

【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 8 月 2 日 (2007.8.2)

【公表番号】特表 2007-500017 (P2007-500017A)

【公表日】平成 19 年 1 月 11 日 (2007.1.11)

【年通号数】公開・登録公報 2007-001

【出願番号】特願 2006-533645 (P2006-533645)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 7/00 (2006.01)**

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**A 6 1 K 39/12 (2006.01)**

**A 6 1 K 39/00 (2006.01)**

**A 6 1 P 11/00 (2006.01)**

**A 6 1 K 39/155 (2006.01)**

**A 6 1 K 39/205 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 7/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 11/00

A 6 1 K 39/155

A 6 1 K 39/205

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 6 月 7 日 (2007.6.7)

【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】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

(a) ウイルス cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで該宿主細胞は N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質を発現し、一過性にトランスフェクトされた プラスミド 発現ベクターから RNA ポリメラーゼを一過性に発現するところの工程；および

(b) 該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項 2】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

ウイルス cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたは

アンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクター、並びに R N A ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、該ベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を可能とするのに十分な条件下で、好適な宿主細胞中に導入する、ここで R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターはプラスミドである、工程；

該宿主細胞をブランクエキスパンション細胞を含む共培養物中に移す工程；および

該共培養物中から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

【請求項 3】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

( a ) ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターを

- ( 1 ) R N A ポリメラーゼ、
- ( 2 ) N タンパク質、
- ( 3 ) P タンパク質、および
- ( 4 ) L タンパク質、

を一過性に発現させる宿主細胞であって、R N A ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質のそれぞれが一過性にトランスフェクトされた プラスミド 発現ベクターから発現される宿主細胞中に導入する工程；および

( b ) 該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

【請求項 4】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクター、並びに R N A ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞中に導入する、ここで R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターはプラスミドである、工程；

該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

【請求項 5】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成するための組成物であって、

( a ) 好適な宿主細胞においてウイルス c D N A からのウイルス R N A 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクター；

( b ) 宿主細胞にて

- ( 1 ) N タンパク質、
- ( 2 ) P タンパク質、および

( 3 ) L タンパク質、  
をエンコードし、その発現を指令する、1つまたはそれ以上の補助ベクター；および、  
( c ) R N A ポリメラーゼをエンコードし且つ宿主細胞中で一過性に発現させる一過性プラスミド発現ベクター、  
を含む組成物。

【請求項 6】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

( a ) ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターを、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質を発現し且つ一過性にトランスフェクトされたプラスミド発現ベクターから R N A ポリメラーゼを一過性に発現する宿主細胞中に導入する工程；および

( b ) 該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

【請求項 7】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクター、並びに R N A ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、該ベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を可能とするのに十分な条件下で、好適な宿主細胞中に導入する、ここで R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターはプラスミドである、工程；

該宿主細胞をブランクエキスポーション細胞を含む共培養物中に移す工程；および

該共培養物中から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

【請求項 8】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

( a ) ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターを、

- ( 1 ) R N A ポリメラーゼ
- ( 2 ) N タンパク質、
- ( 3 ) P タンパク質、および
- ( 4 ) L タンパク質

を一過性に発現する宿主細胞であって、R N A ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質のそれぞれが一過性にトランスフェクトされた発現ベクターから発現される宿主細胞中に導入する、ここで R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされた発現ベクターはプラスミドである、工程；および

( b ) 該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、  
を含む方法。

## 【請求項 9】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルス cDNA 発現ベクターからウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター、並びに RNA ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞中に導入する、ここで RNA ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターはプラスミドである、工程；および

該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する工程、を含む方法。

## 【請求項 10】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成するための組成物であって、

(a) ウイルスの cDNA からのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター；

(b) 該宿主細胞にて

(1) N タンパク質、

(2) P タンパク質、および

(3) L タンパク質

をエンコードし、一過性発現を指令する 1 つまたはそれ以上の発現ベクター；および

(c) 宿主細胞中にて RNA ポリメラーゼをエンコードし、その宿主細胞中で一過性発現を指令する一過性 プラスミド 発現ベクター、を含む組成物。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

図 3A と 3B (パネル A - C) (配列番号 2 - 53、各々、出現した順番通り) は、異種のネガティブ鎖 RNA ウイルスで同定された種々の変異を、弱毒性または他の所望の表現型変化を生じさせるために本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス中に (この場合 HPIV 1 構築物中に) 組み込むことができることを実証する。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

【表 2 - 1】

表 2  
RSV cDNA 変異  
wt RSV および RSV cDNA 変異体の配列比較

変異	遺伝子	ヌクレオチド位置	制限部位	ヌクレオチド配列	配列番号	アミノ酸位置	アミノ酸変化
cp	N	1938		wt. AAA TCA GTT AAA	54	267	V>I
				mut. AAA TCA ATT AAA	55		
cp	F	6314		wt. ATA TCA AAT ATA GAA ACT GTG	56	218	E>A
				mut. ATA TCA AAT ATA GCA ACT GTG	57		
cp	F	7229		wt.		523	T>I
cp	L	9454	AccI (喪失)	wt. GGA GAT TGT ATA	58	319	C>Y
				mut. GGA GAT TAC ATA	59		
cp	L	13566	Sac I	wt. CAT ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAA TTA GAA	60	1690	H>Y
				mut. TAC ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAG CTC GAA	61		
L248	L	10990		wt. ACT CAT GCT GAA GCA GAT	62	831	Q>L
				mut. ACT CAT GCT TTA GCA GAT	63		
L404	L	12047	Xho I	wt. CTT CCA TTG GAT TGT AAC	64	1183	D>E
				mut. CTT CCA CTC GAG TGT AAC	65		
L530	L	10061	Bst EII	wt. CGT TTC TAT CGT GAG TTT CGG TTG CCT	66	521	F>L
				mut. CGT CTA TAT CGT GAG TTT CGG TTA CCT	67		
L955	L	8626	Na	wt. CTC AAA AAT GAT	68	43	N>I
				mut. CTC AAA ATA GAT	69		
L1009	L	12003	Bst XI	wt. GCC ACT GAG ATG ATG AGG	70	1169	M>V
				mut. GCC ACT GAG ATG GTC AGG	71		
L1030	L	12459	Bsu 36I	wt. ACC CTT GGG TTA ACA TAT GAA	72	1321	Y>N
				mut. ACC TTA GGG TTA ACA AAT GAA	73		
M2 404	M2	7606	Xba I	wt. GGGGCAAAAT ATG TCA CGA	74	na	na
				mut GGGGCAAAAC ATG TCA CGA	75		
				wt. GGGGCAAAAT ATG TCT AGA	76		

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 1 3 】

【表 2 - 2】

変異	遺伝子	ヌクレオチド位置	制限部位	ヌクレオチド配列	配列番号	アミノ酸位置	アミノ酸変化
Site	P NS2/ N	2999, 3002 1099	<b>Aat II</b> <b>Afl II</b>	wt. CCA ACA TCA mut. CCG ACG TCA	<u>77</u> <u>78</u>	na	na
				wt. TAATTTAAAA . TTAAGGAGAGAT rA2 TAATTTAAAACTTAAGGAGAGAT	<u>79</u> <u>80</u>		
Site	N	1139-40	Nco I Pst I (消失)	wt. GGGGCAAAATACAAAG ATG GCT rA2 GGGGCAAAATACAACC ATG GCT	<u>81</u> <u>82</u>	na	na
				wt. ATC CTC ACT GCA GTC rA2 ATC CTC ACC GCA GTC	<u>83</u> <u>84</u>		
Site	G/F IGR	5612, 16	Sfu I	wt. TTATCAGAAAAAGCCATGACCAACTT rA2 TTATCAGAAAAAGCCCTTGACCAACTT	<u>85</u> <u>86</u>	na	na
				wt. ACGCGAAAAAATGCGTACAACAAACT rA2 ACGGGAAAAAATGCGTACAACAAACT	<u>87</u> <u>88</u>		
4C	リーダー	4	na	wt. TAGTTACAAAAAAGGAAAGGGT rA2 TAGTTACAAAAA . GGAAAGGGT	<u>89</u> <u>90</u>	na	na
7 vs 8 As	P	3243	na			na	na