



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0026526
(43) 공개일자 2012년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/275 (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7029009
- (22) 출원일자(국제) 2010년05월11일
- 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2011년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/056497
- (87) 국제공개번호 WO 2010/130756
- 국제공개일자 2010년11월18일
- (30) 우선권주장
09305422.9 2009년05월12일 유럽특허청(EPO)(EP)
61/213,484 2009년06월12일 미국(US)

- (71) 출원인
트랜스진 에스.에이.
프랑스, 에프-67400 이으끼르쉬 끄랑팡스따당, 부르발 꽁띠에르 당테르나쉬, 파르끄 템노바띠옹
- (72) 발명자
발루르, 장-마르끄
프랑스, 에프-67000 스프라스부르, 뤼 도르나끄 4아
까프페르, 마리나
프랑스, 에프-67300 쇠띠엥, 뤼 데 말뜨리에, 29
맹귀, 띠에리
프랑스, 에프-91190 기프-쉬르-이베뜨, 루뜨 드 샤또포르, 레지땅쓰 데 캥꽁쎄 6
- (74) 대리인
한인열

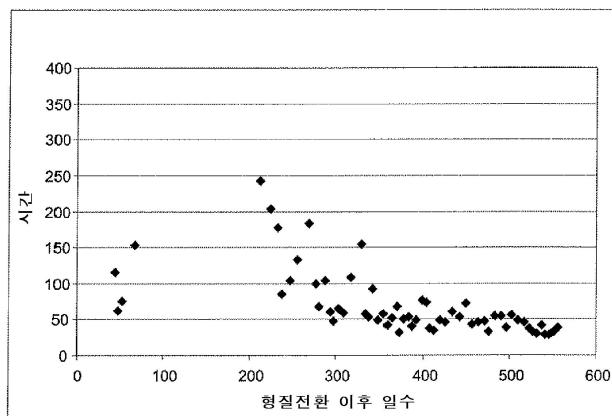
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 불멸화 조류 세포주 및 그의 용도

(57) 요 약

본 발명은 텔로머라제 역전사효소 (TERT)를 발현하고 뚜렷한 생물질 (biologies)의 생산 양상을 나타내는 특이적 불멸화 조류 세포주 (immortalized avian cell lines)에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 플라비바이러스과 (Flaviviridae)를 증폭시킬 수 있지만 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP)와 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)는 증폭시킬 수 없는, 또는 플라비바이러스과와 평스바이러스과 (Poxviridae)를 둘 다 증폭시킬 수 있는 불멸화 조류 세포주에 관한 것이다. 본 발명은 더 나아가 상기 불멸화 조류 세포주의 용도 및 이와 관련된 바이러스와 단백질을 포함하는 생물질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 불멸화 조류 세포주를 제공하고;
- (b) 상기 불멸화 조류 세포주를 생산될 바이러스로 감염시키고; 또한
- (c) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하고,

상기 불멸화 조류 세포주는 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, ECACC에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, 및 그의 유도체로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이러스를 생산하는 방법.

청구항 2

플라비바이러스과 (Flaviviridae) 균주는 적어도 하나를 증폭시킬 수 있는 반면 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (Vaccinia virus strain Copenhagen, W-COP) 또는 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (Vaccinia virus Ankara, MVA)는 둘 다 증폭시킬 수 없는 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주 (immortalized avian cell line).

청구항 3

제 2항에 있어서,

유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 세포주 및 그의 유도체인 불멸화 조류 세포주.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 플라비바이러스과 균주는 황색열 바이러스 (Yellow fever virus, YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주.

청구항 5

(i) 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주 및 (ii) 적어도 하나의 폭스바이러스과 균주를 증폭시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주.

청구항 6

제 5항에 있어서,

유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 세포주 및 그의 유도체인 불멸화 조류 세포주.

청구항 7

제 5항에 있어서,

(i) 상기 플라비바이러스과 균주는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서, 또한 (ii) 상기 폭스바이러스과 균주는 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주.

청구항 8

제 2항 또는 제 5항에 있어서,

상기 불멸화 조류 세포주는 부착성 (adherent) 세포주인 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주.

청구항 9

제 2항 또는 제 5항에 있어서,

상기 불멸화 조류 세포주는 혼탁배양으로 (마이크로)담체 ((micro)carriers)의 존재 시 또는 부재 시 증식하는 비-부착성 (non-adherent) 세포주인 것을 특징으로 하는 불멸화 조류 세포주.

청구항 10

바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도.

청구항 11

바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도.

청구항 12

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

상기 바이러스는 플라비바이러스과 (Flaviviridae), 폭스바이러스과 (Poxviridae), 플루 바이러스 (flu viruses), 파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae), 아데노바이러스 (adenovirus), 아데노-관련 바이러스 (adeno-associated virus, AAV), 레트로바이러스 (retrovirus), 헤파드나바이러스 (Hepadnaviruses), 허파스 바이러스 (herpes viruses), 레오바이러스 (reovirus), 코로나바이러스 (coronavirus), 알파바이러스 (alphavirus), 및 그들의 단편으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 바이러스는 야생형, 약독화 (attenuated), 재조합 및/또는 온도 민감성 바이러스인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 14

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

상기 바이러스는 플라비바이러스과이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 15

제 11항에 있어서,

상기 바이러스는 폭스바이러스과이고, 바람직하게는 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 16

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

상기 단백질은 항체, 수용체 리간드, 호르몬, 사이토카인, 성장인자, 세포 부착 분자, 혈액 응고인자, 효소, 그들의 단편 및 그들의 조합으로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 사이토카인, 항체, 및 호르몬으로 이루어진 그룹에서, 보다 더 상세하게는 IL-2, 리투시마브 (rituximab) 및 에리트로포이에틴 (EPO)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 17

a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 바이러스로

감염시키고; 및/또는

- b) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하는 바이러스를 생산하는 방법.

청구항 18

- a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 바이러스로 감염시키고; 및/또는
- b) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하는 바이러스를 생산하는 방법.

청구항 19

제 17항 또는 제 18항에 있어서,

상기 바이러스는 야생형, 약독화, 재조합 및/또는 온도 민감성 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 17항 또는 제 18항에 있어서,

상기 바이러스는 플라비바이러스파이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 18항에 있어서,

상기 바이러스는 폭스바이러스파이고, 바람직하게는 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라 (MVA)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도

청구항 22

- a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터와 접촉시키고; 및/또는
- b) 상기 조류 세포주를 상기 단백질이 생산되게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하는 단백질을 생산하는 방법.

청구항 23

- a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터와 접촉시키고; 및/또는
- b) 상기 조류 세포주를 상기 단백질이 생산되게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하는 단백질을 생산하는 방법.

청구항 24

제 22항 또는 제 23항에 있어서,

상기 단백질은 항체, 수용체 리간드, 호르몬, 사이토카인, 성장인자, 세포 부착 분자, 혈액 응고인자, 효소, 그의 단편 및 그의 조합으로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 사이토카인, 항체, 및 호르몬으로 이루어진 그룹에서, 보다 더 상세하게는 IL-2, 리투시마브 및 에리트로포이에틴 (EPO)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 바이러스 및 단백질을 포함하는 생물질 (biologics)의 생산을 위한 세포주의 분야에 속하는 것이다. 상세하게, 본 발명은 텔로머라제 역전사효소 (telomerase reverse transcriptase, TERT)를 발현하고, 명백한 생물질 생산 양상을 나타내는 특이적 불멸화 조류 세포주 (immortalized avian cell lines)에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 플라비바이러스과 (Flaviviridae)는 증폭시킬 수 있지만 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (Vaccinia virus strain Copenhagen, W-COP) 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (Vaccinia virus Ankara, MVA)는 증폭시킬 수 없는, 또는 플라비바이러스과 및 폭스바이러스과 (Poxviridae)를 둘 다 증폭시킬 수 있는 불멸화 조류 세포주에 관한 것이다. 본 발명은 더 나아가 상기 불멸화 조류 세포주 또한 바이러스와 단백질 포함하는 생물질을 생산하는 관련 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

조류 세포는 수년간 바이러스 백신 (viral vaccines)의 생산을 위해 사용되어 왔다. 예를 들어, 조류의 부화란 (embryonated chick eggs)은 인간 또는 포유동물 세포에서 복제하도록 손상된 잠재력을 가지는 현저하게 약독화 된 바이러스를 포함하여 넓은 범위의 인간 및 동물 바이러스의 복제를 지원할 수 있다. 인간 바이러스 백신에 사용되는 조류의 부화란은 정의된 한 별의 바이러스와 박테리아 오염물이 없음이 보장되어야 한다 (특이 병원균-없음 또는 SPF). 조류의 부화란은 값이 비싸고 바이러스 백신 비용의 40%까지도 차지할 수 있다. 백신 로트 (lot)는 SPF 공급자가 백신 로트를 제조하는 데 사용한 조류 부화란에 관하여 부모 닭이 어떠한 질병도 완벽히 없었던 점 보증할 때까지 배포될 수 없다. 이러한 불명확성 (uncertainty)은 이들 백신의 제조에 중대한 비용을 추가시킨다. 또한, 달걀을 감염시키고 바이러스 성장을 유지하는 대규모의 방법은 시간이 걸리고 때로 서로 다른 백신 배치 (batches) 간에 일치하지 않는다.

[0003]

세포 배양 기법이 발전하면서 백신 제조자들은 조류의 부화란을 분리된 닭 배아 섬유모세포 (chicken embryo fibroblasts, CEFs)로 대체하여 왔다. 대부분의 플라비바이러스과 백신은 예를 들어 CEFs로부터 제조된다. 세계건강기구 (WHO)가 추천하는 플라비바이러스과의 황색열 바이러스 백신 (Yellow fever virus vaccines)은 17D 균주 및 아균주 (substrains)로부터 나오고, 이들은 뉴클레오파이드 서열에서 소수의 차이점과 동등한 면역성을 가진다 (CAMACHO L.A.B. et al., Rev. Saude Publica 38(5): 671-8 (2004); DOS SANTOS CN., Virus Res. 35: 35-41 (1995)). 플라비바이러스과 바이러스의 생산 방법에 관한 실험들은 17DD 바이러스 균주를 사용한 황색열 바이러스 백신의 생산을 위한 효율적인 방법론을 확립하도록 하였다 (FREIRE M.S., Vaccines 23, 2501-2512 (2005)). CEFs의 사용은 안전성 프로파일, 효율성 및 제조 공정의 신뢰성을 향상시키는 반면, 이것도 역시 많은 시간을 소비하고 더 나아가 비용을 증가시킨다. 따라서 CEFs의 생산은 SPF 달걀의 입수 가능성에 의존하게 된다. CEFs는 배아를 분쇄하고 생존 가능한 세포를 확립하고 증폭하는 것에 의해 SPF 달걀로부터 제조된다. 일차 동물 세포로서 전형적인 섬유모세포는 노화를 겪는다: 배가 시간 (doubling time)이 계대가 진행되면서 증가하고 궁극적으로는 모든 세포가 죽게 된다. 본 과정은 약 20번 계대 이후에 발생한다. 이 제한된 수명은 CEFs의 각 로트에 대해 완벽한 한 별의 안전성 테스트를 수행하도록 제한시킨다.

[0004]

바이러스 백신을 제조하기 위해 이전에 기술된 바와 같은 닭의 부화란과 CEFs의 제한점으로 인해, 새로운 세포 배양 시스템에 대한 탐구가 지난 수십 년간 상당한 주목을 받아왔다. 이러한 관점에서, 불멸화 세포주는 매우 매력적이다. 불멸화 세포주는 해당 생산 장소 상에서 배치로부터 배치까지가 유지되거나 냉동될 수 있고 새로운 생산 공정에 항상 입수가능하다. 더우기 생산 공장에만 한정되어 있기 때문에, 그들은 외인성 오염물 (exogenous contaminant)에 의해 덜 오염된다. 그들의 사용은 생산 공정에 필요한 손수 조작 공정이 급격히 감소하게 한다. 이들 모든 특성은 비용 및 생산 공정의 존속 기간의 감소뿐만 아니라 잡재적인 오염의 감소도 가져온다. 더우기 불멸화 세포주는 완벽하게 특성분석될 수 있고 따라서 바람직한 실험실 관행 및 서로 다른 의료기관의 요구사항을 전적으로 따를 수 있다. 예로서, VERO 세포주는 플라비바이러스과 백신 생산을 위해 승인된 닭의 부화란을 대체하는 대안의 후보로서 기술되어 왔다. 살아있는 약독화된 일본 뇌염 바이러스 백신 키메리백스™-JEV (ChimeriVax™-JEV)이 우태아 혈청을 보충한 배지에서 배양된 VERO 세포에서 증식된 바 있었다 (MONATH et al., Biologicals, 33: 131-144 (2005)). 유사하게, 마테우 등 (MATEU et al., Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 101(3): 289-98 (2007)) 및 토리니와 등 (TORINIWA et al., Vaccine, 4; 26(29-30): 3680-9 (2008))도 각각 VERO 세포에서 황색열 바이러스 백신 및 일본 뇌염 바이러스 백신을 생산하였다. 계다가 불멸화 세포주의 적용은 그들이 설계한 바이러스 백신에 제한되지 않고 재조합 단백질에도 확장될 수 있다. 예를 들어, 항체 및 인플루엔자 바이러스 백신은 둘 다 PER.C6® 세포주 (ECACC 기탁번호 제 96022940호), 아데노바이러스 타입 5의 E1 미니유전자를 사용한 형질전환에 의해 불멸화된 인간 태아 망막모세포 (fetal retinoblast) 세포주 상에서 증식될 수 있다. (FALLAUX F. J. et al., Hum. Gene Ther. 9: 1909-17 (1998); PAU M. G. et.

al., Vaccine 19, 2716-2721 (2001); YALLOP C. et al., Animal Cell Technology meets Genomics, 533-536 (2005)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나 대안의 불멸화 세포주는 여전히 필요하다. 국제특허출원 제 WO 2007/077256호는 일차 조류세포 (*Cairina moschata* primary avian cells) 계놈 내로 TERT 핵산 분자의 표적화된 또는 무작위 삽입 둘 중 하나에 의한 카이리나 모스카타 텔로머라제 역전사효소 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 핵산 분자를 사용한 형질전환으로 일차 조류 세포를 불멸화하는 방법을 제공한다. 상기 방법을 기초로 하여 특히 무작위 삽입에 의하여, 우리는 다른 것들과 구별되는 특성을 가지는 새로운 불멸화 조류 세포주를 지금 확인하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "하나 (a)" 및 "하나 (an)"라는 용어는 문맥 상에서 명백하게 달리 언급되지 않는 경우라면, 그들은 언급된 구성성분들 또는 단계들의 "적어도 하나 (at least one)", "적어도 첫 번째 (at least a first)", "하나 이상 (one or more)" 또는 "다수 (a plurality)"를 의미하는 것으로 사용된다.

[0007] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "및/또는 (and/or)"이라는 용어는 본 명세서에서 사용되는 경우라면 "및", "또는" 또한 "상기 용어와 연결된 요소들의 모두 또는 기타 조합"의 의미를 포함한다.

[0008] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "포함하는 (comprising)" 또는 "포함하다 (comprise)"라는 용어는 산물들, 조성물들 및 방법들이 다른 것을 배제하는 것은 아니지만, 언급된 구성성분들 또는 단계들을 포함하는 것을 의미하도록 의도된다. "필수적으로 구성된 (consisting essentially of)"는 산물들, 조성물들 및 방법들을 정의하고 사용될 때, 기타 필수적으로 중요한 다른 구성성분들 또는 단계들을 배제하는 것을 의미한다. 따라서, 재인용된 (recited) 구성성분들로 필수적으로 구성된 조성물은 극소량 오염물질 (trace contaminants) 및 약학적으로 허용가능한 담체를 제외하려는 것은 아니다. "구성된 (consisting of)"은 다른 구성성분들 또는 단계들의 극소량 요소 (trace elements) 이상을 배제하는 것을 의미한다.

[0009] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "약 (about)" 또는 "대략 (approximately)"는 본 명세서에서 사용될 때 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 이내를 의미한다.

[0010] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "불멸화 조류 세포주 (immortalized avian cell line)"는 배양으로 헤이플릭 한계 (HayFlick limit)를 초과하여 증식하는 조류 세포주를 말한다 (HAYFLICK L., Clin. Geriatr. Med. 1(1): 15-27 (1985)). 보다 상세하게는, "불멸화 조류 세포주"는 약 1 내지 약 2일의 배양 시 배가 시간을 유지하고 약 6개월 이상 동안 연속 배양되었던 30번의 계대 이상 동안 배양으로 성장할 수 있는 조류 세포주를 말한다. 조류 세포주는 배양에서 약 20 내지 약 25번의 계대 이후에 불멸화되는 것으로 생각된다. 불멸화 조류 세포는 형질전환된 세포로부터 분화되지만, 형질전환된 세포와는 달리 불멸화 조류 세포주는 성장 정지되며 (예로, 조류 세포는 충만되어 밀착 저해 (contact inhibition)된다) 균질하게 섬유모세포와 유사한 형태를 가진다.

[0011] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "바이러스를 증폭할 수 있는 불멸화 조류 세포주 (immortalized avian cell line able of amplifying a virus)"라는 용어는 본 발명의 불멸화 조류 세포주가 바이러스에 의한 감염 이후에 감염된 세포에서 바이러스의 생산적 바이러스 복제로 인해 상기 바이러스의 양을 증가시킬 수 있는 것을 의미한다. "생식적 복제 (reproductive replication)"라는 용어는 상기 바이러스가 감염성 자손 바이러스가 생산될 정도로 불멸화 조류 세포주에서 복제하는 사실을 말해준다. 여기에서 유출 바이러스 대비 유입 바이러스의 비율은 1을 초과한다. 달리 말하면, "바이러스를 증폭할 수 있는 (able of amplifying a virus)"는 유출 바이러스 대비 유입 바이러스의 비율이 1을 반드시 초과하는 것을 말한다.

[0012] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "플라비바이러스과 (Flaviviridae)"는 플라비바이러스 (Flaviviruses), 페스티바이러스 (Pestiviruses), 헤파시바이러스 (Hepaciviruses), GB 바이러스 A, GB 바이러스 A-유사 제제, GB 바이러스-B 및 GB 바이러스-C (G형 간염 바이러스라고도 불림)를 포함한다. 플라비바이러스과의 분류, 계놈 구성 및 복제 주기는 잘 기술되어 왔다 (LINDENBACH B. D. et al., in D. M. Knipe and P. M. Howley, Fields Virology 제 5 개정판, 리핀코트-라벤 출판사 (Lippincott-Raven Publishers), 필라델피아 (2007)).

[0013] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "플라비바이러스 (Flaviviruses)"는 "모기-매개 바이러스 군", "진드기-

매개 바이러스 군" 및 "무-매개체 군"을 포함한다 (KUNO G. et al., J. Virol. 72: 73-83 (1998)).

[0014] "모기-매개 바이러스 군 (mosquito-borne virus cluster)"는 뎅기 바이러스 (Dengue virus), 일본 뇌염 바이러스, 무레이 계곡 뇌염 바이러스 (Murray Valley encephalitis virus), 세인트루이스 뇌염 바이러스 (St. Louis encephalitis virus), 웨스트 나일 바이러스 (West Nile virus), 황색열 바이러스 (Yellow fever virus), 쿤진 바이러스 (Kunjin virus), 로시오 바이러스 (Rocio virus) 및 일해우스 바이러스 (Ilheus virus)를 포함한다.

[0015] 뎅기 바이러스 (DENV) 군주는 네 가지 혈청형 DEN-1, DEN-2, DEN-3 및 DEN-4으로 나뉘어진다. 또한 DENVs 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보는 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다: DEN-1 바이러스 (예로, 진뱅크 기탁번호 제 M23027호), DEN-2 바이러스 (예로, 진뱅크 기탁번호 제 M19197호; 제 NC-001474호), DEN-3 바이러스 (예로, 진뱅크 기탁번호 제 M93130호); DEN-4 바이러스 (예로, 진뱅크 기탁번호 제 M14931호).

[0016] 일본 뇌염 바이러스 (JEV)는 군주 P3, SA14, S892, GP78, ThCMAR4492, ThCMAR6793, JaGAr01, Jaoars982, 수빈 (Subin), KE-093/83, 나카야마 야생형 군주 (Nakayama wild-strain), 나카야마-RFVL, 나카야마-요肯 (Nakayama-Yoken), LNDG07-16 및 K94P05:를 포함한다. JEVs 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다: 예로 진뱅크 기탁번호 제 AF045551호.

[0017] 웨스트 나일 바이러스 (WNV) 군주는 유전자형 NY99 및 WN02를 포함하고 있다. WNVs 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다: 예로 진뱅크 기탁번호 제 M12294호; 제 NC-001563호.

[0018] 황색열 바이러스 (YFV) 군주는 군주 아시비 (Asibi), 프렌치 내장친화성 바이러스 (French viscerotropic virus, FVV), B4.1, 렌두 (Rendu), Dak1279, 17D, 17D-204, 콜롬비아 88 (Colombia 88), F-204 및 C-204 를 포함한다 (HAHN et al., Proceedings of National Academy of Sciences USA 84: 2019-2023 (1987); WANG et al., J. of Gen. Virol. 76: 2749-2755 (1995); BALLINGER-CRABTREE & MILLER, J. of Gen. Virol. 71: 2115-2121 (1990); WANG et al., J. of Gen. Virol. 78: 1349-1352 (1997); CAMACHO L.A.B. et al., Rev. Saude Publica 38(5): 671-8 (2004); DOS SANTOS CN., Virus Res. 35: 35-41 (1995); GALLER R. et al., Braz. J. Med. Biol. Res. Volume 30(2): 157-168 (1997)). 황색열 바이러스 (YFV)는 유전학적 수준에서 연구되어 왔고 (RICE et al., Science 229: 726-733 (1985)) 유전형 및 표현형과 상호연관된 정보가 확립되어 왔다 (MARCHEVSKY et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 75-80 (1995)). YFVs 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다: 예로 진뱅크 기탁번호 제 X03700호; 제 NC-002031호.

[0019] "진드기-매개 바이러스 군 (tick-borne virus cluster)"은 세 가지 아형 (subtypes)을 포함하는 진드기-매개 뇌염 바이러스 (TBEV)(진드기-매개 뇌수막염 바이러스 (tick-borne meningoencephalitis virus)라고도 불림)를 말한다: 웨스턴 아형 (Western subtype)(중앙 유럽 뇌염 바이러스라고도 불림), 극동 아형 (Far Eastern subtype)(러시아 봄/여름 뇌염 바이러스라고도 불림) 및 시베리아 아형 (Siberian subtype) (KAISER and REINHARD, Infectious Disease Clinics of North America. 22(3): 561-575 (2008)). TBEVs 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다: 예로 진뱅크 기탁번호 제 U27495호, 제 NC-001672호. 또한 TBEV는 감염성 극동 러시아 TBEV의 C-preM-E 또는 preM-E 구조 단백질 유전자를 남아있는 비구조 단백질 유전자 및 DEN4로부터 유래한 5'- 및 3'-비코딩 서열 [각각 TBEV(CME)/DEN4 및 RBEV(ME)/DEN4]와 함께 포함하도록 제작된 생존가능한 키메라 백신 (chimeric vaccine)도 포함한다 (PLETNEV et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10532-10536 (1992)).

[0020] "무-매개체 바이러스 군 (no-vector virus cluster)"은 아포이 바이러스 (Apolo virus), 세포 융합 제제 바이러스 (cell fusingagent virus), 산 퍼리타 바이러스 (San Perlita virus), 주티아파 바이러스 (Jupiata virus), 몬타나 미오티스 백색질뇌염 바이러스 (Montana myotis leukoencephalitis virus), 모독 바이러스 (Modoc virus), 카우본 리지 바이러스 (Cowbone Ridge virus), 살 비에자 바이러스 (Sal Vieja virus), 부카라자 배트 바이러스 (Bukalasa bat virus), 다카르 박쥐 바이러스 (Dakar bat virus), 리오 브라보 바이러스 (Rio Bravo virus), 캐리섬 바이러스 (Carey Island virus), 프놈펜 박쥐 바이러스 (Phnom Penh bat virus) 및 바투굴 바이러스 (Batu Cave virus) (CUNO G et al., J. Virol., 72: 72-83 (1998)). 무-매개체 바이러스의 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. 예를 들어 아포이 바이러스의 경우: 예로, 진뱅크 기탁번호 제 AF 160193호, 제 NC-003676호.

- [0021] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "헵파시바이러스 (Hepaciviruses)"는 C형 간염 바이러스 (HCV)를 포함한다. 자세한 계통유전학적 분석법은 HCV 분리물을 서로 다른 아형 (a, b, c 등...)을 포함하는 6가지의 주요한 유전형 (1 내지 6)으로의 분류를 가져왔다 (SIMMONS et al., Hepatology 42: 962-973 (2005)). 대표적인 유전형 1a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-1을 포함한다 (CHOO et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455 (1991)), -J1 (OKAMOTO et al., Nucleic acids Res. 20: 6410-6410 (1992)) 및 -H (INCHAUSPE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10292-10296 (1991)). 대표적인 유전형 1b의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-JA (KATO et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 9524-9528 (1990)) 및 BK (TAKAMIZAWA et al., J. Virol. 65: 1105-1113 (1991))를 포함한다. 대표적인 유전형 1c의 HVC 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-G9를 포함한다 (OKAMOTO et al., J. Gen. Virol. 45: 629-635 (1994)). 대표적인 유전형 2a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-J6를 포함한다 (OKAMOTO et al., J. Gen. Virol. 72: 2697-2704 (1991)). 대표적인 유전형 2b의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-J8를 포함한다 (OKAMOTO et al., Virol. 188: 331-341 (1992)). 대표적인 유전형 2c의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-BEBE1를 포함한다 (NAKO et al., J. Gen. Virol. 141: 701-704 (1996)). 대표적인 유전형 3a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-NZL1을 포함한다 (SAKAMOTO et al., J. Gen. Virol. 75: 1761-1768 (1994)). 대표적인 유전형 3b의 HVC 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-Tr을 포함한다 (CHAYAMA et al., J. Gen. Virol. 75: 3623-3628 (1994)). 대표적인 유전형 4a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-ED43을 포함한다 (CHAMBERLAIN et al., J. Gen. Virol. 78: 1341-1347 (1997)). 대표적인 유전형 5a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-EUH1480을 포함한다 (CHAMBERLAIN et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 236: 44-49 (1997)). 대표적인 유전형 6a의 HCV 분리물은 이에 제한되지는 않지만 HCV-EUHK2를 포함한다 (ADAMS et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 234: 393-396 (1997)).
- [0022] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "폭스바이러스과 (Poxviridae)"는 오르토폭스바이러스 (Orthopoxviruses), 카프리폭스바이러스 (Capripoxviruses), 아비폭스바이러스 (Avipoxviruses), 파라폭스바이러스 (parapoxviruses) 및 레포리폭스바이러스 (Leporipoxviruses), 및 그의 유도체를 포함한다.
- [0023] 오르토폭스바이러스는 벼팔로 폭스바이러스, 낙타 폭스바이러스, 소 폭스바이러스, 엑토멜리아 바이러스 (Ectomelia virus), 원숭이 폭스바이러스, 토끼 폭스바이러스, 배리올라 바이러스 (Variola virus), 백시니아 바이러스 (W) 및 예를 들어 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)와 같은 그의 유도체를 포함한다.
- [0024] 카프리 폭스바이러스는 양 폭스바이러스, 염소 폭스바이러스 및 혹성 피부 질환 바이러스 (lumpy skin disease virus)를 포함한다.
- [0025] 조류 폭스바이러스는 카나리 폭스바이러스 (Canarypoxvirus) 및 가금류 폭스바이러스를 포함한다.
- [0026] 파라폭스바이러스는 유사소 폭스바이러스 (pseudocowpox), 아라폭스바이러스 오비스 (arapoxvirus ovis) 및 오르프 바이러스 (orf virus)를 포함한다.
- [0027] 레포리폭스바이러스는 믹소마 바이러스 (Myxoma virus)를 포함한다.
- [0028] 다양한 폭스바이러스과 계놈의 서열은 당해 기술 분야에서 입수가능하고, 예를 들어 W 웨스턴 리저브 (W Western reserve), W 코펜하겐, 변형된 백시니아 바이러스 앙카라, 소 폭스바이러스, 카나리 폭스바이러스, 엑토멜리아 바이러스, 믹소마 바이러스 계놈이 진뱅크에서 입수가능하다 (각각 기탁번호 제 NC_006998호, 제 M35027호, 제 U94848호, 제NC_003663호, 제 NC_005309호, 제 NC_004105호, 제 NC_001132호).
- [0029] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "백시니아 바이러스 (Vaccinia virus)" (W)는 W 균주를 포함한다: 다이렌 1 (Dairen 1), IHD-J, L-IPV, LC16M8, LC16M0, 리스터 (Lister), LIVP, 타슈켄트 (Tashkent), WR 65-16, 와이 에스 (Wyeth), 앙카라, 코펜하겐 (COP) (GOEBEL et al., 1990; 진뱅크 기탁번호 제 M35027.1), 티안탄 (Tian Tan), 웨스턴 리저브 (WR), 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA), 결함성 J2R 유전자 (defective J2R gene)를 포함하는 W (WEIR and MOSS 1983을 참조하라; 진뱅크 기탁번호 제 AAA48082호), 결함성 F2L 유전자를 포함하는 W (국제특허출원 제 WO2009/065547호를 참조하라), 결함성 I4L 및 F4L 유전자(들)을 포함하는 W (국제특허출원 제 WO2009/065547호를 참조하라), 및 그의 유도체.
- [0030] 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바, "변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (Modified Vaccinia virus Ankara, MVA)"는 W 균주 앙카라 (MAYR A. et al., Infection 3: 6-14 (1975)) 및 그의 유도체의 CEFs 상에서 일련의 계대에 의해 생성되는 매우 약독화된 W를 말한다. MVA 바이러스는 먼저 국립 미생물배양 기탁기관 (CNCM)에 기탁 번호 N° 1-721 하로 기탁되었다. MVA는 수터 및 모스 문헌에 완벽하게 기술되어 있다 (SUTTER and MOSS Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-10851 (1992)). MVA 계놈은 지도가 작성되었고 서열분석되었으며 (ANTOINE et al., Virol. 244: 365-396 (1998)) 진뱅크에서 기탁번호 제 U94848호 하로 입수 가능하다.

[0031] 첫 번째 구현예에 따르면, 본 발명은:

[0032] (a) 불멸화 조류 세포주를 제공하고;

[0033] (b) 상기 불멸화 조류 세포주를 생산될 바이러스로 감염시키고; 또한

[0034] (c) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는; 단계를 포함하고,

[0035] 상기 불멸화 조류 세포주는 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, ECACC 기관에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, 및 그들의 유도체로 이루어진 그룹에서 선택되는 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, ECACC 기관에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주, 및 그들의 유도체로 이루어진 그룹에서 선택되는, 조류 텔로머라제 역전사효소 (telomerase reverse transcriptase, TERT)를 발현하는 불멸화 조류 세포주에 관한 것이다. 이들 세포주는 국제특허출원 제 WO 2007/077256호에 기재된 바와 같이 카이리나 모스카타 일차 조류 세포 계놈 내로 조류 TERT 핵산 분자 (서열번호 1)의 무작위 삽입에 의해 일차 카이리나 모스카타 세포 (primary *Cairina moschata* cells)로부터 생성되었다.

[0037] 놀랍게도, 이들 조류 텔로머라제 역전사효소 (TERT)를 발현하는 불멸화 조류 세포주는 명확한 특성을 가지고, 보다 상세하게 그들의 바이러스 균주의 증폭 특성에 의해 서로가 구별된다.

[0038] 한 가지 특별한 구현예에 따르면, 본 발명의 불멸화 조류 세포는 적어도 하나의 플라비바이러스과를 증폭시킬 수 있는 반면 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (Vaccinia virus strain Copenhagen, W-COP) (GOEBEL et al., 1990; 진뱅크 기탁번호 제 M35027.1) 또는 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA) (국립 미생물배양 기탁기관 (CNCM)에 기탁번호 N⁰ 1-721 하로)는 둘 다 증폭시킬 수 없다.

[0039] 불멸화 조류 세포주가 하나의 특정한 바이러스 균주를 증폭시킬 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용된 분석법에 관한 자세한 정보는 다음의 하기에 주어져 있다.

[0040] 바람직한 구현예에 따르면, 플라비바이러스과 (Flaviviridae) 균주는 적어도 하나를 증폭시킬 수 있는 반면 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) 또는 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (Vaccinia virus Ankara, MVA)는 둘 다 증폭시킬 수 없는 본 발명의 조류 세포주는 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 조류 텔로머라제 역전사효소 (TERT)를 발현하는 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체이다.

[0041] 바람직한 구현예에 따르면, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체는 황색열 바이러스 (Yellow fever virus, YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 (예로, HPA 배양 기탁기관에서 참조번호 제 507호) 및 JEV 나카야마 야생형 균주 (예로, HPA 배양 기탁기관에서 참조번호 제 502호)로 이루어진 그룹에서 선택되는 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주를 증폭시킬 수 있다.

[0042] 바람직한 구현예에 따르면, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주를 증폭시킬 수 있다.

[0043] 또 다른 특별한 구현예에 따르면, 본 발명의 불멸화 조류 세포주는 (i) 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주; 및 (ii) 적어도 하나의 폭스바이러스과 균주;를 증폭시킬 수 있다.

[0044] 바람직한 구현예에 따르면, 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주 및 적어도 하나의 폭스바이러스과 균주를 증폭시킬 수 있는 본 발명의 불멸화 조류 세포주는 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 조류 텔로머라제 역전사효소 (TERT)를 발현하는 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체이다.

[0045] 바람직한 구현예에 따르면, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체는 (i) 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 (예로, HPA 배양 기탁기관에서 참조번호 제 507호) 및 JEV 나카야마

야생형 균주 (예로, HPA 배양 기탁기관에서 참조번호 제 502호)로 이루어진 그룹에서 선택되는 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주, 또한 (ii) 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) (GOEBEL et al., 1990; 진뱅크 기탁번호 제 M35027.1) 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA) (국립 미생물배양 기탁기관 (CNCM) 기탁번호 N⁶⁰² 1-721 하)로 이루어진 그룹에서 선택되는 적어도 하나의 폭스바이러스과 균주를 증폭시킬 수 있다.

[0046] 바람직한 구현예에 따르면, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 또는 그의 유도체는 황색열 바이러스 (YFV) 균주, 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주, 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP), 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)를 증폭시킬 수 있다.

[0047] 본 발명의 기탁된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 (*Cairina Moschata immortalized avian cell lines*)의 유도체는, 예를 들어:

[0048] - 상기 기탁된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포 (ECACC 제 08060502호 또는 ECACC 제 08060501호)의 서브클로닝;

[0049] - 특정한 배양 배지 (예로, 혼탁액으로 세포주의 성장을 허용하는 배지) 및/또는 특정한 배양 조건 (예로, 온도; % CO₂) 하에 상기 기탁된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포 (ECACC 제 08060502호 또는 ECACC 제 08060501호)의 적응;

[0050] - 비-퓨코실화된 (non-fucosylated) 단백질, 보다 상세하게는 비-퓨코실화된 항체를 생산하도록 사카라이드 퓨코스 변형 (saccharide fucose modification) (HARUE IMAI-NISHIYA et al., BMC Biotechnology (2007))에 관여하는 카이리나 모스카타의 하나 이상 유전자의 결실 또는 돌연변이 (바람직한 구현예에 따라, 상기 기탁된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포의 유도체들은 α1,6-퓨코실전이효소 (FUT8) 및/또는 GDP-만노스 4,6-탈수화제 (GMD) 유전자의 결실 또는 돌연변이에 의해 획득된다);

[0051] - 세포주의 면역 반응을 감소시키도록 인터페론 저항성에 관여하는 카이리나 모스카타의 하나 이상 유전자의 결실 또는 돌연변이 (바람직한 구현예에 따라, 상기 기탁된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포의 유도체는 STAT1 유전자, STAT2 유전자, STAT3 유전자 및 STAT5 유전자의 결실 또는 돌연변이에 의해 획득된다);

[0052] - 세포주가 배양 조건에 더욱 저항성을 가지고도록, 보다 상세하게는 충만도를 유지하기 위해 카이리나 모스카타의 항-세포사멸 유전자(들)의 하나 이상의 과다 발현 또는 하나 이상의 외인성 항-세포사멸 유전자(들)로의 형질전환 (바람직한 구현예에 따라, 상기 항-세포사멸 유전자(들)은 p19E1 B 인간 아데노바이러스 유전자, bcl-2 유전자, mcl-1 유전자, Bcl-xL 유전자, Bcl-w 유전자, a1 유전자, ICP34.5 헤피스 심플렉스 유전자 및 p35 배콜로바이러스 유전자로 이루어진 그룹에서 선택된다);

[0053] - 증식 속도를 증가시키는 데 적합한 벡터를 사용하여 세포 주기를 조절하는 것에 관여하는 카이리나 모스카타의 하나 이상의 유전자의 과다 발현 (바람직한 구현예에 따라, 세포 주기를 조절하는 것에 관여하는 상기 유전자(들)은 p53 유전자, p21 유전자, p27 유전자 및 p57 유전자로 이루어진 그룹에서 선택된다);

[0054] - 관심 있는 바이러스에 대한 수용체를 인코드하는 하나 이상의 유전자로 형질전환에 의해 이들 바이러스를 증식시키려는 측면에서 세포주의 바이러스 민감성 스펙트럼을 변형하는 것 (바람직한 구현예에 따라, 관심 있는 바이러스에 대한 수용체를 인코드하는 상기 유전자(들)은 홍역바이러스 CD46 수용체를 인코드하는 유전자(들)이다);에 의해 상기 기탁된 세포들로부터 유래된 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주를 말한다.

[0055] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 ECACC 제 08060502호의 유도체는 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주는 증폭시킬 수 있는 반면 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) 또는 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)는 증폭시킬 수 없다.

[0056] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 ECACC 제 08060501호의 유도체는 (i) 적어도 하나의 플라비바이러스과 균주; 및 (ii) 적어도 하나의 폭스바이러스과 균주;를 증폭시킬 수 있다.

[0057] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 불멸화 조류 세포주는 부착성 (adherent) 세포주이다.

[0058] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 불멸화 조류 세포주는 혼탁액으로, (마이크로)담체의 존재 시 또는 부재 시 증식하는 비-부착성 (non-adherent) 세포주이다. 본 발명에 따라 사용되는 (마이크로)담체 (micro-carriers)는 텍스트란, 콜라겐, 폴리스티렌, 폴리아크릴아마이드, 젤라틴, 유리, 셀룰로스, 폴리에틸렌 및/또는 플라스틱으로 만들어질 수 있다. (마이크로)담체는 예로 사이토덱스™ (Cytodex™) 마이크로담체 (파마시아사),

사이토포어™ (Cytopore™) 마이크로담체 (GE 헬스케어 라이프 사이언스사), 힐렉스™ (Hilex™) 마이크로담체 (솔로힐 엔지니어링사), 눈크 2D 마이크로헥스™ (Nunc 2D MicroHex™) 마이크로담체 눈클론™ (Nunclon™)(씨모 피셔 사이언티픽사), 프로넥틴™ (ProNectin™) 마이크로담체 (솔로힐 엔지니어링사), 피브라-셀™ (Fibra-Cell™) 디스크 (뉴 브룬스윅 사이언티픽사), 바이오녹II™ (BioNocII™) 마이크로담체 (세스코 바이오엔지니어링사), 및 컬티스피어-S™ (CultiSpher-S™) 마이크로담체 (퍼셀 바이오리티카사)와 같이 시판된다.

[0059] 본 발명은 또한 바이러스 및 단백질의 생산을 위한 본 발명의 불멸화 조류 세포주의 용도에 관한 것이다.

[0060] 본 출원 전부를 통해 사용되는 바, "바이러스 (viruses)"는 플라비바이러스과 (Flaviviridae), 폭스바이러스과 (Poxviridae), 플루 바이러스 (flu viruses), 파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV), 레트로바이러스 (예로, 라우 육종 바이러스 (RSV); 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)와 같음), 헤파드나바이러스 (예로, B형 간염 바이러스와 같음), 허파스 바이러스 (예로, HSV-1; HSV-2와 같음), 레오바이러스 (예로, 로타바이러스와 같음), 코로나바이러스 (예로, 인간 SARS-CoV; HCoV-NL63과 같음), 및 알파바이러스 (예로, 치쿤구냐 (chikungunya); 로스 리버 바이러스 (Ross river virus, RRV)와 같음)로 이루어진 그룹에서 선택된 바이러스를 포함한다. 상기 바이러스는 야생형 (wild type), 약독화 (attenuated), 재조합 및/또는 온도 민감성 (temperature sensitive) 바이러스일 수 있다.

[0061] 플라비바이러스과 및 폭스바이러스과는 상기에서 정의되었다.

[0062] 본 발명에 따르면, 플라비바이러스과는 야생형, 약독화, 재조합 및/또는 온도 민감성 플라비바이러스과이다.

[0063] 본 발명에 따르면, 폭스바이러스과는 야생형, 약독화, 재조합 및/또는 온도 민감성 폭스바이러스과이다.

[0064] 본 출원 전부를 통해 사용되는 바, "약독화 바이러스 (attenuated virus)"는 의도된 개체에서 그의 병원성이 실질적으로 감소되도록 변형되었던 바이러스라면 모두를 말한다. 바람직하게, 바이러스는 예로 바이러스에 노출된 개체가 대조군 개체에 대비하여 통계학적으로 유의한 병원성의 증가 수준을 나타내는 임상적 측면에서 비병원성이 될 때까지 약독화된다. 야생형 플라비바이러스과의 약독화에 대한 수 가지의 실험적 접근법이 기술되어 왔다 (예로, PUGACHEV et al., J. Parasitolol. 33: 567-582 (2003)를 참조하라). 예를 들어, YFV의 캡시드 (capsid) 및 비-구조 (non-structural) 단백질 또한 JEV, DENV, 또는 웨스트 나일 바이러스의 막 (membrane) 및 외투 (envelop) 단백질을 포함하는 키메라 플라비바이러스과 (chimeric Flaviviridae)의 외투 단백질의 소정 아미노산에서 돌연변이가 내장친화성 (viscerotropism)을 감소시키는 것이 관찰되었다 (예로, 국제특허출원 제 WO2003/103571호 및 제 WO2004/04529호를 참조하라).

[0065] 본 출원 전부를 통해 사용되는 바, "재조합 바이러스 (recombinant virus)"는 그의 계놈 내에 삽입된 외인성 서열을 포함하는 바이러스를 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바, "외인성 서열 (exogenous sequence)"는 자연적으로 부모 바이러스에 존재하지 않는 핵산 분자를 말한다. "재조합 바이러스 (recombinant virus)"는 하나 이상의 구조 단백질이 진핵성, 원핵성, 바이러스 기원 (예로, 두 번째 바이러스의 구조 단백질(들))의 외래 핵산 서열로 대체되었던 바이러스로 이루어진 바이러스라고 말할 수 있다. 따라서 본 발명에 따라, "재조합 바이러스"는 "키메라 바이러스 (chimeric virus)" 또는 "하이브리드 바이러스 (hybrid virus)"와도 차별없이 불리워질 수 있다. 명확하게는, 플라비바이러스과의 경우 키메라 플라비바이러스과는 prM 및 E 단백질이 두 번째 바이러스 (예로, 이전에 기술된 바와 같은 JEV, WNV, DENV, 세인트루이스 뇌염 바이러스 또는 TBEV)의 prM 및 E 단백질로 대체되었던 첫 번째 플라비바이러스과 (예로, 이전에 기술된 바와 같은 예를 들어 YFV 17D 균주와 같은 YFV)를 포함할 수 있다. 키메리백스™ (ChimeriVax™) 기술이 의학적으로 중요한 플라비바이러스과에 대항하는 키메라 백신 후보 (chimeric vaccine candidates)를 만드는 데 사용되어 왔다. 이것은 prM-E 유전자가 JEV, WNV, DENV, WNV 또는 세인트루이스 뇌염 바이러스와 같은 이종유래 플라비바이러스과로부터 나온 prM-E 유전자로 대체되었던 벡터로서 YFV 17 백신 바이러스를 사용하고 있다 (MONATH et al., Vaccines 20: 1004-1018 (2002); PUGACHEV et al., Int. J. Parasitol. 33: 567-582 (2003); GUIRAKHOO et al., J. Virol. 8: 78: 4761-4775 (2004)). SA14-14-2 바이러스 (예로, 중국에서 사용되는 살아있는 약독화된 JEV 백신)로부터 나온 prM-E 유전자를 포함하는 키메리백스™-JEV 백신가 전임상 및 I기와 II기 임상시험에서 성공적으로 테스트되었다. 유사하게, 약독화를 증가시키도록 E 단백질 내에 도입된 세 가지 특이 아미노산 변화를 가지는 WNV (예로, NY99 균주)로부터 나온 prM-E 서열을 포함하는 키메리백스™-WNV 백신 후보를 사용하여 성공적인 I기 임상시험도 시행되었다 (ARROYO et al., J. Virol. 78: 12497-12507 (2004)). 다른 예로서, 키메라 플라비바

이러스과는 또한 국제 특허출원 제 WO2006/068307호, 제 WO2002/102828호, 유럽 특허 제 EP097787호, 국제특허 출원 제 WO98/37911호, 제 WO93/06214호, 미국 특허 제 US7569383호, 및 국제특허출원 제 WO01/39802호에 기술된 바와 같은 키메라 플라비바이러스과일 수 있다.

[0066] 유익하게, 재조합 바이러스는 더 나아가 외인성 서열(들)의 발현에 필요한 요소 (elements)를 포함할 수 있다. 발현에 필요한 요소로는 RNA로의 뉴클레오타이드 서열의 전사 및 폴리펩타이드로의 mRNA의 해독을 허용하는 한 벌의 요소 (set of elements), 상세하게는 세포가 재조합 바이러스에 의해 감염되는 데 효과적인 프로모터 서열 및/또는 조절 서열, 임의적으로 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드의 분비 또는 발현을 허용하는데 필요한 서열을 포함한다. 이들 요소는 유도가능 (inducible)하거나 전신 발현 (constitutive) 될 수 있다. 당연하게, 프로모터는 선택된 재조합 바이러스 및 숙주 세포에 적응될 수 있다. 이러한 프로모터 서열과 관련된 많은 양의 정보는 문헌들이 제공하고 있다. 또한 필요한 요소로는 숙주세포에서 외인성 서열의 발현 또는 그의 유지 (maintenance)를 향상시키는 추가적인 요소를 포함한다. 상세하게는, 인트론 서열, 분비 신호 (secretion signal) 서열, 핵 정착 (nuclear localization) 서열, IRES 탑입의 해독 재개시 (reinitiation of translation)를 위한 내부 부위, 전사의 종결을 위한 폴리 A 서열이 언급될 수 있다.

[0067] 본 출원 전부를 통해 사용되는 바, "온도 민감성 바이러스 (temperature sensitive virus)"는 야생형이 정상적 성장을 하는 소정의 온도 이상에서 손상된 성장 (impaired growth)을 하는 바이러스 유도체를 말한다. 예로서, 보이드 등 (BOYD O. et al., Virology Apr 10; 399(2): 221-30 (2010)), 유럽 특허 제 EP 0 157 528호 (천연두 온도 민감성 바이러스), 및 드릴리엔 등 (DRILLIEN R. et al., Virology 119: 372-381 (1982))에 기술된 바와 같은 온도 민감성 바이러스가 인용될 수 있다.

[0068] 본 발명에 따르면, "플루 바이러스 (Flu viruses)" (인플루엔자 바이러스라고도 불림)로는 A형 인플루엔자 바이러스 및 그의 아형들, B형 인플루엔자 바이러스 및 C형 인플루엔자 바이러스를 포함한다. "A형 인플루엔자 바이러스의 아형들 (subtypes of influenza type A virus)"은 가능한 한의 HA 및 NA 단백질의 서로 다른 조합을 포함한다. NA 단백질 (H1 - H15로 분류됨)의 19가지 클래스 및 NA 단백질 (N1 - N9로 분류됨)의 9가지 클래스가 A형 인플루엔자 바이러스에서 확인되었다. 예로서, A형 인플루엔자 바이러스의 아형은 H1N1 바이러스, H1N2 바이러스, H3N2 바이러스, H3N8 바이러스, H5N1 바이러스, H7N2 바이러스, H7N3 바이러스, H7N7 바이러스 및 H9N2 바이러스일 수 있다. 플루 바이러스 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 자세한 정보도 역시 www.flugenome.org/와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. A형 인플루엔자 바이러스 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크, EMBL 또는 LANL 예로, J02144; J02146; J02148; J02151; V00603; V01099; V01104; V01106:과 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. B형 인플루엔자 바이러스 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크, EMBL 또는 LANL 예로, J02094; J02095; J02096; K00423; K00423; K01395; M20168; M20170; M20172:와 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. C형 인플루엔자 바이러스 계놈의 뉴클레오타이드 서열에 관한 정보도 역시 진뱅크, EMBL 또는 LANL 예로, K01689; M10087; M17700:과 같은 공개적으로 접근가능한 유전자 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. 약독화 플루 바이러스 백신에 관한 자세한 정보는 히클링 (HICKLING J. 인플루엔자 바이러스 백신의 생산 및 인플루엔자 유행의 대비물로서 개발도상국에서 그들의 배포의 적합성, 세계보건기구 (WHO)(2006); www.who.int/vaccine) 및 루덴코 등 (RUDENKO L. G. et al., Vaccine 19(2-3): 308-318 (2000))에서 찾아볼 수 있다. 예를 들어 플루미스트® (FluMist®, 메드아뮨 백신사)와 같은 약독화된 감기-적응되고 온도-민감한 플루 바이러스 백신에 관한 자세한 정보는 글레젠 (GLEZEN W. Expert Rev. Vaccines 3(2): 131-9 (2004))에서 찾아볼 수 있다.

[0069] 본 발명에 따르면, "파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae)"는 아류라바이러스 (Avulaviruses), 헤니파바이러스 (Henipaviruses), 모르빌리바이러스 (Morbiliviruses), 레스피로바이러스 (Respiroviruses), 루불라바이러스 (Rubulaviruses), 뉴모바이러스 (Pneumoviruses) 및 메타뉴모바이러스 (Metapneumoviruses)를 포함한다. 아류라바이러스는 조류 파라믹소바이러스 1 (APMV-1)이라고도 불리는 뉴캐슬병 바이러스 (Newcastle disease virus, NVD)를 포함한다. 헤니파바이러스는 핸드라 바이러스 (Hendra virus, HeV) 및 니파 바이러스 (Nipah virus, NiV)를 포함한다. 모빌리바이러스는 균주: 에드몬스톤 B 균주 (ENDERS J. F. and T. C. PEEBLES, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 277-286 (1954)), 에드몬스톤 A 및 B 약독화 균주 (GRIFFIN D. and BELLINI W., in B. Fields, D. Knipe et al. (ed), Virology, Vol. 2, 1267-1312, 리핀코트-라벤 출판사, 필라델피아 (1996)), 슈바르츠/모라텐 약독화 균주 (GRIFFIN D. and BELLINI W., 홍역 바이러스, in B. Fields, D. Knipe et al. (ed), Virology, Vol. 2, 1267-1312, 리핀코트-라벤 출판사, 필라델피아 (1996); 루백스™ (Rouvax™) 하로 아벤

티스 파스퇴르에 의해 시판됨) 및 유럽 특허 제 EP0540135호, 국제특허출원 제 WO2008/086042호 또는 제 WO99/49017호에 기술된 바와 같은 약독화 MV 균주의 홍역 바이러스 (MV)를 포함한다. 레스피로바이러스는 센다이 바이러스 (마우스 파라인플루엔자 바이러스 1이라고도 불리는 SeV), 소 파라인플루엔자 바이러스 3 (BPIV-3), 인간 파라인플루엔자 바이러스 1 (HPIV-1) 및 인간 파라인플루엔자 바이러스 3 (HPIV-3)를 포함한다. 루불라바이러스는 인간 파라인플루엔자 바이러스 2 (HPIV-2), 인간 파라인플루엔자 바이러스 4a (HPIV-4a), 인간 파라인플루엔자 바이러스 4b (HPIV-4b) 및 면포스 바이러스 (mumps virus)를 포함한다. 뉴모바이러스는 인간 호흡기 합포체 바이러스 A2 (human respiratory syncytial virus A2, HRSV-A2), 인간 호흡기 합포체 바이러스 B1 (HRSV-B1) 및 인간 호흡기 합포체 바이러스 S2 (HRSV-S2)를 포함한다. 메타뉴모바이러스는 인간 메타뉴모바이러스 (HMPV)를 포함한다.

[0070] 본 출원 전부를 통해 사용되는 바, "단백질 (proteins)"은:

- 항체 (예로, 리투시마브 (rituximab); 트라스투주마브 (trastuzumab); 세투시마브 (cetuximab); 밀라투주마브 (milatuzumab); 에쿨리주마브 (eculizumab); 토시리주마브 (tocilizumab); 니모투주마브 (nimotuzumab); 골리무마브 (golimumab); 람시루마브 (ramcirumab); 바피뉴마브 (bapineumab); 인플리시마브 (infliximab); 베마시주마브 (bevacizumab); 아달리무마브 (adalimumab); 라니비주마브 (ranibizumab); 팔리비주마브 (palivizumab); 오말리주마브 (omalizumab); 나탈리주마브 (natalizumab); 패니투무마브 (panitumumab); 앱시지마브 (abciximab); 에팔리주마브 (efalizumab); 세르톨리주마브 (certolizumab); 토시리주마브 (tocilizumab); 우스텐키누마브 (ustenkinumab));

[0072] - 수용체 리간드 (예로, 호르몬; 사이토카인; 성장인자);

[0073] - 호르몬 (예로, 부신피질자극 호르몬 (ACTH); 항이뇨 호르몬 (ADH, 바소프레신); 심방-나트륨이뇨 펩타이드 (ANP); 칼시토닌; 콜레시스토카닌 (CCK); 코르티코트로핀-분비 호르몬 (CRH); 글루카곤; 생식샘자극호르몬-분비 호르몬 (GnRH); 성장호르몬 분비 호르몬 (GHRH); 옥시토신; 세크레틴; 소마토스타틴; 갑상샘자극호르몬-분비 호르몬 (TRH); 에리트로포이에틴 (EPO); 난포-자극 호르몬 (FSH); 성장호르몬 (GH); 인간 융모성 생식샘자극호르몬 (HCG); 인슐린; 인슐린-유사 성장인자-1 (IGF-1); 황체 호르몬 (LH); 부갑상샘 호르몬 (PTH); 프로락틴 (PRL); 트롬보포이에틴; 갑상샘-자극 호르몬 (TSH); 테스토스테론; 디하이드로테스토스테론 (DHT); 안도스텐디온; 디하이드로에피안드로스테론 (DHEA); 테스토스테론; 칼시페롤; 칼시트리올; 에스트라디올; 코티졸; 알도스테론; 프로게스테론; 아드레날린 (에피네프린); 도파민; 멜라토닌; 노르아드레날린 (노르에피네프린, NE); 트리이오도타이로닌 (T3); 타이록신 (T4); 세로토닌);

[0074] - 사이토카인 (예로, 인터루킨 (IL-1; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15; IL-16; IL-17; IL-18; IL-19; IL-20; IL-21; IL-22; IL-23; IL-24; IL-25; IL-26; IL-27; IL-28; IL-29; IL-30; IL-31; IL-32; IL-33); 케모카인 (CC 케모카인 리간드 1 (CCL-1); CCL-2; CCL-3 (대식세포 염증성 단백질 1 알파 (MIP-1 α)라고도 불림); CCL-4 (대식세포 염증성 단백질 1 베타 (MIP-1 β)라고도 불림); CCL-5 (RANTES라고도 불림); CCL-6; CCL-7; CCL-8; CCL-9; CCL-10; CCL-11; CCL-12; CCL-13; CCL-14; CCL-15; CCL-16; CCL-17; CCL-18; CCL-19; CCL-20; CCL-21; CCL-22; CCL-23; CCL-24; CCL-25; CCL-26; CCL-27; CCL-28; CXC 케모카인 1 (CXCL-1); CXCL-2; CXCL-3; CXCL-4 (헬소판 인자 4 (PF4)라고도 불림); CXCL-5; CXCL-6; CXCL-7; CXCL-8; CXCL-9; CXCL-10; CXCL-11; CXCL-12; CXCL-13; CXCL-14; CXCL-15; CXCL-16; CXCL-17; C 케모카인 1 (XCL-1); XCL-2; CX₃C 케모카인 1 (CX₃CL-1); 인터페론 (INF-알파; IFN-베타; IFN-감마); 종양괴사인자 (TNF-알파; TNF-베타));

[0075] - 성장인자 (예로, 표피성장인자 (EGF); 혈관 자궁내피 성장인자 (VEGF); 골 형태형성 단백질 (BMPs); 에리트로포이에틴 (EPO); 섬유모세포 성장인자 (FGF); 과립구 콜로니-형성 인자 (G-CSF); 과립구-대식세포 콜로니-형성 인자 (GM-CSF); 인간 다능성 과립구 콜로니-형성 인자 (hPG-CSF); 대식세포 콜로니-형성 인자 (M-CSF); 인간 분화 인자-9 (GDF9); 대식세포 이동 저해인자 (MIF); 인슐린-유사 성장인자 (IGF); 미오스타틴 (GDF-8); 신경 성장인자 (NGF); 혈소판-유래 성장인자 (PDGF); 트롬보포이에틴 (TPO); 형질전환 성장인자 알파 (TGF- α); 형질 전환 성장인자 베타 (TGF- β); 태반 성장인자 (PIGF)), 항원 (예로, MHC의 항원; 백혈구 기능 관련 항원-1 (LFA-1));

[0076] - 세포 부착 분자 (cell adhesion molecules) (예로, 세포내 세포 부착 분자 (ICAM-1); 신경세포 부착 분자 (NCAMs); 혈관 세포 부착 분자 (VCM-1); 혈소판-내피세포 부착 분자 (PECAM-1); 넥틴; 시냅스 세포 부착 분자 (SynCAMs));

- [0077] - 혈액 응고 인자 (blood clotting factors)(예로, 인자 VIII; 인자 IX; tPA);
- [0078] - 효소 (예로, 알파-아밀라제 (alpha-amylase); 베타-아밀라제 (beta-amylase); 셀룰라제 (cellulase); 베타-글루카나제 (beta-glucanase); 베타-글루코시다제 (beta-glucosidase); 덱스트라나제 (dextranase); 덱스트리나제 (dextransinase); 글루코아밀라제 (glucoamylase); 헤미셀룰라제 (hemicellulase); 펜토사나제 (pentosanase); 자일라나제 (xylanase); 인버타제 (invertase); 락타제 (lactase); 나린기나제 (naringinase); 펙티나제 (pectinase); 풀루라나제 (pullulanase); 산 단백질분해효소 (acid proteinase); 알칼리 단백질분해효소 (alkaline proteinase); 브로멜레인 (bromelain); 펩신 (pepsin); 아미노펩ти다제 (aminopeptidase); 엔도펩티다제 (endopeptidase); 섭틸리신 (subtilisin); 아미노아실라제 (aminoacylase); 글루타미나제 (glutaminase); 라이소자임 (lysozyme); 페니실린 아실라제 (penicillin acylase); 이소머라제 (isomerase); 알코올 탈수소효소 (alcohol dehydrogenase); 카탈라제 (catalase); 클로로퍼옥시다제 (chloroperoxidase); 퍼옥시다제 (peroxidase); 아세토락테이트 탈탄산효소 (acetolactate decarboxylase); 히스티다제 (histidase); 사이클로덱스트린 글리코실전이효소 (cyclodextrin glycosyltransferase)); 그들의 단편들 및 그들의 조합들을 포함한다.
- [0079] 한 가지 특별한 구현예에 따라, 본 발명은 바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도에 관한 것이다.
- [0080] 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도에 관한 것이고, 상기 바이러스는 플라비바이러스과 (Flaviviridae)이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 3은 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.
- [0081] 또 다른 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 예를 들어 사이토카인, 항체 및 호르몬으로 이루어진 그룹으로부터, 보다 더 상세하게는 IL-2, 리투시마브 및 에리트로포이에틴 (EPO)로 이루어진 그룹에서 선택되는 단백질과 같은 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주의 용도에 관한 것이다. 바람직한 IL-2를 생산하는 방법은 실시예 5에 기술되어 있다. 바람직한 리투시마브를 생산하는 방법은 실시예 6에 기술되어 있다. 바람직한 EPO를 생산하는 방법은 실시예 7에 기술되어 있다.
- [0082] 또 다른 특별한 구현예에 따라, 본 발명은 바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도에 관한 것이다.
- [0083] 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도에 관한 것이고, 상기 바이러스는 플라비바이러스과이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 3은 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.
- [0084] 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 바이러스 및 단백질의 생산을 위해, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주 및 그의 유도체의 용도에 관한 것이고, 상기 바이러스는 폭스바이러스과이고, 바람직하게는 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP), 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 4는 W-COP 및 MVA를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.
- [0085] 또 다른 바람직한 구현예에 따라, 본 발명은 예를 들어 사이토카인, 항체 및 호르몬으로 이루어진 그룹으로부터, 보다 더 상세하게는 IL-2, 리투시마브 및 에리트로포이에틴 (EPO)로 이루어진 그룹에서 선택되는 단백질과 같은 단백질의 생산을 위한, 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주의 용도에 관한 것이다. 바람직한 IL-2를 생산하는 방법은 실시예 5에 기술되어 있다. 바람직한 리투시마브를 생산하는 방법은 실시예 6에 기술되어 있다. 바람직한 EPO를 생산하는 방법은 실시예 7에 기술되어 있다.
- [0086] 또한, 본 발명은:
- [0087] a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 바이러스로

감염시키고; 또한

[0088] b) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는; 단계를 포함하는 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0089] 본 발명은 더 나아가:

[0090] a) 패키징 세포의 배양을 준비하고;

[0091] b) 상기 패키징 세포 배양을 오르토폭스바이러스 (Orthopoxvirus)로 감염시키고;

[0092] c) 상기 감염된 패키징 세포를 자손 오르토바이러스가 생산될 때까지 배양하고;

[0093] d) 하나 이상의 핵산분해효소의 존재 시 배양하고;

[0094] e) 상기 오르토폭스바이러스를 배양 상청액 및/또는 패키징 세포로부터 회수하고;

[0095] f) 상기 단계 e)에서 회수된 오르토폭스바이러스에 상기 핵산분해효소(들) 활성을 억제하고 단계 g)에서 음이온 교환 흡착제에 상기 오르토바이러스의 흡착을 피하도록 적합한 조건 하에서 단가 염 (monovalent salts)을 첨가하고;

[0096] g) 상기 단계 f)에서 획득된 혼합물을 핵산의 포획을 허용하도록 적합한 조건 하에서 음이온 교환 흡착제와 접촉시키고;

[0097] h) 상기 단계 g)에서 획득된 혼합물을 세포성 잔재물의 제거를 허용하도록 적합한 조건 하에서 정화하고;

[0098] i) 상기 음이온 교환 흡착제를 유동물 (flow through)에 남아있는 오르토폭스바이러스를 회수하도록 적합한 조건 하에서 단가 염을 포함하는 용액으로 세척하고;

[0099] j) 상기 단계 h)에서 획득된 유동물 및 상기 단계 i)에서 획득된 유동물을 농축하고;

[0100] k) 상기 단계 j)에서 획득된 오르토폭스바이러스를 포함하는 분획을 투석여과하는: 단계를 포함하고,

[0101] 상기 패키징 세포는 국제특허출원 제 WO 2007/077256호에 의해 기재된 텔로머라제 역전사효소 (TERT)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주인 것을 특징으로 하는 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0102] 상세하게는, 다음의 불멸화 조류 세포주가 바람직하다:

[0103] 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하로 기탁된 바와 같은 T3-17490 또는 그의 유도체 (도 2, 3 및 4를 참조하라);

[0104] 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 바와 같은 T6-17490 또는 그의 유도체 (도 5, 6 및 7을 참조하라).

[0105] 바람직한 구현예에 따라, 상기 바이러스는 플라비바이러스파이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 3은 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.

[0106] 또 다른 특별한 구현예에 따라, 본 발명은:

[0107] a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 바이러스로 감염시키고; 또한

[0108] b) 상기 감염된 조류 세포주를 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는: 단계를 포함하는 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0109] 바람직한 구현예에 따라, 상기 바이러스는 플라비바이러스파이고, 바람직하게는 황색열 바이러스 (YFV) 균주 및 일본 뇌염 바이러스 (JEV) 균주로 이루어진 그룹에서, 보다 상세하게는 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 3은 YFV 17D 균주 및 JEV 나카야마 야생형 균주를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.

[0110] 바람직한 구현예에 따라, 상기 바이러스는 폭스바이러스파이고, 바람직하게는 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐

(W-COP), 및 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)로 이루어진 그룹에서 선택된다. 실시예 4는 W-COP 및 MVA를 생산하는 바람직한 방법을 기술하고 있다.

[0111] 본 발명의 조류 세포주는 바람직하게 30°C 및 37°C 사이에 포함되는 온도에서, 더욱 바람직하게는 실시예 3 및 4에 기술된 바와 같이 37°C에서 감염된다. 본 발명의 세포주의 바이러스로 감염의 단계 a)는 적절한 세포 배양 배지에서 수행된다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 예로 혈청 (예로, 우태아 혈청 (FCS)) 및/또는 아미노산(들) (예로, L-글루타민)이 임의적으로 보충될 수 있는 둘베코의 변형 이글 배지 (DMEM, 인비트로겐사) 또는 기본 이글 배지 (BME, 인비트로겐사)일 수 있다. 또한 세포 배양 배지는 동물 산물이 없는 배지일 수 있다. 동물 산물이 없는 많은 배지가 이미 기술되어 왔으며 이들의 일부는 예를 들어 293 SFM II; SFM 적응된 293-F 세포; SFM 적응된 293-H 세포; 293 펙틴TM 형질전환 시약; CD 293 AGTTM; CD 293 배지; 프리스타일TM 293 발현 시스템; 프리스타일TM 293 배지; SFM 적응된 프리스타일TM 293-F 세포; VP-SFM; VP-SFM AGTTM; 아데노바이러스 발현 배지 (AEM) PER.C6[®] 세포를 위한 성장 배지; CD 293 AGTTM; CD 293 배지; SFM 적응된 COS-7L 세포; EPISERF[®] 배지; OptiProTM SFM (인비트로겐사로부터 모두 입수가능함)와 같이 시판되고 있다. 실시예 3에서 및 실시예 4에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 조류 세포주의 감염을 위해 사용되는 세포 배양 배지로는 FCS 및 L-글루타민이 보충된 BME (인비트로겐사)이 바람직하다.

[0112] 본 발명의 세포주는 생산되는 바이러스에 의존하는 감염의 강도 (Multiplicity of Infection, MOI)로 감염된다. 예를 들어, 플라비바이러스과는 본 발명의 조류 세포주 내에 바람직하게 약 0.001 및 0.1 사이에 해당하는 MOI로 접종된다. 보다 상세하게는, 생산되는 플라비바이러스과가 YFV 또는 JEV인 경우, MOI는 실시예 3, 도 7A, 도 8A, 도 9A 및 도 10에 기술된 바와 같이 약 0.001인 것이 더욱 바람직하다. 또 다른 실시예와 같이, 폭스바이러스과는 본 발명의 조류 세포주 내에 바람직하게 약 0.0001 및 0.1 사이에 해당하는 MOI로 접종된다. 보다 상세하게는, 생산되는 폭스바이러스과가 W-COP인 경우, MOI는 실시예 4 및 도 11B에 기술된 바와 같이 약 0.0001인 것이 더욱 바람직하다. 생산되는 폭스바이러스과가 MVA인 경우, MOI는 실시예 4 및 도 11A에 기술된 바와 같이 약 0.05인 것이 더욱 바람직하다.

[0113] 그 다음 감염된 세포주가 바이러스 증폭을 가능하게 하는 조건 하에서 배양되는 것 (예로, 단계 b))은 바이러스 계놈이 전사되고 바이러스 단백질로 해독되고 감염성 바이러스 입자 내로 포장되는 것을 의미한다.

[0114] 감염된 세포주는 (마이크로)담체의 존재 시 또는 부재 시 표면에 부착되는 세포로서 또는 혼탁액으로 배양될 수 있다 (이전에 정의된 바와 같음). 세포주 배양은 예를 들어 접시 (dishes), 회전 병 (roller bottles)에서 또는 회분식 (batch), 사료첨가-회분식 (fed-batch), 연속식 (continuous) 시스템, 빈공간 섬유 (hollow fiber) 등을 사용하는 생물반응기에서 시행될 수 있다. 본 발명의 감염된 조류 세포주는 바람직하게 30°C 및 37°C 사이에 포함되는 온도에서 배양되고, 더욱 바람직하게는 실시예 3 및 4에 기술된 바와 같이 37°C에서 배양된다. 감염된 조류 세포주의 배양의 단계 b)는 조류 세포주의 감염을 위해 사용되는 (단계 a)에서) 세포 배양 배지와 동일하거나 다를 수 있는 적절한 세포 배양 배지에서 수행된다. 감염된 조류 세포주는 바이러스에 의존적으로 1 및 5일 사이 동안 배양되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 생산된 바이러스가 YFV인 경우 감염된 조류 세포주는 도 7A 및 도 9A에 기술된 바와 같이 1 및 3일 사이 동안 배양되는 것이 더 바람직하다. 또 다른 예로서, 생산된 바이러스가 JEV인 경우 감염된 조류 세포주는 도 8A 및 도 10A에 기술된 바와 같이 1 및 4일 사이 동안 배양하는 것이 더 바람직하다. 또 다른 예로서, 생산된 바이러스가 W-COP 또는 MVA인 경우 감염된 조류 세포주는 도 11 (A-B)에 기술된 바와 같이 1 및 4일 사이 동안 배양하는 것이 더 바람직하다.

[0115] 본 발명에 따르면, 단계 b)의 감염은 조류 세포주의 감염에 사용되는 (단계 a)에서) 세포 배양 배지와 감염된 조류 세포주의 배양에 사용되는 (단계 b)에서) 세포 배양 배지는 서로 동일하거나 다를 수 있는 적절한 세포 배양 배지에서 본 발명의 세포주를 배양하는 단계보다 선행될 수 있다. 조류 세포주는 바람직하게 30°C 및 37°C 사이에 포함되는 온도에서, 더욱 바람직하게는 실시예 3 및 4에 기술된 바와 같이 37°C에서 배양되고, 바람직하게 감염 이전에 1 내지 3일 사이 동안, 더욱 바람직하게는 1일 동안 배양된다.

[0116] 본 발명에 따라, 단계 b)의 감염된 세포주를 배양하는 것은 용액에 존재하는 핵산 (예로, DNA; RNA)을 분해하기 위하여 하나 이상의 핵산분해효소 (예로, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제) 존재 시 배양하는 단계로 진행될 수 있다. 바람직하게, 본 발명에 따라 사용되는 핵산분해효소는 엔도뉴클레아제이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제는 다음과 같이 그들의 기질에 근거하여 분류될 수 있다: DNA를 분해하는 데옥시리보뉴클레아제 (DNase); RNA를 분해하는 리보뉴클레아제 (RNase); 및 DNA와 RNA를 분해하는 엔도뉴클레아제. 엔도뉴클레아제 DNase로는 이에 제한되는 것은 아니지만 DNase I, DNase II 및 엔도데옥시리보뉴클레아제를 포함한

다. 엔도뉴클레아제 RNase로는 이에 제한되는 것은 아니지만 RNase I, RNase II, RNase III, RNase E, RNase F 및 RNase P를 포함한다. DNA 및 RNA를 분해하는 엔도뉴클레아제로는 이에 제한되는 것은 아니지만 벤조나제[®] (Benzonase[®])를 포함한다. 바람직하게 본 발명에 따라 사용되는 엔도뉴클레아제는 벤조나제[®]이다. 벤조나제[®]은 특이적 뉴클레오타이드들 간의 내부 포스포디에스테르 결합을 가수분해시켜 핵산 (예로, DNA; RNA)을 분해한다. 완전하게 소화가 되고 나면, 용액에 존재하는 모든 자유 핵산 (예로, DNA; RNA)은 5'-모노포스페이트로 종결되는 3 내지 8개의 염기 길이를 가지는 올리고뉴클레오타이드로 환원된다. 벤조나제[®]은 단백질분해 활성을 전혀 가지지 않는다. 본 발명에 따라 사용되는 벤조나제[®]은 약제학적으로 허용가능한 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용가능한 벤조나제[®]은 시판되고 있다 (예로, 유로젠텍사의 제품번호 ME-0280-10 하로; 예로, 머크사의 제품번호 1.01653.0001 하로). 본 발명에 따라, 사용된 핵산분해효소(들)의 농도는 5 내지 100 U/ml의 범위이고, 5 내지 50 U/ml의 범위인 것이 바람직하고 10 U/ml인 것이 더 바람직하다.

[0117]

그 다음 생산된 바이러스는 상청액 및/또는 세포로부터 회수된다. 생산된 바이러스가 세포로부터 (예로, 단지 세포로부터만, 또는 세포와 상청액으로부터) 회수되는 경우, 생산된 바이러스를 회수하는 단계는 세포막을 파쇄하는 단계가 앞서 선행될 수 있다. 본 단계는 세포로부터 바이러스의 분리 (liberation)를 유도한다. 세포막의 파쇄는 당업자가 잘 숙지하고 있는 다양한 기법에 의해 유도될 수 있다. 이들 기법으로는 이에 제한되는 것은 아니지만 냉동/해동 (freezing/thawing), 저장성 용해 (hypotonic lysis), 파쇄 (sonication) (파쇄기 (sonicator)의 사용에 의함) 및 미세액화 (microfluidization) (미세액화기 (microfluidizer)의 사용에 의함)을 포함한다. 파쇄기는 예로 헤레우스사 PSP (Heraeus PSP), 바이올로지사 (Biologics), 미소닉스사 (Misonix) 또는 글렌밀스사 (Glen Mills)로부터 시판되고 있다. 본 발명에 따라 사용되는 바람직한 파쇄기는 소니튜브 20 kHz 타입 SM 20-120-3 및 소니튜브 35 kHz 타입 SM 35-400-3 (헤레우스사 PSP)이다. 미세액화기는 예로 마이크로플루이딕스사 (Microfluidics Corporation)로부터 시판되고 있다. 또한 조류의 세포막은 SLM 아민코 프렌치 프레스기 (SLM Aminco French press)를 사용하여 파쇄될 수 있다. 또한 세포막은 고속 균질화기 (homogenizer)를 사용하여 파쇄될 수 있다. 고속 균질화기는 예로 실버슨 머신사 (Siverson Machines) 또는 이카-라보테크닉사 (Ika-Labotechnik)로부터 사판되고 있다.

[0118]

본 발명의 특별한 구현예에 따르면, 회수된 바이러스는 그 다음 정제된다. 생산된 바이러스의 정제는 예를 들어 다음의 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다:

[0119]

- 적합한 조건 하에서 세포성 잔재물의 제거를 허용하는 정화. 상기 정화는 예로 심층 여과 (depth filtration)에 의해 수행될 수 있다. 심층 여과는 이에 제한되는 것은 아니지만 사토리우스사 (Sartorius)로부터 나온 사토피어[®] 필터 (예로, 사토피어[®] PP2), 쿠노사 (CUNO)가 만든 AP 시리즈 심층 필터 (예로, AP01), 쿠노가 만든 CP 시리즈 심층 필터 (예로, CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), 쿠노사가 만든 HP 시리즈 심층 필터 (예로, HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), 쿠노사가 만든 칼리프. (Calif.) 시리즈 심층 필터 (예로, CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), 쿠노사가 만든 SP 시리즈 심층 필터 (예로, SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), 쿠노 드리피드 (CUNO Delipid) 및 드리피드 플러스 (Delipid Plus) 필터, 밀리포어사가 만든 CE 시리즈 심층 필터 (예로, CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), 밀리포어사가 만든 DE 시리즈 심층 필터 (예로, DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE60, DE65, DE70, DE75), 밀리포어사가 만든 HC 필터 (예로, A1HC, B1HC, COHC), 쿠노 폴리넷TM (PolyNetTM) 필터 (예로, 폴리넷TM PB P050, P100, P200, P300, P400, P500, P700), 밀리포어사 클라리가드 (Clarigard) 및 폴리가드 (Polygard) 필터, 쿠노 라이프 어슈어 (CUNO Life Assure) 필터, 만셀 어소시에이트 (ManCel Associates) 심층 필터 (예로, PR 12 UP, PR12, PR5 UP); 및 팔사 (PALL) 또는 세이츠шен크사 (SeitzSchenk)가 만든 필터와 같은 하나 이상의 시판되는 제품의 사용을 포함한다. 입수 가능한 심층 필터 유닛 (Depth filtration units)의 정화 능력을 향상시키기 위하여, 공극 크기를 감소시키면서 둘 이상의 유닛을 결합하는 것이 유용할 수 있다. 본 구현예에서, 정화될 혼합물은 가장 큰 오염물을 보유하는 첫 번째의 심층 여과 유닛을 통해 통과하고 이어서 두 번째의 심층 여과 유닛을 통해 통과한다. 본 관점으로, 정화 과정은 심층 여과에 의해 수행되는 것이 바람직하고, 5 μm의 공극 크기를 가지는 필터와 결합된 8 μm의 공극 크기를 가지는 필터를 통하는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명에 따라 사용되는 8 μm 및 5 μm의 공극 크기를 가지는 바람직한 필터는 사토리우스사로부터 시판되는 사토피어[®] 필터이다 (Sartopure[®] PP2). 심층 여과는 1 L/분의 유속으로 수행되는 것이 바람직하다.

[0120]

- 예로, 미세여과 (microfiltration) 또는 초여과 (ultrafiltration)에 의해 수행될 수 있는 농도. 미세여과

는 큰 분자를 농축하고 정제하는 압력으로 추진되는 막 공정 (membrane process)이다. 보다 상세하게, 용액은 공극 크기가 보유물 (retentate)에서 바이러스를 거부하도록 선택되었던 공극 크기를 가지는 필터를 통과하고 작은 분자 (예로, 단백질)가 필터를 통해 통과하여 투과물 (permeate) 내로 통과되도록 한다. 미세여과는 추출 용액의 부피를 감소시킨다. 본 발명에 따라 사용된 필터로는 예를 들어 프로스탁 미세여과 모듈 (Prostak Microfiltration Modules, 밀리포어사)과 같은 고압멸균 가능한 (autoclavable) 시판되는 필터가 바람직하다.

[0121] - 투석여과 (diafiltration)는 미세여과를 개선시킨 것이고 바이러스를 포함하는 상기 분획을 용액으로 희석하여 상기 분획에서 불순물의 농도를 감소시키도록 작용한다. 바이러스를 포함하는 분획의 희석은 상기 분획으로부터 불순물을 세척해내도록 한다. 투석여과는 회분식 양식 (batch mode), 반-연속식 양식 (semi-continuous mode), 또는 연속식 양식 (continuous mode)으로 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 투석여과가 유익하게는 바이러스가 포함되는 완충용액을 교환하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 정제 방법에 사용되는 완충용액을 약 제학적으로 허용가능한 완충액으로 교환하는 것이 유용할 수 있다. 본 발명에 따른 투석여과에 사용되는 필터는 보유물에서 바이러스의 거부 및 필터를 통한 투과물 내로 작은 분자 (예로, 단백질)의 통과를 허용한다. 이러한 필터는 예를 들어 프로스탁 미세여과 모듈 (밀리포어사)과 같은 고압멸균 가능한 시판되는 필터가 바람직하다.

[0122] - 양이온 또는 음이온 교환 흡착제, 바람직하게는 음이온 교환 흡착제를 사용하는 크로마토그래피. 음이온 교환 흡착제의 기능적 그룹은 예를 들어 디메틸아미노에틸 (DMAE), 디에틸아미노에틸 (DEAE), 트리메틸아미노에틸 (TMAE), 트리에틸아미노에틸 (TEAE), R-CH(OH)-CH₂-N+-(CH₃)₃ (Q 그룹이라고도 명명됨; 스트립라인® 레진, 파마시아사를 참고하라)와 같은 일차, 이차, 삼차 또는 사차 아미노 그룹 또는 pH 7.0 내지 9.0 범위 이내에서 정식의 양전하를 이미 가지거나 가질 예를 들어 폴리에틸이민 (PEI)와 같은 기타 그룹일 수 있다. 음이온 교환 흡착제는, 이에 제한되는 것은 아니지만 예로 비드-형성 매트릭스 또는 막으로 구성될 수 있다. 음이온 교환 흡착제가 비드-형성 매트릭스로 구성되는 경우, 매트릭스는 예로 아가로스, 친수성 고분자, 셀룰로스, 텍스트란 또는 실리카일 수 있다. 사슬 (예로, 텍스트란 사슬)은 결합되어 매트릭스가 된다. 기능적 그룹은 이전에 기술된 바와 같이 화학적으로 안정한 결합 (예로, 에스테르 결합)을 통하여 매트릭스에 결합된다. 본 발명에 따라 사용되는 비드-형성 매트릭스로 구성된 음이온 교환 흡착제는 예를 들어 우노스피어® Q (바이오래드사), 우노스피어® S (바이오래드사), 스트립라인™ Q 세파로스® XL (에머 sham 바이오사이언스사), 스트립라인™ SP 세파로스® XL (에머 sham 바이오사이언스사) 또는 바이오세프라® Q 하이퍼Z (펠사 (Pall Corporation))와 같이 고압 멸균가능한 것이 바람직하다. 음이온 교환 흡착제가 막에 있는 경우, 사용되는 막은 바이러스의 크기보다 작은 공극 크기를 가진다.

[0123] 생산된 야생형, 약독화, 재조합 및/또는 온도 민감성 바이러스는 더 나아가 외부 비리온 피막 (outer virion coat)은 그대로 남아있지만 복제 기능은 파괴되도록 불활성화될 수 있다. 상기 "전체-살해된 바이러스 (whole-killed virus)"의 제조는 열 또는 화합물의 경로를 채택할 수 있다. 사용되는 화합물로는 포름알데하이드 또는 베타-프로피오락톤 및 포르밀린을 포함한다 (CHERTOVA E. et al., AIDS Vaccine (2001)).

[0124] 한 가지 특별한 구현예에 따라, 본 발명은:

[0125] a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060502호 하에서 기탁된 불멸화 조류 세포주를 적어도 하나의 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 적어도 하나의 재조합 벡터와 접촉시키고; 또한

[0126] b) 상기 조류 세포주를 상기 단백질이 생산되도록 하는 조건 하에서 배양하는; 단계를 포함하는 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0127] 또 다른 특별한 구현예에 따라, 본 발명은:

[0128] a) 유럽 세포배양 기탁기관 (ECACC)에 기탁번호 제 08060501호 하로 기탁된 불멸화 조류 세포주를 적어도 하나의 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 적어도 하나의 재조합 벡터와 접촉시키고; 또한

[0129] b) 상기 조류 세포주를 상기 단백질이 생산되도록 하는 조건 하에서 배양하는; 단계를 포함하는 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0130] 본 발명에 따르면, 재조합 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 기원일 수 있고 적절한 경우 벡터의 형질전환 효율 및/또는 안정성을 향상시키는 하나 이상의 물질과 조합될 수 있다. 이를 물질은 당업자라면 입수가능한 문헌에 널리 기재되어 있다 (예를 들어 FEIGNER et al., Proc. West Pharmacol. Soc. 32, 115-121 (1987); HODGSON

and SOLAIMAN, Nature Biotechnology 14, 339-342 (1996); REMY et al., Bioconjugate Chemistry, 5, 647-654 (1994)). 본 발명에 따르면, 재조합 백터는 발현 백터이다. 일반적인 방식으로, 그들은 당업자가 숙지하고 있으며 많은 것들이 시판되어 있는 한편, 유전적 조작의 기법을 사용하여 그들을 제작하고 변형하는 것도 역시 가능하다.

[0131] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 재조합 백터는 플라스미드이다. 바람직하게는, 본 발명의 문맥에 사용되는 플라스미드가 복제 원점 (origin of replication)을 포함한다. 플라스미드는 추가적으로 형질전환된 세포가 선택되거나 확인되도록 하는 선별 유전자를 포함한다 (영양요구성 돌연변이의 보상 (complementation), 항생제에 대한 저항성을 인코딩하는 유전자 등). 플라스미드는 본 발명의 불멸화 조류 세포주에서 그의 유지 및/또는 안정성을 향상시키는 부가적인 요소를 포함할 수 있다. 플라스미드의 예는 실시예 5, 6 및 7에 기술되어 있다.

[0132] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 생산된 단백질은 사이토카인, 더 바람직하게는 인터루킨, 보다 더 바람직하게는 IL-2이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 생산된 단백질은 항체, 더 바람직하게는 리투시마브이다. 리투시마브 (리투산[®] 또는 마브테라[®] (MabThera[®]))는 키메라 마우스/인간 항-CD20 모노클론 항체이다. 리투시마브를 생산하는 바람직한 방법은 실시예 6에 기술되어 있다.

[0133] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 생산된 단백질은 호르몬, 더 바람직하게는 에리트로포이에틴 (EPO)이다. EPO를 생산하는 바람직한 방법은 실시예 7에 기술되어 있다.

[0134] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단백질 및 바이러스를 생산하는 방법은 동물 산물이 전혀 없고 (본 발명의 조류 세포주를 제외함) 백신의 무균도 (sterility of vaccines)에 관한 법규상의 요구사항을 전적으로 따르도록 규제되는 무균 산업적 규모 (aseptic industrial-scale)의 제조 공정에 적합하다. 본 출원 전부를 통하여 사용되는 바와 같이, ?동물 산물 (animal products)? 은 살아있는 생물에 있는 동물 세포에서 또는 이에 의해 생산되었던 화합물 또는 화합물의 집합이라면 모두를 말한다.

[0135] 또한 본 발명은 이전에 기술된 바와 같은 방법에 의해 획득된 정제된 야생형, 약독화된, 재조합 및/또는 온도 민감성 바이러스에 관한 것이다.

[0136] 또한 본 발명은 이전에 기술된 바와 같은 방법에 의해 획득된 정제된 전체-살해된 바이러스에 관한 것이다.

[0137] 또한 본 발명은 이전에 기술된 바와 같은 방법에 의해 획득된 정제된 단백질에 관한 것이다.

[0138] 또한 본 발명은 이전에 기술된 바와 같은 방법에 의해 획득된 정제된 야생형, 약독화된, 재조합, 온도 민감성 및/또는 전체-살해된 바이러스를 포함하는 약제학적 조성물, 보다 상세하게는 백신에 관한 것이다.

[0139] 또한 본 발명은 이전에 기술된 바와 같은 방법에 의해 획득된 정제된 단백질을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0140] 본 명세서에서 사용되는 바, "약제학적 조성물 (Pharmaceutical composition)"은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 말한다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 바람직하게는 등장성 (isotonic), 저장성 (hypotonic) 또는 약하게 고장성 (weakly hypertonic)이고, 예를 들어 슈크로스 용액과 같은 비교적 낮은 이온 강도를 가진다. 게다가, 이러한 담체는 용매라면 모두, 또는 비발열성 (nonpyrogenic) 무균 물과 같은 수성 또는 부분적으로 수성의 액체를 포함할 수 있다. 또한, 약제학적 조성물의 pH는 생체내 (*in vivo*) 사용의 요구사항을 만족시키도록 조절되고 완충화된다. 또한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 아쥬반트 또는 부형제 뿐만 아니라 수용화, 안정화 및 보존 제제를 포함할 수 있다. 주사가능한 투여의 경우, 수성, 비수성 또는 저장성 용액에 녹인 제형물이 바람직하다. 적절한 희석제로 사용 시 재구성될 수 있는 액체 또는 건조 (파우더, 냉동저장물 (lyophilisate) 등) 형태로 단일 용량으로 또는 다중 용량으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0141] 도 1은 카이리나 모스카타 (*Cairina moschata*) 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (계대 39)의 광학현미경 영상을 나타낸 것이다.

도 2는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호의 성장 곡선 (계대 7로부터 계대 75까지)을 나타낸 것이다.

도 3은 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호의 집단 배가 시간 (population doubling time)의 진행 과정 (계대 7로부터 계대 75까지)을 나타낸 것이다.

도 4는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 (계대 45)의 광학현미경 영상을 나타낸 것이다.

도 5는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호의 성장 곡선 (계대 15로부터 계대 51까지)을 나타낸 것이다.

도 6은 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호의 집단 배가 시간의 진행 과정 (계대 16로부터 계대 51까지)을 나타낸 것이다.

도 7A 및 도 7B는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (도 7A) 및 VERO 세포주 (도 7B)의 플라비바이러스과 생산 프로파일 (황색열 바이러스 17D (MOI 0.001))을 나타낸 것이다.

도 8A 및 도 8B는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (도 8A) 및 VERO 세포주 (도 8B)의 플라비바이러스과 생산 프로파일 (일본 뇌염 바이러스 나카야마 야생형 균주 (MOI 0.001))을 나타낸 것이다.

도 9A 및 도 9B는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 (도 9A) 및 VERO 세포주 (도 9B)의 플라비바이러스과 생산 프로파일 (황색열 바이러스 17D (MOI 0.001))을 나타낸 것이다.

도 10A 및 도 10B는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 (도 10A) 및 VERO 세포주 (도 10B)의 플라비바이러스과 생산 프로파일 (일본 뇌염 바이러스 나카야마 야생형 균주 (MOI 0.001))을 나타낸 것이다.

도 11A 및 도 11B는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 0806 0501호의 폭스바이러스과 생산 프로파일 (백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP) (도 11B) 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라 (MVA) (도 11A))을 나타낸 것이다.

도 12A 내지 도 12C는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호로부터 (도 12C), CHO K1 세포주로부터 (도 12A) 및 CHO DG44 세포주로부터 (도 12B) 나온 리투주마브의 생산을 나타낸 것이다.

도 13은 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (T3) 및 ECACC 제 08060501호 (T6)로부터 나온 에리트로포이에틴 (EPO)의 생산을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0142]

본 발명을 설명하기 위하여 하기 실시예들이 제공된다. 본 실시예는 어떠한 경우라도 본 발명의 범위를 제한하려고 의도하지 않는다.

[0143]

실시예

[0144]

실시예 1: 불멸화 카이리나 모스카타 조류 세포주 ECACC 제 08060502호

[0145]

카이리나 모스카타 세포 ECACC 제 08060502호 (계대 39)는 균질한 섬유모세포 유사 형태를 가진다 (도 1). 정적인 단일층 (static monolayer)은 100% 충만도 (confluence)까지 안정하고 밀착 저해 (contact inhibition)되어 있다. 세포는 마이코플라스마 오염에 대해 음성으로 또한 미생물 오염에 대해서도 마찬가지로 테스트되었다. 세포주 성장 곡선 (계대 7로부터 계대 75까지) (도 2)는 계대 19로부터 계대 75까지 연속적인 지수적 성장기를 보여준다. 집단 배가 시간 (population doubling time, PDT)의 진행 과정에 초점을 맞추어, 점진적인 안정화 및 감소가 관찰된다. 상세하게, PDT가 최근 10번의 계대 동안 48시간 표시 하에서 안정화되는 것이 확인될 수 있다 (도 3). 해당하는 집단 배가의 횟수 (집단 배가 수준, PDL)가 2가지 지수적 성장기를 누적시켜서 계산되었다: 75 계대 동안 세포는 적어도 147번의 집단 배가 (PD)를 겪었다. 노화가 시작되기 이전에 일차 세포가 겪을 수 있는 집단 배가의 횟수는 조직 및 종 의존적이다. 고점 한계는 50 및 60 PD 사이에 위치하는 것으로 통상적으로 인정된다. 따라서 카이리나 모스카타 세포주 ECACC 제 08060502호는 헤이플릭 한계 (Hayflick limit)를 훨씬 초과하고 결론적으로 불멸화 세포주라고 명명된다.

[0146]

N.B.:

[0147]

- 집단 배가 수준 (PDL)은 세포 세대의 횟수를 말한다

[0148] (바이오매스의 2배 증가).

[0149] PDL 계산법: $PDL = \ln(\text{최종}/\text{초기 세포수})/\ln(2)$;

[0150] - 집단 배가 시간 (PDT)은 세대 시간이라고도 불리고,

[0151] 한 번의 집단 배가에 필요한 시간이다.

[0152] PDT 계산법: $PDT = \Delta t * \ln(2)/\ln(\text{최종}/\text{초기 세포수})$.

[0153] 실시예 2: 불멸화 카이리나 모스카타 조류 세포주 ECACC 제 08060501호

[0154] 카이리나 모스카타 세포 ECACC 제 08060501호 (계대 45)는 균질한 섬유모세포 유사 형태를 가진다 (도 4). 정적인 단일층은 100% 충만도까지 안정하고 밀착 저해되어 있다. 세포는 마이코플라스마 오염에 대해 음성으로 또한 미생물 오염에 대해서도 마찬가지로 테스트되었다. 세포주 성장 곡선 (계대 15로부터 계대 51까지) (도 5)는 계대 19에서부터 연속적인 지수적 성장기를 보여준다. 이 기간 동안 측정된 집단 배가 시간 (PDT)은 점진적으로 감소되었다. 평균 PDT는 94시간으로부터 (계대 20 내지 35) 52시간까지 (계대 36 내지 51) 유지되었다 (도 6). 50번 계대에 해당하는 계산된 집단 배가 (PDL)의 횟수는 적어도 집단 배가 70회이다. 따라서 카이리나 모스카타 세포주 ECACC 제 08060501호는 헤이플릭 환경을 활용 초과하고 결론적으로 불멸화 세포주라고 명명된다.

[0155] N.B.:

[0156] - 집단 배가 수준 (PDL)은 세포 세대의 횟수를 말한다

[0157] (바이오매스의 2배 증가).

[0158] PDL 계산법: $PDL = \ln(\text{최종}/\text{초기 세포수})/\ln(2)$;

[0159] - 집단 배가 시간 (PDT)은 세대 시간이라고도 불리고,

[0160] 한 번의 집단 배가에 필요한 시간이다.

[0161] PDT 계산법: $PDT = \Delta t * \ln(2)/\ln(\text{최종}/\text{초기 세포수})$.

[0162] 실시예 3: 플라비바이러스과의 생산.

3.1 황색열 바이러스 (YFV)의 생산.

[0164] 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 및 제 08060501호의 YFV 종종 능력이 평가되었고 플라비바이러스과 종식에 대한 기준이 되는 VERO 세포주와 비교된다. 카이리나 모스카타 세포주는 10% 우테아 혈청 (FCS) 및 4 mM L-글루타민을 보충한 기본 이글 배지 (인비트로젠파)에서 또한 VERO 세포는 5% FBS를 보충한 둘베코의 변형된 이글 배지 (인비트로젠파)에서 성장시킨다. 황색 열 17D 백신 균주 (YFV 17D)(스타마릴™, 사노피 파스퇴르사)가 본 실험에서 평가되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호 또한 VERO 세포주는 6-웰 플레이트 상에 각각 4.10^5 , 2.10^5 및 6.10^5 세포의 농도로 접종되었고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂로 습윤 환경 하에서 배양되었다. 그 다음 배지는 제거되었고 세포는 배양 배지로 희석된 250 μl의 YFV 17D 바이러스를 사용하여 MOI 0.0001로 감염시켰다. 1시간의 흡착 단계 이후에, 남아있던 바이러스 혼탁액은 제거되었고 세포는 PBS로 두 번 세척되었으며 2 ml의 배지가 각 웰에 첨가되었다. 바이러스는 37°C, 5% CO₂에서 감염시키고 24, 48 및 72시간 이후에 상청액으로부터 회수되었고, 역가 측정 (titration)을 위해 정화되었다. 감염된 세포층은 트립신으로 해체되었고 세척되었으며 슬라이드 상에 고정시켰다. 간접 면역형광 분석 (indirect immunofluorescence analysis)이 감염된 세포의 백분율을 결정하기 위하여 슬라이드 상에서 수행되었다.

[0165] 역가 측정은 대수적 바이러스 희석법 (logarithmic virus dilutions)으로 감염된 VERO 세포 상에서 면역조직화 학적 분석법에 의해 수행되었다. 감염 5일 이후에 세포는 고정되었고, 특이 폴리클론 IA (면역 어스사이트사) 와 배양되었으며 페옥시다제로 표지된 이차 항체로 발현시켰다. 비색 반응 (calorimetric reaction)은 DAB 기질

을 사용하여 획득되었다. 염색된 감염 중심 (foci)이 관찰되었고 계수되었으며, 바이러스 역가가 ml 당 중심 형성 단위 (focus forming units, FFU)로서 계산되었다.

[0166] 결과: 도 7 (A-B)에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (도 7A)를 사용하여 단 24시간 이후에 YFV 17D에 대해 획득된 바이러스 역가는 VERO 세포주 (도 7B)를 사용하여 획득된 바이러스 역가에 비하여 로그 3 이상 더 높다. 도 9 (A-B)에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 (도 9A)를 사용하여 단 24시간 및 48시간 이후에 YFV 17D에 대해 획득된 바이러스 역가는 VERO 세포주 (도 9B)를 사용하여 획득된 바이러스 역가에 비하여 로그 4 이상 더 높다.

3.2 일본 뇌염 바이러스 (JEV)의 생산

[0168] 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060502호의 JEV 종종 능력이 평가되었고 플라비바이러스과 종식에 대한 기준이 되는 VERO 세포주와 비교된다. 카이리나 모스카타 세포주는 10% 우테아 혈청 (FCS) 및 4 mM L-글루타민을 보충한 기본 이글 배지 (인비트로겐사)에서 또한 VERO 세포는 5% FCS를 보충한 둘베코의 변형된 이글 배지 (인비트로겐사)에서 성장시킨다. 감염은 동일한 배양 배지에서 수행되었다. 일본 뇌염 나카야마 야생형 (국립과학연구센터 (CNRS)에 기탁됨)이 본 실험에서 평가되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호 또한 VERO 세포는 6-웰 플레이트 상에 각각 $4 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ 및 $6 \cdot 10^5$ 세포의 농도로 접종되었고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂로 습윤 환경 하에서 배양되었다. 그 다음 배지는 제거되었고 세포는 배양 배지로 희석된 250 μl의 YFV 17D 바이러스를 사용하여 MOI 0.0001로 감염되었다. 1시간의 흡착 단계 이후에, 남아있던 바이러스 혼탁액은 제거되었고, 세포는 PBS로 두 번 세척되었으며 2 ml의 배지가 각 웰에 첨가되었다. 바이러스는 37°C, 5% CO₂에서 감염시키고 24, 48 및 72시간 이후에 상청액으로부터 회수되었으며 역가 측정을 위해 정화되었다. 감염된 세포층은 트립신으로 해체되었고 세척되었으며 슬라이드 상에 고정시켰다. 간접 면역형광 분석법이 감염된 세포의 백분율을 결정하기 위하여 슬라이드 상에서 수행되었다.

[0169] 역가 측정은 대수적 바이러스 희석법으로 감염된 VERO 세포 상에서 면역조직화학적 분석법에 의해 수행되었다. 감염 5일 이후에 세포는 고정되었고 특이 폴리클론 IA (이뮨 어스사이트사)와 배양되었으며 페옥시다제로 표지된 이차 항체로 발현되었다. 비색 반응이 DAB 기질을 사용하여 획득되었다. 염색된 감염 중심이 관찰되었고 계수되었으며, 바이러스 역가가 ml 당 중심 형성 단위 (focus forming units, FFU)로서 계산되었다.

[0170] 결과: 도 8 (A-B)에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 (도 8A)를 사용하여 96시간 이후에 JEV 나카야마 야생형 균주에 대해 획득된 바이러스 역가는 VERO 세포주 (도 8B)를 사용하여 획득된 바이러스 역가에 비하여 로그 3 이상 더 높다. 도 10 (A-B)에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 (도 10A)를 사용하여 72시간 및 96시간 이후에 JEV 나카야마 야생형 균주에 대해 획득된 바이러스 역가는 VERO 세포주 (도 10B)를 사용하여 획득된 바이러스 역가에 비하여 로그 1 및 로그 8 이상 더 높다.

실시예 4: 폭스바이러스과의 생산.

4.1 변형된 백시니아 바이러스 양카라 (MVA)의 생산.

[0173] 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호의 MVA 종종 능력이 평가되었고, MVA 생산을 위한 기질로서 일반적으로 사용되는 일차 닭 배아 섬유모세포 (CEFs)와 비교된다. eGFP를 발현하는 MVA (국립 미생물배양 기탁기관 (CNCM)에 제 N⁶⁰² 1-721호로 기탁됨)가 바이러스 종식의 조사 및 역가 측정을 용이하게 하도록 선택되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호는 25 cm²의 T-플라스크에 $2 \cdot 10^6$ 농도로 접종되었고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 습윤 환경 하에서 배양되었다. 그 다음 배지 (10% 우테아 혈청 (FCS) 및 4 mM L-글루타민을 보충한 기본 이글 배지 (BME))는 제거되었고 세포는 1% 양이온, 1% FCS를 첨가한 PBS로 희석된 500 μl의 MVA 바이러스를 사용하여 MOI 0.05로 감염시켰다. 30분의 흡착 단계 이후에, 남아있던 바이러스 혼탁액은 제거되었고, 세포는 PBS로 한 번 세척되었으며 10% FCS를 첨가한 5 ml의 BME 배지가 다시 각 플라스크에 첨가되었다. 바이러스는 37°C, 5% CO₂에서 감염시키고 0,

24, 48, 72 및 96시간 이후에 냉동-해동 단계에 의해 세포 및 상청액으로부터 회수되었다. 회수된 바이러스 혼탁액은 응집을 피하기 위하여 역가 측정 이전에 과쇄되었다.

[0174] 역가 측정은 6 cm 배양 접시에 접종되어 대수적 바이러스 희석법으로 감염되고 아가로 오버레이 된 CEFs 상에서 세 번 반복하여 수행되었다. eGFP를 발현하는 MVA의 플라크 형성 단위는 두 눈으로 형광 관찰에 의해 시각화되었고 72시간 이후에 계수되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호는 MVA를 증폭시키지 않았다.

[0175] 결과: 도 11A에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호는 고전적인 CEF 기질을 사용하여 획득된 것과 비교할만한 MVA 증식을 가능하게 한다. 가장 높은 바이러스 역가는 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호 및 CEFs 둘 다에서 감염 48시간 이후에 도달하였다. 일치하게, 분명한 세포변성 효과가 둘 다의 세포에서 관찰되었다 (데이터 미도시).

4.2 백시니아 바이러스 균주 코펜하겐 (W-COP)의 생산.

[0177] 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호의 W-COP 증폭 능력이 평가되었고 W-COP 생산을 위한 기질로서 일반적으로 사용되는 일차 닦 배아 섬유모세포 (CEFs)와 비교된다. 결합성 J2R 유전자 (WEIR and MOSS 1983을 참조하라; 진뱅크 기탁번호 제 AAA48082호)를 포함하는 W-COP 균주 (GOEBEL et al. 1990; 진뱅크 기탁번호 제 M35027.1호)가 본 실험에 사용되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호는 175 cm^2 의 T-플라스크에 14.10^6 농도로 접종되었고 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 의 습윤 환경 하에서 배양되었다. 그 다음 배지 (10% 우태아 혈청 (FCS) 및 4 mM L-글루타민)를 보충한 기본 이글 배지 (BME))는 제거되었고 다시 세포는 1% 양이온, 1% FCS를 첨가한 PBS로 희석된 5 ml의 W-COP 바이러스를 사용하여 MOI 0.0001로 감염시켰다. 30분의 흡착 단계 이후에, 10% FCS를 첨가한 35 ml의 BME가 각 플라스크에 첨가되었다. 바이러스는 37°C , 5% CO_2 에서 감염시키고 0, 24, 48, 72 및 96시간 이후에 냉동-해동 단계에 의해 세포 및 상청액으로부터 회수되었다. 회수된 바이러스 혼탁액은 응집을 피하기 위하여 역가 측정 이전에 과쇄되었다.

[0178] 역가 측정은 6-웰 플레이트에 접종된 BHK21 세포 상에서 세 번 반복하여 수행되었다. 세포는 대수적 바이러스 희석법으로 감염시켰고 액체 배양 배지는 바이러스 흡착 1시간 이후에 첨가되었다. 24시간 이후에, 배지는 제거되었고 세포는 크리스탈 바이올렛 및 중성 레드의 혼합물로 오버레이 되었다. 세포의 염색 이후에, 바이러스의 플라크 형성 단위가 두 눈으로 관찰에 의해 시각화되었고 계수되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호는 W-COP를 증폭시키지 않았다.

[0179] 결과: 도 11B에 나타난 바와 같이, 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060501호는 고전적인 CEF 기질을 사용하여 획득된 증폭에 비하여 덜 효율적이긴 하지만 W-COP 증식을 가능하게 한다.

0180] 실시예 5: IL-2의 생산

[0181] 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 ECACC 제 08060501호로부터 나온 상청액은 IL-2 (CMV 프로모터) 발현 플라스미드 (pTG8363: pCiNeo 플라스미드에 클론된 인간 IL-2, CMV 프로모터)로 일시적으로 형질전환되었다. 상청액은 24, 48, 72 및 96시간 이후에 수집되었다. IL-2는 엘라이자 (ELISA, 퀄티카인 (Quantikine), RD 시스템사)에 의해 정량되었고 기능성은 CTLR 분석법으로 결정되었다.

[0182] 결과: 세포주 ECACC 제 08060502호 및 ECACC 제 08060501호 둘 다가 기능적 IL-2를 생산하였다. 양은 둘 다의 세포주 간에 동등하였다. 또한 생산의 수준은 사용된 형질전환 방법과는 상관이 없었고, 4865 IU/ml (CTLR) 및 23.1 IU/ng의 특이 활성에 해당하는 211 ng/ml (ELISA)로부터 5672 IU/ml (CTLR) 및 18.4 IU/ng의 특이 활성에 해당하는 308 ng/ml (ELISA) 범위까지 분포하였다. 따라서 세포주에서 생산된 IL-2의 측정된 특이 활성은 IL-2 (인간, 저칼-유래)에 대한 WHO 국제 표준인 13.16 IU/ng과 적어도 동등하다.

0183] 실시예 6: 리투산 (rituxan)의 생산

[0184] 중쇄 및 경쇄는 진아트사 (GeneArt)에 의해 합성되었고, 해당하는 발현 플라스미드가 pCI-Neo 벡터

(프로메가사)에 기초하여 조립되었다. 일시적 유전자 발현은 특이적 ? 낮은 IgG FCS?를 사용하여 수행되었다. 카이리나 모스카타 불멸화 조류 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호는 10%의 낮은 IgG FCS 대비 고전적인 FCS에서 5일 동안 증식되었다. 세포 성장에 미치는 부정적 효과가 전혀 관찰되지 않았다. 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호로부터 나온 상청액이 수집되었고 모노클론 항체의 양이 IgG 엘라이자(전체 인간 IgG, 베틸사)를 사용하여 평가되었다.

[0185] 결과: 일시적이고 비-최적화된 조건 하에서 세포주 ECACC 제 08060502호에서 0.5 μg/ml까지 생산되었으며 세포주 ECACC 제 08060501호에서는 2.5 μg/ml까지 생산되었다. CHO 표준 세포주들 (CHO K1 (도 12A) 및 디하이드로폴레이트 환원효소-결합성 CHO 클론 CHO DG44 (도 12B))에서 또는 세포주 ECACC 제 08060501호 (도 12C)에서 일시적으로 생산된 리투산 (rituxan)은 해당하는 당화 (glycosylation) 양상을 분석하고 비교하기 위하여 정제되었다. 질량 분광측정법 (mass spectroscopy) 분석 (도 12 (A-C))은 CHO 발현된 리투산 및 세포주 ECACC 제 08060501호 발현된 리투산 간에 퓨코실화 차이를 전혀 보여주지 않았다.

실시예 7: 에리트로포이에틴 (EPO)의 생산

[0187] 발현 일시적 분석법은 인비트로겐사로부터 획득한 시판되는 플라스미드 (진스톰®(GeneStorm®)) 인간 클론, 제품번호 HK1000 RG001720, (인비트로겐사)를 사용하여 수행되었고 여기서 인간 EPO는 pCMV 프로모터의 조절 하에서 있었다. 세 가지의 형질전환 시약이 제조사의 지침에 따라 평가되었다 : 리포펙타민2000 (Lipofectamine2000, 인비트로겐사), 슈퍼펙트 (Superfect, 퀴아젠사) 및 퓨진 δ (Fugene δ, 로슈사); 또한 전기천공 기기 (뉴클레오팩터, 기본 섬유모세포 키트, 아마사사). 세포주 ECACC 제 08060502호 및 제 08060501호로부터 나온 상청액이 48, 72 및 96시간 이후에 수집되었고, 인간 EPO가 엘라이자에 의해 정량되었다.

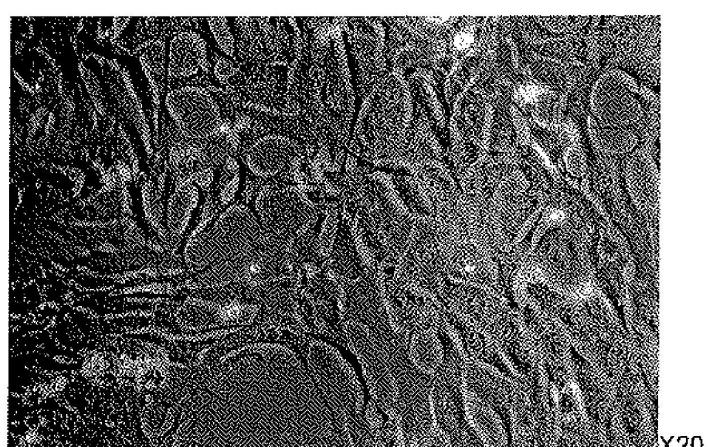
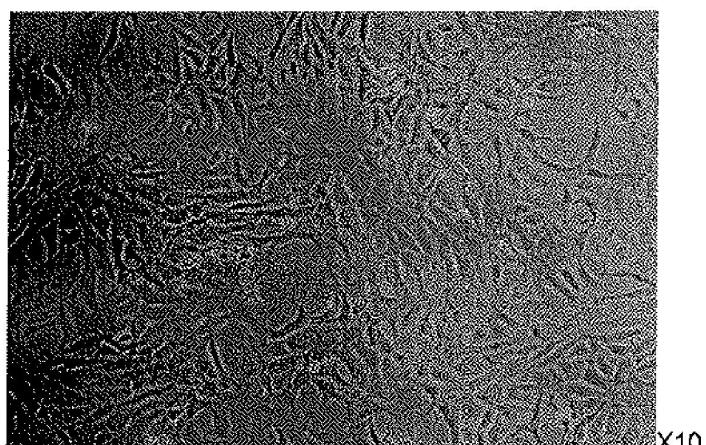
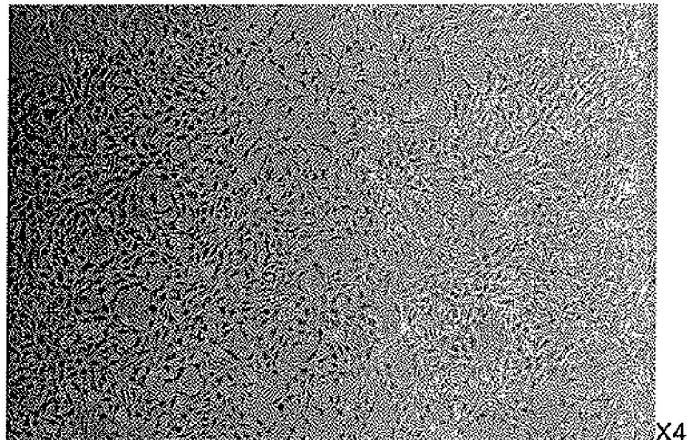
[0188] 결과: 세포주 둘 다에서, 최대 발현 수준이 퓨진 δ 및 이어지는 뉴클레오팩터 시스템을 사용하여 96시간 이후에 획득되었다 (도 13). 일시적이고 비-최적화된 조건에서 0.5 μg/ml까지 생산되었다.

산업상 이용가능성

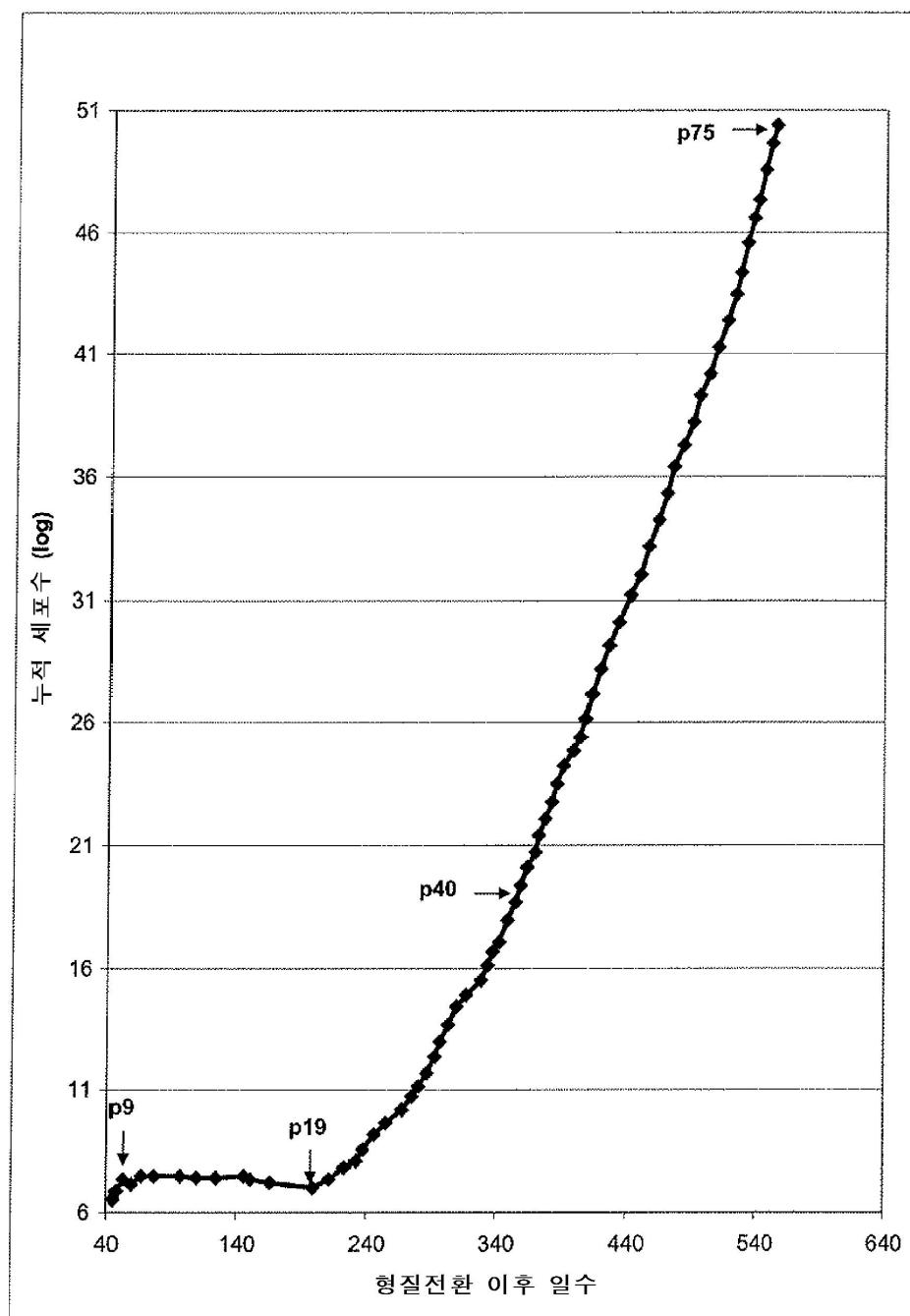
[0189] 상기 명세서에서 인용된 모든 문서들 (예로, 특허들, 특허출원들, 공고들)은 본 명세서에서 참고문헌으로 통합되어 있다. 본 발명의 여러 가지 변형들 및 변화들은 본 발명의 범위 및 정신을 벗어남이 없이 당업자에게는 자명한 것이 될 것이다. 본 발명이 특정한 바람직한 구현예들과 연결되어 기술되었더라도, 청구된 본 발명은 이러한 특정한 구현예들에 부당하게 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 당업자에게 자명한 본 발명을 달성하는 기술된 양식의 다양한 변형들은 다음의 청구항들의 범위 이내에 속하도록 의도된다.

도면

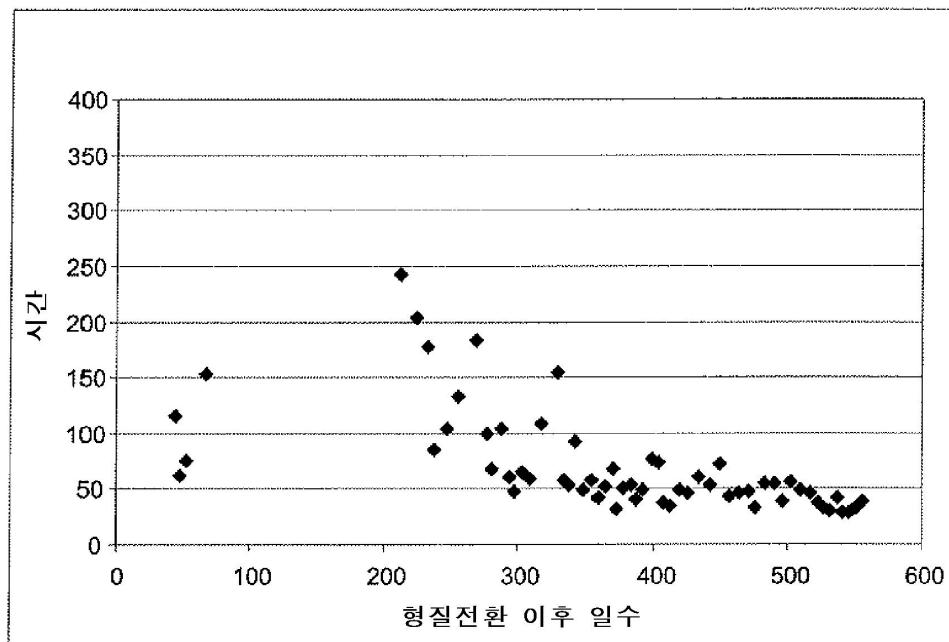
도면1



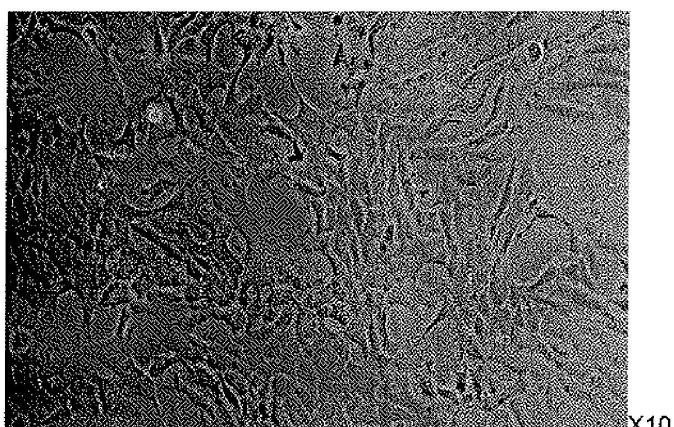
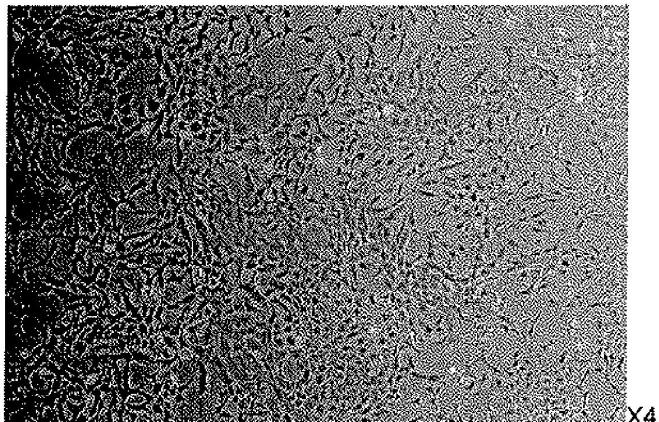
도면2



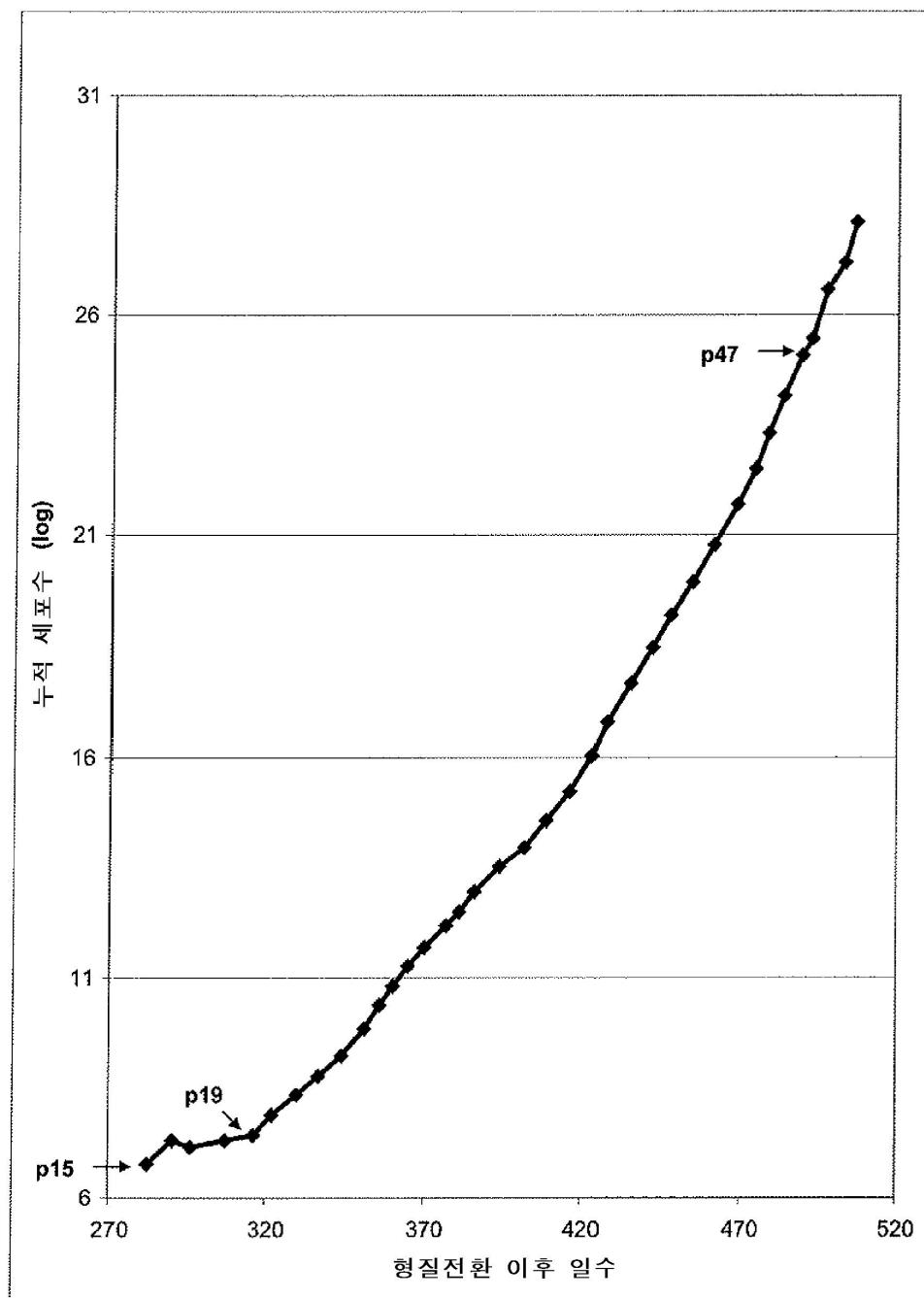
도면3



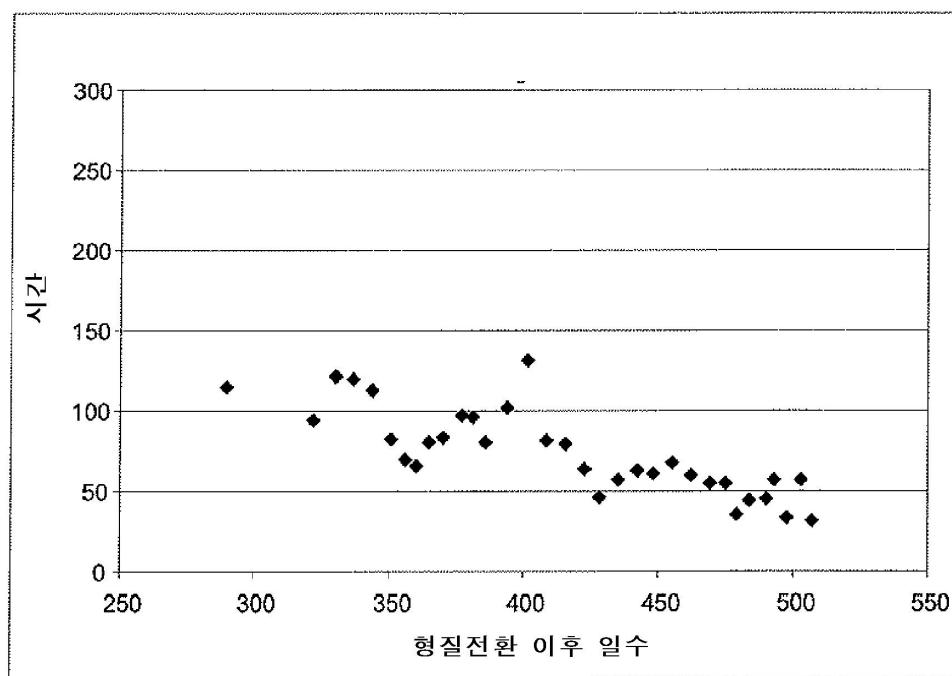
도면4



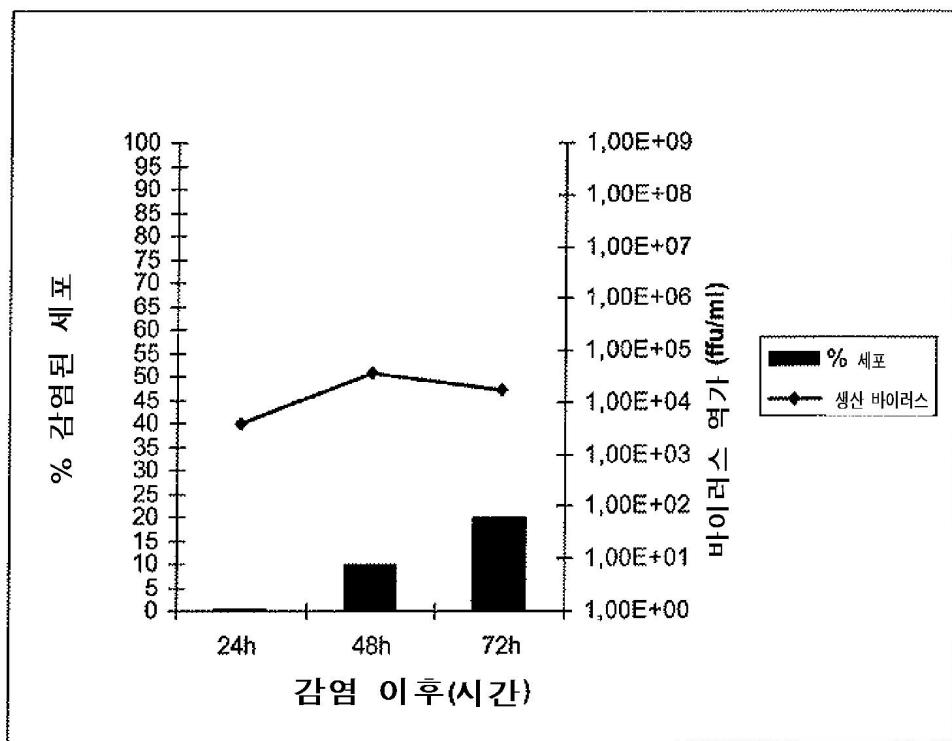
도면5



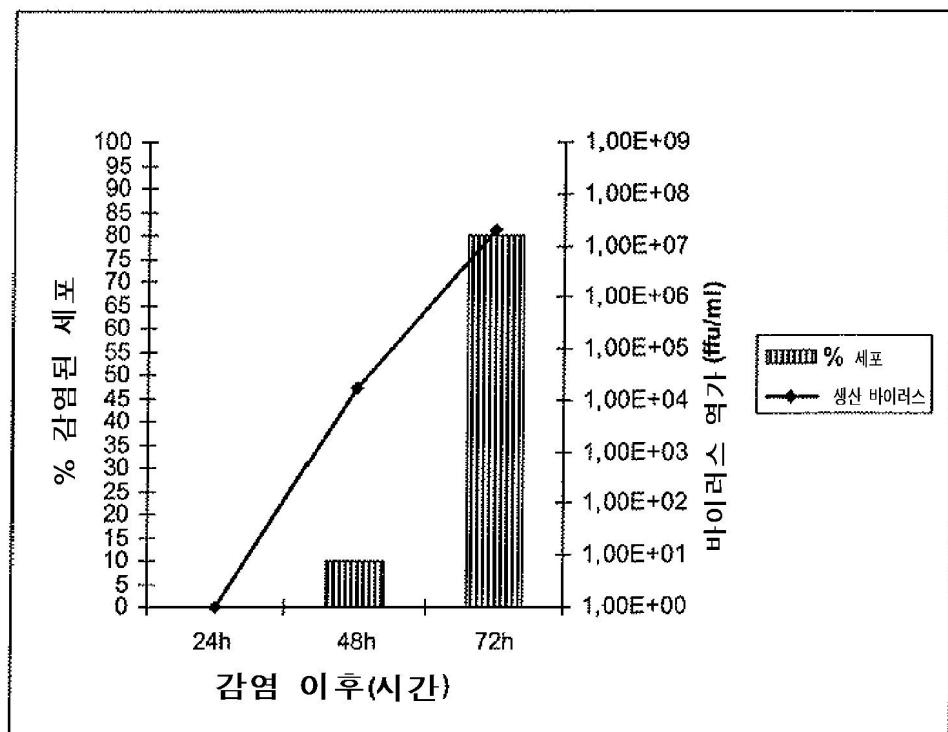
도면6



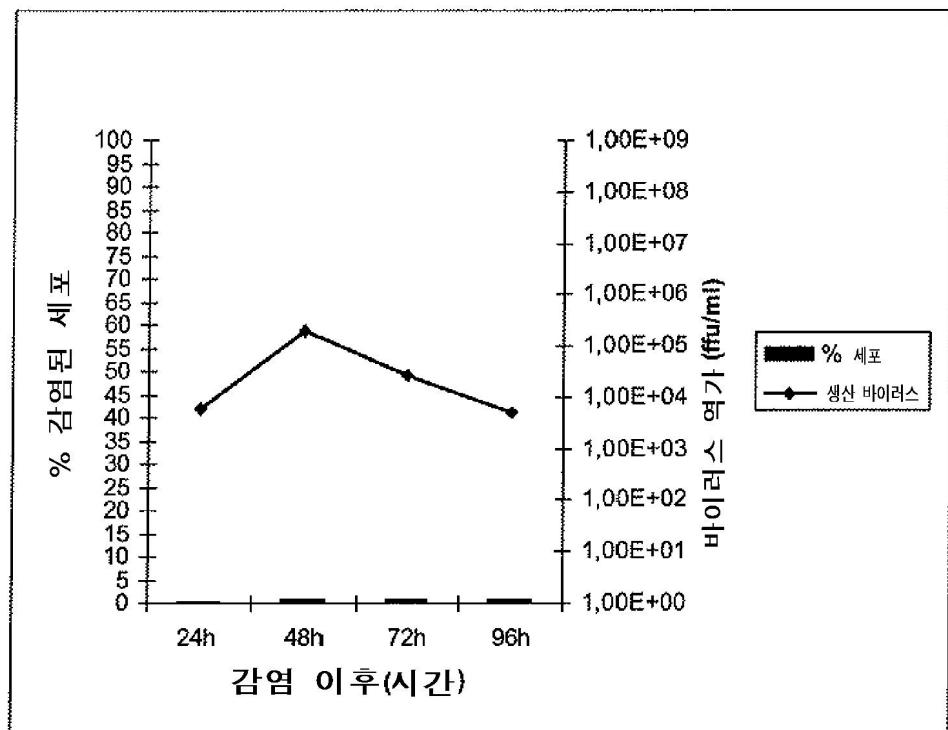
도면7a



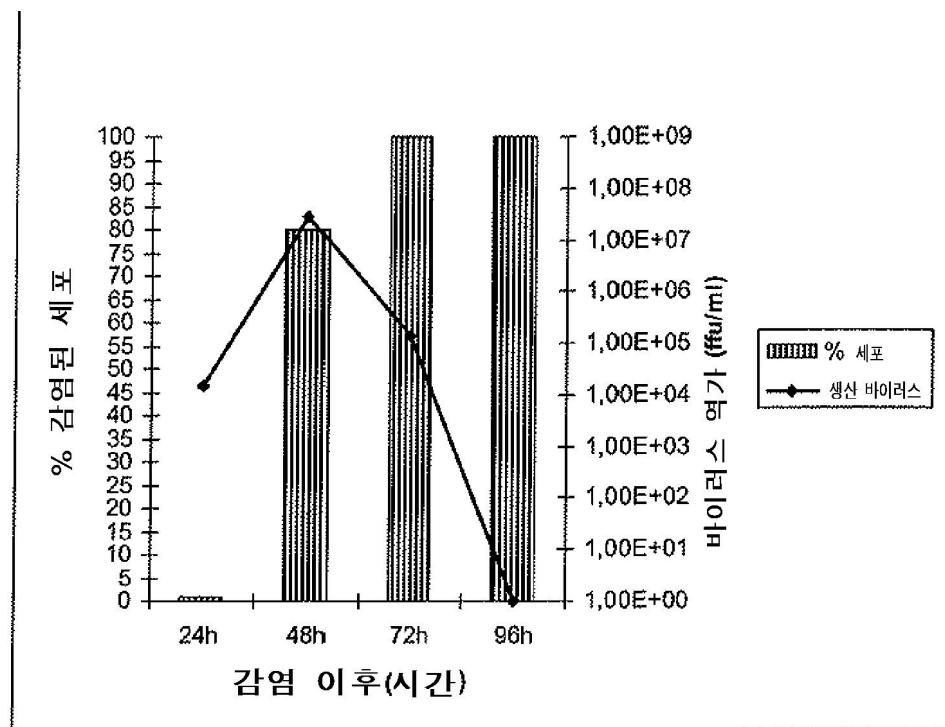
도면7b



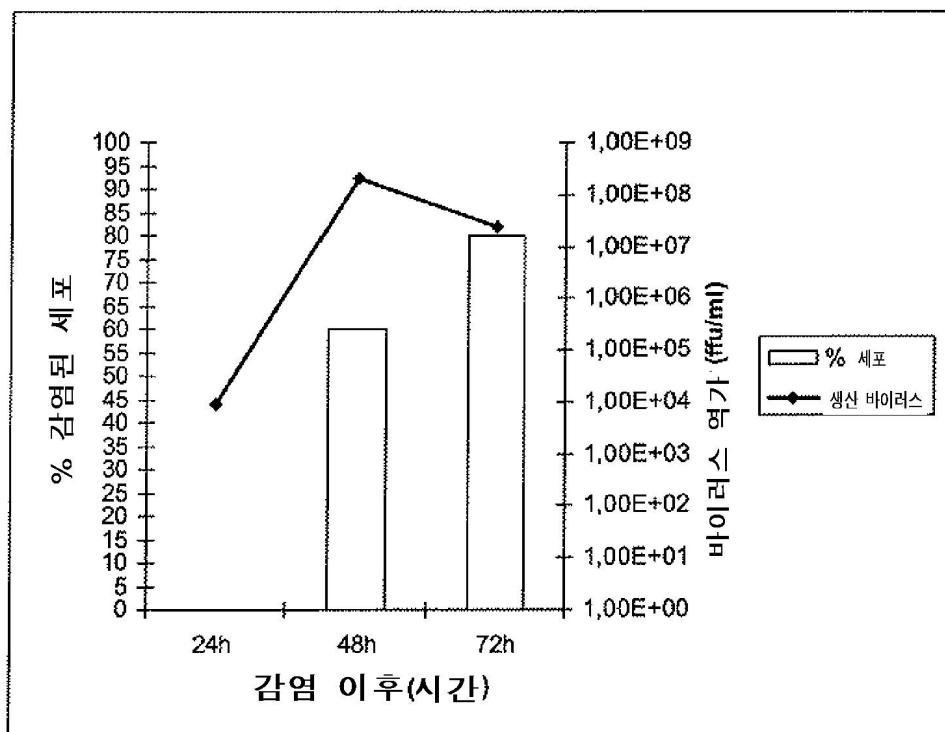
도면8a



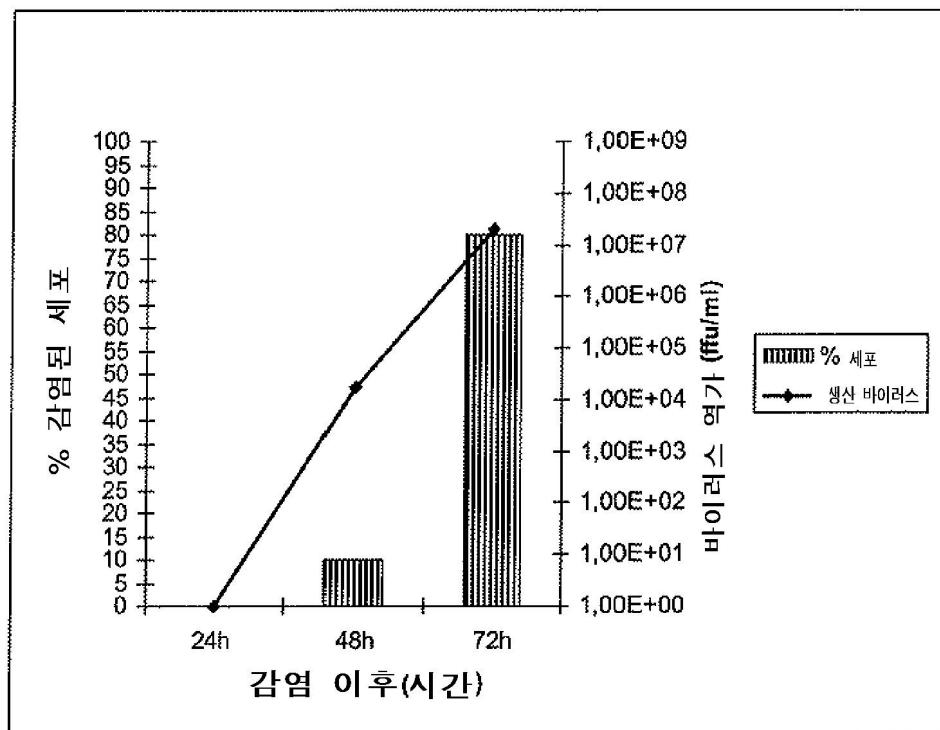
도면8b



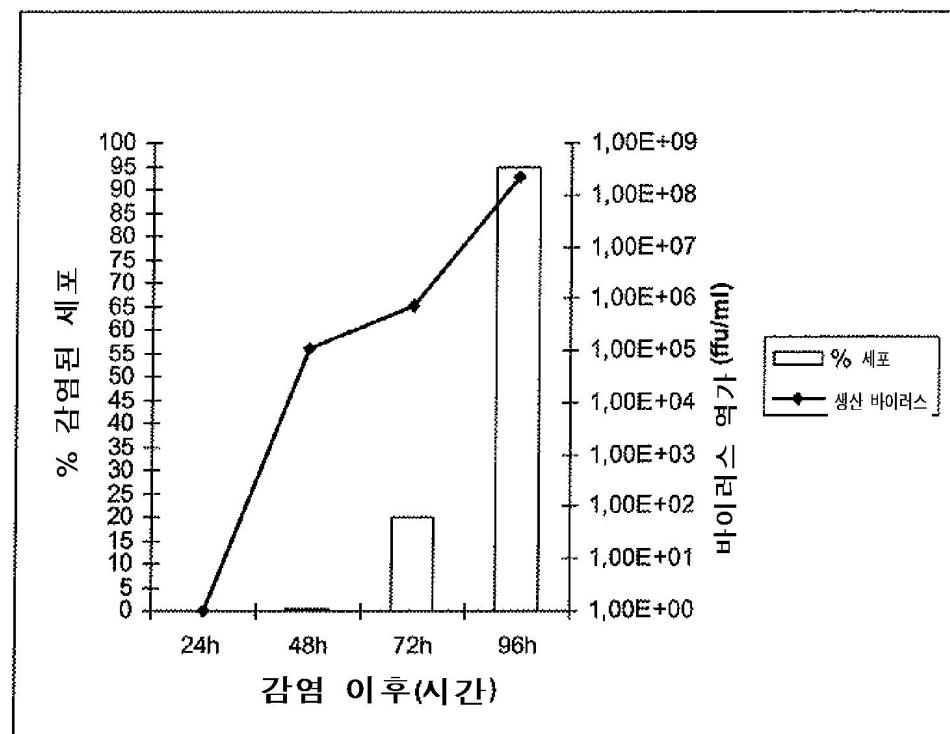
도면9a



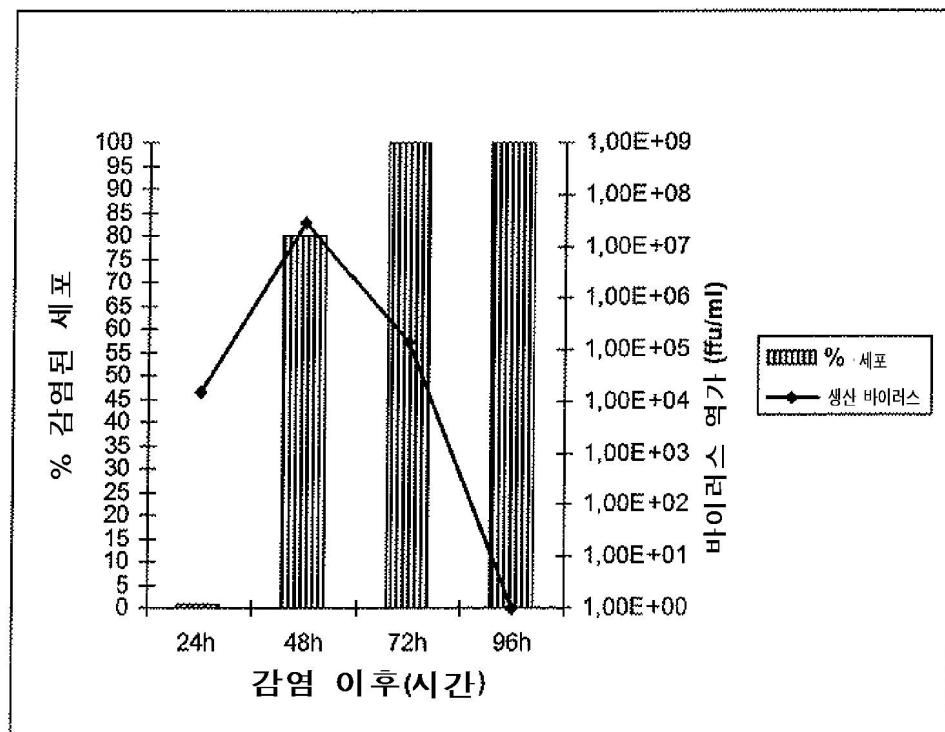
도면9b



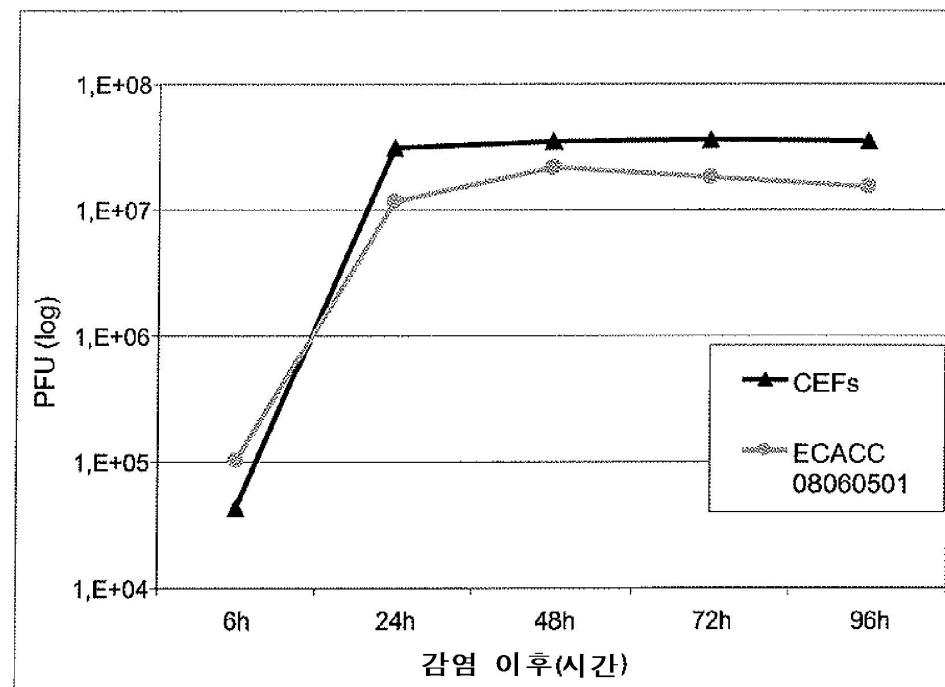
도면10a



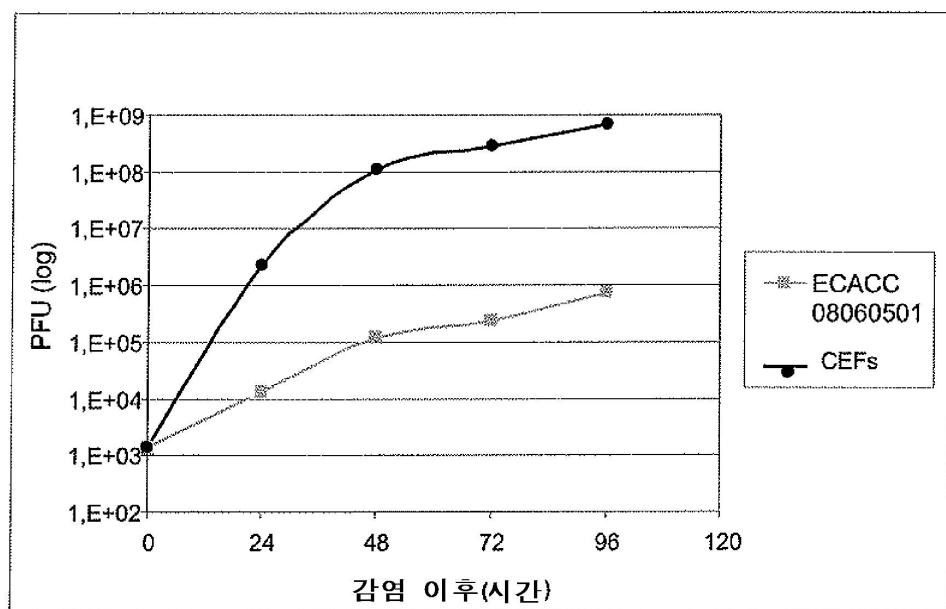
도면10b



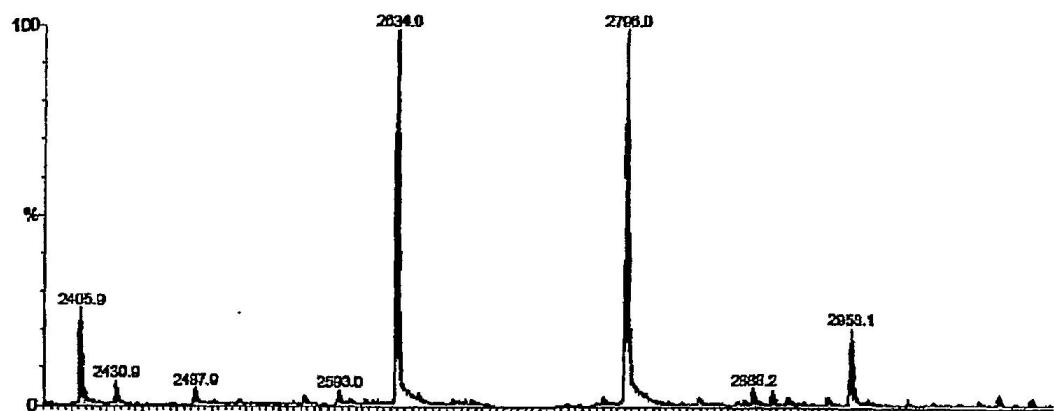
도면11a



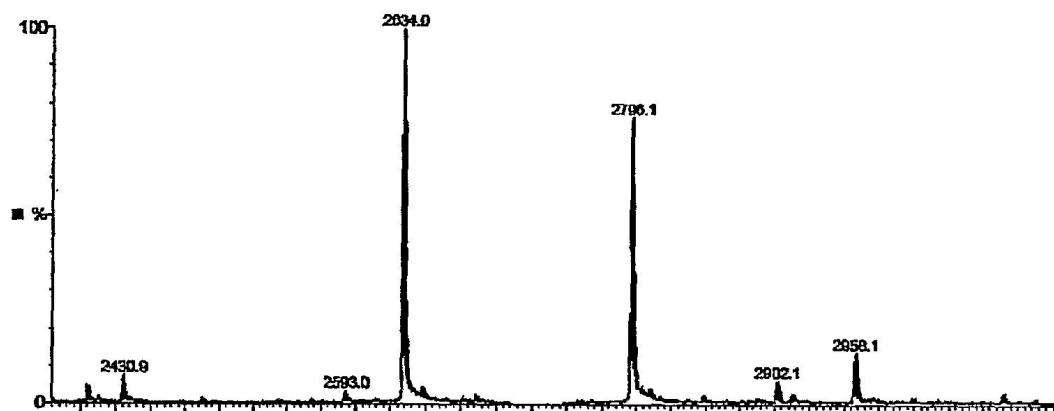
도면11b



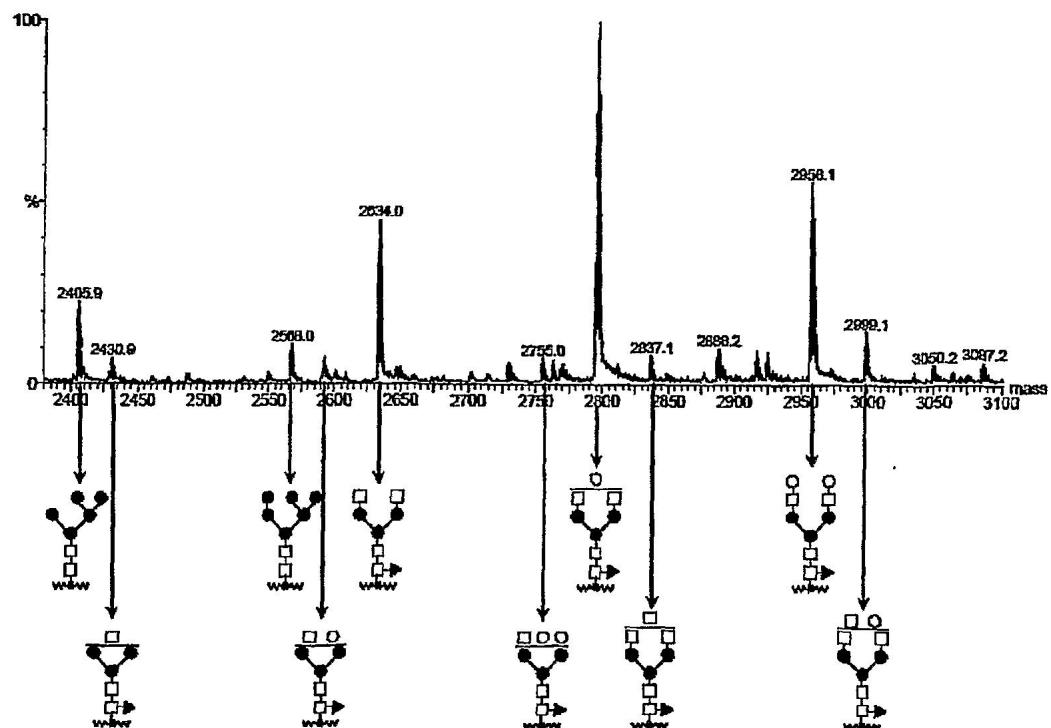
도면12a



도면12b



도면12c



도면13

