(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-136950
(P2016-136950A)
(43)公開日　平成28年8月4日(2016.8.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4C084
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C085
A61K 39/245	(2006.01)	A61K	39/245		4C086

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 58 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-19841 (P2016-19841)
(22)出願日　平成28年2月4日 (2016.2.4)
(62)分割の表示　特願2013-508401 (P2013-508401)の分割
原出願日　平成23年5月5日 (2011.5.5)
(31)優先権主張番号　10005045.9
(32)優先日　平成22年5月12日 (2010.5.12)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(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)

(71)出願人　512286093
ティリオン，クリスティアン
ドイツ連邦共和国，８１３３７　ミュンヘン，マイシュトラーセ　６３
(71)出願人　512286107
コシノフスキー，ウルリヒ
ドイツ連邦共和国，８２３４０　フェルダフィング，アホルンヴェーク　１２
(71)出願人　512286118
モーア，クリスティアン・アー
ドイツ連邦共和国，８１４７５　ミュンヘン，リーデナー・シュトラーセ　１２

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】　（修正有）
【課題】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の提供。
【解決手段】伝播欠損性であり、好ましくは組換えであり、更に内皮向性であり、野生型様ビリオン表面を有するベータヘルペスウイルス。更に、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細胞を含み、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ベータヘルペスウイルス。
【選択図】なし

【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。
【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。
【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。
【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。
【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。

【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１～１２２６３０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１２３６６８～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、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１～１２２６３０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１２３６６８～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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１７】
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、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、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１～１２２６３０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１３１２４３～１８１６５２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、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、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１～１２２６３０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１３１２４３～１８１６５２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３４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３５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。

【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、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６７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、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、請求項１９に記載のベータヘルペスウイルス。
【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１～５８４４２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５９６２３～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、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１～５８４４２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５９６２３～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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。
【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、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１～６２１２９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６３２６１～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、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１～６２１２９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６３２６１～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、請求項２５に記載のベータヘルペスウイルス。

【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１～５８４４２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、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、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、請求項２８に記載のベータヘルペスウイルス。

【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

に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項３１】
配列番号２３によるヌクレオチド配列を含む、請求項１から３０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、請求項１から３１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、請求項３２に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項３３に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項３４に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項３３に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項３６に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項３８】
異種核酸をコードする、請求項１から３７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、請求項４１に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項３８に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項４０に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項４１に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項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、請求項１から４２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４４】
前記対象が、哺乳動物、好ましくはヒトである、請求項４３に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項４５】
ヒトサイトメガロウイルスである、請求項４３または４４に記載のベータヘルペスウイ

ルス。
【請求項４６】
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４３から４５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４７】
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４３から４６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４８】
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４６および４７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４９】
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４８に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項５０】
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４３から４９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５１】
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５０に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項５２】
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５０に記載のベータヘルペスウイルス。
【請求項５３】
医薬品の製造のための、請求項１から４７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５４】
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５３に記載の使用。
【請求項５５】
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５３に記載の使用。
【請求項５６】
ワクチンの製造のための、請求項１から４７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５７】
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５６に記載の使用。
【請求項５８】
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５７に記載の使用。

【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。
【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１２３６８８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。
【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。
【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。
【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

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、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６７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６７に記載のベクター。

【請求項６９】

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１～５８４４２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５９６２３～２３３６８１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と共有結合している、請求項６２に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項７０】

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１～５８４４２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５９６２３～２３３６８１により表される第２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７１】

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と共有結合している、請求項７０に記載のベクター。

【請求項７２】

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１～６２１２９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６３２６１～２３３６８１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と共有結合している、請求項６２に記載の前記核酸を含むベクター。

【請求項７３】

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１～６２１２９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６３２６１～２３３６８１により表される第２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７４】

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と共有結合している、請求項７３に記載のベクター。

【請求項７５】

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１～５８４４２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６３２６１～２３３６８１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と共有結合している、請求項６２に記載の前記核酸を含むベクター。
【請求項７６】
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１～５８４４２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６３２６１～２３３６８１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、配列番号３３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６２に記載の前記核酸を含むベクター。
【請求項７７】
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６３２１６１と共有結合している、請求項７６に記載のベクター。
【請求項７８】
請求項６１に記載の核酸または請求項６２から７７のいずれか１項に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項７９】
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６１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】
【０００１】
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。
【背景技術】
【０００２】
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。
【０００３】
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

、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】

ＡＤ１６９株は非常に攻撃的であるので、実験室順応ＨＣＭＶのより弱毒化された調製物であるＴｏｗｎｅ株が、ＡＤ１６９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、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてもＡＤ１６９と同様の表現型であるとみられた。

【００１０】

最初のヒトでの試験は、予期されたように、Ｔｏｗｎｅ株がＡＤ１６９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、Ｔｏｗｎｅワクチンの効力が広く研究された。これらの研究は、Ｔｏｗｎｅワクチンがヒトにおいて安全で耐容性がよく、ヒトＣＭＶ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。Ｔｏｗｎｅワクチンは、ある条件下でヒトＣＭＶ疾患に対するいくら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、Ｔｏｗｎｅ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。

【００１１】

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

【００１２】

興味深いことに、Ｔｏｗｎｅ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、Ｔｏｗｎｅ株を用いるワクチン接種は、内皮向性（endotheliotropic）ＣＭＶ感染を中和できる抗体を誘導せず、より具体的には、Ｔｏｗｎｅは、内皮向性ヒトＣＭＶ株に対する抗体を誘導しない（Ｃｕｉら２００８　Ｖａｃｃｉｎｅ　２６：５７６０～５７６６頁）。

【００１３】

内皮向性および非内皮向性ウイルスの間の中和を区別するために、Ｇｅｒｎａら（Ｇｅｒｎａら２００８　Ｊ　Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ　８９：８５３～８６５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ＣＭＶ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（Ｇｅｒｎａら、既出）。

【００１４】

Ｔｏｗｎｅ株が内皮細胞に感染できず、Ｔｏｗｎｅ株が内皮向性ヒトＣＭＶ感染を中和できる抗体を誘導できないことに加えて、Ｔｏｗｎｅ株は、臨床的野生型ヒトＣＭＶ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、Ｔｏｗｎｅ株は、Ｃｈａらによっても記載されるように（Ｃｈａら１９９６　Ｊ．Ｖｉｒｏｌ　Ｖｏｌ．７０、第１号、７８～８３頁）、遺伝子ＵＬ１３３、ＵＬ１３４、ＵＬ１３５、ＵＬ１３６、ＵＬ１３７、ＵＬ１３８、ＵＬ１３９、ＵＬ１４０、ＵＬ１４１、ＵＬ１４２、ＵＬ１４３、ＵＬ１４４およびＵＬ１４５を欠く。

【００１５】

ＨＣＭＶ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（Ｄｕｄｅｋら２００６　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　３４４：２３０～２３９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。

【００１６】
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ー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。
【００１７】
複製欠損アルファー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）。
【００１８】
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、Ｉｎｇｌｉｓ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。
【００１９】
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】
【００２０】
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。
【００２１】
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。
【００２２】
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。
【００２３】
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。

【００２４】
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。
【００２５】
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。
【００２６】
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ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$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。
【００２７】
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。
【００２８】
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。
【００２９】
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。
【００３０】
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。
【００３１】
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。
【００３２】
実施形態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、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。
【００３３】
実施形態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、実施形態１０に記載のベータヘルペスウイルス。
【００３４】
実施形態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、実施形態１１に記載のベータヘルペスウイルス。
【００３５】
実施形態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、実施形態１０に記載のベータヘルペスウイルス。
【００３６】
実施形態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、実施形態１３に記載のベータヘルペスウイルス。
【００３７】
実施形態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１～１２２６３０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１２

３６６８～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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。

【００３８】

実施形態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１～１２２６３０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１２３６６８～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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。

【００３９】

実施形態１７．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、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１６に記載のベータヘルペスウイルス。

【００４０】

実施形態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１～１２２６３０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１３１２４３～１８１６５２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、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。

【００４１】

実施形態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１～１２２６３０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１３１２４３～１８１６５２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３４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３５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。

【００４２】

実施形態２０．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、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６７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、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１９に記載のベータヘルペスウイルス。

【００４３】

実施形態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１～５８４４２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５９６２３～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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。

【００４４】

実施形態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１～５８４４２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５９６２３～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、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。

【００４５】

実施形態２３．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２２に記載のベータヘルペスウイルス。

【００４６】

実施形態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１～６２１２９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６３２６１～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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。

【００４７】

実施形態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１～６２１２９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６３２６１～１８１６５２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１８９１９２～２３３６８１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、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のいず

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。
【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。
【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。
【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。
【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。

【００６８】
実施形態４６．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４３～４５のいずれか１つに記載のベータヘルペスウイルス。
【００６９】
実施形態４７．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４３～４６のいずれか１つに記載のベータヘルペスウイルス。
【００７０】
実施形態４８．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４６および４７のいずれか１つに記載のベータヘルペスウイルス。
【００７１】
実施形態４９．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４８に記載のベータヘルペスウイルス。
【００７２】
実施形態５０．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４３～４９のいずれか１つに記載のベータヘルペスウイルス。
【００７３】
実施形態５１．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５０に記載のベータヘルペスウイルス。
【００７４】
実施形態５２．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５０に記載のベータヘルペスウイルス。
【００７５】
実施形態５３．医薬品の製造のための、実施形態１～４７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。
【００７６】
実施形態５４．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５３に記載の使用。
【００７７】
実施形態５５．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５３に記載の使用。
【００７８】
実施形態５６．ワクチンの製造のための、実施形態１～４７のいずれかに記載のベータヘルペスウイルスの使用。
【００７９】
実施形態５７．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５６に記載の使用。
【００８０】
実施形態５８．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５７に記載の使用。
【００８１】

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１～１２２６３０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１２３６８８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１～１２２６３０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、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、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１～１２２６３０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、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１～１２２６３０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、実施形態６２に記載の前記核酸を含むベクター。

【００９０】
実施形態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、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６７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、実施形態６７に記載のベクター。
【００９１】
実施形態６９．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１～５８４４２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５９６２３～２３３６８１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と共有結合している、実施形態６２に記載の前記核酸を含むベクター。
【００９２】
実施形態７０．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１～５８４４２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５９６２３～２３３６８１により表される第２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。
【００９３】
実施形態７１．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と共有結合している、実施形態７０に記載のベクター。
【００９４】
実施形態７２．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１～６２１２９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６３２６１～２３３６８１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と共有結合している、実施形態６２に記載の前記核酸を含むベクター。
【００９５】
実施形態７３．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１～６２１２９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６３２６１～２３３６８１により表される第２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。
【００９６】
実施形態７４．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と共有結合している、実施形態７３に記載のベクター。
【００９７】
実施形態７５．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１～５８４４２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６３２６１～２３３６８１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と共有結合している、実施形態６２に記載の前記核酸を含むベクター。

【００９８】

実施形態７６．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１～５８４４２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６３２６１～２３３６８１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、配列番号３３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６２に記載の前記核酸を含むベクター。

【００９９】

実施形態７７．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６３２１６１と共有結合している、実施形態７６に記載のベクター。

【０１００】

実施形態７８．実施形態６１に記載の核酸または実施形態６２～７７のいずれか１つに記載のベクターを含む宿主細胞。

【０１０１】

実施形態７９．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６１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。

【０１０２】

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ＣＭＶによる人類のような宿主生物の内皮細胞の感染が、ＣＭＶ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ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を含む抗ＣＭＶ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ＣＭＶ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ＣＭＶ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ＣＭＶ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ＣＭＶへの多重感染が生じる（Ｂｏｐｐａｎａ，Ｓ．Ｂ．ら２００１．Ｉｎｔｒａｕｔｅｒｉｎｅ ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ ｏｆ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ ｔｏ ｉｎｆａｎｔｓ ｏｆ ｗｏｍｅｎ ｗｉｔｈ ｐｒｅｃｏｎｃｅｐｔｉｏｎａｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ Ｍｅｄ ３４４：１３６６～１３７１頁；Ｃｉｃｉｎ－Ｓａｉｎ，Ｌ．ら、２００５．Ｆｒｅｑｕｅｎｔ ｃｏｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｃｅｌｌｓ ｅｘｐｌａｉｎｓ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｉｎ ｖｉｖｏ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｔｉｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ ｖａｒｉａｎｔｓ ｉｎ ｔｈｅ ｍｕｌｔｉｐｌｙ ｉｎ

fected 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（Pt3）：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（Pt1）：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】

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（Ｃｈａら、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。

【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。
【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。
【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。
【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学的関係に基づいて、３つのサブファミリー（アルファ（α）、ベータ（β）、ガンマ（γ））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。
【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

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。
【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。
【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（Ｌｏｔｚｅｒｉｃｈ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。
【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。
【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

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。

【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。

【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 Ｓｕｐｐｌ２：Ｓ２３～Ｓ３６頁）。

【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）。

【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

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される）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。

【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髄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。

【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。骨髄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。

【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。

【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】

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有する。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。

【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、本明細書の一部分である添付の配列表に含まれる。

【０１４４】

【表１Ａ】

配列番号	配列	内部参照番号
1	GTGGGATCCACCATGTACCCCTACGACGT GCCCGACTACGCCACGTCCAGACTATCC	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′-Δ*m157*-pCR3-FRT-*Kan*^{r}-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′-Δ*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’Δ*M94*-pO6-*tTA*
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′-Δ*M94*-pO6-*tTA*
9	SIINFEKL	OVA-MHC-Iペプチド
10	TVYGFCLL	*m139* MHC-Iペプチド

【表１Ｂ】

11	RALEYKNL	*ie3* MHC-Iペプチド
12	SCLEFWQRV	*M57* MHC-Iペプチド
13	HGIRNASFI	*M45* MHC-Iペプチド
14	FAM-AACGTACATCGCTCTCTGCTGGCCG-TAMRA	Taqman-プローブM54
15	Ttactgggtgctgccgggcggctttgccgtctcttcgcgcgtcact cttcacggcctggcccagcgagccctgcgggaccggttccaaaa cttcgaggccgtgctggcccggggcatgcacgtggaggccggcc ggcaggagcccgagacccccccgggtgagcggccggcggctgc ccttcgacgacctgtgatccggaggacgacggctcgtgtatcttgt gccaattgctgttgctctaccgcgacggcgaatggatcctctgtcttt gctgcaacggccgttatcaaggccactatggcggggtctgacagtt cacggggagaagaaacaagaaacaacaaaaaaaaaagaggaga tctgcggccgctagggataacagggtaatcgatgttgacaattaat catcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaa ctaaaccatggcaaaactgaccagcgcagttccggttctgaccgc acgtgatgttgccggtgccgttgaattttggaccgatcgtctgggttt tagccgtgattttgtggaagatgattttgccggtgttgttcgtgatgat gttaccctgtttattagcgcagttcaggatcaggttgttccggataat accctggcatgggtttgggttcgtggtctggatgaactgtatgcaga atggtcagaagttgtgagcaccaattttcgtgatgcaagcggtccg gcaatgaccgaaattggtgaacagccgtggggtcgtgaatttgcac tgcgtgatccggcaggtaattgtgttcattttgttgcagaagaacag gattaacctcgattaattaattgtaacattaccctgttatccctaccgg tgtcctaggcggggtctgacagttcacggggagaagaaacaaga aacaacaaaaaaaaaagagg	LIFdelUL94
16	cgtgttagaccgttggagtcgcgacctgtcccgcaagacgaacct accgatctgggtcgccaacagcgccaacgagtacgtcgtcagctc cgtgccccgccccgtcagtccgtagaagtaactcataaactttcag gtctcgcgtacgattcgcgagtcgggaatgtagggataacagggt aatcgatgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtata atacgacaaggtgaggaactaaaccatggcaaaactgaccagcg cagttccggttctgaccgcacgtgatgttgccggtgccgttgaatttt	LIF-delUL99

【表１Ｃ】

	ggaccgatcgtctgggttttagccgtgattttgtggaagatgattttg ccggtgttgttcgtgatgatgttaccctgtttattagcgcagttcagg atcaggttgttccggataataccctggcatgggtttgggttcgtggtc tggatgaactgtatgcagaatggtcagaagttgtgagcaccaatttt cgtgatgcaagcggtccggcaatgaccgaaattggtgaacagcc gtggggtcgtgaatttgcactgcgtgatccggcaggtaattgtgttc attttgttgcagaagaacaggattaacctcgattaattaattgtaacat taccctgttatccctaaagtaactcataaactttcaggtctcgcgtac gattcgcgagtcgggaatg	
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-Ubiqc-BLAs-IRES-Puro
20	配列表に含まれるとおり	pTB40E-BAC4-FRT
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	MGSGIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSAL AMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVN VHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYL QCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIR NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKTFKDEDTQAMPF RVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGT MSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKI KVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSA ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEF RADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP	OVA
25	MSGQGTKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMIGGIGRFY IQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLE EHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIW RQTNNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVMELVRMIKRG INDRNFWRGENGRKTRIAYERMCNILKGKFQTAAQKAMMD QVRESRNPGNAEFEDLTFLARSALILRGSVAHKSCLPACV YGPAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLLQNSQVYSLIRPNE NPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLSFIKGTKVLPRGKLST RGVQIASNENMDAMESSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR ASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTIMAAFNGNTEGRTSDM RTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFD MSNEGSYFFGDNAEEYDN	インフルエンザのNP-NT60
26	MRATVGLVEAIGIRELRQHASRYLARVEAGEELGVTNKG RLVARLIPVQAAERSREALIESGVLIPARRPQNLLDVTA EPARGRKRTLSDVLNEMRDEQ	結核菌H37Rv株からのORF Rv3407

【表１Ｄ】

27	MAWRSGLCETDSRTLKQFLQEECMWKLVGKSRKHREYRAV ACRSTIFSPEDDGSCILCQLLLLYRDGEWILCLCCNGRYQ GHYGVGHVHRRRRRICHLPTLYQLSFGGPLGPASIDFLPS FSQVTSSMTCDGITPDVIYEVCMLVPQDEAKRILVKGHGA MDLTCQKAVTLGGAGAWLLPRPEGYTLFFYILCYDLFTSC GNRCDIPSMTRLMAAATACGQAGCSFCTDHEGHVDPTGNY VGCTPDMGRCLCYVPCGPMTQSLIHNDEPATFFCESDDAK YLCAVGSKTAAQVTLGDGLDYHIGVKDSEGRWLPVKTDVW DLVKVEEPVSRMIVCSCPVLKNLVH	UL94
28	VTLGGAGAWLLP	SSc交差反応性UL94ペプチド
29	MGGELCKRICCEFGTTSGEPLKDALGRQVSLRSYDNIPPT SSSDEGEDDDDGEDDDNEERQQKLRLCGSGCGGNDSSSGS HREATHDGPKKNAVRSTFREDKAPKPSKQSKKKKKPSKHH HHQQSSIMQETDDLDEEDTSIYLSPPPVPPVQVVAKRLPR PDTPRTPRQKKISQRPPTPGTKKPAAPLSF	UL99
30	MATSRLSVKSLRSISRFVQWECCWMLVNKSARYREFRAVT SQSPGLGKVSSTDDGRCLAASMMLFRRDGNFVLCLVVNKE PVGQFGCSGMRREKMVIDGLQEPVYVMRLLAPLIPVKLGF SPYMLPPKSIGGSGGLDPSVIYQNASVVTPEEAATVTMQG SGIVTVGLSGVGSWVQIKDGGNMKLFVFALCFDVFTACCD RLAFPSLAKIYSETVSCEADKCGFCRDSGRHVDPTGRFVG CVPDSGVCLCYSPCRGTDAAVSVRSWLPYLELEDGANTHS LFVRRYDGRKGLPATISDYLGARNSEGDEIPLRTEPWQLL KIEPTLSAMIIMACPLLKKIVLEHM	M94
31	MYPYDVPDYATSRLSVKSLRSISRFVQWECCWMLVNKSAR YREFRAVTSQSPGLGKVSSTDDGRCLAASMMLFRRDGNFV LCLVVNKEPVGQFGCSGMRREKMVIDGLQEPVYVMRLLAP LIPVKLGFSPYMLPPKSIGGSGGLDPSVIYQNASVVTPEE AATVTMQGSGIVTVGLSGVGSWVQIKDGGNMKLFVFALCF DVFTACCDRLAFPSLAKIYSETVSCEADKCGFCRDSGRHV DPTGRFVGCVPDSGVCLCYSPCRGTDAAVSVRSWLPYLEL EDGANTHSLFVRRYDGRKGLPATISDYLGARNSEGDEIPL RTEPWQLLKIEPTLSAMIIMACPLLKKIVLEHM	HA-M94
32	gaccgcgccacagcagagccagcaccagcagaagagccagca ccagcgggcccagagtcgcaaagcgcgcgggcagccacggcc cagactgcggtcgcgatggcccggagcgcgctcgccaccacgat gacggtgcccaacgataaccagtccgctcccgcaccgacgccac cgccgat	delUL50S
33	atgtctagcgttttctcaacagcattcgtgcgccttga	delUL53S
34	cacggcctggcccagcgagccctgcgggaccggttccaaaactt cgaggccgtgctggcccggggcatgcacgtggaggccggccgg caggagcccgagacccccgggtgagcggccggcggctgccct tcgacgacctgtgatccggaggacgacggctcgtgtatcttgtgcc aattgctgttgctctaccgcgacggcgaatggatcctctgtctttgct gcaacggccgttatcaaggccactatgg	delUL94S
35	ctgggtcgccaacagcgccaacgagtacgtcgtcagctccgtgcc ccgccccgtcagtccgtagaag	delUL99S

【０１４５】

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。

【図２】図２Ａは、時間の関数としてのＴＣＩＤ$_{50}$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ブロットである。

【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。

【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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４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。

【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。

【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％ＴｒｉｔｏｎＸ１００を１０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Ｃｒｏｍａ１０１（（ＩｇＧ１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Ｃｒｏｍａ１０１およびヒトＣＭＶの場合にＣＨ１６０に対してのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５５５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、ＬＳＭ５１０Ｍｅｔａ（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、ＩｍａｇｅＪ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプラグイン（Ｒａｓｂａｎｄ，ＷＳ．ＩｍａｇｅＪ　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。

【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　Ｆｌｕｏｒ５５５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、ＩｍａｇｅＪ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプラグイン（Ｒａｓｂａｎｄ、既出）を用いて計数する。

【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Ｃｒｏｍａ１０１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　Ｆｌｕｏｒ５５５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　Ｖｉｒｏｌ７９：９４９２～９５０２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．ＩＦＮαβＲ$^{－}$／$^{－}$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．ＩＦＮαβＲ$^{－}$／$^{－}$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．ＩＦＮαβＲ$^{－}$／$^{－}$）。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（Ｂａｒｎｄｅｎ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、（Ｌｏｔｚｅｒｉｃｈ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、５０μｇ／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－ΔＭ９４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ーニングした。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、ＧＧＡＡ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’－Δｍ１５７－ｐＣＲ３－ＦＲＴ－Ｋａｎ^{r}－ＦＲＴ（配列番号５）（ｎｔ２１６２４３位～２１６２９０位）および３’－Δｍ１５７－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－Δｍ１５７－ｏｖａ、ｐＳＭ３ｆｒ－Δｍ１５７－ｆｌｏｘ－ｏｖａおよびｐＳＭ３ｆｒ－Δｍ１５７－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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－Δｍ１５７－ｏｖａ（ＭＣＭＶ－ｏｖａ）およびｐＳＭ３ｆｒ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ（ＭＣＭＶ－Δｍ１５７－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（Ｌｏｔｚｅｒｉｃｈ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

：ｎｔ１３６１８９位～１３６２３４位およびＭＣＭＶ下流相同性：ｎｔ１３７２５６位～１３７３０９位）を含む直鎖状ＤＮＡ断片を、プライマー５’ΔＭ９４－ｐＯ６－ｔＴＡ（配列番号７）、プライマー３’－ΔＭ９４－ｐＯ６－ｔＴＡ（配列番号８）ならびにプラスミドｐＯ６－ｔＴＡ－ｍＦＲＴ－Ｋａｎ^{r}－ｍＦＲＴを鋳型として用いて作製した。このＰＣＲ断片を、異なる親のｐＳＭ３ｆｒクローンに挿入して、そのことによりＭ９４遺伝子を欠失した。Ｍ９４およびＭ９３のＯＲＦはオーバーラップするので、４７ｂｐの相同性を、Ｍ９４の５’端に残してＭ９３　ＯＲＦをインタクトにしなければならず、１７ｂｐの相同性がＭ９４の以前の３’端にまだ存在する。ここでもまたＦＬＰリコンビナーゼを、Ｋａｎ^{r}の切り出しのために発現させた。ｐＳＭ３ｆｒ－ΔＭ９４、ｐＳＭ３ｆｒ－ｏｖａ－ΔＭ９４、ｐＳＭ３ｆｒ－ｆｌｏｘ－ｏｖａ－ΔＭ９４およびｐＳＭ３ｆｒ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４の構築を、制限消化分析および配列決定により確認した。

【０１６０】

ウイルスを、ＢＡＣ　ＤＮＡから再構築し、ＮＴ／Ｍ９４－７補完細胞上で繁殖させ、以前に記載されたようにして（Ｓａｃｈｅｒ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２４時間ごとに採取した。感染性ウイルスの定量を、ＮＩＨ／３Ｔ３または補完ＮＴ／Ｍ９４－７細胞に対してＴＣＩＤ$_{50}$（中央組織培養感染量）法を用いて行った。ｉｎ　ｖｉｖｏウイルス複製の決定のために、ウイルス量を、標準的プラークアッセイにより、器官１グラムあたりのプラーク形成単位（ＰＦＵ）として、記載されたようにして（Ｓａｃｈｅｒら、既出）決定した。Ｍ９４欠損変異体（ＭＣＭＶ－ΔＭ９４、ＭＣＭＶ－ｏｖａ－ΔＭ９４、ＭＣＭＶ－ｆｌｏｘ－ｏｖａ－ΔＭ９４およびＭＣＭＶ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４）の各ウイルスストックの伝播欠損性は、非補完ＭＥＦの感染後にプラーク形成がないことにより確認したが、個別の感染細胞のＣＰＥは検出可能であった。伝播欠損性ＭＣＭＶ－ΔＭ９４のｐＳＭ３ｆｒ－ΔＭ９４　ＢＡＣを含有する大腸菌を、ブダペスト条約の下でＤＳＺＭに２０１０年４月２８日にＤＳＭ２３５６１として寄託した。

【０１６１】

［ウイルスのＵＶ不活性化］

ｉｎ　ｖｉｖｏで用いるために、免疫のために用いたＭＣＭＶ－ｗｔウイルス調製物の画分を、ＵＶクロスリンカー（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）中で５ｃｍの距離で４℃にて、１．５ｋＪ／ｃｍ^{2}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、２．４×１０^{7}の係数で減少した。同じ処理は、ＭＣＭＶ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐを異なる線量（０．５、１．０および１．５ｋＪ／ｃｍ^{2}）のＵＶ光に供し、その後、ＭＥＦ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（０．５ｋＪ／ｃｍ^{2}）のＵＶを照射した場合、単回感染細胞においてＥＧＦＰ発現をモニタリングし、ＥＧＦＰ発現は、強い照射（１．５ｋＪ／ｃｍ^{2}）の後に観察されなかった。未処理ＭＣＭＶ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐは、ＥＧＦＰ$^{+}$プラークを形成した。

【０１６２】

［マウスの免疫および攻撃］

８～１０週齢の雌Ｂ６マウスを、ＭＣＭＶ－ｗｔまたは変異体ＭＣＭＶ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、１００μｌのウイルス懸濁物をｓ．ｃ．で、または３００μｌをｉ．ｐ．で受容した。Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、１×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔもしくはＭＣＭＶ－ｄｅｌｔａＭ９４で、１２９．ＩＦＮαβＲ$^{-/-}$を、２．５×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｄｅｌｔａＭ９４もしくはＵＶ照射ＭＣＭＶ－ｗｔで、そしてＢ６．ＩＦＮαβＲ$^{-/-}$を、３×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ΔＭ９４もしくはＭＣＭＶ－ｗｔで免疫した。模擬処置マウスは、同じ容量のＰＢＳを受容した。マウスを追加免疫するために、この手順を１４日ｐ．ｉ．にて反復した。１２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、10^6ＰＦＵ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℃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プラー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に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．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスを、2×10^5ＰＦＵのｓｇＭＣＭＶ－ｗｔで攻撃し、１２９．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスを、2.5×10^5ＴＣＩＤ$_{50}$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）をプールし、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、５０ＰＦＵ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$^{+}$　Ｐｔｐｒ^{c}マウスの脾細胞を、２μＭの記載するペプチドとインキュベートし、２μＭ、０．７μＭまたは０．１μＭ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：％ｓｐｅｃ溶解＝（１－初回攻撃なし比率／初回攻撃あり比率）＊１００；比率＝（％ＣＦＳＥｌｏｗ／％ＣＦＳＥｈｉｇｈ）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、ＣＤ８α^{+}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、10^5ＴＣＩＤ$_{50}$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、１００μｌ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－ＴｅｘａｓＲｅｄ結合α－ＣＤ８α（５Ｈ１０；Ｃａｌｔａｇ、Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）およびＰＥ結合α－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}ＴＣＩＤ$_{50}$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α－ＣＤ９０．１（ＨＩＳ５１；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）およびＰＥ－Ｃｙ５．５結合α－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、１００μｌ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（Ｃｉｃｉｎ－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遺伝子を含有する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－ΔＭ９４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／～ｌｅｏｎ／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－ΔＭ９４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

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（Ｍｅｓｓｅｒｌｅら、既出）に、Ｍ９４を破壊して導入してｐＳＭ３ｆｒ－ΔＭ９４を作製した。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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）。次に、ＮＴ／Ｍ９４－７細胞および親のＮＩＨ／３Ｔ３線維芽細胞にＭＣＭＶ－ΔＭ９４またはＭＣＭＶ－ｗｔを感染させる多重ステップ成長分析を行った。

【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、０．１ＴＣＩＤ$_{50}$／細胞にてＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；塗りつぶした記号）またはＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；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ＴＣＩＤ$_{50}$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－ΔＭ９４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－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４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．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウス（ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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、２．５×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$ｉ．ｐ．を感染させ、生存を３０日ｐ．ｉ．にわたって追跡した。

【０１７４】

ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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ΔＭ９４変異体（ＭＣＭＶ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４）が構築された。ＭＣＭＶ－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４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－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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ＭＨＥＣ５－Ｔに、０．１ＴＣＩＤ５０／細胞のＭＣＭＶ－ΔＭ９４－Δｍ１５７－ｒｅｃ－ｅｇｆｐ（ＭＣＭＶ－ΔＭ９４）またはＭＣＭＶ－Δｍ１５７－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１００μｍを表す。

【実施例５】

【０１７６】

［ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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（Ｒｏｉｚｍａｎら１９８２ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ Ｓｔａｎｄ．５２：２８７～３０４頁）またはワクチン接種した患者において（Ｉｙｅｒら２００９ Ａｎｎ．Ｅｍｅｒｇ．Ｍｅｄ ５３：７９２～７９５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。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４と補完性細胞株との間で相同配列の組換えによりＭ９４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ＮＴ／Ｍ９４－７が発現するＭ９４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ＭＣＭＶ－ΔＭ９４の安全性を調査するために、１２９．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスに、ＭＣＭＶ－ｗｔまたはＭＣＭＶ－ΔＭ９４を感染させた。全てのＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスはＭＣＭＶ－ｗｔに感染して１４日以内に死亡したが、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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２Ｃ）。結論として、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４を安全に生成でき、免疫欠損マウスでさえＭＣＭＶ－ΔＭ９４感染に耐容性であった。

【実施例６】

【０１７７】

［ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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、ＨＣＭＶ感染における問題点である（Ｌａｎｄｉｎｉら１９９１ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ １４：９７～１０５頁）。よって、ＭＣＭＶ－ｗｔおよびＭＣＭＶ－ΔＭ９４に対する中和抗体応答を、免疫後１２週に比較した。血清の系列希釈物を、ルシフェラーゼ発現ＭＣＭＶ（ＭＣＭＶ－ｌｕｃ）と混合した後にＮＩＨ／３Ｔ３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。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４での免疫は、ＭＣＭＶ－ｗｔ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３Ａ、ｐ＜０．０５）、ＵＶ照射ＭＣＭＶ－ｗｔ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（Ｇｉｌｌら、既出）。

【０１７８】

本実施例の結果を、図３に示す。図３Ａにおいて、Ｂ６マウスを、ｉ．ｐ．にて10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；塗りつぶした丸）、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；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（ＰＢＳ；灰色の四角）。１２週ｐ．ｉ．にて血液を回収し、血清のウイルス中和能力を、ＭＣＭＶ－ｌｕｃを用いて決定した。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４で免疫したマウスの中和抗体レベルは、２元ＡＮＯＶＡ検定を用いて、ＭＣＭＶ－ｗｔ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＋ＳＤを表す。ＲＬＵ＝相対ルシフェラーゼ単位、ＢＧ＝バックグラウンド。

【０１７９】

図３Ｂにおいて、３×10^{5}のＯＴ－Ｉ ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の養子導入の後に（上のパネル）、Ｂ６マウス（ｎ＝５）に、ｉ．ｐ．にて10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｏｖａ（ｗｔ－ｏｖａ；塗りつぶしたバー）、ＭＣＭＶ－ｏｖａ－ΔＭ９４（ΔＭ９４－ｏｖａ；塗りつぶしていないバー）またはＰＢＳ（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ＣＤ４５．１およびＣＤ８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ＯＴ－ＩＩ ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の養子導入の後に（下のパネル）、Ｂ６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、ＣＤ９０．１およびＣＤ４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＋ＳＤを表す（＊＊、Ｐ＜０．０１）。

【０１８０】

図３Ｃにおいて、Ｂ６マウス（ｎ＝５）に、ｉ．ｐ．にて10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；塗りつぶした記号）、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；塗りつぶしていない記号）またはＵＶ照射ＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔＵＶ；灰色の記号）を感染させた。第６

日ｐ．ｉ．にて、ｉｎ　ｖｉｖｏ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（ＣＦＳＥ）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。

【０１８１】

ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞はともに、ＣＭＶ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ＣＤ８$^+$Ｔ細胞は、急性感染中のＭＣＭＶ制御において効果的であり、免疫の後の防御を媒介する（Ｒｅｄｄｅｈａｓｅら、既出）。さらに、ＣＤ４$^+$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（Ｊｏｎｊｉｃら１９８９　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　１６９：１１９９～１２１２頁）。ＭＣＭＶ－ｗｔとＭＣＭＶ－ΔＭ９４により誘導されるＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$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ＯＶＡを選択した。Ｂ６マウスに ＭＣＭＶ－ｏｖａおよびＭＣＭＶ－ｏｖａ－ΔＭ９４を、ＯＶＡ特異的ＣＤ４$^+$またはＣＤ８$^+$Ｔ細胞の養子導入の１日後に感染させた。ＭＣＭＶ－ｏｖａについて、ＯＶＡ特異的ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$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（Ｋａｒｒｅｒら、２００４　Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　７８：２２５５～２２６４頁）。顕著なことには、ＭＣＭＶ－ｏｖａ－ΔＭ９４もＯＶＡ特異的ＣＤ８$^+$およびＣＤ４$^+$（図３Ｂ）Ｔ細胞の増殖応答を、伝播能のあるＭＣＭＶ－ｏｖａに匹敵する程度まで刺激した。ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の量は、ＭＣＭＶ－ｗｔを用いてわずかにより高くさえあった（Ｐ＜０．０１）。

【０１８２】

この観察結果を、天然ＭＣＭＶ抗原について確認した。Ｂ６マウスに、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４またはＭＣＭＶ－ｗｔを感染させた。６日ｐ．ｉ．にて、ｍ１３９、ｉｅ３、Ｍ５７またはＭ４５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（Ｓｎｙｄｅｒら、２００８既出）に注射し、それらの細胞溶解をｉｎ　ｖｉｖｏにて分析した（図３Ｃ）。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４により誘導される細胞溶解性ＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答は、ＭＣＭＶ－ｗｔに匹敵することがわかった。これとは対照的に、ＵＶ照射ＭＣＭＶを注射したＢ６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。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４またはＭＣＭＶ－ｗｔのＵＶ不活性化も、血清のＯＶＡ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ＭＣＭＶは、ＭＣＭＶ－ｗｔに匹敵する免疫応答を誘導した。

【実施例７】

【０１８３】

［ＣＤ８$^+$Ｔ細胞活性化におけるウイルス標的細胞型の役割］

ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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（Ｖｉｌｌａｄａｎｇｏｓら２００８　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２９：３５２～３６１頁）。効果的なＣＤ８$^+$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ＭＣＭＶを、マーカー遺伝子の条件的活性化と組み合わせた（Ｓａｃｈｅｒら、既出）。Ｃｒｅ媒介組換えの後にのみＯＶＡを発現するＭＣＭＶ－ｆｌｏｘ－ｏｖａ－ΔＭ９４を構築した。

【０１８４】

10^5ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｆｌｏｘ－ｏｖａ－ΔＭ９４（ΔＭ９４－ｆｌｏｘ－ｏｖａ）、ＭＣＭＶ－ｏｖａ－ΔＭ９４（ΔＭ９４－ｏｖａ）、ＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ）またはＰＢＳのｉ．ｐ．注射の１日前に、3×10^5のコンジェニックＯＴ－Ｉ　ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を、ｉ．ｖ．にてＢ６、Ａｌｂ－ｃｒｅおよびＴｉｅ２－ｃｒｅ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ＣＤ４５．１およびＣＤ８についての

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}ＴＣＩＤ$_{50}$の伝播欠損性ＭＣＭＶ－ｆｌｏｘ－ｏｖａ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４－ｏｖａへのＣ５７ＢＬ／６マウスの感染は、ＥＣでの選択的な発現（ＭＣＭＶ－ΔＭ９４－ｆｌｏｘ－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－ΔＭ９４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}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；塗りつぶした記号）、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；塗りつぶしていない記号）、Δｍ０１－１７＋ｍ１４４－１５８－ＭＣＭＶ（ΔΔ；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、プ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－ΔＭ９４は、ＭＣＭＶ－ｗｔでの攻撃に対して防御する］

致死攻撃に対するＭＣＭＶ－ΔＭ９４の防御を試験するために、Ｂ６マウスに、伝播欠損性ＭＣＭＶ－ΔＭ９４、弱毒化株Δｍ０１－１７＋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}ＴＣＩＤ$_{50}$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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４ワクチン接種により媒介される防御は、ＭＣＭＶ－ｗｔまたはΔｍ０１－１７＋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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４の単回投与の後に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－ΔＭ９４を用いるワクチン接種は、Δｍ０１－１７＋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。

【０１９０】

まとめると、伝播欠損性ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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。

【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（ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$）をもたらす（Ｐｒｅｓｔｉら１９９８　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　１８８：５７７～５８８頁）。伝播欠損性ＭＣＭＶ－ΔＭ９４は、ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$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－ΔＭ９４が、ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$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．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスを、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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）。

【０１９２】

本実施例の結果を図６に示す。

【０１９３】

図６Ａにおいて、Ｂ６．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$（ｎ＝６）マウスを、ｉ．ｐ．にて３×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；黒色の丸）またはＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；塗りつぶしていない丸）で免疫した。Ｂ６．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$（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（ｓｇＭＣＭＶ－ｗｔ）マウスのｉ．ｐ．注射により行

い、生存をモニタリングした。
【０１９４】
図６Ｂにおいて、２．５×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；塗りつぶしていない丸、ｎ＝８）またはＵＶ照射ＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔＵＶ；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．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$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－ΔＭ９４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．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスは、Ｌｙ４９Ｈを発現せず、Ｂ６．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスよりもＭＣＭＶ感染に対してさらに感受性が高い。１２９．ＩＦＮαβＲ$^{-}$／$^{-}$マウスに、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４をワクチン接種し、２．５×１０^{5}ＴＣＩＤ^{50}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－ΔＭ９４をワクチン接種したマウスは、２．５×１０^{6}ＴＣＩＤ^{50}の用量の致死攻撃でも生存した。まとめると、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４のゲノムが維持されたことを示した。興味深いことに、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ）（ｎ＝５）またはＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４）（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}ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ急性）（ｎ＝５）、ＰＢＳ（１）、鋳型なし（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。ＭＣ

ＭＶ－ｗｔ（ｗｔ）およびＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４）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10^5ＴＣＩＤ$_{50}$のＭＣＭＶ－ｗｔ（ｗｔ；塗りつぶした記号）、ＭＣＭＶ－ΔＭ９４（ΔＭ９４；塗りつぶしていない記号）、Δｍ０１－１７＋ｍ１４４－１５８－ＭＣＭＶ（ΔΔ；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10^6ＰＦＵのＭＣＭＶ－ｗｔを用いて行った。プラークアッセイを（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。

【実施例１１】

【０２００】

［ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４または対照ウイルスで免疫し、１２カ月後に、10^6ＰＦＵのＭＣＭＶ－ｗｔでの攻撃感染をｉ．ｖ．で与えた（図７Ｃおよびｄ）。ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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。

【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。

【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、非構造性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。

【０２０３】

アルファー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

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－ΔＭ９４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ができることを示す。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 Ｓｔｒａｔｅ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）。

【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。

【０２０５】

ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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Δｍ０１－１７＋ｍ１４４－１５８－ＭＣＭＶ（Ｃｉｃｉｎ－Ｓａｉｎら２００７既出）と同様であった。Δｍ０１－１７＋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）。

【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－β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。

【０２０７】

感受性ＩＦＮαβＲ$^{-/-}$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、ＩＦＮαβＲ$^{-/-}$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

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）、ＩＦＮαβＲ－／－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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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－ΔＭ９４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らかは、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－ΔＭ９４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：ｅ９６８１）。他方、重要な交差提示細胞であると考えられる骨髄由来ＡＰＣは、ＭＣＭＶ感染に対する交差提示によるＣＤ８＋Ｔ細胞応答の活性化に必要でないとみられる（Ｋｅｒｎ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ＣＤ８＋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（Ｍａｔｈｙｓら２００３ Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ １８７：９８８～９９９頁）、ｉｎ ｖｉｖｏで感染する（Ａｎｄｒｅｗｓら２００１ Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２：１０７７～１０８４）。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２０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（Ａｄｌｅｒら、既出）ＴｏｗｎｅおよびＡＤ１６９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（Ｈａｈｎ，Ｇ．ら２００４ Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７８：１００２３～１００３３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。

【実施例１３】

【０２１１】

［ＭＣＭＶ－ΔＭ９４の伝播アッセイ］

ＭＣＭＶ－ΔＭ９４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。

【０２１２】

本実施例の結果を図９に示す。

【０２１３】

ＮＩＨ／３Ｔ３およびＮＴ／Ｍ９４－７細胞を播き、ＭＣＭＶΔ１－１６－ＦＲＴ（ｄｅｌ１－１６）およびＭＣＭＶΔＭ９４ｔＴＡ（Δ）に０．２５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、５μＭ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４８時間後に４％ＰＦＡを用いてＤ－ＰＢＳ中で１０分間、３７℃にて固定し、洗浄し、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を１０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、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ５５５結合抗マウス２次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）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。ウイルス伝達は、最初期１陽性細胞およびＣＦＳＥ陽性細胞を、ＩｍａｇｅＪＣｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｅｒプラグインを用いて計数することにより決定した。

【０２１４】

図９は、ＭＣＭＶΔ１－１６－ＦＲＴ（Ｍｏｈｒ ＣＡら、Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ ｇｅｎｏｍｅｓ ｆｏｒ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｌｉｖｅ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ ｖａｃｃｉｎｅｓ；Ｉｎｔ Ｊ Ｍｅｄ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２００８年１月；２９８（１～２）：１１５～２５頁。Ｅｐｕｂ２００７年８月１６日、概説）およびＭＣＭＶ－ΔＭ９４へのＮＩＨ／３Ｔ３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／３Ｔ３を加え、ウイルス複製を可能にした。さらに４８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

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（図９Ａ）。染色された細胞を計数し、細胞間伝播を、最初期１陽性／ＣＦＳＥ染色細胞と最初期１陽性／ＣＦＳＥ陰性細胞の間の比率を算出することにより決定した（図９Ｃ）。ＭＣＭＶΔ１－１６－ＦＲＴの伝播率を１００％とした。ＭＣＭＶΔ１－１６－ＦＲＴ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９Ｂ）。これとは対照的に、Ｍ９４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、４１６の最初期１＋／ＣＦＳＥ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ＮＴ／Ｍ９４－７細胞上で変異体が成長したときに９７％の伝達率まで回復した。よって、このことは、マウスＣＭＶの２次エンベロープ化に対するＭ９４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。

【実施例１４】

【０２１５】

［伝播欠損性ヒトＣＭＶの繁殖］

［トランス補完性細胞株ＴＣＬ９４／９９－ＢＰの作製］

ａ）ＥＧＦＰと結合したＵＬ９９（ｐＣＢ－Ｕｂｉｃ－ＵＬ９９－ＩＲＥＳ－ｇｆｐ；配列番号１８によりコードされる）と、ｂ）ＵＬ９４ ｍＣｈｅｒｒｙと結合したＵＬ９９（ｐＣＢ－Ｕｂｉｃ－ＵＬ９４－ＩＲＥＳ－ｍＣｈｅ；配列番号１７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ーラクタマーゼ（ｐＬＶ－Ｕｂｉｑｃ－ＢＬＡｓ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏ；配列番号１９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、Ｓｉｒｉｏｎ ＧｍｂＨによりＶｉｒａＰｏｗｅｒレンチウイルスパッケージングミックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を２９３ＦＴ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）において用いて繁殖させた。２×１０^{6}のＭＲＣ５線維芽細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－１７１）に、５ＴＤＵ／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、１０ｃｍの皿に播き、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ ５％ＦＣＳ中の２０μｇ／ｍｌ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２０μｇ／ｍｌ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（ｍＣｈｅｒｒｙ＋ＥＧＦＰ）細胞を、蛍光関連細胞選別により精製し、２．５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}の密度で再び播いた。集密の４８時間後に、細胞を２０μｇ／ｍｌ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。ＯＰＴＩ－ＭＥＭ ５％ＦＣＳ＋２０μｇ／ｍｌ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０．７×１０^{7}細胞／バイアルに分割し、１０％ＦＣＳおよび１０％ＤＭＳＯを補ったＯＰＴＩ－ＭＥＭ中で急速冷凍した。

【０２１６】

［伝播欠損性ヒトＣＭＶの構築］

非機能的ＵＬ９４遺伝子座を作製するために、ｐＴＢ４０Ｅ－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；Ｓｉｎｚｇｅｒ，Ｃ．ら、２００８．Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｏｆ ａ ｈｉｇｈｌｙ ｐｒｏｄｕｃｔｉｖｅ，ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｔｒｏｐｉｃ ｖｉｒｕｓ ｓｔｒａｉｎ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ ＴＢ４０／Ｅ．Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８９：３５９～３６８頁）をＧＳ１７８３大腸菌株（Ｔｉｓｃｈｅｒ，Ｂ．Ｋ．ら、２０１０．Ｅｎ ｐａｓｓａｎｔ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ：ａ ｔｗｏ ｓｔｅｐ ｍａｒｋｅｒｌｅｓｓ ｒｅｄ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．６３４：４２１～４３０頁）に導入した。（ａ）Ｒｅｄ組換えを、合成ＤＮＡ断片ＬＩＦｄｅｌ９４；配列番号１５を標準的なプロトコール（Ｔｉｓｃｈｅｒ，Ｂ．Ｋ．ら、既出）に従って電気的形質転換することにより誘導して、ｐＴＢ４０Ｅ－ＢＡＣ４－ｄｅｌＵＬ９４－ＳＺｅｏを得た。２５μｇ／ｍｌクロラムフェニコールおよび３０μｇ／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。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、２５μｇ／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。２５μｇ／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。２５μｇ／ｍｌクロラムフェニコールおよび３０μｇ／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）。２５μｇ／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］

０．７×１０^{7}凍結ＴＣＬ９４／９９－ＢＰ細胞を、０．２μｇ／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２×１０^{6}細胞の密度で播いた。次の日に、２枚の

６ｃｍ培養物に、２μｇ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１０ｃｍ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．Ｖｉｒｏｌ．２０１０年８月；８４（１５）：７７３０～４２頁。Ｅｐｕｂ２０１０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ＴＣＬ９４／９９－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０．１ＭＯＩで感染した後のＴＣＬ９４／９９－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。

【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。

【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ＴＣＬ９４／９９－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。

【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。

【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】

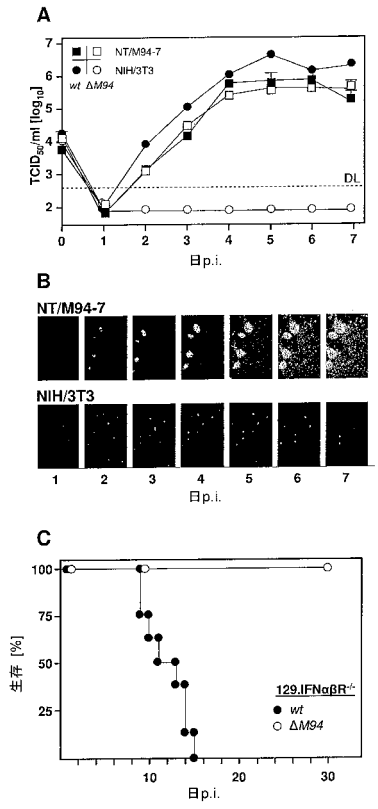
エフェクター複合体	UL50遺伝子	UL53遺伝子	UL94遺伝子	UL99遺伝子
NEC	＋			
NEC		＋		
NEC	＋	＋		
SEC			＋	
SEC			＋	＋

【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、本明細書の一部分であることが認識されなければならない。

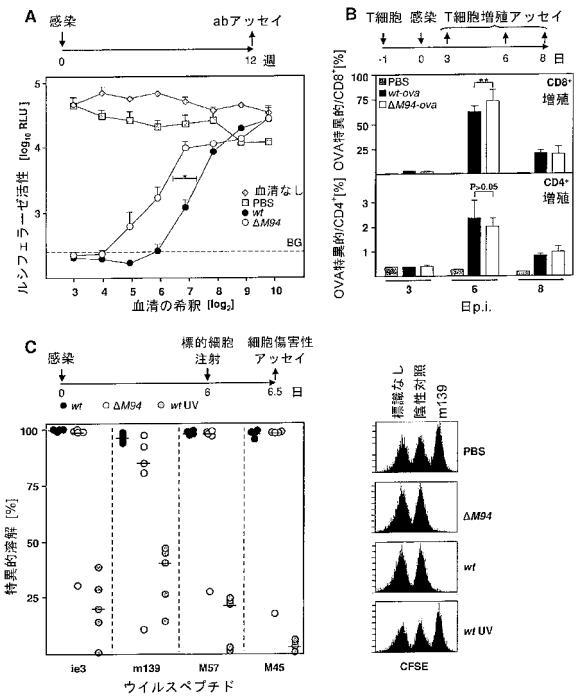
【図２】

図２



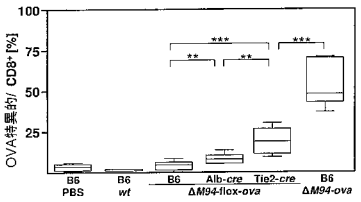
【図３】

図３



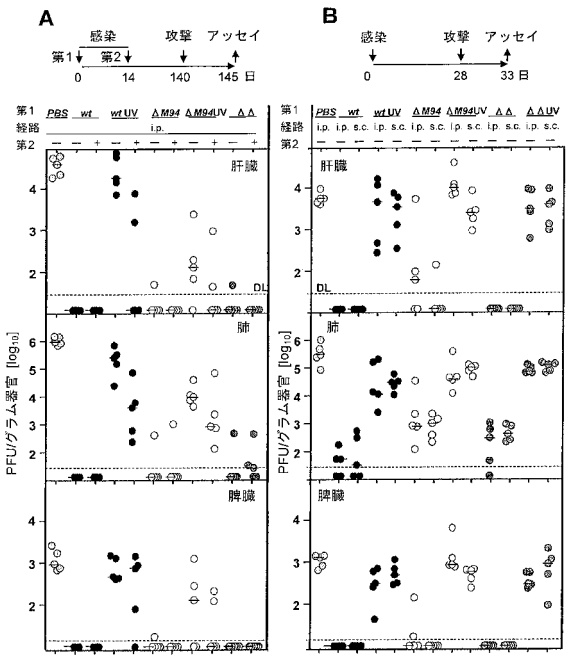
【図４】

図４



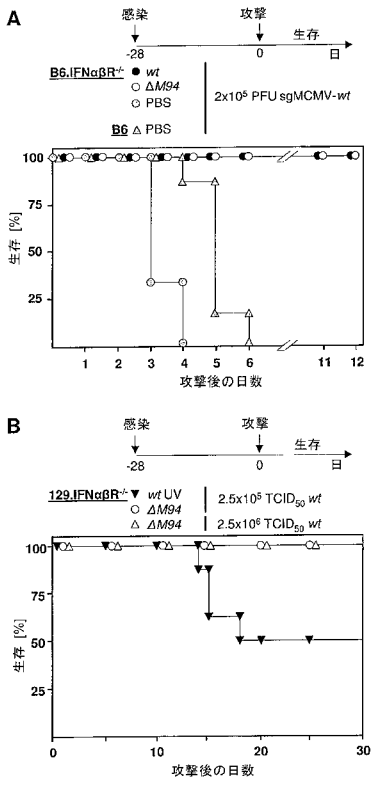
【図５】

図５



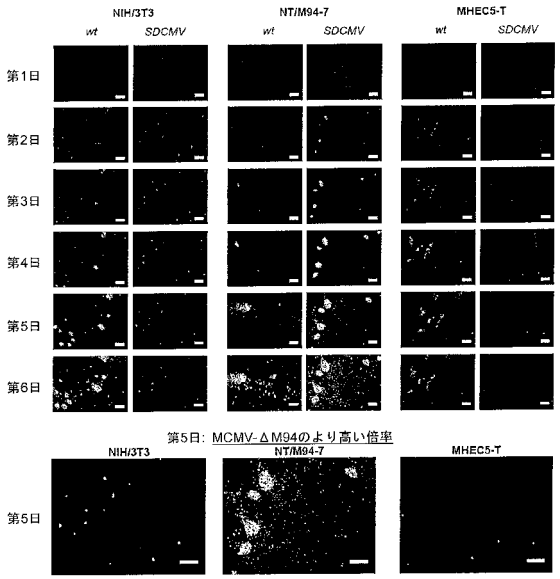
【図６】

図６

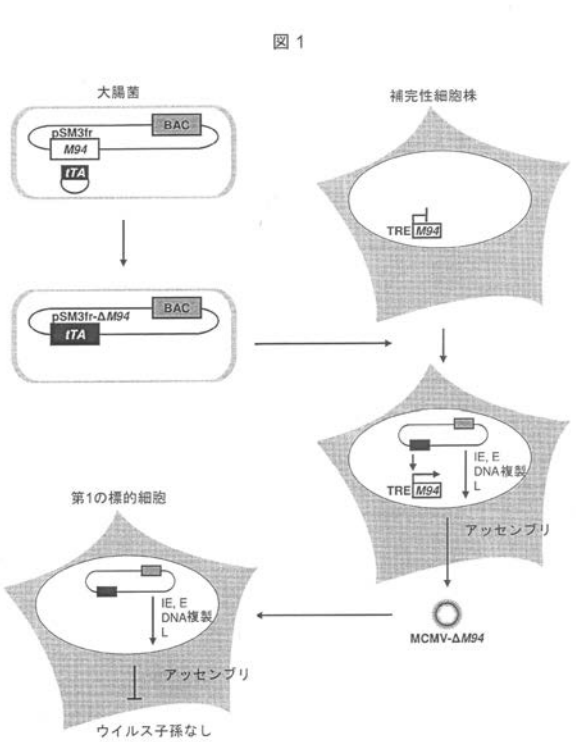


【図８】

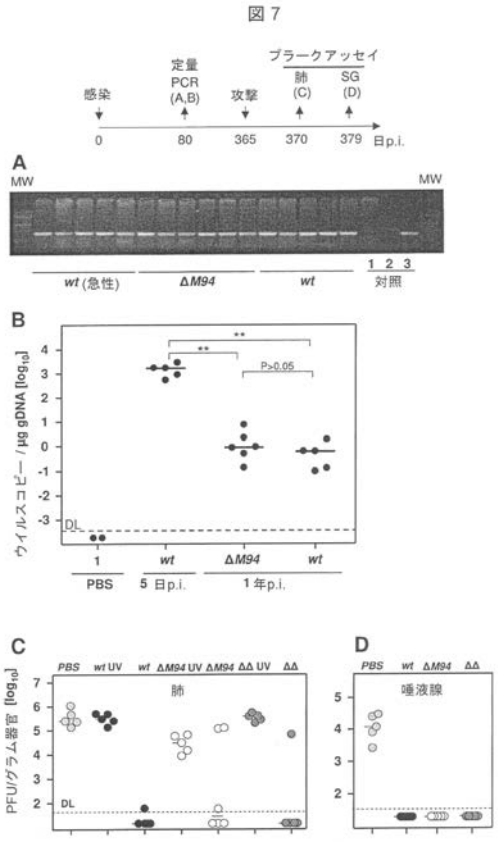
図８



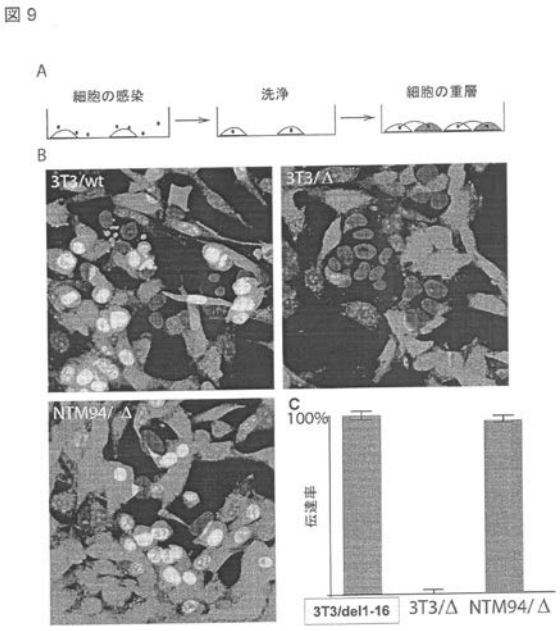
【図１】


図 1
大腸菌
補完性細胞株
pSM3fr
M94
BAC
tTA
TRE M94
pSM3fr-ΔM94
IE, E
DNA複製
L
アッセンブリ
第1の標的細胞
MCMV-ΔM94
ウイルス子孫なし

【図７】


図 7
感染
定量 PCR (A,B)
攻撃
プラークアッセイ 肺 (C) SG (D)
0
80
365
370
379
日p.i.
A
MW
MW
wt (急性)
ΔM94
wt
1 2 3
対照
B
ウイルスコピー / μg gDNA [log10]
P>0.05
DL
1
wt
ΔM94
wt
PBS
5 日p.i.
1 年p.i.
C
PFU/グラム器官 [log10]
PBS
wt UV
wt
ΔM94 UV
ΔM94
ΔΔ UV
ΔΔ
肺
DL
D
PBS
wt
ΔM94
ΔΔ
唾液腺

【図９】


図 9
A
細胞の感染
洗浄
細胞の重層
B
3T3/wt
3T3/Δ
NTM94/ Δ Δ
C
100%
伝達率
3T3/del1-16
3T3/Δ
NTM94/Δ

【配列表】
2016136950000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年3月7日(2016.3.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
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
。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*31/22*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/22	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*31/711*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711	
Ａ６１Ｋ	*35/763*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/763	
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105	
Ａ６１Ｋ	*31/713*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｐ	*33/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00	
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	

(71)出願人 512286129
ルジクス，ゾルト
ドイツ連邦共和国，８６９１１ 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 100166268
弁理士 田中 祐
(74)代理人 100170379
弁理士 徳本 浩一
(72)発明者 ティリオン，クリスティアン
ドイツ連邦共和国，８１３３７ ミュンヘン，マイシュトラーセ ６３
(72)発明者 コシノフスキー，ウルリヒ
ドイツ連邦共和国，８２３４０ フェルダフィング，アホルンヴェーク １２
(72)発明者 モーア，クリスティアン・アー
ドイツ連邦共和国，８１４７５ ミュンヘン，リーデナー・シュトラーセ １２
(72)発明者 ルジクス，ゾルト
ドイツ連邦共和国，８６９１１ 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

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 GA11 HA01 HA08 HA17
4B065 AA95X AB10 AC20 BA01 CA45
4C084 AA13 MA02 NA14 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC751 ZC752
4C085 AA03 BA78 CC08 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33 ZB35 ZB37
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA14 ZB33 ZB35 ZB37