



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월27일
 (11) 등록번호 10-1279677
 (24) 등록일자 2013년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2006-7016708
 (22) 출원일자(국제) 2005년01월20일
 심사청구일자 2009년10월28일
 (85) 번역문제출일자 2006년08월21일
 (65) 공개번호 10-2007-0004636
 (43) 공개일자 2007년01월09일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2005/000705
 (87) 국제공개번호 WO 2005/071092
 국제공개일자 2005년08월04일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2004-00014653 2004년01월22일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 Makoto Inoue 등. JOURNAL OF VIROLOGY. 2003.
 Vol. 77, No. 11, 페이지 6419-6429.*
 Frederic Iseni 등. The EMBO Journal. 2002.
 Vol. 21, No. 19, 페이지 5141-5150.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가부시킴가이사 다나뱅크 겐큐쇼
 일본국 이바라키 쓰쿠바시 간논다이 1-25-11
 (72) 발명자
이이다 아키히로
 일본국 이바라키 쓰쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
 시킴가이사다나뱅크 겐큐쇼 내
반 히로시
 일본국 이바라키 쓰쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
 시킴가이사다나뱅크 겐큐쇼 내
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
서종완

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β - 액틴 프로모터를 포함하는 하이브리드 프로모터를 이
 용한 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 게놈 RNA의 전사, 및 상기 게놈 RNA와 리보핵단백질을 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질의 발현을, 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β-액틴 프로모터를 포함하는 프로모터에 의해 유도하는 것을 특징으로 하는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법은, 안전성이 높은 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 높은 효율로 제조하는 것을 가능하게 한다. 특히 본 발명의 방법은, 엔벨로프 구성 단백질을 유전자를 결손하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 제조하는데 유용하다.

(72) 발명자

이노우에 마코토

일본국 이바라키 쯔쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
시키가이샤디나벡크 겐큐쇼 내

히라타 다카히로

일본국 이바라키 쯔쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
시키가이샤디나벡크 겐큐쇼 내

하세가와 마모루

일본국 이바라키 쯔쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
시키가이샤디나벡크 겐큐쇼 내

특허청구의 범위

청구항 1

파라믹소바이러스 벡터의 제조방법으로서, 상기 바이러스의 생산세포에 있어서, (i) 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를 발현시키는 공정, 및 상기 RNA 폴리머라제에 의해, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 파라믹소바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 전사시키는 공정에 의해 상기 파라믹소바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥의 전사를 유도하고, (ii) 파라믹소바이러스 N, P, 및 L 단백질의 발현을, 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터에 의해 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를, 상기 바이러스 생산세포에 있어서 예외적으로 발현시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를, 상기 바이러스 생산세포의 염색체로부터 발현시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 파라믹소바이러스가 센다이 바이러스인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, F, M, 또는 HN 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있고, 결손하는 상기 단백질을 코딩하는 DNA를, 상기 세포에 있어서 발현시키는 공정을 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

(i) 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA, 또는 상기 DNA를 보유하는 포유동물 세포,

(ii) 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 파라믹소바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA, 및

(iii) 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에, 파라믹소바이러스 N, P, 및 L 단백질을 코딩하는 DNA가 연결된 DNA

를 포함하는 파라믹소바이러스 제조 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 9

제7항에 있어서, (i)의 DNA는, 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능한 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 리콤비나아제가 Cre 또는 F1p인 키트.

청구항 11

(i) 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA,

(ii) 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 파라믹소바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA, 및

(iii) 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에, 파라믹소바이러스 N, P, 및 L 단백질을 코딩하는 DNA가 연결된 DNA

를 보유하는 포유동물 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 파라믹소바이러스 생산용 세포인 포유동물 세포.

청구항 13

삭제

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, F, M, 또는 HN 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 포유동물 세포.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 파라믹소바이러스가 센다이 바이러스인 포유동물 세포.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종래, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 회수는, 주로 T7 RNA 폴리머라제를 발현하는 재조합 백신시아 바이러스 (recombinant vaccinia virus)(vTF7-3: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126(1986), MVA-T7: Sutter, G. et al., FEBS lett. 371: 9-12(1995))를 사용하여, T7 프로모터 제어하에 NP, P, L 유전자와 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈을 발현하는 플라스미드가 사용되어 왔다(Kolakofsky, et al., EMBO J. 14: 6087-6094(1995); Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579(1996)). 재조합 백신시아 바이러스로 발현시킨 T7 RNA 폴리머라제의 작용으로 NP, P, L과 안티게놈의 RNA가 공급되고, 백신시아 바이러스의 캡핑 효소(capping enzyme)의 작용에 의해 NP, P, L mRNA의 5'말단에 캡구조(cap structure)가 형성되고, 단백질이 번역된다. 이들 단백질은 안티게놈 RNA에 작용하여, 기능적인 RNP를 구성한다. 그 다음, 안티게놈 RNP로부터 게놈 RNP가 복제되고, 추가로 바이러스 유래 단백질의 전사가 일어나, 감염 사이클이 시작되고 바이러스가 회수된다.

[0003] 재조합 백신시아 바이러스를 사용함으로써 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 회수는 가능하지만, 최종적인 벡터 표품(final vector preparation)의 조제시에 백신시아 바이러스를 제거할 필요가 있어, 비용과 시간이 든다. 유전자 치료용 벡터로서 이용하는 경우에는, 안전성 면으로부터도, 백신시아 바이러스를 사용하지 않는 벡터의 회수가 요망된다.

[0004] 비특허문헌 1: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126(1986)

[0005] 비특허문헌 2: Sutter, G. et al., FEBS lett. 371: 9-12(1995)

[0006] 비특허문헌 3: Kolakofsky, et al., EMBO J. 14: 6087-6094(1995)

[0007] 비특허문헌 4: Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579(1996)

발명의 상세한 설명

[0008] 발명의 개시

[0009] 발명이 해결하고자 하는 과제

[0010] 본 발명은 사이토메갈로바이러스 인헨서 및 닭 β-액틴 프로모터를 포함하는 하이브리드 프로모터를 이용하여, 백신시아 바이러스를 사용하지 않고 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 과제를 해결하기 위한 수단

[0012] 지금까지, 재조합 백신시아 바이러스를 사용하지 않고 바이러스를 회수하는 방법이 몇 개의 모노네가바이러스(mononegavirus)에서 개발되어 왔다. 그 중 하나는, T7 RNA 폴리머라제를 항상적으로(constitutively) 발현하

는 포유동물 세포주를 사용하는 방법이다. 이 방법에서는, 백시니아 바이러스를 사용한 경우와 같은 캡핑 효소가 없기 때문에, NP, P, L 단백질을 발현시키기 위해, 캡핑 비의존적 번역이 가능한 IRES서열을 갖는 발현 플라스미드를 이용하고 있다. 이 방법을 사용하여, 현재까지 소 합포체성 폐렴바이러스(Bovine respiratory syncytial virus)(BRSV)(Ursula, et al., J. Virol. 73:251-259(1999)), Radies virus(Stefan, et al., J. Virol. 73: 3818-3825(1999)), Newcastle disease virus(NDV)(Romer-Oberdorfer, et al., J. General Virology 80: 2987-2995(1999)), Sendai virus(F. Iseni, et al., EMBO J. Vol. 21: 5141-5150(2002))의 회수가 보고되어 있다. SV5에서는 동일한 세포를 사용하여 안티게놈을 BSR-T7/5 세포를 사용하여 T7 RNA 폴리머라제 발현시키고, NP, P, L 단백질을 세포 유래의 RNA 폴리머라제 II에 의해 전사되는 CAG 프로모터를 갖는 pCAGGS로 구동하는 방법이 보고되어 있다(David L. Waning et al., J. Virol. 76: 9284-9297(2002)).

[0013] 두번째 방법은, Rabies virus에서 보고된 회수방법으로, NP, P, L, 게놈을 모두 사이토메갈로바이러스 프로모터로 구동하는 방법이다(K. Inoue, et al., J. Virological Method. 107: 229-236(2003)). 이 방법에서는, 게놈의 말단을 정확하게 잘라내기 위해 해머헤드 리보자임(hammerhead ribozyme)이 안티게놈의 5'말단에 추가되어 있어, T7 RNA 폴리머라제 발현주를 사용하지 않더라도 바이러스 회수가 가능한 방법이다.

[0014] 단, 이들 방법은 모두 전과능을 갖는 바이러스(transmissible virus)를 재구성시키는 방법이다. 지금까지, 백시니아 바이러스를 사용하지 않고, 전과능을 결손한 바이러스를 재구성한 예는 없다. 전과능을 결손한 바이러스를 재구성하기 위해서는, 엔벨로프(envelope) 구성 단백질을 코딩하는 유전자를 바이러스 게놈으로부터 결손시키고, 바이러스 재구축시에, 엔벨로프 구성 단백질을 트랜스에 공급하여, 감염성 바이러스 입자를 형성시켜야만 한다. 따라서, 결손형 바이러스를 고효율로 재구축하기 위해서는, 전과형 바이러스의 재구축 보다도 더욱 효율이 높은 바이러스 생산계(virus production system)가 필요하다.

[0015] 본 발명자 등은, 보다 효율적으로 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 생산·회수하는 방법을 개발하기 위해, 바이러스 생산세포에 있어서 바이러스 게놈의 전사를 구동하는 방법의 개량을 행하였다. 그 결과, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사, 및 상기 게놈 RNA와 리보핵단백질(ribonucleoprotein)을 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질을 모든 발현을, 사이토메갈로바이러스 인헨서 및 닭 β-액틴 프로모터를 포함하는 하이브리드 프로모터(hybrid promoter)(CA 프로모터라 칭한다)에 의해 직접 또는 간접으로 구동함으로써, 효율적인 바이러스 생산을 실현시키는 것이 가능한 것을 발견하였다. 본 발명에 있어서 게놈 RNA의 전사는, CA 프로모터의 제어하에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 RNA를 코딩하는 DNA를 연결하고, 게놈 RNA의 전사를 CA 프로모터에 의해 직접 유도하거나, 또는 게놈 RNA를 코딩하는 DNA의 상류에 박테리오파지(bacteriophage) 유래 RNA 폴리머라제의 시그널서열을 연결해두고, CA 프로모터로부터 상기 RNA 폴리머라제를 발현시켜, 그것에 의해 게놈 RNA의 전사를 유도한다. 이들 방법에 의해, 백시니아 바이러스를 사용하지 않고, 고역가(high-titer)의 바이러스를 생산시킬 수 있었다.

[0016] 그리고 본 발명자 등은, 이들 방법을 사용하여 엔벨로프 구성 단백질 중 하나인 F 단백질, M 단백질, 그리고 F 및 M 단백질의 유전자를 결손하는 비전과형 마이너스 가닥 RNA 바이러스를, 백시니아 바이러스를 사용하지 않고 처음으로 회수하는 것에 성공하였다. 본 발명의 방법은, 백시니아 바이러스를 전혀 사용하지 않고 고역가의 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 조제할 수 있기 때문에, 유전자 치료 등의 안전성이 높은 바이러스의 제조에 유용하다.

[0017] 즉 본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사 및 상기 게놈 RNA와 리보핵단백질을 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질을 발현을 CA 프로모터에 의해 유도하는 것을 특징으로 하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 청구항의 각 항에 기재된 발명에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 청구항의 각 항에 기재된 발명 중 하나 또는 복수(또는 전부)의 목적으로 하는 조합으로 되는 발명, 특히, 동일한 독립항(다른 항에 기재된 발명에 포함되지 않는 발명에 관한 항)을 인용하는 항(종속항)에 기재된 발명 중 하나 또는 복수(또는 전부)의 목적으로 하는 조합으로 되는 발명에 관한 것이기도 하다. 각 독립항에 기재된 발명에는, 그 종속항의 임의의 조합으로 되는 발명도 의도되어 있다. 즉 본 발명은,

[0018] [1] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법으로서, 바이러스 생산세포에 있어서의 (i) 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥의 전사 및 (ii) 상기 게놈 RNA와 리보핵단백질을 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질의 발현을, 사이토메갈로바이러스 인헨서 및 닭 β-액틴 프로모터를 포함하는 프로모터에 의해 유도하는 것을 특징으로 하는 방법,

[0019] [2] [1]에 있어서, 상기 바이러스 생산세포에 있어서, 사이토메갈로바이러스 인헨서 및 닭 β-액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩

하는 DNA가 연결된 DNA를 전사시키는 공정을 포함하고, 상기 리보자임은 전사산물을 상기 리보자임과 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥 사이에서 절단하는 활성을 갖는 방법,

- [0020] [3] [1]에 있어서, 상기 바이러스 생산세포에 있어서, 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를 발현시키는 공정, 및 상기 RNA 폴리머라제에 의해, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 전사시키는 공정을 포함하는 방법,
- [0021] [4] [2]에 있어서, 상기 리보자임이 해머헤드 리보자임인 방법,
- [0022] [5] [3]에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를, 상기 바이러스 생산세포에 있어서 에피소말하게(episomally) 발현시키는 방법,
- [0023] [6] [3]에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를, 상기 바이러스 생산세포의 염색체로부터 발현시키는 방법,
- [0024] [7] [3], [5], 또는 [6]에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법,
- [0025] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 쉐다이 바이러스인 방법,
- [0026] [9] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있고, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA를, 상기 세포에 있어서 발현시키는 공정을 추가로 포함하는 방법,
- [0027] [10] 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에, 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA가 연결된 DNA로서, 상기 리보자임은 전사산물을 상기 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥 사이에서 절단하는 활성을 갖는 DNA,
- [0028] [11] [10]에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 DNA,
- [0029] [12] [10] 또는 [11]에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 쉐다이 바이러스인 DNA,
- [0030] [13] [10] 내지 [12] 중 어느 하나에 있어서, 상기 리보자임이 해머헤드 리보자임인 DNA,
- [0031] [14] [10] 내지 [13] 중 어느 하나에 있어서, 리코비나아제에 의해 발현 유도 가능한 DNA,
- [0032] [15] [14]에 있어서, 상기 리코비나아제가 Cre 또는 Flp인 DNA,
- [0033] [16] 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA,
- [0034] [17] [16]에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 DNA,
- [0035] [18] [16] 또는 [17]에 있어서, 리코비나아제에 의해 발현 유도 가능한 DNA,
- [0036] [19] [18]에 있어서, 상기 리코비나아제가 Cre 또는 Flp인 DNA,
- [0037] [20] [10] 내지 [15] 중 어느 하나의 DNA를 보유하는 포유동물 세포,
- [0038] [21] [20]에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 생산용 세포인 포유동물 세포,
- [0039] [22] [20] 또는 [21]에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 포유동물 세포,
- [0040] [23] [20] 내지 [22] 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 쉐다이 바이러스인 포유동물 세포,
- [0041] [24] [16] 내지 [19] 중 어느 하나의 DNA를 보유하는 포유동물 세포,
- [0042] [25] [24]에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 생산용 세포인 포유동물 세포,

- [0043] [26] [24] 또는 [25]에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 추가로 보유하는 포유동물 세포,
- [0044] [27] [26]에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 포유동물 세포,
- [0045] [28] [25] 내지 [27] 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 센다이 바이러스인 포유동물 세포에 관한 것이다.
- [0046] 도면의 간단한 설명
- [0047] 도 1은 pCAGGS(B type) 및 pCAGGS(BSX)의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0048] 도 2는 pCALNdlWE-zeo-NP(Z)의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0049] 도 3은 pCAGGS-P4C(-)의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0050] 도 4는 pCAGGS-L(TDK)의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0051] 도 5는 pCAGGS-F의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0052] 도 6은 pCAGGS-F5R의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0053] 도 7은 pCAGGS-F5R의 구축순서를 나타내는 도면이다(도 6에서 계속된다).
- [0054] 도 8은 pCAGGS-T7의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0055] 도 9는 pCAGGS-SeV 및 pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP의 구축순서를 나타내는 도면이다.
- [0056] 도 10은 pCAGGS-SeV 및 pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP의 구축순서를 나타내는 도면이다(도 9에서 계속된다).
- [0057] 도 11은 pCAGGS-SeV의 구축순서를 나타내는 도면이다(도 10에서 계속된다).
- [0058] 도 12는 HamRbz법에 의해 회수한 전파형 SeV 백터의 HA 어세이의 결과를 나타내는 사진이다.
- [0059] 도 13은 HamRbz법에 있어서 게놈 DNA의 양을 변화시킨 경우의 SeV/ Δ F-GFP의 회수효율을 CIU 어세이에 의해 검토한 결과를 나타내는 도면이다. 2 μ g 이상에서 거의 변화는 없다.
- [0060] 도 14는 HamRbz법에 의한 SeV/ Δ F-GFP의 회수시에 있어서의 pCAGGS-F와 pCAGGS-F5R의 회수효율의 검토를 행한 결과를 나타내는 도면이다. pCAGGS-F5R을 사용한 경우의 쪽이, 회수효율은 훨씬 향상되었다.
- [0061] 도 15는 pCAGGS-T7법에 의해 회수한 전파형 SeV(SeV(TDK)18+GFP)의 HA 어세이의 결과를 나타내는 사진이다. BHK-21, BHK/T7, 293T로 회석하지 않고 계란에 접종했을 때만 HA 활성이 검출되었다.
- [0062] 도 16은 pCAGGS-T7법에 있어서 게놈 DNA의 양을 변화시킨 경우의 SeV/ Δ F-GFP의 회수효율을 CIU 어세이에 의해 검토한 결과를 나타내는 도면이다. 0.5-5.0 μ g에서 거의 변화는 없지만, 5 μ g을 사용했을 때에 가장 회수효율이 좋았다.
- [0063] 도 17은 pCAGGS-T7법에 있어서 도입시약을 변화시킨 경우의 SeV18+GFP/ Δ F의 회수효율을 CIU 어세이에 의해 검토한 결과를 나타내는 도면이다. 인산칼슘을 사용한 경우에는 TransIT-LT-1을 사용한 경우와 동등 이상의 회수효율을 나타내었다.
- [0064] 도 18은 pCAGGS-T7법에 있어서 세포종을 변화시킨 경우의 SeV/ Δ F-GFP의 회수효율을 CIU 어세이에 의해 검토한 결과를 나타내는 도면이다. 시험한 모든 세포로부터 바이러스가 회수되었다. 회수효율은 BHK/T7>BHK-21>293T>LLC-MK2의 순서였다(단, BHK/T7을 사용하는 경우는 pCAGGS-T7은 첨가하지 않았다.).
- [0065] 도 19는 HamRbz법과 pCAGGS-T7법에 의한 SeV/ Δ F-GFP의 회수효율의 비교를 CIU 어세이에 의해 검토한 결과를 나타내는 도면이다. pCAGGS-T7법은 HamRbz법 보다도 재구성효율이 좋았다.
- [0066] 도 20은 pCAGGS-T7법에 의한 SeV/ Δ M-GFP의 재구성을 나타내는 도면이다.
- [0067] 도 21은 pCAGGS-T7법에 의한 SeV/ Δ M Δ F-GFP의 재구성을 나타내는 도면이다.
- [0068] 도 22는 CA 프로모터를 사용한 백터의 재구성률과 CMV 프로모터를 사용한 백터의 재구성률을 비교한 결과를 나타내는 도면이다. CA 프로모터의 백터 재구성의 효율은 압도적으로 높다.

[0069] 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

[0070] 본 발명은 바이러스 생산세포에 있어서의 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사, 및 상기 게놈 RNA와 리보핵단백질(RNP)을 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질의 모든 발현을, 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 하이브리드 프로모터(본 발명에 있어서 이것을 CA 프로모터라 칭한다)에 의해 유도하는 것을 특징으로 하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사는, CA 프로모터에 의해 직접 또는 간접으로 유도한다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사를 CA 프로모터에 의해 직접 유도하기 위해서는, CA 프로모터의 제어하에 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA(마이너스 가닥) 또는 그의 상보 가닥(플러스 가닥)을 코딩하는 DNA를 연결한다. 여기에서, 제어하에 연결한다는 것은, 프로모터 활성화에 따라 목적 유전자의 전사가 일어나도록, 상기 프로모터의 하류에 상기 유전자를 코딩하는 DNA를 연결하는 것을 말한다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사를 CA 프로모터에 의해 간접적으로 유도하기 위해서는, 예를 들면 CA 프로모터의 제어하에 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA를 연결한 DNA와, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥(즉 플러스 가닥이어도 마이너스 가닥이어도 된다)을 코딩하는 DNA를 연결한 DNA를 구축하고, 이들을 세포에 도입한다. 여기에서 RNA 폴리머라제의 인식서열이란, 상기 폴리머라제가 전사를 개시하는 시그널이 되는 DNA서열이다. 상기 인식서열에 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 연결함으로써, 상기 폴리머라제에 의해 게놈 RNA(또는 안티게놈 RNA)를 전사시킬 수 있다. CA 프로모터에 의해 RNA 폴리머라제의 발현이 유도되고, 이 RNA 폴리머라제가 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈의 전사를 유도한다. 실시예에 나타내는 바와 같이, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사를 CA 프로모터에 의해 직접 유도하기 보다는, RNA 폴리머라제의 유도를 매개로 하여 간접으로 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA의 전사를 유도함으로써, 보다 높은 역가로의 바이러스 제조가 가능해진다.

[0071] 게놈 RNA와 RNP를 구성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질이란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA와 복합체를 형성하고, 게놈 RNA의 복제 및 게놈에 코딩되어 있는 유전자의 발현에 필요로해지는 바이러스 단백질 군을 말하고, 이들 단백질을 상기에 있어서 발현시키기 위해서는, 상기 단백질의 코딩서열이 CA 프로모터의 하류에 단순히 연결된 발현 벡터를 사용하면 된다. 이것에 의해, 상기 단백질군의 발현은 CA 프로모터에 의해 직접 유도된다. 상기 단백질은, 바이러스의 엔벨로프를 제외한 코어를 형성하는 단백질로, 전형적으로는, N(뉴클레오펙시드), P(포스포), 및 L(라지) 단백질이다. 바이러스중에 따라서는, 표기는 상이한 경우도 있지만, 대응하는 단백질은 당업자에게 있어서는 자명하다(Anjeanette Robert et al., Virology 247:1-6(1998)). 예를 들면 N은 NP로 표기되는 경우도 있다.

[0072] 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조방법은, 구체적으로는,

[0073] (a) 포유동물 세포에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥의 전사, 및 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 리보핵단백질(RNP)을 구성하는 바이러스 단백질의 발현을, CA 프로모터에 의해 유도하는 공정, 및

[0074] (b) 상기 세포에 있어서 생산된 마이너스 가닥 RNA 바이러스 또는 그의 증식산물을 회수하는 공정을 포함하는 방법이다.

[0075] 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥(안티게놈 RNA)은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 RNP를 구성하는 바이러스 단백질과 함께 RNP를 형성하고, 게놈에 코딩되는 바이러스 단백질이 발현되어 세포 내에서 게놈 RNA 및 안티게놈 RNA가 증폭되어, 엔벨로프 구성 단백질이 결합되어 바이러스 입자가 생성된다. 이것을 회수함으로써, 바이러스를 얻을 수 있다.

[0076] 생성시킨 바이러스는, 적절히 증폭시킬 수 있다. 엔벨로프 유전자를 갖는 전과형 바이러스의 경우는, 포유동물 세포에 감염시키면, 통상의 바이러스 증식 사이클에 따라 바이러스가 증식된다. 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자를 결손하는 전과형을 갖지 않는 바이러스의 경우는, 엔벨로프 구성 단백질을 발현하는 세포(헬퍼 세포)에 도입함으로써, 감염성 바이러스를 증폭할 수 있다.

[0077] 본 발명에 있어서 사이토메갈로바이러스 인핸서 및 닭 β -액틴 프로모터를 포함하는 프로모터(CA 프로모터)란, (i) 사이토메갈로바이러스(CMV)의 IE(immediate early)유전자의 인핸서서열, 및 (ii) 닭 β -액틴 유전자 프로모터서열을 포함하는 프로모터를 말한다. CMV IE 인핸서로서는, 목적으로 하는 CMV주의 immediately early 유전자의 인핸서를 사용할 수 있지만, 예를 들면 서열번호: 1의 염기서열을 포함하는 DNA를 예시할 수 있다.

- [0078] 또한, 닭 β-액틴 프로모터로서는, 닭 β-액틴 유전자의 게놈 DNA의 전사개시부위를 포함하는 DNA 단편으로서, 프로모터 활성을 갖는 단편을 사용할 수 있다. 닭 β-액틴 유전자 프로모터의 염기서열에 대해서는, 예를 들면 T.A. Kost 등에 의해 보고되어 있다(Nucl. Acids Res. 11, 8287-8301, 1983). 닭의 β-액틴 유전자 프로모터는, G(구아닌) 및 C(시토신) 함량이 비교적 높고, TATA 박스(Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383, 1981) 및 CCAA 박스(Nucl. Acids Res. 8, 127-142, 1980) 등 프로모터에 특징적인 서열이 구비되어 있는 유전자 단편이다. 닭의 β-액틴 프로모터에 있어서는, 본래의 β-액틴 구조 유전자의 번역개시코돈(translation initiation codon)(ATG)의 상류-909 위치의 G(구아닌)로부터 -7 위치의 G(구아닌)까지의 영역은 인트론(intron)으로 생각된다. 이 인트론에는 전사를 촉진하는 활성이 있기 때문에, 이 인트론의 적어도 일부까지를 포함하는 게놈 DNA 단편을 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 닭 β-액틴 프로모터로서는, 구체적으로는, 예를 들면 서열번호: 2의 염기서열을 포함하는 DNA를 예시할 수 있다. 인트론의 액셉터서열(acceptor sequence)은, 다른 유전자의 인트론 액셉터서열을 사용하는 것이 바람직하고, 예를 들면 토끼 β-글로빈의 스플라이싱(splicing) 액셉터서열을 사용해도 된다. 구체적으로는, 토끼 β-글로빈의 개시코돈의 직전에 있는 제2 인트론의 액셉터 부위를 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 서열번호: 3에 기재된 염기서열을 포함하는 DNA를 예시할 수 있다. 본 발명에 있어서 CA 프로모터로서는, CMV IE 인핸서서열의 하류에, 인트론의 일부까지를 포함하는 닭 β-액틴 프로모터를 연결하고, 그 하류에 목적으로 하는 인트론 액셉터서열을 부가한 DNA가 적합하다. 일례를 서열번호: 4에 나타내었다. 단백질 발현을 위해서는, 이 서열의 마지막 ATG를 개시코돈으로 하여, 목적 단백질의 코드서열을 부가하면 된다. 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈을 전사시키기 위해서는, 상기의 인트론 액셉터서열의 하류에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 또는 그의 상보 가닥(플러스 가닥 또는 마이너스 가닥 중 어느 쪽이든 된다)을 코드하는 DNA를 연결한다. 단, 후술하는 바와 같이, 인트론 액셉터서열과 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈을 코드하는 DNA의 사이에는, 자기절단형 리보자임을 코드하는 DNA를 삽입하는 것이 적합하다.
- [0079] 하이브리드 프로모터에 사용하는 CMV 인핸서서열 및 닭 β-액틴 유전자 프로모터는, 단리주 또는 단리 개체에 의해 서열에 다양성이 있을 수 있다. 또한, 이들 서열은, 제한효소 인식부위를 추가 또는 삭제하거나, 링커서열을 삽입하기 위해, 경미하게 개변되어도 된다. 즉, 이들 서열은, 서열번호: 4에 예시한 것과 완전히 동일한 서열이 아니더라도, 동등 또는 그 이상(예를 들면 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상)의 프로모터 활성을 갖는 한, 적절히 사용할 수 있다. 염기서열에 변이를 도입하는 방법은, 당업자에게 잘 알려져 있다(Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd ed., Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). CMV 인핸서서열 및 닭 β-액틴 유전자 프로모터서열의 배리언트(variant)로서는, 예를 들면 Genbank accession numbers AF334827, AY237157, AJ575208, 및 X00182 등을 들 수 있고, 이들에 기재된 서열을 본 발명에 있어서 사용할 수 있다. 이들 서열로부터 CA 프로모터의 구축에 필요한 서열을 특정하는데는, 서열번호: 1 및 2와 얼라이먼트(alignment)를 작성하여, 해당하는 영역을 선택하면 된다. 또한, CA 프로모터의 구축에는, pCAGGS(Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199, 일본국 특허공개 제(평)3-168087)나 pCALNdLw(Arai, T. et al. J. Virology 72, 1998, p1115-1121)로부터 DNA를 잘라내 이용할 수 있다.
- [0080] 상기와 같은 CMV IE 인핸서서열 및 닭 β-액틴 프로모터의 배리언트로서는, 서열번호: 1에 기재된 CMV IE 인핸서서열, 및 서열번호: 2에 예시된 닭 β-액틴 프로모터에 있어서, 30% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 보다 바람직하게는 15% 이하, 보다 바람직하게는 10% 이하, 보다 바람직하게는 5% 이하, 보다 바람직하게는 3% 이하의 염기를 치환, 결실, 및/또는 삽입한 염기서열을 포함하고, 동등한 프로모터 활성을 나타내는 서열을 들 수 있다. 이들 서열은, 각각 서열번호: 1에 기재된 염기서열, 또는 서열번호: 2에 기재된 염기서열과 높은 호몰로지(homology)를 나타낸다. 높은 호몰로지로서는, 예를 들면 70% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 93% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상의 동일성을 갖는 염기서열이다. 염기서열의 동일성은, 예를 들면 BLAST 프로그램(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)을 사용해서 결정할 수 있다. 예를 들면 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST의 웹페이지에 있어서 Low complexity를 포함하는 필터는 모두 OFF로 하여, 디폴트(default)의 파라미터를 사용하여 검색을 행한다(Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656). 예를 들면 2개의 서열의 비교를 행하는 blast2sequences 프로그램(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)에 의해, 두 서열의 얼라이먼트를 작성하여, 서열의 동일성을 결정할 수 있다. 갭(gap)은 미스매치(mismatch)와 동일하게 취급하여, 예를 들면 서열번호: 1에 기재된 염기서열 전체 또는 서열번호: 2에 기재된 염기서열 전체에 대한 동일성의 값을 계산한다. 구체적으로는, 얼라이먼트에 있어서의 서열번호: 1 또는 2의 총 염기수(갭을 포함한다)에 있어서의 일치하는 염기수의 비율을

계산한다. 얼라이언트에 있어서의 서열번호: 1 또는 2의 바깥쪽 짝은 계산에서 제외한다.

[0081] 또한, CMV 인헨서서열 및 닭 β-액틴 프로모터서열은, CMV의 계놈 핵산 및 닭 계놈 DNA로부터 하이브리다이제이션에 의해 분리할 수 있다. 본 발명에 있어서 사용되는 CMV 인헨서 및 닭 β-액틴 프로모터는, 각각 서열번호: 1에 기재된 염기서열, 또는 서열번호: 2에 기재된 염기서열 또는 그의 상보서열과 스트린젠트(stringent)한 조건에서 하이브리다이제이션하는 DNA로서, 이들과 동등한 프로모터 활성을 갖는 DNA여도 된다. 하이브리다이제이션에 있어서는, 예를 들면 서열번호: 1에 기재된 염기서열, 서열번호: 2에 기재된 염기서열, 또는 그들의 상보서열을 포함하는 핵산으로부터 프로브를 조제, 또는 하이브리다이제이션의 대상으로 하는 DNA로부터 프로브를 조제하고, 그것이 다른 쪽의 DNA에 하이브리다이제이션하는지를 검출함으로써 동정할 수 있다. 스트린젠트한 하이브리다이제이션의 조건은, 예를 들면 5×SSC, 7%(W/V) SDS, 100 micro-g/ml 변성 연어 정자 DNA, 5×덴하르트액(Denhardt's solution)(1×덴하르트용액은 0.2% 폴리비닐피롤리돈, 0.2% 소혈청 알부민, 및 0.2% 피콜을 포함한다)을 포함하는 용액 중, 60℃, 바람직하게는 65℃, 보다 바람직하게는 68℃에서 하이브리다이제이션을 행한 후, 하이브리다이제이션과 동일한 온도에서 2×SSC 중, 바람직하게는 1×SSC 중, 보다 바람직하게는 0.5×SSC 중, 보다 바람직하게는 0.1×SSC 중에서, 진탕하면서 2시간 세정하는 조건이다.

[0082] 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 제조방법 중 하나의 태양은, 바이러스 생산세포에 있어서, CA 프로모터의 제어하에 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코드하는 DNA가 연결된 DNA를 전사시키는 방법이다. 이 DNA로부터 전사되는 초기 전사산물은, 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA(플러스 가닥 또는 마이너스 가닥)를 포함하고 있다. 여기에서 리보자임은, 이 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA의 사이를 절단하는 활성을 갖도록 설계한다. 전사된 RNA 중의 리보자임은, 시스 또는 트랜스로 작용하여, 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA의 사이를 절단하고, 정확한 계놈 말단을 갖는 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA가 생성된다(Inoue, K. et al. J. Virol. Methods 107, 2003, 229-236). 리보자임을 사용한 방법은, DNA를 전사시켜서 RNA를 생성시킬 뿐으로, 정확한 말단을 갖는 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 계놈 RNA가 자기생성되기 때문에, 바이러스의 제조방법이 간편하고, 특별한 세포를 필요로 하지 않는 점에서 우수하다.

[0083] 특정의 서열을 절단하는 리보자임은, 공지의 기술을 토대로 설계하는 것이 가능하다. 예를 들면 해머헤드 리보자임은, 천연에 있어서는 비로이드(viroid) 등으로부터 분리되어 있고(J. M. Buzayan et al., Nature, 1986, 323: 349-353; G.A. Prody et al., Science, 1986, 231:1577-1580), 원래는 3개의 루프(loop)와 3개의 헬릭스(helix)를 갖는 망치구조(hammer structure)를 갖고, 시스로 작용하는 것 외에, 촉매활성을 갖는 RNA 부분과 표적 RNA를 잘라냄으로써 트랜스로 작용시키는 것도 가능하다. 이러한 리보자임은 예를 들면 하나의 루프와 헬릭스를 가지고, 타겟이 되는 서열과 의사적으로 루프를 취한다(Turner, P.C., The Biochemistry of the Hammerhead Ribozyme. In: Scanlon, KJ., and Kashani-Sabet, M. ed. Ribozymes in the Gene Therapy of Cancer(Medical Intelligence UNIT4), R. G. Landes Company, 1998; 3-14). 해머헤드 리보자임은 구조가 충분히 명확해져 있는 리보자임으로, 타바코 링스팟 바이러스(tobacco ringspot virus)의 리보자임은, NUH(N=A, G, C, 또는 U; H=A, C, 또는 U)의 염기서열의 3' 측을 특이적으로 절단한다(M. Koizumi 등, FEBS Lett. 228:225, 1988). 따라서, 표적으로 하는 목적으로 하는 RNA 중의 UC, UU 또는 UA라고 하는 서열을 포함하는 부위를 특이적으로 절단하는 리보자임을 만들어내는 것이 가능하다(M. Koizumi 등, FEBS Lett. 239:285, 1988; 고이즈미 마코토 및 오즈카 에이코, 단백질 핵산효소, 35: 2191, 1990; M. Koizumi 등, Nucleic Acids Res. 17:7059, 1989).

[0084] 또한, 헤어핀 리보자임(hairpin ribozyme)도 본 발명의 목적에 유용하다. 헤어핀 리보자임은, 예를 들면 타바코 링스팟 바이러스의 위성 RNA(satellite RNA)의 마이너스 가닥에 발견된다(J. M. Buzayan, Nature 323:349, 1986). 이 리보자임도, 표적 특이적인 RNA 절단을 일으키도록 설계할 수 있는 것이 나타내어져 있다(Y. Kikuchi 및 N. Sasaki, Nucleic Acids Res. 19:6751, 1992; 기쿠치 요우, 화학과 생물 30:112, 1992).

[0085] 이들 리보자임은 적절히 개변할 수 있다. In vitro 진화계를 사용하여 천연의 리보자임을 개변하고, 활성이 높은 개변 리보자임을 얻는 방법이 알려져 있다(Joyce.1992. Selective Amplification Techniques for Optimization of Ribozyme Function., in Antisense RNA and DNA, pp. 353-372. Wiley-Liss Inc.). 또한 리보자임은 2량체(dimer)로 기능하는 것도 이용할 수 있다.

[0086] RNA 절단 활성을 갖는 리보자임은 일반적으로, 촉매활성에 필수인 서열과, 표적 RNA의 인식에 필요한 표적 인식 서열을 포함하고 있다. 해머헤드 리보자임의 촉매에 필요한 서열은, 예를 들면 5'-¹C²U³G⁴A⁵N⁶G⁷A⁸N⁹N¹⁰N¹¹N¹²N¹³N¹⁴N¹⁵N¹⁶N¹⁷N¹⁸N¹⁹N²⁰N²¹G²²A²³A²⁴N-3'(서열번호: 5)를 들 수 있지만 이것에 한정되지 않는

다. 여기에서 N은 G, A, U, 또는 C이고, 5'-^{8,9,10,11}NNNN-3'와 5'-^{16,17,18,19}NNNN-3'는 서로 상보적인 서열로 하여 염기 쌍을 형성할 수 있도록 한다. 예를 들면, 5'-^{8,9,10,11}NNNN-3'로서 5'-GUCC-3', 5'-^{16,17,18,19}NNNN-3'로서 5'-GGAC-3'를 들 수 있지만 이것에 제한되지 않는다. ^{12,13,14,15}NNNN의 4염기는 루프를 형성시키는 것이 바람직하다. 여기는 4염기가 아니어도, 2~7염기(즉 N₂₋₇) 정도, 예를 들면 3~5염기(즉 N₃₋₅) 정도여도 된다. ^{23,24}AN은 표적 인식서열과 겹쳐져 있어, ²⁴N은 표적 부위인 상기의 NUH의 N과 상보적인 염기로 한다. 예시로서는 5'-GUGA-3'를 들 수 있다. 보다 구체적인 서열은 실시예에 나타내어져 있다. 이 양쪽 말단에 표적 인식서열을 부가한다. 표적 인식서열로서는 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 사이의 서열과 상보적인 서열로 설정한다.

[0087] 본 발명의 방법 중 다른 하나의 태양은, 바이러스 생산세포에 있어서, CA 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를 발현시키는 방법이다. 여기에서, 이 바이러스 생산세포는, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 하류에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 포함하도록 한다. 발현된 RNA 폴리머라제에 의해, RNA 폴리머라제의 인식서열의 하류에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 코딩하는 DNA가 전사되고, 바이러스 게놈 RNA가 생성된다. 사용되는 RNA 폴리머라제로서는, 특이적 서열(RNA 폴리머라제의 표적서열로, 일반적으로 프로모터서열로도 불리운다)을 인식하여 전사를 개시하는 목적으로 하는 박테리오파지 유래 RNA 폴리머라제가 사용되지만, 구체적으로 예시하자면, 대장균 T3 파지 및 T7 파지, 및 살모넬라 SP6 파지 등을 들 수 있다(Krieg, P.A. and Melton, D.A. 1987. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. Methods Enzymol. 155: 397-15; Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. Nucleic Acids Res. 15: 8783-798; Pokrovskaya, I.D. and Gurevich, V.V. 1994. In vitro transcription: Preparative RNA yields in analytical scale reactions. Anal. Biochem. 220: 420-23).

[0088] T3, T7 및 SP6의 전형적인 인식서열(프로모터서열)을 이하에 나타낸다. 여기에서 「+1」은 전사되는 최초의 염기를 나타낸다.

T7 : TAATACGACTCACTATAGGGAGA (서열번호: 6)
 T3 : AATTAACGCTCACTAAAGGGAGA (서열번호: 7)
 SP6 : ATTTAGGTGACACTATAGAAGNG (서열번호: 8) (N=A, G, C, or T)

[0089]

[0090] -17에서 -1까지의 영역은 전사에 필수로, 이중 가닥(double-stranded)인 것이 필요하다. 또한, 상기의 +1에서 +6 중, 효율이 좋은 전사를 실현시키기 위해서는 최초의 2염기(+1 및 +2)가 GP(P=푸린(purine)(A 또는 G))인 것이 중요하고, 그 밖의 염기는 다른 염기로 치환해도 된다. 바람직하게는, 상기의 하선부에 나타낸 서열이 사용된다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 cDNA(플러스 가닥 또는 마이너스 가닥)는, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열 바로 아래에 결합된다. 효율이 높은 바이러스의 제조를 위해서는, 플러스 가닥을 전사시키도록 하면 된다.

[0091] 이상에 기재한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈의 전사 벡터 및 파지 RNA 폴리머라제의 발현 벡터는, 목적으로 하는 DNA 벡터, 또는 세포에 도입 후에 DNA로 변환되는, 레트로바이러스와 같은 벡터 등이어도 되지만, 전형적으로는 플라스미드 벡터가 사용된다. 벡터는 세포에 도입 후에 에피솜(episome)으로서 존재하여 발현하는 벡터여도 되고, 또는 세포의 염색체에 삽입되어 발현하는 염색체 삽입형 벡터여도 된다. 예를 들면 플라스미드를 사용하는 경우는, 트랜스펙션에 의해 일과적으로 발현시켜도 되고, 또는 염색체에 삽입된 안정 도입주를 선택해도 된다. 특히 파지 RNA 폴리머라제를 안정 발현하는 세포주는, 바이러스 제조의 절차를 간략화할 수 있고, 안정된 고역가 바이러스의 제조가 가능해지기 때문에 유용하다(실시예 2 참조). 또한, 벡터는 항상적으로 발현되는 것이어도 되지만, 필요할 때에 발현을 유도할 수 있는 유도 발현형 벡터여도 된다. 예를 들면, 서열 특이적 리코비나아제(재조합 효소)를 사용하여, 유도적으로 발현시키는 것이 가능하다(실시예 2). 이를 위해 이용할 수 있는 리코비나아제로서는, Cre 리코비나아제 및 FLP 리코비나아제를 들 수 있다. 리코비나아제 표적서열에 끼인 DNA를, CA 프로모터와 상기 리보자임 또는 RNA 폴리머라제의 코딩서열 사이에 삽입함으로써, 리코비나아제에 응답하여 발현을 유도할 수 있다.

[0092] Cre는 박테리오파지 P1이 갖는 약 38 kDa의 cyclization 리코비나아제로, loxP 부위의 사이를 특이적으로 재조합한다(Sauer B, Henderson N. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre

recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci USA 85:5166-70; Sternberg N, Hamilton D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 150:467-86; Brian Sauer, Methods of Enzymology; 1993, Vol. 225, 890-900; Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26:99-109). loxP는 8 bp의 스페이서를 갖는 13 bp의 어싱 매트릭 인버티드 리피트 서열(asymmetric inverted repeat sequence)인(ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT; 하선부가 인버티드 리피트)(서열번호: 9).

- [0093] FLP 리콤비나아제는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 2 micron 플라스미드에 유래하는 약 49 kDa의 flippase 리콤비나아제로, FLP recombinase target(FRT) 서열을 표적으로 하여 재조합을 일으킨다(Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH. 1999. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. Nat Biotechnol 17:1091-6; Broach, J. R., Guarascio, V. R. & Jayaram, M. (1982) Cell 29, 227-34; Cox, M. M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4223-227; Vetter, D., Andrews, B. J., Roberts-Beatty, L. & Sadowski, P. D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7284-288; Abremski, K. & Hoess, R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 1509-514; Stark, W. M., Boocock, M. R. & Sherratt, D. J. (1992) Trends Genet. 8, 432-39; Kilby, N. J., Snaith, M. R. & Murray, J. A. H. (1993) Trends Genet. 9, 413-21). loxP와 마찬가지로, FRT서열도 8 bp의 스페이서를 갖는 13 bp의 리피트서열로 된다(GAAGTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC; 서열번호: 10)(Andrews, B. J. et al. (1985). The FLP Recombinase of the 2 Micron Circle DNA of Yeast: Interaction with its Target Sequences. Cell 40, 795-803). 또한, 표적 특이적 재조합은, 상기의 loxP 부위 및 FRT 부위의 변이서열을 이용하여 행하는 것도 가능하다(Baszczyński, Christopher L. et al, US Patent Application 20040003435).
- [0094] 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능한 DNA를 구축하기 위해서는, 한쌍의 리콤비나아제 표적서열에 끼인 DNA를, CA 프로모터와 리보자임 또는 파지 RNA 폴리머라제의 코드서열 사이에 삽입한다. 이 상태에서는, 삽입된 DNA 단편에 방해되어, CA 프로모터로부터는 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈(리보자임이 부가되어 있다) 또는 파지 RNA 폴리머라제는 발현하지 않는다. 그러나, 리콤비나아제를 작용시키면, 표적서열에서 끼인 DNA가 잘라내어져, CA 프로모터로부터 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 또는 파지 RNA 폴리머라제가 발현되게 된다. 이와 같이, 리콤비나아제에 의해, CA 프로모터로부터의 발현을 유도할 수 있다. 리콤비나아제의 표적서열에 끼인 DNA 중에는, 전사종결시그널(transcription termination signal) 및/또는 종지코돈(stop codon)을 포함하도록 해두고, 리콤비나아제를 작용시키지 않을 때, 하류에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 또는 파지 RNA 폴리머라제의 유전자의 발현을 확실하게 차단할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 또한, 리콤비나아제의 표적서열에 끼인 DNA 중에는, 적절히 마커 유전자를 삽입해 둘 수 있다.
- [0095] 본 명세서에 기재한 바이러스 제조를 위한 DNA 및 세포는, 적절히 조합하여 바이러스 제조를 위한 키트로 할 수 있다. 예를 들면 본 발명은, 이하와 같은 키트에 관한 것이다.
- [0096] (1-1) CA 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코드하는 DNA가 연결된 DNA, 및 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코드하는 DNA를 포함하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 제조 키트.
- [0097] (1-2) (1-1)에 있어서, CA 프로모터의 제어하에 연결된, 상기 게놈 RNA와 RNP를 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질을 코드하는 DNA를 추가로 포함하는 키트.
- [0098] (1-3) (1-1) 또는 (1-2)에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코드하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 키트.
- [0099] (1-4) (1-1) 내지 (1-3) 중 어느 하나에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코드하는 DNA를 추가로 포함하는 키트.
- [0100] (1-5) (1-1) 내지 (1-4) 중 어느 하나에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코드하는 DNA가, CA 프로모터의 제어하에 연결되어 있는 키트.
- [0101] (1-6) (1-1) 내지 (1-5) 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 센다이 바이러스인 키트.
- [0102] (1-7) (1-1) 내지 (1-6) 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0103] (1-8) (1-1) 내지 (1-7) 중 어느 하나에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제가 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능한

키트.

- [0104] (1-9) (1-8)에 있어서, 상기 리콤비나아제가 Cre 또는 Flp인 키트.
- [0105] (2-1) CA 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA가 연결된 DNA를 보유하는 포유동물 세포, 및 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 제어하에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 포함하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 제조 키트.
- [0106] (2-2) (2-1)에 있어서, CA 프로모터의 제어하에 연결된, 상기 게놈 RNA와 RNP를 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질을 코딩하는 DNA를 추가로 포함하는 키트.
- [0107] (2-3) (2-1) 또는 (2-2)에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 키트.
- [0108] (2-4) (2-1) 내지 (2-3) 중 어느 하나에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA를 추가로 포함하는 키트.
- [0109] (2-5) (2-1) 내지 (2-4) 중 어느 하나에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA가, CA 프로모터의 제어하에 연결되어 있는 키트.
- [0110] (2-6) (2-1) 내지 (2-5) 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 센다이 바이러스인 키트.
- [0111] (2-7) (2-1) 내지 (2-6) 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0112] (2-8) (2-1) 내지 (2-7) 중 어느 하나에 있어서, 상기 RNA 폴리머라제가 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능한 키트.
- [0113] (2-9) (2-8)에 있어서, 상기 리콤비나아제가 Cre 또는 Flp인 키트.
- [0114] (3-1) (i) CA 프로모터의 제어하에, 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA가 연결된 DNA로서, 상기 리보자임은, 전사산물을 상기 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥 사이에서 절단하는 활성을 갖는 DNA, 및 (ii) CA 프로모터의 제어하에 연결된, 상기 게놈 RNA와 RNP를 형성하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 제조 키트.
- [0115] (3-2) (3-1)에 있어서, 상기 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥이, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 또는 복수를 결손하고 있는 키트.
- [0116] (3-3) (3-1) 또는 (3-2)에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA를 추가로 포함하는 키트.
- [0117] (3-4) (3-1) 내지 (3-3) 중 어느 하나에 있어서, 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA가, CA 프로모터의 제어하에 연결되어 있는 키트.
- [0118] (3-5) (3-1) 내지 (3-4) 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이너스 가닥 RNA 바이러스가 센다이 바이러스인 키트.
- [0119] (3-6) (3-1) 내지 (3-5) 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리오파지가 SP6 파지, T3 파지, 및 T7 파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0120] (3-7) (3-1) 내지 (3-6) 중 어느 하나에 있어서, 상기 (i) 및/또는 (ii)의 DNA가 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능한 키트.
- [0121] (3-8) (3-7)에 있어서, 상기 리콤비나아제가 Cre 또는 Flp인 키트.
- [0122] 또한 리콤비나아제에 의해 발현 유도 가능하다는 것은, CA 프로모터와 그의 하류의 DNA 사이에 상기 리콤비나아제의 인식서열에 끼인 DNA가 삽입되어 있고, 상기 리콤비나아제에 의해 인식서열에 끼인 DNA가 제거되어, CA 프로모터 하류의 DNA의 발현이 유도되도록 되어 있는 것이다.
- [0123] 본 발명에 있어서 마이너스 가닥 RNA 바이러스란, 마이너스 가닥(바이러스 단백질을 센스로 코딩하는 가닥과 상보적인 안티센스 가닥)의 RNA를 게놈으로서 포함하는 바이러스이다. 마이너스 가닥 RNA는 네거티브 가닥 RNA로도 불리운다. 본 발명에 있어서 사용되는 마이너스 가닥 RNA 바이러스로서는, 특히 단일 가닥 마이너스 가닥 RNA 바이러스(비분절형(non-segmented) 마이너스 가닥 RNA 바이러스라고도 한다)를 들 수 있다. 「단일 가닥 네

거티브 가닥 RNA 바이러스」란, 단일 가닥 네거티브 가닥[즉 마이너스 가닥] RNA를 계놈에 갖는 바이러스를 말한다. 이러한 바이러스로서는, 파라믹소바이러스(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, 및 Pneumovirus속 등을 포함한다), 라브도바이러스(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, 및 Ephemerovirus속 등을 포함한다), 필로바이러스(Filoviridae) 등의 과에 속하는 바이러스가 포함된다.

[0124] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 베이스로 하는 감염력을 갖는 바이러스로서, 유전자를 세포에 도입하기 위한 담체를 말한다. 여기에서 「감염력」이란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 세포로의 접촉능을 보유하고 있어, 접촉된 세포의 내부에 벡터에 포함되는 유전자를 도입할 수 있는 능력을 말한다. 또한 「유전자」는, 본 발명에 있어서 제조하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 갖는 임의의 유전물질을 가리키고 외래유전자에 한정되지 않는다. 즉 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는 외래유전자를 갖고 있어도 갖지 않아도 된다. 본 발명의 방법은, 전파능을 갖는 바이러스 벡터의 제조, 및 전파능을 갖지 않는 결손형 벡터의 제조 양쪽에 적용할 수 있다. 특히, 전파능을 갖지 않는 결손형 벡터의 효율적인 제조를 가능하게 하는 이점을 갖는다. 여기에서 「전파능을 갖는」다는 것은, 바이러스 벡터가 숙주세포에 감염된 경우, 상기 세포에 있어서 바이러스가 복제되어, 감염성 바이러스 입자가 생산되는 것을 가리킨다.

[0125] 재조합 바이러스란, 재조합 폴리뉴클레오티드를 매개로 하여 생성한 바이러스, 또는 그 바이러스의 증폭산물을 말한다. 재조합 폴리뉴클레오티드란, 양쪽 말단 또는 한쪽 말단이 자연 상태와 동일하게는 결합되어 있지 않은 폴리뉴클레오티드를 말한다. 구체적으로는, 재조합 폴리뉴클레오티드는, 인위적으로 폴리뉴클레오티드 사슬의 결합이 개변(절단 및/또는 결합)된 폴리뉴클레오티드이다. 재조합 폴리뉴클레오티드는, 폴리뉴클레오티드 합성, 뉴클레아제처리, 리가아제처리 등을 조합하여, 공지의 유전자 재조합 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 재조합 바이러스는, 유전자조작에 의해 구축된 바이러스 계놈을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키고, 바이러스를 재구축함으로써 생성할 수 있다. 예를 들면, 바이러스 계놈을 코드하는 cDNA로부터, 바이러스를 재구성하는 방법이 알려져 있다(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624(1999)).

[0126] 본 발명에 있어서 유전자인 유전물질을 가리키고, 전사단위를 코드하는 핵산을 말한다. 유전자는 RNA여도 DNA여도 된다. 본 발명에 있어서 단백질을 코드하는 핵산은 상기 단백질의 유전자라 부른다. 또한 일반적으로, 유전자는 단백질을 코드하고 있지 않아도 되고, 예를 들면 유전자는 리보자임 또는 안티센스 RNA 등의 기능적 RNA를 코드하는 것이어도 된다. 일반적으로, 유전자는 천연 유래 또는 인위적으로 설계된 서열일 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서 「DNA」란 단일 가닥 DNA(single-stranded DNA) 및 이중 가닥 DNA(double-stranded DNA)를 포함한다. 또 단백질을 코드한다는 것은 폴리뉴클레오티드가 상기 단백질을 적당한 조건하에서 발현할 수 있도록, 상기 단백질의 아미노산서열을 코드하는 ORF를 센스 또는 안티센스로 포함하는 것을 말한다.

[0127] 본 발명에 있어서 특히 적합하게 사용되는 마이너스 가닥 RNA 바이러스로서는, 예를 들면 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae) 바이러스의 센다이 바이러스(Sendai virus), 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus), 유행성 이하선염 바이러스(Mumps virus), 홍역 바이러스(Measles virus), RS 바이러스(Respiratory syncytial virus), 우역 바이러스(rinderpest virus), 디스템퍼 바이러스(distemper virus), 원숭이 파라인플루엔자 바이러스(SV5), 인간 파라인플루엔자 바이러스 1, 2, 3형, 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)의 인플루엔자 바이러스(Influenza virus), 라브도바이러스과(Rhabdoviridae)의 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(Rabies virus) 등을 들 수 있다.

[0128] 본 발명에 있어서 사용할 수 있는 바이러스를 추가로 예시하자면, 예를 들면 Sendai virus(SeV), human parainfluenza virus-1(HPIV-1), human parainfluenza virus-3(HPIV-3), phocine distemper virus(PDV), canine distemper virus(CDV), dolphin morbillivirus(DMV), peste-des-petits-ruminants virus(PDPR), measles virus(MV), rinderpest virus(RPV), Hendra virus(Hendra), Nipah virus(Nipah), human parainfluenza virus-2(HPIV-2), simian parainfluenza virus 5(SV5), human parainfluenza virus-4a(HPIV-4a), human parainfluenza virus-4b(HPIV-4b), mumps virus(Mumps) 및 Newcastle disease virus(NDV) 등이 포함된다. 보다 바람직하게는, Sendai virus(SeV), human parainfluenza virus-1(HPIV-1), human parainfluenza virus-3(HPIV-3), phocine distemper virus(PDV), canine distemper virus(CDV), dolphin morbillivirus(DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus(MV), rinderpest virus(RPV), Hendra virus(Hendra) 및 Nipah virus(Nipah)로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스를 들 수 있다.

[0129] 본 발명에 있어서 제조되는 마이너스 가닥 RNA 바이러스는, 보다 바람직하게는, 파라믹소바이러스 아과(레스피로바이러스속, 루블라바이러스속 및 모빌리바이러스속을 포함한다)에 속하는 바이러스 또는 그의 유도체이고, 보다 바람직하게는 레스피로바이러스속(genus Respirovirus)(파라믹소바이러스속(Paramyxovirus)이라고도 한

다)에 속하는 바이러스 또는 그의 유도체이다. 유도체에는, 바이러스에 의한 유전자 도입능을 손상시키지 않도록, 바이러스 유전자가 개변된 바이러스, 및 화학 수식된 바이러스 등이 포함된다. 본 발명을 적용 가능한 레스피로바이러스속 바이러스로서는, 예를 들면 인간 파라인플루엔자 바이러스 1형(HPIV-1), 인간 파라인플루엔자 바이러스 3형(HPIV-3), 소 파라인플루엔자 바이러스 3형(BPIV-3), 센다이 바이러스(Sendai virus; 마우스 파라인플루엔자 바이러스 1형으로도 불리운다) 및 원숭이 파라인플루엔자 바이러스 10형(SPIV-10) 등이 포함된다. 본 발명에 있어서 파라믹소바이러스는 가장 바람직하게는 센다이 바이러스이다. 이들 바이러스는 천연주, 야생주, 변이주, 라보계대주(laboratory-passaged strain) 및 인위적으로 구축된 주 등에 유래해도 된다.

[0130] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는 바이러스 게놈 RNA에 탑재 유전자를 안티센스로 코딩하고 있다. 바이러스 게놈 RNA란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 바이러스 단백질과 함께 리보핵단백질(RNP)을 형성하여 상기 단백질에 의해 게놈 중의 유전자가 발현되고, 이 RNA가 복제되어 딸 RNP가 형성되는 기능을 갖는 RNA이다. 일반적으로 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈은 3'리더영역(3'-leader region)과 5'트레일러영역(5'-trailer region) 사이에, 바이러스 유전자가 안티센스서열로서 배치되는 구성을 하고 있다. 각 유전자의 ORF 사이에는 전자종결서열(E서열)-개재서열(I서열)-전사개시서열(S서열)이 존재하고, 이것에 의해 각 유전자의 ORF를 코딩하는 RNA가 각각의 시스트론으로서 전사된다. 본 발명의 바이러스에 포함되는 게놈 RNA는 상기 RNA에 코딩되는 유전자군의 발현 및 RNA 자신의 자율적인 복제에 필요한 바이러스 단백질인 N(뉴클레오캡시드), P(포스포) 및 L(라지)을 안티센스로 코딩하고 있다. 또한 상기 RNA는 바이러스 입자의 형성에 필요한 M(매트릭스) 단백질을 코딩하고 있어도 된다. 더욱이 상기 RNA는 바이러스 입자의 감염에 필요한 엔벨로프 단백질을 코딩하고 있어도 된다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 엔벨로프 단백질로서는 세포막 융합을 일으키는 단백질인 F(퓨전) 단백질 및 세포로의 접착에 필요한 HN(헤마글루티닌-뉴라미니다아제) 단백질을 들 수 있다. 단, 어느 종의 세포에서는 감염에 HN 단백질은 필요 없고(Markwell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4):978-982(1985)), F 단백질만으로 감염이 성립된다. 또한, F 단백질 및/또는 HN 단백질 이외의 바이러스 엔벨로프 단백질을 코딩시켜도 된다.

[0131] 예를 들면 파라믹소바이러스 아과에 속하는 각 바이러스에 있어서의 각 유전자는, 일반적으로 다음과 같이 표기된다. 일반적으로, NP 유전자는 "N"으로도 표기된다. 또한, HN은 뉴라미니다아제 활성을 갖지 않는 경우에는 H로 표기된다.

[0132] 레스피로바이러스속 NP P/C/V M F HN - L

[0133] 루블라바이러스속 NP P/V M F HN (SH) L

[0134] 모빌리바이러스속 NP P/C/V M F H - L

[0135] 예를 들면, 센다이 바이러스 각 유전자의 염기서열 데이터베이스의 액세스번호는 NP 유전자에 대해서는 M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218, P 유전자에 대해서는 M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008, M 유전자에 대해서는 D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056, F 유전자에 대해서는 D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131, HN 유전자에 대해서는 D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131, L 유전자에 대해서는 D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886을 참조할 것. 또 그 밖의 바이러스가 코딩하는 바이러스 유전자를 예시하면, N 유전자에 대해서는 CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; 및 Tupaia, AF079780, P 유전자에 대해서는 CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; 및 Tupaia, AF079780, C 유전자에 대해서는 CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; 및 Tupaia, AF079780, M 유전자에 대해서는 CDV, M12669; DMV, Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; 및 SV5, M32248, F 유전자에 대해서는 CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303; HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; 및 SV5, AB021962, HN(H 또는 G) 유전자에 대해서는 CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; 및 SV-5, S76876을 예시할 수 있다. 단, 각 바이러스는 복수의 주가 알려져 있어, 주의 차이에 의해 상

기에 예시한 것 이외의 서열로 되는 유전자도 존재한다.

[0136] 이들 바이러스 단백질을 코드하는 ORF 및 외래유전자의 ORF는 게놈 RNA에 있어서 상기의 E-I-S서열을 매개로 하여 안티센스로 배치된다. 게놈 RNA에 있어서 가장 3'에 가까운 ORF는, 3'리더영역과 상기 ORF 사이에 S서열만이 필요하고, E 및 I서열은 필요 없다. 또한 게놈 RNA에 있어서 가장 5'에 가까운 ORF는, 5'트레일리영역과 상기 ORF 사이에 E서열만이 필요하고, I 및 S서열은 필요 없다. 또한, 2개의 ORF는, 예를 들면 IRES 등의 서열을 사용하여 동일 시스트론으로서 전사시키는 것도 가능하다. 이러한 경우는, 이들 2개의 ORF 사이에는 E-I-S서열은 필요 없다. 예를 들면, 야생형 파라믹소바이러스의 경우, 전형적인 RNA 게놈은 3'리더영역에 이어 N, P, M, F, HN 및 L 단백질을 안티센스로 코드하는 6개의 ORF가 순서대로 배치되고, 그것에 이어 5'트레일리영역을 다른쪽 말단에 갖는다. 본 발명에 있어서 게놈 RNA는, 바이러스 유전자의 배치는 이것에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 야생형 바이러스와 마찬가지로, 3'리더영역에 이어 N, P, M, F, HN 및 L 단백질을 코드하는 ORF가 순서대로 배치되고, 그것에 이어 5'트레일리영역이 배치되는 것이 바람직하다. 어떤 종의 바이러스에 있어서는, 바이러스 유전자가 상이하지만, 그러한 경우에도 상기와 마찬가지로 각 바이러스 유전자를 야생형과 동일한 배치로 하는 것이 바람직하다. 일반적으로 N, P, 및 L 유전자를 보유하고 있는 박터는, 세포 내에서 자율적으로 RNA 게놈으로부터 유전자가 발현되고, 게놈 RNA가 복제된다. 더욱이 F 및 HN 유전자 등의 엔벨로프의 스파이크 단백질(spike protein)을 코드하는 유전자, 및 M 유전자의 작용에 의해, 감염성의 바이러스 입자가 형성되고, 세포 외로 방출된다. 따라서, 이러한 박터는 전파능을 갖는 바이러스 박터가 된다. 박터에 외래유전자를 탑재시키는 경우는, 후술하는 바와 같이, 이 게놈 중의 단백질 비코딩영역에 삽입하면 된다.

[0137] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 박터는, 야생형 바이러스가 갖는 유전자 중 어느 하나를 결손한 것이어도 된다. 예를 들면, 바이러스의 엔벨로프 구성 단백질의 유전자를 결실시킨 바이러스는, 안전성이 높은 유전자 도입 박터로서 유용하다. 본 발명의 방법에 따르면, 엔벨로프 구성 단백질의 유전자를 결실시킨 바이러스를, 박터나 바이러스 박터를 사용하지 않고, 고역가로 회수하는 것이 가능하다. 엔벨로프 구성 단백질이란, 바이러스의 엔벨로프의 성분이 되는 바이러스 단백질을 말하고, 엔벨로프 표면에 노출되어 세포로의 접촉 또는 감염에 기능하는 스파이크 단백질 및 엔벨로프의 형성 등에 기능하는 라이닝 단백질(lining protein)이 포함된다. 구체적으로는, 엔벨로프 구성 단백질의 유전자로서는 F, HN, 및 M을 들 수 있고, 바이러스종에 따라서는 H, M1, 및 G 등의 유전자가 포함된다. 이들 엔벨로프 구성 단백질의 유전자 중 1개 또는 복수를 결실시킨 바이러스는, 감염세포에 있어서 감염성 바이러스 입자를 형성할 수 없기 때문에 안전성이 높다. 이러한 바이러스의 재구성은, 예를 들면, 결손되어 있는 유전자 산물을 외래적으로 공급함으로써 행할 수 있다. 또는, 완전히 별도의 엔벨로프 단백질로, 바이러스의 감염성을 상보해도 된다. 이러한 엔벨로프 단백질로서는, VSV-G를 예시할 수 있다. 즉, 엔벨로프 구성 단백질 유전자를 결실시킨 바이러스의 구축에 사용되는 엔벨로프 단백질 유전자는, 바이러스의 형성 및 감염성을 보장하는 한, 결실시킨 유전자에 한정되지 않는다. 이와 같이 하여 제조된 바이러스는, 야생형 바이러스와 마찬가지로 숙주세포에 접촉되어 세포융합을 일으키지만, 세포에 도입된 바이러스 게놈은 바이러스 유전자에 결손을 갖기 때문에, 최초와 동일한 감염력을 갖는 딸 바이러스 입자는 형성되지 않는다. 이 때문에, 1회 한정 유전자 도입력을 갖는 안전한 바이러스 박터로서 유용하다(W000/70055, W000/70070, 및 W003/025570; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14)6564-6569(2000)). 게놈으로부터 결손시키는 유전자로서는, 예를 들면 F 유전자, HN 유전자, M 유전자, 또는 그의 임의의 조합을 들 수 있다. 예를 들면, F 유전자가 결손된 재조합 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈을 발현하는 플라스미드를, F 단백질의 발현 박터 및 NP, P, 및 L 단백질의 발현 박터와 함께 숙주세포에 트랜스펙션함으로써, 재조합 바이러스의 재구성을 행할 수 있다(실시예 4~5 참조). 또한, 예를 들면, F 유전자가 염색체에 결합된 숙주세포를 사용하여 바이러스를 제조하는 것도 가능하다. 이 경우는, F 유전자는 유도 발현할 수 있도록, 전술한 재조합 효소 표적서열을 사용하여, 재조합 효소 특이적으로 발현을 유도할 수 있도록 해두는 것이 바람직하다. 바이러스 생산세포에서 발현시키는 이들 단백질 군은, 그 아미노산서열은 바이러스 유래의 서열 그대로가 아니어도, 핵산의 도입에 있어서의 활성이 천연형의 그것과 동등하거나 그 이상이라면, 변이를 도입하거나 또는 다른 바이러스의 상동 유전자로 대응해도 된다.

[0138] 또한, 본 발명에 있어서는, 앞서서도 기술하였지만, 바이러스 게놈이 유래하는 바이러스의 엔벨로프 단백질과는 다른 단백질을 엔벨로프에 포함하는 재조합 바이러스를 제조하는 것도 가능하다. 예를 들면, 바이러스의 재구성 시에, 베이스가 되는 바이러스의 게놈이 원래 코드하는 엔벨로프 단백질 이외의 엔벨로프 단백질을 세포에서 발현시킴으로써, 목적으로 하는 엔벨로프 단백질을 갖는 재조합 바이러스를 제조할 수 있다. 이러한 단백질에 특별히 제한은 없다. 세포로의 감염능을 부여하는 목적으로 하는 단백질이 사용된다. 예를 들면, 다른 바이러스의 엔벨로프 단백질, 예를 들면 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus; VSV)의 G 단백질(VSV-G)을 들 수 있다. VSV-G 단백질은, 임의의 VSV주에 유래하는 것이어도 된다. 예를 들면 Indiana 혈청형 주(J. Virology 39:519-528(1981)) 유래의 VSV-G 단백을 사용할 수 있지만, 이것에 한정되지 않는다. 또한 본 발명의

백터는, 다른 바이러스 유래의 엔벨로프 단백질을 임의로 조합시켜 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 단백질로서, 인간 세포에 감염시키는 바이러스에 유래하는 엔벨로프 단백질이 적합하다. 이러한 단백질로서는 특별히 제한은 없지만, 레트로바이러스의 암포트로픽 엔벨로프 단백질(retroviral amphotropic envelope protein) 등을 들 수 있다. 레트로바이러스의 암포트로픽 엔벨로프 단백질로서는, 예를 들면 마우스 백혈병 바이러스(MuLV) 4070A주 유래의 엔벨로프 단백질을 사용할 수 있다. 또한, MuMLV 10A1 유래의 엔벨로프 단백질을 사용하는 것도 가능하다(예를 들면 pCL-10A1(Imgenex)(Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705(1996)). 또한, 헤르페스바이러스과의 단백질(protein of *Herpesviridae*)로서는, 예를 들면 단순 헤르페스 바이러스(herpes simplex virus)의 gB, gD, gH, gp85 단백질, EB 바이러스의 gp350, gp220 단백질 등을 들 수 있다. 헤파드나바이러스과의 단백질(protein of *Hepadnaviridae*)로서는, B형 간염 바이러스의 S 단백질 등을 들 수 있다. 이들 단백질은, 세포의 도메인을 F 단백질 또는 HN 단백질의 세포내 도메인과 결합시킨 융합 단백질로서 사용해도 된다. 이와 같이 본 발명에 있어서 사용되는 바이러스 백터에는, VSV-G 단백질 등과 같이, 게놈이 유래하는 바이러스 이외의 바이러스에 유래하는 엔벨로프 단백질을 포함하는 슈도 타입 바이러스 백터(pseudotype viral vector)가 포함된다. 바이러스의 게놈 RNA에는 이들 엔벨로프 단백질을 게놈에 코드되지 않도록 설계하면, 바이러스 입자가 세포에 감염된 후에는, 바이러스 백터로부터 이 단백질이 발현되는 경우는 없다.

[0139] 또한, 본 발명에 있어서는, 예를 들면 엔벨로프 표면에 특정 세포에 접착할 수 있는 접착인자, 리간드, 수용체 등의 단백질, 항체 또는 그의 단편, 또는 이들 단백질을 세포외영역에 가져, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 엔벨로프 단백질 유래의 폴리펩티드를 세포내영역에 갖는 키메라 단백질(chimeric protein) 등을 포함하는 바이러스를 제조하는 것도 가능하다. 이것에 의해, 바이러스 백터의 감염의 특이성을 제어할 수 있다. 이들은 바이러스 게놈에 코드되어 있어도 되고, 바이러스의 재구성시에, 바이러스 게놈 이외의 유전자(예를 들면 별도의 발현 백터 또는 숙주염색체상 등에 있는 유전자)로부터의 발현에 의해 공급되어도 된다.

[0140] 또한 바이러스 백터는, 예를 들면 바이러스 단백질에 의한 면역원성을 저하시키기 위해, 또는 RNA의 전사효율 또는 복제효율을 높이기 위해, 바이러스에 포함되는 임의의 바이러스 유전자가 야생형 유전자로부터 개변되어 있어도 된다. 구체적으로는, 예를 들면 복제인자인 N, P, 및 L 유전자 중 적어도 하나를 개변하여, 전사 또는 복제 기능을 높이는 것을 생각할 수 있다. 또한, 엔벨로프 단백질의 하나인 HN 단백질은 적혈구 응집소인 헤마글루티닌(hemagglutinin)활성과 뉴라미니다제(neuraminidase)활성의 양자 활성을 갖지만, 예를 들면 전자의 활성을 약화시킬 수 있으면, 혈액 중에서의 바이러스의 안정성을 향상시키는 것이 가능할 것이고, 예를 들면 후자의 활성을 개변함으로써 감염능을 조절하는 것도 가능하다. 또한, F 단백질을 개변함으로써 막융합능을 조절하는 것도 가능하다. 또, 예를 들면 세포 표면의 항원분자가 될 수 있는 F 단백질 및/또는 HN 단백질의 항원제시에 피토프 등을 해석하고, 이것을 이용하여 이들 단백질에 관한 항원제시능을 약화시킨 재조합 바이러스 백터를 제작하는 것도 가능하다.

[0141] 또한 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터는, 액세서리 유전자가 결손된 것이어도 된다. 예를 들면 SeV의 액세서리 유전자 중 하나인 V 유전자를 녹아웃(knocking-out)함으로써, 배양세포에 있어서의 유전자 발현 및 복제는 장애되지 않고, 마우스 등의 숙주에 대한 SeV의 병원성이 현저히 감소한다(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179). 이러한 약독화 백터(attenuated vector)는 in vivo 또는 ex vivo에 있어서의 독성이 없는 유전자 도입용 바이러스 백터로서 특히 유용하다.

[0142] 마이너스 가닥 RNA 바이러스는 유전자 도입 백터로서 우수하여, 숙주세포의 세포질에서만 전사·복제를 행하여 DNA 상(DNA phase)을 갖지 않기 때문에 염색체로의 통합(integration)은 일어나지 않는다(Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of Virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204). 이 때문에 염색체 이상에 의한 암화(癌化) 및 불사화(不死化) 등의 안전면에 있어서의 문제가 발생하지 않는다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 이 특징은 백터화되었을 때의 안전성에 크게 기여하고 있다. 이종(異種) 유전자 발현의 결과에서는, 예를 들면 센다이 바이러스(SeV)를 연속 다대계대(多代繼代)해도 거의 염기의 변이가 인정되지 않고 게놈의 안정성이 높아, 삽입 이종 유전자를 장기간에 걸쳐 안정하게 발현하는 것이 나타나 있다(Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466(1997)). 또한, 캡시드구조 단백질을 가지지 않는 것에 의한 도입 유전자의 사이즈 또는 패키징의 유연성(flexibility) 등 성질상의 장점이 있다. 이와 같이, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터는, 인간의 유전자 치료를 위한 고효율 백터의 새로운 클래스가 되는 것이 시사된다. 전파능을 갖는 SeV 백터는 외래유전자를 적어도 5 kb까지 도입 가능하여, 전사 유닛을 부가함으로써 2종류 이상의 유전자를 동시에 발현하는 것도 가능하다.

- [0143] 특히 센다이 바이러스는, 설치류에게 있어서는 병원성으로 폐렴을 발생시키는 것이 알려져 있지만, 인간에 대해서는 병원성이 없다. 이것은 또한, 야생형 센다이 바이러스의 경비적 투여에 의해 비인간 영장류에 있어서 심각한 유해작용을 나타내지 않는다고 하는 지금까지의 보고에 의해서도 지지되고 있다(Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997; Bitzer, M. et al., J. Gene Med., 5: 543-553, 2003; Slobod, K.S. et al., Vaccine 22: 3182-3186, 2004). 센다이 바이러스의 이들 특징은, 센다이 바이러스 벡터가 인간의 치료로 응용 가능한 것을 시사하는 것이다.
- [0144] 바이러스 벡터는, 게놈 RNA 중에 목적으로 하는 외래유전자를 코드할 수 있다. 외래유전자를 포함하는 재조합 바이러스 벡터는, 상기 바이러스 벡터의 게놈에 외래유전자를 삽입함으로써 얻어진다. 외래유전자의 삽입위치는, 예를 들면 바이러스 게놈의 단백질 비코드영역의 목적으로 하는 부위를 선택할 수 있고, 예를 들면 게놈 RNA의 3'리더영역과 3'말단에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF 사이, 각 바이러스 단백질 ORF 사이 및/또는 5'말단에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF와 5'트레일러영역 사이에 삽입할 수 있다. 또한, M, F 또는 HN 유전자 등의 엔벨로프 구성 단백질을 유전자를 결실하는 게놈에서는 그 결실영역에 외래유전자를 코드하는 핵산을 삽입할 수 있다. 파라믹소바이러스에 외래유전자를 도입하는 경우는, 게놈으로의 삽입단편의 폴리뉴클레오티드의 사슬 길이(chain length)가 6의 배수가 되도록 삽입하는 것이 바람직하다(Journal of Virology, Vol.67, No.8, 4822-4830, 1993). 삽입한 외래유전자와 바이러스 ORF 사이에는, E-I-S서열이 구성되도록 한다. E-I-S서열을 매개로 하여 2 또는 그 이상의 외래유전자를 직렬로 배치하여 삽입할 수 있다.
- [0145] 외래유전자를 용이하게 삽입할 수 있도록 하기 위해, 게놈 RNA를 코드하는 cDNA 중에 외래유전자를 삽입하기 위한 클로닝 사이트를 설계할 수 있다. 그 부위는 예를 들면 게놈의 단백질 비코드영역의 목적으로 하는 위치여도 되고, 구체적으로는 3'리더영역과 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF의 사이, 각 바이러스 단백질 ORF의 사이 및/또는 5'에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF와 5'트레일러영역 사이에 삽입할 수 있다. 엔벨로프 구성 단백질을 유전자를 결실하는 게놈에서는 그 결실영역에 클로닝 사이트를 설계할 수 있다. 클로닝 사이트는 예를 들면 제한효소의 인식서열로 할 수 있다. 클로닝 사이트는 복수의 제한효소 인식서열을 갖는 소위 멀티클로닝 사이트로 해도 된다. 복수의 외래유전자를 게놈 중의 각각의 위치에 삽입할 수 있도록, 클로닝 사이트는 게놈 중의 복수 개소에 존재해도 된다.
- [0146] 벡터에 탑재하는 외래유전자의 발현 레벨은, 그 유전자의 상류(마이너스 가닥(네거티브 가닥)의 3'측)에 부가하는 전사개시서열의 종류에 따라 조절할 수 있다(W001/18223). 또한, 게놈 상의 외래유전자의 삽입위치에 따라 제어할 수 있어, 마이너스 가닥의 3' 가까이 삽입할수록 발현 레벨이 높고, 5' 가까이 삽입할수록 발현 레벨이 낮아진다. 이와 같이, 외래유전자의 삽입위치는 상기 유전자의 목적으로 하는 발현량을 얻기 위해, 또 전후의 바이러스 단백질을 코드하는 유전자와의 조합이 최적이 되도록 적절히 조절할 수 있다. 일반적으로, 외래유전자의 높은 발현을 얻을 수 있는 것이 유리하다고 생각되기 때문에, 외래유전자는 효율이 높은 전사개시서열에 연결하여, 마이너스 가닥 게놈의 3'말단 가까이 삽입하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 3'리더영역과 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF 사이에 삽입된다. 또는, 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 유전자와 2번째의 바이러스 단백질 유전자의 ORF 사이, 또는 3'로부터 2번째와 3번째의 바이러스 단백질 유전자 사이에 삽입해도 된다. 야생형 파라믹소바이러스에 있어서는, 게놈의 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 유전자는 N 유전자이고, 2번째 유전자는 P 유전자, 3번째 유전자는 M 유전자이다. 반대로, 도입 유전자의 고발현이 바람직하지 않은 경우는, 예를 들면 외래유전자의 삽입위치를 마이너스 가닥 게놈의 가능한 한 5'측에 설정하거나, 전사개시서열을 효율이 낮은 것으로 하는 등으로 하여, 바이러스 벡터로부터의 발현 레벨을 낮게 억제함으로써 적절한 치료효과를 얻을 수 있도록 하는 것도 가능하다.
- [0147] 외래유전자를 코드하는 핵산을 게놈에 삽입할 때에 부가하는 S서열로서는, 예를 들면 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 목적으로 하는 S서열을 사용할 수 있지만, 센다이 바이러스라면, 3'-UCCCWVUWC-5'(W=A 또는 C; V=A, C, 또는 G)(서열번호: 11)의 서열을 적합하게 사용할 수 있다. 특히, 3'-UCCAGUUUC-5'(서열번호: 12), 3'-UCCACUUAC-5'(서열번호: 13), 및 3'-UCCACUUUC-5'(서열번호: 14)가 바람직하다. 이들 서열은, 플러스 가닥(plus strand)을 코드하는 DNA서열로 표시하면 각각 5'-AGGGTCAAAG-3'(서열번호: 15), 5'-AGGGTGAATG-3'(서열번호: 16), 및 5'-AGGGTGAAG-3'(서열번호: 17)이다. 센다이 바이러스 벡터의 E서열로서는, 예를 들면 3'-AUUCUUUUU-5'(서열번호: 18)(플러스 가닥을 코드하는 DNA에서는 5'-TAAGAAAAA-3'(서열번호: 19))가 바람직하다. I서열은, 예를 들면 임의의 3염기여도 되고, 구체적으로는 3'-GAA-5'(플러스 가닥 DNA에서는 5'-CTT-3')를 사용하면 된다.
- [0148] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 제조하기 위해서는, 포유동물 세포에 있어서 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 포함하는 RNP의 재구성에 필요한 바이러스 단백질, 즉 N, P 및 L 단백질의 발현과, 마이너스 가닥

RNA 바이러스의 게놈 RNA를 코드하는 cDNA의 전사를, CA 프로모터에 의해 유도한다. 전사에 의해 마이너스 가닥 게놈(즉 바이러스 게놈과 동일한 안티센스 가닥)을 생성시켜도 되고, 또는 플러스 가닥(안티게놈. 게놈 RNA의 상보 가닥.)을 생성시켜도 바이러스 RNP를 재구성할 수 있다. 벡터의 재구성 효율을 높이기 위해서는 바람직한 것은 플러스 가닥을 생성시킨다. RNA 말단은 천연 바이러스 게놈과 동일하게 3'리더서열과 5'트레일러서열의 말단을 가능한 한 정확하게 반영시키는 것이 바람직하다. 이를 위해서는, 전술한 바와 같이, 전사산물의 5'말단에 자기 절단형 리보자임을 부가해 두고, 리보자임에 의해 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈의 말단을 정확하게 잘라냄으로써 실현시킬 수 있다. 또는, 다른 태양에 있어서는, 전사산물의 5'말단을 정확하게 제어하기 위해, 전사개시부위로서 박테리오파지의 RNA 폴리머라제 인식서열을 이용하여, 상기 RNA 폴리머라제를 세포내에서 발현시킨다.

[0149] 전사산물의 3' 말단을 제어하기 위해서는 예를 들면 전사산물의 3'말단에 자기절단형 리보자임을 코드시켜 두고, 이 리보자임에 의해 정확하게 3'말단이 잘려나가도록 할 수 있다(Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, *EMBO J.* 16: 578-587 및 Yu, D. et al., 1997, *Genes Cells* 2: 457-466). 리보자임으로서는, 델타 간염 바이러스의 안티게놈 가닥(antigenomic strand) 유래의 자기개열 리보자임을 사용할 수 있다.

[0150] 예를 들면, 재조합 센다이 바이러스는 본 명세서의 개시 및 Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, *EMBO J.* 16: 578-587 및 Yu, D. et al., 1997, *Genes Cells* 2: 457-466의 기재 등에 준하여, 다음과 같이 하여 구축할 수 있다.

[0151] 외래유전자를 삽입하는 경우는, 먼저 목적의 외래유전자의 cDNA 염기서열을 포함하는 DNA 시료를 준비한다. DNA 시료는 25 ng/micro-l 이상의 농도에서 전기영동적으로 단일 플라스미드라고 확인할 수 있는 것이 바람직하다. 이하, Not I 부위를 이용하여 바이러스 게놈 RNA를 코드하는 DNA에 외래유전자를 삽입하는 경우를 예로 들어 설명한다. 목적으로 하는 cDNA 염기서열 중에 Not I 인식부위가 포함되는 경우는, 부위 특이적 변이도입법 등을 사용하여, 코드하는 아미노산서열을 변화시키지 않도록 염기서열을 개변하여 Not I 부위를 미리 제거해 두는 것이 바람직하다. 이 시료로부터 목적의 유전자 단편을 PCR에 의해 증폭하여 회수한다. 2개의 프라이머 5'부분에 Not I 부위를 부가해둠으로써, 증폭된 단편의 양쪽 말단을 Not I 부위로 한다. 바이러스 게놈 상에 삽입된 후의 외래유전자의 ORF와 그 양쪽 바이러스 유전자의 ORF 사이에 E-I-S서열이 배치되도록, 프라이머 중에 E-I-S서열을 포함시키도록 한다. 합성 DNA의 길이는, 부가한 E-I-S서열을 포함하는 최종적인 삽입단편의 사슬 길이가 6의 배수가 되도록 염기수를 설계한다(이른바 「6의 법칙(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., *J. Virol.* 72: 891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., *J. Virol.* 67: 4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., *J. Virol.* 67: 4822-4830, 1993). E-I-S서열은, 예를 들면 삽입단편의 올리고 DNA의 3'측에 센다이 바이러스의 마이너스 가닥인 S서열, I서열, 및 E서열, 예를 들면 각각 5'-CTTTCACCCT-3'(서열번호: 20), 5'-AAG-3', 및 5'-TTTTTCTTACTACGG-3'(서열번호: 21)를 사용할 수 있다.

[0152] PCR은 Taq 폴리머라제 또는 그 밖의 DNA 폴리머라제를 사용하는 통상의 방법을 사용할 수 있다. 증폭된 목적 단편은 Not I로 소화한 후, pBluescript 등의 플라스미드 벡터의 Not I 부위에 삽입한다. 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 서열분석기(sequencer)로 확인하여, 바른 서열의 플라스미드를 선택한다. 이 플라스미드로부터 삽입단편을 Not I로 잘라내고, 게놈 cDNA를 포함하는 플라스미드의 Not I 부위에 클로닝한다. 또 플라스미드 벡터를 매개로 하지 않고 게놈 cDNA의 Not I 부위에 직접 삽입하여, 재조합 센다이 바이러스 cDNA를 얻는 것도 가능하다.

[0153] 예를 들면, 재조합 센다이 바이러스 게놈 cDNA라면, 문헌의 기재방법에 준하여 구축할 수 있다(Yu, D. et al., *Genes Cells* 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997). 예를 들면, 외래유전자의 센스가닥의 3'측에 E-I-S서열이 연결된 이중 가닥 DNA를 합성한다. 이것을 게놈의 플러스 가닥을 코드하는 cDNA의 목적으로 하는 S서열의 바로 3'측에 삽입한다. 예를 들면 플러스 가닥 게놈을 코드하는 cDNA에 있어서, 목적으로 하는 바이러스 단백질 유전자의 코드서열과 이것을 전사하는 S서열 사이에 미리 제한효소부위(예를 들면 Not I 부위)를 만들어 두고, 여기에 외래유전자 -E-I-S서열을 코드하는 DNA를 제한효소부위를 이용하여 삽입할 수 있다(Tokusumi, T. et al. (2002) *Virus Res* 86(1-2), 33-8).

[0154] 이와 같이 하여 제작한 바이러스 게놈 RNA를 코드하는 DNA를, CA 프로모터에 의해, 상기의 바이러스 단백질(L, P, 및 N) 존재하에서 세포내에서 전사시킴으로써, 효율적으로 바이러스 벡터를 재구성할 수 있다. 본 발명의 방법은, 여러 재조합 바이러스의 재구성방법에 적용할 수 있다(W097/16539; W097/16538; W003/025570; Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14:

5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404). 이들 방법에 본 발명의 방법을 적용함으로써, 파라인플루엔자, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스, 홍역 바이러스, 우역 바이러스, 센다이 바이러스 등을 포함하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 DNA로부터 높은 효율로 재구성시킬 수 있다. 바이러스 게놈을 코딩하는 DNA에 있어서, F 유전자, HN 유전자, 및/또는 M 유전자 등의 엔벨로프 구성 단백질을 유전자를 결실시킨 경우에는, 그대로는 감염성 바이러스 입자를 형성하지 않지만, 숙주세포에 이들 결실시킨 유전자 및/또는 다른 바이러스의 엔벨로프 단백질을 코딩하는 유전자 등을 별도로, 세포에 도입하여 발현시킴으로써, 감염성 바이러스 입자를 형성시키는 것이 가능하다(Hirata, T. et al., 2002, J. Virol. Methods, 104: 125-133; Inoue, M. et al., 2003, J. Virol. 77: 6419-6429). 바이러스 생산세포에 있어서 엔벨로프 구성 단백질을 발현시키는 경우는, 이들 엔벨로프 구성 단백질도 CA 프로모터에 의해 발현시키는 것이 바람직하다. 이를 위해서는, CA 프로모터의 하류에 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 DNA를 연결한다. 이것에 의해, 엔벨로프 구성 단백질의 발현을 CA 프로모터에 의해 직접 발현할 수 있다.

[0155] 구체적 방법의 하나로서는, 예를 들면 일과적으로 바이러스 제조를 행하는 방법을 들 수 있다. 이 방법의 하나는, CA 프로모터의 제어하에 리보자임과 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 전사하는 벡터를, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 포함하는 RNP를 구성하는 바이러스 단백질을 CA 프로모터의 제어하에서 발현하는 벡터와 함께 포유동물 세포에 트랜스펙션하는 방법이다. RNP를 구성하는 바이러스 단백질의 존재하에서, CA 프로모터로부터 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 RNA 또는 안티게놈 RNA가 전사됨으로써, 기능적 RNP가 형성되어 마이너스가 재구축된다. 세포에 있어서 생산된 마이너스 가닥 RNA 바이러스 또는 그의 증식산물을 회수함으로써, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 얻을 수 있다.

[0156] 또한, 별도의 방법에 있어서는, CA 프로모터의 제어하에 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터와, 상기 RNA 폴리머라제의 인식서열의 하류에 연결된 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 포함하는 RNP를 구성하는 바이러스 단백질(N, L, 및 P)을 CA 프로모터의 제어하에서 발현하는 벡터와 함께 포유동물 세포에 트랜스펙션한다. RNP를 구성하는 바이러스 단백질의 존재하에서, CA 프로모터로부터 RNA 폴리머라제가 발현되어, 이것에 의해 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 RNA 또는 안티게놈 RNA가 전사됨으로써, 기능적 RNP가 형성되어 바이러스가 재구축된다. 세포에 있어서 생산된 마이너스 가닥 RNA 바이러스 또는 그의 증식산물을 회수함으로써, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 얻을 수 있다.

[0157] 트랜스펙션에 사용하는 벡터로서는, 예를 들면 플라스미드가 적합하다. 각 플라스미드는 각각 1종류의 단백질을 발현되도록 해도 되고, 복수의 단백질을 하나의 플라스미드로부터 발현시켜도 된다. 이를 위해서는, 하나의 플라스미드에 프로모터를 복수 갖게 하거나, 또는 IRES 등을 이용하여 하나의 프로모터로부터 복수의 단백질을 생성시키는 것도 가능하다. 예를 들면 IRES 등의 비프로모터 구조에 의해 하나의 프로모터로부터 2개 이상의 단백질을 발현시키는 경우는, 상기 프로모터가 CA 프로모터라면, 이들 단백질은 CA 프로모터로부터 발현되는 것으로 간주된다. 그러나 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 포함하는 RNP를 구성하는 바이러스 단백질(L, P, 및 N)은 적어도, 각각이 따로 따로의 CA 프로모터로부터 발현이 구동되는 것이 바람직하다. 이상과 같은 트랜스펙션에 의한 일과적인 바이러스 생산은, 특별한 세포를 사용하지 않더라도 신속하게 바이러스를 제조할 수 있는 점에서 우수하다.

[0158] 세포로의 핵산의 트랜스펙션에는, 예를 들면 인산칼슘법(Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223), 여러 트랜스펙션 시약을 사용한 방법, 또는 전기천공법(electroporation) 등을 사용할 수 있다. 인산칼슘법에 대해서는, 예를 들면 Chen 및 Okayama(Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)에 따라, 2~4% CO₂, 35°C, 15~24시간, 침전혼액 중의 DNA 농도 20~30 micro-g/ml의 조건으로 실시할 수 있다. 트랜스펙션 시약에 대해서는, DEAE-덱스트란(Sigma #D-9885 M.W. 5×10⁵), DOTMA(Roche), Superfect(QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER(Roche #181169), TransIT-LT1(Mirus, Product No. MIR 2300) 등을 사용할 수 있다. 트랜스펙션 시약과 DNA와의 복합체가 엔도솜 중에서 분해되어 버리는 것을 방지하기 위해, 클로로퀸을 첨가할 수 있다(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). 또한, 전기천공법은, 세포선택성이 없다고 하는 점에서 범용성이 높고, 펄스전류의 지속시간, 펄스의 형태, 전계(전극간의 갭, 전압)의 강도, 버퍼의 도전을, DNA 농도, 세포밀도를 최적화하여 적용된다. 벡터 재구성을 위한 DNA의 세포로의 도입에는, 조작이 간편하고 다량의 세포를 사용하여 다수의 검체를 검토할 수 있는 점에서, 트랜스펙션 시약을 사용하는 방법이 적합하다. 적합하게는 Superfect Transfection

Reagent(QIAGEN, Cat No. 301305), DOSPER Liposomal Transfection Reagent(Roche, Cat No. 1811169), 또는 TransIT-LT1(Mirus, Product No. MIR 2300) 등이 사용되지만, 이들에 제한되지 않는다.

- [0159] 본 발명의 바이러스 제조방법의 다른 양태에서는, 바이러스의 생성에 필요한 단백질 및/또는 RNA를, 바이러스 생산세포의 염색체로부터 발현시킨다. 이 방법의 구체예로서는, CA 프로모터로부터 바이러스 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 전사하는 DNA, 또는, CA 프로모터로부터 박테리오파지 유래의 RNA 폴리머라제를 발현하는 DNA가, 포유동물 세포의 염색체에 통합된 세포주를 사용하는 방법을 들 수 있다. 형질전환세포의 클로닝에 의해, 발현량이 높은 세포를 선택함으로써, 보다 높은 역가의 바이러스를 생산하는 능력을 갖는 세포를 조제할 수 있다. 이 때문에, 고역가의 바이러스를 안정하게 제조하는데 유용하다. 이들 세포주에 있어서는, 보통은 CA 프로모터로부터 바이러스 게놈 RNA나 RNA 폴리머라제를 발현하지 않지만, 자극에 응답하여 발현을 유도할 수 있도록 하는 것도 적합하다. 상기의 loxP나 FRT를 사용하여, 유도적으로 CA 프로모터로부터 유전자를 발현시킬 수 있다. 바이러스 제조시에 Cre 리코비나아제나 FLP 리코비나아제를 발현시키고, CA 프로모터로부터의 발현을 유도한다.
- [0160] 이 세포에서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈 RNA를 포함하는 RNP를 구성하는 바이러스 단백질(N, L, 및 P)의 존재하, 바이러스 게놈 RNA 또는 그의 상보 가닥을 전사시킴으로써, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 재구축을 행할 수 있다. RNP 구성 단백질은, 그들을 코드하는 플라스미드 벡터의 트랜스펙션에 의해 공급하면 된다.
- [0161] 트랜스펙션에 사용하는 각 플라스미드의 양을 예시하자면, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈을 리보자임으로 잘라내는 방법(예를 들면 HamRbz법)에 있어서는, NP 발현 플라스미드를 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.3 μg), P 발현 플라스미드를 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg), L 발현 플라스미드를 0.5 μg ~4.5 μg (보다 바람직하게는 2.0 μg), F 발현 플라스미드를 0.1 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg), 바이러스 게놈 RNA(플러스 가닥 또는 마이너스 가닥)를 코드하는 플라스미드를 0.5 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 5 μg)을 사용하면 된다. 예를 들면 SeV의 제조를 위해서는, 실시예에 기재된 각 플라스미드를 이하의 양으로 트랜스펙션에 사용하면 된다.
- [0162] pCAGGS-NP 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.3 μg)
- [0163] pCAGGS-P 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg)
- [0164] pCAGGS-L(TDK) 0.5 μg ~4.5 μg (보다 바람직하게는 2.0 μg)
- [0165] pCAGGS-F5R 0.1 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg)
- [0166] pCAGGS-SeV 0.5 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 5 μg)
- [0167] (pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP)
- [0168] 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈을 박테리오파지의 RNA 폴리머라제를 매개로 하여 전사시키는 방법에 있어서는, NP 발현 플라스미드를 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg), P 발현 플라스미드를 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg), L 발현 플라스미드를 0.5 μg ~4.5 μg (보다 바람직하게는 2.0 μg), F 발현 플라스미드를 0.1 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg), T7 RNA 폴리머라제를 발현하는 플라스미드를 예를 들면 0.5 μg , 바이러스 게놈 RNA(플러스 가닥 또는 마이너스 가닥)를 코드하는 플라스미드를 0.5 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 5 μg) 사용하면 된다. 예를 들면 SeV의 제조를 위해서는, 실시예에 기재된 각 플라스미드를 이하의 양으로 트랜스펙션에 사용하면 된다.
- [0169] pCAGGS-NP 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg)
- [0170] pCAGGS-P 0.1 μg ~2 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg)
- [0171] pCAGGS-L(TDK) 0.5 μg ~4.5 μg (보다 바람직하게는 2.0 μg)
- [0172] pCAGGS-F5R 0.1 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 0.5 μg)
- [0173] pCAGGS-T7 예를 들면 0.5 μg
pSeV(TDK)18+GFP 0.5 μg ~5 μg (보다 바람직하게는 5 μg)
- [0174] (pSeV/ Δ F-GFP)
- [0175] 트랜스펙션으로부터 48~72시간 정도 배양 후, 세포를 회수하고, 동결 용해를 3회 정도 반복하여 세포를 파쇄한

후, RNP를 포함하는 과쇄물을 세포에 재차 트랜스펙션하여 배양한다. 또는, 배양상청을 회수하고, 세포의 배양액에 첨가하여 감염시켜 배양한다. 트랜스펙션은 예를 들면 리포펙트아민 또는 폴리카티오닉 리포솜(polycationic liposome) 등과 함께 복합체를 형성시켜서 세포에 도입하는 것이 가능하다. 구체적으로는, 여러 가지 트랜스펙션시약을 이용할 수 있다. 예를 들면, DOTMA(Roche), Superfect(QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER(Roche #1811169), TransIT-LT1(Mirus, Product No. MIR 2300) 등을 들 수 있다. 엔도솜 중에서의 분해를 방지하기 위해 클로로퀸을 첨가하는 것도 가능하다(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). RNP가 도입된 세포에서는 RNP로부터의 바이러스 유전자의 발현 및 RNP의 복제 과정이 진행되어 바이러스가 증폭된다. 얻어진 바이러스 용액(배양상청)은, 적절히 희석하여 재증폭을 반복함으로써, 혼입될 수 있는 번잡물을 제거할 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법은, T7 RNA 폴리머라제를 발현하는 백시니아 바이러스를 사용하지 않기 때문에, 백시니아 바이러스를 제거하기 위해 재증폭을 반복할 필요는 없는 점에서 우수하다. 얻어진 벡터는 -80℃에서 보존할 수 있다. 엔벨로프 구성 단백질을 코딩하는 유전자를 결손한 전과능을 갖지 않는 바이러스를 재구성시키기 위해서는, 엔벨로프 구성 단백질을 발현하는 세포(헬퍼세포)를 트랜스펙션에 사용하거나, 또는 엔벨로프 구성 단백질 발현 플라스미드를 함께 트랜스펙션하면 된다. 또한, 트랜스펙션을 행한 세포에 엔벨로프 구성 단백질을 발현하는 세포를 중층하여 배양함으로써 엔벨로프 구성 단백질 유전자 결손형 바이러스를 증폭하는 것도 가능하다(국제공개공보 W000/70055 및 W000/70070 참조).

[0176] 엔벨로프 구성 단백질 유전자를 결손하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 구축하기 위해 사용하는 헬퍼세포는, 예를 들면 결손시킨 엔벨로프 구성 단백질 또는 별도의 엔벨로프 단백질(예를 들면 VSV-G나 암포트로픽 env 등)을 코딩하는 유전자를 트랜스펙션함으로써 제작할 수 있다(W000/70055 및 W000/70070; Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820 참조). 유도 발현을 가능하게 하기 위해서는, 예를 들면 Cre/loxP 유도형 발현 플라스미드 pCALNdlw(Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) 등의 재조합 효소 표적서열을 갖는 벡터에 엔벨로프 단백질 유전자를 삽입한다. 세포는, 예를 들면 SeV의 증식에 자주 사용되고 있는 원숭이 신장 유래 세포주 LLC-MK2 세포(ATCCCL-7)를 사용할 수 있다. LLC-MK2 세포는 10%의 열처리 불활성화 소태아혈청(FBS), 페니실린 G 나트륨 50 단위/ml 및 스트렙토마이신 50 micro-g/ml를 첨가한 MEM에서 37℃, 5% CO₂로 배양한다. SeV-F 유전자산물은 세포상해성을 갖기 때문에, Cre DNA 리컴비나아제에 의해 엔벨로프 단백질 유전자산물이 유도 발현되도록 설계된 상기 플라스미드 pCALNdlw/F를, 인산칼슘법(mammalian transfection kit(Stratagene))에 의해 주지의 프로토콜에 따라 LLC-MK2 세포에 유전자 도입을 행한다. 한계희석에 의해 세포를 클로닝한 후, 세포를 확대 배양하고, 도입 유전자의 고발현 세포주의 선별을 행한다. 이를 위해서는, 예를 들면 아데노바이러스 AxCANCre를 사이토 등의 방법(Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol 72, 1115-1121 (1998))에 의해 예를 들면 moi=3~5로 감염시키고, 웨스턴 블로팅(western blotting) 또는 바이러스 생산에 의해 세포를 선택한다.

[0177] 스파이크 단백질인 F 유전자 결실 또는 HN 유전자 결실은, SeV 벡터를 비전과성으로 하는데, 또한, 엔벨로프의 라이닝 단백질인 M 유전자 결실은 감염세포로부터의 입자 형성을 불가능하는데 유효하다. 또한, F, HN, 및 M의 적어도 2개의 유전자의 임의의 조합을 결손하는 벡터는, 보다 안전성이 보장된다. 예를 들면, M 및 F 유전자 양쪽 결실 SeV(SeV/ΔMΔF)는, 비전과성이고 또한 입자 형성이 결여된 벡터가 된다. SeV/ΔMΔF는 in vitro 및 in vivo에서 높은 레벨의 감염성 및 유전자 발현능을 유지하고 있고, 그 레벨은 야생형 SeV 벡터의 레벨과 동일하다. SeV/ΔMΔF의 이들 특징은, SeV의 안전성 향상에 더욱 기여할 것으로 생각된다.

[0178] 회수된 바이러스의 역가는, 예를 들면 CIU(Cell Infecting Unit)측정 또는 적혈구 응집활성(HA)을 측정함으로써 결정할 수 있다(W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999). 또한, GFP(녹색 형광 단백질) 등의 마커 유전자를 탑재한 벡터에 대해서는, 마커의 지표로 직접적으로 감염세포를 카운트함으로써 역가를 정량할 수 있다(예를 들면 GFP-CIU로서). 이와 같이 하여 측정된 역가는 CIU와 동등하게 취급할 수 있다(W000/70070).

[0179] 바이러스가 재구성되는 한, 재구성에 사용하는 숙주세포는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 쉐다이 바이러스 벡터 등의 재구성에 있어서는, 원숭이 신장 유래의 LLC-MK2 세포 및 CV-1 세포(예를 들면 ATCC CCL-70), 햄스터 신장 유래의 BHK 세포(예를 들면 ATCC CCL-10) 등의 배양세포, 인간 유래 세포 등을 사용할 수 있다. 또한, 대량으로 쉐다이 바이러스 벡터를 얻기 위해, 상기의 숙주로부터 얻어진 바이러스 벡터를 발육계란에 감염시켜, 벡터를 증폭시킬 수 있다. 계란을 사용한 바이러스 벡터의 제조방법은 이미 개발되어 있다(나카니시 등편(1993), 「신경과학연구의 첨단기술 프로토콜 III, 분자신경세포생리학」, 고세이샤, 오사카, pp.153-172).

구체적으로는 예를 들면, 수정란을 배양기에 넣고 9~12일간 37~38℃에서 배양하여 배(embryo)를 성장시킨다. 바이러스 벡터를 요막강(allantoic membrane cavity)으로 접종하고, 수일간(예를 들면 3일간) 알을 배양하여 바이러스 벡터를 증식시킨다. 배양기간 등의 조건은 사용하는 재조합 센다이 바이러스에 의해 변할 수 있다. 그 후, 바이러스를 포함한 요액을 회수한다. 요액으로부터의 센다이 바이러스 벡터의 분리·정제는 통상적인 방법에 따라 행할 수 있다(다치요 마비토 「바이러스 실험 프로토콜」, 나가이, 이시하마 감수, 메디컬뷰사, pp.68-73(1995)).

[0180] 본 명세서에 기재된 바이러스 제조방법 따르면, 본 발명의 바이러스 벡터는, 예를 들면 1×10^5 CIU/mL 이상, 바람직하게는 1×10^6 CIU/mL 이상, 보다 바람직하게는 5×10^6 CIU/mL 이상, 보다 바람직하게는 1×10^7 CIU/mL 이상, 보다 바람직하게는 5×10^7 CIU/mL 이상, 보다 바람직하게는 1×10^8 CIU/mL 이상, 보다 바람직하게는 5×10^8 CIU/mL 이상의 역가로 바이러스 생산세포의 세포외액 중으로 방출시키는 것이 가능하다. 바이러스의 역가는 본 명세서 및 그 밖에 기재된 방법에 의해 측정할 수 있다(Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74(1990); W000/70070).

[0181] 회수한 바이러스 벡터는 실질적으로 순수해지도록 정제할 수 있다. 정제방법은 여과(filtration), 원심분리, 흡착, 및 칼럼 정제 등을 포함하는 공지의 정제·분리방법 또는 그의 임의의 조합에 의해 행할 수 있다. 「실질적으로 순수」란, 바이러스 벡터를 포함하는 용액 중에서 상기 바이러스의 성분이 주요한 비율을 차지하는 것을 말한다. 예를 들면 실질적으로 순수한 바이러스 벡터 조성물은, 용액 중에 포함되는 전체 단백질(total protein)(단 캐리어나 안정제로서 첨가한 단백질은 제외한다) 중, 바이러스 벡터의 성분으로서 포함되는 단백질 비율이 10%(중량/중량) 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상을 차지함으로써 확인할 수 있다. 예를 들면 파라믹소바이러스 벡터라면, 구체적인 정제방법으로서는 셀룰로오스 황산 에스테르 또는 가교 폴리사카라이드 황산 에스테르를 사용하는 방법(일본국 특허공고 제(소)62-30752호 공보, 일본국 특허공고 제(소)62-33879호 공보 및 일본국 특허공고 제(소)62-30753호 공보) 및 푸코오스(fucose) 황산 함유 다당 및/또는 그의 분해물에 흡착시키는 방법(W097/32010) 등을 예시할 수 있지만, 이들에 제한되지 않는다.

[0182] 본 발명의 바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 제조에 있어서는, 벡터는 필요에 따라 약리학적으로 허용되는 목적으로 하는 담체 또는 매체와 조합할 수 있다. 「약학적으로 허용되는 담체 또는 매체」란, 벡터와 함께 투여하는 것이 가능하여, 벡터에 의한 유전자 도입을 유의하게 저해하지 않는 재료이다. 이러한 담체 또는 매체로서는, 예를 들면, 멸균수, 염화나트륨용액, 텍스트로오스용액, 유산 함유 링거용액(Ringer's solution), 배양액, 혈청, 인산완충 생리식염수(PBS) 등을 들 수 있고, 이들과 벡터를 적절히 조합하여 제제화하는 것을 생각할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은, 리포솜의 막안정화제(예를 들면 콜레스테롤 등의 스테롤류)를 포함하고 있어도 된다. 또한, 항산화제(예를 들면 토코페롤 또는 비타민 E 등)를 포함하고 있어도 된다. 더욱이, 그 밖에도 식물유, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 살생물제 등이 함유되어 있어도 된다. 또한 보존제나 그 밖의 첨가제를 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물은 수용액, 캡슐, 현탁액, 시럽 등의 형태일 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 용액, 동결건조물, 또는 에어졸 형태의 조성물이어도 된다. 동결건조물의 경우는 안정화제로서 소르비톨, 수크로오스, 아미노산 및 각종 단백질 등을 포함하고 있어도 된다.

[0183] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 면역을 유도하기 위해 사용하는 경우는, 면역원성을 높이기 위해, 사이토카인, 콜레라독소, 살모넬라독소 등의 면역 촉진제를 첨가하는 것도 가능하다. 또한 이러한 백신 조성물에는, 백반(alum), 불완전 프로인트 애쥬번트(incomplete Freund's adjuvant), MF59(오일 에멀전), MTP-PE(마이코박테리아 세포벽 유래의 muramyl tripeptide), 및 QS-21(soapbark tree *Quilaja saponaria* 유래) 등의 애쥬번트를 조합시키는 것도 가능하다. 또한, 조성물 또는 세포의 투여시에는, 애쥬번트 효과를 높이는 사이토카인류를 조합시키는 것도 유효하다. 이러한 유전자로서는, 예를 들면 i) 단일 가닥 IL-12(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15): 8591-8596, 1999), ii) 인터페론-gamma(미국특허 제5,798,100호), iii) 과립구 콜로니 자극인자(GM-CSF), iv) GM-CSF와 IL-4의 조합(J. Neurosurgery 90(6), 1115-1124(1999)) 등을 들 수 있다.

[0184] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 인 비보에서의 투여량은, 질환, 환자의 체중, 연령, 성별, 증상, 투여조성물의 형태, 투여방법, 도입 유전자 등에 따라 다르지만, 당업자라면 적절히 결정하는 것이 가능하다. 투여되는 벡터는 바람직하게는 약 10^5 CIU/ml에서 약 10^{11} CIU/ml, 보다 바람직하게는 약 10^7 CIU/ml 에서 약 10^9 CIU/ml, 가장 바람직하게는 약 1×10^8 CIU/ml에서 약 5×10^8 CIU/ml 범위 내의 양을 약학상 용인 가능한 담체 중에서 투

여하는 것이 바람직하다. 인간에 있어서는 1회당 투여량은 2×10^5 CIU~ 2×10^{11} CIU가 바람직하고, 투여횟수는 1회 또는 임상상 용인 가능한 부작용의 범위에서 복수회 가능하며, 1일 투여횟수에 대해서도 동일하다. 인간 이외의 동물에 대해서도, 예를 들면, 목적의 동물과 인간과의 체중비 또는 투여 표적부위의 용적비(예를 들면 평균값)로 상기 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 또한, 전과성의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 개체 또는 세포에 투여 후, 치료가 완료되는 등 바이러스 백터의 증식을 억제할 필요가 생겼을 때에는, RNA 의존성 RNA 폴리머라제 저해제를 투여하면, 숙주에 장애를 주지 않고 바이러스 백터의 증식만을 특이적으로 억제하는 것도 가능하다. 엑스 비보 투여의 경우는, 체외(예를 들면 시험관 또는 살레 내)에서 표적 세포에 백터를 접촉 시킨다. MOI는 1~500 사이에서 투여하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 2~300, 더욱 바람직하게는 3~200, 더욱 바람직하게는 5~100, 더욱 바람직하게는 7~70이다. 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터의 투여대상이 되는 생물로서는 특별히 제한은 없고, 인간 및 비인간 포유동물을 포함하는 목적으로 하는 포유동물이 포함되고, 구체적으로는, 인간, 마우스, 랫트, 개, 돼지, 고양이, 소, 토끼, 양, 염소, 원숭이를 들 수 있다.

실시예

[0185] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하는데, 본 발명은 이들 실시예에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서 중에 인용된 문헌은 모두 본 명세서의 일부로서 통합된다.

[0186] [실시예 1] 플라스미드의 구축(도 1)

[0187] · pCAGGS(B type)의 구축

[0188] pCALNdLw(Arai, T. et al. J. Virology 72, 1998, p.1115-1121)를 Xho I로 소화하고, Qiaquick PCR Purification kit로 정제하여, 라이게이션을 행하였다. Xho I 단편이 제거된 것을 선별하여, 얻은 것을 pCAGGS(B type)로 하였다. pCAGGS(B type)를 Sal I로 소화하고, Pfu DNA polymerase로 블런트(blunt)화하고, Qiaquick PCR Purification kit로 정제하여, 라이게이션을 행하였다. Sal I 사이트가 무너진 것을 선별하여, pCAGGS(BSX)로 하였다.

[0189] · pCAGGS-NP의 구축(도 2)

[0190] pCALNdLw를 Spe I 및 EcoT22I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)으로 분리하였다. 2651 bp 단편과 3674 bp 단편을 잘라내고, Qiaquick gel Extraction kit로 정제하였다. 2651 bp 단편을 추가로 Xho I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 1761 bp의 밴드를 정제하였다. Zeocin 저항성 유전자를 pcDNA3.1/Zeo(+)를 템플레이트(template)로 하여 프라이머

[0191] 5'-TCTCGAGTCGCTCGGTACGATGGCCAAGTTGACCCAGTGCCGTTCCGGTGCTCAC-3'(서열번호: 22) 및 프라이머

[0192] 5'-AATGCATGATCAGTAAATTAACAATGAACATCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGT GCACGCAGTTG-3'(서열번호: 23)를 사용하여 PCR에 의해 증폭하여 Xho I 및 EcoT22I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리하여, 438 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. 이 Zeocin 저항성 유전자를 포함하는 밴드와 상기 3674 bp 및 1761 bp의 3종류의 단편을 라이게이션에 의해 연결하여 pCALNdLw-Zeo를 얻었다. 이 pCALNdLw-Zeo를 Swa I로 소화하고 Eco RI 링커(STRATAGENE)를 삽입함으로써 pCALNdLWE-Zeo를 얻었다. 멀티클로닝 사이트(multi-cloning site)가 도입된 센다이 바이러스 cDNA(일본국 특허공개 제2002-272465)(이하 pSeV(TDK)라 칭한다)를 Not I 및 Xho I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리하여, 1669 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. 이 NP 유전자를 포함하는 단편을 Not I 및 Xho I로 소화한 pGEM11Zf(+)(Promega)로 삽입하여, pGEM-NP(Z)PCR14-3으로 하였다. 이것을 템플레이트로 하여 프라이머

[0193] 5'-CCGGAATTCAACAAATGGCCGGGTTGTTGAGCACCTTCGA-3'(서열번호: 24) 및 5'-CCGGAATTCCTAGATTCTCTATCCAGCTACTGCTGCTCG-3'(서열번호: 25)를 사용하여 PCR에 의해 증폭하고, Eco RI로 소화 후, pCALNdLWE-Zeo의 Eco RI 사이트에 도입하여, pCALNdLWE-Zeo-NP(Z)를 얻었다. 이어서 pCALNdLWE-Zeo-NP(Z)를 Xho I로 소화하고, 라이게이션을 행하여, Xho I 단편을 제거한 플라스미드를 구축하고, 이것을 pCAGGS-NP로 하였다.

[0194] · pCAGGS-P4C(-)의 구축(도 3)

[0195] pCALNdLw-HygroM(Inoue, M. et al. J. Virology 77, 2003, p6419-6429)을 Xho I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, Hygromycin 저항성 유전자를 포함하는 1679 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. pCALNdLw를 Xho I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동 후 4864 bp의 밴드를 잘라

내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. 양쪽 단편을 사용하여 라이게이션을 행하고 pCALNdLw-Hygro를 구축하였다. 이 pCALNdLw-Hygro를 Swa I로 소화하고, Nhe I 링커(STRATAGENE)를 삽입함으로써 pCALNdLWN-Hygro를 얻었다. 4C(-)SeV cDNA(Kurotani, Kato, Nagai, et al Genes to Cells 3, 1998, p111-124)를 템플레이트로 하여 프라이머

- [0196] 5'-CTAGCTAGCCACCATGGATCAAGATGCCTTCATTCTAAAAGAAGATTCT-3'(서열번호: 26) 및
- [0197] 5'-CTAGCTAGCCTAGTTGGTCAGTGACTCTATGTCCTTCTACGAGTTCCA-3'(서열번호: 27)를 사용하여 KOD-PLUS DNA Polymerase(TOYBO)로 PCR을 행하였다. gene clean kit를 사용하여 정제하고, PCR 산물을 Nhe I로 소화하여, gene clean kit로 정제하였다. 이것을, 상기의 pCALNdLWN-hygro의 Nhe I 사이트에 도입하고, pCALNdLWN-hygro-P(Z)k4C(-)를 얻었다. 이것을 Xho I로 소화하고, Qiaquick PCR Purification kit로 정제 후, 라이게이션을 행하고 Xho I 단편(Hygromycin 저항성 유전자영역)을 제거한 것을 선택하여, pCAGGS-P4C(-)를 얻었다.
- [0198] · pCAGGS-L(TDK)의 구축(도 4)
- [0199] pSeV(TDK)를 Fse I 및 Sac II로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 6732 bp의 밴드를 잘라내어, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. Pfu DNA Polymerase와 dNTP를 사용하여, 72℃에서 10분간 반응시켜 블린트화하였다. Qiaquick PCR purification kit로 정제 후, pCAGGS(BSX)의 Swa I 사이트에 도입하여 pCAGGS-L(TDK)을 얻었다.
- [0200] · pCAGGS-F 및 pCAGGS-F5R의 구축(도 5~7)
- [0201] pCALNdLw/F(Li, H.-O. et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569)를 Xho I로 소화, 정제 후, 라이게이션을 행하고 Xho I 단편(Neomycin 내성 유전자영역)이 제거된 것을 선택하여, pCAGGS-F를 얻었다. pCALNdLw-ZeoF(일본국 특허출원 제2001-283451)를 템플레이트로 하여 조건(I) 5'-CATTTTGGCAAAGAATTGATTAATTCGAG-3'(서열번호: 28) 및
- [0202] 5'-TCACAGCACCAAGAATCTCTTCTGGCGAGCACCGGCATTTTGTGTC-3'(서열번호: 29)의 프라이머의 조합과, 조건(II)
- [0203] 5'-GACACAAAATGCCGGTGCTCGCCAGAAGAGATTCTTGGGTGCTGTGA-3'(서열번호: 30) 및
- [0204] 5'-GATCGTAATCACAGTCTCTCGAGAGTTGTACCATCTACCTAC-3'(서열번호: 31)의 프라이머의 조합을 사용하여 Pfu Turbo(STRATAGENE)를 사용하여 PCR을 행하였다. PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 조건(I)의 1470 bp의 밴드와 조건(II)의 1190 bp의 밴드를 각각 잘라내고, GENE CLEAN KIT를 사용하여 회수하였다(각각 PCR 산물(I), PCR 산물(II)로 한다). 정제한 PCR 산물(I)과 PCR 산물(II)를 각각 10배 희석한 것을 1 μl씩 혼합하고, 추가로
- [0205] 5'-CATTTTGGCAAAGAATTGATTAATTCGAG-3'(서열번호: 28) 및
- [0206] 5'-GATCGTAATCACAGTCTCTCGAGAGTTGTACCATCTACCTAC-3'(서열번호: 31)의 프라이머의 조합으로 Pfu Turbo를 사용하여 PCR을 행하였다. PCR 산물 5 μl를 아가로스 겔 전기영동하고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색한 결과, 예상되는 2.6 kb의 밴드가 검출되었다. 따라서, 나머지 PCR 산물을 Qiaquick PCR Extraction kit로 정제하였다. 그 다음 Dra III와 Mfe I로 연속적으로 제한효소처리를 행하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 약 2.0 kb의 밴드를 잘라내었다. pCALNdLw-Zeo-F를 Dra III와 Mfe I로 연속적으로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하여, 약 6 kb의 밴드를 잘라내고, GENE CLEAN II KIT(BIO)로 정제하였다. 이 pCALNdLw-Zeo-F Dra III-Mfe I 단편과 상기 PCR Dra III-Mfe I 단편을 라이게이션함으로써 pCALNdLw-Zeo-F furin을 얻었다. 이어서 이 pCALNdLw-Zeo-F furin을 템플레이트로 하여, 조건(I)
- [0207] 5'-CATTTTGGCAAAGAATTGATTAATTCGAG-3'(서열번호: 28) 및
- [0208] 5'-TCACAGCACCGAAGAATCTCCTCCGGCGACGACCGGCATTTTGTGTCGTATC-3'(서열번호: 32)의 프라이머의 조합, 조건(II)
- [0209] 5'-GATACGACACAAAATGCCGGTCGTCGCCGAGGAGATTCTCGGTGCTGTGA-3'(서열번호: 33) 및 5'-AAATCCTGGAGTGTCTTTAGAGC-3'(서열번호: 34)의 프라이머의 조합으로 PCR을 행하였다. 전기영동으로 분리 후, 조건(I)의 약 1.4 kbp의 밴드와 조건(II)의 약 200 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick gel Extraction kit로 각각 정제하였다. 50배 희석한 것을 1 μl씩 혼합하고, 추가로
- [0210] 5'-CATTTTGGCAAAGAATTGATTAATTCGAG-3'(서열번호: 28) 및
- [0211] 5'-AAATCCTGGAGTGTCTTTAGAGC-3'(서열번호: 34)의 프라이머의 조합으로 Pfu Turbo를 사용하여 추가로 PCR을 행

하였다. 5 μ l의 PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 염색하고, 약 1.6 kbp의 밴드를 확인하였다. 나머지를 Qiaquick PCR Purification kit로 정제하여 Cla I와 Fse I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 약 1 kbp의 밴드를 잘라내어, Qiaquick PCR Purification kit로 정제하였다.

[0212] pCALNdLw-Zeo-F furin을 Cla I와 Fse I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 약 8 kbp의 밴드를 잘라내어 Qiaquick PCR Purification kit로 정제하였다. 이것과 상기 PCR 산물의 Cla I-Fse I 소화 정제물로 라이게이션함으로써 pCALNdLw-Zeo F5R을 얻었다. 이 pCALNdLw-Zeo F5R을 Xho I로 소화하고, 정제 후 라이게이션을 행하여 Xho I 단편(Zeocin 저항성 유전자를 포함한다)을 포함하지 않는 것을 선택하여, pCAGGS-F5R을 얻었다.

[0213] · pCAGGS-T7의 구축(도 8)

[0214] pTF7-3(ATCC No.67202)를 Bam HI로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, T7 RNA Polymerase 유전자를 포함하는 2.65 kbp의 단편을 회수하고, pMW219(넛폰 진)의 Bam HI 사이트에 삽입하여 pMW219-T7을 얻었다. 이 pMW219-T7을 Sal I로 소화 후, DNA Blunting kit(TaKaRa)를 사용하여 평활 말단으로 하고, Eco RI 링커(Stratagene #901026)를 도입하여, pMW219-T7-Eco RI를 얻었다. 이 pMW219-T7-Eco RI를 Eco RI로 소화하고, T7 RNA Polymerase를 포함하는 Eco RI 단편을 정제하여, 상기 pCALNdLWE의 Eco RI 사이트에 도입함으로써 pCALNdLWE-T7을 얻었다.

[0215] · pCAGGS-SeV 및 pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP의 구축(도 9-11)

[0216] pSeV(TDK)를 Not I 및 Kpn I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 2995 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하였다. MlinkerF 5'-GGCCGCTCGACATCGATGCTAGCCTCGAGCCGCGGTAC-3'(서열번호: 35)와 MlinkerR 5'-CGCGCTCGAGGCTAGCATCGATGTCGACGC-3'(서열번호: 36)를 각 2 μ g(2 μ l)과 H₂O를 21 μ l 혼합하고, 95 $^{\circ}$ C 5분, 85 $^{\circ}$ C 15분, 65 $^{\circ}$ C 15분, 37 $^{\circ}$ C 15분, 25 $^{\circ}$ C 15분, 4 $^{\circ}$ C에서 어닐링시켰다. 이 혼합액과 pSeV(TDK) Not I-Kpn I 정제액을 라이게이션하고, pSeV/Linker를 얻었다. 이 pSeV/Linker를 템플레이트로 하여, pGEM-F5 5'-CTAACTATGCGGCATCAGAGC-3'(서열번호: 37) 및 pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3'(서열번호: 38)를 사용하고, KOD-Plus(TOYOBO)를 사용해서 PCR 반응을 행하여 Qiaquick PCR Purification kit를 사용해서 정제하였다. 이 정제액을 템플레이트로 하여 RibLF1

[0217] 5'-CTATAGGAAAGGAATTCCTATAGTCACCAAACAAGAG-3'(서열번호: 39)와 pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3'(서열번호: 38)를 사용하고, KOD-PLUS(TOYOBO)를 사용해서 PCR 반응을 행하여 Qiaquick PCR Purification kit를 사용해서 정제하였다. 이 정제액을 템플레이트로 하여 RibLF2

[0218] 5'-GATGAGTCCGTGAGGACGAACTATAGGAAAGGAATTC-3'(서열번호: 40)와 pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3'(서열번호: 38)를 사용하고, KOD-Plus(TOYOBO)를 사용해서 PCR 반응을 행하여 Qiaquick PCR Purification kit를 사용해서 정제하였다. 더욱이, 이 정제액을 템플레이트로 하여 RibLF3

[0219] 5'-GCGGGCCCTCTTGTGTTGGTCTGATGAGTCCGTGAGGAC-3'(서열번호: 41)와 pGEM-R1 5'-GCCGATTCATTAATGCAGCTGG-3'(서열번호: 38)를 사용하고, KOD-Plus(TOYOBO)를 사용해서 PCR 반응을 행하여 Qiaquick PCR Purification kit를 사용해서 정제하였다. 이 정제 PCR 산물을 pCAGGS(BSX)의 Swa I 사이트에 도입하고, pCAGGS-SeV(m)으로 하였다. 이어서, pSeV18+b(+)/ Δ F-EGFP(Li, H.-O. et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569)를 Not I 및 Sal I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 1972 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하여, Not I 및 Sal I로 소화하고, 정제한 pCAGGS-SeV(m)과 라이게이션하여, pCAGGS-SeV(m)A를 얻었다. pSeV(+)/18/ Δ F를 Nhe I 및 Kpn I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 3325 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하여, Not I 및 Sal I로 소화하고, 정제한 pCAGGS-SeV(m)과 라이게이션하여 pCAGGS-SeV(m)AC를 얻었다.

[0220] pSeV18+b(+)(Li, H.-O. et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569)를 Sal I 및 Nhe I로 소화하고, Qiaquick PCR purification kit로 정제하였다. 그리고, LITMUS38(NEW ENGLAND BioLabs)의 Sal I-Nhe I 사이트에 도입하여 Litmus38/SeV Sal I-Nhe I를 얻었다. 이 Litmus38/SeV Sal I-Nhe I를 Sal I 및 Nhe I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 9886 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하여, pCAGGS-SeV(m)AC의 Sal I-Nhe I 사이트에 도입함으로써 pCAGGS-SeV를 얻었다.

[0221] pSeV/ Δ F-EGFP(Li, H.-O. et al. J. Virology 74, 2000, p6564-6569)를 Sal I 및 Nhe I로 소화하고, Qiaquick PCR purification kit로 정제하였다. 그리고, LITMUS38(NEW ENGLAND BioLabs)의 Sal I-Nhe I 사이트에 도입하

여 Litmus38/Sal I-Nhe I Δ F-GFP를 얻었다. 이 Litmus38/Sal I-Nhe I Δ F-GFP를 Sal I 및 Nhe I로 소화하고, 아가로스 겔 전기영동으로 분리 후, 8392 bp의 밴드를 잘라내고, Qiaquick Gel Extraction kit로 정제하여, pCAGGS-SeV(m)AC의 Sal I-Nhe I 사이트에 도입함으로써 pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP를 얻었다.

[0222] · pGEM-IRES-Luci의 구축

[0223] pMAMneo-Luci(Clontech)로부터 Bam HI로 소화하여 얻은 루시페라제 프래그먼트(luciferase fragment)를 pTM1(Nature, 348, 1, November, 1990, 91-92)의 Bam HI 사이트에 도입하여 pGEM-IRES-Luci를 구축하였다.

[0224] [실시에 2] T7 RNA Polymerase 발현 BHK-21(이하 BHK/T7으로 한다)의 수립

[0225] 상기에서 구축한 pCALNdLWE-T7을 BHK-21 세포(ATCC CCL-10)에 mammalian transfection kit(Stratagene) 또는, SuperFect(Qiagen)를 사용하여 트랜스펙션을 행하였다. 400 μ g/ml의 G418을 포함하는 D-MEM에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 2주간 배양하고, 단일 세포로부터 증식시킨 약제내성 클론을 얻었다. 얻어진 약제내성 클론은 Cre DNA recombinase를 발현하는 재조합 아데노바이러스(AxCANCre)를 Moi=4로 감염시키고, 24시간 후에 세포를 PBS로 1회 세정한 후에, 세포를 회수하고, anti-T7 RNA Polymerase rabbit Polyclonal antibody를 사용한 웨스턴 블롯 해석에 의해 T7 RNA Polymerase의 발현을 확인하였다.

[0226] 발현을 확인할 수 있었던 클론에 관하여 pGEM-IRES-Luci를 SuperFect를 사용하여 트랜스펙션하였다. 24시간 후에 세포를 회수하여 듀얼 루시페라제 리포터 시스템(Dual Luciferase Reporter System)(Promega) 키트를 사용하여 MiniLumat LB9506(EG&G BERTHOLD)으로 루시페라제 활성을 측정하여 T7 RNA Polymerase의 활성을 확인하였다.

[0227] [실시에 3] 종래법에 의한 재조합 센다이 바이러스의 제조

[0228] LLC-MK2 세포를 5×10^6 cells/dish로 100 mm 페트리접시에 뿌리고, 24시간 배양 후, 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 1회 세정한 후, 3 μ g/ml의 소랄렌(psoralen)과 장파장 자외선(365 nm)으로 5분간 처리한 T7 RNA 폴리머라제를 발현하는 리콤비넨트 백시니아 바이러스(recombinant vaccinia virus)(Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126(1986))에 실온에서 1시간 감염시켰다(moi=2). 세포를 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 2회 세정한 후, LacZ 탑재 F 결실형 센다이 바이러스 벡터 cDNA(pSeV(+18:LacZ) Δ F), pGEM/NP, pGEM/P, 및 pGEM/L(Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579(1996))을 각각 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g/dish 및 엔벨로프 플라스미드 pGEM/FHN을 4 μ g/dish 첨가하고, Opti-MEM(GIBCO)에 현탁하여, SuperFect transfection reagent(1 μ g DNA/5 μ l의 SuperFect, QIAGEN)를 넣고, 실온에서 15분간 방치 후, 최종적으로 3% FBS를 포함하는 Opti-MEM 3 ml에 넣은 DNA-SuperFect 혼합물을 세포에 첨가하여 배양하였다. 3시간 배양 후, 세포를 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 2회 세정하고, 시토신 β -D-아라비노후라노시드(cytosine β -D-arabinofuranoside) 40 μ g/ml(AraC, Sigma)와 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는 MEM에서 24시간 배양하였다. 배양상청을 제거하고, 혈청을 포함하지 않는 MEM(40 μ g/ml AraC, 7.5 μ g/ml 트립신을 포함한다)에 현탁된 100 mm 페트리접시 1장 분량의 F 발현 LLC-MK2/F7 세포(F 발현을 유도한 세포는 LLC-MK2/F7/A라 기재한다; Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000); W000/70070) 현탁액 5 ml를 중층하였다. 추가로 배양 48시간 후, 이들 세포와 상청을 회수하여, 각각 P0-d3 샘플로 하였다. P0-d3의 펠릿을 Opti-MEM에 현탁하고(2×10^7 cells/ml), 동결융해를 3회 반복하여 리포펙션시약(lipofection reagent) DOSPER(Boehringer mannheim)와 혼합하고(10^6 cells/25 μ l DOSPER) 실온에서 15분간 방치한 후, F 발현 LLC-MK2/F7 세포주(LLC-MK2/F7/A)에 트랜스펙션(10^6 cells/well 24-well-plate)하고, 혈청을 포함하지 않는 MEM(40 μ g/ml AraC, 7.5 μ g/ml 트립신을 포함한다)에서 배양하였다. 배양 후 7일째에 상청을 회수하여, P1-d7 샘플로 하였다. 추가로 상청 전량을 12-well-plate에 뿌린 F 발현 LLC-MK2/F7 세포주(LLC-MK2/F7/A)에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감염시켜, MEM 배지로 1회 세정한 후, 혈청을 포함하지 않는 MEM(40 μ g/ml AraC, 7.5 μ g/ml 트립신을 포함한다)에서 배양하였다. 배양 후 7일째에 상청을 회수하여, P2-d7 샘플로 하였다. 추가로 상청 전량을 6-well-plate에 뿌린 F 발현 LLC-MK2/F7 세포주(LLC-MK2/F7/A)에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감염시켜, MEM 배지로 1회 세정한 후, 혈청을 포함하지 않는 MEM(7.5 μ g/ml 트립신을 포함한다)에서 배양하였다. 배양 후 7일째에 상청을 회수하여, P3-d7 샘플로 하였다. 추가로 상청 전량을 10 cm plate에 뿌린 F 발현 LLC-MK2/F7 세포주(LLC-MK2/F7/A)에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감염시켜, MEM 배지로 1회 세정한 후, 혈청을 포함하지 않는 MEM(40 μ g/ml AraC, 7.5 μ g/ml 트립신을 포함한다)에서 배양하였다. 배양 후 7일째에 상청을 회수하여, P4-d7 샘플로 하였다.

- [0229] [실시예 4] CA 프로모터를 사용한 센다이 바이러스 벡터의 회수방법 1
- [0230] · pCAGGS에 해머헤드 리보자임을 부가한 센다이 바이러스 게놈을 사용한 센다이 바이러스 벡터의 회수방법(이하 HamRbz법으로 한다)
- [0231] 4-1[전과형 SeV 벡터의 회수]
- [0232] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-SeV를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 2 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 4일간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 4일간 배양하였다. LLC-MK2/F7/A 중층 4일 후에 상층을 회수하여, HA 어세이를 행하였다. HA는 네거티브였기 때문에, 회수한 상층을 10일간 부란(孵卵)시킨 계란 3개에 100 μ l를 접종하고, 부란기로 35 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였다. 그 다음, 요액을 회수하여, HA 어세이를 행하였다. 그 결과, 3개 중 2개의 계란으로부터 회수한 요액에서 HA 활성이 인정되었다. 따라서, 본 방법에 의해 야생형 센다이 바이러스 벡터를 회수하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다(도 12).
- [0233] 4-2[F 결실형 SeV 벡터의 회수]
- [0234] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP를 각각 0.3 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 0.5~5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보존하였다.
- [0235] 4-3[GFP 발현 세포의 카운트에 의한 CIU의 측정(GFP-CIU)]
- [0236] CIU 어세이의 2~3일 전에 LLC-MK2 세포를 12 well-plate에 뿌렸다. 2일 전의 경우는 1.5×10^5 cells/well의 비율로, 10% FBS가 든 MEM 1 ml/well로 뿌리고, 3일 전의 경우는 8.0×10^4 cells/well의 비율로, 10% FBS가 든 MEM 1 ml/well로 뿌렸다. CIU 어세이 당일에 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 1회 세정한 후, 중층 후 24, 48, 72 시간째에 회수한 배양액의 1/10 희석계열을 MEM 배지에서 제작하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감염 후, MEM 배지로 1회 세정하고, MEM 배지 1 ml를 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 2일 배양 후, 세포를 형광현미경으로 관찰하고, 적절한 희석 웰의 GFP 양성 세포의 수를 세었다. 그 결과, 중층 72시간 후에 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ GFP-CIU/ml의 바이러스 벡터가 회수되었다(도 13).
- [0237] 4-4[F 유전자의 공급이 야생형 F(이하 F)의 경우에 대한 furin 인식서열을 도입한 F(이하 F5R)의 경우의 생산성의 개선]
- [0238] pCAGGS로 F 단백질을 공급할 때에, 야생형의 F 유전자를 사용한 경우와 furin 인식서열을 도입한 F5R의 경우에

서 재구성효율의 비교를 행하였다. 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L, pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP를 각각 0.3 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 2 μ g에 고정하고, pCAGGS-F 또는 pCAGGS-F5R을 0.1 μ g, 0.3 μ g, 0.5 μ g, 0.7 μ g, 0.9 μ g으로 조건을 다양하게 하여 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보존하였다. 모든 샘플을 회수한 후에 CIU 어세이를 행하였다. 그 결과, pCAGGS-F는 0.7 μ g일 때가 가장 재구성효율이 좋고, 중층 24시간째, 48시간째, 72시간째에서 각각 0 CIU/ml, 7.9×10^2 CIU/ml, 3.3×10^4 CIU/ml의 바이러스 벡터를 포함하고 있었다. 한편으로, pCAGGS-F5R을 사용하는 경우는, 0.5 μ g일 때가 가장 좋고, 중층 24시간째, 48시간째, 72시간째에서 각각 3.2×10^4 CIU/ml, 5.7×10^5 CIU/ml, 1.2×10^7 CIU/ml의 바이러스 벡터를 포함하고 있었다. 양자에서 재구성효율이 가장 좋았던 조건에서 비교해 보면, pCAGGS-F5R을 사용하는 경우 쪽이 pCAGGS-F를 사용하는 경우 보다도 재구성효율이 훨씬 좋고, 중층 72시간째에서 373배 높은 바이러스 벡터를 얻을 수 있었다(도 14).

[0239] [실시에 5] CA 프로모터를 사용한 센다이 바이러스 벡터의 회수방법 2

[0240] · pCAGGS-T7을 사용한 센다이 바이러스 벡터의 회수방법(이하 pCAGGS-T7법으로 한다)

[0241] 5-1[전과형 SeV 벡터의 회수]

[0242] 트랜스펙션하는 전날에 각 세포를 6 well plate에 뿌렸다(293T 세포: 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM, LLC-MK2 세포: 5.0×10^5 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM, BHK-21 세포: 2.5×10^5 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM, BHK/T7 세포: 2.5×10^5 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM). 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pSeV(TDK)18+GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 3일간 배양하였다. 이 때, GFP 양성 세포의 수를 카운트한 결과, 293T 세포에서 246개, LLC-MK2 세포에서 16개, BHK-21 세포에서 288개, BHK/T7 세포에서 405개였다. 그 다음, 배양액을 버리고, PBS(-) 1 ml를 세포에 첨가하고, 셀 스크래퍼(cell scraper)로 박리하여, 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)에 회수하였다. 1회 동결용해를 한 후에, 회석하지 않는 세포현탁액과 PBS(-)로 10배, 100배, 1000배 희석한 세포현탁액 100 μ l를 10일 계란에 각각 접종하였다. 부란기로 35 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 후, 요액을 회수하여, HA 어세이를 행하였다. 그 결과, 회석하지 않는 293T 세포, BHK-21 세포, BHK/T7 세포현탁액을 접종한 계란에서 바이러스의 증식을 확인할 수 있었다(도 15).

[0243] 5-2[F 결실형 SeV 벡터의 회수]

[0244] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pSeV/ Δ F-GFP(W000/70070)를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 0.5~5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분

간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, Try-MEM에 1×10⁶ cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80°C에서 보존하였다.

[0245] 5-3[GFP 발현 세포의 카운트에 의한 CIU의 측정(GFP-CIU)]

[0246] CIU 어세이의 2~3일 전에 LLC-MK2 세포를 12 well-plate에 뿌렸다. 2일 전의 경우는 1.5×10⁵ cells/well의 비율로, 10% FBS가 든 MEM 1 ml/well로 뿌리고, 3일 전의 경우는 8.0×10⁴ cells/well의 비율로, 10% FBS가 든 MEM 1 ml/well로 뿌렸다. CIU 어세이 당일에 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 1회 세정한 후, 중층 후 24, 48, 72 시간째에 회수한 배양액의 1/10 희석계열을 MEM 배지에서 제작하고, 37°C에서 1시간 감염 후, MEM 배지로 1회 세정하고, MEM 배지 1 ml를 첨가하였다. 37°C에서 2일 배양 후, 세포를 형광현미경으로 관찰하고, 적절한 희석 웰의 GFP 양성 세포의 수를 세었다. 그 결과, 중층 72시간 후에 1×10⁶~1×10⁷ GFP-CIU/ml의 바이러스 벡터가 회수되었다(도 16).

[0247] 이 pCAGGS-T7법은 플라스미드의 도입 세포에 293T 세포를 사용했을 때는, 인산칼슘법으로도 SeV18+GFP/ Δ F의 회수에 성공하였다. 효율은 TransIT-LT1과 동등 이상이었다(도 17).

[0248] [실시예 6] pCAGGS-T7법의 세포종의 검토

[0249] pCAGGS-T7법이 293T 이외의 세포에서도 센다이 바이러스 벡터의 회수가 가능한지의 여부를 검토하기 위해, LLC-MK2, BHK-21, BHK/T7, 293T 세포에서 회수하는 것이 가능한지를 시도하였다. 각 세포를 트랜스펙션하는 전날에 6 well plate에 뿌렸다(LLC-MK 세포: 5×10⁵ cells/well, BHK-21 세포: 2.5×10⁵ cells/well, BHK/T7 세포: 2.5×10⁵ cells/well, 293T 세포: 1.0×10⁶ cells/well). 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pSeV/ Δ F-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g으로 용해하였다(단, BHK/T7 세포를 사용할 때는 pCAGGS-T7은 첨가하지 않았다). 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, Try-MEM에 1×10⁶ cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80°C에서 보존하였다. n=3에서 행하였다. 그 결과, 테스트한 모든 세포종으로부터 벡터가 회수되었다. 벡터의 회수효율은 BHK/T7 세포>BHK-21 세포>293T 세포>LLC-MK2 세포의 순서였다(도 18). 또한, BHK/T7 발현주에는 pCAGGS-T7은 트랜스펙션하지 않았기 때문에, T7 발현주에 있어서 CA 프로모터를 사용해도, F 결실형 SeV/ Δ F-GFP의 회수가 가능한 것이 나타내어졌다.

[0250] [실시예 7] HamRbz법과 pCAGGS-T7법의 비교

[0251] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10⁶ cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pCAGGS-SeV/ Δ F-GFP를 각각 0.3 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g으로 용해하였다.

10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80°C에서 보존하였다.

[0252] pCAGGS-T7법에 대해서는, 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-T7, pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pSeV/ Δ F-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, Try-MEM에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80°C에서 보존하였다. CIU 측정 결과, pCAGGS-T7법은 HamRbz법 보다도 재구성효율이 높은 것이 나타내어졌다(도 19).

[0253] [실시예 8] M 유전자 결실형 벡터 및 MF 양쪽 유전자 결실형 벡터의 구축

[0254] pCAGGS-T7법에 의한 M 유전자 결실형 센다이 바이러스 벡터(SeV/ Δ M), 및 MF 양쪽 유전자 결실형 센다이 바이러스 벡터(SeV/ Δ M Δ F-GFP)의 재구성을 행하였다.

[0255] · SeV/ Δ M 벡터의 재구성

[0256] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-M, pCAGGS-T7, pSeV/ Δ M-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 1.0 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 센다이 바이러스의 M 유전자와 F 유전자 양쪽을 발현하는 LLC-MK2 세포(이하 LLC-M/F로 한다)를 1 ml/well로 중층하여, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 중층 후 3일간은 매일 배지를 새로운 Try-MEM으로 교환하였다. 그 후로는 2~3일마다 교환하였다. 트랜스펙션 후 9일째에 배양액을 새로운 LLC-MK2-M/F 세포에 첨가하고, 32°C, 5% CO₂ 하에서 9일간 배양하였다(2~3일마다 배지 교환하였다). 그 상층을 새로운 LLC-MK2-M/F 세포에 첨가하고, 마찬가지로 4일간 배양하였다. 이 배양상층 중에는 5.4×10^8 CIU/ml의 SeV/ Δ M-GFP 벡터가 존재하고 있는 것을 확인하였다. 트랜스펙션 후 4일간 배양한 세포(P0d4), 1회째의 계대 후 7일간 배양한 세포(P1d7), 2회째의 계대 후 4일간 배양한 세포(P2d4)의 벡터 감염세포의 확산을 GFP의 형광으로 관찰한 결과를 도 20에 나타내었다.

[0257] · SeV/ Δ M Δ F-GFP의 재구성

[0258] 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pCAGGS-M, pCAGGS-T7, pSeV/ Δ M Δ F-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 1.0 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-M/F를 1 ml/well로 중층하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 중층 후 3일간은 매일 배지를 새로운 Try-MEM으로 교환하였다. 그 후로는 2~3일마다 교환하였다. 트랜스펙션 후 9일째에 배양액을 새로운 LLC-M/F 세포에 첨가하고, 32 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 9일간 배양하였다(2~3일마다 배지 교환하였다). 그 상청을 새로운 LLC-M/F 세포에 첨가하고, 마찬가지로 4일간 배양하였다. 추가로, 그 상청을 새로운 LLC-M/F 세포에 첨가하고, 마찬가지로 3일간 배양하였다. 이 배양상청 중에는 4.6×10^7 CIU/ml의 SeV/ Δ M Δ F-GFP 벡터가 존재하고 있는 것을 확인하였다. 트랜스펙션 후 4일간 배양한 세포(P0d4), 1회째의 계대 후 9일간 배양한 세포(P1d9), 2회째의 계대 후 4일간 배양한 세포(P2d4), 3회째의 계대 후 3일간 배양한 세포(P3d3)의 벡터 감염세포의 확산을 GFP의 형광으로 관찰한 결과를 도 21에 나타내었다.

[0259] [실시예 9] CA 프로모터와 CMV 프로모터의 재구성효율의 비교

[0260] CMV 프로모터와 CA 프로모터의 비교를 위해, CMV 프로모터 지배하의 NP, P, L, F5R, T7 RNA polymerase를 pC1-neo(Promega)에 탑재하였다(각각 pC1-neo-NP, pC1-neo-P4C(-), pC1-neo-L(TDK), pC1-neo-F5R, 및 pC1-neo-T7). 293T 세포를 트랜스펙션하는 전날에 1×10^6 cells/well/2 ml 10% FBS가 든 D-MEM에서 6 well plate에 뿌렸다. 트랜스펙션은 이하와 같이 하여 행하였다. Opti-MEM 30 μ l에 TransIT-LT1(Mirus)을 15 μ l 혼합하고, 실온에서 10~15분간 배양하였다. 배양하는 동안 DNA 용액을 조정하였다. CA 프로모터(pCAGGS 플라스미드)를 사용하는 경우는, Opti-MEM 20 μ l에 pCAGGS-NP, pCAGGS-P4C(-), pCAGGS-L(TDK), pCAGGS-F5R, pCAGGS-T7, pSeV/ Δ F-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 2 μ g, 0.5 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. CMV 프로모터(pC1-neo)를 사용하는 경우는, Opti-MEM 20 μ l에 pC1-neo-NP, pC1-neo-P4C(-), pC1-neo-L(TDK), pC1-neo-F5R, pC1-neo-T7, pSeV/ Δ F-GFP를 각각 0.5 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 5 μ g으로 용해하였다. 10~15분 후에 TransIT-LT1 용액과 DNA 용액을 혼합하여 실온에서 15분간 정치하였다. 정치하는 동안에 세포의 배지를 빼서 새로운 10% FBS가 든 D-MEM을 1 ml/well로 조용히 첨가하였다. 15분 후, Opti-MEM(GIBCO) 500 μ l를 DNA-TransIT-LT1 혼합물에 첨가하고, 전량을 세포에 첨가해서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 72시간 배양 후, 배양액을 버리고, 트립신 7.5 μ g/ml를 포함하는(혈청을 포함하지 않는) MEM(이하 Try-MEM)에 1×10^6 cells/ml가 되도록 현탁한 LLC-MK2/F7/A 세포를 1 ml/well로 중층하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 그로부터 24시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 48시간 후에 배양액 1 ml를 회수하고, 새로운 Try-MEM을 1 ml 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 72시간 후에 배양액 1 ml를 회수하였다. 회수한 배양액은 7.5% BSA를 133 μ l 첨가하고(최종농도 1% BSA), CIU를 측정할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보존하였다.

[0261] CA 프로모터를 사용한 경우는, 트랜스펙션 72시간째에 GFP의 확산이 관찰되고, LLC-MK2/F7/A 세포를 중층 후에도 효율 좋게 증식되었다. 한편, CMV 프로모터를 사용한 경우는, 트랜스펙션 72시간째에는 GFP의 형광은 관찰되지 않고, LLC-MK2/F7/A 세포 중층 48시간 후에 겨우 GFP의 작은 확산이 관찰되었다. 벡터의 재구성은, CA 프로모터 쪽이 1000배 이상 효율적이었다. 따라서, CA 프로모터 쪽이 CMV 프로모터 보다도 훨씬 벡터의 회수에 적합하다.

[0262] 또한, CMV 프로모터 지배하의 유전자와 CA 프로모터 지배하의 유전자의 조합에서의 검토를 행한 바, 헬퍼 플라스미드 전부를 CA 프로모터로 드라이브하는 쪽이 CMV와 CA의 조합 보다도 벡터의 회수효율은 훨씬 좋았다.

산업상 이용 가능성

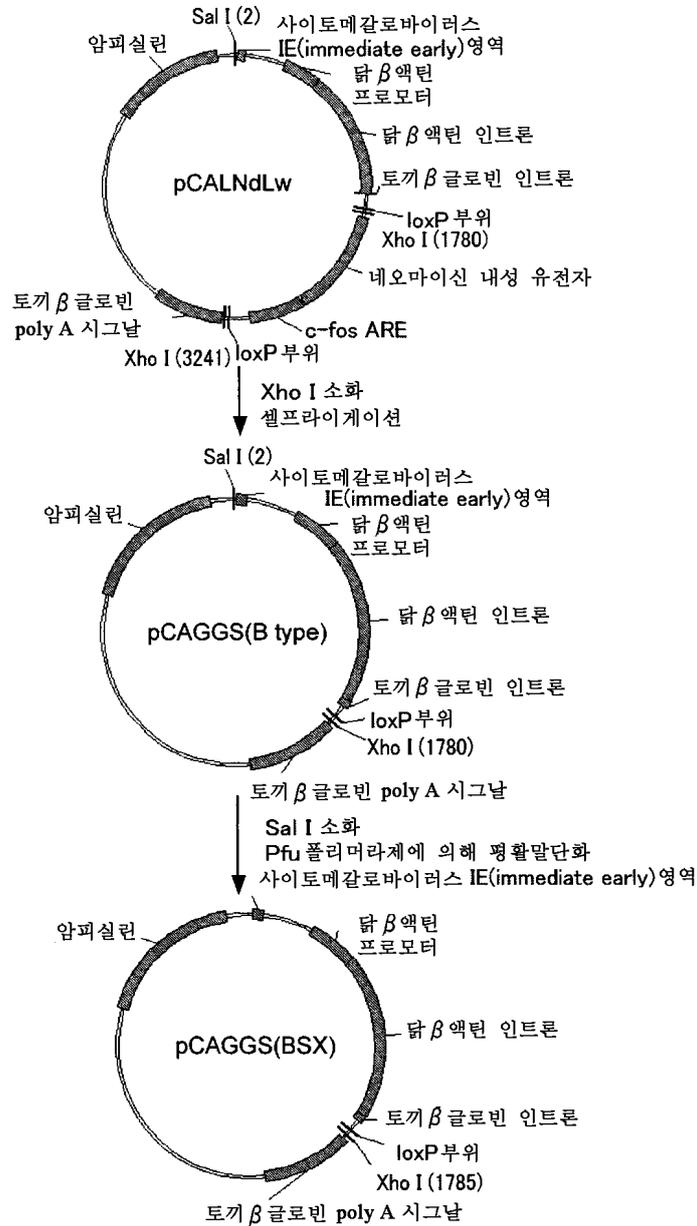
[0263] 본 발명의 방법은, 백시니아 바이러스를 사용하지 않고, 고효율로 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 제조하는 것이 가능하고, 제조과정 및 생성 제품의 안전성이 높다. 특히 본 발명에 의하면, F 유전자, HN 유전자, 및/또

는 M 유전자 등의 엔벨로프 구성 단백질 유전자를 결손하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를, 백시니아 바이러스 비의존적으로 제조할 수 있다. 본 발명의 방법은, 특히 유전자 치료용 벡터 등의 높은 안전성이 필요한 벡터의 제조방법으로서 유용하다.

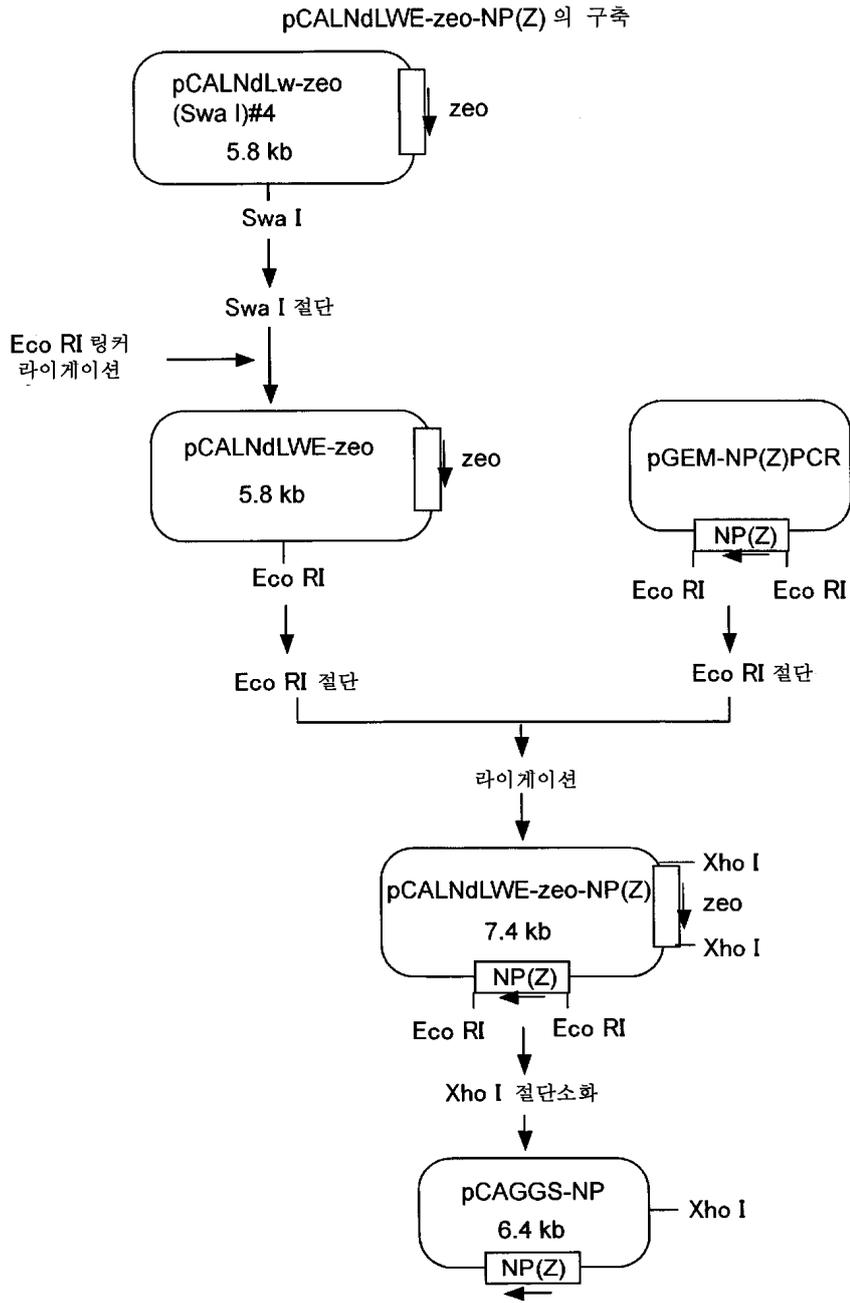
도면

도면1

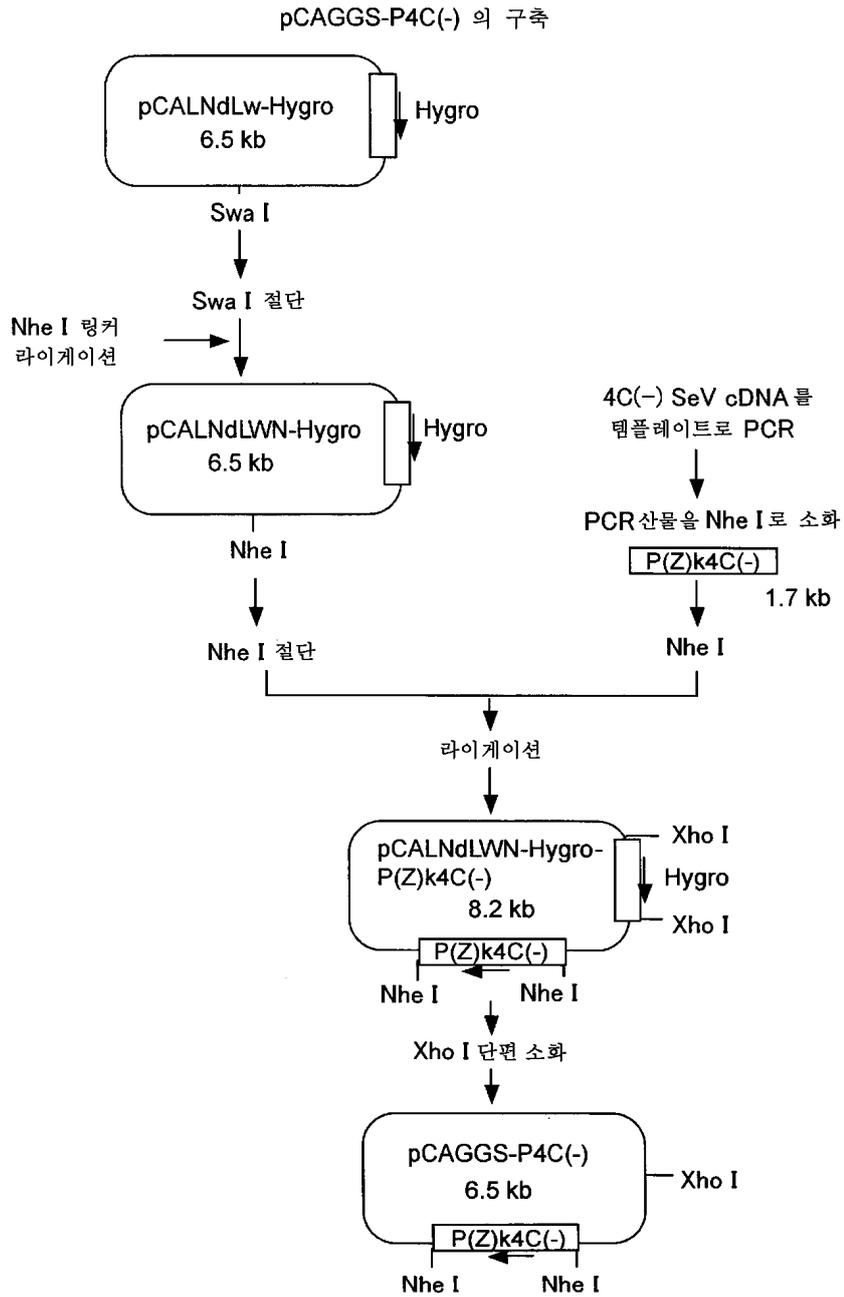
pCAGGS(B type), pCAGGS(BSX) 의 구축



도면2

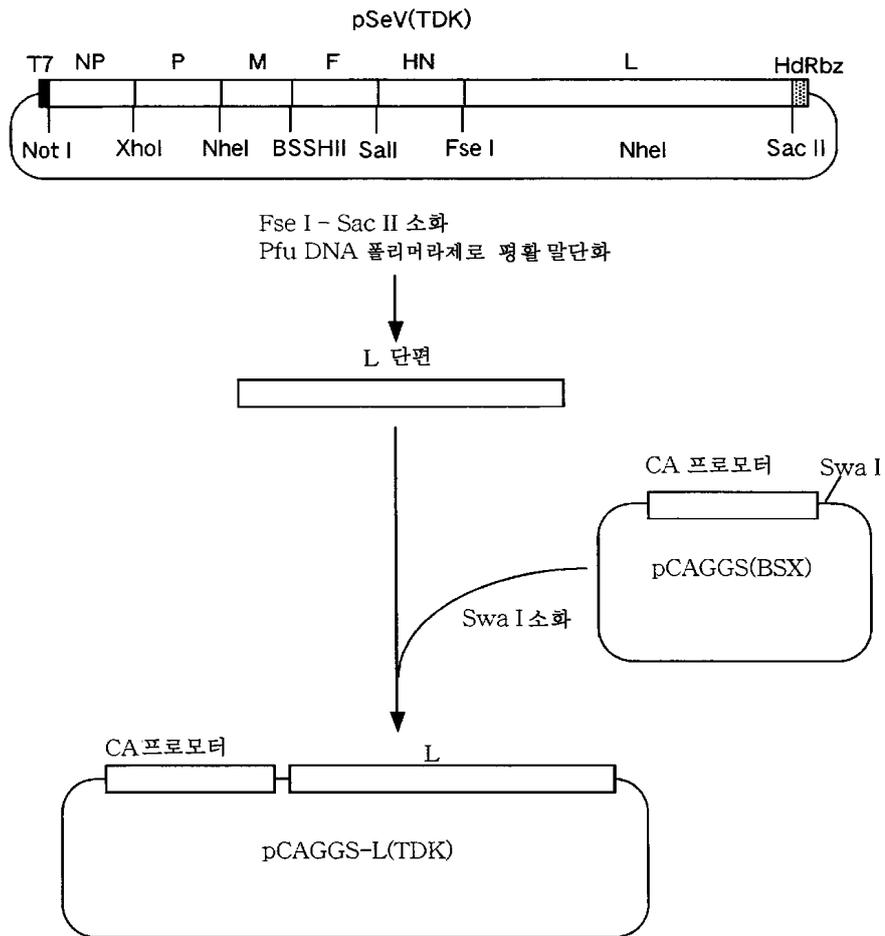


도면3



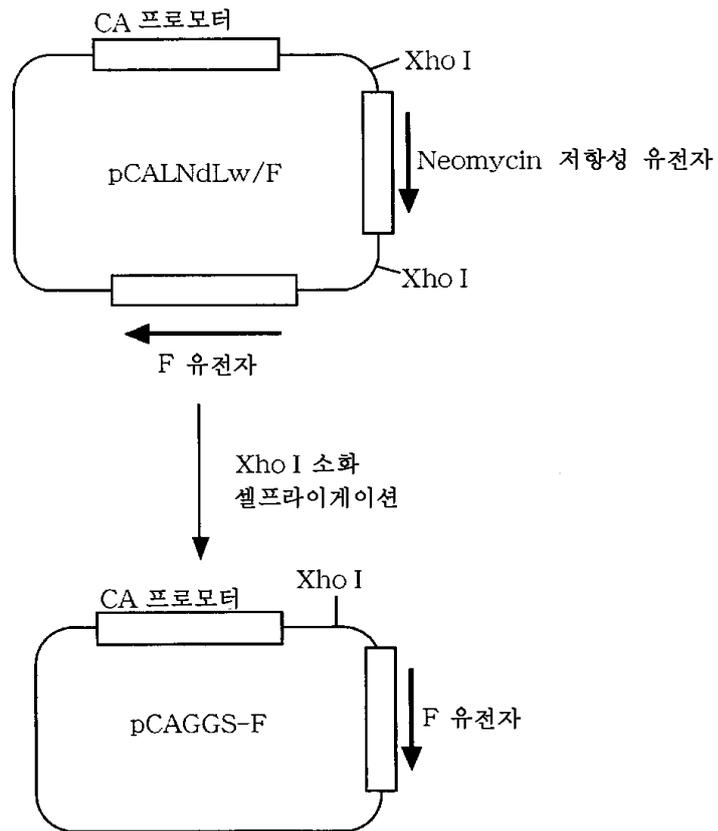
도면4

pCAGGS-L(TDK)의 구축

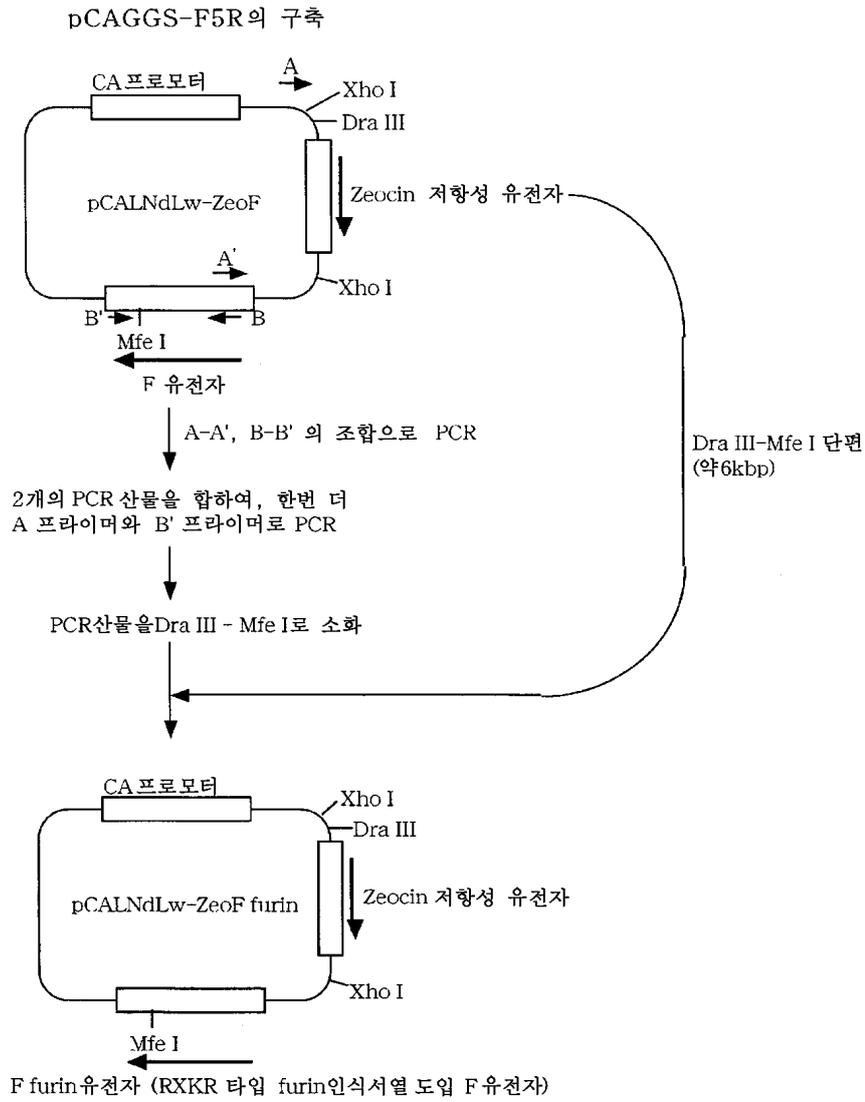


도면5

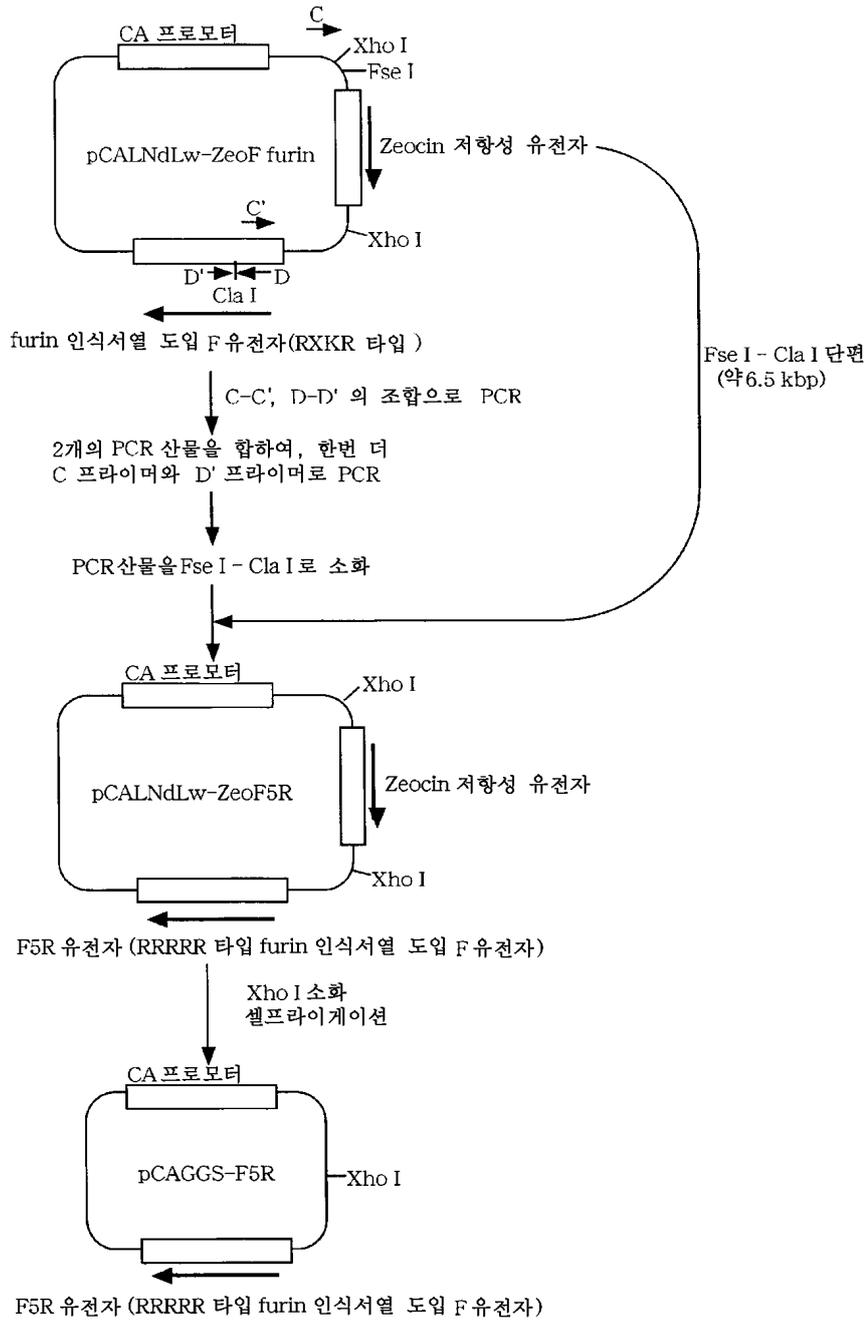
pCAGGS-F의 구축



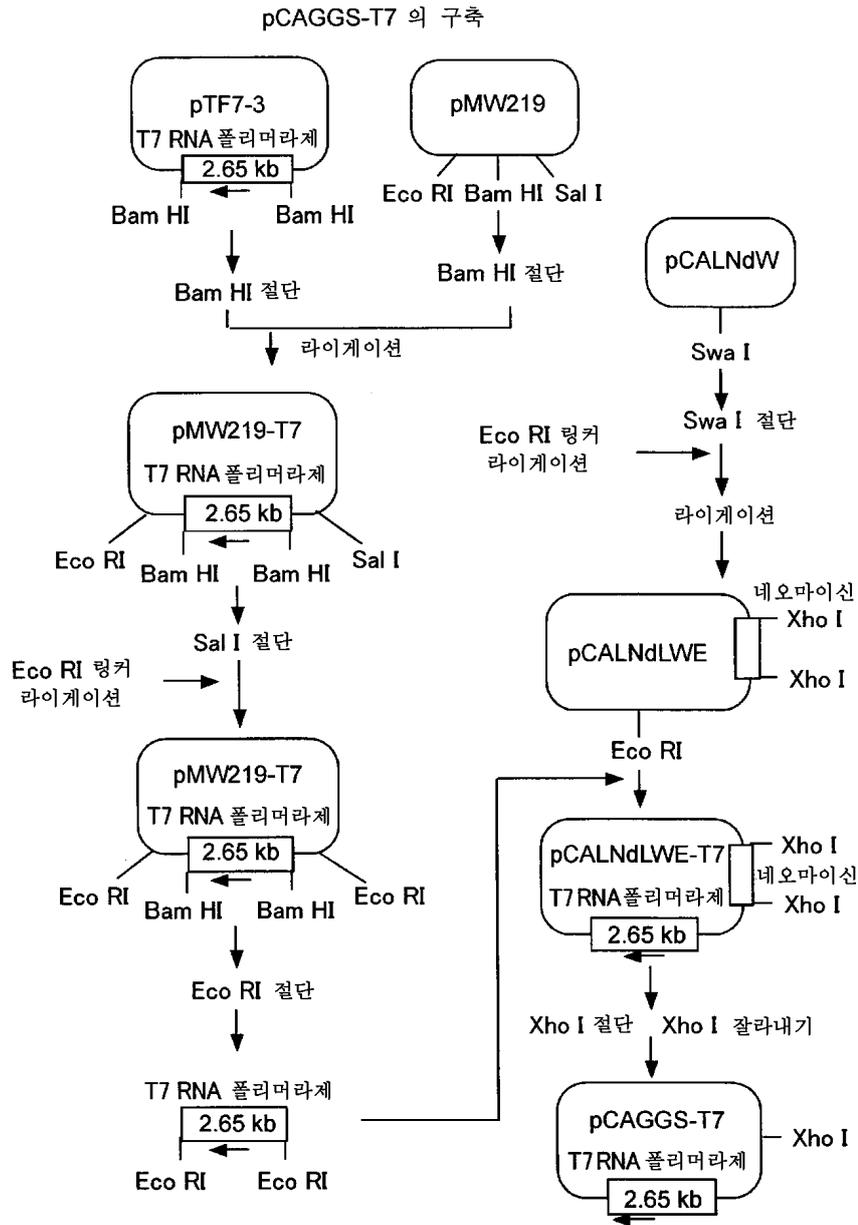
도면6



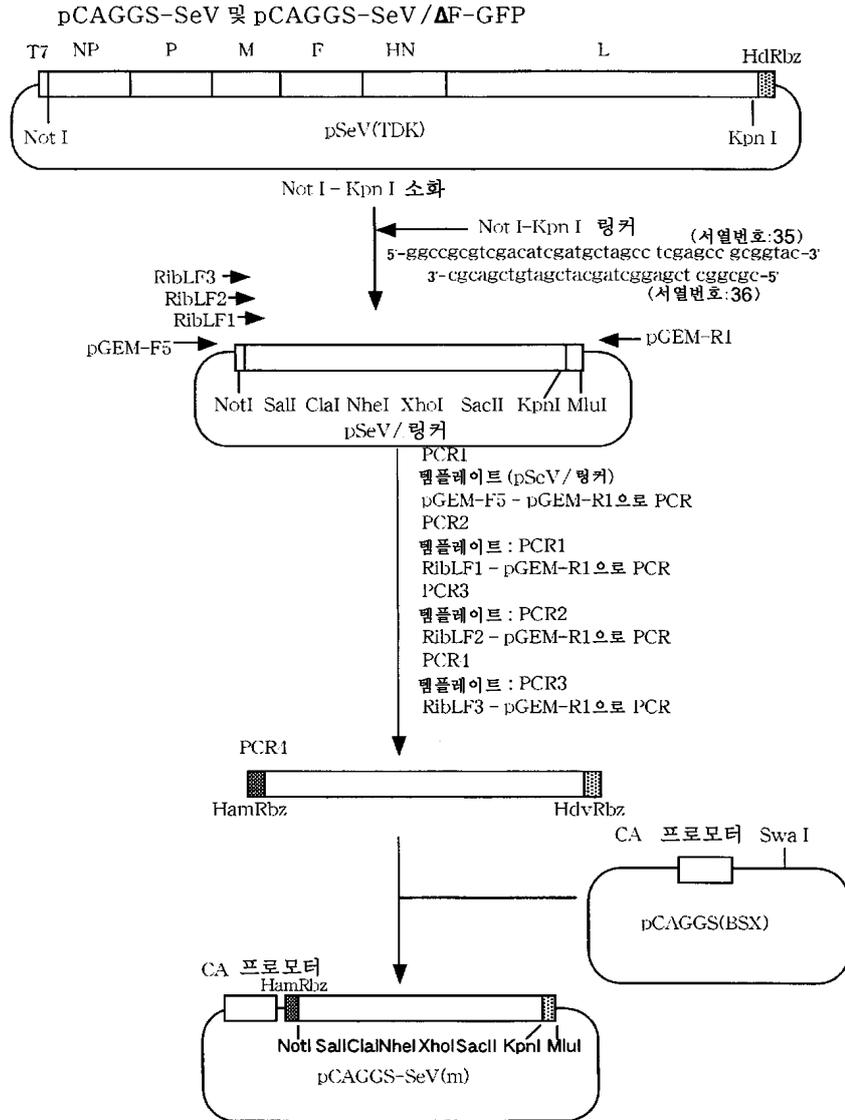
도면7



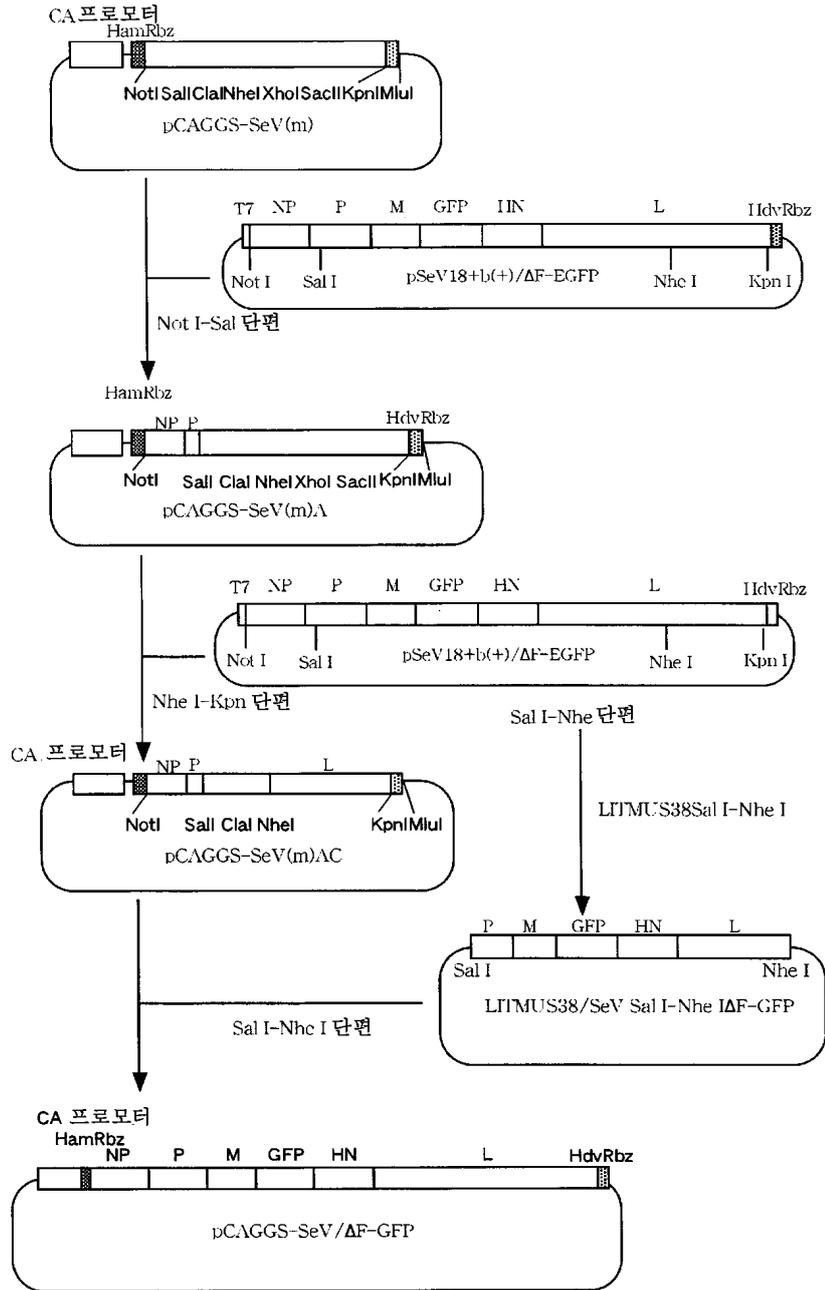
도면8



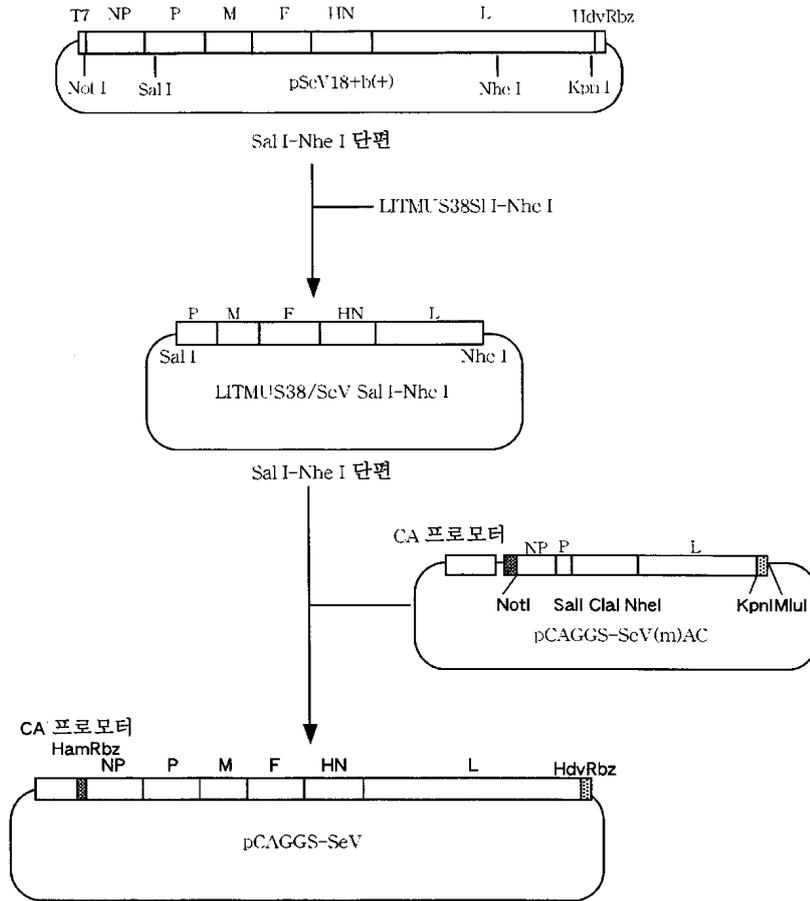
도면9



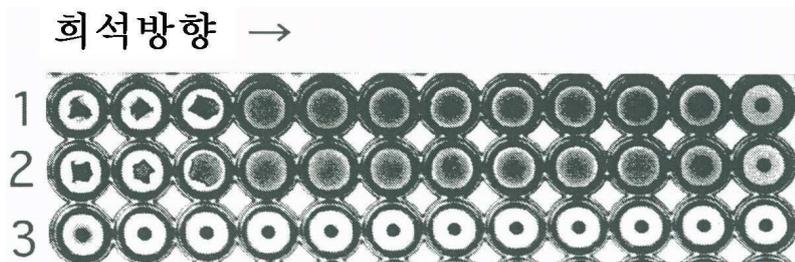
도면10



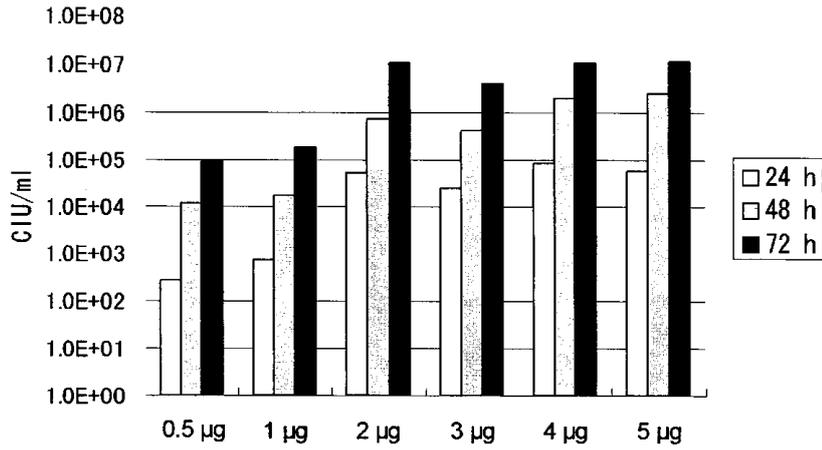
도면11



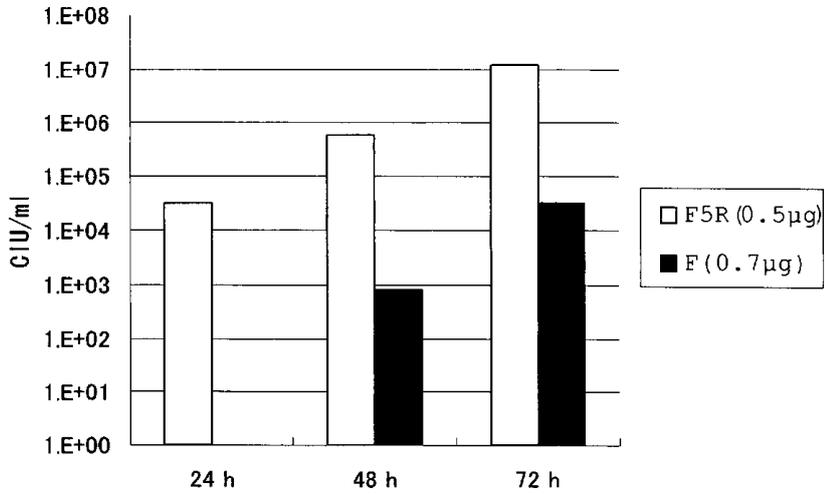
도면12



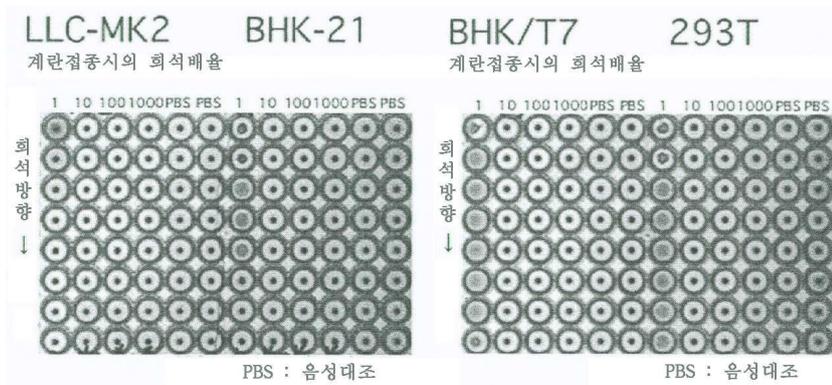
도면13



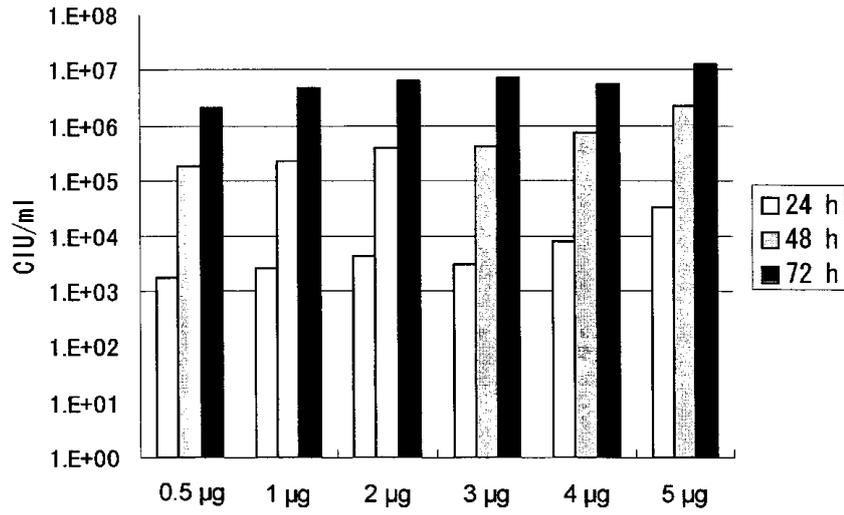
도면14



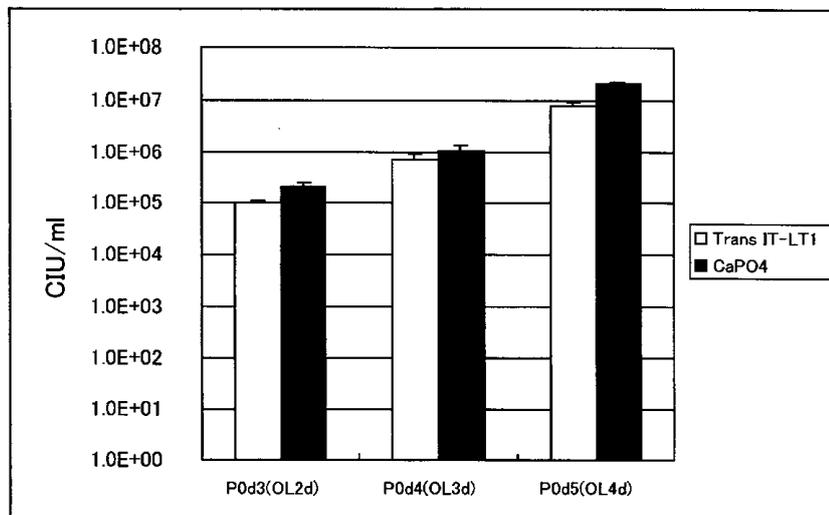
도면15



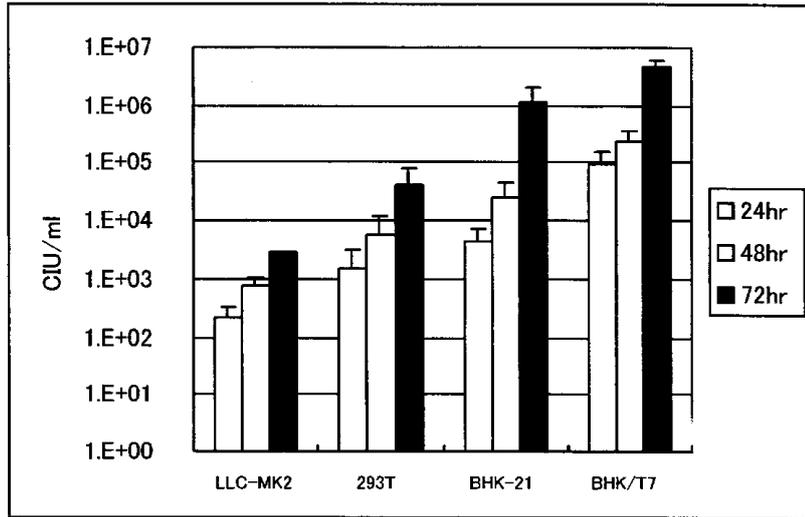
도면16



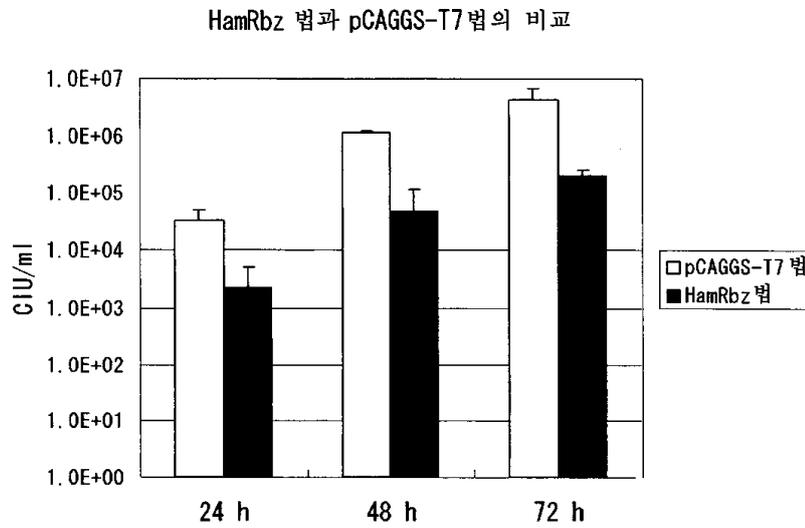
도면17



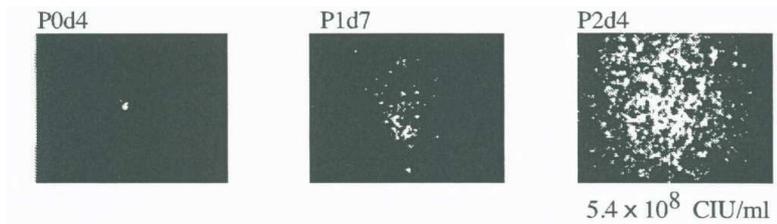
도면18



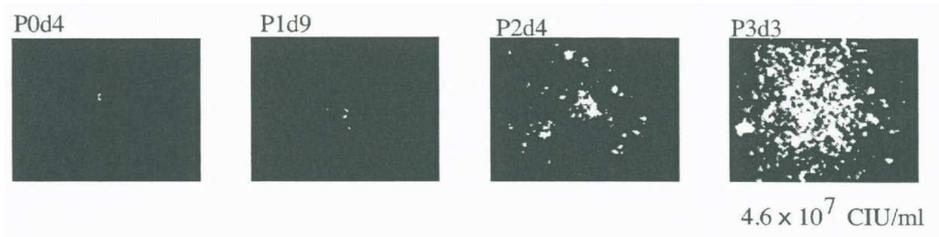
도면19



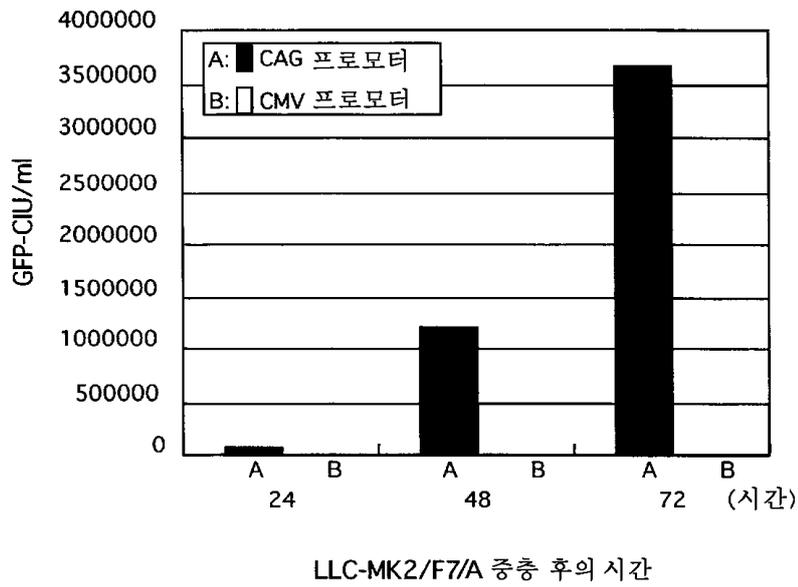
도면20



도면21



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for production of minus-strand RNA virus vectors using a promoter containing a cytomegalovirus enhancer and a chicken beta actin promoter

<130> D3-A0310P

<140>

<141>

<150> JP 2004-014653

<151> 2004-01-22

<160> 41

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 367
 <212> DNA
 <213> Cytomegalovirus

<400> 1
 actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 60
 cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca 120
 ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 180
 caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 240
 ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag 300
 tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 360
 accatgg 367

<210> 2
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> Gallus gallus

<400> 2
 tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tcccacatctc cccccctcc ccacccccaa 60
 ttttgtaattt atttatttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120
 ggcgcgcgcc aggcggggcg ggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagagggtg 180
 cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc 240
 ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcggggcg gagtcgctgc gacgtgcct 300
 tcgccccgtg ccccgtccg ccgcccctc gcgcgcgccg ccccggctct gactgaccgc 360
 gttactecca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct cgggctgta attagcgtt 420

 ggtttaatga cggcttgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttgagg ggctccggga 480
 gggccctttg tgcgggggga gcggctcggg ggggtgcgtgc gtgtgtgtgt gcgtggggag 540
 cgcccgctgc ggctccgcgc tgcccggcgg ctgtgagcgc tgcgggcgcg gcgcggggct 600
 ttgtgcgctc cgcagtgctc gcgaggggag cgcggccggg ggcgggtccc cgcggtgcgg 660
 ggggggctgc gaggggaaca aaggctgctg gcgggggtgtg tgcgtggggg ggtgagcagg 720
 ggggtgaggc gcgtcggctg ggctgcaacc ccccctgcac ccccctccc gagttgctga 780
 gcacggcccg gcttcgggtg cggggctccg tacggggcgt ggcgcggggc tcgcccgtgc 840

 gggcgggggg tggcggcagg tgggggtgcc ggcggggcg gggcccctc gggccgggga 900
 gggctcgggg gagggcgcg gcggccccg gagcgcgggc ggcctgtcag gcgcggcgag 960
 ccgcagccat tgccttttat ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtcca 1020
 aatctgtgag gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgacc cctctagcg ggcgcggggc 1080
 gaagcgggtg ggcgcggca ggaaggaat ggcgggggag ggccttcgtg cgtcccgcg 1140
 ccgcgtccc cttctcctc tcagcctcg gggctgtccg cggggggacg gctgccttcg 1200
 ggggggacgg ggcaggcg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcgg 1248

<210> 3
 <211> 95

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 3

cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg 60
 ttattgtgct gtctcatcat ttggcaag aattc 95

<210> 4

<211> 1744

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an example of CA promoter

<400> 4

actagttatt aatagtaate aattacgggg tcattagtgc atagcccata tatggagtgc 60
 cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca 120
 ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacccaa tagggacttt ccattgacgt 180
 caatgggtgg agtatttacg gtaaacgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 240
 ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcttgca ttatcccag 300
 tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgtatt 360
 accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 420

cccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 480
 gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcgggggcg ggcgaggcgg 540
 agaggtgagg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttcttt tatggcgagg 600
 cggcggggcg ggccggccta taaaagcga agcgcgcggc ggccgggggag tcgctgcgac 660
 gctgccttgc cccgtgccc cgtccgccc cgcctcgcg ccgcccgcc cggtctgac 720
 tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt 780
 agcgtttggt ttaatgacgg cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc 840

tccgggaggg ccctttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgctg tgtgtgtgcg 900
 tggggagcgc cgcgtgcggc tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgtgc gggcgcggcg 960
 cggggctttg tgcgtccgc agtgtgcgag aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc 1020
 ggtgcggggg gggtgagcag ggaacaaag gctgctgctg ggtgtgtgct gtgggggggt 1080
 gagcaggggg tgtgggcgag tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1140
 ttgctgagca cggcccggct tcgggtgagg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg 1200
 ccgtgccggg cgggggggtg cggcaggtgg ggggtccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1260

ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggag cgccggcggc tgtcaggcgc 1320
 cggcgagcgc cagccattgc cttttatggt aatcgtgca gagggcgag ggacttcctt 1380
 tgtcccaaat ctgtgcggag ccgaaatctg ggagcgcggc ccgaccccc tctagcgggc 1440
 gcggggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgctt 1500
 cgccgcggc cgctccctt ctcctctcc agcctcgggg ctgtccgag ggggacggct 1560
 gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggtctta 1620
 gagcctctgc taacctggt catgccttct tcttttctt acagctctct ggcaacctgc 1680

tggttattgt getgtctcat cttttggca aagaattcgg cttgatcga gcttcccac 1740
 catg 1744

<210> 5
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of a hammerhead ribozyme

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> g or a or u or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(19)
 <223> g or a or u or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> g or a or u or c

<400> 5
 cugangannn nnnnnnnng aaan 24

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Bacteriophage T7

<400> 6
 taatacgact cactataggg aga 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Bacteriophage T3

<400> 7
 aattaaccct cactaaaggg aga 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Bacteriophage SP6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> a or g or c or t

<400> 8
 atttaggtga cactatagaa gng 23

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Bacteriophage P1

<400> 9
 ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat 34

<210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 10
 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc 34

<210> 11
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence (w= a or c; v= a or c or g)

<400> 11
 ucccwvuuwc 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 12
 ucccaguuuc 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 13
 ucccacuuac 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 14
 ucccacuuuc 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 15

agggtcaaag 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 16
 agggtgaatg 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 17
 agggtgaaag 10

<210> 18
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an example of Sendai virus E sequence

<400> 18
 auucuuuuu 9

<210> 19
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> an example of Sendai virus E sequence

<400> 19
taagaaaa

9

<210> 20
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an example of Sendai virus S sequence

<400> 20
ctttcacct

10

<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an example of Sendai virus E sequence

<400> 21
tttttcttac tacgg

15

<210> 22
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 22
tctcgagtgc ctccgtacga tggccaagtt gaccagtgcc gttccggtgc tcac

54

<210> 23
<211> 85
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 23

aatgcatgat cagtaaatta caatgaacat cgaaccccag agtcccgctc agtcctgctc 60
ctcggccacg aagtgcacgc agttg 85

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 24

ccggaattca acaaatggcc gggttgttga gcaccttcga 40

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 25

ccggaattcc tagattctc ctatcccagc tactgtgct cg 42

<210> 26

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 26

ctagctagcc caccatggat caagatgcct tcattctaaa agaagattct 50

<210> 27
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized sequence

<400> 27
 ctagctagcc tagttggtca gtgactctat gtcctcttct acgagttcca 50

<210> 28
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized sequence

<400> 28
 cattttggca aagaattgat taattcgag 29

<210> 29
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized sequence

<400> 29
 tcacagcacc caagaatctc ttctggcgag caccggcatt ttgtgtc 47

<210> 30
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized sequence

<400> 30
gacacaaaat gccggtgctc gccagaagag attcttgggt gctgtga 47

<210> 31
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 31
gatcgtaatc acagtctctc gagagttgta ccatctacct ac 42

<210> 32
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 32
tcacagcacc gaagaatctc ctccggcgac gaccggcatt ttgtgtcgta tc 52

<210> 33
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 33
gatacgaac aaaatgccgg tcgtcgccgg aggagattct tcggtgctgt ga 52

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 34

aaatcctgga gtgtctttag agc

23

<210> 35

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 35

ggccgcgtcg acatcgatgc tagcctcgag ccgcggtac

39

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 36

cgccggctcga ggctagcatc gatgctgacg c

31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 37

cttaactatg cggcatcaga gc

22

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 38

gccgattcat taatgcagct gg

22

<210> 39

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 39

ctataggaaa ggaattccta tagtcaccaa acaagag

37

<210> 40

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 40

gatgagtccg tgaggacgaa actataggaa aggaattc

38

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 41

gcgggccctc tcttgtttg tctgatgagt ccgtgaggac

40