

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成26年3月6日 (2014.3.6)

【公表番号】特表2013-529894(P2013-529894A)

【公表日】平成25年7月25日 (2013.7.25)

【年通号数】公開・登録公報2013-040

【出願番号】特願2013-503962(P2013-503962)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 P 17/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 33/06 (2006.01)

A 6 1 P 15/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

G 0 1 N 33/569 (2006.01)

C 1 2 N 15/117 (2010.01)

C 0 7 K 14/015 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

A 6 1 K 31/713

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 33/06

A 6 1 P 15/00

A 6 1 P 37/04

G 0 1 N 33/569 L

C 1 2 N 15/00 J

C 0 7 K 14/015

【手続補正書】

【提出日】平成26年1月15日 (2014.1.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

パルボウイルスのウイルス様粒子（VLP）を生成する方法であって、（a）第1の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP1をコードするヌクレオチド配列と、第2の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸分子を含有する宿主細胞を提供するステップと、（b）前記VP1タンパク質およびVP2タンパク質が発現され、集合してVLPになる条件下で前記宿主細胞を維持するステップとを包含する、方法。

【請求項 2】

VP1が、VP2よりも低いアバンダンスで生成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

VP1およびVP2を含有するVLPが生成される、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記組換え核酸分子がバイシストロン性ベクターである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記第1の制御エレメントが前記第2の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、VP2と比較してVP1の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記第1の制御エレメントが、VP1をコードする核酸の上流のTATAボックスの少なくとも一部分の欠失、VP1をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、VP1をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 7】

前記第2の制御エレメントが、ADH2 / GAPDHプロモーター（配列番号19）である、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記宿主細胞が酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記宿主細胞を、VP1およびVP2が生成され、これらのタンパク質が集合してVLPになるのに適した培養条件下で維持する、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記VLPを単離するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記VLPを、宿主細胞の馴化培地、宿主細胞の溶解物、宿主細胞のホモジネート、またはそれらの組み合わせから単離する、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

単離された前記VLPをさらに精製する、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

単離された前記VLPを、スクロースクッション、スクロース勾配遠心分離、クロマトグラフィー法、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される精製方法を用いてさらに精製する、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

請求項1から13までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、VP1およびVP2を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子（VLP）。

【請求項 15】

請求項14に記載のパルボウイルス・VLPを含む免疫原性組成物。

【請求項 16】

第1の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルスVP1をコードするヌ

クレオチド配列と、第 2 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸であって、適切な宿主細胞内に V P 1 をコードする前記配列と V P 2 をコードする前記配列とが同量存在する場合、V P 1 が、V P 2 よりも低いアバンドンスで発現される、組換え核酸。

【請求項 17】

前記第 1 の制御エレメントが弱いプロモーターであり、前記第 2 の制御エレメントが強力なプロモーターである、請求項 16 に記載の組換え核酸。

【請求項 18】

前記第 1 の制御エレメントが前記第 2 の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、V P 2 と比較して V P 1 の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、請求項 17 に記載の組換え核酸。

【請求項 19】

前記修飾が、V P 1 をコードする核酸の上流の T A T A ボックスの少なくとも一部分の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 18 に記載の組換え核酸。

【請求項 20】

前記第 2 の制御エレメントが、A D H 2 / G A P D H プロモーター（配列番号 19）である、請求項 16 に記載の組換え核酸。

【請求項 21】

前記核酸が、D N A または R N A の形態であり、かつ一本鎖または二本鎖のいずれかである、請求項 20 に記載の組換え核酸。

【請求項 22】

プラスミドである、請求項 21 に記載の組換え核酸。

【請求項 23】

前記プラスミドが検出可能なマーカーを含む、請求項 22 に記載の組換え核酸。

【請求項 24】

請求項 16 から 23 までのいずれか一項に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

【請求項 25】

前記組換え核酸が前記宿主細胞のゲノムに組み込まれているか、または染色体外のエレメントに保有されている、請求項 24 に記載の宿主細胞。

【請求項 26】

酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、請求項 25 に記載の宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 1 から 13 までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、V P 1 および V P 2 を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子（V L P）を、診断用キット内の抗原として用いる方法。

【請求項 28】

生物学的試料中の抗パルボウイルス抗体を検出する方法であって、個体から得られた生物学的試料を準備するステップと、前記試料を、請求項 1 から 13 までのいずれか一項に記載の方法によって生成されたパルボウイルス・V L P と組み合わせるステップと、抗体 - V L P 複合体を検出するステップとを包含し、抗体 - V L P 複合体が存在することにより、抗パルボウイルス抗体が前記生物学的試料中に存在することが示される、方法。

【請求項 29】

前記生物学的試料が血液試料または血清試料である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

哺乳動物における免疫応答を上昇させることができる医薬品として使用するための、請求項 16 に記載の組換え核酸を含む免疫原性組成物。

【請求項 31】

前記医薬品は、小児における伝染性紅斑、鎌状赤血球貧血、溶血性貧血、遺伝性球状赤血球症、慢性赤血球形成不全、免疫不全の患者における貧血、成人における持続性の関節症、免疫無防備状態の患者における血球減少症、マラリア原虫に同時感染している間の貧血の悪化、マラリアにおける貧血の悪化、妊娠中の女性における胎児水腫および自然流産からなる群から選択される状態を処置または予防するため使用される、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

パルボウイルス VP1 および / または VP2 に対する免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は、請求項 16 から 23 までのいずれか一項に記載の組換え核酸を含み、該組成物は、個体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 33】

前記組成物は、筋肉内注射によって投与されることを特徴とする、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

パルボウイルス VP1 および / または VP2 に対する免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は、請求項 14 に記載のウイルス様粒子または請求項 15 に記載の免疫原性組成物を含み、該組成物は、個体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 35】

前記組成物は、筋肉内注射によって投与されることを特徴とする、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

可溶性の VP1 が、可溶性の VP2 よりも低いアバンダンスで生成される、請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明は、本明細書に記載の方法に従って生成される、VP1 および VP2 を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を、治療目的および診断目的で、例えば診断用キット内の抗原として用いる方法にも関する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

パルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を生成する方法であって、(a) 第 1 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス VP1 をコードするヌクレオチド配列と、第 2 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス VP2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸分子を含有する宿主細胞を提供するステップと、(b) 前記 VP1 タンパク質および VP2 タンパク質が発現され、VLP に集合する条件下で前記宿主細胞を維持するステップとを包含する、方法。

(項目 2)

VP1 が、VP2 よりも低いアバンダンスで生成される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

VP1 および VP2 を含有する VLP が生成される、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記組換え核酸分子がバイシストロン性ベクターである、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記第 1 の制御エレメントが前記第 2 の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、VP2 と比較して VP1 の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

前記第 1 の制御エレメントが、V P 1 をコードする核酸の上流の T A T A ボックスの少なくとも一部分の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 7)

前記第 2 の制御エレメントが、A D H 2 / G A P D H プロモーター（配列番号 1 9 ）である、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記宿主細胞が酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記宿主細胞を、V P 1 および V P 2 が生成され、これらのタンパク質が V L P に集合するのに適した培養条件下で維持する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記 V L P を単離するステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記 V L P を、宿主細胞の馴化培地、宿主細胞の溶解物、宿主細胞のホモジネート、またはそれらの組み合わせから単離する、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

単離された前記 V L P をさらに精製する、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

単離された前記 V L P を、スクロースクッション、スクロース勾配遠心分離、クロマトグラフィー法、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される精製方法を用いてさらに精製する、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

項目 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、V P 1 および V P 2 を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子（V L P）。

(項目 1 5)

項目 1 4 に記載のパルボウイルス・V L P を含む免疫原性組成物。

(項目 1 6)

第 1 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス V P 1 をコードするヌクレオチド配列と、第 2 の制御エレメントに作動可能に連結しているパルボウイルス V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む組換え核酸であって、適切な宿主細胞内に V P 1 をコードする前記配列と V P 2 をコードする前記配列とが同量存在する場合、V P 1 が、V P 2 よりも低いアバンダンスで発現される、組換え核酸。

(項目 1 7)

前記第 1 の制御エレメントが弱いプロモーターであり、前記第 2 の制御エレメントが強力なプロモーターである、項目 1 6 に記載の組換え核酸。

(項目 1 8)

前記第 1 の制御エレメントが前記第 2 の制御エレメントの改変体であり、前記改変体が、V P 2 と比較して V P 1 の生成を転写的に、翻訳的に、または転写的かつ翻訳的に減少させる修飾を含む、項目 1 7 に記載の組換え核酸。

(項目 1 9)

前記修飾が、V P 1 をコードする核酸の上流の T A T A ボックスの少なくとも一部分の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の接合部位の欠失、V P 1 をコードする核酸の上流の転写開始部位もしくは転写終止部位の導入、またはそれらの組み合わせを含む、項目 1 8 に記載の組換え核酸。

(項目 2 0)

前記第 2 の制御エレメントが、A D H 2 / G A P D H プロモーター（配列番号 1 9 ）で

ある、項目 1 6 に記載の組換え核酸。

(項目 2 1)

前記核酸が、DNA または RNA の形態であり、かつ一本鎖または二本鎖のいずれかである、項目 2 0 に記載の組換え核酸。

(項目 2 2)

プラスミドである、項目 2 1 に記載の組換え核酸。

(項目 2 3)

前記プラスミドが検出可能なマーカーを含む、項目 2 2 に記載の組換え核酸。

(項目 2 4)

項目 1 6 から 2 3 までのいずれか一項に記載の組換え核酸を含む宿主細胞。

(項目 2 5)

前記組換え核酸が前記宿主細胞のゲノムに組み込まれているか、または染色体外のエレメントに保有されている、項目 2 4 に記載の宿主細胞。

(項目 2 6)

酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、トリの細胞、細菌、テトラヒメナの細胞またはそれらの組み合わせである、項目 2 5 に記載の宿主細胞。

(項目 2 7)

項目 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載の方法に従って生成される、VP 1 および VP 2 を含有するパルボウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を、診断用キット内の抗原として用いる方法。

(項目 2 8)

生物学的試料中の抗パルボウイルス抗体を検出する方法であって、個体から得られた生物学的試料を準備するステップと、前記試料を、項目 1 から 1 3 までのいずれか一項に記載のパルボウイルス・VLP と組み合わせるステップと、抗体 - VLP 複合体を検出するステップとを包含し、抗体 - VLP 複合体が存在することにより、抗パルボウイルス抗体が前記生物学的試料中に存在することが示される、方法。

(項目 2 9)

前記生物学的試料が血液試料または血清試料である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

項目 1 6 に記載の組換え核酸を含む免疫原性組成物を、哺乳動物における免疫応答を上昇させることができる医薬品として使用する方法。

(項目 3 1)

前記医薬品を使用して、小児における伝染性紅斑、鎌状赤血球貧血、溶血性貧血、遺伝性球状赤血球症、慢性赤血球形成不全、免疫不全の患者における貧血、成人における持続性の関節症、免疫無防備状態の患者における血球減少症、マラリア原虫に同時感染している間の貧血の悪化、マラリアにおける貧血の悪化、妊娠中の女性における胎児水腫および自然流産からなる群から選択される状態を処置または予防する、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 2)

パルボウイルス VP 1 および / または VP 2 に対する免疫応答を誘導する方法であって、個体に、有効量の項目 1 6 から 2 3 までのいずれか一項に記載の組換え核酸を投与し、それによって、免疫応答を誘導するステップを包含する、方法。

(項目 3 3)

前記組換え核酸を筋肉内注射によって投与する、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 4)

パルボウイルス VP 1 および / または VP 2 に対する免疫応答を誘導する方法であって、個体に、項目 1 4 に記載のウイルス様粒子または項目 1 5 に記載の免疫原性組成物を有効量で投与し、それによって、免疫応答を誘導するステップを包含する、方法。

(項目 3 5)

前記ウイルス様または免疫原性組成物を筋肉内注射によって投与する、項目 3 4 に記載の方法。