



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0017799
(43) 공개일자 2023년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/073 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0603 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7043618
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월14일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/032479
- (87) 국제공개번호 WO 2021/231884
국제공개일자 2021년11월18일
- (30) 우선권주장
63/025,812 2020년05월15일 미국(US)

- (71) 출원인
아이박스솔, 아이엔씨.
미국 매사추세츠 01605, 우스터, 17 브라이언 스트리트
- (72) 발명자
그린, 마이클
미국 매사추세츠 01605, 우스터, 17 브라이언 스트리트
- (74) 대리인
특허법인세림

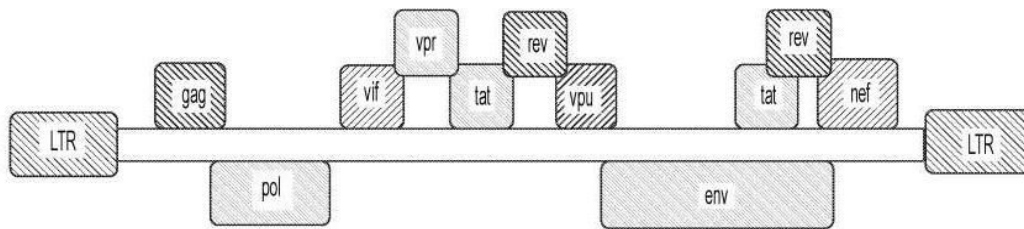
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 세포 및 유전자 요법을 위한 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포를 생산하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용은 바이러스 벡터의 산업적 규모 생산을 가능하게 하는 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포주를 생산하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 포유동물 세포에서 바이러스 벡터의 생산을 위한 관심 유전자를 운반하는 신규한 벡터 구조물 및 바이러스 부속 단백질을 운반하는 신규한 벡터 구조물이 또한 개시되어 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 5/0686 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12N 2740/10043 (2013.01)

C12N 2740/10052 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

C12N 2740/16052 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14152 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법으로,

상기 방법은,

관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물(construct) 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하고;

상기 GOI 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합된 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질전환 세포의 집단을 생산하고;

상기 형질전환 세포의 집단으로부터 목적하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 선택하고; 및

상기 세포 클론으로부터 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 제조하는 것을 포함하며,

여기서 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물의 도입은 동시에 일어나는, 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법.

청구항 2

안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법으로,

상기 방법은,

관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물(construct) 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하고;

상기 GOI 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합된 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질전환 세포의 집단을 생산하고;

상기 형질전환 세포의 집단으로부터 목적하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 선택하고; 및

상기 세포 클론으로부터 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 제조하는 것을 포함하며,

여기서 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물의 도입은 세포 배양의 개입 없이 하나 이상의 순차적 단계를 통해 일어나는, 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 형질전환 세포는 다클론 세포를 포함하는, 제조 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 선택은 상기 형질전환 세포의 다클론성에서 단클론성으로의 선택을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포주를 냉동보존으로 저장하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방법은 상기 냉동보존된 세포주로부터의 세포가 바이러스 벡터를 제조하도록 확장하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은, 상기 선택된 세포 클론, 상기 제조된 세포주 또는 이 둘 다 중, 바이러스 벡터 게놈 및 하나 이상의 부속 단백질의 수준을 정량하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은, 상기 선택된 세포 클론, 상기 제조된 세포주 또는 이 둘 다 중, 바이러스 벡터 게놈 및 하나 이상의 부속 단백질의 화학량론적 비율을 측정하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은, 상기 선택된 세포 클론, 상기 제조된 세포주 또는 이 둘 다의 통합 프로파일(integration profile)을 결정하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은, 상기 선택된 세포 클론, 상기 제조된 세포주 또는 이 둘 다로부터 바이러스 벡터를 수확하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방법은, 상기 선택된 세포 클론, 상기 제조된 세포주 또는 이 둘 다의 바이러스 역가를 측정하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주는 레트로바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는, 제조 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주는 렌티바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는, 제조 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주는 아데노-연관 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는, 제조 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주는 하나 이상의 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 벡터를 생산하는, 제조 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주는 하나 이상의 외피 단백질을 포함하는 바이러스 벡터를 생산하는, 제조 방법.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 5' 긴 말단 반복부, 3' 긴 말단 반복부, 패키징 신호, 및 중심 폴리퓨린 관으로 이루어진 균으로부터 하나 이상 선택된 요소를 포함하는, 제조 방법.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 5' 긴 말단 반복부, 3' 긴 말단 반복부, 패키징 신호, 또는 중심 폴리퓨린 관을 포함하지 않는, 제조 방법.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 자가-불활성화 긴 말단 반복부를 포함하는, 제

조 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질은 구조적 바이러스 단백질, 조절 바이러스 단백질 또는 이 둘다를 코딩하는 서열을 포함하는 제조 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 구조적 단백질 및/또는 조절 단백질은 Gag, Pol, Rev, Env, Tat, Nef, Vpr, Vif, Vpu, 및 Vpx으로 이루어진 군으로부터 선택된, 제조 방법.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 도입은 형질도입을 포함하는, 제조 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 도입은 형질전환을 포함하는, 제조 방법.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 부착 배양 또는 현탁 배양에 적응된, 제조 방법.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 혈청-보충된 또는 혈청 없는 배지에서 배양된, 제조 방법.

청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 HEK293 세포주 또는 이의 유도체인, 제조 방법.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 키메라 바이러스 입자를 생산하는, 제조 방법.

청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, 예정되거나 미리-선택된 비율의 바이러스 벡터 게놈 구조물 및 하나 이상의 바이러스 부속 구조물이 사용되는, 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 5월 15일자로 출원된 미국 가특허출원 제63/025,812호로부터 우선권을 주장하며, 이 가출원은 전문이 여기에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 세포 및 유전자 요법을 위한 바이러스 벡터의 생산 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 임상 개발을 통한 급속한 진보과 결합된 유전자 치료 후보들의 증가하는 수는 전 세계적으로 유전자 치료 벡터

의 부족을 야기하였다. 500개 이상의 유전자 요법과 100개 이상의 세포 요법 후보물들이 서로 다른 개발 단계에 있다. 전 세계적으로 2200개 이상의 임상 연구가 진행 중이다. 바이러스 벡터(예: 렌티바이러스 벡터)의 강력하고 입증된 안전성 프로파일은 강력한 임상 개발 파이프라인을 뒷받침해 왔다. 그러나, 바이러스 벡터, 특히 렌티바이러스 벡터의 임상 제조 및 사용은 또한 몇 가지 제한 사항이 있었다. 예를 들어, 기존의 제조 방법 및 관련 기술은 구식이며 확장 가능하지 않으며, 낮은 다운스트림 프로세스 수율(~20%)을 제공하며, 더 나아가 상당한 초기 자본과 지속적인 운영 비용이 필요하다. 또한 전통적으로 바이러스 벡터 제조는 예측할 수 없고 매우 위험한 것으로 간주되어 수요가 공급을 크게 초과하여 가격이 상승하게 된다. 고용량에서 고역가의 안정적인 생산자 라인을 생성하여 바이러스 벡터를 제조하기 위한 새로운 방법 및 개선 사항을 식별할 필요가 있다.

발명의 내용

요약

일 측면에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법을 제공한다:

- [0008] 1. 관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물(construct) 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하는 단계;
- [0009] 2. GOI 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질전환 세포의 집단을 생산하는 단계;
- [0010] 3. 목적하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 형질전환 세포의 집단으로부터 선택하는 단계; 및
- [0011] 4. 세포 클론으로부터 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포주를 생성하는 단계로, 여기서 하나 이상의 부속 구조물의 도입은 동시에 발생한다.

또 다른 측면에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포주의 제조 방법을 제공한다:

- [0013] 1. 관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하는 단계;
- [0014] 2. GOI 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질전환 세포의 집단을 생산하는 단계;
- [0015] 3. 목적하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 상기 형질전환 세포의 집단으로부터 선택하는 단계; 및
- [0016] 4. 상기 세포 클론으로부터 안정적인 바이러스 벡터 생산자 세포주를 생성하는 단계로, 여기서 하나 이상의 부속 구조물의 도입은 개입된 세포 배양 없이 하나 이상의 순차적 단계를 통해 일어난다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 HIV-1 바이러스의 게놈 조직의 예시를 제공한다. HIV-1 게놈은 9,749 bp를 포함한다. 모든 레트로바이러스에 공통적인 *gag*, *pol* 및 *env* 유전자 외에도 HIV-1에는 바이러스 복제에 필수적인 조절 유전자(*rev*)와 5가지 부속 유전자(*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* 및 *nef*)가 포함되어 있으며, 이는 시험관 내 바이러스 성장에 필수적이지만 생체 내 복제 및 발병에 있어서는 핵심이다. 각 HIV 인코딩 단백질의 생물학적 기능에 대한 추가 정보는 표 1에 제공되어 있다.

도 2는 다양한 구조물 요소(element)의 안정적인 도입으로 세포 클론을 생성하는 예시적인 공정 흐름을 제공한다.

도 3은 실시예 2에서 사용된 예시적인 벡터 구조물을 제공한다.

도 4는 GFP에 대한 최적 조건(조합 16 및 4) 및 Globin-LCR-GFP에 대한 최적 조건(조합 12 및 6)을 나타내는 실시예 2의 실험의 결과를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 명세서에서 사용되는 기술적, 과학적 용어는 달리 정의되지 않는 한, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 당업자는 본 개시내용의 실시에서 많은 방법이 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 실제로, 본 개시내용은 기술된 방법 및 재료에 제한되지 않는다. 용어가 단수로

제공되는 경우, 본 발명자들은 또한 그 용어의 복수에 의해 기술된 개시내용의 측면을 고려하고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 참조로 포함된 참조에서 사용된 용어 및 정의에 불일치가 있는 경우, 본 출원에서 사용된 용어는 여기에 제공된 정의를 갖는다. 사용된 다른 기술 용어는 예를 들어 "The American Heritage® Science Dictionary"(The American Heritage® Science Dictionary, 2011, Houghton Mifflin Harcourt, Boston 및 New York), "McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms"(6판, 2002, McGraw-Hill, New York) 또는 "Oxford Dictionary of Biology"(6판, 2008, Oxford University Press, 옥스포드 및 뉴욕)와 같은 다양한 기술-특이적인 사전들에 예시된 것처럼 사용된 기술 분야에서 일반적인 의미를 갖는다.

- [0019] 예를 들어, 모든 특허 및 간행물을 포함하여 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 그 전체가 참조에 의해 포함된다.
- [0020] 대체 그룹이 제시될 때, 대체 그룹을 구성하는 구성원의 임의의 모든 조합이 구체적으로 구상된다. 예를 들어, 항목이 A, B, C 및 D로 구성된 그룹에서 선택되는 경우 본 발명자는 개별적으로 각 대체를 구체적으로 구상하고 (예: A 단독, B 단독 등), A, B 및 D; A 및 C; B 및 C; 등과 같은 조합을 구상한다. 2개 이상의 항목 목록에서 사용되는 "및/또는"이라는 용어는 나열된 항목 중 하나를 단독으로 또는 나열된 다른 항목 중 하나 이상의 조합을 의미한다. 예를 들어, "A 및/또는 B"라는 표현은 A와 B 중 하나 또는 둘 다를 의미하며, 즉, A 단독, B 단독 또는 A와 B 조합을 의미한다. "A, B 및/또는 C"라는 표현은 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 조합, A 및 C 조합, B 및 C 조합, 또는 A, B 및 C의 조합.
- [0021] 숫자의 범위가 본 명세서에 제공될 때, 범위는 범위의 말단의 숫자 뿐만 아니라 범위의 정의된 말단 숫자 사이의 임의의 수를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어 "1과 10 사이"에는 1과 10 뿐만 아니라, 1과 10 사이의 임의의 숫자가 포함된다.
- [0022] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 화합물을 포함할 수 있다.
- [0023] 용어 "약"은 대략적으로, 대충, 주위에, 또는 ~의 영역을 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. "약"이라는 용어가 수치 범위와 함께 사용될 때, 그것은 제시된 수치 값의 위아래로 경계를 확장하여 그 범위를 수정하며, 플러스 또는 마이너스 10%를 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, "약 100"은 90에서 110까지를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "실질적으로"라는 용어는 품질을 변경하는 데 사용될 때, 일반적으로 품질이 손실되지 않는 양으로 어느 정도의 변화를 허용하는 의미이다. 예를 들어, 특정 측면에서 이러한 변화 정도는 0.1% 미만, 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1%, 1-2% 사이, 2-3% 사이, 3-4% 사이, 4-5% 사이, 또는 5% 초과일 수 있다.
- [0025] 의심을 피하기 위해, "약", "적어도", "적어도 약", "최대", "미만", "보다 큼", "이내" 또는 "유사한"과 같은 용어나 문구 후에 일련의 백분율의 숫자 목록이 따를 때, 그러한 용어 또는 문구는 부사, 전치사 또는 기타 수식어구가 각각의 및 모든 숫자 앞에 기재되었는지 여부와 관계없이 시리즈 또는 목록의 각각의 및 모든 백분율을 수정하는 것으로 간주된다.
- [0026] 본원에 사용된 "바이러스 벡터 생산자 세포"는 재조합 바이러스 벡터 입자(예를 들어, 레트로바이러스 전달 시스템 포함)의 생산에 필요한 모든 요소를 함유하는 세포를 지칭한다. 전형적으로, 이러한 바이러스 벡터 생산자 세포는 바이러스 구조 단백질(예: *gag*, *pol* 및 *env*)을 발현할 수 있는 하나 이상의 발현 카세트를 함유한다. "안정한 바이러스 벡터 생산자 세포"는 재조합 바이러스 벡터 입자의 생산에 필요한 모든 요소를 핵 게놈에 함유하고 예피솜으로 또는 이들의 조합으로 유지하는 바이러스 벡터 생산자 세포를 의미한다. "안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주"는 적절한 신선한 배지 및 공간이 주어지면 무기한 증식할 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포의 영구적으로 확립된 세포 배양물을 의미한다.
- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, "재조합 바이러스 벡터"는 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하고 표적 숙주 세포를 침투할 수 있는 외피 바이러스 입자이며, 이로써 발현가능한 서열을 세포 내로 운반할 수 있다. 일 측면에서, 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열은 관심 유전자(GOI)를 포함하거나 암호화한다. 외피 입자는 바람직하게는 천연 바이러스의 숙주 범위 및 감염성을 변경시킨 렌티바이러스 또는 비-렌티바이러스를 포함하는 다른 바이러스 종으로부터 엔지니어링된 또는 천연의 바이러스 외피 또는 캡시드 단백질로 슈도타입화된다.
- [0028] 본원에 사용된 "바이러스 벡터 게놈 구조물"은 형질도입 재조합 바이러스 벡터 내로 패키징된 폴리뉴클레오티드

서열을 함유하는 구조물이다. 일 측면에서, 5' LTR 및 3' LTR을 포함하고 기능적 인테그레이즈(integrase) 효소로 패키징되는 경우, 바이러스 벡터 게놈 구조물은 숙주 게놈 내로 통합될 수 있는 재조합 바이러스 벡터의 생산에 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 바이러스 벡터 게놈 구조물은 5' LTR 및 3' LTR을 포함하고 기능적 인테그레이즈 효소의 결핍으로 인해 숙주 게놈으로 통합할 수 없는 재조합 바이러스 벡터를 생산하며, 이는 인테그레이즈-결합 렌티바이러스 벡터(IDLV)로도 알려져 있다.

- [0029] 본원에 사용된 "바이러스 부속 구조물"은 적합한 숙주 세포에서 기능성 재조합 바이러스 벡터를 생산하고 발현 가능한 이중의 서열을 이의 내부로 패키징하기에 유용한 하나 이상의 요소를 함유하거나 코딩하는, 구조물, 플라스미드 또는 분리된 핵산 분자를 말한다.
- [0030] 본원에 사용된 "바이러스 벡터 구조물"은 바이러스 벡터 게놈 구조물 또는 바이러스 부속 구조물을 지칭한다.
- [0031] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 한 조각(piece)이 다른 조각의 의도된 유전적 결과에 영향을 미칠 수 있도록 하는 2개 이상의 DNA 조각의 공간적 관계를 기술한다. 예를 들어, "작동가능하게 연결된"은 조절 영역(전형적으로 프로모터 요소이지만 인핸서 요소를 포함할 수 있음)과 유전자의 코딩 영역 사이의 관계를 나타낼 수 있으며, 이에 의해 상기 코딩 영역의 전사는 상기 조절 영역의 조절하에 있다.
- [0032] 본원에 사용된 "연쇄체(concatemer)"는 시리즈로 연결된 동일하거나 실질적으로 동일한 DNA 서열의 다중 카피를 함유하는 연속 DNA 분자로 정의된다. 일 측면에서, 연쇄체는 또한 하나 이상의 선택 유전자를 포함할 수 있다.
- [0033] 본원에 사용된 용어 "트랜스"는 상이한 분자로부터 작용하는 메카니즘을 지칭한다.
- [0034] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 복잡성 및 크기가 최소 프로모터로부터 상류 요소 및 인핸서를 포함하는 프로모터에 이르는 핵산 영역을 포함한다.
- [0035] 본원에 사용된 용어 "형질도입"은 바이러스 벡터에 의해 바이러스 벡터를 사용한 핵산 절편을 전달하는 것을 지칭한다.
- [0036] 본원에 사용된 용어 "형질감염"은 외래 DNA를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 지칭한다.
- [0037] 어떠한 이론에도 구속되지 않고, 바이러스 벡터 생산자 세포주로부터 유래된 감염성 벡터 입자의 품질 및 양은 렌티바이러스 벡터 게놈 RNA 대 트랜스 발현된 부속 단백질의 화학량론적 비에 의해 직접적으로 영향을 받는다. 주어진 렌티바이러스 벡터 게놈에 대해 최적의 비율은 선행적으로 알려져 있지 않으며 시행착오를 통해 경험적으로 결정되어야 한다. 이 생물학적 사실을 자주 인식하지 못하기 때문에 안정적인 세포주의 구축은 역사적으로 부속 유전자를 한 번에 하나씩 연속 방식으로 추가함으로써 이루어졌다. 이것은 부속 단백질을 갖고 발현했지만 최적이지 아닌 비율로 렌티바이러스 벡터 게놈에 대한 벡터를 생산하는 궁극적인 세포주의 능력을 제한하는 자손 클론을 보장하였다. 이 문제에 대한 해결책은 각 요소의 다중적 도입을 장려하는 방식으로 모든 부속 요소들을 한 번에 추가하는 것이다. 이것은 부속 유전자 도입을 여러 차례의 서브클로닝에서 단일 라운드로 축소하여 임의의 주어진 생산자 클론의 개발 시간을 단축할 뿐만 아니라 각각 다른 비율을 갖는 다양한 클론 세트를 생성할 수 있도록 하며, 이로써 클론은 스크리닝될 때, 그 비율이 무엇인지 사전에 알 필요도 없이, 우리가 원하는 품질과 양의 벡터를 생성하는 클론을 찾을 수 있는 가능성이 증가된다.
- [0038] 일 측면에서, 본 개시내용은 샷건(shotgun) 클로닝을 사용한 무작위 분류에 의해 최적화된 안정한 벡터 생산 세포주의 자연 선택을 달성하는 방법을 제공한다. 일 측면에서, 본 출원은 별도로 도입된 구조물로부터 트랜스로 발현된 렌티바이러스 벡터 게놈 및 렌티바이러스 부속 단백질을 둘 다를 도입함으로써 제공되는 안정한 렌티바이러스 벡터 생산자 세포주를 제공한다.
- [0039] 일 측면에서, 벡터 생산자 세포주는 불멸화된 인간 세포주로부터 유래된 모 세포주로부터 생산된다. 다른 측면에서, 벡터 생산자 세포주는 인간/동물 유래 혈청이 있거나 없는 한정된 배지에서 성장한다. 또 다른 측면에서, 벡터 생산자 세포주는 부착성 또는 현탁액 적응 방식으로 성장한다.
- [0040] **재조합 바이러스 벡터**
- [0041] 본 개시내용은 재조합 바이러스 벡터(또한 재조합 바이러스 입자로 공지됨)의 제조 및/또는 생산에 관한 것이다. 본 개시내용은 관심 대상의 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 숙주 세포 내로 도입하는데 이용될 수 있는 재조합 바이러스 벡터, 및 그의 제조를 위한 구조물에 관한 것이다.
- [0042] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 생산자 세포는 레트로바이러스 생산 시스템을 포함하고, 여기서 바이러스 벡터는 레트로바이러스로부터 유래된다. 레트로바이러스는 7-12kb의 단일 가닥의 포지티브 센스 RNA 게

놈을 가진 외피 바이러스 패밀리를 포함한다. 상기 레트로바이러스 패밀리에선 발암성 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 스푸마바이러스(spumaviruses)의 5개 그룹이 포함된다.

[0043] 레트로바이러스 벡터 생산 시스템은 일반적으로 바이러스 패키징 기능으로부터 바이러스 게놈의 분리를 포함한다. 바이러스 부속 단백질 또는 바이러스 부속 단백질 도메인은 별도의 발현 카세트를 통해 또는 트랜스로 도입될 수 있다. 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 바이러스 패키징에 관여하는 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 암호화하거나 제공한다.

[0044] 일 측면에서, 본 개시내용은 렌티바이러스 벡터, 및 이의 제조를 위한 구조물에 관한 것으로, 이는 숙주 세포 내로 관심 대상의 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 도입하는데 이용될 수 있다. 일 측면에서, 렌티바이러스 벡터는 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하고 표적 숙주 세포를 침투할 수 있고, 이에 의해 발현가능한 서열을 세포 내로 운반할 수 있는 외피 바이러스 입자이다. 외피 입자는 바람직하게는 천연 렌티바이러스의 숙주 범위 및 감염성을 변경하는 비-렌티바이러스를 포함하는 다른 바이러스 종으로부터의 엔지니어링된 또는 천연의 바이러스 외피 단백질로 슈도타입화(pseudotype)된다.

[0045] 본원에 기재된 바이러스 벡터는 예를 들어 단백질 생산을 위해 (백신 생산을 포함), 유전자 요법을 위해 (유전자 대체, 유전자 편집 및 합성 생물학 포함), 치료적 폴리펩타이드 전달을 위해, siRNA, 리보자임, 안티센스 및 기타 기능성 폴리뉴클레오티드 등을 전달하는 것을 포함한 광범위한 적용에 이용될 수 있다. 이러한 형질도입 벡터는 단일 또는 이중 유전자를 운반하고 억제 서열(예: RNAi 또는 안티센스)을 포함하는 능력을 갖는다. 특정 측면에서, 형질도입 벡터는 또한 전사 활성이 감소되었지만 존재하지 않는 것은 아닌 변형된 3' LTR을 포함하는 핵산을 운반한다.

[0046] 렌티바이러스는 긴 잠복기를 특징으로 하는 레트로바이러스의 그룹이다. 그들은 감염시키는 척추동물 숙주에 따라 소, 말, 고양이, 양/염소 및 영장류의 5가지 혈청그룹으로 분류된다. 렌티바이러스의 일부 예는 인간(HIV), 유인원(SIV) 및 고양이(FIV) 면역결핍 바이러스이다.

[0047] 렌티바이러스는 다량의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA로 전달할 수 있고 분열 및 비분열 세포 모두에 통합될 수 있다. 바이러스 게놈은 분열 중에 딸 세포로 전달되어 가장 효율적인 유전자 전달 벡터 중 하나가 된다.

[0048] HIV의 구조는 다른 레트로바이러스의 구조와 다르다. HIV는 직경이 ~120 nm인 대략 구형이다. HIV는 2,000개의 p24 단백질 카피들을 포함하는 원추형 캡시드로 둘러싸인 9개의 유전자를 암호화하는 2개의 파지티브 ssRNA 카피로 구성된다. ssRNA는 뉴클레오패시드 단백질, p7 및 비리온 개발에 필요한 효소인 역전사효소(RT), 프로테아제(PR), 리보뉴클레아제 및 인테그레이즈(IN)에 단단히 결합된다. p17로 구성된 매트릭스는 비리온의 무결성을 보장하도록 캡시드를 둘러싸고 있다. 이것은 차례로 새로 형성된 바이러스 입자가 세포에서 나올 때 인간 세포의 막에서 가져온 인지질의 2개 층으로 구성된 외피로 둘러싸여 있다. 바이러스 외피에는 숙주 세포의 단백질과 바이러스 입자의 표면을 통해 돌출된 Env로 알려진 복합 HIV 단백질의 약 70개 카피들이 있다.

[0049] Env는 3개의 gp120 분자로 구성된 캡과, 구조를 바이러스 외피에 고정시키는 3개의 gp41 분자로 구성된 스템(stem)으로 이루어진다. 당단백질 복합체는 바이러스가 표적 세포에 부착하고 융합하여 감염 주기를 개시하도록 한다. 각 HIV 인코딩 단백질의 생물학적 기능에 대한 추가 정보는 표 1에 나와 있다.

표 1

HIV 인코딩 단백질의 생물학적 기능 요약

[0050]

	유전자	기능	전구체 단백질 →생산물
벡터화된 렌티바이러스를 위한 필수 유전자	gag	그룹-특이적 항원	gag →MA, CA, SP1, NC, SP2, P6
	pol	폴리머라제	pol→RT, RNase H, IN, PR
	env	외피	gp160 →gp120, gp41
	rev	비리온 단백질의 발현 조절자	주요 바이러스 단백질 합성에 중요하고 바이러스 복제에 있어서 필수적
야생형 HIV에서 발견되는 추가적 유전자	tat	HIV 트랜스액티베이터	파지티브 전사 조절자
	vif	바이러스 감염성	특정 세포 유형의 감염성에 필요
	vpr	바이러스 단백질 R	전-통합 복합체 및 숙주 세포 주기 어레스트(arrest)의 핵 이입
	vpu	바이러스 단백질 U	CD44의 단백질 변형 및 감염된 세포에서 비리온의 방출
	nef	네가티브 인자	어팍토시스 및 바이러스 감염성에서의 역할

- [0051] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 생산자 세포는 렌티바이러스 벡터 생산 시스템을 포함하고, 여기서 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스로부터 유래된다. 렌티바이러스는 서서히 점진적인 질병을 일으키는 레트로바이러스 그룹이다. 본 명세서에 개시된 렌티바이러스 벡터 생산 시스템에 의해 생산된 렌티바이러스 벡터 입자는 천천히 분열하는 세포에 형질도입될 수 있는 반면, 표준 레트로바이러스(감마 레트로바이러스)는 유사분열 활성 세포만을 감염시킬 수 있다. "천천히 분열하는" 세포 유형은 대략 3-4일에 한 번 분열할 수 있다.
- [0052] 렌티바이러스 벡터의 생산에서, 다중 플라스미드가 사용되는데, 하나는 외피 단백질(*env* 플라스미드)을 인코딩하고, 하나 이상의 플라스미드는 바이러스 부속 단백질을 인코딩하고, 하나의 플라스미드는 렌티바이러스 3'-LTR 및 렌티바이러스 5'-LTR 사이에 관심 유전자 발현 카세트를 포함함으로써 인코딩된 관심 유전자(들)의 숙주 계놈 내로의 통합을 용이하게 한다.
- [0053] 일 측면에서, 바이러스 벡터는 하이브리드 바이러스 벡터일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "하이브리드"는 렌티바이러스 서열 및 비-렌티바이러스 서열 모두를 함유하는 벡터, 또는 벡터의 핵산 성분을 지칭한다.
- [0054] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 생산자 세포는 헤르페스바이러스 벡터 생산 시스템을 포함하고, 여기서 상기 바이러스 벡터는 헤르페스바이러스로부터 유래된다.
- [0055] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 생산자 세포는 아데노바이러스 벡터 생산 시스템을 포함하고, 여기서 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스로부터 유래된다. 아데노바이러스는 36-킬로베이스의 이중 가닥 DNA 계놈을 가진 외피가 없는 바이러스이다. 아데노바이러스는 고역가 재조합 바이러스로 성장할 수 있는 능력, 큰 트랜스유전자 용량, 분열하는 및 비분열의 세포의 효율적인 형질도입으로 인해, 매력적인 유전자 전달의 매개체 후보이다. 50가지 이상의 인간 및 비인간 혈청형의 아데노바이러스가 광범위한 조직으로의 유전자 전달을 매개하는 것으로 밝혀졌다.
- [0056] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 생산자 세포는 아데노-연관 바이러스 벡터 생산 시스템을 포함하고, 여기서 상기 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스로부터 유래된다. 아데노 관련 바이러스(AAV)는 4.7kb 단일 가닥 DNA 계놈을 갖는 외피가 없는 바이러스이다. 100가지 이상의 AAV 혈청형이 인간 및 비인간 조직에서 분리되었다.
- [0057] 추가 측면에서, 본원에 개시된 재조합 바이러스 벡터는 모자이크 계놈 구조를 포함하는 바이러스로부터 유래된다. 추가 측면에서, 본원에 개시된 재조합 바이러스 벡터는 표적 특이적이다. 추가 측면에서, 표적-특이적 바이러스 벡터는 수용체-표적화된다. 추가 측면에서, 표적-특이적 바이러스 벡터는 재조합 항체 분자를 포함한다. 표적-특이적 바이러스 벡터를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가 측면에서, 재조합 벡터는 부분적으로 또는 완전히 합성된 핵산 서열로부터 유래된다.
- [0058] 본원에 개시된 재조합 바이러스 벡터는 하나 이상의 선택가능, 추적가능 또는 검출가능한 마커 요소를 가질 수 있다. 일 측면에서, 선택가능한 요소는 리포터 유전자이다. 추가 측면에서, 선택가능한 요소는 에피토프 태그이다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터는 리포터 유전자 및 에피토프 태그 둘 다를 함유할 수 있다. 일 측면에서, 에피토프 태그는 크로마토그래피, 효소 분석, 형광 분석 및 면역검출 분석을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해 선택되거나 검출될 수 있다. 일 측면에서, 면역검출 분석은 면역블롯팅, 면역형광, 면역세포화학 및 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0059] 추가 측면에서, 리포터 유전자는 흡광도를 검출하는 방법에 의해 검출될 수 있다. 흡광도를 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일 측면에서, 리포터 유전자는 형광을 검출하는 방법에 의해 검출될 수 있다. 형광을 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가 측면에서, 리포터 유전자는 발광을 검출하는 방법에 의해 검출될 수 있다. 발광을 검출하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일 측면에서, 선택가능한 마커 유전자는 항생제 내성 유전자이다. 추가 측면에서, 항생제 유전자는 네오마이신 내성을 코딩한다. 추가 측면에서, 항생제 유전자는 퓨로마이신 내성을 코딩한다.
- [0060] 추가 측면에서, 추적 가능한 마커 유전자는 형광 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 상이한 발색단을 갖는 형광 단백질을 선택하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 추가 측면에서, 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 울트라마린, 청색 및 청록색 형광 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는 이의 변이체일 수 있다. 추가 측면에서, 형광 단백질의 변이체는 최적화된 변이체일 수 있다. 형광 단백질의 특성을 최적화하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 다른 특성 중에서 발색단 성숙, 폴딩 동역학 및 열안정성을 개선하는 방법을 포함하

지만 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 일 측면에서, 재조합 바이러스 벡터는 자가-불활성화될 수 있다. 용어 "자가-불활성화"는 일단 표적 또는 숙주 세포의 게놈 내로 통합되면 벡터가 동원되는 능력을 감소시키도록 변형된 벡터를 지칭한다. 예를 들어, 상기 변형은 3' LTR(long terminal repeat) 영역의 결실을 포함할 수 있다. SIN 벡터는 유전자 전달 응용 분야에서 비 SIN 벡터에 비해 안전성 이점이 있다.

[0062] 또 다른 측면에서, 여기서 생성된 재조합 바이러스 벡터는 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터(SIN 벡터)이다. SIN 벡터에서, 3' LTR로부터 렌티바이러스 인핸서 및 프로모터 서열의 결실은 표적 세포의 감염 시 벡터 길이 RNA를 전사할 수 없는 벡터의 생성을 초래한다. 이러한 변형으로 인해 통합된 SIN 벡터는 추가 복제가 불가능하여 복제 가능한 바이러스를 생성할 가능성과 인근 내인성 프로모터의 전사 활성화에 부주의하게 영향을 미칠 위험을 줄인다.

[0063] 또 다른 측면에서, 여기서 생산된 재조합 바이러스 벡터는 조건부 SIN 벡터이다. 예를 들어, 예시적인 조건부 SIN 벡터에서, 3' LTR U3 전사 조절 요소는 유도성 프로모터(예: Tet-반응성 요소)로 대체될 수 있다.

[0064] **바이러스 벡터 게놈 구조물**

[0065] 본원에 개시된 개시내용에서, 바이러스 벡터 게놈 구조물은 관심 유전자를 코딩한다. 일 측면에서, 관심 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0066] 일 측면에서, 관심 유전자는 질병의 병태생리학에서 알려져 있거나 잠재적으로 중요한 후보 유전자일 수 있다. 추가 측면에서, 관심 유전자는 공지된 또는 잠재적인 치료 또는 진단 용도를 가질 수 있다. 일 측면에서, 관심 유전자는 코딩 영역을 포함할 수 있다. 추가 측면에서, 관심 유전자는 부분 코딩 영역을 포함할 수 있다. 관심 유전자는 당업계에 공지된 다양한 기술을 통해 본원에 개시된 바이러스 벡터 내로 삽입을 위해 수득될 수 있다.

[0067] 추가 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 게놈 구조물은 하나 이상의 선택가능하거나 검출가능한 요소(element)(들)를 포함한다. 일 측면에서, 선택가능하거나 검출가능한 요소는 리포터이다. 추가 측면에서, 선택가능하거나 검출가능일 측면은 에피토프 태그이다. 일 측면에서, 선택가능하거나 검출가능한 요소는 발광, 흡광도, 형광, 항생제, 항원-항체 상호작용, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해 선택되거나 검출될 수 있다.

[0068] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 게놈 구조물은 프로모터, 5' 및 3' 긴 말단 반복부(long terminal repeats), 패키징 신호, 중심 폴리퓨린 관, 및 폴리아데닐화 서열(p(A))로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 요소를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 게놈 구조물은 선행 문장의 모든 요소를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 게놈 구조물은 프로모터, 5' 긴 말단 반복부, 3' 긴 말단 반복부, 패키징 신호, 중심 폴리퓨린 관, 또는 폴리아데닐화 서열을 포함하지 않는다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터 게놈 구조물은 바이러스 유사 입자를 생산하는 데 사용될 수 있다. 추가 측면에서, 긴 말단 반복부는 자가-비활성화 긴 말단 반복부이다.

[0069] 본원에 개시된 개시내용의 바이러스 벡터 게놈 구조물은 연쇄체의 형태일 수 있다. 일 측면에서, 연쇄체는 하나 이상의 전사 인자를 포함할 수 있다. 추가 측면에서, 전사 인자는 리간드-반응성 전사 인자일 수 있다. 추가 측면에서, 연쇄체는 하나 이상의 항생제 선택 유전자를 함유할 수 있다. 항생제 선택 유전자는 당업계에 공지되어 있다. 일 측면에서, 연쇄체는 문헌[Throm et al. Blood, 2009;113(21): 5104-10]에 기술된 바와 같이 제조되고 사용될 수 있다. 예를 들어, 안정적인 바이러스 생산자 세포주는 연쇄체 어레이 형질감염에 의해 게놈에 안정적으로 통합된 완전한 SIN 렌티바이러스 게놈 및 바이러스 부속 구조물을 포함할 수 있다. 이러한 어레이는 어레이에 포함된 약물 내성 및/또는 기타 선택/리포터 카세트와 함께 SIN 렌티바이러스 벡터 게놈을 인코딩하는 DNA 단편의 결찰을 통해 얻을 수 있다.

[0070] **바이러스 부속 유전자/단백질/구조물**

[0071] 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 예를 들어 구조 단백질(예를 들어, Gag 전구체), 처리 단백질(예를 들어, Pol 전구체), 및 기타 단백질, 예컨대 프로테아제, 외피 단백질을 포함하는 하나 이상의 부속 단백질을 코딩한다. 또 다른 측면에서, 바이러스 부속 벡터는 숙주 세포에서 하나 이상의 부속 단백질을 제조하고 기능성 바이러스 입자를 조립하는 데 필요한 발현 및 조절 신호를 제공하는 서열을 포함한다. 일 측면에서, Env, Rev 및 Gag-Pol 전구체에 대한 코딩 서열은 동일한 플라스미드 또는 바이러스 부속 구조물 상에 존재한다. 또 다른 측면에서, Env, Rev 및 Gag-Pol 전구체에 대한 코딩 서열은 별도의 플라스미드 또는 바이러스 부속 구조물 상에

위치한다. 추가 측면에서, Gag, Pol, Rev 및 외피 단백질의 각각의 코딩 서열에 대해 별도의 플라스미드 또는 바이러스 부속 구조물이 사용된다. 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 그룹-특이적 항원(Gag), RNA-의존성 DNA 폴리머라제(Pol), 바이러스 단백질의 발현 조절자(Rev), 외피(Env), 트랜스액티베이터(Tat), 네거티브 조절 인자(Nef), 바이러스 단백질 R(Vpr), 바이러스 감염 인자(Vif), 바이러스 단백질 U(Vpu) 및 바이러스 단백질 X(Vpx)로 이루어진 군으로부터 선택된, 하나 이상의 구조적 및/또는 조절적 바이러스 단백질, 또는 그의 기능적 단편 또는 도메인을 코딩할 수 있다. 또 다른 측면에서, 기능적 단편 또는 도메인은 MA(매트릭스[p17]), CA(캡시드[p24]), NC(뉴클레오캡시드[p9]), p6, 프로테아제(p10), RT(p50), RNase H(p15) 및 인테그레이즈(p31)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 하나 이상의 바이러스 부속 단백질의 코딩 서열은 작동가능하게 연결된다. 일 측면에서, 하나 이상의 바이러스 부속 단백질의 코딩 서열은 별도의 바이러스 부속 구조물에 존재한다.

[0072] 일 측면에서, 여기에 사용된 바이러스 부속 구조물은 재조합 렌티바이러스 벡터를 생산하기 위한 것이다. 일 측면에서, 본 개시내용에서 사용되는 바이러스 부속 구조물은 임의의 적합한 순서 또는 위치에 개별적으로 또는 집합적으로 하나 이상의 다음 요소들, 예를 들어 a) 렌티바이러스 Gag 및 Pol (예: 렌티바이러스 Gag-Pol 전구체)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터; 및 b) *env* 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함할 수 있다.

[0073] 임의의 렌티바이러스 종, 아종, 균주 또는 분기군(clade)으로부터 수득된 LTR을 포함하는, 임의의 적합한 렌티바이러스 5' LTR이 본 개시내용에 따라 이용될 수 있다. 여기에는 영장류 및 비-영장류 렌티바이러스가 포함된다. 종의 특정 예에는 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스(HIV)-1(A, B, C, D, E, F 및 G, R5 및 R5X4 바이러스 등과 같은 아종, 분기군 또는 균주 포함), HIV-2(R5 및 R5X4 바이러스 등과 같은 아종, 분기군 또는 균주 포함), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV), 원숭이 인간 면역결핍 바이러스(SHIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 염소-관절염-뇌염 바이러스, 켈브라나병 바이러스, 양 렌티바이러스, 비스나/메디(visna/mae) 바이러스 및 말 감염성 빈혈 바이러스를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 이러한 바이러스에 대한 게놈 참조 서열은 널리 이용가능하며, 예를 들어 HIV-1(NC_001802), HIV-2(NC_001722), SIV(NC_001549), SIV-2(NC_004455), 염소 관절염-뇌염 바이러스(NC_001463), 고양이 면역결핍 바이러스(NC_001482), 켈브라나병 바이러스(NC_001654), 양 렌티바이러스(NC_001511), 비스나/메디 바이러스(NC_001452), 말 감염성 빈혈 바이러스(NC_001450), 및 소 면역결핍 바이러스(NC_001413)이다.

[0075] 일 측면에서, 여기에서 사용되는 렌티바이러스 5' LTR은 인핸서, 프로모터, 전사 개시(캡핑), 전사 종결자 및 폴리아데닐화를 포함하는 유전자 발현에 사용되는 신호들을 포함한다. 이들은 일반적으로 U3, R 및 U5 영역을 갖는 것으로 기술된다. LTR의 U3 영역에는 인핸서, 프로모터, 및 RBEIII, NF-kB, SpI, AP-I 및/또는 GABP 모티프를 포함한 전사 조절 신호가 포함되어 있다. TATA 박스는 5' LTR을 얻은 종 및 균주에 따라 R 시퀀스의 시작 부분에서 약 25개의 염기쌍에 위치한다. 완전히 손상되지 않은 5' LTR을 사용하거나 변형된 카피를 사용할 수 있다. 변형은 바람직하게는 TAR 서열이 치환된 R 영역(하기 참조), 및/또는 U5 영역의 전부 또는 일부의 결실을 포함한다. 변형된 5' LTR은 바람직하게는 프로모터 및 인핸서 활성, 예를 들어 바람직하게는 천연 U3, 치환된 TAR을 갖는 변형된 R, 및 천연 U5를 포함한다.

[0076] 일 측면에서, 이중성 또는 비-바이러스성 프로모터는 렌티바이러스 *Gag* 및 *Pol*을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. "작동가능하게 연결된"이라는 용어는 프로모터가 언급된 코딩 서열의 전사를 유도할 수 있는 방식으로 위치하는 것을 의미한다. 일 측면에서, *gag* 및 *pol* 코딩 서열은 천연 렌티바이러스에서 *gag-pol* 전구체로서 조직화된다. *gag* 시퀀스는 p55라고도 하는 55kD Gag 전구체 단백질을 코딩한다. p55는 성숙 과정에서 바이러스로 암호화된 프로테아제 4(*pol* 유전자의 산물)에 의해 MA(매트릭스[p17]), CA(캡시드[p24]), NC(뉴클레오캡시드[p9]) 및 p6으로 명명된 4개의 더 작은 단백질로 절단된다. *Pol* 전구체 단백질은 바이러스로 인코딩된 프로테아제에 의해 *Gag*으로부터 절단되고 추가로 분해되어 프로테아제(p10), RT(p50), RNase H(p15) 및 인테그레이즈(p31) 활성을 분리한다.

[0077] 일 측면에서, 하나 이상의 스플라이스 공여자(SD) 부위는 바이러스 벡터 게놈 구조물 또는 바이러스 부속 구조물에 존재할 수 있다. 스플라이스 공여자 부위는 일반적으로 5'LTR의 3' 말단과 패키징 서열 사이에 존재한다. 예를 들어, *pol* 서열의 3' 말단에 다운스트림 스플라이스 수용체(SA)가 또한 존재할 수도 있다. 상기 SD 부위는 벡터의 임의의 효과적인 위치에서 여러 카피들(copies)로 존재할 수 있다. SD는 렌티바이러스 서열의 고유 또는 돌연변이된 카피를 가질 수 있다.

[0078] 천연 *gag-pol* 서열이 바이러스 부속 구조물에 이용되거나 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변형은 키메라 *gag-*

*pol*을 포함할 수 있으며, 여기서 *gag* 및 *pol* 서열은 상이한 바이러스(예를 들어, 상이한 종, 아종, 균주, 분기 균 등)로부터 수득되고/되거나, 서열이 전사 및/또는 번역을 개선시키거나/개선시키고 재조합을 감소시키도록 변형되어 있다. 본 개시내용의 다른 측면에서, *Gag* 및 *Po1* 전구체를 코딩하는 서열(또는 이의 일부, 예를 들어 MA(매트릭스[p17]), CA(캡시드[p24]), NC(뉴클레오캡시드[p9]), p6, 프로테아제(p10), RT(p50), RNase H(p15) 및 인테그레이즈(p31) 중 하나 이상)는 분리되어 서로 다른 벡터 구조물에 위치할 수 있으며, 여기서 각 서열은 고유한 발현 신호를 가진다.

- [0079] HIV-1의 RNA 게놈은 바이러스 조립 동안 Gag 폴리단백질의 뉴클레오캡시드(NC) 도메인에 의해 인식되는 대략 120개의 뉴클레오티드 *psi*-패키징 신호를 함유한다. 패키징 신호의 중요한 부분은 주요 스플라이스 공여자(SD) 부위와 HIV 프로바이러스의 *gag* 개시 코돈 사이에 있으며, 5' LTR의 U5 영역에 대해서는 대략 멀리 있다. 일 측면에서, 패키징 신호는 기능적으로 활성인 *gag-pol* 전구체가 바이러스 형질도입 벡터로 패키징되는 것을 피하기 위해 부속 구조물로부터 기능적으로 부재한다. 예를 들어 *gag*를 포함하지만 패키징 신호는 없는 벡터를 기술하는 문헌[미국 특허 5,981,276(소드로스키 등)]을 참조한다.
- [0080] 추가의 프로모터 및 인핸서 서열은 *gag-pol* 전구체의 전사를 증가, 개선, 강화 등을 위해 5' LTR의 상류에 위치할 수 있다. 유용한 프로모터의 예는 포유동물 프로모터(예를 들어, 구성적, 유도성, 조직-특이적), CMV, RSV, 다른 렌티바이러스 종으로부터의 LTR, 및 상기 및 하기에 언급된 기타 프로모터를 포함한다. 또한, 구조물은 프로모터 서열에 의해 구동되는 전사를 종결시키는 데 효과적인 polyA 신호와 같은 전사 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 적합한 폴리A 서열은, 예를 들어 베타 글로빈(포유류, 인간, 토끼 등), 티미딘 키나제, 성장 호르몬, SV40 및 기타 다수로부터의 서열이 사용될 수 있다.
- [0081] 일 측면에서, *gag-pol* 서열은 단일 바이러스 부속 벡터에서 외피 서열과 반대의 전사 배향으로 배치된다. 후자는 전사 방향이 역 또는 반대임을 의미한다. 이는 상응하는 프로모터를 반대 방향(즉, 서로 마주함)으로 배치하거나 양방향 프로모터를 사용하여 달성할 수 있다(예: Trinklein et al., Genome Research 14:62-66, 2004). 이 배열은 안전 목적, 예를 들어 재조합의 위험 및/또는 기능성 재조합 HIV 게놈의 생산의 위험을 줄이기 위해 활용될 수 있다. 전사 리드-쓰루(read-through)가 기능적 *gag-pol* 및 *env* 서열을 모두 포함하는 RNA를 생성할 가능성이 없기 때문에 이러한 벡터를 사용하면 안전성이 증가한다. 전사 간섭은 전사를 종결시키는 강력한 폴리아데닐화 서열을 이용하여 방지할 수 있다. 강력한 전사 종결 서열의 예는 예를 들어 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 신호(문헌[Lanoix and Acheson, EMBO J. 1988 Aug;7(8):2515-22], 또한 문헌 [Plant et al., 분자 및 세포 생물학, 2005년 4월, 25(8): 3276-3285] 참조)를 포함하여, 당업계에 공지되어 있다. 또한, 시스-작용 리보자임 또는 임의의 추정 관독 서열을 표적으로 하는 RNAi 서열과 같은 전사 종결을 촉진하기 위해 다른 요소가 *gag-pol* 및 *env* 코딩 서열들 사이에 삽입될 수 있다. 유사하게, 불안정성 서열, 종결 서열, 및 정지 부위는 코딩 서열들 사이에 위치할 수 있다.
- [0082] 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 구조적 바이러스 단백질을 코딩할 수 있다. 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 조절 바이러스 단백질을 코딩할 수 있다. 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 구조적 및 조절적 바이러스 단백질 둘 다를 코딩할 수 있다.
- [0083] 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은, 그룹-특이적 항원(Gag), DNA 폴리머라제(Po1), 바이러스 단백질 발현 조절기(Rev), 외피(Env), 트랜스액티베이터(Tat), 네거티브 조절 인자(Nef), 바이러스성 단백질 R(Vpr), 바이러스 감염성 인자(Vif), 바이러스성 단백질 U(Vpu) 및 바이러스성 단백질 X(Vpx)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아닌, 구조적 및/또는 조절적 바이러스 단백질을 코딩할 수 있다.
- [0084] *Gag*는 매트릭스 단백질(MA), 캡시드 단백질(CA) 및 뉴클레오캡시드 단백질(NC)과 같은 구조적 단백질을 코딩한다. *Po1*은 프로테아제(PR), 역전사효소(RT) 및 인테그레이즈(IN)와 같은 단백질을 코딩한다. *Env*는 외피 단백질의 표면 및 막횡단 단위를 코딩한다.
- [0085] 일 측면에서, 암호화된 바이러스 부속 단백질은 융합 단백질이다. 일 측면에서, 암호화된 바이러스 부속 단백질은 부분적인 바이러스 부속 단백질, 예컨대 단백질 도메인이다. 일 측면에서, 바이러스 부속 단백질 도메인은 캡시드 단백질(CA), 매트릭스 단백질(MA), 뉴클레오캡시드 단백질(NC), p6, 전사 인자 특이성 단백질 1(SP1), 역전사효소(RT), 인테그레이즈(IN), 프로테아제(PR) 및 데옥시우리딘 트리포스파타제(dUTPase 또는 DU)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 추가 측면에서, 코딩된 바이러스 부속 단백질은 적어도 하나의 전장 단백질 또는 적어도 하나의 단백질 도메인을 포함한다.
- [0086] 일 측면에서, 바이러스 구조물은 5' LTR 또는 *gag* 및 *pol* 서열과 상이한 렌티바이러스 종으로부터 수득되는 RRE

요소를 포함하는 RRE 요소를 추가로 포함할 수 있다. RRE 요소는 13-kD 서열 특이적 RNA 결합 단백질인 rev 폴리펩타이드에 대한 결합 부위이다. RRE 서열을 포함하는 구조물은 효율적인 발현을 위해 Rev 폴리펩타이드에 의존한다. Rev는 *pol* 및 *gag* 코딩 서열에서 원위인 HIV의 두 번째 인트론 내에 위치한 Rev 반응 요소("RRE")의 복잡한 RNA 2차 구조의 240개 염기 영역에 결합한다. Rev와 RRE의 결합은 비-스플라이스된 및 불완전 스플라이스된 바이러스 RNA를 핵에서 세포질로 내보내는 것을 촉진하여 HIV 단백질의 발현을 조절한다. RRE 요소는 구조물의 적절한 위치에 있을 수 있으며, 바람직하게는 대략적인 천연 위치에서 Gag-Pol 전구체 이후일 수 있다. Tat 폴리펩타이드의 경우와 유사하게, RRE에 결합하는 능력을 보유하는 한 임의의 적합한 Rev 폴리펩타이드가 이용될 수 있다.

[0087] **바이러스 캡시드/외피**

[0088] 바이러스 입자는 캡시드(capsid)라고 하는 단백질 코트에 포장된 바이러스 게놈을 포함한다. 일부 바이러스의 경우 캡시드는 일반적으로 바이러스가 숙주 세포에 결합할 수 있도록 하는 단백질을 포함하는 바이러스 단백질을 포함하는 지질 이중층으로 둘러싸여 있다. 이 지질 및 단백질 구조를 바이러스 외피라고 하며 이는 숙주 세포막에서 유래한다. 캡시드와 외피는 세포에 대한 바이러스 부착, 세포로의 진입, 캡시드 내용물의 세포 내 방출, 새로 형성된 바이러스 입자의 포장을 포함하여 바이러스 감염에서 많은 역할을 한다. 캡시드와 외피는 또한 한 세포로부터 다른 세포로 바이러스 유전 물질을 전달하는 역할을 한다. 이러한 구조는 또한 화학적 또는 물리적 비활성화에 대한 내성과 같은 바이러스 입자의 안정성 특성을 결정한다.

[0089] 일 측면에서, 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 외피 단백질을 생산한다. 일 측면에서, 이 세포주 시스템에 사용된 외피 단백질(들)은 천연 HIV *env* 유전자(야생형 또는 코돈 최적화됨)를 사용하거나, 양쪽성 외피 단백질, 수포성 구내염 벡터(인디아나 또는 기타 균주), 홍역 또는 생물공학적인 키메라 홍역 외피 단백질, 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 또는 고양이 백혈병 바이러스 또는 생물공학적인 FLV 키메라를 포함하지만 이에 제한되지 않는 생체적합성 대체물을 사용하여 슈도타입화된 입자를 생성한다.

[0090] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터는 하나 이상의 캡시드 단백질을 함유한다. 일 측면에서, 캡시드 단백질은 이중성일 수 있다. 일 측면에서, 캡시드 단백질은 유전적으로 변형될 수 있다. 추가 측면에서, 캡시드 단백질은 화학적으로 변형될 수 있다. 캡시드 단백질을 유전적으로 및 화학적으로 변형시키는 전략은 당업계에 공지되어 있다. 캡시드 단백질은 벡터 생체분포를 변경하기 위해 변형될 수 있다.

[0091] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터는 하나 이상의 외피("Env") 단백질을 코딩하는 서열을 가질 수 있다. 바이러스 벡터 친화성은 숙주 세포 상의 분자(단백질, 지질 또는 당)와 상호작용하는 바이러스 외피 단백질의 능력에 의해 결정된다.

[0092] 일 측면에서, 바이러스 부속 구조물은 *env* 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 이중 프로모터를 포함하는 외피 모듈 또는 발현 카세트를 포함할 수 있다. 외피 폴리펩타이드는 바이러스 표면에 나타나며 바이러스 입자에 의한 숙주 세포의 인식 및 감염에 관여한다. 숙주 범위 및 특이성은 외피 폴리펩타이드를 변형 또는 치환함으로써, 예를 들어 상이한(이종) 바이러스 종에 의해 발현되거나 달리 변형된 외피로 변경됨으로써 달라질 수 있다. 이것을 슈도타입화라고 한다. 예를 들어, 문헌[Yee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9564-9568, 1994]을 참조한다. 수포성 구내염 바이러스(VSV) 단백질 G(VSV G)는 광범위한 종 및 조직 친화성 및 벡터 입자에 물리적 안정성 및 높은 감염성을 부여하는 능력으로 인해 광범위하게 사용되었다. 예를 들어, 문헌[Yee et al., Methods Cell Biol., (1994) 43:99-112]을 참조한다.

[0093] 외피 폴리펩타이드는 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어 HIV gp120(천연 및 변형된 형태 포함), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV 또는 MMLV), 하비 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV 또는 HSV), 뮤린 유선 종양 바이러스(MuMTV 또는 MMTV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALV), 라우스 육종 바이러스(RSV), 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스(VSV-G), 모콜라 바이러스, 광견병, 필로바이러스(예: GP1/GP2 외피와 같은 에볼라 및 마르부르크, NP_066246 및 Q05320 포함), 양쪽성, 알파바이러스 등을 포함한다. 다른 예에는 예를 들어 토가바이러스과, 람도바이러스과, 레트로바이러스과, 폭스바이러스과, 파라믹소바이러스과 및 기타 외피 바이러스과로부터의 외피 단백질을 포함한다. 다른 예시적 외피는 전세계 웹 사이트(ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses)에 있는 데이터베이스에 나열된 바이러스로부터의 것이다.

[0094] 또한, 바이러스 외피 단백질은 형질도입 벡터가 정상 범위 밖의 숙주 세포를 표적으로 하여 감염되거나 보다 구체적으로 세포 또는 조직 유형으로 형질도입을 제한하는 폴리펩타이드 서열을 함유하도록 변형되거나 조작될 수 있다. 예를 들어, 외피 단백질은, 수용체 리간드, 항체(단일 사슬 항체와 같은 재조합 항체 유형 분자 또는 항

체의 항원 결합 부분 사용) 및, 형질도입 벡터 코트(coat) 상에 나타날 때 비리온 입자의 관심 표적 세포로의 직접 전달을 용이하게 하는 폴리펩타이드 잔기 또는 이의 변형(예: 표적 서열 내 글리코실화 부위가 존재하는)과 같은 표적화 서열과 프레임 내 결합될 수 있다. 또한, 외피 단백질은 세포 기능을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 형질도입 벡터로 세포 기능을 조절하면 혼합된 세포 집단에서 특정 세포 유형에 대한 형질도입 효율이 증가하거나 감소할 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포는 혈액이나 골수에서 발견되는 다른 세포 유형보다 줄기 세포에 특이적으로 결합하는 리간드 또는 결합 파트너를 포함하는 외피 서열로 더욱 특이적으로 형질도입될 수 있다. 이러한 리간드는 당업계에 공지되어 있다. 비제한적 예는 줄기 세포 인자(SCF) 및 Flt-3 리간드이다. 다른 예는 예를 들어 항체(예를 들어, 세포 유형에 특이적인 단일 사슬 항체), 및 폐, 간, 췌장, 심장, 내피, 평활근, 지방, 전립선, 상피 등과 같은 조직에 특이적인 본질적인 임의 항원(수용체 포함)을 포함한다.

[0095] 임의의 이중 프로모터가 작동가능하게 연결된 경우 바이러스 외피 코딩 서열의 발현을 유도하기 위해 이용될 수 있다. 예는 예를 들어 CMV, EF1 알파, EF1 알파-HTLV-1 하이브리드 프로모터, 페리틴 프로모터, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터, 및 본원에 언급된 기타 프로모터를 포함한다.

[0096] 일 측면에서, 코딩된 외피 단백질은 내인성이다. 추가 측면에서, 코딩된 외피 단백질은 이중성이다. 본원에 개시된 바이러스 벡터의 이중 외피 단백질은 생체적합성인 임의의 외피 단백질을 사용하여 생성될 수 있다. 생체적합성은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0097] 일 측면에서, env는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)로부터 유래될 수 있다. 일 측면에서, HIV-유래 외피 유전자를 코딩하는 서열은 야생형일 수 있다. 추가 측면에서, HIV-유래 외피 유전자를 코딩하는 서열은 코돈-최적화될 수 있다.

[0098] Env는 또한 슈도타입화된 입자로서 생성될 수 있다. 슈도타입화는 바이러스 벡터 입자를 상이한 표적 세포 특이성을 갖도록 조작할 수 있어, 외피 단백질이 유래된 천연 바이러스의 숙주 범위를 확장 및/또는 변경할 수 있다.

[0099] 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터는 양쪽성 슈도타입화 바이러스 벡터일 수 있다. 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터는 에코트로픽(ecotropic) 슈도타입화 바이러스 벡터일 수 있다. 일 측면에서, 본원에 개시된 바이러스 벡터는 팬트로픽(pantropic) 슈도타입화 바이러스 벡터일 수 있다. 본 명세서에 개시된 바이러스 벡터에 의해 코딩된 외피 단백질 서열은 베시쿨로바이러스, 감마레트로바이러스, 또는 모르빌리바이러스 속의 임의의 종으로부터 유래될 수 있다.

[0100] 일 측면에서, 외피 단백질은 뉴저지 수포성 구내염 바이러스(VSV-NJ) 및 인디애나 수포성 구내염 바이러스(VSV-IN)를 포함하나 이에 제한되지 않는 베시쿨로바이러스 속의 종으로부터 유래될 수 있다. 추가 측면에서, 외피 단백질은 임의의 수포성 구내염 바이러스 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 추가 측면에서, 외피 단백질은 절단된 단백질일 수 있다. 추가 측면에서, 외피 단백질은 생물공학적인 키메라 베시쿨로바이러스 단백질일 수 있다.

[0101] 일 측면에서, 외피 단백질은 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV) 및 고양이 백혈병 바이러스(FLV)를 포함하나 이에 제한되지 않는 감마레트로바이러스 속의 종으로부터 유래될 수 있다. 추가 측면에서, 외피 단백질은 GaLV 키메라 및 FLV 키메라를 포함하는 생체조작된 키메라 감마레트로바이러스 단백질일 수 있다. 본원에 정의된 "키메라"는 별개의 기원 또는 별개의 조성의 2개 이상의 유전자 단편으로 구성된 생물학적 개체, 예를 들어 바이러스를 지칭한다.

[0102] 일 측면에서, 외피 단백질은 홍역 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 모르빌리바이러스 속의 종으로부터 유래될 수 있다. 추가 측면에서, 외피 단백질은 생체조작된 키메라 홍역 외피 단백질을 포함하는 생체조작된 키메라 모르빌리바이러스 단백질일 수 있다. 키메라 외피 단백질을 생물공학적으로 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0103] **임의적 Tat(타트)**

[0104] 일 측면에서, 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 Tat 단백질을 포함하거나 생산한다. 또 다른 측면에서, 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 Tat 단백질을 생산하지 않는다. Tat 단백질이 없는 경우 5' LTR의 HIV 프로모터가 전사를 보장하기 위해 이중 인핸서/프로모터로 대체되도록 렌티바이러스 게놈 벡터가 변형된다. 일 측면에서, 이러한 프로모터는 바이러스(CMV와 같은) 또는 세포(EF1- α 와 같은)일 수 있다.

[0105] 또 다른 측면에서, 바이러스 부속 구조물은, 내재하는 5' LTR 및/또는 gag 및 pol 서열과 상이한, 즉 구조물 내 존재하는 다른 렌티바이러스 요소에 이중인, 렌티바이러스 종, 군, 아종, 아군, 균주 또는 분기군으로부터 수득

된 TAR 요소를 추가로 포함할 수 있다. TAR은 바람직하게는 정상 위치의 5' LTR, 예를 들어 LTR의 U3 및 U5 요소 사이에 존재하며, 여기서 천연 R은 이중 렌티바이러스 종의 R'로 대체된다.

[0106] TAR 요소는 바이러스 DNA의 5'LTR(예를 들어, R) 및 상응하는 RNA의 5' 말단에 위치하는 트랜스-활성화 반응 영역 또는 반응 요소이다. 렌티바이러스 RNA에 존재하는 경우, 전사적 트랜스액티베이터인 Tat가 이에 결합하여 HIV LTR의 전사를 여러 배 활성화시킨다. Tat는 TAR 요소에 의해 형성된 짧은 스텝 루프 구조에 결합하는 RNA 결합 단백질이다.

[0107] 이중의 TAR 요소가 이용되는 경우, 5' LTR은 다른 종의 TAR 서열에 대한 천연 TAR을 대체함으로써 일상적으로 변형될 수 있다. TAR 영역의 예는 널리 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[De Areliano et al., AIDS Res. Human Retro., 2005, 21: 949-954]을 참조한다. 이러한 변형된 렌티바이러스 5' LTR은 LTR이 완전히 기능하도록 온전한 U3 및 U5 영역을 포함할 수 있다. TAR 영역 또는 전체 R이 치환될 수 있다.

[0108] 상기 나타낸 바와 같이, Tat 폴리펩타이드는 TAR 서열에 결합한다. *tat*에 대한 코딩 서열은 바이러스 부속 구조물에 존재할 수 있다. TAR에 결합하고 RNA의 전사를 활성화할 수 있는 한, 모든 Tat 폴리펩타이드를 사용할 수 있다. 여기에는 동족 TAR 요소와 같거나 상이한 종에서 얻은 천연 *tat* 서열과, 조작되고 변형된 *tat* 서열이 포함된다.

[0109] **프로모터**

[0110] 일 측면에서, 본원에 개시된 구조물은 구성적, 유도성, 전환, 재조합, 파괴/편집 프로모터 또는 프로모터/인핸서의 조절 하에 부속 단백질 또는 RNA 분자를 발현하는 하나 이상의 발현 카세트를 함유한다. 일 측면에서, 프로모터는 프로모터의 시공간 발현 패턴을 결정하기 위해 상류 시스 조절을 갖는 최소 프로모터이다. 상류 조절 요소는 시스 작용 요소(또는 시스 작용 모티프) 또는 전사 인자 결합 부위를 포함할 수 있다. 추가 측면에서, 프로모터는 이중의(heterologous) 상류 조절 요소들의 조합을 포함한다.

[0111] 일 측면에서, 프로모터는 프로모터/인핸서이다. 본원에 사용된 용어 프로모터/인핸서는 프로모터 및 인핸서 기능 모두를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA 단편을 지칭한다. 프로모터/인핸서는 내인성 또는 외인성 또는 이중성일 수 있다. 내인성 프로모터/인핸서는 천연 바이러스 게놈에서 주어진 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. 외인성 또는 이중성 인핸서/프로모터는 분자 생물학 기술에 의해 유전자에 병치되어 유전자의 전사가 연결된 프로모터/인핸서에 의해 지시되는 것이다.

[0112] 일 측면에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일 측면에서, 유도성 프로모터는 양성으로 유도될 수 있고 양성 대조군에 의해 조절된다. 일 측면에서, 유도성 프로모터는 음성 유도성이며 음성 대조군에 의해 조절된다.

[0113] 추가 측면에서, 유도성 프로모터는 화학적으로 유도성인 프로모터일 수 있다. 화학적으로 유도성인 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 추가 측면에서, 화학적으로 유도성인 프로모터는 테트라사이클린-제어가 가능한 프로모터일 수 있다. 추가 측면에서, 테트라사이클린-제어가 가능한 프로모터는 천연 프로모터이다. 추가 측면에서, 테트라사이클린-제어가 가능한 프로모터는 합성 프로모터이다.

[0114] 추가 측면에서, 유도성 프로모터는 온도 유도성 프로모터일 수 있다. 추가 측면에서, 유도성 프로모터는 광 유도성 프로모터일 수 있다. 추가 측면에서, 유도성 프로모터는 생리학적으로 조절되는 프로모터일 수 있다.

[0115] 일 측면에서, 프로모터는 구성적 프로모터일 수 있다. 일 측면에서, 프로모터는 전환된 프로모터일 수 있다. 일 측면에서, 프로모터는 재조합 프로모터일 수 있다. 일 측면에서, 프로모터는 파괴/편집된 프로모터일 수 있다.

[0116] 일 측면에서, 프로모터 요소는 자연적으로 유래될 수 있다. 추가 측면에서, 프로모터는 CMV, EF1a, SV40, PGK1, Ubc, 인간 베타 액틴, CAG, TRE, CaMKIIa, Ca11, 10, H1 및 U6을 포함하나 이에 제한되지 않는 진핵생물 프로모터로부터 유래된 서열을 함유할 수 있다.

[0117] 추가 측면에서, 프로모터는 합성 요소를 포함한다. 합성 촉진제를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일 측면에서, 합성 프로모터는 구성적 합성 프로모터이다. 일 측면에서, 합성 프로모터는 유도성 합성 프로모터이다. 일 측면에서, 합성 프로모터는 조직-특이적 합성 프로모터이다.

[0118] **폴리아데닐화 서열**

[0119] 일 측면에서, 바이러스 벡터 게놈 구조물 또는 바이러스 부속 구조물은 하나 이상의 폴리아데닐화 서열(p(A))을 포함한다. 진핵 세포에서 재조합 DNA 서열의 발현은 최종 전사체의 종결 및 폴리아데닐화를 지시하는 신호의 발현을 필요로 한다. 본원에 사용된 용어 "폴리아데닐화 서열"은 초기 형성된 RNA 전사체의 종결 및 폴리아데닐화

를 지시하는 핵산 서열을 지칭한다. polyA 꼬리가 없는 전사체는 불안정하고 빠르게 분해될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바이러스 벡터 계놈 구조물에서 이용되는 polyA 신호는 이중성 또는 내인성일 수 있다. 내인성 polyA 신호는 주어진 유전자의 코딩 영역의 3' 말단에서 자연적으로 발견되는 polyA 서열을 의미한다. 이중의 polyA 신호는 한 유전자에서 분리되어 다른 유전자의 3' 말단에 위치한 polyA 서열을 의미한다.

[0120] 발현 카세트

[0121] 한 측면에서, 본원에 기재된 바이러스 벡터 계놈 구조물 및/또는 바이러스 부속 구조물은 하나 이상의 발현 카세트를 포함한다. 발현 카세트는 모노시스트론 발현 카세트 또는 폴리시스트론 발현 카세트일 수 있다.

[0122] 한 측면에서, 폴리시스트론 발현 카세트는 하나 이상의 바이러스 스킵(skip) 서열을 함유한다. 바이러스 스킵 서열은 진핵 세포에서 번역 동안 폴리펩티드의 "절단"을 매개하는 18-22개의 아미노산 바이러스 올리고펩티드인 "자가 절단" 2A 펩티드이다. "2A" 지정은 바이러스 계놈의 특정 영역을 나타낸다. 2A 절단의 메커니즘은 입체장애 생성에 필수적인 고도로 보존된 C-말단 서열에 의해 매개되는 리보솜 스킵이다. 한 측면에서, 바이러스 스킵 서열은 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A)로부터 유래된 2A 펩티드를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 스킵 서열은 토세아 아사이나 바이러스 2A(T2A)로부터 유래된 2A 펩티드를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 스킵 서열은 말 비염 A 바이러스(E2A)로부터 유래된 2A 펩티드를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 스킵 서열은 구제역 바이러스(F2A)로부터 유래된 2A 펩티드를 포함할 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 스킵 서열은 보존된 "2A" C-말단 서열 GDVEXNPGP와 실질적으로 유사한 2A 서열을 갖는 임의의 바이러스로부터 유래될 수 있다.

[0123] 한 측면에서, 폴리시스트론 발현 카세트는 하나 이상의 내부 리보솜 엔트리 부위 요소(IRES)를 함유한다. IRES 요소는 단백질 합성의 내부 개시를 촉진하는 시스 작용 RNA 영역이다. IRES 서열은 리보솜에 의해 인식되므로 단일 전사체에서 여러 단백질의 번역을 유도하는 데 사용할 수 있다.

[0124] 추가 측면에서, 폴리시스트론 발현 카세트는 하나 이상의 바이러스 스킵 서열 및 하나 이상의 내부 리보솜 엔트리 부위 요소를 함유한다.

[0125] 일 측면에서, 폴리시스트론 발현 카세트는 바이러스 스킵 서열 또는 내부 리보솜 엔트리 서열과 유사한 기전을 제공하는 서열을 코딩한다.

[0126] 코돈 최적화

[0127] 발현 카세트는 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 서열을 함유한다. 한 측면에서, 바이러스 부속 단백질은 야생형 서열에 의해 코딩될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 부속 단백질은 돌연변이된 서열에 의해 코딩될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 인테그레이즈는 돌연변이된 서열에 의해 인코딩된다. 추가 측면에서, 바이러스 부속 단백질은 코돈 최적화된 서열에 의해 코딩될 수 있다. 코돈 최적화는 일반적으로 재조합 단백질 또는 바이러스 벡터의 생산을 증가시키는 데 사용된다. 코돈 최적화는 코돈 사용 편향을 해결하기 위한 바람직한 분자 도구이다. 코돈 사용 편향은 모든 계놈의 특징이며, 계놈 내 코돈 분포의 빈도를 반영하는 것을 코돈 사용 편향이라 한다. 코돈 사용은 종마다 다양하며 선호하는 코돈은 고도로 발현되는 유전자에서 더 자주 사용된다. 트랜스퍼 RNA 또는 tRNA는 주어진 유기체의 코돈 사용을 반영하므로 특정 tRNA의 풍부도는 유기체마다 다르다. 코돈 최적화는 아주 밀접한 코돈을 생성하기 위해 침묵 돌연변이를 도입하여 DNA 서열을 수정하는 과정이다.

[0128] 추가 측면에서, 발현 카세트는 모두 야생형 서열, 모든 코돈 최적화된 서열, 모든 돌연변이된 서열, 또는 야생형, 코돈 최적화된, 및 돌연변이된 서열의 조합인 서열을 함유할 수 있다. 한 측면에서, 포함되는 경우, Rev, Tat, Nef, Vpr, Vif, Vpu/Vpx의 발현은 바이러스 스킵 서열(예: P2A 또는 T2A) 또는 내부 리보솜 엔트리 서열, 또는 기타 유사한 메커니즘 또는 전사체당 단일 메시지를 사용하는 폴리시스트론성인 야생형 또는 코돈 최적화된 구조물로부터 유래한다. 시퀀스 또는 기타 유사한 메커니즘 또는 전사체당 단일 메시지. 한 측면에서, gag/pol의 발현은 야생형 또는 코돈 최적화된 폴리시스트론 메시지로부터, 또는 별개의 gag 및 pol 구조물로서, 또는 추가로 분리된 CA, MA SP1, NC, p6, RT, IN, PR, 및/또는 DU 구조물로서 이다.

[0129] 표적 또는 숙주 세포에 바이러스 벡터 도입

[0130] 일 측면에서, 세포 내로 하나 이상의 구조물의 도입은 리포펙타민 또는 리포펙타민-유사 화학 시약, 폴리에틸렌 이민(PEI), 칼슘 포스페이트 결정, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 나노입자 또는 나노입자 유사 시약, 또는 전기천공을 포함하나 이에 제한되지 않는 표준 화학적, 생물학적 또는 물리적 방법을 사용하여 달성된

다. 또 다른 측면에서, 이들 구조물의 세포주 계능 내로의 통합은 인테그레이즈, 트랜스포사제, 재조합효소, CRISPR-Cas9 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않는 생물학적 재조합 효소를 사용하거나, 세포 DNA 복구 기구를 사용하여 자발적 또는 표적화된 삽입을 이용하여 달성된다.

- [0131] 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물을 표적 또는 숙주 세포에 도입하는 방법은 형질도입 또는 형질감염을 포함할 수 있다. 형질감염 및 형질도입은 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 수행할 수 있으며, 형질감염 또는 형질도입 효율을 향상시키기 위한 최적화를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 최적화는 동결-해동 시약을 포함할 수 있다.
- [0132] 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 당업계에 공지된 화학적 방법을 사용하여 표적 또는 숙주 세포에 도입된다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 당업계에 공지된 생물학적 방법을 사용하여 표적 또는 숙주 세포에 도입된다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 당업계에 공지된 물리적 방법을 사용하여 표적 또는 숙주 세포에 도입된다.
- [0133] 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 광학 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 자기(magnetic) 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 생물학적 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 중합체 기반 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 리포솜 기반 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 나노입자 기반 기술을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 광학, 자기, 생물학적, 폴리머 기반, 리포솜 기반 및 나노입자 기반 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는 기술의 조합을 포함하는 방법의 조합에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다.
- [0134] 추가 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 전기천공을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 초음파천공법을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 기계천공법을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 구조물은 광천공을 포함하는 방법에 의해 표적 또는 숙주 세포에 도입될 수 있다.
- [0135] 추가 측면에서, 도입 방법은 또한 양이온성 중합체, 인산칼슘, 양이온성 지질, 또는 이들의 조합의 사용을 포함하는 방법을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 양이온성 중합체는 헥사다이메트린 브로마이드(상업적 브랜드명 폴리브렌)이다.
- [0136] 추가 측면에서, 도입 방법은 또한 레트로바이러스, 렌티바이러스, 트랜스포존, 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 트랜스포사제, CRISPR-관련 뉴클레아제(예를 들어, Cas9, Cas12a 등), 또는 재조합효소의 사용이 관여되는 방법을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 재조합효소는 Cre-재조합효소, 플리파제(Flippase) 재조합효소, 또는 이들의 유도체일 수 있다.
- [0137] 핵산의 생산 세포로의 통합을 촉진하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 핵산 구조물을 선형화하는 것을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0138] 한 측면에서, 하나 이상의 바이러스 벡터 구조물은 바이러스 벡터 생산 세포 내에서 안정적으로 통합되거나 에피솜으로 유지될 수 있다. 도입된 임의의 바이러스 벡터에 의해 코딩된 서열의 유전자 발현은 통합된 서열 또는 에피솜으로부터 발생할 수 있다.
- [0139] 한 측면에서, 성분의 일부를 안정적으로 발현하는 바이러스 벡터 생산 세포는 벡터 생산에 필요한 나머지 성분으로 형질감염될 수 있다. 바이러스 벡터 생산에 필요한 나머지 구성요소의 형질감염은 일시적일 수 있다.
- [0140] 바이러스 벡터 구조물은 숙주 또는 표적 세포 내로 도입시 무작위로 또는 부위-특이적 방식으로 통합될 수 있다.
- [0141] **바이러스 벡터 생산 세포**
- [0142] 본원에 개시된 개시내용은 본원의 하나 이상의 바이러스 벡터 구조물을 적합한 표적 세포 또는 숙주 세포에 도입하고, 세포 확장 및 벡터 성분의 발현에 이르는 조건하에 상기 세포를 배양시킴으로써 바이러스 벡터 입자들을 시험관 내(in vitro) 제조하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 세포" 및 "숙주

세포"는 호환가능하다.

- [0143] 바이러스 벡터 생산 세포는 하나 이상의 바이러스 벡터 구조물의 도입 시에 바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터 입자를 생산할 수 있는 표적 세포 또는 숙주 세포이다.
- [0144] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포는 형질전환 세포이다. 본원에 사용된 용어 "형질전환 세포"는 한 세포 유형에서 다른 세포 유형으로 전달된 유전 물질을 포함하는 세포를 지칭한다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 집단은 다클론성이다. 다클론성 세포는 통합 건의 개수 및 세포 전반에 걸친 통합 부위에 있어서 변화를 가질 수 있는 다중 클론을 갖는 세포의 이종 집단을 포함한다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 집단은 단클론성이다.
- [0145] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포는 선택된 바이러스 벡터 생산 세포 클론으로부터 확장된 세포주로부터의 것이다.
- [0146] 바이러스 벡터 생산 세포 클론은 당업계에 공지된 방법에 의해 다클론성 집단으로부터 유래될 수 있다. 선택 방법에는 희석 제한, 단일 세포 분류, 단일 세포 선택 및 이들의 조합이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 제한 희석은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 단일 세포 분류는 단일 세포 프린팅, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 및 자기 활성화 세포 분류를 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 단일 세포 선택은 에피토프, 단백질, 리포터 유전자, 또는 이들의 조합에 대한 선택을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 선택 방법에 의해 수행될 수 있다. 추가 측면에서, 단일 세포 선택 방법은 하나 이상의 대사 또는 항생제 특성을 통한 선택을 포함할 수 있다.
- [0147] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 부착 방식으로 성장한다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 현탁액에서 성장한다. 추가 측면에서, 부착성 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 현탁-적응될 수 있다.
- [0148] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 혈청-보충된 또는 무혈청 배지에서 배양된다. 당업자는 제시된 바이러스 벡터 생산 세포 유형에 적합한 배지를 선택하고 본원에 개시된 방법의 다양한 단계에서 배지 조성을 변형할 수 있을 것이다. 배지에는 분비된 세포 단백질, 확산성 영양소, 아미노산, 유기 염, 무기 염, 비타민, 미량 금속, 당 및 사이토카인과 같은 기타 성장 촉진 물질의 선택을 포함할 수 있다. 배지는 글루타민 또는 이의 대체물로 보충될 수 있다.
- [0149] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 벡터가 유래된 특정 바이러스의 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다. 한 측면에서, 레트로바이러스 벡터의 경우, 생산 세포 클론 또는 세포주는 레트로바이러스 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다. 한 측면에서, 렌티바이러스 벡터의 경우, 생산 세포 클론 또는 세포주는 렌티바이러스 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다. 한 측면에서, 헤르페스바이러스 벡터의 경우, 생산 세포 클론 또는 세포주는 헤르페스바이러스 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다. 한 측면에서, 아데노바이러스 벡터의 경우, 생산 세포 클론 또는 세포주는 아데노바이러스 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다. 한 측면에서, 아데노-연관 바이러스 벡터의 경우, 생산 세포 클론 또는 세포주는 아데노-연관 바이러스 수명 주기를 지원하는 임의의 진행 세포일 수 있다.
- [0150] 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 불멸화된다. 세포주는 상업적으로 이용 가능하거나 상업적으로 이용 가능하지 않은 실험실 파생물일 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 진행 기원의 것이다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 포유동물 기원이다. 바이러스 벡터의 생산을 위한 포유동물 세포는 당업계에 공지되어 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주는 인간 기원의 것이다.
- [0151] 추가의 측면에서, 바이러스 벡터 생산자 세포주는 고도로 형질감염될 수 있는 인간 배아 신장(HEK) 293 세포에서 또는 그로부터 개발된다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 생산자 세포주는 HEK293T 또는 HEK293F 세포와 같은 HEK293 세포의 유도체이다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주에 대한 세포 유형에는 HeLa 세포, Vero 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, A549 세포, 및 NIH 3T3 세포가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.
- [0152] **생산된 바이러스 벡터의 특성화**
- [0153] 바이러스 벡터 생산자 세포 클론 또는 세포주에 의해 생산된 바이러스 벡터 입자는 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 특징지어질 수 있다.

- [0154] 한 측면에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 바이러스 벡터 입자는 슈도타입화 바이러스 입자이다. 슈도타입화 바이러스 입자는 한 바이러스 혈청형의 바이러스 부착 단백질을 다른 바이러스 혈청형으로 대체하여 생성할 수 있다. 본원에 사용된 "바이러스 부착 단백질"은 바이러스 캡시드 단백질 또는 바이러스 외피 단백질을 지칭한다.
- [0155] 한 측면에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 바이러스 벡터 입자는 모자이크 바이러스 입자이다. 모자이크 바이러스 입자는 상이한 바이러스 변이체로부터 상이한 바이러스 부착 단백질을 혼합함으로써 생성될 수 있다.
- [0156] 한 측면에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 바이러스 벡터 입자는 키메라 바이러스 입자이다. 키메라 바이러스 입자는 (합리적인 방법 또는 높은 처리량 제조 기술들을 통해) 혈청형 간에 바이러스 부착 단백질의 더 작은 도메인을 교환하는 것을 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0157] 안정한 바이러스 벡터 생산 세포 클론 또는 세포주로부터, 바이러스 벡터 게놈 및 부속 단백질은 정량적으로 또는 정성적으로 특성화될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 벡터 게놈과 하나 이상의 부속 단백질의 화학량론적 비율이 결정될 수 있다. 추가 측면에서, 바이러스 벡터 게놈 및 하나 이상의 부속 단백질의 수준이 결정될 수 있다.
- [0158] 선택된 세포 클론 또는 세포주의 통합 프로파일이 결정될 수 있다. 한 측면에서, 통합 프로파일 또는 삽입 프로파일은 역 PCR, 선형 증폭-매개 PCR 또는 결찰-매개 PCR과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 검출될 수 있다. 그런 다음 이러한 방법에 의해 검출된 벡터 측면 서열을 숙주 세포 게놈에 매핑하고 참조 세트와 비교할 수 있다. 매핑(mapping)은 QuickMap과 같은 벡터 측면 서열을 매핑하고 분석하기 위해 계산 도구를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0159] 한 측면에서, 재조합 바이러스 벡터는 세포 클론 또는 세포주로부터 수확될 수 있다. 한 측면에서, 세포주는 단클론성이다. 수확된 바이러스 벡터는 정성적으로 또는 정량적으로 특성화될 수 있다. 한 측면에서, 바이러스 역가는 밀리리터당 형질도입 단위(t.u./ml)로 표현된다.
- [0160] 바이러스 역가는 물리적 또는 기능적 적정을 사용하여 측정될 수 있다. 한 측면에서, 적정 방법은 용량 의존적 양의 벡터 상정액을 사용하는 지표 세포의 형질도입을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0161] 추가 측면에서, 형질도입된 지표 세포는 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 평가될 수 있다. PCR에 의한 정량은 상대 정량 또는 절대 정량을 사용하여 수행할 수 있다. PCR에 의한 상대 또는 절대 정량화 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0162] 추가 측면에서, 바이러스 역가 측정 방법은 효소 면역검정이다. 수확된 바이러스 입자는 바이러스 캡시드 단백질이 유래된 바이러스에 특이적인 면역분석을 사용하여 바이러스 캡시드 단백질의 양을 측정함으로써 정량화될 수 있다(예: HIV의 경우 p24).
- [0163] 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 바이러스 벡터 입자는 통과형 초원심분리 및 고속 원심분리, 및 접선 유동 여과를 사용하여 농축 및/또는 정제될 수 있다. 초원심분리를 통한 흐름은 RNA 종양 바이러스의 정제에 사용되었다(문헌[Toplin et al., Applied Microbiology, 1967, 15: 582-589; Burger et al., Journal of the National Cancer Institute, 1970, 45: 499-503] 참조). 본 개시내용은 렌티바이러스 벡터의 정제를 위한 통과형 초원심분리의 사용을 제공한다. 이 방법은 다음 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 세포 공장 또는 생물반응기 시스템을 사용하여 세포에서 생산할 수 있다. 일시적 형질감염 시스템(상기 참조)을 이용하거나 패키징 또는 생산자 세포주도 유사하게 사용할 수 있다. 원하는 경우 초원심분리기에 재료를 적재하기 전에 사전-정화 단계를 거칠 수 있다. 연속 흐름 또는 배치 침강을 사용하여 통과형 초원심분리를 수행할 수 있다. 침전에 사용되는 재료는 예를 들어 염화세슘(CsCl), 주석산칼륨 및 브롬화칼륨이며, 이들은 모두 부식성이 있지만 낮은 점도로 고밀도를 생성한다. CsCl은 생성될 수 있는 넓은 밀도 구배(1.0 ~ 1.9 g/cm)로 인해 높은 순도를 달성할 수 있기 때문에 공정 개발에 자주 사용된다. 브롬화칼륨은 고밀도에서 사용할 수 있지만 일부 단백질의 안정성과 양립할 수 없는 25°C와 같은 고온에서만 사용할 수 있다. 자당은 저렴하고 독성이 없어 널리 사용될 수 있으며, 대부분의 단백질, 하위 세포 분획 및 전체 세포의 분리에 적합한 구배를 형성할 수 있다. 일반적으로 Hie 최대 밀도는 약 1.3g/cm³이다. 자당의 삼투 가능성은 세포에 유독할 수 있으며 이 경우 예를 들어 니코덴즈(Nycodenz)와 같은 복잡한 구배 물질을 사용할 수 있다. 구배는 당해 구배에서 1개 이상의 단계로 사용할 수 있다. 바람직한 측면은 단계식 자당 구배를 사용하는 것이다. 재료 캔의 부피는 바람직하게는 런(run)당 0.5리터에서 200리터 이상이다. 유속 속도는 바람직하게는 시간당 5 내지 25리터 이상이다. 선호되는 작동 속도는 25,000~40,500rpm 사이이며, 최대 122,000 x g의 힘을 생성한다. 로터는 원하는 부피 비

울로 정적으로 언로드(unload)될 수 있다. 바람직한 측면은 원심분리된 물질을 100ml 분획으로 언로드하는 것이다. 정제되고 농축된 렌티바이러스 벡터를 함유하는 분리된 분획은 겔 여과 또는 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 원하는 완충액에서 교환될 수 있다. 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피는 또한 완충액 교환 또는 추가 정제를 위한 대안적 또는 추가 방법으로 사용될 수 있다. 또한, 접선 흐름 여과(Tangential Flow Filtration)은 필요한 경우 버퍼 교환 및 최종 제제에도 사용할 수 있다. 접선 흐름 여과(TFF)는 또한 2단계 TFF 절차가 구현되는 초고속 또는 고속 원심분리의 대안 단계로 사용할 수 있다. 첫 번째 단계는 벡터 상층액의 부피를 줄이는 반면, 두 번째 단계는 완충액 교환, 최종 제제 및 물질의 추가 농축에 사용된다. TFF 막은 100~500 킬로달톤의 막 크기를 가져야 하며, 여기서 상기 첫 번째 TFF 단계는 500 킬로달톤의 바람직한 막 크기를 가져야 하고 두 번째 TFF는 300~500 킬로달톤 사이의 바람직한 막 크기를 가져야 한다. 최종 완충액에는 벡터가 장기간 보관될 수 있도록 하는 재료가 포함되어야 한다.

[0164] 본 개시내용은 또한 부착성 세포를 함유하는 세포 공장을 사용하거나, 렌티바이러스 벡터를 생성하기 위해 벡터 및 부속 구조물로 형질감염되거나 형질도입되는 현탁 세포를 함유하는 생물반응기를 사용하여 렌티바이러스 벡터를 농축 및 정제하는 방법을 제공한다. 비제한적인 예 또는 생물반응기는 Wave 생물반응기 시스템 및 Xcellerex 생물반응기를 포함한다. 둘 다 일회용 시스템이다. 그러나 일회용이 아닌 시스템도 사용할 수 있다. 구조물은 본원에 기술된 것들 뿐만 아니라 다른 제조합 바이러스 벡터일 수 있다. 대안적으로 세포주는 형질도입 또는 형질감염의 필요 없이 렌티바이러스 벡터를 생성하도록 조작될 수 있다. 형질감염 후, 렌티바이러스 벡터를 수확하고 여과하여 미립자를 제거한 다음 연속 흐름 고속 또는 초원심분리를 사용하여 원심분리할 수 있다. 일 측면에서, 고속 원심분리를 구비한 JCF-A 구역 및 연속 유동 로터와 같은 고속 연속식 유동 장치가 사용된다. 또한 원심분리 속도가 5,000xg RCF보다 크고 26,000xg RCF 미만인 임의의 연속 흐름 원심분리기가 제공된다. 바람직하게는, 연속 흐름 원심력은 스핀 시간 20시간 내지 4시간으로 약 10,500xg 내지 23,500xg RCF이고, 더 긴 원심 시간은 더 느린 원심력에 사용된다. 렌티바이러스 벡터는, 이를 여과할 수 없어 벡터를 직선 원심분리하는 데 문제가 있어서 바이러스 벡터 펠렛에 이르는 응집체를 형성하지 않도록, 보다 조밀한 물질의 쿠션 상에서 원심분리될 수 있다(비제한적인 예는 자당이지만 다른 시약을 사용하여 쿠션을 형성할 수 있고 이들은 당업계에 잘 알려져 있다). 쿠션에 대한 연속 흐름 원심분리는 벡터가 큰 응집체 형성을 방지할 수 있도록 하지만, 렌티바이러스 벡터를 생산하는 대량의 형질감염된 물질로부터 벡터가 높은 수준으로 농축되도록 한다. 또한, 자당의 두 번째 덜 조밀한 층은 렌티바이러스 벡터 제제의 떠를 두르는 데 사용할 수 있다. 연속 흐름 원심분리기의 유속은 바람직하게는 분당 1~100ml이지만 더 높거나 더 낮은 유속도 사용할 수 있다. 유속은 높은 유속으로 인해 상당한 양의 벡터가 손실됨 없이 벡터가 원심분리기의 코어에 들어갈 충분한 시간을 제공하도록 조정된다. 더 높은 유속이 필요한 경우 연속 흐름 원심분리기에서 흘러나온 물질이 재순환되어 원심분리기를 두 번째로 통과할 수 있다. 연속 흐름 원심분리를 사용하여 바이러스를 농축한 후 TFF(접선 흐름 여과)를 사용하여 벡터를 추가로 농축하거나 TFF 시스템을 완충액 교환에 간단히 사용할 수 있다.

[0165] TFF 시스템의 비제한적인 예는 GF> 헬스케어에서 생산하는 Xampler 카트리지 시스템이다. 선호하는 카트리지는 MW 컷오프가 500,000 MW 이하인 카트리지이다. 바람직하게는 카트리지는 300,000 MW의 MW 컷오프로 사용된다. 100,000 MW 컷오프 카트리지도 사용할 수 있다. 더 큰 부피의 경우 더 큰 카트리지를 사용할 수 있으며 벡터 제제를 최종 채우기 전에 이 최종 완충액 교환 및/또는 농축 단계에 적합한 TFF 시스템을 쉽게 찾을 수 있다. 최종 충전 제제에는 벡터를 안정화시키는 요소가 포함될 수 있다. 예를 들어, 당이 일반적으로 사용되고 당업계에 공지되어 있다.

[0166] **추가 세포주 변형**

[0167] 한 측면에서, 제조합 바이러스 벡터를 제조하는 데 사용되는 세포주는 바이러스 벡터 생산을 향상시키기 위해, 예를 들어, RNAi 또는 안티센스를 녹아웃 유전자에 도입하여 바이러스 벡터 생산을 제한하는 유전자의 발현을 감소시키거나 바이러스 벡터 생산을 향상시키는 서열을 도입하여 이하 언급되는 임의의 방식으로 변형될 수 있다. 세포 또는 바이러스 인핸서를 코딩하는 서열은, 또한 바이러스 생성물의 수준 또는 세포 트랜스액티베이터 단백질의 수준을 향상시키기 위해, HIV LTR에 작용하는 헤르페스 바이러스, B형 간염 바이러스와 같은 세포주 (예: 추가 플라스미드 벡터를 사용) 내로, 조작될 수 있다. 세포 트랜스액티베이터 단백질에는 예를 들어 NF- κ B, UV 광 반응성 인자 및 T 세포 활성화 인자가 포함된다. 또 다른 측면에서, 제조합 바이러스 벡터를 제조하는 데 사용되는 세포주는 메가뉴클레아제, 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 CRISPR 관련 뉴클레아제(예: Cas9, Cas12a 등)로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레아제에 의해 변형되거나 편집될 수 있다.

[0168] 한 측면에서, 세포주는 DNA를 세포 내로 도입하기 위해, 예를 들어 전기천공법, 인산칼슘, 리포솜 등을 사용하

여 세포주를 구조물 DNA로 통상적으로 형질전환시킬 수 있다. 세포는 공동 형질전환(즉, 보조 벡터와 전달 벡터를 모두 사용)하거나, 각 단계에 다른 벡터를 도입하는 별도의 단계로 형질전환될 수 있다.

[0169] 세포는 바이러스 벡터를 생산하기에 효과적인 조건하에서 배양된다. 이러한 조건에는 예를 들어 단백질 생산을 달성하는 데 필요한 특정 환경이 포함된다. 이러한 환경에는 예를 들어 적절한 완충액, 산화제, 환원제, pH, 보조인자, 온도, 이온 농도, 사용되는 세포의 적절한 연령 및/또는 세포 단계(예: 특히 세포 주기의 특정 부분, 또는 특정 유전자가 발현되는 특정 단계), 배양 조건(세포 배지, 기질, 산소, 이산화탄소, 포도당 및 기타 당 기질, 혈청, 성장 인자 등 포함)을 포함한다.

[0170] 본 개시내용은 또한 향상된 성장 특성, 배지에 존재하는 고가의 인자에 대한 감소된 의존성, 더 높은 수율의 단백질 생성 및 더 높은 역가의 벡터 입자를 생성하는 세포주의 용도를 제공한다. 예를 들어, HEK 293 세포는 세포 수용체의 특정 증가된 발현을 가지며 세포의 배지에 특정 리간드를 추가함으로써 증식 가능성을 증가시키는 것으로 최근에 보고되었다(참조 문헌[Allison et al., Bioprocess International, 2005, 3(1.): 38-45]). 바람직한 측면은 HEK 293 세포와 관련된 리간드 단백질의 최적화된 조합을 발현하는 복수의 렌티바이러스 벡터이며, 그 후 세포는 렌티바이러스 벡터의 다중 카피를 함유하는 HEK 293 세포의 클론을 단리하기 위해 고처리량 방법에 의해 분류된다. 이 세포는 HIV 벡터에 포함된 리간드 유전자와는 상이하지만 다중 카피를 발현하는 HIV 벡터의 조합을 포함한다. 리간드 유전자는 코돈 최적화되거나 돌연변이가 추가되어 발현을 추가로 증가시킬 수 있다. 바람직한 조합은 다중 용도를 가질 수 있는 최종 분리된 클론 세포에서 발현된 리간드 단백질의 다중 카피를 갖는 것이다. 이는 단백질 또는 항체(단클론, 인간화, 단일 사슬 포함) 생산에 사용될 수 있다. 렌티바이러스 벡터와 같은 벡터의 생산에도 사용될 수 있지만, 렌티바이러스 벡터에 한정되는 것은 아니다. 아데노 및 아데노-연관 벡터, 뮤린 레트로바이러스 벡터, SV40 벡터 및 기타 벡터와 같은 다른 벡터들은 현재 최적화된 이 세포주에서 쉽게 생성될 수 있다. HEK 293 세포에서 증가된 발현/활성을 나타내는 수용체 및 이들의 리간드의 목록은 예를 들어 AXL 수용체(gasβ); EGF 수용체(EGF), 케모카인 수용체(프랙탈린); PDGF 수용체, 베타(PDGF); IL-15R-알파; IL-2R-알파; 케모카인 수용체 2(MCP1); IL-2R, 감마; IL-1R-1; CSF-1 수용체; 온코스타틴 수용체; IL-4R; 비타민 D3 수용체; 뉴로필린 1(VEGF); 대식세포 자극 수용체 1(MSP); NGF-R; PDGFR-알파 수용체; IL-11-R, 예를 들어 알파; IL-10-R, 예를 들어 베타; FGF-R-4(aFGF); BMP 수용체, 예를 들어, II형(BMP-2); TGF-R, 예를 들어 베타 수용체 II(TGF-베타); FGF-R-1(bFGF); 케모카인 수용체 4(SFD1a); 인터페론 감마 수용체 1 및 2를 포함한다. 문헌[BioProcess International, 2005년 1월 참조. 표 1, "HEK-293에 의해 발현되는 성장 인자/사이토카인 수용체"]을 참조한다. 그러한 세포는 더 개선된 단백질 및 벡터 생산의 잠재력을 가질 것이고 세포 자체가 인자를 생성하고 배지로 분비할 것이기 때문에 배지에 존재하는 리간드 인자의 존재에 덜 의존할 것이다.

[0171] CHO 세포와 같은 다른 세포 유형의 경우, 다른 수용체-리간드 조합이 중요할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 성장 인자 수용체 I, 인슐린 성장 인자 및 인슐린은 세포에서 항-세포자멸 활성을 갖는 것으로 생각된다. 인슐린 성장 인자 수용체(I 또는 II), 인슐린 성장 인자(I 또는 II), 인슐린 및 생산을 위한 표적 단백질이, 모두 생산 세포의 형질도입을 위한 벡터에 포함되도록, 및 표적 단백질의 매우 높은 생산을 나타내는 클론을 선택하기 위해 바람직하게는 고처리량 방법을 사용하여 적합한 클론이 선택되도록, 복수의 렌티바이러스 벡터를 구축할 수 있다. 최적의 클론은 조작된 모든 유전자 또는 유전자 발현 억제체를 고도로 발현하는 세포가 아닐 수 있으며, 오히려 일부의 경우 낮은 수준의 발현일 수 있는 각 유전자의 최적 발현 수준일 수 있다. 렌티바이러스 벡터 시스템의 가치와 이러한 세포주를 조작하기 위해 복수의 렌티바이러스 벡터를 사용하는 것은 렌티바이러스 벡터 혼합물로 형질도입된 세포 집단에서 각 벡터 카피 수의 무작위 또는 확률적 분포가 있다는 것이며, 따라서 혼합물의 각 벡터의 양, 각 개별 두 번째 유전자의 카피수 또는 억제 서열을 최적화할 수 있다. 벡터와 2차 유전자 또는 유전자 억제 서열의 바람직한 조합은, 각각의 렌티바이러스 벡터가, 생산을 위한 관심 단백질 및, 생산 세포의 생존 능력 또는 일부 측면에 영향을 미침으로써 임의로 추가로 적어도 하나의 직접 또는 간접적으로 단백질 수율 또는 벡터 수율을 추가로 촉진하는 하나 이상의 RNAi 또는 유전자를 발현한다는 것이다. 그러나, 이러한 2차 서열의 효과를 증가시키기 위해 2차 유전자 또는 유전자 발현 억제체만을 발현하는 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터를 갖는 것도 유익할 수 있다.

[0172] **예시적인 구현예들**

[0173] 구현예 1. 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

[0174] 1. 관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하는 단계;

- [0175] 2. 상기 GOI 및 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합된 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질 전환 세포의 집단을 생산하는 단계;
- [0176] 3. 상기 형질전환 세포의 집단으로부터 원하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 선택하는 단계; 및
- [0177] 4. 상기 세포 클론으로부터 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 생성하는 단계를 포함하며, 상기 하나 이상의 보조 구조물의 도입이 동시에 일어나는 제조 방법.
- [0178] 구현예 2. 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:
- [0179] 1. 관심 유전자(GOI)를 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 구조물 및 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 하나 이상의 바이러스 부속 구조물을 세포 집단 내로 도입하는 단계;
- [0180] 2. 상기 GOI 및 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 통합된 또는 에피솜 서열을 포함하는 형질 전환 세포의 집단을 생산하는 단계;
- [0181] 3. 상기 형질전환 세포의 집단으로부터 원하는 바이러스 역가를 생산하는 세포 클론을 선택하는 단계; 및
- [0182] 4. 상기 세포 클론으로부터 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주를 생성하는 단계를 포함하며,
- [0183] 여기서 상기 하나 이상의 보조 구조물의 도입은 세포 배양의 개입 없이 하나 이상의 순차적 단계를 통해 일어나는, 제조 방법.
- [0184] 구현예 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 형질전환 세포는 다클론성 세포를 포함하는, 방법.
- [0185] 구현예 4. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 선택 단계는 상기 형질전환 세포의 다클론성에서 단클론성으로의 선택을 추가로 포함하는 방법.
- [0186] 구현예 5. 구현예 4에 있어서, 상기 다클론성에서 단클론성으로의 선택은 제한 희석, 단일 세포 분류, 단일 세포 선택, 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.
- [0187] 구현예 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주의 생성이 상기 선택된 세포 클론의 확장에 의해 발생하는 방법.
- [0188] 구현예 7. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 냉동보존에 의해 상기 선택된 세포주를 저장하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0189] 구현예 8. 구현예 7에 있어서, 상기 방법은 상기 동결보존된 세포주로부터 세포를 확장하여 바이러스 벡터를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0190] 구현예 9. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론, 상기 생성된 세포주, 또는 둘 모두에서 상기 바이러스 벡터 게놈 및 상기 하나 이상의 보조 단백질의 수준을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0191] 구현예 10. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론, 상기 생성된 세포주, 또는 둘 모두에서 바이러스 벡터 게놈 RNA 및 하나 이상의 부속 단백질의 화학량론적 비를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0192] 구현예 11. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론, 상기 생성된 세포주, 또는 둘 모두의 통합 프로파일을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0193] 구현예 12. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론, 상기 생성된 세포주, 또는 둘 모두로부터 바이러스 벡터를 수확하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0194] 구현예 13. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론, 상기 생성된 세포주, 또는 둘 모두의 바이러스 역가를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0195] 구현예 14. 구현예 13에 있어서, 상기 바이러스 역가를 결정하는 단계는 물리적 적정, 기능적 적정, 또는 둘 다를 포함하는 방법.
- [0196] 구현예 15. 구현예 13에 있어서, 상기 바이러스 역가를 결정하는 것은 PCR, RT-PCR, 및 블롯 혼성화에 의한 정량적 검출로 이루어진 군으로부터 선택된 분석을 통해 바이러스 핵산을 분석하거나 면역 분석을 통한 바이러스 단백질에 대해 분석하여 결정되는, 방법.

- [0197] 구현예 16. 구현예 14에 있어서, 상기 방법은 상기 선택된 세포 클론 또는 상기 생성된 세포주의 상기 바이러스 역가의 감염성을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0198] 구현예 17. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 표적-특이적 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0199] 구현예 18. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 레트로바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0200] 구현예 19. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 렌티바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생성하는 방법.
- [0201] 구현예 20. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 헤르페스바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0202] 구현예 21. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 아데노바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0203] 구현예 22. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 아데노 연관 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0204] 구현예 23. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 하나 이상의 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0205] 구현예 24. 구현예 23에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 단백질은 이중성인 방법.
- [0206] 구현예 25. 구현예 23의 방법에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 단백질은 유전적으로 변형된 방법.
- [0207] 구현예 26. 구현예 23에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 단백질이 화학적으로 변형된 것인 방법.
- [0208] 구현예 27. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산자 세포주가 하나 이상의 외피 단백질을 포함하는 바이러스 벡터를 생산하는 방법.
- [0209] 구현예 28. 구현예 27에 있어서, 상기 하나 이상의 외피 단백질은 이중성인 방법.
- [0210] 구현예 29. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 5' 긴 말단 반복부, 3' 긴 말단 반복부, 패키징 신호, 및 중앙 폴리퓨린 관으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 요소를 포함하는, 방법.
- [0211] 구현예 30. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 5' 긴 말단 반복부, 3' 긴 말단 반복부, 패키징 신호, 또는 중심 폴리퓨린 관을 포함하지 않는 방법.
- [0212] 구현예 31. 구현예 29에 있어서, 상기 5' 긴 말단 반복부가 키메라인 방법.
- [0213] 구현예 32. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 자가-불활성화 긴 말단 반복부를 포함하는, 방법.
- [0214] 구현예 33. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 하나 이상의 선택가능한 또는 리포터 요소를 포함하는 방법.
- [0215] 구현예 34. 구현예 33에 있어서, 상기 하나 이상의 선택가능한 또는 리포터 요소는 리포터 유전자, 에피토프 태그, 또는 둘 모두인 방법.
- [0216] 구현예 35. 구현예 33에 있어서, 상기 하나 이상의 선택 가능한 또는 리포터 요소는 발광, 흡광도, 형광, 항생제, 항원-항체 상호작용, 또는 이들의 조합에 의해 선택되거나 검출되는 방법.
- [0217] 구현예 36. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 프로모터 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 방법.
- [0218] 구현예 37. 구현예 36에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물의 상기 프로모터는 구성적 또는 유도성인 방법.
- [0219] 구현예 38. 구현예 36에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물의 상기 프로모터는 합성인 방법.
- [0220] 구현예 39. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 절연체 서열을 포함하는 것인 방법.

- [0221] 구현예 40. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 바이러스 벡터 게놈 구조물은 연쇄체를 포함하는 방법.
- [0222] 구현예 41. 구현예 40에 있어서, 상기 연쇄체는 상기 GOI를 코딩하는 발현 카세트의 다중 카피를 포함하는 방법.
- [0223] 구현예 42. 구현예 40에 있어서, 상기 연쇄체는 전사 인자를 코딩하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하는 방법.
- [0224] 구현예 43. 구현예 40에 있어서, 상기 연쇄체는 항생제 선택 유전자를 코딩하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하는 방법.
- [0225] 구현예 44. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물은 프로모터 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 방법.
- [0226] 구현예 45. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물은 인핸서 서열을 포함하는, 방법.
- [0227] 구현예 46. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물은 절연체 서열을 포함하는 방법.
- [0228] 구현예 47. 구현예 44에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물의 상기 프로모터는 프로모터/인핸서를 포함하는, 방법.
- [0229] 구현예 48. 구현예 44에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물의 상기 프로모터가 합성 프로모터인 방법.
- [0230] 구현예 49. 구현예 44에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물의 상기 프로모터는 유도성, 구성적, 전환된, 재조합, 또는 파괴/편집된 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0231] 구현예 50. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질이 융합 단백질인 방법.
- [0232] 구현예 51. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 구조물은 하나 이상의 발현 카세트를 포함하는, 방법.
- [0233] 구현예 52. 구현예 51에 있어서, 상기 발현 카세트가 모노시스트론 발현 카세트 또는 폴리시스트론 발현 카세트인 방법.
- [0234] 구현예 53. 구현예 52에 있어서, 상기 폴리시스트론 발현 카세트가 하나 이상의 바이러스 스킵 서열, 내부 리보솜 엔트리 부위 요소, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 방법.
- [0235] 구현예 54. 구현예 53에 있어서, 상기 바이러스 스킵 서열은 P2A, T2A, E2A, 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된 방법.
- [0236] 구현예 55. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질은 구조적 바이러스 단백질, 조절 바이러스 단백질, 또는 둘 다를 코딩하는 서열을 포함하는 방법.
- [0237] 구현예 56. 구현예 55에 있어서, 상기 구조적 단백질 및/또는 조절 단백질은 Gag, Pol, Rev, Env, Tat, Nef, Vpr, Vif, Vpu, 및 Vpx로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0238] 구현예 57. 구현예 50의 방법에 있어서, 상기 바이러스 부속 구조물은 부분적인 바이러스 부속 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 방법.
- [0239] 구현예 58. 구현예 57에 있어서, 상기 부분 바이러스 부속 단백질이 하나 이상의 바이러스 부속 단백질 도메인을 포함하는 방법.
- [0240] 구현예 59. 구현예 57에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질 도메인은 CA, MA, NC, p6, SP1, RT, IN, PR, 및 DU로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0241] 구현예 60. 구현예 55 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질 또는 도메인을 인코딩하는 서열은 야생형 서열, 돌연변이된 서열, 코돈 최적화된 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.
- [0242] 구현예 61. 구현예 55 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 바이러스 부속 단백질 또는 바이러스

부속 단백질 도메인은 별도의 발현 카세트를 통해 도입되는 것인 방법.

- [0243] 구현예 62. 구현예 56에 있어서, 상기 env 단백질은 생체조작된(bioengineered) 키메라 외피 단백질을 포함하는 방법.
- [0244] 구현예 63. 구현예 56에 있어서, 상기 env 단백질은 항체 또는 리간드에 연결된, 방법.
- [0245] 구현예 64. 구현예 56에 있어서, 상기 env 단백질은 인간 면역결핍 바이러스로부터 유래된 것인 방법.
- [0246] 구현예 65. 구현예 56의 방법에 있어서, 상기 env 단백질은 베시쿨로바이러스, 감마레트로바이러스 및 모르빌리 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스로부터 유래된, 방법.
- [0247] 구현예 66. 구현예 65에 있어서, 상기 베시쿨로바이러스는 뉴저지 수포성 구내염 바이러스(VSV-NJ), 인디애나 수포성 구내염 바이러스(VSV-IN), 및 이로부터 유래된 균주로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.
- [0248] 구현예 67. 구현예 65에 있어서, 상기 감마레트로바이러스는 긴팔원숭이 백혈병 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0249] 구현예 68. 구현예 65에 있어서, 상기 모르빌리바이러스는 홍역 바이러스 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0250] 구현예 69. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 도입 단계는 화학적, 생물학적 또는 물리적 단계를 포함하는 방법.
- [0251] 구현예 70. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 도입 단계는 광학적 방법, 자기적 방법, 생물학적 방법, 폴리머 기반 방법, 리포솜 기반 방법, 나노입자 기반 방법, 또는 이의 조합을 포함하는, 방법.
- [0252] 구현예 71. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 도입 단계가 형질도입을 포함하는 방법.
- [0253] 구현예 72. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 도입 단계가 형질감염을 포함하는 방법.
- [0254] 구현예 73. 구현예 69에 있어서, 상기 화학적 도입 단계는 양이온성 중합체, 인산칼슘, 양이온성 지질, 또는 이의 조합의 사용을 포함하는 방법.
- [0255] 구현예 74. 구현예 69에 있어서, 상기 생물학적 도입 단계는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 트랜스포존, TALEN, 아연 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 트랜스포사제, CRISPR-관련 뉴클레아제, 또는 재조합효소를 통한 도입을 포함하는 방법.
- [0256] 구현예 75. 구현예 74에 있어서, 상기 재조합효소는 Cre-재조합효소 또는 플로리파제(Flippase) 재조합효소를 포함하는 방법.
- [0257] 구현예 76. 구현예 69에 있어서, 상기 물리적 도입 단계는 전기천공, 소노천공, 기계천공 및 광천공으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0258] 구현예 77. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 통합된 서열은 랜덤 통합을 나타내는 방법.
- [0259] 구현예 78. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 통합된 서열은 부위-특이적 통합을 나타내는, 방법.
- [0260] 구현예 79. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 일정 부피의 배지를 포함하는 세포 배양물에 있는 것인 방법.
- [0261] 구현예 80. 구현예 1 또는 2의 방법에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주는 부착 배양 또는 현탁 배양에 적응된, 방법.
- [0262] 구현예 81. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 혈청-보충된 또는 무혈청 배지에서 배양된, 방법.
- [0263] 구현예 82. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 불멸화되는 방법.
- [0264] 구현예 83. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 진핵생물인 방법.
- [0265] 구현예 84. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 포유동물인 방법.
- [0266] 구현예 85. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 인간인 방법.
- [0267] 구현예 86. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 HEK293 세포 또는 이의 유

도체인 방법.

- [0268] 구현예 87. 구현예 86에 있어서, 상기 HEK293 세포가 HEK293T 세포인 방법.
- [0269] 구현예 88. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 슈도타입화 바이러스 입자를 생산하는 방법.
- [0270] 구현예 89. 구현예 88에 있어서, 상기 슈도타입화 바이러스 입자는 베시콜로바이러스, 감마레트로바이러스 및 모르빌리바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스의 하나 이상의 외피 단백질을 포함하는 방법.
- [0271] 구현예 90. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 모자이크 바이러스 입자를 생산하는 방법.
- [0272] 구현예 91. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 안정한 바이러스 벡터 생산자 세포주가 키메라 바이러스 입자를 생산하는 방법.
- [0273] 이제 본 개시내용을 일반적으로 기재하였지만, 이는 예시로서 제공되는 하기 실시예를 참조함으로써 더욱 용이하게 이해될 것이며, 명시되지 않는 한 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지는 않을 것이다.
- [0274] **실시예**
- [0275] **실시예 1:**
- [0276] 여기에 설명된 개념의 예시로서, HIV 기반 렌티바이러스 벡터 생산자 세포주가 생산된다(도 1). 도 2는 다양한 구성 요소를 안정적으로 도입하여 세포 클론을 생성하는 대표적인 작업 흐름을 요약한 것으로, 이는 이후에 확장, 냉동 보존 및 보관될 수 있다.
- [0277] **실시예 2:**
- [0278] 각각의 벡터가 상이한 비율을 사용시 최상의 역가를 생성한다는 것을 입증하기 위해 상이한 성분 비율의 배터리를 사용하여 2개의 상이한 벡터 구조물을 테스트하기 위한 실험이 수행된다. 부속 유전자는 gag/pol, rev 및 env에 대해 각각 하나씩 표준 패키징 플라스미드를 사용하여 전달된다. 벡터 구조물(관심 유전자에 대해 'GOI'라고 함)은 각각 표준 적정 분석에 의해 벡터 감염성을 결정하는 데 사용되는 녹색 형광 단백질 리포터 카세트(도 3)를 전달한다. 첫 번째 GOI 구조물은 GFP라고 하며 4.2kb 프로바이러스에서 간단한 단일 발현 카세트를 전달한다(도 3). 두 번째 GOI는 GFP 리포터 카세트, 유전자좌 제어 영역(LCR)이라고 하는 3.3kb 구조 요소 및 안티센스 방향으로 고유 프로모터에서 발현하여 최종 mRNA에서 스플라이싱되는 두 개의 인트론을 통합할 수 있는, 인간 베타 글로빈 카세트를 포함하는 약 10kb의 보다 복잡하고 임상적으로 관련된 구조물이다(도 3). 이 구조물(도 3에 Globin-LCR-GFP로 표시됨)은 GFP보다 더 낮은 역가를 생성하는 것으로 알려져 있다. 두 구조물 모두 아래에 요약된 벡터 생산 프로토콜에 따라 테스트된다.
- [0279] HEK293 패키징 세포 제조: HEK293 세포의 대수상 확장 진탕 플라스크에 샘플을 제거하고 계수한 다음, 새로운 배지를 추가하여 세포를 3.5e6 세포/ml로 희석한다. 37°C, 8% CO₂에서 진탕하면서 밤새 배양한다. 4.7e6 세포/ml가 되도록 신선한 배지로 희석하여 세포를 샘플링하고 계수한다. 각 조건에 대해 새로운 125ml 셰이크 플라스크에 25.5ml의 세포 현탁액을 추가한다. LV-MAX 보충제 1.5ml를 넣고 휘저어 혼합한다. DNA 형질감염 혼합물을 준비하는 동안 인큐베이터로 되돌린다.
- [0280] DNA 형질감염: 각 조건에 대해, 4개의 플라스미드 각각의 표시된 부피를 표시된 15ml 원뿔형 튜브에 첨가하고 Opti-MEM 배지로 희석하여 총 1.5ml가 되도록 한다(표 2에 따름). 소용돌이/탭하여 혼합한다. 각 조건에 대해 180ul의 LV-MAX 시약과 1.32ml의 Opti-MEM 배지를 두 번째의 라벨링된 15ml 원뿔형 튜브에 첨가한다. 소용돌이/탭하여 혼합한다. 희석된 LV-MAX 형질감염 시약에 희석된 플라스미드 DNA를 첨가하고 부드럽게 위아래로 피펫을 사용하여 혼합한다. 형질감염 혼합물이 실온에서 10분 동안 배양되도록 한다. 인큐베이터에서 표적 세포를 회수하고 각 조건에 대해 형질감염 혼합물을 셰이커 플라스크로 천천히 옮기고 부드럽게 휘저어 혼합하고 48-55시간 동안 셰이커 인큐베이터로 되돌린다.
- [0281] 벡터 수확: 배양물을 50ml 원뿔형 튜브로 옮기고 실온에서 5분 동안 1500xg으로 원심분리한다. 상층액을 0.45 마이크론 PES 주사기 필터가 장착된 60ml 주사기로 옮기고 부드러운 압력을 가하여 상층액을 새로운 50ml 원뿔형 튜브로 천천히 여과시킨다. 투명화된 벡터 제제를 튜브당 3~5ml의 라벨이 붙은 15ml 원뿔형 튜브에 분주하고 드라이아이스에서 급속 동결한 다음 사용할 준비가 될 때까지 -20°C에서 보관한다.

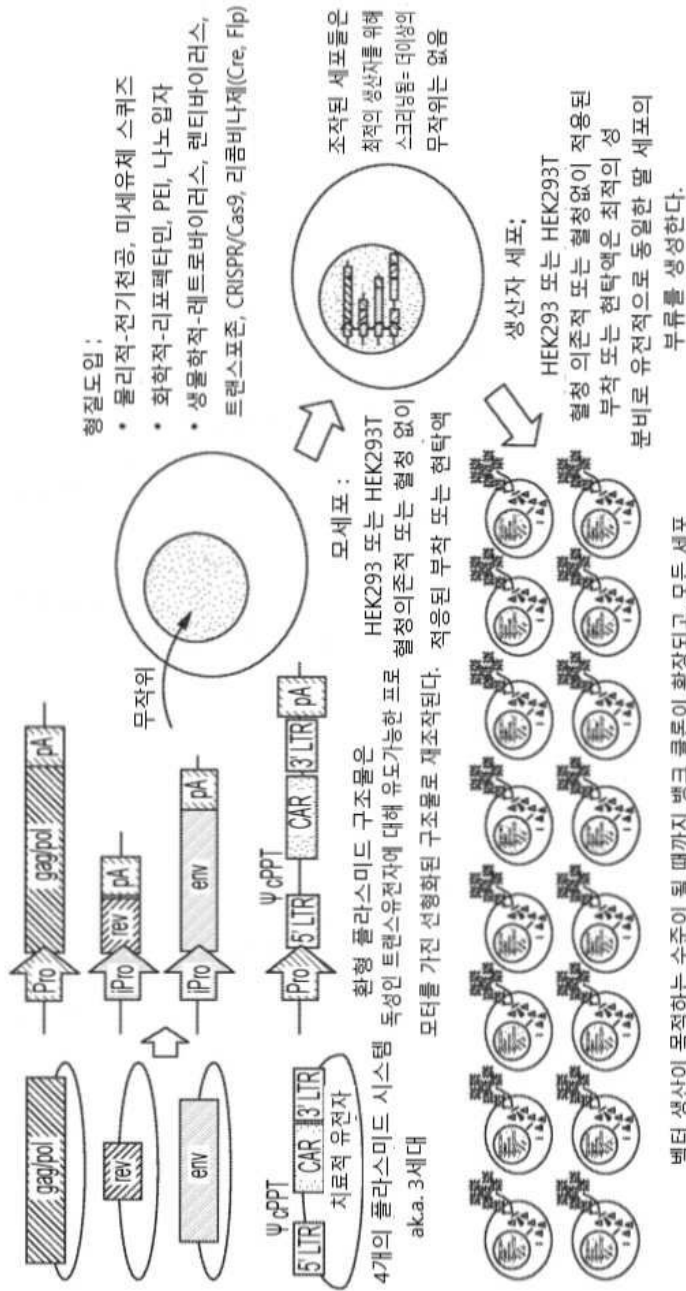
- [0282] 표적 세포 제조: SupT1 세포의 대수기 성장 배양물에 대해, 샘플을 제거하고 계수한 다음, 세포를 새로운 배지로 1e6 세포/ml로 희석한다. 1000x 프로타민 설페이트를 첨가하여 최종 세포 현탁액을 2x로 만든다(세포 1ml 당 2ul). 표시된 대로 모든 벡터 제제에 대해 1행으로 96웰 플레이트에 세포 혼합물을 플레이트한다.
- [0283] 벡터 제제: 완전히 해동될 때까지 실온에서 인큐베이션하여 테스트할 모든 벡터 로트를 해동합니다. 4개의 15ml 원추형 튜브에 1:2, 1:10, 1:20, 1:100을 라벨링한다. 1:2 튜브에 해동된 벡터 2ml와 신선한 SupT1 배지 2ml를 첨가하고 2-3회 뒤집어서 혼합한다. 1:10 튜브에 해동된 벡터 1ml와 신선한 SupT1 배지 9ml를 첨가하고 2-3회 뒤집어서 혼합한다. 1:20 튜브에 1:2 희석액 1ml와 신선한 SupT1 배지 9ml를 첨가하고 2-3회 뒤집어서 혼합한다. 1:100 튜브에 1:10 희석액 1ml와 신선한 SupT1 배지 9ml를 첨가하고 2-3회 뒤집어서 혼합한다. 희석된 벡터를 웰당 세포 배양 플레이트 100ul에 첨가하고, 각 희석은 벡터당 한 줄로 3회 반복한다(플레이트당 8줄을 사용하면 이러한 방식으로 8개의 벡터를 테스트할 수 있다). 역가 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 3일 동안 배양한다.
- [0284] 역가 측정: 유세포 분석을 사용하여 역가 플레이트의 각 웰에 대한 형질도입되지 않은 SupT1 대조군에 대한 %GFP 양성을 측정한다. 다음 공식을 사용하여 웰당 역가를 측정한다: (1e5 세포 * %GFP+)/(100ul * 희석 인자)=역가(tu/ml). 1-10% 사이의 %GFP+가 있는 주어진 벡터 제제의 모든 샘플에 대해 산술 평균을 결정한다. 그 평균 값이 해당 제제에 대해 관찰된 역가이다.
- [0285] Globin-LCR-GFP 구조물은 GFP 벡터보다 더 낮은 역가를 나타낸다. GFP 벡터에 대해 관찰된 최적 역가는 조건 16(9:1:1:9 비율)을 사용하여 약 1e7 tu/ml이고, 다음 최적 역가는 조건 4(3:1:1:3 비율)를 사용한 8e6 tu/ml이고 Globin-LCR-GFP에 대한 최적 역가는 조건 12(9:1:1:6 비율)를 사용하는 1e6 tu/ml이고 두 번째로 최적은 조건 6(6:1:1:3 비율)으로 역가 2e5 tu/ml이다(도 4).
- [0286] 상기 실험은 상이한 GOI 구조물에 대해 최적의 벡터 입자 감염 역가를 달성하기 위해 상이한 비율의 구성 요소가 필요함을 입증한다. 이 실험은 또한 개시 비율의 배열을 사용하여 경험적으로 나중에 결정될 수 있으므로 최적 비율이 무엇인지 미리 알 필요가 없음을 보여준다. 이 실험은 고정된 비율의 구성 요소를 사용하여 안정적인 생산 시스템을 제조하는 것이 가능한 GOI에 대해 최적의 역가를 생성할 가능성이 낮고 좁은 스펙트럼의 구조물을 사용하여 잘 작동할 가능성이 있음을 보여준다. 이 실험은 가능한 벡터 비율 및 조합의 범위가 발생하도록 허용한 다음, 최적의 생산자 세포 클론을 찾기 위해 결과 라인을 실험적으로 테스트하는 여기에 설명된 예시적인 실시예를 제공한다.

표 2

[0287] **별도의 테스트 구조물을 위한 최적 조합을 위한 시험에 사용된 예시적 플라스미드 비**

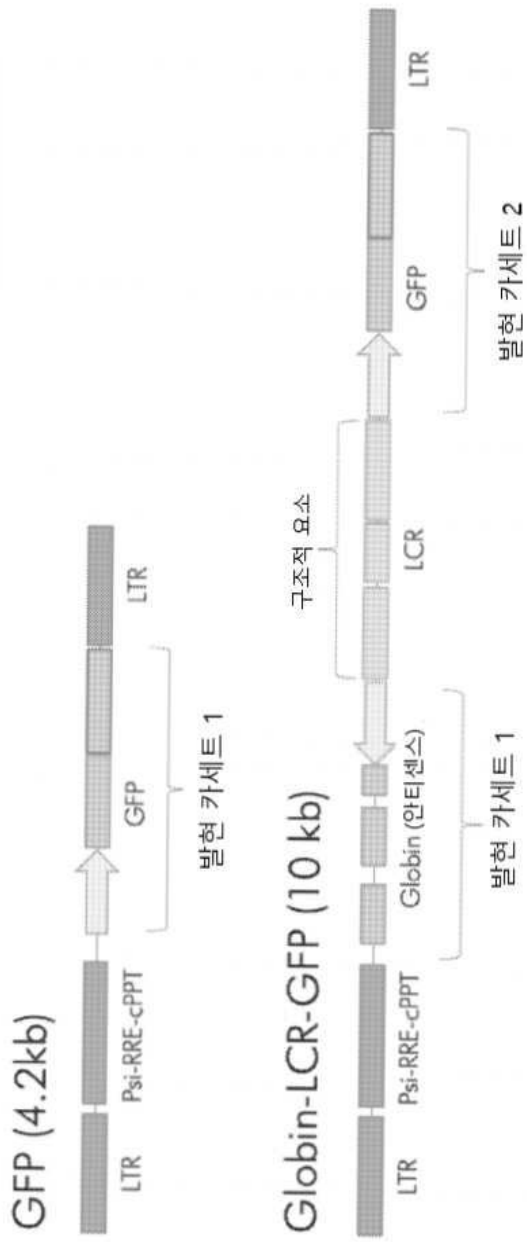
조건	비				플라스미드 양 (µg)			
	gag/pol	rev	env	GOI	gag/pol	rev	env	GOI
1	1	1	1	1	18.75	18.75	18.75	18.75
2	3	1	1	1	37.50	12.50	12.50	12.50
3	1	1	1	3	12.50	12.50	12.50	37.50
4	3	1	1	3	28.13	9.38	9.38	28.13
5	6	1	1	1	50.00	8.33	8.33	8.33
6	6	1	1	3	40.91	6.82	6.82	20.45
7	1	1	1	6	8.33	8.33	8.33	50.00
8	3	1	1	6	20.45	6.82	6.82	40.91
9	6	1	1	6	32.14	5.36	5.36	32.14
10	9	1	1	1	56.25	6.25	6.25	6.25
11	9	1	1	3	48.21	5.36	5.36	16.07
12	9	1	1	6	39.71	4.41	4.41	26.47
13	1	1	1	9	6.25	6.25	6.25	56.25
14	3	1	1	9	16.07	5.36	5.36	48.21
15	6	1	1	9	26.47	4.41	4.41	39.71
16	9	1	1	9	33.75	3.75	3.75	33.75

도면2



벡터 생산이 목적하는 수준이 될 때까지 벡터 클론이 확장되고, 모든 세포들은 최적의 양과 질로 벡터를 생산할 것이다.

도면3



도면4

