 EpCAMscFv를 삽입하여 제작한 것으로, 구체적으로 pCAGGSMCS 플라스미드와 PCR로 증폭한 EpCAMscFv(Willuda J et al., Cancer Res. 1999, 15;59(22):5758-67)에 *NotI* 제한효소(NEB, R3189)를 처리하고 *NotI*으로 잘려진 pCAGGSMCS 플라스미드와 EpCAMscFv를 T4 DNA ligase(NEB, M0202)를 이용하여 결합시켜 제작하였다.

[0143] 기존 삽입된 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트와 앞서 삽입된 gH29/30-EpCAMscFv가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), gH29/30에서 EpCAMscFv의 도입 여부를 도입 여부를 제한효소 EcoRI, XhoI 처리와 PCR (ploymerase chain recation)를 수행으로 확인했고, PCR 산물을 시퀀싱하여 정확한 유전자 서열을 확인하였다.

[0144] 완성된 KOS-37/BAC-gH_EpCAMscFv-EmGFP-gD-R222N/F223I와 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-gH/EpCAMscFv-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후, Cre 재조합 효소(recombinase)를 이용하여 BAC 유전자를 제거하기 위하여 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 각각의 DNA 1 ug을 형질주입하였다. 형질주입 2일 후, 형광현미경을 이용하여 EmGFP 단백질의 형광발현과 세포의 플락(plaque) 형성을 관찰하였다. 플라크의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006.135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)을 통해 KOS-gH/EpCAMscFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(EgH-S)와 KOS-gH/EpCAMscFv-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스(EADa-EgH-D)를 획득하였다.

[0145] **<실시예 6> HER2 이중 표적화 항암 바이러스의 활성 측정**

[0146] 상기 실시예 3, 4에서 제작된 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 KOS-UL3/4_HER2scFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스 (HADa-S) 와 gH에 HER2scFv를 발현하는 KOS-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 바이러스 (HgH-S) 그리고 HER2scFv-HveA 어댑터와 gH에 HER2scFv를 발현하는 KOS-UL3/4_HER2scFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I (HADa-HgH-D) 이중 표적화(double-targeting) 바이러스의 바이러스 확산 및 증폭, HER2scFv-HveA 어댑터 발현량을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0147] 바이러스 확산 실험을 진행하기 위하여 Vero-HVEM 세포와 SK-OV-3 세포를 2.0 X 10^5으로 12 well 플레이트에 깔아주었다. HSV-1 야생형 바이러스 (KOS)와

[0148] 실시예 2에서 제조된 형광단백질 EmGFP을 발현하고 세포 수용체로서 HVEM만을 사용하여 진입하는 바이러스 gDm, 실시예 3에서 제조된 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 바이러스 HADa-S, 실시예 4에서 제조된 gH에 HER2scFv를 리간드 갖는 바이러스 HgH-S, 실시예 4에서 제조된 gH에 HER2scFv를 리간드 갖고 HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 이중 표적화 바이러스 HADa-HgH-D를 하나의 well에 20~50개가 될 수 있도록 바이러스를 희석하여 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스를 제거하고 바이러스의 확산을 방지하기 위하여 0.2% 메틸셀룰로오스(methylcellulose)가 들어있는 배지로 교체하였다. 3일 후 형광현미경을 이용하여 바이러스 플락(plaque)의 크기를 통하여 바이러스 확산을 측정하였다.

[0149] 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11에서와 확인되는 바와 같이, Vero-HVEM 세포주에서는 야생형 바이러스(KOS)에 대비하여 gDm, HgH-S, HADa-S 그리고 HADa-HgH-D의 플락(plaque) 크기가 각각 18%, 49%, 4%, 29% 작게 형성이 되었다. HER2 발현 세포주인 SK-OV-3 세포에서는 야생형 바이러스(KOS)에 대비하여 HgH-S의 플락(plaque) 크기가 53% 감소 되었지만, HADa-S과 HADa-HgH-D 바이러스는 각각 20%, 19% 증가한 것을 관찰하였다. HgH-S의 플락(plaque) 크기가 감소한 것은 gD가 진입 수용체(entry receptor)에 결합을 하면 gH가 이러한 결합에 의해 활성 시그널을 gB로 전달하여 세포융합을 유도하는 역할을 하며, 또한 인테그린(integrins)과 결합하여 엔도시토시스(endocytosis)를 유도하게 되는데, gH에 scFv가 삽입되면서 구조적인 변화로 인한 이러한 시그널 전달 또는 엔

도시토시스에 영향을 주어 바이러스 확산이나 복제가 저해되는 것으로 판단된다.

[0150] 바이러스 복제 실험을 진행하기 위하여 Vero-HVEM 세포를 1.0 X 10^4 으로 96 well 플레이트에 깔아주었다. gDm, gH에 HER2scFv를 리간드 발현하는 HgH-S, HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 HADa-S 그리고 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스 0.1 MOI를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스를 제거하기 위하여 새로운 배지로 교체하였다. 감염 후, 3, 24, 48시간에 바이러스 배양액을 획득하고, 배양액에 있는 바이러스의 수를 측정하였다.

[0151] 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에서와 확인되는 바와 같이, Vero-HVEM 세포주에 gDm, HADa-S 그리고 HADa-HgH-D의 바이러스 증식 활성은 비슷하지만, 도 11의 결과에서와 바이러스 확산 능력의 감소로 인한 HgH-S에서 바이러스의 증식 활성이 감소되는 것을 확인하였다.

[0152] 어댑터의 발현량을 측정하는 실험을 진행하기 위하여 Vero-HVEM과 SK-OV-3 세포를 2.0 X 10^5으로 12 well 플레이트에 깔아주었다. gDm, gH에 HER2scFv 리간드 발현하는 HgH-S, HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 HADa-S 그리고 이중 표적화 바이러스인 HADa-HgH-D 바이러스 0.1 MOI를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스를 제거하기 위하여 FBS가 없는 새로운 배지로 교체하였다. 감염 48시간 후, 바이러스 배양액을 획득하였고, 배양액에 있는 어댑터를 측정하기 위하여 웨스턴 블럿(Western blot)을 통하여 단백질 발현량을 측정하였다.

[0153] 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에서와 확인되는 바와 같이, Vero-HVEM 세포주에서는 HADa-HgH-D 이중 표적화 바이러스가 어댑터만 발현하는 HADa-S 바이러스에 비하여 3배 이상의 어댑터가 발현되었다. 하지만 어댑터가 없는 gDm과 HgH-S 바이러스 배양액에서는 어댑터가 측정되지 않았다. HER2가 발현하는 SK-OV-3 세포에서는 HADa-HgH-D 이중 표적화 바이러스의 어댑터만 검출되었다. 이러한 이유는 HADa-S 바이러스에 비하여 HADa-HgH-D 이중 표적화 바이러스가 HER2가 발현되는 세포주에 감염률이 높아 비례적으로 어댑터의 발현이 높기 때문이다.

[0154] 종합적으로 HADa-HgH-D 이중 표적화 바이러스는 바이러스 확산 및 증폭 그리고 어댑터 발현량에서 다른 바이러스와 비교하여 상대적으로 향상된 능력을 확인하였다.

[0155] **<실시예 7> HER2 이중 표적화 항암 바이러스를 이용한 HER2 발현 암세포의 감염 및 세포독성**

[0156] 상기 실시예 2, 3, 4에서 제작된 gDm, gH에 HER2scFv 리간드를 발현하는 HgH-S, HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 HADa-S 그리고 HER2scFv-HveA 어댑터와 gH에 HER2scFv 리간드를 모두 발현하는 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스를 HER2를 발현하는 암 세포주에서 실험을 진행하였다. 각각의 바이러스가 당단백질 gH에서 발현하는 HER2scFv 리간드 또는 어댑터에 의하여 주변의 암세포로의 바이러스의 감염을 유도하는지, 감염 후 세포독성을 유도하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0157] 실험에 사용된 세포주는 HER2가 발현되지 않는 세포주(MDA-MB-231)와 HER2가 발현되는 세포주(SK-OV-3, MCF-7, MDA-MB-453, BT-474)이다. 유방암 세포주인 MDA-MB-231(ATCC, HTB-26), MCF-7(ATCC, HTB-22), , BT-474(ATCC, HTB-20), 난소암 세포주인 SK-OV-3(ATCC, HTB-77)는 DMEM 배지에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS를 사용하여 배양했고 유방암 세포주인 MDA-MB-453 (ATCC, HTB-131) RPMI 1640 배지에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS를 사용하여 배양하였다.

[0158] HER2 특이적 바이러스 감염실험을 위하여 8×10^3의 SK-OV-3과 MDA-MB-231, 4.0×10^4의 MCF-7, 8.0×10^4의 MDA-MB-453, 7.0×10^4의 BT-474 세포주들은 2 MOI로, gH에 HER2scFv를 리간드 발현하는 HgH-S, HER2scFv-HveA 어댑터를 발현하는 HADa-S 그리고 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스와 대조군으로 HER2 타겟팅이 되지 않는 gDm 바이러스를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스를 제거하기 위하여 새로운 배지로 교체하였다. 감염 2일 후, 각각의 세포주에서 바이러스 감염을 EmGFP 형광 발현으로 확인하였다 (BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514). 또한 감염 후, 4일 동안 세포독성을 측정하기 위하여 EZ-Cytox (DoGenBio) 시약을 사용하여 살아있는 세포에서만 형성되는 발색물질인 포르마잔(formazan)의 발색정도를 ELISA 리더기를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다. 흡광도를 수치화하여 각각의 바이러스에 의한 암 세포주의 세포독성을 측정하였다.

[0159] 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14에서 확인되는 바와 같이, 어댑터를 발현하는 HADa-S 바이러스는 SK-OV-3와 MCF7 세포에서 감염률이 높지만, MDA-MB-453과 BT-474에서 낮은 감염률을 관찰하였다. gH에 HER2scFv 리간드를 발현하는 HgH-S 바이러스는 SK-OV-3와 MCF7 그리고 MDA-MB-453 세포에서 감염률이 높지만, BT-474에서 낮은 감염률을 관찰하였다. 리간드와 어댑터를 각각 하나씩 발현하는 바이러스와는 다르게 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스는 HER2가 발현하는 모든 세포에서 높은 감염률을 관찰하였다. 하지만, gDm 바이러스는 HER2 표적화가 되

지 않기 때문에 암 세포주에 감염이 되지 않았고, 대조군인 HER2가 발현하지 않는 MDA-MB-231 세포에서는 모든 바이러스의 감염이 관찰되지 않았다. 상기 MDA-MB-453과 BT-474에서의 낮은 감염율은 MDA-MB-453과 BT-474의 세포형태 및 특성 그리고 그것으로 인한 HADa-S 바이러스의 초기 낮은 감염에 기인한 것으로 판단된다.

[0160] 또한 도 15에서는 감염 후, 4일 동안 바이러스에 의한 암세포의 세포독성을 관찰한 결과를 나타내었다. HgH-S, HAD-S HADa-HgH-D 바이러스는 SK-OV-3에서 41%, 27%, 25%의 세포 생존율을, MCF-7에서는 61%, 52%, 39%의 세포 생존율을, MDA-MB-453에서는 49%, 100%, 23%의 세포 생존율을 관찰하였다. HER2가 발현하는 3가지 세포주에서 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스 감염에 의한 세포독성이 가장 높은 것을 관찰하였다. 하지만 gDm 바이러스는 HER2 타겟팅이 되지 않기 때문에 세포독성을 관찰하지 못했고, HER2가 발현하지 않는 MDA-MB-231에서도 감염이 되지 않기 때문에 3가지 바이러스가 세포독성에 관여하지 않는다는 것을 관찰하였다. MDA-MB-453 세포의 생존율에 영향이 없었던 것은 HADa-S 바이러스가 초기 감염이 다른 바이러스에 비하여 현저히 낮았기 때문인 것으로 보인다.

[0161] **<실시예 8> 마우스에서 HER2 이중 표적화 항암 바이러스에 의한 종양세포의 생장 억제**

[0162] 상기 실시예 4에서 제작된 이중 표적화 HADa-HgH-D 바이러스가 마우스에서 HER2를 발현하는 암세포 성장의 억제를 유도하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0163] 5주령 Balb/c nude mice (오리엔트 바이오)의 피하에 5 X 10^6 cells/mouse의 SK-OV-3를 주입한 후, 종양의 크기가 100mm^3가 될 때까지 관찰하였다. 종양이 생성된 마우스 5마리에 HER2 더블 타겟팅 HADa-HgH-D 바이러스를 2 X 10^7 pfu/mouse로 종양내 주입(Intratumoral injection)하였고, 대조군 역시 5마리의 마우스에 PBS를 주입하였다. 바이러스 주입 후, 28일 동안 마우스에 생성된 종양의 크기를 관찰하였다.

[0164] 결과를 도 16에 28일 동안 종양의 크기를 그래프로 나타내었다. PBS를 넣은 대조군은 초기 116.46 ± 11.21 mm^3에서 815.28 ± 141.36 mm^3로 종양이 성장했지만, HER2 더블 타겟팅 HADa-HgH-D 바이러스를 주입한 마우스에서는 108.85 ± 15.54 mm^3 초기에서 110.02 ± 55.44 mm^3으로 종양의 성장이 대조군과 비교하여 억제되는 것을 관찰하였다.

[0165] **<실시예 9> EpCAM 이중 표적화 항암 바이러스를 이용한 EpCAM 발현 암세포의 감염 및 세포독성**

[0166] 상기 실시예 3, 5에서 제작된 EpCAMscFv-HveA 어댑터가 발현되는 EADa-S 바이러스와 gH에 EpCAMscFv 리간드를 발현되는 EgH-S 바이러스 그리고 EpCAMscFv-HveA 어댑터와 gH에 EpCAMscFv 리간드를 모두 발현하는 이중 표적화 EADa-EgH-D 바이러스를 이용하여 암세포주에서 실험을 진행하였다.

[0167] 각각의 바이러스가 당단백질 gH에 발현하는 EpCAMscFv 리간드 또는 어댑터에 의하여 주변의 암세포로 바이러스의 감염을 유도하는지, 감염 후 세포독성을 유도하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0168] 실험에 사용된 세포주는 EpCAM가 발현되지 않는 세포주(Mia-PaCa-2)와 EpCAM가 발현되는 세포주(MCF-7, MDA-MB-453, BT-474)이다. 유방암 세포주인 MCF-7(ATCC, HTB-22), BT-474(ATCC, HTB-20), 췌장암 세포주인 Mia-PaCa-2(ATCC, CRL-1420)는 DMEM 배지에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene))와 10% FBS를 사용하여 배양했고, 유방암 세포주인 MDA-MB-453 (ATCC, HTB-131)는 RPMI 배지에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS를 사용하여 배양하였다.

[0169] EpCAM 특이적 바이러스 감염실험을 위하여 4.0×10^4의 MCF-7, 8.0×10^4의 MDA-MB-453, 7.0×10^4의 BT-474 세포주들은 1 MOI로, 상기 실시예 3에서 제작된 EpCAMscFv-HveA 어댑터가 발현되는 EADa-S, 실시예 4에서 제작된 gH에 EpCAMscFv 리간드를 발현하는 EgH-S 바이러스, 어댑터와 리간드가 같이 발현하는 이중 표적화 EADa-EgH-D 바이러스와 대조군으로 실시예 2에서 제작된 EpCAM 표적화가 되지 않는 gDm 바이러스를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스를 제거하기 위하여 새로운 배지로 교체하였다. 감염 2일 후, 각각의 세포주에서 바이러스 감염을 EmGFP 형광 발현으로 확인하였다 (BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514). 또한 감염 후, 5일 동안 세포독성을 측정하기 위하여 EZ-Cytox (DoGenBio) 시약을 사용하여 살아있는 세포에서만 형성되는 발색물질인 포르마잔(formazan)의 발색정도를 ELISA 리더기를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다. 흡광도를 수치화하여 각각의 바이러스에 의한 암 세포주의 세포독성을 측정하였다.

[0170] 결과를 도 17에 나타내었다. 도 17에서 확인되는 바와 같이, BT-474와 MDA-MB-453 그리고 MCF7 세포에서 EpCAM-HveA 어댑터만 발현되는 EADa-S 바이러스, gH에 EpCAMscFv 리간드가 발현하는 EgH-S 바이러스, 어댑터와

리간드가 같이 발현되는 이중 표적화 EADa-EgH-D 바이러스가 모두 세포을 감염시키는 것을 형광으로 관찰하였지만, 이중 표적화 EADa-EgH-D 바이러스가 EADa-S, EgH-S 바이러스와 비교하여 높은 감염률을 관찰하였다. gDm 바이러스는 EpCAM 표적화가 되지 않기 때문에 암 세포주에 감염이 되지 않았고, EpCAM가 발현하지 않는 Mia-PaCa-2 세포에서는 바이러스가 감염되지 않는 것을 관찰하였다.

[0171] 또한 도 18에 감염 후, 5일 동안 바이러스에 의한 암세포의 세포독성을 관찰한 결과를 나타내었다. EgH-S, EAD-S EADa-EgH-D 바이러스는 BT-474에서 35%, 34%, 26%의 세포 생존율을, MDA-MB-453에서는 22%, 19%, 17%의 세포 생존율을, MCF-7에서는 36%, 31%, 20%의 세포 생존율을 관찰하였다. EpCAM을 발현하는 3가지 세포주에서 EADa-EgH-D 더블 타겟팅 바이러스 감염에 의한 세포독성이 가장 높은 것을 관찰하였다. 하지만 gDm 바이러스는 EpCAM 타겟팅이 되지 않기 때문에 세포독성을 관찰하지 못했고, EpCAM을 발현하지 않는 Mia-PaCa-2에서도 감염이 되지 않기 때문에 바이러스 모두 세포독성에 관여하지 않는다는 것을 관찰하였다.

[0172] **<실시예 10> HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1 제작**

[0173] 특정 암에서 발현하는 2가지 표적분자(HER2/EpCAM)를 이중으로 표적화할 수 있는 HSV의 제작을 위하여, EpCAMscFv-HveA 어댑터가 발현되는 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I (EADa-S) 바이러스 당단백질인 gH 아미노산 서열(GenBank Accession No. ASM47773, 서열번호 35)의 29번과 30번째 아미노산 사이에 암세포에 특이적으로 발현하는 HER2를 인지하는 리간드(HER2 scFv)를 삽입하였다.

[0174] 상기 실시예 3에서 제작된 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD/R222N/F223I (EADa-S) *DNA*에 있는 당단백질 gH의 아미노산 29번과 30번 사이에 HER2scFv를 발현할 수 있는 유전자를 삽입하였다.

[0175] HSV-1의 gH에 HER2scFv 리간드가 삽입된 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD/R222N/F223I 바이러스 게놈 개요도를 도 19에 나타내었으며, 또 gH-HER2scFv 리간드의 전체 서열과 해당 서열의 구성은 도 8에 나타나 있다. 여기서 HER2에 대한 scFv는 서열번호 4의 VH와 서열번호 5의 VL이 서열번호 24의 링커 펩티드를 매개로 연결된 구성이고, 이 scFv의 N-말단에 서열번호 36의 링커 펩티드가 연결되어 있고 또 C-말단에 서열번호 37의 링커 펩티드가 연결되어 있다.

[0176] 본 실시예에서 사용된 전장의 HER2scFv의 아미노산 서열과 유전자 서열은 각각 서열번호 38와 서열번호 39에 개시되어 있다.

[0177] gH-HER2scFv 리간드의 삽입은 상기 실시예 4와 마찬가지로 카운터 셀렉션 BAC 변형 키트(counter selection BAC modification kit; GeneBridges. Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[0178] 구체적으로 상기 실시예 3에서 제작된 KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I *DNA*가 들어있는 *E.coli* 클론에 상동 재조합(homologous recombination) 기능을 수행하는 RecE와 RecT를 발현하는 pRed/ET 플라스미드를 형질전환하였다(Muyrers JP *et al.*; Nucleic Acids Res. 1999. 27(6):1555-1557). gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이에 타겟 유전자를 도입하고자 하는 위치를 포함하는 상동 영역의 프라이머(homologous region primer) 세트(정방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_for: 서열번호 40, 역방향 프라이머 gH29/30-rpsL-neo_rev: 서열번호 41)를 사용하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트(cassette)를 제작하였다.

[0179] KOS-37/BAC-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA와 pRed/ET가 들어있는 클론에 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, 상기 제작한 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트 200 ng을 형질전환하였다. 이러한 상동 재조합에 의하여 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트가 gH의 아미노산 29번째와 30번째 사이에 삽입되게 된다. gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입된 *E.coli*는 카나마이신 저항성을 갖고 있지만, 스트렙토마이신 저항성은 rpsL 유전자로 인해 차단된다. 카나마이신 배지에서 선별된 *E.coli*는 gH29/30-rpsL-neo/kan가 삽입되었다고 판단하여, 마지막 단계인 타겟 유전자를 삽입하는 단계로 진행하였다.

[0180] gH29/30-rpsL-neo/kan카세트가 있는 *E.coli*에 pRed/ET의 기능을 활성화시키는 L-아라비노오스(L-arabinose; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 상동 재조합(homologous recombination)이 가능하도록 유도한 후, gH29/30-HER2scFv 리간드 200 ng을 형질전환하였다. 상기 gH29/30-HER2scFv 리간드는 pCAGGSMCS-gH-HER2scFv 플라스미드를 주형으로 사용하여 정방향 프라이머 gH29/30-scFv_For(서열번호 42)와 역방향 프라이머 gH29/30scFv_Rev(서열번호 43)를 사용하여 제작하였다.

[0181] 기존 삽입된 gH29/30-rpsL-neo/kan 카세트와 앞서 삽입된 gH29/30-HER2scFv가 교체되면서 rpsL에 의해 차단된 스트렙토마이신 저항성이 활성화되는 원리를 이용하여 후보군을 스트렙토마이신 배지에서 선별하였다(Heermann

R et al., Microb Cell Fact. 2008. 14:. doi: 10.1186). 선별된 후보군은 DNA prep 방법을 이용하여 DNA 분리를 하였고(Horsburgh BC et al., Methods enzymol. 1999. 306:337-352), gH29/30에서 HER2scFv의 도입 여부를 도입 여부를 제한효소 EcoRI, XhoI 처리와 PCR (ploymerase chain recation)를 수행으로 확인했고, PCR 산물을 시퀀싱하여 정확한 유전자 서열을 확인하였다.

[0182] 완성된 KOS-37/BAC-gH/HER2scFv-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-EmGFP-gD-R222N/F223I DNA를 라지 컨스트럭트 DNA 분리 키트(Large construct DNA purification kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 추출한 후, Cre recombinase를 이용하여 BAC 유전자를 제거하기 위하여 2×10^5의 Cre-Vero-HVEM 세포에 리포펙타민 2000 시약(Lipofectamine 2000 reagent, Invitrogen)을 이용하여 각가의 DNA 1 ug을 형질주입하였다. 형질주입 3일 후, 형광현미경을 이용하여 EmGFP 단백질의 형광발현과 세포의 플락(plaque) 형성을 관찰하였다. 플라크의 형성을 확인한 다음 바이러스가 포함된 세포를 걷어서 3회의 freeze-thaw 방법(Gierasch WW et al.; J. Virol Methods. 2006. 135:197~206)과 초음파 파쇄(sonication)를 통해 EpCAMscFv-HveA 어댑터와 gH에 HER2scFv 리간드를 발현되는 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-gH_HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 이중(dual) 표적화 바이러스(EADa-HgH-D)를 획득하였다.

[0183] **<실시예 11> HER2 표적화 변형된 당단백질 gH를 갖고 EpCAM 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1의 이중 표적화 효과 실험**

[0184] 상기 실시예 10에서 제작된 EpCAMscFv-HveA 어댑터와 gH에 HER2scFv 리간드를 발현하는 KOS-UL3/4_EpCAMscFv-HveA-gH/HER2scFv-EmGFP-gD-R222N/F223I 듀얼 타겟팅 바이러스(EADa-HgH-D)가 HER2와 EpCAM 단백질이 발현되는 세포에 감염을 유도하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0185] 실험에 사용된 세포주는 HER2와 EpCAM이 발현되지 않는 세포주(CHO-K1)와 HER2가 발현되는 세포주(CHO-HER2) 그리고 EpCAM이 발현되는 세포주(CHO-EpCAM)이다. 중국 햄스터 난소 세포주인 CHO-K1, CHO-HER2, CHO-EpCAM (Kuroki M et al., J Biol Chem. 1991. 74:10132-10141)는 HaM's F-12K 배지(Welgene))에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS(fetal bovine serum)를 사용하여 배양하였다.

[0186] 특이적 바이러스 감염을 위하여 2.5×10^4의 CHO-K1, CHO-HER2, CHO-EpCAM 세포주들을 96 well 플레이트에 깔아준다. 24시간이 지난 후, 상기 실시예 4에서 제작된 HER2 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D), 상기 실시예 5에서 제작된 EpCAM 이중 표적화 바이러스(EADa-EgH-D) 그리고 상기 실시예 10에서 제작된 HER2/EpCAM 이중(dual) 표적화 바이러스(EADa-HgH-D)를 각각 5 MOI를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스 및 어댑터를 제거하기 위하여 새로운 배지로 교체하였다. 감염 2일 후, 형광 발현으로 각각의 세포주에 바이러스 감염을 형광현미경으로 관찰하였다(BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514).

[0187] 결과를 도 20에 나타내었다. 도 20에서 확인되는 바와 같이 각각의 바이러스가 세포주에 감염된 현상을 형광현미경으로 촬영한 사진을 나타내었다. HER2와 EpCAM이 발현하지 않는 CHO-K1 세포주에는 모든 바이러스가 감염되지 않은 것을 관찰하였다. HER2 이중 표적화 바이러스(HADa-HgH-D)는 CHO-HER2에만 감염되었고, EpCAM 이중 표적화 바이러스(EADa-EgH-D)는 CHO-EpCAM에서만 감염이 되었다. 하지만, HER2/EpCAM 이중(dual) 표적화 바이러스(EADa-HgH-D)는 CHO-HER2와 CHO-EpCAM 세포 모두에서 감염을 확인하였다. 이 결과를 통하여 2가지 표적분자를 함께 표적화할 수 있는 바이러스에 의한 2가지 이상의 표적분자를 표적화하는 전략의 가능성을 확인할 수 있었다.

[0188] **<실시예 12> HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 어댑터를 발현하는 HSV-1의 이중 표적화 효과 실험**

[0189] 상기 실시예 3에서 제작된 EpCAMscFv-HveA 어댑터와 HER2scFv-HveA 어댑터를 같이 발현하는 HER2 및 EpCAM 이중(dual) 표적화 바이러스 (EADa-HADa-D)가 HER2와 EpCAM 단백질이 발현되는 세포에 감염을 유도하는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0190] 실험에 사용된 세포주는 HER2와 EpCAM이 발현되지 않는 세포주(CHO-K1)와 HER2가 발현되는 세포주(CHO-HER2) 그리고 EpCAM이 발현되는 세포주(CHO-EpCAM)이다. 중국 햄스터 난소 세포주인 CHO-K1, CHO-HER2, CHO-EpCAM (Kuroki M et al., J Biol Chem. 1991. 74:10132-10141)는 HaM's F-12K 배지(Welgene))에 100 U/ml 페니실린/100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene)와 10% FBS(fetal bovine serum)를 사용하여 배양하였다.

[0191] 특이적 바이러스 감염을 위하여 2.5×10^4의 CHO-K1, CHO-HER2, CHO-EpCAM 세포주들을 96 well 플레이트에 깔아준다. 24시간이 지난 후, 상기 실시예 3에서 제작된 HER2scFv-HveA 어댑터만을 발현하는 바이러스(HADa-S)와 EpCAMscFv-HveA 어댑터만을 발현하는 바이러스(EADa-S) 그리고 EpCAMscFv-HveA 어댑터와 HER2scFv-HveA 어댑터

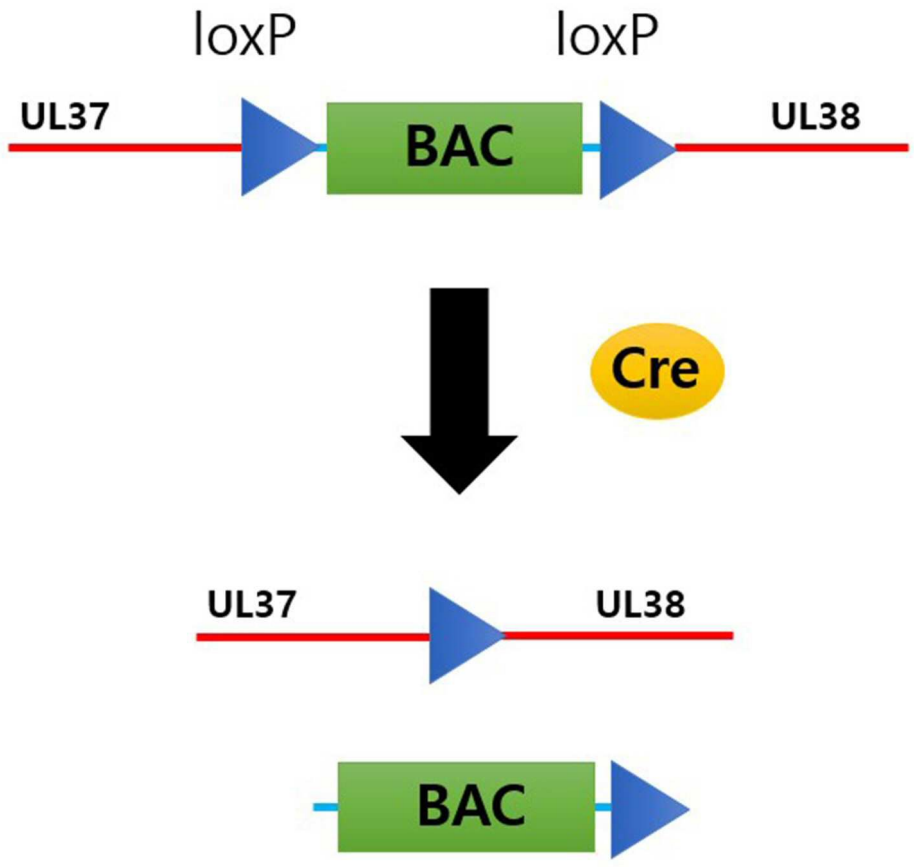
를 같이 발현하는 이중 표적화 바이러스(EADa-HADa-D)를 각각 5 MOI를 감염시켰다. 90분 후, 잔류하는 초기 바이러스 및 어댑터를 제거하기 위하여 새로운 배지로 교체하였다. 감염 2일 후, 형광 발현으로 각각의 세포주에 바이러스 감염을 형광현미경으로 관찰하였다(BaeK HJ *et al.*, Mol Ther. 2011. 19(3):507-514).

[0192] 결과를 도 21에 각각의 바이러스가 세포주에 감염된 현상을 형광현미경으로 촬영한 사진을 나타내었다. HER2와 EpCAM이 발현하지 않는 CHO-K1 세포주에는 모든 바이러스가 감염되지 않은 것을 관찰하였다. HER2scFv-HveA 어댑터만을 발현하는 바이러스(HADa-S)는 CHO-HER2에만 감염되었고, EpCAMscFv-HveA 어댑터만을 발현하는 바이러스(EADa-S)는 CHO-EpCAM에서만 감염이 되었다. 하지만, EpCAMscFv-HveA 어댑터와 HER2scFv-HveA 어댑터를 같이 발현하는 이중 표적화 바이러스(EADa-HADa-D)는 CHO-HER2와 CHO-EpCAM 세포 모두에서 감염을 확인하였다.

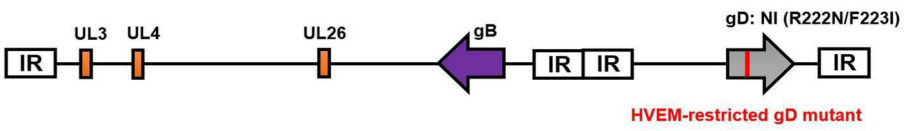
[0193] 이 결과를 통하여 2가지 표적분자를 함께 표적화할 수 있는 어댑터를 발현하는 바이러스에 의한 2가지 이상의 표적분자를 표적화하는 전략의 가능성을 확인할 수 있었다.

도면

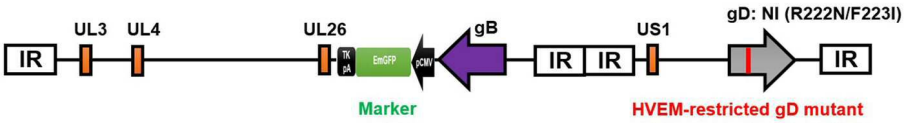
도면1



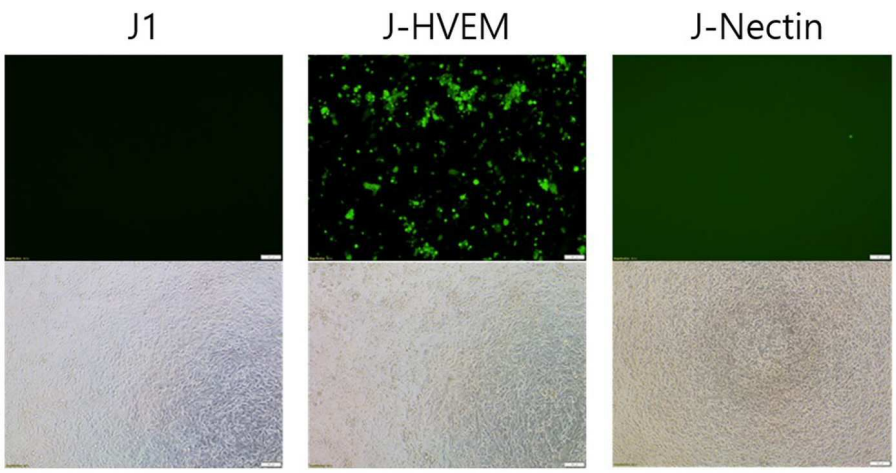
도면2



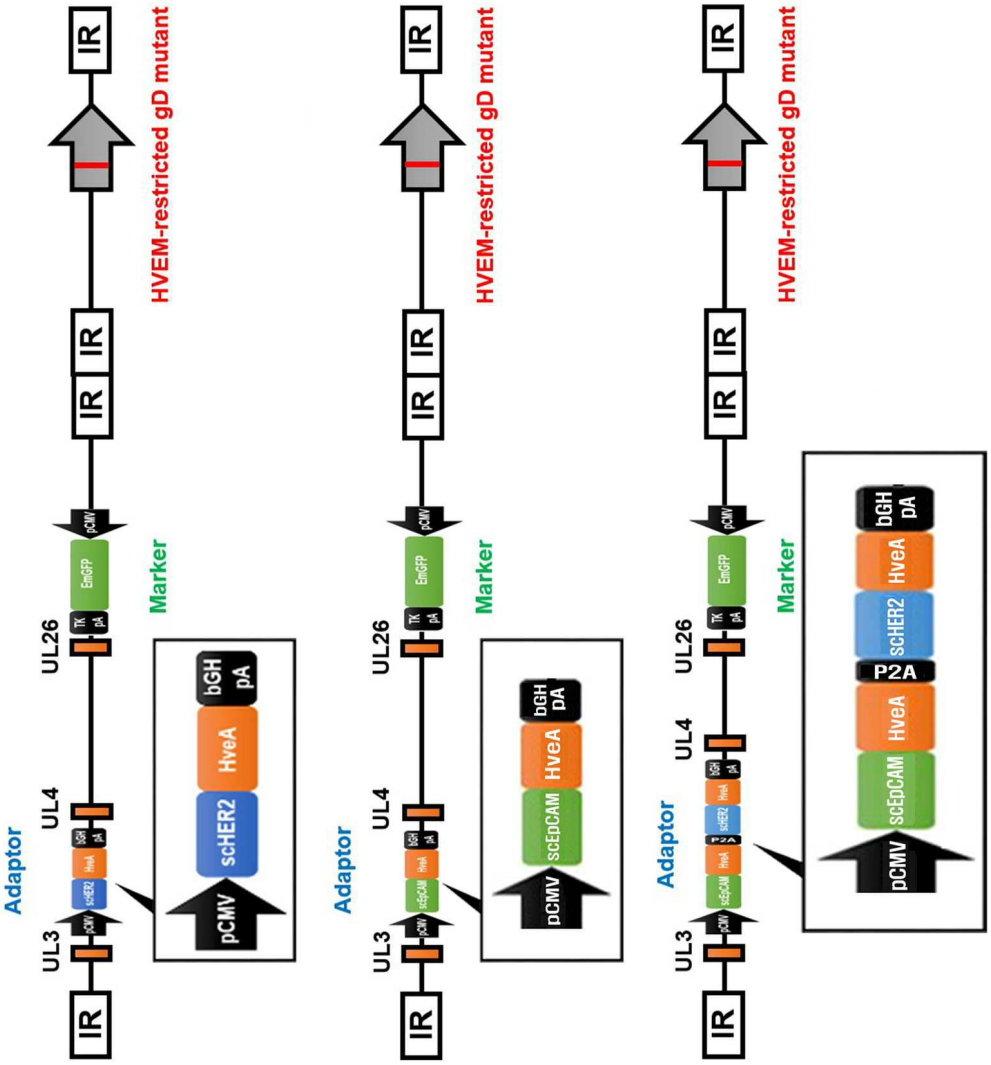
도면3


UL3
UL4
UL26
gB
US1
gD: NI (R222N/F223I)
IR
IR
IR
IR
TK pA
EmGFP
pCMV
Marker
HVEM-restricted gD mutant

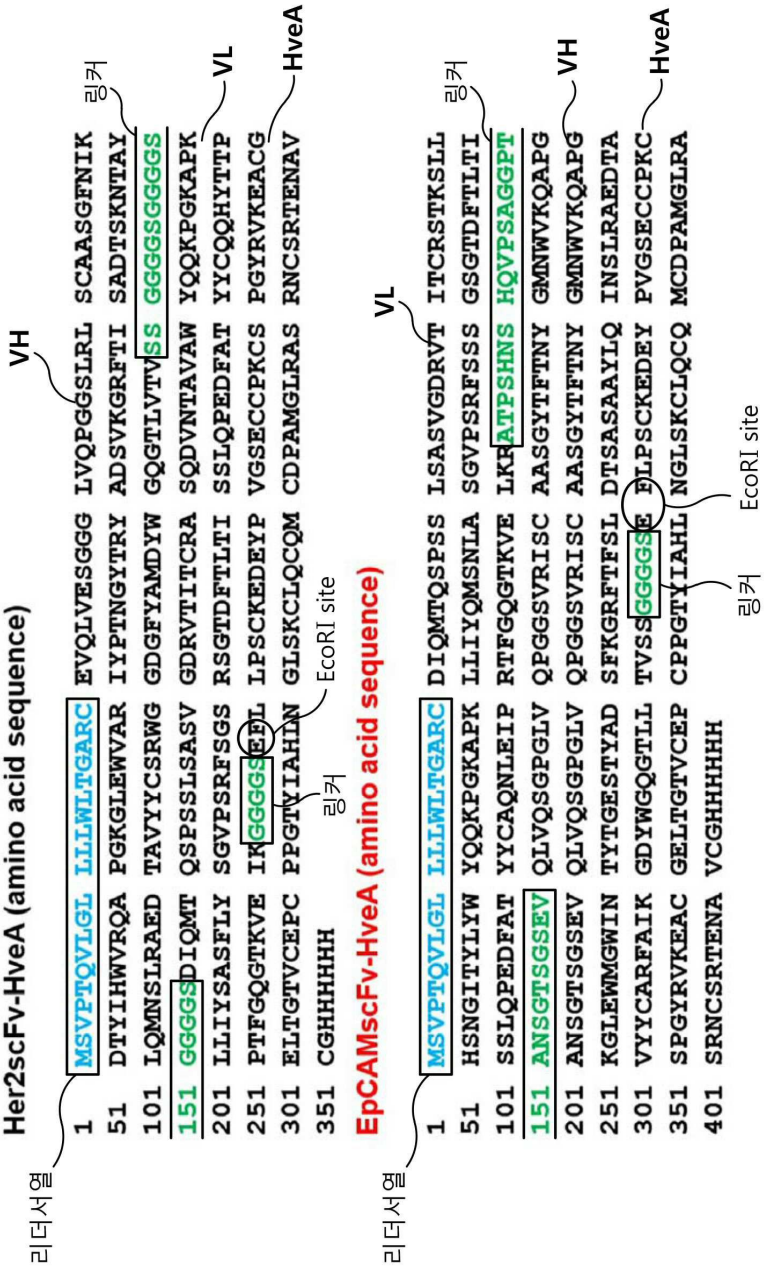
도면4


J1
J-HVEM
J-Nectin

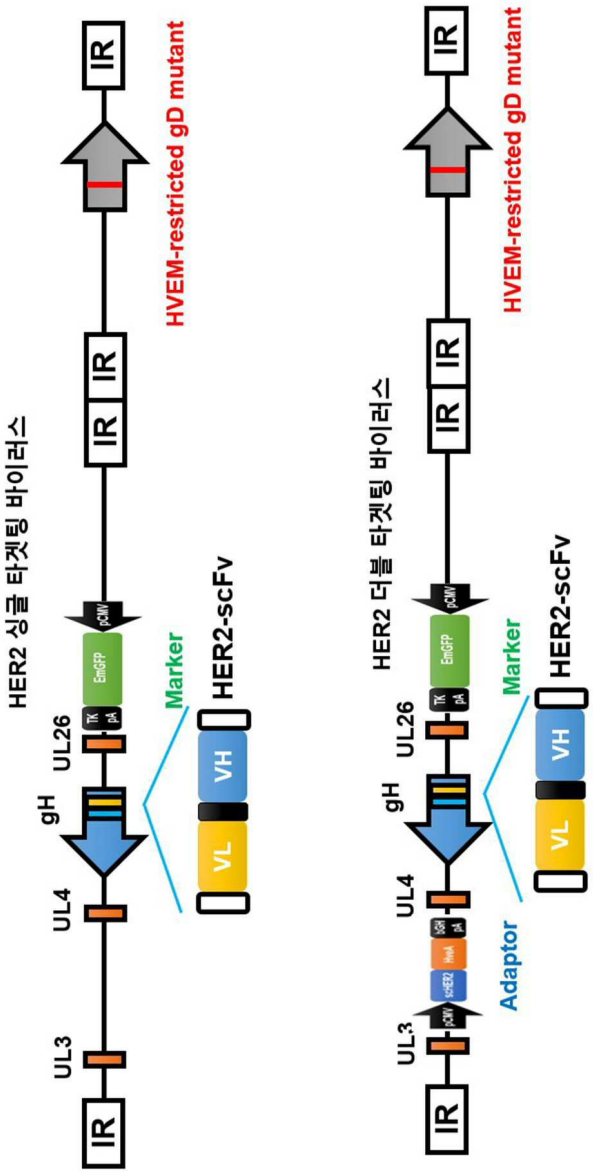
도면5


IR
UL3
UL4
UL26
Adaptor
Marker
HVEM-restricted gD mutant
pCMV
scHER2
HveA
bGH pA
EmGFP
TK pA
scEpCAM
P2A

도면6


Her2scFv-HveA (amino acid sequence)
VH
링커
VL
HveA
리더서열
EcoRI site
EpCAMscFv-HveA (amino acid sequence)
VL
링커
VH
HveA
리더서열
링커
EcoRI site

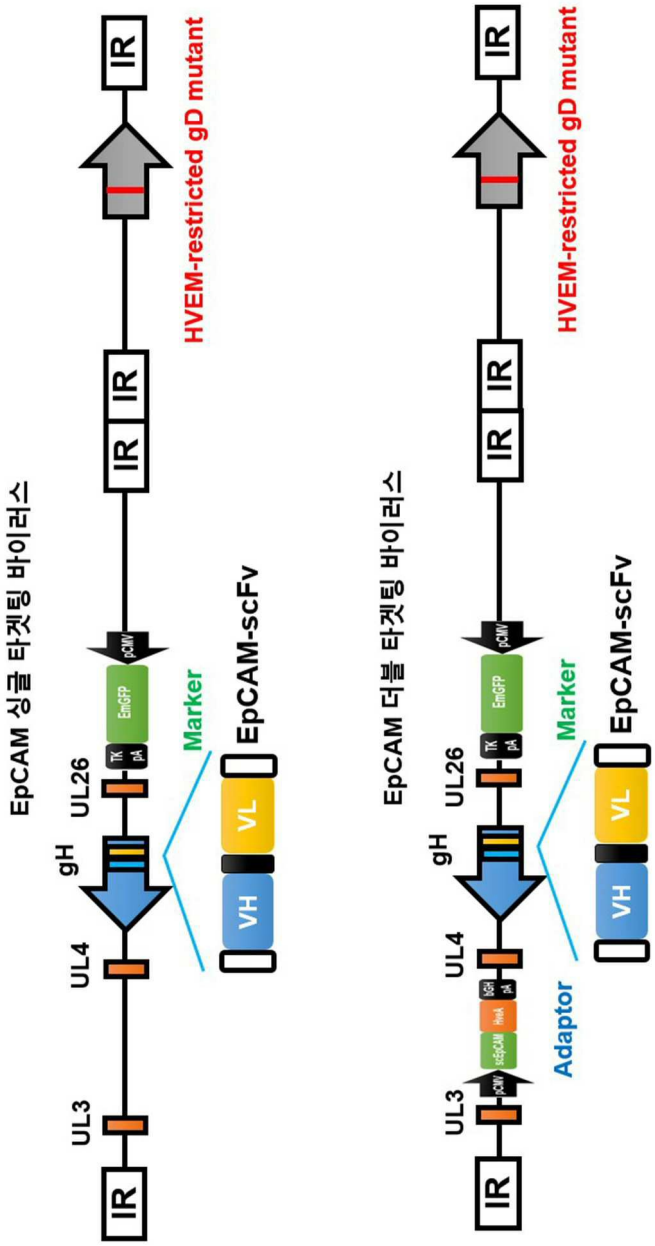
도면7


HER2 싱글 타겟팅 바이러스
IR
UL3
UL4
gH
UL26
pCMV
EmGFP
TK
pA
IR
IR
HVEM-restricted gD mutant
Marker
HER2-scFv
VH
VL
HER2 더블 타겟팅 바이러스
IR
UL3
pCMV
scHER2
HA
pA
UL4
gH
UL26
pCMV
EmGFP
TK
pA
IR
IR
HVEM-restricted gD mutant
Adaptor
Marker
HER2-scFv
VH
VL

도면8

Her2scFv (amino acid sequence)
VH
VL
링커
N-말단링커
C-말단링커
1 AAASSGGGSG SGGEVQLVES GGGLVQPGGS LRLSCAASGF NIKDTYIHWV
51 RQAPGKGLEW VARIYPTNGY TRYADSVKGR FTISADTSKN TAYLQMNSLR
101 AEDTAVYYCS RWGGDGFYAM DYWGQGTLVT VSSGGGGSGG GGSGGGGSDI
151 QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRASQDVNTA VAWYQQKPGK APKLLIYSAS
201 FLYSGVPSRF SGSRSGTDFT LTISSLQPED FATYYCQQHY TTPPTFGQGT
251 KVEIKSGGGS GSGGAAA

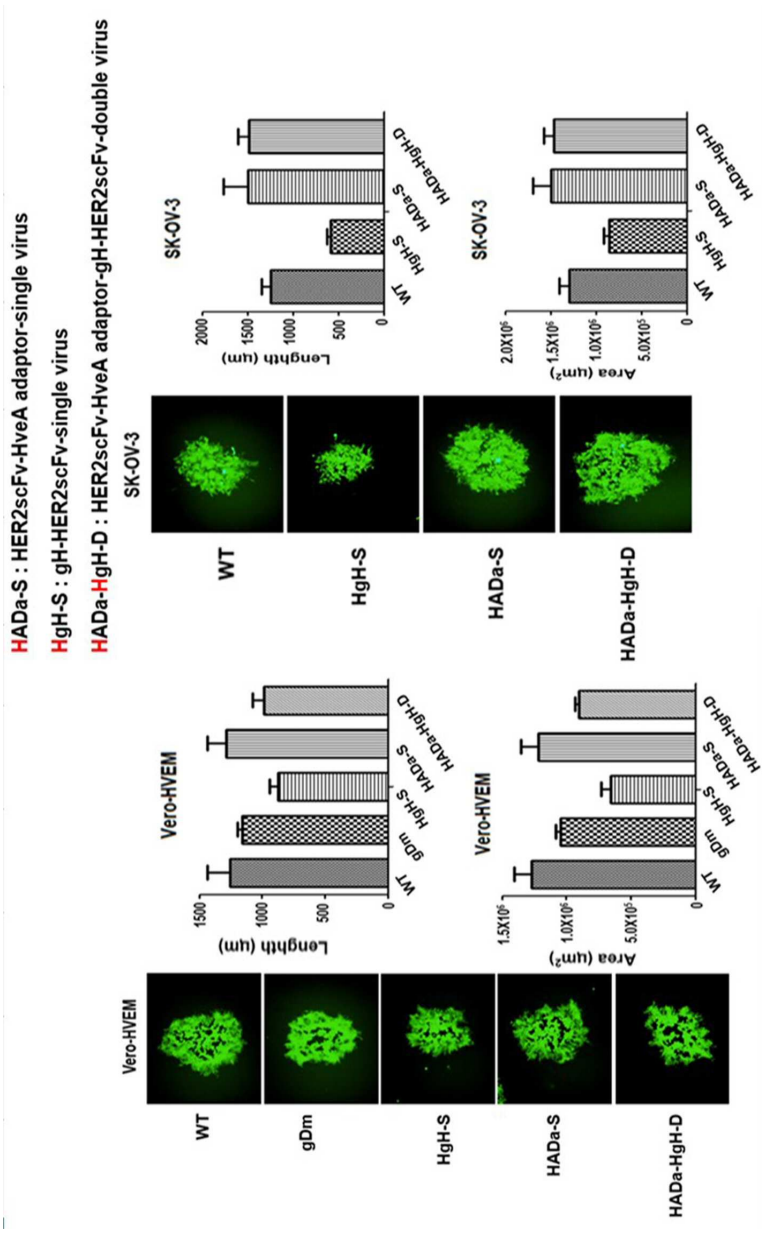
도면9


EpCAM 싱글 타겟팅 바이러스
IR
UL3
UL4
gH
UL26
TK pA
EmGFP
pCMV
IR
IR
HVEM-restricted gD mutant
Marker
VL
VH
EpCAM-scFv
EpCAM 더블 타겟팅 바이러스
IR
UL3
pCMV
scEpCAM
linker
BGH pA
UL4
gH
UL26
TK pA
EmGFP
pCMV
IR
IR
HVEM-restricted gD mutant
Adaptor
Marker
VL
VH
EpCAM-scFv

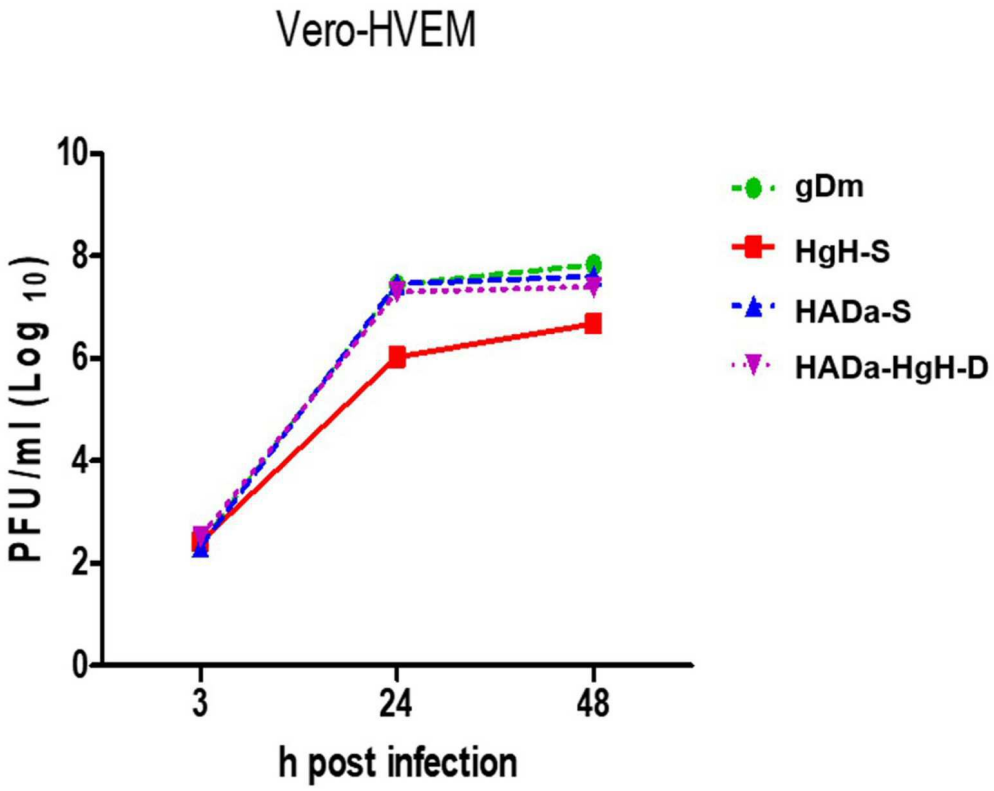
도면10

EpCAMscFv (amino acid sequence)
VL
VH
링커
N-말단링커
C-말단링커
1 AAASSGGGSG SGDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRSTKS LLHSNGITYL
51 YWYQQKPGKA PKLLIYQMSN LASGVPSRFS SSGSGTDFTL TISSLQPEDF
101 ATYYCAQNLE IPRTFGQGTK VELKRATPSH NSHQVPSAGG PTANSGTSGS
151 EVQLVQSGPG LVQPGGSVRI SCAASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGLEWMGW
201 INTYTGESTY ADSFKGRFTF SLDTSASAAY LQINSLRAED TAVYYCARFA
251 IKGDYWGQGT LLTVSSSSGG GSGSGGSAAA

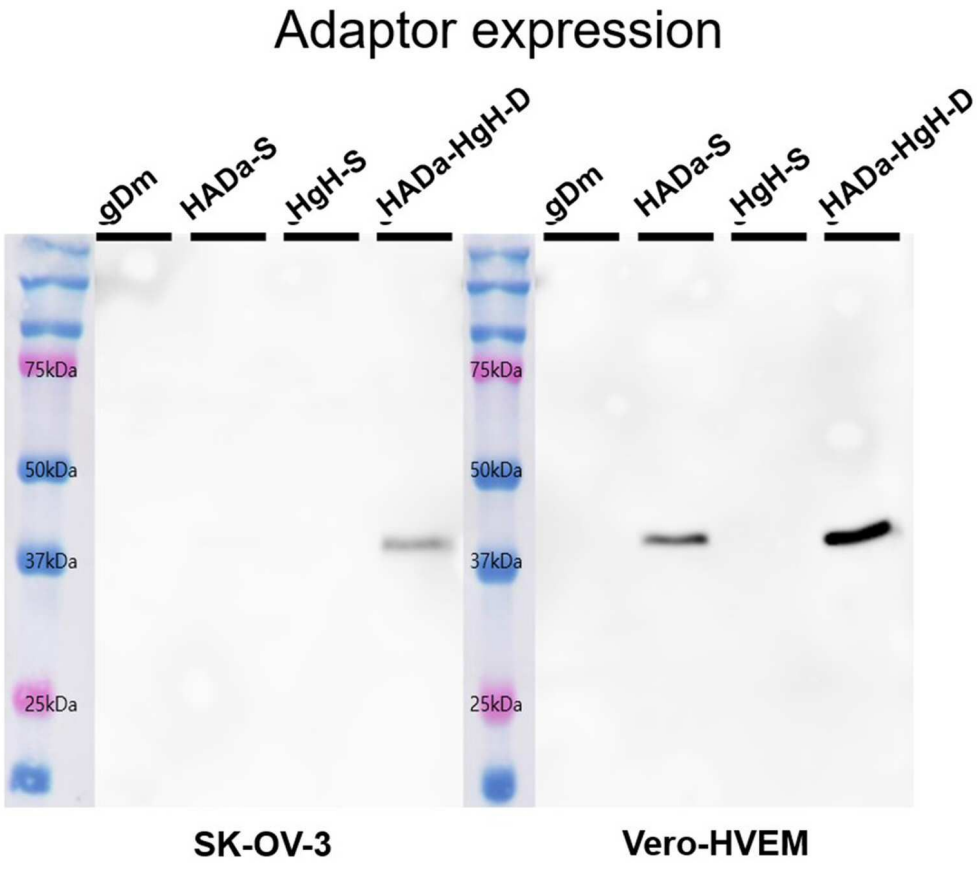
도면11


HADa-S : HER2scFv-HveA adaptor-single virus
HgH-S : gH-HER2scFv-single virus
HADa-HgH-D : HER2scFv-HveA adaptor-gH-HER2scFv-double virus
SK-OV-3
WT
HgH-S
HADa-S
HADa-HgH-D
Length (um)
Area (um²)
Vero-HVEM
gDm
WT
HgH-S
HADa-S
HADa-HgH-D

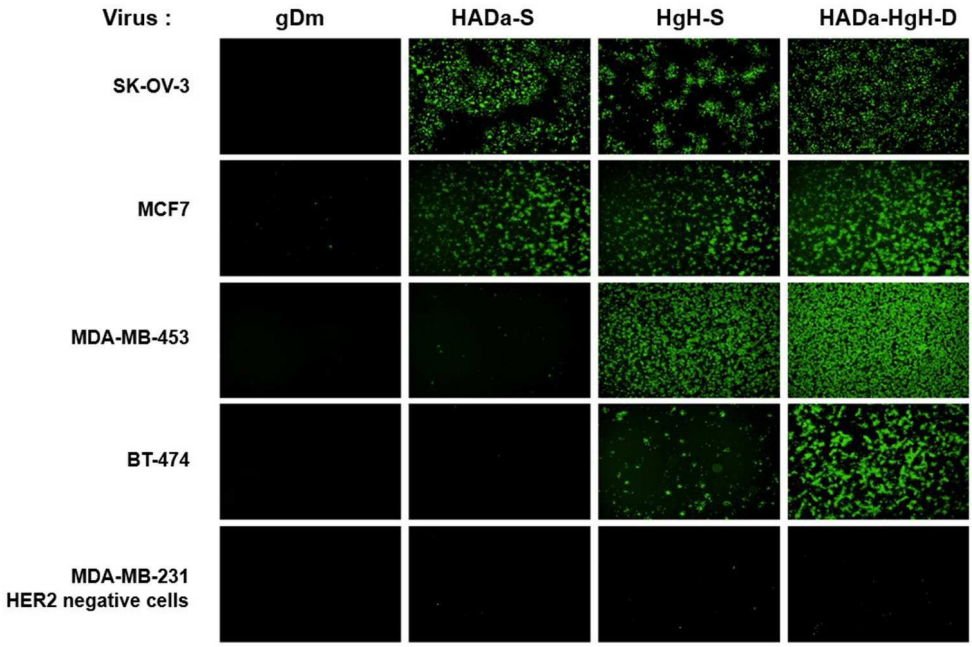
도면12


Vero-HVEM
PFU/ml (Log 10)
10
8
6
4
2
0
3
24
48
h post infection
gDm
HgH-S
HADa-S
HADa-HgH-D

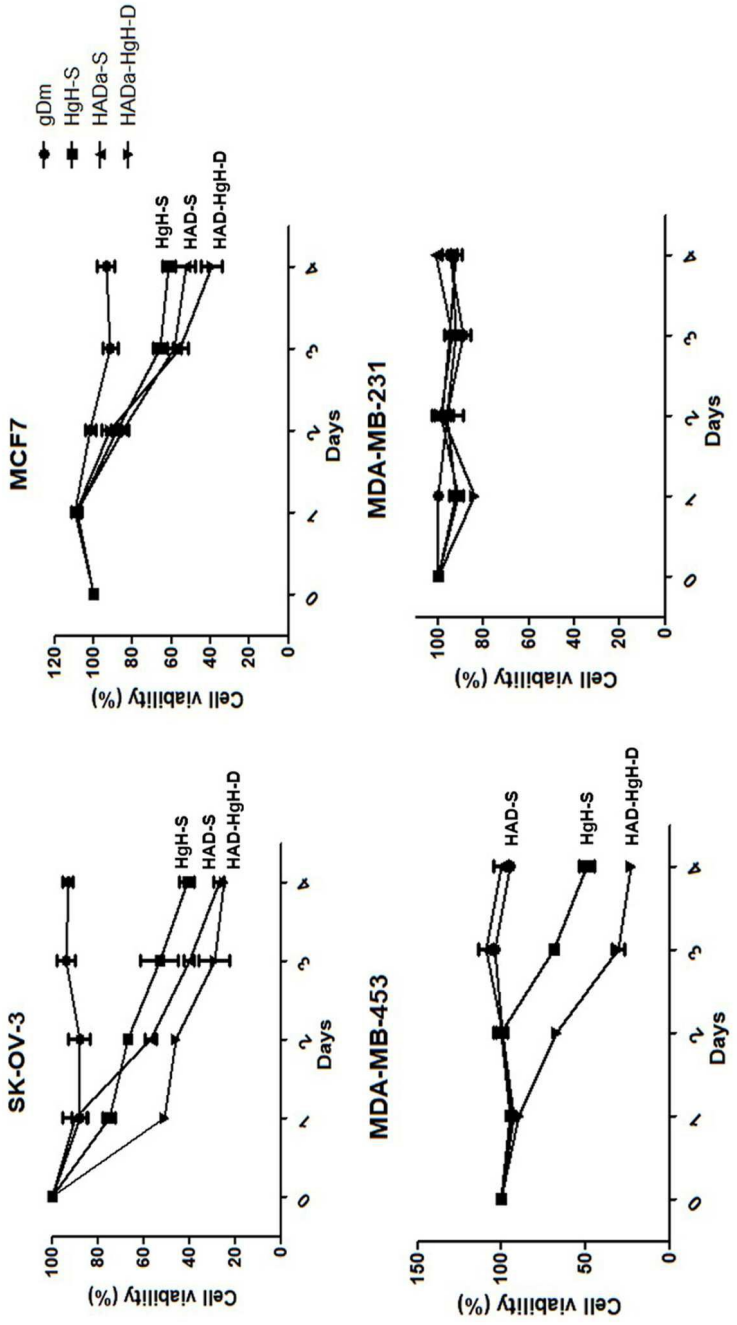
도면13


Adaptor expression
gDm
HADa-S
HgH-S
HADa-HgH-D
gDm
HADa-S
HgH-S
HADa-HgH-D
75kDa
50kDa
37kDa
25kDa
75kDa
50kDa
37kDa
25kDa
SK-OV-3
Vero-HVEM

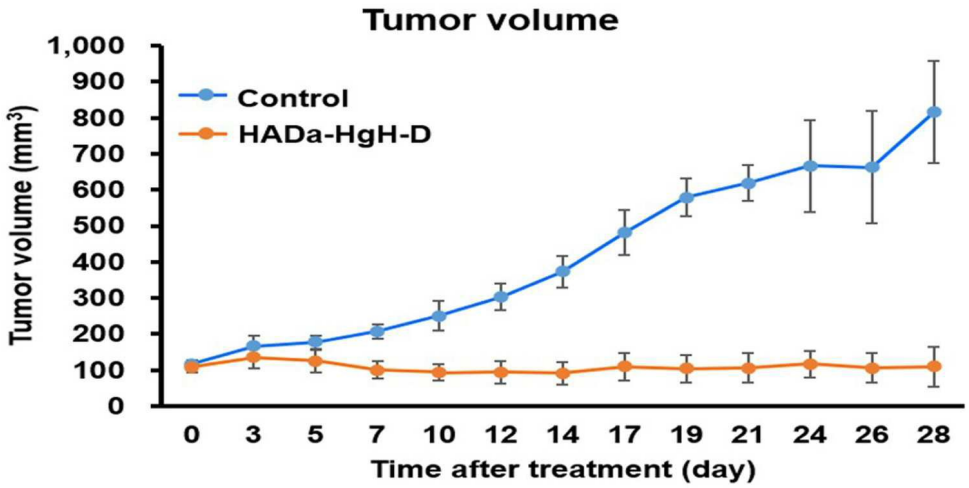
도면14


Virus :
gDm
HADa-S
HgH-S
HADa-HgH-D
SK-OV-3
MCF7
MDA-MB-453
BT-474
MDA-MB-231
HER2 negative cells

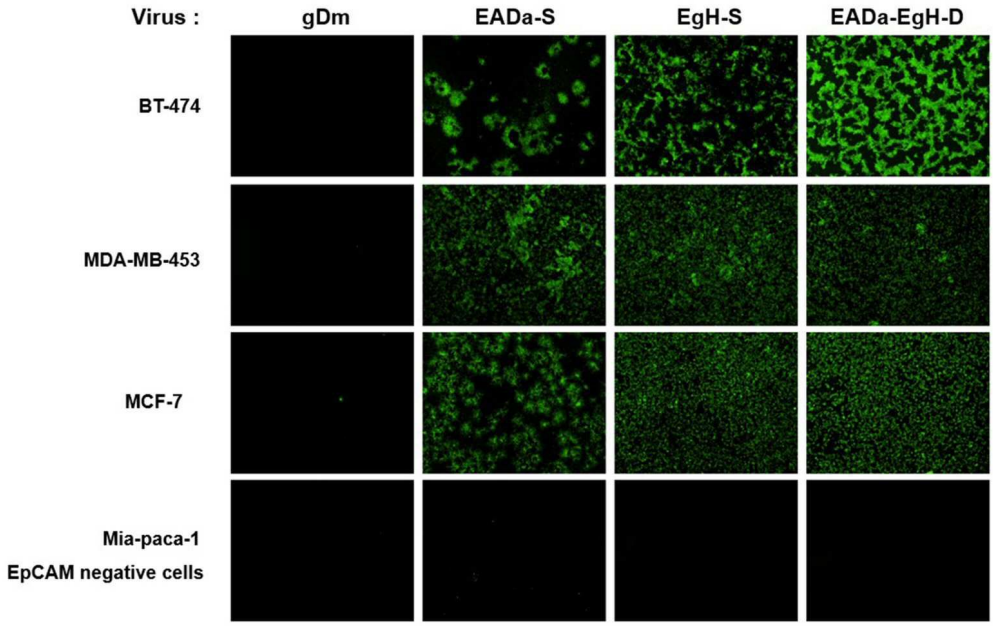
도면15


gDm
HgH-S
HADa-S
HADa-HgH-D
MCF7
HgH-S
HAD-S
HAD-HgH-D
Cell viability (%)
Days
MDA-MB-231
SK-OV-3
MDA-MB-453

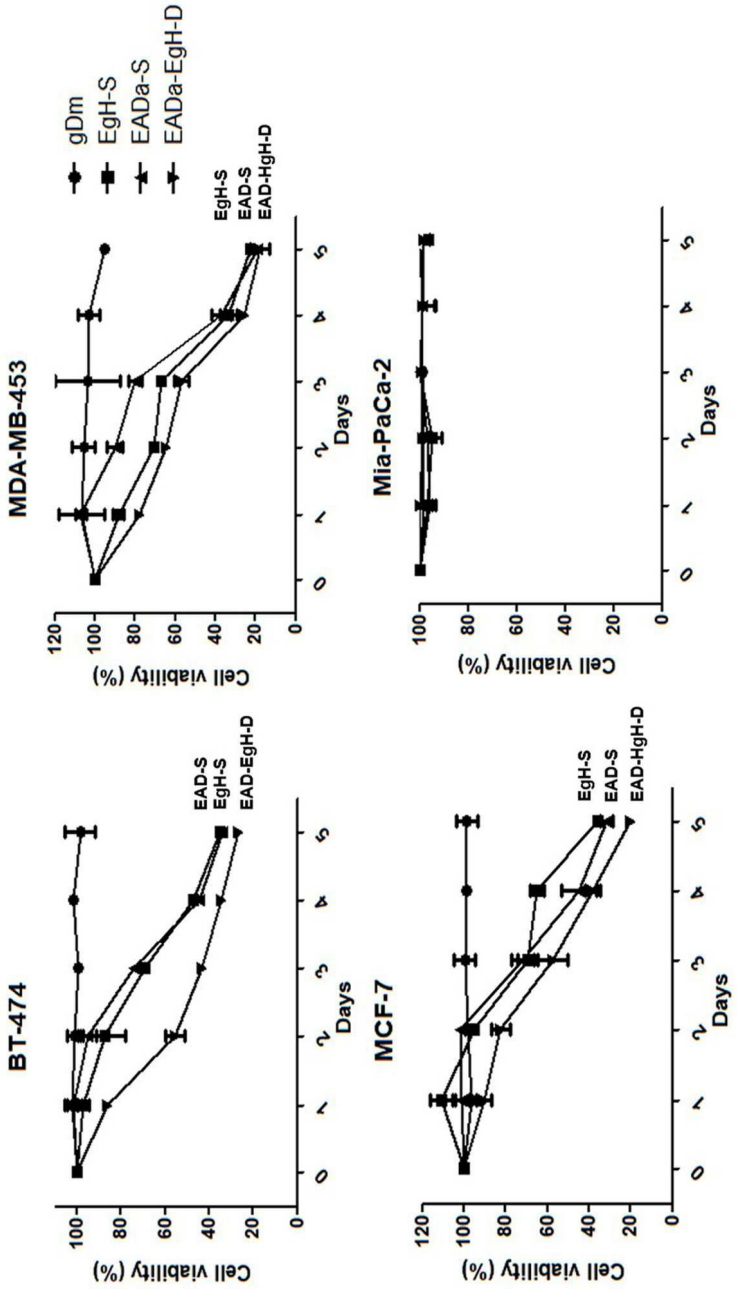
도면16


Tumor volume
Control
HADa-HgH-D
Tumor volume (mm3)
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 3 5 7 10 12 14 17 19 21 24 26 28
Time after treatment (day)

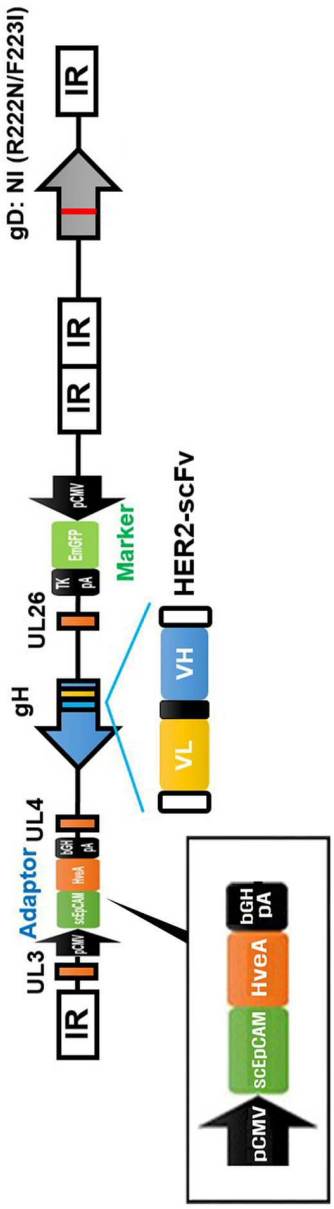
도면17


Virus :
gDm
EADa-S
EgH-S
EADa-EgH-D
BT-474
MDA-MB-453
MCF-7
Mia-paca-1
EpCAM negative cells

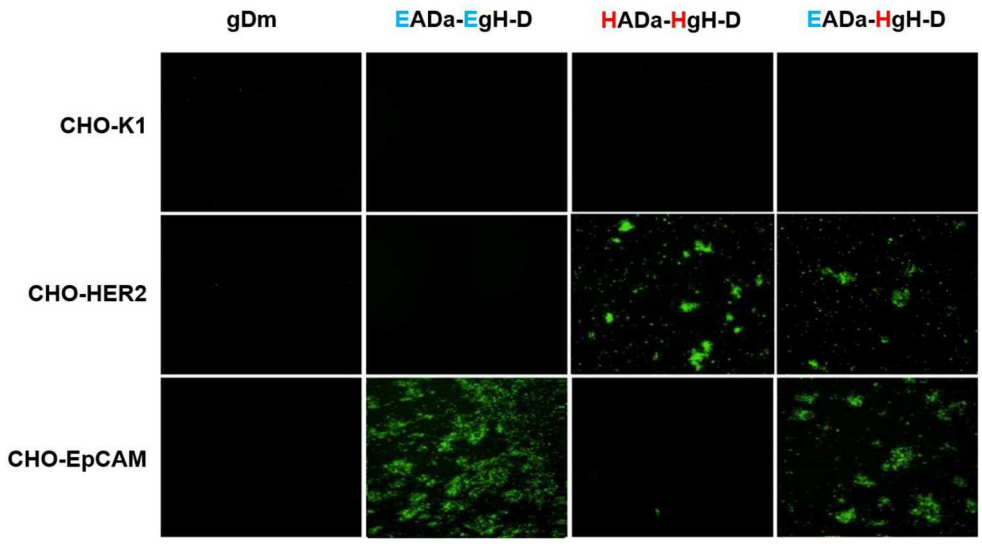
도면18


MDA-MB-453
gDm
EgH-S
EADa-S
EADa-EgH-D
EgH-S
EAD-S
EAD-HgH-D
Cell viability (%)
Days
Mia-PaCa-2
BT-474
EAD-S
EgH-S
EAD-EgH-D
MCF-7

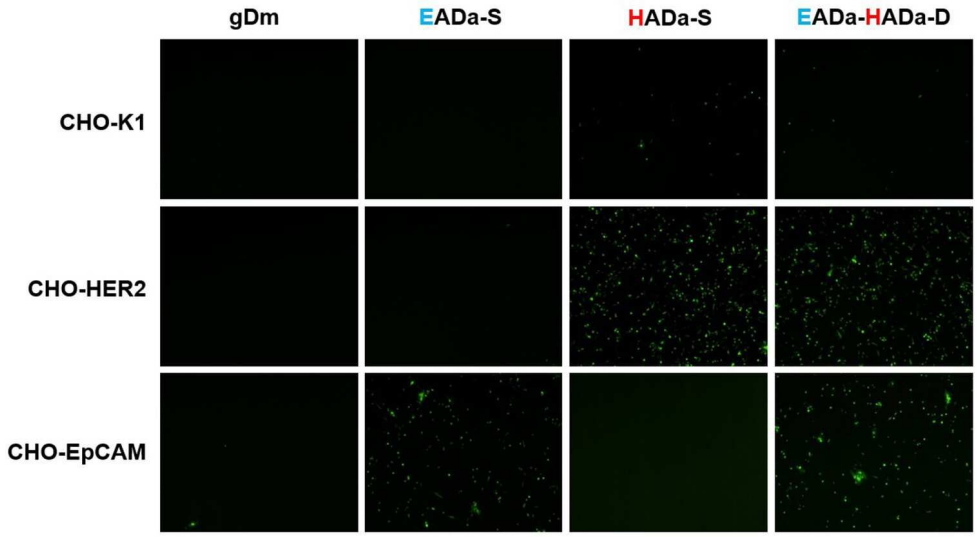
도면19


gD: NI (R222N/F223I)
IR
IR
IR
pCMV
EmGFP
TK pA
Marker
UL26
gH
HER2-scFv
VH
VL
Adaptor UL4
bGH pA
HveA
scEpCAM
pCMV
UL3
IR
bGH DA
HveA
scEpCAM
pCMV

도면20



도면21



서 열 목 록

<110> KOREA, Gencellmed

<120> Recombinant Herpes Simplex Virus Containing Expression Cassette Expressing a Fused Protein of Tumor Cell-targeting Domain and Extracellular Damain of HVEM and Use of the Same

<130> PP20-000

<160> 46

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gB

<400> 1

Met His Gln Gly Ala Pro Ser Trp Gly Arg Arg Trp Phe Val Val Trp
1 5 10 15

Ala Leu Leu Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Val Ala Ser Ala Ala Pro
20 25 30

Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr
50 55 60

Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro
65 70 75 80

Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr

85 90 95

Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn
100 105 110

Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu
115 120 125

Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu
130 135 140

Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys
145 150 155 160

Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly
165 170 175

His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val
180 185 190

Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg
195 200 205

Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His
210 215 220

Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala

225 230 235 240

Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro

245 250 255

Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile

260 265 270

Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val

275 280 285

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

290 295 300

Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Thr Ala Asp Arg Phe Lys

305 310 315 320

Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala

325 330 335

Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val

340 345 350

Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys

355 360 365

Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe

370 375 380

Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr

385 390 395 400

Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp

405 410 415

Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr

420 425 430

His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly Phe

435 440 445

Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr

450 455 460

Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Arg Lys Pro Pro Asn Pro Thr

465 470 475 480

Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys

485 490 495

Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His

500 505 510

Ile Gln Arg His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp

515 520 525

Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys

530 535 540

Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Val Thr Val Gly Arg Arg Val Ser

545 550 555 560

Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val

565 570 575

Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser Arg

580 585 590

Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp

595 600 605

Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg

610 615 620

Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr

625 630 635 640

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser

645 650 655

His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp

660 665 670

Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val

675 680 685

Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu

690 695 700

Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp

705 710 715 720

Thr Val Ile His Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Gly

725 730 735

Ala Phe Phe Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val
740 745 750
Val Met Gly Ile Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser
755 760 765
Ser Phe Met Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val
770 775 780
Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Met Arg
785 790 795 800
Leu Gln Ser Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu

805 810 815
Leu Lys Asn Pro Thr Asn Pro Asp Ala Ser Gly Glu Gly Glu Glu Gly
820 825 830
Gly Asp Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg
835 840 845
Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Lys
850 855 860
Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ala Lys Val Thr Asp Met Val
865 870 875 880

Met Arg Lys Arg Arg Asn Thr Asn Tyr Thr Gln Val Pro Asn Lys Asp
885 890 895
Gly Asp Ala Asp Glu Asp Asp Leu
900

<210> 2
<211> 511
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> gC
<400> 2

Met Ala Pro Gly Arg Val Gly Leu Ala Val Val Leu Trp Ser Leu Leu
1 5 10 15
Trp Leu Gly Ala Gly Val Ala Gly Gly Ser Glu Thr Ala Ser Thr Gly

20 25 30

Pro Thr Ile Thr Ala Gly Ala Val Thr Asn Ala Ser Glu Ala Pro Thr
35 40 45
Ser Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Glu Val Thr Pro Thr Ser
50 55 60
Thr Pro Asn Pro Asn Asn Val Thr Gln Asn Lys Thr Thr Pro Thr Glu
65 70 75 80
Pro Ala Ser Pro Pro Thr Thr Pro Lys Pro Thr Ser Thr Pro Lys Ser
85 90 95
Pro Pro Thr Ser Thr Pro Asp Pro Lys Pro Lys Asn Asn Thr Thr Pro

100 105 110
Ala Lys Ser Gly Arg Pro Thr Lys Pro Pro Gly Pro Val Trp Cys Asp
115 120 125
Arg Arg Asp Pro Leu Ala Arg Tyr Gly Ser Arg Val Gln Ile Arg Cys
130 135 140
Arg Phe Arg Asn Ser Thr Arg Met Glu Phe Arg Leu Gln Ile Trp Arg
145 150 155 160
Tyr Ser Met Gly Pro Ser Pro Pro Ile Ala Pro Ala Pro Asp Leu Glu
165 170 175

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

245 250 255
Thr Trp Val Arg Val Arg Met Phe Arg Pro Pro Ser Leu Thr Leu Gln
260 265 270

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

His Pro Asp Gly Phe Thr Thr Val Ser Thr Val Thr Ser Glu Ala Val
325 330 335
Gly Gly Gln Val Pro Pro Arg Thr Phe Thr Cys Gln Met Thr Trp His
340 345 350
Arg Asp Ser Val Met Phe Ser Arg Arg Asn Ala Thr Gly Leu Ala Leu
355 360 365
Val Leu Pro Arg Pro Thr Ile Thr Met Glu Phe Gly Val Arg His Val
370 375 380
Val Cys Thr Ala Gly Cys Val Pro Glu Gly Val Thr Phe Ala Trp Phe

385 390 395 400
Leu Gly Asp Asp Pro Ser Pro Ala Ala Lys Ser Ala Val Thr Ala Gln
405 410 415
Glu Ser Cys Asp His Pro Gly Leu Ala Thr Val Arg Ser Thr Leu Pro
420 425 430
Ile Ser Tyr Asp Tyr Ser Glu Tyr Ile Cys Arg Leu Thr Gly Tyr Pro
435 440 445
Ala Gly Ile Pro Val Leu Glu His His Gly Ser His Gln Pro Pro Pro
450 455 460

Arg Asp Pro Thr Glu Arg Gln Val Ile Glu Ala Ile Glu Trp Val Gly
465 470 475 480
Ile Gly Ile Gly Val Leu Ala Ala Gly Val Leu Val Val Thr Ala Ile
485 490 495
Val Tyr Val Val Arg Thr Ser Gln Ser Arg Gln Arg His Arg Arg
500 505 510

<210> 3

<211> 838

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH

<400> 3

Met Gly Asn Gly Leu Trp Phe Val Gly Val Ile Leu Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

Trp Gly Gln Val His Asp Trp Thr Glu Gln Thr Asp Pro Trp Phe Leu

20 25 30

Asp Gly Leu Gly Met Asp Arg Met Tyr Trp Arg Asp Thr Asn Thr Gly

35 40 45

Arg Leu Trp Leu Pro Asn Thr Pro Asp Pro Gln Lys Pro Pro Arg Gly

50 55 60

Phe Leu Ala Pro Pro Asp Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala Ser Leu Pro

65 70 75 80

Leu Leu Arg Trp Tyr Glu Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu Val Thr Thr

85 90 95

Ala Glu Phe Pro Arg Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile Ser Lys Thr

100 105 110

Tyr Leu Leu Gly Arg Pro Pro Asn Ala Ser Leu Pro Ala Pro Ile Thr

115 120 125

Val Glu Pro Thr Ala Gln Pro Pro Pro Ala Val Ala Pro Leu Lys Gly

130 135 140

Leu Leu His Asn Pro Thr Ala Ser Val Leu Leu Arg Ser Arg Ala Trp

145 150 155 160

Val Thr Phe Ser Ala Val Pro Asp Pro Glu Ala Leu Thr Phe Pro Arg

165 170 175

Gly Asp Asn Val Ala Thr Ala Ser His Pro Ser Gly Pro Arg Asp Thr

180 185 190

Pro Pro Pro Arg Pro Pro Val Gly Ala Arg Arg His Pro Thr Thr Glu

195 200 205

Leu Asp Ile Thr His Leu His Asn Ala Ser Thr Thr Trp Leu Ala Thr

210 215 220

Arg Gly Leu Leu Arg Ser Pro Gly Arg Tyr Val Tyr Phe Ser Pro Ser
225 230 235 240
Ala Ser Thr Trp Pro Val Gly Ile Trp Thr Thr Gly Glu Leu Val Leu
245 250 255
Gly Cys Asp Ala Ala Leu Val Arg Ala Arg Tyr Gly Arg Glu Phe Met
260 265 270
Gly Leu Val Ile Ser Met His Asp Ser Pro Pro Val Glu Val Met Val
275 280 285
Val Pro Ala Gly Gln Thr Leu Asp Arg Val Gly Asp Pro Ala Asp Glu

290 295 300
Asn Pro Pro Gly Ala Leu Pro Gly Pro Pro Gly Gly Pro Arg Tyr Arg
305 310 315 320
Val Phe Val Leu Gly Ser Leu Thr Arg Ala Asp Asn Gly Ser Ala Leu
325 330 335
Asp Ala Leu Arg Arg Val Gly Gly Tyr Pro Glu Glu Gly Thr Asn Tyr
340 345 350
Ala Gln Phe Leu Ser Arg Ala Tyr Ala Glu Phe Phe Ser Gly Asp Ala
355 360 365

Gly Ala Glu Gln Gly Pro Arg Pro Pro Leu Phe Trp Arg Leu Thr Gly
370 375 380
Leu Leu Ala Thr Ser Gly Phe Ala Phe Val Asn Ala Ala His Ala Asn
385 390 395 400
Gly Ala Val Cys Leu Ser Asp Leu Leu Gly Phe Leu Ala His Ser Arg
405 410 415
Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Asp
420 425 430
Ser Val Phe Phe Asn Val Ser Val Leu Asp Pro Thr Ala Arg Leu Gln

435 440 445
Leu Glu Ala Arg Leu Gln His Leu Val Ala Glu Ile Leu Glu Arg Glu
450 455 460

Gln Ser Leu Ala Leu His Ala Leu Gly Tyr Gln Leu Ala Phe Val Leu
465 470 475 480
Asp Ser Pro Ser Ala Tyr Asp Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala His Leu
485 490 495
Ile Asp Ala Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Gly Gly Arg Val Leu Thr Thr
500 505 510

Pro Val Val His Arg Ala Leu Phe Tyr Ala Ser Ala Val Leu Arg Gln
515 520 525
Pro Phe Leu Ala Gly Val Pro Ser Ala Val Gln Arg Glu Arg Ala Arg
530 535 540
Arg Ser Leu Leu Ile Ala Ser Ala Leu Cys Thr Ser Asp Val Ala Ala
545 550 555 560
Ala Thr Asn Ala Asp Leu Arg Thr Ala Leu Ala Arg Ala Asp His Gln
565 570 575
Lys Thr Leu Phe Trp Leu Pro Asp His Phe Ser Pro Cys Ala Ala Ser
580 585 590
Leu Arg Phe Asp Leu Asp Glu Ser Val Phe Ile Leu Asp Ala Leu Ala
595 600 605
Gln Ala Thr Arg Ser Glu Thr Pro Val Glu Val Leu Ala Gln Gln Thr
610 615 620
His Gly Leu Ala Ser Thr Leu Thr Arg Trp Ala His Tyr Asn Ala Leu
625 630 635 640
Ile Arg Ala Phe Val Pro Glu Ala Ser His Arg Cys Gly Gly Gln Ser
645 650 655

Ala Asn Val Glu Pro Arg Ile Leu Val Pro Ile Thr His Asn Ala Ser
660 665 670
Tyr Val Val Thr His Ser Pro Leu Pro Arg Gly Ile Gly Tyr Lys Leu
675 680 685
Thr Gly Val Asp Val Arg Arg Pro Leu Phe Leu Thr Tyr Leu Thr Ala
690 695 700
Thr Cys Glu Gly Ser Thr Arg Asp Ile Glu Ser Lys Arg Leu Val Arg
705 710 715 720

Thr Gln Asn Gln Arg Asp Leu Gly Leu Val Gly Ala Val Phe Met Arg

725 730 735

Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Val Met Ser Val Leu Leu Val Asp Thr Asp

740 745 750

Asn Thr Gln Gln Gln Ile Ala Ala Gly Pro Thr Glu Gly Ala Pro Ser

755 760 765

Val Phe Ser Ser Asp Val Pro Ser Thr Ala Leu Leu Leu Phe Pro Asn

770 775 780

Gly Thr Val Ile His Leu Leu Ala Phe Asp Thr Gln Pro Val Ala Ala

785 790 795 800

Ile Ala Pro Gly Phe Leu Ala Ala Ser Ala Leu Gly Val Val Met Ile

805 810 815

Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ile Leu Lys Val Leu Arg Thr Ser Val Pro

820 825 830

Phe Phe Trp Arg Arg Glu

835

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 VH

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 VL

<400> 5

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCAM VL

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

<210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> EpCAM VH
<400> 7
Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val
1 5 10 15
Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
20 25 30
Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
35 40 45
Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly

50 55 60
Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95
Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 8
<211> 82
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> HveA 82
<400> 8
Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys
1 5 10 15
Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu
20 25 30
Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His
35 40 45
Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala
50 55 60

Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val
65 70 75 80
Cys Gly

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> leader sequence _ HveA82
<400> 9
Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro
1 5 10 15
Arg Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala

20 25 30

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

100 105 110
Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly
115 120

<210> 10
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HveA 87
<400> 10
Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys
1 5 10 15
Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu
20 25 30
Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His

35 40 45
Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala
50 55 60
Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val
65 70 75 80
Cys Gly Cys Ser Pro Gly His
85

<210> 11

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader sequence - HveA 87

<400> 11

Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro

1 5 10 15

Arg Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala

20 25 30

Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro

35 40 45

Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys

50 55 60

Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro

65 70 75 80

Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys

85 90 95

Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser

100 105 110

Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His

115 120 125

<210> 12

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HveA 102

<400> 12

Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys

1 5 10 15

Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu

20 25 30

Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His

35 40 45

Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala

50 55 60

Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val

65 70 75 80

Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile Val Gln Asp Gly Asp His

85 90 95

Cys Ala Ala Cys Arg Ala

100

<210> 13

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader sequence - HveA 102

<400> 13

Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro

1 5 10 15

Arg Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala

20 25 30

Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro

35 40 45

Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys

50 55 60

Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro

65 70 75 80

Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys

85 90 95

Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser

100 105 110

Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile

115 120 125

Val Gln Asp Gly Asp His Cys Ala Ala Cys Arg Ala

130 135 140

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HveA 107

<400> 14

Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys
1 5 10 15

Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu
20 25 30

Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His
35 40 45

Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala
50 55 60

Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val
65 70 75 80

Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile Val Gln Asp Gly Asp His
85 90 95

Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser Ser
100 105

<210> 15

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader sequence - HveA 107

<400> 15

Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro
1 5 10 15

Arg Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala
20 25 30

Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro

35 40 45

Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys

50 55 60

Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro

65 70 75 80

Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys

85 90 95

Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser

100 105 110

Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile

115 120 125

Val Gln Asp Gly Asp His Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser

130 135 140

Ser

145

<210> 16

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gD (ASM47818)

<400> 16

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg

1 5 10 15

Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro

20 25 30

Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe

35 40 45

Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg

50 55 60

Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile

65 70 75 80

Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr

85 90 95

Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val

100 105 110

Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro

115 120 125

Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val

130 135 140

Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr

145 150 155 160

Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile

165 170 175

Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala

180 185 190

Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr

195 200 205

Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile

210 215 220

Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly

225 230 235 240

Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu

245 250 255

Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro

275 280 285

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr

290 295 300

Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly

305 310 315 320

Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val

325 330 335

Tyr Trp Met His Arg Arg Thr Arg Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu

340 345 350

Pro His Ile Arg Glu Asp Asp Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe

355 360 365

Tyr

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gD-rpsL For

<400> 17

cccaggccta ccagcagggg gtgacggtgg acagcatcgg gatgctgccc ggcctggtga 60

60

<210> 18

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gD-rpsL Rev

<400> 18

ccggcgatct tcaagctgta tacggcgacg gtgcgctggt tctcggggat tcagaagaac 60

tcgtcaagaa ggcgtgatgg cgggatcg 88

<210> 19

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gD R222N_F223I_mutant

<400> 19

cccaggccta ccagcagggg gtgacggtgg acagcatcgg gatgctgccc aatatcatcc 60

ccgagaacca gcgcaccgtc gccgtataca gcttgaagat cgccgg 106

<210> 20

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL26/27-rpsL_For

<400> 20

gcgtgggggg gaggaaatcg gcactgacca agggggtccg ttttgtcacg tcagaagaac 60

tcgtcaagaa ggcg 74

<210> 21

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL26/27-rpsL_Rev

<400> 21

aacacataaa ctcccccggg tgtccgcggc ctgtttcctc tttcctttcc ggcctggtga 60

tgatggcggg atcg 74

<210> 22

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL26/27-tkpA_For

<400> 22

gcgtgggggg gaggaaatcg gcactgacca agggggtccg ttttgtcacg gcctcagaag 60

ccatagagcc cacc 74

<210> 23

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL26/27-pCMV_Rev

<400> 23

aacacataaa ctcccccggg tgtccgcggc ctgtttcctc tttcctttcc tatacgcgtt 60

gacattgatt attg 74

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 Linker

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCAM Linker

<400> 25

Ala Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro

1 5 10 15

Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val

20 25

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv leader sequence

<400> 26

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys

20

<210> 27

<211> 351

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ HER2scFv-HveA adapter

<400> 27

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn

35 40 45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr

65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln

180 185 190

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe

195 200 205

Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr

210 215 220

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly

245 250 255

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Phe Leu Pro Ser

260 265 270

Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys

275 280 285

Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr

290 295 300

Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly

305 310 315 320

Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu

325 330 335

Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly

340 345 350

<210> 28

<211> 1053

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ HER2scFv-HveA adapter

<400> 28

atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60

gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 120

tcttgtgccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccgacaggcc 180

cctggcaaag gacttgaatg ggtcgccaga atctacccca ccaacggcta caccagatac 240

gccgactctg tgaagggcag attcaccatc agcgccgaca ccagcaagaa caccgcctac 300

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgttc tagatgggga 360

ggcgacggct tctacgccat ggattattgg ggccagggca ccctggtcac agtttctagc 420

ggaggcggag gttctggcgg cggaggaagt ggtggcggag gctctgatat ccagatgaca 480

cagagcccca gcagcctgtc tgcctctgtg ggagacagag tgaccatcac ctgtagagcc 540

agccaggacg tgaacacagc cgtggcttgg tatcagcaga agcctggcaa ggcccctaag 600

ctgctgatct acagcgccag ctttctgtac agcggcgtgc ccagcagatt cagcggctct 660

agaagcggca ccgacttcac cctgaccata agcagtctgc agcccgagga cttcgccacc 720

tactactgtc agcagcacta caccacacct ccaaccttcg gacagggcac caaggtggaa 780

atcaagggtg gtggcggttc agaattcctg ccgtcctgca aggaggacga gtacccagtg 840

ggctccgagt gctgccccaa gtgcagtcca ggttatcgtg tgaaggaggc ctgcggggag 900

ctgacgggca cagtgtgtga accctgccct ccaggcacct acattgccca cctcaatggc 960

ctaagcaagt gtctgcagtg ccaaatgtgt gacccagcca tgggcctgcg cgcgagccgg 1020

aactgctcca ggacagagaa cgccgtgtgt ggc 1053

<210> 29

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ EpCAMscFv-HveA adapter

<400> 29

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro
130 135 140

Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val
165 170 175

Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met

180 185 190

Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp

195 200 205

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly

210 215 220

Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln

225 230 235 240

Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

245 250 255

Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val

260 265 270

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Phe Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp

275 280 285

Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr

290 295 300

Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro

305 310 315 320

Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys

325 330 335

Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg

340 345 350

Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly His His His His His

355 360 365

His

<210> 30

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ EpCAMscFv-HveA adapter

<400> 30

atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60

gatatccaga tgacccagtc cccgtcctcc ctgagtgctt ctgttggtga ccgtgttacc 120

atcacctgcc gttccaccaa atccctcctg cactccaacg gtatcaccta cctttattgg 180

tatcaacaga aaccgggtaa agctccgaaa cttctgatct accagatgtc caacctggct 240

tccggtgttc cgtctcgttt ctccagttct ggttctggta ccgacttcac cctgaccatc 300

tcttctctgc agccggaaga cttcgctacc tactactgcg ctcagaacct ggaaatcccg 360

cgtaccttcg gtcagggtac caaagttgaa cttaagcgcg ctaccccgtc tcacaactcc 420

caccaggttc catccgcagg cggtccgact gctaactctg gaactagtgg atccgaagta 480

cagctggttc agtccggccc gggtcttgtt caaccgggtg gttccgttcg tatctcttgc 540

gctgcttctg gttacacgtt caccaactac ggcatgaact gggtcaaaca ggctccgggt 600

aaaggcctgg aatggatggg ctggatcaac acctacaccg gtgaatccac ctacgctgac 660

tccttcaaag gtcgcttcac tttctccctc gacacaagtg ctagtgctgc atacctccaa 720

atcaactcgc tgcgtgcaga ggatacagca gtctattact gcgcccgttt cgctatcaaa 780

ggtgactact ggggtcaagg cacgctgctg accgtttcct cgggtggtgg cggttcagaa 840

ttcctgccgt cctgcaagga ggacgagtac ccagtgggct ccgagtgctg ccccaagtgc 900

agtccaggtt atcgtgtgaa ggaggcctgc ggggagctga cgggcacagt gtgtgaaccc 960

tgccctccag gcacctacat tgcccacctc aatggcctaa gcaagtgtct gcagtgccaa 1020

atgtgtgacc cagccatggg cctgcgcgcg agccggaact gctccaggac agagaacgcc 1080

gtgtgtggc 1089

<210> 31

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL3/4-rpsL-neo_for

<400> 31

taaataacac ataaatttgg ctggttgttt gttgtcttta atggaccgcc cgcaaggcct 60

ggtgatgatg gcgggatcg 79

<210> 32

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL3/4-rpsL-neo_rev

<400> 32

taggatcccg gccggatcgc gctcgtcacc cgacactgaa acgccccccc cccctcagaa 60

gaactcgtca agaaggcg 78

<210> 33

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL3/4-HM_pCMV_For

<400> 33

taaataacac ataaatttgg ctggttgttt gttgtcttta atggaccgcc cgcaatatac 60

gcgttgacat tgattattg 79

<210> 34

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL3/4_bGH_poly_R

<400> 34

taggatcccg gccggatcgc gctcgtcacc cgacactgaa acgccccccc ccccgcctca 60

gaagccatag agcccacc 78

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2scFv _ N terminus linker

<400> 35

Ala Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2scFv _ C terminus linker

<400> 36

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ HER2scFv ligand

<400> 37

Ala Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln
1 5 10 15

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
20 25 30

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
35 40 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
50 55 60

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
65 70 75 80

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met

85 90 95

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
100 105 110

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
145 150 155 160

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
165 170 175

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
180 185 190

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr

225 230 235 240

Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser

245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Ala Ala

260 265

<210> 38

<211> 801

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence _ HER2scFv ligand

<400> 38

gcggccgcca gtagtggcgg tggctctggt tccggtggag aggtgcagct ggttgaatct 60

ggcggaggac tggttcagcc tggcggatct ctgagactgt cttgtgccgc cagcggcttc 120

aacatcaagg acacctacat ccactgggtc cgacaggccc ctggcaaagg acttgaatgg 180

gtcgccagaa tctaccccac caacggctac accagatacg ccgactctgt gaagggcaga 240

ttcaccatca gcgccgacac cagcaagaac accgcctacc tgcagatgaa cagcctgaga 300

gccgaggaca ccgccgtgta ctactgttct agatggggag gcgacggctt ctacgccatg 360

gattattggg gccagggcac cctggtcaca gtttctagcg gaggcggagg ttctggcggc 420

ggaggaagtg gtggcggagg ctctgatatc cagatgacac agagccccag cagcctgtct 480

gcctctgtgg gagacagagt gaccatcacc tgtagagcca gccaggacgt gaacacagcc 540

gtggcttggt atcagcagaa gcctggcaag gcccctaagc tgctgatcta cagcgccagc 600

tttctgtaca gcggcgtgcc cagcagattc agcggctcta gaagcggcac cgacttcacc 660

ctgaccataa gcagtctgca gcccgaggac ttcgccacct actactgtca gcagcactac 720

accacacctc caaccttcgg acagggcacc aaggtggaaa tcaagggtgg aggctctggt 780

tccggtggat ccgcggccgc g 801

<210> 39

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH29/30-rpsL-neo_For

<400> 39

tcgtgggggt tattcttttg ggcgttgcgt ggggtcaggt ccacgactgg ggcctggtga 60

tgatggcggg atc 73

<210> 40

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH29/30-rpsL-neo_Rev

<400> 40

ttcgtgtcgc gccagtacat gcggtccatg cccaggccat ccaaaaacca tcagaagaac 60

tcgtcaagaa ggcg 74

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH29/30-scFv_For

<400> 41

tcgtgggggt tattcttttg gg 22

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH29/30-scFv_Rev

<400> 42

ttcgtgtcgc gccagtacat g 21

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCAMscFv - N terminus linker

<400> 43

Ala Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EpCAMscFv - C terminus linker

<400> 44

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Whole sequence - EpCAMscFv ligand

<400> 45

Ala Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ile Gln Met

1 5 10 15

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

20 25 30

Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr

35 40 45

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

50 55 60

Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

65 70 75 80

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

85 90 95

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro

100 105 110

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr Pro

115 120 125

Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn
130 135 140
Ser Gly Thr Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

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

225 230 235 240
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser
260 265 270
Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ala Ala
275 280

<210> 46
<211> 840
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Whole sequence - EpCAMscFv ligand
<400>
> 46

gcggccgcca gtagtggcgg tggctctggt tccggtgata tccagatgac ccagtccccg 60
tcctccctga gtgcttctgt tggtgaccgt gttaccatca cctgccgttc caccaaatcc 120
ctcctgcact ccaacggtat cacctacctt tattggtatc aacagaaacc gggtaaagct 180
ccgaaacttc tgatctacca gatgtccaac ctggcttccg gtgttccgtc tcgtttctcc 240
agttctggtt ctggtaccga cttcaccctg accatctctt ctctgcagcc ggaagacttc 300
gctacctact actgcgctca gaacctggaa atcccgcgta ccttcggtca gggtaccaaa 360

gttgaactta agcgcgctac cccgtctcac aactcccacc aggttccatc cgcaggcggt 420

ccgactgcta actctggaac tagtggatcc gaagtacagc tggttcagtc cggcccgggt 480

cttgttcaac cgggtggttc cgttcgtatc tcttgcgctg cttctggtta cacgttcacc 540

aactacggca tgaactgggt caaacaggct ccgggtaaag gcctggaatg gatgggctgg 600

atcaacacct acaccggtga atccacctac gctgactcct tcaaaggtcg cttcactttc 660

tccctcgaca caagtgctag tgctgcatac ctccaaatca actcgctgcg tgcagaggat 720

acagcagtct attactgcgc ccgtttcgct atcaaaggtg actactgggg tcaaggcacg 780

ctgctgaccg tttcctcgtc ttccggtgga ggctctggtt ccggtggatc cgcggccgcg 840

840