

【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20年12月11日(2008.12.11)

【公表番号】特表2008-518591(P2008-518591A)

【公表日】平成20年6月5日(2008.6.5)

【年通号数】公開・登録公報2008-022

【出願番号】特願2007-538349(P2007-538349)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 R 1/93 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/00 B

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 7/00

C 1 2 R 1:93

【手続補正書】

【提出日】平成20年10月23日(2008.10.23)

【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】

a . E B V 由来複製起点 (O r i - P) ;

b . A d 5 (I T R 結合部) ;

c . A d 5 由来ポリメラーゼおよびブレ末端タンパク質をコードする核酸配列からなる第 1 転写単位 ;

d . A d 5 E 4 O R F 6 および D N A 結合タンパク質をコードする核酸配列からなる第 2 転写単位 ; および

e . 選択マーカー

を含んでなり、第 1 転写単位および第 2 転写単位が二方向性テトラサイクリン依存性プロモーターに融合している、アデノウイルスアンプリコン。

【請求項 2】

前記アンプリコンが p E 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載のアデノウイルスアンプリコン。

【請求項 3】

プラスミド L M B P 4 9 7 2 のヌクレオチド配列からなるエピソームプラスミド。

【請求項 4】

プロモーターに融合したトランスジーンをコードする発現カセットを更に含む、請求項 1 記載のアデノウイルスアンプリコン。

【請求項 5】

a . E B V 由来 E B N A 1 タンパク質 ;

b. T e t 転写サイレンサー；
 c. T e t 逆トランスアクチベーター；
 d. アデノウイルスアンプリコン { 前記アデノウイルスアンプリコンは、E B V 由来 O r i - P、アデノウイルス I T R 結合部、ならびに第 2 転写単位（第 2 転写単位は A d 5 E 4 O R F 6 および D N A 結合タンパク質をコードする核酸配列からなる）と組合された第 1 転写単位（第 1 転写単位は A d 5 由来ポリメラーゼおよびプレ末端タンパク質をコードする核酸配列からなる）よりなり、第 1 転写単位および第 2 転写単位は二方向性テトラサイクリン依存性プロモーターに融合している}；および
 e. 選択マーカー、
 を発現する、アデノウイルスプロデューサー細胞。

【請求項 6】

前記細胞が、E B N A 1 タンパク質を発現する霊長類由来細胞系である、請求項 5 記載のプロデューサー細胞。

【請求項 7】

前記細胞が 2 9 3 E B N A である、請求項 6 記載のプロデューサー細胞系。

【請求項 8】

T e t 転写サイレンサーが t T S ^{k i d} である、請求項 5 記載のプロデューサー細胞。

【請求項 9】

T e t 逆トランスアクチベーターが r t T A 2 である、請求項 8 記載のプロデューサー細胞系。

【請求項 10】

2 E 2 プロデューサー細胞（p E 2 で形質転換された 2 9 3 E B N A 細胞）。

【請求項 11】

関心のある遺伝子を含む複製欠損アデノウイルスの製造方法であって、

a. プロデューサー細胞内に多欠失アデノウイルス発現ベクターを導入すること [ここで、前記プロデューサー細胞は、

i. E B V 由来 E B N A タンパク質、

i i. T e t 転写サイレンサー、

i i i. T e t 逆トランスアクチベーター、

i v. アデノウイルスアンプリコン { 前記アデノウイルスアンプリコンは、E B V 由来 o r i - P、アデノウイルス I T R 結合部、ならびに第 2 転写単位（第 2 転写単位は A d 5 E 4 O R F 6 および D N A 結合タンパク質をコードする核酸配列からなる）と組合された第 1 転写単位（第 1 転写単位は A d 5 E 2 由来ポリメラーゼおよびプレ末端タンパク質をコードする核酸配列からなる）からなり、第 1 転写単位および第 2 転写単位は二方向性テトラサイクリン依存性プロモーターに融合している} を発現する]；

b. E 2 および E 4 O R F 6 コード配列の発現を誘導すること；および

c. 産生された複製欠損アデノウイルスを回収すること、
 を含んでなる、前記製造方法。

【請求項 12】

前記プロデューサー細胞系が、アデノウイルス E 1 タンパク質、E B N A 1 および転写調節系を発現するヒト細胞系である、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 13】

前記プロデューサー細胞が、t T s ^{k i d} と r E T A 2 とを発現する 2 9 3 E B N A 細胞である、請求項 12 記載の製造方法。

【請求項 14】

多欠失アデノウイルスベクターがアデノウイルス E 1、E 2、E 3 および E 4 遺伝子を欠く、請求項 13 記載の製造方法。

【請求項 15】

多欠失アデノウイルスベクターがヒト A d 5 バックボーンからなる、請求項 14 記載の製造方法。

【請求項 16】

E2 および E4 ORF6 コード配列の発現が、前記プロデューサー細胞をドキシサイクリンと接触させることにより誘導される、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 17】

EBNA1、Tet 転写サイレンサーおよび Tet 逆トランスアクチベーターを発現する哺乳類細胞内に請求項 4 記載のアデノウイルスアンプリコンを導入し、E2 および E4 ORF6 コード配列の発現を誘導し、産生された複製欠損アデノウイルスを回収することを含んでなる、複製欠損アデノウイルス粒子の製造方法。

【請求項 18】

前記プロデューサー細胞系が、tTS^{kid}とrtTA2とを発現する293EBNA細胞である、請求項 17 記載の製造方法。

【請求項 19】

E2 および E4 ORF6 コード配列の発現が、前記パッケージング細胞をドキシサイクリンと接触させることにより誘導される、請求項 17 記載の製造方法。

【請求項 20】

請求項 17 記載の製造方法により回収され精製された、組換え複製欠損アデノウイルス粒子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

本発明の第2の態様は、本発明のアデノウイルスアンプリコンを含んでなるプロデューサー/ヘルパー細胞系を提供する。より詳しくは、本発明は、(a) Ad5 E1 タンパク質、(b) EBV 由来 EBNA タンパク質、(c) Tet 転写サイレンサー、(d) Tet 逆トランスアクチベーター、(e) アデノウイルスアンプリコン [該アデノウイルスアンプリコンは、EBV 由来 OriP、アデノウイルス ITR 結合部、ならびに第2転写単位 (第2転写単位は Ad5 DNA 結合タンパク質および E4 ORF6 をコードする核酸配列よりなる。)と組合された第1転写単位 (第1転写単位は Ad5 由来ポリメラーゼおよびプレ末端タンパク質をコードする核酸配列よりなる。) からなり、第1転写単位および第2転写単位は二方向性テトラサイクリン依存性プロモーターに融合している。]、ならびに (f) 選択マーカーを発現するアデノウイルスパッケージング細胞系を提供する。