

【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) ウィルスcDNA発現ベクターからのウィルス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ィルス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：

ウィルスcDNA発現ベクターからのウィルス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、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、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；

該宿主細胞をブラー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RNA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) ウィルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA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、

- (1) RNA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、RNA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RNA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、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；

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5】

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組成物であって、

(a) 好適な宿主細胞においてウイルス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) 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) RNA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RNA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cDNA発現ベクターからのウイルスRNA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、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RNA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RNA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発現ベクターからのウイルスRNA転写物の合成を指令するため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、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；

該宿主細胞をブラー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増殖 - または複製 - 欠損、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RNA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発現ベクターを、

(1) RNA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、RNA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RNA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RNA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 R N A ウィ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 ウィ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；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 R N A ウィ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 R N A ウィルスを生成するための組成物であって、

(a) ウィルスの 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増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 R N A ウィ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) 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 R N A 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】0 0 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 2】

図 3 A と 3 B (パネル A - C) (配列番号 2 - 5 3、各々、出現した順番通り) は、異種のネガティブ鎖 R N A ウィ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 R N A ウィルス中に (この場合 H P I V 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】0 1 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 2】

【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	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	mut. AAA TCA ATT AAA	54 55	267	V>I
cp	F	6314		wt. ATA TCA AAT ATA GAA ACT GTG	mut. ATA TCA AAT ATA GCA ACT GTG	56		
cp	F	7229		wt. mut.		57	218	E>A
cp	L	9454	AccI(喪失)	wt. GGA GAT TGT ATA	mut. GGA GAT TAC ATA	58 59	319	C>Y
cp	L	13566	<i>Sac I</i>	wt. CAT ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAA	mut. TAC ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAG CTC GAA	60 61	1690	H>Y
L248	L	10990		wt. ACT CAT GCT CAA GCA GAT	mut. ACT CAT GCT TTA GCA GAT	62		
L404	L	12047	<i>Xba I</i>	wt. CTT CCA TTG GAT TGT AAC	mut. CTT CCA CTC GAG TGT AAC	64 65	1183	D>E
L530	L	10061	<i>Bst EII</i>	wt. CGT TCT TAT CGT GAG TTT CGG TTG CCT	mut. CGT CTA TAT CGT GAG TTT CGG TTA CCT	66 67	521	F>L
L955	L	8626	Na	wt. CTC AAA AAT GAT	mut. CTC AAA ATA GAT	68	43	N>I
L1009	L	12003	<i>Bst XI</i>	wt. GCC ACT GAG ATG ATG AGG	mut. GCC ACT GAG ATG GTC AGG	70 71	1169	M>V
L1030	L	12459	<i>Bsu 36I</i>	wt. ACC CTT GGG TTA ACA TAT GAA	mut. ACC TTA GGG TTA ACA AAT GAA	72 73	1321	Y>N
M2 404	M2	7606	<i>Xba I</i>	wt. GGGCAAAAT ATG TCA CGA	mut. GGGCAAAAC ATG TCA CGA	74 75	na	
				wt. GGGCAAAAT ATG TCT AGA		76	na	

【手続補正4】

【補正対象書類の】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	2999, 3002	Aat II	wt. CCA ACA TCA mut. CCG ACG TCA	77 78	na	na
Site	NS2/ N	1099	Afl II	wt. TAATTAAAA. TTAAGGAGAGAT rA2 TAATTAAACTTAAGGAGAGAT	79 80	na	na
Site	N	1139-40	Nco I	wt. GGGCAAATACAAG ATG GCT rA2 GGGCAAATACAACC ATG GCT	81 82	na	na
Site	F	5709	Pst I (消失)	wt. ATC CTC ACT GCA GTC rA2 ATC CTC ACC GCA GTC	83 84	16	サインント
Site	G/F lGR	5612,16	Stu I	wt. TTATCACAAAAAGCCATGACCAACTT rA2 TTATCACAAAAAGGCCTTGACCAACTT	85 86	na	na
4C	リ-ダ-	4	na	wt. ACGGAAAAATGCGTACACAAACT rA2 ACGGAAAAATGCGTACACAAACT	87 88	na	na
7 vs 8 As	P	3243	na	wt. TAGTTACAAAAAGGAAAGGT rA2 TAGTTACAAAAAGGAAAGGT	89 90	na	na