



등록특허 10-2700433



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월30일  
(11) 등록번호 10-2700433  
(24) 등록일자 2024년08월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)  
*C12N 7/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*C12M 29/10* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7040149
- (22) 출원일자(국제) 2021년11월23일  
심사청구일자 2022년11월17일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월16일
- (65) 공개번호 10-2022-0164801
- (43) 공개일자 2022년12월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/082615
- (87) 국제공개번호 WO 2022/112218  
국제공개일자 2022년06월02일

(30) 우선권주장  
20209811.7 2020년11월25일  
유럽특허청(EPO)(EP)

## (56) 선행기술조사문현

US20020127582 A1\*  
WO2020154607 A1\*  
WO2020223274 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

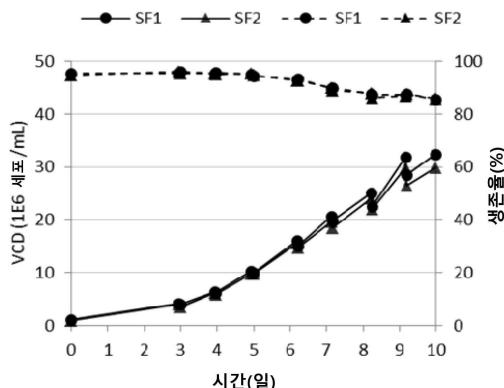
전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 손영희

## (54) 발명의 명칭 AAV의 제조 방법

**(57) 요약**

본 발명은 아데노 관련 바이러스(AAV)의 제조 방법에 관한 것으로, AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화 유전자들 중 적어도 일부 또는 전부가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되어 있는 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주를 제공하는 단계, 및 AAV 제조 단계 동안(즉, N 단계 동안) 관류 배양에서 상기 세포를 배양하는 단계로서, 상기 관류 배양은 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것을 포함하고, 상기 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 생성의 유도 후에 계속되는, 세포 배양 단계를 포함한다.

**대 표 도** - 도1a

(52) CPC특허분류

**C12N 7/00** (2013.01)  
C12N 2750/14122 (2013.01)  
C12N 2750/14143 (2013.01)  
C12N 2750/14151 (2013.01)  
C12N 2750/14152 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아데노 관련 바이러스(AAV)의 제조 방법으로,

(a) AAV의 제조에 필요한 성분(component)을 암호화하는 유전자들 중 적어도 일부 또는 전부가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되어 있는 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주를 제공하는 단계;

(b) AAV 제조 단계 동안 관류 배양(perfusion culture)에서 상기 세포를 배양하는 단계로서, 상기 관류 배양은 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것을 포함하고, 상기 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 생성의 유도 후에 계속되는, 단계,

를 포함하고, 적어도 하기 유전자:

AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자;

AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 및

아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자,

가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되는, 제조 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

적어도 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되는, 제조 방법:

AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자;

AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자;

AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자;

아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자; 및

AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI).

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

AAV는, AAV 혈청형 1(AAV1), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVDJ, AAVDJ8, AA VRh10, 상기 혈청형 중 상이한 둘 이상의 조합(hybrid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제조 방법.

#### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자는 AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6, E2A 및 VA-RNA를 암호화하는 유전자; Ad5 헬퍼 유전자인 E1A 및 E1B를 암호화하는 유전자; 및 AAV 역 말단 반복 서열(ITRs)이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)로 이루어진 군에서 선택되는, 제조 방법.

#### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

하기의 추가의 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되는, 제조 방법:

AAV Rep 단백질인 Rep78 및 Rep68 둘 다를 암호화하는 유전자,

AAV Rep 단백질인 Rep52 및 Rep40 둘 다를 암호화하는 유전자; 및

아데노바이러스 헬퍼 기능인 E1A, E1B 중 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 유전자 또는 유전자들.

#### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

안정적인 AAV 제조 숙주 세포주는, CAP 세포, AGE1.hn, HEK293, PER.C6, NS01, COS-7, BHK, CHO, CV1, VERO, HeLa, MDCK, BRL3A, W138, 및 HepG2 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포주인, 제조 방법.

#### 청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

관류 배양은, 교반 탱크 생물반응기(STR), 궤도 진탕 생물반응기(OSB), 로킹 베드 생물반응기, 공기 부양 생물반응기, 관형 생물반응기, 중공사 생물반응기(HFBR), 고정층 생물반응기, 또는 유동층 생물반응기에서 수행되는, 제조 방법.

#### 청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

관류 배양을 위해 사용되는 관류 장치는, TFF(접선 흐름 여과) 모드 또는 ATF(교대 접선 흐름) 모드에서 사용되는 중공사 필터(hollow-fiber filter); 부유 맴브레인, 스픈 필터, 회전식 원통형 필터, 회전 디스크 필터, 원심분리기, 중력 침강기, 라멜라 침강기, 콤팩트 셀 침강기, 음향 침강기, 또는 하이드로사이클론인, 제조 방법.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

관류 배양을 위해 사용되는 관류 장치는, ATF 모드에서 사용되는 중공사 필터인, 제조 방법.

#### 청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은, AAV 생성의 유도 후 최소 24시간 동안, 최소 48시간 동안, 또는 최소 72시간 동안, 및/또는 AAV의 수확 때까지 계속되는, 제조 방법.

#### 청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

세포 특이적 관류 속도(CSPR)는 약 0.01 내지 약 0.20 nL/세포/일인, 제조 방법.

#### 청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

관류 속도는 약 1 내지 약 20 vvd(새로운 배지의 부피/반응기의 작업 부피/일)인, 제조 방법.

#### 청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

관류 배양물의 파종 시 세포 밀도는 약  $0.5 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^6$  세포/mL인, 제조 방법.

#### 청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

AAV 생성의 유도 시점에서의 세포 밀도는 약  $20 \times 10^6$  세포/mL 이상인, 제조 방법.

### 청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 방법은 관류 배양 잔류물로부터 AAV를 수확하는 단계를 더 포함하는, 제조 방법.

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

삭제

### 청구항 18

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자들 중 적어도 일부 또는 전부가 세포 계놈에 안정적으로 통합되어 있는 안정적인 AAV 제조 세포주를 제공하는 단계 및 AAV 제조 단계 동안(즉, N 단계 동안) 관류 배양(perfusion culture)에서 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 관류 배양은 사용된 배지(spent media)를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것을 포함하고, 상기 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 제조의 유도 후에 계속되는, 아데노 관련 바이러스(AAV)의 제조 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

최근 AAV 유래 벡터를 기반으로 하는 유전자 치료 시험 및 제품의 수가 급격히 증가하여 왔다. 유전자 요법에서 AAV 벡터의 장점은 우수한 안전성 프로파일, 이러한 벡터가 병원성이 아니라는 사실, 즉 어떤 질병과도 관련이 없다는 사실, 이식유전자의 장기간 발현, 및 분할뿐만 아니라 비-분할 세포를 형질도입하는 가능성이다. 그러나, 이러한 유망한 연구를 임상 개발로 옮기기 위한 주요 과제는 상당한 양의 AAV 바이러스 벡터를 고품질로 전달하여야 하는 과제이다.

[0003]

제조합 AAV의 제조는 트랜스로(*in trans*) 공급되는 재조합 바이러스의 제조를 위해 AAV 계놈에 의해 일반적으로 암호화되는 AAV Rep 및 Cap 단백질의 발현을 특히 필요로 한다. 또한, 다른 헬퍼 바이러스로부터 유래될 수 있는 헬퍼 유전자가 사용되고, 가장 일반적인 것은 E1A, E1B, E2A, E4orf6 또는 VA RNA와 같은, 아데노바이러스(AV)에서 유래된 헬퍼 바이러스 유전자이다. 또한, AAV 역 말단 반복 서열(ITRs)이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)를 포함하는 전달 벡터가 필요하다.

[0004]

그러나, 현재 AAV 제조 시스템은 대부분 몇 가지 단점이 있는 하기의 기술에 의존한다.

[0005]

제조합 AAV 제조를 위한 가장 일반적인 시스템은 AAV 제조에 필요한 모든 유전자를 일시적 형질감염에 의해 제조 세포에 도입하는 것에 의존한다. 일시적 형질감염에는 일반적으로 다음과 같은 2개 플라스미드 또는 3개 플라스미드 시스템이 필요하다: 관심 유전자를 포함하는 전달 벡터; 아데노바이러스 헬퍼 기능이 있는 pHelper; 및 캡시드 및 레플리카제 기능을 제공하는 pAAV-Rep2CapX(CapX = 다양한 AAV 혈청형의 캡시드 기능). 그러나, 이러한 접근 방법에는 몇 가지 단점이 있다. 특히, 일시적인 형질감염 단계로 인해 이러한 방법은 고비용의 플라스미드 DNA를 수반하고 충분한 확장성, 견고성 및 재현성이 부족하다.

[0006]

또한, 일시적인 형질감염 단계는 광범위한 배지 및 공급 최적화, 제조 동안 pH, 온도 또는 세포 밀도와 같은 공정 매개변수의 변화와 같은, 다른 재조합 생물학적 제제의 제조에서 일반적으로 실시되는 제품 역가 또는 제품 품질을 증가시키기 위한 특정 공정 최적화 단계를 방해한다. 특히 후자는 전체 제품 역가를 증가시키기 위한 유망한 접근 방법이다. 세포 특이적 생산성이 감소되지 않는 한 일반적으로 더 높은 세포 밀도는 역가의 증가로

이어진다("세포 밀도 효과"). 특히 일시적 형질감염을 사용하는 동안 세포 특이적 생산성은 세포 밀도가 증가하면서 감소할 수 있다. 또한, 이것은 특히 바이러스 벡터의 제조의 경우에 설명된다.

[0007] AAV의 제조는 특정 제조 공정과 무관하게, AAV ITRs의 측면에 있는 패키지된 관심 유전자(GOI)를 포함하는 채워진(full) AAV 입자와 패키지된 GOI가 없는 빈(empty) 입자의 혼합물을 항상 생성한다. 포유류 혼탁 세포(예를 들어 HEK293 세포)의 일시적 형질감염에 의해 달성된 AAV 역가는 공정에 따라  $1 \times 10^{13}$  내지  $1 \times 10^{15}$  vg/L(L당 바이러스 개놈)의 범위에 있다. 일시적인 형질감염에 의해 채워진 입자(full particle)의 비율은 최대 약 30%의 채워진 입자인 것으로 보고되었지만 일반적으로는 10 내지 18% 범위이다. 이는 82 내지 90%가 바람직하지 않은 빈 입자임을 의미한다. 빈 입자는 치료적으로 비활성이며 환자에서 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 따라서, 제조 후 정제 과정에서 이러한 빈 입자는 가능한 한 효율적으로 제거되어야 한다. 이는 효과적이지만 확장(scalable)할 수 없는 과정인 원심분리를 통해 또는 크로마토그래피 방법을 통해 달성할 수 있다. 후자는 대규모 제조에도 사용될 수 있지만 채워진 입자의 농축 배수(fold enrichment)는 일반적으로 3 내지 6배 범위에 불과하다. 따라서, 예를 들어 약 10%의 채워진 입자를 갖는 샘플을 농축하면 최종 비율이 겨우 30 내지 60%인 채워진 입자가 얻어진다.

[0008] 이미 안정적으로 통합된 관심 유전자를 갖는 이른바 제조 세포주는 대부분 HEK 또는 HeLa 세포를 기반으로 한다. 그러나, 이들은 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스)를 이용한 추가의 감염을 필요로 한다. AAV 제조 동안 헬퍼 바이러스를 추가하려면 해당 헬퍼 바이러스를 먼저 제조한 다음, 최종 제품으로부터 헬퍼 바이러스를 제거하기 위해 제조된 AAV 벡터를 광범위하게 정제하는 것 및 헬퍼 바이러스가 없다는 값비싼 입증이 필요하다. 이는 단순 포진 바이러스(HSV) 기반 시스템에도 동일하게 적용된다. 또한, 바쿨로바이러스(Baculovirus) 기반 시스템은 충분한 확장성과 견고성이 부족하고 곤충 숙주 세포 단백질 및 면역원성 곤충 세포 특이적 글리코실화 구조에 의한 오염 위험이 있다.

[0009] 따라서, 현재의 AAV 제조 시스템은 확장성, 견고성, 재현성, 사용 용이성 및 비용 효율성 측면에서 뿐만 아니라 제품 품질 측면에서도 제한이 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 기본이 되는 기술적 과제는 일시적 형질감염 또는 헬퍼 바이러스를 필요로 하지 않으므로, AAV 유전자 치료 벡터의 견고하고 산업적이며 확장 가능한 제조를 가능하게 할 뿐만 아니라 광범위한 업스트림 공정 개발 최적화를 가능하게 하는, AAV 벡터의 안정적인 제조를 위한 확장 가능한 시스템을 제공함에 있고, 특히 제품 역가 및/또는 세포 특이적 수율을 향상시키고, 특히 더욱 중요하게는 채워진 입자(full particle)의 비율의 측면에서 제품 품질을 향상시키는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 기술적 과제에 대한 해결 방안은 청구항의 특징을 가지는 구현예들에 의해 달성된다.

[0012] 특히, 제1 측면에서, 본 발명은,

[0013] (a) AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자들 중 적어도 일부 또는 전부가 숙주 세포 개놈에 안정적으로 통합되는 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주를 제공하는 단계;

[0014] (b) AAV 제조 단계 동안(즉, N 단계 동안) 관류 배양에서 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 관류 배양은 사용된 배지(spent media)를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것을 포함하고, 상기 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 제조의 유도 후에 계속되는, 아데노 관련 바이러스(AAV)의 제조 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서 AAV는 특정 AAV 혈청형에 제한되지 않는다. 따라서, AAV는 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVDJ, AAVDJ8, AAVrh10, 상기 혈청형 중 상이한 둘 이상의 조합(hybrid)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 상기 혈청형은 AAV 혈청형의 친화성(tropism)을 변경시키는 돌연변이를 갖는다. 바람직하게는, AAV는 AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되고, AAV8이 특히 바람직하다.

[0016] 본 발명에 따르면, AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자 중 적어도 일부 또는 전부가 숙주 세포 개놈

에 안정적으로 통합된다. 바람직하게는, 상기 유전자 중 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 또는 전부가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다. 보다 바람직하게는, 모든 상기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다.

[0017] 이와 관련하여, 본 발명에 따르면, AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자는 AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6, E2A 및 VA-RNA를 암호화하는 유전자; Ad5 헬퍼 유전자인 E1A 및 E1B를 암호화하는 유전자; 및 AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직하게는, AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자는 AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자, AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6을 암호화하는 유전자, 및 AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)를 포함한다. 특정 구현예에서, AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자는 AAV Rep 단백질인 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E2A 및 VA-RNA를 암호화하는 유전자; 및 Ad5 헬퍼 유전자인 E1A 및 E1B를 암호화하는 유전자 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 모두를 추가로 포함한다.

[0018] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 제공된 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주에서, 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다:

[0019] AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자;

[0020] AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 및

[0021] 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자.

[0022] 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 제공된 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주에서, 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다:

[0023] AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자;

[0024] AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자;

[0025] AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자;

[0026] 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자; 및

[0027] AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI).

[0028] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 제공된 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주에서, 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다:

[0029] AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자;

[0030] AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68 중 어느 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 유전자 또는 유전자들;

[0031] AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40 중 어느 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 유전자 또는 유전자들;

[0032] AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 및

[0033] 선택적으로, 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E1A, E1B, E4orf6 및 E2A 중 어느 하나, 어느 둘, 어느 셋, 또는 모두를 암호화하는 유전자 또는 유전자들.

[0034] 관련된 특정 구현예에서, 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 제공된 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주에서, 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다:

[0035] (i) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자, AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 및 AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 또는

[0036] (ii) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자, AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6을 암호화하는 유전자, 및 AAV ITRs이 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 또는

- [0037] (iii) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자, AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자, 및 AAV ITRs의 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 또는
- [0038] (iv) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자, AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E1A, E1B, E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자, 및 AAV ITRs의 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 또는
- [0039] (v) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자; 및 AAV ITRs의 측면에 있는 관심 유전자(GOI); 또는
- [0040] (vi) AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자; AAV Rep 단백질인 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40을 암호화하는 유전자; 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E1A, E1B, E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자; 및 AAV ITRs의 측면에 있는 관심 유전자(GOI).
- [0041] 일 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 AAV 제조 방법은:
- [0042] (a) AAV의 제조에 필요한 성분을 암호화하는 유전자들 중 적어도 일부 또는 전부가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합되는 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주를 제공하는 단계;
- [0043] (b) AAV 제조 단계 동안(즉, N 단계 동안) 관류 배양에서 상기 세포를 배양하는 단계로서, 상기 관류 배양은 사용된 배지(spent media)를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것을 포함하고, 상기 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 제조의 유도 후에 계속되는, 세포 배양 단계;를 포함하고,
- [0044] 적어도 하기 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합된다:
- [0045] AAV Cap 단백질인 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 유전자;
- [0046] AAV Rep 단백질인 Rep78 또는 Rep68을 암호화하는 유전자;
- [0047] AAV Rep 단백질인 Rep52 또는 Rep40을 암호화하는 유전자;
- [0048] 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E4orf6 및 E2A를 암호화하는 유전자; 및
- [0049] AAV ITRs의 측면에 있는 관심 유전자(GOI).
- [0050] 이러한 특정 구체예에서, 하기의 추가의 유전자가 숙주 세포 계놈에 안정적으로 통합될 수 있다:
- [0051] AAV Rep 단백질인 Rep78 및 Rep68 둘 다를 암호화하는 유전자,
- [0052] AAV Rep 단백질인 Rep52 및 Rep40 둘 다를 암호화하는 유전자; 및
- [0053] 아데노바이러스 헬퍼 기능인 E1A, E1B 중 하나 또는 둘 모두를 암호화하는 유전자 또는 유전자들.
- [0054] 본 발명의 맥락에서 사용되는 GOI는 특별히 제한되지 않으며 그의 AAV 벡터의 수용자 내로의 전달이 관심 있는 임의의 유전자를 포함한다. 이러한 유전자는 예를 들어 안과 질환, 실명 질환, 근육 질환, Duchenne 근이영양증, GM2 강글리오시드증 및 척수소뇌 운동실조 유형, ALS, 헌팅턴병, X-연관 중증 복합 면역결핍증(X-SCID), 아데노신 디아미네이즈 결핍증(ADA-SCID), 중추신경계 질환, 파킨슨 병, 알츠하이머병, 간 질환, 간 효소 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC) 결핍증, 레버(Leber's) 선천성 흑암, 혈우병, β-지중해빈혈, 암 질환, 두경부암, 전이성 흑색종, 심장 질환, 폐 질환, 또는 낭포성 섬유증, 위스코트-알드리히(Wiskott-Aldrich) 증후군(WAS), 이색성 백혈구 이상증(MLD), 및 중증 지단백질 리파제 결핍 장애(LPLD) 감염 질환, 중증 복합 면역결핍증후군, HIV 감염, 니만 픽 병(Niemann Pick Disease) Type C 및 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC) 결핍증을 포함한 희귀 질환의 치료를 위한 것이다.
- [0055] 본 발명에서 사용되는 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주는 당업계에 공지된 임의의 적합한 세포주로부터 유래될 수 있다. 그러나, 바람직한 구현예에서, 상기 세포주는 CAP cells, AGE1.hn, HEK293, PER.C6, NS01, COS-7, BHK, CHO, CV1, VERO, HeLa, MDCK, BRL3A, W138, 및 HepG2 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포주이거나 세포주로부터 유래되고, 여기서 CAP 세포 및 HEK293 세포가 특히 바람직하다. 특정 구현예에서, 상기 세포주는 CAP 세포로부터 유래되거나 CAP 세포주이다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 세포주는 HEK293 세포로부터 유래되거나 HEK293 세포주이다. 이러한 맥락에서, "안정적인 AAV 제조 숙주 세포주는 세포주 X로부터 유래된다"라는

용어는 상기 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주가 상기 나타낸 각각의 유전자를 세포주 X의 세포에 안정적으로 통합함으로써 생성됨을 나타낸다. 따라서, 상기 용어는 상기 나타낸 바와 같이 세포주 X인 안정적인 AAV 제조 숙주 세포주를 명시적으로 포함한다. 이러한 맥락에서, "안정적인 AAV 제조 숙주 세포주는 세포주 X로부터 유래된다"라는 용어는 "안정적인 AAV 제조 숙주 세포주는 세포주 X를 기반으로 한다"로 읽을 수 있으며, 각각의 용어들은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 AAV 제조의 규모는 밀리리터 범위의 작은 부피에서 중간 범위 부피 내지 대규모 부피에 이르기 까지 다양할 수 있으며, 예를 들어 제조 진행(production run)당 2,000L 또는 25,000L 부피이다.

[0057] 본 발명의 방법의 단계 (b)에서 관류 배양은 당업계에 공지된 임의의 적합한 배양 용기 또는 시스템에서 수행될 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 다양한 유형의 생물반응기는 교반 탱크 생물반응기(STR), 케도 진탕 생물반응기(OSB), 로킹 베드 생물반응기(예: WAVE, Rocking Motion), 공기 부양 생물반응기 또는 관형 생물반응기를 포함한다. 이러한 생물 반응기 유형의 경우, 유리, 스테인리스강 또는 일회용 생물 반응기 용기가 사용될 수 있다. 또한, 관류 장치에 결합된 고처리량 생물 반응기를 포함하여 유효한 다중 병렬 생물 반응기가 사용될 수 있다. 또한, 부착 세포용으로 설계된 관류 생물 반응기, 예를 들어, 중공사 생물반응기(HFBR), 고정층 생물반응기(예: 충전층 생물반응기) 및 유동층 생물반응기도 사용할 수 있다.

[0058] 관류 배양을 위한 작동 모드는 당업계에 공지된 표준 관류(연속), 농축 관류(연속), 하이브리드 관류/유가식, 부피 팽창이 있는 관류, 및 2-단계 연속 공정을 포함하지만 이에 특별히 제한되지 않는다. 관류 장치는 TFF(접선 흐름 여과) 및 ATF(교대 접선 흐름)같은 전략에 따라 작동되는 중공사 필터, 부유 멤브레인, 스픈 필터 및 회전식 원통형 필터(와류 흐름 필터 또는 외부 스픈 필터라고도 함) 및 회전 디스크 필터(전단 제어 필터라고도 함)를 포함하고, 여기서는 ATF 관류 배양이 특히 바람직하다. 연동 펌프, 다이어프램 펌프 또는 자기 부상 기반 원심 펌프(예: Levitronix)와 함께 작동하는 중공사 기반 또는 관형 멤브레인 모듈과 같은 다른 유형의 여과 장치도 사용할 수 있다. 여전히 다른 관류 장치는 당업계에 공지된 바와 같이 중력 침강기(라벨라 침강기, 콤팩트 셀 침강기), 음향 침강기(음향 필터라고도 함), 원심분리기, 및 하이드로사이클론을 포함한다.

[0059] 본 발명에 따르면, 관류 배양은 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것(즉, 연속적 배지 교환)을 포함하며, 여기서 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 AAV 제조의 유도 후에 계속된다. 바람직한 구현예에서, 사용된 배지를 새로운 배지로 연속적으로 교체하는 것은 유도 후 최소 24시간 동안, 유도 후 최소 48시간 동안, 유도 후 최소 72시간 동안 및/또는 AAV의 수확 때까지 계속된다. 당업계에 공지된 바와 같이, "사용된 배지를 새로운 배지로 계속 교체" 또는 "연속적 배지 교환"이라는 용어는 사용된 배지를 새로운 배지로 반드시 논스톱으로 교체(즉, 논스톱 배지 교환)할 필요는 없지만, 당업계에 공지된 바와 같이, 하루에 여러 번 상기 교체를 일시 중지할 수 있다. 예를 들어, 교체 또는 중간 교환의 가능한 일시 중지는 예를 들어 다음과 같은 일시 중지이다. 하루에 최대 1시간 또는 최대 2시간, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6회의 일시 중지, 또는 예를 들어 하루에 최대 6시간 또는 최대 12시간 동안 한 번 또는 두 번의 일시 중지이다.

[0060] 바람직한 구현예에서, 관류 배양 동안 세포 특이적 관류 속도(CSPR)는 약 0.01 내지 약 0.20 nL/세포/일이다. 또한, 관류 속도는 바람직하게는 약 1 내지 약 20 vvd(새로운 배지의 부피/반응기의 작업 부피/일)이다.

[0061] 본 발명에 따르면, 방법은 약  $0.1 \times 10^6$  내지 약  $2.0 \times 10^6$  세포/mL 범위의 더 낮은 생존 세포 밀도(VCD) 또는 약  $2.0 \times 10^6$  내지 약  $20 \times 10^6$  세포/mL의 더 높은 VCD의 파종(seeding)시 세포 밀도로 개시될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 관류 배양물의 파종 시 세포 밀도는 약  $0.5 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^6$  세포/mL이다.

[0062] 추가로, AAV 생성 유도 시점에서의 세포 밀도는 약  $1.0 \times 10^6$  내지 약  $10 \times 10^6$  세포/mL 범위의 더 낮은 VCD, 약  $10 \times 10^6$  내지 약  $100 \times 10^6$  세포/mL 범위의 높은 VCD, 또는 약  $100 \times 10^6$  내지 약  $200 \times 10^6$  세포/mL 범위의 매우 높은 VCD일 수 있다. 바람직한 구현예에서, AAV 생성 유도 시점에서의 세포 밀도는 약  $20 \times 10^6$  세포/mL 이상이다.

[0063] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 관류 배양 잔류물로부터 AAV를 수확하는 단계를 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 방법에서, 파종 후로부터 AAV 제조 유도까지의 공정 시간은 0 내지 21일의 범위일 수 있다. 또한, 유도 후 쳐공정 시간은 유도 후 2 내지 10일의 범위일 수 있다.

[0065] 최대 AAV 역가를 달성하기 위해, 파종 세포 밀도, 온도, 교반 속도, pH, DO(용존 산소), 삼투압 농도 및/또는

생물반응기 작업 부피와 같은 공정 매개변수는 당업계에 공지된 바와 같이 제조 공정 동안에 변경될 수 있다. 또한, 특정 아미노산, 당류, 유기산, 보조인자, 비타민, 무기질 및/또는 기타 요소의 부족을 피하기 위해, 당업계에 공지된 바와 같이 세포 배양액에 부족한 성분을 보충하는 것은 제조 공정의 일부가 될 수 있다.

- [0066] 제2 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 아데노-관련 바이러스 (AAV)에 관한 것이다.
- [0067] 본원에서 사용되는 용어 "포함하는"/"포함한다"은, 상호 교환가능한 용어들인 "본질적으로 ~로 구성되는" 및 "~로 구성되는"/"구성된다"라는 용어를 명시적으로 포함한다..
- [0068] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 지정된 값의  $\pm 10\%$ , 바람직하게는  $\pm 7\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$ ,  $\pm 1\%$ , 또는  $\pm 0.5\%$ 의 변형이다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 용어 "약 10"은 9 내지 11의 범위를 의미할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서, 완전히 안정적인 AAV 제조 세포주는 AAV 벡터의 대규모 제조를 위한 효과적인 방법을 나타낸다. 이러한 완전히 안정적인 AAV 제조 세포는 예를 들어 캡시드 유전자(VP1, VP2, VP3), 조절 유전자(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), 아데노바이러스 헬퍼 기능(E1A, E1B, E4orf6, E2A 및 VA-RNA) 및 ITR이 측면에 있는 이식유전자(관심 유전자; GOI)가 안정적으로 통합된 세포로 구성된다. 이러한 시스템에서, 4개의 rep 단백질과 헬퍼 기능인 E2A 및 E4orf6의 발현은 유도성 시스템의 제어 하에 있다. 유도인자(inducer)의 첨가에 의해, 전술한 단백질이 발현되고, 재조합 AAV(rAAV) 벡터가 제조된다.
- [0070] 이러한 안정적인 시스템은 일시적인 형질감염 단계나 헬퍼 감염 단계가 필요하지 않기 때문에 몇 가지 장점이 있다. 따라서, 생략된 플라스미드 비용이나 헬퍼 바이러스 제조를 위한 생략된 추가 비용으로 인해 제품 비용이 감소된다. 이러한 시스템은 배치(batch) 간 변동이 미미하거나 전혀 없이 확장 가능하고 재현성이 높다.
- [0071] 가장 중요하게는, 일시적 형질감염 또는 바이러스 감염이 필요 없는 본 발명에서 사용되는 안정적인 AAV 제조 세포주는, 예를 들어 바이러스 역가 수율(체적 생산성 및/또는 세포 특이적 바이러스 수율)을 증가시키고/시키거나 특히 채워진 입자의 비율의 측면에서 제품 품질을 증가시키기 위해 광범위한 업스트림 세포 배양 공정 개발 및 최적화를 가능하게 한다.
- [0072] 일반적으로, 업스트림 세포 배양 공정은 회분식, 유가식, 연속식 또는 세포 제순환(관류) 모드 또는 하이브리드 모드(예: 관류 및 유가식의 하이브리드)를 사용하여 연속적으로 작동될 수 있다. 작동 모드는 성장 프로필 및 제조 동역학(kinetics)을 결정한다.
- [0073] 관류 모드에서, 신선한 배지의 공급(입구)과 사용된 배지의 제거(출구)는 일반적으로 생물 반응기 부피가 일정하게 유지되도록 입구와 출구에서 동일한 유속을 사용하여 수행된다. 세포는 세포 보유(또는 관류) 장치를 사용하여 제조 시스템(생물 반응기)에 보유된다. 결과적으로, 높은 세포 밀도가 얻어질 수 있다. 일반적으로, 관류는 다른 작동 모드와 비교하여 더 낮은 설치 공간으로 더 높은 체적 생산성을 가능하게 한다.
- [0074] 세포 분리를 위한 하기과 같은 다양한 메커니즘을 사용하는 다양한 관류 장치를 사용할 수 있다: 침강(중력 또는 원심력 하에서), 초음파장 하에서 응집(이어서 침강) 및 여과. 따라서, 분리 효율은 장치 선택에 따라 달라진다. 예로는 원심분리기, 중력 침강기(라벨라 침강기, 소형 셀 침강기), 음향 침강기(음향 필터라고도 함), 원심분리기, 하이드로사이클론 및 필터가 있다. 다양한 전략하에서 작동되는 여과로는 하기의 것들이 있다: TFF (접선 흐름 여과) 및 ATF(교대 접선 흐름), 부유 멤브레인, 스판 필터 및 회전 원통형 필터(와류 흐름 필터 또는 외부 스판 필터라고도 함) 및 회전 디스크 필터(제어된 전단 필터라고도 함). 다양한 유형의 필터 중에서, TFF 및 ATF가 관류에 일반적으로 사용된다. 두 경우 모두, 필터 멤브레인을 포함하는 중공사 모듈이 사용된다. ATF의 경우, 다이어프램 펌프를 통해 양방향 흐름을 얻는다. 현재, ATF는 재조합 단백질 제조(바이오의약품)에 가장 많이 사용되는 세포 유지(cell retention) 장치이다. 관류는 생물의약 제조 공정의 경우에 잘 확립되어 있지만, 바이러스 벡터의 확장 가능한 제조에는 아직 사용 가능하지 않았다.
- [0075] 요약하면, 본 발명에 따른 rAAV 제조를 위한 관류 공정은 안정적인 AAV 제조 세포를 사용한 통상적인 배지 공정과 비교하여, 더 높은 역가(vg/L) 및 더 높은 세포 특이적 바이러스 수율(vg/세포)을 가능하게 하였다. 예상외로, 안정적인 AAV 제조 시스템에서 관류를 적용한 경우, 기존의 배지 공정에 비해 채워진 바이러스 입자와 빈 바이러스 입자 사이의 비율이 크게 증가했다. 또한, AAV 바이러스 벡터의 수확이 투과물(permeate) 대신 잔류물(생물 반응기 별크로부터 수집된 전체 세포 혼탁액)으로부터 수행될 수 있으므로, 후속 AAV 정제 공정의 부피가 크게 줄어들어서 전체 공정이 보다 효율적이게 된다.
- [0076] 본 발명에 기술된 완전히 안정적인 AAV 제조 플랫폼을 이용하면 완전히 일시적인 접근 방법과 비교하여 유사한

백분율의 채워진 입자가 얻어진다. 그러나, 이는 배치 또는 유가(fed-batch) 방식으로 AAV 입자를 제조하는 경우에만 해당된다. 예상외로, 관류를 이용하는 완전히 안정적인 제조 세포 시스템으로 AAV 바이러스 벡터를 제조하면 기준 배치 공정과 비교하여 최대 약 10배까지 채워진 입자의 비율이 극적으로 증가하는 이점이 있다. 따라서, 후속의 채워진 입자 농축(full particle enrichment) 단계에서 예를 들어 AEX 크로마토그래피를 이용함으로써, 75% 이상의 채워진 입자의 최종 비율을 달성할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0077]

### 도 1: 유사 관류 모드의 진탕 플라스크(SF)에서 안정적인 CAP AAV 제조자의 성장.

A) 높은 세포 밀도에 대한 진탕 플라스크(SF) 1 및 2(생물학적 복제물)에서 배양물의 세포 성장 및 생존율. B) 생물학적 복제물(duplicate)의 평균 VCD로 계산된 세포 특이적 관류 속도(CSPR).

### 도 2: rAAV 제조를 위한 ATF 기반 관류 공정의 단순화된 개략도.

새로운 배지(공급물)의 지속적인 추가 및 사용된 배지(투과액)의 제거가 수행된다. ATF(교대 접선 흐름)가 관류 장치로 도시되어 있다.

### 도 3: 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 사용한 rAAV 제조를 위한 ATF 기반 관류 과정.

관류 생물반응기에서 CAP AAV 제조 세포주의 생존 세포 밀도(VCD, 실선) 및 생존율(파선). 3개의 독립적인 배양: 진행 1(◆), 2(◇) 및 3(●). 관류 모드는 접종 후 3일 후에 시작된다(회색 수직선). rAAV의 제조는 접종 후 7일에 시작된다(파선 수직선). 제조 단계는 유도 후 5일까지 수행된다.

### 도 4: 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 사용한 rAAV 제조를 위한 기존 배치 과정.

배치 모드의 생물반응기에서 CAP AAV 제조 세포주의 생존 가능한 세포 밀도(VCD, 실선) 및 생존율(파선). 2개의 독립적인 배양: 진행 1(■) 및 2(□). rAAV의 제조는 접종 후 3일에 시작된다(수직 접선).

### 도 5: 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 사용한 배치 프로세스와 비교하여 관류 모드에서 rAAV의 제조.

CAP AAV 제조자 세포주를 사용하여 관류 모드에서 3회 진행(run) 및 배치 모드에서 2회 진행을 수행했다. A) qPCR에 의해 측정된 AAV8 계놈 역가. B) ELISA에 의해 측정된 캡시드의 농도. 데이터는 유도 후 5일째에 2개의 배치 과정의 평균 값에 정규화된다.

### 도 6: 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 이용한 관류 모드에서 채워진 캡시드의 더 높은 백분율.

배치 참조 과정과의 비교. 백분율은 계놈 역가(도 5A) 대 캡시드 역가(도 5B)의 비율로 계산되었다. 데이터는 배치 진행에 정규화된다. A) 관류 모드( $n = 3$ ) 및 배치 모드( $n = 2$ )에서 과정의 시간 경과. 여기서  $n$ 은 생물학적 복제물(replicate)의 수를 나타낸다. B) 채워진 캡시드 데이터는 생물학적 복제물의 평균 ± 표준 편차로 표시된다.

### 도 7: 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 사용한 관류 모드에서 증가된 세포 특이적 바이러스 수율(CSV).

배치 참조 과정과의 비교. 수화 시점에서의 계놈 역가 대 유도 시점에서의 생존 세포 밀도의 비율로 수율을 계산하였다. 데이터는 생물학적 복제물의 평균 ± 표준 편차로 표시된다(관류:  $n = 3$ , 배치:  $n = 2$ ). 데이터는 유도 후 5일째에 배치에 정규화된다.

### 도 8: 관류 및 배치에서의 제조 동안 CAP 유래 AAV 입자의 감염성.

데이터는 각 제조 진행의 유도 후 3일에 정규화된다.

### 도 9: AAV 제조 단계에서 ATF 기반 관류 과정을 중단하면 유도 후 생존 가능한 세포 밀도와 세포 생존율이 감소 한다.

생존 가능한 세포 밀도(VCD, 실선) 및 생존율(파선). 관류 모드는 접종 후 3일에 시작된다(회색 수직선). rAAV의 제조는 접종 후 8일에 시작된다(파선 수직선). 제조 단계는 유도 후 4일까지 배치 모드에서 수행된다.

### 도 10: AAV 제조 단계에서 ATF 기반 관류 과정을 중단하면 AAV 역가가 크게 감소한다.

qPCR에 의해 결정된 AAV8 계놈 역가. 수화 시에 측정된 높은 세포 밀도(HCD) 배치의 역가. 데이터는 유도 후 5일째에 기존의 낮은 세포 밀도(LCD) 배치에 정규화된다.

도 11: 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 안정적인 rAAV 제조를 위한 ATF 기반 관류 과정.

관류 생물반응기(◆)에서 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀의 생존 가능한 세포 밀도(VCD, 실선) 및 생존율(파선). 관류는 접종 후 3일에 시작된다(회색 수직선). rAAV의 제조는 접종 후 6일에 시작된다(파선 수직선). 제조 단계는 유도 후 4일까지 지속된다.

도 12: 배치 모드에서 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 안정적인 rAAV 제조.

배치 진탕 플라스크에서 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀의 생존 가능한 세포 밀도(VCD, 실선) 및 생존율(파선)(□). 배치 모드에서의 제조는 접종 후 3일(직선 파선)에 시작되고 유도 후 5일까지 수행된다.

도 13: 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 관류 모드에서 rAAV의 제조.

관류 모드에서 한 번 진행하고 및 배치 모드에서 한 번 진행. A) qPCR에 의해 결정된 AAV8 게놈 역가. B) ELISA에 의해 결정된 캡시드의 농도. 데이터는 배치 제어 유도 후 3일에 정규화된다.

도 14: 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 관류 모드에서 증가된 세포 특이적 바이러스 수율(CSVY).

수율은 유도 시점의 생존 세포 밀도에 대한 피크 게놈 역가의 비율로 계산되었다. 결과는 배치 제어에 정규화된다.

그림 15: 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 관류 모드에서 더 높은 비율의 채워진 캡시드.

백분율은 정규화된 캡시드 역가(도 13B)에 대한 정규화된 게놈 역가(도 13A)의 비율로 계산되었다. 데이터는 배치 제어에 정규화된다.

도 16: AEX 진행의 상이한 분획 유래의 AAV 입자의 SyproRuby 염색은 약 1:1:10의 VP1 대 VP2 대 VP3의 비율을 나타낸다.

두 가지 다른 AEX 진행의 상이한 분획 유래의 캡시드를 SyproRuby 염색으로 시각화했다.

도 17: AEX 정제 후 채워진 것 대 빈 것의 비율.

ELISA에 의한 바이러스 입자 및 qPCR에 의한 바이러스 게놈 역가의 측정 후, ATF 관류를 이용한 AAV 제조으로부터 2회의 AEX 진행으로부터의 상이한 분획의 채워진 입자 대 빈 입자의 비율을 계산하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0078]

본 발명은 다음의 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다:

[0079]

SEQ ID NO: 1

[0080]

SV40 PolyA 프라이머 정방향

[0081]

AGCAATAGCATCACAAATTCACAA

[0082]

SEQ ID NO: 2

[0083]

SV40 PolyA 프라이머 역방향

[0084]

CCAGACATGATAAGATACTTGATGAGTT

[0085]

SEQ ID NO: 3

[0086]

SV40 PolyA 프로브

[0087]

AGCATTTCAGTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTC

[0088]

SEQ ID NO: 4

[0089]

GFP 프라이머 정방향

[0090]

TTCTCAAGTCCGCCATGCC

[0091]

SEQ ID NO: 5

[0092]

GFP 프라이머 역방향

- [0093] AAGTCGATGCCCTTCAGCTC
- [0094] SEQ ID NO: 6
- [0095] GFP 프로브
- [0096] CGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCACTACA
- [0097] 이하에서는 본 발명을 다음의 실시예들을 통하여 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이에 한정되지 않는다.
- [0098] **실시예**
- [0099] 실험 과정
- [0100] **제조 세포주:**
- [0101] 관류 공정 개발을 위해, AAV 제조에 필요한 모든 성분을 포함하는 안정적인 AAV 제조 세포주를 선택하였다. (1) CAP 세포 기반 세포주 및 (2) HEK293 세포 기반 세포주의 두 가지 세포주가 사용되었다.
- [0102] (1) 혈청형 특이적 캡시드(AAV8)의 유도인자 Tet3G, 유도성 복제효소, 유도성 헬퍼(E2A, E4orf6), VA-RNA, VP1, VP2 및 VP3, 및 ITR이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)인 GFP에 대한 서열을 포함하는 안정적인 CAP AAV 제조 단일 세포 클론. 또한, Ad5 헬퍼 유전자인 E1A 및 E1B는 불멸화되어 CAP 세포에 이미 안정적으로 통합되어 있다.
- [0103] (2) 혈청형 특이적 캡시드(AAV8)의 유도인자 Tet3G, 유도성 복제효소, 유도성 헬퍼(E2A, E4orf6), VA-RNA, VP1, VP2 및 VP3, 및 ITR이 측면에 있는 관심 유전자(GOI)인 GFP-루시페라제에 대한 서열을 포함하는 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀. 또한, Ad5 헬퍼 유전자인 E1A 및 E1B는 불멸화됨에 따라 HEK 세포에 이미 안정적으로 통합되어 있다.
- [0104] **세포 배양:**
- [0105] (1) 정규 배양을 위해, CAP 세포를 진탕 인큐베이터에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 120 내지 185 rpm으로 배풀이 없는 진탕 플라스크에서, 4mM GlutaMAX(Gibco)가 첨가된 단백질 발현 배지(PEM)(Life Technologies/Gibco사)에서 배양하였다. 세포를 3 내지 4일마다 0.5×10<sup>6</sup> 내지 1×10<sup>6</sup> 세포/mL의 생존 가능한 세포 밀도까지 새로운 배지로 일상적으로 계대했다.
- [0106] (2) 정규 배양을 위해, HEK293 세포를 진탕 인큐베이터에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 170 내지 200 rpm으로 배풀이 없는 진탕 플라스크에서, 4mM GlutaMAX(Gibco)가 첨가된 단백질 발현 배지(PEM)(Life Technologies/Gibco사)에서 배양하였다. 세포를 2 내지 3일마다 0.3×10<sup>6</sup> 내지 0.5×10<sup>6</sup> 세포/mL의 생존 가능한 세포 밀도까지 새로운 배지로 일상적으로 계대했다.
- [0107] **안정적인 AAV 제작 플랫폼을 사용한 AAV 제조:**
- [0108] qAAV 제조는 배양물에 독시사이클린을 첨가하여 유도하였다.
- [0109] **바이러스 역가를 측정하기 위한 qPCR:**
- [0110] SV40 PolyA 또는 GOI(GFP)에 대한 하기의 프라이머/이중 표지된 프로브 조합(MWG, Eurofins; 표 1)을 사용하여 바이러스 역가를 측정했다.

**표 1**

바이러스 역가 측정에 사용된 프라이머/프로브 조합

프라이머/프로브	서열
SV40 PolyA 프라이머 정방향	5' - AGC AAT AGC ATC ACA AAT TTC ACA A -3' (서열번호 1)
SV40 PolyA 프라이머 역방향	5' - CCA GAC ATG ATA AGA TAC ATT GAT GAG TT -3' (서열번호 2)
SV40 PolyA 프로브	Fam-5' - AGC ATT TTT TTC ACT GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC -3' -BHQ1 (서열번호 3)
GFP 프라이머 정방향	5' - TTC TTC AAG TCC GCC ATG CC -3' (서열번호 4)
GFP 프라이머 역방향	5' - AAG TCG ATG CCC TTC AGC TC -3' (서열번호 5)

GFP 프로브	Hex-5'- CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC A- 3'-BHQ2 (서 열번호 6)
---------	---

- [0112] Fam: 6-카르복시플루오레세인; BHQ1: 블랙홀 소광제(Quencher); Hex: 5-헥사클로로-플루오레세인
- [0113] 표준으로서, 정의된 카페 수를 갖는 선형화된 이식유전자 플라스미드가 사용되었다. qPCR 반응은 하기의 성분을 포함했다: 2 X Brilliant Multiplex qPCR 마스터 믹스(Agilent사), 뉴클레아제가 없는 H<sub>2</sub>O(Thermo Fisher Scientific사), 프라이머/프로브 믹스 및 샘플/표준. qPCR은 제조사의 지침에 따라 Agilent Mx3005P에서 수행하였다.
- [0114] 조립된 캡시드에 대한 ELISA:
- [0115] 조립된 캡시드에 특이적인 ELISA는 제조사의 지침에 따라 시판되는 ELISA 키트(Progen사)를 사용하여 수행하였다.
- [0116] SDS-PAGE 및 SyproRuby 염색:
- [0117] 캡시드 단백질인 VP1, VP2 및 VP3의 비율을 측정하기 위해 캡시드 단백질을 SDS PAGE 상에서 분리하고 SyproRuby 염색을 통해 시각화했다. 간단히 말해서, 샘플을 4A LDS 완충액과 혼합한 다음 70°C의 건열 블록에서 10분 동안 인큐베이션했다. 투브를 회전시키고 웰에 10 μL 샘플을 로딩했다. 4 내지 12% Bis-Tris 겔을 MES SDS 완충액에서 200V에서 40분 동안 진행했다. Sypro Ruby 염색은 염색 용액에서 밤새 인큐베이션한 후 10% 메탄올, 7% 아세트산 및 최종적으로 ddH<sub>2</sub>O에서 30분 세척하여 수행하였다.
- [0118] 음이온 교환 크로마토그래피를 통한 채워진 AAV 입자 및 빈 AAV 입자의 분리:
- [0119] 전체 세포 혼탁액 용해물의 AAV 입자는 크로마토그래피를 통해 농축했다. 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 채워진 입자 대 빈 입자 분리를 달성했다.
- [0120] 실시예 1:
- [0121] 유사 관류 실험(세포 성장)
- [0122] 세포 생존율을 유지하고 세포 성장을 유지하기 위해, 세포 밀도가 높을수록 대부분의 세포 배양 배지를 사용하여 더 높은 관류 속도가 필요하다. 제조 과정 동안에 세포 밀도가 변화함에 따라, 세포 특이적 관류 속도(CSP R)는 세포 밀도를 기반으로 전체 공정 동안의 관류 속도를 결정하는 요소이다.
- [0123] CSPR은 연속 과정에서 세포당 하루 영양 공급을 나타낸다.
- [0124] CSPR = P/VCD,
- [0125] 여기서 P = 관류 속도(1/일) 및 VCD = 생존 세포 밀도( $1 \times 10^6$  세포/mL).
- [0126] 관류 생물반응기 공정에 대한 CSPR을 결정하기 위해, 안정적인 CAP AAV 제조자(단일 세포 클론)를 배풀이 없는 진탕 플라스크에서 4mM GlutaMAX가 포함된 PEM의 진탕 플라스크에서 배양했다. 배양 3일차부터 매일 배지 교환을 하였다. 원심분리 후, 사용한 배지는 버렸다. 이어서, 세포 펠릿을 동일한 양의 새로운 배지에 재현탁시켰다. 즉, 생존율의 저하가 관찰될 때까지 관류 속도를 1 vvd로 유지하였다.
- [0127] 지수적 세포 성장 및 높은 생존율(> 90%)은 7일까지 관찰되었으며, 이는  $20 \times 10^6$  세포/mL의 VCD 및 약 0.05nL/세포/일의 CSPR에 해당한다(도 1). 이러한 매개변수는 관류 생물반응기로의 확장(scale-up)을 위한 표적으로 선택되었다.
- [0128] 보충된 PEM 배지를 관류 배지로 사용하여 더 높은 세포 밀도를 유지하려면 더 높은 관류 속도를 적용해야 한다.
- [0129] 실시예 2:
- [0130] 안정적인 CAP AAV 제조 단일 세포를 사용하여 관류 모드에서 AAV 제조
- [0131] 기존의 회분식 공정에 비해 ATF 기반 관류를 사용하는 이점을 평가하기 위해, 안정적인 CAP AAV 제조 세포를 사용한 AAV 제조를 회분식 공정 또는 ATF 기반 관류 공정으로 수행했다. 둘 모두는 제어된 조건 하에 교반 탱크 생물 반응기에서 수행되었다.

[0132] 기준의 배치 공정:

[0133] 세포를 교반 탱크 생물 반응기, 예를 들어, 일회용 10c 용기(Eppendorf사) 용기, BioFlo320 시스템(Eppendorf사)에서 배양하였다. 생물반응기는 4mM GlutaMAX가 첨가된 PEM 배지에서 비교적 낮은 세포 밀도( $0.5 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^6$  세포/mL)로 접종한다. 공정은 배치 모드로 작동되었다. 세포가 AAV 제조를 위한 표적 생존 세포 밀도로 성장한 후(일반적으로 과종 후 3일), AAV 제조는  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  독시사이클린으로 시작되었다.

[0134] 관류 장치(set-up):

[0135] ATF 기반 관류 장치는 ATF 유닛에 연결된 교반 탱크 생물 반응기로 구성되었다. 세포는 교반 탱크 생물 반응기, 예를 들어, 일회용 3c 용기(Eppendorf사) 용기, BioFlo320 시스템(Eppendorf사)에서 배양하였다.

[0136] 관류 기반 AAV 공정:

[0137] 생물반응기에는 4mM GlutaMAX가 첨가된 PEM 배지에서 비교적 낮은 세포 밀도( $0.5 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^6$  세포/mL)로 접종하였다. 공정은 3일 동안 배치 모드로 작동하였다. 그 후, 약  $0.05 \text{ nL}/\text{세포}/\text{일}$  내지 약  $0.10 \text{ nL}/\text{세포}/\text{일}$ 의 세포 특이적 관류 속도(CSPR)에 따라, 보충된 PEM 배지를 공급하면서 관류를 시작하였다. 세포가 약  $20 \times 10^6$  개 생존 세포/mL로 성장한 후(7일째), AAV 생성 유도를  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  독시사이클린으로 수행하였다. 제조 단계 동안 관류 속도는 약 1 vvd에서 거의 일정하게 유지하였다.

[0138] 세 번의 관류 진행(run)에서  $20 \times 10^6$  세포/mL까지의 강력한 세포 성장이 관찰되었다(도 3). 관류 생물반응기에서의 세포 성장은 진탕 플라스크에서의 반관류 실험과 비슷했다(도 1). 배치 공정에 비해 유도 시 VCD의 약 5배 증가가 관찰되었다(도 4).

[0139] 관류 모드에서, 계놈 역가(vg/mL)는 매우 높았다(도 5). 최대 역가를 고려하면, CAP 관류 공정(3번의 독립적인 배양의 평균)은 참조 배치 공정(2번의 독립적인 배양의 평균)에 비해 42배 증가했다. 이것은 부분적으로 더 높은 VCD 때문이지만 더 중요한 것은 관류에서 평균 9배 더 높은 세포 특이적 바이러스 수율(vg/cell)의 상당한 증가 때문이었다(도 7).

[0140] 예상외로, 채워진 입자의 비율도 회분식 공정에 비해 관류 공정(도 6)에서 크게 증가했다. 관류에서 채워진 입자의 최대 백분율(약 4d.p.i.)은 동일한 시점에서 기준 배치 공정에서 얻은 값과 비교하여 약 10배 더 높았다. 평균적으로, 채워진 AAV 입자의 최대 백분율은 3회의 관류 진행과 2회의 배치 진행의 데이터를 비교할 때 관류 진행의 경우 9.3배 더 높았다. 가능한 설명은 관류 환경이 더 나은 AAV 박터 DNA 중복 또는 AAV 입자로의 바이러스 계놈 패키징 증가에 기여했다는 것일 수 있다.

[0141] 감염성 AAV 입자를 형질도입 분석에 의해 결정하였다. 바이러스 계놈(VG)에 대한 형질도입 단위(TU)의 비율을 계산하였다(TU:VG). 배치 진행 2의 경우, TU:VG는 유도 후 3일부터 6일(d.p.i.)까지 결정되었다. 최대값은 3d.p.i에서 얻어졌다. 관류 진행 1 및 2의 경우 3d.p.i에서도 최대값이 얻어졌다. 따라서, 각 샘플의 TU:VG 비율은 각 진행마다 3d.p.i에 정규화되었다.

[0142] 그 결과(도 8)는 배치에 비해 관류 모드에서 시간이 지남에 따라 더 높은 감염성이 유지되었음을 시사한다. 유도 후 3일에서 5일 사이에, 감염성 AAV 입자의 약 30%가 배치에서 감염성을 상실한 반면, 관류 모드(1 vvd)에서는 상실은 동일한 기간 동안 18% 미만이었다.

[0143] 실시예 3:

[0144] 높은 세포 밀도 CAP 제조 세포 배양액의 생성을 위한 ATF 관류의 이용

[0145] 세포 특이적 생산성의 현저한 증가, 체적 역가의 증가 및 채워진 입자의 백분율 증가가 주로 AAV 제조의 유도 전의 관류 모드에 의한 것인지 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.  $20 \times 10^6$  세포/mL의 표적 생존 세포 밀도에 도달할 때까지 실시예 2에 기재된 바와 같이 세포를 N 생물반응기에서 관류 모드로 배양하였다. 그러나, 독시사이클린 유도에 의한 AAV 제조의 유도 직후, 관류를 중단하고 제조 단계를 배치 모드로 작동시켰다. 이는 제조 단계에서 더 이상의 배지 교환이 수행되지 않았음을 의미한다.

[0146] 관류 장치:

[0147] ATF 기반 관류 장치는 ATF 장치에 연결된 교반 탱크 생물 반응기로 구성되었다. 세포를 교반 탱크 생물반응기,

예를 들어 일회용 3c 용기(Eppendorf사) 용기, BioFlo320 시스템(Eppendorf사)에서 배양했다.

[0148] 관류/배치 AAV 공정:

[0149] 생물반응기에는 4mM GlutaMAX가 첨가된 PEM 배지에서 비교적 낮은 세포 밀도( $0.5 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^6$  세포/mL)로 접종하였다. 공정은 3일 동안 배치 모드로 작동되었다. 그 후, 약 0.05 nL/세포/일 내지 약 0.10 nL/세포/일의 세포 특이적 관류 속도(CSPR)에 따라, 보충된 PEM 배지를 공급하면서 관류를 시작하였다. 세포가 약  $20 \times 10^6$  개 생존 세포/mL로 성장한 후, AAV 생성의 유도를 1 $\mu$ g/mL 독시사이클린으로 수행하였다. 유도 후 관류를 중단했다.

[0150] 관류 배양은 이전 진행과 동일한 성장 프로파일을 따랐고(도 3), 유도 시점에서  $2.0 \times 10^6$  세포/mL에 도달했다 (도 9). 배치로의 작동 모드 전환 후, 세포 농도는 유도 후 24시간 동안 유지하였다. 결과적으로, 세포 농도 및 생존율이 급격히 떨어졌다. 흥미롭게도, 체적 및 세포 특이적 생산성은 기준 배치 공정에 비해 유도 후 4일의 계획 역가가 약 40배 더 낮았을 때 매우 낮았다(도 10). 그 결과는 단순히 유도 전의 관류 모드가 아니라 유도 시점에서 생존 세포 밀도의 증가가 전술한 체적 생산성, 세포 특이적 생산성 및 채워진 AAV 입자의 백분율 증가의 놀라운 증가에 기여함을 나타낸다(실시예 2).

[0151] 본 실시예(실시예 3)의 결과는, 관류 모드가 유도 후 추가로 계속되고 따라서 전체 제조 단계 동안 계속되어 세포의 지속가능성이 확보되는 경우에만, 높은 세포 특이적 바이러스 수율 및 채워진 AAV 입자의 증가된 백분율을 갖는 효율적인 AAV 제조가 달성된다는 것을 명백히 나타낸다.

[0152] 실시예 4:

[0153] AAV 제조를 위한 안정적인 HEK293 AAV 제조 세포를 사용하는 관류 모드

[0154] 세포 특이적 바이러스 수율, 체적 생산성 및 채워진 AAV 입자의 증가된 백분율과 관련하여 관류 공정의 유익한 효과가 안정한 CAP AAV 제조 세포(실시예 2)에 제한되지 않지만, 다른 AAV 제조 시스템으로 전달된다는 것을 입증하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 따라서, 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀을 위해 유사한 관류 공정을 개발했다. 내부 대조군으로서, 진탕 플라스크에서 배양되고 배치 모드에서 작동되는 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용하여 AAV를 또한 제조하였다.

[0155] 배치 공정:

[0156] 세포를 30mL 배양 부피를 갖는 125mL 배플이 없는 진탕 플라스크에서 배양하였다. 배양물은 4mM GlutaMAX가 첨가된 PEM 배지에서 비교적 낮은 세포 밀도( $0.5 \times 10^6$  내지  $1.0 \times 10^6$  세포/mL)로 접종하였다. 공정은 배치 모드로 작동되었다. 3일의 세포 성장 기간 후, AAV 제조의 유도를 1  $\mu$ g/mL 독시사이클린으로 시작하였다.

[0157] 관류 장치:

[0158] ATF 기반 관류 장치는 ATF 장치에 연결된 교반 탱크 생물 반응기로 구성되었다. 세포는 교반 탱크 생물 반응기, 예를 들어, 일회용 3c 용기(Eppendorf사) 용기, BioFlo320 시스템(Eppendorf사)에서 배양하였다.

[0159] 관류 기반 AAV 공정:

[0160] 생물반응기에는 4mM GlutaMAX가 첨가된 PEM 배지에서 비교적 낮은 세포 밀도( $0.5 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^6$  세포/mL)로 접종되었다. 공정은 3일 동안 배치 모드로 작동되었다. 그 후, 약 0.05 nL/세포/일 내지 약 0.10 nL/세포/일의 세포 특이적 관류 속도(CSPR)에 따라, 보충된 PEM 배지를 공급하면서 관류를 시작하였다. 세포가 약  $20 \times 10^6$  개 생존 세포/mL로 성장한 후(7일째), AAV 생성의 유도를 1 $\mu$ g/mL 독시사이클린으로 수행하였다. 제조 단계 동안 관류 속도는 약 1.25 vvd로 거의 일정하게 유지하였다.

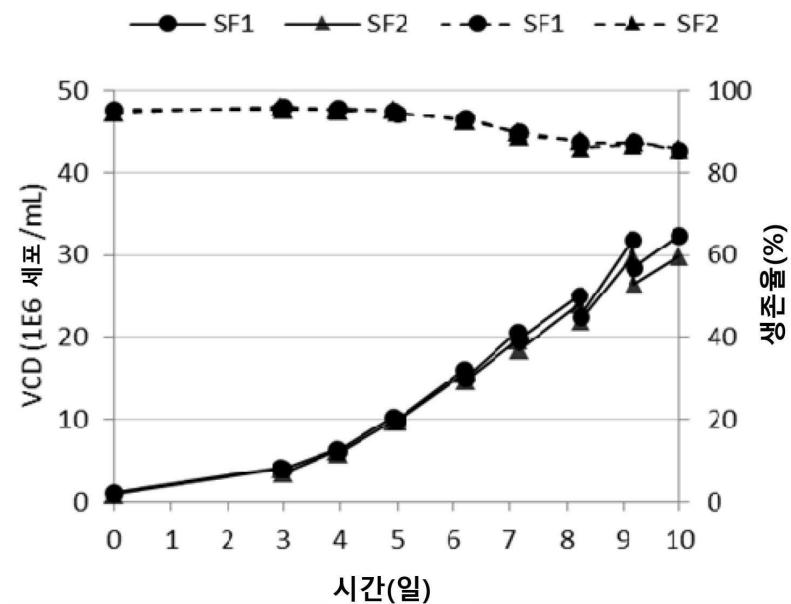
[0161] 높은 생존율로 관류에서  $20 \times 10^6$  세포/mL까지의 세포 성장은 유도 전에 관찰되었으며(도 11), 이는 회분식 유도 시 생존 세포 밀도의 약 6배에 해당한다(도 12).

[0162] 실시예 2에서 안정적인 CAP AAV 제조 단일 세포에 대해 이미 알 수 있듯이, 전체 제조 단계 동안(즉, AAV 제조의 유도 전후) 관류 모드에서 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 배양함으로써 약 30배의 부피 생산성의 엄청난 증가(도 13)를 달성할 수 있었다. 다시 말하지만, 체적 생산성의 증가는 이러한 증가가 약 6배에 불과하기 때문에 유도 시점에서 단순히 생존 세포 수의 증가로 인한 것이 아니었다. 따라서, 전체 역가 증가는 회분식 모드와 비교할 때 관류 모드에서 5배 더 높은 세포 특이적 바이러스 수율에 의해 달성되었다(도 14).

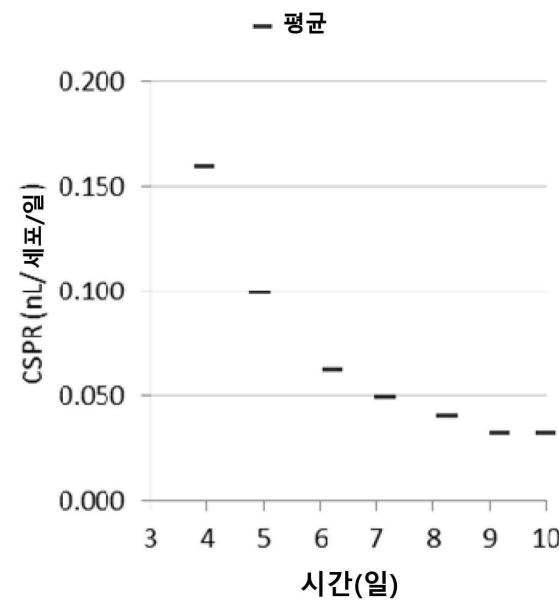
- [0163] 안정적인 CAP AAV 제조 단일 세포(실시예 2)에 대해 알 수 있는 바와 같이, 안정적인 HEK293 AAV 제조 풀 세포를 사용한 관류 공정은 배치 공정에 비해 채워진 AAV 입자의 비율의 대략 4배 증가(도 15)를 초래한다. CAP 관류 공정과 비교하여 안정적인 HEK293 관류 공정의 경우의 더 낮은 배수(fold) 증가는 HEK293 공정의 경우에는 다클론 풀이 사용된 반면 CAP 관류 공정의 경우에는 단클론 단일 세포 클론이 사용되었다는 사실 때문이라는 가능성이 가장 높다.
- [0164] 실시예 5:
- [0165] AEX를 통한 관류 물질로부터 채워진 AAV 입자의 농축
- [0166] 예상외로, 완전히 안정적인 AAV 제조 CAP 세포주를 사용한 AAV 입자의 제조를 위해 ATF 관류를 적용하면서, 채워진 입자의 비율이 기존의 배치 공정과 비교하여 약 9배 크게 증가할 수 있음이 확인되었다.
- [0167] 이미 더 높은 비율의 채워진 입자로 시작하여 AEX 크로마토그래피를 사용하여 채워진 입자를 추가로 농축할 수 있는지 테스트하기 위해, 하기의 실험을 수행하였다.
- [0168] 안정적인 CAP AAV 제조 세포(실시예 2)를 사용한 관류 진행의 전류물(retentate)로부터의 세포 혼탁액을 용해시키고 AAV 입자를 크로마토그래피에 의해 농축시켰다. 이어서, AAV 입자를 함유하는 풀링된 분획을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다. 용리 구배에서, 채워진 AAV 입자는 관류 AEX 진행 1의 경우 분획 2 및 관류 AEX 진행 2의 경우 분획 5 내지 7에서 농축시켰다(도 16).
- [0169] 도 16에 도시된 바와 같이, 관류 공정으로부터 물질의 분리 결과, 최대 78%의 채워진 입자의 백분율이 얻어졌다.
- [0170] 캡시드 단백질인 VP1, VP2 및 VP3의 비율을 결정하기 위해, 두 가지 별개의 AEX 실험에서 얻은 상이한 분획을 SDS PAGE에서 분리하고 SyproRuby 염색을 통해 시각화했다. 도 17에 도시된 바와 같이, 두 실험의 모든 분획에 걸쳐 3개의 캡시드 단백질은 약 1:1:10의 예상된 비율을 나타내어, 관류 과정이 AAV 캡시드의 조성을 변경하지 않는다는 것이 입증되었다.
- [0171] 요약하면, ATF 관류를 이용한 개발된 공정이 최종 제품에서 채워진 AAV 입자의 높은 비율을 확보하는 뛰어난 방법이라는 것이 입증된다.
- [0172] 고찰:
- [0173] 본 발명은 배치 공정과 비교하여 본 발명에 따른 관류 공정에서 세포 특이적 바이러스 수율이 현저히 증가함을 명시적으로 보여준다(도 7). 이는 본 발명에서 확인된 역가의 증가가 유도 시점의 생존 세포 밀도의 증가에 기인할 뿐만 아니라 세포당 역가의 증가에 기인함을 입증한다.
- [0174] 또한, 실시예 3 및 도 9 및 도 10은 독시사이클린을 통한 AAV 생성의 유도 전에 관류 공정에 의해 생존 세포 밀도가 증가되었지만 유도 직후 관류 공정이 중단되는 관류 공정을 나타낸다. 따라서, AAV의 제조는 높은 세포 밀도를 갖는 배치(batch) 공정으로 이루어지며, 이는 생산성 증가가 유도 시점에서의 높은 세포 밀도에 의한 것이 아니라 이후의 관류 공정에 의한 것임을 입증한다.
- [0175] 또한, 실시예 4 및 도 11 내지 15는 안정적인 HEK293 AAV 제조 세포를 이용한 본 발명에 따른 관류 공정을 나타내며, 이는 AAV 생산성(체적 및 세포 특이적)의 증가 및 더 높은 채워진 입자 대 빈 입자 비율로 인한 AAV 품질의 개선이 CAP 세포에 제한되는 것이 아니라 다른 세포주, 즉, HEK293의 경우에도 재현 가능하다는 것을 입증한다.
- [0176] 따라서, 본 발명은 유리하게는 본 발명의 방법에서 세포 특이적 생산성의 증가 뿐만 아니라 채워진 AAV 입자 대 빈 AAV 입자의 증가를 제공하며, 둘 모두 예상치 못한 놀라운 것이다. 이러한 유리한 특성은 도 9 및 도 10에 도시된 바와 같이, 총 세포 수의 단순한 증가에 기인한 것이 아니라, 유도 후 지속적인 관류의 결과이다.

## 도면

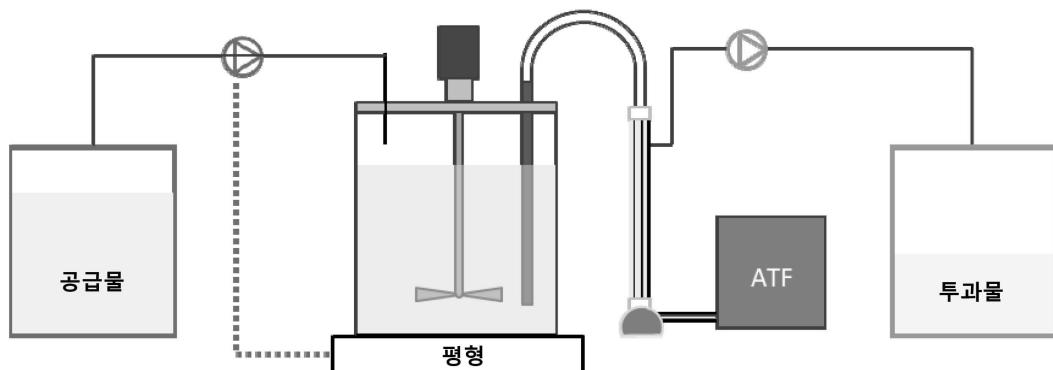
## 도면 1a



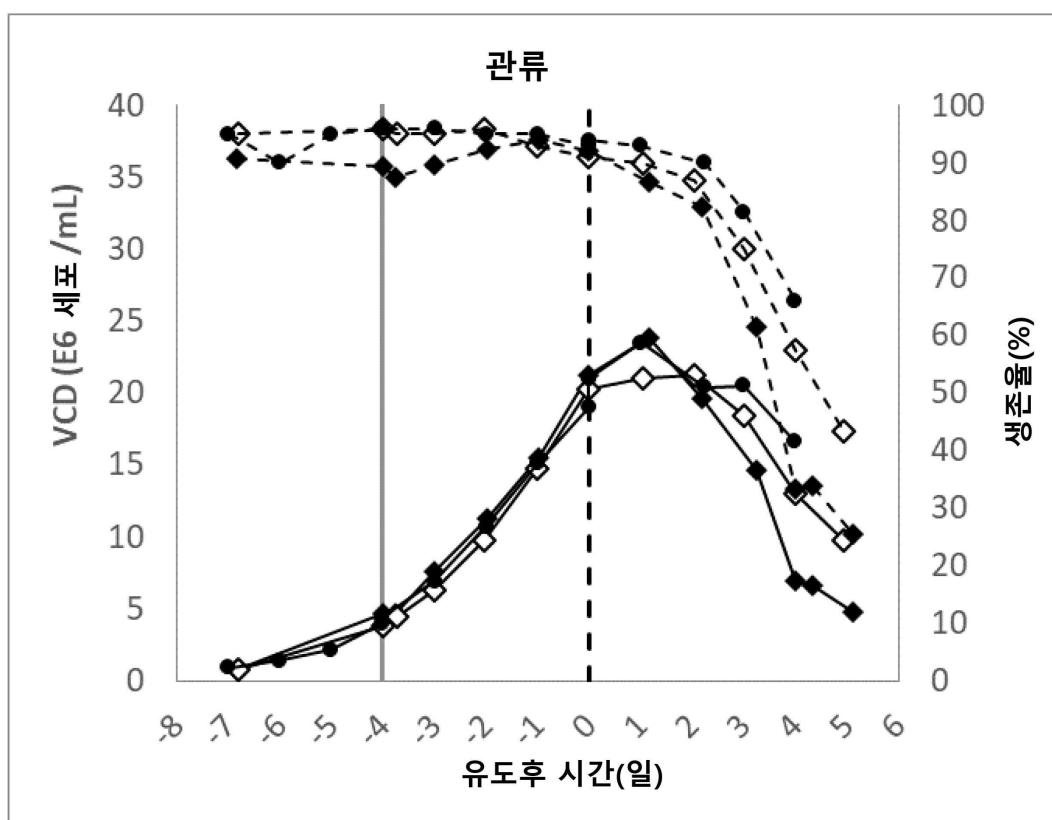
## 도면 1b



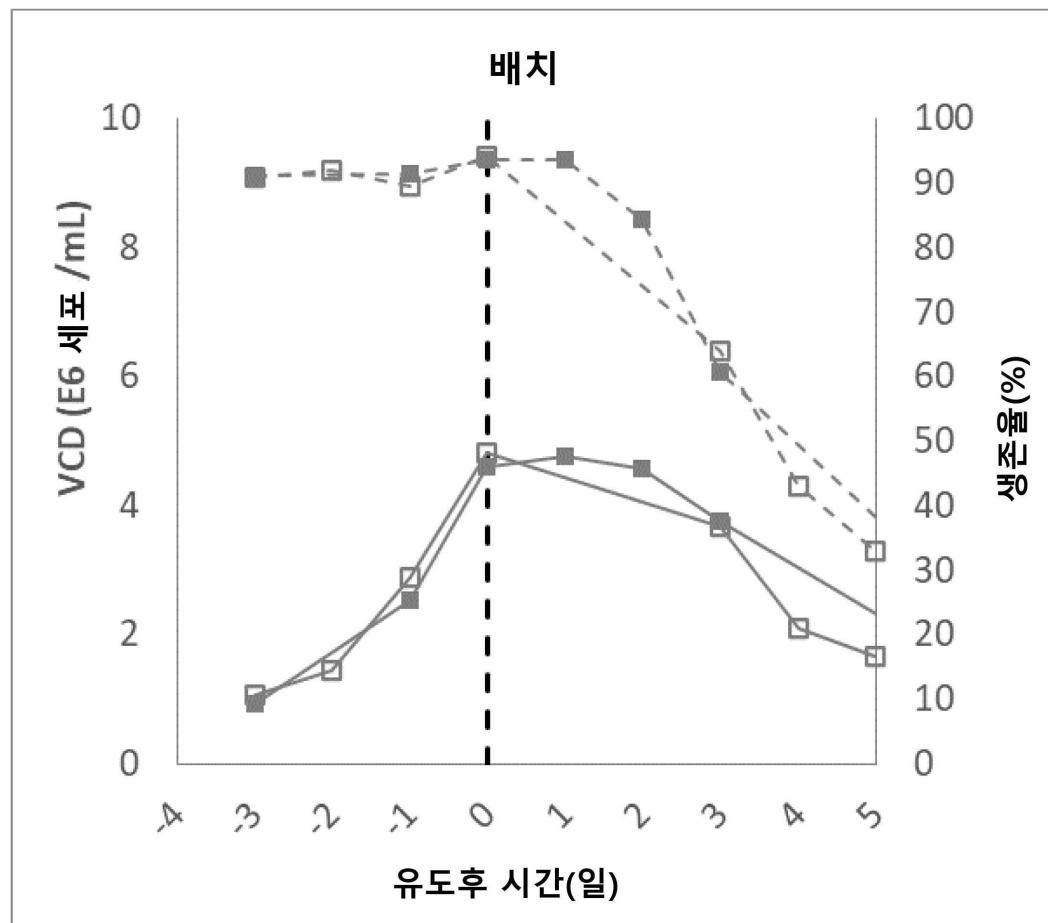
## 도면2



### 도면3

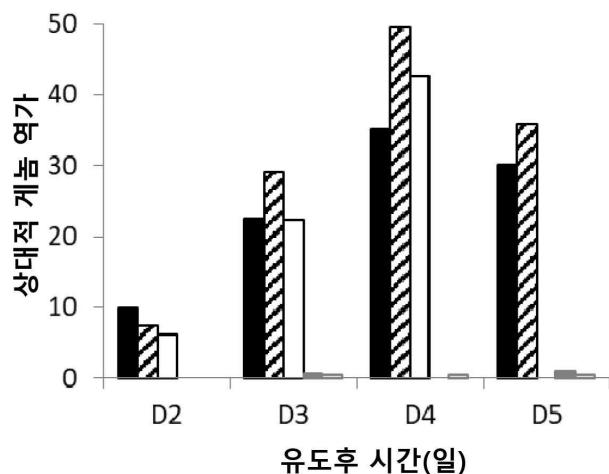


도면4



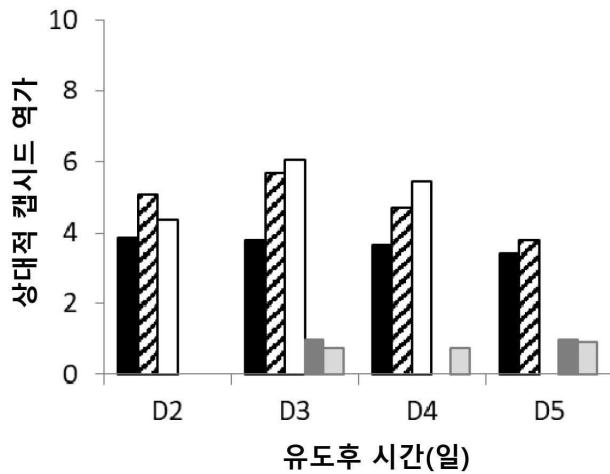
도면5a

■관류 #1 □관류 #2 □관류 #3 ■배치 #1 □배치 #2



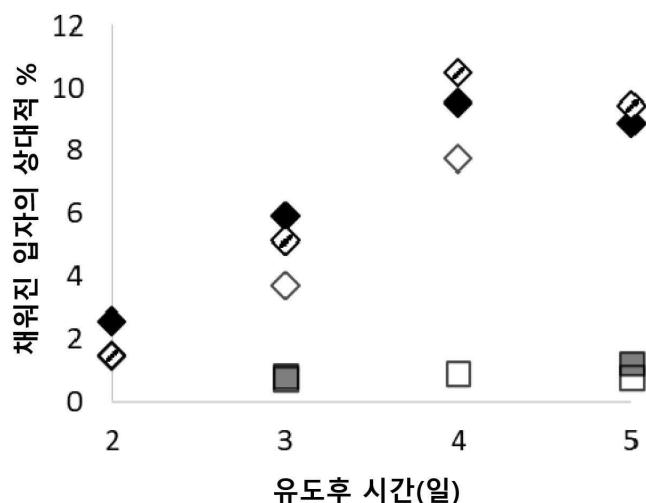
도면5b

■ 관류 #1 ▨ 관류 #2 □ 관류 #3 ■ 배치 #1 □ 배치 #2



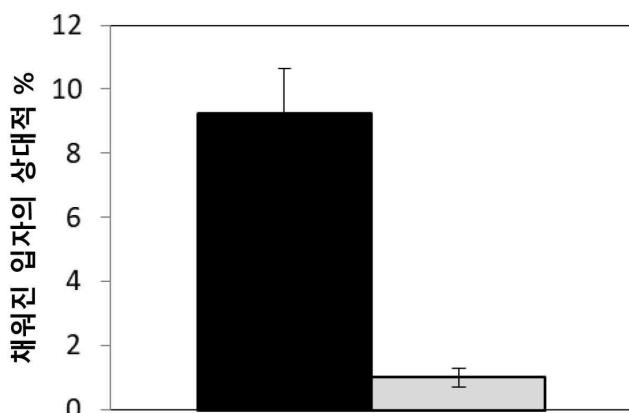
도면6a

◆ 관류 #1 ◇ 관류 #2 ◇ 관류 #3 ■ 배치 #1 □ 배치 #2

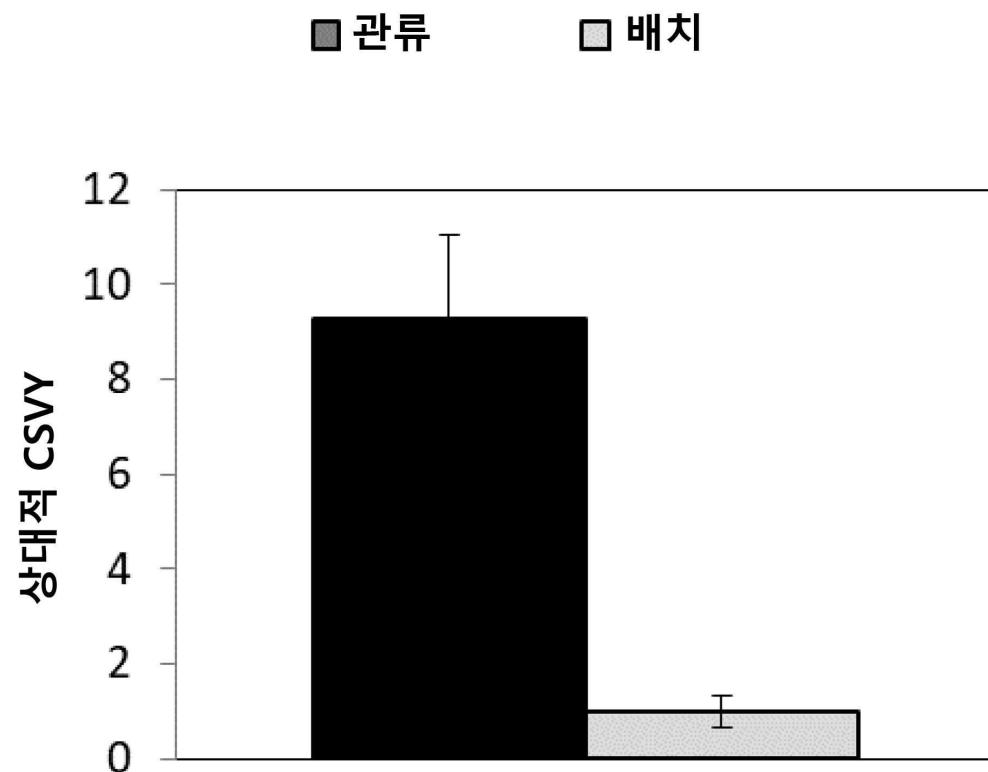


도면6b

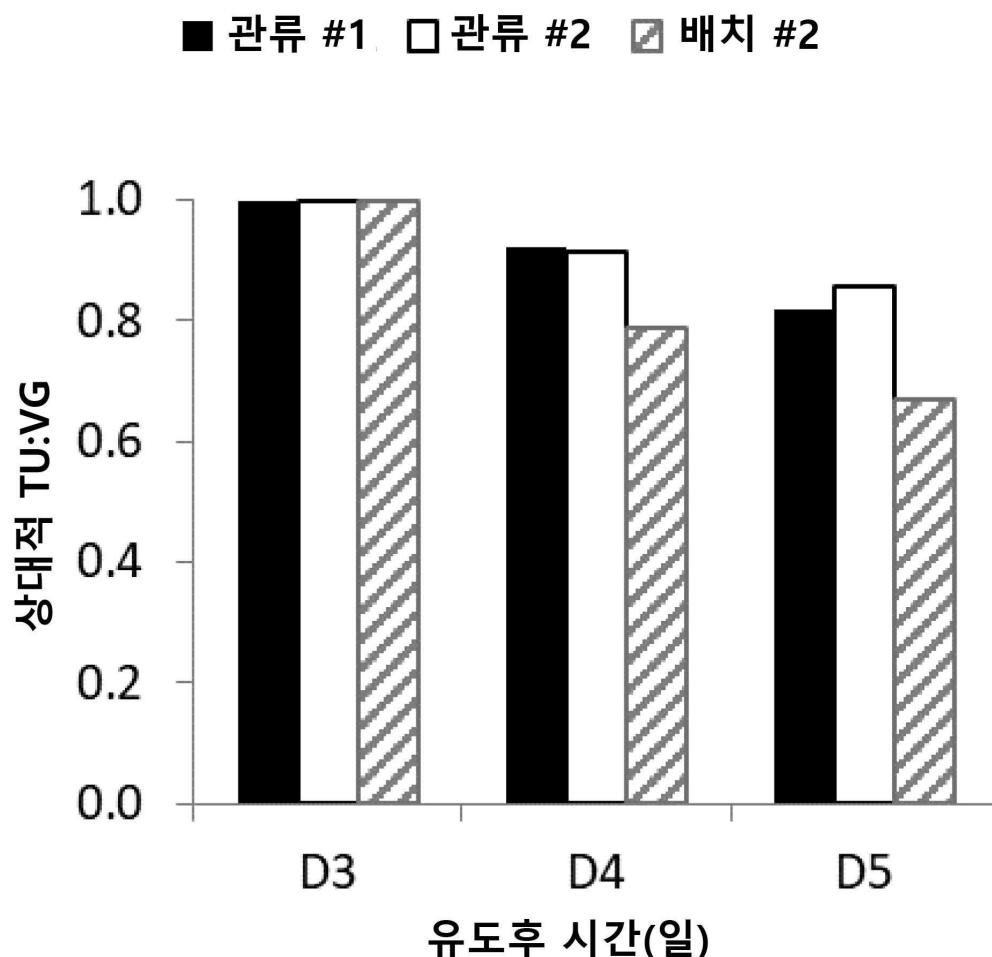
■ 관류 □ 배치



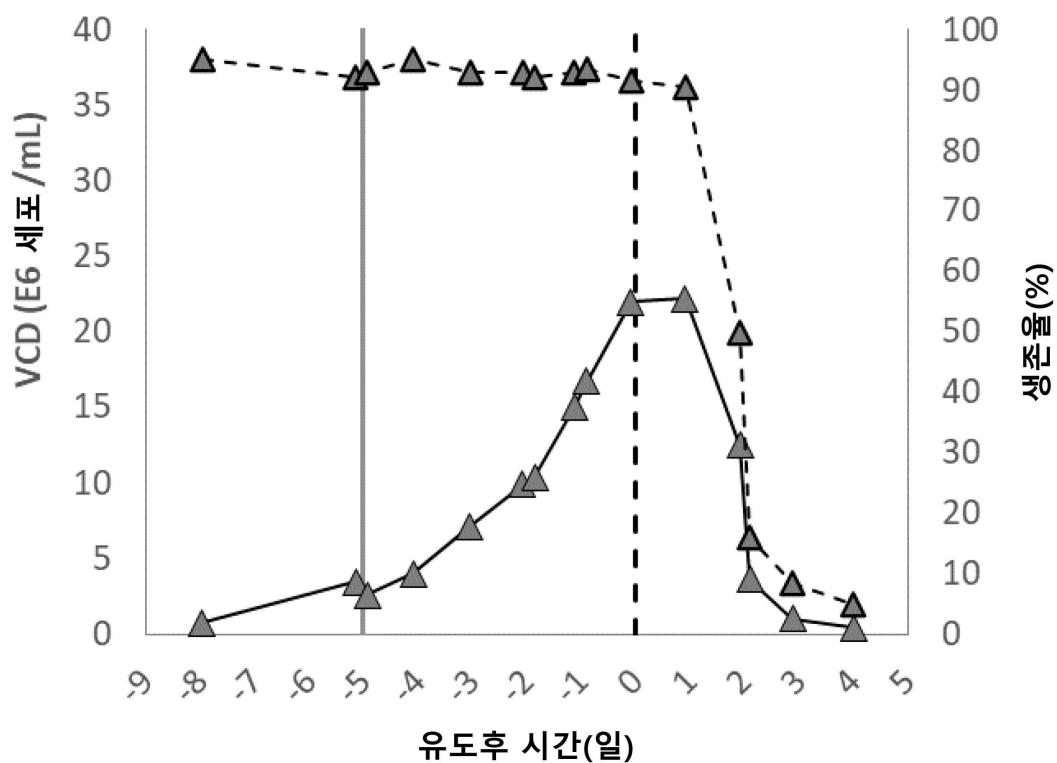
도면7



도면8

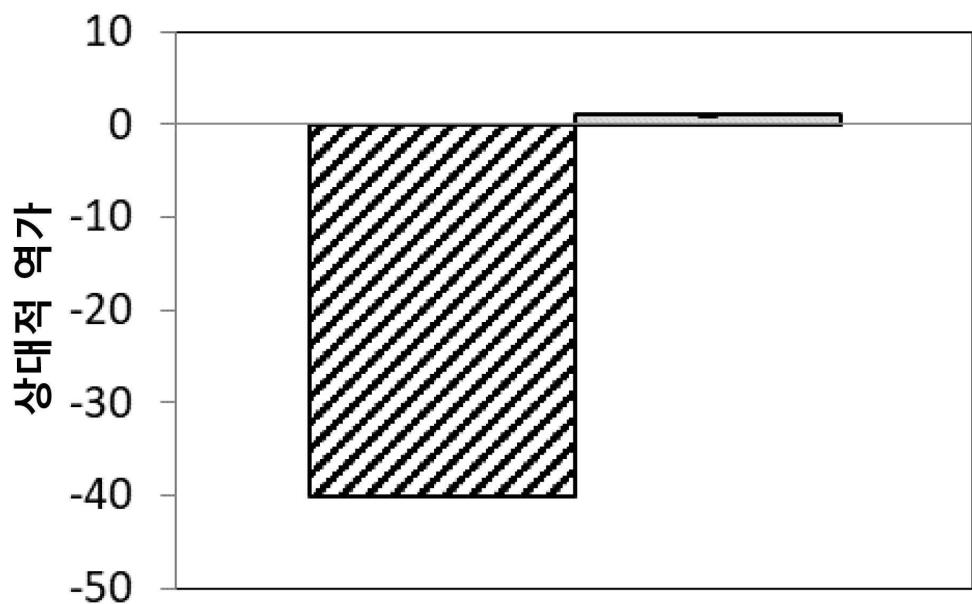


도면9

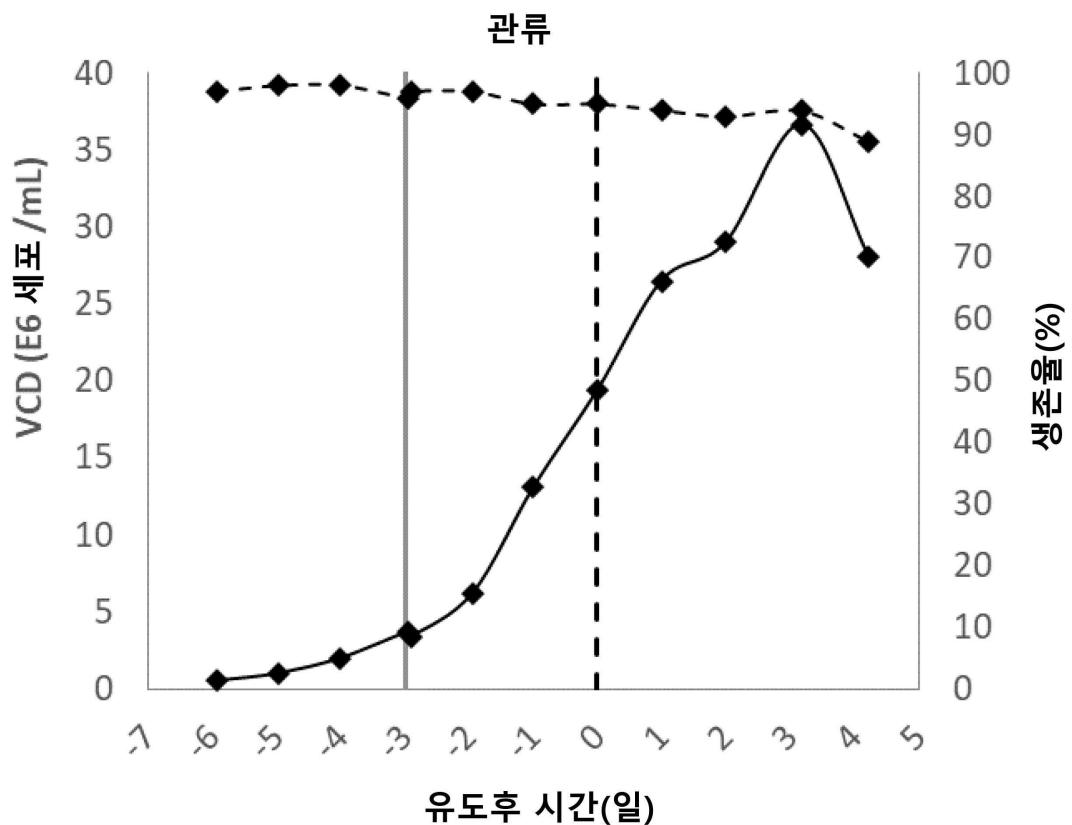


도면10

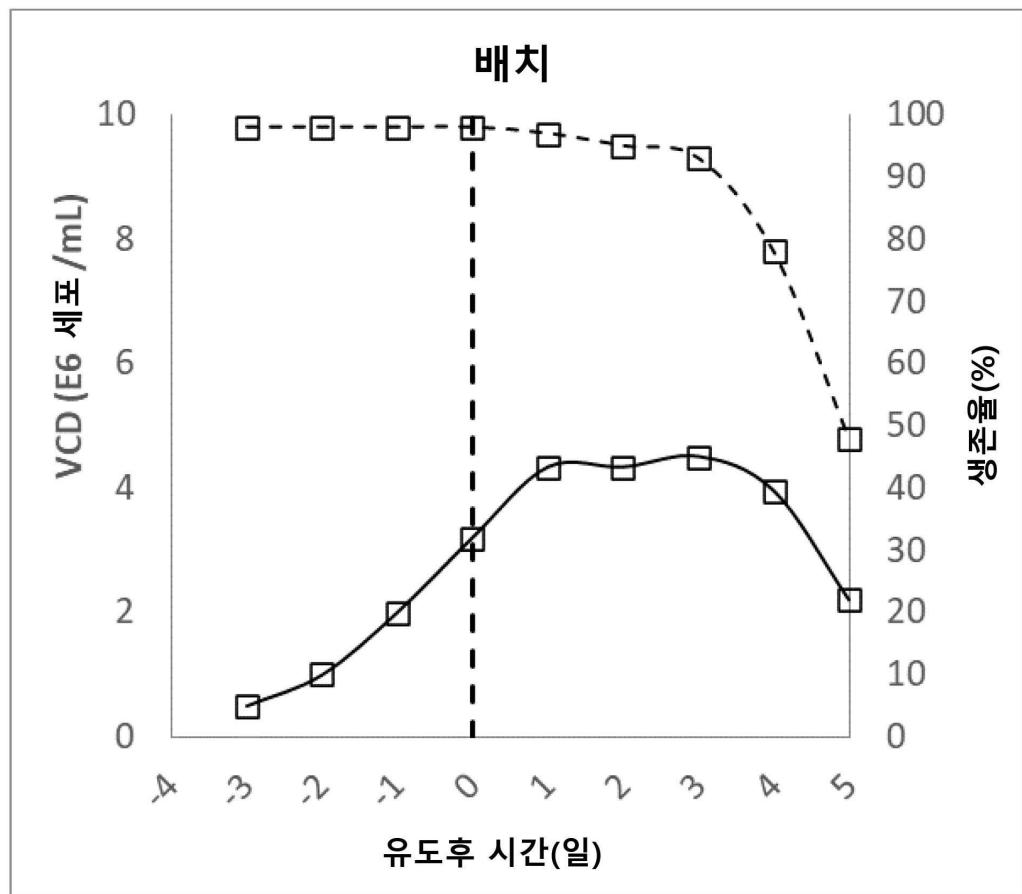
▣ HCD-역가      □ LCD-역가



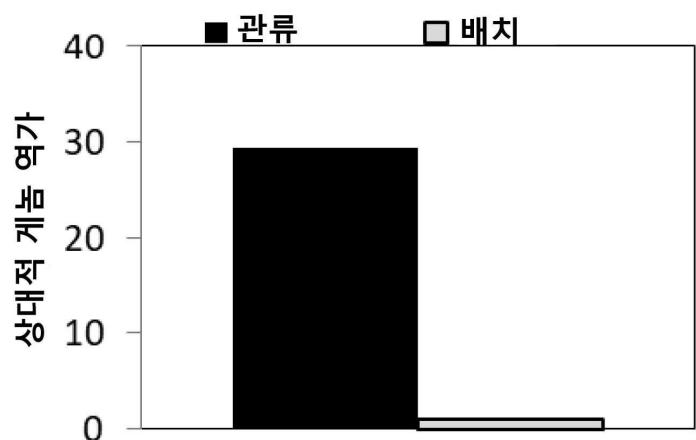
도면11



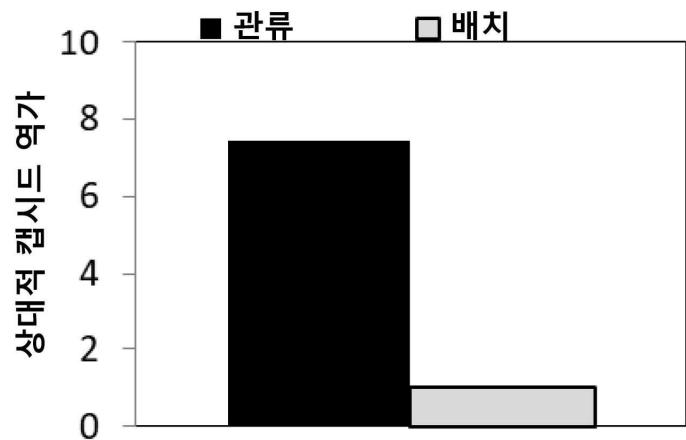
도면12



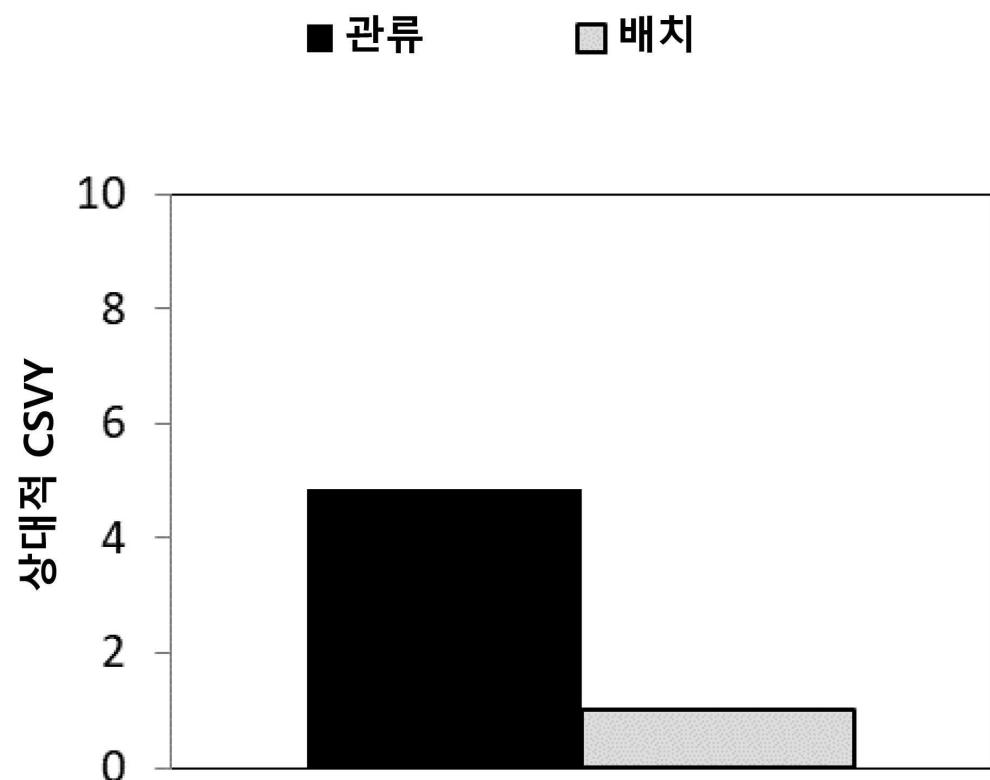
도면13a



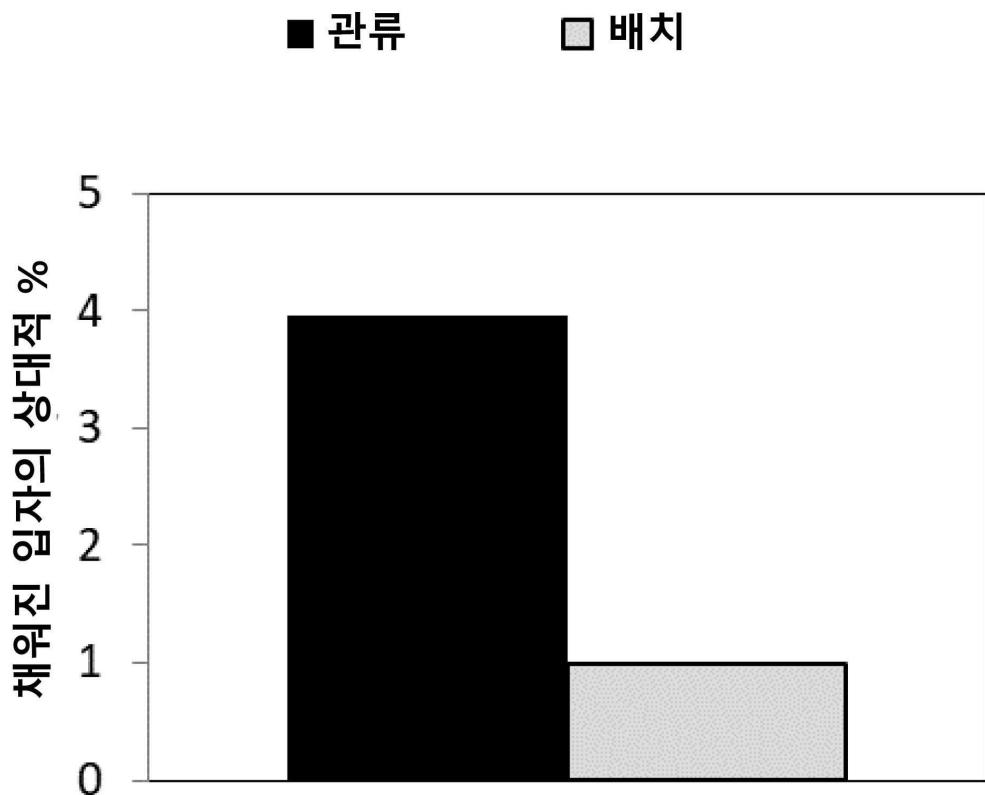
도면13b



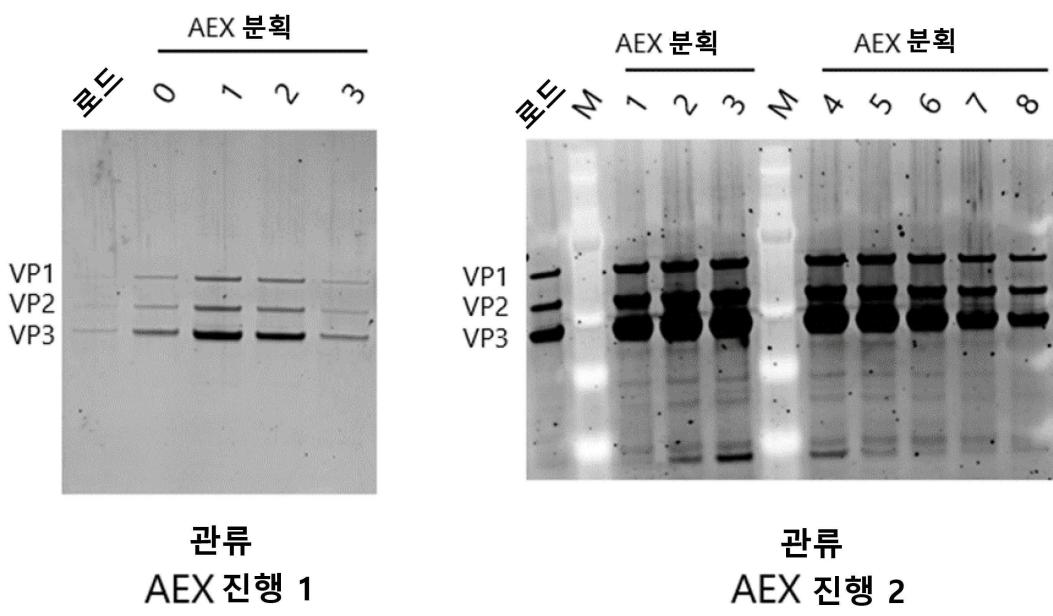
도면14



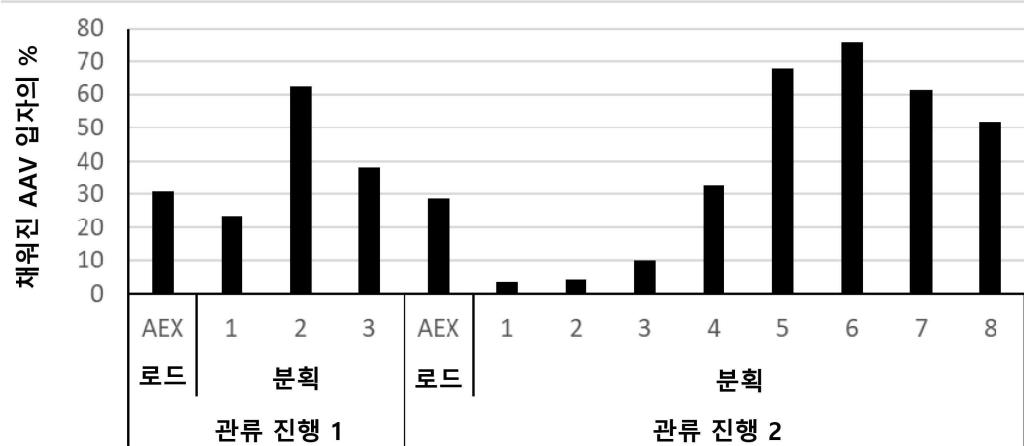
### 도면15



### 도면16



## 도면17



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CEVEC PHARMACEUTICALS GMBH

&lt;120&gt; METHOD FOR THE PRODUCTION OF AAV

&lt;130&gt; IP20224188DE

&lt;150&gt; EP 20 209 811.7

&lt;151&gt; 25.11.2020

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 1

agcaatagca tcacaatattt cacaat 25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 2

ccagacatga taagatacat tcatgagtt	29
<210> 3	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Probe	
<400> 3	
agcattttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtc	36
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 4	
ttcttcaagt ccgcctatgcc	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 5	
aagtcgatgc cttcagctc	20
<210> 6	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Probe	
<400> 6	
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac taca	34