

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6652497号
(P6652497)

(45) 発行日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年1月27日(2020.1.27)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 35/763	(2015.01)
A 6 1 K 39/245	(2006.01)
A 6 1 P 31/22	(2006.01)
A 6 1 P 37/04	(2006.01)
A 6 1 P 17/02	(2006.01)
A 6 1 K	35/763
A 6 1 K	39/245
A 6 1 P	31/22
A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	17/02

請求項の数 10 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-555659 (P2016-555659)
(86) (22) 出願日	平成27年3月2日(2015.3.2)
(65) 公表番号	特表2017-510262 (P2017-510262A)
(43) 公表日	平成29年4月13日(2017.4.13)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/018272
(87) 國際公開番号	W02015/134368
(87) 國際公開日	平成27年9月11日(2015.9.11)
審査請求日	平成30年3月1日(2018.3.1)
(31) 優先権主張番号	62/080,663
(32) 優先日	平成26年11月17日(2014.11.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/946,965
(32) 優先日	平成26年3月3日(2014.3.3)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	515314797 アルバート アインシュタイン カレッジ オブ メディシン アメリカ合衆国 10461 ニューヨーク、ブロンクス、モリス パーク アベニュー 1300
(74) 代理人	100110423 弁理士 曽我 道治
(74) 代理人	100111648 弁理士 梶並 順
(74) 代理人	100122437 弁理士 大宅 一宏
(74) 代理人	100161115 弁理士 飯野 智史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え単純ヘルペスウィルス2 (HSV-2) ワクチンベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) U s 6 遺伝子が欠失し、かつ、脂質二重層上に単純ヘルペスウィルス-1 (HSV-1) 糖タンパク質Dである表面糖タンパク質を含む組換えHSV-2、又はそのビリオンを含む、対象においてHSV-2 感染若しくはHSV-1 感染を処置する、または対象においてHSV-2 もしくはHSV-1 感染によって引き起こされる疾患を処置するためのワクチン又は医薬組成物。

【請求項2】

前記組換えHSV-2 がその脂質二重層上に非HSV-2 ウィルス表面糖タンパク質をさらに含む、請求項1に記載のワクチン又は医薬組成物。

10

【請求項3】

前記組換えHSV-2 が、その脂質二重層上に細菌又は寄生体の表面糖タンパク質をさらに含み、前記寄生体は、哺乳類の寄生体である、請求項1に記載のワクチン又は医薬組成物。

【請求項4】

前記表面糖タンパク質は、前記組換えHSV-2 の前記ゲノム中に挿入されたトランスジーンによってコードされる、請求項1~3のいずれか一項に記載のワクチン又は医薬組成物。

【請求項5】

前記表面糖タンパク質は、脂質二重層上に存在するが、これは、細胞を、HSV-2 糖

20

タンパク質D - コード遺伝子が欠失した組換えHSV - 2で感染させて、前記細胞がトランسفェクトされて、その細胞膜上に前記表面糖タンパク質を発現し、脂質二重層上に存在する前記表面糖タンパク質を含む前記組換えHSV - 2が、前記細胞から產生されるこ¹⁰とによるものである、請求項1～4のいずれか一項に記載のワクチン又は医薬組成物。

【請求項6】

前記組換え単純ヘルペスウィルス - 2 (HSV - 2) が、対象において免疫応答を誘発する、請求項1～5のいずれか一項に記載のワクチン又は医薬組成物。

【請求項7】

対象においてHSV - 2感染を処置する、または対象においてHSV - 2感染によって引き起こされる疾患を処置するための、請求項1～6のいずれか一項に記載のワクチン又は医薬組成物。

10

【請求項8】

HSV - 2感染によって引き起こされる前記疾患は、性器潰瘍を含む、請求項7に記載の、ワクチン又は医薬組成物。

【請求項9】

対象にHSV - 2のワクチン接種をするための、請求項1～8のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項10】

ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (HSV - 2) Us 6 遺伝子が欠失し、かつ、脂質二重層上に単純ヘルペスウィルス - 1 (HSV - 1) 糖タンパク質Dである表面糖タンパク質を含む組換え単純ヘルペスウィルス - 2 (HSV - 2) 又はそのビリオンを含む、対象において抗原性標的に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を誘導するための、ワクチン又は医薬組成物であって、前記単純ヘルペスウィルス - 2 (HSV - 2) が、脂質二重層上に異質抗原を含む、ワクチン又は医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年3月3日出願の米国仮特許出願第61/946965号明細書、および2014年11月17日出願の米国仮特許出願第62/080663号明細書の利益を主張する。各出願の内容は、引用を以て本明細書中に組み込まれる。

30

【0002】

連邦政府による資金提供の記載

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) によって授与された認可番号AI - 061679およびAI - 51519の下に、政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において、一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

本出願の全体を通して、種々の刊行物が引用され、角括弧内に番号によって挙げられる。これらの引用文献の完全な引用を、本明細書の最後に見出すことができる。これらの刊行物、ならびに本明細書中に引用される全ての特許、特許出願公開、および書籍の開示は、それらの全体が、本発明が属する技術をより完全に記載するために、引用を以て本出願中に組み込まれる。

40

【0004】

単純ヘルペスウィルス1型および2型 (HSV - 1 およびHSV - 2) は、世界的に重大な健康問題として残存しており、世界中の発展途上国および貧困コミュニティに不均衡に影響を与え、かつHIVエピデミックをあおっている。現在、HSV - 1、HSV - 2、またはHIVの有効なワクチンがないので、これらの感染用のワクチンが緊急に必要とされている。HSV - 1は感染性失明の主な原因である一方、HSV - 2は世界的に、性器潰瘍の主な原因であるが、HSV - 1は目下、先進諸国において、性器疾患と関連して

50

より一般的に同定されている。性器ヘルペスは、感染した人々に汚名をさせ、かつ心理的に衝撃を与えるおそれがある、再発性の、生涯にわたる疾患である。H S V - 2 による感染は、H I V に感染して伝染させる可能性を著しく増大させる一方、いずれかの血清型の垂直伝染は多くの場合、重度の乳児罹患または乳児死亡の原因となる。ウィルス糖タンパク質 D を単独で、または糖タンパク質 B と組み合わせて (g D および g B) 用いるサブユニット製剤に基づく H S V - 2 ワクチンの最近の臨床試験は、全身の中和抗体を誘導するにもかかわらず、失敗した。驚くべきことに、H S V - 2 g D サブユニット (g D - 2) ワクチンが、H S V - 1 に対する部分的な防御を提供したが、H S V - 2 からの防御を実現しなかった。いくつかの弱毒化ウィルスがプレ臨床的に評価されてきたが、臨床研究は現在まで、治療薬用途（再発の頻度の引下げ）に限定されてきた。そしてまた、有効性を示すこともなかった。ゆえに、新規のワクチン戦略が開発され、かつ評価されなければならない。10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明はこの、新しく、かつ向上した H S V - 1 ワクチンおよび H S V - 2 ワクチンの必要性を扱う。

【課題を解決するための手段】

【0006】

ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) 糖タンパク質 D - コード遺伝子 (U_{s6}) が欠失した単離組換え H S V - 2 が提供される。20

【0007】

また、ゲノム中の H S V - 2 糖タンパク質 D - コード遺伝子 (U_{s6}) が欠失した単離組換え H S V - 2 のビリオンが提供される。

【0008】

本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ゲノムまたは本明細書中に記載される組換え H S V - 1 遺伝子を内部に含む単離細胞であって、ヒト中に存在しない細胞が提供される。

【0009】

また、本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含むワクチン組成物が提供される。30

【0010】

また、本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含む組成物であって、ウィルスまたはビリオンのゲノムは、少なくとも第 2 の遺伝子の欠失を含み、第 2 の遺伝子は、H S V - 2 ウィルスの複製または病原性に必須である、組成物が提供される。

【0011】

本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビリオン、および医薬的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物。

【0012】

また、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ウィルス；(i i) その、本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において免疫応答を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。40

【0013】

また、対象において H S V - 1 、 H S V - 2 、もしくは H S V - 1 および H S V - 2 の重感染を処置する、または対象において H S V - 1 、 H S V - 2 、もしくは重感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換え H S V - 2 ウィルス；(i i) その、本明細書中に記載されるビリオン；(i i i)

10

30

40

50

) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において、HSV-1、HSV-2もしくは重感染を処置する、またはHSV-1、HSV-2もしくは重感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0014】

また、対象にHSV-1、HSV-2または重感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(i i) その、本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象にHSV-1、HSV-2または重感染のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。10

【0015】

また、HSV-1、HSV-2または重感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(i i) その、本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、HSV-1、HSV-2または重感染に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0016】

ワクチン、組成物および医薬組成物の、そしてこれらの使用の方法の実施形態において、組換えHSV-2の量は、明示された目的を達成するのに有効な組換えHSV-2のpfuの量である。20

【0017】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウイルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上にHSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dを含む組換えHSV-2のビリオンを生産する方法であって、HSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dをコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウイルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2で、組換え単純ヘルペスウイルス-2(HSV-2)の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生されたHSV-2ビリオンを回収することを含む方法が提供される。30

【0018】

また、組換え核酸がHSV-2糖タンパク質Dをコードする配列を含まないこと以外、野生型HSV-2のゲノムと同じ配列を有する組換え核酸が提供される。

【0019】

また、対象においてHSV-1、HSV-2または重感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウイルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2が提供される。

【0020】

また、対象においてHSV-1、HSV-2または重感染を処置または予防するための、ゲノム中のHSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2のビリオンが提供される。40

【0021】

ゲノム中の単純ヘルペスウイルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2が提供される。

【0022】

また、ゲノム中のHSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2のビリオンが提供される。

【0023】

また、本明細書中に記載されるウィルスまたは本明細書中に記載されるビリオンを内部

50

に含む単離細胞であって、ヒト中に存在しない細胞が提供される。

【0024】

本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含むワクチン組成物。

【0025】

また、提供されるのは、本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含む組成物であり、当該ウィルスまたは当該ビリオンのゲノムは、少なくとも第2の遺伝子の欠失を含み、第2の遺伝子は、HSV-2ウィルスの複製に必須である。

【0026】

また、本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオン、および医薬的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物が提供される。

【0027】

また、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、(i)本明細書中に記載されるウィルス；(ii)本明細書中に記載されるビリオン；(iii)本明細書中に記載されるワクチン；(iv)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において免疫応答を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0028】

また、対象においてHSV-2感染を処置する、または対象においてHSV-2感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i)本明細書中に記載されるウィルス；(ii)本明細書中に記載されるビリオン；(iii)本明細書中に記載されるワクチン；(iv)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において、HSV-2感染を処置する、またはHSV-2感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0029】

また、対象にHSV-2感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i)本明細書中に記載されるウィルス；(ii)本明細書中に記載されるビリオン；(iii)本明細書中に記載されるワクチン；(iv)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象にHSV-2のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0030】

また、HSV-2感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i)本明細書中に記載されるウィルス；(ii)本明細書中に記載されるビリオン；(iii)本明細書中に記載されるワクチン；(iv)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、HSV-2に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0031】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上にHSV-1糖タンパク質Dを含む、組換えHSV-2のビリオンを生産する方法であって、HSV-1糖タンパク質Dをコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2で、組換え単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生された、脂質二重層上にHSV-1糖タンパク質Dを含む組換えHSV-2ビリオンを回収することとを含む方法が提供される。

【0032】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上に非HSV-2表面糖タンパク質を含む組換えH

10

20

30

40

50

S V - 2 のビリオンを生産する方法であって、非 H S V - 2 表面糖タンパク質をコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) 糖タンパク質 D - コード遺伝子が欠失した組換え H S V - 2 で、組換え単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生された、脂質二重層上に非 H S V - 2 表面糖タンパク質を含む組換え H S V - 2 ビリオンを回収することとを含む方法が提供される。

【 0 0 3 3 】

また、配列が H S V - 2 糖タンパク質 D をコードする配列を含まないこと以外、 H S V - 2 のゲノムと同じ配列を有する組換え核酸が提供される。

【 0 0 3 4 】

また、対象において H S V - 2 感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) 糖タンパク質 D - コード遺伝子が欠失した単離組換え H S V - 2 が提供される。

【 0 0 3 5 】

また、対象において H S V - 1 感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) 糖タンパク質 D - コード遺伝子が欠失した単離組換え H S V - 2 が提供される。

【 0 0 3 6 】

また、対象において H S V - 2 感染を処置または予防するための、ゲノム中の H S V - 2 糖タンパク質 D - コード遺伝子が欠失した単離組換え H S V - 2 のビリオンが提供される。

【 0 0 3 7 】

また、対象において H S V - 1 感染もしくは H S V - 1 および H S V - 2 の重感染を処置する、または対象において H S V - 2 感染もしくは H S V - 1 および H S V - 2 の重感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において H S V - 2 感染を処置する、もしくは H S V - 2 感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量、または対象において H S V - 1 および H S V - 2 の重感染を処置する、もしくは H S V - 1 および H S V - 2 の重感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 3 8 】

また、対象に H S V - 1 感染、または H S V - 1 および H S V - 2 の重感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象に H S V - 1 感染、または H S V - 1 および H S V - 2 の重感染のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 3 9 】

また、 H S V - 1 感染、または H S V - 1 および H S V - 2 の重感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、 H S V - 1 感染、または H S V - 1 および H S V - 2 の重感染に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 4 0 】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス - 2 (H S V - 2) 糖タンパク質 D - コード遺伝子が欠失しており、さらに病原体の異質抗原を含む単離組換え H S V - 2 が提供される。

10

20

30

40

50

【0041】

また、対象において抗原性標的に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）を誘導する方法であって、対象に、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2（H S V - 2）糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失しており、さらに脂質二重層上に異質抗原を含む単離組換えH S V - 2を、抗原性標的に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】H S V - 2 g D が、不稔感染を誘導する：H S V - 2 g D - / + が、g Dをトランスで提供する細胞（例えばV D 6 0 [4 0 、 4 1] ）においてのみ首尾よく複製するが、U s 6 をコードしないV e r o 細胞（A T C C C C L - 8 1 、ミドリザルの腎臓）またはC a S k i (A T C C C R L - 1 5 5 0 、ヒト、頸部）等の細胞において複製しない。非補完H S V - 2 g D (V e r o 細胞から得られた g D - / -) は、U s 6 をコードしない、V e r o およびC a S k i 等の細胞に感染することができない。

【図2】A . 最大 1 0 ⁷ ブラーケ形成単位 (p f u) のH S V - 2 g D - / + ウィルスを接種した重症複合型免疫不全（S C I D ）マウスは、高い用量の腔内接種または皮下接種後に、疾患の徵候を呈しない。対照的に、1 , 0 0 0 倍低いウィルス用量 (1 0 ⁴ p f u) にて野生型ウィルスを接種したS C I D マウスは、疾患に屈する。Aにおいて生存曲線が、Bにおいて紅斑、浮腫、または性器潰瘍の証拠に関する上皮スコア（0から5のスケール）が、そしてCにおいてニューロン感染の証拠に関する神経学的スコア（0から5のスケール）が示される。

【図3】H S V - 2 g D - / + ウィルスによる免疫処置が、抗H S V - 2 抗体を誘発する。s c . - s c . 免疫処置が、かなりのレベルの全身性抗H S V - 2 抗体および粘膜（腔洗浄液）抗H S V - 2 抗体を誘発する一方、H S V - 2 g D - / + によるs c . - i . v a g . 免疫化が、全身性抗H S V - 2 抗体をより低いレベルで誘発し、腔洗浄液中の抗体レベルの増大を誘発しなかった。Aにおいて血清中の抗H S V - 2 抗体レベルが示され、Bにおいて腔洗浄液中の抗H S V - 2 抗体レベルが示される。g D - / + で免疫化したマウスは、病原性H S V - 2 によるチャレンジ後、血清中に中和抗H S V - 2 抗体を示す。g D - / + 免疫化によって誘発される抗体の中和能力は、Cにおいて示される（* p < 0 . 0 5 ; ** p < 0 . 0 1 ; *** p < 0 . 0 0 1 ）。

【図4】A : T g T 細胞が伝達されてから、H S V - 2 g D - / + またはV D 6 0 溶解物（コントロール）でプライムブーストされたC 5 7 B 1 / 6 マウスの脾臓におけるC D 8 + g B T - I T 細胞カウント。B : ワクチン接種マウスまたはコントロールマウスの脾臓におけるg B T - I 記憶T 細胞のパーセンテージ。C : ブースト後1 4 日目に、脾細胞が単離されて、g B 4 9 8 - 5 0 5 ペプチドによりi n v i t r o で再刺激されて、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリによって、サイトカイン産生について6 時間後に分析された（* p < 0 . 0 5 ; ** p < 0 . 0 1 ; *** p < 0 . 0 0 1 ）。

【図5】H S V - 2 g D - / + (1 0 ⁶ p f u / マウス) による免疫化が、マウスを致死H S V - 2 チャレンジから防御する。マウスは皮下でプライムされ、かつ3週間の間隔をあけてs c . またはi . v a g . でブーストされてから、ブーストの3週後、L D ₉ ₀ の病原性野生型H S V - 2 (4 6 7 4) により腔内でチャレンジされた。コントロール（V D 6 0 細胞溶解物で免疫化された）マウスが、かなりの体重損失（A）および死亡（B）によって呈されるように、疾患に屈したが、g D - / + 免疫化マウスが、有意に少ない病状しか示さなかった。さらに、g D - / + 免疫化マウスは、致死チャレンジ後、より少ない上皮疾患（C）および神経学的病状（D）しか示さなかった。加えて、g D - / + ワクチン接種マウスが、病原性H S V - 2 の致死用量による腔内チャレンジ後、腔洗浄液（E）、腔組織および後根神経節（D R G ）（F）において、コントロールとしての、V D 6 0 細胞溶解物により免疫化したマウスと比較して、有意に少ないウィルス負荷しか示さなかった。感染性ウィルスは、g D - / + 免疫化マウスから、4日目の腔洗浄

10

20

30

40

50

液または5日目の膿組織およびD R G中に回収され得なかつた(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)。

【図6】HSV-2 gD-/-により免疫化したマウスが、病原性HSV-2によるチャレンジ後、膿洗浄液においてより少ない炎症サイトカインしか分泌しない。HSV-2 gD-/-により免疫化したマウスの膿洗浄液中に分泌したTNF-、IL-6およびIL-1は、VD60溶解物により免疫化され、かつ病原性HSV-2によりチャレンジされたマウスよりも少ない。炎症サイトカイン発現の差異が、チャレンジ後の様々な時点にて観察される(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)。

【図7】HSV-2 gD-/-による免疫化が、感染部位、および関連するLNにT細胞をリクルートする。gD-/-によりsc.-sc.で免疫化したマウスが、病原性HSV-2によるチャレンジ後、仙骨リンパ節(LN)中の活性化抗HSV-2 gB T-I CD8+T細胞(A)およびCD4+T細胞(B)のパーセンテージの増大を示した。フローサイトメトリ分析のために、LNが抽出されて、UV不活化gD-/-と6時間インキュベートされてから抗体で染色された。gD-/-によりsc.-i.v. ag.で免疫化したマウスが、病原性HSV-2によるチャレンジ後、膿中の抗HSV-2 gB T-I CD8+T細胞(C)およびCD4+T細胞(D)の数の増大を示した。フローサイトメトリ分析のために、T細胞を抽出し、かつ抗体で染色するように、膿の組織がプロセシングされた。細胞カウンティングが、Count Bright(商標)(Lifetecnologies)によりなされた(* p < 0.05; ** p < 0.01)。

【発明を実施するための形態】

【0043】

ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2が提供される。

【0044】

ある実施形態において、HSV-2糖タンパク質Dは、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を含む：

M G R L T S G V G T A A L L V V A V G L R V V C A K Y A L A D P S L K M A D P N
R F R G K N L P V L D Q L T D P P G V K R V Y H I Q P S L E D P F Q P P S I P I
T V Y Y A V L E R A C R S V L L H A P S E A P Q I V R G A S D E A R K H T Y N L
T I A W Y R M G D N C A I P I T V M E Y T E C P Y N K S L G V C P I R T Q P R W
S Y Y D S F S A V S E D N L G F L M H A P A F E T A G T Y L R L V K I N D W T E
I T Q F I L E H R A R A S C K Y A L P L R I P P A A C L T S K A Y Q Q G V T V D
S I G M L P R F I P E N Q R T V A L Y S L K I A G W H G P K P P Y T S T L L P P
E L S D T T N A T Q P E L V P E D P E D S A L L E D P A G T V S S Q I P P N W H
I P S I Q D V A P H H A P A A P S N P G L I I G A L A G S T L A V L V I G G I A
F W V R R R A Q M A P K R L R L P H I R D D D A P P S H Q P L F Y (HSV-2参考株HG52)。

【0045】

ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に、単純ヘルペスウィルス-1(HSV-1)糖タンパク質Dを含む。

【0046】

ある実施形態において、HSV-1糖タンパク質Dは、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を含む：

M G G A A A R L G A V I L F V V I V G L H G V R G K Y A L A D A S L K M A D P N
R F R G K D L P V L D Q L T D P P G V R R V Y H I Q A G L P D P F Q P P S L P I
T V Y Y A V L E R A C R S V L L N A P S E A P Q I V R G A S E D V R K Q P Y N L
T I A W F R M G G N C A I P I T V M E Y T E C S Y N K S L G A C P I R T Q P R W
N Y Y D S F S A V S E D N L G F L M H A P A F E T A G T Y L R L V K I N D W T E

ITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAAGWHGPKAPYTSPLLPP
ELSETPNATQPELAPEPEDPESALLEDPVGTVAPQIIPPNWH
IPSIQDAATPYHPPATPNNMGLIAGAVGGSLLAALVICGI
VYWMRRRTQKAPKRIRLPHIREDDQPSHQLFY (HSV-1
参照株F)。

【0047】

ある実施形態において、HSV-2 糖タンパク質D - コード遺伝子は、HSV-2 U_s₆ 遺伝子である。(例えば、HSV-2 ゲノムおよびU_s₆ 遺伝子について、Dolan et al. J Virol. 1998 March; 72 (3): 2010-2010. (PMCID: PMC109494) "The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2" 参照(その全体が引用を以て本明細書中に組み込まれる)。)

【0048】

また、ゲノム中のHSV-2 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2 のビリオンが提供される。

【0049】

ある実施形態において、ビリオンはさらに、その脂質二重層上にHSV-1 糖タンパク質D またはHSV-2 糖タンパク質D を含む。実施形態において、HSV-2 糖タンパク質D - コード遺伝子は、HSV-2 U_s₆ 遺伝子である。

【0050】

ある実施形態において、ウィルスはさらに、その脂質二重層上にHSV-1 糖タンパク質D またはHSV-2 糖タンパク質D を含む。実施形態において、HSV-2 糖タンパク質D - コード遺伝子は、HSV-2 U_s₆ 遺伝子である。

【0051】

HSV-2 U_s₆ 遺伝子を含まない組換えHSV-2 ゲノムを内部に含む単離細胞が提供される。

【0052】

ある実施形態において、細胞は、組換えHSV-2 ゲノムによってコードされない発現HSV-1 糖タンパク質または発現HSV-2 糖タンパク質を提供する補完細胞(complementing cell)である。ある実施形態において、補完細胞は、HSV-1 糖タンパク質D またはHSV-2 糖タンパク質D をコードする異種核酸を含む。ある実施形態において、該細胞は、その膜上にHSV-1 糖タンパク質D を発現する。該細胞のある実施形態において、HSV-1 糖タンパク質D は、異種核酸によってコードされ、当該異種核酸は、HSV-1 糖タンパク質D 遺伝子もしくはHSV-2 糖タンパク質D 遺伝子である、またはHSV-1 糖タンパク質D 遺伝子もしくはHSV-2 糖タンパク質D 遺伝子と同一の配列を有する核酸である。

【0053】

また、本明細書中に記載される組換えHSV-2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含むワクチン組成物が提供される。ある実施形態において、該ワクチンは免疫アジュバントを含む。ある実施形態において、該ワクチンは免疫アジュバントを含まない。組換えHSV-2 を含む、本明細書中に記載されるワクチン、組成物、または医薬組成物の実施形態において、HSV-2 は生きている。

【0054】

また、本明細書中に記載される組換えHSV-2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含む組成物であって、ウィルスまたはビリオンのゲノムは、少なくとも第2の遺伝子の欠失を含み、第2の遺伝子は、HSV-2 ウィルスの複製または病原性に必須である、組成物が提供される。

【0055】

本明細書中に記載される組換えHSV-2 ウィルス、または本明細書中に記載されるビ

リオン、および医薬的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物。

【0056】

ある実施形態において、組成物、医薬組成物、またはワクチンは、ヒト対象への皮下投与に適切であるように製剤化される。ある実施形態において、組成物、医薬組成物、またはワクチンは、ヒト対象への腔内投与に適切であるように製剤化される。ある実施形態において、組成物、医薬組成物、またはワクチンは、ヒト対象への筋肉内投与、鼻腔内投与、または粘膜投与に適切であるように製剤化される。

【0057】

また、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(ii) その、本明細書中に記載されるビリオン；(iii) 本明細書中に記載されるワクチン；(iv) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において免疫応答を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0058】

また、対象においてHSV-2感染を処置する、または対象においてHSV-1、HSV-2もしくは重感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(ii) その、本明細書中に記載されるビリオン；(iii) 本明細書中に記載されるワクチン；(iv) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において、HSV-1、HSV-2もしくは重感染を処置する、またはHSV-1、HSV-2もしくは重感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。ある実施形態において、本方法は、HSV-1、HSV-2または重感染によって引き起こされるHSV-1またはHSV-2の病状を処置することを含む。本方法の実施形態において、HSV-1、HSV-2または重感染によって引き起こされる疾患は、性器潰瘍である。本方法の実施形態において、HSV-1、HSV-2または重感染によって引き起こされる疾患は、ヘルペス、口腔ヘルペス、ヘルペスひょうそ、性器ヘルペス、ヘルペス性湿疹、闘技ヘルペス(*herpes gladiatorum*)、HSV角膜炎、HSV網膜炎、HSV脳炎、またはHSV髄膜炎である。

【0059】

HSV-1、HSV-2または重感染(すなわち、HSV-1およびHSV-2の双方による感染)のための処置またはワクチン接種に関する本明細書中の方法の実施形態において、HSV-1感染を処置する、HSV-2感染を処置する、重感染を処置する、HSV-1感染に対してワクチン接種する、HSV-2感染に対してワクチン接種する、そして重感染に対してワクチン接種する、別個の、個々の実施形態がそれぞれ提供される。

【0060】

また、対象にHSV-1、HSV-2または重感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(ii) その、本明細書中に記載されるビリオン；(iii) 本明細書中に記載されるワクチン；(iv) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象にHSV-1、HSV-2または重感染のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0061】

また、HSV-1、HSV-2または重感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載される組換えHSV-2ウイルス；(ii) その、本明細書中に記載されるビリオン；(iii) 本明細書中に記載されるワクチン；(iv) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、HSV-1、HSV-2または重感染に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0062】

本方法のある実施形態において、対象は、皮下または腔内にプライミング用量が投与さ

10

20

30

40

50

れ、そして第2の用量が、皮下または腔内に投与される。本方法のある実施形態において、該対象は、抗HSV抗体およびT細胞を誘発するために、皮下または腔内のプライミング用量と同じくらい多く投与される。

【0063】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上にHSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dを含む組換えHSV-2のビリオンを生産する方法であって、HSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dをコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2で、組換え単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生されたHSV-2ビリオンを回収することを含む方法が提供される。

10

【0064】

ある実施形態において、細胞は、その膜上にHSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dを発現する。

【0065】

また、組換え核酸がHSV-2糖タンパク質Dをコードする配列を含まないこと以外、野生型HSV-2のゲノムと同じ配列を有する組換え核酸が提供される。ある実施形態において、組換え核酸はDNAである。ある実施形態において、組換え核酸はRNAである。

20

【0066】

また、対象においてHSV-1、HSV-2または重感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2が提供される。ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に単純ヘルペスウィルス-1(HSV-1)糖タンパク質Dまたは単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)糖タンパク質Dを含む。単離組換えHSV-2のある実施形態において、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子は、HSV-2_U_S₆遺伝子である。

【0067】

また、対象においてHSV-1、HSV-2または重感染を処置または予防するための、ゲノム中のHSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2のビリオンが提供される。ある実施形態において、ビリオンはさらに、その脂質二重層上にHSV-1糖タンパク質DまたはHSV-2糖タンパク質Dを含む。ある実施形態において、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子は、HSV-2_U_S₆遺伝子である。

30

【0068】

記載されるウィルスまたはビリオンのある実施形態において、HSV-1、HSV-2または重感染は、性器潰瘍を引き起こす。

【0069】

ゲノム中のHSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換え単純ヘルペスウィルス-2(HSV-2)が提供される。

40

【0070】

ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に表面糖タンパク質を含み、これは、単純ヘルペスウィルス-1(HSV-1)糖タンパク質Dである。ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に非HSV-2ウィルス表面糖タンパク質を含む。ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に細菌表面糖タンパク質を含む。ある実施形態において、単離組換えHSV-2はさらに、その脂質二重層上に寄生体の表面糖タンパク質を含み、寄生体は、哺乳類の寄生体である。

【0071】

ある実施形態において、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子は、HSV-2_U

50

S 6 遺伝子である。ある実施形態において、表面糖タンパク質は、組換えHSV-2のゲノム中に挿入されたトランスジーンによってコードされる。ある実施形態において、表面糖タンパク質は、脂質二重層上に存在するが、これは、細胞を、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2で感染させて、当該細胞がトランスフェクトされて、その細胞膜上に表面糖タンパク質を発現し、脂質二重層上に存在する表面糖タンパク質を含む組換えHSV-2が、細胞から產生されることによるものである。ある実施形態において、ウィルス糖タンパク質は、HIV、エンテロウィルス、RSV、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、ブタコロナ呼吸器ウィルス、狂犬病ウィルス、ラッサ熱ウィルス、ブニアウィルス、CMV、またはフィロウィルス由来である。ある実施形態において、糖タンパク質はHIV gp 120である。ある実施形態において、フィロウィルスはエボラウィルスである。ある実施形態において、ウィルスは、HIV、結核菌(*M. tuberculosis*)、クラミジア(*chlamydia*)、マイコバクテリウム・ウルセランス(*Mycobacterium ulcerans*)、*M. marinum*、らい菌(*M. leprae*)、*M. abscessens*、淋菌(*Neisseria gonorrhoea*)、またはトレポネーマ属(*Treponeme*)である。ある実施形態において、トレポネーマ属(*Treponeme*)は梅毒トレポネーマ(*Treponeme pallidum*)である。
10

【0072】

また、ゲノム中のHSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2のビリオンが提供される。
20

【0073】

ある実施形態において、単離組換えHSV-2のビリオンはさらに、その脂質二重層上に表面糖タンパク質を含み、これは、単純ヘルペスウィルス-1(HSV-1)糖タンパク質Dである。ある実施形態において、単離組換えHSV-2のビリオンはさらに、その脂質二重層上に非HSV-2ウィルス表面糖タンパク質を含む。ある実施形態において、単離組換えHSV-2のビリオンはさらに、その脂質二重層上に細菌表面糖タンパク質を含む。ある実施形態において、単離組換えHSV-2のビリオンはさらに、その脂質二重層上に寄生体表面糖タンパク質を含み、寄生体は、哺乳類の寄生体である。ある実施形態において、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子は、HSV-2 U_{S6}遺伝子である。ある実施形態において、表面糖タンパク質は、ビリオンの組換えHSV-2のゲノム中に挿入されたトランスジーンによってコードされる。ある実施形態において、表面糖タンパク質は、脂質二重層上に存在するが、これは、細胞を、HSV-2糖タンパク質D-コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2で感染させて、当該細胞がトランスフェクトされて、その細胞膜上に表面糖タンパク質を発現し、脂質二重層上に存在する表面糖タンパク質を含む組換えHSV-2が、細胞から產生されることによるものである。ある実施形態において、ビリオンはそのようなものから回収された。ある実施形態において、ウィルス糖タンパク質は、HIV、エンテロウィルス、RSV、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、ブタコロナ呼吸器ウィルス、狂犬病ウィルス、ラッサ熱ウィルス、ブニアウィルス、CMV、またはフィロウィルス由来である。ある実施形態において、糖タンパク質はHIV gp 120である。ある実施形態において、フィロウィルスはエボラウィルスである。ある実施形態において、ウィルスは、HIV、結核菌(*M. tuberculosis*)、クラミジア(*chlamydia*)、マイコバクテリウム・ウルセランス(*Mycobacterium ulcerans*)、*M. marinum*、らい菌(*M. leprae*)、*M. abscessens*、淋菌(*Neisseria gonorrhoea*)、またはトレポネーマ属(*Treponeme*)である。ある実施形態において、トレポネーマ属(*Treponeme*)は梅毒トレポネーマ(*Treponeme pallidum*)である。
30
40

【0074】

また、本明細書中に記載されるウィルスまたは本明細書中に記載されるビリオンを内部
50

に含む単離細胞であって、ヒト中に存在しない細胞が提供される。該細胞のある実施形態において、細胞は、H S V - 1 糖タンパク質Dをコードする異種核酸を含む。該細胞のある実施形態において、細胞は、その膜上にH S V - 1 糖タンパク質Dを発現する。

【 0 0 7 5 】

前記細胞のある実施形態において、H S V - 1 糖タンパク質Dは、異種核酸によってコードされ、当該異種核酸は、H S V - 1 糖タンパク質D遺伝子である、またはH S V - 1 糖タンパク質D遺伝子と同一の配列を有する核酸である。

【 0 0 7 6 】

本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含むワクチン組成物。ワクチン組成物のある実施形態において、該ワクチン組成物は、免疫アジュバントを含む。

10

【 0 0 7 7 】

また、本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオンを含む組成物が提供され、当該ウィルスまたは当該ビリオンのゲノムは、少なくとも第2の遺伝子の欠失を含み、第2の遺伝子は、H S V - 2 ウィルスの複製に必須である。ある実施形態において、組成物は、免疫応答を誘発するためにウィルスまたはビリオンが予め導入されている哺乳類由来の血清を含む、または当該血清に由来する。

【 0 0 7 8 】

また、本明細書中に記載されるウィルス、または本明細書中に記載されるビリオン、および医薬的に許容可能なキャリアを含む医薬組成物が提供される。

20

【 0 0 7 9 】

また、対象において免疫応答を誘発する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において免疫応答を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 8 0 】

また、対象においてH S V - 2 感染を処置する、または対象においてH S V - 2 感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象において、H S V - 2 感染を処置する、またはH S V - 2 感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

30

【 0 0 8 1 】

また、対象にH S V - 2 感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象にH S V - 2 のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

40

【 0 0 8 2 】

また、H S V - 2 感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(i i) 本明細書中に記載されるビリオン；(i i i) 本明細書中に記載されるワクチン；(i v) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、H S V - 2 に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【 0 0 8 3 】

H S V - 2 疾患およびH S V - 1 疾患は、当該技術分野において知られており、そしてまた本明細書中に記載されている。H S V - 2 疾患およびH S V - 1 疾患の処置および予防が、それぞれ別個に包含される。H S V - 2 およびH S V - 1 の重感染の処置または予

50

防もまたカバーされる。予防は、未処置の対象と比較して、本明細書中に記載されるウィルス、ビリオン、ワクチンまたは組成物で処置された対象において、関連する疾患または感染の発症の程度の改善を意味すると理解される。

【0084】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上にHSV-1 糖タンパク質Dを含む、組換えHSV-2 のビリオンを生産する方法であって、HSV-1 糖タンパク質Dをコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2 で、組換え単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生された、脂質二重層上にHSV-1 糖タンパク質Dを含む組換えHSV-2 ビリオンを回収することとを含む方法が提供される。10

【0085】

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失しており、かつ脂質二重層上に非HSV-2 表面糖タンパク質を含む組換えHSV-2 のビリオンを生産する方法であって、非HSV-2 表面糖タンパク質をコードする異種核酸を含む細胞を、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した組換えHSV-2 で、組換え単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) の複製を可能にする条件下で感染させることと、細胞によって產生された、脂質二重層上に非HSV-2 表面糖タンパク質を含む組換えHSV-2 ビリオンを回収することとを含む方法が提供される。20

【0086】

また、配列がHSV-2 糖タンパク質Dをコードする配列を含まないこと以外、HSV-2 のゲノムと同じ配列を有する組換え核酸が提供される。

【0087】

また、対象においてHSV-2 感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2 が提供される。

【0088】

また、対象においてHSV-1 感染を処置または予防するための、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (HSV-2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2 が提供される。30

【0089】

また、対象においてHSV-2 感染を処置または予防するための、ゲノム中のHSV-2 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失した単離組換えHSV-2 のビリオンが提供される。

【0090】

また、対象においてHSV-1 感染もしくはHSV-1 およびHSV-2 の重感染を処置する、または対象においてHSV-2 感染もしくはHSV-1 およびHSV-2 の重感染によって引き起こされる疾患を処置する方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(ii) 本明細書中に記載されるビリオン；(iii) 本明細書中に記載されるワクチン；(iv) 本明細書中に記載される組成物；または(v) 本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象においてHSV-2 感染を処置する、もしくはHSV-2 感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量、または対象においてHSV-1 およびHSV-2 の重感染を処置する、もしくはHSV-1 およびHSV-2 の重感染によって引き起こされる疾患を処置するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。40

【0091】

また、対象にHSV-1 感染、またはHSV-1 およびHSV-2 の重感染のワクチン接種をする方法であって、対象に、(i) 本明細書中に記載されるウィルス；(ii) 本50

明細書中に記載されるビリオン；(i i i)本明細書中に記載されるワクチン；(i v)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、対象にH S V - 1 感染、またはH S V - 1 およびH S V - 2 の重感染のワクチン接種をするのに有効な量投与することを含む方法が提供される。

【0092】

また、H S V - 1 感染、またはH S V - 1 およびH S V - 2 の重感染に対して対象を免疫化する方法であって、対象に、(i)本明細書中に記載されるウィルス；(i i)本明細書中に記載されるビリオン；(i i i)本明細書中に記載されるワクチン；(i v)本明細書中に記載される組成物；または(v)本明細書中に記載される医薬組成物の量を、H S V - 1 感染、またはH S V - 1 およびH S V - 2 の重感染に対して対象を免疫化するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。10

【0093】

免疫化する、ワクチン接種をする、または免疫応答を誘発する、本明細書中の方法のある実施形態において、ビリオンもしくはウィルスの受動伝達、またはそれによって誘導される抗体もしくは免疫因子は、ある対象から別の対象にもたらされてよい。関連する産物は、一方の対象からの獲得後に、第2の対象への投与前に、処理されてよい。本明細書中に記載される本発明の好ましい実施形態において、対象は、哺乳類の対象である。ある実施形態において、哺乳類の対象は、ヒト対象である。

また、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (H S V - 2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失しており、さらに病原体の異質抗原を含む単離組換えH S V - 2 が提供される。ある実施形態において、異質抗原は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、または糖タンパク質である。ある実施形態において、異質抗原は、H S V - 2 に関する異質抗原であるが、関連する「病原体」に見られる抗原である。ウィルス病原体および細菌病原体が、本明細書中に記載される。ある実施形態において、病原体は、哺乳類の細菌病原体または哺乳類のウィルス病原体である。ある実施形態において、抗原、または病原体をコードするトランスジーンは、病原体から実際にとられることはない、または物理的に取り出されないが、それでもやはり、病原体抗原またはコードする核酸配列と同じ配列を有する。ある実施形態において、単離組換えH S V - 2 は、その脂質二重層上に病原体の異質抗原を含む。単離組換えH S V - 2 のある実施形態において、病原体は、細菌またはウィルスである。ある実施形態において、病原体は、哺乳類の寄生体である。ある実施形態において、H S V - 2 糖タンパク質D - コード遺伝子は、H S V - 2 U₅遺伝子である。単離組換えH S V - 2 のある実施形態において、異質抗原は、組換えH S V - 2 のゲノム中に挿入されたトランスジーンによってコードされる。20

【0094】

また、対象において抗原性標的に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) を誘導する方法であって、対象に、ゲノム中の単純ヘルペスウィルス-2 (H S V - 2) 糖タンパク質D - コード遺伝子が欠失しており、さらに脂質二重層上に異質抗原を含む単離組換えH S V - 2 を、抗原性標的に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) を誘発するのに有効な量投与することを含む方法が提供される。30

【0095】

適切なトランスジーンを発現する組換えH S V - 2 g D - / + g D - / + は、病原体による皮膚感染または粘膜感染から防御する抗体および細胞免疫応答を選択的に誘導するであろう。40

【0096】

ある実施形態において、異質抗原は、表面抗原である。

【0097】

ある実施形態において、トランスジーンは、H I V、結核菌 (M. tuberculosis)、クラミジア (chlamydia)、マイコバクテリウム・ウルセラヌス (Mycobacterium ulcerans)、M. マリヌム (M. marinum)、らい菌 (M. leprae)、M. アブセンシエンス (M. absenscens) 50

、淋菌 (*Neisseria gonorrhoea*)、またはトレポネーマ属 (*Treponeme*) 由来の抗原をコードする。ある実施形態において、トレポネーマ属 (*Treponeme*) は梅毒トレポネーマ (*Treponeme pallidum*) である。ある実施形態において、トランスジーンは、結核菌 (*M. tuberculosis*) バイオフィルム - コード遺伝子である。ある実施形態において、トランスジーンは、HIV gp 120 - コード遺伝子である。

【0098】

ある実施形態において、異質抗原は、抗原性標的の表面抗原である。実施形態において、異質抗原は、寄生体抗原である。ある実施形態において、異質抗原は、細菌抗原またはウィルス抗原である。

10

【0099】

ある実施形態において、抗原性標的はウィルスであり、ラッサ熱ウィルス、ヒト免疫不全ウィルス、RSV、エンテロウィルス、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、ブタコロナ呼吸器ウィルス、狂犬病ウィルス、ブニアウィルス、またはフィロウィルスである。

【0100】

ある実施形態において、抗原性標的は細菌であり、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、*M. ulcerans* (*M. ulcerans*)、*M. marinum* (*M. marinum*)、らい菌 (*M. leprae*)、*M. absenscens* (*M. absenscens*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoea*)、または梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*) である。

20

【0101】

ある実施形態において、単離組換えHSV-2トランスジーンは、結核菌 (*M. tuberculosis*) バイオフィルム - コード遺伝子であり、トランスジーンは、HIV gp 120 - コード遺伝子である。

【0102】

本明細書中に記載される方法の好ましい実施形態において、対象はヒトである。本明細書中に記載される方法の実施形態において、対象は、HSV-1にもHSV-2にもまだ感染していないし、重感染もしていない。本明細書中に記載される方法の実施形態において、対象は、HSV-1もしくはHSV-2に感染し、または重感染している。

30

【0103】

本明細書中に記載されるように、重感染は、HSV-1およびHSV-2による重感染を意味する。

【0104】

本明細書中に記載される種々の要素の全ての組合せは、本明細書中で特に明記しない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明の範囲内である。

【0105】

本発明は、以下の実験の詳細からよりよく理解されるであろう。しかしながら、当業者であれば、議論される具体的な方法および結果は単に、後に続く特許請求の範囲においてより完全に記載される本発明の例示であると容易に理解するであろう。

40

【0106】

実験の詳細

本明細書中で、遺伝子操作した、HSV-2のgD (*U_{S6}*) 遺伝子の欠失変異体を開示し、その安全性、免疫原性、およびワクチンの有効性を、マウス感染モデルにおける脛内HSV-2チャレンジに照らして評価した。gD 遺伝子を、緑色蛍光タンパク質 (*gfp*) をコードするDNAフラグメントと置き換えて、HSV-1 gDを発現するVero細胞 (*VD60*細胞) をこの構築体でトランスフェクトして、緑色プラークを形成する相同組換えウィルスに関してスクリーニングした。分子分析により、正確な組換えが操作されたことが明らかとなった。これは、補完 *VD60* 細胞において高い力価となるように

50

複製するが、非補完細胞で増殖した場合には非感染性である。野生型マウスまたはS C I Dマウスの、 10^7 p f u / マウスの補完g D - ヌルウイルス（本明細書中で、遺伝子型的にg Dが欠失しているが、V D 6 0 細胞上での増殖によって表現型的に補完されているウイルスについて、H S V - 2 g D - / +と表す）による腔内チャレンジは、病原性を明らかにしなかったが、 10^4 p f u / マウスほどに低い用量の親の野生型ウイルスでは、100%致死であった。さらに、H S V - 2 g D - / +によるマウスの免疫化は、H S V - 2 の臨床単離体による腔内チャレンジに対して完全な防御をもたらした。H S V - 2 g D - / +によって誘発したロバストな体液性免疫および細胞性免疫を測定して、g Dが、in vivo 増殖性感染に必要であること、そして必須の糖タンパク質において欠失した弱毒化株が、H S V - 2 に対して防御免疫を誘発することが結論される。ゆえに、H S V - 2 g D - / +は、性器ヘルペスの予防または処置に有望なワクチンである。

【0107】

H S V - 2 g D - / +によって誘発した防御の機構および関連。g D - 2 ヌルウイルスが生じ、これは、免疫正常マウスおよび免疫不全マウスの双方において非常に弱毒化され、そして、ワクチン候補として試験すると、H S V - 2 による腔内チャレンジに対する防御免疫応答を誘導することが実証された。H S V - 2 g D - / +による皮下免疫化は、H S V の双方の血清型（H S V - 2 およびH S V - 1）による腔内チャレンジに対する防御に必要とされる体液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘導するであろう。

【0108】

H S V - 2 g D - / +は、不穏感染を誘導する：U S 6 が欠失しているH S V - 2 株を、シグナリング事象の初めの、細胞感染中に起こる際の寄与を評価するために構築した[41]。このウイルスは、U S 6 をコードするg D補完細胞系統（例えば、g D - 1 をコードするV D 6 0 細胞[40、41]）上で、内在性プロモータ（例えば、ある実施形態において、g D - 1 プロモータ）の制御下で増殖しない限り、宿主細胞に感染することができない。実際に、非補完細胞から単離したH S V - 2 g D 粒子は、上皮細胞（図1）にもニューロン細胞（S K - N - S H、不図示）にも感染しない。しかしながら、V D 6 0 細胞中で増殖すれば、表現型的に補完されたウイルス（g D - / +）が得られ、これは、野生型H S V - 2 に共通の標的である細胞に完全に感染することができる。しかしながら、g D - / +による感染後、感染性の粒子もウイルスプラーカ（p f u）も、これらの細胞から産生されず、ウイルスは、感染細胞から非感染細胞に広がることができない。このことは、これらのプロセスにおけるg Dの必要条件を反映している；ゆえに、これは不穏感染である。

【0109】

H S V - 2 g D - / +は、マウス感染モデルにおいて安全である：野生型マウスおよび重症複合型免疫不全（S C I D）マウスにおいて、皮下に、または腔内に高用量接種することによって、g D - / +を安全性についてin vivo評価した。 10^7 p f uのg D - / +（補完細胞で力価測定(titered)した）を腔内接種したマウスは、実験全体を通して、ウイルス誘導病状の徴候を何ら呈しなかったが、1,000倍低い野生型ウイルス（ 10^4 p f u）を接種した動物は、H S V - 2 疾患に屈して、接種後8日目から死亡し始めた（図2A）。 10^7 p f uのg D - / +を腔内接種したマウスは、実験全体を通して、ウイルス誘導上皮疾患または神経疾患の徴候を何ら呈しなかった（図2Bおよび図2C）。感染性ウイルスは、プラーカアッセイまたはV e r o 細胞とのD R Gの共存培養によって判定して（不図示）、性器組織からもD R Gからも回収されなかった。

【0110】

H S V - 2 g D - / +は、H S V - 2 に対する全身性抗体および粘膜抗体を誘発する：マウスにg D - / +を接種して皮下でブーストして（s c . - s c .）、またはこの候補ワクチン株（ 10^6 p f u / マウス）を皮下接種して腔内でブーストして（s c . - i . v a g .）、血清および腔洗浄液の抗H S V - 2 抗体の増大によって明示されるよ

10

20

30

40

50

うに、HSV-2に対する体液性免疫応答を誘発した（図3Aおよび図3B）。コントロール動物を、非感染V D 6 0細胞溶解物で免疫化した（コントロールと呼ぶ）。抗体は、抗原として感染細胞溶解物を用いるELISAによって測定した（非感染細胞溶解物に対する反応は、バックグラウンドとして差し引いた）。注目すべきは、抗体反応の大きさは、免疫化の経路に応じて異なることである。実際に、s . c . - s . c .免疫処置は、s . c . - i . v a g .免疫化よりも有意に多くの、HSV-2に対する血清および膣洗浄液の抗体を誘発した。この発見は、膣洗浄液抗体がおそらく、血液由来のIgGの漏出液を表すことを示唆し、そしてs c . - s c .が、HSV-2に対する高いレベルの全身性IgG抗体および局所IgG抗体を誘発するのにより適切な経路であることを示唆している。加えて、g D - / + (10⁶ p f u /マウス)を接種して皮下でブーストした(s c . - s c .)マウスは、ウィルスおよびこれらのマウス由来の血清によるVero細胞単層のin vitro中和によって明示されるように、中和抗HSV-2を誘発した（図3C）。

【0111】

HSV-2 g D - / +は、HSV-2特異的T細胞活性化を誘発する：g B 4 9 8 - 5 0 5 - 特異的トランスジェニックCD8+T細胞(g B T - I)を、ワクチン接種前にC 5 7 B L / 6マウス中に伝達した。ワクチン接種済みマウスに、10⁶ p f u g D - / +を、またはV D 6 0細胞溶解物（コントロール）を接種した。ブースト後14日目に脾臓を採取して、カウンティングビーズ（Count Bright（商標）、Life technologies）を用いるフローサイトメトリによって定量化した（図4A）。同じ日に、脾臓を記憶表面マーカーについて染色して、フローサイトメトリによって分析した（図4B）。最後に、同じ日に採取した脾細胞を、アゴニストg B 4 9 8 - 5 0 5 - ペプチドで6時間、in vitroで再刺激し、細胞内サイトカイン染色を実行して、これらの細胞によるIFN- γ 産生を測定した。g D - / +による免疫化は、コントロールマウスと比較して、ワクチン接種済みマウスにおいて、IFN- γ 産生を増大させた（図4C）。コントロールマウスの反応は、おそらく、伝達後の未感作マウスにおけるg B T - I T細胞の持続性を反映している。同様の結果が、g B 4 9 8 - 5 0 5 - ペプチドによりin vitroで再刺激した脾細胞の上澄みにマルチプレックスサイトカイン分析を用いて得られた（不図示）。これらの発見は、ワクチンがT細胞反応を誘導することを実証している。

【0112】

HSV-2 g D - / +で免疫化したマウスは、膣内HSV-2致死チャレンジから防御される：HSV-2 g D - / +によりs c . - s c .またはs c . - i . v a g のいずれかでワクチン接種をした動物は、LD₅₀に等しい膣内致死用量チャレンジ(5 × 10⁴ p f u /マウス)後、体重減を伴ってチャレンジを生存するが、V D 6 0コントロール溶解物で免疫化したマウスは、10日目までに疾患に屈した（図5Aおよび図5B）。ワクチンはまた、LD₅₀の10倍(5 × 10⁵ p f u /マウス、図示せず)に対して完全な防御を提供した。この防御は、有意に引き下げられた上皮疾患スコア（図5C）および神経学的徴候の完全な不在（図5D）を伴った。スコアリングは、先に記載されるように実行した[44]。さらに、膣チャレンジ後2日目に、コントロールマウスと比較して有意に少ないウィルスが、g D - / +免疫化マウスの膣洗浄液において回収され、これにより迅速なクリアランスが示唆された（図5E）。さらに、非感染性ウィルスを、4日目の膣洗浄液中で（図5E）、またはチャレンジ後5日目に単離した膣組織もしくはDRG中で（図5F）回収した。後者は、ワクチンが、DRGへのウィルスの到達および/またはDRG中の複製を予防することを示唆している。

【0113】

HSV-2 g D - / +による免疫化は、病原性HSV-2によるチャレンジ後に感染部位での炎症を予防する：HSV-2 g D - / +でワクチン接種をし、かつ病原性HSV-2により膣内でチャレンジしたマウスは、V D 6 0溶解物を接種した動物（コントロール）と比較して、感染部位にて有意に少ない炎症サイトカインしか示さない。実際

10

20

30

40

50

に、ワクチン接種済みマウスは、感染後2日目および7日目の膣洗浄液中に、コントロールマウスよりも有意に少ないTNF- α （図6A）、IL-6（図6B）およびIL-1（図6C）しか分泌しない。注目すべきは、炎症サイトカインのレベル増大が、HIV複製の増大、ならびにHSV-2およびHIVにより重感染した性器での排出を伴うことがある[45、46]。同様の現象がin vitroでも観察されている[47]。

【0114】

HSV-2 gD-/-による免疫化は、T細胞を、感染部位および関連するLNにリクルートする。gD-/-によりsc.-sc.で免疫化したマウスは、病原性HSV-2によるチャレンジ後の仙骨リンパ節（LN）において、活性化抗HSV-2 gB T-I CD8+T細胞（図7A）およびCD4+T細胞（図7B）のパーセンテージの増大を示した。gD-/-によりsc.-i.vag.で免疫化したマウスは、病原性HSV-2によるチャレンジ後の膣において、抗HSV-2 gB T-I CD8+T細胞（図7C）およびCD4+T細胞（図7D）の数の増大を示し、gD-/-によるワクチン接種が、抗HSV-2 CD8+T細胞および活性化CD4+T細胞（抗HSV-2の可能性がある）を、感染部位および関連するリンパ節にリクルートすることが示唆された。

【0115】

更なる実験において、HSV-2-gD-/-gD-1による免疫化は、C57BL/6およびBalb/Cにおける防御を、病原性HSV-2による膣チャレンジに対して与えることが見出された。また、膣内HSV-2チャレンジ済みgD-/-gD-1免疫化マウスは、チャレンジ後5日目に膣または神経組織においてHSV-2が検出可能でなかった。HSV-2 gD-/-gD-1 sc.sc.抗体は、HSV-2病的結合マウス（HSV-2 morbid-bound mice）とは異なり、多数のHSV-2タンパク質（gDおよびgBの双方）を認識することが見出された。ワクチン接種した動物由来の血清抗体は、HSV-1およびHSV-2のin vitro中和を示した。さらに、gD-/-gD-1ワクチン接種済みマウス由来の血清は、HSV-2感染した細胞の抗体依存性細胞傷害（ADCC）をin vitroで誘発した。

【0116】

要約すると、HSV-2 gD-/-gD-1は弱毒化され、wtマウスおよびSCIDマウスにおいて完全に安全である。組換えHSV-2 gD-/-gD-1は、致死HSV-2膣内感染およびHSV-2/HSV-1皮膚感染から防御した。防御が、2つの異なるマウス株において観察された。検出可能な感染および殺菌免疫はなかった。また、観察されたのは、HSV-2特異的CD8+T細胞、ならびに全身性HSV抗体および粘膜HSV抗体の誘導であった。IgG2aおよびIgG2bが、主な抗HSVアイソタイプであった。また、観察されたのは、FcγRⅢI/II-依存性ADCCであった。驚くべきことに、免疫血清の受動伝達が、感作マウスを防御し、FcRnノックアウトマウスおよびFcγRノックアウトマウスは、免疫血清により防御されなかった。

【0117】

考察

世界保健機構（World Health Organization）は、5億を超える人々が世界中で単純ヘルペスウィルス2型（HSV-2）に感染し、毎年おおよそ2000万の新しい症例を伴うと推定した[1]。感染リスクは年齢と共に増大する。ウィルスは頻度の高い亜臨床的再活性または臨床的再活性により潜在性を確立するので、感染の影響は生涯にわたる。憂慮すべきことに、HSV-2は、HIVの感染および伝染の危険を著しく増大させる[2~4]。HSV-2の蔓延は、世界地域間で異なり、日本の8.4%から、HIV蔓延がエピデミックな地域であるサハラ以南のアフリカの70%にまで変動する（[5、6]）。米国において、HSV-2の蔓延は約16%であり、HSV-1の蔓延は約54%に下落した。米国（および他の欧州の国）におけるHSV-1の蔓延の減少は、性器ヘルペス疾患の大部分の症例がHSV-1によって引き起こされた、最近の予想外の糖タンパク質D（gD）サブユニットワクチン試験の結果[7~9]によつ

て明示されるように、性器HSV-1の増大と関連がある。HSV-1が、HSV-2と比較して、より少ない再発、およびより少ない性器ウィルス排出を伴う一方、双方の血清型が周産期に伝染して、新生児疾患を引き起こす；新生児疾患は、アシクロビル処置によってすら、高い罹患率および死亡率を伴う[10～12]。性器ヘルペスを伴う罹患率、HIVエピデミックとの相乗効果、およびその直接的な医学コスト（米国だけで5億ドルを越える）は、安全かつ有効なワクチンを開発する緊急事態を強調している[13]。

【0118】

アジュvantと組み合わせたウィルスエンベロープ糖タンパク質からなるサブユニット製剤が、ほぼ20年間、HSV-2ワクチン分野を支配し、そして大部分の臨床試験は、この戦略に集中してきた[8、14～19]。サブユニット調製が安全であり、かつ中和抗体を誘発するが、この製剤は、臨床試験において、HSV-2感染または疾患に対して少しの有効性しか提供しなかった[8、14]。驚くべきことに、HSV-2 gDサブユニットワクチンが、HSV-2ではなく性器HSV-1からの防御を提供した[8、20]。以降の研究により、血清HSV-2 gD抗体レベルがHSV-1からの防御に相關することが見出され、HSV-2防御に必要とされる抗体力価は、HSV-1から防御するのに必要な抗体力価よりも高くなり得ることが示唆された[21]。対照的に、細胞媒介性免疫（重なり合うgDペプチドに対する細胞内サイトカインの反応）が、どちらの血清型からの防御とも相關しなかった[21]。ワクチンは、CD8⁺T細胞反応ではなくCD4⁺T細胞反応を誘発したが、ワクチン接種した感染女性と非感染女性との間で、CD4⁺T細胞反応の差異はなかった[21]。性器または他の粘膜の抗体反応は、測定されなかった。gHがゲノムから欠失したHSV-2ワクチン候補は、血清反応陽性の対象間で行なった臨床試験において、ウィルスの再発の頻度を引き下げることができず、ワクチンは主な感染に対する有効性について評価されなかった[29]。

【0119】

中和血清抗体の誘導にも拘らず、CD8⁺T細胞反応を何ら誘発できないgDサブユニットワクチンと組み合わせた、HIV感染患者におけるHSV-2再活性率の増大を示す臨床研究により、有効なワクチンは、防御T細胞反応も誘発しなければならないことが示唆される[28、30～32]。T細胞の重要性はさらに、ヒト三叉神経節におけるHSV-1反応性T細胞の選択的な保持を示す研究によって強調される。ニューロンを取り囲むCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞が同定された。標的とされるウィルスタンパク質の異質性が存在する一方、外皮タンパク質、ビリオンタンパク質16（VP16）は、多様なHLA-Aおよび-B対立遺伝子との関連で、複数の三叉神経節T細胞によって認識された；これらの発見は、外皮タンパク質が重要な免疫原であるかもしれないことを示唆する[33]。同様に、外皮タンパク質に向けられる細胞障害性T細胞は、HSV-2に潜在的に感染したヒトの研究においても同定された[34]。CD8⁺T細胞（CD8⁺T細胞を含む）が、HSV再活性後の真皮-表皮接合部の性器皮膚および粘膜中に残存することから、それらは免疫制御に関与することが示唆される[35]。

【0120】

本明細書中で開示されるのは、本来あるHSV-2 gDが遺伝的に欠失した操作済みHSV-2ウィルスである。HSV-2 gD遺伝子は、ウィルス侵入および細胞間スプレッドに必須のエンベロープ糖タンパク質をコードする。糖タンパク質Dはまた、ヘルペスウィルス侵入メディエータ（HLEM）としても知られる免疫調節スイッチである腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリメンバ14（TNFRSF14）に結合する。HLEMが複数のリガンドのためのドッキング部位を保有し、そしてシグナリングが、これらの分子がシスまたはトランスのいずれでHLEMに結合するかに応じて異なるので、gDは、免疫細胞に調節影響を及ぼし得る[36、37]。実際に、最近の研究は、gDが、この受容体の本来あるリガンド（natural ligand）と競合して、ウィルスに対するサイトカイン反応を調節することを示唆している[38、39]。gD遺伝子は、緑色蛍光タンパク質（gfp）をコードするDNAフラグメントと置き換えられて、この構築体により形質転換された、HSV-1 gDを発現する補完Vero細胞（Vero細胞[40]）（例

10

20

30

40

50

えば、g D - 1 プロモータ下に g D - 1 がある)が、緑色のブラークを形成する相同組換えウイルスに関してスクリーニングされた。変異体ウイルスは、補完 Vero 細胞系統において、高い力価となるように複製する(補完細胞で継代された場合、HSV-2 g D - / + と表される)が、非補完細胞において非感染性である(非補完細胞から単離された場合、HSV-2 g D - / - と表される)。このウイルスが精製されて、in vivo で特徴付けられた[41]。免疫正常マウスまたは免疫不全(SCID)マウスの膣内接種または皮下接種により、親の野生型ウイルスによって引き起こされる致死感染と比較して、病原性がないことが明らかとなった。免疫化(皮下プライムに続く、皮下投与または膣内投与の単回ブースト)が、病原性HSV-2 による膣内チャレンジから 100 % 防御された。ロバストな体液性免疫および細胞性免疫がHSV-2 g D - / + によって誘発され、U.S. 6 (g D - 2) は、in vivo 増殖性感染に必要とされると結論された。この生弱毒化ウイルス株は、HSVに対する殺菌免疫を提供するであろう。また、血清または血清産物の受動伝達が利用されてもよい。

【0121】

参考文献

1. Looker, K.J., G.P. Garnett, and G.P. Schmid, An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull World Health Organ*, 2008. 86(10): p. 805-12, A.
2. Freeman, E.E., et al., Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*, 2006. 20(1): p. 73-83.
3. Gray, R.H., et al., Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*, 2001. 357(9263): p. 1149-53.
4. Wald, A. and K. Link, Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *J Infect Dis*, 2002. 185(1): p. 45-52.
5. Paz-Bailey, G., et al., Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect*, 2007. 83(1): p. 16-22.
6. Doi, Y., et al., Seroprevalence of herpes simplex virus 1 and 2 in a population-based cohort in Japan. *J Epidemiol*, 2009. 19(2): p. 56-62.
7. Bradley, H., et al., Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. *J Infect Dis*, 2014. 209(3): p. 325-33.
8. Belshe, R.B., et al., Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*, 2012. 366(1): p. 34-43.
9. Bernstein, D.I., et al., Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin Infect Dis*, 2013. 56(3): p. 344-51.
10. Kimberlin, D., Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes*, 2004. 11 Suppl 2: p. 65A-76A.
11. Ward, K.N., et al., Herpes simplex serious neurological disease in young children: incidence and long-term outcome. *Arch Dis Child*, 2012. 97(2): p. 162-5.
12. Lafferty, W.E., et al., Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med*, 1987. 316(23): p. 1444-9.
13. Owusu-Edusei, K., Jr., et al., The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis*, 2013. 40(3): p. 197-201.
14. Mertz, G.J., et al., Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes

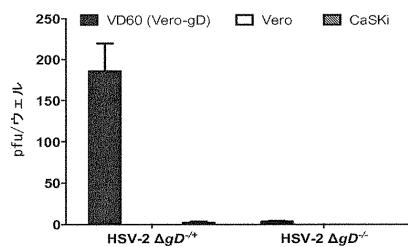
- infection. *J Infect Dis*, 1990. 161(4): p. 653-60.
15. Group, H.S.V.S., et al., Safety and immunogenicity of a glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy girls 10-17 years of age: results from a randomised, controlled, double-blind trial. *Vaccine*, 2013. 31(51): p. 6136-43.
16. Leroux-Roels, G., et al., Immunogenicity and safety of different formulations of an adjuvanted glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy adults: a double-blind randomized trial. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. 9(6): p. 1254-62.
17. Bernstein, D.I., et al., Safety and immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine. *Clin Infect Dis*, 2005. 40(9): p. 1271-81.
18. Stanberry, L.R., et al., Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*, 2002. 347(21): p. 1652-61. 10
19. Corey, L., et al., Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*, 1999. 282(4): p. 331-40.
20. jh.richardus@rotterdam.nl, Safety and immunogenicity of a glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy girls 10-17 years of age: Results from a randomised, controlled, double-blind trial. *Vaccine*, 2013. 31(51): p. 6136-43.
21. Belshe, R.B., et al., Correlate of Immune Protection Against HSV-1 Genital Disease in Vaccinated Women. *J Infect Dis*, 2013.
22. Gerber, S.I., B.J. Belval, and B.C. Herold, Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. *Virology*, 1995. 214(1): p. 29-39. 20
23. Lubinski, J.M., et al., The herpes simplex virus 1 IgG fc receptor blocks antibody-mediated complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *J Virol*, 2011. 85(7): p. 3239-49.
24. Para, M.F., L. Goldstein, and P.G. Spear, Similarities and differences in the Fc-binding glycoprotein (gE) of herpes simplex virus types 1 and 2 and tentative mapping of the viral gene for this glycoprotein. *J Virol*, 1982. 41(1): p. 137-44.
25. Hook, L.M., et al., Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin M antibody. *J Virol*, 2006. 80(8): p. 4038-46. 30
26. Lubinski, J.M., et al., Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J Virol*, 2002. 76(18): p. 9232-41.
27. Awasthi, S., et al., Immunization with a vaccine combining herpes simplex virus 2 (HSV-2) glycoprotein C (gC) and gD subunits improves the protection of dorsal root ganglia in mice and reduces the frequency of recurrent vaginal shedding of HSV-2 DNA in guinea pigs compared to immunization with gD alone. *J Virol*, 2011. 85(20): p. 10472-86.
28. Manservigi, R., et al., Immunotherapeutic activity of a recombinant combined gB-gD-gE vaccine against recurrent HSV-2 infections in a guinea pig model. *Vaccine*, 2005. 23(7): p. 865-72. 40
29. de Bruyn, G., et al., A randomized controlled trial of a replication defective (gH deletion) herpes simplex virus vaccine for the treatment of recurrent genital herpes among immunocompetent subjects. *Vaccine*, 2006. 24(7): p. 914-20.
30. Ouwendijk, W.J., et al., T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Curr Opin Virol*, 2013. 3(4): p. 452-60.
31. Parr, M.B. and E.L. Parr, Mucosal immunity to herpes simplex virus type 2 infection in the mouse vagina is impaired by in vivo depletion of T lymphocytes. *J Virol*, 1998. 72(4): p. 2677-85. 50

32. Noisakran, S. and D.J. Carr, Lymphocytes delay kinetics of HSV-1 reactivation from in vitro explants of latent infected trigeminal ganglia. *J Neuroimmunol*, 1999. 95(1-2): p. 126-35.
33. van Velzen, M., et al., Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog*, 2013. 9(8): p. e1003547.
34. Muller, W.J., et al., Herpes simplex virus type 2 tegument proteins contain subdominant T-cell epitopes detectable in BALB/c mice after DNA immunization and infection. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 5): p. 1153-63.
35. Zhu, J., et al., Immune surveillance by CD8alphaalpha+ skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature*, 2013. 497(7450): p. 494-7. 10
36. Steinberg, M.W., et al., Regulating the mucosal immune system: the contrasting roles of LIGHT, HVEM, and their various partners. *Semin Immunopathol*, 2009. 31(2): p. 207-21.
37. Steinberg, M.W., T.C. Cheung, and C.F. Ware, The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev*, 2011. 244(1): p. 169-87.
38. Kopp, S.J., C.S. Storti, and W.J. Muller, Herpes simplex virus-2 glycoprotein interaction with HVEM influences virus-specific recall cellular responses at the mucosa. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012: p. 284104. 20
39. Yoon, M., et al., Functional interaction between herpes simplex virus type 2 gD and HVEM transiently dampens local chemokine production after murine mucosal infection. *PLoS One*, 2011. 6(1): p. e16122.
40. Ligas, M.W. and D.C. Johnson, A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol*, 1988. 62(5): p. 1486-94.
41. Cheshenko, N., et al., HSV activates Akt to trigger calcium release and promote viral entry: novel candidate target for treatment and suppression. *FASEB J*, 2013. 27(7): p. 2584-99.
42. Parr, E.L. and M.B. Parr, Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J Virol*, 1997. 71(11): p. 8109-15. 30
43. Mbopi-Keou, F.X., et al., Cervicovaginal neutralizing antibodies to herpes simplex virus (HSV) in women seropositive for HSV Types 1 and 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. 10(3): p. 388-93.
44. Hendrickson, B.A., et al., Decreased vaginal disease in J-chain-deficient mice following herpes simplex type 2 genital infection. *Virology*, 2000. 271(1): p. 155-62.
45. Nixon, B., et al., Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in Humanized HIV-Transgenic Mice Triggers HIV Shedding and Is Associated With Greater Neurological Disease. *J Infect Dis*, 2013. 40
46. Carr, D.J. and L. Tomanek, Herpes simplex virus and the chemokines that mediate the inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 303: p. 47-65.
47. Stefanidou, M., et al., Herpes simplex virus 2 (HSV-2) prevents dendritic cell maturation, induces apoptosis, and triggers release of proinflammatory cytokines: potential links to HSV-HIV synergy. *J Virol*, 2013. 87(3): p. 1443-53.
48. Bourne, N., et al., Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis*, 2003. 187(4): p. 542-9.
49. Bourne, N., et al., Impact of immunization with glycoprotein D2/AS04 on herp 50

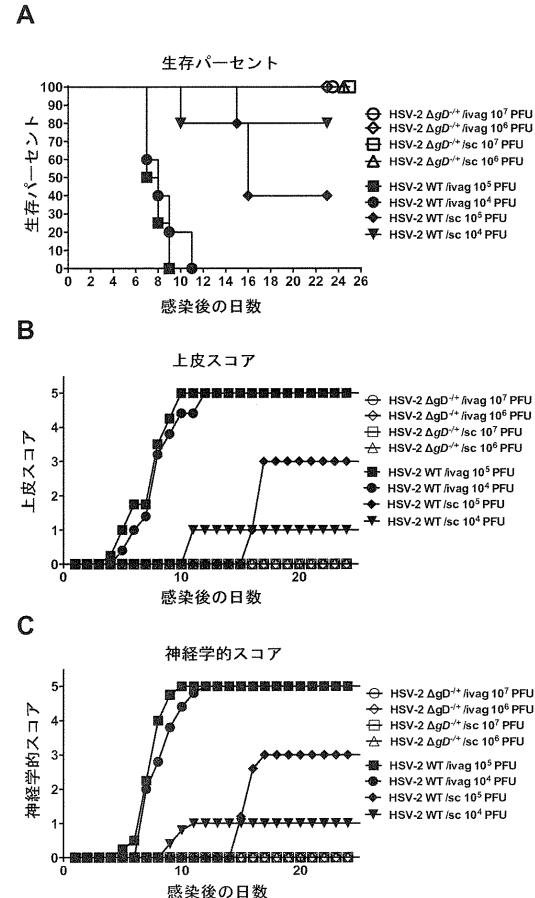
- es simplex virus type 2 shedding into the genital tract in guinea pigs that become infected. *J Infect Dis*, 2005. 192(12): p. 2117-23.
50. Bernstein, D.I., et al., The adjuvant CLDC increases protection of a herpes simplex type 2 glycoprotein D vaccine in guinea pigs. *Vaccine*, 2010. 28(21): p. 3748-53.
51. Bernstein, D.I., et al., Potent adjuvant activity of cationic liposome-DNA complexes for genital herpes vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. 16(5): p. 699-705.
52. Sweeney, K.A., et al., A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*, 2011. 17(10): p. 1261-8. 10
53. Kohl, S., et al., Limited antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody response induced by a herpes simplex virus type 2 subunit vaccine. *J Infect Dis*, 2000. 181(1): p. 335-9.
54. John, M., et al., Cervicovaginal secretions contribute to innate resistance to herpes simplex virus infection. *J Infect Dis*, 2005. 192(10): p. 1731-40.
55. Nugent, C.T., et al., Analysis of the cytolytic T-lymphocyte response to herpes simplex virus type 1 glycoprotein B during primary and secondary infection. *J Virol*, 1994. 68(11): p. 7644-8.
56. Mueller, S.N., et al., Characterization of two TCR transgenic mouse lines specific for herpes simplex virus. *Immunol Cell Biol*, 2002. 80(2): p. 156-63. 20
57. Wallace, M.E., et al., The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J Virol*, 1999. 73(9): p. 7619-26.
58. Milligan, G.N., et al., T-cell-mediated mechanisms involved in resolution of genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection of mice. *J Reprod Immunol*, 2004. 61(2): p. 115-27.
59. Wang, K., et al., A herpes simplex virus 2 glycoprotein D mutant generated by bacterial artificial chromosome mutagenesis is severely impaired for infecting neuronal cells and infects only Vero cells expressing exogenous HVEM. *J Virol*, 2012. 86(23): p. 12891-902. 30
60. Barletta, R.G., et al., Identification of expression signals of the mycobacteriophages Bxb1, L1 and TM4 using the *Escherichia-Mycobacterium* shuttle plasmids pYUB75 and pYUB76 designed to create translational fusions to the lacZ gene. *J Gen Microbiol*, 1992. 138(1): p. 23-30.
61. Yamaguchi, S., et al., A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector. *PLoS One*, 2011. 6(2): p. e17267.
62. Xu, Z., et al., Accuracy and efficiency define Bxb1 integrase as the best of fifteen candidate serine recombinases for the integration of DNA into the human genome. *BMC Biotechnol*, 2013. 13: p. 87. 40
63. Hill, A., et al., Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, 1995. 375(6530): p. 411-5.
64. Shu, M., et al., Selective degradation of mRNAs by the HSV host shutoff RNase is regulated by the UL47 tegument protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(18): p. E1669-75.
65. Umbach, J.L., et al., MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*, 2008. 454(7205): p. 780-3.
66. Cheshenko, N., et al., Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signal pathways. *J Cell Biol*, 2003. 163(2): p. 283-93. 50

67. Cheshenko, N. and B.C. Herold, Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. *J Gen Virol*, 2002. 83(Pt 9): p. 2247-55.
68. Cheshenko, N., et al., Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(8): p. 3119-30.
69. Immergluck, L.C., et al., Viral and cellular requirements for entry of herpes simplex virus type 1 into primary neuronal cells. *J Gen Virol*, 1998. 79 (Pt 3): p. 549-59.
70. Nixon, B., et al., Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in Humanized HIV-Transgenic Mice Triggers HIV Shedding and Is Associated With Greater Neurological Disease. *J Infect Dis*, 2014. 209(4): p. 510-22. 10
71. Cheshenko, N., et al., HSV usurps eukaryotic initiation factor 3 subunit M for viral protein translation: novel prevention target. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. e11829.
72. Carbonetti, S., et al., Soluble HIV-1 Envelope Immunogens Derived from an Elite Neutralizer Elicit Cross-Reactive V1V2 Antibodies and Low Potency Neutralizing Antibodies. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86905.
73. Janes, H., et al., Vaccine-induced gag-specific T cells are associated with reduced viremia after HIV-1 infection. *J Infect Dis*, 2013. 208(8): p. 1231-9. 20
74. Ferre, A.L., et al., Immunodominant HIV-specific CD8+ T-cell responses are common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers. *J Virol*, 2010. 84(19): p. 10354-65.

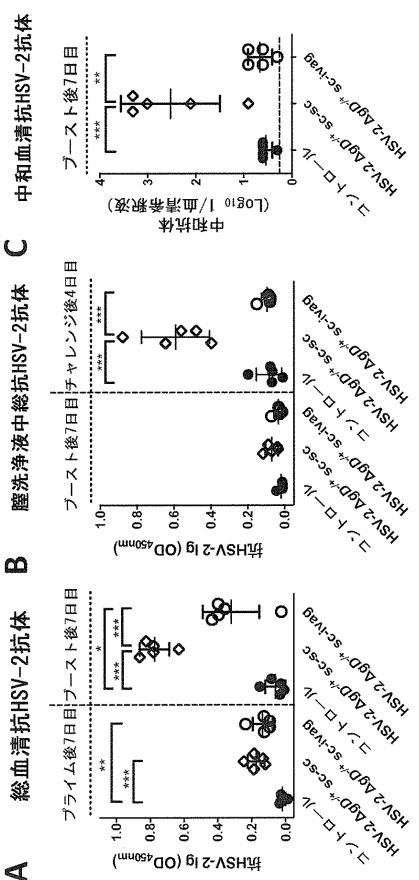
【図1】



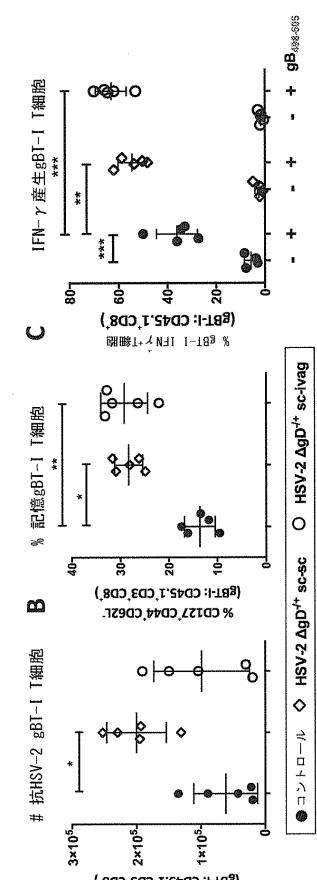
【図2】



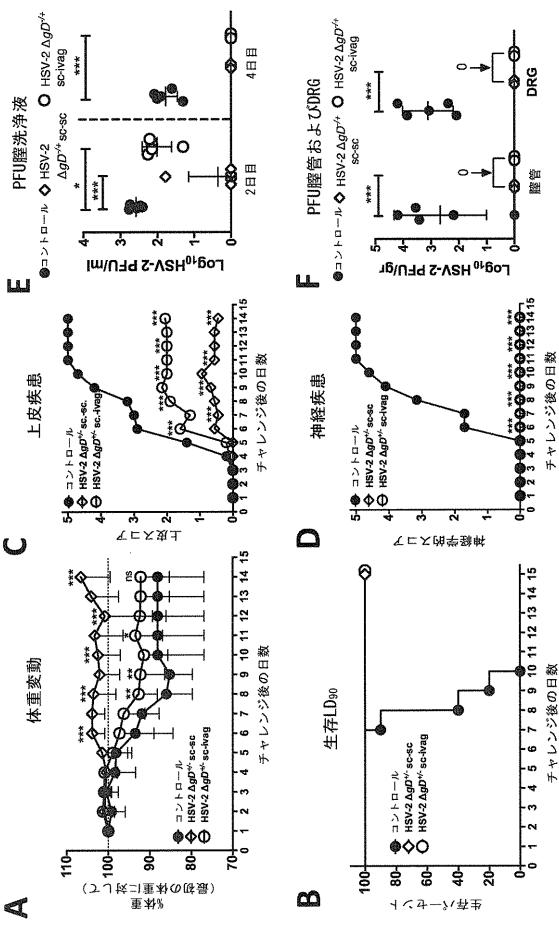
【図3】



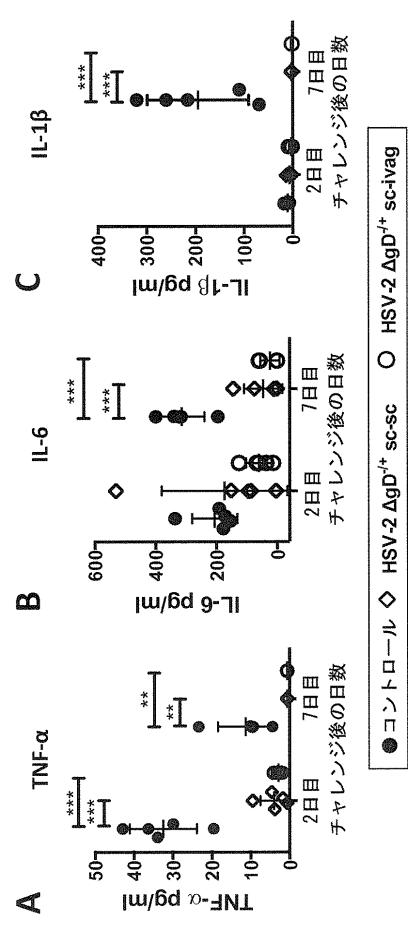
【図4】



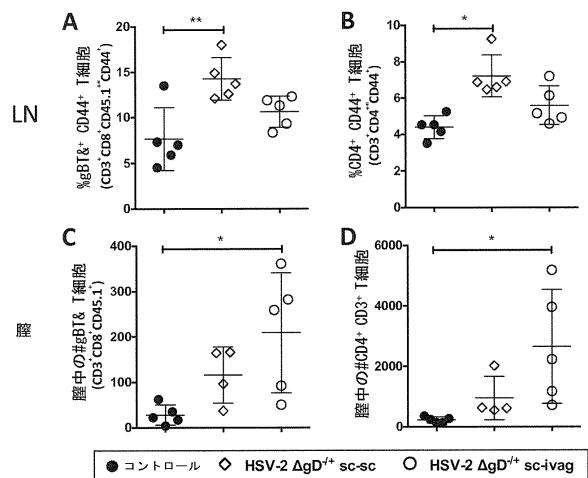
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0006652497000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01
C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869 Z
C 0 7 K	14/035 (2006.01)	C 0 7 K	14/035 Z N A
C 1 2 N	15/38 (2006.01)	C 1 2 N	15/38

(72)発明者 ジェーコブス、ウィリアム
アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ペルハム、アイデン・アヴェニュー 47
(72)発明者 ゴンサレス・ムノス、パブロ・エイ
チリ国、サンティエゴ、ラス・コンデス、デプト 106-2、アヴェニュー・アポキンド 67
97
(72)発明者 ヘロルド、ベツィ
アメリカ合衆国、コネチカット州、ロウェイトン、パイン・ポイント・ロード 12
(72)発明者 ペトロ、クリストファー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州、プレザントン、トリミンガム・ドライブ 11457

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 特表平08-507784 (JP, A)
国際公開第2005/005637 (WO, A1)
特表2010-502219 (JP, A)
CHESHENKO N. et al., FASEB J., 28(7)(2013), p.2584-2599
MESEDA C. A. et al., Virology, 318(2004), p.420-428
LIGAS M.W. et al., J. Virol., vol.62, no.5(1988), p.1486-1494

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K	1 4 / 0 3 5
C 1 2 N	7 / 0 1
C 1 2 N	1 5 / 3 8
C 1 2 N	1 5 / 8 6 9
A 6 1 K	3 5 / 7 6 3
A 6 1 K	3 9 / 2 4 5
A 6 1 P	1 7 / 0 2
A 6 1 P	3 1 / 2 2
A 6 1 P	3 7 / 0 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)	
P u b M e d	
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)	