

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-192400

(P2017-192400A)

(43) 公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(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 6 4
C O 7 K 14/045 (2006.01)	C O 7 K 14/045	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-149179 (P2017-149179)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(22) 出願日	平成29年8月1日(2017.8.1)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(62) 分割の表示	特願2015-519155 (P2015-519155) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成25年6月29日(2013.6.29)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/668,975	(72) 発明者	アンドレア カルフィ
(32) 優先日	平成24年7月6日(2012.7.6)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセ ッツ アベニュー 350, ノバルティ ス ヴァクシNZ アンド ダイアグノス ティクス, インコーポレイテッド 氣付
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/770,257		
(32) 優先日	平成25年2月27日(2013.2.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトメガロウイルスタンパク質の複合体

(57) 【要約】

【課題】 サイトメガロウイルスタンパク質の複合体を提供すること。

【解決手段】 本開示は、単離されたヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 膜タンパク質複合体であって、g H、g L および少なくとももう1つのH C M V糖タンパク質を含む複合体を提供する。一部の実施形態では、複合体は、g H、g L およびg Oからなる。他の実施形態では、複合体はg H、g L、p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 およびp U L 1 3 1 Aからなる。本開示は、前記複合体を発現させ、精製するためのプロセス、ならびにその後の免疫原性組成物およびワクチンにおける前記複合体の使用も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

g H、g L および少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質を含む H C M V 膜タンパク質複合体を発現させるためのプロセスであって、

哺乳動物細胞に、膜貫通ドメインを欠き、かつ、配列番号 4、6、29 および 30 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含む g H の断片をコードする第 1 の核酸構築物、g L タンパク質をコードする第 2 の核酸構築物、および、少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質をコードする第 3 の核酸構築物をトランスフェクトするステップ、
を含む、プロセス。

10

【請求項 2】

g L、膜貫通ドメインを欠き、かつ、配列番号 4、6、29 および 30 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % 同一である配列を含む g H、および、少なくとも 1 つの追加的な H C M V 糖タンパク質をコードする組換え核酸分子であって、

- (a) 自己複製 R N A 分子ではなく、
 - (b) アルファウイルスレプリコンではなく、
 - (c) N S P 1、N S P 2、N S P 3 および N S P 4 などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、
 - (d) E M C V または E V 7 1 などの内部リボソーム進入部位 (I R E S) を含有せず、かつ / または、
 - (e) F M D V などのウイルスの 2 A 部位を含有しない
- 組換え核酸分子。

20

【請求項 3】

- g L、膜貫通ドメインを欠く g H、p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 および p U L 1 3 1 A、または、

- g L、膜貫通ドメインを欠く g H および g O
をコードする、請求項 2 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 4】

g L、膜貫通ドメインを欠く g H、および少なくとも 1 つの追加的な H C M V 糖タンパク質をコードする複数の組換え核酸であって、該 g H をコードする核酸分子が、配列番号 2 4 に示される配列に対して少なくとも 89 % 同一であり、該複数の組換え核酸のうちの 1 つまたは複数または全てが、

30

- (a) 自己複製 R N A 分子ではなく、
 - (b) アルファウイルスレプリコンではなく、
 - (c) N S P 1、N S P 2、N S P 3 および N S P 4 などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、
 - (d) E M C V または E V 7 1 などの内部リボソーム進入部位 (I R E S) を含有せず、かつ / または、
 - (e) F M D V などのウイルスの 2 A 部位を含有しない
- 複数の組換え核酸。

40

【請求項 5】

- 膜貫通ドメインを欠く g H、および g L をコードする第 1 の構築物と、
- 1 つの追加的な H C M V 糖タンパク質をコードする第 2 の構築物と
を含む、請求項 4 に記載の複数の組換え核酸。

【請求項 6】

前記第 2 の構築物が、
- p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 および p U L 1 3 1 A、または、
- g O
をコードする、請求項 5 に記載の複数の組換え核酸。

【請求項 7】

50

- g Lをコードする第1の組換え核酸分子と、
 - 膜貫通ドメインを欠くg Hの断片をコードする第2の組換え核酸分子と、
 - 1つまたは複数の追加的なHCMVタンパク質をコードする1つまたは複数の第3の組換え核酸分子と
を含む、請求項6に記載の複数の組換え核酸。

【請求項8】

膜貫通ドメインを欠き、かつ、配列番号4、6、29および30のいずれか1つに対して少なくとも80%同一である配列を含むg H、g L、および少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む細胞であって、

(a) HCMVゲノムを含有せず、

(b) HCMVピリオンを産生せず、

(c) 該g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする自己複製RNA分子を含有せず、かつ/または、

(d) アルファウイルスレプリコンを含有しない、

細胞。

【請求項9】

g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む単離または精製されたHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、請求項8に記載の細胞を増殖培地中で増殖させることを伴う、プロセス。

【請求項10】

前記HCMV膜タンパク質複合体が前記増殖培地中に分泌される、請求項9に記載のプロセス。

【請求項11】

前記HCMV膜タンパク質複合体を増殖培地1リットル当たり複合体 > 0.8 mg、> 0.85 mg、> 0.88 mg、> 0.9 mg、> 0.95 mg、> 1 mg、> 1.5 mg、> 2 mg、> 2.5 mg、> 3 mg、> 3.5 mg、> 4 mg、> 4.5 mg、> 5 mgの濃度まで蓄積させる、請求項10に記載のプロセス。

【請求項12】

- g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体のタンパク質成分の1つまたは複数にコードするRNAを含む1つまたは複数の初回刺激免疫組成物と、

- g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む精製されたHCMV膜タンパク質複合体を含む1つまたは複数のその後の追加刺激免疫組成物と
を含む、RNA初回刺激 - タンパク質追加刺激組み合わせ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年7月6日に提出された米国仮特許出願第61/668,975号および2013年2月27日に提出された米国仮特許出願第61/770,257号の優先権の利益を請求し、各々の上記出願の完全な内容は、本開示によって全ての目的について参照によって本開示に組み込まれる。

【0002】

本発明は、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対するワクチン接種、特に、g H、g Lおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含む精製された複合体、好ましくは三量体g H/g L/g O複合体または五量体g H/g L/pUL128/pUL130/pUL131A複合体の単離、およびその後のワクチンにおけるそれらの使用の分野にある。

【背景技術】

【0003】

サイトメガロウイルス(CMV)は、Herpesviridaeまたはヘルペスウイ

10

20

30

40

50

ルスとして公知のウイルスファミリーに属するウイルスの属である。ヒトに感染する種は、一般に、HCMVまたはヒトヘルペスウイルス-5 (HHV-5)として公知である。Herpesviridaeの中で、HCMVはBetaherpesvirinae亜科に属し、この亜科は他の哺乳動物のサイトメガロウイルスも包含する。

【0004】

HCMV感染は全身に見いだされ得るが、唾液腺に関連付けられる頻度が高い。HCMVは、一般的な集団の大半に抗体が存在することによって示される通り、米国では成人の50%~80%に感染している(世界では40%)。HCMV感染は、一般には、健康な人では気づかれないが、免疫無防備状態の人、例えば、HIV感染した人、臓器移植レシピエント、または新生児などでは生命にかかわる恐れがある(Mocarski、ShenkおよびPass 2006年)。HCMVは、発育中の胎児に最も頻繁に伝染するウイルスである。HCMVは、感染後、時々潜伏状態から再活性化しながら宿主の生涯にわたって体内に潜伏したままにすることができる。

10

【0005】

HCMVは、晩年に免疫パラメータに対して大きな影響を有し、罹患率および最終的な死亡率の上昇の一因となり得ると思われる(Simaneckら(2011年))。

【0006】

現在まで、実験室株および臨床分離株の両方を含め、20種超の異なるHCMV株のゲノムが配列決定されている。例えば、以下のHCMV株が配列決定されている: Towne (GI:239909366)、AD169 (GI:219879600)、Tolledo (GI:290564358)およびMerlin (GI:155573956)。HCMVのAD169株、Towne株およびMerlin株はAmerican Type Culture Collectionから入手することができる(それぞれATCC VR538、ATCC VR977およびATCC VR1590)。

20

【0007】

HCMVは未知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の公知の糖タンパク質およそ30種のうち、gHおよびgLが、いくつかの異なる複合体:二量体gH/gL、三量体gH/gL/gO(gCII複合体としても公知である)および五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A(最後のタンパク質はpUL131とも称される)に存在するので、特に興味深いものとして浮上した。HCMVは、五量体複合体を使用して上皮細胞および内皮細胞にエンドサイトーシスおよび低pH依存性融合によって進入すると考えられているが、線維芽細胞にはgH/gLまたはおそらくgH/gL/gOを必要とするプロセスで原形質膜における直接融合によって進入すると考えられている。線維芽細胞への感染にはgH/gL複合体および/またはgH/gL/gO複合体で十分であるが、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である(Ryckman、Rainishら、2008年)。

30

【0008】

Geniniら(2011年)には、最初のHCMV感染および再活性化したHCMV感染におけるHCMVの五量体複合体に対する血清抗体応答が開示されている。応答は、固定した、または溶解させた、それぞれが1種のHCMV遺伝子を保有する1つまたは複数のアデノウイルスベクターを感染させた上皮(ARPE-19)細胞と、並行して、対照アデノウイルスベクターを感染させた上皮(ARPE-19)細胞を使用して、間接的な免疫蛍光法(IFA)およびELISAの両方によって決定された。結果の特異性は、複合体の2種のタンパク質、3種のタンパク質、または4種のタンパク質を認識するヒトモノクローナル中和抗体の反応性によって決定された。最初の感染の14例では、感染開始後2~4週間以内にUL128-131遺伝子産物に対するIgG抗体の抗体陽転が一貫して検出され、一方で抗体は少なくとも12ヶ月にわたって持続した。UL128-131遺伝子産物に対するIgG抗体応答は、概してgHに対する応答よりも優れており、中和抗体応答に続くと思われた(上皮細胞において決定して)。再活性化した感染では、抗体応答には追加刺激応答によく似た傾向が示された。IgG抗体は、HCMV血清反応

40

50

陽性の健康な成人対照では検出されたが、HCMV血清反応陰性の個体では検出されなかった。

【0009】

Kinzlerら(2002年)は、組換えバキュロウイルスを使用してgH、gL、およびgOを昆虫細胞において同時発現させたが、gH/gL/gO三分子複合体を産生することはできなかった。その代わりに、gH/gLヘテロ二量体、gH/gLヘテロ多量体、およびgOホモ多量体のみが検出された。対照的に、gH、gL、およびgOを哺乳動物細胞において同時発現させることにより、HCMV感染細胞において形成されるgH/gL/gO複合体とよく似た高分子量複合体が産生された。細胞表面免疫蛍光法により、これらの複合体がトランスフェクトされた細胞の表面で発現され、提示されることが示された。

10

【0010】

US7704510には、上皮細胞のトロピズムにはpUL131Aが必要であることが開示されている。US7704510には、pUL128およびpUL130がgH/gLと複合体を形成し、それがピリオンに組み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に感染するためには必要であるが、線維芽細胞に感染するためには必要ではない。抗CD46抗体は上皮細胞のHCMV感染を阻害することが見いだされた。しかし、US7704510には、HCMV複合体の単離については開示されていない。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Mocarski, ES, T Shenk, and RF Pass. "Cytomegalovirus." In *Fields Virology*, edited by David M Knipe and Peter M Howley. Philadelphia, Pa., USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

【非特許文献2】Simanek, Amanda M., Jennifer Beam Dowd, Graham Pawelec, David Melzer, Ambarish Dutta, and Allison E. Aiello. "Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All-Cause and Cardiovascular Disease-Related Mortality in the United States." *PLoS ONE* 6 ((2011)): e16103.

30

【非特許文献3】Ryckman, BJ, et al. "Characterization of the Human Cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 Complex That Mediates Entry into Epithelial and Endothelial Cells." *Journal of Virology* 82 (2008): 60-70.

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

現在まで、研究者はHCMVのgH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含む複合体、例えば、三量体gH/gL/gO複合体または五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体などを精製することができていない。そのような精製された複合体は、診断に適用するための抗原として、およびHCMVに対するワクチン用の免疫原として有用である。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCM

50

V膜タンパク質複合体の組換えによる発現および精製に基づく。

【0014】

本発明は、gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、前記gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質が集合してタンパク質複合体が形成される条件下での、HCMVのgHタンパク質、HCMVのgLタンパク質、および少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質の組換え同時発現を含むプロセスを提供する。このプロセスは、必要に応じて、タンパク質複合体の単離を伴ってよく、その結果、精製された形態で調製することができる。一部の実施形態では、当該プロセスは、テグメントタンパク質またはカプシドタンパク質などの非エンベロープHCMVタンパク質のいずれの同時発現も伴わない。

10

【0015】

本発明は、このプロセスによって作製されるタンパク質複合体も提供する。例えば、複合体は、(i)gH、gLおよびgOまたは(ii)gH、gL、pUL128、pUL130およびpUL131Aを含んでよい。

【0016】

一部の実施形態では、本発明の複合体を高収率で作製することができる。例えば、本発明の細胞を増殖培地中で増殖させることを伴うプロセスでは、本発明の膜タンパク質複合体を、増殖培地1リットル当たり0.4mg超(例えば、増殖培地1リットル当たり0.45mg、0.5mg、0.55mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg、1.0mg、1.2mg、1.4mg、1.6mg、1.8mg、2mg、2.5mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mgまたは5mg、またはそれ以上)のレベルに蓄積することができる。

20

【0017】

本発明は、HCMVのgH、HCMVのgLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含む単離されたタンパク質複合体も提供する。gHおよびgLを含むタンパク質複合体の1つの例は、gH、gLおよびgOからなる三量体複合体である。gHおよびgLを含むタンパク質複合体の別の例は、gH、gL、pUL128、pUL130およびpUL131Aからなる五量体複合体である。

【0018】

本発明は、本発明のタンパク質複合体を含む組成物も提供する。一部の実施形態では、組成物は、ポリアクリルアミドを含有しない。一部の実施形態では、組成物は、水性液体などの液体であり、ゲルではない。一部の実施形態では、タンパク質複合体は組成物内で固定化されていない。例えば、前記HCMV膜タンパク質複合体は、ゲルの中、またはフィルム、膜、紙またはスライドの上に存在しなくてよい。

30

【0019】

本発明は、本発明のタンパク質複合体を含む組成物であって、HCMVのテグメントまたはHCMVのカプシドタンパク質などの非エンベロープHCMVタンパク質のいずれも含有しない組成物も提供する。

【0020】

本発明は、膜貫通(TM)ドメインを欠く、修飾されたHCMVのgHポリペプチドも提供する。TMドメインが存在しないことは、この修飾されたポリペプチドが脂質二重層の内部に存在することができないことを意味する。一部の実施形態では、gHポリペプチドは全長の天然TMドメインを欠き、他の実施形態では、gHポリペプチドは天然TMドメインの一部を保持し得るが、当該タンパク質が脂質二重層の内部に存在することが可能になるには不十分である。したがって、当該ポリペプチドは、天然のgHのTMドメインの最大10アミノ酸(例えば、1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸または10アミノ酸)を含有してよい。TMドメインの一部または全部を欠くことに加えて、当該ポリペプチドは、HCMVのgHの天然のC末端ドメインを欠いてもよく、C末端ドメインの一部を欠いても

40

50

よい。本発明は、前記修飾されたgHポリペプチドをコードする核酸分子、および前記修飾されたgHポリペプチドを、例えば、組換えによる発現、または化学合成によって（少なくとも一部において）作製するためのプロセスも提供する。

【0021】

本発明は、前記HCMV膜タンパク質複合体のタンパク質成分をコードする1つまたは複数の核酸分子を細胞に導入することを伴う、トランスフェクションの方法を提供する。前記1つまたは複数の核酸分子は、細胞に安定に導入することもでき（例えば、染色体への組み込みによって）、細胞に一過性に導入することもできる。本発明は、前記トランスフェクションから得られる細胞も提供する。前記トランスフェクションから得られる細胞は、前記1つまたは複数の核酸分子が安定に導入された細胞であることが好ましい。本発明は、前記細胞の後代、前記細胞のクローンまたは前記細胞から継代した細胞も提供する。これらの細胞を培養して本発明の複合体を発現させることができ、次いでそれを精製することができる。

10

【0022】

本発明は、HCMV膜タンパク質複合体を産生する細胞であって、(i)HCMVゲノムを含有すること、かつ/または(ii)HCMVビリオンを産生すること、かつ/または(iii)非エンベロープHCMVタンパク質のいずれも発現すること、をしない細胞も提供する。理想的には、細胞は、(i)、(ii)または(iii)のうちの1つを欠き、好ましくはそのうちの2つを欠き、より好ましくは(i)、(ii)および(iii)の3つ全てを欠く。

20

【0023】

本発明は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を認識するが、単離されたgHポリペプチド、gLポリペプチド、gOポリペプチド、pUL128ポリペプチド、pUL130ポリペプチドまたはpUL131Aポリペプチドのいずれにも結合せず、かつ/または、単離されたgH-gLヘテロ二量体に結合しない抗体を提供する。本発明の抗体は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を抗原として使用して生じさせたものであってよい。本発明の抗体は中和抗体であることが好ましい。本発明の抗体は、多様な抗体ライブラリーを使用したファージディスプレイなどの*in vitro*における選択方法を使用して同定したものであってよい。下記の通り、本発明の抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体であってよく、かつ/または、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体であってよい。

30

【0024】

本発明は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を使用して抗体を生じさせるための方法も提供する。あるいは、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を使用して、多様な抗体ライブラリーを使用したファージディスプレイなどの*in vitro*における選択方法を使用して抗体を同定することができる。

【0025】

本発明の抗体は、診断アッセイにおいて使用することができ、そして直接的にまたは間接的に標識されていてよい。一部の実施形態では、本発明の抗体は、療法において、例えば、HCMV感染症の治療において使用することができる。

40

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む単離されたHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、該gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質の組換え発現を含む、プロセス。

(項目2)

gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体を、

- gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質をコードする1つまたは複数の組換え核酸分子を発現系に導入すること、

50

- 該 1 つまたは複数の核酸を該発現系において発現させること、ならびに
- 該膜タンパク質複合体を精製すること

によって発現させるためのプロセス。

(項目 3)

哺乳動物細胞に、膜貫通ドメインを欠く g H の断片をコードする第 1 の核酸構築物、g L タンパク質をコードする第 2 の核酸構築物、および少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質をコードする第 3 の核酸構築物をトランスフェクトするステップを含む、項目 2 に記載のプロセス。

(項目 4)

前記 H C M V 膜タンパク質複合体が g H、g L および g O からなる、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

10

(項目 5)

前記 H C M V 膜タンパク質複合体が g H、g L、p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 および p U L 1 3 1 A からなる、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 6)

- 前記 p U L 1 2 8 が配列番号 1 3、1 4、1 5 または 3 3 に記載されている配列のいずれか 1 つを含み、またはそれからなり、

- 前記 p U L 1 3 0 が配列番号 1 6、1 7 または 3 4 に記載されている配列のいずれか 1 つを含み、またはそれからなり、かつ / または、

- 前記 p U L 1 3 1 A が配列番号 1 8、1 9、2 0 または 3 5 に記載されている配列の

20

いずれか 1 つを含む、またはそれからなる、
項目 5 に記載のプロセス。

(項目 7)

前記 H C M V 膜タンパク質複合体の純度が > 8 5 質量%、> 8 6 質量%、> 8 7 質量%、> 8 8 質量%、> 8 9 質量%、> 9 0 質量%、> 9 1 質量%、> 9 2 質量%、> 9 3 質量%、> 9 4 質量% または > 9 5 質量% である、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目 8)

前記 H C M V 膜タンパク質複合体内の g H、g L、g O、p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 および p U L 1 3 1 A のうちの 1 つまたは複数が、

- 哺乳動物のグリコシル化パターンを有し、かつ / または、

- 昆虫細胞のグリコシル化パターンを含有しない、

前記項目のいずれかに記載のプロセス。

30

(項目 9)

g H、g L および少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質を含む精製された H C M V 膜タンパク質複合体。

(項目 10)

前記項目のいずれかに記載のプロセスによって作製される、g H、g L および少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質を含む H C M V 膜タンパク質複合体。

(項目 11)

項目 9 または項目 10 に記載の単離された H C M V 膜複合体を含む免疫原性組成物。

40

(項目 12)

ワクチンである、項目 11 に記載の免疫原性組成物。

(項目 13)

アジュバントを含む、項目 11 に記載の免疫原性組成物。

(項目 14)

前記アジュバントが水中油エマルションまたはアルミニウム塩である、項目 12 に記載の免疫原性組成物。

(項目 15)

- H C M V 膜タンパク質複合体をコードする自己複製 R N A 分子と、

- 項目 9 または項目 10 に記載の H C M V 膜タンパク質複合体と

50

を含む免疫原性組成物。

(項目16)

- HCMV膜タンパク質複合体をコードする自己複製RNA分子を含む初回刺激用組成物と、

- 項目9または項目10に記載のHCMV膜タンパク質複合体を含む追加刺激用組成物と

を含むキット。

(項目17)

gL、膜貫通ドメインを欠くgH、および少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする組換え核酸分子であって、

(a) 自己複製RNA分子ではなく、

(b) アルファウイルスレプリコンではなく、

(c) NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、

(d) EMCVまたはEV71などの内部リボソーム進入部位(IRES)を含有せず、かつ/または、

(e) FMDVなどのウイルスの2A部位を含有しない

組換え核酸分子。

(項目18)

- gL、膜貫通ドメインを欠くgH、pUL128、pUL130およびpUL131A、または、

- gL、膜貫通ドメインを欠くgHおよびgO

をコードする、項目17に記載の組換え核酸分子。

(項目19)

gL、膜貫通ドメインを欠くgH、および少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする複数の組換え核酸であって、前記複数の組換え核酸のうちの1つまたは複数または全てが、

(a) 自己複製RNA分子ではなく、

(b) アルファウイルスレプリコンではなく、

(c) NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、

(d) EMCVまたはEV71などの内部リボソーム進入部位(IRES)を含有せず、かつ/または、

(e) FMDVなどのウイルスの2A部位を含有しない

複数の組換え核酸。

(項目20)

- 膜貫通ドメインを欠くgH、およびgLをコードする第1の構築物と、

- 1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする第2の構築物と

を含む、項目19に記載の複数の組換え核酸。

(項目21)

前記第2の構築物が、

- pUL128、pUL130およびpUL131A、または、

- gO

をコードする、項目20に記載の複数の組換え核酸。

(項目22)

- gLをコードする第1の組換え核酸分子と、

- 膜貫通ドメインを欠くgHの断片をコードする第2の組換え核酸分子と、

- 1つまたは複数の追加的なHCMVタンパク質をコードする1つまたは複数の第3の組換え核酸分子と

を含む、項目21に記載の複数の組換え核酸。

10

20

30

40

50

(項目23)

g H、g L および少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含む細胞であって、

- (a) H C M Vゲノムを含有せず、
- (b) H C M Vピリオンを産生せず、
- (c) 前記g H、g L および少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質をコードする自己複製R N A分子を含有せず、かつ/または、
- (d) アルファウイルスレプリコンを含有しない細胞。

(項目24)

g H、g L および少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含む単離または精製されたH C M V膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、項目23に記載の細胞を増殖培地中で増殖させることを伴う、プロセス。

(項目25)

前記H C M V膜タンパク質複合体が前記増殖培地中に分泌される、項目24に記載のプロセス。

(項目26)

前記H C M V膜タンパク質複合体を増殖培地1リットル当たり複合体 > 0.8 mg、> 0.85 mg、> 0.88 mg、> 0.9 mg、> 0.95 mg、> 1 mg、> 1.5 mg、> 2 mg、> 2.5 mg、> 3 mg、> 3.5 mg、> 4 mg、> 4.5 mg、> 5 mgの濃度まで蓄積させる、項目25に記載のプロセス。

(項目27)

- g H、g L および少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含むH C M V膜タンパク質複合体のタンパク質成分の1つまたは複数にコードするR N Aを用いて1回または複数回の初回刺激免疫を実施することと、

- g H、g L および少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含む精製されたH C M V膜タンパク質複合体を用いて1回または複数回の追加刺激免疫を後に実施することと

を含む、R N A初回刺激 - タンパク質追加刺激レジメン。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、Hisタグを付けた可溶性g Hを哺乳動物細胞で発現させるために使用する7591bpの構築物のプラスミドマップを示す。この構築物のヌクレオチド配列は配列番号23に示されている。当該構築物は、CMVプロモーター、myc-ポリヒスチジンタグと融合した、配列番号4（全長のg Hタンパク質のアミノ酸残基1～715からなるg H可溶性タンパク質）をコードする遺伝子、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化（bgh-PolyA）シグナル終結配列、F1ファージ複製開始点、SV40複製開始点、ネオマイシン耐性遺伝子、pUCサブゲノムのプロモーターおよびアンピシリン耐性遺伝子を含む。

【0027】

【図2】図2は、g Lを哺乳動物細胞で発現させるために使用する5156bpの構築物のプラスミドマップを示す。この構築物のヌクレオチド配列は配列番号24に示されている。当該構築物は、イントロンAを含有するCMVプロモーター/エンハンサー、配列番号7（g L）をコードする遺伝子、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化（bgh-PolyA）シグナル終結配列、カナマイシン耐性遺伝子およびColE1複製開始点を含む。

【0028】

【図3】図3は、UL128を哺乳動物細胞で発現させるために使用する4835bpの構築物のプラスミドマップを示す。この構築物のヌクレオチド配列は配列番号25に示されている。当該構築物は、イントロンAを含有するCMVプロモーター/エンハンサー、

10

20

30

40

50

U L 1 2 8 遺伝子、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化 (b g h - P o l y A) シグナル終結配列、カナマイシン耐性遺伝子および C o l E 1 複製開始点を含む。

【 0 0 2 9 】

【 図 4 】 図 4 は、U L 1 3 0 を哺乳動物細胞で発現させるために使用する 4 9 6 4 b p の構築物のプラスミドマップを示す。この構築物のヌクレオチド配列は配列番号 2 6 に示されている。当該構築物は、イントロン A を含有する C M V プロモーター/エンハンサー、U L 1 3 0 遺伝子、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化 (b g h - P o l y A) シグナル終結配列、カナマイシン耐性遺伝子および C o l E 1 複製開始点を含む。

【 0 0 3 0 】

【 図 5 】 図 5 は、U L 1 3 1 A を哺乳動物細胞で発現させるために使用する 4 7 0 9 b p の構築物のプラスミドマップを示す。この構築物のヌクレオチド配列は配列番号 2 7 に示されている。当該構築物は、イントロン A を含有する C M V プロモーター/エンハンサー、U L 1 3 1 A 遺伝子、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化 (b g h - P o l y A) シグナル終結配列、カナマイシン耐性遺伝子および C o l E 1 複製開始点を含む。

【 0 0 3 1 】

【 図 6 】 レーン A ~ C は銀染色 S D S - P A G E に対応し、他方でレーン E ~ K は、ウエスタンブロット分析に対応する。レーン E ~ G では、緑色 = 抗 A P P タグ (g H)、赤色 = 抗 g L であり、他方でレーン H ~ K では、赤色 = 抗 6 H i s (g O) である。レーン A、E および H にはラダーが示されている。レーン B、F および I は、ジチオスレイトール (D T T) の存在下で沸騰近くまで短時間加熱した試料に対応し、レーン C、G および K は、加熱または D T T に供しなかった試料に対応する。

【 0 0 3 2 】

【 図 7 】 図 7 は、サイズ排除クロマトグラムを示す。5 種のタンパク質全てが単一のピークとして溶出し、したがって、インタクトな五量体複合体が存在することが実証される。

【 0 0 3 3 】

【 図 8 】 図 8 は、S D S - P A G E およびウエスタンブロット分析について示す。

【 0 0 3 4 】

【 図 9 】 図 9 は、g H / g L 単独、または M F 5 9 を用いて製剤化した g H / g L のいずれかによって惹起される中和力価と、五量体複合体単独、または M F 5 9 を用いて製剤化した五量体複合体のいずれかによって惹起される中和力価の比較を示す。M F 5 9 を用いて製剤化した、精製された五量体複合体により、製剤化していないタンパク質よりも高い中和力価が惹起された。

【 0 0 3 5 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、五量体複合体単独 (A) ならびに M F 5 9 を用いて製剤化した五量体複合体 (B)、オキシ水酸化アルミニウムを用いて製剤化した五量体複合体 (C) および T L R 7 アゴニストが吸着した水酸化アルミニウムを用いて製剤化した五量体複合体 (D) によって惹起される中和力価を示す。

【 0 0 3 6 】

【 図 1 1 】 図 1 1 は、自己増幅性 R N A およびサブユニット単独で、または組合せにより、高い中和抗体力価が惹起されることを示すグラフである。具体的には、H C M V 五量体複合体をコードする自己増幅性 R N A (L N P に封入された自己複製 R N A) ; M F 5 9 を用いてアジュバント化した精製された五量体のサブユニット ; 自己増幅性 R N A の種々の配列、その後の M F 5 9 中サブユニット ; または自己増幅性 R N A とサブユニットの組合せによって惹起された中和力価が示されている。自己増幅性 R N A およびサブユニットの用量は 1 μ g であり、混合した用量は 1 + 1 μ g であった。中和アッセイ : 補体の存在下での A R P E - 1 9 細胞の V R 1 8 1 4 感染。

【 0 0 3 7 】

【 図 1 2 】 図 1 2 は、精製された g H / g L および五量体のサブユニットを使用したワクチン接種に対する (A) 3 w p 3 (6 4 日目) および (B) 4 w p 3 (7 1 日目) における C D 4 + T 細胞応答 (C D 4 + T 細胞の正味の %、および T h 0 C D 4、T h 1 C

10

20

30

40

50

D 4 および T h 2 C D 4 の % の単位として) を示すグラフである。

【 0 0 3 8 】

【 図 1 3 】 図 1 3 は、精製された五量体複合体を使用したワクチン接種に対する (A) 3 w p 3 (6 4 日目) および (B) 4 w p 3 (7 1 日目) における C D 4 + T 細胞応答 (C D 4 + T 細胞の正味の % の単位として) を示すグラフである。

【 0 0 3 9 】

【 図 1 4 】 図 1 4 は、精製された五量体複合体を使用したワクチン接種に対する (A) 3 w p 3 (6 4 日目) および (B) 4 w p 3 (7 1 日目) における C D 8 + T 細胞応答 (C D 8 + T 細胞の正味の % の単位として) を示すグラフである。

【 0 0 4 0 】

【 図 1 5 】 図 1 5 は、g H ペプチドプール 2 を使用したワクチン接種に対する (A) 3 w p 3 (6 4 日目) および (B) 4 w p 3 (7 1 日目) における C D 8 + T 細胞応答 (C D 8 + T 細胞の正味の % の単位として) を示すグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 1 】

本発明のタンパク質

U L 7 5 遺伝子によってコードされる H C M V 糖タンパク質 H (g H) は、感染性に必要であり、アルファヘルペスウイルス、ベータヘルペスウイルスおよびガンマヘルペスウイルスのメンバーの間で保存されているビリオン糖タンパク質である。g H は、g L と安定な複合体を形成し、この複合体の形成により、細胞表面での g H の発現が容易になる。H S V - 2 および E B V g H / g L 複合体の結晶構造に基づいて、g L サブユニットおよび g H の N 末端残基は構造の一端で球状ドメイン (「 頭部 」) を形成し、これは、g B との相互作用および膜融合の活性化に関係づけられる。ウイルスの膜の近位にある g H の C 末端ドメイン (「 尾部 」) も膜融合に関係づけられる。g H は、宿主因子 T L R 2 によって認識される決定因子を提示し、そして宿主因子 T L R 2 と T L R 1 の間で形成されるヘテロ二量体と直接相互作用する。T L R 2 は、N F - B 活性化および細胞からの炎症性サイトカイン応答を媒介する (B o e h m e , G u e r r e r o および C o m p t o n 、 2 0 0 6 年) 。

【 0 0 4 2 】

H C M V の M e r l i n 株由来の g H は、7 4 2 アミノ酸からなることが報告されている (G I : 5 2 1 3 9 2 4 8 、 配列番号 1) 。 H C M V の T o w n e 株由来の g H (G I : 1 3 8 3 1 4 、 配列番号 2) も、7 4 2 アミノ酸からなり、6 つの N - グリコシル化部位 (残基 5 5 、 6 2 、 6 7 、 1 9 2 、 6 4 1 および 7 0 0) を有し、N 末端にある疎水性シグナル配列 (アミノ酸残基 1 ~ 2 3) 、細胞から細胞外の空間に突出する外部ドメイン (残基 2 4 ~ 7 1 7) 、疎水性 T M ドメイン (残基 7 1 8 ~ 7 3 6) および C 末端の細胞質ドメイン (残基 7 3 7 ~ 7 4 2) からなることが報告されている。配列番号 2 は、配列番号 1 および H C M V の A D 1 6 9 株由来の g H (G I : 1 3 8 3 1 3 、 配列番号 3) と、それぞれ 9 9 % および 9 6 % のアミノ酸類似性を共有する。

【 0 0 4 3 】

一般には、g H タンパク質の N 末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟 g H タンパク質が生じる。本発明の H C M V 膜複合体内の g H タンパク質は N 末端シグナル配列を欠いてよい。成熟型の g H (本発明の単離された H C M V 膜複合体に見いだされる) は N 末端シグナル配列、T M ドメインおよび C 末端ドメインを欠くことが好ましい。

【 0 0 4 4 】

全長の U L 7 5 遺伝子配列が発現されることにより、g H を含む可溶性複合体の精製が妨げられる。逆に、g H の T M ドメインの少なくとも一部分を省略することにより、g H を含む複合体を高い収率および純度で精製することができる。例えば、ちょうど N 末端シグナル配列および g H の外部ドメインをコードする (しかし T M ドメインはコードしない) 構築物を使用して、容易に精製される形態の g H を発現させることができる。前記構築

10

20

30

40

50

物は、g Hの外部ドメインの大部分（例えば、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上）をコードしてよいが、TMドメインはコードしない、またはそのごく一部のみをコードしてよい。本発明のg Hタンパク質は、g Hの外部ドメインの全てを含んでもよく、g Hの外部ドメインのトランケート形態を含んでもよい。前記外部ドメインのトランケート形態は、全長のHCMVのg Hタンパク質と比較して、N末端および/またはC末端の1~20アミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸残基）を欠いてよい。本発明のg Hタンパク質の例は配列番号4であり、これは、配列番号1のアミノ酸残基1~715からなる。本発明の好ましいg Hタンパク質の例は配列番号29であり、これは、g HのN末端シグナル配列、TMドメインおよびC末端ドメインを欠き、そして配列番号1のアミノ酸残基24~715からなる。

10

20

30

40

50

【0045】

本発明のg Hタンパク質は、N末端またはC末端の伸長などの追加的なアミノ酸残基を含有してよい。そのような伸長は、g Hタンパク質の検出を容易にすることができるタグ（例えば、モノクローナル抗体によって検出するためのエピトープタグ）および/または精製を容易にすることができるタグ（例えば、ニッケルキレート化樹脂上での精製を可能にするポリヒスチジン-タグ）を1つまたは複数含んでよい。myc-タグおよびポリヒスチジン-タグを含むC末端の伸長の例は配列番号5で示される。したがって、本発明のg Hタンパク質（例えば、配列番号6および配列番号30）は、C末端に、配列番号5に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を含んでよい。本発明のg Hタンパク質は、C末端の伸長と融合した、トランケートされたg Hの外部ドメインを含んでよい。

【0046】

g Hの外部ドメインは、疎水性TMを欠くg Hの一部に対応する。外部ドメインの位置および長さは、所与の配列と配列番号1のペアワイズアラインメントに基づいて、例えば、目的のg Hポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1とアラインメントし、配列番号1の残基24~717と整合した配列を同定することによって予測することができる。同様に、TMドメインおよびC末端ドメインの位置は、目的のg Hポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1とアラインメントし、それぞれ配列番号1の残基718~736および残基737~742と整合する配列を同定することによって予測することができる。あるいは、外部ドメイン、シグナル配列およびTMドメインの位置および長さは、所与のg Hタンパク質配列の長さに沿って疎水性をコンピュータにより解析することに基づいて予測することができる。シグナル配列およびTMドメインの疎水性は最高レベルであり、これらの2つの領域は疎水性の低い外部ドメインと隣接している。

【0047】

本発明のg Hタンパク質は、配列番号4に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号4に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のg Hタンパク質は、配列番号6に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号6に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のg Hタンパク質は、配列番号29に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号29に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のg Hタンパク質は、配列番号30に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号30に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。

。好ましいgHタンパク質は、(i)HCMVのgLと二量体を形成することができ、(ii)三量体gH/gL/gO複合体の一部を形成し、(iii)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体の一部を形成し、(iv)配列番号4または配列番号29由来の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(v)HCMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

【0048】

HCMV糖タンパク質L(gL)は、UL115遺伝子によってコードされる。gLはウイルスの複製に必須であると考えられており、gLの既知の機能的特性は全て、gHとの二量体形成と直接関連付けられる。gL/gH複合体は、宿主細胞へのウイルスの進入を導くウイルスと原形質膜の融合に必要である。HCMVのMerlin株由来のgL(GI:39842115、配列番号7)およびHCMVのTowne株由来のgL(GI:239909463、配列番号8)は、278アミノ酸の長さであることが報告されている。HCMVのAD169株由来のgL(GI:2506510、配列番号9)は、278アミノ酸の長さであり、N末端にシグナル配列を含み(アミノ酸残基1~35)、2つのN-グリコシル化部位を有し(残基74および残基114)、TMドメインを欠くことが報告されている(Rigoutsosら、2003年)。配列番号7のN末端シグナル配列はアミノ酸残基1~30を含むことが予測される。配列番号8は、配列番号7と98%のアミノ酸同一性を共有する。22~39種の臨床分離株、ならびに実験室株AD169、TowneおよびToledo由来の全長のgL遺伝子の配列決定により、分離株の間のアミノ酸配列の変動が2%未満であることが明らかになった(Rasmussenら、2002年)。

10

20

【0049】

一般には、gLタンパク質のN末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟gLタンパク質が生じる。本発明のHCMV膜複体内のgLタンパク質はN末端シグナル配列を欠いてよい。本発明の好ましいgLタンパク質の例は配列番号31であり、これは、N末端シグナル配列を欠き、そして配列番号7のアミノ酸残基31~278からなる。

【0050】

本発明のgLタンパク質は、配列番号7に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号7に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のgLタンパク質は、配列番号31に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号31に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。好ましいgLタンパク質は、(i)HCMVのgHと二量体を形成することができ、(ii)三量体gH/gL/gO複合体の一部を形成し、(iii)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体の一部を形成し、(iv)配列番号7または配列番号31由来の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(v)HCMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

30

40

【0051】

UL74遺伝子によってコードされるHCMV糖タンパク質O(gO)は、分子シャペロンとしての機能を果たし、gH/gLのER輸出およびビリオンへの組み込みを増加させることが報告されている。gOは、gH/gLへの結合についてpUL128-131Aと競合するが、gH/gLから放出され、その結果、gH/gL(pUL128-131Aを欠く)がビリオンに組み込まれることが提唱されている(Ryckman、ChaseおよびJohnson、2010年)。他のウイルス遺伝子と比較して、HCMVのgOは、種々のHCMV株の中で異常に可変性であり、22~39種の臨床分離株、ならびに実験室株AD169、TowneおよびToledoの間のgOアミノ酸配列の変動性は、45%に近づいた(すなわち、異なる分離株の間でgOアミノ酸配列間の同一性は

50

わずか55%であった)(Rasmussenら、2002年)。HCMVのMerlin株由来のgO(GI:39842082、配列番号10)、AD169株由来のgO(GI:136968、配列番号11)およびTowne株由来のgO(GI:239909431、配列番号12)は、それぞれ472アミノ酸、466アミノ酸および457アミノ酸からなることが報告されている。配列番号10と73%のアミノ酸類似性を共有するHCMVのAD169株のgOは、18個のN-グリコシル化部位(残基75、残基83、残基87、残基103、残基130、残基157、残基162、残基171、残基219、残基242、残基288、残基292、残基350、残基385、残基392、残基399、残基433および残基454)を有し、N末端に切断可能なシグナル配列を含む可能性があり(アミノ酸残基1~30からなることが予測される)、これは成熟ポリペプチドには存在しない。Rigoutsos(2003年)により、TMドメイン(領域10~28および領域190~212)およびコイルドコイル領域(残基240~272)が存在することが予測された。

10

【0052】

一般には、gOタンパク質のN末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟gOタンパク質が生じる。本発明のHCMV膜複合体内のgOタンパク質はN末端シグナル配列を欠いてよい。本発明の好ましいgOタンパク質の例は配列番号32であり、これは、N末端シグナル配列を欠き、そして配列番号10のアミノ酸残基31~472からなる。

20

【0053】

本発明のgOタンパク質は、配列番号10に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号10に記載されている配列と少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のgOタンパク質は、配列番号32に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号32に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。好ましいgOタンパク質は、(i)三量体gH/gL/gO複合体の一部を形成することができ、(ii)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体の一部を形成することができず、(iii)配列番号10または配列番号32の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(iv)HCMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

30

【0054】

HCMVのMerlin株由来のpUL128(GI:39842124、配列番号13)は、130アミノ酸からなること、および中途終結を引き起こす1ヌクレオチド置換を含有することが報告されている。HCMVのTowne株由来のpUL128(GI:39841882、配列番号14)およびAD169株由来のpUL128(GI:59803078、配列番号15)は、171アミノ酸からなることが報告されている。配列番号13の中途終結に起因して、配列番号13と配列番号15は、配列番号15の全長にわたってわずか75%の同一性を共有する。pUL128は、配列番号13の残基1~27に位置するN末端シグナル配列を有することが予測されるが、TMドメインを欠くことが予測される。本発明の好ましいpUL128タンパク質の例は配列番号33であり、これは、N末端シグナル配列を欠き、そして配列番号14のアミノ酸残基28~171からなる。配列番号33も、配列番号15のアミノ酸残基28~171からなる。

40

【0055】

本発明のpUL128タンパク質は、配列番号15に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号15に記載されている配列と少なくとも60%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のpUL128タン

50

パク質は、配列番号33に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号33に記載されている配列と少なくとも60%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。好ましいpUL128タンパク質は、(i)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体の一部を形成することができ、(ii)配列番号15または配列番号33の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(iii)HCMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

【0056】

UL130は、UL131A-128遺伝子座の中心の最も大きな(214コドン)遺伝子である。遺伝子の概念的な翻訳(conceptual translation)により、推定されるケモカインドメイン(アミノ酸46~120)内の2つの潜在的なN結合グリコシル化部位(Asn85およびAsn118)および独特のC末端領域の末端の近くの追加的なN-グリコシル化部位(Asn201)を含有する親水性タンパク質に先行する長い(25アミノ酸)N末端シグナル配列が予測される。pUL130は、TMドメインを欠くことが予測される。pUL130は、感染細胞から非効率的に分泌されるが、ビリオンエンベロープにゴルジ成熟形態として組み込まれる管腔の糖タンパク質であることが報告されている(Patroneら、2005年)。HCMVのMerlin株由来のpUL130の配列およびTowne株由来のpUL130の配列が公的に入手可能であり(それぞれGI:39842125、配列番号16およびGI:239909473、配列番号17)、これらは、それぞれ214アミノ酸および229アミノ酸からなる。配列番号17は、pUL130のC末端領域内にフレームシフト突然変異を含有することが報告されており、配列番号16のHCMVと配列番号16の全長にわたって94%の同一性を共有する。

【0057】

一般には、pUL130タンパク質のN末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟pUL130タンパク質が生じる。本発明のHCMV膜複合体内のpUL130タンパク質はN末端シグナル配列を欠いてよい。本発明の好ましいpUL130タンパク質の例は配列番号34であり、これは、N末端シグナル配列を欠き、そして配列番号16のアミノ酸残基26~214からなる。

【0058】

本発明のpUL130タンパク質は、配列番号16に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号16に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のpUL130タンパク質は、配列番号34に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号34に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。その代わりに、本発明のpUL130タンパク質は、配列番号17に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号17に記載されている配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。好ましいpUL130タンパク質は、(i)五量体gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A複合体を形成することができ、(ii)それぞれ配列番号16、配列番号34または配列番号17の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(iii)HCMVビリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

【0059】

pUL131Aの機能は、内皮細胞におけるHCMVの複製だけでなく上皮細胞におけるHCMVの複製にも必要である。HCMVのMerlin株由来のpUL131A(G

10

20

30

40

50

I : 3 9 8 4 2 1 2 6、配列番号 1 8) および Towne 株由来の p U L 1 3 1 A (G I : 2 3 9 9 0 9 4 7 4、配列番号 1 9) および A D 1 6 9 株由来の p U L 1 3 1 A (G I : 2 1 9 8 7 9 7 1 2、配列番号 2 0) は、それぞれ 1 2 9 アミノ酸、1 2 9 アミノ酸および 7 6 アミノ酸からなることが報告されている。p U L 1 3 1 A は、配列番号 1 8 の残基 1 ~ 1 8 に位置する N 末端シグナル配列を含有すること、および T M ドメインを欠くことが予測される。A D 1 6 9 株由来の U L 1 3 1 A は、フレームシフトを引き起こす 1 塩基対の挿入を含有することが報告されている (W a n g および S h e n k、2 0 0 5 年) 。配列番号 1 8 は、配列番号 2 0 と N 末端の 2 8 アミノ酸にわたって 9 6 % 同一であるが、A D 1 6 9 の U L 1 3 1 A 遺伝子のフレームシフトに起因して、配列番号 1 8 の全長にわたる配列番号 2 0 との同一性はわずか 3 6 % である。

10

【 0 0 6 0 】

一般には、p U L 1 3 1 A タンパク質の N 末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟 p U L 1 3 1 A タンパク質が生じる。本発明の H C M V 膜複合体内の p U L 1 3 1 A タンパク質は N 末端シグナル配列を欠いてよい。本発明の好ましい p U L 1 3 1 A タンパク質の例は配列番号 3 5 であり、これは、N 末端シグナル配列を欠き、そして配列番号 1 8 のアミノ酸残基 1 9 ~ 1 2 9 からなる。配列番号 3 5 も、配列番号 1 9 のアミノ酸残基 1 9 ~ 1 2 9 からなる。

【 0 0 6 1 】

本発明の p U L 1 3 1 A タンパク質は、配列番号 1 7 に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号 1 8 に記載されている配列と少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であってよい。本発明の p U L 1 3 1 A タンパク質は、配列番号 3 5 に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号 3 5 に記載されている配列と少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であってよい。好ましい p U L 1 3 1 A タンパク質は、(i) 五量体 g H / g L / p U L 1 2 8 / p U L 1 3 0 / p U L 1 3 1 A 複合体を形成することができ、(i i) 配列番号 1 8 または配列番号 3 5 の少なくとも 1 つのエピトープを含み、かつ / または (i i i) H C M V ビリオンと免疫学的に交差反応する抗体を *i n v i v o* で惹起することができる。

20

【 0 0 6 2 】

臨床分離株を線維芽細胞で継代すると、U L 1 3 1 A - 1 2 8 遺伝子座における突然変異が非常に急速に蓄積し、他の細胞型に感染する能力が妨げられる可能性がある。実際に、そのような突然変異がウイルスストックに現れるのには、わずか 3 回の線維芽細胞での継代で十分であり得る。例えば、線維芽細胞で継代されていない臨床分離株と比較して、M e r l i n および T o l e d o は U L 1 2 8 に突然変異を有し、T o w n e は U L 1 3 0 の O R F に突然変異を有し、A D 1 6 9 は、突然変異した U L 1 3 1 A の O R F を含有する。臨床分離株は上皮細胞に効率的に感染し、感染性の後代を生じるが、実験室株はそうではないので、内皮細胞のようなこの細胞型は、U L 1 3 1 A - U L 1 2 8 遺伝子座における突然変異に選択されない臨床 H C M V ストックを作製するための実験室における宿主として有望である (W a n g および S h e n k、2 0 0 5 年) 。

30

40

【 0 0 6 3 】

本発明は、g H、g L および少なくとももう 1 つの H C M V 糖タンパク質を含む H C M V 複合体、例えば、g H / g L / g O または g H / g L / p U L 1 2 8 / p U L 1 3 0 / p U L 1 3 1 A を含む免疫原性組成物を提供する。そのような免疫原性組成物は、糖タンパク質 B (g B) などの他の H C M V タンパク質をさらに含んでよい (しかし、非エンベロープ H C M V タンパク質は含まないことが好ましい) 。

【 0 0 6 4 】

g B は、U L 5 5 によってコードされ、ウイルスと細胞膜の間の融合を媒介する。したがって、g B は、ウイルスの進入および感染において重要な役割を果たす。多くの他のウイルスの融合タンパク質と同様に、g B は、細胞膜に挿入する疎水性ループを含有し、そ

50

して進入の間に大きな構造的変化を受ける（融合前コンフォメーションおよび融合後コンフォメーション）。gHと同様に、gBは、宿主因子TLR2によって認識される決定因子を提示し、そして宿主因子TLR2とTLR1の間で形成されるヘテロ二量体と直接相互作用する。TLR2はNF- κ B活性化および細胞からの炎症性サイトカイン応答を媒介する（Boehme、GuerreroおよびCompton、2006年）。

【0065】

糖タンパク質B（gB）は、ヒトヘルペスウイルスのエンベロープ糖タンパク質のうちで最も高度に保存されている。HCMVのgBの構造は現在のところ未知であるが、HCMVのgBの構造は、配列相同性に基づいて、HSVのgBおよびEBVのgBの構造と同様であることが想定される。また、HSV-1のgBおよびEBVのgBと水疱性口内炎ウイルス（VSV）タンパク質の融合タンパク質（G）のgBの間には配列類似性がないにもかかわらず、HSV-1のgBおよびEBVのgBの融合後コンフォメーションとVSV-Gの融合後コンフォメーションの驚くべき程度の構造的な相同性が示される。

10

【0066】

HCMVのMerlin株由来のgB（GI：39842076、配列番号21）およびTowne株由来のgB（GI：138193、配列番号22）は907アミノ酸からなることが報告されている。HCMVのAD169株由来のgB（GI：138192、配列番号23）は906アミノ酸からなり、19個のN-グリコシル化部位（残基37、残基68、残基73、残基85、残基208、残基281、残基286、残基302、残基341、残基383、残基405、残基409、残基417、残基447、残基452、残基464、残基465、残基554、残基および585）を有し、N末端にあるシグナル配列（アミノ酸残基1～25）、細胞外領域（残基26～751）、TMドメイン（残基752～772）および細胞質ドメイン（残基773～907）からなることが報告されている（Rigoutsosら、2003年）。女性53人の試験において、gBの亜型が5種見いだされ、その間のヌクレオチド多型は28～124bpにわたる（Murthyら、2011年）。HCMVのMerlin株のgBとAD169株のgBは95%のアミノ酸類似性を共有する。HCMVのMerlin株のgBではN末端シグナル配列は配列番号21のアミノ酸残基1～22からなることが予測される。

20

【0067】

一般には、gBタンパク質のN末端シグナル配列が宿主細胞のシグナルペプチダーゼによって切断されて成熟gBタンパク質が生じる。本発明のHCMV膜複合体内のgBタンパク質はN末端シグナル配列を欠いてよい。本発明の好ましいgBタンパク質の例は配列番号36であり、これは、N末端シグナル配列を欠き、そして配列番号21のアミノ酸残基23～907からなる。

30

【0068】

本発明のgBタンパク質は、配列番号21に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号21に記載されている配列と少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のgBタンパク質は、配列番号36に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号36に記載されている配列と少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。好ましいgBタンパク質は、(i)配列番号18または配列番号36の少なくとも1つのエピトープを含み、かつ/または(ii)HCMVピリオンと免疫学的に交差反応する抗体をin vivoで惹起することができる。

40

【0069】

グリコシル化

gH、gL、gO、gBおよびpUL130は糖タンパク質と称することができるが、この命名法は、これらのタンパク質が本発明で使用する際にグリコシル化されていなければならないことを意味するものと解釈されるべきではない。それどころか、本発明の一部

50

の実施形態では、ポリペプチドのうちの1つまたは複数はグリコシル化されていない。しかし、通常は、本発明の複合体内の1つまたは複数（または全て）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、本発明の複合体内の1つまたは複数（または全て）のポリペプチドが、突然変異した哺乳動物細胞などの培養細胞のグリコシル化突然変異株によってグリコシル化されている。そのようなグリコシル化突然変異株により、グリコシル化の野生型パターンとは異なるポリペプチドのグリコシル化のパターンが生じる、すなわち、生じるポリペプチドのグリコフォームが野生型グリコフォームとは異なる。

【0070】

グリコシル化のレベルおよび種類は、宿主細胞の種に左右される。一般に、進化の点でヒトから最も遠い種、例えば、細菌、酵母、真菌、昆虫および植物などのグリコシル化レパートリーはヒトのグリコシル化レパートリーとの類似性が最も低い。細菌細胞ではタンパク質は通常グリコシル化されていないが、N結合グリコシル化系の *Escherichia coli* への移入が報告されている（Langdon、CuccuiおよびWren、2009年）。昆虫細胞ではタンパク質はグリコシル化されている場合がある。しかし、脊椎動物の細胞とは異なり、昆虫細胞は最後から2番目のガラクトースおよび末端シアル酸で複合N結合側鎖を生成することができない。したがって、昆虫細胞におけるグリコシル化の種類は治療用タンパク質のためには最適ではない可能性がある。酵母細胞はマンノースを使用してN結合グリコシル化（アスパラギンと）およびO結合グリコシル化（セリン/トレオニンと）を行うことができる。哺乳動物細胞では典型的ではないゴルジにおける過剰グリコシル化（hyperglycosylation）（外側の鎖の伸長）が酵母細胞の特徴であり、これにより、抗体反応性に関する問題が生じる可能性がある。また、哺乳動物細胞とは異なり、酵母細胞はマンノース以外の糖を組み込むことができない。酵母細胞および昆虫細胞とは対照的に、哺乳動物細胞において発現される哺乳動物糖タンパク質は忠実にグリコシル化され、その結果、*in vivo*において形成されるものと最も類似した組換え産物が生じる。

【0071】

したがって、本発明の複合体内のグリコシル化されたポリペプチドは、(i)哺乳動物のグリコシル化パターンを有し、かつ/または、(ii)昆虫細胞のグリコシル化パターンを含有しないことが好ましい。一部の実施形態では、本発明のタンパク質のうちの1つまたは複数は、最後から2番目のガラクトースおよび末端シアル酸の複合N結合側鎖を含有する。

【0072】

本発明の膜タンパク質複合体

本発明のHCMV膜タンパク質複合体は、gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMVタンパク質の間のヘテロオリゴマー結合体である。これらの複合体内のタンパク質は、非共有結合による相互作用および/または共有結合による相互作用によって結びついてよい。gH/gL/gO三量体複合体では、ジスルフィド結合によってgHがgOおよびgLと連結している。本発明の五量体複合体では、gH、gLおよびpUL128は、一般には、ジスルフィド結合によって連結しているが、pUL130およびpUL131Aは、一般には、非共有結合による相互作用によって五量体複合体に組み込まれる（実施例7に示されている通り）。一部の実施形態では、本発明のpUL130タンパク質および/または本発明のpUL131Aタンパク質は非共有結合による相互作用によって五量体複合体に組み込まれる。さらに、本発明のpUL130タンパク質および/またはpUL131Aは、非共有結合による相互作用によって内部で連結してよい。

【0073】

三量体複合体および五量体複合体の化学量論は、それぞれ1:1:1（HuberおよびCompton、1999年）および1:1:1:1:1（Ryckman、ChaseおよびJohnson、2010年）であると仮定されるが、これは未だに決定的には確認されていない。

【0074】

10

20

30

40

50

本発明者らは、本発明の膜タンパク質複合体は免疫原性応答を誘導することができることを発見した。したがって、本発明の膜タンパク質複合体はHCMV感染に対する免疫を誘導することができる。これらの2つの機能は、本発明の膜タンパク質複合体上の、中和抗体を含めた抗体の産生を惹起することができるエピトープの保持に左右される。五量体複合体について種々の立体構造エピトープ (conformational epitope) が公知である。例えば、Macagno (2010年) は、内皮細胞、上皮細胞、および骨髄細胞のHCMV感染を中和したヒトモノクローナル抗体のパネルを単離した。UL128遺伝子産物内の保存されたエピトープに結合した抗体を1つ例外として、他の抗体は全て、gH/gL/UL128-131A複合体の2種以上のタンパク質の発現が必要な立体構造エピトープに結合した。本発明の五量体複合体は、Macagno (2010年) によって同定された立体構造エピトープのうちの1つまたは複数を有することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0075】

本発明の各タンパク質は、HCMVのMerlin株および/またはAD169株と比較して、挿入、欠失および置換などの突然変異を、これらの突然変異がタンパク質の抗原としての使用に有害でない限り (具体的には、タンパク質が少なくともHCMVのMerlin株および/またはAD169株の膜タンパク質複合体に結合することができる抗体および/または前記HCMV膜タンパク質複合体の生物学的効果を中和することができる抗体の産生を惹起することができる1つまたは複数のエピトープを保持する限り) 含有してよい。さらに、そのような突然変異により本発明の膜タンパク質複合体を形成するタンパク質の能力が妨げられるべきではない。本発明の膜タンパク質複合体を形成する能力は、タンパク質の精製を実施すること、および非還元PAGEによってタンパク質を分析すること、ウエスタンブロットおよび/またはサイズ排除クロマトグラフィーによって試験することができる。タンパク質は、複合体の一部を形成する場合、全てがネイティブなPAGEゲル上の単一のバンドに存在し得、かつ/またはサイズ排除クロマトグラムの単一のピークに存在し得る。

【0076】

本発明のHCMV膜タンパク質複合体は、種々のレベルの純度で、例えば、総タンパク質の少なくとも80質量%、85質量%、90質量%、95質量%、または99質量%に調製することができる、すなわち、複合体が組成物中の総タンパク質量の少なくとも80%を占める。組成物はポリアクリルアミドを含まなくてよい。

【0077】

発現系

一態様では、本発明は、本発明の膜タンパク質複合体を発現させるためのプロセスを提供する。本発明において使用するための適切な発現系は当業者に周知であり、その多くはDoyle (2008年) に詳しく記載されている。一般に、必要な宿主において核酸分子を維持し、増やし、発現させてポリペプチドを産生させることに適した任意の系またはベクターを使用することができる。適切なヌクレオチド配列を、例えばSambrook (2000年) に記載のものなどの種々の周知であり慣例的な任意の技法によって発現系に挿入することができる。一般に、コードする遺伝子をプロモーター、および必要に応じてオペレーターなどの制御エレメントの制御下に置くことができ、その結果、所望のペプチドをコードするDNA配列が形質転換された宿主細胞においてRNAに転写される。

【0078】

適切な発現系の例としては、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母の染色体エレメント、ウイルス、例えば、パキウウイルス、SV40などのパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス、またはそれらの組合せなどに由来するベクター、例えば、コスミドおよびファージミドを含めたプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝エレメントに由来するものなどを含めた染色体系、エピソーム系およびウイルス由来の系が挙げられる。プラスミドに含有させ、発現させることができ

るものよりも大きなDNAの断片を送達するために、ヒト人工染色体(HAC)も使用することができる。

【0079】

適切な発現系としては、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させたもしくはトランスフェクトした昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)もしくは細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。無細胞翻訳系も本発明のタンパク質を作製するために使用することができる。本発明のタンパク質は、哺乳動物細胞などの真核細胞で産生されることが好ましい。

10

【0080】

組換えポリペプチドは一過性に発現させることも安定に発現させることもできる。組換えタンパク質は安定に発現させることが好ましい。例えば、目的のペプチドを安定に発現する細胞系統に、ウイルス起源の複製および/または内在性発現エレメントならびに同じベクター上または別のベクター上にある選択可能なマーカー遺伝子を含む発現ベクターを使用してトランスフェクトすることができる。ベクターを導入した後、選択培地に切り換える前に細胞を強化培地中で1~2日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、これが存在することにより、導入された配列を首尾よく発現する細胞を増殖させ、回収することが可能になる。安定に形質転換された細胞の抵抗性クローンを、細胞型に適した組織培養技法を使用して増殖させることができる。

20

【0081】

発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞系統は当該分野で公知であり、それらとして、これだけに限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓(COS)細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、ヒト胎児由来腎臓(HEK)293細胞、Bowes黒色腫細胞およびヒト肝細胞癌(例えば、Hep G2)細胞ならびにいくつかの他の細胞系統を含めた、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞系統が挙げられる。哺乳動物細胞における発現は、産生されるタンパク質が忠実な哺乳動物のグリコシル化パターンを有し、したがって、感染性HCMV粒子上に存在するエピトープを保有するので好ましい。したがって、本発明の膜タンパク質複合体を哺乳動物細胞で産生させることにより、感染の間に、天然に存在するHCMV粒子に結合することができる抗体の産生が導かれる。

30

【0082】

バキュロウイルス系では、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料がキットの形態で、とりわけ、Invitrogen、San Diego CA(「MaxBac」キット)から市販されている。これらの技法は、一般に、当業者に公知であり、Summersら(SummersおよびSmith、1987年)に十分に記載されている。この系において使用するために特に適した宿主細胞としては、Drosophila S2(すなわち、安定にトランスフェクトしたDrosophila S2細胞に組換えバキュロウイルスを感染させることによる)およびSpodoptera Sf9細胞などの昆虫細胞が挙げられる。一部の実施形態では、本発明のタンパク質は昆虫細胞では産生されない。

40

【0083】

当該分野で公知の多くの植物細胞培養物および植物全体の遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞の遺伝子発現系の例としては、米国特許第5,693,506号；米国特許第5,659,122号；米国特許第5,608,143号およびZenk(1991年)^{2,3}に記載されているものが挙げられる。具体的には、プロトプラストを単離し、培養して再生された植物全体を生じることができる全ての植物を利用することができ、その結

50

果、移入された遺伝子を含有する植物全体が回収される。実際に、これだけに限定されないが、サトウキビ、サトウダイコン、綿、果実および他の木、マメ科植物および野菜の主要な種の全てを含めた全ての植物を培養細胞または組織から再生することができる。

【0084】

原核生物発現系の例としては、*streptococci*、*staphylococci*、*E. coli*、*Streptomyces* および *Bacillus subtilis* を宿主細胞として使用するものが挙げられる。

【0085】

真菌発現系の例としては、酵母（例えば、*S. cerevisiae*）およびアスペルギルス属（*Aspergillus*）を宿主細胞として使用するものが挙げられる。

10

【0086】

HEK293細胞は、リン酸カルシウム法およびポリエチレンイミン（PEI）法を含めた種々の技法によるトランスフェクト能が高いので、本発明のHCMVタンパク質を一過性に発現させるために適している。有用なHEK293の細胞系統は、EBVのEBNA1タンパク質を発現するもの、例えば、293-6Eなどである（Loignonら、2008年）。形質変換されたHEK293細胞は、本発明のタンパク質複合体を増殖培地中に高レベルで分泌し、したがって、そのようなタンパク質複合体を増殖培地から直接精製することが可能になることが示されている。

【0087】

CHO細胞は、長期間にわたる安定な遺伝子発現およびタンパク質の高収率が可能になるので、免疫原または抗原として使用するための本発明のHCMVタンパク質を工業生産するために特に適した哺乳動物宿主である。

20

【0088】

一部の実施形態では、本発明の膜タンパク質複合体は、それが発現される細胞から分泌される。本発明の他の実施形態では、本発明のタンパク質は分泌されない。*E. coli* では、例えば、非分泌タンパク質が封入体内に蓄積され得る。組換えタンパク質を封入体から精製するための方法は当該分野で周知である。

【0089】

トランスフェクションは、リン酸カルシウムの使用、電気穿孔を含めた種々の方法によって、または細胞膜と融合し、それらのカーゴを内側に沈着するリポソームを作製するための材料とカチオン性脂質を混合することによって行うことができる。

30

【0090】

核酸構築物

本発明は、gL、TMドメインを欠くgH、および少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする組換え核酸を提供する。前記組換え核酸は、(a)自己複製RNA分子ではなく、(b)アルファウイルスレプリコンではなく、(c)NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、(d)EMCVまたはEV71などの内部リポソーム進入部位（IRES）を含有せず、かつ/または(e)FM DVなどのウイルスの2A部位を含有しないことが好ましい。前記組換え核酸の例は、本発明のgLタンパク質、本発明のgHタンパク質、本発明のpUL128タンパク質、本発明のpUL130タンパク質および本発明のpUL131タンパク質をコードする単一の構築物であってよい。

40

【0091】

本発明は、本発明の1つまたは複数のタンパク質をコードする複数の組換え核酸も提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、2つの核酸構築物：本発明のgHタンパク質および本発明のgLタンパク質をコードする第1の構築物、ならびに本発明のpUL128タンパク質、本発明のpUL130タンパク質および本発明のpUL131Aタンパク質をコードする第2の構築物を提供する。

【0092】

本発明は、本発明のgLタンパク質をコードする第1の組換え核酸分子；本発明のgH

50

タンパク質をコードする第2の組換え核酸分子；および1つまたは複数の追加的なHCMVタンパク質をコードする1つまたは複数の第3の組換え核酸分子を含む複数の組換え核酸も提供する。前記第1の組換え核酸分子、第2の組換え核酸分子および/または第3の組換え核酸分子（複数可）は、（a）自己複製RNA分子ではなく、（b）アルファウイルスレプリコン（複数可）ではなく、（c）NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、（d）EMCVまたはEV71などの内部リボソーム進入部位（IRES）を含有せず、かつ/または（e）FMDVなどのウイルスの2A部位を含有しないことが好ましい。

【0093】

一実施形態では、第3の組換え核酸分子は、本発明のgOタンパク質をコードし、別の実施形態では、第3の組換え核酸分子（複数可）は、本発明のpUL128タンパク質、pUL130タンパク質およびpUL131Aタンパク質をコードする。したがって、複合体内の個々のポリペプチドをコードする配列は単一の核酸分子に存在してもよく、2つ以上の核酸分子の間に分布してもよい。

【0094】

一実施形態では、本発明は、（i）本発明のgLタンパク質をコードする第1の組換え核酸分子、（ii）本発明のgHタンパク質をコードする第2の組換え核酸分子、（iii）本発明のpUL128タンパク質をコードする第3の組換え核酸分子、（iv）本発明のpUL130タンパク質をコードする第4の組換え核酸分子、および（v）本発明のpUL131Aタンパク質をコードする第5の組換え核酸分子を含む複数の組換え核酸を提供する。前記第1の組換え核酸分子、第2の組換え核酸分子、第3の組換え核酸分子、第4の組換え核酸分子および/または第5の組換え核酸分子（複数可）は、（a）自己複製RNA分子ではなく、（b）アルファウイルスレプリコン（複数可）ではなく、（b）NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、（c）EMCVまたはEV71などの内部リボソーム進入部位（IRES）を含有せず、かつ/または（d）FMDVなどのウイルスの2A部位を含有しないことが好ましい。

【0095】

本発明のgHタンパク質をコードする核酸分子は、配列番号24に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号24に記載されている配列と少なくとも89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のgLタンパク質をコードする核酸分子は、配列番号25に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号25に記載されている配列と少なくとも89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のpUL128タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号26に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号26に記載されている配列と少なくとも74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のpUL130タンパク質をコードする核酸分子は、配列番号27に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号27に記載されている配列と少なくとも74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。本発明のpUL131Aタンパク質をコードする核酸分子は、配列番号28に対して種々の程度の同一性を有してよく、例えば、配列番号28に記載されている配列と少なくとも74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であってよい。

【0096】

本発明の核酸は、ゲノムDNAおよび/またはcDNAを含んでよい。cDNAとは異なり、ゲノムDNAはイントロンを含有してよい。いくつかの遺伝子はイントロンが存在

10

20

30

40

50

する場合、より効率的に発現される。ゲノムUL128遺伝子およびUL131A遺伝子はそれぞれ2つのエクソンからなり、一方UL130はいかなるイントロンも含有しない。ゲノム配列を使用する場合、作製されるタンパク質は、スプライシングに左右され、これは使用する発現系に応じて変動し得る。

【0097】

本発明は、前記核酸を含むベクターであって、適切なプロモーターおよびターミネーターを含むベクターを提供する。前記組換え核酸はプラスミドであってもよく、細胞のゲノムに組み込むこともできる。これらのベクター内のプロモーターはHCMVプロモーターであっても非HCMVプロモーターであってもよい。

【0098】

本発明は、gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体を、gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質をコードする1つまたは複数の組換え核酸分子を発現系に導入すること；前記1つまたは複数の核酸を前記発現系において発現させること；ならびに前記HCMV膜タンパク質複合体を精製することによって発現させるためのプロセスも提供する。一部の実施形態では、このプロセスは、細胞に、本発明のgHタンパク質、gLタンパク質、pUL128タンパク質、pUL130タンパク質およびpUL131Aタンパク質または本発明のgHタンパク質、gLタンパク質およびgOタンパク質のいずれかをコードする第1の核酸構築物をトランスフェクトすることを含む。一部の実施形態では、このプロセスは、細胞に、本発明のgHタンパク質をコードする第1の核酸構築物、本発明のgLタンパク質をコードする第2の核酸構築物、および本発明の1つまたは複数の追加的なHCMV糖タンパク質をコードする1つまたは複数の第3の核酸構築物をトランスフェクトすることを含んでよい。一部の実施形態では、このプロセスは、細胞に、本発明のgHタンパク質および本発明のgLタンパク質をコードする第1の核酸構築物、ならびに本発明の1つまたは複数の追加的なHCMV糖タンパク質、例えば、gOまたはpUL128、pUL130およびpUL131Aなどをコードする第2の核酸構築物（複数可）をトランスフェクトすることを含んでよい。

【0099】

前記HCMV膜タンパク質複合体を哺乳動物細胞において発現させることができる。前記単離されたHCMV膜タンパク質複合体は、必要に応じて精製することができる。

【0100】

本発明の細胞

本発明は、本発明の1つの核酸分子または複数の核酸分子を発現する細胞であって、完全なHCMVゲノムを含まない細胞も提供する。前記細胞は、本発明の前記1つの核酸分子または複数の核酸分子を用いて安定に形質転換することができる。前記細胞は、哺乳動物細胞、例えば、CHO細胞であることが好ましい。

【0101】

本発明は、gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む細胞であって、HCMVゲノムを含有せず、かつ/またはHCMVビリオンを産生せず、かつ/または非エンベロープHCMVタンパク質のいずれも発現しない細胞を提供する。

【0102】

膜タンパク質複合体の単離および精製

本発明の複合体は、単離された形態で調製し、使用することが好ましい。「単離された」という用語は、本明細書で使用される場合、その天然の環境から取り出されたことを意味する。したがって、「単離されたHCMV膜タンパク質複合体」とは、HCMV感染細胞の表面上または感染性HCMVビリオン内にあるHCMV膜タンパク質複合体を含まない。

【0103】

実施例に記載されている発現方法を使用して、本発明の複合体を高収率で作製することができる。[上記を参照されたい]。

10

20

30

40

50

【0104】

本発明は、本発明のHCMV膜複合体を精製するためのプロセスを提供する。そのような本発明のプロセスにより、HCMV膜タンパク質複合体を、ゲル電気泳動によって決定して、総タンパク質の>85質量%、>86質量%、>87質量%、>88質量%、>89質量%、>90質量%、>91質量%、>92質量%、>93質量%、>94質量%または>95質量%の純度で作製することが可能になる。これらの高レベルの純度により、複合体が診断への適用における免疫原として、またはワクチン製剤における抗原として使用するために適したものになる。

【0105】

本発明は、本発明のHCMV膜タンパク質複合体を精製するためのプロセスであって、前記精製が、1つまたは複数のクロマトグラフィーのステップを含むプロセスを提供する。前記クロマトグラフィーのステップは、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーなどのアフィニティークロマトグラフィー、および/またはサイズ排除クロマトグラフィーを含んでよい。

10

【0106】

組成物

本発明は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を含む組成物も提供する。本発明は、本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体を含む組成物も提供する。

【0107】

HCMV膜タンパク質複合体は、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。そのような組成物を使用して、哺乳動物（例えば、ヒト）において抗体を生じさせることができる。

20

【0108】

本発明は、本発明のHCMV膜タンパク質複合体を含む医薬組成物を提供する。同様に、本発明は、本発明のHCMV膜タンパク質複合体を薬学的に許容される担体と組み合わせることを伴う、医薬組成物を作成するためのプロセスを提供する。

【0109】

それらの抗原に加えて、本発明の免疫原性組成物および医薬組成物は、一般には、薬学的に許容される担体を含み、そのような担体の詳細な考察はRemington: The Science and Practice of Pharmacyにおいて入手可能である。

30

【0110】

組成物のpHは、通常は6から8の間であり、6.5から7.5の間（例えば、約7）であることがより好ましい。安定なpHは、緩衝液、例えば、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはヒスチジン緩衝液を使用することによって維持することができる。したがって、組成物は、一般に、緩衝液を含む。

【0111】

組成物は滅菌されていてよく、かつ/または発熱物質を含まなくてよい。組成物はヒトに対して等張性であってよい。

【0112】

組成物は、その抗原（複数可）を免疫学的に有効な量で含む。「免疫学的に有効な量」とは、対象に投与した際に抗原に対する抗体応答を惹起するために有効な量である。この量は、治療される個体の健康状態、個体の年齢、個体の免疫系の抗体を合成する能力、所望の保護の程度、ワクチンの製剤、治療担当医師による医学的状況の評価、および他の関連性のある因子に応じて変動し得る。この量は、慣例的な試験によって決定することができる比較的広範な範囲に入ることが予想される。本発明の組成物の抗原含有量は、一般に、用量当たりのタンパク質の質量を単位として表される。抗原当たり10~500μg（例えば、50μg）の用量が有用であり得る。

40

【0113】

免疫原性組成物は、免疫学的アジュバントを含んでよい。したがって、例えば、免疫原

50

性組成物は、アルミニウム塩アジュバントまたは水中油エマルション（例えば、MF59またはAS03などのスクアレンを含む水中油エマルション）を含んでよい。適切なアルミニウム塩としては、水酸化物（例えば、オキシ水酸化物）、ホスフェート（例えば、ヒドロキシホスフェート、オルトホスフェート）（例えば、Vaccine Design...（1995年）、Powell & Newman編、ISBN：030644867X、Plenumの8章&9章を参照されたい）、またはそれらの混合物が挙げられる。塩は任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、非結晶など）を取ってよく、抗原が塩に吸着していることが好ましい。患者に投与するための組成物中の Al^{+++} の濃度は、5mg/ml未満、例えば、 $< 4\text{ mg/ml}$ 、 $< 3\text{ mg/ml}$ 、 $< 2\text{ mg/ml}$ 、 $< 1\text{ mg/ml}$ などであることが好ましい。好ましい範囲は 0.3 mg/ml から 1 mg/ml の間である。最大で用量当たり 0.85 mg が好ましい。水酸化アルミニウムアジュバントおよびリン酸アルミニウムアジュバントが本発明で使用するために特に適している。

10

【0114】

1つの適切な免疫学的アジュバントは、アルミニウム塩に吸着させた、WO2011/027222において定義されている式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩を含む。Powell & Newman（1995年）に開示されているもののいずれかを含めた多くのさらなるアジュバントを使用することができる。

【0115】

組成物は、特に複数回投与形式で包装される場合には、抗菌薬を含んでよい。チオメルサルおよび2-フェノキシエタノールなどの抗菌薬が一般にワクチンに見いだされるが、水銀を含まない防腐剤を使用するか、防腐剤を全く使用しないことが好ましい。

20

【0116】

組成物は、界面活性剤、例えば、ポリソルベート80などのポリソルベートを含んでよい。界面活性剤は、一般に、低レベル、例えば、 $< 0.01\%$ で存在する。

【0117】

組成物は、浸透圧をもたらすためにナトリウム塩（例えば、塩化ナトリウム）を含んでよい。 $NaCl$ の濃度は $10 + 2\text{ mg/ml}$ 、例えば約 9 mg/ml が典型的である。

【0118】

本発明の組成物は、一般に、対象に直接投与される。直接送達は、非経口注射（例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、または組織の間質腔への注射）によって、または任意の他の適切な経路によって実現することができる。例えば大腿または上腕への筋肉内投与が好ましい。注射は針（例えば、皮下針）を介するものであってよいが、無針注射を代わりに使用することができる。典型的な筋肉内投与体積は 0.5 ml である。

30

【0119】

投与は、単回投薬スケジュールを伴っても複数回投薬スケジュールを伴ってもよい。

【0120】

免疫される対象はヒトであり、任意の年齢、例えば、 $0 \sim 12$ ヶ月齢、 $1 \sim 5$ 歳、 $5 \sim 18$ 歳、 $18 \sim 55$ 歳、または、 56 歳以上であってよい。

【0121】

本発明のワクチンは、予防用（すなわち、疾患を予防するためのもの）であってよく、治療用（すなわち、疾患の症状を軽減または排除するためのもの）であってよい。

40

【0122】

本発明の単離および/または精製されたHCMV膜タンパク質複合体は、単独で、または、例えば、RNA初回刺激（prime）、その後タンパク質追加刺激（boost）などの混合モダリティレジメンにおける初回刺激または追加刺激のいずれかとして、投与することができる。RNA初回刺激タンパク質追加刺激の戦略の、タンパク質初回刺激タンパク質追加刺激の戦略と比較した利点としては、例えば、抗体価の上昇、より平衡のとれたIgG1:IgG2a垂型プロファイル、ウイルス粒子のものと同様のTH1型CD4+T細胞媒介性免疫応答の誘導、および非中和抗体の産生の減少が挙げられる。RNA初回刺激により、組成物がアジュバントを含有するかしないかにかかわらず、組成物の

50

免疫原性を増大させることができる。

【0123】

RNA初回刺激 - タンパク質追加刺激戦略では、RNAおよびタンパク質は同じ標的抗原を対象とする。RNAを送達する適切な形態の例としては、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、例えば、カチオン性ナノエマルジョン(CNE)を用いて製剤化されたレプリコンなどが挙げられる。適切なカチオン性水中油ナノエマルジョンは、WO2012/006380に開示されており、例えば、油のコア(例えば、スクアレンを含む)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。

10

【0124】

WO2012/051211には、五量体複合体のタンパク質構成物をコードするVRPおよび製剤化されたRNA(CNEおよびLNP)を用いて免疫したマウスにおいて五量体複合体に対する抗体が産生されることが開示されている。これらの抗体は、上皮細胞におけるHCMV感染を中和することができることが見いだされている。RNA初回刺激 - タンパク質追加刺激レジメンは、まず(例えば、0~8週に)、本発明のHCMV膜タンパク質複合体のタンパク質成分の1つまたは複数をコードするRNA(VRP、LNP、CNEなどとして送達することができる)を用いた1回または複数回の初回刺激免疫を実施し、次いで、必要に応じてアジュバントを用いて製剤化された、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を用いて、または、必要に応じてアジュバントを用いて製剤化された、本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体を用いて1回または複数回の追加刺激免疫を後に(例えば、24~58週に)実施することを伴ってもよい。

20

【0125】

したがって、本発明は、第1のエピトープを含む第1のポリペプチドHCMV抗原および第2のエピトープを含む第2のポリペプチドHCMV抗原をコードする自己複製RNA分子を含む免疫原性組成物を提供する。本発明は、(i)病原体由来の第1のエピトープを含む第1のポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子を含む初回刺激用組成物、および(ii)その病原体由来の第2のエピトープを含む第2のポリペプチド抗原を含む追加刺激用組成物を含むキットにも関する。

【0126】

抗原は、独立に、gB、gH、gL、gO、pUL128、pUL130およびpUL131Aからなる群から選択することができる。前記第1のポリペプチドHCMV抗原は、本発明のHCMV膜タンパク質複合体、例えば、三量体gH/gL/gO複合体または五量体複合体などであることが好ましい。前記第2のポリペプチドHCMV抗原は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体、例えば、三量体gH/gL/gO複合体もしくは五量体複合体など、または本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体、例えば、三量体gH/gL/gO複合体もしくは五量体複合体などであることが好ましい。第1のポリペプチド抗原および第2のポリペプチド抗原は実質的に同じであってよい。第1のポリペプチド抗原は可溶性ポリペプチドであっても膜アンカー型ポリペプチドであってもよく、第2のポリペプチド抗原は可溶性ポリペプチドであってよい。第1のポリペプチド抗原は融合ポリペプチドであってよい。第2のポリペプチド抗原は融合ポリペプチドであってよい。自己複製RNAはアルファウイルス由来のRNAレプリコンであってよい。

30

40

【0127】

自己複製RNA分子は、1つまたは複数の修飾されたヌクレオチドを含んでよい。一部の実施形態では、自己複製RNA分子は、本発明のHCMV膜タンパク質複合体、例えば、本発明の三量体gH/gL/gO複合体または五量体複合体などをコードする。一部の実施形態では、第2のポリペプチド抗原は、本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体、例えば、本発明の精製された三量体gH/gL/gO複合体または精製された五量体複合体などである。

【0128】

50

一部の実施形態では、RNA分子は、カチオン性脂質、リボソーム、コクリエート(cocleaate)、ピロソーム、免疫刺激性複合体、微小粒子、ミクروسフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム(emulsome)、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合せに封入されているか、それに結合しているか、またはそれに吸着している。

【0129】

一部の実施形態では、キットまたは免疫原性組成物の初回刺激用組成物は、カチオン性脂質、リボソーム、コクリエート、ピロソーム、免疫刺激性複合体、微小粒子、ミクروسフェア、ナノスフェア、単層小胞、多重膜小胞、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、エマルソーム、ポリカチオン性ペプチド、またはカチオン性ナノエマルジョンをさらに含む。

10

【0130】

本発明の抗体

本発明は、本発明の単離および/または精製されたHCMV膜タンパク質複合体を認識するが、単離されたgHポリペプチド、gLポリペプチド、gOポリペプチド、pUL128ポリペプチド、pUL130ポリペプチドまたはpUL131Aポリペプチドのいずれにも結合せず、かつ/または単離されたgH-gLヘテロ二量体に結合しない抗体を提供する。

【0131】

下記の通り、本発明の抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体であってよく、かつ/または、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体であってよい。

20

【0132】

本発明の抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。多くの状況にモノクローナル抗体(mAb)が好ましい。本来抗体に関連して使用される「モノクローナル」という用語は、全てが同じ標的タンパク質を認識するが、異なるB細胞によって産生され、そのタンパク質の異なるエピトープを対象とする「ポリクローナル」抗体とは対照的に、免疫細胞の単一のクローン株によって産生される抗体を指す。本明細書で使用される場合、「モノクローナル」という単語は、いかなる特定の細胞起源も意味しないが、同じ標的タンパク質内の特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す任意の抗体の集団を指す。この使用は当該分野では標準的なものである。

30

【0133】

したがって、mAbは、免疫細胞、非免疫細胞、無細胞系などを含めた任意の適切なタンパク質合成系を使用して作製することができる。したがって、mAbは、従来のモノクローナル抗体方法論(例えば、KohlerおよびMilsteinの標準の体細胞ハイブリダイゼーション技法)を含めたさまざまな技法によって、Bリンパ球のウイルス形質転換または発がん性形質転換によって、コンビナトリアル合成によって、ファージディスプレイによってなどで作製することができる。したがって、本発明の抗体は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を抗原として使用して、または本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体を抗原として使用して、in vivoで生じさせることができる。抗体を生じさせる動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギなどであってよい。代替の手法として、抗体のファージディスプレイなどのin vitroにおける選択方法を使用して抗体を同定することができる。

40

【0134】

本発明の抗体は、種々の形態をとってよい。例えば、本発明の抗体は、哺乳動物において天然に見いだされるネイティブな抗体であってよい。ネイティブな抗体は重鎖および軽鎖で構成される。重鎖および軽鎖はどちらも、可変ドメインと定常ドメインに分けられる。異なる抗体の異なる抗原を認識する能力は、それらの軽鎖および重鎖の両方の可変ドメインが異なることから生じる。脊椎動物種におけるネイティブな抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ()またはラムダ()のいずれかであ

50

る。ネイティブな抗体の重鎖の定常ドメインは、 κ 、 λ 、 μ 、または δ であり、それぞれ I g A クラス、I g D クラス、I g E クラス、I g G クラス、または I g M クラスの抗体を生じさせる。クラスは、さらに、サブクラスまたはアイソタイプ、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g A 2 などに分けることができる。抗体は、アロタイプによって分類することもでき、例えば、重鎖は G 1 m アロタイプ a、f、x もしくは z、G 2 m アロタイプ n、または G 3 m アロタイプ b 0、b 1、b 3、b 4、b 5、c 3、c 5、g 1、g 5、s、t、u、もしくは v を有し得、軽鎖は K m (1) アロタイプ、K m (2) アロタイプまたは K m (3) アロタイプを有し得る。ネイティブな I g G 抗体は 2 つの同一の軽鎖 (1 つの定常ドメイン C L および 1 つの可変ドメイン V L) ならびに 2 つの同一の重鎖 (3 つの定常ドメイン C H 1、C H 2 および C H 3 ならびに 1 つの可変ドメイン V H) を有し、これらはジスルフィド架橋によって結びついている。種々のクラスのネイティブな抗体のドメインおよび三次元構造が周知である。

【 0 1 3 5 】

本発明の抗体が定常ドメインを伴う軽鎖を有する場合、その軽鎖は、 κ 軽鎖または λ 軽鎖であってよい。本発明の抗体が定常ドメインを伴う重鎖を有する場合、その重鎖は、 μ 重鎖、 δ 重鎖、 κ 重鎖、 λ 重鎖または μ 重鎖であってよい。クラス (すなわち、I g G 抗体) の重鎖が好ましい。

【 0 1 3 6 】

本発明の抗体は、抗原結合活性を保持するネイティブな抗体の断片であってよい。例えば、ネイティブな抗体をパepsin 消化することにより、「F a b」断片と称される、それぞれが単一の抗原結合性部位を有する 2 つの同一の抗原結合性断片、および残りの抗原結合活性を有さない「F c」断片が生じる。ペプシン処理により、2 つの抗原結合性部位を有する「F (a b ')₂」断片がもたらされる。「F v」は、完全な抗原結合性部位を含むネイティブな抗体の最小の断片であり、1 つの重鎖可変ドメインと 1 つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。したがって、本発明の抗体は、F a b、F a b'、F (a b ')₂、F v、またはネイティブな抗体の任意の他の種類の断片であってよい。

【 0 1 3 7 】

本発明の抗体は、V H ドメインおよび V L ドメインを単一のポリペプチド鎖として含む「単鎖 F v」(「s c F v」または「s F v」) であってよい。一般には、V H ドメインおよび V L ドメインは、s c F v が抗原と結合するための所望の構造を形成することを可能にする、V H ドメインと V L ドメインの間の短いポリペプチドリンカー (例えば、> 1 2 アミノ酸) によってつながっている。少なくとも最初の選択のために s c F v タンパク質を発現させる典型的なやり方は、ファージディスプレイライブラリーまたは他のコンビナトリアルライブラリーに関連する。複数の s c F v が単一のポリペプチド鎖に連結してよい。

【 0 1 3 8 】

本発明の抗体は、複数の連結した F v (s c F v) 断片を含む「ダイアボディ」または「トリアボディ」などであってよい。V H ドメインと V L ドメインの間の、互いと対をなすことが可能になるには短い (例えば、< 1 2 アミノ酸) リンカーを使用することによって、それらは、その代わりに、別の F v 断片の相補的なドメインと対をなさざるを得ず、したがって、2 種の抗原結合性部位が創出される。これらの抗体は、C H ドメインおよび / または C L ドメインを含んでよい。

【 0 1 3 9 】

本発明の抗体は、単一の可変ドメインまたは V H H 抗体であってよい。ラクダ科の動物 (例えば、ラクダおよびラマ) およびサメにおいて天然に見いだされる抗体は、重鎖を含有するが軽鎖は含有しない。したがって、哺乳動物のネイティブな抗体とは異なり、抗原認識は単一の可変ドメインによって決定される。そのような抗体の定常ドメインは省略することができるが、抗原結合活性は保持される。少なくとも最初の選択のために単一の可変ドメイン抗体を発現させる 1 つのやり方は、ファージディスプレイライブラリーまたは他のコンビナトリアルライブラリーに関連する。

10

20

30

40

50

【0140】

本発明の抗体は、「ドメイン抗体」(dAb)であってよい。そのようなdAbは、ヒト抗体の重鎖または軽鎖のいずれかの可変ドメインに基づき、分子量がおよそ13kDa(完全な抗体のサイズの10分の1未満)である。異なる標的を認識する重鎖dAbおよび軽鎖dAbの対を形成することにより、二重特異性を有する抗体を作出することができる。dAbは直ちに体内から取り除かれ、したがって、持続放出系が有効であるが、血液タンパク質(例えば、血清アルブミン)に結合する第2のdAbに融合させることによって、ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール)とのコンジュゲーションによって、または他の技法によって、循環中にさらに持続させることができる。

【0141】

抗体は、フィブロネクチンIII型ドメインに基づく足場、例えば、アドネクチンまたはトリネクチンを有してよい。フィブロネクチンに基づく足場は免疫グロブリンではないが、全体的なフォールディングは、最小の機能性抗体断片のものと密接に関連する。この構造に起因して、非免疫グロブリン抗体は、性質および親和性が天然の抗体と同様である抗原結合特性を模倣する。FnIIIドメインは、2つのベータシート間に分布し、それら自体が互いに詰まってタンパク質のコアを形成する7つまたは8つのベータストランドを有し、そしてベータストランドを互いに接続し、溶媒露出(solvent exposed)しているループ(抗体CDRと類似している)をさらに含有する。そのようなループがベータシートサンドイッチの各縁端部に少なくとも3つ存在し、縁端部はベータストランドの方向に対して垂直のタンパク質の境界である。FnIIIループは標準のクローニング技法を使用して免疫グロブリンCDRと置き換えることができ、in vivoにおける抗体の親和性成熟化のプロセスと同様であるin vitroにおけるループランダム化およびシャッフリング戦略において使用することができる。FnIII足場は、フィブロネクチンIII型の第10のモジュール(すなわち、¹⁰Fn3)に基づいてよい。

【0142】

したがって、「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、多様な構造的特徴を有する種々のタンパク質を包含するが、通常は、2つのβ-シート内に配置された逆平行ストランドの2層サンドイッチを伴う全タンパク質フォールディングを有する少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。

【0143】

本発明で使用する抗体は、単一の抗原結合部位(例えば、Fab断片またはscFvなどの場合)または複数の抗原結合部位(例えば、F(ab')₂断片またはダイアボディまたはネイティブな抗体などの場合)を含んでよい。抗体が2つ以上の抗原結合部位を有する場合、抗原の架橋が有利にもたらされ得る。

【0144】

抗体が2つ以上の抗原結合性部位を有する場合、抗体は、単一特異性(すなわち、全ての抗原結合性部位が同じ抗原を認識する)であってもよく、多重特異性(すなわち、抗原結合性部位が2つ以上の抗原を認識する)であってもよい。

【0145】

本発明の抗体は、非タンパク質物質を、例えば、共有結合性コンジュゲーションを介して含んでよい。例えば、抗体は放射性同位元素を含んでよく、例えば、ZEVALLIN(商標)およびBEXXAR(商標)製品はそれぞれ⁹⁰Y同位元素および¹³¹I同位元素を含む。さらなる例として、抗体は細胞傷害性分子を含んでよく、例えば、MYLOTARG(商標)は細菌毒素であるN-アセチル-カリチアマイシンに連結している。さらなる例として、抗体は共有結合したポリマーを含んでよく、例えば、ポリオキシエチル化ポリオールまたはポリエチレングリコール(PEG)が結合することにより、抗体の循環半減期が増大することが報告されている。

【0146】

一部の実施形態では、抗体は、1つまたは複数の定常ドメイン(例えば、CHドメイン

10

20

30

40

50

またはC Lドメインを含む)を含んでよい。上記の通り、定常ドメインは 軽鎖もしくは軽鎖または 重鎖、 重鎖、 重鎖、 重鎖もしくは μ 重鎖を形成し得る。抗体が定常ドメインを含む場合、その定常ドメインは、ネイティブな定常ドメインであっても修飾された定常ドメインであってもよい。重鎖は、3つの定常ドメイン(クラス、 クラス、 クラスなどの場合)または4つの定常ドメイン(μ クラス、 クラスなどの場合)のいずれかを含んでよい。定常ドメインは、抗体と抗原の間の結合性相互作用に直接関与しないが、これだけに限定されないが、抗体依存性細胞傷害性(A D C C)への抗体の関与; C 1 q 結合; 補体依存性細胞傷害; F c 受容体結合; 食作用; および細胞表面受容体の下方制御を含めた種々のエフェクター機能をもたらし得る。

【0147】

定常ドメインは、ネイティブな抗体の重鎖のC末端領域である「F c領域」を形成することができる。本発明の抗体がF c領域を含む場合、そのF c領域は、ネイティブなF c領域であっても修飾されたF c領域であってもよい。F c領域はいくつかの抗体の機能のために重要であり、例えば、H E R C E P T I N (商標)の活性はF c依存性である。ネイティブな抗体のF c領域の境界は変動し得るが、ヒトI g G重鎖F c領域は、通常、C y s 2 2 6位またはP r o 2 3 0位のアミノ酸残基から重鎖のC末端までにわたると定義される。F c領域は、一般には、例えば、F c R I (C D 6 4)、F c R I I (例えば、F c R I I A、F c R I I B 1、F c R I I B 2、F c R I I C)、F c R I I I (例えば、F c R I I I A、F c R I I I B)、F c R n、F c R (C D 8 9)、F c R、F c μ R、F c R I (例えば、F c R I 2またはF c R I 2)、F c R I I (例えば、F c R I I AまたはF c R I I B)などの1つまたは複数のF c受容体に結合することができる。F c領域は、同様にまたはその代わりに、C 1 qなどの補体タンパク質に結合することができ得る。抗体のF c領域に対する修飾を使用して、そのエフェクター機能(複数可)を変化させること、例えば、受容体への結合親和性を上昇または低下させることができる。

【0148】

抗体は、一般には、グリコシル化されている。重鎖のC H 2ドメインに結合したN結合グリカンは、例えば、C 1 qおよびF c Rへの結合に影響を及ぼし得、グリコシル化されていない(a g l y c o s y l a t e d)抗体は、これらの受容体に対する親和性がより低い。グリカン構造は、活性にも影響を及ぼす可能性があり、例えば、グリカンの二分枝鎖の末端にあるガラクトース糖の数(0個、1個または2個)に応じて補体媒介性細胞死の差異が見られ得る。抗体のグリカンによって投与後にヒト免疫原性応答が生じないことが好ましい。

【0149】

抗体は、天然では付随すると思われる産物から遊離した形態で調製することができる。抗体の天然の環境の混入成分としては、酵素、ホルモン、または他の宿主細胞タンパク質などの物質が挙げられる。

【0150】

有用な抗体は、それらの標的抗原に対して、ナノモルまたはピコモル単位(例えば、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} Mの、またはそれよりも密接な)親和定数を有する。そのような親和性は、従来の分析的な技法を使用して、例えば、B I A c o r e (商標)計装に具体化された表面プラズモン共鳴技法を使用し、製造者の説明書に従って操作して決定することができる。

【0151】

本発明で使用するモノクローナル抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体または(例えば、獣医科用に)非ヒト抗体であってもよい。

【0152】

一部の実施形態では、抗体はヒトm A bである。これらは、種々の手段によって調製することができる。例えば、目的の抗原を産生するヒトB細胞を、例えば、エプスタイン・バーウイルス(E B V)を必要に応じてポリクローナルB細胞活性化因子の存在下で感染

10

20

30

40

50

させることによって不死化することができる。ヒトモノクローナル抗体は、非ヒト宿主において、例えば、ScidマウスまたはTrimeramマウス中に、宿主自身の免疫系を機能性ヒト免疫系と置き換えることによって、産生させることもできる。本明細書では集会的に「ヒトIgマウス」と称される、Medarexからの「humab mouse」およびAbgenixからの「xeno-mouse」を含めたトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソミック(transchromosomal)マウスがヒトモノクローナル抗体を生成するために首尾よく使用されてきた。ファージディスプレイもこの目的に関して成功している。非ヒト抗体とは異なり、ヒト抗体では、ヒトに投与した際にそれらの定常ドメインを対象とする免疫応答が惹起されない。さらに、これらのヒト抗体の可変ドメインは完全ヒトであり(具体的には、相補性決定領域[CDR]に加えて、可変ドメインのフレームワーク領域が完全ヒトである)、したがって、ヒトに投与した際に、可変ドメインフレームワーク領域を対象とする免疫応答は惹起されない(潜在的に、任意の抗イディオタイプ応答以外)。ヒト抗体は、ヒト起源ではない配列はいかなるものも含まない。

10

20

30

40

50

【0153】

一部の実施形態では、抗体はヒト化mAb、CDRグラフト化mAbまたはキメラmAbである。これらは、種々の手段によって調製することができる。例えば、これらは、非ヒト(例えば、マウス)モノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。非ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを得、標準の分子生物学技法を使用して、ヒト免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創出するために、当該分野で公知の方法を使用してマウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる。CDRグラフト化抗体を創出するために、マウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる。ヒト化抗体を創出するために、1つまたは複数の非CDR可変フレームワーク残基を変更することもできる。H1 CDR、H2 CDRおよびH3 CDRと一緒にアクセプターVHドメインに移入することができるが、それらのうちの1つまたは2つのみを移入することも適切であり得る。同様に、L1 CDR、L2 CDRおよびL3 CDRのうちの1つ、2つまたは3つ全てをアクセプターVLドメインに移入することができる。好ましい抗体は、ドナーCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ全てを有する。1つのCDRのみを移入する場合、一般には、そのCDRは、通常6つのうちで最も短いL2 CDRではない。一般には、ドナーCDRは全て同じヒト抗体由来であるが、これらを混合すること、例えば、第1の抗体由来の軽鎖CDRと第2の抗体由来の重鎖CDRを移入することも可能である。

【0154】

一部の実施形態では、抗体は非ヒトmAbである。これらは、種々の手段、例えば、マウスmAbを調製するための最初のKohlerおよびMilstein技法によって調製することができる。

【0155】

本発明の抗体を生じさせるための方法

本発明は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体または本発明の精製されたHCMV膜タンパク質複合体を使用して抗体を生じさせるための方法も提供する。これらの抗体はヒト抗体であってもヒト化抗体であってもよい。これらの抗体は、本発明の単離されたHCMV膜タンパク質複合体に特異的であり、単離されたgH、gL、gO、pUL128、pUL130またはpUL131Aには結合しないことが好ましい。そのような抗体は、診断アッセイのために使用することができ、そして直接的にまたは間接的に標識されていてよい。広範囲の抗体標識が当該分野で公知である。本発明の他の実施形態では、本発明の抗体は、治療のために、例えば、HCMV感染症の処置において使用することができ、抗原の生物活性を阻害または中和することができる中和抗体の形態であってよい。

【0156】

定義

「組換え」とは、本明細書においてポリヌクレオチドを説明するために使用される場合、その起源または操作によって、(1)天然で付随するポリヌクレオチドの全部または一部が付随せず、かつ/または(2)天然で連結しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結しているゲノム起源、cDNA起源、半合成起源、または合成起源であるポリヌクレオチドを意味する。「組換え」という用語は、タンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、組換えポリヌクレオチドを発現させることによって作製されるポリペプチドを意味する。

【0157】

「含む (comprising)」という用語は、「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からなってもよく、追加的な何かを含み、例えば、X+Yであってもよい。

10

【0158】

「実質的に」という単語により、「完全に」は排除されず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくてよい。必要であれば、「実質的に」という単語は本発明の定義から省くことができる。

【0159】

数値xと関連した「約」という用語は、任意選択であり、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0160】

特に明記されていない限り、2つ以上の成分を混合するステップを含むプロセスでは、混合にいかなる特定の順序も必要ない。したがって、成分を任意の順序で混合することができる。例えば、3つの成分が存在する場合、2つの成分を互いと組み合わせることができ、次いでその組合せを第3の成分と組み合わせることができる。

20

【0161】

動物(特にウシ)材料を細胞の培養に使用する場合、その材料は、伝達性海綿状脳症(TSE)を伴わない、特に牛海綿状脳症(BSE)を伴わない供給源から入手すべきである。全体的に、動物由来の材料が完全に存在しない状態で細胞を培養することが好ましい。

【0162】

化合物を組成物の一部として体内に投与する場合、その化合物を、その代わりに適切なプロドラッグと置き換えることができる。

30

【0163】

ポリペプチド配列間の配列同一性は、Needleman-Wunschグローバルアライメントアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch、1970年)を使用し、初期状態のパラメータ(例えば、ギャップ開始ペナルティ(gap opening penalty) = 10.0、およびギャップ伸長ペナルティ(gap extension penalty) = 0.5を用い、EBLOSUM62スコアリング行列を使用する)を使用してペアワイズアライメントアルゴリズムによって決定することが好ましい。このアルゴリズムは、EMBOSSパッケージ内のニードルツールで都合よく実行される(Rice、LongdenおよびBleasby、2000年)。配列同一性は本発明のポリペプチド配列の長さ全体にわたって算出されるべきである。

40

【0164】

本発明の特定の実施形態

本発明の特定の実施形態としては、以下が挙げられる：

【0165】

1. gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む単離されたHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、前記gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質の組換え発現を含むプロセス。

【0166】

50

2. HCMV膜タンパク質複合体の精製を含む、項目1に記載のプロセス。

【0167】

3. gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体を、

- gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質をコードする1つまたは複数の組換え核酸分子を発現系に導入すること、

- 前記1つまたは複数の核酸を前記発現系において発現させること、ならびに

- 前記膜タンパク質複合体を精製すること

によって発現させるためのプロセス。

【0168】

4. 細胞に、膜貫通ドメインを欠くgHの断片をコードする第1の核酸構築物、gLタンパク質をコードする第2の核酸構築物、および少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質をコードする第3の核酸構築物をトランスフェクトするステップを含む、項目3に記載のプロセス。

【0169】

5. 前記HCMV膜タンパク質複合体を哺乳動物細胞で発現させる、項目3または項目4に記載のプロセス。

【0170】

6. gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含む精製されたHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、前記HCMV膜タンパク質複合体を項目3に記載のプロセスに従って発現させるステップと、単離されたHCMV膜タンパク質複合体を精製するステップとを含むプロセス。

【0171】

7. HCMV膜タンパク質複合体がgH、gLおよびgOからなる、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0172】

8. HCMV膜タンパク質複合体がgH、gL、pUL128、pUL130およびpUL131Aからなる、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0173】

前記gHが配列番号1、2、3、4、6、29または30に記載されている配列のいずれか1つを含み、またはそれからなり、かつ/または、前記gLが配列番号7、8、9または31に記載されている配列のいずれか1つを含む、またはそれからなる、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0174】

9. 前記gOが配列番号10、11、12または32に記載されている配列のいずれか1つを含む、またはそれからなる、項目7に記載のプロセス。

【0175】

10. - 前記pUL128が配列番号13、14、15または33に記載されている配列のいずれか1つを含み、またはそれからなり、

- 前記pUL130が配列番号16、17または34に記載されている配列のいずれか1つを含み、またはそれからなり、かつ/または、

- 前記pUL131Aが配列番号18、19、20または35に記載されている配列のいずれか1つを含む、またはそれからなる、

項目8または項目9に記載のプロセス。

【0176】

11. - 前記gHが配列番号1、2、3、4、6、29または30に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含み、またはそれからなり、かつ/または、

- 前記gLが配列番号7、8、9または31に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含む、またはそれからなる、

10

20

30

40

50

前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0177】

12. 前記gOが配列番号10、11、12または32に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含む、またはそれからなる、項目11に記載のプロセス。

【0178】

13. - 前記pUL128が、配列番号13、14、15または33に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含み、またはそれからなり、
- 前記pUL130が配列番号16、17または34に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含み、またはそれからなり、かつ/または、
- 前記pUL131Aが配列番号18、19、20または35に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含む、またはそれからなる、
項目12に記載のプロセス。

10

【0179】

14. 前記項目のいずれか1つに規定されるHCMV膜タンパク質複合体を精製するためのプロセスであって、前記生成は、1つまたは複数のクロマトグラフィーのステップを含む、プロセス。

【0180】

15. 前記クロマトグラフィーのステップが、アフィニティークロマトグラフィー、好ましくは、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーおよび/またはサイズ排除クロマトグラフィーを含む、項目14に記載のプロセス。

20

【0181】

16. HCMV膜タンパク質複合体の純度が、>85質量%、>86質量%、>87質量%、>88質量%、>89質量%、>90質量%、>91質量%、>92質量%、>93質量%、>94質量%または>95質量%である、前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0182】

17. 前記HCMV膜タンパク質複合体内のgH、gL、gO、pUL128、pUL130およびpUL131Aのうちの1つまたは複数が、
- 哺乳動物のグリコシル化パターンを有し、かつ/または、
- 昆虫細胞のグリコシル化パターンを含有しない、

30

前記項目のいずれかに記載のプロセス。

【0183】

18. gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含む精製されたHCMV膜タンパク質複合体。

【0184】

19. 前記項目のいずれかに記載のプロセスによって作製される、gH、gLおよび少なくとももう1つのHCMV糖タンパク質を含むHCMV膜タンパク質複合体。

【0185】

20. 項目18または項目19に記載の単離されたHCMV膜タンパク質複合体を含む組成物。

40

【0186】

21. ポリアクリルアミドを含有しない、項目20に記載の組成物。

【0187】

22. HCMVのテグメントタンパク質またはカプシドタンパク質を含有しない、項目20または項目21に記載の組成物。

【0188】

23. 液体である、項目20から22までのいずれか1つに記載の組成物。

【0189】

24. 免疫原性組成物である、項目20から23までのいずれか1つに記載の組成物。

50

【0190】

25. g Bを含む、項目24に記載の免疫原性組成物。

【0191】

26. 前記g Bが配列番号21、22、23または36に記載されている配列のいずれか1つを含む、またはそれからなる、項目25に記載の免疫原性組成物。

【0192】

27. 前記g Bが配列番号21、22、23または36に記載されている配列のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含む、またはそれからなる、項目26に記載の免疫原性組成物。

【0193】

28. 前記g Bが、
 - 哺乳動物のグリコシル化パターンを有し、かつ/または、
 - 昆虫細胞のグリコシル化パターンを含有しない、
 項目25から27までのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

10

【0194】

29. ワクチンである、項目24から28までのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

【0195】

30. アジュバントを含む、項目24から29までのいずれか1つに記載の免疫原性組成物。

20

【0196】

31. 前記アジュバントが水中油エマルションまたはアルミニウム塩である、項目30に記載の免疫原性組成物。

【0197】

32. - HCMV膜タンパク質複合体をコードする自己複製RNA分子と、
 - 項目18または項目19に記載のHCMV膜タンパク質複合体と
 を含む免疫原性組成物。

【0198】

33. - HCMV膜タンパク質複合体をコードする自己複製RNA分子を含む初回刺激用組成物と、
 - 項目18または項目19に記載のHCMV膜タンパク質複合体を含む追加刺激用組成物と
 を含むキット。

30

【0199】

34. g L、膜貫通ドメインを欠くg H、および少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする組換え核酸分子であって、
 (a) 自己複製RNA分子ではなく、
 (b) アルファウイルスレプリコンではなく、
 (c) NSP1、NSP2、NSP3およびNSP4などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、
 (d) EMCVまたはEV71などの内部リボソーム進入部位(IRES)を含有せず、かつ/または、
 (e) FMDVなどのウイルスの2A部位を含有しない
 組換え核酸分子。

40

【0200】

35. - g L、膜貫通ドメインを欠くg H、pUL128、pUL130およびpUL131A、または、
 - g L、膜貫通ドメインを欠くg Hおよびg O
 をコードする、項目34に記載の組換え核酸分子。

【0201】

50

36. g L、膜貫通ドメインを欠く g H、および少なくとも1つの追加的な H C M V 糖タンパク質をコードする複数の組換え核酸であって、前記複数の組換え核酸のうちの1つまたは複数または全てが、

- (a) 自己複製 R N A 分子ではなく、
- (b) アルファウイルスレプリコンではなく、
- (c) N S P 1、N S P 2、N S P 3 および N S P 4 などのアルファウイルス非構造タンパク質のいずれもコードせず、
- (d) E M C V または E V 7 1 などの内部リボソーム進入部位 (I R E S) を含有せず、かつ/または、
- (e) F M D V などのウイルスの 2 A 部位を含有しない

複数の組換え核酸。

【0202】

37. - 膜貫通ドメインを欠く g H、および g L をコードする第1の構築物と、
- 1つの追加的な H C M V 糖タンパク質をコードする第2の構築物と
を含む、項目36に記載の複数の組換え核酸。

【0203】

38. 前記第2の構築物が、
- p U L 1 2 8、p U L 1 3 0 および p U L 1 3 1 A、または、
- g O
をコードする、項目37に記載の複数の組換え核酸。

【0204】

39. - g L をコードする第1の組換え核酸分子と、
- 膜貫通ドメインを欠く g H の断片をコードする第2の組換え核酸分子と、
- 1つまたは複数の追加的な H C M V タンパク質をコードする1つまたは複数の第3の組換え核酸分子と
を含む、項目36に記載の複数の組換え核酸。

【0205】

40. (a) g H をコードする前記核酸分子が配列番号24に記載されている配列と89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、

(b) g L をコードする前記核酸分子が配列番号25に記載されている配列と89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、

(c) p U L 1 2 8 をコードする前記核酸分子が配列番号26に記載されている配列と74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、

(d) p U L 1 3 0 をコードする前記核酸分子が配列番号27に記載されている配列と74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、かつ/または、

(e) p U L 1 3 1 A をコードする前記核酸分子が配列番号28に記載されている配列と74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である、項目34または項目35に記載の組換え核酸分子、または項目36から39までのいずれか1つに記載の複数の組換え核酸分子。

【0206】

41. 完全な H C M V ゲノムを含まない、項目34から40までのいずれか1つに記載の組換え核酸または複数の組換え核酸を発現する細胞。

【0207】

42. 前記組換え核酸または複数の組換え核酸を用いて安定に形質転換される、項目4

10

20

30

40

50

1 に記載の細胞。

【0208】

43．哺乳動物細胞である、項目41または項目42に記載の細胞。

【0209】

44．gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む細胞であって、

(a) HCMVゲノムを含有せず、

(b) HCMVビリオンを産生せず、

(c) 前記gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質をコードする自己複製RNA分子を含有せず、かつ/または、

(d) アルファウイルスレプリコンを含有しない

細胞。

【0210】

45．gH、gLおよび少なくとも1つの追加的なHCMV糖タンパク質を含む単離または精製されたHCMV膜タンパク質複合体を作製するためのプロセスであって、項目41から44までのいずれか1つに記載の細胞を増殖培地中で増殖させることを伴うプロセス。

【0211】

46．前記HCMV膜タンパク質複合体が前記増殖培地中に分泌される、項目45に記載のプロセス。

【0212】

47．前記HCMV膜タンパク質複合体を増殖培地1リットル当たり複合体>0.8mg、>0.85mg、>0.88mg、>0.9mg、>0.95mg、>1mg、>1.5mg、>2mg、>2.5mg、>3mg、>3.5mg、>4mg、>4.5mg、>5mgの濃度まで蓄積させる、項目46に記載のプロセス。

【0213】

48．前記HCMV膜タンパク質複合体を前記増殖培地から精製するステップを含む、項目45から47までのいずれか1つに記載のプロセス。

【0214】

49．項目18または項目19に記載のHCMV膜タンパク質複合体を使用して抗体を生じさせるための方法。

【0215】

50．前記抗体がヒト抗体またはヒト化抗体である、項目49に記載の方法。

【0216】

51．前記抗体が中和抗体である、項目49または50に記載の方法。

【0217】

52．項目49から51までのいずれか1つに記載の方法によって作製される抗体。

【0218】

53．項目49から52までのいずれか1つに記載の方法によって作製される抗体であって、前記項目のいずれかに記載の単離されたHCMV膜タンパク質複合体には結合するが、単離されたgH、gL、gO、pUL128、pUL130またはpUL131Aには結合しない抗体。

【0219】

54．診断アッセイにおいて使用するための、項目52または項目53に記載の抗体。

【0220】

55．直接的にまたは間接的に標識されている、項目52から54までのいずれか1つに記載の抗体。

【0221】

56．治療において使用するための、項目52から53までのいずれか1つに記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0222】

58. - g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含むH C M V膜タンパク質複合体のタンパク質成分の1つまたは複数をコードするR N Aを用いて1回または複数回の初回刺激免疫を実施することと、

- g H、g Lおよび少なくとも1つの追加的なH C M V糖タンパク質を含む精製されたH C M V膜タンパク質複合体を用いて1回または複数回の追加刺激免疫を後に実施することと

を含む、R N A初回刺激 - タンパク質追加刺激レジメン。

【実施例】

【0223】

10

(実施例1)

五量体複合体を発現しているレプリコンの免疫原性

W O 2 0 1 2 / 0 5 1 2 1 1では、単一の構築物由来の五量体複合体の5種のタンパク質全て(g H、g L、p U L 1 2 8、p U L 1 3 0およびp U L 1 3 1 A)を発現しているアルファウイルスレプリコンベクターを作製した。このベクターによって発現されるR N Aは、V R P中にパッケージングするか、または、レプリコンをC N Eとの複合体にすることによって、もしくはレプリコンをL N Pに封入することによってのいずれかでR N Aワクチン接種用に製剤化するかした。V R Pおよび製剤化されたR N Aを使用してB A L B / cマウスを3週間の間隔で免疫した。免疫したマウス由来の血清をマイクロ中和アッセイで使用して、上皮細胞へのH C M V T B 4 0の感染を遮断した(補体の不在下で)。H C M V T B 4 0株は臨床株と類似しており、i n v i v oにおけるH C M Vの天然の標的細胞である内皮細胞および上皮細胞に感染する(17)。マイクロ中和アッセイのデータにより、五量体複合体を発現しているレプリコンにより、g H / g Lを発現しているレプリコンよりも強力な中和抗体が惹起されたことが実証された。マイクロ中和試験のデータにより、五量体複合体を発現しているR N Aによって惹起される抗体は、上皮細胞におけるH C M V感染を中和することができるが(当該抗体は五量体複合体を標的とするので)、線維芽細胞におけるH C M V感染を中和することはできない(感染に五量体複合体が必要とされない)ことも示され、したがって、五量体複合体を発現しているR N Aにより、g H / g L二量体ではなくインタクトな五量体複合体を特異的に標的とする抗体が惹起されることが実証された。この研究により、五量体複合体に対して抗体を生じさせることができ、これらの抗体は、H C M V感染を中和することができることが実証される。

20

30

【0224】

(実施例2)

哺乳動物細胞において五量体複合体を安定発現させるための構築物

哺乳動物細胞における五量体複合体の発現および精製を可能にするために、5種の核酸構築物を作製した。五量体複合体を精製するための以前の試みは、構築物が全長のg Hタンパク質をコードする遺伝子を含む場合に失敗した。この問題を克服するための試みにおいて、本発明者らは、全長の配列ではなく、C末端m y c - (H i s) 6タグを伴うg Hの外部ドメイン(g H e c t o)(配列番号6)のみをコードする構築物を作製した。以下の5種の構築物を使用して五量体複合体を作製した: 配列番号6をコードする構築物(図1および配列番号23)、全長のg Lをコードする構築物(図2および配列番号24)、全長のp U L 1 2 8をコードする構築物(図3および配列番号25)、全長のp U L 1 3 0をコードする構築物(図4および配列番号26)および全長のp U L 1 3 1 Aをコードする構築物(図5および配列番号27)。

40

【0225】

(実施例3)

293 - 6 E細胞においてタンパク質複合体をトランスフェクトし、発現させるためのプロトコール

材料:

50

哺乳動物293-6E細胞(Gibco FreeStyle 293 Expression Medium; Opti-MEMおよびPolyethylenimine Linear (PEI)、MW25,000。

【0226】

細胞の調製

293-6E細胞を無血清293発現培地(Expression Medium)中で維持した。細胞が24時間ごとに倍加し、生存率が90%超になったら、細胞を培地1mL当たり 1×10^6 個の密度まで希釈した。

【0227】

トランスフェクション

各構築物に対応するDNAを、トランスフェクトする細胞培養物の体積の2.5%の体積のOpti-MEMを使用してOpti-MEM中に希釈した。DNA構築物を、総DNAが培養物の体積1mL当たり $1 \mu\text{g}$ に等しくなるように適した比率で混合した。例えば、細胞培養物1Lを使用して五量体複合体を安定発現させるためには、25mLのOpti-MEMに配列番号23~27のそれぞれを $200 \mu\text{g}$ 添加した。

【0228】

PEIを、トランスフェクトする細胞培養物の体積の2.5%の体積のOpti-MEMを使用して、Opti-MEM中に希釈した。希釈したPEIを室温で5分、時々回転させながらインキュベートして混合した。培養物1mL当たり $3 \mu\text{g}$ のPEIを使用した(例えば、細胞培養物1Lに対して3mgのPEIを25mLのOpti-MEM中に希釈した)。

【0229】

DNA混合物をPEI混合物に加え(その結果、培養物1mL当たり $1 \mu\text{g}$ の総DNA + $3 \mu\text{g}$ のPEIを使用した)、回転させ、室温で30分インキュベートした。DNA-PEI混合物を、混合物を徐々に添加することによって細胞に加え、混合物が培養物に一样に添加されるように細胞を時々回転させた。次いで、細胞をすぐに元の増殖条件に戻した。

【0230】

発現および収集

トランスフェクトした3日後に、細胞を2,000rpmで遠心沈殿することによって培地を収集した。次いで、培地をおよそ10xに濃縮し、300mMのNaCl、25mMのトリス、pH7.5を含有する緩衝液中にダイアフィルトレーションした。最後に、透析した培地を-80で凍結させた。新鮮な培地を培養物に加え、さらに3日後に培地を収集し、上記の通り濃縮/ダイアフィルトレーションした。

【0231】

(実施例4)

HCMV複合体を精製するためのプロトコール

材料:

GE AKTExpress; Qiagen Ni-NTA Superflow Cartridges, 5ml; 96 Well Clear V-Bottom 2 mL Polypropylene Block; 緩衝液A (= 結合緩衝液) 50mMのトリス-HCl、pH7.5、300mMのNaCl、5mMのイミダゾール; 緩衝液B (= 溶出緩衝液) 50mMのトリス-HCl、pH7.5、300mMのNaCl、1Mのイミダゾール; SEC緩衝液 (= 緩衝液の交換およびサイズ排除クロマトグラフィー用); システムの洗浄用に0.5MのNaOH溶液 $2 \times 500\text{ml}$; Invitrogen NuPAGE (登録商標) Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm、12ウェル; NuPAGE (登録商標) LDS Sample Buffer (4x) およびNuPAGE (登録商標) Sample Reducing Agent (10x)。

手順

10

20

30

40

50

【0232】

内毒素を含まないストック溶液および濾過したMilli-Q水を用いて緩衝液を調製した。

【0233】

精製する培地を温かいウォーターバス中で解凍した。その間に、AKTExpressを0.5MのNaOHで洗浄して可能性のある内毒素コンタミネーションならびに残留するタンパク質/培地を除去し、次いで、濾過した内毒素を含まないMilli-Q水ですすいだ。

【0234】

Ni-NTA superflow cartridgeをAKTExpress systemに接続し、水および緩衝液Aおよび緩衝液Bを定位置にセットした。次いで、「Ni-NTA prep」プログラムを開始させて、システムに緩衝液を流し、カラム中のエタノールを洗い流し、緩衝液Aをカラムに流してカラムを平衡化した。

10

【0235】

画分採取用96ウェルを、各ウェル中に500mMのEDTA溶液3.5μlを入れることによって準備した。ローディング試料もローディングの直前に調製した。培地が解凍されたら、1/500体積の2.5Mイミダゾールストックを添加し、穏やかに混合した。次いで、ローディング試料を定位置にセットした。

【0236】

次いで、精製プログラムを開始した。このプログラムは、以下のステップで実施された：試料をカラムにローディングするステップ；ベースラインが定まるまで結合していない化合物を緩衝液Aで洗い流すステップ；非特異的に結合した化合物を15カラム体積の2.5%緩衝液B(=30mMのイミダゾール)で洗い流すステップ；10カラム体積の25%緩衝液B(=254mMのイミダゾール)を用いてHCMVタンパク質複合体を溶出させるステップ；および5カラム体積の100%緩衝液B(=1Mのイミダゾール)を用いてカラムを最終的に洗浄するステップ。試料のローディング速度は毎分2.5mlであり、他方洗浄および溶出速度は毎分5mlであった。フロースルー全部ならびに洗浄および溶出からの画分それぞれ1.75mlを採取した。

20

【0237】

250mMのイミダゾールによる溶出ピークから6つまたは7つの画分をSDS-PAGEによって分析するために選択した。SDS-PAGEゲルに従ってタンパク質の量が最も多かった4つまたは5つの画分を一緒にプールし、SEC緩衝液2Lに対して室温で1時間の透析を2回行った。透析液を回収し、BCA法を使用して濃度を測定した。精製されたタンパク質プール中に複合体の全ての成分が存在することをウエスタンブロットによって検証した。

30

【0238】

いくつかの試料の純度を上昇させるために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を実施した。Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare、17-5175-01)において、2カラム体積より多くのSEC緩衝液を用いて平衡化した。1カラム体積の緩衝液をローディングした透析済みプールをカラムに流し、1mlの画分を採取した。SDS-PAGEを実施して、どの画分をプールし、維持するかを決定した。

40

【0239】

(実施例5)

三量体gH/gL/gO複合体の発現、精製および特徴付け

以下の3種の構築物を作製した：C末端APPタグを伴うgHの外部ドメイン、全長のgLおよびC末端(His)6タグを伴う全長のgO。これらの3種の構築物を、実施例3に記載されている方法に従ってHEK293細胞で同時発現させた。Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーを伴う実施例4の精製方法を実施した。

【0240】

50

次いで、精製された試料をSDS-PAGE、その後、抗APPタグ(gH)抗体、抗gL抗体および抗6His(gO)抗体を使用したウエスタンブロット分析に供した。これらの3種の抗体は、還元性条件下で(+熱、+DTT)異なるタンパク質に結合したが、非還元条件(-熱、-DTT)では全てが単一の複合体に結合した。これらの結果により、gH/gL/gOの三量体複合体としての精製が成功したことが実証される。培地1L当たりおよそ0.5mgの複合体がHEK293細胞から精製された。SECにより、gH/gL/gO複合体の純度が上昇した。

【0241】

(実施例6)

五量体複合体の発現および精製

実施例3に記載されている方法に従って、HEK293細胞に実施例2に記載されている5種の構築物を同時トランスフェクトし、トランスフェクトした3日後および6日後に培地を収集し、発現されたタンパク質を、実施例4に記載されている方法に従ってNi-NTAクロマトグラフィー法によって精製した。

【0242】

精製された五量体複合体についてのサイズ排除クロマトグラムにおける単一のピーク(図7)により、インタクトな単量体複合体が首尾よく精製されたことが示された。五量体複合体の5つのメンバー:gHecto-His、gL、pUL128、pUL130およびpUL131Aの全てが精製された複体内に存在するかどうかを評価するために、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析を実施した。

【0243】

(実施例7)

HCMV五量体複合体のウエスタンブロット法

材料:

BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell; Invitrogen Nitrocellulose membranes、0.2μm孔; NuPAGE(登録商標) Transfer Buffer(20x); メタノール; Odyssey(登録商標) Blocking Buffer; DPBS; 10x PBS; 一次抗体: マウス抗Hisタグ、ウサギ抗gL 27-46、マウス抗pUL128 4B10、マウス抗UL130 3E3、およびウサギ抗UL131A 90-136; 二次抗体: IRDye 800CWヤギ抗ウサギIgG(H+L)、IRDye 680LTヤギ抗マウスIgG(H+L)。

【0244】

手順

抗体のセットを3つ使用し、1つはgHecto-His/gLの検出用であり、1つはpUL128/pUL131Aの検出用であり、1つはpUL130の検出用であった。

【0245】

タンパク質9μlをLDS試料緩衝液/還元剤混合物(9:1)3μlと混合し、100で3分煮沸した。煮沸した試料をウェルにローディングし、200Vで35分流した。次いで、タンパク質を、Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cellを使用して0.2μmのニトロセルロース膜に20Vで35分かけて移した。ブロッキング緩衝液を用いて膜を室温で30分ブロッキングした。膜を一次抗体溶液と一緒に室温で1時間インキュベートした。一次抗体溶液は、全てブロッキング緩衝液とDPBSの1:1混合物中に希釈した、(A)抗Hisタグの1:10000希釈物および抗gLの1:5000希釈物、(B)抗pUL128の1:500希釈物および抗UL131Aの1:1000希釈物、ならびに(C)抗UL130の1:500希釈物からなった。膜を、室温でPBS+0.1%Tweenを用いて3回すすぎ、次いで、二次抗体溶液と一緒に室温で1時間インキュベートした。膜(A)および(B)については、抗マウス抗体および抗ウサギ抗体のそれぞれの、プロッ

10

20

30

40

50

キング緩衝液とDPBSの1:1混合物中1:25000希釈物を使用した。膜(C)については、抗マウス抗体の1:25000希釈物のみを使用した。膜を、室温でPBS+0.1%Tweenを用いて3回すすぎ、次いで、室温でDPBSを用いて1回すすいだ。Odyssey Infrared Imaging System(Li-Cor 9201)を用いて膜をスキャンし、Odyssey software version 2.1.12を使用して解析した。

【0246】

五量体複合体の5つのメンバー:gHecto-His、gL、pUL128、pUL130およびpUL131Aの全てが精製された複体内に存在し、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析によって同定され(図8)、したがって、五量体複合体の精製が成功したことが確認された。

10

【0247】

gHecto-His、gLおよびpUL128は、熱もDTTも伴わないSDSビス-トリスゲルにおいて一緒に移動したが、pUL128とgH/gLの結びつきはDTTの存在下で完全に消失し(データは示していない)、したがって、pUL128とgH/gLがジスルフィド結合によって結びつくことが実証された。pUL130/pUL131AはgH/gL/pUL128と一緒に移動せず、これにより、pUL130/pUL131Aが非共有結合によって五量体複合体に組み込まれることが示された。

【0248】

ゲル上で最も優勢であったバンドは非還元、非煮沸条件でgH/gL複合体の位置の近くにあり、したがって、HCMV五量体複合体に対応すると考えられた。純度は90質量%であると推定された。SEC精製を用いて、純度はほぼ100%に上昇した。Ni-NTA精製により、培地1リットル当たり五量体複合体およそ0.6mgを精製することができた。

20

【0249】

(実施例8)

組換え五量体複合体はコンフォメーション依存性中和抗体に結合する

ヒト中和抗体(HuMab)のパネルを血清反応陽性の個体の記憶B細胞から単離した。五量体複合体タンパク質をプレート上に固定化し、中和抗体を10倍連続希釈で添加した直接ELISAを実施した。このELISAの結果が表1に示されている。HuMabはいくつかのULタンパク質およびgH/gL/pUL128/pUL130に結合し、これにより、正しいコンフォメーションの五量体複合体が形成されたことが確認された。gHに対するHuMabの結合により、これらのエピトープが組換え複合体上に露出していることが示唆される。

30

【表1】

表1

HuMab	10P3	5A2	4I22	8J16	7I13	15D8	8I21	3G16	11B12	cytotect	Chick. Lyso.
エピトープ	pUL130/ pUL131A 部位3	pUL130/ pUL131 A部位2	pUL130/ pUL131 A部位1	pUL128/ pUL130/ pUL131A 部位1	pUL128/ pUL130/ pUL131 A部位2	pUL128	gH/gL/ pUL128/ pUL130	gH/gL 部位A	gH/gL部位B		
KD(nM)	0.17	0.1	0.1	0.13	0.11	0.33	0.57	0.06	0.21	9.8	-

40

【0250】

(実施例9)

五量体複合体により、gH/gLよりも高い中和力価が惹起される

【0251】

0.1/1μgの精製されたgH/gLおよび0.16μg/1.6μgの五量体複合体タンパク質を、MF59を用いて、または用いずに製剤化し、マウスを免疫するために

50

使用した。3 w p 3 の中和力価は、五量体複合体に関して g H / g L (同じく g B と比較して高い中和力価が惹起される) と比較しておよそ 4 倍の上昇が示された (図 9)。M F 5 9 を用いて製剤化した、精製された五量体複合体により、製剤化していないタンパク質よりも高い中和力価が惹起された (図 9)。T L R 7 アゴニストを吸着させた水酸化アルミニウムを用いた五量体複合体の製剤により、オキシ水酸化アルミニウムおよび / または M F 5 9 を用いた製剤よりもさらに高い中和力価が惹起された (図 10)。

【 0 2 5 2 】

(実施例 10)

精製された g H / g L / g O を抗原として使用したモノクローナル抗体の作製

精製された g H / g L / g O 複合体を 150 mM の N a C l、25 mM のトリス (p H 7.5)、1 mM の E D T A 中に 0.4 mg / mL まで希釈し、凍結させる。ワクチン接種日に g H / g L / g O 複合体を解凍し、解凍した g H / g L / g O 複合体にアジュバント 438 μ l を添加し、チューブを少なくとも 10 回反転させることによって十分に混合する。生じた組成物を混合してから 1 時間以内に使用する。

10

【 0 2 5 3 】

6 ~ 8 週齢の雌性 B A L B / c マウス 3 匹の 2 つの群を、50 μ g の精製された g H / g L / g O、および M F 5 9 アジュバントを含む組成物を用いて免疫する。各マウスを、各四頭筋に 125 μ L を用いて免疫し (すなわち、各マウスは 250 μ L を受ける)、眼窩静脈叢から採血する。

20

【 0 2 5 4 】

マウス 3 匹の各群について、免疫スケジュールが以下の表 2 に要約されている。

【表 2】

表 2

週数	0	0	3	5	6	8
手順	採血 0	免疫 1	免疫 2	採血 2	免疫 3	採血 3

【 0 2 5 5 】

g H / g L / g O に対するモノクローナル抗体を精製するために、一次 E L I S A スクリーニングに g H / g L / g O 抗原を使用し、次いで、一次スクリーニングからの陽性クローンを、g H / g L 抗原を使用してその後さらにスクリーニングする。

30

【 0 2 5 6 】

同様の方法を使用して、精製された五量体複合体を抗原として使用してモノクローナル抗体を作製することができる。

【 0 2 5 7 】

(実施例 11)

H C M V の五量体抗原を使用した、S A M (商標) ワクチン初回刺激、タンパク質追加刺激および R N A およびサブユニットの同時投与

マウスを、3 週間の間隔を空けて、H C M V 五量体複合体をコードする本明細書に記載の自己複製 R N A である S A M ワクチン、M F 5 9 を用いてアジュバント化した精製された五量体のサブユニット、S A M ワクチンの種々の配列とその後の M F 5 9 中サブユニット、またはその 2 つの組合せ (表 3) を用いて 3 回免疫した。S A M ワクチンは、ウイルスによらずに送達するために合成 L N P に封入した。対照マウス群はいかなるワクチンも受けなかった。

40

【表 3】

表 3

群	マウス数	投与数	抗原	製剤	用量
1	4	-	3	-	1
2	8	3	五量体複合体をコードするSAMワクチン (ペンタSAMワクチン)	脂質ナノ粒子 (LNP)	1 マイクログラム
3	8	3	精製された五量体複合体 (ペンタサブユニット)	MF59	1 マイクログラム
4	8	3	1回目にペンタSAMワクチン 2回目および3回目にペンタサブユニット	LNP MF59	1 マイクログラム
5	8	3	1回目および2回目にペンタSAMワクチン 3回目にペンタサブユニット	LNP MF59	1 マイクログラム
6	8	3	ペンタSAM+ペンタサブユニット(混合)	LNP	1 マイクログラム + 1 マイクログラム

10

【 0 2 5 8 】

各免疫の3週間後に血清を収集し、ELISAに使用して結合抗体価を決定し、このアッセイにはサブユニットワクチンの場合と同じ精製された抗原を使用した。血清をARPE-19上皮細胞へのTB40感染またはVR1814感染を使用したHCMVマイクロ中和アッセイのためにも使用した。3回目の免疫の3週間または4週間後に、屠殺したマウスから脾臓を摘出した。脾臓細胞を*in vitro*で精製タンパク質またはgHタンパク質のc末端側の半分に対応する15-merのペプチド(11アミノ酸が重複している)のプールを用いて刺激し、サイトカイン発現に対して染色し、フローサイトメトリーを使用して分析した。

20

【 0 2 5 9 】

SAMワクチンおよびサブユニット/MF59単独により、3回の投与後に強力な中和抗体応答が惹起された(図11)。MF59中の五量体サブユニットではワクチンの1回目および2回目の投与に対して五量体SAMワクチンほどの応答はなかったが、3回目の投与後、サブユニット/MF59によって惹起される力価はSAMワクチンによって惹起される力価に勝った。SAMワクチン初回刺激を1回、その後サブユニット/MF59の単回投与を行うことにより、サブユニット/MF59の2回投与よりも強力な中和応答が惹起されたが、これはSAM単独と同等であった。2回目のサブユニット/MF59追加刺激をこれらの動物に行うことにより、サブユニット/MF59またはSAMワクチン3回を投与した後に見られるものを超えるレベルの中和応答が生じた。SAMワクチンを2回投与し、その後、サブユニット/MF59を単回投与することは、サブユニット/MFまたはSAMワクチン単独のいずれと比較しても中和応答の利益にならないと思われた。MF59を用いずにSAMワクチンとサブユニットを混合することにより、1回目の投与後にRNA単独と同様の強力な応答が惹起され、2回目および3回目の投与後に強力な中和力価が惹起された。

30

40

【 0 2 6 0 】

精製したgH/gLおよび五量体サブユニットを使用したワクチン接種に応答するCD4+T細胞を分析した。SAMワクチン初回刺激タンパク質追加刺激およびSAMワクチン+サブユニットの混合により、gH/gLによる再刺激に対して応答するCD4+T細胞が、SAMワクチンまたはサブユニット/MF59単独よりも多く惹起された(図12)。RNA単独に対するCD4+応答は些細なものであったが、サブユニット/MF59単独に対する応答はTh2/Th0表現型であった。SAMワクチンとサブユニットの組合せで免疫したマウス由来の応答細胞の表現型は主にTh1/Th0であった。細胞を精製された五量体複合体で再刺激した際に同様の傾向が見られたが、応答は概してより強力であった(図13)。

50

【 0 2 6 1 】

精製された五量体のサブユニットまたは g H に対するペプチドのプールを使用したワクチン接種に対する C D 8 + T 細胞応答も分析した。S A M ワクチンを 2 回投与し、その後、サブユニット / M F 5 9 を 1 回投与することで免疫したマウスにおいてのみ、五量体のサブユニットで再刺激した際に有意な C D 8 応答が見られた (図 1 4)。これらの動物由来の細胞では、g H ペプチドを用いて再刺激した際にも最も強力な応答が示された (図 1 5)。S A M ワクチン + サブユニットを用い、S A M ワクチンを 1 回投与し、その後、サブユニット / M F 5 9、または S A M ワクチン単独を 2 回投与することで免疫したマウスにおいても再刺激に対する有意な応答が示された (図 1 5)。

【 0 2 6 2 】

結論：S A M ワクチンを 1 回投与し、その後、サブユニット / M F 5 9 を 2 回接種すること、ならびに S A M ワクチン + サブユニットにより、サブユニット / M F 5 9 単独よりも高い中和力価が惹起された。S A M ワクチン + サブユニットに対する応答には M F 5 9 アジュバントの添加は必要なかった。S A M ワクチン初回刺激サブユニット / M F 5 9 追加刺激の最も大きな影響は、細胞性免疫応答に対するものであった。S A M ワクチンを含む組合せのいずれによっても主に T h 1 / T h 0 C D 4 + 応答が生じた。さらに、S A M ワクチンを用いて 2 回免疫し、その後、サブユニット / M F 5 9 を用いて 1 回免疫することにより、最も強力な C D 8 + 応答が生じた。この試験により、S A M ワクチン初回刺激タンパク質追加刺激のレジメンを最適化して、所望の免疫応答、すなわち、細胞性免疫応答または体液性免疫応答を生じさせることができることが示された。

【 表 4 - 1 】

参考文献：

Akter, P, et al. "Two novel spliced genes in human cytomegalovirus." *Journal of General Virology* 84 (2003): 1117-1122.

Boehme, KW, M Guerrero, and T Compton. "Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells." *Journal of Immunology* 177 (2006): 7094-7102.

Doyle, Sharon A, ed. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, 2008.

Genini, E, E Percivalle, A Sarasini, MG Revello, F Baldanti, and G Gerna. "Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections." *Journal of Clinical Virology* 52 (2011): 113-118.

Huber, MT, and T Compton. "Intracellular Formation and Processing of the Heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) Glycoprotein Envelope Complex of Human Cytomegalovirus." *Journal of Virology* 73 (1999): 3886-3892.

Kinzler, Eric R, Regan N Theiler, and Teresa Compton. "Expression and reconstitution of the gH/gL/gO complex of human cytomegalovirus." *Journal of Clinical Virology*, 2002: 87-95.

Langdon, RH, J Cuccui, and BW. Wren. "N-linked glycosylation in bacteria: an unexpected application." *Future Microbiology* 4 (2009): 401-412.

Loignon, M, et al. "Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells." *BMC Biotechnology* 8 (2008): 65.

10

20

30

40

【表 4 - 2】

- Macagno, A, et al. "Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex." *Journal of Virology* 84 (2010): 1005-13.
- Melnicka, M, PP Sedghizadehb, CM Allenc, and T Jaskolla. "Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship." *Experimental and Molecular Pathology* 92 (2012): 118-125. 10
- Mocarski, ES, T Shenk, and RF Pass. "Cytomegalovirus." In *Fields Virology*, edited by David M Knipe and Peter M Howley. Philadelphia, Pa., USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.
- Murthy, S, et al. "Detection of a Single Identical Cytomegalovirus (CMV) Strain in Recently Seroconverted Young Women." *PLoS One* 6 (2011): e15949.
- Needleman, SB, and CD Wunsch. "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." *Journal of Molecular Biology* 48 (1970): 443-453.
- Patrone, M, M Secchi, L Fiorina, M Ierardi, G Milanesi, and A Gallina. "Human Cytomegalovirus UL130 Protein Promotes Endothelial Cell Infection through a Producer Cell Modification of the Virion." *Journal of Virology* 79 (2005): 8361-8373. 20
- Rasmussen, L, A Geissler, C Cowan, A Chase, and M Winters. "The Genes Encoding the gCIII Complex of Human Cytomegalovirus Exist in Highly Diverse Combinations in Clinical Isolates." *Journal of Virology* 76 (2002): 10841-10888.
- Rice, P, I Longden, and A Bleasby. "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite." *Trends Genetics* 16 (2000): 276-277.
- Rigoutsos, I, et al. "In silico pattern-based analysis of the human cytomegalovirus genome." *Journal of Virology* 77 (2003): 4326-44. 30
- Ryckman, BJ, et al. "Characterization of the Human Cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 Complex That Mediates Entry into Epithelial and Endothelial Cells." *Journal of Virology* 82 (2008): 60-70.
- Ryckman, BJ, MC Chase, and DC Johnson. "Human Cytomegalovirus TR Strain Glycoprotein O Acts as a Chaperone Promoting gH/gL Incorporation into Virions but Is Not Present in Virions." *Journal of Virology* 84 (2010): 2597-2609.
- Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 40
- Simanek, Amanda M., Jennifer Beam Dowd, Graham Pawelec, David Melzer, Ambarish Dutta, and Allison E. Aiello. "Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All-Cause and Cardiovascular Disease-Related Mortality in the United States." *PLoS ONE* 6 ((2011)): e16103.

【表 4 - 3】

Summers, MD, and GE Smith. "A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures." *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555*, 1987.

Wang, D, and T Shenk. "Human Cytomegalovirus UL131 Open Reading Frame Is Required for Epithelial Cell Tropism. Human Cytomegalovirus UL131 Open Reading Frame Is Required for Epithelial Cell Tropism." *Journal of Virology* 79 (2005): 10330–10338.

【表 5 - 1】

配列表

配列番号 1 (HCMVのMerlin株由来の g H = GI:52139248)

MRPGLPSYLIILAVCLFSLHLLSSRYGAEAVSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAIS
FNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQORLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTT
VPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLI DELRYVKITLTE
DFFVVTVSIDDDTPMLLI FGHLPRVLFKAPYQRDNF I LRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSY LKDPDFLDAALDFNYLD
LSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGA QVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLS
QTTPRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKHKLASFLSAF
ARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLS DLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLF
PDATVPATVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALT VSEHVS YIVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIIT
QTDSQTKCELTRNMHTTHSITVALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
YLMLLNKGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALS AIIIGIYLLYRMLKTC

10

配列番号 2 (HCMVのTowne株由来の g H = GI:138314)

MRPGLPSYLIIVLAVCLLHLLSSRYGAEAI SEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAIS
FNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQORLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTT
VPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLI DELRYVKITLTE
DFFVVTVSIDDDTPMLLI FGHLPRVLFKAPYQRDNF I LRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSY LKDPDFLDAALDFNYLD
LSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGA QVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLS
QTTPRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKHKLASFLSAF
ARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLS DLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLF
PDATVPATVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALT VSEHVS YVVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIIT
QTDSQTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
YLMLLNKGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALS AIIIGIYLLYRMLKTC

20

配列番号 3 (HCMVのAD169株由来の g H = GI:138313)

MRPGLPPYLTVFTVYLLSHLPSQRYGADAASEALDPHAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAI
SFNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQORLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLQOQPT
TVPPPIDLSIPHVWMPPTTPHDWKGSHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLMDELRYVKITLT
EDFFVVTVSIDDDTPMLLI FGHLPRVLFKAPYQRDNF I LRQTEKHELLVLVKKQQLNRHSY LKDSDFLDAALDFNYL
DLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGTEI SIPRALDRQAALLQIQEFMITCL
SQTPPRTLLLYPTAVDLAKRALWTPDQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALQLHKHKLASFLSA
FARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLS DLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLF
PDATVPATVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALT VSEHVS YVVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIIT
QTDSQTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
HYLMLLNKGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALS AIIIGIYLLYRMLKTC

30

配列番号 4 (配列番号 1 のアミノ酸残基 1 ~ 715 からなる g H タンパク質)

MRPGLPSYLIILAVCLFSLHLLSSRYGAEAVSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAIS
FNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQORLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTT
VPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLI DELRYVKITLTE
DFFVVTVSIDDDTPMLLI FGHLPRVLFKAPYQRDNF I LRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSY LKDPDFLDAALDFNYLD
LSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGA QVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLS
QTTPRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKHKLASFLSAF
ARQELYLMGSLVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLS DLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLF
PDATVPATVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALT VSEHVS YIVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIIT
QTDSQTKCELTRNMHTTHSITVALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
YLMLLNKGTVLEVTDVVVDATD

配列番号 5 (myc-タグおよびポリヒスチジン-タグを含むC末端の伸長)
GTKLGPQKLI SEEDLNSAVDHHHHH

40

配列番号 6 (配列番号 4 および 5 を含む g H タンパク質)

MRPGLPSYLIILAVCLFSLHLLSSRYGAEAVSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAIS
FNFFQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQORLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTT
VPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLI DELRYVKITLTE
DFFVVTVSIDDDTPMLLI FGHLPRVLFKAPYQRDNF I LRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSY LKDPDFLDAALDFNYLD

【表 5 - 2】

LSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLS
 QTPFRPTLLLYPTAVDLAKRALWTFNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAF
 ARQELYLMGSLVHSMVLVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDYTPCSSSRRDRHSLERLTRLF
 PDATVPATVPAALSILSTMQPSSTLETFFDLFCLPLGSEFSALTVEHVSYIVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIIT
 QTDSQTKCELTRNMHTTHSITVALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
 YLMLLKNGTVLEVTDVVVVDATDGTCLGPEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH

配列番号 7 (HCMVのMerlin株由来の g L = GI:39842115)

MCRRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLLPIVSSAAVSVAPTAAEKVPAECPPELTRRCLLGEVFEQDKYESWLRPLVNVTG
 RDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDEAFLDTLALLYNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECQDGS PAVYTC
 VDDLRCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLFGEFVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRLPVSTAAAPEGITLIFYGLYNAVKE
 FCLRHLQDPPLLRHLKDYAGLPELQKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

10

配列番号 8 (HCMVのTowne株由来の g L = GI:239909463)

MCRRPDCGFSFSPGPVALLWCCLLLPIVSSATVSVAPTAAEKVPAECPPELTRRCLLGEVFEQDKYESWLRPLVNVTR
 RDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDDAFLDTLALLYNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECQDGS PAVYTC
 VDDLRCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLFGEFVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRLPVSTAAAPEGITLIFYGLYNAVKE
 FCLRHLQDPPLLRHLKDYAGLPELQKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号 9 (HCMVのAD169株由来の g L = GI:2506510)

MCRRPDCGFSFSPGPVLLWCCLLLPIVSSVAVSVAPTAAEKVPAECPPELTRRCLLGEVFEQDKYESWLRPLVNVTR
 RDGPLSQLIRYRPVTPPEAANSVLLDDAFLDTLALLYNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECQDGS PAVYTC
 VDDLRCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLFGEFVPPSLFNVVVAIRNEATRTRNAVRLPVSTAAAPEGITLIFYGLYNAVKE
 FCLRHLQDPPLLRHLKDYAGLPELQKQTRVNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号 10 (HCMVのMerlin株由来の g O = GI:39842082)

MGKKEMIMVKGIPKIMLLISITFLLLSLINCNVLVNSRGTRRSWPYTVLSYRGKEILKKQKEDILKRLMSTSSDGYR
 FLMPYPSQQKFHAIIVISMDKFPQDYILAGPIRNDSTITHMWFDFYSTQLRKPakyvYSEYNHTAHKITLRPPPCGTVP
 MNCLSEMLNVSKRNDTGEKGCNFTTFNPMFFNVPRWNTKLYIGSNKVNVDSTIYFLGLTALLLRYAQRNCTRFSY
 LVNAMSRLFRVPKYINGTKLKNTRKLRKQALVKEQPQKKNKKSQSTTTPYLSYTTSTAFNVTTNVTYSATAAVT
 RVATSTTGYPDSNFMKSI MATQLRDLATWVYTTLRYSRNEPFCPDRNRNAVSEFMKNTHVLI RNETPYTYGTLD
 SLYNETMSVENETASDNNETPTSPSTRFQRTFIDPLWDYDLSLLFLDKIRNFSLQLPAYGNLTPPEHRAANLS
 TLNSLWWSQ

20

配列番号 11 (HCMVのAD169株由来の g O = GI:136968)

MGRKEMMRDVPKMFVFLISIFLLVFSFINCKVMSKALYNRPWRGLVLSKIGYKLDQKLEILRQLETTISTKYNVS
 KQPVKNLTMNTEFFQYYILAGPIQNYSTIYLWDFYSTQLRKPakyvYSQYNHTAKTITFRPPPCGTVP SMTCLSE
 MLNVSKRNDTGEQCGNFTTFNPMFFNVPRWNTKLYVGPVKVNVDSTIYFLGLTALLLRYAQRNCTHSFYLVNAMS
 RNLFRVPKYINGTKLKNTRKLRKQAPVKEQFEKAKKTQSTTTPYFSYTTSAALNVTTNVTYSITTAARRVSTST
 IAYRPDSSFMKSI MATQLRDLATWVYTTLRYSRNEPFCPDRNRNAVSEFMKNTHVLI RNETPYTYGTLDMS
 SLYNETMVENETASDNNETPTSPSTRFQRTFIDPLWDYDLSLLFLDEIRNFSLSRPTVYVNLTPPEHRAVNLSTLNSLW
 WWLQ

30

配列番号 12 (HCMVのTowne株由来の g O = GI:239909431)

MGRKGEMRGVFNLFLLMSLTFLLFSFINCKIAVARFRVKSQKAKEEERQLKLRILQELASKTGDDYKFFTFPSQQKL
 YNITVEMKQFPNPSILAGPIRNSITHLWDFHTTQLRKPakyvYSEYNHTGQKITFRPPPCGTIP SMTCLSEMLNV
 SRRNNTGEENCNFTTFNPMFFNVPRWNTKLYVGPVKVNVDSTIYFLGLAALLLRYAQRNCTRFSYLVNAMS
 RNLFRVPKYINGTKLKNTRKLRKQAPVKSISKKSRSVSTTTPYSSYTTSTIFNVSTNVTYSPIVPTRIPTSTIGYR
 PDENFMKSI LTTQLKDLATWVYTTLRYSRNEPFCPDRNRNAVSEFMKNTHVLI RNETPYTYGTLDMS
 SLYNETMVENETASDNNETPTSPSTRFQRTFIDPMWDYDLSLLFLSEIRNFSLSQSSYGNLTPPEHRAVNLSTLNSLW
 WWLQ

配列番号 13 (HCMVのMerlin株由来の pUL128 = GI:39842124)

MSPKDLTPFLTALWLLLGHRSRVPVRAEECCFEINVNHPPERCYDFKMCNRFVVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIV
 TTMTHTSLTRQVVHNKLTSCNYNPLYLEADGRIRCGKVNDKAQYLLGAAGSVPY

40

配列番号 14 (HCMVのTowne株由来の pUL128 = GI:39841882)

MSPKNLTPFLTALWLLLGHRSRVPVRAEECCFEINVNHPPERCYDFKMCNRFVVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIV
 TTMTHTSLTRQVVHNKLTSCNYNPLYLEADGRIRCGKVNDKAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVK
 KHKRLDVCRAKMGYMLQ

【表 5 - 3】

配列番号 1 5 (HCMVのAD169株由来のpUL128=GI:59803078)

MSPKDLTFFLTLLWLLLGHSRVPRVRAEECCFEINVNHPPEPCYDFKMCNRFVALRCPDGEVVCYSPEKTAEIRGIV
TTMTHSLTRQVHNKLTSCNYPNPLYLEADGRIRCGKVNDAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVK
KHKRLDVCRAKMGYMLQ

配列番号 1 6 (HCMVのMerlin株由来のpUL130=GI:39842125)

MLRLLLRHHFHCLLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPPWSKLTYSKPHDAATFYCPFLYSPPPRSPLQFSGFQRV
STGPECRNETLYLLYNREGQTLVERSSTWVKKVIWYLSGRNQITLQRMPTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMVVK
QTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTTEANNQTYTFCPTHPLIV

配列番号 1 7 (HCMVのTowne株由来のpUL130=GI:239909473)

MLRLLLRHHFHCLLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPPWSKLTYSKPHDAATFYCPFLYSPPPRSPLQFSGFQRV
LTGPECRNETLYLLYNREGQTLVERSSTWVKKVIWYLSGRNQITLQRMPTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMVVK
QTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTTEANNQTFTPSAPIPISSFEFVARAGNFENRAS

10

配列番号 1 8 (HCMVのMerlin株由来のpUL131A=GI:39842126)

MRLCRVWLSVCLCAVVLGQCQRETAEKNDYRVPHYWDACSRAALPDQTRYKYVEQLVDLTLNHYHDASHGLDNFDVL
KRINVTEVSLISDFRRQNRGGTNRKRTTFNAAGSLAPHARSLEFSVRLFAN

配列番号 1 9 (HCMVのTowne株由来のpUL131A=GI:239909474)

MRLCRVWLSVCLCAVVLGQCQRETAEKNDYRVPHYWDACSRAALPDQTRYKYVEQLVDLTLNHYHDASHGLDNFDVL
KRINVTEVSLISDFRRQNRGGTNRKRTTFNAAGSLAPHARSLEFSVRLFAN

配列番号 2 0 (HCMVのAD169株由来のpUL131A=GI:219879712)

MRLCRVWLSVCLCAVVLGQCQRETAEKRLPSTALLGRVLSRAARPNIPLQVCGTARGPHVELPLRCEPRLGQL

20

配列番号 2 1 (HCMVのMerlin株由来のgB=GI:39842076)

MESRIWCLVVCVNLICVCLGAAVSSSTRGTSATHSHSSHTTSAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGVNETIYNTTLK
YGDVVGVTNTKYPYRVCMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYA
YIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHHINSHSQCYSSYSRVLAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKD
QWHSRGSTWLYRETCLNLCMVTITARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTVSD
FGRPNSALETHRLVAFLEADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSKAMTATFLSKQEVNMS
DSALDCVRDEAINKLQIFNTSYNQTYEKYGNVSVFETTGGLVVFQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTHNRTRKST
DGNNAHLSNMESVHNLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTELVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAA
RFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFANSSVYQYQGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSL
KIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSI STVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQR
VKYVEDKVVDPPLPYLKGDDLMGLGAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVI I IYL
IYTRQRLCTQPLQNLFPYLVADGTTVTSGSTKDTSLQAPPSYEEVSVNSGRKGPSPSSDASTAAPPYTNEQAYQ
MLLALARLDAEQRAQQNGTDSLDRGTGTQDKGQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

30

配列番号 2 2 (HCMVのTowne株由来のgB=GI:138193)

MESRIWCLVVCVNLICVCLGAAVSSSTRGTSATHSHSSHTTSAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGVNETIYNTTLK
YGDVVGVTNTKYPYRVCMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYA
YIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHHINSHSQCYSSYSRVLAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKD
QWHSRGSTWLYRETCLNLCMVTITARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTVSD
FGRPNSALETHRLVAFLEADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSKAMTATFLSKQEVNMS
DSALDCVRDEAINKLQIFNTSYNQTYEKYGNVSVFETTGGLVVFQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTHNRTRKST
DGNNAHLSNMESVHNLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTELVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAA
RFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFANSSVYQYQGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSL
KIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSI STVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQR
VKYVEDKVVDPPLPYLKGDDLMGLGAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVI I IYL
IYTRQRLCMQPLQNLFPYLVADGTTVTSGNTKDTSLQAPPSYEEVSVNSGRKGPSPSSDASTAAPPYTNEQAYQ
MLLALVRLDAEQRAQQNGTDSLDRGTGTQDKGQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

40

配列番号 2 3 (HCMVのAD169株由来のgB=GI:138192)

MESRIWCLVVCVNLICVCLGAAVSSSTSHATSSHTNGSHTSRTTSAQTRSVYSQHVTSSSEAVSHRANETIYNTTLK
YGDVVGVTNTKYPYRVCMAQGTDLIRFERNICTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYA
YIYTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHHINKFAQCYSSYSRVIGGTVFVAYHRDSYENKTMQLIPDDYSNTHSTRYVTVKD
QWHSRGSTWLYRETCLNLCMLTITARSKYPYHFFATSTGDVVYISPFIYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTVSD

【表 5 - 4】

FGRPNAAPETHRLVAFLELRADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMS
 DSALDCVRDEAINKLQIFNTSYNQTYEKYGNVSVFETSGGLVFWQGIKQKSLVELERLANRSSLNITHRTRRST
 DNNTTHLSMESVHNLYVAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAIIILSAIYNKPIAAR
 FMGDVILGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVIIFNFANSSYVQYQQLGEDNEIILGNHRTEECQLPSLK
 IFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSIISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQRV
 KYVEDKVVDPPLPPYLKGLDDLMSSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVIITYLI
 YTRQRLCTQPLQNLFPYLVSADGTTVTSGSTKDTSLQAPPSESVYNSGRKGGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQM
 LLALARLDAEQRAQQNGTDSLGDGTGTDKQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

配列番号 24 (C末端 myc - (His) 6 タグに融合した gH (ecto) をコードする構築物)

gacggatcgggagatctcccgatcccctatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccag
 tatctgctccctgctgtgtgttgaggctcgctgagtagtgcgagcaaaaattagctacaacaaggcaaggctt
 gaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcttttgcgctgcttcgcatgtacgggcccagatatacgc
 gttgacattgattattgactagttattaatagtaaatcaattacggggctcattagttcatagccatataatggagttc
 cggttacaaacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgac
 gtatgtcccatagtaacgcaataggactttccattgacgtcaatgggtggagattttacggtaaactgccact
 tggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcat
 tatgccagtagatgacctatgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcacgctattaccatggt
 gatgcggttttggcagtagatcaatggcggtgtagcgtttgactcacgggatttccaagtctccaccccattg
 acgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctcgttaacaactccgccccattgacg
 caatgggcggtaggcgtgtagcgtgggaggtctataataagcagagctctctggctaactagagaaccactgctta
 ctggcttatcgaaataatacagactcactatagggagaccacaagctggctagcgcaccatgaggcctggcctgccc
 tctactctgatcctctgacgctgtgctgttcagccactgctgtccagcagatagcggcgccgagggcctgagcga
 gcccctggacaaggctttccacctgctgctgaacacctacggcagaccatccgggtttctgcgggagaacaccaccc
 agtgccacctacaacagcagcctgcggaacagcaccgctcgtgagagagaacgccatcagcttcaactttttccagagc
 tacaaccagtagctacgtgttccacatgccagatgcctgtttgcccgcctctggccgagcagttcctgaaccagg
 ggacctgaccgagacactggaaagataccagcagcggctgaatacctacgcccctggtgtccaaggacctggccagct
 accggtccttttagccagcagctcaaggctcaggatagcctcggcgagcagcctaccaccgtgccccctcccctcgac
 ctgagcatccccactgtgtgtagtgcctccccagaccacctcagggctggaccgagagccacaccacctccggcct
 gcacagacccccacttcaaccagacctgacctgttcgagccaccagcctgctgttttagcaccgacccccctgccc
 tgcaccagggttctacctgatcagcagctgagatagctgaagatcacctgaccgaggatttctctgtggtcacc
 gtgtccatcgacgacgacacccccatgctgctgatcttcggccacctgccagagtgctgttcaaggccccctacca
 gcgggacaacttcatctcgcggcagaccgagaagcagcagctgctggtgctggtcaagaaggaccagctgaaccggc
 actcctacctgaaggacccccgacttcttgagcgcgcctggacttcaactacctggacctgagcgcctgctgaga
 aacagcttccacagatagcgcgtggcagctgctgaagtccggaagggtgccagatgctcagctcggcggaccggtggagat
 ggccttcgctatgcctcgcctgttcgcccgtgcccagcaggaagaggctggcgcccaggtgtcagtgcccagag
 cccctggatagacaggcccctgctgacagatccaggaattcatgatcacctgcctgagccagacccccctagaacc
 acctgctgctgtacccccacagcctggatctggccaagaggccctgtggaccccccaaccagatcacccgacatcac
 aagcctcgtgcccgtcgtgtacatcctgagcaagcagaaccagcagcactgatccccagtgggcctgagacaga
 tcgcccacttcgcccgaagetgcacaagaccatctggccagctttctgagcgccttcgcccaggcaggaactgtac
 ctgatgggcagcctggtccacagatgctggtgcataccaccgagcggcgggagatcttcatcgtggagacaggcct
 gtgtagcctggccgagctgtcccacttaccagctgctggcccacctcaccacagtagctgagcagcactgtaca
 ccccctgcagcagcagcggcagcgggaccacagcctggaaacggctgaccagactgttccccgatgccaccctgccc
 gctacagtgccctgcgcctgtccatctgtccacctgacgcccagcaccctggaaaccttccccgacctgtctg
 cctgccccctgggagagacttttagcgcctgaccgtgtccgagcagctgtcctacatcgtgaccaatcagtagctga
 tcaaggcatcagctaccccgtgtccaccacagctcgtggccagagcctgatcatcaccagaccgacagccagacc
 aagtgcgagctgaccggaaacatgcacaccacacacagcatcacctggcccctgaacatcagcctggaaaactgcgc
 tttctgtcagctctgcctgctggaatacagcagataccaggggctgatcaacatcatgtacatgacgacagcagcag
 acgctgctgttcgcccctgacccctacaacgaggtggtggtgctccagccccggaccactacctgatgctgctgaag
 aacggcaccgtgctggaagtgaccgagctggtggtggacggcaccgagctaccaagcttgggcccgaacaaaaact
 catctcagaagaggatctgaatagcgcctgacccatcatcatcatcattgagtttaaacggctctccagcttaa
 gtttaaacggctgatcagcctcagctgtgcttctagttgcccagcactctgttgtttgcccctccccctgcccctcc
 ttgacctggaagggtgcccactcccactgctcttccctaaataaaatgaggaattgcatcgcattgtctgagtaggtg
 tcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggg
 atgcccgtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctagggggtatccccacgcccctgtagc
 ggcgcaataagcgcggcggtgtggttaocgcccagcgtgaccgctacacttgcagcgcctagcgcgcctccctcc
 tttcgttttctcccttcttctcgcacgcttcgcccgttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttttag
 ggttccgatttagtgccttaocggcacctcgaacccccaaaaaacttgattagggtaggttcacgtagtgggccatcg
 cccctgatagacgggttttgccttttagcgttggagtcacgcttctttaaagtgtagctctgttccaaactggaac
 aacactcaaccctatctcggctctattcttttgatttataagggattttgcccatttcggcctattgggttaaaaaatg

10

20

30

40

【表 5 - 5】

```

agctgatttaacaaaaatttaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggct
ccccagcaggcagaagtatgcaaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgcccattcccgc
cagggcagaagtatgcaaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgcccattcccgc
cctaactccgcccagttccgcccatttctccgcccattggtgactaattttttttatattatgacagaggccgaggccg
cctctgcctctgagctattccagaagttagtgaggaggttttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctcccgga
gcttgatataatccattttcggatctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcagatggaacaagatggattgca
cgagggttctccgcccgttgggtggagaggctattccggctatgactgggcacaacagacaatcggtctctgatg
ccgcccgtgtccggtgtcagcgcaggggcgcgggttctttttgtcaagaccgacctgtccgggtgcctgaatgaa
ctgcaggcagaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacggcggttctctgcgcagctgtgctgcagcttctcac
tgaagcgggaaggactggctgctattgggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctccacttgcctcctgccc
agaaagtatccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgttgcagcttgcagctacctgcccattcgaccacca
gcgaacatcgcacgagcagcagcactcggatggaagccggctctgtcagatcaggatgatctggacgaagagca
tcaggggctcgcgcccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacc
atggcgatgctgcttgcgaatatcatggtggaaaaatggccgcttttctggattcatcagactgtggccggctgggt
gtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccg
cttctcgtgctttacggctatcgcgctcccgttccagctcgccttctatcgccttcttgacagattctctc
gagcgggactctggggtcgaatgaccgaccaagcagcgcaccaactgcccacacagatctcagattccaccgccc
ccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatgatcctccagcgggggactctcatg
ctggagttcttcccccaccacttgtttatgacagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaattt
cacaataaagcatttttttactgcattctagttgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgta
taccgtcagcctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctcgtgtgaaattggttatccgctcaca
attccacacaacatcagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagtgactaacacattaat
tgcgttgcgctcactgcccgttccagctcgggaaactgtcgtgcagctgcattaatgaatcggcacaacgcgcg
ggagaggcgggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgctcggctcgttccgctcggg
cgagcggatcagctcactcaagcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtg
agcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgtttttccataggctccgccccctg
acgagcatcacaataatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataaccagcgtttccc
cctggaagctccctcgtgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctcccttccggtg
aagcgtggccttctcactagctcagcgtgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagcagctggctg
tgcacgaacccccctcagcccgcctcagccttccgcttccgcttccgcttccgcttccgcttccgcttccgcttccg
gacttatcgcactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggatgtagggcgggtgctacagagttctt
gaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatatttggatctgcgctctcgtgaagccagttacctcg
gaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcgggtggttttttggttgcaagcagcag
attacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaa
ctcagcttaagggattttggctcatgagattatcaaaaaggacttccactagatccttttaattaaaaatgaagtt
ttaaataactcctaagtatatgagtaaaacttggctcagcagttaccaatgcttaatacagtgaggcagctatctca
gcgactctgtctatttgcgttcatccatagttgcctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggagggcttacc
atctggccccagtgctgcaatgataaccgagagaccacgctcaccgctccagatttatcagcaataaaaccagccag
ccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattggttgcgggaagct
agagtaagtagttccgagttatagtttgcgcaacgcttgggtgccattgctacagggatcgtgggtgcaacgctcgtc
gtttggataggcttcatcagctccggttcccacagatcaaggcaggttacctgatccccatggttgcacaaaaag
cggtagctcctcggctcctcagatcgttgtcagaagtaagttggccgagtggttatcactcatggttatggcagca
ctgcataactcttacttactgcatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcag
agaatagtgatgtagcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
taaaagtgctcatcattggaaaaagcttcttccggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagttcg
atgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttacttccaccagcgttctcgggtgagcaaaaacagg
aaggcaaaatgcccgaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcactcttcttcttcaatatt
attgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatattgaaatgatttagaaaaataacaaaataggg
gttccgcgcacatttccccgaaaaagtgccacctgacgctc

```

配列番号 25 (全長 g L をコードする構築物)

```

gccgcggaatttcgactctaggccattgcatacgttggatctatatacataatagtacatttatattggctcatgtc
caatatgaccgcatggtgacattgattattgactagttattaatagtaatacaattacggggctcattagttcatagc
ccatatatggagttccgcttacataacttacggttaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccatt
gacgtcaataatgacgtagttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatattac
ggtaaaactgccacttggcagtcacatcaagtgtatcatatgccaagtccgccccctattgacgtcaatgacggtaaa
tggcccgcctggcattatgcccagtcacatgaccttacgggacttctcacttggcagtcacatctacgtattagtcac
cgtattaccatgggtgatgcggttttggcagtacaccaatggcgctggatagcgggttggactcaggggatttccaa
gtctccacccttggcagtcattgggagtttggtttggcaccacaaatcaacgggacttccaaaatgctgtaataac
ccgccccgttgcgcaaatggcggttaggcgtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccg
tcagatcgcctggagacgcatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggacccgatccagcctccgccc

```

【表 5 - 6】

```

gggaacgggtgcattggaacgaggattccccgtgccaagagtgaogtaagtaccgectatagactctatagggcacacc
cctttggctcttatgcatgctataactgtttttggcttggggcctatacacccccgcttcccttatgctataggtgatg
gtatagcttagcctataggtgtgggttattgaccattattgaccactccccatttgggtgacgatactttccattact
aatccataacatggctctttggcacaactatctctattggctatatgccaatactctgtccttcagagactgacacg
gactctgtatttttacaggatgggggtcccattttattttacaaattcacatatacaacaacgcccgtccccgtgcc
cgcagtttttattaaacatagcgtgggatctocacgcgaatctcgggtacgtgttccggacatgggctcttctccgg
tagcggcgagacttccacatocgagccctgggtcccattgctccagcggctcatggctcgtcggcagctccttgcctc
taacagtggaggccagacttaggcacagcacaatgcccaccaccaccagtggtgcgcacaaaggccgtggcggtaggg
tatgtctgaaaaatgagctcggagattgggctcgcaccgctgagcagatggaagacttaaggcagcggcagaaga
agatgcaggcagctgagttgttattctgataagagtcagaggtaactcccgttgcgggtgctgttaacggtggagg
gcagtgtagtctgagcagtaactcgttgcgtccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaacagactgttc
ctttccatgggtctttctgcagtcaccgctcgtcgcagccaccatgtgcagaaggcccagctgcggcttcagcttca
gccctggaccocgtgatcctgctgtgggtgctgcctgctgctgcctatcgtgtcctctgccgocgtgtctgtggccct
acagccgcgagaaggtgccagccgagtgccccgagctgaccagaagatgctcgtgggagaggtgttcgagggcga
caagtacgagagctggctgcccctgggtcaactgaccggcagagatggccccctgagccagctgatccggtaca
gaccctgacccccgagcccaatagcgtgctgctgagcggccttccctggataaccctggccctgctgcaaac
aaccocgaccagctgagagccctgctgaccctgctgtccagcgcacccgccccagatggatgaccgtgatgccccg
ctacagcagtggtggagatggcagccctgcccgtgtacacctgctggagcactgctgcagaggctacgacctgacca
gactgagctacggccggtccatcttcaacagagcagctgctgggcttcgagctgggtgcccccaagcctgttcaactg
gtggtggccatccggaacgaggccaccagaaccaacagaccgtgcccgtgctgctacagccgctgcacctga
gggcatcacactgttctacggcctgtacaacgcctgaaagagttctgctccggcaccagctggatccccccctgc
tgagcaacctggacaagtactacgcccctgccccagctgaagcagacacagagtgaaacctgcccgcacagc
agatatggccctcaggccgtggacgcccagatgataatctagaagccatggatatacgatccactacgcttagagc
tcgctgatcagcctcagctgtgcttctagttgcccagccatctgttgtttgccccctccccctgccccttcttgacc
tggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcatctt
atctgggggggtgggtggggcaggacagcaagggggagattgggaagacaatagcaggggggtgggccaagaact
ccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccggcgtcccggaaaacgatccgaagcccaacctttcatag
aaggcggcgggtggaatcgaaatctcgtgatggcaggttggcgctcgttggctcggcaccagctggatccccccctgc
gctcagaagaactcgtcaagaaggcagtagaaggcagtagcctgcgaatcgggagcggcgataccgtaaagcagcag
gaagcggctcagcccattcgcgcgcaagctcttcagcaatatcaoggttagccaacgctatgtcctgatagcggctccg
ccacaccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcg
ccatgggtcacgacgagatcctcgcctcgggcatgcgcgcttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagccc
ctgatgctcttcgtccagatcctcgtatcgacaagaccggcttccatccgagtagctgctcgtcgtatgcatgtt
tcgcttgggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaagcgtatgcagccgcccattgcatcagccatgatggact
ttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccggcacttcgcccataagcagccagctccctcccgc
ttcagtgacaactcgtcaagaaggcagtagaaggcagtagcctgcgcaatcgggagcggcgataccgtaaagcagcag
gcagttcattcagggcaccggacaggtcgttctgacaaaaagaaccgggcccctgctgacagccggaacacag
gcccacagagcagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccaccacaagcggccggagaacc
tgctgcaatccatcttgttcaatcatgcgaaacgatcctcatcctgtctcttgatcagatcttgatccccctgcgc
atcagatccttggcggcaagaaagccatccagtttactttgagggcttcccaaccttaccagagggcgccccagct
ggcaattccgggttcgcttgcctgtccataaaaacgcgccagcttagctatcgccatgtaagcccactgcaagctacctg
ctttctcttgcgcttgcgttttcccttgcagatagcccagtagctgacattcatccggggtcagcaccgtttctt
gcccagctggctttctacgtgttccgcttcttttagcagcccttgcgcccctgagtgcttgcggcagcgtgaagctaat
tcatggttaaattttgttaaatacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaaatcccttataaaatcaaa
agaatagcccagatagggttgagtggttgcagtttggaaacaagagtcactatataagaacgctggactccaacg
tcaaaagggcgaaaaaacgctctatcagggcagatggccggaacagcttatgcggtgtgaaataccgcacagatgctaa
ggagaaaaatccgcatcagggcctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttccggctgcggcga
gcccgtatcagctcaactcaaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagc
aaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgctggcgtttttccataggtcccgcctccctgacg
agcatcacaaaaaatcgacgctcaagtgcagaggtggcgaaaccgcagagactataaagataaccaggcgtttccccc
ggaagctccctcgtgctcctctgttccgaccctgcccgttaccggatacctgtccgctttctcccttccgggaag
cgtggcgtctttctcatagctcagcgtgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgc
acgaaccccccgcttccagcccagcgtcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgac
ttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggatgttagggcgggtgtacagagttcttgaa
gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagttttggtatctgcgctcgtgtaagccagttaccttcggaa
aaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtttttttgttggcaagcagcagatt
acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctactgaacgggtgatccccaccggaattgcg

```

配列番号 26 (全長 pUL128 をコードする構築物)
gcccggaaatttcgactctaggccattgcatocgttgtatctatatacataatgtacattttatattggctcatgtc
caatatgaccgcccattgtgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattaccggggtcattagttcatagc

【表 5 - 7】

ccatataatggagttccgcggttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccatt
gacgtcaataatgacgtatggtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatattac
ggtaaaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaagtccgcccctattgacgtcaatgacggtaaa
tggcccgcctggcattatgcccagtagacacctacgggactttccctacttggcagtagcatctacgtattatgcoat
cgctattaccatgggtgatgcccgttttggcagtagacccaatgggctggatagcgggttgactcacggggatttccaa
gtctccaccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtataaac
cccgcccgttgacgcaaatgggctgtagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccg
tcagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagacacgggaccgatccagcctccgcgcc
gggaacgggtgcatggaacgaggattccccgtgccaagagtacgtaagtaccgctatagactctataggcacc
cctttggctcttatgcatgctatactgttttggcttggggcctatacacccccgcttcccttatgctatagggtgatg
gtatagcttagcctatagggtgggttattgaccattattgaccactcccctattgggtgacgatactttccattact
aatccataacatggctctttgccacaactatctctattggctatattgccaatactctgtccttcagagactgacacg
gactctgtatttttacaggatgggggtcccattttattttacaaaattcacatatacaacaacgcccgtccccctgccc
cgcagtttttataaacatagcgtgggatctccacgcgaatctcgggtacgtgtccggacatgggctcttctccgg
tagcggcgggagcttccacatccgagccctgggtcccatgcccacagcggctcatggctcgtcggcagctccttgcctc
taacagtggaggccagacttaggcacagcacaatgcccaccaccagctgtgcccgcacaaggccgtggcggtaggg
tatgtgtcgaanaatgagctcggagattgggctcgcaccgctgacgcagatggaagacttaaggcagcggcagaaga
agatgcaaggcagctgattgtttgtattctgataagagtcagaggttaactcccgttgcgggtcgtttaacgggtgagg
gcagtgtagtctgagcagtagctcgttgcgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaacagactgttc
ctttccatgggtcttttctgcagtcaccgctcgtcgcagccaccatgagccccaggacctgaccccccttccctgacaa
ccctgtggctgctcctgggcatagcagagtgccatagagtgccgggcccagggaatgctgcgagttcatcaacgtgaa
caccoccccgagcgggtctacgacttcaagatgtgcaaccgggttcaccgtggccctgagatgcccgcagcggcgaag
gtgctacagccccgagaaaaccgcccagatccggggcctcgtgaccaccatgaccacagcctgacccggcaggtgg
tgcacaacaagctgaccagctgcaactacaacccccctgtaacctggaagccgacggcggatcagatgcccgaagtg
aacgacaaggccagtagctgctgggagccgcccgaagcgtgcccctaccggtggatcaacctggaatacgcacaagat
caccggatcgtgggctggaccagtagctggaagcgtgaagaagcacaagcggctggacgtgtgcagagccaaga
tgggctacatgctgcagtgataatctagaagccatggatccggatccactacgcgcttagagctcgtgatcagcc
tcgactgtgcttctagttgccagccatctgttttgcocctccccctgccccttcccttgaccctggaaggtgcccac
tcccactgtccttccctaaataaaatgaggaatgtcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctatctctggggggtg
gggtggggcaggacagcaaggggggaggttgggaagacaatagcaggggggtgggccaagaactccagcatgagatc
cccgcctggagtagccagccggctcccgcaaacgattccgaagcccaacctttcatalagaaggcggcgttg
aatcgaatactcgtgatggcaggttggcgctcgttggctcggctcatttcgaaccccagagctcccgtcagaagact
cgtcaagaaggcagatagaaggcagtagcgtcgcgaatcgggagcggcgataccgtaaaagcagaggaagcgggtcagcc
cattcgcgcccaagctcttcagcaatatacgggtagccaaagctatgtcctgatagcgggtccgcccaccccagccc
gccacagctcagatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcgaagcaggtatccgcatgggtcaca
cgagatcctcgcctcgggcatgcccgccttgagcctggcgaacaggttcggctggcgcgagcccctgatgctcttcg
tccagatcactcctgatcgaacaagaccgcttccatccagtagcgtgctcgtcgtatgagatgtttcgtctgggtggc
gaatgggcaggtagccagccagcgtatgcccggccagcatttccatcagccatgatggatactttctcggcagag
caaggtgagatgacaggagatcctgccccggcaacttgcoccaaagcagccagctccttcccgttccagtgacaacg
tcgagcacagctgcccgaaggaacgcccctcgtggccagccacgatagccgcgctgcccctcgtcctgcagttcattcag
ggcaccggacaggtcgtcttgacaaaaaagaaaccgggcccctcgcctgacagccggaacacggcggcatcagagc
agccgattgtctgttggcccagtcatagcccgaatagcctctccaccacaagcggccggagaaacctgctgcaatcca
tcttgttcaatcatgcaaaagatcctcatcctgtctcttgatcagatcttgatcccctgcgccatcagatccttgg
cggcaagaaagccatccagtttactttgagggcttcccaaccttaccagagggcgcccagctggcaatccgggtt
cgcttgcgtccataaaaaccgcccagcttagctatcggccatgtaagcccactgcaagctacctgctttctcttggc
cttgcgttttcccttgcagatagcccagtagctgacattcatccgggggtcagcacggtttctcgggactggcctt
ctacgtgttccgcttcccttagcagcccttgcgcctgagtgcttgcggcagcgtgaagctaatcattgggttaaatt
tttgttaaatacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaaatcccttataaatcaaaagaatagcccag
ataggggtgagtggttccagtttggaaacaagagttccactataaagaacgtggactccaacgtcaaaagggcgaaa
aacgctctatcagggcgatggccggatcagcttatgcccgtgtgaaataccgcacagatgctgaaggagaaaataaccg
catcagggcctcttccgcttccctcactgactcgtcgcctcggctcgttcggctgcccggagcgggtatcagctc
actcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaa
aaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgttttccataggctccgccccctgacagagcatcaaaaaa
tcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccccagcaggactataaagataaccagggcttccccctggaagctccctcg
tgcgctcctcgttccgaccctgcccgttaccggataacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttct
catagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttgcctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccctg
tcagcccagcctgccccttatccggtaactatcgtcttgagttccaaccggtaagacacgacttatccgcaactgg
cagcagccactggtaaacaggattagcagagcggatgttaggcgggtgctacagagttcttgaaagtgggtgctaac
tacggctacactagaaggacagtagtttgggtatctgcgctcgtcgtgaagccagttacctcggaaaaagagttggtag
ctcttgatccggcaaaacaaaccgctggtagcgggtggttttttgggttgcagcagcagattacgcgcagaaaaa
aaggatctcaagaagatccctttgatctttctactgaacgggtgatccccaccggaattgcg

10

20

30

40

【表 5 - 8】

配列番号 27 (全長 pUL130 をコードする構築物)

gcccgcgaatttcgactctagccattgcatcagttgtatctatatcataatatgtacatttatattggctcatgtc
caatatgaccgcatgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggggtcattagttcatagc
ccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccatt
gacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagatttac
ggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtccgccccctattgacgtcaatgacggtaaa
tggcccgctggcattatgccagtagatgaccttacgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac
cgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtagaccaatggcggtggatagcgggttgactcacggggatttccaa
gtctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaataac
ccgccccgttgacgcaaatggcggttaggcgtgtagcgggtgggaggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccg
tcagatcgctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaaagacaccgggaccgctccagcctccgcgcc
gggaacggtgacattggaaacggtattccccgtgccaagatgacgtaagtaccgctatagactctatagcttggcacacc
cctttggctcttatgcatgctatactgtttttggcttggggcctatacaccgcccttcccttatgctataggtgatg
gtatagcttagcctataggtgtgggttattgaccattattgaccactcccctattggtagcagatactttccattact
aatccataaactggctccttggcacaactatctctattggctatattgccaatactctgtccttcagagactgacacg
gactctgtatttttacaggatggggtcccatttattttacaattcacatatacaacaacgcccgtcccccggtgcc
cgcagtttttattaaacatagcgtgggatctccacgcgaatctcgggtacgtgttccggacatgggctcttctccgg
tagcccccttggccaagctgacctacagcaagccccacgcgcgacctctactgcccccttctgtaccctcc
taacagtggaagccagacttaggcacagcacaatgccaccaccaccagtgtgcccgcacaaggccgtggcggtaggg
tatgtgtctgaaaatgagctcggagattgggctcgcaccgctgacgcagatggaagacttaaggcagcggcagaaga
agatgcaggcagctgagttgttgtattctgataagagctcagaggttaactcccgttgcgggtgctgttaacgggtggagg
gcagtgtagctgagcagtagctcgttggctgcccgcgcgcccaccagacataatagctgacagactaacagactgttc
ctttccatgggtcttttctgcagtcaccgtcgtcgaagccaccatgctgcggtgctgctgagacaccacttccact
gctgctgctgtgtgcccgtgtgggccacccttctgtctggccagcccttggagcaccctgaccgccaaccagaacct
agcccccttggccaagctgacctacagcaagccccacgcgcgaccttctactgcccccttctgtaccctccag
ccctcccagaagccccctgcagttcagcggcttccagagagtgtccaccggccctgagtgccgaacgagacactgt
aactgctgtacaaccgggaggccagacactgggtggagcggagcagcacctgggtgaaaaaagtgtctggtatctg
agcggccggaaccagaccatcctgcagcggatgcccagaaccgcccagcaagcccagcagcggcaacgtgcagatcag
cgtggaggacgcaaaaatcttccggcggccacatgggtgcccagcagaccaagctgctgagattcctggtcaacgacg
gcaccagatatacagatgtgctgatgaagctggaaagctgggcccacgtgttccgggactactccgtgagcttccag
gtccggctgaccttaccgagggccaacaaccagacctacaccttctgacccaccccaacctgatcgtgtgataatc
tagaaaagcctggccaatcgtgacctacagcagcttagagctcgtgatcagcctctactgtgccttctgttaccagc
catctgttgtttgcccctccccctgaccttcttgaacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaat
gaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctatcttctggggggtggggtggggcaggacagcaaggggga
ggattgggaaagacaatagcaggggggtgggcaagaactccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccg
gctccccgaaaacgattccgaagcccaaccttctatagaaggcggcggtggaatcgaaaatctcgtgatggcaggtt
gggctcgttggctgggtcatttccgaaccagagctcccgtcagaagaactcgtcaagaaggcagatagaaggcagat
gctcgcgaatcgggagcggcagatccgtaagcagcaggaagcggctcagccattcgcgcgcaagctcttccagcaa
tatcacggttagccaacgctatgtcctgtagcggctcgcgcccacaccagcggccacagtcgatgaatccagaaaag
cggccattttccaccatgatattcggcaagcagggcatcgccatgggtcacgacagatcctcgcgctcgggcatgctg
cgccttgacctggcgaacagttcgggtggcgcgagccctgatgctcttctgctccagatcatcctgatcgacaagac
cggcttccatccgagtagctgctcgtcgtcagatgcttctcgttgggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaagc
gtatgcagccgcccattgcatcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctg
ccccggcacttgcaccaatagcagccagctcccttcccgttccagtgaacaagctcagacacagctcgcgaaggaaagc
ccgtcgtggccagccacgatagccgcgctgctcctgctcctgagttcattcagggcaccggacaggtcggctcttgaca
aaaagaaccggggcggccctgctgacagccggaaacagcggccatcagagcagccgatgtctgttggccagtc
atagccgaatagcctctccacccaagcggccggagaacctgctgcaatccatcttgttcaatcatgcaaaacgatc
ctcatcctgctcttgatcagatcttgatcccctgcgccaatcagatccttggcggcaagaaagccatccagtttact
ttgcagggcttcccaaccttaccagagggcgccccagctggcaattccgggttgccttgcctgtccataaaaaccgcca
gtctagctatcgccatgtaagccactgcaagctacctgtttctcttggcgttgcgttttcccttgtccagatag
ccagtagctgacattcatccgggtcagcaccgtttctgcggactggctttctacgtgttccgcttccctttagcag
cccttgcgacctgagtgcttgcggcagcgtgaaactaattcatggttaaattttgttaaatacagctcatttttttaa
ccaataggccgaaaatcggcaaaaatcccttataaatcaaaagaatagcccagatagggttgagtggttgcagttt
ggaacaagagtccactatataagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccgg
atcagcttatgctgtgaaataccgcacagatgctgaaggagaaaataccgcatcaggcgtcttccgcttccctg
ctcactgactcgtgctcggctcgttccgctgcccgcagcggatcagctcactcaaggcggtaatacggttatc
cacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg
cgttgcagcgtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcagcgtcaagtcagaggtggcga
aactccagagactataaagataaccaggcttccccctggaagctccctcgtgctctcctgttccgacctgccc
gcttaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgttttctcatagctcacgctgtaggtatctca

10

20

30

40

【表 5 - 9】

gttcgggtgtaggtcgctcccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgccccttatcc
 ggtaactatcgctcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattag
 cagagcgggtatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtat
 ttggatatcgctctgctgaaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaccacc
 gctggtagcgggtgttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat
 cttttctactgaacgggtgatccccaccggaattgacg

配列番号 28 (全長 pUL131A をコードする構築物)

gcccgggaatttcgactctaggccattgcatacgttgtatctatatacataatgtacatttatattggctcatgtc
 caatatgaccgccaatgtagacattgattatttgacttatttaataagtaatacaattacggggcatttagttcatagc
 ccataatggaagttccgcttacataaacttacggtaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccatt
 gacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagttttac
 ggtaaactgcccacttggcagtaacatcaagtgtatcatalgccaagtccgccccctattgacgtcaatgacggtaaa
 tggccccgctggcattatgcccagtaacatgacctacgggactttcctacttggcagtaacatctacgtattagtc
 cgctattaccatgggtgatgcccgttttggcagtaacccaatggcggtggatagcgggtttgactcacggggatttcaa
 gtctccacccccattgacgtcaatgggagtttggtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaataac
 cccgccccgttgcagcaaatggcggtaggcgtgtagcggtaggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccg
 tcagatcgctggagagccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgccc
 gggaaacgggtgacattggaacgcccattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgctatagactctataggcacacc
 cctttggctcttatgcatgctatactgttttggcttggggcctatacacccccgttcccttatgctatagggtgatg
 gtatagccttagcctataggtgtgggttattgaccattattgaccactcccctattgggtgacgatactttccattact
 aatccataacatggctctttgcccacaactatctctattggctataatgccaatactctgtccttcagagactgacacg
 gactctgtatttttacaggaatggggtcccatttattatttacaattcacatatacaacaacgcccgtccccgtgccc
 cgcagtttttataaacatagcgtgggatctccacgcgaatctcgggtacgtgttccggacatgggctcttctccgg
 tagcggcggagcttccacatccgagccctgggtcccattgctccagcggctcatggctcgtcggcagctccttgcctcc
 taacagtgaggccagacttaggcacagcacaatgcccaccaccaccagtggtgccgcacaaggccggtggcggtaggg
 tatgtgtctgaaaatgagctcggagattgggctcgcaccgctgacgcagatggaagacttaaggcagcggcagaaga
 agatgcaggcagctgagttgtgtattctgataagagtcagaggttaactcccgttgcgggtgctgtaacgggtggagg
 gcagtgtagctgagcagtaactcgttgcctgcccgcgcgcccaccagacataatagctgacagactaacagactgttc
 ctttccatgggtcttttctgacgtcacccgtctgcagccaccatgcccgtgctgacagagtggtgctgctcgtgctgccc
 tgtgtccgtgtgtgctgggctgcccagagagagacagccagcaagaacgactactaccgggtgcccactactggtg
 gatgctgacgagagccctgcccagaccagaccgggtacaaaactcgtggagcagctcgtggacctgacctgaacta
 ccaactacgacgccagccacggcctggacaacttcgacgtgctgaagcggatcaacgtgaccgaggtgctcctgctga
 tcagcagcttccggcggcagaacagaagaggcggcaccacaacgagaccacctcaacgcccgtgctctctggcc
 cctcacgcccagatccctggaattcagcgtgcccgtgttcgccaaactgataatctagaaaagccatggatctcgatcc
 actacgcccattagagctcgtgacagcctcagctgtgctcttctagttgcccagccatctgttgtttgccccctccccg
 tgcctccttgacccctggaagtgccactcccactgctccttcttaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctg
 agtaggtgtcattctattctgggggtggggcaggacagcaagggggaggttgggaagacacatagcagggg
 ggtgggccaagaactccagcatgagatccccgcctggaggatcatccagcccgcctcccggaaaaacgattccgaag
 cccaacctttcatagaaggcggcgggtggaatcgaatctcgtgatggcaggttgggcgctcgttggctcggctcatttc
 gaaccccagagtcggcctcagaagaactcgtcaagaaggcagatagaaggcagatgcccgtgcgaatcgggagcggcag
 accgtaaaagcagaggaagcgggtcagcccattcgcgcgcaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacgctatgt
 cctgatagcggctccgcccacaccagcggccacagtcgatgaaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattc
 ggcaagcagcagatcggccatgggtcacgacgagatcctcggcgtcgggcatgcccgccttgagcctggcgaacagttc
 ggctggcgcgagcccctgatgctctcgtccagatcatcctgatcagacaagaccgcttccatccgagtagctgctc
 gctcgtatgctgatttccgttgggtggatgggaggttagccggatcaagcgtatgacgcccgcgcatgtgcatca
 gccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgcccggcacttcgcccacatagcag
 ccagtccttcccgttccagtgacaacgtcagcagcagctgcgcaaggaaacgcccgtcgtggccagccacgatagcc
 gcgctgctcgtcctgacgttcatcagggcaccggacaggtcggctcttgacaaaaagaaccgggcccctgcccgt
 gacagccggaacacggcggcatcagagcagccgattgtctgttggccagtcataagccgaatagcctctccaccaca
 agcggccgggaacctgcgtgcaatccatcttggttcaatcatgcaaacgatcctcatcctgtctcttgatcagatc
 ttgatcccctgcgccatcagatccttggcggcaagaagccatccagtttactttgacgggcttcccaaccttacc
 gagggcggcccagctggcaattccgggttcgcttgcgtgtccataaaaacggcccagcttagctatcgccatgtaagccc
 actgcaagctacctgctttctcttggcgttgcgttttcccttggccagatagcccagtagctgacatccatccggg
 gtcagcaccgtttctgcccactggctttctacgtgttccgcttcccttagcagcccttggcccctgagtgcttgcgg
 cagcgtgaagtaattcattggttaaattttggtaaatcagctcattttttaaccaataggccgaaatcggcaaaat
 cctttataaatcaaaaagaatagcccagatagggttaggttaggttccagtttggaaacaagagtcactatataaaga
 acgtgactccaacgtcaaaaggcgaaaaacggctctatcaggcagatggcggatcagcttatgcccgtgtaaatc
 cgcacagatgctgaaggagaaaaatccgcatcagcgcctcttccgcttccctcgtcactgactcgtcgcgctcggctc
 gttcggctgcccgcagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcagg
 aaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgtttttccatagcc

10

20

30

40

【表 5 - 10】

tccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataagatac
caggcgtttccccctggaagctccctcgtgctctcctggtccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctt
tctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtcgtcca
agctgggctgtgtgacgaacccccgctcagccgacccgctgctgcttaccggtaactatcgtcttgagtccaac
ccggtgaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgc
tacagagttcttgaaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagattttggtatctgctgctgctgaagc
cagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaacaccaccgctgtagcggtggttttttggtt
tgcaagcagcagattacgctcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctactgaacggtgatcccc
accggaattgcg

配列番号 29 (配列番号 1 のアミノ酸残基 24~715 からなる gH 成熟タンパク質)

10

RYGAEAVSEPLDKAFHLLNNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGP
LAEQFLNQVDLTETLERYQQRNLTYALVSKDLASYRFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSPHVWMPQTTPHGW
TESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIIDELRYVKITLTEDFFVTVSIDDTPMLLIFGHLF
RVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDLKSGRCQ
MLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALW
TPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMVLVHTTERR
EIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSLDLYTPCSSSGRRDHSLERLRLFPDATVPATVPAALSILSTMQPST
LETFFDLFCLPLGESFSALTVSEHVSIVTNQYLKIGISYPVSTTVVGQSLIITQTDQSQTCELTRNMHTTHSITVA
LNI SLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHSDDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYMLLKNGTVLEVTDVVVDATD

配列番号 30 (配列番号 29 および 5 を含む gH 成熟タンパク質)

20

RYGAEAVSEPLDKAFHLLNNTYGRPIRFLRENTTQCTYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGP
LAEQFLNQVDLTETLERYQQRNLTYALVSKDLASYRFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSPHVWMPQTTPHGW
TESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIIDELRYVKITLTEDFFVTVSIDDTPMLLIFGHLF
RVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDLKSGRCQ
MLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALW
TPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMVLVHTTERR
EIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSLDLYTPCSSSGRRDHSLERLRLFPDATVPATVPAALSILSTMQPST
LETFFDLFCLPLGESFSALTVSEHVSIVTNQYLKIGISYPVSTTVVGQSLIITQTDQSQTCELTRNMHTTHSITVA
LNI SLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHSDDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYMLLKNGTVLEVTDVVVDATD
TKLGPEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH

配列番号 31 (配列番号 7 のアミノ酸残基 31~278 からなる gL 成熟タンパク質)

30

AAVSVAPTAAEKVPAECPCLTRRCLLGEVFEFGDKYESWLRPLVNVTVGRDGPLSQLIRYRPVTPAANSVLLDEAFDL
TLALLYNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGPVAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELV
PPSLFNVVVAIRNEATRTRAVRVLVSTAAAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHLQDPLLRHLDKYYAGLPELQKTR
VNLPAHSRYGPQAVDAR

配列番号 32 (配列番号 10 のアミノ酸残基 31~472 からなる gO 成熟タンパク質)

CNVLVNSRGTRRSWPYTVLSYRGKEILKKQKEDILKRLMSTSSDGYRFLMYPSSQKFHAIVISMDKFPQDIILAGPI
RNDISITHMWFDFYSTQLRKPAYVYSEYNHTAHKITLRPPPCGTVPSMNCLEMLNVSKRNDTGEKGCNFTTFNPM
FFNVPRWNTKLYIGSNKVNVDSTIYFLGLTALLLRYAQRNCTRSFYLVNAMSRLNFRVVPKYINGTKLKNMTRKLR
KQALVKEQPQKKNKSQSTTTPYLSYTTSTAFNVTTNVTYSATAAVTRVATSTTGYRPSNFMKSIMATQLRDLATW
VYTTLRYRNEPFCKPDRNRTAVSEFMKNTHVLIRNETPYTIYGTLDMSLYNETMVENETASDNNETPTPTSPSTR
FQRTFIDPLWDYLDLFLDKIRNFSLQLPAYGNLTPPEHRRANLSTLNSLWWSQ

配列番号 33 (配列番号 14 および 15 のアミノ酸残基 28~171 からなる pUL128 成熟タンパク質)

40

ECCCFINVNHPERCYDFKMCNRFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTMTTHSLTRQVVHNKLTSCNYNPLYLE
ADGRIRCGKVNDAQYLLGAAGSVYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVKKHKRDLVCRAKMGYMLQ

配列番号 34 (配列番号 16 のアミノ酸残基 26~214 からなる pUL130 成熟タンパク質)

SPWSTLTANQNPSFPWSKLTYSKPHDAATFYCPFLYSPPRSPLQFSGFQRVSTGPECRNETLYLLYNREGQTLVER
SSTWVKKVIWYLSGRNQITLQRMPRTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMVPKQTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESW
AHVFRDYSVSFQVRLTFTEANNQTYTFCTHPNLIV

【表 5 - 1 1】

配列番号35 (配列番号18および配列番号19のアミノ酸残基19~129からなるpUL131A成熟タンパク質)

QCQRETAEKNDYRVPHYWDACSRALPDQTRYKYVEQLVDLTLNYHYDASHGLDNFDVLKRINVTEVSLIISDFRRQ
NRRGGTNKRRTTFNAAGSLAPHARSLEFSVRLFAN

配列番号36 (配列番号21のアミノ酸残基23~907からなるgB成熟タンパク質)

VSSSSTRGTSATHSHSSHTTSAAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVTTKYPYRVC SMAQG
TDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGIMVVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMEI
HHINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLYRETCLNLCMVT
ITTARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTIIVSDFGRPNSALETHRLVAFLERADS
VISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTS
YNQTYEKYGNVSVFETTGGLVVFWQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTNHRTRKSTDGNATHLSNMESVHNLVYAQL
QFTYDTLRGYINRALAQIAEAWCVDRRTLEVFKEKLSKINPSAILSAINKPIAARFMGDVGLGLASCVTINQTSVKV
LRDMNVKESPGRCYSRPVVIFFNFANSSYVQYQGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMI
LSSI STVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPLPPYLKGLDDL
MSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVIITYLIYTRQRRLCTQPLQNLFPYLVS
ADGTTVTSGSTKDTSLQAPPSYEEESVYNSGRKGPSPSSDASTAAPPTNEQAYQMLLALARLDAEQRAQQNGTDSL
DGRTGTQDKGQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV

10

【図 1】

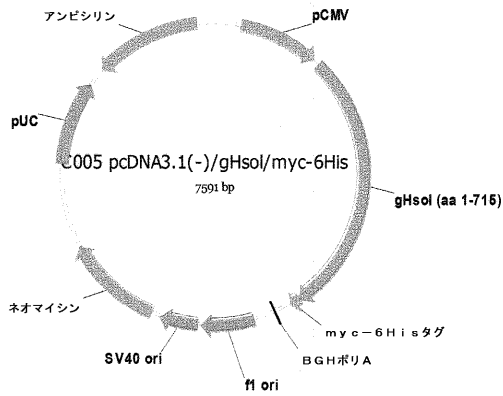


Figure 1

【図 2】

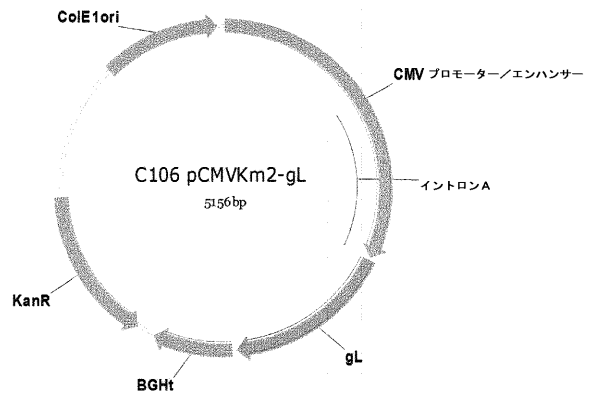


Figure 2

【 図 3 】

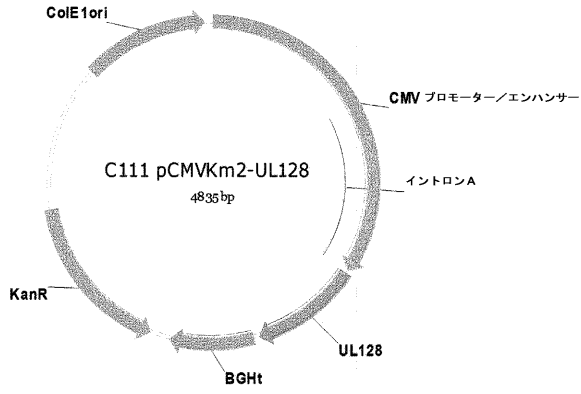


Figure 3

【 図 4 】

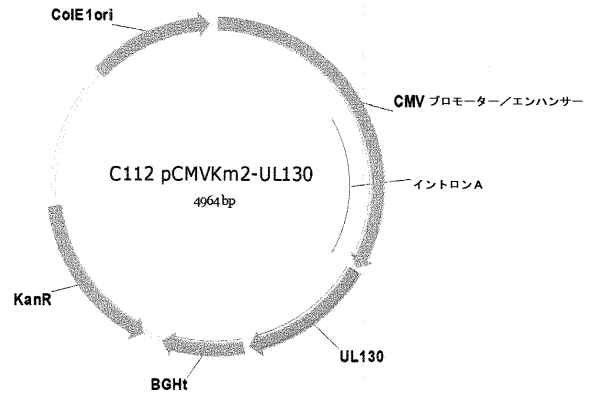


Figure 4

【 図 5 】

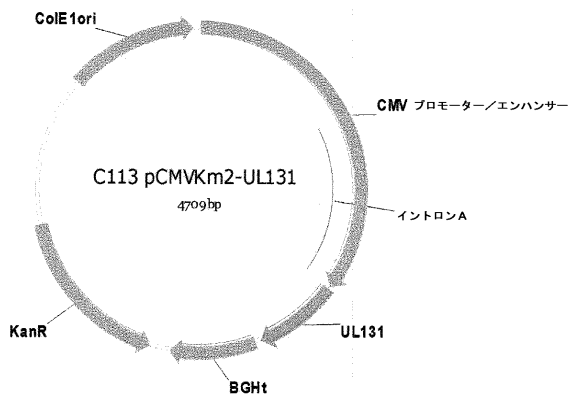


Figure 5

【 図 6 】

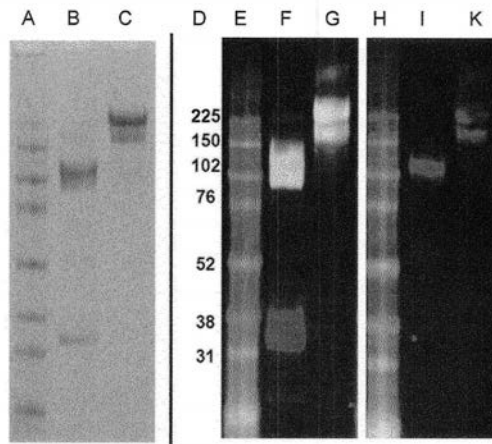


Figure 6

【 図 7 】

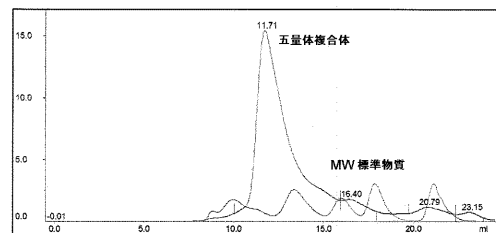


Figure 7

【 図 8 】

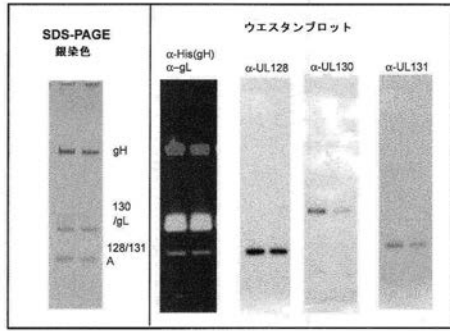


Figure 8

【 図 9 】

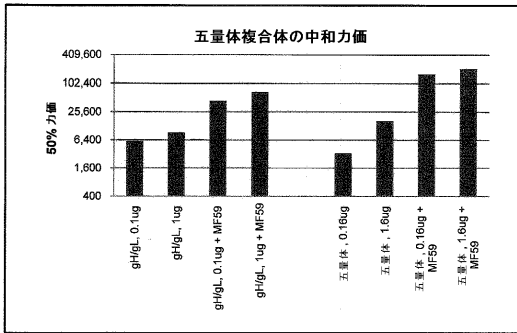


Figure 9

【 図 1 2 】

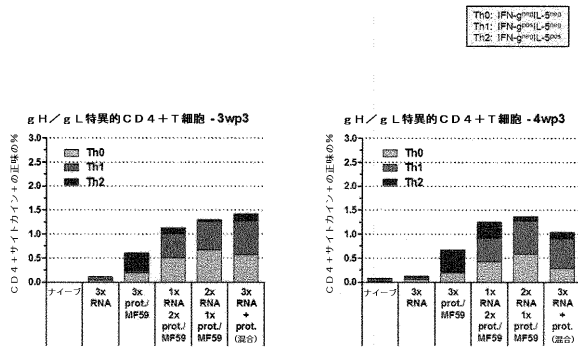


Figure 12

【 図 1 3 】

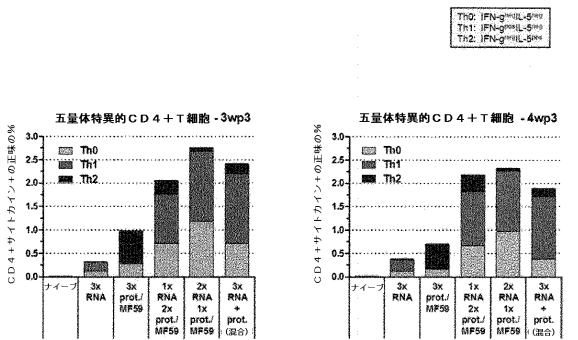


Figure 13

【 図 1 0 】

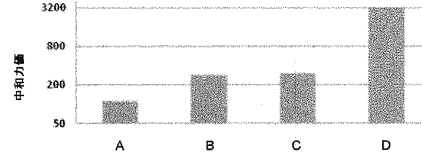


Figure 10

【 図 1 1 】

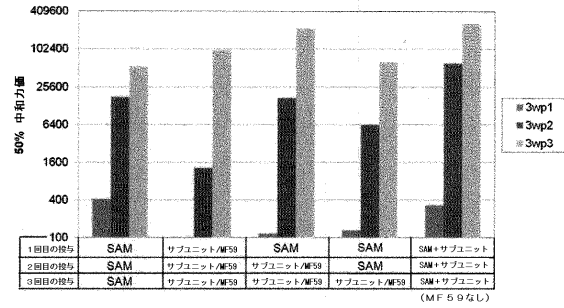


Figure 11

【 図 1 4 】

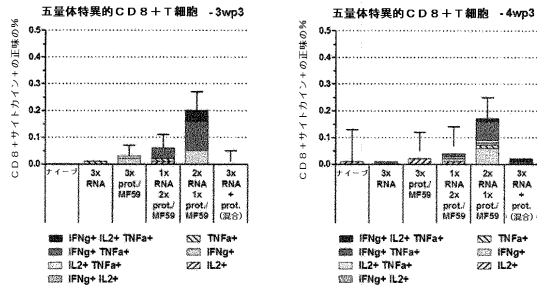


Figure 14

【 図 1 5 】

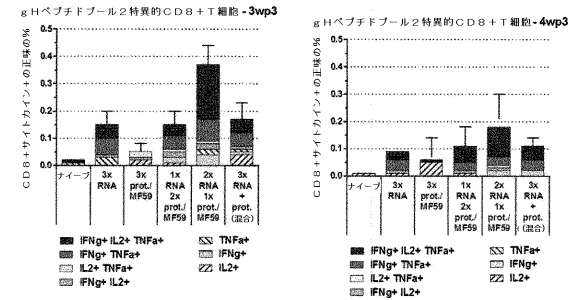


Figure 15

【配列表】

2017192400000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/22 (2006.01)			A 6 1 P	31/22		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)			A 6 1 K	48/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)			A 6 1 P	43/00	1 2 1	

(72)発明者 インシア ウェン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , マサチューセッツ アベニ
 ュー 3 5 0 , ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス , インコーポレ
 イテッド 気付

Fターム(参考) 4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA87X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
 4C084 AA13 MA02 NA14 ZB331 ZB332 ZC751 ZC752
 4C085 AA03 BA78 DD62 EE03
 4H045 AA11 BA10 CA01 DA86 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】

2017192400000001.pdf