

(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2005-510489

(P2005-510489A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-537550 (P2003-537550)	(71) 出願人	502399237
(86) (22) 出願日	平成13年11月16日 (2001.11.16)		ユニバーシティ オブ メリーランド, ボルチモア
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)		アメリカ合衆国 メリーランド 21201, ボルチモア, ウェスト ランバード
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/043783		ストリート 520
(87) 国際公開番号	W02003/034981	(71) 出願人	503160537
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)		オールクス, インコーポレイテッド
(31) 優先権主張番号	60/249,387		アメリカ合衆国 メリーランド 21061-3230, グレン バーニー, マ
(32) 優先日	平成12年11月16日 (2000.11.16)		コミック ドライブ 500, スイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107489
			弁理士 大塩 竹志
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 再発性のウイルス性疾患の予防

(57) 【要約】

本発明は再発性のウイルス性疾患を改善させるか、または減少させるための組成物および方法を開示し、ここで、組成物および方法は、優先的なTh1応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの増加を生じる。本発明は、動物においてTh1応答を誘導することによって、潜伏性に感染した動物において、再発性のウイルス性疾患の症状を予防するか、または減少させることに関する。本発明は、Th2応答と比較して、Th1応答における増加を誘発する方法を教示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスに感染した動物におけるウイルス性疾患の症状を改善する方法であって、該方法が、該ウイルス由来の少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質を該動物に投与する工程を包含し、ここで、該タンパク質が 1 型 T ヘルパー細胞 (T h 1) 応答を誘導する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 T h 1 応答が 1 つ以上の以下の応答：

a . 優先的な T h 1 応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの増加した比；

b . ウイルス特異的なインターフェロン / インターロイキン - 1 0 (I N F / I L - 1 0) の増加した比；

c . 増加した C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) レベル；および

d . 増加したインターロイキン 1 2 (I L - 1 2) レベル、

を含む、方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記ウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの増加した比が、 I g G 2 a / I g G 1、 I g G 1 / I g G 4、 I g G 2 / I g G 4、 I g G 3 / I g G 4、 (I g G 1 + I g G 2 + I g G 3) / I g G 4、 (I g G 1 + I g G 2 + I g G 3) / I g G 5、 I g G 1 / I g E、 I g G 2 / I g E および I g G 3 / I g E からなる群より選択される、方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、前記少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質がマウスに投与される場合に、 I g G 2 a / I g G 1 の増加した比を含む T h 1 応答を誘導する、方法。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の方法であって、前記 T h 1 応答が、優先的な T h 1 応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの少なくとも 2 5 % まで増加した比、ウイルス特異的なインターフェロン / インターロイキン - 1 0 (I N F / I L - 1 0) の少なくとも 2 5 % まで増加した比、少なくとも 2 5 % まで増加した C D 8 + C T L レベル、および少なくとも 2 5 % まで増加した I L - 1 2 レベル、を含む、方法。

【請求項 6】

優先的な T h 1 応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの少なくとも 2 5 % まで増加した比を含む応答の増加を生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ウイルス特異的なインターフェロン / インターロイキン - 1 0 (I N F / I L - 1 0) の少なくとも 2 5 % まで増加した比を生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 2 5 % まで増加した C D 8 + C T L レベルを生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 2 5 % まで増加した I L - 1 2 レベルを生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記動物がヒトである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の方法であって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C 型肝炎ウイルス、パピロマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルスおよび単純疱疹ウイルスからなる群より選択される、方法。

【請求項 1 2】

前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

10

20

30

40

50

前記ウイルスがサイトメガロウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ウイルスが C 型肝炎ウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ウイルスがパピローマウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ウイルスがエプスタイン-バーウイルスある、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ウイルスが水痘 - 帯状疱疹ウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ウイルスが単純疱疹ウイルスである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記単純疱疹ウイルスが単純疱疹ウイルス - 2 である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記単純疱疹ウイルスが単純疱疹ウイルス - 1 である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 に記載の方法であって、該方法が、薬学的に受容可能なキャリア中に、I C P 1 0 P K タンパク質ではなく、複数の H S V - 2 タンパク質を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 1 に記載の方法であって、該方法が、少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質を含むか、または投与後に、該少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質を発現するウイルスの投与を包含する、方法。

【請求項 2 3】

単純疱疹ウイルス - 2 を投与する工程を包含する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

単純疱疹ウイルス - 2 の I C P 1 0 P K 変異体を投与する工程を包含する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質が、該少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質をコードする核酸を投与することによって、間接的に投与される、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記動物がヒトであり、かつ前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C 型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘 - 帯状疱疹ウイルスおよび単純疱疹ウイルスからなる群より選択される、方法。

【請求項 2 7】

前記ウイルス性疾患が疱疹であり、かつ前記核酸が I C P 1 0 P K をコードしない、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記動物がヒトである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載の方法であって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C 型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘 - 帯状疱疹ウイルスおよび単純疱疹ウイルスからなる群より選択される、方法。

【請求項 3 0】

前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ウイルスがサイトメガロウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

前記ウイルスが C 型肝炎ウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ウイルスがパピローマウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ウイルスがエプスタイン-バーウイルスある、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記ウイルスが水痘-帯状疱疹ウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記ウイルスが単純疱疹ウイルスである、請求項 2 9 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記単純疱疹ウイルスが単純疱疹ウイルス - 2 である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記単純疱疹ウイルスが単純疱疹ウイルス - 1 である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

請求項 2 9 に記載の方法であって、該方法が、少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質を含むか、または投与後に、該少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質を発現するウイルスの投与を包含する、方法。

【請求項 4 0】

請求項 3 7 に記載の方法であって、該方法が、薬学的に受容可能なキャリア中に、I C P 1 0 P K タンパク質ではなく、複数の H S V - 2 タンパク質を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

20

【請求項 4 1】

単純疱疹ウイルス - 2 の I C P 1 0 P K 変異体を投与する工程を包含する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

請求項 5 に記載の方法であって、前記少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質が、該少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質をコードする核酸を投与することによって、間接的に投与される、方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の方法であって、前記動物がヒトであり、かつ前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C 型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルスおよび単純疱疹ウイルスからなる群より選択される、方法。

30

【請求項 4 4】

前記ウイルス性疾患が疱疹であり、かつ前記核酸が I C P 1 0 P K をコードしない、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

ウイルスに感染した動物において、ウイルス性疾患の症状を改善するための治療ワクチンであって、該治療ワクチンは、少なくとも 1 つの該ウイルス由来の免疫原性タンパク質を含み、該動物への投与後に以下の応答：優先的な T h 1 応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの増加した比、ウイルス特異的なインターフェロン / インターロイキン - 1 0 (I N F / I L - 1 0) の増加した比、増加した C D 8 + C T L レベル、および増加した I L - 1 2 レベル、を含む応答、を誘導する、治療ワクチン。

40

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の治療ワクチンであって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C 型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルスおよび単純疱疹ウイルスからなる群より選択される、治療ワクチン。

【請求項 4 7】

50

請求項 4 6 に記載の治療ワクチンであって、前記ウイルスが単純疱疹ウイルス - 2 であり、かつ少なくとも 1 つの前記単純疱疹ウイルス由来の免疫原性タンパク質が単純疱疹ウイルス - 2 由来である、治療ワクチン。

【請求項 4 8】

単純疱疹ウイルス - 2 変異体を含む、請求項 4 7 に記載の治療ワクチン。

【請求項 4 9】

前記変異体が、プロテインキナーゼ活性を欠く変異体 I C P 1 0 タンパク質をコードする、請求項 4 8 に記載の治療ワクチン。

【請求項 5 0】

前記ワクチンが、免疫刺激剤およびアジュバントをさらに含有する、請求項 4 6 に記載の治療ワクチン。 10

【請求項 5 1】

ウイルス性疾患を引き起こすウイルスに感染した動物において、該ウイルス性疾患を改善する薬剤を同定する方法であって、該方法が、動物に対して試験薬剤を投与する工程、それに対する免疫応答を分析する工程、および T h 1 応答を誘導する試験試薬を選択する工程、を包含する、方法。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の方法であって、前記 T h 1 応答が、優先的な T h 1 応答を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの増加した比、ウイルス特異的なインターフェロン / インターロイキン - 1 0 (I N F / I L - 1 0) の増加した比、増加した C D 8 + C T L レベル、および増加した I L - 1 2 レベル、を含む、方法。 20

【請求項 5 3】

請求項 5 1 に記載の方法であって、前記試験試薬が、ウイルス、変異体ウイルス、D N A、ポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチドおよびそれらの混合物からなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、米国特許法第 1 1 9 条第 (e) 項の下で、米国特許仮出願番号 6 0 / 2 4 9 , 3 8 7 (2 0 0 0 年 1 1 月 1 6 日出願) に対する優先権を主張する。 30

【0002】

(連邦政府によって支援された研究または開発に関する声明)

本発明は、米国政府 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 助成金番号 9 6 0 1 8 4) から獲得した助成金を用いて一部分が実行された。米国政府は本発明において特定の権利を有し得る。

【0003】

(発明の背景)

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の流行性に応じて、教育的な試みがなされたにもかかわらず、性感染症の拡大は衰えず続いている。最近の研究は、米国において、2 型単純疱疹ウイルス (H S V - 2) の年齢で調整した罹患率は、現在、2 0 . 8 % であり、過去 1 3 年にわたって約 3 0 % の増加であることを示している。全体的に、H S V - 2 は 1 型ウイルス (H S V - 1) (顔面の病変を引き起こす) と 5 0 % 相同である。しかし、2 つのウイルスは、身体の異なる部位に偏好を有し、再発性疾患を引き起こす異なる傾向を有する (H S V - 2 および H S V - 1 について、それぞれ、6 0 % および 3 0 %) 。これらは、異なる神経学的疾患 (主に、H S V - 2 は髄膜炎であり、H S V - 1 は脳炎である) に関連し、そして H S V - 2 のみが新生物形成能力を有す。若年成人における H S V - 2 獲得の増加する率は、分娩時に、乳児が H S V - 2 に曝露される可能性を増加させ、抗ウイルス治療にも関わらず、なお生命を脅かす感染を生じる。H S V - 2 感染についての新たな関心は、H S V - 2 感染が先に記されていない過剰増殖性病変を引き起こし、そして H I 50

Vの拡大およびこの疾患の重篤度の増大を促進することである。

【0004】

HSV-1またはHSV-2のいずれかの感染は、4段階：(i)急性感染、(ii)潜伏期の確立、(iii)潜伏状態の持続および(iv)潜伏性ウイルスの再活性化、に分けられ得る。原発性HSV感染の最も一般的な部位は、HSV-1については顔面の粘膜であり、HSV-2については生殖器の粘膜である。このウイルスは感染部位の細胞において複製し、原発性病変を生じる。ウイルスDNAは、一般的に宿主の寿命を通じて潜伏状態で感覚神経に保持される。特定の刺激は、末梢部位への、ウイルス子孫の随伴性逆軸策輸送を伴う、門脈の入口または入口付近での、ウイルス複製の再活性化を引き起こす。潜伏性ウイルスゲノムの周期的な再活性化はウイルスの複製を生じ、しばしば、再発性疾患を引き起こす。しかし、再活性化がいつも再発性疾患を生じるとは限らない。感染した被験体の一部(HSV-2およびHSV-1について、それぞれ、60%および30%)のみが再発性疾患を発症する。HSV感染は、その後、体液性免疫およびT細胞媒介性免疫の発達が続く。感染した被験体は、ウイルス特異的抗体(IgGおよびIgM)の相対的に高い力価ならびにT細胞応答(その寿命の間持続する)を有し、そして感染の結果は、免疫状態によって影響され、免疫抑制された個体は、重篤な消耗性疾患を持続する。

10

【0005】

再発性HSV-2病変は、再発性疾患のモルモットモデル(Iwasakara、1983、Infect. Immun. 42:955-964)および感染した患者の両方において、ウイルス特異性T細胞応答の一過性の下方調節に関連する。ヒト患者において、T細胞の下方調節は、最初にニューロンのウイルス再活性化の時点で、前徴の間(病変の発生の1~2日前)に見られ、症状がはっきりし始めたとき、病変の発症の3~5日後でもはや見られなかった。Th2サイトカイン(例えば、IL-6およびIL-10)の増加したレベルならびにTh1サイトカイン(例えば、インターフェロン(IFN-))レベルに随伴した減少によって明らかのように、下方調節は、2型(Th2)集団(下方調節機能を有する)を優先する、HSV特異的Tヘルパー細胞のバランスにおける移行を反映するようである。

20

【0006】

Th1サイトカイン遺伝子の同時投与は、DNA予防ワクチンの能力を増強させることが示された(Sinら、1999、J. Immunol. 162:2912-2921)。しかし、これらの因子がいくつかのHSV疾患(例えば、角膜炎(Niemialtowskiら、1992、J. Immunol. 149:3035-3039)またはHSVに関連する多形性紅斑(Jonesら、2000、J. Gen. Virol. 81:Pt 2:407-414)の病因に寄与するので、Th1サイトカインまたはIL-12の投与は、再発性疾患の発症を予防する見込みのあるアプローチではなく、そしてこの状況におけるこれらの投与は、免疫病原性HSV疾患の増加した重篤度に至る(Kanangataら、1996、J. Immunol. 156:1110-1116)。さらに、潜伏的に感染した三叉神経節におけるウイルスの再活性化は、CD8+細胞傷害性T細胞(CTL)によって最も効果的に阻害され(Liuら、2000、J. Exp. Med. 191:1459-1466)、Th1サイトカイン単独の投与が再発性疾患を予防しないことを示す。しかし、例えそうであったとしても、ウイルスタンパク質(ICP47)によって妨害されるので、CD8+ CTLは、HSV感染によって不完全に誘導される(Jugovicら、1998、J. Virol. 72:5076-84)。

30

40

【0007】

Pachukら(米国特許第5,958,895号)は、改善されたHSVワクチンプロトコルの設計について、主にTh1から主にTh2へ免疫応答を移行させる構築物を開示する。Pachukらはさらに、Th2応答がワクチンの改善された保護を提供することを提示する。しかし、再発性疾患の減少について所望された応答の徴候は提供されない。

【0008】

Ghiasiらは、CD8+ CTL細胞を含むCD4+が、両方ともHSV-1に対す

50

る保護に關与することを見出した (G h i a s i ら、2000, Br. J. O p h t h a l m o l . 84 (4) : 408 - 12)。G h i a s i (米国特許第6,193,984号) はまた、H S V タンパク質の複合体混合物が、H S V に感染した動物において見出されるレベルより低いレベルで、抗体を生成するために使用され得ることを見出した。

【0009】

ワクチン組換え体の研究は以下を示した：(i) グリコシル化関連エピトープが、ウイルス糖タンパク質による保護的免疫の誘導に重要であること、(ii) 保護は、非構造的H S V タンパク質を含むワクチン接種によって達成されること、(iii) 保護的免疫の発達は、組換えベクターの構造に基づく「関連性のある」抗体提示に依存すること、ならびに(iv) 致死的なH S V - 2疾患からの防護および皮膚からの高用量H S V - 2のクリ
アランスは、主にウイルス特異的1型Tヘルパー(T h 1)免疫応答の機能であるが、C
D 8 + C T L もまた關与すること(W a c h s m a n ら、1992, V a c c i n e
10 : 447 - 454)。再発性疾患を予防する際のウイルス特異的免疫応答の役割は明
らかでない。抗原コードプラスミドD N A を用いる免疫化は、いくつかのモデルにおいて
防護的免疫を誘導するが、他のモデルにおいては、免疫は不完全であることを示した。

10

【0010】

治療ワクチンについては相対的にほとんど知られていない。サブユニット調製物は、再発
性疾患における症状の頻度および重篤度の適度な減少を引き起こし、そしてウイルスの出
芽(s h e d d i n g)の発生率を減少させたが、これらの効果は、強力なアジュバント
の同時投与に依存した(H o ら、1989, J. V i r o l . 63 : 2951 - 2958
)。累積病変スコアにおける最小減少(36%)は、1つ(別ではない)の経路によって
与えられる、g H 欠失H S V 組換え体で見られ(B o u r s n e l l ら、1997, J.
I n f . D i s . 175 : 16 - 25)、そしてこの免疫応答の役割は、まだ明らかでない。

20

【0011】

I C P 10 P K は、I C P 10 遺伝子のプロテインキナーゼ(P K)ドメインにおいて
欠失を有する変異体H S V - 2ウイルスである。この変異体およびそのワクチンとしての
特性は、米国特許第6,013,265号、同第6,054,131号および同第6,2
07,168号に記載されている。I C P 10 P K 変異体は、新生物形成転換を引き起
こさず、分裂促進性/増殖性R a s / M E K / M A P K 経路を活性化できない(A u r e
l i a n ら、1999, V a c c i n e 17 : 1951 - 1963; S m i t h ら、2
000, J. V i r o l . 74 : 10417 - 10429)。H S V - 2が、感染した患
者において大規模な過剰増殖性病変を引き起こし得ることを、最近の研究は示すので(B
e a s l e y ら、1997, J. A m . A c a d . D e r m a t o l . 37 : 860 - 8
63)、この特性は臨床的に重要である。

30

【0012】

I C P 10 P K は、免疫系への提示のための広範な抗原性範囲を保持する。I C P 10
P K は、マウスモデルにおいてH S V 特異的体液性免疫およびT細胞免疫を誘導し(A
u r e l i a n ら、1999, V a c c i n e 17 : 1951 - 1963)、そしてモ
ルモットにおいてD T H 応答を誘導する(W a c h s m a n ら、2001, V a c c i n
e 19 : 1879 - 1890)。しかし、H S V - 2感染動物の免疫が、既存のウイルス
特異性免疫応答を調節し得(T h 1またはT h 2様プロファイルの増加したレベルに指
向される)、そしてこの調節が抗原性刺激の形態に依存することが、ますます明らかにな
っている(M o h a m e d i ら、2000, V a c c i n e 18, 1778 - 1792
)。I C P 10 P K が、再発性疾患の発症を予防すること(すなわち、治療ワクチンで
あること)が本明細書中に示されるので、これは、疱疹の再発性疾患および他のウイルス
性疾患(ここで、ウイルスが周期的に再発するか、または長期間にわたって存在する)を
減少させ得る他の構築物の選択を導くための唯一のモデルを提供する。とりわけ、H I V
、サイトメガロウイルス、肝炎ウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウ
イルスおよびエプスタイン-バーウイルスである。

40

50

【0013】

再発性疾患を改善する有用な治療ワクチンが同定され、そして使用され得るメカニズムを提供することが、当該分野において長い間必要だと感じられている。本発明は、この必要性を満たしている。

【0014】

(発明の簡単な要旨)

本発明は、動物においてTh1応答を誘導することによって、潜伏性に感染した動物において、再発性のウイルス性疾患の症状を予防するか、または減少させることに関する。

【0015】

(発明の詳細な説明)

本発明は、特定の免疫応答(すなわち、Tヘルパー細胞1型(Th1)応答)を誘発することを教示する。さらに詳細には、本発明は、Th2応答と比較して、Th1応答における増加を誘発する方法を教示する。さらに、本発明は、Th2応答と比較して、Th1応答における増加を誘発する化合物、およびこのような化合物の同定法を教示する。このような応答は、典型的には、1つ以上の以下の応答を含む:優先的なTh1応答を反映するウイルス特異的な免疫グロブリンサブクラスの増加した比、IFN / IL-10の増加した比、増加したIL-12レベル、および増加したCD8+CTLレベル。これらは、潜伏性感染する病原に対して特異的であり、それによって、病原の再活性化に関連する疾患症状の再発から潜伏性感染した動物を保護する。マウスにおける優先的なTh1応答を反映するウイルス特異的な免疫グロブリンサブクラスの増加した比は本明細書中に記載されるように、IgG2a / IgG1比を増加させる。しかし、ヒトおよび他の動物において、応答の免疫グロブリンおよびそれらの比は、変動し得、以下の比を含み得ることが可能である: IgG1 / IgG4、IgG2 / IgG4、IgG3 / IgG4、(IgG1 + IgG2 + IgG3) / IgG4、(IgG1 + IgG2 + IgG3) / IgG5、IgG1 / IgE、IgG2 / IgE、またはIgG3 / IgE。代表的には、このような病原は、代表的には、サイクルにおける潜伏段階および活性段階にあるウイルスである。このような病原の例としては、限定されないが、以下が挙げられる:単純性疱疹ウイルス(HSV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、エプスタイン-バーウイルス(EBV)、ヒトパピローマウイルス(HPV)、サイトメガロウイルス(CMV)、水痘-帯状疱疹ウイルス(VZV)およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)。

【0016】

1つの特定の実施形態において、本発明は、ICP10PKドメインを欠く生きたHSV-2、従って、関連したプロテインキナーゼおよびオンコジーン活性を教示し、このオンコジーン活性は、固有の免疫応答を誘発し、この固有の免疫応答は、生きた野生型HSV-2に感染した患者において保持され、この固有の免疫応答は、この保護的な固有免疫応答をも誘発し得る他のウイルス、化合物、組成物、薬剤または分子を同定するためのアッセイにおいて使用され得る。それゆえに、HSV感染および再発性疾患に対する免疫に関連する特異的な免疫応答を誘発するための新規な方法ならびにこの免疫応答を誘発する薬剤を同定する新規な方法が開発されてきた。

【0017】

本発明の1つの実施形態において、HSV、あるいはICP6PKまたはICP10PKタンパク質を欠くHSV由来のタンパク質の混合物は、優先的なウイルス特異的Th1応答を誘発する免疫刺激剤もしくはアジュバントとともにまたはなしで投与される。このようなタンパク質はまた、優先的なウイルス特異的Th1応答と誘導するための免疫刺激剤もしくはアジュバントの存在下もしくは非存在下で、HSV DNAあるいはICP6PKもしくはICP10PKタンパク質をコードするDNAを欠く、HSVタンパク質をコードするDNAまたは核酸の混合物を投与することによって、間接的に投与され得る。いずれかの場合において、ウイルス特異的Th1応答は、優先的なTh1応答(例えば、マウスにおけるIgG2a / IgG1またはヒトにおけるIgG1 / IgG4、IgG2 / IgG4、IgG3 / IgG4、(IgG1 + IgG2 + IgG3) / IgG4、(Ig

10

20

30

40

50

$G 1 + I g G 2 + I g G 3$) / $I g G 5$ 、 $I g G 1 / I g E$ 、 $I g G 2 / I g E$ 、もしくは $I g G 3 / I g E$) を反映するウイルス特異的免疫グロブリンサブクラスの比を、投与前より少なくとも 15%、好ましくは、少なくとも 25% 増加させ、従って、再発性疾患を減少させるための方法を提供することを含む。なおさらに好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 50% である。より好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 75% である。最も好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 95% である。本明細書中に提供される開示に基づいて、 $T h 1$ 応答は、免疫グロブリンサブクラスおよび比の両方において、異なる種の間で変動し得、応答を決定し測定するための適切な技術を使用することができることを当業者は知る。

【0018】

1つ以上の増加した免疫グロブリンの比、増加した $C D 8 + C T L$ レベル、および増加した $I L - 1 2$ レベルに加えてまたはその代わりに、ウイルス特異的 $T h 1$ 応答は、ウイルス特異的 $I F N / I L - 1 0$ の比における増加を含み得、その比は、 T 細胞のインビトロでの培養物または血液レベルのいずれかによって測定した場合、投与前の比を少なくとも 15%、好ましくは少なくとも 25% 超え、従って、再発性疾患を減少させる方法を提供する。なおさらに好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 50% である。より好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 75% である。最も好ましい実施形態において、比における増加は、少なくとも 95% である。

【0019】

1つ以上の増加した免疫グロブリンの比、 $I F N / I L - 1 0$ の比、および $C D 8 + C T L$ レベル、に加えてまたはその代わりに、ウイルス特異的 $T h 1$ 応答は、 $I L - 1 2$ レベルにおける増加を含み得、このレベルは、樹状細胞のインビトロでの培養物または血液レベルのいずれかによって測定する場合、投与前の比より少なくとも 15%、好ましくは少なくとも 25% 超え、従って、再発性疾患を減少させる方法を提供する。別の実施形態において、増加は、少なくとも 50% である。より好ましい実施形態において、増加は、少なくとも 75% である。最も好ましい実施形態において、増加は、少なくとも 95% である。

【0020】

1つ以上の増加した免疫グロブリンの比、 $I F N / I L - 1 0$ 比、および $I L - 1 2$ レベルに加えてまたはその代わりに、ウイルス特異的 $C D 8 + C T L$ レベルは、少なくとも 15%、より好ましくは少なくとも 25%、投与前のレベルを超えて増加され、従って、再発性疾患を減少させる方法を提供する。別の実施形態において、増加は、少なくとも 50% である。より好ましい実施形態において、増加は、少なくとも 75% である。最も好ましい実施形態において、増加は、少なくとも 95% である。

【0021】

優先的な $T h 1$ 応答を反映する免疫グロブリンサブクラスにおける相対的な増加 (例えば、マウスにおいて見られる $I g G 2 a / I g G 1$ 、またはヒトにおける $I g G 1 / I g G 4$ 、 $I g G 2 / I g G 4$ 、 $I g G 3 / I g G 4$ 、 $(I g G 1 + I g G 2 + I g G 3) / I g G 4$ 、 $(I g G 1 + I g G 2 + I g G 3) / I g G 5$ 、 $I g G 1 / I g E$ 、 $I g G 2 / I g E$ 、もしくは $I g G 3 / I g E$ 、 $I F N / I L - 1 0$ の比、 $I L - 1 2$ レベル、および $C D 8 + C T L$ レベル) は、同じである必要はないが、全てが同程度まで増加することが好ましい。

【0022】

$I C P 1 0 P K$ は、 $I C P 1 0$ 遺伝子のプロテインキナーゼ ($P K$) ドメインにおいて欠失を有する変異体 $H S V - 2$ ウイルスである。この変異体およびワクチンとしてのその性質は、米国特許第 6, 013, 265 号、同第 6, 054, 131 号、および同第 6, 207, 168 号に記載されている。 $H S V - 2$ 変異体 $I C P 1 0 P K$ は、これらの免疫特性を誘発するタンパク質の混合物を提供する 1 つの公知の方法である。米国特許第 6, 013, 265 号、同第 6, 054, 131 号、および同第 6, 207, 168 号は、本明細書中でその全体が記載されているかのように、参考として援用される。

10

20

30

40

50

【0023】

ICP6PKは、HSV-2におけるICP10PKのHSV-1アナログである。HSV-1、HSV-1由来のタンパク質を有する再発性感染を処置するために、ICP6PK以外が、HSV-2に関して本明細書中に記載されるような同様の様式において使用され得る。本発明は、ICP6PKまたはICP10PKが存在しない、全てのHSV株由来のHSVタンパク質の全ての混合を含むように解釈されるべきである。

【0024】

本発明において、ICP10PKが存在しないHSVタンパク質の混合物を用いるマウスの処置は、HSV-2を有する動物の処置よりも、HSV-2誘発に対するリンパ節細胞応答に関する異なる効果を導くことを示す。処置されたマウス由来のリンパ節細胞は、HSV-2を用いて実質的に誘発される場合、ICP10PKを含むHSV-2タンパク質を用いて前処理した動物由来のリンパ節細胞より、大きいレベルのIFN- γ およびより低いレベルのIL-10を分泌する。IFN- γ 対IL-10の比はまた、ICP10PKを欠くHSVタンパク質で処置した動物由来の細胞においてより高い。さらに、これらは、ウイルス特異的Th1応答を示すウイルス特異的IgG抗体(IgG2a/IgG1比)の型の血清レベルを示す。さらに、それらは、ウイルス特異的CD8+CTLの増加したレベルを示す。これらのデータは、適切に選択したHSVタンパク質混合物(ICP10PKが存在しない)を用いたインビボでの前処理は、Th1応答に対するウイルス特異的な免疫応答をゆがめ、再発性疾患の減少をもたらすことを示す。

【0025】

本発明は、HSVタンパク質を有する、適切に選択された混合物(ICP6PKまたはICP10PKが存在しない)を用いた動物の前処理によって誘導されるウイルス特異的Th1応答が、樹状リンパ節細胞によるIL-12の増加した産生に続くHSV感染に基づくことをさらに示す。

【0026】

本発明の別の実施形態において、HIV感染を処置するために、HIV-1Env、gp41、およびGagタンパク質、またはこれらのタンパク質をコードするDNAの混合物の投与は、本発明において固定される変更された免疫グロブリンの比、IFN- γ /IL-10の比、IL-12またはCD8+CTLレベルを達成するために使用され得る(Ngo-Giang-Huongら、2001、AIDS Res. Hum. Retroviruses 17:1435-1446)。

【0027】

CMV感染を処置するための別の実施形態において、ホスホプロテインpp65およびgBタンパク質、またはこれらのタンパク質をコードするDNAの混合物の投与は、密体(dense body)または密体をコードするDNAに加えて、本発明において同定される免疫グロブリンの比、IFN- γ /IL-10の比、IL-12またはCD8+CTLレベル)を変更させるために使用され得る(Pepperlら、2000、J. Virol. 74:6132-46)。

【0028】

C型肝炎感染を処置するための、なお別の実施形態において、Core、120、ヘリカーゼ、NS3、NS4およびNS5タンパク質、またはこれらのタンパク質をコードするDNAの混合物の投与は、本発明中に定義される免疫グロブリンの比、IFN- γ /IL-10の比、IL-12またはCD8+CTLレベルを変更するために使用され得る(Alvarez-Oregonら、2001、Vaccine 19:3940-3946; Hempelら、2001、J. Med. Virol. 64:340-349)。

【0029】

ヒトパピローマウイルス感染を処置するための実施形態において、HPV-16E2タンパク質のC末端ドメインおよびN末端ドメインならびにヒトパピローマウイルス(HPV)16型のaa6~35タンパク質またはこれらのタンパク質をコードするDNAの混合物の投与は、本発明中で同定される免疫グロブリンの比、IFN- γ /IL-10の比、I

10

20

30

40

50

L-12またはCD8+ CTLレベルを変更するために使用され得る(Bontkesら、1999、J. Gen. Virol. 80:2453-2459; de Gruijlら、1996、Int. J. Cancer. 68:731-738)。

【0030】

エプスタイン-バーウイルス感染を処置するための、なお別の実施形態において、EBNA1およびEBNA3タンパク質またはこれらのタンパク質をコードするDNAの混合物の投与は、本発明中で同定される免疫グロブリンの比、IFN / IL-10の比、IL-12またはCD8+ CTLレベルを変更するために使用され得る(Bickhamら、2001、J. Clin. Invest. 107:121-130)。

【0031】

水痘帯状疱疹ウイルス感染を処置するための実施形態において、糖タンパク質gEまたは糖タンパク質gEをコードするDNAの混合物の投与は、本発明中で同定される免疫グロブリンの比、IFN / IL-10の比、IL-12またはCD8+ CTLレベルを変更するために使用され得る(Hasanら、2000、Vaccine 18:1506-14)。

【0032】

本発明は、用語「タンパク質を投与する」とは、タンパク質を直接的に投与することのみを意味するように限定されると解釈されるべきではない。本発明はまた、タンパク質の間接的な投与(例えば、DNAまたはタンパク質をコードする単離された核酸が投与される場合)を意味すると解釈されるべきである。

【0033】

被験体を免疫することは、当該分野で周知の標準的な解釈、ならびに病原ウイルスで潜伏性感染した被験体における再発性疾患の症状を低減するための、本明細書中に開示される本発明の組成物および方法の治療用途を示す。

【0034】

本発明はまた、潜伏性感染する病原に対するTh1免疫応答を誘導する薬剤の同定またはスクリーニングの方法、ならびに動物(好ましくは、ヒト)に対してこのような組成物を投与して、このような応答を誘導し、それによって、動物に対して他の病原に関連する再発性疾患を予防する方法を含む。代表的には、このような他の組成物は、本明細書中に提供される開示に基づいて、変異体ウイルス系統またはタンパク質の混合物を調製すること

【0035】

ヒトに使用するためのウイルス特異的Th1免疫応答を誘導する薬剤の処方は、安定化成分の存在下または非存在下、ならびに免疫刺激剤およびアジュバントの存在下または非存在下で、溶液中に懸濁することによって達成される。安定化剤、免疫刺激剤およびアジュバントの例としては、とりわけ、ミョウバン、油/水乳濁液、サポニン、不完全なフロイントのアジュバント、MR-59(Chiron Corp., Emeryville, CA)、MTPPE、およびMPL(モノホスホリル脂質A)が挙げられる。このような安定化剤、アジュバントおよび免疫刺激剤は、当該分野で周知であり、単一または組み合わせて使用され得る。ヒトにおけるIgG2またはマウスにおけるIgG2aの産生を際

【0036】

本発明の組成物は、任意の動物(魚、両生類、鳥および哺乳動物を含む)(ここで、哺乳動物としては、サル、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない)に投与され得る。この組成物は、任意の適切な投与様式(例えば、筋内、経口、皮下、皮内、腔内、直腸、または経鼻投与)を介して投与され得る。投与の好ましい様式は、経口、静脈内、皮下、筋内または皮内投与である。最も好ましい様式は、非経口(皮下投与を含む)である。

【0037】

投与の頻度(必要な場合、追加免疫を含む)および免疫化に関連する他の技術は、当業者

10

20

30

40

50

に周知であり、そうでなければすでに記載されるかまたは決定された技術が、過度の実験なしにそのようになされ得る。例えば、適切な免疫予防の、非毒性の、そして固有の免疫応答を誘導する量の本発明の組成物は、従来のワクチンにおける有効量の範囲の抗原であり得る。しかし、任意の特定の被験体に対する特定の用量レベルは、種々の因子（年齢、全身的健康、性別、および非検体の食餌を含む）に依存することが理解される。用量レベルに影響を与える他の因子としては、限定されないが、以下が挙げられる：投与時間、投与経路、投与される任意の他の薬物との相乗的な、添加の、または拮抗性の相互作用、および保護の量または探索された免疫応答の誘導レベル。例えば、組み合わせワクチンにおいて、本発明のワクチンの用量は、他のワクチン成分の干渉を停止させるように増加することが必要であり得る。

10

【0038】

本発明の組成物、例えば、HSV-2変異体、ICP10 PKを含む治療ワクチンは、当業者に周知の方法を用いて、他のワクチンと組み合わせて使用され得る。他のワクチンとしては、限定されないが、以下が挙げられる：肝炎、エプスタイン-バーウイルス、ヒトパピローマウイルス、天然痘ウイルス、HIV、水痘、おたふく風邪、および麻疹のようなウイルスまたは疾患に対するワクチン。HSVに暴露する種々の方法および後に続くワクチンまたはワクチンの組み合わせの投与が含まれ、当業者に周知の方法を用いて決定され得、これらは、本明細書中に提供される開示に基づく。例えば、HSVまたは変異体HSVに対する被験体の暴露の後、被験体は、HSVワクチンおよび他のウイルスワクチン（HSV-1、HSV-2、HSV-1の変異体、HSV-2の変異体、なら

20

【0039】

変異体ウイルスまたはウイルス特異的Th1免疫応答を誘導する他の薬剤は、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤とともに投与され得る。このような薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤の例としては、水、リン酸緩衝化生理食塩水または炭酸水素ナトリウム緩衝液が挙げられる。多くの他の受容可能なキャリアまたは希釈剤もまた、当該分野で公知である。

【0040】

それゆえに、本発明は、HSVおよび他の潜伏性感染ウイルス病原に対する新規または固有の免疫応答、この応答を誘導するための新規の方法、この応答を誘導する薬物を同定するための新規の方法、ならびに再発性ウイルス疾患を改善させるための新規な方法を開発した。

30

【0041】

(定義)

本明細書中で使用される冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、1つまたは1つより多い(すなわち、少なくとも1つ)の冠詞の文法上の対象をいう。例としては、「1つの要素(an element)」は、1つの要素または1つより多い要素を意味する。「複数の」は、少なくとも2つを意味する。

40

【0042】

本明細書中で使用される場合、用語「約」または「少なくとも」は、記載される数よりも約5%少ないかまたは多いことを意味するために使用される。すなわち、「少なくとも25%」は、「少なくとも20~30%」を意味するが、語句「少なくとも」によって規定される任意の範囲に限定されない。

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「改善する」は、感染または疾患の症状を改良または減らす処置、ならびに再発性疾患の活性段階に関連する症状の発生を防ぐかまたは減らす処置をいう。改善は、再発性の重篤度ならびに疾患の再発の発生率を減らすことの両方を含む。「再発性疾患を改善する」は、「再発性疾患を減らす」と交換可能に使用される。

50

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「同時投与する」は、前、同時、または後を意味する。

【0045】

本明細書中で使用される場合、「サイトカイン」は、細胞間シグナル伝達分子をいい、この最も公知の分子は、哺乳動物体細胞の調節に関連する。サイトカインの多くのファミリー、それらの効果における増殖を促進することおよび増殖を阻害することの両方は、以下を含むことを特徴とする：例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9（P40）、IL-10、IL-11、IL-12およびIL-13）；CSF型サイトカイン（例えば、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LIF、EPO、TNF- およびTNF- ）；インターフェロン（例えば、IFN-、IFN-、およびIFN- ）；TGF- ファミリーのサイトカイン（例えば、TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3、インヒピンA、インヒピンB、アクチピンA、およびアクチピンB）；走化性因子（例えば、NAP-1、MCP-1、MIP-1、MIP-1、MIP-2、SIS、SIS、SIS、PF-4、PBP、IP-10、およびMGSA）；増殖因子（例えば、EGF、TGF-、aFGF、bFGF、KGF、PDGF-A、PDGF-B、PD-ECGF、INS、IGF-I、IGF-II、およびNGF- ）；型インタークリンサイトカイン（例えば、IL-8、GRO/MGSA、PF-4、PBP/CTAP/TG、IP-10、MIP-2、KC、および9E3）；ならびに型 20
インタークリンサイトカイン（例えば、MCAF、ACT-2/PAT、744/G26、LD-78/PAT 464、RANTES、G26、I309、JE、TCA3、MIP-1、BおよびCRG-2）。多くの他のサイトカインはまた、当業者に公知である。これらのサイトカインの供給源、特性、標的およびエフェクター活性が記載されている。

【0046】

本明細書中で使用される場合、「疾患」は、動物が恒常性を維持することができない動物の健康状態である。

【0047】

用語「疱疹」は、単純性疱疹ウイルスに関連する疾患を意味する。 30

【0048】

抗原に対して「免疫する」との用語は、被験体に対して、組成物、タンパク質複合体、タンパク質複合体をコードするDNA、抗体または抗体をコードするDNA、タンパク質または抗体をコードするファージ含有DNA、あるいはその表面でタンパク質または抗体を発現するファージを投与し、被験体における免疫応答を誘発することを意味する。好ましくは、免疫応答は、被験体に、抗原または抗原を発現する生物体によって引き起こされる疾患に対する保護を提供する。

【0049】

本明細書中で使用されるような「単離された核酸」は、天然に生じる状態においてフランキングし、配列から分割された核酸セグメントまたはフラグメントをいう。この用語はまた、自然に核酸（例えば、RNAまたはDNA）に付随する他の成分またはタンパク質（細胞中で自然に核酸に付随する）から実質的に精製された核酸をいう。 40

【0050】

本発明は、使用される核酸の性質によって限定されることを意図しない。標的核酸分子は、ネイティブまたは合成された核酸分子であり得る。核酸分子は、ウイルス、細菌、動物、ファージ、または植物源由来であり得る。核酸は、DNAまたはRNAであり得、二本鎖、一本鎖、もしくは部分的に二本鎖の形態で存在し得る。さらに、核酸は、ウイルスまたは他の高分子の一部に見い出され得る。例えば、Fasbenderら、1996、J. Biol. Chem. 272: 6479-89を参照のこと。

【0051】

本発明において有用な核酸としては、例としてであって限定ではないが、以下が挙げられる：オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド；遺伝子治療のためのDNA；ウイルスDNAおよび/またはRNAを含むウイルスフラグメント；DNAおよび/またはRNAキメラ；mRNA；プラスミド；コスミド；cDNA；遺伝子フラグメント；一本鎖DNA、二本鎖DNA、高次コイルDNAおよび/または三重らせんDNAを含むDNAの種々の構造形態；Z-DNAなど。核酸は、代表的に核酸を大量に調製するために使用される任意の従来的手段によって調製され得る。例えば、DNAおよびRNAは、当該分野で周知の方法によって、市販の試薬および合成機を用いて化学的に合成され得る。RNAは、プラスミドを用いて、インビトロ転写を介して、高収率で生成され得る。

【0052】

いくつかの状況において、増加したヌクレアーゼ安定性が望ましい場合、改変されたヌクレオシド間結合を有する核酸が望ましくあり得る。改変されたヌクレオシド間結合を含む核酸はまた、当該分野で周知の試薬および方法を用いて合成され得る。例えば、以下を含む核酸を合成するための方法が、当該分野で周知である：ホスホネートホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミデートメトキシエチルホスホラミデート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、ジソプロピルシリル、アセトアミデート、カルバメート、ジメチレンスルフィド(-CH₂-S-CH₂)、ジメチレンスルホキシド(-CH₂-SO-CH₂)、ジメチレンスルホン(-CH₂-SO₂-CH₂)、2'-O-アルキル、および2'-デオキシ-2'-フルオロホスホロチオエートヌクレオシド間結合(Uhlmannら、1990、Chem. Rev. 90:543-584；Schneiderら、1990、Tetrahedron Lett. 31:335およびこれらの中で引用される参考文献を参照のこと)。

【0053】

核酸は、当該分野で周知のように、任意の適切な手段によって精製され得る。例えば、核酸は、逆相HPLCまたはイオン交換HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、あるいはゲル電気泳動によって精製され得る。もちろん、精製方法は、精製されるDNAのサイズに部分的に依存することを、当業者は理解する。核酸との用語はまた、具体的には、5つの生物学的に生じる塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシン、およびウラシル)以外の塩基で構成される核酸を含む。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、活性成分が組み合わされる化学組成物、およびその後の組み合わせが、被験体に対して活性成分を投与するために使用され得る組成物を意味する。

【0055】

「ポリペプチド」は、アミノ酸残基で構成されるポリマー、関連する天然に生じる構造改変体、およびペプチド結合を介して連結される、その合成的な非天然に生じるアナログ、関連する天然に生じる構造改変体、ならびにその合成的な非天然に生じるアナログをいう。合成ポリペプチドは、例えば、自動化ポリペプチド合成機を用いて合成され得る。

【0056】

用語「タンパク質」とは、代表的に、大きいポリペプチドまたは転写後変更されたポリペプチドをいう。

【0057】

用語「ペプチド」とは、代表的に、短いポリペプチドまたは転写後変更されたポリペプチドをいう。

【0058】

用語「再発性疾患」は、本明細書中で使用される場合、潜伏性ウイルスの再活性化後に生じるかまたは再発する疾患症状を意味する。

【0059】

「治療的」とは、本明細書中で使用される場合、疾患を有するかまたは疾患の徴候を示す被験体に投与される、有利な効果を提供するに十分である処置をいう。有利な効果として

10

20

30

40

50

は、再発性疾患を低減するような効果が挙げられる。予防的 (p r o p h y l a c t i c または p r e v e n t i v e) 処置またはワクチンは、感染を予防する目的で、疾患を有しも疾患の徴候を示しもしない被験体に投与され、この疾患に関連する病理を発症する危険性を減少させるものである。

【 0 0 6 0 】

用語「ワクチン」は、本明細書中で使用される場合、動物に接種される場合に疾患またはその症状に対して動物を完全または部分的に保護するように働く、動物における免疫応答を刺激する効果を有する組成物を意味する。用語ワクチンは、予防的ワクチンまたは治療ワクチンを包含する。併用ワクチンは、2以上のワクチンを組み合わせるワクチンである。

10

【 0 0 6 1 】

(実施例)

以下に示される実施例は、さらなる手引きとして当業者に提供され、本発明のさらなる理解を容易にし、そしていかなるようにも本発明の限定として解釈されるべきではない。これらの実施例は、本発明の例示であり、限定ではない。

【 0 0 6 2 】

本明細書中に示される実施例 1 ~ 4 に使用された材料を、ここで記載する。

【 0 0 6 3 】

5 週齢の S w i s s W e b s t e r マウスまたは B A L B / c マウスを使用し、これらは、C h a r l e s R i v e r L a b s、W i l m i n g t o n、M A から入手した。これらのマウスは、H S V - 2 についての標準的な動物モデルであるので選択した。抗 I F N - 抗体 (R 4 - 6 A 2)、抗 I L - 1 0 抗体 (J E S 5 - 2 A 5)、ビオチン化抗 I F N - 抗体 (X M G 1 . 2)、抗 I L - 1 2 抗体 (C 1 5 . 6)、ビオチン化抗 I L - 1 2 抗体 (C 1 7 . 8) および抗 I L - 1 0 抗体 (L E S S - 1 6 E 3) を、P h a r m i n g e n、S a n D i e g o、C A から入手した。ヤギ抗マウス I g G、I g G 1 および I g G 2 a ならびにマウス抗ヒト I g G 1 および I g G 2 を、S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e s、I n c .、B i r m i n g h a m、A L から入手した。抗体コーティングした D y n a b e a d s を、D y n a l、O s l o、N o r w a y から入手した。組換えマウス I L - 1 2 を、P h a r m i n g e n から入手した。ニトロセルロールメンブレン (M i l l i t i t e r H A) を、M i l l i p o r e、B e d f o r d、M a s s a c h u s e t t s から入手した。H S V - 2 抗原を、S o u t h e r n B i o t e c h n o l o g y A s s o c i a t e s、I n c .、B i r m i n g h a m、A L から入手した。

20

30

【 0 0 6 4 】

(実施例 1 . I C P 1 0 P K によって誘発される H S V 特異的免疫応答は、優勢な T h 1 パターンを証明する)

本実施例に示される実験において使用した方法を、ここで記載する。

【 0 0 6 5 】

マウス (S w i s s W e b s t e r、5 週齢、C h a r l e s R i v e r) に、H S V - 2 (1×10^6 プラーク形成単位 (p f u)) または I C P 1 0 P K (3×10^6 p f u) を、足蹠で皮下接種することによって感染させた。これらに、10 日間の間隔を開けて、2 回または 3 回の注射を与えた。膝窩リンパ節細胞 (L N C) を、最後の注射の 3、5 および 10 日後に回収し、そして $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の H S V - 2 抗原と共に、R P M I - 1 0 % F C S (完全培地) 中で培養した (4×10^6 細胞 / ml)。インターフェロン - (I F N -) を分泌する細胞 (T h 1) またはインターロイキン 1 0 (I L - 1 0) を分泌する細胞 (T h 2) を、培養の 1 ~ 5 日目に、E L I S P O T アッセイにおいて同定した。新たに単離した L N C をまた、E L I S P O T アッセイを使用して、I F N - または I L - 1 0 を分泌する細胞について研究した。また、いくつかの実験において、この L N C を、抗体コーティング磁石ビーズ (D y n a b e a d s ; D y n a l、O s l o、N o r w a y) を使用して、C D 4 + または C D 8 + T 細胞を枯渇させ、H S V -

40

50

2 抗原 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と共に培養し、そして ELISPOT によって上記のようにアッセイした。

【0066】

ELISPOT アッセイを、以前に記載されたように実施した。簡潔には、ニトロセルロースメンブレン基部を含む 96 ウェルプレート (Millititer HA、Millipore) を、PBS 中 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$) の濃度で抗 IFN- γ mAb (R4-6A2: Pharmingen, San Diego, CA) または抗 IL-10 mAb (JES5-2A5: Pharmingen) を用いて、4 日に一晩コーティングした。ウェルを PBS で 2 回洗浄し、次いで室温にて 1 時間、完全培地でブロッキングした。刺激または未刺激の LNC を個々のウェルに添加し (1 $\times 10^5$ 細胞/ウェル)、そして 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 時間インキュベートした。ウェルを、PBS - 0.5% Tween 20 で洗浄して (4 \times)、細胞を除去し、PBS - Tween 中 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、100 μl のビオチン化抗 IFN- γ mAb (XMG1.2: Pharmingen) または抗 IL-10 mAb (JES5-16E3: Pharmingen) と共に、室温にて 1 時間インキュベートした。PBS - Tween での洗浄後、反応を、PBS - Tween 中 1:1000 で希釈した 100 μl のアビジン - ペルオキシダーゼと共にインキュベート (30 分間; 室温) することによって進め、その後 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (AEC) を加えた。特異的サイトカインを分泌する細胞のコロニーを示すスポット (SFC) を計数し、そして 3 つの独立した実験から得られた結果を平均した。これらの結果を、SFC / 10⁵ 細胞 \pm SEM として示す。

10

20

【0067】

2 回の免疫を与えたマウス由来の LNC において、IFN- γ を分泌する細胞数は、HSV-2 および ICP10 PK の両方について、接種後 3 日目にピークに達したが、その後減少した。接種後 3 日目で、SFC / 10⁵ 細胞は、HSV-2 について 138 \pm 20 であり、ICP10 PK について 182 \pm 40 であった。しかし、IL-10 を分泌する細胞数は、感染後 3 日目および 5 日目の両方において、ICP10 PK についてよりも、HSV-2 についてより高く、その結果、IFN- γ / IL-10 SFC の比は、HSV-2 (感染後、3 日目および 5 日目において、それぞれ、2.0 \pm 0.13 および 2 \pm 0.07) よりも、ICP10 PK (感染後、3 日目および 5 日目において、それぞれ、3.8 \pm 0.38 および 4.0 \pm 0.36) について、有意に高かった。より高い IFN- γ / IL-10 SFC の比は、ICP10 PK について、感染後 10 日目でもなお観察された (ICP10 PK および HSV-2 について、それぞれ、4.4 \pm 1.1 および 2.1 \pm 0.08)。IFN- γ / IL-10 SFC の比はまた、HSV-2 (3.4 \pm 0.16) と比較して、ICP10 PK (5.3 \pm 0.39) で感染されたマウスから新たに単離された LNC において、より高かった。IFN- γ または IL-10 を分泌する細胞数は、HSV-2 感染したマウス由来の LNC および ICP10 PK 感染したマウス由来の LNC の両方について、培養物時間と共に増加し、2 ~ 3 日目に最大レベルに達し、その後減少した。培養 5 日目に、IL-10 産生細胞は、HSV-2 についてなお観察されたが、ICP10 PK については観察されなかった。この差異は、この時点での HSV-2 よりも ICP10 PK についてのより高い IFN- γ / IL-10 SFC の比に反映される。3 回の免疫を与えた動物において、感染後 10 日目に回収された LNC の IFN- γ / IL-10 SFC の比もまた、HSV-2 (1.9 \pm 0.2) よりも ICP10 PK (5.3 \pm 0.7) について、より高かった。このデータは、ICP10 PK に対するインビボの曝露が、Th1 機能を好む応答に偏向し、そして HSV-2 抗原に対するインビボの再曝露は、このバランスに負に影響しなかったことを示すと解釈され得る。

30

40

【0068】

この結果の妥当性を確認するために、上記で研究した LNC 培養物の上清を、IFN- γ および IL-10 のレベルについてアッセイした。ELISA を、捕捉抗体として、抗 IFN- γ mAb (R4-6A2: Pharmingen) および抗 IL-10 mAb

50

(JES5-2A5: Pharmingen) を使用し、検出抗体として、ビオチン化抗 IFN- γ mAb (XMG1.2: Pharmingen) および抗 IL-10 mAb (JES5-6E3: Pharmingen) を使用して実行した。組換えマウス IFN- γ および IL-10 (Pharmingen) をコントロールとして使用して、標準曲線を作製した。これらの研究の結果は、IL-10 のレベルが、HSV 刺激 (または未刺激) LNC の上清において、HSV-2 免疫した動物由来の LNC よりも、ICP10 PK 免疫した動物由来の LNC において有意に低かった (それぞれ、 4184 ± 358 および 924 ± 102 pg/ml) ことを示した。ELISPOT アッセイおよび ELISA アッセイの両方において、枯渴研究は、IFN- γ および IL-10 の両方が、CD4⁺ 細胞によって産生されることを示した。従って、HSV-2 感染マウス由来の LNC における、サイトカイン分泌細胞コロニーの数 (IFN- γ および IL-10 について、それぞれ、 77 ± 5.6 および 37.2 ± 4.2) は、CD4⁺ 細胞の枯渴によって有意に減少した (IFN- γ および IL-10 について、それぞれ、 7.6 ± 1.3 および 3.8 ± 1.0) が、CD8⁺ CTL 細胞の枯渴は、サイトカイン分泌細胞の数を減少させなかった (IFN- γ および IL-10 について、それぞれ、 70 ± 11 および 35.5 ± 5.6)。同様の結果が、上清中のサイトカインレベルについて得られた。HSV-2 感染マウス由来の LNC の培養物において、IFN- γ レベルは、非分画培養物および CD8 枯渴培養物について、 7834 ± 578 および 7608 ± 513 pg/ml であったが、CD4 枯渴培養物についてはほんの 677 ± 51 pg/ml であった。ICP10 PK 感染マウス由来の LNC の培養物における IFN- γ は、非分画培養物、CD8 枯渴培養物および CD4 枯渴培養物について、それぞれ、 4822 ± 191 、 4724 ± 493 および 512 ± 36 pg/ml であった。IL-10 レベルは、HSV-2 感染動物由来の、非分画 LNC 培養物、CD8 枯渴 LNC 培養物および CD4 枯渴 LNC 培養物について、 4184 ± 358 、 3847 ± 265 および 378 ± 3.5 pg/ml であり、そして、ICP10 PK 感染動物由来の、非分画 LNC 培養物、CD8 枯渴 LNC 培養物および CD4 枯渴 LNC 培養物について、 924 ± 103 、 869 ± 63 および 78 ± 3 pg/ml であった。動物は 2 回の注射を与えられ、かつ LNC は、感染後 1 ~ 10 日目に回収されたので、ICP10 PK に対する二次曝露は、局所的な HSV 特異的 Th1 応答を増強するようであるが、HSV-2 での同様の感染は、HSV 特異的 Th2 応答を好むようである。

10

20

30

【0069】

ICP10 PK が Th1 機能を好むという結果はまた、2 種のウイルスによって誘導される IgG 抗体の型によって支持される。マウスに、10 日間隔で 3 回、HSV-2 (10^6 pfu) または ICP10 PK (3×10^6 pfu) を足蹠において感染させた。最後の感染の 14 日後に血清を収集し、そして HSV 特異的 IgG、IgG1 (Th2 細胞に依存) および IgG2a (Th2 細胞に依存) について、ELISA によってアッセイした。簡潔には、ELISA プレートに、HSV-2 抗原 ($50 \mu\text{g/ml}$) または標準曲線のためのコントロールとして使用されるヤギ抗マウス IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) ($2 \mu\text{g/ml}$) でコーティングし、4 $^\circ\text{C}$ にて一晩インキュベートした。このプレートを、PBS-Tween で洗浄し、そして 37 $^\circ\text{C}$ にて 1 時間、PBS-10% FCS でブロッキングした。標準曲線について、IgG、IgG1 または IgG2a (Southern Biotechnology Associates) の連続希釈をコントロールプレートに添加し、一方、血清サンプルの連続希釈を HSV コーティングしたプレートに添加した。37 $^\circ\text{C}$ で 2 時間後、これらのウェルを洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化したヤギ抗マウス IgG、IgG1 または IgG2a 重鎖特異的抗体 (Southern Biotechnology Associates) を添加した。37 $^\circ\text{C}$ で 1 時間のインキュベーション後、基質 2,2'-アジノ-ビス 3-エチルペンズ-チアゾリン (thiasoline) - 6 - スルホン酸 (ABTS) を、発色のためにウェルに添加した。これらのウェルを、ELISA 2550 EIA リーダー (B

40

50

i o R a d、H e r c u l e s、C A)を用いて450nmで読み取った。HSV特異的 I g Gの総レベルは、HSV-2 (3676 ± 735 ng/ml)よりも、ICP10 PK (7581 ± 2052 ng/ml)についてより高かった。HSV特異的 I g G1のレベルは、I g G2aのレベル(ICP10 PKおよびHSV-2について、それぞれ、3338 ± 774 ng/mlおよび537 ± 99 ng/ml)同様、HSV-2についてよりもICP10 PKについてより高かった(それぞれ、381 ± 60および1609 ± 408 ng/ml)。I g G2a/I g G1の比として表されるI g Gアイソフォームのバランスは、ICP10 PKについてI g G2aを好んだが(2.1 ± 0.17)、HSV-2については好まなかった(1.41 ± 0.19)。

【0070】

(実施例2. ICP10 PK免疫は、樹状細胞による高レベルのIL-12の産生を引き起こす)

樹状細胞は、IL-12(これは、抗原に対する応答を生じる)のレベルに基づいて、免疫応答が、Th1であるかTh2であるかを決定することに関与する。高IL-12レベルは、Th1を好む応答(IFN- 産生を含む)に偏向する(Riffaubaら、2000、J. Gen. Virol. 81:2365-2373)。

【0071】

本実施例に示される実験において使用した材料および方法を、ここに記載する。

【0072】

この一連の実験を、ICP10 PK感染動物由来の樹状細胞によるIL-12産生がまた、HSV-2に感染した動物において観察されるよりも高いか否かを決定するために設計した。BALB/cマウス(5週齢、Charles River)に、10日間の間隔をあけて、HSV-2(10⁶ pfu)またはICP10 PK(3 × 10⁶ pfu)を用いて足蹠に3回注射し、そして膝窩LNCを、最後の追加免疫の24時間後に回収した。樹状細胞を、メトリザミド勾配遠心分離によって単離した。簡潔には、2mlの完全培地中14.5%のメトリザミド(Sigma, Saint Louis, MO)を、15mlのコニカル試験管の底に層状にし、そして8mlの細胞懸濁物で穏やかに重層した。遠心分離(600 × g、20分間、4)後、樹状細胞に富んだ界面を収集し、そして細胞を、HSV-2抗原(10 μg/ml)を含むかまたは含まない、25 ng/mlのGM-CSFおよび5 ng/mlのIL-4を含む、96ウェルの丸底プレート中で培養した(6 × 10⁴ /ウェル)。培養物上清を、培養の3日目および5日目に、新鮮な培地に移しかえた。最後の培地置換の12時間後、培養物上清を収集し、そしてIL-12の濃度をELISAによって測定した。このアッセイを、捕捉抗体として抗IL-12(C15.6: Pharmingen) mAbを使用し、検出抗体としてビオチン化抗IL-12(C17.8: Pharmingen) mAbを使用し、そして標準曲線についてのコントロールとして組換えマウスIL-12(Pharmingen)を使用して、上記のように実行した。このデータは、IL-12レベルが、HSV-2を与えたマウス由来の樹状細胞の培養物(17.2 ± 0.6 ng/ml)より、ICP10 PKを与えたマウス由来の樹状細胞の培養物(63.6 ± 8 ng/ml)において有意に高かったことを示す。IL-12レベルは、HSV-2抗原の存在下または非存在下でなされた培養物において類似であり、このことは、増大したIL-12産生が、(培養物中の)抗原に対するさらなる曝露に依存しないことを示した。

【0073】

(実施例3. ICP10 PKは、CD8+ CTLを誘導する)

以前の研究は、CD8+ CTL活性が、IL-12およびIFN- の増大したレベルによって増強されることを示した(McNallyら、1999、Immunology 163:675-681)。ICP10 PKが、樹状細胞によるIL-12産生の増大および増強されたTh1応答(より高レベルのIFN-)に向かう免疫応答を調節することが示されているので、これが、CD8+ CTLを好む応答に偏向するか否かを次に決定した。

10

20

30

40

50

【0074】

本実施例において示される実験に使用した材料および方法を、ここに記載する。

【0075】

BALB/cマウスを、10日間の間隔で2回感染させた。感染は、足蹠で、HSV-2 (1×10^6 pfu) またはICP10 PK (3×10^6 pfu) を用いた。ICP10のRRドメインを欠失したHSV-2変異体(ICP10 RR; 3×10^6 pfu) を、変異体ウイルスによる感染に対する非特異的影響についてのコントロールとして使用した。膝窩LNCを、最後の追加免疫の5日後に収集した。細胞(2×10^6 / ml) を、完全培地中で37°Cにて3日間培養した。非接着細胞を完全培地で1回洗浄し、エフェクターとして使用した。いくつかの実験において、LNCを、インビトロの培養の前に、抗体コーティングしたDynabeads (Dynal) を使用して、CD4+ またはCD8+ CTL細胞を枯渇させた。10%の熱不活化FCSを有するダルベッコ改変培地(DMEM)中で増殖したmKSA (H-2^d)細胞に、10PFU/細胞のHSV-2で17時間感染させ、そして100μCiの⁵¹Crで最後の16時間標識した。これらを、DMEMで洗浄し、トリプシン処理し、DMEMでさらに3回洗浄し、そして生存細胞を標的として使用した。これらを、完全培地中で再懸濁して、 2×10^5 細胞/mlの最終濃度にし、そして所望のエフェクター：標的の比(E:T)を生じるように調節された等量のエフェクターを含む、96ウェルの丸底プレート中に分配した(100ml中、 2×10^4 細胞/ウェル)。プレートを遠心分離し(200×g、2分間)、37°Cで6時間インキュベートし、そして再び遠心分離し(200×g、5分間)、そして上清液への⁵¹Crの放出を、Beckman Gamma Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA)で計数した。自然放出を、エフェクター細胞なしで標的細胞をインキュベートすることによって決定した。最大の放出を、5% SDSで標的細胞を溶解することによって決定した。特異的細胞傷害性%を、以下の式から決定した： $\% \text{特異的 } ^{51}\text{Cr 放出} = \frac{\text{実験放出} - \text{自然放出}}{\text{最大放出} - \text{自然放出}}$ 。

10

20

【0076】

ICP10 PKに感染した動物由来の非分画LNCのCTL活性(20:1で $18 \pm 1.3\%$)は、HSV-2を与えた動物由来の非分画LNCのCTL活性(20:1で $7 \pm 0.4\%$)よりも高かった。CD8+ CTL細胞の枯渇は、ICP10 PK免疫マウス由来のLNCのCTL活性の有意な減少を生じた(非分画細胞の100%に対して、80:1、40:1および20:1で、%溶解=46.7、34.1および28.7)。CD4+細胞の枯渇は、CTL活性を減少させなかった。対照的に、HSV-2感染動物由来のLNCのCTL活性は、CD4+細胞の枯渇によって減少した(非分画細胞の100%に対して、80:1、40:1および20:1で、%溶解=43.7、38.9および26.1)、CD8+細胞の枯渇は、CTL活性を減少させなかった。このデータは、ICP10 PKが、HSV-2が誘導しないCD8+ CTLを誘導することを示す。

30

【0077】

重要なことに、ICP10 RRに感染したマウス由来のLNCもまた、CTL活性を有した(20:1で $13 \pm 0.6\%$)。この活性は、HSV-2について観察されたレベルよりもいくらか低いレベルではあるものの、CD4+ T細胞の枯渇によって有意に減少した(非分画細胞の100%に対して、80:1、40:1および20:1で、%溶解=154.7、55.6および50.1)。CTL活性の最小の減少はまた、高いE:T比でのみ、CD8+細胞の枯渇によって観察され(非分画細胞の100%に対して、80:1、40:1および20:1で、%溶解=77、74および89)、HSV-2についても観察されたように、CTL活性が、CD4+細胞によって主に媒介されることを示唆する。理論に束縛されることを望まないが、このデータは、ICP10 PKタンパク質が、CD8+ CTLの誘導を妨害することを示すと解釈され得る。

40

【0078】

(実施例4. ICP10 PKは、HSV-2のHSV記憶応答と類似のHSV記憶応答を誘導する)

50

ICP10 PKが、局所的(LNC)Th1応答および全身性(血清)Th1応答(ウイルスに対する再曝露(2回目または3回目の追加免疫)の直後のCD8+ CTLを含む)の誘導を好むことが示されているので、本発明者らは、これが、長期免疫記憶を誘導し得るか否かを知ることが望んだ。この問題に対処するために、記憶CTLアッセイを使用した。

【0079】

本実施例において示される実験において使用した材料および方法を、ここに記載する。

【0080】

BALB/cマウスに、腹腔内接種によって、ICP10 PK(3×10^6 pfu)またはHSV-2(1×10^6 pfu)を感染させ、脾細胞を感染後30日目に収集した。細胞(1×10^7 /ウェル)を、24ウェルのプレートにおいて、HSV-2(5×10^5 pfu)で16時間感染させ、そしてマイトマイシンC処理($50 \mu\text{g/ml}$; 30分間)されたmKSA細胞と一緒に培養した。培養5日目に、細胞を収集し、そして上記のように行われるCTLアッセイにおいてエフェクターとして使用した。これらの結果は、記憶CTL活性が両方のウイルスについて類似であることを示し、ICP10 PKが、HSV-2が誘導する応答と類似の記憶CTL応答を誘導することを示す。

【0081】

理論に束縛されることを望まないが、これらの研究は、HSV-2に対して、ICP10 PKが、CD8+ CTLを含むHSV特異的Th1免疫の誘導を好むことを示す。この応答は、局所的(LNC)および全身性(血清)の両方であり、樹状細胞によるIL-12産生の増大によって媒介されるようである。CD8+ CTLを含むTh1は、ウイルス抗原に対する再曝露に対する迅速な応答であり、従って、再活性化された神経節ウイルスの複製を含み得、それによって再発性疾患の発症を予防する。対照的に、HSV-2に感染した動物における免疫応答は、Th2機能に向かって偏向し(おそらく、樹状細胞によるより低いIL-12産生に関連する)、そして検出可能なレベルのCD8+ CTLは存在しない。このように、再活性化された神経節ウイルスの複製は、邪魔されずに進み、再発性疾患の発症を生じる。

【0082】

(実施例5. 稀な再発を有するヒト患者におけるHSV特異的抗体は、主にIgG1である)

稀な再発性HSVを有する患者が、優勢なウイルス特異的Th1応答を有するという結論は、血清中に存在するウイルス特異的な免疫グロブリンのサブクラスによって支持される。血清を、稀なHSVの再発性感染の病歴を有する15人の被験体から収集し、そしてELISAによってウイルス特異的抗体についてアッセイした。HSV特異的IgG、IgG1およびIgG2を、実施例1に記載のようにアッセイした。簡潔には、ELISAプレートを、HSV-2抗原($50 \mu\text{g/ml}$)または標準曲線についてのコントロールとして使用されるヒトIgG(Sigma、St. Louis MO)、IgG1(Sigma)もしくはIgG2(Chemicon、Temecula、CA)の連続希釈($100 \mu\text{g/ml} \sim 2 \text{ ng/ml}$)を用いてコーティングし、4 で一晩インキュベートした。このプレートを、PBS-Tweenで洗浄し、そしてPBS-10% FCSで37 にて1時間ブロッキングした。プレートを洗浄し、そして血清(1:5および1:50で希釈)を、HSVプレートに添加した。37 で2時間後、ウェルを洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化したマウス抗ヒトIgG、IgG1またはIgG2特異的抗体(Southern Biotechnology Associates)を添加した。37 での1時間のインキュベーションおよび引き続き洗浄後、基質2,2-アジノ-ビス3-エチルペンズ-チアゾリン(thiasoline)-6-スルホン酸(ABTS)を、発色のためにウェルに添加した。これらのウェルを、ELISA 2550 EIAリーダー(BioRad、Hercules、CA)を用いて405 nmで読み取った。HSV特異的IgGの総レベルは、 $9460 \pm 3204 \text{ ng/ml}$ であった。HSV特異的IgG1のレベルは、 $7587 \pm 3045 \text{ ng/ml}$ であり、そして、

H S V - 2 感染患者と H S V - 1 感染患者との間に明らかな差異は存在しなかった。I g G 2 のレベルは、 $898 \pm 512 \text{ ng/ml}$ であり、そして、H S V - 2 感染患者と H S V - 1 感染患者との間に明らかな差異は存在しなかった。

【0083】

特定の作用機構に束縛されることを意図しないが、H S V - 2 の再発性疾患を処置する方法は、サイトカインカスケードの活性化を含むと結論付けられ、このサイトカインカスケードは、以下である：(i) 樹状細胞による増大した I L - 1 2 産生で開始する、(i i) C D 4 + T h 1 応答および増大した I F N - レベル（および減少した I L - 1 0 レベル）を好む H S V 特異的応答の改変が続いて生じる、そして(i i i) 続いて、増大したレベルの H S V 特異的 C D 8 + C T L を生じる。これは、I C P 1 0 P K での免疫によって活性化され得るが、他の H S V 組換え体、ウイルスタンパク質、核酸およびポリペプチドの混合物で誘導される場合、再発の現象において、等しく有効である。本発明は、H S V - 2 に対してのみ有効であるだけでなく、H S V - 1 に対しても有効である。さらに、長期にわたって続くか、または再発性である、他のウイルス性疾患（例えば、サイトメガロウイルス、エプスタイン - バーウイルス、ヒトパピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、水痘 帯状疱疹ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス（H I V ））は、再発性疾患または持続性疾患を減少させるために必要な T h 1 応答についてのマーカーとして働く、ウイルス特異的な免疫グロブリンの比における増大を生じるように選択される薬剤に応答する。本発明はまた、ウイルス特異的 T h 1 免疫応答を誘導する薬剤を同定するための方法、ならびに潜伏性ウイルス感染および原発性ウイルス感染に対して保護し、そしてウイルス特異的 T h 1 免疫応答を誘導する、併用ワクチンの使用のための方法を開示する。

10

20

【0084】

使用されたが本明細書中には記載されない他の方法は周知であり、免疫学、ウイルス学、細胞生物学および分子生物学の当業者の能力の範囲内である。

【0085】

本明細書中に引用された、各々または全ての特許、特許出願および広報の開示は、本明細書によって、その全体が参考として援用される。

【0086】

本発明を、特定の実施形態を参照して開示してきたが、本明細書中に提供される開示に基づいて、本発明の他の実施形態および種々のバリエーションが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、このような実施形態および等価なバリエーションを全て含むように構築されることが意図される。

30

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/43783	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : A61K 39/00, 39/12, 39/21, 39/29, 31/70; C12N 7/01, 7/04			
US CL : 424/185.1, 186.1, 187.1; 435/235.1, 236; 514/44;			
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. : 424/185.1, 186.1, 187.1; 435/173.1, 173.3; 514/44			
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) EAST, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X --- Y	US 6,146,632 A (MOMIN et al) 14 November 2000 (14.11.2000) see particularly columns 1-3, figures 1, 2b-4b.	1-15, 17-20, 28-33, 35-39, 45-47, 50 ----- 16, 34,	
X --- Y	US 6,013,265 A (AURELIAN) 11 January 2000 (11.01.2000), see particularly abstract, columns 5 and 6, and examples 13 and 14.	1-11, 18-24, 28, 29, 36-41, 45-50 ----- 27, 44	
X --- Y	US 5,830,876 A (WEINER et al) 03 November 1998 (03.11.1998), see particularly abstract and claims 1-7.	25, 26, 42, 43, ----- 16, 27, 34, 44	
Y	WO 99/36513 A1 (AURX, INC.) 22 July 1999 (22.07.1999), see particularly the abstract and examples 3, 4.	27, 44	
X	US 6,013,268 A (REED) 11 January 2000 (11.01.2000), see particularly the abstract and figures 7, 8, 10, 11, 12.	51-53	
<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
"E"	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 06 August 2002 (06.08.2002)		Date of mailing of the international search report 05 SEP 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Q. Justice LL Telephone No. 703-308-0196	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/25	A 6 1 K 39/25	
A 6 1 K 39/29	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	G

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, 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, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 オーレリアン, ロール
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 5 - 3 1 0 5, ボルチモア, バンクロフト ロード
 3 4 0 4

(72) 発明者 行徳 隆裕
 福岡県福岡市早良区室見 1 丁目 2 6 番 2 3 号

(72) 発明者 カルトン, ゲーリー ジェイ.
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 7 5, エルクリッジ, ランディング ロード 5 3 3
 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB50 CB01 DA37 FB01 FB03
 4C085 AA03 AA19 BA69 BA76 BA78 BA79 BA80 BA83 BA92 GG02
 GG03 GG04 GG05 GG08
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33
 4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZB33

专利名称(译)	预防复发性病毒性疾病		
公开(公告)号	JP2005510489A	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003537550	申请日	2001-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	马里兰大学巴尔的摩分校 所有箱公司		
申请(专利权)人(译)	马里兰大学巴尔的摩分校 Orukusu公司		
[标]发明人	オーレリアンロール 行徳隆裕 カールトンゲリージェイ		
发明人	オーレリアン, ロール 行徳 隆裕 カールトン, ゲーリー ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/245 A61K39/25 A61K39/29 A61P31/12 C07K14/035 C12N7/01 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/12 A61K39/245 A61K2039/57 A61P31/12 A61P31/22 C07K14/005 C12N2710 /16622 C12N2710/16634		
FI分类号	A61K39/12 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/21 A61K39/245 A61K39/25 A61K39/29 A61P31/12 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/569.G		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA37 2G045/FB01 2G045/FB03 4C085 /AA03 4C085/AA19 4C085/BA69 4C085/BA76 4C085/BA78 4C085/BA79 4C085/BA80 4C085/BA83 4C085/BA92 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB33 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB33		
优先权	60/249387 2000-11-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了用于改善或减少复发性病毒疾病的组合物和方法，其中所述组合物和方法涉及病毒特异性免疫球蛋白亚类，其反映优先性Th1应答导致增加的。本发明涉及通过在动物中诱导Th1应答来预防或减轻潜伏感染动物中复发性病毒疾病的症状。本发明教导了与Th2应答相比诱导Th1应答增加的方法。

		(P20) (43) 公表日 平成17年4月21日
(5) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/21	A 6 1 K 39/21	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 頁
(2) 出願番号	特願2003-537550 (P2003-537550)	(71) 出願人 502399237
(8) (2) 出願日	平成13年11月16日 (2001.11.16)	ユニバーシティ オブ メリー ルチモア
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)	アメリカ合衆国 メリーランド 1, ホルチモア, ウェスト ラ ストリート 520
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/043783	(71) 出願人 503160537
(87) 国際公開番号	W02003/034981	オールクス, インコーポレイ アメリカ合衆国 メリーランド 1-3230, グレン パー, コーミック ドライブ 500, ト ジェイ
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)	(74) 代理人 100107489
(31) 優先権主張番号	60/249,387	弁理士 大塚 竹志
(32) 優先日	平成12年11月16日 (2000.11.16)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	