

【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 2 月 1 日 (2007.2.1)

【公表番号】 特表 2006-509524(P2006-509524A)
 【公表日】 平成 18 年 3 月 23 日 (2006.3.23)
 【年通号数】 公開・登録公報 2006-012
 【出願番号】 特願 2004-560855(P2004-560855)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】 平成 18 年 12 月 6 日 (2006.12.6)

【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】

アルファウイルス・レプリコン粒子 (A R P s) の製造方法であって、該方法が以下のステップ：

(a) アルファウイルス・レプリコン核酸を宿主細胞中に導入し、該レプリコン核酸は少なくともウイルス・パッケージング・シグナル及び該アルファウイルス・レプリコン核酸中で発現できる少なくとも 1 の異種性コード配列を含み、ここで改変宿主細胞を作り出すために該宿主細胞が少なくとも 1 のヘルパー機能を含み；

(b) 上記少なくとも 1 のヘルパー機能の発現を許容し、上記アルファウイルス・レプリコン核酸の複製及び該アルファウイルス・レプリコン核酸のパッケージングを許容する条件下で上記改変宿主細胞を培養して、A R P s を形成し、ここで当該 A R P s がヘパリン結合性 A R P s であり；

(c) ステップ (b) の後に上記改変宿主細胞を、0.2 M ～ 5 M のイオン強度を有する水溶液と接触して、上記 A R P s を該水溶液中に放出させて、A R P を含む溶液を作り出し；

(d) ステップ (c) の A R P を含む溶液から A R P s を回収するステップを含む前記方法。

【請求項 2】

1 m l あたり $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ のステップ (a) に記載の宿主細胞における前記少なくとも 1 のヘルパー機能が、該宿主細胞のゲノム中に安定して組み込まれた核酸配列によりコードされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記宿主細胞中の前記少なくとも 1 のヘルパー機能が、前記アルファウイルス・レプリコン核酸を結合できるキャプシドタンパク質をコードする少なくとも 1 のヘルパー核酸、及び少なくとも 1 のアルファウイルス糖タンパク質に基いて導入され、ここで該アルファウイルス糖タンパク質が、該アルファウイルス・レプリコン核酸及び該キャプシドタンパク質と会合し、ここで該少なくとも 1 のヘルパー核酸分子が該アルファウイルス・レプリコン核酸と共に該宿主細胞中へと導入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 のヘルパー機能が、少なくとも 2 個のヘルパー核酸分子によりコードされ、ここで該 2 個のヘルパー核酸分子の各々が、少なくとも 1 のウイルス・ヘルパー機能をコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記イオン強度が 0.5 M ~ 5 M である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 のヘルパー機能が、DNA 分子中にコードされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アルファウイルス・レプリコン核酸が、電気穿孔により前記宿主細胞中に導入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記宿主細胞が、1 ml あたり $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ の濃度で電気穿孔混合液中に存在する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記宿主細胞が、1 ml あたり $5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ の濃度で電気穿孔混合液中に存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のステップ(c)の前に、細胞洗浄ステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アルファウイルスが、ベネズエラ・ウマ脳炎ウイルスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞洗浄溶液が塩を含まず、かつデオキシリボヌクレアーゼをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ヘルパー核酸が、キャップなし RNA 分子である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 14】

アルファウイルス・レプリコン RNA 及び第一ヘルパー RNA 分子及び第二 RNA ヘルパー分子が、1 : 0.3 : 0.3 ~ 1 : 20 : 20 の比で電気穿孔混合液に存在する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 15】

前記比が、1 : 0.5 : 0.5 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記比が、1 : 5 : 5 である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

アルファウイルス・レプリコン粒子の製造方法であって、アルファウイルス・レプリコン・ベクター及び 1 以上のヘルパー核酸分子を、電気穿孔を介してアルファウイルス-許容状態細胞へと導入することを含み、ここで、電気穿孔の間の培養培地中の該アルファウイルス許容状態細胞の濃度が、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 細胞/ml であり、かつ電気穿孔前に該細胞に加えられた該アルファウイルス RNA レプリコン・ベクターの濃度が、約 35 $\mu\text{g/ml}$ である、前記方法。

【請求項 18】

前記電気穿孔が、電気穿孔チャンバー内で行われ、ここで電極間のギャップが 0.4 ~ 1.0 cm である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヘルパー機能が、全てのアルファウイルス構造タンパク質をコードするシングル DNA ヘルパー分子内にコードされる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 DNA ヘルパー分子の濃度が、少なくとも $100 \mu\text{g/ml}$ である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アルファウイルス-許容状態細胞が、ベロ細胞である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ(d)の後に、イオン交換、ヘパリン・アフィニティー・クロマトグラフィー、アフィニティー又は疎水性クロマトグラフィーステップが行われる、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記アルファウイルスが、弱毒化アルファウイルスである、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記アルファウイルスが、ベネズエラ・ウマ脳炎ウイルス(V E E)である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

前記塩洗浄ステップにおいて前記塩が、 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酢酸アンモニウム、及び炭酸水素アンモニウムである、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

アルファウイルス・レプリコン粒子(A R P s)の製造方法であって、該方法が以下のステップ:

(a) アルファウイルス・レプリコン核酸を宿主細胞中へ導入し、該レプリコン核酸が、少なくともウイルス・パッケージング・シグナルと該アルファウイルス・レプリコン核酸中に発現する少なくとも 1 の異種性コード配列を含み、ここで改変宿主細胞を作り出すために該宿主細胞が少なくとも 1 のヘルパー機能を含み、ここで上記レプリコン核酸が、 1 ml あたり $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 細胞濃度で、宿主細胞を電気穿孔することにより該宿主細胞中に導入され;

(b) 上記少なくとも 1 のヘルパー機能の発現を許容し、上記アルファウイルス・レプリコン核酸の複製及び該アルファウイルス・レプリコン核酸のパッケージングを許容する条件下で上記改変宿主細胞を培養して、A R P s を形成し、ここで、当該 A R P s がヘパリン結合性 A R P s であり;

(c) ステップ(b)の後に上記改変宿主細胞を、 $0.2 \text{ M} \sim 5 \text{ M}$ のイオン強度を有する水溶液と接触して、上記 A R P s を該水溶液中に放出させて、A R P を含む溶液を作り出し;

(d) ステップ(c)の A R P を含む溶液から A R P s を回収するステップを含む前記方法。

【請求項 27】

前記宿主細胞が、 1 ml あたり $5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ の濃度で、電気穿孔混合液中に存在する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 28】

前記アルファウイルスが、ベネズエラ・ウマ脳炎ウイルス(V E E)である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ヘルパー核酸が、キャップなし RNA 分子である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の方法により製造されるアルファウイルス・レプリコン粒子調製品。