

【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8月7日(2008.8.7)

【公表番号】特表2004-501639(P2004-501639A)

【公表日】平成16年1月22日(2004.1.22)

【年通号数】公開・登録公報2004-003

【出願番号】特願2002-506184(P2002-506184)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 K 39/155 (2006.01)

A 6 1 K 39/205 (2006.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 39/155

A 6 1 K 39/205

A 6 1 P 37/02

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/04

【手続補正書】

【提出日】平成20年6月20日(2008.6.20)

【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】モノネガウイルス目のウイルスのプロモーターから遠位に位置する遺伝子の発現量を増大させる方法であって、

前記プロモーターから遠位に位置する前記遺伝子を野性型ウイルスの 3' 末端側のプロモーターの近位の部位に近づく方向に移動させることによって前記モノネガウイルス目のウイルスの前記遺伝子の順序を再編成する工程を含む方法。

【請求項 2】前記遠位遺伝子は表面糖タンパク質の遺伝子である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】前記モノネガウイルス目のウイルスはラブドウイルスもしくはパラミクソウイルスである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】前記ラブドウイルスは、狂犬病ウイルス及び水疱性口内炎ウイルスからなる群から選択され、前記パラミクソウイルスは、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、及び呼吸系発疹ウイルスからなる群から選択される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】プロモーターから遠位の遺伝子を野性型ウイルスの 3' 末端側のプロモーターの近位の部位に近づく方向に移動させることによってゲノムが再編成されたモノネガウイルス目の組換えウイルス。

【請求項 6】前記プロモーターの遠位の遺伝子は表面糖タンパク質の遺伝子である

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記モノネガウイルス目のウイルスはラブドウイルスもしくはパラミクソウイルスである請求項 5 に記載の組換えウイルス。

【請求項 8】 前記ラブドウイルスは、狂犬病ウイルス及び水疱性口内炎ウイルスからなる群から選択され、前記パラミクソウイルスは、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、及び呼吸系発疹ウイルスからなる群から選択される請求項 7 に記載の組換えウイルス。

【請求項 9】 請求項 5 に記載の組換えウイルスを含有する、防御的免疫応答を促進かつ増強させるための組成物。

【請求項 10】 モノネガウイルス目のウイルスを弱毒化する方法であって、遺伝子を野性型ウイルスにおける位置から遠くに移動させることによって前記モノネガウイルス目のウイルスの遺伝子の順序を再編成する工程を含む方法。

【請求項 11】 モノネガウイルス目のウイルスを弱毒化する方法であって、野性型ウイルスにおける 3' 末端側のプロモーターの近位の部位から遠ざかる方向に遺伝子を移動させることによって前記モノネガウイルス目のウイルスの遺伝子順序を再編成する工程であって、前記遺伝子はゲノムの複製に必須の制限因子である工程を含む方法。

【請求項 12】 前記必須の制限因子の遺伝子はヌクレオカプシド (N) 遺伝子である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 前記必須の制限因子の遺伝子は前記ウイルスの遺伝子順序において最後から 2 番目の位置に配される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】 請求項 11 の方法に基づいて弱毒化されたウイルス。

【請求項 15】 ワクチンとして有用なモノネガウイルス目の弱毒化ウイルスを構築する方法であって、

野性型ウイルスにおける 3' 末端側のプロモーターの近位の部位から遠ざかる方向に遺伝子を移動させることによって前記ウイルスの遺伝子順序を再編成する工程であって、前記遺伝子はゲノムの複製に必須の制限因子である工程と、

免疫応答誘導抗原をコードした遺伝子を前記ウイルスの遺伝子順序の 3' 末端に最も近い位置に配することによりワクチン用の弱毒化ウイルスを構築する工程とを含む方法。

【請求項 16】 前記必須の制限因子の遺伝子はヌクレオカプシド (N) 遺伝子である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】 前記必須の制限因子の遺伝子は前記ウイルスの遺伝子順序において最後から 2 番目の位置に配される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】 免疫応答誘導抗原をコードした前記遺伝子は、付着用糖タンパク質 (G) 遺伝子、融合遺伝子、またはヘマグルチニン/ノイラミニダーゼ遺伝子からなる群から選択される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】 請求項 15 の方法に基づいて弱毒化されたウイルス。

【請求項 20】 前記モノネガウイルス目のウイルスはラブドウイルスもしくはパラミクソウイルスである請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】 前記ラブドウイルスは狂犬病ウイルスまたは水疱性口内炎ウイルスであり、前記パラミクソウイルスは、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、及び呼吸系発疹ウイルスからなる群から選択される請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 ワクチンとして有用な前記弱毒化ウイルスは、該ウイルスの致死量と防御反応誘導量が約 1000 倍異なるように弱毒化されている請求項 15 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 1 2 】

本発明の別の一実施形態では、ゲノムが再編成されたモノネガウイルス目の組換えウイルスであって、ウイルスのプロモーターの遠位の遺伝子を野性型ウイルスの3'末端側のプロモーターの近位の部位に近づく方向に移動させることによってゲノムが再編成される組換えウイルスが提供される。こうした組換えウイルスを利用して防御的免疫応答を促進かつ増強することが可能である。

【 手続補正 3 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 1 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 1 3 】

本発明の更に別の一実施形態では、所定の遺伝子をその野性型ウイルスにおける位置から遠ざかる方向に移動させることによってウイルスの遺伝子順序を再編成するか、もしくは、必須の制限因子の遺伝子を野性型ウイルスにおける3'末端側のプロモーターの近位の部位から遠ざかる方向に移動させることによってウイルスの遺伝子順序を再編成することによりモノネガウイルス目のウイルスを弱毒化する方法が提供される。

【 手続補正 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 1 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 1 4 】

本発明の更に別の一実施形態では、ワクチンとして有用な弱毒化ウイルスを構築するための方法であって、野性型ウイルスにおける3'末端側のプロモーターの近位の部位から遠ざかる方向に所定の遺伝子を移動させることによって当該ウイルスの遺伝子順序を再編成する工程であって、当該所定の遺伝子はゲノムの複製に必須の制限因子である工程と、免疫応答誘導抗原をコードした遺伝子をウイルスの遺伝子順序の3'末端に最も近い位置に配する工程とを含む方法が提供される。

【 手続補正 5 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 2 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 2 3 】

本発明の更なる別の一実施形態では、モノネガウイルス目のウイルスを弱毒化するための方法であって、所定の遺伝子をその野性型における位置から遠ざかる方向に移動させることによってウイルスの遺伝子の順序を再編成するか、または、必須の制限因子の遺伝子をその野性型における3'末端側のプロモーターに最も近い部位から遠ざかる方向に移動させることによってウイルスの遺伝子の順序を再編成することによってモノネガウイルス目のウイルスを弱毒化する方法が提供される。好ましくは当該遺伝子はウイルスの遺伝子の順序において最後から2番目の位置に配される。更に、ゲノム複製に必須の制限因子としての前記遺伝子はヌクレオカプシド(N)遺伝子であることが好ましい。モノネガウイルス目に属するウイルスの代表例としては、狂犬病ウイルスや水疱性口内炎ウイルスなどのラブドウイルス、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザウイルスや呼吸器系発疹ウイルス(ヒト及びウシの)などのパラミクソウイルス、及びエボラウイルスやマールブルグウイルスなどのフィロウイルスが挙げられる。本発明は本方法に基づいて弱毒化されたウイルスをも含むものである。

【 手続補正 6 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 2 4 】

本発明の更なる別の一実施形態では、ワクチンとして有用な弱毒化ウイルスを構築するための方法であって、ゲノム複製に必須の制限因子である所定の遺伝子をその野性型における3'末端側のプロモーターに最も近い部位から遠ざかる方向に移動させることによって当該ウイルスの遺伝子の順序を再編成する工程と、免疫応答誘導抗原をコードする遺伝子をウイルスの遺伝子順序の3'末端に最も近い位置に配する工程とからなる方法が提供される。好ましくは、必須の制限因子の遺伝子はヌクレオカプシド(N)遺伝子であり、該遺伝子は当該ウイルスの遺伝子の順序において最後から2番目に配される。更に好ましくは、免疫応答誘導抗原をコードする遺伝子は付着用糖タンパク質(G)遺伝子、融合遺伝子またはヘマグルチニン/ノイラミニダーゼ遺伝子である。当業者であれば適当な免疫応答誘導抗原に容易に置換することが可能である。本発明は本方法に基づいて弱毒化されたウイルスをも含むものである。

【手続補正7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 5 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 5 6 】

実施例 1 4

N 遺伝子を再編成したウイルスによる RNA 合成

ゲノム上でN遺伝子を順次下流に移動させると複製及びNのmRNA合成レベルは大きく変化した。NのmRNAの合成レベルは、N2、N3及びN4ウイルスにおいてN遺伝子をプロモーターから遠ざかる方向に順次移動させることにより野性型のレベルから大幅に低下した(それぞれ野性型の36%、6%及び3%。図11)。これに符合するように、遺伝子順序の中でG遺伝子の位置がプロモーターに1つ近づき、代わりにN遺伝子が最後から2番目の位置に配されたN4ウイルスではGのmRNAの量の増加が観察された(図11)。N2、N3及びN4のゲノムRNAの複製量は、野性型に対して減少し(それぞれ50%、28%、及び4%。図11)、これにともなってN遺伝子の発現が低下した。これはNタンパク質の合成が複製を制限している場合に予想されるとおりである。N遺伝子が段階的にプロモーターから遠ざかるにしたがって更に全体の転写レベルも低下したが、これは恐らくゲノムのテンプレートの数が減少したことの副次的な効果であると考えられる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 7 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 7 3 】

実施例 2 5

N 及び G 遺伝子が再編成されたウイルスの複製

1 段階増殖条件下での遺伝子再編成ウイルスの複製能を、感染多重度(MOI)が3となるようにBHK-21培養細胞にウイルスを感染させた後、37℃にて培養して調べた。異なる時間に上清を回収し、ブランクアッセイによってウイルス収量を測定した。プロモーターに最も近い位置から遠ざかる方向にN遺伝子を転座させると、第1番目の位置から遠位へと遺伝子が移動させられるにしたがって複製量は段階的に低減した。N遺伝子の第2番目の位置への移動(G1N2)により、複製量は3分の1に減少したのに対し、N遺伝子を第4番目の位置に移動(G3N4)させると複製量は1,000分の1にまで低下

した(図19)。これに対し、N遺伝子が第4番目の位置にある2種類のウイルス(G3N4とG1N4)では1段増殖条件下での複製量が大きく異なったが、これは最適な複製が行われるうえで重要なN:Pのモル比がG1N4ではG3N4よりも安定していたことに恐らくよるものと考えられる。感染5時間後に細胞内のタンパク質合成速度を測定したところ、G1N4(3'-GPMNL-5')に感染した細胞ではN:Pのモル比は1:1.6であったのに対し、G3N4(3'-PMGNL-5')に感染した細胞ではN:Pのモル比は1:1.8であった(図18C)。野性型に感染した細胞(N1G4)におけるN:Pの比が1:0.7であり、G1N2に感染した細胞では1:0.8であることに示されるように、ウイルスの複製には1:0.5~1:1のN:Pのモル比が最適である。野性型ウイルス及びG1N2ではいずれも遺伝子順序においてN遺伝子の直後にP遺伝子が位置している(図17)。Nに対するPの量が多すぎても少なすぎても複製量は大幅に低下する。G3N4に感染した細胞ではNが制限因子となっているばかりでなくN:Pのモル比が最適値の2倍以上となっている。G3N4及びG1N4の複製速度は野性型及びG1N2に比較して遅くなっている。N1G4及びG1N2では1段増殖は感染12時間後に完了したのに対し、G3N4及びG1N4では感染24時間後であった。G1N2では野性型ウイルスと比較して複製の遅れは見られなかったことから、感染細胞における過剰量のGの存在が複製のこうした遅れの原因であるとは考えにくい。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0078】

実施例27

再編成されたN及びG遺伝子を有するウイルスを接種したマウスの血清抗体

G遺伝子が再編成されたウイルスの接種が体液性免疫応答に与える影響を評価するため、各変異体ウイルスの10倍毎の連続希釈液をマウスに鼻腔内接種した。毎週尾から採血してELISAにより血清の抗体レベルを求めた。この実験では接種後のマウスの生存が前提条件であるのでLD₅₀以下の投与量のみを用いた。G遺伝子の転座によって抗体の応答反応の反応速度及び程度が変化した(図22)。野性型ウイルスを接種したマウスでは21日以内に辛うじて検出可能なレベルの抗体が産生されたのに対して、100PFUのG1N2を接種した動物では14日目までに有意な抗体価の抗体が産生され、G1N4を接種した動物では接種7日後までに有意な抗体価の抗体が産生された。このような促進、増強された免疫応答は、100PFUのウイルスを接種したマウスを比較することによって最も明らかとなる(図22)。これらの結果は、G遺伝子を第1番目の位置から第4番目の位置に転座させることによってVSVに対する体液性免疫応答が増強されることを示すものである。G1N4を接種したマウスではG3N4を接種したマウスと比較して早期かつ高レベルの抗体の産生が見られた。このことは更に、G遺伝子を遺伝子順序の第1番目の位置に配することでVSVの免疫原性が高められるという観察を裏付けるものである。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

ゲノムRNAの複製には化学量論的な量のNタンパク質を必要とすることから、N遺伝子の位置及びNタンパク質の発現レベルと複製の効率とは相関していると考えられる。野性型ウイルスN1G4が最も高いウイルス価で複製し、次いでG1N2及びG1N4ウイルスの順でG3N4ウイルスの複製能が最も低かった。G1N4ウイルスとG3N4ウイ

ルスではいずれも第4番目の位置にN遺伝子があるにも関わらずG1N4ウイルスの複製能はG3N4よりも大幅に高かった。これらのウイルスではいずれも複製速度は遅く、Nタンパク質の供給によって子孫ウイルスの生成が制限されると仮定した場合に予想されるとおりであった。