

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-508522

(P2014-508522A)

(43) 公表日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/01 (2006.01)	C O 7 K 14/01	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-555367 (P2013-555367)
(86) (22) 出願日 平成24年2月24日 (2012. 2. 24)
(85) 翻訳文提出日 平成25年8月21日 (2013. 8. 21)
(86) 国際出願番号 PCT/KR2012/001408
(87) 国際公開番号 W02012/115474
(87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
(31) 優先権主張番号 61/446, 284
(32) 優先日 平成23年2月24日 (2011. 2. 24)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504385351
モガム バイオテクノロジー リサーチ
インスティテュート
大韓民国449-910キョンギド、ヨン
インシ、ギヒュング、ボジュンドン341
番
(74) 代理人 100106002
弁理士 正林 真之
(74) 代理人 100120891
弁理士 林 一好
(74) 代理人 100165157
弁理士 芝 哲央
(74) 代理人 100126000
弁理士 岩池 満

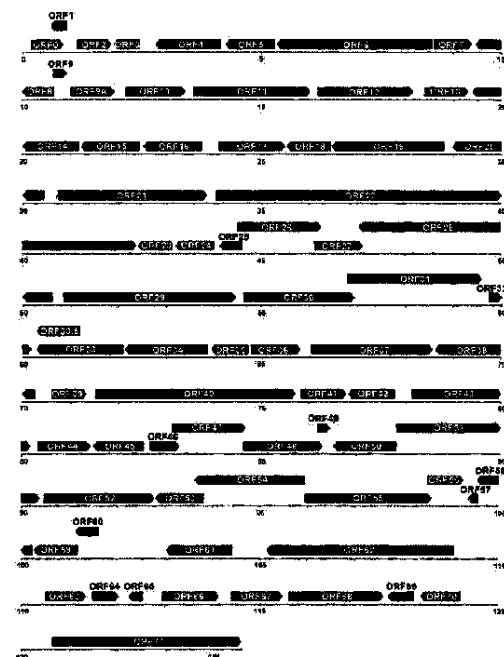
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な水痘帯状疱疹ウイルス株及びそれを用いた水痘及び帯状疱疹ウイルスワクチン

(57) 【要約】

本発明は、新規な水痘帯状疱疹ウイルス株及びそれを用いた水痘及び帯状疱疹ウイルスワクチンに関し、より詳細には、韓国人患者から分離したVZV MVA06のゲノムDNA、そのオープンリーディングフレーム (open reading frame、ORF)、前記VZV MVA06のゲノムDNA及びそのORFによりコードされたタンパク質、並びに前記タンパク質を有効成分とするワクチン組成物に関する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の塩基配列からなる水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus、VZV) MAV06 のゲノム DNA。

【請求項 2】

配列番号 2 の塩基配列からなる ORF0、配列番号 3 の塩基配列からなる ORF17、配列番号 4 の塩基配列からなる ORF29、配列番号 5 の塩基配列からなる ORF56、及び配列番号 6 の塩基配列からなる ORF60 から選択されることを特徴とする、VZV MAV06 のゲノム DNA のオープンリーディングフレーム (Open Reading Frame、ORF)。

10

【請求項 3】

請求項 2 又は 3 に記載の VZV MAV06 のゲノム DNA のオープンリーディングフレームによりコードされたタンパク質。

【請求項 4】

配列番号 1 の塩基配列からなる VZV MAV06 のゲノム DNA、配列番号 2 の塩基配列からなる ORF0、配列番号 3 の塩基配列からなる ORF17、配列番号 4 の塩基配列からなる ORF29、配列番号 5 の塩基配列からなる ORF56、及び配列番号 6 の塩基配列からなる ORF60 から選択されるオープンリーディングフレームを含む、組換え発現ベクター。

【請求項 5】

20

請求項 4 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 6】

宿主細胞は、動物細胞、植物細胞、酵母、大腸菌、昆虫細胞から選択されるものであることを特徴とする、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

前記形質転換された宿主細胞は、サル腎臓細胞 7 (COS7: monkey kidney cells)、NSO 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO: chinese hamster ovary) 細胞、W138、ベビーハムスター腎臓 (BHK: baby hamster kidney) 細胞、MDCK、ミエロマ細胞株、HuT78 細胞及び 293 細胞、大腸菌、バチルスサブチリス (Bacillus subtilis)、ストレプトマイセス属 (Streptomyces sp.)、シュドモナス属 (Pseudomonas sp.)、プロテウスミラビリス (Proteus mirabilis) 又はスタフィロコッカス属 (Staphylococcus sp.)、アスペルギルス属 (Aspergillus sp.)、ピキアパストリス (Pichia pastoris)、サッカロミセスセレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces sp.) 及びニューロスポラクラッサ (Neurospora crassa) から選択されることを特徴とする、請求項 6 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 8】

配列番号 1～6 から選択される何れか 1 つの塩基配列によりコードされた VZV MAV06 のタンパク質の製造方法。

40

【請求項 9】

請求項 8 に記載の VZV MAV06 のタンパク質を有効成分とするワクチン組成物。

【請求項 10】

体内への注入時に抗体形成を増進させる役割をする薬学的に許容される免疫アジュバント (adjuvant) をさらに含むことを特徴とする、請求項 9 に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

前記免疫アジュバントは、アルミニウム塩 (Al(OH)₃、AlPO₄)、スクアレン (squalene)、ソルビタン (sorbitane)、ポリソルベート 80 (p

50

olysorbate 80)、CpG、リボソーム、コレステロール、MPL (monophosphoryl lipid A)、GLA (glucopyranosyl lipid A) から選択される一つ以上であることを特徴とする、請求項10に記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な水痘帯状疱疹ウイルス株及びそれを用いた水痘及び帯状疱疹ウイルスワクチンに関し、より詳細には、韓国人患者から分離して弱毒化したVZV MAV06のゲノムDNA、そのオープンリーディングフレーム (open reading frame、以下「ORF」)、前記VZV MAV06のゲノムDNA及びそのORFによりコードされたタンパク質、並びに前記タンパク質を有効成分とするワクチン組成物に関する。

10

【背景技術】

【0002】

水痘帯状疱疹ウイルス株 (Varicella Zoster virus、以下「VZV」) はヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) に属するウイルスであり、2つの異なる症状を示す疾患 (水痘及び帯状疱疹) の原因である。

【0003】

20

臨床検体から分離した水痘帯状疱疹ウイルス株 (非特許文献1) として、Dumas株 (Dumas strain) の完全なヌクレオチド配列が最初に報告された。また、現在までparent Okazaki株、Okazaki株由来の3つのワクチンウイルス株 (弱毒化vOkazaki株、VARIVAX Okazaki株、VARILRIX Okazaki株) を含み、総23個の水痘帯状疱疹ウイルス株の完全な全体ヌクレオチド配列がNCBI Genbankデータベースに報告されている。

【0004】

現在、ワクチンウイルス株と臨床ウイルス株の全体ヌクレオチド配列の比較分析は、ワクチン株の弱毒化のための特定部位に関する研究を可能とした (Argaw et al., 2000; Gomi et al., 2002; Tillieux et al., 2008; Yamanish, 2008)。

30

【0005】

一方、株式会社ミドリ十字 (Green Cross Corp.) は、1994年から水痘に対する弱毒化ワクチンとして「SuduVax」を生産している。前記SuduVaxの生産に用いられるMAV06ウイルス株は、1989年水痘に感染した33ヶ月の韓国人患者の水疱から水痘ウイルスを分離してヒト胎児肺細胞に初代培養することで得られ、様々な水痘ウイルス特性試験を行うことにより、新規な水痘帯状疱疹ウイルスであることを確認した (非特許文献2)。

【0006】

前記SuduVaxは1994年以後に韓国で商品化されており、1998年から海外市場に拡大されて用いられている。しかし、SuduVaxの効能及び安定性が市場で立証されているが、これに対するワクチンの効能及び弱毒化のメカニズムを説明することができる分子生物学的特性はまだ報告されていない。

40

【0007】

前記分子生物学的特性は、弱毒化ワクチンの有効性、安全性及び同質性を保障及び保証するための品質管理及び品質保証の正確度を増加させるために非常に重要であり、これは解決すべき急務の課題となっている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

50

【非特許文献1】Davison, A. J. and Scott, J. E, 1986

【非特許文献2】Park et al., Propagation of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea, J Kor Soc Virol 21, 1-9, 1991

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記の問題点を解決するために、本発明者らは、韓国人患者から分離した新規なVZV MAV06のゲノム配列を明らかにし、これに対するORF分析及び系統発生的分析を含む分子生物学的分析を行って、本発明を成すに至った。

10

【0010】

本発明の目的は、VZV MAV06のゲノムDNAを提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的は、VZV MAV06のゲノムDNAのORFを提供することにある。

【0012】

本発明のさらに他の目的は、VZV MAV06のゲノムDNAのORFによりコードされたタンパク質を提供することにある。

【0013】

本発明のさらに他の目的は、VZV MAV06のゲノムDNA又はそのORFを含む組換え発現ベクターを提供することにある。

20

【0014】

本発明のさらに他の目的は、VZV MAV06のゲノムDNA又はそのORFを含む形質転換体を提供することにある。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、VZV MAV06のゲノムDNA又はそのORFによりコードされたVZV MAV06のタンパク質の製造方法を提供することにある。

【0016】

本発明のさらに他の目的は、VZV MAV06のタンパク質を有効成分とするワクチン組成物を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0017】

上記の目的を果たすために、本発明は、VZV MAV06のゲノムDNA及びそのORFを提供する。

【0018】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0019】

本明細書で用いられた用語「オープンリーディングフレーム」又は「ORF」は、アミノ酸配列に翻訳されるDNA塩基配列であって、翻訳開始コドン（例：ATG）から終止コドン（例：TGA、TAA、TAG）までを含む塩基配列を意味する。

40

【0020】

本発明は、配列番号1の塩基配列からなる水痘帯状疱疹ウイルス（Varicella-zoster virus、VZV）MAV06のゲノムDNAを提供する。

【0021】

本発明は、VZV MAV06のゲノムDNAのORFを提供する。より詳細には、前記ORFは、配列番号2の塩基配列からなるORF0、配列番号3の塩基配列からなるORF17、配列番号4の塩基配列からなるORF29、配列番号5の塩基配列からなるORF56、及び配列番号6の塩基配列からなるORF60から選択されることを特徴とする。

【0022】

50

本発明は、前記 V Z V M A V O 6 のゲノム DNA 及びそのオープンリーディングフレームによりコードされたタンパク質を提供する。より詳細には、配列番号 1 の塩基配列からなる V Z V M A V O 6 のゲノム DNA、配列番号 2 の塩基配列からなる O R F 0、配列番号 3 の塩基配列からなる O R F 1 7、配列番号 4 の塩基配列からなる O R F 2 9、配列番号 5 の塩基配列からなる O R F 5 6、及び配列番号 6 の塩基配列からなる O R F 6 0 から選択されるオープンリーディングフレームによりコードされたタンパク質を提供する。

【0023】

本発明は、前記 V Z V M A V O 6 のゲノム DNA 及びそのオープンリーディングフレームを含む組換え発現ベクターを提供する。より詳細には、配列番号 1 の塩基配列からなる V Z V M A V O 6 のゲノム DNA、配列番号 2 の塩基配列からなる O R F 0、配列番号 3 の塩基配列からなる O R F 1 7、配列番号 4 の塩基配列からなる O R F 2 9、配列番号 5 の塩基配列からなる O R F 5 6、及び配列番号 6 の塩基配列からなる O R F 6 0 から選択されるオープンリーディングフレームを含む組換え発現ベクターを提供する。

【0024】

本発明において「組換えベクター」とは、適当な宿主細胞で目的タンパク質を発現することができる発現ベクターであって、遺伝子挿入物が発現するように作動可能に連結された必須的な調節エレメントを含む遺伝子作製物をいう。本発明において、「作動可能に連結された (operably linked)」とは、一般的機能を行うために、核酸発現調節配列と、目的タンパク質をコードする核酸配列とが機能的に連結されていることをいう。組換えベクターとの作動的連結は、本発明が属する技術分野で公知されている遺伝子組換え技術を用いて製造することができ、部位特異的 DNA の切断及び連結は、本発明が属する技術分野で一般に知られている酵素などを用いて容易に行うことができる。

【0025】

本発明で用いられる適切な発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサー (enhancer) などの発現調節エレメントの他にも、膜標的化又は分泌のためのシグナル配列を含むことができる。開始コドン及び終止コドンは、通常、免疫原性標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部とみなされ、遺伝子作製物が投与された時、個体において必ず作用を示さなければならず、コード配列とインフレーム (in frame) にあるべきである。一般のプロモーターは、構成的又は誘導性である。原核細胞としては lac、tac、T3 及び T7 のプロモーターが挙げられるが、これに限定されない。真核細胞としては、サルウイルス 40 (SV40)、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、例えば HIV の長末端反復部 (LTR) プロモーター、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、エプスタインバーウイルス (EBV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターだけでなく、β-アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ヒトメタロチオネイン由来のプロモーターが挙げられるが、これに限定されない。前記発現ベクターは、ベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択性マーカーを含むことができる。選択マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選別するためのもので、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性又は表面タンパク質の発現といった選択可能な表現型を付与するマーカーが用いられることができる。選択剤 (selective agent) が処理された環境では選別マーカーを発現する細胞のみが生存するため、形質転換された細胞が選別可能である。また、ベクターは、複製可能な発現ベクターの場合、複製が開始される特定の核酸配列である複製起点 (replication origin) を含むことができる。組換え発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルス、コスミドなどの様々な形態のベクターを用いることができる。組換えベクターの種類は、原核細胞及び真核細胞の各種宿主細胞で目的の遺伝子を発現し、目的のタンパク質を生産する機能を行うものであれば特に限定されないが、強い活性を示すプロモーターと強い発現力を有しながら自然状態と同様の形態の外來タンパク質を大量生産することができるベクターが好ましい。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明による配列番号1～6から選択される何れか1つの塩基配列によりコードされたVZV MAV06のタンパク質を発現させるために、様々な発現宿主／ベクターの組み合わせが用いられることができる。真核宿主に適した発現ベクターとしては、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス (adenovirus associated virus)、サイトメガロウイルス、及びレトロウイルス由来の発現調節配列などが用いられることができるが、これに限定されるものではない。細菌宿主に使用可能な発現ベクターとしては、pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUCベクター、colE1、pCR1、pBR322、pMB9及びこれらの誘導体のような大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の細菌性プラスミド、RP4のように広い宿主域を有するプラスミド、λgt10とλgt11、NM989のように非常に多様なファージλ (phage lambda) 誘導体で例示されるファージDNA、及びM13や繊維状1本鎖DNAファージなどの他のDNAファージが含まれる。酵母細胞に有用な発現ベクターは、2℃プラスミド及びその誘導体である。昆虫細胞に有用なベクターは、pVL941である。

10

【0027】

前記組換えベクターは宿主細胞に挿入されて形質転換体を形成する。この際、適当な宿主細胞は、大腸菌、バチルスサブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、プロテウスミラビリス (*Proteus mirabilis*) 又はスタフィロкокカス属 (*Staphylococcus* sp.) などの原核細胞であることができ、また、アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.) などの真菌、ピキアパストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセスセレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces* sp.) 及びニューロスポラクラッサ (*Neurospora crassa*) などの酵母、その他の下等真核細胞、及び昆虫からの細胞のような高等真核生物の細胞などの真核細胞であることができる。

20

【0028】

また、前記宿主細胞は、好ましくは植物、哺乳動物由来のものであることができるが、サル腎臓細胞7 (COS7: monkey kidney cells)、NSO細胞、SP2/0、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO: chinese hamster ovary) 細胞、W138、ベビーハムスター腎臓 (BHK: baby hamster kidney) 細胞、MDCK、ミエローマ細胞株、HuT78細胞及びHEK293細胞などが利用可能であり、これに限定されない。特に、CHO細胞が好ましい。

30

【0029】

本発明において宿主細胞への「形質転換」は、核酸を有機体、細胞、組織又は機関に取り入れる如何なる方法も含まれ、当分野で公知されたように、宿主細胞に応じて適当な標準技術を選択して行うことができる。このような方法には、エレクトロポレーション (electroporation) 法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム (CaPO₄) 沈殿法、塩化カルシウム (CaCl₂) 沈殿法、炭化ケイ素繊維を用いた攪拌法、アグロバクテリアを介した形質転換法、PEG、デキストラン硫酸、リポフェクタミン及び乾燥／抑制を介した形質転換法などが含まれるが、これに限定されない。

40

【0030】

組換えベクターが発現される形質転換された宿主細胞を栄養培地で培養することで、本発明による配列番号1～6から選択される何れか1つの塩基配列によりコードされたVZV MAV06のタンパク質を大量生産することができる。培地及び培養条件は宿主細胞に応じて適宜選択して用いることができる。培養時、細胞の生育及びタンパク質の大量生産に適するように、温度、培地のpH及び培養時間などの条件を適当に調節することができる。上記のように組換えで生産された配列番号1～6から選択される何れか1つの塩基配列によりコードされたVZV MAV06のタンパク質は培地又は細胞分解物から回収

50

されることができ、通常の生化学分離技術により分離、精製することができる (Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deuschler, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA (1990))。これには、電気泳動、遠心分離、ゲル濾過、沈澱、透析、クロマトグラフィー (イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど)、等電点電気泳動 (isoelectric focusing) 及びその様々な変形及び複合方法などが利用可能であるが、これに限定されない。 10

【0031】

本発明は、配列番号1～6から選択される何れか1つの塩基配列によりコードされたVZV MAV06のタンパク質を有効成分とするワクチン組成物を提供する。この際、前記ワクチン組成物には、薬学的に許容される免疫アジュバント (adjuvant) 又は付形剤がさらに含まれることができる。免疫アジュバントとしては、体内への注入時に抗体形成を増進する役割をして本発明の目的を達成することができるものであれば使用可能であり、特に、アルミニウム塩 ($Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$)、スクアレン (squalene)、ソルビタン (sorbitan)、ポリソルベート80 (polysorbate 80)、CpG、リポソーム、コレステロール、MPL (monophosphoryl lipid A) 及びGLA (glucopyranosyl lipid A) から選択される一つ以上が好ましいが、これに限定されるものではない。 20

【発明の効果】

【0032】

本発明は、韓国人患者から分離した水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus、VZV) MAV06の全体ゲノム配列を分析し、前記VZV MAV06の全体配列と23個のVZVウイルス株の配列とを比較することで、繰り返し配列及び複製開始点の変形に起因した種の間のゲノム長の多型性を確認することができた。また、VZV MAV06ウイルスの全体配列は、生物情報学的研究及び比較誘電体研究などによって弱毒化されたVZVワクチンウイルス株の分子特性を理解するに助けとなる 30

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】本発明によるVZV MAV06 (以下、図面では「SuduVax」と表示する) のORFマップを示す図である。

【図2】全体ヌクレオチド配列に基いた24個のVZVウイルス株の系統樹を示す図である。

【図3】非コード (non-coding) ヌクレオチド配列に基いた24個のVZVウイルス株の系統樹を示す図である。

【図4】ワクチンウイルス株と臨床ウイルス株との間の12個のORF区分に基いたワクチンウイルス株の特徴的な系統樹を示す図である。 40

【図5】VZVウイルス株のゲノム長と繰り返し配列との間の相関関係を示す図である。

【図6】本発明によるVZV MAV06のORF0とOkavirus株との間の突然変異を示す図である。

【図7】本発明によるVZV MAV06のORF17において3bpの欠失部位を示す図である。

【図8】本発明によるVZV MAV06のORF56において3bpの欠失部位を示す図である。

【図9】本発明によるVZV MAV06のORF29において15bpの欠失部位を示す図である。 50

【図10】本発明によるVZV MAV06のORF60において3bpの挿入部位を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、本発明を実施例及び添付図面を参照して詳細に説明する。しかし、これらは本発明をより詳細に説明するためのものであり、本発明の権利範囲が下記の実施例によって限定されるものではない。

【0035】

〔実施例1〕ウイルス及びDNAシーケンシング

MAV06ウイルス株は、1989年水痘に感染された33ヶ月の韓国人患者の水疱から水痘ウイルスを分離し、ヒト胎児肺細胞に初代培養することで得られた(Hwang, K. K., Park, S. Y., Kim, S. J., Ryu, Y. W. & Kim, K. H. (1991). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Varicella-Zoster Virus isolated in Korea. JKorSocVirol21, 201-210.)。

【0036】

前記培養されたMAV06ウイルス株を34℃～36℃でヒト及びモルモットの胎児正常二倍体肺細胞で(embryonic diploid Lung cell)55回継代培養した後、細胞感受性及び温度感受性試験を行って弱毒化されたことを確認した(Hwang et al., Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea)。前記弱毒化されたウイルス株を「MAV06」と命名し、これをSuduVaxの生産に用いた。

【0037】

前記弱毒化MAV06ウイルス株をヒト胎児正常二倍体肺細胞で連続継代培養してマスターウイルス株(virus seed)を作製し、これから連続継代培養して製造用ウイルス株(virus seed)を生産した。

【0038】

また、最終ワクチンである「SuduVax」は製造用ウイルスバンクから継代培養されたものを用いて生産し、配列分析には5回継代培養されたウイルスを用いた。

【0039】

QIAamp DNAミニキット(QIAGEN)を用いてMAV06ウイルス株ストックから5.5ug/100ulの濃度でDNAを抽出した。DNA配列を、ハイスループットスクリーニング法(high-throughput sequencing method)であるキアゲン(QIAGEN)によりサービスされるロシュダイアグノスティックス(Roche Diagnostics)のゲノムシーケンサFLXスタンダードシステム(Genome Sequencer FLX Standard System)によって決定した。

【0040】

平均長さ～400bpの23,722配列断片を得て、これらをConsedプログラム(<http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/consed.html>)を利用して組み合わせ及び可視化した。配列断片の平均クオリティは99.99%であった。総99.38%の124,759配列が、導き出されたコンセンサス配列と一致し、包含範囲はヌクレオチド当たり83リード(reads)であった。これらを2つの参照ウイルス株Dumas(NC_001348)及びVarilrix(DQ008354)に対して整列し、コンティグ(contig)の間のギャップは隣接したコンティグから得られたプライマーを用いたPCRシーケンシングにより満たした。

【0041】

MAV06 ウイルス株の完成された全体ゲノム配列は、NCBI Genbank データベースに 2011 年 8 月 9 日登録 (JF306641) し、配列番号 1 に示した。配列番号 1 に示したように、MAV06 ウイルス株のゲノムは 124,759 bp の長さを有すると確認された。

【0042】

〔実施例 2〕 オープンリーディングフレーム分析

2 つの参照ウイルス株 Dumas (NC_001348) 及び Varilrix (DQ008354) に対する BLAST 検索 (Blast search) により、全体ゲノム配列で MAV06 ウイルス株のオープンリーディングフレーム (ORF) の位置を検索した。結果データは、MAV06 ウイルス株のゲノムにおける各 ORF の一番目と最後のヌクレオチド位置及び ORF の方向を含むことを確認することができた。

10

【0043】

ORF 情報を、CLC シーケンスビューア (CLC Sequence Viewer) (version 6.1 <http://www.clcbio.com/index.php>) 及び NCBI により提供される ORF Finder のような ORF 確認プログラムによって検証した。BLAST 検索結果が ORF 確認プログラムの結果と一致しない場合、該当 ORF のヌクレオチド配列を BioEdit Sequence Alignment Editor (Department of Microbiology, North Carolina State University, version 5.0.9, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) で調査し、手作業で編集して開始及び終止コドンの位置を決定した。最後に、配置された全ての ORF を、翻訳されたアミノ酸配列を確認することで確認した。

20

【0044】

前記分析結果を下記 (1) ~ (4) に示した。

【0045】

(1) MAV06 ウイルス株ゲノム構造及び ORF マッピング

MAV06 ウイルス株ゲノム構造は、ゲノムが 6 部位、TRL、UL、IRL、IRS、US 及び TRS に分けられるという点で、VZV ウイルス株の典型的な構造であった。各部位の長さはそれぞれ 88 bp、104,799 bp、88 bp、7,267 bp、5,232 bp 及び 7,276 bp であった。

30

【0046】

MAV06 ウイルス株ゲノムの G+C 含量は約 46.1% であり、ゲノムの総長さは 24 個の VZV ウイルス株と酷似していた。下記表 1 に、本発明で分析した VZV ウイルス株及びこれらのジェンバンク (Genbank) 登録番号、ゲノム長及び GC 含量を示した。

【0047】

【表 1】

本発明で分析したVZVウイルス株の情報

Strain	Accession Number	Country	Length (bp)							%G+C
			Genome	TRL	UI	IRI	IRs	Us	TRs	
Dumas	NC001348	Netherlands	124,884	88	104,836	88	7,320	5,232	7,320	46.0
M2DR	DQ452050	Morocco	124,770	89	104,719	89	7,320	5,232	7,321	46.0
CA123	DQ457052	USA	124,771	100	104,698	98	7,322	5,232	7,321	46.0
SD	DQ479953	USA	125,087	88	104,787	88	7,446	5,232	7,446	46.1
Ke1	DQ479954	USA	125,374	88	104,857	88	7,555	5,232	7,554	46.2
11	DQ479955	Canada	125,370	88	104,906	88	7,529	5,232	7,527	46.2
22	DQ479956	Canada	124,868	88	104,689	88	7,386	5,232	7,385	46.0
03-500	DQ479957	Canada	125,239	88	105,299	88	7,266	5,232	7,266	46.1
36	DQ479958	Canada	125,030	88	104,850	88	7,387	5,232	7,385	46.1
49	DQ479959	Canada	125,041	88	104,916	88	7,358	5,232	7,359	46.1
8	DQ479960	Canada	125,451	89	105,020	88	7,510	5,232	7,512	46.2
32p5	DQ479961	USA	124,945	88	104,760	88	7,389	5,232	7,388	46.1
32p22	DQ479962	USA	125,084	88	104,791	88	7,443	5,232	7,442	46.1
32p72	DQ479963	USA	125,169	88	104,870	88	7,446	5,232	7,445	46.1
NH29_3	DQ674250	USA	124,811	87	104,766	87	7,320	5,230	7,321	46.0
SVETA	EU154348	Russia	124,813	87	104,772	87	7,319	5,230	7,318	46.0
MSP	AY548170	USA	124,883	88	104,848	88	7,313	5,232	7,314	46.0
BC	AY548171	Canada	125,459	88	105,326	88	7,363	5,231	7,363	46.2
HJ0	AJ871403	Germany	124,928	89	104,752	89	7,335	5,230	7,433	46.0
pOka	AB097933	Japan	125,125	88	104,798	88	7,463	5,225	7,463	46.1
vOka	AB097932	Japan	125,078	88	104,822	88	7,427	5,232	7,421	46.1
VariIRix	DQ008354	Japan	124,821	88	104,761	88	7,326	5,231	7,327	46.1
VariVax	DQ008355	Japan	124,815	88	104,758	88	7,324	5,232	7,325	46.1
MAV06	This study	Korea	124,759	88	104,799	88	7,276	5,232	7,276	46.1

【0048】

MAV06ウイルス株は74個のORFを含んでおり、これらのうち64個はUL遺伝子、4個はUS遺伝子であることを確認した。

【0049】

IRS内の3個の遺伝子(ORFs 62-64)はTRS(ORFs 69-71)内で逆方向に繰り返して存在し、74個のORFのうち70個は正方向に、34個は逆方向に存在した。また、ORF方向はVZV菌株で100%保存されていた。MAV06ウイルス株のORFマップを図1(全ての図面では「SuduVax」と表示する)に示した。

10

20

30

40

50

【0050】

(2) MAV06 ウイルス株の系統発生学的分析

前記表1のウイルス株の全体ヌクレオチド配列に基いて、近隣結合法 (neighbor joining method) を利用して系統樹を作製した。

【0051】

MAV06 ウイルス株のORFヌクレオチド配列を、ClustalW (ver 2.0.1) により、NCBI ジェンバンクデータベースに登録された前記表1の24個のVZV ウイルス株のヌクレオチド配列及びアミノ酸と多重整列した後、手作業で編集した。

【0052】

結果出力ファイルを、Phylip パッケージ (version 3.69、<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) に含まれたDnadist 及び neighbour プログラムを利用して系統樹を作成するために用いた。距離マトリックスを木村2パラメータ (Kimura-2-parameter) により得た。クラスター分析を近隣結合法 (neighbour-joining、NJ) 及び最尤法 (maximum-likelihood、ML) により行い、結果ツリーファイルをツリービュー (Treeview) プログラム (version 1.6.6) によって可視化した。系統樹の有意性をブートストラップ (bootstrap) 分析により検証した。系統樹をSeqboot プログラムにより生成された1000個のレプリケート (replicates) から構築し、コンセンサスツリーをコンセンス (Consense) プログラムで確認した。

【0053】

全体ヌクレオチド配列に基いて最尤法により系統樹を作成した結果、図2から確認できるように、MAV06 ウイルス株を含む4個の弱毒化生ウイルスワクチンのウイルス株 (vOka、Varilrix、Varivax) とクラスターを形成し、M2DR ウイルス株と8ウイルス株が隣接したクラスターを形成した。また、CA123 ウイルス株は単独で形成、11、22、03-500、及びHJ0 ウイルス株がクラスターを形成、残りの臨床ウイルス株がともにクラスターを形成した。

【0054】

非コードヌクレオチド配列に基いた最尤法により系統樹を作成した結果、図3から確認できるように、韓国で分離したMAV06 ウイルス株と日本で分離したOka ウイルス株は (Japan-Korean (J-K) cluster) 独特のクラスターを形成した。全体ヌクレオチド配列及び共通のアミノ酸配列に基いた24個のVZV ウイルス株の系統樹ではpOka ウイルス株が4個のワクチンウイルス株 (vOka、Varilrix、Varivax、MAV06) と19個の臨床ウイルス株との間に位置するが、非コードヌクレオチド配列に基いた24個のVZV ウイルス株の系統樹ではワクチンウイルス株の間に位置していた。即ち、4個のワクチンのウイルス株 (vOka、Varilrix、Varivax、MAV06) は全体ヌクレオチド配列及び共通のアミノ酸配列に基いた24個のVZV ウイルス株の系統樹ではJapan-Korean (J-K) クラスター内で下位クラスターを形成することを確認することができたが、非コードヌクレオチド配列に基いた24個のVZV ウイルス株との系統樹ではそうではなかった。

【0055】

ワクチンウイルス株と臨床ウイルス株とを区分するための主なORFを確認するために、ORFによる74個の系統樹を作成し、そのうち12個のORFで図4のようにワクチンウイルス株の特徴的な系統樹を確認することができた。ワクチンウイルス株の特徴的な系統樹が得られるORFとしては、ORF0、1、6、18、31、35、39、59、62、64、69及び71がある。

【0056】

(3) 繰り返し配列 (Reiteration sequences) とゲノム長の多型性の分析

VZV ウイルス株のORFの長さは殆ど変化がなかった。VZV ウイルス株の74OR

10

20

30

40

50

Fのうち63番目は、ウイルス株の間に長さ差が殆どないことを確認することができた。3個のORF（ORF11、14、22）は下記表2から確認できるように、繰り返された配列の長さのため、系統の間に長さの多型性が比較的高く存在することを確認することができた。

【0057】

【表2】

VZVウイルス株の繰り返し配列

Strain	Length (bp)									Rank ⁴ (R)	Rank ⁴ (G)
	R1	R2	R3	R4a	R4b	R5	R ¹	G ²	G-R ³		
Dumas	303	326	72	146	146	200	1,193	124,884	123,691	9	10
M2DR	303	284	27	146	146	200	1,106	124,770	123,664	3	2
CA123	261	284	36	146	146	200	1,073	124,771	123,698	1	3
SD	258	326	72	281	281	200	1,418	125,087	123,669	16	17
Ke1	321	326	72	389	389	200	1,697	125,374	123,677	21	22
11	225	326	225	362	362	200	1,700	125,370	123,670	22	21
22	195	284	72	200	200	200	1,151	124,868	123,717	8	8
03-500	225	284	657	92	92	200	1,550	125,239	123,689	20	20
36	321	326	72	227	227	200	1,373	125,030	123,657	13	13
49	321	410	54	200	200	200	1,385	125,041	123,656	14	14
8	258	620	36	335	335	200	1,784	125,451	123,667	23	23
32p5	243	326	54	227	227	200	1,277	124,945	123,668	12	12
32p22	291	326	36	281	281	200	1,415	125,084	123,669	15	16
32p72	291	326	117	281	281	200	1,496	125,169	123,673	19	19
NH29_3	258	326	51	146	146	200	1,127	124,811	123,684	4	4
SVETA	243	326	72	146	146	200	1,133	124,813	123,680	5	5
MSP	258	368	90	146	146	200	1,208	124,883	123,675	10	9
BC	258	326	612	200	200	200	1,796	125,459	123,663	24	24
HJ0	225	326	72	146	254	200	1,223	124,928	123,705	11	11
pOka	225	326	36	281	281	312	1,461	125,125	123,664	18	18
vOka	258	326	27	254	254	312	1,431	125,078	123,647	17	15
VariRix	258	326	72	146	146	200	1,148	124,821	123,673	6	7
VariVax	258	326	72	146	146	200	1,148	124,815	123,667	6	6
MAV06	273	326	99	92	92	200	1,082	124,759	123,677	2	1
Avg	263.8	336.5	116.9	209.0	213.5	209.3	1,349	125,024	23,675		
Stdev	33.8	65.8	164.5	83.0	82.4	31.6	229.7	224.1	16.0		
CV	0.128	0.196	1.407	0.397	0.386	0.151	0.170	0.00179	0.00013		

¹ Sum of R sequences

² Length of the genome

³ Length of the genome after deletion of R sequences

⁴ Rank in the order of length from the shortest to the longest

【0058】

即ち、R1はORF11に位置し、18bpのエレメント（コンセンサス：GGACG

10

20

30

40

50

C G A T C G A C G A C G A) 及び 15 b p のエレメント (コンセンサス: G G G A G A G G C G G A G G A) の多様な配列の組み合わせで構成されていた。MAV06 ウイルス株は、ORF11 内の 15 b p のエレメントが追加的に繰り返されるため、Ok a ワクチンウイルス株とは長さが異なった。

【0059】

また、R2 は ORF14 に位置し、多様な 42 b p のエレメント (コンセンサス: A C C T C G G C C G C T T / a C C C G A A A G / t a C C C G A T C C C G C C G T C G C G C C C : 小文字は和の小さい偏差を示す) で構成され、その部分的な 32 b p のエレメントがさらに追加されている。MAV06 ウイルス株は Ok a ワクチンウイルス株のように ORF11 内の 42 b p のエレメントが 7 回繰り返されていた。

10

【0060】

また、R3 は ORF22 の 3 / 末端の中間に位置し、9 b p のエレメントが繰り返して複製されている。9 b p のコンセンサス配列は G C / t C C G C / t G / c C A / g (小文字は和の小さい偏差を示す) である。繰り返し回数 (n) は系統の間に大きく異なる。03-500 ウイルス株は繰り返し回数が 73 回であり、vOk a ウイルス株は繰り返し回数が 3 回である。MAV06 ウイルス株は 9 b p のエレメントが 11 回繰り返されているが、Varilrix 及び Varivax ウイルス株は 8 回繰り返されている。

【0061】

また、R4 と R5 は非コード (non-coding) 部位である。R4 は 27 b p のエレメント (コンセンサス: C C C C G C C G A T G G G G A G G G G C G C G G T A) で構成され、その部分的な 11 b p エレメントがさらに追加されている。R4 (R4a) は IRS 内の ORF62 と 63 との間に位置しており、それに相補的な R4b の位置は TRS 内の ORF70 と 71 との間に位置している。R4a の長さは R4b 長さと同じであるが、HJ0 ウイルス株の場合は R4a と R4b の長さが異なる。HJ0 ウイルス株の R4b の長さは、27 b p のエレメントが 4 回さらに繰り返されるため、R4a より 108 b p 長い。Varilrix 及び Varivax ウイルス株の場合は、27 b p のエレメントが 5 回さらに繰り返されている。MAV06 ウイルス株は、27 b p のエレメントが 3 回さらに繰り返されている。

20

【0062】

R5 は ORF60 と 61 との間に位置しており、24 b p のエレメントが含まれた 88 b p のエレメントで構成されている。前記 2 個のエレメントは、他の繰り返し配列と異なって、2 つのタイプの繰り返し配列が存在した。MAV06 ウイルス株は大部分のウイルス株と同様に、2 個の 88 b p のエレメント及び 1 個の 24 b p のエレメントを含んでいたが、vOk a 及び pOk a ウイルス株は 3 個の 88 b p 及び 2 個の 24 b p のエレメントを含んでいた。

30

【0063】

24 個の VZV ウイルス株のゲノム配列と繰り返し配列の長さを比較することで、VZV ウイルス株のゲノムの長さの多様性は、繰り返し配列の長さによるものであることを確認した。BC ウイルス株は最長のゲノムであり、最長の繰り返し配列を含んでいたが、MAV06 ウイルス株は最短のゲノムであり、二番目に短い繰り返し配列を含んでいた。最長のゲノムと最短のゲノムとの間の長さ (700 b p) は、最長の繰り返し配列と最短の繰り返し配列との差 (724 b p) とほぼ同様であった。もし繰り返し配列がゲノムから除去されると、CV (変動係数) の変化とともにゲノム長が短くなる。全体ゲノムから繰り返し配列が除去されると 0.000129 値が削除され、CV は 0.00179 に計算される。

40

【0064】

実際に、下記図 5 から確認できるように、ゲノムの長さの順を繰り返し配列の長さの順にした時に、相関係数 (r^2) は 0.9854 の値を有し、VZV ウイルス株のゲノムと繰り返し配列の長さが略直線関係になった。

【0065】

50

(4) 複製開始点 (Origin of replication)

VZVウイルス株の複製 (origin of replication、ORI) 配列はORF62とORF63との間に位置していた。ORI配列の長さは、36ウイルス株では80bpであり、HJ0ウイルス株では、ORI配列の配列中間にTAとGAのジヌクレオチドの繰り返し数が異なるため108bpであった。

【0066】

MAV06ウイルス株のORI配列は、下記表3から確認できるように、ゲノムの110,080番目と110,183番目の位置の間に位置しており、15タンデム (tandem) GAの繰り返し塩基が15回、TAの繰り返し塩基が11回含まれていた。

【0067】

【表 3】

Strain	Start	End	Length	(TA) n^1	(GA) m^2
Dumas	110,166	110,263	98	15	8
M2DR	110,052	110,149	98	15	8
CA123	110,050	110,147	98	15	8
SD	110,250	110,337	88	11	7
Kel	110,431	110,514	84	9	7
11	110,455	110,538	84	8	8
22	110,075	110,180	106	13	14
03-500	110,580	110,667	88	11	7
36	110,262	110,341	80	7	7
49	110,300	110,379	80	7	7
8	110,541	110,632	92	13	7
32p5	110,171	110,254	84	9	7
32p22	110,256	110,339	84	9	7
32p72	110,335	110,420	86	10	7
NH29_3	110,094	110,191	98	15	8
SVETA	110,101	110,194	94	13	8
MSP	110,176	110,265	90	12	7
BC	110,708	110,795	88	11	7
HJ0	110,085	110,192	108	11	17
pOka	110,268	110,371	104	11	15
vOka	110,264	110,359	96	8	14
VarilRix	110,096	110,191	96	8	14
Varivax	110,093	110,190	98	8	15
MAV06	110,080	110,183	104	11	15

¹ TAの繰り返し塩基数² GAの繰り返し塩基数

【0068】

ゲノムの110, 235位置内の繰り返し塩基数は異なるが、Okaワクチンウイルス株及びMAV06ウイルス株は、通常、参照ウイルス株であるDumas内の110, 235の該当ヌクレオチド位置でGA繰り返しのうち1つがAがGで置換されている。ORI配列は、HJ0及びVarilRixウイルス株を除き、正確に相互補完的な形態にO

10

20

30

40

50

R F 7 0 と O R F 7 1 との間に重複されていた：(T A) 3 (G A) 2 は H J o ウイルス株で欠失されており、V a r i l R i x ウイルス株では1個のG A 繰り返し塩基が欠失されていた。

【0069】

(5) M A V 0 6 ウイルス株のO R F の特性分析

M A V 0 6 ウイルス株のO R F 0 の長さは突然変異のため長かった。終止コドンであるT G A (ヌクレオチド位置388-390)がアルギニン(A g r)をコードするC G A に突然変異されていた。終止コドンと推定されるT G A はO R F 1 とともに重なっている下端部位で探すことができた。拡張されたO R F 0 は221個のアミノ酸残基を有する新しいタンパク質をエンコードした。同一の突然変異を、他の類似のv O k a、V a r i l R i x、及びV a r i V a x ワクチンウイルス株でも確認することができた(図6)。

10

【0070】

全ての臨床ウイルス株のうちp O k a ウイルス株は、129個のアミノ酸をコードする390 b p の長さのO R F 0 を含んでいた。

【0071】

参照ウイルス株であるD u m a s と比べると、M A V 0 6 ウイルス株のO R F 1 7 (配列番号3)とO R F 5 6 (配列番号5)の長さは、それぞれ658~660位置のT C T と367~369位置のT C A が欠失されて、3 b p の差があった(図7及び図8)。上記のような全ての欠失は、セリン(S e r i n e、S)アミノ酸残基の欠失をもたらした。一方、M A V 0 6 ウイルス株のO R F 6 0 (配列番号6)には、28番目の位置に3個のヌクレオチドA T G が挿入されていた(図10)。興味深いことに、p O k a ウイルス株を含む全てのO k a ワクチンウイルス株で、1つの挿入及び2つの欠失を確認することができた。

20

【0072】

また、O k a ワクチンウイルス株だけでなくM A V 0 6 ウイルス株で、O R F 2 9 (配列番号4)がD u m a s および大部分の臨床ウイルス株より15 b p ((A A C A T T T C A G G G T C A)短かった。参照ウイルス株であるD u m a s および大部分の臨床ウイルスは、15 b p の配列を連続的に且つ繰り返して含んでいた。M 2 D R、C A 1 2 3 及び8の臨床ウイルス株は、O k a ワクチンウイルス株及びM A V 0 6 ウイルス株と同様に、O R F 6 0 の長さが同一であった(図9)。

30

【0073】

配列番号1はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAを示す。

配列番号2はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAのO R F 0 を示す。

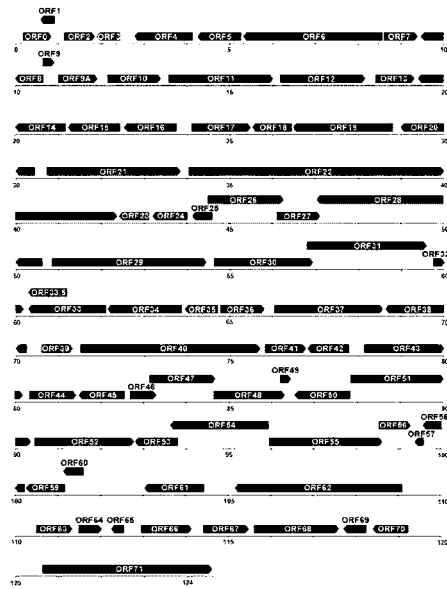
配列番号3はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAのO R F 1 7 を示す。

配列番号4はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAのO R F 2 9 を示す。

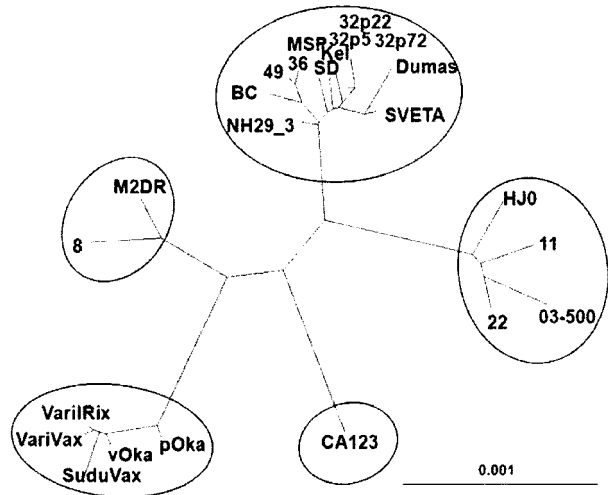
配列番号5はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAのO R F 5 6 を示す。

配列番号6はV Z V M A V 0 6 ゲノムDNAのO R F 6 0 を示す。

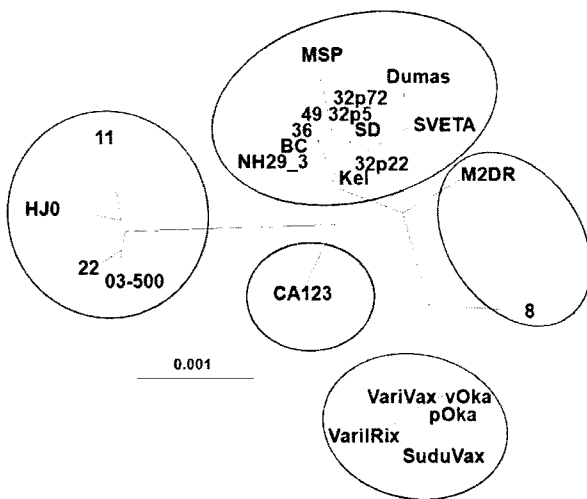
【 図 1 】



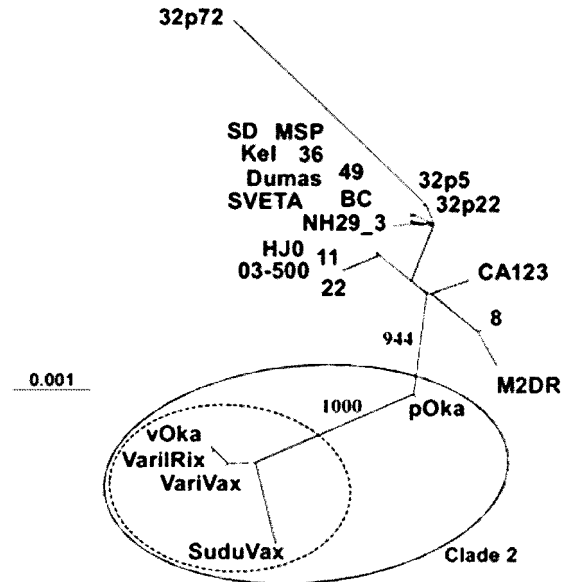
【 図 2 】



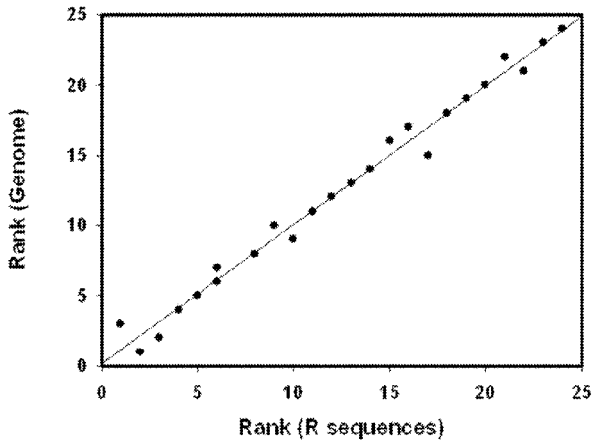
【 図 3 】



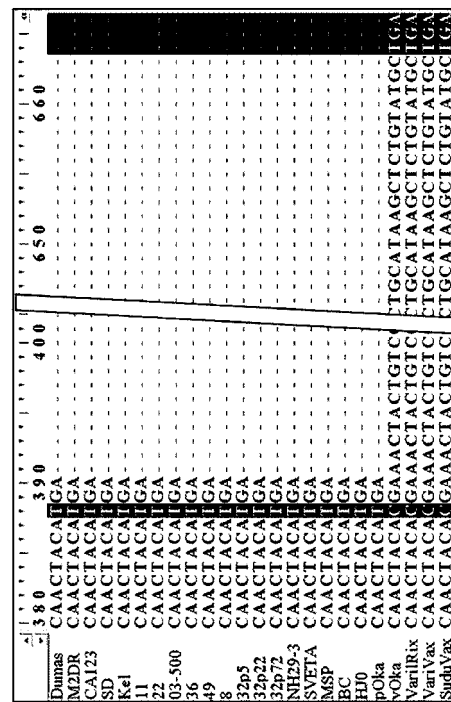
【 図 4 】



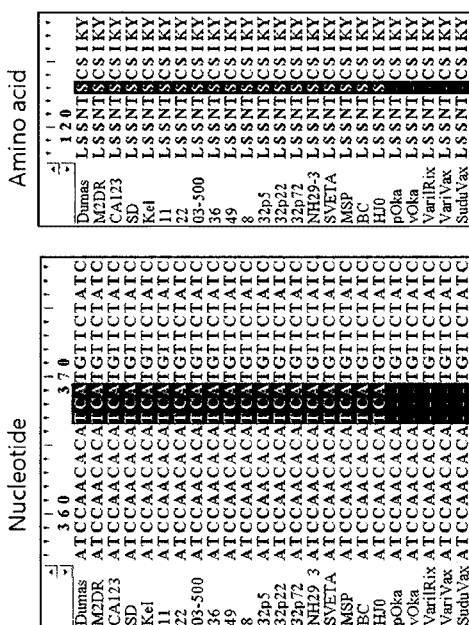
【図 5】



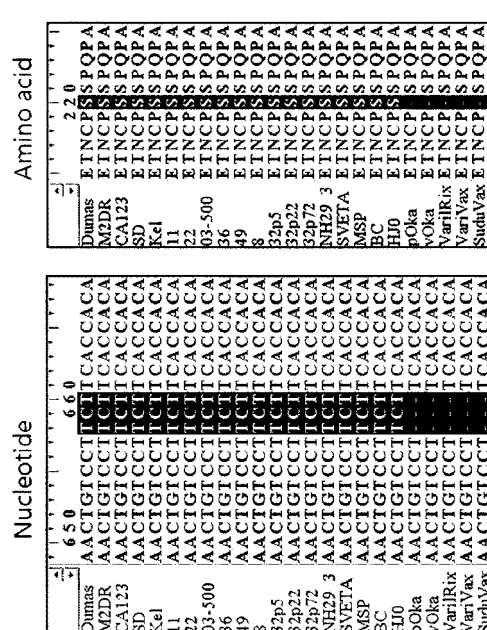
【図 6】



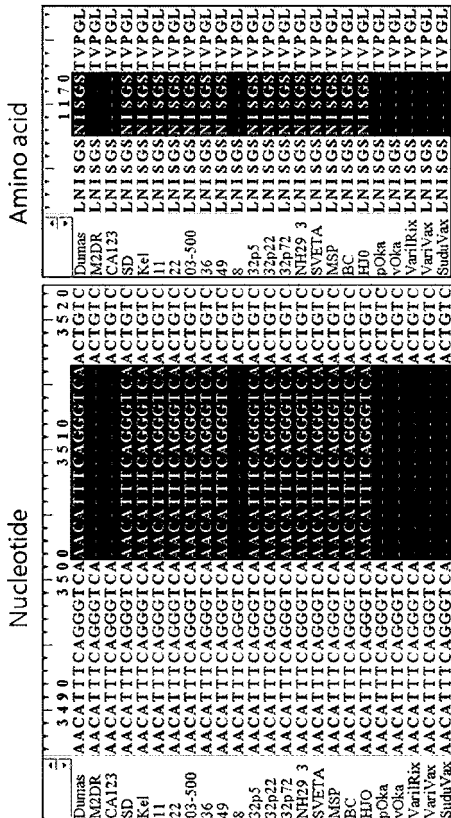
【図 7】



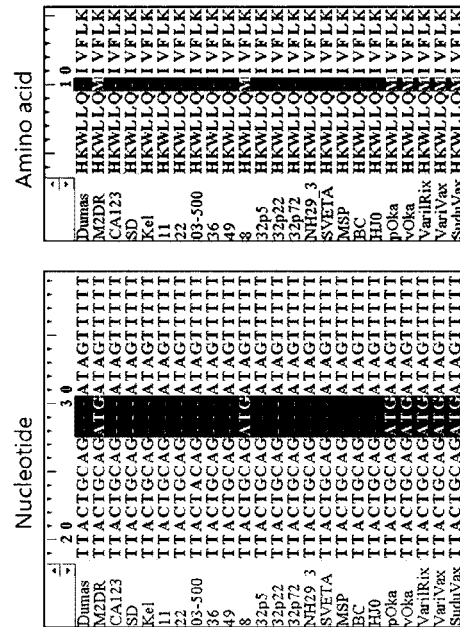
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2014508522000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年8月21日(2013.8.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の塩基配列からなる水痘帯状疱疹ウイルス(Varicella-zoster virus、VZV)MAV06のゲノムDNA。

【請求項2】

配列番号2の塩基配列からなるORF0、配列番号3の塩基配列からなるORF17、配列番号4の塩基配列からなるORF29、配列番号5の塩基配列からなるORF56、及び配列番号6の塩基配列からなるORF60から選択されることを特徴とする、VZV MAV06のゲノムDNAのオープンリーディングフレーム(Open Reading Frame、ORF)。

【請求項3】

請求項1又は2に記載のVZV MAV06のゲノムDNAのオープンリーディングフレームによりコードされたタンパク質。

【請求項4】

配列番号1の塩基配列からなるVZV MAV06のゲノムDNA、配列番号2の塩基配列からなるORF0、配列番号3の塩基配列からなるORF17、配列番号4の塩基配

列からなるORF29、配列番号5の塩基配列からなるORF56、及び配列番号6の塩基配列からなるORF60から選択されるオープンリーディングフレームを含む、組換え発現ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項6】

宿主細胞は、動物細胞、植物細胞、酵母、大腸菌、昆虫細胞から選択されるものであることを特徴とする、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

前記形質転換された宿主細胞は、サル腎臓細胞7 (COS7: monkey kidney cells)、NSO細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO: chinese hamster ovary) 細胞、W138、ベビーハムスター腎臓 (BHK: baby hamster kidney) 細胞、MDCK、ミエローマ細胞株、HuT78細胞及び293細胞、大腸菌、バチルスサブチリス (Bacillus subtilis)、ストレプトマイセス属 (Streptomyces sp.)、シュドモナス属 (Pseudomonas sp.)、プロテウスミラビリス (Proteus mirabilis) 又はスタフィロкокカス属 (Staphylococcus sp.)、アスペルギルス属 (Aspergillus sp.)、ピキアパストリス (Pichia pastoris)、サッカロミセスセレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces sp.) 及びニューロスポラクラッサ (Neurospora crassa) から選択されることを特徴とする、請求項6に記載の宿主細胞。

【請求項8】

配列番号1～6から選択される何れか1つの塩基配列によりコードされたVZV MAV06のタンパク質の製造方法。

【請求項9】

請求項8に記載のVZV MAV06のタンパク質を有効成分とするワクチン組成物。

【請求項10】

体内への注入時に抗体形成を増進させる役割をする薬学的に許容される免疫アジュバント (adjuvant) をさらに含むことを特徴とする、請求項9に記載のワクチン組成物。

【請求項11】

前記免疫アジュバントは、アルミニウム塩 ($Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$)、スクアレン (squalene)、ソルビタン (sorbitane)、ポリソルベート80 (polysorbate 80)、CpG、リポソーム、コレステロール、MPL (monophosphoryl lipid A)、GLA (glucopyranosyl lipid A) から選択される一つ以上であることを特徴とする、請求項10に記載のワクチン組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2014508522000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/001408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/33(2006.01)i, C12N 7/00(2006.01)i, C07K 14/04(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 39/25(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/33; A61K 39/25

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-0135614 B1 (MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 23 April 1998 See abstract and examples 1-3.	1-11
Y	TILLIEUX, S. L. et al. "Complete DNA sequences of two oka strain varicella-zoster virus genomes" Journal of Virology. Vol.82(22), pp.11023-11044 (10 September 2008) See p. 11024 "Materials and Methods".	1-11
A	SOHN, Y. M. et al. "Safety and Immunogenicity of Live attenuated Varicella Virus Vaccine (MAV/06 strain) The Journal of Korean Pediatric Society. Vol. 37(10), pp. 1405-1413 (October 1994) [KOREAN] See abstract.	1-11
A	HWANG, K. K. et al. "Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea" The Journal of the Korean Society of Virology. Vol.22(2), pp. 105-109 (December 1992) [KOREAN] See abstract.	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 SEPTEMBER 2012 (18.09.2012)

Date of mailing of the international search report

19 SEPTEMBER 2012 (19.09.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/001408

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, J. I. et al. "Sequencing and characterization of Varicella-zoster virus vaccine strain SuduVax" Virology Journal. Vol. 8: 547 (16 December 2011) See the entire document.	1-11

International application No.
PCT/KR2012/001408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0135614 B1	23.04.1998	KR 1996-0016906 A	17.06.1996

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2012/001408
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 15/33(2006.01)i, C12N 7/00(2006.01)i, C07K 14/04(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 39/25(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/33; A61K 39/25 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eCOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Pubmed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-0135614 B1 (MOGAM BIOTECHNOLOGY INSTITUTE) 23 April 1998 초록 및 실시예 1~3 참조.	1-11
Y	TILLIEUX, S. L. et al. 'Complete DNA sequences of two oka strain varicella-zoster virus genomes' Journal of Virology. Vol.82(22), pp.11023-11044 (10 September 2008) p. 11024 "Materials and Methods" 참조.	1-11
A	SOHN, Y. M. et al. 'Safety and Immunogenicity of Live attenuated Varicella Virus Vaccine (MAV/06 strain) The Journal of Korean Pediatric Society. Vol. 37(10), pp.1405-1413 (October 1994) [KOREAN] 초록 참조.	1-11
A	HWANG, K. K. et al. 'Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea' The Journal of the Korean Society of Virology. Vol.22(2), pp.105-109 (December 1992) [KOREAN] 초록 참조.	1-11
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 외문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2012년 09월 18일 (18.09.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 09월 19일 (19.09.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (문산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김지윤 전화번호 82-42-481-8288 

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2012/001408

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, J. I. et al. 'Sequencing and characterization of Varicella-zoster virus vaccine strain SuduVax' Virology Journal. Vol. 8: 547 (16 December 2011) 전문 참조.	1-11

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2009년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2012/001408

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0135614 B1	1998.04.23	KR 1996-0016906 A	1996.06.17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K	39/25	(2006.01)	A 6 1 K 39/25
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P 31/22
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39

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

(72)発明者 キム グン ヒ
大韓民国 キョンギード 4 4 6-7 9 9 ヨンインーシ ギフンーグ ポジュンードン 3 4 1
(72)発明者 クウォン シ ネ
大韓民国 キョンギード 4 4 6-7 9 9 ヨンインーシ ギフンーグ ポジュンードン 3 4 1
(72)発明者 イ チャン ヒ
大韓民国 チュンブク 3 6 1-8 0 4 チョンジューシ フンドクーグ ゲシンードン 1 0
サミク アパートメント ナンバー 1 0 7-5 0 3
(72)発明者 ユン ヨブ
大韓民国 キョンギード 4 4 6-7 9 9 ヨンインーシ ギフンーグ ポジュンードン 3 4 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 CA04 CA20 DA02 DA03 GA11
4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA93X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C085 AA03 AA38 BA79 BB11 CC08 CC21 DD62 EE01 FF02 FF12
FF14
4H045 AA11 AA20 AA30 CA01 DA86 EA31 FA74