

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-527758

(P2013-527758A)

(43) 公表日 平成25年7月4日 (2013. 7. 4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-508401 (P2013-508401)	(71) 出願人	512286093
(86) (22) 出願日	平成23年5月5日 (2011.5.5)		ティリオン, クリスティアン
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月7日 (2013.1.7)		ドイツ連邦共和国, 8 1 3 3 7 ミュンヘン, マイシュトラーセ 6 3
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/002252	(71) 出願人	512286107
(87) 国際公開番号	W02011/138040		コシノフスキー, ウルリヒ
(87) 国際公開日	平成23年11月10日 (2011.11.10)		ドイツ連邦共和国, 8 2 3 4 0 フェルダフティング, アホルンヴェーク 1 2
(31) 優先権主張番号	10005045.9	(71) 出願人	512286118
(32) 優先日	平成22年5月12日 (2010.5.12)		モーア, クリスティアン・アー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ドイツ連邦共和国, 8 1 4 7 5 ミュンヘン, リーデナー・シュトラーセ 1 2
(31) 優先権主張番号	10004751.3		
(32) 優先日	平成22年5月5日 (2010.5.5)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ベータヘルペスウイルス感染に対するワクチンおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は、伝播欠損性であるベータヘルペスウイルスに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

伝播欠損性であるベータヘルペスウイルス、好ましくは組換えベータヘルペスウイルス。

【請求項 2】

内皮向性であり、かつ／または野生型様ビリオン表面を有する、請求項 1 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3】

内皮向性であり、野生型様ビリオン表面を有する、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 4】

前記ベータヘルペスウイルスが、免疫応答の誘導に適切であるかまたは免疫応答を誘導でき、好ましくは、前記免疫応答が、ベータヘルペスウイルスに対する中和抗体ならびにベータヘルペスウイルスのエピトープに対しての CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 5】

前記免疫応答が、中和抗体を含み、ベータヘルペスウイルスが、前記中和抗体により内皮細胞および／または上皮細胞に感染することを妨げられる、請求項 4 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 6】

前記中和抗体により内皮細胞および／または上皮細胞に感染することを妨げられるベータヘルペスウイルスが、病原体、好ましくはヒト病原体である、請求項 5 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 7】

ヒトベータヘルペスウイルスである、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 8】

サイトメガロウイルスである、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【請求項 9】

ヒトサイトメガロウイルスである、請求項 7 および 8 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 10】

1 次および／または 2 次エンベロープ化に関与する少なくとも 1 つの遺伝子生成物を欠損している、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項、好ましくは請求項 9 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、1 次エンベロープ化に関与する、請求項 10 に記載のベータヘルペスウイルス。

40

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、UL50 および UL53 ならびにそのそれぞれの相同体を含む群から選択される遺伝子によりコードされる、請求項 11 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、2 次エンベロープ化に関与する、請求項 10 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、UL94 および UL99 ならびにそのそれぞれの相同体を含む群から選択される遺伝子によりコードされる、請求項 13 に記載のベータヘルペスウイルス。

50

【請求項 15】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 16】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 17】

配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 16 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 18】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

30

40

【請求項 19】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列を含む第 6 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

50

【請求項 20】

配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 34 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 34 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 35 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 35 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 7 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 19 に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 21】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 22】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 32 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【請求項 23】

配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 22 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 24】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

40

【請求項 25】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1

50

核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 33 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 26】

配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 25 に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 27】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 1 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 28】

前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 32 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列と、配列番号 33 によるヌクレオチド配列を含む第 6 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【請求項 29】

配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、請求項 28 に記載のベータヘルペスウイルス。

40

【請求項 30】

UL133、UL134、UL135、UL136、UL137、UL138、UL139、UL140、UL141、UL142、UL143、UL144 および UL145 を含む群から選択される 1 または複数の遺伝子を含む、請求項 1 から 29 のいずれか 1 項

50

に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 1】

配列番号 2 3 によるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 3 0 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 2】

免疫回避遺伝子によりコードされる少なくとも 1 つの遺伝子生成物を欠損している、請求項 1 から 3 1 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 3】

免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、MHC クラス I 提示を調節する遺伝子生成物および NK 細胞応答を調節する遺伝子生成物を含む群から選択される、請求項 3 2 に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 3 4】

免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、MHC クラス I 提示を調節する遺伝子生成物である、請求項 3 3 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 5】

MHC クラス I 提示を調節する前記遺伝子生成物が、US 6、US 3、US 2、UL 1 8、US 1 1、UL 8 3 および UL 4 0 を含む群から選択される、請求項 3 4 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 6】

免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、NK 細胞応答を調節する遺伝子生成物である、請求項 3 3 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 3 7】

NK 細胞応答を調節する前記遺伝子生成物が、遺伝子 UL 4 0、UL 1 6 および UL 1 8 によりコードされる遺伝子生成物を含む群から選択される、請求項 3 6 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 8】

異種核酸をコードする、請求項 1 から 3 7 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 3 9】

前記異種核酸が、機能的核酸であり、好ましくは、アンチセンス分子、リボザイムおよび RNA 干渉媒介核酸を含む群から選択される、請求項 4 1 に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【請求項 4 0】

前記核酸が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸である、請求項 3 8 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 1】

前記ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質が、少なくとも 1 つの抗原を含む、請求項 4 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 2】

前記抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原および寄生体抗原を含む群から選択される抗原である、請求項 4 1 に記載のベータヘルペスウイルス。

40

【請求項 4 3】

対象の治療のための方法における使用および / もしくは対象のワクチン接種のための方法における使用のためのまたは使用に適切な、請求項 1 から 4 2 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 4】

前記対象が、哺乳動物、好ましくはヒトである、請求項 4 3 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 5】

ヒトサイトメガロウイルスである、請求項 4 3 または 4 4 に記載のベータヘルペスウイ

50

ルス。

【請求項 4 6】

前記対象が、疾患に罹患しているか、または疾患に罹患する危険性がある、請求項 4 3 から 4 5 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 7】

前記ワクチン接種が、疾患に対するワクチン接種である、請求項 4 3 から 4 6 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 4 8】

前記疾患が、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患または状態である、請求項 4 6 および 4 7 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【請求項 4 9】

前記疾患または状態が、先天性封入体病を含む群から選択される、請求項 4 8 に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 5 0】

前記対象が、妊娠している雌または生殖可能年齢の雌、好ましくは、妊娠している女性または生殖可能年齢の女性である、請求項 4 3 から 4 9 のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス。

【請求項 5 1】

前記治療が、雌から前記雌が有しているかまたは将来有する胎児および／または胚へのベータヘルペスウイルス、好ましくはヒトサイトメガロウイルスの移動を妨げるかまたは妨げるのに適するかまたは妨げることができる、請求項 5 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【請求項 5 2】

前記治療が、雌の体内での免疫応答または雌の体内での免疫応答を生じさせるためであるかまたは生じさせるのに適するかまたは生じさせることができ、好ましくはそのような免疫応答が、前記雌が有しているかまたは将来有する胎児および／または胚に、ベータヘルペスウイルス、好ましくはヒトサイトメガロウイルスおよび／またはベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態に対する防御を授ける、請求項 5 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【請求項 5 3】

医薬品の製造のための、請求項 1 から 4 7 のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスの使用。

【請求項 5 4】

前記医薬品が、ベータヘルペスウイルス感染の治療および／または予防用である、請求項 5 3 に記載の使用。

【請求項 5 5】

前記医薬品が、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態の治療および／または予防用である、請求項 5 3 に記載の使用。

40

【請求項 5 6】

ワクチンの製造のための、請求項 1 から 4 7 のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスの使用。

【請求項 5 7】

前記ワクチンが、ベータヘルペスウイルス感染の治療および／または予防用である、請求項 5 6 に記載の使用。

【請求項 5 8】

前記ワクチンが、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態の治療および／または予防用である、請求項 5 7 に記載の使用。

50

【請求項 59】

前記ワクチンが、対象への投与のためであるかまたは投与に適し、前記対象が、妊娠している雌、生殖可能年齢の雌、移植片のドナー、移植片のレシピエントおよびHIVに感染しているかもしくはHIVに感染する危険性がある対象を含む群から選択される、請求項56から58のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 60】

前記ドナーが、潜在的ドナーであり、かつ/または前記レシピエントが、潜在的レシピエントである、請求項59に記載の使用。

【請求項 61】

前記請求項のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスをコードする核酸。

10

【請求項 62】

請求項61に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 63】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1～122630により表される第1核酸配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668～233681により表される第2ヌクレオチド配列とを含み、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド122630が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド12368と共有結合している、請求項62に記載の前記核酸を含むベクター。

20

【請求項 64】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1～122630により表される第1核酸配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668～233681により表される第2ヌクレオチド配列と、配列番号34によるヌクレオチド配列を含む第3ヌクレオチド配列とを含む、請求項62に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項 65】

配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド122630が、配列番号34によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1と共有結合し、配列番号34によるヌクレオチド配列のヌクレオチド252が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668と共有結合している、請求項64に記載のベクター。

30

【請求項 66】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1～122630により表される第1核酸配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668～130670により表される第2ヌクレオチド配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド131243～233681により表される第3ヌクレオチド配列とを含み、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド122630が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668と共有結合し、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド130670が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド131243と共有結合している、請求項62に記載の前記核酸を含むベクター。

40

【請求項 67】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1～122630により表される第1核酸配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド123668～130670により表される第2ヌクレオチド配列と、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド131243～233681により表される第3ヌクレオチド配列と、配列番号34によるヌクレオチド配列を含む第3ヌクレオチド配列と、配列番号35によるヌクレオチド配列を含む第4ヌクレオチド配列とを含む、請求項62に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項 68】

配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド122630が、配列番号34に

50

よるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 7 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合している、請求項 6 7 に記載のベクター。

【請求項 6 9】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合している、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

10

【請求項 7 0】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

20

【請求項 7 1】

配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合している、請求項 7 0 に記載のベクター。

【請求項 7 2】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

30

【請求項 7 3】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項 7 4】

配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、請求項 7 3 に記載のベクター。

40

【請求項 7 5】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオ

50

チド 6 2 1 2 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項 7 6】

前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列とを含む、請求項 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

10

【請求項 7 7】

配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 1 6 1 と共有結合している、請求項 7 6 に記載のベクター。

【請求項 7 8】

請求項 6 1 に記載の核酸または請求項 6 2 から 7 7 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 7 9】

前記請求項のいずれか 1 項に記載のベータヘルペスウイルス、請求項 6 1 に記載の核酸および / または前記請求項のいずれか 1 項に記載のベクターと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ベータヘルペスウイルス、好ましくは組換えベータヘルペスウイルス、医薬品の製造のためのベータヘルペスウイルスの使用、ワクチンの製造のためのベータヘルペスウイルスの使用、ベータヘルペスウイルスをコードする核酸、ベータヘルペスウイルスをコードする核酸を含むベクター、およびベータヘルペスウイルスをコードする核酸またはベクターを含む宿主細胞に関する。好ましい実施形態では、ベータヘルペスウイルスは、ヒトサイトメガロウイルスである。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

ベータヘルペスウイルスサブファミリーのメンバーであるヒトサイトメガロウイルス (CMV) は、ヒトに感染する医学的に最も重要なヘルペスウイルスである (Arvin ら 2004 Clin. Infect. Dis. 39: 233 ~ 239 頁; Stratton ら 1999 Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking National Academy Press)。ヒト CMV 感染のほとんどは、徴候となる疾患なしで授乳または唾液 / 尿接触により小児期の早期に獲得される。このことは、開発途上国において 100 % 近くの HCMV の有病率をもたらす。先進国では、人口の約 30 % が小児期に感染し、ヒト CMV 感染の有病率は、成人期の早期に約 50 % まで増加する。

40

【0 0 0 3】

ヒト CMV は、妊娠中に母体から胎児へ伝達されることもあり、感染した小児において知的障害および発達障害を導く。ヒト CMV は、先進国における先天性感染の最も重要な原因因子であり、新生児 1000 名あたり 1 名が発症する。現在までに、米国において毎年 30,000 ~ 40,000 名の乳児が先天性サイトメガロウイルスに感染して誕生し

50

、このことにより、全ての先天性感染のうちでサイトメガロウイルスが格段に最も一般的で重要になっている。新生児における先天性感染の見込みおよび疾患の程度は、母体の免疫状態に依存する。もし妊娠中に一次母体感染が生じるならば、胎児へ伝達される率は平均で40%である。これらの新生児の約65%は、先天性封入体病（congenital inclusion disease：CID）を有することになる。潜伏感染からの再活性化に伴う母体再感染があると、胎児への伝達の危険性は、0.5から1.5%までだけの範囲でより低く、これらの乳児の大多数は無症状でもある。妊娠前の自然感染は、再活性化に伴う胎児母体間伝達の危険性を引き起こすが、誘導免疫が、CIDに対する主な防御因子である。

【0004】

誕生時の感染は、重度の合併症の危険性を有する。HCMVへの一次感染は、免疫能がある個体において、通常、無症状である。メジャーリスク群は、臓器移植片レシピエントおよび後天性免疫不全症候群（AIDS）の患者を含み、これらの患者においてヒトCMVは、高い確率で生命を脅かす炎症性疾患を誘導する。さらに、いずれの年齢での一次感染の後でも、CMVは、生涯にわたる潜伏感染を確立し、感染した個体は、免疫抑制時により後の段階で再活性化する危険性を残すことになる。

【0005】

サイトメガロウイルスの分子生物学および免疫学は、最近大きく進展しているが（Murphyら2008 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 325：1～19頁）、現在まで、商業的に利用可能なワクチンはなく、一回的中の化学療法が、急性HCMV感染を管理する唯一の方法である（D. M. KnipeおよびP. M. Howley（編）、Fields Virology, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, PA. 中のMocarskiら2007、2701～2772頁）。この化学療法は、重度の副作用を引き起こし、この使用は、最も重度の事例にしばしば限られる。

【0006】

CMV感染に対するワクチンの開発は、Schleissらにおいて概説されている（Schleissら2005 Herpes. 12：66～75頁；Schleissら2008 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 325：361～382頁）。

【0007】

ヒトCMVワクチンの開発のためのある方策は、弱毒生HCMVの使用である。弱毒生CMVは、複数の細胞培養継代により作製される。これによって、弱毒生ワクチン中の投与されるウイルスは感染性である。しかし、細胞培養への順応により、機能的遺伝子の喪失が生じ、ここで、喪失された遺伝子はin vitroでのウイルス繁殖にとって必要でないが、in vivoでのウイルス感染にとって重要である。このような弱毒生CMVは、よって、宿主にとって病原性が低くなる。

【0008】

臨床試験において試験された最初のヒトCMVワクチン候補は、弱毒生ワクチンであった。これは、ヒト初代線維芽細胞における多数回の組織培養継代により弱毒化されたHCMVのAD169株であった。この弱毒化は、細胞および細胞培養の条件へのウイルスの選択的順応の結果である。ビルレンスの喪失は、in vitro状況にとって関係しないが、その天然宿主においてウイルスにとって重要である遺伝子に影響した結果であるとみられる。よって、線維芽細胞において多数回継代されたAD169が内皮細胞および単球に感染するその能力を喪失したことは、驚くことではない。AD169ワクチンを接種した血清陰性成人の大多数において、HCMV特異的免疫応答が生じた。このワクチンは、安全であり、全般的に耐容性がよいことが見出された。しかし、注射部位反応が一般的であり、いくらかの患者において、発熱、頭痛、疲労および筋肉痛からなる穏やかな全身性症状が生じた。

【0009】

10

20

30

40

50

A D 1 6 9 株は非常に攻撃的であるので、実験室順応 H C M V のより弱毒化された調製物である T o w n e 株が、A D 1 6 9 と同様の様式で、可能性のある弱毒生ワクチンとして開発された。この株は、細胞培養においてより多数回継代され、i n v i t r o においても A D 1 6 9 と同様の表現型であるとみられた。

【 0 0 1 0 】

最初のヒトでの試験は、予期されたように、T o w n e 株が A D 1 6 9 よりもよい耐容性を示した。この最初の肯定的な試験の後に、T o w n e ワクチンの効力が広く研究された。これらの研究は、T o w n e ワクチンがヒトにおいて安全で耐容性がよく、ヒト C M V に特異的な体液性および細胞性の両方の免疫を誘導することを示した。T o w n e ワクチンは、ある条件下でヒト C M V 疾患に対するいくつかの防御をもたらすとみられたが、残念なことに、ワクチン接種は、自然免疫よりも防御性が低い。よって、T o w n e 株は、過剰に弱毒化され、ワクチンとしての最適な効力を有さないものになった可能性が高い。

10

【 0 0 1 1 】

その結果、中程度に弱毒化された新しいヒト C M V 株が作り出されている。キメラウイルスが、T o w n e 株と、組織培養継代により弱毒化されていないヒト C M V の野生型様臨床単離株である T o l e d o 株との間の遺伝子組換えにより構築されている。

【 0 0 1 2 】

興味深いことに、T o w n e 株およびそれに基づくワクチンの必須の特徴は、内皮細胞に効果的に感染できないことである。さらに、T o w n e 株を用いるワクチン接種は、内皮向性 (endotheliotropic) C M V 感染を中和できる抗体を誘導せず、より具体的には、T o w n e は、内皮向性ヒト C M V 株に対する抗体を誘導しない (C u i r a 2 0 0 8 V a c c i n e 2 6 : 5 7 6 0 ~ 5 7 6 6 頁)。

20

【 0 0 1 3 】

内皮向性および非内皮向性ウイルスの間での中和を区別するために、G e r n a ら (G e r n a ら 2 0 0 8 J G e n V i r o l 8 9 : 8 5 3 ~ 8 6 5 頁) は、ヒト血清の試験、ならびに内皮 (または上皮) 細胞での繁殖および試験によるヒト C M V 臨床単離株に対する中和効力およびヒト線維芽細胞に感染する同じウイルスに対する中和効力の定量を提案した (G e r n a ら、既出)。

【 0 0 1 4 】

T o w n e 株が内皮細胞に感染できず、T o w n e 株が内皮向性ヒト C M V 感染を中和できる抗体を誘導できないことに加えて、T o w n e 株は、臨床的野生型ヒト C M V 単離株と比較して遺伝子を欠いていることに注目することが重要である。より具体的には、T o w n e 株は、C h a らによっても記載されるように (C h a ら 1 9 9 6 J . V i r o l V o l . 7 0 、第 1 号、7 8 ~ 8 3 頁)、遺伝子 U L 1 3 3 、U L 1 3 4 、U L 1 3 5 、U L 1 3 6 、U L 1 3 7 、U L 1 3 8 、U L 1 3 9 、U L 1 4 0 、U L 1 4 1 、U L 1 4 2 、U L 1 4 3 、U L 1 4 4 および U L 1 4 5 を欠く。

30

【 0 0 1 5 】

H C M V ワクチンを開発するためのさらなる方策は、ウイルスゲノムからの必須遺伝子の欠失に基づき、アデノウイルス、アルファ - ヘルペスウイルスおよびレトロウイルスのような多くのウイルスについて記載された。ヘルペスウイルスに対するワクチンと同様の複製欠損または単サイクルウイルスを用いる免疫化試験は、現在までに、アルファ - ヘルペスウイルスについてのみ記載されている (D u d e k ら 2 0 0 6 V i r o l o g y 3 4 4 : 2 3 0 ~ 2 3 9 頁)。これらのウイルスの繁殖は、欠如しているゲノムを発現し、欠損ウイルスの増殖を支持する補完細胞により促進される。遺伝子を欠失したこのようなウイルスの補完細胞上での繁殖は、野生型ビリオン表面と、第 1 の標的細胞についての野生型ウイルスと同様の向性とを有するワクチン - ウイルス粒子をもたらす。これらのウイルスは、ファーストラインの標的細胞についてのワクチン接種の際に感染性である。前記ファーストラインの標的細胞において、欠失または不活性化された遺伝子は、ウイルス複製の抑止または感染性または向性が減じられたウイルス粒子の形成のいずれかを導く。

40

50

【 0 0 1 6 】

DNA複製に必須の1つの遺伝子の欠失または標的複合体、すなわち糖タンパク質gBの欠失による感染性粒子の生成の抑止によるアルファ-ヘルペスウイルスワクチンの設計が、Dudekらにおいて概説されている(Dudekら、既出)。これらのウイルスの2つのタイプ、いわゆる「複製欠損」ウイルスおよびいわゆる「単サイクル」ウイルスが記載された。

【 0 0 1 7 】

複製欠損アルファ-ヘルペスウイルスは、DNA複製サイクルのために必須の遺伝子の欠失により作製された。ウイルスDNA複製のために必須の遺伝子、例えばメジャーDNA結合タンパク質ICP8の欠失を用いて、各欠失ウイルスを作製した。前記ウイルスは、欠如している遺伝子の生成物を補完する、安定に形質転換された細胞を用いることによりin vitroで繁殖できる(Forresterら1992 J Virol 66:341~348頁)。Knipeらからのいくつかの出版物は、このようなウイルスが防御免疫応答を誘導できることを証明している(Morrisonら1998 Virology 243:178~187頁; Morrisonら1994 J Virol 68:689~696頁; Morrisonら1996 Virology 220:402~413頁; Morrisonら1997 Virology 239:315~326頁を参照されたい)。

【 0 0 1 8 】

単サイクルウイルスは、標的複合体の糖タンパク質、例えば糖タンパク質gBまたは融合複合体、例えばgH/gLを欠く(Dudekら、既出)。このようなウイルス変異体は、IngallsらによるUS7,374,768に記載されている。前記複合体は、細胞の感染のための最初のステップとしてこの細胞への接着および/またはウイルスとこの細胞との融合のために重要であることが記載されている。前記糖タンパク質の欠失は、ファーストラインの標的細胞に感染する単サイクルワクチンウイルス粒子を生じる。宿主中の前記細胞は、上記の糖タンパク質を欠くので野生型様ビリオン表面を有さないウイルス粒子を形成することに注目することが重要である。糖タンパク質を欠くこれらの粒子は、感染性でないか、または次に感染する細胞について少なくとも限定された向性もしくは感染性を有する。さらに、前記糖タンパク質の欠失は、好ましくは感染細胞において抗原として効果的な前記糖タンパク質の発現の欠如を導く。

【 0 0 1 9 】

罹患群および新たに出現する疫学的状況の両方においてヒトCMV感染により引き起こされる社会的費用のために、効果的なHCMVワクチンの開発は、National Vaccine Committee of the Institute of Medicine(US)により最高レベルの優先事項として強調されている(Strattonら、既出)。

【 発明の概要 】

【 0 0 2 0 】

よって、本発明の根底にある課題は、効果的なHCMVワクチンと、そのようなワクチンに含まれるベータヘルペスウイルスとをそれぞれ提供することであった。

【 0 0 2 1 】

この課題は、添付の独立請求項により解決される。好ましい実施形態は、添付の従属請求項から理解できる。

【 0 0 2 2 】

特許請求の範囲は、以下に実施形態として記載する。さらなる実施形態は、本明細書の開示によりもたらされるが、本開示は、特許請求の範囲について記載するこれらの実施形態に限定されない。

【 0 0 2 3 】

実施形態1. 伝播欠損性であるベータヘルペスウイルス、好ましくは組換えベータヘルペスウイルス。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

実施形態 2 . 内皮向性であり、かつ / または野生型様ビリオン表面を有する、実施形態 1 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 2 5 】

実施形態 3 . 内皮向性であり、野生型様ビリオン表面を有する実施形態 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 2 6 】

実施形態 4 . 前記ベータヘルペスウイルスが、免疫応答の誘導に適切であるかまたは免疫応答を誘導でき、好ましくは、前記免疫応答が、ベータヘルペスウイルスに対する中和抗体ならびにベータヘルペスウイルスのエピトープに対しての C D 4 ⁺ および C D 8 ⁺ T 細胞を含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

10

【 0 0 2 7 】

実施形態 5 . 前記免疫応答が、中和抗体を含み、ベータヘルペスウイルスが、前記中和抗体により内皮細胞および / または上皮細胞に感染することを妨げられる、実施形態 4 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 2 8 】

実施形態 6 . 前記中和抗体により内皮細胞および / または上皮細胞に感染することを妨げられるベータヘルペスウイルスが、病原体、好ましくはヒト病原体である、実施形態 5 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 2 9 】

20

実施形態 7 . ヒトベータヘルペスウイルスである、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 0 】

実施形態 8 . サイトメガロウイルスである、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 1 】

実施形態 9 . ヒトサイトメガロウイルスである、実施形態 7 および 8 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 2 】

実施形態 1 0 . 1 次および / または 2 次エンベロープ化に関与する少なくとも 1 つの遺伝子生成物を欠損している、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つ、好ましくは実施形態 9 に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【 0 0 3 3 】

実施形態 1 1 . 前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、1 次エンベロープ化に関与する、実施形態 1 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 4 】

実施形態 1 2 . 前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、U L 5 0 および U L 5 3 ならびにそのそれぞれの相同体を含む群から選択される遺伝子によりコードされる、実施形態 1 1 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 5 】

40

実施形態 1 3 . 前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、2 次エンベロープ化に関与する、実施形態 1 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 6 】

実施形態 1 4 . 前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、U L 9 4 および U L 9 9 ならびにそのそれぞれの相同体を含む群から選択される遺伝子によりコードされる、実施形態 1 3 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 7 】

実施形態 1 5 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2

50

3 6 6 8 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 3 8 】

実施形態 1 6 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

10

【 0 0 3 9 】

実施形態 1 7 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 6 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【 0 0 4 0 】

実施形態 1 8 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

30

【 0 0 4 1 】

実施形態 1 9 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列を含む第 6 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

40

【 0 0 4 2 】

実施形態 2 0 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌ

50

クレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 7 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 9 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 4 3 】

実施形態 2 1 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

10

【 0 0 4 4 】

実施形態 2 2 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

20

【 0 0 4 5 】

実施形態 2 3 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 2 2 に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【 0 0 4 6 】

実施形態 2 4 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 1 6 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 と共有結合している、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

40

【 0 0 4 7 】

実施形態 2 5 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 1 8 1 6 5 2 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 8 9 1 9 2 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド

50

配列と、配列番号 33 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0048】

実施形態 26 . 配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 62129 が、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 38 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 63261 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 181652 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 189192 と共有結合している、実施形態 25 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0049】

実施形態 27 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 58442 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 59623 ~ 62129 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 632161 ~ 181652 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 189192 ~ 233681 により表される第 4 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 58442 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 59623 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 62129 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 63261 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 181652 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 189192 と共有結合している、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0050】

実施形態 28 . 前記ベータヘルペスウイルスが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 58442 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 59623 ~ 62129 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 63261 ~ 181652 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 189192 ~ 233681 により表される第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 32 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列と、配列番号 33 によるヌクレオチド配列を含む第 6 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0051】

実施形態 29 . 配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 58442 が、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 32 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 179 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 59623 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 62129 が、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 33 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 38 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 63261 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 181652 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 189192 と共有結合している、実施形態 28 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0052】

実施形態 30 . UL133、UL134、UL135、UL136、UL137、UL138、UL139、UL140、UL141、UL142、UL143、UL144 および UL145 を含む群から選択される 1 または複数の遺伝子を含む、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0053】

実施形態 31 . 配列番号 23 によるヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ~ 30 のいづ

10

20

30

40

50

れか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0054】

実施形態 32 . 免疫回避遺伝子によりコードされる少なくとも 1 つの遺伝子生成物を欠損している、実施形態 1 ~ 31 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0055】

実施形態 33 . 免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、MHC クラス I 提示を調節する遺伝子生成物および NK 細胞応答を調節する遺伝子生成物を含む群から選択される、実施形態 32 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0056】

実施形態 34 . 免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、MHC クラス I 提示を調節する遺伝子生成物である、実施形態 33 に記載のベータヘルペスウイルス。

10

【0057】

実施形態 35 . MHC クラス I 提示を調節する前記遺伝子生成物が、US6、US3、US2、UL18、US11、UL83 および UL40 を含む群から選択される、実施形態 34 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0058】

実施形態 36 . 免疫回避遺伝子によりコードされる前記少なくとも 1 つの遺伝子生成物が、NK 細胞応答を調節する遺伝子生成物である、実施形態 33 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【0059】

実施形態 37 . NK 細胞応答を調節する前記遺伝子生成物が、遺伝子 UL40、UL16 および UL18 によりコードされる遺伝子生成物を含む群から選択される、実施形態 36 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0060】

実施形態 38 . 異種核酸をコードする、実施形態 1 ~ 37 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0061】

実施形態 39 . 前記異種核酸が、機能的核酸であり、好ましくは、アンチセンス分子、リボザイムおよび RNA 干渉媒介核酸を含む群から選択される、実施形態 41 に記載のベータヘルペスウイルス。

30

【0062】

実施形態 40 . 前記核酸が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸である、実施形態 38 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0063】

実施形態 41 . 前記ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質が、少なくとも 1 つの抗原を含む、実施形態 40 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0064】

実施形態 42 . 前記抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原および寄生体抗原を含む群から選択される抗原である、実施形態 41 に記載のベータヘルペスウイルス。

40

【0065】

実施形態 43 . 対象の治療のための方法における使用および / もしくは対象のワクチン接種のための方法における使用のためのまたは使用に適切な、実施形態 1 ~ 42 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【0066】

実施形態 44 . 前記対象が、哺乳動物、好ましくはヒトである、実施形態 43 に記載のベータヘルペスウイルス。

【0067】

実施形態 45 . ヒトサイトメガロウイルスである、実施形態 43 または 44 に記載のベータヘルペスウイルス。

50

【 0 0 6 8 】

実施形態 4 6 . 前記対象が、疾患に罹患しているか、または疾患に罹患する危険性がある、実施形態 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 6 9 】

実施形態 4 7 . 前記ワクチン接種が、疾患に対するワクチン接種である、実施形態 4 3 ~ 4 6 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 7 0 】

実施形態 4 8 . 前記疾患が、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患または状態である、実施形態 4 6 および 4 7 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

10

【 0 0 7 1 】

実施形態 4 9 . 前記疾患または状態が、先天性封入体病を含む群から選択される、実施形態 4 8 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 7 2 】

実施形態 5 0 . 前記対象が、妊娠している雌または生殖可能年齢の雌、好ましくは、妊娠している女性または生殖可能年齢の女性である、実施形態 4 3 ~ 4 9 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 7 3 】

実施形態 5 1 . 前記治療が、雌から前記雌が有しているかもしくは将来有する胎児および / または胚へのベータヘルペスウイルス、好ましくはヒトサイトメガロウイルスの移動を妨げるかまたは妨げるのに適するかまたは妨げることができる、実施形態 5 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

20

【 0 0 7 4 】

実施形態 5 2 . 前記治療が、雌の体内での免疫応答または雌の体内での免疫応答を生じさせるためであるかまたは生じさせるのに適するかまたは生じさせることができ、好ましくはそのような免疫応答が、前記雌が有しているかもしくは将来有する胎児および / または胚に、ベータヘルペスウイルス、好ましくはヒトサイトメガロウイルスおよび / またはベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態に対する防御を授ける、実施形態 5 0 に記載のベータヘルペスウイルス。

【 0 0 7 5 】

実施形態 5 3 . 医薬品の製造のための、実施形態 1 ~ 4 7 のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルスの使用。

30

【 0 0 7 6 】

実施形態 5 4 . 前記医薬品が、ベータヘルペスウイルス感染の治療および / または予防用である、実施形態 5 3 に記載の使用。

【 0 0 7 7 】

実施形態 5 5 . 前記医薬品が、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態の治療および / または予防用である、実施形態 5 3 に記載の使用。

【 0 0 7 8 】

実施形態 5 6 . ワクチンの製造のための、実施形態 1 ~ 4 7 のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスの使用。

40

【 0 0 7 9 】

実施形態 5 7 . 前記ワクチンが、ベータヘルペスウイルス感染の治療および / または予防用である、実施形態 5 6 に記載の使用。

【 0 0 8 0 】

実施形態 5 8 . 前記ワクチンが、ベータヘルペスウイルス感染、好ましくはヒトサイトメガロウイルス感染に伴う疾患もしくは状態の治療および / または予防用である、実施形態 5 7 に記載の使用。

【 0 0 8 1 】

50

実施形態 59 . 前記ワクチンが、対象への投与のためであるかまたは投与に適し、前記対象が、妊娠している雌、生殖可能年齢の雌、移植片のドナー、移植片のレシピエントおよび HIV に感染しているかもしくは HIV に感染する危険性がある対象を含む群から選択される、実施形態 56 ~ 58 のいずれか 1 つに記載の使用。

【0082】

実施形態 60 . 前記ドナーが、潜在的ドナーであり、かつ / または前記レシピエントが、潜在的レシピエントである、実施形態 59 に記載の使用。

【0083】

実施形態 61 . 前記実施形態のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスをコードする核酸。

【0084】

実施形態 62 . 実施形態 61 に記載の核酸を含むベクター。

【0085】

実施形態 63 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 8 8 と共有結合している、実施形態 62 に記載の前記核酸を含むベクター。

【0086】

実施形態 64 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 34 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 62 に記載の前記核酸を含むベクター。

【0087】

実施形態 65 . 配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 34 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 34 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合している、実施形態 64 に記載のベクター。

【0088】

実施形態 66 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合している、実施形態 62 に記載の前記核酸を含むベクター。

【0089】

実施形態 67 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 1 2 2 6 3 0 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 ~ 1 3 0 6 7 0 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 20 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 34 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 35 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 62 に記載の前記核酸を含むベクター。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

実施形態 6 8 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 2 6 3 0 が、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 4 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 5 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 2 3 6 6 8 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 0 6 7 0 が、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 5 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 7 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 3 1 2 4 3 と共有結合している、実施形態 6 7 に記載のベクター。

【 0 0 9 1 】

10

実施形態 6 9 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合している、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

【 0 0 9 2 】

実施形態 7 0 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

20

【 0 0 9 3 】

実施形態 7 1 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合している、実施形態 7 0 に記載のベクター。

【 0 0 9 4 】

実施形態 7 2 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

30

【 0 0 9 5 】

実施形態 7 3 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列を含む第 3 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

40

【 0 0 9 6 】

実施形態 7 4 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、実施形態 7 3 に記載のベクター。

【 0 0 9 7 】

実施形態 7 5 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌ

50

レオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列とを含み、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 と共有結合している、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

【 0 0 9 8 】

実施形態 7 6 . 前記ベクターが、ヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 ~ 5 8 4 4 2 により表される第 1 核酸配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 ~ 6 2 1 2 9 により表される第 2 ヌクレオチド配列と、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 6 1 ~ 2 3 3 6 8 1 により表される第 3 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列を含む第 4 ヌクレオチド配列と、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列を含む第 5 ヌクレオチド配列とを含む、実施形態 6 2 に記載の前記核酸を含むベクター。

10

【 0 0 9 9 】

実施形態 7 7 . 配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 8 4 4 2 が、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 2 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 7 9 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 9 6 2 3 と共有結合し、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 2 1 2 9 が、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 1 と共有結合し、配列番号 3 3 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 3 8 が、配列番号 2 0 によるヌクレオチド配列のヌクレオチド 6 3 2 1 6 1 と共有結合している、実施形態 7 6 に記載のベクター。

20

【 0 1 0 0 】

実施形態 7 8 . 実施形態 6 1 に記載の核酸または実施形態 6 2 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載のベクターを含む宿主細胞。

【 0 1 0 1 】

実施形態 7 9 . 前記実施形態のいずれか 1 つに記載のベータヘルペスウイルス、実施形態 6 1 に記載の核酸および / または前記実施形態のいずれか 1 つに記載のベクターと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

30

【 0 1 0 2 】

本発明者らは、ベータヘルペスウイルス、より具体的には本発明の C M V による人類のような宿主生物の内皮細胞の感染が、C M V に対する免疫応答の誘発をもたらすことを、驚くべきことに見出した。より具体的には、該免疫応答は、ベータヘルペスウイルスに対する中和抗体ならびにベータヘルペスウイルスのエピトープに対しての C D 4 + および C D 8 + T 細胞を含む抗 C M V 応答である。さらに、本発明者らは、このような免疫応答が、ベータヘルペスウイルス、より具体的には伝播欠損性 (spread-deficient) である本発明のヒトサイトメガロウイルスにより誘発できることを、驚くべきことに見出した。マウス C M V のようなベータヘルペスウイルスに関するいずれの特徴、実施形態およびいずれの記述も、ヒト C M V に対して等しくあてはまることが認識されなければならない。さらに、本発明によるベータヘルペスウイルスは、好ましい実施形態において、ヒトおよびマウスそれぞれの C M V について観察される以下の特徴を示すことが認識される：マウスおよびヒトそれぞれにおいてマウスおよびヒト C M V への多重感染が生じる (Boppa n a , S . B . ら 2 0 0 1 . I n t r a u t e r i n e t r a n s m i s s i o n o f c y t o m e g a l o v i r u s t o i n f a n t s o f w o m e n w i t h p r e c o n c e p t i o n a l i m m u n i t y . N . E n g l . J M e d 3 4 4 : 1 3 6 6 ~ 1 3 7 1 頁 ; C i c i n - S a i n , L . ら、2 0 0 5 . F r e q u e n t c o i n f e c t i o n o f c e l l s e x p l a i n s f u n c t i o n a l i n v i v o c o m p l e m e n t a t i o n b e t w e e n c y t o m e g a l o v i r u s v a r i a n t s i n t h e m u l t i p l y i n

40

50

fect ed host . J Virol 79 : 9492 ~ 9502 頁) ; CMV に対する中和抗体の通常になく高い応答が、マウスおよびヒトそれぞれにおいてマウスおよびヒトCMVへの感染により引き起こされる (Farrell , H . E . および G . R . Shellam , 1990 . Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to murine cytomegalovirus . J . Gen . Virol . 71 (Pt 3) : 655 ~ 664 頁 ; Farrell , H . E . および G . R . Shellam , 1991 . Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies . J . Gen . Virol . 72 (Pt 1) : 149 ~ 156 頁 ; Gerna , G . , A . ら、2008 . Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial / epithelial cells , but not fibroblasts , early during primary infection . J . Gen . Virol . 89 : 853 ~ 865 頁) ; 非常に特徴的なCD8 + T細胞応答を表す記憶膨張が、マウスおよびヒトそれぞれにおいてマウスおよびヒトCMVへの感染により引き起こされ、ほぼ同一の速度論を有する (Karrer , U . ら、2003 . Memory inflation : continuous accumulation of antiviral CD8 + T cells over time . J . Immunol . 170 : 2022 ~ 2029 頁 ; Karrer , U . ら2004 . Expansion of protective CD8 + T-cell responses driven by recombinant cytomegaloviruses . J . Virol . 78 : 2255 ~ 2264 頁 ; Klenerman , P . および P . R . Dunbar , 2008 . CMV and the art of memory maintenance . Immunity . 29 : 520 ~ 522 頁 ; Komatsu , H . ら、2003 . Population analysis of antiviral T cell responses using MHC class I-peptide tetramers . Clin . Exp . Immunol . 134 : 9 ~ 12 頁) 。本発明に関連して、当業者は、マウスCMV遺伝子を、ヒトCMVにおいて前記マウスCMV遺伝子の相同体で置き換えることができることも認識する (Schnee , M . ら、2006 . Common and specific properties of herpesvirus UL34 / UL31 protein family members revealed by protein complementation assay . J Virol 80 : 11658 ~ 11666 頁) 。

【0103】

好ましい実施形態では、本発明によるベータヘルペスウイルスは、Liuらにより米国特許第7,407,744号に記載されるTowne株、すなわち、好ましくは野生型と比較して、遺伝子UL133、UL134、UL135、UL136、UL137、UL138、UL139、UL140、UL141、UL142、UL143、UL144およびUL145が欠失しているTowne株とは異なる。当業者は、Towne株が内皮向性でなく、欠陥のあるgH / gL複合体も有することをさらに認識する。

【0104】

さらに好ましい実施形態では、本発明によるベータヘルペスウイルスは、配列番号23によるヌクレオチド配列を含む。

【0105】

よりさらに好ましい実施形態では、本発明によるベータヘルペスウイルスは、Toledo株とは異なる。

【0106】

10

20

30

40

50

伝播欠損は、本明細書で用いる場合、好ましくは、伝播欠損性であるウイルスが細胞に感染し、ウイルス粒子が感染細胞から放出されず、ここで、ウイルスDNAが複製され、本発明に従って欠失されたもの以外のウイルスタンパク質が感染細胞において発現され、好ましくは全てのウイルス糖タンパク質が発現され、より好ましくは細胞へのウイルスの侵入を媒介する全てのウイルス糖タンパク質が発現され、ここで、好ましくは、細胞が内皮および/または上皮細胞であることを意味する。ウイルスが伝播欠損性であるか否かを決定するために本発明に従って好ましく用いられるアッセイは、実施例1として本明細書に記載する。

【0107】

本明細書で好ましく用いられる野生型CMV株は、ウイルスが、その天然宿主から単離され、組織培養において内皮細胞に感染するその能力を維持しているベータヘルペスウイルス株であることを意味する。より具体的には、本明細書で好ましく用いられる野生型ヒトCMV株は、なかでも、遺伝子UL133、UL134、UL135、UL136、UL137、UL138、UL139、UL140、UL141、UL142、UL143、UL144およびUL145を含有し(Chara、既出)、より具体的には、本明細書で好ましく用いられる野生型CMV株は、ヒトCMVについてTB40/EおよびFIX-BAC(Sinzgerら1999 Journal of General Virology、80、2867~2877頁;Hahnら2002 J Virol. 76(18):9551~9555頁)ならびに/またはTB40E-BAC4-FRT(配列番号20)(Scrivano, L.ら、2011. HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. PLoS Pathog. 7:e1001256)あるいはMCMVについてSmith株である(Rawlinsonら1996 J Virol 70:8833~8849頁)。本発明の好ましい実施形態では、本明細書で好ましく用いられる野生型CMV株は、配列番号23によるヌクレオチド配列を含む。TB40E-BAC4-FRTによる分子感染性BACプラスミドであるpTB40E-BAC4-FRTの配列は、配列番号20によるヌクレオチド配列を有する。

【0108】

前記pTB40E-BAC4-FRTは、nt1~181652およびnt189192~233681によりコードされるウイルス配列と、nt181653~189191により表されるBAC配列とからなる。当業者は、TB40E-BAC4-FRTのウイルスゲノムのようなウイルスゲノムを含むpTB40E-BAC4-FRTのようなBACプラスミドが、大腸菌において環状であり、よって、配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド233681が配列番号20によるヌクレオチド配列のヌクレオチド1と共有結合することを認識する。当業者は、前記ウイルスのウイルスゲノムを含むBACプラスミドからのウイルスを再構築するため、例えば、TB40E-BAC4-FRTのウイルスゲノムを含むpTB40E-BAC4-FRTからTB40E-BAC4-FRTを再構築するための方法を理解している。このような方法は、なかでも、補完細胞を含む細胞のトランスフェクションを含む。

【0109】

本明細書で用いる場合、用語「少なくとも1つの遺伝子生成物が欠損している」は、好ましくは、核酸、DNA、RNAまたは遺伝子の発現に起因するペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質のような生化学的物質である少なくとも1つの遺伝子生成物が、野生型株における前記遺伝子生成物が示す機能の少なくとも1つを示さないことを意味する。好ましくは、示されない前記機能の少なくとも1つは、ベータヘルペスウイルスの伝播を担う機能である。また、好ましくは、野生型株における前記遺伝子生成物の機能の全てが示されない。このことは、前記遺伝子生成物をコードする遺伝子の完全もしくは部分的な欠失もしくは変異、前記遺伝子生成物をコードする遺伝子の発現を制御する核酸の変異の完全もしくは部分的な欠失、前記遺伝子生成物の切断、またはその他の形で競合する遺伝子生成物の阻害の結果であってよい。

10

20

30

40

50

【0110】

本明細書で用いる場合、用語「DNAが複製される」は、好ましくは、複製が、野生型ウイルスの複製と同様に生じることを意味する。

【0111】

本明細書で用いる場合、野生型様ビリオン表面は、好ましくは、本明細書で定義する野生型のベータヘルペスウイルス、より具体的には本明細書で定義するサイトメガロウイルス野生型株が提示する表面である。野生型のベータヘルペスウイルスが提示する表面を定義するために用いられる分子は、細胞、好ましくは内皮細胞への前記野生型ウイルスの侵入を媒介する前記野生型ウイルスにより発現される糖タンパク質である。言い換えると、野生型様ビリオン表面を有する本発明によるウイルスは、初代線維芽細胞の感染の後に、それに基づいて本発明のウイルスを作製するために欠失を作製したかもしくは作製できる野生型ウイルスと同一、本質的に同一または少なくとも著しく異ならない、同じ糖タンパク質を提示または発現するビリオン表面を有する。糖タンパク質の発現の決定は、当業者に知られており、定量RT-PCRまたは質量分析法により行ってよい(Brittら1990, J Virol 64:1079~1085)が、このような目的に適するその他の方法は、当業者に知られている。

10

【0112】

本発明のベータヘルペスウイルス、特に本発明のヒトサイトメガロウイルスが内皮向性であるかを決定するために、好ましくは、実施例2に記載するアッセイを用いる。

【0113】

本発明のベータヘルペスウイルス、特に本発明のヒトサイトメガロウイルスにより誘発される免疫応答が少なくとも中和抗体を含み、ここで、少なくとも中和抗体が、前記ウイルスが内皮細胞および/または上皮細胞に感染することを妨げるかを決定するために、Cuiら(Cuiら、既出)に記載されるアッセイを好ましく用いることができる。

20

【0114】

ウイルスDNA複製は、複製欠損ウイルス変異体において抑止され、よって、遺伝子発現が、ウイルスエピトープの全てのセットを活用しないことが認識される。特に、糖タンパク質および構造ビリオン成分が発現されない。

【0115】

本発明をさらに説明するために、ヒトサイトメガロウイルスの生物学について以下に概説する。

30

【0116】

ヒトサイトメガロウイルスは、8種のヒトヘルペスウイルスのうちの1種であり、これらは、生物学的特性および他のヘルペスウイルスとの分子系統発生的関係に基づいて、3つのサブファミリー(アルファ()、ベータ()、ガンマ())にクラスタ分けされる。サイトメガロウイルスは、ベータヘルペスウイルスサブファミリーに属し、ヘルペスウイルスファミリーの中で最大のゲノムを有する。240kbpのそのゲノムは、200を超える可能性のある遺伝子生成物をコードできる(Murphyら、既出)。

【0117】

サイトメガロウイルスのウイルス粒子は、3つの主な構成要素、すなわち2本鎖直鎖状DNAゲノムを包む内側正20面体カプシド、カプシドを囲むあまり組織化されていないタンパク質の網であるテグメント、およびウイルス糖タンパク質複合体が埋め込まれた脂質2重層である最外エンベロープからなる。

40

【0118】

宿主細胞へのウイルス粒子の感染は、宿主細胞表面の分子構造へのウイルス糖タンパク質の接触により媒介される。CMVは、多くの異なる型の細胞に感染でき、ウイルス侵入の機構は、具体的な細胞型に依存し、2つの主な経路により生じ得ることが知られている。(a)遊離の、すなわち細胞非結合性ウイルス粒子は、宿主細胞に直接遭遇できるか、または(b)ウイルスは、予め形成された、すなわち非ウイルス誘導性細胞間接触もしくはウイルス誘導性細胞間接触、いわゆる細胞から細胞への伝播により、感染細胞から非感

50

染細胞に移動する。

【0119】

細胞受容体のセットと高い親和性で結合した後に、ウイルス糖タンパク質は、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜との間の融合を誘導する。CMV粒子が宿主細胞に侵入した後に、HCMVゲノムは、核を標的にし、ここで、該ゲノムは、いくらかサイレントなゲノムが無症状で維持されることを特徴とする潜伏感染を確立するか、または新しい感染性CMV粒子の繁殖を導く溶解感染を誘導する。

【0120】

CMVの溶解性複製サイクルは、3段階の調節された遺伝子発現：最初期、初期および後期に分割される。複製段階の特徴は、特徴的な速度論で発現される特異的遺伝子クラスターである。最初期遺伝子転写がまず生じ、ウイルス生成の必要性に応じて宿主細胞を再プログラムするウイルスマスターレギュレーターの合成を導く。最初期遺伝子生成物の合成の後に、初期遺伝子が転写される。初期遺伝子生成物は、DNA複製タンパク質ならびにヌクレオチド代謝において重要なレギュレーターおよび酵素を含む。最後に、後期遺伝子が、DNA複製の開始後に転写され、前記後期遺伝子の遺伝子生成物は、主に、新しい感染性ウイルス粒子のアッセンブリおよび放出に関与する構造タンパク質である。

10

【0121】

後期遺伝子生成物は、gBおよびgH/gL複合体（これらは、CMVに対する中和抗体の主な標的である）のようなウイルス糖タンパク質（Schleissら2008既出）ならびに主なテグメントタンパク質であるホスホプロテイン65（pp65）および最初期1タンパク質（これらは、CMVに対する細胞性免疫応答の主な標的である）を含む多くのウイルス抗原を含む。

20

【0122】

CMVの溶解性複製サイクルにおけるさらなるステップは、成熟前ウイルス粒子を膜構造でエンベロープ化するステップを含む、新規な感染性ウイルス粒子の成熟化である。エンベロープ化のステップは、1次エンベロープ化、脱エンベロープ化および2次エンベロープ化を含む。

【0123】

核膜での1次エンベロープ化は、ウイルスカプシドが核を出て放出されるために重要である。この1次エンベロープ化において必須の役割を演じる核放出複合体（NEC）とも呼ばれるタンパク質複合体の一部としてのタンパク質は、マウスCMVのM50およびM53（Lotzereichら2006 J Virol 80:73~84頁）またはヒトCMVにおけるそれらの相同体であるUL50およびUL53として最近同定された。

30

【0124】

相同遺伝子は、本明細書で用いる場合、好ましくは、Fossumら（Fossumら PLoS Pathog. 2009年9月; 5(9):e1000570）またはDavisonら（Davisonら(2010) Vet Microbiol. 2010年2月11日. Herpesvirus systematics; およびDavisonら 2004 Compendium of Human Herpesvirus gene names; Reno）に従って、別のヘルペスウイルスの遺伝子の相同体であると言われるあるヘルペスウイルスの遺伝子である。

40

【0125】

さらに、UL50の相同体は、EMBL-EBI InterProデータベース（<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>）に、受託番号IPR007626の下で列挙され、UL53相同体は、同様に、見出しIPR021152の下で見出される。

【0126】

2次エンベロープ化は、ゴルジ装置および/または小胞体の膜にて生じる。前記2次エンベロープ化に関連して、2次エンベロープ化複合体（SEC）とも呼ばれるタンパク質複合体が、マウスCMVのM94またはヒトCMVにおけるその相同体、すなわちUL9

50

4 の遺伝子生成物を少なくとも含んで同定された。HCMV の遺伝子 UL94 は、全てのヘルペスウイルスサブファミリーで保存され (Chee ら 1991 Transplant Proc 23:174~80 頁; Chee ら 1990 Curr Top Microbiol Immunol 154:125~169 頁; Higgins ら 1989 Comput. Appl. Biosci. 5:151~153 頁)、感染の後期段階でのみ見出された (Scott ら 2002 Virus Genes 24:39~48 頁; Wing ら 1996 J Virol 70:3339~3345 頁)。UL94 が、ビリオンの一部分であることが最近示された (Kalejta ら 2008 Microbiol Mol Biol Rev 72:249~65 頁; Kattenhorn ら 2004 J Virol 78:11187~11197 頁; Wing ら、前掲)。UL94 は、トランスポゾン媒介突然変異誘発により示される HCMV の Towne 株の感染に必須である (Dunn ら 2003 Proc Natl Acad Sci USA 100:14223~14228 頁)。M94 がマウス CMV 感染に必須であることは、本明細書の実施例部分に開示する。

10

【0127】

UL94 の相同体は、EMBL - EBI InterPro データベース (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) に、受託番号 IPR004286 の下で列挙される。

【0128】

唾液腺中の CMV の高いウイルス量は、分泌を介する直接接触による CMV 伝達を示す。侵入部位での最初の標的細胞における最初の複製の後に、CMV は、血液およびリンパ液により体内に伝播する。ウイルスは、白血球細胞により取り込まれ、これがウイルスを 1 次感染部位からほぼ全ての内部器官にウイルスを運ぶ可能性が最も高い。

20

【0129】

CMV とその宿主、すなわちヒトまたはマウスとの間の相互作用は、非常に複雑である。他方で、宿主の免疫応答は、ウイルスの複製を非常に効果的に制御する。よって、CMV 感染のほとんどは、無症状であり、このことは、組織損傷が観察可能な病的レベルの局所または全身の炎症に到達する前に、ウイルス複製が制御されることを意味する。他方、ウイルス自体は、免疫応答を制御し、宿主からのウイルスの効果的なクリアランスをもたらす。免疫能のあるほとんど全ての事例において、自然 CMV 感染は、ウイルスが、宿主から完全に排除されることなく免疫系により制御される状況にたどり着く (Reddehase ら 2002 J Clin Virol 25 Suppl 2:S23~S36 頁)。

30

【0130】

最近、CMV の免疫抑制機能の分子機構を研究することにより、かなりの部分の知識が得られた。CMV 遺伝子の半数より多くが、免疫系の全ての段階で異なる免疫機構に干渉する遺伝子生成物、いわゆる免疫回避遺伝子 (immune evasive gene) をコードすることが認識されている。体液性または細胞性免疫応答単独は、CMV 感染を制御するために十分でないという証拠が存在する。これらの両方の協調した作用が、ウイルス免疫回避とのバランスを保つために必要である (Adler ら 1995 J Infect Dis 171:26~32 頁; Reddehase ら 1987 J Virol 61:3102~3108 頁)。

40

【0131】

ベータヘルペスウイルスおよびヒト CMV にそれぞれ感染した対象の疾患および状態は、なかでも、単核球症様の症状、脾腫、間質性肺炎、失明、難聴、先天性封入体病ならびに HCMV に感染した器官のそれぞれ器官損傷および器官不全である。前記疾患および状態は、本発明のベータヘルペスウイルスにより治療および/または予防できる疾患および状態であることが認識される。

【0132】

典型的に、ヒト CMV 感染は、宿主の免疫系が脆弱化または抑制されている場合にのみ

50

臨床的に出現する。公衆衛生的に重要ないくつかのメジャーリスク群が存在する。

【0133】

宿主免疫系が脆弱である、ある状況は、生殖可能年齢の妊娠していない女性または妊娠している女性がヒトCMVに感染する場合である。ヒトCMV感染が、妊娠中に、それぞれ胎児および胚の未熟な免疫系により母体から胎児および胚にそれぞれ伝達されるならば、ヒトCMV感染の直接細胞傷害性病状が発生でき、これは、先天性封入体病（CID）と呼ばれる。CIDの症状は、小頭症、大脳萎縮症、脈絡網膜炎および感音難聴を含む（これらは、典型的に、子宮内胎児発育遅延、肝脾腫を含むその他の内臓器官の感染の結果、血小板減少症のような血液の異常および紅斑として出現する様々な皮膚の徴候、すなわち点状出血および紫斑病と組み合わせられる）ヒトCMVが中枢神経系に感染する原因が大部分である。CIDは、先進国における最も頻度が高い感染性先天性障害である。さらに、ヒトCMV感染は、ウイルス感染の後に獲得される難聴の主な原因である。

10

【0134】

臨床的に重要なヒトCMV感染の第2のシナリオは、免疫低下または免疫抑制患者により形成される。この種の患者は、例えば、HIV陽性患者または移植片レシピエントである。これらの患者において、疾患の徴候は、免疫機能障害の質および程度に依存して変動する。感染は、潜伏ウイルス感染の再活性化を原因としてほとんどの場合生じるが、移植片レシピエントの場合に、すでに感染したドナーに由来する器官または骨髓移植片からのウイルス再活性化により新たに獲得されることもある。

20

【0135】

十分な免疫制御がない場合、CMV感染は、様々な器官の炎症性疾患を導く。これに関連して、最も頻度が高い臨床的徴候は、間質性肺炎、胃腸疾患、肝炎および網膜炎からなる。骨髓移植片レシピエントにおいて、HCMV間質性肺炎が、90%の死亡率で発生する。前記疾患および状態は、本発明のベータヘルペスウイルスにより治療および/または予防できる疾患および状態であることが認識される。

【0136】

AIDS患者において、日和見ヒトCMV感染は一般的であり、抗レトロウイルス療法が失敗したかまたは該療法を適用できない/利用できないならば、ほぼ100%の頻度で発生する。これは、効果的な療法がまだ利用可能でない非先進国の場合にまだあてはまる。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染に対する高度に活性な抗レトロウイルス療法が利用可能になる前に、HCMV網膜炎は、後天性免疫不全症候群（AIDS）の成人患者における失明の最も一般的な原因であり、全体的な生涯有病率は90%を超えていた。

30

【0137】

本発明のベータヘルペスウイルスの実施形態では、ベータヘルペスウイルスは、ワクチンおよび/またはベクターとして用いられる。本発明のさらなる実施形態では、このようなベータヘルペスウイルスは、異種核酸をコードする。好ましくは、このような異種核酸は、抗原、より好ましくは病原体の抗原をコードする。このことにより、このようなワクチンおよびベクターはそれぞれ、前記病原体により引き起こされるかまたは該病原体に伴う疾患の治療および/または予防に適する。このような病原体は、好ましくは、ウイルスおよび細菌を含む。ある実施形態では、抗原は、インフルエンザのNP-NT60であり、このことにより、ベクターは、インフルエンザの治療において有用である。さらなる実施形態では、抗原は、結核菌H37Rv株からのORF Rv3407であり、このことにより、ベクターは、結核の治療において有用である。

40

【0138】

ある実施形態では、本発明のベータヘルペスウイルスは、組換えベータヘルペスウイルスである。

【0139】

さらなる実施形態では、本発明のベータヘルペスウイルスは、ヒトベータヘルペスウイルス、好ましくは組換えヒトベータヘルペスウイルスである。

【0140】

50

好ましい実施形態では、本発明のベータヘルペスウイルスの個別のヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により結合、好ましくは共有結合している。このようなホスホジエステル結合は、細胞のような生物学的材料に含まれるかまたは生成される核酸分子に含まれるホスホジエステル結合である。

【0141】

本発明のベータヘルペスウイルスが、医薬組成物の一部分であることが認識される。好ましくは、このような医薬組成物は、本発明のベータヘルペスウイルスおよび/またはそれをコードする核酸以外に、薬学的に許容される担体を含む。このような医薬組成物の成分およびそれらのそれぞれの含有量は、当業者に知られている。このような医薬組成物が、本発明のベータヘルペスウイルスと関連して本明細書で開示する疾患および状態の治療のためであるかまたは該治療において用いるためであることがさらに認識される。

10

【0142】

本出願の実施例部分において示す実験による証拠がマウスCMVに基づくが、このような証拠はHCMVに直接的およびそのまま移すことができることが当業者により認識され、よって、本発明は、当業者にとってもっともらしい。この理由は、CMVを含む異なるヘルペスウイルス株のゲノムが直線的に相関しており、ヒト宿主におけるヒトCMVおよびマウス宿主におけるマウスCMVの作用の形態が本質的に同一であるからである。

【0143】

本発明による核酸分子、タンパク質およびペプチドの様々な配列番号、化学的性質、それらの実際の配列ならびに内部参照番号を、以下の表にまとめる。この表に示していない特定の配列の範囲で、これらは、本明細書の一部である添付の配列表に含まれる。

20

【0144】

【表 1 A】

配列番号	配列	内部参照番号
1	GTGGGATCCACCATGTACCCCTACGACGT GCCCCGACTACGCCACGTCCAGACTATCC	HAM94for
2	ACTCTAGAGTCGACTTCACATGTGCTCGA GAACA	M94rev
3	AATTCATGATAACTTCGTATAGCATACAT TATACGAAGTTATCCGGAGATATCCACCG GTCTGGCGGCCGC	ATGlox1
4	TCGAGCGGCCGCCAGACCGGTGGATATCT CCGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATA CGAAGTTATCATG	ATGlox2
5	CGT GGT CAA GCC GGT CGT GTT GTA CCA GAA CTC GAC TTC GGT CGC GTT GCT TAC AAT TTA CGC GCG GG	5'- $\Delta m157$ -pCR3-FRT- <i>Kan^r</i> - FRT
6	CCC CGA TAT TTG AGA AAG TGT ACC CCG ATA TTC AGT ACC TCT TGA CTA AGA AGC CAT AGA GCC CAC CGC	3'- $\Delta m157$ -flox-egfp
7	TGC TTC CCG GCG GCT TCT GCG CGA CCT TCC AGC TGC AGG TAG ACC ACG GCG ACG TCC AGA CTA TCC GTG AAA AGT TTG AGA AGC ATC AGT AGC CGA TTT CGG CCT ATT GGT T	5' $\Delta M94$ -pO6- <i>tTA</i>
8	CAT GGA TGG GTT GGT TGA TTT GTA TGT CTG TTG GCT ACT CAC ATG TGC TCG AGA AGC CAG TGT GAT GGA TGA TCC TC	3'- $\Delta M94$ -pO6- <i>tTA</i>
9	SIINFEKL	OVA-MHC-Iペプチド
10	TVYGFCLL	<i>m139</i> MHC-Iペプチド

10

20

30

40

【表 1 B】

11	RALEYKNL	<i>ie3</i> MHC-Iペプチド
12	SCLEFWQRV	<i>M57</i> MHC-Iペプチド
13	HGIRNASFI	<i>M45</i> MHC-Iペプチド
14	FAM-AACGTACATCGCTCTCTGCTGGCCG-TAMRA	Taqman-プローブM54
15	Ttactgggtgctgccggggcggctttgccgtctcttcgcgcgtcact cttcacggcctggcccagcgagccctgcgggaccggttcacaaa cttcgaggccgtgctggcccggggcatgcacgtggaggccggcc ggcaggagcccagacccccgggtgagcggccggcggctgc ccttcgacgacctgtgatccggaggacgacggctcgtgtatcttgt gccaattgctgttgctctaccgcgacggcgaatggatcctctgtcttt gctgcaacggccgttatcaaggccactatggcggggtctgacagtt cacgggggagaagaaacaagaaacaacaaaaaaaaagaggaga tctgcggccgctagggataacagggtaatcgtgttgacaattaat catcggcatagtatatcggcatagtagataatacacaaggtagaggaa ctaaacctatggcaaaactgaccagcgcagttccgggtctgaccgc acgtgatgttgccgggtgccgtgaattttggaccgatcgtctgggttt tagccgtgattttgtggaagatgattttgccgggtgttgctgatgat gttaccctgtttattagcgcagttcaggatcagggtgttccggataat accctggcatgggtttgggttcgtggtctggatgaactgtatgcaga atggtcagaagttgtgagcaccaattttcgtgatgcaagcggtcg gcaatgaccgaaattggtgaacagccgtggggtcgtgaatttcac tgcgtgatccggcaggtaattgtgttcattttgttcagaagaacag gattaacctcgattaattaattgaacattaccctgttatccctaccgg tgtcctaggcggggtctgacagttcacggggagaagaaacaaga aacaacaaaaaaaaagagg	LIFdelUL94
16	cgtgttagaccgttgagtcgcgacctgtcccgaagacgaacct accgatctgggtcgccaacagcgccaacgagtagctcgtcagctc cgtgccccgccccgtcagtcgtagaagtaactcataaactttcag gtctcgcgtacgattcgcgagtcgggaatgtaggataacagggt aatcgtatgtgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtata atacacaaggtaggaaactaaacctatggcaaaactgaccagcg cagttccgggtctgaccgcacgtgatgttgccgggtgccgtgaatttt	LIF-delUL99

10

20

30

40

【表 1 C】

	ggaccgatcgtctgggttttagccgtgattttgtggaagatgattttg ccggtgtgttcgtgatgatgtaccctgtttattagcgcagttcagg atcagggtgttccggataataccctggcatgggtttgggttcgtggtc tggatgaactgtatgcagaatggcagaagttgtgagcaccaatttt cgtgatgcaagcgggccgcaatgaccgaaattggtgaacagcc gtggggctgtgaatttgcactgcgtgatccggcaggtaattgtgttc attttgtgcagaagaacaggattaacctcgattaattaattgtaacat taccctgttatccctaaagtaactcataaactttcaggtctcgcgtac gattcgcgagtcgggaatg		10
17	配列表に含まれるとおり	pCB-Ubic-UL94-IRES-mChe	
18	配列表に含まれるとおり	pCB-Ubic-UL99-IRES-gfp	
19	配列表に含まれるとおり	pLV-Ubiq-BLAs-IRES-Puro	
20	配列表に含まれるとおり	pTB40E-BAC4-FRT	20
21	配列表に含まれるとおり	pBSK-OVA	
22	配列表に含まれるとおり	pTRE-HAM94	
23	配列表に含まれるとおり	TB40独特配列(UL133～ UL145)	
24	MSGGIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSAL AMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPFGDSIEAQCGTSVN VHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYL QCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIR NVLQPSVSDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPF RVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGT MSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFELKTEWTSSNVMEERKI KVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSA ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEF RADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP	OVA	30
25	MSGQGTKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMIGGIGRFY IQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLE EHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIW RQTNNGDDATAGLTHMMIWHNSLNDATYQRTALVRTGMD PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVMELVMIKRG INDRNFWRGENGRKTRIAYERMCNILKGKFQTAAQKAMMD QVRESRNPNGNAEFEDLTFLARSALILRGSVAHKSCLPACV YGPVAVASGYDFEREGLVGLIDPFRLQNSQVYSLIRPNE NPAHKSQVLVWMACHSAAFEDLRVLSFIKGTKVLPRGKLST RGVQIASNENMDAMESSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR ASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTIMAAFNNGTEGRTSDM RTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFD MSNEGSYFFGDNAEEYDN	インフルエンザのNP-NT60	40
26	MRATVGLVEAIGIRELRQHASRYLARVEAGEELGVTNKG RLVARLIPVQAAERSREALIESGVLI PARRPQNLLDVTA EPARGRKRTLSDVLNEMRDEQ	結核菌H37Rv株からのORF Rv3407	

【表 1 D】

27	MAWRSGLCETDSRTLKQFLQEECMWKLVGKSRKHREYRAV ACRSTIFSPEDDGSCILCQLLLLYRDGEWILCLCCNGRYQ GHYGVGHVHRRRRRICHLEPTLYQLSFGGPLGPASIDFLPS FSQVTSSMTCDGITPDVIEVCMLVPQDEAKRILVKGHGA MDLTCQKAVTLGGAGAWLLPRPEGYTLFFYILCYDLFTSC GNRCDIPSMTRLMAAATACGQAGCSFCTDHEGHVDPTGNY VGCTPDMGRCLCYVPCGPMTQSLIHNDPATFFCESDDAK YLCAVGSKTAAQVTLGDGLDYHIGVKDSEGRWLPVKTDVW DLVKVEEPVSRMIVCSCPVLKNLVH	UL94	10
28	VTLGGAGAWLLP	SSc交差反応性UL94ペプチド	
29	MGGELCKRICCEFGTTSGEPLKDALGRQVSLRSYDNIPPT SSSDEGEDDDDDGEDDDNEERQQKLRLCGSGCGNDSSSGS HREATHDGPKNVNRSTFREDKAPKPSKQSKKKKKPSKHH HHQSSIMQETDDLDEEDTSIYLSPPPPVPPVQVVAKRLPR PDTPRTPRQKKISQRPPPTPGTKKPAAPLSF	UL99	
30	MATSRLSVKSLRSISRFBVQWECCWMLVNKSARYREFRAVT SQSPGLGKVSSTDDGRCLAASMMMLFRRDGNFVLCVNVKE PVGQFGCSGMRREKMVIDGLQEPVYVMRLLAPLIPVKLGF SPYMLPPKSIGGSGGLDPSVIYQNASVVTPEEAATVTMQG SGIVTVGLSGVGSWVQIKDGGNMKLFVFALCFDVFTACCD RLAFPSLAKIYSETVSCEADKCGFCRDSGRHVDPTGRFVG CVPDSGVCLCYSPCRGTDAAVSVRSWLPYLELEDGANTHS LFVRRYDGRKGLPATISDYLGAARNSEGDEIPLRTEPWQLL KIEPTLSAMIIMACPLLKKIVLEHM	M94	20
31	MYPYDVDPDYATSRLSVKSLRSISRFBVQWECCWMLVNKSAR YREFRAVTSQSPGLGKVSSTDDGRCLAASMMMLFRRDGNFV LCVNVKEPVGQFGCSGMRREKMVIDGLQEPVYVMRLLAP LIPVKLGFSPYMLPPKSIGGSGGLDPSVIYQNASVVTPEE AATVTMQGSGIVTVGLSGVGSWVQIKDGGNMKLFVFALCF DVFTACCDRLAFPSLAKIYSETVSCEADKCGFCRDSGRHV DPTGRFVGCVPDSDGVCLCYSPCRGTDAAVSVRSWLPYLEL EDGANTHSLFVRRYDGRKGLPATISDYLGAARNSEGDEIPL RTEPWQLLKIEPTLSAMIIMACPLLKKIVLEHM	HA-M94	
32	gaccgcgccacagcagaccagcaccagcagaagagccagca ccagcggggccagagtcgcaaagcgcgcgggcagccacggcc cagactgcggtcgcgatggcccgagcgcgctcgcaccacgat gacggtgcccacgataaccagtcgcgtcccgccaccgacgccac cgccgat	delUL50S	30
33	atgtctagcgttttctcaacagcattcgtgcgccttga	delUL53S	
34	cacggcctggcccagcgagccctgcgggaccggttccaaaactt cgaggccgtgctggcccggggcatgcacgtggaggccggccgg caggagcccagagacccccgggtgagcggccggcggtgcctt tcgacgacctgtgatccggaggacgacggctcgtgtatcttgtgcc aattgctgttgcctaccgcgacggcgaatggatcctctgtcttgc gcaacggccgttatcaaggccactatgg	delUL94S	40
35	ctgggtcgccaacagcgccaacgagtacgtcgtcagctccgtgcc ccgccccgtcagtccttagaag	delUL99S	

【 0 1 4 5 】

上記の核酸配列のそれぞれおよび全てが、遺伝コードの縮重性により、上記の核酸配列

と同じまたは機能的に相同なペプチドおよびタンパク質をそれぞれコードする核酸配列に置き換えることができることを当業者は認識し、このことは、本発明の範囲内でもある。

【0146】

本発明を、以下の図面および実施例によりここでさらに説明し、これらからさらなる特徴、実施形態および利点が理解できる。

【0147】

より具体的には、以下のとおりである。

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】誘導性トランス補完の概念の模式図である。

10

【図2】図2Aは、時間の関数としてのTCID₅₀を示す線図である。図2Bは、一連の顕微鏡写真である。図2Cは、時間の関数としてマウスの生存を示す生存曲線である。

【図3】図3Aは、血清の希釈の関数としてのルシフェラーゼ活性としてのウイルス中和抗体応答を示す線図である。図3Bは、様々な時点での適応移入T細胞のパーセンテージを示す線図である。図3Cは、様々なウイルスペプチドを負荷した移入細胞の、ウイルスペプチドに特異的なCD8⁺T細胞による特異的溶解のパーセンテージを示す線図である。

【図4】異なるウイルス変異体に感染した異なるマウス株における適応移入T細胞のパーセンテージを示すWhiskerプロットである。

【図5】図5Aおよび図5Bは、ワクチン接種したマウスの異なる器官における攻撃ウイルス量を示す線図である。

20

【図6】図6Aおよび図6Bは、時間の関数としてのワクチン接種したマウスの生存を示す生存曲線である。

【図7】図7Aは、野生型またはMCMV - M94のいずれかの感染マウスの肺においてウイルス遺伝子M54を検出するPCRの結果を示すアガロースゲルである。図7Bは、野生型またはMCMV - M94のいずれかの感染マウスの肺においてウイルス遺伝子M54を検出する定量PCRの結果を示す線図である。図7Cおよび図7Dは、ワクチン接種したマウスの異なる器官における攻撃ウイルス量を示す線図である。

【図8】MCMV - m157 - rec - egfp - M94に感染した異なる株化細胞の細胞の一連の顕微鏡写真である。

30

【図9】図9Aは、伝播アッセイの模式的概要である。図9Bは、一連の顕微鏡写真である。図9Cは、伝播アッセイの結果を示す線図である。

【実施例1】

【0149】

[伝播アッセイ]

本明細書に記載する伝播アッセイは、ベータヘルペスウイルスおよびヒトサイトメガロウイルスの特徴決定の関係において、このようなウイルスが伝播欠損性であるかを決定するために用いることができる。

【0150】

ヒトCMVについての初代線維芽細胞の株化細胞MRC5およびマウスCMVについてのNIH/3T3ならびに補完性細胞株TCL94/99-BPおよびNTM94-7をそれぞれ播き、約0.25のMOIで1時間感染させ、D-PBSで2回洗浄する。細胞を6時間インキュベートし、その後、D-PBSで4回洗浄する。同数の非感染細胞を、5μMのCFSEで8分間染色し、2%FCS/D-PBSでブロックし、次いで、2%FCS/D-PBSで2回洗浄し、その後、未染色であるが感染した細胞の上に播種した。

40

【0151】

感染の48時間(マウスCMV)および72時間(ヒトCMV)後に、4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いてD-PBS中で10分間、37℃にて共培養物を固定し、洗浄し、0.1%Triton X100を10分間用いて透過にした。3回の洗浄後、細

50

胞を、3% BSA / D - PBS で1時間ブロックした。最初期染色を、CMVの最初期遺伝子生成物に対する1次抗体、より具体的にはモノクローナル抗体Croma 101 ((Ig G 1アイソタイプ) Keilら (Keilら1987 J Virol . 61 (2) : 526 ~ 533頁))において抗体6 / 20 / 1と称されるマウスCMVの最初期タンパク質1に特異的)、およびヒトCMV最初期1に特異的なPlachterらにおいてCH160と称されるモノクローナル抗体 ((Plachterら1993 Virology 193、642 ~ 652頁) Virusys Co. から市販で入手可能) と固定細胞を3% BSA / D - PBS 中でインキュベートすることにより行った。3回のD - PBS 洗浄の後に、細胞を、MCMVの場合に1次抗体Croma 101およびヒトCMVの場合にCH160に対してのAlexa Fluor 555結合2次抗体と、3% BSA / D - PBS 中でインキュベートした。最後に、細胞を3回洗浄し、LSM510 Meta (Zeiss) を用いて共焦顕微鏡により画像化した。CMV株または変異体が伝播欠損性であるかを決定するために、野生型CMVに感染した細胞を陽性対照として用いる。伝播欠損性ウイルス伝達は、最初期陽性細胞およびCFSE陽性細胞を、Image J Cell Counter プラグイン (Rasband , WS . Image J 2009 . Bethesda , Maryland , USA , U . S . National Institutes of Health . このプログラムは、NCBIにて自由にアクセスできる標準であり (http : // rsbweb . nih . gov / ij /) 、科学出版物において参考として受け入れられている) を用いて計数することにより決定する。CFSE染色細胞、最初期陽性細胞および両方のシグナルを示す細胞を計数した。ウイルス伝達は、最初期陽性 / CFSE染色細胞と最初期陰性 / CFSE染色細胞の間の比率を算出することにより決定した。

10

20

【実施例2】

【0152】

[ウイルスが内皮向性であるかを決定するためのアッセイ]

ここに記載するアッセイは、ウイルスが内皮向性であるかを決定するために用いる。

【0153】

ヒトCMVが内皮向性であるかを決定することについて、初代ヒト線維芽細胞の株化細胞、本発明のHCMVが欠損している関係の遺伝子の生成物を補完する補完株化細胞、およびヒト内皮株化細胞を播き、約0.1のMOIでHCMV野生型または本発明のウイルスに感染させる。感染の24時間後に、最初期染色を、本発明のベータヘルペスウイルスの最初期遺伝子生成物に対するモノクローナル抗体、より具体的にはVirusys Co. から市販で入手可能なCMV IE 1 / 2モノクローナル抗体CH160 (Plachterら、既出) と固定細胞を3% BSA / D - PBS 中でインキュベートすることにより行う。3回のD - PBS 洗浄の後に、細胞を、HCMVのヒト最初期1に対するモノクローナル抗体に対してのAlexa Fluor 555結合2次抗体と、3% BSA / D - PBS 中でインキュベートする。最後に、細胞を3回洗浄し、UV顕微鏡により画像化する。野生型HCMVに感染した細胞を陽性対照として用い、最初期1陽性細胞およびCFSE陽性細胞を、Image J Cell Counter プラグイン (Rasband、既出) を用いて計数する。

30

40

【0154】

マウスCMVが内皮向性であるかを決定することについて、初代マウス線維芽細胞の株化細胞、本発明のMCMVが欠損している関係の遺伝子の生成物を補完する補完性細胞株、およびマウス内皮株化細胞を播き、約0.1のMOIでMCMV野生型または本発明のウイルスに感染させる。感染の24時間後に、最初期染色を、本発明のベータヘルペスウイルスの最初期遺伝子生成物に対するモノクローナル抗体、より具体的にはKeilら (Keilら、既出))において抗体6 / 20 / 1と称されるCroma 101と固定細胞を3% BSA / D - PBS 中でインキュベートすることにより行う。3回のD - PBS 洗浄の後に、細胞を、マウスCMVの最初期1に対するマウスモノクローナル抗体に対してのAlexa Fluor 555結合2次抗体と、3% BSA / D - PBS 中でインキュベ

50

ートする。最後に、細胞を3回洗浄し、UV顕微鏡により画像化する。野生型マウスCMVに感染した細胞を陽性対照として用い、最初期1陽性細胞を、ImageJ Cell Counterプラグイン(Rasband、既出)を用いて計数する。

【実施例3】

【0155】

[材料および方法]

[細胞およびマウス]

マウス胚性線維芽細胞(MEF)に由来する線維芽細胞の株化細胞NIH/3T3およびBALB/cは、Cicin-Sainら(Cicin-Sainら2005 J Virol 79:9492~9502頁)に記載されるようにして培養した。C57BL/6(B6)マウス、B6.SJL-Ptpr^c(Ptpr^c)マウスおよび129.IFN R^{-/-}マウスは、Elevage Janvier(Le Genest Saint Isle、France)、Jackson Laboratories(Bar Harbor、Maine、USA)およびB&K Universal Limited(Grimston、England)からそれぞれ購入した。129.IFN R^{-/-}マウス(Mullerら1994 Science 264:1918~1921頁)は、B6バックグラウンドと戻し交配した(B6.IFN R^{-/-})。T細胞受容体トランスジェニックマウスOT-I(Hogquistら1994 Cell 76:17~27頁)およびOT-II(Barnndenら1998 Immunol Cell Biol 76:34~40頁)は、Ptpr^c(CD45.1)またはThy1.1(CD90.1)コンジェニックマウスとそれぞれ戻し交配した。Alb-cre(Posticら1999 J Biol Chem 274:305~315頁)およびTie2-cre(Constienら2001 Genesis 30:36~44頁)は、B6バックグラウンドで維持した。マウスは、特定の病原体フリーの条件で保持した。動物実験は、Bavaria州の管轄機関(承認番号第55.2-1-54-2531-111-07号)またはUniversity of Rijekaの倫理委員会により承認された。

【0156】

[トランス補完性細胞株NT/M94-7の作製]

条件的トランス補完性細胞株NT/M94-7を、(Lotzgerichら、既出)に従って作製した。簡単に述べると、M94 ORFをpSM3fr(Sacherら2008 Cell Host Microbe 3:263~272頁)から、プライマーHAM94for(配列番号1)およびM94rev(配列番号2)を用いて増幅することにより、N末端にHAタグを導入した。PCR生成物をBamHIおよびXbaIで消化し、BamHI-およびNheI-切断pTRE2Hygベクター(BD Biosciences Clontech、Heidelberg、Germany)に挿入して、HAM94発現(HAM94タンパク質は配列番号31に示す)をテトラサイクリン(tet)誘導性プロモーターの制御下に行うpTRE-HAM94(配列番号22)を得た。pTRE-HAM94を有する安定なNIH/3T3トランスフェクタントを、50 µg/mlハイグロマイシンBを用いて選択した。欠失ウイルスMCMV-M94を、異なるNT/M94細胞クローンにそれぞれのBACをトランスフェクトすることにより再構築した。最も生産性がよく感染されたトランス補完性細胞株NT/M94-7を、限界希釈を用いてサブクロニングした。トランス補完性細胞株を、ブダペスト条約に従って、DSZM、Germanyに、2010年5月5日に寄託した。

【0157】

[組換えウイルスの作製]

組換えマウスCMV(MCMV)変異体は、MCMV細菌人工染色体(BAC)クローンpSM3fr(Smith株(Messerleら1997 Proc Natl Acad Sci USA 94:14759~14763頁)を起源とする)に由来した。ヌクレオチドの位置は、Rawlinsonら(Rawlinsonら、既出)に従っ

て示す。FRTに挟まれたカナマイシン耐性遺伝子(Kan^r)を有するpCP15の1.4キロ塩基対(bp)のSmaI断片を、pCR3(Invitrogen、Basel、Switzerland)のBssHII部位に導入して、pCR3-FRT-Kan^r-FRTを得た。ATG開始コドンおよびloxP部位を含有する断片を、オリゴヌクレオチドATGlox1(配列番号3)とATGlox2(配列番号4)とをアニールすることにより作製した。この断片を、pCR3-FRT-Kan^r-FRTのHCMVのメジャー最初期プロモーター(IEP)とウシ増殖ホルモンのポリAシグナルとの間に位置するEcoRIおよびXhoI部位に挿入して、pCR3-FRT-Kan^r-FRT-ATG-loxPを得た。オボアルブミン遺伝子(ova)を、pBSK-OVA(配列番号21)に含まれるのと同様に、GGAをnt9位の後に導入して合成して、さらなるクローニングのためのBspEI制限部位を得た。Ovaを、pCR3-FRT-Kan^r-FRT-ATG-loxPのBspEIおよびNotIを用いてインフレームで挿入して、IEPの制御下で開始ATGの後にloxP部位が挿入された全長ovaを得て、pCR3-FRT-Kan^r-FRT-ATG-loxP-ovaと命名した。Cre誘導性オボアルブミン(OVA)発現を有する構築物(配列番号24)を得るために、floxstopカセット(Sacherら、既出)を、pCR3-ATG-loxP-ovaのEcoRIおよびBspEI部位に挿入して、pCR3-ATG-flox-stop-ovaを得た。これらの構築物を鋳型として、オリゴヌクレオチド5'-m157-pCR3-FRT-Kan^r-FRT(配列番号5)(nt216243位~216290位)および3'-m157-flox-egfp(配列番号6)(nt216885位~216930位)をプライマーとして用いて、IEP-ovaカセット、FRTに挟まれたKan^rおよびMCMVゲノム標的部位m157に対するウイルス相同配列を含む直鎖状DNA断片を作製した。同様の手順で、ホタルルシフェラーゼ遺伝子(luc)を、IEPの制御下に、FRTに挟まれたKan^rを有するpCP15中にクローニングした。これらの断片を、記載されるようにして(Sacherら、既出)pSM3frのm157中に導入して、pSM3fr-m157-ova、pSM3fr-m157-flox-ovaおよびpSM3fr-m157-lucを得た。FRTに挟まれたKan^rの切り出しのために、FLPリコンビナーゼを、プラスミドpCP20から一過的に発現させた。

【0158】

[伝播欠損性ウイルス変異体の作製]

図1に示すように、大腸菌において、BAC pSM3fr-M94を、tTAトランスアクチベーターカセットをpSM3frに挿入して、そのことによりM94を欠失することにより作製した。トランス補完性細胞株NT/M94-7は、pM94を、Tet誘導性プロモーターの制御下に発現する。pSM3fr-M94のトランスフェクションにより、ウイルスゲノムによるtTAの発現が、細胞によるpM94の発現を誘導し、トランス補完MCMV-M94の生成を導く。このウイルスは、非補完性の最初の標的細胞に感染できる。必須遺伝子M94を欠くので、感染性ウイルス粒子の放出は不可能であるが、最初期(IE)、初期(E)および後期(L)ウイルス遺伝子発現ならびにDNA複製(DNA rep)は生じる。

【0159】

M94配列を欠く組換えMCMVを作製するために、親のMCMV BACであるpSM3fr(MCMV-wt)、pSM3fr-m157-ova(MCMV-ova)およびpSM3fr-m157-rec-egfp(MCMV-m157-rec-egfp)(Sacherら、既出)を、第2突然変異誘発ステップに用いた。よって、pO6ie-F5からの変異体34bp FRT部位で両側を挟まれたKan^rをpO6-tTA(Lotzgerichら、既出)に挿入することによりプラスミドpO6-tTA-mFRT-Kan^r-mFRTを得て、tTAトランス活性化遺伝子を、pM94(配列番号30)のトランス補完に必要なIEPの制御下に発現させた。tTAカセット、Kan^rおよびMCMVゲノム標的部位に対するウイルス相同配列(MCMV上流相同性

： n t 1 3 6 1 8 9 位 ~ 1 3 6 2 3 4 位および M C M V 下流相同性： n t 1 3 7 2 5 6 位 ~ 1 3 7 3 0 9 位) を含む直鎖状 D N A 断片を、プライマー 5' - M 9 4 - p O 6 - t T A (配列番号 7)、プライマー 3' - M 9 4 - p O 6 - t T A (配列番号 8) ならびにプラスミド p O 6 - t T A - m F R T - K a n^r - m F R T を鋳型として用いて作製した。この P C R 断片を、異なる親の p S M 3 f r クローンに挿入して、そのことにより M 9 4 遺伝子を欠失した。M 9 4 および M 9 3 の O R F はオーバーラップするので、4 7 b p の相同性を、M 9 4 の 5' 端に残して M 9 3 O R F をインタクトにしなければならず、1 7 b p の相同性が M 9 4 の以前の 3' 端にまだ存在する。ここでもまた F L P リコンビナーゼを、K a n^r の切り出しのために発現させた。p S M 3 f r - M 9 4、p S M 3 f r - o v a - M 9 4、p S M 3 f r - f l o x - o v a - M 9 4 および p S M 3 f r - m 1 5 7 - r e c - e g f p - M 9 4 の構築を、制限消化分析および配列決定により確認した。

【 0 1 6 0 】

ウイルスを、B A C D N A から再構築し、N T / M 9 4 - 7 補完細胞上で繁殖させ、以前に記載されたようにして (S a c h e r ら、既出)、スクロースクッション上で精製した。ウイルス複製の分析のために、感染細胞からの上清を 2 4 時間ごとに採取した。感染性ウイルスの定量を、N I H / 3 T 3 または補完 N T / M 9 4 - 7 細胞に対して T C I D₅₀ (中央組織培養感染量) 法を用いて行った。i n v i v o ウイルス複製の決定のために、ウイルス量を、標準的ブランクアッセイにより、器官 1 グラムあたりのブランク形成単位 (P F U) として、記載されたようにして (S a c h e r ら、既出) 決定した。M 9 4 欠損変異体 (M C M V - M 9 4、M C M V - o v a - M 9 4、M C M V - f l o x - o v a - M 9 4 および M C M V - m 1 5 7 - r e c - e g f p - M 9 4) の各ウイルスストックの伝播欠損性は、非補完 M E F の感染後にブランク形成がないことにより確認したが、個別の感染細胞の C P E は検出可能であった。伝播欠損性 M C M V - M 9 4 の p S M 3 f r - M 9 4 B A C を含有する大腸菌を、ブダペスト条約の下で D S Z M に 2 0 1 0 年 4 月 2 8 日に D S M 2 3 5 6 1 として寄託した。

【 0 1 6 1 】

[ウイルスの UV 不活性化]

i n v i v o で用いるために、免疫のために用いた M C M V - w t ウイルス調製物の画分を、UV クロスリンカー (S t r a t a g e n e、A m s t e r d a m、N e t h e r l a n d s) 中で 5 c m の距離で 4 にて、1 . 5 k J / c m² の UV 光に曝露することにより不活性化した。ウイルス感染性は、2 . 4 × 1 0⁷ の係数で減少した。同じ処理は、M C M V - m 1 5 7 - r e c - e g f p を異なる線量 (0 . 5、1 . 0 および 1 . 5 k J / c m²) の UV 光に供し、その後、M E F 上で力価決定した場合に、ウイルス遺伝子発現を消失させるのに十分であった。感染後 (p . i .) 4 日後に、ウイルスに低線量 (0 . 5 k J / c m²) の UV を照射した場合、単回感染細胞において E G F P 発現をモニタリングし、E G F P 発現は、強い照射 (1 . 5 k J / c m²) の後に観察されなかった。未処理 M C M V - m 1 5 7 - r e c - e g f p は、E G F P⁺ ブランクを形成した。

【 0 1 6 2 】

[マウスの免疫および攻撃]

8 ~ 1 0 週齢の雌 B 6 マウスを、M C M V - w t または変異体 M C M V のいずれかの腹腔内 (i . p .) または皮下 (s . c .) 注射により免疫した。各マウスは、1 0 0 μ l のウイルス懸濁物を s . c . で、または 3 0 0 μ l を i . p . で受容した。C 5 7 B L / 6 マウスを、1 × 1 0⁵ T C I D₅₀ の M C M V - w t もしくは M C M V - d e l t a M 9 4 で、1 2 9 . I F N R^{- / -} を、2 . 5 × 1 0⁵ T C I D₅₀ の M C M V - d e l t a M 9 4 もしくは UV 照射 M C M V - w t で、そして B 6 . I F N R^{- / -} を、3 × 1 0⁵ T C I D₅₀ の M C M V - M 9 4 もしくは M C M V - w t で免疫した。模擬処置マウスは、同じ容量の P B S を受容した。マウスを追加免疫するために、この手順を 1 4 日 p . i . にて反復した。1 2 週 p . i . のマウスから回収した血清を用いて、ウイ

ルス特異的抗体の量を、以下に記載するウイルス中和アッセイにより決定した。

【0163】

初回抗原刺激の28日または20週間後に、マウスを、 10^6 PFUの組織培養由来MCMV-wtの静脈内(i.v.)注射により攻撃した。攻撃の5日後に、肺、肝臓および脾臓を滅菌条件下で回収し、 -80°C に貯蔵した。器官のホモジネートを、感染性ウイルス量について、MEF細胞上での標準的なブランクアッセイにより分析した。唾液腺由来MCMV(sgMCMV-wt)を、組織培養由来MCMV-wtに感染したマウスからの唾液腺のホモジネートとして、Trgovcichら(Trgovcichら2000 Arch Virol 145:2601~2618頁)に記載されるようにして作製した。単離sgMCMV-wtは、組織培養由来MCMV-wtと比較してビルレンスがより高い(Pilgrimら2007 Exp Mol Pathol 82:269~279頁)。ワクチン接種したB6.IFN R^{-/-}マウスを、 2×10^5 PFUのsgMCMV-wtで攻撃し、129.IFN R^{-/-}マウスを、 2.5×10^5 TCID₅₀組織培養由来MCMV-wtで攻撃した。

【0164】

[ウイルス中和アッセイ]

5匹の免疫化マウス12週p.i.からの熱不活性化血清(56、30分間)をブールし、1:2で、10%(最終濃度)モルモット補体を含有するDMEM中で系列希釈した。各希釈物に、50 PFUのMCMV-lucを混合し、90分間、37にてインキュベートし、その後、NIH/3T3細胞に96ウェルフォーマットで加えた。37にて1時間後に、ウイルス接種物を取り出し、NIH/3T3培養物を加えた。培養物を24時間インキュベートし、ルシフェラーゼ活性を、細胞抽出物において、ルシフェラーゼアッセイ(Promega、Mannheim、Germany)をルミノメータ(Berthold、Bad Wildbad、Germany)中で供給業者および製造業者の使用説明にそれぞれ従って用いて決定した。

【0165】

[In vivo細胞傷害性アッセイ]

CD8⁺T細胞エフェクター機能をin vivoで評価するために、コンジェニックCD45.1⁺ Ptp^{cr}マウスの脾細胞を、2 μMの記載するペプチドとインキュベートし、2 μM、0.7 μMまたは0.1 μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)およびPKH26赤色蛍光細胞リンカーミニキットを製造業者の使用説明(Sigma-Aldrich)に従って用いて染色した。第6日p.i.にて、標識CD45.1⁺細胞を、B6(CD45.2⁺)レシピエントに移入した。16時間後に、レシピエントマウスの脾臓を取り出し、標的細胞のフローサイトメトリー分析を行った。標的細胞の特異的細胞傷害性を、等式： $\% \text{spec 溶解} = (1 - \text{初回攻撃なし比率} / \text{初回攻撃あり比率}) \times 100$ ；比率 = $(\% \text{CFSE low} / \% \text{CFSE high})$ を用いて算出した(Lauterbachら2005 J Gen Virol 86:2401~2410頁)。OVA由来クラスIペプチド(配列番号9)ならびにm139(配列番号10)、ie3(配列番号11)、M57(配列番号12)およびM45(配列番号13)に由来するMCMV特異的ペプチド(Snyderら、2008既出)をMetabion、Germanyから購入し、製造業者のデバイスに従って溶解して貯蔵した。

【0166】

[養子導入およびフローサイトメトリー分析]

OVA特異的CD8⁺T細胞を、コンジェニックCD45.1⁺マウスと戻し交配したOT-I TCRトランスジェニックマウスの脾臓ならびに頸部、腋窩、上腕および鼠径リンパ節から単離した。OT-I細胞を、CD8⁺T細胞単離キット(Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany)によるネガティブ選択により精製した。 3×10^5 のトランスジェニックT細胞を、レシピエントB6マウスに、 10^5 TCID₅₀のMCMVでのi.p.感染の1日前にi.v.注射し

た。移入されたOT-I T細胞の増殖を追跡するために、100 µlの血液を3、6および8日p.i.に採集し、赤血球を溶解し(PharmLyse、BD Biosciences、Heidelberg、Germany)、残りの細胞を、PE-Texas Red結合 - CD8 (5H10; Caltag、Sacramento、CA、USA)およびPE結合 - CD45.1抗体(A20; BD Biosciences Pharmingen)とインキュベートした。フローサイトメトリーによる取得を、Epics XL-MCL(Beckman-Coulter)を用いて行い、データを、FlowJoソフトウェア(Tristar、Ashland、OR、USA)を用いて分析した。

【0167】

OVA特異的CD4⁺T細胞を、コンジェニックCD90.1⁺マウスと戻し交配したOT-II TCRトランスジェニックマウスの脾臓ならびに頸部、腋窩、上腕および鼠径リンパ節から単離した。赤血球の溶解の後に、 3×10^5 トランスジェニックT細胞を、レシピエントマウスに、 10^5 TCID₅₀のMCMVでの感染の1日前にi.v.注射した。脾臓を取り出し、脾細胞を、Fcブロック(2.4G2; BD Biosciences)とインキュベートし、その後、PEコンジュゲート - CD90.1(HIS 51; eBioscience)およびPE-Cy5.5結合 - CD4(RM 4-5; eBioscience)で染色した。フローサイトメトリーによる取得を、FACS Calibur(BD Biosciences)を用いて行い、データを、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。

【0168】

[器官ホモジネート中のウイルスゲノムの定量]

肺を、感染の12カ月後にマウスから取り出した。器官をホモジネートし、DNAを、Qiagen(Hilden、Germany)からのDNeasy血液および組織キットを用いて抽出した。溶出を、100 µlの供給される溶出緩衝液を用いて行い、各試料のゲノムDNA濃度を、2重で、NanoDrop ND-1000 UV-Vis分光光度計を用いて定量した。ウイルスDNAを定量するために、MCMV M54遺伝子に特異的な定量リアルタイムPCR(Ciccin-Sainら、2005既出)を、特異的Taqmanプローブ(配列番号14)およびTaqman1000 RXN PCRコア試薬キットをABI PRISM 7700配列検出器(Applied Biosystems、Carlsbad、CA、USA)で用いて行った。ウイルスゲノムコピー数を算出するために、M54遺伝子を含むBACプラスミドpSM3frの標準曲線を含めた。

【0169】

[統計分析]

統計分析は、GraphPad Prism4(GraphPad Software La Jolla、CA、USA)を用いて行った。ウイルスのin vitro増殖比較、中和抗体アッセイ、リアルタイムPCRおよびT細胞増殖のために、平均を、標準偏差(SD)を用いて算出した。器官におけるウイルス量およびin vivo細胞傷害性を示す全ての図において、中央値を示す。MCMV-wtまたはMCMV-M94をワクチン接種したマウスにおける中和抗体応答の比較を、2元ANOVA検定を用いて行った。器官またはウイルスゲノムにおけるT細胞増殖のパーセンテージおよびウイルスの定量の比較は、ウェブサイト<http://elegans.swmed.edu/~leeson/stats/utest.cgi>を用いる両側Wilcoxon順位和検定を用いて行った。アスタリスクは、統計学的な差を示す(*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

【実施例4】

【0170】

[MCMV-M94は、伝播欠損性である]

HCMVビリオンタンパク質pUL94は、ウイルス複製にとって必須であり(Dun

10

20

30

40

50

nら、既出)、後期速度論で発現される(Wingら、既出)。MCMV相同体であるpM94も必須であり、ウイルス成熟の後核ステップにおいて重要な役割を演じることが見出されている。必須のM94遺伝子生成物をトランス補完し、M94欠失変異体を再構築するために、M94遺伝子をTREプロモーターの制御下に有するNIH/3T3由来補完性細胞株NT/M94-7を作製した。TREプロモーターは、Tetトランスアクチベーター(tTA)の存在下でのみ活性である。tTAをpM94のトランス補完のために提供するために、tTA発現カセットを、pSM3fr(Messlerら、既出)に、M94を破壊して導入してpSM3fr-M94を作製した。MCMV-M94ウイルスを、NT/M94-7細胞をトランスフェクトすることにより再構築した(図1)。

【0171】

本実施例の結果を図2に示す。図2Aにおいて、親のNIH/3T3(丸)およびNT/M94-7線維芽細胞(箱)に、0.1TCID₅₀/細胞にてMCMV-wt(wt;塗りつぶした記号)またはMCMV-M94(M94;塗りつぶしていない記号)を感染させた。記載する日数にて、上清中の感染性ウイルスを、NT/M94-7細胞上でTCID₅₀終点力価決定により定量した。2重の力価決定の平均+/-SDを示す。第5日p.i.にて、上清をMEF上でさらに力価決定した。MCMV-M94に感染したNT/M94-7の1ml上清中でPFUは見出されなかった。p.i.=感染後;DL=検出限界。

【0172】

図2Bに示すように、親のNIH/3T3(下のパネル)およびNT/M94-7(上のパネル)線維芽細胞に、MCMV-m157-rec-egfp-M94を感染させた。記載する時点にて、EGFP発現細胞をモニタリングした。hpi=感染後の時間。

【0173】

図2Cに示すように、129.IFN α - β マウス(MCMV-M94についてn=15、塗りつぶしていない記号;MCMV-wtについてn=8、塗りつぶした記号)に、2.5 \times 10⁵TCID₅₀i.p.を感染させ、生存を30日p.i.にわたって追跡した。

【0174】

MCMV-M94はMCMV-wt様力価をNT/M94-7細胞上で再現したが、感染性ウイルスは、NIH/3T3細胞の上清中で検出できなかった(図2A)。MCMV-M94が上清中に感染性ウイルス粒子を放出できないことは、細胞に付随するウイルスの伝播を排除しないので、増強緑色蛍光タンパク質EGFPを発現するM94変異体(MCMV-m157-rec-egfp-M94)が構築された。MCMV-m157-rec-egfp-M94はNT/M94-7細胞上でMCMV-wtに匹敵する速度論で伝播するが、MCMV-m157-rec-egfp-M94は、最初に感染したNIH/3T3細胞に厳密に限定されたままであった(図2B)。この結果は、内皮細胞においても確認された(図8)。まとめると、M94は必須であり、欠失は、ウイルス放出および細胞間伝播を抑止する。さらに、MCMV-M94は、トランス補完により効果的に生成できる。

【0175】

補完NT/M94-7、親のNIH/3T3線維芽細胞および心筋由来内皮細胞MEHC5-Tに、0.1TCID₅₀/細胞のMCMV-M94-m157-rec-egfp(MCMV-M94)またはMCMV-m157-rec-egfp(wt)を感染させた。記載する時点にてEGFP発現細胞をモニタリングした。尺度バーは100 μ mを表す。

【実施例5】

【0176】

10

20

30

40

50

[M C M V - M 9 4 は、複製能のあるウイルスに復帰しない]

主な安全性の懸念は、調製中 (R o i z m a n ら 1 9 8 2 D e v B i o l S t a n d . 5 2 : 2 8 7 ~ 3 0 4 頁) またはワクチン接種した患者において (I y e r ら 2 0 0 9 A n n . E m e r g . M e d 5 3 : 7 9 2 ~ 7 9 5 頁) ワクチン株が複製能のあるウイルスに復帰することである。M C M V - M 9 4 と補完性細胞株との間で相同配列の組換えにより M 9 4 遺伝子を獲得することを排除するために、ウイルス構築中に相同性を注意深く回避した。欠失ウイルスと N T / M 9 4 - 7 が発現する M 9 4 遺伝子との間の組換えを示す複製能のあるウイルスは、全く観察されなかった。感受性が高いマウス株におけるワクチン接種研究について M C M V - M 9 4 の安全性を調査するために、1 2 9 . I F N R - / - マウスに、M C M V - w t または M C M V - M 9 4 を感染させた。全ての I F N R - / - マウスは M C M V - w t に感染して 1 4 日以内に死亡したが、M C M V - M 9 4 への感染の後に、全てのマウスは、全く体重減少しないかまたは最小限の体重減少を有して生存した (図 2 C)。結論として、M C M V - M 9 4 を安全に生成でき、免疫欠損マウスでさえ M C M V - M 9 4 感染に耐容性であった。

10

【実施例 6】

【0 1 7 7】

[M C M V - M 9 4 は、中和抗体および T 細胞応答を誘導する]

ウイルス侵入を妨げる中和抗体の誘導が乏しいことは、H C M V 感染における問題点である (L a n d i n i ら 1 9 9 1 C o m p I m m u n o l M i c r o b i o l I n f e c t D i s 1 4 : 9 7 ~ 1 0 5 頁)。よって、M C M V - w t および M C M V - M 9 4 に対する中和抗体応答を、免疫後 1 2 週に比較した。血清の系列希釈物を、ルシフェラーゼ発現 M C M V (M C M V - l u c) と混合した後に N I H / 3 T 3 に感染させた。ルシフェラーゼシグナルの低減は、抗血清の中和能力を反映した。M C M V - M 9 4 での免疫は、M C M V - w t を用いるよりもわずかに低い量の中和抗体を誘導したが (図 3 A、 $p < 0.05$)、UV 照射 M C M V - w t での免疫は、中和抗体の誘導を消失させ、発表された観察結果が確認された (G i l l ら、既出)。

20

【0 1 7 8】

本実施例の結果を、図 3 に示す。図 3 A において、B 6 マウスを、i . p . にて 10^5 T C I D ₅₀ の M C M V - w t (w t ; 塗りつぶした丸)、M C M V - M 9 4 (M 9 4 ; 塗りつぶしていない丸) で免疫したかまたは模擬感染させた (P B S ; 灰色の四角)。1 2 週 p . i . にて血液を回収し、血清のウイルス中和能力を、M C M V - l u c を用いて決定した。M C M V - M 9 4 で免疫したマウスの中和抗体レベルは、2 元 A N O V A 検定を用いて、M C M V - w t で免疫したマウスの抗体レベルよりも有意に低かった ($P = 0.04$)。値は、測定した血清プールの平均 + S D を表す。R L U = 相対ルシフェラーゼ単位、B G = バックグラウンド。

30

【0 1 7 9】

図 3 B において、 3×10^5 の O T - I C D 8 ⁺ T 細胞の養子導入の後に (上のパネル)、B 6 マウス (n = 5) に、i . p . にて 10^5 T C I D ₅₀ の M C M V - o v a (w t - o v a ; 塗りつぶしたバー)、M C M V - o v a - M 9 4 (M 9 4 - o v a ; 塗りつぶしていないバー) または P B S (灰色のバー) を感染させた。第 3、6 および 8 日 p . i . にて、コンジェニックマーカー C D 4 5 . 1 および C D 8 についてのフローサイトメトリー分析を血液に対して行った。 3×10^5 の O T - I I C D 4 ⁺ T 細胞の養子導入の後に (下のパネル)、B 6 マウス (n = 5) に、i . p . にて上記のように感染させた。第 3、6 および 8 日 p . i . にて、C D 9 0 . 1 および C D 4 についてのフローサイトメトリー分析を脾細胞に対して行った。各バーは、記載する群の平均 + S D を表す (* *、 $P < 0.01$)。

40

【0 1 8 0】

図 3 C において、B 6 マウス (n = 5) に、i . p . にて 10^5 T C I D ₅₀ の M C M V - w t (w t ; 塗りつぶした記号)、M C M V - M 9 4 (M 9 4 ; 塗りつぶしていない記号) または UV 照射 M C M V - w t (w t U V ; 灰色の記号) を感染させた。第 6

50

日 p . i . にて、i n v i v o 細胞傷害性アッセイを、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (C F S E) で標識した脾細胞および記載するウイルスペプチドを用いて行った。記号は、個別の動物における記載するペプチドに対する特異的溶解活性を表す。横棒は、分析した群の中央値を示す。右のパネルは、フローサイトメトリーデータの例示的なセットを示す。

【 0 1 8 1 】

C D 4 ⁺ および C D 8 ⁺ T 細胞はともに、C M V に対する宿主防御において重要な役割を演じる。抗ウイルス C D 8 ⁺ T 細胞は、急性感染中の M C M V 制御において効果的であり、免疫の後の防御を媒介する (R e d d e h a s e ら、既出)。さらに、C D 4 ⁺ T ヘルパー細胞は、唾液腺におけるウイルスクリアランスのために必要である (J o n j i c ら 1 9 8 9 J E x p M e d 1 6 9 : 1 1 9 9 ~ 1 2 1 2 頁)。M C M V - w t と M C M V - M 9 4 により誘導される C D 4 ⁺ および C D 8 ⁺ T 細胞応答のレベルを比較するために、ワクチンが発現するモデル抗原として O V A を選択した。B 6 マウスに M C M V - o v a および M C M V - o v a - M 9 4 を、O V A 特異的 C D 4 ⁺ または C D 8 ⁺ T 細胞の養子導入の 1 日後に感染させた。M C M V - o v a について、O V A 特異的 C D 4 ⁺ および C D 8 ⁺ T 細胞の発現は、第 6 日 p . i . にてピークになり、発表されたデータと一致した (K a r r e r ら、2 0 0 4 J V i r o l 7 8 : 2 2 5 5 ~ 2 2 6 4 頁)。顕著なことには、M C M V - o v a - M 9 4 も O V A 特異的 C D 8 ⁺ および C D 4 ⁺ (図 3 B) T 細胞の増殖応答を、伝播能のある M C M V - o v a に匹敵する程度まで刺激した。C D 8 ⁺ T 細胞の量は、M C M V - w t を用いてわずかにより高くさえあった (P < 0 . 0 1)。

10

20

【 0 1 8 2 】

この観察結果を、天然 M C M V 抗原について確認した。B 6 マウスに、M C M V - M 9 4 または M C M V - w t を感染させた。6 日 p . i . にて、m 1 3 9、i e 3、M 5 7 または M 4 5 のいずれかに由来するウイルスペプチドを負荷した標的細胞 (S n y d e r ら、2 0 0 8 既出) に注射し、それらの細胞溶解を i n v i v o にて分析した (図 3 C)。M C M V - M 9 4 により誘導される細胞溶解性 C D 8 ⁺ T 細胞応答は、M C M V - w t に匹敵することがわかった。これとは対照的に、UV 照射 M C M V を注射した B 6 マウスは、標的を全く溶解しないかまたは標的の乏しい溶解だけを生じた。M C M V - M 9 4 または M C M V - w t の UV 不活性化も、血清の O V A 特異的 T 細胞増殖およびウイルス中和能力を消失させた。つまり、ウイルス遺伝子発現は、適応免疫応答の誘導に重要であるとみられた。まとめると、伝播欠損性 M C M V は、M C M V - w t に匹敵する免疫応答を誘導した。

30

【 実施例 7 】

【 0 1 8 3 】

[C D 8 ⁺ T 細胞活性化におけるウイルス標的細胞型の役割]

M C M V - M 9 4 に対する強い適応免疫応答は、驚くべきことであった。なぜなら、M C M V - M 9 4 遺伝子発現は、最初の標的細胞に限定されるからである。特異的 T 細胞応答の誘導は、感染細胞および専門の抗原提示細胞による抗原提示に依存する (V i l l a d a n g o s ら 2 0 0 8 I m m u n i t y . 2 9 : 3 5 2 ~ 3 6 1 頁)。効果的な C D 8 ⁺ T 細胞応答の発生における異なる細胞型の感染の貢献度を評価するために、複製欠損 M C M V を、マーカー遺伝子の条件的活性化と組み合わせた (S a c h e r ら、既出)。C r e 媒介組換えの後にのみ O V A を発現する M C M V - f l o x - o v a - M 9 4 を構築した。

40

【 0 1 8 4 】

1 0 ⁵ T C I D ₅₀ の M C M V - f l o x - o v a - M 9 4 (M 9 4 - f l o x - o v a)、M C M V - o v a - M 9 4 (M 9 4 - o v a)、M C M V - w t (w t) または P B S の i . p . 注射の 1 日前に、3 × 1 0 ⁵ のコンジェニック O T - I C D 8 ⁺ T 細胞を、i . v . にて B 6、A l b - c r e および T i e 2 - c r e マウスに移入した。第 6 日 p . i . にて、コンジェニックマーカー C D 4 5 . 1 および C D 8 についての

50

フローサイトメトリー分析を、PBLに対して行った。箱は、3回の独立した実験のプールとしてのCD8⁺細胞あたりのOT-I細胞の比率を表し、25百分位数から75百分位数までの範囲である。直線は、中央値を示す。ひげは、極度の値を示す範囲に広がる。P値は、両側Wilcoxon順位和検定を用いて得た(*、 $P < 0.01$; **、 $P < 0.001$)。結果を図4に示す。

【0185】

内皮細胞(EC)および肝細胞(Hc)は、MCMVが*in vivo*において感染する最初の標的細胞に含まれる(Sacherら、既出)。これらの細胞型がCD8⁺T細胞活性化に貢献するかについて、血管EC(Tie2-cre)またはHc(Alb-cre)においてCreリコンビナーゼを選択的に発現するマウスに感染させることにより取り組んだ。OVA特異的CD8⁺T細胞の養子導入の1日後に、マウスに、 10^5 TCID₅₀の伝播欠損性MCMV-fl ox - ova - M94を感染させた。Hcは、感染の最初の数日間、感染性ウイルスを主に生成し、Creリコンビナーゼによる条件的マーカー遺伝子の活性化において非常に効果的である(Sacherら、既出)。しかし、MCMV感染HcにおけるOVA発現の選択的誘導は、OVA特異的CD8⁺T細胞の弱い増殖だけをもたらした(図4)。これとは対照的に、OVA特異的CD8⁺T細胞の有意に($P < 0.001$)より高い増殖応答が、ECにおけるOVA発現の際に観察された。よって、ECの感染は、Hcの感染よりも、抗ウイルスCD8⁺T細胞応答の誘導により強く貢献する。全ての感染した細胞におけるOVAの発現を導くMCMV - M94 - ovaへのC57BL/6マウスの感染は、ECでの選択的な発現(MCMV - M94 - fl ox - ovaに感染したTie2-creマウス; $P < 0.01$)よりも高い割合のOVA特異的CD8⁺T細胞を誘導するので、さらなる細胞型が、抗原発現およびT細胞刺激に関与するとみられる。さらに、細胞型特異的*in vivo*組換えの後の著しく異なるT細胞応答は、MCMV - M94が細胞から細胞へと伝播できないことを証明する。

【0186】

本実施例に関連する実験の詳細は、実施例3に概説したものに加えて、以下のとおりであり、本実施例の結果は、図5に示す。

【0187】

B6マウス($n = 5$)を、(第1回)s.c.またはi.p.にて 10^5 TCID₅₀のMCMV-wt(wt;塗りつぶした記号)、MCMV - M94(M94;塗りつぶしていない記号)、m01-17+m144-158-MCMV(;灰色の記号)またはPBS(薄い灰色の記号)で免疫した。ウイルス調製物に、記載するように、免疫前にUV照射した(UV)。場合によって、マウスに、(第2回)2週間後に同じ用量、経路およびウイルスを追加免疫した。攻撃感染は、i.v.にて、初回の20(A)または4週間(B)後に 10^6 PFUのMCMV-wtを用いて行った。攻撃の5日後に、ブラークアッセイを行った。水平のバーは、各群の中央値を示す。各記号は、1匹の個体マウスを表す。DL = 検出限界。

【実施例8】

【0188】

[MCMV - M94は、MCMV - wtでの攻撃に対して防御する]

致死攻撃に対するMCMV - M94の防御を試験するために、B6マウスに、伝播欠損性MCMV - M94、弱毒化株 m01-17+m144-158-MCMV(Cicin-Sainら2007 J Virol 81:13825~13834)またはMCMV-wtのいずれかを感染させた。追加感染を、4週間後に同じ用量で行った。初回の20週間後に、マウスを、i.v.にて 10^6 TCID₅₀組織培養由来MCMV-wtで攻撃した。最も顕著なことには、単回免疫用量のMCMV - M94が、MCMV-wt複製を肺において10,000倍、肝臓において1,000倍および脾臓において少なくとも100倍、強く抑制するためにすでに十分であったが、非免疫対照は、試験した全ての器官において高いウイルス量を有した(全て $P < 0.01$;図5A)。概して、

MCMV - M94 ワクチン接種により媒介される防御は、MCMV - wt または m01 - 17 + m144 - 158 - MCMV ワクチン接種に匹敵した (全て $P > 0.05$)。1 回の投与の後にすでに強い防御が達成されたので、追加の効果は検出できなかった。しかし、UV 不活性化 MCMV - wt または UV 不活性化 MCMV - M94 ウイルスを投与した場合に、単回用量の後に弱い防御効果が存在した。UV 不活性化ウイルスを追加攻撃した後にのみ、効果はわずかに改善されたが、単回用量の MCMV - M94 のものよりも低いままであった ($P < 0.05$)。

【0189】

短期間のワクチン接種プロトコールにおいて MCMV - M94 の単回投与の後も強い防御を実現できるかが疑問であった。さらに、2 つの異なる投与経路の影響も試験した。B6 マウスに、i.p. または s.c. のいずれかにて注射し、その後、たった 4 週間後に、MCMV - wt を用いて攻撃感染させた。ここで、MCMV - M94 を用いるワクチン接種は、m01 - 17 + m144 - 158 - MCMV での免疫に匹敵するために、約 100 倍の攻撃ウイルス量の低減を肝臓 ($P < 0.05$)、肺 ($P < 0.01$) および脾臓 ($P < 0.01$; 図 5B) においてもたらした。MCMV - wt ワクチン接種は、1,000 倍の攻撃ウイルス量の低減をもたらした ($P < 0.01$)。全般的に、i.p. または s.c. ワクチン接種経路の間に有意な差はなかったが、s.c. 注射は、脾臓 ($P > 0.05$ 、図 5B) および心臓においてわずかによりよい防御を誘導するとみられた。

10

【0190】

まとめると、伝播欠損性 MCMV - M94 でのワクチン接種は、免疫能のあるマウスを、MCMV - wt での攻撃に対して、単回用量のワクチン接種の後に効果的に防御できた。顕著なことには、MCMV - M94 でのワクチン接種は、長期間のワクチン接種に関して MCMV - wt でのワクチン接種と同様に効果があったが、UV 不活性化ウイルスの使用は、2 回目の投与の後にさえ競争できなかった。

20

【実施例 9】

【0191】

[重度に免疫低下したレシピエントの防御]

I 型インターフェロンは、CMV に対する免疫応答における鍵となるサイトカインであり、それらの受容体の欠失は、重度に免疫低下し、MCMV 感染に対して親のマウス株よりも少なくとも 1,000 倍感受性が高いマウス (IFN $R^{-/-}$) をもたらす (Prestiti ら 1998 J Exp Med 188:577~588 頁)。伝播欠損性 MCMV - M94 は、IFN $R^{-/-}$ マウスにおいて耐容性がよいことが証明されたので (図 2C)、MCMV - M94 が、IFN $R^{-/-}$ マウスでさえ、致死 MCMV - wt 攻撃に対して防御できるかを試験した (図 6A を参照されたい)。B6 . IFN $R^{-/-}$ マウスを、MCMV - M94 または致死用量以下の MCMV - wt で免疫した。両方の群は生存し、MCMV - M94 で免疫したマウスは、著しい体重減少を示さなかったが、MCMV - wt 感染マウスは、およそ 15% 体重が低下した。4 週間後に、マウスを、致死用量のよりビルレントな唾液腺由来 MCMV への感染により攻撃した (実施例 3 に記載されるようにして)。最も著しいことに、MCMV - M94 および MCMV - wt でのワクチン接種はともに防御的であり、全ての動物は生存した (図 6A)。

30

40

【0192】

本実施例の結果を図 6 に示す。

【0193】

図 6A において、B6 . IFN $R^{-/-}$ ($n = 6$) マウスを、i.p. にて 3×10^5 TCID₅₀ の MCMV - wt (wt; 黒色の丸) または MCMV - M94 (M94; 塗りつぶしていない丸) で免疫した。B6 . IFN $R^{-/-}$ (灰色の丸) または B6 (灰色の三角) の対照群は、PBS で処理した。4 週間後に、攻撃感染を、 2×10^5 PFU の唾液腺由来 MCMV (sg MCMV - wt) マウスの i.p. 注射により行

50

い、生存をモニタリングした。

【0194】

図6Bにおいて、 2.5×10^5 TCID₅₀のMCMV-M94 (M94; 塗りつぶしていない丸、 $n=8$) またはUV照射MCMV-wt (wt UV; 塗りつぶした下向きの三角、 $n=8$) で4週間前に免疫した129-IFN R^{-/-}マウスを、致死用量のMCMV-wtで攻撃し(図2Cを参照されたい)、生存をモニタリングした。10倍高い用量のMCMV-wtを、MCMV-M94で免疫したマウス($n=7$)に投与した(塗りつぶしていない三角)。

【0195】

B6マウスは、ナチュラルキラー細胞のLy49H依存性活性化により利益を受け、m157によりコードされるMCMVタンパク質により刺激される強い自然免疫応答が得られる(Sunら2008, J. Exp. Med. 205: 1819~1828頁)。129-IFN R^{-/-}マウスは、Ly49Hを発現せず、B6-IFN R^{-/-}マウスよりもMCMV感染に対してさらに感受性が高い。129-IFN R^{-/-}マウスに、MCMV-M94をワクチン接種し、 2.5×10^5 TCID₅₀の用量の組織培養由来MCMV-wtで4週間後に攻撃した(図6B)。以前のデータと一致して(Cicin-Sainら2007既出)、UV不活性化ウイルスでのワクチン接種は、部分的防御だけを媒介し、死亡を短期間遅らせることができた。MCMV-M94をワクチン接種したマウスは、 2.5×10^6 TCID₅₀の用量の致死攻撃でも生存した。まとめると、MCMV-M94でのワクチン接種は、感受性が高い免疫低下マウスでさえ、致死MCMV攻撃に対して防御できる。

【実施例10】

【0196】

[MCMV-M94ゲノムのin vivoでの維持]

弱毒化生ワクチンの使用に対するある議論は、再活性化の危険性を有する潜伏感染を確立するそれらの能力である(Iyerら、既出)。他方、非増殖性再活性化エピソードは、抗ウイルス免疫応答の内因的上昇をもたらし得る(Snyderら2008, Immunity 29: 650~659頁)。よって、MCMV-M94ゲノムが、ワクチン接種した宿主において維持されるかを試験することに興味があった。CMV疾患の鍵となる徴候部位である(Balthesenら1993, J. Virol 67: 5360~5366頁)肺から抽出したトータルDNAに対する定量PCR分析を行った。12カ月p.i.にて、MCMV-M94のゲノムを、試験した全てのマウスにおいて検出でき(図7AおよびB)、このことは、MCMV-M94のゲノムが維持されたことを示した。興味深いことに、MCMV-M94およびMCMV-wtへの感染の1年後に肺で検出されたゲノム数は、有意な差がなかった($P>0.05$)。この知見は、最初の標的細胞の少なくともいくらかは、ウイルスにより誘導される細胞死または免疫応答による排除によって感染後に失われないことを証明した。まとめると、これらのデータは、ウイルス伝播が、長期間のゲノム維持のために必要でなく、MCMV-M94の最初の標的細胞が、より持続的な免疫応答に貢献できることについての最初の証拠ももたらす。

【0197】

本実施例の結果を図7に示す。

【0198】

B6マウスに、i.p.にて 10^5 TCID₅₀のMCMV-wt (wt) ($n=5$) またはMCMV-M94 (M94) ($n=6$) を感染させた。12カ月p.i.にて、トータルDNAを肺から抽出した。(図7A) PCR分析を行って、ポリメラーゼ遺伝子M54の特異的246bp断片を得た。対照として、 10^5 TCID₅₀のMCMV-wt (wt 急性) ($n=5$)、PBS (1)、鑄型なし (2) またはBACプラスミドpSM3fr (3) への感染の5日後の肺からのDNAを用いた。(図7B) 定量リアルタイムPCR分析を行い、ウイルスM54遺伝子コピーを、1μgのゲノムDNAあたり算出した。各記号は、1匹の個体マウスを表す。水平なバーは、各群の中央値を示す。M C

MV - wt (wt) および MCMV - M94 (M94) のゲノムコピー数は、有意な差がない ($P > 0.05$)。両方の群は、急性感染肺 (wt 急性) と比較して有意に異なる (**、 $P < 0.01$)。MW = 分子量マーカー；DL = 検出限界。

【0199】

(図7Cおよび図7D) B6マウス ($n = 5$) を、i.p. にて 10^5 TCID₅₀ の MCMV - wt (wt；塗りつぶした記号)、MCMV - M94 (M94；塗りつぶしていない記号)、m01 - 17 + m144 - 158 - MCMV (；灰色の記号) または PBS (薄い灰色の記号) で免疫した。ウイルス調製物に、記載するように、免疫前に UV 照射した (UV)。攻撃感染を、i.v. にて、初回の1年後に 10^6 PFU の MCMV - wt を用いて行った。ブランクアッセイを (図7C) 攻撃の5日後に肺を用い、(図7D) 攻撃の14日後に唾液腺 (SG) を用いて行った。水平のバーは、各群の中央値を示す。各記号は、1匹の個体マウスを表す。DL = 検出限界。

10

【実施例11】

【0200】

[MCMV - M94でのワクチン接種は、気道でのウイルス複製を妨げる]

疫学的研究から、唾液が、HCMVの伝達の重要な経路であることが示唆された (Passら1986 N. Engl. J. Med. 314: 1414~1418頁)。ワクチン MCMV - M94 が唾液腺および肺におけるウイルス複製を遮断できるかを試験するために、C57BL/6マウスを、MCMV - M94 または対照ウイルスで免疫し、12カ月後に、 10^6 PFU の MCMV - wt での攻撃感染を i.v. で与えた (図7CおよびD)。MCMV - M94 の単回投与は、6匹の動物のうち4匹において、肺で1,000を超える係数で攻撃ウイルス複製を抑制するために十分であった (図7C)。さらに、攻撃ウイルスは、攻撃の14日後に唾液腺から単離できなかった (図7D)。このことは、唾液を介して気道からウイルスが出てくることおよびそれによるこの経路による水平伝達が、伝播欠損性 MCMV でのワクチン接種により抑止されることを意味する。

20

【実施例12】

【0201】

[考察]

本明細書において、伝播欠損性ワクチンを用いるベータヘルペスウイルスに対するワクチン接種について報告する。このワクチンは、MCMV - wt に匹敵する強い適応免疫応答を誘導し、高度に免疫低下したマウスにおいてさえ防御を授けた。このことは、最初の標的細胞の感染が、ワクチン接種の成功にとって十分であることを意味する。

30

【0202】

インタクトな免疫系は、通常、HCMV疾患に対して防御する。よって、野生型ウイルスの抗原性能力は、防御免疫応答の誘導のために十分である。UV不活性化ウイルスが攻撃感染に対して効果的に防御できないことは、非構造的抗原を含むウイルス抗原発現の必要性を実証した (Cicin-Sainら2007既出；Gillら2000 J. Med. Virol. 62: 127~139頁)。その結果、理想的なワクチンは、野生型ウイルスの完全な免疫原性の能力を活用するが、病原性の能力を回避すべきである。

40

【0203】

アルファ - ヘルペスウイルスの分野は、複製欠損ウイルスをワクチンとして用いることにより開拓されてきた (Dudekら、既出)。これらのワクチンは、ウイルス複製のために必須の遺伝子の欠失により作製され、よって、非病原性である (Dudekら、既出)。今回、伝播欠損性ベータヘルペスウイルスワクチンを構築するために、M94の欠失が、以下の理由により選択された。まず、M94は、MCMVの伝播のために必須であり、HCMVの研究から推測して、ウイルス複製の後期速度論に従って発現されるはずである (Scottら、既出；Wingら、既出)。次に、pM94は、HCMVの中和抗体応答についての主要な標的を含む糖タンパク質の群に属さない。第3に、MCMVのM94は、ヒト病原体への翻訳を原則的に可能にするヒトCMVにおけるUL94の相同体である (Wingら、既出)。最後に、HCMVのUL94の欠失は、pUL94が全身性

50

硬化症に関連する自己反応性抗体を誘導するので、より有利であり得る (Lunardi ら 2000 Nat Med 6: 1183 ~ 1186 頁)。SSc 交差反応性 UL94 ペプチドを配列番号 28 に示す。興味深いことに、伝播欠損性 MCMV - M94 のゲノムは、i.p. 感染後の肺において検出され、ウイルスが、遊離の粒子として (Hsu ら 2009 J Gen Virol 90: 33 ~ 43 頁) または細胞に付随して広まることを示す。単球およびマクロファージは、感染後の腹腔に誘引され、ウイルスを血液中に輸送することが示された (Stoddart ら 1994 J Virol 68: 6243 ~ 6253 頁; van der Straete ら 2003 J Virol 77: 11274 ~ 11278 頁)。これらの細胞は、離れた部位にてウイルスを放出して、EC または他の細胞型に感染することもできた (トランス感染と呼ばれるプロセス) (Halary ら 2002 Immunity 17: 653 ~ 664 頁)。

10

【0204】

本明細書に示す伝播欠損性ベータヘルペスウイルスワクチンは、野生型 CMV 感染に類似する強い防御能力を有する。ワクチンの免疫応答は、全ての分析した器官においてウイルス複製を制御して、顕性 CMV 疾患を妨げる。長期間ワクチン接種したマウスの唾液腺において攻撃の 2 週間後に検出可能な量の感染性ウイルスが存在しなかったことは、唾液を介する他の個体への水平伝達も抑止されることを意味する。このことにより、このような等価なワクチンが、予め存在する感染の防御効果と同様に、HCMV 疾患に対して防御する可能性が高い。このことは、HCMV に曝露された女性が、非感染女性と比較して、徴候となる疾患を有する小児を生む危険性がより低かったという観察結果により支持される (Fowler ら 2003 JAMA 289: 1008 ~ 1011 頁)。母体が血清陽性であることは、感染を妨げることはできなかったが、小児の発病を妨げることができた。さらに、異なる CMV 株に頻繁に曝露されることは、再感染に対する免疫をさらに増加できた (Adler ら、既出)。よって、ここでもまた、伝播欠損性ヒト CMV ワクチンが、徴候となるヒト CMV 感染に対して防御する自然感染に等しい免疫応答を、再活性化および発病の危険性なしで誘導する可能性が高い。

20

【0205】

MCMV - M94 に対する免疫応答は、MCMV - wt に匹敵するレベルに達した。防御は、32 のウイルス遺伝子を欠くが、in vitro で伝播欠損性でない最近作製されたワクチン m01 - 17 + m144 - 158 - MCMV (Cicin-Sain ら 2007 既出) と同様であった。m01 - 17 + m144 - 158 - MCMV において、免疫回避遺伝子は、抗ウイルス免疫応答を増加させ、よって、ウイルスを弱毒化するために欠失されている (Scalzo ら 2007 Immunol Cell Biol 85: 46 ~ 54 頁)。

30

【0206】

(a) 少なくとも 1 つの必須遺伝子と (b) 少なくとも 1 つの免疫回避遺伝子が欠失されていることが本発明の実施形態の範囲内であり、ここで、欠失される少なくとも 1 つの免疫回避遺伝子が、抗原提示、サイトカインとの相互作用、補完系および体液性免疫に影響する遺伝子生成物をコードする遺伝子を含む群から選択されることが好ましい。より好ましくは、欠失される少なくとも 1 つの免疫回避遺伝子は、MHC I を下方制御して CTL 応答を回避する遺伝子生成物、NK 細胞応答を回避する遺伝子生成物、MHC II 提示に干渉し、接着分子を下方制御する遺伝子生成物、IL - 1 と相互作用する遺伝子生成物、TGF - を活性化する遺伝子生成物をコードする遺伝子を含む群から選択される。

40

【0207】

感受性 IFN γ マウスの伝播欠損性 MCMV への感染は、ワクチン接種コンセプトの安全性を証明した。さらに、IFN γ マウスは、本来なら致死の攻撃に対して、その他の感染モデルと同様に防御された (Calvo-Pinilla ら 2009 PLoS One, 4: e5171; Paran ら 2009 J Infect Dis 199: 39 ~ 48 頁)。最近の研究は、I 型インターフェロンを効果的に誘導

50

するMCMVの能力について明らかにしているが(Hokeness - Antonelliら2007 J Immunol 179:6176~6183頁)、IFN R^{-/-}マウスにおける伝播欠損性MCMVワクチンの効力は、I型インターフェロン依存性免疫が、短期間のワクチン接種により授けられる防御において必須でないことを意味する。

【0208】

興味深いことに、伝播欠損性MCMVは、適応免疫応答を、MCMV-wtと同様の効率で誘導した。CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答は、MCMV-wtと同じレベルであり、中和抗体応答は、わずかに低減されただけであった。このわずかにより低い中和能力は、感染細胞の数がより少ないことおよびそれによりMCMV-M94での感染後に放出される抗原の量が低減されたことを原因とする可能性がある。より少数の抗原-抗体複合体は、あまり効果的でない親和性成熟を導き、より低い中和能力の抗体を創出する可能性がある。それにもかかわらず、ウイルスの中和は、ウイルス複製を制御するために十分であるとみられる。

【0209】

なぜ、ワクチンに対する適応免疫応答は、伝播不能性にもかかわらずMCMV-wt感染に近いレベルに達したのか？MCMV-M94は、ウイルスゲノム維持を、MCMV-wtと同様に効果的に確立できた。ヘルペスウイルス潜伏感染の伝統的な定義は、後続の感染性ウイルスの放出を有する再活性化遺伝子発現の能力を含む(Roizmanら1987 Annu Rev Microbiol 41:543~571頁)。用語「潜伏感染」は、増殖性感染がないMCMV-M94での状況に形式的に当てはめることはできないが、pM94が遺伝子発現の再活性化に影響するという証拠は存在しない。MCMV-M94の防御効果は、時間経過とともに衰えるよりもむしろ増加したので、本発明者らは、遺伝子発現の再活性化による免疫応答の周期的な再刺激が、MCMV-M94により誘導される持続的な防御に貢献したと考える。興味深いことに、ウイルスに感染した細胞は、活性化された免疫応答により排除されない。このことは、伝播欠損性ワクチンに感染した最初の標的細胞が、排除に対して耐性であることを意味する。同様に、ガンマヘルペスウイルスMHV-68の伝播欠損性変異体に感染した細胞は、適応免疫応答により攻撃されなかった(Tibbettsら2006 Virology 353:210~219頁)。MCMV-wtについて、T細胞が、専門のAPCにより提示されるM45の抗原性が高いウイルスエピトープに対して活性化されたが、活性化されたT細胞は、C57BL/6マウスの器官において感染した標的細胞を排除しなかったことが示された(Holtappelsら2004 J Exp Med 199:131~136頁)。この防御は、MHCクラスIを下方調節することが知られているm152により引き起こされた。CD8⁺T細胞排除から防御された標的細胞は同定されず、これらの防御された細胞の少なくともいくつかは、MCMVの最初の標的細胞であることを示すことができた。

【0210】

内皮細胞(EC)、肝細胞(Hc)およびマクロファージは、HCMVおよびMCMVについてin vivoでの最初の標的細胞である(Hsuら、既出;Sacherら、既出)。さらに、ECは、ウイルス潜伏感染の部位として最近同定され(Seckertら2009 J Virol 83:8869~8884頁)、少なくとも肝臓ECは、細胞傷害性T細胞応答を直接刺激できる(Kernら2010 Gastroenterology 138(1):336~46頁)。MCMV-M94構築物を条件的遺伝子発現のために用いて、CD8⁺T細胞応答を活性化するECおよびHcの能力において実質的な差が認められた。ECとは対照的に、急性感染中のMCMVによる最も重要な最初の標的の1つであるHc(Sacherら、既出)は、乏しいCD8⁺T細胞応答だけを誘導した。この刺激能力の欠如は、明らかに、専門の抗原提示細胞による交差提示により補償されない。交差提示は、単サイクルMCMVに感染した線維芽細胞に対するT細胞応答の誘導のために重要であること示された(Snyderら2010 PLoS On

e . 5 : e 9 6 8 1) 。 他方、重要な交差提示細胞であると考えられる骨髓由来 APC は、MCMV 感染に対する交差提示による CD 8 + T 細胞応答の活性化に必要でないと思われる (K e r n ら、既出) 。ほとんどの感染細胞における抗原発現が感染 EC のみにおける発現よりも強い T 細胞応答を導いたので、EC に加えて、その他の細胞型も CD 8 + T 細胞刺激に貢献するとみられる。感染樹状細胞およびマクロファージは、MCMV に対する T 細胞応答を *in vitro* にて活性化すると記載され (M a t h y s ら 2 0 0 3 J I n f e c t D i s 1 8 7 : 9 8 8 ~ 9 9 9 頁) 、 *in vivo* で感染する (A n d r e w s ら 2 0 0 1 N a t I m m u n o l 2 : 1 0 7 7 ~ 1 0 8 4) 。よって、このこと自体が、感染した専門 APC が、EC に加えて、MCMV に対する免疫刺激に貢献することを示唆する。免疫原性の 2 0 倍の低減および免疫防御を授けることができないことを特徴とする (A d l e r ら、既出) T o w n e および A D 1 6 9 のような弱毒化ヒト CMV 株が、変異を蓄積し、EC、上皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージに感染できなくなった (H a h n , G . ら 2 0 0 4 J V i r o l 7 8 : 1 0 0 2 3 ~ 1 0 0 3 3 頁) ことは、注目すべきことであるとみられる。よって、制限された細胞向性は、実際に、ヒト CMV ワクチンとしてそれらが失敗したことの原因である可能性が高い。

10

【実施例 13】

【0211】

[MCMV - M94 の伝播アッセイ]

MCMV - M94 の表現型を、細胞間伝播において分析した。このことは、以下の改変を有する本明細書の実施例 1 に本質的に記載したような *in vitro* 伝播アッセイにより調査した。

20

【0212】

本実施例の結果を図 9 に示す。

【0213】

NIH / 3 T 3 および NT / M94 - 7 細胞を播き、MCMV 1 - 16 - FRT (d e l 1 - 1 6) および MCMV M94 t T A () に 0 . 2 5 の MOI にて 1 時間感染させ、次いで、D - PBS で 2 回洗浄した。細胞を 6 時間インキュベートし、その後、D - PBS で 4 回洗浄した。同数の非感染細胞を、5 μ M カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) で 8 分間染色し、2 % FCS / D - PBS でブロックし、2 % FCS / D - PBS で 2 回洗浄し、その後、未染色であるが感染した細胞の上に播種した。細胞を、感染の 4 8 時間後に 4 % PFA を用いて D - PBS 中で 1 0 分間、3 7 にて固定し、洗浄し、0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 を 1 0 分間用いて透過にした。3 回の洗浄後、細胞を、3 % BSA / D - PBS で 1 時間ブロックした。最初期遺伝子生成物の染色を、MCMV 最初期 1 に対するモノクローナル抗体と固定細胞を 3 % BSA / D - PBS 中でインキュベートすることにより行った。3 回の D - PBS 洗浄の後に、細胞を、A l e x a F l u o r 5 5 5 結合抗マウス 2 次抗体 (I n v i t r o g e n) と 3 % BSA / D - PBS 中でインキュベートした。最後に、細胞を 3 回洗浄し、LSM 5 1 0 M e t a (Z e i s s) を用いて共焦顕微鏡により画像化した。ウイルス伝達は、最初期 1 陽性細胞および CFSE 陽性細胞を、I m a g e J C e l l C o u n t e r プラグインを用いて計数することにより決定した。

30

40

【0214】

図 9 は、MCMV 1 - 16 - FRT (M o h r C A ら、E n g i n e e r i n g o f c y t o m e g a l o v i r u s g e n o m e s f o r r e c o m b i n a n t l i v e h e r p e s v i r u s v a c c i n e s ; I n t J M e d M i c r o b i o l . 2 0 0 8 年 1 月 ; 2 9 8 (1 ~ 2) : 1 1 5 ~ 2 5 頁。E p u b 2 0 0 7 年 8 月 1 6 日、概説) および MCMV - M94 への NIH / 3 T 3 および NT / M94 - 7 (NTM94) 細胞の感染と、感染後の多数回の洗浄による過剰ウイルスの除去を示す。次に、CFSE 染色 NIH / 3 T 3 を加え、ウイルス複製を可能にした。さらに 4 8 時間後に、培養物を固定し、最初期 1 について染色した。このことにより、最初期 1

50

陽性、C F S E 陽性または両方の染色について陽性の細胞が得られた（図 9 A）。染色された細胞を計数し、細胞間伝播を、最初期 1 陽性 / C F S E 染色細胞と最初期 1 陽性 / C F S E 陰性細胞の間の比率を算出することにより決定した（図 9 C）。M C M V 1 - 1 6 - F R T の伝播率を 1 0 0 % とした。M C M V 1 - 1 6 - F R T 感染は、多数の二重染色された核により示されるように、細胞培養物全体に迅速に伝播した（図 9 B）。これとは対照的に、M 9 4 欠失変異体は、新しく加えた細胞に感染しなかった。1 つだけの二重染色された核が、4 1 6 の最初期 1 + / C F S E 陰性細胞を計数した後にみられた。新鮮な細胞に感染するその能力は、しかし、補完 N T / M 9 4 - 7 細胞上で変異体が成長したときに 9 7 % の伝達率まで回復した。よって、このことは、マウス C M V の 2 次エンベロープ化に対する M 9 4 欠失の影響も、細胞間伝播の欠損をもたらしたことの証拠になる。

10

【実施例 1 4】

【0 2 1 5】

[伝播欠損性ヒト C M V の繁殖]

[トランス補完性細胞株 T C L 9 4 / 9 9 - B P の作製]

a) E G F P と結合した U L 9 9 (p C B - U b i c - U L 9 9 - I R E S - g f p ; 配列番号 1 8 によりコードされる) と、b) U L 9 4 m C h e r r y と結合した U L 9 9 (p C B - U b i c - U L 9 4 - I R E S - m C h e ; 配列番号 1 7 によりコードされる) と、c) ピューロマイシン耐性遺伝子と結合したベータ - ラクタマーゼ (p L V - U b i q c - B L A s - I R E S - P u r o ; 配列番号 1 9 によりコードされる) とを発現する組換えレンチウイルスを構築し、S i r i o n G m b H により V i r a P o w e r レンチウイルスパッケージングミックス (I n v i t r o g e n) を 2 9 3 F T 細胞 (I n v i t r o g e n) において用いて繁殖させた。2 × 1 0 ⁶ の M R C 5 線維芽細胞 (A T C C C C L - 1 7 1) に、5 T D U / 細胞 (形質導入単位 / 細胞) の各レンチウイルスを、製造業者のプロトコールに従ってスピン感染により形質導入した。形質導入細胞を、1 0 c m の皿に播き、O P T I - M E M 5 % F C S 中の 2 0 μ g / m l ピューロマイシンを用いて 5 日間選択した。形質導入細胞を 2 0 μ g / m l のピューロマイシンの存在下で 1 回継代し (1 : 2)、二重陽性 (m C h e r r y + E G F P) 細胞を、蛍光関連細胞選別により精製し、2 . 5 × 1 0 ⁴ 細胞 / c m ² の密度で再び播いた。集密の 4 8 時間後に、細胞を 2 0 μ g / m l のピューロマイシンの存在下でさらに 2 回継代し (1 : 5)、上記のようにして再選別した。O P T I - M E M 5 % F C S + 2 0 μ g / m l のピューロマイシン中でさらに 1 回継代した後に、細胞を 0 . 7 × 1 0 ⁷ 細胞 / バイアルに分割し、1 0 % F C S および 1 0 % D M S O を補った O P T I - M E M 中で急速冷凍した。

20

30

【0 2 1 6】

[伝播欠損性ヒト C M V の構築]

非機能的 U L 9 4 遺伝子座を作製するために、p T B 4 0 E - B A C 4 - F R T ; 配列番号 2 0 (S c r i v a n o L ら、2 0 1 1 . H C M V s p r e a d a n d c e l l t r o p i s m a r e d e t e r m i n e d b y d i s t i n c t v i r u s p o p u l a t i o n s . P L o S . P a t h o g . 7 : e 1 0 0 1 2 5 6 ; S i n z g e r , C . ら、2 0 0 8 . C l o n i n g a n d s e q u e n c i n g o f a h i g h l y p r o d u c t i v e , e n d o t h e l i o t r o p i c v i r u s s t r a i n d e r i v e d f r o m h u m a n c y t o m e g a l o v i r u s T B 4 0 / E . J . G e n . V i r o l . 8 9 : 3 5 9 ~ 3 6 8 頁) を G S 1 7 8 3 大腸菌株 (T i s c h e r , B . K . ら、2 0 1 0 . E n p a s s a n t m u t a g e n e s i s : a t w o s t e p m a r k e r l e s s r e d r e c o m b i n a t i o n s y s t e m . M e t h o d s M o l . B i o l . 6 3 4 : 4 2 1 ~ 4 3 0 頁) に導入した。(a) R e d 組換えを、合成 DNA 断片 L I F d e l 9 4 ; 配列番号 1 5 を標準的なプロトコール (T i s c h e r , B . K . ら、既出) に従って電氣的形質転換することにより誘導して、p T B 4 0 E - B A C 4 - d e l U L 9 4 - S Z e o を得た。2 5 μ g / m l クロラムフェニコールおよび 3 0 μ g / m l ゼオ

40

50

シンの存在下でLB寒天プレート上に形質転換体を播いた後に単独クローンを採取することにより、組換え体を選択した。配列番号20を参照してnt122630から123668までのBAC配列がLIFdelUL94、配列番号15で正しく置き換えられたことを、制限パターン分析および配列決定により確認した。(b)ゼオシンカセットをUL94遺伝子座から除くために、2回目のRed組換えを、pTB40E-BAC4-delUL94-Szeoの液体培養物中で、標準的なプロトコール(Tischer, B. K.ら、既出)に従って、25 μ g/mlクロラムフェニコールおよび2%のL-アラビノースの存在下で誘導した。25 μ g/mlクロラムフェニコール1%のL-アラビノースの存在下でLB寒天プレート上に組換え体を播いた後に単独クローンを採取することにより、新造pTB40E-BAC4-del94である組換え体を選択した。作動配列の正しい除去は、制限パターン分析および配列決定により確認した。(c)次のred組換えを、合成突然変異誘発断片LIFdel99、配列番号16の上記のような(この項のa)を参照されたい)電気的形質転換により誘導して、pTB40E-BAC4-delUL94-del99-Szeoを得た。25 μ g/mlクロラムフェニコールおよび30 μ g/mlゼオシンの存在下でLB寒天プレート上に形質転換体を播いた後に単独クローンを採取することにより、組換え体を選択した。nt130670から131243まで(本明細書において配列番号20というBACの番号付けに従う)の配列の正しい置き換えを、制限パターン分析および配列決定により確認した。(d)ゼオシンカセットをUL99遺伝子座から除くために、最後の回のred組換えを、pTB40E-BAC4-delUL94-delUL99-Szeoの液体培養物中で、上記のようにして誘導した(この項のb)を参照されたい)。25 μ g/mlクロラムフェニコール1%のL-アラビノースの存在下でLB寒天プレート上に形質転換体を播いた後に単独クローンを採取することにより、新造pTB40E-BAC4-del94-del99である組換え体を選択した。UL99遺伝子座からの作動配列の正しい除去は、制限パターン分析および配列決定により確認した。1.新しい様式でのBAC改変の説明は、次のとおりである。

【0217】

M1)非機能的UL94を作製する(またはUL94遺伝子を不活性化する)ために、nt122630とnt123668との間のpTB40E-BAC4-FRT(配列番号20)のnt配列を、合成断片delUL94S(配列番号34)で置き換える。

【0218】

M2)非機能的UL99を作製する(またはUL99遺伝子を不活性化する)ために、nt130670とnt131243との間のpTB40E-BAC4-FRT(配列番号20)のnt配列を、合成断片delUL99S(配列番号35)で置き換える。UL94-UL99の二重変異体のために、このことは、M1の改変に加えて行わなければならない。

【0219】

M3)非機能的UL50を作製する(またはUL50遺伝子を不活性化する)ために、nt58442とnt59622との間のpTB40E-BAC4-FRT(配列番号20)のnt配列を、合成断片delUL50S(配列番号32)で置き換える。

【0220】

M4)非機能的UL53を作製する(またはUL53遺伝子を不活性化する)ために、nt62129とnt63261との間のpTB40E-BAC4-FRT(配列番号20)のnt配列を、合成断片delUL53S(配列番号33)で置き換える。UL50-UL53の二重変異体のために、このことは、M3の改変に加えて行わなければならない。

【0221】

[伝播欠損性ヒトCMVの再構築]

0.7 \times 10⁷凍結TCL94/99-BP細胞を、0.2 μ g/mlピューロマイシンを含有するOPTI-MEM 5%FCS中で10cmの皿に播き、2日後に、接着細胞を剥がし、6cmの皿に、皿あたり2 \times 10⁶細胞の密度で播いた。次の日に、2枚の

6 cm培養物に、2 µgの精製pTB40E-BAC4-FRT-del94-del99-DNAをそれぞれ、Lipofectamin2000 (Invitrogen)により、製造業者のプロトコールに従ってトランスフェクトした。24時間後に、2枚の培養物を併せ、OPTI-MEM 5%FCS中で10 cmの皿に播いた。10日後に、組換えTB40E-BAC4-FRT-del94-del99ウイルスの再構築が、プラークの形成により示された。トランスフェクトされた培養物中のほとんどの細胞がCPEを示した14~16日後に、培養物全体を採集した。生存ウイルスの量を、Mohrら (Mohr, C. A.ら、2010. A spread-deficient cytomegalovirus for assessment of first-target cells in vaccination. *Virology*, 2010年8月; 84 (15): 7730~42頁。Epub 2010年5月12日)に記載されるTCID50 (中央組織培養感染量)法を用いて、96ウェルプレート中で、集密以下のTC94/99-BP細胞上での限界希釈により決定した。TB40E-BAC4-FRTdel94-99から再構築した伝播欠損性ヒトCMVは、細胞あたり0.1 MOIで感染した後のTC94/99-BP細胞を用い、Scrivanoら (Scrivanoら、既出)に記載されるヒトCMVの繁殖のための標準的なプロトコールを用いて繁殖できる。

10

【0222】

2次エンベロープ化複合体、すなわちUL99およびUL94を欠くHCMVは、伝播欠損性である。

20

【0223】

TB40E-BAC4-FRTdel94-99から再構築したUL94-UL99二重欠失CMVの表現型を、細胞間伝播において試験した。このことは、TB40E-BAC4-FRT-del94-del99およびTB40E-BAC4-FRTからそれぞれ再構築したCMVに、本明細書の実施例1に本質的に記載するようにして、MRC5およびTC94/99-BP細胞を感染させ、その後、過剰のウイルスを、感染後の多数回の洗浄により除去することにより調べた。次に、CFSE染色MRC5細胞を加え、ウイルス複製を可能にした。さらに72時間後に、培養物を固定し、最初期1発現について本明細書の実施例1に記載するようにして染色した。このことにより、「最初期1」陽性、CFSE陽性または両方の染色について陽性の細胞が得られた。これらの細胞を、各調製物について計数した。TB40E-BAC4-FRT-del94-del99に感染した後のMRC5において二重陽性細胞の増加がないことは、細胞間伝播の欠損の決め手である。

30

【実施例15】

【0224】

[伝播欠損性ヒトCMVでの免疫化]

伝播欠損性ヒトCMVを用いる初回免疫および追加免疫の後に、ヒト血清は、内皮細胞または上皮細胞 (例えばそれぞれHUVEC [ATCC CRL1730]またはARPE-19 [ATCC CRL2302])においてアッセイして、ヒト線維芽細胞株化細胞 (例えばMRC5、ATCC CLL-171)においてアッセイした同じウイルスに対するよりも、TB40EまたはVR1814のような内皮向性ヒトCMV株に対して少なくとも64倍高い中和効力を示す。さらに、UL130、UL128またはUL131Aの遺伝子生成物に対して (ここでは、少なくとも1つの特異性が見られれば十分である)、ウェスタンブロットにより特異的抗体応答を検出できる。

40

【0225】

記載した遺伝子の以下の欠失は、伝播欠損性である組換えヒトベータヘルペスウイルスをもたらす。

【0226】

【表 2】

エフェクター複合体	UL50遺伝子	UL53遺伝子	UL94遺伝子	UL99遺伝子
NEC	+			
NEC		+		
NEC	+	+		
SEC			+	
SEC			+	+

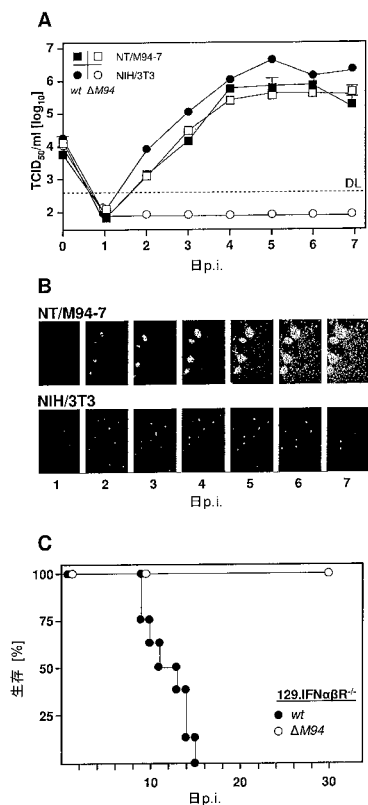
10

【0227】

本明細書、特許請求の範囲、配列表および／または図面に開示する本発明の特徴は、別々にでもそれらの任意の組み合わせにおいても、本発明を様々な形態で実現するために実質的である。配列表が、本明細書の一部であることが認識されなければならない。

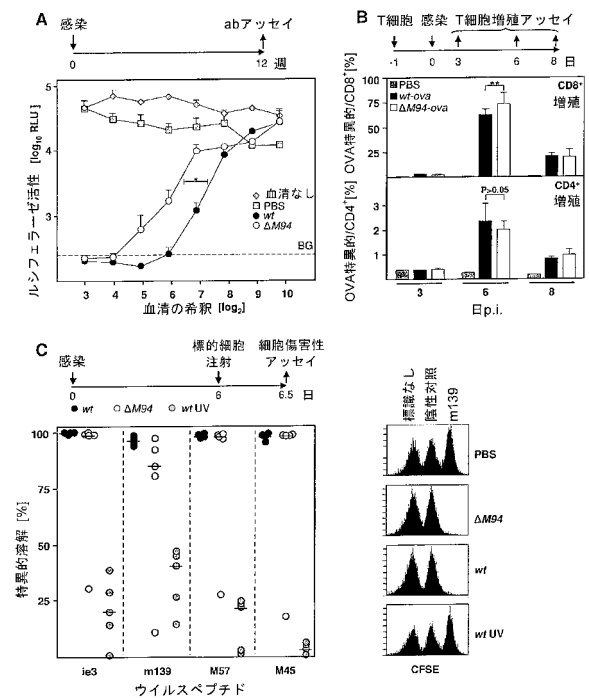
【図 2】

図 2



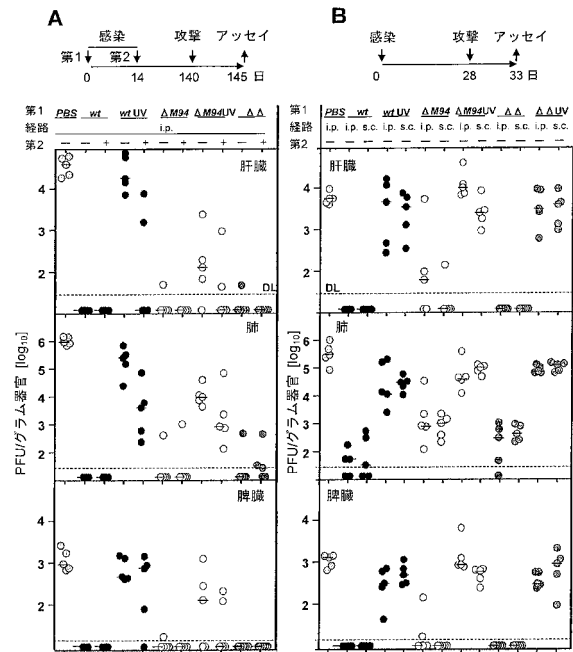
【図 3】

図 3



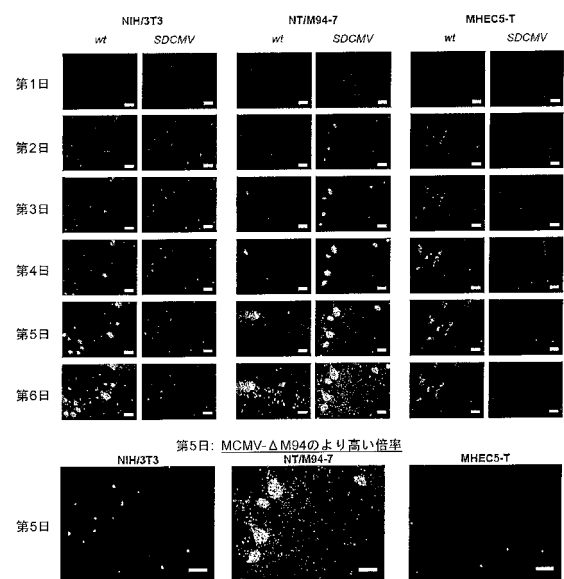
【 図 5 】

图 5



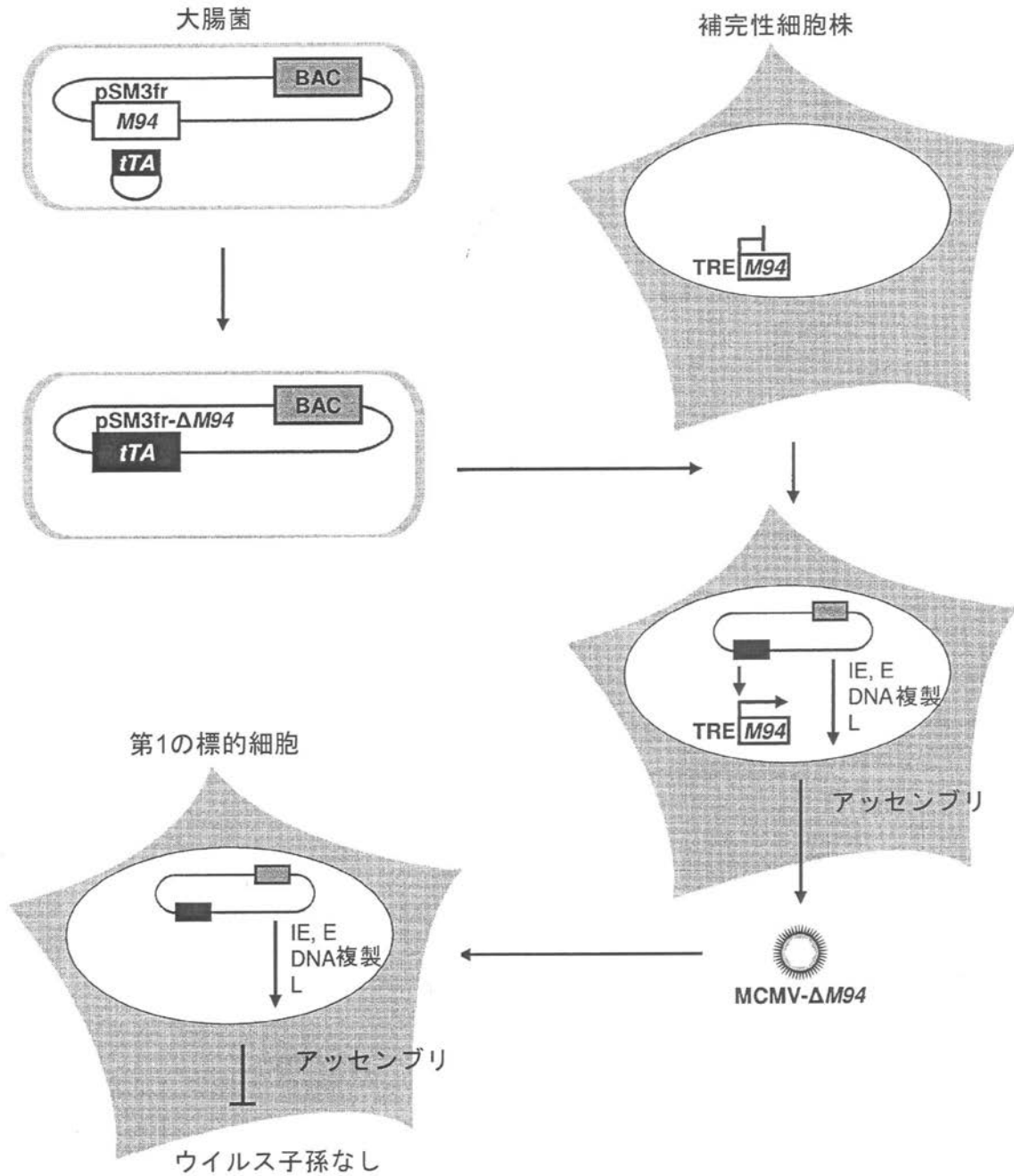
【 図 8 】

图 8



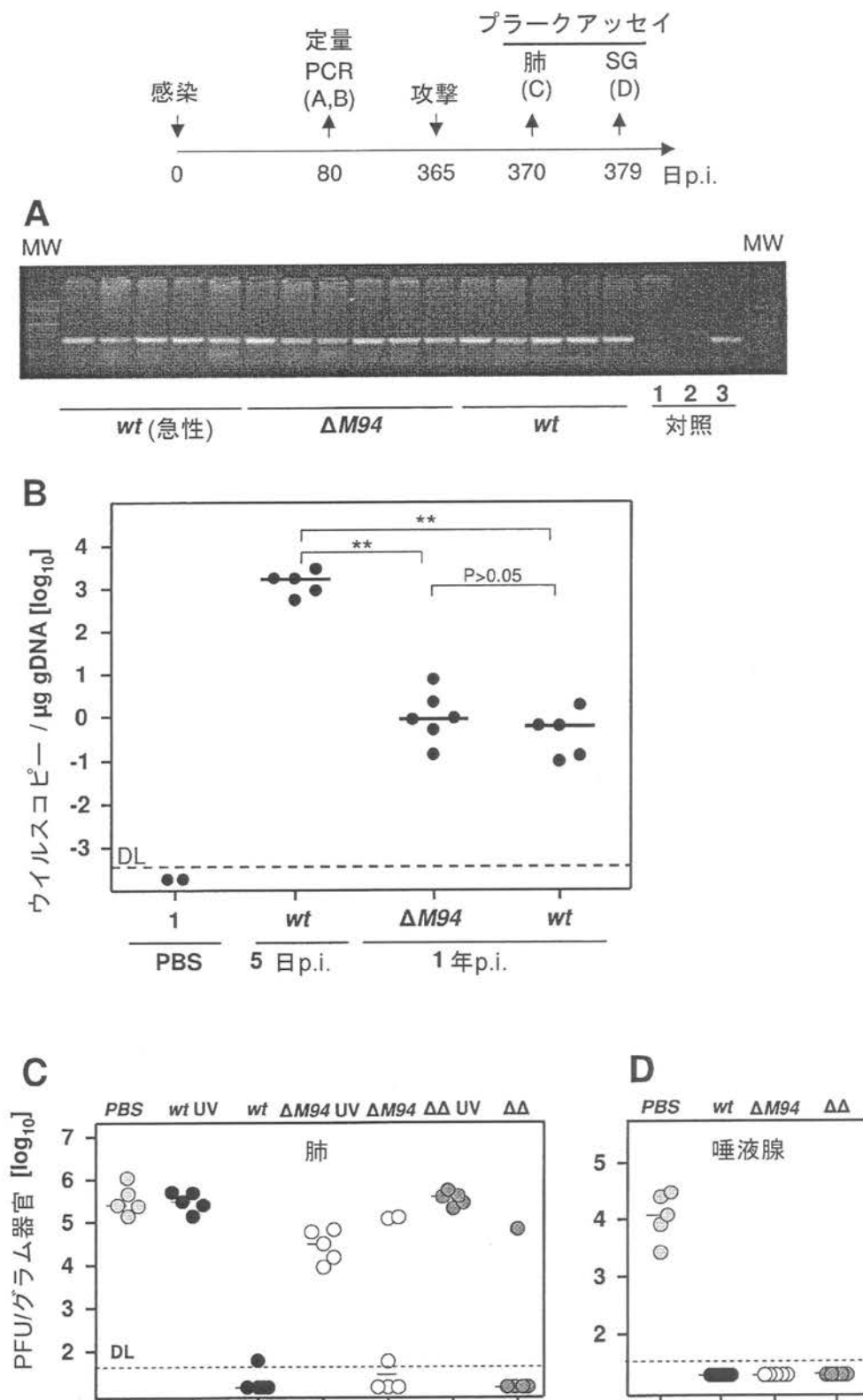
【図 1】

図 1



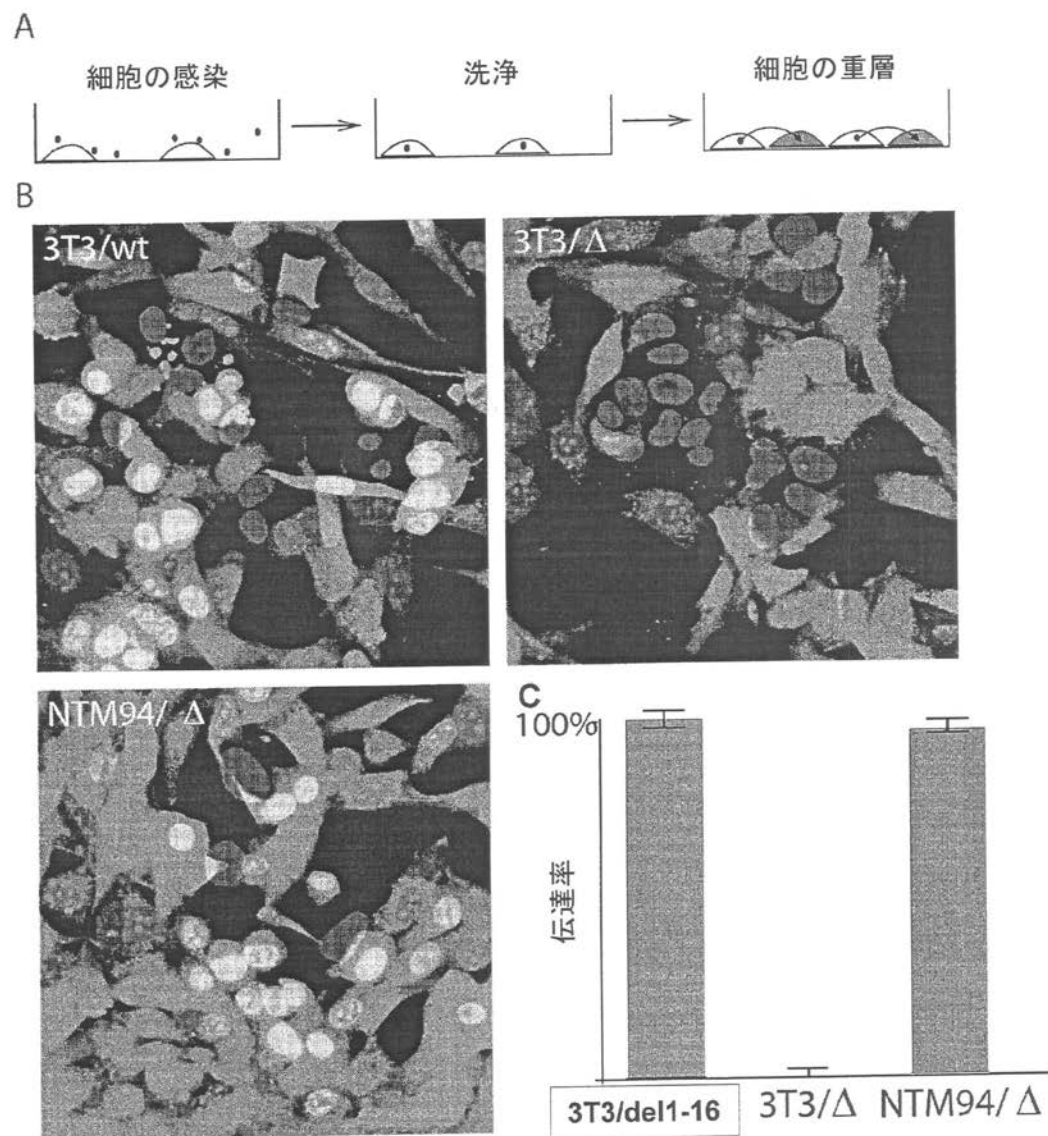
【図 7】

図 7



【 図 9 】

図 9



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/002252

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☒

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/002252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N7/04 C12N15/869 A61K39/245 C12N7/02
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>A. BUBECK ET AL: "Comprehensive Mutational Analysis of a Herpesvirus Gene in the Viral Genome Context Reveals a Region Essential for Virus Replication", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 15, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 8026-8035, XP55004753, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.15.8026-8035.2004 * concerns Invention 1 *; page 8028, paragraph 2 - page 8029, right-hand column, paragraph 1; table 2 ----- -/--</p>	<p>1-6,8, 10-12, 30, 38-41, 43,44, 46-52, 61,62,78</p>

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

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 2012

Date of mailing of the international search report

13/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brenz Verca, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/002252

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. RUPP ET AL: "Conditional Cytomegalovirus Replication In Vitro and In Vivo", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 486-494, XP55004778, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.1.486-494.2005 * concerns Invention 1 *; page 488, right-hand column, paragraph 2; figures 1C, 3 -----	1-6,8, 10-12, 30, 38-41, 43,44, 46-52, 61,62,78
X	CHRISTOPHER M. SNYDER ET AL: "Cross-Presentation of a Spread-Defective MCMV Is Sufficient to Prime the Majority of Virus-Specific CD8+ T Cells", PLOS ONE, vol. 5, no. 3, 1 January 2010 (2010-01-01), pages E9681-E9681, XP55004357, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0009681 page 2, left-hand column, paragraph 2 - page 3, right-hand column, paragraph 1; figures 1,2 page 6, left-hand column, paragraph 2 -----	1,2,4-6, 8,30, 38-44, 46-52, 61,62, 78,79
X	W. DUNN: "Functional profiling of a human cytomegalovirus genome", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 24, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 14223-14228, XP55004412, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.2334032100 * concerns Invention 3 *; figure 1; table 1 -----	1,2,4, 7-10,13, 14,30, 38-42, 61,62,78
X	WO 2005/012545 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; LIU FENYONG [US]; DUNN WALTER [US]; CHOU CASSIE) 10 February 2005 (2005-02-10) * concerns Invention 3 *; claims 2-4; tables 1,6 ----- -/--	1,2,4, 7-10,13, 14,30, 38-42, 61,62,78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/002252

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D. YU ET AL: "Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 21, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 12396-12401, XP55037376, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1635160100 * concerns Invention 3 *; page 12400, right-hand column, lines 13-15; figure 2; table 1 -----	1,2, 4-10,13, 14,30, 38-42, 61,62,78
X,P	C. A. MOHR ET AL: "A Spread-Deficient Cytomegalovirus for Assessment of First-Target Cells in Vaccination", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 84, no. 15, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 7730-7742, XP55000990, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02696-09 cited in the application concerns Invention 3; the whole document -----	1-10, 13-20, 30-68, 78,79
A	C. SINZGER ET AL: "Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 89, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 359-368, XP55001586, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.83286-0 the whole document -----	1-23, 27-71, 75-79
A	CUI X ET AL: "Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 26, no. 45, 23 October 2008 (2008-10-23), pages 5760-5766, XP026046073, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2008.07.092 [retrieved on 2008-08-19] the whole document ----- -/--	4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/002252

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DUDEK T ET AL: "Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors", VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 344, no. 1, 5 January 2006 (2006-01-05), pages 230-239, XP024896310, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2005.09.020 [retrieved on 2006-01-05] cited in the application page 232, right-hand column, line 3 - page 233, left-hand column, line 5; figure 1</p> <p>-----</p>	<p>1-12, 21-23, 27-62, 69-71, 75-79</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/002252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005012545 A2	10-02-2005	US 2005064394 A1 WO 2005012545 A2	24-03-2005 10-02-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/002252**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
15-17, 21-23, 63-65, 69-71(completely); 1-14, 18-20, 27-62, 66-68
75-79(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 002252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 21-23, 69-71(completely); 1-12, 27-62, 75-79(partially)

Spread-deficient beta-herpesvirus deficient in gene product involved in primary and/or secondary envelopment; said virus for or suitable for use in a method of treatment and/or vaccination of a subject; use of said virus for the manufacture of a medicament; use of said virus for the manufacture of a vaccine; nucleic acid coding for said beta-herpesvirus; vector comprising said nucleic acid; host cell comprising said nucleic acid or vector; pharmaceutical composition comprising said beta-herpesvirus, said nucleic acid and/or said vector; wherein the gene is UL50.

2. claims: 24-26, 72-74(completely); 1-12, 27-62, 75-79(partially)

Spread-deficient beta-herpesvirus deficient in gene product involved in primary and/or secondary envelopment; said virus for or suitable for use in a method of treatment and/or vaccination of a subject; use of said virus for the manufacture of a medicament; use of said virus for the manufacture of a vaccine; nucleic acid coding for said beta-herpesvirus; vector comprising said nucleic acid; host cell comprising said nucleic acid or vector; pharmaceutical composition comprising said beta-herpesvirus, said nucleic acid and/or said vector; wherein the gene is UL53.

3. claims: 15-17, 63-65(completely); 1-10, 13, 14, 18-20, 30-62, 66-68, 75-79(partially)

Spread-deficient beta-herpesvirus deficient in gene product involved in primary and/or secondary envelopment; said virus for or suitable for use in a method of treatment and/or vaccination of a subject; use of said virus for the manufacture of a medicament; use of said virus for the manufacture of a vaccine; nucleic acid coding for said beta-herpesvirus; vector comprising said nucleic acid; host cell comprising said nucleic acid or vector; pharmaceutical composition comprising said beta-herpesvirus, said nucleic acid and/or said vector; wherein the gene is UL94.

4. claims: 1-10, 13, 14, 18-20, 30-62, 66-68, 75-79(all partially)

Spread-deficient beta-herpesvirus deficient in gene product involved in primary and/or secondary envelopment; said virus for or suitable for use in a method of treatment and/or vaccination of a subject; use of said virus for the

International Application No. PCT/ EP2011/ 002252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

manufacture of a medicament; use of said virus for the
manufacture of a vaccine; nucleic acid coding for said
beta-herpesvirus; vector comprising said nucleic acid; host
cell comprising said nucleic acid or vector; pharmaceutical
composition comprising said beta-herpesvirus, said nucleic
acid and/or said vector;
wherein the gene is UL99.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/06 (2006.01)	C 1 2 N 7/06	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	

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

- (71) 出願人 512286129
ルジクス, ゾルト
ドイツ連邦共和国, 8 6 9 1 1 ディーセン・アム・アンマーゼー, アム・クラインフェルト 9
アー
- (74) 代理人 100099623
弁理士 奥山 尚一
- (74) 代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74) 代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (74) 代理人 100114591
弁理士 河村 英文
- (74) 代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74) 代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74) 代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
- (74) 代理人 100166268
弁理士 田中 祐
- (74) 代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
- (74) 代理人 100161001
弁理士 渡辺 篤司
- (72) 発明者 ティリオン, クリスティアン
ドイツ連邦共和国, 8 1 3 3 7 ミュンヘン, マイシュトラーク 6 3
- (72) 発明者 コシノフスキー, ウルリヒ
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 4 0 フェルダフィング, アホルンヴェーク 1 2
- (72) 発明者 モーア, クリスティアン・アー
ドイツ連邦共和国, 8 1 4 7 5 ミュンヘン, リーデナー・シュトラーク 1 2
- (72) 発明者 ルジクス, ゾルト
ドイツ連邦共和国, 8 6 9 1 1 ディーセン・アム・アンマーゼー, アム・クラインフェルト 9

ア－

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA02 DA06 EA02 EA04
4B065 AA26X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C084 AA13 ZB331 ZB332
4C085 AA03 BA78 CC32
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZB33
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 ZB33