



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월25일

(11) 등록번호 10-1961347

(24) 등록일자 2019년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/02 (2006.01) B01D 61/14 (2006.01)

C12Q 1/24 (2017.01)

(21) 출원번호 10-2014-7009146

(22) 출원일자(국제) 2012년09월07일

심사청구일자 2017년08월18일

(85) 번역문제출일자 2014년04월07일

(65) 공개번호 10-2014-0074333

(43) 공개일자 2014년06월17일

(86) 국제출원번호 PCT/NL2012/050619

(87) 국제공개번호 WO 2013/036118

국제공개일자 2013년03월14일

(30) 우선권주장

11180594.1 2011년09월08일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/532,176 2011년09월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010148143 A1\*

GESUNDHEITSSCHUTZ. 2009, vol. 53, no. 1, pages 38-44.

VACCINE. 2000, vol. 19, no. 7-8, pages 726-734.

BIOPHARM INTERNATIONAL. 2006, vol. 19, no. 10, pages 32-41.

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니큐어 아이피 비.브이.

네덜란드 암스테르담 1105 비피 파아슈벨베그 25  
에이

(72) 발명자

에르멘스, 빌헬무스 데오도루스 요하네스 마리아  
크리스티안네덜란드 앤엘-1105 비에이 암스테르담, 마이베르  
크드리프 61

스미스, 제임스 패트릭

네덜란드 앤엘-1105 비에이 암스테르담, 마이베르  
크드리프 61

(74) 대리인

특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 AAV 제조물로부터 오염 바이러스의 제거

**(57) 요약**

본 발명은 시료에 포함된 막대 형태 형상을 갖는 바이러스로부터 본질적으로 구형 형상의 바이러스를 분리하는 방법에 관한 것으로, 여기서 바이러스를 포함하는 시료는 여과에 가해진다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

파보바이러스 및 배클로바이러스 비리온의 집단을 포함하는 시료를 필터를 통해 여과하는 단계를 포함하며, 필터는 30-40nm의 공칭 포어 크기를 갖는, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 파보바이러스는 아데노 연관 바이러스인, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 배클로바이러스는 오토크래파 캘리포니카(*Autographa californica*) 멀티캡시드 뉴클레오폴리헤드로바이러스(AcmNPV)인, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 바이러스 필터 또는 한외 여과기인, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 표면 또는 적층형(depth) 필터인, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 구리암모늄-재생 셀룰로즈, 폴리비닐리덴플루오라이드, 폴리실폰, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 변성 폴리에테르실폰, 비변성 폴리에테르실폰, 셀룰로즈 아세테이트, 셀룰로즈 니트레이트, 폴리아미드 및 재생 셀룰로즈로 구성되는 그룹으로부터 선택된 물질을 포함하는, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 32 - 38nm의 공칭 포어 크기를 갖는, 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온

의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 구리암모늄-재생 셀룰로즈를 포함하는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 필터는 구리암모늄-재생 셀룰로즈 홀로우 섬유를 포함하는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 필터는 Planova 35 멤브레인 또는 Ultipor DV50 필터인, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료는 2 이상의 타입의 필터를 사용하여 여과되는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

여과 단계 전에 시료는 밀도 구배, 예비 여과(prefiltration), 크로마토그래피 단계, 및 이들 방법의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 방법을 사용하여 예비 정제되는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

여과 단계 전에 시료는 친화 크로마토그래피 또는 이온-교환 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 사용하여 예비 정제되는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

#### 청구항 14

제12항에 있어서,

상기 예비 여과는 70 - 200nm의 포어 크기를 갖는 필터를 통해 이루어지는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료의 pH는 6-10인, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료의 pH는 7-9인, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료의 pH는 7.5-8.5인, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 시료의 pH는 8인, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서,

1-200ml의 시료가 바이러스 필터 표면 1cm<sup>2</sup>당 여과되는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서,

80-120ml의 시료가 바이러스 필터 표면 1cm<sup>2</sup>당 여과되는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서,

적어도 85%의 파보바이러스가 용출되고, 배콜로바이러스의 타이터는 적어도 5logs 감소하는, 배콜로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법.

### 발명의 설명

## 기술 분야

[0001]

본 발명은 바이러스학 및 유전자 치료 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 예를 들어, 아데노 연관 바이러스 유전자 치료 벡터와 같은 본질적으로 구형상을 갖는 바이러스 제조물로부터, 예를 들어 배클로바이러스와 같은 막대 형태의 형상을 갖는 오염 바이러스를 제거하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002]

유전자 치료에 사용되는 바이러스 벡터의 제조시 복제-결핍 바이러스가 안전성의 이유로 사용된다. 복제-결핍 바이러스는 생체내에서 인간 세포에 감염될 수 있으며, 이식 유전자를 세포내로 이동시킬 수 있으나, 그 자체로 세포에서 복제는 불가능하다. 전형적으로, 이는 예를 들어, rep 및 cap 유전자와 같은 바이러스 복제에 중요한 바이러스 유전자를 제거함으로써 달성된다. 이는 또한, 바이러스 유전자 대신에 관심있는 유전자 산물(들)을 편입시키는 것을 가능케 한다. 숙주 세포에서 바이러스 파티클의 생성을 위해, 복제-결핍 바이러스로부터 제거된 바이러스 유전자는 예를 들어, 헬퍼 바이러스에 의해 제공됨으로써 별도로 제공될 필요가 있다.

[0003]

아데노 연관 바이러스(AAV)는 파보비리다에파에 속하는 비자주적으로 복제하는 바이러스이며, 약 18 내지 26nm의 직경을 갖는 구조 단백질의 외부 20면체 코트를 갖는 단일 가닥 DNA 분자로 구성된다. 와일드 타입 AAV 바이러스는 헬퍼 바이러스의 존재하에서 숙주 세포의 게놈내로 통합되거나 숙주 세포내로 복제될 수 있다. 아데노바이러스는 가능한 헬퍼 바이러스로서 처음에 확인되었다. 그러나, 인간 및 동물에 병원성인 헤르페스 바이러스와 같이 다른 본질적으로 구형 형상의 포유류 헬퍼 바이러스가 또한 적절하다. 최근에, 곤충 세포에서 배클로바이러스-기초 발현 시스템을 통한 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터 생성(Urabe et al. [2002] Hum Gene Ther. 13(16):1935-43)이 유전자 치료의 산업 적용에 쉽게 확장가능하기 때문에 인기가 점점 증가하고 있다. 이러한 생성 시스템에서, 전형적으로 AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및 AAV 역 말단 반복부(ITRs) 측면에 있는(flanked) 관심있는 (이식 유전자 DNA) 유전자 산물을 암호화하는 3개의 재조합 배클로바이러스가 사용된다.

[0004]

헬퍼 바이러스 또는 바이러스-기초 발현 시스템을 이용한 바이러스 벡터의 제조와 관련된 현저한 결점은 추가 정제해야만 하는 산물 바이러스 파티클 및 헬퍼 바이러스의 혼합 집단의 형성이다. 예를 들어, 아데노바이러스 또는 배클로바이러스와 같은 오염 바이러스는, 오염 바이러스의 잠재적 병원성 및/또는 면역원성 때문에 유전자 치료시 바이러스 벡터를 사용할 경우에 회피되거나 최소화되어야 한다.

[0005]

헬퍼 바이러스를 제거하는 여러 가지 방법이 당해 기술분야에 현재 알려져 있으나, 모두 결점을 가지고 있다. 이러한 방법들의 예는 밀도 구배 원심분리 또는 열 불활성화 또는 이의 조합이다. 그러나, 밀도 구배 원심분리는 상대적으로 작은 용량에 대해 경제적으로 실현가능할 뿐이며, 이에 따라 이 방법은 산업적 규모에는 실현가능하지 못하다. 열 불활성화는 AAV 및 헬퍼 바이러스의 다른 열 안정성에 기초한다. 예를 들어, 아데노바이러스와 AAV의 혼합 집단을 56-65°C로 가열하는 것은 AAV의 활성의 경미한 손실만으로 헬퍼 바이러스의 다소 선택적인 열 불활성화를 이끈다. 불행하게도, 시료 및 유전자 치료에 사용시 여전히 존재하는 변성 헬퍼 바이러스 단백질은 환자에서 세포성 면역 반응을 유발할 수 있다(Smith, C. A. et al.(1996) J. Virol., 70, 6733-6740).

[0006]

또한, 이온 교환(음이온 및/또는 양이온계) 및 친화 크로마토그래피를 포함하는 컬럼 크로마토그래프법은 AAV 벡터를 정제하기 위해 개발되었다. 이러한 방법은 AAV 벡터의 고 농축 제조물을 형성하나, 이들은 판매되는 약학 제품의 규제 요건을 충족하기 위해 헬퍼 바이러스의 충분한 소모를 나타내는 것을 단독으로 입증할 수 없다.

[0007]

결국, 미국 특허 제6,479,273호에, 재조합 AAV 및 아데노바이러스의 분리, 즉, 실질적으로 다른 직경을 갖는 2개의 본질적으로 구형인 바이러스가, 두 바이러스 모두를 함유하는 용액을 약 50nm의 포어 크기를 갖는 필터 맴

브레인 또는 약 35nm의 포어 크기를 갖는 필터 멤브레인을 통해 1회 이상 여과하여 얻어지는 것이 개시되어 있다. rAAV는 약 25nm의 직경을 갖는 것으로 개시되어 있으며, 아데노바이러스는 약 65-90nm의 직경을 갖는 것으로 언급되어 있으나, 예를 들어 100nm에 가까운 보다 큰 직경이 문헌으로 보고된 바 있다[Kennedy and Parks (2009) Molecular Therapy 17(10):1664-1666; Berkowitz (2003) WCBP 7<sup>th</sup> annual meeting January 7-10 2003, San Francisco, CA]. 그러나, 곤충 세포에서 배클로바이러스-기초 발현 시스템에 의한 AAV 벡터 생성으로부터 형성된 오염 바이러스는 배클로바이러스로부터 유도되어, 이에 따라 약 260nm의 길이 및 약 20nm의 직경을 갖는 막대형상이다. (재조합) AAV는 실질적으로 구형이고 약 18-26nm의 직경을 가지므로, 배클로바이러스는 부분적으로 표적 바이러스와 (두 치수에서) 유사한 크기를 갖는다.

[0008] 예를 들어, 유럽 의약청(EMA)에 의해 인간 또는 동물 기원의 세포주(ICH Q5A(R1))으로부터 유래된 생명공학 산물의 바이러스 안전성 평가와 같은 규제 요건은, 생물학적 약제의 정제 공정이 어느 비-산물 바이러스를 제거할 수 있음을 필요로 한다. 바이러스 오염물의 제거는 "바이러스 클리어런스" 또는 "바이러스 제거" 공정 단계에 의해 수행되며, 보통 크로마토그래피 및/또는 바이러스 여과에 의해 획득된다. 또한, 비-산물 바이러스에 의해 야기되는 잠재적 병원성 효과를 약화시키기 위해 "바이러스 불활성화" 공정 단계가 사용된다. 이는 보통 극도의 물리적 조건(예, pH, 온도) 및/또는 화학 조건(예, 세제, 용매)을 포함한다. 약학 산물은 일반적으로 200kDa미만의 단백질이며, "바이러스 제거" 공정은 잘 확립되어 있다. 그러나, 상대적으로 새로운 타입의 산물은 "바이러스 제거" 공정이 잘 입증되어 있지 않은 수천 kDa의 바이러스를 포함하는 유전자 치료 산물과 관련된다. 특히, 약학 산물이 구형 바이러스이고 바이러스 오염물이 막대형 바이러스인 "바이러스 제거" 공정은 아직 입증되어 있지 않다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 따라서, 산업적 규모에 활용되기에 기술적으로 그리고 경제적으로 실현가능하며, AAV를 함유하는 시료, 바람직하게는 배클로바이러스-기초 발현 시스템으로부터 얻어진 재조합 AAV 시료로부터 바이러스-기초 발현 시스템의 비-산물 바이러스를 부분적으로 또는 완전히 제거할 수 있는 부가적인 분리/정제 방법이 당해 기술분야에 요구된다. 그렇게 함으로써 비-산물 바이러스의 잠재적 병원성 및/또는 면역원성이 감소한다. 특히, 비-산물 바이러스 AAV의 직경의 수배 길이를 가지나 AAV와 유사한 직경을 갖는 막대형태 형상인 경우에 부가적인 분리/정제 방법이 당해 기술분야에 요구된다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 제 1 견지로, 본 발명은 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 분리하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 파보바이러스 비리온만 통과할 수 있는 필터를 통해 파보바이러스 및 배클로바이러스 비리온의 집단을 포함하는 시료를 여과하는 단계를 포함한다. 필터는 30-70nm, 보다 바람직하게 30-40nm, 보다 바람직하게 32-38nm, 그리고 가장 바람직하게 (약) 35nm의 공칭 포어 크기를 갖는 것이 바람직하다. 바람직한 구현으로, 파보바이러스는 아데노 연관 바이러스이며, 보다 바람직하게 배클로바이러스는 오토그래파 캘리포니아 멀티캡시드 뉴클레오플리헤드로바이러스(AcmNPV)이다.

[0011] 바람직한 구현으로, 시료의 여과에 사용될 필터는 바이러스 필터이거나 한외 여과기이다. 필터는 표면 및/또는 적층형(depth) 필터가 바람직하다. 본 발명의 방법에 사용되는 필터는 바람직하게 구리암모늄-재생 셀룰로즈, 폴리비닐리덴플루오라이드, 예를 들어, 변성 또는 비변성 폴리에테르셀론, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 변성 또는 비변성 폴리에테르셀론과 같은 폴리에테르셀론과 같은 폴리셀론, 셀룰로즈 아세테이트, 셀룰로즈 니트레이트, 폴리아미드 또는 재생 셀룰로즈로 구성되는 그룹으로부터 선택된 물질을 포함한다. 특히 바람직한 구현으로, 본 발명의 방법에 사용되는 필터는 구리암모늄-재생 셀룰로즈, 바람직하게 구리암모늄-재생 셀룰로즈 홀로우 섬유, 보다 바람직하게 여기서 필터는 Planova<sup>TM</sup> 35 membrane(Asahi KASEI;

www.planovafilters.com). 다른 바람직한 구현으로, 본 발명의 방법에 사용되는 필터는 Ultipor<sup>TM</sup> VF Grade DV50 Virus Removal Filter(Pall Corp.; www.pall.com)이다.

[0012] 본 발명에 따른 방법의 구현으로, 시료는 2개 이상의 필터를 사용하여 여과에 가해진다.

[0013] 본 발명에 따른 방법으로, 시료는 여과 단계 전에, 밀도 구배, 예비 여과(prefiltration), 크로마토그래피 단계, 바람직하게 친화 크로마토그래피 및/또는 이온-교환 크로마토그래피, 및 이들 방법의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 방법을 사용하여 예비 정제될 수 있다. 예비 여과는 바람직하게 70-200nm의 포어 크기를 갖는 필터에 의해 이루어진다. 바람직하게, 본 발명의 방법에 가해지는 시료의 pH는 6-10, 바람직하게 7-9, 보다 바람직하게 7.5-8.5, 가장 바람직하게 약 8이다. 본 발명의 구현으로, 1cm<sup>2</sup>의 바이러스 필터 표면당 1-200ml의 시료가 여과되며, 바람직하게 1cm<sup>2</sup>의 바이러스 필터 표면당 80-120ml의 시료가 여과된다.

[0014] 본 발명의 방법은 바람직하게 파보바이러스의 적어도 85%의 용출 및 배클로바이러스의 적어도 51ogs, 즉,  $10*10^5$ 의 감소를 이끈다.

[0015] 정의

[0016] 본 명세서에 사용된 용어 "바이러스" 또는 "바이러스들"은 자연적으로 발생하는 바이러스 또는 유전자 조작, 즉, 소위 재조합 바이러스에 의해 변형된 바이러스뿐만 아니라, 바이러스 파티클, 즉, WO 96/11272에 따른 파필로마바이러스-유사 파티클과 같은 감염성 및 비감염성 바이러스들, 바이러스-유사 파티클("VLP") 모두, 그리고 핵산을 함유하나 비어있을 수도 있는 캡시드, 및 이의 일부, 특히, 하나 이상의 바람직하게 캡시드의 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 80%, 특히 약 90%를 구성하도록 여러 서브유닛 또는 캡소머, 특히 여러 캡소머가 연관되거나 결합된 경우의 여러 서브유닛 또는 캡소머를 포함한다. 혼합물로부터 제거된 바이러스는 특히, 본질적으로 비-구형 막대형태 형상의 구조를 가지나, 약학 제품인 바이러스는 본질적으로 구형, 바람직하게 정 20면체 형상을 갖는다. 용어 "바이러스"는 바이러스의 비리온의 집단, 바람직하게는 바이러스의 동종 집단을 칭할 수 있다. 따라서, 용어 "파보바이러스(parvovirus)"는 파보바이러스 비리온의 집단, 바람직하게 파보바이러스 비리온의 동종 집단을 칭할 수 있다.

[0017] 파보비리다에과의 바이러스는 소 DNA 동물 바이러스이다. 파보비리다에과는 2개의 아과로 나뉠 수 있다: 척추동물에 감염되는 파보비리나에(Parvovirinae), 및 곤충에 감염되는 텐소비리나에(Densovirinae). 파보비리나에 아과의 멤버들은 본 명세서에서 파보바이러스로 칭하여지며, 데펜도바이러스(Dependovirus)속을 포함한다. 이들의 속명으로부터 추론될 수 있는 바와 같이, 데펜도바이러스의 멤버들은 일반적으로 세포 배양시 증식성 감염을 위해 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 같은 헬퍼 바이러스와 동시에 감염을 필요로 하는 점에서 독특하다.

[0018] 데펜도바이러스속은 아데노 연관 바이러스(AAV)를 포함하며, 이는 보통 인간(예, 혈청형 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 및 6) 또는 영장류(예, 혈청형 1 및 4)에 감염되며, 다른 온혈 동물(예, 소, 개, 말 및 양 아데노 연관 바이러스)에 감염되는 바이러스들과 관련된다. 오늘날, 적어도 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8 및 AAV-9의 혈청학적으로 구별가능한 타입들간에 구별하는 것이 가능하다. AAV 벡터들은 18-26nm의 직경, 전형적으로 약 25nm의 직경을 갖는 구조 단백질의 외부 정 2십면체 코트를 갖는 단일 가닥 DNA로 구성된다. 파보바이러스 및 파보비리다에의 다른 멤버들에 대한 추가 정보는 Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996)에 기술되어 있다. 편의상 본 발명은 AAV를 참조로 추가 예시되고 설명된다. 그러나, 본 발명은 AAV로 한정되지 않으며, 다른 파보바이러스에 동등하게 적용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명은 와일드 타입 파보바이러스(18-26nm 직경)에 대해 발견되는 것과 유사한 크기를 갖는 키메릭 캡시드 단백질 및/또는 AAV 하이브리드 바이러스(또는 슈도타입 바이러스)를 포함하는 AAV 키메릭 바이러스로 확장되는 것으로 이해되어야 한다. WO 0028004에 이에 대한 설명 및 일부 예가 주어진다. AAV 키메릭 및/또는 하이브리드 바이러스의 예는 예를 들어, AAV2/1,

AAV2/3, AAV2/4, AAV2/5, AAV2/5.2, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8 및 AAV2/9이다.

[0019] AAV 계놈은 바이러스의 복제에 필요한 단백질을 암호화하는 rep 유전자 및 바이러스 구조 단백질을 암호화하는 cap 유전자로 구성된다. 복제에 필요한 rep 유전자(예, rep 40, rep 52, rep 68 및/또는 rep 78) 또는 캡시드 구조에 필요한 cap 유전자(예, VP-1, VP-2 및/또는 VP-3) 중 하나 이상은 예를 들어, 아데노 연관 백터 제조시 바이러스에 이식 유전자와 대체될 수 있다. 5' 및 3' 말단에 여전히 존재하는 ITR 리전은 이식 유전자를 감염성 재조합 AAV 파티클내로 패키징하기 위해, 그리고 재조합 AAV 계놈의 DNA의 복제를 위해 시스-활성 엘리먼트로서 요구된다(Kotin, R. M. (1994) *Hum Gene Ther.* 5(7):793-801). 여기서 "재조합 파보바이러스 또는 AAV 백터"(또는 "rAAV 백터")는 하나 이상의 관심있는 폴리뉴클레오타이드 서열, 관심있는 유전자 또는 파보바이러스나 AAV 역 말단 반복부(ITRs) 측면에 있는(flanked) "이식 유전자"를 포함하는 백터를 칭한다. 이러한 rAAV 백터는 AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 곤충 숙주 세포에 존재할 경우에 복제되고 감염성 바이러스 파티클로 패키징될 수 있다. rAAV 백터가 라지 핵산 구조물(예, 크로모좀에서 또는 클로닝 또는 트랜스펙션에 사용되는 플라즈미드 또는 배클로바이러스와 같은 또 다른 백터에서)로 편입될 경우에, rAAV 백터는 전형적으로, AAV 패키징 기능 및 필수적인 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡슐화에 의해 "구조(rescued)"될 수 있는 "프로-백터(pro-vector)"로 칭하여진다.

[0020] 본 명세서에서 "곤충 세포"는 재조합 파보바이러스(rAAV) 백터의 복제가 가능하며 배양시 유지될 수 있는 곤충 세포를 칭한다. 예를 들어, 사용되는 세포주는 스포돕테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*), 초파리 세포주, 또는 아에데스 알보픽터스(*Aedes albopictus*) 유도 세포주와 같은 모기 세포주로부터 얻어질 수 있다. 바람직한 곤충 세포 또는 세포주는 예를 들어, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5, High Five(Invitrogen, CA, USA) and expresSF+®(US 6,103,526; Protein Sciences Corp., CT, USA)를 포함하는 배클로바이러스 감염에 민감한 곤충 종들로부터 얻어진 세포들이다. 배양시 곤충 세포에 대한 성장 조건 및 배양시 곤충 세포에서 이종 산물의 생성은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 곤충 세포의 분자 공학에 대한 하기 참고문헌들에 기술되어 있다. 곤충 세포에서 분자 공학 및 폴리펩타이드의 발현에 대한 방법은 예를 들어, Summers 및 Smith. 1986. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures*, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. In Prokop et al., *Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications*, 97-152; King, L. A. 및 R. D. Possee, 1992, *The baculovirus expression system*, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology*, volume 39; US 4,745,051; US2003148506; 및 WO 03/074714에 기술되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1: 바이러스 여과 중에 GC 및 TP의 회수.

도 1은 시료 용량, 세척 사용 후 멤브레인 및 상술한 분액의 풀(pool)로부터 이루어진 보정을 포함하여, 계놈 복제의 %인풋 및 여과물의 총 파티클로서 회수율을 나타낸다.

도 2: 바이러스 여과 중에 배클로바이러스 감소

도 2는 배클로바이러스 스파이크 물질, 바이러스 필터 공급물(스파이크된 AIEX 용출물), 여과 용량(xmL)에 따른 나노여과물 및 바이러스 필터 여과물 및 바이러스 필터 세척물의 최종 풀(pool)의 TCID<sub>50</sub>에 의해 측정된 배클로바이러스 타이터를 나타낸다. 여과물 및 최종 풀은 어세이가 배클로바이러스에 대해 양성이 나타나지 않는 것으로 복귀하는 가능한 최대 타이터이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 재조합 rAAV는 배클로바이러스-기초 발현 시스템을 사용하여 곤충 세포에서 생성될 수 있으며, 여기서 곤충 세

포는 AAV 벡터 및 rep와 cap 기능을 은닉하고 있는 3개의 재조합 배클로바이러스로 감염된다. 감염된 곤충 세포가 배양될 경우에, AAV 비구조 단백질 유전자 및 AAV 구조 단백질 유전자가 발현되고, 이식 유전자 DNA가 복제되고, 재조합 AAV 파티클(rAAV 파티클)이 패키징되고 어셈블리된다. rAAV 파티클은 단일 가닥 DNA의 형태로 ITR 리전의 양 말단에 측면에 있는 관심있는 유전자 산물(들)(이식 유전자(들))을 함유한다. 이와 동시에, 재조합 배클로바이러스는 이러한 세포에서 복제되고, 이는 일반적으로 며칠 후 감염된 세포의 용해 및 사멸시 종료한다. 그 결과 형성된 바이러스들(배클로바이러스 및 rAAV 파티클)은 세포 배양 상층액으로 일부 방출되거나 용해된 세포에 남아 있게 된다. 이러한 이유로, 세포들은 일반적으로, 동결 및 용해 또는 변형적으로 예를 들어, 바이러스의 본질적으로 완전한 방출을 달성하기 위해 트립신을 이용하는 것과 같이 효소적 가수분해에 의해 또는 세제 용해에 의한 것과 같이 당해 기술분야의 숙련자에게 알려진 세포 파괴 방법을 이용하여 파괴된다.

**[0023]** 배클로바이러스-기초 발현 시스템과 같은 바이러스-기초 발현 시스템을 이용하거나 또는 헬퍼 바이러스 시스템을 이용하여 바이러스 벡터를 제조하는 것과 관련된 현저한 결점은 추가 정제해야만 하는 산물 바이러스 파티클과 비-산물 바이러스의 혼합 집단의 형성이다. 편의상, 기재 "헬퍼 바이러스"는 본 명세서에서 예를 들어, 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 같은 AAV 또는 배클로바이러스의 생성시 사용되는 '트루(true)' 헬퍼 바이러스를 나타내는데 사용되나, 배클로바이러스가 곤충 세포에서 헬퍼 기능을 제공하는지 또는 AAV 유전자를 운반하는지는 아직까지 명확하지 않다. 오염 배클로바이러스는 배클로바이러스의 잠재적 병원성 또는 면역원성 때문에 유전자 치료시 바이러스 벡터를 사용하는 경우에 회피되어야 한다.

**[0024]** 따라서, 본 발명은 예를 들어, 규제 승인된 파보바이러스 산물, 즉 산업적 규모로 이용되는 것이 기술적으로 및 경제적으로 실현가능하고, 특히 막대 형상의 바이러스 파티클이 파보바이러스 파티클과 유사한 직경을 갖는 경우에(즉, 막대 형상의 바이러스 파티클이 두 치수에서 유사하지만 3번째 치수에서는 보다 더 큰 경우), 막대형태 형상의 바이러스 파티클 및 본질적으로 구형 바이러스 파티클을 포함하는 바이러스 시료에서 막대형태 형상의 바이러스의 감소, 바람직하게는 고갈을 나타낼 수 있어, 이에 따라 헬퍼 바이러스의 잠재적 병원성 및/또는 면역원성이 감소되는, 규제 승인된 파보바이러스 산물을 얻기에 적절한 분리/정제 방법을 제공한다. 두 치수에서 유사한 크기를 갖는 비-산물 바이러스와 산물 바이러스의 혼합물이 여과 기술에 의해, 바람직하게 고수준으로 분리될 수 있다는 것은 도전적인 것이며 그렇게 되지 않을 것으로 통상의 기술자에게 인식된다.

**[0025]** 따라서, 제 1 견지로, 본 발명은 시료에서 비리온의 두 집단을 분리하는 방법에 관한 것으로, 바람직하게 여기서 비리온의 한 집단은 본질적으로 구형 형상인 비리온을 포함하며, 비리온의 다른 집단은 막대형태 형상인 비리온을 포함하며, 상기 방법은 두 비리온 집단 모두를 포함하는 시료를 본질적으로 구형 형상의 비리온만이 통과할 수 있는 필터를 통해 여과하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 막대형태 형상을 갖는 바이러스는 적어도 4:1의 종횡비를 갖는다. 막대형태 형상의 바이러스의 직경 및 본질적으로 구형 형상의 직경은 12nm이상 차이가 나지 않는 것이 또한 바람직하다. 본질적으로 구형 형상의 바이러스는 파보바이러스이고, 막대 형태 형상의 바이러스는 배클로바이러스인 것이 바람직하다. 특히, 본 발명은 배클로바이러스 비리온 집단으로부터 파보바이러스 비리온 집단을 분리하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 파보바이러스 비리온만이 통과할 수 있는 필터를 통해 파보바이러스 및 배클로바이러스 비리온의 집단을 포함하는 시료를 여과하는 단계를 포함한다.

**[0026]** 본 명세서에 사용된 용어 "분리(separating)"는 분리될 두 파티클이 시료로부터 회수되는 것을 시사하지 않는다. 본 명세서에 사용된 용어 "분리(separating)"는 시료로부터 막대형태 형상의 바이러스 파티클의 부분적 또는 완전한 제거를 나타내며, 이에 따라 본질적으로 구형 바이러스 파티클의 시료에서 막대형태 형상의 바이러스의 오염을 감소시킨다. 따라서, 분리는 시료에서 본질적으로 구형 바이러스 파티클의 정제를 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 배클로바이러스 및 파보바이러스의 경우에, 본 명세서에 사용된 용어 "분리"는 시료로부터 배클로바이러스의 부분적 또는 완전한 제거를 나타내며, 이에 따라 파보바이러스를 포함하는 시료에서 배클로바이러스의 오염을 감소시킨다. 본 경우에서, 분리는 시료에서 파보바이러스의 정제를 의미한다.

**[0027]** 여과는 예를 들어, 주어진 크기 한정 이하의 크기를 갖는 고형물만 또는 그 유체만이 통과할 수 있는 매체를 개재함으로써 다른 크기의 고형물로부터 또는 유체로부터 고형물을 분리하는데 사용되는 물리적 조작이다. 시료

에서 크기를 초과하는 고형물은 공급물에 남게된다. 필터를 통해 통과한 고형물을 포함하는 유체는 여과물 또는 투과물이라 칭할 수 있다.

[0028] 본 발명에 적용되는 "바이러스 제거" 공정은 "바이러스 여과"로도 알려진 "여과"에 의해 수행된다. "바이러스 여과"는 바이러스 필터 또는 한외여과와 같은 필터에 의해 바이러스 오염물로부터 약학 산물을 분리하는 것으로 이해된다. 약학 산물 자체는 또한 바이러스(유전차 치료) 벡터와 같이 바이러스일 수 있다.

[0029] 바이러스 여과는 멤브레인이 나노미터 스케일의 공칭 포어 크기로 사용되는 여과 기술이다. 바이러스 필터 및 한외여과는 전형적으로 30나노미터 - 1마이크로미터의 범위 또는 10,000 - 750,000Dalton의 범위, 바람직하게 10,000 - 500,000Dalton의 범위, 보다 바람직하게 10,000-100,000Dalton의 범위에 있는 분자량 컷오프(MWCO)의 공칭 포어 크기를 갖는 멤브레인을 포함한다. 필터 타입의 분류는 멤브레인 구조, 재료 및 벤더에 따라 달라진다. 또한 사용 타입은 분류를 결정한다. 접선 유동 여과(TFF) 방식(크로스 플로우 여과로도 알려져 있으며; 재순환 중에, 시료를 포함하는 공급 유체는 필터와 평행으로 되고, 시료를 포함하는 공급 유체의 일부만이 투과물 생성을 위해 사용되며, 공급 유체의 대부분은 필터를 가로지르지 않고 모듈을 떠난다.)으로 한외여과기를 사용하거나 이를 데드 엔드 필터로 사용할 수 있다(시료 모두가 필터를 통해 통과한다.). 용어는 당해 기술분야의 숙련자에 의해 매우 잘 이해된다.

[0030] 바이러스 여과는 전형적으로 멤브레인에 걸쳐 압력차이를 사용한다: 0.02 내지 0.8MPa, 바람직하게 0.02-0.1MPa의 트랜스멤브레인 압력(멤브레인에 가로지르는 압력 드롭). 압력차이는 시료에 적용되는 흐름 속도(즉, 펌프)에 의해 영향받을 수 있다. 필터가 TFF 방식으로 작동될 경우에, 트랜스멤브레인 압력은 또한, 투석유물(retentate) 라인을 조임으로써 멤브레인 전에 또는 펌프를 이용하여 멤브레인 후에(즉, 투과물에) 시료를 가압하여 조절될 수 있다. 이러한 작동은 당해 기술분야의 숙련자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현으로, 본질적으로 구형 형상을 갖는 비리온 집단은 정 2십면체 대칭 및 약 18-25nm의 직경을 갖는 비리온이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구현으로, 본질적으로 구형 형상을 갖는 비리온 집단은 파보바이러스 비리온, 바람직하게 아데노 연관 바이러스의 집단이다.

[0032] 형상의 "종횡비(aspect ratio)"는 보다 짧은 치수에 대한 보다 긴 치수의 비이다. 따라서, 대칭 물체에 대해 막대의 길이 및 직경과 같이 단지 2 측정값으로 기술된다. 변형적으로 또는 본 발명의 어느 다른 구현들의 조합으로, 본 발명의 바람직한 구현으로, 막대형태 형상을 갖는 바이러스의 종횡비는 적어도 4:1이며, 바람직하게 적어도 5:1, 보다 바람직하게 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 11:1, 적어도 12:1, 또는 약 13:1이다. 본 발명의 방법을 사용하여 분리되는 배클로바이러스와 같은 막대형태 형상의 비리온 집단에서, 바람직하게 비리온은 18 - 30nm, 보다 바람직하게 20 - 27nm, 보다 바람직하게 20 - 25nm, 보다 바람직하게 20 - 23nm의 직경, 및 70 - 300nm, 바람직하게 80 - 280nm, 90 - 260nm, 100 - 260nm, 120 - 260nm, 140 - 260nm, 160 - 260nm, 180 - 260nm, 200 - 260nm, 220 - 260nm, 240 - 260nm의 길이를 갖는다. 보다 바람직하게, 비리온은 20 - 23nm의 직경 및 180 - 280nm의 길이, 특히 약 20nm의 직경 및 약 120-260nm의 길이를 갖는다.

[0033] 본 발명의 막대형태 형상의 비리온 집단은 바람직하게 배클로비리다에파에 속하는 비리온 집단이다. 명칭 배클로비리다에는 비리온의 막대형상 때문에 제안되었으며, 이는 라틴어 baculum = cane(줄기), walking stick(지팡이), staff(스태프)로부터 유래되었다. 가잘 잘 연구된 배클로바이러스는 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 모노클레오 폴리헤드로시스 바이러스(AcmNPV)이며, 이는 대칭형상이며 약 20 - 120-260nm의 직경을 갖는다(즉, 두 치수에서 약 20nm이고 제 3 치수에서 약 120-260nm이거나, 또는 변형적으로 그리고 바람직하게 약 20nm의 직경 및 약 120-260nm의 길이를 갖는 것으로 표현됨). 배클로비리다에속으로 분류된 바이러스들은 알파배클로바이러스(*Alphabaculoviruses*), 베타배클로바이러스(*Betabaculoviruses*), 델타배클로바이러스(*Deltabaculoviruses*) 및 감마배클로바이러스(*Gammabaculoviruses*)이며, 이의 각 멤버들은 레피ડ테란 NPs,

레디톱테란 GVs, 하이메놉테란 NPVs 및 딥테란 NPVs이다. 여러 배클로바이러스가 다른 계놈 길이를 갖는 것으로 조사되었기 때문에, 캡시드 길이는 80kb 내지 160kb 범위의 계놈 길이로 유연할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 본 명세서에 정의된 파보바이러스 비리온 집단으로부터 분리될 수 있는 배클로바이러스의 예는 표 1에 제공된다(Baculovirus Molecular Biology by G.F. Rohrmann; Second Edition; 26 January 2011; Chapter 1: "Introduction to the baculoviruses and their taxonomy"에 기초함).

### 표 1

선택된 배클로바이러스들의 계놈 크기 및 예측 ORF 컨텐트\*

바이러스 타입	바이러스 명칭	참고문헌	크기 (kb)	Orfs (>50 aa)
그룹 I(12 멤버)**	EppoMNPV	Hyink O. et al.; J Gen Virol. 2002;83(Pt 4):957-71. [PubMed]	119	136
	AnpeNPV	Fan Q. et al.; Virology. 2007;366(2):304-15. [PubMed]	126	145
	AcMNPV	Ayres M.D. et al.; Virology. 1994;202:586-605. [PubMed]	134	~150
그룹 II(16 멤버)	AdhoNPV	Nakai M. et al.; Virology. 2003;316(1):171-83. [PubMed]	113	125
	SeMNPV	Ijkel W.F.J. et al.; J. Gen. Virol. 1999;80:3289-3304. [PubMed]	136	139
	AgseNPV	Jakubowska A.K. et al.; J Gen Virol. 2006;87(Pt 3):537-51. [PubMed]	148	153
	LdMNPV	Kuzio J. et al.; Virology. 1999;253:17-34. [PubMed]	161	163
	LeseNPV	Xiao H., Qi Y.; Virus Genes. 2007;35(3):845-56. [PubMed]	168	169
GV(10 멤버)	AdorGV	Wormleaton S., Kuzio J., Winstanley D.; Virology. 2003;311(2):350-65. [PubMed]	100	119
	CrleGV	Lange M., Jehle J.A.; Virology. 2003;317(2):220-36. [PubMed]	111	124
	CpGV	Luque T. et al.; J Gen Virol. 2001;82(Pt 10):2531-47. [PubMed]	124	143
	XecnGV	Hayakawa T. et al.; Virology. 1999;262:277-297. [PubMed]	179	181
히메놉트. NPV(3 멤버)	NeleNPV	Lauzon H.A. et al.; J Gen Virol. 2005;86:945-61. [PubMed]	82	89
	NeabNPV	Duffy S.P. et al.; J Virol. 2006;80(14):6952-63. [PubMed]	84	93
	NeseNPV	Garcia-Maruniak A. et al.; J Virol. 2004;78(13):7036-51. [PubMed]	86	90
딥테란 NPV(1멤버)	CuniNPV	Afonso C.L. et al.; J Virol. 2001;75:11157-65. [PubMed]	108	109

\*40개 이상의 계놈 서열로부터 선택됨(2008); \*\*괄호안의 수는 카테고리에서 계놈의 총수를 나타냄; 그룹 1: 2 주요 계열의 레피톱테란 NPVs 중 하나; 이는 다른 엔벨로프 융합 단백질, gp64를 사용하여 다른 배클로바이러스로부터 구별된다. 여러 다른 유전자가 또한 이 계열에 대해 독특하다; 그룹 2: 2 주요 계열의 레피톱테란 NPVs 중 하나; 멤버들은 감염을 개시하기 위해 융합 단백질(F)을 이용하는 것으로 여겨진다; GV: 그라뉼로시스 바이러스: 레피톱테라에 대해 병원성인 배클로바이러스의 계열이며, 일반적으로 타원형 형상의 포매체(occlusion body)당 단일 비리온을 갖는다; 뉴클리어 폴리헤드로시스 바이러스: 가장 폭 넓게 분포된 타입의 배클로바이러스. NPVs는 핵에서 복제되고, 보통 하나 이상의 비리온을 함유하는 다면체 형상의 포매체를 생성한다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현으로, 배클로바이러스 비리온의 집단은 오토그라파 캘리포니카(*Autographa*

*californica*) 멀티캡시드 뉴클레오플리헤드로바이러스(AcmNPV)의 집단이다. AAV 제조 시스템에서, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 멀티플 뉴클레오플리헤드로시스 바이러스(AcmNPV)는 선택의 배클로바이러스 타입이다. AcmNPV는 가장 잘 연구된 배클로바이러스이다. 상기 바이러스는 본래 알팔파 루페(레피도프테란(lepidofteteran))로부터 분리되었으며, 154 오픈 리딩 프레임을 갖는 134kbp 게놈을 함유한다. 주요 캡시드 단백질 VP39는 일부 마이너 단백질과 함께 p6.9 단백질로 DNA를 둘러싸는 막대형상의 뉴클레오플리헤드(21nm x 260nm)를 형성한다. 배클로바이러스-매개 AAV 제조 공정으로, AAV 복제를 위해 현재 스크리닝된 유전자들 중 7개는 배클로바이러스 복제에 관련되는 것으로 보이며(*lef-1*, *lef-2*, *lef-11*, *dna-pol*, *lef-3*, *lef-7* 및 *dbp*), 3개는 트랜스-활성 인자를 암호화하는 것으로 기재되었다(*p35*, *ie-1*, *ie-2*).

[0037]

본 발명의 바람직한 구현으로, 막대형태 형상 비리온의 직경 및 본질적으로 구형 형상의 비리온의 직경은 크기가 12nm미만 차이가 나며, 바람직하게 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5nm미만 차이가 나며, 이에 따라 구형 형상의 비리온은 바람직하게 상기 둘 중에서 보다 큰 직경을 갖는다. 따라서, 예를 들어, 파보바이러스 비리온이 배클로바이러스 비리온 집단, 바람직하게 아데노 연관 바이러스로부터 분리되는 본 발명의 바람직한 구현으로, 파보바이러스(예, AAV)의 직경 및 배클로바이러스가 5nm미만으로(두 치수에서) 차이나기 때문에 두 타입의 비리온은 부분적으로 유사한 크기를 갖는다.

[0038]

본 발명에 사용되는 필터는 막대형태 형상의 바이러스의 직경(즉, 막대형태 형상의 바이러스의 길이가 아니라, 보다 짧은 치수의 직경)에 대해 바람직하게 1.2 내지 3.3배의 공칭 포어 크기를 갖는 멤브레인이다. 여러 필터 제조자에 의해 사용되는 용어 "포어 크기(pore size)", "제거율(removal rate)", "유효 크기(effective size)", "공칭 포어 크기(nominal pore size)" 또는 "특정 최소 크기를 갖는 파티클이 제거되는 것을 가능하게 하는 포어 크기"는 본 발명의 목적상 동등한 용어이며 상호 호환적으로 사용될 수 있다.

[0039]

바람직하게, 멤브레인은 막대형태 형상의 바이러스의 직경의 적어도 1.3, 1.4, 1.5배이나, 막대형태 형상의 바이러스의 직경의 3.2, 3.1, 3.0, 2.9, 2.7, 2.5, 2.3, 2.1, 1.9, 1.8배미만의 포어 크기를 갖는다. 보다 바람직하게, 멤브레인은 막대형태 형상의 바이러스의 직경의 1.6~1.7배의 포어 크기를 갖는다. 바람직한 구현으로, 본 발명의 방법에 사용되는 필터는 30~70nm, 보다 바람직하게 30~60nm, 보다 바람직하게 30~50nm, 보다 바람직하게 30~40nm, 보다 바람직하게 32~38nm, 보다 바람직하게 34~36nm, 가장 바람직하게 35nm의 포어 크기를 갖는다. 35nm의 포어 크기를 갖는 바이러스 필터의 예는, 예를 들어 Asahi-Kasai Planova 35N 멤브레인([www.planovafilters.com](http://www.planovafilters.com))이다. 다른 바람직한 구현으로, 본 발명의 방법에 사용되는 필터는 Ultipor<sup>TM</sup> VF Grade DV50 Virus Removal Filter(Pall Corp.; [www.pall.com](http://www.pall.com))이다.

[0040]

바람직한 구현으로, 본 발명에 사용되는 필터는 바이러스 필터 또는 한외여과기이다. 바이러스 필터는 전형적으로 포어가 나노미터 스케일인 크기를 갖는 필터이다. 바람직하게, 바이러스 필터는 포어가 나노미터 스케일인 크기를 가지며, 섬유가 그 안에서 비대칭 포어를 가지며, 특정 크기의 파티클을 포함하고 보다 작은 파티클은 통과되도록 하는 필터이다. 본 발명에 이용될 수 있는 바이러스 필터의 예는 35N Planova 멤브레인이다. 한외여과기의 예는 Pellicon 2 또는 Pellicon 3(Millipore), Sartocon(Sartorius) 및 Centracette(Pall)이다.

[0041]

본 발명의 바람직한 구현으로, 예를 들어, 35N Planova 필터와 같은 필터는 형태가 다른 바이러스들의 식별을 위해 표면 또는 깊이 메커니즘 또는 이들 둘의 조합을 이용한다. 표면 여과는 포어 크기에 기초하며, 여과 중에 포어 크기보다 큰 직경을 갖는 파티클은 필터의 '플로우-인(flow-in)'측의 표면에 남고, '케이크(cake)'가 형성되는 것을 포함한다. 이와 상반적으로, 깊이 여과에서는, 파티클은 플로우-인측에 있는 섬유층은 거친 섬유로 구성되고, 플로우-아웃측에 있는 섬유층은 미세한 섬유로 구성되는 섬유층의 구성 때문에, 필터 매체 내부에 트래핑된다. 깊이 필터는 매체의 표면 보다는 매체를 통해 파티클을 보유하기 위해 다공성 여과 매체를 사용하는 다양한 필터들이 존재한다. 이러한 필터는 일반적으로, 여과될 유체가 고 부하의 파티클을 함유하는 경우에 사용되며, 그 이유는 다른 타입의 필터에 비해 블로킹되기 시작하기 전에 다양한 파티클을 보유할 수 있기

때문이다.

[0042] "필터 멤브레인"은 모든 필터에서 시빙을 수행하는 실제 필터 재료를 의미하는 것으로 이해된다. 바람직하게, 사용되는 필터 멤브레인은 우선적으로 예를 들어, 바람직하게 구리암모늄 재생 셀룰로즈 홀로우 섬유와 같은 구리암모늄 재생 셀룰로즈와 같이 재생 셀룰로즈로 구성되나, 다른 적절한 물질은 폴리비닐리덴플루오라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 변성 또는 비변성 폴리에테르설폰, 셀룰로즈 아세테이트, 셀룰로즈 니트레이트 또는 폴리아미드이다. 약 40-400nm의 크기를 갖는 파티클의 제거를 가능하게 하는 포어 크기를 갖는 이러한 멤브레인의 예는 Ultipor VF 멤브레인(Pall GmbH, 63303 Dreieich, 약 50nm 또는 20nm의 공칭 포어 크기를 가짐), Asahi Chemical's Bemberg microporous membranes(Asahi Chemical Industry Ltd., Tokyo, Japan, 약 15, 19, 35 또는 72nm의 공칭 포어 크기를 가짐), 또는 다른 제조자 즉, Sartorius AG, 37075 Gottingen 또는 Schleicher and Schuell GmbH, 37582 Dassel로부터 제조되는 이에 상응하는 멤브레인들이다. 본 발명의 바람직한 구현으로, 필터는 구리암모늄 재생 셀룰로즈, 폴리비닐리덴플루오라이드, 폴리설폰, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 변성 또는 비변성 폴리에테르 설폰, 셀룰로즈 아세테이트, 셀룰로즈 니트레이트, 폴리아미드 또는 재생 셀룰로즈를 포함하며, 바람직하게 필터는 구리암모늄 재생 셀룰로즈 홀로우 섬유 또는 폴리비닐리덴플루오라이드를 함유한다.

[0043] 본 발명의 방법은 특히 배클로바이러스 비리온의 집단으로부터 파보바이러스 비리온의 집단을 정제하는데 적절하다. 실제로, 예를 들어, Asahi-Kasai Planova 35N 멤브레인과 같은 35nm의 포어 크기를 갖는 바이러스 필터는 특히 rAAV 파티클 및 배클로바이러스를 분리하기 위해 본 발명의 방법에서 유리하다. 이러한 필터는 특히 혼합 집단으로부터 적어도  $5\log_{10}$ 의 감염성 배클로바이러스의 본질적으로 정량적인 제거를 달성할 뿐만 아니라, 약 >90%의 고 수율의 rAAV 파티클을 달성하는 것을 가능하게 한다.

[0044] 막대형태 형상의 바이러스의 타이터 감소, 즉, 제거할 바이러스의 타이터가 감소하는 팩터는 바람직하게 rAAV 비리온과  $10 \times 10^5$  배클로바이러스 비리온의 혼합 집단이 본 발명의 방법에 따라 분리된 후에 적어도 51ogs이며, 그 다음 배클로바이러스 비리온은 여과물에서 검출되지 않았다. 바람직하게, 본 발명의 방법에 의해 달성되는 막대형태 형상의 바이러스의 타이터 감소는 적어도 5.51ogs, 적어도 61ogs, 적어도 6.51ogs, 적어도 71ogs, 적어도 81ogs, 적어도 91ogs, 가장 바람직하게 적어도 101ogs이다. 타이터는 예를 들어, TCID<sub>50</sub>(Tissue Culture Infectious Dose 50%) 어세이와 같이 당해 기술분야에 알려진 일반적 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 시료내 배클로바이러스 비리온 집단의 감염성 배클로바이러스 타이터는 TCID<sub>50</sub> 어세이를 이용하여 검출될 수 있다. 이 방법은 양성 컨트롤 시료에서 감염성 배클로바이러스를 이용한 Sf9 곤충 세포의 모노레이어의 감염에 기초한다. 세포들을 감염시키기 위해 양성 컨트롤 시료의 배지에서 연속 희석을 사용한다. 세포들은 +28°C에서 7일간 배양된다. 후속적으로, 상층액을 Sf9 곤충 세포의 모노레이어가 담긴 새로 준비한 플레이트에 옮기고, +28°C에서 7일간 배양한다. 감염이 진행됨에 따라, 감염된 세포들은 서로 부착된 채로 남아있지 못하고, 플레이트 표면에 부착되지 못하고, 헐거워진 세포들을 형성한다. 즉, 현미경으로 관찰될 수 있는 세포변성 효과(CPE)를 나타낸다.  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL의 타이터를 Spearman-Kaber 방법을 이용하여 산출한다.

[0045] 바람직하게, 본질적으로 구형 형상의 비리온 집단의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99%가 본 발명의 방법을 이용하여 회수된다. 따라서, 본질적으로 구형 형상의 비리온 집단의 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99%가 용출물(또는 투과물)에 회수된다.

[0046] 본 발명의 바람직한 구현으로, 시료는 2이상의 필터를 통해 여과된다.

[0047] 분리할 비리온 집단을 포함하는 시료는 전형적으로, 예를 들어, AAV 비리온을 생성하기 위한 곤충 세포 배양물과 같은 바이러스-기초 발현 시스템의 배양 상층물(예, 배지), AAV 비리온을 생성하기 위한 바이러스-기초 발현 시스템의 곤충 세포, 또는 배양 상층물과 곤충 세포의 조합이다. 바람직하게, 시료는 본 발명의 방법에 사용되

기 전에 동결-용해 사이클에 가해진다. 보다 구체적으로, 시료는 본 발명의 방법에 사용되기 전에 예비-정제된다. 이는 특히 구형 형상의 비리온 집단(예, 파보바이러스 비리온, 바람직하게 AAV)의 여과를 통한 수율을 증가시키고, 또한 필터의 수명에 유리한 것으로 여겨진다. 따라서, 바람직한 구현으로, 시료는 세포 오염물을 함유하지 않는다.

[0048] 따라서, 바람직한 구현으로, 상기 방법은 예를 들어, 원심분리, 하나 이상의 밀도 구배, 예비-여과 및/또는 크로마토그래피에 의한 것과 같이 비리온 집단을 포함하는 시료의 예비-정제를 포함한다. 바람직하게, 시료는 시료가 예를 들어, rAAV 배양물의 상층물인 경우에, 예를 들어 예비-여과에 의해 예비-정제되어 보다 큰 파티클은 제거되고, 배클로바이러스 및 rAAV 파티클은 여과물에 보유된다. 유리하게, 예비-여과는, 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 본 명세서에 앞서 나타낸 바와 같은 비리온 집단의 실질적인 분리 전에 수행된다. 바람직한 구현으로, 시료는 밀도 구배, 예비-여과, 크로마토그래피 단계, 바람직하게 친화 크로마토그래피 및/또는 이온-교환 크로마토그래피 및 이러한 방법들의 조합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 방법을 이용하여 예비-정제된다. 이러한 정제 방법의 예는 Brument et. al., 2002 Molecular Therapy, Kaluduv et. al., 2002 Human Gene Therapy, Potter et. al., 2002 Methods in Enzymology and Cecchini et. al., 2010 Human gene therapy를 포함한다. 바람직하게, 예비-정제는 밀도 구배 및 하나 이상의 예비-여과 및/또는 원심분리 단계를 포함한다. 바람직하게, 예비-정제는 하나 이상의 크로마토그래피 단계와 함께 하나 이상의 예비-여과를 포함한다.

[0049] 분리될 비리온 집단은 통과하지만 보다 큰 불순물은 보유되는 하나 이상의 멤브레인을 이용한 시료의 예비-정제가 특정 바람직한 예로 주어진다. 일반적으로, 예비-정제는 막대형태 형상 및 본질적으로 구형 비리온의 집단의 후속적인 분리를 초래하는 본 발명의 방법에 사용되는 필터의 블로킹을 억제하거나 보다 어렵게 한다. 비리온 집단의 분리 중에 필터의 블로킹은 시료를 본 발명의 방법에 가하기 전에, 제거되지 않거나 적절히 제거되지 않은 시료에서 바이러스 배양물의 성분들에 의해 일어날 수 있다. 저속 원심분리는 이러한 성분들을 적절히 제거하는데 충분하지 않을 수 있어, 따라서 시료의 추가 예비-정제는 필터의 블로킹을 최소화하는데 바람직하다.

[0050] 바람직하게, 예비-정제는 예비-여과에 의해 수행된다. AAV 및 배클로바이러스를 포함하여 본 발명의 방법에 적용될 시료를 예비-정제하기 위한 멤브레인 필터는, 바람직하게 70-200nm, 보다 바람직하게 80-180nm, 90-150nm, 100-130nm의 포어 크기를 갖는다. 예를 들어, Ultipor N66 filter(Pall GmbH, 63303 Dreieich)와 같이 약 100nm의 포어 크기를 갖는 멤브레인 필터는 특히 rAAV 파티클과 배클로바이러스의 혼합 집단을 예비-정제하는데 매우 적합하다. 따라서, 바람직한 구현으로, 예비여과는 70-200nm의 포어 크기를 갖는 필터로 이루어진다.

[0051] 예비-정제를 위한 적절한 방법 및 수단은 앞서 상술한 바와 같이 파보바이러스 및 배클로바이러스의 집단을 분리하는 본 발명의 방법에 사용될 필터에 따라 달라지며, 당해 기술분야의 숙련자에 의해 시험될 수 있다. 예비 정제후 조건은 1) 필터가 통합된 채로 유지되고, 2) 파보바이러스가 안정하고, 3) 염 농도가 생리학적으로 근접하고, 그리고 4) 필터에 결친 압력 저하가 파보바이러스(예, AAV)가 '용해(lyse)'되어 더 이상 기능을 하지 못하게 되지 않도록 크지 않아야 한다.

[0052] 또 다른 바람직한 구현으로, 시료의 pH는 6-10, 바람직하게 7-9, 보다 바람직하게 7.5-8.5, 특히 약 8.0이다. 필요에 따라, 시료의 pH는 예를 들어, Tris/HCl 버퍼(트리스(히드록시메틸)아미노-메탄)와 같은 적절한 버퍼로 상기 언급된 pH로 조절된다. 시료의 pH는 바람직하게 약 8.0이며, 그 이유는 이러한 pH가 여과후 AAV의 우수한 수율을 형성하기 때문이다.

[0053] 본 발명의 바람직한 구현으로, 시료는 AAV가 안정한 것을 확보하기 위해 pH 6-8.5(본질적으로 생리학적임)를 갖는다. 이러한 범위내의 pH를 갖는 버퍼는 또한 바람직하게 특정 파보바이러스에 대해 적합한 전도성을 가져야 한다. 전형적으로, 요구되는 전도성은 AAV의 혈청형 및 이식 유전자에 따라 달라진다. 숙련자는 케이스 대 케이스에 기초하여 적절한 버퍼를 결정할 수 있다. 전형적으로, 백그라운드 전도성은 생리학적 전도성, 즉, 137mM NaCl에 상당해야 한다. 적절한 버퍼 용액의 예는 MES, Trizma, Bis-Tris, HEPES, PBS 및 Bis-Tris

Propane이다.

[0054] 바람직한 구현으로, 적어도 0.5ml의 시료가 필터 표면 1cm<sup>2</sup>당 여과되며, 바람직하게 1cm<sup>2</sup>당 1-100ml가 여과된다. 그러나, 이는 분리될 시료내 바이러스의 순도 및 농도에 따라 크게 달라지며, 대부분의 경우에 여과는 다운스트림 공정의 말미에 적용되므로, 1L이상이 1cm<sup>2</sup>당 여과될 수 있다. 변형적으로 또는 다른 바람직한 어느 구현과 함께, 본 발명의 바람직한 구현으로, 적어도 1-10ml, 바람직하게 1-5ml, 특히 약 1.5ml의 시료가 필터 표면 1cm<sup>2</sup>당 여과된다. 일반적으로, 이는 고 수율의 rAAV 파티클을 달성하며, 예를 들어, 이와 동시에 배클로바이러스의 제거를 달성한다.

[0055] 따라서, 본 발명은 시료내의 본질적으로 구형 형태의 비리온 집단 및 막대 형태 형상을 갖는 비리온 집단의 분리/정제를 단순하고 저비용적인 방식으로 수행하는 방법을 제공하며, 이 방법은 산업적 규모로 적용될 수 있다. 본 발명의 방법은 특히 온화한 조건하에서 이용될 수 있으며, 본질적으로 구형 형상의 비리온의 고수율을 얻으며, 반면에 막대 형태의 형상을 갖는 비리온은 여과물로부터 감소되거나 제거된다. 본 발명의 추가 이점은 본 발명에 따라 정제된 비리온이 예를 들어, 배클로바이러스와 같은 다른 바이러스들을 적절히 함유하지 않기 때문에, 예를 들어, 유전자 치료용 바이러스 백터로서 직접 이용될 수 있다는 것이다. 배클로바이러스의 작은 잔류분획이 여과물에 잔류할 수 있으나, 이러한 DNA는 복제-컴퍼턴트 배클로바이러스와 관련되지 않고, 오히려 rAAV 내의 코-패킹된 DNA와 관련되며, 그리고 이는 결과적으로 감염성 배클로바이러스를 나타내지 않는다.

[0056] 바람직한 구현으로, 예를 들어 유리 배클로바이러스 단백질 및 서브바이러스 파티클과 같은 배클로바이러스 구성분들이 본 발명의 방법에 의해 감소된다. 이는 특히 바이러스 백터가 환자에서 유전자 치료에 사용될 경우에 이러한 구성분들이 비특이적 면역반응을 유도할 수 있기 때문에 이점이 있다.

[0057] 변형적으로 또는 상술한 구현들과 함께, 본 발명의 방법은 예를 들어, 배클로바이러스 발현 시스템이 하나 이상의 다른 배클로바이러스 백터들을 사용하여 이에 따라 다중 타입의 배클로바이러스 비리온을 형성하는 경우와 같이 2개 이상의 다른 비리온 집단을 분리하는데 사용될 수 있는 본 발명의 구현이 존재한다. 상술한 바와 같은 본 발명의 방법은 파보바이러스 비리온 집단으로부터 배클로바이러스 집단을 분리하는데 사용될 수 있다. 따라서, 또한 본 발명은 시료에서 적어도 2 비리온 집단을 분리하는 방법에 관한 것이며, 바람직하게 여기서 하나 이상의 비리온 집단은 본질적으로 구형 형상인 비리온을 포함하며, 하나 이상의 비리온 집단은 막대 형태 형상인 비리온을 포함하며, 상기 방법은 본질적으로 구형 형상의 비리온만이 통과할 수 있는 필터를 통해 비리온 집단을 포함하는 시료를 여과하는 단계를 포함한다.

[0058] 본 명세서 및 특허청구범위에서, 동사 "포함하다" 및 이의 활용형들은 상기 기재에 후속하는 아이템들이 포함되나, 특별히 언급되지 않은 아이템들이 배제되지 않는 것을 의미하는 비한정적 견지로 사용된다. 또한, 구성분이 부정관사 "하나의(a 또는 an)"로 참조된 경우에, 이는 정황상 분명히 하나이어야 하고 단지 하나의 구성분만이 존재할 필요가 있는 경우를 제외하고 하나 이상의 구성분이 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서, 부정관사 "하나의(a 또는 an)"는 보통 "적어도 하나(at least one)"을 의미한다.

[0059] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고문헌들이 그 전체 내용이 참고문헌으로 편입된다.

[0060] 하기 실시예는 단지 예시하기 위한 목적으로 제공되는 것이며, 본 발명의 범위를 어느 방식으로 한정하려는 의도는 아니다.

[0061] 실시예[0062] 실시예 1

[0063] 아데노 연관 바이러스 백터(AAV)는 Urabe et al., 2002(Hum. Gene Ther 13(16):1935-1943)에 의해 이전에 기술된 바와 같이 3개의 재조합 배클로바이러스로 곤충 세포의 감염 후에 생성되었다.

[0064] 감염 3일 후에, 세포 배양물을 세제로 용해하고, 후속적으로 9U/mL 벤조네이즈(Merck)의 첨가 및 제조자의 지시에 따른 배양으로 뉴클레아제 처리하였다.

[0065] 크루드 용해 밸크를 후속적으로 Pall Profile® Star and Pall Supor® filters(Pall Corporation)를 사용하여 연속적으로 투명하게 하였다. 세제의 존재하에서 바이러스 감소 배양을 적어도 28°C에서 수행하였다. 이 물질을 AVB Sepharose HP, GE Healthcare를 이용하여 친화 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 간략히, 여과된 세포 용해물을 20cm 직경 컬럼(약 6cm 베드 높이를 갖는 BPG 200/500, GE Healthcare)에 150cm/hr의 선형 속도로 적용하였다. UV 흡광도 곡선이 베이스라인에 돌아오고 안정화될 때까지 컬럼을 인산염 완충염수로 세정하였다. 흡착된 rAAV 파티클을 산성 매체(HCl로 pH 3.0으로 조절된 50mM 소듐 시트레이트)에 용출하고, 컬럼 용출물을 즉시 1/20 체적의 1M Tris-HCl(pH 8.0)로 적정하였다.

[0066] 1900g에서 원심분리하고 0.2μm 보틀 필터(Corning)를 통해 여과하여 투명하게 한 후에, 이 중화된 용출물에, Urabe et al.(2002; 상기 참조)에 의해 앞서 제조된 10% v/v 배클로바이러스 스파이크를 첨가하여 바이러스 필터에 공급하기 위한 배클로바이러스와 AAV의 혼합 집단을 제공하였다.

[0067] 사용 전에, Planova 35N 필터를 제조자 지시에 따라 제조하였다. 간략히, 보관 용액을 제거하고, 40mL의 60mM Tris/HCl(pH 8.0)의 첨가로 모든 공기를 펴징하고, 제조자 지시에 따라 플러싱 절차를 수행하였다.

[0068] 바이러스 필터에 대한 공급 흐름 속도는 연동 펌프를 이용하여 제조자의 권장대로 5mL/min으로 설정하였다(참조 표 2). 바이러스 여과 중에, 공급 압력 및 투과 흐름을 모니터하였다(참조 표 2).

## 표 2

바이러스 여과 성능

공정 시간 (min)	펌프 속도 (rpm)	공급 압력(mBar)	처리량(mL)	투과 흐름(mL/min)
0	3	160	0	5
10	3	160	50	5
20	3	160	100	5
30	3	160	150	5
40	3	160	200	5
50	3	160	250	5
60	3	160	300	5
70	3	160	350	5
80	3	160	400	5

[0070] 50, 250 및 400mL 여과물을 취득한 후, Sf9 세포주를 이용하여 감염성 배클로바이러스에 대한 TCID<sub>50</sub> 어세이를 통해 배클로바이러스 타이터를 측정하기 위해 시료들을 수집하였다. 결과를 TCID<sub>50</sub>으로 제공한다: 50% 조직 배

양 감염 도즈. 이는 접종된 조직 배양 *sf9* 세포의 50%에서 세포독성 효과를 생성하는데 필요한 바이러스의 양을 나타낸다.

[0071] 약 1ml 시료들을 여과물로부터 취하고, 이들을 AAV에서 관심있는 유전자의 Genome Copies(이하 GC라 칭함) 및 AAV의 총 파티클(이하 TP라 칭함)에 대해 분석하여 이들의 관련 회수율을 모니터하였다. GC 및 TP 분석은 하기와 같이 수행하였다.

[0072] 시료의 계놈 복제 농도를 측정하기 위해, 시험 시료의 10배 연속 희석물 및 웰리화이드 워킹 스탠다드를 준비하고, DNase 다이제스션으로 외래 DNA를 제거하고, 프로테이네이즈 K 다이제스션으로 캡시드화 DNA를 풀어주었다. 그 다음, 방출된 바이러스 DNA를 MagneSil Blue®을 이용하여 정제하였다. 후속적으로, 백터 계놈 서열에 특이적인 프라이머를 이용한 정량-PCR(Q-PCR)에 의해 DNA를 증폭하였다. DNA 증폭은 형광 DNA 바인딩 염료 SYBR 그린의 편입에 의해 실시간으로 모니터하였다. 시료에 존재하는 DNA의 양은 시험 시료에 대해 발견되는 Ct값을 워킹 스탠다드에 대해 발견되는 값과 비교하여 산출될 수 있다. 어떠한 비율을 제공하는, 상기 웰리화이드 워킹 스탠다드에 대한 시험 시료의 연속 희석물을 시험하기 위해 평행성 검정(parallel-line-assay) 디자인을 사용하였으며, 이는 어떠한 비율을 제공하였다. 이 비율은 워킹 스탠다드 계놈 컨텐트를 사용하여 계놈 복제 농도( $gc/mL$ )로 변형되었다.

[0073] AAV 파티클의 총수(코렉트 계놈(백터 파티클) 뿐만 아니라 빈 파티클을 포함하는 전체 파티클 모두)는 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 측정된다. 겔 여과 HPLC는 BioBasic SEC-1000(Thermo Electron Corporation)을 사용하여 25°C에서 D-PBS의 수성 상으로 1mL/min의 흐름 속도로 수행된다. 용출은 214nm에서 UV 흡광도로 모니터된다. 시험 시료의 피크 영역은 mL당 알려진 양의 AAV와 함께 웰리화이드 워킹 스탠다드의 보정 곡선을 이용하여 정량된다.

[0074] Planova 35N 필터는 제조자 지시에 따라 10mL의 60mM Tris/HCl(pH 8.0)을 사용하여 세정되었다. 세정물은 여과물과 함께 모으고, TCID<sub>50</sub> 어세이를 통해 배클로바이러스 감염 타이터를 측정하기 위해 샘플링하였다. 세정물은 여과물 물질과 함께 모으기 전에 나중의 GC 및 TP 타이터 측정을 위해 샘플링하였다. 여과물 및 세정물의 풀(pool)을 수동으로 혼합하여 확실히 균질화하고, 나중의 GC 및 TP 타이터 측정을 위해 샘플링하였다. TP 및 GC 타이터로부터 회수율을 산출하고 도 1에 나타내었다.

[0075]

[0076] 시료의 감염성 배클로바이러스 타이터는 50% 조직 배양 감염 도즈(TCID<sub>50</sub>) 어세이를 이용하여 측정된다. 이 방법은 시험 시료에서 감염성 배클로바이러스를 이용한 *Sf9* 곤충 세포의 모노레이어의 감염에 기초한다. 시험 시료의 배지에서 3-배 연속 희석을 사용하여 옥토플리케이트에 있는 세포들을 감염시켰다. 플레이트는 +28°C에서 7일간 배양하였다. 후속적으로, 상층물을 새로 준비한 플레이트에 옮기고, +28°C에서 7일간 배양하였다. 감염이 진행됨에 따라, 감염된 세포들은 서로 부착되지 못하고 플레이트 표면에 남아있지 않고 루즈 셀(loose cells)을 형성하였다. 즉, 현미경을 통해 관찰될 수 있는 세포변성 효과(CPE)가 나타났다.  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL으로 타이터가 Spearman-Karber 방법을 이용하여 산출되었다.

[0077] 결과

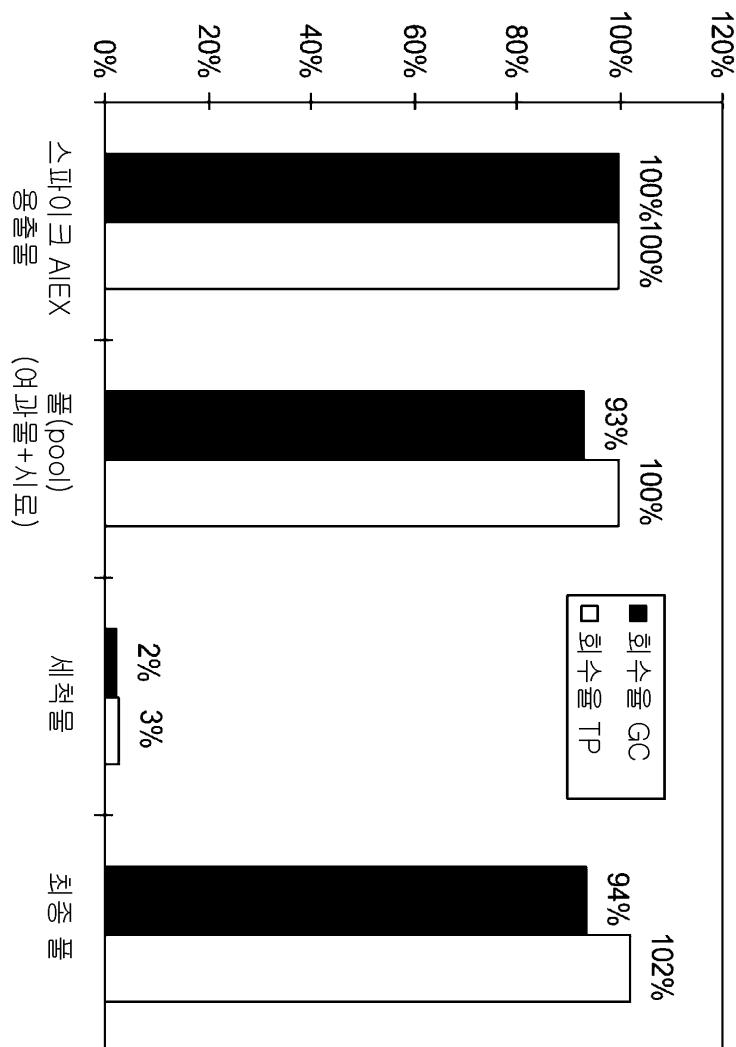
[0078] 배클로바이러스 타이터 측정 결과를 도 2에 나타내었다.

[0079] 스파이크 용액은 8.1  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL의 감염성 배클로바이러스 타이터를 갖는다. 스파이크 용액은 7.62  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL의 스파이크된 AIEX 용출물에 10%로 첨가된다. 나노여과물의 TCID<sub>50</sub> 값은 적어도 6 logs로 이러한 특정 어세이의 정량화 수준인 1.511  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL 이하로 감소한다. 따라서, 나노여과는 적어도 6 logs의 배클로바이러스 감소를 제공하며, 이에 따라 나노여과는 두 치수에서 대등한 크기를 갖는 두 바이러스의 식별을 위

해 실현 가능한 단위 조작이다.

## 도면

### 도면1



도면2

