

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6717836号  
(P6717836)

(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(24) 登録日 令和2年6月15日(2020.6.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/38	(2006.01) C 12 N 15/38
C 07 K 14/045	(2006.01) C 07 K 14/045 Z N A
C 12 N 1/15	(2006.01) C 12 N 1/15
C 12 N 1/19	(2006.01) C 12 N 1/19
C 12 N 1/21	(2006.01) C 12 N 1/21

請求項の数 15 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-538387 (P2017-538387)
(86) (22) 出願日	平成28年1月22日 (2016.1.22)
(65) 公表番号	特表2018-504117 (P2018-504117A)
(43) 公表日	平成30年2月15日 (2018.2.15)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2016/050335
(87) 國際公開番号	W02016/116904
(87) 國際公開日	平成28年7月28日 (2016.7.28)
審査請求日	平成31年1月9日 (2019.1.9)
(31) 優先権主張番号	15152221.6
(32) 優先日	平成27年1月22日 (2015.1.22)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	305060279 グラクソsmithkline バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89
(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木國際特許事務所
(72) 発明者	カルフィ, アンドレア アメリカ合衆国 02139 マサチュー セツツ州, ケンブリッジ, マサチューセッ ツ アヴェニュー 350
(72) 発明者	シフェッリ, クラウディオ アメリカ合衆国 94602 カリフォル ニア州, オークランド, ノートン アヴェ ニュー 4224

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サイトメガロウイルス抗原およびその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組み換えサイトメガロウイルスgLタンパク質、またはその複合体形成性断片であって、該gLタンパク質または複合体形成性断片は、プロテアーゼ認識部位残基91～102(配列番号1に従ってナンバリングされる)に突然変異を含み、該突然変異は対照と比較した場合に該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させるものであり、該突然変異は、以下：

(a) 残基N97と残基S98との間の、大きな側鎖を含む1もしくは2個のアミノ酸残基の付加；

(b) A95、A96、N97、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される残基の欠失；

(c) 非極性残基または大きな側鎖を含む残基を用いてA96を置換すること；

(d) R、L、EまたはNを用いてA95を置換すること；

(e) 極性残基または非極性残基を用いてN97を置換すること；

(f) 小さな側鎖を含むアミノ酸残基を用いてS98を置換すること；

(g) Iを用いてV99を置換すること；

(h) FまたはVを含むアミノ酸残基を用いてL100を置換すること；

(i) VまたはIを含むアミノ酸残基を用いてL101を置換すること；

あるいは上記の組み合わせから選択される、上記gLタンパク質または複合体形成性断片。

## 【請求項 2】

前記(a)の付加が、残基N97と残基S98との間のF、Q、FQまたはQFの付加を含む、請求

10

20

項1に記載のgLタンパク質または複合体形成性断片。

【請求項3】

前記(c)の残基A96の置換が、I、L、VまたはSを用いた置換である、請求項1～2のいずれか1項に記載のgLタンパク質または複合体形成性断片。

【請求項4】

前記(e)の残基N97の置換が、小さな側鎖を含む極性残基を用いた置換である、請求項1～3のいずれか1項に記載のgLタンパク質または複合体形成性断片。

【請求項5】

前記(e)の残基N97の置換が、大きな側鎖を含む極性残基を用いた置換である、請求項1～3のいずれか1項に記載のgLタンパク質または複合体形成性断片。

10

【請求項6】

前記(f)の残基S98の置換が、G、T、V、またはIを用いた置換である、請求項1～5のいずれか1項に記載のgLタンパク質または複合体形成性断片。

【請求項7】

組み換えサイトメガロウイルスgLタンパク質、またはその複合体形成性断片であって、該gLタンパク質または複合体形成性断片は、プロテアーゼ認識部位残基91～102(配列番号1に従ってナンバリングされる)に突然変異を含み、該突然変異は対照と比較した場合に該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させるものであり、該突然変異は三重突然変異A96L/N97S/S98Gである、上記gLタンパク質または複合体形成性断片。

【請求項8】

組み換えサイトメガロウイルスgLタンパク質、またはその複合体形成性断片であって、該gLタンパク質または複合体形成性断片は、プロテアーゼ認識部位残基91～102(配列番号1に従ってナンバリングされる)に突然変異を含み、該突然変異は対照と比較した場合に該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させるものであり、該突然変異は三重突然変異A96I/N97D/S98Gである、上記gLタンパク質または複合体形成性断片。

20

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組み換えgLタンパク質または複合体形成性断片を含むサイトメガロウイルス複合体。

【請求項10】

gHまたはその五量体形成性断片、gLタンパク質またはその五量体形成性断片、pUL128またはその五量体形成性断片、pUL130またはその五量体形成性断片、およびpUL131またはその五量体形成性断片を含む五量体複合体である、請求項9に記載の複合体。

30

【請求項11】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組み換えサイトメガロウイルスgLタンパク質または複合体形成性断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸を含む、宿主細胞、好ましくは哺乳動物宿主細胞。

【請求項13】

gHまたはその五量体形成性断片、gLまたはその五量体形成性断片、pUL128またはその五量体形成性断片、pUL130またはその五量体形成性断片、およびpUL131またはその五量体形成性断片を含むサイトメガロウイルス五量体複合体をコードする1種以上のポリヌクレオチド配列を含む、請求項12に記載の宿主細胞。

40

【請求項14】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組み換えサイトメガロウイルスgLタンパク質または複合体形成性断片、または請求項9～10のいずれか1項に記載の複合体を含み、任意によりアジュバントを含む、免疫原性組成物。

【請求項15】

サイトメガロウイルスに対する免疫応答の誘導での使用のための、請求項14に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

50

**【技術分野】****【0001】**

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含むものであり、その全体を参照により本明細書に組み入れる。このASCIIコピーは、2016年1月14日に作製され、VN056504WO\_SL.txtの名称でサイズが26,466バイトである。

**【0002】**

本発明は、ワクチンに使用することができるサイトメガロウイルス(CMV)抗原の分野に属する。

**【背景技術】****【0003】**

10

サイトメガロウイルスは、ヘルペスウイルス科またはヘルペスウイルスとして知られるウイルスファミリーに属するウイルスの1つの属である。ヒトに感染するウイルス種は、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)またはヒトヘルペスウイルス5型(HHV-5)として一般的に知られている。ヘルペスウイルス科の中では、HCMVはベータヘルペスウイルス亜科(Betaherpesvirinae subfamily)に属し、この亜科は他の哺乳動物由来のサイトメガロウイルスも含む。

**【0004】**

HCMVは身体中で見出され得るが、HCMV感染は、高頻度で唾液腺に関連する。HCMVは、一般集団の大半での抗体の存在により示される通り、米国の成人のうちの50%~80%（全世界では40%）に感染している。HCMV感染は典型的には健康な人では気づかれないが、HIVに感染した人、臓器移植レシピエント、または新生児などの免疫力のない人にとっては生命を脅かすものであり得る。HCMVは発生中の胎児に最も高頻度に伝染するウイルスである。感染後、HCMVは、潜伏状態からの偶発的な再活性化を伴って、宿主の生涯にわたって身体内に潜伏し続ける能力を有する。この疾患の重症度および重要性を考えれば、有効なワクチンの取得は公衆衛生の最優先事項であると考えられる (Sung, H., et al., (2010) Expert review of vaccines 9, 1303-1314 ; Schleiss, Expert Opin Ther Pat. Apr 2010; 20(4): 597-602)。

20

**【0005】**

20種類超の種々のHCMVウイルス株のゲノムが配列決定されており、実験室株および臨床単離株の両方のものが含まれる。例えば、以下のHCMV株が配列決定されている：Towne株(GL239909366)、AD169株(GI:219879600)、Toledo株(GL290564358)およびMerlin株(GI: 155573956)。HCMVのAD169株、Towne株およびMerlin株は、American Type Culture Collectionから入手できる（それぞれ、ATCC VR538、ATCC VR977およびATCC VR1590）。

30

**【0006】**

サイトメガロウイルスは、未知の数の膜タンパク質複合体を含有する。ウイルスエンベロープ中の約30種類の公知の糖タンパク質のうち、gHおよびgLは、以下の数種類の異なる複合体中でのそれらの存在により、特に興味深いものとして浮上してきている：二量体gH/gL、三量体gH/gL/g0 (gC111複合体としても知られる)、および五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (pUL131は「pUL131A」、「pUL131a」、または「UL131A」とも称され；pUL128、pUL130、およびpUL131サブユニットは、ときにはUL128、UL130、UL131とも称される)。CMVは、gH/gLまたはおそらくgH/gL/g0を伴うプロセスで、形質膜での直接的融合により線維芽細胞に侵入すると考えられているが、エンドサイトーシスおよび低pH依存性融合により上皮細胞および内皮細胞に侵入するためには五量体複合体を用いると考えられている。gH/gLおよび/またはgH/gL/g0複合体が線維芽細胞感染に対しては十分である一方で、内皮細胞および上皮細胞に感染するためには五量体複合体が必要とされる。

40

**【0007】**

五量体複合体は、CMVワクチン接種の主要な標的であると考えられている。ウイルス遺伝子UL128、UL130およびUL131が、内皮細胞侵入に必要とされる (Hahn, Journal of Virology 2004; 78:10023-33)。線維芽細胞適合型非内皮細胞指向性株は、これらの3種類の遺伝子のうちの少なくとも1種類に突然変異を含む。例えば、Towne株はUL130遺伝子中に

50

フレームシフトを引き起こす2塩基対挿入を含み、AD169株はUL131遺伝子中に1塩基対挿入を含む。Towne株およびAD169株の両方が、内皮細胞での増殖に適合することができ、両方の例で、UL130またはUL131遺伝子中のフレームシフト突然変異が修復されていた。

【 0 0 0 8 】

米国特許第7704510号には、pUL131Aが上皮細胞指向性に必要であることが開示されている。米国特許第7704510号にはまた、pUL128およびpUL130がgH/gLとの複合体を形成し、これがビリオン中に取り込まれることも開示されている。この複合体は、内皮細胞および上皮細胞への感染には必要であるが、線維芽細胞への感染には必要でない。抗CD46抗体が、上皮細胞のHCMV感染を阻害することが見出された。

【 0 0 0 9 】

臨床試験で試験されたCMVワクチンには、Towne株ワクチン、Towne株-Toledo株キメラ、抗原としてgBを含むアルファウイルスレブリコン、gB/MF59ワクチン、GlaxoSmithKline社により製造されたgBワクチン、そしてgBおよびpp65を用いるDNAワクチンが含まれる。pp65は、CMVを標的とするCD8陽性応答の強力な誘導因子であるウイルスタンパク質である。これらのワクチンはすべて、内皮細胞/上皮細胞へのウイルス侵入を遮断する抗体の弱い誘導因子である (Adler, S. P. (2013), British Medical Bulletin, 107, 57-68. doi:10.1093/bmb/ldt023)。

【 0 0 1 0 】

CMVワクチンの前臨床動物試験には、UL131遺伝子において修復された不活性化AD169、野生型UL130遺伝子を用いるDNAワクチン、そしてpUL130および131由来のペプチドを用いるペプチドワクチンが含まれる (Sauer, A, et al., Vaccine 2011;29:2705-1, doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.036)。

【 0 0 1 1 】

CMV gB抗原は、内皮/上皮細胞への侵入を阻止する抗体の不十分な誘導因子と考えられる。フェーズII臨床試験において、gB/MF59ワクチンは、家に小さな子どものいる若い女性の一次感染の予防でわずかに50%有効であった (Pass, RF, et al., N Engl J Med 2009;360:1191-9)。

【 0 0 1 2 】

したがって、他の抗原標的、例えばgH/gL、gH/gL/gO、または五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131を含むCMVワクチンの開発ニーズがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 3 】

【特許文献1】米国特許第7704510号明細書

【非特許文献】

【 0 0 1 4 】

【非特許文献1】Sung, H., et al., (2010) Expert review of vaccines 9, 1303-1314

【非特許文献2】Schleiss, Expert Opin Ther Pat. Apr 2010; 20(4): 597-602

【非特許文献3】Hahn, Journal of Virology 2004; 78:10023-33

【非特許文献4】Adler, S. P. (2013), British Medical Bulletin, 107, 57-68.

【非特許文献5】Sauer, A, et al., Vaccine 2011;29:2705-1

【非特許文献6】Pass, RF, et al., N Engl J Med 2009;360:1191-9

【発明の概要】

【 0 0 1 5 】

本明細書中に開示および例示される通り、本発明者らは、サイトメガロウイルス抗原gLが哺乳動物宿主 (CHO細胞またはHEK細胞など) により組み換え的に発現され、そこから精製される場合に、顕著な割合のgLが切断されることを見い出した。インタクトなgLタンパク質の組み換え発現および精製を改善するために、gLのプロテアーゼ切断を減少させるための突然変異を導入した。突然変異体は、組み換え産生の間のプロテアーゼ切断に対する抵抗性の増加を示す。

10

20

30

40

50

## 【0016】

したがって、一態様では、本発明は、組み換えCMV gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を提供し、このとき、該gLタンパク質または断片はプロテアーゼ認識部位に突然変異を含み、該突然変異は、対照と比較した場合に、該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切斷を減少させる。プロテアーゼ認識部位とは、残基91～102（配列番号1に基づくナンバリング）を指す。好ましくは、突然変異は、プロテアーゼ認識部位のC末端部分の二次構造（ストランドコンホメーションを有すると考えられている）を変化させることなく、対照と比較した場合に、プロテアーゼ切斷を減少させる。

## 【0017】

本明細書中に記載されるgLタンパク質または断片を含むCMV複合体もまた、本明細書中に提供される。そのような複合体は、gH/gL複合体、gH/gL/g0複合体、および五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131であり得る。 10

## 【0018】

本明細書中に記載される通りの、CMV gLタンパク質およびその複合体形成性断片をコードする核酸もまた、本明細書中に提供される。核酸は、核酸ベースのワクチン（例えば、gLまたはその複合体形成性断片をコードする自己複製性RNA分子）として用いることができる。核酸はまた、gLタンパク質もしくは断片、またはgLタンパク質もしくは断片を含むCMV複合体の組み換え生成のために用いることもできる。

## 【0019】

本発明はまた、本明細書中に記載される核酸を含む宿主細胞も提供する。核酸は、gLタンパク質もしくはその複合体形成性断片、またはgLもしくはその複合体形成性断片を含むCMV複合体を発現するために、宿主細胞により用いられることができる。好ましくは、CMV複合体は、宿主細胞により分泌されてもよい。好ましい宿主細胞は、CHO細胞またはHEK293細胞などの哺乳動物宿主細胞である。 20

## 【0020】

本発明はまた、本明細書中に記載される宿主細胞を含む細胞培養物も提供する。好ましくは、培養物は少なくとも20リットルのサイズである。CMV五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131を発現させるために用いる場合、五量体複合体の収率は少なくとも0.1g/Lであることが好ましい。 30

## 【0021】

本発明はまた、免疫学的有効量の本明細書中に記載される通りのgLタンパク質もしくはその複合体形成性断片、またはgLタンパク質もしくは断片を含むCMV複合体を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む、CMVに対する免疫応答を誘導する方法も提供する。本発明はまた、細胞を、本明細書中に記載される通りのgLタンパク質もしくはその複合体形成性断片、またはgLタンパク質もしくは断片を含むCMV複合体と接触させるステップを含む、細胞へのサイトメガロウイルス（CMV）侵入を阻害する方法も提供する。

## 【0022】

CMVに対する免疫応答を誘導するための本明細書中に記載される組成物の使用、およびCMVに対する免疫応答を誘導するための医薬の製造での本明細書中に記載される組成物の使用もまた提供される。 40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0023】

【図1】図1Aは、プロテアーゼ認識部位付近の種々のヘルペスウイルス由来のgLタンパク質の部分配列アライメント（出現順に、それぞれ配列番号12～15）を示す。図1Bは、HSV-2およびVZV由来のgH/gL複合体の二次構造を示す。矢印は、切断部位を示す。

【図2】図2Aは、gL突然変異体の部分配列（出現順に、それぞれ配列番号15～26）を示す。図2Bは、抗gL抗体を用いるウエスタンプロットの結果を示す。図2Cは、抗His抗体を用いるウエスタンプロットの結果を示す。

【図3】非還元（NR）または還元煮沸（RB）タンパク質サンプルのいずれかを用いるWT五量体複合体（penta）およびLSG突然変異体五量体複合体（mutant penta）のウエスタンブ

50

ロット分析を示す図である。

【図4】非還元(NR)または還元煮沸(RB)タンパク質サンプルのいずれかを用いるWT五量体複合体(penta)およびIDG突然変異体五量体複合体(mutant penta)のウエスタンプロット分析を示す図である。

【図5】図5Aは、精製されたWT五量体複合体(penta)ならびにIDGおよびLSG突然変異体五量体複合体(mutant penta)を示す。図5Bは、MF59によりアジュvant化されたWT五量体複合体、LSG突然変異体五量体複合体、またはIDG突然変異体五量体複合体を用いて免疫化されたマウス血清の中和抗体力値(NAB)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

10

#### 1. 概要

本明細書中に開示および例示される通り、本発明者らは、サイトメガロウイルス抗原gLが哺乳動物宿主(CHO細胞またはHEK細胞など)により組み換えるに発現され、そこから精製される場合に、顕著な割合のgLが未知のプロテアーゼにより切断されること(「gLクリッピング」とも称される)を見い出した。実際には、gLクリッピングが、3種類の異なるCMV複合体: gH/gL複合体、gH/gL/gO複合体、および五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131の組み換え発現および精製中に起こったことが観察された。gLのクリッピングは、抗原生成の不均一性、およびgLに基づく抗原に対する中和部位の欠損の可能性を引き起した。

【0025】

20

ウエスタンプロットおよびN末端配列決定を用いて、本発明者らは、Merlin株由来のgLの残基97と残基98との間のペプチド結合に対する切断部位を特定およびマッピングした(配列番号1)(図1)。クリッピング問題を解決するために、HSV1、HSV2、およびVZVを含む数種類の関連するヘルペスウイルス由来のgLタンパク質の構造的特徴を調べた。HSV1、HSV2、およびVZV由来のgLタンパク質は、クリッピング問題を有しないようである。構造研究に基づいて、本発明者らは、組み換え発現されたgLのプロテアーゼ切断を減少させるために、アミノ酸残基91および102を含むプロテアーゼ認識部位に突然変異を導入できることを見い出した。

【0026】

例えば、本明細書中に例示される通り、A96L/N97S/S98G三重突然変異(「LSG」突然変異体)およびA96I/N97D/S98G三重突然変異(「IDG」突然変異体)が、gLクリッピング問題を実質的に除去した。2種類の他の突然変異体である、残基Asn97の欠失(Asp97)、およびA96S/N97S/S98T(「SST」突然変異体)もまた、gHおよびgLを共発現させた場合にgLクリッピングを劇的に減少させたことが示された。

30

【0027】

他のヘルペスウイルス由来のgLタンパク質の構造解析(図1)に基づくと、プロテアーゼ認識部位は、N末端からC末端に向かって、考えられる短いヘリックス( $^{91}\text{VTPE}^{94}$ )(配列番号27)、短いループ( $^{95}\text{AA}^{96}$ )、および保存されたストランド構造( $^{97}\text{NSVLLD}^{102}$ )(配列番号7)を探ることが明らかになる。切断は、ストランドのN末端で起こる(図1)。ストランドは、タンパク質中のシートの構造単位である。これは、典型的には3~10アミノ酸長であるポリペプチド鎖の伸びたストレッチであり、同じシート中の他のストランドと水素結合を形成する。図1に示される通り、このストランド(図1では4)が、gL由来のストランド5および6、ならびにgH由来のストランドと一緒にになって、シートを形成する。したがって、好ましい実施形態では、突然変異は、プロテアーゼ認識部位のC末端部分の二次構造を維持するはずである(すなわち、ストランドコンホメーションが保存され、例えば、4と他のストランドとの間の相互作用が実質的に維持される)。ストランド構造が維持されることにより、CMV複合体(五量体複合体など)のアセンブリに対するいかなる負の影響も低減することができる可能性があり、かつ、重要な免疫学的エピトープを保存することもできる可能性がある。例えば、プロテアーゼ認識部位由来の1箇所以上の残基を、別のヘルペスウイルス(HSV-1、HSV-2、また

40

50

はVZV)由来の対応する残基により置換することができる。図1に示される通り、配列分析および構造解析により、対応するHSV-1、HSV-2、またはVZV残基を用いるCMV残基の置換が、プロテアーゼ切断を減少させることができる一方で、ストランドコンホメーションを変化させないことが示される。任意により、ストランドのすぐ前の短いループ構造(図1の<sup>95</sup>AA<sup>96</sup>)もまた維持することができる。

【0028】

したがって、一態様では、本発明は、組み換えサイトメガロウイルス(CMV)gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を提供し、このとき、該gLタンパク質または断片は、プロテアーゼ認識部位での突然変異を含み、該突然変異は、対照と比較して該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させる。プロテアーゼ認識部位とは、残基91～102(配列番号1に基づくナンバリング)を指す。好ましくは、突然変異は、プロテアーゼ認識部位のC末端部分でのストランド構造を変化させることなく、対照と比較してプロテアーゼ切断を減少させる。

【0029】

本明細書中に記載されるgLタンパク質または断片を含むCMV複合体もまた、本明細書中に提供される。そのような複合体は、gH/gL複合体、gH/gL/gO複合体、および五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131であり得る。

【0030】

本明細書中に記載されるgLタンパク質または断片、および本明細書中に記載されるgLタンパク質または断片を含むCMV複合体の組み換え発現のための宿主細胞もまた、本明細書中に提供される。上記の通り、組み換え生成プロセス中に哺乳動物宿主細胞でgLクリッピングが観察された。したがって、本明細書中に開示される突然変異は、哺乳動物宿主(多数の生物製剤に対して好ましい宿主である)でのCMVワクチンの組み換え生成に特に好適である。例えば、HEK-293細胞およびCHO細胞は、生物学的製品の商業的製造のために長年用いられてきた。したがって、gL切断を減少させる突然変異を組み込むことにより、製造効率および収率を改善し、かつ混入物となる部分的に分解された生成物の形成を減少させることができる。

【0031】

2. 定義

サイトメガロウイルス(CMV)タンパク質(gLなど)の「複合体形成性断片」との用語は、別のCMVタンパク質との複合体を形成する能力を保持するタンパク質のいずれかの部分または一部分を意味する。そのような複合体としては、例えば、gH/gL二量体複合体、gH/gL/gO三量体複合体、またはgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体が挙げられる。CMVタンパク質(gLなど)の「五量体形成性断片」とは、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体を形成する能力を保持するタンパク質のいずれかの部分または一部分を意味する。

【0032】

本明細書中で用いる場合、「五量体複合体」または「五量体」とは、5種類の異なるサブユニット:gH、gL、pUL128、pUL130、およびpUL131を含むCMV複合体を意味する。本明細書中では、一般的にgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体(またはgH、gL、pUL128、pUL130、およびpUL131を含む五量体複合体)と称されるが、5種類のサブユニットのそれぞれが全長である必要はなく;この用語はまた、gH、gL、pUL128、pUL130、およびpUL131の複合体形成性断片により形成される五量体も包含する。

【0033】

「突然変異」との用語は、アミノ酸残基の付加、欠失、または置換を意味する。この用語はまた、天然に存在しないアミノ酸またはアミノ酸アナログをポリペプチド鎖へと導入する改変も含む。

【0034】

荷電アミノ酸残基としては、D、E、K、R、およびHが挙げられる。極性非荷電残基としては、S、T、C、Y、N、およびQが挙げられる。非極性または疎水性残基としては、A、V、

10

20

30

40

50

L、I、M、W、F、およびPが挙げられる。

【0035】

大きな側鎖を含むアミノ酸残基としては、W、F、M、Y、Q、R、E、H、およびKが挙げられる。側鎖を含まないか、または小さな側鎖を含むアミノ酸残基としては、G、A、V、S、T、C、D、およびNが挙げられる。

【0036】

側鎖が分岐鎖または環状置換基を含む場合、アミノ酸残基は「嵩高い側鎖」(bulky side chain)を含む。嵩高い側鎖を有するアミノ酸残基の例としては、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、1-メチルトリプトファン、-メチルチロシン、-メチルフェニルアラニン、-メチルロイシン、-メチルイソロイシン、-メチルヒスチジン、シクロペンチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、ナフチルアラニン等が挙げられる。

【0037】

本発明はいづれのCMV株由来のgLタンパク質にも適用可能であるが、その理解を早めるために、本明細書中でアミノ酸位置に言及する場合には、ナンバリングは、特に記載しない限り、Merlin株由来の配列番号1のgLタンパク質のアミノ酸配列に関して与えられる。しかしながら、本発明は、Merlin株に限定されるものではない。本発明の教示を用いて、いづれの他のCMV株のgLタンパク質中の同等のアミノ酸位置でも、すぐに入手可能でありかつ周知のアライメントアルゴリズム(例えば、BLAST(デフォルト設定を用いる)；ClustalW2(デフォルト設定を用いる)；またはCorpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22):10881-10890に開示されているアルゴリズム(デフォルトパラメータを用いる))を用いてアミノ酸配列をアライメントすることにより、当業者が決定することができる。つまり、「CMV gLタンパク質」に言及する場合には、いづれかのウイルス株(Merlin株に加えて)由来のCMV gLタンパク質であると理解されるべきである。実際の番号は、実際の配列アライメントに依存して、他のウイルス株由来のgLタンパク質に関して調整しなければならない場合がある。

【0038】

例えば、「プロテアーゼ認識部位」は、アミノ酸残基91～102からなるもの、特に、残基91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101および102からなるものと定義される。これらの番号は、配列番号1のgLタンパク質のアミノ酸配列に関する。他のCMV株のgLタンパク質、あるいは他のgL突然変異体もしくは変異体、またはgLの断片由来のプロテアーゼ認識部位は、問い合わせ配列を配列番号1とアライメントして、配列番号1の91～102にマッチする残基を特定する標準的配列アライメントプログラムを用いて究明することができる。

【0039】

具体的なアミノ酸残基位置もまた、配列番号1に従ってナンバリングされる。例えば、「S98」とは、配列番号1の98位(Sである)、ならびに配列を配列番号1とアライメントした場合に配列番号1のS98とマッチする、他のgL配列(または変異体もしくは断片)由来の対応する残基を意味する。便宜上、配列番号1のS98に対応するgL配列(または変異体もしくは断片)由来のいづれの残基も、その残基の実際の位置が98であってもなくてもよく、かつ実際の残基がSであってもなくてもよいが、S98と称される。例えば、保存的置換(例えば、T)は配列番号1のS98とアライメントすることができる。保存的置換は、典型的には、BLAST2により「正」または「+」として特定される。

【0040】

同様に、突然変異もまた、配列番号1のナンバリングに従って特定される。例えば、S98Gとは、配列番号1のS98に対応する、gL配列(または変異体もしくは断片)由来のいづれかの残基が、Gに突然変異されていることを意味する。

【0041】

問い合わせアミノ酸配列を参照配列とアライメントすることにより、残基の位置が指定された位置とマッチする場合に、問い合わせ配列のアミノ酸残基は参照配列の指定された

位置（例えば、配列番号1のS98）に「対応する」。そのようなアライメントは、手動で、またはClustalW2もしくは「BLAST 2 Sequences」（デフォルトパラメータを用いる）などの周知の配列アライメントプログラムを用いることにより、行なうことができる。

【0042】

「 」とは、少なくとも10アミノ酸残基長であり、かつ配列番号5に対して少なくとも50%同一である配列を意味する。図1に示される通り、Merlin株由来の野生型gLに対して、HSV1、HSV2、およびVZVと比較して、CMV gLに固有の17残基断片が特定されている（「 1 」と示される）。好ましくは、挿入領域は、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、もしくは少なくとも20残基を含み、かつ/または配列番号5に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは100%同一である。一部の実施形態では、挿入領域は、配列番号5の1個～8個のアミノ酸残基が保存的に置換されている配列を含む。

【0043】

「保存的に置換されている」とは、残基が、別の生物学的に類似する残基に置き換えられていることを意味する。例としては、類似の特性を有するアミノ酸残基、例えば、小型アミノ酸、酸性アミノ酸、極性アミノ酸、塩基性アミノ酸、疎水性アミノ酸および芳香族アミノ酸を用いるアミノ酸残基の置換が挙げられる。保存的アミノ酸置換の例としては、以下の表1中のもの、および類似の特性を有する非天然アミノ酸による元の残基の類似置換が挙げられる。

【表1】

元の残基	極めて高度に保存された置換	高度に保存された置換 (Blosum90 Matrixから)	保存された置換 (Blosum65 Matrixから)
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

【0044】

特に記載しない限り、2種類の配列の同一性%は、2種類の配列のうちの短い方の全長にわたって決定される。

【0045】

3. 改変型CMV gLタンパク質および複合体

A. 改変型gLタンパク質

一態様では、本発明は、残基N97と残基S98との間のペプチド結合でのクリッピング（切断）を減少させる、改変型CMV gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を提供する。

【0046】

10

20

30

40

50

ヒトCMV糖タンパク質L(gL)は、UL115遺伝子によりコードされる。gLはウイルス複製にとって必須であると考えられ、gLの公知の機能的特性のすべてが、gHとのその二量体化に直接的に関連する。gH/gL複合体は、宿主細胞へのウイルス侵入をもたらすウイルス膜と形質膜との融合に必要とされる。HCMVのMerlin株由来のgL(GI:39842115、配列番号1)およびHCMVのTowne株由来のgL(GI:239909463、配列番号2)は、278アミノ酸長であると報告されている。HCMVのAD169株由来のgL(GI:2506510、配列番号3)は、278アミノ酸長であり、そのN末端のシグナル配列(アミノ酸残基1~35)、2箇所のN-グリコシル化部位(残基74および114)を含み、TMドメインを欠損していることが報告されている(Rigoutsos, I, et al., *Journal of Virology* 77 (2003): 4326-44)。配列番号1のN末端シグナル配列は、アミノ酸残基1~30を含むと予測される。配列番号2は、配列番号1と98%のアミノ酸配列同一性を共有する。22~39種類の臨床単離株、ならびに実験室株AD169株、Towne株およびToledo株由来の全長gL遺伝子の配列決定により、単離株同士でのアミノ酸配列中の2%未満の変動が明らかになった(Rasmussen, L, et al., *Journal of Virology* 76 (2002): 10841-10888)。

#### 【0047】

典型的には、gLタンパク質のN末端シグナル配列は、宿主細胞のシグナルペプチダーゼにより切断されて、成熟gLタンパク質を生じる。本発明のHCMV膜複合体中のgLタンパク質は、N末端シグナル配列を欠損している場合がある。N末端シグナル配列を欠損したgLタンパク質の一例は配列番号4であり、これは、N末端シグナル配列を欠損し、かつ配列番号1のアミノ酸残基31~278からなる。

#### 【0048】

gLはウイルス複製にとって必須であると考えられているが、一方で、gLの公知の機能的特性のすべてがgHとのその二量体化に直接的に関連する。

#### 【0049】

本発明のgLタンパク質は、配列番号1に対する様々な程度の同一性を有するgL変異体、例えば、配列番号1、配列番号2、もしくは配列番号3に示される配列に対して、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一なgL変異体であり得る。本発明のgLタンパク質は、配列番号4に対する様々な程度の同一性を有することができ、例えば、配列番号4に示される配列に対して、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。一部の実施形態では、gL変異体タンパク質は:(i)二量体複合体gH/gLの一部分を形成し；(ii)三量体gH/gL/gO複合体の一部分を形成し；(iii)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131複合体の一部分を形成し；(iv)配列番号1、配列番号2、配列番号3、もしくは配列番号4に由来する少なくとも1箇所のエピトープを含み；かつ/または(v) CMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで生起することができる。

#### 【0050】

本明細書中に記載されるgLタンパク質の複合体形成性断片もまた、本発明に包含される。gLの複合体形成性断片は、別のCMVタンパク質との複合体を形成する能力を保持するgLタンパク質のいずれかの部分または一部分であり得る。一部の実施形態では、gLの複合体形成性断片は、二量体複合体gH/gLの一部分を形成する。一部の実施形態では、gLの複合体形成性断片は、三量体gH/gL/gO複合体の一部分を形成する。一部の実施形態では、gLの複合体形成性断片は、五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131複合体の一部分を形成する。gLの複合体形成性断片は、共免疫沈降アッセイ、架橋、または蛍光染色による共局在などの当技術分野で公知の標準的なアッセイによって取得または決定することができる。一部の実施形態では、gLの複合体形成性断片もまた、(i)配列番号1、配列番号2、配列番号3、もしくは配列番号4に由来する少なくとも1箇所のエピトープを含み；かつ/または(ii) CMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで生起することができる。

#### 【0051】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるgLタンパク質、またはその複合体形成性断片は、プロテアーゼ認識部位(残基91~102)に突然変異を含み、該突然変異は、対照

10

20

30

40

50

と比較した場合に、該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させる。

#### 【0052】

様々な対照を用いることができる。実質的に同じ条件下での対応する野生型gLのプロテアーゼ切断（残基97と残基98との間のペプチド結合での）のレベルを、対照として用いることができる。あるいは、対照は、予め測定されたレベルまたは閾値レベル（例えば、全gLタンパク質のうちの20%、25%、または30%）であり得る。パーセンテージはモルパーセンテージを指す。

#### 【0053】

例えば、突然変異は、その宿主細胞に対して標準的な培養条件下で哺乳動物宿主細胞中で組み換えた場合に、野生型のものと比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%などの、残基97と残基98との間のペプチド結合でのプロテアーゼ切断の減少をもたらす。

10

#### 【0054】

あるいは、またはそれに加えて、プロテアーゼ切断は、その宿主細胞に対して標準的な培養条件下で哺乳動物宿主細胞中に組み換えた場合に、野生型のものと比較して、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも75倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍または少なくとも100倍減少する。

20

#### 【0055】

あるいは、またはそれに加えて、突然変異は、その宿主細胞に対して標準的な培養条件下で哺乳動物宿主細胞中に組み換えた場合に、gL分子、またはその複合体形成性断片のうちの約35%以下が、残基97と残基98との間のペプチド結合で切断されるものであり得る。例えば、突然変異により、その宿主細胞に対して標準的な培養条件下で哺乳動物宿主細胞中に組み換えた場合に、gL分子、またはその複合体形成性断片のうちの約35%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、または約1%以下が、残基97と残基98との間のペプチド結合で切断されることをもたらし得る。パーセンテージはモルパーセンテージを指す。

30

#### 【0056】

一般的に用いられる哺乳動物宿主細胞に対する標準的な培養条件は、公知である。例えば、CHO細胞に対して、標準的な培養条件は、10%以下のCO<sub>2</sub>を用いてpH7.0の培地中の3.6.5の温度であり得る。1つの具体例では、以下の実施例に示される通り、Expi293細胞をトランスフェクションして、37、8%CO<sub>2</sub>にてpH7.0で3日間、五量体複合体（gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131）を発現させ、細胞培養物の上清をアフィニティー精製し、かつウエスタンプロットを用いて分析した。

#### 【0057】

突然変異は、アミノ酸残基の付加、欠失、置換、またはそれらの組み合わせを含む。好ましくは、突然変異は、プロテアーゼ認識部位のC末端部分の二次構造を実質的に保存する。特に、図1に示される通り、該プロテアーゼ認識部位のC末端部分の残基はストランドを形成し、これは他のストランドと相互作用してシートを形成すると考えられている。好ましくは、該突然変異は、このストランドコンホメーションを維持する。二次構造を維持することの考えられる利点としては、例えば、gL含有複合体（例えば、gH/gL、gH/gL/gO、またはgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131）のアセンブリが促進されること、および主要な免疫原性エピトープが維持されることが挙げられる。任意により、ストランドのすぐ前の短いループ構造もまた保存される。

40

#### 【0058】

多数のコンピュータプログラムおよびアルゴリズムが、二次構造を予測するために利用可能であり、そのようなものとしては、I-TASSER、HHpred、RaptorX、MODELLER、SWISS-M

50

ODEL、Robetta Beta、SPARKSx、PEP-FOLD、PhyreおよびPhyre2、RAPTOR、QUARK、Abalone、Folditなどが挙げられる。突然変異がプロテアーゼ認識部位の二次構造を変化させるか否かは、これらのツールを用いて解析することができる。

【0059】

一部の実施形態では、突然変異は、1個以上のアミノ酸残基の付加を含む。例えば、突然変異は、2~5個のアミノ酸残基の付加を含むことができる。一部の実施形態では、2~5個のアミノ酸残基は、極性残基および非極性残基の両方を含む。

【0060】

一部の実施形態では、突然変異は、残基N97と残基S98との間に1個以上の残基の付加を含む。実施例に示される通り、N97とS98との間のペプチド結合がプロテアーゼにより切断され；したがって、N97とS98との間に1個以上の追加の残基を導入することにより、より切斷抵抗性である突然変異体gL（または断片）を生じさせることができる。例示的な実施形態では、突然変異は、残基97と残基98との間にF、Q、またはそれらの組み合わせの付加を含む。例示的な実施形態では、突然変異は、残基97と残基98との間にFQまたはQFの付加を含む。

10

【0061】

一部の実施形態では、突然変異は、1~3個のアミノ酸残基の欠失などの、1個以上のアミノ酸残基の欠失を含む。一部の実施形態では、突然変異は、V91、T92、P93、E94、A95、A96、N97、S98、V99、L100、L101、D102、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個の残基の欠失を含む。一部の実施形態では、突然変異は、E94、A95、A96、N97、S98、V99、L100、L101、D102およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個の残基の欠失を含む。例示的な実施形態では、突然変異は、A96、N97、S98、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1個の残基の欠失を含む。例示的な実施形態では、突然変異は、N97の欠失を含む。

20

【0062】

一部の実施形態では、突然変異は、別のヘルペスウイルスのgLタンパク質由来の対応する残基を用いて残基を置換することを含む。ヘルペスウイルス科（Herpesviridae）には、例えば、1型および2型単純ヘルペスウイルス（HSV-1またはHHV-1、HSV-2またはHHV-2）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZVまたはHHV-3）、エプスタイン・バーウィルス（EBVまたはHHV-4）、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）、ヒトヘルペスウイルス7型（HHV-7）、およびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（HHV-8）が含まれる。一部の実施形態では、別のヘルペスウイルス由来のgLタンパク質は、HSV1、HSV2、VZV、EBV、PrV、またはウシヘルペスウイルス5型由来のgLタンパク質である。

30

【0063】

別のヘルペスウイルス由来の対応する残基を用いてCMV残基を置換することの1つの考えられる利点は、プロテアーゼ認識部位の二次構造がおそらく保存されるであろうということである。図1に示される通り、HSV-1、HSV-2およびVZVはすべて、同じ二次構造を実質的に共有し、特に、プロテアーゼ認識部位のC末端部分は、すべてがストランド構造を採る。

40

【0064】

複数の置換が行なわれる場合、それらの置換が同じヘルペスウイルスに由来する必要はない。例えば、第1のCMV残基をHSV-1由来の対応する残基で置換し、第2の残基をHSV-2由来の対応する残基で置換し、かつ/または第3のCMV残基をVZV由来の対応する残基で置換することなどができる。したがって、突然変異は、第1の他のヘルペスウイルスgLタンパク質由来の対応する残基を用いて置換された第1のアミノ酸残基、および第2の他のヘルペスウイルスgLタンパク質由来の対応する残基を用いて置換された第2のアミノ酸残基、および/または第3の他のヘルペスウイルスgLタンパク質由来の対応する残基を用いて置換された第3のアミノ酸残基などを含むことができる。

【0065】

一部の実施形態では、突然変異は、Aを用いてE94を置換することを含む。

50

## 【0066】

一部の実施形態では、突然変異は、R、L、またはNを用いてA95を置換することを含む。

## 【0067】

一部の実施形態では、突然変異は、非極性残基を用いて、またはW、F、もしくはMなどの大きな側鎖を含む残基を用いてA96を置換することを含む。一部の実施形態では、突然変異は、I、L、またはSを用いてA96を置換することを含む。

## 【0068】

一部の実施形態では、突然変異は、極性残基または非極性残基を用いてN97を置換することを含む。極性残基は、小さな側鎖または大きな側鎖を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、S、D、E、A、またはYを用いてN97を置換することを含む。 10

## 【0069】

一部の実施形態では、突然変異は、G、A、V、S、T、C、D、またはNなどの小さな側鎖を有するアミノ酸残基を用いてS98を置換することを含む。一部の実施形態では、突然変異は、G、T、V、またはIを用いてS98を置換することを含む。

## 【0070】

一部の実施形態では、突然変異は、Iを含むアミノ酸残基を用いてV99を置換することを含む。

## 【0071】

一部の実施形態では、突然変異は、FまたはVを含むアミノ酸残基を用いてL100を置換することを含む。 20

## 【0072】

一部の実施形態では、突然変異は、Vを含むアミノ酸残基を用いてL101を置換することを含む。

## 【0073】

本明細書中に記載される付加、欠失、および置換は、単独で、またはいずれかの組み合わせで用いることができる。例えば、gL突然変異体は、1つの位置での付加、第2の位置での欠失、および第3の位置での置換を含むことができる。

## 【0074】

一部の実施形態では、gLタンパク質または断片は、プロテアーゼ認識部位のN末端に挿入領域を含む。図1に示される通り、HSV-1、HSV-2およびVZV由来のgLタンパク質と比較した場合、CMV gLタンパク質は追加の17残基挿入を含む。実施例に示される通り、この17残基の挿入が部分的または完全に欠失した場合、gLタンパク質はよりプロテアーゼ切断され易くなった。したがって、17残基挿入は、プロテアーゼ認識部位に対するプロテアーゼのアクセスを少なくとも部分的に遮断するようである。したがって、プロテアーゼ認識部位のN末端に挿入領域を維持することが望ましい場合がある。「挿入領域」は、少なくとも10アミノ酸残基長であるべきであり、配列番号5(HSV1、HSV2およびVZVと比較した場合に、CMV gLに固有の生来の17残基断片である)に対して少なくとも50%同一である。 30

## 【0075】

一部の実施形態では、突然変異は、プロテアーゼ切断を減少させると考えられる、天然に存在しないアミノ酸残基を導入することを含む。 40

## 【0076】

一部の実施形態では、突然変異は、プロテアーゼ認識部位に対するプロテアーゼのアクセスを少なくとも部分的に遮断し、かつプロテアーゼ切断を減少させると考えられる嵩高い側鎖を含むアミノ酸残基を導入することを含む。

## 【0077】

### B. CMVタンパク質複合体

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される改変型CMV gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を含む複合体を提供する。そのような複合体としては、例えば、(i)本明細書中に記載される改変型gLタンパク質、またはその複合体形成性断片、およびCMVタンパク質gHまたはその複合体形成性断片を含む単離された二量体複合体；(ii)本明細書

中に記載される改変型gLタンパク質、またはその複合体形成性断片、およびCMVタンパク質gHまたはその複合体形成性断片、およびg0またはその複合体形成性断片を含む単離された三量体複合体；(iii)本明細書中に記載される改変型gLタンパク質、またはその複合体形成性断片、およびCMVタンパク質pUL128またはその複合体形成性断片、pUL130またはその複合体形成性断片、pUL131またはその複合体形成性断片、およびgHまたはその複合体形成性断片を含む単離された五量体複合体が挙げられる。構成要素としてgL(またはその複合体形成性断片)を含むいすれかの他の複合体もまた挙げられる。

#### 【0078】

gH、gL、g0、pUL128、pUL130、pUL131を糖タンパク質と称する場合があるが、この名称は、これらのタンパク質が本発明と共に用いられる場合にグリコシル化されていなければならぬことを意味するものと解釈するべきではない。それどころか、本発明の一部の実施形態では、ポリペプチドのうちの1種以上がグリコシル化されていない。しかしながら、通常は、本発明の複合体中の1種以上(またはすべて)のポリペプチドがグリコシル化されている。一部の実施形態では、本発明の複合体中の1種以上(またはすべて)のポリペプチドが、突然変異型哺乳動物細胞などの培養細胞のグリコシル化突然変異体によりグリコシル化される。そのようなグリコシル化突然変異体は、野生型のグリコシル化パターンとは異なるポリペプチドグリコシル化パターンを生じ、すなわち、得られるポリペプチドグライコフォーム(glycoform)が野生型グライコフォームとは異なる。

#### 【0079】

一部の実施形態では、gL(またはその複合体形成性断片)、またはgL(またはその複合体形成性断片)を含む複合体のグリコシル化パターンは哺乳動物グリコシル化パターンであり；かつ/または昆虫細胞のグリコシル化パターンを有しない。一部の実施形態では、複合体のタンパク質のうちの1種以上が、最後から2番目のガラクトースおよび末端シアル酸を含む複合型N結合側鎖を含む。

#### 【0080】

タンパク質複合体(五量体複合体など)の組み換え生成に関して、複合体が可溶性であることが望ましい場合がある。配列分析に基づけば、CMV gHタンパク質は膜貫通(TM)ドメインを含むが、gL、g0、pUL128、pUL130、およびpUL131は膜貫通ドメインを有しない。したがって、可溶性複合体(例えば、五量体複合体)を生成させるために、五量体複合体のgHサブユニットがTMドメインを欠損していることができる。例えば、gHのN末端シグナル配列およびエクトドメインを含むがTMドメインを含まないgH断片を用いることができる。

#### 【0081】

CMVのTowne株由来のgHは配列番号6(GI:138314、742アミノ酸残基)として示されている。Towne株由来のgHは以下の部分を有することが特徴とされている：(i)6個のN-グリコシル化部位(残基55、62、67、192、641および700)；(ii)そのN末端の疎水性シグナル配列(アミノ酸残基1~23)；(iii)細胞外腔へと細胞から突き出しているエクトドメイン(残基24~717)；(iv)疎水性膜貫通(TM)ドメイン(残基718~736)；および(v)C末端細胞質ドメイン(残基737~742)。他のウイルス株由来のgHタンパク質、または他のgH変異体および断片のTMドメインは、配列アライメントにより特定することができる。

#### 【0082】

生成の利便性のために、組み換え的に生成されたCMV複合体(五量体複合体など)を、宿主細胞から培養培地へと分泌させることができる。

#### 【0083】

一部の実施形態では、該五量体複合体は、宿主細胞から分泌される。5種類すべてのサブユニットgH、gL、pUL128、pUL131、およびpUL131の存在が、ゴルジ装置へと運び出される前の、ERでの五量体複合体のアセンブリに十分であることが報告されている。Ryckman et al., J Virol. Jan 2008; 82(1): 60-70を参照されたい。あるいは、または加えて、適切なシグナルペプチドを、5種類のサブユニットのうちの1種以上で用いることができる(例えば、分泌シグナルを有する融合タンパク質を作製することにより)。分泌タンパク

10

20

30

40

50

質を生成するためのシグナル配列（および発現カセット）は、当技術分野で公知である。一般的に、リーダーペプチドは、5~30アミノ酸長であり、かつ典型的には新規合成されるタンパク質のN末端に存在する。シグナルペプチドのコアは、一般的に、一本鎖ヘリックス (single alpha-helix) を形成する傾向を有する疎水性アミノ酸の長い伸長部を含む。加えて、多くのシグナルペプチドは、正に荷電したアミノ酸の短いストレッチから始まり、これが、移動中のポリペプチドの正しいトポロジーを強化することを補助する場合がある。シグナルペプチドの終端には、典型的には、シグナルペプチダーゼにより認識および切断されるアミノ酸のストレッチがある。シグナルペプチダーゼは、転移（トランスロケーション）中または転移の完了後に切断する場合があり、それにより遊離のシグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生じさせる。

10

#### 【0084】

##### C. 改変型gLタンパク質および複合体をコードする核酸

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される改変型gLタンパク質、またはその複合体形成性断片をコードする配列を含む核酸を提供する。核酸はDNAまたはRNAであり得る。

#### 【0085】

一部の実施形態では、核酸はDNAである。組み換えタンパク質の発現および精製のためのDNAに基づく発現系は、周知である。例えば、発現系は、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、または昆虫宿主細胞などの宿主細胞中での改変型gLまたはgL断片の発現を調節する発現制御配列に機能的に連結されている、本明細書中に記載される改変型gLまたはgL断片をコードするヌクレオチド配列を含むベクターであり得る。発現制御配列は、例えば、プロモーター、エンハンサー、リボソーム侵入部位、またはポリアデニル化配列であり得る。本発明での使用に関して検討される他の発現制御配列には、イントロンおよび3'UTR配列が含まれる。

20

#### 【0086】

組み換えた改変型gLタンパク質もしくはその断片、または改変型gLタンパク質もしくはその断片を含む複合体は、国際公開第2014/005959号に開示されている精製法などの本明細書中に記載される方法、または当技術分野で公知の他の方法を用いて、精製することができる。

#### 【0087】

30

一部の実施形態では、核酸分子は、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、またはアルファウイルス由来のベクターである。一部の実施形態では、核酸分子は複製欠損ウイルスベクターである。

#### 【0088】

一部の実施形態では、核酸はRNAである。一部の実施形態では、核酸は、アルファウイルス由来RNAレプリコンなどの自己複製性RNA分子である。

#### 【0089】

自己複製性RNA分子は当技術分野で周知であり、例えば、アルファウイルス由来の複製エレメントを用いて、構造ウイルスタンパク質を所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列で置換することにより、作製することができる。自己複製性RNA分子は、典型的には、細胞への送達後に直接翻訳できるプラス鎖分子であり、この翻訳がRNA依存的RNAポリメラーゼを生じ、続いてこれが送達されたRNAからアンチセンス転写産物およびセンス転写産物の両方を生成させる。つまり、送達されたRNAは、複数の娘RNAの生成を引き起こす。これらの娘RNA、ならびに同一線上のサブゲノム転写産物は、それら自体を翻訳して、コードされた抗原のin situ発現をもたらすことができるか、または転写されて、翻訳により抗原のin situ発現をもたらす送達されたRNAと同じ意味を有するさらなる転写産物を提供することができる。この配列の転写の全体的な結果は、導入されたレプリコンRNAの数の大幅な増幅であり、したがって、コードされる抗原は細胞の主要なポリペプチド生成物になる。自己複製性RNAをトランスフェクトされた細胞は、アポトーシス細胞死を経験する前に、一時的に抗原を生成する。この細胞死は、必須の二本鎖(ds)RNA中間体の

40

50

結果であると考えられ、この中間体はまた、樹状細胞を過剰活性化することが示されている。つまり、自己複製性RNAの強化された免疫原性は、宿主細胞のRNAウイルス感染を模倣する炎症性dsRNAの生成の結果であり得る。

#### 【0090】

この様式での自己複製を達成するための1つの好適な系は、アルファウイルスに基づくレプリコンを用いることである。アルファウイルスは、遺伝学的、構造的、および血清学的に関連するトガウイルス科の節足動物媒介性ウイルスのセットを含む。26種類の公知のウイルスおよびウイルス亜種がアルファウイルス属に分類されており、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、およびベネズエラウマ脳炎ウイルスが含まれる。そうすると、本発明の自己複製性RNAは、セムリキ森林ウイルス (SFV)、シンドビスウイルス (SIN)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE)、ロスリバーウイルス (RRV)、東部ウマ脳炎ウイルス、またはアルファウイルスファミリーに属する他のウイルスに由来するRNAレプリカーゼを取り込むことができる。

#### 【0091】

アルファウイルスに基づく「レプリコン」発現ベクターを、本発明で用いることができる。レプリコンベクターは、DNA、RNA、および組み換えレプリコン粒子をはじめとする数種類の形式で利用できる。そのようなレプリコンベクターは、例えば、シンドビスウイルス (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 )、セムリキ森林ウイルス (Liljestrom (1991) *Bio/Technology* 9:1356-1361 ; Berglund et al. (1998) *Nat. Biotech.* 16:562-565 )、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス (Pushko et al. (1997) *Virology* 239:389-401 )を含むアルファウイルスから誘導されてきた。アルファウイルス由来レプリコンは、一般的に、全体的な特性（例えば、構造、複製）が非常に似通っており、個々のアルファウイルスは、固有の、いくつかの特定の特性（例えば、受容体結合性、インターフェロン感受性、および疾患プロフィール）を示す場合がある。したがって、異なるウイルスファミリーから作製されたキメラ型アルファウイルスレプリコンもまた有用であり得る。

#### 【0092】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるCMV gLタンパク質（またはその断片）は、アルファウイルスレプリコン粒子 (VRP) を用いて送達される。「アルファウイルスレプリコン粒子」 (VRP) または「レプリコン粒子」は、アルファウイルス構造タンパク質を用いてパッケージングされたアルファウイルスレプリコンである。

#### 【0093】

アルファウイルスに基づくRNAレプリコンの使用は当技術分野で公知であり、例えば、国際公開第2013/006837号、段落[0155]～[0179]を参照されたい。RNAレプリコンは、レプリコン中でコードされるタンパク質の精製に対する必要性なしに、投与することができる。

#### 【0094】

一部の実施形態では、核酸分子は、アデノウイルスに由来するベクターの一部分である。アデノウイルスゲノムは、各鎖の5'末端に共有結合した55kDaの末端タンパク質を有する約36000塩基対の線状二本鎖DNA分子である。アデノウイルス（「Ad」）DNAは、約100塩基対の同一の逆方向末端反復（「ITR」）を含み、実際の長さは血清型によって異なる。ウイルスの複製起点はゲノムの本当の終端にあるITR内に位置する。本発明と共に用いるためのアデノウイルスベクターは、様々なアデノウイルス血清型のうちのいずれかに由来することができ、血清型としては、限定するものではないが、血清型2、5、12、40、および41などのアデノウイルスの40種類を超える血清型株のうちのいずれかが挙げられる。

#### 【0095】

一部の実施形態では、核酸分子は、アデノ随伴ウイルス (AAV) に由来するベクターの一部分である。AAVゲノムは、約4681個のヌクレオチドを含む線状一本鎖DNA分子である。AAVゲノムは、一般的に、両端に逆方向末端反復 (ITR) が連結された内部非反復ゲノムを

10

20

30

40

50

含む。ITRは、約145塩基対 (bp) の長さである。ITRは、DNA複製起点として機能すること、およびウイルスゲノムに対するパッケージングシグナルとして機能することをはじめとする、複数の機能を有する。AAVはヘルパー依存的ウイルスであり；すなわち、自然界でAAVビリオンを形成させるためには、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス）との共感染を必要とする。ヘルパーウイルスとの共感染がない場合は、AAVは潜伏状態を構築し、このとき、ウイルスゲノムが宿主細胞染色体に挿入されるが、感染性ビリオンは生成されない。ヘルパーウイルスによる後続の感染がインテグレートされたゲノムをレスキューし、そのゲノムを感染性AAVビリオンへと複製およびパッケージングすることを可能にする。AAVは種々の生物種由来の細胞に感染することができるが、ヘルパーウイルスは宿主細胞と同じ生物種のものでなければならない。つまり、例えば、ヒトAAVは、イヌアデノウイルスと共感染したイヌ細胞では複製するであろう。

#### 【0096】

一部の実施形態では、核酸分子はレトロウイルスに由来するベクターの一部分である。当技術分野で公知の技術を用いて、選択された遺伝子をベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。続いて、組み換えウイルスを単離し、*in vivo*または*ex vivo*で被験体の細胞に送達することができる。多数のレトロウイルス系が記載されている。例えば、米国特許第5,219,740号；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を参照されたい。

#### 【0097】

本発明はまた、本明細書中に開示される核酸分子を含む宿主細胞も提供する。核酸分子を担持するために、および/または組み換えタンパク質を発現するために好適な宿主細胞、ならびに好適な宿主細胞へと核酸を導入する方法は、当技術分野で公知である。

#### 【0098】

##### 4. gLタンパク質および複合体の組み換え生成

本発明はまた、上記の通りのgLタンパク質およびその断片をコードする核酸を含む宿主細胞も提供する。

#### 【0099】

好ましくは、宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト、非ヒト靈長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、およびげっ歯類（例えば、ハムスター））、鳥類細胞（例えば、ニワトリ、アヒル、およびガチョウ）である。好適な哺乳動物細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚性腎臓細胞（HEK-293細胞、典型的にはせん断型5型アデノウイルスDNAを用いて形質転換されている）、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（ECACC受託番号第96022940号）、Hep G2細胞、MRC-5 (ATCC CCL-171)、WI-38 (ATCC CCL-75)、胎児アカゲザル肺細胞 (ATCC CL-160)、Madin-Darbyウシ腎臓（「MDBK」）細胞、Madin-Darbyイヌ腎臓（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK (NBL2)、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞（BHK21-Fなど）、HKCC細胞などが挙げられる。

#### 【0100】

一部の実施形態では、宿主細胞はHEK-293細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞はCHO細胞である。一部の実施形態では、本明細書中に記載されるgLタンパク質（またはその断片）をコードするポリヌクレオチドはCHO細胞のゲノムDNAへとインテグレートされる。CMVタンパク質複合体の組み換え生成に関して、複合体の他のサブユニットをコードするヌクレオチド配列もまた、CHO細胞のゲノムDNAへとインテグレートされているべきである。

#### 【0101】

したがって、一部の実施形態では、宿主細胞はCMV五量体複合体をコードする1種以上の

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド配列を含み、該五量体複合体は、以下の構成要素：gHまたはその五量体形成性断片、gLまたはその五量体形成性断片、pUL128またはその五量体形成性断片、pUL130またはその五量体形成性断片、およびpUL131またはその五量体形成性断片を含む。一部の実施形態では、CMV五量体複合体をコードする1種以上のポリヌクレオチド配列は、該宿主細胞のゲノムDNAへとインテグレートされている。一部の実施形態では、宿主細胞は、好適な条件下で培養された場合に、該CMV五量体複合体（好ましくは可溶性であり、かつ/または宿主細胞から分泌される）を発現する。

【 0 1 0 2 】

European Collection of Cell Cultures ( ECACC ) から入手可能な例示的CHO細胞株を表2に列記する。表2に列記されたいずれのCHO細胞も用いることができる。

【表2】

細胞株名称	キーワード
CHO	チャイニーズハムスター卵巣
CHO (PROTEIN FREE)	チャイニーズハムスター卵巣
CHO-CHRM1	ヒトコリン作動性受容体ムスカリノン性M1、CHRM1、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-CHRM2	ヒトコリン作動性受容体ムスカリノン性M2、CHRM2、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-CHRM5	ヒトコリン作動性受容体ムスカリノン性M5、CHRM5、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-CNR1	ヒトカンナビノイド受容体 I、CNR1 Gene ID 1268、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-FFAR2	ヒト遊離脂肪酸受容体 2、FFAR2、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-GPR120	ヒト受容体 GPR120 (オーファン受容体)、GPR120、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣
CHO-K1-AC-free	チャイニーズハムスター卵巣、無血清
CHO-K1/SF	チャイニーズハムスター卵巣 (MEM適合)
CHO-NPY1R	ヒトニューロペプチドY受容体、NPY1R、Gene ID 4886、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-OPRL1	ヒトアヘン剤受容体様1、OPRL1、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO-SSTR1	ヒトソマトスタチン受容体1、SSTR1 Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。
CHO/dhFr-	チャイニーズハムスター卵巣
CHO/dhFr-AC-free	チャイニーズハムスター卵巣、無血清
RR-CHOKI	チャイニーズハムスター卵巣
T02J-10/10 (CHO-GCGR (GCGR))	ヒトグルカゴン受容体、GCGR、Gタンパク質共役型受容体、GPCR、トランスフェクション済み、InSCREENeX SCREENflexTM、CHO-K1宿主。

【0103】

様々なCHO細胞株がAmerican Type Culture Collection (ATCC) からも入手可能であり、CHO細胞株hCBE11 (ATCC(登録商標) PTA-3357<sup>TM</sup>)、E77.4 (ATCC(登録商標) PTA-3765<sup>TM</sup>)、hLT-B: R-hG1 CHO #14 (ATCC(登録商標) CRL-11965<sup>TM</sup>)、MOR-CHO-MORAb-003-RCB (ATCC(登録商標) PTA-7552<sup>TM</sup>)、AQ.C2クローン11B (ATCC(登録商標) PTA-3274<sup>TM</sup>)、AQ.C2クローン11B (ATCC(登録商標) PTA-3274<sup>TM</sup>)、CHO-DG44中のhsAQC2 (ATCC(登録商標) PTA-3356<sup>TM</sup>)、xrs5 (ATCC(登録商標) CRL-2348<sup>TM</sup>)、CHO-K1 (ATCC(登録商標) CCL-61<sup>TM</sup>)

、Lec1 [元々はPro-5WgaRI3Cという名称] (ATCC(登録商標) CRL-1735<sup>TM</sup>)、Pro-5 (ATCC(登録商標) CRL-1781<sup>TM</sup>)、ACY1-E (ATCC(登録商標) 65421<sup>TM</sup>)、ACY1-E (ATCC(登録商標) 65420<sup>TM</sup>)、pgsE-606 (ATCC(登録商標) CRL-2246<sup>TM</sup>)、CHO-CD36 (ATCC(登録商標) CRL-2092<sup>TM</sup>)、pgsC-605 (ATCC(登録商標) CRL-2245<sup>TM</sup>)、MC2/3 (ATCC(登録商標) CRL-2143<sup>TM</sup>)、CHO-ICAM-1 (ATCC(登録商標) CRL-2093<sup>TM</sup>)、およびpgsB-618 (ATCC(登録商標) CR L-2241<sup>TM</sup>)などがある。これらのCHO細胞株のうちのいずれの1つでも用いることができる。

#### 【0104】

他の市販のCHO細胞株としては、例えば、Life Technologies社からのFreeStyle<sup>TM</sup> CHO-S細胞およびFlp-In<sup>TM</sup>-CHO細胞株が挙げられる。

10

#### 【0105】

他の好適な宿主細胞としては、例えば、対照と比較してC12orf35タンパク質の発現レベルまたは活性が減少しているCHO細胞（例えば、国際公開第2015/092735号（参照により本明細書中に組み入れられる）を参照されたい。該文献は、対照と比較してC12orf35タンパク質の発現レベルまたは活性が減少している哺乳動物細胞の詳細な説明を提供している）、対照と比較してFAM60Aタンパク質の発現レベルまたは活性が減少しているCHO細胞（例えば、国際公開第2015/092737号（参照により本明細書中に組み入れられる）を参照されたい。該文献は、FAM60Aタンパク質の発現レベルまたは活性が減少している哺乳動物細胞の詳細な説明を提供している）；対照と比較してマトリプターゼの発現レベルまたは活性が減少しているCHO細胞（米国特許仮出願第61/985,589号（2014年4月29日出願、参照により本明細書中に組み入れられる）および同第61/994,310号（2014年5月16日出願、参照により本明細書中に組み入れられる）。該文献は、マトリプターゼの発現レベルまたは活性が減少している哺乳動物細胞の詳細な説明を提供している）が挙げられる。

20

#### 【0106】

一般的にCHO細胞中で組み換えタンパク質を発現させるための方法は開示されてきている。例えば、米国特許第4,816,567号および同第5,981,214号を参照されたい。

#### 【0107】

2014年10月31日出願の欧州特許出願第14191385.5号（参照により本明細書中に組み入れられる）は、CMVタンパク質であるgH、gL、pUL128、pUL130、pUL131（またはそれらの複合体形成性断片）をコードする配列がゲノムへと安定的にインテグレートされている哺乳動物宿主細胞、特にCHO細胞を開示している。

30

#### 【0108】

本明細書中に記載される宿主細胞を含む細胞培養物もまた、本明細書中に提供される。細胞培養物は、大規模であり得、例えば、少なくとも約10L、少なくとも約20L、少なくとも約30L、少なくとも約40L、少なくとも約50L、少なくとも約60L、少なくとも約70L、少なくとも約80L、少なくとも約90L、少なくとも約100L、少なくとも約150L、少なくとも約200L、少なくとも約250L、少なくとも約300L、少なくとも約400L、少なくとも約500L、少なくとも約600L、少なくとも約700L、少なくとも約800L、少なくとも約900L、少なくとも約1000L、少なくとも約2000L、少なくとも約3000L、少なくとも約4000L、少なくとも約5000L、少なくとも約6000L、少なくとも約7000L、少なくとも約8000L、少なくとも約85000L、少なくとも約90000L、少なくとも約95000L、少なくとも約100000L等であり得る。

40

#### 【0109】

一部の実施形態では、CMV複合体（五量体複合体など）の収率は、少なくとも約0.01g/L、少なくとも約0.02g/L、少なくとも約0.03g/L、少なくとも約0.05g/L、少なくとも約0.06g/L、少なくとも約0.07g/L、少なくとも約0.08g/L、少なくとも約0.09g/L、少なくとも約0.1g/L、少なくとも約0.15g/L、少なくとも約0.20g/L、少なくとも約0.25g/L、少なく

50

とも約0.3g/L、少なくとも約0.35g/L、少なくとも約0.4g/L、少なくとも約0.45g/L、少なくとも約0.5g/L、少なくとも約0.55g/L、少なくとも約0.6g/L、少なくとも約0.65g/L、少なくとも約0.7g/L、少なくとも約0.75g/L、少なくとも約0.8g/L、少なくとも約0.85g/L、少なくとも約0.9g/L、少なくとも約0.95g/L、または少なくとも約1.0g/Lである。

## 【0110】

サイトメガロウイルス(CMV)gLタンパク質、もしくはその断片、または該gLタンパク質もしくは断片を含む複合体の生成方法もまた本明細書中に提供され、該方法は、以下のステップ：(i)好適な条件下で本明細書中に記載される宿主細胞を培養し、それにより該gLタンパク質、またはその断片を発現させるステップ；および(ii)該gLタンパク質、もしくはその断片、または該gLタンパク質もしくは断片を含む複合体を培養物から回収するステップを含む。10

## 【0111】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるgLタンパク質（またはその断片）、または該gLタンパク質もしくは断片を含む複合体を含む複合体が精製される。gLタンパク質（またはその断片）は、HPLC、種々のタイプのクロマトグラフィー法（疎水性相互作用、イオン交換、アフィニティー、キレート、およびサイズ排除など）、電気泳動、密度勾配遠心、溶媒抽出などのいずれかの好適な方法を用いて精製することができる。

## 【0112】

例えば、gLタンパク質（またはその断片）、または該gLタンパク質もしくは断片を含む複合体を含む複合体を精製するために、イオン交換を用いることができる。イオン交換クロマトグラフィーに有用な材料の例としては、DEAE-セルロース、QAE-セルロース、DEAE-セファロース(DEAE-cepahalose)、QAE-セファロース(QAE-cepahalose)、DEAE-Toyopearl、QAE-Toyopearl、Mono Q、Mono S、Qセファロース、SPセファロース等が挙げられる。1つの例示的実施形態では、方法はMono Sカラムを用いる。別の例示的実施形態では、方法はMono Qカラムを用いる。20

## 【0113】

あるいは、またはそれに加えて、アフィニティーに基づく精製を用いることができる。アフィニティー精製タグの例としては、例えば、Hisタグ（金属イオンに結合する）、抗体（プロテインAまたはプロテインGに結合する）、マルトース結合性タンパク質(MBP)（アミロースに結合する）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)（グルタチオンに結合する）、FLAGタグ(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)（配列番号8）（抗flag抗体に結合する）、Strepタグ（ストレプトアビジンまたはその誘導体に結合する）が挙げられる。30

## 【0114】

1つの例示的実施形態はStrepタグ（またはストレプトアビジンアフィニティータグ）であり、これはストレプトアビジンまたはStrep-Tactinなどのその誘導体に結合するタグである。Strepタグは、9個のアミノ酸のペプチド：Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly（配列番号9）、または8個のアミノ酸のペプチド（StrepタグIIとも称される）：Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（配列番号10）を含む。Strepタグに結合したタンパク質のカラムからの溶出は、ビオチンまたはデスチオビオチンなどのその誘導体もしくはホモログを用いて行なうことができる。40

## 【0115】

アフィニティー精製タグは、いずれかの好適な手段により連結することができ、直接的または間接的に連結することができる。例えば、タグは、ポリペプチド配列のN末端に、またはポリペプチド配列のC末端に、共有結合させることができる。これは、ポリペプチドおよびタグを含む融合タンパク質の組み換え発現により、またはポリペプチドをタグに連結させる標準的なコンジュゲート化技術により、達成できる。タグは、標準的なコンジュゲート化技術を用いてポリペプチドのアミノ酸残基の側鎖官能基に連結することができる。あるいは、タグは、非共有的に連結することができる。

## 【0116】

10

20

30

40

50

タグの連結は、直接的、または間接的（リンカーを介して）であり得る。好適なリンカーは当業者に公知であり、例えば、直鎖または分岐鎖炭素リンカー、複素環状炭素リンカー、炭水化物リンカーおよびポリペプチドリンカーが挙げられる。

【0117】

一部の実施形態では、切断可能なリンカーを、対象となる分子をタグに連結するために用いることができる。これは、例えば、リンカーを切断することが可能な薬剤の添加により、精製された複合体からタグを分離することを可能にする。多数の様々な切断可能リンカーが当業者に公知である。そのようなリンカーは、例えば、光解離性結合への照射または酸触媒加水分解により、切断することができる。プロテアーゼ認識部位を組み込んでおり、かつ好適なプロテアーゼ酵素の添加により切断できるポリペプチドリンカーもある。

10

【0118】

gLタンパク質（またはその断片）を含む複合体が精製される場合、タグは複合体の他の構成成分に連結していることができる。例えば、CMV五量体複合体を精製する場合、タグは、pUL128、pUL130、またはpUL131に連結していることができる。

【0119】

5. 医薬組成物および投与

本発明はまた、本明細書中に記載されるCMVタンパク質、複合体、および核酸を含む医薬組成物も提供する。本発明はまた、本明細書中に記載されるCMVタンパク質、複合体、および核酸をコードする核酸を含む医薬組成物も提供する。

【0120】

20

本明細書中に記載されるCMVタンパク質、複合体、および核酸は、免疫原性組成物、またはワクチン組成物に組み込むことができる。そのような組成物は、哺乳動物（例えば、ヒト）で抗体を生起するために用いることができる。

【0121】

本発明は、本明細書中に記載されるCMVタンパク質、複合体、および核酸を含む医薬組成物、ならびに製薬上許容される担体と本明細書中に記載されるCMVタンパク質、複合体、および核酸を組み合わせることを含む、医薬組成物の製造方法を提供する。本発明の医薬組成物は、典型的には、製薬上許容される担体を含み、そのような担体についての徹底的な議論が、Remington: The Science and Practice of Pharmacyで得られる。

【0122】

30

組成物のpHは通常は約4.5～約11であり、例えば、約5～約11、約5.5～約11、約6～約11、約5～約10.5、約5.5～約10.5、約6～約10.5、約5～約10、約5.5～約10、約6～約10、約5～約9.5、約5.5～約9.5、約6～約9.5、約5～約9、約5.5～約9、約6～約9、約5～約8.5、約5.5～約8.5、約6～約8.5、約5～約8、約5.5～約8、約6～約8、約4.5、約5、約6.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、約10、約10.5、約11などである。安定なpHは、緩衝剤、例えば、Tris緩衝剤、クエン酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、またはヒスチジン緩衝剤の使用により維持することができる。つまり、組成物は、一般的に、緩衝剤を含むであろう。

【0123】

組成物は、無菌であるか、かつ/またはバイロジエン不含であり得る。組成物は、ヒトに対して等張性であり得る。

40

【0124】

組成物は、免疫学的有効量のその抗原を含む。「免疫学的有効量」とは、被験体に投与される場合に、抗原に対する抗体応答を惹起するのに有効な量である。この量は、治療対象の個体の健康状態および身体状態、その年齢、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望の保護の程度、ワクチンの製剤化、治療中の医師による医学的状態の評価、その他の関連する要因に応じて変わり得る。量は、慣用の治験を通して決定できる比較的広い範囲内に入るであろうことが予測される。本発明の組成物の抗原含有量は、一般的に、用量当たりのタンパク質の質量基準で表わされるであろう。抗原当たり10～500 μg（例えば、50 μg）の用量が有用であり得る。

50

## 【0125】

免疫原性組成物は、免疫学的アジュバントを含むことができる。例示的アジュバントとしては、鉱物含有組成物；油エマルジョン；サポニン製剤；ビロソーム (virosome) およびウイルス様粒子；細菌または微生物誘導体；生体接着物質 (bioadhesive) および粘液接着物質 (mucoadhesive)；リポソーム；ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル製剤；ポリホスファゼン (pcpp)；ムラミルペプチド；イミダゾキノロン化合物；チオセミカルバゾン化合物；トリプタントリン (tryptanthrin) 化合物；ヒト免疫調節因子；リポペプチド；ベンゾナフチリジン；微粒子；免疫刺激性ポリヌクレオチド (RNAまたはDNAなど；例えば、CpG含有オリゴヌクレオチド) が挙げられる。

## 【0126】

例えは、組成物は、アルミニウム塩アジュバント、水中油型エマルジョン (例えは、スクワレンを含む水中油型エマルジョン、MF59またはAS03など)、TLR7アゴニスト (イミダゾキノリンまたはイミキモドなど)、またはそれらの組み合わせを含むことができる。好適なアルミニウム塩としては、水酸化物 (例えは、オキシ水酸化物)、リン酸塩 (例えは、ヒドロキシリノ酸塩 (hydroxyphosphate)、オルトリン酸塩)、(例えは、Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenumのchapter 8および9を参照されたい) またはそれらの混合物が挙げられる。塩は、塩に対する抗原の吸着を一例として、いずれかの好適な形態を探ることができる (例えは、ゲル、結晶、非晶質など)。患者に対する投与用の組成物中のAI<sup>+3</sup>の濃度は、5mg/mL未満、例えは、4mg/mL未満、3mg/mL未満、2mg/mL未満、1mg/mL未満などであり得る。好ましい範囲は、0.3~1mg/mLである。0.85mg/用量の最大量が好ましい。水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムアジュバントが、本発明との使用のために好適である。

## 【0127】

1つの好適な免疫学的アジュバントは、アルミニウム塩に吸着した、国際公開第2011/027222号で定義される式(I)の化合物、または製薬上許容されるその塩を含む。Powell & Newman (1995)に開示されるもののうちのいずれかをはじめとする、多数のさらなるアジュバントを用いることができる。

## 【0128】

組成物は、特に複数用量形式で包装される場合には、抗微生物剤を含むことができる。チメロサールおよび2-フェノキシリタノールなどの抗微生物剤がワクチン中に一般的に見出されるが、水銀不含保存料を用いるか、または保存料を一切用いないことが望ましい場合がある。

## 【0129】

組成物は、界面活性剤、例えは、ポリソルベート80などのポリソルベートを含むことができる。界面活性剤は、一般的に低いレベルで、例えは0.01%未満で存在する。

## 【0130】

組成物は、等張性を与えるためにナトリウム塩 (例えは、塩化ナトリウム) を含むことができる。10±2mg/mL NaCl、例えは、約9mg/mLの濃度が典型的である。

## 【0131】

別の態様では、本発明は、サイトメガロウイルス (CMV) に対する免疫応答を誘導する方法を提供し、該方法は、上記の通りのタンパク質、DNA分子、RNA分子 (例えは、自己複製性RNA分子)、またはVRPを含む、免疫学的有効量の本明細書中に記載される免疫原性組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。

## 【0132】

一部の実施形態では、免疫応答は、CMVに対する中和抗体の產生を含む。一部の実施形態では、中和抗体は補体非依存性である。

## 【0133】

免疫応答は、体液性免疫応答、細胞性免疫応答、またはその両方を含み得る。一部の実施形態では、免疫応答は、それぞれの送達されたCMVタンパク質に対して誘導される。細胞性免疫応答は、ヘルパーT細胞 (Th) 応答、CD8+細胞毒性T細胞 (CTL) 応答、またはそ

10

20

30

40

50

の両方を含み得る。一部の実施形態では、免疫応答は体液性免疫応答を含み、抗体は中和抗体である。中和抗体は、細胞のウイルス感染を遮断する。CMVは上皮細胞および線維芽細胞にも感染する。一部の実施形態では、免疫応答は、両方の細胞タイプの感染を減少または防止する。中和抗体応答は、補体依存性または補体非依存性であり得る。一部の実施形態では、中和抗体応答は補体非依存性である。一部の実施形態では、中和抗体応答は交差中和性であり；すなわち、投与された組成物に対して生成された抗体が、組成物中で用いられたウイルス株以外の株のCMVウイルスを中和する。

#### 【 0 1 3 4 】

当技術分野での抗体効力の有用な指標は、「50% 中和力価」である。50% 中和力価を決定するために、免疫化された動物由来の血清を希釈し、どれだけ希釈された血清が、ウイルスの50%が細胞へと侵入するのを妨げる能力を未だ保持し得るかを評価する。例えば、700の力価とは、700倍に希釈された後で、ウイルスの50%を中和する能力を血清が保持したことを意味する。つまり、高い力価は、より強力な中和抗体応答を示す。一部の実施形態では、この力価は、約200、約400、約600、約800、約1000、約1500、約2000、約2500、約3000、約3500、約4000、約4500、約5000、約5500、約6000、約6500、または約7000の下限を有する範囲内である。50% 中和力価範囲は、約400、約600、約800、約1000、約1500、約2000、約2500、約3000、約3500、約4000、約4500、約5000、約5500、約6000、約6500、約7000、約8000、約9000、約10000、約11000、約12000、約13000、約14000、約15000、約16000、約17000、約18000、約19000、約20000、約21000、約22000、約23000、約24000、約25000、約26000、約27000、約28000、約29000、または約30000の上限を有することができる。例えば、50% 中和力価は、約3000～約25000であり得る。「約」とは、示された値の±10%を意味する。

#### 【 0 1 3 5 】

本発明の組成物は、一般的に、被験体に直接的に投与されるであろう。直接送達は、非経口注入（例えば、皮下注入、腹腔内注入、静脈内注入、筋内注入、または組織の間質腔への注入）により、またはいずれかの他の好適な経路により実現できる。例えば、筋内投与を、例えば、大腿部または上腕に対して用いることができる。注入は針（例えば、皮下注射針）を介するものであり得るが、無針注射を代替的に用いることができる。典型的な筋内投与体積は、約0.5mLである。

#### 【 0 1 3 6 】

投与は、単一用量スケジュールまたは複数用量スケジュールによるものであり得る。複数用量は、初回免疫スケジュールおよび/または追加免疫スケジュールで用いることができる。複数用量スケジュールでは、種々の用量を、同じかまたは異なる経路により与えることができ、例えば、非経口初回免疫と粘膜追加免疫、粘膜初回免疫と非経口追加免疫などであり得る。複数用量は、典型的には、少なくとも1週間間隔で（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）で投与されるであろう。

#### 【 0 1 3 7 】

被験体は、動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物であり得る。本明細書中で対象とされる病原体は広範囲の生物種にわたって問題となるものであり得るので、例示的被験体としては、例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ、ネコまたはイヌが挙げられる。ワクチンが予防的用途のものである場合、ヒトは好ましくは小児（例えば、幼児（toddler）または乳児（infant））、ティーンエイジャー、または成人であり；ワクチンが治療的用途のものである場合、ヒトは好ましくはティーンエイジャーまたは成人である。小児を対象としたワクチンは、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために、成人に投与することもできる。

#### 【 0 1 3 8 】

本発明のワクチンは、予防的（すなわち、疾患を予防するため）または治療的（すなわち、疾患の症状を減少させるかまたは除去するため）であり得る。予防的との用語は、特定の症状の重症度を低下させるか、またはその発症を防止することであると考えられる。

10

20

30

40

50

誤解を避けるために、予防的ワクチンとの用語はまた、例えば、感染の重症度または持続時間を減少させることにより、未来の感染の影響を改善するワクチンを意味する場合もある。

#### 【 0 1 3 9 】

本明細書中に記載される単離および/または精製されたCMVタンパク質、複合体、および核酸は、単独で、またはRNA初回免疫とそれに続くタンパク質追加免疫などの混合様式レジメンで初回免疫もしくは追加免疫のいずれかとして、投与することができる。タンパク質初回免疫-タンパク質追加免疫戦略と比較したRNA初回免疫-タンパク質追加免疫戦略の利点としては、例えば、抗体力値の増大、よりバランスの取れたIgG1 : IgG2aサブタイププロフィール、TH1型CD4+ T細胞媒介免疫応答（ウイルス粒子のものと同様であった）の誘導、および非中和抗体の産生の減少が挙げられる。RNA初回免疫は、アジュバントを含有するか否かにかかわらず、組成物の免疫原性を増大させることができる。

10

#### 【 0 1 4 0 】

RNA初回免疫-タンパク質追加免疫戦略では、RNAおよびタンパク質は同じ標的抗原に向けられている。RNAの好適な送達様式の例としては、ウイルス様レプリコン粒子（VRP）、アルファウイルスRNA、脂質ナノ粒子（LNP）中に封入されたレプリコンまたは製剤化されたRNA（カチオン性ナノエマルジョン（CNE）と共に製剤化されたレプリコンなど）が挙げられる。好適なカチオン性水中油型ナノエマルジョンは、国際公開第2012/006380号に開示され、例えば、油性コア（例えば、スクワレンを含む）およびカチオン性脂質（例えば、DOTAP、DMTAP、DSTAP、DC-コレステロールなど）を含む。

20

#### 【 0 1 4 1 】

国際公開第2012/051211号は、五量体複合体に対する抗体が、五量体複合体のタンパク質構成要素をコードするVRPおよび製剤化型RNA（CNEおよびLNP）を用いて免疫化されたマウスで産生されることを開示している。これらの抗体は、上皮細胞内でCMV感染を中和できることが見出されている。RNA初回免疫-タンパク質追加免疫レジメンは、本発明のCMVタンパク質複合体のタンパク質構成要素のうちの1種以上をコードするRNA（VRP、LNP、CNE等として送達することができるであろう）を用いる1回以上の初回免疫化を最初に（例えば、第0週～第8週に）行なうステップ、および続いて、任意によりアジュバントと共に製剤化されている本発明の単離されたCMVタンパク質複合体、または任意によりアジュバントと共に製剤化されている本発明の精製されたCMVタンパク質複合体を用いて、遅れて（例えば、第24週～第58週に）1回以上の追加免疫化を行なうステップを含むことができる。

30

#### 【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、RNA分子は、カチオン性脂質、リポソーム、コクレエート（cochleate）、ビロソーム（virosome）、免疫刺激性複合体、微粒子、ミクロスフェア、ナノスフェア、単層ベシクル、多層ベシクル、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、エマルソーム（emulosome）、ポリカチオン性ペプチド、カチオン性ナノエマルジョン、またはそれらの組み合わせに封入されているか、それらに結合しているか、またはそれらに吸着している。

#### 【 0 1 4 3 】

40

本明細書中に記載される核酸（例えば、RNA）、精製されたタンパク質、および精製された複合体を投与するためのキット、および使用説明書もまた、本明細書中に提供される。本発明はまた、本明細書中に開示される組成物またはワクチンを予め充填された送達デバイスもまた提供する。

#### 【 0 1 4 4 】

本明細書中に記載される医薬組成物は、1種以上の追加の治療剤と組み合わせて投与することができる。追加の治療剤としては、限定するものではないが、抗生物質または抗細菌剤、制吐剤、抗真菌剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤、免疫調節剤、サイトカイン、抗うつ剤、ホルモン、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、抗有糸分裂剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞増殖抑制剤、抗浸潤剤、血管新生防止剤、増殖因子機能の阻害剤、

50

ウイルス複製阻害剤、ウイルス酵素阻害剤、抗癌剤、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\gamma$ -インターフェロン、リバビリン、ホルモン、および他のtoll様受容体調節因子、免疫グロブリン(Ig)、およびIg機能を変化させる抗体(抗IgE(オマリズマブ)など)が挙げられる。

【0145】

一部の実施形態では、本明細書中に開示される組成物は、例えば、哺乳動物などのそれを必要とする被験体での免疫応答の誘導または増強での使用のための医薬として用いることができる。

【0146】

一部の実施形態では、本明細書中に開示される組成物は、哺乳動物などのそれを必要とする被験体での免疫応答を誘導または増強するための医薬の製造で用いることができる。

10

【0147】

治療的処置の有効性をチェックする1つの方法は、本明細書中に開示される組成物またはワクチンの投与後に、病原体感染をモニタリングすることを含む。予防的処置の有効性をチェックする別の方法は、抗原に対する、全身性(IgG1およびIgG2a産生のレベルをモニタリングするなど)および/または粘膜性(IgA産生のレベルをモニタリングするなど)の免疫応答をモニタリングすることを含む。典型的には、抗原特異的血清抗体応答は免疫化後かつ抗原刺激前に決定されるが、抗原特異的粘膜性抗体応答は免疫化後かつ抗原刺激後に決定される。

【0148】

本発明は、限定的であると解釈されるべきではない以下の実施例により、さらに説明される。

20

【実施例】

【0149】

実施例1：材料および方法

配列および構造分析：CMV、VZVならびにHSV1およびHSV2のgL配列を、CLUSTALW([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html))を用いてアライメントし、VZVおよびHSV2の保存されたストランドに寄与する残基をアラインするために手動で調節した。

【0150】

五量体複合体およびgH/gL複合体の発現：野生型(WT)五量体複合体(「penta」)またはgL突然変異を含む五量体複合体(penta)(「LSG」および「IDG」突然変異体)を、gHおよびgLを1つのベクター中に含み、3種類のULを他のベクター中に含む2ベクター系を用いて発現させた。IRES(内部リボソーム侵入部位)の配列が、各ベクター中の異なる遺伝子を隔てている。gHはC末端6×Hisタグを有し(配列番号11)、UL130は切断可能なC末端Strepタグを有する。培養物1リットル当たり1mgの総DNAと共に、2種類のベクターのDNAを、ExpiFectamineトランスフェクションキット(Life Technologies社)を製造業者のプロトコールに従って用いて、Expi293細胞へトランスフェクションした。細胞は、トランスフェクションの日に、約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mLまで、97%超の生存率にて振盪フラスコ中で増殖させた。トランスフェクションされた細胞を、37°C、150rpmおよび8%CO<sub>2</sub>で作動された振盪インキュベーター中で、約60%の生存率で約 $8 \times 10^6$ 細胞/mLまで、3日間増殖させた。発現培地の上清を、4200rpmで30日間の遠心分離により回収した。

30

【0151】

WT gH/gLまたはgL突然変異を含むgH/gLを、上記と同様にして、gHおよびgLの両方を含むベクターを用いて発現させた。

【0152】

N末端配列決定：アフィニティー精製されたWT五量体複合体(penta)のSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング(WB)により見て取れる未知のバンドを特定するために、N末端配列決定を用いた。SDS-PAGE上の五量体複合体(penta)を、エタノール活性化したPVDFメンブレンにトランスファーし、これを40%メタノール中で0.02%クマシーブリリアントブルーを用いて染色し、続いて蒸留水で数回洗浄してから、完全に風乾させた。対象と

40

50

なるバンドを切り出し、配列決定のためにタフツ大学タンパク質コア施設 (Tufts University Protein Core Facility) に送った。

【0153】

精製およびウエスタンプロット分析：回収した上清を、KrosFlo Research II TFFシステムおよび中空纖維カートリッジ (Spectrumlabs社) を用いて、濃縮およびアフィニティーカラム結合バッファー (50mM Hepes pH7.0、150mM NaCl、および1mM EDTA) へとバッファー交換した。濃縮された上清をStrepTrap HPカートリッジ (GE Life Sciences社) にロードし、溶出バッファー (50mM Hepes pH7.0、150mM NaCl、2.5mMデスチオビオチン、および1mM EDTA) を用いて溶出した。溶出液由来のピーク画分を、gLまたはgHのC末端に配置されたHisタグに対する抗体を用いて、SDS-PAGEおよびウエスタンプロットティングにより分析した。

10

【0154】

マウスでの免疫化研究：群当たり10頭のマウスを、3週間の間隔での3回の注入により、3種類の異なる用量 (0.03 µg、0.1 µgおよび1 µg) にて、MF59を用いてアジュバント化された精製WTまたは突然変異体五量体複合体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131を用いて免疫化した。血清サンプルを56 30分間で熱不活性化し、2倍ずつ連続希釈し (希釈毎に2つの反復) 、培地 ± 10% モルモット補体 (Cedarlane Labs, Burlington, NC, USA) 中で200 ~ 250 個の感染細胞/係数視野の標的濃度まで希釈した等体積のHCMVウイルスと混合し、37 /5 %CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした。これらの血清/ウイルスサンプルを、96ウェルハーフエリア培養プレート (Corning Inc., Corning, NY, USA) 中に準備したARPE-19細胞またはMRC-5細胞に加えた。感染させた単層細胞を37 /5 %CO<sub>2</sub>で48時間 ( ± 8時間) インキュベートし、10%緩衝ホルマリン (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA) を用いて1時間固定し、洗浄バッファー (PBS/0.05%Tween-20) を用いて3回洗浄し、PBS/2.5%胎児ウシ血清、0.5%サポニン、0.1%アジ化ナトリウムを用いて室温にて1時間ブロッキングした。プレートを3回洗浄し、テープ乾燥させ (taped dry) 、25 の湿式インキュベーター中で1時間インキュベートした。続いて、プレートを、ハイブリドーマL14由来の抗HCMV IE1抗体 (サポニンバッファー中で希釈) を加えて室温で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、AlexaFluor 488を用いてコンジュゲート化された抗マウスIgG (サポニンバッファー中で希釈) を加えて1時間インキュベートし、続いて、PBS/0.05%Tween-20を用いて3回洗浄した。蛍光細胞を、Immunospot S5 UV Analyzer (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA) を用いてカウントし、感染細胞カウントでの50%の減少 (希釈剤添加ウイルス対照ウェルでの感染細胞カウントと比較して) をもたらした血清希釈の逆数として定義される50%中和力値を、50%の値の上下の平均感染細胞カウントを生じたウェルを有する2種類の希釈の間の線形回帰補間ににより算出した。

20

【0155】

実施例2：結果

1. gLクリッピングは保存された ストランドの隣で起こる

N末端配列決定により、gLに対する抗体を用いるウエスタンプロットにより特定されたバンドは、gLの残基97から始まることが決定された。つまり、哺乳動物細胞で発現されるgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体は、gLの残基Asn97と残基Ser98との間でクリッピングされたgLタンパク質の集団を含む。構造に基づく配列アライメントにより、クリッピング部位がVZVとHSV-2の両方のgH/gL構造で保存されている ストランドの隣のループ領域中にあることがさらに明らかになった (図1)。

40

【0156】

このクリッピング部位の近傍のgL配列に導入された種々の突然変異が、gLクリッピングの量の減少をもたらした。付加突然変異は、極性残基と非極性残基の混じった2~5個の残基を切断部位へと挿入した。欠失突然変異は、切断部位周囲の1~3残基を欠失させた。置換突然変異は、Ala96を疎水性残基または大きな側鎖を有する残基へと変更し；Asn97を比較的小さいかもしくは大きい側鎖を有する極性残基へ、または非極性残基へと変更し；あるいはSer98を極性または非極性の特性を有する小さな側鎖を含む残基へと変更した。

50

## 【0157】

## 2. 種々の突然変異体gH/gLと野生型gH/gLとの比較

図2Aは、試験された種々の突然変異体gLタンパク質を示す。種々のgL突然変異を含むgH/gL複合体をExp293細胞で発現させ、WT gH/gLと比較した。プロテアーゼ認識部位での突然変異は、発現されたgH/gL複合体でのgLクリッピングを減少させた。例えば、WT未処理上清の抗gLウエスタンプロットは、N末端配列決定により決定される通り、そのN末端に残基98を有するgL断片のはっきり見て取れるバンドを示した。対照的に、同様のバンドは「LSG」突然変異体では検出されず、「Asn97」および「SST」突然変異体では検出されないか、または顕著に減少していた(図2)。

## 【0158】

10

クリッピング部位の近傍に導入された3残基変異体は、クリッピング部位の近傍での1残基変異体よりも大いにクリッピングを減少させた。「LSG」突然変異体は、抗Hisウエスタンプロッティングで、最も顕著にgLクリッピングバンドの濃さを減少させた。加えて、17残基挿入の除去は、ウエスタンプロッティングにより観察されるgLクリッピングバンド(gH/gL(N))の濃さを増強し、このことは、この挿入が切断部位を保護し得ることを示唆した(図2C)。

## 【0159】

## 3. 「LSG」および「IDG」突然変異体五量体複合体(penta)と野生型五量体との比較

「LSG」および「IDG」突然変異体がgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体でのgLクリッピングも除去または減少させたのか否かを分析するために、アフィニティー精製されたWTおよび突然変異体五量体を、抗Hisおよび抗gLウエスタンプロットにより分析した。WT五量体の抗Hisウエスタンプロットでは、全長gH/gLよりも小さな分子量を有する目立ったバンドがあり、これはgHとクリッピング後のgLのN末端領域との複合体に合致する。このgLのN末端断片は、抗gL抗体により認識されないことに留意されたい。抗gLウエスタンプロットでは、N末端配列決定により決定される通り、残基98で始まるgLのC末端領域が、非還元サンプル中でUL128と複合体を形成する。同じgLのC末端断片自体が、還元サンプルで観察された。それと比較して、gLクリッピングから生じるそれらのバンドは、「LSG」または「IDG」突然変異体五量体では検出されなかった(図3および図4)。「LSG」および「IDG」突然変異体の両方が、WT五量体複合体と同様の挙動を示す五量体を生じた。したがって、これらの突然変異は、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体のアセンブリには影響しないが、gLタンパク質のタンパク質分解クリッピングを生じなくさせた(図5A)。

20

## 【0160】

30

免疫原性分析により、LSGおよびIDG突然変異体が、gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体の免疫原性を損なわせなかつたことが示された(図5B)。

## 【0161】

40

クリッピングから生じたgLの断片が、gH/gL複合体、gH/gL/g0複合体(データ示さず)およびgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131複合体の発現中に検出された。これらの3種類の複合体でのクリッピング部位は同一であり、残基97と残基98との間である。したがって、gH/gLの発現中にgLクリッピングを防止する突然変異は、gH/gL/g0複合体およびgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体複合体の発現中にもgLクリッピングを防止する。

## 【0162】

わずか3残基の置換または1箇所の欠失により、それぞれ、gLクリッピングを除去できるか、または顕著に減少させることができる。これらの突然変異の位置は、それらの近傍での保存された二次構造に影響を及ぼすとは予測されない。このことは、大きくは影響されないその三次元構造、および抗原性/免疫原性を有する均一なgH/gL/pUL128/pUL130/pUL131五量体の產生を可能にする。本発明者らは、相同的な配列を有するクリッピング部位の近傍で配列を突然変異させる戦略が効果的であると証明されたと結論付ける。

## 【0163】

上記の個々の節で言及された本発明の様々な特徴および実施形態が、適宜、他の節に準用される。結果として、1つの節に詳述される特徴を、適宜、他の節に詳述される特徴と

50

組み合わせることができる。

【0164】

本明細書は、本明細書中で引用される参考文献の教示を踏まえて、最も完全に理解される。本明細書中の実施形態は、本発明の実施形態の例示を提供し、本発明の範囲を限定するものと理解するべきではない。当業者は、多くの他の実施形態が本発明に包含されることを容易に認識する。本開示中に引用されるすべての刊行物および特許は、その全体で参照により組み入れられる。参照により組み入れられた資料が本明細書と矛盾するかまたは整合しない程度まで、本明細書はいかなるそのような資料にも優先するであろう。本明細書中のいかなる参考文献の引用も、そのような参考文献が本発明の先行技術であることの承認ではない。

10

【0165】

本発明の実務は、特に示されない限り、当技術分野の技能の範囲内である化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の慣用の方法を利用するであろう。そのような技術は、文献中に完全に説明されている。用語「含む」(comprising)は、「含む」(including)ならびに「からなる」(consisting)を包含し、例えば、Xを「含む」(comprising)組成物は、排他的にXからなる場合があり、または、何らかの追加の成分、例えばX+Yを含む場合がある。

【0166】

用語「実質的に～からなる」とは、追加の成分、ステップおよび/または部分が特許請求される組成物、方法または構造の基本的特徴および新規な特徴を著しく変化させない場合に限ってではあるが、組成物、方法または構造が、追加の成分、ステップおよび/または部分を含むことができるることを意味する。用語「からなる」は、特許請求される発明が、特許請求の範囲に明記されている構成要素に限定され(かつ等価物の原理が当てはまる限りは、それらの等価物を含むことができ)ることを意味するものと一般的には理解される。

20

【0167】

当業者は、慣用の実験方法以上のものを用いずに、本明細書中に記載される本発明の具体的実施形態に対する多数の等価物を認識するか、またはそれを究明することができるであろう。そのような等価物は、以下の実施形態に包含されることが意図される。

【0168】

30

- 組み換えサイトメガロウイルス(CMV)gLタンパク質、またはその複合体形成性断片であって、該gLタンパク質または断片はプロテアーゼ認識部位内に突然変異を含み、該突然変異は対照と比較した場合に該プロテアーゼ認識部位でのプロテアーゼ切断を減少させる、上記gLタンパク質または断片。

- 前記突然変異が、アミノ酸残基の付加、欠失、置換、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態1に記載のgLタンパク質または断片。

- 前記プロテアーゼ認識部位の3個以上の残基がストランドを形成し、かつ前記突然変異がストランドコンホメーションを維持する、実施形態1または2に記載のgLタンパク質または断片。

- 前記突然変異により、哺乳動物宿主細胞で組み換え的に発現される場合に、前記プロテアーゼ認識部位で切断されるのがgLのうちの20%以下(モルパーセンテージ)となる、実施形態1~3のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

40

- 前記突然変異が、1個以上のアミノ酸残基の付加を含む、実施形態1~4のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

- 前記突然変異が、2~5個のアミノ酸残基の付加を含む、実施形態1~5のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

- 前記2~5個のアミノ酸残基が、極性残基および非極性残基の両方を含む、実施形態6に記載のgLタンパク質または断片。

- 前記突然変異が、残基N97と残基S98との間の1個以上の残基の付加を含む、実施形態1~7のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

50

9. 前記突然変異が、残基N97と残基S98との間のF、Q、FQまたはQFの付加を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

10. 前記突然変異が、1個以上のアミノ酸残基の欠失を含む、実施形態1～9のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

【0169】

11. 前記突然変異が、1～3個のアミノ酸残基の欠失を含む、実施形態1～10のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

12. 前記突然変異が、V91、T92、P93、E94、A95、A96、N97、S98、V99、L100、L101、D102およびそれらの組み合わせからなる群より選択される残基の欠失を含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。 10

13. 前記突然変異が、A95、A96、N97、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される残基の欠失を含む、実施形態1～12のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

14. 前記突然変異が、N97を欠失させることを含む、実施形態1～13のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

15. 前記突然変異が、別のヘルペスウイルスのgLタンパク質由来の対応する残基を用いて残基を置換することを含む、実施形態1～14のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

16. 前記別のヘルペスウイルス由来のgLタンパク質が、HSV1、HSV2、VZV、EBV、PrV、またはウシヘルペスウイルス5型由来のgLタンパク質である、実施形態15に記載のgLタンパク質または断片。 20

17. 前記突然変異が、非極性残基または大きな側鎖を含む残基を用いてA96を置換することを含む、実施形態1～16のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

18. 前記突然変異が、I、L、VまたはSを用いてA96を置換することを含む、実施形態1～17のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

19. 前記突然変異が、R、L、EまたはNを用いてA95を置換することを含む、実施形態1～18のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

20. 前記突然変異が、AまたはLを用いてE94を置換することを含む、実施形態1～19のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

【0170】 30

21. 前記突然変異が、極性残基または非極性残基を用いてN97を置換することを含む、実施形態1～20のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

22. 前記極性残基が小さな側鎖を含む、実施形態21に記載のgLタンパク質または断片。

23. 前記極性残基が大きな側鎖を含む、実施形態21に記載のgLタンパク質または断片。

24. 前記突然変異が、S、D、E、A、TまたはYを用いてN97を置換することを含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

25. 前記突然変異が、SまたはDを用いてN97を置換することを含む、実施形態1～24のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。 40

26. 前記突然変異が、小さな側鎖を含むアミノ酸残基を用いてS98を置換することを含む、実施形態1～25のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

27. 前記突然変異が、G、T、V、またはIを用いてS98を置換することを含む、実施形態1～26のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

28. 前記突然変異が、G、またはTを用いてS98を置換することを含む、実施形態1～27のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

29. 前記突然変異が、Iを用いてV99を置換することを含む、実施形態1～28のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

30. 前記突然変異が、FまたはVを含むアミノ酸残基を用いてL100を置換することを含む、実施形態1～29のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。 50

## 【0171】

31. 前記突然変異が、VまたはIを含むアミノ酸残基を用いてL101を置換することを含む、実施形態1～30のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

32. プロテアーゼ認識部位のN末端に挿入領域を含む、実施形態1～31のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

33. 前記突然変異が、天然に存在しないアミノ酸残基を導入することを含む、実施形態1～32のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

34. 前記突然変異が、嵩高い側鎖を含むアミノ酸残基を導入することを含む、実施形態1～33のいずれか1つに記載のgLタンパク質または断片。

35. 実施形態1～34のいずれか1つに記載の組み換えgLタンパク質または断片を含むCMV複合体。 10

36. gH、gL、pUL128、pUL130、pUL131、g0、それらの複合体形成性断片、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるCMVタンパク質を含む、実施形態35に記載の複合体。

37. gHまたはその五量体形成性断片、gLまたはその五量体形成性断片、pUL128またはその五量体形成性断片、pUL130またはその五量体形成性断片、およびpUL131またはその五量体形成性断片を含む五量体複合体である、実施形態35または36に記載の複合体。

38. gHまたはその複合体形成性断片、およびgLまたはその複合体形成性断片を含むgH/gL複合体である、実施形態35または36に記載の複合体。 20

39. gHまたはその複合体形成性断片、gLまたはその複合体形成性断片、およびg0またはその複合体形成性断片を含む三量体複合体である、実施形態35または36に記載の複合体。 20

40. 実施形態1～34のいずれか1つに記載の組み換えCMV gLタンパク質もしくは断片、または実施形態35～39のいずれか1つに記載の複合体を含む、免疫原性組成物。

## 【0172】

41. アジュバントをさらに含む、実施形態40に記載の免疫原性組成物。

42. 前記アジュバントが、アルミニウム塩、TLR7アゴニスト、水中油型エマルジョン、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態41に記載の免疫原性組成物。

43. 前記水中油型エマルジョンがMF59である、実施形態42に記載の免疫原性組成物。 30

44. 実施形態1～34のいずれか1つに記載の組み換えCMV gLタンパク質または断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

45. RNA、好ましくは自己複製性RNAである、実施形態44に記載の単離された核酸。

46. 前記自己複製性RNAがアルファウイルスレプリコンである、実施形態45に記載の単離された核酸。

47. 実施形態46に記載のアルファウイルスレプリコンを含む、アルファウイルス複製粒子（VRP）。 30

48. 実施形態44～46のいずれか1つに記載の核酸を含む、免疫原性組成物。

49. 実施形態47に記載のVRPを含む、免疫原性組成物。

50. アジュバントをさらに含む、実施形態48または49に記載の免疫原性組成物。 40

## 【0173】

51. 前記アジュバントが、アルミニウム塩、TLR7アゴニスト、水中油型エマルジョン（MF59など）、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態50に記載の免疫原性組成物。

52. 実施形態44～46のいずれか1つに記載の核酸を含む、宿主細胞。

53. 前記核酸がDNAである、実施形態52に記載の宿主細胞。

54. 哺乳動物細胞である、実施形態53に記載の宿主細胞。

55. 前記哺乳動物細胞がCHO細胞またはHEK-293細胞である、実施形態54に記載の宿主細胞。 50

56. CMV gLタンパク質またはその断片をコードする前記DNAが、前記宿主細胞のゲノムDNAにインテグレートされている、実施形態53～55のいずれか1つに記載の宿主細胞。

57. gHまたはその五量体形成性断片、gLまたはその五量体形成性断片、pUL128または

その五量体形成性断片、pUL130またはその五量体形成性断片、およびpUL131またはその五量体形成性断片を含むCMV五量体複合体をコードする1種以上のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態52～56のいずれか1つに記載の宿主細胞。

58. CMV五量体複合体をコードする1種以上のポリヌクレオチド配列が、前記宿主細胞のゲノムDNAにインテグレートされている、実施形態57に記載の宿主細胞。

59. 好適な条件下で培養される場合に、前記CMV五量体複合体を発現する、実施形態57または58に記載の宿主細胞。

60. 前記五量体複合体が分泌される、実施形態59に記載の宿主細胞。

【0174】

61. 少なくとも20リットルのサイズである、実施形態52～60のいずれか1つに記載の宿主細胞を含む細胞培養物。 10

62. 少なくとも100リットルのサイズである、実施形態52～60のいずれか1つに記載の宿主細胞を含む細胞培養物。

63. 前記五量体複合体の収率が少なくとも0.05g/Lである、実施形態57～60のいずれか1つに記載の宿主細胞を含む細胞培養物。

64. 前記五量体複合体の収率が少なくとも0.1g/Lである、実施形態63に記載の宿主細胞を含む細胞培養物。

65. 組み換えサイトメガロウイルス(CMV)gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を生成する方法であって、以下のステップ：

(i)好適な条件下で実施形態52～60のいずれか1つに記載の宿主細胞を培養し、それにより該gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を発現させるステップ；および 20

(ii)培養物から該gLタンパク質、またはその複合体形成性断片を回収するステップを含む、上記方法。

66. 免疫学的有効量の実施形態40～43および48～51のいずれか1つに記載の免疫原性組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む、サイトメガロウイルス(CMV)に対する免疫応答を誘導する方法。

67. 免疫応答がCMVに対する中和抗体の産生を含む、実施形態66に記載の方法。

68. 中和抗体が補体非依存性である、実施形態67に記載の方法。

69. 細胞を、実施形態40～43および48～51のいずれか1つに記載の免疫原性組成物と接觸させるステップを含む、細胞へのサイトメガロウイルス(CMV)侵入を阻害する方法 30

。

70. サイトメガロウイルス(CMV)に対する免疫応答の誘導での使用のための、実施形態40～43および48～51のいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

【0175】

71. サイトメガロウイルス(CMV)に対する免疫応答を誘導するための、実施形態40～43および48～51のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

72. サイトメガロウイルス(CMV)に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造での、実施形態40～43および48～51のいずれか1つに記載の免疫原性組成物の使用。

【0176】

配列

配列番号1 (HCMV Merlin株由来のgL = GI:39842115)

MCRRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLPIVSSAAVSAPTAEKVPAECPELRRCLLGEVFEGDKYESWLRPLVNVTGRDG  
PLSQLIYRNPVTPEAANSVLLDEAFLDTLALLYNNPQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCR  
GYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTNRAVRLPVSTAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQLDP  
PLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号2 (HCMV Towne株由来のgL = GI:239909463)

MCRRPDCGFSFSPGPVALLWCCLLPIVSSATVSAPTAEKVPAECPELRRCLLGEVFQGDKYESWLRPLVNTRRDG  
PLSQLIYRNPVTPEAANSVLLDDAFLDTLALLYNNPQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCR  
GYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTNRAVRLPVSTAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQLDP

50

20

30

40

PLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号3 (HCMV AD169株由来のgL = GI:2506510)

MCRRPDCGFSFSPGPVLLWCCLLPIVSSAVSVAPTAEEKVPAECPELRRCLLGEVFQGDKYESWRPLVNTRRDG  
PLSQLIYRVPVTPEAANSVLLDDAFLDTLALLYNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCR  
GYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTNRAVRLPVSTAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQQLDP  
PLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号4 (配列番号1のアミノ酸残基31-278からなるgL成熟タンパク質)

AAVSVAPTAEEKVPAECPELRRCLLGEVFQGDKYESWRPLVNVTGRDGPLSQLIYRVPVTPEAANSVLLDEAFLDTLA  
LLYNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFN  
VVVAIRNEATRTNRAVRLPVSTAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQQLDPPLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPAHSRY  
GPQAVDAR

配列番号5 (HCMV Merlin株由来のgLからの17残基挿入)

GRDGSQLIYRVPVTP

配列番号6 (HCMV Towne株由来のgH = GI:138314)

MRPGLPSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEAISEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAISFNF  
FQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQQRLNTYALVSKDLASYRSFSQQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDI  
LSIPHVMPPQTTPHGWTESTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVTVSI  
DDDTPMILLFGHLPVRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHR  
AVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTPPRTTLLYPTAV  
DLAKRALWTPNQITDITSVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFAKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMLVH  
TTERREIFIIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPTTVPAALSILSTMQP  
STLETFPDLCPLGESFSALTVSEHVSYVTNQYLKGISYPVSTTVVGQLITQTDSQTKEELTRNMHTHSITAAL  
NISLENCAFQCSALLEYDDTQGVINIMYMHSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMLLKNGTVLEVTDVVVADDSRLLM  
MSVYALSAIIGIYLLYRMLKTC

配列番号7 (HCMV Merlin株由来のgLからの6残基挿入)

NSVLLD

30

配列番号8 (FLAGタグ)

DYKDDDDK

配列番号9 (Strepタグ)

AWRHPQFGG

配列番号10 (StrepタグII)

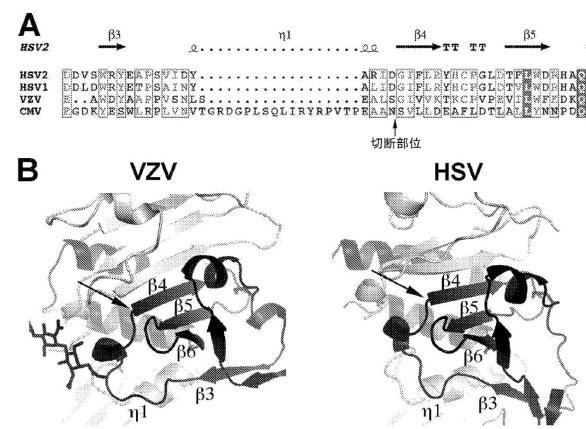
WSHPQFEK

40

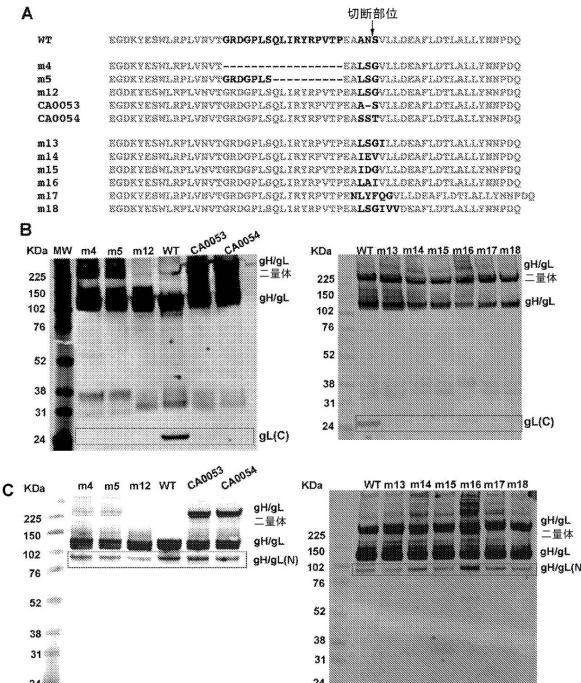
配列番号11 (Hisタグ)

HHHHHH

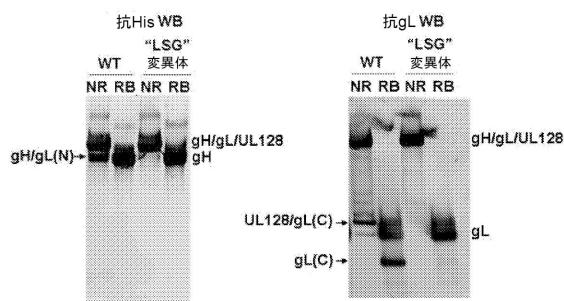
【図1】



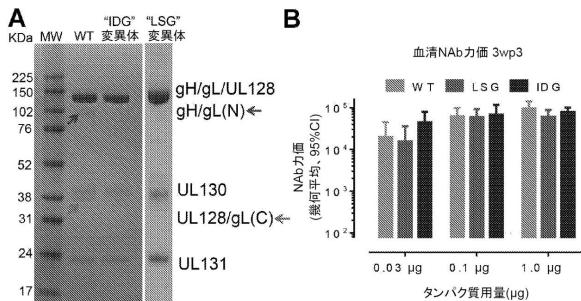
【図2】



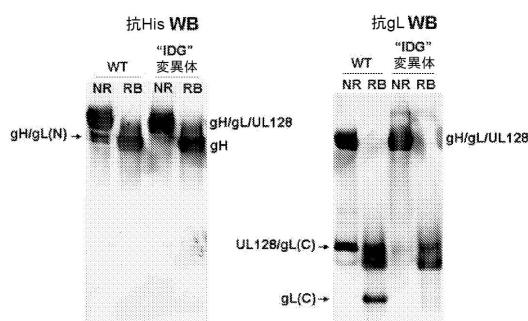
【 図 3 】



【圖 5】



〔 4 〕



【配列表】

0006717836000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 12 N 5/10 (2006.01) C 12 N 5/10  
C 12 N 7/01 (2006.01) C 12 N 7/01

(72)発明者 シン , イ  
アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州 , アンドーバー , アップル ブロッサム ロード 6

審査官 松本 淳

(56)参考文献 国際公開第2014/005959 (WO , A1 )  
国際公開第2014/068001 (WO , A1 )  
Vaccine, 2014, Vol.32, pp.3796-3804

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90  
C 07 K 14 / 00 - 14 / 825  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)