

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6265344号
(P6265344)

(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)

(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)

(51) Int.Cl.	F 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 9 7
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	D
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
請求項の数 30 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-502478 (P2015-502478)	(73) 特許権者	507397054
(86) (22) 出願日	平成25年3月27日 (2013. 3. 27)		ヴァリエーション バイオテクノロジーズ
(65) 公表番号	特表2015-518140 (P2015-518140A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成27年6月25日 (2015. 6. 25)		カナダ, オンタリオ ケー1ブイ 1シ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/001021		ー1, オタワ, ハント クラブ ロー
(87) 国際公開番号	W02013/144722		ド イースト 310, セカンド フロ
(87) 国際公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)		ア
審査請求日	平成28年3月15日 (2016. 3. 15)	(74) 代理人	100107456
(31) 優先権主張番号	61/616, 204		弁理士 池田 成人
(32) 優先日	平成24年3月27日 (2012. 3. 27)	(74) 代理人	100162352
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 酒巻 順一郎
		(74) 代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		(74) 代理人	100148596
			弁理士 山口 和弘
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗サイトメガロウイルス中和抗体の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) H C M V 候補ワクチンを用いて免疫処置されている対象から得られた熱不活化血清を、蛍光部分を含むH C M Vと混合して、混合物を形成するステップと、

(i i) (i) の混合物にウサギ補体を添加するステップと、

(i i i) 感染を可能にする条件下でH C M Vによる感染に対して感受性である宿主細胞を、(i i) のウサギ補体が存在する混合物と接触させるステップであって、宿主細胞はレチナル色素性上皮細胞であるステップと、

(i v) フローサイトメトリーによって、混合物と接触された宿主細胞の蛍光レベルを評価するステップと、

(v) 評価された蛍光レベルに基づいて、宿主細胞の感染のレベルを決定するステップとを含む、方法。

【請求項 2】

(i i) の添加ステップは、2 . 5 % のウサギ補体を添加することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

レチナル色素性上皮細胞がARPE - 19細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

免疫処置されている対象が、ヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

血清が、抗HCMV中和抗体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

HCMV候補ワクチンが、VLPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

VLPが、HCMVに由来するgB、gH、gH-G、gB-G及びpp65のうち1種又は複数を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

蛍光部分が、蛍光タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

10

【請求項 10】

蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質である、請求項8に記載の方法。

【請求項 11】

蛍光部分を含むHCMVが、TB40-GFP株ウイルスである、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

蛍光部分を含むHCMVが、AD169-GFP株ウイルスである、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 13】

蛍光部分を含むHCMVが、CMV-GFP-Towne株ウイルスである、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

CMV-GFP-Towne株がTS15-rRである、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

(ii)のウサギ補体が存在する混合物が、ステップ(iii)の前に少なくとも15分間インキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

評価ステップ(iv)が、ハイスループット法で実施される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 17】

評価ステップ(iv)が、蛍光レベルを参照に対して比較することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

参照が、予め決定された参照である、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

参照が、陽性対照又は陰性対照参照である、請求項17に記載の方法。

【請求項 20】

決定ステップに基づいて血清における抗HCMV中和抗体力価を決定するステップをさらに含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 21】

決定ステップに基づいて候補HCMVワクチンの有効性を評価するステップをさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

混合物と接触された宿主細胞の蛍光レベルが、参照蛍光レベルよりも低い場合に、候補HCMVワクチンを、中和抗体を誘導するワクチンとして選択するステップをさらに含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

接触ステップ(iii)が、少なくとも1時間のインキュベーションを含む、請求項1

50

に記載の方法。

【請求項 24】

宿主細胞が、視覚的細胞形態学評価又は視覚的蛍光評価によって、感染についてさらにモニタリングされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

視覚的細胞形態学評価が、細胞膨潤及び円形化をモニタリングすることを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

視覚的蛍光評価が、蛍光を検出することを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

蛍光が、蛍光顕微鏡で検出される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

宿主細胞の核の蛍光レベルが評価される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

全宿主細胞の蛍光レベルが評価される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

宿主細胞の蛍光レベルを定量化するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願の相互参照]

[0001]本願は、2012年3月27日に出願された米国特許仮出願第61/616,204号の利益を主張し、その内容は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【0002】

[背景]

[0002]ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、ヘルペスウイルスは、遍在的に存在する病原体である。免疫が保たれている人では、HCMV感染は、普通は気づかれない、せいぜい軽度の非特異的な症状を有する。それに反して、特定のリスク群、例えば、AIDS患者又は移植レシピエントなどの免疫抑制患者、また出生前感染後では、HCMV感染は、重篤な徴候を有する(Staras SAら、2006年 Clin Infect Dis 43巻(9号):1143~51頁; Hebart Hら、2004年 Hum Immunol 65巻(5号):432~6頁; Rowshani ATら、2005年 Transplantation 79巻(4号):381~6頁)。既存の治療として、免疫グロブリン及びガンシクロビル及びその誘導体などの抗ウイルス剤の使用が挙げられ、これらは、リスク集団において予防的に、又は感染の間の極めて初期に使用された場合に最も有効である。しかし、既存の治療は、相当な毒性及び特に、遅発型疾患に対する限定された有効性を特徴とし(Boeckh M., 2004年 Pediatr Transplant 8(付録5):19~27頁; Limaye AP., 2004年 Transplantation 78巻(9号):1390~6頁)、それらは、先天性HCMV疾患に対して影響を有していなかった。HCMV疾患に対して防御するための有効なワクチンの開発は、重要な公衆衛生の優先事項として認識されている(Arvin AMら、2004年 Clin Infect Dis 39巻(2号):233~9頁)。

【0003】

[0003]in vitroアッセイは、HCMV感染を妨げるその能力について、候補ワクチンを評価するための重要なツールである。例えば、中和アッセイは、感染個体において免疫応答を研究するために、並びに臨床試験及び前臨床試験の両方においてワクチン免疫原候補を評価するために開発された。HCMVの場合には、抗原結合ELISAによって、HCMV抗原に特異的な抗体を測定できるが、細胞へのウイルスの侵入の中和が測定されるアッセイのみが、HCMV抗原特異的抗体の生物活性を確立し、定量できる(Ab

10

20

30

40

50

aiら、2007年J Immunol Methods 332(1~2):82~93頁)。通常、HCMVのこのような中和アッセイでは、アッセイにおいて中和抗体が細胞のHCMV感染を低減する程度が、細胞における1種又は複数のウイルスタンパク質の発現に基づいた感染細胞の核の定量によって決定される。このような分析は、時間がかかり、ハイスループットアプリケーションにおいて使用することが困難なものであり得る。中和抗体の誘導に強力なHCMVワクチン候補をスクリーニングする方法の改良が当技術分野では依然として必要である。

【0004】

[概要]

[0004]とりわけ、本開示内容は、宿主細胞におけるHCMV感染のレベルを決定するのに、拡張して、サンプル中に存在する中和抗体のレベルを決定するのに有用な方法を提供する。本開示内容は、蛍光部分を有するHCMVウイルスによって、ウイルス感染の検出が可能になる(例えば、宿主細胞をウイルスと接触させた後に細胞中の蛍光を評価することによって)という認識を包含する。いくつかの実施形態では、HCMV感染のレベルは、ウイルスが、対象から得た試験サンプル(例えば、血清サンプル)とともにプレインキュベートされている蛍光検出によって決定される。いくつかの実施形態では、対象は候補HCMVワクチンが投与されている。

10

【0005】

[0005]本開示のその他の特徴、目的及び利点は、以下の詳細な説明において明らかである。しかし、詳細な説明は、本開示の実施形態を示すが、単に例示として示されるのであって制限ではないと理解されなければならない。本開示の範囲内の種々の変更及び改変は、詳細な説明から当業者には明らかである。

20

【0006】

[0006]図面は、単に例示目的のものであって、制限のためではない。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、二価gBウイルス様粒子(VLP)(gB/pp65及びgB/pp65+gH-G/pp65)を用いて免疫処置した後の例示的ELISA抗gB抗体力価を表す。単回免疫処置後にウサギにおいて二価gB VLPによって強力な持続した免疫性が誘導される。

30

【図2】図2は、ウサギにおいてgB/pp65 CMV VLPを用いて誘導された中和抗体反応を示す、線維芽細胞におけるGFP発現の例示的FACS解析を表す。ウサギ(n=6匹/群)を、0週目及び8週目に2回免疫処置(IM)し、2週間後に出血させた。血清をプールし、示された希釈で、HFF線維芽細胞におけるGFP発現CMVウイルス(TB40)に対して、同様の希釈のサイトガム(Cytogam)(商標)と比較して試験した。感染(GFP+)細胞のフローサイトメトリー解析の間に100000個の細胞を集めた。

【図3】図3は、ウサギにおいて二価gB+gH CMV VLPを用いて誘導された中和抗体反応を示す、線維芽細胞におけるGFP発現の例示的FACS解析を表す。ウサギ(n=6匹/群)を、0週目及び8週目に2回免疫処置(IM)し、2週間後に出血させた。血清をプールし、示された希釈で、HFF線維芽細胞におけるGFP発現CMVウイルス(TB40)に対して、同様の希釈のサイトガム(商標)と比較して試験した。感染(GFP+)細胞のフローサイトメトリー解析の間に100000個の細胞を集めた。

40

【図4】図4は、HFF-1細胞における例示的中和パーセントを表す。HFF-1細胞における1:6 CMV-GFP-TB40-010512に対する10%モルモット補体の存在下での、15RA09群7(ミョウバンをアジュバントとする一価gB-G/一価gH-G)PlVd14、PlVd28、PlVd42、PlVd55及びP2Vd14でプールされたサンプル;並びにP2Vd14の15RA05群8(空のMLV Gag)の中和が表されている。

【図5】図5は、ARPE-19細胞における例示的中和パーセントを表す。ARPE-

50

19細胞における1:3 CMV - GFP - Towne - 150612に対する2.5%ウサギ補体の存在下での、15RA09群7(ミョウパンをアジュバントとする一価gB - G / 一価gH - G) P1Vd14、P1Vd28、P1Vd42、P1Vd55及びP2Vd14でプールされたサンプル;並びにP2Vd14での15RA05群8(空のMLV Gag)の中和が表されている。

【0008】

[定義]

[0012]本開示がより容易に理解されるために、特定の用語をまず以下に定義する。以下の用語及びその他の用語のさらなる定義が、本明細書の全体を通して示されている。

【0009】

[0013]アミノ酸:本明細書において使用されるように、用語「アミノ酸」とは、その広い意味で、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び/又は物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造 $H_2N - C(H)(R) - COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、合成アミノ酸であり;いくつかの実施形態では、アミノ酸は、d - アミノ酸であり;いくつかの実施形態では、アミノ酸は、L - アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然に存在するペプチド中によく見られる20種の標準L - アミノ酸のいずれかを指し、「非標準アミノ酸」とは、合成によって調製されるか、天然供給源から得られるかに関わらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。本明細書において、「合成アミノ酸」とは、限定されるものではないが、塩、アミノ酸誘導体(アミドなど)、及び/又は置換を含めた化学的に修飾されたアミノ酸を包含する。ペプチド中の、カルボキシ - 及び/又はアミノ - 末端アミノ酸を含めたアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基及び/又はその活性に悪影響を及ぼすことなくペプチドの循環半減期を変更し得るその他の化学基との置換によって修飾され得る。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与し得る。アミノ酸は、1種又は複数の化学成分(例えば、メチル基、アセテート基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸塩基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ピオチン部分など)と関連しているものなどの1種又は翻訳後修飾を含み得る。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と同義的に使用され、遊離アミノ酸及び/又はペプチドのアミノ酸残基を指すこともある。遊離アミノ酸を指すか、又はペプチドの残基を指すかは、この用語が使用される文脈から明らかとなる。

【0010】

[0014]抗原:本明細書において、用語「抗原」とは、抗体によって認識される1種又は複数のエピトープ(直鎖、立体構造のいずれか、又は両方)を含有する物質を指す。特定の実施形態では、抗原は、ウイルス又はウイルスのポリペプチドであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、用語「抗原」とは、サブユニット抗原を指す(すなわち、天然に抗原が関連している全ウイルスから分離された、個別の抗原;例えば、ウイルス様粒子と関連している抗原)。或いは、又はさらに、いくつかの実施形態では、用語「抗原」とは、死滅した、弱毒化された、又は不活化されたウイルスを指す。特定の実施形態では、抗原は、「免疫原」である。

【0011】

[0015]およそ又は約:本明細書において使用されるように、用語「およそ」又は「約」とは、1種又は複数の注目する値に適用されるように、記載された参照値と同様である値を指す。特定の実施形態では、用語「およそ」又は「約」とは、別に記載されない限り、又は文脈から別であると明確でない限り、記載された参照値のいずれかの方向に(より多いか、又はより少ない)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%又はそれ以下内に入る値の範囲を指す(このような数が、可能性ある値の100%を超える場合を除く)。

【0012】

10

20

30

40

50

[0016]回復：本明細書において使用されるように、用語「回復」とは、状況の予防、低減若しくは寛解又は対象の状況の改善を意味する。回復は、疾患、障害又は状態（例えば、HCMV感染）の完全な回復又は完全な予防を含むが、これを必要とはしない。用語「予防」とは、疾患、障害又は状態の発症の遅延を指す。予防は、疾患、障害又は状態の発症が、所定の期間遅延された場合に完全と考えられ得る。

【0013】

[0017]剤形：本明細書において使用されるように、用語「剤形」及び「単位剤形」とは、治療される患者の治療薬の物理的に別個の単位を指す。各単位は、所望の治療効果をもたらすよう算出された活性材料の所定量を含有する。しかし、組成物の総投与量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることが理解される。

10

【0014】

[0018]投与計画：「投与計画」（又は「治療計画」）は、その用語が本明細書において使用されるように、一般に、期間によって分かれている、対象に個々に投与される一連の単位用量（一般に、2以上）である。いくつかの実施形態では、所与の治療薬は、1つ又は複数の用量を含み得る推奨される投与計画を有する。いくつかの実施形態では、投与計画は、各々が同一の長さの期間によって互いに分かれている複数の用量を含み；いくつかの実施形態では、投与計画は、複数の用量及び個々の用量を分ける少なくとも2種の異なる期間を含む。

【0015】

[0019]発現：本明細書において使用されるように、核酸配列の「発現」とは、以下の事象のうち1つ又は複数を指す：（1）DNA配列からのRNA鋳型の製造（例えば、転写による）；（2）RNA転写物のプロセッシング（例えば、スプライシング、エディティング、5'キャップ形成及び/又は3'末端形成による）；（3）RNAのポリペプチド又はタンパク質への翻訳；及び/又は（4）ポリペプチド又はタンパク質の翻訳後修飾。

20

【0016】

[0020]蛍光：本明細書において使用されるように、用語蛍光とは、発光する部分を指す。通常、蛍光部分は、ある波長で電磁エネルギーを吸収し、第2の波長で電磁エネルギーを放出し得る電子を含有する。細胞中のいくつかのタンパク質又は小分子は、天然に蛍光である（例えば、NADH、トリプトファン、内因性クロロフィル、フィコエリトリン又は緑色蛍光タンパク質（GFP））。蛍光タンパク質の種々の突然変異体が設計されており、本開示内容に従って有用であり得るということは当然のことである。中でも、EGFP、青色蛍光タンパク質（EBFP、EBFP2、アズライト（Azurite）、mKalamal）、シアン蛍光タンパク質（ECFP、セルラーン（Cerulean）、CyPet）、黄色蛍光タンパク質（YFP、シトリン（Citrine）、ビーナス（Venus）、YPet）、酸化還元感受性GFP（roGFP）及び単量体GFPなど。GFP及びその他の蛍光タンパク質は、単独で、又は融合タンパク質として細胞において外因的に発現され得る。このアプローチによって、蛍光タンパク質が、細胞内局在性及び発現パターンなどの任意の数の生物的事象のレポーターとして使用されることが可能となる。

30

【0017】

[0021]或いは、又はさらに、特定の又は一般的なタンパク質、核酸、脂質又は小分子は、小分子、タンパク質又は量子ドットであり得る外因性フルオロフォア、蛍光色素で標識されてもよい。例示的フルオロフォアとして、それだけには限らないが、1,5IAEDANS；1,8-ANS；4-メチルウンベリフェロン；5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン；5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）；5-カルボキシナフトフルオレセイン；5-カルボキシテトラメチルローダミン（5-TAMRA）；5-ヒドロキシトリプタミン（5-HAT）；5-ROX（カルボキシ-X-ローダミン）；6-カルボキシローダミン6G；6-CR6G；6-JOE；7-アミノ-4-メチルクマリン；7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD）；7-ヒドロキシ-4-1メチルクマリン；9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン（ACMA）；ABQ；

40

50

酸性フクシン；アクリジンオレンジ；アクリジンレッド；アクリジンイエロー；アクリフラビン；アクリフラビンフォイルゲンSITSA；エクオリン（発光タンパク質）；AFP - 自己蛍光タンパク質 - - (Quantum Biotechnologies) sg GFP、sgBFPを参照のこと；アレクサフルオル(Alexa Fluor)350 (商標)；アレクサフルオル430 (商標)；アレクサフルオル488 (商標)；アレクサフルオル532 (商標)；アレクサフルオル546 (商標)；アレクサフルオル568 (商標)；アレクサフルオル594 (商標)；アレクサフルオル633 (商標)；アレクサフルオル647 (商標)；アレクサフルオル660 (商標)；アレクサフルオル680 (商標)；アリザリンコンプレキソン(Alizarin Complexon)；アリザリンレッド；アロフィコシアニン(APC)；AMC, AMCA-S；アミノメチルクマリン(AMCA)；AMCA-X；アミノアクチノマイシンD；アミノクマリン；アニリンブルー(Anilin Blue)；ステアリン酸アンスロシル(Anthrocyll stearate)；APC-Cy7；APTRA-BTC；APTS；アストラゾンブリリアントレッド(Astrazon Brilliant Red)4G；アストラゾンオレンジ(Astrazon Orange)R；アストラゾンレッド(Astrazon Red)6B；アストラゾンイエロー(Astrazon Yellow)7 GLL；アタブライン(Atabrine)；ATTO-TAG (商標)CBQCA；ATTO-TAG (商標)FQ；オーラミン；オーロホスフィン(Aur phosphine)G；オーロホスフィン；BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール)；BCECF (高pH)；BCECF (低pH)；硫酸ベルベリン；ラクタマーゼ；BFP青色偏移GFP(Y66H)；青色蛍光タンパク質；BFP/GFP FRET；ビマン(Bimane)；ビスベンゼミド(Bisbenz emide)；ビスベンジミド(Bisbenz imide) (ヘキスト(Hoechst))；ビス-BTC；ブランコフォル(Blancophor)FFG；ブランコフォルSV；BOBO (商標) - 1；BOBO (商標) - 3；ボディピー(Bodipy)492/515；ボディピー493/503；ボディピー500/510；ボディピー；505/515；ボディピー530/550；ボディピー542/563；ボディピー558/568；ボディピー564/570；ボディピー576/589；ボディピー581/591；ボディピー630/650-X；ボディピー650/665-X；ボディピー665/676；ボディピーFL；ボディピーFL ATP；ボディピーFL-セラミド；ボディピーR6G SE；ボディピーTMR；ボディピーTMR-Xコンジュゲート；ボディピーTMR-X, SE；ボディピーTR；ボディピーTR ATP；ボディピーTR-X SE；BO-PRO (商標) - 1；BO-PRO (商標) - 3；ブリリアントスルホフラビン(Brilliant Sulphoflavin)FF；BTC；BTC-5N；カルセイン；カルセインブルー；カルシウムクリムゾン - - ；カルシウムグリーン；カルシウムグリーン - 1Ca²⁺色素；カルシウムグリーン - 2 Ca²⁺；カルシウムグリーン - 5N Ca²⁺；カルシウムグリーン - C18 Ca²⁺；カルシウムオレンジ；カルコフロールホワイト；カルボキシ-X-ローダミン(5-ROX)；カスケードブルー(商標)；カスケードイエロー；カテコールアミン；CCF2 (GeneBlazer)；CFDA；CFP (シアン蛍光タンパク質)；CFP/YFP FRET；クロロフィル；クロモマイシンA；クロモマイシンA；CL-NERF；CMFDA；セレンテラジン；セレンテラジンcp；セレンテラジンf；セレンテラジンfc p；セレンテラジンh；セレンテラジンhcp；セレンテラジンip；セレンテラジンn；セレンテラジンO；クマリンファロイジン；C-フィコシアニン；CPM Iメチルクマリン；CTC；CTCホルマザン；Cy2 (商標)；Cy3.1 8；Cy3.5 (商標)；Cy3 (商標)；Cy5.1 8；Cy5.5 (商標)；Cy5 (商標)；Cy7 (商標)；シアンGFP；サイクリックAMP フルオロセンサー(FiCRhR)；ダブシル；ダンシル；ダンシルアミン；ダンシルカダベリン；ダンシルクロリド；ダンシルDHPE；ダンシルフルオライド；DAPI；ダポキシル(Dapoxyl)；ダポキシル2；ダポキシル3' DCFDA；DCFH (ジクロロジヒドロフルオロセインジアセテート)；DDAO；DHR (ジヒドロダミ

10

20

30

40

50

ン (Dihydorhodamine) 123) ; ジ - 4 - ANEPPS ; ジ - 8 - ANEPPS (非レシオ) ; DiA (4 - ジ16 - ASP) ; ジクロロジヒドロフルオレインジアセテート (DCFH) ; DiD - 親油性トレーサー ; DiD (DiIC18 (5)) ; DiDS ; ジヒドロダミン123 (DHR) ; DiI (DiIC18 (3)) ; Iジニトロフェノール ; DiO (DiOC18 (3)) ; DiR ; DiR (DiIC18 (7)) ; DM - NERF (高pH) ; DNP ; ドーパミン ; DsRed ; DTAF ; DY - 630 - NHS ; DY - 635 - NHS ; EBFp ; ECFp ; EGFP ; ELF97 ; エオシン ; エリスロシン ; エリスロシンITC ; 臭化エチジウム ; エチジウムホモ二量体 - 1 (EthD - 1) ; オイクリシン (Eucrysin) ; オイコライト (Eukolight) ; ユウロピウム (111) クロリド ; EYFP ; ファストブルー (Fast Blue) ; FDA ; フォイルゲン (Feulgen) (Pararosaniline) ; FIF (ホルムアルデヒド (Formaldehyde) 誘導性蛍光) ; FITC ; フラゾオレンジ (Flazo Orange) ; Fluor - 3 ; Fluor - 4 ; フルオレイン (FITC) ; フルオレインジアセテート ; フルオロ - エメラルド ; フルオロ - ゴールド (ヒドロキシスチルバミジン) ; フルオル - ルビー (Fluor - Ruby) ; フルオル (Fluor) X ; FM1 - 43 (商標) ; FM4 - 46 ; フラレッド (Fura Red) (商標) (高pH) ; フラレッド (商標) / Fluor - 3 ; フラ (Fura) - 2 ; フラ - 2 / BCECF ; ゲナクリルブリリアントレッド (Genacryl Brilliant Red) B ; ゲナクリルブリリアントイエロー (Genacryl Brilliant Yellow) 10GF ; ゲナクリルピンク (Genacryl Pink) 3G ; ゲナクリルイエロー (Genacryl Yellow) 5GF ; ジーンブレイザー (GeneBlazer) ; (CCF2) ; GFP (S65T) ; GFP赤色偏移 (rsGFP) ; GFP野生型非UV励起 (wtGFP) ; GFP野生型、UV励起 (wtGFP) ; GFPuv ; グロキサン酸 ; グラニューブルー (Granular blue) ; ヘマトポルフィリン ; ヘキスト33258 ; ヘキスト33342 ; ヘキスト34580 ; HPTS ; ヒドロキシクマリン ; ヒドロキシスチルバミジン (フルオロゴールド (FluoroGold)) ; ヒドロキシトリプタミン ; Indo - 1、高カルシウム ; Indo - 1低カルシウム ; インドジカルボシアニン (DiD) ; インドトリカルボシアニン (DiR) ; イントラホワイト (Intrawhite) Cf ; JC - 1 ; JO - JO - 1 ; JO - PRO - 1 ; レーザープロ (LaserPro) ; ロードダン (Laurodan) ; LDS 751 (DNA) ; LDS751 (RNA) ; ロイコホール (Leucophor) PAF ; ロイコホールSF ; ロイコホールWS ; リサミンローダミン ; リサミンローダミンB ; カルセイン / エチジウムホモ二量体 ; Lolo - 1 ; LO - PRO - 1 ; ルシフェールイエロー (Lucifer Yellow) ; リソトラッカーブルー (Lyso Tracker Blue) ; リソトラッカーブルー - ホワイト (Lyso Tracker Blue - White) ; リソトラッカーグリーン (Lyso Tracker Green) ; リソトラッカーレッド (Lyso Tracker Red) ; リソトラッカーイエロー (Lyso Tracker Yellow) ; リソセンサーブルー (LysoSensor Blue) ; リソセンサーグリーン (LysoSensor Green) ; リソセンサーイエロー / ブルー (LysoSensor Yellow / Blue) ; マググリーン (Mag Green) ; マグダラレッド (Magdala Red) (フロキシシン (Phloxin B) ; マグ - フラレッド (Mag - Fura Red) ; マグ - フラ (Mag - Fura) - 2 ; マグ - フラ - 5 ; マグ - インド (Mag - Indo) - 1 ; マグネシウムグリーン ; マグネシウムオレンジ ; マラカイトグリーン ; マリーナブルー (Marina Blue) ; Iマキシロンブリリアントフラビン (Maxilon Brilliant Flavin) 10GF ; マキシロンブリリアントフラビン8GF ; メロシアニン (Merocyanin) ; メトキシクマリン ; ミトトラッカーグリーン (Mitotracker Green) FM ; ミトトラッカーオレンジ (Mitotracker Orange) ; ミトトラッカーレッド (Mitotracker Red) ; ミトラマイシン (Mitramycin)

10

20

30

40

50

in) ;モノブロモビマン ;モノブロモビマン (mBBBr - GSH) ;モノクロロビマン
 ;MPS (メチルグリーンピロニンスチルベン) ;NBD ;NBD アミン ;ナイルレ
 ド (Nile Red) ;ニトロベンゾキセジドール (Nitrobenzoxedid
 ole) ;ノルアドレナリン ;ヌクレアファストレッド (Nucler Fast Red)
 ;iヌクレアイエロー (Nucler Yellow) ;ナイロサンブリリアントラ
 ビン (Nylosan Brilliant lavin) E8G ;オレゴングリーン (O
 regon Green) (商標) ;オレゴングリーン (商標) 488 ;オレゴングリー
 ン (商標) 500 ;オレゴングリーン (商標) 514 ;パシフィックブルー (Paci
 fic Blue) ;パラロサニリン (Pararosanine) (フォイルゲン
) ;PBF1 ;PE - Cy5 ;PE - Cy7 ;PerCP ;PerCP - Cy5.5 ;P
 E - テキサスレッド (Red 613) ;フロキシ (Phloxin) B (マグダラレ
 ッド (Magdala Red)) ;ホルウィット (Phorwhite) AR ;ホルウィ
 ットBKL ;ホルウィットRev ;ホルウィットRPA ;ホスフィン3R ;フォトレジス
 ト (PhotoResist) ;フィコエリトリンB [PE] ;フィコエリトリンR [P
 E] ;PKH26 (Sigma) ;PKH67 ;PMIA ;ポントクロムブルーブラック
 (Pontochrome Blue Black) ;POPO - 1 ;POPO - 3 ;P
 O - PRO - 1 ;PO - 1PRO - 3 ;プリムリン (Primuline) ;プロシオン
 イエロー (Procion Yellow
) ;プロビジウムイオディド (Propidium Iodid) (PI) ;PyMPO
 ;ピレン (Pyrene) ;ピロニン (Pyronine) ;ピロニンB ;ピロザルブリ
 リアントフラビン (Pyrozal Brilliant Flavin) 7GF ;QS
 Y7 ;キナクリンマスタード ;レゾルフィン ;RH414 ;Rhod - 2 ;ローダミン ;
 ローダミン110 ;ローダミン123 ;ローダミン5GLD ;ローダミン6G ;ローダミ
 ンB ;ローダミンB200 ;ローダミンBエクストラ ;ローダミンBB ;ローダミンBG
 ;ローダミングリーン ;ローダミンファリシジン (Phallicidine) ;ローダ
 ミン : ファロイジン ;ローダミンレッド ;ローダミンWT ;ローズベンガル ;R - フィコ
 シアニン ;R - フィコエリトリン (PE) ;rsGFP ;S65A ;S65C ;S65L
 ;S65T ;サファイアGFP ;SBFI ;セロトニン ;セブロンブリリアントレッド (S
 evron Brilliant Red) 2B ;セブロンブリリアントレッド4G ;
 セブロン (Sevron) Iブリリアントレッド (Brilliant Red) B ;セ
 ブロンオレンジ (Sevron Orange) ;セブロンイエロー (Sevron Y
 ellow) L ;sgBFP (商標) (スーパーグロー (super glow) BFP
 ;sgGFP (商標) (スーパーグローGFP) ;SITS (プリムリン (Primli
 ne) ;スチルベンイソチオスルホン酸) ;SNAFLカルセイン ;SNAFL - 1 ;S
 NAFL - 2 ;SNARFカルセイン ;SNARF1 ;ナトリウムグリーン ;スペクトラ
 ムアクア (SpectrumAqua) ;スペクトラムグリーン (SpectrumGr
 een) ;スペクトラムオレンジ (SpectrumOrange) ;スペクトラムレッ
 ド (Spectrum Red) ;SPQ (6 - メトキシ - N - (3スルホプロピル) キ
 ノリニウム) ;スチルベン ;スルホローダミンB及びC ;スルホローダミンエクストラ ;
 SYTO11 ;SYTO12 ;SYTO13 ;SYTO14 ;SYTO15 ;SYTO1
 6 ;SYTO17 ;SYTO18 ;SYTO20 ;SYTO21 ;SYTO22 ;SYT
 O23 ;SYTO24 ;SYTO25 ;SYTO40 ;SYTO41 ;SYTO42 ;S
 YTO43 ;SYTO44 ;SYTO45 ;SYTO59 ;SYTO60 ;SYTO61
 ;SYTO62 ;SYTO63 ;SYTO64 ;SYTO80 ;SYTO81 ;SYTO
 82 ;SYTO83 ;SYTO84 ;SYTO85 ;SYTOXブルー ;SYTOXグリー
 ン ;SYTOXオレンジ ;テトラサイクリン ;テトラメチルローダミン (TRITC)
 ;テキサスレッド (商標) ;テキサスレッド - X (商標) コンジュゲート ;チアジカルボ
 シアニン (DiSC3) ;チアジンレッドR ;チアゾールオレンジ ;チオフラビン5 ;チ
 オフラビンS ;チオフラビンTON ;チオライト (ThioLyte) ;チオゾールオレ
 ンジ (Thiozole Orange) ;チノポール (Tinopol) CBS (カル

10

20

30

40

50

コフロールホワイト) ; T I E R ; T O - P R O - 1 ; T O - P R O - 3 ; T O - P R O - 5 ; T O T O - 1 ; T O T O - 3 ; トリカラー (T r i C o l o r) (P E - C y 5) ; T R I T C テトラメチルロダミネルソチオシアネート (R o d a m i n e l s o T h i o C y a n a t e) ; トループルー (T r u e B l u e) ; トループレッド (T r u R e d) ; ウルトラライト (U l t r a l i t e) ; ウラニン (U r a n i n e) B ; ユビテックス (U v i t e x) S F C ; w t G F P ; W W 7 8 1 ; X - ロードミン ; X R I T C ; キシレンオレンジ ; Y 6 6 F ; Y 6 6 H ; Y 6 6 W ; イエロー GFP ; Y F P ; Y O - P R O - 1 ; Y O - P R O 3 ; Y O Y O - 1 ; Y O Y O - 3 ; S y b r G r e e n ; チアゾールオレンジ (インターキレート (i n t e r c h e l a t i n g) 色素) ; 量子ドットなどの半導体ナノ粒子 ; 又はケージドフルオロフォア (光又はその他の電磁エネルギー源で活性化され得る) 又はそれらの組合せが挙げられる。

10

【 0 0 1 8 】

[0022] 融合タンパク質 : 本明細書において使用されるように、用語「融合タンパク質」とは、一般に、各々が、(1) 天然に存在する、及び/又は(2) ポリペプチドの機能的ドメインを表すペプチド部分に対して高度のアミノ酸同一性を示す、少なくとも2つのセグメントを含むポリペプチドを指す。通常、少なくとも2つのこのようなセグメントを含有するポリペプチドは、2つのセグメントが、(1) 同一ペプチド中に天然には含まれない、及び/又は(2) 単一ポリペプチドに互いにこれまでは連結していなかった、及び/又は(3) 人の手の作用によって互いに連結された部分である場合に融合タンパク質であると考えられる。

20

【 0 0 1 9 】

[0023] 遺伝子 : 本明細書において使用されるように、用語「遺伝子」は、当技術分野で理解されるような意味を有する。用語「遺伝子」は、遺伝子調節配列 (例えば、プロモーター、エンハンサーなど) 及び/又はイントロン配列を含み得るということは、当業者には理解される。遺伝子の定義は、タンパク質をコードしないが、tRNA、RNAi 誘導物質などといった機能的RNA分子をコードする核酸への言及を含むということもさらに理解される。明確にするために、本発明者らは、本出願において使用されるように、用語「遺伝子」は、一般に、タンパク質をコードする核酸の部分の部分を指し、この用語は、当業者には文脈から明確であるように、所望により、調節配列を包含し得るということを注記する。この定義は、用語「遺伝子」の非タンパク質をコードする発現ユニットへの適用を排除することを意図するものではなく、ほとんどの場合、この用語は、本文書において使用されるように、タンパク質をコードする核酸を指すことを明確にするを意図するものである。

30

【 0 0 2 0 】

[0024] 遺伝子産物又は発現産物 : 本明細書において使用されるように、用語「遺伝子産物」又は「発現産物」とは、一般に、遺伝子から転写されたRNA (プロセシング前及び/又はプロセシング後) 又は遺伝子から転写されたRNAによってコードされるポリペプチド (修飾前及び/又は修飾後) を指す。

【 0 0 2 1 】

[0025] ハイスループット : 本明細書において使用されるように、用語「ハイスループット」とは、各個々のサンプルを形式化すること、調製ステップ及び複雑化を最小にすること、アッセイ結果を並行して又は矢継ぎ早に評価することが、重要になるような多数のアッセイを用いる調査を幅広く指す。ハイスループット試験は、一般に、1つのアッセイの調製、実行、測定及びデータ収集がすべて完了され、その後、次の物質に関するアッセイが行われる単一の個々によるアッセイなどの手作業の、1つずつのアッセイを含まない。ハイスループットは、通常、例えば、サンプルのバッチ (例えば、24種、96種、384種又はそれを超える試験サンプル) が調製され、測定される任意のアッセイを含む。このような試験サンプルにおいて試験を形式化することとは、自動化の支援などを借りて、並行した、又は矢継ぎ早の測定を可能にすることによってアッセイプロセスを促進することを意味する。

40

50

【 0 0 2 2 】

[0026]免疫原性：本明細書において使用されるように、用語「免疫原性」とは、非宿主実体（例えば、HCMV抗原）に対して宿主動物において免疫応答を生じさせることができることを意味する。特定の実施形態では、この免疫応答は、特定の感染性生物（例えば、HCMV）に対するワクチンによって誘発される感染防御免疫の基礎を形成する。

【 0 0 2 3 】

[0027]免疫応答：本明細書において使用されるように、用語「免疫応答」とは、動物において誘発された応答を指す。免疫応答は、細胞性免疫、体液性免疫を指し得、又は両方を含み得る。免疫応答はまた、免疫系の一部に限定され得る。例えば、特定の実施形態では、免疫原性組成物は、IFN γ 応答の増大を誘導し得る。特定の実施形態では、免疫原性組成物は、粘膜IgA 応答（例えば、鼻腔及び/又は直腸洗浄において測定されるような）を誘導し得る。特定の実施形態では、免疫原性組成物は、全身性IgG 応答（例えば、血清において測定されるような）を誘導し得る。特定の実施形態では、免疫原性組成物は、ウイルス中和抗体又は中和抗体応答を誘導し得る。

10

【 0 0 2 4 】

[0028]改善、増大又は低減：本明細書において、用語「改善」、「増大」又は「低減」又は文法上の同等物は、本明細書に記載された治療の開始前の同一個体における測定値又は本明細書に記載された治療の非存在下での対照個体（又は複数の対照個体）における測定値などのベースライン測定値に対する値を示す。

【 0 0 2 5 】

[0029]個体、対象、患者：本明細書において使用されるように、用語「対象」、「個体」又は「患者」とは、ヒト又は非ヒト哺乳類対象を指す。治療されている個体（「患者」又は「対象」とも呼ばれる）は、疾患、例えば、HCMV感染を患っている個体（胎児、乳児、小児、青年又は成体）である。いくつかの実施形態では、対象は、HCMV感染のリスクにある。いくつかの実施形態では、対象は、免疫抑制対象である。例えば、いくつかの実施形態では、免疫抑制対象は、HIV感染した対象、AIDS患者、移植レシピエント、小児対象及び妊娠中の対象からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象は、HCMV感染に曝露されている。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

20

【 0 0 2 6 】

[0030]単離：本明細書において使用されるように、用語「単離」とは、（1）最初に製造されたときに（天然に、及び/又は実験的設定においてに関わらず）関連していた成分の少なくとも一部から分離されている、及び/若しくは（2）人の手によって製造された、調製された、及び/若しくは作製された物質並びに/又は実体を指す。単離された物質及び/又は実体は、最初に関連しているその他の成分のうち約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約99%超から分離され得る。いくつかの実施形態では、単離された作用物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は約99%超純粋である。本明細書において使用されるように、物質は、その他の成分を実質的に含まない場合に「純粋」である。本明細書において使用されるように、単離された物質及び/又は実体の純度パーセントの算出は、賦形剤（例えば、バッファー、溶媒、水など）を含んではならない。

30

40

【 0 0 2 7 】

[0031]リンカー：本明細書において使用されるように、用語「リンカー」とは、例えば、融合タンパク質中の、天然タンパク質において特定の位置に現れるもの以外の適当な長さの、一般に、可動性であること及び/又は - ヘリックスなどの構造を2種のタンパク質部分の間に挿入されることが設計されているアミノ酸配列を指す。一般に、リンカーは、融合タンパク質の2種以上のドメインが、各ドメインの生物活性の50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上を保持す

50

ることを可能にする。リンカーはまた、スパーサーと呼ぶこともある。

【0028】

[0032] 核酸：本明細書において使用されるように、用語「核酸」は、広い意味で、オリゴヌクレオチド鎖であるか、又はそれに組み込まれ得る任意の化合物及び/又は物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、オリゴヌクレオチド鎖であるか、ホスホジエステル結合を介してそれに組み込まれ得る化合物及び/又は物質である。いくつかの実施形態では、「核酸」とは、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び/又はヌクレオシド）を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」とは、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。本明細書において使用されるように、用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、同義的に使用され得る。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNA並びに一本鎖及び/又は二本鎖DNA及び/又はcDNAを包含する。さらに、用語「核酸」、「DNA」、「RNA」及び/又は同様の用語は、核酸類似体、すなわち、ホスホジエステル主鎖以外を有する類似体を含む。例えば、当技術分野で公知であり、主鎖中に、リン酸ジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する、いわゆる「ペプチド核酸」は、本開示の範囲内と考えられる。用語「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型である、及び/又は同一アミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質及び/又はRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。核酸は、天然供給源から精製され得る、組換え発現系を使用して製造され、所望により、精製され得、化学合成などされ得る。必要に応じて、例えば、化学合成された分子の場合には、核酸は、化学的に修飾された塩基又は糖、主鎖修飾などを有する類似体などのヌクレオシド類似体を含み得る。核酸配列は、特に断りのない限り5'から3'方向に提示される。用語「核酸セグメント」は、本明細書において、長い核酸配列の一部である核酸配列を指すよう使用される。多数の実施形態では、核酸セグメントは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える残基を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン及びデオキシシチジン）；ヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン及び2-チオシチジン）；化学的に修飾された塩基；生物学的に修飾された塩基（例えば、メチル化塩基）；介在塩基；修飾された糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース及びヘキソース）；及び/又は修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエート及び5'-N-ホスホルアミダイト結合）であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、送達を促進又は達成するよう化学的に修飾されていない核酸（例えば、ヌクレオチド及び/又はヌクレオシドを含む、ポリヌクレオチド及び残基）を意味する「修飾されていない核酸」を具体的に対象とする。

【0029】

[0033] 医薬上許容される：本明細書において使用されるように、用語「医薬上許容される」とは、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応又はその他の問題若しくは合併症を伴わず、妥当なリスク・ベネフィット比に釣り合った、健全な医学的判断の範囲内で、ヒト及び動物の組織との接触において使用するのに適している物質を指す。

【0030】

[0034] ポリペプチド：本明細書において使用されるように、「ポリペプチド」は、一般的に言えば、ペプチド結合によって互いに結合している一連の少なくとも2個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、各々が少なくとも1つのペプチド結合によって別のものと結合している、少なくとも3~5個のアミノ酸を含み得る。当業者

10

20

30

40

50

ならば、ポリペプチドは、ポリペプチド鎖に組み込まれることができるかどうかに関わらず、「非天然」アミノ酸又はその他の実体を所望により含むこともあるということは理解する。

【0031】

[0035]実質的相同性：語句「実質的相同性」とは、本明細書において、アミノ酸又は核酸配列間の比較を指すよう使用される。当業者には理解されるように、一般に、2種の配列は、それらが、対応する位置において相同な残基を含有する場合に、「実質的に相同である」と考えられる。相同な残基は、同一残基であってもよい。或いは、相同な残基は、適宜同様の構造的及び/又は機能的特徴を有する非同一致残基であってもよい。例えば、当業者には周知であるように、特定のアミノ酸は、通常、「疎水性」又は「親水性」アミノ酸として、及び/又は「極性」又は「非極性」側鎖を有するとして分類される。あるアミノ酸の、同一種類の別のものとの置換は、「相同」置換と考えられ得ることが多い。

10

【0032】

[0036]この技術分野では周知であるように、アミノ酸又は核酸配列は、ヌクレオチド配列のためのBLASTN及びアミノ酸配列のためのBLASTP、gappedBLAST及びPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラム中で入手可能なものを含めた種々のアルゴリズムのいずれかを使用して比較され得る。例示的なこのようなプログラムは、Altschulら、Basic local alignment search tool、J. Mol. Biol.、215巻(3号)：403~410頁、1990年；Altschulら、Methods in Enzymology；Altschulら、「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」、Nucleic Acids Res. 25巻：3389~3402頁、1997年；Baxevanisら、Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins、Wiley、1998年；及びMisenerら(編)、Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology、132巻)、Humana Press、1999年に記載されている。上記のプログラムは、相同配列を同定することに加えて、通常、相同性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、2種の配列は、対応する残基のうち、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上が、残基の関連する一続きにわたって相同である場合に、実質的に相同であると考えられる。いくつかの実施形態では、関連する一続きは、完全配列である。いくつかの実施形態では、関連する一続きは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個又はそれを超える残基である。

20

30

【0033】

[0037]実質的同一性：語句「実質的同一性」とは、本明細書において、アミノ酸又は核酸配列間の比較を指すよう使用される。当業者には理解されるように、2種の配列は、一般に、対応する位置に同一残基を含有する場合に「実質的に同一である」と考えられる。当技術分野では周知であるように、アミノ酸又は核酸配列は、ヌクレオチド配列のためのBLASTN及びアミノ酸配列のためのBLASTP、gappedBLAST及びPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラム中で入手可能なものを含めた種々のアルゴリズムのいずれかを使用して比較され得る。例示的なこのようなプログラムは、Altschulら、Basic local alignment search tool、J. Mol. Biol.、215巻(3号)：403~410頁、1990年；Altschulら、Methods in Enzymology；Altschul

40

50

ら、Nucleic Acids Res. 25巻：3389～3402頁、1997年；Baxevanisら、Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins、Wiley、1998年；及びMisenerら（編）、Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology、132巻)、Humana Press、1999年に記載されている。上記のプログラムは、同一配列を同定することに加えて、通常、同一性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、2種の配列は、対応する残基のうち、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上が、残基の関連する一続きにわたって同一である場合に、実質的に同一であると考えられる。いくつかの実施形態では、関連する一続きは、完全配列である。いくつかの実施形態では、関連する一続きは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個又はそれを超える残基である。

10

【0034】

[0038]患っている：疾患、障害又は状態（例えば、HCMV感染）を「患っている」個体は、疾患、障害又は状態の1種又は複数の症状を有すると診断されている、及び/又は示す。

20

【0035】

[0039]に対して感受性がある：疾患、障害又は状態（例えば、HCMV感染）「に対して感受性がある」個体は、疾患、障害又は状態を発症するリスクにある。いくつかの実施形態では、疾患、障害又は状態に対して感受性がある個体は、疾患、障害又は状態の任意の症状を示さない。いくつかの実施形態では、疾患、障害又は状態に対して感受性がある個体は、疾患、障害及び/又は状態を有すると診断されていない。いくつかの実施形態では、疾患、障害又は状態に対して感受性がある個体は、疾患、障害又は状態の発症と関連する条件に曝露された個体である（例えば、個体は、HCMVに曝露されている）。

【0036】

[0040]症状が低減される：本開示によれば、特定の疾患、障害又は状態の1種又は複数の症状の規模（例えば、強度、重篤度など）又は頻度が低減される場合に「症状が低減される」。明確にするために、特定の症状の発生の遅延は、その症状の頻度の低減の1つの形態と考えられる。本開示が、症状が排除される症例のみに制限されることは意図されない。本開示は、1種又は複数の症状が、完全に排除されなくとも、低減される（それによって対象の状態が「改善される」）ような治療を明確に考慮する。

30

【0037】

[0041]治療上有効な量：本明細書において使用されるように、用語「治療上有効な量」とは、任意の医学的処置に適用できる妥当なリスク・ベネフィット比で、治療された対象に治療効果を付与するのに十分な量を指す。治療効果は、客観的なもの（すなわち、何らかの試験又はマーカーによって測定可能）である場合も、主観的なもの（すなわち、対象が、効果の指標を与えるか、効果を感じる）である場合もある。特に、「治療上有効な量」とは、疾患と関連する症状を回復させること、疾患の発症を予防又は遅延させること及び/又は疾患の症状の重篤度若しくは頻度を減少させることなどによって、所望の疾患又は状態を治療する、回復させる、若しくは予防するのに、又は検出可能な治療又は予防効果を示すのに有効な治療用タンパク質又は組成物の量を指す。治療上有効な量は、複数の単位用量を含み得る投与計画で一般に投与される。任意の特定の免疫原性組成物については、治療上有効な量（及び/又は有効な投与計画内の適当な単位用量）は、例えば、投与経路に応じて、その他の医薬品との組合せに応じて変わり得る。また、任意の特定の患者のための特定の治療上有効な量（及び/又は単位用量）は、治療されている障害及び障害の重篤度；使用される特定の医薬品の活性；使用される特定の組成物；患者の年齢、体重

40

50

、全身の健康状態、性別及び食事；投与時間、投与経路及び／又は使用される特定の免疫原性組成物の排泄若しくは代謝の速度；治療期間；及び医学の技術分野において周知である同様の因子を含めた種々の因子に応じて変わり得る。

【 0 0 3 8 】

[0042]治療：本明細書において使用されるように、用語「治療」（また、「治療する」又は「治療している」とは、特定の疾患、障害及び／又は状態（例えば、HCMV感染）の1種若しくは複数の症状若しくは特徴又は疾患への素因を、部分的若しくは完全に緩和する、回復させる、軽減する、阻害する、その発症を遅延させる、その重篤度を低減する及び／又はその罹患率を低減する免疫原性組成物の任意の投与を指す。このような治療は、関連疾患、障害及び／又は状態の徴候を示さない対象のもの、及び／又は疾患、障害、及び／又は状態の早期徴候のみを示す対象のものであり得る。或いは、又はさらに、このような治療は、関連疾患、障害及び／又は状態の1種又は複数の確立された徴候を示す対象のものであり得る。特定の実施形態では、用語「治療している」とは、患者のワクチン接種を指す。

10

【 0 0 3 9 】

[0043]指向性：本明細書において使用されるように、ウイルス及びその他の病原体に関連して、用語「指向性」又は「宿主指向性」又は「細胞指向性」とは、一般に、ウイルス又は病原体の、特定の細胞型に感染する能力を指す。指向性は、ウイルス又は病原体が、特定の宿主種又はそれらの種内の特定の細胞型を優先的に標的とするよう進化した方法を指す場合もある。例えば、HCMVは、通常、実質的あらゆる臓器の実質細胞、結合組織細胞及び種々の造血細胞型を含めた、その宿主内の際立って広い細胞範囲に感染できる。上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞及び平滑筋細胞が、ウイルス複製の主な標的である。しかし、種々の細胞の指向性は、例えば、UL128～131遺伝子座内の変更から、異なるHCMV株の間で大きく変わる。いくつかの実施形態では、HCMV株は、線維芽細胞に感染できるが、上皮細胞及び／又は内皮細胞には感染できない。いくつかの実施形態では、HCMV株は、線維芽細胞、上皮細胞及び内皮細胞に感染できる。

20

【 0 0 4 0 】

[0044]ワクチン接種：本明細書において使用されるように、用語「ワクチン接種」とは、例えば、疾患を引き起こす物質（例えば、HCMV）に対する免疫応答を生じさせるよう意図される組成物の投与を指す。本開示の目的上、ワクチン接種は、疾患を引き起こす作用物質に対する曝露の前、その間及び／又はその後、特定の実施形態では、作用物質に対する曝露の前、その間及び／又はそのすぐ後に投与され得る。いくつかの実施形態では、ワクチン接種は、ワクチン接種組成物の、適宜、時間間隔のあいた複数回の投与を含む。

30

【 0 0 4 1 】

[0045]ベクター：本明細書において使用されるように、「ベクター」とは、結合している別の核酸を輸送できる核酸分子を指す。いくつかの実施形態では、ベクターは、真核細胞及び／又は原核細胞などの宿主細胞において、連結された核酸を染色体外複製及び／又は発現できる。作動可能に連結している遺伝子の発現を指示できるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

40

【 0 0 4 2 】

[特定の実施形態の詳細な説明]

[0046]とりわけ、本開示内容は、宿主細胞におけるHCMV感染のレベルを決定するのに、拡張して、サンプル中に存在する中和抗体のレベルを決定するのに有用な方法を提供する。本開示内容は、蛍光部分を有するHCMVウイルスによって、ウイルス感染の検出が可能になる（例えば、宿主細胞をウイルスと接触させた後に細胞中の蛍光を評価することによって）という認識を包含する。いくつかの実施形態では、HCMV感染のレベルは、ウイルスが、対象から得た試験サンプル（例えば、血清サンプル）とともにプレインキュベートされている蛍光検出によって決定される。いくつかの実施形態では、対象は候補HCMVワクチンが投与されている。

50

【0043】

I. HCMV感染及びワクチン

[0047] ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、 γ -ヘルペスウイルスは、普遍的に生じる病原体である。一般に、細胞へのヘルペスウイルスの侵入は、吸着及び受容体結合と、それに続く、ウイルスエンベロープの細胞膜との融合によって開始される複雑なプロセスである。融合は、一般に、原形質膜又はエンドソーム膜のいずれかで起こる。HCMVは、*in vivo*で、上皮細胞、内皮細胞及び線維芽細胞を含めた複数の細胞種に感染する (Plachter Bら、1996年 *Adv Virus Res* 46巻: 195~261頁)。線維芽細胞の原形質膜と融合し (Compton Tら、1992年 *Virology* 191巻: 387~395頁)、エンドサイトーシスによって網膜色素上皮細胞及び臍帯静脈内皮細胞に侵入する (Bodaghi Bら、1999年 *J Immunol* 162巻: 957~964頁; Ryckman BJら、2006年 *J Virol* 80巻: 710~722頁)。ヘルペスウイルスがその侵入経路を選択する機序は、依然としてわかっていない。一般に、侵入経路は主に宿主細胞によって決定されると考えられているが、ピリオン糖タンパク質の向性の役割の証拠がある (Wang Xら、1998年 *J Virol* 72巻: 5552~5558頁)。HCMVは、2種のgH/gL複合体: gH/gL/gO及びgH/gL/UL128/UL130/UL131をコードする。gO含有複合体は、線維芽細胞感染にとって十分であるのに対し、pUL128/UL130/UL131含有複合体は、内皮及び上皮細胞のHCMV感染にとって重要である。本明細書において使用されるように、ウイルス及びその他の病原体に関連して、用語「指向性」又は「宿主指向性」又は「細胞指向性」とは、一般に、ウイルス又は病原体の、特定の細胞型に感染する能力を指す。指向性は、ウイルス又は病原体が、特定の宿主種又はそれらの種内の特定の細胞型を優先的に標的とするよう進化した方法を指す場合もある。いくつかの実施形態では、HCMV株は、線維芽細胞に感染できるが、上皮細胞及び/又は内皮細胞には感染できない。いくつかの実施形態では、HCMV株は、線維芽細胞、上皮細胞及び内皮細胞に感染できる。

【0044】

[0048] HCMVは、40歳までに成人の50~85%に感染する (Gershon A Aら、1997年 *Viral Infections of Humans*、第4版、New York; Plenum Press: 229~251頁)。誕生後にHCMVを獲得するほとんどの健常な個体は、あるとしても、2、3の症状しか発症しない。しかし、造血細胞移植 (HCT) 及び実質臓器移植 (SOT) のレシピエントなどの免疫無防備状態の個体では、HCMV疾患は、相当な罹病率及び死亡率の原因である (Pass RF 2001 *Cytomegalovirus. In Fields Virology*、第4版、Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkens: 2675~2705頁)。SOT又はHCT集団では、HCMV疾患は、ドナー臓器若しくはHCTから伝染した新規感染から起こり得るか、又はレシピエントにおける潜在性ウイルスの再活性化の結果として再発し得る。HIV感染個体では、HCMV感染は、抗レトロウイルス治療の有効性に関わらず、AIDS及び死亡への進行を加速する (Deayton JRら、2004年 *Lancet* 363巻: 2116-2121)。さらに、米国では、HCMVは、最もよくある子宮内感染であり、毎年、およそ8,000人の乳児 (幼児) において、死亡又は聴覚消失及び精神遅滞を含めた重篤な先天的欠損症をもたらす先天性の異常を引き起こす (Stagon Sら、1986年 *JAMA* 256巻: 1904~1908頁)。

【0045】

[0049] HCMVを制御する免疫応答は、不完全にしか理解されていない。その他のヒトヘルペスウイルスに対する類似性によって、細胞性及び体液性免疫応答の両方とも、重要な役割を果たすと考えられ得る (Kohl S 1992年 *Current topics in Microbiology and Immunology* 179巻: 75~88頁)。マウスCMVについて、細胞傷害性T細胞応答又は中和抗体の受動的移動

は、致死的な抗原曝露から防御するのに十分であるということがわかった (R a p p M
ら、1993年 Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease 327 ~
332頁; Reddehase MJら、198 J Virology 61巻: 3
102 ~ 3108頁)。

【0046】

[0050]免疫無防備状態の人におけるHCMVの制御は、主に細胞性免疫応答と関連して
いる; CD8⁺及びCD4⁺Tリンパ球の両方が、CMV疾患に対する防御にとって重要
である (G a m a d i a L Eら、2003年 Blood 101巻: 2686 ~ 26
92頁; C o b b o l d Mが、2005年 J Exp Med 202巻: 379 ~ 10
386頁)。CMVに対する細胞性免疫応答は、ウイルスの外被、エンベロープとカプシ
ドの間のウイルス粒子の領域中に見られるいくつかの抗原に対する、CD4⁺ヘルパーT
リンパ球及びCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球応答を含む。健常なドナーから得たCMV特
異的CD4⁺及びCD8⁺T細胞の最近の研究は、一連のCMVオープンリーディングフ
レームから得た重複するペプチドを使用して、CMV感染後に認識される抗原を同定した
(S y l w e s t e r A Wら、2005年 J Exp Med 202巻: 673 ~
685頁)。CMV外被ホスホタンパク質65 (p p 6 5) 及び表面糖タンパク質gBが
、CD4⁺T細胞によって最も頻繁に認識される抗原であり、pp65もまた、CD8⁺
T細胞によって最も頻繁に認識される抗原の1種であった。

【0047】

[0051]移植の状況とは対照的に、ウイルスに対する母系の体液性免疫応答は、新生児に
おいてHCMV疾患を予防するのに重要であると思われる。表面糖タンパク質、特に、g
Bに対する抗体は、HCMVの母系的胎児移動に対する防御にとって決定的であると思わ
れる (F o w l e r K Bら、2003年 JAMA 289巻: 1008 ~ 1011頁)
。さらに、以前のワクチン接種研究において、再感染からの防御は、中和抗体と相関関係
があるということがわかった (A d l e r S Pら、1995年 J Infectio
us Diseases 171巻: 26 ~ 32頁)。HCMVに対する体液性免疫応答
は、ウイルス粒子の外側エンベロープ中に存在するウイルスのエンベロープ糖タンパク質
(例えば、gB及びgH)に対する応答によって支配されている。

【0048】

[0052]HCMVの場合には、ウイルスが厳密に種特異的であり、動物モデル系が利用可
能ではないので、免疫学的エフェクター機能の直接評価は困難である。しかし、マウスC
MV及びモルモットCMVは、これらの宿主種におけるワクチン戦略を評価するために使用
されている。

【0049】

[0053]防御的T細胞及び中和抗体応答の両方を誘導するCMVワクチンは、感染を防ぐ
か、又は先天性感染若しくは移植によるCMV疾患を回復させる可能性を有する。

【0050】

[0054]ヒトにおいて試験された第1の生存する弱毒化HCMVワクチン候補は、実験室
に適応したAD169株に基づいていた。別の実験室に適応した臨床単離物、Towne
株を用いるその後の試験によって、生存する弱毒化ワクチンは、中和抗体並びにCD4⁺
及びCD8⁺Tリンパ球応答を誘発し得るということが確認された。Towneワクチン
の有効性は、腎移植レシピエントにおける一連の研究において評価された。Towneワ
クチンは、HCMV疾患に対する防御的影響を提供したが、移植後のHCMV感染を防ぐ
ことはできなかった (P l o t k i n S Aら、1984年 Lancet 1巻: 52
8 ~ 530頁)。Towneワクチンはまた、そのHCMV感染小児からの感染の獲得か
ら防ぐことができなかった、小児担当グループダイケアを受ける血清陰性母体のプラセボ
対照試験においても評価された (A d l e r S Pら、1995年 J Infectio
us Diseases 171巻: 26 ~ 32頁)。これらの研究の解釈は、Tow
neワクチンは、過剰に弱毒化されたというものであった。この可能性を調査するために

、CMVの弱毒化されていない「Toledo」株の領域が、Towneゲノムの対応する領域と置換された一連の遺伝子組換え体は、Towneワクチン弱毒化に関する突然変異の、すべてではないが一部を含有するTowne/Toledo「キメラ」の構築をもたらした(Heineman TCら2006年 J Infect Disease 193巻:1350~1360頁)。4種のTowne/Toledo「キメラ」の安全性及び認容性が、第I相試験において試験されている。不顕性HCMV感染を確立する潜在的リスクへの長期安全性の懸念が、生存する弱毒化ワクチンのさらなる開発を妨げてきた。

【0051】

[0055]先頭に立つサブユニットCMVワクチン候補は、自然感染の際に高力価ウイルス中和抗体反応を誘発するこのタンパク質の能力のために、エンベロープ糖タンパク質、gB(精製組換えgBワクチンは、Sanofi-Pasteur Vaccinesによって製造されている)に基づいている。組換えgBワクチンは、中和抗体反応を誘発し、優れた安全性プロフィールを有するが、中和抗体反応のその他の糖タンパク質標的を排除し、より重要なことにTリンパ球標的を排除する。ワクチンは、免疫原性を最適化するためにMF59アジュバントを必要とする。最近の試験では、このワクチンは、若い女性における第2相臨床試験においてCMV感染の予防について全体で50%の有効性を提供した(Pass RFら、2009年 N Engl J Med 360巻:1191~1199頁)。サブユニットワクチン候補として評価されているその他のウイルスタンパク質として、pp65及びIE1が挙げられ、その両方ともT細胞応答を誘発する。

【0052】

[0056]DNAワクチンは、動物において頑強な細胞性及び体液性免疫応答を誘発し、ワクチン設計における特異性及び精密度に適している。CMVに対するDNAワクチンが開発され、候補標的免疫原としてgB、IE1及びpp65タンパク質に焦点が当てられた。pp65及びgBをコードするプラスミドDNAを使用する二価のCMV DNAワクチン候補(Wloch MK 2008年 J Infectious Diseases 297巻:1634~1642頁)及びIE1遺伝子産物をコードする第3のプラスミドも含む三価のワクチン候補(Jacobson MA 2009年 Vaccine 27巻:1540~1548頁)が、Vical Vaccinesによって開発された(米国特許第7,410,795号)。三価DNAワクチンは、単独で、投与経路に関わりなく最小の免疫原性を有していた。しかし、CMV DNAワクチンは、生存する弱毒化CMV(Towne)の投与後に観察されたCMV抗原に対する記憶応答を安全に抗原刺激すると思われた。

【0053】

[0057]ベクターワクチンアプローチでは、対象とする遺伝子産物は、非複製(普通、ウイルス)担体との関連で発現される。この一例として、Virogenetics及びSanofi-Pasteur Vaccineによって開発されたALVACと呼ばれるカナリアボックスベクターがあり、これは、哺乳類細胞において不稔に複製する弱毒化ボックスウイルスである。CMV gBを発現するALVAC及びpp65を発現するALVAC(米国特許第6,267,965号)は、臨床試験において試験されている。ALVAC-CMV(gB)は、中和抗体を誘導しなかったが、gBサブユニット/MF59ワクチンを用いるその後の免疫処置後に中和抗体力価をブーストしないと思われたものの(Bernstein DIら 2002年 J Infectious Diseases 185巻:686~690頁)、Towne株CMVでのその後の感染後のより高い中和抗体力価に対して抗原刺激した(Adler SPら 1999年 J Infectious Diseases 180巻:843~846頁)。pp65、ALVAC-CMV(pp64)を発現するカナリアボックスベクターは、元々血清陰性のボランティアすべてにおいて、天然に血清陽性の個体に匹敵する頻度で長く持続するCTL反応を誘導した(Berencsi Kら、2001年 J Infectious Diseases 183巻:1171~1179頁)。gBをベクターワクチンとして発現さ

10

20

30

40

50

せるために使用される別のアプローチとして、AlphaVax Inc製のアルファウイルスレプリコン系の使用がある（米国特許第7,419,674号）。このアプローチは、pp65、IE1又はgBタンパク質を発現するウイルス様レプリコン粒子（VRP）を製造するためにアルファウイルス、ベネズエラウマ脳炎（VEE）ウイルスの弱毒化株に由来する増殖に欠陥のある単一サイクルRNAレプリコンベクター系を含む（Bersteinら、2010年 Vaccine 28巻：484～493頁）。2成分アルファウイルスレプリコンワクチンを使用して、3種のCMVタンパク質を、CMV gB（Towne株）の可溶性形態として発現させ、pp65/IE1融合タンパク質（Reap EAら、2007年 Vaccine 25巻：7441～7449頁）は安全であるとわかり、高レベルの中和抗体及び多機能性CD4⁺及びCD8⁺抗原特異的T細胞応答を誘導した。高用量群の幾何平均力価（Geometric Mean Titre）（GMT）は、アッセイにおいて試験された12人の自然感染したCMV血清陽性個体におけるGMTの約半分であった。

10

【0054】

[0058]現在、前臨床開発中であるHCMVに対するワクチン接種の候補として、「デンスボディ（dense body）」ワクチンがある。デンスボディ（DB）は、細胞培養においてCMVの複製の際に形成される、エンベロープを持つ複製に欠陥のある粒子である。それらは、エンベロープ糖タンパク質及び多量のpp65タンパク質の両方を含有する。DBは、非感染性であり、免疫原性であるが、ワクチンレシピエントにおいて不顕性のHCMV感染を確立できない。DBは、ウイルスの遺伝子発現の非存在下でマウスにおいてウイルス中和抗体及びT細胞応答を誘導できるとわかっている（Pepperl Sら、2000年 J Virol 74巻：6132～6146頁、国際公開第00/53729号パンフレット及び米国特許第6,713,070号）。

20

【0055】

[0059]HCMVに対するワクチン接種のために考慮されるさらなる候補として、ウイルス様粒子（VLP）がある。レトロウイルスは、レトロウイルス科（Retroviridae）に属するエンベロープ型RNAウイルスである。レトロウイルスによる宿主細胞の感染後、逆転写酵素によってRNAがDNAに転写される。次いで、インテグラーゼ酵素によってDNAが宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その後、宿主細胞のDNAの一部として複製する。レトロウイルス科は、以下の属、アルファレトロウイルス（Alpharetrovirus）、ベータレトロウイルス（Betaretrovirus）、ガンマレトロウイルス（Gammaretrovirus）、デルタレトロウイルス（Deltaretrovirus）、イプシロンレトロウイルス（Epsilonretrovirus）、レンチウイルス（Lentivirus）及びスプーマウイルス（Spumavirus）を含む。この科のレトロウイルスの宿主は、一般に、脊椎動物である。レトロウイルスは、宿主細胞膜に由来する脂質二重層によって囲まれた、球状のヌcleoカプシド（ウイルス構造タンパク質との複合体中のウイルスのゲノム）を含有する感染性ビリオンを製造する。

30

【0056】

[0060]レトロウイルスベクターを使用して、感染性であり、複製能力があるか、又は複製に欠陥のあるかのいずれかであるエンベロープ型ビリオンを作製できる。複製可能感染性レトロウイルスベクターは、ビリオン合成に必要な遺伝子のすべてを含有し、ひとたび宿主細胞の感染が起こると、それ自体で増殖し続ける。複製に欠陥のある感染性レトロウイルスベクターは、最初の感染後に拡散しない。これは、レトロウイルスのコーディング領域のほとんどの、移行される遺伝子又はヌcleoチド配列での置換によって達成され、その結果、ベクターは、複製のさらなるラウンドに必要なタンパク質を作製できない。

40

【0057】

[0061]或いは、又はさらに、レトロウイルスベクターを使用して、レトロウイルス由来のゲノムを欠き、非感染性及び非複製性の両方であるウイルス様粒子（VLP）を作製できる。VLPの有利な特性のために、VLPは、抗原送達系として利用され得る。さらに

50

、VLPは、非感染性であるので、免疫原性組成物（例えば、ワクチン）として安全に投与され得る。VLPは、一般に、上記のエンベロープ型ピリオンと構造的に類似しているが、レトロウイルス由来ゲノムを欠き、そのため、ウイルスの複製が起こる可能性が低くなる。一部のウイルス（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）などの Maus 白血病ウイルス）のカプシドタンパク質（例えば、Gag）の発現は、対応する天然ウイルスと同様の粒子への自己組織化につながり、この粒子はウイルスの遺伝物質を含まない。

【0058】

[0062]さまざまなVLPが調製されている。例えば、エンベロープタンパク質及び/又は表面糖タンパク質を含むか、又は含まない単一又は複数のカプシドタンパク質を含むVLPが調製されている。いくつかの場合には、ヘパドナウイルス（例えば、Engerix（商標）、GSK及びRecombivax HB（商標）、Merck）、パピローマウイルス（例えば、Cervarix（商標）、GSK及びGardasil（商標）、Merck）、パルポウイルス（parovirus）又はポリオーマウイルスから調製されたVLPについて示されるように、VLPは、非エンベロープ型であり、1つの主要なカプシドタンパク質のみの発現によって組み立てられる。いくつかの実施形態では、VLPは、エンベロープ型であり、対応する天然ウイルスに見られる複数の抗原タンパク質を含み得る。VLPは、通常、その対応する天然ウイルスに似ており、多価粒子構造であり得る。いくつかの実施形態では、抗原タンパク質は、VLP構造の成分としてVLPの内部で、及び/又はVLPの表面で提示され得る。いくつかの実施形態では、VLPとの関連での抗原の提示は、その他の形態の抗原提示、例えば、VLPと関連していない可溶性抗原と比較して、抗原に対する中和抗体の誘導にとって有利である。中和抗体は、ほとんどの場合、三次又は四次構造を認識し、これは、その天然ウイルスコンホメーションにおいてエンベロープ糖タンパク質のような抗原性タンパク質を提示することを必要とすることが多い。或いは、又はさらに、VLPは、細胞性免疫（例えば、T細胞応答）を誘導する状況において、抗原の提示にとって有用であり得る。いくつかの実施形態では、VLP系における抗原の組合せの使用は、改善された免疫応答を生じさせ得る。

【0059】

II. 検出可能なHCMV

[0063]上記のように、とりわけ、本開示内容は、宿主細胞におけるHCMV感染のレベルを決定するのに、拡張して、サンプル中に存在する中和抗体のレベルを決定するための方法を提供する。本開示内容は、蛍光部分を有するHCMVウイルスによって、ウイルス感染の検出が可能になる（例えば、宿主細胞をウイルスと接触させた後に細胞中の蛍光を評価することによって）という認識を包含する。いくつかの実施形態では、HCMV感染のレベルは、ウイルスが、対象から得た試験サンプル（例えば、血清サンプル）とともにプレインキュベートされている蛍光検出によって決定される。いくつかの実施形態では、対象は候補HCMVワクチンが投与されている。

【0060】

[0064]蛍光部分を含むHCMVウイルスを利用する方法が提供される。本明細書に記載された宿主細胞に感染できる任意のHCMVウイルスは、蛍光部分を含むよう設計することができる。いくつかの実施形態では、線維芽細胞に感染するために、gH/gL/gO複合体のすべて又は一部を含むHCMVウイルスを、蛍光部分を含むよう設計することができる。いくつかの実施形態では、内皮細胞及び/又は上皮細胞に感染するために、gH/gL/UL128/UL130/UL131複合体のすべて又は一部を含むHCMVウイルスを、蛍光部分を含むよう設計することができる。蛍光検出を受け入れられる改変されたHCMV株は、当技術分野で公知であり、本開示内容に従って使用され得る。例えば、UL32-EGFP-HCMV-TB40は、HCMV株TB40の、GFPと融合されたTB40 UL32遺伝子を保持するプラスミド（ATCC；VR-1578）を用いるin vitro組換え体である。UL32-EGFP-HCMV-TB40組換え株は、UL32遺伝子の産物である外被リンタンパク質pp150のC末端と融合してい

る GFP を有する組換え HCMV ウイルスを生じさせる (Sampaio ら、2005 年 Journal of Virology 79 (5) : 2754 頁)。GFP は、ウイルス構造タンパク質と結合しているため、ウイルス粒子は、適当な照明下で緑色の蛍光を発する。UL32-EGFP-HCMV-TB40 株は、線維芽細胞に対して指向性を有すると実証されている (Sampaio ら、2005 年 Journal of Virology 79 (5) : 2754 頁)。蛍光検出を受け入れられるさらなる HCMV 株として、CMV 株 AD169 ゲノム及び GFP リポーターカセットを含有する HB15-t178b がある (Saccoccio ら、2011 年 Vaccine 29 (15) : 2705 頁)。

【0061】

[0065]用語、蛍光とは、本明細書において使用されるように、発光する部分を指すということは理解されるべきである。通常、蛍光部分は、ある波長で電磁エネルギーを吸収し、第2の波長で電磁エネルギーを放出し得る電子を含有する。細胞中のいくつかのタンパク質又は小分子は、天然に蛍光である(例えば、NADH、トリプトファン、内因性クロロフィル、フィコエリトリン又は緑色蛍光タンパク質(GFP))。蛍光タンパク質の種々の突然変異体が設計されており、本開示内容に従って使用され得るということは当然のことである。中でも、EGFP、青色蛍光タンパク質(例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal)、シアン蛍光タンパク質(例えば、ECFP、Cerulean、CyPet)、黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、Citrine、Venus、YPet)、酸化還元感受性 GFP (例えば、roGFP)及び単量体 GFP など。GFP 及びその他の蛍光タンパク質は、単独で、又は融合タンパク質として細胞において外因的に発現され得る。このアプローチによって、蛍光タンパク質が、細胞内局在性及び発現パターンなどの任意の数の生物学的事象のレポーターとして使用されることが可能となる。

【0062】

[0066]或いは、又はさらに、特定の又は一般的なタンパク質、核酸、脂質又は小分子は、小分子、タンパク質又は量子ドットであり得る外因性フルオロフォア、蛍光色素で標識されてもよい。例示的フルオロフォアとして、それだけには限らないが、1,5IAEDANS; 1,8-ANS; 4-メチルウンベリフェロン; 5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン; 5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM); 5-カルボキシナフトフルオレセイン; 5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA); 5-ヒドロキシトリプタミン(5-HAT); 5-ROX(カルボキシ-X-ローダミン); 6-カルボキシローダミン6G; 6-CR6G; 6-JOE; 7-アミノ-4-メチルクマリン; 7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD); 7-ヒドロキシ-4-1メチルクマリン; 9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン(ACMA); ABQ; 酸性フクシン; アクリジンオレンジ; アクリジンレッド; アクリジンイエロー; アクリフラビン; アクリフラビンフォイルゲンSITSA; エクオリン(蛍光タンパク質); AFP-自己蛍光タンパク質--(Quantum Biotechnologies)sgGFP、sgBFPを参照のこと; アレクサフルオル(登録商標)350; アレクサフルオル(登録商標)430; アレクサフルオ(登録商標)488; アレクサフルオル(登録商標)532; アレクサフルオル(登録商標)546; アレクサフルオル(登録商標)568; アレクサフルオル(登録商標)594; アレクサフルオル(登録商標)633; アレクサフルオル(登録商標)647; アレクサフルオル(登録商標)660; アレクサフルオル(登録商標)680; アリザリンコンプレキソン; アリザリンレッド; アロフィコシアニン(APC); AMC, AMCA-S; アミノメチルクマリン(AMCA); AMCA-X; アミノアクチノマイシンD; アミノクマリン; アニリンブルー; ステアリン酸アンソシル; APC-Cy7; APTRA-BTC; APTS; アストラゾンブリリアントレッド4G; アストラゾンオレンジR; アストラゾンレッド6B; アストラゾンイエロー7GLL; アタブライン; ATTO-TAG(商標)CBQCA; ATTO-TAG(商標)FQ; オーラミン; オーロホスフィンG; オーロホスフィン; BAO9(ピ

10

20

30

40

50

スアミノフェニルオキサジアゾール) ; B C E C F (高 p H) ; B C E C F (低 p H) ;
 硫酸ベルベリン ; ラクタマーゼ ; B F P 青色偏移 G F P (Y 6 6 H) ; 青色蛍光タンパ
 ク質 ; B F P / G F P F R E T ; ビマン ; ビスベンゼミド ; ビスベンジミド (ヘキスト
) ; ビス - B T C ; プランコフォル F F G ; プランコフォル S V ; B O B O (商標) - 1
 ; B O B O (商標) - 3 ; ボディピー - 4 9 2 / 5 1 5 ; ボディピー - 4 9 3 / 5 0 3 ; ボデ
 イピー - 5 0 0 / 5 1 0 ; ボディピー ; 5 0 5 / 5 1 5 ; ボディピー - 5 3 0 / 5 5 0 ; ボデ
 イピー - 5 4 2 / 5 6 3 ; ボディピー - 5 5 8 / 5 6 8 ; ボディピー - 5 6 4 / 5 7 0 ; ボディ
 ピー - 5 7 6 / 5 8 9 ; ボディピー - 5 8 1 / 5 9 1 ; ボディピー - 6 3 0 / 6 5 0 - X ; ボデ
 イピー - 6 5 0 / 6 6 5 - X ; ボディピー - 6 6 5 / 6 7 6 ; ボディピー - F 1 ; ボディピー - F
 L A T P ; ボディピー - F 1 - セラミド ; ボディピー - R 6 G S E ; ボディピー - T M R ; 10
 ボディピー - T M R - X コンジュゲート ; ボディピー - T M R - X , S E ; ボディピー - T R ;
 ボディピー - T R A T P ; ボディピー - T R - X S E ; B O - P R O (商標) - 1 ; B O
 - P R O (商標) - 3 ; プリリアントスルホフラビン F F ; B T C ; B T C - 5 N ; カル
 セイン ; カルセイブルー ; カルシウムクリムゾン (商標) ; カルシウムグリーン (商標
) ; カルシウムグリーン (商標) - 1 C a ²⁺ 色素 ; カルシウムグリーン (商標) - 2
 C a ²⁺ ; カルシウムグリーン (商標) - 5 N C a ²⁺ ; カルシウムグリーン (商標)
 - C 1 8 C a ²⁺ ; カルシウムオレンジ (商標) ; カルコフロールホワイト ; カルボキ
 シ - X - ローダミン (5 - R O X) ; カスケードブルー (登録商標) ; カスケードイエロ
 ー (商標) ; カテコールアミン ; C C F 2 (G e n e B l a z e r) ; C F D A ; C F P
 (シアン蛍光タンパク質) ; C F P / Y F P F R E T ; クロロフィル ; クロモマイシン 20
 A ; クロモマイシン A ; C L - N E R F ; C M F D A ; セレンテラジン ; セレンテラジン
 c p ; セレンテラジン f ; セレンテラジン f c p ; セレンテラジン h ; セレンテラジン h
 c p ; セレンテラジン i p ; セレンテラジン n ; セレンテラジン O ; クマリンファロイジ
 ン ; C - フィコシアニン ; C P M I メチルクマリン ; C T C ; C T C ホルマザン ; C y
 2 (商標) ; C y 3 . 1 8 ; C y 3 . 5 (商標) ; C y 3 (商標) ; C y 5 . 1 8 ;
 C y 5 . 5 (商標) ; C y 5 (商標) ; C y 7 (商標) ; シアン G F P ; サイクリック A
 M P フルオロセンサー (F i C R h R) ; ダブシル ; ダンシル ; ダンシルアミン ; ダン
 シルカダベリン ; ダンシルクロリド ; ダンシル D H P E ; ダンシルフルオライド ; D A P
 I ; ダボキシル ; ダボキシル 2 ; ダボキシル 3 ' D C F D A ; D C F H (ジクロロジヒド
 ロフルオロセインジアセテート) ; D D A O ; D H R (ジヒドロローダミン 1 2 3) ; ジ - 30
 4 - A N E P P S ; ジ - 8 - A N E P P S (非レシオ) ; D i A (4 - ジ 1 6 - A S P)
 ; ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (D C F H) ; D i D - 親油性トレーサ
 ー ; D i D (D i l C 1 8 (5)) ; D I D S ; ジヒドロローダミン 1 2 3 (D H R) ; D
 i l (D i l C 1 8 (3)) ; I ジニトロフェノール ; D i O (D i O C 1 8 (3)) ;
 D i R ; D i R (D i l C 1 8 (7)) ; D M - N E R F (高 p H) ; D N P ; ドーパミ
 ン ; D s R e d ; D T A F ; D Y - 6 3 0 - N H S ; D Y - 6 3 5 - N H S ; E B F P ;
 E C F P ; E G F P ; E L F 9 7 ; エオシン ; エリスロシン ; エリスロシン I T C ; 臭化
 エチジウム ; エチジウムホモ二量体 - 1 (E t h D - 1) ; オイクリシン ; オイコライト
 ; ユウロピウム (1 1 1) クロリド ; E Y F P ; ファストブルー ; F D A ; フォイルゲン
 (P a r a r o s a n i l i n e) ; F I F (ホルムアルデヒド誘導性蛍光) ; F I T C 40
 ; フラゾオレンジ ; F l u o - 3 ; F l u o - 4 ; フルオレセイン (F I T C) ; フルオ
 レセインジアセテート ; フルオロ - エメラルド ; フルオロ - ゴールド (ヒドロキシスチル
 バミジン) ; フルオール - ルビー ; フルオール X ; F M (登録商標) 1 - 4 3 ; F M (登
 録商標) 4 - 4 6 ; フラレッド (商標) (高 p H) ; フラレッド (商標) / F l u o - 3
 ; フラ - 2 ; フラ - 2 / B C E C F ; ゲナクリルプリリアントレッド B ; ゲナクリルプリ
 リアントイエロー - 1 0 G F ; ゲナクリルピンク 3 G ; ゲナクリルイエロー - 5 G F ; ジーン
 プレーザー ; (C C F 2) ; G F P (S 6 5 T) ; G F P 赤色偏移 (r s G F P) ; G F
 P 野生型非 UV 励起 (w t G F P) ; G F P 野生型、UV 励起 (w t G F P) ; G F P u
 v ; グロキサン酸 ; グラニューブルー ; ヘマトポルフィリン ; ヘキスト 3 3 2 5 8 ; ヘ
 キスト 3 3 3 4 2 ; ヘキスト 3 4 5 8 0 ; H P T S ; ヒドロキシクマリン ; ヒドロキシス

チルバミジン (フルオロゴールド) ; ヒドロキシトリプタミン ; I n d o - 1、高カルシウム ; I n d o - 1 低カルシウム ; インドジカルボシアニン (D i D) ; インドトリカルボシアニン (D i R) ; イントラホワイト C f ; J C - 1 ; J O J O - 1 ; J O - P R O - 1 ; レーザープロ ; ロードダン ; L D S 7 5 1 (D N A) ; L D S 7 5 1 (R N A) ; ロイコホール P A F ; ロイコホール S F ; ロイコホール W S ; リサミンローダミン ; リサミンローダミン B ; カルセイン / エチジウムホモ二量体 ; L O L O - 1 ; L O - P R O - 1 ; ルシフェールイエロー ; リソトラッカーブルー ; リソトラッカーブルー - ホワイト ; リソトラッカーグリーン ; リソトラッカーレッド ; リソトラッカーイエロー ; リソセンサーブルー ; リソセンサーグリーン ; リソセンサーイエロー / ブルー ; マググリーン ; マグダラレッド (フロキシシン B) ; マグ - フラレッド ; マグ - フラ - 2 ; マグ - フラ - 5 ; マグ - インド - 1 ; マグネシウムグリーン ; マグネシウムオレンジ ; マラカイトグリーン ; マリーナブルー ; I マキシロンブリリアントフラビン 1 0 G F F ; マキシロンブリリアントフラビン 8 G F F ; メロシアニン ; メトキシクマリン ; ミトトラッカーグリーン F M ; ミトトラッカーオレンジ ; ミトトラッカーレッド ; ミトラマイシン ; モノプロモビマン ; モノプロモビマン (m B B r - G S H) ; モノクロロビマン ; M P S (メチルグリーンピロニンスチルベン) ; N B D ; N B D アミン ; ナイルレッド ; ニトロベンゾキセジドール ; ノルアドレナリン ; ヌクレアファストレッド ; i ヌクレアイエロー ; ナイロサンブリリアントラビン E 8 G ; オレゴングリーン (登録商標) ; オレゴングリーン (登録商標) 4 8 8 ; オレゴングリーン (登録商標) 5 0 0 ; オレゴングリーン (登録商標) 5 1 4 ; パシフィックブルー ; パラロサニリン (フォイルゲン) ; P B F I ; P E - C y 5 ; P E - C y 7 ; P e r C P ; P e r C P - C y 5 . 5 ; P E - テキサスレッド (R e d 6 1 3) ; フロキシシン B (マグダラレッド) ; ホルウィット A R ; ホルウィット B K L ; ホルウィット R e v ; ホルウィット R P A ; ホスフィン 3 R ; フォトレジスト ; フィコエリトリン B [P E] ; フィコエリトリン R [P E] ; P K H 2 6 (S i g m a) ; P K H 6 7 ; P M I A ; ポントクロムブルーブラック ; P O P O - 1 ; P O P O - 3 ; P O - P R O - 1 ; P O - 1 P R O - 3 ; プリムリン ; プロシオンイエロー ; プロピジウムイオデイド (P I) ; P y M P O ; ピレンピロニン ; ピロニン B ; ピロザルブリリアントフラビン 7 G F ; Q S Y 7 ; キナクリンマスタード ; レゾルフィン ; R H 4 1 4 ; R h o d - 2 ; ローダミン ; ローダミン 1 1 0 ; ローダミン 1 2 3 ; ローダミン 5 G L D ; ローダミン 6 G ; ローダミン B ; ローダミン B 2 0 0 ; ローダミン B エクストラ ; ローダミン B B ; ローダミン B G ; ローダミングリーン ; ローダミンファリジジン ; ローダミン : ファロイジン ; ローダミンレッド ; ローダミン W T ; ローズベンガル ; R - フィコシアニン ; R - フィコエリトリン (P E) ; r s G F P ; S 6 5 A ; S 6 5 C ; S 6 5 L ; S 6 5 T ; サファイア G F P ; S B F I ; セロトニン ; セブロンブリリアントレッド 2 B ; セブロンブリリアントレッド 4 G ; セブロン I ブリリアントレッド B ; セブロンオレンジ ; セブロンイエロー L ; s g B F P (商標) (スーパーグロー B F P) ; s g G F P (商標) (スーパーグロー G F P) ; S I T S (プリムリン ; スチルベンイソチオスルホン酸) ; S N A F L カルセイン ; S N A F L - 1 ; S N A F L - 2 ; S N A R F カルセイン ; S N A R F 1 ; ナトリウムグリーン ; スペクトラムアクア ; スペクトラムグリーン ; スペクトラムオレンジ ; スペクトラムレッド ; S P Q (6 - メトキシ - N - (3 スルホプロピル) キノリニウム) ; スチルベン ; スルホローダミン B 及び C ; スルホローダミンエクストラ ; S Y T O 1 1 ; S Y T O 1 2 ; S Y T O 1 3 ; S Y T O 1 4 ; S Y T O 1 5 ; S Y T O 1 6 ; S Y T O 1 7 ; S Y T O 1 8 ; S Y T O 2 0 ; S Y T O 2 1 ; S Y T O 2 2 ; S Y T O 2 3 ; S Y T O 2 4 ; S Y T O 2 5 ; S Y T O 4 0 ; S Y T O 4 1 ; S Y T O 4 2 ; S Y T O 4 3 ; S Y T O 4 4 ; S Y T O 4 5 ; S Y T O 5 9 ; S Y T O 6 0 ; S Y T O 6 1 ; S Y T O 6 2 ; S Y T O 6 3 ; S Y T O 6 4 ; S Y T O 8 0 ; S Y T O 8 1 ; S Y T O 8 2 ; S Y T O 8 3 ; S Y T O 8 4 ; S Y T O 8 5 ; S Y T O X ブルー ; S Y T O X グリーン ; S Y T O X オレンジ ; テトラサイクリン ; テトラメチルローダミン (T R I T C) ; テキサスレッド (登録商標) ; テキサスレッド (商標) - X コンジュゲート ; チアジカルボシアニン (D i S C 3) ; チアジンレッド R ; チアゾールオレンジ ; チオフラビン 5

10

20

30

40

50

;チオフラビンS;チオフラビンTON;チオライト;チオゾールオレンジ;チノポールCBS(カルコフロールホワイト);TIER;TO-PRO-1;TO-PRO-3;TO-PRO-5;TOTO-1;TOTO-3;トリカラー(TriColor)(PE-Cy5);TRITCテトラメチルロダミンソチオシアネート;トルーブルー;トルーレッド;ウルトラライト;ウラニンB;ユビテックスSFC;wt GFP;WW781;X-ローダミン;XRITC;キシレンオレンジ;Y66F;Y66H;Y66W;イエローGFP;YFP;YO-PRO-1;YO-PRO3;YOYO-1;YOYO-3;Sybr Green;チアゾールオレンジ(インターキレート色素);量子ドットなどの半導体ナノ粒子;又はケージドフルオロフォア(光又はその他の電磁エネルギー源で活性化され得る)又はそれらの組合せが挙げられる。

10

【0063】

III. 感染アッセイ

[0067]HCMVの感染力価の決定は、通常、HCMVによる感染に対して感受性である宿主細胞を、任意の試験物質の非存在下で細胞感染を可能にする条件下でウイルス(例えば、蛍光部分を含むHCMV)の段階希釈と接触させることを含む。リポーター遺伝子構築物(例えば、蛍光部分、例えば、GFP)を発現する標的細胞の数が、決定され(例えば、フローサイトメトリーによって)、ウイルス調製物の感染力価が算出され得る。

【0064】

[0068]候補ワクチンが投与されている対象の血清中の中和抗体の存在及び/又は活性を評価するために、血清は、中和抗体がHCMVの感染力を低減するのに十分な期間(例えば、少なくとも15分、少なくとも30分、少なくとも1時間、少なくとも2時間又はそれ以上)、HCMV(例えば、蛍光部分、例えば、GFPを含むHCMV)とともにプレインキュベートされ得る。次いで、血清及びHCMV(例えば、蛍光部分を含むHCMV)のプレインキュベートされた混合物の段階希釈が、HCMVによる感染に感受性である宿主細胞を、感染を可能にする条件下で接触させるために使用され得る。当業者ならば、感染アッセイのための血清の適当な希釈を決定できる。例えば、いくつかの実施形態では、試験される希釈は、1:6、1:12、1:24、1:48、1:96、1:192又はそれらの組合せである。

20

【0065】

[0069]感染を可能にする条件は、中でも、ウイルス株、宿主細胞型、温度、細胞コンフルエンス、ウイルス濃度を含めた種々の因子に応じて変わり得るということは当然のことである。当業者ならば、感染条件を適宜改変できる。いくつかの実施形態では、感染条件は、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間又はそれ以上の宿主細胞のウイルスとともにインキュベーションを含む。細胞の感染のモニタリングは、視覚的細胞形態学評価(例えば、細胞膨潤及び円形化について)及び/又は視覚的蛍光評価(例えば、蛍光顕微鏡などの装置で蛍光を検出すること)を含み得るということも当然である。感染後、宿主細胞は、集められ(例えば、洗浄すること及びトリプシン処理すること及び/又はスクレイピングによって)、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載される蛍光検出法によって解析され得る。

30

40

【0066】

[0070]HCMVによる感染に対して感受性である任意の宿主細胞が本明細書に記載される方法において使用され得る。例示的宿主細胞として、それだけには限らないが、ヒト包皮線維芽細胞(HFF)などのヒト線維芽細胞及びレチナール色素性上皮細胞(ARPE-19)などのヒト上皮細胞が挙げられる。感染アッセイの間に宿主細胞が増殖される培地は、細胞型によって変わり得る。例えば、いくつかの実施形態では、HFF感染培地は、MEM + 5% FBS + 1% Pen Strepを含む。いくつかの実施形態では、ARPE感染培地は、DMEM:F-12 + 1% FBSを含む。

【0067】

50

I V . 蛍光検出及び中和抗体評価

[0071] 蛍光は、例えば、フローサイトメトリー解析、蛍光活性化細胞ソーティング又は流動顕微鏡蛍光測定法を含めた、任意の適当な方法を使用して検出され得る。蛍光検出の感受性は、一般に、検出システムにおける蛍光実体のコピー数、検出機器の効率並びにサンプル中の内因性生物学的蛍光実体から、及び蛍光実体のサンプルとの非特異的会合から生じるバックグラウンド蛍光に対する蛍光実体の蛍光輝度に応じて変わるということは当然のことである。蛍光実体の輝度は、順に、蛍光シグナルをもたらす蛍光実体の量子効率及び蛍光実体の光吸収能（吸光係数によって定量化される）に応じて変わる。

【0068】

[0072] 細胞は、緑色蛍光タンパク質（GFP）などのリポーター分子を使用して、表面及び/又は細胞内蛍光のレベルに基づいて同定及び/又は単離され得るということは理解されるべきである。一般に、蛍光強度とタンパク質製造（例えば、ウイルス感染及び製造）の間の相関が観察される。例えば、いくつかの実施形態では、宿主細胞における高レベルの蛍光強度は、宿主細胞の高レベルのウイルス感染と相関する。

【0069】

[0073] いくつかの実施形態では、細胞は、全体的な蛍光レベル（例えば、蛍光の細胞内局在性に関わりなく）について評価される。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞の特定の細胞内位置（例えば、核）における蛍光レベルについて評価される。一般に、フローサイトメトリーは、多数の細胞の定量的表現型解析を可能にするが、多くのフローサイトメトリーアプリケーションが、それらが定量化される時の細胞をイメージングする能力を含まない。いくつかの実施形態では、細胞の蛍光の検出及び定量化は、感染の評価に十分である。いくつかの場合には、細胞内の蛍光の局在性を決定することが望ましいことであることは当然のことである。いくつかの実施形態では、細胞のフローサイトメトリー解析は、蛍光の視覚的評価と組み合わされ得る。蛍光レベル及び局在性の二重解析は、複数の装置（例えば、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡）を使用して、又は単一装置で実施され得る。局在性解析とともに蛍光解析及び/又は定量化を可能にするこのような装置が、当技術分野で利用可能である。例えば、ImageStream[×]（Amnis（登録商標））は、蛍光の強度及び局在性の両方を定量化し、1分あたり50000個を超える細胞のイメージングを可能にする。

【0070】

[0074] 細胞蛍光レベルは、当技術分野で公知の任意の適当な方法によって定量化され得る。細胞蛍光レベルは、参照レベルと比較され得る。いくつかの実施形態では、参照レベルは、予め決定された参照レベル又は通時的参照レベルである。いくつかの実施形態では、参照レベルは、参照サンプル（例えば、陽性対照及び/又は陰性対照）との対照比較によって得られる。

【0071】

[0075] フローサイトメトリー及び細胞ソーティングを使用するスクリーニング及び選択方法の到来は、スクリーニングされ得る細胞数を大幅に増大させる。例えば、短時間で数百万個の細胞がスクリーニングされ得、混合細胞集団から亜集団及び単細胞が、集団内に 10^{-6} ほど低い頻度で存在する場合であっても単離され得る。提供される方法の利点の1つは、サンプル評価がハイスループット法で達成され得ることであることは、当然のことである。いくつかの実施形態では、提供される方法は、既知感染及び/又は中和抗体検出法（例えば、ウイルスタンパク質の染色、蛍光顕微鏡、ELISPOTなど）と比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%又はそれ以上スループットを増大する。提供される方法は、マルチウェルプレート形式で実施され得、したがって、ミッド~ハイスループットスクリーニングにおける使用に特に適している。いくつかの実施形態では、マルチウェルプレートは、96ウェルを有する。いくつかの実施形態では、マルチウェルプレートは、別の数のウェルを有し、これとして、それだけには限らないが、6、12、24、384、864又は1536ウェルを有するプレートが挙げられる。用語「マルチウェルプレート」及び「マイクロタイタープレート」は、同義的に使用さ

10

20

30

40

50

れる。

【0072】

[0076]いくつかの実施形態では、生存細胞が解析される。いくつかの実施形態では、細胞は、解析に先立って固定される。

【0073】

[0077]いくつかの実施形態では、本開示内容は、蛍光検出及び/又は宿主細胞のウイルス感染を相関させることによって抗HCMV中和抗体を測定する方法を提供する。例えば、蛍光部分(例えば、GFP)を含むHCMVは、HCMV候補ワクチンを用いて免疫処置された対象から得られた血清とともにプレインキュベートされ得る。血清中に存在する中和抗体は、HCMV(例えば、蛍光部分を含むHCMV)が、HCMVによる感染に対して正常に感受性である宿主細胞に感染するのを低減する。次いで、HCMV(例えば、蛍光部分を含むHCMV)及び血清を含むプレインキュベートされた混合物を使用して、このような宿主細胞に接触させることができ、宿主細胞の蛍光レベルを評価してもよい。宿主細胞における蛍光レベルに基づいて、宿主細胞の感染のレベルが決定され得る。宿主細胞の感染のレベルは、一般に、血清中の中和抗体の存在及び量と反比例し、次いで、治療的応答(例えば、防御免疫応答)を誘発する候補ワクチンの有効性と相関する。例えば、対象における中和抗体の誘導において有効な候補ワクチンほど、血清中により多くの中和抗体が存在し、次いで、蛍光部分を含むHCMVの、血清とともにプレインキュベートした後の宿主細胞に感染する能力の低減に対応し、蛍光部分を含むHCMVと接触させた後の宿主細胞における蛍光検出の低減にさらに対応する。いくつかの実施形態では、本開示内容の方法は、本明細書に記載される相関に基づいて、候補ワクチン(例えば、HCMV候補ワクチン)を、中和抗体を誘導するワクチンとして選択すること及び/又は同定することをさらに含む。

【実施例】

【0074】

[0078]以下の実施例は、本明細書に記載されている特定の組成物を作製及び実施するいくつかの例示的様式を記載する。これらの実施例は、単に例示目的のものであって、本明細書に記載された組成物及び方法の範囲を制限しようとするものではないということは理解されなければならない。

【0075】

実施例1: ウイルス様粒子を用いるウサギの免疫処置

[0079]この実施例は、種々の組換えHCMV抗原を含有するウイルス様粒子を用いるウサギの例示的免疫処置を記載する。

【0076】

[0080]HEK293T細胞(ATCC、CRL-11268)を、リン酸カルシウム法を使用し、種々の組換えHCMV抗原をコードする発現プラスミドを用いて一過性にトランスフェクトした。HEK293細胞による種々のHCMV抗原の発現は、フローサイトメトリーによって確認した。トランスフェクションの48~72時間後、VLPを含有する上清を回収し、0.45µmの孔径の膜を通して濾過し、さらに濃縮し、SW32 Beckmanローターにおける20%スクロースクッションを介した超遠心分離(25000rpm、2時間、4)によって精製した。ペレットを、滅菌エンドトキシン不含PBS(GIBCO)に再懸濁して、500倍濃縮されたVLPストックを得た。総タンパク質は、ブラッドフォードアッセイ定量キット(BioRad)によってアリコートで決定した。精製VLPは、使用されるまで-80 で保存した。

【0077】

[0081]以下の表1に示されるように、ウサギを、t=0及びt=8週で、VLPを用いて筋肉内に免疫処置した。t=4、6、8、10、13及び16週で血清を採取した。

【0078】

10

20

30

40

【表1】

表1

試験品番号 (n=6匹/群)	用量	試験品説明
1	100 μ g	gB/pp65二価VLP
6	100 μ g/各	gB/pp65二価VLP+ gH-G/pp65二価VLP (1:1比)

【0079】

[0082] 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を実施して、ウサギ血清 HCMV IgG 含量を決定した。図1は、gB/pp65二価VLP (上部) 及び gB/pp65二価VLP + gH-G/pp65二価VLP (下部) を用いて免疫処置したウサギにおける強力な持続した免疫性を示す。

【0080】

実施例2：フローサイトメトリーベースの中和活性

[0083] この実施例は、免疫処置された動物から得た血清における HCMV に対する中和抗体反応の評価を記載する。この実施例の目的は、1) その他の動物研究から選択された CMV 臨床候補成分の免疫原性を確認すること、2) 用量並びに投与経路 (例えば、IM 対 IP 投与) との可能性ある相乗及び/又は拮抗作用を評価すること及び3) 免疫学的追加免疫及び免疫性の耐性を評価すること含んでいたが、それに限定されなかった。

【0081】

[0084] 実施例1から得られた試験品番号6を用いて免疫処置されたウサギから得た血清サンプルを、 $t = 0$ (POV) 及び $t = 2$ 週 (P2Vd14) の時点で採取した。次いで、この群から得た、プールし、熱不活化した (HI) サンプルを、中和抗体活性について以下に記載されるように試験した。

【0082】

[0085] 血清サンプルを $1/6 \sim 1/96$ に希釈した。HFF細胞 (P=9、播種後24時間で使用した) 及び新たに回収したウイルス TB40-230212 を使用した。TB40-230212 ウイルスは、TB40-010212 の子孫である。TB40-010212 は、ATCC から入手した (ATCC VR-1578; ヒトヘルペスウイルス5; UL32-EGFP-HCMV-TB40)。ウイルス感染期間は、T150 感染フラスコ中で15日とした (表2)。顕微鏡観察は、ウイルスは感染性であると示した。感染培地は、TB40-HFF-1 感染培地 (MEM + 5% FBS + 1% Pen/Strep) 又は VR1814-APRE-19 感染培地 (DMEM: F-12 + 1% FBS) とした。

【0083】

【表2】

表2

ウイルス	ロット 番号	ウイルス感染			
		優勢なもの	期間	感染フラスコ	顕微鏡観察
TB40	230212	TB40-010212 (新ATCC)	15日	T150	感染性

【0084】

[0086] HFF を播種した T150 フラスコに、CMV TB40-010212 (5 バイアル) + 20 ml の感染培地 (MEM-Sigma カタログ番号 M4655 製の最少必須培地イーグル + 5% FBS + 1% P/S) を感染させた。CO₂ インキュベーター / 37 中で15日後、フラスコは十分に感染した。フラスコからほとんどすべての上清を回収し、50 mL Falcon チューブ中に無菌で維持することによってウイルスを採取した。残りの上清、およそ 5 ~ 7 mL は、細胞スクレーパー (NUNC、カタログ番

10

20

30

40

50

号179707)での細胞のスクレイピングを補助するよう働いた。スクレイピング後、強くピペティングして上下させることによって(最大10回)、細胞からのウイルス放出を促進した。Falconチューブから、元の上清容量の半量(約8mL)を加えて、より強力なウイルスとした。

【0085】

[0087]液体窒素からの5本のバイアルのTB40-010212(優勢)を、1本のT150フラスコに感染させ、37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした。インキュベーション後、12mLの感染培地を加えた。ウイルスを15mLの上清中に濃縮した。

【0086】

[0088]サイトガム(商標)(CMV-IGIV-サイトメガロウイルス免疫グロブリン 静脈内-ヒト; CSL Behring; 市販の濃度2.5g/50ml又は50mg/ml)を陽性対照として使用した。20倍希釈を基本濃度として作製し(20倍希釈:100μLのサイトガム(商標)50mg/ml+1900μLの感染培地)、希釈、ウサギ血清に使用した同一希釈を作製するために、後に使用した。ウサギ血清と同一条件下(以下の表3~5に記載されるような)でサイトガム(商標)を熱不活化した。

【0087】

【表3】

表3.感染アッセイ

プールした HI P0V	1/6	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第1の プレート
	1/12	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/24	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第2の プレート
	1/48	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/96	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
細胞			2つの6ウェルプレートウェル	
プールした HI P2V	1/6	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第3の プレート
	1/12	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/24	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第4の プレート
	1/48	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/96	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
細胞			2つの6ウェルプレートウェル	
HIサイトガム (商標) (ベース1/20)	1/6	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第5の プレート
	1/12	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/24	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	第6の プレート
	1/48	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
	1/96	1/2ウイルス	2つの6ウェルプレートウェル	
TB40-230212	2倍希釈した		2つの6ウェルプレートウェル	

【0088】

10

20

30

【表 4】

表4.P0V、P2Vd14のための、及びサイトガム(商標)のためのプールした血清希釈

使用した血清希釈	使用した血清	希釈を作製するためのFBSを含まない培地(μl)	合計(μl)	アッセイに使用した血清(μl)	アッセイに使用したそのままのウイルス(μl)	最終濃度血清対ウイルス
1/3	100 μlそのままの血清	200	300	130 μl 1/3	130	1/6 対 1/2
1/6	150 μl 1/3	150	300	130 μl 1/6	130	1/12 対 1/2
1/12	150 μl 1/6	150	300	130 μl 1/12	130	1/24 対 1/2
1/24	150 μl 1/12	150	300	130 μl 1/24	130	1/48 対 1/2
1/48	150 μl 1/24	150	300	130 μl 1/48	130	1/96 対 1/2

10

20

【 0 0 8 9 】

【表 5】

表5.HFF-1細胞増殖及び感染培地

	試薬	供給業者	カタログ番号	ロット番号	実験	成分の濃度	容量
HFF-1細胞増殖培地	DMEM(ダルベッコの改変イーグル培地)	HyClone	SH30243.01	AWH17628	08/2012	80%	420ml
(DMEM+15% FBS+1% Pen/Strep)	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	AVC67186	03/2015	15%	75ml
	Pen/Strep(ペニシリンストレプトマイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	031M0787	10/2012	1%	5ml
HFF感染培地TB40	MEM(最小必須培地イーグル)	Sigma	M4655-500ml	RNC0312	09/2012	94%	470ml
(MEM+5% FBS+1% Pen/Strep)	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	AVC67186	03/2015	5%	25ml
	Pen/Strep(ペニシリンストレプトマイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	031M0787	10/2012	1%	5ml

30

40

【 0 0 9 0 】

[0089] 各特定の濃度の血清又はサイトガム(商標)及び1/2最終ウイルス希釈を組み合わせ、37℃で1時間回転させた。95%~100%コンフルエントのHFF細胞を有する使用準備のできた6ウェルプレートを、加温PBSを用いて2回注意深くすすぎ、次いで、ウイルス-血清混合物を、4時間にわたる乾燥を避けるために、100 μL混合物/ウェル+200 μL感染培地として2連でアプライした。インキュベーションは、37℃/5% CO₂/4時間とした(60分毎に振動した)。4時間インキュベートした後、ピペットを用いて各ウェルから内容物を注意深く吸引し、3 mLの新鮮感染培地を加えた。プレートをインキュベーター中で、37℃/5% CO₂で10日間維持した。通常、感染の5日後に、細胞におけるウイルス感染の日常点検を実施した。光学顕微鏡又は

50

蛍光顕微鏡を用いる緑色蛍光検出によって膨潤及び円形化細胞を可視化した。

【0091】

[0090] サンプル採取のために、各ウェルから培地を吸引した。各ウェルを、PBS (HyClone DPBS / カルシウム及びマグネシウムを含まないよう改変された; カタログ番号 SH30028.02) を用いて2回すすぎ、100 µL の1×トリプシン-EDTA (Sigma; カタログ番号 T4174-100ml) 及び100 µL のPBS を加えた。細胞が十分にトリプシン処理されるまで、サンプルをCO₂ インキュベーター中で2~3分維持した。1 mL / ウェルのPBS + 5% FBS を加えて、トリプシンを停止した。サンプルを透明な流動向きチューブ中に回収した(同一サンプル/チューブに対して2つのウェル)(BD Falcon、5 mL ポリスチレン丸底、REF 352054)。プレートを光学顕微鏡下で調べ、すべての細胞が回収されたことを確認した(回収されていなかった場合には、さらに加えられた500 µL PBS + 5% FBS を使用して残部を回収した)。サンプルを900 rpmで10分間遠心沈殿させた。上清を廃棄し、ペレットを保持した。ペレットが残りのバッファー中に分散されるよう、チューブをボルテックス処理した。残りのステップは、光に対して最少にしか曝露せずに実施した。200 µL の固定液(BD Biosciences、BD Cytotfix、固定バッファー カタログ番号 554655、100 ml) を加え、氷上で15分間インキュベートした。1 mL / チューブの混合物PBS + 5% FBS を加えて、Cytotfix を停止した。サンプルを900 rpmで10分間遠心沈殿させた。上清を廃棄し、ペレットを保持した。ペレットを500 µL のPBS + 5% FBS 中で再構成し、激しくボルテックス処理し、その後、フローサイトメーターに置いた。

10

20

【0092】

[0091] サンプルをフローサイトメーターに付し、Cellquestソフトウェアを使用して解析した。FSC及びSSCパラメータは、「linear」に設定し、その他のすべてのパラメータは「log」に設定した。感染細胞のフローサイトメーター解析の間に100,000個の細胞を採取した。HFF細胞及びTB40 CMVを使用する流動のための普通の条件は、FSC E-1及び4.83; SSC 325; FL1 427としたが、パラメータは、より適当なドットプロットを得るために既存の条件の前後でわずかに変更され得る。

【0093】

[0092] 図2は、ウサギにおいてgB/pp65 CMV VLPを用いて誘導された中和抗体反応を示す線維芽細胞におけるGFP発現の例示的FACS解析を表す。ウサギ(n = 6匹/群)を、0週目及び8週目に2回免疫処置(IM)し、2週間後に出血させた。血清をプールし、示された希釈で、HFF線維芽細胞におけるGFP発現CMVウイルス(TB40)に対して、同様の希釈のサイトガム(商標)と比較して試験した。感染(GFP+)細胞のフローサイトメーター解析の間に100,000個の細胞を集めた。

30

【0094】

[0093] 図3は、ウサギにおいて二価gB + gH CMV VLPを用いて誘導された中和抗体反応を示す線維芽細胞におけるGFP発現の例示的FACS解析を表す。ウサギ(n = 6匹/群)を、0週目及び8週目に2回免疫処置(IM)し、2週間目に出血させた。血清をプールし、示された希釈で、HFF線維芽細胞におけるGFP発現CMVウイルス(TB40)に対して、同様の希釈のサイトガム(商標)と比較して試験した。感染(GFP+)細胞のフローサイトメーター解析の間に100,000個の細胞を集めた。

40

【0095】

実施例3: フローサイトメーターによる中和抗体の検出のための例示的マイクロ中和アッセイ

[0094] この実施例は、ワクチン接種した動物から得た血清サンプルにおけるフローサイトメーターによる機能的抗CMV中和抗体の検出を記載する。

【0096】

材料 / 機器

50

[0095]このアッセイでは、以下の材料及び機器が使用される。ヒト包皮線維芽細胞 (HFF-1) 細胞 - ATCC 番号 SCRC-1041; ヒト起源レチナール色素上皮 - (ARPE-19) - ATCC 番号 CRL-2302; ヒトヘルペスウイルス 5 HCMV (UL32-EGFP-HCMV-TB40) - ATCC 番号 VR-1578; ヒト CMV-EGFP-Towne TS15-rR (Dr. M. McVoy から入手、VCU-Virginia); ウサギ IgG (GAR) に対するヤギ抗血清 - MP Cappel、カタログ番号 55620; ウサギから得た補体血清 - Sigma-Aldrich カタログ番号 S7764-5ml; 標準モルモット補体 - Cedarlane カタログ番号 CL-5000; 滅菌蒸留水 - Gibco、カタログ番号 15230; ダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM) - HyClone; カタログ番号 SH30243.01 (増殖培地); 最小必須培地イーグル (MEM) - Sigma; カタログ番号 M4655-500ml (感染培地); ウシ胎児血清 (FBS) - HyClone; カタログ番号 SH30396.03; ペニシリンストレプトマイシン溶液 (Pen/Strep) - Sigma; カタログ番号 P0781-100ml; 1X トリプシン - EDTA - Sigma; カタログ番号 T4174-100ml 改変リン酸緩衝生理食塩水 (DPBS - カルシウム及びマグネシウムを含まない) - HyClone; カタログ番号 SH30028.02; 固定バッファー - BD Biosciences; BD Cytotfix カタログ番号 554655-100ml; サイトガム (CMV-IGIV-サイトメガロウイルス免疫グロブリン静脈内/ヒト - CSL Behring; 市販の濃度 2.5g/50ml; ジメチルスルホキシド (DMSO) - Sigma-Aldrich カタログ番号 D1435-500ml; 安全キャビネット; インキュベーター 5% CO₂、37; 遠心機; ボルテックス; フローサイトメーターのためのサンプル獲得チューブ (BD Falcon、5ml ポリスチレン丸底、REF352054); 6 ウェルプレート; マルチチャンネルマイクロピペットレザバー; 5 及び 10ml メモリピペット; 使い捨てチップを用いる、10µl ~ 1000µl の調節性単一チャンネルマイクロピペット; 細胞スクレーパー - NUNC; カタログ番号 179707; 50ml Falcon チューブ - BD358206; エッペンドルフチューブのための回転板; 蛍光顕微鏡; FACSCAN 機器。

【0097】

ウイルスの入手及び採取

[0096] HFF-1 細胞 (T150 フラスコに播種された 95% コンフルエント単層) に、1.5ml の UL32-EGFP-HCMV-TB40 (「TB40」) を感染させる。ARPE-19 細胞には、同様の方法で HCMV-EGFP-Towne-TS15-rR (「Towne」) を感染させる。これらのウイルスは感光性であるので、細胞は電気を消した状態で感染させる。フラスコを CO₂ インキュベーター / 37 中で 30 分間 インキュベートして、細胞とウイルスの間の付着を可能にする。

【0098】

[0097] 次いで、細胞に 2.5ml の感染培地を加える (表 6 及び 7 を参照のこと)。細胞が十分に感染する (TB40 の場合には、膨潤及び円形化細胞が、光学顕微鏡又は蛍光顕微鏡を用いる緑色蛍光によって見られる、Towne については、緑色蛍光によって感染が検出される) まで、フラスコを CO₂ インキュベーター中 / 37 維持する。良好な感染に必要な時間は、優勢ウイルスの感染能に応じて異なる。

【0099】

[0098] 採取は、フラスコからほとんどすべての上清を回収し、50ml Falcon チューブ中に無菌で維持することによって始められる。残りの上清、およそ 5ml は、細胞スクレーパーでの細胞のスクレイピングを促進する。良好なスクレイピング及び強くピペティングして上下させること (最大 10x) によって、ウイルスが細胞から放出されることが可能となる。Falcon チューブから元の上清容量の 10ml を加え、900rpm で 10 分間遠心沈殿させる。ペレットを除去し、およそ 15ml の濃縮ウイルスを保持する。ウイルス総量中、5% の凍結保護物質 (DMSO) を加える。1ml のアリコート調製し、標識し、-80 で短時間保存するか、又は液体窒素中で長期間保存する

【 0 1 0 0 】

【 表 6 】

表6.CMV-GFP-TB40のためのHFF-1細胞増殖及び感染培地

	試薬	供給業者	カタログ番号	成分の濃度	容量
HFF-1増殖培地	DMEM(ダルベッコの 改変イーグル培地)	HyClone	SH30243.01	80%	420ml
	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	15%	75ml
(DMEM+15% FBS +1% Pen/Strep)	Pen/Strep (ペニシリンストレプト マイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	1%	5ml
CMV-GFP-TB40の ためのHFF-1感染 培地	MEM(最小必須培地 イーグル)	Sigma	M4655-500ml	94%	470ml
	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	5%	25ml
	Pen/Strep (ペニシリンストレプト マイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	1%	5ml
(MEM+5% FBS+1 % Pen/Strep)					

10

【 0 1 0 1 】

【 表 7 】

表7.CMV-GFP-TowneのためのARPE-19細胞増殖及び感染培地

	試薬	供給業者	カタログ番号	成分の濃度	容量
ARPE-19増殖培地	DMEM:F-12(ダルベッ コの改変イーグル培 地栄養混合物F-12HA M)	HyClone	SH30023.01	80%	420ml
	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	15%	75ml
	Pen/Strep (ペニシリンストレプト マイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	1%	5ml
Towne増殖のため のARPE-19感染培 地	DMEM:F-12(ダルベッ コの改変イーグル培 地栄養混合物F-12HA M)	HyClone	SH30023.01	99%	470ml
	FBS(ウシ胎児血清)	HyClone	SH30396.03	5%	25ml
	Pen/Strep (ペニシリンストレプト マイシン溶液)	Sigma	P0781-100ML	1%	5ml
(DMEM:F-12 +5% FBS +1% Pen/Strep)					

20

30

【 0 1 0 2 】

実験設定及び方法

[0099]出血前及び免疫処置後血清サンプルを、使用前に56℃で30分間熱不活化する。陽性対照として用いる市販の血清、サイトガムを同様に熱不活化する。血清希釈を、1/6から出発して、所望の希釈まで2連で作製する。サイトガムは、匹敵する希釈、ストック試薬1:20の先の希釈で試験して、ヒト/ウサギ血清のIg含量を調整する(表8を参照のこと)。

40

【 0 1 0 3 】

【表 8】

表8.血清及びウイルス希釈(例として、2倍ウイルス希釈が示される)

作業血清希釈	血清容量	希釈を作製するためのFBSを含まない培地(μl)	合計(μl)	アッセイ中の血清容量(μl)	アッセイにおけるそのままのウイルス(μl)	最終濃度血清対ウイルス
1/3	100 μl そのままの血清	200	300	130 μl 1/3	130	1/6 対 1/2
1/6	150 μl 1/3	150	300	130 μl 1/6	130	1/12 対 1/2
1/12	150 μl 1/6	150	300	130 μl 1/12	130	1/24 対 1/2
1/24	150 μl 1/12	150	300	130 μl 1/24	130	1/48 対 1/2
1/48	150 μl 1/24	150	300	130 μl 1/48	130	1/96 対 1/2
1/96	150 μl 1/48	150	300	130 μl 1/96	130	1/192 対 1/2
1/192(など)	150 μl 1/96	150	300	130 μl 1/192	130	1/384 対 1/2(など)

10

20

【 0 1 0 4 】

[0100] 特定の濃度の血清(サイトガム)及びウイルスを組み合わせ、37 で1時間回転させた。いくつかのアッセイでは、補体が含まれる。補体及びHFF細胞を利用するアッセイのためには、各特定の血清(サイトガム)/ウイルス混合物に10%標準モルモット補体を加える。ウイルス対照を同一の方法で処理する。補体及びARPE-19細胞を利用するアッセイのためには、どの種が使用されるか(ウサギ又は血清)に関わらず、各混合物に2.5%ウサギ補体を加える。血清及びウイルスを37 で1時間回転させる。

30

【 0 1 0 5 】

[0101] 95%コンフルエントの細胞(6ウェルプレートに播種された)を、加温PBSを用いて2回注意深くすすぎ、次いで、ウイルス-血清混合物を2連でアプライした。4時間のインキュベーションにわたる乾燥を避けるために、100 μL混合物/ウェル+200 μL感染培地を加える。細胞を、37 / 5% CO₂ / 4時間インキュベートする(60分毎に振動した)。4時間インキュベートした後、ピペットを用いて各ウェルからの内容を注意深く吸引し、3 mLの適当な、新鮮加温感染培地を加える。十分に感染するまで、プレートを37 / 5% CO₂でインキュベートする。5日インキュベートした後、細胞をウイルス感染について解析する。HFF-1細胞の感染は、光学顕微鏡又は蛍光顕微鏡を用いる緑色蛍光検出によって可視化される細胞の膨潤及び円形化によって決定される。ARPE-19細胞感染は、蛍光顕微鏡を用いて緑色蛍光として検出される。

40

【 0 1 0 6 】

フローサイトメトリーのためのサンプル採取及び調製

[0102] サンプル採取の前に、光学顕微鏡下で、利用可能な場合には、蛍光顕微鏡を使用して細胞に組み込まれたGFPを解析することによって、良好な感染の存在を確認する。各ウェルから培地を吸引し、流し捨てる。細胞を、PBS(Hyclone DPBS/カルシウム及びマグネシウムを含まないよう改変された; カタログ番号SH30028.02)を用いて2回すすぐ。HFF-1細胞に、100 μlの1×トリプシン-EDTA(Sigma; カタログ番号T4174-100ml)及び200 μlのPBSを加える。ARPE-19細胞に、200 μlの1×トリプシン-EDTA及び100 μlのPB

50

Sを加える。細胞が十分にトリプシン処理されるまで、細胞をCO₂インキュベーター中で2～3分維持する。1ml/ウェルのPBS+5% FBSを加えて、トリプシンを停止する。細胞を透明な流動向きチューブ中に回収する(同一サンプル/チューブに対して2つのウェル)(BD Falcon、5mlポリスチレン丸底、REF352054)。ウェルを光学顕微鏡下で可視化し、細胞が残っている場合には、さらに500μlのPBS+5% FBSを加えて、さらなる細胞を集める。

【0107】

[0103] Falconチューブを900rpmで10分間遠心沈殿させる。上清を廃棄し、ペレットを保持する。チューブをボルテックス処理して、ペレットを残存するバッファー中に分散させる。残りのステップは、暗所で実施する。各チューブに、200μlのCytotfix (BD Biosciences、BD Cytotfix、固定バッファークatalog番号554655 100ml)を加え、サンプルを氷上で15分間インキュベートする。各チューブに、1mlの混合物PBS+5% FBSを加えて、Cytotfixを停止する。チューブを900rpmで10分間遠心沈殿させる。上清を流し捨て、ペレットを保持する。ペレットを500μlのPBS+5% FBS中で再構成し、激しくボルテックス処理し、フローサイトメトリーを実施する。

【0108】

実施例4：ウサギにおける例示的VLPの中和活性

[0104] CHO細胞を、一価gB-G及び一価gH-Gのプラスミドを用い、1.5E06～2.0E06個細胞/mlの間の細胞密度でトランスフェクトした(国際出願PCT/US2012/64556に記載されたとおりに調製された)。総DNA濃度を最大1μg/細胞培養物1mlとするようにスタッファーDNAを加えた。トランスフェクションに使用したプラスミドは、MaxiPrep又はGigaPrepプラスミド精製キット(Qiagen)によって、まず精製した。DNAを細胞に送達するためにトランスフェクションのために使用したPEIMAXは、6:1(PEI:DNA wt/wt)の比で準備された。1リットルボトル中で、Beckman Coulter社製のローターJS-4.2Aを使用して4000rpmで20分間遠心分離することによって、トランスフェクションの72時間後に細胞培養物を回収した。0.8/0.45μmフィルター(AcroPak 500 Capsule, Pall)を通して上清を濾過した。次いで、濾過した上清をタンジェンシャルフロー濾過(VLPの濃縮のためのTFF)によって濃縮し、ヒスチジン含有バッファーに対してダイアフィルトレーションした。70μlのベンゾナーゼ(Benzonase)(250ユニット/μlを含有するNovogen 99%純度(D00127703))を、2mM最終濃度を有するようMgCl₂を補給した400μlのPBSに懸濁した。TFF保持部分を、PBS溶液で希釈したベンゾナーゼと混合し、ロータリーシェーカー(ヘッド-トゥ-ター回転)中で室温で1時間維持し、次いで、チューブを4℃で一晩置いた。ダイアフィルトレーションしたベンゾナーゼ処理材料を、陰イオン交換クロマトグラフィーカラム(DNA及び宿主タンパク質の還元のためのAEX)上にロードし、ここで、フロースルーを回収した。次いで、フロースルーを0.45μmを通して滅菌濾過し、種々の容量に分注した。

【0109】

[0105]記載されるように調製した一価gB-G及び一価gH-G VLP組成物を一緒に混合し、ミョウバンをアジュバントとし、次いで、実施例3に記載されるマイクロ中和アッセイを使用して中和活性について雌のニュージーランドホワイトウサギ6～8週齢(試験群あたり最少5匹の動物)において試験した。ウサギを、0.5ml(近位尾側後大腿筋の2つの部位中に250μl)のVLP組成物を用いて3回、0日目に1回(プライム)及び57日目に1回(8週目にブースト)及び162日目に1回(24週目にブースト)筋肉内に免疫処置した。ウサギを、50μgの一価gB-G及び一価gH-G(1:1比で一緒に混合された)両VLP組成物を用いて処置した。ウサギにおける体液性免疫応答を評価するために、研究において、最初の免疫処置の前、次いで、最初の免疫処置後、28、42及び55日目及び2回目の免疫処置後14日目にすべてのウサギから血液を

10

20

30

40

50

採取した。

【0110】

[0106] H C M V に対する中和抗体反応は、これまでに記載したように G F P を発現する C M V ウイルス (T B 4 0) に基づいた線維芽細胞におけるマイクロ中和アッセイ、及び感染 (G F P +) H F F - 1 細胞のフローサイトメトリー解析を使用して決定した。記載したように免疫処置前及び免疫処置後に採取したウサギ血清をプールし、陽性対照 C M V ハイパーグロブリン、サイトガム (商標) 及び空の G a g V L P (抗原性タンパク質 g B - G 及び / 又は g H - G を欠く) からなる陰性対照に対して、H F F 線維芽細胞において G F P を発現する H C M V に対するモルモット補体の存在下で中和活性について試験した。

10

【0111】

[0107] 図 4 は、10%モルモット補体及びウサギ血清の存在下で、C M V - G F P - T B 4 0 - 0 1 0 5 1 2 ウイルスとともにインキュベートした H F F - 1 細胞における中和パーセントを示す (1 5 R A 0 9 から得られた群 7 のプールされた血清を、動物が一価 g B - G 及び一価 g H - G V L P を用いて 3 回処理された場合を代表する陽性データとして使用し、1 5 R A 0 5 研究 (空の G a g) から得られた群 8 を代表的な陰性対照として使用した) 。図 4 に示されるように、一価 g B - G 及び一価 g H - G V L P 組成物の組合せは、線維芽細胞感染に対して、ウサギにおいて迅速な、相乗的な持続した中和抗体反応を誘発したのに対し、空の G a g V L P は、中和抗体反応を示さなかった。(「G F P - T B 4 0 - 0 1 0 5 1 2」は、2012年5月1日に増殖させた (実施例 3 に記載される) ヒトヘルペスウイルス 5 H C M V (U L 3 2 - E G F P - H C M V - T B 4 0) - A T C C 番号 V R - 1 5 7 8 を表す。)

20

【0112】

[0108] プールされたウサギ血清はまた、先に記載したように、G F P を発現する H C M V ウイルス (T o w n e T S 1 5 - r R) に基づいた、上皮細胞におけるマイクロ中和アッセイ、及び感染 (G F P +) A R P E - 1 9 細胞のフローサイトメトリー解析を使用して H C M V に対する中和抗体反応について試験した。記載したように免疫処置前及び免疫処置後に採取したウサギ血清をプールし、陽性対照 C M V ハイパーグロブリン、サイトガム (商標) 及び空の G a g V L P (抗原性タンパク質 g B - G 及び / 又は g H - G を欠く) からなる陰性対照に対して、A R P E - 1 9 上皮細胞において G F P を発現する H C M V に対する 2 . 5 % ウサギ補体の存在下で中和活性について試験した。

30

【0113】

[0109] 図 5 は、2.5%ウサギ補体及びウサギ血清の存在下で、C M V - G F P - T o w n e - 1 5 0 6 1 2 ウイルスとともにインキュベートした A R P E - 1 9 細胞における中和パーセントを示す (1 5 R A 0 9 から得られた群 7 のプールされた血清を、動物が一価 g B - G 及び一価 g H - G V L P 組成物を用いて 3 回処理された場合を代表する陽性データとして使用し、また、1 5 R A 0 5 研究 (空の G a g) から得られた群 8 を、代表的な陰性対照として使用した) 。図 5 に示されるように、一価 g B - G 及び一価 g H - G V L P 組成物の組合せは、上皮細胞感染に対して、ウサギにおいて迅速な、相乗的な持続した中和抗体反応を誘発したのに対し、空の G a g V L P は、中和抗体反応を示さなかった。(「G F P - T o w n e - 1 5 0 6 1 2」は、2012年6月15日に増殖させた (D r . M . M c V o y , V C U - V i r g i n i a から入手し、実施例 3 に記載される) ヒト C M V - G F P - T o w n e T S 1 5 - r R を表す)。

40

【0114】

その他の実施形態

[0110] 開示内容のその他の実施形態は、本明細書の検討及び本明細書に開示される開示内容の実施から当業者には明らかとなる。本明細書及び実施例は、単に例示的なものと考えられ、本開示内容の真の範囲は以下の特許請求の範囲によって示されるものとする。本明細書において参照される任意の参考文献の内容は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

50

【 図 1 】

単回免疫処置後のウサギにおける二価のGB VLPの強力な、持続した免疫

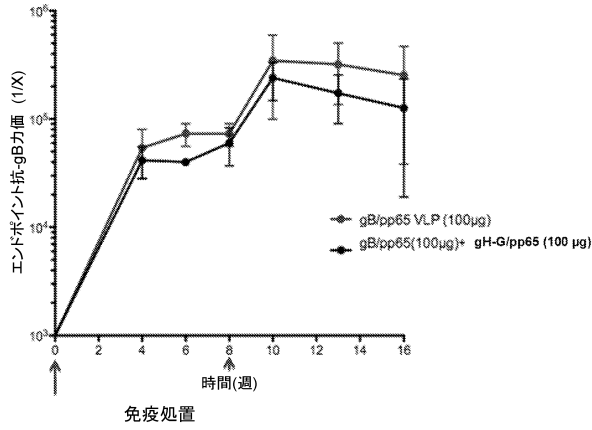


Figure 1

【 図 2 】

線維芽細胞感染に対して、ウサギにおいて二価GB+GH CMV VLPを用いて誘導された強力な、相乗的な中和抗体反応

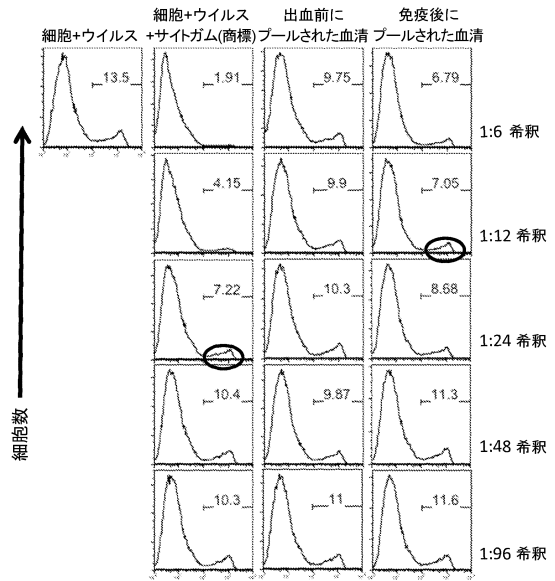


Figure 2

【 図 3 】

線維芽細胞感染に対して、ウサギにおいて二価GB+GH CMV VLPを用いて誘導された強力な、相乗的な中和抗体反応

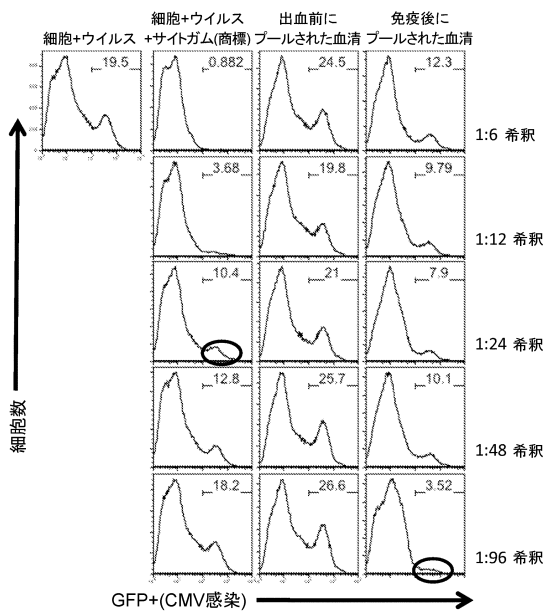


Figure 3

【 図 4 】

15RA09/15RA05中和アッセイ
HFF-1細胞における1:80CMV-GFP-TB40-01D512に対する、10%モルモット精体の存在下での、15RA09群7 (ミョウパンをアジュバントとする、一価gB-G/一価gH-G/PIVd14、PIVd28、PIVd42、PIVd55及びP2Vd14)にプールのされたサンプル並びにP2Vd14の15RA05群(空のMLV Gag) (EZZ P2Vd14 Empty MLV Gag+10% GP
EZZ CytoGam+40% GP
P1Vd28 (Cr. 7)+10% GP
P1Vd42 (Cr. 7)+10% GP
P1Vd55 (Cr. 7)+10% GP
P2Vd14 (Cr. 7)+10% GP

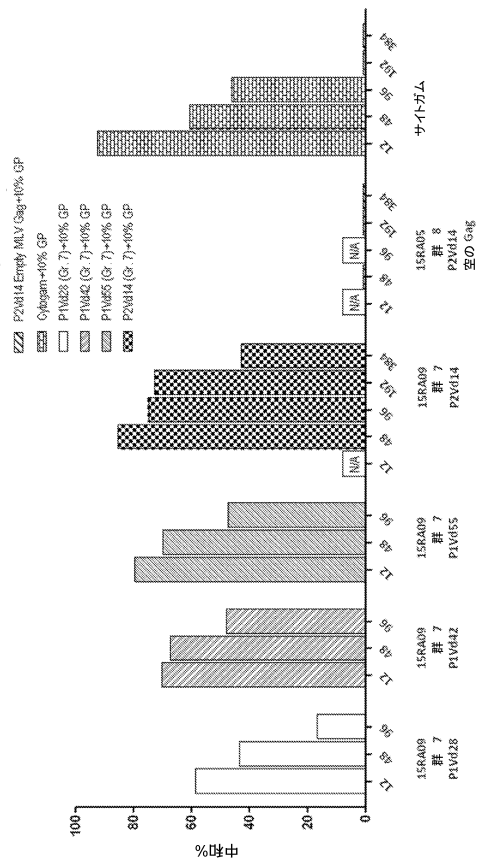


Figure 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50		Z
G 0 1 N 21/64	(2006.01)	G 0 1 N 21/64		F
G 0 1 N 21/78	(2006.01)	G 0 1 N 21/64		E
C 1 2 Q 1/70	(2006.01)	G 0 1 N 21/78		C
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 Q 1/70		
		C 1 2 N 15/00		A

(72)発明者 アンダーソン, デイヴィッド, イー.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州, ボストン, アパートメント 4, コロンブス ア
ベニュー 478

(72)発明者 ボジッチ, ジャスミンカ
カナダ, オンタリオ ケー1 ヴィ 2 ケー6, オタワ, アイ ブライト クレセント 22
7

(72)発明者 オントウカ, バルテルミー
カナダ, ケベック エイチ9ジェイ 3アールジェイ, モントリオール, ピエールフォン,
シビエージ ストリート 17739

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特表2010-501595(JP,A)
特表2002-537830(JP,A)
特開平06-222062(JP,A)
Kerstin Laib Sampaio et al., JOURNAL OF VIROLOGY, 2005年, Vol.79, No.5, p.2754-276
7
Frances M. Saccoccio et al., VACCINE, 2011年, Vol.29, No.15, p.2705-2711

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33/48 - 33/98
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	检测抗巨细胞病毒中和抗体的方法		
公开(公告)号	JP6265344B2	公开(公告)日	2018-01-24
申请号	JP2015502478	申请日	2013-03-27
申请(专利权)人(译)	变化生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	变化生物技术公司		
[标]发明人	アンダーソンデイヴィッドイー ボジッチジャスミンカ オントウカバルテルミー		
发明人	アンダーソン, デイヴィッド, イー. ボジッチ, ジャスミンカ オントウカ, バルテルミー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/536 G01N37/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N21/64 G01N21/78 C12Q1/70 C12N15/09		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/5258 A61K2039/55505 A61K2039/70 C12N2710/16134 G01N33/5044 G01N33 /6854 G01N2333/045 G01N2469/20 C12Q1/70		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.597 G01N33/536.D G01N37/00.103 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N21 /64.F G01N21/64.E G01N21/78.C C12Q1/70 C12N15/00.A		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	61/616204 2012-03-27 US		
其他公开文献	JP2015518140A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开内容提供了用于确定宿主细胞中HCMV感染水平的方法，并且通过扩展，确定了样品中存在的中和抗体的水平。本公开内容包括认识到具有荧光部分的HCMV病毒允许检测病毒感染（例如，通过在宿主细胞与病毒接触后评估细胞中的荧光）。在一些实施方案中，通过荧光检测确定HCMV感染水平，其中病毒已经与来自受试者的测试样品（例如，血清样品）预孵育。在一些实施方案中，向受试者施用候选HCMV疫苗。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6265344号 (P6265344)
(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)		(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 3	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	
請求項の数 30 (全 38 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-502478 (P2015-502478)	(73) 特許権者 507397054	
(86) (22) 出願日 平成25年3月27日(2013.3.27)	ヴァリエーション バイオテクノロジーズ	
(65) 公表番号 特表2015-518140 (P2015-518140A)	インコーポレイテッド	
(43) 公表日 平成27年6月25日(2015.6.25)	カナダ、オンタリオ ケー1ブイ 1シ	
(86) 国際出願番号 PCT/182013/001021	ー1、オタワ、ハントクラブ ロー	
(87) 国際公開番号 W02013/144722	ド イースト 3 1 0、セカンド フロ	
(87) 国際公開日 平成25年10月3日(2013.10.3)	ア	
審査請求日 平成28年3月15日(2016.3.15)	(74) 代理人 100107456	
(31) 優先権主張番号 61/616,204	弁理士 池田 成人	
(32) 優先日 平成24年3月27日(2012.3.27)	(74) 代理人 100162352	
(33) 優先権主張国 米国(US)	弁理士 酒巻 順一郎	
	(74) 代理人 100123995	
	弁理士 野田 雅一	
	(74) 代理人 100148596	
	弁理士 山口 和弘	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗サイトメガロウイルス中和抗体の検出方法