

【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19年9月6日(2007.9.6)

【公表番号】特表2003-505033(P2003-505033A)

【公表日】平成15年2月12日(2003.2.12)

【出願番号】特願2001-511201(P2001-511201)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	35/12	(2006.01)
A 6 1 K	47/42	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/015	(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 P	21/00	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	48/00	
C 0 7 K	14/015	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/00	C
C 1 2 N	5/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月18日(2007.7.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】アデノ随伴ウイルス(AAV)及び/又はAAV粒子を精製するための、AAVの構造タンパク質であって、構造タンパク質がウイルスのクロマトグラフィー特性を変化させる突然変異を少なくとも1つ含むことを特徴とし、

(i) 突然変異(単数又は複数)が、該構造タンパク質のY K Q I S S Q S G A、Y L T L N N G S Q A、Y Y L S R T N T P S、E E K F F P Q S G V、N P V A T E Q Y G S、L Q R G N R Q A A T、N V D F T V D T N Gから選択された配列における少なくとも1つのアミノ酸の前及び/又は後に位置され、及び/又は

(ii) 該突然変異(単数又は複数)が該構造タンパク質のN末端に位置され、及び/又は

(iii) 該突然変異(単数又は複数)がVP1-コーディング核酸のXhoI切断部位における1つ以上の挿入によってもたらされ、及び/又は

(iv) 該突然変異(単数又は複数)が、VP1-コーディング核酸のBsrBI切断部

位における 1 つ以上の挿入によってもたらされ、及び / 又は

(v) 該突然変異(単数又は複数)が、V P 1 - コーディング核酸の B s r B I - H i n d I I 切断部位間の 1 つ以上の欠失と、1 つ以上の挿入とによってもたらされ、及び / 又は

(vi) 該突然変異(単数又は複数)が、V P 1 - コーディング核酸の X h o I - X h o I 切断部位間の 1 つ以上の欠失によってもたらされ、及び / 又は

(vii) 該突然変異(単数又は複数)が、V P 1 - コーディング核酸の B s r B I - H i n d I I 切断部位間の 1 つ以上の欠失によってもたらされる、構造タンパク質。

【請求項 2】 クロマトグラフィー特性の変化が精製の改良、特にウイルス、好ましくはウイルス粒子のより高いタイターまでの濃縮、より高い純度までの精製及び / 又はより高い効率の精製を可能にすることを特徴とする、請求項 1 記載の構造タンパク質。

【請求項 3】 突然変異がウイルス感染性の無視できるほどの低減をもたらすにすぎないことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の構造タンパク質。

【請求項 4】 突然変異した構造タンパク質が粒子形成することができるることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【請求項 5】 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5 及び / 又は A A V 6 に由来する、並びにこれらに、特に A A V 2 に由来する他の A A V 血清型に由来することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【請求項 6】 請求項 1 の (i) 及び / 又は (ii) における突然変異が、点突然変異、複数個のアミノ酸の突然変異、1 つ以上の欠失、特に 1 つ以上の挿入、又は前記修飾の組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【請求項 7】 好ましくはアフイニティクロマトグラフィーに適した機能的配列のアミノ酸が挿入されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【請求項 8】 挿入されるアミノ酸配列が受容体のリガンド若しくはリガンドの受容体、抗体若しくは抗体の一部、特に抗体エピトープ、抗原若しくは抗原エピトープ、ホルモン、ホルモン受容体、酵素、酵素基質、レクチン、糖支持アミノ酸、特にヒスチジン富化ペプチド(H i s タグ)、多重荷電ペプチド、グルタチオン S - トランスフェラーゼ(G S T タグ)、抗体の F c 部分、免疫グロブリン結合ドメイン、例えばプロテイン A 若しくはプロテイン G 若しくはこれらの一部、レシチン、核酸結合部位、ヘパリン結合部位、特異性リガンド、特異性受容体、インテグリン、サイトカイン又はサイトカイン、インテグリン若しくは成長因子の受容体結合ドメイン、細胞表面受容体に結合する一本鎖抗体、細胞表面構造に対する抗体、エピトープ及び / 又は抗体結合構造から選択されることを特徴とする、請求項 7 記載の構造タンパク質。

【請求項 9】 配列 QAGTFALRGDNPQG を有するペプチドが挿入されることを特徴とする、請求項 7 又は 8 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【請求項 10】 A A V 粒子の形態、特に A A V カプシドの形態である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の構造タンパク質。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 3】

A A V カプシドは 3 つの異なるタンパク質 : V P 1、V P 2 及び V P 3 から成り、これらの相対的割合は 5 % V P 1、5 % V P 2 及び 9 0 % V P 3 である。A A V カプシド遺伝子は A A V ゲノムの右手端部に位置され、異なる開始コドンと、2 つの異なってスプライスされた転写物(transcript)とを用いて、同じオーブンリーディングフレーム(O R F)の配列をオーバーラップさせることによって、コードされる。V P 1 遺伝子は V P 2 遺伝子配列全体を含有し、この V P 2 遺伝子配列は、特異的な N 末端領域を有する V P

3 遺伝子配列全体を含有する。オーバーラッピングリーディングフレームが 3 種類の AA V カプシドタンパク質の全てをコードするという事実が、全てのカプシドタンパク質の、程度の差こそあれ、必須の発現の原因である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

好ましい実施態様では、例えば、5～30 アミノ酸、好ましくは 8～20 アミノ酸、特に 10～18 アミノ酸を有するペプチドが挿入される。ペプチドは例えば配列 QAGTFALRGD NPQG 又はこれと高度にホモロジーである配列を有する。この特に好ましいリガンドは、ラミニンファミリーの鎖のコア配列からの 14 アミノ酸の長さを有するペプチドである P1 ペプチドである。この配列は例えば、特にウイルス粒子、例えばアデノウイルスのエンドサイトーシスを仲介する、インテグリン受容体を認識するために充分である。P1 ペプチドは、その形態（線状又は環状）に拘わらず、インテグリン受容体に結合する。本発明によると、P1 ペプチドのコーディング DNA 配列は、例えばヘルパー・プラスミド上に位置される、AAV の構造タンパク質をコードする遺伝子中に組み込まれる。変異体ヘルパー・プラスミドによるパッケージングは、カプシド中に P1 を含む組換え AAV (rAAV-P1) を生じる。このペプチドの挿入に関して、これらの AAV 粒子はカチオン交換体から非修飾 AAV 粒子に比べて低い伝導率で溶離されるので、条件に依存して、改良された分離（例えば、野性型から）と精製を可能にすることを示すことができた。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

突然変異（単数又は複数）は好ましくはウイルス表面に位置される。表面に位置される構造タンパク質領域の決定に関して、本発明によると、意外にも、CPV と AAV2 の配列及び構造が匹敵するものであることが判明した。それ故、好ましくは、例えばパルボウイルス B19 又は CPV（イヌパルボウイルス）のようなパルボウイルスの既知結晶構造に頼って、ホモロジー比較によって、ウイルス表面に位置するタンパク質ドメインを同定することが可能である。それ故、本発明によると、例えば、CPV と AAV2 とのコンピューター補助比較、及びパルボウイルス B19 と AAV2 とのコンピューター補助比較が、意外にも、配列が変化して、即ち、低いホモロジーを有して、ウイルス表面に位置すると推定される、VP3 中のループの再現可能な同定を生じた。体液性免疫応答に対する抗原は抗体に、したがってウイルス表面にアクセス可能でなければならないので、これらのループは突然変異のための好ましい候補である。このように、CPV VP2 カプシドタンパク質の既知結晶構造（例えば、Luo M. (1988), J. Mol. Biol., 200, 209-211; Wu and Rossmann (1993), J. Mol. Biol., 233, 231-244）は、ウイルスカプシド表面上に暴露され、局部的アミノ酸配列に基づいて例えばペプチド配列の挿入を克服するために充分にフレキシブルである領域を見出すために、タンパク質の二次構造における AAV2 VP3 との大きな類似性に基づいてパターンと見なされた。この場合に、カプシドを不安定化すると考えられる、AAV2 カプシドタンパク質の二次構造要素を選択しないように注意した。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0031】**

好ましい実施態様では、突然変異（単数又は複数）は構造タンパク質のN末端に位置される、この理由は、例えばパルボウイルスC P V及びB 1 9では、N末端が細胞表面に位置されることが判明しているからである。

【手続補正6】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0032****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0032】**

構造タンパク質の表面に位置する領域を決定するための他の可能性は、異なるA A V血清型からのカプシドコーディング核酸配列を比較することである。このために、例えばA A V 2 の可能なカプシド形態の構造分析のために、例えばA A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5又はA A V 6のような、異なるA A V血清型からの既知DNA配列を用いることが可能であり、この場合に、最初から、可能な三次構造を算出して、一般に知られたアミノ酸性質に基づいて配列領域を内側又は外側カプシド領域に割り当てることが可能である。したがって、本発明によると、例えば、ペプチドを挿入して、それらをウイルス表面上に発現させることを可能にする、A A V 2 カプシドのV P 3 領域における可能な挿入部位を見出すことが可能であった（以下参照）。

【手続補正7】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0034****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0034】**

本発明の他の好ましい実施態様では、62アミノ酸を含むV P 1 コーディング核酸のX h o I - X h o I 切断部位間の1つ以上の欠失によって、突然変異（単数又は複数）がもたらされる（Hermonat, P.L. et al. (1984), J. Virol., 51, 329-339）。他の好ましい、対応する実施態様では、上記欠失内に位置され、29アミノ酸を含むV P 1 コーディング核酸のB s r B I - H i n d I I 切断部位間に、欠失（単数又は複数）が位置される。この欠失はR e p 遺伝子とのオーバーラップを有さないので、パッケージング機構に本質的に影響を及ぼさないという利点を有する。

【手続補正8】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0035****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0035】**

他の好ましい実施態様では、V P 3 構造タンパク質(Rutledge, E.A. et al. (1998) 上記文献)中のYKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT, EQYGS, L QRGN RQAAT, NVDFT VDTNGから選択された配列における少なくとも1つのアミノ酸の前及び/又は後に1つ以上の挿入が存在する、この理由はこれらの部位がループの暴露部位に位置され、この場合にはV P 3 構造が変化する危険性が低いからである。

【手続補正9】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0046****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0046】**

V P 1 における突然変異

(a) V P - 1 の X h o I - X h o I 切断部位間の欠失 (X h o ; 62 アミノ酸、 AA) (Hermonat et al. (1984) Journal of Virology 51, 329-339)、

(b) 上記欠失 (a) 内に位置され、 29 AA を含む、 V P - 1 の B s r B I - H i n d I I 切断部位間の欠失 (B H) ;

(c) B s r B I と H i n d I I 間の欠失と、 リガンド (P 1 ペプチド) の挿入 (B H + L) ; 及び

(d) B s r B I 切断部位におけるリガンド (P 1 ペプチド) の純粹な挿入 (B + L) 。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

(A A V 2 の V P - 1 における N 末端の始点からのアミノ酸 (AA) 後に数えられる AA 数に応じて名付けられ、 各場合にその N 末端に位置される 5 アミノ酸とその C 末端に位置される 5 アミノ酸とによって隣接される ; その後に挿入が導入される AA は、 太字で示される) 。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

同様に、 太字の AA の次の位置される、 直接隣接する 5 AA 中に挿入を導入することも可能である、 この理由はこれらが A A V 2 カプシド中のループ内に同様に位置されるからである。