

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2007-0114157

(43) 공개일자

2007년11월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/861 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2007-7021145

(22) 출원일자

2007년09월14일

심사청구일자

없음

번역문제출일자

2007년09월14일

(86) 국제출원번호

PCT/US2006/005431

국제출원일자

2006년02월16일

(87) 국제공개번호

WO 2006/089001

국제공개일자

2006년08월24일

(30) 우선권주장

60/653,386 2005년02월16일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

렌티젠 코퍼레이션

미국 21227 메릴랜드주 발티모아 사우쓰 롤링 로드 1450

(72) 발명자

드로폴릭, 보로

미국 21042 메릴랜드주 엘리콧트 시티 골든 오크 드라이브 12627

창, 융, 니엔

미국 21075 메릴랜드주 엘크릿지 힐라이즈 코트 8048

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 45 항

#### (54) 렌티바이러스 벡터 및 그의 용도

#### (57) 요약

본 발명은 유전자 요법, 암 치료, 항체 및 백신과 같은 재조합 단백질의 제조, 및 다른 치료 목적을 위한 렌티바이러스 벡터에 관한 것이다. 고효율 형질도입 벡터의 제조에 이용될 수 있는, 예를 들어 반대 배향의 헬퍼 서열 및/또는 최소 기능성 LTR 서열을 포함하는 신규한 렌티바이러스 벡터가 개시된다. 벡터는 또한 침묵화 RNA 및 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 발현하도록 설계된다.

(30) 우선권주장

60/660,310	2005년03월10일	미국(US)
60/682,059	2005년05월18일	미국(US)
60/723,768	2005년10월05일	미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

a) 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 기능성 천연 프로모터, 및 상기 천연 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호를 포함하는 렌티바이러스 5' LTR;

b) 외피 코딩 서열에 작동적으로 연결된 이중 프로모터, 및 상기 이중 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호

를 포함하며, 상기 천연 및 이중 프로모터는 반대 전사 배향으로 상기 플라스미드에 존재하고, 상기 플라스미드는 기능성 패키징 서열이 결여된 것인, 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 플라스미드가 5' LTR과 상이한 렌티바이러스 종으로부터 수득된 TAR 요소를 포함하며, 5' LTR과 상이한 렌티바이러스 종으로부터 수득된 RRE 요소를 포함하는 것인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 3

(누락)

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 5' LTR이 천연성인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 플라스미드가 프로모터에 작동적으로 연결된 Tat 폴리펩티드 또는 Rev 폴리펩티드를 코딩하는 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 5' LTR이 HIV-1 또는 HIV-2인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 HIV-1 gag 및 pol 또는 HIV-2 gag 및 pol인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 8

제1항에 있어서, gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이, 적합성 숙주에서 발현될 경우 상기 코딩 서열의 번역을 개선시키는 하나 이상의 비-천연 발생 코돈을 포함하는 것인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 pol과, 종결 코돈인 외피 코딩 서열, 또는 p7 KETWETWWTE 코딩 서열 사이에 존재하는 것인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 외피 코딩 서열이 VSV-G 외피 또는 필로바이러스 외피에 대한 것인 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 외피 코딩 서열의 번역을 억제하는데 유효한 안티-센스 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드.

## 청구항 12

- a) 렌티바이러스 5' LTR;
  - b) 상기 5' LTR에 대해 원위인 렌티바이러스 패키징 서열;
  - c) TATA 박스 서열을 포함하지만 상기 TATA 박스 서열에 대해 5'인 3' U3 서열이 결여되고, 감소된 전사 활성을 갖는 변형된 렌티바이러스 3' LTR
- 을 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 13

제12항에 있어서, d) 이중 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 이중 프로모터를 추가로 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 14

제12항에 있어서, 결여된 3' U3 서열이 TATA 박스 서열의 20개 뉴클레오타이드 내에 대해 5'인 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 15

제12항에 있어서, 3' LTR이 제2 이중 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 제2 이중 프로모터를 추가로 포함하고, 상기 프로모터 및 이중 폴리뉴클레오타이드 서열이, 상기 3' LTR의 전사 활성을 감소시키는데 유효한 위치에서 3' LTR 내로 삽입된 것인 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 16

제12항에 있어서, 당해 제2 유전자를 코딩하는 이중 서열에 작동적으로 연결된 제2 이중 프로모터를 추가로 포함하는 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제1 및 제2 이중 코딩 서열이 내부 리보솜 유입 부위에 의해 분리된 것인 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 18

제16항에 있어서, 각각의 상기 이중 코딩 서열이 상기 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호를 추가로 포함하는 것인 렌티바이러스 전달 벡터.

## 청구항 19

- a) 제1항의 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드,
  - b) 제12항의 렌티바이러스 전달 벡터, 및
  - c) 이중 프로모터에 작동적으로 연결된 rev 폴리펩티드에 대한 코딩 서열, 및 이중 프로모터에 작동적으로 연결된 tat 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함하는 플라스미드
- 를 포함하는, 렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조용 렌티바이러스 패키징 시스템.

## 청구항 20

제1항의 헬퍼 벡터를 포함하는 단리된 세포.

## 청구항 21

제12항의 전달 벡터를 포함하는 단리된 세포.

## 청구항 22

제19항의 렌티바이러스 패키징 시스템을 포함하는 단리된 세포.

#### 청구항 23

제19항의 패키징 시스템을 포함하는 플라스미드를 형질도입 벡터를 제조하는데 유효한 조건하에서 숙주 세포에서 공동-발현시키는 것을 포함하는, 렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조 방법.

#### 청구항 24

숙주 세포를 렌티바이러스 형질도입 벡터로 형질도입시켜, 형질도입된 숙주 세포를 형성하는 것을 포함하며, 상기 벡터는 당해 분비된 이중 폴리펩티드를 코딩하는 발현가능한 이중 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 숙주 세포에서의 당해 폴리펩티드의 제조 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO 또는 293 세포인 방법.

#### 청구항 26

제24항에 있어서, 상기 형질도입된 숙주 세포를 상기 당해 폴리펩티드를 제조하는데 유효한 조건하에서 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 27

제24항에 있어서, 상기 숙주 세포가 다수의 렌티바이러스 형질도입 벡터로 형질도입되며, 각각의 벡터가 상이한 폴리펩티드를 코딩하는 상이한 이중 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 각각의 상기 이중 폴리뉴클레오티드가, 상기 숙주 세포에서 발현될 경우 바이러스 캡시드 내로 자가-집합가능한 바이러스 캡시드의 하나 이상의 캡시드 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 30

제24항에 있어서, 상기 숙주 세포가 헤마글루티닌, 뉴라미니다제 및 매트릭스 (M1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질도입된 것인 방법.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 각각의 폴리뉴클레오티드가 상이한 바이러스 형질도입 벡터에 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 32

제30항의 생성물.

#### 청구항 33

각각의 세포가 그의 서열이 서로 상이한 발현가능한 이중 폴리뉴클레오티드를 포함하는 2가지 이상의 상이한 렌티바이러스 형질도입으로 형질도입된 것인, 다수의 형질도입된 숙주 세포를 제조하고;

상기 숙주 세포를 이중 서열과 관련된 기능적 활성화에 대해 스크리닝하는 것

을 포함하는, 숙주 세포에서의 폴리펩티드, 또는 숙주 세포에서의 폴리펩티드의 제조를 개선시키는 유전자의 확인 방법.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 이중 서열이 RNAi 서열, 폴리펩티드에 대한 코딩 서열, 또는 당해 유전자에 대한 안티-센스인 방법.

#### <청구항 30>

3' LTR 내로 삽입된 이중 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 이러한 삽입이 최소 전사 활성을 갖는 3' LTR을 초래하는 것을 특징으로 하는, 렌티바이러스 형질도입 벡터.

#### 청구항 35

공여자 림프구를, 세포증식억제성 또는 세포독성 요소를 코딩하는 발현가능하거나 선택적으로 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 렌티바이러스 형질도입 벡터로 형질도입시키고,

임의로 세포를 수여자 폴리펩티드 또는 세포의 존재하에서 형질도입시키고,

상기 형질도입된 림프구를 상기 숙주 내로 주입하는 것

을 포함하는, 공여자 림프구의 숙주 내로의 이식과 관련된 GVHD 질환의 치료 방법.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 상기 선택적으로 발현가능한 유전자가 유도성 프로모터, 또는 외인성으로 도입된 화학물질의 존재하에서 활성화되는 프로모터에 작동적으로 연결된 것인 방법.

#### 청구항 37

제35항에 있어서, 상기 선택적으로 발현가능한 유전자가 RNAi 또는 프로-아포토시스 폴리펩티드를 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 38

제35항에 있어서, 상기 세포독성 요소가 헤르페스 티미딘 키나제 또는 다중기질 키나제 유전자에 대한 코딩 서열인 방법.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 유효량의 간시클로비어, AZT, 플루라다(flurada)(등록상표) 또는 아시클로비어를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 상기 양은 상기 형질도입된 숙주 세포를 세포 사멸시키는데 유효한 것인 방법.

#### 청구항 40

제35항에 있어서, 상기 공여자 세포를 상기 공여자 세포의 형질도입과 동시에 또는 그 전에 유효량의 숙주 자가-항원과 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 41

a) 천연 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 기능성 천연 프로모터, 및 상기 천연 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호 (여기서, 번역 종결 신호는 gag-pol 서열의 시작점의 하류에 존재함)를 포함하는 렌티바이러스 5' LTR;

b) gag-pol 서열의 하류에 위치된 스플라이스 엑셉터 부위; 및

c) 5' LTR 프로모터에 작동적으로 연결된 gag-pol 서열에 대해 하류에 위치된 이중 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 42

T 세포 수용체 및 세포독성 요소를 포함하는 렌티바이러스 형질도입 벡터.

#### 청구항 43

VSV-G에 대해 표적화된 유도성 유전자 억제성 또는 침묵화 서열을 발현하는 렌티바이러스 벡터 패키징 또는 프

로듀서 세포주.

#### 청구항 44

렌티바이러스 벡터를 이용한 형질도입 전에 림프구 집단이 하위집단으로 정제되지 않는, 렌티바이러스 벡터를 이용한 말초 혈액 림프구의 집단의 형질도입 방법.

#### 청구항 45

줄기 세포를 내피 특이적 프로모터에 작동적으로 연결된 세포독성 요소를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 처리하며, 줄기 세포를 암 환자에게 주입하는, 렌티바이러스 벡터를 이용한 암의 치료 방법.

### 명세서

<1> 본 출원은 2005년 2월 16일자로 출원된 미국 가출원 제60/653,386호; 2005년 3월 10일자로 출원된 동 제 60/660,310호; 2005년 5월 18일자로 출원된 동 제60/682,059호; 및 2005년 10월 5일자로 출원된 동 제 60/723,768호의 이익을 청구하며, 상기 출원들은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

### 발명의 상세한 설명

<6> 본 발명은 렌티바이러스 벡터, 형질도입 벡터, 렌티바이러스 시스템, 및 기능 유전체학, 약물 개발, 표적 확인, 단백질 제조 (예를 들어, 치료 단백질, 백신, 모노클로날 항체), 유전자 요법 및 치료적 처치에 있어서의 그의 사용 방법을 제공한다. 본원에 개시된 임의의 방법은 본 발명에 의해 제공된 신규한 벡터, 또는 이동화 벡터 (예를 들어, 미국 특허 제5,885,806호 또는 제6,114,141호) 또는 비-이동화 또는 자가-불활성화 벡터 (예를 들어, 미국 특허 제5,994,136호 또는 제6,428,953호)와 같은 당업계에 공지된 렌티바이러스 벡터 또는 시스템으로 달성될 수 있다.

<7> 렌티바이러스 형질도입 벡터

<8> 본 발명은 당해 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 숙주 세포 내로 도입하는데 이용될 수 있는 렌티바이러스 형질도입 벡터, 및 그의 제조를 위한 구조물에 관한 것이다. 렌티바이러스 형질도입 벡터는 발현가능한 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하며, 표적 숙주 세포를 통과함으로써 발현가능한 서열을 세포 내로 운반할 수 있는 외피화된 비리온 입자이다. 외피화된 입자는 바람직하게는 천연 렌티바이러스의 숙주 범위 및 감염성을 변경시키는 비-렌티바이러스를 비롯한 또다른 바이러스 종으로부터의 유전자조작된 또는 천연 바이러스 외피 단백질로 의사형태화된다. 하기에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 형질도입 벡터는 예를 들어 단백질 제조 (백신 제조 포함), 유전자 요법, 치료 폴리펩티드의 전달, siRNA, 리보자임, 안티-센스, 및 다른 기능성 폴리뉴클레오티드의 전달 등을 비롯한 광범위한 적용에서 이용될 수 있다. 이러한 형질도입 벡터는 단일 또는 이중 유전자를 운반하고, 억제성 서열 (예를 들어, RNAi 또는 안티센스)을 포함시키는 능력을 갖는다. 특정 실시양태에서, 형질도입 벡터는 또한 감소되지만 부재하지는 않는 전사 활성을 갖는 변형된 3' LTR을 포함하는 핵산을 전달한다.

<9> 렌티바이러스 헬퍼 구조물

<10> 본 발명은 렌티바이러스 헬퍼 구조물 (예를 들어, 플라스미드 또는 단리된 핵산)을 제공한다. 이러한 구조물은 기능성 렌티바이러스 형질도입 벡터를 적합성 숙주 세포에서 제조하고, 이에 발현가능한 이중 서열을 패키징하는데 유용한 요소를 함유한다. 상기 요소로는 구조 단백질 (예를 들어, gag 전구체), 프로세싱 단백질 (예를 들어, pol 전구체), 예를 들어 프로테아제, 외피 단백질, 및 숙주 세포에서 단백질을 제조하고 기능성 바이러스 입자를 집합하는데 필요한 발현 및 조절 신호를 들 수 있다. 하기 기재된 실시양태는 외피 및 gag-pol 전구체를 동일한 플라스미드 상에 함유하지만, 필요할 경우 이는 각각의 gag, pol 및 외피 단백질에 대한 별개의 플라스미드를 비롯한 별개의 플라스미드 상에 위치될 수 있다.

<11> 본 발명의 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드는 하나 이상의 하기 요소를 임의의 적합한 순서 또는 위치로 포함할 수 있다: 예를 들어, a) 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 렌티바이러스 gag-pol 전구체)에 작동적으로 연결된 기능성 천연 프로모터를 포함하는 렌티바이러스 5' LTR; 및 b) 외피 코딩 서열에 작동적으로 연결된 이중 프로모터. 렌티바이러스 5' LTR은 천연 서열로부터 상류에 위치된 이중 인핸서 서열을 임의로 함유할 수 있다.

<12> 임의의 렌티바이러스 종, 아종, 군주 또는 분기군으로부터 수득된 LTR을 비롯한 임의의 적합한 렌티바이러스 5' LTR이 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 종 등의 구체적인 예로는 예를 들어, HIV-1 (A, B, C, D, E, F 및 G,

R5 및 R5X4 바이러스 등과 같은 아종, 분기군 또는 군주 포함), HIV-2 (R5 및 R5X4 바이러스 등과 같은 아종, 분기군 또는 군주 포함), 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 원숭이/인간 면역결핍 바이러스 (SHIV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 소 면역결핍 바이러스 (BIV), 염소-관절염-뇌염 바이러스, 켈브라나(Jembrana)병 바이러스, 양 렌티바이러스, 비스나 바이러스 및 말 감염성 빈혈 바이러스를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 바이러스에 대한 계통 서열, 예를 들어, HIV-1 (NC\_001802), HIV-2 (NC\_001722), SIV (NC\_001549), SIV-2 (NC\_004455), 염소 관절염-뇌염 바이러스 (NCJ)01463), 원숭이-인간 면역결핍 바이러스 (NC\_001870), FIV (NC\_001482), 켈브라나병 바이러스 (NC\_001654), 양 (NC\_001511), 비스나 바이러스 (NC\_001452), 말 감염성 빈혈 바이러스 (NC\_001413)은 광범위하게 이용가능하다.

<13> 렌티바이러스 5' LTR은 인핸서, 프로모터, 전사 개시 (캡핑), 전사 종결자 및 아데닐중합을 비롯한 유전자 발현에 이용되는 신호를 포함한다. 이는 전형적으로 U3, R 및 U5 영역을 갖는 것으로 기재된다. LTR의 U3 영역은 인핸서, 프로모터, 및 RBEIII, NF- $\kappa$ B, Sp1, AP-1 및/또는 GABP 모티프를 비롯한 전사 조절 신호를 함유한다. TATA 박스는 5' LTR이 수득되는 종 및 군주에 따라, R 서열의 시작점으로부터 약 25 염기쌍에 위치된다. 완전한 비손상 5' LTR이 이용될 수 있거나, 변형된 카피가 이용될 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.

<14> 5' LTR은 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. "작동적으로 연결된"이라는 용어는, LTR이 언급된 코딩 서열의 전사를 유도할 수 있는 방식으로 위치된 것을 의미한다. gag 및 pol 코딩 서열은 천연 렌티바이러스에서 Gag-Pol 전구체로서 조직화된다. gag 서열은 p55로도 지칭되는 55-kD Gag 전구체 단백질을 코딩한다. p55는 성숙 과정 동안 MA (매트릭스 [p17]), CA (캡시드 [p24]), NC (뉴클레오캡시드 [p9]) 및 p6으로 지칭되는 4가지의 보다 작은 단백질로 바이러스적으로 코딩된 프로테아제 4 (pol 유전자의 생성물)에 의해 절단된다. pol 전구체 단백질은 바이러스적으로 코딩된 프로테아제 4에 의해 절단된다 (pol 유전자의 생성물). pol 전구체 단백질은 바이러스적으로 코딩된 Gag로부터 절단되고, 추가로 소화되어 프로테아제 (p10), RT (p50), RNase H (p15) 및 인테그라제 (p31) 활성을 분리시킨다.

<15> 하나 이상의 스플라이스 공여자 (SD) 부위는 헬퍼 플라스미드에 존재할 수 있다. 스플라이스 공여자 부위는 전형적으로 5' LTR의 3' 말단과 패키징 서열 사이에 존재한다. 하류 스플라이스 억셉터 (SA)는 또한 예를 들어 pol 서열의 3' 말단에 존재할 수 있다. SD 부위는 벡터 내의 임의의 유효한 위치에 다중 카피로 존재할 수 있다. SD는 천연 렌티바이러스 서열을 가질 수 있거나, 그의 돌연변이된 카피일 수 있다.

<16> 천연 Gag-Pol 서열이 헬퍼 벡터에 이용될 수 있거나, 변형이 이루어질 수 있다. 상기 변형 (하기에 보다 상세히 기재됨)은 키메라 Gag-Pol을 포함하며, 여기서 Gag 및 Pol 서열은 상이한 바이러스 (예를 들어, 상이한 종, 아종, 군주, 분기군 등)로부터 수득되고/거나, 서열은 전사 및/또는 번역을 개선시키기 위해 및/또는 재조합을 감소시키기 위해 변형되었다. 본 발명의 다른 실시양태에서, gag 및 pol 전구체를 코딩하는 서열은 분리되고, 상이한 벡터 구조물 상에 위치되며, 각각의 서열은 자기 자신의 발현 신호를 갖는다.

<17> HIV-1의 RNA 계통은 바이러스 집합 동안 Gag 폴리단백질의 뉴클레오캡시드 (NC) 도메인에 의해 인식되는 대략 120개 뉴클레오타이드의 Psi-패키징 신호를 함유한다. 패키징 신호의 중요한 부분은 주요 스플라이스 공여자 (SD) 부위와 gag 개시 코돈 사이에 있으며, HIV 프로바이러스의 경우는 대략 5' LTR의 U5 영역에 대략 원위이다. 패키징 신호는 기능적으로 활성인 gag-pol 전구체가 바이러스 형질도입 벡터로 패키징되는 것을 방지하기 위해, 헬퍼 플라스미드로부터 기능적으로 결여된다. 예를 들어, gag를 함유하지만 패키징 신호가 결여된 벡터가 기재되어 있는 미국 특허 제5,981,276호 (Sodroski et al.)를 참조한다.

<18> 추가의 프로모터 및 인핸서 서열은 gag-pol 전구체의 전사를 증가, 개선, 증진시키는 등을 위해 5' LTR의 상류에 위치될 수 있다. 유용한 프로모터의 예로는 포유동물 프로모터 (예를 들어, 구조적, 유도성, 조직-특이적), 다른 렌티바이러스 종으로부터의 CMV, RSV, LTR, 및 상기 및 하기 언급된 바와 같은 다른 프로모터를 들 수 있다.

<19> 또한, 플라스미드는 프로모터 서열에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 폴리A 신호와 같은 전사 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 적합한 폴리A 서열, 예를 들어 베타 글로빈 (포유동물, 인간, 토끼 등), 티미딘 키나제, 성장 호르몬, SV40 및 다른 많은 것들로부터의 서열이 이용될 수 있다.

<20> 헬퍼 구조물은 외피 코딩 서열에 작동적으로 연결된 이중 프로모터를 포함하는 외피 모듈을 추가로 포함할 수



있다. 외피 폴리펩티드는 바이러스 표면 상에 제시되고, 바이러스 입자에 의한 숙주 세포의 인식 및 감염에 관여한다. 숙주 범위 및 특이성은 외피 폴리펩티드를 예를 들어 상이한 (이중) 바이러스 종에 의해 발현시키거나, 다르게는 변형된 외피로 변형 또는 치환시킴으로써 변화될 수 있다. 이는 의사형태화로 지칭된다. 예를 들어, 문헌 [Yee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568, 1994]을 참조한다. 소수포 구내염 바이러스 (VSV) 단백질 G (VSV G)는 광범위한 종 및 조직 친화성, 및 벡터 입자에 물리적 안정성 및 높은 감염성을 부여하는 능력 때문에 폭넓게 이용되었다. 예를 들어, 문헌 [Yee et al., Methods Cell Biol., (1994) 43:99-112]을 참조한다.

<21> 예를 들어 HIV gp120 (천연 및 변형된 형태 포함), 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV 또는 MMLV), 하비(Harvey) 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV 또는 HSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV 또는 MMTV), 긴 팔원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV 또는 GALV), 라우스(Rous) 육종 바이러스 (RSV), 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스 (VSV-G), 몰로카(Moloka), 광견병, 필로바이러스 (예를 들어, 에볼라(에볼라) 및 마르부르그(Marburg), 예를 들어 NP\_066246 및 Q05320을 비롯한 GP1/GP2 외피), 양생(amphotropic), 알파바이러스 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 외피 폴리펩티드가 이용될 수 있다. 다른 예로는 예를 들어 토가비리대(Togaviridae), 람도비리대(Rhabdoviridae), 레트로비리대(Retroviridae), 폭스비리대(Poxviridae), 파라믹소비리대(Paramyxoviridae), 및 다른 외피화된 바이러스 과로부터의 외피 단백질을 들 수 있다. 다른 예의 외피는 월드 와이드웹 상의 하기 데이터베이스의 [ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/virases.html](http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/virases.html)에 열거된 바이러스로부터의 것이다.

<22> 또한, 바이러스 외피 단백질은 형질도입 벡터가 그의 정상 범위 밖에서 숙주 세포를 표적화하고 감염시키도록 하거나, 보다 구체적으로 형질도입을 세포 또는 조직 유형으로 제한하는 폴리펩티드 서열을 함유하도록 변형되거나 유전자조작될 수 있다. 예를 들어, 외피 단백질은 형질도입 벡터 외피 상에 제시될 경우 비리온 입자의 당해 표적 세포에의 지정된 전달을 용이하게 하는 수용체 리간드, 항체 (항체의 항원-결합 부분, 또는 단일쇄 항체와 같은 재조합 항체-유형 분자를 이용함) 및 폴리펩티드 잔기 또는 그의 변형물 (예를 들어, 글리코실화 부위가 표적화 서열에 존재할 경우)과 같은 표적화 서열로 격자 내에서 결합될 수 있다. 또한, 외피 단백질은 세포 기능을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 형질도입 벡터로 세포 기능을 조절하면, 세포의 혼합된 집단에서 특정 세포 유형에 대한 형질도입 효율을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포는 혈액 또는 골수에서 발견되는 다른 세포 유형보다는 줄기 세포에 특이적으로 결합하는 리간드 또는 결합 상대를 함유하는 외피 서열로 보다 특이적으로 형질도입될 수 있다. 이러한 리간드는 당업계에 공지되어 있다. 비-제한적인 예는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 Flt-3 리간드이다. 다른 예로는 예를 들어 항체 (예를 들어, 세포-유형에 대해 특이적인 단일쇄 항체), 및 폐, 간, 췌장, 심장, 내피, 위, 유방, 전립선, 상피, 혈관암 등과 같은 임의의 조직에 대해 특이적인 본질적으로 임의의 항원 (수용체 포함)을 들 수 있다.

<23> 임의의 이중 프로모터는 그에 작동적으로 연결될 경우 바이러스 외피 코딩 서열의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다. 그 예로는 예를 들어 CMV, E1F 알파, E1F 알파-HTLV-1 혼성 프로모터, 페리틴 프로모터, 유도성 프로모터, 구조적 프로모터 및 본원에 언급된 다른 프로모터 등을 들 수 있다.

<24> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, gag 및 pol 서열은 외피 서열로부터 반대 전사 배향으로 위치된다. 반대 전사 배향은 전사의 방향이 반대 또는 역인 것을 의미한다. 이는 상응하는 프로모터를 반대 방향으로 위치시킴으로써 (즉, 서로 대향시킴으로써), 또는 이중-방향성 프로모터를 이용함으로써 달성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Trinklein et al., Genome Research 14:62-66, 2004]). 상기 배열은 안전성 목적을 위해, 예를 들어 재조합의 위험 및/또는 기능성 재조합 HIV 게놈의 생성을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 전사 관독이 기능성 gag-pol 및 외피 서열 둘다를 함유하는 RNA를 초래할 가능성이 없기 때문에, 이러한 벡터를 이용하면 안전성이 증가된다. 전사 간섭은 전사를 종결시키는 강력한 아데닐중합 서열을 이용함으로써 방지될 수 있다. 강력한 전사 종결 서열의 예는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 토끼 베타-글로빈 아데닐중합 신호를 들 수 있다 (문헌 [Lanoix and Acheson, EMBO J. 1988 Aug;7(8):2515-22]). 또한, 문헌 [Plant et al., Molecular and Cellular Biology, April 2005, p. 3276-3285, Vol. 25, No. 8]을 참조한다. 또한, 시스-작용 리보자임 또는 RNAi 서열과 같은 다른 요소가 gag-pol과 외피 코딩 서열 사이에 삽입되어, 전사 종결을 용이하게 할 수 있으며, 추정적인 관독 서열에 대해 표적화된다. 유사하게, 불안정성 서열, 종결 서열 및 휴지 부위는 코딩 서열 사이에 위치될 수 있다.

<25> 헬퍼 플라스미드는 그에 존재하는 5' LTR 및/또는 gag 및 pol 서열과 상이한 렌티바이러스 종, 군, 아종, 아군, 균주 또는 분기군으로부터 수득된 TAR 요소를 추가로 포함할 수 있으며, 즉 이는 플라스미드 구조물에 존재하는 다른 렌티바이러스 요소에 대해 이중이다. TAR은 바람직하게는 5' LTR에 그의 정상 위치로, 예를 들어 천연 R

이 이중 렌티바이러스 종의 R'로 대체된 LTR의 U3 및 U5 요소 사이에 존재한다 [CONFIRM yes]. 이중 TAR 요소가 유래될 수 있는 다양한 렌티바이러스 종의 예는 상기 열거되어 있다.

- <26> TAR 요소는 바이러스 DNA의 5' LTR (예를 들어, R) 및 상응하는 RNA의 5' 말단에 위치한 전이-활성화 반응 영역 또는 반응 요소이다. 렌티바이러스 RNA에 존재할 경우, 전사 전이활성화제인 Tat가 그에 결합하여 HIVLTR 배수체로부터 전사를 활성화시킨다. Tat는 TAR 요소에 의해 형성된 짧은-줄기 루프 구조에 결합하는 RNA 결합 단백질이다.
- <27> 이중 TAR 요소가 이용될 경우, 5' LTR은 그의 천연 TAR을 또다른 종으로부터의 TAR 서열로 치환함으로써 통상적으로 변형될 수 있다. TAR 영역의 예는 광범위하게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [De Areliano et al., AIDS Res. Human Retro., 21:949-954, 2005]을 참조한다. 이러한 변형된 렌티바이러스 5' LTR은 LTR이 완전히 기능성이 되도록 비손상 U3 및 U5 영역을 포함할 수 있다. TAR 영역 또는 전체 R이 치환될 수 있다 [CONFIRM].
- <28> 상기 설명된 바와 같이, Tat 폴리펩티드는 TAR 서열에 결합한다. Tat에 대한 코딩 서열은 헬퍼 플라스미드에 존재할 수 있거나, 이는 패키징 시스템의 또다른 요소 상에 있을 수 있다. 예를 들어, 이는 바이러스 형질도입 벡터의 제조에 이용되는 세포주의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 세포주 내로 도입된 또다른 플라스미드 또는 벡터 구조물 상에 존재할 수 있다. TAR에 결합하고 RNA의 전사를 활성화시킬 수 있는 한, 임의의 Tat 폴리펩티드가 이용될 수 있다. 이는 동족체 TAR 요소와 동일하거나 상이한 종으로부터 수득된 천연 Tat 서열, 뿐만 아니라 유전자조작 및 변형된 Tat 서열을 포함한다.
- <29> 헬퍼 플라스미드는 5' LTR 또는 gag 및 pol 서열과 상이한 렌티바이러스 종으로부터 수득된 RRE 요소를 비롯한 RRE 요소를 추가로 포함할 수 있다. RRE 요소는 13-kD 서열-특이적 RNA 결합 단백질인 rev 폴리펩티드에 대한 결합 부위이다. RRE 서열을 함유하는 구조물은 효율적인 발현을 위해 rev 폴리펩티드에 의존한다. Rev는 pol 및 gag 코딩 서열에 대해 원위인, HIV의 제2 인트론 내에 위치한 rev 반응 요소 ("RRE")의 복합 RNA 이차 구조의 240-염기 영역에 결합한다. rev의 RRE에의 결합은 스플라이싱되지 않은, 및 불완전하게 스플라이싱된 바이러스 RNA의 핵으로부터 세포질로의 방출을 용이하게 함으로써, HIV 단백질의 발현을 조절한다. RRE 요소는 구조물 상의 임의의 적합한 위치에 있을 수 있으며, 바람직하게는 Gag-Pol 전구체 뒤의 그의 근접한 원래 위치에 있다. 유사하게, Tat 폴리펩티드에 대해, RRE에 결합하는 능력을 보유하는 한, 임의의 적합한 rev 폴리펩티드가 이용될 수 있다. rev에 대한 코딩 서열은 별개의 플라스미드 상의 헬퍼 플라스미드, 전달 플라스미드에 존재할 수 있거나, 형질도입 벡터 제조에 이용되는 숙주 세포주 내로 통합될 수 있다. 유사하게, tat에 대한 코딩 서열은 별개의 플라스미드 상의 헬퍼 플라스미드, 전달 플라스미드에 존재할 수 있거나, 형질도입 벡터 제조에 이용되는 숙주 세포주 내로 통합될 수 있다.
- <30> 본 발명의 구조물에 존재하는 임의의 서열은 예를 들어 전사의 개선, 번역의 개선, 이차 RNA 구조의 감소 또는 변경 및/또는 재조합의 감소를 위해, 그의 천연 형태로부터 변형될 수 있다. 변형으로는 예를 들어 뉴클레오타이드 첨가, 결실, 치환 및 대체를 들 수 있다. 예를 들어, gag, pol, rev 및 tat에 대한 코딩 서열은 천연-발생 코돈을 비-천연-발생 코돈으로 대체함으로써, 예를 들어 이를 숙주 세포에서 보다 효과적으로 번역되는 코돈으로 치환함으로써 변형될 수 있다. 예를 들어 서열이 특정 숙주 세포 유형에서 발현될 경우 서열 변형이 효과를 나타내는 숙주 세포는 적합성 세포로서 지칭될 수 있다. 또한, 서열을 변형시켜 패키징 서열과 같은 조절 요소를 제거할 수 있다. 또한, 서열을 변형시켜 재조합 부위를 제거할 수 있다. 재조합을 위한 열점의 예는, 예를 들어 문헌 [Zhuang et al., J. Virol., 76:11273-11282, 2002]에 개시되어 있다.
- <31> 추가의 실시양태는 그 후 임의의 주어진 벡터 구조물에 대한 프로듀서 세포주로 개발될 수 있는 렌티바이러스 벡터 및 패키징 세포주의 제조용의 헬퍼 시스템의 개발을 포함한다. 한 가지 이러한 실시양태는 렌티바이러스 벡터 제조를 증가시키는 세포성 단백질의 사용이다. Sam68은 KH 도메인을 함유하는 단백질의 족에 속한다. 일부 KH 단백질은 번역 조절자인 반면, 다른 것들은 교대 스플라이싱을 매개하는 것으로 여겨진다. Sam68은 시험관내 및 생체내에서 HIV-1의 Rev 반응 요소 (RRE)에 결합하며, RRE-매개된 유전자 발현 및 바이러스 복제에서 HIV-1로 기능적으로 대체되고/거나 이와 상승작용할 수 있다 (문헌 [Modem et al Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, 873-879]). 또한, Sam68은 다른 복합 레트로바이러스의 Rev-유사 단백질의 활성을 증진시키는 것으로 나타났다. 최근에, Sam68은 세포질로 방출되어야 할 스플라이싱되지 않은 HIV-1 RNA의 3' 말단 프로세싱을 증진시키는 것으로 입증되었다. Sam68 이외의 KH 단백질 (즉, SLM-1, SLM-2, QKI-5, QKI-6 및 QKI-7)은 또한 Rev/RRE-매개된 유전자 발현을 증진시킨다. 그러나, 시험된 KH 단백질 중에서, Sam68만이 인간 세포에서 구조적 운반 요소 (CTE)-매개된 gag 유전자 발현을 활성화시킬 수 있었다. Rev의 존재하에서 과발현될 경우, Sam68은 Rev와 상승작용하여 핵으로부터의 RRE 함유 RNA의 방출을 실질적으로 증가시킨다. Rev의 부재하에서의

Sam68의 과발현은 또한 RRE-함유 mRNA의 핵 방출을 용이하게 한다. 따라서, 프로듀서 세포로부터의 HIV-기반 렌티바이러스 벡터의 제조를 증가시키기 위해, Sam68을 헬퍼 구조물로부터 발현시켜 세포질로의 렌티바이러스 벡터 RNA 방출을 용이하게 하고 렌티바이러스 입자의 제조를 증가시킬 수 있다. Sam68은 rev 의존성 또는 rev 독립성인 헬퍼 구조물로부터 발현될 수 있다. 본 발명은 Sam68에 제한되지 않으며, SF2/ASF, hRIP, hRNP A1, p54nrb/PSF 및 RRE BP49와 같은 HIV RNA와 결합된 다른 단백질을 표적화할 수 있다. 반대로, Sam68 또는 상기 다른 단백질에 대해 표적화된 RNAi를 렌티바이러스 벡터 내로 삽입하여 HIV 감염에 대한 유전자 요법의 형태로 서 야생형 HIV RNA의 방출을 억제할 수 있다. HIV 요법에 대한 보다 상세한 사항에 대해서는 하기를 참조한다.

<32> 렌티바이러스 전달 벡터

<33> 본 발명은 또한 렌티바이러스 전달 벡터를 제공한다. 전달 벡터는 형질도입 렌티바이러스 벡터 내로 패키징된 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 구조물이다. 5' LTR 및 3' LTR을 포함할 경우, 전달 벡터는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있는 형질도입 벡터의 제조에 이용될 수 있다. 이러한 통합은 예를 들어 pol 서열의 헬퍼 플라스미드 상에 존재하는 인테그라제 분자를 돌연변이시킴으로써 방지될 수 있다. 그러나, 통합 벡터는 장기 유전자 전달에 바람직하다.

<34> 본 발명의 렌티바이러스 전달 플라스미드 벡터는 하기 성분 중 하나 이상을 포함할 수 있다: a) 렌티바이러스 5' LTR 폴리뉴클레오티드 서열; b) 상기 5' LTR에 대해 원위인 패키징 서열 (psi); 및 c) TATA 박스 서열을 포함하지만 상기 TATA 박스 서열에 대해 5'인 3' U3 서열이 결여된 변형된 렌티바이러스 3' LTR. 하나 이상의 발현가능한 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 예를 들어 패키징 서열과 3' LTR의 U5 영역 사이에서 전달 벡터 내로 삽입될 수 있다.

<35> 임의의 적합한 렌티바이러스 5' LTR 서열은 전달 벡터에 위치될 수 있다. 이러한 서열은 비손상이며 완전히 천연일 수 있거나, 예를 들어 TAR 서열을 이중 TAR 서열 (R)로 대체함으로써, 또는 그의 뉴클레오티드를 비-천연-발생 뉴클레오티드로 대체함으로써, 상기 기재된 바와 같이 변형되어 재조합 사건을 최소화할 수 있다. 앞서 기재된 바와 같은 5' LTR은 존재하는 U3, R 및 U5 영역을 갖지만, 이들이 그의 기능적 특성을 보유하는 방식으로 변형될 수 있다.

<36> 상기 5' LTR에 대해 원위인 패키징 서열 (psi)은 또한 전달 벡터에 존재할 수 있다. Gag의 NC 도메인에 의해 인식되는 상기 서열 (약 110개 뉴클레오티드)은 시스로 이용되어 당해 이중 서열의 형질도입 벡터 내로의 캡슐화를 용이하게 한다. 예를 들어, 문헌 [Lever et al., J. Virol. (1989), 63:4085-4087]; [Amarasinghe et al., J Mol. Bio. (2001), 314(5):961-970]을 참조한다. psi 패키징 서열은 이웃 서열에 상대적으로 자율적이다. 전달 벡터에서의 그의 위치는 통상적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 패키징 서열의 위치화를 최적화시키기 위해 리포터 유전자를 이용한 문헌 [Man and Baltimore, J Virol., 54(2):401-407, 1985]을 참조한다.

<37> 전달 벡터는 또한 렌티바이러스 3' LTR을 포함할 수 있다. 3' LTR은 각각 PPT 및 PBS 서열에 플랭킹된 U3, R5 및 U5 영역을 갖는다. 3' LTR은 비손상이며 천연일 수 있지만, 바람직하게는 이는 변형된다. 바람직하게는, 변형은 최소량의 기능적 활성, 예를 들어, 전사 (프로모터-인핸서) 기능적 활성을 보유하는 LTR을 생성하는 것을 포함한다. 이러한 전사 활성은 예를 들어 리포터 유전자를 이용하여 통상적으로 측정될 수 있다. 감소된 (천연 3' LTR에 비해) 및 최소 기능적 활성을 갖는 LTR을 생성하는 변형의 예로는 U3 영역에서 TATA 박스에 대해 5' (상류)인 결실을 들 수 있다. 이러한 결실로는 예를 들어 하나 이상의 하기 전사 조절 부위, 예를 들어 RBEIII, NF- $\kappa$ B 및/또는 Sp1, 뿐만 아니라 PPT 부위의 결실 또는 변형을 들 수 있다. 최소 전사 활성을 갖는 3' LTR의 예로는 TATA 박스를 포함하지만 상기 TATA 박스 서열에 대해 5'인 3' U3 서열이 결여되거나 5' 서열이 기능적으로 활성이지 않도록 변형된 (결실, 치환, 첨가), 변형된 렌티바이러스 3' LTR을 들 수 있다. 예를 들어, NF- $\kappa$ B 및 Sp1 부위는 이들이 불활성이고/거나 조절 단백질에 결합할 수 없는 점으로 돌연변이될 수 있다. 5' 상류 영역의 결실은 TATA 박스의 T 뉴클레오티드로부터 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 등의 뉴클레오티드로부터를 포함한다. 잔류하는 전사 활성의 양 (천연 LTR에 비해)은 예를 들어 약 0.1 내지 1%, 0.1 내지 2%, 0.1 내지 5%, 0.1 내지 10%, 0.1 내지 20%, 0.1 내지 25%, 0.5 내지 5%, 0.5 내지 10%, 0.5 내지 20%, 0.5 내지 25%; 약 0.1%; 약 0.5%; 약 1%; 약 2%; 약 5%; 약 7%; 약 10% 등일 수 있다.

<38> U3 영역의 5' 말단은 통합 (말단 디뉴클레오티드+att 서열)에 필요하다. 따라서, 말단 디뉴클레오티드 및 att 서열은 결실될 수 있는 U3 서열의 5' 경계를 나타낼 수 있다. 또한, 전달 벡터는 중앙 폴리-퓨린 구역 서열의 상류 또는 하류에 위치될 수 있는 RRE 서열을 포함할 수 있다. RRE 또는 중앙 폴리-퓨린 구역 서열은 천연 또는 비-천연 (이중) 렌티바이러스 벡터 서열로부터 유래될 수 있다.



- <39> 3' LTR의 5' 영역 (예를 들어, U3)은 발현가능한 shRNA, 리보자임, 안티-센스, 마이크로RNA 및 압타머 서열과 같은 발현가능한 코딩 서열을 비롯한 이중 서열의 삽입에 의해 기능적으로 교란될 수 있다. 상기 서열은 pol II 및 pol III (예를 들어, 인간 U6, 마우스 U6 및 인간 H1, 7SK) 프로모터로부터 발현될 수 있으며, 3' LTR에서, 또는 LTR로부터의 상류 및 5' LTR로부터의 하류에서 벡터 게놈에 위치될 수 있다. 프로모터에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mammalian Genome* 10, 168-175]을 참조한다.
- <40> 그러나, 변형된 3' LTR은 유전자조작된 U3 영역 외부의 서열, 예를 들어 PPT, R5 및 U5를 보유할 수 있다. 5' LTR에 대해, R 영역 내의 TAR 요소는 상이한 렌티바이러스 중 또는 아종으로부터의 이중 TAR 서열로 대체될 수 있다.
- <41> 바이러스 전사는 5' LTR의 U3 영역의 3' 말단에서 시작되기 때문에, 상기 서열은 바이러스 mRNA의 일부가 아니며, 3' LTR로부터의 그의 카피는 통합된 프로바이러스에서 LTR 둘다의 생성에 대한 주형으로서 작용한다. U3 영역의 3' LTR 카피가 벡터 구조물에서 변경될 경우, 벡터 RNA는 프로듀서 세포에서 비손상 5' LTR로부터 여전히 제조되지만, 표적 세포에서 재생성될 수 없다. 이러한 벡터의 형질도입은 후손 바이러스에서 LTR 둘다의 불활성화를 초래한다. 따라서, 레트로바이러스는 자가-불활성 (SIN)이며, 이러한 벡터는 SIN 전달 벡터로서 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Mirta et al., *Nucl. Acid Res.*, 30(21):ell3, 2002]; [Zufferey et al., *J. Virol.*, 72:9873-9880, 1998]; 미국 특허 제6,428,953호 (Naldini et al.)를 참조한다.
- <42> 발현가능한 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 예를 들어 패키징 서열과 3' LTR 사이에서 전달 벡터 내로 삽입될 수 있다. 발현가능한 서열은 바이러스 형질도입 벡터 내로 캡슐화되며 본질적으로 그의 페이로드(payload)인 서열이다. 치료 단백질, 효소 및 항체 등을 코딩하는 서열; siRNA; 안티-센스; 마이크로RNA, 압타머; 리보자임, 임의의 유전자 억제제 또는 침묵화 서열; 및 렌티바이러스 형질도입 벡터를 통해 숙주 세포로 전달되는 임의의 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 당해 이중 서열은 전달 벡터 내로 삽입될 수 있다.
- <43> "발현가능한"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드 서열이 세포에서 전사되고 번역될 수 있음을 나타낸다. 발현가능성을 부여하는 서열로는 예를 들어 인핸서, 프로모터, 폴리머라제 결합 부위, 리보솜 부착 부위, 스플라이스 공여자 및 엑셉터 부위, 아데닐중합 신호, 전사 개시 및 종결 서열 등을 들 수 있다.
- <44> 상기 언급된 임의의 프로모터는 그에 작동적으로 연결될 경우 이중 서열의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 벡터가 세포독성 또는 세포증식억제성 폴리펩티드 (즉, 숙주 세포에 유해한 생성물을 발현하는 유전자)를 코딩할 경우, 유도성 프로모터 시스템은 바람직하게는 유전자 발현이 필요하지 않을 경우 숙주 독성을 최소화하도록 그의 발현이 조절될 수 있도록 그의 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 테트라시클린-조절가능한 유전자 발현 시스템 (문헌 [Gossenand Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:5547-5551, 1992])은 전달된 세포로부터 테트라시클린이 회수될 경우 유전자의 유도성 발현을 제공하는데 이용될 수 있다.
- <45> 유전자 발현을 유도적으로 제어하는데 이용될 수 있는 다른 시스템은 프로모터 함유 반응 요소를 이용한 시스템이다. 이러한 시스템에서, 프로모터는 프로모터-함유 요소에 의해 결합될 경우 불활성이다. 유도자 리간드는 예를 들어 고 농도의 유도자가 보다 높은 전사 활성화와 관련되는 정량적인 방식으로 프로모터를 활성화시킨다. 예를 들어, 레오스위치(RheoSwitch)(등록상표) 유전자 조절 시스템은 3가지 주요 성분을 갖는다: 표적 유전자의 프로모터 영역에 결합하는 독점적인 레오셉트(RheoCept)(등록상표) 단백질 수용체, 조절되어야 할 표적 유전자, 및 독점적인 유기 소분자 리간드 유도자. 프로모터는 수용체가 결합하는 고유한 반응 요소를 함유하며, 표적 유전자 발현은 유도자가 수용체에 결합하고 전사를 활성화시킬 경우에만 활성화된다. 예를 들어, 문헌 [Kumar et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 26, 27211-27218, June 25, 2004, "Highly Flexible Ligand Binding Pocket of Ecdysone Receptor: A single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists"]을 참조한다. 유도성 시스템은 또한 벡터로 형질도입된 세포를 치사시킬 수 있는 유전자를 통합시킴으로써 벡터의 안정성을 증가시키는데 이용될 수 있다. 본 출원에서, 유도성 프로모터는 제2 유전자를 발현하고, 이는 제2 유도성 프로모터의 발현을 조절하고, 그 후 활성화시 형질도입된 세포의 치사를 초래하는 "자살" 또는 안전 유전자를 발현할 것이다. 이중 조절 "스위치"의 이점은, 자살 또는 안전 유전자는 그것이 먼저 도입될 때까지는 발현되지 않으며, 따라서 면역원성일 경우, 하나 이상의 프로드러그가 첨가되어 유도성 유전자 중 하나의 발현을 자극할 때까지 발현되지 않는다는 점이다. 이중 조절 스위치의 다른 이점은, 프로드러그의 존재하에서의 배경 발현은 단일 스위치가 이용될 경우보다 훨씬 낮은 것이라는 점이다. 적어도 제2 프로드러그는 자살 또는 안전 유전자의 발현시 세포를 사실상 치사시키는데 필요할 것이다. 비-제한적 예는, 제1 유도성 프로모터로부터 전사 조절 단백질을 발현하고, 그 후 제2 유도성 시스템

에 결합하고 증강시키며, 다시, 바람직하게는 자살 또는 안전 유전자인 임의의 당해 유전자를 발현하는 것이다. 상기 비-제한적 예는 그 자체가 프로드러그의 첨가에 의해 활성화되는 자살 또는 안전 유전자의 발현을 위한 단일 유도성 프로모터 시스템의 사용에 제한되는 것을 의미하지 않는다. 또한, 상기 설명된 예는 안전 또는 자살 유전자의 사용에 제한되는 것을 의미하지 않지만, 임의의 당해 유전자 또는 서열은 이러한 이중 유도성 발현 시스템으로부터 발현될 수 있다.

<46> 전달 벡터의 유연성을 증가시키고 모듈식 벡터 시스템을 생성하기 위해, 다중 클로닝 부위 (MCS)를 또한 당해 이중 서열의 삽입을 용이하게 하는 벡터 내로 혼입시킬 수 있다. 상기 MCS는 임의의 프로모터, 단일 유전자, 2개의 유전자, 및 임의로 유전자 억제성 서열, 예를 들어 안티센스, 리보자임, shRNA, RNAi, 마이크로RNA, 압타머, 전이우성 돌연변이 단백질 등의 도입을 용이하게 한다. 바람직한 실시양태는 그의 뉴클레오타이드 서열이 세포 내의 내인성 유전자에 관해 퇴화된 코돈이 되고, 또한 동일한 벡터가 당해 천연 유전자를 억제하거나 침묵화시킬 수 있는 유전자 억제성 또는 침묵화 서열을 발현하도록 변형된 당해 유전자를 발현하는 것이다. 상기 접근법은 상기 도메인에서 변형된 당해 단백질을 발현하고 동시에 당해 천연 비-변형된 유전자의 발현을 억제하거나 침묵화시키는 유전자 억제성 또는 침묵화 서열을 발현함으로써, 다양한 단백질 도메인의 기능의 이해에 있어서 엄청난 유용성을 갖는다. 본 출원은 또한 질환의 치료를 위한 유전자 치료 접근법에 이용될 수 있다. 예를 들어, 베타-헤모글로빈에 대해 표적화된 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터는 겸상적혈구 빈혈을 갖는 환자에서 겸상-헤모글로빈을 억제하거나 침묵화시킬 수 있다. 동일한 렌티바이러스 벡터는 또한 RNAi에 의해 표적화된 부위에서 코돈-퇴화된 정상 헤모글로빈 분자를 발현할 수 있다. 이러한 방식으로, 겸상 글로빈을 발현하는 적혈구계 세포는 천연 헤모글로빈을 발현하면서 겸상 글로빈 발현을 억제할 수 있으며, 유전자 비정상상을 교정할 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 중국에는 적혈구 세포가 될 헤모글로빈을 발현하는 적혈구계 세포를 발생시킬 줄기 세포 집단으로 전달될 것이다. 상기 접근법은 암, 유전적 질환 및 감염성 질환을 비롯한 광범위하게 다양한 질환의 치료에 이용될 수 있다.

<47> 전달 벡터는 (이미 기재된 요소와 함께) 예를 들어 하기 순서로 배열된 다른 추가 요소를 추가로 포함할 수 있다: 5' LTR, PBS5 패키징 서열, 스플라이스 공여자 (SD) 복제 원점, 임의로 중앙 폴리퓨린 구역 (PPT), RRE, MCS, 스플라이스 억셉터 (SA) 및 변형된 최소 기능성 3' LTR. 발현가능한 이중 폴리뉴클레오타이드 서열은 스플라이스 공여자 부위와 3' LTR의 U5 영역 사이에 삽입될 수 있다. 전달 벡터는 또한 헬퍼 벡터에 대해 상기 기재된 바와 같이 하나 이상의 SD (천연-발생 또는 변형된) 부위를 함유할 수 있다.

<48> 복제 원점은 숙주 세포에 존재할 경우 구조물의 카피 수를 증가시키는데 이용될 수 있다. SV40 ori는 예를 들어 HEK293-T 세포와 같은 SV40 대형 T 항원을 생성하는 세포에서 상기 목적을 위해 통상적으로 이용된다.

<49> 전달 벡터에 제공될 수 있으며 MCS에 대해 3'인 다른 요소로는 예를 들어 합성 인트론 또는 안정성 mRNA에 대해 이용된 다른 서열, 단일 mRNA로부터의 2개의 오픈 리딩 프레임의 번역을 용이하게 하는 내부 리보자임 유입 부위 (IRES), 선택가능한 마커 및 전사 종결 신호 (예를 들어, 아테닐중합 부위)를 들 수 있다.

<50> 2개의 오픈 리딩 프레임의 발현을 용이하게 하는 다른 요소가 이용될 수 있다. 한 가지 예는 예정된 부위에서 폴리펩티드의 절단을 용이하게 하는 2A/2B 펩티드 서열이다 (문헌 [Szymczak et al Nature Biotechnology 22:589-594, 2004]). 이러한 방식으로, 2A 서열을 자가-절단함으로써 분리된 2개의 폴리펩티드 서열은 렌티바이러스 벡터로부터 단일 오픈 리딩 프레임으로부터 생성될 수 있다. 또다른 예는 2가지 비-제한적 예인 피코르나바이러스 또는 족구병 바이러스로부터의 것과 같은 내부 리보솜 개시 서열 또는 IRES 요소를 이용하는 것이다. 또한, 문헌 [Donnelly et al., J. Gen. Virol., 82:1013-1025, 2001]을 참조한다.

<51> 본 발명은 또한 예를 들어 a) 천연 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 기능성 천연 프로모터를 포함하는 렌티바이러스 5' LTR (또는 그의 단편), 및 상기 천연 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호 (여기서, 번역 종결 신호는 gag-pol 서열의 시작점의 하류에 존재함), 및 b) gag-pol 서열에 대해 하류에 위치한 이중 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 이중 프로모터를 포함하는 전달 벡터 구조물을 제공한다.

<52> 본 발명은 또한 a) 천연 렌티바이러스 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 기능성 천연 프로모터를 포함하는 렌티바이러스 5' LTR (및 그의 단편), 및 상기 천연 프로모터에 의해 유도된 전사를 종결시키는데 유효한 이중 폴리A 신호 (여기서, 번역 종결 신호는 gag-pol 서열의 시작점의 하류에 존재함), 및 b) gag-pol 서열에 대해 하류에 위치한 스플라이스 억셉터 부위, 및 c) 5' LTR 프로모터에 작동적으로 연결된 gag-pol 서열에 대해 하류에 위치한 이중 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 구조물을 제공한다.

- <53> 전달 벡터는 전달 벡터에 대해 상기 기재된 임의의 요소를 포함할 수 있고/거나 전형적으로 렌티바이러스 전달 벡터를 포함한다. gag-pol 서열은 상기 기재된 바와 같은 전사 종결자의 삽입으로 실질적으로 완료될 수 있지만, 또한 그의 부분적 단편, 예를 들어 패키징 서열을 함유하는 단편이 이용될 수 있다. 종결 신호는 gag-pol 서열의 어디에나 위치될 수 있지만, 바람직하게는 단지 gag 코딩 서열의 불완전 카피, 및 pol 코딩 서열이 생성되지 않는 위치에 위치된다. 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 gag-pol 서열의 개시 코돈의 하류, 및 5' LTR 프로모터에 작동적으로 연결된 위치에 위치될 수 있다. 이러한 위치는 예를 들어 작동가능한 연결을 용이하게 하는 위치를 결정하는 리포터 유전자를 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 이중 서열은 전사 종결자로부터의 하류에서 완전 gag-pol 코딩 서열 내로 삽입될 수 있다. 대안적으로, gag-pol 서열은 부분적 서열일 수 있으며, 이중 서열은 부분적 서열 및 3' 전사 종결자에 이어질 수 있다.
- <54> 마이크로RNA, shRNA 및 다른 이중 서열의 벡터 발현을 위한 최적 형태는, 5' LTR의 하류에서 gag-pol 서열을 변형시킴으로써 비손상이지만 비-기능성 gag-pol 서열을 함유하는 벡터이다. 상기 변형은 gag-pol 폴리펩티드의 ATG 출발 부위의 하류인 정지 코돈을 초래하지만, 패키징을 위한 시스 작용 요소를 간섭하지 않는다 [이에 대한 청구항을 가져야 한다]. RNAi, 마이크로RNA 서열은 gag-pol 서열의 하류에 삽입된다. 추가의 시스 요소를 포함시키는 것은 벡터를 안정화시켜 기능성 효과기 서열의 역가 및 생성의 증가를 유발할 것이다. 또다른 실시양태에서, 이러한 벡터는 다중 부위에 대해 표적화되어 단일 효과기 RNAi가 표적 서열의 발현을 효과적으로 억제할 가능성을 증가시키는 RNAi, 마이크로RNA 또는 shRNA (안티센스 등)를 발현한다 [또한 이에 대한 청구항을 가져야 한다].
- <55> pol 서열의 번역 및 전사를 불활성화시키기 위해, 폴리뉴클레오티드는 gag 및 pol 코딩 서열, 예를 들어, 이중 서열 이중 발현 카세트 (예를 들어, 프로모터, 코딩 서열 및 폴리 A), siRNA, 안티센스, 번역 (예를 들어, 종결 코돈) 및/또는 전사 종결 서열 사이에 삽입될 수 있다. 단백질 합성 또는 번역의 종결은 정지 코돈에 대한 반응으로서 리보솜에서 일어난다. 정지 코돈의 예로는 예를 들어, UAG, UAA 및 UGA를 들 수 있다. 또한, 문헌 [Cassan and Rousset, "UAG readthrough in mammalian cells: Effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals," BMC Molecular Biology 2001, 2:3]을 참조한다.
- <56> 렌티바이러스 패키징 시스템
- <57> 본 발명은 또한 렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조용의 렌티바이러스 패키징 시스템을 제공한다. 패키징 시스템은 완전-외피화되고 기능성 렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조에 유용한 다수의 구조물을 지칭한다. 이로는 예를 들어 상기 상세히 기재된 바와 같은 렌티바이러스 헬퍼 구조물 및 전달 구조물 (예를 들어, 플라스미드의 형태)을 들 수 있다. 헬퍼 구조물은 바람직하게는 gag-pol 전구체 및 외피 단백질 둘다를 함유하지만, 각각은 또한 상이한 구조물에 존재할 수 있다. 이러한 경우, 헬퍼 구조물 둘다는 시스템에 포함될 수 있다.
- <58> 또한, 시스템은 형질도입 벡터의 제조를 증진시키기 위해 트랜스로 작용하는 폴리펩티드의 발현용의 구조물을 추가로 포함할 수 있다. 이로는 바람직하게는 각각 RRE 및 TAR 서열과 상호작용하기 위한 발현가능한 rev 및 tat 폴리펩티드를 포함하는 플라스미드를 들 수 있다. 다시, 이는 예를 들어 각각이 그 자신의 전사 종결 신호를 갖거나, 코딩 서열이 ITES 서열에 의해 분리되어 동일한 전령 RNA를 이용하여 번역을 달성하는 동일한 플라스미드 상에 존재할 수 있다. 예를 들어, 시스템은 헬퍼 플라스미드, 전달 플라스미드, 및 rev 및/또는 tat 폴리펩티드의 발현용의 플라스미드를 비롯한 3개의 플라스미드 또는 구조물을 포함할 수 있다.
- <59> 보조 단백질 nef, vif, vpr 및 vpu와 같은 렌티바이러스에 통상적으로 존재하는 다른 폴리펩티드는 바람직하게는 형질도입 시스템에 존재하는 임의의 구조물 상에 발현되지 않는다. 임의로, SIV로부터의 vpx 단백질은 벡터 플라스미드, 헬퍼, 또는 헬퍼 플라스미드 중 하나로부터 발현되거나, 단독으로 또는 또다른 서열과 조합으로 플라스미드로부터 발현될 수 있다. vpx 단백질은 HIV 또는 다른 렌티바이러스 기반 벡터의 형질도입 효율의 증가를 용이하게 할 수 있다.
- <60> 본 발명의 구조물은 또한 복제 원점 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli)에서 고-카피 복제 및 유지를 돕는 pUC), 선택가능한 마커, 및 예를 들어 박테리아에서 헬퍼 및 전달 구조물의 제조를 위한 다른 서열을 포함할 수 있다. 또한, 마커는 벡터의 존재에 대해 분석하는데 이용될 수 있으며, 따라서 감염 및 통합을 확인하는데 이용될 수 있다. 마커 유전자의 존재는 또한 삽입물만을 발현하는 숙주 세포의 선택 및 성장을 보장한다. 전형적인 선택 유전자는 항생제 및 다른 독성 물질, 예를 들어 히스티딘올, 푸로마이신, 히그로마이신, 네오마이신, 메토평렉세이트 등, 및 세포 표면 마커에 대한 내성을 부여하는 단백질을 코딩한다.
- <61> 본 발명의 헬퍼 및 전달 벡터는 예를 들어, 미국 특허 제5,994,136호, 제6,165,782호 및 제6,428,953호



(Naldini); 미국 특허 제6,013,516호 (Verma); 미국 특허 제5,665,577호 및 제5,981,276호 (Sodroski); 미국 특허 제5,817,491호 (Yee); 미국 특허 제6,555,107호; 미국 특허 제6,627,442호; 미국 특허 제 6,051,427호 (Finer et al.); 미국 특허 제6,924,123호 (Kingsman et al.); 미국 특허 제5,591,264호 (Barber et al.)에 기재되거나 청구된 벡터 및 그의 하나 이상의 요소를 배제할 수 있다.

<62> 벡터 구축

<63> 또한, 헬퍼 서열을 렌티바이러스 벡터 구조물 내로 포함시킴으로써 렌티바이러스 벡터의 안정성을 증가시키는 메카니즘이 제공된다. 직접 반복을 함유하는 레트로바이러스는 불안정하며, 불안정성의 수준은 직접 반복 서열의 길이에 정비례함이 공지되어 있다. 200개 염기 초과와 직접 반복 서열은 인간 렌티바이러스와 같은 인간 레트로바이러스로부터 매우 효과적으로 삭제된다. 벡터와 헬퍼 서열 사이의 가능한 재조합 부위로부터 상류의 바람직하지 않은 헬퍼 구조물로부터의 헬퍼 서열을 제공함으로써, 렌티바이러스 벡터의 안정성이 개선될 수 있다. 예를 들어, VSV-G 서열이 렌티바이러스 벡터 내로 혼입되는 것은 바람직하지 않을 것이다. 바람직한 실시양태는 VSV-G (바람직하게는, 폴리 A 부위를 포함하지 않음)의 500 내지 1000개 염기의 3' 또는 말단 영역을 잠재적인 재조합 부위 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터 패키징 부위에 대해 원위)로부터 상류에 위치된 벡터 내로 위치시키는 것이다. 헬퍼 및 벡터로부터의 VSV-G 서열 사이에 재조합이 일어나야 할 경우, 직접 반복 서열이 형성되어 불안정성을 초래하고, 이는 이어서 역전사 동안 벡터로부터 결실될 것이다.

<64> 다른 실시양태는 유도적 방식으로 RNA 서열로 안정화된 표적 단백질 mRNA를 함유하는 유도성 제조 시스템이다. 예를 들어, 3' RhoB 비번역된 영역 (UTR)은 혈청에 대한 반응으로 당해 독성 단백질을 발현하는 표적 RNA를 안정화시킬 수 있다. 또다른 예는 에오타신 3' 비번역된 영역을 낮은 반감기를 갖지만 TNF-알파 및 IL-4를 세포에 첨가하여 안정화된 당해 표적 유전자에 연결시키는 것이다. 대안적으로, CYP2E1 및 CYP2B1 mRNA의 5' 코딩 영역 내의 16 mer 서열에 함유된 서열은 인슐린의 존재하에서 표적 RNA를 불안정화시킨다. 인슐린의 제거시, 표적 RNA는 안정화되며, 단백질은 발현될 수 있다 (문헌 [Trong et al. Biochem J. 2004 Dec 23]). 바람직한 본 발명은 이러한 불안정화 서열을 이용하여 유도적 방식으로 VSV-G와 같은 독성 단백질을 생성할 수 있는 패키징 세포주를 제조하는 것이다. 불안정화 서열을 VSV-G 또는 다른 단백질과 연결시키고, 안정화 인자를 첨가하거나 제거함으로써, VSV-G 또는 다른 단백질의 유도성 발현이 달성될 수 있다. 바람직한 실시양태는 독성 단백질 코딩 mRNA를 불안정화시키지만 여전히 일부 안정화 인자에 반응하여 안정화된 독성 단백질 함유 RNA 서열을 발현하는 헬퍼 구조물이다. 추가의 바람직한 실시양태는 mRNA를 안정화시키는 일부 인자의 첨가시 안정하게 발현될 수 있는 RNA 불안정성 서열에 연결된 당해 단백질 유전자를 코딩하는 렌티바이러스 벡터이다.

<65> 또다른 실시양태는 유도성 프로모터 시스템 하에서 VSV-G 단백질에 대해 표적화된 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터 패키징 세포주이다. 세포주의 선택 동안, 항-VSV-G RNAi는 활성이며, 그 후 '셧-오프'로 유도되어 렌티바이러스 벡터 생성을 개시한다. 이러한 유도성 프로모터는 당업계에 공지되어 있으며, 또한 본 출원에 기재되어 있다 (문헌 [Gossen, M. and Bujard, H., "Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-responsive Promoters," Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:5547-5551]). 다른 이들은 패키징 세포주에서 VSV-G의 발현을 유도하는 유도성 시스템을 이용하였다 (Yang et al., 미국 특허 제5,750,396호; Verma, 미국 특허 제6,218,181호). 그러나, 대안적인 방법은 테트라시클린 반응성 프로모터와 같은 유도성 프로모터의 제어하에서 독성 단백질에 대해 표적화된 유전자 발현의 억제제를 위치시킴으로써 VSV-G와 같은 독성 단백질의 발현을 제어하지만, 상기 특정 유도성 시스템은 제한이 아니며 다른 유도성 시스템도 이용될 수 있다. 유전자 발현의 억제제는 그 자체가 독성이 아닌 안티센스, RNAi (그의 몇몇 변이체가 있으며, 일부는 상기 기재되어 있음), 리보자임 또는 전이우성 돌연변이 단백질이다. 바람직한 실시양태는 세포주 (그 후 벡터 제조시 동안 "스위치-오프"됨)의 유지 동안 VSV-G 발현의 억제를 위한 ddRNAi의 유도성 발현이다. 동일한 방법이 세포 성장의 특정 단계 동안 광범위하게 다양한 단백질의 발현을 유도하는데, 및 벡터 제조 이외의 적용을 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, RNAi의 발현은 세포 주기 또는 세포 분열을 촉진하는 유전자에 대해 표적화된 세포 주기 억제제 또는 제2 RNAi의 발현에 맞춰질 수 있다. 표적화될 수 있는 다른 서열은 다른 잠재적인 표적 유전자 중에서도 세포 사멸, 분열, 대사, 단백질 합성 및 대사, 세포 주기, 핵산 합성 및 대사, 및 세포 분화에 관여하는 유전자이다. 이는 독성 또는 원하지 않는 단백질에 대해 표적화된 RNAi를 내부 리보솜 유입 서열 (IRES) 또는 당업계에 공지된 유사한 서열을 이용하여 유전자와 작동적으로 연결시킴으로써 달성될 것이다. RNAi는 또한 2개의 RNAi 서열을 완충 서열과 단순히 분리시킴으로써 제2 RNAi와 연결될 수 있다. 완충 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 RNAi 서열의 기능을 간섭하지 않는 임의의 서열이다.

<66> 상기 방법은 RNAi 또는 RNA 불안정성 서열을 이용하여 렌티바이러스 벡터의 독성 또는 원하지 않는 재조합을 방

지하는 렌티바이러스 벡터의 제조를 위한 보다 안전한 헬퍼 벡터 시스템의 제조에 이용될 수 있다. RNAi는 헬퍼 구조물 내의 오픈 리딩 프레임 사이의 잠재적인 관독물의 단일 또는 다중 영역에 대해 표적화될 수 있다. RNA 불안정성 서열 (mRNA- 및 단백질-불안정화 요소로도 공지됨 - 예를 들어, PEST 서열, P1, P2, cUb 및 Ub, 노나머 UUAUUUAUU (서열 1)의 1, 2 또는 4 카피 (각각 N1, N2 및 N4), c-fos 및 c-myc 3'-UTR로부터의 AU-풍부 요소 (ARE)). 바람직한 실시양태는 하나 이상의 RNA 불안정화 요소 및 하나 이상의 단백질 불안정화 요소로 이루어진 이중-불안정화된 구조물임)은 관독물을 갖는 것이 바람직하지 않은 유전자 사이의 영역 내로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 동일한 mRNA 상에 VSV-G 외피 및 Gag 또는 Pol 단백질을 갖는 것은 바람직하지 않을 것이며, 따라서, 헬퍼 구조물 상의 VSV-G 및 Gag 또는 Pol 오픈 리딩 프레임 사이의 (또는 추정적인 재조합 영역) 단일 또는 다중 영역에 대해 표적화된 RNAi는 본 발명의 바람직한 실시양태가 될 것이다. 바람직한 실시양태는 Gag 및/또는 Pol 및 VSV-G 외피 단백질을 함유하는 RNA 서열을 잠재적으로 초래하는 헬퍼 구조물 상의 영역에 대해 표적화된 shRNAi 또는 ddRNAi의 사용은 관독을 발생시켜야 한다는 것이다. 관독 RNA 및/또는 단백질 서열의 발생이 바람직하지 않은 코딩 서열 사이에 불안정성 요소 또는 퇴화 서열을 삽입함으로써, RNA 또는 단백질 불안정성 또는 퇴화 서열을 이용하여 관독 전사 또는 관독 단백질 서열을 방지할 수 있다. 퇴화 서열은 모든 오픈 리딩 프레임에 위치될 수 있으며, 따라서 3회 이상 반복될 수 있는데, 이는 이용될 실제 리딩 프레임이 반드시 관독 또는 재조합 사건에 대해 선택적으로 공지되지는 않기 때문이다. 또한, gag-pol 및 vsv-g가 삼중 코돈 서열의 상이한 단계에 있음을 보장함으로써, 관독 폴리단백질을 생성하는 외피 및 gag-pol 오픈 리딩 프레임의 방지 방법이 제공된다. 바람직하게는, vsv-g는 gag-pol의 하류이며, gag-pol 코돈 삼중 서열에 대해 -1 단계화된다.

<67> 또다른 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터의 안전성은 벡터와 재조합될 경우 반대인 것으로 간주되는 임의의 서열에 대해 표적화된 유도성 RNAi 또는 안티센스 서열을 삽입함으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, 항-vsv-g 서열 (즉, 항-외피 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 RNAi 또는 안티-센스)은 이것이 단지 벡터 제조 동안 늦게, 및 게놈 벡터 RNA에서만 발현되도록 주요 스플라이스 엑셉터 부위로부터 상류에 삽입될 수 있다. 이러한 방식으로, 이는 벡터 역가에 유의하게 영향을 주지 않을 것이다. 그러나, 재조합 사건이 보장되어야 할 경우, RNAi 또는 안티센스 서열은 VSV 서열에 결합하고 재조합을 파괴할 것이다. 따라서, 헬퍼 (또는 전달 벡터)는 상기 외피 코딩 서열의 번역을 억제하는데 유효한 안티-센스 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 안티센스의 설계는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 벡터 내로 삽입된 완전 안티센스 서열, 또는 외피 센스 RNA를 혼성화하고 그의 번역을 억제하는데 충분한 그의 부분적 서열을 포함할 수 있다.

<68> 또다른 실시양태는 렌티바이러스 벡터 또는 헬퍼 발현 구조물 내의 하기 펩티드 서열, KETWETWWTE (서열 2)의 존재이다. 상기 펩티드 서열은 역전사효소 이량체화의 강력한 억제제이다. 펩티드는 2가지 형식으로 이용될 수 있다: 패키징 시스템으로부터의 보다 안전한 렌티바이러스 벡터의 제조를 위해, 또는 HIV/AIDS 유전자 요법을 위해. 보다 안전한 패키징 시스템의 제조를 위해, 펩티드를 gag-pol과 외피 (예를 들어 VSV-G) 코딩 서열 사이에 삽입하고, 관독시에만 2개의 오픈 리딩 프레임 사이에서 발현시킨다. 그 후, 역전사효소 이량체화 및 비리온 내로의 패키징을 억제함으로써 벡터의 생존력을 억제하는 펩티드를 생성한다. 제2 형식에서, 이는 HIV/AIDS의 치료를 위한 HIV 기반 렌티바이러스 벡터로부터 발현된다. 펩티드를 발현하는 세포를 함유하는 벡터는 야생형-HIV로 감염시 이량체화된 역전사효소 없이 결합성 입자를 생성한다. 이는 감염성 바이러스가 생성됨 없이 체내에 존재하는 에피토프와의 면역 반응의 자극을 가능하게 한다. 제3 형식에서, 펩티드를 제2 유전자로서의 렌티바이러스 벡터로부터 발현시켜 초기 형질도입 후 벡터의 임의의 추가의 이동을 방지할 수 있다. 펩티드 서열 또는 서열의 집합은 생성 동안이 아니라 표적 세포에서 발현되지만 할 것이며, 펩티드가 생성 동안 벡터 내의 그의 프로모터 서열로부터 해리되지만, 펩티드가 발현되어야 할 펩티드 서열과 프로모터를 재결합시키는 개재성 직접 반복 서열의 결과로서 표적 세포에서 생성될 것이다. 동일한 방법은 역전사효소 이량체화를 억제하는 펩티드 대신 독성 단백질을 발현하는데 이용될 수 있다. 일시적으로, 벡터는 하기와 같이 조직화된다: 렌티바이러스로부터 유래된 5' LTR, 패키징 서열, 내부 프로모터, 그의 5' 경계에 스플라이스 공여자 부위 및 강력한 스플라이스 엑셉터 부위를 함유하는 500개 염기 이상의 서열 (바람직하게는, 이에 제한되지 않음), 개재 서열, 강력한 엑셉터 부위보다 약한 스플라이스 공여자 부위를 갖지 않지만 단일 또는 다중 점 돌연변이된 스플라이스 엑셉터 부위를 갖는 동일한 500개 염기 이상의 서열, 코돈 개시 서열, 펩티드 코딩 서열 (또는 독성 단백질), 코돈 정지 서열, 렌티바이러스로부터 유래된 폴리 A 및 3' LTR.

<69> 최근에, LM02 유전자는 백혈병의 발달에 관련되었지만, 상기 유전자는 T 세포 발생 동안 본질적이지 않은 것으로 보인다 (문헌 [McCormack MP, Forster A, Drynan L, Pannell R, Rabbitts TH Mol Cell Biol. 2003 Dec;23(24):9003-13]). 바람직한 실시양태는 CD34 또는 혈액 세포 유형이 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터로 형질도입되고, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터가 상기 세포의 염색체 내로 통합되는 질환의 인



간 유전자 요법 동안 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터의 안정성을 증가시키는 안티센스, 리보솜, RNAi 또는 억제제 LM02 유전자 발현을 발현하는 렌티바이러스 벡터이다.

- <70> LM02 이외에, 다른 유전자는 HIV 벡터로 형질도입될 경우 비조절되거나 하향조절되는 것으로 나타났다 (문헌 [Zhao et al Gene Therapy 12:311-319, 2005]). 예를 들어, EEF1 알파는 인간 배꼽 정맥 내피 세포에서 10배로 상향조절되는 반면, 클러스테린은 3배로 상향조절된다. 상기 유전자의 과발현에 기인한 임의의 부작용을 방지하기 위해, 과발현된 유전자에 대한 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 구축할 수 있거나, 발현저하된 유전자를 코딩하고 발현할 수 있다. 이러한 방식으로, 렌티바이러스 벡터의 안정성은 증가될 수 있다.
- <71> 또한, 모든 코돈 개시 부위가 렌티바이러스 단백질에 대한 코돈 개시 서열 주위 및 이를 포함한 점 결실, 2개의 염기 결실, 3개의 염기 결실 또는 3개 초과 염기 결실을 이용하여 결실된 렌티바이러스 벡터에 대한 설명이 제공된다. 이러한 방식으로, 벡터는 최대 캡슐화에 필요한 시스 작용 서열을 보유하지만, 야생형 렌티바이러스를 생성하는 능력을 갖지 않는다. 또한, 암호적 코돈 개시 부위가 또한 결실된다. 바람직한 실시양태에서, 충분한 서열은 코돈 개시 부위 주위에서 결실되어 상기 유전자 또는 RNAi의 삽입을 위한 공간을 생성하여 벡터의 치료 효과 또는 목적하는 비-치료 효과, 예를 들어 세포주에서의 증가된 단백질 생성의 효능을 증가시킨다.
- <72> 이의 이점은, 그의 과발현이 벡터를 함유하지만 아직 야생형 렌티바이러스로 감염되지 않은 세포에 대한 면역 반응을 유발하지 않도록 세포성 단백질이 면역원성이 아니라는 점이다.
- <73> 또한, (1) 세포의 활성화, 및 세포로부터 결합성 벡터 입자의 증가된 생성; (2) 면역 반응의 자극; (3) 결합성 입자의 증가된 생성; 및/또는 (4) 감염성 렌티바이러스 입자의 감소된 생성을 초래하는 다수의 유전자 또는 RNAi를 발현하는 상기 벡터가 제공된다. 이러한 유전자 또는 RNAi는 상기 기재되어 있다.
- <74> 형질도입 벡터 제조
- <75> 본 발명은 또한 형질도입 벡터 및 그의 제조 방법을 제공한다. 상기 기재된 특정 실시양태는 형질도입 벡터를 제조하는 숙주 세포에서 일시적으로 이용될 수 있다. 벡터를 제조하는데 이용될 수 있는 숙주 세포의 예로는 임의의 포유동물 또는 인간 세포주 또는 1차 세포를 들 수 있다. 비-제한적 예로는 예를 들어, 293, HT1080, 저캣(Jurkat) 및 SupT1 세포를 들 수 있다. 다른 예는 CHO, 293, HeLa, VERO, L929, BHK, NIH 3T3, MRC-5, BAE-1, HEP-G2, NSO, U937, 나말와(Namalwa), HL60, WEHI 231, YAC 1, U 266B1, SH-SY5Y, CHO, 예를 들어, CHO-K1 (CCL-61), 293 (예를 들어, CRL-1573)을 들 수 있다.
- <76> 본 발명은 예를 들어 a) 숙주 세포를 렌티바이러스 헬퍼 플라스미드 및 전달 플라스미드로 형질감염시켜 프로듀서 세포주를 생성하고; 상기 형질전환된 프로듀서 세포를 렌티바이러스 형질도입 벡터를 제조하는데 유효한 조건하에서 배양하는 것을 포함하는, 렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조 방법을 제공한다. 전기천공, 인산칼슘 형질감염, PEI 중합체 매개된 형질감염, 팩투린 또는 지질-기반 형질감염 방법을 비롯한 임의의 적합한 형질감염 방법이 벡터 제조 공정에 이용될 수 있다. 형질도입 벡터는 바람직하게는 이것이 회수되고 임의로 풍부화되거나 정제될 수 있는 세포 배양 배지 내로 분리된다.
- <77> 형질도입 벡터의 제조에 이용되는 세포주는 하기 언급된 임의의 방식으로, 예를 들어 RNAi 또는 안티센스의 벡터 제조를 제한하는 유전자의 발현을 감소시키는 녹아아웃 유전자의 도입에 의해, 또는 벡터 제조를 증진시키는 서열의 도입에 의해 변형되어 벡터 단백질 생성을 증진시킬 수 있다. 세포성 또는 바이러스 인핸서를 코딩하는 서열은 또한 HIVLTR에 작용하여 바이러스 생성 또는 세포성 전이활성화제 단백질의 수준을 증진시키는 헤르페스 바이러스, 간염 B 바이러스와 같은 세포주로 (예를 들어, 추가의 플라스미드 벡터를 이용하여) 유전자조작될 수 있다. 세포성 전이활성화 단백질로는 예를 들어, NF- $\kappa$ B, UV 광 반응성 인자, 및 T 세포 활성화 인자를 들 수 있다.
- <78> 세포주는 예를 들어 전기천공, 인산칼슘, 리포솜 등을 이용하여 구조물 DNA로 통상적으로 형질전환되어 DNA를 세포 내로 도입할 수 있다. 세포는 공동-형질감염될 수 있거나 (즉, 헬퍼 및 전달 벡터 둘다를 이용하여), 이는 각각의 단계가 상이한 벡터의 도입을 포함하는 별개의 단계로 형질전환될 수 있다.
- <79> 세포는 형질도입 벡터를 제조하는데 유효한 조건하에서 배양된다. 이러한 조건으로는 예를 들어 단백질 생성을 달성하는데 필요한 특정 환경을 들 수 있다. 이러한 환경으로는 예를 들어 적절한 완충액, 산화제, 환원제, pH, 조-인자, 온도, 이온 농도, 세포의 적합한 나이 및/또는 세포가 이용되는 단계 (예를 들어, 특히 세포 주기의 일부 또는 특정 유전자가 발현되는 특정 단계), 배양 조건 (세포 배지, 기질, 산소, 이산화탄소, 글루코스 및 다른 당 기질, 혈청, 성장 인자 등 포함)을 들 수 있다.

<80> 형질도입 효능

<81> 상기 기재된 외피 변형 이외에, 증가된 형질도입을 위한 세포의 자극은 세포의 표면 상의 리간드의 발현에 제한되지 않는다. 형질도입 효능은 또한 2가지 이상의 벡터의 유형으로 세포를 형질도입시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 증가될 수 있다. 제1 벡터는 상기 벡터가 표적 세포를 자극하여 당해 치료 또는 다른 서열을 발현하는 형질도입 벡터를 혼입시키는데 보다 수용성이 되도록 하는 단백질 또는 리간드를 생성하는 "촉진 벡터"로 지칭된다. 촉진 벡터는 고 효율 벡터 매개된 형질도입을 위해 표적 세포를 자극하는데 이용되는 단백질, 리간드 또는 인자 이외에 안전 또는 자살 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 일단 형질도입 벡터가 세포의 표적 집단의 고 효율 형질도입을 매개하면, 촉진 벡터는 형질도입 벡터에 의해 고 효율 형질도입에 필요한 단백질, 표면 리간드 또는 인자를 발현하고, 그 후 세포의 표적 혼합물로부터 결실될 수 있다. 상기 방법은 하나 이상의 촉진 벡터가 SCF, TPO 및 Flt-3 리간드의 조합물을 발현할 수 있는 줄기 세포의 형질도입에 이용될 수 있으며, 그에 의해 각각의 촉진 벡터는 일단 프로드러그가 세포의 집단에 첨가되면 집단으로부터 세포를 제거하게 될 안전 또는 자살 유전자(들)를 함유한다. 안전 또는 자살 유전자는 당업계에 공지되어 있으며, 본 출원에서 이하에 보다 상세하게 기재된다. 임의로, 촉진 벡터는 단독으로 또는 안전 또는 자살 유전자(들)와 조합으로 사용될 수 있는 유도성 프로모터로부터 단백질, 인자 또는 리간드를 발현할 수 있다. 유도성 시스템을 안전 또는 자살 유전자(들)와 협력하여 증상화시키는 것은 단백질/인자/리간드/RNAi/안티센스 등 생성의 감수성 및 특이성 (유도성 시스템은 조직 특이적으로 만들어질 수 있음) 및 안전 또는 자살 유전자(들)의 발현을 증가시키기 위해 이용될 수 있다. 촉진 벡터로부터의 단백질/인자/리간드/RNAi의 발현은 임의로 조직 특이적 프로모터로부터 발현되어 촉진 벡터에서 서열의 특이적 세포 유형에 대한 발현을 제한할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 비 표적 세포를 우선적으로 형질도입하여 표적 세포 자극 인자를 발현하도록 촉진 벡터를 최소 자극으로 세포의 집단에 첨가하고, 이들이 나중에 결실될 수 있도록 안전 또는 자살 유전자로 마킹한다. 일정 시간 후 (촉진 벡터의 첨가 후 1시간 이상 및 수 주 이하, 바람직하게는 다음날), 형질도입 벡터를 고 효율 매개된 형질도입을 위해 세포에 첨가한다.

<82> 세포주

<83> 본 발명은 또한 성장을 위한 특성을 증진시키고, 배지에 존재하는 비싼 인자에 대한 의존성을 감소시키고, 보다 높은 수율의 단백질을 생성하고, 보다 높은 역가의 벡터 입자를 생성하는 세포주의 개발을 제공한다. 예를 들어, HEK 293 세포가 세포성 수용체의 특이적으로 증가된 발현을 가지며, 특이적 리간드를 세포의 배지에 첨가함으로써 이들이 증식 잠재성을 증가시킬을 입증하였음이 최근에 보고되었다 (문헌 [Allison et al, Bioprocess International 3:1, 38-45, 2005]). 바람직한 실시양태는 HEK 293 세포에 대해 관련된 리간드 단백질의 최적화된 조합을 발현하는 다수의 렌티바이러스 벡터이며, 이후 세포를 고 처리량 방법에 의해 분류하여 렌티바이러스 벡터의 다중 카피를 함유하는 HEK 293 세포의 클론을 단리한다. 상기 세포는 상이하게 발현하는 HIV 벡터, 또한 HIV 벡터에 함유된 리간드 유전자의 다중 카피의 조합물을 함유한다. 리간드 유전자는 코돈 최적화되거나 그의 발현을 추가로 증가시키기 위해 첨가된 돌연변이일 수 있다. 바람직한 조합은 그 후 다중 용도를 가질 수 있는 최종 단리된 클론 세포에서 발현된 리간드 단백질의 다중 카피를 갖는 것이다. 이는 단백질 또는 항체 (모노클로날, 인간화, 단일쇄 포함) 생성에 이용될 수 있다. 이는 또한 렌티바이러스와 같은 벡터 (그러나, 렌티바이러스 벡터에 제한되지 않음)의 제조에 이용될 수 있다. 아데노 및 아데노-관련된 벡터, 뮤린 레트로바이러스 벡터, SV40 벡터 및 다른 벡터와 같은 다른 벡터는 상기 본 발명의 최적화된 세포주로부터 용이하게 제조될 수 있다. HEK 293 세포에서 증가된 발현/활성을 나타내는 수용체 및 그의 리간드의 목록으로는 예를 들어, AXL 수용체 (gas6); EGF 수용체 (EGF), 케모카인 수용체 (프락탈린); PDGF 수용체, 베타 (PDGF); IL-15R-알파; IL-2R-알파; 케모카인 수용체 2 (MCP1); IL-2R, 감마; IL-1R-1; CSF-1 수용체; 옹코스타틴 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, 제II형 (BMP-2); TGF-R, 예를 들어, 베타 수용체 II (TGF-베타); FGF-R-I (bFGF); 케모카인 수용체 4 (SFDIa); 인터페론 감마 수용체 1 및 2를 들 수 있다. 문헌 [BioProcess International, January 2005. Table 1, "Growth factor/cytokine receptors expressed by HEK-293]을 참조한다. 이러한 세포는 보다 높은 단백질 및 벡터 생성 잠재성을 가질 것이며, 세포 그 자체가 인자를 생성하고 이를 배지 내로 분비할 것이기 때문에 배지에 존재하는 리간드 인자의 존재에 덜 의존할 것이다.

<84> CHO 세포와 같은 다른 세포 유형에 대해, 다른 수용체-리간드 조합이 중요할 수 있다. 예를 들어, 인슐린 성장 인자 수용체 I, 인슐린 성장 인자 및 인슐린은 세포에서 항-아포토시스 활성을 갖는 것으로 여겨진다. 다수의 렌티바이러스 벡터는 인슐린 성장 인자 수용체 (I 또는 II), 인슐린 성장 인자 (I 또는 II), 인슐린 및 생성을

위한 표적 단백질이 모두 CHO 세포와 같은 생성 세포의 형질도입을 위한 벡터에 함유되도록, 및 적절한 클론이 바람직하게는 고-처리량 방법을 이용하여 분비되어 표적 단백질의 매우 높은 생성을 나타내는 클론을 선택하도록 구축될 수 있다. 최적 클론은 모든 유전자조작된 유전자 또는 유전자 발현의 억제제를 고도로 발현하는 세포가 아닐 수 있으며, 오히려 일부가 낮은 수준의 발현일 수 있는, 각각의 유전자의 최적 발현 수준이다. 렌티바이러스 벡터 시스템의 가치 및 이러한 세포주를 유전자조작하는데 다수의 렌티바이러스 벡터를 사용하는 것은, 렌티바이러스 벡터 혼합물로 형질도입된 세포의 집단에서 각각의 벡터 카피 수의 무작위 또는 확률적인 분포가 있다는 것이며, 따라서 혼합물에서 각각의 벡터의 양을 변화시킴으로써, 각각의 개별 제2 유전자 또는 억제성 서열의 카피의 수가 최적화될 수 있다. 벡터 및 2차 유전자 또는 유전자 억제성 서열의 바람직한 조합은 각각의 렌티바이러스 벡터가 제조를 위한 당해 단백질, 임의로 또한 생성 세포의 생존력 또는 일부 측면에 영향을 줌으로써 직접적 또는 간접적으로 단백질 수율 또는 벡터 수율을 추가로 증진시키는 하나 이상의 RNAi 또는 유전자를 발현하는 것이다. 그러나, 또한 상기 2차 서열의 효과를 증가시키기 위해 2차 유전자 또는 유전자 발현의 억제제만을 발현하는 하나 이상의 렌티바이러스 벡터를 갖는 것이 유익할 수 있다.

<85>

렌티바이러스 벡터 내로 유전자조작되어 인슐린 성장 인자 수용체 경로, 세포 성장 및 생존력에 긍정적으로 영향을 줄 수 있는 다른 유전자 (또는 상기 유전자의 억제제)는 Akt 유전자 족 구성원 (Akt 1, Akt 2, Akt 3), p13K, Ras, Raf, MEK, MAPK p42, MAPK p44, 14-3-3 단백질, Bad 및 Grb/SOS이다. 관련 경로를 자극하기 위해, 상기 경로의 적절한 수용체에 결합하는 리간드를 렌티바이러스 벡터로부터 발현시켜 세포에 적절한 신호를 제공하여, 세포로부터의 단백질, 벡터 (렌티바이러스 벡터에 제한되지 않음) 또는 백신 생성에 긍정적으로 영향을 줄 수 있다. 일부의 경우, 렌티바이러스 벡터가 특정 경로를 자극하는 수용체 및 리간드 둘다를 발현하는 것이 바람직할 수 있다. 키메라 수용체는 또한 특정 경로의 특이적 자극을 생성하기 위해 구축될 수 있다. 이는 또한 하나의 리간드가 동일한 리간드 결합 도메인을 갖지만 상이한 세포내 신호 도메인을 갖는 키메라 수용체를 통해 다수의 경로를 자극할 수 있기 때문에, 세포에서 생성될 필요가 있는 리간드의 수를 감소시킬 수 있다. 반대로, 상이한 결합 도메인 및 동일한 신호 도메인을 함유하는 키메라 수용체는 또한 자극되는 경로의 유형을 맞추는데 이용될 수 있다. 키메라 수용체는 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명은 단백질, 백신 또는 벡터 제조 뿐만 아니라 유전자 요법에도 이용될 수 있다. CHO 또는 293 세포 (비 제한적 예)와 같은 세포에서 렌티바이러스로부터의 그의 과발현 후 (또는 RNAi, 안티센스, 리보솜 등에 의한 억제)에 단백질, 백신 또는 벡터 제조에 긍정적으로 영향을 줄 수 있는 다른 유전자는 골 형태형성 단백질-2, PACEsol, 포스포리파제 D PI3K (포스포이노시티드 3-키나제), p70S6K (p70 S6 키나제) 및 ERK (세포외-신호-조절된 키나제), CDKN1, CCNB1, CDC20, CDK20, CDK4, CDKN3, CCNC, BMP1, MADH4, GA4, RCA, ATPS, HAT4, GAPDH, SP3, TCEB1L, TFAP2B, SMARCA4, EIF4E, RAB2, D1S155E, SSI-1, WT1, MYC, TSG101, SHC3, PHB, TCF 12, NFIX, E2F4, TAF3C, STAT6, BCL2, NERF-2, POU2F1, NFKB1, EIF4E, BMI1, MYBL2, PIM1, KRAS2, RPA1A, JUNB, ABL1, TIM, SAS, AKT1, CSF3R, BCR, MXI1, TNFAIP6, AIP1, ILK, PTK2, CSK, CSNK2B, GK, PRKCA, MADH2, LIMK1, PIK3CA, PRKCD, PPP6C, 세포성 PrP, 및 성장, 대사, 세포 주기 및 발생에 관여하는 다른 단백질 유형이다. 바람직한 실시양태는 세포성 프리온 단백질 (PrP), BSE 또는 렌티바이러스 벡터 패키징 또는 프로듀서 세포에서 세포주를 오염시킬 수 있는 다른 반대 작용제에 대해 표적화된 RNAi의 발현이다. 추가의 바람직한 실시양태는 비-제한적 예로서 항-PrP RNAi와 같은 세포성 PrP에 대한 억제제를 발현하는 헬퍼 구조물 또는 패키징 세포주이다. 반대로, 기재된 단백질은 유전적 질환, HIV/AIDS 또는 암과 같은 질환에 대한 유전자 요법에 이용하기 위해 RNAi 등에 의해 과발현되거나 억제될 수 있다. 치료 용도를 위한 바람직한 렌티바이러스 벡터 조성물은 모노클로날 항체 또는 단백질 (또는 다수의 단백질) 및 신체에서 단백질의 생성에 긍정적인 영향을 주는 적어도 제2 유전자 (또는 RNAi와 같은 유전자의 억제제)의 발현이다. 제2 유전자 또는 유전자의 억제제는 생체내 단백질 생성을 위한 세포내 단백질에 제한되지 않지만, 면역 반응, 신체의 대사, 호르몬 또는 사이토킨 생성에 영향을 주는 단백질일 수 있다. 제2 유전자 (하나 이상의 제2 유전자) 또는 유전자의 억제제 (하나 이상의 유전자의 제2 억제제)는 유도성 프로모터 시스템, 또는 질환 동안 생성된 단백질, 바이러스 또는 인자와 같은 신체에 존재하는 일부 인자에 반응하여 생성될 수 있다. 이러한 방식으로, 제1 단백질 또는 항체 (예를 들어, 모노클로날, 인간화, 단일쇄)의 생성은 제2 유전자의 생성에 의해 조절될 수 있다. 인간 단백질의 정확한 글리코실화에 관여하는 단백질은 또한 생성을 위한 목적하는 단백질과 제휴하여 렌티바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다. 특정 종으로부터의 글리코실화는 모노클로날 항체와 같은 단백질에 바람직하지 않은 효과를 유발할 수 있으며, 따라서 상기 특이적 글리코실화 패턴을 생성하는 상기 효소에 대한 억제제의 발현은 재조합 단백질 생성의 안정성 및 효능을 증가시킬 것이다. 예를 들어, 마우스 또는 다른 포유동물로부터 유래된 세포주의 글리코실화는 인간 글리코실화와 매우 유사하다. 그러나, 몇몇 유의한 차이는 품질 뿐만 아니라 생활성에 영향을 줄 수 있다. 대부분의 마우스-유래된 세포주 (예를 들어, NSO 세포)는 추가의 글리코실화 효소를 함유한다. 효소는 알파 1,3-갈락토실트랜스퍼라제로 지칭



되며, 이는 알파 배위로 UDPGal로부터 내부 및/또는 노출된 Gal 잔기로의 Gal 잔기의 이동을 매개한다. 인간은 알파-Gal 에피토프에 대한 항체를 갖는다. rIgG 상의 알파-Gal 에피토프의 존재가 인간에 대해 면역원성을 암시하는 문헌상의 증거는 없지만, 조절제는 알파-Gal 잔기-함유 치료 당단백질에 대해 발현할 수 있다. 따라서, 사용되는 단백질의 보다 최적의 글리코실화를 증진시켜 인간 용도를 형성하기 위해, 마우스 알파 1,3-갈락토실트랜스퍼라제에 대해 표적화된 RNAi (또는 유사한 억제제)를 렌티바이러스 벡터 내로 삽입하여, 알파-Gal 잔기가 치료 당단백질 상에 존재하지 않도록, 마우스 알파 1,3-갈락토실트랜스퍼라제 단백질을 회피하거나 감소된 수준을 갖는 세포주를 생성할 수 있다. 또다른 예는 CHO 세포와 같은 설치류 세포에 존재하는 CMP-N-아세틸뉴라민산 히드록실라제이다. 상기 효소는 인간에서 활성 형태로 발현되지 않으며, 증거는 제조용 치료 당단백질에서 Neu5Gc의 존재가 면역 반응을 유발할 수 있음을 암시한다. 따라서, 렌티바이러스 벡터는 당해 단백질 유전자 돌다를 함유하도록 유전자조작되고, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 CMP-Neu5 Ac 히드록실라제 활성을 감소시키고, 따라서 또한 효소에 대해 표적화된 RNAi 또는 안티센스 RNA 서열을 함유함으로써, 생성된 글리코컨쥬게이트의 Neu5Gc 함량을 감소시킬 수 있다. 2가지 예는 제한적임을 의미하지 않으며, 글리코실화 또는 다른 세포 프로세스에 관여하는 다른 효소는 또한 원하지 않는 효소/인자를 억제함으로써 또는 목적하는 효소를 과발현시켜 생성되어야 하는 목적하는 단백질 또는 인자의 특징을 향상시키거나 최적화시킴으로써 표적화될 수 있다.

<86>

RNAi는 또한 벡터, 단백질, 인자 또는 백신의 제조에 이용되는 세포주에서 복제되기에 바람직하지 않을 잠재적인 원하지 않거나 우발적인 바이러스 또는 임의의 바이러스 또는 박테리아로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 미코플라스마 리보솜 또는 전령 RNA는 RNAi 기술에 의해 표적화되어 미코플라스마 복제 및 오염을 방지할 수 있다. 세포에서 유익한 바이러스 또는 박테리아 복제의 이러한 억제 방법은 다른 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련된 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 폴리오마 기반 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터) 또는 백신 (예를 들어, 인플루엔자, 천연두, 풍진, 에볼라, 우두)의 제조에 이용하기 위해 확장될 수 있다. 이러한 방법의 표적이 될 수 있는 바이러스의 완전한 세트는 [ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/viruses.html](http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/viruses.html)에서 발견된다. 벡터 제조 시스템에서 cDNA 및 RNAi의 발현은 HIV 벡터 제조를 추가로 증가시키는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 세포 성장을 억제하는 유전자는 세포 생합성을 증가시킬 수 있으며, 따라서 세포주로부터 HIV 벡터의 보다 높은 제조를 초래하고, 따라서 보다 높은 역가 벡터를 초래한다. 과발현될 수 있는 유전자는 탄수화물 대사, 에너지 대사, 생체이물의 생분해에 관여하는 단백질, 핵산 및 아미노산 대사, mRNA의 전사 또는 단백질의 번역 또는 세포 분열 및 성장을 활성화시키는 유전자, 예를 들어 Bcl-2를 증가시키는 것이다. 또한, RNAi 기술을 이용하여 세포 성장을 감소시키거나 차단하는 유전자 또는 HIV 벡터 입자의 생성을 억제하는 유전자를 억제함으로써 벡터 제조를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, RNAi는 세포 분열, 세포 성장, 세포 대사, 핵산 및 아미노산 대사, mRNA의 전사 또는 단백질의 번역을 억제함으로써 기능하는 단백질에 표적화되며, 따라서 HIV 벡터 입자의 생성을 증가시킨다. 이러한 유전자의 완전한 목록 및 그의 공지된 경로는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>에서 발견될 수 있다. 세포주로부터의 렌티바이러스 벡터의 제조를 증가시키는 몇몇 방법이 이용될 수 있다. 먼저, 인간 또는 또다른 유기체로부터의 cDNA의 라이브러리는 패키징 구조물(들)로 공동형질감염되거나, HIV 벡터 입자의 생성에 필요한 유전자를 함유하는 패키징 세포 내로 형질도입용 HIV 벡터 내로 삽입될 수 있다. 방법의 각각의 단계는 다중웰 형식으로 수행될 수 있으며, 시스템의 용량을 추가로 증가시키기 위해 자동화될 수 있다.

<87>

또다른 실시양태는 세포가 당해 유전자를 함유하는 벡터 및 RNAi를 발현하는 벡터 둘다로 바람직하게는 프로테아제 유전자 또는 바람직하지 않은 또다른 유전자에 형질도입되도록, 발현되어야 할 당해 유전자 이외에 렌티바이러스 벡터 상의, 또는 혼합물로서 세포에 첨가된 상이한 렌티바이러스 벡터 상의 프로테아제 유전자에 대해 표적화된 RNAi와 같은 유전자의 억제제를 포함시키는 것이다. 표적화되어야 할 프로테아제는 당해 목적하는 단백질 또는 목적하는 인자의 생성 또는 정제에 악영향을 줄 수 있는 프로테아제의 임의의 단일체 또는 조합일 수 있다. 단백질 족 및 특정 비-제한적 예가 기재된다: 시스템인 프로테아제, 예를 들어 카스파제, 카텝신; 아연 프로테아제 (메탈로프로테아제), 예를 들어 카르복시펩티다제, 다양한 매트릭스 메탈로프로테아제; 세린 프로테아제, 예를 들어 트립신, 키모트립신 및 엘라스타제. 유비퀴틴 경로는 또한 세포주에서 단백질 생성 생성 단계 동안 유용한 표적일 수 있다. RNAi는 유비퀴틴, 유비퀴틴-활성화 효소 (E1), 유비퀴틴-컨쥬게이트 효소 (E2) 및/또는 유비퀴틴-단백질 리가제 (E3)를 표적화하는 렌티바이러스 벡터 내로 삽입될 수 있다. 바람직하게는, 유비퀴틴 경로를 표적화하는 RNAi는 유비퀴틴화의 억제가 특정 시기 동안만 일어나도록 유도성 프로모터로부터 발현된다. 유비퀴틴에 대해 표적화된 RNAi의 유도는 본 발명의 제한이 아니며, 렌티바이러스 벡터는 프로테아제, 바람직하게는 세포 사멸에 관여하는 프로테아제에 대해 표적화된 RNAi를 구조적으로 발현하는 것이 바람직할 것이다. 이러한 프로테아제로는 아스파르트레이트-특이적 시스템인 프로테아제 (ASCP), 세린 프로테아제, 예

를 들어 Omi/HtrA2, 카스파제, 티올 프로테아제의 ICE 족, 예를 들어 ICE/CED-3 프로테아제, 그란짐 B를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 백터는 IAP 단백질과 같은 아포토시스를 억제하는 유전자를 발현할 수 있다. 이러한 세포 표현형의 조절 방법은 세포에서 단백질 생성에 제한되지는 않지만, 백신 및 치료 목적을 위한 트랜스제닉 동물의 생성에도 이용될 수 있다. 상기 적용에 바람직한 실시양태는 조직 특이적 프로모터로부터 제2 유전자 또는 유전자 억제성 서열을 발현하는 것이다.

<88> 렌티바이러스 백터에 존재하는 임의의 2차 유전자에 대한 추가의 바람직한 실시양태는, 정제를 위한 목적하는 단백질을 함유하는 단백질 혼합물로부터 2차 단백질의 급속한 제거를 가능하게 하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 태깅하는 것이다. 이러한 방식으로, 단백질 2차 단백질의 임의의 조합은 단일의 통상적인 아미노산 서열 태그를 사용함으로써 급속하게 제거되어, 표적 단백질의 급속한 정제를 가능하게 할 수 있다. 표적 단백질은 상이한 태그를 가질 수 있거나, 태그를 전혀 갖지 않을 수 있고, 이는 목적이 천연 단백질을 생성하고 정제하는 것일 경우 바람직하다. 반대로, 당해 단백질은 단독으로 태깅될 수 있다. 또한, 이러한 백터는 인간 유전자 요법 및 트랜스제닉 마우스의 생성을 위해 생체내에서 이용될 수 있으며, 시험관내 시스템을 위한 사용에 제한되지 않는다.

<89> 폴리펩티드의 제조 방법

<90> 본 발명은 또한 본원에 개시된 형질도입 백터와 같은 렌티바이러스 형질도입 백터를 이용한 폴리펩티드의 제조 방법, 및 이러한 방법의 생성물을 제공한다. 방법은 하나 이상의 하기 단계, 예를 들어, 숙주 세포를 렌티바이러스 형질도입 백터로 형질도입시켜 형질도입된 숙주 세포를 형성하고 (여기서, 상기 백터는 당해 이중 폴리펩티드를 코딩하는 발현가능한 이중 폴리뉴클레오티드를 포함함); 상기 형질도입된 숙주 세포를 상기 당해 폴리펩티드를 생성하는데 유효한 조건하에서 배양하고; 폴리펩티드를 상기 숙주로부터, 예를 들어 폴리펩티드가 배양 배지 내로 분비될 경우 배양 배지로부터 분리하는 것을 포함할 수 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 전사, 번역 및/또는 배지 내로의 분비 (예를 들어, 분비 서열)에 필요한 임의의 추가의 서열을 포함할 수 있다. 본원에 언급된 임의의 세포주, 예를 들어 CHO (예를 들어, CHO DG44) 및 HEK 293 (예를 들어, HEK 293F)을 비롯한 임의의 세포주는 본 발명에 따라 형질도입될 수 있다.

<91> 형질도입 백터는 본원에 기재된 방법에 따르는 것을 비롯하여 통상적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 프로듀서 세포주는 헬퍼 플라스미드 (적합한 외피 및/또는 gag/pol 전구체 함유) 및 이중 코딩 서열을 함유하는 전달 백터로 기능성 형질도입 백터를 제조하는데 유효한 조건하에서 형질전환될 수 있다. 외피 단백질은 제조되어야 하는 표적 숙주 세포를 형질도입하는 폴리펩티드의 능력에 대해 선택될 수 있다. 인플루엔자 백신의 제조를 위해, 하기 세포주 및 상응하는 외피 단백질을, 예를 들어 293 또는 CHO; VSV-G, 양생, 모콜라 및 파라믹소비리대가 바람직하다 (예를 들어, 월드와이드웹에서 [ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_param.htm](http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_param.htm) 참조).

<92> 숙주 세포의 예로는 예를 들어 포유동물 세포; 인간 세포, 예를 들어 A2058 흑색종, C3A 간, G-402 신장, C8166 T-세포, Caco-2 결장 및 K562 골수; CHO; 293F, 293 FT 등, 및 상기 및 하기 언급된, 및 ATCC 웹 사이트 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))에 존재하는 세포주, 및 세포에 대한 다른 공급원을 들 수 있다.

<93> 예를 들어, 백신, 인터페론 (알파, 베타, 감마, 엡실론), 에리트로포이에틴, 인자 VIII, 응고 인자, 항체 및 그의 단편 (예를 들어, 단일쇄, Fab 및 인간화 포함), 인슐린, 케모카인, 사이토킨, 성장 인자, 혈관신생 조절 인자, 아포토시스 조절 인자 등을 비롯한 임의의 적합한 또는 목적하는 이중 서열이 발현될 수 있다. 단일쇄 항체 (예를 들어, 단일쇄 가변 단편 또는 "scFv")가 통상적으로 제조될 수 있다.

<94> 본 발명의 특정 실시양태에서, 렌티바이러스 형질도입 백터는 백신으로서 사되는 항원 제조물의 제조에 이용될 수 있다. 프리온, 바이러스, 미코박테리움, 원충 (예를 들어, 플라즈모듐 *Plasmodium falciparum*) (말라리아), 트리파노좀, 박테리아 (예를 들어, 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 네이세리아(*Neisseria*) 등)를 비롯한 임의의 적합한 항원(들)은 본 발명에 따라 제조될 수 있다.

<95> 숙주 세포는 하나 이상의 이중 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 단일 렌티바이러스 백터 또는 다수의 렌티바이러스 백터로 형질도입될 수 있으며, 각각의 백터는 동일하거나 상이한 이중 폴리뉴클레오티드 서열(들)을 포함한다. 예를 들어, 다중-서브유닛 항원 (세포내 및 세포-표면 다중-서브유닛 성분 포함)은 개별 서브유닛을 별개의 백터 상에 발현시키지만, 집합이 숙주 세포 내에서 일어나도록 동일한 숙주 세포를 모든 백터로 감염시킴으로써 제조될 수 있다.

<96> 백신은 대개 예를 들어 상이한 단백질로부터 및/또는 동일한 단백질의 상이한 에피토프 영역으로부터 유래된 다수의 항원 성분을 함유한다. 예를 들어, 바이러스 질환에 대한 백신은 숙주에 투여될 경우 바이러스 챌린지에

대한 면역원성 또는 보호성 반응을 유발하는, 바이러스로부터 수득된 하나 이상의 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다.

<97> 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 예를 들어 하나 초과 폴리펩티드로 이루어진 항원 제조물이 제조되는 폴리펩티드 중합체를 제조하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 캡시드는 하나 초과 폴리펩티드 서브유닛으로 이루어질 수 있다. 숙주 세포를 상이한 바이러스 외피 서열을 운반하는 벡터로 형질도입시킴으로써, 세포에서 발현될 경우 단백질은 하나 초과 단백질 서브유닛을 함유하는 3-차원 구조 내로 (예를 들어, 그의 천연 배향으로) 자가-집합될 수 있다. 구조는 항원 활성, 효소 활성, 세포 결합 활성 등을 비롯한 기능적 활성을 가질 수 있다. 더욱이, 적합한 세포주에서 발현될 경우, 이는 세포 배양 배지 내로 분비되어 정제를 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 N 및 H 캡시드 단백질 및 임의로 M 단백질 (하기 참조)가 렌티바이러스 형질도입 벡터를 이용하여 프로듀서 세포주 내로 도입될 경우, 비어 있는 캡시드 또는 바이러스-유사 입자 (VLP)가 세포에서 형성되고, 그 후 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 이러한 VLP는 통상적으로 단리 및 정제된 후, 인플루엔자 백신으로서 투여될 수 있다. VLP는 예를 들어 실질적인 양의 바이러스 RNA를 함유하지 않는 (예를 들어, 비어 있는) 자가-집합된 캡시드이다. VLP는 바람직하게는 천연 감염성 바이러스 입자의 쉼질에 대한 적어도 일정 정도의 보호를 제공하거나, 적어도 그에 대한 항체를 유도하는데 유효한 면역 반응을 유도할 수 있다.

<98> 현재, 풍진, 볼거리, 간염 (A 및 B), 홍역, 인플루엔자, 폴리오, 천연두, 수두, 아데노바이러스, 일본 뇌염, 광견병, 에볼라 등을 비롯한 많은 이용가능한 바이러스 백신이 있다. 본 발명은 임의의 상기 언급된 질환에 대한 백신의 제조에 이용될 수 있다.

<99> 렌티바이러스 형질도입 시스템은 이들이 유효한 인플루엔자 백신을 개발하고 제조하는 시간을 단축시켜, 공중보건 부문이 인플루엔자 질환에서 변화 패턴에 보다 급속하게 반응하는 것을 가능하게 하기 때문에 특히 흥미롭다. 현재, 인플루엔자 바이러스, 특히 A 및 B형 군주는 세계적으로 중증 질병 및 사망의 주요한 원인이다. 미국에서, 인플루엔자는 모든 사망 원인 중에서 7위를 차지하며, 다수의 입원 (200,000건), 실직일 (70,000,000일) 및 제한된 활동일 (346,000,000일)을 초래하여, 상당한 경제적 충격을 유발한다. 예를 들어, [dhhs.gov/nvpo/influenza\\_vaccines.html](http://dhhs.gov/nvpo/influenza_vaccines.html)을 참조한다. 인플루엔자 A 바이러스는 그의 표면 항원에서 빈번히 변화되는 반면, B형 인플루엔자 바이러스는 덜 빈번히 변화된다. 하나의 군주에 의한 감염 후 면역성은 후속 항원 변이체에 대해 완전히 보호되지 않을 수 있다. 결과로서, 다음 전염병을 유발할 가능성이 가장 큰 순환성 군주와 조화되도록 인플루엔자에 대한 신규한 백신이 매년 설계되어야 한다. 세계 보건 기구는 인플루엔자 백신 조성물에 대한 해마다의 권고사항을 만드는 세계적 인플루엔자 감독 네트워크를 설립하였다. 본 발명의 렌티바이러스 형질도입 시스템은 효과적인 백신을 제조하는데 필요한 시간을, 예를 들어 8개월까지 소요될 수 있는 현재 이용되는 표준 달걀 기술에 비해, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 이용하여 5주 이하로 유의하게 감소시킬 수 있다.

<100> 본 발명에 따라 백신이 제조될 수 있는 바이러스의 예로는 예를 들어 오르토믹소바이러스, 인플루엔자바이러스 A (그의 HA 및 NA 단백질이 다양한 모든 군주, 예를 들어 (비-제한적 예) H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H7N7 및 H3N8 포함); 인플루엔자 B, 인플루엔자 C, 토고토 바이러스 (Dhori, Batken 바이러스, SiAR 126 바이러스 포함) 및 이사바이러스 (예를 들어, 감염성 연어 빈혈 바이러스)를 들 수 있다. 이는 무척추동물, 척추동물, 포유동물, 인간, 비-인간 영장류, 원숭이, 돼지, 소 및 다른 가축, 조류, 가금류, 예를 들어 닭, 메추라기 및 오리, 야생 조류 (수생 및 육상 조류 포함), 파충류 등으로부터의 단리체를 비롯한 모든 종 유형으로부터 단리되거나 전염된 인플루엔자를 포함한다. 이는 또한 예를 들어 돌연변이, 항원 유동, 항원 이동, 재조합 등을 통해 변화된 기존의 군주, 특히 증가된 독성 및/또는 중간 전염 (예를 들어, 인간-대-인간)을 갖는 군주를 포함한다.

<101> 동물유행병성이고/거나 종을 넘나드는 인플루엔자 바이러스는, 이들이 넓은 숙주 범위를 갖거나, 감염된 숙주에서의 재조합 때문에 및/또는 천연-발생 또는 지정된 돌연변이 때문에 특히 흥미롭다. 예를 들어, H5N1 (바이러스, 헤마글루티닌 제5형 및 뉴라미니다제 제1형 상에 존재하는 표면 항원의 아형에 대해)은 아시아에서 가금류에서의 인플루엔자의 발생을 유발한 조류 인플루엔자 A의 아형이다. 2005년 11월 현재, 120,000,000 마리 초과 조류가 감염되어 죽었거나, 추가의 감염 확산의 방지를 위해 처사되었다. 상기 바이러스는 또한 높은 치사율과 관련되는 인간 숙주 ("조류 플루")로 확산되었다.

<102> 인플루엔자 항원 제조물 (예를 들어, 백신)은 인플루엔자 비리온에서 천연적으로 발생되는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 그러나, 이는 바람직하게는 천연 병원성 바이러스를 발생시킬 모든 폴리펩티드 유전자



를 포함하지는 않는다. 이로는 예를 들어 헤마글루티닌 (HA 유전자에 의해 코딩됨), 뉴라미니다제 (NA 유전자에 의해 코딩됨), 핵단백질 (NA 유전자에 의해 코딩됨), 매트릭스 (M1) 단백질 (M 유전자에 의해 코딩됨), M2 (M 유전자에 의해 코딩됨), 비-구조 단백질 (NS 유전자에 의해 코딩됨) 및 폴리머라제를 들 수 있다. 천연-발생 비리온은 통합 단백질 H 및 N ("캡시드 층")으로 "장식된" 지질 이중층에 쉬스된다. 매트릭스 단백질 (M1)은 바이러스 막 아래에서 단백질 층 ("매트릭스 층")을 형성하며, 바이러스 집합, 안정성 및 통합에 관여한다. 예를 들어, 문헌 [Harris et al, Virol. 289:34-44, 2001]을 참조한다. M2 단백질은 막 단백질 이온 채널이다. 본 발명의 VLP는 H, N 및 임의로 M1 및 M2 단백질을 포함할 수 있다. 상기 단백질에 대한 서열은 공지되어 있고/거나 젠뱅크(GenBank)에서 확인될 수 있다. 예를 들어, M1 및 M2 서열에 대한 문헌 [Widjaja et al. J Virol, 78:8771-8779, 2004]을 참조한다.

- <103> 이는 개별적으로 또는 동일한 플라스미드 상의 전달 벡터 내로 클로닝되고, 형질도입 벡터의 제조에 이용될 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 각각 고유한 인플루엔자 유전자 서열 (예를 들어, H, N 및 M1을 코딩하여 3가지 상이한 형질도입 벡터를 초래함)을 함유하는 다수의 형질도입 벡터가 제조될 수 있다. 이러한 벡터가 동일한 숙주 세포 (예를 들어, CHO 또는 293)에서 공동-발현될 경우, 배지 내로 분비되고, 원심분리에 의해 수거된 후, 백신으로서 투여될 수 있는 자가-집합체 VLP가 제조된다.
- <104> 인플루엔자 A H5. 9가지 이상의 아형의 H5가 확인되었다. 현재 아시아 및 유럽에 퍼져 있는 HPAI H5N1 바이러스와 같은 H5 감염은 인간 중에서 기록되었으며, 종종 질병 또는 사망을 유발할 수 있다.
- <105> 인플루엔자 A H7. 9가지 이상의 아형의 H7이 확인되었다. 인간에서의 H7 감염은 드물지만, 감염된 조류와 직접 접촉한 사람들 사이에서 발생할 수 있다. 증상으로는 결막염 및/또는 상기도 증상을 들 수 있다. H7 바이러스로는 예를 들어 H7N2, H7N7 및 H7N3을 들 수 있으며, 인간에서 온건 내지 중증 및 치명적 질병을 유발하였다. H 아형은 이들이 바이러스가 세포에 결합하고 그에 유입되는 능력을 지배하고, 그 후 바이러스의 배가가 일어나기 때문에, 전염병학적으로 가장 중요하다. N 아형은 세포로부터 새롭게 형성된 바이러스의 방출을 지배한다.
- <106> 인플루엔자 A H9. 9가지 이상의 아형의 H9가 확인되었다. 인플루엔자 A H9는 인간을 감염시키는 것으로는 거의 보고되지 않았다. 그러나, H9 균주로 감염될 경우 인플루엔자-유사 증상을 나타내는 어린이의 보고가 있다.
- <107> 본 발명은 기존의 아형, 그의 유도체, 및 그의 재조합, 예를 들어 인간-대-인간으로부터 확산되는 능력을 갖는 아형 및 재조합을 비롯한 모든 조류 인플루엔자 아형 (예를 들어, H 및 N 아형)에 대한 백신을 제공한다. 다양한 단리체, 특히 H5 아형에 대한 것이 특성화되었다. 예를 들어, 문헌 [Stem-Ramirez, J. Virol., 2004, 78, 4892-4901]; [Guan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, 101, 8156-8161]을 참조한다.
- <108> 본 발명의 형질도입 벡터는 이러한 단백질이 배양 배지 내로 분비될 경우, 가공되지 않은 배양 배지 mL 당 재조합 이중 단백질 예를 들어 약 0.1 내지 0.3 mg/mL 내지 약 5 내지 10 mg/mL 이상으로 높은 수준의 이중 단백질 생성을 초래할 수 있다.
- <109> 본 출원은 또한 항체의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 하이브리도마 또는 동물 모델이 필요 없는 모노클로날 항체 (예를 들어, 인간, 마우스 및 다른 포유동물 유형)의 제조 방법이 제공된다. 한 가지 비-제한적 예에서, 종양원성 단백질을 발현하는 렌티바이러스 벡터는 항원으로 이전에 자극된 마우스로부터의 말초 혈액 B 세포에 형질도입된다. 상기 벡터는 마우스 세포를 효과적으로 형질도입시켜 이들을 항체 생성 세포가 되게 한다. 두 번째 비-제한적 예에서, 2가지 렌티바이러스 벡터가 유전자조작되는데, 한 가지는 중쇄 항체를 발현하고, 제2 벡터는 경쇄 항체를 발현한다. 유전자의 일정한 영역은 인간 (또는 필요에 따라 다른 종) 이뮤노글로불린 유전자 (예를 들어, IgG, IgM 또는 Ig의 다른 유형)로부터 유래된다. 유전자의 다양한 영역이 변형되거나 퇴화되어 다양성을 창출한다. 퇴화성 서열은 당업계에 공지된 임의의 적합한 기술에 의해 수득되고, 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝되어 중쇄 또는 경쇄 이뮤노글로불린 분자를 발현하는 렌티바이러스 벡터의 라이브러리를 생성할 수 있다. 항체는 세포를 벡터 둘다로 형질도입시켜 중쇄 및 경쇄 둘다를 함유하는 기능성 항체를 생성함으로써 생성될 수 있다. 형질도입되고 발현하는 세포를 항원과의 결합을 위해 선택하고 스크리닝할 수 있으며, 그 후 양성 클론을 단리하고, 다중 라운드로 친화도 성숙시킬 수 있다.
- <110> 본 방법의 이점은 항체가 비-편향된 방법으로 제조된다는 점이다. 전통적인 하이브리도마 및 제노마우스 (Xenomouse) 기술과 같은 다른 방법은, 이들이 내인성, 예를 들어 마우스 조직에 반응성이기 때문에, 클론 선택 및 특정 항체 클론이 결실된 B 세포에 의존한다. 상기 결실된 클론의 일부는 이들이 인간 항원과 교차 반응할 수 있기 때문에 가변성일 수 있다. 기재된 방법의 이점은 분자 항체 클론의 결실이 없고 이들이 모두 비-편향

된 방법으로 분석되며 여전히 완전히 인간화된 (인간화가 필요할 경우) 항체 분자라는 점이다. 렌티바이러스 벡터의 또다른 이점은, 유전자가 높은 다중도로 세포 내로 형질도입되어 하나의 세포에서 다양한 항체 유형을 생성할 수 있다는 점이다. 이는 매우 다양한 항원 결합 부위를 함유하는 라이브러리를 생성하도록 제조될 필요가 있는 세포의 수를 감소시킨다. 두 번째 이점은, 1보다 높은 감염 다중도로 세포를 형질도입시킴으로써 추가의 다양성이 창출될 수 있도록 상이한 렌티바이러스 벡터에 중쇄 및 경쇄 유전자를 위치시킨다는 점이다. 예를 들어, 10의 MOI가 각각의 중쇄 및 경쇄 발현 렌티바이러스 벡터로 세포를 형질도입하는데 이용될 경우, 각각의 세포에서 생성된 항체의 조합의 수는 100개이다. 따라서, 단일 웰에 약 10,000개 세포가 있는 96-웰 플레이트에서, 상기 방법으로 생성될 수 있는 가능한 변이체의 수는 96-웰 플레이트의 단일 웰에서 1,000,000개이다. 따라서, 일정한 척도에 따라, 다수의 항체 변이체가 상기 방법으로 생성될 수 있다. 방법은 세포의 각각의 구조물에 대해 10의 MOI를 이용하는 것에 제한되지 않으며, 필요에 따라 보다 높은 MOI가 이용될 수 있다. 예를 들어, 100의 MOI가 이용될 경우, 각각의 세포는 10,000개의 변이체 항체를 생성할 수 있으며, 96 웰 플레이트의 각각의 웰은 10,000,000,000개의 변이체를 생성할 수 있다. 따라서, 각각의 96 웰 플레이트는 당업계에 공지된 많은 방법이 있는 (예를 들어, ELISA) 표적 항원에 대한 스크리닝에 이용될 수 있는  $1 \times 10^{12}$  개의 변이체 항체 분자를 생성할 수 있다. 일단 특정 웰이 목적하는 항체 반응을 생성하는 것으로 확인되면, 세포는 정확한 항체를 발현하는 세포 클론을 발견하도록 희석을 제한함으로써 클로닝될 수 있다. 일단 상기 클론이 확인되면, PCR을 이용하여 중쇄 및 경쇄 항체를 발현하는 벡터를 클로닝할 수 있다. 그 후, 벡터 DNA를 헬퍼 구조물(들)로 형질감염시켜 벡터를 제조할 수 있다. 대안적으로, 세포의 상기 클론을 헬퍼 구조물(들) (PEI, 인산칼슘, 지질 형질감염 또는 당업계에 공지된 다른 형질감염 방법)로 직접적으로 형질감염시켜 변이체 렌티바이러스 벡터를 생성할 수 있다. 그 후, 생성된 벡터를 역가측정한 후, 보다 낮은 MOI에서 세포 상으로, 그러나 보다 많은 수의 세포를 형질도입시켜 당해 항체를 생성하는 클론을 단리할 수 있다. 일단 세포의 클론을 단리하면, 항체는 보다 높은 감염 다중도로 세포를 형질도입시킴으로써 보다 높은 역가를 생성할 수 있으며, 동일한 방법은 전체 항체 분자에 제한되지는 않지만, 단일쇄 항체, 항체 단편, 파지 제시 및 다른 항체-유사 분자 (모두 당업계에 공지됨)에도 적용될 수 있다. 항체를 발현하는 것 이외에, 벡터는 모노클로날 항체의 생성을 증가시키거나 그 수율을 증가시키기 위해 다른 유전자를 발현할 수 있다. 이러한 유전자는 ras 및 myc와 같은 종양유전자일 수 있지만, Bcl-2와 같은 항-아포토시스 유전자와 같은 다른 유전자도 이용될 수 있다. 또한, 이러한 벡터를 이용하여 항원에 노출된 동물의 혈액 내의 B 세포로부터 모노클로날 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 항원에 노출된 마우스로부터의 B 세포를 종양유전자 또는 유전자 침묵화 RNA의 조합을 이용함으로써 흑색종 세포 내로 형질전환시킬 수 있다. 이러한 유전자로는 예를 들어 성장 인자, 예를 들어 암피레굴린, B-림프구 자극제, 인터루킨 16 (IL 16), 티모포이에틴, TRAIL, Apo-2, Pre B 세포 콜로니 증진 인자, 내피 분화-관련된 인자 1 (EDF1), 내피 단핵구 활성화 폴리펩티드 II, 대식세포 이동 억제 인자 MIF, 자연 킬러 세포 증진 인자 (NKEFA), 골 형태형성 단백질 8 (골원성 단백질 2), 골 형태형성 단백질 6, 결합 조직 성장 인자 (CTGF), CGI-149 단백질 (신경내분비 분화 인자), 사이토킨 A3 (대식세포 감염성 단백질 1-알파), 아교모세포종 세포 분화-관련된 단백질 (GBDR1), 간암-유도된 성장 인자, 뉴로메디안 U-25 전구체, 임의의 종양 유전자, 종양유전자, 원종양유전자 또는 세포 조절 유전자 (condor.bcm.tmc.edu/oncogene에서 발견될 수 있음), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 혈관 내피 성장 인자 B (VEGF-B), T-세포 특이적 RANTES 전구체, 흥선 수치상 세포-유도된 인자 1; 수용체, 예를 들어 액티빈 A 수용체, 제II형 (ACVR2),  $\beta$ -신호 서열 수용체 (SSR2), CD14 단핵구 LPS 수용체, CD36 (콜라겐 제1형/트롬보스폰딘 수용체)-유사 2, CD44R (헤르메스(Hermes) 항원 gp90 귀환 수용체), G 단백질 커플링된 수용체 9, 케모카인 C x C 수용체 4, 콜로니 자극 인자 2 수용체  $\beta$  (CSF2RB), FLT-3 수용체 티로신 키나제, 일시적 수용체 잠재적 C 전구체에 대한 유사체, 킬러 세포 액틴-유사 수용체 아족 B, 저밀도 지단백질 수용체 유전자, 저-친화도 Fc-감마 수용체 HC, MCP-1 수용체, 단핵구 화학유인성 단백질 1 수용체 (CCR2), 핵 수용체 아족 4, 군 A, 구성원 1, 오르판 G 단백질-커플링된 수용체 GPRC5D, 페록시좀 증식성 활성화된 수용체 감마, 페로몬 관련-수용체 (rat), 바소프레신-활성화된 칼슘 이동화 추정적인 수용체, 레티노산 x 수용체, 톨(Toll)-유사 수용체 6, 막관통 활성화제 및 CAML 상호작용제 (TACI), B 세포 성숙 펩티드 (BCMA), CSF-1 수용체, 인터페론 ( $\alpha$ ,  $\beta$  및 감마) 수용체 1 (IFNAR1)을 들 수 있다. 항체 생성을 증가시키기 위해 조절될 수 있는 경로로는 예를 들어, 유비퀴틴/프로테아좀; 텔프메라제; FGFR3; 및 Mc1-1을 들 수 있다. 항체 생성을 증가시키기 위해 표적화될 수 있는 다른 유전자로는 하기 표에 열거된 것들을 들 수 있다.



골수종 및 비골수종 세포주 사이의 차등적인 발현  
(Claudio et al. Blood, Vol. 100, Issue 6, 2175-2186, September 15, 2002)

클론 확인	유전자/클론 매치	순위	유니진
상향-조절된			
PCL1920	글루코스-조절된 단백질, 58 kDa (MGC:3178)	1	Hs.289101
PCL0833	계놈 DNA 클론 (염색체 2 클론 RP11-218L22)	2	
PCL2440	cDNA 클론 이미지: 1694766 3'으로부터의 EST	3	Hs.134923
MYE4362	계놈 DNA 클론 (염색체 14 BAC R-214N1)	4	
PCL1712	프로게스테론 수용체 막 성분-2 (PGRMC2)	5	Hs.9071
PCL2089	가상의 단백질 FLJ22332 (c2h2유형, 아연 핑거)	6	Hs.111092
PCL1633	계놈 DNA 클론 (7로부터의 BAC CTD-2022G18)	7	
PCL0849	다발성 골수종 종양유전자-1 (MUM1)/(IRF4)	8	Hs.82132
PCL1492	골수종 EST PCL1492	9	
MYE4007	BUP 단백질	10	Hs.35660
BCMA	B 세포 성숙 단백질 (BCMA)	11	Hs.2556
PCL1414	종양 거부반응 항원-1 (TRA1)	12	Hs.82689
PCL1515	류신 2 전구체와 약간 유사	13	Hs.20183
PCL0308	프로테오솜 (서브유닛, $\alpha$ 유형, 2) (PSMA2)	14	Hs.181309
PCL0940	셀레노프로테인 T	15	Hs.8148
MYE2868	골수종 EST MYE2868	16	
MYE2693	신호 인식 입자 14 kD (SRP14)	17	Hs.180394
PCL5267	골수종 EST PCL5267	18	
MYE3869a	골수종 EST MYE3869a	19	

<111>

PCL5298	뇌-특이적 혈관신생 억제제-1과 유사 (BAI-1)	20	
PCL1662	유사분열 방추사 집합체에 대한 염색체 단백질과 유사	21	Hs.16773
PCL0105	CD138/신데칸-1 (SDC1)	22	Hs.82109
MYE4521	아렉신 A2, 리포코르틴 II, 칼파크린 I	23	Hs.217493
PCL4099	게놈 DNA 클론 (BAC CTA-227L24, 7q21.1-q21.2)	24	
PCL1657	가상의 단백질 FLJ11200	25	Hs.107381
MYE2821	리보솜 단백질 L4 (RPL4)	26	Hs.286
MYE4493	DNA-결합 단백질 CPBP	27	Hs.285313
PCL3222	폴수종 EST PCL3222	28	
MYE1378a	가상의 단백질 FLJ10055 (WD 반복을 갖는 단백질과 유사)	29	Hs.9398
MYE2209	열 쇼크 70 kDa 단백질 5	30	Hs.75410
MYE4932	X-box-결합 단백질-1 (XBP1)	31	Hs.149923
PCL3824	PIM-2	32	Hs.80205
PCL4079	게놈 DNA 클론 (염색체 5 클론 CTC-504A5)	33	
PCL4441	카르보닐 리덕타제-1 (CBR1)	34	Hs.88778
하향-조절된			
PCL4897	라미닌 수용체-1 (67 kDa, 리보솜 단백질 SA)	1	Hs.181357
PCL5225	폴수종 EST PCL5225	2	
PCL0639	폴수종 EST PCL0639	3	
MYE3255a	리보솜 단백질 S2 (RPS2)	4	Hs.182426
PCL4678	뉴클레오포스틴	5	Hs.9614
PCL2015	폴수종 EST PCL2015	6	
PCL3726	림프구 세포질 단백질-1 (L-plastin)	7	Hs.76506
PCL3287	번역적으로 제어된 종양 단백질-1 (TPT1)	8	Hs.279860
PCL4214	단백질 포스파타제-2, 조절 서브유닛 B (PPP2R2A)	9	Hs.179574
MYE5079	리보솜 단백질 S2 (RPS2)	10	Hs.182426
PCL1818	고-이동성기 단백질-1 (HMG1)	11	Hs.337757
MYE2310	글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제 (GAPD)	12	Hs.169476
PCL3027	폴수종 EST PCL3027	13	
MYE3019	리보솜 단백질 L31 (RPL31)	14	Hs.184014
PCL1701	액틴, $\gamma$ -1 (ACTG1)	15	Hs.14376
MYE1012	폴수종 EST MYE1012	16	
PCL2226	리보솜 단백질 L10 (RPL10)	17	Hs.29797
MYE2056	리보솜 단백질 L5 (RPL5)	18	Hs.180946

클론	서열	공지된 단백질 또는 도메인에 대한 상동성	수탁 번호
MYE4005	522	SH2 도메인-험유 어댑터	NM_032855.1
MYE3305	523	DEAD box 헬리카제	AAC27435.1
MYE6227	246	토르신 B 및 토르신 A	AAC51733.1
PCL1515	251	뮤신과 약간 유사	A43932
PCL5298	272	뇌-특이적 혈관신생 억제제-1과 유사	BAA23647.1
PCL1662	160	유사분열 방추사에 대한 염색체 단백질과 유사	S41044
PCL2089	239	신규한 c2h2 유형 아연 핑거	BC008901.1
MYE1378	410	Trp Asp (WD) 반복 단백질과 유사	XM_008266.3
PCL1215	310	티거 1 트랜스포사제	U49973
PCL1952	235	미각 발달-관련된 NYD-SP19	AAK53407
PCL2063	112	Pm5 단백질	NM_014287
PCL2220	191	GTP-결합 단백질과 유사한 DKFZp586D0222	AL136929.1
PCL2520	389	안키린 도메인	Z70310
PCL2835	132	v-rel 조류 세망내피종 바이러스 발암유전자	XM_012000.2
PCL2999	320	APOBEC1 (아포지단백질 B 편집 단백질)	AK022802
PCL3405	401	코나도트르핀 유도성 전사 억제제-2	NM_016264.1
MYE4184	365	RAY/RAB1C (RAYL)과 유사한 GTP-결합 단백질	XM_009956.1
PCL3139	375	ZNF140-유사 단백질	AF155656
PCL0758	294	KIAA0790과 유사(52%)	AB018333
MYE1302	410	PARP 도메인 함유 단백질 DKFZp566D244.1	CAB59261.1
MYE2885	183	가상의 단백질 DKFZp434H132	XM_007645.3
MYE5546	347	<u>S68401</u> (소) 글루코스-유도된 유전자 (HS1119D91)	XM_009498.1
MYE6872	220	전사 조절제와 유사한 가상의 단백질	AL117513
MYE5259	218	Rad4와 유사한 가상의 단백질 DKFZP564C186	CAB43240
MYE6738	333	SH3 도메인-함유 단백질	BC008374.1
PCL0791	235	플렉스트린 상동성 및 FYVE 아연 핑거 도메인	XM_016836.1
MYE4229a	310	RNA 인식 모티프를 함유하는 FL20273 단백질	NM_019027.1

<113>

MYE4229a	310	RNA 인식 모티프를 함유하는 FL20273 단백질	NM_019027.1
클러스터 96	707	신규한 단백질 디솔피드 이소메라제	BC001199.1
PCL1850	215	Myb-유사 DNA-결합 도메인을 함유하는 단백질	NM_022365.1
PCL2185	138	CDK-5 활성화제-결합 단백질과 유사한 FLJ13660	XM_017042.1
PCL4352	376	스플라이싱 인자 아르기닌/세린-풍부-4와 유사한 FLJ11021	XM_016227.1
MYE4184	365	RAY/RAB1C (RAYL)과 유사한 GTP-결합 단백질	XM_009956.1
PCL5805	210	BH3 도메인 함유 단백질	XM_002214.1
MYE4482	271	MMTV 수용체 변이체-2 (Mtrv2)	AF052151.1
MYE5150	132	프로게스테론 수용체-관련된 p48과 유사	XM_010011.4
PCL1756	340	일시적 수용체 잠재적 C 전구체 (GIP-유사 단백질)	P36951
PCL1178	286	SAM 도메인-함유 단백질 FLJ21610	XM_015753.1

<114>

<115>

렌티바이러스 형질도입 벡터의 제조 방법

<116>

본 발명은 또한 통류(flow-through) 초원심분리 및 고속 원심분리 및 접류(tangential flow) 여과를 이용한 렌티바이러스 벡터의 농축 및 정제 방법을 제공한다. 통류 초원심분리는 과거에 RNA 종양 바이러스의 정제에 이용되었다 (문헌 [Toplin et al., Applied Microbiology 15:582-589, 1967]; [Burger et al., Journal of the National Cancer Institute 45:499-503, 1970]). 본 발명은 렌티바이러스 벡터의 정제를 위한 통류 초원심분리의 사용을 제공한다. 상기 방법은 하나 이상의 하기 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터

는 세포 공장 또는 생물반응기 시스템을 이용하여 세포로부터 제조될 수 있다. 일시적 형질감염 시스템 (하기 참조)이 이용될 수 있거나, 패키징 또는 프로듀서 세포주도 유사하게 이용될 수 있다. 필요에 따라, 물질을 초원심분리로 로딩하기 전 예비-정화 단계가 이용될 수 있다. 통류 초원심분리는 연속적인 유동 또는 배치식 침전을 이용하여 수행될 수 있다. 침전에 사용되는 물질은 예를 들어 모두 부식성이지만 낮은 점도로 높은 밀도를 생성하는 염화세슘, 타르트산칼륨 및 브롬화칼륨이다. CsCl은 생성될 수 있는 광범위한 밀도 구배로 인해 높은 정도의 순도가 달성될 수 있기 때문에 (1.0 내지 1.9 g/cm<sup>3</sup>), 공정 개발에 빈번히 이용된다. 브롬화칼륨은 높은 밀도에서 이용될 수 있지만, 일부 단백질의 안정성과는 부적합성일 수 있는 승온, 즉 25℃에서만 이용될 수 있다. 수크로스는 값싸고 무독성이기 때문에 광범위하게 이용되며, 대부분의 단백질, 아-세포 분획 및 전체 세포의 분리에 적합한 구배를 형성할 수 있다. 전형적으로, 최대 밀도는 약 1.3 g/cm<sup>3</sup>이다. 수크로스의 삼투포텐셜은 복합 구배 물질, 예를 들어 니코덴즈(Nycodenz)가 이용될 수 있을 경우 세포에 대해 독성일 수 있다. 구배는 하나 이상의 단계로 구배에서 이용될 수 있다. 바람직한 실시양태는 단계 수크로스 구배를 이용하는 것이다. 물질의 부피는 바람직하게는 구동 당 0.5 L 내지 200 L이다. 유속은 바람직하게는 시간당 5 내지 25 L이다. 바람직한 작동 속도는 122,000x g 이하의 힘을 생성하는 25,000 내지 40,500 rpm이다. 축차는 목적하는 부피 분획으로 통계적으로 연로딩될 수 있다. 바람직한 실시양태는 100 mL 분획으로 원심분리된 물질을 연로딩하는 것이다. 그 후, 정제되고 농축된 렌티바이러스 벡터를 함유하는 단리된 분획을 겔 여과 또는 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 목적하는 완충액에서 교환할 수 있다. 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피는 또한 완충액 교환 또는 추가의 정제를 위한 대안적인 또는 추가의 방법으로서 사용될 수 있다. 또한, 점류 여과는 또한 완충액 교환 및 필요에 따라 최종 제제화에 사용될 수 있다. 점류 여과 (TFF)는 또한 2 단계 TFF 절차가 실시될 초원심분리 또는 고속 원심분리에 대한 대안적인 단계로서 사용될 수 있다. 제1 단계는 벡터 상청액의 부피를 감소시킬 것인 반면, 제2 단계는 완충액 교환, 최종 제제화 및 물질의 일부 추가의 농축에 이용될 것이다. TFF 막은 100 내지 500 킬로달톤의 막 크기를 가져야 하며, 제1 TFF 단계는 500 킬로달톤의 바람직한 막 크기를 가져야 하는 반면, 제2 TFF는 300 내지 500 킬로달톤의 바람직한 막 크기를 가져야 한다. 최종 완충액은 벡터가 장기 저장을 위해 저장되도록 하는 물질을 함유해야 한다.

<117>

본 발명은 또한 렌티바이러스 벡터의 농축 및 정제 방법을 제공한다. 방법은 부착 세포를 함유하는 세포 공장, 또는 벡터 및 헬퍼 구조물로 형질감염되거나 형질도입되어 렌티바이러스 벡터를 생성하는 생물반응기를 이용한다. 생물반응기의 비-제한적 예로는 웨이브(Wave) 생물반응기 시스템 및 크셀렉스(Xcellerex) 생물반응기를 들 수 있다. 둘다는 일회용 시스템이다. 그러나, 비-일회용 시스템도 이용될 수 있다. 구조물은 본원에 기재된 것, 뿐만 아니라 다른 렌티바이러스 형질도입 벡터일 수 있다. 대안적으로, 세포주를 유전자조작하여 형질도입 또는 형질감염이 필요 없이 렌티바이러스 벡터를 제조할 수 있다. 형질감염 후, 렌티바이러스 벡터를 수거하고 여과하여 미립자를 제거한 후, 연속 유동 고속 원심분리 또는 초원심분리를 이용하여 원심분리할 수 있다. 바람직한 실시양태는 고속 원심분리기를 갖는 JCF-A 구역 및 연속 유동 축차와 같은 고속 연속 유동 장치를 이용하는 것이다. 또한, 바람직하게는 중간 규모 렌티바이러스 벡터 제조를 위한 콘티퓨지 스트라투스(Contifuge Stratus) 원심분리기의 이용이다. 또한, 바람직하게는 원심분리의 속도가 5,000x g RCF 초과 26,000x g RCF 미만인 임의의 연속 유동 원심분리기이다. 바람직하게는, 연속 유동 원심분리력은 20시간 내지 4시간의 스핀 시간을 갖는 약 10,500x g to 23,500 x g RCF이며, 보다 긴 원심분리 시간에는 보다 낮은 원심분리력이 이용된다. 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터가 여과가능하지 않은 응집물을 형성하지 않도록 보다 농밀한 물질 (비 제한적 예는 수크로스이지만, 쿠션을 형성하는 다른 시약을 이용할 수 있으며, 이는 당업계에 널리 공지되어 있음)의 쿠션 상에서 원심분리될 수 있으며, 이는 바이러스 벡터 펠릿을 초래하는 것이 벡터를 수직 원심분리의 문제점이기 때문이다. 쿠션 상으로의 연속 유동 원심분리는 벡터가 대형 응집물 형성을 회피하는 것을 가능하게 하지만, 벡터가 렌티바이러스 벡터를 제조하는 형질감염된 대량의 물질로부터 고 수준으로 농축되는 것을 여전히 가능하게 한다. 또한, 수크로스의 덜-농밀한 제2 층을 이용하여 렌티바이러스 제조물을 묶을 수 있다. 연속 유동 원심분리에 대한 유속은 바람직하게는 분당 1 내지 100 mL이지만, 보다 높은 유속 및 보다 낮은 유속도 이용될 수 있다. 유속은 벡터가 높은 유속에 기인하여 소실되는 유의한 양의 벡터가 없이 원심분리기의 코어에 유입되도록 하는 충분한 시간을 제공하도록 조정된다. 보다 높은 유속이 요망될 경우, 연속 유동 원심분리로부터 유동하는 물질은 재-순환되고 원심분리기를 통해 제차 통과될 수 있다. 바이러스를 연속 유동 원심분리를 이용하여 농축시킨 후, 벡터를 점류 여과 (TFF)를 이용하여 추가로 농축할 수 있거나, TFF 시스템을 단순히 완충액 교환에 이용할 수 있다. TFF 시스템의 비-제한적 예는 GE-헬스케어(GE-Healthcare)에 의해 제조된 챔플러(Xampler) 카트리지 시스템이다. 바람직한 카트리지는 500,000 MW 이하의 MW 컷-오프를 갖는 것이다. 바람직하게는, 300,000 MW의 MW 컷-오프를 갖는 카트리지가 이용된다. 100,000 MW 컷-오프의 카트리지가 또한 이용될 수 있다. 보다 큰 부피를 위해, 보다 큰 카트리지를 이용할 수 있으며, 이는

당업자가 벡터 제조물의 최종 충전 전에 상기 최종 완충액 교환 및/또는 농축 단계를 위한 올바른 TFF 시스템을 용이하게 발견하도록 할 것이다. 최종 충전 제조물은 벡터를 안정화시키는 인자를 함유할 수 있으며, 당이 일반적으로 사용되고 당업계에 공지되어 있다.

<118> 백신 및 HIV 요법

<119> 종양 세포는 세포 표면 상에 종양-특이적 항원을 발현하는 것으로 공지되어 있다. 상기 항원은 이들이 숙주에 통상적으로 존재하는 종양유전자 또는 다른 세포 유전자의 유전자 생성물을 제시하고, 따라서 명백하게 비-자가성으로 인식되지 않기 때문에, 거의 면역원성이 아닌 것으로 여겨진다. 많은 조사자가 다양한 종양 특이적 항원으로부터의 에피토프에 대해 면역 반응을 표적화하려고 시도했지만, 어느 누구도 생체내에서 적당한 종양 면역성을 유도하는데 성공하지 못했다. 과거 30년에 걸쳐, 문자 그대로 수 천 개의 특허가 백신 제조물로서 종양 세포 항원을 투여했지만, 상기 시도의 결과는 종양 세포 면역화가 유효한 백신의 설계 또는 구축을 위한 타당한 근거를 제공하는데 실패했음을 입증하였다. 환자가 종양-특이적 항체 또는 세포독성 T-세포를 발현하는 경우에도, 상기 면역 반응은 관련된 질환의 억제와 상관되지 않는다. 이렇게 면역계가 숙주를 보호하지 못하는 것은 거의 면역원성이 아닌 종양 항원의 발현 또는 다양한 종양 세포에 의한 특이적 항원의 이중 발현에 기인할 수 있다. 종양 성장을 억제하는데 유효한 면역 반응을 유도하기 위한 종양 항원의 적절한 제시는 유효한 암 백신의 개발에 있어서 중점적인 논점으로 남아 있다. 또한, 항원 발현의 양 및 지속기간은 또한 비-렌티바이러스 벡터가 상기 발현을 최적화하지 않는 경향이 있는 경우 중요하다. 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하기에 충분히 강력한 면역 반응을 유도하는 방식으로 대상체의 면역계에 대해 거의 면역원성이 아닌, "자가" 항원으로 공지된 종양 항원의 제시 방법에 대한 큰 요구가 남아 있다. 본 발명은 생체내에서 면역 반응을 생성하여 종양 세포를 억제할 수 있는 케모카인 및 종양 항원을 포함하는 융합 단백질을 제조함으로써, 당업계의 이전의 한계 및 단점을 극복한다. 본 발명은 또한 HIV 감염의 치료 또는 예방용 백신으로서 유효한 케모카인 및 HIV 항원을 포함하는 융합 단백질을 제공함으로써, HIV 백신 개발 분야의 이전의 단점을 극복한다. 또한, 보다 안전한 렌티바이러스 벡터의 구축 방법, 렌티바이러스 벡터의 정제 방법, 및 단백질-단백질 상호작용의 검출용의 렌티바이러스 벡터의 신규한 사용 방법이 제공된다.

<120> 본 발명은 또한 하기 단백질로부터 유래된 하기 펩티드의 임의의 조합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 HIV 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공한다: 케모카인, 자살 유전자, HIV 단백질, 사이토킨, 세포 표면 단백질, 종양 항원, 또는 세포로부터 HIV의 생성에 영향을 주는 임의의 세포성 유전자 (세포성 유전자를 과발현하거나 RNAi 등에 의해 그의 발현을 억제함으로써) (모두는 렌티바이러스 벡터로부터 제공되고 발현됨).

<121> 또다른 바람직한 실시양태는 인간 케모카인 및 바이러스 또는 박테리아 항원 (예를 들어 HIV, 디프테리아 독소 항원), 케모카인 (예를 들어 IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP 1, RANTES, SDF-1, MIG 및/또는 MDC) 또는 프로-아포토시스 단백질, 자살 유전자 단백질, 또는 감염성 반응을 촉진하는 단백질의 임의의 개별물 또는 조합을 포함하는 천연 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는, 치료 용도를 위한 렌티바이러스 벡터이다.

<122> 또한, 본 발명은 렌티바이러스 벡터로부터 발현된 개별 또는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 단백질 또는 핵산으로서, 케모카인 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 항원 또는 케모카인, 프로-아포토시스 유전자, 자살 유전자 및 종양 항원을 포함하는 본 발명의 임의의 개별 또는 융합 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 면역 반응의 생성 방법을 제공한다. 또한, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 단백질 또는 핵산으로서, 케모카인 및 종양 항원을 포함하는 본 발명의 임의의 개별 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암의 치료 방법이 제공된다.

<123> 또한, 하기 단백질로부터 유래된 하기 펩티드의 임의의 조합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 HIV 감염의 치료 또는 예방 방법이 제공된다: 케모카인, 자살 유전자, HIV 단백질, 사이토킨, 세포 표면 단백질, 종양 항원, 또는 세포로부터 HIV의 생성에 영향을 주는 임의의 세포성 유전자 (세포성 유전자를 과발현하거나 RNAi 등에 의해 그의 발현을 억제함으로써) (모두는 렌티바이러스 벡터로부터 제공되고 발현됨).

<124> 본 발명은 또한 HIV 벡터 세포가 HIV 감염된 개체의 신체에서 발견된 감염성 또는 결합성 HIV 입자로 감염될 경우 HIV 입자의 생성이 가능한 HIV 벡터를 제공한다. 벡터는 야생형 HIV 입자보다 덜 병원성이거나 바람직하게는 비-병원성인 바이러스 입자를 조래하는 하기 세포성 숙주 인자의 천연 또는 돌연변이 형태를 억제하거나 과발현하는 서열을 함유한다. 이로는 예를 들어, APOBEC 족 구성원 (APOBEC 1, 2, 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, CEM15/Apobec-3G), AID, ACF, Tsg101, Vps 4, Vps 28, Vps 37, Vps 32, ESCRT-1, ESCRT-2, ESCRT-3, TRBP-1, Sam68, KH 도메인을 함유하는 단백질, 바이러스 입자의 이량체화 및 성숙에 관여하는 세포성 단백질, Hck, 세포



간 세포 부착 분자 (ICAM), 예를 들어 ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 및 ICAM-5; 백혈구 기능-관련된 항원-1 (LFA-1) 및 대식세포 항원 1 (Mac-1), Trim5-알파, Trim1, 인간 CRM1, 세포성 프리온 단백질 (PrP), E2F-4, 시클로필린 A, JAK/STAT 경로의 구성원, TIP30, 인간 Rev-상호작용 단백질 (hRIP), 글리코실-포스파티딜이노시톨 (GPI)-부착된 단백질, CD4, CD36, PRP4, HSP27, HSP70, p38 MAPK, 미토겐-활성화된 단백질 (MAP) 키나제 상족의 임의의 구성원, Tip 110, TGF베타-1, MCP-1, 인터페론 조절 인자 (IRF), IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7; RA5, SDF-1알파, CCR5, CXCR4, TNF 수용체 상족 (TNFRSF), CD40 리간드 (CD40L, CD 154 또는 TNFSF5로도 지칭됨), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-14, IL-15, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, TNF-알파, 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴, 줄기 세포 인자, flk2/flt3 리간드 및 이중 리보핵단백질 A2를 들 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 상기 가특히 출원의 어딘가에 논의되어 있는 유전자의 임의의 조합물 또는 유전자 발현의 억제제를 포함할 수 있다. 렌티바이러스 벡터에서 발현되는 유전자의 바람직한 조합은 IFN-알파 및 IFN-베타이다. 추가의 바람직한 조합은 동일한 mRNA로부터 유전자 둘다의 번역을 가능하게 하는 IRES 요소 또는 격자이동 돌연변이에 의해 분리된 IFN-알파 및 IFN-베타를 발현하는 렌티바이러스 벡터이다.

<125> 세포의 제거 방법

<126> 본 발명은 또한 렌티바이러스 벡터를 이용한 세포의 (예를 들어, 생체내 또는 시험관내에서의) 제거 (예를 들어, 퍼징) 방법을 제공한다. 이러한 렌티바이러스 벡터는 표적 세포에서 발현될 경우 세포 사멸을 유발하는 세포독성, 세포종식억제성 또는 자살 유전자를 포함할 수 있다.

<127> 예를 들어, 본 발명은 정상 세포보다는 종양 세포, 특히 렌티바이러스 벡터를 비롯한 임의의 벡터로 형질도입시키기 매우 어려운 조혈 줄기 세포 내로 선택적으로 감염되고 통합되는 렌티바이러스 벡터를 제공한다. 사실, 조혈 줄기 세포의 85% 초과까지의 효능의 유효한 형질도입은, 특정 줄기 세포 인자의 존재하에서 다중 형질도입으로만 달성될 수 있었다 (문헌 [Davis et al Blood 2004]). T 세포의 90% 초과 형질도입은 특정 인자로 T 세포를 자극한 후에만 달성될 수 있었다 (문헌 [Humeau et al 2004]). 따라서, 본 발명은 렌티바이러스 벡터를 이용하여 정상 세포보다는 종양 세포 내로 유전자를 선택적으로 전달하여 종양 세포의 조혈 세포 (및 다른 세포) 이식물을 퍼징하여 재발성 질환의 가능성을 감소시킨다. 유전자는 세포성 아포토시스를 유도하는 유전자 또는 번역 반응을 자극하는 유전자인 "자살 유전자"일 수 있다. 대안적으로, 그의 생성물이 분열하는 세포를 위한 조건부 치사 메커니즘을 제공하는 유전자 또는 코딩 서열이 선택될 수 있다. 이러한 방식으로, 특정 단백질의 발현, 및 후속 치료는 신생물 세포의 치사에 유효하다. 후속 치료는 화학적 및 물리적 치료를 포함한다. 화학 치료용 작용제는 유전자 생성물과 반응하여 숙주 세포를 치사시키는 효소 또는 다른 성분의 사용을 포함한다. 물리적 치료는 세포를 방사선, UV 광 등에 적용시키는 것을 포함한다. 방법은 구체적으로 오염 세포 (제조물 오염시킬 수 있거나 부작용을 제공하는 잠재성을 갖는 세포 또는 종양 또는 악성종양, 전-악성종양, 원종양원성, 종양원성 또는 임의의 비정상적 세포 유형을 포함하나, 이에 제한되지 않음)에 대한 번역 반응을 퍼징하거나 자극할 수 있는 당해 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 이용하여, 상기 방법은 (1) 이식물에서 정상 세포가 오염 세포보다 적은 빈도로 렌티바이러스 벡터로 형질도입되는, 99% 초과 오염 세포가 렌티바이러스 벡터로 형질도입되는 시기 동안 오염 세포의 퍼징되어야 할 세포 제조물에 벡터를 첨가하고; (2) 세포 제조물을 필요로 하는 환자에게 세포 제조물을 투여하는 것을 포함한다. 대안적으로, 세포를 세척하여 과량의 벡터를 제거할 수 있지만, 이는 필수적이지는 않다. 벡터는 또한 정상 세포보다는 종양원성 세포에서 GOI mRNA의 안정성을 촉진하는 시스 작용 서열, 또는 종양원성 세포보다는 정상 세포에서 GOI mRNA의 불안정성을 촉진하는 시스 작용 서열로 또는 종양 세포에서 보다 특이적으로 발현되는 프로모터 하에서 렌티바이러스 벡터가 함유된 '당해 퍼징 유전자' (GOI)를 발현할 수 있다. 유도성 프로모터 시스템과 같은 다른 프로모터 시스템도 협력적으로 이용될 수 있다. 상기의 예는 테트라시클린 유도성 프로모터 시스템이다.

<128> 본 발명에 사용될 수 있는 몇몇 유형의 유전자가 있다. 예를 들어, 단순 헤르페스 바이러스 제I형 (HSV-1), 티미딘 키나제 (TK) 유전자는 분열하는 세포를 위한 조건부 치사 메커니즘을 제공한다. HSV-1-TK의 사용의 선택적 이점은 효소가 포유동물 TK보다 아시클로비어, 간시클로비어 및 FIAU와 같은 특정 뉴클레오시드 유사체에 대해 보다 높은 친화도를 갖는다는 사실로부터 유래되었다 (문헌 [McLaren et al., In: Herpes Virus and Virus Chemotherapy, R. Kono, ed., pp. 57-61, Amsterdam, Elsevier (1985)]). 상기 약물은 뉴클레오티드-유사 전구체로 전환되고, 복제하는 세포의 DNA 내로 혼입되므로, 게놈의 통합을 교란시키고, 궁극적으로 세포 사멸을 유발한다. 몇몇 연구는 트랜스제닉 마우스의 개발 연구에서 (문헌 [Borrelli et al., Nature 339:538-541 (1983)]; [Heyman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2698-2702 (1989)]), 배양된 세포에서 비-균일한 재조합 사건에 대한 선택가능한 마커로서 (문헌 [Capecchi, M. R., Trends in Genetics 5 (3):70-76 (1989)]),

야생형 헤르페스 바이러스를 갖는 세포를 치사시키기 위해 (문헌 [Corey and Spear, N. Engl. J. Med. 314:686-691 (1986)]; [Corey and Spear, N. Engl. J. Med. 314:749-756 (1986)]), 및 TK 활성이 없는 헤르페스 바이러스 돌연변이체를 선택하는데 있어서 (문헌 [Coen et al., Science 234:53-59 (1986)]), TK의 조건부 독성을 성공적으로 이용하였다. 다른 "자살 유전자"가 이용가능하며 (예를 들어, <http://www.zgene.net/technology.html>), TK의 사용은 제한적인 예를 의미하지 않는다. 아폽토시스 유전자는 또한 조합으로 또는 단독으로 이용될 수 있다. 그 예로는 TNF 리간드 족: LTA (TNF-b), LTB (LT-b), TNF (TNF- $\alpha$ ), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (Apo3L), TNFSF13 (APRIL), TNFSF14 (HVEM-L). TNF 수용체 족: LTBR, TNFRSF1A (TNFR1), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF4 (OX40), TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB), TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF10C (DcR1), TNFRSF10D (DcR2), TNFRSF12 (DR3), TNFRSF14 (HVEM). Bcl-2 족: BAD, BAK1, BAX, BCL2, BCL2A1 (bcl-1), BCL2L1 (bcl-x), BCL2L11 (bim-유사 단백질), BCL2L2 (bcl-w), BIK, BLK, BNIP3 (nip3), BOK (Mtd), HRK, MCL-1. 카스파제 족: CASP1, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, CASP13, CASP14. IAP 족: BIRC1 (NIAP), BIRC2 (IAP2), BIRC3 (IAP1), BIRC4 (XIAP), BIRC5 (서르비빈(Survivin)), BIRC6 (브루스(Bruce)). TRAF 족: TANK (1-TRAF), TRAF1, TRAF2, TRAF3 (CRAF1), TRAF4, TRAF5, TRAF6, TRIP. CARD 족: APAF1, ASC, BCL10 (HuE10), NOD1 (CARD4), NOL3 (Nop30), RIPK2 (CARDIAC). 사멸 도메인 족: CRADD, DAPK2, FADD, MYD88, RIPK1. 사멸 효과기 도메인 족: CASP8AP2 (FLASH), CFLAR (CASPER), FADD, LOC51283 (BAR). CIDE 도메인 족: CIDEA, CIDEB, DFFA, DFFB. p53 및 ATM 경로: ATM, CHEK1 (chk1), CHEK2 (chk2, Rad53), GADD45A, MDM2, P63, RPA3, TP53 (p53)을 들 수 있다.

<129>

면역원성 또는 사이토킨 유전자는 또한 단독으로 또는 자살 또는 아폽토시스 유전자와 조합으로 이용될 수 있다. 이러한 유전자의 예로는 어댑터 단백질: FADD, IRAK1, IRAK2, MYD88, NCK2, TNFAIP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6. 세포 표면 수용체: ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10. 케모카인 수용체: BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1. 사이토킨 수용체: AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TGF $\beta$ 1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R, TGFB2R, TGFB3R, TH1L, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, RNFI10 (ZNF144). 신호 형질도입 단백질: CABIN1, CALM1, CALM2, CALM3, CAMK2B, CAMK4, CDC25A, CDKN1A, CDKN2B, CHUK, CSNK2A1, CSNK2B, ENG, EVI1, GSK3A, GSK3B, IKBKB, IKBKE, IKBKG, IL18BP, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, KPNA5, KPNB3, LAG3, LAT, MADH1, MADH2, MADH3, MADH4, MADH5, MADH6, MADH7, MADH9, MAP2K4, MAP2K7, MAP3K1, MAP3K2, MAP3K7, MAP3K7IP1, MAP3K14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MAPK10, MAPK14, MHC2TA, NAP4, NBL1, NMA, NUP214, PAK1, PLAU, PPP3CB, PPP3CC, PPP3R1, PTPRC, RIPK1, SERPINE1, SLA, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS7, TBK1, TIMP1, TRPV6, TSC22, TYK2, VAV1, VAV2, VAV3, XPO5. 반응성 유전자 및 다른 관련된 유전자: AGT, BAD, BCL2, BCL3, BF, C3, CHRD, CKTSF1B1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, FST, HRAS, ICAM1, ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, IGFBP3, IGSF6, ITGB5, ITGB7, IVL, MGC27165, MYF5, NCAM1, NOS2A, ORM1, PIN1, RFX1, RFX2, RFX3, RFX4, RFX5, RFXANK, RFXAP, RFXDC1, SAA1, SELE, SELL, SELPLG, SFN, TGIF, VCAM1. 전사 인자: ATF2, CEBPB, CREB1, CREBBP, EGR1, EGR2, EGR3, ELK1, ELK3, EP300, FKBP1B, FLJ14639 (NIP45), FOS, FOSL1, FOSL2, FOXP3, GATA3, GATA4, GRLF1, ICOS, IRF1, JUN, JUNB, JUND, MAF, MAX, MEF2A, MEF2B, MEF2D, MYC, NFAT5, NFATC1, NFATC2, NFATC3, NFATC4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIB, NFKBIE, NFKBIL1, NFKBIL2, NFKB, RAF1, REL, RELB, RUNX1, RUNX2, SP1, SP3, SRF, STAT1, STAT4, STAT6, TFCP2, YY1을 들 수 있다.

<130>

자살 유전자 요법은 또한 프로드러그에 의해 유도된 아폽토시스에 대한 표적 세포의 감수성을 증가시키는데 이용될 수 있는 프로드러그-활성화 유전자 요법으로 지칭될 수 있다. 렌티바이러스 벡터를 이용한 자살 유전자의

도입은 표적화된 조직에 대한 독성 약물 대사물의 생성을 제한하는, 편재화된 프로드러그 활성화에 대한 능력을 갖는 종양 세포를 제공한다. 자살 유전자 요법 시스템으로는 예를 들어 항바이러스 프로드러그 간시클로비어와 조합된 HSV-tk, 및 프로드러그 5-플루오로시토신과 조합된 박테리아 유전자 시토신 데아미나제를 들 수 있다. 또한, 시클로포스파미드 및 그의 이성질체 이포스파미드와 같은 다양한 항암 프로드러그와 조합될 수 있는 시토크롬 P-450 효소가 이용될 수 있다.

<131> 높은 사망률을 갖는 동종 이식의 부작용인 이식편 대 숙주 ("GVH") 질환의 치료용 벡터를 이용하려는 시도가 과거에 있었다. 이는 공여자 림프구의 높은 형질도입 효율이 달성될 수 없거나, 이식편 대 숙주 질환을 담당하는 세포가 효과적으로 표적화될 수 없었기 때문에 실패했다. 본 발명은 결점 둘다를 겨냥한 렌티바이러스 형질도입 벡터의 용도를 제공한다. 본 발명은 동종 이식 동안 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)의 치료를 위한 새로운 전략을 제공한다. 현재, 동종 이식은 공여자로부터의 림프구가 숙주를 외래물질로서 인식하고 정상적인 숙주 조직을 파괴하기 시작하는 이식편 대 숙주 질환에 기인한 높은 사망률을 초래한다. 공여자로부터의 림프구가 종양 세포를 효과적으로 파괴할 수 있는 반면, GVHD 부작용은 다양한 형태의 암을 치료하는 수단으로서 동종 및 비관련 공여자 이식을 방지한다. 본 방법은 이식편 대 숙주 질환의 치료 또는 예방을 위해 렌티바이러스 벡터를 이용한다. 방법은 공여자 림프구 집단을 형질도입시키는데 사용되는 자살 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 이용한다.

<132> 다른 전략으로는 유도성 프로모터를 발현하는 생존 인자에 대한 아포토시스 유전자 또는 RNAi의 발현을 들 수 있다. 기재된 페이로드를 비-제한적 예이며, 임의의 유전자 또는 유전자 침묵화 서열은 장래에 일부 지점에서 세포를 단순히 치사시키는 것보다는, 동종 T 세포의 기능을 조절하는데 이용될 수 있다. 방법은 자살 유전자 또는 유도성 세포 사멸 유전자 또는 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 이용한 형질도입 이전에 또는 그 동안, 항-CD3 및 항-CD28 항체로 공여자 림프구를 자극한다. 자극은 렌티바이러스 벡터를 이용한 림프구 집단의 높고 심지어 완전한 형질도입을 가능하게 할 것이다. 따라서, 일단 형질도입된 세포가 환자에게 주입되면, 동종이식 유발된 GVHD의 경우, GVHD는 GVHD를 매개하는 림프구의 세포 치사를 유도하는 프로드러그로 치료될 수 있다. 프로드러그의 수준은 또한 이식편 대 종양 효과가 유지될 수 있도록 투여량 의존적 방식으로 GVHD를 감소시킬 수 있다.

<133> 림프구 또는 말초 혈액 세포 집단의 바람직한 치료 방법은, 이것이 GVHD의 매개자인 동종반응성 T 세포이기 때문에, 상기 세포를 벡터로 보다 특이적으로 표적화하는 것이다. 렌티바이러스 벡터는 보다 활성화된 세포를 보다 효과적으로 형질도입시키는 것으로 공지되어 있기 때문에, 동종반응성 T 세포는 이들이 동종반응성이 아닌 T 세포에 대해 선택적으로 활성화될 경우 렌티바이러스 벡터로 보다 효과적으로 형질도입될 것이다. 동종반응성 T 세포의 특이적 활성화는 공여자 림프구 (또는 백혈구 또는 CD4 T 세포)를 수여자 세포 (백혈구, 적혈구 또는 다른 수여자 세포; 세포는 조사되거나, 세포 성장을 치사하거나 방지하도록 처리될 수 있음) 또는 수여자의 세포의 추출물과 혼합하고, 동시에, 세포의 혼합에 의해 자극되지 않는 비-동종반응성 세포가 아니라 동종반응성 세포를 선택적으로 형질도입시키는 적절한 MOI (감염 다중도)로 벡터를 집단에 첨가함으로써 달성될 수 있다. 바람직한 방법은 상기 세포가 부 MHC 항원을 비롯한 MHC 항원을 발현할 때 수여자의 적혈구 세포를 공여자 림프구와 혼합하는 것이며 (문헌 [Zimring et al., Blood. 2006 Jan 1;107(1):187-9]), 이는 핵제거될 때 벡터로 안정하게 형질도입되지 않을 세포가 아니다. 당업자는 리포터 발현 벡터를 이용하여 어느 세포가 형질도입되었는지를 측정하여 상기 MOI를 용이하게 측정할 수 있다. 적혈구 세포를 공여자 림프구와 혼합하고, 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨 후, 림프구를 세척하고, 바람직하게는 적혈구로부터 단리한 후, 환자에게 주입한다. 림프구로부터의 적혈구 세포의 분리는 비드 분리 또는 피콜 구배 원심분리를 비롯한 몇몇 기술에 의해 달성될 수 있으며, 당업계에 통상적으로 공지되어 있다. 자극을 위해 다른 세포 유형에 비해 단리된 적혈구 세포를 사용하는 것의 이점은, (1) 이들이 용이하게 이용가능하고, (2) 이들이 자극 후 용이하게 제거되고, (3) 이들이 성장하지 않으며 따라서 공여자 림프구의 지연된 자극에 기여하지 않고, (4) 이들이 벡터로 형질도입되지 않는다는 점이다. 형질도입된 동종반응성 세포는 환자에게 주입 전 또는 주입 후 시험관내에서 파괴될 수 있다. 대안적으로, 세포는 또한 환자 특이적이며 환자의 특정 부 또는 주 조직적합성 복합체 (MHC) 유전자로부터 유래된 세포 추출물 또는 펩티드로 자극될 수 있다. 특이적 MHC 유전자를 발현하는 추출물 또는 펩티드/단백질의 제조는 당업계에 공지되어 있다. 바람직하게는, 추출물은 동종-특이적 세포가 질환 관련된 항원에 대해 특이적인 세포보다 특이적으로 형질도입되도록 비-종양 조직으로부터 유래된다. 추출물 또는 펩티드/단백질을 공여자 세포 상에서 펄싱하여 렌티바이러스 벡터에 의한 유효한 형질도입을 가능하게 하는 동종반응성 세포를 자극한다. 벡터로 형질도입한 후, 세포를 세척한 후, 동결 또는 환자예의 주입용으로 준비할 수 있다. 환자에게 주입하기 전 단기간 동안 IL-2에서 세포를 배양하는 것이 바람직할 수 있다.



- <134> 대안적인 T 세포의 형질도입 방법은 혼합된 림프구 집단에서 가용성 CD3, IL-2 (또는 2가지 가용성 인자의 조합, 또는 하나의 가용성 및 하나의 고정된 인자 또는 리간드의 조합)을 이용한다. 렌티바이러스 벡터를 가용성 CD3 및 IL-2의 존재하에서, 구체적으로는 정제된 CD4 T 세포의 집단에 첨가하는 것이 아니라, 림프구의 집단에 첨가한다. 대안적으로, 가용성 CD3 및 IL-2는 본 출원의 어딘가에 기재된 바와 같이 중재자 벡터로부터 발현될 수 있다. 혼합된 림프구 환경은 이것이 세포에 첨가될 경우 CD3 및 IL-2 이외에 세포를 자극하는 작용을 하여 렌티바이러스 벡터에 의한 고 효율 형질도입을 가능하게 한다. 이러한 렌티바이러스 벡터에 의한 T 세포의 형질도입 방법은 유전적, 감염성 및 종양원성 질환의 치료를 포함하나 이에 제한되지 않는 광범위하게 다양한 적용을 위해 폭넓게 이용될 수 있다.
- <135> 또한, 자살 또는 안정성 유전자(들)를 세포 내로 임의로 혼입하는 방법은 광범위한 적용을 갖는다. 한 가지 비-제한적 적용은 자살 유전자와 조합으로 질환을 갖는 세포에 대해 표적화된 천연 또는 키메라 T 세포 수용체의 렌티바이러스 벡터 매개된 발현의 조합이다. 이러한 유전적으로 변형된 세포 (자가유래성이거나 불멸화 세포로부터 유래될 수 있음)는 암 세포 또는 병원체로 감염된 세포와 같은 질환 세포에 귀환할 수 있으며, 그 후 T 세포 및 구경꾼 효과 둘다를 제거하고, 암, 감염된 세포 또는 질환을 갖는 세포를 치사시키는 프로드러그로 환자를 치료할 수 있다. 이러한 접근법은 단독으로, 또는 본 출원에 기재된 임의의 다른 접근법과 조합으로 이용될 수 있다.
- <136> 상기 방법의 한 가지 비-제한적 예는 렌티바이러스 벡터 형질도입된 세포를 치사시키거나 파괴할 수 있는 유전자를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 이용한다. 바람직하게는, 유전자는 유도성 방식으로 발현되고/거나 유전자는 프로드러그의 존재하에서만 활성화된다. 이용가능한 많은 유도성 프로모터가 있으며, 비-제한적 예는 테트라시클린 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터이다. 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 및 드로소필라(Drosophila) Dm-dNK 키나제 유전자를 비롯한 이용가능한 많은 자살 유전자가 있으며, 이는 상기 유전자로 형질도입된 세포를 프로드러그에 대해 감작화시켜 약물이 시험관내 또는 생체내로 도입된 후 세포 치사 또는 사멸을 유도한다. 프로모터 유도성 유전자 침묵화 서열은 또한 세포 사멸을 유도하는데 이용될 수 있다.
- <137> 본 발명은 또한 자살 유전자의 프로모터 특이적 발현에 의한 혈액 질환의 치료 방법을 제공한다. 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 및 드로소필라 Dm-dNK 키나제 유전자를 비롯한 이용가능한 많은 자살 유전자가 있으며, 이는 상기 유전자로 형질도입된 세포를 프로드러그에 대해 감작화시켜 약물이 시험관내 또는 생체내로 도입된 후 세포 치사 또는 사멸을 유도한다. 기능 유전체학의 신규한 방법은 질환을 갖는 세포에서 전사 활성 또는 전사후 mRNA 생존이 증가된 유전자를 확인하였다. 질환을 갖는 세포의 이러한 고유한 기여는 상기 질환의 치료를 위한 렌티바이러스 벡터 전략을 개발하는데 이용될 수 있다. 방법은 조직 특이적 방식으로 자살 유전자를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 사용한다. 비-제한적 예는 렌티바이러스 벡터가 B-세포 관련된 백혈병 및 림프종의 치료를 위한 CD19 B 세포 특이적 프로모터의 제어하에서 드로소필라 Dm-dNK 키나제 유전자를 발현할 수 있는 것이다. 상기 렌티바이러스 벡터는 골수 이식에 의해 줄기 세포로 전달된다. 재발성 백혈병의 발달시, 환자에게 프로드러그를 투여하며, CD1를 발현하는 모든 세포 (모든 B 세포)는 치사될 것이다. 공격성 암을 갖는 환자에서, 기능성 B-림프구의 소실은 내성이 되며, 환자에게 이뮤노글로불린을 정맥내로 보충할 수 있다. 재발성 B-세포 관련된 종양 세포를 치사시킴으로써 환자의 생명이 보호된다. 상기 전략은 정상 B 세포에서가 아니라 종양에서만 발견되는 프로모터 또는 전사후 요소를 사용함으로써 종양 세포 유형에 보다 특이적이 될 수 있다.
- <138> 표적 세포의 제거는 또한 자살, 세포독성 및 세포증식억제성 유전자에 작동적으로 연결된 조직-특이적 프로모터를 포함하는 세포 내로 유전자 카세트를 형질도입시키는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 조혈 줄기 세포는 내피 세포 프로모터로부터 특이적으로 발현되는 자살 유전자로 형질도입될 수 있다. 일부 줄기 세포가 내피 세포로 분화될 경우, 상기 세포는 자살 유전자를 활성화시키는 프로드러그에 의해 특이적으로 치사될 수 있다. 최근에, 암의 치료를 위한 골수 이식 동안, 암 세포로부터의 혈관 내피는 골수 세포로부터 유래됨이 밝혀졌다. 따라서, 이를 트로이 목마처럼 만듦으로써, 성장하고 전이를 형성하는데 필요한 내피 종양을 치사시킬 수 있다. 유사하게, 줄기 세포가 치료적으로 사용될 경우 (예를 들어, 심장, 췌장, 간, 신경, 혈관 등의 조직을 재생하기 위해), 바람직하지 않은 전환분화 사건은, 바람직하지 않은 세포 유형에서 발현될 경우 그의 사멸을 초래하는 유전자 카세트로 줄기 세포를 형질도입시킴으로써 제어될 수 있다.
- <139> 렌티바이러스 벡터의 용도
- <140> 렌티바이러스 벡터, 특히 HIV 벡터는 다양한 표현형을 갖는 세포의 라이브러리를 생성하여 다양한 약물 및 생물질의 특이성 및 안전성을 특이적으로 시험하는 시스템의 잠재성을 실현할 수 있다.

- <141> HIV 벡터, 패키징 플라스미드 또는 패키징 세포주를 이용하여 미지의 기능의 샘플 핵산의 기능을 고 처리량 설정으로 직접적으로, 급속하게, 명확하게 측정하기 위해 이용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 방법은 cDNA, DNA, EST, 유전자, 합성 올리고뉴클레오타이드, shRNAi, ddRNAi, 또는 핵산의 라이브러리의 세트를 기능성 HIV 단백질로서 발현되는 HIV 유전자가 없는 HIV 벡터 플라스미드 내로 삽입함으로써 플라스미드 형태로 벡터를 구축하는 단계, HIV 벡터 플라스미드를 헬퍼 플라스미드(들)로 HIV 벡터의 복제 및 패키징에 필요한 보완 성분을 갖는 세포주 또는 패키징 세포주 내로 공동-형질감염시키는 단계를 포함한다. 결과는 바람직하게는 96 및 384 웰 형식, 어레이, 슬라이드 상으로의 프린팅 벡터, 및 유사한 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 축소된 고 처리량 설정으로 재조합 HIV의 세트 또는 라이브러리를 제조하는 것이다. 샘플 핵산에 의해 코딩된 생성물(들)을 확인하고 기능을 지정하기 위해, 숙주 또는 숙주 세포를 고 처리량 설정으로 샘플 핵산의 생성물(들)을 발현하는 재조합 HIV 벡터로 형질도입시키고, 그에 의해 숙주의 표현형을 변경시킨다.
- <142> 바람직한 실시양태는, 헬퍼가 패키징된 벡터 입자가 벡터 증폭을 위해 이웃 세포를 감염시키거나 형질도입시키는 것을 가능하게 하는 외피 유전자를 발현하는 세포 또는 패키징 세포주 내로 형질감염되거나 형질도입된 cDNA 또는 RNAi 라이브러리를 함유하는 HIV 벡터이다. 패키징 세포 또는 패키징 세포주 내로 초기에 형질감염되거나 형질도입된 각각의 벡터가 동일할 경우, 보다 효과적으로 제조된 상기 벡터는, 효과적으로 제조되지 않은 상기 벡터보다 급속하게 증폭될 것이다. 그 후, 각각의 샘플에서 벡터 역가를 다양한 방법에 의해 분석할 수 있다. 이러한 방법의 하나는 당업계에 널리 공지된 분석인 ELISA 분석이며, 분석되어야 할 단백질은 세포의 배지 중 HIV로부터의 p24 항원이다. 어느 클론이 HIV 벡터를 보다 효과적으로 생성하는지를 측정하는데 이용될 수 있는 다른 분석은 벡터에서 코딩된 녹색 형광 단백질과 같은 형광측정 방법을 이용하는 것이다. 형광 단백질의 사용을 위한 바람직한 실시양태는 동일한 프로모터를 밖에서 및 동일한 mRNA 내에서 cDNA 및 형광 단백질을 발현하고, 번역 개시 서열에 의해 분리하여 제2 유전자 생성물의 번역을 개시하는 것이다. 이러한 번역 개시 서열은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 내부 리보솜 유입 부위 (IRES) 서열은 통상적으로 이용되는 것이다. 일반적으로, IRES로부터의 하류 유전자로부터의 발현은 상류 유전자로부터의 발현만큼 효과적이지 않다. 하류 유전자의 발현 수준이 수용가능한 것보다 낮을 경우, 전사후 조절 요소 (PRE)를 하류 유전자의 원위에 삽입하여 그의 발현을 증가시킬 수 있다. 방법은 HIV에서의 역전사효소 분자의 입증된 오류 및 HIV의 재조합하는 능력에 기인하여 변형된 친화성을 갖는 벡터 외피 단백질을 생성하기 위해 변형될 수 있다. 각각의 증폭 라운드 동안, HIV 벡터는 그의 게놈 내에 오류를 생성하며, 따라서 그에 함유된 외피 서열을 변형할 수 있고, 따라서 바이러스 벡터의 결합 친화도 및 가능한 친화성을 변화시킬 수 있다. 헬퍼 성분을 함유하는 패키징 세포주 (예를 들어, 특정 유형의 암 세포)로서 표적 세포를 이용함으로써, 상기 세포주에 대한 증가된 친화성을 갖는 벡터는 감소된 친화성을 갖거나 복제에 대해 결함성인 벡터에 반해 각각의 복제 라운드 동안 우선적으로 선택될 것이다. 선택 후, 변형된 외피를 외피 서열에 대해 5' 및 3'에 위치한 벡터 특이적 프라이머를 이용한 PCR에 의해 분리하고, 특성화할 수 있다. 외피 서열은 천연 외피 서열로 시작할 필요는 없지만, 당업계에 공지된 몇몇 기술에 의해 생성될 수 있는 외피 단백질 변이체의 라이브러리로 이루어질 수 있다. 선택 절차는 세포 배양에 제한될 필요는 없다.
- <143> 트랜스제닉 동물은 동물에서 HIV 벡터의 전체 동물 선택을 위한 패키징 성분으로 생성될 수 있다. 패키징 성분은 종 특이적으로 설계될 필요가 있을 수 있으며, 예를 들어 원숭이에서의 복제를 위해, SIV 패키징 유전자 (예를 들어, gag, pol, 조절 또는 보조 유전자)가 HIV 패키징 유전자에 바람직할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 전 달 벡터로서 HIV 게놈을 이용할 수 있다 (예를 들어, 패키징 서열, 임의로 rre 요소 및 그의 스플라이스 억셉터 서열, 외피 유전자 및 3' HIV-LTR을 함유하는, HIV gag의 비 코딩 부분 이하의 5' HIV - LTR). 조직 특이적 프로모터 하에서, 외피 유전자는 그 후 벡터의 동물에의 투여시 특정 기관 또는 조직에서 발현될 수 있다. 이러한 방식으로, 벡터의 패키징 및 이동화를 위한 특정 패키징 유전자를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하면 고도로 특이적인 표적화된 벡터를 생성할 수 있다.
- <144> 또다른 실시양태는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 유전자의 기능을 측정하는 공정의 자동화이다. 유전자의 기능을 측정하기 위해, cDNA 또는 RNAi의 세트를 HIV 벡터 내로 삽입하여, 각각 cDNA, RNAi 또는 cDNA 및 RNAi, 당해 특정 유전자에 대해 표적화된 2개의 RNAi를 발현하는 HIV 벡터의 라이브러리를 생성한다. 방법의 각각의 단계는 다중웰 형식으로 수행되며, 시스템의 용량을 추가로 증가시키기 위해 자동화될 수 있다. 이러한 고 처리량 시스템은 시험관내 및 생체내 둘다에서 인간 및 다른 유기체로부터의 다수의 샘플 핵산의 발현 분석을 용이하게 하며, 당 분야의 다른 이용가능한 기술에 비해 유의한 개선이다. 본 발명은 하나 이상의 샘플 핵산을 함유하는 재조합 HIV 벡터 라이브러리의 고-처리량 생성을 이용하며, 그 후 아데노바이러스 벡터 라이브러리를 숙주에서 고-처리량 스크리닝하여, 샘플 핵산의 발현 생성물(들)에 대한 기능을 지정하는 수단으로서 숙주의 표

현형을 변경시킨다. HIV 백터의 라이브러리는 핵산 구조물 및 상보성 패키징 세포를 이용한 고-처리량 설정으로 생성된다. 샘플 핵산 라이브러리는 별개의 확인된 또는 미확인된 서열의 세트일 수 있거나, 미확인된 또는 확인된 서열의 풀(pool)일 수 있다. 제1 핵산 구조물은 상대적으로 작으며, 샘플 핵산으로 어댑터 플라스미드 및 발현 카세트를 조작하기에 용이하다. 제2 핵산 구조물은 서로 및/또는 제1 구조물 내의 서열과 부분적으로 중첩되는 하나 이상의 핵산 분자를 함유하며, 어댑터 플라스미드 또는 패키징 구조물 또는 세포에 의해 제공되지 않는 재조합 HIV의 복제 및 패키징에 필요한 적어도 모든 HIV 백터 서열을 함유한다. 제1 및 제2 핵산 구조물의 패키징 세포 내로의 공동-형질감염은 제1 및 제2 핵산 구조물 내의 중첩 서열 사이, 및 하나 초과 핵산 분자로 이루어질 경우 제2 핵산 구조물 중에서 동종 재조합을 유발한다. HIV 백터 라이브러리는 그의 생물학적 활성의 검출 및 분석을 가능하게 하는 샘플 핵산에 의해 코딩된 생성물(들)의 충분한 발현을 가능하게 하도록 성장된 숙주 내로 고-처리량 설정으로 도입된다. 숙주는 시험관내에서 또는 동물 또는 식물 모델에서 배양된 세포일 수 있다. 샘플 핵산에 의해 코딩된 생성물(들)의 충분한 발현은 숙주의 표현형을 변경시킨다. 임의의 다양한 시험관내 및 생체내 생물학적 활성 분석을 이용하여, 변경된 표현형을 확인하고 분석하며, 그에 의해 샘플 핵산의 생성물(들)에 대한 기능을 지정한다.

<145> 현재 이용가능한 기술에 비해 본 발명은 몇 가지 이점을 갖는다. 전체 공정은 특히 96-웰 또는 다른 다중-웰 형식으로 증폭될 경우, 그 자체가 자동화된다. 다수의 상이한 시험관내 분석을 이용한 고-처리량 스크리닝은 상대적으로 짧은 기간에 기능 정보를 효과적으로 수득하는 수단을 제공한다. 시험관내 또는 동일계내에서 목적하는 표현형을 나타내거나 유도하는 재조합 HIV 백터 라이브러리의 구성원(들)을 확인하여 재조합 아데노바이러스 백터 또는 클론의 제어가능한 수로 라이브러리를 축약시키며, 이를 동물 모델에서 시험관내에서 시험할 수 있다. 본 발명의 또다른 특징적인 이점은 방법이 복제 경쟁성 렌티바이러스(RCL)-무함유 아데노바이러스 라이브러리를 생성한다는 점이다. 라이브러리 전체에 걸친 RCL 오염은, 특히 라이브러리가 다중 스크리닝 프로그램에 사용하기 위해 연속적으로 증폭될 경우 주요한 장애가 될 수 있다.

<146> 또다른 실시양태는 의도되는 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체 유전자를 갖는 글루타민 신테타제(GS) 유전자를 발현하는 렌티바이러스 백터이다. GS는 매우 중요한 대사물이며 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체의 높은 발현을 나타내는 세포의 강력한 선택을 초래한다고 공지되어 있다. HIV 백터는 동일한 백터 내에 재조합 단백질 유전자 및 GS 유전자를 함유할 것이다. 대안적으로, 재조합 단백질, GS 또는 재조합 단백질의 생성을 촉진하는 또다른 유전자를 함유하는 다수의 백터는 또한 본 발명의 바람직한 실시양태이다. 푸로마이신, 표면 마커 유전자 발현 및 다른 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 선택 방법이 이용될 수 있다.

<147> 본 발명은 또한 상기 기재된 고 처리량 방법을 이용하여 단백질, 백신 또는 모노클로날 항체의 생성 수율을 증가시키는 유전자의 단리 방법을 기재한다. cDNA 또는 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 또는 HIV 백터의 라이브러리는 별개의 렌티바이러스 또는 HIV 백터, 또는 cDNA 또는 RNAi(shRNAi 및 ddRNAi, 또는 리보자임, 안티센스, 압타머, 전이우성 돌연변이 단백질 등과 같은 유전자 발현의 다른 억제제 포함)의 라이브러리를 함유하는 백터 상에 발현된 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체로 구축된다. 백터를 제조하고, 단백질의 제조에 이용되는 세포에 첨가하고, 상기 기재된 고 처리량 형식을 이용하여 재조합 단백질을 발현하는 개별 세포를 클로닝한다. 단백질 생성의 양은 당업계에 공지된 방법에 의해 측정할 수 있으며, 높은 수준의 단백질을 발현하는 클론을 확인할 수 있다. 라이브러리로부터의 특이적 cDNA 또는 RNAi를 상기 기재된 바와 같은 백터 특이적 프라이머를 이용하여 증폭하고, 서열을 특성화할 수 있다. 그 후, 상기 cDNA 또는 RNAi는, 이를 모든 HIV 백터 구조물에 포함시킴으로써, 또는 확인된 cDNA 또는 RNAi를 현재 구조적으로 발현하는 세포주를 구축함으로써, 다른 단백질 또는 모노클로날 항체의 생성을 증가시키는데 이용될 수 있다.

<148> 본 발명의 또다른 측면은 의도되는 재조합 단백질, 모노클로날 항체 유전자 또는 백신을 갖는 프로테아제 유전자에 대해 표적화된 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 백터이다. 프로테아제는 정제 공정 동안 의도되는 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체의 생성을 유의하게 감소시키는 것으로 공지되어 있다. HIV 백터는 동일한 백터 내에 하나 이상의 프로테아제 유전자에 대한 재조합 단백질 유전자 및 RNAi를 함유할 것이다. 대안적으로, 재조합 단백질, 항-프로테아제 RNAi, 또는 정제 공정 동안 재조합 단백질의 생성을 촉진하는 또다른 유전자를 함유하는 다수의 백터는 또한 본 발명의 바람직한 실시양태이다.

<149> 본 발명은 또한 그의 정제 동안 생성에 영향을 주는 단백질을 억제함으로써 하류 정제 공정 동안 단백질 또는 모노클로날 항체의 생성을 증가시키는 유전자의 단리 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 기재된 고 처리량 방법을 그대로 따를 수 있다. cDNA 또는 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 또는 HIV 백터의 적어도 단일 라이브러리는, 별개의 렌티바이러스 또는 HIV 백터, 또는 cDNA 또는 RNAi의 라이브러리를 함유하는 백터 상에 발현된 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체로 구축된다. 백터를 제조하고, 단백질의 제조에 사용되는 세포에 첨가하고,



상기 기재된 고 처리량 형식을 이용하여 재조합 단백질을 발현하는 개별 세포를 클로닝한다. 그 후, 재조합 단백질 또는 모노클로날 항체를 정제하고, 당업계에 공지된 방법에 의해 수율을 측정한다. 고 생성의 단백질 또는 모노클로날 항체를 함유하는 특이적 세포주를 확인한다. 라이브러리로부터의 특이적 cDNA 또는 RNAi를 상기 기재된 바와 같은 벡터 특이적 프라이머를 이용하여 증폭하고, 서열을 특성화할 수 있다. 그 후, 상기 cDNA 또는 RNAi는, 이를 모든 HIV 벡터 구조물에 포함시킴으로써, 또는 확인된 cDNA 또는 RNAi를 현재 구조적으로 발현하는 세포주를 구축함으로써, 다른 단백질 또는 모노클로날 항체의 생성을 증가시키는데 사용될 수 있다.

<150> 실시양태는 또한 모노클로날 항체, 단백질 또는 백신을 생성하는 세포주의 잠재적인 바이러스, 프리온, 또는 오염물을 억제하는 cDNA 또는 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터이다. 한 가지 비-제한적 예는 단백질 발현 렌티바이러스 벡터에서 발현되고, 생물질의 제조 동안 제조물의 잠재적인 오염물인 소 해면상 뇌변증 작용제 또는 크로이츠펠트-야콥병 (CJD) 작용제에 대해 표적화된 RNAi이다. 항-BSE 또는 항-CJD RNAi의 발현은 BSE 또는 CJD 작용제에 의한 제조물의 오염에 대한 위험을 최소화시키고, 따라서 이러한 유전자조작된 생물학적 제조물의 안전성을 증가시킬 것이다. HIV 벡터는 재조합 단백질 유전자, 및 오염에 관여하는 하나 이상의 작용제에 대한 재조합 단백질 유전자 및 RNAi를 함유할 것이다. 대안적으로, 재조합 단백질, 항-작용제 RNAi, 또는 작용제의 복제를 억제하는 또다른 유전자를 함유하는 다수의 벡터는 또한 본 발명의 바람직한 실시양태이다. 본 발명은 또한 재조합 생성물의 생성 및 품질에 유해하거나 부정적인 것으로 여겨지는 임의의 유전자의 생성을 최소화하기 위한 유전자 또는 RNAi를 포함하도록 변형될 수 있다.

<151> 렌티바이러스 벡터는 또한 하나 또는 다수의 유전자의 과발현 또는 억제에 있어서 상이한 세포주의 라이브러리를 생성하는데 사용될 수 있다. 다수의 벡터 발현 유전자를 세포에 첨가하여 특정 표현형을 갖는 목적하는 세포를 수득한다. 마커 및 당해 유전자가 동일한 mRNA로부터 번역될 수 있도록, 예로서 상기 기재된 IRES 요소와 같은 요소를 이용하여 형광성 마커 유전자로부터 상류에서 유전자를 클로닝할 수 있다. 세포를 바람직하게는 상기 기재된 고-처리량 방법에 의해 클로닝하고, 유전자의 정확한 오염물을 갖는 세포를 과발현시키고, 다른 유전자를 RNAi 매개된 억제에 의해 하향-조절한다. 한 가지 바람직한 유전자는 출발 물질이 텔로머라제 역전사효소 (TERT)의 발현 또는 특허 (미국 특허 제6686159호 또는 제6358739호)에서 기재된 다른 방법과 같은 주요한 세포일 경우, 세포를 불멸화시키는 유전자일 수 있다. 그러나, 기존의 세포주를 비롯한 임의의 세포를 출발 물질로서 이용할 수 있다.

<152> 또다른 예시적인 실시양태는 당해 발현된 유전자 및/또는 유전자 발현의 억제제를 포함하는 다수의 렌티바이러스 벡터를 이용하여 세포를 유전적으로 변형시킨 후, 세포 클론을 고 처리량 방법을 이용하여 단리하여, 목적하는 유전자형 및/또는 표현형을 갖는 세포의 클론을 단리하는 것이다.

<153> 본 발명은 또한 다수의 렌티바이러스 벡터를 세포와 함께 배양하여 당해 유전자를 과발현하는 유전자, 및 당해 제2 유전자에 대한 적어도 제2 유전자 또는 적어도 억제제 서열을 과발현하는 유전자 둘다를 함유하도록, 이를 유전적으로 변형시키고, 그 후, 다수의 세포를 고 처리량 방법으로 단리하여, 목적하는 유전자형 및/또는 표현형을 갖는 세포의 클론을 단리하는 것을 포함하는, 당해 유전자 또는 그의 경로 내의 그의 발현 생성물 또는 하류 유전자 또는 단백질에 선택적으로 영향을 주는 시험 화합물의 확인 방법을 제공한다.

<154> 본 발명은 또한 포유동물 세포에서 단백질 또는 유전자 발현의 수준을 변경시키는 작용제의 확인 방법을 제공하며, 상기 방법은 당해 유전자를 과발현하는 유전자, 및 당해 제2 유전자에 대한 적어도 제2 유전자 또는 적어도 억제제 서열을 과발현하는 유전자 둘다를 함유하도록 이를 유전적으로 변형시키고, 그 후, 다수의 세포를 고 처리량 방법으로 단리하여 목적하는 유전자형 및/또는 표현형을 갖는 세포의 클론을 단리하고, 그 후 상기 세포를 후보 작용제의 존재하에서 인큐베이션하고, 상기 후보 작용제의 세포에 대한 효과를 측정하는 것을 포함한다.

<155> 본 발명의 또다른 측면은 면역 반응을 자극하는 cDNA 또는 RNAi를 발현하는 렌티바이러스 벡터이다. 바람직한 실시양태는 GM-CSF, CD40L 및/또는 임의의 사이토킨 또는 면역 반응의 자극제를 발현하는 HIV 벡터이다. 벡터는 치료 또는 백신화에 대한 목적하는 의도에 따라, 이동하는 것, 또는 이동하지 않는 벡터일 수 있다. 사이토킨 유전자 이외에, 프로드러그의 투여 후 자살 유전자를 벡터 내로 삽입하여 벡터를 함유하는 세포에서 아포토시스를 유도할 수 있다.

<156> 또다른 실시양태는 2-혼성 기술을 이용한 포유동물 세포에서의 신규한 단백질-단백질 상호작용의 발견을 위한 렌티바이러스 벡터의 용도이다. 한 가지 예는 프로메가 코퍼레이션(Promega Corporation) (www.promega.com)에 의해 제공된다. 2-혼성 시스템은 생체내에서 단백질:단백질 상호작용을 검출하는 매우 강력한 방법이다. 2-혼성 시스템의 기초는 일부 전사 인자에서 발견되는 모달식 도메인이다. 체크메이트(CheckMate)(상표명) 포유동물 2-혼성 시스템에서, pBIND 벡터는 다중 클로닝 영역의 상류에 효모 GAL4 DNA 결합 도메인을 함유하며,

pACT 벡터는 다중 클로닝 영역의 상류에 단순 헤르페스 바이러스 VP 16 활성화 도메인을 함유한다. 또한, pBIND 벡터는 사용자가 형질감염 효능을 정규화할 수 있게 하는 레닐라 레니포르미스(Renilla reniformis) 루시페라제를 발현한다. 당해 2가지 잠재적 상호작용성 단백질을 코딩하는 2개의 유전자를 pBIND 및 pACT 벡터 내로 클로닝하여 GAL4의 DNA 결합 도메인 및 VP16의 활성화 도메인을 각각 갖는 융합 단백질을 생성한다. pG51uc 벡터는 최소 TATA 박스의 상류에 5개의 GAL4 결합 부위를 함유하며, 이는 다시 반딧불이 루시페라제 유전자(luc+)의 상류에 있다. pGAL4 및 pVP16 융합 구조물을 pG51uc 벡터와 함께 포유동물 세포 내로 형질감염시킨다. 형질감염 후 2 내지 3일에, 세포를 용해시키고, 레닐라 루시페라제 및 반딧불이 루시페라제의 양을 듀얼-루시페라제(Dual-Luciferase)(등록상표) 리포터 분석 시스템을 이용하여 정량화한다. GAL4 및 VP16 융합 구조물과 같은 2가지 시험 단백질 사이의 상호작용은 음성 대조군에 비해 반딧불이 루시페라제 발현의 증가를 초래한다. 이러한 2-혼성 시스템은 포유동물 세포에서 단백질-단백질 상호작용의 직접 스크리닝을 위해 렌티바이러스 내로 용이하게 적응될 수 있다.

<157>

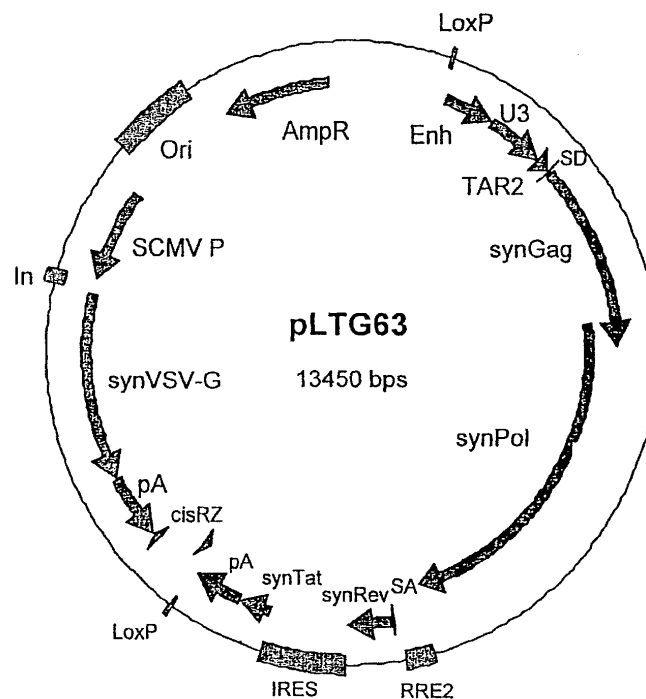
상기 설명된 표제는 본 출원에서 특정 정보가 발견될 수 있는 지침을 의미하지만, 이러한 표제에 대한 정보가 발견될 수 있는 본 출원의 자료인 것만을 의도하지는 않는다. 상기 인용된 모든 출원, 특허 및 간행물의 전체 개시사항은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 2005년 2월 16일자로 출원된 미국 가출원 제60/653,386호; 2005년 3월 10일자로 출원된 동 제60/660,310호; 2005년 5월 18일자로 출원된 동 제60/682,059호; 및 2005년 10월 5일자로 출원된 동 제60/723,768호는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

### 도면의 간단한 설명

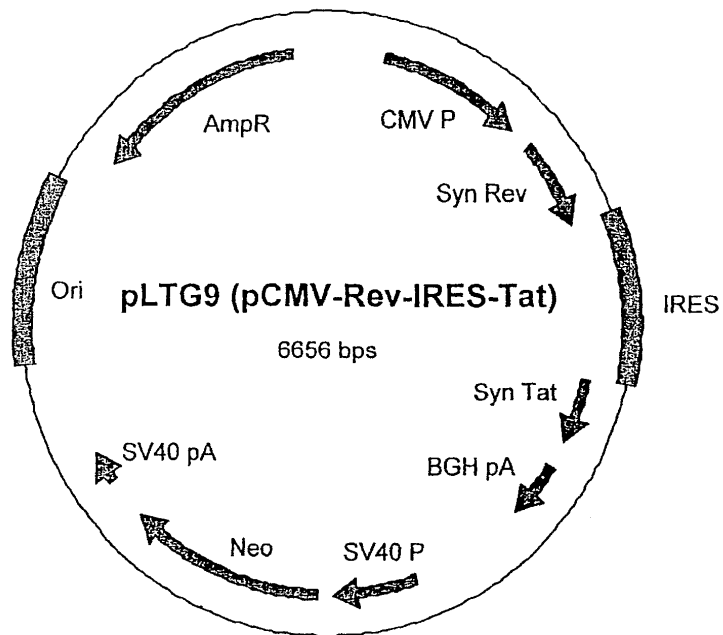
- <2> 도 1은 vsv-g 및 gag-pol을 반대 방향으로 함유하는 2가지 플라스미드 시스템에 대한 헬퍼 벡터의 개략도이다.
- <3> 도 2는 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하는 전달 벡터의 개략도이다.
- <4> 도 3은 외피 및 gag-pol 서열이 또다른 플라스미드 상에 있는, 3가지 플라스미드 시스템에 이용되는 Tat 및 Rev에 대한 발현의 개략도이다.
- <5> 도 4는 본 발명의 모듈식 전달 벡터의 예이다.

### 도면

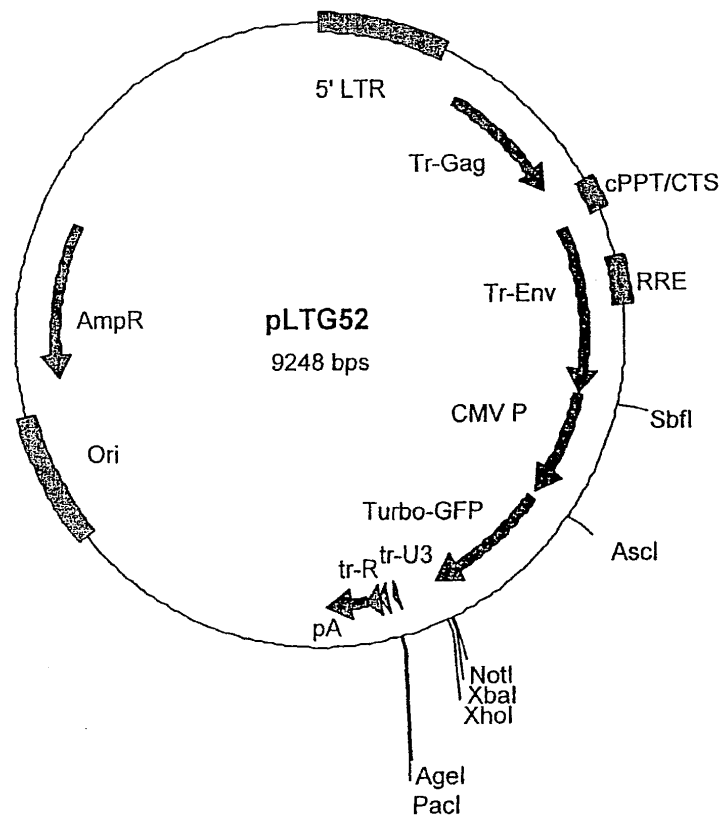
도면1



도면2



도면3



도면4

