



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0100039
(43) 공개일자 2017년09월01일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/245 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7023123</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년01월22일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년08월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2016/050335</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/116904
국제공개일자 2016년07월28일</p> <p>(30) 우선권주장
15152221.6 2015년01월22일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트(비-1330) 루 드 린스티튜트 89</p> <p>(72) 발명자
카피, 안드레아
미국 02139 매사추세츠 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 350
시페리, 클라우디오
미국 94602 캘리포니아 오클랜드 노턴 애비뉴 4224
싱, 이
미국 01810 매사추세츠 앤도버 애플 블라썸 로드 6</p> <p>(74) 대리인
특허법인 남앤드남</p> |
|--|---|

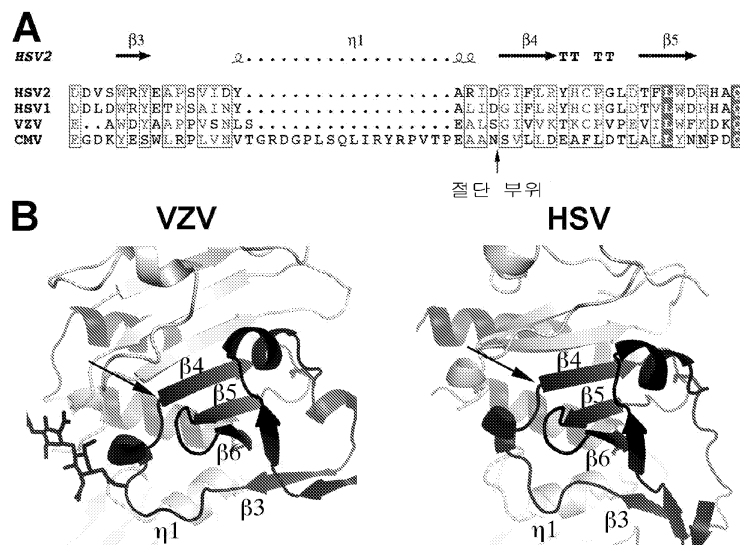
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 사이토메갈로바이러스 항원 및 이의 용도

(57) 요약

본 명세서는 변형된 사이토메갈로바이러스(CMV) gL 단백질 및 gL 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다. 변형된 gL 단백질은 손상되지 않은 채 유지되며 다른 CMV 단백질과 복합체를 형성할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/245 (2013.01)

C07K 16/081 (2013.01)

A61K 2039/55566 (2013.01)

C12N 2710/16122 (2013.01)

C12N 2710/16134 (2013.01)

C12N 2710/16151 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 사이토메갈로바이러스 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편으로서, 상기 gL 단백질 또는 단편이 프로테아제 인식 부위에서 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 대조군과 비교하여 상기 프로테아제 인식 부위에서 프로테아제 절단을 감소시키는, 재조합 사이토메갈로바이러스 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이가 아미노산 잔기의 첨가, 결실, 치환, 또는 이들의 조합을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 프로테아제 인식 부위의 잔기가 β -가닥을 형성하며, 상기 돌연변이가 β -가닥 입체형태를 유지하는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이가 포유동물 숙주 세포에서 재조합 발현될 경우 상기 프로테아제 인식 부위에서 20% (몰 백분율) 이하의 절단된 gL을 발생시키는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이가 2 내지 5개의 아미노산 잔기의 첨가를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이가 1 내지 3개의 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이가 잔기를 또 다른 헤르페스 바이러스의 gL 단백질로부터의 상응하기 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

청구항 8

제 7항에 있어서, 또 다른 헤르페스 바이러스로부터의 상기 gL 단백질이 HSV1, HSV2, VZV, EBV, PrV 또는 소 헤르페스바이러스 5로부터의 gL 단백질인 gL 단백질 또는 단편.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중의 어느 한 항의 재조합 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 사이토메갈로바이러스 복합체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 복합체가 gH 또는 이의 펜타머-형성 단편, gL 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL128 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL130 또는 이의 펜타머-형성 단편, 및 pUL131 또는 이의 펜타머-형성 단편을 포함하는 펜타머 복합체인 복합체.

청구항 11

제 1항 내지 제 8항 중의 어느 한 항의 재조합 사이토메갈로바이러스 gL 단백질 또는 단편을 엔코딩하는 폴리뉴

클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산.

청구항 12

제 11항의 핵산을 포함하는 숙주 세포, 바람직하게는, 포유동물 숙주 세포.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 숙주 세포가 사이토메갈로바이러스 펜타머 복합체를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 펜타머 복합체는 gH 또는 이의 펜타머-형성 단편, gL 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL128 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL130 또는 이의 펜타머-형성 단편, 및 pUL131 또는 이의 펜타머-형성 단편을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 14

제 1항 내지 제 8항 중의 어느 한 항의 재조합 사이토메갈로바이러스 gL 단백질 또는 단편, 또는 제 9항 또는 제 10항의 복합체를 포함하며, 애주번트를 선택적으로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 사이토메갈로바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 면역원성 조성물.

발명의 설명

기술 분야

서열 목록

본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출되고 그 전체가 본원에 참조로 통합된 서열 목록을 함유한다. 2016년 1월 14일 작성된 상기 ASCII 사본은 VN056504WO_SL.txt로 명명되며, 크기는 26,466 바이트이다.

발명의 기술 분야

본 발명은 백신에 사용될 수 있는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 항원 분야에 속한다.

배경 기술

사이토메갈로바이러스는 헤르페스비리대 또는 헤르페스바이러스로서 공지된 바이러스 과에 속하는 바이러스의 속이다. 인간을 감염시키는 종은 인간 사이토메갈로바이러스 (HCMV) 또는 인간 헤르페스바이러스-5 (HHV-5)로서 일반적으로 알려져 있다. 헤르페스비리대 중에서 HCMV는 베타헤르페스비리내 아과에 속하며, 이는 또한 다른 포유동물로부터의 사이토메갈로바이러스를 포함한다.

이들은 전신에 걸쳐 발견될 수 있지만, HCMV 감염은 종종 타액선과 관련되어 있다. HCMV는 많은 일반 인구에서 항체의 존재에 의해 나타나는 바와 같이 미국 성인의 50% 내지 80%를 감염시킨다 (전세계 40%). HCMV 감염은 일반적으로 건강한 사람에게는 나타나지 않지만, HIV-감염자, 기관 이식 수용자, 또는 새로 태어난 신생아와 같은 면역력약화된 사람에게는 생명을 위협할 수 있다. HCMV는 발달중인 태아에게 가장 빈번하게 전달되는 바이러스이다. 감염 후, HCMV는 숙주의 일생 동안 신체 내부에 잠복한 채 남아있을 수 있는 능력을 가지며, 때로는 잠복 기로부터 재활성화된다. 이러한 질병의 심각성 및 중요성을 감안할 때, 효과적인 백신을 얻는 것이 공중 보건에 최우선 사항으로 간주된다 (Sung, H., et al., (2010) Expert review of vaccines 9, 1303-1314; Schleiss, Expert Opin Ther Pat. Apr 2010; 20(4): 597-602).

20종 초과 상이한 HCMV 균주의 계능은 실험실 균주 및 임상 분리물 둘 모두의 계능을 포함하여 시퀀싱되었다. 예를 들어, HCMV의 하기 균주가 시퀀싱되었다: Towne (GL239909366), AD169 (GI:219879600), Toledo (GL290564358) 및 Merlin (GI: 155573956). HCMV 균주 AD169, Towne 및 Merlin은 아메리칸 타입 컬렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 얻을 수 있다 (각각 ATCC VR538, ATCC VR977 및 ATCC VR1590).

사이토메갈로바이러스는 알려지지 않은 수의 막 단백질 복합체를 함유한다. 바이러스 엔벨로프에서 대략 30개의 공지된 당단백질 중 gH 및 gL은 여러 상이한 복합체에서 이들의 존재로 인해 특히 흥미로운 것으로 나타났다: 다이머 gH/gL, 트리머 gH/gL/gO (또는 gCIII 복합체로서 공지됨), 및 펜타머 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (pUL131은 또한 “pUL131A”, “pUL131a”, 또는 “UL131A” 로 불림; pUL128, pUL130, 및 pUL131 서브유닛은

때때로 또한 UL128, UL130, UL131로 불림). CMV는 세포내이입 및 낮은 pH-의존성 융합에 의해 상피 세포 및 내피 세포로 진입하기 위해 펜타머 복합체를 사용하는 것으로 생각되지만, gH/gL 또는 가능하게는 gH/gL/gO 관련 과정에서 원형질막에 직접 융합함으로써 섬유아세포로 진입하는 것으로 생각된다. gH/gL 및/또는 gH/gL/gO 복합체(들)는 섬유아세포 감염에 충분한 반면, 내피 세포 및 상피 세포를 감염시키기 위해서는 펜타머 복합체가 필요하다.

- [0009] 펜타머 복합체는 CMV 백신화에 대한 주요 표적으로서 간주된다. 바이러스 유전자 UL128, UL130 및 UL131은 내피 진입에 필요하다 (Hahn, Journal of Virology 2004; 78:10023-33). 섬유아세포-적응된 비-내피 열대성 균주는 이들 3 가지 유전자 중 적어도 하나에 돌연변이를 함유한다. 예를 들어, Towne 균주는 UL130 유전자에서 프레임 이동을 초래하는 2개 염기 쌍 삽입을 함유하는 반면, AD169는 UL131 유전자에서 하나의 염기 쌍 삽입을 함유한다. Towne 및 AD169 둘 모두는 내피 세포에서의 성장에 적응할 수 있으며, 두 경우 모두 UL130 또는 UL131 유전자에서 프레임 이동 돌연변이가 복구되었다.
- [0010] US7704510은 pUL131A가 상피 세포 친화성에 필요함을 기재한다. US7704510은 또한 pUL128 및 pUL130이 비리온에 혼입되는 gH/gL과의 복합체를 형성함을 기재한다. 이러한 복합체는 내피세포 및 상피세포는 감염시키는데 필요하나 섬유아세포를 감염시키는데 필요하지 않다. 항-CD46 항체는 상피 세포의 HCMV 감염을 억제하는 것으로 밝혀졌다.
- [0011] 임상 시험에서 평가된 CMV 백신은 Towne 백신, Towne-Toledo 키메라, 항원으로서 gB를 갖는 알파바이러스 레플리콘, gB/MF59 백신, GlaxoSmithKline에 의해 생산된 gB 백신, 및 gB 및 pp65를 사용한 DNA 백신을 포함한다. pp65는 CMV에 대해 유도된 CD8+ 반응의 강력한 유도인자인 바이러스 단백질이다. 이들 백신은 모두 내피/상피 세포로의 바이러스 진입을 차단하는 항체의 빈약한 유도인자이다 (Adler, S. P. (2013), British Medical Bulletin, 107, 57-68. doi:10.1093/bmb/ldt023).
- [0012] CMV 백신의 임상전 동물 연구는 UL131 유전자가 복구된 비활성화된 AD169, 야생형 UL130 유전자를 사용하는 DNA 백신 및 pUL130 및 131로부터의 펩티드를 사용하는 펩티드 백신을 포함한다 (Sauer, A, et al., Vaccine 2011;29:2705-1, doi:10.1016).
- [0013] CMV gB 항원은 내피/상피 세포 내로의 진입을 차단하는 항체의 빈약한 유도인자로 간주된다. II기 임상 시험에서, gB/MF59 백신은 집에 아이가 있는 젊은 여성들 중 1차 감염을 예방하는데 단지 50% 효과적이었다 (Pass, RF, et al., N Engl J Med 2009;360:1191-9).
- [0014] 따라서, gH/gL, gH/gL/gO 또는 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131과 같은 다른 항원 표적을 포함하는 CMV 백신을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

- [0015] 본원에 기재되고 예시된 바와 같이, 본 발명자들은 사이토메갈로바이러스 항원 gL이 재조합적으로 발현되고 포유동물 숙주 (예컨대, CHO 세포 또는 HEK 세포)로부터 정제되는 경우, gL의 상당 부분이 절단됨을 발견하였다. 손상되지 않은 gL 단백질의 재조합 발현 및 정제를 개선하기 위해, 돌연변이를 도입하여 gL의 프로테아제 절단을 감소시켰다. 돌연변이체는 재조합 생성 동안 프로테아제 절단에 대해 증가된 내성을 나타낸다.
- [0016] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 재조합 CMV gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편을 제공하며, 여기에서 상기 gL 단백질 또는 단편은 프로테아제 인식 부위에서 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 대조군과 비교하여 상기 프로테아제 인식 부위에서 프로테아제 절단을 감소시킨다. 프로테아제 인식 부위는 잔기 91-102 (SEQ ID NO:1에 기초한 넘버링)를 나타낸다. 바람직하게는, 돌연변이는 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분의 2차 구조 (β -가닥 형태를 갖는 것으로 여겨짐)를 변화시키지 않으면서 대조군과 비교하여 프로테아제 절단을 감소시킨다.
- [0017] 본원에 기재된 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체가 또한 본원에 제공된다. 이러한 복합체는 gH/gL 복합체, gH/gL/gO 복합체, 및 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131일 수 있다.
- [0018] 또한, 본원에 기재된 바와 같이 CMV gL 단백질 및 이의 복합체-형성 단편을 엔코딩하는 핵산이 본원에 제공된다. 핵산은 핵산-기반 백신 (예를 들어, gL 또는 이의 복합체-형성 단편을 엔코딩하는 자가-복제 RNA 분자)으로서 사용될 수 있다. 핵산은 또한 gL 단백질 또는 단편, 또는 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체의 재조합 생산에 사용될 수 있다.

- [0019] 본 발명은 또한 본원에 기재된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 핵산은 숙주 세포에 의해 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 또는 gL 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 CMV 복합체를 발현시키는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, CMV 복합체는 숙주 세포로부터 분리될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포 또는 HEK-293 세포이다.
- [0020] 본 발명은 또한 본원에 기재된 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 바람직하게는, 배양물의 크기는 적어도 20 리터이다. CMV 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131을 발현시키는데 사용되는 경우, 펜타머 복합체의 수득량은 적어도 0.1 g/L인 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명은 또한 CMV에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같이, 면역학적 유효량의 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 또는 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체를 CMV에 대한 면역 반응 유도가 필요한 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포 내로의 사이토메갈로바이러스 (CMV) 진입을 억제하는 방법으로서, 세포를 본원에 기재된 바와 같은 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 또는 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0022] 또한, CMV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 본원에 기재된 조성물의 용도, 및 CMV에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 의학의 제조에서 본원에 기재된 조성물의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1A는 프로테아제 인식 부위 근처에서 다양한 헤르페스 바이러스로부터의 gL 단백질의 부분 서열 정렬을 보여준다 (외관 순서대로 각각 SEQ ID NO 12-15). 도 1B는 HSV-2 및 VZV로부터의 gH/gL 복합체의 2차 구조를 보여준다. 화살표는 절단 부위를 나타낸다.
- 도 2A는 gL 돌연변이체의 부분 서열을 보여준다 (외관 순서대로 각각 SEQ ID NO 15-26). 도 2B는 항-gL 항체를 사용한 웨스턴 블롯의 결과를 보여준다. 도 2C는 항-His 항체를 사용한 웨스턴 블롯의 결과를 보여준다.
- 도 3은 비-환원(NR) 또는 환원 및 비등(RB) 단백질 샘플 중 어느 하나를 사용한 WT 및 LSG 돌연변이체 펜타의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.
- 도 4는 비-환원(NR) 또는 환원 및 비등(RB) 단백질 샘플 중 어느 하나를 사용한 WT 및 IDG 돌연변이체 펜타의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.
- 도 5A는 정제된 WT 펜타 및 IDG 및 LSG 돌연변이체 펜타를 보여준다. 도 5B는 MF59로 애주버트 처리된 WT, LSG 돌연변이체 또는 IDG 돌연변이체 펜타로 면역화된 마우스 혈청의 중화 항체 역가 (NAB)를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 발명의 상세한 설명

[0025] 1. 개요

- [0026] 본원에 기재되고 예시된 바와 같이, 본 발명자들은 사이토메갈로바이러스 항원 gL이 재조합적으로 발현되고 포유동물 숙주 (예컨대, CHO 세포 또는 HEK 세포)로부터 정제되는 경우, gL의 상당 부분이 알려지지 않은 프로테아제에 의해 절단(또한, "gL 클리핑"으로서 언급됨)됨을 발견하였다. 실제로, 3가지 상이한 CMV 복합체: gH/gL 복합체, gH/gL/gO 복합체, 및 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131의 재조합 발현 및 정제 동안 gL 클리핑이 발생하는 것이 관찰되었다. gL의 클리핑은 항원 생성의 비-균일성, 및 gL-기반 항원에서 중화 부위의 잠재적 손실을 초래하였다.

- [0027] 웨스턴 블롯 및 N-말단 시퀀싱을 이용하여, 본 발명자들은 Merlin 균주 (SEQ ID NO:1) (도 1)의 gL 잔기 97과 98 사이의 펩티드 결합에 대한 절단 부위를 확인하고 맵핑하였다. 클리핑 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 HSV1, HSV2 및 VZV를 포함하는 여러 관련된 헤르페스 바이러스로부터의 gL 단백질의 구조적 특징을 연구하였다. HSV1, HSV2 및 VZV의 gL 단백질은 클리핑 문제를 갖는 것으로 보이지 않는다. 구조 연구에 기초하여, 본 발명자들은 아미노산 잔기 91 및 102를 포함하는 돌연변이가 프로테아제 인식 부위에 도입되어 재조합적으로 발현된 gL의 프로테아제 절단을 감소시킬 수 있음을 발견하였다.

- [0028] 예를 들어, 본원에서 예시된 바와 같이, A96L/N97S/S98G 트리플 돌연변이("LSG" 돌연변이체) 및 A96I/N97D/S98G 트리플 돌연변이 ("IDG" 돌연변이체)는 gL 클리핑 문제를 실질적으로 제거하였다. 두개의 다른 돌연변이체, 즉 잔기 Asn97의 결실 (델타 Asp97) 및 A96S/N97S/S98T ("SST" 돌연변이체) 또한, gH와 gL이 공동

-발현되는 경우 극적으로 감소된 gL 클립핑을 나타냈다.

[0029] 다른 헤르페스 바이러스의 gL 단백질의 구조 분석을 기초로 하여 (도 1), 프로테아제 인식 부위는 N-말단으로부터 C-말단으로 가능한 짧은 α -헬릭스 (⁹¹VTPE⁹⁴)(SEQ ID NO:27), 짧은 루프 (⁹⁵AA⁹⁶) 및 보존된 β -가닥 구조 (⁹⁷NSVLLD¹⁰²)(SEQ ID NO:7)를 취하는 것으로 드러났다. 절단은 β -가닥의 N-말단 단부에서 발생한다 (도 1). β -가닥은 단백질에서 β -시트의 구조 단위체이다. 이는 동일한 β -시트에서 다른 β -가닥과의 수소 결합을 형성하는 전형적으로 3 내지 10개의 아미노산 길이인 폴리펩티드 사슬의 연장된 스트레치이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 이러한 β -가닥 (도 1에서 β 4)은 gL로부터의 가닥 β 5 및 β 6과 함께, 뿐만 아니라 gH로부터의 β -가닥과 함께 β -시트를 형성한다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 돌연변이는 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분의 2차 구조를 유지해야한다 (즉, β -가닥 입체형태가 보존되며, 예컨대, β 4와 다른 β -가닥(들) 사이의 상호작용이 실질적으로 유지된다). β -가닥 구조의 유지는 CMV 복합체 (예컨대, 펜타머 복합체)의 어셈블리에 대한 임의의 부정적인 영향을 잠재적으로 감소시킬 수 있으며, 또한 중요한 면역원성 에피토프를 잠재적으로 보존할 수 있다. 예를 들어, 프로테아제 인식 부위로부터의 하나 이상의 잔기는 또 다른 헤르페스 바이러스 (예컨대, HSV-1, HSV-2 또는 VZV)로부터의 상응하는 잔기에 의해 치환될 수 있다. 도 1에 도시된 바와 같이, 서열 및 구조 분석은, CMV 잔기의 상응하는 HSV-1, HSV-2 또는 VZV 잔기로의 치환이 β -가닥 입체형태를 변화시키지 않는 반면 프로테아제 절단은 감소시킬 수 있음을 보여준다. 선택적으로, β -가닥 바로 앞에 있는 짧은 루프 구조 (도 1의 ⁹⁵AA⁹⁶)가 또한 유지될 수 있다.

[0030] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 재조합 사이토메갈로바이러스 (CMV) gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편을 제공하며, 여기에서 상기 gL 단백질 또는 단편은 프로테아제 인식 부위에서 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 대조군과 비교하여 상기 프로테아제 인식 부위에서 프로테아제 절단을 감소시킨다. 프로테아제 인식 부위는 잔기 91-102 (SEQ ID NO:1에 기초한 넘버링)를 나타낸다. 바람직하게는, 돌연변이는 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분에서 β -가닥 구조를 변화시키지 않으면서 대조군과 비교하여 프로테아제 절단을 감소시킨다.

[0031] 본원에 기재된 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체가 또한 본원에 제공된다. 이러한 복합체는 gH/gL 복합체, gH/gL/gO 복합체, 및 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131일 수 있다.

[0032] 본원에 기재된 gL 단백질 또는 단편, 및 본원에 기재된 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체의 재조합 발현을 위한 숙주 세포가 또한 본원에 제공된다. 언급한 바와 같이, gL 클립핑은 재조합 생산 과정 동안 포유동물 숙주 세포에서 관찰되었다. 따라서, 본원에 기재된 돌연변이는 포유동물 숙주 (많은 생물 체제에 대해 선호되는 숙주임)에서의 CMV 백신의 재조합 생산에 특히 적합하다. 예를 들어, HEK-293 및 CHO 세포는 생물학적 생산의 상업적 생산에 오랫동안 사용되었다. 따라서, gL 절단을 감소시키는 돌연변이 혼입은 생산 효율 및 수율을 향상시킬 수 있고, 오염되고 부분적으로 분해된 생성물의 형성을 감소시킬 수 있다.

[0033] 2. 정의

[0034] 용어 사이토메갈로바이러스 (CMV) 단백질 (예컨대, gL)의 "복합체-형성 단편"은 또 다른 CMV 단백질과 복합체를 형성하는 능력을 보유하는 단백질의 임의의 부분 또는 일부를 지칭한다. 이러한 복합체는 예를 들어, gH/gL 다이머 복합체, gH/gL/gO 트리머 복합체, 또는 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체를 포함한다. CMV 단백질 (예컨대, gL)의 "펜타머-형성 단편"은 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체를 형성하는 능력을 보유하는 단백질의 임의의 부분 또는 일부를 지칭한다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같은, "펜타머 복합체" 또는 "펜타머"는 다섯개의 상이한 서브유닛 즉, gH, gL, pUL128, pUL130 및 pUL131을 포함하는 CMV 복합체를 지칭한다. 본 명세서에서 일반적으로 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 (또는 gH, gL, pUL128, pUL130 및 pUL131을 포함하는 펜타머 복합체)로서 언급되지만, 5개의 서브유닛 각각은 전장일 필요는 없다; 상기 용어는 또한 gH, gL, pUL128, pUL130 및 pUL131의 복합체-형성 단편에 의해 형성된 펜타머를 포함한다.

[0036] 용어 "돌연변이"는 아미노산 잔기의 첨가, 결실 또는 치환을 나타낸다. 상기 용어는 또한, 비-자연 발생 아미노산 또는 아미노산 유사체를 폴리펩티드 사슬에 도입시키는 변형을 포함한다.

[0037] 하전된 아미노산 잔기는 D, E, K, R 및 H를 포함한다. 극성의 비-하전된 잔기는 S, T, C, Y, N 및 Q를 포함한다. 비극성 또는 소수성 잔기는 A, V, L, I, M, W, F 및 P를 포함한다.

[0038] 큰 측쇄를 포함하는 아미노산 잔기는 W, F, M, Y, Q, R, E, H 및 K를 포함한다. 측쇄가 없거나 작은 측쇄를 포

합하는 아미노산 잔기는 G, A, V, S, T, C, D 및 N을 포함한다.

- [0039] 아미노산 잔기는 측쇄가 분지형 또는 환형 치환기를 포하는 경우 "벌키 측쇄(bulky side chain)"를 포함한다. 벌키 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 예는 트립토판, 티로신, 페닐알라닌, 호모페닐알라닌, 류신, 이소류신, 히스티딘, 1-메틸트립토판, α -메틸티로신, α -메틸페닐알라닌, α -메틸류신, α -메틸이소류신, α -메틸히스티딘, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실알라닌, 나프틸알라닌 등을 포함한다.
- [0040] 본 발명이 임의의 CMV 균주로부터 기원하는 gL 단백질에 적용가능 하지만, 이의 이해를 돕기 위해 본 명세서에서 아미노산 위치를 언급할 때, 달리 언급되지 않는 한, Merlin 균주로부터 기원하는 SEQ ID NO:1의 gL 단백질의 아미노산 서열과 관련하여 넘버링이 부여된다. 그러나, 본 발명은 Merlin 균주에 한정되지 않는다. 본 발명의 교시를 이용하여, 임의의 다른 CMV 균주의 gL 단백질에서 유사한 아미노산 위치가, 용이하게 이용가능하며 널리 공지된 정렬 알고리즘 (예컨대, 디폴트 세팅(default setting)을 이용하는 BLAST; 디폴트 세팅을 이용하는 ClustalW2; 또는 디폴트 파라미터를 이용하는 문헌 [Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16 (22):10881-10890]에 기재된 알고리즘)을 이용하여 아미노산 서열을 정렬시킴으로써 당업자에 의해 결정될 수 있다. 따라서, "CMV gL 단백질"을 언급할 때, 이는 임의의 균주 (Merlin 균주 이외에)로부터의 CMV gL 단백질로서 이해되어야 한다. 실제 수는 실제 서열 정렬에 따라 다른 균주로부터의 gL 단백질에 대해 조정되어야 할 수 있다.
- [0041] 예를 들어, "프로테아제 인식 부위"는 특히 잔기 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 및 102로 구성된 아미노산 잔기 91-102로 구성되는 것으로 정의된다. 이들 번호는 SEQ ID NO:1의 gL 단백질의 아미노산 서열과 관련된다. 다른 CMV 균주의 gL 단백질, 또는 다른 gL 돌연변이체 또는 변이체, 또는 gL의 단편으로부터의 프로테아제 인식 부위는 SEQ ID NO:1을 갖는 질의 서열을 정렬하는 표준 서열 정렬 프로그램을 사용하여 확인될 수 있으며, SEQ ID NO:1의 91-102에 매칭되는 잔기를 확인한다.
- [0042] 특정 아미노산 잔기 위치는 또한, SEQ ID NO:1에 따라 넘버링된다. 예를 들어, "S98"은 SEQ ID NO:1의 98번 위치 (이는 S임)일뿐만 아니라 서열을 SEQ ID NO:1과 정렬시킬 경우, SEQ ID NO:1의 S98과 매칭되는 다른 gL 서열 (또는 변이체 또는 단편)로부터의 상응하는 잔기를 나타낸다. 간단히 하기 위해, SEQ ID NO:1의 S98에 상응하는 gL 서열 (또는 변이체 또는 단편)으로부터의 임의의 잔기는 S98로서 불리며, 비록 그러한 잔기의 실제 위치는 98번일 수도 있고 아닐 수도 있으며, 실제 잔기는 S일 수 있거나 아닐 수도 있다. 예를 들어, 보존적 치환(예를 들어, T)이 SEQ ID NO:1의 S98과 정렬될 수 있다. 보존적 치환은 전형적으로 BLAST 2에 의해 "양성" 또는 "+"로서 확인된다.
- [0043] 유사하게는, 돌연변이는 또한 SEQ ID NO:1의 넘버링에 따라 식별된다. 예를 들어, S98G는 SEQ ID NO:1의 S98에 상응하는 gL 서열 (또는 변이체 또는 단편)의 임의의 잔기가 G로 돌연변이됨을 의미한다.
- [0044] 질의 서열의 아미노산 잔기는 질의 아미노산 서열을 기준 서열과 정렬시킴으로써 잔기의 위치가 설계된 위치와 매칭되는 경우 기준 서열의 설계된 위치 (예를 들어, SEQ ID NO:1의 S98)에 "상응한다". 이러한 정렬은 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 예컨대, 디폴트 파라미터를 사용하는 "BLAST 2 Sequences" 또는 ClustalW2를 사용함으로써 또는 수동으로 수행될 수 있다.
- [0045] ""는 적어도 10개 아미노산 잔기 길이이고 SEQ ID NO:5와 적어도 50% 동일한 서열을 지칭한다. 도 1에 도시된 바와 같이, Merlin 균주로부터의 야생형 gL에 있어서, HSV1, HSV2 및 VZV와 비교하여 CMV gL에 고유한 17-잔기 단편이 확인되었다("n1"로 표시). 바람직하게는, 삽입 영역은 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개 또는 적어도 20개 잔기를 포함하고/거나 SEQ ID NO:5와 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일하다. 특정 구체예에서, 삽입 영역은 SEQ ID NO:5의 1 내지 8개 아미노산 잔기가 보존적으로 치환되는 서열을 포함한다.
- [0046] "보존적으로 치환된"은 잔기가 생물학적으로 유사한 또 다른 잔기로 대체됨을 의미한다. 예로는 아미노산 잔기의 유사한 특징의 예를 들어, 작은 아미노산, 산성 아미노산, 극성 아미노산, 염기성 아미노산, 소수성 아미노산 및 방향족 아미노산으로의 치환을 포함한다. 보존적 아미노산 치환의 예는 하기 표 1의 것들, 및 유사한 특징을 갖는 비-천연 알파 아미노산에 의한 원래 잔기의 유사 치환을 포함한다.

표 1

원래 잔기	매우 고도로-보존된 치환	고도로 보존된 치환 (Blosom90 매트릭스로부터 유래)	보존된 치환 (Blosom65 매트릭스로부터 유래)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	None	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu; Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

달리 명시하지 않는 한, 두 서열의 동일성 퍼센트는 두 서열 중 더 짧은 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정된다.

3. 변형된 CMV gL 단백질 및 복합체

A. 변형된 gL 단백질

한 양태에서, 본 발명은 변형된 CMV gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편을 제공하며, 이는 잔기 N97과 S98 사이의 펩티드 결합에서 클리핑(절단)을 감소시킨다.

인간 CMV 당단백질 L(gL)은 UL115 유전자에 의해 암호화된다. gL은 바이러스 복제에 필수적인 것으로 여겨지며, gL의 모든 공지된 기능적 특성은 이의 gH와의 다이머화와 직접 관련된다. gH/gL 복합체는 바이러스의 숙주 세포 내로의 진입을 유도하는, 바이러스 및 원형질 막의 융합에 필요하다. HCMV 균주 Merlin (GI:39842115, SEQ ID NO:1) 및 HCMV 균주 Towne (GI:239909463, SEQ ID NO:2)로부터의 gL은 278개 아미노산 길이인 것으로 보고되었다. HCMV 균주 AD169 (GI: 2506510, SEQ ID NO:3)로부터의 gL은 278개 아미노산 길이인 것으로 보고되었으며, 이의 N-말단(아미노산 잔기 1-35)에서 신호 서열을 포함하고, 2개의 N-글리코실화 부위(잔기 74 및 114)를 가지며, TM 도메인이 결합되어있다(Rigoutsos, I, et al., Journal of Virology 77 (2003):4326-44). SEQ ID NO:1에서 N-말단 신호 서열은 아미노산 잔기 1-30을 포함하는 것으로 예측된다. SEQ ID NO:2는 SEQ ID NO:1과 98% 아미노산 동일성을 공유한다. 22 내지 39개 임상 분리물뿐만 아니라 실험실 균주 AD169, Towne 및 Toledo로부터 전장 gL 유전자의 시퀀싱은 분리물 중 아미노산 서열의 변동이 2% 미만임을 드러냈다(Rasmussen, L, et al., Journal of Virology 76 (2002): 10841-10888).

전형적으로, gL 단백질의 N-말단 신호 서열은 숙주 세포 신호 펩티다제에 의해 절단되어 성숙한 gL 단백질을 생성한다. 본 발명의 HCMV 막 복합체에서 gL 단백질은 N-말단 신호 서열이 절단될 수 있다. N-말단 신호 서열이 절단된 gL 단백질의 예는 SEQ ID NO:4이며, 이는 N-말단 신호 서열이 절단되어 있으며 SEQ ID NO:1의 아미노산 잔기 31-278로 구성된다.

gL은 바이러스 복제에 필수적인 것으로 생각되지만, gL의 모든 공지된 기능적 특성은 이의 gH와의 다이머화와 직접 관련된다.

본 발명의 gL 단백질은 SEQ ID NO:1과 다양한 정도의 동일성을 갖는 예컨대, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:3에 열거된 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 gL 변이체일 수 있다. 본 발명의 gL 단백질은 SEQ ID NO:4와 다양한 정도의 동일성을 가질 수 있으며, 예컨대, SEQ ID NO:4에 열거된 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 특정 구체예에서, gL 변이체 단백질은 (i) 다이머 복합체 gH/gL의 일부를 형성하고; (ii) 트리머 gH/gL/gO 복합체의 일부를 형성하고; (iii) 펜타머 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 복합체의 일부를 형성하고; (iv) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4로부터의 적어도 하나의 에피토포

프를 포함하고/거나 (v) CMV 비리온과 면역학적으로 교차 반응하는 항체를 생체 내에서 유발시킬 수 있다.

- [0057] 본원에 기재된 gL 단백질의 복합체-형성 단편이 또한 본 발명에 포함된다. gL의 복합체-형성 단편은 또 다른 CMV 단백질과 복합체를 형성하는 능력을 보유하는 gL 단백질의 임의의 부분 또는 일부일 수 있다. 특정 구체예에서, gL의 복합체-형성 단편은 다이머 복합체 gH/gL의 일부를 형성한다. 특정 구체예에서, gL의 복합체-형성 단편은 트리머 gH/gL/g0 복합체의 일부를 형성한다. 특정 구체예에서, gL의 복합체-형성 단편은 펜타머 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 복합체의 일부를 형성한다. gL의 복합체-형성 단편은 당업계에 공지된 표준 검정 예컨대, 공동-면역침전 검정, 가교, 또는 형광 염색에 의한 공동-위치결정, 등에 의해 획득되거나 결정될 수 있다. 특정 구체예에서, gL의 복합체-형성 단편은 또한, (i) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 또는 SEQ ID NO:4로부터의 적어도 하나의 에피토프를 포함하고/거나 (ii) CMV 비리온과 면역학적으로 교차 반응하는 항체를 생체 내에서 유발시킬 수 있다.
- [0058] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편은 프로테아제 인식 부위 (잔기 91-102)에서 돌연변이를 포함하며, 여기에서 상기 돌연변이는 대조군과 비교하여 상기 프로테아제 인식 부위에서 프로테아제 절단을 감소시킨다.
- [0059] 다양한 대조군이 사용될 수 있다. 실질적으로 동일한 조건하에서 상응하는 야생형 gL의 (잔기 97과 98 사이의 펩티드 결합에서) 프로테아제 절단의 수준이 대조군으로서 이용될 수 있다. 대안적으로, 대조군은 소정 수준 또는 임계 수준 (예를 들어, 전체 gL 단백질의 20%, 25%, 또는 30%)일 수 있다. 백분율은 몰 백분율을 나타낸다.
- [0060] 예를 들어, 돌연변이는, 포유동물 숙주 세포에 대한 표준 배양 조건하에서 포유동물 숙주 세포에서 재조합적으로 발현시킬 경우, 야생형의 것과 비교하여, 잔기 97과 98 사이의 펩타이드 결합에서 프로테아제 절단의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 정도의 감소를 발생시킬 수 있다.
- [0061] 대안적으로 또는 부가적으로, 포유동물 숙주 세포에 대한 표준 배양 조건하에서 포유동물 숙주 세포에서 재조합적으로 발현시킬 경우, 야생형의 것과 비교하여, 프로테아제 절단은 적어도 3배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 75배, 적어도 80배, 적어도 90배 또는 적어도 100배 감소된다.
- [0062] 대안으로 또는 부가적으로, 돌연변이는, 포유동물 숙주 세포에 대한 표준 배양 조건하에서 포유동물 숙주 세포에서 재조합적으로 발현시킬 경우, gL 분자 또는 이의 복합체-형성 단편의 약 35% 이하가 잔기 97과 98 사이의 펩티드 결합에서 절단되는 것일 수 있다. 예를 들어, 포유동물 숙주 세포에 대한 표준 배양 조건하에서 포유동물 숙주 세포에서 재조합적으로 발현시킬 경우, gL 분자, 또는 이의 복합체-형성 단편의 약 35% 이하, 약 30% 이하, 약 25% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 10% 이하, 약 9% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하가 잔기 97과 98 사이의 펩티드 결합에서 절단되는 돌연변이가 발생할 수 있다. 백분율은 몰 백분율을 나타낸다.
- [0063] 통상적으로 사용되는 포유동물 숙주 세포에 대한 표준 배양 조건은 공지되어 있다. 예를 들어, CHO 세포의 경우 표준 배양 조건은 10% 이하의 CO₂를 갖는 pH 7.0 배지에서 36.5℃의 온도일 수 있다. 한 특정 예에서, 37℃ 및 8% CO₂하의 pH 7.0에서 3일 동안 펜타머 복합체 (gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131)를 발현시키기 위해 Expi293 세포를 트랜스펙션시키고, 세포 배양물의 상청액을 하기 실시예에 제시된 바와 같이 친화성 정제하고, 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0064] 돌연변이는 아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 또는 이들의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 돌연변이는 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분의 이차 구조를 실질적으로 보존한다. 특히, 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분의 잔기는 β-가닥을 형성하며, 이는 다른 β-가닥과 상호작용하여 β-시트를 형성하는 것으로 여겨진다. 바람직하게는, 상기 돌연변이는 이러한 β-가닥 입체형태를 유지한다. 이차 구조를 유지하는 잠재적 이점은 예를 들어, gL-함유 복합체 (예를 들어, gH/gL, gH/gL/g0 또는 gH/gL/pIL128/pUL130/pUL131)의 조립을 촉진시키고 주요 면역원성 에피토프를 유지하는 것을 포함한다. 선택적으로, β-가닥 바로 앞에 있는 짧은 루프 구조가 또한 보존된다.
- [0065] I-TASSER, HHpred, RaptorX, MODELLER, SWISS-MODEL, Robetta Beta, SPARKSx, PEP-FOLD, Phyre 및 Phyre2, RAPTOR, QUARK, Abalone, Foldit, 등등을 포함하는 많은 컴퓨터 프로그램 및 알고리즘이 이차 구조를 예측하는데 이용가능하다. 돌연변이가 프로테아제 인식 부위의 이차 구조를 변화시키는지의 여부는 이러한 도구를 사용

하여 분석될 수 있다.

- [0066] 특정 구체예에서, 돌연변이는 하나 이상의 아미노산 잔기의 첨가를 포함한다. 예를 들어, 돌연변이는 2개 내지 5개 아미노산 잔기의 첨가를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 2개 내지 5개 아미노산 잔기는 극성 잔기(들) 및 비-극성 잔기(들) 모두를 포함한다.
- [0067] 특정 구체예에서, 돌연변이는 잔기 N97과 S98 사이의 하나 이상의 잔기의 첨가를 포함한다. 실시예에 나타난 바와 같이, N97과 S98 사이의 펩티드 결합은 프로테아제에 의해 절단되며; 따라서, N97과 S98 사이에 하나 이상의 추가 잔기를 도입하면 절단 저항성이 더 큰 돌연변이체 gL (또는 단편)을 발생시킬 수 있다. 예시적 구체예에서, 돌연변이는 잔기 97과 98 사이에 F, Q 또는 이들의 조합물의 첨가를 포함한다. 예시적 구체예에서, 돌연변이는 잔기 97과 98 사이에 FQ 또는 QF의 첨가를 포함한다.
- [0068] 특정 구체예에서, 돌연변이는 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 예컨대, 1 내지 3개의 아미노산 잔기의 결실을 포함한다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 잔기의 결실을 포함한다: V91, T92, P93, E94, A95, A96, N97, S98, V99, L100, L101, D102, 및 이들의 조합물. 특정 구체예에서, 돌연변이는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 잔기의 결실을 포함한다: E94, A95, A96, N97, S98, V99, L100, L101, D102, 및 이들의 조합물. 예시적 구체예에서, 돌연변이는 하기로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 잔기의 결실을 포함한다: A96, N97, S98, 및 이들의 조합물. 예시적 구체예에서, 돌연변이는 N97 결실을 포함한다.
- [0069] 특정 구체예에서, 돌연변이는 잔기를 또 다른 헤르페스 바이러스의 gL 단백질로부터의 상응하기 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 헤르페스 바이러스 (헤르페스비리대) 과에는 예를 들어, 헤르페스 심플렉스 바이러스 1 및 2 (HSV-1 또는 HHV-1, HSV-2 또는 HHV-2), 수두대상포진 바이러스 (VZV 또는 HHV-3), 엡스타인-바르 바이러스 (EBV 또는 HHV-4), 인간 헤르페스바이러스 6 (HHV-6), 인간 헤르페스 바이러스 7 (HHV-7), 및 카포시 육종 관련 포진 바이러스 (HHV-8)를 포함한다. 특정 구체예에서, 또 다른 헤르페스 바이러스로부터의 gL 단백질은 HSV1, HSV2, VZV, EBV, PrV, 또는 소 헤르페스바이러스 5로부터의 gL 단백질이다.
- [0070] CMV 잔기를 또 다른 헤르페스 바이러스로부터의 상응하는 잔기로 치환하는 것의 한 잠재적 이점은 프로테아제 인식 부위의 2차 구조가 보존될 가능성이 높다는 점이다. 도 1에 도시된 바와 같이, HSV-1, HSV-2 및 VZV는 모두 실질적으로 동일한 이차 구조를 공유하며, 특히 프로테아제 인식 부위의 C-말단 부분은 모두 β -가닥 구조를 채택한다.
- [0071] 다중 치환이 일어나는 경우, 이들이 동일한 헤르페스 바이러스로부터 유래할 필요는 없다. 예를 들어, 제 1의 CMV 잔기는 HSV-1로부터의 상응하는 잔기로, 제 2 잔기는 HSV-2로부터의 상응하는 잔기로, 및/또는 제 3의 CMV 잔기는 VZV로부터의 상응하는 잔기로 및 기타 등등으로 치환할 수 있다. 따라서, 돌연변이는 제 1의 다른 헤르페스 바이러스 gL 단백질로부터의 상응하는 잔기로 치환된 제 1 아미노산 잔기, 및 제 2의 다른 헤르페스 바이러스 gL 단백질로부터의 상응하는 잔기로 치환된 제 2 아미노산 잔기, 및/또는 제 3의 다른 헤르페스 바이러스 gL 단백질로부터의 상응하는 잔기로 치환된 제 3 아미노산 잔기, 등등을 포함할 수 있다.
- [0072] 특정 구체예에서, 돌연변이는 E94를 A로 치환하는 것을 포함한다.
- [0073] 특정 구체예에서, 돌연변이는 A95를 R, L, 또는 N으로 치환하는 것을 포함한다.
- [0074] 특정 구체예에서, 돌연변이는 A96를 W, F, 또는 M과 같은 큰 측쇄를 포함하는 잔기 또는 비-극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 A96를 I, L, 또는 S로 치환하는 것을 포함한다.
- [0075] 특정 구체예에서, 돌연변이는 N97을 극성 잔기 또는 비-극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 극성 잔기는 작은 측쇄 또는 큰 측쇄를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 N97을 S, D, E, A, 또는 Y로 치환하는 것을 포함한다.
- [0076] 특정 구체예에서, 돌연변이는 S98을 G, A, V, S, T, C, D 또는 N과 같은 작은 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 S98을 G, T, V 또는 I로 치환하는 것을 포함한다.
- [0077] 특정 구체예에서, 돌연변이는 V99를 I를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.
- [0078] 특정 구체예에서, 돌연변이는 L100를 F 또는 V를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.
- [0079] 특정 구체예에서, 돌연변이는 L101를 V를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.

- [0080] 본원에 기재된 첨가, 결실, 및 치환은 단독으로 또는 임의의 조합으로 이용될 수 있다. 예를 들어, gL 돌연변이체는 하나의 위치에서의 첨가, 제 2 위치에서의 결실, 및 제 3 위치에서의 치환을 포함할 수 있다.
- [0081] 특정 구체예에서, gL 단백질 또는 단편은 프로테아제 인식 부위의 N-말단에서 삽입 영역을 포함한다. 도 1에서 도시된 바와 같이, HSV-1, HSV-2 및 ZVZ로부터의 gL 단백질과 비교하여, CMV gL 단백질은 여분의 17-개 잔기 삽입물을 포함한다. 실시예에 나타난 바와 같이, 이러한 17개-잔기 삽입물이 부분적으로 또는 완전히 결실될 경우, gL 단백질은 프로테아제 절단이 더욱 쉽게 일어난다. 따라서, 17-잔기 삽입물은 프로테아제 인식 부위로의 프로테아제 접근을 적어도 부분적으로 차단하는 것으로 보인다. 따라서, 프로테아제 인식 부위의 N-말단에서 삽입 영역을 유지하는 것이 바람직할 수 있다. "삽입 영역"은 적어도 10개 아미노산 잔기 길이어야 하며, SEQ ID NO:5 (이는 HSV1, HSV2, 및 VZV와 비교하여, CMV gL에 고유한 원래의 17-잔기 단편임)와 적어도 50% 동일하다.
- [0082] 특정 구체예에서, 돌연변이는 비-자연 발생 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함하며, 이는 프로테아제 절단을 감소시키는 것으로 여겨진다.
- [0083] 특정 구체예에서, 돌연변이는 벌키 측쇄를 포함하는 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함하며, 이는 프로테아제 인식 부위로의 프로테아제 접근을 적어도 부분적으로 차단하는 것으로 여겨지며, 프로테아제 절단을 감소시킨다.
- [0084] **B. CMV 단백질 복합체**
- [0085] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 변형된 CMV gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 복합체를 제공한다. 이러한 복합체는 예를 들어, (i) 본원에 기재된 변형된 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 CMV 단백질 gH 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 분리된 다이머 복합체; (ii) 본원에 기재된 변형된 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 CMV 단백질 gH 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 gO 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 분리된 트리머 복합체; 및 (iii) 본원에 기재된 변형된 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 CMV 단백질 pUL128 또는 이의 복합체-형성 단편, pUL130 또는 이의 복합체-형성 단편, pUL131 또는 복합체-형성 단편, 및 gH 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 분리된 펜타머 복합체를 포함한다. 또한, 구성요소로서 gL (또는 이의 복합체-형성 단편)을 포함하는 임의의 다른 복합체가 포함된다.
- [0086] 비록 gH, gL, gO, pUL128, pUL130, pUL131이 당단백질로서 언급될 수 있지만, 이러한 명명법은 이들 단백질이 본 발명에 사용될 때 글리코실화되어야 한다는 것을 의미하지는 않는다. 대조적으로, 본 발명의 일부 구체예에서, 폴리펩티드 중 하나 이상은 글리코실화되지 않는다. 그러나, 일반적으로, 본 발명의 복합체에서 하나 이상의 (또는 모든) 폴리펩티드는 글리코실화된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 복합체에서 하나 이상의 (또는 모든) 폴리펩티드는 돌연변이된 포유동물 세포와 같은 배양된 세포의 글리코실화 돌연변이체에 의해 글리코실화된다. 이러한 글리코실화 돌연변이체는 야생형 글리코실화 패턴과 상이한 폴리펩티드 글리코실화 패턴을 생성하며, 즉, 생성된 폴리펩티드 글리코폼은 야생형 글리코폼과 상이하다.
- [0087] 특정 구체예에서, gL (또는 이의 복합체-형성 단편) 또는 gL (또는 이의 복합체-형성 단편)을 포함하는 복합체의 글리코실화 패턴은 포유동물 글리코실화 패턴을 가지며/거나 곤충 세포 글리코실화 패턴을 갖지 않는다. 일부 구체예에서, 복합체의 단백질 중 하나 이상은 말단으로부터 두 번째의 갈락토스 및 말단 시알 산을 갖는 복합체 N-연결된 측쇄를 함유한다.
- [0088] 단백질 복합체 (예컨대, 펜타머 복합체)의 재조합 생성을 위해, 복합체는 가용성인 것이 바람직할 수 있다. 서열 분석에 기초하여, CMV gH 단백질은 트랜스멤브레인 (TM) 도메인을 포함하나, gL, gO, pUL128, pUL130, 및 pUL131은 트랜스멤브레인 도메인을 갖지 않는다. 따라서, 가용성 복합체 (예를 들어, 펜타머 복합체)를 생성하기 위해, 펜타머 복합체의 gH 서브유닛은 TM 도메인이 결여될 수 있다. 예를 들어, gH의 N-말단 신호 서열 및 엑토도메인을 포함하나, TM 도메인을 포함하지 않는 gH 단편이 사용될 수 있다.
- [0089] CMV 균주 Towne로부터의 gH는 SEQ ID NO:6 (GI:138314, 742개 아미노산 잔기)으로 나타내었다. Towne으로부터의 gH는 (i) 6개의 N-글리코실화 부위 (잔기 55, 62, 67, 192, 641 및 700); (ii) 이의 N-말단의 소수성 신호 서열 (아미노산 잔기 1-23); (iii) 세포의 공간으로 세포 밖으로 돌출된 엑토도메인 (잔기 24-717); (iv) 소수성 트랜스멤브레인 (TM) 도메인 (잔기 718-736); 및 (v) C-말단 세포질 도메인 (잔기 737-742)을 갖는 것으로 특성규정되었다. 다른 균주로부터의 gH 단백질, 또는 다른 gH 변이체 및 단편의 TM 도메인은 서열 정렬에 따라 식별될 수 있다.

- [0090] 용이한 생산을 위해, 재조합적으로 생성된 CMV 복합체 (예컨대, 펜타머 복합체)는 숙주 세포로부터 배양 배지로 분리될 수 있다.
- [0091] 특정 구체예에서, 상기 펜타머 복합체는 숙주 세포로부터 분리된다. 5개의 모든 서브유닛 즉, gH, gL, pUL128, pUL131 및 pUL131의 존재는 골지체로 운반되기 전에 ER에서 펜타머 복합체의 조립에 충분한 것으로 보고되었다. 문헌 [Ryckman et al., J Virol. Jan 2008; 82(1):60-70] 참조. 대안적으로 또는 부가적으로, 적절한 신호 펩티드는 5개 서브유닛 중 하나 이상에 사용될 수 있다 (예를 들어, 분비 신호를 갖는 융합 단백질을 재조합으로써). 분비 단백질을 생성하기 위한 신호 서열 (및 발현 카세트)은 종래 기술에 공지되어 있다. 일반적으로, 리더 펩티드는 5-30개 아미노산 길이이며, 전형적으로 새로 합성된 단백질의 N-말단에 존재한다. 신호 펩티드의 코어는 일반적으로, 단일 알파-헬릭스를 형성하는 경향을 갖는 소수성 아미노산의 긴 스트레치를 함유한다. 또한, 많은 신호 펩티드는 아미노산의 양으로 하전된 짧은 스트레치로 시작되며, 이는 전위 동안 폴리펩티드의 적절한 토폴로지를 강화하는데 도움을 줄 수 있다. 신호 펩티드의 말단에, 인식되어 신호 펩티다제에 의해 절단되는 아미노산의 스트레치가 전형적으로 존재한다. 신호 펩티다제는 전위 동안 또는 전위 완료 후 절단되어 자유 신호 펩티드 및 성숙 단백질을 생성할 수 있다.
- [0092] **C. 변형된 gL 단백질 및 복합체를 엔코딩하는 핵산**
- [0093] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 변형된 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편을 엔코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다.
- [0094] 특정 구체예에서, 핵산은 DNA이다. 재조합 단백질의 발현 및 정제를 위한 DNA-기반 발현 시스템은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 발현 시스템은 숙주 세포 예컨대, 포유동물 숙주 세포, 박테리아 숙주 세포, 또는 곤충 숙주 세포에서 변형된 gL 또는 gL 단편의 발현을 조절하는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 본원에 기재된 변형된 gL 또는 gL 단편을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터일 수 있다. 발현 조절 서열은 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 리보솜 진입 부위, 또는 폴리아데닐화 서열일 수 있다. 본 발명에 사용하기 위해 고려되는 다른 발현 조절 서열은 인트론 및 3' UTR 서열을 포함한다.
- [0095] 재조합적으로 발현된 변형된 gL 단백질 또는 이의 단편, 또는 변형된 gL 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 복합체는 본원에 기재된 방법, 예컨대 WO 2014/005959에 기재된 정제 방법 또는 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 정제될 수 있다.
- [0096] 특정 구체예에서, 핵산 분자는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스, 또는 알파바이러스로부터 유래된 벡터이다. 특정 구체예에서, 핵산 분자는 복제-결핍 바이러스 벡터이다.
- [0097] 특정 구체예에서, 핵산은 RNA이다. 특정 구체예에서, 핵산은 자가-복제 RNA 분자 예컨대, 알파바이러스-유래된 RNA 레플리콘이다.
- [0098] 자가-복제 RNA 분자는 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어, 알파바이러스로부터 유래된 복제 엘리먼트를 사용하고 바이러스 구조 단백질을 관심 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열로 치환함으로써 생성될 수 있다. 자가-복제 RNA 분자는 전형적으로, 세포로 전달된 후 직접 번역될 수 있는 플러스-가닥 분자이며, 이러한 번역은 RNA-의존성 RNA 중합효소를 제공하며, 이는 이어서 전달된 RNA로부터 안티센스 및 센스 전사를 둘 모두를 생성한다. 이와 같이, 전달된 RNA는 다중 도터 RNA의 생성으로 이어진다. 이러한 도터 RNA는 물론 공선의 서브게놈 전사물은 자체적으로 번역되어 엔코딩된 항원의 원위치 발현을 제공할 수 있거나, 번역되어 항원의 원위치 발현을 제공하는 전달된 RNA와 동일한 센스를 갖는 추가의 전사물을 제공하도록 전사될 수 있다. 전사의 이러한 서열의 전반적인 결과는 도입된 레플리콘 RNA의 수의 막대한 증폭이며, 따라서 엔코딩된 항원은 세포의 주요 폴리펩티드 생성물이 된다. 간단하게는, 자가-복제 RNA로 형질감염된 세포는 아포토시스 사멸을 겪기 전에 항원을 생성한다. 이러한 사멸은 수지상 세포를 과다활성화시키는 것으로 또한 입증된, 필요한 이중-가닥(ds) RNA 중간체의 가능한 결과이다. 따라서, 자가-복제 RNA의 향상된 번역원성은 숙주 세포의 RNA-바이러스 감염을 모방하는 염증전 dsRNA의 생성의 결과일 수 있다.
- [0099] 이러한 방식으로 자가-복제를 달성하기에 적합한 한 시스템은 알파바이러스-기반의 레플리콘을 사용하는 것이다. 알파바이러스는 토가비리과 과의 유전적으로, 구조적으로 및 혈청학적으로 관련된 절지동물-매개 바이러스 세트를 포함한다. 신드비스 바이러스, 쉼리키 삼립 바이러스, 로스 강 바이러스, 및 베네주엘라 말 뇌염 바이러스를 포함하는 26개의 공지된 바이러스 및 바이러스 아형이 알파바이러스 속으로 분류되었다. 이와 같이, 본 발명의 자가-복제 RNA는 쉼리키 삼립 바이러스(SFV), 신드비스 바이러스(SIN), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(VEE), 로스 강 바이러스(RRV), 동부 말 뇌염 바이러스, 또는 알파바이러스 과에 속하는 다른 바이러스로부터

유래된 RNA 복제효소를 혼입시킬 수 있다.

- [0100] 알파바이러스-기반 "레플리콘" 발현 벡터가 본 발명에 사용될 수 있다. 레플리콘 벡터는 DNA, RNA 및 재조합 레플리콘 입자를 포함하는 여러 포맷으로 활용될 수 있다. 이러한 레플리콘 벡터는 예를 들어, 신드비스 바이러스 (Xiong et al. (1989) Science 243:1188-1191; Dubensky et al., (1996) J. Virol. 70:508-519; Hariharan et al. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo et al. (1999) PNAS 96:4598-4603), 쉘리키 삼립 바이러스 (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9:1356-1361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech. 16:562-565), 및 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(Pushko et al. (1997) Virology 239:389-401)를 포함하는 알파바이러스로부터 유래되었다. 알파바이러스-유래된 레플리콘은 일반적으로 전반적인 특성(예를 들어, 구조, 복제)에 있어서는 상당히 유사하고, 개별적인 알파바이러스는 고유한 일부 특정 성질(예를 들어, 수용체 결합, 인터페론 감수성, 및 질병 프로파일)을 나타낼 수 있다. 따라서, 분기하는 바이러스 과로부터 만들어진 키메라 알파바이러스 레플리콘이 또한 유용할 수 있다.
- [0101] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 CMV gL 단백질 (또는 이의 단편)은 알파바이러스 레플리콘 입자(VRP)를 사용하여 전달된다. "알파바이러스 레플리콘 입자"(VRP) 또는 "레플리콘 입자"는 알파바이러스 구조 단백질로 패키징된 알파바이러스 레플리콘이다.
- [0102] 알파바이러스-기반 RNA 레플리콘의 사용은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, WO 2013006837, 단락 [0155] 내지 [0179] 참조). RNA 레플리콘은 그 안에 엔코딩된 단백질을 정제할 필요 없이 투여될 수 있다.
- [0103] 특정 구체예에서, 핵산 분자는 아데노바이러스로부터 유래된 벡터의 일부이다. 아데노바이러스 게놈은 각 가닥의 5' 말단에 공유 결합된 55-kDa 말단 단백질을 갖는 약 36,000개 염기 쌍의 선형 이중-가닥 DNA 분자이다. 아데노바이러스 ("Ad") DNA는 혈청형에 따라 정확한 길이의 약 100개 염기쌍의 동일한 역 말단 반복부(Inverted Terminal Repeat)("ITR")를 함유한다. 바이러스의 복제 기점은 정확하게 게놈 단부의 ITR 내에 위치한다. 본 발명에 사용하기 위한 아데노바이러스 벡터는 비제한적으로, 아데노바이러스의 40개 초과 혈청형 군주 중 임의의 혈청형 예컨대, 혈청형 2, 5, 12, 40 및 41을 포함하는 임의의 다양한 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래될 수 있다.
- [0104] 특정 구체예에서, 핵산 분자는 아데노 관련 바이러스(AAV)로부터 유래된 벡터의 일부이다. AAV 게놈은 대략 4681개의 뉴클레오티드를 함유하는 선형의 단일-가닥 DNA 분자이다. AAV 게놈은 일반적으로 역 말단 반복부(ITR)가 각 말단에 측면 인접한 내부 비반복형 게놈을 포함한다. ITR은 대략 145개 염기쌍 (bp) 길이이다. ITR은 DNA 복제 기점으로서 작용하고, 바이러스 게놈에 대한 패키징 신호로서 작용하는 것을 포함하는 다양한 기능을 갖는다. AAV는 헬퍼-의존적 바이러스이다; 즉, 이는 야생에서 AAV 비리온을 형성하기 위해 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 또는 백시니아)와의 공동-감염을 필요로 한다. 헬퍼바이러스와의 공동-감염의 부재시에, AAV는 바이러스 게놈이 숙주 세포 크로모솜 내로 삽입되지만, 감염성 비리온이 생성되지 않는 잠복된 상태를 확립한다. 헬퍼 바이러스에 의한 후속 감염은 통합된 게놈을 구제하여, 이를 복제하게 하고 이의 게놈을 감염성 AAV 비리온 내로 패키징되게 한다. AAV는 다른 종으로부터의 세포를 감염시킬 수 있지만, 헬퍼 바이러스는 숙주 세포와 동일한 종이어야 한다. 따라서, 예를 들어, 인간 AAV는 개 아데노바이러스와 공동-감염된 개 세포에서 복제될 것이다.
- [0105] 특정 구체예에서, 핵산 분자는 레트로바이러스로부터 유래된 벡터의 일부이다. 선택된 유전자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입되고 레트로바이러스 입자로 패키징될 수 있다. 이어서, 재조합 바이러스를 분리하여 생체 내 또는 생체 외에서 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 기재되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,219,740; 문헌 [Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-90; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-52; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-37; Boris-Lawrie and Temin (1993) Curr. Opin. Genet. Develop. 3:102-09] 참조.
- [0106] 본 발명은 또한 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 핵산 분자를 잠복시키고/거나 재조합 단백질을 발현시키기에 적합한 숙주 세포, 및 적합한 숙주 세포 내로 핵산을 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0107] **4. gL 단백질 및 복합체의 재조합 생성**
- [0108] 본 발명은 또한 상기 기재된 gL 단백질 및 이의 단편을 엔코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0109] 바람직하게는, 숙주 세포는 포유동물 세포 (예를 들어, 인간, 인간 이외의 영장류, 말, 소, 양, 개, 고양이 및

설치류 (예를 들어, 햄스터), 조류 세포 (예를 들어, 닭, 오리 및 거위)이다. 적합한 포유동물 세포는 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 세포 (전형적으로 전단된 아데노바이러스 유형 5 DNA로 형질 전환된 HEK-293 세포), NIH-3T3 세포, 293-T 세포, Vero 세포, HeLa 세포, PERC.6 세포 (ECACC 기탁 번호 96022940), Hep G2 세포, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), 태아 레수스 폐 세포 (ATCC CL-160), Madin-Darby 소 신장 ("MDBK") 세포, Madin-Darby 개 신장 ("MDCK") 세포 (예를 들어, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; 또는 MDCK 33016, DSM ACC 2219), 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포 예컨대, BHK21-F, HKCC 세포, 및 기타 등등을 포함한다.

[0110] 특정 구체예에서, 숙주 세포는 HEK-293 세포이다. 특정 구체예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 gL 단백질 (또는 이의 단편)을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CHO 세포의 게놈 DNA 내로 통합된다. CMV 단백질 복합체의 재조합 생산을 위해, 복합체의 다른 서브유닛을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열은 또한, CHO 세포의 게놈 DNA 내로 통합되어야 한다.

[0111] 따라서, 특정 구체예에서, 숙주 세포는 CMV 펜타머 복합체를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 펜타머 복합체는 gH 또는 이의 펜타머-형성 단편, gL 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL128 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL130 또는 이의 펜타머-형성 단편, 및 pUL131 또는 이의 펜타머-형성 단편을 포함한다. 특정 구체예에서, CMV 펜타머 복합체를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 숙주 세포의 게놈 DNA 내로 통합된다. 특정 구체예에서, 적합한 조건하에 배양되는 경우 숙주 세포는 상기 CMV 펜타머 복합체 (이는 바람직하게는 가용성이고/거나 숙주 세포로부터 분리됨)를 발현한다.

[0112] 유럽 세포 배양 컬렉션 (European Collection of Cell Culture)(ECACC)에서 입수가 가능한 예시적인 CHO 세포주는 표 2에 열거되어 있다. 표 2에 열거된 임의의 CHO 세포가 사용될 수 있다.

[0113] 표 2

세포주 명칭	키워드
CHO	중국 햄스터 난소
CHO (단백질 비함유)	중국 햄스터 난소
CHO-CHRM1	인간 콜린성 수용체 무스카린 M1, CHRM1, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-CHRM2	인간 콜린성 수용체 무스카린 M2, CHRM2, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-CHRM5	인간 콜린성 수용체 무스카린 M5, CHRM5, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-CNR1	인간 칸나비노이드 수용체 I, CNR1 Gene ID 1268, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-FFAR2	인간 자유 지방산 수용체 2, FFAR2, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-GPR120	인간 수용체 GPR120(오피), GPR120, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-K1	중국 햄스터 난소
CHO-K1-AC-비함유	중국 햄스터 난소, 혈청-비함유
CHO-K1/SF	햄스터 중국 난소 (MEM 적응)
CHO-NPY1R	인간 뉴로펩티드 Y 수용체, NPY1R, Gene ID 4886, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-OPRL1	인간 오피에이트 수용체-유사 1, OPRL1, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO-SSTR1	인간 소마토스타틴 수용체 1, SSTR1 G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.
CHO/dhFr-	중국 햄스터 난소
CHO/dhFr-AC-비함유	중국 햄스터 난소, 혈청-비함유
RR-CHOKI	중국 햄스터 난소
T02J-10/10 (CHO-GCGR (GCGR))	인간 글루카곤 수용체, GCGR, G 단백질 결합된 수용체, GPCR, 형질감염체, InSCREENeX SCREENflex™, CHO-K1 숙주.

[0114]

[0115]

또한, 다양한 CHO 세포주, 예컨대, CHO 세포주 hCBE11(ATCC® PTA-3357™), E77.4(ATCC® PTA-3765™), hLT-B:R-hG1 CHO #14(ATCC® CRL-11965™), MOR-CHO- MORAb-003-RCB(ATCC® PTA-7552™), AQ.C2 클론 11B(ATCC® PTA-3274™), AQ.C2 클론 11B(ATCC® PTA-3274™), CHO-DG44 중 hsAQC2(ATCC® PTA-3356™), xrs5(ATCC® CRL-2348™), CHO-K1(ATCC® CCL-61™), Lec1[원래 Pro-5WgaRI3C로 명명됨](ATCC® CRL-1735™), Pro-5(ATCC® CRL-1781™), ACY1-E(ATCC® 65421™), ACY1-E(ATCC® 65420™), pgsE-606(ATCC® CRL-2246™), CHO-CD36(ATCC® CRL-2092™), pgsC-605(ATCC® CRL-2245™), MC2/3(ATCC® CRL-2143™), CHO-ICAM-1(ATCC® CRL-2093™), 및 pgsB-618(ATCC® CRL-2241™)이 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC)으로부터 입수가능하다. 이러한 CHO 세포주 중 어느 하나가 사용될 수 있다.

[0116]

다른 상업적으로 입수가능한 CHO 세포주는 예를 들어, Life Technologies로부터의 FreeStyle™ CHO-S Cells 및 Flp-In™-CHO Cell Line를 포함한다.

[0117]

기타 적합한 숙주 세포는 예를 들어, C12orf35 단백질의 발현 수준 또는 활성이 대조군과 비교하여 감소된 CHO 세포 (예를 들어, C12orf35 단백질의 발현 수준 또는 활성이 대조군과 비교하여 감소된 포유동물 세포의 상세한

설명을 제공하는, 본원에 참조로 통합된 W02015/092735 참조), FAM60A 단백질의 발현 수준 또는 활성이 대조군과 비교하여 감소된 CHO 세포 (예를 들어, FAM60A의 발현 수준 또는 활성이 감소된 포유동물 세포의 상세한 설명을 제공하는, 본원에 참조로 통합된 W02015/092737 참조); 마트립타제의 발현 수준 또는 활성이 대조군과 비교하여 감소된 CHO 세포 (마트립타제의 발현 수준 또는 활성이 감소된 포유동물 세포의 상세한 설명을 제공하는, 2014년 4월 29일 출원되고 본원에 참조로 통합된 미국 특허 가출원 번호 61/985,589, 및 2014년 5월 16일 출원되고 본원에 참조로 통합된 미국 특허 가출원 번호 61/994,310)를 포함한다.

- [0118] 일반적으로 CHO 세포에서 재조합 단백질을 발현시키는 방법은 기재되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 및 5,981,214를 참조하라.
- [0119] 2014년 10월 31일 출원된 유럽 특허 출원 EP14191385.5 (본원에 참조로 통합됨)는 포유동물 숙주 세포 특히, CHO 세포를 기재하고 있으며, 여기에서 CMV 단백질 gH, gL, pUL128, pUL130, pUL131 (또는 이의 복합체-형성 단편)을 엔코딩하는 서열(들)은 게놈 내로 안정적으로 통합된다.
- [0120] 본원에 기재된 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물이 또한 본원에 제공된다. 세포 배양물은 대규모 예를 들어, 적어도 약 10 L, 적어도 약 20 L, 적어도 약 30 L, 적어도 약 40 L, 적어도 약 50 L, 적어도 약 60 L, 적어도 약 70 L, 적어도 약 80 L, 적어도 약 90 L, 적어도 약 100 L, 적어도 약 150 L, 적어도 약 200 L, 적어도 약 250 L, 적어도 약 300 L, 적어도 약 400 L, 적어도 약 500 L, 적어도 약 600 L, 적어도 약 700 L, 적어도 약 800 L, 적어도 약 900 L, 적어도 약 1000 L, 적어도 약 2000 L, 적어도 약 3000 L, 적어도 약 4000 L, 적어도 약 5000 L, 적어도 약 6000 L, 적어도 약 10,000 L, 적어도 약 15,000 L, 적어도 약 20,000 L, 적어도 약 25,000 L, 적어도 약 30,000 L, 적어도 약 35,000 L, 적어도 약 40,000 L, 적어도 약 45,000 L, 적어도 약 50,000 L, 적어도 약 55,000 L, 적어도 약 60,000 L, 적어도 약 65,000 L, 적어도 약 70,000 L, 적어도 약 75,000 L, 적어도 약 80,000 L, 적어도 약 85,000 L, 적어도 약 90,000 L, 적어도 약 95,000 L, 적어도 약 100,000 L 등일 수 있다.
- [0121] 특정 구체예에서, CMV 복합체 (예컨대, 펜타머 복합체)의 수득량은 적어도 약 0.01 g/L, 적어도 약 0.02 g/L, 적어도 약 0.03 g/L, 적어도 약 0.05 g/L, 적어도 약 0.06 g/L, 적어도 약 0.07 g/L, 적어도 약 0.08 g/L, 적어도 약 0.09 g/L, 적어도 약 0.1 g/L, 적어도 약 0.15 g/L, 적어도 약 0.20 g/L, 적어도 약 0.25 g/L, 적어도 약 0.3 g/L, 적어도 약 0.35 g/L, 적어도 약 0.4 g/L, 적어도 약 0.45 g/L, 적어도 약 0.5 g/L, 적어도 약 0.55 g/L, 적어도 약 0.6 g/L, 적어도 약 0.65 g/L, 적어도 약 0.7 g/L, 적어도 약 0.75 g/L, 적어도 약 0.8 g/L, 적어도 약 0.85 g/L, 적어도 약 0.9 g/L, 적어도 약 0.95 g/L, 또는 적어도 약 1.0 g/L이다.
- [0122] 또한, 사이토메갈로바이러스 (CMV) gL 단백질 또는 이의 단편, 또는 상기 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 복합체를 생성하는 방법으로서, (i) 적합한 조건하에 본원에 기재된 숙주 세포를 배양하여 상기 gL 단백질 또는 이의 단편을 발현시키고; (ii) 상기 gL 단백질 또는 이의 단편, 또는 상기 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 복합체를 배양물로부터 채취하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0123] 특정 구체예에서, gL 단백질 (또는 이의 단편), 또는 본원에 기재된 상기 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 복합체를 포함하는 복합체가 정제된다. gL 단백질 (또는 이의 단편)이 임의의 적합한 방법 예컨대, HPLC, 다양한 유형의 크로마토그래피 (예컨대, 소수성 상호작용, 이온 교환, 친화성, 킬레이팅, 및 크기 배제), 전기영동, 밀도 구배 원심분리, 용매 추출, 또는 기타 등등을 이용하여 정제될 수 있다.
- [0124] 예를 들어, 이온 교환이 gL 단백질 (또는 이의 단편), 또는 상기 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 복합체를 포함하는 복합체를 정제하는데 이용될 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피에 유용한 물질의 예로는 DEAE-셀룰로스, QAE-셀룰로스, DEAE-세팔로스, QAE-세팔로스, DEAE-토요펄(Tyosephar), QAE-토요펄, Mono Q, Mono S, Q 세파로스, SP 세파로스, 등등을 포함한다. 예시적인 한 구체예에서, 방법은 Mono S 칼럼을 사용한다. 또 다른 예시적 구체예에서, 방법은 Mono Q 칼럼을 사용한다.
- [0125] 대안적으로 또는 부가적으로, 친화성-기반 정제가 이용될 수 있다. 친화성-정제 태그의 예는 예를 들어, His 태그 (금속 이온에 결합), 항체 (단백질 A 또는 단백질 G에 결합), 말토스-결합 단백질 (MBP) (아밀로스에 결합), 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST) (글루타티온에 결합), FLAG 태그 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (SEQ ID NO:8) (항-플래그 항체에 결합), Strep 태그 (스트렙타비딘 또는 이의 유도체에 결합)를 포함한다.
- [0126] 예시적인 한 구체예는 Strep 태그 (또는 스트렙타비딘 친화성 태그) 즉, 스트렙타비딘 또는 이의 유도체에 결합하는 태그, 예컨대, Strep-Tactin이다. Strep 태그는 9개 아미노산: Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:9), 또는 8개 아미노산 (또한, 스트렙-태그 II로 불림): Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO:10)의 펩티드를 포함한다. 칼럼으로부터 스트랩-태그에 부착된 단백질의 용출은 바이오틴 또는 이의 유도체 또는 동족체, 예컨대, 테스티오바이오틴을 사용하여 수행될 수 있다.

[0127] 친화성-정제 태그는 임의의 적합한 수단에 의해 부착될 수 있으며, 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 태그는 폴리펩티드 서열의 N-말단 또는 폴리펩티드 서열의 C-말단에 공유적으로 부착될 수 있다. 이는 폴리펩티드 및 태그를 포함하는 융합 단백질의 재조합 발현에 의해 또는 폴리펩티드를 태그에 연결시키는 표준 컨주게이션 기술에 의해 달성될 수 있다. 태그는 표준 컨주게이션 기술을 사용하여 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 측쇄 작용기에 부착될 수 있다. 대안적으로, 태그는 비-공유적으로 부착될 수 있다.

[0128] 태그의 부착은 직접적 또는 간접적 (링커를 통해)일 수 있다. 적합한 링커는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 직쇄 또는 분지쇄 탄소 링커, 헥테로사이클릭 탄소 링커, 탄수화물 링커 및 폴리펩티드 링커를 포함한다.

[0129] 특정 구체예에서, 절단가능한 링커는 관심 분자를 태그에 부착시키는데 사용될 수 있다. 이는 예를 들어, 링커를 절단할 수 있는 제제의 첨가에 의해 정제된 복합체로부터 태그를 분리되게 한다. 많은 다양한 절단가능한 링커가 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 링커는 예를 들어, 광불안정성 결합의 조사 또는 산-촉매된 가수분해에 의해 절단될 수 있다. 프로테아제 인식 부위가 혼입되고 적합한 프로테아제 효소의 첨가에 의해 절단될 수 있는 폴리펩티드 링커가 또한 존재한다.

[0130] gL 단백질 (또는 이의 단편)을 포함하는 복합체가 정제되는 경우, 태그는 복합체의 다른 성분(들)에 부착될 수 있다. 예를 들어, CMV 펜타머 복합체를 정제할 경우, 태그는 pUL128, pUL130 또는 pUL131에 부착될 수 있다.

[0131] 5. 약학적 조성물 및 투여

[0132] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CMV 단백질, 복합체, 및 핵산을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 본원에 기재된 CMV 단백질을 엔코딩하는 핵산, 복합체, 및 핵산을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0133] 본원에 기재된 CMV 단백질, 복합체, 및 핵산은 면역원성 조성물, 또는 백신 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 포유동물 (예를 들어, 인간)에서 항체를 발생시키는데 사용될 수 있다.

[0134] 본 발명은 본원에 기재된 CMV 단백질, 복합체, 및 핵산을 포함하는 약학적 조성물, 및 본원에 기재된 CMV 단백질, 복합체, 및 핵산을 약학적으로 허용되는 담체와 조합시키는 것을 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물은 전형적으로 약학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 이러한 담체의 철저한 논의는 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy]에서 입수가능하다.

[0135] 조성물의 pH는 일반적으로 약 4.5 내지 약 11, 예컨대, 약 5 내지 약 11, 약 5.5 내지 약 11, 약 6 내지 약 11, 약 5 내지 약 10.5, 약 5.5 내지 약 10.5, 약 6 내지 약 10.5, 약 5 내지 약 10, 약 5.5 내지 약 10, 약 6 내지 약 10, 약 5 내지 약 9.5, 약 5.5 내지 약 9.5, 약 6 내지 약 9.5, 약 5 내지 약 9, 약 5.5 내지 약 9, 약 6 내지 약 9, 약 5 내지 약 8.5, 약 5.5 내지 약 8.5, 약 6 내지 약 8.5, 약 5 내지 약 8, 약 5.5 내지 약 8, 약 6 내지 약 8, 약 4.5, 약 5, 약 6.5, 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 약 9, 약 9.5, 약 10, 약 10.5, 약 11 등이다. 안정한 pH는 완충제 예를 들어, Tris 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 또는 히스티딘 완충제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 따라서, 조성물은 일반적으로 완충제를 포함할 것이다.

[0136] 조성물은 무균일 수 있고/거나 발열원을 함유하지 않을 수 있다. 조성물은 인간에 대해 등장성일 수 있다.

[0137] 조성물은 면역학적 유효량의 이의 항원(들)을 포함한다. "면역학적 유효량"은 대상체에 투여될 경우, 항원에 대한 항체 반응을 유발시키는데 유효한 양이다. 이러한 양은 치료할 개체의 건강과 신체 상태, 이들의 연령, 개체 면역계의 항체 합성 능력, 요망되는 보호 정도, 백신의 제형, 의료 상황에 대한 담당의의 평가, 및 기타 관련 요인에 따라 달라질 수 있다. 이러한 양은 관례적 시험을 통해 결정될 수 있는 상대적으로 넓은 범위에 해당할 것으로 예상된다. 본 발명의 조성물의 항원 함량은 일반적으로 투여량 당 단백질의 양으로 표현될 것이다. 항원 당 10-500 μg (예를 들어, 50 μg)의 투여량이 유용할 수 있다.

[0138] 면역원성 조성물은 면역 애주번트를 포함할 수 있다. 예시적인 애주번트는 미네랄-함유 조성물; 오일 에멀전; 사포닌 제형; 비로솜 및 바이러스-유사 입자; 박테리아 또는 미생물 유도체; 생체접착제 및 점막접착제; 리포솜; 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르 제형; 폴리포스파젠(pcgp); 무라밀 펩티드; 이미다조퀴놀론 화합물; 티오세미카르바존 화합물; 트립탄트린 화합물; 인간 면역조절제; 리포펩티드; 벤조나프티리딘; 미세입자; 면역자극 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, RNA 또는 DNA; 예를 들어, CpG-함유 올리고뉴클레오타이드)를 포함할 수 있다.

- [0139] 예를 들어, 조성물은 알루미늄 염 애주번트, 수중유 에멀전 (예를 들어, 스쿠알렌을 포함하는 수중유 에멀전 예컨대, MF59 또는 AS03), TLR7 아고니스트 (예컨대, 이미다조퀴놀린 또는 이미퀴모드), 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 적합한 알루미늄 염은 하이드록시드(예를 들어, 옥시하이드록시드), 포스페이트(예를 들어, 하이드록시포스페이트, 오르토포스페이트), (예를 들어, 문헌 [chapters 8 & 9 of Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum] 참조), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 염은 임의의 적합한 형태 (예를 들어, 겔, 결정질, 비정질, 등)를 취할 수 있으며, 염으로의 항원 흡착이 한 예이다. 환자에 투여하기 위한 조성물 중의 Al^{+3} 의 농도는 5mg/ml 미만, 예를 들어, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, 등등일 수 있다. 바람직한 범위는 0.3 내지 1 mg/ml이다. 최대 0.85 mg/투여량이 바람직하다. 알루미늄 하이드록시드 및 알루미늄 포스페이트 애주번트가 본 발명에 사용하기에 적합하다.
- [0140] 적합한 한 면역 애주번트는 알루미늄 염에 흡착된, W02011/027222에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 문헌 [Powell & Newman (1995)]에 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하는 많은 추가의 애주번트가 사용될 수 있다.
- [0141] 조성물은 특히 다중 투여 형태로 패키징되는 경우 항미생물제를 포함할 수 있다. 항미생물제 예컨대, 티메로살 및 2 페녹시에탄올이 일반적으로 백신에서 발견되지만, 때때로 수은-비합유 보존제를 사용하거나 보존제를 전혀 사용하지 않는 것이 바람직할 수 있다.
- [0142] 조성물은 계면활성제(detergent) 예를 들어, 폴리소르베이트 예컨대, 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 계면활성제는 일반적으로 낮은 수준 예를 들어, 0.01% 미만으로 존재한다.
- [0143] 조성물은 소듐 염 (예를 들어, 소듐 클로라이드)를 포함하여 장성을 제공한다. 10 ± 2 mg/ml의 NaCl 농도 예를 들어, 약 9 mg/ml가 전형적이다.
- [0144] 또 다른 양태에서, 본 발명은 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에 상기 기재된 바와 같은 단백질, DNA 분자, RNA 분자 (예를 들어, 자가-복제 RNA 분자), 또는 VPR를 포함하는, 면역학적 유효량의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0145] 특정 구체예에서, 면역 반응은 CMV에 대한 중화 항체의 생성을 포함한다. 특정 구체예에서, 중화 항체는 보체-비의존적이다.
- [0146] 면역 반응은 체액성 면역 반응, 세포-매개된 면역 반응, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 반응은 각 전달된 CMV 단백질에 대해 유도된다. 세포-매개된 면역 반응은 헬퍼 T-세포 (Th) 반응, CD8+ 세포독성 T-세포(CTL) 반응, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 반응은 체액성 면역 반응을 포함하고, 항체는 중화 항체이다. 중화 항체는 세포의 바이러스 감염을 차단한다. CMV는 상피 세포 및 또한, 섬유아세포도 감염시킨다. 일부 구체예에서, 면역 반응은 두 세포 유형 모두의 감염을 감소 또는 예방한다. 중화 항체 반응은 보체-의존적 또는 보체-비의존적일 수 있다. 일부 구체예에서, 중화 항체 반응은 보체-비의존적이다. 일부 구체예에서, 중화 항체 반응은 교차-중화이고; 즉, 투여된 조성물에 대해 생성된 항체는 조성물에 사용된 균주 이외의 균주의 CMV 바이러스를 중화시킨다.
- [0147] 당업계에서 항체 효능의 유용한 척도는 "50% 중화 역가"이다. 50% 중화 역가를 결정하기 위해, 면역화된 동물로부터의 혈청을 희석하여 얼마나 희석된 혈청이 바이러스의 50%가 세포 내로 진입하는 것을 차단하는 능력을 여전히 보유할 수 있는지를 평가한다. 예를 들어, 700의 역가는 혈청이 700배 희석된 후 바이러스의 50%를 중화시키는 능력을 보유한다는 것을 의미한다. 따라서, 더 높은 역가는 더욱 강력한 중화 항체 반응을 나타낸다. 일부 구체예에서, 이러한 역가는 약 200, 약 400, 약 600, 약 800, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 2500, 약 3000, 약 3500, 약 4000, 약 4500 약 5000, 약 5500, 약 6000, 약 6500 또는 약 7000의 하한을 갖는 범위이다. 50% 중화 역가 범위는 약 400, 약 600, 약 800, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 2500, 약 3000, 약 3500, 약 4000, 약 4500, 약 5000, 약 5500, 약 6000, 약 6500, 약 7000, 약 8000, 약 9000, 약 10000, 약 11000, 약 12000, 약 13000, 약 14000, 약 15000, 약 16000, 약 17000, 약 18000, 약 19000, 약 20000, 약 21000, 약 22000, 약 23000, 약 24000, 약 25000, 약 26000, 약 27000, 약 28000, 약 29000 또는 약 30000의 상한을 가질 수 있다. 예를 들어, 50% 중화 역가는 약 3000 내지 약 25000일 수 있다. "약"은 언급된 값의 플러스 또는 마이너스 10%를 의미한다.
- [0148] 본 발명의 조성물은 일반적으로 대상체에 직접 투여될 것이다. 직접 전달은 비경구 주입 (예를 들어, 피하, 복강내, 정맥내, 근육내, 또는 조직의 간질 공간)에 의해 또는 임의의 다른 적합한 경로에 의해 달성될 수 있다.

예를 들어, 근육내 투여 예를 들어, 넓적다리 또는 위팔로의 투여가 이용될 수 있다. 주입은 바늘 (예를 들어, 피하 바늘)을 통해서 이루어질 수 있으나, 무침 주입이 대안적으로 이용될 수 있다. 전형적인 근육내 투여 용량은 약 0.5 ml이다.

- [0149] 투약은 단일 용량 스케줄 또는 다중 용량 스케줄에 의해 이루어질 수 있다. 다중 용량은 일차 면역화 스케줄 및 /또는 부스터 면역화 스케줄에 이용될 수 있다. 다중 용량 스케줄에서, 다양한 용량이 동일하거나 상이한 경로, 예를 들어, 비경구 프라임(prime) 및 점막 부스트(boost), 점막 프라임 및 비경구 부스트, 등으로 제공될 수 있다. 다중 용량은 전형적으로, 적어도 1주 간격으로 (예를 들어, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 10주, 약 12주, 약 16주 등) 투여될 것이다.
- [0150] 대상체는 동물 바람직하게는, 척추동물, 더욱 바람직하게는, 포유동물일 수 있다. 예시적인 대상체는 예를 들어, 인간, 소, 돼지, 닭, 고양이 또는 개를 포함할 수 있는데, 본원에서 다루는 병원체가 광범위한 종에 걸쳐 문제가 될 수 있기 때문이다. 백신이 예방용인 경우, 인간은 바람직하게는, 소아 (예를 들어, 토들러 또는 신생아), 십대, 또는 성인이며; 백신이 치료용인 경우, 인간은 바람직하게는, 십대 또는 성인이다. 또한, 소아를 대상으로 하는 백신이 예를 들어, 안전성, 투여량, 면역원성 등을 평가하기 위해 성인에게 투여될 수 있다.
- [0151] 본 발명의 백신은 예방적 (즉, 질병을 예방하기 위한) 또는 치료적 (즉, 질병의 증상을 감소시키거나 제거하기 위한)일 수 있다. 용어 예방적은 특정 병태의 중증도를 감소시키거나 이의 발병을 예방하는 것으로 간주될 수 있다. 의심의 여지를 피하기 위해, 용어 예방 백신은 또한, 예를 들어, 향후 감염의 중증도 또는 기간을 감소시킴으로써 이러한 감염의 효과를 완화시키는 백신을 지칭할 수 있다.
- [0152] 본원에 기재된 분리되고/거나 정제된 CMV 단백질, 복합체, 및 핵산은 단독으로 또는 혼합-양식 요법에서 프라임 또는 부스터로서 예컨대, RNA 프라임 후의 단백질 부스터로서 투여될 수 있다. RNA 프라임 단백질 부스터 전략의 이점은, 단백질 프라임 단백질 부스터 전략과 비교하여, 예를 들어, 증가된 항체 역가, 더욱 균형을 이룬 IgG1:IgG2a 서브타입 프로파일, 바이러스 입자의 것과 유사한 TH1-타입 CD4+ T 세포-매개된 면역 반응의 유도, 및 비-중화 항체의 감소된 생성을 포함한다. RNA 프라임은 이들이 애주번트를 함유하고 있는지의 여부와 무관하게 조성물의 면역원성을 증가시킬 수 있다.
- [0153] RNA 프라임-단백질 부스터 전략에서, RNA 및 단백질은 동일한 표적 항원으로 향하게 된다. 적합한 RNA 전달 모드의 예는 바이러스-유사 레플리콘 입자(VRP), 알파바이러스 RNA, 리피드 나노입자(LNP)에 캡슐화된 레플리콘 또는 제형화된 RNA, 예컨대, 양이온성 나노에멀전(CNE)으로 제형화된 레플리콘을 포함한다. 예를 들어, 오일 코어 (예를 들어, 스쿠알렌 포함) 및 양이온 리피드 (예를 들어, DOTAP, DMTAP, DSTAP, DC-콜레스테롤, 등)을 포함하는, 적합한 양이온 수중유 나노에멀전이 WO2012/006380에 기재되어 있다.
- [0154] WO2012/051211은 펜타머 복합체에 대한 항체가 펜타머 복합체의 단백질 성분을 엔코딩하는 제형화된 RNA (CNE 및 LNP) 및 VRP로 면역화된 마우스에서 생성됨을 기재하고 있다. 이들 항체는 상피 세포에서 CMV 감염을 중화시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. RNA 프라임-단백질 부스터 요법은 먼저 (예를 들어, 0-8주) 본 발명의 CMV 단백질 복합체의 단백질 구성요소 중 하나 이상을 엔코딩하는 RNA(VRP, LNP, CNE, 등으로서 전달될 수 있음)로 1회 이상 프라임 면역화(들)를 수행하는 것을 포함할 수 있으며, 이어서 나중에 (예를 들어, 24-58주) 애주번트와 선택적으로 제형화된 본 발명의 분리된 CMV 단백질 복합체 또는 애주번트와 선택적으로 제형화된 본 발명의 정제된 CMV 단백질 복합체로 1회 이상 부스팅 면역화(들)를 수행할 수 있다.
- [0155] 일부 구체예에서, RNA 분자는 양이온성 리피드, 리포솜, 코킬레이트, 비로솜, 면역-자극 복합체, 마이크로입자, 마이크로스피어, 나노스피어, 단일 라멜라 소포, 다중 라멜라 소포, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 에멀전, 다중양이온 펩티드, 양이온성 나노에멀전, 또는 이들의 조합물 내에 캡슐화되거나, 이들에 결합되거나 이들 상에 흡착된다.
- [0156] 또한, 본원에 기재된 핵산 (예를 들어, RNA), 정제된 단백질, 및 정제된 복합체의 투여용 키트, 및 사용 설명서가 본원에 제공된다. 본 발명은 또한, 본원에 개시된 조성물 또는 백신으로 사전-충전된 전달 장치를 제공한다.
- [0157] 본원에 기재된 약학적 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 추가적인 치료제는 비제한적으로, 항생제 또는 항균제, 항구토제, 항진균제, 항염증제, 항바이러스제, 면역 조절제, 사이토카인, 항우울제, 호르몬, 알킬화제, 항대사물질, 항종양 항생제, 항유사분열제, 국소이성화효소 억제제, 세포증식억제제, 항-침습제(anti-invasion agent), 항혈관형성제, 성장 인자 기능의 억제제, 바이러스 복제 억제제, 바이러스 효소 억제제, 항암제, α -인터페론, β -인터페론, 리바비린, 호르몬 및 기타 킬-유사 수용체 조절제, 면역글로불린 (Ig), 및 Ig 기능을 조절하는 항체 (예컨대, 항-IgE (오말리주맵(omalizumab)))를 포함할 수 있다.

- [0158] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 예를 들어, 면역 반응의 유도 또는 증강을 필요로 하는 대상체 예컨대, 포유동물에서 면역 반응을 유도하거나 증강시키는데 사용하기 위한 의약으로서 이용될 수 있다.
- [0159] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 면역 반응의 유도 또는 증강을 필요로 하는 대상체 예컨대, 포유동물에서 면역 반응을 유도하거나 증강시키기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다.
- [0160] 치료학적 치료의 효능을 확인하는 한 방법은 본원에 기재된 조성물 또는 백신의 투여 후에 병원체 감염을 모니터링하는 것을 포함한다. 예방학적 치료의 효능을 확인하는 또 다른 방법은 항원에 대한 면역 반응을 전신에서 (예컨대, IgG1 및 IgG2a 생산 수준 모니터링) 및/또는 점막에서 (예컨대, IgA 생산 수준 모니터링)을 모니터링하는 것을 포함한다. 전형적으로, 항원-특이적 혈청 항체 반응은 면역화 후 그러나, 챌린지 전(pre-challenge)에 결정되는 반면, 항원-특이적 점막 항체 반응은 면역화 후 및 챌린지 후에 결정된다.
- [0161] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다.
- [0162] **실시예**
- [0163] **실시예 1: 재료 및 방법**
- [0164] **서열 및 구조 분석.** CMV, VZV 및 HSV1 및 HSV2의 gL 서열을 CLUSTALW (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)를 사용하여 정렬하고, 수동으로 조절하여 VZV 및 HSV2의 보존된 β -가닥에 기여하는 잔기를 정렬하였다.
- [0165] **펜타 및 gH/gL 복합체의 발현.** 야생형(WT) 펜타머 복합체("펜타") 또는 gL 돌연변이 ("LSG" 및 "IDG" 돌연변이체)를 갖는 펜타를, 하나의 벡터에는 gH 및 gL을 가지며 나머지 다른 하나의 벡터에는 3개의 UL을 갖는 2개의 벡터 시스템을 사용하여 발현시켰다. IRES(내부 리보솜 진입 부위)의 서열은 각 벡터에서 다른 유전자를 분리한다. gH는 C-말단 6xHis 태그 (SEQ ID NO:11)를 가지며, UL130은 절단가능한 C-말단 스트랩-태그를 갖는다. 배양액 1리터당 1mg의 총 DNA를 갖는 두 벡터의 DNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 Expifectamine 형질감염 키트 (Life Technologies)를 사용하여 Expi293 세포 내로 형질감염시켰다. 세포를 셰이커 플라스크에서 97% 초과와 생존율로 트랜스펙션 당일에 $\sim 2.5 \times 10^6$ 세포/mL로 성장시켰다. 형질감염된 세포를 37°C, 150rpm 및 8% CO₂에서 작동되는 셰이커 인큐베이터에서 $\sim 60\%$ 의 생존율로 3일 동안 $\sim 8 \times 10^6$ 세포/mL로 성장시켰다. 발현 배지의 상청액을 4200 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 채취하였다.
- [0166] WT gH/gL 또는 gL 돌연변이를 갖는 gH/gL을 상기 기술된 것과 동일한 방식으로 gH 및 gL 둘 모두를 함유하는 벡터를 사용하여 발현시켰다.
- [0167] **N-말단 시퀀싱.** N-말단 시퀀싱을, 친화성 정제된 WT 펜타의 SDS page 및 웨스턴 블롯 (WB)의해 가시화가능한 알려지지 않은 밴드를 확인하는데 이용하였다. SDS page 상의 펜타를 에탄올 활성화된 PVDF 막으로 옮기고, 이를 40% 메탄올 중의 0.02% Coomassie Brilliant 블루로 염색하고, 이어서 증류수로 여러 번 세척한 후 완전히 공기 건조시켰다. 관심 밴드를 절제하고 시퀀싱을 위해 Tufts University Protein Core Facility로 발송하였다.
- [0168] **정제 및 웨스턴 블롯 분석.** 채취된 상청액을 농축하고 KrosFlo Research II TFF 시스템 및 증공 Fiber Cartridge (Spectrumlabs)를 사용하여 친화성 칼럼 결합 완충액 (50 mM Hepes pH7.0, 150 mM NaCl, 및 1 mM EDTA)으로 완충액 교환하였다. 농축된 상청액을 StrepTrap HP 카트리지 (GE Life Sciences)에 로딩하고, 용출 완충액 (50 mM Hepes pH 7.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM 테스티오마이오틴, 및 1 mM EDTA)으로 용출하였다. 용출액으로부터의 피크 분획을 gH의 C-말단에 위치한 His-태그 또는 gL에 대한 항체를 사용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다.
- [0169] **마우스에서 면역화 연구.** 군 당 10마리 마우스를 3가지의 상이한 용량 0.03 μ g, 0.1 μ g 및 1 μ g의, MF59로 애주번트 처리된 정제된 WT 또는 돌연변이 펜타머 복합체 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131로 3주 간격을 두고 3회 주사로 면역화시켰다. 혈청 샘플을 56°C에서 30분 동안 열-불활성화시키고, 2배 단계 (희석 당 2회 반복)로 연속 희석하고, 배지 $\pm 10\%$ 기니아 피그 보완물 (Cedarlane Labs, Burlington, NC, USA)에서 200-250개 감염된 세포/계수 필드(counting field)의 표적 농도로 희석된 동일한 부피의 HCMV 바이러스와 혼합하고, 37°C/5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 혈청/바이러스 샘플을 96-웰 반-면적 세포 배양 플레이트 (Corning Inc., Corning, NY, USA)에서 제조된 ARPE-19 세포 또는 MRC-5 세포에 첨가하였다. 감염된 단층을 37°C/5% CO₂에서 48시간 (± 8 시간) 동안 인큐베이션하고, 10% 완충 포르말린 (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA)

으로 1시간 동안 고정시키고, 세척 완충액 (PBS/0.05 % Tween-20)으로 3회 세척하고, PBS/2.5% 소태아 혈청, 0.5% 사포닌, 0.1% 소듐 아지드로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 탭핑 건조(taped dry)시키고, 25℃ 습식 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 하이브리도마 L14 (사포닌 완충액에서 희석됨)로부터 유래된 항-HCMV IE1 항체와 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척하고, AlexaFluor 488 (사포닌 완충액으로 희석됨)과 컨주게이팅된 항-마우스 IgG와 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 PBS/0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. Immunospot S5 UV Analyzer (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA)를 사용하여 형광 세포를 계수하고, (희석제 플러스 바이러스 대조군 웰에서 감염된 세포 계수와 비교하여) 감염된 세포 계수의 50% 감소를 초래하는 혈청 희석의 역수로서 규정된 50% 중화 역가를, 50% 값 초과 및 50% 값 미만의 평균 감염된 세포 계수를 산출하는 웰들을 사용하여 두 희석액 사이의 선형 회귀 보간법에 의해 계산하였다.

[0170] **실시예 2: 결과**

[0171] **1. gL 클립핑은 보존된 β -가닥 옆에 발생한다.**

[0172] gL에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블롯에 의해 확인된 밴드가 gL 잔기 97로 시작됨이 N-말단 시퀀싱에 의해 밝혀졌다. 따라서, 포유동물 세포에서 발현된 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체는 gL 잔기 Asn97과 Ser98 사이에서 클립핑된 gL 단백질 집단을 함유한다. 구조 기반 서열 정렬은, 클립핑 부위가 VZV 및 HSV-2 gH/gL 구조 둘 모두에서 보존된 β -가닥 옆의 루프 영역에 존재함을 추가로 드러냈다 (도 1).

[0173] 이러한 클립핑 부위 부근에서 gL 서열로 도입된 다양한 돌연변이는 gL 클립핑 양의 감소를 유도하였다. 추가 돌연변이를 절단 부위 내로 극성 및 비극성 잔기가 혼합된 2개 내지 5개 잔기 사이에 삽입시켰다. 결실 돌연변이는 절단 부위 주변의 1 내지 3개 잔기를 결실시켰다. 치환 돌연변이는 Ala96을 소수성 잔기 또는 큰 측쇄를 지닌 잔기로 교환시키거나; Asn97을 더 작거나 더 큰 측쇄를 지닌 극성 잔기 또는 비극성 잔기로 교환시키거나; Ser98을 극성 또는 비극성 특성을 갖는 작은 측쇄를 지닌 잔기로 교환시켰다.

[0174] **2. 다양한 돌연변이체 gH/gL과 야생형 gH/gL의 비교**

[0175] 도 2A는 평가된 다양한 돌연변이체 gL 단백질을 보여준다. 다양한 gL 돌연변이를 함유하는 gH/gL 복합체를 Expi293 세포에서 발현시키고 WT gH/gL과 비교하였다. 프로테아제 인식 부위에서의 돌연변이는 발현된 gH/gL 복합체에서 gL 클립핑을 감소시켰다. 예를 들어, WT 미처리 상청액의 항-gL 웨스턴 블롯은 N-말단 시퀀싱에 의해 결정된 바와 같이, 이의 N-말단에서 잔기 98을 지닌 gL 단편의 명확하게 가시화된 밴드를 보여주었다. 대조적으로, 유사한 밴드가 "LSG" 돌연변이체에서 검출되지 않았으며, "델타 Asn97" 및 "SST" 돌연변이체에서 검출되지 않거나 현저하게 감소되었다 (도 2).

[0176] 클립핑 부위 부근에 도입된 3개의 잔기 변이체는 클립핑 부위 부근에서 단일 잔기 변이체보다 더 큰 정도로 클립핑을 감소시켰다. "LSG" 돌연변이체는 항-His 웨스턴 블롯에서 gL 클립핑 밴드의 강도를 가장 현저하게 감소시켰다. 또한, 17-잔기 삽입의 제거는 웨스턴 블롯에 의해 관찰된 gL 클립핑 밴드 즉, gH/gL(N)의 강도를 향상시켰으며, 이러한 삽입이 절단 부위를 보호할 수 있음을 암시한다 (도 2C).

[0177] **3. "LSG" 및 "IDG" 돌연변이체 펜타와 야생형 펜타머의 비교**

[0178] "LSG" 및 "IDG" 돌연변이체가 또한 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머에서 gL 클립핑을 제거하거나 감소시켰는지의 여부를 분석하기 위해, 친화성 정제된 WT 및 돌연변이체 펜타머를 항-His 및 항-gL 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. WT 펜타머의 항-His 웨스턴 블롯에서, 전장 gH/gL보다 더 적은 분자량을 갖는 명백한 밴드가 존재하며, 이는 클립핑 후 gL의 N-말단 영역과 gH의 복합체와 일치한다. gL의 이러한 N-말단 단편은 항-gL 항체에 의해 인식되지 않음을 주지하라. 항-gL 웨스턴 블롯에서, N-말단 시퀀싱에 의해 결정된 바와 같이, 잔기 98로 시작되는 gL의 C-말단 영역은 비-환원 샘플에서 UL128과의 복합체를 형성한다. gL의 동일한 C-말단 단편 자체는 환원 샘플에서 관찰되었다. 비교해 보면, gL 클립핑으로부터 발생하는 이들 밴드는 "LSG" 또는 "IDG" 돌연변이체 펜타머에서 검출되지 않았다(도 3 및 4). "LSG" 및 "IDG" 돌연변이체 둘 모두는 WT 펜타머 복합체와 유사하게 행동하는 펜타머를 생성하였다. 따라서, 이러한 돌연변이는 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체의 어셈블리에 영향을 미치지 않으나, gL 단백질의 단백질분해 클립핑을 제거하였다 (도 5A).

[0179] 면역원성 분석은 LSG 및 IDG 돌연변이체가 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체의 면역원성을 손상시키지 않았음을 보여주었다 (도 5B).

[0180] 클립핑으로부터 발생한 gL의 단편은 gH/gL, gH/gL/g0 (데이터 미도시됨) 및 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 복합

체의 발현 동안 검출되었다. 이러한 3가지의 복합체에서 클립핑 부위는 gL 잔기 97과 98 사이로 동일하다. 따라서, gH/gL의 발현 동안 gL 클립핑을 방지하는 돌연변이가 또한 gH/gL/gO 및 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머 복합체의 발현 동안 gL 클립핑을 방지한다.

- [0181] 단지 3회의 잔기 치환 또는 단일 결실을 이용하여, gL 클립핑이 각각 제거되거나 현저하게 감소될 수 있다. 이러한 돌연변이의 위치는 이들 부근의 보존된 이차 구조에 영향을 미칠 것으로 예상되지 않는다. 이는 동종성 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 펜타머로서, 이의 삼차원 구조, 및 항원성/면역원성은 크게 영향을 받지 않는 펜타머의 생성을 허용한다. 본 발명자들은 동종 서열을 갖는 클립핑 부위 부근에서의 서열을 돌연변이시키는 전략의 유효성을 입증한 것으로 결론 내렸다.
- [0182] 상기 개별 섹션에서 언급된 본 발명의 다양한 특징 및 구체예는 필요한 부분만 약간 수정하여 적절하게 다른 섹션에 적용된다. 결론적으로, 한 섹션에서 명시된 특징은 다른 섹션에서 명시된 특징과 적절하게 조합될 수 있다.
- [0183] 본 명세서는 본 명세서 내에 언급된 참고문헌의 교시의 관점에서 가장 잘 이해된다. 본 명세서 내의 구체예는 본 발명의 구체예의 실례를 제공하며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 당업자는 많은 다른 구체예가 본 발명에 포함됨을 용이하게 인지한다. 본 기재내용에 언급된 모든 간행물 및 특허는 그 전체가 참조로서 통합된다. 참고문헌에 의해 통합된 내용이 본 명세서와 상충되거나 일관되지 않을 정도로, 본 명세서는 임의의 이러한 내용을 대신할 것이다. 본원에서 임의의 참고문헌의 인용은 이러한 참고문헌이 본 발명의 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다.
- [0184] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 당해 기술 내의 화학, 생화학, 분자 생물학, 면역학 및 약리학의 통상적인 방법을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)"은 물론 "구성하는"을 포함하며, 예를 들어, X를 "포함하는" 조성물은 X로 독점적으로 구성될 수 있거나 일부 추가적인 것 예를 들어, X + Y를 포함할 수 있다.
- [0185] 용어 "본질적으로 구성되는"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가적인 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있으며, 단 추가적인 성분, 단계 및/또는 부분은 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적 및 신규한 특징을 실질적으로 변경시키지 않아야 함을 의미한다. 일반적으로, 용어 "구성된"은, 청구된 바와 같은 본 발명이 청구범위에 구체적으로 인용된 요소들로 제한됨 (등가물의 학설이 적용되는 한 이들의 등가물을 포함할 수 있음)을 의미하는 것으로 간주된다.
- [0186] 당업자는 관례적인 실험만을 이용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 구체예에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 하기 구체예에 의해 포함되는 것으로 의도된다.
- [0187] 1. 재조합 사이토메갈로바이러스 (CMV) gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편으로서, 상기 gL 단백질 또는 단편은 프로테아제 인식 부위 내에서 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 대조군과 비교하여 상기 프로테아제 인식 부위에서 프로테아제 절단을 감소시키는, 재조합 CMV gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편.
- [0188] 2. 제 1 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 아미노산 잔기의 첨가, 결실, 치환, 또는 이들의 조합을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0189] 3. 제 1 또는 제 2 구체예에 있어서, 상기 프로테아제 인식 부위의 3개 또는 그 초과 잔기가 β -가닥을 형성하며, 상기 돌연변이가 β -가닥 입체형태를 유지하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0190] 4. 제 1 내지 제 3 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 포유동물 숙주 세포에서 재조합 발현될 경우 상기 프로테아제 인식 부위에서 20% (몰 백분율) 이하의 절단된 gL을 발생시키는 gL 단백질 또는 단편.
- [0191] 5. 제 1 내지 제 4 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 하나 이상의 아미노산 잔기의 첨가를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0192] 6. 제 1 내지 제 5 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 2 내지 5개의 아미노산 잔기의 첨가를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0193] 7. 제 6 구체예에 있어서, 상기 2 내지 5개의 아미노산 잔기가 극성 잔기(들) 및 비-극성 잔기(들) 둘 모두를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0194] 8. 제 1 내지 제 7 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 잔기 N97과 S98 사이에 하나 이상의 잔기의 첨가를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

- [0195] 9. 제 1 내지 제 8 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 잔기 N97과 S98 사이에 F, Q, FQ 또는 QF의 첨가를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0196] 10. 제 1 내지 제 9 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0197] 11. 제 1 내지 제 10 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 1 내지 3개의 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0198] 12. 제 1 내지 제 11 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 V91, T92, P93, E94, A95, A96, N97, S98, V99, L100, L101, D102 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 잔기의 결실을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0199] 13. 제 1 내지 제 12 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 A95, A96, N97 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 잔기의 결실을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0200] 14. 제 1 내지 제 13 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 N97을 결실시키는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0201] 15. 제 1 내지 제 14 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 잔기를 또 다른 헤르페스 바이러스의 gL 단백질로부터의 상응하기 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0202] 16. 제 15 구체예에 있어서, 또 다른 헤르페스 바이러스로부터의 상기 gL 단백질이 HSV1, HSV2, VZV, EBV, PrV, 또는 소 헤르페스바이러스 5로부터의 gL 단백질인 gL 단백질 또는 단편.
- [0203] 17. 제 1 내지 제 16 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 g A96을 비극성 잔기 또는 큰 측쇄를 포함하는 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0204] 18. 제 1 내지 제 17 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 A96을 I, L, V 또는 S로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0205] 19. 제 1 내지 제 18 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 A95를 R, L, E 또는 N으로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0206] 20. 제 1 내지 제 19 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 E94를 A 또는 L로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0207] 21. 제 1 내지 제 20 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 N97을 극성 잔기 또는 비-극성 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0208] 22. 제 21 구체예에 있어서, 상기 극성 잔기가 작은 측쇄를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0209] 23. 제 21 구체예에 있어서, 상기 극성 잔기는 큰 측쇄를 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0210] 24. 제 1 내지 제 23 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 N97을 S, D, E, A, T 또는 Y로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0211] 25. 제 1 내지 제 24 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 N97을 S 또는 D로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0212] 26. 제 1 내지 제 25 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 S98을 작은 측쇄를 지닌 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0213] 27. 제 1 내지 제 26 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 S98을 G, T, V 또는 I로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0214] 28. 제 1 내지 제 27 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 S98을 G 또는 T로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0215] 29. 제 1 내지 제 28 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 V99를 I로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0216] 30. 제 1 내지 제 29 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 돌연변이가 L100을 F 또는 V를 지닌 아미노산

잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.

- [0217] 31. 제 1 내지 제 30 구체에 중 어느 한 구체에 있어서, 상기 돌연변이가 L101을 V 또는 I를 지닌 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0218] 32. 제 1 내지 제 31 구체에 중 어느 한 구체에 있어서, 상기 gL 단백질 또는 단편이 프로테아제 인식 부위의 N-말단에서 삼입 영역을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0219] 33. 제 1 내지 제 32 구체에 중 어느 한 구체에 있어서, 상기 돌연변이가 비-자연 발생 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0220] 34. 제 1 내지 제 33 구체에 중 어느 한 구체에 있어서, 상기 돌연변이가 벌키 측쇄를 포함하는 아미노산 잔기를 도입하는 것을 포함하는 gL 단백질 또는 단편.
- [0221] 35. 제 1 내지 제 34 구체에 중 어느 한 구체에의 재조합 gL 단백질 또는 단편을 포함하는 CMV 복합체.
- [0222] 36. 제 35 구체에에 있어서, gH, gL, pUL128, pUL130, pUL131, g0, 이의 복합체-형성 단편, 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 CMV 단백질을 포함하는 복합체.
- [0223] 37. 제 35 또는 제 36 구체에에 있어서, 상기 복합체가 gH 또는 이의 펜타머-형성 단편, gL 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL128 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL130 또는 이의 펜타머 형성 단편, 및 pUL131 또는 이의 펜타머-형성 단편을 포함하는 펜타머 복합체인 복합체.
- [0224] 38. 제 35 또는 제 36 구체에에 있어서, 상기 복합체가 gH 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 gL 또는 이의 복합체-형성 단편을 포함하는 gH/gL 복합체인 복합체.
- [0225] 39. 제 35 또는 제 36 구체에에 있어서, 상기 복합체가 gH 또는 이의 복합체-형성 단편, gL 또는 이의 복합체-형성 단편, 및 g0 또는 이의 복합체 형성 단편을 포함하는 트리머 복합체인 복합체.
- [0226] 40. 제 1 내지 제 34 구체에 중 어느 한 구체에의 재조합 CMV gL 단백질 또는 단편, 또는 제 35 내지 제 39 구체에 중 어느 한 구체에의 복합체를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0227] 41. 제 40 구체에에 있어서, 애주번트를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0228] 42. 제 41 구체에에 있어서, 상기 애주번트가 알루미늄 염, TLR7 효능제, 수중유 에멀전, 또는 이들의 조합물을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0229] 43. 제 42 구체에에 있어서, 상기 수중유 에멀전이 MF59인 면역원성 조성물.
- [0230] 44. 제 1 내지 제 34 구체에 중 어느 한 구체에의 재조합 CMV gL 단백질 또는 단편을 엔코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 핵산.
- [0231] 45. 제 44 구체에에 있어서, 상기 분리된 핵산이 RNA 바람직하게는, 자가-복제 RNA인 분리된 핵산.
- [0232] 46. 제 45 구체에에 있어서, 상기 자가-복제 RNA가 알파바이러스 레플리콘인 분리된 핵산.
- [0233] 47. 제 46 구체에의 알파바이러스 레플리콘을 포함하는 알파바이러스 복제 입자(VRP).
- [0234] 48. 제 44 내지 제 46 구체에 중 어느 한 구체에의 핵산을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0235] 49. 제 47 구체에의 VRP를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0236] 50. 제 48 또는 제 49 구체에에 있어서, 애주번트를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0237] 51. 제 50 구체에에 있어서, 상기 애주번트가 알루미늄 염, TLR7 효능제, 수중유 에멀전(예컨대, MF59), 또는 이들의 조합물을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0238] 52. 제 44 내지 제 46 구체에 중 어느 한 구체에의 핵산을 포함하는 숙주 세포.
- [0239] 53. 제 52 구체에에 있어서, 상기 핵산이 DNA인 숙주 세포.
- [0240] 54. 제 53 구체에에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 세포인 숙주 세포.
- [0241] 55. 제 54 구체에에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포 또는 HEK-293 세포인 숙주 세포.
- [0242] 56. 제 53 내지 제 55 구체에 중 어느 한 구체에에 있어서, CMV gL 단백질 또는 이의 단편을 엔코딩하는 상기

DNA가 상기 숙주 세포의 게놈 DNA로 통합된 숙주 세포.

- [0243] 57. 제 52 내지 제 56 구체예 중 어느 한 구체예에 있어서, 상기 숙주 세포가 CMV 펜타머 복합체를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 펜타머 복합체는 gH 또는 이의 펜타머-형성 단편, gL 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL128 또는 이의 펜타머-형성 단편, pUL130 또는 이의 펜타머-형성 단편, 및 pUL131 또는 이의 펜타머-형성 단편을 포함하는 숙주 세포.
- [0244] 58. 제 57 구체예에 있어서, 상기 CMV 펜타머 복합체를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 숙주 세포의 게놈 DNA로 통합된 숙주 세포.
- [0245] 59. 제 57 또는 제 58 구체예에 있어서, 상기 세포가 적합한 조건하에서 배양되는 경우 상기 CMV 펜타머 복합체를 발현하는 숙주 세포.
- [0246] 60. 제 59 구체예에 있어서, 상기 펜타머 복합체가 분비되는 숙주 세포.
- [0247] 61. 제 52 내지 제 60 구체예 중 어느 한 구체예의 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물로서, 상기 배양물이 적어도 20 리터 크기인 세포 배양물.
- [0248] 62. 제 52 내지 제 60 구체예 중 어느 한 구체예의 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물로서, 상기 배양물이 적어도 100 리터 크기인 세포 배양물.
- [0249] 63. 제 57 내지 제 60 구체예 중 어느 한 구체예의 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물로서, 상기 펜타머 복합체의 수득량이 적어도 0.05 g/L인 세포 배양물.
- [0250] 64. 제 63 구체예에 있어서, 상기 펜타머 복합체의 수득량이 적어도 0.1 g/L인 숙주 세포를 포함하는 세포 배양물.
- [0251] 65. 재조합 사이토메갈로바이러스 (CMV) gL 단백질, 또는 이의 복합체-형성 단편을 생성하는 방법으로서,
- [0252] (i) 적합한 조건하에서 제 52 내지 제 60 구체예 중 어느 한 구체예의 숙주 세포를 배양하여 상기 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편을 발현시키고;
- [0253] (ii) 상기 gL 단백질 또는 이의 복합체-형성 단편을 배양물로부터 채취하는 것을 포함하는 방법.
- [0254] 66. 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에 면역학적 유효량의 제 40 내지 제 43 및 제 48 내지 제 51 구체예 중 어느 한 구체예의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0255] 67. 제 66 구체예에 있어서, 면역 반응이 CMV에 대한 중화 항체의 생성을 포함하는 방법.
- [0256] 68. 제 67 구체예에 있어서, 중화 항체가 보체-비의존적인 방법.
- [0257] 69. 사이토메갈로바이러스 (CMV)가 세포 내로 진입하는 것을 억제하는 방법으로서, 세포를 제 40 내지 제 43 및 제 48 내지 제 51 구체예 중 어느 한 구체예의 면역원성 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0258] 70. 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용하기 위한 제 40 내지 제 43 및 제 48 내지 제 51 구체예 중 어느 한 구체예의 면역원성 조성물.
- [0259] 71. 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 제 40 내지 제 43 및 제 48 내지 제 51 구체예 중 어느 한 구체예의 면역원성 조성물의 용도.
- [0260] 72. 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 의약의 제조에서 제 40 내지 제 43 및 제 48 내지 제 51 구체예 중 어느 한 구체예의 면역원성 조성물의 용도.

[0261] 서열

SEQ ID NO: 1 (gL from HCMV strain Merlin = GI:39842115)
 MCRRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLLPIVSSAAVSVAPTAAEKVPAECPPELRRCLLGEVFEGDKYESWLRPLVNV
 GRDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDEAFDLTLALLYNNPDQLRALTLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVY
 TCVDLDCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRPLPVSTAAAPGKITLFYGLYNA
 VKEFCLRHQLDPPLLRHLDDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 2 (gL from HCMV strain Towne = GI:239909463)
 MCRRPDCGFSFSPGPVALLWCCLLLPIVSSATVSVAPTVAEKVPAECPPELRRCLLGEVFQGDKEYESWLRPLVNV
 RRDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDDAFDLTLALLYNNPDQLRALTLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVY
 TCVDLDCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRPLPVSTAAAPGKITLFYGLYNA
 VKEFCLRHQLDPPLLRHLDDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 3 (gL from HCMV strain AD169 = GI:2506510)
 MCRRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLLPIVSSAAVSVAPTAAEKVPAECPPELRRCLLGEVFQGDKEYESWLRPLVNV
 RRDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDDAFDLTLALLYNNPDQLRALTLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVY
 TCVDLDCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRPLPVSTAAAPGKITLFYGLYNA
 VKEFCLRHQLDPPLLRHLDDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 4 (gL mature protein consisting of amino acid residues 31-278 of SEQ ID NO: 1)
 AAVSVAPTAAEKVPAECPPELRRCLLGEVFEGDKYESWLRPLVNVTRDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDEAF
 DTLALLYNNPDQLRALTLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDLDCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGF
 ELPVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRPLPVSTAAAPGKITLFYGLYNAVKEFCLRHQLDPPLLRHLDDKYYAGLPPELK
 QTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 5 (17 residue insert from gL from HCMV strain Merlin)
 GRDGPLSQLIRYRPVTP

SEQ ID NO: 6 (gH from HCMV strain Towne = GI:138314)
 MRGPLSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEAISEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAI
 SFNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVLTETLERYQQLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQP
 TVVPPPIDLSIPHVMPPQTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIIDELRYVKIT
 LTEDFFVTVSIDDTPMLLIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYKDPDFDLDAALDF
 NYLDLSALLRNSFHRYAVDVLSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFM
 ITCLSQTPPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNOQHLPQWALRQIADFALKLHKTHLA
 SFLSAFARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLTPCSSSGRRDHSL
 ERLTRLFPDATVPTTVPAALSILSTMQPSTLETFFDLFCPLGESFSALTVEHVSIVVTNQYLIKISYPVSTTV
 VQGSLIITQTDSTKCELRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNE
 VVSSPRTHYLMLLKNGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALSAIIGIYLLYRMLKTC

SEQ ID NO: 7 (6 residue insert from gL from HCMV strain Merlin)
 NSVLLD

SEQ ID NO: 8 (FLAG Tag)
 DYKDDDDK

SEQ ID NO: 9 (Strep Tag)
 AWRHPQFGG

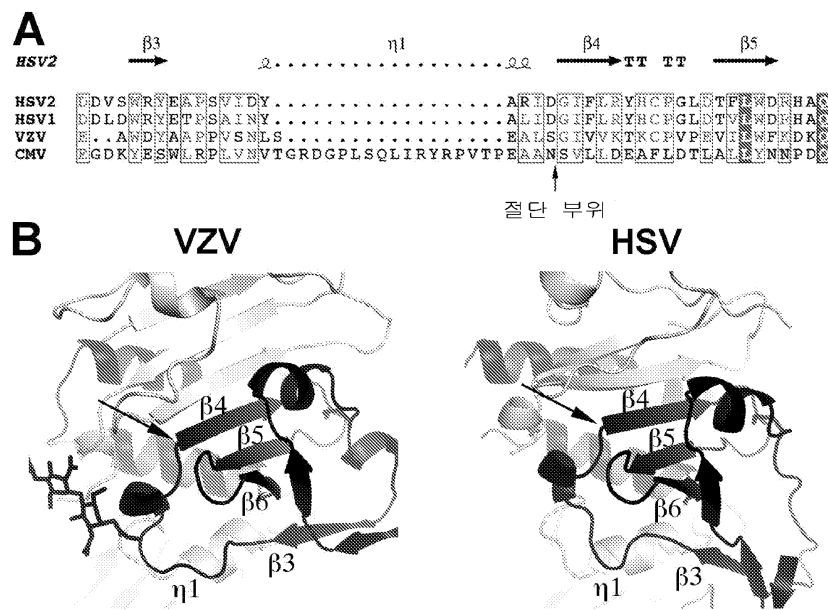
SEQ ID NO: 10 (Strep Tag II)
 WSHPQFEK

SEQ ID NO: 11 (His Tag)
 HHHHHH

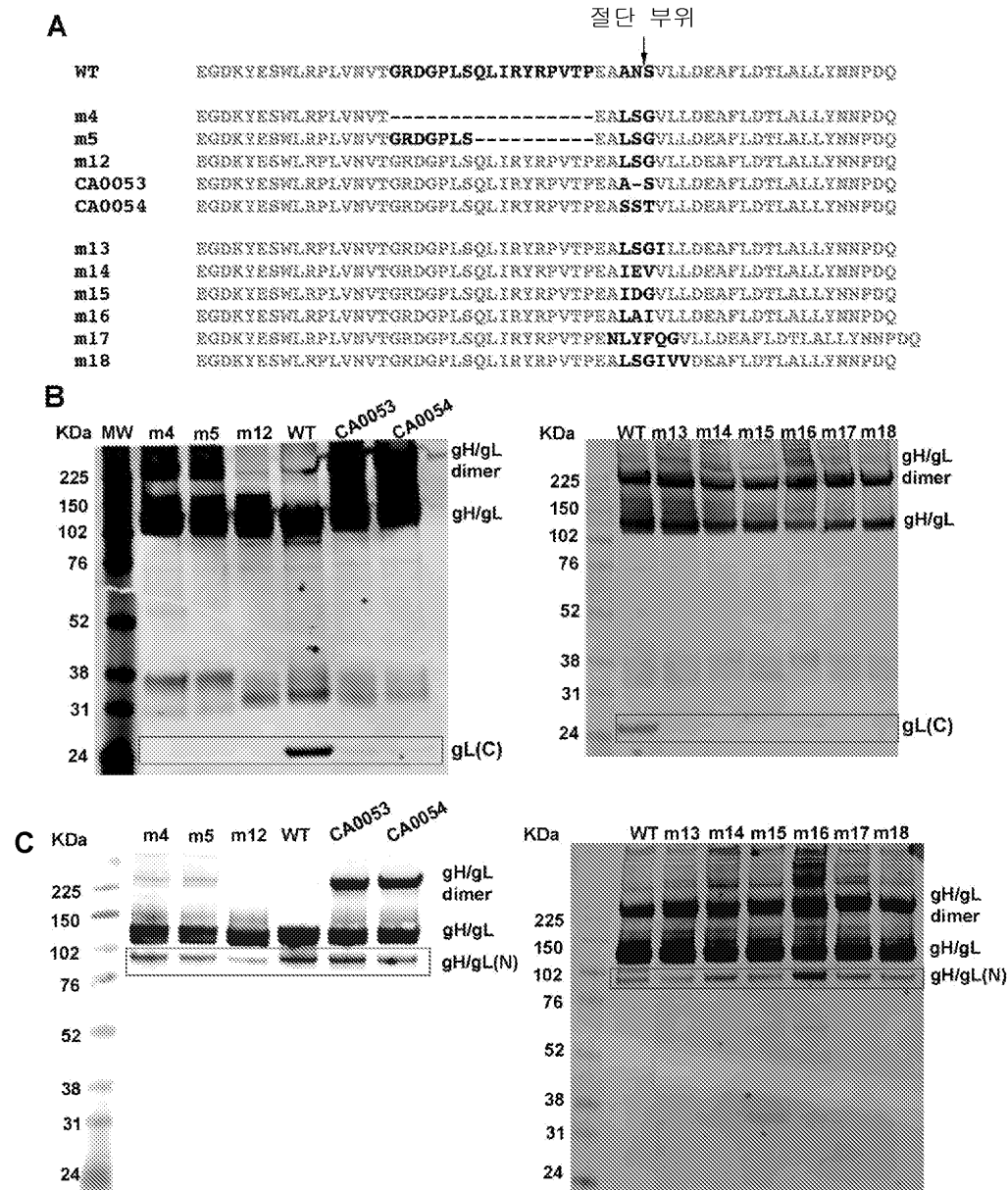
[0262]

도면

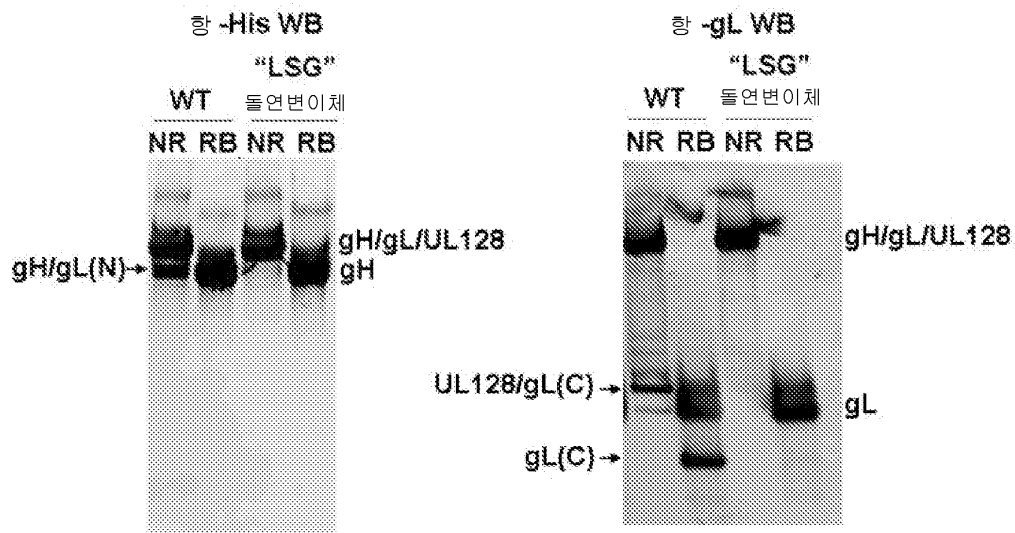
도면1



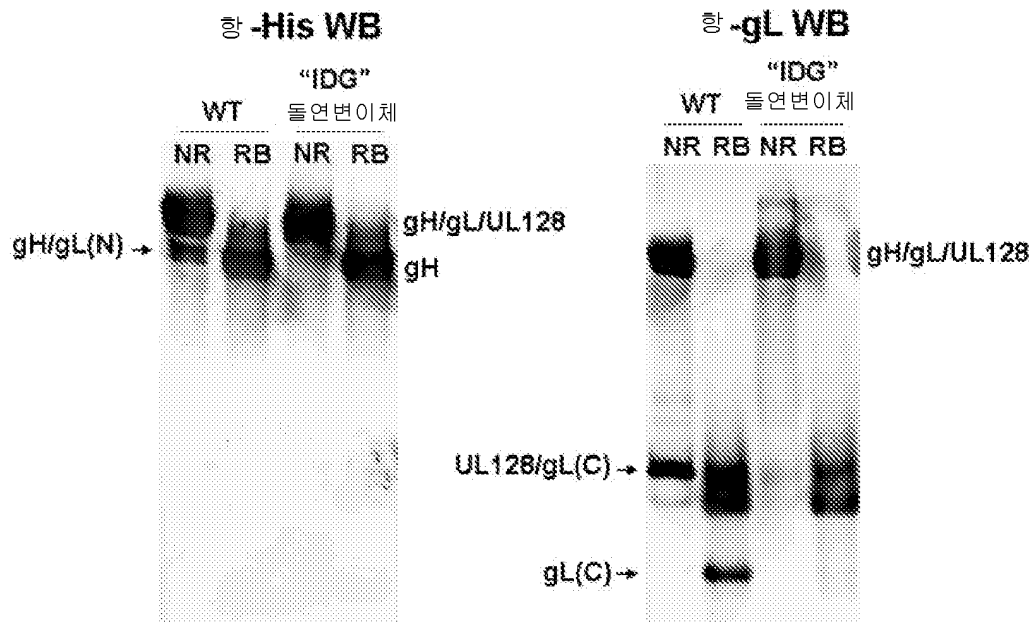
도면2



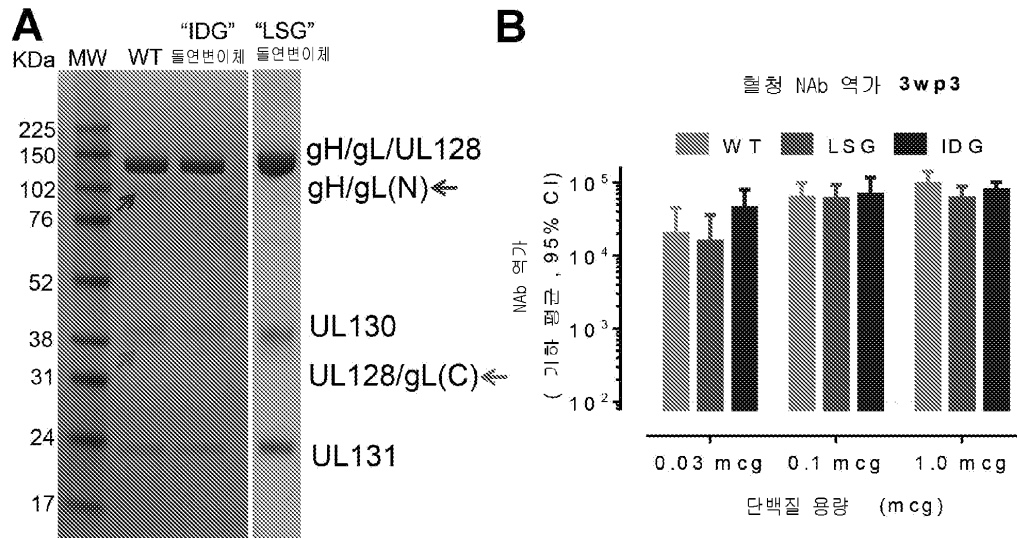
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

<120> CMV ANTIGEN AND USES THEREOFF

<130> VN056504 WO

<140><141><150> EP 15152221.6

<151> 2015-01-22

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 278

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 1

Met Cys Arg Arg Pro Asp Cys Gly Phe Ser Phe Ser Pro Gly Pro Val

1 5 10 15

Ile Leu Leu Trp Cys Cys Leu Leu Leu Pro Ile Val Ser Ser Ala Ala

20 25 30

Val Ser Val Ala Pro Thr Ala Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu Cys Pro

35 40 45

Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Glu Gly Asp Lys

50 55 60

Tyr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Thr	Gly	Arg	Asp	Gly
65				70				75				80			
Pro	Leu	Ser	Gln	Leu	Ile	Arg	Tyr	Arg	Pro	Val	Thr	Pro	Glu	Ala	Ala
				85				90				95			
Asn	Ser	Val	Leu	Leu	Asp	Glu	Ala	Phe	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu
100								105				110			
Tyr	Asn	Asn	Pro	Asp	Gln	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser
115								120				125			
Asp	Thr	Ala	Pro	Arg	Trp	Met	Thr	Val	Met	Arg	Gly	Tyr	Ser	Glu	Cys
130				135				140							
Gly	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Val	Tyr	Thr	Cys	Val	Asp	Asp	Leu	Cys	Arg
145				150				155				160			
Gly	Tyr	Asp	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Gly	Arg	Ser	Ile	Phe	Thr	Glu
				165				170				175			
His	Val	Leu	Gly	Phe	Glu	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Leu	Phe	Asn	Val	Val
180								185				190			
Val	Ala	Ile	Arg	Asn	Glu	Ala	Thr	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Arg	Leu
195								200				205			
Pro	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Glu	Gly	Ile	Thr	Leu	Phe	Tyr	Gly
210				215				220							
Leu	Tyr	Asn	Ala	Val	Lys	Glu	Phe	Cys	Leu	Arg	His	Gln	Leu	Asp	Pro
225				230				235				240			
Pro	Leu	Leu	Arg	His	Leu	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu
				245				250				255			
Leu	Lys	Gln	Thr	Arg	Val	Asn	Leu	Pro	Ala	His	Ser	Arg	Tyr	Gly	Pro
260								265				270			
Gln	Ala	Val	Asp	Ala	Arg										
275															

<210> 2

<211> 278

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 2

Met Cys Arg Arg Pro Asp Cys Gly Phe Ser Phe Ser Pro Gly Pro Val

1 5 10 15

Ala Leu Leu Trp Cys Cys Leu Leu Leu Pro Ile Val Ser Ser Ala Thr

20 25 30

Val Ser Val Ala Pro Thr Val Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu Cys Pro

35 40 45

Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Gln Gly Asp Lys

50 55 60

Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr Arg Arg Asp Gly

65 70 75 80

Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr Pro Glu Ala Ala

85 90 95

Asn Ser Val Leu Leu Asp Asp Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala Leu Leu

100 105 110

Tyr Asn Asn Pro Asp Gln Leu Arg Ala Leu Leu Thr Leu Leu Ser Ser

115 120 125

Asp Thr Ala Pro Arg Trp Met Thr Val Met Arg Gly Tyr Ser Glu Cys

130 135 140

Gly Asp Gly Ser Pro Ala Val Tyr Thr Cys Val Asp Asp Leu Cys Arg

145 150 155 160

Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Gly Arg Ser Ile Phe Thr Glu

165 170 175

His Val Leu Gly Phe Glu Leu Val Pro Pro Ser Leu Phe Asn Val Val

180 185 190

Val Ala Ile Arg Asn Glu Ala Thr Arg Thr Asn Arg Ala Val Arg Leu

195 200 205

Pro Val Ser Thr Ala Ala Ala Pro Glu Gly Ile Thr Leu Phe Tyr Gly

210 215 220

Leu Tyr Asn Ala Val Lys Glu Phe Cys Leu Arg His Gln Leu Asp Pro

225 230 235 240

Pro Leu Leu Arg His Leu Asp Lys Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro Pro Glu

245 250 255

Leu Lys Gln Thr Arg Val Asn Leu Pro Ala His Ser Arg Tyr Gly Pro

260 265 270

Gln Ala Val Asp Ala Arg

275

<210> 3

<211> 278

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 3

Met Cys Arg Arg Pro Asp Cys Gly Phe Ser Phe Ser Pro Gly Pro Val

1 5 10 15

Val Leu Leu Trp Cys Cys Leu Leu Leu Pro Ile Val Ser Ser Val Ala

20 25 30

Val Ser Val Ala Pro Thr Ala Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu Cys Pro

35 40 45

Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Gln Gly Asp Lys

50 55 60

Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr Arg Arg Asp Gly

65 70 75 80

Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr Pro Glu Ala Ala

85 90 95

Asn Ser Val Leu Leu Asp Asp Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala Leu Leu

100 105 110

Tyr Asn Asn Pro Asp Gln Leu Arg Ala Leu Leu Thr Leu Leu Ser Ser

115 120 125

Asp Thr Ala Pro Arg Trp Met Thr Val Met Arg Gly Tyr Ser Glu Cys

130 135 140

Gly Asp Gly Ser Pro Ala Val Tyr Thr Cys Val Asp Asp Leu Cys Arg

145 150 155 160

Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Gly Arg Ser Ile Phe Thr Glu
165 170 175
His Val Leu Gly Phe Glu Leu Val Pro Pro Ser Leu Phe Asn Val Val
180 185 190
Val Ala Ile Arg Asn Glu Ala Thr Arg Thr Asn Arg Ala Val Arg Leu
195 200 205
Pro Val Ser Thr Ala Ala Ala Pro Glu Gly Ile Thr Leu Phe Tyr Gly
210 215 220
Leu Tyr Asn Ala Val Lys Glu Phe Cys Leu Arg His Gln Leu Asp Pro
225 230 235 240
Pro Leu Leu Arg His Leu Asp Lys Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro Pro Glu
245 250 255
Leu Lys Gln Thr Arg Val Asn Leu Pro Ala His Ser Arg Tyr Gly Pro
260 265 270
Gln Ala Val Asp Ala Arg
275

<210> 4

<211> 248

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 4

Ala Ala Val Ser Val Ala Pro Thr Ala Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu
1 5 10 15
Cys Pro Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Glu Gly
20 25 30
Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr Gly Arg
35 40 45
Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr Pro Glu
50 55 60
Ala Ala Asn Ser Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala
65 70 75 80
Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln Leu Arg Ala Leu Leu Thr Leu Leu

85 90 95
 Ser Ser Asp Thr Ala Pro Arg Trp Met Thr Val Met Arg Gly Tyr Ser
 100 105 110
 Glu Cys Gly Asp Gly Ser Pro Ala Val Tyr Thr Cys Val Asp Asp Leu
 115 120 125
 Cys Arg Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Gly Arg Ser Ile Phe
 130 135 140
 Thr Glu His Val Leu Gly Phe Glu Leu Val Pro Pro Ser Leu Phe Asn
 145 150 155 160
 Val Val Val Ala Ile Arg Asn Glu Ala Thr Arg Thr Asn Arg Ala Val
 165 170 175
 Arg Leu Pro Val Ser Thr Ala Ala Ala Pro Glu Gly Ile Thr Leu Phe
 180 185 190
 Tyr Gly Leu Tyr Asn Ala Val Lys Glu Phe Cys Leu Arg His Gln Leu
 195 200 205
 Asp Pro Pro Leu Leu Arg His Leu Asp Lys Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro
 210 215 220
 Pro Glu Leu Lys Gln Thr Arg Val Asn Leu Pro Ala His Ser Arg Tyr
 225 230 235 240
 Gly Pro Gln Ala Val Asp Ala Arg
 245

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 5

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
 1 5 10 15
 Pro

<210> 6

<211> 742

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 6

Met Arg Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Leu Ile Val Leu Ala Val Cys Leu

1 5 10 15

Leu Ser His Leu Leu Ser Ser Arg Tyr Gly Ala Glu Ala Ile Ser Glu

20 25 30

Pro Leu Asp Lys Ala Phe His Leu Leu Leu Asn Thr Tyr Gly Arg Pro

35 40 45

Ile Arg Phe Leu Arg Glu Asn Thr Thr Gln Cys Thr Tyr Asn Ser Ser

50 55 60

Leu Arg Asn Ser Thr Val Val Arg Glu Asn Ala Ile Ser Phe Asn Phe

65 70 75 80

Phe Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Tyr Val Phe His Met Pro Arg Cys Leu

85 90 95

Phe Ala Gly Pro Leu Ala Glu Gln Phe Leu Asn Gln Val Asp Leu Thr

100 105 110

Glu Thr Leu Glu Arg Tyr Gln Gln Arg Leu Asn Thr Tyr Ala Leu Val

115 120 125

Ser Lys Asp Leu Ala Ser Tyr Arg Ser Phe Ser Gln Gln Leu Lys Ala

130 135 140

Gln Asp Ser Leu Gly Glu Gln Pro Thr Thr Val Pro Pro Pro Ile Asp

145 150 155 160

Leu Ser Ile Pro His Val Trp Met Pro Pro Gln Thr Thr Pro His Gly

165 170 175

Trp Thr Glu Ser His Thr Thr Ser Gly Leu His Arg Pro His Phe Asn

180 185 190

Gln Thr Cys Ile Leu Phe Asp Gly His Asp Leu Leu Phe Ser Thr Val

195 200 205

Thr Pro Cys Leu His Gln Gly Phe Tyr Leu Ile Asp Glu Leu Arg Tyr

210 215 220

Val Lys Ile Thr Leu Thr Glu Asp Phe Phe Val Val Thr Val Ser Ile
225 230 235 240
Asp Asp Asp Thr Pro Met Leu Leu Ile Phe Gly His Leu Pro Arg Val
245 250 255
Leu Phe Lys Ala Pro Tyr Gln Arg Asp Asn Phe Ile Leu Arg Gln Thr
260 265 270
Glu Lys His Glu Leu Leu Val Leu Val Lys Lys Asp Gln Leu Asn Arg
275 280 285

His Ser Tyr Leu Lys Asp Pro Asp Phe Leu Asp Ala Ala Leu Asp Phe
290 295 300
Asn Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Leu Leu Arg Asn Ser Phe His Arg Tyr
305 310 315 320
Ala Val Asp Val Leu Lys Ser Gly Arg Cys Gln Met Leu Asp Arg Arg
325 330 335
Thr Val Glu Met Ala Phe Ala Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Ala Ala Ala
340 345 350

Arg Gln Glu Glu Ala Gly Ala Gln Val Ser Val Pro Arg Ala Leu Asp
355 360 365
Arg Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ile Gln Glu Phe Met Ile Thr Cys Leu
370 375 380
Ser Gln Thr Pro Pro Arg Thr Thr Leu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala Val
385 390 395 400
Asp Leu Ala Lys Arg Ala Leu Trp Thr Pro Asn Gln Ile Thr Asp Ile
405 410 415

Thr Ser Leu Val Arg Leu Val Tyr Ile Leu Ser Lys Gln Asn Gln Gln
420 425 430
His Leu Ile Pro Gln Trp Ala Leu Arg Gln Ile Ala Asp Phe Ala Leu
435 440 445
Lys Leu His Lys Thr His Leu Ala Ser Phe Leu Ser Ala Phe Ala Arg
450 455 460
Gln Glu Leu Tyr Leu Met Gly Ser Leu Val His Ser Met Leu Val His

465						470						475						480
Thr	Thr	Glu	Arg	Arg	Glu	Ile	Phe	Ile	Val	Glu	Thr	Gly	Leu	Cys	Ser			
					485						490						495	
Leu	Ala	Glu	Leu	Ser	His	Phe	Thr	Gln	Leu	Leu	Ala	His	Pro	His	His			
					500						505						510	
Glu	Tyr	Leu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Pro	Cys	Ser	Ser	Ser	Gly	Arg	Arg			
					515						520						525	
Asp	His	Ser	Leu	Glu	Arg	Leu	Thr	Arg	Leu	Phe	Pro	Asp	Ala	Thr	Val			
					530						535						540	
Pro	Thr	Thr	Val	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Met	Gln	Pro			
					545						550						555	560
Ser	Thr	Leu	Glu	Thr	Phe	Pro	Asp	Leu	Phe	Cys	Leu	Pro	Leu	Gly	Glu			
					565						570						575	
Ser	Phe	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	His	Val	Ser	Tyr	Val	Val	Thr			
					580						585						590	
Asn	Gln	Tyr	Leu	Ile	Lys	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Val	Ser	Thr	Thr	Val			
					595						600						605	
Val	Gly	Gln	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr	Gln	Thr	Asp	Ser	Gln	Thr	Lys	Cys			
					610						615						620	
Glu	Leu	Thr	Arg	Asn	Met	His	Thr	Thr	His	Ser	Ile	Thr	Ala	Ala	Leu			
					625						630						635	640
Asn	Ile	Ser	Leu	Glu	Asn	Cys	Ala	Phe	Cys	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu			
					645						650						655	
Tyr	Asp	Asp	Thr	Gln	Gly	Val	Ile	Asn	Ile	Met	Tyr	Met	His	Asp	Ser			
					660						665						670	
Asp	Asp	Val	Leu	Phe	Ala	Leu	Asp	Pro	Tyr	Asn	Glu	Val	Val	Val	Ser			
					675						680						685	
Ser	Pro	Arg	Thr	His	Tyr	Leu	Met	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Thr	Val	Leu			
					690						695						700	
Glu	Val	Thr	Asp	Val	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Met			
					705						710						715	720

Met Ser Val Tyr Ala Leu Ser Ala Ile Ile Gly Ile Tyr Leu Leu Tyr

725

730

735

Arg Met Leu Lys Thr Cys

740

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 7

Asn Ser Val Leu Leu Asp

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 10
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 6xHis tag"

<400> 11

His His His His His His

1 5

<210> 12

<211> 40

<212> PRT

<213> Herpes simplex virus 2

<400> 12

Asp Asp Val Ser Trp Arg Tyr Glu Ala Pro Ser Val Ile Asp Tyr Ala

1 5 10 15

Arg Ile Asp Gly Ile Phe Leu Arg Tyr His Cys Pro Gly Leu Asp Thr

20 25 30

Phe Leu Trp Asp Arg His Ala Gln

35 40

<210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> Herpes simplex virus 1

<400> 13

Asp Asp Leu Asp Trp Arg Tyr Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Tyr Ala
 1 5 10 15
 Leu Ile Asp Gly Ile Phe Leu Arg Tyr His Cys Pro Gly Leu Asp Thr
 20 25 30
 Val Leu Trp Asp Arg His Ala Gln
 35 40

<210> 14

<211> 39

<212> PRT

<213> Varicella zoster virus

<400> 14

Glu Ala Trp Asp Tyr Ala Ala Pro Pro Val Ser Asn Leu Ser Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Gly Ile Val Val Lys Thr Lys Cys Pro Val Pro Glu Val Ile
 20 25 30

Leu Trp Phe Lys Asp Lys Gln
 35

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 15

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
 1 5 10 15
 Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
 20 25 30

Pro Glu Ala Ala Asn Ser Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr
 35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
 50 55

<210> 16

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Glu Ala Leu Ser Gly Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu
 20 25 30

Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
 35 40

<210> 17

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 17

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Glu Ala Leu Ser Gly Val Leu Leu Asp
 20 25 30

Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
 35 40 45

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 18

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
20 25 30

Pro Glu Ala Leu Ser Gly Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
50 55

<210> 19

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 19

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
20 25 30

Pro Glu Ala Ala Ser Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu
35 40 45

Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
50 55

<210> 20

<211> 58

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 20

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr

1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr

20 25 30

Pro Glu Ala Ser Ser Thr Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr

35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln

50 55

<210> 21

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 21

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr

1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr

20 25 30

Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ile Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr

35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln

50 55

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
20 25 30

Pro Glu Ala Ile Glu Val Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
50 55

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 23

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
20 25 30

Pro Glu Ala Ile Asp Gly Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
50 55

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 24

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
 1 5 10 15
 Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
 20 25 30
 Pro Glu Ala Leu Ala Ile Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr
 35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
 50 55

<210> 25

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 25

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr
 1 5 10 15
 Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr
 20 25 30

Pro Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu
 35 40 45

Asp Thr Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln
 50 55 60

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 26

Glu Gly Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr

1 5 10 15

Gly Arg Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr

 20 25 30

Pro Glu Ala Leu Ser Gly Ile Val Val Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr

 35 40 45

Leu Ala Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln

 50 55

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 5

<400> 27

Val Thr Pro Glu

1