

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-500035

(P2006-500035A)

(43) 公表日 平成18年1月5日(2006.1.5)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 39/245 (2006.01) | A 6 1 K 39/245 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 P 31/22 (2006.01) | A 6 1 P 31/22 | 4 C O 8 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 109 頁) 最終頁に続く | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-538499 (P2004-538499) | (71) 出願人 | 505105604 マクロジェニックス インコーポレイテッド |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年9月23日 (2003. 9. 23) | | アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル イースト グーデ ドライブ 1500 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年5月16日 (2005. 5. 16) | (71) 出願人 | 505090687 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2003/030301 | | ボード オブ リージェンツ ザ ユニバーシティー オブ テキサス システム |
| (87) 国際公開番号 | W02004/026265 | | アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン イースト 7 ス ストリート 201 |
| (87) 国際公開日 | 平成16年4月1日 (2004. 4. 1) | (74) 代理人 | 100102978 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/412, 956 | | 弁理士 清水 初志 |
| (32) 優先日 | 平成14年9月23日 (2002. 9. 23) | (74) 代理人 | 100128048 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 新見 浩一 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 ヘルペスウイルス科の核酸配列および／またはポリペプチド配列を含むワクチンの同定方法およびワクチン接種用組成物

(57) 【要約】

本発明は、ヘルペスウイルスゲノム、特にHSV-1ゲノムのスクリーニングによって得ることができる抗原およびこのような抗原をコードする核酸に関する。より詳細な局面では、本発明は、このような抗原および核酸の単離方法ならびに免疫応答を生じさせるためのこのような単離抗原の使用方法に関する。抗原が免疫応答を生じさせる能力を、ワクチン接種または抗体調製技術で使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫応答を誘導するのに有効な量の薬学的組成物を被験体に投与する工程を含み、該薬学的組成物が少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片を含む、被験体を免疫化する方法。

【請求項2】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片が、HSV-1抗原またはその断片としてさらに定義される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を有する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

被験体を動物ヘルペスウイルスに対して免疫化する、請求項1記載の方法。

【請求項5】

被験体をヒトヘルペスウイルスに対して免疫化する、請求項4記載の方法。

【請求項6】

被験体を、HSV-1、HSV-2、または水痘帯状疱疹ウイルスに対して免疫化する、請求項5記載の方法。

【請求項7】

被験体をHSV-1に対して免疫化する、請求項5記載の方法。

【請求項8】

被験体をHSV-2に対して免疫化する、請求項5記載の方法。

【請求項9】

被験体を、オナガザルヘルペスウイルス、ウシヘルペスウイルス、またはイヌヘルペスウイルスに対して免疫化する、請求項4記載の方法。

【請求項10】

(a) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載のアミノ酸配列、またはその断片を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を調製する工程；

(b) 薬学的に許容される担体中の一つまたは複数のポリヌクレオチドを被験体に投与

する工程；および

(c) 該被験体中で一つまたは複数のヘルペスウイルス抗原を発現させる工程を含む、少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原を提供する、請求項1記載の方法。

【請求項11】

ポリヌクレオチドが発現ベクターである、請求項10記載の方法。

【請求項12】

発現ベクターが遺伝子免疫化ベクターである、請求項11記載の方法。

【請求項13】

発現ベクターが、直鎖状発現エレメント発現系または環状発現エレメント発現系である、請求項11記載の方法。

10

【請求項14】

ポリヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115、またはその断片である、請求項10記載の方法。

20

【請求項15】

ポリヌクレオチドを、筋肉内注射、上皮注射、または微粒子銃によって投与する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

ポリヌクレオチドを、静脈内、皮下、病変内、腹腔内、皮内、経口もしくは他の粘膜、または吸入投与経路によって投与する、請求項14記載の方法。

【請求項17】

第1の投与から少なくとも約3週間後に第2の投与を行う、請求項16記載の方法。

30

【請求項18】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも2つのポリヌクレオチドを被験体に投与する、請求項10記載の方法。

【請求項19】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも3つのポリヌクレオチドを被験体に投与する、請求項18記載の方法。

【請求項20】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも4つのポリヌクレオチドを被験体に投与する、請求項19記載の方法。

40

【請求項21】

少なくとも2つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を免疫応答を誘導するのに有効な量で投与する、請求項1記載の方法。

【請求項22】

少なくとも3つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を免疫応答を誘導するのに有効な量で投与する、請求項21記載の方法。

【請求項23】

少なくとも4つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を免疫応答を誘導するのに有効な量で投与する、請求項22記載の方法。

【請求項24】

50

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115、またはその相補物のうち少なくとも1つと共通する少なくとも17個の連続ヌクレオチドを有する配列を含む、単離ポリヌクレオチド。

【請求項25】

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115、またはその相補物のうち少なくとも1つと共通する少なくとも50個の連続ヌクレオチドを有する配列を含むものとしてさらに定義される、請求項24記載のポリヌクレオチド。

【請求項26】

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115、またはその相補物のうち少なくとも1つと共通する全ヌクレオチドを有する配列を含むものとしてさらに定義される、請求項25記載のポリヌクレオチド。

【請求項27】

ベクター中に含まれるものとしてさらに定義される、請求項24記載のポリヌクレオチド。

【請求項28】

薬学的組成物中に含まれるものとしてさらに定義される、請求項24記載のポリヌクレオチド。

【請求項29】

ワクチン中に含まれるものとしてさらに定義される、請求項24記載のポリヌクレオチド。

【請求項30】

10

20

30

40

50

号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114、および/または配列番号：116のアミノ酸配列を有するものとしてさらに定義される、請求項33記載のポリペプチド。

【請求項35】

薬学的組成物中に含まれるものとしてさらに定義される、請求項30記載のポリペプチド。

【請求項36】

ワクチン中に含まれるものとしてさらに定義される、請求項30記載のポリペプチド。

10

【請求項37】

組換えポリペプチドとしてさらに定義される、請求項34記載のポリペプチド。

【請求項38】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原もしくはその断片またはヘルペスウイルス抗原もしくはその断片をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、ワクチン組成物。

【請求項39】

遺伝子ワクチン、ポリペプチドワクチン、細胞媒介性ワクチン、弱毒化病原体ワクチン、生ベクターワクチン、食用ワクチン、死滅病原体ワクチン、精製サブユニットワクチン、複合ワクチン、ウイルス様粒子ワクチン、またはヒト化抗体ワクチンとしてさらに定義される、請求項38記載のワクチン組成物。

20

【請求項40】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むものとしてさらに定義される、請求項39記載のワクチン組成物。

【請求項41】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片を含むものとしてさらに定義される、請求項39記載のワクチン組成物。

【請求項42】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むものとしてさらに定義される、請求項38記載のワクチン組成物。

30

【請求項43】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも2つのポリヌクレオチドを含むものとしてさらに定義される、請求項42記載のワクチン組成物。

【請求項44】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも3つのポリヌクレオチドを含むものとしてさらに定義される、請求項43記載のワクチン組成物。

【請求項45】

異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも4つのポリヌクレオチドを含むものとしてさらに定義される、請求項44記載のワクチン組成物。

40

【請求項46】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：

50

94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を含むポリペプチドをコードする、請求項42記載のワクチン組成物。

【請求項47】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21もしくは配列番号：23のポリヌクレオチド配列、またはその断片を含む、請求項42記載のワクチン組成物。

【請求項48】

異なるヘルペスウイルス抗原をコードする少なくとも2つのポリヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115のポリヌクレオチド配列、またはその断片を含む、請求項43記載のワクチン組成物。

【請求項49】

異なるヘルペスウイルス抗原をコードする少なくとも3つのポリヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115のポリヌクレオチド配列、またはその断片を含む、請求項44記載のワクチン組成物。

【請求項50】

異なるヘルペスウイルス抗原をコードする少なくとも4つのポリヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115のポリヌクレオチド配列、またはその断片を含む、請求項45記載のワ

10

20

30

40

50

クチン組成物。

【請求項 5 1】

薬学的に許容される担体中に少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片を含むものとしてさらに定義される、請求項38記載のワクチン組成物。

【請求項 5 2】

薬学的に許容される担体中に少なくとも2つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を含むものとしてさらに定義される、請求項51記載のワクチン組成物。

【請求項 5 3】

薬学的に許容される担体中に少なくとも3つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を含むものとしてさらに定義される、請求項52記載のワクチン組成物。

10

【請求項 5 4】

薬学的に許容される担体中に少なくとも4つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片を含むものとしてさらに定義される、請求項53記載のワクチン組成物。

【請求項 5 5】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を有する、請求項51記載のワクチン組成物。

20

【請求項 5 6】

少なくとも2つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を有する、請求項52記載のワクチン組成物。

30

40

【請求項 5 7】

少なくとも3つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列

50

番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を有する、請求項53記載のワクチン組成物。

【請求項58】

少なくとも4つの異なるヘルペスウイルス抗原またはその断片が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を有する、請求項54記載のワクチン組成物。

10

【請求項59】

(i) (a) 公知の抗原ポリペプチドのアミノ酸配列もしくは公知の抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾する工程、(b) 公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得る工程、または(c) 公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得て、該ホモログのアミノ酸配列もしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾することによって、少なくとも1つの試験ポリペプチドまたは試験ポリヌクレオチドを得る工程と、

20

(ii) 該試験ポリペプチドが抗原性であるか、または該試験ポリヌクレオチドが抗原ポリペプチドをコードするかどうかを決定するのに適切な条件下で該試験ポリペプチドまたは該試験ポリヌクレオチドを試験する工程と

を含む、免疫応答を引き起こす能力について少なくとも1つの試験ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする試験ポリヌクレオチドをスクリーニングする方法。

30

【請求項60】

試験ポリペプチドを得る工程を含むものとしてさらに定義される、請求項59記載の方法。

【請求項61】

試験ポリペプチドを得る工程が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のうち少なくとも1つのポリペプチドまたはその断片のアミノ酸を修飾すること、またはそのホモログを得ることを含む、請求項60記載の方法。

40

【請求項62】

試験ポリペプチドが、修飾された配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号

50

：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のうち少なくとも1つのアミノ酸配列、またはその断片を含む、請求項61記載の方法。 10

【請求項63】

試験ポリヌクレオチドを得る工程を含むものとしてさらに定義される、請求項59記載の方法。

【請求項64】

試験ポリヌクレオチドを得る工程が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116の配列またはその断片を有する少なくとも1つのポリペプチドの修飾アミノ酸配列、またはそのホモログをコードするポリヌクレオチドを得ることを含む、請求項63記載の方法。 20

【請求項65】

試験ポリヌクレオチドを得る工程が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115のうち少なくとも1つのポリヌクレオチド配列、またはその断片を修飾することを含む、請求項64記載の方法。 30 40

【請求項66】

抗原性である少なくとも1つの試験ポリペプチド、または抗原ポリペプチドをコードする少なくとも1つの試験ポリヌクレオチドを同定する工程をさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項67】

同定された抗原ポリペプチドまたは該抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的組成物中に含める工程をさらに含む、請求項66記載の方法。

【請求項68】

被験体にワクチン接種するために同定された抗原ポリペプチドまたは該抗原ポリペプチ 50

ドをコードするポリヌクレオチドを使用する工程をさらに含む、請求項66記載の方法。

【請求項69】

被験体にヘルペスウイルスワクチンを接種する、請求項68記載の方法。

【請求項70】

ヘルペスウイルスがHSV-1である、請求項69記載の方法。

【請求項71】

被験体に非ヘルペスウイルス疾患ワクチンを接種する、請求項68記載の方法。

【請求項72】

請求項59記載の方法によって抗原性を示すと決定された抗原ポリペプチドまたは該抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得る工程と、ワクチン組成物中に該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドを含める工程とを含む、ワクチンの製造方法。 10

【請求項73】

請求項72記載のワクチンを製造する工程と、該ワクチンを被験体に接種する工程とを含む、被験体へのワクチン接種方法。

【請求項74】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原もしくはその断片または該ヘルペスウイルス抗原もしくはその断片をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むワクチン組成物を投与する工程を含む、病原体に感染した被験体の治療方法。

【請求項75】

ワクチン組成物が、遺伝子ワクチン、ポリペプチドワクチン、細胞媒介性ワクチン、弱毒化病原体ワクチン、生ベクターワクチン、食用ワクチン、死滅病原体ワクチン、精製サブユニットワクチン、複合ワクチン、ウイルス様粒子ワクチン、またはヒト化抗体ワクチンである、請求項74記載の方法。 20

【請求項76】

ワクチン組成物が少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項75記載の方法。

【請求項77】

ワクチン組成物が少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片を含む、請求項75記載の方法。

【請求項78】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を含むポリペプチドをコードする、請求項76記載の方法。 40

【請求項79】

ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号： 50

59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71；配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113もしくは配列番号：115のポリヌクレオチド配列、またはその断片を含む、請求項76記載の方法。

【請求項80】

少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原もしくはその断片または該ヘルペスウイルス抗原もしくはその断片をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むワクチン組成物を投与する工程を含む、再活性化の疾患に対して治療的免疫応答を惹起する方法。

10

【請求項81】

ヘルペスウイルス抗原が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を含む、請求項80記載の方法。

20

【請求項82】

1つまたは複数のヘルペスウイルス抗原に反応性を示す少なくとも1つの抗原結合因子を被験体に投与する工程を含む、受動免疫化方法。

【請求項83】

ヘルペスウイルス抗原が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、またはその断片を含む、請求項82記載の方法。

30

【請求項84】

抗原結合因子が抗体である、請求項77記載の方法。

40

【請求項85】

抗原結合因子がアンチカリン (anticalin) である、請求項77記載の方法。

【請求項86】

抗原結合因子がアプタマーである、請求項77記載の方法。

【請求項87】

初回刺激投与量のヘルペスウイルスワクチン組成物を投与する工程を含む、ワクチン接種方法。

【請求項88】

初回刺激投与後に追加免疫投与を行う、請求項87記載の方法。

50

【請求項 89】

ワクチン組成物を少なくとも1回投与する、請求項87記載の方法。

【請求項 90】

ワクチンを少なくとも2回投与する、請求項89記載の方法。

【請求項 91】

(a) 少なくとも1つの核酸ワクチン組成物を投与する工程と、その後に(b) 少なくとも1つのポリペプチドワクチン組成物を投与する工程とを含む、請求項90記載の方法。

【請求項 92】

(a) 少なくとも1つのポリペプチドワクチン組成物を投与する工程と、その後に(b) 少なくとも1つの核酸ワクチン組成物を投与する工程とを含む、請求項90記載の方法。

10

【請求項 93】

(a) 少なくとも1つの核酸ワクチン組成物を投与する工程と、その後に(b) 少なくとも1つのポリペプチドワクチン組成物を投与する工程とを含む、請求項88記載の方法。

【請求項 94】

(a) 少なくとも1つのポリペプチドワクチン組成物を投与する工程と、その後に(b) 少なくとも1つの核酸ワクチン組成物を投与する工程とを含む、請求項88記載の方法。

【請求項 95】

(a) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/または配列番号：116に記載の配列を有する抗原に反応性を示す抗体を試料と混合する工程と、

20

(b) 抗原と抗体の結合について該試料をアッセイする工程とを含む、ヘルペスウイルスの検出方法。

30

【請求項 96】

(a) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/または配列番号：116に記載の配列を有するペプチドを試料と混合する工程と、

40

(b) 抗原と抗体の結合について該試料をアッセイする工程とを含む、ヘルペスウイルスに対する抗体の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年9月23日に出願された「METHODS AND COMPOSITIONS FOR VACCINATION

50

COMPRISING NUCLEIC ACID AND/OR POLYPEPTIDE SEQUENCES OF THE HERPESVIRUS FAMILY」
というタイトルの米国仮特許出願第60/412,956号の恩典を主張するものである。

【0002】

政府は、DARPA助成金番号MDA9729710013にしたがって、本発明に権利を有する。

【0003】

A. 発明の分野

本発明は、一般に、ワクチン学分野、免疫学分野、ウイルス学分野、機能的ゲノム学分野、および分子生物学分野に関する。より詳細には、本発明は、ヘルペスウイルスゲノム由来の遺伝子発現ライブラリーの投与から作製したワクチンのスクリーニングおよび獲得方法に関する。特定の態様では、本発明は、被験体へのワクチン接種が記載の方法によって防御性または免疫原性を示すと立証された遺伝子または類似の配列の一部または全てに由来する一つまたは複数のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたはその変異型を含む組成物を介し得る、ヘルペスウイルス感染症および感染疾患に対する被験体へのワクチン接種のための方法および組成物に関する。

10

【背景技術】

【0004】

B. 関連技術の説明

純粹に経験的見解において、Edward Jennerは、最初に、1790年代に感染症に対する防御的ワクチン接種を証明した。ミルクメイドが痘瘡に接触しないという所見の後、彼は意図的に男児を牛痘ウイルスに感染させ、その後痘瘡感染に対する免疫を見出した。それ以来、麻疹、ポリオ、炭疽、狂犬病、腸チフス、コレラ、およびペスト、ならびに多数の他の感染因子に対するワクチンが開発された。新規のワクチンの開発方法は、各ウイルス、細菌、または他の病原体標的によって多種多様であるが、これらは、伝統的には、Jennerワクチンのように弱毒化形態または死滅形態の病原体全体からなっていた。社会的および経済的考慮により、ワクチン接種が動物およびヒトの感染症からの至適な防御方法とされている。しかし、ワクチンは、多数の最も重篤なヒト感染症（マラリア、結核、HIV、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ロタウイルス、赤痢菌、および他の病原体が含まれる）に利用することができない。さらに多数の病原体のための有効であり、且つ容易に産生されないワクチンを開発する必要がある。例えば、インフルエンザウイルスの抗原連続変異には、新規のワクチンを毎年定期的に開発する必要がある。狂犬病（Xiang, et al, 1994）、ヘルペス（Rouse, 1995）、結核（Lowrie, et al, 1994）、HIV（Coney, et al, 1994）、および他の多数の疾患または病原体のための有効なワクチンを同定するための研究が継続されている。

20

30

【0005】

ほとんどの現在利用可能なワクチンは、生/弱毒化または死滅させた病原体から構成される（Ada, 1991）。これらの全病原体接種材料により、宿主中で広範な免疫応答が誘発される。病原体の全ての成分を免疫系に授与するので、このアプローチの長所は抗原同定が必要ないことである。しかし、この簡単なアプローチは固有の問題を有する。生/弱毒化株の病原性または病原性へのその復帰変異の可能性がある。せいぜい、防御免疫応答に必要な病原体の成分を、バゲッジ（baggage）として保有しているか、またはいくつかの成分は防御免疫に障害を生じさせ得る。いくつかの例では、病原体の不活化時に防御抗原が喪失するか変性されるかもしれない。明らかに、進化または病原体自体を防御するか宿主免疫系を回避する因子の獲得によって病原体は病原性を示すようになる。特に、多数のHSV遺伝子は、免疫回避および病因に関与し、詳細には、インビトロで重要でないものである。全生物ワクチンでは、生/弱毒化ワクチンまたは死滅ワクチンのいずれであっても抗原のレパートリーおよびその発現レベルは病原体によって調節される。したがって、宿主免疫系は、しばしばほとんどの防御抗原決定基に指向しない。病原体の全ての潜在的な防御抗原が宿主に授与された場合、非防御抗原が自己免疫、毒性、または防御抗原に対する応答の妨害などの副作用を生じる機会が与えられるとも考えられる。

40

【0006】

50

全病原体ワクチン使用の代替法には、宿主中の防御免疫応答の刺激のための単一免疫優性成分または成分の小群の使用が含まれる。破傷風などのいくつかの成分ワクチンは、豊富であるが、高度に精製されていない病原体成分からなる。他のワクチンは、B型肝炎ワクチンなどの組換え成分からなる。これらは、免疫原性および安全性が改良され、副作用が減少され、全生物ワクチンと比較して品質管理が容易である。しかし、最良の防御を付与する抗原が常に知られているとは限らないので、その選択は知識に基づいた推測または技術的利便性に陥り、その後さらに研究される。例えば、i) 高レベルの抗体を産生するか、ii) 病原体表面で発現または分泌されるか、iii) コンセンサス主要組織適合 (MHC) 結合部位を保有するか、iv) 豊富且つ精製が容易である病原体の成分に対応することに基づいてワクチン候補としてのサブユニットを選択している。不運なことに、タンパク質、ペプチド、または生きたベクター送達方法を使用したワクチン候補についての広範な機能スクリーニングが実用的でないため、これらの候補を試行錯誤によって非体系的に試験しなければならない。これにより、病原体攻撃誘発に対する迅速且つ防御的な応答のために免疫系をプライミングすることができる免疫原を発現する病原体の特定の遺伝子の同定におけるより基本的且つ未解決の問題が定義される。

10

【0007】

ある特定の非ウイルス病原体およびいくつかのウイルスは、非常に巨大なゲノムを有し、例えば、原生動物ゲノムは、約 10^8 個までのヌクレオチドを含むので、有効な免疫原性抗原を同定または単離するための分析が高額で時間がかかる。1つの病原体からでさえも抗原ごとに何百万もの可能性のある決定基に潜在的な免疫が評価されることが新規のワクチン開発における重要な障害である。

20

【0008】

特に、ヘルペスウイルス科 (ウイルス病原体の1科) に対する新規の防御抗原を発見する必要がある。ヘルペスウイルス (HSV) 感染は、世界的に増加している (最も罹患している疾患はHSV1型および2型 (HSV-1、HSV-2) による) (Stanberry et al., 1997)。20年にわたって、米国国民は、HSV感染症が急増しており (Whitley and Miller, 2001およびFarr ell et al., 1994)、世界人口の大部分は、ヒトヘルペスウイルス科の少なくとも1つのメンバーに感染している (Kleymann et al., 2002)。ウイルスにより、伝播経路、感染部位、用量、および宿主の免疫状態によって決定される種々の類似の疾患を発症する (Whitley et al., 1998)。HSVの特徴の定義は、その急性期感染、その後のニューロン細胞への一生涯の感染である。その名称のギリシャ語は、その持続性および潜伏期を説明する「クリーピング (creeping)」である (Whitley and Roizman, 2001)。ほとんどの成人は、その末梢神経系に潜伏状態でHSV-1を保有する。知覚神経節でのウイルスの再活性化はストレスによって誘導され、再発、病変、およびウイルスの放出 (shedding) をもたらす。HSV-1は、口腔顔面感染、脳炎、および核膜瘢痕から失明し得る眼の感染症に最も頻繁に関連する。HSV-2は、通常、生殖器感染に関連するが、HSV-1に起因する原発性陰部ヘルペスが増加しつつある (Whitley and Miller, 2001)。抗ウイルス薬 (アシクロビルが含まれる) は、現在のヘルペス治療の中核である (Leung and Sacks, 2000)。これらの治療により一時的に症状が抑制されるが、継続投与によってのみ有効であり、これは骨が折れる作業であり、耐性株の出現を助長する。痛烈には、これらの薬物の利用では、陰部ヘルペスが世界中で第3の最も蔓延している性感染症となること (Whitley, and Miller, 2001) および眼球ヘルペスが先進国における失明の第2の主な原因となることが回避されなかった。一般市民における大流行の伝染病は、幼若宿主および免疫不全宿主におけるいくつかの疾患と合わせて、ヘルペスワクチンの開発への取り組みを刺激している (Bernstein and Stanberry, 1999)。

30

40

【0009】

HSVワクチンの最終目標はウイルス感染からの長期防御であり、疾患の症状の抑制は健康上非常に有利でもある。予防または治療ワクチンのいずれかの現在の目的の1つは、臨床エピソードおよび一次感染および潜在性感染からのウイルス放出を減少させることである。予防ワクチンの以下の3つのカテゴリーを臨床試験で試験したが、不本意な結果に終

50

わった。1) 全ウイルス、ii) タンパク質サブユニット、およびiii) 遺伝子ベースのサブユニットワクチン (Stanberry et al., 2000)。1970年代では、多数の死滅ウイルスワクチンが調査されたが、有効なものは無かった。最も最近では、弱毒化HSVが僅かに免疫原性を示すことが見出された。臨床試験では複製インコンピテントウイルスが使用されているが、複製インコンピテントウイルスの臨床的使用は、安全性が懸念される。2つの組換え糖タンパク質に基づくサブユニットワクチンが、異なるアジュバント処方物と合わせて臨床的に評価されている。Chironによって開発されたワクチンは、トランスフェクトされたCHO細胞から精製され、アジュバントMF59中で処方されたHSV-2のgD₂およびgB₂の短縮形態を含む。Glaxo-Smithkline (GSK) によって開発された別のワクチンは、アジュバント (ミョウバンおよび3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A (MPL)) で処方した短縮gD₂を含む。両ワクチンは、免疫原性を示し、第I/II相試験で十分に安全性が確認された。しかし、第III相分析では、ChironワクチンはHSV-2セロコンバージョンに対して全く効果がなく、研究は中断された。GSKワクチンは、HSV-1およびHSV-2血清反応陰性の女性ボランティアにおいて有意な有効性 (73~74%) を示したが、男性では全く効果がなかった。第I相試験でgD₂を使用した遺伝子ワクチンも使用しており、免疫原性データを現在分析中である。

10

【0010】

制限されたワクチン有効性でさえもHSV感染者に有利な影響を与えるが、これらの試験は少数のワクチンの可能性しか試験していない。これは、ワクチンの発見が体系的ではなかったためである。全ウイルスワクチンの実行により、免疫系への病原体自体の提示により至適な免疫が得られると推測される。実際、全病原体ワクチンに対する免疫応答の範囲および持続時間は、歴史的にサブユニットワクチンよりも良好であった。しかし、ワクチン株の病原性を考慮しなければならない。サブユニットワクチンは、現在まで、その予想される病原体および感染時の免疫原性におけるその予想される重要性に基づいてワクチン試験を選択している。これらのアプローチによりHSVに対する1つの候補が同定されるが、有効性がいくらか制限され、他の処方物では全く効果が無い。従って、ヘルペス疾患から防御するための新規且つ改良されたヘルペスウイルスワクチン発見方法が必要である。

20

【発明の開示】

【0011】

30

発明の概要

本発明の特定の態様では、防御抗原についてHSV-1のコード配列を体系的にスクリーニングするために2つの方法を使用した。以前に証明されたように、ランダムELI (RELI) により、新規の候補が得られた。しかし、微生物ゲノム学および高処理オリゴヌクレオチド合成の開発ならびに直鎖状発現エレメント (LEE) の発明により、範囲およびスピードに関してELIのスクリーニング力を増大させることができる。本発明の種々の態様は、新規の配向 (directed) ELI (DELI) 法を使用し、HSV-1ゲノムから種々の新規の候補が同定される。病原体のゲノム配列を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または他の核酸増幅技術によって遺伝子を増幅するためのプライマーをデザインすることができる。マイクロタイター形式での安価なオリゴヌクレオチド合成により、病原粒子の全ゲノムのプライマー組を産生する。ELIを実施するために遺伝子免疫化のための各PCR増幅ORFの発現ベクターへの構築が必要である。数百の予想されるクローニング工程および関連する人工物を回避するために、本発明者らは直鎖状発現エレメントを開発した (米国特許第6,410,241号 (参照として本明細書に組み入れられる))。LEEプロトコールでは、PCR増幅ORFを、有利なプロモーターエレメントおよびターミネーターエレメントと共有結合または非共有結合させ、その後ゲノム免疫化による発現のために動物に直接送達させる。このクローニングに対する代替法により、発現ベクターを得るプロセスが劇的に効率的になる。多数の供給源由来の多数の異なる長さのゲノムをPCR増幅し、種々の方法を使用して異なる発現エレメントに有効に連結した。インピボでのLEEおよびプラスミドを保有する遺伝子発現の定量により、活性レベルがほぼ同一であることが示された。LEEおよびプラスミドとし

40

50

て送達された遺伝子抗原によって得られた免疫応答および防御アッセイの読み取りでは区別不可能である。

【0012】

感度が有意に増加する一方でプロセスの時間、費用、および変動性が減少する新規のELIスクリーニング法をデザインするために、これらの技術を組み合わせた。各ライブラリーメンバーの配列が定義されているので、各サブライブラリープールの成分をデザインすることができ、完全なゲノム範囲を確保し、適切な発現のために構築物を位置付ける。これにより、ライブラリークローンの冗長性および発現しないDNAのバゲッジの保有のための統計的に必要な冗長性が回避される。配列指示(sequence-directed)断片(指示増幅(directed amplification))の構築により、ライブラリーサイズ、マウス数、シッピングラウンド(sibbing round)、および誤りが減少する。マイクロタイタープレート中で病原体の全コード能力を示す規則正しいアレイを作製するために、病原体のそれぞれの同定された遺伝子をすぐに作製することができる。大腸菌ベースのプラスミド増殖を使用しないで遺伝子アレイが発現するので、時間および供給源が節約され、クローニングに関連する誤りが回避される。

【0013】

本発明により、ヘルペスウイルス科のウイルスに対する免疫化に関連する種々の困難および問題が克服される。本発明の種々の態様は、被験体の免疫化のための抗原として使用することができるヘルペスウイルスポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を含む。本発明はまた、ヘルペスウイルス科の他のウイルス由来の抗原を含むワクチンおよびこのようなワクチンを使用したワクチン接種方法を含み得る。ワクチン組成物および方法は、種々のヘルペスウイルス感染症ならびにこのような感染症に関連する疾患および障害に対する免疫化に広範に適用可能である。本明細書で使用される、「抗原」は、被験体中で免疫応答を誘導する物質である。詳細には、組成物および方法は、ヘルペスウイルス科のウイルス(例えば、HSV-1、HSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ウシヘルペスウイルス(BHV)、ウマヘルペスウイルス(EHV)、サイトメガロウイルス(CMV)、オナガザルヘルペスウイルス(CHVまたはサルBウイルス)、またはエプスタイン-バーウイルス(EBV))のゲノムの機能的スクリーニングによって得られたポリペプチドおよび/またはポリペプチドをコードする核酸を含み得る。

【0014】

本発明の特定の態様は、ヘルペスウイルス科メンバー由来の単離ポリヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、アルファヘルペスウイルス亜科のウイルス(特に、HSV-1、HSV-2)または単純ウイルス属の他のメンバーからポリヌクレオチドを単離することができる。ポリヌクレオチドには、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列番号:53、配列番号:55、配列番号:57、配列番号:59、配列番号:61、配列番号:63、配列番号:65、配列番号:67、配列番号:69、配列番号:71;配列番号:73、配列番号:75、配列番号:77、配列番号:79、配列番号:81、配列番号:83、配列番号:85、配列番号:87、配列番号:89、配列番号:91、配列番号:93、配列番号:95、配列番号:97、配列番号:99、配列番号:101、配列番号:103、配列番号:105、配列番号:107、配列番号:109、配列番号:111、配列番号:113および/もしくは配列番号:115に記載の配列、その相補物、断片、または密接に関連する配列を含むヌクレオチド配列が含まれ得るが、これらに限定されない。さらなる態様では、本発明は、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:11、配列番号:13、配列番号:15、配列番号:17、配列番号:19、配列番号:21、配列番号:23、配列番号:25、配列番号:27、配列番号:29、配列番号:31、配列番号:33、配列番号:35、配列番号:37、配列番号:39、配列番号:41、配列番号:43、配列番号:45、配列番号:47、配列番号:49、配列番号:51、配列

番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69 配列番号：71；配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115のうち少なくとも1つと共通する少なくとも15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、125個、150個、200個もしくはそれ以上の連続するヌクレオチドを含む配列、その相補物、またはその断片、ならびにヌクレオチドの任意の介在長または範囲を有する領域を含むこのようなポリヌクレオチドに関することができる。いくつかの特定の態様では、本発明は、UL1（配列番号：7）；UL17（配列番号：39）；UL28（配列番号：63）；またはUS3（配列番号：105）をコードする特定の核酸の全長、その断片、変異型、または密接に関連する配列を含むポリヌクレオチドに関するが、これに限定されない。なおさらに特定の態様は、配列番号：5に記載のUL1；配列番号：37に記載のUL17；配列番号：59に記載のUL28；および配列番号：103に記載のUS3の核酸の特定の断片、さらなる断片、変異型、または密接に関連する配列に関する。

10

【0015】

ヘルペスウイルスポリヌクレオチドを、ゲノムDNAまたはゲノムDNA発現ライブラリーから単離することができるが、必要ではない。例えば、ポリヌクレオチドはまた、他方の種における相同配列の防御能力に基づいて防御性を示すと決定されたある種由来の配列であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、以前に動物被験体またはヒト被験体で防御性が示されているHSV-1ホモログの各ゲノム配列の分析後に防御性を示すと決定された同一のアルファヘルペスウイルス亜科（アルファウイルス亜科）またはベータヘルペスウイルス（ベータヘルペスウイルス亜科）亜科もしくはガンマヘルペスウイルス（ガンマヘルペスウイルス亜科）亜科などの異なる亜科の水痘ウイルス属から選択される配列であり得る。以下で考察されるように、ポリヌクレオチドは、天然起源である必要もなければ、正確に天然に存在するヘルペスウイルス抗原である抗原をコードする必要もない。

20

【0016】

多数の態様では、ヘルペスウイルスポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヘルペスウイルスに対する被験体の免疫化（例えば、遺伝子免疫化）のために特定の態様で使用することができる核酸ベクター中に含まれ得る。種々の態様では、遺伝子免疫化ベクターは、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドを発現することができる。他の態様では、遺伝子免疫化ベクターは、ヘルペスウイルスポリペプチドを含む融合タンパク質を発現することができる。遺伝子免疫化ベクターによって発現されるポリペプチドには、異種抗原ペプチド、シグナル配列、免疫刺激ペプチド、オリゴマー化ペプチド、酵素、マーカータンパク質、または毒素などを含み得るヘルペスウイルスポリペプチドを含む融合タンパク質が含まれ得る。遺伝子免疫化ベクターは、ヘルペスウイルス/マウスユビキチン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチ

30

40

【0017】

特定の態様では、遺伝子免疫化ベクターは、真核細胞中で作動可能なプロモーター（例えば、CMVプロモーターが含まれるが、これに限定されない）を含む。このようなプロモーターは、当業者に周知である。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、ウイルス発現ベクターまたはプラスミド発現ベクターに含まれる。種々の発現系が周知である。発現系には、直鎖状または環状発現エレメント（LEEまたはCEE）、発現プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、および単純ヘルペスウイルス、pVAX1（商標）（Invitrogen）、pCIneo、pCI、およびpSI（Promega）、Adeno-X（商標）発現系、およびRetro-X（商標）系（Clontech）ならびに他の市販の発現系が含まれるが、これら

50

に限定されない。遺伝子免疫化ベクターを、裸のDNAとして投与するかウイルス、非ウイルス、細胞媒介性、病原体媒介性ワクチンに組み込むか、他の公知の核酸送達体またはワクチン接種法によって投与することができる。

【0018】

他の態様では、ポリヌクレオチドは、同一の配列であっても同一の配列でなくてもよい一つまたは複数の抗原をコードすることができる。単一の分子中で任意の順番にて複数の抗原をコードすることができ、および/または複数の抗原を個別のポリヌクレオチドがコードし得る。複数の抗原を、単一の処方物で共に投与するか、個別の処方物で異なる時間で投与するか、異なる処方物で共に投与することができる。遺伝子免疫化のための発現ベクターは、ヘルペスウイルス科の一つまたは複数のウイルス由来の少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上の抗原をコードする少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上のポリヌクレオチドまたはその断片を含み、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上の他の病原体由来の他の抗原または免疫調整剤を同様に含み得る。

【0019】

本発明の種々の態様は、ウイルスポリペプチド（その変異型または模倣物が含まれる）およびウイルスポリペプチド、その変異型、または模倣物を含む組成物を含み得る。ウイルスポリペプチド、特にヘルペスポリペプチドには、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114、および/もしくは配列番号：116のアミノ酸配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列が含まれるが、これらに限定されない。さらなる態様では、本発明は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70もしくは配列番号：72のうち少なくとも1つと共通する少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、125個、150個、200個もしくはそれ以上の連続するアミノ酸を含む配列、その相補物、または断片、ならびにアミノ酸の任意の介在長または範囲を有する領域を含むポリペプチドに関することができる。いくつかの特定の態様では、本発明は、UL1（配列番号：8）；UL17（配列番号：40）；UL28（配列番号：64）；またはUS3（配列番号：106）のアミノ酸配列の全長、断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を含むポリペプチドに関するが、これに限定されない。なおさらに特定の態様は、配列番号：6に記載のUL1；配列番号：38に記載のUL17；配列番号：60に記載のUL28；および配列番号：104に記載のUS3の特定の断片、さらなる断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列に関する。

【0020】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる態様はまた、組換え法などの公知の方法を使用したこのようなポリペプチドの産生方法に関する。

【0021】

本発明のポリペプチドは、合成、組換え、または精製ポリペプチドであり得る。本発明のポリペプチドは、単一の分子中に提示される複数の抗原を有し得る。抗原は、同一の抗原である必要はなく、且つ任意の特定の順序である必要もない。本発明の範囲内のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗原は合成であってよく、そして/または天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを模倣するか改良するために操作することができ、依然として本発明で有用であり得ると認識される。当業者は、明細書を考慮して、任意の数のこのような化合物を得ることができる。

10

【0022】

本発明の種々の態様は、ワクチン組成物を含む。ワクチン組成物は、(a)薬学的に許容される担体、および(b)少なくとも1つのウイルス抗原またはウイルス抗原をコードする核酸を含み得る。本発明の特定の態様では、ワクチンは、ヘルペスウイルス科に対するものであり得る。他の態様では、ワクチンは、アルファヘルペスウイルス亜科のメンバー(特に、HSV-1、HSV-2、またはVZV)に指向し得る。いくつかの態様では、HSV抗原は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載の配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を有する。他の特定の態様では、ワクチン組成物は、このようなHSV抗原をコードする核酸(配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115に記載の配列、その相補物、断片、または密接に関連する配列を含むヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されない)を含む。いくつかの特定の態様では、本発明は、UL1(配列番号：7および配列番号：8)；UL17(配列番号：39および配列番号：40)；UL28(配列番号：63および配列番号：64)；またはUS3(配列番号：105および配列番号：106)の核酸およびアミノ酸配列の全長、断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を含むワクチン組成物に関するが、これに限定されない。なおさらなる特定の態様は、配列番号：5および配列番号：6に記載のUL1；配列番号：37および配列番号：38に記載のUL17；配列番号：59および配列番号：60に記載のUL28；ならびに配列番号：103および配列番号：104に記載のUS3の特定の断片、さらなる断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列に関する。

20

30

40

【0023】

本発明の特定の態様では、ワクチンは、(a)薬学的に許容される担体、ならびに(b)

50

少なくとも1つのポリペプチドおよび/またはヘルペスウイルス配列（その断片、変異型、または模倣物が含まれる）を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。ヘルペスウイルスポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドには、HSVポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたはその断片もしくは密接に関連する配列が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、ヘルペスウイルスポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、HSV-1配列であり得る。

【0024】

本発明のワクチンは、複数のポリヌクレオチド配列および/または複数のポリペプチド配列を含み得る。いくつかの態様では、ワクチンは、ヘルペスウイルス配列を有するポリペプチドをコードする少なくとも第1のポリヌクレオチドまたはヘルペスウイルス配列を有するポリペプチドを含む。他の態様は、少なくとも第2、第3、第4などのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含み、第1のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび第2またはそれ以後のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは異なる配列を有する。さらに特定の態様では、第1のポリヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115の配列、その相補物、または断片を有することができ、ならびに/または配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載のポリペプチド配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列をコードすることができる。他の態様では、抗原断片は、2つまたはそれ以上の抗原断片を単一の分子に操作する多エピトープ形式で存在することができる。

【0025】

種々の態様では、本発明は、ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1、HSV-2、VZV、BHV、EHV、CMV、またはCHV）抗原およびこれらをコードする核酸の単離方法ならびに被験体において免疫応答を得るためのこのような単離抗原の使用方法に関する。本発明の抗原を、ヘルペスウイルス感染症またはヘルペス疾患に対する被験体のワクチン接種で使用することができる。

【0026】

本発明の態様は、免疫応答を誘導するのに有効な量の少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその抗原断片を動物に投与する工程を含む動物の免疫化方法を含み得る。ヘルペスウイルス抗原は、HSV-1、HSV-2、または任意の他のヘルペスウイルス種に由来し得る。上で考察し、以下で詳述するように、本発明で有用なヘルペスウイルス抗原は、天然の抗原である必要はない。むしろ、これらの抗原は、抗原または免疫応答が得られるかこ

れらに役立つ限り、当業者に公知の多数の方法で修飾された配列を有し得る。

【0027】

本発明の種々の態様では、動物または被験体は哺乳動物である。いくつかの場合、哺乳動物は、マウス、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、またはヒトであり得る。または、被験体は、ニワトリ、カメ、トカゲ、魚、およびヘルペスウイルス感染に感受性を示す他の動物から選択され得る。好ましい態様では、動物または被験体はヒトである。

【0028】

または、単純ヘルペスウイルス属(HSV)以外のヘルペスウイルス種(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)および/または水痘帯状疱疹ウイルス/ヒトヘルペスウイルス3(VZV)が含まれるが、これらに限定されない)に対する免疫応答を誘導するために、これら

10

の方法を実施することができる。

【0029】

本発明の他の局面では、(i)(a)公知の抗原ポリペプチドのアミノ酸配列もしくは公知の抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾すること、(b)公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得ること、または(c)公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得て、前記ホモログのアミノ酸配列もしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾することによって、少なくとも1つの試験ポリペプチドまたは試験ポリヌクレオチドを得る工程と、(i)

20

(i)前記試験ポリペプチドが抗原性であるか、または前記試験ポリヌクレオチドが抗原ポリペプチドをコードするかどうかを決定するのに適切な条件下で前記試験ポリペプチドまたは前記試験ポリヌクレオチドを試験する工程とを含む、免疫応答を引き起こす能力について少なくとも1つの試験ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする試験ポリヌクレオチドをスクリーニングする方法を意図する。試験ポリペプチドは、本明細書に記載の少なくとも1つのポリペプチドまたはその断片の修飾アミノ酸配列またはホモログを含み得る。試験ポリペプチドは、配列が修飾された少なくとも1つの上記アミノ酸配列またはその断片のアミノ酸配列を含み得る。

【0030】

特定の態様では、本方法は、試験ポリヌクレオチドを得る工程を含み得る。試験ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の配列またはその断片を有する少なくとも1つのポリペ

30

プチドの修飾アミノ酸配列またはホモログをコードするポリヌクレオチドを含み得る。態様は、少なくとも1つの本明細書に記載の核酸配列またはその断片のポリヌクレオチド配列の修飾を含む試験ポリヌクレオチドを得る工程を含み得る。

【0031】

種々の態様では、方法は、少なくとも1つの試験ポリペプチドが抗原性を示すことを同定する工程または少なくとも1つの試験ポリヌクレオチドが抗原ポリペプチドをコードすることを同定する工程をさらに含み得る。同定された抗原ポリペプチドまたは抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的組成物中に含めることができる。同定された抗原ポリペプチドまたは抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して、被験体にワクチン接種することができる。特定の態様では、被験体にヘルペスウイルスワ

40

クチンを接種する。好ましい態様では、ヘルペスウイルスはHSV-1である。他の態様では、被験体に非ヘルペスウイルス疾患ワクチンを接種する。

【0032】

本発明のさらに別の局面では、本明細書に記載の任意の方法によって抗原性を示すと決定された抗原ポリペプチドまたは前記抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得る工程と、ワクチン組成物中に前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドを含める工程とを含む、ワクチンの製造方法を意図する。

【0033】

本発明の組成物のワクチンを製造する工程と、前記ワクチンを被験体に接種する工程とを含む、被験体へのワクチン接種方法もまた意図する。特定の態様では、少なくとも1つ

50

のヘルペスウイルス抗原もしくはその断片または少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原もしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物を投与する工程を含む、病原体に感染した被験体の治療方法を意図する。ワクチン組成物は、遺伝子ワクチン、ポリペプチドワクチン、細胞媒介性ワクチン、弱毒化病原体ワクチン、生ベクターワクチン、食用ワクチン、死滅病原体ワクチン、精製サブユニットワクチン、複合ワクチン、ウイルス様粒子ワクチン、またはヒト化抗体ワクチンを含み得るがこれらに限定されない。特定の態様では、ワクチン組成物は、本明細書に記載の少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。種々の態様では、ワクチン組成物は、上記の少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその断片を含む。

【0034】

10

特定の態様は、上記の少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原もしくはその断片または少なくとも1つの上記ヘルペスウイルス抗原もしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物を投与する工程を含む、再活性化の疾患に対する治療的免疫応答を惹起する方法を含む。

【0035】

本発明のなおさらなる局面は、一つまたは複数のヘルペスウイルス抗原に反応性を示す少なくとも1つの抗原結合因子を被験体に投与する工程を含む、受動免疫化方法を含む。ヘルペスウイルス抗原は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチド、ペプチド、またはその変異型のアミノ酸配列を含み得る。抗原結合因子には、抗体、アンチカリン、またはアプタマーが含まれ得るが、これらに限定されない。

20

【0036】

特定の態様では、ワクチン接種方法は、初回刺激投与量のヘルペスウイルスワクチン組成物を投与する工程を含む。初回刺激投与後に追加免疫投与を行うことができる。種々の態様では、ワクチン組成物を、少なくとも1回、2回、3回、またはそれ以上投与する。ワクチン接種法は、(a) 少なくとも1つの核酸および/またはポリペプチドまたはペプチドワクチン組成物を投与する工程と、その後に(b) 少なくとも1つのポリペプチドおよび/または核酸ワクチン組成物を投与する工程を含み得る。本発明の一定の局面は、(a) 上記のアミノ酸配列を有する抗原に反応性を示す抗体を試料と混合する工程と、(b) 抗原と抗体の結合について前記試料をアッセイする工程とを含む、ヘルペスウイルスおよび/またはヘルペスウイルスに対する抗体の検出方法を含み得る。

30

【0037】

さらなる局面では、抗原をコードする核酸の供給源に関係なく、指定(directed) ELI (DELI) 法を使用することができる。動物中で免疫応答を得る能力を有するポリペプチドをコードするかどうかを決定するための少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、10個、20個、50個、100個、500個、数千個、および数十万個(これらの間の整数が含まれる)の読み取り枠のスクリーニング法の例は、既知または予想される読み取り枠の増幅または合成によってプロモーターに連結された読み取り枠を含む少なくとも1つの直鎖状または環状発現エレメントをインビトロで調製する工程と; 前記少なくとも1つの直鎖状または環状発現エレメントをクローニングまたは細菌増殖を介在するか介在することなく動物内の細胞に移入する工程と; 前記発現エレメント中で読み取り枠によってコードされたポリペプチドの発現によって動物内で免疫応答が得られるかどうかを決定するアッセイを行う工程とを含み得る。特定の態様では、読み取り枠をインビボで産生し、その後インビトロでプロモーターに非共有結合させることができる。種々の態様では、直鎖状または環状発現エレメントは、読み取り枠に連結したターミネーターをさらに含み得る。読み取り枠は、病原体のRNA、DNA、および/またはゲノムヌクレオチド配列に由来し得る。病原体は、ウイルス、細菌、真菌、藻類、原生動物、節足動物、線虫、扇形動物、または植物であり得る。特定の態様では、発現エレメントの調製は、読み取り枠へのプロモーターおよび/またはターミネーターの非共有結合または共有結合を含み得る。発現エレメントの調製は、ポリメラーゼ連鎖反応もしくは他の核酸増幅技術および/または当技術分野において公知の核酸合成法の使用を含み得る。種々の態様では、発現エレメントの調製は、読

40

50

み取り枠の化学合成を含み得る。方法は、動物によって産生され、且つ読み取り枠によってコードされるポリペプチドに指向する抗体の同定および/または単離をさらに含み得る。特定の態様では、直鎖状または環状発現エレメントを動物に注射することができる。種々の態様では、動物を病原体による攻撃誘発から保護する。本方法は、動物に防御を付与する一つまたは複数の抗原の同定を含み得る。

【0038】

本発明の特定の態様では、本方法は、LEE/CEE産生のためのキメラDNAの作製を含み、所望ならばその後共有結合に変化させることができる非共有結合のための相補的一本鎖オーバーハングの作製が含まれるが、これらに限定されない。核酸エレメントの連結または結合方法の非限定的な例には、dU/UDG、rU/Rnase、T4ポリメラーゼ/dNTP排除、dスパーサー、dブロック、リボSTOPパー、および異なる長さのアニーリング直鎖状DNAが含まれる。共有結合を使用した結合の作製方法には、PCRおよび遺伝子アセンブリ技術が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0039】

本明細書で使用される、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を含み得る。用語「含む(comprising)」と共に使用される場合、本明細書で使用される、用語「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは1つより多くのことを意味することができる。本明細書で使用される、「別の(another)」は、少なくとも第2またはそれ以上を含み得る。

【0040】

本明細書で使用される、「複数の(plurality)」は、1つより多くのことを意味する。一定の特定の局面では、複数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51またはそれ以上、ならびにこれらから導き出すことができる任意の整数およびこれらから導き出すことができる任意の範囲を含み得る。

20

【0041】

本明細書で使用される、「これらから導き出すことができる任意の整数」は、本明細書に記載の数字の間の整数を含み、この「これらから導き出すことができる任意の範囲」は、このような数字または整数から選択された任意の範囲を含み得る。

30

【0042】

本明細書で使用される、「断片」は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載のポリペプチド配列の連続残基を有するか、または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500もしくはそれ以上、または任意の点の間の任意の範囲もしくは任意の点の間の任意の他の整数を有するが、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、

40

50

配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116の全長未満の配列であるか；または、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71；配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115に記載のヌクレオチドの連続残基を有するか、または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500もしくはそれ以上、または任意の点の間の任意の範囲もしくは任意の点の間の任意の他の整数を有するが、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71；配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115の全長未満の配列をいう。「断片」の定義をアミノ酸および核酸の断片に適用することができることが意図される。

【0043】

本明細書で使用される、「抗原断片」は、動物中で免疫応答を誘発することができる上記定義の断片をいう。

【0044】

「ヘルペスウイルス配列」などの生物中の配列の記載は、その生物に固有であるかその生物で見出される断片（または全長領域）を構成する連続残基（アミノ酸または核酸のいずれか）のセグメントをいう。

【0045】

添付の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の一定の局面をさらに証明する。本明細書に記載の特定の態様の詳細な説明と合わせた一つまたは複数のこれらの図面を参照することにより、本発明をより良く理解することができる。

【0046】

例示的態様の説明

10

20

30

40

50

本発明は、典型的には防御性を示すヘルペスウイルス科の一つまたは複数のメンバー（ヘルペスウイルス亜科）からの核酸および/またはポリペプチドの単離によってヘルペスウイルスワクチンの現在の制限を克服する。特定の態様は、単純ヘルペスウイルス1型および2型（それぞれHSV-1およびHSV-2）または他のヘテロウイルス（すなわち、VZV、BHV、EBV、CMV、CHV、またはEHV）由来の単離核酸および/またはポリペプチドを含む。ヘルペスウイルスの単離核酸およびポリペプチドを含む組成物ならびにこのような組成物の使用方法により、ヘルペスウイルス科メンバーに対する予防的または治療的免疫化を得ることができる。本発明の一つまたは複数の組成物の導入により、被験体にヘルペスウイルス科の一つまたは複数のウイルス、特にアルファヘルペスウイルス亜科（アルファヘルペスウイルス亜科）（近縁のウイルスHSV-1およびHSV-2が含まれる）に対する抗体の産生を誘導することができる。本発明の他の態様では、抗体およびアンチカリンなどの結合因子を、受動免疫化法または他の治療法で使用することができる。

10

【0047】

ヘルペスウイルス科メンバーによる広範なヒト感染症は、ワクチン学の特定の課題である。例えば、ヒトにおけるヘルペスウイルス感染症は、単核細胞症、失明、脳炎、癌、または他の病態を発症することができる。したがって、ヒトおよび他の脊椎動物のヘルペスウイルス感染症の有効な治療が臨床上重要である。本発明では、発現ライブラリー免疫化（ELI）プロセスを単独およびLEEと組み合わせて使用して、ヘルペスウイルス感染症および関連疾患に対するワクチン候補を同定することができる。臨床的に、ヘルペスウイルスに対する治療または免疫化のいくつかの目的には、一次感染に関連する疾患の重症度の減少；潜在ウイルスの再活性化頻度の減少；再活性化疾患の重症度の制限；および一次または再活性化感染症に関連するウイルス伝播の制限が含まれ得る。

20

【0048】

サブユニットワクチンのための抗原選択への総括的な先入観の無いアプローチは、遺伝子免疫化（Tang et al., 1992）と発現ライブラリー免疫化（ELI）の発明（Barry et al., 1995）との組み合わせによって可能である。ELIは、防御ワクチンを同定するためのJennerに類似の経験的方法である。しかし、Jennerと異なり、全病原体最終生成物よりもむしろサブユニットに基づく。ELIを使用して、防御抗原について病原体の全ゲノムを検索することができる。病原体DNAを断片化し、哺乳動物発現ベクターにクローン化して、生物の全遺伝物質に対応するライブラリーを作製する。1995年に、病原体ライブラリーでの事前のワクチン接種によるマイコプラズマ（M.）プルモニス攻撃誘発からのマウスの防御におけるELIの有用性が証明された。完全ライブラリーをサブライブラリーに分割して、試験動物群の個別の免疫化に使用する。攻撃誘発後に疾患から動物を防御するサブライブラリー接触材料を正にスコアリングする。おそらく、正のサブライブラリー内の一つまたは複数のプラスミドは、防御応答を担う。防御能力を保持する構成性抗原発現プラスミドを同定するために、サブライブラリーをさらに分割し、試験することができる。プールからプラスミドDNAを調製し、より多数の動物への接種に使用し、防御についてアッセイする。他の研究者は、その後、他の細菌および寄生虫病原体に対するELIの首尾の良い適用を報告している。Brayton et al.は、心水症のマウスモデルにおける防御サブライブラリープールをスクリーニングするためにリケッチア（心糸状虫）発現ライブラリーを使用した。異なるサブライブラリーを接種し、至適レベルの細菌で攻撃誘発した10群のマウスのうちの4群は、感染レベルの減少を示した（Brayton et al. 1998）。別の研究では、寄生蠕虫テニア・クラシセプスのcDNAから部分的発現ライブラリーを作製し、これを使用して蠕虫疾患に対してマウスを免疫化した。接種材料はゲノムの一部のみを示したが、寄生虫血症が1/2に減少した（Manoutcharian et al., 1998）。Alberti et al.は、トリパノソーマ・クルーズ（シャーガス病を発症する原生動物）ゲノムから作製した発現ライブラリーにより、マウスにおいて特異的免疫応答が刺激されることを見出した（Alberti et al., 1998）。リーシュマニア・メジャー（リーシュマニア症を発症する原生動物）のゲノムDNAから作製したライブラリーは、攻撃誘発マウスの寄生虫負荷を僅かに減少させることができた（Piedrafita et al., 1999）。このライブラリーのさらなる分割物を接種した試験マウ

30

40

50

スは、元のマウスよりも防御レベルが高かった。これは、プラスミドの接種材料の2ラウンドの複雑さの減少によって防御クローンが富化したことを示す。最近の研究では、マイコプラズマ・ハイオニューモエ由来のランダムゲノムDNA断片を、発現ベクターにクローン化し、読み取り枠についてスクリーニングし、ブタの免疫化に使用した。これらのライブラリーは、感染からこの天然病原体宿主を防御することを示した (Moore et al., 2001)。さらに、Smooker et al. (2000) は、マラリアに対するげっ歯類の免疫化においてELIを研究した。

【0049】

ELI研究によって、混合抗原ライブラリーが疾患を防御することができ、いくつかの場合、元の混合物の複雑さを減少させることが現在示されている。ランダム断片プラスミドクローンを使用した最初に示されたELI (RELI) は、有効なワクチン候補を提供することができる。しかし、本発明者らはまた、より多数のワクチン候補を獲得し、且つ時間および技術上の困難さを減少させるためにELIを劇的に改良した。配列病原体ゲノムの利用可能性により、配列指向プライマーをデザインし、PCRによってORFを増幅することができる。各ライブラリーメンバーを定義するので、完全なゲノム範囲が確保され、構築物を適切に発現する位置に配置することができる。これにより、統計的に必要な冗長性が排除され、その結果、配向ELI (DELI) によりライブラリーのサイズおよびシピングラウンド数が減少する。配向ELIの実施が技術的に困難であるので、ゲノムの全ORFを提示するのに十分な各ライブラリークローンを構築した。何千もの手ごわいクローニング工程を回避するために、直鎖状発現エレメント (LEE) を開発した。LEEプロトコールでは、PCR増幅ORFを所望のプロモーターおよびターミネーターに連結させ、その後遺伝子発現のために動物に直接送達させることができる。

10

20

【0050】

本発明は、ヘルペスウイルス感染症に対する脊椎動物 (ヒトが含まれる) の免疫化のための組成物および方法を提供する。本発明の組成物は、ヘルペスウイルスポリペプチドをコードする単離核酸; ヘルペスウイルスポリペプチド (抗原成分としての相補物、断片、模倣物、または密接に関連する配列が含まれる); および/またはヘルペスウイルスメンバー由来の抗原に結合する結合因子または親和性因子を含み得る。典型的には、ワクチン候補物についてヘルペスウイルスゲノム (例えば、HSV-1ゲノム) をスクリーニングするようにELIおよびLEE法を適合させることによって本発明の核酸およびポリペプチドを同定する。本発明の組成物および方法は、ヘルペスウイルス感染症 (例えば、HSV-1およびHSV-2感染症) に対するワクチン接種に有用であり得る。

30

【0051】

種々の態様では、ヘルペスウイルス科メンバーに指向するワクチン組成物を提供することができる。本発明のワクチンは、ヘルペスウイルスの核酸および/またはポリペプチドを含み得る。特定の態様では、ヘルペスウイルスは、HSVウイルス、好ましくはHSV-1またはHSV-2である。本発明のワクチン組成物は、被験体にHSVおよび/または他のヘルペスウイルス感染症の防御的または治療的耐性を付与することができる。

【0052】

さらに他の態様では、本発明は、LEEによって発現ライブラリーを構築する工程と、ヘルペスウイルス感染症からの防御または治療を付与するヘルペスウイルス遺伝子 (例えば、HSV-1遺伝子) を同定するために発現ライブラリー免疫化によってこれをスクリーニングする工程とを含むスクリーニング方法を提供し得る。さらに、この方法を使用して、他の関連生物に由来するか同定されたヘルペスウイルスポリペプチドのポリペプチドを模倣する分子の合成によるポリヌクレオチドおよびポリペプチドを同定して使用することができる。

40

【0053】

1. ヘルペスウイルス科

ヘルペスウイルス科のメンバー (ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae)) は、広範な脊椎動物宿主の核で複製される (ヒトで単離された8種、ウマ、ウシ、マウス、ブタ、ニ

50

ワトリ、カメ、トカゲ、魚類、およびいくつかの無脊椎動物（カキなど）で単離された数種が含まれる）。ヒトヘルペスウイルス感染症は地方病性であり、性的接触がいくつかのウイルス（単純ヘルペスウイルス1型および2型（HSV-1、HSV-2）が含まれる）の一般的な伝播方法である。陰部ヘルペス流行の増大および対応する新生児感染の増大ならびにヒト癌の補因子としてのエプスタイン-バーウイルス（EBVまたはHHV-4）およびカポジ肉腫ヘルペスウイルスの影響により、このウイルス科に対するより良好なワクチン接種の必要性が切迫している。

【0054】

全てのヘルペスウイルスビリオンは、エンベロープ、キャプシド、外被、およびコアを有する。コアは、dsDNAの単一の直鎖状分子を含む。キャプシドはコアを覆い、直径約100 nmの20面体である。キャプシドは、12個の五角形キャプソマー（各先端に1つ）および150個の六角形キャプソマーからなる162個のキャプソマーから構成される。外被は、キャプシドとエンベロープとの間に存在する。外被は、無定形であり、しばしば非対称であり、これはヘルペスウイルス科の特徴である。外被は、ウイルス酵素（宿主細胞の化学的プロセスを調節および妨害してビリオンを産生させるのに必要なもの、宿主細胞の即時応答を防御するのに必要なもの、および機能が依然として理解されていないものがある）からなる。エンベロープは、ビリオンの外層であり、変化した宿主膜およびエンベロープ中に組み込まれた短いスパイクとして電子顕微鏡写真で認められる1ダースの固有のウイルス糖タンパク質から構成される。

【0055】

ヘルペスウイルスゲノムの長さは、120～230キロ塩基対（kbp）の範囲であり、その塩基組成は、G+C含量が31%～75%であり、60個～120個の遺伝子を含む。核内で複製が起こるので、ヘルペスウイルスは、遺伝子の複雑なアレイを有する巨大ゲノムを支持するために宿主の転写機構およびDNA修復酵素の両方を使用することができる。ヘルペスウイルス遺伝子はオペロン中に配置されず、ほとんど場合、個別のプロモーターを有する。しかし、真核生物遺伝子と異なり、非常に少数のヘルペスウイルス遺伝子がスプライシングする。全てのヘルペスウイルスゲノムは、正方向および逆方向の両方に長末端反復を含む。6つの長末端反復の配置およびどのようにしてこれらの反復がウイルスで首尾よく機能するのかについては完全に理解されている。

【0056】

ヘルペスウイルス科は、一般に、3つの亜科に分類される（アルファヘルペスウイルス亜科、ベータヘルペスウイルス亜科、およびガンマヘルペスウイルス亜科）。アルファヘルペスウイルス亜科には、単純ウイルス（例えば、HSV-1およびHSV2）およびバリセロウイルス（例えば、水痘帯状疱疹ウイルス、VZV）が含まれる。ベータヘルペスウイルス亜科には、サイトメガロウイルス（例えば、ヒトヘルペスウイルス5（HHV-5）またはCMV）、ムロメガロウイルス（Muromegalovirus）（例えば、マウスサイトメガロウイルス1）、およびロセオロウイルス（Roseolovirus）（例えば、HHV-6およびHHV-7）が含まれる。最後に、ガンマヘルペスウイルス亜科には、リンホクリプトウイルス（例えば、HHV-4またはEBV）およびラジノウイルス（例えば、HHV-8）が含まれる。ヘルペスウイルス科のより詳細な概説は、Fields Virology（1996）（参照として本明細書に組み入れられる）で見出すことができる。

【0057】

II. ワクチン

ワクチン接種/免疫化の概念は、免疫系の2つの基本的な特徴（すなわち、免疫系成分の特異性および記憶）に基づく。ワクチン接種/免疫化は、被験体が攻撃誘発された抗原に特異的に指向する応答から開始される。さらに、記憶Bリンパ球およびTリンパ球集団を誘導することができる。抗原または抗原が由来する病原体への再曝露の際、免疫系がより迅速且つ劇的に応答するようにプライミングするので、ワクチン接種/免疫化によって被験体に病原体または病態からの免疫学的防御が付与される。同一または異なる抗原の被験体への反復投与またはワクチン組成物での被験体の追加免疫によって防御を増大させること

10

20

30

40

50

ができる。

【0058】

ワクチン接種は、病原体の被病原性形態または模倣物の全部または一部の投与による能動的に獲得した免疫の人為的誘導である。その目的は、疾患の予防または疾患の症状の治療であるので、この手順を、それぞれ予防的免疫化または治療的免疫化ともいうことができる。能動的に獲得した免疫に加えて、被験体の治療を有利にするために受動的免疫化法も使用することができる（以下を参照のこと）。

【0059】

特に、遺伝子ワクチン接種（DNA免疫化としても公知）は、適切な生物、組織、細胞、または標的細胞内で正確に折りたたまれた抗原の産生を誘導するために、インビボ、イン
10
ビトロ、またはエクスピボで抗原をコードする発現ベクターを投与する工程を含む。遺伝子ワクチンの移入により、これらの細胞内で抗原が発現し、この抗原は、典型的には一つまたは複数の病原体のタンパク質の一部または全部である。プロセッシングされたタンパク質は、典型的には、正常な細胞の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原と協力してトランスフェクトした細胞の細胞表面上に提示される。MHC抗原と関連したこれらの抗原決定基の提示は、決定基に特異的な細胞傷害性Tリンパ球クローンの増殖を誘発することが意図される。さらに、トランスフェクトされた細胞の発現によって放出されたタンパク質を、選出するか、内在化するか、全身体液性抗体応答を誘発するために抗原提示細胞によって発現することもできる。

【0060】

ワクチンは、非病原性であり、且つワクチン接種での使用に適切に修飾された病原体の全部もしくは一部またはその模倣物由来の抗原を含む組成物である。用語「ワクチン」は、痘瘡に対してヒトを免疫化するためにウシから単離された牛痘ウイルスを使用したJennerの元のワクチンに由来する。ワクチンには、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、弱毒化病原体、死滅（または不活化）病原体、不活化毒素、抗原の模倣物、および/または被験体中の免疫応答を誘導する他の抗原物質が含まれ得る。これらの抗原を、免疫化または治療される被験体に種々の方法で提示することができる。ワクチンの型には、遺伝子
20
ワクチン、ピロソーム、弱毒化または不活化全生物ワクチン、組換えタンパク質ワクチン、複合ワクチン、トランスジェニック植物ワクチン、トキシイドワクチン、精製サブユニットワクチン、多遺伝子操作ワクチン、抗イディオタイプワクチン、ペプチドミメトープ
30
（mimotope）、および当技術分野において公知の他のワクチン型が含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

免疫応答は、能動または受動免疫応答であり得る。身体が種々の抗原に曝された場合、能動免疫が増大する。これは、典型的には、Bリンパ球およびTリンパ球を含む。Bリンパ球（B細胞とも呼ばれる）が抗体を産生する。抗体が特定の抗原に結合し、それにより貪食細胞が抗原を破壊しやすくなる。典型的には、Tリンパ球（T細胞）はB細胞の抗体産生を助け、他のT細胞は直接抗原に攻撃するか、ウイルス感染細胞を死滅させ、感染をいく
40
らか制御することができる。特定の抗原または抗原型に特異的なB細胞およびT細胞が増大する。受容免疫化は、一般に、予め形成された抗体または抗原に結合する他の結合因子の投与をいう。免疫化の種々の目的の1つは、感染症または感染症もしくは病原体の存在に
50
関連する疾患からの一定の防御または治療を提供することである。

【0062】

ある特定の場、免疫応答は、養子免疫療法の結果であり得る。養子免疫療法では、被験体からリンパ球を獲得し、インビトロで抗原組成物に曝露するかこれでパルスし、その後被験体に投与しなおす。抗原組成物は、さらなる免疫刺激因子またはこのような因子をコードする核酸ならびにアジュバントまたは賦形剤を含み得る（以下を参照のこと）。一定の例では、被験体の血液または他の組織からリンパ球を得ることができる。リンパ球は、末梢血リンパ球であってよく、同一または異なる被験体（それぞれ自己ドナーまたは異種ドナーという）に投与することができる（方法または組成物の例については、米国特許

10

20

30

40

50

第5,614,610号；米国特許第5,766,588号；米国特許第5,776,451号；米国特許第5,814,295号；米国特許第6,004,807号、および米国特許第6,210,963号を参照のこと）。

【0063】

本発明は、被験体とヘルペスウイルス抗原またはヘルペスウイルス抗原をコードするポリヌクレオチドを含む抗原組成物との接触によって被験体を免疫化、治療、またはワクチン接種する方法を含む。抗原組成物は、核酸；ポリペプチド；弱毒化病原体（ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫など）（ヘルペスウイルス抗原を発現できてもできなくても良い）；ヘルペスウイルス抗原を発現する原核細胞；ヘルペスウイルス抗原を発現する真核細胞；およびピロソームなどまたはその組み合わせを含み得る。本明細書で使用される、「抗原組成物」は、典型的には、薬学的に許容される処方物中に抗原を含む。

10

【0064】

抗原は、任意の物質、分子、または宿主が異物と見なすことにより免疫応答を誘発する物質をコードする分子（特に抗原に反応性を示す特定の抗体またはT細胞の形態）をいう。抗原組成物は、さらに、本明細書に記載され、且つ当技術分野において公知である（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」を参照のこと）アジュバント、免疫調整剤、ワクチン送達体、および/または他の賦形剤を含み得る。

【0065】

ヘルペスウイルス抗原は、ヘルペスウイルス科のメンバーである任意のウイルス由来の抗原である。特定の態様では、ヘテロウイルス抗原は、HSV-1またはHSV-2ウイルス由来の抗原であり得る。

20

【0066】

抗原または抗原組成物の被験体への種々の移入方法は当技術分野において公知である。ワクチン接種方法には、DNAワクチン接種または遺伝子免疫化（例えば、米国特許第5,589,466号、米国特許第5,593,972号、米国特許第6,248,565号、米国特許第6,339,086号、米国特許第6,348,449号、米国特許第6,348,450号、米国特許第6,359,054号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）、食用トランスジェニック植物ワクチン（例えば、米国特許第5,484,719号、米国特許第5,612,487号、米国特許第5,914,123号、米国特許第6,034,298号、米国特許第6,136,320号、および米国特許第6,194,560号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）、経皮免疫化（Glenn et al., 1999および米国特許第5,980,898号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる））、経鼻または粘膜免疫化（例えば、米国特許第4,512,972号、米国特許第5,429,599号、米国特許第5,707,644号、米国特許第5,942,242号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）；ピロソーム（Huang et al., 1979；Hosaka et al., 1983；Kaneda, 2000；米国特許第4,148,876号；米国特許第4,406,885号；米国特許第4,826,687号；米国特許第5,565,203号；米国特許第5,910,306号；米国特許第5,985,318号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる））、および肝臓ベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。抗原送達方法を、一つまたは複数のワクチン接種投薬計画と組み合わせることもできる。

30

【0067】

抗原、ポリペプチド、または抗原をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンにより、種々の免疫応答の刺激の状況において抗原を提示することができる。種々のワクチンのいくつかには、弱毒化病原体、不活化病原体、トキシイド、抱合体、および組換えベクターなどが含まれる。これらのワクチンの多くは、同一または異なる病原体由来の抗原の混合物を含み得る。本発明のポリペプチドを、種々のワクチン組成物と混合するか、これによって発現するか、これと結合することができる。種々のワクチン組成物により、直接抗原を得ることができるか、抗原産生組成物（例えば、発現構築物）をその後抗原または抗原をコードする分子を産生または発現する細胞に送達することができる。

40

【0068】

A. 遺伝子ワクチン

細胞、組織、器官、または被験体への抗原をコードする核酸での接種、トランスフェク

50

ション、または形質導入によって、抗原または病原体に対して免疫化することができる。次いで、一つまたは複数の被験体細胞は、核酸によってコードされる抗原を発現し得る。したがって、抗原をコードする核酸は、被験体のワクチン接種および免疫化に有用な「遺伝子ワクチン」を含み得る。インピボでの核酸の発現は、例えば、プラスミド型ベクター、ウイルスベクター、ウイルス/プラスミド構築ベクター、またはLEEもしくはCEE構築物に由来し得る。

【0069】

好ましい局面では、核酸は、抗原タンパク質もしくはペプチドの全部または一部をコードするコード領域またはその免疫学的に機能的な等価物を含む。勿論、核酸は、さらなる配列（一つまたは複数の免疫調整剤またはアジュバントを含む配列が含まれるが、これらに限定されない）を含むか/またはコードし得る。核酸をインピボ、エクスピボ、またはインピトロで発現することができ、特定の態様では、核酸は、インピボ複製および/または発現のためのベクターを含む。組成物および方法の例については、米国特許第5,589,466号；米国特許第6,200,959号；および米国特許第6,339,068号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

10

【0070】

B. ポリペプチドワクチン

本発明によれば、被験体で免疫応答を誘導するための一つまたは複数の抗原ポリペプチドならびにその変異型または模倣物を含む抗原組成物を使用することができる。本発明の抗原ポリペプチドを合成するか、天然または組換え供給源から精製してポリペプチドワクチンの成分として使用することができる。種々の態様では、ポリペプチドには、融合タンパク質、単離ポリペプチド、他の免疫原性分子または物質と抱合したポリペプチド、および他の免疫原性分子または物質とのポリペプチド混合物など（方法および/または組成物の例については、米国特許第5,976,544号；米国特許第5,747,526号；米国特許第5,725,863号；および米国特許第5,578,453号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）が含まれ得る。

20

【0071】

C. 精製サブユニットワクチン

本明細書に記載の組成物および方法を使用して、サブユニットワクチンとして使用するための病原体の一部を単離することができる。サブユニットワクチンは、抗原として病原体の部分的または実質的に精製した分子を使用することができる。本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを、サブユニットワクチンとして使用することができるか、ヘルペスウイルスのサブユニットワクチンと組み合わせる使用するか、これに含めることができる。サブユニットワクチンの調製方法には、公知の精製方法による細菌、ウイルス、寄生虫、および/または他の病原体からの一定の抗原分子の抽出が含まれ得る。サブユニットワクチンの調製により、全病原体の病原性を中和してワクチン自体を非感染性にすることができる。例には、インフルエンザワクチン（ウイルス表面血球凝集素分子）およびネイセリア・メニンジタイディスワクチン（莢膜多糖分子）が含まれる。利点には、高純度、副作用が稀であること、および免疫の特異性が高いことが含まれる。より安全に産生する遺伝子操作技術によって、タンパク質サブユニットを非病原性微生物中で産生することができる。

30

40

【0072】

D. 複合ワクチン

複合ワクチンを産生するために、本発明の組成物および抗原を他の分子と抱合することができる。それ自体によって免疫原性が低いことが見出された多糖は、一旦免疫原性タンパク質と抱合すると非常に良好な免疫原となることが示されている（米国特許第4,695,624号（参照として本明細書に組み入れられる））。複合ワクチンを使用して、抗原ポリペプチドの免疫原性を増強することもできる。複合ワクチンは、糖脂質、多糖類、および他のポリペプチドなどの免疫学的特徴を増強するために、一定のペプチドの免疫学的特徴を使用する。本発明の特定の態様は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの免疫

50

原性を増強するための抱合体の使用を意図する。複合ワクチンの例は、米国特許第6,309,646号；米国特許第6,299,881号；米国特許第6,248,334号；米国特許第6,207,157号；および米国特許第5,623,057号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）で見出すことができる。

【0073】

E. ウイルス様粒子（VLP）ワクチン

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、VLPワクチンと組み合わせて使用することができる。多数のウイルス種では、核酸の非存在下でウイルスタンパク質をアセンブリして、いわゆるウイルス様粒子（すなわち、VLP）を形成することができる。同様に、通常ウイルスコアを形成するために核酸を共に組み込むタンパク質を、核酸の非存在下でアセンブリしていわゆるコア様粒子（CLP）を形成することができる。ウイルスゲノムの非存在下でのウイルスタンパク質の集合物（または修飾もしくはキメラウイルスタンパク質）を命名するために、用語「ウイルス様粒子」および「コア様粒子」を使用する。これらの粒子の文脈における抗原ペプチドの付加は、経口または他の粘膜投与経路のためのワクチンの開発で特に有用であり得る（例えば、米国特許第5,667,782号（参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。本発明の他の態様では、ピロソームを使用することもできる。ピロソーム組成物および方法の例を、米国特許第4,148,876号；米国特許第4,406,885号；米国特許第4,826,687号；およびKaneda, 2000（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）で見出すことができる。

10

【0074】

F. 細胞媒介性ワクチン

別の抗原提示方法は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのための発現伝達体または送達伝達体（delivery vehicle）として遺伝子操作された細胞を使用することである。例えば、本明細書に記載のように、被験体または他のドナーから細胞を単離し、抗原を発現する遺伝子構築物で形質転換することができる。選択後、必要に応じて抗原発現細胞を培養する。次いで、これらの細胞が抗原を発現して免疫応答を誘導する場合、細胞を被験体に移入または再移入することができる（米国特許第6,228,640号；米国特許第5,976,546号；および米国特許第5,891,432号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。

20

【0075】

特定の態様では、細胞媒介性ワクチンには、抗原提示細胞（APC）を含むワクチンが含まれ得る。通常または優先的にクラスII主要組織適合分子または遺伝子複合体で免疫細胞に抗原を表示または提示する細胞は、「抗原提示細胞」である。分泌分子または可溶性分子（例えば、サイトカインおよびアジュバントなど）もまた、抗原に対する免疫応答を補助または増強することができる。このような分子は、当業者に周知であり、種々の例を、本明細書に記載する。

30

【0076】

樹状細胞（DC）は、一次および二次免疫応答の両方の刺激において有効である強力な抗原提示細胞であるので、細胞媒介性ワクチン接種に使用することができる細胞型である（Steinman, 1999；Celluzzi and Falco, 1997）。本発明の抗原組成物での樹状細胞の曝露または形質転換により、典型的には、ヘルペスウイルス科のウイルス（例えば、HSV-1またはHSV-2）に特異的な強力な免疫応答が誘発されることが本発明で意図される。特定の態様では、APCへの提示前に抗体と抗原を反応させるかコーティングすることができる。

40

【0077】

G. 食用ワクチン

食用ワクチンは、感染症、病原体、生物、細菌、ウイルス、または非感染性疾患（自己免疫疾患など）に対して防御性を示す抗原の送達で使用される食用植物または食品である。特に、本発明は、ヘルペスウイルス科のメンバーに対して免疫化状態を誘導する食用ワクチンを提供する。本発明はまた、少なくとも1つの本発明のポリペプチド、ペプチド、またはその断片のコード配列を含む遺伝子構築物またはキメラ遺伝子構築物、遺伝子構築

50

物またはキメラ遺伝子構築物で形質転換された植物細胞およびトランスジェニック植物、ならびにこれらの植物細胞およびトランスジェニック植物由来の食用ワクチンの調製方法も含み得る。方法の例については、米国特許出願第20020055618号ならびに米国特許第5,914,123号；米国特許第6,034,298号；米国特許第6,136,320号；米国特許第6,444,805号；および米国特許第6,395,964号（参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。本発明はまた、本発明の食用ワクチンおよび食用ワクチンを含む組成物での疾患または感染症の治療方法を提供する。

【0078】

多数の植物が食用ワクチンの産生に有用であり、タバコ、トマト、ジャガイモ、ナス、ピーノ、ヤムイモ、ダイズ、エンドウ、サトウダイコン、レタス、ピーマン、セロリ、ニンジン、アスパラガス、タマネギ、グレープバイン、マスクメロン、イチゴ、イネ、ヒマワリ、ナタネ/カノーラ、コムギ、カラスムギ、トウモロコシ、綿、クルミ、トウヒ/針葉樹、ポプラ、およびリンゴが含まれる。食用ワクチンには、プロモーターおよび本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸構築物で形質転換した植物細胞が含まれ得る。配列は、選択的に、例えば、ペプチドに融合したコレラ毒素サブユニットBペプチドを含むキメラタンパク質をコードする。本発明の植物プロモーターには、CaMV 35S、パパイン、mas、および粒子結合デンプンシンターゼプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。さらに有用なプロモーターおよびエンハンサーは、国際公開公報第99/54452号（参照として本明細書に組み入れられる）に記載されている。

10

【0079】

本発明の食用ワクチンを、疾患または感染症を罹患しているかその危険性のある哺乳動物に投与することができる。好ましくは、食用ワクチンを、経口投与する（例えば、本発明のトランスジェニック植物の消費）。トランスジェニック植物は、植物の一部、抽出物、ジュース、液体、粉末、または錠剤の形態であり得る。食用ワクチンを、経鼻経路を介して投与することもできる。

20

【0080】

H. 生ベクターワクチン

別の態様では、弱毒化および/または非病原性微生物（例えば、同一または異なる微生物中で発現する本発明のペプチドまたは抗原をコードするポリヌクレオチドまたは核酸を含むウイルスまたは細菌）を含む生ベクターワクチンを調製することができる。「担体ワクチン」および「生抗原送達系」とも呼ばれる生ベクターワクチンは、ワクチン学の刺激的且つ多様な領域を含む（Levine et al., 1990；Morris et al., 1992；Barletta et al., 1990；Dougan et al., 1987；およびCurtiss et al., 1989；米国特許第5,783,196号；米国特許第5,648,081号；および米国特許第6,413,768号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる））。このアプローチでは、別の微生物の防御的外来抗原を発現し、この抗原を免疫系に送達させることによって、防御免疫応答が刺激されるように、生ウイルスまたは細菌ワクチンを修飾する。普及している生細菌ベクターには、特に、弱毒化サルモネラ属（Levine et al., 1990；Morris et al., 1992；Dougan et al., 1987；およびCurtiss et al., 1989）、カルメット-ゲラン菌（Barletta et al., 1990）、エルシニア・エンテロコリテイカ（Van Damme et al., 1992）、V.コレラ01（Viret et al., 1993）、および大腸菌（Hale, 1990）が含まれる。関連病原体の防御抗原を発現する生ベクター/ワクチンとしての弱毒化生物の使用は周知である。

30

40

【0081】

I. 弱毒化病原体ワクチン

特定の態様では、ヘルペスウイルス抗原を、抗原をコードするか、発現するか、これに結合することができる弱毒化病原体または細胞に組み込むか結合させることができる。遺伝子操作、病原体の培養条件の変更、病原体の処置（化学的または熱による不活化または他の手段など）によって弱毒化を行うことができる。弱毒化病原体によってコードされた抗原は、発現または曝露された場合に免疫応答を誘導し、抗原が由来するヘルペスウイルス科の一つまたは複数のメンバーまたは関連生物由来のウイルスに対して動物またはヒト

50

が防御および/または治療することができる抗原である。ヘルペスウイルス抗原を、これをコードするDNAによって弱毒化病原体に移入することができる。方法および組成物の例については、米国特許第5,922,326号；米国特許第5,922,326号；米国特許第5,607,852号、および米国特許第6,180,110号を参照のこと。

【0082】

J. 死滅病原体ワクチン

抗原を、死滅または不活化病原体または細胞と組み合わせることもできる。死滅病原体ワクチンには、非生存性となるように処理した（不活化した）野生型病原体または密接に関連する病原体の調製物が含まれる。不活化方法には、病原体の熱死滅が含まれる。熱死滅の1つの利点は、外来の残渣を放出せずにタンパク質の高次構造を変化させることができるので免疫原性が特異的であるが、免疫原性分子が多糖類であるワクチンに有用であるという点である。別の死滅方法には、有毒残渣を残存し得るが、タンパク質高次構造が有意に変化しないで免疫原特異性が保存される化合物（ α -プロピオ-ラコンまたはホルムアルデヒド）が含まれる。死滅病原体ワクチンを、本明細書に記載の他のワクチン伝達体と組み合わせて使用することができる。方法および組成物の例については、米国特許第6,303,130号、米国特許第6,254,873号、米国特許第6,129,920号、および米国特許第5,523,088号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

10

【0083】

K. ヒト化抗体

本発明のポリペプチド、その断片、または模倣物を使用して、ワクチンで使用するための抗イディオタイプ抗体を産生することができる。抗イディオタイプワクチンでは、免疫原は、病原体の抗原分子に対して惹起する第2の抗体のFab末端に対する抗体である。抗イディオタイプ抗体のFab末端は、病原体の抗原分子と同一の抗原形状を有し、抗原として使用することができる（例として、米国特許第5,614,610号および米国特許第5,766,588号を参照のこと）。本明細書で使用するための「ヒト化」抗体は、一つまたは複数の選択されたアミノ酸がヒト抗体でより一般的に認められるアミノ酸と交換された非ヒト種由来の抗体であり得る。日常的な組換え技術（特に、部位特異的変異誘発）の使用によってこれを容易に実施することができる。ヒト化抗体を、下記の受動免疫化因子として使用することもできる。

20

【0084】

III. 抗原スクリーニング法

免疫応答を起こす能力についての少なくとも1つの試験ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする試験ポリヌクレオチドをスクリーニングする方法は、(i) (a) PCRによってポリヌクレオチドを増幅すること、(b) 遺伝子アセンブリによって前記ポリヌクレオチドを構築すること、(c) 公知の抗原ポリペプチドのアミノ酸配列もしくは公知の抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾すること、(d) 公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得ること、または(e) 公知の抗原配列のホモログもしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドを得て、前記ホモログのアミノ酸配列もしくはこのようなホモログをコードするポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列を修飾することによって、少なくとも1つの試験ポリペプチドまたは試験ポリヌクレオチドを得る工程と、(ii) 試験ポリペプチドが抗原性であるか、または試験ポリヌクレオチドが抗原ポリペプチドをコードするかどうかを決定するのに適切な条件下で試験ポリペプチドまたは試験ポリヌクレオチドを試験する工程とを含み得る。

30

40

【0085】

スクリーニング方法は、疾患または感染症に対する防御のためのポリペプチドをコードする直鎖状ポリヌクレオチドの混合物の試験によってポリペプチドを同定する工程を含み得る。

【0086】

スクリーニング方法は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列

50

番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のうち少なくとも1つのポリペプチドまたはその断片のアミノ酸配列を修飾すること、またはそのホモログを得ることによって、試験ポリペプチドを得る工程を含み得る。スクリーニング方法は、修飾された配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116のうち少なくとも1つのアミノ酸配列またはその断片を含む試験ポリペプチドも含み得る。

【0087】

他の態様では、スクリーニング方法は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116の配列またはその断片を有する少なくとも1つのポリペプチドの修飾アミノ酸配列、またはそのホモログをコードするポリヌクレオチドを含む試験ポリヌクレオチドを得る工程、または配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115のうち少なくとも1つのポリヌクレオチド配列またはその断片を修飾することを含む試験ポリヌクレオチドを得る工程も含み得る。種々の態様では、ス

クリーニング方法は、抗原性である少なくとも1つの試験ポリペプチド、または抗原ポリペプチドをコードする少なくとも1つの試験ポリヌクレオチドを同定する工程をさらに含み得る。

【0088】

記載の方法は、同定された抗原ポリペプチドまたは抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的組成物中に含める工程を含み得る。方法はまた、被験体にワクチン接種するために同定された抗原ポリペプチドまたは抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用する工程も含み得る。一定の局面では、被験体にヘルペスウイルス、特にHSV-1ワクチンを接種することができる。さらに、被験体に、非ヘルペスウイルス疾患ワクチンを接種することができる。

10

【0089】

さらなる態様は、公知のスクリーニング方法および/または本明細書に記載のスクリーニング方法によって抗原性を示すと決定された抗原ポリペプチドまたは抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを得る工程と、ワクチン組成物中にポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含める工程とを含む、ワクチンの調製方法を含む。記載のワクチンの調製および被験体へのワクチン接種による被験体のワクチン接種でワクチン組成物を使用することができる。

【0090】

IV.ヘルペスウイルス抗原

本発明の抗原を、典型的には、ヘルペスウイルス科のメンバー、特に、アルファヘルペスウイルス亜科（すなわち、HSV-1、HSV-2、VZV、およびBHV）から単離する。特定の態様では、本発明の脊椎動物の免疫化は、ヘルペスウイルスコード配列のライブラリーを含む発現構築物を含む。種々の態様では、DNA発現構築物は、典型的には、完全な遺伝子（プロモーター、コード配列、およびターミネーター）を含む直鎖状発現エレメント（「LEE」）および/または環状発現エレメント（「CEE」）の文脈であり得る。これらのLEEおよびCEEを、細胞またはインタクトな生物中に直接移入して発現させて、標準的な超らせん複製プラスミド由来のものに匹敵する発現レベルを得ることができる（Sykes and Johnston, 1999）。特定の態様では、HSV（例えば、HSV-1およびHSV-2）の発現ライブラリーを提供する。発現ライブラリー免疫化（本明細書中、ELI）は、当技術分野において周知である（米国特許第5,703,057号（特に参照として本明細書に組み入れられる））。特定の態様では、本発明は、事実上任意の病原体に適用可能であり、病原体の生成物学的性質についての知識を必要としないELI法を提供する。この方法は、当業者に一般的に受け入れられており、任意の病原体の全ての可能なポリペプチドベースの決定基がそのゲノム中でコードされるという過程を操作する。本発明者らは、以前に、病原体の全てのポリペプチドベースの決定基を提示するゲノム発現ライブラリーを使用したワクチンの同定方法を考案した（米国特許第5,703,057号）。この方法は、有利になるように先入観の無い体系的様式でゲノムを介して免疫学的試薬を分類するために遺伝子免疫化の簡潔さを使用する。

20

30

【0091】

当業者に周知の技術および方法を使用して発現ライブラリーを調製する（Sambrook et al., 2001）。病原体のゲノム配列は、知られていても知られていなくても良い。したがって、実質的に病原体（例えば、HSV-1）の全ゲノムを提示するDNA（またはcDNA）が得られる。約 10^5 （約 $18 \times$ ゲノムサイズ）個のメンバーのライブラリーを得るために、物理的断片化または制限エンドヌクレアーゼによってDNAをある長さのセグメントに破壊する。次いで、被験体へのライブラリーまたはサブライブラリーの精製DNAの接種および病原体での被験体の攻撃誘発によりライブラリーを試験し、病原体での攻撃誘発からの被験体の免疫防御は感染に対する防御免疫応答を付与するクローンを示す。

40

【0092】

本発明のいくつかの態様では、（a）ヘルペスウイルス科のメンバーの核酸（例えば、ゲノムDNA）から調製した配列特異的直鎖状発現エレメントライブラリーを調製する工程と、（b）前記ライブラリーの少なくとも1つのLEEを含む薬学的に許容される担体を動物

50

に投与する工程と、(c)前記動物中で少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原を発現させる工程とを含む方法によってヘルペスウイルス抗原を得ることができる。発現ライブラリーは、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115の配列、その相補物、断片、または密接に関連する配列を有する少なくとも一つまたは複数のポリヌクレオチドを含み得る。配列番号：1、配列番号：5、配列番号：9、配列番号：13、配列番号：17、配列番号：21、配列番号：25、配列番号：29、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：41、配列番号：45、配列番号：49、配列番号：53、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：65、配列番号：69、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：79、配列番号：83、配列番号：87、配列番号：91、配列番号：95、配列番号：99、配列番号：103、配列番号：107、配列番号：111および配列番号：113のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のELIおよび関連技術を使用して同定される例示的遺伝子断片を示す。さらに、配列番号：3、配列番号：7、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：23、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：39、配列番号：39、配列番号：43、配列番号：47、配列番号：51、配列番号：55、配列番号：63、配列番号：63、配列番号：67、配列番号：71、配列番号：77、配列番号：81、配列番号：85、配列番号：89、配列番号：93、配列番号：97、配列番号：101、配列番号：105および配列番号：115のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のELIおよび関連技術を使用して同定される例示的全長遺伝子配列の代表である。発現ライブラリーを、遺伝子免疫化ベクターまたは任意の他の適切な発現構築物中でクローン化することができる。構築物は、ユビキチン遺伝子に発現ライブラリーポリヌクレオチドを連結するようにデザインされたヘルペスウイルス/マウスユビキチン/抗原融合タンパク質を産生するように配置したマウスユビキチンポリペプチドをコードする遺伝子を含み得る。ベクターは、真核細胞中で作動可能なプロモーター(例えば、CMVプロモーター)または任意の他の適切なプロモーターを含み得る。このような方法では、ポリヌクレオチドを、筋肉内注射、皮内注射、もしくは上皮注射または微粒子銃によって投与することができる。同様に、ポリヌクレオチドを、静脈内、皮下、病変内、腹腔内、経口もしくは他の粘膜、または吸入投与経路によって投与することができる。いくつかの特定の例示的態様では、上皮注射/遺伝子銃によって少なくとも $0.0025\mu\text{g}$ ~ $5.0\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを投与することができる。筋肉内注射によって少なくとも $0.1\mu\text{g}$ ~ $50\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを投与することもできる。いくつかの場合、第1の投与後少なくとも約2週間またはそれ以上で第2の投与(例えば、筋肉内注射および/または上皮注射)を行うことができる。これらの方法では、ポリヌクレオチドを、ウイルス発現ベクター(例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスベクターが含まれる、ウイルス発現ベクター)にクローン化することができるが、その必要はない。本明細書に開示されているか当業者に公知の任意の他の方法でポリペプチドを投与することもできる。

【0093】

さらに他の態様では、(a)ヘルペスウイルス抗原またはその断片をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を調製する工程と、(b)一つまたは複数の前記ライブラリーのORFを含む薬学的に許容される担体を動物に投与する工程と、(c)動物中で一つまたは複数のヘルペスウイルス抗原を発現させる工程とを含む方法によって

ヘルペスウイルス抗原を得ることができる。一つまたは複数のポリヌクレオチドを、一つまたは複数のベクターに含めることができる。

【0094】

または、ヘルペスウイルス抗原を得る方法は、(a)少なくとも1つのヘルペスウイルス抗原またはその抗原断片の薬学的組成物を調製する工程と、(b)少なくとも1つの抗原または断片を動物に投与する工程とを含み得る。筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、上皮注射、吸入、経口、もしくは他の粘膜経路によって抗原を投与することができる。

【0095】

(a)ヘルペスウイルス科から選択したウイルスのゲノムDNAから発現ライブラリーを調製する工程と、(b)一つまたは複数のライブラリーの成分を含む薬学的に許容される担体を免疫応答の誘導に有効な量で動物に投与する工程と、(c)免疫応答を誘導するポリヌクレオチド配列をライブラリーから選択する工程と、動物中の免疫応答がヘルペスウイルス感染に対して防御性を示すこととを含む、非ヒト動物におけるヘルペスウイルス科のメンバー(特に、HSV-1)に対する免疫応答を引き起こすのに有効なポリヌクレオチド配列を得る方法もまた本明細書に記載する。このような方法は、ヘルペスウイルスでの動物の攻撃誘発によってヘルペスウイルス感染に対する免疫耐性について動物を試験する工程をさらに含み得る。いくつかの場合、ゲノムDNAを物理的または制限酵素によって断片化した。DNA断片は、平均して約300~1500塩基対長であり得る。いくつかの場合、ライブラリー中の各成分は、ユビキチン遺伝子に発現ライブラリーポリヌクレオチドが連結するようにデザインされたマウスユビキチン融合ポリペプチドをコードする配列を含み得るが、全ての場合でこれは必要というわけではない。いくつかの場合、ライブラリーは、約4~約400個またはそれ以上のORFを含み得るが、より特定の場合、ライブラリーは 1×10^5 個のORFを有し得る。いくつかの好ましい方法では、読み取り枠の約0.01 μ gから約5 μ gのDNAを動物に投与する。いくつかの状況では、筋肉内注射または上皮注射によってゲノムDNA、遺伝子、またはcDNAを導入する。これらのプロトコールのいくつかの変形形態では、発現ライブラリーは、脊椎動物細胞中で発現するDNAに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。

10

20

【0096】

本願は、(a)単純ヘルペスウイルスのPCR増幅ゲノムDNAからORF発現ライブラリーを調製する工程と、(b)一つまたは複数のライブラリーのORFを含む薬学的に許容される担体を免疫応答の誘導に有効な量で動物に投与する工程と、(c)免疫応答を誘導するポリヌクレオチド配列をライブラリーから選択する工程と、(d)真核生物または原核生物発現系などの細胞培養物中でポリヌクレオチド配列を発現させる工程と、(e)細胞培養物中で発現したポリペプチドを精製する工程とを含む、脊椎動物の感染症からの防御を付与する抗原の調製方法も開示する。しばしば、これらの方法は、一つまたは複数のヘルペスウイルスまたは他の病原体での動物の攻撃誘発によって感染に対する免疫耐性について動物を試験する工程をさらに含む。

30

【0097】

さらに他の態様では、本発明は、(a)ヘルペスウイルス科の選択されたメンバーで攻撃誘発した場合にHSVまたは科の他のメンバーの感染に対して免疫耐性を付与するHSV抗原を同定する工程と、(b)工程(a)で同定した抗原を使用して脊椎動物に免疫応答を引き起こす工程と、(c)動物中に産生された抗体を得る工程を含む、ヘルペスウイルス抗原に対する抗体の調製方法に関する。

40

【0098】

本発明はまた、免疫原性を示すが必ずしもワクチンとして防御しないヘルペスウイルスポリペプチドに対する抗体の調製方法に関する。例えば、ヘルペス特異的抗体は、研究分析、診断、または抗体療法で有用でなければならない。同定された抗原での動物の免疫化により抗体が産生され得るか、抗体をコードする遺伝子の発現により抗体が産生され得る。ヘルペスウイルス抗体の他の産生方法では、同定された抗原をフェージライブラリーの

50

パニングに使用することができる。この手順により、インビトロで一本鎖ファージディスプレイ抗体が単離される。

【0099】

A. 核酸

本発明は、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドを含む組成物および脊椎動物中で防御免疫応答を誘導するためのこれらの組成物の使用方法を提供する。特定の態様では、動物をヘルペスウイルス感染で攻撃誘発することができる。

【0100】

本発明の種々の態様では、ヘルペスウイルスポリペプチドをコードする遺伝子およびポリヌクレオチドならびにその断片を提供する。他の態様では、ヘルペスウイルスポリペプチドまたはポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを、原核細胞または真核細胞で発現することができる。発現したポリペプチドまたはポリペプチド断片を、脊椎動物のワクチン接種またはヘルペスウイルスポリペプチドまたはポリペプチド断片で免疫反応性を示す抗体の作製におけるヘルペスウイルス抗原として使用するために精製することができる。

10

【0101】

本発明は、ヘルペスウイルス科の任意の特定のウイルスの遺伝子にその範囲が限定されない。当業者は、本明細書に記載の核酸を使用して、ヘルペスウイルス科の関連ホモログを容易に同定することができる。さらに、本発明は本明細書に開示の特定の核酸に制限されないことが明らかである。以下で考察するように、特定の「ヘルペスウイルス」遺伝子またはポリヌクレオチド断片は、種々の異なる塩基を含み、本明細書に開示のポリヌクレオチド配列と機能的に区別不可能であり、いくつかの場合構造的に区別不可能である対応するポリペプチドをなおさらに産生することができる。

20

【0102】

1. ヘルペスウイルス抗原をコードする核酸

本発明は、脊椎動物において防御免疫応答を誘導することができる抗原ヘルペスウイルスポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび抗ヘルペスウイルス抗体または他の病原体に反応性を示す抗体を作製するための抗原として使用するためのポリヌクレオチドを提供する。一定の例では、抗ヘルペスウイルス抗体の作製または他の病原体に反応性を示す抗体の作製においてワクチンとして使用される特定の抗原ヘルペスウイルスポリペプチドドメインまたは配列をコードするヘルペスウイルスポリヌクレオチドを発現することが望ましい。本発明の核酸は、全HSV遺伝子または本明細書に記載のHSV配列の任意の他の断片をコードし得る。核酸は、特定の生物のPCR増幅DNAに由来し得る。しかし、他の態様では、核酸は、ゲノムDNA、相補DNA (cDNA)、または合成DNAを含み得る。タンパク質は、ワクチンまたは抗体の単離方法で使用するための指定された配列に由来し得る。

30

【0103】

用語「cDNA」は、テンプレートとして伝令RNA (mRNA) を使用して調製したDNAをいうことを意図する。ゲノムDNAテンプレートから増幅もしくは合成されたDNAまたは非プロセシングもしくは部分的プロセシングRNAテンプレートと対照的なcDNA使用の利点は、cDNAは主に対応するタンパク質の読み取り枠 (ORF) を含むコード配列を含むという点である。全長または部分的ゲノム配列が好ましい場合 (最適な発現に非コード領域が必要な場合など)、時間がかかり得る。

40

【0104】

なおさらなる態様では、所与の種由来のヘルペスウイルスポリヌクレオチドを、核酸配列が僅かに異なるにもかかわらず同一のポリペプチドをコードする天然の変異型によって提示することができる (以下の表1を参照のこと)。さらに、ある種由来の所与のヘルペスウイルスポリペプチドを別のコドンを使用して作製することができ、これにより異なる核酸別配列が得られるが同一のポリペプチドをコードすることが意図される。

【0105】

本願で使用される、用語「ヘルペスウイルスポリヌクレオチドをコードする核酸」は、

50

単離されて全細胞核酸を含まない核酸分子をいう。用語「機能的に等価なコドン」は、同一のアミノ酸をコードするコドン（アルギニンまたはセリンの6つのコドン（以下の表1）など）をいうために本明細書で使用され、以下のページで考察される生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンもいう。

【0106】

(表1)

| アミノ酸 | | | コドン | | | | |
|----------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| アラニン | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU | |
| システイン | Cys | C | UGC | UGU | | | 10 |
| アスパラギン酸 | Asp | D | GAC | GAU | | | |
| グルタミン酸 | Glu | E | GAA | GAG | | | |
| フェニルアラニン | Phe | F | UUC | UUU | | | |
| グリシン | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU | |
| ヒスチジン | His | H | CAC | CAU | | | |
| イソロイシン | Ile | I | AUA | AUC | AUU | | |
| リジン | Lys | K | AAA | AAG | | | |
| ロイシン | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG |
| | | | | CUU | | | 20 |
| メチオニン | Met | M | AUG | | | | |
| アスパラギン | Asn | N | AAC | AAU | | | |
| プロリン | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU | |
| グルタミン | Gln | Q | CAA | CAG | | | |
| アルギニン | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG |
| | | | | CGU | | | |
| セリン | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG |
| | | | | UCU | | | 30 |
| トレオニン | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU | |
| バリン | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU | |
| トリプトファン | Trp | W | UGG | | | | |
| チロシン | Tyr | Y | UAC | UAU | | | |

【0107】

遺伝コードの縮重を斟酌すると、配列は、所与のヘルペスウイルス遺伝子またはポリヌクレオチドのヌクレオチドと同一な少なくとも約50%、通常少なくとも約60%、より通常には約70%、最も通常には約80%、好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは約95%のヌクレオチドを有するヘルペスウイルス遺伝子またはポリヌクレオチドに記載の配列と本質的に同一であると見なす。ヘルペスウイルス遺伝子またはポリヌクレオチドに記載の配列と本質的に同一の配列を、標準的な条件下でヘルペスウイルスポリヌクレオチドの成分を含む核酸セグメントとハイブリッド形成することができる配列と機能的に定義することもできる。用語「密接に関連する配列」は、実質的に配列が類似している配列または本明細書に記載の類似の抗原応答を行うか誘発するタンパク質をコードする配列をいう。用語「密接に関連する配列」は、比較されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドと最低で50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%類似する配列を示すために本明細書で使用される。

【0108】

本発明のDNAセグメントには、上記の生物学的機能が等価なヘルペスウイルスタンパク

質およびペプチドをコードするものが含まれる。このような配列を、核酸配列内で天然に存在し、それによりタンパク質がコードされることが公知のコドン重複性およびアミノ酸機能等価性の結果として惹起することができる。または、機能的に等価なタンパク質またはペプチドを、交換されるアミノ酸の特性の考慮に基づいてタンパク質構造の変化を操作することができる組換えDNA技術の適用を介して作製することができる。下記のように、部位特異的変異誘発技術の適用によって変化を操作するか、無作為に移入し、その後所望の機能についてスクリーニングすることができる。

【0109】

2. 非細菌増幅核酸

本発明の核酸またはポリヌクレオチドを、当業者に公知の任意の技術（例えば、化学合成または酵素的産生など）によって作製することができる。合成核酸（例えば、合成オリゴヌクレオチド）の非限定的な例には、ホスホトリエステル、亜リン酸塩、またはホスホロアミダイト化学を使用したインビトロ化学合成、欧州特許第266,032号（参照として本明細書に組み入れられる）などに記載の固相技術、またはまたFroehler et al., 1986および米国特許第5,705,629号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）に記載のデオキシヌクレオシドH-リン酸中間体によって作製された核酸が含まれる。本発明の方法では、一つまたは複数のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを使用することができる。種々の異なるオリゴヌクレオチド合成機構は、例えば、米国特許第4,659,774号、米国特許第4,816,571号、米国特許第5,141,813号、米国特許第5,264,566号、米国特許第4,959,463号、米国特許第5,428,148号、米国特許第5,554,744号、米国特許第5,574,146号、および米国特許第5,602,244号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）に開示されている。

10

20

【0110】

酵素的により産生された核酸またはポリヌクレオチドの非限定的な例には、PCR（商標）（例えば、米国特許第4,683,202号および米国特許第4,682,195号（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）などの増幅反応において酵素によって産生されたものか、米国特許第5,645,897号（参照として本明細書に組み入れられる）に記載のオリゴヌクレオチド合成によって産生されたものが含まれる。

【0111】

核酸またはポリヌクレオチドの別の増幅方法は、EPO No.320 308（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）に開示のリガーゼ連鎖反応（「LCR」）である。LCRでは、2つの相補プローブ対を調製し、標的配列の存在下で各対が標的の反対の相補鎖に隣接して結合する。リガーゼの存在下では、2つのプローブ対が結合して1つの単位を形成する。PCR（商標）のような温度サイクリングにより、結合したライゲーション単位が標的から解離し、過剰なプローブ対のライゲーションのための「標的配列」として使用される。米国特許第4,883,750号は、標的配列へのプローブ対の結合のためのLCRに類似の方法を記載する。

30

【0112】

得られた「ジオリゴヌクレオチド」配列を有し、それによりジオリゴヌクレオチドが増幅する核酸の存在下での2つ（またはそれ以上）のオリゴヌクレオチドのライゲーションに基づく方法を、本発明の増幅工程で使用することもできる（Wu et al., (1989)（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。

40

【0113】

3. オリゴヌクレオチド

当然、本発明は、ヘルペスウイルスポリヌクレオチド配列と相補的であるか本質的に相補的であるオリゴヌクレオチドも含む。「相補的な」核酸配列は、標準的なワトソン-クリック相補規則に従って塩基対合することができる核酸配列である。本明細書で使用される、用語「相補配列」は、上記と同一のヌクレオチド比較によって評価することができるか、本明細書に記載の条件などの比較的ストリンジェントな条件下でヘルペスウイルスポリヌクレオチドの核酸セグメントとハイブリッド形成することができることと定義することが

50

できる、実質的に相補的な核酸配列を意味する。

【0114】

または、ハイブリッド形成セグメントはより短いオリゴヌクレオチドであり得る。17塩基長の配列はヒトゲノムで1回だけ生じるはずであるので、固有の標的配列の特定に十分である。より短いオリゴマーは作製が容易であり、且つインビボでの利用しやすさが増大するが、多数の他の要因がハイブリッド形成の特異性の決定に関連する。オリゴヌクレオチドのその相補標的に対する結合親和性および配列特異性は、長いほど増大する。例として、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、またはそれ以上の塩基対のオリゴヌクレオチドの使用が意図されるが、他も意図される。250、500、1000、1212、1500、2000、2500、3000、または3500塩基およびそれ以上の塩基をコードするより長いポリヌクレオチドも同様に意図される。このようなオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、典型的には、例えば、サザンブロットおよびノーザンブロットのプローブとしてならびに増幅反応のプライマーまたはワクチンとしての用途がある。

10

【0115】

適切なハイブリッド形成条件は、当業者に周知である。一定の適用（例えば、部位特異的変異誘発によるアミノ酸の置換）では、より低いストリンジェンシー条件が必要であると認識される。これらの条件下では、プローブ配列および標的鎖が完全に相補的ではないが、一つまたは複数の位置が適合していない場合でさえも、ハイブリッド形成が起こり得る。部位特異的変異誘発は、基礎をなすDNAの特異的変異誘発による各ポリペプチドまたは生物学的機能が等価なタンパク質もしくはペプチドの調製に有用な技術である。典型的には、配列の連結点の両側の約5~10残基が変化した約17~25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい（Sambrook et al., 2001を参照のこと）。

20

【0116】

本発明のプローブおよびプライマーの1つの使用法は、抗原HSVポリペプチド、より詳細には他の関連ウイルス由来のHSVのホモログをコードすると同定されたHSVのポリヌクレオチドに関連する遺伝子の検索において行われる。通常、標的DNAはゲノムまたはcDNAライブラリーであるが、スクリーニングはRNA分子の分析を含み得る。ハイブリッド形成のストリンジェンシーおよびプローブ領域の変化により、異なる相同性を発見することができる（Sambrook et al., 2001を参照のこと）。

30

【0117】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の使用法は、インビボで特定の発現を干渉するための短いRNA分子（siRNA）をデザインすることである。

【0118】

B. ポリペプチドおよび抗原

本発明の目的のために、ヘルペスウイルスポリペプチド（すなわち、ヘルペスウイルス科のウイルス由来のポリペプチド）は、本明細書に記載の方法によって同定され、当業者に周知のタンパク質抽出技術を使用して抽出された天然に存在するポリペプチドであり得る。特定の態様では、ヘルペスウイルス抗原を、ELI、RELI、またはDELIによって同定し、動物のワクチン接種のために薬学的に許容される担体中に調製することができる。

40

【0119】

別の態様では、ヘルペスウイルスポリペプチドまたは抗原は合成ペプチドであり得る。さらに他の態様では、ペプチドは、分子操作技術によって産生された組換えペプチドであり得る。本節は、本発明で抗原として使用するためのヘルペスウイルスポリペプチド組成物の産生に関する方法および組成物を記載する。

【0120】

1. ヘルペスウイルスポリペプチド

ヘルペスウイルス感染に対する防御を付与するヘルペスウイルス遺伝子のスクリーニングおよび同定方法を本明細書に記載する。抗原ヘルペスウイルスポリペプチドの産生のために、ヘルペスウイルスポリペプチドをコードする遺伝子またはその対応するcDNAを、適

50

切な発現ベクター、LEE、またはCEEに挿入することができる。さらに、ポリペプチドの配列変異型を調製することができる。ポリペプチド配列変異型は、集団内での天然の変異によって惹起するポリペプチドの少数の配列変異型であり得るか、他のウイルス中に見出されるホモログであり得る。これらはまた、天然に存在しないが、同様に機能し、そして/または天然のポリペプチド形態と交差反応する免疫応答を誘発するほど十分に類似した配列であり得る。Sambrook et al.2001などに記載の標準的な部位特異的変異誘発法によって配列変異型を調製することができる。

【0121】

抗原ヘルペスウイルスポリペプチドの別の合成または組換え変形形態は、ヘルペスウイルスタンパク質中で天然に見出されるエピトープ決定基の反復を含むポリエピトープ部分である。このような合成ポリエピトープタンパク質を、任意の1つのヘルペスウイルスタンパク質エピトープのいくつかの相同反復から作製することができるか、一つまたは複数のヘルペスウイルスタンパク質エピトープで発現する2つまたはそれ以上の相同エピトープを含み得る。

10

【0122】

ポリペプチドのアミノ酸配列変異型は、置換変異型、挿入変異型、または欠失変異型であり得る。欠失変異型は、機能または免疫原性活性に不可欠ではない一つまたは複数の天然タンパク質の残基を欠く。別の共通の欠失変異型型は、分泌シグナル配列または細胞の特定の部分に結合するためにタンパク質に向かうシグナル配列を欠くものである。

【0123】

置換変異型は、典型的には、タンパク質内の一つまたは複数の部位であるアミノ酸が別のアミノ酸に交換されており、タンパク質分解酵素による切断に対する安定性などのポリペプチドの一つまたは複数の性質を調整するようにデザインすることができる。置換は保存的であることが好ましい(すなわち、あるアミノ酸が類似の形状及び電荷のアミノ酸に置換される)。保存的置換は当技術分野において周知であり、例えば、アラニンからセリンへの変更、アルギニンからリジンへの変更、アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへの変更、アスパラギン酸からグルタミン酸への変更、システインからセリンへの変更、グルタミンからアスパラギンへの変更、グルタミン酸からアスパラギン酸への変更、グリシンからプロリンへの変更、ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへの変更、イソロイシンからロイシンまたはバリンへの変更、ロイシンからバリンまたはイソロイシンへの変更、リジンからアルギニンへの変更、メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへの変更、フェニルアラニンからチロシン、ロイシン、またはメチオニンへの変更、セリンからトレオニンへの変更、トレオニンからセリンへの変更、トリプトファンからチロシンへの変更、チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへの変更、およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへの変更が含まれる。

20

30

【0124】

挿入変異型には、ポリペプチドを迅速に精製するために使用されるものなどの融合タンパク質が含まれ、ポリペプチドのホモログである他のタンパク質およびポリペプチド由来の配列を含むハイブリッドタンパク質も含まれ得る。例えば、挿入変異型には、別の種または亜種由来の相同ポリペプチドの一部と共にある種由来のポリペプチドのアミノ酸配列の一部が含まれ得る。他の挿入変異型には、ポリペプチドのコード配列内にさらなるアミノ酸が移入されたものが含まれ得る。これらは、典型的には、上記の融合タンパク質よりも小さな挿入物であり、例えば、プロテアーゼ切断部位に移入される。

40

【0125】

1つの態様では、ポリペプチドをコードする遺伝子の一部を組換え宿主中で発現させ、得られたタンパク質を免疫応答を誘発する能力について試験する、経験的アプローチによってポリペプチドの主な抗原決定基を同定することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して、タンパク質のC末端のより長い断片を首尾よく欠く一定範囲のcDNAコードペプチドを調製することができる。これらの各ペプチドの免疫原性活性により、この活性に不可欠なポリペプチドの断片またはドメインが同定される。各繰り返りで少数

50

のアミノ酸のみを除去または付加するさらなる研究により、ポリペプチドの他の抗原決定基が位置付けられる。従って、ポリメラーゼ連鎖反応（熱安定性DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド、およびプライマー配列を使用した複数の変性-再生サイクルによる特定のDNAセグメントの増幅技術）の使用が本発明で意図される（Mullis,1990；Mullis et al.,1992）。

【0126】

本発明のポリペプチドの調製のための別の態様は、ペプチド模倣物の使用である。模倣物は、タンパク質の二次構造エレメントを模倣した分子である。多数のタンパク質がその折たたまれた表面の比較的小さな領域を介してその生物活性を発揮するので、生物活性表面を保持し、且つ部分的に改良された薬物動態学的/力学的性質を有するさらにより小さな設計（模倣物）分子によってその作用を再生することができる（Fairlie et al.,1998）。二次構造（ヘリックス、ターン、ストランド、シート）の各エレメントの模倣方法およびその組み合わせの三次構造（ヘリックスバンドル、多ループ、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフ）へのアセンブリ方法は概説されている（Fairlie et al.,1998；Moore,1994）。模倣ペプチドの予想方法、調製方法、修飾方法、およびスクリーニング方法は、米国特許第5,933,819号および米国特許第5,869,451号（それぞれ特に参照として本明細書に組み入れられる）に記載されている。ペプチド模倣物は免疫応答のモジュレーターのスクリーニングで有用であることが本発明で意図される。

10

【0127】

遺伝子またはポリヌクレオチドの配列を修飾および変化させることができ、所望の特徴を有するタンパク質またはポリペプチドをコードする分子がさらに得られる。以下は、等価またはさらに改良された第2世代の分子を作製するためのタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸の変化に基づいた考察である。以下の実施例によるDNA配列のコドンの変化またはペプチドの化学合成によってアミノ酸を変化させることができる。

20

【0128】

例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互結合能力をあまり喪失することなくポリペプチド構造中で一定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することができる。生物活性を定義するポリペプチドの相互作用能力および性質であるので、ポリペプチド配列およびその基本となるDNAコード配列中に一定のアミノ酸置換を行うことができるにもかかわらず、同様または改良された性質を有するポリペプチドを得ることができる。したがって、その生物学的有用性または活性を過剰に喪失することなく本発明のポリヌクレオチドおよび遺伝子のDNA配列を様々に変化させることができることが本発明者らによって意図される。表1は、特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。

30

【0129】

このような変化のために、アミノ酸のハイドロパシク・インデックス（hydropathic index）を考慮することができる。タンパク質への相互作用生物機能の付与におけるアミノ酸のハイドロパシク・インデックスの重要性は、当技術分野において一般に理解されている（Kyte and Doolittle,1982）。アミノ酸の相対ハイドロパシク特徴（hydropathic character）が得られたタンパク質の二次構造に寄与し、それにより他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、および抗原など）とのタンパク質の相互作用が定義されることが受け入れられている。

40

【0130】

一定のアミノ酸を類似のハイドロパシク・インデックスまたはスコアを有する他のアミノ酸と置換して、依然として類似の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドを得ることができることが当技術分野において公知である。親水性に基づいて類似のアミノ酸を有効に置換することができることも当技術分野において理解されている。米国特許第4,554,101号（参照として本明細書に組み入れられる）は、タンパク質のもっと高い局所平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されているので、タンパク質の生物学的性質と相関すると述べている。

【0131】

50

アミノ酸を類似の疎水性値を有する別のアミノ酸と置換して、依然として生物学的に等価であり、且つ免疫学的に等価なタンパク質を得ることができることも理解される。

【0132】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対類似性（例えば、その疎水性、親水性、電荷、およびサイズなど）に基づく。種々の上記特徴を考慮した置換の例は当業者に周知であり、アルギニンおよびリジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、セリンおよびトレオニン、グルタミンおよびアスパラギン、ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンなどが含まれる。

【0133】

2. 合成ポリペプチド

抗原として使用するためのヘルペスウイルスタンパク質および関連ペプチドが本発明で意図される。特定の態様では、ヘルペスウイルスペプチド断片の合成を考慮する。従来の技術にしたがって、溶液中または固体支持体上で本発明のペプチドを合成することができる。種々の自動合成機は市販されており、公知のプロトコールに従って使用することができる。例えば、Stewart and Young, (1984); Tam et al., (1983); Merrifield, (1986); およびBarany and Merrifield (1979) (それぞれ参照として本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0134】

3. ポリペプチド精製

典型的には、動物における防御免疫応答の誘導および抗ヘルペスウイルス抗体の調製のための抗原として本発明のヘテロウイルスポリペプチドを使用する。したがって、本発明の一定の局面は、ヘルペスウイルスポリペプチドの精製、特定の態様では、実質的精製に関する。本明細書で使用される、用語「精製タンパク質またはペプチド」は、タンパク質またはペプチドがその天然に得られる状態と比較して任意の程度に精製される、他の成分から単離可能な組成物をいうことを意図する。したがって、精製タンパク質またはペプチドはまた、天然に存在し得る環境から遊離したタンパク質またはペプチドをいう。

【0135】

一般に、「精製された」とは、種々の他の成分を除去するために分画に供され、且つ実質的にその発現した生物活性を保持するタンパク質またはペプチド組成物をいう。用語「実質的に精製された」を使用する場合、この用語は、タンパク質およびペプチドが組成物の主成分を形成する（例えば、組成物のタンパク質の約50%またはそれ以上を構成する）組成物をいう。

【0136】

タンパク質またはペプチドの精製度の種々の定量方法は、本開示を照らして当業者に公知である。これらには、例えば、活性画分の比活性の決定またはSDS/PAGE分析による画分内のポリペプチド数の評価が含まれる。画分の純度の好ましい評価方法は、画分の比活性を計算し、これを最初の抽出物の比活性と比較し、純度を計算し、本明細書では「~倍精製数」で評価することである。活性量を示すために使用した実際の単位は、勿論、精製を追跡するために選択した特定のアッセイ技術および発現したタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうか依存する。

【0137】

タンパク質精製での使用に適切な種々の技術は、当業者に周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体、または熱変性での沈殿（その後遠心分離することができる）、イオン交換、ゲル濾過、逆相、ハイドロキシアパタイト、および親和性クロマトグラフィなどのクロマトグラフィ工程、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、およびこれらおよび他の技術の組み合わせが含まれる。当技術分野において一般に知られているように、種々の精製工程の順序を変更することができるか、一定の工程を省略することができるか、それにより依然として実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの適切な調製方法が得られると考えられる。

【0138】

10

20

30

40

50

タンパク質またはペプチドが常にその最も精製された状態で得られる一般的要件は存在しない。実際、特定の態様では、実質的精製よりも低い精製度の産物に有用性があることが意図される。同一の一般的な精製スキームの異なる形態と組み合わせたより少ない精製工程の使用またはこれの使用によって部分精製を行うことができる。より低い相対精製度を示す方法は、タンパク質産物の総回収率または発現タンパク質活性の維持で有利であり得る。

【0139】

天然または組換えである所望のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを精製するために、少なくともいくつかの特定のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを含む組成物を分画して組成物から種々の他の成分を除去する。タンパク質精製での使用に適切な種々の技術は当業者に周知である。最も一般的に使用されている化学合成ペプチドの分離手順は、HPLCクロマトグラフィである。他のタンパク質精製手順には、アフィニティクロマトグラフィ（例えば、イムノアフィニティクロマトグラフィ）および当技術分野において公知の他の方法が含まれる。方法およびより詳細な考察の例については、Marshak et al. (1996) または Janson and Ryden (1998) を参照のこと。

10

【0140】

C. ポリヌクレオチドの送達

本発明の特定の態様では、真核細胞中で作動可能な異種プロモーターの調節下でヘルペスウイルスポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドセグメントを含む発現構築物を提供する。例えば、HSV-1抗原コード発現構築物をこの様式で送達することができる。本発明の一定の局面における一般的アプローチは、特定のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチド断片をコードする発現構築物を有する細胞を提供し、それにより細胞中に抗原タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド断片を発現させることである。発現構築物の送達後、発現構築物によってコードされたタンパク質、ポリペプチド、またはペプチド断片を、細胞および/またはワクチンベクターの転写および翻訳機構によって合成する。ポリヌクレオチド送達のための種々の組成物および方法は公知である（Sambrook et al., 2001; Liu and Huang, 2002; Ravid et al., 1998; および Balicki and Beutler, 2002 (それぞれ参照として本明細書に組み入れられる) を参照のこと)。

20

【0141】

ウイルスおよび非ウイルス送達系は、抗原タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド断片をコードする発現構築物の送達のための種々の送達系のうちの2つである。両送達系型は当技術分野において周知であり、以下に簡単に述べる。遺伝子免疫化の目的のための発現構築物の送達で使用される2つの主なアプローチ（間接的（エキスピボ法）または直接的（インピボ法）のいずれか）も存在する。エキスピボ遺伝子導入は、培養物中での（宿主）細胞のベクター修飾およびベクター修飾細胞の被験体への投与または移植を含む。インピボ遺伝子導入は、ワクチンベクターの免疫化されるべき被験体への直接移入を含む。

30

【0142】

種々の態様では、発現すべき核酸は、典型的には、完全な遺伝子発現成分組（プロモーター、コード配列、およびターミネーター）を含む直鎖状発現エレメント（「LEE」）および/または環状発現エレメント（「CEE」）の文脈であり得る。これらのLEEおよびCEEを、細胞またはインタクトな生物に直接移入および発現させて標準的な超らせん状の複製プラスミド由来の発現レベルに匹敵する発現レベルを得ることができる（Sykes and Johnston, 1999）。本発明のいくつかの別の方法および組成物では、LEEまたはCEEにより、任意の読み取り枠（ORF）（例えば、PCR（商標）増幅ORF）を真核生物プロモーターおよびターミネーターに非共有結合される。局所遺伝子発現を得るために、これらの迅速に連結した断片を動物に直接注射することができる。ORFをマウスに注射して簡単に結合した哺乳動物プロモーター配列およびターミネーター配列によってコードされた外来タンパク質に対する抗体を産生することができることも証明された。

40

【0143】

本発明の特定の態様では、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドまたは類似のポリヌクレ

50

オチドをコードする核酸を、細胞のゲノムに安定に組み込むことができる。なおさらなる態様では、核酸を、個別のDNAエピソームセグメントとして細胞中に安定または一過性に維持することができる。このような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主の細胞周期と独立または同調した維持および複製に十分な配列をコードする。どのようにして発現構築物が細胞に送達されるのか、および/または細胞中のどこで核酸が維持されるのかは、使用したベクターの型に依存する。以下の遺伝子送達方法により、好ましい適用に最も適切な遺伝子送達系の選択および開発のための枠組みが得られる。

【0144】

1. 非ウイルスポリヌクレオチド送達

本発明の1つの態様では、ポリヌクレオチド発現構築物には、組換え産生DNAプラスミドまたはインビトロ作製DNAが含まれ得る。本発明の種々の態様では、例えば、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドを含む発現構築物を、注射および/または微粒子銃（例えば、遺伝子銃）を介して被験体に投与する。DNAコーティング微粒子を高速度に加速してDNAコーティング微粒子を細胞膜を通過させて細胞に侵入させることによってポリヌクレオチド発現構築物を細胞に導入することができる。別の好ましい態様では、ニードル注射によってポリヌクレオチドを被験体に注射する。ポリヌクレオチド発現構築物を、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、または腹腔内注射によって注射することができる。

【0145】

微粒子銃は、DNAコーティング微粒子を高速度に加速してこれらを細胞膜を通過させてこれらを死滅させること無く細胞に侵入させる能力に依存する（Klein et al., 1987）。小粒子を加速させるためのいくつかのデバイスが開発されている。最も一般的に使用されている形態は、高圧ヘリウムガスに依存する（Sanford et al., 1991）。使用した微粒子は、生物学的に不活性な物質（タングステン粒子または金粒子など）からなる。

【0146】

細胞膜を物理的または化学的に透過させる任意の方法（例えば、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、直接微量注入、DNA負荷リポソーム、およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞の超音波処理、高速微粒子銃を使用した遺伝子銃、および受容体媒介性トランスフェクション）によって、本発明のヘルペスウイルスポリヌクレオチドまたは類似のポリヌクレオチドを含む発現構築物を導入することもできる。特定の態様では、ヘルペスウイルスポリヌクレオチド、ヘルペスウイルスポリペプチド、またはヘルペスウイルスポリヌクレオチドを含む発現ベクターの宿主細胞への移入のための脂質処方物および/またはナノカプセルの使用を意図する（Bangham et al., 1965; Gregoriadis, 1979; Deamer and Uster, 1983; Szoka and Papahadjopoulos 1978; Nicolau et al., 1987およびWatt et al., 1986（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）に記載の方法および組成物の例を参照のこと）。本発明の別の態様では、発現構築物は、単純に、裸の組換えDNA、発現カセット、またはプラスミドからなり得る。

【0147】

2. ウイルスベクター

特定の態様では、ウイルスベクターによって本発明に従って感染に対する免疫耐性を付与するヘルペスウイルス遺伝子または他のポリヌクレオチドを送達させることができることが意図される。一定のウイルスベクターが細胞に感染または侵入する能力、宿主細胞ゲノムに組み込まれる能力、およびウイルス遺伝子を安定に発現する能力により、多数の異なるウイルスベクター系が開発および適用された（Robbins and Ghivizzani, 1998）。現在、エキスピボおよびインピボ遺伝子導入のためのベクターとして使用するためのウイルス系が開発されている。現在、癌、嚢胞性線維症、ゴーシェ病、腎疾患、および関節炎などの疾患の治療のための、例えば、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターが評価されている（Robbins and Ghivizzani, 1998; Imai et al., 1998; 米国特許第5,670,488号）。

【0148】

特定の態様では、アデノウイルス（米国特許第6,383,795号；米国特許第6,328,958号お

10

20

30

40

50

よび米国特許第6,287,571号(それぞれ特に参照として本明細書に組み入れられる); レトロウイルス(米国特許第5,955,331号; 米国特許第5,888,502号; および米国特許第5,830,725号(それぞれ特に参照として本明細書に組み入れられる)); 単純ヘルペスウイルス(米国特許第5,879,934号および米国特許第5,851,826号(それぞれ特にその全体が参照として本明細書に組み入れられる)); アデノ随伴ウイルス(AAV); ポックスウイルス(例えば、ワクシニアウイルス(Gnant et al.,1999)); アルファウイルス(例えば、シンドビスウイルス); セムリキ森林熱ウイルス(Lundstrom,1999); レオウイルス(Coffey et al.,1998)およびインフルエンザA型ウイルス(Neumann et al.,1999); キメラポックスウイルス/レトロウイルスベクター(Holzer et al.,1999); アデノウイルス/レトロウイルスベクター(Feng et al.,1997; Bilbao et al.,1997; Caplen et al.,1999)およびアデノウイルス/アデノ随伴ウイルスベクター(Fisher et al.,1996; 米国特許第5,871,982号)の発現ベクターが、発現構築物の送達を意図する。「ウイルス発現ベクター」は、(a)構築物のパッケージングの補助および(b)クローン化された組織または細胞特異的構築物の最終的な発現に十分なウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。ウイルスの成長および操作は、当業者に公知である。

【0149】

D.ヘルペスウイルス抗原に反応性を示す抗体

別の局面では、本発明は、本発明のヘルペスウイルスポリペプチドまたはその任意の一部と免疫反応性を示す抗体組成物を含む。さらに他の態様では、本発明の抗原を使用して、抗体および/または抗体組成物を産生することができる。抗体は、ヘルペスウイルスポリペプチドと特異的または優先的に反応性を示し得る。ヘルペスウイルスに反応性を示す抗体には、HSVに反応性を示す抗体(配列番号:2、配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8、配列番号:10、配列番号:12、配列番号:14、配列番号:16、配列番号:18、配列番号:20、配列番号:22、配列番号:24、配列番号:26、配列番号:28、配列番号:30、配列番号:32、配列番号:34、配列番号:36、配列番号:38、配列番号:40、配列番号:42、配列番号:44、配列番号:46、配列番号:48、配列番号:50、配列番号:52、配列番号:54、配列番号:56、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:64、配列番号:66、配列番号:68、配列番号:70、配列番号:72、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:78、配列番号:80、配列番号:82、配列番号:84、配列番号:86、配列番号:88、配列番号:90、配列番号:92、配列番号:94、配列番号:96、配列番号:98、配列番号:100、配列番号:102、配列番号:104、配列番号:106、配列番号:108、配列番号:110、配列番号:112、配列番号:114、および/もしくは配列番号:116に記載の配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を有する抗原に指向する抗体が含まれる)が含まれる。配列番号:2、配列番号:6、配列番号:10、配列番号:14、配列番号:22、配列番号:34、配列番号:42、配列番号:46、配列番号:50、配列番号:54、配列番号:58、配列番号:60、配列番号:62、配列番号:66、配列番号:70、配列番号:74、配列番号:76、配列番号:80、配列番号:84、配列番号:88、配列番号:92、配列番号:96、配列番号:100、配列番号:104、配列番号:108、配列番号:112および配列番号:114の抗原は、HSVポリペプチドの抗原断片の代表である。配列番号:4、配列番号:8、配列番号:12、配列番号:16、配列番号:20、配列番号:24、配列番号:28、配列番号:32、配列番号:40、配列番号:44、配列番号:48、配列番号:52、配列番号:56、配列番号:64、配列番号:68、配列番号:72、配列番号:78、配列番号:82、配列番号:86、配列番号:90、配列番号:94、配列番号:98、配列番号:102、配列番号:106および配列番号:116に記載の抗原は、例示的な抗原断片が同定された全長HSVポリペプチドの例である。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってよく、当技術分野において公知の方法によって産生することができる。抗体はまた、1価または2価であり得る。種々の生物学的または化学的手段によって抗体を分割することができる。抗体の各半分は、1つの抗原としか結合できないので、1価と定義される。抗体の調製および特徴づけ手段は、当技術分野において周知である(例えば、Harlow and Lane,1988(参照として本明細書に組み入れられる)を参照のこと)。

【0150】

抗体を産生するために、本発明のヘルペスウイルスポリペプチドの一つまたは複数の抗原決定基に対応するペプチドを調製することができる。このようなペプチドは、一般に、少なくとも5または6アミノ酸残基長であるべきであり、好ましくは約10、15、20、25、または約30アミノ酸残基長であり、約35～50残基までを含むことができる。合成ペプチドは、一般に、約35塩基長であり、これは、自動化ペプチド合成機（Applied Biosystems（Foster City, CA）から市販されているものなど）でのほぼ上限の長さである。例えば、組換え手段によってより長いペプチドを調製することもできる。他の方法では、全長または実質的に全長のポリペプチドを使用して、本発明の抗体を産生することができる。

【0151】

一旦少なくとも一つまたは複数の抗原決定基を含むペプチドが調製されると、このペプチドをポリペプチドに対する抗血清の作製で使用する。これらの決定基をコードするミニ遺伝子または遺伝子融合体を構築し、標準的な方法（例えば、PCRクローニング法の使用）によって発現ベクターに挿入することもできる。抗体作製またはワクチン接種のためのペプチドの使用には、ペプチドと免疫原性担体タンパク質（B型肝炎表面抗原、キーホールリンペットヘモシアニン、またはウシ血清アルブミンなど）との抱合が必要である。この抱合方法は、当技術分野において周知である。

【0152】

本発明の方法で使用される抗体には、修飾された（すなわち、任意の分子型と抗体との共有結合による）誘導体が含まれる。例えば、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護/ブロッキング基、タンパク質分解酵素による切断、および/または細胞リガンドもしくは他のタンパク質への結合による誘導体化によって修飾された抗体が含まれるが、これらに限定されない。公知の技術（特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、およびツニカマイシンの存在下での代謝合成が含まれるが、これらに限定されない）によって任意の多数の化学修飾を行うことができる。さらに、誘導体は、一つまたは複数の非古典的アミノ酸を含み得る。

【0153】

いくつかの使用（ヒトにおける抗体のインビボ使用およびインビトロ検出アッセイが含まれる）のために、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体は、異なる抗体部分が異なる動物種に由来する分子である（マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有する抗体など）。キメラ抗体の産生方法は、当技術分野において公知である。例えば、Morrison, 1985; O'Neil et al., 1986; Gillies et al. 1989; 米国特許第5,807,715号; 米国特許第4,816,567号; および米国特許第4,816,397号（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の一つまたは複数の相補性決定部（CDR）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望の抗原に結合する非ヒト種由来の抗体分子である。しばしば、抗原結合を変化（好ましくは、改良）するために、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基を、CDRドナー抗体由来の対応する残基と置換する。これらのフレームワーク置換を、当技術分野において周知の方法（例えば、CDRと抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのフレームワーク残基との相互作用のモデリングならびに特定の位置での異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較）によって同定する。例えば、米国特許第5,585,089号およびRiechmann et al. (1988)（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。当技術分野において公知の種々の技術（例えば、CDRグラフティング（欧州特許第239,400号; 国際公開公報第91/09967号; 米国特許第5,225,539号; 米国特許第5,530,101号および米国特許第5,585,089号）、ベニールリング（veneering）またはリサフェーシング（resurfacing）（欧州特許第592,106号; 欧州特許第519,596号; Padlan, 1991; Studnicka et al., 1994; Roguska et al., 1994）、および鎖シャフリング（米国特許第5,565,332号）（その全体が参照として本明細書に組み入れられる））を使用して、抗体をヒト化することができる。

10

20

30

40

50

【0154】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療で特に望ましい。ヒト抗体を、当技術分野において公知の種々の方法（ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを使用した上記のファージディスプレイ法が含まれる）によって作製することができる。米国特許第4,444,887号および米国特許第4,710,111号；ならびに国際公開公報第98/46645号；国際公開公報第99/50433号；国際公開公報第98/24893号；国際公開公報第98/16654号；国際公開公報第96/34096号；国際公開公報第96/33735号；および国際公開公報第91/10741号（それぞれその全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

【0155】

機能的内因性免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して、ヒト抗体を産生することもできる。このヒト抗体産生技術の概説については、Lonberg and Huszar, 1995を参照のこと。このヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体の産生技術ならびにこのような抗体の産生プロトコルの詳細な考察については、例えば、国際公開公報第98/24893号；国際公開公報第92/01047号；国際公開公報第96/34096号；国際公開公報第96/33735号；欧州特許第0598877号；米国特許第5,413,923号；5,625,126；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；米国特許第5,545,806号；米国特許第5,814,318号；米国特許第5,885,793号；米国特許第5,916,771号；および米国特許第5,939,598号（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)、Kirin, Inc. (Japan)、Medarex (NJ)、およびGenpharm (San Jose, CA) などの企業は、上記と類似の技術を使用して選択した抗原に指向するヒト抗体の提供に携わることができる。

【0156】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体を、「誘導選択 (guided selection)」という技術を使用して作製することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を使用して、同一のエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を誘導する (Jespers et al., 1988)。

【0157】

本発明は、単一ドメイン抗体（ラクダ化単一ドメイン抗体が含まれる）を含む（例えば、Muyldermans et al., 2001; Nuttall et al., 2000; Reichmann and Muyldermans, 1999; 国際公開公報第94/04678号；国際公開公報第94/25591号；および米国特許第6,005,079号（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。1つの態様では、本発明は、単一ドメイン抗体が形成されるように修飾された2つのVHドメインを含む単一ドメイン抗体を提供する。

【0158】

本発明の方法は、哺乳動物、好ましくはヒトでの半減期（例えば、血清半減期）が、15日超、好ましくは20日超、25日超、30日超、35日超、40日超、45日超、2ヶ月超、3ヶ月超、4ヶ月超、または5ヶ月超である抗体またはその断片の使用も含む。哺乳動物、好ましくはヒトでの本発明の抗体またはその断片の半減期の増大により、哺乳動物での抗体または抗体断片の血清力価がより高くなり、それにより抗体または抗体断片の投与頻度が減少し、そして/または抗体またはその断片の投与濃度が減少する。インビボで半減期が増大した抗体またはその断片を、当業者に公知の技術によって作製することができる。例えば、インビボで半減期が増大した抗体またはその断片を、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に参与することが同定されたアミノ酸残基の修飾（例えば、置換、欠失、または付加）によって作製することができる。生体半減期を増大させるためのWard et al.に記載の方法によって本発明の抗体を操作することができる（米国特許第6,277,375 B1号を参照のこと）。例えば、本発明の抗体を、インビボまたは血清半減期を増大させたFc-ヒンジドメイン中で操作することができる。

【0159】

インビボ半減期が増大した抗体またはその断片を、抗体または抗体断片と高分子量ポリ

エチレングリコール (PEG) などの高分子との結合によって作製することができる。多機能リンカーを使用するか使用しないで、PEGと抗体または抗体断片のN末端またはC末端との部位特異的抱合またはリジン残基上に存在するアミノ基または他の化学的性質のいずれかによってPEGを抗体または抗体断片に結合することができる。典型的には、生物活性の喪失が最小となる直鎖または分岐ポリマー誘導体化を使用する。PEG分子と抗体との適切な抱合を確認するために、抱合度をSDS-PAGEおよび質量分析によって厳密にモニタリングする。例えば、サイズ排除クロマトグラフィまたはイオン交換クロマトグラフィによって、未反応のPEGを抗体-PEG抱合体から分離することができる。

【0160】

実質的に免疫応答を引き起こすことなく哺乳動物循環系に注射することができる組成物を提供するために、Davis et al. (米国特許第4,179,337号)に記載の方法およびカップリング試薬によって本発明の抗体を修飾することもできる。

10

【0161】

1つの局面では、本発明は、抗Fc受容体部分、抗標的部分、および選択的に抗増強因子 (抗EF) 部分を最小限含む多重特異性多価分子を特徴とする。好ましい態様では、抗Fc受容体部分は抗体断片 (例えば、Fabまたは (Fab')₂断片) であり、抗標的部分はリガンドまたは抗体断片であり、抗EF部分は細胞傷害活性に關与する表面タンパク質に指向する抗体である。特定の態様では、組換え抗FcR抗体またはその断片を、「ヒト化する」(例えば、非ヒト抗体 (例えば、マウス) 由来の相補性決定部 (CDR) の少なくとも一部を有し、残りの部分が元のヒトである)。

20

【0162】

種々の態様では、本発明は、多重特異性分子 (例えば、第1の特異性が抗原についてであり、第2の特異性がFc受容体についてである) の作製方法を含む。1つの態様では、両特異性が同一のベクターでコードされ、宿主細胞中で発現されてアセンブリされる。別の態様では、各特異性を組換えによって作製し、得られたタンパク質またはペプチドを、重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して互いに抱合する。特に好ましい態様では、ヒンジ領域を、抱合前にたった1つのスルフヒドリル残基を含むように修飾する。これらの方法ならびに他の関連する方法および組成物の例については、米国特許第6,410,690号; 米国特許第6,365,161号; 米国特許第6,303,755号; 米国特許第6,270,765号; および米国特許第6,258,358号 (それぞれ参照として本明細書に組み入れられる) を参照のこと

30

【0163】

本発明は、修飾Fc領域を含む抗体も含む。Fc媒介エフェクター機能に影響を与える修飾は当技術分野において周知であり (米国特許第6,194,551号 (その全体が参照として本明細書に組み入れられる))、例えば、一つまたは複数のアミノ酸の変更 (例えば、置換) をFc領域に導入する。修飾アミノ酸は、例えば、プロリン329、プロリン331、またはリジン322であり得る。プロリン329、331、およびリジン322は、アラニンで置換されることが好ましいが、任意の他のアミノ酸での置換が意図される (国際公開公報第00/42072号および米国特許第6,194,551号 (参照として本明細書に組み入れられる))。1つの特定の態様では、Fc領域の修飾は、Fc領域中の一つまたは複数の修飾を含む。別の特定の態様では、Fc領域の修飾により抗体媒介性エフェクター機能が変化している。本発明の別の態様では、Fc領域の修飾により、他のFc受容体 (例えば、Fc活性化受容体) への結合が変化している。さらに別の特定の態様では、修飾Fc領域を含む本発明の抗体はADCCをより有効に媒介する。別の態様では、Fc領域の修飾によりC1q結合活性が変化する。なおさらなる態様では、Fc領域の修飾により補体依存性細胞傷害性が変化する。

40

【0164】

50

本発明は、抗体媒介エフェクター機能を増大させる炭水化物を変化させる修飾（例えば、グリコシル化、フコシル化など）を行った抗体も含む。抗体媒介エフェクター機能を变化させる炭水化物修飾は当技術分野において周知である（例えば、Shields et al., 2001 ; Davies et al., 2001を参照のこと）。

【0165】

1. 抗体抱合体

本発明は、融合タンパク質を作製するために、異種ポリペプチド（すなわち、無関係のポリペプチドまたはその一部（好ましくは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド））と組換えによって融合したか化学的に抱合した（共有結合および非共有結合による抱合が含まれる）抗体を含む。直接融合する必要はないが、リンカー配列を介して融合することができる。抗体を使用して、例えば、抗体と特定の細胞表面受容体に特異的な抗体との融合または抱合によってインビトロまたはインビボのいずれかで異種ポリペプチドが特定の細胞型を標的することができる。異種ポリペプチドに融合または抱合した抗体を、当技術分野において公知の方法を使用してインビトロでの免疫アッセイおよび精製方法で使用することもできる（例えば、国際公開公報第93/21232号；欧州特許第439,095号；Naramura et al., 1994；米国特許第5,474,981号；Gillies et al., 1992；およびFell et al., 1991（その全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。

【0166】

さらに、抗体を、所与の生物学的応答を修飾する治療薬または薬物部分に抱合することができる。治療薬または薬物部分は、古典的な化学療法薬に制限されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素（すなわち、PE-40）、ジフテリア毒素、リシン、ゲロノン（gelonon）、およびブタクサ抗ウイルスタンパク質などの毒素もしくは他の毒素、腫瘍壊死因子などのタンパク質、インターフェロン（インターフェロン（IFN- α ）、インターフェロン（IFN- β ）が含まれるが、これらに限定されない）、神経成長因子（NGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）、アポトーシス因子（例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（国際公開公報第97/33899号）、AIM II（国際公開公報第97/34911号）、Fasリガンド（Takahashi et al., 1994）、およびVEGF（国際公開公報第99/23105号））、抗血栓症薬または抗血管形成薬（例えば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン）、生体応答調製薬（例えば、リンホカイン（例えば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）など）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、マクロファージコロニー刺激因子（「M-CSF」）、成長因子（例えば、成長ホルモン（「GH」）；プロテアーゼ、またはリボヌクレアーゼが含まれ得る。

【0167】

精製を容易にするために、抗体をペプチドなどのマーカー配列に融合することができる。好ましい態様では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサヒスチジンペプチド（特に、pQEベクター（QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA）から提供されているタグなど）であり、その多くが市販されている。Gentz et al., 1989に記載のように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンにより、融合タンパク質が都合よく精製される。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する血球凝集素「HA」タグ（Wilson et al., 1984）および「フラグ」タグ（Knappik et al., 1994）が含まれるが、これらに限定されない。

【0168】

本発明は、さらに、抗体断片に融合または抱合した異種ポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、異種ポリペプチドを、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)₂断片、またはその一部に融合または抱合することができる。ポリペプチドの抗体部分への融合または抱合

方法は当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；米国特許第5,622,929号；米国特許第5,359,046号；米国特許第5,349,053号；米国特許第3,447,851号；および米国特許第5,112,946号；欧州特許第307,434号および欧州特許第367,166号；国際公開公報第96/04388号および国際公開公報第91/06570号；Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539；Zheng et al., 1995；およびVil et al., 1992（それぞれその全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

【0169】

さらなる融合タンパク質を、遺伝子シャフリング技術、モチーフシャフリング技術、エクソンシャフリング技術、および/またはコドンシャフリング技術（集合的に「DNAシャフリング」という）によって作製することができる。DNAシャフリングを使用して、本発明の抗体またはその断片（例えば、親和性が高く且つ解離速度が遅い抗体またはその断片）の活性を変化させることができる（一般に、米国特許第5,605,793号；米国特許第5,811,238号；米国特許第5,830,721号；米国特許第5,834,252号；および米国特許第5,837,458号；Patten et al., 1997；Harayama, 1998；Hansson et al., 1999；Lorenzo and Blasco, 1998（それぞれその全体が参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。抗体もしくはその断片またはコードされた抗体もしくはその断片を、変異性PCR、無作為核酸挿入、または他の方法による組換え前の無作為な変異誘発に供することによって変化させることができる。特異的にFc RIIBに結合する抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドの一つまたは複数の部分を、一つまたは複数の異種分子の一つまたは複数の成分、モチーフ、切片、一部、ドメイン、断片などで組換えることができる。

【0170】

本発明は、診断薬もしくは治療薬または血清半減期が増大することが望ましい任意の他の分子に抱合した抗体も含む。抗体を診断で使用して、例えば、臨床試験手順の一部（例えば、所与の治療計画の有効性の決定）として疾患、障害、または感染症の発症または進行をモニタリングすることができる。抗体の検出可能な物質へのカップリングによって検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、放射性物質、陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。当技術分野において公知の技術（例えば、本発明の診断物質として使用するための抗体に抱合することができる金属イオンについては、米国特許第4,741,900号を参照のこと）を使用して、検出可能な物質を、抗体に直接か、媒介物（例えば、当技術分野において公知のリンカーなど）を介して結合または抱合することができる。このような診断および検出を、検出可能な物質（種々の酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない）、補欠分子族（ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどであるが、これらに限定されない）、蛍光物質（ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン、フルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンなどであるが、これらに限定されない）、蛍光金属（ルミノールなどであるが、これに限定されない）、生体発光物質（ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどであるが、これらに限定されない）、放射性金属（ビスマス（ ^{213}B ）、炭素（ ^{14}C ）、クロム（ ^{51}Cr ）、コバルト（ ^{57}Co ）、フッ素（ ^{18}F ）、ガドリニウム（ ^{153}Gd 、 ^{159}Gd ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、ゲルマニウム（ ^{68}Ge ）、ホルミウム（ ^{166}Ho ）、インジウム（ ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、ランタニウム（ ^{140}La ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、マンガン（ ^{54}Mn ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、リン（ ^{32}P ）、パラセオジミウム（ ^{142}Pr ）、プロメチウム（ ^{149}Pm ）、レニウム（ ^{186}Re 、 ^{188}Re ）、ロジウム（ ^{105}Rh ）、ルテミウム（ ^{97}Ru ）、サマリウム（ ^{153}Sm ）、スカンジウム（ ^{47}Sc ）、セレン（ ^{75}Se ）、ストロンチウム（ ^{85}Sr ）、硫黄（ ^{35}S ）、テクネチウム（ ^{99}Tc ）、チタン（ ^{44}Ti ）、スズ（ ^{113}Sn 、 ^{117}Sn ）、トリチウム（ ^3H ）、キセノン（ ^{136}Xe ）、イットテルビウム（ ^{179}Yb 、 ^{175}Yb ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、亜鉛（ ^{65}Zn ）などであるが、これらに限定されない）、種々の陽電子放出断層撮影で使用する陽電子放出金属、ならびに非

放射性常磁性金属イオンが含まれるが、これらに限定されない)への抗体のカップリングによって行うことができる。

【0171】

抗体を、細胞毒素(例えば、細胞増殖抑制薬または殺細胞薬)、治療薬、または放射性元素(例えば、放出体、放出体など)などの治療部分に抱合することができる。細胞毒素または細胞傷害薬には、細胞に損害を与える任意の薬剤が含まれる。例には、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anhracindione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチンシオマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログが含まれる。治療薬には、代謝拮抗薬(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、プスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金(II)(DDP)、シスプラチン)、アントラシクリン(例えば、ダウノルピシン(以前は、ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前は、アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、および抗有糸分裂薬(例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0172】

さらに、抗体を、放射性金属イオンの抱合に有用な放射性物質または大環状キレーターなどの治療部分(例えば、上記の放射性金属を参照のこと)に抱合することができる。特定の態様では、大環状キレーターは、リンカー分子を介して抗体に結合することができる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)である。このようなリンカー分子は当技術分野において一般に公知であり、Denardo et al.,1998; Peterson et al.,1999; および Zimmerman et al.,1999(それぞれその全体が参照として本明細書に組み入れられる)に記載されている。

30

【0173】

抗体へのこのような治療部分の抱合技術は周知である(例えば、Arnon et al.,1985; Hellstrom et al.,1987; Thorpe,1985; Thorpe et al.,1982を参照のこと)。

【0174】

単独または細胞傷害因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与する治療部分が抱合されているか抱合されていない抗体またはその断片を、治療薬として使用することができる。

【0175】

または、Segal(米国特許第4,676,980号)(その全体が参照として本明細書に組み入れられる)に記載のように、抗体を第2の抗体と抱合して抗体ヘテロ抱合体を形成することができる。

40

【0176】

抗体を、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に結合することもできる。このような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロリド、またはポリプロピレンが含まれるが、これらに限定されない。

【0177】

2. 抗ヘルペスウイルス抗体の作製

本発明は、ヘルペスウイルスポリペプチドに免疫反応性を示すモノクローナル抗体組成物を提供する。上で詳述するように、全長ヘルペスウイルスポリペプチドに対して作製さ

50

れる抗体に加えて、エピトープコア領域（野生型および変異エピトープが含まれる）を含むより小さな構築物に応答する抗体を作製することもできる。本発明の他の態様では、抗ヘルペスウイルス単鎖抗体、キメラ抗体、およびダイアボディ（diabody）などの使用が意図される。

【0178】

本明細書で使用される、用語「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEなどの任意の免疫原性結合因子を広くいうことが意図される。一般に、生理学的状況で最も一般的な抗体であり、且つ研究環境で最も容易に作製されるので、IgGおよび/またはIgMが好ましい。

【0179】

しかし、マウス、ラット、ヤギ、または他の種由来のキメラ抗体、融合タンパク質、単鎖抗体、ダイアボディ、二重特異性抗体、および他の操作抗体ならびにその断片と同様に、「ヒト化」ヘルペスウイルス抗体も意図される。本明細書で定義される、「ヒト化」抗体は、ヒト抗体遺伝子由来の定常領域および非ヒト抗体遺伝子由来の可変領域を含む。「キメラ抗体」は、2つの遺伝的に異なる個体由来の定常領域および可変領域を含む。抗HSVヒト化抗体またはキメラ抗体を、抗体がそのHSV抗原結合部位を保持する限り、所与の分子量および生物学的寿命のHSV抗原結合部位を含むように遺伝子操作することができる。米国特許第5,889,157号の以下の教示の使用によってヒト化抗体を調製することができる。

10

【0180】

用語「抗体」を、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子をいうために使用し、これには、Fab'、Fab、F(ab')₂、単鎖ドメイン抗体（DAB）、Fv、scFv（単鎖Fv）、およびキメラなどの抗体の断片が含まれる。上記抗体ベースの構築物および断片産生のための方法および技術は、当技術分野において周知である（米国特許第5,889,157号；米国特許第5,821,333号；および米国特許第5,888,773号（それぞれ特に参照として本明細書に組み入れられる）。抗体の調製および特徴づけのための方法および技術は、当技術分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988（参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと）。

20

【0181】

当技術分野においても周知であるように、特定の免疫原組成物の免疫原性を、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって増強することができる。適切な分子アジュバントには、サイトカイン、毒素、または合成組成物などの全ての許容される免疫刺激化合物が含まれる。アジュバントに加えて、T細胞免疫を上方制御するかサプレッサー細胞活性を下方制御することが示されている生物反応修飾物質（BRM）を同時投与することが望ましい。

30

【0182】

3. ヘルペスウイルスの検出

本発明はまた、（a）本発明のヘルペスウイルス抗原に指向する上記抗体を得る工程と、（b）被験体、患者、および/または動物から試料を得る工程と、（c）該抗体と該試料とを混合する工程と、（d）抗原と抗体の結合について該試料をアッセイする工程と、該抗原と抗体の結合が動物のヘルペスウイルス感染を示すこととを含む、患者、被験体、脊椎動物、および/またはヒトのヘルペスウイルス感染、特にHSV-1またはHSV-2感染の存在のアッセイ方法に関する。いくつかの場合、抗原に指向する抗体を、ポリクローナル抗体とさらに定義する。他の態様では、抗原に指向する抗体を、モノクローナル抗体とさらに定義する。いくつかの態様では、抗体は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：

40

50

64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載の配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を有する抗原に反応性を示す。抗原と抗体の結合についての試料のアッセイは、沈降反応、放射免疫アッセイ、ELISA、ウェスタンブロット、免疫蛍光、または当業者に公知の任意の他の方法であり得る。

【0183】

他の態様では、本発明はまた、(a)上記のペプチドを得る工程と、(b)被験体、患者、および/または動物から試料を得る工程と、(c)該ペプチドと該試料とを混合する工程と、(d)抗原と抗体の結合について該試料をアッセイする工程と、該抗原と抗体の結合が動物のヘルペスウイルスの曝露を示すこととを含む、患者、被験体、脊椎動物、および/またはヒトのヘルペスウイルス感染またはヘルペスウイルスに反応性を示す抗体、特にHSV-1またはHSV-2感染の存在のアッセイ方法に関する。ペプチドは、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：36、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：42、配列番号：44、配列番号：46、配列番号：48、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：54、配列番号：56、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：62、配列番号：64、配列番号：66、配列番号：68、配列番号：70、配列番号：72、配列番号：74、配列番号：76、配列番号：78、配列番号：80、配列番号：82、配列番号：84、配列番号：86、配列番号：88、配列番号：90、配列番号：92、配列番号：94、配列番号：96、配列番号：98、配列番号：100、配列番号：102、配列番号：104、配列番号：106、配列番号：108、配列番号：110、配列番号：112、配列番号：114および/もしくは配列番号：116に記載の配列、その断片、変異型、模倣物、または密接に関連する配列を有し得る。抗原と抗体の結合についての試料のアッセイは、沈降反応、放射免疫アッセイ、ELISA、ウェスタンブロット、免疫蛍光、または当業者に公知の任意の他の方法であり得る。

【0184】

本発明は、さらに、(a)配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31、配列番号：33、配列番号：35、配列番号：37、配列番号：39、配列番号：41、配列番号：43、配列番号：45、配列番号：47、配列番号：49、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：55、配列番号：57、配列番号：59、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：65、配列番号：67、配列番号：69、配列番号：71、配列番号：73、配列番号：75、配列番号：77、配列番号：79、配列番号：81、配列番号：83、配列番号：85、配列番号：87、配列番号：89、配列番号：91、配列番号：93、配列番号：95、配列番号：97、配列番号：99、配列番号：101、配列番号：103、配列番号：105、配列番号：107、配列番号：109、配列番号：111、配列番号：113および/もしくは配列番号：115、相補物、断片、または密接に関連する配列の1つに含まれる配列を含むオリゴヌクレオチドプローブを得る工程と、(b)PCRまたは他の検出プロトコールにおいて該プローブを使用する工程を含む、動物のHSV感染の存在のアッセイ方法に関する。

【0185】

E.他の結合因子または親和性因子

本発明の種々の態様は、核酸および/またはポリペプチド(本発明の核酸またはポリペプチド(その変異型が含まれる)の断片、一部、および一区画などが含まれる)に優先的に結合する別の結合因子または親和性因子の使用を含み得る。化合物、分子、または複合体が、本発明の核酸またはポリペプチドについて、優先的に結合するか、当技術分野にお

いて公知の方法によって決定した場合に測定可能な親和性を有する限り、結合因子には、核酸、アミノ酸、合成ポリマー、炭水化物、脂質、およびその組み合わせが含まれ得る。例えば、因子の結合親和性を、Munson and Pollard, 1980のスキッチャード分析によって測定することができる。他の結合因子には、核酸アプタマー；アンチカリンまたは他のリポカリン誘導体（例えば、米国特許第5,506,121号および米国特許第6,103,493号；国際公開公報第99/16873号および国際公開公報第00/75308号などを参照のこと）；合成または組換え抗体誘導体（例えば、米国特許第6,136,313号を参照のこと）が含まれ得るが、これらに限定されない。方法および組成物の例を、米国特許第5,506,121号および米国特許第6,103,493号ならびに国際公開公報第99/16873号および国際公開公報第00/75308号など（それぞれ参照として本明細書に組み入れられる）で見出すことができる。本発明の組成物を使用して誘導した任意の結合因子または親和性因子を、治療方法、予防方法、ワクチン接種方法、および/または診断方法で使用することができる。

10

【0186】

V. 治療組成物および方法

本発明の組成物および方法を、ウイルス感染のための治療組成物として使用することができる。治療薬を使用して、ウイルス感染を治療および/または診断することができる。特定の態様では、本発明の核酸および/またはポリペプチドを治療薬として使用することができる。本発明の種々の態様では、本発明の核酸またはポリペプチドを認識して結合する抗体、結合因子、または親和性因子を治療薬として使用することができる。これらの治療組成物は、機構（生物または被験体による能動免疫応答の誘導または刺激が含まれるが、これらに限定されない）を介して作用することができる。このような治療方法には、受動免疫化、初回刺激投与-追加免疫化、ならびに病原体の感染を防御、予防、および/または治療するための抗原、ワクチン、および/または抗体または他の結合因子の他の使用方法が含まれる。

20

【0187】

本発明の抗体または結合因子を、治療薬に抱合することができる。治療薬には、アポトーシス誘導薬、毒素、抗ウイルス薬、酵素に変換されるプロドラッグ、およびウイルス感染の治療を補助することができる任意の他の治療薬が含まれ得るが、これらに限定されない。本発明の組成物を、感染目標への治療薬のターゲティングで使用することができる。その方法は、病原体に感染した患者に有効量の抗体-治療薬抱合体を注射する工程を含み得る。抱合体は、一つまたは複数の病原体または病原体によって誘導され、感染目標での病原体の断片化または破壊の結果として細胞によって提示される抗原の一つまたは複数のエピトープに特異的に結合する一つまたは複数の化学結合抗体または抗体断片の免疫反応性合成物を含み得る。抗体抱合体は、感染症を治療し、それにより治療薬を病原体部位に局在化またはターゲティングするための化学結合治療薬を有し得る。

30

【0188】

抗菌化学療法概説は、Slack, 1987、およびSection XII, Goodman and Gilmanの「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, 1980の章に見出すことができる。

【0189】

これらの書籍に示されるように、いくつかの抗菌薬は、宿主が耐えられる濃度で微生物を死滅または阻害するので、その毒性で選択性を示す（すなわち、薬物は宿主細胞と異なる微生物の構造または生合成経路に作用する）。他の薬剤は、微生物成長を一過性にしか阻害できず、インヒビターを除去した場合に成長が再開し得る。しばしば、微生物または寄生虫を死滅または阻害する能力は、体内およびその体液中の薬剤濃度の関数である。

40

【0190】

これらの原理および利用可能な抗菌薬は、多数の感染症、特に細菌感染の治療に成功しているが、他の感染症（例えば、ウイルス感染および一定の真菌、原生動物、および寄生虫の感染症）は、全身化学療法に抵抗性を示すか比較的応答しない。

【0191】

本明細書中で使用される、「微生物」は、ウイルス、細菌、リケッチア、マイコプラズ

50

マ、原生動物、および真菌を意味するが、「病原体」は、微生物と感染性多細胞無脊椎動物（例えば、蠕虫およびスピロヘータなど）の両方を意味する。

【0192】

ウイルスは、宿主細胞に感染し、循環する全身薬から「隠れる」ことができる。ウイルス増殖が活発な場合でさえ、ウイルスが宿主細胞から放出され、全身薬は患者が絶えらるレベルで十分に強力ではない。従って、本発明の組成物を典型的には治療薬を病原体による感染の治療により有効な位置へのターゲティングで使用することができる。

【0193】

A. 初回刺激投与 - 追加免疫投与におけるワクチン接種法

一つまたは複数の本発明の組成物を、アジュバントおよび/または他の賦形剤と組み合わせるか組み合わせないで投与した場合、抗原を、他の抗原組成物の前、後、および/または同時に投与することができる。例えば、抗原またはワクチン組成物の組み合わせを、初回刺激投与量の抗原またはワクチン組成物として投与することができる。次いで、一つまたは複数の抗原またはワクチン組成物を、追加免疫投与量（初回刺激投与量として使用した抗原またはワクチン組成物が含まれる）で投与することができる。または、2つまたはそれ以上の抗原またはワクチン組成物の組み合わせを、追加免疫投与量の抗原と投与することができる。次いで、一つまたは複数の抗原またはワクチン組成物を初回刺激投与量で投与することができる。「初回刺激投与量（priming dose）」は、被験体への最初の抗原投与量である。感染した被験体の場合、初回刺激投与量は、被験体の病原体への最初の曝露であり、抗原またはワクチン組成物の組み合わせを追加免疫投与量で被験体に投与することができる。「追加免疫投与量（boost dose）」は、既に抗原に曝露されている被験体に投与される同一または異なる抗原またはワクチン組成物の第2、第3、第4、第5、第6、またはそれ以上の用量である。いくつかの場合、感染する危険性のある被験体を感染から防御するために追加免疫投与量が必要でないように、初回刺激投与量を、抗原またはワクチン組成物と組み合わせ投与することができる。抗原を、一つまたは複数のアジュバントまたは他の賦形剤と個別または任意の組み合わせで投与することができる。アジュバントを、一つまたは複数の抗原またはワクチン組成物の投与前、同時、または後に投与することができる。抗原およびワクチン組成物の一つまたは複数の成分の反復投与を一つまたは複数の投与のために単独または組み合わせで行うことができることが意図される。抗原は1つの病原体に由来する必要はなく、一つまたは複数の病原体に由来し得る。ワクチン組成物の順序および組成を、本明細書に記載の教示と組み合わせた公知の方法の使用によって容易に決定することができる。初回刺激投与 - 追加免疫投与によるワクチン接種法の例は、米国特許第6,210,663号（参照として本明細書に組み入れられる）に見出すことができる。

【0194】

種々の態様では、初回刺激投与と追加免疫投与との間の時間間隔は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、32日、33日、34日、35日、36日、37日、38日、39日、40日、41日、42日、43日、44日、45日、46日、47日、48日、またはそれ以上の日数、週、月、または年であり得る。ワクチン組成物には、本明細書に記載の任意のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および結合因子組成物または、任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上の各組成物の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0195】

B. 受動免疫化

本発明の抗原に対する一つまたは複数の抗体または親和性因子を含む組成物の動物またはヒト被験体への投与によって予め選択したリガンドまたは病原体に対して動物またはヒト被験体を受動免疫化する方法が意図される。

【0196】

10

20

30

40

50

免疫グロブリン分子および他の親和性因子または結合因子は、予め選択した抗原に結合することができ、植物細胞または動物細胞ならびに種々の動物（ウマ、ブタ、ウサギ、ヤギ、ロバ、マウス、ラット、ヒト、および天然または組換え分子を産生することができる他の生物が含まれるが、これらに限定されない）で効率的且つ経済的に合成することができる。一定の場合、免疫グロブリン分子は、シアル酸を含んでも含まなくても良いが、コアグリコシル化タンパク質および外側に枝分かれしたN-アセチルグルコサミンを含む。種々の態様では、免疫グロブリン分子は、IgA、IgM、分泌IgM、または分泌IgAのいずれかである。

【0197】

分泌IgMおよび分泌IgAなどの分泌免疫グロブリンは、タンパク質分解および変性に耐性を示し得る。このような分子の投与または使用のために考慮される環境には、酸性環境、環境因子（高温環境）を含むプロテアーゼ、および他の厳しい環境が含まれる。例えば、プロテアーゼおよび酸の両方が存在する動物の胃腸管は厳しい環境である（Kobayishi et al., 1973を参照のこと）。静脈内、筋肉内、経口、腹腔内、粘膜、または他の投与方法による本発明の抗原を認識する抗体または結合因子の接触または投与によって、動物またはヒト被験体の受動免疫化を行うことができる。粘膜投与方法には、肺、消化管、鼻咽頭腔、および泌尿生殖器系などによる投与が含まれ得る。

10

【0198】

種々の態様では、免疫グロブリン分子などの抗体または結合因子は、予め選択された抗原に特異的である。典型的には、この抗原は、疾患を引き起こす病原体上に存在する。一つまたは複数の抗体または結合因子は、病原体に結合して病態を予防または治療することができる。

20

【0199】

特定の態様では、一つまたは複数の抗体または結合因子を含む組成物は、治療でまたは薬学的に許容される組成物である。有効成分としてポリペプチド、タンパク質、または他の分子を含む治療でまたは薬学的に許容される組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されており、本明細書に簡単に記載する。

【0200】

特定の態様では、一つまたは複数の抗体または結合因子を含む組成物は、病原体抗原と特異的または優先的に結合する分子を含む。分子が他の抗原または分子と結合し得るが、好ましい抗原に対する親和性と比較してはるかに親和性が低いことを意味するために本明細書中で使用することが好ましい。病原体は、別の生物で疾患を引き起こす任意の生物であり得る。

30

【0201】

病原体に特異的または優先的な抗体または結合因子を、標準的な合成技術、組換え技術、または抗体産生技術（Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., eds., Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)を参照のこと）ならびに本明細書に記載の別の親和性因子または結合因子を使用して産生することができる。

【0202】

C. 治療的ワクチン接種

ワクチン接種の有望な使用は、確立された疾患または感染の治療または治癒のための治療的ワクチン接種の使用である。動物またはヒト被験体の本発明の一つまたは複数の抗原を含む組成物との接触または投与による予め選択したりガンドまたは病原体に対する動物またはヒト被験体の治療的免疫化方法が意図される。治療的ワクチン接種により、例えば、ヘルペスウイルス感染に起因する病変または前駆病変（precursor lesion）の合併症が緩和され、それにより予防的介入の代替法を得ることができる。このワクチン接種型は、持続的に感染した細胞で発現する本明細書に記載の種々のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含み得る。このワクチン型の投与後、感染または疾患に関連する病変中の持続的に感染した細胞に対して細胞傷害性T細胞が活性化され得ると推測される。

40

【0203】

50

感染の治療のための感染被験体への送達のために本発明のワクチン候補を調製するか組み合わせることができる。これらの抗原に対して惹起される免疫応答が耐性病原体を排除するかヘルペス再活性化に関連する症状を予防または緩和することができることが認識される。

【0204】

VI. 微生物ゲノミクス

自動化DNA配列決定は、分析に利用可能なそのゲノム内に含まれる情報全体の作製によって、病原性微生物の調査に革命をもたらした。ゲノミクスおよび/またはプロテオミクス情報を、本明細書に記載の発明の文脈で利用することができる。特定の態様では、ゲノミクスまたはプロテオミクスの情報を、病原性生物のゲノムの分析およびワクチン接種、ワクチン調製、および抗体調製などの目的でのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの同定に使用することができる。ゲノミクス技術、方法、および組成物を、配列データ（タンパク質およびDNA）、マイクロアレイデータ、および他のゲノミクスベースのデータから知識を抽出するようにデザインした。全ゲノム配列情報の1つの適用は、微生物遺伝子およびその候補のワクチンとしての病原的役割の調査である。非常に多数の配列決定された微生物ゲノムの利用により、微生物遺伝子が体系的に研究および分析される。

10

【0205】

非常に多数の医学的および農学的に重要な生物のゲノム配列が公知であるか公知となるであろう。ゲノミクス技術は、特に、配列情報の増大により明確になる複雑な問題の解明で魅力的である。多数の従来からの遺伝学的および生化学的アプローチでは、特にいくつかの病原性生物に関して限界がある。

20

【0206】

急速に発展したゲノミクス、プロテオミクス、およびバイオインフォマティクス分野は、種々の技術（質量分析、高速クロマトグラフィ、電気泳動、タンパク質配列決定、および他のゲノミクスまたはプロテオミクス技術（一般的概要については、Cunningham, 2000を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない）に依存する。また、プロテオミクス技術および他の分野の開発、進歩、および統合は、機能的ゲノミクス（一次構造の決定、タンパク質の化学修飾、タンパク質-タンパク質架橋の質量分析、タンパク質の精製および特徴づけならびにプロセス工学が含まれる）と関連していた。

30

【0207】

ゲノミクス適用には、ハプロタイプ分析、発現分析、生物兵器防衛、および微生物分析の強化が含まれるが、これらに限定されない。DNAの長い破壊していないセグメントの直接的な一次読み取りの使用により、研究者にゲノムを解読する技術を提供する包括的な遺伝子データが獲得され、遺伝子の変異を同定し、薬理ゲノミクス、創薬、集団遺伝学、および農業バイオ技術が可能である。

【0208】

A. ゲノミクス技術

病原体の分析時に種々のゲノミクス法および技術を使用することができる。例えば、遺伝子合成（方法の例については、米国特許第6,472,184号および米国特許第6,110,668号を参照のこと）；遺伝子タイピング（方法の例については、米国特許第5,846,704号および米国特許第6,449,562号を参照のこと）；ライブラリーの構築（方法の例については、米国特許第6,468,765号およびSambrook et al., 2001を参照のこと）；オリゴ合成（修飾オリゴおよびRNAオリゴ合成が含まれる）（Ausubel, et al., 1993またはIntegrated DNA Technologies, Coralville, IA）、ならびに市販の配列決定および合成サービス（例えば、Qiagen Genomics, Bothell, WA；またはCleveland Genomics, Cleveland, OH）。

40

【0209】

B. 動物モデル

遺伝子またはタンパク質の機能に関する情報を得るために使用する種々のアッセイは、トランスジェニック生物を使用する。動物モデルには、トランスジェニック動物、トラン

50

スジェニックマウス、トランスジェニックマウス細胞株、トランスジェニックラット細胞株、またはトランスジェニックラットが含まれる。

【0210】

C.アレイ技術

ゲノミクスおよびプロテオミクス分析に種々のアレイ技術も利用することができる (Bottell et al., 2003)。アレイには、抗体アレイ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) ; cDNAアレイ (Incyte Genomics, St. Louis, MO.)、微生物アレイ (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX)、オリゴアレイ (QIAGEN Operon, Alameda, CA) ; タンパク質-DNA相互作用アレイ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) ; タンパク質アレイ (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, CA) ; および種々の業者から市販されている他のアレイ型が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0211】

D.ロボット工学

典型的には、種々のロボットまたは自動機械を、ゲノミクスおよびプロテオミクスと組み合わせた高処理方法と組み合わせて使用する。ロボットまたは機械の例には、自動化コロニーピッカー/アレイヤー (Biorad, Hercules CA) ; および Genetix, Beaverton OR) ; 自動化ディスペンサー、マイクロプレートハンドラー、マイクロプレートウォッシャー (Beckman Coulter, Fullerton CA ; Bio-Tek Instruments, Winooski VT ; および PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston MA) ; 自動化核酸/タンパク質分析 (Beckman Coulter, Fullerton CA)、自動化核酸精製 (QIAGEN, Valencia CA) ; 自動化タンパク質発現装置 (Roche Applied Science, Indianapolis IN) ; および高処理蛍光検出 (Cellomics, Inc., Pittsburgh PA) が含まれる。

20

【0212】

VI.薬学的組成物

本発明の組成物は、薬学的に許容される担体および/または水媒体に溶解および/または分散することができる有効量のヘルペスウイルスポリヌクレオチドまたはその変異型 ; 抗原タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはペプチド模倣物 ; および抗ヘルペスウイルス抗体などを含む。遺伝子免疫化ベクターおよびワクチンの水性組成物、および任意の上記の発現も意図される。

【0213】

A.ペプチド、核酸、および他の活性化合物の薬学的性質

本発明のヘルペスウイルスポリペプチドおよびこれをコードする核酸を当業者に公知の任意の方法によって送達させることができる (例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Editionを参照のこと)。

30

【0214】

本発明の組成物を含む溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中で調製することができる。通常の保存および使用条件下で、これらの調製物は微生物の成長を防止するための防腐剤を含む。注射に適切な薬学的形態には、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。形態は、通常、滅菌であるべきであり、シリンジでの使用が容易な範囲までの流動物でなければならない。製造および保存条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの夾雑微生物作用に対して保存されなければならない。

40

【0215】

水溶液での非経口投与のために、例えば、必要に応じて溶液を適切に緩衝化し、最初に液体希釈物を十分な生理食塩水またはグルコースで等張にする。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、および腹腔内投与に特に適切である。これに関して、使用することができる滅菌水溶液は、本開示に照らして当業者に公知である。有効成分としてのペプチド治療薬の使用に関して、米国特許第4,608,251号 ; 米国特許第4,601,903号 ; 米国特許第4,599,231号 ; 米国特許第4,599,230号 ; 米国特許第4,596,792号 ; および/または米国特許第4,578,770号 (参照として本明細書に組み入れられる) の技術を使用する

50

ことができる。

【0216】

ヒト投与のために、調製物は、FDAのCenter for Biologics Evaluation and Research およびCenter for Drug Evaluation and Researchの定める安定性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきである。

【0217】

用語「薬学的に許容される」または「薬理的に許容される」は、ヒトに投与した場合にアレルギー反応または類似の望ましくない反応を起こさない分子実体および組成物をいう。有効成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されている。典型的には、このような組成物を、注射可能形態（液体溶液または懸濁液のいずれか）として調製し、注射前に溶液または懸濁液に適切な固体形態を液体に調製することもできる。

10

【0218】

B. 送達 / 投与経路

薬学的組成物を、従来通り、非経口、注射（例えば、皮下、皮内、または筋肉内のいずれか）によって投与することができる。しかし、組成物の任意の投与方法を適用することができる。これらには、ペプチドをコードするDNAの遺伝子銃接種、生理学的に許容される固体基剤または生理学的に許容される分散液での経口投与、経皮パッチ投与、非経口送達、または注射などが含まれる。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、典型的には、非経口投与（静脈内、筋肉内、皮下、病変内、上皮、経皮、腹腔内経路を介した注射など）のために処方する。さらに、経口、腔内、または吸入送達のために組成物を処方することができる。

20

【0219】

ヘルペスウイルスポリペプチドをコードする核酸が注射に必要なニードルの特定のゲージを通過することができる限り、ヘルペスウイルスポリペプチドをコードする核酸を、シリンジまたは溶液注入で使用される任意の他の方法によって送達することができる。溶液を保持するためのアンブルチャンパーを規定するノズルおよび溶液をノズルから送達部位に押出すためのエネルギーデバイスを有する新規のニードルレス注射システムが最近記載されている（米国特許第5,846,233号）。シリンジシステムはまた、所定量の溶液の任意の深さでの複数の注射が可能な遺伝子療法での使用についても記載されている（米国特許第5,846,225号）。

30

【0220】

C. アジュバント

ベクターまたは抗原をアジュバントと同時投与した場合、免疫原性を有意に改良することができる。アジュバントにより、抗原の免疫原性が増強するが、必ずしもこれら自体が免疫原性ではない。アジュバントは、抗原の免疫系細胞への徐放を促進する持続効果を得るための投与部位付近の抗原の局所的保持によって作用することができる。抗原の持続および免疫応答の誘発のために免疫系細胞を刺激するために、アジュバントを免疫系細胞に引きつけることもできる。アジュバントは、免疫系細胞または因子を刺激するかシグナル活性化することができる。アジュバントの例を、米国特許第6,406,705号（参照として本明細書に組み入れられる）で見出すことができる。

40

【0221】

本明細書中で使用される、用語「アジュバント」は、免疫学的アジュバントをいう。これは、免疫原性物質または抗原に対する免疫系応答を増強することができる化合物を意味する。用語「免疫原性」は、単独またはアジュバントと共に被験体に投与した場合に被験体の免疫応答を誘導する物質または有効成分をいう。用語「免疫応答」には、特定の体液性免疫応答（すなわち、抗体）および細胞性免疫応答が含まれ、抗体は血清学的および分泌性であり、サブクラスIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgE、ならびに全てのイソ型、アロタイプ、およびそのサブクラスに属する。この用語は、さらに、他の血清または組織成分を含むことが意図される。細胞性応答には、Tヘルパーリンパ球1型および2型、細胞傷害

50

性T細胞、ならびにナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。

【0222】

さらに、アジュバニシティ（adjuvanicity）に関するいくつかの他の要因は、抗原の免疫原性を促進すると考えられる。これらには、（1）抗原を微粒子（例えば、アルミニウム塩）にすること、（2）抗原のポリマーまたは重合、（3）抗原の徐放（例えば、乳濁液またはマイクロカプセル封入）、（4）細菌および細菌産物（例えば、CFA）、（5）他の化学的アジュバント（例えば、poly-I:C、硫酸デキストラン、およびイヌリン）、（6）サイトカイン、および（7）APCをターゲティングする抗原が含まれる。

【0223】

本発明と組み合わせて使用することができるアジュバントの一般的カテゴリーには、ペプチド、核酸、サイトカイン、微生物（細菌、真菌、寄生虫）、糖タンパク質、糖脂質、リポ多糖類、および乳濁液などが含まれるが、これらに限定されない。

【0224】

アジュバントの組み合わせを、同時または連続的に投与することができる。アジュバントを同時投与する場合、これらを同一または個別の処方物、後者の場合、同一または個別の部位に投与することができるが、同時に投与することができる。少なくとも2つのアジュバントを一過性に分けて投与する場合、アジュバントを連続的に投与する。2つのアジュバントの投与時間の間隔は、約数分でもそれより長くても良い。時間間隔は、14日未満、より好ましくは7日未満、最も好ましくは1日未満である。時間間隔はまた、初回単一の刺激投与で1つのアジュバントおよび初回組み合わせの刺激投与での1つのアジュバント、または初回単一の刺激投与で1つのアジュバントによってもよい。

【0225】

いくつかの態様では、アジュバントは、Adjumer（商標）、Adju-Phos、アルガルグルカン、アルガムムリン（Algammulin）、アルヒドロゲル（Alhydrogel）、抗原処方物、Avridine（登録商標）、BAY R1005、カルシトリオール、リン酸カルシウムゲル、コレラホ口毒素（CT）、コレラ毒素Bサブユニット（CTB）、コレラ毒素A1-サブユニット-タンパク質A D断片融合タンパク質、CRL1005、サイトカイン含有リポソーム、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、デヒドロエピアンドロステロン；ジミリストイルホスファチジルコリン；1,2-ジミリストイル-sn-3-ホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、デオキシコール酸ナトリウム塩；フロント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、インスリン、ゲルブ（Gerbu）アジュバント、GM-CSF、N-アセチルグルコサミン-（1-4）-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、イミキモド、ImmTher（商標）、インターフェロン-1、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-7、インターロイキン-12、ISCOM（商標）、Iscoprep 7.0.3.（商標）、リポソーム、ロキソリピン、LT-0AまたはLT経口アジュバント、MF59、MONTANIDE ISA 51、MONTANIDE ISA 720、MPL（商標）、MTP-PE、MTP-PEリポソーム、ムラメチド、ムラパルミチン、D-ムラパルミチド、NAGO、非イオン性界面活性賦形剤、プロイラン、乳酸ポリマー、グリコール酸ポリマー、プルロニックL121、ポリメチルメタクリレート、PODDS（商標）、ポリrA：ポリrU、ポリソルベート80、タンパク質コクリエート（Cochleate）、QS-21、Quil-A、リヒドラゲルHPA、リヒドラゲルLV、S-28463、SAF-1、スクラボペプチド、センダイプロテオリポソーム、センダイ含有脂質マトリクス、Span85、スペコール、スクアラン、スクアレン、ステアリルチロシン、セラミド（商標）、スレオニル-M DP、Ty粒子、またはウォルターリードリポソームである。

【0226】

D. 投薬量および投薬計画

ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの投薬量および投薬計画を、例えば、被験体の体重および年齢、治療を受ける疾患の型、病態の重症度、以前または現在の治療介入、および投与様式などの要因を考慮して、被験体毎に変化させることができ、これを当業者によって容易に決定することができる。

【0227】

10

20

30

40

50

投与は投薬処方物と適合可能な任意の様式であり、治療に有効および/または免疫原的な量で投与する。投与量は、治療する被験体（個体の免疫系の抗体を合成する能力が含まれる）および所望の防御の程度に依存する。ワクチン投薬量は投与経路に依存し、宿主のサイズによって変化する。投与に必要な有効成分の正確な量は、当業者の判断に依存する。

【0228】

特定の態様では、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化化合物を含み得る。1つの種々の活性化化合物は、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。他の態様では、活性化化合物は、単位重量の約2%～約75%との間または約25%～約60%との間および例えばこれらから導き出される任意の範囲の活性化化合物を含み得る。しかし、適切な投与量の範囲は、例えば、ワクチン接種あたり数百 μg オーダーの有効成分であり得る。他の非限定的な例では、用量はまた、ワクチン接種あたり約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重から約 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重またはそれ以上までならびにこれらから導き出される任意の範囲を含み得る。本明細書に列挙した数字から導き出される範囲の非限定的な例では、上記数字に基づいて、約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重の範囲を投与することができる。初回投与および追加免疫投与（例えば、接種）のための適切な投与計画も変更可能であるが、初回投与後に接種するか他の投与を行うことが典型である。

【0229】

多数の例では、ワクチンを複数回投与する（通常6回を越えないワクチン接種、より通常では4回を越えないワクチン接種、好ましくは一回または複数回、通常少なくとも約3回のワクチン接種）ことが望ましい。ワクチン接種は、通常、2週間から12週間までの間隔、より通常には3週間から5週間までの間隔である。一連の初回免疫化後の1～5年間隔、通常3年間隔での定期的追加免疫が抗体の防御レベルの維持に望ましい。

【0230】

一連の免疫化後に、上清抗原について抗体をアッセイすることができる。放射性核種、酵素、および蛍光などの従来の特許による標識によってアッセイを行うことができる。これらの技術は周知であり、広範な種々の特許（これらのアッセイ型の例として、米国特許第3,791,932号；米国特許第4,174,384号、および米国特許第3,949,064号など）で見出すことができる。他の免疫アッセイを行うことができ、免疫化後に核酸での攻撃誘発からの防御をアッセイすることができる。

【0231】

VII. キット

本発明はまた、適切なコンテナ中に、(a) 薬学的に許容される担体および(b) HSV抗原に指向する抗体または他の適切な結合因子を含むHSV感染アッセイキットに関する。

【0232】

本発明の治療キットは、ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1またはHSV-2）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはポリペプチドに対する抗体を含むキットである。このようなキットは、一般に、適切なコンテナ中に、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの薬学的に許容される処方物、ポリペプチドに対する抗体、または薬学的に許容可能な処方物中で任意の上記を発現するベクターを含む。キットは、1つのコンテナを有することができ、そして/または各化合物について個別のコンテナを有することができる。

【0233】

キットの構成要素を1つおよび/または複数の溶液中に提供する場合、溶液は水溶液であり、滅菌水溶液が特に好ましい。ヘルペスウイルスポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは抗体組成物を、シリンジで利用可能な組成物に処方することもできる。この場合、コンテナ自体がシリンジ、ピペット、および/または他のこのような類似の装置であっ

10

20

30

40

50

てよく、これから処方物を身体の感染領域に投与し、動物に注射し、そして/またはキットの他の構成要素に適用し、そして/または混合することができる。

【0234】

しかし、キットの構成要素を乾燥粉末として提供することができる。試薬および/または構成要素を乾燥粉末として提供する場合、粉末を適切な溶媒の添加によって再構成することができる。溶媒を別のコンテナ中に提供することもできることが予想される。

【0235】

コンテナには、一般に、ヘルペスウイルスポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは抗体処方物を入れる、好ましくは適切に配置する少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、および/または他のコンテナが含まれる。キットはまた、滅菌された薬学的に許容される緩衝液および/または他の希釈剤を含めるための第2のコンテナを含み得る。

10

【0236】

本発明のキットには、典型的には、所望のバイアルを保持するインジェクションおよび/またはブロー成形プラスチックコンテナなどの販売のための厳重な封じ込めのためのバイアル封入手段も含まれる。

【0237】

コンテナの数および/または型と無関係に、本発明のキットは、最終的なヘルペスウイルスポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはポリペプチドに対する抗体の動物の体内への注射/投与および/または位置付けを補助する装置も含み、そして/またはパッケージングすることもできる。このような装置は、シリンジ、ピペット、鉗子、および/または任意のこのような医学的に承認された送達伝達体であり得る。

20

【0238】

実施例

本発明の好ましい態様を証明するために、以下の実施例を含める。以下の実施例に開示の技術が、本発明の実施において十分に機能することが本発明者らによって発見され、それによりその実施の好ましい様式を構成すると考えることができる技術を示すと当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲を逸脱することなく開示の特定の態様の多くの変更形態を得ることができ、依然として同様または類似の結果が得られると認識すべきである。

30

【0239】

実施例1 RELIスクリーニング：単純ヘルペスウイルス1 (HSV-1) DNAを発現するライブラリーの構築

HSV-1のMacIntyre株由来のゲノムDNAを、培養サバンナモンキー腎細胞 (VERO-E6) から精製した。ウイルスDNAを、噴霧によって物理的に剪断し、精製し、1.5%アガロースTRIS-ホウ酸ゲルでの電気泳動によってサイズ選択した。500から2000塩基対 (bp) までの断片を切り出し、電気遊離した。ライブラリー産生プロトコールは、HIVランダム発現ライブラリーの作製のために以前に記載されたプロトコールと類似していた (Sykes and Johnston, 1999 (参照として本明細書に組み入れられる))。しかし、BglII制限部位オーバーハングを作製するための剪断断片へのアダプターの結合の代わりに、平滑末端を作製するために断片を酵素で修復した (KlenowおよびT4ポリメラーゼ)。修復断片を、2つの哺乳動物発現プラスミドにライゲーションした。BglII制限酵素での直鎖状化、アルカリホスファターゼでの脱リン酸化、およびKlenowでの5'一本鎖オーバーハングの平滑末端化によるライゲーションのために修復断片を調製した。組織プラスミドアクチベーター遺伝子由来の分泌ペプチド配列 (pCMVtPA (tPAベクター)) またはマウスユビキチンサブユニット (pCMViUB (UBベクター)) のいずれかとの融合物として哺乳動物系中でインサートを発現するように、2つのベクターをデザインする。

40

【0240】

感染および疾患の解明のための免疫分析により、体液性応答および細胞性応答の両方についての役割が示唆されたので (Whitley and Miller, 2001)、tPAおよびUBベクター両方

50

を使用して、それぞれMHCIIおよびMHCI提示を駆動した。2つのライゲーション産物組を使用して、DH5 大腸菌を形質転換し、アンピシリンを含むLB寒天上でプレートし、サブコンフルエントまで成長させた。これらの元のライブラリー形質転換体を、爪楊枝で吊り上げ、これを使用して、75 µg/mLアンピシリンを補足したHYT凍結培地（1.6% Bacto-トリプトン、1.0% Bacto-酵母抽出物、85.5mM NaCl、36mM K₂HPO₄、13.2mM KH₂PO₄、1.7mMクエン酸ナトリウム、0.4mM MgSO₄、6.8mM硫酸アンモニウム、4.4% wt/volグリセロール）を含む各マイクロタイタープレート培養物に接種し、37 °Cで一晩成長させた。ライブラリーのミニ培養物としての成長および保存は、元のライブラリーの複雑さの恒久的維持の目的を果たす。いくつかのミニ培養物からプラスミドDNAを精製し、病原体の同一性を確認し、ライブラリーを特徴づけるために分析した。配列分析により、55%のライブラリーインサートがHSV-1配列であり、残りのインサートがおそらくウイルスストックの増殖のために使用した培養細胞に由来するサル由来のDNAであることが立証された。 10

【0241】

プラスミド形質転換細菌を、tPAベクターライゲーションで形質転換した384コロニーの12プールおよびUBベクターライゲーションで形質転換された別の384コロニーの12プールに編成した。プールは、4つの96ウェルマイクロタイター培養物から構成された。スタンピングツールを使用して、20×20cmのLB-カルベニシリン/リンコマイシン寒天プレートにサブライブラリープラスミドの細菌増殖のためのマイクロタイター培養物を接種した。プレートを37 °Cで一晩インキュベートし、細菌細胞を回収した。各24発現ライブラリープールに対応する混合プラスミドDNA試料を、無内毒素Qiagen tip-500カラムキット（QIAGEN Inc., Valencia, CA）で精製した。DNAの質およびプールの複雑さの完全性を、分光測光法、酵素消化、およびゲル電気泳動によって評価した。得られた各HSVインサート保有ライブラリークローンは、平均900bp~152,000bpのウイルスゲノムの1つの無作為に挿入した断片を含む。各サブライブラリープール中に384クローン（55%がHSV-1 DNAを保有する）が存在するので、6断片中たったの1つが適切に配向およびフレーム化し、1つのプールは0.2のゲノムのコード配列の平均等価物を発現することができる（ $(384 \times .55) \times 900 \times (1/6) 152,000 = 0.21$ 発現等価物）。合わせると、全部で24個のサブライブラリーを含む2つの細胞内ターゲティングライブラリーは、統計上は5つのゲノム発現等価物を示す。 20

【0242】

実施例2 免疫化および攻撃誘発保護アッセイ（ラウンド1） 30

12個のサブライブラリーDNAを含むtPAベクターおよび12個のDNAを含むUBベクターを、緩衝化生理食塩水中でそれぞれ1/10ライブラリー量でマウスGMCSFを発現するプラスミドと組み合わせた。これらの接種材料を、24群の6週齢のヌードマウス（hairless mice）に筋肉内注射した（i.m.）。50 µgのプールしたライブラリープラスミドおよび5 µgの遺伝子アジュバントGMCSFを各マウス（群あたり4匹）に注射し、2つの大腿四頭筋および2つの前脛骨筋に均一に分布させた。4週間および8週間後の初回刺激投与後に動物に同一の接種材料で2回追加免疫投与を行い、最後の免疫から2週間後にウイルスで攻撃誘発した。真皮を剃った擦過傷領域への 2×10^5 pfuのHSVストックの50 µl懸濁液のピペティングによって、HSV-1株を17syn+に曝露した。ヘルペス感染の2つの読み取りi) 感染誘導病変およびii) 動物生存) を使用するtPAおよびUBライブラリースクリーニング両方を、14日間モニタリングした。上皮の変化を、軽度、中等度、または重症として記録した。これらの結果を図1に記載する。重篤な皮膚病変および脊髄炎も有するマウスを安楽死させた。図2は、攻撃誘発後のマウス生存率を示す。対照動物と比較した病変の減少および生存率の増大の両方の読み取りに基づいて正と記録した（ナイーブおよび無関係のライブラリー免疫化）。2つの基準は強く相関した。プラスミドプールT1、T3およびT8に対応するtPAライブラリー免疫化由来の3つの群を正と記録した。逆重畳についてUBライブラリー免疫化由来の4つの群を同定し、これらをプラスミドプールU6、U7、U11、およびU12とした。 40

【0243】

実施例3 ライブラリー減少（ラウンド2）

第2ラウンドの同胞試験および正のクローン富化のための接種材料を作製するために、3 50

つの正に記録されたtPA群および4つの正に記録されたUB群に対応する21個のマイクロタイター培養プレートをフリーザーストックから取り出した。ラウンド2ELI試験のために、スタンピングツールを使用して、20 x 20cmのLB-カルベニシリン/リンコマイシン寒天プレートに、ライブラリープラスミドの新規のプールを定義する細菌形質転換体組を接種した。仮想三次元行列に各形質転換体を位置付け、その後仮想平面に従って細菌を組み合わせることにによってプール組成物をデザインした(図3)。このプーリング法により、各形質転換体を3つの固有のプールに位置付け、3つの各次元に1つに対応する。目的は、平面の交点の行列分析により防御に相関する1つの形質転換体を有効に同定されるように本発明者らの防御アッセイデータをこのグリッド上にマッピングすることであった。12-X軸、16-Y軸、および8-Z軸に編成される100~200プラスミドの36群を使用してtPAグリッドを構築した。6-X軸、9-Y軸、10-Z軸を示す300プラスミドの25接種群を使用してUBグリッドを形成させた。細菌群を寒天プレート上で増殖させ、細胞を回収した。上記のように混合プラスミド試料を精製し、プールの複雑さの完全性を評価した。これおよびその後の免疫化ラウンドにおいて、接種材料中にGMCSFプラスミドを含まなかった。アジュバントはプールの複雑さにおいて重要度が低いと考えられ、本発明者らはサイトカイン発現による不適切な免疫調整のいかなる可能な逆効果も回避するようにした。この株およびヌードマウス由来の結果が類似することが認められたので、ラウンド2および3のための攻撃誘発モデルに使用したマウス株はBALB/cであった。ヌードマウスにより病変をより容易に評価されるが、両株は致命的HSV感染に類似の感受性を示す。したがって、BALB/cを使用して得たその後の防御の結果は、疾患モニタリングを使用しない生存の読み取りに依存していた。i.m.注射(ラウンド1に記載のように50 μ g/マウス)および遺伝子銃送達(1 μ g/耳)によって、動物をライブラリープラスミドの再整列プールで免疫化した。攻撃誘発手順は、ラウンド1に記載と類似していた。

【0244】

tPA融合ライブラリーのスクリーニングでは、3週間後および10週間後に追加免疫を投与し、最後の免疫化から2週間後に動物をウイルスに曝露した。攻撃誘発の読み取り結果を、図4Aでグラフ化する。ラウンド1由来の正に記録されたプールを再試験し、再度防御を付与した。負の対照群を空のベクターで免疫化するか、マウスを非免疫化(NI)した。各データセット内の上位の生存試験群を選択した。Z軸プールで免疫化したマウスは、X軸プールおよびY軸プールで免疫化したものよりも低い生存度を均一に示し、それにより、Z軸マウス群のスコアリングはあまり厳しくない。正として選択されたプールは、グリッド次元 X1, X8, Y1, Y4、およびY9, Y12, Y14, Y15、およびZ2, Z3, Z5, Z7に対応していた。その交点は、48マイクロタイターウェル形質転換体を示した。

【0245】

UB融合ライブラリーのスクリーニングのために、0、6週間後、および12週間後にマウスを免疫化した。3週間後に投与したウイルス攻撃誘発の死亡率の結果を図4Bにグラフ化する。攻撃誘発から10日後まで毎日2回生存度をモニタリングした。感染10日後に死亡が安定するが、NIでは完全な死亡を示すためにより長くモニタリングし得るので、tPAライブラリーを研究する限り、モニタリングを行った。感染9日後で認められた生存率を使用して、正の群を選択した。また、マウスを、より低い生存率を均一に示すZ軸プールで免疫化した。各データセット内の最良の生存群を選択した。これらの群を、行列平面 X1, X2, X5、およびY1, Y2, Y6, Y9、およびZ2, Z7, Z9を示すプラスミドプールで免疫化した。その交点は、最初にデザインしたグリッド由来の90個のマイクロタイターウェル形質転換体が認められた生存の改良を担うことを示した。

【0246】

実施例4 各抗原コードクローンの減少

行列クロスヘアによってデザインした各ライブラリー形質転換体を、それぞれ液体培養で増殖させ、小規模アルカリ溶解キット法(Qiagen, Turbo-preps)を使用してプラスミドを精製した。ライブラリーインサートクローニング部位の上流および下流付近をハイブリッド形成するプライマーを使用して、配列決定反応を行った。配列データ分析を使用して

、50アミノ酸(aa)長を超える適切に融合したHSV-1読み取り枠(ORF)をコードするインサートを同定した。

【0247】

48tPAペプチド融合ライブラリークローンから構成される群由来の21クローンは哺乳動物DNAインサートで汚染されており、別の26クローンは非コードHSV-1 DNAを保有していた。6つのクローンは、以下の6つのタンパク質由来の断片をコードするHSV-1 ORFをコードした。

- 1.現在ワクチン候補として研究されているUS6(糖タンパク質D(gD))。スクリーニングで同定されたgDライブラリーインサートは1385bpであり、全長遺伝子に及ぶ。
- 2.US3(セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ)。
- 3.UL17(ウイルスDNA切断およびパッケージングタンパク質)。
- 4.UL50(dUTPアーゼ)。インサートは、50aaを超える読み取り枠をコードするが、推定コードフレーム中に存在しない。
- 5.IgG媒介免疫応答を阻害することが公知のUS8(糖タンパク質E(gE))。
- 6.UL28(ウイルスDNA切断およびパッケージングタンパク質および輸送タンパク質)。

【0248】

98個のUB融合ライブラリークローンから構成される群由来の27クローンは哺乳動物DNAインサートで汚染されており、25クローンはHSV-1インサートであるが、HSV-1タンパク質断片をコードしなかった。8個のプラスミドは、以下の6つのタンパク質の一つまたは複数の断片に対応するHSV-1 ORFをコードした。

- 1.UL29/ICP-8のアンチセンス。
- 2.UL53(糖タンパク質K(gK))。
- 3.現在ワクチン候補として研究されているUL27(糖タンパク質B(gB))。
- 4.UL36(非常に巨大な外被タンパク質)。
- 5.UL29/ICP-8(主要な一本鎖DNA結合タンパク質)。
- 6.UL24(複製タンパク質)。

【0249】

配列決定により、3つの固有のライブラリークローンが約10kbのUL36遺伝子の3つの異なる領域に対応するインサートを保有することが明らかとなった。これらのコードされたUL36断片のうち2つおよびこれらのうちの1つを正と記録した。2つのORFは、UL29遺伝子に対応した。UL29コード配列が逆方向で融合されているので、コードされたUL29断片および他のORFをコードしたこれらのうちの1つは偶然であるようである。

【0250】

実施例5 各ライブラリークローンを使用した防御分析(RELIラウンド3)

上記の各tPAおよびUBライブラリークローンを保有するストック細菌培養物を、標準的方法によって液体培養で成長させ、プラスミドをQiagen無内毒素キットで精製した。前のラウンドと比較して各用量が多いので、単一クローン接種には少量のライブラリープラスミドを使用した。接種材料中の総DNA量を維持する場合、任意の1つの抗原の用量は混合物の複雑さの減少に連れて増大する。tPAスクリーニングのラウンド3のために、各ライブラリープラスミドの等量のpUC118(送達を促進するための非特異的担体DNA)での希釈によってワクチン接種のための接種材料を調製した。特に、BALB/cマウスに、50 μ gのDNA(25 μ gの防御候補の1つおよび25 μ gのpUC118から構成される)を筋肉内注射した。これらを、遺伝子銃で2回の1 μ gのDNAショット(それぞれ0.5 μ gのpUC118を含む0.5 μ gの同一のワクチン候補から構成される)で同時投与した。5週間後および9週間後に動物に同一の摂取材料を追加免疫投与した。最後の追加免疫から3週間後、ワクチン接種動物をHSV-1 17syn⁺株で攻撃誘発した。不運なことに、未免疫化対照マウスの生存率によってウイルスストックは予想よりも感染力があまり強くないことが証明された。滴定したHSV-1の新鮮なストックで2週間後に動物を再攻撃誘発し、生存率をモニタリングし、14日間記録した。第2の攻撃誘発により読み取りに変化が無いことを確認するために、tPAライブラリーのラウンド3研究を繰り返し、類似の結果が得られた。生存率の結果を、図5Aに示す。6つのクロ

10

20

30

40

50

なくとも2つの異なるマウスモデル株と無関係に防御を付与することができることを示す。

【0254】

4つの固有の候補に加えて、ワクチン候補として現在研究されている2つの主要な抗原の両方が同定された。特に、tPA融合ライブラリーのスクリーニングにより全長糖タンパク質D遺伝子が得られ、UB融合ライブラリーのスクリーニングにより糖タンパク質B遺伝子の発現断片が得られた。このライブラリークローンに保有された断片は、感染個体で免疫原性を示した決定基をコードする。ELIプロセスによる公知のワクチン候補の産生は、先入観の無い方法の妥当性を支持し、他の産生抗原の有用性が示唆される。

【0255】

RELIスクリーニング由来の新規のワクチン候補は主な表面タンパク質ではない。その代わりに、酵素、核タンパク質、および細胞質局在タンパク質が発見された。例えば、tPAライブラリースクリーニング由来の新規の候補は、US3のN末端断片、セリン/トレオニンタンパク質キナーゼを発現する。HSV-1および2の両方において、US3遺伝子はプログラム細胞死の特徴的なヘルペスウイルス誘導遮断に必要である。興味深いことに、アポトーシスを遮断すると考えられる他の2つの遺伝子のうちの1つはgDである(Whitley and Roizman, 2001)。US3欠失変異株は、通常複製されるが、高度に弱毒化される。これらの変異体の感染力の減少により免疫活性が増大するが、宿主免疫応答の抑制におけるUS3の役割が示唆される(Inagaki-Ohara et al., 2001)。サイトメガロウイルスでは、US3は、細胞傷害性T細胞へのウイルス抗原の提示を遅延させることが示されている(Jones et al., 1996)。ヒトT細胞エピトープのスクリーニングでは、US3への15aaペプチドマッピングにより、インビトロ増殖アッセイにおいてCD4T細胞が刺激されると同定された(米国特許出願第20020090610号)。本発明者らが知る限り、US3タンパク質キナーゼは、ワクチン候補として以前に予測も試験もされていなかった。tPA融合ライブラリースクリーニング由来の他の候補のうちの2つは、ウイルスDNA切断およびゲノムパッケージングに關与するタンパク質断片(UL17およびUL28)をコードする。本発明者らが知る限り、これらは以前に防御抗原とされていなかった。UBライブラリースクリーニング由来の新規の候補はUL29である。UL29遺伝子産物はICP-8(ウイルス複製に必要な一本鎖DNA結合タンパク質)である。DNA病変へのヘリカーゼプライマーゼ複合体の漸増に關与するようである(Carrington-Lawrence et al., 2003)。UL29の変異HSV-2欠損によりDNAの合成および複製が欠損する(Da Costa et al., 2000)。サイトメガロウイルス(CMV)では、UL36-38複合体とUS3タンパク質との相乗効果によって宿主の熱ショックタンパク質70遺伝子の転写が調節される。

【0256】

表2は、比較研究における攻撃誘発に対する防御をマウスに付与するHSVランダムライブラリーの各断片の配列を提供し、その長さをまとめている。ランダム断片内の遺伝子コード領域の長さおよび全長遺伝子のサイズを示す。表3では、ライブラリー減少時のこれらのライブラリークローンのプーリング歴を記載する。

【0257】

(表2) RELIによって同定されたHSV-1ワクチン候補

| 遺伝子 | ライブラリー インサート | インサートの配列番号 | コード断片 | 全長 遺伝子 | 遺伝子の配列番号 |
|----------|-----------------|------------|-------|-----------|-----------|
| US6(gD) | 1381 | 配列番号: 111 | 1185 | 1185 | 配列番号: 115 |
| US3 | 974 | 配列番号: 103 | 969 | 1446 | 配列番号: 105 |
| UL17 | 1425 | 配列番号: 33 | 558 | 2112 | 配列番号: 39 |
| UL28 | 1815 | 配列番号: 57 | 1815 | 2358 | 配列番号: 63 |
| UL27(gB) | 683 | 配列番号: 53 | 681 | 2715 | 配列番号: 55 |
| UL29 | 514 | 配列番号: 65 | 513 | 3591 | 配列番号: 67 |

10

20

30

40

50

【 0 2 5 8 】

(表3) RELI候補のレジデントプール (resident pool)

| 誘導遺伝子 | ラウンド1プール | ラウンド2プール |
|-----------|----------|----------------|
| US6 (gD) | T3 | T: X1, Y1, Z7 |
| US3 | T3 | T: X1, Y14, Z2 |
| UL17 | T8 | T: X1, Y9, Z3 |
| UL28 | T8 | T: X8, Y14, Z7 |
| UL27 (gB) | U7 | U: X2, Y6, Z9 |
| UL29 | U12 | U: X1, Y6, Z7 |

10

【 0 2 5 9 】

表4は、ELI同定HSV-1遺伝子断片によってコードされた産物のアミノ酸の他のヘルペスウイルス選択におけるそのホモログとの類似性および同一性を示す。これらの配列比較は、HSV-1ホモログが防御能力を有し得ることを示し得る。例えば、HSV-1およびHSV-2由来のホモログと同様に、BHVのgDはBHVに対する防御性を示した。明白に、多数のRELI候補は、gDよりも高いヘルペスウイルス類似性/同一性を示す。無関係であることにより、あるウイルス由来の遺伝子または遺伝子産物でのワクチン接種により異なるヘルペスウイルスへの曝露に対して異なる防御を示し得ることも示唆される。

20

【 0 2 6 0 】

(表4) RELIヒットのヘルペスウイルスホモログとの類似/同一率(%)の例

| 遺伝子断片 | <i>HSV2</i> | <i>VZV</i> | <i>BHV</i> | <i>EHV</i> | <i>CMV</i> | <i>CHV</i> |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| gD | 82/88 | 25/44 | 27/39 | 23/40 | 30/33 | 58/72 |
| US3 | 70/79 | 44/61 | 44/62 | 34/55 | 26/36 | 51/64 |
| UL17 | 84/90 | 31/53 | 34/48 | 31/51 | 33/43 | 69/79 |
| UL28 | 88/91 | 46/62 | 51/64 | 52/67 | 22/41 | 81/87 |
| gB | 90/95 | 45/67 | 45/64 | 42/58 | 26/42 | 77/86 |
| UL29 | 97/98 | 48/63 | 53/67 | 55/71 | 26/40 | 88/91 |

30

【 0 2 6 1 】

実施例8 DELIスクリーニング: HSV-1遺伝子ライブラリーの構築

HSV-1のMacIntyre株由来のゲノムDNAを、培養サバンナモンキー腎臓細胞 (VERO-E6) から精製した。ゲノムDNA自体を、ポリメラーゼ連鎖反応のテンプレートとして使用する。プラスミドへのゲノムDNAのクローニングによって、テンプレートの予備供給源を作製した。この状態では、DNAは異なる特徴 (例えば、トポロジー) を有し、再生可能な供給源である。RELIのための実施例1に記載の2つのライブラリーもDELIの別のプラスミドテンプレートとして使用した。

40

【 0 2 6 2 】

全てのHSV-1遺伝子の発現ライブラリーを構築するために、HSV-1コード配列の配列特異的PCR増幅を行うための各読み取り枠 (ORF) の5' および3' 末端配列に対応する2つのオリゴヌクレオチド (オリゴ) 組をデザインした。首尾の良いハイブリッド形成の確立を最適にしてそのプライマー対の融解温度 (T_m) がおよそ適合するように各プライマーをデザインした。反復配列、GC含有量、融解温度、産物の長さ、およびLEE連結に対応させた。1,500bpより長い遺伝子を、サブ遺伝子断片に分割した。ORFへの発現エレメントの結合を容易にするために、その5' 末端に15塩基のデオキシウラシル (dU) 含有ストレッチ、そ

50

の後に約20ヌクレオチドのORF特異的配列を有するように各プライマーをデザインした。dUストレッチは、dUホスホラミダイトを含み、それによりこの領域をウラシル-DNA-グリコシレート(UDG)分解に感受性を示させる反復トリプレット配列を含む。この配列を含める目的は、5'ストレッチの分解および3'オーバーハングの作製によって一本鎖領域を作製することである。dUストレッチの配列を、ORFの自己アニーリングを防止するか、プロモーターおよびターミネーター発現断片に相補的にアニーリングするようにデザインする。確実にHSV-1ポリペプチドのコードフレームが維持されるように各オリゴをデザインする。77HSV-1遺伝子をコードする126ORFを増幅するためのプライマー組を、96ウェル形式でのMerMade 1V(商標)装置にて合成した。ゲル電気泳動によって質について35~37塩基のオリゴ産物を評価し、蛍光光度法によって収率を評価した。

10

【0263】

dU含有オリゴストックを10 μ mに希釈し、その後ORFプライマー組に組み合わせた。以下のように各ORFをPCR増幅するために、反応マスターミックスを調製した。

MgCl₂を含む10 \times PCR緩衝液(Promega) 10 μ l

2.5 mM dNTP 5 μ l

dH₂O 55.8 μ l

HSV-1ゲノムDNA(1.2ng/ μ l) 8.2 μ l

Taqポリメラーゼ(Promega) 1 μ l

【0264】

以下のORF特異的プライマーを個別に各マイクロタイターウェルに添加した。

20

dUプライマー対(10 μ m) 20 μ l

【0265】

反応物を、以下のプログラムによってサーモサイクラー(Perkin-Elmer)中でインキュベートした。

96 (融解) 2分

94 (融解) 30秒

55 (アニーリング) 30秒

72 (重合) 1分30秒

以上を34サイクル、その後72 10分

【0266】

HSVゲノムの高GC含量(69%)および反復配列数は、広範なPCR試験に必要となると考えられる。十分な特異性または収率で増幅されない反応物を再調製し、Robocycler(Stratagene, La Jolla, CA)の温度勾配プログラムで運転した。126プライマー組の至適な増幅により、33 から63 まで変化する8つの異なるアニーリング温度が必要であることが見出された。さらに、UL36遺伝子ならびにUL29およびUL27遺伝子の一部などのORFのサブセットをコードするORFの至適増幅には、反応物への6% DMSOの添加が必要であった。DMSO含有試料は、最も低いアニーリング温度(33)でプログラミングされた反応物のみであった。一旦適切な条件が同定されると、十分な量の各ORFを増幅するための複数の反応物を調製した。同定産物を合わせ、0.3M酢酸ナトリウムおよび3倍体積のエタノールの添加によって沈殿させた。産物を、水中に再懸濁し、各PCR産物の試料(5/100)を、定量した100b

30

40

pのDNA標準ラダー(Promega, Madison, WI)とのアガロースゲル電気泳動によって分析した。速度測定プログラムを使用した蛍光光度法によってTecanプレートリーダー(Tecan, Research Triangle Park, NC)におけるピコグリーン色素でのDNA濃度を測定するために、別の試料(1/100)を取り出した。

【0267】

実施例9 立方体表示(cubic designation)によるHSV-1 ORFライブラリーの整列

質および量調節ORFを、仮想25 \times 25 \times 25グリッド内のそのコンピュータで割り当てた位置に従って、5つのORFの75プール(25X軸、25Y軸、25Z軸)に整列させた。新規の各プールは、コンピュータによって導き出された三次元行列のx面、y面、およびz面の構成要素を示した。各ORFが3つ全ての次元中の位置に保持されるので、各ORFは、配列試験のため

50

の3つの独立したプールに含まれる。BioMek (Beckman, Brea, CA) 装置を使用して、ロボットでプーリングを行った。全ORFが各プール中で等モル量で存在するように、PCR産物の名称および濃度をインポートし、各産物を3つの75ウェル (25X、25Y、および25Zプールを示す) に分布するプログラムを書いた。産物の長さは変化するので、ウェルあたりの総DNA量は、2.6 μ gから3.9 μ gまで変化した。以下のウラシルDNA-グリコシラーゼ反応を準備するために、ウェル中の試料量を一般にdH₂Oで150 μ lに増大させた。

PCR産物 150 μ l
 10 \times UDG緩衝液 (NEB) 17.3 μ l
 UDG 6 μ l (6単位)

【0268】

10

反応物を、37 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートし、酵素を65 $^{\circ}$ Cで10分間不活化させた。得られた産物は、両端に15塩基の一本鎖ストレッチを有する。試料を精製するために、200 μ lのMnasil DNA結合ビーズ (Promega, Madison, WI) を添加し、試料を30分間ボルテックスした。静置後、上清を個別のチューブに移し、200 μ lの新鮮なビーズを使用して精製を繰り返した。ビーズに洗浄液を添加し、指示どおりにボルテックスした。ビーズを指示どおりに80%エタノールで洗浄し、乾燥させた。PCR産物を回収するために、溶離緩衝液をビーズに添加した。凍結乾燥によって体積を50 μ lに減少させた。

【0269】

実施例10 遺伝子発現のための整列させたライブラリーの調製

プラスミドおよびLEEベースの抗原発現の両方を使用した多数の遺伝子免疫化研究に基づいて、本発明者らは、確実に十分に行われる発現エレメント対に到達した。プロモーターエレメントは、サイトメガロウイルス即時型遺伝子プロモーター、pCIのキメライントロン、および抗原の細胞内ターゲティングのための2つの融合ペプチドの1つから構成されるPCR産物である。前記のように、i) ヒト1-抗トリプシン (LS) 由来の分泌リーダー配列、およびii) 短いユビキチンサブユニット配列 (UB) の使用によってMHCIIまたはMHCI提示のいずれかを優先するように2つの融合物をデザインする。ターミネーター (GHterm) は、ヒト成長ホルモン転写終結配列から構成されるPCR産物である。一貫性を持たせるために、以下の100 μ lの標準反応マスターミックスを使用して、これら3つの発現エレメントを巨大なバッチで調製した。

20

MgCl₂を含む10 \times PCR緩衝液 (Promega) 10 μ l
 2.5mM dNTPS 5 μ l
 ddH₂Oで最終体積を100 μ lにする
 Taq (5単位/ μ l) (Promega) 1 μ l

30

【0270】

混合物を3つの部分に分割し、異なるテンプレートおよびプライマー組を以下のそれぞれに添加した。

LSプロモーター融合エレメント用 (産物サイズは、1.2kb) :

プラスミドテンプレート pCMViLS 50ng

CMVFプライマー-151 1 μ g

LSdURプライマー 1.5 μ g

40

UBプロモーター融合エレメント用 (産物サイズは、1.34kb) :

プラスミドテンプレート pCMViUB 50ng

CMVFプライマー-151 1 μ g

UBdURプライマー 1.5 μ g

GHターミネーターエレメント用 (産物サイズは、0.61kb) :

プラスミドテンプレート pCMVi 50ng

GHtermdUFプライマー 1 μ g

GHtermRプライマー-1590 1.5 μ g

【0271】

プラスミドテンプレートは、リーダー配列またはユビキチン配列のいずれかおよびヒト

50

成長ホルモン遺伝子ターミネーターを含む任意のコード配列を含まない（インサートなし）遺伝子免疫化ベクターであった。PCR増幅を容易にするために、これらをPvuI制限酵素での消化によって直鎖状化した。各発現エレメントプライマー組では、一方のプライマーはdUストレッチを含み、他方のプライマーは含まない。これらのオリゴプライマー配列は以前に記載されている（Sykes and Johnston, 1999）。ORFプライマー組のために、両プライマーはdUストレッチを含む。以下のプログラムによって、サーモサイクラー（Perkin-Elmer, Boston MA）にて反応物をインキュベートした。

96 （融解） 3分
 T* （アニーリング） 1分15秒
 72 （重合） 1分30秒
 94 （融解） 45秒
 T* （アニーリング） 1分15秒
 72 （重合） 1分30秒
 以上を34サイクル、その後72 10分

10

【0272】

* 至適アニーリング温度（T）は、以下の要素によって変化した。

LSプロモーターのために44~55 （融合）、UBプロモーターのために54~55 （融合）、ターミネーターのために44~65 。

【0273】

複数の100 μ lの反応物が一旦調製されると、精製のために回収した。最終濃度0.3Mの酢酸ナトリウムを添加し、試料を等量のフェノール/クロロホルムで1回抽出する。新たなチューブに水溶液を除去し、エタノール沈殿を行った。ペレットを元の体積の1/4の水に再懸濁した。ゲル電気泳動によってエレメントを分析し、蛍光光度法によって濃度を決定した。

20

【0274】

ORFと等モル比の発現エレメントを得るために、2つのプロモーター融合エレメントおよびターミネーターエレメントのプールされた各ORFへの組み合わせによって直鎖状発現エレメント（LEE）を作製した。特に、2つのプロモーター融合物とORFとターミネーターとのモル比を、0.5:0.5:1:1となるように計算した。

ORF（50 μ l中約3.75 μ g）
 10x アニーリング緩衝液 10 μ l
 1.25 μ g CMViUB 6.25 μ l
 1.25 μ g CMViLS 6.94 μ l
 1.25 μ g GHterm 4.2 μ l

30

【0275】

連結反応物を、95 で5分間インキュベートし、65 にした。試料を約1分間冷却した後、最終濃度0.5Mの2M KCl（25.8 μ l）を添加した。試料を65 で10分間、37 で15分間、および25 で10分間インキュベートした。連結効率を評価するために、1 μ lを取り出し、TEおよびローディング色素で5倍希釈し、0.7%アガロースゲルにて低圧で電気泳動した。

【0276】

40

実施例 1 1 直接マウス接種のための整列LEE発現ライブラリーの調製

全部で30 μ gのDNAの発現エレメント連結ORF（100 μ l中に約7.5 μ g）と直鎖状化プラスミドDNA（pUC118）との混合によって、動物免疫化のための接種材料を作製した。EcoRI消化pUC118充填物（filler）を、より効率的な金沈殿のための担体として使用した（以下を参照のこと）。各HSV遺伝子プール接種材料のために、各ショットで750ngの担体と共に250ngのHSV DNAが送達されるように30遺伝子銃用量（弾丸）を調製した。直径が1~3 μ mの範囲の金微粒子（Degusa Inc.）の乾燥重量を秤量し、チューブあたり75mgで複数の微量遠心管に移した。粒子を約1mlのddH₂Oで洗浄し、取り出し、約1mlの100%エタノールで洗浄し、取り出し、最後に1.25mlのddH₂Oに再懸濁して60mg/mlの金のスラリーを得た。スラリーを、75本の各微量遠心管あたり225 μ lずつ等分した。チューブを穏やかにスピンさせ

50

て金をペレット化し、ddH₂Oを除去した。各チューブに、100 μ lの連結反応物および22.5 μ gのpUC118を添加した。DNA/金スラリーをボルテックスし、1倍体積(130 μ l)の2.5M CaCl₂(pH5.2)を添加した。ボルテックスしながら、1/10体積(26 μ l)の1Mスペルミジン(遊離塩基)を添加した。試料中の金微粒子を室温で15分間沈殿させ、その後室温で1分間スピンした。上清を除去し、金を、70%、その後100%エタノールで3回洗浄した。洗浄試料を、1.8mlの新鮮な非常に乾燥した100%エタノールと合わせ、デシケーター中で一晚乾燥させた。Helios(BioRad, Inc., Hercules CA)の説明書のように遺伝子銃の銃弾を調製した。簡単に述べれば、1.8mlの各試料をシリンジに入れ、回転ステーション上に固定した乾燥プラスチックチュービングに注入した。DNA結合金を、窒素封入によってチュービングの内面に乾燥させた。本発明者らは、一度に8つの試料に対応するようにステーションを適合させた。各パッチから30個までの銃弾が得られ、これを分析に使用した。TEおよびローディング色素と共に銃弾をチューブに入れた。次いで、分析のために溶液をアガロースゲルにロードした。調製した銃弾を、免疫化のために使用するまでデシケーター中で保存した。

10

【0277】

実施例12 マウス免疫化およびHSV-1攻撃誘発防御アッセイ

25個の次元を定義した試験プールの3つの組として、5つのHSV ORFおよび対照を発現するLEEの75プールを、4匹のBALB/cマウス群に投与した。正の対照群に、公知のワクチン候補糖タンパク質D₁(gD)を発現するプラスミドまたはLEEを投与し、負の対照群は免疫化しなかった(NI)。各マウスにHelios遺伝子銃を使用して金微粒子にて送達される全部で2 μ gのDNAを投与した。マウスの耳の皮膚に2つの1 μ gの用量で免疫化を分布させた。各試験用量は、250ngのHSV-1 DNA(したがって、50ngの各個体ORF)および充填物として750ngのpUC118 DNAから構成されていた。各正の対照の用量は、250ngのpCMVigDまたはLEE-gD、および750ngのpUC118から構成されていた。初回刺激投与から4週間後および8週間後に動物に同一の接種材料を2回追加免疫投与し、最後の免疫化から3週間後にウイルスで攻撃誘発した。2 \times 10⁵プラーク形成単位を含むウイルスストックの50 μ l懸濁液の毛を剃った真皮の擦過傷領域へのピペティングによってHSV-1病原株17syn⁺に曝露した。12日間~15日間生存率をモニタリングし、疾患誘導死は6日目から認められ、曝露から12日後まで継続した。

20

30

【0278】

行列整列ライブラリー接種材料のX、Y、およびZ組で免疫化したマウスの攻撃誘発アッセイの結果を、図7および図8に示す。図7では、7~10日目および最終日(屠殺前にモニタリングされた最終日)に未加工の(raw)生存率が得られる。図8では、生存スコアをプロットしている。X、Y、およびZ群の組の間の防御レベルを比較するために、これらのスコアを導いた。6日目~12日目に記録した動物生存データを使用して、75研究群および対照群のそれぞれの生存スコアを決定した。動物が生存した曝露後の日数(6~12日目)の合計によって、各動物スコアを計算した。各マウス群についての平均スコアおよび標準誤差を計算し、群の結果のグラフ化のために使用した。

【0279】

実施例13 防御データの行列分析

三次元行列に関して結果を分析するために、平均群生存スコアを、X、Y、およびZの各データセットに一般に含まれる正の対照群のスコアに正規化した。標準(gD対照)への正規化の目的は、3つの独立して行ったX、Y、およびZ攻撃誘発研究の間の任意の意図されない相違の影響を最小にすることである。正規化群のスコア「0」は感染6日後を超えてマウスが生存しないことを示し、「1.0」の群スコアは群の生存スコアが全用量(250ng)の防御抗原gDで免疫化した並行して試験した正の対照マウスのそれと同等であることを示す。負の対照マウスの3つの群(X、Y、およびZ)の平均正規化生存スコアを計算したところ0.166であった。

40

【0280】

75種の研究群の攻撃誘発防御アッセイのこれらの結果を、i) 三角測量(triangulation

50

) または ii) 定量的順位付けのいずれかによって防御候補が推測される行列分析に供した。三角測量法のために、生存スコアを使用して、各試験群を正または負のいずれかに分類した。3つの各データセット由来の25試験群のうちの平均15試験群が、負の対照を超える群生存スコアを示した。したがって、上位スコアの15群を、等辺 (equilateral) 行列分析で正と指定し、これらの動物群の接種に使用したORF-プールを追跡した。正のプールの面交点は、これらのプールのデザインに最初に使用した仮想立方体内に3,375個の遺伝子座を示した。15,625個の可能な位置 (25×25×25) を有するグリッド中に127個のORFのみを整列させたので、ほとんどの遺伝子座が充填されておらず、三角測量によって23個のORF含有交点を特定することができる。これらのクロスヘアに位置付けられたORFは、1つの正に記録された各X、Y、およびZプール中に存在するので、これらは認められたマウス防御を生じるための候補であった。したがって、クロスヘア三角測量および低占有率により、127個のORFのうち104個が選別され、ライブラリーの82%が減少した。gDを含む21個の異なるHSV-1遺伝子に対応する23個のORFを表5に列挙する。ライブラリー試験ORFのヌクレオチド長、誘導遺伝子のサイズ、およびORFのグリッド座標を提供する。分析のために各軸から15群が選択されたので、約15個のORFが認められた防御を担うと評価された。一つまたは複数の群が正と誤って分類される場合、または一つまたは複数のORFが別のORFと共にプールして、防御活性をマスキングされる場合、15個未満のORFは真の候補であり得る。本発明者は他のORFの3つの独立したプール中の各ORFを試験したにもかかわらず、三角測量分析による同定には、クロスヘアが必要であるか、3つ全てのORFレジデントプールは正のスコアが必要である。

10

20

【0281】

(表5) 三角測量による交点分析

| ORF名 | 断片サイズ (bp) | 遺伝子サイズ (bp) | レジデントプール |
|----------|------------|-------------|---------------|
| RL1_a_a | 339 | 747 | X20,Y1,Z15 |
| UL1_a | 588 | 675 | X20,Y1,Z8 |
| UL11_a | 249 | 291 | X23,Y6,Z12 |
| UL13_b | 801 | 1557 | X09, Y20, Z15 |
| UL15_a_a | 309 | 2208 | X21,Y16,Z18 |
| UL16_a_c | 309 | 1122 | X6,Y24,Z4 |
| UL17_a | 984 | 2112 | X1,Y14,Z4 |
| UL17_b | 1053 | 2112 | X11,Y3,Z6 |
| UL18_a | 939 | 957 | X22,Y23,Z3 |
| UL21_b | 795 | 1608 | X22,Y13,Z3 |
| UL25_a | 831 | 1743 | X16,Y20,Z1 |
| UL28_a | 1065 | 2358 | X6,Y25,Z18 |
| UL36_b | 1320 | 9495 | X17,Y6,Z3 |
| UL37_b | 1128 | 3372 | X09, Y11, Z12 |
| UL41_a | 1401 | 1470 | X10, Y13, Z04 |
| UL43_a | 1182 | 1305 | X21,Y3,Z17 |
| UL44_a | 708 | 1536 | X12,Y16,Z5 |
| UL5_a | 1290 | 2649 | X12,Y4,Z1 |
| UL52_c | 1020 | 3177 | X25,Y25,Z15 |
| UL54_a | 702 | 1539 | X09, Y16, Z05 |
| UL54_b | 711 | 1539 | X23,Y13,Z23 |
| US5_a | 261 | 279 | X10, Y24, Z12 |
| US6_a | 1089 | 1185 | X16,Y20,Z6 |

30

40

50

【 0 2 8 2 】

三角測量法の1つの利点は任意の特定された候補を三連で試験することであるが、3つの正の読み取りの要件は不利でもあり得る。さらに、グリッド中のあるORFの推測防御能力を相互に区別することができない。第2の行列分析では、これらの潜在的な両落とし穴に取り組む定量的順位付けを行った。順序付け法は、防御ORFが負のORFを保有するプール中に存在し得る可能性に対応する。他の2つのレジデントプールが良好に記録された場合、依然として好ましい3つのプールの累積スコアに基づいて防御ORFを同定することができる。定量により、各ORFにスコア値を割り当てることが可能であり、それにより全ゲノムグリッド中の全ての成分ORFの順序付け分類リストが導かれる。

【 0 2 8 3 】

順序付け法のために、各ORFに任意の特定のORFを含む3つのプール（1つのX、1つのY、および1つのZ）を接種した3つの群の各スコアに基づいたスコア値を与えた。グリッド中の各ORFの3つのX、Y、およびZ「座標」の正規化スコアを合計し、平均し、標準誤差を計算した。図6は、そのレジデントプールの平均生存スコアに基づいたORFの順位分類リストを示す。ORF断片の長さ、誘導遺伝子サイズ、および各ORFグリッド座標も示す。

【 0 2 8 4 】

（表6）定量的順位付けによる交点分析（生存スコア）

| ORF 名 | 順位 | 断片サイズ (bp) | 遺伝子サイズ (bp) | レジデントプール |
|----------|----|------------|-------------|---------------|
| UL16 a c | 1 | 309 | 1122 | X6,Y24,Z4 |
| UL8 a | 2 | 1039 | 2253 | X17, Y21, Z19 |
| UL18 a | 3 | 939 | 957 | X22,Y23,Z3 |
| UL43 a | 4 | 1182 | 1305 | X21,Y3,Z17 |
| UL17 a | 5 | 984 | 2112 | X1,Y14,Z4 |
| UL21 b | 6 | 795 | 1608 | X22,Y13,Z3 |
| UL52 b a | 7 | 315 | 3177 | X16, Y12, Z07 |
| UL30 c | 8 | 1249 | 3708 | X08, Y08, Z07 |
| UL41 a | 9 | 1401 | 1470 | X10, Y13, Z04 |
| US6 a | 10 | 1089 | 1185 | X16,Y20,Z6 |
| UL6 b | 11 | 946 | 2031 | X21, Y10, Z17 |
| UL25 a | 12 | 831 | 1743 | X16,Y20,Z1 |
| UL28 b b | 13 | 312 | 2358 | X04, Y07, Z12 |
| UL15 a a | 14 | 309 | 2208 | X21,Y16,Z18 |
| UL40 a | 15 | 904 | 1023 | X06, Y09, Z06 |
| RS1 a | 16 | 1273 | 3897 | X22, Y12, Z11 |
| UL47 b | 17 | 973 | 2082 | X22, Y20, Z16 |
| UL26 a | 18 | 877 | 1908 | X12, Y17, Z04 |
| UL37 c | 19 | 1083 | 3372 | X4,Y5,Z23 |
| UL28 a | 20 | 1065 | 2358 | X6,Y25,Z18 |
| UL26.5 a | 21 | 973 | 990 | X21, Y19, Z11 |
| UL49A a | 22 | 166 | 276 | X24, Y06, Z07 |
| UL17 b | 23 | 1053 | 2112 | X11,Y3,Z6 |
| UL33 a | 24 | 325 | 393 | X08, Y19, Z07 |
| US4 a | 25 | 661 | 717 | X21, Y23, Z21 |
| UL36 d c | 26 | 426 | 9495 | X19, Y23, Z06 |
| UL5 a | 27 | 1290 | 2649 | X12,Y4,Z1 |
| UL36 g c | 28 | 426 | 9495 | X22, Y21, Z09 |
| UL55 a | 29 | 478 | 561 | X03, Y02, Z04 |
| UL37 b | 30 | 1128 | 3372 | X09, Y11, Z12 |
| UL13 a | 31 | 799 | 1557 | X04, Y13, Z02 |
| UL29 b | 32 | 1141 | 3591 | X18, Y11, Z06 |
| UL8 b | 33 | 1087 | 2253 | X13, Y08, Z14 |
| US5 a | 34 | 261 | 279 | X10, Y24, Z12 |

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

ORFもまた、ORFの生存スコアと負の対照のそれとの間の相違の学生t検定によって計算されたp値に基づいて順位分類した。表7は、0.05以下のp値を示す34個のORFを列挙する。ORFの断片長、誘導遺伝子サイズ、および各ORFのグリッド座標も示す。34個のORFが表7で使用したp値のカットオフを超えると決定されたので、本発明者らはまた、表6の生存スコアによって34個の上位ORFを任意に列挙するために選択する。

【 0 2 8 6 】

(表7) 定量的順序付けによる交点分析 (t検定)

| ORF名 | 順位 | 断片サイズ(bp) | 遺伝子サイズ(bp) | レジデントプール |
|-----------------|----|-----------|------------|---------------|
| UL54 b | 1 | 711 | 1539 | X23,Y13,Z23 |
| UL1 a | 2 | 588 | 675 | X20,Y1,Z8 |
| UL28 a | 3 | 1065 | 2358 | X6,Y25,Z18 |
| RL1 a a | 4 | 339 | 747 | X20,Y1,Z15 |
| RL2 a a | 5 | 345 | 2328 | X10, Y14, Z02 |
| UL13 b | 6 | 801 | 1557 | X09, Y20, Z15 |
| UL25 a | 7 | 831 | 1743 | X16,Y20,Z1 |
| US8A a | 8 | 433 | 480 | X12, Y11, Z02 |
| US6 a | 9 | 1089 | 1185 | X16,Y20,Z6 |
| UL8 b | 10 | 1087 | 2253 | X13, Y08, Z14 |
| UL36 b | 11 | 1320 | 9495 | X17,Y6,Z3 |
| UL18 a | 12 | 939 | 957 | X22,Y23,Z3 |
| UL36 a | 13 | 1353 | 9495 | X11,Y18,Z22 |
| UL43 a | 14 | 1182 | 1305 | X21,Y3,Z17 |
| UL16 a c | 15 | 309 | 1122 | X6,Y24,Z4 |
| UL31 a | 16 | 907 | 921 | X13, Y21, Z17 |
| UL52 a | 17 | 1018 | 3177 | X11, Y07, Z03 |
| UL52 c | 18 | 1020 | 3177 | X25,Y25,Z15 |
| UL37 b | 19 | 1128 | 3372 | X09, Y11, Z12 |
| UL21 b | 20 | 795 | 1608 | X22,Y13,Z3 |
| UL17 b | 21 | 1053 | 2112 | X11,Y3,Z6 |
| UL49 a | 22 | 841 | 906 | X14, Y01, Z20 |
| UL44 b | 23 | 751 | 1536 | X23, Y02, Z02 |
| UL22 b | 24 | 1186 | 2517 | X10, Y14, Z16 |
| UL51 a | 25 | 685 | 735 | X02, Y14, Z10 |
| UL28 b b | 26 | 312 | 2358 | X04, Y07, Z12 |
| UL15 a a | 27 | 309 | 2208 | X21,Y16,Z18 |
| UL36 f b | 28 | 420 | 9495 | X13, Y06, Z23 |
| UL16 a b | 29 | 354 | 1122 | X23, Y10, Z03 |
| UL37 c | 30 | 1083 | 3372 | X4,Y5,Z23 |
| US5 a | 31 | 261 | 279 | X10, Y24, Z12 |
| UL39 b | 32 | 1093 | 3414 | X01, Y10, Z18 |
| UL20 a | 33 | 628 | 669 | X11, Y07, Z02 |
| UL11 a | 34 | 249 | 291 | X23,Y6,Z12 |

10

20

30

40

【 0 2 8 7 】

本発明者らは、クロスヘア三角測量およびおよび定量的順序付け法が同一のORFを支配的に同定することを見出した。特に、三角測量によって同定された23個全てのORFも順序付けによって同定した。しかし、2つの定量分析により、推測される防御能力を使用してより多くのORFを同定することが可能である。2つの分析アプローチ間の最も有用な区別は、累積スコアリングにより全てのヘルペスウイルススコード配列を推測される有用性によって順序付けることができるという点である。表8は、前のDELIデータ分析に基づいて候補ワクチンと推測されるORFを列挙する。3つの分析のうち少なくとも2つによって同定されたORFを、「反復ヒット」として列挙し、配列番号はこれらのORFに対応する。

50

【 0 2 8 8 】

(表 8) DELIスクリーニング分析由来の簡約したアウトプット

| 全 <i>ORF</i> | | 反復 <i>ORF</i> | 反復 <i>ORF</i> の 配列番号 |
|--------------|----------|---------------|-------------------------|
| RL1_a_a | UL36_d_c | RL1 a a | 配列番号 :1 |
| RL2_a a | UL36_f b | UL1 a | 配列番号 :5 |
| RS1 a | UL36_g c | UL5 a | 配列番号 :9 |
| UL1_a | UL37_b | UL8 b | 配列番号 :13 |
| UL5_a | UL37_c | UL11 a | 配列番号 :17 |
| UL6_b | UL39_b | UL13 b | 配列番号 :21 |
| UL8_a | UL40_a | UL15 a a | 配列番号 :25 |
| UL8_b | UL41_a | UL16 a c | 配列番号 :29 |
| UL11_a | UL43_a | UL17 a | 配列番号 :35 |
| UL13_a | UL44_a | UL17 b | 配列番号 :37 |
| UL13_b | UL47_b | UL18 a | 配列番号 :41 |
| UL15_a_a | UL49_a | UL21 b | 配列番号 :45 |
| UL16_a_b | UL51_a | UL25 a | 配列番号 :49 |
| UL16_a_c | UL52_a | UL28 a | 配列番号 :59 |
| UL17_a | UL52_b_a | UL28 b b | 配列番号 :61 |
| UL17_b | UL52_c | UL36 b | 配列番号 :69 |
| UL18_a | UL54_a | UL37 b | 配列番号 :73 |
| UL20_a | UL54_b | UL37 c | 配列番号 :75 |
| UL21_b | UL55_a | UL41 a | 配列番号 :79 |
| UL22_b | US4_a | UL43 a | 配列番号 :83 |
| UL25_a | US5_a | UL44 a | 配列番号 :87 |
| UL26.5_a | US6_a | UL49 a | 配列番号 :91 |
| UL26_a | US8A_a | UL52 c | 配列番号 :95 |
| UL28_a | | UL54 b | 配列番号 :99 |
| UL28_b_b | | US5 a | 配列番号 :107 |
| UL29_b | | US6 a | 配列番号 :113 |
| UL30_c | | | |
| UL31_a | | | |
| UL33_a | | | |
| UL36_a | | | |
| UL36_b | | | |

10

20

30

40

【 0 2 8 9 】

表9では、DELIデータの3つの分析によって同定されたORFの誘導遺伝子を列挙し、無作為に作製したHSV-1遺伝子断片のRELIスクリーニングの結果と比較した。最後の列は、ELI分析によって繰り返し示された26個のORFヒットに対応する23個の遺伝子のリストを提供する。

【 0 2 9 0 】

(表 9) HSV-1のDELIおよびRELIスクリーニング分析によって同定された遺伝子のまとめ

| 三角測量 | | 順位付け | | | まとめ | |
|-------------|-------------|-----------------------------|-------------------------------------|----|-------|----------------|
| <i>RELI</i> | <i>DELI</i> | スコア による <i>DELI</i> , | <i>T</i> 検定 による <i>DELI</i> , | 順位 | 反復遺伝子 | 反復遺伝子の 配列番号 |
| UL17 | RL1 | UL16 | UL54 | 1 | RL1 | 配列番号 :3 |
| UL24 | UL1 | UL8 | UL1 | 2 | UL1 | 配列番号 :7 |
| UL27 | UL5 | UL18 | UL28 | 3 | UL5 | 配列番号 :11 |
| UL28 | UL11 | UL43 | RL1 | 4 | UL8 | 配列番号 :15 |
| UL29 | UL13 | UL17 | RL2 | 5 | UL11 | 配列番号 :19 |
| UL36 | UL15 | UL21 | UL13 | 6 | UL13 | 配列番号 :23 |
| UL50 | UL16 | UL52 | UL25 | 7 | UL15 | 配列番号 :27 |
| US3 | UL17 | UL30 | US8 | 8 | UL16 | 配列番号 :31 |
| US6 | UL18 | UL41 | US6 | 9 | UL17 | 配列番号 :39 |
| US8 | UL21 | US6 | UL8 | 10 | UL18 | 配列番号 :43 |
| | UL25 | UL6 | UL36 | 11 | UL21 | 配列番号 :47 |
| | UL28 | UL25 | UL18 | 12 | UL25 | 配列番号 :51 |
| | UL36 | UL28 | UL43 | 13 | UL28 | 配列番号 :63 |
| | UL37 | UL15 | UL16 | 14 | UL36 | 配列番号 :71 |
| | UL41 | UL40 | UL31 | 15 | UL37 | 配列番号 :77 |
| | UL43 | RS1 | UL52 | 16 | UL41 | 配列番号 :81 |
| | UL44 | UL47 | UL37 | 17 | UL43 | 配列番号 :85 |
| | UL52 | UL26 | UL21 | 18 | UL44 | 配列番号 :89 |
| | UL54 | UL37 | UL17 | 19 | UL49 | 配列番号 :93 |
| | US5 | UL26.5 | UL49 | 20 | UL52 | 配列番号 :97 |
| | US6 | UL49 | UL44 | 21 | UL54 | 配列番号 :101 |
| | | UL33 | UL22 | 22 | US5 | 配列番号 :109 |
| | | US4 | UL51 | 23 | US6 | 配列番号 :115 |
| | | UL36 | UL15 | 24 | | |
| | | UL5 | US5 | 25 | | |
| | | UL55 | UL39 | 26 | | |
| | | UL13 | UL20 | 27 | | |
| | | UL29 | UL11 | 28 | | |
| | | US5 | | 29 | | |

10

20

30

【0291】

また、行列整列を使用しないでELI防御研究を分析した。上記のように127個のORFを5個のORFのプールに区画化し、上記のように15の正の群を選択し、40% ((10個の負の群) × (5個のORF/群)) / 127) の非防御ORFを選別した。たった1つのORF混合物中の各ORFを1回だけ試験した。

40

【0292】

実施例14 DELI同定ORFの分析

配向LEEライブラリースクリーニングでは、23個のHSV-1 ORFを三角測量によってワクチン候補と同定し、別の31個を定量的採点およびp値分類のいずれか/両方によって同定した。これらのうちORFが糖タンパク質D (gD) であり、変化し得る前に研究したHSVワクチン候補により臨床試験を行う。gDをコードする遺伝子 (US6) を、本発明者らの3つ全てのDELI分析によって同定した。可能なワクチン成分が糖タンパク質B (gB) であるので、第2のHSV抗原を最も研究した。本発明者らのORF候補リストに記載されていないことを、ORFデザインとgBの公知のB細胞決定基との比較によって説明することができる。プライマーデ

50

ザインのための遺伝子分割プログラムにより、遺伝子を1,500bpを超えるサブ遺伝子に破壊し、特に2,715bpのgB遺伝子を任意に2つのサブ遺伝子ORFに分割した。ORFのアミノ酸(aa) 461の「a」末端およびORFの「b」は、aa444から始まる。公知のHSV-1に対する中和抗体によって検出された突き出たH-2d(すなわち、BALB/cマウス)ドメインは、アミノ酸290~520に及ぶ(Navarro et al., 1992)。HSV-1ゲノムのRELIスクリーニングでは、8個の他のORFと共に無作為に断片化したORF集団を使用して、gBおよびgD両方の断片を、候補防御ORFとして同定した。RELIによって同定された8個の新規の候補のうちの4個に対応する遺伝子もDELIスクリーニングで同定された(US8、UL17、UL28、およびUL29)。

【0293】

新規の候補のうち、RELIスクリーニングとDELIスクリーニングとの間にいくつかの重複する結果が存在する。例えば、非常に巨大な外被タンパク質UL36の異なる部分をコードする5個の異なるORFは、DELIスクリーニングでいくらかの防御能レベルを保持すると推測した。RELIの結果を三角測量したDNA断片は、これらの5個のDELIヒットの2個(aa1~461; aa444~897)に及ぶUL36(aa338~509)の一部をコードする。別の場合、DELIのために2ORFに分割したUL17の両部分を、DELIスクリーニングで同定し、ランダムUL17断片をRELIによって同定した。同様に、全長UL28遺伝子の両断片をDELIによって同定し、そのランダム断片をRELIによって同定した。このスクリーニングによっていくらかの防御能力を保有すると推測される残りのORFは、細胞質、核、および構造遺伝子の種々の組に対応する。DELIスクリーニングの3つの分析のうち少なくとも2つによって示された遺伝子を、ウイルス産物および/またはこれらの遺伝子産物が関与することが公知であるか示唆される生物学的過程と共に表10に列挙する。複数ヒットした遺伝子産物のカテゴリーには、DNAパッケージング、外被、キャプシド、および即時型タンパク質、糖タンパク質、およびヘリカーゼ-プライマーゼ複合体の成分が含まれる。毒性因子、DNアーゼ、代謝タンパク質、および公知の機能を有さないいくつかの産物も候補として示す。

【0294】

(表10) HSV-1遺伝子産物名および/またはその公知または提案される生物活性

10

20

| ORF | 遺伝子産物/活性 |
|-------------|--|
| RL1 | ICP34.5、神経毒性因子、 宿主タンパク質合成の阻害 |
| UL1 | 糖タンパク質 Lウイルス拡大 |
| UL5 | ウイルスゲノム複製、DNAヘリカーゼ-プライマーゼサブ ユニット |
| UL8 | 細胞内タンパク質輸送 |
| UL11 | ミリスチル化外被タンパク質、 ウイルスキャプシド環境 |
| UL13 | ウイルスによるアポトーシスの誘導、 ATP結合、タンパク質キナーゼ |
| UL15 | ウイルス DNA パッケージングタンパク質 |
| UL16 | DNA パッケージング、キャプシド成熟タンパク質 |
| UL17 | ウイルス DNA 切断およびパッケージング |
| UL18 | キャプシドタンパク質 |
| UL21 | 細胞骨格組織化および生合成 |
| UL25 | キャプシド会合外被、ウイルスアセンブリタンパク質 |
| UL28 | ICP18.5 ウイルス DNA パッケージングタンパク質 |
| UL36 | ICP1-2, 非常に巨大な外被タンパク質のウイルスの出口 |
| UL37 | ウイルス出芽 |
| UL41 | Vhs 宿主防御の回避、サイトカイン産生の阻害 |
| UL43 | 外被タンパク質 |
| UL44 | 糖タンパク質 C 感染力の増強 |
| UL49 | VP22 細胞間のウイルス拡大 |
| UL52 | DNAヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット、 ATGコドンのイニシエーター |
| UL54 | ICP27 宿主細胞転写の混乱 |
| US5 | GJ アポトーシスのウイルス阻害 |
| US6 | 糖タンパク質 D、 ウイルス誘導細胞間融合 |

10

20

30

40

50

【 0 2 9 5 】

表11は、他のヘルペスウイルス中のホモログに対するELIスクリーニングで同定されたHSV-1 ORFによってコードされる遺伝子産物のヌクレオチドの類似性および同一性を示す。配列比較は、HSV-1ホモログが防御能力を保有し得ることを示し得る。例えば、BHVのgD遺伝子産物は、HSV-1およびHSV-2由来のその糖タンパク質ホモログと同様に、BHVに対して防御性を示すことが示された。特に、多数のDELI HSV-1ヒットは、他のヘルペスウイルス遺伝子産物と類似性を示し、これはgDの類似性よりも有意に高い。1つのウイルス由来の

遺伝子でのワクチン接種は、異なるヘルペスウイルスへの曝露に対する防御が異なることも示唆される。

【0296】

(表11) ヘルペスウイルスホモログとのアミノ酸同一率/類似率の例

| <i>ORF</i> | <i>HSV2</i> | <i>VZV</i> | <i>BHV</i> | <i>EHV</i> | <i>CMV</i> | <i>CHV</i> |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| RL1aa | 41/47 | 32/39 | 29/33 | 29/33 | 24/26 | 26/31 |
| UL1a | 70/80 | 29/50 | 28/33 | 31/47 | 26/37 | 58/66 |
| UL5a | 90/92 | 62/78 | 64/77 | 67/81 | 32/51 | 85/92 |
| UL8b | 78/83 | 26/42 | 31/43 | 29/46 | 43/46 | 52/62 |
| UL11a | 73/80 | 34/54 | 35/45/ | 35/52 | 26/35 | 59/70 |
| UL13b | 80/88 | 33/54 | 34/44 | 34/54 | 28/41 | 58/70 |
| UL15aa | 96/98 | 44/67 | 55/65 | 56/70 | 34/46 | 80/87 |
| UL16ac | 72/79 | 34/50 | 42/58 | 42/49 | 24/34 | 63/73 |
| UL17a | 76/83 | 35/50 | 35/44 | 36/50 | 24/32 | 36/48 |
| UL17b | 87/90 | 33/50 | 39/50 | 38/55 | 33/48 | 74/81 |
| UL18a | 92/95 | 42/61 | 47/63 | 43/65 | 28/42 | 83/90 |
| UL21b | 82/88 | - | 34/40 | 27/43 | 33/46 | 56/70 |
| UL25a | 85/88 | 42/58 | 49/60 | 46/63 | 29/38 | 71/80 |
| UL28a | 88/90 | 43/56 | 49/61 | 47/60 | 23/44 | 83/88 |
| UL28bb | 99/100 | 63/78 | 68/81 | 67/85 | 31/55 | 93/96 |
| UL36b | 80/87 | 32/47 | 31/42 | 30/47 | 27/40 | 61/75 |
| UL37b | 90/95 | 32/46 | 28/43 | 31/50 | 28/50 | 76/83 |
| UL37c | 80/85 | 25/42 | 27/41 | 23/41 | 31/44 | 66/77 |
| UL41a | 85/88 | 39/56 | 32/48 | 33/51 | 34/44 | 70/80 |
| UL43a | 65/71 | 28/35 | 24/30 | 31/35 | 25/33 | 44/52 |
| UL44a | 54/61 | 28/40 | 23/40 | 26/37 | 24/35 | 37/46 |
| UL49a | 68/75 | 25/32 | 26/33 | 32/42 | 25/35 | 44/55 |
| UL52c | 85/89 | 48/65 | 48/63 | 42/59 | 31/44 | 71/80 |
| UL54b | 91/94 | 40/61 | 46/60 | 43/62 | 26/42 | 70/82 |
| US5a | 48/62 | 39/51 | 27/30 | 33/39 | 29/35 | 27/41 |
| US6a | 83/89 | 25/44 | 27/38 | 27/42 | 29/41 | 61/74 |

10

20

30

【0297】

この研究では、2つの異なるプロモーター-リーダー融合物を、試験した各ORFに連結した。これらのLEE構築物を同時に送達するので、分泌またはプロテアソームターゲティングにより防御応答がより高くなるかどうかを識別することができない。しかし、本発明者らは、ORFの同時送達はいかなる各ORF作製応答も干渉しないことを以前に見出していた。

40

【0298】

実施例15 配向LEEライブラリースクリーニング法とランダムELIスクリーニング法との比較

ランダムELI (RELI) スクリーニングプロトコルでは、HSV-1ゲノム由来のgBおよびgD遺伝子の断片を含む10個のORFは、行列三角測量によって防御抗原の候補であると推測された。DELIデータの三角測量により、防御有用性が推測される23個のORFが明らかとなった。これらの2つの産生群中の多数の遺伝子は重複しているが、他は固有であった。表12は、2つのELI研究の結果に影響を与える可能性のあるいくつかの技術的パラメーターを示す。

【0299】

50

2つの防御研究の結果は、デザインにおけるこれらの相違および類似の両方を反映する。RELIグリッド中の防御候補として同定された10個の遺伝子断片のうち、誘導遺伝子のうちの6個は、DELI防御スクリーニングで同定された上位23個の遺伝子のリストに存在した。個別に試験した場合に正と試験された6個のRELI遺伝子断片のうち、2個の誘導遺伝子を除く全てもDELIグリッドで同定された。これら2つの例外物(outliers)はgBおよびUS3であった。上記のように、糖タンパク質B(UL27)を、最も可能性の高い技術的理由についてRELIスクリーニングでのみ同定した。同様にUS3を、最も可能性の高い技術的理由についてRELIグリッドでのみ同定した。特に、US3の断片を、RELI研究でのランダムサブ遺伝子集団から機能的に選択した。しかし、DELI研究では、全長US3遺伝子を試験した。最近の研究により、全長配列を保有する構築物は防御性を示さないことが証明されている。

10

【0300】

(表12) 2つのELIスクリーニングの比較

| RELI | DELI |
|---|--|
| ゲノム範囲を統計的に予想する | 完全に定義された範囲 |
| ラウンド1でプラスミドGMCSFを含む | アジュバントは使用しない |
| 任意の特定のORFを未知の回数で試験する | 各遺伝子を三連で試験する |
| ラウンド1のプールサイズは~600である | プールサイズは5 ORF |
| クローニングの偏りおよび夾雑の可能性のあるプラスミド中でORFを発現させる | LEE発現のためにORFをインビトロで作製する |
| 各ORFをtPAまたはUBターゲティングペプチドのいずれかをコードする配列と融合する | 細胞内ターゲティングのために、各ORFをLSおよびUB配列の両方と融合させる |
| ライブラリーは、ランダムな~800bpの物理的に作製されたゲノム断片から構成される | ライブラリーは配列が定義された1500bpのORFから構成される |
| ORFをバイオリスティックに(biolistically)耳に送達し、注射によって脚の筋肉に送達させる | ORFをバイオリスティックに耳に送達する |
| ラウンド1でヌードマウスを使用し、その後のラウンドでBALB/cマウスを使用する | BALB/cマウスのみ |

20

30

40

【0301】

実施例16 ワクチン候補としての各DELI ORFの試験

攻撃誘発生存アッセイの結果の定量的三角測量分析から、26個のHSV-1 ORF(23個の遺伝子由来)が防御能力を保有すると推測された。この組から、19個のORFをPCRで増幅し、LEEとして金微粒子上に再度調製した。これらの抗原を、1遺伝子(200ng)として5匹のBALB/cマウス群に遺伝子銃にて送達した。各接種材料は、微粒子調製を容易にするために使用する800ngの空のベクターDNAも含んでいた。4週間後および8週間後に追加免疫を投与し、11週間後にウイルスに曝露した。これらのマウスを、以前に行われた剥離経路を使用してHSV-1で致死的に攻撃誘発し、その後生存率を14日間毎日2回モニタリングした。9つの

50

マウス群は試験遺伝子として同用量のgD (US6) を投与した正の対照群よりも長く生存した。このgD群は、8日目まで生存し、より長い生存に関連するこれらのORFは、UL1a、UL11a、UL15a、UL17a、UL18a、UL44a、UL52c、およびRL1aである。研究の終了時(終点は14日)、UL1a、UL11a、およびUL17aで免疫化したマウス群は依然として生存していた。他の対照群を、LEE中およびプラスミドとして構築した1 μ gの全量のgDで免疫化し、CpGが豊富なプラスミドpCMVi中に非HSV-1遺伝子(LUC)を保有していた。モニタリング期間中の数日間の生存率を、図9Aにプロットする。8日目から12日目までの期間生存スコアを計算し、これらを図9Bにグラフ化する。モニタリング期間中の複数の日数を統合した各マウスの単一の生存スコアの計算により、群平均および標準誤差を決定することができる。分析により、UL1a、UL17a、およびUL52cでの免疫化により非免疫化対照群と重複しない生存スコアが得られることが示される。三角測量および定量分析由来の残りのORFを、次で個別に試験する。

【0302】

実施例17 ELI同定ヘルペスウイルス核酸とアミノ酸配列との組み合わせを使用したワクチンの作製および試験

ヘルペスウイルス配列および防御を示す抗原により、以下の様式でヒトおよび動物のヘルペスウイルスワクチンを開発した。遺伝子抗原、遺伝子抗原断片、タンパク質抗原、またはタンパク質抗原断片(以前に同定した糖タンパク質BおよびD抗原が含まれる)を互いに組み合わせ、改良されたワクチンを産生することができる。これらを、遺伝子、タンパク質、または生ベクターなどの方法の組み合わせによって送達させることができる。または、複数のヘルペスウイルス由来の同定した抗原候補の機能または配列ホモログを組み合わせ、1つのワクチン中で複数の種に対するより広範な防御を得ることができる。

【0303】

実施例18 同定されたヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した他のヘルペスウイルスに対するワクチンの作製および試験

本願で開示したヘルペスウイルス配列および抗原は、ヒトおよび商業的に重要な動物のヘルペスウイルスワクチンでの使用を想定している。しかし、これらのヘルペスウイルス配列を使用して、他のウイルス種のワクチンを作製することもできる。例えば、ヘルペスウイルス配列と実質的に相同な別のウイルス病原体の配列を同定するために得たヘルペスウイルスに関する情報を使用することができる。多くの場合、この相同性は、他の種において30%より多くのアミノ酸配列が同一または類似すると予想されるか、タンパク質の一部のみ(例えば、30アミノ酸)についてであり得る。このような同一性/類似性をコードする遺伝子を単離し、タンパク質または核酸のいずれかとしての適切なモデル系でのワクチン候補として試験することができる。または、ヘルペスウイルスホモログを対象となる動物種中で直接試験することができる。スクリーニングする遺伝子数が限られている場合および遺伝子が別の種で防御性を示すことが証明されている場合、成功率は高いはずである。または、ヘテロウイルス遺伝子のホモログに対応するタンパク質またはペプチドを使用して、動物またはヒトにおいて、関連病原体を感染したヒトまたは動物での免疫応答についてアッセイすることができる。このような免疫応答を検出する場合、特にこれらが防御と相関する場合、ホモログに対応する遺伝子、タンパク質、またはペプチドを、ワクチンとして動物またはヒトで直接試験することができる。

【0304】

実施例19 ヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した市販のワクチンの作製および試験

本明細書に記載のワクチン候補によって市販のワクチンを開発することができる。例えば、ワクチン接種すべき動物のcodon優先度(codon preference)と一致するようなcodonの変化によって、同定された遺伝子を最適化哺乳動物発現配列に変換することができる。これは簡単な手順であり、当業者は容易に実施することができる。または、防御遺伝子ワクチンを、他のヘルペスウイルス由来のホモログのシャフリングによって配列を最適化することができる(Stemmer et al., 1995)。これにより、HSV-1曝露効率が増大し、そし

て/または複数のヘルペスウイルスに対して防御するワクチンが得られる。次いで、遺伝子を、関連宿主（例えば、ヒト）で感染に対する防御について試験することができる。遺伝子免疫化により、効率についてワクチン候補を試験する簡単な方法が得られ、この送達形態を広範な動物（ヒトが含まれる）で使用した。または、遺伝子を、関連宿主で試験すべき別のベクター（例えば、ワクチンベクター）に導入することができる。

【0305】

または、アジュバントを含むか含まない対応するタンパク質を試験することもできる。これらの試験を、比較的少数の動物に対して実施することができる。一旦実施すると、より大規模な試験でいくつの防御抗原が含まれるかについて決定することができる。産生の経済学に基づいて、サブセットのみを選択することができる。好ましい処方物を使用して、大規模な現地試験を行うことができる。おそらく1回より多くの異なる場所で実施される現地試験の結果に基づいて、市販のワクチンを産生することができる。

10

【0306】

実施例20 ヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した他の病原体に対するワクチンの作製および試験

HSV-1が他のヘルペスウイルスと類似の生物学的性質を有する場合、本発明者らは、ワクチン候補としてHSV-1由来の配列に対応するホモログについて他のヘルペスウイルスを試験するためにHSV-1ゲノムで既に達成したスクリーニングを活用する。当業者は、HSV-1から進化的に離れて移動するので、ホモログが防御する見込みがおそらく減少すると予想することができる。一旦ホモログが同定および単離されると、適切な動物モデル系でワクチンとしての効率について試験することができる。例えば、他のヘルペスウイルスホモログ、遺伝子、またはタンパク質を、マウスヘルペスウイルスモデルで試験することができる。

20

【0307】

当業者は、本明細書に開示のヘルペスウイルス配列または本明細書に開示の任意の方法を使用して防御性を示すと決定されたさらなる配列を入手し、他の病原体中の相同配列を決定するために関連遺伝子データベースのコンピュータベースの検索を行うことができる。例えば、これらの検索を、GenBankのBLASTデータベースで行うことができる。

【0308】

一旦防御配列に相同な配列が決定されると、当業者に公知の任意の数の方法を使用して相同配列を得ることが可能である。例えば、ゲノムDNAからの病原体由来の相同遺伝子のPCR増幅およびプラスミドまたはLEEなどの適切な遺伝子免疫化ベクター中に遺伝子を置くこと。次いで、ヘルペスウイルス遺伝子のホモログが病原体での攻撃誘発から宿主を防御するかどうかを決定するために、これらの相同遺伝子を防御が探された病原体に適切な動物モデルで試験することができる。

30

【0309】

本明細書に開示のヘルペスウイルス遺伝子は防御性を示すか本明細書に開示の方法を使用して防御性を示すと決定され、第1の非ヘルペスウイルス生物から防御配列が得られ、その後第2の非ヘルペスウイルス生物またはヘルペスウイルス生物中の相同配列を検索するために非ヘルペス生物由来の防御配列を使用することが意図される。防御ヘルペスウイルス配列を一連の検索および試験で少なくとも1つの相同性の決定のための出発点として使用する限り、このような方法は本発明の範囲内である。

40

【0310】

実施例21 ヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した治療ワクチンの作製および試験

本明細書に記載のワクチン候補は、予防だけでなく治療にも有用であり得る。例えば、潜伏ヘルペス感染の再活性化は、重要な健康上の問題である（Keadle et al., 1997; Nesburn et al., 1998; Nesburn et al., 1994; Nesburn et al., 1998）。この予防的スクリーニングで同定されたワクチン候補は、感染を排除するかヘルペスウイルス増殖のその後の活性化に関連する症状の緩和のためのHSV感染被験体の免疫化が想定される。

50

【0311】

一旦被験体または患者のヘルペスウイルス感染が同定されると、本発明のワクチン接種法および組成物を治療として使用することができる。本明細書に照らして考慮した場合、投与の量、計画、および経路を最適化する方法は公知である。

【0312】

実施例22 ヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した治療抗生物質の作製および試験

本明細書に記載のワクチン候補を、受動免疫療法のために開発することができる。防御抗原のいくつかの部分により、防御抗体応答を介して免疫され得る。これらの抗体は、即時性の非薬物治療産物として有用であり得る。受動免疫療法では、治療は、抗病原体効果を直接または間接的に媒介することができ、且つ必ずしもインタクトな宿主免疫系に依存しない確立された免疫反応性を有する生物試薬（エフェクター細胞または抗体など）の送達を含み得る。エフェクター細胞の例には、開示の抗原を発現するTリンパ球（例えば、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球、CD4⁺Tヘルパー）、キラー細胞（ナチュラルキラー細胞、リンホカイン活性化キラー細胞など）、B細胞、または抗原提示細胞（樹状細胞およびマクロファージなど）が含まれる。本明細書に開示のポリペプチドを使用して、受動免疫療法のための抗体または抗イデオタイプ抗体（米国特許第4,918,164号）を作製することもできる。

10

【0313】

1つの態様では、エフェクター細胞を単離および培養する。次に、エフェクター細胞を、本発明の抗原に曝露するか初回刺激投与する。次いで、エフェクター細胞を、被験体に再移入する。他の態様では、体外で大量に抗体を調製し、このような治療を必要とする患者の体内に移入することができる。

20

【0314】

実施例23 ヘルペスウイルス核酸およびアミノ酸配列を使用した診断または薬物標的の作製および試験

本明細書に記載のワクチン候補により、以下の様式で市販の診断候補を開発することができる。防御免疫応答の惹起に有用な抗原により宿主応答を迅速に検出することができ、これは病原体の曝露または初期感染の同定に有用であり得ることが想定される。さらに、これらの抗原は、感染または疾患の薬物ベースの阻害または治療の開発のための重要な病原体標的を示し得る。

30

【0315】

本明細書に開示されており、且つ特許請求の範囲に記載の全ての組成物および方法を、本開示に照らして、過度に実験することなく作製および実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して記載しているが、本発明の概念、精神、および範囲を逸脱することなく、本明細書に記載の組成物および方法ならびに工程または方法の工程の順序を変化させることができることが当業者に自明である。より詳細には、本明細書に記載の薬剤を化学的および生理学的に関連する一定の薬剤に置換することができ、且つ同一または類似の結果が得られることが自明である。当業者に自明のこのような全ての類似の置換形態および修正形態は、添付の特許請求の範囲によって定義された本発明の精神、範囲、および概念の範囲内と見なされる。

40

【0316】

文献

以下の文献は、これらが手順の例または本明細書に記載の事項の補助となる他の詳細を提供する範囲で、特に参照として本明細書に組み入れられる。

U.S. Patent 3,447,851
U.S. Patent 3,791,932
U.S. Patent 3,949,064
U.S. Patent 4,148,876
U.S. Patent 4,148,876
U.S. Patent 4,174,384
U.S. Patent 4,179,337 10
U.S. Patent 4,406,885
U.S. Patent 4,406,885
U.S. Patent 4,444,887
U.S. Patent 4,512,972
U.S. Patent 4,554,101
U.S. Patent 4,578,770
U.S. Patent 4,596,792 20
U.S. Patent 4,599,230
U.S. Patent 4,599,231
U.S. Patent 4,601,903
U.S. Patent 4,608,251
U.S. Patent 4,676,980
U.S. Patent 4,695,624
U.S. Patent 4,710,111 30
U.S. Patent 4,741,900
U.S. Patent 4,816,397
U.S. Patent 4,816,567
U.S. Patent 4,826,687
U.S. Patent 4826,687
U.S. Patent 5,112,946

| | |
|-----------------------|----|
| U.S. Patent 5,225,539 | |
| U.S. Patent 5,336,603 | |
| U.S. Patent 5,349,053 | |
| U.S. Patent 5,359,046 | |
| U.S. Patent 5,413,923 | |
| U.S. Patent 5,429,599 | |
| U.S. Patent 5,474,981 | 10 |
| U.S. Patent 5,474,981 | |
| U.S. Patent 5,484,719 | |
| U.S. Patent 5,506,121 | |
| U.S. Patent 5,506,121 | |
| U.S. Patent 5,523,088 | |
| U.S. Patent 5,530,101 | |
| U.S. Patent 5,545,806 | 20 |
| U.S. Patent 5,565,203 | |
| U.S. Patent 5,565,332 | |
| U.S. Patent 5,569,825 | |
| U.S. Patent 5,578,453 | |
| U.S. Patent 5,585,089 | |
| U.S. Patent 5,585,089 | |
| U.S. Patent 5,589,466 | 30 |
| U.S. Patent 5,589,466 | |
| U.S. Patent 5,593,972 | |
| U.S. Patent 5,605,793 | |
| U.S. Patent 5,607,852 | |
| U.S. Patent 5,612,487 | |
| U.S. Patent 5,614,610 | |
| U.S. Patent 5,614,610 | 40 |
| U.S. Patent 5,622,929 | |
| U.S. Patent 5,623,057 | |
| U.S. Patent 5,625,126 | |
| U.S. Patent 5,633,425 | |
| U.S. Patent 5,648,081 | |

| | |
|-----------------------|----|
| U.S. Patent 5,661,016 | |
| U.S. Patent 5,667,782 | |
| U.S. Patent 5,670,488 | |
| U.S. Patent 5,703,057 | |
| U.S. Patent 5,707,644 | |
| U.S. Patent 5,725,863 | |
| U.S. Patent 5,747,526 | 10 |
| U.S. Patent 5,766,588 | |
| U.S. Patent 5,766,588 | |
| U.S. Patent 5,776,451 | |
| U.S. Patent 5,783,196 | |
| U.S. Patent 5,807,715 | |
| U.S. Patent 5,811,238 | |
| U.S. Patent 5,814,295 | 20 |
| U.S. Patent 5,814,318 | |
| U.S. Patent 5,821,333 | |
| U.S. Patent 5,830,721 | |
| U.S. Patent 5,830,725 | |
| U.S. Patent 5,834,252 | |
| U.S. Patent 5,837,458 | |
| U.S. Patent 5,846,225 | 30 |
| U.S. Patent 5,846,233 | |
| U.S. Patent 5,851,826 | |
| U.S. Patent 5,869,451 | |
| U.S. Patent 5,871,982 | |
| U.S. Patent 5,879,934 | |
| U.S. Patent 5,885,793 | |
| U.S. Patent 5,888,502 | 40 |
| U.S. Patent 5,888,773 | |
| U.S. Patent 5,889,157 | |
| U.S. Patent 5,889,157 | |
| U.S. Patent 5,891,432 | |
| U.S. Patent 5,910,306 | |

| | |
|--------------------------|----|
| U.S. Patent 5,914,123 | |
| U.S. Patent 5,916,771 | |
| U.S. Patent 5,922,326 | |
| U.S. Patent 5,922,326 | |
| U.S. Patent 5,933,819 | |
| U.S. Patent 5,939,598 | |
| U.S. Patent 5,942,242 | 10 |
| U.S. Patent 5,955,331 | |
| U.S. Patent 5,976,544 | |
| U.S. Patent 5,976,546 | |
| U.S. Patent 5,980,898 | |
| U.S. Patent 5,985,318 | |
| U.S. Patent 6,004,807 | |
| U.S. Patent 6,005,079 | 20 |
| U.S. Patent 6,034,298 | |
| U.S. Patent 6,103,493 | |
| U.S. Patent 6,103,493 | |
| U.S. Patent 6,129,920 | |
| U.S. Patent 6,136,313 | |
| U.S. Patent 6,136,320 | |
| U.S. Patent 6,180,110 | 30 |
| U.S. Patent 6,194,551 | |
| U.S. Patent 6,194,560 | |
| U.S. Patent 6,200,959 | |
| U.S. Patent 6,207,157 | |
| U.S. Patent 6,210,963 | |
| U.S. Patent 6,228,640 | |
| U.S. Patent 6,248,334 | 40 |
| U.S. Patent 6,248,565 | |
| U.S. Patent 6,254,873 | |
| U.S. Patent 6,277,375 B1 | |
| U.S. Patent 6,287,571 | |
| U.S. Patent 6,299,881 | |

| | |
|------------------------|----|
| U.S. Patent 6,303,130 | |
| U.S. Patent 6,309,646 | |
| U.S. Patent 6,328,958 | |
| U.S. Patent 6,339,068, | |
| U.S. Patent 6,339,086 | |
| U.S. Patent 6,348,449 | |
| U.S. Patent 6,348,450 | 10 |
| U.S. Patent 6,359,054 | |
| U.S. Patent 6,383,795 | |
| U.S. Patent 6,406,705 | |
| U.S. Patent 6,413,768 | |
| EP 0598877 | |
| EP 239,400 | |
| EP 307,434 | 20 |
| EP 367,166 | |
| EP 439,095; | |
| EP 519,596 | |
| EP 592,106 | |
| WO 00/42072 | |
| WO 00/75308 | |
| WO 00/75308 | 30 |
| WO 91/06570 | |
| WO 91/09967 | |
| WO 91/10741 | |
| WO 92/01047 | |
| WO 93/21232 | |
| WO 94/04678 | |
| WO 94/25591 | 40 |
| WO 96/04388 | |
| WO 96/33735 | |
| WO 96/33735 | |
| WO 96/34096 | |
| WO 96/34096 | |

WO 97/33899

WO 97/34911

WO 98/16654

WO 98/24893

WO 98/24893

WO 98/46645

WO 99/16873

10

WO 99/16873

WO 99/50433

Ada, *Mol. Immunol.*, 28(3):225-230, 1991.

Alberti *et al.*, *Vaccine*, 16(6):608-612, 1998.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988.

20

Arnon *et al.*, In: *Monoclonal antibodies and cancer therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), 243-256, Alan R. Liss, Inc., 1985.

Ashkenazi *et al.*, *PNAS*, 88:10535-10539, 1991.

Ausubel, *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1993.

Balicki and Beutler, *Medicine*, 81(1):69-86, 2002.

Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 13:238, 1965.

Barany and Merrifield, In: *The peptides*, Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.

30

Barletta *et al.*, *Res. Microbiol.*, 141:931-940, 1990.

Barry *et al.*, *Nature*, 377(6550):632-635, 1995.

Bernstein and Stanberry, *Vaccine*, 17(13-14):1681-1689, 1999.

Bilbao *et al.*, *FASEB J.*, 11(8):624-634, 1997.

Bowtell *et al.*, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*; Cold Spring Harbor Press, 2003

40

Brayton *et al.*, *Ann. N Y Acad. Sci.*, 849:369-371, 1998.

Caplen *et al.*, *Gene Ther.*, 6(3):454-459, 1999.

Carrington-Lawrence *et al.*, *J. Virol.*, 77(7):4237-4247, 2003.

Celluzzi and Falo, *J. Invest. Dermatol.*, 108(5):716-720, 1997.

Coffey *et al.*, *Science*, 282(5392):1332-1334, 1998.

- Coney *et al.*, *Vaccine*, 12(16):1545-1550, 1994.
- Cunningham, *J Pharmacol Toxicol Methods*. Jul-Aug;44(1):291-300, 2000.
- Curtiss *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 146:35-49, 1989.
- Da Costa *et al.*, *J. Virol.* 4(17):7963-7971, 2000.
- Davies *et al.*, *Biotech. and Bioengin.*, 74(4): 288-294, 2001.
- Deamer and Nichols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(1):165-168, 1983.
- Denardo *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4:2483-2490, 1998. 10
- Dougan *et al.*, *Para. Immunol.*, 9:151-160, 1987.
- Farlie *et al.*, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 77(1):131-133, 1998.
- Farrell *et al.*, *J. Virol.*, 68(2):927-932, 1994.
- Fell *et al.*, *J. Immunol.*, 146:2446-2452, 1991.
- Feng *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):866-70, 1997.
- Fields Virology, 3rd Ed., Fields *et al.*, (Eds.) chapter 71, 1996.
- Fisher *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7(17):2079-2087, 1996. 20
- Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.
- Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:821-824, 1989.
- Gillies *et al.* *J. Immunol. Methods*, 125:191-202, 1989.
- Gillies *et al.*, *PNAS*, 89:1428-1432, 1992.
- Glenn *et al.*, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8:797-805, 1999.
- Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.
- Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 6th Ed., 30
 Goodman *et al.*, (Eds.), 1080-1248; Macmillan Publishing Co., NY, 1980.
- Gregoriadis, *Drug Carriers In Biology And Medicine*, G. Gregoriadis (ed.), 287-341,
 1979.
- Hale, *Res. Microbiol.*, 141(7-8):913-919, 1990.
- Hansson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 287:265, 1999.
- Harayama, *Trends Biotechnol.*, 16:76, 1998.
- Harlow and Lane, In: *Antibodies*, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor
 Laboratory, 1988. 40
- Hellstrom *et al.*, In: *Controlled drug delivery*, 2d Ed., Robinson *et al.* (eds.), 623-653,
 Marcel Dekker, Inc., 1987.
- Holzer *et al.* *Virology*, 253(1):107-114, 1999.
- Hosaka *et al.*, *J. Virol.*, 46(3):1014-1017, 1983.

- Huang *et al.*, *Virology*, 97:212-217, 1979.
- Imai *et al.*, *Nephrologie*, 19(7):397-402, 1998.
- Inagaki-Ohara *et al.*, *Vaccine*, 20(1-2):98-104, 2001.
- Janson and Ryden, In: *Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications*, 2d Ed., 1998.
- Jespers *et al.*, *Bio/technology*, 12:899-903, 1988.
- Jones *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(21):11327-11333, 1996. 10
- Kaneda, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 43(2-3):197-205, 2000.
- Keadle *et al.*, *J. Infectious Dis.*, 176, 331-338, 1997.
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Kleymann *et al.*, *Nat. Med.*, 8(4):392-398, 2002.
- Knappik *et al.*, *Biotechniques*, 17(4):754-761, 1994.
- Kobayishi *et al.*, *Immunochemistry*, 10:73, 1973.
- Kyte and Doolittle, *J Mol Biol*, 157(1):105-32, 1982. 20
- Leung and Sacks, *Drugs*, 60(6):1329-1352, 2000.
- Levine *et al.*, *Microecol. Ther.*, 19:23-32, 1990.
- Liu and Huang, *J. Control Release*, 78(1-3):259-66, 2002.
- Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93, 1995.
- Lorenzo and Blasco, *BioTechniques*, 24:308, 1998.
- Lowrie *et al.*, *Vaccine*, 12(16):1537-1540, 1994.
- Lundstrom, *J. Recept Signal Transduct. Res.*, 19(1-4):673-686, 1999. 30
- Manoutcharian *et al.*, *Immunol. Lett.*, 62(3):131-136, 1998.
- Marshak *et al.*, In: *Strategies for protein purification and characterization*, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1996.
- Merrifield, *Science*, 232:341-347, 1986.
- Moore *et al.*, *Vaccine*, 20(1-2), 2001.
- Moore, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15(4):124-129, 1994.
- Morris *et al.*, *Gastroenterol*, 103:699-702, 1992. 40
- Morrison, *Science*, 229:1202, 1985.
- Mullis *et al.*, *Biotechnology*, 24:17-27, 1992.
- Mullis, *Sci. Am.*, 262(4):56-61, 64-65, 1990.
- Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220, 1980.
- Muyldermans *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 26:230, 2001.

- Naramura *et al.*, *Immunol. Lett.*, 39:91-99, 1994.
- Navarro *et al.*, *Virology*, 186(1), 99-112, 1992.
- Nesburn *et al.*, *Invest. Ophthalm. Visual Sci.*, 39(7):1163-1170, 1998.
- Nesburn *et al.*, *J. Virology*, 68(8):5084-5092, 1994.
- Nesburn *et al.*, *Virology*, 252(1), 200-209, 1998.
- Neumann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(16):9345-9350, 1999.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987. 10
- Nuttall *et al.*, *Cur. Pharm. Biotech.*, 1:253, 2000.
- Ol *et al.*, *BioTechniques*, 4-214, 1986.
- Padlan, *Molec. Immunol.*, 28(4/5):489-498, 1991.
- Patten *et al.*, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 8:724-33, 1997.
- Peterson *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 10:553, 1999.
- Piedrafita *et al.*, *J. Immunol.*, 163(3):1467-1472, 1999.
- Ravid *et al.*, In: *DNA transfer to cultured cells*, Wiley and Sons, 1998 20
- Reichmann and Muyldermans, *J. Immunol. Meth.*, 231:25, 1999.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580,
Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327, 1988.
- Robbins and Ghivizzani, *Trends Biotech.*, 16(1):35-40, 1998.
- Roguska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973, 1994.
- Rouse *et al.*, *J. Virol.*, 68(9):5685-5689, 1994. 30
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor
Laboratory; 3rd edition, 2001.
- Sanford *et al.*, *Technique*, 3:3-16, 1991.
- Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277(30):26733-26740, 2001.
- Slack, In: *Oxford Textbook of Medicine*, 2d Ed., Weatherall *et al.*, (Eds.) 1:5.35,
Oxford University Press, Oxford/Melbourne/New York, 1987.
- Smooker *et al.*, *Vaccine* 18:2533-2540, 2000. 40
- Stanberry *et al.*, *Clinical Infect. Dis.*, 30(3):549-566, 2000.
- Stanberry *et al.*, In: *Viral infections of humans: epidemiology and control*, Evans *et al.*, (Eds.), Plenum Medical Book Company, NY, 419-454, 1997..
- Steinman *et al.*, *Hum Immunol*, 60(7):562-567, 1999
- Stemmer *et al.*, *Gene*, 154(1):49-53, 1995.

Stewart and Young, In: *Solid phase peptide synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co.

1984.

Studnicka *et al.*, *Protein Eng.*, 7(6):805-814, 1994.

Sykes and Johnston, *DNA Cell. Biol.*, 18:521-531, 1999.

Sykes and Johnston, *Nat. Biotechnol.*, 17(4):355-359, 1999.

Szoka and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198, 1978.

Takahashi *et al.*, *J. Immunol.*, 6:1567-1574, 1994

10

Tam *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.

Tang *et al.*, *Nature*, 356:152-154, 1992.

Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 65:119-138, 1982.

Thorpe, In: *Monoclonal antibodies '84: Biological and clinical applications*, Pinchera *et al.* (eds.), 475-506, 1985.

Van Damme *et al.*, *Gastroenterology*, 103(2):520-531, 1992.

Vil *et al.*, *PNAS*, 89:11337-11341, 1992.

20

Viret *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 7(2):239-252, 1993.

Watt *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 83(2):3166-3170, 1986.

Whitley and Miller, *Viral Immunol.*, 14(2):111-118, 2001.

Whitley and Miller, *Viral Immunol.*, 14(2), 111-118, 2001.

Whitley and Roizman, *Lancet.*, 357(9267):1513-1518, 2001.

Whitley *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, 26(3):541-553, 1998.

Wilson *et al.*, *Cell*, 37:767, 1984.

30

Wu *et al.*, *Genomics*, 4:560-569, 1989.

Xiang *et al.*, *J. Virol*, 199(1):132-140, 1994.

Zheng *et al.*, *J. Immunol.*, 154:5590-5600, 1995.

Zimmerman *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 26:943-50, 1999.

【図面の簡単な説明】

【 0 3 1 7 】

【図 1】症状の読み取りによるRELIラウンド1攻撃誘発アッセイの結果を示す図である。12種のtPA融合サブライブラリー(T1~T12)の1つ、または12種のUB融合サブライブラリー(U1~U12)の1つで免疫化したマウス群についてヘルペス疾患の重症度をスコアリングした。対照動物が死亡し始める前日であるので、感染7日後を示す。全ての動物を、種々の疾患パラメーターについて目視検査を行った。値は、症状について割り当て、数字が増加するほど疾患が悪化することを示す。浮腫、腹部膨満、痂皮化および痂皮形成を3とし、水疱およびリンパ節の肥大を5とし、病変および紅斑を6とし、潰瘍および腸小孔形成を7とし、低体温症を8とし、麻痺および神経感染症を10とし、死亡または安楽死を20とした。値を、効果が、非常に穏やか(+2)、穏やか(+3)、中程度(+5)、激しい(+7)、または非常に激しい(+9)かどうかによってさらに修正した。正とスコアリングされたマウス群を黒のバーで示した。ベクター=HSVインサートを含まないプラスミド。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

50

【図2】死亡率の読み取りによるRELIラウンド1攻撃誘発アッセイの結果を示す図である。12種のtPA融合サブライブラリー(T1~T12)の1つ、または12種のUB融合サブライブラリー(U1~U12)の1つで免疫化したマウス群についての生存率の決定によって、死亡からの防御を評価した。曝露から7日後~9日後に生存している動物の比率をプロットする。負の対照動物は、7日目で死亡しはじめ得るが、第9日目からモニタリング期間の終了(14日目)までさらなる死亡は認められなかった。正とスコアリングされたマウス群をアスタリスクでマークする。ベクター=HSVインサートを含まないプラスミド。NI=非免疫化。

【図3】HSV-1ライブラリーの各成分を整列させるために実質的に構築した三次元グリッドの図である。グリッドの面積を使用して、多重化プール(multiplexed pool)を定義した。これらのプールを、ELI試験の遺伝子接種材料として使用した。

【図4】(図4A)tPAおよび(図4B)UB融合ライブラリー由来の第2ラウンドのRELIでの攻撃誘発防御アッセイによる死亡率の結果を示す図である。ラウンド1研究由来の正にスコアリングされたプールを含むライブラリー成分を、キューブのX、Y、およびZ面によって定義される新規のプールに再整列した。遺伝子免疫化によってこれらをアッセイし、対照接種材料と共にこれらを灰色のバーで示す。ベクター=インサートを含まないプラスミド。NI=接種材料なし。減少について選択したラウンド1サブライブラリーを再試験した。tPAスクリーニング由来のRD1#1、RD1#3、およびRD1#8、ならびにUBスクリーニング由来のRD1#6(Rd+)およびRD1#11(Rd+)。正にスコアリングされたマウス群をアスタリスクでマークする。

【図5】図5AおよびBは、2つのHSV1ライブラリーから減少した単一プラスミドクローンの防御分析を示す図である。ラウンド2データの行列分析から推測されるライブラリークローンの配列決定により、ラウンド3での試験のためのORFを同定した。遺伝子免疫化によってこれらをアッセイし、対照接種材料と共にこれらを灰色のバーで示す。pCMVigD=以前に記載したHSV抗原を発現するプラスミド、Irrel=非HSVライブラリー接種材料、NI=非免疫化。UBライブラリー由来のクローンを、tPA由来のクローンで使用したものと比較して200倍希釈のDNA用量で投与した。(図5A)tPAライブラリー由来のラウンド3試験のために、それぞれ9日目、12日目、13日目、および14日目で生存しているマウスの比率を示す。(図5B)UBライブラリー由来のラウンド3試験のために、8日目、9日目、および14日目をプロットする。正にスコアリングされた接種材料をアスタリスクでマークする。

【図6】図6AおよびBは、tPAおよびUBグリッド両方から推測されるORFの比較試験を示す図である。ライブラリークローンを、同用量で並行して試験した(図6A)。それぞれ8日目、9日目、10日目、11日目、および14日目で各候補を免疫化したマウスの生存率。(図6B)マウスのこれらの各接種群の平均生存スコアをプロットした。これらの計算値を、攻撃誘発後8日~14日の期間中の生存と組み合わせる。

【図7】図7A~Cは、配向ELI研究由来の生存率を示す図である。マウス群を、三次元行列分析のためにプールしたHSV-1 ORFで免疫化した。各データセットは、(図7A)X軸、(図7B)Y軸、または(図7C)Z軸を示す。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

【図8】図8A~Cは、配向ELI研究由来の平均生存スコアを示す図である。各日数における生存率と同一の上記データを使用して、モニタリング期間中の生存期間延長を示す単一スコアを導いた。一旦非免疫化群が死滅し始めると、各マウスが生存する日数を合計した。群生存スコアを決定するために、群あたりの各動物の合計を平均した。図1のように、各データセットは、(図8A)X軸、(図8B)Y軸、または(図8C)Z軸を示す。正にスコアリングされた群を、影をつけた黒で示す。正の対照群および負の対照群に灰色の影をつける。

【図9】図9AおよびBは、DELIグリッドの三角測量分析(triangulation analysis)から推測される各ORFの初期試験を示す図である。試験したORFおよびその誘導遺伝子の両方を示す。いくつかの代表的な日数での長期生存率(図9A)および曝露後8日目~14日目に計算した生存スコア(図9B)として防御を示す。非免疫化を使用した非重複エラーバーを示す群を、黒で示す。正の対照群および負の対照群に灰色の影をつける。

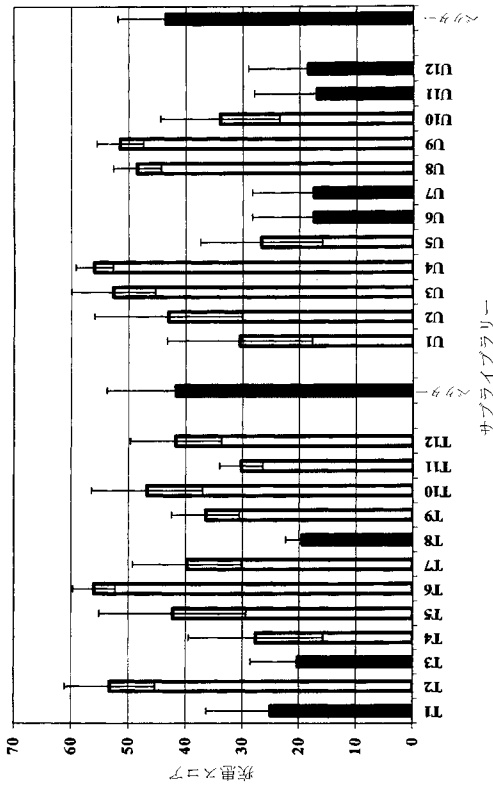
10

20

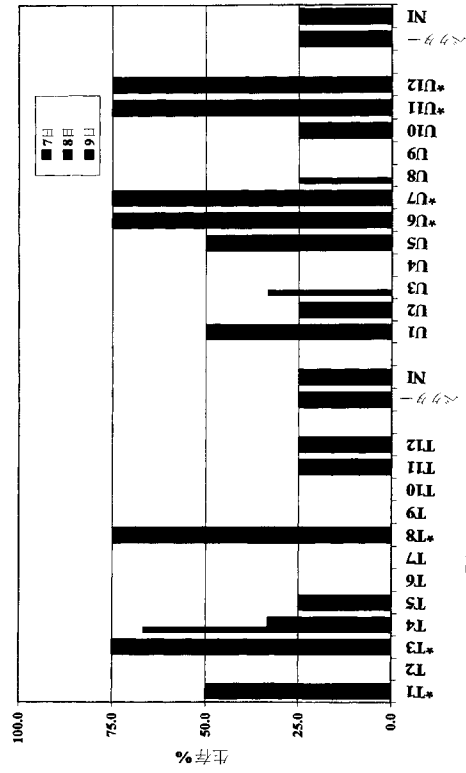
30

40

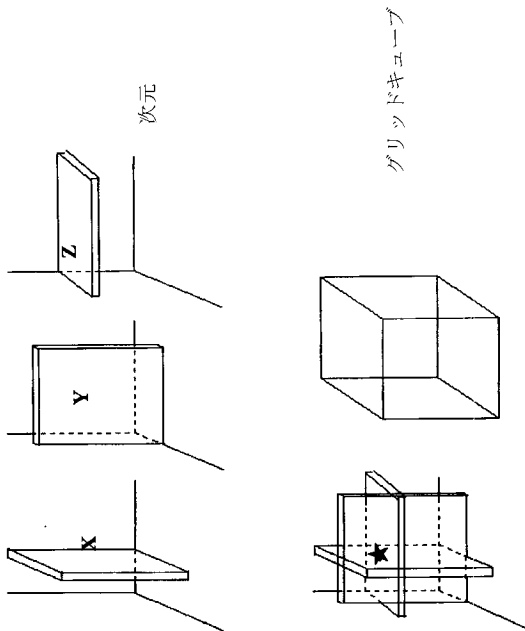
【図1】



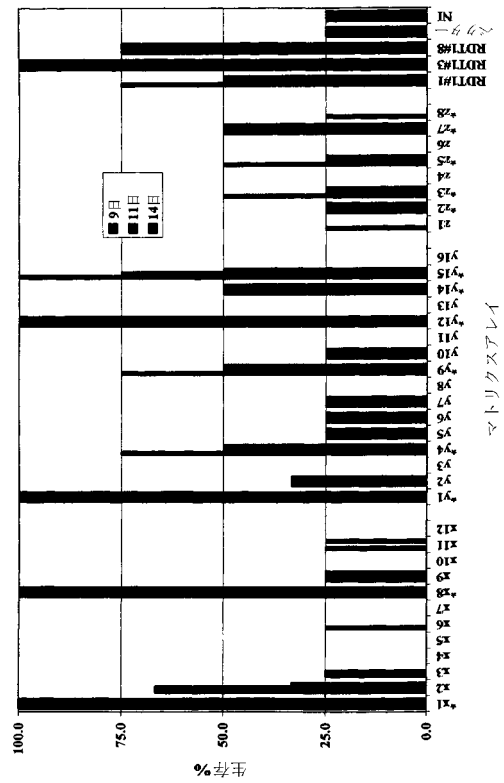
【図2】



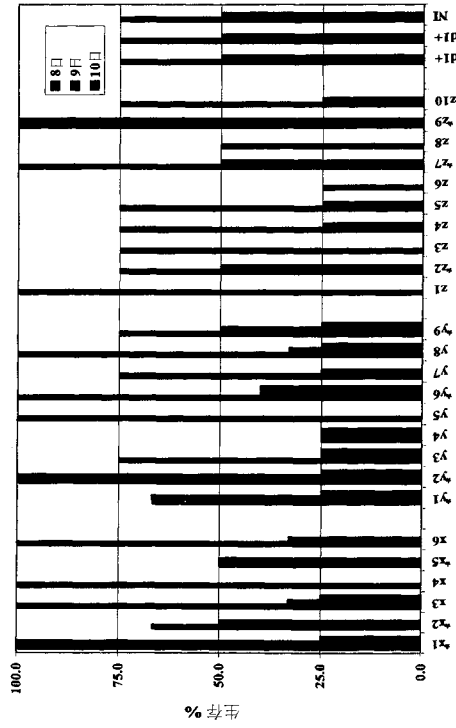
【図3】



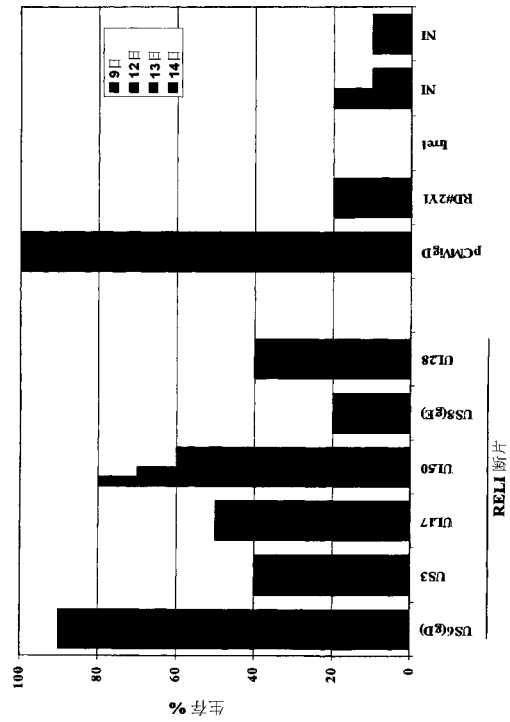
【図4 A】



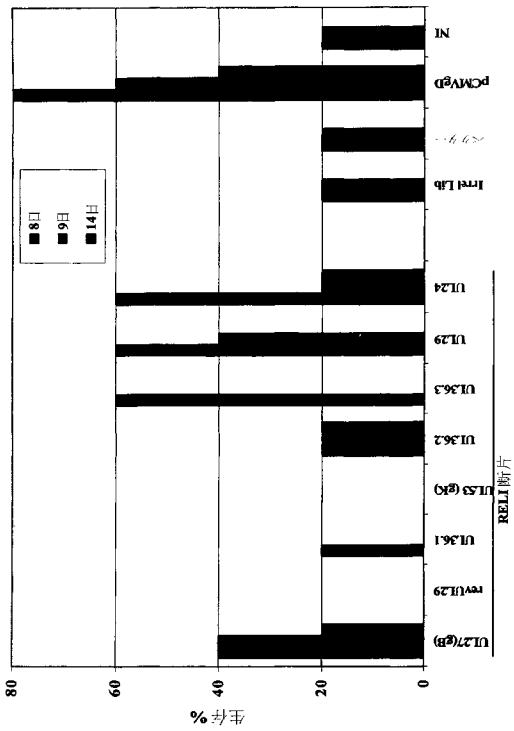
【 図 4 B 】



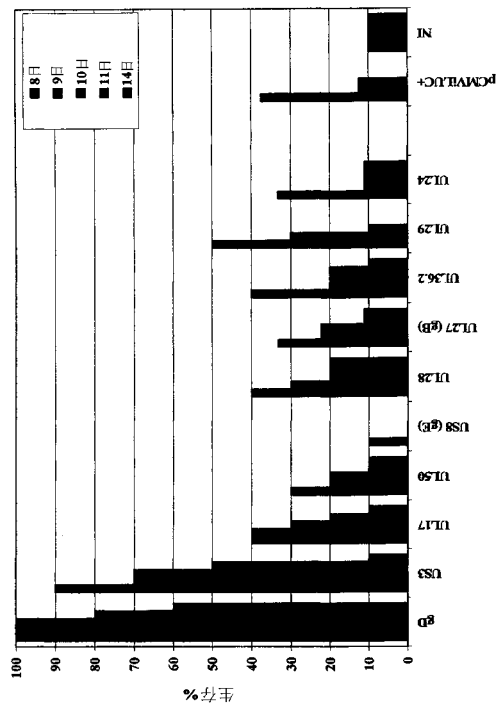
【 図 5 A 】



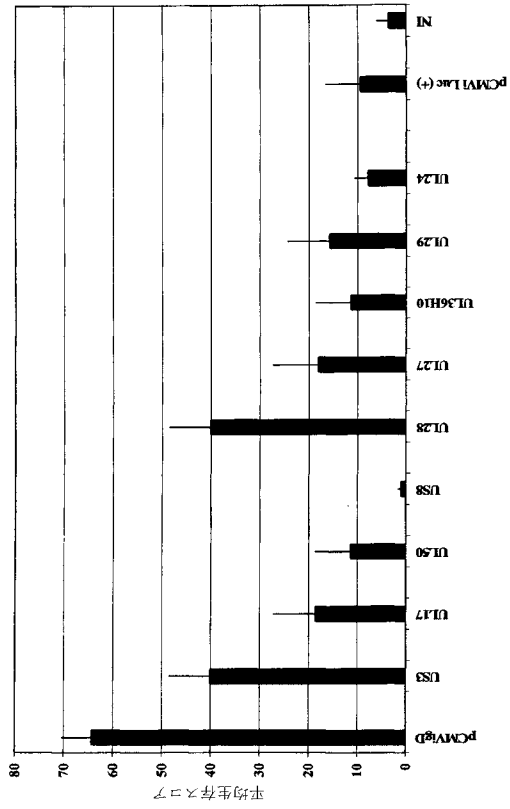
【 図 5 B 】



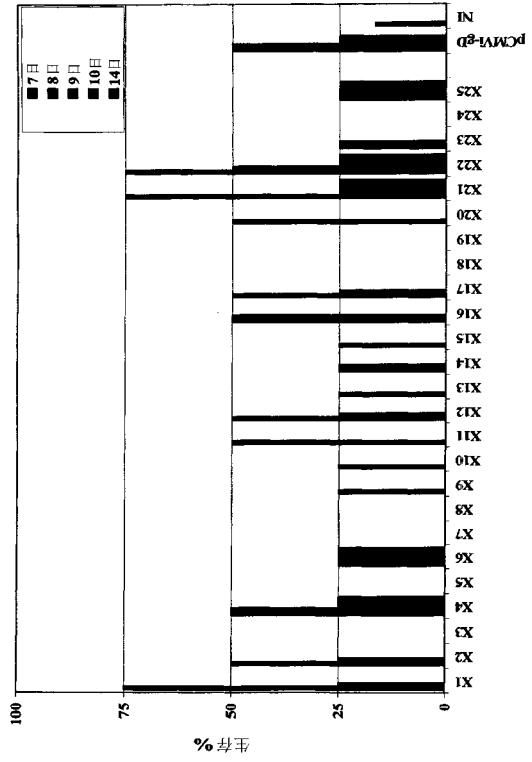
【 図 6 A 】



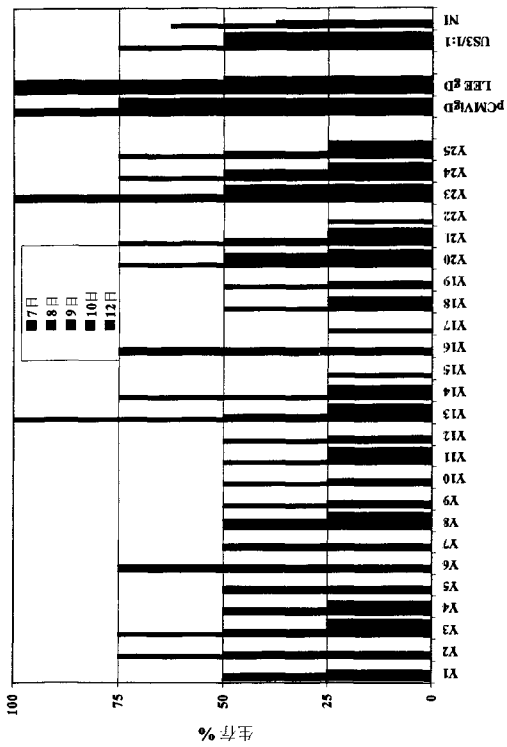
【 図 6 B 】



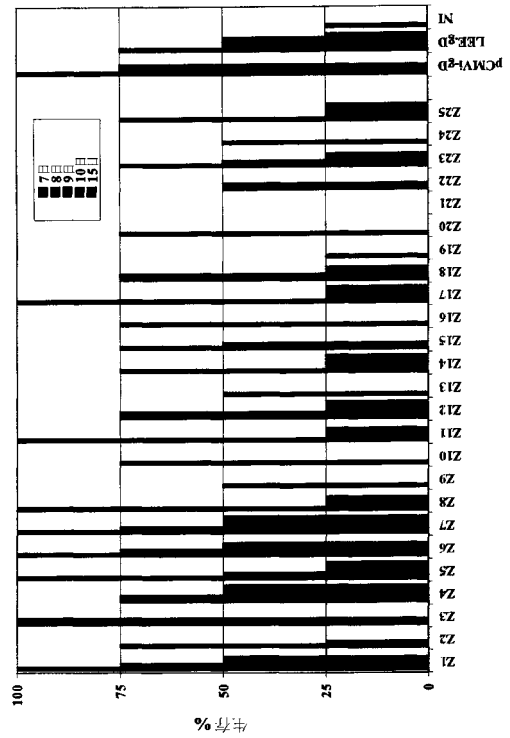
【 図 7 A 】



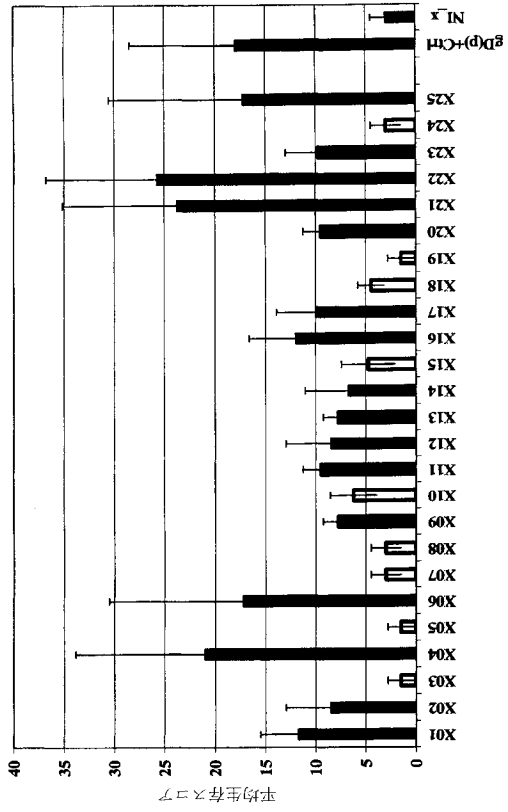
【 図 7 B 】



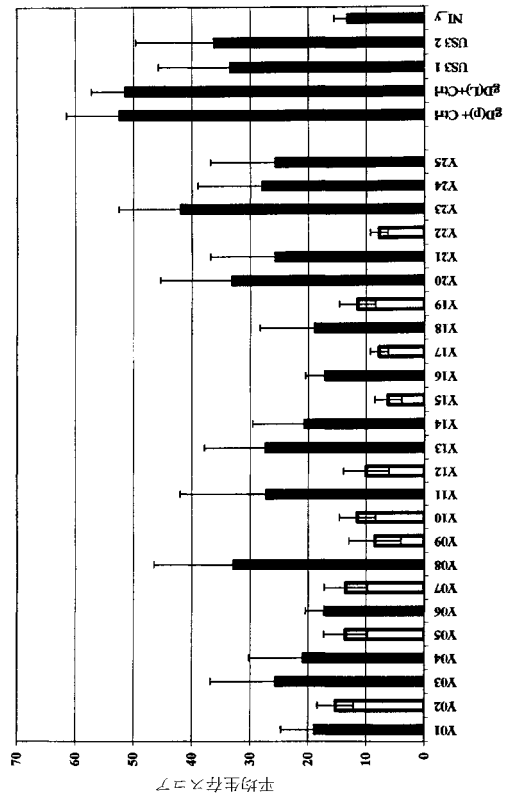
【 図 7 C 】



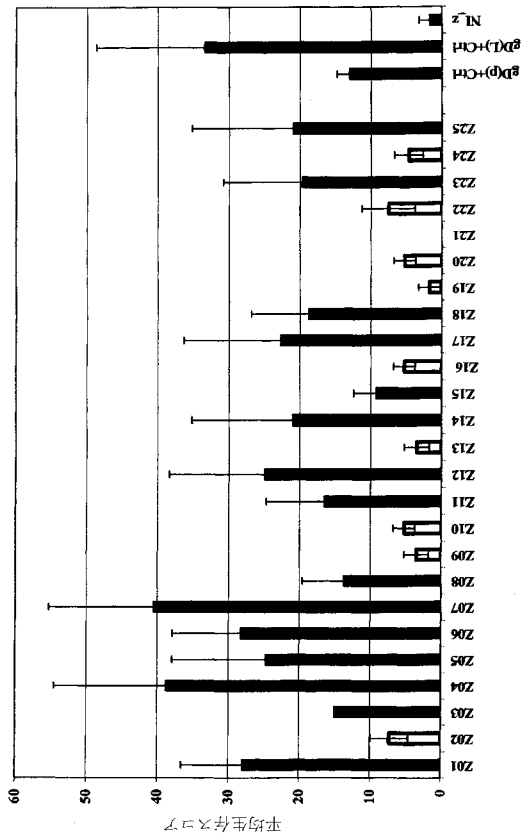
【 8 A 】



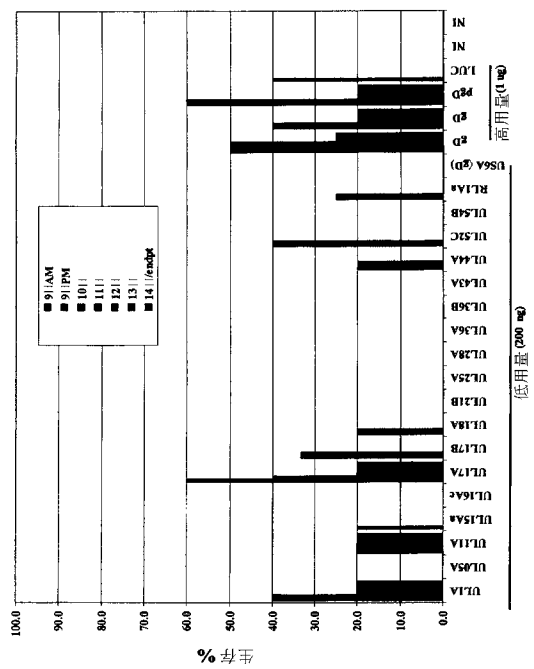
【 8 B 】



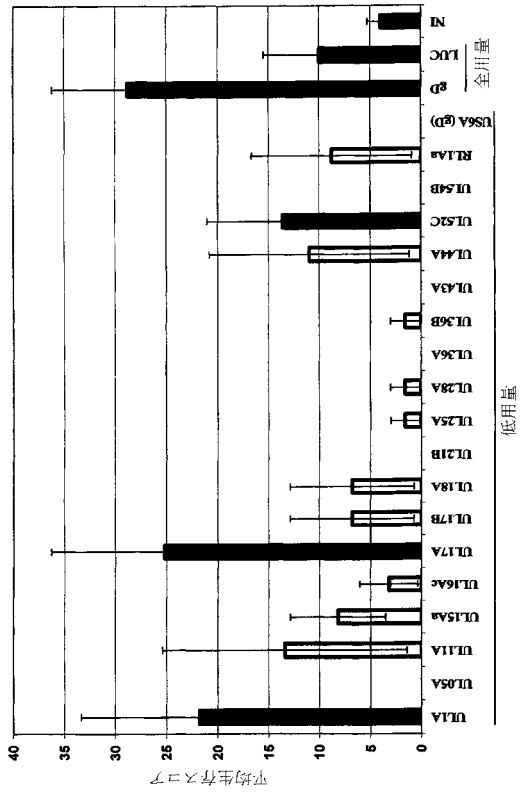
【 8 C 】



【 9 A 】



【 図 9 B 】



【 配列表 】

[2006500035000001.app](#)

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US03/30301 |
|---|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : C12Q 1/68, C12P 19/34; A61K 39/245 US CL : 435/6, 91.1; 424/229.1 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1; 424/229.1 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 4,891,315 A (WATSON et al) 02 January 1990 (02.01.1990), see the claims. | 1-9, 21-23 |
| Y | US 5,750,114 A (BURKE et al) 12 May 1998 (12.05.1998), see the claims. | 1-9, 21-23 |
| Y | US 5,747,039 A (BURKE et al) 05 May 1998 (05.05.1998), see the claims. | 1-9, 21-23 |
| Y | US 5,151,267 A (BABIUK et al) 29 September 1992 (29.09.1992), see the claims. | 1-9, 21-23 |
| Y | US 5,679,348 A (NESBURN et al) 21 October 1997 (21.10.1997), see the claims. | 1-9, 21-23 |
| Y | DOLAN et al. Status of the ICP34.5 gene in herpes simplex virus type 1 strain 17. Journal of General Virology. 1992, Vol. 73, pages 971-973, see Figure 4. | 1-9, 21-23 |
| Y | LISE et al. The DNA Sequences of the Long Repeat Region and Adjoining Parts of the Long Unique region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. Journal of General Virology. 1988, Vol. 69, pages 2831-2846, see Figure 2. | 1-9, 21-23 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | |
| "B" earlier application or patent published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 01 November 2004 (01.11.2004) | Date of mailing of the international search report 26 NOV 2004 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230 | Authorized officer A R Salimi <i>F. Roberts for</i> Telephone No: (571) 272-1600 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/30301

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-9, 21-23, SEQ ID NO: 2, and SEQ ID NO: 8

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/30301

Continuation of Item 4 of the first sheet:

Title is too long. The New Title is:

Compositions and methods for treatment of herpesvirus infections.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I claim(s) 1-9, 21-23, drawn to method of immunizing a subject by providing the subject at least one herpes virus antigen or fragment within the scope of SEQ ID NO: 2 only. (Total species 57 see below)

Group II, claim(s) 1, 4-20, drawn to method of immunizing a subject by providing the subject at least one herpes virus polynucleotide sequence within the scope of SEQ ID NO: 2 (Total species 57 see below)

Group III, claim(s) 24-29, 38-50, drawn to vaccine and isolated polynucleotide comprising at least 17 contiguous nucleotides in common within the scope SEQ ID NO: 1. (Total species 57 see below)

Group IV, claim(s) 30-37, 38, 51-58, drawn to vaccine and isolated polypeptide having at least 5 consecutive amino acids within the SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

Group V, claim(s) 59-73, drawn to a method of screening for at least one test polypeptide within the scope of SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

Group VI, claim(s) 74-79, drawn to method of treating a subject infected with a pathogen within the scope of SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

Group VII, claim(s) 80-81, drawn to method of raising immune response against reactivation within the scope of SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

Group VIII, claim(s) 82-86, drawn to a method of passive immunization special technical feature of a binding agent within the scope of SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

Group IX, claim(s) 87-94, drawn to method special technical feature of of vaccinating administering a priming dose.

Group X, claim(s) 95-96, drawn to method comprising special technical feature of detecting herpes virus within the scope of SEQ ID NO: 2. (Total species 57 see below)

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows: Multitudes of nucleic acid sequences as well as polypeptide sequences as recited within each applicable groups the polypeptide. Total number of sequences for either nucleic acid or polypeptide are 57.

The inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The invention of Group I is known in the prior art as evidenced by Watson et al (US Patent No. 4,891,315) wherein the reference teaches method and composition to induce immune response against herpes virus (see abstract, and the claims). The cited evidence proves that the technical feature of Group I does not make a contribution over the prior art. Thus, the claims are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/30301

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Each of the sequences listed confer different structure and presumably different effect. All 57 proteins/DNA are isolated from the general class of herpesvirus, however, they are isolated from different genes of herpesvirus, see Table 2, these genes do not share a common similarity structure profile either between themselves see Table 4. In addition, the various sequences would induce different antibodies.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, WEST, DERWENT, EPA, JPA

Search terms: herpesvirus, HSV?, ICP?, Unique Long region, UL, method of immunizing, antigen, fragment, VZV

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 37/00 (2006.01) | A 6 1 P 37/00 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01) | A 6 1 P 37/02 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 14/03 (2006.01) | C 0 7 K 14/03 | |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/70 (2006.01) | C 1 2 Q 1/70 | |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01) | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01) | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | N |
| G 0 1 N 33/569 (2006.01) | G 0 1 N 33/569 | J |
| C 0 7 K 16/08 (2006.01) | C 0 7 K 16/08 | |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 サイクス キャスリン エフ.

アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス レ ジャルダン 1 0 5 1 9

(72) 発明者 ヘイル キャサリン エス.

アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ピー.オー.ボックス 3 5 9 1 3

(72) 発明者 ジョンストン ステファン エー.

アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス レ ジャルダン 1 0 5 1 9

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA35 DA13

4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA02 DA06 EA04 GA11 HA03 HA14
HA17

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ79 QR32 QR35 QR77 QS24 QS33 QS36
QX01

4C084 AA13 MA52 MA56 MA66 NA14 ZB01 ZB07 ZB33

4C085 AA03 BA78 CC08 CC21 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA52 MA56 MA66 NA14
ZB01 ZB07 ZB33

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA03 DA76 DA86 EA29 EA31 EA53
FA72 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于鉴定包含疱疹病毒科的核酸序列和/或多肽序列的疫苗的方法和用于疫苗接种的组合物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006500035A | 公开(公告)日 | 2006-01-05 |
| 申请号 | JP2004538499 | 申请日 | 2003-09-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 宏基因扫描公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 宏基因扫描公司 评议委员会得克萨斯大学系统 | | |
| [标]发明人 | サイクスキャスリンエフ ヘイルキャサリンエス ジョンストンステファンエー | | |
| 发明人 | サイクス キャスリン エフ. ヘイル キャサリン エス. ジョンストン ステファン エー. | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A61K31/7088 A61K39/245 A61K48/00 A61P31/22 A61P37/00 A61P37/02 C07K14/03 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 C07K16/08 A61K39/12 A61K39/25 C07K14/035 | | |
| CPC分类号 | A61K39/245 A61K39/12 A61K2039/53 A61K2039/55522 C07K14/005 C12N2710/16622 C12N2710/16634 C12Q1/705 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/245 A61K48/00 A61P31/22 A61P37/00 A61P37/02 C07K14/03 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/569.J C07K16/08 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA29 2G045/AA35 2G045/DA13 4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB01 4C084/ZB07 4C084/ZB33 4C085/AA03 4C085/BA78 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB01 4C086/ZB07 4C086/ZB33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA03 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 清水初衷 | | |
| 优先权 | 60/412956 2002-09-23 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及通过筛选疱疹病毒基因组，特别是HSV-1基因组获得的抗原，以及编码这些抗原的核酸。在更详细的方面，本发明涉及分离这些抗原和核酸的方法以及使用这种分离的抗原产生免疫应答的方法。抗原产生免疫应答的能力可用于疫苗接种或抗体制备技术。

| アミノ酸 | | | コドン | | | |
|----------|-----|---|-----|-----|-----|-----|
| アラニン | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU |
| システイン | Cys | C | UGC | UGU | | |
| アスパラギン酸 | Asp | D | GAC | GAU | | |
| グルタミン酸 | Glu | E | GAA | GAG | | |
| フェニルアラニン | Phe | F | UUC | UUU | | |
| グリシン | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU |
| ヒスチジン | His | H | CAC | CAU | | |
| イソロイシン | Ile | I | AUA | AUC | AUU | |
| リジン | Lys | K | AAA | AAG | | |
| ロイシン | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC |
| | | | | CUU | | CUG |
| メチオニン | Met | M | AUG | | | |
| アスパラギン | Asn | N | AAC | AAU | | |
| プロリン | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU |
| グルタミン | Gln | Q | CAA | CAG | | |
| アルギニン | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC |
| | | | | CGU | | CGG |
| セリン | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC |
| | | | | UCU | | UCG |
| トレオニン | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU |
| バリン | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU |
| トリプトファン | Trp | W | UGG | | | |
| チロシン | Tyr | Y | UAC | UAU | | |