(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0019120
(43) 공개일자 2024년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7042063
(22) 출원일자(국제) 2022년05월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/029601
(87) 국제공개번호 WO 2022/245803
국제공개일자 2022년11월24일
(30) 우선권주장
63/189,771 2021년05월18일 미국(US)

(71) 출원인
아시모브 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02215 보스턴 201 브루클라인 애비뉴 스위트 1201
(72) 발명자
갬 제레미 제이.
미국 매사추세츠주 02215 보스턴 1325 보일스턴 스트리트 스위트 500
스타키 크리스토퍼 에스.
미국 매사추세츠주 02215 보스턴 1325 보일스턴 스트리트 스위트 500
닐슨 알렉 에이. 케이.
미국 매사추세츠주 02215 보스턴 1325 보일스턴 스트리트 스위트 500
(74) 대리인
특허법인아주김장리

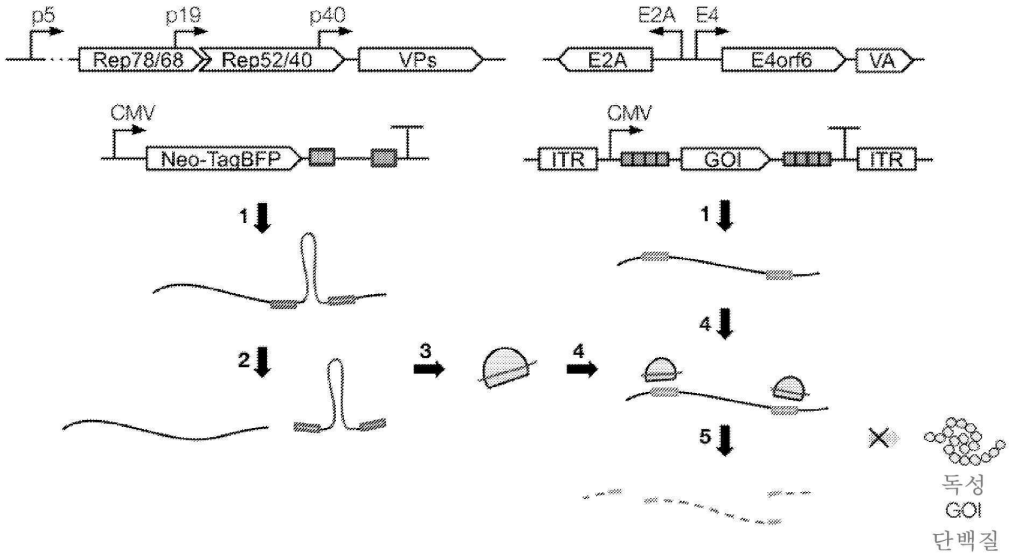
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 **바이러스 벡터 생산 시스템, 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

바이러스 벡터 생산 시스템 및 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포가 본 명세서에 기재된다. 또한, 바이러스 벡터를 생산하기 위해 조작된 세포를 사용하는 방법이 본 명세서에 기재된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2740/16043 (2013.01)
C12N 2740/16052 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14152 (2013.01)
C12N 2800/40 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이러스 벡터 생산 시스템으로서,

(a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로(collectively) 암호화하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는 바이러스 벡터 생산 구성요소를 포함하는 조작된 세포;

(b) 제1 발현 카세트를 암호화하는 이종 핵산 서열로서, 상기 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 상기 이종 핵산 서열; 및

(c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는(flanked) 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산

을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 중심 핵산 서열은 다중 클로닝 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 중심 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열이 측접하는 다중 클로닝 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 다중 클로닝 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부가 측접하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 다중 클로닝 서열은 5' 말단 및 3' 말단에 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열이 측접하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중심 핵산 서열은 프로모터를 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전달 다중핵산 서열의 중심 핵산 서열은 제2 발현 카세트를 포함하되, 상기 제2 발현 카세트는 프로모터와 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 조절 RNA의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소의 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트의 유전자 산물을 암호화하는 상기 핵산 서열은 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인트론; 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 갖는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 선별 마커는 형광 단백질 또는 항생제 저항성 단백질을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트 내 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인트론; 상기 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 갖는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 시스템은 AAV 바이러스 벡터 생산 시스템이되, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중 핵산을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부(AAV inverted tandem repeat)인, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 시스템은 렌티바이러스 벡터 생산 시스템

이되, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부인, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소의 하나 이상의 이종 다중핵산은 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소 각각은 하나 이상의 이종 다중핵산 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 제1 발현 카세트를 암호화하는 이종 핵산 서열을 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 HEK293 세포, HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래되는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 RNA는 shRNA 또는 amiRNA인, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 2 내지 11 중 어느 하나의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) 상기 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 인트론은 상기 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR로서, 상기 선별 마커의 인트론이 5' UTR에 위치하는, 상기 5' UTR; 및 3' UTR로서, 상기 선별 마커의 인트론이 3' UTR에 위치하는, 상기 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 선별 마커의 인트론은 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 상기 코딩 영역에 위치하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 33

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인트론은 서열번호 12의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 34

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 RNA는 Cas13 가이드 RNA인, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 2개 이상의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 Cas13은 Cas13d인, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 Cas13d는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산은 상기 제1 발현 카세트를 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 상기 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 상기 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 추가로 포함하는, 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 42

바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포로서,

(a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소;

(b) shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; 및

(c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 상기 중심 핵산 서열은 프로모터와 및 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산

을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 shRNA 또는 2개 이상의 별개의 amiRNA의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 47

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함하는, 조작된 바이러스 벡터 생산 시스템.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 인트론은 상기 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR로서, 상기 선별 마커의 인트론이 5' UTR에 위치하는, 상기 5' UTR; 3' UTR로서, 상기 선별 마커의 인트론이 3' UTR에 위치하는, 상기 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 선별 마커의 인트론은 상기 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 상기 코딩 영역에 위치하는, 조작된 세포.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인트론은 서열번호 12의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 52

제42항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 임의의 서열번호 2 내지 11 중 임의의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 53

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부인, 조작된 세포.

청구항 56

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부인, 조작된 세포.

청구항 59

제42항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 조작된 세포.

청구항 60

제42항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 조작된 세포.

청구항 61

제42항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 HEK293 세포 HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래되는, 조작된 세포.

청구항 62

제42항 내지 제60항 중 어느 한 항의 조작된 세포에서 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드 분자의 발현을 감소시키는 방법으로서, 바이러스 벡터 생산 동안 shRNA 또는 amiRNA를 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포로서,

(a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소;

(b) 제1 발현 카세트로서, 상기 제1 발현 카세트는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 상기 제1 발현 카세트;

(c) Cas13을 암호화하는 핵산 서열; 및

(d) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 상기 중심 핵산 서열은 프로모터와 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산

을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 2개 이상의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 Cas13은 Cas13d인, 조작된 세포.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 Cas13d는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 67

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 Cas13을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 조작된 세포.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 상기 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 69

제63항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 상기 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 70

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자의 핵산 서열은 상기 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 사익 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 71

제63항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 상기 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함하는, 조작된 세포.

청구항 72

제63항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 Cas13 가이드 RNA의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 73

제63항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부인, 조작된 세

포.

청구항 76

제63항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부인, 조작된 세포.

청구항 79

제63항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 상기 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 조작된 세포.

청구항 80

제63항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 상기 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합되는, 조작된 세포.

청구항 81

제63항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 HEK293 세포, HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래되는, 조작된 세포.

청구항 82

제63항 내지 제81항 중 어느 한 항의 조작된 세포에서 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드 분자의 발현을 감소시키는 방법으로서, 바이러스 벡터 생산 동안 Cas13 및 Cas13 가이드 RNA를 발현시키는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **기술 분야**

[0002] 바이러스 벡터 생산 시스템 및 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포가 본 명세서에 기재되어 있다. 또한, 바이러스 벡터를 생산하기 위해 조작된 세포를 사용하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0003] **관련 출원**

[0004] 본 출원은 35 U.S.C. § 119하에 2021년 5월 18일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/189,771호에 대한 우선권을 주장하며, 이 기초출원의 전체 내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0005] **EFS-웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0006] 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 형식으로 제출되었으며 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 서열 목록을 포함하고 있다. 2022년 5월 17일에 생성된 상기 ASCII 사본의 이름은 A121070007WO00-SEQ-CRP이며, 크기는 15,679바이트이다.

배 경 기 술

[0007] 바이러스 벡터는 질환을 치료하기 위해 유전자 페이로드를 표적 세포에 전달하는 유망한 치료법이다. 일반적인 유형의 페이로드는 환자의 세포에서 해당 유전자의 결핍 또는 돌연변이를 교정하기 위해 완전히 기능하는 관심 유전자(gene of interest: GOI)를 코딩하는 DNA이다. AAV 벡터는 다량의 바이러스를 생산할 수 있는 생산자 세

포주(예를 들어, HEK293-유래 세포주)를 사용하여 생산되지만, 이의 성장 및 생산 속도는 세포 건강 및 자원 할당에 영향을 미치는 많은 요인에 의해 영향을 받을 수 있다

발명의 내용

[0008] 페이로드 분자의 발현에 대한 증가된 제어를 가능하게 하는 바이러스 벡터 생산 시스템 및 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포가 본 명세서에 기재되어 있다. 또한, 상기 시스템 및 상기 조작된 세포를 사용하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0009] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로(collectively) 암호화하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는 바이러스 벡터 생산 구성요소를 포함하는 조작된 세포; (b) 제1 발현 카세트를 암호화하는 이종 핵산 서열로서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 상기 이종 핵산 서열; 및 (c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는(flanked) 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산을 포함하는 바이러스 벡터 생산 시스템에 관한 것이다.

[0010] 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 중심 핵산 서열은 다중 클로닝 부위를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열이 측접하는 다중 클로닝 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 다중 클로닝 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부가 측접한다. 일부 실시형태에서, 다중 클로닝 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열에 의해 5' 말단 및 3' 말단에 측접한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산 서열은 프로모터를 추가로 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 중심 핵산 서열 서열은 제2 발현 카세트를 포함하되, 제2 발현 카세트는 프로모터와 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 조절 RNA의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 바이러스 벡터의 유전자 산물 생산 구성요소를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트 내 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인트론; 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 갖는다.

[0015] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커는 형광 단백질 또는 항생제 저항성 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트 내 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인트론; 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 갖는다.

[0016] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 AAV 바이러스 벡터 생산 시스템이되, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부(AAV inverted tandem repeat)이다.

[0017] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 렌티바이러스 벡터 생산 시스템이되, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부이다.

[0018] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소의 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소의 하나 이상의 이종 다중핵산 각각은 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 제1 발현 카세트를 암호화하는 이종 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0019] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 HEK293 세포, HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래된다.

[0020] 일부 실시형태에서, 위에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템 중 어느 하나의 조절 RNA는 shRNA 또는 amiRNA이다. 일부 실시형태에서, shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 2 내지 11 중 어느 하나의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인트론은 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함한다.

[0021] 일부 실시형태에서, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 5' UTR에 위치함); 3' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 3' UTR에 위치함); 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커의 인트론은 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 코딩 영역에 위치한다. 일부 실시형태에서, 인트론은 서열번호 12의 핵산 서열을 포함한다.

[0022] 일부 양태에서, 위에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터 생산 시스템의 조절 RNA는 Cas13 가이드 RNA이다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas13은 Cas13d이다. 일부 실시형태에서, Cas13d는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 일부 실시형태에서, Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산은 제1 발현 카세트를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 추가로 포함한다.

[0024] 일부 양태에서, 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포는 집합적으로 다음을 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함한다:

[0025] (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소;

[0026] (b) shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; 및

[0027] (c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 중심 핵산 서열은 프로모터와 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산.

[0028] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA 또는 amiRNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 shRNA 또는 2개 이상의 별개의 amiRNA의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함한다.

[0030] 일부 실시형태에서, 인트론은 shRNA 또는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부 shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 5' UTR에 위치함); 3' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 3' UTR에 위치함); 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0031] 일부 실시형태에서, 선별 마커의 인트론은 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 코딩 영역에 위치한다.

[0032] 일부 실시형태에서, 인트론은 서열번호 12의 핵산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 실시형태에서, shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 2 내지 11 중 임의의 핵산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부이다.

[0035] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부이다.

[0036] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 HEK293 세포 HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래된다.

[0038] 일부 양태에서, 본 출원은 바이러스 벡터 생산 동안 shRNA를 발현시키는 단계를 포함하는, 위에 기재된 바와 같은 조작된 세포 중 어느 하나에서 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드 분자의 발현을 감소시키는 방법을 개시한다.

[0039] 일부 양태에서, 본 출원은 집합적으로 다음을 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포를 개시한다:

[0040] (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소; (b) Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; (c) Cas13을 암호화하는 핵산 서열; 및 (d) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 중심 핵산 서열은 프로모터와 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산.

[0041] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas13은 Cas13d이다. 일부 실시형태에서, Cas13d는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0043] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다.

[0044] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 Cas13 가이드 RNA의 핵산 서열을 포함한다.

[0045] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부이다.

[0046] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵

산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부이다.

[0047] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다.

[0048] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 HEK293 세포, HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래된다.

[0049] 일부 양태에서, 본 개시내용은 바이러스 벡터 생산 동안 Cas13 및 Cas13 가이드 RNA를 발현시키는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 조작된 세포 중 어느 하나에서 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드 분자의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 다음 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 개시내용의 소정의 양태를 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본 명세서에 제시된 특정 실시형태의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다. 도면에 예시된 데이터는 결코 본 개시내용의 범위를 제한하지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

도 1은 AAV 페이로드 분자(또는 관심 유전자, "GOI")의 shRNA-매개성 넉다운의 예시적인 개략도를 보여준다. 1) RNA는 3' UTR에 shRNA가 있는 GOI 및 유전자(여기서는 Neo-TagBFP)에 따라 전사된다. shRNA(루프)는 인트론 공여 및 수용 부위(별표)의 측접한다. GOI는 5' 및 3' UTR의 shRNA 표적 부위(음영 상자)의 탠덤 반복부의 측접한다. 2) shRNA 서열은 스플라이싱되어 shRNA 헤어핀이 유리된다. 3) shRNA 헤어핀은 RNAi 기구에 의해 처리되고, 가이드 가닥은 RNA-유도성 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex: RISC)에 혼입된다. 4) 가이드 가닥이 있는 RISC는 GOI mRNA에 결합한다. 5) RISC는 GOI mRNA를 절단할 수 있고/있거나 이의 번역을 억제할 수 있다. 번역에 이용 가능한 GOI mRNA의 감소는 GOI 단백질의 수준을 감소시킨다.

도 2A 내지 도 2B는 shRNA 발현 플라스미드가 있거나 또는 결여된 세포에서의 페이로드 분자(EGFP) 넉다운의 비교를 보여준다. 도 2A는 EGFP shRNA를 첨가하거나 첨가하지 않고 AAV 및 AAV 감염성 역가를 얻기 전 AAV 생산자 세포의 형광 이미지를 보여준다. 도 2B는 AAV 역가의 정량화를 보여준다.

도 3은 5' UTR 또는 3' UTR에 FF5 표적 부위를 포함하는 면역글로불린(IG)-EYFP 페이로드 분자, FF5 표적 부위가 결여된 IG-EYFP 페이로드 분자 및 FF5 표적 부위가 결여된 EGFP 페이로드 분자의 비교를 보여준다. 왼쪽에는 AAV를 생산하는 데 사용되는 형질감염된 세포 내에서 측정된 EYFP 또는 EGFP의 형광 기하 평균이 있다. 오른쪽에는 형질전환 검정을 사용하여 측정된 바이러스 역가가 있다. FF5 shRNA(파란색 막대)를 사용한 형질감염은 FF5 표적 부위를 보유하는 작제물에 대해 AAV-생산 세포에서 페이로드 분자의 현저한 감소를 가져오지만, FF5 shRNA로 형질감염되지 않은 대조군(빨간색 막대)과 비교하여 여전히 유사하거나 또는 더 나은 바이러스 역가를 생성한다.

도 4는 AAV 페이로드 분자(또는 관심 유전자, "GOI")의 Cas13-매개성 넉다운의 예시적인 개략도를 보여준다. 넉다운 시스템은 5' UTR, 3' UTR 또는 Cas13d-crRNA 복합체에 의해 인식되는 두 영역 모두에 배치된 표적 서열의 어레이로 이루어진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 본 개시내용의 발명자들은 바이러스 벡터 생산 동안 바이러스 벡터의 페이로드 분자(즉, 관심 유전자 또는 "GOI")의 발현이 자원을 바이러스 벡터를 생산하는 것으로부터 페이로드의 RNA 및 단백질을 생산하는 쪽으로 전환시킬 수 있다는 것을 인식하였다. 본 발명자들은 또한 일부 페이로드 분자가 독성이 있어 생산자 세포의 성장 및 생산성에 추가로 영향을 미칠 수 있음을 인식하였다. 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드 분자의 발현에 대한 증가된 제어를 가능하게 하는 바이러스 벡터 생산 시스템 및 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포가 본 명세서에 기재된다. 또한, 상기 조작된 세포를 사용하는 방법이 본 명세서에 기재된다.

[0052] **I. 바이러스 벡터 생산 시스템**

[0053] 일부 양태에서, 본 개시내용은 바이러스 벡터 생산 시스템에 관한 것이다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터 생산 시스템은 하나 이상의 다중핵산 집합적으로 (a) 바이러스 벡터 생산 구성요소; (b) 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; 및 (c) 전달 다중핵산을 포함한다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이러스 벡터 생산 구성요소"는 재조합 숙주 세포에서 바이러스 벡터의 생성에 필요한 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 지칭한다. 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함하여 여러 유형의 바이러스 벡터(이의 생산에 필요한 구성요소 포함)가 이전에 기술되었다. 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템은 이전에 기술된 임의의 이러한 바이러스 벡터의 생산에 필요한 유전자 산물을 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소를 포함할 수 있다.

[0055] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 재조합 숙주 세포에서 AAV 벡터를 생성하는 데 필요한 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예시적인 AAV 유전자 산물은 Rep52, Rep40, Rep78, Rep68, E2A, E4Orf6, VARNA, VP1, VP2, VP3, AAP 및 MAAP 또는 이들의 기능적 변이체를 포함한다. Rep 유전자 산물(Rep52, Rep40, Rep78 및 Rep68 포함)은 AAV 게놈 복제에 관여한다. E2A 유전자 산물은 AAV 복제 동안 DNA 합성 과정을 돕는 데 관여한다. E4Orf6 유전자 산물은 AAV 복제를 지원한다. VARNA 유전자 산물은 번역을 조절하는 역할을 한다. CAP 유전자 산물(VP1, VP2, VP3 포함)은 바이러스 캡시드 단백질을 암호화한다. AAP 유전자 산물은 캡시드 조립에서 역할을 한다. MAAP는 프레임시프트된 VP1 단백질이며, 전체가 참조에 의해 원용되어 있는 문헌[Ogden et al. Science 366.6469 (2019): 1139-1143]에 기술되어 있는 바와 같이 바이러스 캡시드에서 역할을 하는 것으로 보인다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능적 변이체"는 야생형 서열과 비교하여 변형된 핵산 또는 아미노산 서열을 포함하고, 야생형 유형 유전자 산물의 기능(예를 들어, 효소, 조절 또는 결합)을 수행할 수 있는 유전자 산물을 지칭한다. 예를 들어, Rep52의 기능적 변이체는 여전히 AAV 게놈 복제에서 기능할 수 있다.

[0057] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 다음 유전자 산물: Rep52(또는 이들의 기능적 변이체) 또는 Rep40(또는 이들의 기능적 변이체); Rep78(또는 이들의 기능적 변이체) 또는 Rep68(또는 이들의 기능적 변이체); E2A(또는 이들의 기능적 변이체); E4Orf6(또는 이들의 기능적 변이체); VARNA(또는 이들의 기능적 변이체); VP1(또는 이들의 기능적 변이체); VP2(또는 이들의 기능적 변이체); VP3(또는 이들의 기능적 변이체); 및 AAP(또는 이들의 기능적 변이체)를 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 다음 유전자 산물: Rep52(또는 이들의 기능적 변이체), Rep40(또는 이들의 기능적 변이체), Rep78(또는 이들의 기능적 변이체), Rep68(또는 이들의 기능적 변이체), E2A(또는 이들의 기능적 변이체), E4Orf6(또는 이들의 기능적 변이체(예를 들어, 서열번호 23), VARNA(또는 이들의 기능적 변이체), VP1(또는 이들의 기능적 변이체), VP2(또는 이들의 기능적 변이체), VP3(또는 이들의 기능적 변이체) 및 AAP(또는 이들의 기능적 변이체)를 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0058] 스플라이스 부위가 제거된 E4Orf6의 예시적인 기능적 변이체:

atgactacgtccggcgttccatttggcatgacactacgaccaacacgatctcggttgtctcggcgcactccgtacagtagggatcgcct
acctccttttgagacagagacccgcgctaccatactggaggatcatccgctgctgcccgaatgtaacactttgacaatgcacaaTgtT
TCCtacgtgcgaggtcttccctgcagtgtgggatttacgctgattcaggaatgggttgttccctgggatatggttctgacgcgggagg
agcttgtaatcctgaggaagtgtatgcacgtgtgcctgtgttgtgccaacattgatatcatgacgagcatgatgatccatggttacgagtc
ctgggctctccactgtcattgttccagtcccggttccctgcagtgcatagccggcgggcaggttttggccagctggtttaggatggtggt
ggatggcgccatgtttaatcagaggtttatatggtaccgggaggtggtgaattacaacatgccaaaagaggtaatgtttatgtccagcgt
gtttatgaggggtcgccacttaatctacctgcgcttgtggtatgatggccacgtgggttctgtggtccccgccatgagctttggatacagc
gccttgcactgtgggattttgaacaatattgtggtgctgtgctgcagttactgtgctgatttaagtgagatcagggtgcgctgctgtgcccg
gaggacaaggcgtctcatgctgcgggcggtgcgaatcatcgctgaggagaccactgccatgttgtattcctgcaggacggagcggc
ggcggcagcagtttattcgcgcgctgctgcagcaccaccgccctatcctgatgcacgattatgactctacccccatgTAGtaa

(서열번호 23)

[0059]

[0060] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 재조합 숙주 세포에서 렌티바이러스 벡터를 생성하는 데 필요한 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예시적인 렌티바이러스 유전자 산물은 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 다음 유전자 산물: VSV-G(또는 이들의 기능적 변이체), Gag-Pol(또는 이들의 기능적 변이체) 및 Rev(또는 이들의 기능적 변이체)를 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0061] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소(즉, 바이러스 벡터의 유전자 산물 구성요소)는 단일 다중핵산에 암

호화된다. 다른 실시형태에서, 다중 다중핵산은 집합적으로 바이러스 벡터 구성요소를 포함한다(즉, 바이러스 벡터의 유전자 산물 구성요소 중 적어도 2개는 상이한 다중핵산에 암호화된다). 예를 들어, 바이러스 벡터 구성요소는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 다중핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 2개, 3개, 4개 또는 5개의 다중핵산을 포함한다.

[0062] 바이러스 벡터 구성요소 이외에, 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트를 포함한다.

[0063] 아래에 설명된 바와 같이(파트 IA 및 파트 IB), 예시적인 조절 RNA는 shRNA 및 Cas13 가이드 RNA를 포함한다.

[0064] 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 카피를 포함한다.

[0065] 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 이상의 탠덤 반복부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개 또는 4개 내지 5개의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개 또는 5개의 탠덤 반복부를 포함한다.

[0066] 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 클러스터(예를 들어, shRNA 클러스터 또는 인공 miRNA 클러스터)를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 클러스터는 전체가 참조에 의해 원용되어 있는 문헌 [Lai, X., and J. Vera. "MicroRNA clusters." Encyclopedia of Systems Biology. New York: Springer (2013)]에 기술되어 있는 바와 같이 물리적으로 인접하고(즉, 약 10킬로베이스 이내), 동일한 배향으로 전사되며, 전사 단위 또는 반대 배향의 miRNA에 의해 분리되지 않는 2개 이상의 miRNA 세트를 암호화하는 다중핵산을 지칭한다. 예시적인 miRNA 클러스터는 miR-30e, miR-30c-1, miR-214, miR-199a-2, miR-215, miR-194-1, miR-217, miR-216, miR-15b, miR-16-2, miR-143, miR-145, miR-25, miR-93, miR-106b, miR-23b, miR-27b, miR-24-1, miR-181a, miR-181b-2, miR-34b; miR-34c, miR-125b-1, let-7a-2, miR-100, miR-16-1, miR-15a, miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1, miR-92-1, miR-299, miR-323, miR-329, miR-134, miR-154, miR-133a-1, miR-1-2, miR-99b, let-7e, miR-125a, miR-133a-2, miR-1-1, miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-98, let-7f-2, miR-105-1 및 miR-105-2를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 클러스터는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과의 miRNA를 암호화한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 shRNA 클러스터 또는 인공 miRNA 클러스터는 miRNA의 헤어핀이 본 명세서에 기재된 바와 같은 shRNA 또는 인공 miRNA의 헤어핀(예를 들어, 페이로드 유전자를 표적으로 하는 shRNA 헤어핀)으로 대체된 클러스터를 지칭한다. amiRNA 클러스터를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 전체가 참조에 의해 원용되어 있는 문헌 [Bhaskaran, Vivek, et al. Nature protocols 14.12 (2019): 3538-3553]에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, shRNA 또는 amiRNA 클러스터는 자연 발생적이 아닌 shRNA 또는 amiRNA 헤어핀을 포함한다. 일부 실시형태에서, shRNA 클러스터 또는 amiRNA 클러스터의 5'-최측접 및 3'-최측접 영역은 키메라 shRNA 클러스터 또는 키메라 amiRNA 클러스터를 생성하는 다른 miRNA 클러스터의 측접 영역으로 대체된다.

[0067] 제1 발현 카세트는 별개의 조절 RNA(즉, 별개의 핵산 서열을 갖는 조절 RNA)의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 별개의 조절 RNA의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9

개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 조절 RNA의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 조절 RNA의 핵산 서열을 포함한다.

[0068] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 프로모터는 핵산 코딩 서열에 대한 프로모터의 위치가 프로모터에 대한 전사 활성인자의 결합이 코딩 서열의 발현을 유도할 수 있도록 하는 경우 핵산 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0069] 프로모터는 구성적 프로모터(즉, 지속적인 전사를 가능하게 하는 조절되지 않은 프로모터)일 수 있다. 구성적 프로모터의 예는 당업계에 공지되어 있으며, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 연장 인자 1 α(EF1α) 프로모터, 시미안 액포형 바이러스 40(SV40) 프로모터, 유비퀴틴-C(UBC) 프로모터, U6 프로모터 및 포스포글리세레이트 카이네이스(PGK) 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[Ferreira et al., Tuning gene expression with synthetic upstream open reading frames. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013 Jul; 110(28): 11284-89; 공개 제US 2014/377861 A1호; Qin, Jane Yuxia, et al. " PloS one 5.5 (2010): e10611]을 참조한다.

[0070] 대안적으로, 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다(즉, 특정 상황하에서만 전사를 활성화한다). 유도성 프로모터는, 예를 들어, 화학 유도성 프로모터, 온도 유도성 프로모터 또는 광 유도성 프로모터일 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 당업계에 공지되어 있으며, 테트라사이클린/독시사이클린 유도성 프로모터, 큐메이트 유도성 프로모터, ABA 유도성 프로모터, CRY2-CIB1 유도성 프로모터, DAPG 유도성 프로모터 및 미페프리스톤 유도성 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[Stanton et al., ACS Synth. Biol. 2014 Dec 19; 3(12): 880-91; Liang et al., Sci. Signal. 2011 Mar 15; 4(164): rs2; 특허 제US 7,745,592 B2호; 특허 제US 7,935,788 B2호]을 참조한다.

[0071] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트의 프로모터는 CMV 프로모터, EF1α 프로모터, SV40 프로모터, UBC 프로모터, U6 프로모터 또는 PGK 프로모터와 같은 구성적 프로모터이다.

[0072] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트의 프로모터는 화학 유도성 프로모터, 온도 유도성 프로모터 또는 광 유도성 프로모터와 같은 유도성 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린/독시사이클린 유도성 프로모터, 큐메이트 유도성 프로모터, ABA 유도성 프로모터, CRY2-CIB1 유도성 프로모터, DAPG 유도성 프로모터 또는 미페프리스톤 유도성 프로모터이다.

[0073] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 위에 기재된 바이러스 벡터의 유전자 산물 생산 구성요소를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 예를 들어, 바이러스 벡터 생산 구성요소가 AAV 바이러스 벡터 구성요소인 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Rep52, Rep40, Rep78, Rep68, E2A, E4Orf6, VARNA, VP1, VP2, VP3, AAP 또는 이들의 조합을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 유사하게는, 바이러스 벡터 생산 구성요소가 렌티바이러스 벡터 구성요소인 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 VSV-G, Gag-Pol, Rev 또는 이들의 조합을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0074] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트의 프로모터는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열과 바이러스 벡터의 유전자 산물 생산 구성요소를 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR, 인트론 및/또는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR을 갖는다.

[0075] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "선별 마커"는 세포에 도입되거나 또는 세포에서 발현될 때 선택에 적합한 특성(trait)을 부여하는 단백질을 지칭한다.

[0076] 선별 마커는 형광 단백질일 수 있다. 형광 단백질의 예는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, TagBFP, EBFP2, EGFP, EYFP, mKO2 또는 Sirius). 예를 들어, 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 특허 제US 5,874,304호; 특허 제EP 0969284 A1호; 공개 제US 2010/167394 A호를 참조한다.

[0077] 대안적으로 또는 추가적으로, 선별 마커는 항생제 저항성 단백질일 수 있다. (예를 들어, 퓨로마이신, 하이그로마이신, 네오마이신, 제오신, 블라스티시딘 또는 플레오마이신 선택을 용이하게 하는) 항생제 저항성 단백질의 예는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 공개 제WO 1997/15668 A2호; 공개 제WO 1997/43900 A1호를 참조한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트의 프로모터는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열과 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR, 인트론 및/또는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 3' UTR을 갖는다.

[0079] 바이러스 벡터 구성요소 및 제1 발현 카세트 이외에, 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템은 전달 다중핵산을 포함한다. 본 명세서에 기재된 전달 다중핵산은 5' 말단 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이러스 말단 반복부"는 바이러스 벡터 페이로드의 숙주 세포 게놈으로의 다중핵산 통합에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 예시적인 바이러스 말단 반복부는 당업자에게 공지되어 있다.

[0080] 예를 들어, 바이러스 벡터 생산 구성요소가 AAV 바이러스 벡터 구성요소인 실시형태에서, 전달 다중핵산은 5' 말단 및 3' 말단에 AAV 역 탠덤 반복부("ITR")의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예시적인 AAV ITR은 당업자에게 공지되어 있다.

[0081] 바이러스 벡터 생산 구성요소가 렌티바이러스 벡터 구성요소인 실시형태에서, 전달 다중핵산은 5' 말단 및 3' 말단에 렌티바이러스 긴 탠덤 반복부(LTR)의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예시적인 렌티바이러스 LRT는 당업자에게 공지되어 있다.

[0082] 전달 다중핵산의 중심 핵산은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 표적 핵산 서열은 숙주 세포의 생리학적 조건하에서 조절 RNA에 결합될 수 있는(즉, 조절 RNA와 혼성화할 수 있는) 경우에 조절 RNA를 "보완한다". 표적 핵산 서열은 조절 RNA의 역 상보체인 핵산 서열을 포함하는 경우 조절 RNA와 100% 상보성을 갖는다고 한다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 조절 RNA와 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상보성을 갖는다. 일부 실시형태에서 표적 핵산 서열은 조절 RNA와 85% 내지 100%, 90% 내지 100%, 95% 내지 100%, 96% 내지 100%, 97% 내지 100%, 98% 내지 100% 또는 99% 내지 100% 상보성을 갖는다.

[0083] 대안적으로 또는 추가적으로, 전달 다중핵산의 중심 핵산은 다중 클로닝 부위의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예시적인 다중 클로닝 부위는 당업자에게 공지되어 있다. 다중 클로닝 부위는 숙주 세포에서 바이러스 벡터가 생성되기 전에 페이로드 분자(또는 관심 유전자)(또는 페이로드 분자를 암호화하는 발현 카세트)를 전달 다중핵산으로 클로닝하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중 클로닝 부위의 핵산 서열은 (5' 말단, 3' 말단 또는 5' 말단과 3' 말단 둘 다에) 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열이 측접한다 - 이들 모두는 중심 핵산 내에 포함된다. 예를 들어, 중심 핵산은 다중 클로닝 부위에 클로닝된 관심 유전자에 작동 가능하게 연결될 수 있는 표적 핵산 서열(제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완함)을 포함하는 5' UTR 서열 및/또는 3' UTR 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 프로모터(본 명세서에 기재된 바와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터)의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산은, 5'에서 3'로, (i) 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열; (ii) 프로모터의 핵산 서열; (iii) (3' 말단, 5' 말단 또는 5' 말단 및 3' 말단 둘 다에) 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열이 측접하는 다중 클로닝 부위의 핵산 서열; 및 (iv) 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열을 포함한다.

[0084] 대안적으로 또는 추가적으로, 전달 다중핵산의 중심 핵산은 프로모터(본 명세서에 기재된 바와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터)를 포함하는 발현 카세트 및 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 둘 다 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열은 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 표적 핵산 서열을 포함하는 코딩 서열; 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0085] 중심 핵산은 표적 핵산 서열(즉, 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 핵산 서열)의 탠덤 반복부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태

에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 카피를 포함한다.

[0086] 중심 핵산은 표적 핵산 서열(즉, 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는 핵산 서열)의 2개 이상의 탠덤 반복부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개 또는 4개 내지 5개의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개 또는 5개의 탠덤 반복부를 포함한다.

[0087] 제1 발현 카세트가 별개의 조절 RNA(즉, 별개의 핵산 서열을 갖는 조절 RNA)를 포함하는 실시형태에서, 중심 핵산은 별개의 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 별개의 표적 핵산 서열의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 표적 핵산 서열의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중심 핵산은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 표적 핵산 서열의 핵산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템은 조작된 세포를 포함한다. 조작된 세포는 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템의 임의의 부분(및 부분의 임의의 조합)을 포함할 수 있다.

[0089] 예를 들어, 조작된 세포는 바이러스 벡터 생산 구성요소의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 그리고 위에 기재된 바와 같이, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 다중 다중핵산을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 조작된 세포는 상기 다중 다중핵산 중 하나 이상을 포함하며, 이들 각각은 염색체 외에 위치하거나 또는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 전체 바이러스 벡터 생산 구성요소를 포함한다.

[0090] 대안적으로 또는 추가적으로, 조작된 세포는 바이러스 생산 시스템의 제1 발현 카세트를 포함할 수 있다.

[0091] 대안적으로 또는 추가적으로, 조작된 세포는 바이러스 생산 시스템의 전달 다중핵산을 포함할 수 있다.

[0092] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함하는 바이러스 벡터 생산 구성요소를 포함하는 조작된 세포; (b) 제1 발현 카세트를 암호화하는 이종 핵산 서열로서, 제1 발현 카세트는 조절 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는, 상기 이종 핵산 서열; 및 (c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산을 포함한다.

[0093] **A. shRNA 조절 RNA를 갖는 생산 시스템.**

[0094] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템의 조절 RNA는 shRNA이다. 작은 헤어핀 RNA("shRNA")는 마이크로RNA를 모방하며, 마이크로RNA 서열에 대한 충분한 상보성을 가지고 RNA 전사체를 하향조절하는 서열이다. shRNA는 Pol II 또는 Pol III 프로모터에 의해 전사되고 처리되어 RNA-유도성 침묵 복합체(RISC)로 통합된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템의 조절 RNA는 amiRNA(인공 마이크로RNA)이다. 인공 miRNA는 표적 유전자(예를 들어, 페이로드 유전자)의 하향조절을 지시하는 서열을 포함하도록 변형된 자연 발생적 pri-miRNA 서열이다. shRNA 및 amiRNA는 페이로드 분자(GOI) 코딩 서열 및/또는 UTR(5' UTR 또는 3' UTR)에 상보적으로 설계될 수 있다. 특정 표적 서열은, 예를 들어, 페이로드 분자의 UTR 서열에 혼입될 수 있다.

[0095] 조절 RNA로서 shRNA를 갖는 생산 시스템은 위에 기재된 임의의 실시형태를 가질 수 있다(파트 I). 조절 RNA로서 amiRNA를 갖는 생산 시스템은 위에 기재된 임의의 실시형태를 가질 수 있다(파트 I).

[0096] 일부 실시형태에서, shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 2 내지 11 중 어느 하나의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, shRNA 또는 amiRNA는 서열번호 13 내지 22 중 어느 하나의 서열을 표적으로 한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열(본 명세서에 기재된 바와 같음)을 포함하되, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) shRNA를 암호화하는

핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함한다.

[0098] 일부 실시형태에서, shRNA는 PolIII 프로모터(예를 들어, U6 프로모터)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, amiRNA는 PolIII 프로모터(예를 들어, U6 프로모터)에 작동 가능하게 연결된다.

[0099] 일부 실시형태에서, 인트론은 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다.

[0100] 일부 실시형태에서, 인트론은 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 shRNA 클러스터를 포함한다. 일부 실시형태에서, shRNA 클러스터는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, shRNA 클러스터는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, shRNA 클러스터는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 인트론은 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 amiRNA 클러스터를 포함한다. 일부 실시형태에서, amiRNA 클러스터는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, amiRNA 클러스터는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, amiRNA 클러스터는 amiRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 5' UTR에 위치함); 3' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 3' UTR에 위치함); 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커의 인트론은 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 코딩 영역에 위치한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 도 1에 도시되어 있는 바와 같다.

[0104] 일부 실시형태에서, 인트론은 AGgtaagtNNNNTACTTTAGGACCCTTTTTTTTCCacagGT(서열번호 12)의 핵산 서열을 포함하되, "NNNN"은 shRNA의 표적화 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, "NNNN"은 서열번호 2 내지 11 중 어느 하나를 포함한다.

[0105] **B. Cas13 가이드 RNA 조절 RNA를 갖는 생산 시스템.**

[0106] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템의 조절 RNA는 Cas13 가이드 RNA이다. Cas13은 유전자의 코딩 DNA 서열을 변경하지 않고 표적화된 mRNA 넉다운을 가능하게 하는 뉴클레이스 활성을 갖는 프로그래밍 가능한 RNA-가이드된 RNA-표적화 Cas 단백질이다. Cas13은 표적 서열을 보완하는 가이드 RNA에 의해 표적 RNA로 가이드된다. 표적 인식은 RNA-RNA 혼성화 및 표적 RNA의 절단을 유도한다. 가이드 RNA는 페이로드 분자(GOI) 코딩 서열 및/또는 UTR(5' UTR 또는 3' UTR)에 상보적으로 설계될 수 있다. 특정 표적 서열은, 예를 들어, 페이로드 분자의 UTR 서열에 혼입될 수 있다. Cas13은 코딩 DNA 서열을 변형하지 않고 RNA 절단을 통해 페이로드 분자("GOI") 단백질 수준을 넉다운시키는 데 사용될 수 있다. Cas13은 전사된 영역 내의 임의의 서열의 표적화를 허용하는 프로토스페이서 측접 서열 요구사항을 나타내지 않는다.

[0107] 조절 RNA로서 Cas13 가이드 RNA를 갖는 생산 시스템은 위에 기재된 임의의 실시형태를 가질 수 있다(파트 I).

[0108] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 별개의 gRNA는 전체가 참조에 의해 원용되어 있는 문헌[McCarty, Nicholas S., et al. " Nature communications 11.1 (2020): 1-13]에 기술되어 있는 바와 같이 천연 가이드 RNA 어레이, 리보자임 자가-절단 가이드 RNA 어레이, Cys4 가이드 RNA 어레이 또는 tRNA 가이드 RNA 어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 가이드 RNA 어레이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0109] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 추가로 포함한다. 예시적인 Cas13 단백질은 당업자에게 공지되어 있으며, Cas13a, Cas13b, Cas13c 및 Cas13d를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13a를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13b를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13c를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13d를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다.

[0110] 일부 실시형태에서, Cas13은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 동일성을 갖는 기능적 변이체의 아미노산 서열을 포함한다. Cas13 단백질의 맥락에서 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능적 변이체"는 야생형 Cas13 단백질에 대해 적어도 50%의 엔도뉴클레이스 활성을 갖는 변이체를 지칭한다.

[0111] 2개의 서열(예를 들어, 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 다중핵산) 사이의 동일성의 정도를 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 한 가지 예시적인 방법은 기본 매개변수를 사용하는 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST®) 소프트웨어(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)를 사용하는 것이다.

[0112] 일부 실시형태에서, Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산은 제1 발현 카세트를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 Cas13을 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다.

[0114] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 도 4에 도시되어 있다.

[0115] **II. 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포**

[0116] 일부 양태에서, 본 개시내용은 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포에 관한 것이다. 이러한 조작된 세포는 위에 기재된 바이러스 벡터 생산 시스템의 일부의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예시적인 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포가 아래에 제공된다.

[0117] **A. shRNA 조절 RNA를 포함하는 조작된 세포.**

[0118] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포는 다음을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함한다: (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소; (b) shRNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; 및 (c) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 중심 핵산 서열은 프로모터와 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산.

[0119] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3'

UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0120] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 shRNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 카피를 포함한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다.

[0122] 일부 실시형태에서, shRNA를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 2 내지 11 중 임의의 핵산 서열을 포함한다.

[0123] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 shRNA의 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 shRNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 별개의 shRNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 내지 3, 2개 내지 4, 2개 내지 5, 2개 내지 6, 2개 내지 7, 2개 내지 8, 2개 내지 9, 2개 내지 10, 3개 내지 4, 3개 내지 5, 3개 내지 6, 3개 내지 7, 3개 내지 8, 3개 내지 9, 3개 내지 10, 4개 내지 5, 4개 내지 6, 4개 내지 7, 4개 내지 8, 4개 내지 9, 4개 내지 10, 5개 내지 6, 5개 내지 7, 5개 내지 8, 5개 내지 9, 5개 내지 10, 6개 내지 7, 6개 내지 8, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 shRNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0124] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은, 5'에서 3'로, (i) 인트론 공여 부위; (ii) shRNA를 암호화하는 핵산 서열; 및 (iii) 인트론 수용 부위를 갖는 인트론을 포함한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 인트론은 shRNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열은 5' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 5' UTR에 위치함); 3' UTR(여기서, 선별 마커의 인트론은 5' UTR에 위치함); 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커의 인트론은 선별 마커를 암호화하는 핵산 서열의 코딩 영역에 위치한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 인트론은 서열번호 12의 핵산 서열을 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부이다.

[0129] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부이다.

[0130] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 도 1에 도시된 바와 같은 바이러스 벡터 생산 시스템을 포함한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다.

[0132] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 HEK293 세포 또는 HeLa 세포, BHK 세포 또는 Sf9 세포로부터 유래된다.

[0133] **B. Cas13 가이드 RNA 조절 RNA를 포함하는 조작된 세포.**

[0134] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산을 위한 조작된 세포는 다음을 집합적으로 포함하는 하나 이상의 이종 다중핵산을 포함한다: (a) 바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 바이러스 벡터 생산 구성요소; (b)Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함하는 제1 발현 카세트; (c) Cas13을 암호화하는 핵산 서열; 및 (d) 5' 및 3' 말단에 바이러스 말단 반복부의 핵산 서열이 측접하는 중심 핵산 서열을 포함하는 전달 다중핵산으로서, 중심 핵산 서열은 프로모터와 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 페이로드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 전달 다중핵산.

[0135] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0136] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13a를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13b를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13c를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 시스템은 Cas13d를 암호화하는 이종 다중핵산을 포함한다.

[0137] 일부 실시형태에서, Cas13은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 동일성을 갖는 기능적 변이체의 아미노산 서열을 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 gRNA를 암호화하는 핵산 서열과 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 모두에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터의 핵산 서열을 포함한다.

[0139] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 5' UTR; 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열을 포함하는 3' UTR; 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0140] 일부 실시형태에서, 페이로드 분자의 핵산 서열은 제1 발현 카세트에 의해 암호화된 Cas13 가이드 RNA를 보완하는 표적 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 표적 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 카피를 포함한다.

[0141] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 탠덤 반복부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어

도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탠덤 반복부는 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개의 카피를 포함한다.

[0142] 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 이상의 별개의 Cas13 가이드 RNA의 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 발현 카세트는 2개 내지 3개, 2개 내지 4개, 2개 내지 5개, 2개 내지 6개, 2개 내지 7개, 2개 내지 8개, 2개 내지 9개, 2개 내지 10개, 3개 내지 4개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개, 3개 내지 7개, 3개 내지 8개, 3개 내지 9개, 3개 내지 10개, 4개 내지 5개, 4개 내지 6개, 4개 내지 7개, 4개 내지 8개, 4개 내지 9개, 4개 내지 10개, 5개 내지 6개, 5개 내지 7개, 5개 내지 8개, 5개 내지 9개, 5개 내지 10개, 6개 내지 7개, 6개 내지 8개, 6개 내지 9개 또는 6개 내지 10개의 별개의 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0143] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 AAV 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 Rep52 또는 Rep40; Rep78 또는 Rep68; E2A; E4Orf6; VARNA; VP1; VP2; VP3; 및 AAP의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 AAV 역 탠덤 반복부이다.

[0144] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 생산 구성요소는 렌티바이러스 벡터의 유전자 산물을 집합적으로 암호화하는 하나 이상의 다중핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터 구성요소는 VSV-G, Gag-Pol 및 Rev의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 다중핵산의 바이러스 말단 반복부는 렌티바이러스 긴 말단 반복부이다.

[0145] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 도 4에 도시된 바와 같은 바이러스 벡터 생산 시스템을 포함한다.

[0146] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산 중 적어도 하나는 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이종 다중핵산은 각각 조작된 세포의 게놈에 안정적으로 통합된다.

[0147] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 HEK293 세포 또는 HeLa 세포로부터 유래된다.

[0148] **III. 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드의 발현을 감소시키는 방법**

[0149] 일부 양태에서, 본 개시내용은 파트 II에 기술된 조작된 세포를 이용하는 바이러스 벡터 생산 동안 페이로드의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이되, 페이로드는 (제1 발현 카세트에 의해 암호화된 조절 RNA를 보완하는) 표적 핵산 서열을 포함한다.

[0150] 조작된 세포가 조절 RNA로서 shRNA를 포함하는 일부 실시형태에서, 페이로드의 발현을 감소시키는 방법은 바이러스 벡터 생산 동안 shRNA를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0151] 조작된 세포가 Cas13을 암호화하는 핵산 서열 및 Cas13 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 일부 실시형태에서, 페이로드의 발현을 감소시키는 방법은 바이러스 벡터 생산 동안 Cas13 및 Cas13 가이드 RNA를 발현시키는 단계를 포함한다.

[0152] 실시예

[0153] **실시예 1. AAV 페이로드 분자의 shRNA-매개성 넉다운.**

[0154] EGFP에 대한 shRNA 발현 플라스미드의 유무에 관계없이 AAV pHelper, AAV pRepCap 및 전달 플라스미드를 HEK293FT 세포에 공동 형질감염시켰다. 3개의 상이한 shRNA 플라스미드를 함께 풀링한 후 테스트하였다(도 1). 형질감염 72시간 후, 드라이 아이스 아이소프로판올조에서 3회의 동결 해동 주기에 의해 AAV를 수거하였다. 바이러스 스톡을 1-배, 10-배 및 100-배로 연속 희석하고, 10㎕의 생성된 바이러스 스톡을 96-웰 플레이트에 플레이팅된 5e4 HEK293FT 세포에 첨가하여 형질도입시켰다. 형질전환 48시간 후, 형질도입된 세포를 수거하고, EGFP

양성 세포의 백분율을 유세포 분석법으로 결정하고, mℓ당 변환 단위(TU/mℓ)를 계산하는 데 사용하였다(도 2A 내지 도 2B). EGFP shRNA를 추가하면 AAV 역가가 단지 약 1.1-배 감소하여 EGFP 형광이 크게 감소하였다. EGFP의 독성이 최소화되어 AAV 역가는 증가하지 않았고, AAV 역가의 최소한의 감소는 shRNA가 AAV 생산 및 패키징에 최소한의 영향을 미쳤음을 보여준다. 상이한 면역글로불린(IG)-EYFP 전달 서열(도 3)과 함께 전달 플라스미드의 FF5 표적 부위와 함께 FF5 shRNA를 사용할 때 유사한 결과가 얻어졌다.

표 1

예시적인 shRNA 서열

서열 번호	설명	서열
2	miRE.shRNA.T1	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTAACGTACGCGGAATACTTCGAATAGTGA AGCCACAGATGTATTCGAAGTATTCCGCGTACGTGTGCCTACT GCCTCGGACTTCAAGGGGC
3	miRE.shRNA.T2	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATAGTGAA GCCACAGATGTATAGGGTTGGTACTAGCAACGCTTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
4	miRE.shRNA.FF3	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACGATATGGGCTGAATACAAATAGTGA AGCCACAGATGTATTTGTATTCAGCCCATATCGTTTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
5	miRE.shRNA.FF4	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGACGCTTGAAGTCTTTAATTAAATAGTGAAG CCACAGATGTATTTAATTAAAGACTTCAAGCGGTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
6	miRE.shRNA.FF5	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTAGCACTCTGATTTGACAATTATAGTGAAG CCACAGATGTATAATTGTCAAATCAGAGTGCTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
7	miRE.shRNA.FF6	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACCAAAGAGATTCCTCATAAATAGTGAA GCCACAGATGTATTTATGAGGAATCTCTTTGGTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
8	miRE.shRNA.fluc.130	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACCAAAGAGATTCCTCATAAATAGTGAA GCCACAGATGTATTTATGAGGAATCTCTTTGGTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
9	miRE.shRNA.fluc.563	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTATGCACATATCGAGGTGGACATAGTGAA GCCACAGATGTATGTCCACCTCGATATGTGCATCTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
10	miRE.shRNA.fluc.773	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTGGACAAGACAATTGCACTGATTAGTGAA GCCACAGATGTAATCAGTGCAATTGTCTTGTCCCTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
11	miRE.shRNA.fluc.1497	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTTGGATTTCGAGTCGTCTTAATTAGTGAA GCCACAGATGTAATTAAGACGACTCGAAATCCACTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC

[0155]

표 2

예시적인 shRNA 서열의 표적

서열번호	설명	서열
13	T1 표적	CACGTACGCGGAATACTTCGAA
14	T2 표적	AGCGTTGCTAGTACCAACCCTA
15	FF3 표적	AACGATATGGGCTGAATACAAA
16	FF4 표적	CCGCTTGAAGTCTTTAATTAAA
17	FF5 표적	AAGCACTCTGATTTGACAATTA
18	FF6 표적	AACCAAAGAGATTCCTCATAAA
19	fluc.130 표적	AACCAAAGAGATTCCTCATAAA
20	fluc.563 표적	GATGCACATATCGAGGTGGACA
21	fluc.773 표적	GGGACAAGACAATTGCACTGAT
22	fluc.1497 표적	GTGGATTTCGAGTCGTCTTAAT

[0156]

[0157] **실시예 2. AAV 페이로드 분자의 Cas13-매개성 넉다운.**

[0158] Cas13d는 GOI 코딩 DNA 서열을 변형하지 않고 RNA 절단을 통해 AAV 페이로드 GOI 단백질 수준을 넉다운시키는 데 사용될 수 있다(도 4). Cas13d는 전사된 영역 내의 임의의 서열의 표적화를 가능하게 하는 프로토스페이서 측접 서열 요구사항을 나타내지 않는다.

[0159] Cas13에 대한 예시적인 아미노산 서열(서열번호 1):

MSPKKKRKVEASIEKKKSFAKGMGVKSTLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGDSI
RSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAKFSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGLKE
TLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILDIEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFGKFS
TVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLINAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFSKEGR
NYIINYGNECYDILALLSGLRHWVVHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYISTLNYL
YDRITNELTNSFSKNSAANVNYIAETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGFNITKLRE
VMLDRKDMSEIRKNHKVFDSIRTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAANKSLPDNEK
SLSEKDIFVINLRGSFNDDQKDALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGNKTREYKKK
DAPRLPRILPAGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNIQSFLKVMPLIG
VNAKFVEEYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIADARRAMYIDAIRILGTNLSYDE
LKALADTFSLDENGNKLKKGKHGMRNFIINNVISNKRFHYLIRYGDPAHLHEIAKNE
AVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKDKGKSVSEKVDALTKIITGMNY
DQFDKKRSVIEDTGRENAEREKFKKIISLYLTVIYHILKNIVNINARYVIGFHCVERDA
QLYKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETAPDKRKDVEKEMAERAKESIDSLE
SANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKAKTALNAYLRNTKWNVIIREDLLRIDN
KTCTLFRNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVNSYFQLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKVS
EYFDAVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGYCIPRFKNLSIEALFDRNEAAKFDKEKKKVSG
[0160] NSGSGPKKKRKVAAAYPYDVPDYA

[0161] 다른 실시형태

[0162] 본 명세서에 개시된 모든 특징은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각 특징은 동일하거나 동등하거나 유사한 목적을 제공하는 대체 특징으로 대체될 수 있다. 따라서, 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, 개시된 각 특징은 등가 또는 유사한 특징의 일반적인 시리즈의 예일 뿐이다.

[0163] 상기 설명으로부터, 당업자는 본 개시내용의 본질적인 특징을 쉽게 확인할 수 있고, 그 사상과 범위를 벗어나지 않고 본 개시내용을 다양한 용도와 조건에 적합화하기 위해 다양한 변화와 수정을 가할 수 있다. 따라서, 다른 실시형태도 청구범위 내에 있다.

[0164] 등가물

[0165] 여러 가지 본 발명의 실시형태가 본 명세서에 기술되고 예시되었지만, 당업자라면 본 명세서에 기재된 기능을 수행하고/하거나 설명된 결과 및/또는 하나 이상의 이점을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 쉽게 구상할 수 있을 것이며, 이러한 변형 및/또는 수정 각각은 본 명세서에 기재된 실시형태의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 당업자라면 본 명세서에 기술된 모든 매개변수, 치수, 물질 및 구성이 예시적인 것을 의미하며, 실제 매개변수, 치수, 물질 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 사용되는 특정 응용 분야에 따라 달라질 것이라는 점을 쉽게 이해할 것이다. 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본 명세서에 기술된 특정 발명의 실시형태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 전술한 실시형태는 단지 예로서 제시된 것이며, 첨부된 청구범위 및 그 균등물의 범위 내에서, 본 발명의 실시형태는 구체적으로 설명되고 청구된 것과 다르게 실시될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 독창적인 실시형태는 본 명세서에 기술된 각각의 개별적인 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법이 상호 모순되지 않는 경우, 2개 이상의 이러한 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은 본 개시내용의 범위 내에 포함된다.

[0166] 본 명세서에 정의되고 사용되는 모든 정의는 사전적 정의, 참조에 의해 원용된 문서의 정의 및/또는 정의된 용어의 일반적인 의미를 제어하는 것으로 이해되어야 한다.

[0167] 본 명세서에 개시된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 각각 인용된 특허 대상과 관련하여 참조에 의해 원용되며, 일부 경우에는 문서 전체를 포괄할 수 있다.

[0168] 상세한 설명 및 청구범위에서 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "단수 형태"는 달리 명확하게 나타내지 않는 한 "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0169] 상세한 설명 및 청구범위에서 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 어구 "및/또는"은 이와 결합된 요소, 즉, 일부 경우에 결합하여 존재하고 다른 경우에는 분리하여 존재하는 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"으로 열거되는 여러 요소는 동일한 방식으로, 즉, 이와 같이 결합된 요소 중 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. "및/또는" 절에 의해 구체적으로 식별되는 요소 외에 구체적으로 식별되는 요소와 관련되든 관련되지 않든 간에 다른 요소가 선택적으로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때 "A 및/또는 B"에 대한 언급은 일 실시형태에서는 A 단독(선택적으로 B이외의 요소를 포함함); 다른 실시형태에서는 B 단독(선택적으로 A 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시형태에서는 A와 B 모두(선택적으로 다른 요소를 포함함) 등을 지칭할 수 있다.

[0170] 상세한 설명 및 청구범위에서 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "또는"은 위에서 정의된 바와 같이 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록 내의 항목을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉, 다수의 요소 또는 목록 중 적어도 하나를 포함하지만 또한 그 중 하나 초과 및 선택적으로 추가적인 열거되지 않은 항목을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. "~중 단지 하나" 또는 "~ 중 정확히 하나" 또는 청구범위에서 사용될 때 "~로 이루어지는"과 같이 명백히 반대로 지시되는 용어만이 다수의 요소 또는 요소의 목록 중 정확히 하나의 요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 용어 "또는"은 단지 "어느 하나", "~ 중 하나", "~ 중 단지 하나" 또는 "~ 중 정확히 하나"와 같은 배타적인 용어가 선행할 때 배타적인 양자택일(즉, "하나 또는 다른 하나, 그러나 둘 모두는 아님")을 지시하는 것으로 해석될 것이다. 청구범위에 사용될 때 "~로 본질적으로 이루어지는"은 특허법 분야에서 사용되는 일반적인 의미를 갖는다.

[0171] 상세한 설명 및 청구범위에서 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 어구 "적어도 하나"는 요소의 목록 내의 임의의 하나 이상의 요소로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 반드시 요소의 목록 내에 구체적으로 열거되는 각각의 그리고 모든 요소 중 적어도 하나를 포함하는 것은 아니며, 요소의 목록 내의 요소의 임의의 조합을 배제하는 것은 아니다. 이러한 정의는 또한 어구 "적어도 하나"가 지칭하는 요소의 목록 내의 구체적으로 식별되는 요소 이외의 요소가 구체적으로 식별되는 요소와 관련되든 관련되지 않든 간에 선택적으로 존재할 수 있다는 것을 허용한다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나"(또는 동등하게는, "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는 동등하게는 "A 및/또는 B 중

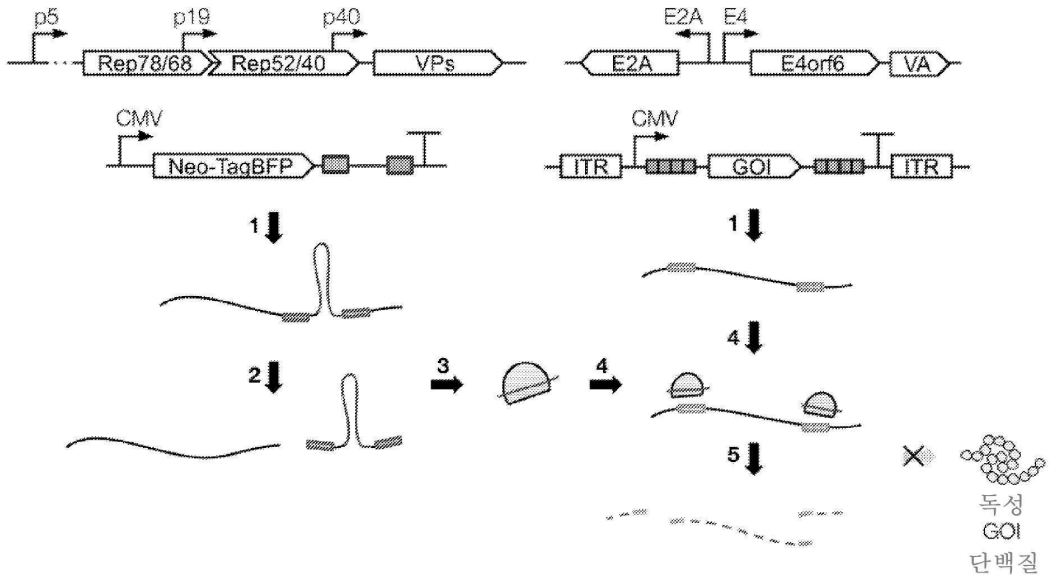
적어도 하나")는 일 실시형태에서는 선택적으로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의, B가 존재하지 않는 A(및 선택적으로 B 이외의 요소를 포함함); 다른 실시형태에서는 선택적으로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의, A가 존재하지 않는 B(및 선택적으로 A 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시형태에서는 선택적으로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 A 및 선택적으로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 B(및 선택적으로 다른 요소를 포함함); 등을 지칭할 수 있다.

[0172] 또한, 명백히 반대로 지시되지 않는 한, 하나 초과의 단계 또는 동작을 포함하는 본 명세서에 청구되는 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 동작의 순서가 반드시 방법의 단계 또는 동작이 언급되는 순서로 제한되는 것은 아니라는 것이 이해되어야 한다.

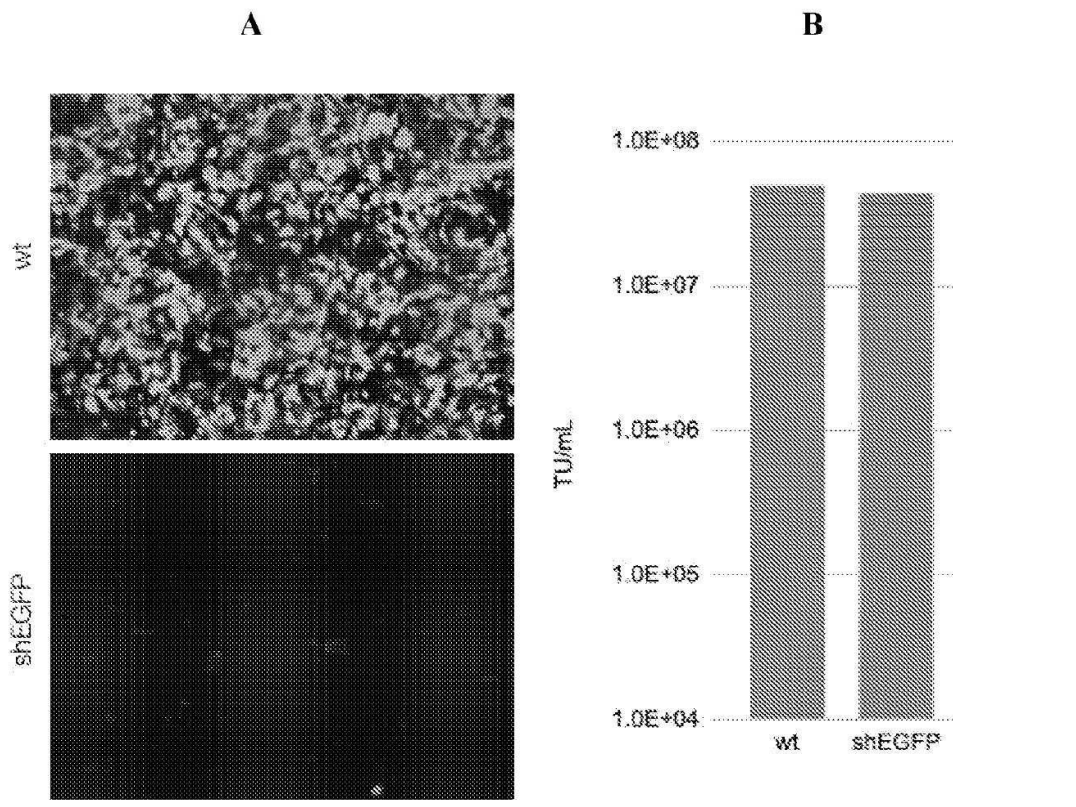
[0173] 위의 명세서에서뿐만 아니라 청구범위에서, "포함하는(comprising 또는 including)", "가지고 있는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "보유하는", "~로 구성된" 등과 같은 모든 이행구들은 개방형인 것으로, 즉, ~를 포함하지만 이에 제한되지 않는을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 미국 특허청 특허 심사 절차 매뉴얼, 부문 2111.03에 명시된 바와 같이 전환 어구 "~로 이루어지는" 및 "~로 본질적으로 이루어지는" 만이 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 전환 어구일 것이다. 개방형 전환 어구(예를 들어, "포함하는")를 사용하여 본 문서에 기술된 실시형태는 또한 대안적인 실시형태에서 개방형 전환 어구에 의해 기술된 특징을 "~로 이루어지는" 및 "~로 본질적으로 이루어지는" 것으로 상정된다는 점을 이해하여야 한다. 예를 들어, 본 개시내용이 "A 및 B를 포함하는 조성물"을 기술하고 있는 경우, 본 개시내용은 대안적인 실시형태 "A 및 B로 이루어진 조성물" 및 "A 및 B로 본질적으로 이루어진 조성물"도 상정한다.

도면

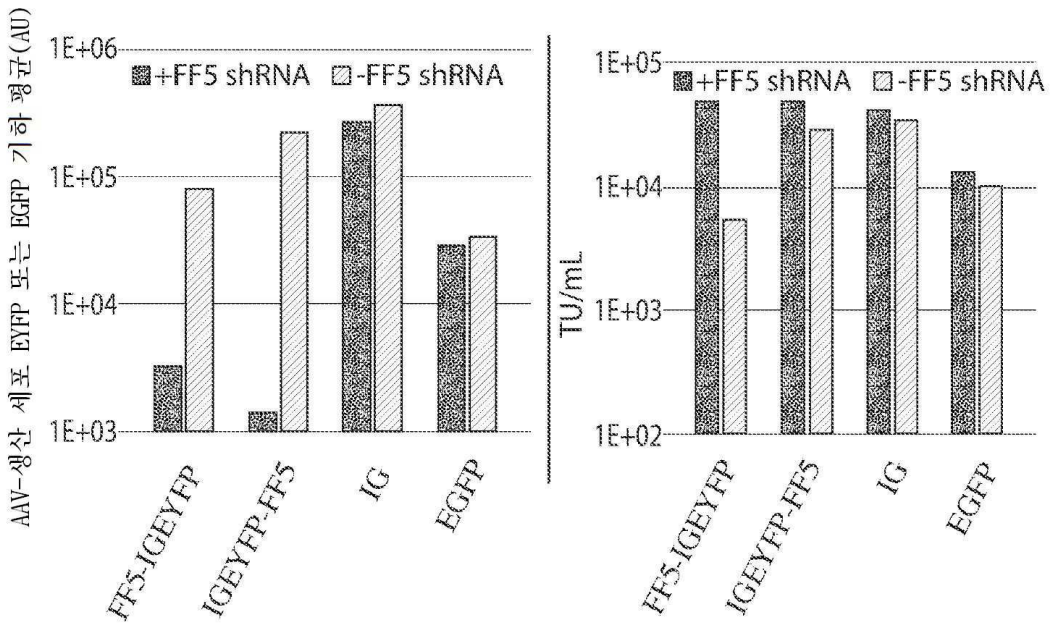
도면1



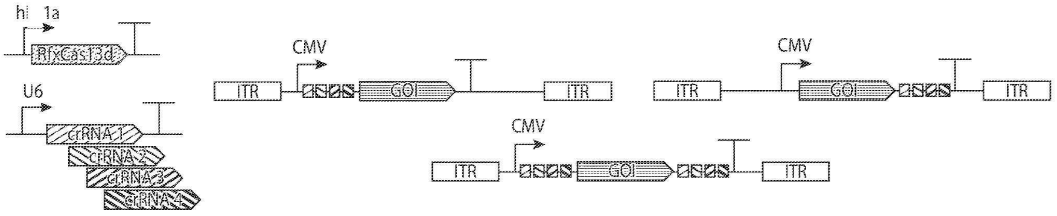
도면2


A
B
wt
shEGFP
TU/mL
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
wt
shEGFP

도면3


AAV-생산 세포 EYFP 또는 EGFP 기하 평균(AU)
1E+06
1E+05
1E+04
1E+03
+FF5 shRNA
-FF5 shRNA
FF5-IGEYFP
IGEYFP-FF5
IG
EGFP
TU/mL
1E+05
1E+04
1E+03
1E+02
+FF5 shRNA
-FF5 shRNA
FF5-IGEYFP
IGEYFP-FF5
IG
EGFP

도면4



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Asimov Inc.

<120> VIRAL VECTOR PRODUCTION SYSTEMS, ENGINEERED CELLS FOR VIRAL VECTOR PRODUCTION, AND METHODS OF USE THEREOF

<130> WO2022245803

<140> PCT/US2022/029601

<141> 2022-05-17

<150> US 63/189,771

<151> 2021-05-18

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1000

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Met Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Ala Ser Ile Glu Lys Lys
1 5 10 15

Lys Ser Phe Ala Lys Gly Met Gly Val Lys Ser Thr Leu Val Ser Gly
20 25 30

Ser Lys Val Tyr Met Thr Thr Phe Ala Glu Gly Ser Asp Ala Arg Leu
35 40 45

Glu Lys Ile Val Glu Gly Asp Ser Ile Arg Ser Val Asn Glu Gly Glu
50 55 60

Ala Phe Ser Ala Glu Met Ala Asp Lys Asn Ala Gly Tyr Lys Ile Gly

65 70 75 80

Asn Ala Lys Phe Ser His Pro Lys Gly Tyr Ala Val Val Ala Asn Asn
85 90 95
Pro Leu Tyr Thr Gly Pro Val Gln Gln Asp Met Leu Gly Leu Lys Glu
100 105 110
Thr Leu Glu Lys Arg Tyr Phe Gly Glu Ser Ala Asp Gly Asn Asp Asn
115 120 125
Ile Cys Ile Gln Val Ile His Asn Ile Leu Asp Ile Glu Lys Ile Leu
130 135 140

Ala Glu Tyr Ile Thr Asn Ala Ala Tyr Ala Val Asn Asn Ile Ser Gly
145 150 155 160
Leu Asp Lys Asp Ile Ile Gly Phe Gly Lys Phe Ser Thr Val Tyr Thr
165 170 175
Tyr Asp Glu Phe Lys Asp Pro Glu His His Arg Ala Ala Phe Asn Asn
180 185 190
Asn Asp Lys Leu Ile Asn Ala Ile Lys Ala Gln Tyr Asp Glu Phe Asp
195 200 205

Asn Phe Leu Asp Asn Pro Arg Leu Gly Tyr Phe Gly Gln Ala Phe Phe
210 215 220
Ser Lys Glu Gly Arg Asn Tyr Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Glu Cys Tyr
225 230 235 240
Asp Ile Leu Ala Leu Leu Ser Gly Leu Arg His Trp Val Val His Asn
245 250 255
Asn Glu Glu Glu Ser Arg Ile Ser Arg Thr Trp Leu Tyr Asn Leu Asp
260 265 270

Lys Asn Leu Asp Asn Glu Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Tyr Leu Tyr Asp
275 280 285
Arg Ile Thr Asn Glu Leu Thr Asn Ser Phe Ser Lys Asn Ser Ala Ala
290 295 300
Asn Val Asn Tyr Ile Ala Glu Thr Leu Gly Ile Asn Pro Ala Glu Phe
305 310 315 320

Ala Glu Gln Tyr Phe Arg Phe Ser Ile Met Lys Glu Gln Lys Asn Leu
325 330 335

Gly Phe Asn Ile Thr Lys Leu Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Lys Asp
340 345 350

Met Ser Glu Ile Arg Lys Asn His Lys Val Phe Asp Ser Ile Arg Thr
355 360 365

Lys Val Tyr Thr Met Met Asp Phe Val Ile Tyr Arg Tyr Tyr Ile Glu
370 375 380

Glu Asp Ala Lys Val Ala Ala Ala Asn Lys Ser Leu Pro Asp Asn Glu
385 390 395 400

Lys Ser Leu Ser Glu Lys Asp Ile Phe Val Ile Asn Leu Arg Gly Ser
405 410 415

Phe Asn Asp Asp Gln Lys Asp Ala Leu Tyr Tyr Asp Glu Ala Asn Arg
420 425 430

Ile Trp Arg Lys Leu Glu Asn Ile Met His Asn Ile Lys Glu Phe Arg
435 440 445

Gly Asn Lys Thr Arg Glu Tyr Lys Lys Lys Asp Ala Pro Arg Leu Pro
450 455 460

Arg Ile Leu Pro Ala Gly Arg Asp Val Ser Ala Phe Ser Lys Leu Met
465 470 475 480

Tyr Ala Leu Thr Met Phe Leu Asp Gly Lys Glu Ile Asn Asp Leu Leu
485 490 495

Thr Thr Leu Ile Asn Lys Phe Asp Asn Ile Gln Ser Phe Leu Lys Val
500 505 510

Met Pro Leu Ile Gly Val Asn Ala Lys Phe Val Glu Glu Tyr Ala Phe
515 520 525

Phe Lys Asp Ser Ala Lys Ile Ala Asp Glu Leu Arg Leu Ile Lys Ser
530 535 540

Phe Ala Arg Met Gly Glu Pro Ile Ala Asp Ala Arg Arg Ala Met Tyr
545 550 555 560

Ile Asp Ala Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asn Leu Ser Tyr Asp Glu Leu

565 570 575

Lys Ala Leu Ala Asp Thr Phe Ser Leu Asp Glu Asn Gly Asn Lys Leu

580 585 590

Lys Lys Gly Lys His Gly Met Arg Asn Phe Ile Ile Asn Asn Val Ile

595 600 605

Ser Asn Lys Arg Phe His Tyr Leu Ile Arg Tyr Gly Asp Pro Ala His

610 615 620

Leu His Glu Ile Ala Lys Asn Glu Ala Val Val Lys Phe Val Leu Gly

625 630 635 640

Arg Ile Ala Asp Ile Gln Lys Lys Gln Gly Gln Asn Gly Lys Asn Gln

645 650 655

Ile Asp Arg Tyr Tyr Glu Thr Cys Ile Gly Lys Asp Lys Gly Lys Ser

660 665 670

Val Ser Glu Lys Val Asp Ala Leu Thr Lys Ile Ile Thr Gly Met Asn

675 680 685

Tyr Asp Gln Phe Asp Lys Lys Arg Ser Val Ile Glu Asp Thr Gly Arg

690 695 700

Glu Asn Ala Glu Arg Glu Lys Phe Lys Lys Ile Ile Ser Leu Tyr Leu

705 710 715 720

Thr Val Ile Tyr His Ile Leu Lys Asn Ile Val Asn Ile Asn Ala Arg

725 730 735

Tyr Val Ile Gly Phe His Cys Val Glu Arg Asp Ala Gln Leu Tyr Lys

740 745 750

Glu Lys Gly Tyr Asp Ile Asn Leu Lys Lys Leu Glu Glu Lys Gly Phe

755 760 765

Ser Ser Val Thr Lys Leu Cys Ala Gly Ile Asp Glu Thr Ala Pro Asp

770 775 780

Lys Arg Lys Asp Val Glu Lys Glu Met Ala Glu Arg Ala Lys Glu Ser

785 790 795 800

Ile Asp Ser Leu Glu Ser Ala Asn Pro Lys Leu Tyr Ala Asn Tyr Ile

805 810 815

Lys Tyr Ser Asp Glu Lys Lys Ala Glu Glu Phe Thr Arg Gln Ile Asn
820 825 830
Arg Glu Lys Ala Lys Thr Ala Leu Asn Ala Tyr Leu Arg Asn Thr Lys
835 840 845

Trp Asn Val Ile Ile Arg Glu Asp Leu Leu Arg Ile Asp Asn Lys Thr
850 855 860
Cys Thr Leu Phe Arg Asn Lys Ala Val His Leu Glu Val Ala Arg Tyr
865 870 875 880
Val His Ala Tyr Ile Asn Asp Ile Ala Glu Val Asn Ser Tyr Phe Gln
885 890 895
Leu Tyr His Tyr Ile Met Gln Arg Ile Ile Met Asn Glu Arg Tyr Glu
900 905 910

Lys Ser Ser Gly Lys Val Ser Glu Tyr Phe Asp Ala Val Asn Asp Glu
915 920 925
Lys Lys Tyr Asn Asp Arg Leu Leu Lys Leu Leu Cys Val Pro Phe Gly
930 935 940
Tyr Cys Ile Pro Arg Phe Lys Asn Leu Ser Ile Glu Ala Leu Phe Asp
945 950 955 960
Arg Asn Glu Ala Ala Lys Phe Asp Lys Glu Lys Lys Lys Val Ser Gly
965 970 975

Asn Ser Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Tyr
980 985 990
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
995 1000

<210> 2
<211> 147
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 2
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtaac 60
gtacgcggaa tacttcgaat agtgaagcca cagatgtatt cgaagtattc cgcgtacgtg 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 3

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttgc 60

gttgctagta ccaaccctat agtgaagcca cagatgtata gggttggtac tagcaacgct 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 4

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60

gatatgggct gaatacaaat agtgaagcca cagatgtatt tgtattcagc ccatatcgtt 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 5

<211> 146

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgacgc 60

ttgaagtctt taattaaata gtgaagccac agatgtattt aattaaagac ttcaagcggt 120

gcctactgcc tcggacttca aggggc 146

<210> 6

<211> 146

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtagc 60

actctgattt gacaattata gtgaagccac agatgtataa ttgtcaaatc agagtgcttt 120

gcctactgcc tcggacttca aggggc 146

<210> 7

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60

caaagagatt cctcataaat agtgaagcca cagatgtatt tatgaggaat ctctttggtt 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 8

<211> 147

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60

caaagagatt cctcataaat agtgaagcca cagatgtatt tatgaggaat ctctttggtt 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 9

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttat 60

gcacatatcg aggtggacat agtgaagcca cagatgtatg tccacctcga tatgtgcatc 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 10

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttgg 60

acaagacaat tgcactgatt agtgaagcca cagatgtaat cagtgcaatt gtcttgtccc 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 11

<211> 147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtttg 60

gatttcgagt cgtcttaatt agtgaagcca cagatgtaat taagacgact cgaaatccac 120

tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 12

aggtaagtnn nntactttag gacccttttt tttccacagg t 41

<210> 13

<211> 22

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

cacgtacgcg gaatacttcg aa 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

agcgttgcta gtaccaaccc ta 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

aacgatatgg gctgaataca aa 22

<210>

16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

ccgcttgaag tctttaatta aa 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

aagcactctg atttgacaat ta 22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

aaccaaagag attcctcata aa 22

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

aaccaaagag attcctcata aa 22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

gatgcacata tcgaggtgga ca 22

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

gggacaagac aattgcactg at 22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

gtggatttcg agtcgtctta at 22

<210> 23

<211> 888

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> AAV2

<400> 23

atgactacgt ccggcgttcc atttggcatg acactacgac caacacgatc tcggttgtct 60

cggcgcactc cgtacagtag ggatcgccta cctccttttg agacagagac ccgcgctacc 120

atactggagg atcatccgct gctgcccgaa tgtaacactt tgacaatgca caatgtttcc 180

tacgtgcgag gtcttccctg cagtgtggga tttacgctga ttcaggaatg ggttgttccc 240

tgggatatgg ttctgacgcg ggaggagctt gtaatcctga ggaagtgtat gcacgtgtgc 300

ctgtgttgtg ccaacattga tatcatgacg agcatgatga tccatggtta cgagtcctgg 360

gctctccact gtcattgttc cagtcccggt tccctgcagt gcatagccgg cgggcaggtt 420

ttggccagct ggtttaggat ggtggtggat ggcgccatgt ttaatcagag gtttatatgg 480

taccgggagg tggtgaatta caacatgcca aaagaggtaa tgtttatgtc cagcgtgttt 540

atgaggggtc gccacttaat ctacctgcgc ttgtggtatg atggccacgt gggttctgtg 600

gtccccgcca tgagctttgg atacagcgcc ttgcactgtg ggattttgaa caatattgtg 660

gtgctgtgct gcagttactg tgctgattta agtgagatca gggtgcgctg ctgtgcccgg 720

aggacaaggc gtctcatgct gcgggcggtg cgaatcatcg ctgaggagac cactgccatg 780

ttgtattcct gcaggacgga gcggcggcgg cagcagttta ttcgcgcgct gctgcagcac 840

caccgcccta tcctgatgca cgattatgac tctaccccca tgtagtaa 888