



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월20일

(11) 등록번호 10-2091957

(24) 등록일자 2020년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7014237

(22) 출원일자(국제) 2016년11월21일

심사청구일자 2018년06월11일

(85) 번역문제출일자 2018년05월18일

(65) 공개번호 10-2018-0079351

(43) 공개일자 2018년07월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/078336

(87) 국제공개번호 WO 2017/089308

국제공개일자 2017년06월01일

(30) 우선권주장

1520761.6 2015년11월24일 영국(GB)

1609303.1 2016년05월26일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

WO1995003400 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자

글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 디벨로
프먼트 리미티드영국 미들섹스 브랜트포드 그레이트 웨스트 로드
980 (우: 티더블유8 9지एस)

(72) 발명자

존슨, 사빈

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티버니지 거
늘스 우드 로드 글락소스미스클라인

펠런트, 셀레스트

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티버니지 거
늘스 우드 로드 글락소스미스클라인

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

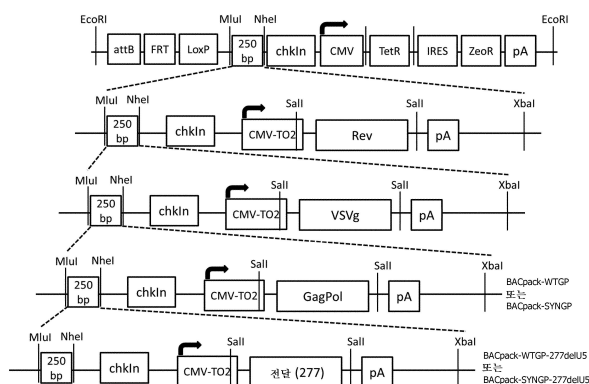
양영준, 김영

심사관 : 이근혜

(54) 발명의 명칭 레트로바이러스 생산을 위한 안정한 세포주

(57) 요약

본 발명은 gag 및 pol 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열이 모두 레트로바이러스 생산 세포 게놈 내에 단일 좌위에 위치하는 레트로바이러스 생산 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하고, gag 및 pol 단백질, 및 env 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 또한 안정한 레트로바이러스 패키징 및 생산 세포주를 생산하기 위해, 상기 핵산 벡터를 이용하는 방법과 용도에 관한 것이다.

대표도

(52) CPC특허분류

C12N 2740/15043 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

C12N 2740/16052 (2013.01)

C12N 2830/006 (2013.01)

C12N 2830/40 (2013.01)

C12N 2830/60 (2013.01)

(72) 발명자

맘바, 에이리니

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티버니지 거늘
스 우드 로드 글락소스미스클라인 내

빈크, 콘래드

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티버니지 거늘
스 우드 로드 글락소스미스클라인

(56) 선행기술조사문헌

W02000066758 A1

W02002020728 A2

GB2538321 A

GB2538324 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하는 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계이며,

여기서 상기 핵산 벡터는

gag 및 pol 단백질, 및

env 단백질

을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하고 각각의 레트로바이러스 핵산 서열은 핵산 벡터 내에서 개별 발현 구축물로서 배열되는 것을 특징으로 하며, 상기 벡터는 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, P1 유래 인공 염색체, 포스미드 또는 코스미드로부터 선택되는 것인 단계; 및

(b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙주 세포에 대해 선택하는 단계

를 포함하는 안정한 레트로바이러스 패키징 세포주의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 포유류 세포가 HEK 293 세포인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 방법에 의하여 얻어지는 레트로바이러스 패키징 세포주.

청구항 4

(a) 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하는 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계이며,

여기서 상기 핵산 벡터는

gag 및 pol 단백질, 및

env 단백질

을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하고 각각의 레트로바이러스 핵산 서열은 핵산 벡터 내에서 개별 발현 구축물로서 배열되는 것을 특징으로 하며, 상기 벡터는 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, P1 유래 인공 염색체, 포스미드 또는 코스미드로부터 선택되는 것인 단계;

(b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙주 세포에 대해 선택하는 단계; 및

(c) 복제 결함있는 레트로바이러스 벡터가 생성되는 조건 하에서 포유류 숙주 세포를 추가적으로 배양하는 단계를 포함하는 복제 결함있는 레트로바이러스 벡터의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 하나 이상의 전이유전자(transgene)를 추가적으로 포함하며, 여기서 전이유전자는 숙주 세포에서 존재하지 않거나 충분히 발현되지 않는 치료적 활성 유전자인, 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 복제 결함있는 레트로바이러스 벡터를 분리하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항의 방법에 의하여 얻어지는 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레트로바이러스 생산에 필요한 유전자를 포함하는 핵산 벡터 및 이들의 용도에 관한 것이다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 벡터를 포함하는 레트로바이러스 패키징/생산 세포주를 제조하는 방법이 제공된다.

배경 기술

[0002] 유전자 치료에서 유전 물질은 치료가 필요한 대상의 내인성 세포로 전달된다. 유전 물질은 대상에게 새로운 유전자를 도입하거나 선제 유전자의 추가 카피를 도입하거나 대상에게 존재하는 유전자와 다른 대립 유전자 또는 변이형을 도입할 수 있다. 바이러스 벡터 시스템은 유전자 치료에 사용하기 위한 효과적인 유전자 전달 방법으로 제안되어왔다(문헌[Verma and Somia (1997) *Nature* 389 : 239-242]).

[0003] 특히, 이들 바이러스 벡터는 유전자 페이로드를 숙주의 게놈에 통합시키는 능력 때문에 레트로바이러스 계열의 구성원에 기초한다. 레트로바이러스 벡터는 레트로바이러스 게놈의 패키징 및 전달에 필요한 필수 단백질을 유지하도록 설계되었지만, 질병 프로필을 담당하는 것을 포함하여 필수적이지 않은 임의의 부속 단백질은 제거되었다. 레트로바이러스 벡터의 예로는 비-증식성 세포에 통합될 수 있기 때문에 널리 사용되는 인간 면역결핍 바이러스 유형 1(HIV-1)에 기초한 것과 같은 렌티바이러스 벡터가 포함된다.

[0004] 현재, 대다수의 바이러스 벡터는 바이러스 유전자의 숙주 세포주로의 일시적인 동시 형질감염에 의해 생산된다. 바이러스 유전자는 플라스미드에 남아 있고 게놈에 통합되지 않기 때문에 제한된 기간 동안에만 숙주 세포에 존재하는 박테리아 플라스미드를 사용하여 바이러스 유전자가 도입된다. 따라서 일시적으로 형질감염된 유전 물질은 세포 분열 과정에서 다음 세대로 전달되지 않는다.

[0005] 배치별 가변성, 형질감염 시약의 높은 비용 및 품질 관리를 유지하는 어려움과 같이 일시적인 형질감염과 관련된 몇 가지 결점이 있다(문헌[Segura *et al.* (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(7): 987-1011] 참조). 형질감염 공정 자체도 노동 집약적이며 규모를 늘리기도 어렵다. 벡터 준비 과정에서 넘겨지는 플라스미드 불순물을 제거하는 것도 어려운 과제이다(문헌[Pichlmair *et al.* (2007) *J. Virol.* 81(2): 539-47] 참조).

[0006] 일시적인 형질감염과 관련된 문제를 해결하기 위해, 레트로바이러스 벡터 생산을 단순화하기 위해 레트로바이러스 패키징 및 생산 세포주를 개발하고자하는 욕구가 있어왔다.

[0007] 패키징 세포주는 레트로바이러스 벡터를 패키징할 수 있는 세포주를 플라스미드로 형질감염 시킴으로써 생성되며, 여기에는 개개의 플라스미드가 레트로바이러스 패키징 유전자 및 고유한 진행 세포 선별 마커를 지니고 있다. 패키징 유전자는 패키징 세포주의 게놈에 통합되어 안정적으로 형질감염된 것으로 기재된다. 지난 20 년 동안 레트로바이러스 벡터에 대한 안정한 패키징 및 생산 세포주를 만들기 위한 다양한 시도가 이루어졌다.

[0008] 숙주 세포 게놈에 레트로바이러스 벡터 구성 요소의 통합을 통해 제조된 패키징 및 생산 세포주에서 많은 보고된 문제점이 있었다. 첫 번째 예로써, 레트로바이러스 벡터 구성 요소를 순차적으로 도입하는 것은 고되고 유연하지 못하다. 또한, 레트로바이러스 벡터 구성 요소가 숙주 세포 게놈에 통합될 때, 통합 부위를 예측할 수 없기 때문에 레트로바이러스 벡터 구성 요소의 유전적 및/또는 전사 불안정성에 문제가 있어 왔다(문헌[Ni *et*

al. (2005) *J. Gene Med.* 7: 818-834]). 바이러스 벡터 생산성의 현저한 저하는 서스펜션 적응과 생산 세포주의 스케일업 동안에도 보고되었다(문헌[Farson *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12: 981-997]; 문헌[Guy *et al.* (2013) *Hum. Gene Ther. Methods.* 24(2): 125-39]).

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 기존의 방법과 관련된 하나 이상의 단점을 극복하는 안정한 레트로바이러스 패키징 및 생산 세포주를 만드는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명자들은 박테리아 인공 염색체와 같은 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하는 핵산 벡터의 사용을 수반하고, 레트로바이러스 벡터 생산에 필수적인 레트로바이러스 유전자를 포함하는 패키징 및 생산 세포주를 제조하는 새로운 방법을 개발했다. 이것은 일시적인 형질감염 방법과 관련된 문제를 개선하기 위해 복제 결함있는 레트로바이러스 벡터 입자의 생산에 필요한 레트로바이러스 유전자의 발현을 허용한다.

[0012] 비-포유류의 복제 기점을 포함하고 적어도 25 kb의 DNA(즉, 대형 구축물 DNA)를 보유하는 능력을 갖는 핵산 벡터의 사용은 몇 가지 장점을 갖는다. 첫 번째 사례에서, 벡터는 첫 번째로, 이들을 사용하기에 훨씬 쉽게 만드는 포유류 숙주 세포가 아닌 비-포유류 세포(예를 들어, 박테리아 세포와 같은 미생물 세포)에서 조작될 수 있다(예를 들어, 박테리아 인공 염색체는 대장균(*E. coli*)에서 첫 번째로 조작될 수 있다). 한 번 핵산 벡터가 제조되면, 포유류 숙주 세포에 도입될 수 있으며, 안정한 세포주를 분리하기 위해 내인성 염색체에 통합된 핵산 벡터를 갖는 임의의 포유류 세포를 선택할 수 있다.

[0013] 포유류 숙주 세포 내로의 레트로바이러스 핵산의 도입은 단일 단계에서 일어나 선택압 및 침묵 기간(silencing timeframe)을 감소시키는 것을 돕는다. 이를 통해 잠재적인 패키징 세포를 신속하게 스크리닝 할 수 있으며 여러 플라스미드 벡터를 사용하는 이전 방법보다는 단일 벡터만 사용되기 때문에 재료 비용을 절감할 수 있다. 특히, 현재 시스템을 사용하면 플라스미드 비용의 절감, 필요한 형질감염 시약(예를 들어, 폴리에틸렌이민 [PEI]), 필요한 벤조나제 처리량 감소(렌티바이러스 수확시 DNA량이 감소하며, 따라서 다운스트림 공정에서 과량을 제거하기 위해서는 더 적은 벤조나제가 요구된다) 및 절감된 테스트 비용(렌티바이러스 생산물에서 잔류 플라스미드를 테스트할 필요가 없다)에 의해 생산 비용이 감소한다.

[0014] 또한, 레트로바이러스 생산에 필수적인 레트로바이러스 유전자(전달 벡터와 함께 또는 전달 벡터없이)는 핵산 벡터 내에 존재하여 벡터가 포유류 숙주 세포에 도입될 때, 핵산 벡터에 포함된 모든 레트로바이러스 유전자가 내인성 포유류 숙주 세포 게놈 내의 하나의 좌위에 통합될 것이다. 이것은 레트로바이러스 유전자가 무작위로 숙주 세포 게놈 내의 상이한 좌위에 통합될 때 발생할 수 있는 유전자 침묵과 같은 문제를 극복할 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 핵산 벡터의 사용은 레트로바이러스 패키징 및 생산 세포주의 생성에 장점을 제공한다.

[0016] 따라서, 본 발명의 제1 양태에 따르면,

[0017] gag 및 pol 단백질;

[0018] env 단백질 또는 이들의 기능적 대체물; 및

[0019] 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈,

[0020] 을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열이 모두 레트로바이러스 생산 세포 게놈 내에 단일 좌위에 위치하는 레트로바이러스 생산 세포가 제공된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하고,

[0022] gag 및 pol 단백질, 및

[0023] env 단백질 또는 이들의 기능적 대체물

[0024] 을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하고 각각의 레트로바이러스 핵산 서열은 핵산 벡터 내에서 개별 발현 구축물로서 배열되는 것을 특징으로 하는 핵산 벡터가 제공된다.

[0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,

- [0026] (a) 본원에서 정의된 바와 같은 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계; 및
- [0027] (b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙주 세포에 대해 선택하는 단계
- [0028] 를 포함하는 안정한 레트로바이러스 패키징 세포주의 제조 방법이 제공된다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에서 정의된 방법에 의해 얻어진 레트로바이러스 패키징 세포가 제공된다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,
- [0031] (a) 본원에서 정의된 바와 같은 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계;
- [0032] (b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙주 세포에 대해 선택하는 단계; 및
- [0033] (c) 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자가 생성되는 조건 하에서 포유류 숙주 세포를 추가적으로 배양하는 단계
- [0034] 를 포함하는 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자의 제조 방법이 제공된다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에서 정의된 방법에 의해 얻어진 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1: BACpack-WTGP-277de1U5 및 BACpack-SYNGP-277de1U5의 구축에 대한 단계별 안내.

도 2: 안정한 폴리클론 풀의 선택. HEK293T 부착성 세포를 인산 칼슘을 사용하여 BACpackWTGagPol-전달로 형질 감염시켰다. 안정한 풀은 2 주의 제오신 선택 후 생성되었다. 안정한 형질감염체가 바이러스를 생성할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 안정한 폴리-풀을 독시사이클린으로 48 시간 동안 유도하였다. 바이러스 상등액을 유도 48 시간 후 수거하고, 0.22 μ m 필터를 통해 여과하고, HEK293T 세포를 형질도입하여 적정하였다. GFP 양성 형질도입 세포를 사용하여 형질도입 단위/mL(TU/mL)를 계산하였다.

도 3: 안정한 형질감염 서스펜션 클론 생성. HEK293 6E 세포를 293펙틴(293fectin) 시약을 사용하여 BACpackWTGagPol-전달로 형질감염시켰다. 안정한 풀은 2 주의 제오신 선택 후 생성되었다. 단일 세포 클론을 얻기 위해 96 웰 플레이트로 희석을 제한하여 안정한 풀을 클로닝하고, 이어서 이를 확대시켰다. GFP는 서스펜션 적응(프리스타일 배지) 후 부착성 배지(DMEM + FBS)로 얻어지는 최고의 클론 1, 14, 15 및 16의 형광 현미경 검사에 의해 검출되었다.

도 4: 서스펜션 클론에서의 렌티바이러스 유도. 안정한 HEK6E 형질감염체가 바이러스를 생성할 수 있는지를 알아보기 위해 독시사이클린(2 μ g/mL)을 사용하여 20 mL의 안정한 서스펜션 클론을 48 시간 동안 유도하였다. 바이러스 상등액을 유도 48 시간 후 수거하고, 0.45 μ m 필터를 통해 여과하고, HEK293T 세포를 형질도입하여 적정하였다. GFP 양성 형질도입 세포를 사용하여 형질도입 단위/mL(TU/mL)를 계산하였다.

도 5: 실시예 4에 따라 생성된 클론의 벡터 역가. 결과는 클론 1 및 16의 벡터 역가가 통로 5 내지 통로 21 사이에서 완만하게 증가했던 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 정의
- [0038] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 출판물은 그 전체가 참고 문헌으로 포함된다.
- [0039] 용어 "포함하는(comprising)"은 "비롯한(including)" 또는 "이루어지는(consisting)"을 내포한다. 예를 들어, X를 "포함하는" 조성물은 X만으로 이루어질 수 있거나, 예를 들어, X + Y와 같이 부가적인 것을 포함할 수 있다.

- [0040] 용어 "본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"은 특징의 범위를 특정 물질 또는 단계 및 청구된 특징의 기본 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다.
- [0041] 용어 "으로 이루어지는(consisting of)"은 임의의 추가 구성 요소(들)의 존재를 배제한다.
- [0042] 용어 "약"은 수치 x와 관련하여, 예를 들어, $x \pm 10\%$, 5% , 2% 또는 1% 를 의미한다.
- [0043] 용어 "백터" 또는 "핵산 백터"는 외부(즉, 외인성) 유전 물질을 다른 세포로 인위적으로 운반할 수 있는 운반체를 말하며, 복제 및/또는 발현될 수 있다. 백터의 예는 박테리아 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC), P1 유래 인공 염색체(PAC), 코스미드 또는 포스미드와 같은 비-포유류 핵산 백터를 포함한다.
- [0044] 백터의 다른 예는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 백터와 같은 바이러스 백터를 포함하며, 이는 본 출원에서 특히 중요하다. 인간 면역결핍 바이러스 유형 1(HIV-1)에 기초한 것과 같은 렌티바이러스 백터는 비-중식성 세포에 통합될 수 있기 때문에 널리 사용된다. 바이러스 백터는 예를 들어, 별도의 플라스미드 상에 놓는 것과 같이, 바이러스 게놈을 별개의 부분으로 분할함으로써 복제 결함을 만들 수 있다. 예를 들어, 솔크 인스티튜트 바이올로지컬 스터디즈(Salk Institute for Biological Studies)에서 개발한 이른바 제1 세대 렌티바이러스 백터는 패키징 발현 카세트, 엔벨로프 발현 카세트 및 백터 발현 카세트에 이루어지는 3 개의 플라스미드 발현 시스템으로 제작되었다. "패키징 플라스미드"는 전체 *gag-pol* 서열, 조절(*tat* 및 *rev*) 및 부속(*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) 서열을 포함한다. "엔벨로프 플라스미드"는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터의 제어 하에, 고유 HIV-1 엔벨로프 단백질 대신에 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSVg)을 보유하고 있다. 세 번째 플라스미드("전달 플라스미드")는 숙주 세포 내에서 전이유전자를 발현하기 위해 긴 말단 반복순서(Long Terminal Repeats(LTR)), 캡슐화 서열(Ψ), Rev 반응 요소(RRE) 서열 및 CMV 프로모터를 가지고 있다.
- [0045] 제2 세대 렌티바이러스 백터는 독성 서열 *vpr*, *vif*, *vpu* 및 *nef*의 결손을 특징으로한다. 패키징 백터는 *gag*, *pol*, *tat* 및 *rev* 유전자로 감소되어 시스템의 안전성을 증가시킨다.
- [0046] 렌티바이러스 시스템을 개선하기 위해, 제3 세대 백터는 패키징 구축물에서 *tat* 유전자를 제거하고 백터 카세트에서 LTR을 불활성화하도록 설계되었고, 그에 따라 삽입 돌연변이가 유발 효과와 관련된 문제를 줄인다.
- [0047] 다양한 렌티바이러스 세대는 다음 참고 문헌: 1 세대: 문헌[Naldini *et al.* (1996) *Science* 272(5259): 263-7]; 2 세대: 문헌[Zufferey *et al.* (1997) *Nat. Biotechnol.* 15(9): 871-5]; 3 세대: 문헌[Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* 72(11): 8463-7]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다. 렌티바이러스 백터의 개발에 대한 검토는 문헌[Sakuma *et al.* (2012) *Biochem. J.* 443(3): 603-18] 및 문헌[Picanco-Castro *et al.* (2008) *Exp. Opin. Therap. Patents* 18(5): 525-539]에서 찾을 수 있다.
- [0048] 용어 "비-포유류 복제 기점"은 복제가 개시되고 비-포유류 공급원으로부터 유래된 핵산 서열을 말한다. 이는 본 발명의 핵산 백터가 적절한 숙주 세포(예를 들어, 박테리아 또는 효모 세포와 같은 미생물 세포) 내에서 내인성 염색체와 함께 안정적으로 복제 및 분리되도록 하여, 숙주 세포가 포유류 숙주 세포인 경우를 제외하고, 숙주 세포 자손에게 전달될 수 있도록 한다. 포유류 숙주 세포에서, 비-포유류 복제 기점을 갖는 핵산 백터는 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체로 통합되거나 포유류 숙주 세포 복제시 상실될 것이다. 예를 들어, 박테리아 인공 염색체(BAC), P1 유래 인공 염색체(PAC), 코스미드 또는 포스미드와 같은 비-포유류 복제 기점을 갖는 핵산 백터는 박테리아 세포(대장균과 같은)에서 내인성 염색체와 함께 안정적으로 복제 및 분리될 수 있지만, 그들이 포유류 숙주 세포에 도입된다면, BAC, PAC, 코스미드 또는 포스미드는 통합되거나 포유류 숙주 세포 복제시 상실될 것이다. 효모 인공 염색체(YAC)는 효모 세포에서 내인성 염색체와 함께 안정적으로 복제 및 분리될 수 있지만, 포유류 숙주 세포에 도입되는 경우 YAC는 통합되거나 포유류 숙주 세포 복제시 상실될 것이다.
- [0049] 따라서, 본 명세서에서, 본 발명의 핵산 백터는 레트로바이러스 생산을 위한 안정한 세포주를 생성하기 위해 포유류 세포로 용이하게 전이될 수 있는 DNA 저장소(즉, 레트로바이러스 생산에 필수적인 유전자를 위한)로서 작용한다. 비-포유류 복제 기점의 예들은 *oriC*, *oriV* 또는 *oriS*와 같은 박테리아 복제 기점 또는 자가복제서열(Autonomously Replicating Sequences(ARS 요소))로도 알려진 효모 복제 기점을 포함한다.
- [0050] 본 발명의 핵산 백터는 비-포유류 복제 기점을 포함하고, 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 핵산 백터는 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 또는 350 kb의 DNA를 보유하는 능력을 갖는다. "보유 능력"에 대한 언급은 그것의 통상적인 의미를 가지며, 핵산 백터에 대한 삽입물의 크기의 상한이 청구된 크기보다 작지 않음을 의미하는 것(즉, 25

kb 이상의 DNA)으로 이해될 것이다.

- [0051] 본 발명의 목적은 레트로바이러스 패키징에 필수적인 유전자를 단일 구축물(즉, 핵산 벡터)에 포함시키는 것이다. 따라서, 본 발명의 핵산 벡터는 큰 DNA 삽입물을 보유할 수 있어야 한다. 의심의 여지를 피하기 위해, "핵산 벡터" 또는 "인공 염색체"에 대한 언급은 천연 박테리아 플라스미드(예를 들어, 일시적 형질감염 방법에서 현재 사용되는 플라스미드와 같은)를 말하지 않는다는 것으로 이해될 것이며, 이는 이들이 적어도 25 kb의 DNA를 보유할 수 없기 때문이다. 플라스미드가 함유할 수 있는 최대 크기 삽입물은 약 15 kb이다. 이러한 핵산 벡터는 또한 일반적으로 5-11 kb의 최대 삽입물만을 보유하는 박테리오파지를 말하지 않는다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 핵산 벡터는 플라스미드, 박테리오파지 또는 에피솜이 아니다.
- [0052] 용어 "내인성 염색체"는 박테리아 인공 염색체와 같은 외인성 핵산 벡터를 생성 또는 도입하기 전에 숙주 세포에서 발견되는 게놈 염색체를 말한다.
- [0053] 본원에서 사용되는 용어 "형질감염", "형질전환" 및 "형질도입"은 표적 세포로의 비-포유류 또는 바이러스 벡터의 삽입을 기술하는데 사용될 수 있다. 바이러스 벡터의 삽입은 형질도입이라고 불릴 수 있는 반면, 벡터의 삽입은 보통 박테리아 세포에 대해 형질전환, 진핵 세포에 대해 형질감염으로 불리운다. 당업자는 물리적 방법(예를 들어, 전기천공법, 세포 압착법, 초음파천공법, 광학 형질감염, 원형질체 융합, 임페일펙션(impalefection), 마그네토펙션(magnetofection), 유전자 총 또는 입자 투사), 화학적 시약(예를 들어, 인산 칼슘, 고도로 분지된 유기 화합물 또는 양이온성 중합체) 또는 양이온성 지질(예를 들어, 리포펙션)의 사용을 포함하되, 이에 제한되지 않는, 일반적으로 사용되는 상이한 비-바이러스 형질감염 방법을 인식할 것이다. 많은 형질감염 방법은 플라스미드 DNA의 용액을 세포에 접촉시킨 다음 세포를 성장시키고 마커 유전자 발현을 위해 선택되는 것을 요구한다.
- [0054] 용어 "프로모터"는 유전자 발현을 유도하는 서열을 말한다. 높은 수준의 발현을 유도하기 위해, 비-레트로바이러스, 고효율 프로모터와 같은 고효율 프로모터를 사용하는 것이 유익할 수 있다. 적합한 프로모터의 예는 인간 거대세포바이러스(CMV) 극초기 프로모터, 비장 병소 형성 바이러스(SFFV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 또는 인간 신장 인자 1-알파(pEF) 프로모터와 같은 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0055] Tet 오페론(테트라사이클린-조절된 전사 활성화)은 유도성 유전자 발현의 방법에 사용될 수 있으며, 여기서 전사는 항생제 테트라사이클린 또는 그의 하나의 유도체(예를 들어, 독시사이클린)의 존재 하에서 가역적으로 켜지거나 꺼지게 된다. 본질적으로, Ptet 프로모터는 TetR(억제자) 및 TetA(테트라사이클린 항생제를 세포 밖으로 펌핑하는 단백질)를 발현한다. 본 발명에서, Tet 오페론은 존재하거나 존재하지 않을 수 있는데, 예를 들어, 하나의 실시양태에서, Tet 오페론은 프로모터에 존재할 수 있다.
- [0056] 용어 "선별 마커"는 삽입된 유전자(예를 들어, 전이유전자)를 활발히 발현하는 세포를 선별하는데 도움이 되는 유전자를 의미한다. 적합한 선별 마커의 예로는 항생제, 예를 들어, 카나마이신, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, 블라스티시딘 또는 제오신에 대한 내성을 코딩하는 효소(즉, 항생제 내성 유전자)를 포함한다. 적합한 선별 마커의 다른 예는 형광 단백질, 예를 들어 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP) 또는 청색 형광 단백질(BFP)이다.
- [0057] 용어 "폴리A 신호"는 폴리 아데닐레이션 신호 서열을 말하며, 예를 들어, 전이유전자의 3'에 위치하여 숙주 인자가 전사 중에 초기 mRNA의 말단에 폴리아데노신(폴리A) 꼬리를 부가할 수 있게 한다. 폴리A 꼬리는 효소 분해로부터 mRNA를 보호하고, 또한 번역을 돕는 최대 300 개의 아데노신 리보뉴클레오타이드의 스트레치(stretch)이다. 따라서, 본 발명의 핵산 벡터는 인간 베타 글로빈 또는 토끼 베타 글로빈 폴리A 신호, 사마귀 바이러스 40(SV40) 초기 또는 후기 폴리A 신호, 인간 인슐린 폴리A 신호 또는 소 성장 호르몬 폴리A 신호와 같은 폴리A 신호 서열을 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 폴리A 신호 서열은 인간 베타 글로빈 폴리A 신호이다.
- [0058] 용어 "인트론 서열"은 RNA 스플라이싱에 의한 최종 유전자 생성물로부터 제거된 뉴클레오타이드 서열을 말한다. 인트론/프로모터 영역의 다운스트림 및 cDNA 삽입물의 업스트림 인트론의 사용은 유전자 발현 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 발현의 증가는 특정 cDNA 삽입물에 의존한다. 따라서, 본 발명의 핵산 벡터는 인간 베타 글로빈 인트론, 토끼 베타 글로빈 인트론 II 또는 키메라 인간 베타 글로빈-면역글로불린 인트론과 같은 인트론을 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 인트론은 인간 베타 글로빈 인트론 및/또는 토끼 베타 글로빈 인트론 II이다.
- [0059] 용어 "패키징 세포주"는 안정적으로 gag와 pol 단백질 및 엔벨로프 당단백질 유전자가 삽입된 세포주를 의미한다. 대안적으로, 용어 "생산 세포주"는 관심있는 전이유전자를 함유하는 안정적으로 삽입된 전달 벡터를 갖는

패키징 세포주를 말한다. 당업계의 통상의 기술자는 본원에 기재된 핵산 벡터는 패키징 세포주(즉, 적어도 *gag*, *pol* 및 *env* 유전자가 핵산 벡터 상에 존재하고 숙주 세포 내로 포함될 때) 또는 생산 세포주(즉, 핵산 벡터가 *gag*, *pol* 및 *env* 유전자와 함께 숙주 세포 내로 포함될 전달 벡터 구성 요소를 추가적으로 포함하는 경우)를 생성하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

- [0060] 용어 "안정적으로 형질감염된"은 형질감염된 DNA가 내인성 염색체에 포함되거나 외인성 염색체의 안정한 유전성을 통해 포함되었기 때문에 도입된 레트로바이러스 유전자를 그들의 자손(즉, 딸 세포)에 전달할 수 있는 세포주를 의미한다.
- [0061] 핵산 벡터
- [0062] 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 비-포유류 복제 기점 및 적어도 25 킬로베이스(kb)의 DNA를 보유하는 능력을 포함하는 핵산 벡터가 제공되며, 핵산 벡터는 다음을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열을 포함하는 것으로 특징으로 한다:
- [0063] *gag* 및 *pol* 단백질, 및
- [0064] *env* 단백질 또는 이들의 기능적 대체물.
- [0065] 특히, 각각의 레트로바이러스 핵산 서열은 핵산 벡터 내에서 개별 발현 구축물로서 배열될 수 있다.
- [0066] 레트로바이러스 벡터를 생성하는 현재의 방법은 레트로바이러스 유전자를 숙주 세포에 일시적으로 형질감염시키는 것을 포함한다. 그러나, 비용이 많이 들고, 고되며, 규모를 늘리기도 어렵기 때문에 많은 단점이 이 방법과 관련되어 있다. 한 가지 해결책은 일시적인 형질감염과 관련된 문제를 피하고 변동이 심한 레트로바이러스 벡터 배출을 줄이기 위해 레트로바이러스 패키징 유전자를 안정적으로 포함하는 패키징 세포주를 조작하는 것이다.
- [0067] 본 발명자들은 본원에 기재된 핵산 벡터가 레트로바이러스 벡터 생산 방법과 관련된 이전의 어려움을 완화시키는 레트로바이러스 패키징 세포주를 생성시키는데 사용될 수 있음을 발견하였다. 예를 들어, 레트로바이러스 패키징 세포주를 생산하는 공지된 방법은 각각의 레트로바이러스 유전자가 도입된 후 다중 선택 작업을 포함한다. 이 공정은 최대 6 개월이 걸릴 수 있으며 상당히 노동 집약적이다. 핵산 벡터에 모든 레트로바이러스 유전자를 포함시킴으로써 레트로바이러스 유전자를 하나의 단일 단계로 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 삽입할 수 있다. 따라서, 본원에서 제안된 바와 같이, 핵산 벡터의 사용은 선택압을 감소시키고, 침묵 기간을 감소시키며, 잠재적인 패키징 세포의 보다 빠른 스크리닝을 허용할 것이다. 또한, 핵산 벡터에 포함된 레트로바이러스 유전자는 모두 단일 좌위에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합되어 개별 레트로바이러스 유전자가 침묵하게 될 위험을 감소시키고 모든 레트로바이러스 유전자가 균등하게 발현되도록 한다.
- [0068] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈을 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함한다. 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈은 일반적으로 일시적인 형질감염 방법에 사용되는 "전달 벡터"에 포함되는 것으로 이해될 것이다. 전달 벡터 플라스미드는 일반적으로 프로모터(CMV와 같은), 3'LTR(자체-불활성화(즉, SIN) 3'-LTR일 수도 있고 아닐 수도 있음), 5'LTR(U5 영역을 함유할 수도 있고, 아닐 수도 있음), 캡시드화 서열(Ψ) 및 잠재적으로 프로모터에 연결된 전이유전자를 함유한다.
- [0069] 하나의 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자(즉, 전달 벡터)의 RNA 게놈의 다중 카피가 핵산 벡터에 포함된다. 전달 벡터의 다중 카피는 더 높은 바이러스 벡터 역가를 초래할 것으로 예상된다. 예를 들어, 핵산 벡터는 레트로바이러스 벡터 입자(즉, 전달 벡터)의 RNA 게놈의 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이상과 같이 2 개 이상의 카피를 포함할 수 있다.
- [0070] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 하나 또는 복수 개의 재조합 부위(들)를 함유한다. 이것은 재조합 효소의 존재 하에 표적 서열을 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 부위-특이적 방식으로 통합시킬 수 있게 한다. 리코비나제 효소는 두 재조합 부위 사이의 재조합 반응을 촉매한다.
- [0071] 많은 유형의 부위-특이적 재조합 시스템이 당업계에 공지되어 있으며, 임의의 적합한 재조합 시스템이 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, 재조합 부위(들)는 람다 파지의 *int/att* 시스템, 박테리오파지 P1의 *Cre/lox* 시스템, 효모의 *FLP/FRT* 시스템, 파지 Mu의 *Gin/gix* 리코비나제 시스템, Cin 리코비나제 시스템, 대장균의 *Pin* 리코비나제 시스템 및 pSR1 플라스미드의 *R/RS* 시스템, 또는 이들의 임의의 조합에서 선택되거나 유도된다. 또 다른 실시양태에서, 재조합 부위는 람다 인테그라제의 존재하에 부위-지정된 통합을 허용하는 *att* 부위(예를 들어, 람다 파지에서)이다. "람다 인테그라제"에 대한 언급은 *int/att* 시스템, 예를 들

어, WO 2002/097059에 기재된 변형된 람다 인테그라제와 여전히 양립 가능한 돌연변이 인테그라제에 대한 언급을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0072] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 박테리아 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC), P1 유래 인공 염색체(PAC), 포스미드 또는 코스미드로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 핵산 벡터는 박테리아 인공 염색체(BAC)이다.

[0073] *박테리아 인공 염색체*

[0074] 용어 "박테리아 인공 염색체" 또는 "BAC"는 외인성 DNA의 큰 삽입물을 보유할 수 있는 박테리아 플라스미드에서 유래된 DNA 구축물을 말한다. 보통 약 350 kb의 최대 DNA 삽입물을 보유할 수 있다. BAC는 박테리아 세포 분열 이후에 플라스미드의 균등한 분포까지 촉진하는 분할 유전자를 함유하는 적절히 특성화된 박테리아의 기능적 수정 플라스미드(F-플라스미드)로부터 개발되었다. 이것은 BAC가 내인성 박테리아 게놈(대장균과 같은)과 함께 안정적으로 복제되고 분리되도록 한다. BAC는 보통 박테리아 세포에서 BAC의 안정적인 유지 보수를 보장하는 복제 기점(*oriS* 또는 *oriV* 유전자와 같은), *repE* 유전자(플라스미드 복제 및 카피 개수 조절에 대한) 및 분할 유전자(*sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* 및/또는 *parC*와 같은)에 대한 적어도 하나의 카피를 함유한다. BAC는 이들이 YAC와 같은 선형 인공 염색체보다 쉽게 복구할 수 있도록 만들 수 있도록 자연적으로 원형이고 초나선형이다. 그들은 또한 전기천공법과 같은 간단한 방법을 사용하여 상대적으로 쉽게 박테리아 숙주 세포에 도입될 수 있다.

[0075] 하나의 실시양태에서, 박테리아 인공 염색체는 *oriS* 유전자를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 박테리아 인공 염색체는 *repE* 유전자를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 박테리아 인공 염색체는 분할 유전자를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 분할 유전자는 *sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* 및/또는 *parC*에서 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 박테리아 인공 염색체는 *sopA* 및 *sopB* 유전자를 포함한다.

[0076] 본 발명에서 사용하기 위한 BAC는 예를 들어, 루씨젠(LUCIGEN)TM의 p스마트 BAC(pSMART BAC)와 같은 상업적 출처로부터 얻을 수 있다(전체 백본 서열에 대해서는 게놈 등록번호(Genome Accession No.) EU101022.1 참조). 이 BAC에는 TrfA 복제 단백질의 존재 하에서만 활성인 *oriV* 중간-카피의 복제 기점을 또한 포함하는 L-아라비노오스 "카피-업"시스템이 포함되어 있다. TrfA에 대한 유전자는 L-아라비노오스 유도성 프로모터 *araC-P_{BAD}*(문헌 [Wild et al. (2002) *Genome Res.* 12(9): 1434-1444] 참조)의 조절하에 박테리아 숙주 세포의 게놈에 포함될 수 있다. L-아라비노오스의 첨가는 *oriV*를 활성화시키는 TrfA의 발현을 유도하여 플라스미드를 세포 당 50 카피까지 복제하게 한다.

[0077] *효모 인공 염색체*

[0078] 용어 "효모 인공 염색체" 또는 "YAC"는 효모 DNA가 박테리아 플라스미드에 포함된 염색체를 말한다. 그것들은 자가복제서열(ARS)(즉, 복제 기점), 동원체 및 텔로미어를 함유한다. BAC와는 달리 YAC는 선형이어서 염색체의 양쪽 끝에 효모 텔로미어를 함유하여, 이것이 숙주 세포 자손으로 전달될 때 분해로부터 끝을 보호한다. YAC는 100-2000 kb 범위의 다양한 DNA 삽입물 크기를 보유할 수 있다.

[0079] *P1 유래 인공 염색체*

[0080] 용어 "P1 유래 인공 염색체" 또는 "PAC"은 P1-박테리오파지 및 박테리아 F-플라스미드의 DNA로부터 유래된 DNA 구축물을 말한다. 그들은 보통 약 100-300 kb의 최대 DNA 삽입물을 보유할 수 있으며 대장균에서 클로닝 벡터로 사용된다. PAC는 정제 및 박테리아 숙주 세포로의 도입이 용이하다는 점과 같은 BAC와 유사한 장점을 갖는다.

[0081] *코스미드와 포스미드*

[0082] 용어 "코스미드"는 박테리오파지 람다로부터 유도된 *cos* 부위를 추가적으로 함유하는 박테리아 플라스미드로부터 유래된 DNA 구축물을 말한다. 코스미드는 일반적으로 박테리아 복제 기점(*oriV*와 같은), 선택 마커, 클로닝 부위 및 적어도 하나의 *cos* 부위를 포함한다. 코스미드는 보통 40-45 kb의 최대 DNA 삽입물을 허용할 수 있다. 코스미드는 표준 박테리아 플라스미드보다 대장균 세포를 감염시키는데 더 효과적임이 밝혀졌다. 용어 "포스미드"는 박테리아 F-플라스미드를 기본으로하는 것을 제외하고는, 코스미드와 유사한 비-포유류 핵산 벡터를 말한다. 특히, 그들은 큰 DNA 단편의 클로닝을 허용하기 위해 F-플라스미드 복제 기점 및 분할 메커니즘을 사용한다. 포스미드는 보통 최대 40 kb의 DNA 삽입물을 허용할 수 있다.

- [0083] 레트로바이러스
- [0084] 레트로바이러스는 유사-이배체 단일-가닥 RNA 게놈을 함유하는 바이러스 군이다. 그들은 RNA 게놈으로부터 DNA를 생산하는 역전사 효소를 코딩하여 숙주 세포 DNA에 삽입할 수 있다. 본원에 기재된 발명은 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자를 생산하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 레트로바이러스 벡터 입자는 임의의 적합한 레트로바이러스로부터 선택되거나 이로부터 유래될 수 있다.
- [0085] 하나의 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 렌티바이러스 또는 감마-레트로바이러스와 같은, 렌티바이러스, 알파-레트로바이러스, 감마-레트로바이러스 또는 포말-레트로바이러스, 특히 렌티바이러스로부터 유래되거나 이로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 HIV-1, HIV-2, SIV, FIV, EIAV 및 비스나(Visna)로 이루어진 군에서 선택된 렌티바이러스이다. 렌티바이러스는 유전자 치료를 위하여 레트로바이러스 벡터를 매력적으로 만드는 비-분할(즉, 휴지) 세포를 감염시킬 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 HIV-1이거나 HIV-1에서 유래된다. 일부 레트로바이러스의 게놈 구조는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, HIV-1에 대한 자세한 내용은 NCBI 젠뱅크(Genbank)(게놈 등록번호 AF033819)에서 찾을 수 있다. HIV-1은 가장 잘 이해된 레트로바이러스 중 하나이므로 종종 레트로바이러스 벡터로 사용된다.
- [0086] 레트로바이러스 유전자
- [0087] 다음과 같이, 모든 레트로바이러스에 공통된 핵산 서열은 보다 상세히 설명될 수 있다:
- [0088] 긴 말단 반복순서(LTR): 레트로바이러스 게놈의 기본 구조는 레트로바이러스 생산에 필요한 유전자가 그 사이에 또는 그 내부에 위치한 5'-LTR 및 3'-LTR을 포함한다. LTR은 레트로바이러스 통합 및 전사에 필요하다. 그들은 또한 레트로바이러스 유전자의 발현을 조절하기 위한 프로모터 서열로서 작용할 수 있다(즉, 그들은 시스-작용 유전자이다). LTR은 U3, R, U5로 명명된 3 개의 하위 영역으로 구성된다: U3는 RNA의 3'말단 고유의 서열로부터 유도된다; R은 RNA의 양 말단에서 반복되는 서열로부터 유도된다; U5는 RNA의 5'말단 고유의 서열로부터 유도된다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 추가로 5'- 및 3'-LTR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 5'LTR의 U5 영역이 결실되고 비-HIV-1 폴리A 꼬리로 대체될 수 있다(문헌[Hanawa *et al.* (2002) *Mol. Ther.* 5(3): 242-51] 참조).
- [0089] 복제 가능 바이러스의 생성과 관련된 안전 문제를 다루기 위해, TATA 상자 및 전사 인자 Sp1 및 NF- κ B에 대한 결합 부위를 포함하는 3'LTR의 U3 영역에 있는 섹션을 삭제하여 자체-불활성화(SIN) 벡터를 개발했다(문헌[Miyoshi *et al.* (1998) *J. Virol.* 72(10):8150-7] 참조). 결실은 감염된 세포에서의 역전사 및 통합 후 5'LTR로 옮겨져 LTR의 전사 불활성화를 초래한다. 이는 본 발명에 포함될 수 있는 자가-불활성화 렌티바이러스-기반 벡터 시스템으로 알려져 있다.
- [0090] ψ : 레트로바이러스 RNA의 캡시드화는 레트로바이러스 게놈의 5'말단에 위치한 ψ (psi) 서열의 효력에 의해 발생한다. psi 서열의 다운스트림 및 gag 코딩 영역으로 연장되는 서열이 효율적인 레트로바이러스 벡터 생산에 관여한다는 것이 또한 당업계에 공지되어 있다(문헌[Cui *et al.* (1999) *J. Virol.* 73(7): 6171-6176] 참조). 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 ψ (psi) 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0091] 프라이머 결합 부위(PBS): 레트로바이러스 게놈은 5'LTR의 U5 영역 뒤에 존재하는 PBS를 포함한다. 이 부위는 역전사의 개시에 필요한 tRNA 프라이머에 결합한다. 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 PBS 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0092] PPT: 레트로바이러스 게놈은 레트로바이러스 게놈의 3'말단 근처에 폴리퓨린 트랙(polypurine tracts, PPT)이라고 불리는 짧은 길이의 퓨린 스트레치를 함유한다. 이 PPT는 역전사 동안 플러스-가닥 DNA 합성을 위한 RNA 프라이머로서 기능한다. 복잡한 레트로바이러스(HIV-1와 같은)는 DNA 합성의 개시를 위한 두 번째 부위를 제공하는 두 번째, 보다 중앙에 위치한 PPT(즉, 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT))를 함유한다. cPPT를 코딩하는 레트로바이러스 벡터는 형질도입 및 전이유전자 발현이 증가된 것으로 밝혀졌다(문헌[Barry *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12(9):1103-8] 참조). 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 3'-PPT 서열 및/또는 cPPT 서열을 추가적으로 포함한다.
- [0093] 상기 기재된 비-코딩 영역의 게놈 구조는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, HIV-1의 비-코딩 영역의 게놈 구조에 대한 세부 사항은 NCBI 젠뱅크에서 게놈 등록번호 AF033819 또는 HIV-1 HXB2(일반적으로 사용되는 HIV-1 참조 균주)에 대하여 게놈 등록번호 K03455로 찾아질 수 있다. 하나의 실시양태에서, 비-코딩 영역은 게놈 등록번호 K03455에서 이용 가능한 서열에서, 예를 들어, 염기쌍 454-1126 (R-U5-PBS-Gag의 경우), 7622-

8479(RRE의 경우) 또는 7769-8146(RRE의 경우), 4781-4898(cPPT의 경우), 9015-9120 및 9521-9719(dNEF-PPT-sinU3-R-U5의 경우)에서 유래된다.

[0094] *Gag/pol*: *gag*와 *pol* 유전자의 발현은 *gag*와 *gagpol* 사이의 번역 틀이동에 의존한다. 둘 다 성숙화 도중 쪼개질 다단백질이다. 레트로바이러스 벡터의 주요 구조 매트릭스, 캡시드 및 뉴클레오캡시드 단백질은 *gag*에 의해 코딩된다. *pol* 유전자는 레트로바이러스 효소: i) 역전사 효소(레트로바이러스 RNA 게놈을 이중 가닥 DNA로 역전사하는데 필수적인 것), ii) 인테그라제(레트로바이러스 DNA 게놈을 숙주 세포 염색체에 통합을 가능하게 하는 것), 및 iii) 프로테아제(레트로바이러스의 성숙 및 기능적 단백질을 생산하기 위해 합성된 다단백질을 쪼개는 것)를 코딩한다. 하나의 실시양태에서, *gag* 및 *pol* 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열이 게놈 등록번호 K03455에서 예를 들어, 염기쌍 790-5105에서 입수 가능한 HIV-1 HXB2 서열로부터 유도된다.

[0095] *Env*: *env*("엔벨로프") 유전자는 레트로바이러스 엔벨로프(예를 들어, HIV-1의 당단백질 gp120 및 gp41)의 표면 및 막 횡단 구성 요소를 코딩하고 레트로바이러스 세포 막 융합에 관여한다. 레트로바이러스 벡터의 조직 친화력을 넓히기 위해, 본원에 기재된 레트로바이러스 벡터는 다른 바이러스로부터의 엔벨로프 단백질로 위형화될 수 있다. 위형화는 렌티바이러스 벡터를 포함한 레트로바이러스 벡터의 숙주 세포 범위가 레트로바이러스 벡터 입자의 당단백질(GP)을 변화시킴으로써(예를 들어, 다른 엔벨로프된 바이러스로부터 얻거나 유도된 GP를 사용하거나, 합성/인공 GP를 사용함으로써) 확장되거나 대체될 수 있는 공정을 말한다. 레트로바이러스 벡터를 위형화하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 당단백질은 그것의 넓은 조직 친화력 및 높은 벡터 입자 안정성을 고려할 때, 수포성 구내염 바이러스 GP(VSVg)이다. 그러나 당업자는 다른 당단백질이 위형화에 사용될 수 있음을 이해할 것이다(문헌[Cronin *et al.* (2005) *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398] 참조, 그 전체가 본원에 참고로 인용됨). 위형화에 사용되는 바이러스의 선택은 표적화될 세포 및/또는 기관의 유형에 따라 달라질 수 있는데, 이는 일부 위형화 유형이 조직-유형 선호도를 나타내기 때문이다.

[0096] 하나의 실시양태에서, *env* 단백질 또는 이들의 기능적 대체물은 수포성 바이러스(예를 들어, 수포성 구내염 바이러스), 리사바이러스(예를 들어, 광견병 바이러스, 모코라 바이러스), 아레나바이러스(예를 들어, 림프구성 맥락수막염바이러스(LCMV)), 알파바이러스(예를 들어, 로스 리버 바이러스(RRV), 신디비스 바이러스, 썸리키 삼립열 바이러스(SFV), 베네수엘라 이콰인 뇌염 바이러스), 필로바이러스(예를 들어, 에볼라 바이러스 레스턴, 에볼라 바이러스 자이르, 라사 바이러스), 알파레트로바이러스(예를 들어, 조류 백혈병 바이러스(ALV), 베타레트로바이러스(예를 들어, 야그지크테 양 레트로바이러스(JSRV)), 감마레트로바이러스(예를 들어, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스(MLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALV), 고양이 내인성 레트로바이러스(RD114)), 델타레트로바이러스(예를 들어, 인간 T-림프영양성 바이러스 1(HTLV-1)), 스푸마바이러스(예를 들어, 인간 포말 바이러스), 렌티바이러스(예를 들어, 메디-비스나 바이러스(MVV)), 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV), 레스피로바이러스(예를 들어, 센다이 바이러스, 호흡기형 세포융합 바이러스(RSV)), 헤파시바이러스(예를 들어, C 형 간염 바이러스(HCV)), 인플루엔자바이러스(예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A) 및 핵다각체병바이러스(예를 들어, 오토그라파 칼리포니카 다중 뉴클레오폴리헤드로바이러스(AcMNPV))에서 선택된 바이러스에서 얻어지거나 유도된다. 또 다른 실시양태에서, *env* 단백질 또는 이들의 기능적 대체물은 수포성 구내염 바이러스로부터 얻어지거나 유도된다. 이 실시양태에서, 레트로바이러스 입자가 보다 넓은 숙주 세포 범위를 감염시키고 야생형 엔벨로프 단백질을 생산하기 위한 재조합 기회를 제거할 수 있게 하는 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSVg) 단백질이 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, *env* 단백질 또는 이들의 기능적 대체물을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열은 게놈 등록번호 J02428.1에서 이용 가능한 서열, 예를 들어, 염기쌍 3071 내지 4720로부터 유도된다.

[0097] 본 명세서에 기재된 구조 유전자는 모든 레트로바이러스에 공통적이다. 다른 보조 유전자는 다른 유형의 레트로바이러스에서 발견될 수 있다. 예를 들어, HIV-1과 같은 렌티바이러스는 *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef* 및 *tat*로 알려진 6 개의 추가 보조 유전자를 함유한다. 다른 레트로바이러스는 본원에 기재된 유전자와 유사한 보조 유전자를 가질 수 있지만, 이들은 언제나 문헌에서와 동일한 이름을 부여하지 않을 수도 있다. 문헌[Tomonaga and Mikami (1996) *J. Gen. Virol.* 77(Pt 8):1611-1621]과 같은 참고 문헌은 다양한 레트로바이러스 보조 유전자를 기재하고 있다.

[0098] *Rev*: 보조 유전자 *rev*("비리온의 조절자")는 Rev 반응 요소(RRE)에 결합하고 레트로바이러스 전사체의 배출을 촉진하는 부속 단백질을 코딩한다. 상기 유전자의 단백질 생성물은 Rev 반응 요소(RRE)를 함유하는 레트로바이러스 mRNA의 단편이 핵에서 세포질로 내보내지는 것을 허용한다. RRE 서열은 복잡한 접힌 구조를 형성할 것으로 예측된다. *rev*의 이러한 특별한 역할은 스플라이싱과 핵 배출 단계의 긴밀한 커플링을 반영한다. 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 RRE 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, RRE 서열은 게놈 등록번호 K03455에

서, 예를 들어, 염기쌍 7622 내지 8479, 또는 7769 내지 8146, 특히 염기쌍 7622 내지 8479로부터 이용 가능한 HIV-1 HXB2 서열로부터 유도된다.

[0099] Rev는 RRE와 결합하여 단일 스플라이싱된(*env*, *vif*, *vpr* 및 *vpu*) 또는 비-스플라이싱(*gag*, *pol* 및 게놈 RNA) 바이러스 전사체의 배출을 촉진하여 유전자 번역 및 패키징과 같은 다운스트림 사건을 유도한다(문헌[Suhasini and Reddy (2009) *Curr. HIV Res.* 7(1): 91-100] 참조). 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 보조 유전자 *rev* 또는 그에 유사한 유전자(즉, 다른 레트로바이러스 또는 기능적으로 유사한 시스템으로부터)를 추가적으로 포함한다. *rev* 유전자의 함유는 특히, RRE 요소가 또한 전달될 전사체에 함유된 경우, 레트로바이러스 벡터 게놈의 RNA 전사체를 핵에서 세포질로 효율적으로 내보내는 것을 보장한다. 또 다른 실시양태에서, *rev* 유전자는 게놈 등록번호 M11840(즉, HIV-1 클론 12 cDNA, HIVPCV12 유전자 자리)의 염기쌍 970 내지 1320과 적어도 70 %의 서열 동일성과 같은, 적어도 60 %의 서열 동일성을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, *rev* 유전자는 게놈 등록번호 K03455.1(즉, 인간 면역결핍 바이러스 유형 1, HXB2)의 염기쌍 5970 내지 6040 및 8379 내지 8653과 적어도 70 %, 80 %, 90 % 또는 100 % 서열 동일성과 같은, 적어도 60 %의 서열 동일성을 포함한다.

[0100] 보조 유전자는 레트로바이러스 복제 및 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 따라서 현재의 많은 바이러스 벡터 생산 시스템에는 이러한 유전자 중 일부를 포함하지 않는다. 예외가 일반적으로 존재하는 *rev*이거나, *rev*/RRE 시스템과 유사한 시스템이 잠재적으로 사용된다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 하나 이상의 보조 유전자 *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* 및 *nef* 또는 유사한 보조 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 파괴되어 상기 보조 유전자가 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈으로부터 제거되거나 기능적 보조 단백질을 코딩할 수 없다. 또 다른 실시양태에서, 보조 유전자 *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* 및 *nef* 또는 유사한 보조 유전자 중 적어도 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상 또는 전부가 파괴되어 상기 보조 유전자가 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈으로부터 제거되거나 기능적 보조 단백질을 코딩할 수 없다. 기능적 보조 유전자의 제거는 전체 유전자의 제거를 요구하지 않을 수 있다; 유전자 일부의 제거 또는 유전자의 파괴로 충분할 것이다.

[0101] 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자를 코딩하는 핵산 서열은 레트로바이러스 벡터 입자가 기초하는 레트로바이러스의 야생형 유전자(즉, 서열이 야생형 바이러스에 유전적으로 또는 그렇지 않으면 변형된 버전의 서열로 함유된)와 동일하거나 또는 그로부터 유래될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 핵산 벡터 또는 숙주 세포 게놈에 포함된 레트로바이러스 유전자는 또한 야생형 유전자의 코돈-최적화된 버전으로 말할 수 있다.

[0102] 추가 구성 요소

[0103] 본 발명의 핵산 벡터는 추가 구성 요소를 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 추가 기능은 예를 들어, 번역을 위한 전사체 안정화, 유전자 발현 수준 증가, 유전자 전사를 켜고/끄는 것을 돕기 위해 사용될 수 있다.

[0104] 본 발명에 의해 생산된 레트로바이러스 벡터 입자는 유전자 치료법에 사용할 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 추가적으로 하나 이상의 전이유전자를 포함한다. 이 전이유전자는 표적 질환을 치료 또는 완화하는데 사용될 수 있는 유전자 생산물을 코딩하는 치료적 활성 유전자일 수 있다. 전이유전자는 예를 들어, 안티센스 RNA, 리보자임, 단백질(예를 들어, 중앙 억제 단백질), 독소, 항원(항체 또는 헬퍼 T 세포 또는 세포독성 T 세포를 유도하는데 사용될 수 있는) 또는 항체(단일 사슬 항체와 같은)를 코딩할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 전이유전자는 베타 글로빈을 코딩한다.

[0105] 전이유전자를 함유하는 전달 벡터의 다중 카피는 더 높은 레트로바이러스 벡터 역가를 초래할 것으로 예상되며, 따라서 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 2 개 이상과 같은, 특히 3 개 이상의 전이유전자 카피와 같은 전이유전자의 다중 카피를 포함한다. 일부 경우, 질병을 치료하기 위해 하나를 초과하는 유전자 생산물이 요구되기 때문에, 또 다른 실시양태에서, 핵산 벡터는 2 개 이상, 예컨대 3 개 이상 또는 4 개 이상의 상이한 전이유전자를 추가적으로 포함한다.

[0106] 본원에서 언급된 "전이유전자"는 이들이 도입되는 포유류 숙주 세포에서 존재하지 않거나 충분하게 발현되지 않는 이종 또는 외래 DNA를 말한다. 이는 예를 들어, 표적 유전자가 포유류 숙주 세포에서 정확하게 발현되지 않는 경우, 따라서, 표적 유전자의 정정된 버전이 전이유전자로서 도입될 수 있다는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 전이유전자는 잠재적인 치료적 관심 유전자일 수 있다. 전이유전자는 다른 세포 유형 또는 다른 종으로부터 얻어지거나 합성으로 제조될 수 있다. 대안적으로, 전이유전자는 숙주 세포로부터 수득될 수 있지만, 천연 유전자에 존재하는 것과 상이한 조절 영역에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, 전이유전자는 숙주 세포에 존재하는 유전자의 상이한 대립 유전자 또는 변이체일 수 있다.

[0107] 유전자 치료의 목적은 치료 목적으로 살아있는 세포의 유전 물질을 변경시키는 것이며 치료적 효과를 얻기 위해

기능적 유전자를 세포에 삽입하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 핵산 벡터 및 숙주 세포를 사용하여 생산된 레트로바이러스 벡터는 표적 세포를 형질감염시키고 잠재적 치료적 관심 유전자의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 따라서 레트로바이러스 벡터는 유전된 장애, 암 및 특정 바이러스 감염을 포함하나 이에 한정되지 않는 증상을 앓고 있는 인간 대상과 같은 포유류 대상의 치료에 사용될 수 있다.

[0108] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 전사 조절 요소를 추가적으로 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 요소는 발현이 조절될 수 있도록 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본원에 언급된 프로모터는 전체적으로 또는 부분적으로, 예를 들어, 조절 단백질이 존재하는 경우, 구성적으로 작동하거나 유도성일 수 있는 공지된 프로모터를 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 CMV 프로모터와 같은 고효율 프로모터를 추가적으로 포함한다. 이 프로모터는 비-포유류 핵산 벡터 상에 코딩된 요소의 높은 수준의 발현을 촉진시키는 장점을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, CMV 프로모터는 인간 거대세포바이러스 군주 AD169로부터 유래된 서열을 포함한다. 이 서열은 게놈 등록번호 X17403에서 이용 가능하며, 예를 들어 염기쌍 173731에서 174404까지이다.

[0109] 하나의 실시양태에서, 프로모터(CMV 프로모터와 같은)는 적어도 하나의 Tet 오페론을 추가적으로 포함한다. Tet 오페론 시스템은 핵산 벡터 내에 함유된 레트로바이러스 서열의 발현을 조절하는데 사용될 수 있다. 간략하게, Tet 억제자 단백질은 프로모터에 도입된 Tet 오페론 부위에 결합함으로써 발현을 차단한다. 따라서, Tet 억제자가 Tet 오페론에 결합될 때, 유전자 발현은 없다. 테트라사이클린 또는 독시사이클린을 첨가하면, Tet 억제자가 차단되어 프로모터 활성을 허용함으로써 유전자 발현이 작동한다. 인비트로진(Invitrogen)에서 입수 가능한 pcDNATM4/TO 포유류 발현 벡터에 사용되는 Tet 오페론과 같은 Tet 오페론 시스템이 널리 사용 가능하다.

[0110] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 테트라사이클린 내성 오페론 억제자 단백질("Tet 억제자" 또는 "TetR")을 추가적으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Tet 억제자는 코돈 최적화된다.

[0111] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 염색질 절연체와 같은 절연체를 추가적으로 포함한다. 용어 "절연체"는 프로모터와 인핸서 사이의 상호 작용을 차단하는 유전적 서열을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, 절연체(염색질 절연체와 같은)는 각각의 레트로바이러스 핵산 서열 사이에 존재한다. 이것은 인접한 레트로바이러스 핵산 서열 사이의 프로모터 간섭(즉, 하나의 전사 단위로부터의 프로모터가 인접한 전사 단위의 발현을 손상시키는 경우)을 방지하는 것을 돕는다. 절연체가 각각의 레트로바이러스 핵산 서열 사이의 핵산 벡터에 존재한다면, 이들이 핵산 벡터 내에서 개별적인 발현 구축물로서 배열될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 레트로바이러스 핵산 서열을 코딩하는 각 서열은 그 자체의 프로모터 및/또는 인트론 및/또는 폴리A 신호를 갖는다. 하나의 실시양태에서, 염색질 절연체는 닭(갈루스 갈루스(*Gallus gallus*)) HS4 절연체 서열(예를 들어, 게놈 등록번호 U78775.2, 염기쌍 1 내지 1205 참조)과 적어도 90 %의 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는다.

[0112] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 선별 마커를 추가적으로 포함한다. 이는 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포가 선택되는 것을 허용한다. 또 다른 실시양태에서, 선별 마커는 제오신, 카나마이신 또는 푸로마이신 내성 유전자, 특히 제오신(ZeoR) 내성 유전자와 같은 항생제 내성 유전자이다. 또 다른 실시양태에서, 제오신 내성 유전자는 스트렙토알로테이쿠스 힌두스탄스 블(*Streptoalloteichus hindustans ble*) 유전자(예를 들어, 게놈 등록번호 X52869.1의 염기쌍 3 내지 377 참조)로부터 유래된 것이다.

[0113] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 폴리A 신호를 추가적으로 포함한다. 폴리A 신호의 사용은 mRNA를 효소 분해로부터 보호하고 번역을 돕는 장점이 있다. 또 다른 실시양태에서, 폴리A 신호는 SV40, 소 성장 호르몬 및/또는 인간 베타 글로빈으로부터 얻어지거나 이로부터 유래된다. 하나의 실시양태에서, 폴리A 신호는 SV40 초기 폴리A 신호로부터 유도된다(예를 들어, 게놈 등록번호 EF579804.1, 마이너스 가닥으로부터 염기쌍 2668 내지 2538 참조). 하나의 실시양태에서, 폴리A 신호는 인간 베타 글로빈 폴리A 신호로부터 유도된다(예를 들어, 게놈 등록번호 GU324922.1, 염기쌍 3394 내지 4162 참조).

[0114] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 인트론 서열을 추가적으로 포함한다. 인핸서/프로모터 영역의 다운스트림 및 cDNA 삽입물(즉, 전이유전자)의 업스트림 인트론을 사용하는 것은 삽입물의 발현 수준을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또 다른 실시양태에서, 인트론 서열은 인간 베타 글로빈 인트론 또는 토끼 베타 글로빈 인트론 II 서열이다. 하나의 실시양태에서, 인간 베타 글로빈 인트론은 게놈 등록번호 KM504957.1에서 이용 가능한 서열로부터 유도된다(예를 들어, 염기쌍 476 내지 1393에서). 하나의 실시양태에서, 토끼 베타 글로빈 인트론 II는 게놈 등록번호 V00882.1(예를 들어, 염기쌍 718 내지 1290에서)에서 이용 가능한 서열로부터 유도된다.

- [0115] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE)를 추가적으로 포함한다. WPRE의 존재는 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 따라서 높은 수준의 발현을 달성하는데 유익할 것이다. 또 다른 실시양태에서, WPRE는 게놈 등록번호 J04514.1(예를 들어, 염기쌍 1093 내지 1684)에서 이용 가능한 서열로부터 유도된다.
- [0116] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가적으로 포함한다. IRES는 보통 5'-캡(개시 복합체의 조립에 필요한)의 다운스트림 5'-비번역 영역에서 발견되는 구조화된 RNA 요소이다. IRES는 번역 개시 요소에 의해 인식되며 캡-독립 번역을 허용한다. 또 다른 실시양태에서, IRES는 뇌 심근염 바이러스(EMCV) 게놈(예를 들어, 게놈 등록번호 KF836387.1, 염기쌍 151 내지 724 참조)으로부터 유래된다.
- [0117] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 다중 클로닝 부위(MCS)를 추가적으로 포함한다. MCS는 핵산 벡터 내에서 DNA가 짧은 단편으로 여러 제한 부위(예를 들어, 10, 15 또는 20 개 영역)를 포함한다. 이들 부위는 대개 핵산 벡터 내에서 단 한 번만 발생하여 엔도뉴클레아제가 한 부위에서만 절단하는 것을 보장한다. 이는 레트로바이러스 유전자가 적절한 엔도뉴클레아제(즉, 제한 효소)를 사용하여 용이하게 삽입되도록 한다.
- [0118] 구조물이 핵산 벡터 내에서 임의의 순서로 배열될 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다. 예시적인 실시양태에서, 핵산 벡터는 다음의 삽입물을 포함한다: gag 및 pol 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, env 단백질 또는 이의 기능적 대체물(VSVg와 같은)을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, 보조 유전자 rev(예를 들면, 코돈 최적화된 rev 서열) 또는 이들과 유사한 유전자 또는 기능적으로 유사한 시스템을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, 테트라사이클린 내성 오페론 억제자 단백질(TetR), 내부 리보솜 진입 부위 및 선별 마커(제오신 내성 선별 마커와 같은)(즉, GagPol-Env-Rev-Tet 억제자-IRES-항생제 내성 마커-잔존 BAC 서열("BAC 뼈대(bone)"); GagPol-(야생형)VSVg-(코돈-최적화된)Rev-Tet 억제자-IRES-제오신내성-pSMARTBAC와 같은)을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열. 또 다른 실시양태에서, 절연체(염색질 절연체와 같은)가 gagpol, env 및 rev 서열 각각 사이에 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 프로모터가 gagpol, env 및 rev 서열 각각 앞에 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 전달 벡터 서열(즉, 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈을 코딩하는 핵산 서열을 포함함)의 카피가 gagpol 서열 앞에 존재한다.
- [0119] 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터는 다음 삽입물을 포함한다: 절연체(염색질 절연체와 같은), 프로모터(임의적으로 Tet 오페론 서열을 포함하는 CMV 프로모터와 같은), 인트론(인간 베타 글로빈 인트론과 같은), gag 및 pol 단백질을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, RRE를 코딩하는 레트로바이러스 핵산, 폴리A 신호(인간 베타 글로빈 폴리A 신호와 같은), 절연체(염색질 절연체와 같은), 프로모터(임의적으로 Tet 오페론 서열을 포함하는 CMV 프로모터와 같은), 인트론(인간 베타 글로빈 인트론과 같은), env 단백질 또는 이의 기능적 대체물(VSVg와 같은)을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, 폴리A 신호(인간 베타 글로빈 폴리A 신호와 같은), 절연체(염색질 절연체와 같은), 프로모터(임의적으로 Tet 오페론 서열을 포함하는 CMV 프로모터와 같은), 보조 유전자 rev 또는 이들과 유사한 유전자 또는 기능적으로 유사한 시스템을 코딩하는 레트로바이러스 핵산 서열, 폴리A 신호(인간 베타 글로빈 폴리A 신호와 같은), 절연체(염색질 절연체와 같은), 프로모터(CMV 프로모터와 같은), 인트론(토끼 베타 글로빈 인트론과 같은), 테트라사이클린 내성 오페론 억제자 단백질(TetR), 내부 리보솜 진입 부위, 선별 마커(제오신 내성 선별 마커와 같은), 폴리A 신호 및 다중 클로닝 부위.
- [0120] 핵산 서열은 핵산 벡터에 순차적으로 도입될 수 있다. 이는 필요한 모든 핵산 서열이 핵산 벡터에 성공적으로 통합되도록 하기 위해 각 통합 후 선택을 허용한다. 대안적으로, 둘 이상의 핵산 서열이 동시에 핵산 벡터에 도입된다.
- [0121] 본원에 기술된 추가 유전자는 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 및 라이게이션 기술을 사용하여, 당업계에 공지된 표준 분자 클로닝 기술에 의해 핵산 벡터에 도입될 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 핵산 벡터, 특히 BAC, PAC, 포스미드 및/또는 코스미드는 전기천공법과 같은 표준 기술에 의하여 박테리아 숙주 세포(대장균 세포, 특히 대장균 균주 DH10B와 같은)에 도입될 수 있다.
- [0122] 사용
- [0123] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 레트로바이러스 패키징 또는 생산 세포주를 생산하는데 사용하기 위한 본원에서 정의된 바와 같은 핵산 벡터가 제공된다.
- [0124] 본원에 기재된 핵산 벡터는 레트로바이러스 벡터 생산을 크게 단순화시키는 레트로바이러스 패키징 세포주를 생성하는데 사용될 수 있다. 전이유전자가 핵산 벡터에 포함되면, 이는 생산 세포주를 생성하는데 사용된다는 것을 이해할 것이다.

- [0125] 본원에 기재된 바와 같이, 일시적인 형질감염과 관련된 어려움을 극복하기 위해 안정한 레트로바이러스 패키징 (또는 생산) 세포주를 개발하는 것이 유용할 것이다. 본 명세서에 기재된 핵산 벡터는 레트로바이러스 패키징에 필요한 필수 유전자를 함유하는 큰 DNA 삽입물을 보유할 수 있기 때문에 상기 패키징 세포주를 제조하는데 사용될 수 있으며, 이후 한 단계로 포유류 숙주 세포의 내인성 게놈에 통합될 수 있다.
- [0126] 숙주 세포
- [0127] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,
- [0128] gag 및 pol 단백질; 및
- [0129] env 단백질 또는 이들의 기능적 대체물
- [0130] 을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 모두 레트로바이러스 패키징 세포 게놈 내의 단일 좌위에 위치하는 레트로바이러스 패키징 세포가 제공된다.
- [0131] 큰 핵산 벡터 상에 모든 레트로바이러스 유전자를 포함시키는 장점은 먼저 미생물 세포(박테리아 또는 효모 세포와 같은)에서 준비될 수 있다는 것인데, 이는 포유류 세포에 단일 단계로 통합되기 전에 조작 및 조절이 훨씬 용이하다. 레트로바이러스 유전자가 포유류 숙주 세포에 통합되면 이는 선택압을 완화하고 침묵 기간을 단축시킨다. 이 방법의 특징적인 특성은 패키징 세포주를 만드는데 필요한 모든 레트로바이러스 유전자가 내인성 게놈 전체에 무작위로 흩어져 있는 것이 아니라 내인성 게놈의 단일 유전자 좌위에 존재한다는 점이다. 이것은 레트로바이러스 유전자가 내인성 게놈 전체에 무작위로 통합되는 이전의 방법(고르지 못한 발현 수준을 유발할 수 있는)과 비교하여 이들은 동일한 좌위에 있기 때문에 동일한 수준에서 모든 레트로바이러스 유전자를 발현하는 레트로바이러스 패키징 세포를 생산하는 장점을 갖는다.
- [0132] 하나의 실시양태에서, 레트로바이러스 패키징 세포는 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈을 코딩하는 핵산 서열을 추가적으로 포함한다. 이것은 단일 좌위에 gag 및 pol 단백질 및 env 단백질 또는 이들의 기능적 대체물을 코딩하는 핵산 서열과 함께 위치할 수 있다.
- [0133] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,
- [0134] gag 및 pol 단백질;
- [0135] env 단백질 또는 이들의 기능적 대체물; 및
- [0136] 레트로바이러스 벡터 입자의 RNA 게놈
- [0137] 을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열이 모두 레트로바이러스 생산 세포 게놈 내에 단일 좌위에 위치하는 레트로바이러스 생산 세포가 제공된다.
- [0138] 하나의 실시양태에서, 레트로바이러스 패키징 세포는 포유류 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 포유류 세포는 HEK 293 세포, CHO 세포, 주르카트(Jurkat) 세포, KS62 세포, PerC6 세포, 힐라(HeLa) 세포 또는 이들의 유도체 또는 기능적 등가물로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 포유류 숙주 세포는 HEK 293 세포이거나 또는 HEK 293 세포에서 유래된 것이다. 그러한 세포는 부착성 세포주(즉, 이들은 표면에 부착된 단일층으로 성장한다) 또는 서스펜션으로된/비-부착성 세포주(즉, 이들은 배양 배지에서 서스펜션에서 성장한다)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HEK 293 세포는 HEK 293T 세포이다. 용어 "HEK 293 세포"는 생물 공학에서 일반적으로 사용되는 인간 배아 신장 293 세포주를 의미한다. 특히, HEK 293T 세포는 일반적으로 다양한 레트로바이러스 벡터의 생산에 사용된다. 적합한 상업적으로 이용 가능한 세포주의 다른 예는 T-REXTM(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 세포주를 포함한다.
- [0139] 핵산 벡터에 대해 앞서 기재된 모든 실시양태가 본 발명의 레트로바이러스 패키징/생산 세포에도 또한 적용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0140] 방법
- [0141] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,
- [0142] (a) 본원에서 정의된 바와 같은 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계; 및
- [0143] (b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙

주 세포에 대해 선택하는 단계

- [0144] 를 포함하는 안정한 레트로바이러스 패키징 세포주의 제조 방법이 제공된다.
- [0145] 하나의 실시양태에서, 포유류 숙주 세포는 HEK 293 세포, HEK 6E 세포, CHO 세포, 주르카트 세포, KS62 세포, PerC6 세포, 힐라 세포 또는 이들의 유도체 또는 기능적 등가물로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 포유류 숙주 세포는 HEK 293 세포이거나 또는 HEK 293 세포에서 유래된 것이다. 그러한 세포는 부착성 세포주(즉, 이들은 표면에 부착된 단일층으로 성장한다) 또는 서스펜션으로된/비-부착성 세포주(즉, 이들은 배양 배지에서 서스펜션에서 성장한다)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HEK 293 세포는 HEK 293T 세포 또는 HEK 6E 세포이다. 적합한 상업적으로 이용 가능한 세포주의 다른 예는 T-REXTM(라이프 테크놀로지스) 세포주를 포함한다.
- [0146] 핵산 벡터를 숙주 세포에 도입하는 것이 당업계에 공지된 적절한 방법, 예를 들어, 지질-매개 형질감염, 마이크로인젝션, 세포(마이크로셀과 같은) 융합, 전기천공법 또는 미세투사물 투사를 사용하여 수행될 수 있다는 것을 당업자가 인식할 것이다. 하나의 실시양태에서, 핵산 벡터가 전기천공법에 의해 숙주 세포 내로 도입된다. 핵산 벡터를 도입하기 위해 사용하는 방법의 선택은 사용되는 포유류 숙주 세포의 유형에 따라 선택될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0147] 일단 포유류 숙주 세포 내로 들어가면, 핵산 벡터는 포유류 숙주 세포의 내인성 게놈에 무작위로 통합될 것이다. 따라서, 상기 방법은 핵산 벡터 상에 코딩된 핵산이 통합된 포유류 숙주 세포를 선택하는 단계를 추가적으로 포함한다(예를 들어, 제오신 내성 마커와 같은 항생제 내성 선별 마커를 사용).
- [0148] 당업자는 핵산 벡터의 통합을 장려하는 방법, 예를 들어, 자연적으로 원형인 경우(예를 들어, BAC, PAC, 코스미드 또는 포스미드) 핵산 벡터를 선형화하는 방법을 인식할 것이다. 핵산 벡터는 내인성 게놈 내의 선택된 부위의 통합을 유도하기 위해 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체와 공유된 상동성 영역을 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 재조합 부위가 핵산 벡터 상에 존재한다면, 이들은 표적 재조합에 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산 벡터는 Cre 재조합 효소와 조합될 때(즉, P1 박테리오파지에서 유래된 Cre/lox 시스템을 사용) 표적화된 통합을 허용하는 *loxP* 부위를 함유할 수 있다. 택일적으로(또는 추가적으로), 재조합 부위는 *att* 부위(예를 들어, 람다 파지로부터)이며, 여기서 *att* 부위는 람다 인테그라제의 존재하에 부위-유도된 통합을 허용한다. 이것은 레트로바이러스 유전자가 높은 및/또는 안정한 발현을 허용하는 내인성 게놈 내의 좌위로 표적화될 수 있게 한다.
- [0149] 타겟 통합의 다른 방법은 당업계에 잘 알려져있다. 예를 들어, 게놈 DNA의 표적화된 절단을 유도하는 방법은 선택된 염색체 좌위에서 표적화된 재조합을 장려하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 내인성 게놈에서 이중가닥 끊어짐(DSB) 또는 닉(nick)을 유도하여, 비-동질 말단 결합(NHEJ) 또는 수리 템플릿을 사용하는 수리(즉, 상동성 지시된 수리 또는 HDR)와 같은 자연적인 방법에 의해 끊어짐을 수리하는 것을 유도하도록 조작된 절단 시스템의 사용을 종종 포함한다.
- [0150] 절단은 특정 절단을 유도하기 위해 조작된 crRNA/tracrRNA('단일 가이드 RNA')를 갖는 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하고/하거나 아거노트(Argonaute) 시스템(예를 들어, 'TtAgo'로 알려진, 티. 쉐모필러스(*T. thermophilus*))에서, 문헌[Swarts *et al.* (2014) *Nature* 507(7491): 258-261 참조]에 기초한 뉴클레아제를 사용하여 조작된 아연 집게 뉴클레아제(ZFN), 전사-활성기 같은 이펙터 뉴클레아제(TALEN)와 같은 특정 뉴클레아제의 사용을 통해 발생할 수 있다. 이들 뉴클레아제 시스템 중 하나를 사용하는 표적화된 절단은 HDR 또는 NHEJ 매개 방법을 이용하여 특정 표적 위치에 핵산을 삽입하는데 이용될 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 핵산 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 적어도 하나의 뉴클레아제를 사용하여 포유류 숙주 세포의 게놈(즉, 내인성 염색체)에 통합하는 단계를 추가적으로 포함하고, 적어도 하나의 뉴클레아제는 핵산 서열이 세포의 게놈에 통합되도록 포유류 숙주 세포의 게놈을 절단한다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레아제는 아연 집게 뉴클레아제(ZFN), 테일(TALE) 뉴클레아제(TALEN), CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0151] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에서 정의된 방법에 의해 수득된 레트로바이러스 패키징 세포가 제공된다.
- [0152] 본원에서 정의된 방법을 사용하여 얻어진 세포주는 고역가의 레트로바이러스 벡터를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0153] 본원에서 언급된 용어 "고역가"는 대상 세포와 같은 표적 세포를 형질도입시킬 수 있는 유효량의 레트로바이러스

스 벡터 또는 입자를 지칭한다. 하나의 실시양태에서, 고역가는 농축이 없이 10^6 TU/ml를 초과한다(TU = 형질 도입 단위).

[0154] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면,

[0155] (a) 본원에서 정의된 바와 같은 핵산 벡터를 포유류 숙주 세포의 배양물에 도입하는 단계;

[0156] (b) 배양물 내에서 포유류 숙주 세포의 내인성 염색체에 통합된 벡터 상에 코딩된 핵산 서열을 갖는 포유류 숙주 세포에 대해 선택하는 단계; 및

[0157] (c) 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자가 생성되는 조건 하에서 포유류 숙주 세포를 추가적으로 배양하는 단계

[0158] 를 포함하는 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자의 제조 방법이 제공된다.

[0159] 전술한 바와 같이, 하나의 실시양태에서, 포유류 숙주 세포는 HEK 293 세포, CHO 세포, 주르카트 세포, KS62 세포, PerC6 세포, 힐라 세포 또는 이들의 유도체 또는 기능적 등가물로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 포유류 숙주 세포는 HEK 293 세포이거나 또는 HEK 293 세포에서 유래된 것이다. 그러한 세포는 부착성 세포주(즉, 이들은 표면에 부착된 단일층으로 성장한다) 또는 서스펜션으로된/비-부착성 세포주(즉, 이들은 배양 배지에서 서스펜션에서 성장한다)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HEK 293 세포는 HEK 293T 세포이다. 적합한 상업적으로 이용 가능한 세포주의 다른 예는 T REX™(라이프 테크놀로지스) 세포주를 포함한다.

[0160] 당업자는 본원에 기재된 방법에서 사용된 조건이 사용된 숙주 세포에 의존 할 것이라는 것을 이해할 것이다. 전형적인 조건, 예를 들어, 사용되는 배양 배지 또는 온도는 당업계에 잘 알려져 있다. 하나의 실시양태에서, 배양 단계는 습윤 조건 하에서 포유류 숙주 세포를 인큐베이션함으로써 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 습윤 조건은 형질감염된 세포를 37 °C, 5 % CO₂에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 배양 단계는 10 %(부피/부피)의 소 태아 혈청(FBS), 혈청-비함유 울트라컬처(UltraCULTURE)™ 배지(론자(Lonza), 카탈로그 번호 12-725F), 또는 프리스타일(FreeStyle)™ 발현 배지(써모 피셔(Thermo fisher), 카탈로그 번호 12338-018)를 함유하는 돌베코의 변형된 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM))에서 선택된 배양 배지를 사용하여 수행된다.

[0161] 하나의 실시양태에서, 방법은 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자를 분리하는 단계를 추가적으로 포함한다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, 분리하는 단계는 필터를 사용하여 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 필터는 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 또는 폴리에테르설폰(PES) 인공 멤브레인과 같은 저-단백질 결합 멤브레인(예를 들어, 0.22 μm 저-단백질 결합 멤브레인 또는 0.45 μm 저-단백질 결합 멤브레인)이다.

[0162] 일단 포유류 숙주 세포 내에 들어가면, 핵산 벡터 상에 존재하는 레트로바이러스 핵산은 내인성 게놈 내의 임의의 단일 좌위에 통합될 수 있다. 통합 단계는 전술한 바와 같이, 예를 들어 선형화 및/또는 공유된 상동성 영역을 사용하여 장려될 수 있다. 재조합 부위는 또한 표적화된 재조합에 사용될 수 있다.

[0163] 표적 유전자가 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 갖는 내인성 염색체에 통합되는 경우, 상기 방법은 레트로바이러스 핵산이 성공적으로 통합된 포유류 숙주 세포를 선택하는 것을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0164] 일단 분리되면, 레트로바이러스 벡터 입자는 생체 내 적용을 위해 농축될 수 있다. 농축 방법은 예를 들어, 초원심분리, 침전 또는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 초원심분리는 작은 규모의 레트로바이러스 벡터 농축에 대한 신속한 방법으로 유용하다. 대신에 음이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 무스탕(Mustang) Q 음이온 교환 멤브레인 카트리지를 사용) 또는 침전(예를 들어, PEG 6000 사용)은 대량의 렌티바이러스 벡터 상등액을 처리하는데 특히 유용하다.

[0165] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에서 정의된 방법에 의해 얻어진 복제 결합있는 레트로바이러스 벡터 입자가 제공된다.

[0166] 본 발명은 이제 다음의 비-한정적인 실시예를 참조하여 더욱 상세히 기재될 것이다.

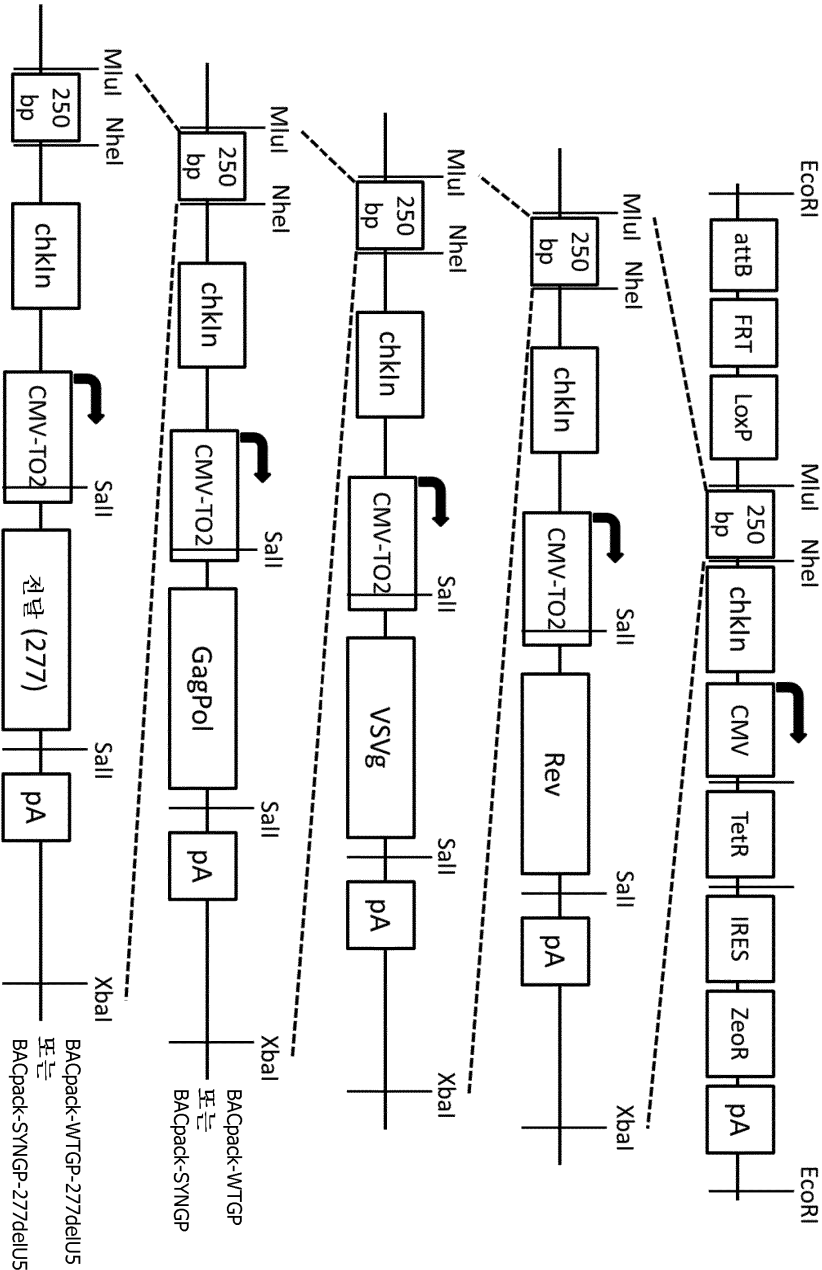
[0167] 실시예

[0168] 실시예 1: 구축물 안내

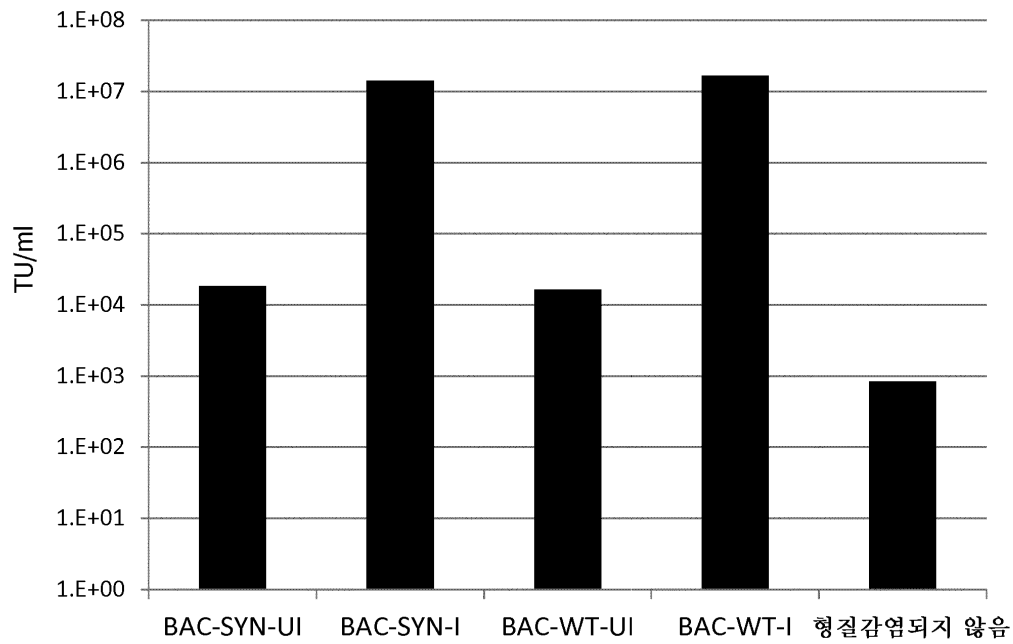
- [0169] 도 1은 BACpack-WTGP-277de1U5 및 BACpack-SYNGP-277de1U5의 구조를 단계적으로 보여주었다. XbaI와 NheI 소화의 양립 가능한 말단 때문에, 렌티바이러스 패키징 유전자는 점진적으로 pSmart BAC 벡터에 적재되었다. GagPol 첨가 시점에서, 야생형 GagPol(WTGP) 또는 코돈 최적화된 GagPol, SYNGP을 함유하는 2 가지 구축물이 제조되었다. 이들은 BACpack-WTGP와 BACpack-SYNGP의 명명법을 각각 부여받았다. 그리고 전달 카세트를 이들 구축물 모두에 적재하여 BACpackWTGP-277de1U5 및 BACpackSYNGP-277de1U5를 생성시켰다.
- [0170] **실시예 2: 안정한 폴리클론 풀의 선택.**
- [0171] 부착성 세포주인 HEK293T를 BACpackSYNGP-277de1U5 또는 BACpackWTGP-277de1U5로 형질감염 시킴으로써 폴리클론의 안정한 형질감염체 풀을 생성시켰다. 성공적인 통합 사건은 제오신으로 선택되었다.
- [0172] 렌티바이러스 벡터를 생성시키는 이들 폴리클론 풀의 능력을 평가하기 위해, 세포는 독시사이클린(I)으로 유도되거나 비-유도된(UI) 상태로 남게되고, 형질감염되지 않은 HEK293T 세포와 비교되었다.
- [0173] 결과는 각 형질감염 조건에서 수거한 렌티바이러스 벡터 상등액의 형질도입 단위 (TU)/mL로 역가를 보여준다. 도 2의 적정 결과로부터, BACpackSYNGP-277de1U5 또는 BACpackWTGP-277de1U5로 생성된 안정한 폴리클론 풀이 현재 일시적인 형질감염 시스템에 필적하는 10e7 TU/mL의 영역 농도에서 렌티바이러스 벡터를 생산할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0174] 결과는 렌티바이러스 생산에 필요한 모든 패키징 유전자를 포함하는 단일 BAC 벡터가 적절한 역가에서 렌티바이러스 벡터를 생산할 수 있는 세포주를 생성할 수 있음을 확인하였다.
- [0175] **실시예 3: 안정한 형질감염 서스펜션 클론 생성.**
- [0176] BAC 기술을 사용하여 세포주를 생산하는 렌티바이러스 벡터를 생성하는 주요 목적은 플랫폼에 새로운 발전을 신속하게 적용한다는 것이다. 이러한 발전에는 전문 세포주의 개조가 포함될 가능성이 있다. 예를 들어, 부착성 세포보다 밀도가 높아질 때 서스펜션 세포에서 생물학적 생산물을 생산하여 수율을 높이는 것이 업계 표준이다. 그러나 현재의 렌티바이러스 벡터 생산 시스템은 부착형 HEK293T 세포보다 서스펜션 세포에서 성취하기가 어려운 높은 형질감염률에 의존한다. 성공적인 통합체의 선택으로 인해 안정한 세포주를 생성할 때 형질감염 효율은 우려할만한 것이 아니기 때문에 BAC 구축물은 서스펜션 세포주를 생성하는 렌티바이러스 벡터를 생산하는 이상적인 해결책이다.
- [0177] 이전에 기재된 바와 같이, BAC 구축물은 부착형 HEK293T 세포로부터 렌티바이러스 벡터 생산 세포주를 생성할 수 있다. BAC 구축물의 유연성을 증명하기 위해, 안정한 형질감염 세포주가 서스펜션 세포주 HEK293 6E로부터 생성되었다. HEK293 6E 세포를 BAC 구축물 BACpackWTGP-277de1U5로 형질감염한 다음 제오신으로 선택하였다. 클론 세포주를 생성하기 위해 클로닝이 뒤따랐다. 도 3의 결과는 안정한 세포주에 의해 생성된 GFP 신호를 보여준다. 이는 전달 벡터 부분에 제오신 내성과 기능적 GFP 발현 카세트가 있음을 나타낸다.
- [0178] 이 결과는 BAC 구축물이 여러 세포주에서 안정한 클론을 생성할 수 있음을 시사한다.
- [0179] **실시예 4: 서스펜션 클론에서의 렌티바이러스 유도**
- [0180] 렌티바이러스 벡터를 생산하는 안정한 서스펜션 클론의 능력을 확인하기 위해 클론 1, 14, 15 및 16을 2 µg/mL의 독시사이클린으로 유도하고 HEK293T 세포의 형질도입에 의해 바이러스 역가를 상등액으로 측정하였다.
- [0181] 도 4의 결과는 각 클론에서 수거한 렌티바이러스 벡터 상등액의 형질도입 단위 (TU)/mL의 역가를 보여준다. 결과는 서스펜션 세포주 HEK293 6E의 BACpackWTGP-277de1U5로의 안정한 형질감염에 의해 생성된 세포주가 현재의 일시적인 형질감염 시스템에 필적할 만한 수율로 렌티바이러스 벡터를 생산할 수 있음을 명확히 보여준다.
- [0182] **실시예 5: 클론의 벡터 역가**
- [0183] 도 4에 기재된 바와 같은 클론 1 및 16을 배양액에서 계대시키고 늦은 시점에서 유도 및 적정함으로써 이들 매우 생산성 있는 클론으로부터 벡터 생산이 안정적인지 여부를 결정하였다. 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이, 이들 클론의 벡터 역가는 실제로 유도 방법에 도입된 부티레이트 나트륨 농도의 증가로 인해 5 번 및 21 번 계대 사이에서 완만하게 증가하였다.
- [0184] 본원에 기재된 실시양태는 본 발명의 모든 양태에 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 본 명세서에 인용된 특허 및 특허 출원을 포함하되 이에 한정되지 않는 모든 출판물은 완전히 개시된 것처럼 본원에 참고 문헌으로 포함된다.

도면

도면1



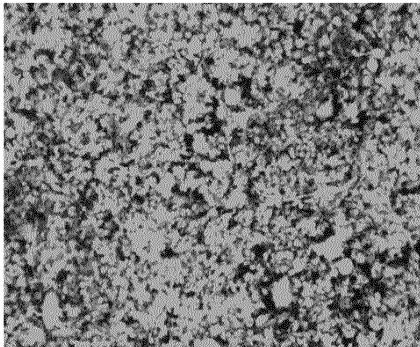
도면2



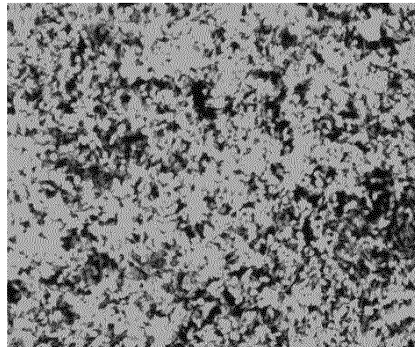
도면3

안정한 세포주의 GFP 형광 이미지

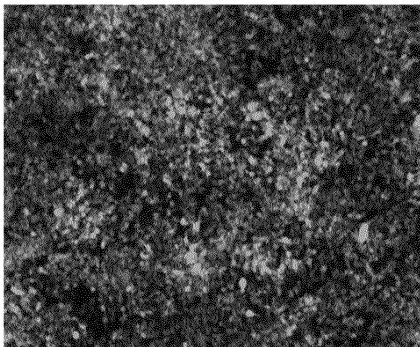
클론 1



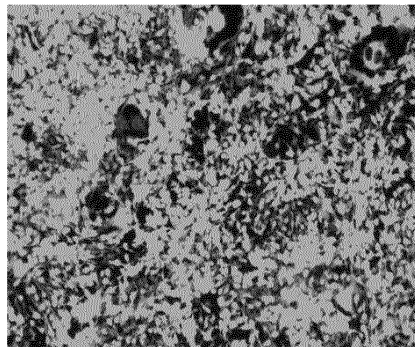
클론 14



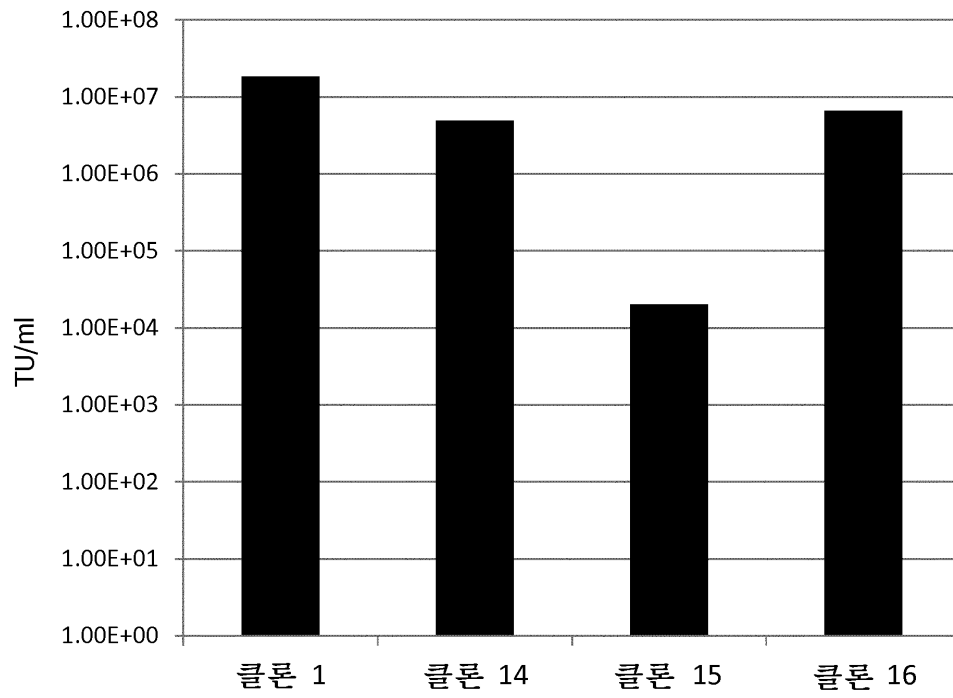
클론 15



클론 16



도면4



도면5

