

(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2004-501663

(P2004-501663A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/685	A 6 1 K 31/685	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 239 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-506752 (P2002-506752)	(71) 出願人	397069329
(86) (22) 出願日	平成13年6月28日 (2001. 6. 28)		コリクサ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月4日 (2002. 12. 4)		アメリカ合衆国 ワシントン 98104
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020981		, シアトル, コロンビア ストリート
(87) 国際公開番号	W02002/002131		1124, スイート 200
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002. 1. 10)	(74) 代理人	100107489
(31) 優先権主張番号	60/215, 458		弁理士 大塩 竹志
(32) 優先日	平成12年6月29日 (2000. 6. 29)	(72) 発明者	ホスケン, ナンシー エイ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ワシントン 98103
(31) 優先権主張番号	60/277, 438		, シアトル, ノース 56ティーエイ
(32) 優先日	平成13年3月20日 (2001. 3. 20)		チ ストリート 2314
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単純疱疹ウイルス感染の診断および処置のための組成物および方法

(57) 【要約】

H S V 感染の診断および処置のための化合物および方法が提供される。この化合物は、H S V ポリペプチドの少なくとも1つの抗原性部分を含むポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするD N A 配列を含む。このようなポリペプチドまたはD N A 配列を含む薬学的組成物およびワクチンもまた、このようなポリペプチドに対して指向される抗体と共に提供される。このようなポリペプチドおよび／またはD N A 配列、ならびに患者および生物学的サンプルにおけるH S V 感染を検出するための適切な検出試薬を含む診断キットもまた、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも H S V 抗原の免疫原性部分を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該抗原は、配列番号 2～3、5～7、10～12、14～15、17～18、20～23、25～26、39～41、45～47、50～51、および 54～55 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1、4、8～9、13、16、19、24、34～38、48～49、および 52～53 のいずれか 1 つに記載される配列を含む、請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項 4】

少なくとも H S V U L 4 6 抗原の免疫原性部分を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該抗原は、配列番号 15 に記載されるアミノ酸配列を含み、そしてここで、該免疫原性部分は、配列番号 27～33 および 59～62 からなる群より選択される、単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

少なくとも H S V U L 1 5 抗原の免疫原性部分を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該抗原は、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含み、そしてここで、該免疫原性部分は、配列番号 56～57 からなる群より選択される、単離されたポリペプチド。 20

【請求項 6】

少なくとも H S V U S 3 抗原の免疫原性部分を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該抗原は、配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列を含み、そしてここで、該免疫原性部分は、配列番号 63 を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

少なくとも H S V U S 8 A 抗原の免疫原性部分を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該抗原は、配列番号 7 に記載されるアミノ酸配列を含み、そしてここで、該免疫原性部分は、配列番号 64 を含む、単離されたポリペプチド。 30

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリペプチドおよび融合パートナーを含む、融合タンパク質。

【請求項 9】

前記融合パートナーが、前記融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされた宿主細胞中で、該融合タンパク質の発現を増大する発現エンハンサーを含む、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記融合パートナーが、請求項 1 に記載のポリペプチド内には存在しない T ヘルパーエпитープを含む、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記融合パートナーが、親和性タグを含む、請求項 8 に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 12】

請求項 8 に記載の融合タンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、あるいはそれらの抗体結合フラグメント。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および生理学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および免疫賦活剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 16】

前記免疫賦活剤が、モノホスホリルリピド A、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート、サポニン、またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

患者における免疫応答を刺激するための方法であって、患者に、請求項 14～16 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 18】

患者における H S V 感染を検出するための方法であって、以下：

- (a) 該患者から生物学的サンプルを得る工程；
 - (b) 該サンプルを、請求項 1 に記載のポリペプチドと接触させる工程；および
 - (c) 該ポリペプチドに結合する抗体の存在を検出する工程、
- を包含する、方法。

10

【請求項 19】

前記生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、唾液、脳脊髄液、および尿からなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

生物学的サンプル中の H S V 感染を検出するための方法であって、以下：

- (a) 該生物学的サンプルを、請求項 1 に記載のポリペプチドに結合し得る結合剤と接触させる工程；および
 - (b) 該サンプル中で、該結合剤と結合するポリペプチドを検出する工程、
- を包含し、これによって該生物学的サンプル中の H S V 感染を検出する、方法。

20

【請求項 21】

前記結合剤が、モノクローナル抗体である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記結合剤が、ポリクローナル抗体である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記生物学的サンプルが、全血、痰、血清、血漿、唾液、脳脊髄液、および尿からなる群より選択される、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 24】

診断キットであって、以下：

- (a) 請求項 1 に記載のポリペプチド；
- (b) 請求項 8 に記載の融合タンパク質；
- (c) 請求項 13 に記載の少なくとも 1 つの抗体、またはその抗原結合フラグメント；および
- (d) 検出試薬、

からなる群より選択される成分を含む、診断キット。

【請求項 25】

前記ポリペプチドが、固体支持体上に固定されている、請求項 24 に記載のキット。

40

【請求項 26】

前記検出試薬が、結合剤に結合体化したレポーター基を含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 27】

前記結合剤が、抗免疫グロブリン、プロテイン G、プロテイン A およびレクチンからなる群より選択される、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

前記レポーター基が、放射性同位体、蛍光基、発光基、酵素、ビオチンおよび色素粒子からなる群より選択される、請求項 26 に記載のキット。

50

【請求項 29】

患者におけるH S V感染を処置するための方法であって、以下の工程：

- (a) 該患者から末梢血細胞を得る工程；
 - (b) T細胞が増殖するように、該細胞を、少なくとも1つの請求項1に記載のポリペプチドの存在下でインキュベートする工程；および
 - (c) 該患者に該増殖したT細胞を投与する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 30】

前記T細胞をインキュベートする工程が、1回以上繰り返される、請求項29に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記工程(a)が、前記末梢血細胞からT細胞を分離する工程をさらに包含し、そして前記工程(b)においてインキュベートされる前記細胞がT細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項 32】

前記工程(a)が、前記末梢血細胞からC D 4 +細胞またはC D 8 + T細胞を分離する工程をさらに包含し、そして前記工程(b)において増殖される前記細胞が、C D 4 +またはC D 8 + T細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項 33】

前記工程(a)が、前記末梢血細胞から γ/δ Tリンパ球を分離する工程をさらに包含し、そして前記工程(b)において増殖される前記細胞が、 γ/δ Tリンパ球である、請求項29に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記工程(b)が、前記ポリペプチドの存在下で増殖した1つ以上のT細胞をクローニングする工程をさらに包含する、請求項29に記載の方法。

【請求項 35】

患者におけるH S V感染を処置するための薬学的組成物であって、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、請求項1に記載のポリペプチドの存在下で増殖したT細胞を含む、薬学的組成物。

【請求項 36】

患者におけるH S V感染を処置するための方法であって、以下の工程：

- (a) 少なくとも1つの請求項1に記載のポリペプチドの存在下で、抗原提示細胞をインキュベートする工程；
 - (b) 該患者に、該インキュベートした抗原提示細胞を投与する工程、
- を包含する、方法。

30

【請求項 37】

前記抗原提示細胞が、樹状細胞、マクロファージ細胞、B細胞、線維芽細胞、単球細胞、および幹細胞からなる群より選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

患者におけるH S V感染を処置するための薬学的組成物であって、生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、請求項1に記載のポリペプチドの存在下でインキュベートされた抗原提示細胞を含む、薬学的組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の技術分野)

本発明は、一般に、H S V感染の検出および処置に関する。特に、本発明は、H S V抗原を含むポリペプチド、H S V抗原をコードするDNAならびにH S V感染の診断および処置のためのこのような組成物に使用に関連する。

【0002】

(発明の背景)

50

ヘルペスウイルスは、1型（H S V - 1）および2型（H S V - 2）と命名される2つの密接に関連する改変体を含む、単純疱疹ウイルス（H S V）を含む。H S Vは、ヒトにおける生殖感染の一般的な原因であり、600,000の新患の推定年間発生率であり、そして1000~2000万人の個体が症候性慢性再発性疾患を体験する。無症候性潜在性感染の割合は、なおより高い。例えば、型特異的な血清学的アッセイを使用して、アトランタの健康管理機関クリニックに通院する女性の35%の非選択集団は、H S V 2型（H S V - 2）に対する抗体を有する。抗ウイルス剤（例えば、アシクロビル）の連続的な投与は、急性のH S V疾患の重篤度を改善し、そして再発性発症の頻度および持続時間を減少するが、このような化学療法介入は、潜伏の確立の中断も、潜伏ウイルスの状態の変更もしない。結果として、再発性疾患パターンは、薬剤処置の中止によって迅速に再確立される。

10

【0003】

単純疱疹ウイルス（H S V）の少なくとも1つの株のゲノムは、特徴付けられている。これは、約150kbであり、そして約85の既知の遺伝子をコードする。これらのそれぞれは、50~1000アミノ酸長の範囲のタンパク質をコードする。しかし、ウイルス感染に対して効果的なT細胞免疫応答を誘起し得る免疫原性部分、特に免疫原性エピトープは未知である。

【0004】

従って、H S V感染に対する効果的な免疫応答を誘起し得るH S Vポリペプチドの免疫原性部分、好ましくは、エピトープを同定することが医療的および科学的に必要である。このような情報は、H S V感染を実質的に予防するためのより安全でありかつさらに効果的な予防的薬学的組成物、例えば、ワクチン組成物、および感染が、既に起きている場合、疾患と戦う治療的な成物を導く。本発明は、これらの必要性および他の必要性を満たす。

20

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、H S V感染の診断および治療のための組成物および方法を提供する。1つの局面において、本発明は、H S V抗原の免疫原性部分あるいはこのような抗原の改変体または生物学機能の等価物を含むポリペプチドを提供する。特定の好ましい部分および他の改変体は、免疫原性であり、その結果抗原特異的な抗血清に反応する部分または改変体の能力は、実質的に減少していない。特定の実施形態において、ポリペプチドは、以下からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む：（a）配列番号1、4、8~9、13、16、19、24、35~38、48~49および52~53のいずれか1つの配列；（b）それらの配列の相補体、および（c）中程度のストリンジェント条件下で、（a）または（b）の配列にハイブリダイズする配列。特定の実施形態において、本発明ポリペプチドは、その改変体および生物学的機能等価物を含む、配列番号2、3、5、6、7、10~12、14~15、17~18、20~23、25~33、39~47、50~51および54~64のいずれか1つに示されるいくつかまたは全てのアミノ酸配列を含む、H S Vタンパク質の少なくとも部分、好ましくは、少なくとも免疫原性部分を含む。

30

【0006】

本発明はさらに、上記のようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその部分（例えば、H S Vタンパク質の少なくとも15連続アミノ酸残基をコードする部分）、そのようなポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびそのような発現ベクターを用いて形質転換されたかまたはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

40

【0007】

関連する局面において、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、1つ以上のこれらのポリヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターおよびこのような発現ベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクトされた宿主細胞もまた、提供される。

【0008】

別の局面において、本発明は、薬学的組成物およびそのワクチンとしての使用のための、

50

例えば、生理学的に受容可能なキャリアまたは免疫賦活剤との組み合わせた1つ以上のHSVポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。

【0009】

本発明は、(a) HSVタンパク質に特異的に結合する抗体（ポリクローナルおよびモノクローナルのいずれかまたはその抗原結合フラグメント）および(b) 生理学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物をさらに提供する。

【0010】

他の局面において、本発明は、本明細書中に開示される1つ以上のHSVポリペプチドまたはその部分あるいはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子および生理学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。本発明はまた、予防目的および治療目的のために、本明細書中に定義されるような、1つ以上の開示されるポリペプチドおよび免疫賦活剤を含むワクチンならびにこのようなポリペプチドをコードする1つ以上のポリヌクレオチド配列および免疫賦活剤を含むワクチンを提供する。 10

【0011】

なお別の局面において、患者に有効量の1つ以上の上記に薬学的組成物またはワクチンを投与することを含む、患者において予防的な免疫を誘導するための方法が、提供される。患者の処置における使用のために同定されるポリペプチドのいずれかは、ヘルペス感染を処置するために使用される薬学的薬剤（例えば、Zovirax（登録商標）（アシクロビル）、Valtrex（登録商標）（バラシクロビルおよびFamvir（登録商標）（ファムシクロビル）であるがこれらに限定されない）と共に使用され得る。 20

【0012】

なおさらなる局面において、患者におけるHSV感染の影響を処置、実質的に予防または改善のための方法が提供され、この方法は、その患者から末梢血単核細胞（PBMC）を得る工程、そのPBMCを本発明のポリペプチド（もしくはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）とインキュベートして、インキュベートされたT細胞を提供する工程、およびこのインキュベートされたT細胞をその患者に投与する工程、を含む。本発明はさらに、抗原提示細胞を本発明のポリペプチド（もしくはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）とインキュベートして、インキュベートされた抗原提示細胞を提供する工程、およびこのインキュベートされた抗原提示細胞をその患者に投与する工程、を包含する、HSV感染の処置のための方法を提供する。増殖した細胞は、必要ではないが、患者に投与される前にクローニングされ得る。特定の実施形態において、この抗原提示細胞は、樹状細胞、マクロファージ、単球、B細胞および線維芽細胞からなる群から選択される。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドとインキュベートされたT細胞または抗原提示細胞を含むHSV感染の処置のための組成物もまた提供される。 30
関連する局面において、以下を含む、ワクチンが、提供される：(a) 上記のようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞および(b) 免疫賦活剤。

【0013】

別の局面において、本発明は、生物学的サンプルからHSV感染した細胞を除去し、この方法は、HSVタンパク質と特異的に反応するT細胞に生物学的サンプルを接触させる工程を包含する方法をさらに提供する。ここで、接触の工程は、サンプルからタンパク質を発現する細胞の除去を可能にする条件かつ十分な時間において実施される。 40

【0014】

関連する局面において、上記されるように処理される生物学的サンプルを患者に投与する工程を包含する、患者におけるHSV感染の発生を阻害する方法が、提供される。本発明のさらなる局面において、方法および診断キットは、患者におけるHSV感染を検出するために提供される。1つの実施形態において、この方法は以下を包含する：(a) 生物学的サンプルと本明細書中に開示されるポリペプチドまたは融合タンパク質の少なくとも1つを接触させる工程；および(b) ポリペプチドまたは融合タンパク質に結合する結合剤の存在をサンプルを検出し、それによって、生物学的サンプル中でHSV感染を検出する工程。適切な生物学的サンプルとしては、以下が挙げられる：全血、痰、血清、血漿、唾 50

液、脳脊髄液および尿。1つの実施形態において、診断キットは、検出試薬と組み合わせにおいて、本明細書中に開示される1つ以上のポリペプチドまたは融合タンパク質を含む。なお別の実施形態において、診断キットは、本発明のポリペプチドに結合するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを含む。

【0015】

本発明はまた、以下を包含するHSV感染を検出するための方法を提供する：(a)患者から生物学的サンプルを得る工程；(b)ポリメラーゼ連鎖反応において少なくとも2つのオリゴヌクレオチドとサンプルを接触される工程であってこのオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも1つは、本明細書中に開示されポリヌクレオチドに特異的である、工程；および(c)オリゴヌクレオチドプライマーの存在下において増幅されるポリヌクレオチド配列をサンプルから検出する工程。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列またはそれとハイブリダイズする配列の約10個の連続したヌクレオチドを含む。

【0016】

さらなる局面において、本発明は、以下を包含する、患者におけるHSV感染を検出するための方法を提供する：(a)患者から生物学的サンプルを得る工程；(b)本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブとサンプルを接触させる工程；および(c)オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするポリヌクレオチド配列をサンプル中から検出する工程。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチドプローブは、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列またはそれとハイブリダイズする配列の少なくとも約15個の連続したヌクレオチドを含む。

【0017】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明を参照して明らかになる。本明細書中に開示されるすべての参考文献は、各々が個別に援用されるように、そのすべてが本明細書中で参考として援用される。

【0018】

(配列識別子)

配列番号1は、HSV2 UL39 frag H12A12と命名される単離されたクロンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0019】

配列番号2は、配列番号1のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、H12A12 or fl. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0020】

配列番号3は、全長HSV-2 UL39タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0021】

配列番号4は、HSV2 UL8A frag D6. B-B11-T7 Trc. seqと命名される単離されたクロンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0022】

配列番号5は、配列番号4のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、D6B or fl. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0023】

配列番号6は、配列番号4のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、D6B or fl. 2. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0024】

配列番号7は、全長HSV-2 UL8Aタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0025】

配列番号8は、HSV2 UL8A frag F10B3-T7 Trc. seqと命名される単離されたクロンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0026】

配列番号9は、HSV2 UL8A frag F10B3-T7 P. seqと命名される

単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0027】

配列番号10は、配列番号8のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F10B3orf2. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0028】

配列番号11は、配列番号9のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、8F10B3orf1. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0029】

配列番号12は、全長HSV-2 US3タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0030】

配列番号13は、HSV2II_UL46fragF11F5_T7Trc. seqと命名される単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0031】

配列番号14は、配列番号13のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F11F5orf1. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0032】

配列番号15は、全長HSV-2 UL46タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0033】

配列番号16は、HSV2II_UL27fragH2C7_T7Trc. seqと命名される単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0034】

配列番号17は、配列番号16のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、H2C7orf1. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0035】

配列番号18は、全長HSV-2 UL27タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0036】

配列番号19は、HSV2II_UL18fragF10A1_rc. seqと命名される単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0037】

配列番号20は、配列番号19のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F10A1orf3. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0038】

配列番号21は、配列番号19のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F10A1orf2. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0039】

配列番号22は、配列番号19のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F10A1orf1. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0040】

配列番号23は、全長HSV-2 UL18タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0041】

配列番号24は、HSV2II_UL15fragF10A12_rc. seqと命名される単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。

【0042】

配列番号25は、配列番号24のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、F10A12orf1. proと命名されるアミノ酸配列を示す。

【0043】

配列番号26は、全長HSV-2 UL15タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0044】

配列番号27は、HSVII_UL46遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

【0045】

配列番号28は、HSV I UL46遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0046】

配列番号29は、HSV I UL46遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0047】

配列番号30は、HSV I UL46遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0048】

配列番号31は、HSV I UL46遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0049】

配列番号32は、HSV I UL18遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0050】

配列番号33は、HSV I UL18遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0051】

配列番号34は、RL2__E9A4__5__consensus.seqと命名される単離されたクローンのヌクレオチド配列を示す。 20

【0052】

配列番号35は、全長HSV-2 RL27遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

【0053】

配列番号36は、UL23__22__C12A12__consensus.seqと命名される単離されたクローンのヌクレオチド配列を示す。

【0054】

配列番号37は、全長HSV-2 UL23タンパク質のヌクレオチド配列を示す。

【0055】

配列番号38は、全長HSV-2 UL22タンパク質のヌクレオチド配列を示す。 30

【0056】

配列番号39は、配列番号37のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーディングフレームの、HSV-2__UL23と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0057】

配列番号40は、配列番号36のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、HSV2__UL23と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0058】

配列番号41は、配列番号36のポリヌクレオチド内にコードされるオープンリーディングフレームの、HSV2__UL22と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0059】

配列番号42は、HSV I UL23遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。 40

【0060】

配列番号43は、HSV I UL23遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0061】

配列番号44は、HSV I UL23遺伝子の免疫原性部分由来の15マーのポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0062】

配列番号45は、配列番号38のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーデ 50

ィングフレームの、H S V 2 _ U L 2 2 と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0063】

配列番号46は、配列番号34のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーディングフレームの、R L 2 _ E 9 A 4 _ 5 _ c o n s e n s u s . s e q と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0064】

配列番号47は、配列番号35のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーディングフレームの、H S V 2 _ R L 2 と命名されるアミノ酸配列を示す。

【0065】

配列番号48は、G 1 0 _ U L 3 7 c o n s e n s u s . s e q と命名される単離されたクローンのポリヌクレオチド配列を示す。 10

【0066】

配列番号49は、全長H S V - 2 _ U L 3 7 遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

【0067】

配列番号50は、配列番号48のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーディングフレームの、H S V 2 _ U L 3 7 と命名されるアミノ酸配列を示し、そして

配列番号51は、配列番号49のポリヌクレオチドによってコードされるオープンリーディングフレームの、H S V 2 _ U L 3 7 と命名されるアミノ酸配列を示す

配列番号52は、クローンU L 4 6 f r a g F I I F 5 の挿入物に由来するD N A 配列を示す。 20

【0068】

配列番号53は、クローンG 1 0 の挿入物に由来するD N A 配列を示す。

【0069】

配列番号54は、クローンU L 4 6 f r a g F I I F 5 の挿入物に由来するアミノ酸配列を示す。

【0070】

配列番号55は、クローンG 1 0 の挿入物に由来するアミノ酸配列である。

【0071】

配列番号56は、H S V - 2 遺伝子U L 1 5 のペプチド番号23（アミノ酸688～702）のアミノ酸配列である。 30

【0072】

配列番号57は、H S V - 2 遺伝子U L 1 5 のペプチド番号30（アミノ酸716～730）のアミノ酸配列である。

【0073】

配列番号58は、H S V - 2 遺伝子U L 2 3 のペプチド番号7（アミノ酸265～279）のアミノ酸配列である。

【0074】

配列番号59は、H S V - 2 遺伝子U L 4 6 のペプチド番号2（アミノ酸621～635）のアミノ酸配列である。

【0075】

配列番号60は、H S V - 2 遺伝子U L 4 6 のペプチド番号8（アミノ酸645～659）のアミノ酸配列である。 40

【0076】

配列番号61は、H S V - 2 遺伝子U L 4 6 のペプチド番号9（アミノ酸649～663）のアミノ酸配列である。

【0077】

配列番号62は、H S V - 2 遺伝子U L 4 6 のペプチド番号11（アミノ酸657～671）のアミノ酸配列である。

【0078】

配列番号63は、H S V - 2 遺伝子U S 3 のペプチド番号33（アミノ酸262～276 50

）のアミノ酸配列である。

【0079】

配列番号64は、HSV-2遺伝子US8Aのペプチド番号5（アミノ酸99～113）のアミノ酸配列である。

【0080】

（例示的な実施形態の説明）

上記されるように、本発明は、一般に、組成物ならびに方法、特にHSV感染の治療および診断において組成物を作製および使用するための方法に関する。本明細書中に記載される特定の例示的な組成物は、HSVポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、抗体のような結合剤、抗原提示細胞（APC）、および／または免疫系細胞（例えば、T細胞）を含む。特定のHSVタンパク質およびその免疫原性部分は、HSVに感染した患者の抗血清に検出可能（例えば、ELISAまたはウエスタンブロットのような免疫アッセイにおいて）に反応するHSVポリペプチドを含む。

10

【0081】

従って、本発明は、例示的なポリヌクレオチド組成物、例示的なポリペプチド組成物、このポリヌクレオチドおよびポリペプチド組成物の免疫原性部分、このようなポリペプチドに結合し得る抗体組成物ならびにこのような組成物を使用する多数のさらなる実施形態（例えば、ヒトHSV感染の検出、診断および／または治療において）を提供する。

【0082】

（ポリヌクレオチド組成物）

20

本明細書中で使用される場合、用語「DNAセグメント」および「ポリヌクレオチド」は、特定の種の全ゲノムDNAを含まない単離されたDNA分子をいう。従って、ポリペプチドをコードするDNAセグメントは、DNAセグメントが得られる種の全ゲノムDNAから実質的に単離されたか、またはこのゲノムDNAから精製された、1つ以上のコード配列を含むDNAセグメントをいう。DNAセグメントおよびこのようなセグメントのより小さなフラグメント、そしてまた、組換えベクター（例えば、プラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルスなどを含む）が、用語「DNAセグメント」および「ポリヌクレオチド」内に含まれる。

【0083】

当業者に理解されるように、本発明のDNAセグメントは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するか、または発現し得るように適応されたゲノム配列、ゲノム外配列およびプラスミドにコードされる配列、ならびにより小さな操作された遺伝子セグメントを含み得る。このようなセグメントは、自然に単離され得るか、または人の手によって合成的に改変され得る。

30

【0084】

本明細書中で使用される場合、「単離された」は、ポリヌクレオチドが、実質的に他のコード配列から離れており、そしてDNAセグメントが無関係のコードDNA（例えば、大きな染色体フラグメントまたは他の機能的遺伝子あるいはポリペプチドコード領域）の大部分を含まないことを意味する。当然のことながら、これは、最初に単離され、そして人の手によってセグメントに加えられた後に遺伝子またはコード領域を除外しないDNAセグメントをいう。

40

【0085】

当業者に認識されるように、ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードもしくはアンチセンス）または二本鎖であり得、そしてDNA分子（ゲノム、cDNAもしくは合成）またはRNA分子であり得る。RNA分子は、HnRNA分子（これはイントロンを含み、そしてDNA分子に1対1の様式で対応する）、およびmRNA分子（これは、イントロンを含まない）を含む。さらなるコード配列または非コード配列は、本発明のポリヌクレオチド内に存在し得るがその必要はなく、そしてポリヌクレオチドは、他の分子および／または支持材料に連結され得るがその必要はない。

【0086】

50

ポリヌクレオチドは、ネイティブの配列（すなわち、H S Vタンパク質をコードする内因性配列またはその部分）を含み得るか、あるいはこのような配列の改変体、または生物学的もしくは抗原性の機能的均等物を含み得る。ポリヌクレオチド改変体は、以下にさらに記載されるように、好ましくはネイティブのH S Vタンパク質と比較して、コードされたポリペプチドの免疫原性が減少しないように、1つ以上の置換、付加、欠失、および／または挿入を含み得る。コードされたポリペプチドの免疫原性の効果は、一般に、本明細書中に記載されるように評価され得る。用語「改変体」はまた、異種間の起源の相同な遺伝子を含む。

【0087】

ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を比較する場合、2つの配列におけるヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、以下に記載されるように最大一致についてアライメントされる場合に同じときに、2つの配列が「同一」といわれる。2つの配列の間の比較は、代表的には、配列類似性の局所領域を同定および比較するために、比較ウィンドウ（comparison window）にわたって配列を比較することによって行われる。本明細書中で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20、通常は30～約75、40～約50の連続した位置のセグメントをいい、ここで、2つの配列が最適に整列された後に、配列が連続した位置の同じ数の参照配列と比較され得る。

【0088】

比較のための配列の最適なアライメントは、生命情報科学ソフトウェアのLasergeneスイート（suite）におけるMegalignプログラム（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を使用して、デフォルトパラメーターで行われ得る。このプログラムは、以下の参考文献に記載のいくつかのアライメントスキームを統合する：Dayhoff, M. O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358におけるDayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships.; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. およびSharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. およびMuller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. およびSokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. およびLipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

【0089】

あるいは、比較のための配列の最適なアライメントは、SmithおよびWaterman (1981) Add. APL. Math 2:482の局所同定アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の同定アライメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI

におけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)によって、または検査によって行われ得る。

【0090】

配列同一性および配列類似性の割合を決定するために適切なアルゴリズムの1つの好ましい例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これはそれぞれAltschulら(1977)Nucleic Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403-410に記載される。BLASTおよびBLAST2.0は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについての配列同一性の割合を決定するために、例えば、本明細書中に記載のパラメータを使用して使用され得る。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国バイオテクノロジー情報センターを通して公に利用可能である。1つの例示的な例において、累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメータM(一致する残基の対についての報酬スコア(reward score);常に >0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア;常に <0)を使用して算出され得る。アミノ酸配列について、スコア行列は、累積スコアを算出するために使用され得る。各方向におけるワードヒットの伸長は、以下の場合に停止する:累積アライメントスコアが、その最大到達値から量Xだけ低下した場合;累積スコアが、1以上の負のスコアの残基アライメントの累積に起因してゼロ以下になった場合;またはいずれかの配列の末端に到達した場合。このBLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、アライメントの検出感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列について)は、ワード長さ(W) 11、および期待値(E) 10をデフォルトとして使用し、そしてBLOSUM62スコアリング行列(HenikoffおよびHenikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと)は、50の(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較をアライメントする。

10

20

【0091】

好ましくは、「配列同一性のパーセンテージ」は、少なくとも20位置の比較ウィンドウにわたる2つの最適にアライメントした配列を比較することによって決定され、ここで比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分は、参照配列(これは、付加または欠失を含まない)と比較して、2つの配列の最適なアライメントについて20パーセント以下、通常は5~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。このパーセンテージは、両方の配列で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が生じる位置の数を決定して一致する位置の数を得、この一致する位置の数を参照配列における位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で除算し、そしてこの結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

30

【0092】

従って、本発明は、本明細書中に開示される配列に実質的に同一性を有するポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列(例えば、本明細書中に記載される方法(例えば、以下に記載するような標準的パラメータを使用するBLAST解析)を使用して本発明のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較して、少なくとも50%の配列同一性、好ましくは少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%以上の配列同一性を含む配列)を含む。当業者は、これらの値が、コドンの縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレームの位置などを考慮することによって、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定するために、適切に調整され得ることを認識する。

40

【0093】

さらなる実施形態において、本発明は、本明細書中に記載の配列の1つ以上に同一であるかまたは相補的な配列の種々の長さの連続したストレッチを含む単離されたポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。例えば、本発明に開示される配列の1つ以上の、少なくとも約15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、4

50

00、500または1000以上、ならびにその間の全ての中間の長さの連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、本発明によって提供される。本発明の状況において、「中間の長さ」が、示される値の間の任意の長さ（例えば、16、17、18、19など；21、22、23など；30、31、32など；50、51、52、53など；100、101、102、103など；150、151、152、153など；200～500；500～1,000などの間の全ての整数を含む）を意味することが容易に理解される。

【0094】

本発明のポリヌクレオチド、またはそのフラグメントは、そのコード配列自体の長さに関わらず、他のDNA配列（例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、マルチクローニング部位、他のコードセグメントなど）と組み合わせ得、その結果、その全体の長さは、相当変化し得る。従って、ほとんど任意の長さの核酸フラグメントが使用され得ることが意図され、その全長は、好ましくは意図した組換えDNAプロトコルにおける調製および使用の容易さによって制限される。例えば、約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50の塩基対長など（全ての中間の長さを含む）の全長を有する例示的なDNAセグメントが、本発明の多くの実行において有用であることが意図される。

【0095】

他の実施形態において、本発明は、中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列またはそのフラグメント、あるいはその相補配列にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドに関する。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の分野において周知である。例示の目的で、本発明のポリヌクレオチドの、他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するために適切な中程度にストリンジェントな条件は、 $5\times\text{SSC}$ 、 0.5% SDS、 1.0mM EDTA（ $\text{pH}8.0$ ）の溶液中での予洗； $50^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 、 $5\times\text{SSC}$ で一晩のハイブリダイゼーション；続いて 0.1% SDSを含む $2\times$ 、 $0.5\times$ 、および $0.2\times\text{SSC}$ で各20分、 65°C で2回の洗浄を含む。

【0096】

さらに、遺伝コードの縮重の結果として、本明細書中に記載されるようなポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することが、当業者に理解される。これらのポリヌクレオチドのうちいくつかは、任意のネイティブな遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する。それにもかかわらず、コドンの用法における差異に起因して変化するポリヌクレオチドは、本発明によって詳細に意図される。さらに、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、1以上の変異（例えば、ヌクレオチドの欠失、付加および／または置換）の結果として変化する内因性遺伝子である。得られたmRNAおよびタンパク質は、変化した構造または機能を有し得るが、必ずしもそれらを有するに及ばない。対立遺伝子は、標準的な技術（例えば、ハイブリダイゼーション、増幅および／またはデータベース配列比較）を用いて、同定され得る。

【0097】

（プローブおよびプライマー）

本発明の他の実施形態において、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列は、核酸のハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして、有利に使用され得る。従って、本明細書中で開示される15ヌクレオチド長の連続した配列と同じ配列か、またはこの連続した配列に相補的な配列を有する、少なくとも約15ヌクレオチド長の連続した配列の配列領域を含む核酸セグメントが、特定の有用性を見出すことが意図される。より長い連続した同一または相補的な配列（例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000（全ての中間長さを含む）および全長配列までの配列）はまた、特定の実施形態において使用される。

【0098】

このような核酸プローブの、目的の配列に特異的にハイブリダイズする能力は、所定のサンプルにおける相補配列の存在を検出における使用を可能にする。しかし、他の用途（例えば、変異体種プライマーの調製のための配列情報の使用、または他の遺伝的構築物の調製における使用のためのプライマーの使用）もまた想定される。

【0099】

10～14、15～20、30、50、または100～200ヌクレオチド程度（同様に中間長さを含む）の連続したヌクレオチドストレッチを含む配列領域を有し、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列に同一または相補的なポリヌクレオチド分子は、例えばサザンブロットイングまたはノーザンブロットイングにおける使用のためのハイブリダイゼーションプローブとして特に意図される。これは、遺伝子産物またはそのフラグメントの、多様な細胞型およびまた種々の細菌細胞の両方における分析を可能とする。フラグメントの全サイズ、ならびに相補的ストレッチのサイズは、究極的には、特定の核酸セグメントの意図される用途または適用に依存する。より短いフラグメントは、一般にハイブリダイゼーション実施形態における用途を見出し、ここで連続した相補領域の長さが増加され得る（例えば、約15ヌクレオチドと約100ヌクレオチドとの間）が、検出を望む相補配列の長さに従って、より長い連続した相補ストレッチが使用され得る。

10

【0100】

約15～25ヌクレオチド長のハイブリダイゼーションプローブの使用は、安定および選択的の両方の二重鎖分子の形成を可能にする。しかし、15塩基長より長いストレッチの連続した相補配列を有する分子は、ハイブリッドの安定性および選択性を増加するために一般に好ましく、それによって、得られる特異的ハイブリッド分子の質および程度が改善する。15～25の連続したヌクレオチド、または望まれる場合にはより長い遺伝子相補的ストレッチを有する核酸分子を設計するのが一般には好ましい。

20

【0101】

ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中で開示された任意の配列の任意の一部分から選択され得る。必要とされる全てのことは、本明細書中で開示される配列に示された配列、すなわち、プローブまたはプライマーとして使用することを所望する、約15～25ヌクレオチド長から全長配列長以下の、この配列の任意の連続した一部分を精査することである。プローブおよびプライマーの選択は、種々の因子によって支配される。例えば、全長配列の末端周辺から使用することを所望し得る。

30

【0102】

小さなポリヌクレオチドセグメントまたはフラグメントは、通常自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して行われるように、例えば化学的手段によってフラグメントを直接合成することによって、容易に調製され得る。また、フラグメントは、核酸複製技術（例えば、米国特許第4,683,202号（本明細書中に参考として援用される）のPCRTM技術）の適用によって、組換え産物のために選択配列を組換えベクターに導入することによって、および一般に分子生物学の分野の当業者に公知の他の組換えDNA技術によって、得られ得る。

【0103】

本発明のヌクレオチド配列は、目的の完全遺伝子または遺伝子フラグメントの相補的ストレッチと、二重鎖分子を選択的に形成するその能力のために使用され得る。想定される適用に依存して、代表的には、標的配列に対するプローブの選択性の種々の程度に達するために、ハイブリダイゼーションの種々の条件を使用することが望ましい。高い選択性を必要とする適用について、代表的には、ハイブリッドを形成するための比較的ストリンジェントな条件を使用することが望ましい。例えば、比較的低い塩、および／または高温の条件（例えば、約50℃～約70℃で、約0.02M～約0.15Mの塩の塩濃度によって提供されるような）が選択される。このような選択条件は、存在する場合、プローブとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチにわずかに許容性であり、そして関連する配列の単離のために特に適切である。

40

【0104】

50

当然のことながら、いくつかの適用（例えば、潜在的なテンプレートにハイブリダイズする変異体プライマー鎖を使用する、変異体の調製が望ましい場合）について、低ストリンジェント（減少したストリンジェンシー）のハイブリダイゼーション条件は、ヘテロ二重鎖を形成するために代表的に必要とされる。これらの状況において、約20℃～約55℃の温度範囲で約0.15M～約0.9Mの塩の条件のような塩条件を使用することが望ましくあり得る。これによって、交差ハイブリダイズ種は、コントロールハイブリダイゼーションに関して、陽性ハイブリダイズシグナルとして容易に同定され得る。任意の場合において、ホルムアミド（これは、上昇した温度と同じ様式で、ハイブリッド二重鎖を不安定化するように作用する）の増加した量の添加によって、条件がよりストリンジェントになり得ることが一般に理解される。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、そして一般に、所望の結果に依存する最良の方法である。 10

【0105】

（ポリヌクレオチドの同定および特徴づけ）

ポリヌクレオチドは、種々の十分に確立された技術のいずれかを使用して、同定、調製および／または操作され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、以下により詳細に記載されるように、cDNAのマイクロアレイをHSVに関連する発現（すなわち、本明細書中で提供される代表的なアッセイを使用して決定する場合、正常な組織における発現よりも、患部である組織での少なくとも2倍高い発現）についてスクリーニングすることによって、同定され得る。このようなスクリーニングは、例えば、製造者の指示に従ってSyntennaマイクロアレイ（Palo Alto, CA）を使用して（そして本質的にSchenara, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619, 1996およびHellera, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 1997に記載されるように）、行われ得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるタンパク質を発現する細胞から調製されるcDNAから増幅され得る。このようなポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を介して増幅され得る。このアプローチのために、配列特異的プライマーが、本明細書中で提供される配列に基づいて設計され得、そして購入または合成され得る。 20

【0106】

本発明のポリヌクレオチドの増幅した部分を使用して、適切なライブラリー（例えば、HSV cDNAライブラリー）から周知の技術を使用して全長遺伝子を単離し得る。このような技術において、増幅に適した1以上のポリヌクレオチドプローブまたはプライマーを使用して、ライブラリー（cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー）をスクリーニングする。好ましくは、ライブラリーはより大きな分子を含むようにサイズが選択される。無作為に刺激されたライブラリー（random primed library）もまた、遺伝子の5'領域および上流領域の同定ために好ましくあり得る。ゲノムライブラリーは、イントロンを得ることおよび5'配列を伸長させることについて好ましい。 30

【0107】

ハイブリダイゼーション技術に関して、部分配列は、周知の技術を使用して標識（例えば、ニックトランスレーションまたは³²Pでの末端標識）され得る。次いで、細菌ライブラリーまたはバクテリオファージライブラリーは、一般に、標識プローブと、変性した細菌コロニー（またはファージプラークを含む菌叢）を含むフィルターとをハイブリダイズすることによってスクリーニングされる（Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと）。ハイブリダイズするコロニーまたはプラークを選択し、そして拡大する。そしてそのDNAをさらなる分析のために単離する。cDNAクローンを、さらなる付加配列の量を決定するために、例えば、部分配列由来のプライマーおよびそのバクテリオ由来のプライマーを使用するPCRによって分析し得る。制限地図および部分配列を作成して、1以上の重複クローンを同定し得る。次いで、標準的な技術（これは、一連の欠失クローンを作製することを包含し得る）を使用して完全配列を決定し得る。次い 40 50

で、得られた重複配列を1つの連続配列にアセンブルし得る。周知の技術を使用して、適切なフラグメントを連結することにより全長cDNA分子を生成し得る。

【0108】

あるいは、部分cDNA配列からの全長コード配列を得るための多くの増幅技術が存在する。このような技術において、増幅は、一般的に、PCRを介して行われる。種々の市販キットのいずれかを使用して増幅工程を行い得る。例えば、当該分野で周知のソフトウェアを使用してプライマーを設計し得る。プライマーは、好ましくは、長さが22～30ヌクレオチドであり、少なくとも50%のGC含有量を有し、そして標的配列に約68℃～72℃の温度でアニールする。増幅した領域は、上記に記載されるように配列決定され得、そして重複配列を連続する配列へと構築する。

10

【0109】

このような増幅技術の1つは、インバースPCRである(Trigliaら, Nucleic Acids Res. 16:8186, 1988を参照のこと)。この技術は、制限酵素を使用して、その遺伝子の既知の領域内のフラグメントを生成する。次いで、このフラグメントを分子内連結により環状化し、そして既知の領域に由来する多岐したプライマーを用いたPCRのための鑄型として使用する。代替のアプローチにおいて、部分配列に隣接した配列を、リンカー配列に対するプライマーおよび既知の領域に特異的なプライマーを使用する増幅により取り出し得る。この増幅した配列を、代表的に、同じリンカープライマーおよび既知の領域に特異的な第2のプライマーを使用する2回目の増幅に供する。既知の配列から反対方向に伸長を開始する2つのプライマーを使用するこの手順についての改変は、WO 96/38591に記載される。そのような別の技術は、「迅速なcDNA末端の増幅」またはRACEとして公知である。この技術は、公知配列の5'および3'である配列を同定するために、内側プライマーおよび外側プライマー(これは、ポリA領域またはベクター配列にハイブリダイズする)の使用を含む。さらなる技術としては、キャプチャーPCR(Lagerstromら, PCR Methods Applied. 1:111-19, 1991)およびウォーキングPCR(Parkerら, Nucleic Acids Res. 19:3055-60, 1991)が挙げられる。増幅を利用する他の方法もまた使用して、全長cDNA配列を入手し得る。

20

【0110】

特定の場合において、発現配列タグ(EST)データベース(例えば、GenBankより入手可能なもの)に提供される配列の分析により、全長cDNA配列を入手することが可能である。重複ESTの検索は、一般に、周知のプログラム(例えば、NCBI BLAST検索)を使用して行われ得、そしてこのようなESTを使用して連続した全長配列を生成し得る。全長DNA配列はまた、ゲノムフラグメントの分析により入手され得る。

30

【0111】

(宿主細胞におけるポリヌクレオチド発現)

本発明の他の実施形態において、本発明のポリペプチドまたはその融合タンパク質もしくは機能的等価物をコードするポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントは、適切な宿主細胞におけるポリペプチドの発現に方向付けるように組換えDNA分子において使用され得る。遺伝コードの先天的な縮重に起因して、実質的に同じか、または機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列が産生され得、そしてこれらの配列を使用して所定のポリペプチドをクローン化し、そして発現させ得る。

40

【0112】

当業者によって理解されるように、いくつかの場合において、天然に存在しないコドンをもつポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を作製することが有利であり得る。例えば、特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好まれるコドンは、タンパク質発現の速度を増加させるためか、または所望の特性(例えば、天然に存在する配列から生成される転写物の半減期よりも長い半減期)を有する組換えRNA転写物を産生するように選択され得る。

【0113】

50

さらに、本発明のポリヌクレオチド配列は、種々の理由（遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および／または発現を変更する改変が挙げられるが、それらに限定されない）のためにポリペプチドコード配列を変更するために、当該分野において一般的に公知の方法を使用して操作され得る。例えば、無作為切断によるDNAシャッフリングならびに遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのPCR再アセンブリを使用して、ヌクレオチド配列を操作し得る。さらに、部位指向性変異誘発（site-directed mutagenesis）を使用して、新たな制限部位を挿入し得るか、グリコシル化パターンを改変し得るか、コドン優先（preference）を変化させ得るか、スプライス改変体を作製し得るか、または変異を導入など行い得る。

【0114】

10

本発明の別の実施形態において、天然の核酸配列、改変された核酸配列、または組換え核酸配列は、融合タンパク質をコードする異種配列に連結され得る。例えば、ポリペプチド活性のインヒビターについてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、市販の抗体により認識され得るキメラタンパク質をコードすることが有用であり得る。融合タンパク質はまた、ポリペプチドコード配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作され得、その結果そのポリペプチドは、異種部分から切断され得、そして精製されて取り出され得る。

【0115】

所望のポリペプチドをコードする配列が、当該分野において周知の化学的方法を使用して、全体または部分的に合成され得る（Caruthers, M. H. ら、(1980) N u c l . A c i d s R e s . S y m p . S e r . 2 1 5 ~ 2 2 3、Horm, T ら、(1980) N u c l . A c i d s R e s . S y m p . S e r . 2 2 5 ~ 2 3 2 を参照のこと）。あるいは、タンパク質自体は、ポリペプチドまたはその一部のアミノ酸配列を合成するための化学的方法を使用して産生され得る。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を使用して実施され得（Roberge, J. Y ら、(1995) S c i e n c e 2 6 9 : 2 0 2 ~ 2 0 4）、そして自動化合成は、例えば、ABI 431A P e p t i d e S y n t h e s i z e r（Perkin Elmer, Palo Alto, CA）を使用して達成され得る。

20

【0116】

新たに合成されたペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィー（例えば、Creighton, T. (1983) P r o t e i n s , S t r u c t u r e s a n d M o l e c u l a r P r i n c i p l e s , W H F r e e m a n a n d C o . , N e w Y o r k , N . Y .）または当該分野において利用可能な他の同等技術により実質的に精製され得る。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定（例えば、エドマン分解手順）により確認され得る。さらに、ポリペプチドまたはその任意の部分のアミノ酸配列は、直接合成の間改変されて、そして／または化学的方法を使用して、他のタンパク質もしくはその任意の部分に由来する配列と組み合わせられて、改変体ポリペプチドを産生し得る。

30

【0117】

所望のポリペプチドを発現させるために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または機能的等価物は、適切な発現ベクター（すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含むベクター）内に挿入され得る。当業者に周知である方法を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列および適切な転写制御エレメントおよび翻訳制御エレメントを含む発現ベクターを構築し得る。これらの方法としては、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。そのような技術は、Sambrook, J ら、(1989) M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , P l a i n v i e w , N . Y . , および Ausubel, F. M. ら、(1989) C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k . N . Y . に記載され

40

50

る。

【0118】

種々の発現ベクター／宿主系が、ポリヌクレオチド配列を含み、そして発現させるように利用され得る。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：微生物（例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌）；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または細菌発現ベクター（例えば、TiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系。

10

【0119】

発現ベクター内に存在する「制御エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を実行するように宿主細胞タンパク質と相互作用する、そのベクターの非翻訳領域（エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域）である。そのようなエレメントは、その長さおよび特異性を変更し得る。利用されるベクター系および宿主に依存して、多数の適切な転写エレメントおよび翻訳エレメント（構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む）が使用され得る。例えば、細菌系においてクローニングする場合、誘導性プロモーター（例えば、PBLUESCRIPTファージミド（Stratagene, La Jolla, Calif.）またはSPORT1プラスミド（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）などのハイブリッドlacZプロモーターが使用され得る。哺乳動物細胞系において、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターが、一般的に好ましい。ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞株を生成することが必要とされる場合、SV40またはEBVベースのベクターが、適切な選択マーカーと共に都合良く使用され得る。

20

【0120】

細菌系において、多数の発現ベクターが、発現されるポリペプチドに対して意図される使用に依存して選択され得る。例えば、抗体の誘導のために大量に必要とされる場合、容易に精製される融合タンパク質の高レベルの発現を方向づけるベクターが使用され得る。そのようなベクターとしては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：多機能性E. coliクローニングベクターおよび発現ベクター（例えば、BLUESCRIPT（Stratagene）、ここでは目的のポリペプチドをコードする配列が、β-ガラクトシダーゼのアミノ末端Metおよびそれに引続く7残基についての配列とインフレームでベクター内に連結され得、その結果、ハイブリッドタンパク質が産生される）；pINベクター（Van Heeke, G. および S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503-5509）など。pGEXベクター（Promega, Madison, Wis.）はまた、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般的に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、次に遊離のグルタチオンの存在下において溶出させることによって、溶解した細胞から容易に精製され得る。そのような系において作製されたタンパク質は、ヘパリン、トロニン、または第XA因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され得、その結果、クローン化された目的のポリペプチドが、随意にGST部分から放出され得る。

30

40

【0121】

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）において、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター（例えば、α因子、アルコールオキシダーゼおよびPGH）を含む多数のベクターが使用され得る。概説については、Ausubelら、（前出）およびGrantら、（1987）Methods Enzymol. 153: 516-544を参照のこと。

【0122】

植物発現ベクターを使用する場合において、ポリペプチドをコードする配列の発現は、任

50

意の多数のプロモーターにより駆動され得る。例えば、ウイルスプロモーター（例えば、CaMVの35Sプロモーターおよび19Sプロモーター）を、単独でか、またはTMV由来のωリーダー配列と組み合わせて使用し得る（Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311）。あるいは、植物プロモーター（例えば、RUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーター）を使用し得る（Coruzzi, G. ら、(1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. ら、(1984) Science 224:838-843; およびWinter, J. ら、(1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105）。これらの構築物は、直接的なDNA形質転換または病原体媒介性トランスフェクションによって植物細胞内に導入され得る。このような技術は、多数の一般的に入手可能な概説に記載されている（例えば、Hobbs, S. またはMurry, L. E. McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N. Y.; 191-196頁を参照のこと）。

【0123】

昆虫系はまた、目的のポリペプチドを発現させるために使用され得る。例えば、このような1つの系において、オートグラフィカリフォルニア核多角体病ウイルス（AcNPV）は、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeにおいて外来遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。ポリペプチドをコードする配列は、ウイルスの非必須領域内（例えば、ポリヘドリン（polyhedrin）遺伝子）にクローン化され、そしてポリヘドリンプロモーターの制御下に置かれ得る。ポリペプチドコード配列の首尾良い挿入は、ポリヘドリン遺伝子を不活性化し、そして外殻タンパク質を欠損している組換えウイルスを産生する。次いで、この組換えウイルスを使用して、例えば、S. frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeに感染させ得、そして目的のポリペプチドが発現され得る（Engelhard, E. K. ら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-3227）。

【0124】

哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルスベースの発現系が一般的に利用可能である。例えば、アデノウイルスが、発現ベクターとして使用される場合において、目的のポリペプチドをコードする配列は、後期プロモーターおよび3部からなるリーダー配列から構成されるアデノウイルス転写／翻訳複合体内に連結され得る。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域における挿入を使用して、感染した宿主細胞においてポリペプチドを発現し得る、生存可能ウイルスを入手し得る（Logan, J. およびShenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659）。さらに、転写エンハンサー（例えば、ラウス肉腫ウイルス（RSV）エンハンサー）を使用して、哺乳動物宿主細胞における発現を増加させ得る。

【0125】

特定の開始シグナルはまた、目的のポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために使用され得る。このようなシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接配列を含む。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドンおよび上流配列が適切な発現ベクター内に挿入されている場合において、さらなる転写制御シグナルまたは翻訳制御シグナルは必要とされなくとも良い。しかし、コード配列のみ、またはその一部のみが挿入されている場合、ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供されるべきである。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために正確なリーディングフレーム内にあるべきである。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは、種々の起源（天然および合成の両方）に由来し得る。発現の効率は、使用される特定の細胞系に適切なエンハンサー（例えば、文献（Scharf, D. ら、(1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162）に記載されるエンハンサー）の封入によって増大され得る。

【0126】

さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調節するか、または所望の様式において発現されたタンパク質をプロセッシングするその能力について選択され得る。ポリペプチドのこのような改変としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化 (lipidation) およびアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングはまた、正確な挿入、折り畳みおよび／または機能を促進するために使用され得る。異なる宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38) (これらは、このような翻訳後活性についての特定の細胞機構 (machinery) および特徴的機構 (mechanisms) を有する) は、外来タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを確実にするように選択され得る。 10

【0127】

組換えタンパク質の長期間の高収率の産生のために、安定な発現が一般的に好ましい。例えば、目的のポリヌクレオチドを安定に発現する細胞株が、ウイルス複製起点および／または内因性発現エレメントならびに同じかもしくは別個のベクター上の選択マーカー遺伝子を含み得る、発現ベクターを使用して形質転換され得る。このベクターの導入後、細胞は、それらが選択培地に切換えられる前に、富化 (enriched) 培地において1～2日間の増殖され得る。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を与えることであり、そしてその存在は、導入された配列を首尾良く発現する細胞の増殖および回収を可能とする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適切な組織培養技術を使用して、増殖され得る。 20

【0128】

多数の選択系を使用して、形質転換細胞株を回収し得る。これらの選択系としては、それぞれ、tk. sup. 一細胞またはaprt. sup. 細胞において使用され得る、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (Wigler, M. ら、(1977) Cell 11: 223-32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, I. ら、(1990) Cell 22: 817-23) 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、代謝拮抗剤耐性、抗生物質耐性または除草剤耐性は、選択のための基礎として使用され得る；例えば、dhfr (これは、メトトレキサートに対する耐性を与える (Wigler, M. ら、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70))；npt (これは、アミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を与える (Colbere-Garapin, F. ら、(1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14))；ならびにalsまたはpat (これらは、それぞれ、クロルスルフロンおよびホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を与える (Murry, 前出))。さらなる選択遺伝子、例えば、trpB (これは、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする) またはhisD (これは、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする) (Hartman, S. C. およびR. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51) が記載されている。近年、アントシアニン、β-グルクロニダーゼおよびその基質のGUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質のルシフェリンのようなマーカーを用いる、可視マーカーの使用の人気の高くなっており、形質転換体を同定するためのみならず、特定のベクター系に起因し得る一過性のタンパク質発現または安定なタンパク質発現の量を定量するためにもまた広範に使用されている (Rhodes, C. A. ら、(1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131)。 30 40

【0129】

マーカー遺伝子発現の存在／非存在は、目的の遺伝子もまた存在するということを示唆しているが、その存在および発現は、確認されることを必要とし得る。例えば、ポリヌクレオチドをコードする配列が、マーカー遺伝子配列内に挿入される場合、配列を含む組換え細胞は、マーカー遺伝子機能の非存在により同定され得る。あるいは、マーカー遺伝子は 50

、単一のプロモーターの制御下にポリペプチドコード配列と直列に配置され得る。誘導または選択に応じたマーカー遺伝子の発現は、通常、その直列遺伝子の発現も同様に示す。

【0130】

あるいは、所望のポリヌクレオチド配列を含み、かつ発現する宿主細胞は、当業者に公知の種々の手順によって同定され得る。これらの手順としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：核酸またはタンパク質の検出および／または定量化のための膜ベースの技術、溶液ベースの技術、またはチップベースの技術を含む、DNA-DNAもしくはDNA-RNAハイブリダイゼーション技術およびタンパク質バイオアッセイ技術またはイムノアッセイ技術。

【0131】

ポリヌクレオチドにコードされる産物に特異的なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体のいずれかを使用して、この産物の発現を検出および測定するための種々のプロトコルは、当該分野において公知である。例としては、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) および蛍光活性化セルソーティング (FACS) が挙げられる。所定のポリペプチド上の2つの非干渉性エピトープに対して反応性であるモノクローナル抗体を利用する2つの部位の、モノクローナルベースのイムノアッセイが、いくつかの適用のために好まれ得るが、競合的結合アッセイもまた、利用され得る。これらのアッセイおよび他のアッセイが他の場所に記載される (Hampton, R. ら、(1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.) および Maddox, D. E. ら、(1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216)。

【0132】

広範に種々の標識技術および結合技術は、当業者に公知であり、そして種々の核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにおいて使用され得る。ポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを作製するための手段としては、オリゴ標識 (oligolabeling)、ニックトランスレーション、末端標識または標識されたヌクレオチドを使用するPCR増幅が挙げられる。あるいは、mRNAプローブの産生のために、配列またはその任意の部分が、ベクター内にクローン化され得る。このようなベクターは、当該分野において公知であり、市販されており、そして適切なRNAポリメラーゼ (例えば、T7、T3、またはSP6) および標識されたヌクレオチドを添加することにより、RNAプローブをインビトロで合成するために使用され得る。これらの手順は、種々の市販キットを使用して実施され得る。使用され得る適切なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光、または色素形成剤ならびに基質、コファクター、インヒビター、磁気粒子などが挙げられる。

【0133】

目的のポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、発現および細胞培養物からのタンパク質の回収に適した条件下において培養され得る。組換え細胞により産生されたタンパク質は、使用された配列および／またはベクターに依存して、細胞内に分泌または含まれ得る。当業者によって理解されるように、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核生物細胞膜または真核生物細胞膜を介して、コードされたポリペプチドの分泌を方向付けるシグナル配列を含むように設計され得る。他の組換え構築物を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させ得る。このような精製促進ドメインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：固定された金属上での精製を可能にする金属キレート化ペプチド (例えば、ヒスチジン-トリプトファンモジュール)、固定された免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長／アフィニティー精製システム (ImmuneX Corp., Seattle, Wash.) において利用されるドメイン。精製ドメインとコードされるポリペプチドとの間に切断可能なリンカー配列 (例えば、第XA因子またはエンテロキナーゼに対して特異的な配列 (Invitrogen, San Diego, Calif.)) の封入を

使用して、精製を促進させ得る。このような発現ベクターの1つは、目的のポリペプチドを含む融合タンパク質およびチオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位の前に6つのヒスチジン残基をコードする核酸の発現を提供する。ヒスチジン残基は、P o r a t h, Jら、(1992、Prot. Exp. Purif. 3:263-281)に記載されるように、IMIA C (固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) 上での精製を促進する一方で、エンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターの考察は、K r o l l, D. J. ら、(1993; DNA Cell Boil, 12:441-453) において提供される。

【0134】

組換え産生方法に加えて、本発明のポリペプチドおよびそのフラグメントは、固相技術 (M e r r i f i e l d J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154) を使用する、直接的なペプチド合成によって産生され得る。タンパク質合成は、手動の技術を使用してか、または自動化によって実施され得る。自動化合成は、例えば、A p p l i e d B i o s y s t e m s 431A ペプチド合成装置 (P e r k i n E l m e r) を使用して達成され得る。あるいは、種々のフラグメントは、別々に化学的に合成されて、そして全長分子を生成するために化学的方法を使用して組み合わされ得る。

【0135】

(部位特異的変異誘発)

部位特異的変異誘発は、個々のペプチド、または生物学的機能の等価なポリペプチドをコードする基礎を成すポリヌクレオチドの特異的変異誘発を通じて、それらを調製する上で有用な技術である。当業者に周知の技術は、例えば、1つ以上の前述の考察を取り入れながら、1つ以上のヌクレオチド配列変化をDNA内に導入することによって配列改変体を調製し、そして試験する迅速な能力をさらに提供する。部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列ならびに十分な数の隣接ヌクレオチドの使用を介して変異体の産生を可能にし、横断される欠失結合部の両側に安定な二重鎖を形成するために、十分なサイズのプライマー配列および配列複雑性を提供する。変異は、ポリヌクレオチド自体の特性を改善するか、変更するか、減少させるか、修飾するか、さもなくば変化させるため、そして/またはコードされたポリペプチドの特性、活性、組成、安定性または一次配列を変更するために、選択されたポリヌクレオチド配列において使用され得る。

【0136】

本発明の特定の実施形態において、本発明者らは、コードされたポリペプチドの1つ以上の特性 (例えば、ポリペプチドワクチンの抗原性) を変更するような開示されたポリヌクレオチド配列の変異誘発を意図する。部位特異的変異誘発の技術は、当該分野に周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の改変体を作製するために広範に使用される。例えば、部位特異的変異誘発は、しばしば、DNA分子の特定部分を変更するために使用される。このような実施形態において、代表的に約14~約25ヌクレオチド長程度から成るプライマーが使用され、配列の両側の結合部における約5残基~約10残基が変更される。

【0137】

当業者によって理解されるように、部位特異的変異誘発技術は、しばしば、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用する。部位指向性変異誘発において有用である代表的なベクターとしては、例えば、M13ファージのようなベクターが挙げられる。これらのファージは、容易に商業的に入手可能であり、そしてそれらの使用は、一般的に当業者に周知である。二本鎖プラスミドもまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージに移入する工程を取り除く部位指向性変異誘発において慣用的に使用される。

【0138】

10

20

30

40

50

一般的に、本発明に従う部位特異的変異誘発は、所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列中に含む、一本鎖ベクターを最初に入手する工程またはその配列を含む二本鎖ベクターの2本の鎖を融解して分ける工程によって実行される。所望の変異した配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的に、合成的に調製される。次いで、このプライマーは、一本鎖ベクターとアニーリングされ、そして変異を保有する鎖の合成を完了するために、DNA重合酵素（例えば、E. coli ポリメラーゼ I Klenow フラグメント）に供される。このようにヘテロ二重鎖が形成され、ここで一方の鎖が変異を有さない本来の鎖をコードし、そして第2の鎖は所望の変異を保有する。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターは、適切な細胞（例えば、E. coli 細胞）を形質転換するために使用され、そして、変異した配列の配置（sequence arrangement）を保有する組換えベクターを含むクローンが選択される。 10

【0139】

部位特異的変異誘発を使用する、選択されたペプチドコードDNAセグメントの配列改変体の調製は、潜在的に有用な種を生成する手段を提供し、そしてこれは、限定を意味するものではない。なぜなら、ペプチドの配列改変体およびそれらをコードするDNA配列が入手され得る他の方法が存在するからである。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターは、変異誘発剤（例えば、ヒドロキシルアミン）で処理されて、配列改変体を入手し得る。これらの方法およびプロトコルに関する具体的な詳細は、Malloyら、1994；Segal、1976；ProkopおよびBajpai、1991；Kuby、1994；およびManiatisら、1982（各々がその目的のために本明細書中に参考として援用される）の教示において見出され得る。 20

【0140】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」とは、鋳型依存的プロセスおよびベクター媒介増殖をいい、これは、その初期の濃度と比較して、特定の核酸分子の濃度の増加を生じるか、または検出可能なシグナルの濃度の増加（例えば、増幅）を生じる。本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド特異的変異誘発手順」は、プライマー分子の鋳型依存的な伸長を含むプロセスをいうことが意図される。用語鋳型依存的プロセスとは、RNA分子またはDNA分子の核酸合成をいい、ここで新規に合成された核酸の鎖の配列は、相補的塩基対形成の周知の規則によって指示され得る（例えば、Watson、1987を参照のこと）。代表的には、ベクター媒介方法論は、DNAまたはRNAベクターへの核酸フラグメントの導入、ベクターのクローン増幅、および増幅した核酸フラグメントの回収を包含する。これらの方法論の例は、具体的にその全体が参考として本明細書中に援用される、米国特許第4,237,224号によって提供される。 30

【0141】

（ポリヌクレオチド増幅技術）

多数の鋳型依存性プロセスが、サンプル中に存在する目的の標的配列を増幅するために利用可能である。最もよく知られた増幅方法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCRTM）であり、これは、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号に詳細に記載され、これらの各々はその全体が本明細書中に参考として援用される。手短に言えば、PCRTMにおいては、標的配列の反対の相補鎖上の領域に対して相補的な2つのプライマー配列が調製される。過剰のデオキシヌクレオチド三リン酸を、DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）とともに反応混合液に添加する。標的配列がサンプル中に存在する場合、プライマーはその標的に結合し、そしてポリメラーゼが、ヌクレオチドを付加することによって標的配列に沿ってプライマーを伸長させる。反応混合物の温度を上昇および下降させることによって、伸長したプライマーは、標的から解離して反応生成物を形成し、過剰のプライマーは標的および反応生成物に結合し、そしてこのプロセスが反復される。好ましくは、逆転写およびPCRTM増幅手順が、増幅されたmRNAの量を定量するために実行され得る。ポリメラーゼ連鎖反応方法論は、当該分野で周知である。 40

【0142】

増幅のための別の方法は、リガーゼ連鎖反応（LCRともいわれる）であり、欧州特許出願公開番号320, 308（その全体が特に本明細書中に参考として援用される）において開示されている。LCRにおいては、2つの相補的プローブ対が調製され、そして標的配列の存在下では、各対がその標的の反対の相補鎖に結合し、その結果、それらは接触する。リガーゼの存在下では、これらの2つのプローブ対は、連結して1つの単位を形成する。温度のサイクリングによって、PCR^{T M}におけるのと同様に、結合した連結単位は標的から解離し、次いで過剰のプローブ対の連結のために「標的配列」として働く。米国特許第4, 883, 750号（その全体が参考として本明細書中に援用される）は、標的配列に対するプローブ対の結合のためのLCRに類似する増幅の代替方法を記載する。

10

【0143】

Q β レプリカーゼ（PCT国際特許出願公開番号PCT/US87/00880に記載され、その全体が参考として本明細書中に援用される）もまた、本発明におけるなお別の増幅方法として使用され得る。この方法において、標的の配列に相補的な領域を有するRNAの複製配列が、RNAポリメラーゼの存在下でサンプルに添加される。このポリメラーゼは複製配列をコピーし、次いで検出され得る。

【0144】

制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを使用して、制限部位の一方の鎖におけるヌクレオチド5'-[α -チオ]三リン酸を含む標的分子の増幅を達成する等温増幅方法（Walkerら、1992、その全体が参考として本明細書中に援用される）もまた、本発明における核酸の増幅において有用であり得る。

20

【0145】

鎖置換増幅（Strand Displacement Amplification）（SDA）は、複数のラウンドの鎖置換および合成（すなわち、ニックトランスレーション）を含む核酸の等温増幅を実行する別の方法である。同様の方法（修復鎖反応（Repair Chain Reaction）（RCR）と呼ばれる）は、本発明において有用であり得る別の増幅方法であり、そして増幅のために標的化される領域全体にわたっていくつかのプローブをアニーリングする工程、続いて4塩基のうちの2塩基のみが存在する修復反応を包含する。他の2塩基は、容易な検出のためのビオチン化誘導体として添加され得る。同様のアプローチが、SDAにおいて使用される。

30

【0146】

配列はまた、周期的プローブ反応（cyclic probe reaction）（CPR）を使用して検出され得る。CPRにおいて、非標的DNAの3'配列および5'配列ならびに標的タンパク質特異的RNAの内部または「中間」配列を有するプローブは、サンプル中に存在するDNAにハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションにおいて、反応物はRNase Hで処理され、そしてプローブの生成物は、消化後に遊離されるシグナルを生成することによって識別される産物として同定される。最初の鋳型は、別のサイクリングプローブにアニーリングされ、そして反応が反復される。従って、CPRは、標的遺伝子特異的な発現した核酸に対するプローブのハイブリダイゼーションによって生成されるシグナルを増幅する工程を包含する。

40

【0147】

英国特許出願番号2 202 328号およびPCT国際特許出願公開番号PCT/US89/01025（これらの各々はその全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されるなお他の増幅方法は、本発明に従って使用され得る。前者の出願において、「改変された」プライマーが、PCR様の鋳型および酵素依存性合成において使用される。このプライマーは、捕捉部分（例えば、ビオチン）および／または検出体部分（例えば、酵素）で標識することによって改変され得る。後者の出願において、過剰な標識プローブがサンプルに添加される。標的配列の存在下において、プローブが結合し、そして触媒的に切断される。切断後、標的配列は、過剰のプローブによって結合されるためにインタクトで遊離される。標識プローブの切断は、標的配列の存在を示す。

50

【0148】

他の核酸増幅手順として、転写に基づく増幅系 (TAS) (Kwohら、1989; PCT国際特許出願公開番号WO 88/10315 (その全体が本明細書中に参考として援用される)) が挙げられ、これには、核酸配列に基づく増幅 (NASBA) および3SRが含まれる。NASBAにおいて、核酸は、標準的なフェノール/クロロホルム抽出、サンプルの熱変性、溶解緩衝液を用いる処理、ならびにDNAもしくはRNAの単離のためのミニスピンカラムまたはRNAの塩化グアニジウム抽出によって増幅のために調製され得る。これらの増幅技術は、標的配列に特異的な配列を有するプライマーをアニーリングさせる工程を包含する。重合後、DNA/RNAハイブリッドはRNase Hで消化され、一方、二本鎖DNA分子は再度熱変性される。いずれの場合においても、一本鎖DNAは、第2の標的特異的プライマーの添加によって完全に二本鎖にされ、その後重合する。次いで、二本鎖DNA分子は、ポリメラーゼ (例えば、T7またはSP6) によって複数回転写される。等温サイクル反応において、RNAはDNAに逆転写され、そして再度ポリメラーゼ (例えば、T7またはSP6) を用いて転写される。得られる生成物は、短縮型または完全型のいずれであっても、標的特異的配列を示す。

【0149】

欧州特許出願公開番号329, 822 (その全体が本明細書中に参考として援用される) は、一本鎖RNA (「ssRNA」)、ssDNA、および二本鎖DNA (dsDNA) をサイクル合成する工程を包含する核酸増殖プロセスを開示し、これらは、本発明に従って使用され得る。ssRNAは、第1のプライマーオリゴヌクレオチドのための最初の鑄型であり、逆転写酵素 (RNA依存性DNAポリメラーゼ) によって伸長される。次いで、RNAは、得られるDNA:RNA二重鎖からリボヌクレアーゼH (RNase H、DNAまたはRNAのいずれかと二重鎖を形成したRNAに特異的なRNase) の作用によって除去される。得られたssDNAは、第2のプライマーのための第2の鑄型であり、これはまた、RNAポリメラーゼプロモーター (T7 RNAポリメラーゼによって例示される) の5'からその鑄型に対するその相同性までの配列を含む。次いで、このプライマーは、DNAポリメラーゼ (E. coli DNAポリメラーゼIの大「Klenow」フラグメントによって例示される) によって伸長させられ、プライマー間に最初のRNAの配列と同一の配列を有し、そして一方の端にプロモーター配列をさらに有する、二本鎖DNA (「dsDNA」) 分子として得られる。このプロモーター配列は、DNAの多くのRNAコピーを作製するために適切なRNAポリメラーゼによって使用され得る。次いで、これらのコピーはサイクルに再び入り、非常に迅速な増幅をもたらす得る。酵素の適切な選択を用いて、この増殖は、各サイクルで酵素の添加なしに等温で行われ得る。このプロセスの循環的な性質のために、開始の配列は、DNAまたはRNAのいずれかの形態であるように選択され得る。

【0150】

PCT国際特許出願公開番号WO 89/06700 (その全体が本明細書中で参考として援用される) は、プロモーター/プライマー配列の標的一本鎖DNA (「ssDNA」) へのハイブリダイゼーション、続くこの配列の多くのRNAコピーの転写に基づく核酸配列増幅スキームを開示する。このスキームは、循環性ではない; すなわち、新しい鑄型は、得られたRNA転写物から産生されない。他の増幅方法には、「RACE」 (Frohman、1990) および「ワンサイド (one-sided) PCR」 (Ohara、1989) が挙げられ、これらは当業者に周知である。

【0151】

得られた「ジオリゴヌクレオチド」の配列を有する核酸の存在下で2つの (または2より多い) オリゴヌクレオチドを連結し、それによってジオリゴヌクレオチドを増殖することに基づく方法 (WuおよびDean、1996、その全体が参考として本明細書中に援用される) もまた、本発明のDNA配列の増幅において使用され得る。

【0152】

(生物学的機能的等価物)

改変および変化が、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造においてなされ得、そしてなお、所望の特性を有するポリペプチドをコードする機能的分子を入手し得る。上述のように、特定のポリヌクレオチド配列に1つ以上の変異を導入することがしばしば所望される。特定の状況において、得られるコードされたポリペプチド配列はこの変異によって変更されるか、または他の場合において、このポリペプチドの配列は、コードするポリヌクレオチドにおける1つ以上の変異によっては変化しない。

【0153】

等価物または改善された第2世代の分子さえも作製するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることが所望される場合、このアミノ酸の変化は、表1に従ってDNA配列をコードする1つ以上のコドンを変化させることによって達成され得る。

10

【0154】

例えば、特定のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような構造を有するタンパク質構造中の他のアミノ酸に、感知可能な相互作用的結合能の損失なしで、置換され得る。タンパク質の相互作用的な能力および性質がタンパク質の生物学的機能的活性を規定するので、特定のアミノ酸配列置換は、タンパク質配列、および当然ながら、その根底にあるDNAコード配列においてなされ得、そしてそれにも関わらず、同様の特性を有するタンパク質が入手される。従って、種々の変化が、ペプチドの生物学的有用性または活性の感知可能な損失を伴わずに、開示された組成物のペプチド配列またはそのペプチドをコードする対応するDNA配列においてなされ得ることが意図される。

20

【0155】

【表1】

表 1

アミノ酸			コドン							
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
システイン	Cys	C	UGC	UGU						
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU						
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG						
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU						
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU				
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU						
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
リジン	Lys	K	AAA	AAG						
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
メチオニン	Met	M	AUG							
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU						
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU				
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG						
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU		
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU		
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU				
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU				
トリプトファン	Trp	W	UGG							
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU						

30

40

このような変化を作製する際に、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮され得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、一般的に当該分野において理解されている (KyteおよびDoolittle、1982、本明細書中に参考として援用される)。アミノ酸の相対的な疎水性親水性の性質は、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、これが次に、他の分子 (例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など) とのそのタンパク質の相互作用を規定することが受け入れられている。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて疎水性親水性指標を割り当てられている (KyteおよびDoolittle、1982)。これらの値は以下である：イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8)

50

；フェニルアラニン（＋2.8）；システイン／シスチン（＋2.5）；メチオニン（＋1.9）；アラニン（＋1.8）；グリシン（－0.4）；スレオニン（－0.7）；セリン（－0.8）；トリプトファン（－0.9）；チロシン（－1.3）；プロリン（－1.6）；ヒスチジン（－3.2）；グルタミン酸（－3.5）；グルタミン（－3.5）；アスパラギン酸（－3.5）；アスパラギン（－3.5）；リジン（－3.9）；およびアルギニン（－4.5）。

【0156】

特定のアミノ酸が類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を有するタンパク質を生じる（すなわち、生物学的に機能的に等価なタンパク質をなお入手する）ことが、当該分野において公知である。このような変化を作製する際に、その疎水性親水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その疎水性親水性指標が±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその疎水性親水性指標が±0.5以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。同様なアミノ酸の置換が、親水性に基づいて有効になされ得ることもまた、当該分野で理解されている。米国特許第4,554,101号（その全体が本明細書中に参考として詳細に援用される）は、そのタンパク質の最大局所的平均親水性が、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるので、そのタンパク質の生物学的特性と相関することを言及している。

10

【0157】

米国特許第4,554,101号に詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン（＋3.0）；リジン（＋3.0）；アスパラギン酸（＋3.0±1）；グルタミン酸（＋3.0±1）；セリン（＋0.3）；アスパラギン（＋0.2）；グルタミン（＋0.2）；グリシン（0）；スレオニン（－0.4）；プロリン（－0.5±1）；アラニン（－0.5）；ヒスチジン（－0.5）；システイン（－1.0）；メチオニン（－1.3）；バリン（－1.5）；ロイシン（－1.8）；イソロイシン（－1.8）；チロシン（－2.3）；フェニルアラニン（－2.5）；トリプトファン（－3.4）。アミノ酸は、類似の親水性の値を有する別のアミノ酸に置換され得、そしてなお、生物学的な等価物（特に、免疫学的に等価なタンパク質）を得ることが理解される。このような変化において、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、その親水性値が±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そしてその親水性値が±0.5以内であるアミノ酸の置換がなおより特に好ましい。

20

30

【0158】

上記で概説したように、従って、アミノ酸置換は、一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性（例えば、その疎水性、親水性、電荷、大きさ、など）に基づく。前述の種々の特徴を考慮する典型的な置換は当業者に周知であり、そして以下を含む：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0159】

さらに、任意のポリヌクレオチドが、インビボでの安定性を増加させるためにさらに改変され得る。可能性のある改変として以下が挙げられるがこれらに限定されない：5'末端および／または3'末端での隣接配列の付加；骨格におけるホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用；ならびに／あるいは従来とは異なる塩基（例えば、イノシン、キューオシン、およびワイブトシン、ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル、メチル、チオ、および他の修飾形態）の含有。

40

【0160】

（インビボポリヌクレオチド送達技術）

さらなる実施形態において、本発明の1以上のポリヌクレオチドを含む遺伝子構築物は、インビボで細胞に導入される。これは、種々のまたは周知のアプローチのいずれかを用いて達成され得、これらのいくつかは、例示の目的で以下に概説される。

50

【0161】

(1. アデノウイルス)

1以上の核酸配列のインビボ送達のための好ましい方法の1つは、アデノウイルス発現ベクターの使用を包含する。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a)この構築物のパッケージングを支持するため、および(b)センス方向またはアンチセンス方向でその中にクローニングされたポリヌクレオチドを発現するため、に十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。当然のことながら、アンチセンス構築物の文脈において、発現は、遺伝子産物が合成されることを必要としない。

【0162】

発現ベクターは、一般的にアデノウイルスの遺伝子操作された形態を含む。アデノウイルスの遺伝的構成の知見(36 kb、線状、二本鎖DNAウイルス)は、7 kbまでの外来性配列でアデノウイルスDNAの大きな断片を置換することを可能にする(GrunhausおよびHorwitz、1992)。レトロウイルスとは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体への組込みを生じない。なぜなら、アデノウイルスDNAは、潜在的な遺伝毒性を有さないエピソーム性様式で複製し得るからである。また、アデノウイルスは構造的に安定であり、そして大規模な増幅後にゲノム再構成は検出されなかった。アデノウイルスは、細胞の細胞周期段階に関わりなく、実質的にすべての上皮細胞に感染し得る。今日まで、アデノウイルス感染は、穏やかな疾患(例えば、ヒトの急性呼吸器疾患)にのみに関連しているらしい。

【0163】

アデノウイルスは、その中程度のサイズのゲノム、操作の容易さ、高い力価、広範な標的細胞範囲、および高い感染力のため、遺伝子移入ベクターとしての使用のために特に適している。ウイルスゲノムの両端は100~200塩基対の逆方向反復(ITR)を含み、これらは、ウイルスDNA複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである。ゲノムの初期(E)領域および後期(L)領域は、異なる転写単位を含み、これは、ウイルスDNA複製の開始によって分裂する。E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよびいくつかの細胞遺伝子の転写の調節の原因であるタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現は、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成を生じる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞シャットオフに参与する(Renan、1990)。後期遺伝子の産物(ウイルスキャプシドタンパク質の大多数を含む)は、主要後期プロモーター(MLP)によって与えられる単一の一次転写物の有意なプロセッシング後にのみ発現される。MLP(16.8 m.u.に位置する)は、感染の後期の間に特に効率的であり、そしてこのプロモーターに由来するすべてのmRNAは、5'-3'成分リーダー(TPL)配列(この配列は、RNAを翻訳のために好ましいmRNAにする)を有する。

【0164】

現在の系では、組換えアデノウイルスが、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの間の相同組換えから生成する。2つのプロウイルスベクター間の可能な組換えに起因して、野生型アデノウイルスは、このプロセスから生成され得る。従って、個々のプラークからウイルスの単一クローンを単離すること、およびそのゲノム構造を調べることが重要である。

【0165】

複製欠損である現在のアデノウイルスベクターの生成および増殖は、特有のペルパー細胞株(293と称される)に依存し、そのヘルパー細胞株は、Ad5 DNAフラグメントによりヒト胚性腎臓細胞から形質転換され、そしてE1タンパク質を構成的に発現する(Grahamら、1977)。E3領域は、アデノウイルスゲノムから不必要であるので(JonesおよびShenk、1978)、293細胞の補助のによって、現在のアデノウイルスベクターは、E1もしくはD3のいずれかまたはその両方の領域に、外来DNAを保有する(GrahamおよびPrevec、1991)。本質的には、アデノウイルスは、DNAより約2 k B多い容量を仮定すると、野生型ゲノムの約105%をパッケージ

し得る (G h o s h - C h o u d h u r y ら、1987)。E1 および E3 領域で交換可能である約 5.5 k B の DNA と組合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大容量は、7.5 k B より低いか、またはベクターの全長の約 15 % である。アデノウイルスのウイルス性のゲノムの 80 % より多くは、ベクター骨格内にあり、そしてベクター保有 (b o r n e) 細胞毒性の供給源である。また、E1 欠失ウイルスの複製欠損は、不完全である。例えば、ウイルス遺伝子発現のリーク (l e a k a g e) は、高い多重感染 (M O I) で、現在利用可能なベクターで観察された (M u l l i g a n、1993)。

【0166】

ヘルパー細胞株は、ヒト細胞 (例えば、ヒト胚性腎臓細胞、筋細胞、造血細胞または他のヒト胚性間葉細胞または上皮細胞) に由来し得る。あるいは、ヘルパー T 細胞は、ヒトアデノウイルス許容性である他の哺乳動物種の細胞に由来し得る。このような細胞としては、例えば、V e r o 細胞または他のサル胚性間葉細胞または上皮細胞が挙げられる。上記のように、現在、好ましいヘルパー細胞株は、293 である。

【0167】

最近、R a c h e r ら (1995) は、293 細胞の培養およびアデノウイルスの増殖についての改良方法を開示した。1つのフォーマットにおいて、天然の細胞の凝集物は、100 ~ 200 ml の培地を含む 1 リットルのシリコン処理した攪拌フラスコ (T e c h n e, C a m b r i g e、UK) 内に、個々の細胞を接種することによって増殖する。40 r p m の攪拌後、細胞生存度を、トリパンブルーで評価する。別のフォーマットにおいて、F i b r a - C e l マイクロキャリア (B i b b y S t e r l i n、S t o n e、UK) (5 g / l) を、以下のように使用する。5 ml の培地に再懸濁された細胞接種物を、250 ml の E r l e n m e y e r フラスコ中のキャリア (50 ml) に添加し、そして時々攪拌しながら、1 ~ 4 時間、静止させておく。次いで培地を、50 ml の新鮮な培地で置換し、そして振盪を開始する。ウイルス産生のために、細胞を、約 80 % のコンフルエンスまで増殖させ、その後、培地を置換し (最終容量の 25 % まで)、そしてアデノウイルスを 0.05 の M O I で添加する。培養物を、一晩静止させ、その後容量を 100 % まで増やし、そしてさらに 72 時間の振盪を開始する。

【0168】

アデノウイルスベクターは、複製欠損または少なくとも条件付で欠損であるという必要性以外に、アデノウイルスベクターの特性は、本発明の実施の成功に重要でないと考えられる。アデノウイルスは、42 の異なる公知の血清型またはサブグループ A ~ F のいずれかのアデノウイルスであり得る。サブグループ C のアデノウイルス 5 型は、本発明において使用するための条件付複製欠損アデノウイルスベクターを得るために好ましい開始物質である。なぜならアデノウイルス 5 型は、大量の生化学的情報および遺伝学的情報が公知であるヒトアデノウイルスであり、そしてそれは、ベクターとしてアデノウイルスを使用するほとんどの構築物に歴史的に使用されてきたからである。

【0169】

上記のように、本発明による代表的なベクターは、複製欠損であり、そしてアデノウイルス E1 領域を有さない。従って、目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、E1 コード配列が除去された位置に導入することが最も簡便である。しかし、アデノウイルス配列内の構築物の挿入の位置は、本発明に重要ではない。目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドはまた、K a r l s s o n ら (1986) に記載されるように、E3 置換ベクターに、欠失した E3 領域の代わりに挿入され得るか、またはヘルパー細胞株またはヘルパーウイルスが E4 欠損を補足する E4 領域に挿入され得る。

【0170】

アデノウイルスは、容易に増殖し、かつ容易に操作され、そしてインビトロおよびインビボでの広い宿主範囲を示す。この群のウイルスは、高い力価 (例えば、 $10^9 \sim 10^{11}$ プラーク形成ユニット / ml) で得られ得、そしてそれらは非常に感染性である。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない。アデノウイルスベクターによって送達された外来遺伝子は、エピソーム性であり、従って、宿主細胞に対して低

10

20

30

40

50

い遺伝毒性を有する。副作用は、野生型アデノウイルスでのワクチン接種の研究において報告されていない (Couchら、1963; Topら、1971)。このことは、インビボ遺伝子トランスファーベクターとしてのそれらの安全かつ治療的な可能性を示す。

【0171】

アデノウイルスベクターを、真核生物遺伝子発現 (Levreroら、1991; Gomez-Foxら、1992) およびワクチンの開発 (GrunhausおよびHorwitz、1992; GrahamおよびPrevec、1992) に使用した。最近、動物研究は、組換えアデノウイルスが、遺伝子療法に使用され得ることを示唆した (Stratford-PerricaudetおよびPerricaudet、1991; Stratford-Perricaudetら、1990; Richら、1993)。異なる組織に組換えアデノウイルスを投与する際の研究としては、気管点滴注入法 (Rosenfeldら、1991; Rosenfeldら、1992)、筋肉注射 (Ragotら、1993)、末梢静脈内注射 (HerzおよびGerard、1993) および脳における定位接種法 (Le Gal La Salleら、1993) が挙げられる。

10

【0172】

(2. レトロウイルス)

レトロウイルスは、逆転写のプロセスによって感染された細胞においてそれらのRNAを2本鎖DNAに転換する能力によって特徴付けられる一本鎖RNAウイルスの群である (Coffin、1990)。次いで、生じるDNAを、プロウイルスとして細胞染色体に安定に組み込み、そしてウイルスタンパク質を合成させる。この組み込みは、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持を生じる。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする3つの遺伝子 (gag、polおよびenv) を含む。gag遺伝子上流に見出された配列は、ビリオンへのゲノムのパッケージングのためのシグナルを含む。2つの長い末端反復 (LTR) 配列は、ウイルスゲノムの5' および3' 末端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、そしてまた宿主細胞ゲノムへの組み込みに必要とされる (Coffin、1990)。

20

【0173】

レトロウイルスベクターを構築するために、1つ以上の目的のオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列をコードする核酸が、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入され、複製欠損であるウイルスを作製する。ビリオンを作製するために、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含むが、LTR成分およびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株が構築される (Mannら、1983)。レトロウイルスLTR配列およびパッケージング配列と一緒にcDNAを含む組換えプラスミドがこの細胞株に (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって) 導入される場合、パッケージング配列は、ウイルス粒子にパッケージングされる組換えプラスミドのRNAの転写を可能にし、次いで培養培地に分泌される (NicolasおよびRubenstein、1988; Temin、1986; Mannら、1983)。次いで、この組換えレトロウイルスを含む培地は、収集され、必要に応じて、濃縮され、そして遺伝子移入のために使用される。レトロウイルスベクターは、広範な細胞型に感染し得る。しかし、組み込みおよび安定な発現は、宿主細胞の分裂を必要とする (Paskindら、1975)。

30

40

【0174】

レトロウイルスベクターの特異的な標的化を可能にするように設計された新規なアプローチが最近、ラクトース残基のウイルスエンベロープへの化学的な付加によるレトロウイルスの化学的な改変に基づいて、開発された。この改変は、シアログリコタンパク質レセプターを介する肝細胞の特異的な感染を可能にし得る。

【0175】

組換えレトロウイルスの標的化のための異なるアプローチが、設計され、この方法においては、レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するビオチン化抗体および特定の細胞レセプターに対するビオチン化抗体が使用された。この抗体は、ストレプトアビジンを使

50

用することによってビオチン成分を介して結合された（Rouxら、1989）。主な組織適合性複合体の、クラスI型抗原およびクラスII型抗原に対する抗体を使用して、著者らは、インビトロでエコトロピックウイルスを伴った細胞表面抗原を保持する種々のヒト細胞の感染を実証した（Rouxら、1989）。

【0176】

（3．アデノ随伴ウイルス）

AAV（Ridgeway, 1988; HermonatおよびMuzyczska, 1984）は、パルボウイルス（parovirus）であり、アデノウイルスのストックの汚染物質として発見された。AAVは、いかなる疾患にも関連していない偏在する（抗体は、アメリカ人の集団の85%に存在する）ウイルスである。AAVはまた、AAVの複製がヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス）の存在に依存するので、デPENDウイルスとして分類される。5つの血清型が単離されている。そのうち、AAV-2は、最も特徴付けされている。AAVは、キャプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3にキャプシド形成され、直径20nm～24nmの正二十面体のビリオンを形成する、一本鎖の線状DNAを有する（MuzyczkaおよびMcLaughlin, 1988）。

10

【0177】

このAAV DNAは、約4.7キロ塩基長である。このDNAは、2つのオープンリーディングフレームを含み、そして2つのITRに隣接される（図2）。AAVゲノム中には、2つの主な遺伝子（repおよびcap）が存在する。rep遺伝子は、ウイルスの複製を担うタンパク質をコードし、これに対し、capは、キャプシドタンパク質VP1-3をコードする。各々のITRは、T形状のヘアピン構造を形成する。これらの末端繰り返しは、染色体組み込みのために必須のAAVのcis成分のみである。従って、このAAVは、送達のための遺伝子のカセットによって、全てのウイルスコード配列が除去および置換されたベクターとして使用され得る。それらの地図位置に従って、3つのウイルスプロモーターが同定され、そしてp5、p19、およびp40と称されている。p5およびp19からの転写はrepタンパク質の産生を生じ、そしてp40からの転写はキャプシドタンパク質を産生する（HermonatおよびMuzyczka, 1984）。

20

【0178】

発現ベクターとしてrAAVを使用する可能性を研究するために研究者を駆り立てるいくつかの要因が存在する。1つは、宿主染色体に組み込むために遺伝子を送達する必要性が、驚くべきことに少ないことである。145bpのITR（AAVゲノムのわずか6%である）を有することが必要である。これは、4.5kbのDNA挿入物を作製する余地をベクター残す。これは、AAVが大きな遺伝子を送達するのを妨げ得る、能力を保有するが、本発明のアンチセンス構築物を送達するのに十分に適している。

30

【0179】

AAVはまた、その安全性に起因して、送達ビヒクルの優れた選択である。相対的に複雑なレスキュー機構が存在する：野生型のアデノウイルス遺伝子だけでなく、AAV遺伝子もrAAVを動員する必要がある。同様に、AAVは、病原性ではなく、そしていかなる疾患にも関連しない。ウイルスコード配列の除去は、ウイルス遺伝子発現に対する免疫反応を最小化し、従って、rAAVは、炎症応答を生じない。

40

【0180】

（4．発現構築物としての他のウイルスベクター）

他のウイルスベクターを、宿主細胞へのオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列の送達のための本発明における発現構築物として用いてもよい。ワクシニアウイルス（Ridgeway, 1988; Comparら、1988）、レンチウイルス、ポリオウイルス、およびヘルペスウイルスのようなウイルス由来のベクターを用いてもよい。これらは、種々の哺乳動物細胞に、いくつかの魅力のある特性を提供する（Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Comparら、1988; Horwichら、1990）。

【0181】

50

B型ヘルペス欠損ウイルスの最近の認識によると、新しい見識は、異なるウイルス配列の構造－機能の関連性を与えた。インビトロでの研究は、このウイルスが、そのゲノムの80%までの欠失にもかかわらず、ヘルパー依存パッケージングおよび逆転写についての能力を保持し得ることを示した(Horwichら、1990)。このことは、ゲノムの大部分が外来の遺伝物質と交換され得ることを示唆した。肝臓向性(hepatotropism)および持続(組込み)は、肝臓指向性遺伝子移入についての特に魅力的な特性であった。Changら、(1991)は、ポリメラーゼコード配列、表面コード配列、および前表面(presurface)コード配列に代えて、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子をアヒルB型肝炎ウイルスゲノムに導入した。これを、野生型ウイルスと共に、トリ肝炎細胞株へと、同時トランスフェクトした。高力価の組換えウイルスを含む培養培地を用いて、初代仔ガモ肝細胞を感染させた。安定なCAT遺伝子発現を、トランスフェクション後の少なくとも24日間検出した(Changら、1991)。

【0182】

(5. 非ウイルスベクター)

本発明のオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列の発現をもたらすために、発現構築物は、細胞に送達されなければならない。この送達は、細胞株を形質転換するための実験手順の際のように、インビトロで達成され得るか、または特定の疾患状態の処置の際のように、インビボもしくはエキソビボで達成され得る。上記のように、送達のための1つの好ましい機構は、ウイルス感染を介する機構であり、ここで、発現構築物は、感染性ウイルス粒子の中にカプセル化される。

【0183】

一旦、発現構築物が、細胞の中に送達されると、所望のオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列をコードする核酸は、異なる部位に配置され、そして異なる部位で発現し得る。特定の実施形態では、この構築物をコードする核酸は、細胞のゲノムの中に安定に組込まれ得る。この組込みは、相同組換え(遺伝子置換)を介する特定の位置および特定の配向であってもよいし、またはこれは無作為な非特異的な位置に組込まれてもよい(遺伝子増強)。なおさらなる実施形態では、核酸は、DNAの別個のエピソームセグメントとして、細胞の中で安定に維持され得る。このような核酸セグメント、または「エピソーム」は、宿主細胞周期から独立して、または宿主細胞周期に同調して維持および複製させるのに十分な配列をコードする。どのように発現構築物を細胞に送達させ、そして細胞の中のどこで核酸を維持するかは、用いられる発現構築物の型に依存する。

【0184】

本発明の特定の実施形態では、1つ以上のオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列を含む発現構築物は、単に、裸の組換えDNAまたはプラスミドから構成されてもよい。この構築物の移入は、細胞膜を物理的または化学的に透過化処理する、上記の方法のいずれかにより行われ得る。このことは、特に、インビトロでの移入に適用可能であるが、これはインビボでの使用でも同様に適用され得る。Dubenskyら、(1984)は、ポリオーマウイルスDNAを、成体および新生仔マウスの肝臓および腎臓に、リン酸カルシウム沈殿物の形態で首尾良く注入した。これは、能動的ウイルス複製および急性感染を実証した。BenvenistyおよびReshef(1986)はまた、沈降リン酸カルシウムプラスミドの直接的腹腔内注入が、トランスフェクトした遺伝子の発現を生じることを実証した。目的の遺伝子をコードするDNAはまた、インビボで同じ様式で移入され得、遺伝子産物を発現することが想定される。

【0185】

細胞の中に裸のDNA発現構築物を移入するための本発明の別の実施形態では、粒子子銃(particle bombardment)を包含し得る。この方法は、DNAをコーティングした微粒子を、この粒子が細胞膜を貫き、そして細胞を殺すことなく細胞に侵入することが可能な高速まで加速させる能力に依存する(Kleinら、1987)。小さな粒子を加速させるためのいくつかの装置が、開発されている。このような装置の1つ

は、高電圧放電に依存して電流を発生させ、これは、次いで原動力を提供する（Yangら、1990）。用いられる微粒子は、タングステンビーズまたは金ビーズのような生物学的に不活性な物質からなっている。

【0186】

ラットおよびマウスの肝臓組織、皮膚組織、および筋肉組織を含む選択された器官は、インビボでボンバードされた（Yangら、1990；Zeleninら、1991）。このことは、銃と標的器官との間の任意の介在組織を除去する（すなわち、エキソビボ処置）ための、組織または細胞の外科的露出を必要とし得る。また、特定の遺伝子をコードするDNAは、この方法を介して送達され、そしてなお本発明に含まれ得る。

【0187】

（アンチセンスオリゴヌクレオチド）

遺伝子情報の流れの最終的結果は、タンパク質の合成である。DNAは、ポリメラーゼによってメッセンジャーRNAへと転写され、そしてリボソーム上で翻訳されて、フォールディングされた機能性タンパク質が生じる。従って、この経路に沿って、タンパク質合成が阻害され得るいくつかの段階が存在する。本明細書中に記載されるポリペプチドをコードするネイティブのDNAセグメントは、すべての哺乳動物DNA鎖のように、水素結合により結合された2つの鎖（センス鎖およびアンチセンス鎖）を有する。ポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAは、センスDNA鎖と同じヌクレオチド配列を有するが、ただし、そのDNAのチミジンがウリジンに置き換わっている。従って、合成アンチセンスヌクレオチド配列は、mRNAに結合し、そしてそのmRNAによりコードされるタンパク質の発現を阻害する。

【0188】

従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドにmRNAを標的とさせることは、タンパク質合成を妨げるための1つの機構であり、結果的に、強力かつ標的化された治療アプローチを示す。例えば、ポリガラクトナーゼ（polygalacturonase）の合成および2型ムスカリンアセチルコリンレセプターは、そのそれぞれのmRNA配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号（各々その全体が、本明細書中に詳細に参考として援用される））。さらに、アンチセンス阻害の例が、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクトリン、STK-1、線条体GABA_AレセプターおよびヒトEGFを用いて示されている（Jaskulskiら、1988；VasanthakumarおよびAhmed、1989；Perisら、1998；米国特許第5,801,154号；同第5,789,573号；同第5,718,709号および同第5,610,288号（各々その全体が、本明細書中に詳細に参考として援用される））。種々の異常な細胞増殖（例えば、癌）を阻害しそして処置するために使用され得る、アンチセンス構築物もまた、記載されている（米国特許第5,747,470号；同第5,591,317号および同第5,783,683号（各々その全体が、本明細書中に詳細に参考として援用される））。

【0189】

従って、例示的实施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列に特異的に結合し得る任意の配列もしくはその相補体のすべてまたは一部を含む、オリゴヌクレオチド配列を提供する。1つの実施形態において、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAまたはその誘導体を含む。別の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、RNAまたはその誘導体を含む。第3の実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート改変骨格を含む、改変DNAである。第4の実施形態において、そのオリゴヌクレオチド配列は、ペプチド核酸またはその誘導体を含む。各場合において、好ましい組成物は、本明細書中に開示されるポリヌクレオチドのうちの1つ以上の部分に相補的な、より好ましくは実質的に相補的な、そしてさらにより好ましくは完全に相補的な、配列領域を含む。

【0190】

10

20

30

40

50

所定の遺伝子配列に特異的なアンチセンス組成物の選択は、選択された標的配列（すなわち、これらの例示的例においては、ラット配列およびヒト配列）の分析ならびに二次構造、 T_m 、結合エネルギー、相対的安定性の決定に基づき、そしてアンチセンス組成物は、二量体、ヘアピン、または宿主細胞において標的 mRNA への特異的結合を減少もしくは妨げる他の二次構造をそれらが形成できない相対的能力に基づいて選択された。

【0191】

mRNA の非常に好ましい標的領域は、AUG 翻訳開始コドンの領域またはその付近の領域、および mRNA の 5' 領域と実質的に相補的な配列である。これらの二次構造分析および標的部位選択の考慮は、OLIGO プライマー分析ソフトウェアのバージョン 4 (Rychlik, 1997) および BLASTN 2.0.5 アルゴリズムソフトウェア (Altschul ら, 1997) を使用して実施された。 10

【0192】

短いペプチドベクター (MPG (27 残基) と称する) を使用するアンチセンス送達法の使用もまた意図される。この MPG ペプチドは、HIV gp41 の融合配列由来の疎水性ドメインと、SV40 T 抗原の核局在化配列由来の親水性ドメインとを含む (Morris ら, 1997)。この MPG ペプチドのいくつかの分子がアンチセンスオリゴヌクレオチドをコートし、そして比較的高効率 (90%) で 1 時間未満で培養哺乳動物細胞へと送達され得ることが示された。さらに、MPG との相互作用は、ヌクレアーゼに対するそのオリゴヌクレオチドの安定性および原形質膜を横切る能力の両方を強力に増加させる (Morris ら, 1997)。 20

【0193】

(リボザイム)

タンパク質が伝統的に、核酸の触媒のために使用されているが、別の種類の高分子が、この試みにおいて有用であるとして出現した。リボザイムは、部位特異的様式で核酸を切断する RNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を保有する特異的触媒ドメインを有する (Kim および Cech, 1987; Gerlach ら, 1987; Forster および Symson, 1987)。例えば、多数のリボザイムが、高い程度の特異性でホスホエステル転移反応を促進し、しばしば、オリゴヌクレオチド基質中の数個のホスホエステルのうちの 1 つだけを切断する (Cech ら, 1981; Michel および Westhof, 1990; Reinhold-Hurek および Shub, 1992)。この特異性は、この基質が、化学反応の前にリボザイムの内部ガイド配列 (「IGS」) との特異的塩基対形成相互作用を介して結合するという要件に帰せられている。 30

【0194】

リボザイム触媒は、主に、核酸を含む配列特異的切断/連結反応の一部として観察されている (Joyce, 1989; Cech ら, 1981)。例えば、米国特許第 5,354,855 号 (詳細に本明細書中に参考として援用される) は、特定のリボザイムが、配列特異性が既知のリボヌクレアーゼの配列特異性よりも高くかつ DNA 制限酵素の配列特異性に近い、エンドヌクレアーゼとして作用し得ることを報告している。従って、遺伝子発現の配列特異的リボザイム媒介性阻害は、治療適用に特に適切であり得る (Scanlon ら, 1991; Sarver ら, 1990)。最近、リボザイムが適用されたいくつかの細胞株においてそのリボザイムが遺伝子変化を惹起したこと; その変化した遺伝子がオンコジーンである H-ras、c-fos および HIV の遺伝子を含んだことが、報告された。この研究のほとんどは、特定のリボザイムにより切断される特定の変異体コドンに基づく、標的 mRNA の改変を含んだ。 40

【0195】

天然に存在する酵素的 RNA の 6 つの基本的変種が、現在公知である。各々が、生理学的条件下で、トランスで、RNA ホスホジエステル結合の加水分解を触媒し得 (従って、他の RNA 分子を切断し得) る。一般に、酵素的核酸は、まず、標的 RNA への結合によって作用する。このような結合は、標的 RNA を切断するように作用する分子の酵素的部分 50

に近接して保持される、酵素的核酸の標的結合部分を介して生じる。従って、その酵素的核酸はまず、標的RNAを認識し、次いで相補的塩基対形成を介してその標的RNAに結合し、そして一旦正確な部位に結合すると、その標的RNAを酵素的に切断するように作用する。このような標的RNAの戦略的切断は、コードされるタンパク質を直接合成する能力を破壊する。酵素的核酸がそのRNA標的に結合しそして切断した後、その酵素的核酸は、別の標的を探索するためにそのRNAから離れ、そして繰り返し、新しい標的に結合しそして切断し得る。

【0196】

リボザイムの酵素特性は、多くの技術（例えば、アンチセンス技術（ここで、核酸分子は、翻訳を阻害するために核酸標的に簡単に結合する））に対して有利である。なぜなら、治療的処置に影響を与えるのに必要であるリボザイムの濃度は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度よりも低いからである。この利点は、酵素学的に作用するリボザイムの能力に影響を与える。従って、単一のリボザイム分子は、標的RNAの多くの分子を切断し得る。さらに、このリボザイムは、高度に選択的なインヒビターであり、この阻害の特異性は、標的RNAに結合する塩基対形成の機構に依存するだけでなく、標的RNAの切断の機構にも依存する。切断部位付近の1個のミスマッチまたは塩基置換により、リボザイムの触媒活性が完全になくなり得る。アンチセンス分子内の同様のミスマッチでは、それらの作用は妨げられない（Woolfら、1992）。従って、リボザイムの作用の特異性は、同じRNA部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用の特異性よりも高い。

10

20

【0197】

この酵素学的核酸分子は、ハンマーヘッドモチーフ、ヘアピンモチーフ、 δ 型肝炎ウイルスモチーフ、I群イントロンモチーフまたはRNaseP RNAモチーフ（RNA誘導配列に関連する）あるいはNeurospora VS RNAモチーフにおいて形成され得る。ハンマーヘッドモチーフの例は、Rossiら（1992）に記載される。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら（欧州特許出願公開番号EP 0360257）、HampelおよびTritz（1989）、Hampelら（1990）および米国特許第5,631,359号（本明細書中で詳細に参考として援用される）に記載される。 δ 型肝炎ウイルスモチーフの例は、PerrottaおよびBeen（1992）に記載される；RNasePモチーフの例は、Guerrier-Takadaら（1983）に記載される；Neurospora VS RNAリボザイムモチーフは、Collins（SavilleおよびCollins, 1990；SavilleおよびCollins, 1991；CollinsおよびOlive, 1993）に記載される；そしてI群イントロンの例は、米国特許第4,987,071号に記載される（本明細書中で詳細に参考として援用される）。本発明の酵素学的核酸分子において重要であることは、1以上の標的遺伝子RNA領域に相補的である特定の基質結合部位を有すること、およびこの分子にRNA切断活性を付与する基質結合部位内にヌクレオチド配列を有することまたはこの基質結合部位を取り囲むヌクレオチド配列を有することだけである。従って、リボザイム構築物は、本明細書中に記載される特定のモチーフに限定する必要はない。

30

【0198】

特定の実施形態において、所望の標的のRNA（例えば、本明細書中において開示される配列の1つ）に対して高度の特異性を示す、酵素学的切断試薬を産生することが重要であり得る。好ましくは、この酵素学的核酸分子は、標的mRNAの高度に保存された配列領域に対して標的化される。このような酵素学的核酸分子は、必要とされる場合、特定の細胞に外因的に送達され得る。あるいは、このリボザイムは、特定の細胞に送達されるDNAベクターまたはRNAベクターから発現され得る。

40

【0199】

小さな酵素学的核酸モチーフ（例えば、ハンマーヘッド構造またはヘアピン構造のモチーフ）はまた、外因的送達のために使用され得る。これらの分子の単純な構造は、酵素学的核酸がmRNA構造の標的化領域に浸潤する能力を増大させる。あるいは、触媒RNA分

50

子は、真核生物のプロモータにより細胞内で発現され得る（例えば、Scanlonら、1991；Kashani-Sabetら、1992；Dropulicら、1992；Weerasingheら、1991；Ojwangら、1992；Chenら、1992；Sarverら、1990）。当業者は、任意のリボザイムが、適切なDNAベクター由来の真核生物細胞において発現され得ることを理解する。このようなリボザイムの活性は、第二リボザイムによる第一転写物からの解放によって増強され得る（国際特許出願公開番号WO 93/23569、および国際特許出願公開番号WO 94/02595（これらの両方は、参考として本明細書によって援用される）；Ohkawaraら、1992；Tairaら、1991；ならびにVenturaら、1993）。

【0200】

リボザイムは、直接的に添加されるか、またはリボザイム内にパッケージングされたカチオン性脂質と共に複合体化され（脂質複合体）、さもなくば、標的細胞に送達され得る。RNAまたはRNA複合体は、生体高分子中に取り込んだ状態または取り込んでない状態で、注射、エアロゾル吸入、注入ポンプまたはステントを介して、関連する組織（エキソビボ、またはインビボ）に局所的に投与され得る。

【0201】

リボザイムは、国際特許出願公開番号WO 93/23569および国際特許出願公開番号WO 94/02595（各々は、本明細書中で参考として詳細に援用される）に記載されるように設計され得、そして記載されるようにインビトロおよびインビボにおいて試験するために合成され得る。このようなリボザイムはまた、送達するために最適化され得る。特定の例が提供されるが、当業者は、他の種において等価なRNA標的が、必要な場合に利用され得ることを理解する。

【0202】

ハンマーヘッドリボザイムまたはヘアピンリボザイムを、コンピュータフォールディング（Jaegerら、1989）によって個々に分析し、リボザイム配列が、適切な2次構造に折り畳まれたかどうかを評価し得る。結合アーム（binding arm）と触媒中心との間で好ましくない分子内相互作用を有するこれらのリボザイムは、考慮から外される。種々の結合アームの長さが、活性を最適化するために選択され得る。一般に、各アームにおいて少なくとも5個以上の塩基が標的RNAに結合するか、さもなくばこの標的RNAと相互作用し得る。

【0203】

ハンマーヘッドモチーフまたはヘアピンモチーフのリボザイムは、mRNAメッセージの種々の部位に対してアニールするように設計され得、そして化学的に合成され得る。使用される合成の方法は、Usmanら（1987）およびScaringeら、（1990）に記載されるように通常のRNA合成のための手順に従い、そして一般的な核酸保護基および連結基（例えば、5'末端においてジメトキシトリチルおよび3'末端においてホスホルアミダイト）が使用される。平均的、段階的な連結収率は、代表的に、98%より高い。ヘアピンリボザイムは、2個の部分で合成され得、そして活性リボザイムを再構築するためにアニールされ得る（ChowriraおよびBurke、1992）。リボザイムは、大規模に改変され得、ヌクレアーゼ耐性基を用いて改変すること（例えば、2'-アミノ、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-オ-メチル、2'-H（概説のために、例えばUsmanおよびCedergren、1992を参照のこと））によって安定性が増大され得る。リボザイムは、一般的な方法を使用するゲル電気泳動または高圧液体クロマトグラフィーによって精製され得、そして水中に再懸濁され得る。

【0204】

リボザイムの活性は、リボザイムの結合アームの長さを変更することにより、または血清リボヌクレアーゼによる分解を防ぐ改変（例えば、国際特許出願公開番号WO 92/07065；Perraultら、1990；Piekenら、1991；UsmanおよびCedergren、1992；国際特許出願公開番号WO 93/15187；国際特許出願公開番号WO 91/03162；欧州特許出願公開番号92110298. 4

10

20

30

40

50

；米国特許第5, 334, 711号；および国際特許出願公開番号WO 94/13688（これには、酵素学的RNA分子の糖部分に対して成され得る、種々の化学的修飾が記載される）を参照のこと）、細胞中でのリボザイムの有効性を増強する改変、ならびにRNAの合成時間を短縮および化学的必要性を低下させるための幹（stem）II塩基の除去によって、リボザイムを化学的に合成することによって最適化され得る。

【0205】

Sullivanら（国際特許出願公開番号WO 94/02595）は、酵素学的RNA分子の送達のための一般的な方法を記載する。リボザイムは、当業者に公知の種々の方法によって細胞に投与され得、これらには、リボソームへのカプセル化、イオン導入法、あるいは、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体接着性ミクロスフィアのような他のビヒクルへの取り込みによるもの、が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの指針のために、リボザイムは、エキソビボで細胞または組織に、上記のビヒクルを使用してか、または使用せずに直接送達され得る。あるいは、RNA／ビヒクルの組合せは、直接的な吸入、直接的な注射、またはカテーテル、注入ポンプまたはステントの使用により、局所的に送達され得る。他の送達経路としては、血管内注射、筋内注射、皮下注射または関節注射、エアロゾル吸入、経口送達（錠形態または丸薬形態）、局所送達、全身送達、眼送達、腹腔内送達および／またはくも膜下送達が挙げられるが、これらに限定されない。リボザイム送達および投与のより詳細な記載は、国際特許出願公開番号WO 94/02595および国際特許出願公開番号WO 93/23569（各々は、本明細書中で参考として詳細に援用される）に提供される。

10

20

【0206】

高濃度のリボザイムを細胞内に蓄積する別の手段は、リボザイムコード配列をDNA発現ベクターに組み込むことである。リボザイム配列の転写は、真核生物RNAポリメラーゼI（pol I）、RNAポリメラーゼII（pol II）、またはRNAポリメラーゼIII（pol III）のためのプロモーターにより駆動される。pol IIプロモーターまたはpol IIIプロモーターからの転写物は、全ての細胞内で高レベルで発現される；所定の細胞型における所定のpol IIプロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子調節配列（エンハンサー、サイレンサーなど）の性質に依存する。原核生物のRNAポリメラーゼプロモーターもまた使用され得るが、但し、原核生物RNAポリメラーゼ酵素は、適切な細胞において発現される（Elroy-SteinおよびMoss、1990；GaoおよびHuang、1993；Lieberら、1993；Zhouら、1990）。このようなプロモーターから発現するリボザイムは、哺乳動物細胞において機能し得る（例えば、Kashani-Saberら、1992；Ojwangら、1992；Chenら、1992；Yuら、1993；L'Huillierら、1992；Liszewiczら、1993）。このような転写ユニットは、哺乳動物細胞内への導入のための種々のベクター（プラスミドDNAベクター、ウイルスDNAベクター（例えば、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ベクター）、またはウイルスRNAベクター（例えば、レトロウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター）が挙げられるがこれらに限定されない）に組み込まれ得る。

30

【0207】

リボザイムを診断道具として使用して、疾患細胞内の遺伝的変動および変異を試験し得る。これらをまた使用して、標的RNA分子のレベルを評価し得る。リボザイム活性と標的RNAの構造との間の緊密な関係は、標的RNAの塩基対形成および3次元構造を変える分子の任意の領域における変異の検出を可能にする。複数のリボザイムを使用することにより、インビトロならびに細胞および組織でのRNAの構造および機構に対して重要であるヌクレオチドの変化をマップし得る。リボザイムを用いる標的RNAの切断を使用して、遺伝子発現を阻害し得、そして疾患の進行における特定の遺伝子産物の役割（必須性）を規定し得る。この様式で、他の遺伝子標的が、その疾患の重要な媒介物として、規定され得る。これらの研究は、併用治療の可能性（例えば、異なる遺伝子を標的とする複数のリボザイム、公知の低分子インヒビターに結合したリボザイム、あるいはリボザイムおよ

40

50

び／または他の化学的分子もしくは生物学的分子と組み合わせた間欠性処置）を提供することにより、疾患の進行のより良好な処置をもたらす。リボザイムの他のインビトロでの他の使用は、当該分野で周知であり、そして I L-5 に関連する状態に関する m R N A の存在の検出を含む。このような R N A は、標準的な方法を使用してリボザイムと共に処置した後に、切断産物の存在を決定することによって検出される。

【0208】

（ペプチド核酸）

特定の実施形態において、本発明者は、本発明の方法の実施において、ペプチド核酸（P N A）の使用を考慮した。P N A は、核酸塩基が、偽ペプチド骨格に結合された D N A 模倣物である（G o o d および N i e l s e n、1997）。P N A は、R N A または D N A を伝統的に使用した複数の方法において利用され得る。時々、P N A 配列は、対応する R N A 配列または D N A 配列よりも技術的により良く実施され、そして R N A にも D N A にも固有でない有用性を有する。産生方法、使用の特徴付け、および使用方法を含む P N A の総説は、C o r e y（1997）によって提供され、そして本明細書中で参考として援用される。このように、特定の実施形態において、A C E m R N A 配列の 1 以上の部分に相補的である P N A 配列を調製し得、そしてこのような P N A 組成物は、A C E-特異的 m R N A の翻訳を調節、変更、減少、または低下させるために使用され得、これにより、このような P N A 組成物が投与される宿主細胞において A C E 活性のレベルを変更する。

10

【0209】

P N A は、正常な D N A のホスホジエステル骨格を置換する 2-アミノエチル-グリシン連結を有する（N i e l s e n ら、1991；H a n v e y ら、1992；H y r u p および N i e l s e n、1996；N e i l s e n、1996）。この化学は、3つの重要な結果を有する。第 1 に、D N A またはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドと比較して、P N A は、中性の分子であり；第 2 に、P N A は、アキラル（立体選択的な合成を開発する必要がない）であり；そして第 3 に、P N A 合成は、標準的な B o c プロトコル（D u e h o l m ら、1994）または F m o c プロトコル（T h o m s o n ら、1995）を、固相ペプチド合成に使用する。一方、改良型 M e r r i f i e l d 法を含む他の方法が使用される（C h r i s t e n s e n ら、1995）。

20

【0210】

P N A モノマーまたは既製のオリゴマーは、P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s（F r a m i n g h a m, M A）から市販されている。B o c プロトコルまたは F m o c プロトコルのいずれかによる P N A の合成は、手動プロトコルまたは自動プロトコルを使用して簡単に実施される（N o r t o n ら、1995）。この手動プロトコルは、それ自体で、化学的に修飾された P N A の産生または密接に関係する P N A のファミリーの同時合成を導く。

30

【0211】

ペプチドの合成に関して、特定の P N A 合成の成功は、選択した配列の特性に依存する。例えば、理論上、P N A は、ヌクレオチド塩基の任意の組合せを取り込み得るが、隣接するプリンの存在は、産生の際に、1 以上の残基の欠失を導き得る。この困難性を見越して、隣接するプリンを有する P N A を産生する際に、非効率的に加えられているようである残基の連結を繰り返すべきであることを提案する。この後、ペプチド合成の間に観測されるのと類似する産物の収率および純度を提供する逆相高圧液体クロマトグラフィーによって P N A を精製すべきである（N o r t o n ら、1995）。

40

【0212】

所与の適用のための P N A の修飾が、固相合成の間にアミノ酸を連結することによって、または露出された N 末端アミンにカルボン酸基を含む化合物を付加することによって達成され得る。あるいは、P N A は、導入されたリジンまたはシステインに連結することによって合成した後に修飾され得る。P N A が修飾され得る簡便さにより、より良い溶解度または特定の機能的必要性の最適化を容易にする。一旦合成されると、P N A およびそれら

50

の誘導体の同定は、質量分析器によって確認され得る。いくつかの研究が、PNAの修飾物を作製および利用した(Nortonら、1995; Haaimaら、1996; Stetsenkoら、1996; Petersenら、1995; Ulmannら、1996; Kochら、1995; Orumら、1995; Footerら、1996; Griffithら、1995; Kremiskyら、1996; Pardridgeら、1995; Boffaら、1995; Landsdorpら、1996; Gambacorti-Passeriniら、1996; Armitageら、1997; Seegerら、1997; Ruskowskiら、1997)。米国特許第5,700,922号は、PNA-DNA-PNAキメラ分子および診断におけるその分子の使用、生物中で修飾するタンパク質、ならびに治療に対して影響を受け易い状態の処置について議論する。

10

【0213】

負に荷電した連結を含有するDNAおよびRNAと対照的に、PNA骨格は、中性である。この劇的な変更にも係らず、PNAは、Watson-Crick対形成によって相補的なDNAおよびRNAを認識し(Egholmら、1993)、Nielsenら(1991)による初期のモデリングを確証する。PNAは、3'~5'の極性を欠き、そして平行様式または逆平行様式のいずれかで結合し得るが、逆平行様式が好ましい(Egholmら、1993)。

【0214】

DNAオリゴヌクレオチドとDNAおよびRNAとのハイブリダイゼーションは、負に荷電した相補鎖のリン酸骨格の間の静電的な反発によって不安定化される。対照的に、PNA-DNAまたはPNA-RNAの二重鎖において電荷の反発がないことにより、融解温度(T_m)が上昇し、そして一価のカチオンまたは二価のカチオンの濃度への T_m の依存度が減少する(Nielsenら、1991)。ハイブリダイゼーションの増加した速度および親和性は重要である。なぜならば、これらは、緩和した二重鎖DNA内の相補配列の鎖侵入を実施するようなPNAの驚くべき能力の原因となるからである。さらに、逆方向反復での効果的なハイブリダイゼーションは、PNAが、二重鎖DNA内で効果的に二次構造を認識し得ることを示唆する。増強した認識はまた、表面上に固定化されたPNAで生じ、Wangらは、支持体に結合したPNAが、ハイブリダイゼーション事象を検出するために使用され得ることを示した(Wangら、1996)。

20

【0215】

相補的な配列に対するPNAの強固な結合がまた、類似の(同じではない)配列との結合を増加し、PNA認識の配列特異性を減少させることが予期され得る。しかし、DNAハイブリダイゼーションに関して、選択的認識は、オリゴマー長およびインキュベーション温度を平均化することにより達成され得る。さらに、PNAの選択的ハイブリダイゼーションは、DNA-DNAハイブリダイゼーションよりも低い塩基ミスマッチを許容するPNA-DNAハイブリダイゼーションによって促進される。例えば、16bpのPNA-DNA二重鎖内での1個のミスマッチは、15℃まで T_m を低下させ得る(Egholmら、1993)。高いレベルの識別は、点変異の分析に対して、数種のPNAに基づく戦略の開発を可能にする(Wangら、1996; Carlssonら、1996; Thiedeら、1996; WebbおよびHurskainen、1996; Perry-O'Keefeら、1996)。

30

40

【0216】

高い親和性結合は、PNAに対する分子認識および新規適用の開発のための明確な利点を提供する。例えば、11~13個のヌクレオチドPNAは、テロメアーゼ(本質的なRNA鋳型を使用するテロメア末端を伸長するリボヌクレオタンパク質)の活性を阻害するが、類似のDNAオリゴマーは、阻害しない(Nortonら、1996)。

【0217】

中性PNAは、類似のDNAオリゴマーよりもより疎水性であり、そしてこのことは、特に、PNAが高いプリン含有量を有する場合、または二次構造を形成するような能力を有する場合に、このPNAを中性のpHで溶解するのをより困難にし得る。これらの溶解度

50

は、1以上の正の電荷をPNA末端に付与することによって増加され得る（Nielsenら、1991）。

【0218】

Allfreyおよび共同実験者による発見は、鎖の侵入が染色体DNA内の配列において自然に起こることを示唆している（Boffaら、1995；Boffaら、1996）。これらの研究は、ヌクレオチドCAGの三塩基反復に対してPNAを標的化し、そして転写性活性DNAを精製（Boffaら、1995）し、そして転写を阻害（Boffaら、1996）するためのこの認識を使用した。この結果は、PNAが細胞内に送達され得た場合、このPNAが遺伝子発現の一般的な配列特異的調節因子となる能力を有することを示唆する。PNAのアンチセンスおよび抗遺伝子試薬としての使用に関する研究および総説には、Nielsenら（1993b）、Hanveyら（1992）、およびGoodおよびNielsen（1997）が挙げられる。Koppelhusら（1997）は、HIV-1の逆転写を阻害するためにPNAを使用して、PNAが抗ウイルス治療に使用され得ることを示した。

10

【0219】

PNAのアンチセンス結合特性を特徴づける方法は、Rose（1993）およびJensenら（1997）において議論される。Roseは、キャピラリーゲル電気泳動を使用して、相対的な結合速度論および化学量論を測定することで、PNAのそれらの相補的オリゴヌクレオチドとの結合を決定する。同じタイプの測定が、BIAcoreTM技術を使用してJensenらによって成された。

20

【0220】

PNAの他の適用には、DNA鎖の侵入（Nielsenら、1991）、アンチセンス阻害（Hanveyら、1992）、変異分析（Orumら、1993）、転写の増強（Mollegaardら、1994）、核酸の精製（Orumら、1995）、転写活性遺伝子の単離（Boffaら、1995）、転写因子結合の阻害（Vickersら、1995）、ゲノムの切断（Veselkovら、1996）、バイオセンサー（Wangら、1996）、インサイチュハイブリダイゼーション（Thistedら、1996）、およびサザンブロッティングの代替（Perry-O'Keefe、1996）における使用が挙げられる。

【0221】

（ポリペプチド組成物）

他の局面において、本発明は、ポリペプチド組成物を提供する。一般に、本発明のポリペプチドは、HSV由来の単離されたポリペプチド（もしくはエピトープ、改変体、またはその活性フラグメント）である。好ましくは、ポリペプチドには、本明細書中に開示されるポリヌクレオチド配列または本明細書に開示されるポリヌクレオチド配列に対して中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列によってコードされるポリペプチドである。あるいは、ポリペプチドは、本明細書中に開示されるアミノ酸配列由来の連続アミノ酸配列を含むポリペプチド、または本明細書中に開示される全体のアミノ酸配列を含むポリペプチドとして規定され得る。

30

【0222】

本発明において、ポリペプチド組成物はまた、本発明のポリペプチドに対して生成される抗体および／またはT細胞に対して免疫学的に反応性である1つ以上のポリペプチド（特に本明細書中において開示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその活性フラグメント、またはその改変体もしくはこれらの生物学的機能等価物）を含むことが理解される。

40

【0223】

同様に、本発明のポリペプチド組成物は、1以上の連続核酸配列あるいは中程度～高いストリンジェンシーの条件下でこれらの配列の1以上とハイブリダイズする1以上の核酸配列によってコードされる本明細書中に開示されるアミノ酸配列に含まれる1以上のポリペプチド配列、またはそれらの活性なフラグメントもしくは改変体と免疫学的に反応性であ

50

る抗体またはT細胞を惹起し得る1以上のポリペプチドを含むことが理解される。特に例示的なポリペプチドは、配列番号2、5、6、9、10、11、14、17、20、21、22および25に開示されるアミノ酸配列を含む。

【0224】

本明細書中で使用される場合、ポリペプチドの活性なフラグメントは、慣用的な技術（例えば、変異誘発）または付加、欠失もしくは置換によって改変されるポリペプチドの全体または一部を含むが、この活性なフラグメントは、本明細書中に記載されるポリペプチドと実質的に同じ構造、機能、抗原性などを示す。

【0225】

特定の例示的な実施形態において、本発明のポリペプチドは、本細書中に記載されるような、HSV抗原の少なくとも1つの免疫原性部分またはその改変体もしくはその生物学的に機能的な等価物を含む。本明細書中に記載されるようなポリペプチドは、任意の長さのものであり得る。ネイティブなタンパク質に由来するさらなる配列および／または異種配列が存在し得、そしてこのような配列は、さらなる免疫原性特性または抗原性特性を保持し得る（保持しなくてもよい）。

10

【0226】

本明細書中で使用される場合、「免疫原性部分」は、B細胞表面抗原レセプターおよび／またはT細胞表面抗原レセプターによって認識される（すなわち、特異的に結合される）タンパク質の部分である。このような免疫原性部分は、一般に、HSVタンパク質またはその改変体の、少なくとも5アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも10アミノ酸残基、なおより好ましくは、少なくとも20アミノ酸残基を含む。特定の好ましい免疫原性部分は、N末端リーダー配列および／または膜貫通ドメインが欠失されたペプチドを含む。他の好ましい免疫原性部分は、成熟タンパク質と比較して、小さいN末端欠失および／またはC末端欠失（例えば、1～30アミノ酸、好ましくは5～15アミノ酸）を含み得る。

20

【0227】

免疫原性部分は、一般に、Paul, Fundamental Immunology, 第3版、243-247 (Raven Press, 1993) およびそこに引用される参考文献に要約されるような周知の技術を使用して、同定され得る。このような技術は、抗原特異的な抗体、抗血清および／あるいはT細胞株またはT細胞クローンと反応する能力についてポリペプチドをスクリーニングする工程を含む。本明細書中で使用される場合、抗血清および抗体は、それらが抗原に特異的に結合する（すなわち、これらが、ELISAまたは他のイムノアッセイにおいてそのタンパク質と反応し、無関係なタンパク質とは検出可能に反応しない）場合、「抗原特異的」である。このような抗血清および抗体は、本明細書中に記載されるように、そして周知の技術を使用して調製され得る。ネイティブのHSVタンパク質の免疫原性部分は、（例えば、ELISAおよび／またはT細胞反応性アッセイにおいて）その全長ポリペプチドの反応性よりも実質的に小さくないレベルで、このような抗血清および／またはT細胞と反応する部分である。このような免疫原性部分は、このようなアッセイにおいて、その全長ポリペプチドの反応性と類似またはそれより大きいレベルで反応し得る。このようなスクリーニングは、一般的に、当業者に周知の方法（例えば、HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載のような技術）を使用して行われる。例えば、ポリペプチドを固体支持体に固定し、そして患者の血清と接触させて、その血清中の抗体をその固定されたポリペプチドに結合させ得る。次いで、結合されなかった血清を除去し、そして結合された抗体を、例えば、¹²⁵I 標識化プロテインAを使用して検出し得る。

30

40

【0228】

上記のように、組成物は、ネイティブのHSVタンパク質の改変体を含み得る。本明細書中で使用される場合、ポリペプチド「改変体」は、ネイティブのHSVタンパク質と、そのポリペプチドの免疫原性が、実質的には減少されないように1以上の置換、欠失、付加

50

および／または挿入において異なる、ポリペプチドである。言い換えると、抗原特異的な抗血清と反応する改変体の能力は、そのネイティブタンパク質と比較して、増強されても、または変化されなくてもよく、あるいは、そのネイティブタンパク質と比較して、50%未満だけ、そしてより好ましくは、20%未満だけ減少されてもよい。このような改変体は、一般に、本明細書中に記載のように、上記ポリペプチド配列の1つを改変し、この改変ポリペプチドの抗原特異的な抗体または抗血清との反応性を評価することによって同定され得る。好ましい改変体としては、1つ以上の部分（例えば、N末端リーダー配列または膜貫通ドメイン）が取り除かれた改変体が挙げられる。他の好ましい改変体としては、小さな部分（例えば、1～30アミノ酸、好ましくは5～15アミノ酸）が、成熟タンパク質のN末端および／またはC末端から取り除かれた改変体が挙げられる。

10

【0229】

本発明によって包含されるポリペプチド改変体は、本明細書中に開示されるポリペプチドに対する、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%またはそれ以上の同一性（上記のように決定された）を示すポリペプチド改変体を含む。

【0230】

好ましくは、改変体は、保存的置換を含む。「保存的置換」は、あるアミノ酸が、類似の特性を有する別のアミノ酸で置換され、その結果、ペプチド化学の当業者は、そのポリペプチドの二次構造および疎水性親水性性質が、実質的に変化されないことを予測する置換である。アミノ酸置換は、一般に、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性性質の類似性に基いてなされ得る。例えば、負に荷電したアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸；正に荷電したアミノ酸としては、リジンおよびアルギニン；および類似の親水性値を有する非荷電の極性頭部基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的変化を示し得る他のグループのアミノ酸としては、以下：（1）ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；（2）cys、ser、tyr、thr；（3）val、ile、leu、met、ala、phe；（4）lys、arg、his；および（5）phe、tyr、trp、hisが挙げられる。改変体はまた、またはあるいは改変体は、非保存的変化を有し得る。好ましい実施形態において、改変体ポリペプチドは、5アミノ酸以下の置換、欠失または付加によって、ネイティブの配列とは異なる。改変体はまた（またはあるいは改変体は）、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造および疎水性親水性性質に最小限の影響しか有さないアミノ酸の欠失または付加によって、改変され得る。

20

30

【0231】

上記のように、ポリペプチドは、タンパク質のN末端にシグナル（または、リーダー）配列を含み得、これは、翻訳と同時に、または翻訳後に、そのタンパク質の移動を指向する。このポリペプチドはまた、このポリペプチドの合成、精製または同定を容易にするために、またはこのポリペプチドの固体支持体への結合を増強するために、リンカー配列または他の配列（例えば、ポリHis）に結合体化され得る。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域に結合体化され得る。

40

【0232】

ポリペプチドは、任意の種々の周知の技術を使用して調製され得る。上記のようなDNA配列によってコードされる組換えポリペプチドは、当業者に公知の任意の種々の発現ベクターを使用して、DNA配列から容易に調製され得る。発現は、組換えポリペプチドをコードするDNA分子を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた、任意の適切な宿主細胞において達成され得る。適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母ならびに高等真核生物の細胞（例えば、哺乳動物細胞および植物細胞）が挙げられる。好ましくは、使用される宿主細胞は、E. coli、酵母または哺乳動物細胞株（例えば、COSまたはCHO）である。組換えタンパク質または組換えポリペプチドを培養培地中に分

50

泌する適切な宿主／ベクター系からの上清は、市販のフィルターを使用して、最初に濃縮され得る。濃縮後、この濃縮物を、適切な精製マトリックス（例えば、アフィニティーマトリックスまたはイオン交換樹脂）に適用し得る。最終的に、1以上の逆相HPLC工程を使用して、組換えポリペプチドをさらに精製し得る。

【0233】

約100アミノ酸未満、そして一般に、約50アミノ酸未満のアミノ酸を有する部分および他の改変体もまた、当業者に周知の技術を使用して、合成手段によって生成され得る。例えば、このようなポリペプチドは、任意の市販の固相技術（例えば、Merrifield固相合成法（ここで、アミノ酸が連続的に付加されて、アミノ酸鎖を成長させる））を使用して、合成され得る。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149-2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動合成のための装置は、Perkin Elmer/Applied Biosystems Division (Foster City, CA) のような供給者から市販され、そして製造業者の説明書に従って操作され得る。

10

【0234】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、本明細書中に記載の複数のポリペプチドを含むか、または本明細書に記載の少なくとも1つのポリペプチドおよび関連しない配列（例えば、公知のタンパク質）を含む融合タンパク質であり得る。例えば、融合パートナーは、Tヘルパーエпитープ（免疫学的融合パートナー）、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパーエпитープを提供する際に補助し得るか、またはネイティブの組換えタンパク質より高い収量でタンパク質（発現エンハンサー）を発現する際に補助し得る。特定の好ましい融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強融合パートナーの両方である。他の融合パートナーは、タンパク質の溶解性を増加するように、またはタンパク質が所望の細胞内コンパートメントに標的化されることを可能にするように選択され得る。なおさらなる融合パートナーとしては、親和性タグ（これは、タンパク質の精製を容易にする）が挙げられる。

20

【0235】

融合タンパク質は、一般に、標準的な技術（化学的結合体化を含む）を使用して調製され得る。好ましくは、融合タンパク質は、発現系において、組換えタンパク質として発現され、非融合タンパク質と比較して、増加した産生レベルを可能にする。手短に言うと、このポリペプチド成分をコードするDNA配列を、別々に組み立て得、そして適切な発現ベクターに連結し得る。1つのポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端は、ペプチドリinkerを用いてかまたは用いずに、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端に、これらの配列のリーディングフレームが同じ相にあるように連結される。このことが、両方の成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一の融合タンパク質への翻訳を可能にする。

30

【0236】

ペプチドリinker配列は、各ポリペプチドがその二次構造および三次構造へと折り畳まれるのを保証するために十分な距離で第一および第二のポリペプチド成分を隔てるために用いられ得る。このようなペプチドリinker配列は、当該分野で周知の標準的な技術を用いて融合タンパク質中に組み込まれる。適切なペプチドリinker配列は、以下の因子に基づいて選択され得る：（1）フレキシブルな伸長したコンホメーションを採る能力；（2）第一および第二のポリペプチド上の機能的なエピトープと相互作用し得る二次構造を採ることができないこと；および（3）ポリペプチドの機能的なエピトープと反応し得る疎水性または荷電した残基の欠如。好ましいペプチドリinker配列は、Gly残基、Asn残基およびSer残基を含む。ThrおよびAlaのような中性に近い他のアミノ酸もまた、リンカー配列中に用いられ得る。リンカーとして有用に用いられ得るアミノ酸配列としては、Marateaら、Gene 40:39-46, 1985；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986；米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されるア

40

50

ミノ酸配列が挙げられる。リンカー配列は、一般的に1～約50アミノ酸長であり得る。リンカー配列は、第一および第二のポリペプチドが、機能的ドメインを分離し、かつ立体構造の干渉を防ぐために用いられ得る非必須N末端アミノ酸領域を有する場合、必要とされない。

【0237】

連結されたDNA配列は、適切な転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結される。DNAの発現を担う調節エレメントは、第一のポリペプチドをコードするDNA配列の5'側にのみ位置する。同様に、翻訳を終了するために必要とされる停止コドンおよび転写終結シグナルは、第二のポリペプチドをコードするDNA配列の3'側にのみ存在する。

10

【0238】

融合タンパク質もまた提供される。このようなタンパク質は、本明細書中に記載されるようなポリペプチドを、無関係の免疫原性タンパク質とともに含む。好ましくは、免疫原性タンパク質は、リコール (recall) 応答を惹起し得る。このようなタンパク質の例としては、破傷風タンパク質、結核タンパク質および肝炎タンパク質が挙げられる (例えば、Stout et al., New Engl. J. Med., 336: 86-91 (1997)) を参照のこと)。

【0239】

好ましい実施形態において、免疫学的融合パートナーは、グラム陰性細菌、Haemophilus influenza Bの表面タンパク質である、プロテインD (WO 91/18926) に由来する。好ましくは、プロテインD誘導体は、タンパク質のほぼ最初の3分の1 (例えば、最初のN末端100～110アミノ酸) を含み、そしてプロテインD誘導体は、脂質化 (lipidated) され得る。特定の好ましい実施形態において、リボプロテインD融合パートナーの最初の109残基は、さらなる外因性T細胞エピトープを有するポリペプチドを提供するように、そしてE. coli中の発現レベルを増加する (従って、発現エンハンサーとして機能する) ように、N末端に含まれる。脂質テールは、抗原提示細胞への抗原の最適な提示を保証する。他の融合パートナーとしては、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質、NS1 (血球凝集素) が挙げられる。代表的に、N末端の81アミノ酸が用いられるが、Tヘルパーエピトープを含む異なるフラグメントが用いられてもよい。

20

30

【0240】

別の実施形態において、Mycobacterium tuberculosis由来のRa12ポリヌクレオチドは、本発明のHSVポリヌクレオチドの少なくとも1つの免疫原性部分に連結される。Ra12組成物および異種ポリヌクレオチド配列の発現を増強する際のRa12を使用するための方法は、米国特許出願番号60/158,585に記載され、この開示は本明細書中でその全体が参考として援用される。簡潔には、Ra12は、Mycobacterium tuberculosis MTB32A核酸の部分配列であるポリヌクレオチド領域をいう。MTB32Aは、M. tuberculosisの病原性株および非病原性株の遺伝子によってコードされる32KDの分子量のセリンプロテアーゼである。MTV32Aのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、開示されている (本明細書中で参考として援用される、米国特許出願番号60/158,585; Skelly et al., Infection and Immunity, (1999) 67: 3998-4007もまた参照のこと)。MTB32Aコード配列のRa12 C末端フラグメントは、それ自体高レベルで発現し、そして精製プロセスを通じて可溶性タンパク質のままである。さらに、融合ポリペプチド中のRa12ポリペプチドフラグメントの存在は、Ra12と融合した異種抗原性HSVポリペプチドの免疫原性を増強し得る。1つの実施形態において、HSV抗原と共に融合ポリペプチド中に存在するRa12ポリペプチド配列は、MTB32Aのアミノ酸残基192～323のいくらかまたは全てを含む。

40

【0241】

別の実施形態において、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして公知のタンパク質、

50

またはその部分（好ましくはC末端部分）である。LYTAは、アミダーゼLYTA（Ly t A遺伝子によりコードされる；Gene 43：265－292、1986）として公知のN－アセチル－L－アラニンアミダーゼを合成するStreptococcus pneumoniaeに由来する。LYTAは、ペプチドグリカン骨格中の特定の結合を特異的に分解する自己溶解素である。LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリンまたはいくつかのコリンアナログ（例えば、DEAE）に対する親和性を担う。この特性は、融合タンパク質の発現のために有用なE. coli C－LYTA発現プラスミドの開発のために開発された。アミノ末端でC－LYTAフラグメントを含むハイブリッドタンパク質の精製が、記載されている（Biotechnology 10：795－798、1992を参照のこと）。好ましい実施形態において、LYTAの反復部分は、融合タンパク質に組み込まれ得る。反復部分は、残基178で開始するC末端領域中に見出される。特に好ましい反復部分は、残基188～305を組み込む。

10

20

30

40

50

【0242】

一般に、本明細書に記載されるようなポリペプチド（融合タンパク質を含む）およびポリヌクレオチドが単離される。「単離された」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、その元来の環境から取り出されたものである。例えば、天然に存在するタンパク質は、それが天然の系において共存する物質のいくつかまたは全てから分離されている場合、単離されている。好ましくは、このようなポリペプチドは、少なくとも約90%純粋、より好ましくは少なくとも約95%純粋、そして最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。ポリヌクレオチドは、例えば、それが天然の環境の一部でないベクターにクローニングされる場合、単離されているとみなされる。

【0243】

（結合剤）

本発明は、さらにHSVタンパク質に特異的に結合する薬剤（例えば、抗体およびその抗原結合フラグメント）をさらに提供する。本明細書において用いる場合、抗体またはその抗原結合フラグメントは、HSVタンパク質と検出可能レベルで反応し（例えば、ELISAにおいて）、そして類似の条件下で無関係のタンパク質とは検出可能に反応しない場合、HSVタンパク質に「特異的に結合する」といわれる。本明細書において用いる場合、「結合（binding）」は、複合体が形成されるような2つの別々の分子間の非共有結合をいう。結合する能力は、例えば、複合体の形成についての結合定数を決定することにより評価され得る。結合定数は、複合体の濃度を成分濃度の積で割って得られる値である。一般に、2つの化合物は、複合体形成の結合定数が約 10^3 L/molを超える場合、本発明の文脈中で「結合している」といわれる。結合定数は、当該分野で周知の方法を用いて決定され得る。

【0244】

結合剤は、本明細書中において提供される代表的アッセイを用いて、HSV感染を有する患者と有さない患者の間をさらに区別し得る。例えば、好ましくは、HSVタンパク質に結合する抗体または他の結合剤は、疾患を有する少なくとも約20%の患者においては感染の存在を示すシグナルを生成し、そしてHSV感染を有さない少なくとも約90%の個体においては疾患の存在しないことを示すネガティブなシグナルを生成する。結合剤がこの要件を満たすか否かを決定するために、（標準的な臨床試験を用いて決定されるような）HSVを有する患者およびHSVを有さない患者由来の生物学的サンプル（例えば、血液、血清、痰、尿、および／または生検）は、この結合剤に結合するポリペプチドの存在について、本明細書に記載のようにアッセイされ得る。疾患を有する統計的に有意な数のサンプルおよび疾患を有さない統計的に有意な数のサンプルをアッセイすべきであることが明白である。それぞれの結合剤は、上記の基準を満たすべきである；しかし、当業者は、結合剤が感受性を改善する組み合わせで用いられ得ることを認識する。

【0245】

上記の要件を満たす任意の薬剤が結合剤であり得る。例えば、結合剤はリボソーム（ペプチド成分を伴うかまたは伴わない）、RNA分子またはポリペプチドであり得る。好まし

い実施形態において、結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントである。抗体は、当業者に公知の任意の種々の技術のいずれかにより調製され得る。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと。一般的に、抗体は、細胞培養技術（本明細書中に記載のモノクローナル抗体の産生を含む）により、または組換え抗体の産生を可能にするための適切な細菌細胞宿主または哺乳動物細胞宿主への抗体遺伝子のトランスフェクションを介して、産生され得る。1つの技術では、このポリペプチドを含む免疫原は、任意の広範な種々の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、またはヤギ）にまず注射される。この工程で、本発明のポリペプチドは、改変なしの免疫原として働き得る。あるいは、特に、相対的に短いポリペプチドについて、このポリペプチドがキャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）に連結される場合、優れた免疫応答が惹起され得る。この免疫原は、好ましくは所定のスケジュール（1回以上のブースター免疫を組み込む）に従って、動物宿主に注射され、そしてこれらの動物は、定期的に採血される。次いで、このポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、例えば、適切な固体支持体に結合しているポリペプチドを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより、このような抗血清から精製され得る。

10

【0246】

目的の抗原性ポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体は、例えば、KohlerおよびMilstein、Eur. J. Immunol. 6: 511-519、1976の技術、ならびにその改良型を使用して調製され得る。手短には、これらの方法は、所望の特異性（すなわち、目的のポリペプチドとの反応性）を有する抗体を産生し得る不死化細胞株の調製を包含する。このような細胞株は、例えば、上記のように、免疫された動物から得られた脾臓細胞から産生され得る。次いで、脾臓細胞は、例えば、ミエローマ細胞融合パートナー（好ましくは、免疫された動物と同系のもの）との融合によって不死化される。種々の融合技術が使用され得る。例えば、脾臓細胞およびミエローマ細胞は、非イオン性界面活性剤と数分間組み合わせられ得、次いで、ハイブリッド細胞の増殖を支持するが、ミエローマ細胞の増殖を支持しない選択培地上で低密度でプレートされ得る。好ましい選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間（通常約1～2週間）後、ハイブリッドのコロニーが観察される。シングルコロニーが選択され、そしてそれらの培養上清が、ポリペプチドに対する結合活性について試験される。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが好ましい。

20

30

【0247】

モノクローナル抗体を、増殖しているハイブリドーマコロニーの上清から単離し得る。さらに、種々の技術（例えば、適切な脊椎動物宿主（例えば、マウス）の腹腔腔へのハイブリドーマ細胞株の注射）が、収量を増化するために利用され得る。次いで、モノクローナル抗体を、腹水または血液から収集し得る。夾雑物を、通常の技術（例えば、クロマトグラフィー、ゲルろ過、沈殿、および抽出）によって抗体から除去し得る。本発明のポリペプチドを、例えば、アフィニティークロマトグラフィー工程における精製プロセスにおいて使用し得る。

40

【0248】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントの使用が好まれ得る。このようなフラグメントとしては、標準的な技術を使用して調製され得るFabフラグメントが挙げられる。手短には、免疫グロブリンを、プロテインAビーズカラムでのアフィニティークロマトグラフィー（HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988）によってウサギ血清から精製し得、そしてパパインによって消化して、FabフラグメントおよびFcフラグメントを産生し得る。FabフラグメントおよびFcフラグメントは、プロテインAビーズカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって分離され得る。

50

【0249】

本発明のモノクローナル抗体は、1つ以上の治療薬剤に結合され得る。これに関して適切な薬剤としては、放射性核種、分化誘導剤、薬物、毒素、およびこれらの誘導体が挙げられる。好ましい放射性核種としては、 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、および ^{212}Bi が挙げられる。好ましい薬物としては、メトトレキサート、ならびにピリミジンアナログおよびプリンアナログが挙げられる。好ましい分化誘導剤としては、ホルボールエステルおよび酪酸が挙げられる。好ましい毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン (gelonin)、Pseudomonas 体外毒素、Shigella 毒素、およびアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が挙げられる。

10

【0250】

治療剤は、直接的または間接的に（例えば、リンカー基を介して）のいずれかで、適切なモノクローナル抗体と結合（例えば、共有結合によって）され得る。薬剤と抗体との間の直接的な反応は、各々が互いに反応し得る置換基を有する場合に可能である。例えば、一方の求核基（例えば、アミノ基またはスルフヒドリル基）は、他方のカルボニル含有基（例えば、無水物もしくは酸ハロゲン化物）または良好な脱離基（例えば、ハロゲン化物）を含むアルキル基と反応し得る。

【0251】

あるいは、リンカー基を介して治療剤と抗体と結合させることが所望され得る。リンカー基は、結合能力の妨害を回避するために抗体を薬剤から隔てるためのスペーサーとして機能し得る。リンカー基はまた、薬剤または抗体上の置換基の化学的反応性を増加させるために働き得、従って結合効率を増大させる。化学的反応性の増大はまた、さもなければ可能ではない、薬剤または薬剤上の官能基の使用を容易にし得る。

20

【0252】

種々の二官能性または多官能性試薬、ホモ官能性とヘテロ官能性との両方（例えば、Pierce Chemical Co.、Rockford、ILのカタログ中に記載されるもの）が、リンカー基として使用され得ることが当業者には明らかである。結合は、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、または酸化された炭水化物残基を通してもたらされ得る。このような方法論を記載する多数の参考文献（例えば、Rodwellらに対する米国特許第4,671,958号）が存在する。

30

【0253】

本発明の免疫結合体の抗体部分がないときに治療剤がより強力である場合、細胞中への内部移行の間、またはその際に切断可能なリンカー基を使用することが所望であり得る。多数の異なる切断可能なリンカー基が記載されてきた。これらのリンカー基からの薬剤の細胞内放出についての機構は、ジスルフィド結合の還元（例えば、Spitlerらへの米国特許第4,489,710号）、感光性結合の照射（例えば、Senterらへの米国特許第4,625,014号）、誘導体化されたアミノ酸側鎖の加水分解（例えば、Kohnらへの米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介性加水分解（例えば、Rodwellらへの米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加水分解（例えば、Blattlerらへの米国特許第4,569,789号）による切断を含む。

40

【0254】

1つより多い薬剤を抗体に結合させることが所望され得る。1つの実施形態において、複数の薬剤の分子が1つの抗体分子に結合される。別の実施形態において、1つより多い薬剤が1つの抗体に結合され得る。特定の実施形態に関わらず、1つより多い薬剤との免疫結合体は、種々の方法で調製され得る。例えば、1つより多い薬剤が、抗体分子に直接的に結合され得るか、または付着のための複数の部位を提供するリンカーが使用され得る。あるいは、キャリアが使用され得る。

【0255】

キャリアは、種々の方法（直接的にまたはリンカー基を介するかのいずれかの共有結合を含む）で薬剤を保有し得る。適切なキャリアとしては、アルブミンのようなタンパク質（

50

例えば、K a t oらへの米国特許第4, 507, 234号)、ペプチド、およびアミノデキストランのような多糖(例えば、S h i hらへの米国特許第4, 699, 784号)が挙げられる。キャリアはまた、例えばリポソーム小胞内に、非共有結合によって、またはカプセル化によって、薬剤を保有し得る(例えば、米国特許第4, 429, 008号および同第4, 873, 088号)。放射性核種薬剤に特異的なキャリアとしては、放射性ハロゲン化された低分子およびキレート化合物が挙げられる。例えば、米国特許第4, 735, 792号は、代表的な放射性ハロゲン化低分子およびそれらの合成を開示する。放射性核種キレートは、金属、または金属酸化物、放射性核種を結合するためのドナー原子として窒素原子および硫黄原子を含むキレート化合物を含むキレート化合物から形成され得る。例えば、D a v i s o nらへの米国特許第4, 673, 562号は、代表的なキレート化合物およびそれらの合成を開示する。 10

【0256】

抗体および免疫結合体の投与の種々の経路が使用され得る。代表的には、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与などである。抗体/免疫結合体の正確な用量は、使用される抗体、抗原密度、および抗体のクリアランス速度に依存して変化することが明らかである。

【0257】

(T細胞)

免疫療法組成物はまた、あるいは、H S Vタンパク質に特異的なT細胞を含み得る。このような細胞は、一般的に標準的手順を使用して、インビトロまたはエキソビボで調製され得る。例えば、T細胞は、市販の細胞分離システム(例えば、I s o l e x^{T M} システム (N e x e l l T h e r a p e u t i c s, I n c. (I r v i n e, C A; 米国特許第5, 240, 856号; 米国特許第5, 215, 926号; W O 89/06280; W O 91/16116およびW O 92/07243もまた参照のこと)から入手可能)を使用して、患者の骨髓、末梢血あるいは骨髓または末梢血の画分中から単離され得る。あるいは、T細胞は、関連または無関連のヒト、非ヒト哺乳動物、細胞株または培養物から誘導され得る。 20

【0258】

T細胞は、H S Vポリペプチド、H S Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはこのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞(A P C)を用いて刺激され得る。このような刺激は、このポリペプチドに特異的であるT細胞の生成を可能にする条件下および十分な時間、行われる。特定の実施形態において、H S Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、送達ビヒクル(例えば、ミクロスフェア)中に存在して、特定のT細胞の生成を容易にする。 30

【0259】

T細胞は、このT細胞が、特異的に増殖するか、サイトカインを分泌するか、またはこのポリペプチドで被覆されるか、もしくはこのポリペプチドをコードする遺伝子を発現する標的細胞を殺傷する場合に、H S Vポリペプチドに特異的であるとみなされる。T細胞特異性は、種々の標準的技術のいずれかを使用して評価され得る。例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイにおいて、ネガティブコントロールと比較して、溶解および/または増殖における2倍を超える増加の刺激指標は、T細胞特異性を示す。このようなアッセイは、例えば、C h e nら、C a n c e r R e s. 54:1065-1070, 1994に記載されるように、実行され得る。あるいは、T細胞の増殖の検出は、種々の公知の技術によって達成され得る。例えば、T細胞増殖は、DNA合成の速度の増加を測定することによって検出され得る(例えば、トリチウム化チミジンでT細胞の培養物をパルス標識し、そしてDNAに取り込まれたトリチウム化チミジンの量を測定することによって)。3~7日間のH S Vポリペプチド(100 ng/ml~100 μg/ml、好ましくは、200 ng/ml~25 μg/ml)との接触は、T細胞の増殖において少なくとも2倍の増加を生じる。2~3時間の上記のような接触は、標準的なサイトカインアッセイを使用して測定されるように(ここで、サイトカイン(例えば、T N FまたはI F N-γ)放出のレベルの2倍の増加が、T細胞の活性化を示す)、T細胞の活性化を生じるべき 40 50

である (Coliganら、Current Protocols in Immunology, 第1巻、Wiley Interscience (Greene 1998) を参照のこと)。HSVポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド発現APCに応答して活性化されたT細胞は、CD4⁺ および／またはCD8⁺ であり得る。HSVポリペプチド特異的T細胞は、標準的な技術を使用して拡大され得る。好ましい実施形態において、T細胞は、患者、関連するドナーまたは無関連のドナーに由来し、そして刺激および拡大後にその患者に投与される。

【0260】

治療目的で、HSVポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに応答して増殖するCD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞は、インビトロまたはインビボのいずれかで大量に拡大され得る。このようなT細胞のインビトロでの増殖は、種々の方法で達成され得る。例えば、T細胞は、T細胞増殖因子 (例えば、インターロイキン-2) の添加を伴うか、または伴わずに、HSVポリペプチド、またはこのようなポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドに対して再曝露され得、そして／またはHSVポリペプチドを合成する刺激細胞に対して再曝露され得る。あるいは、HSVポリペプチドの存在下で増殖する1つ以上のT細胞は、クローニングによって数の上で拡大され得る。細胞をクローニングするための方法は、当該分野で周知であり、そしてこれらとしては、限界希釈が挙げられる。

【0261】

(薬学的組成物)

さらなる実施形態において、本発明は、細胞または動物への投与のための、単独でかまたは治療の1つ以上の他の様相と合わせてかのいずれかでの、薬学的に受容可能な溶液中の本明細書中に開示される1つ以上のポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞および／または抗体組成物の処方物に関する。

【0262】

所望される場合、本明細書中に開示されるようなポリペプチドを発現する核酸セグメント、RNA、DNAまたはPNA組成物は、他の薬剤 (例えば、他のタンパク質もしくはポリペプチドもしくは種々の薬学的に活性な薬剤など) と組合わせても同様に投与され得ることが、理解される。事実、さらなる薬剤が標的細胞または宿主細胞と接触した際に有意な有害な影響をもたらさないとすれば、さらに含まれ得る他の成分に実質的に制限はない。従って、この組成物は、特定の例において必要とされる種々の他の薬剤と共に送達され得る。このような組成物は、宿主細胞または他の生物学的供給源から精製され得るか、あるいは、本明細書中に記載されるように化学的に合成され得る。同様に、このような組成物はさらに、置換または誘導体化されたRNA組成物またはDNA組成物を含み得る。

【0263】

薬学的に受容可能な賦形剤およびキャリア溶液の処方は、様々の処置レジメンにおいて本明細書中で記載される特定の組成物を使用するための適切な投薬レジメンおよび処置レジメン (例えば、経口、非経口、静脈内、鼻腔内、および筋肉内の投与および処方物を含む) の開発と同様に、当業者に周知である。

【0264】

(1. 経口送達)

特定の用途において、本明細書中で開示される薬学的組成物は、経口投与によって動物に送達され得る。このように、これらの組成物は、不活性希釈剤と共にかまたは同化可能食用キャリアと共に処方され得るか、あるいはこれらの組成物は、硬質または軟質ゼラチンカプセルに入れられ得るか、あるいはこれらの組成物は錠剤に圧縮され得るか、あるいはこれらの組成物は食餌の食品に直接組み込まれ得る。

【0265】

活性化化合物は、さらに賦形剤に組み込まれ得、そして経口摂取錠剤、経頬粘膜錠剤、トローチ、カプセル剤、エリキシル、懸濁液、シロップ、カシェ剤などの形態で使用される (例えば、Mathiowitzら、1997; Hwangら、1998; 米国特許第5,

10

20

30

40

50

641, 515号; 米国特許第5, 580, 579号および米国特許第5, 792, 451号(これらの各々は、その全体が本明細書中で詳細に参考として援用される))。錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤などはまた、以下を含み得、結合剤(例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチン); 賦形剤(例えば、リン酸二カルシウム); 崩壊剤(例えば、コーンスターチ、ポテトデンプン、アルギン酸など); 潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム); および甘味料(例えば、スクロース、ラクトースまたはサッカリン)または香料(例えば、ペパーミント、ウインターグリーン油、またはチェリー香料)が添加され得る。投薬単位形態がカプセルである場合、これは上記の形態の材料に加えて液体キャリアを含み得る。様々な他の材料が、コーティングとして存在し得るか、またはそうでなければ物理的形態の投薬単位を改変し得る。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤は、セラック、糖またはその両方でコーティングされ得る。エリキシルのシロップは、香味料メチルとして活性なスクロース化合物、防腐剤としてプロピルパラベン、チェリー香料またはオレンジ香料のような染料および香料を含み得る。もちろん、任意の投薬単位形態を調製する際に使用される任意の材料は、薬学的に純粋でありかつ用いられる量で実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物が、徐放性の調製物および処方物に組み込まれ得る。

10

【0266】

代表的に、これらの処方物は、少なくとも約0.1%またはそれよりも多い活性化合物を含み得るが、活性成分の割合は、もちろん、変化し得、そして好都合に、全処方物の重量または体積の約1または2%と、約60%または70%以上のとの間であり得る。当然、薬学的に有用な組成物の各々の中の活性化合物の量は、適切な投薬量が、化合物の任意の所定の単位用量において得られるような様式で、調製され得る。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与の経路、製品の有効期限のような因子、および他の薬理学的考慮が、このような薬学的処方物を調製する分野の当業者によって意図され、そして、そういうものとして種々の投薬量および処置レジメンが、所望され得る。

20

【0267】

経口投与について、本発明の組成物は、うがい薬、歯みがき剤、バツカル錠、経口スプレー、または舌下経口投与処方物の形態で、1つ以上の賦形剤と混合され得る。例えば、適切な溶媒(例えば、ホウ酸ナトリウム溶液(Dobell溶液))中に必要な量で活性成分を組み込むうがい薬が、調製され得る。あるいは、活性成分は、経口溶液(例えば、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび炭酸水素カリウムを含む溶液)に組み込まれ得るか、または歯みがき剤に分散され得るか、または治療的有效量で、水、結合剤、研磨剤、香料、発泡剤、および湿潤剤を含み得る組成物に添加され得る。あるいは、これらの組成物は、舌下に置かれ得るか、そうでなければ口の中で溶解され得る錠剤形態または溶液形態に成形され得る。

30

【0268】

(2. 注射送達)

特定の状況において、本明細書中で開示される薬学的組成物を、米国特許第5, 543, 158号; 米国特許第5, 641, 515号および米国特許第5, 399, 363号(各々が、本明細書中でその全体が参考として詳細に援用される)において記載されるように、非経口送達、静脈内送達、筋肉内送達またはさらに腹腔内送達することが所望される。遊離塩基または薬学的に受容可能な塩としての活性化合物の溶液は、界面活性剤(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース)と適切に混合された水中で調製され得る。分散物もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびにオイル中で調製され得る。保存および使用の通常の下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために防腐剤を含む。

40

【0269】

注入用途のために適切な例示的な薬学的形態として、滅菌水性液剤または分散物および滅菌注射用液剤または分散物の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる(米国特許第5, 466, 468号(本明細書中にその全体が参考として詳細に援用される))。全ての場合

50

において、その形態は、滅菌でなければならず、そして容易に注射することができる程度に、流動性でなければならない。それは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および／もしくは植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、そして／または界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン（p a r a b e n）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によって促進され得る。多くの場合において、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含めることが、望ましい。注射可能な組成物の長期にわたる吸収は、組成物中での吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の使用によって、もたらされ得る。

10

【0270】

例えば、水溶液での非経口投与のために、必要ならばその溶液は、適切に緩衝化されるべきであり、そして液体希釈剤が、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされる。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与に適切である。これに関連して、使用され得る滅菌水性媒体は、本開示の観点から当業者に公知である。例えば、一投与量は、1 ml の等張性 NaCl 溶液に溶解され得、そして 1000 ml の皮下注入流体に添加され得るか、または注入予定部位で注入され得るかのいずれかである（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照のこと）。投薬量におけるいくつかの変化が、処置される被験体の状態に依存して必然的に生じる。投与に責任のあるヒトは、任意の事象において、個々の被験体について適切な用量を決定する。さらに、ヒト投与について、調製物は、FDA Office of Biologics standardsによって要求されるような、無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性標準および純度標準を満たさなければならない。

20

【0271】

滅菌注射溶液は、上に列挙された種々の他の成分を含む適切な溶媒中に要求された量で活性化化合物を組み込み、必要ならば、続いてろか滅菌することによって調製される。一般に、分散物は、基本分散媒体、および上に列挙されたものに由来する要求された他の成分を含む滅菌ビヒクルに種々の滅菌活性成分を組み込むことによって、調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、調製の好ましい方法は、活性成分の粉末、および以前に滅菌ろ過したその溶液から任意のさらなる所望の成分を生じる減圧乾燥技術および凍結乾燥技術である。

30

【0272】

本明細書中で開示される組成物は、中性形態または塩形態で処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される）が挙げられ、そしてこれらの塩は、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸とともに形成される。遊離カルボキシル基とともに形成される塩もまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄）、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導され得る。処方の際に、溶液は、投薬処方物と適合する様式でかつ治療的に有効な量で投与される。これらの処方物は、注射溶液、薬物放出カプセルなどのような種々の投薬形態で容易に投与される。

40

【0273】

本明細書中で使用される場合、「キャリア」は、任意および全ての溶媒、分散媒体、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収を遅延させる薬剤、緩衝液、キャリア溶液、懸濁液、コロイドなどを含み得る。薬学的活性物質のための

50

このような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性成分と不適合である場合を除いては、治療組成物におけるその使用が、企図される。補助的活性成分もまた、これらの組成物に組み込まれ得る。

【0274】

句「薬学的に受容可能な」とは、ヒトに投与される場合に、アレルギー反応または類似の厄介な反応を生成しない分子実体および組成物をいう。活性成分としてのタンパク質を含む水性組成物の調製は、当該分野で十分に理解されている。代表的には、このような組成物は、注射剤として、液体溶液または懸濁液のいずれかとして、調製される；注射の前の液体中の溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた、調製され得る。これらの調製物はまた、乳化され得る。

10

【0275】

(3. 経鼻送達)

特定の実施形態において、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および／または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達され得る。遺伝子、核酸およびペプチド組成物を、経鼻エアロゾルスプレーを介して肺に直接送達するための方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号（各々が、本明細書中にその全体が参考として詳細に援用される）に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（Takemagaら、1998）およびリゾホスファチジルグリセロール化合物（米国特許第5,725,871号（本明細書中にその全体が参考として詳細に援用される））を使用する薬物の送達はまた、薬学分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号（本明細書中にその全体が参考として詳細に援用される）に記載される。

20

【0276】

(4. リポソーム送達、ナノカプセル送達、および微粒子媒介送達)

特定の実施形態において、本発明は、適切な宿主細胞への本発明の組成物の導入のために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、マイクロスフィア、脂質粒子、小胞などを意図する。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、またはナノ粒子などのいずれかにカプセル化して送達するために処方され得る。

【0277】

このような処方物は、本明細書中に開示される核酸または構築物の薬学的に受容可能な処方物の導入のために好ましくあり得る。リポソームの形成および使用は一般に、当業者に公知である（例えば、Couvreurら、1977；Couvreur, 1988；Lasica, 1998を参照のこと；これは、細胞内細菌感染および疾患のための標的抗生物質治療におけるリポソームおよびナノカプセルの使用を記載する）。近年、改善された血清安定性および循環半減期を有するリポソームが開発された（GabizonおよびPapahadjopoulos, 1988；AllenおよびChoun, 1987；米国特許第5,741,516号（本明細書中にその全体が参考として詳細に援用される））。さらに、潜在的な薬物キャリアとしてのリポソーム調製物およびリポソーム様調製物の種々の方法が、総説されている（Takakura, 1998；Chandranら、1997；Margalit, 1995；米国特許第5,567,434号；米国特許第5,552,157号；米国特許第5,565,213号；米国特許第5,738,868号および米国特許第5,795,587号（各々が、その全体が本明細書中で参考として詳細に援用される））。

30

40

【0278】

リポソームは、T細胞懸濁液、初代肝細胞培養物およびPC12細胞を含む他の手順によるトランスフェクションが通常困難である多くの細胞型とともに、首尾よく使用されている（Renneisenら、1990；Mullerら、1990）。さらに、リポソームは、ウイルスベクターの送達系に典型的なDNA長の制限がない。リポソームは、遺伝子、薬物（HeathおよびMartin, 1986；Heathら、1986；Balazsovitsら、1989；FrestaおよびPuglisi, 1996）、放射線

50

治療剤（Pikulら、1987）、酵素（Imaizumiら、1990a；Imaizumiら、1990b）、ウイルス（FallerおよびBaltimore、1984）、転写因子およびアロステリックエフェクター（NicolaouおよびGersonde、1979）を、種々の培養細胞株および動物に導入するために効果的に使用されている。リポソーム媒介薬物送達の効力を試験するいくつかの成功した臨床試験が完了している（Lopez Beresteinら、1985a；1985b；Couné、1988；Sculierら、1988）。さらに、いくつかの研究によって、リポソームの使用は、全身送達後の、自己免疫応答、毒性または性腺局在にも関連しないことが示唆される（MoriおよびFukatsu、1992）。

【0279】

10

リポソームは、水性媒体中に分散したリン脂質から形成され、そして多層同心性二重層小胞（多層小胞（MLV）とも呼ばれる）を自発的に形成する。MLVは一般に、25nm～4μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、200～500Åの範囲の直径を有し、コア中に水溶液を含む小さな単層小胞（SUV）の形成を生じる。

【0280】

リポソームは、細胞膜に類似点を有し、ペプチド組成物のためのキャリアとして本発明と組み合わせての使用を意図されている。これらは、広範に適切である。なぜなら、水可溶性物質および脂質可溶性物質の両方は、それぞれすなわち水性空間および二重層自体に包括され得るからである。薬物保有リポソームは、リポソーム処方物を選択的に改変することによる活性薬剤の部位特異的送達のためにさらに使用され得る。

20

【0281】

Couvreuxら（1977；1988）の教示に加えて、以下の情報が、リポソーム処方物の生成において利用され得る。リン脂質は、水中に分散される場合、脂質対水のモル比に依存して、リポソーム以外の種々の構造を形成し得る。低比率において、リポソームは、好ましい構造である。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度および二価陽イオンの存在に依存する。リポソームは、イオン物質および極性物質に対する低い透過性を示し得るが、高温において、これらの透過性を顕著に変更する相転移を起こす。この相転移は、密接充填した順序付けられた構造（ゲル状態として知られている）から緩く充填したより順序付けられていない構造（流体状態として知られている）への変化を含む。これは、特徴的な相転移温度で生じ、そしてイオン、糖および薬物に対する透過性の増加を生じる。

30

【0282】

温度に加えて、タンパク質への曝露は、リポソームの透過性を変更し得る。特定の可溶性タンパク質（例えば、チトクロームc）は、二重層に結合し、変形し、そして透過し、それにより、透過性における変化を生じる。コレステロールは、リン脂質をより密に充填することによって、タンパク質のこの透過を明らかに阻害する。抗生物質およびインヒビター送達のための最も有用なリポソーム処方物は、コレステロールを含むことが意図される。

【0283】

溶質を捕捉する能力は、異なる型のリポソーム間で変化する。例えば、MLVは、捕捉溶質において中程度に効率的であるが、SUVは、極端に非効率的である。SUVは、サイズ分布における同質性および再現性の利点を提供するが、サイズと捕捉効率との間の妥協が、大きな単層小胞（LUV）によって提供される。これらは、エーテルエバポレーションによって調製され、そしてMLVよりも溶質の包括において3～4倍効率的である。

40

【0284】

リポソーム特徴に加えて、化合物を包括する際の重要な決定因子は、化合物自体の生理化学的特質である。極性化合物は、水性空間に捕捉され、そして非極性化合物は、小胞の脂質二重層に結合する。極性化合物は、透過を介してかまたは二重層が破壊される場合に放出されるが、非極性化合物は、二重層が温度またはリポタンパク質への曝露によって破壊されない限り、二重層と結合したままである。両方の型は、相転移温度で最大流出速度を

50

示す。

【0285】

リポソームは、4つの異なる機構を介して細胞と相互作用する：マクロファージおよび好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水性の力または静電気力によってか、または細胞表面成分との特異的な相互作用によってかのいずれかによる細胞表面への接着；細胞質へのリポソーム内容分の同時放出を伴う、原形質膜へのリポソームの脂質二重層の挿入による形質細胞膜との融合；およびリポソーム内容分のいずれの会合も伴わない、細胞膜または亜細胞膜へのリポソーム脂質の移行（または逆の場合も同じである）。どの機構が有効であるかを決定することはしばしば困難であり、そして1つ以上が同時に作用し得る。

10

【0286】

静脈内注射されたリポソームの運命および処分は、これらの物理的特性（例えば、サイズ、流動性、および表面電荷）に依存する。これらは、数時間または数日間、組織に存続し得（これらの組成に依存する）、そして血液中の半減期は、数分から数時間の範囲である。より大きいリポソーム（例えば、MLVおよびLUV）は、細網内皮系の食細胞によって迅速に取り込まれるが、循環系の生理は、多数の部位におけるこのような大きい種の出ていくことを制限する。これらは、大きい開口部または孔が毛細血管内皮において存在する場所（例えば、肝臓または脾臓の洞様毛細血管）のみに存在し得る。従って、これらの器官は、取り込みの優勢である部分である。他方、SUVは、広範な組織分布を示すが、肝臓および脾臓においてなお高度に隔離されている。一般に、このインビボ挙動は、これらの大きいサイズにアクセス可能なこれらの器官および組織のみにリポソームの潜在的な標的化を制限する。これらとしては、血液、肝臓、脾臓、骨髄、およびリンパ様器官が挙げられる。

20

【0287】

標的化は一般に、本発明の観点における制限ではない。しかし、特定の標的化が所望される場合、これが達成される方法が利用可能である。リポソーム表面に結合し、そして抗体およびその薬物内容物を、特定の細胞型表面上に位置する特異的な抗原性レセプターに指向する抗体が、使用され得る。炭水化物決定因子（細胞-細胞の認識、相互作用および接着において役割を果たす糖タンパク質または糖脂質細胞表面成分）はまた、特定の細胞型にリポソームを指向する際に可能性を有するので、認識部位として使用され得る。たいていは、リポソーム調製物の静脈内注射が使用されることが意図されるが、投与の他の経路もまた考えうる。

30

【0288】

あるいは、本発明は、本発明の組成物の薬学的に受容可能なナノカプセル処方物を提供する。ナノカプセルは一般に、化合物を安定かつ再現可能な様式で補足し得る（Henry-Michellandら、1987；Quintanar-Guerreroら、1998；Douglasら、1987）。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を回避するために、このような超微粒子（約0.1 μm のサイズ）は、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノカプセルは、本発明における使用について意図される。このような粒子は、Couvreurら、1980；1988；zur Muhlenら、1998；Zambauxら、1998；Zambauxら、1998；Pinto-Alphandryら、1995および米国特許第5,145,684号（これらは、本明細書中でその全体が参考として詳細に援用される）に記載されるようにして容易に作製され得る。

40

【0289】

（ワクチン）

本発明の特定の好ましい実施形態において、ワクチンが提供される。ワクチンは一般に、免疫刺激剤と組み合わせて、上に議論されるようなもののような、1つ以上の薬学的組成物を含む。免疫刺激剤は、外因性抗原に対する免疫応答（抗体および／または細胞媒介性

50

）を強化または増強する任意の物質であり得る。免疫刺激剤の例としては、アジュバント、生分解性微粒子（例えば、ポリ乳酸ガラクトド（galactide））およびリポソーム（化合物が組み込まれる；例えば、Fullerton, 米国特許第4, 235, 877号）が挙げられる。ワクチン調製物は一般に、例えば、M. F. PowellおよびM. J. Newman編、「Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)」、Plenum Press (NY, 1995)において記載される。本発明の範囲内の薬学的組成物およびワクチンはまた、他の化合物を含み得、これらは、生物学的に活性または不活性であり得る。例えば、他のHSV抗原の1つ以上の免疫原性部分は、組成物またはワクチン中で、融合ポリペプチドに組み込まれてか、または別々の化合物としてかのいずれかで存在し得る。

10

【0290】

例示的ワクチンは、上記のようなポリペプチドのうちの1つ以上をコードするDNAを、そのポリペプチドがインサイチュで生成されるように含み得る。上記のように、そのDNAは、当業者に公知の種々の送達系（核酸発現系、細菌発現系およびウイルス発現系を含む）のいずれかに存在し得る。多数の遺伝子送達技術が当該分野で周知であり、例えば、Rolland、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143~198、1998およびその中に引用される参考文献により記載される技術である。適切な核酸発現系は、患者における発現に必要なDNA配列（例えば、適切なプロモーターおよび終止シグナル（terminating signal））を含む。細菌送達系は、その細胞表面上にそのポリペプチドの免疫原性部分を発現するかまたはそのようなエピトープを分泌する細菌（例えば、Bacillus-Calmette-Guerrin）の投与を包含する。好ましい実施形態において、そのDNAは、ウイルス発現系（例えば、ワクシニアウイルスまたは他のポックスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルス）を使用して導入され得、このウイルス発現系は、非病原性（欠損）複製コンピテントウイルスの使用を含み得る。適切な系は、例えば、以下に開示される：Fisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317~321、1989；Flexnerら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:86~103、1989；Flexnerら、Vaccine 8:17~21、1990；米国特許第4, 603, 112号、同第4, 769, 330号および同第5, 017, 487号；WO 89/01973；米国特許第4, 777, 127号；GB 2, 200, 651:EP 0, 345, 242号；WO 91/02805；Berckner、Biotechniques 6:616~627、1988；Rosenfeldら、Science 252:431~434、1991；Kollsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215~219、1994；Kass-Eislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498~11502、1993；Guzmanら、Circulation 88:2838~2848、1993；ならびにGuzmanら、Cir. Res. 73:1202~1207、1993。このような発現系にDNAを組み込む技術は、当業者に周知である。このDNAはまた、例えば、Ulmerら、Science 259:1745~1749、1993に記載されそしてCohen、Science 259:1691~1692、1993により概説されるように、「裸」でもあり得る。裸のDNAの取り込みは、生分解性ビーズ（これは、細胞に効率的に輸送される）上にそのDNAをコーティングすることによって増加され得る。ワクチンがポリヌクレオチドおよびポリペプチド成分の両方を含み得ることは、明らかである。このようなワクチンは、増強された免疫応答を提供し得る。

20

30

40

【0291】

ワクチンが、本明細書中で提供されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的に受容可能な塩を含み得ることは、明らかである。このような塩は、薬学的に受容可能な非毒性塩基（有機塩基（例えば、一級アミンの塩、二級アミンの塩および三級アミンの塩、ならびに塩基性アミノ酸の塩）ならびに無機塩基（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リ

50

チウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩)を含む)から調製され得る。

【0292】

当業者に公知の任意の適切なキャリアが、本発明のワクチン組成物にて使用され得るが、キャリアの型は、投与様式に依存して変化する。本発明の組成物は、任意の適切な投与様式(例えば、局所投与、経口投与、経鼻投与、静脈内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与、または筋肉内投与を含む)のために処方され得る。非経口投与(例えば、皮下注射)のために、そのキャリアは、好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ろう、または緩衝剤を含む。経口投与のために、上記のキャリアのいずれか、または固体キャリア(例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、および炭酸マグネシウム)が使用され得る。生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリラクテート、ポリグリコレート)もまた、本発明の薬学的組成物のためのキャリアとして使用され得る。適切な生分解性ミクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号;同第5,075,109号;同第5,928,647号;同第5,811,128号;同第5,820,883号;同第5,853,763号;同第5,814,344号および同第5,942,252号に開示される。改変B型肝炎コアタンパク質キャリア系(例えば、WO/99 40934およびそこで引用される参考文献(これらの全ては参考として本明細書中に参照される)に記載される系)もまた、適切である。米国特許第5,928,647号に記載される微粒子-タンパク質複合体を含むキャリアもまた使用され得、このようなキャリアは、宿主においてクラスI拘束細胞傷害性Tリンパ球応答を誘導し得る。

10

20

【0293】

このような組成物はまた、緩衝剤(例えば、中性の緩衝化生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水)、糖質(例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸(例えば、グリシン)、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤(例えば、EDTAまたはグルタチオン)、アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)、処方物をレシipientの血液に対して等張性、低張性または弱く高張性にする溶質、懸濁剤、濃化剤および/または保存剤を含み得る。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として処方され得る。化合物はまた、周知の技術を使用してリポソーム内にカプセル化され得る。

30

【0294】

種々の任意の免疫刺激剤が、本発明のワクチンにおいて使用され得る。例えば、アジュバントが含まれ得る。ほとんどのアジュバントは、抗原を迅速な異化作用から保護するように設計された物質(例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油)および免疫応答の刺激物(例えば、リポドA、*Bordetella pertussis*由来のタンパク質または*Mycobacterium tuberculosis*由来のタンパク質)を含む。適切なアジュバントは、例えば、フロイント不完全アジュバントおよびフロイント完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2(SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); アルミニウム塩(例えば、水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)またはリン酸アルミニウム;カルシウム塩、鉄塩または亜鉛塩;アシル化チロシンの不溶性懸濁物;アシル化糖;カチオン誘導体化多糖またはアニオン誘導体化多糖;ポリフォスファゼン;生分解性ミクロスフェア;モノホスホリルリポドAおよびクイルA(Quil A)として市販されている。サイトカイン(例えば、GM-CSF、あるいはインターロイキン-2、インターロイキン-7、またはインターロイキン-12)もまた、アジュバントとして使用され得る。

40

【0295】

本明細書中に提供されるワクチンにおいて、そのアジュバント組成物は、好ましくは、主にTh1型の免疫応答を誘導するように設計される。高レベルのTh1型サイトカイン(

50

例えば、 $IFN-\gamma$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IL-2$ および $IL-12$)は、投与される抗原に対する細胞媒介性免疫応答の誘導を支持する傾向がある。対照的に、高レベルの $Th2$ 型サイトカイン(例えば、 $IL-4$ 、 $IL-5$ 、 $IL-6$ および $IL-10$)は、体液性免疫応答の誘導を支持する傾向がある。本明細書中に提供されるようなワクチンの適用の後、患者は、 $Th1$ 型応答および $Th2$ 型応答を含む免疫応答を支持する。応答が主に $Th1$ 型である好ましい実施形態において、 $Th1$ 型サイトカインのレベルは、 $Th2$ 型サイトカインのレベルより高い程度まで増加する。これらのサイトカインのレベルは、標準的アッセイを使用して容易に評価され得る。サイトカインのファミリーの概説については、MossmanおよびCoffman、Ann. Rev. Immunol. 7:145~173、1989を参照のこと。

10

【0296】

主な $Th1$ 型応答を惹起する際の使用に好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA(好ましくは3-O-脱アシルモノホスホリルリピドA(3D-MPL))とアルミニウム塩との組み合わせが挙げられる。MPLアジュバントは、Corixa Corporation(Seattle, WA; 米国特許第4,436,727号; 同第4,877,611号; 同第4,866,034号および同第4,912,094号を参照のこと)から入手可能である。CpG含有オリゴヌクレオチド(そのCpGジヌクレオチドはメチル化されていない)もまた、主な $Th1$ 型応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは周知であり、例えば、WO 96/02555、WO 99/33488ならびに米国特許第6,008,200号および同第5,856,462号に記載されている。免疫刺激性DNA配列もまた、例えば、Satoら、Science 273:352、1996により記載されている。別の好ましいアジュバントは、サポニン(好ましくはQS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc.、Framingham, MA))であり、これは、単独でも他のアジュバントと組み合わせても使用され得る。例えば、増強された系は、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体との組み合わせ(例えば、WO 94/00153に記載されるような、QS21と3D-MPLとの組み合わせ)またはWO 96/33739に記載されるような、QS21がコレステロールでクエンチされている反応生成が低い(less reactogenic)組成物を含む。他の好ましい処方物は、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含む。水中油型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む、特に強力なアジュバント処方物が、WO 95/17210に記載されている。

20

30

【0297】

他の好ましいアジュバントとしては、Montanide ISA 720(Seppic、フランス)、SAF(Chiron、California、米国)、ISCOMS(CSL)、MF-59(Chiron)、SBASシリーズのアジュバント(例えば、SBAS-2またはSBAS-4(SmithKline Beecham、Rixensart、ベルギーから入手可能)、Detox(Corixa、Hamilton、MT)、RC-529(Corixa、Hamilton、MT)、ならびに他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート(AGP)(例えば、係属中の米国特許出願第08/853,826号および同第09/074,720号(その開示は、全体が本明細書中に参考として援用される)に記載されるもの)が挙げられる。他の好ましいアジュバントは、WO 99/52549A1に記載されるような、ポリオキシエチレンエーテルを含む。

40

【0298】

本明細書中に提供される任意のワクチンは、抗原、免疫応答エンハンサーおよび適切なキャリアもしくは賦形剤の組み合わせを生じる、周知の方法を使用して調製され得る。本明細書中に記載される組成物は、徐放性処方物(すなわち、投与後に化合物のゆっくりした放出をもたらす、カプセル、スポンジまたはゲル(例えば、多糖から構成される)のような処方物)の一部として投与され得る。このような処方物は、一般的に、周知の技術(例えば、Coombesら、Vaccine 14:1429~1438、1996を参照

50

のこと)を使用して調製され得、そしてたとえば、経口投与、直腸投与もしくは皮下移植または所望の標的部位への移植により投与され得る。徐放性処方物は、キャリアマトリックス中に分散されており、そして／または速度制御膜により囲まれた貯蔵物中に含まれる、ポリペプチド、ポリヌクレオチドもしくは抗体を含み得る。

【0299】

このような処方物内での使用のためのキャリアは、生体適合性であり、そしてまた、生分解性であり得；好ましくはその処方物は、比較的一定なレベルの活性成分放出を提供する。このようなキャリアとしては、ポリ(ラクチド-ε-グリコリド)、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げられる。他の遅延性放出キャリアとしては、超分子バイオベクター(supramolecular biovector)が挙げられ、これは、非液体親水性コア(例えば、架橋した多糖またはオリゴ糖)と、必要に応じて両親媒性化合物(例えば、リン脂質)を含む外層とを含む(例えば、米国特許第5,151,254号およびPCT出願WO94/20078、WO/94/23701およびWO96/06638を参照のこと)。徐放性処方物中に含まれる活性化合物の量は、移植部位、放出の速度および予想持続期間、ならびに処置もしくは予防される状態の性質に依存する。

10

【0300】

種々の任意の送達ビヒクルが、HSV感染細胞を標的とする抗原特異的免疫応答の生成を促進するために、薬学的組成物およびワクチンにて使用され得る。送達ビヒクルとしては、抗原提示細胞(APC)(例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球、ならびに有効なAPCであるように操作され得る他の細胞)が挙げられる。このような細胞は、抗原を提示する能力を増大させるように、T細胞応答の活性化および／もしくは維持を改善するように、それ自体が抗HSV効果を有するように、そして／または受容物と免疫学的に適合性(すなわち、一致したHLAハロタイプ)であるように、遺伝子改変され得るが、その必要はない。APCは、一般的には、種々の生物学的流体ならびに器官のいずれかから単離され得、そして自系細胞でも、同種異系細胞でも、同系細胞でも、または異種細胞でもよい。

20

【0301】

本発明の特定の好ましい実施形態は、抗原提示細胞として、樹状細胞またはその前駆体を使用する。樹状細胞は、非常に強力なAPCであり(BanchereauおよびSteinman、Nature 392:245~251、1998)、そして、予防的免疫または治療的免疫を惹起するための生理学的アジュバントとして有効であることが示されている(TimmermanおよびLevy、Ann. Rev. Med. 50:507~529、1999を参照のこと)。一般的には、樹状細胞は、その代表的形状(インサイチュで星状であり、顕著な細胞質突起(樹状突起)がインビトロで見える)、高効率に抗原を取り込み、プロセッシングして提示する能力、ならびに未刺激T細胞応答を活性化する能力に基づいて同定され得る。樹状細胞は、当然、インビボでもエキソビボでも樹状細胞上に通常は見出されない特定の細胞表面レセプターもしくはリガンドを発現するように操作され得、そしてそのような改変樹状細胞が、本発明により意図される。樹状細胞の代替物として、分泌小胞抗原ロード樹状細胞(secreted vesicles and antigen-loaded dendritic cells)(エキソソームと呼ばれる)が、ワクチンで使用され得る(Zitvogelら、Nature Med. 4:594~600、1998を参照のこと)。

30

40

【0302】

樹状細胞および前駆体が、末梢血、骨髓、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血、あるいは他の適切な任意の組織もしくは流体から入手され得る。例えば、樹状細胞は、サイトカイン(例えば、GM-CSF、IL-4、IL-13および／またはTNFα)の組み合わせを末梢血から収集した単球の培養物に添加することによって、エキソビボで分化され得る。あるいは、末梢血、臍帯血または骨髓から収集したCD34陽性細胞は、GM-CSF、IL-3、TNFα、CD40リガンド、LPS、flt3リガンドおよび／または樹状

50

細胞の分化、成熟および増殖を誘導する他の化合物の組み合わせを、培養培地に添加することによって、樹状細胞へと分化し得る。

【0303】

樹状細胞は、「未熟」細胞および「成熟」細胞として簡便に分類されており、これにより、簡単な方法によって2つの十分に特徴づけられた表現型間を区別することが可能である。しかし、この命名法は、可能なすべての分化の中間段階を排除すると解釈されるべきではない。未熟樹状細胞は、抗原取り込みおよびプロセッシングについて高い能力を有するAPCとして特徴付けられ、これはFcγレセプターおよびマンノースレセプターの高発現と相関する。成熟表現型は、代表的には、これらのマーカーのより低い発現により、しかしT細胞活性化の原因である細胞表面分子（例えば、クラスI MHCおよびクラスII MHC、接着分子（例えば、CD54およびCD11）ならびに同時刺激性分子（例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB））の高発現により、特徴付けられる。

10

【0304】

APCは、一般的には、HSVタンパク質（あるいはその一部もしくは他の改変体）をコードするポリヌクレオチドで、そのHSVポリペプチドまたはその免疫原性部分が細胞表面上で発現されるように、トランスフェクトされ得る。このようなトランスフェクションは、エキソビボで生じ得、次いで、このようなトランスフェクトされた細胞を含む組成物またはワクチンは、本明細書中に記載されるような治療目的のために使用され得る。あるいは、樹状細胞または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルが患者に投与され得、インビボで生じるトランスフェクションをもたらす。例えば、樹状細胞のインビボおよびエキソビボでのトランスフェクションは、一般的には、当該分野で公知の任意の方法（例えば、WO 97/24447に記載される方法、あるいはMahvira、Immunology and Cell Biology 75:456~460、1997により記載される遺伝子銃アプローチ）を使用して実施され得る。樹状細胞の抗原ローディングは、樹状細胞または前駆細胞をHSVポリペプチド、DNA（裸またはプラスミドベクター内）もしくはRNAとともに、または抗原を発現する組換え細菌もしくは組換えウイルス（例えば、ワクシニアウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクター、アデノウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクター）とともに、インキュベートすることによって達成され得る。ローディングの前に、そのポリペプチドは、T細胞の補助を提供する免疫学的パートナー（例えば、キャリア分子）に共有結合により結合体化され得る。あるいは、樹状細胞は、非結合体化免疫学的パートナーを用いて、別々にかまたはそのポリペプチドの存在下で、パルスされ得る。

20

30

【0305】

ワクチンおよび薬学的組成物は、単位用量容器または複数用量容器（例えば、シールされたアンプルまたはバイアル）にて提示され得る。このような容器は、好ましくは、使用するまで処方物の滅菌性を保存するために密封シールされる。一般的には、処方物は、油状ビヒクルまたは水性ビヒクル中の懸濁物、溶液またはエマルジョンとして保存され得る。あるいは、ワクチンまたは薬学的組成物は、滅菌した液体キャリアを使用直前に添加することのみ必要な、凍結乾燥状態で保存され得る。

40

【0306】

（免疫治療適用）

本発明のさらなる局面において、本明細書中に記載される組成物は、HSV感染の免疫治療に使用され得る。このような方法において、薬学的組成物およびワクチンは代表的には、患者に投与される。本明細書中で使用される場合、「患者」とは、任意の温血動物（好ましくはヒト）をいう。上記の薬学的組成物およびワクチンは、HSVによる感染を予防的に阻害するかもしくはHSVによる感染の程度を改善するため、またはすでにHSVに感染した患者を処置するために使用され得る。投与は、適切な任意の方法（静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、皮下経路、鼻内経路、皮内経路、肛門経路、膣経路、局所経路および経口経路による投与を含む）によってであり得る。

50

【0307】

特定の実施形態において、免疫療法は、能動免疫療法であり得、この能動免疫療法において、処置は、免疫応答改変剤（例えば、本明細書中に提供されるようなポリペプチドおよびポリヌクレオチド）の投与による、H S V感染に対して反応する内因性宿主免疫系のインビボ刺激に依存する。

【0308】

他の実施形態において、免疫療法は受動免疫療法であり得、この受動免疫療法において、処置は、治療的効果を直接または間接に媒介し得るそしてインタクトな宿主免疫系に必ずしも依存しないH S V免疫反応性が確立された因子（例えば、エフェクター細胞または抗体）の送達を含む。エフェクター細胞の例としては、上記のようなT細胞、Tリンパ球（例えば、C D 8⁺細胞傷害性Tリンパ球およびC D 4⁺ Tヘルパーリンパ球）、キラー細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞）、B細胞および本明細書中に提供されるポリペプチドを発現する抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびマクロファージ）が挙げられる。本明細書中に列挙されるポリペプチドに特異的なT細胞レセプターおよび抗体レセプターは、クローニングされ得、発現され得、そして養子免疫療法のために他のベクターもしくはエフェクター細胞に移入され得る。本明細書中に提供されるポリペプチドはまた、抗体または抗イディオタイプ抗体（上記および米国特許第4, 9 1 8, 1 6 4号に記載されるような）を受動免疫療法のために生成するために使用され得る。

【0309】

エフェクター細胞は、一般的には、本明細書中に記載されるように、インビトロでの増殖による養子免疫療法に十分な量で得られ得る。インビボで抗原認識を保持しつつ、1個の抗原特異的エフェクター細胞を数十億個へと数を増やすための培養条件は、当該分野で周知である。このようなインビトロ培養条件は、代表的には、しばしばサイトカイン（例えば、I L - 2）および分裂中でないフィーダー細胞の存在下で、抗原による間欠性刺激を使用する。上記のように、本明細書中に提供されるような免疫反応性ポリペプチドは、免疫療法のために十分な数の細胞を生成するために、抗原特異的T細胞培養物を迅速に増殖させるために使用され得る。詳細には、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、単球、線維芽細胞および／またはB細胞）が、当該分野で周知の標準的技術を使用して、免疫反応性ポリペプチドでパルスされ得るか、または1つ以上のポリヌクレオチドで

【0310】

あるいは、本明細書中に列挙されるポリペプチドを発現するベクターは、患者から採取された抗原提示細胞に導入され得、そして同じ患者に移植し戻すためにエキソビボでクローン増殖され得る。トランスフェクトされた細胞は、当該分野で公知の任意の手段を使用して、好ましくは滅菌形態で、静脈投与、腔内投与、または腹腔内投与によって、その患者に再導入され得る。

【0311】

本明細書中に記載される治療組成物の投与の経路および頻度、ならびに投与量は、個体間で変化するが、標準的技術を使用して容易に確立され得る。1つの実施形態において、1と約10との間の用量が、52週間にわたって投与され得る。別の実施形態において、約6用量が、1ヶ月間隔で投与され、そしてブースターワクチン接種が、代表的にその後定期的に与えられる。代替プロトコルが、個々の患者に適切であり得る。

【0312】

適切な用量は、上記のように投与される場合、抗HSV免疫応答を促進し得、かつ好ましくは基礎（すなわち、未処置）レベルを少なくとも10～50%超える、化合物の量である。このような応答は、例えば、患者における抗HSV抗体を測定することによって、モニターされ得る。このようなワクチンはまた、ワクチン接種されていない患者と比較した場合、ワクチン接種された患者において改善された臨床成果（例えば、より頻繁な完全または部分的な寛解、あるいは疾患を伴わないより長期の生存）をもたらす免疫応答を生じ得る。一般的に、1つ以上のポリペプチドを含む薬学的組成物およびワクチンについて、1用量中に存在する各ポリペプチドの量は、宿主1kgあたり約25μg～5mgの範囲である。適切な用量の大きさは、患者の大きさとともに変化するが、代表的には、約0.1mL～約5mLの範囲である。 10

【0313】

一般的に、適切な投薬量および処置レジメンは、治療的利益および／または予防的利益を提供するために十分な量で活性化化合物を提供する。このような応答は、未処置の患者と比較した場合に、処置された患者において、改善された臨床成果（例えば、より頻繁な完全または部分的な寛解、あるいは疾患を伴わないより長い生存）を確立することによってモニターされ得る。HSVタンパク質に対する既存の免疫応答の増加は、一般的に、改善された臨床的成果に相関し得る。このような免疫応答は、一般的に、標準的な増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイまたはサイトカインアッセイを用いて評価され得、これらのアッセイは、処置の前および後に患者から得たサンプルを用いて実行され得る。 20

【0314】

（HSVの検出および診断）

一般的に、HSVは、この患者から得た生物学的サンプル（例えば、血液、血清、痰、尿および／または他の適切な組織）中の1以上のHSVタンパク質および／または、このようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在に基づいてその患者において検出され得る。言いかえると、このようなタンパク質は、患者におけるHSVの存在または不在を示すマーカーとして使用され得る。本明細書中で提供される結合剤は、一般的に、この生物学的サンプルにおいてこの因子に結合する抗原のレベルの検出を可能にする。ポリヌクレオチドプライマーおよびプローブは、HSVタンパク質をコードするmRNAのレベルを検出するために使用され得、これはまた、HSV感染の存在または不在を示す。 30

【0315】

サンプルにおけるポリペプチドマーカーを検出するために結合剤を使用する、当業者に公知の種々のアッセイ形式が存在する。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと。一般的に、患者におけるHSVの存在または不在は、患者から得た生物学的サンプルを結合剤と接触させ、そしてこの結合剤に結合するポリペプチドのレベルをサンプルにおいて検出することによって決定され得る。

【0316】

好ましい実施形態において、アッセイは、ポリペプチドに結合して残りのサンプルからそれを取り出すために、固体支持体に固定化された結合剤の使用を含む。次いで、結合したポリペプチドは、レポーター基を含みかつ結合剤／ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して検出され得る。このような検出試薬は、例えば、ポリペプチドに特異的に結合する結合剤あるいはこの結合剤に特異的に結合する抗体または他の因子（例えば、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチン）を含み得る。あるいは、競合アッセイが、利用され得、このアッセイにおいて、ポリペプチドは、レポーター基で標識され、そしてサンプルとの結合剤のインキュベーション後に、固定化された結合剤に結合させる。サンプルの成分が、結合剤への標識されたポリペプチドの結合を阻害する程度は、固定化された結合剤とのそのサンプルの反応性を示す。このようなアッセイにおける使用に適切なポリペプチドは、上記のような、全長HSVタンパク質および結合 40 50

剤が結合するその一部分を含む。

【0317】

固体支持体は、タンパク質が付着され得る、当業者に公知な任意の材料であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウェルまたはニトロセルロース膜もしくは他の適切な膜であり得る。あるいは、この支持体は、ガラス、ファイバーガラス、ラテックスまたはプラスチック材料（例えば、ポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル）のようなビーズあるいはディスクであり得る。この支持体はまた、例えば、米国特許第5,359,681号に開示されるもののような、磁気粒子または光ファイバーセンサーであり得る。結合剤は、当業者に公知の種々の技術を使用して固体支持体上に固定化され得、これは、特許および科学文献において詳細に記載されている。本発明の文脈において、用語「固定化」は、吸着のような非共有結合的会合および共有結合的付着（これは、この因子と支持体上の官能基との間の直接的結合であり得るか、または架橋剤による結合であり得る）の両方をいう。マイクロタイタープレートにおけるウェルまたは膜に対する吸着による固定化が、好ましい。このような場合において、吸着は、適切な緩衝液中で、適切な長さの時間の間、結合剤と固体支持体とを接触することによって達成され得る。接触時間は、温度とともに変化するが、代表的には約1時間と約1日との間である。一般に、プラスチックマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレンまたはポリビニルクロリド）のウェルと約10 ng～約10 μgの範囲、および好ましくは約100 ng～約1 μgの範囲の量の結合剤とを接触させることは、適切な量の結合剤を固定化するために十分である。

10

20

【0318】

固体支持体に対する結合剤の共有結合的付着は、一般的に、この支持体および結合剤上の官能基（例えば、ヒドロキシル基またはアミノ基）の両方と反応する二官能性試薬を、この支持体とまず反応させることによって達成され得る。例えば、この結合剤を、ベンゾキノンを使用するか、または結合パートナーのアミンおよび活性な水素と支持体のアルデヒド基との縮合によって、適切なポリマーコーティングを有する支持体に対して共有結合的に付着し得る（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, A12～A13を参照のこと）。

【0319】

特定の実施形態において、このアッセイは、2抗体サンドイッチアッセイである。本アッセイは、最初に、固体支持体（一般に、マイクロタイタープレートのウェル）上で固定化されている抗体をサンプルに接触させて、その結果、サンプル内のポリペプチドを固定化抗体に結合させることによって実施され得る。次いで、非結合サンプルは固定化ポリペプチド-抗体複合体から除去され、そして検出試薬（好ましくは、そのポリペプチド上の異なる部位に結合し得る第2の抗体（レポーター基を含む））が添加される。次いで、固体支持体に結合したままである検出試薬の量が、特定のレポーター基に関して適切な方法を用いて決定される。

30

【0320】

より詳細には、一旦抗体が上記のように支持体上に固定化されると、支持体上の残りのタンパク質結合部位は、典型的にはブロックされる。任意の適切なブロック剤（例えば、ウシ血清アルブミンまたはTween 20TM（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO））は、当業者に公知である。固定化抗体は次いで、サンプルとインキュベートされ、そしてポリペプチドをこの抗体に結合させる。インキュベーションの前に、このサンプルは適切な希釈液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS））で希釈され得る。概して、適切な接触時間（すなわち、インキュベーション時間）は、HSV感染を有する個体から得られたサンプル内のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間である。好ましくは、この接触時間は、結合ポリペプチドと非結合ポリペプチドとの間の平衡で達成されるレベルの少なくとも約95%の結合レベルを達成するのに十分な時間である。当業者は、ある時間にわたって起こる結合レベルをアッセイすることによって、平衡に達するまでに必要な時間が容易に決定され得ることを認識する。室温では、一般

40

50

に、約30分間のインキュベーション時間で十分である。

【0321】

次いで、非結合サンプルが、適切な緩衝液（例えば、0.1% Tween 20TMを含むPBS）を用いて固体支持体を洗浄することによって除去され得る。レポーター基を含む第2の抗体が次いで、固体支持体に添加され得る。好ましいレポーター基は、上記の基を含む。

【0322】

次いで、検出試薬が、結合されたポリペプチドを検出するのに十分な量の時間、固定化抗体-ポリペプチド複合体とインキュベートされる。適切な量の時間は、一般に、ある時間にわたって起こる結合のレベルをアッセイすることによって決定され得る。次いで、非結合の検出試薬は除去され、そして結合した検出試薬は、レポーター基を用いて検出される。レポーター基を検出するために使用される方法は、レポーター基の性質に依存する。放射性基について、一般的には、シンチレーション計数法またはオートラジオグラフィ法が適切である。分光法は、色素、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る。ビチオンは、異なるレポーター基（一般に、放射性もしくは蛍光基または酵素）に結合されたアビジンを使用して検出され得る。酵素レポーター基は、一般に、基質の添加（一般には、特定の時間の間）、続いて反応産物の分光分析または他の分析により検出され得る。

【0323】

HSVの存在または非存在を決定するために、固体支持体に結合したままのレポーター基から検出されるシグナルが、一般に、所定のカットオフ値と対応するシグナルと比較される。1つの実施形態において、HSVの検出のためのカットオフ値は、固定化抗体を、HSVを有さない患者由来のサンプルとインキュベートした際に得られる平均シグナルである。代替の実施形態において、このカットオフ値は、Sackettら、*Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 106~7頁の方法に従って、レシーバーオペレーターカーブ（Receiver Operator Curve）を使用して決定される。簡単に言うと、この実施形態において、このカットオフ値は、診断試験結果についての各可能なカットオフ値に対応する真の陽性割合（すなわち、感度）および偽陽性割合（100%-特異性）の対のプロットから決定され得る。プロット上の上方左手角に最も近いカットオフ値（すなわち、最大領域を囲む値）が、最も正確なカットオフ値であり、そして本方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生ずるサンプルが陽性に見なされ得る。あるいは、カットオフ値は、偽陽性割合を最小にするためにプロットに沿って左へシフトされ得るか、または偽陰性割合を最小にするために右へシフトされ得る。概して、この方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生ずるサンプルが、陽性に見なされる。

【0324】

関連の実施形態において、このアッセイは、フロースルー試験形式またはストリップ試験形式で実行される（ここで、結合剤は、ニトロセルロースのような膜上で固定化される）。フロースルー試験では、サンプル内のポリペプチドは、サンプルが膜を通過するにつれて固定化結合剤に結合する。次いで、第2の標識化された結合剤が、この第2の結合剤を含む溶液がその膜を介して流れるにつれて、結合剤-ポリペプチド複合体と結合する。次いで、結合した第2の結合剤の検出は、上記のように実行され得る。ストリップ試験形式では、結合剤が結合される膜の一端を、サンプルを含む溶液中に浸す。このサンプルは、膜に沿って、第2の結合剤を含む領域を通して、そして固定化結合剤の領域まで移動する。固定化抗体の領域での第2の結合剤の濃度が、HSVの存在を示す。代表的には、その部位での第2の結合剤の濃度は、視覚的に読みとられ得るパターン（例えば、線）を生成する。このようなパターンが存在しないことは陰性の結果を示す。概して、この膜上に固定化される結合剤の量は、生物学的サンプルが、上記の形式において、2抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生じるのに十分であるレベルのポリペプチドを含む場合、視覚的に識別可能なパターンを生じるように選択される。このようなアッセイにおけ

10

20

30

40

50

る使用に好ましい結合剤は、抗体およびその抗原結合フラグメントである。好ましくは、膜上に固定化される抗体の量は、約25 ng～約1 μgの範囲であり、そしてより好ましくは、約50 ng～約500 ngの範囲である。このような試験は、代表的には、非常に少ない量の生物学的サンプルを用いて実行され得る。

【0325】

もちろん、本発明のHSVタンパク質または結合剤との使用に適する多数の他のアッセイ手順が存在する。上記の記載は、例示のみを意図する。例えば、上記手順が、HSVポリペプチドを使用するために容易に改変されて、生物学的サンプル中のこのようなポリペプチドに結合する抗体を検出し得ることが当業者に明かである。このようなタンパク質特異的抗体の検出は、HSV感染の同定を可能にし得る。

10

【0326】

HSV感染もまた、あるいはHSV感染が、生物学的サンプル中のHSVタンパク質と特異的に反応するT細胞の存在に基づいて検出され得る。特定の方法では、患者から単離されたCD4⁺T細胞および／またはCD8⁺T細胞を含む生物学的サンプルは、HSVポリペプチド、このようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび／またはこのようなポリペプチドの少なくとも免疫原性部分を発現するAPCとともにインキュベートされ、そしてT細胞の特異的活性化の存在または非存在が検出される。適切な生物学的サンプルとしては、単離されたT細胞が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、T細胞は、慣用技術によって（例えば、末梢血リンパ球のFicoll/Hypaque密度勾配遠心分離法によって）患者から単離され得る。T細胞は、約2～9日間（代表的に4日間）、37℃にてポリペプチド（例えば、5～25 μg/ml）とともにインビトロでインキュベートされ得る。T細胞サンプルの別のアリコート、コントロールとして役立てるために、HSVポリペプチドの非存在下でインキュベートすることが所望され得る。CD4⁺T細胞に関して、活性化は好ましくは、T細胞の増殖を評価することによって検出される。CD8⁺T細胞に関しては、活性化は好ましくは、細胞溶解活性を評価することによって検出される。疾患のない患者におけるよりも少なくとも2倍高い増殖レベルおよび／または少なくとも20%高い細胞溶解活性レベルは、患者におけるHSVの存在を示す。

20

【0327】

上記のように、HSV感染はまた、あるいはHSV感染は、生物学的サンプル中のHSVタンパク質をコードするmRNAレベルに基づいて検出され得る。例えば、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づくアッセイにおいて用いて、生物学的サンプルに由来するHSV cDNAの一部を増幅し得、ここで、オリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも1つは、HSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的である（すなわち、ハイブリダイズする）。次いで、増幅されたcDNAが、当該分野で周知の技術（例えば、ゲル電気泳動）を用いて分離され、そして検出される。同様に、HSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いて、生物学的サンプル中のこのHSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在を検出し得る。

30

40

【0328】

アッセイ条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするために、オリゴヌクレオチドのプライマーおよびプローブは、少なくとも10ヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも20ヌクレオチドの長さの、HSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドの一部に対して少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、そしてより好ましくは少なくとも約90%の同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含むべきである。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーおよび／またはプローブは、上記に規定されるような、中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中に記載されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。本明細書中に記載される診断方法において有用に用いられ得るオリゴヌクレオチドのプライマーおよび／またはプローブは、好ましく

50

は、少なくとも10～40ヌクレオチドの長さである。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書中に開示される配列を有するDNA分子の少なくとも10連続ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15連続ヌクレオチドを含む。PCRに基づくアッセイおよびハイブリダイゼーションアッセイの両方についての技術は、当該分野で周知である（例えば、Mullisら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich編, PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989を参照のこと）。

【0329】

1つの好ましいアッセイは、RT-PCRを用い、ここで、PCRは、逆転写と組み合わせて適用される。代表的に、RNAは生物学的サンプル（例えば、生検組織）から抽出され、そして逆転写されてcDNA分子を生成する。少なくとも1つの特異的プライマーを用いるPCR増幅は、cDNA分子を生成し、このcDNA分子は、例えば、ゲル電気泳動を用いて分離および可視化され得る。増幅は、試験患者およびHSVに感染していない個体から採取された生物学的サンプルについて行われ得る。増幅反応は、例えば、2桁の大きさに及ぶいくつかのcDNA希釈物について行われ得る。

【0330】

上記のように、感度を改善するために、複数のHSVタンパク質マーカーは、所定のサンプル内でアッセイされ得る。異なるHSVポリペプチドに特異的な結合剤が単一のアッセイにおいて組み合わせられ得ることは明らかである。さらに、複数のプライマーまたはプローブが同時に用いられ得る。HSVタンパク質マーカーの選択は、最適な感度をもたらす組み合わせを決定する慣用実験に基づき得る。さらに、または代替として、本明細書中に提供されるHSVタンパク質についてのアッセイは、他の公知のHSV抗原に対するアッセイと組み合わせられ得る。

【0331】

本発明はさらに、上記の診断方法および／または治療方法のうちのいずれかにおいて使用するためのキットを提供する。このようなキットは代表的に、診断アッセイおよび／または治療アッセイを行うのに必要な2以上の構成要素を備え、そしてこのキットの使用のための取扱説明書をさらに含む。構成要素は、化合物、試薬、容器および／または器具であり得る。例えば、診断キット内の1つの容器は、HSVタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含み得る。このような抗体またはフラグメントは、上記のように支持体材料に付着されて提供され得る。1以上のさらなる容器は、アッセイにおいて使用される要素（例えば、試薬または緩衝液）を封入し得る。このようなキットはまた、あるいはこのようなキットは、抗体結合の直接的または間接的な検出に適切なレポーター基を含む上記のような検出試薬を備え得る。

【0332】

あるいは、キットは、生物学的サンプル中のHSVタンパク質をコードするmRNAレベルを検出するように設計され得る。このようなキットは一般に、HSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、上記のような、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーを備える。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いられ得る。このようなキット内に存在し得るさらなる構成要素としては、HSVタンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を容易にする、第2のオリゴヌクレオチドおよび／または診断試薬もしくは容器が挙げられる。

【0333】

以下の実施例は、例示のために提供され、そして限定のためではない。

【0334】

（実施例1）

（HSV-2抗原の同定）

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態を説明し、これらを作製および使用する際に当

業者を補助するために提示される。これらの実施例は、その他に、本発明の範囲を制限することをいかなるようにも意図しない。

【0335】

(HSV-2 陽性ドナーの供給源) : リンパ球を以下の2つの型のドナーから得た : グループA) 未知の臨床的状态を有するセロポジティブドナー、およびグループB) 十分に特徴付けられた臨床的状态 (ウイルス散布性および肛門性器病変再発) を有するセロポジティブドナー。

【0336】

グループA : 血液サンプル (50 ml) を、13人の潜在的ドナーから得た。HSV感染の病歴に関する情報は、要求されなかった。ウェスタンブロットによって、血液を、HSV-1およびHSV-2に対する血清抗体についてスクリーニングした。PBMCをまた、HSV-1溶解物抗原およびHSV-2溶解物抗原 (ABI ; Columbia, MD) に対する特異的増殖性T細胞応答についてスクリーニングした。3人のドナー (AD104、AD116、およびAD120) が、HSV-2血清抗体およびHSV-2抗原に応答して特異的に増殖したそれらのPBMCについて、陽性であった。白血球搬出PBMCを、これらのドナーから収集し、そして液体窒素中で凍結保存した。

10

【0337】

グループB : 肛門性器病変生検 (biopsies) を、ドナーDK21318およびJR5032から得た。病変生検リンパ球を、50 μ Mアシクロビルの存在下で、IL-2およびPHAとともにインビトロで増殖させ、続いて、液体窒素中で凍結保存した。代表的に、 5×10^6 個 ~ 5×10^7 個のリンパ球を、二週間後に得る。自己PBMCもまた、DK2318およびJR5032の血液から収集し、そして液体窒素中で凍結保存した。

20

【0338】

(CD4 + T細胞株の作製) : 凍結保存したPBMCまたは病変生検リンパ球を解凍し、RPMI 1640 + 10%ヒト血清 + 10 ng/ml IL-7中の1 μ g/ml HSV-2抗原 (ABI) を用いてインビトロで刺激した。照射された自己PBMCを、病変生検リンパ球のみについて、抗原提示細胞として添加した。組換えIL-2 (1 ng/ml) を1日目および4日目に添加した。7日目に細胞を収集し、洗浄し、そしてIL-2およびIL-7を含む新鮮な培地中に置き換えた。組換えIL-2を10日目に再び添加した。培養の14日目に、T細胞を収集し、洗浄し、そしてHSV-2抗原および照射された自己PBMCを用いてインビトロで同じ方法で再刺激した。T細胞株を、二次刺激の11~12日目に、液体窒素中で、 1×10^7 細胞/バイアルで凍結保存した。解凍後、凍結保存したT細胞は、インビトロでHSV-2抗原に対して、特異的に増殖する能力を保持した。続いて、これらのT細胞を使用して、以下に記載のように、E. coli中で調製されるHSV-2遺伝子フラグメント発現クローニングライブラリーをスクリーニングした。

30

【0339】

(HSV-2 (333) DNAの調製) : HSV-2株333ウイルスを、200 ml / ボトルのMedium 199 (Gibco) + 5% FCSのローラーボトル中で培養されたペロ細胞において増殖させた。ペロ細胞をATCC (カタログ番号CCL-81) から得たアフリカ緑サル線維芽細胞様細胞に形質転換させる。コンフルエンスに近いペロ細胞 (10個のローラーボトル) を、50 ml / ボトルのMedium 199 + 5% FCS中で、0.01のMOIで、HSV-2株333ウイルスに感染させた。細胞および培地をローラーボトルから収集し、そして細胞をペレット化した。上清を氷上で保存し、そして細胞ペレットを新鮮なMedium 199 + 1% FCS中に再懸濁させ、6サイクルの凍結/解凍によって溶解させた。溶解物中の細胞細片をペレット化し、そして上清を保存された培養上清とともにプールした。ウイルスを、超遠心分離 (ultracentrifugation) (12,000 g、2時間、4 $^{\circ}$ C) によってプールされた上清からペレット化し、そして2 mlの新鮮なMedium 199 + 1% FCS中に再懸濁させた。ウ

40

50

ウイルスを、以前に記載されるように、超遠心分離（19,000g、2時間、4℃）によって5～15%線形Ficoll勾配でさらに精製した（第10章：Herpes simplex virus vectors of Molecular Virology: A Practical Approach（1993）；著者：F. J. RixonおよびJ. McClaughlan, 編者：A. J. DavisonおよびR. M. Elliott；出版社：Oxford University Press, Inc, New York, N. Y.）。HSV-2ウイルス含有バンドを、Medium199で10倍に希釈した勾配から抽出し、そしてウイルスを、超遠心分離（19,000g、4時間、4℃）によってペレット化した。ウイルスペレットを回収し、10mlのTris/EDTA（TE）緩衝液中に再懸濁させた。インタクトなビリオンを、DNaseおよびRNaseで処理して、細胞性DNAおよび細胞性RNAを除去した。次いで、酵素をEDTAの添加および65℃でのインキュベーションによって不活化した。DNAを、EDTAの存在下でSDSを用いてウイルス粒子を溶解し、続いて、フェノール/クロロホルムで抽出してゲノムウイルスDNAを精製することによって、勾配精製されたウイルスから調製した。HSV-2 DNAをEtOHを用いて沈殿させ、そしてDNAペレットを乾燥させ、そして1mlのTris/EDTA緩衝液中に再懸濁させた。DNAの濃度および純度を、UV分光光度計でのOD260およびOD280を読むことによって決定した。この方法で調製されたゲノムDNAを、E. coliにおけるHSV-2ゲノムフラグメント発現ライブラリーの構築のために使用した。

10

20

30

50

【0340】

（pET17bベクターにおけるHSV-2 DNAフラグメントライブラリーの構築）：HSV2-Iライブラリーを、以下のように構築した。DNAフラグメントを、Fisher「60SonicDismembrator」（Fisher）を用いて15%出力で4秒間、ゲノムHSV-2 DNAを超音波処理することによって作製した。次いで、超音波処理したDNAを沈殿させ、ペレット化し、そして11μL TE緩衝液中で再懸濁させた。DNAフラグメントのおよそのサイズを、1μLのフラグメント化HSV-2ゲノムDNA 対 1.5μgの非超音波処理物質のアガロースゲル電気泳動によって測定した。ゲルの臭化エチジウム染色後に視覚化したときに、DNAフラグメントの平均サイズが、約500bpであることを決定した。不完全なDNAフラグメント末端を、T4 DNAポリメラーゼを使用して、満たした（平滑末端化した）。次いで、EcoRIアダプターを、T4 DNAリガーゼを使用して、DNAフラグメントの平滑末端に連結した。次いで、DNAを、T4 Polynucleotide Kinaseを使用してキナーゼ処理し、手動で充填したS-400HR Sephacryl（Sigma）のカラムを使用して精製し、そして、pET17b発現ベクターに連結した。HSV2-Iライブラリーを類似の様式で構築した。このライブラリーにおける挿入物の平均サイズは、約1000bpであることを決定した。

【0341】

（E. coliにおけるHSV-2フラグメント発現ライブラリーの作製）HSV2-Iライブラリーを、グリセロールストックの調製およびHSV-2 DNA挿入物提示の試験のために、E. coliに形質転換した。大量のHSV-2/pET17bライブラリーDNAを調製するために、DNAを、ElectroMAX DH10B E. coli（Gibco）に形質転換した。形質転換された細菌を、3枚のLB/アンピシリンプレート（約750CFU/プレート）上で増殖させ、小さなサブセットのコロニーを、DNA挿入物の配列決定のために選び、そして各プレート由来の残りの細菌を、プラスミドDNAの調製のためにプールとして収集した。これらのプールをHSV-2 Pool9、10および11と名付けた。これらの細菌プールの一部のグリセロールストックを-80℃で保存した。プラスミドをプールの残りから精製した。3つのプールのそれぞれ由来の等しい量のプラスミドDNAを合わせて、単一のプールのプラスミドDNAを作製した。プールされたDNAの形質転換効率を、JM109（DE3）E. coli細菌を使用して実験的に決定した。次いで、JM109（DE3）細菌を、1プレート当たり15コ

40

ロニー形成単位 (C F U) を生じることが予期された、一定量の最終プールのライブラリー DNA で形質転換した。次いで、形質転換された細菌を、100 枚の LB / アンピシリンプレート上にプレートした。20 C F U (平均) を、100 枚のプレートのそれぞれにおいて実際に観測した；従って、この HSV-2 ライブラリーのプールサイズは、約 20 クローン / プレートであった。細菌コロニーを、約 800 μ l / プレートの LB + 20 % グリセロール中に、それぞれのプレートからプールとして収集した。各プールを、4 つの 96 ウェルの U 底プレートに等しく分配し (200 μ l / ウェル)、そしてこれらの「マスターストック」プレートを、-80 °C で保存した。従って、この HSV-2 遺伝子フラグメントライブラリー (本明細書中において以降、HSV2 I と呼ぶ) のサイズは、20 コロニー / プールの 96 プールであった。プラスミド DNA を、20 の無作為に選択されたコロニーから調製し、そして挿入物を配列決定した。約 15 % (3 / 20) が HSV-2 DNA を挿入物として含み、80 % (16 / 20) が、非 HSV-2 DNA (E. coli またはペロ細胞の DNA) を含み、そして 5 % (1 / 20) が、挿入 DNA を含まなかった。HSV2-I I DNA ライブラリーを、E. coli に形質転換し、そして類似した方法で、無作為にコロニーを分析した。ライブラリー HSV2-I I の構築における関連した差は、実験的評価のための JM109 (DE3) 細菌へのプールおよび形質転換のための大量のプラスミドの調製のためにエレクトロポレーションを使用する代わりに、NovaBlue (Novagen) 化学的コンピテント E. coli への HSV-2 / pET17b 連結産物の形質転換を含んだ。さらに、プラスミド DNA を、平均 160 コロニー / プレートの 10 のプールから調製した。これらの 10 のプラスミドプールを、以前のように、JM109 (DE3) への形質転換のために、1 つのプールに、等しい様式 (分光光度計の読みに基づいて規格化された) で合わせ、先のように、グリセロールストックプールに収集するために、平均 20 コロニー (クローン) / プレートを得た。約 25 % が、HSV-2 DNA を挿入物として含み、残りの 75 % が、E. coli DNA を挿入物として含んだ。

【0342】

(ヒト CD4 + T 細胞を用いるスクリーニングのための、HSV-2 フラグメント発現ライブラリーの誘導) マスター HSV2 I ライブラリー 96 ウェルプレートのうちの 1 つを、室温で解凍した。アリコート (20 μ L) を、各ウェルから、180 μ L / ウェルの LB 培地 + アンピシリンを含む新しい 96 ウェルプレートに移した。細菌を 1 晩増殖させ、次いで、40 μ l を、160 μ L の 2 $\times$ YT 培地 + アンピシリンを含む 2 つの新たな 96 ウェルプレートに移した。細菌を、37 °C で 1 時間 15 分間増殖させた。次いで、タンパク質発現を、200 mM までの IPTG の添加によって誘導した。細菌をさらに 3 時間培養した。これらのプレートの 1 つを使用して、細菌数 / ウェルを規格化するために、分光光度計の読みを得た。第 2 に、規格化されたプレートを使用して、細菌をペレット化した後に CD4 + T 細胞を用いてスクリーニングし (約 2×10^7 / ウェル)、上清を除いた。HSV2-I I ライブラリーを増殖させ、そして類似の様式で誘導した。

【0343】

(自己樹状 APC の調製) : 樹状細胞 (DC) を、RPMI 1640 + 10 % の FCS : HS の 1 : 1 混合物 + 10 ng / ml GM-CSF + 10 ng / ml IL-4 中で、6 ウェルプレート (Costar 3506) のプラスチック接着ドナー細胞 (1 $\times$ 10⁸ PBMC 由来) を 37 °C で培養することによって作製した。非接着 DC を培養の第 6 日目にプレートから収集し、そして 3300 Rad で照射した。次いで、DC を平底 96 ウェルプレート (Costar 3596) 中で 1 $\times$ 10⁴ / ウェルでプレートし、そして 37 °C で 1 晩培養した。次の日に、細菌ペレットを 200 μ l RPMI 1640 + 10 % FCS 中で抗生物質なしで再懸濁し、そして 10 μ l / ウェルを、190 μ l の抗生物質なしの同じ培地中に DC を含むウェルに移すことによって、DC を、誘導した HSV2-I ライブラリープールまたは HSV2-I I ライブラリープールでパルスした。DC および細菌を、90 分間 37 °C で同時培養した。次いで、DC を洗浄し、10 μ l / ウェル RPMI 1640 + 10 % HS + L-glut. + 50 μ g / ml ゲンタマイシン抗

生物質中に再懸濁させた。

【0344】

(応答 (responder) T細胞の調製) : 凍結保存したCD4+T細胞株を、使用の5日前に解凍し、そしてRPMI 1640+10%HS+1ng/ml IL-2+10ng/ml IL-7中で、37℃で培養した。2日後、培地を、IL-2およびIL-7を含まない新鮮な培地と置き換えた。

【0345】

(HSV2ライブラリーの一次スクリーニング) : T細胞を、新鮮なRPMI 1640+10%HS中に再懸濁させ、そして 2×10^4 / ウェルで、E. coli パルス自己DCを含むプレートに添加した。3日後、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの上清を取り出し、そして新たな96ウェルプレートに移した。続いて、上清の半分をELISAによりIFN- γ 含量について試験し、そして残りを-20℃で保存した。次いで、T細胞を37℃で8時間、 $1 \mu\text{Ci}$ / ウェルの[3H]-チミジン (Amersham/Pharmacia; Piscataway, NJ) でパルスした。次いで、3Hパルス細胞を、UniFilter GF/Cプレート (Packard; Downers Grove, IL) 上に収集し、続いて、[3H]を取り込むCPMを、シンチレーションカウンター (Top-Count; Packard) を使用して測定した。ELISAアッセイを、ヒトIFN- γ についての標準的なサイトカイン-捕捉ELISAプロトコルに続いて、細胞上清で行った。

10

【0346】

D104由来のT細胞を用いたHSV2-Iライブラリーのスクリーニングから、ウェルHSV2 I__H10およびHSV2 I__H12 (CPMレベルとIFN- γ レベルの両方が、バックグラウンドより有意に上であった) を、陽性として記録した。

20

【0347】

(陽性HSV2 Iライブラリープールの分解) : 最初のCD4+T細胞スクリーニング実験由来の陽性ウェル (HSV2 I__H10およびHSV2 I__H12) を、再び、マスターグリセロールストックプレートから増殖させた。各プール由来の48のサブクローンを無作為に選択し、増殖させ、そして以前に記載のようにIPTG誘導した。サブクローンを、上記のように、AD104 CD4+T細胞株に対してスクリーニングした。HSV2 I__H12プール分解由来のクローン (HSV2 I__H12 A12) を陽性として記録した。この陽性の結果を、第2のAD104 CD4+T細胞アッセイで検証した。

30

【0348】

(CD4+ T細胞抗原としてのUL39の同定) : 陽性クローン (HSV2 I__H12 A12) を、サブクローニングし、そして10クローンをEcoRI NB#675 pg. 34を用いる制限消化分析のために選択した。10の全てのクローンは、同じサイズ (約900bp長) のDNA挿入物を含んだ。これらのクローンのうち3つ (HSV2 I__H12 A12__1, 7, および8) を、配列決定のために選択し、そしてその全てが、挿入物の5'および3'末端の両方に同一な挿入配列を含んだ。挿入物のDNA配列は、配列番号1に示され、そして配列番号2に示されるオープンリーディングフレームを含む。この挿入配列を、HSV-2菌株HG52 (NCBI部位、登録#Z86099) の完全ゲノム配列と比較し、そしてこの配列が、UL39 (a. k. a. ICP6) (HSVリボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニット (140kD)) (この配列は、配列番号3に示される) に対する高い相同性を有することを決定した。配列番号1に示されるこの挿入配列は、UL39オープンリーディングフレーム (3, 432bp) のヌクレオチド876~1690にまたがり、そして配列番号2に示されるアミノ酸配列 (これは、UL39 (全長=1143aa) のアミノ酸292~563に対して高い相同性を有する) をコードする。

40

【0349】

(CD4+ T細胞抗原としての、US8A、US3/US4、UL15、UL18、UL27およびUL46の同定) : T細胞抗原としてのUL39の同定について上記した様

50

式と本質的に同一の様式で、さらなるH S V 2 遺伝子フラグメント発現クローニングライブラリー（H S V 2 - I Iといわれる）を調製し、E. c o l i 中で発現させ、そしてドナーT細胞を用いてスクリーニングした。

【0350】

ドナーA D 1 1 6 由来のT細胞を用いるH S V 2 - I I ライブラリーのスクリーニングは、クローンH S V 2 I I _ U S 8 A f r a g D 6 . B _ B 1 1 _ T 7 T r c . s e q を同定し、配列番号4に示される挿入配列を有することが決定され、配列番号5および6に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームをコードし、配列番号5の配列は、H S V 2 _ U S 8 A タンパク質と高い相同性を有し、この配列は配列番号7に示される。

10

【0351】

さらに、ドナーA D 1 0 4 由来のT細胞を用いるH S V 2 - I I ライブラリーのスクリーニングは、以下のクローン挿入物を同定した：

配列番号8、これは、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有する潜在的オープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U S 3 / U S 4 f r a g F 1 0 B 3 _ T 7 T r c . s e q に対応する；

配列番号9、これは、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U S 3 / U S 4 f r a g F 1 0 B 3 _ T 7 P . s e q に対応し、そしてH S V - 2 _ U S 3 タンパク質（配列番号12）と高い相同性を共有する；

20

配列番号13、これは、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U L 4 6 f r a g F 1 1 F 5 _ T 7 T r c . s e q に対応し、そしてH S V - 2 _ U L 4 6 タンパク質（配列番号15）と高い相同性を共有する；

配列番号16、これは、配列番号17に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U L 2 7 f r a g - H 2 C 7 _ T 7 T r c . s e q に対応し、そしてH S V - 2 _ U L 2 7 タンパク質（配列番号18）と高い相同性を共有する；

配列番号19、これは、配列番号20、21および22に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U L 1 8 f r a g F 1 0 A 1 _ r c . s e q に対応し、配列番号22は、H S V - 2 _ U L 1 8 タンパク質（配列番号23）と高い相同性を共有する；ならびに

30

配列番号24、これは、配列番号25に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームを含むクローンH S V 2 I I _ U L 1 5 f r a g F 1 0 A 1 2 _ r c . s e q に対応し、そしてH S V - 2 _ U L 1 5 タンパク質（配列番号26）と高い相同性を共有する。

【0352】

（実施例2）

（H S V - 2 抗原の同定）

A D 1 0 4 由来のC D 4 ⁺ T細胞が、実施例1に詳細に記載されるようなクローンH S V 2 I I _ U L 4 6 f r a g F 1 1 F 5 _ T 7 T r c . s e q （配列番号13）およびH S V 2 I I _ U L 1 8 f r a g F 1 0 A 1 _ r c . s e q （配列番号19）由来の挿入物を認識することを見出した。これらのクローン由来の配列は、H S V 2 - I 遺伝子（それぞれ、U L 4 6 （配列番号15）およびU L 1 8 （配列番号23））と高い相同性を共有する。したがって、これらのT細胞によって認識されるエピトープをさらに特徴付けるために、重複する15マーのペプチドを、U L 1 8 およびU L 4 6 のクローン挿入フラグメントを横切って作製した。A D 1 0 4 のC D 4 ⁺ T細胞によるペプチド認識を、48時間のI F N - γ E L I S P O T アッセイにおいて試験した。E L I S P O T S を、96ウェルのE L I S P O T プレートにおけるウェル当たり、1 × 1 0 ⁴ の自己E B V 形質転換B細胞（L C L）またはD C を添加することによって実施した。A D 1 0 4 株由来の2

40

50

$\times 10^4$ の A D 1 0 4 C D 4 + T 細胞を、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の H S V 2 ペプチドと共に 1 ウェル毎に添加した。A D 1 0 4 C D 4 + T 細胞は、U L 1 8 のペプチド 2 0 および 2 1 (配列番号 3 2 および 3 3)、ならびに U L 4 6 のペプチド 1、4、9、1 0、および 2 0 (配列番号 2 7 ~ 3 1) を認識した。

【0353】

(実施例 3)

(H S V - 2 抗原の同定)

C D 4 + T 細胞株を、D K 2 3 1 8 および J R 5 0 3 2 の病変生検から作製した。この C D 4 + リンパ球を、実施例 1 に記載したような照射した自己 P B M C および H S V 2 抗原でインビトロで 2 回刺激した。この株を、実施例 1 に記載されるようなその抗原特異性について試験し、そして凍結保存した。この C D 4 + T 細胞株を、実施例 1 で作製した H S V 2 - I I 発現クローニングライブラリーに対してスクリーニングした。

10

【0354】

D K 2 3 1 8 が、クローン C 1 2 および G 1 0 と反応することを示した。クローン C 1 2 は、配列番号 3 6 に示される挿入配列を有することを決定した。この挿入物は、2 つの H S V - I I 遺伝子のフラグメント (U L 2 3 のヌクレオチド 7 2 3 ~ 1 3 1 1 および U L 2 2 のヌクレオチド 1 - 8 5 2) と配列相同性を有することを見出した。これらの配列は、配列番号 4 0 に示される U L 2 3 のアミノ酸 2 4 1 ~ 3 7 6、および配列番号 4 1 に示されるアミノ酸 1 ~ 2 8 4 に対応する。配列番号 3 6 の D N A 配列を、G e n b a n k を含む公共データベースに対して検索し、そして、それぞれ配列番号 3 7 および 3 8 に示される H S V 2 遺伝子 U L 2 3 および U L 2 2 に対して高い配列相同性を有することを示した。配列番号 3 7 および 3 8 によってコードされるタンパク質配列は、配列番号 3 9 および 4 5 に示される。クローン G 1 0 は、以下が決定された：配列番号 4 8 に示される挿入配列を有すること、配列番号 5 0 に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームをコードすること、配列番号 4 8 の配列が、H S V 2 U L 3 7 (この配列は配列番号 4 9 に示される) と高い配列相同性を有すること、配列番号 5 1 に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームをコードすること。D K 2 3 1 8 の C D 4 + T 細胞株を、U L 2 3 タンパク質を覆う重複する 1 5 マーに対してスクリーニングした。D K 2 3 1 8 の C D 4 株は、3 つの U L 2 3 特異的ペプチド (配列番号 4 1 ~ 4 3) に対して反応することが示され、これは U L 2 3 が標的であることを示唆する。

20

30

【0355】

J R 5 0 3 2 から作製された C D 4 + T 細胞株は、以下が見出された：配列番号 3 4 に示される挿入配列を含むクローン E 9 と反応すること、配列番号 4 6 に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームをコードすること、配列番号 3 4 が、H S V 2 R L 2 (また、I C P 0 といわれる) (この配列は配列番号 3 5 に示される) と高い配列相同性を有すること、配列番号 4 7 に示されるアミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームをコードすること。

【0356】

(実施例 4)

(C D 4 クローン F 1 1 F 5 および G 1 0 A 9 の特徴付け)

実施例 2 および 3 は、ドナー A D 1 0 4 および D K 2 3 1 3 からの C D 4 T 細胞株の作製を記載し、これらを、H S V - 2 3 3 3 菌株を使用して作製される c D N A ライブラリーに対してスクリーニングした。A D 1 0 4 は、クローン H S V 2 I I _ U L 4 6 f r a g F 1 1 F 5 に対して反応することが見出された。この挿入物を、配列番号 1 3 に開示される配列を使用して、部分的に配列決定した。この挿入物の全長配列決定は、この配列が、H S V - 2 3 3 3 菌株由来の U L 4 6 のフラグメントをコードすることを明らかにした。この挿入物由来の D N A およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 5 2 および 5 4 に開示される。

40

【0357】

D K 2 3 1 2 は、クローン G 1 0 に対して反応することが見出された。この挿入物を、部

50

分的に配列決定し、そしてこの配列を配列番号48に開示した。全長配列決定は、この配列が、HSV-2 333菌株由来のUL37のフラグメントをコードすることを明らかにした。この挿入物由来のDNAおよびアミノ酸配列を、それぞれ配列番号53および55に開示する。

【0358】

(実施例5)

(HSV-2由来のCD8特異的免疫反応性ペプチドの同定)

末梢血単核細胞を、正常なドナーAD104、AD116、AD120、およびD477から得た。これらのドナーは、低分解能DNA分類方法論を使用してHLA分類し、そしてこの結果を表2に示す。

【0359】

(表2)

【0360】

【表2】

ドナー	AD104	AD116	AD120	D477
HLA-A	24, 33	0206, 24	0211, 3303	0201, 2501
HLA-B	45, 58	0702, 35	1505, 4403	1501, 5101
HLA-C	01, 0302	0702, 1203	0303, 0706	0304, 12

HSV-2のどのエピトープが免疫反応性であるかを決定するために、合成ペプチドを合成した。これらのペプチドは、11アミノ酸だけ重複する15アミノ酸長であった。これらのペプチドを、以下のHSV-2遺伝子の以下の領域を横切って合成した：UL15 (aa600~734)、UL18 (aa1~110)、UL23 (aa241~376)、UL46 (aa617~722)、US3 (aa125~276)、およびUS8A (aa83~146)。

【0361】

CD8⁺ T細胞を、ネガティブ選択を使用して、上記のドナーの各々のPBMCから精製した。次いで、この精製したCD8⁺ T細胞を、HSV-2特異的ペプチドに対するそれらの反応性について試験した。2×10⁵のCD8⁺ T細胞、1×10⁴の自己樹状細胞および10μg/mlのペプチドプールを含む共培養（平均で、10ペプチド/プールを含む）を、抗ヒトIFN-γ抗体(1D1K:mAbTech)で予めコーティングした96ウェルのELISPOTプレート中で確立した。24時間後、このELISPOTプレートを、当業者に周知の標準的プロトコルを使用して展開させた。次いで、ウェル当たりのスポットの数を、自動化ビデオ顕微鏡(video microscopy) ELISPOTプレートリーダーを使用して計数した。次いで、ペプチドプールに対する陽性応答を示すドナー由来のCD8⁺ T細胞を、第2のELISPOTアッセイにおいて、このプール中の個々のペプチドに対して引き続き試験した。ペプチド反応性の結果を、表3に示す。

【0362】

(表3)

【0363】

【表3】

10

20

30

40

ドナー	HSV-2 遺伝子	ペプチド # (アミノ酸番号)	配列番号
AD104	US3	#33 (262-276)	63
AD116	UL15	#23(688-702)	56
		#30(716-730)	57
	UL23	#7(265-279)	58
	UL46	#2(621-635)	59
		#8(645-659)	60
		#9(649-663)	61
		#11(657-671)	62
	US8A	#5(99-113)	64
AD120	UL46	ペプチド: #1-12	-
D477	UL18	ペプチド: #1-12	-
	UL23	ペプチド: #1-20	-
	UL46	ペプチド: #1-12	-

10

20

当業者は、前述の説明に開示された概念および特定の実施形態が、本発明と同じ目的を実施するために他の実施形態を改変または設計するための基礎として、容易に利用され得ることを理解する。当業者はまた、このような等価な実施形態が、添付の特許請求の範囲に示される本発明の精神および範囲から逸脱しないことを理解する。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02131 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 38/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/20981
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/215,458 29 June 2000 (29.06.2000) US
60/277,438 20 March 2001 (20.03.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CORIXA CORPORATION [US/US], 1124 Columbia Street, Suite 200, Seattle, WA 98104 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOSKEN, Nancy, A. [US/US], 2314 North 56th Street, Seattle, WA 98103 (US); DAY, Craig, H. [US/US], 11501 Stone Avenue N., C122, Seattle, WA 98133-8317 (US); DILLON, Davin, C. [US/US], 18112 N.W. Montreux Drive, Issaquah, WA 98027 (US); MCGOWAN, Patrick [US/US], 2319 44th Avenue S.W., Seattle, WA 98116 (US); SLEATH, Paul, R. [GB/US], 1623 Eighth Avenue W., Seattle, WA 98119 (US).
- (74) Agents: POTTER, Jane, E., R. et al.; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/02131 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

(57) Abstract: Compounds and methods for the diagnosis and treatment of HSV infection are provided. The compounds comprise polypeptides that contain at least one antigenic portion of an HSV polypeptide and DNA sequences encoding such polypeptides. Pharmaceutical compositions and vaccines comprising such polypeptides or DNA sequences are also provided, together with antibodies directed against such polypeptides. Diagnostic kits are also provided comprising such polypeptides and/or DNA sequences and a suitable detection reagent for the detection of HSV infection in patients and in biological samples.

WO 02/02131

PCT/US01/20981

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT
OF HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to the detection and treatment of HSV infection. In particular, the invention relates to polypeptides comprising HSV antigens, DNA encoding HSV antigens, and the use of such compositions for the diagnosis and treatment of HSV infection.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The herpes viruses include the herpes simplex viruses (HSV), comprising two closely related variants designated types 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2). HSV is a prevalent cause of genital infection in humans, with an estimated annual incidence of 600,000 new cases and with 10 to 20 million individuals experiencing symptomatic chronic recurrent disease. The asymptomatic subclinical infection rate may be even higher. For example, using a type-specific serological assay, 35% of an unselected population of women attending a health maintenance organization clinic in Atlanta had antibodies to HSV type 2 (HSV-2). Although continuous administration of antiviral drugs such as acyclovir ameliorates the severity of acute HSV disease and reduces the frequency and duration of recurrent episodes, such chemotherapeutic intervention does not abort the establishment of latency nor does it alter the status of the latent virus. As a consequence, the recurrent disease pattern is rapidly reestablished upon cessation of drug treatment.

The genome of at least one strain of herpes simplex virus (HSV) has been characterized. It is approximately 150 kb and encodes about 85 known genes, each of which encodes a protein in the range of 50-1000 amino acids in length. Unknown, however, are the immunogenic portions, particularly immunogenic epitopes, that are capable of eliciting an effective T cell immune response to viral infection.

Thus, it is a matter of great medical and scientific need to identify immunogenic portions, preferably epitopes, of HSV polypeptides that are capable of eliciting an effective immune response to HSV infection. Such information will lead to safer and more effective prophylactic pharmaceutical compositions, e.g., vaccine

compositions, to substantially prevent HSV infections, and, where infection has already occurred, therapeutic compositions to combat the disease. The present invention fulfills these and other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides compositions and methods for the diagnosis and therapy of HSV infection. In one aspect, the present invention provides polypeptides comprising an immunogenic portion of a HSV antigen, or a variant or biological functional equivalent of such an antigen. Certain preferred portions and other variants are immunogenic, such that the ability of the portion or variant to react with antigen-specific antisera is not substantially diminished. Within certain embodiments, the polypeptide comprises an amino acid sequence encoded by a polynucleotide sequence selected from the group consisting of (a) a sequence of any one of SEQ ID NO: 1, 4, 8-9, 13, 16, 19, 24, 35-38, 48-49, and 52-53; (b) a complement of said sequence; and (c) sequences that hybridize to a sequence of (a) or (b) under moderately stringent conditions. In specific embodiments, the polypeptides of the present invention comprise at least a portion, preferably at least an immunogenic portion, of a HSV protein that comprises some or all of an amino acid sequence recited in any one of SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 7, 10-12, 14-15, 17-18, 20-23, 25-33, 39-47, 50-51, and 54-64, including variants and biological functional equivalents thereof.

The present invention further provides polynucleotides that encode a polypeptide as described above, or a portion thereof (such as a portion encoding at least 15 contiguous amino acid residues of a HSV protein), expression vectors comprising such polynucleotides and host cells transformed or transfected with such expression vectors.

In a related aspect, polynucleotide sequences encoding the above polypeptides, recombinant expression vectors comprising one or more of these polynucleotide sequences and host cells transformed or transfected with such expression vectors are also provided.

In another aspect, the present invention provides fusion proteins comprising one or more HSV polypeptides, for example in combination with a

physiologically acceptable carrier or immunostimulant for use as pharmaceutical compositions and vaccines thereof.

The present invention further provides pharmaceutical compositions that comprise: (a) an antibody, either polyclonal and monoclonal, or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to a HSV protein; and (b) a physiologically acceptable carrier.

Within other aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions that comprise one or more HSV polypeptides or portions thereof disclosed herein, or a polynucleotide molecule encoding such a polypeptide, and a physiologically acceptable carrier. The invention also provides vaccines for prophylactic and therapeutic purposes comprising one or more of the disclosed polypeptides and an immunostimulant, as defined herein, as well as vaccines comprising one or more polynucleotide sequences encoding such polypeptides and an immunostimulant.

In yet another aspect, methods are provided for inducing protective immunity in a patient, comprising administering to a patient an effective amount of one or more of the above pharmaceutical compositions or vaccines. Any of the polypeptides identified for use in the treatment of patients can be used in conjunction with pharmaceutical agents used to treat herpes infections, such as, but not limited to, Zovirax® (Acyclovir), Valtrex® (Valacyclovir), and Famvir® (Famcyclovir).

In yet a further aspect, there are provided methods for treating, substantially preventing or otherwise ameliorating the effects of an HSV infection in a patient, the methods comprising obtaining peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the patient, incubating the PBMC with a polypeptide of the present invention (or a polynucleotide that encodes such a polypeptide) to provide incubated T cells and administering the incubated T cells to the patient. The present invention additionally provides methods for the treatment of HSV infection that comprise incubating antigen presenting cells with a polypeptide of the present invention (or a polynucleotide that encodes such a polypeptide) to provide incubated antigen presenting cells and administering the incubated antigen presenting cells to the patient. Proliferated cells may, but need not, be cloned prior to administration to the patient. In certain embodiments, the antigen presenting cells are selected from the group consisting of

WO 02/02131

PCT/US01/20981

4

dendritic cells, macrophages, monocytes, B-cells, and fibroblasts. Compositions for the treatment of HSV infection comprising T cells or antigen presenting cells that have been incubated with a polypeptide or polynucleotide of the present invention are also provided. Within related aspects, vaccines are provided that comprise: (a) an antigen presenting cell that expresses a polypeptide as described above and (b) an immunostimulant.

The present invention further provides, within other aspects, methods for removing HSV-infected cells from a biological sample, comprising contacting a biological sample with T cells that specifically react with a HSV protein, wherein the step of contacting is performed under conditions and for a time sufficient to permit the removal of cells expressing the protein from the sample.

Within related aspects, methods are provided for inhibiting the development of HSV infection in a patient, comprising administering to a patient a biological sample treated as described above. In further aspects of the subject invention, methods and diagnostic kits are provided for detecting HSV infection in a patient. In one embodiment, the method comprises: (a) contacting a biological sample with at least one of the polypeptides or fusion proteins disclosed herein; and (b) detecting in the sample the presence of binding agents that bind to the polypeptide or fusion protein, thereby detecting HSV infection in the biological sample. Suitable biological samples include whole blood, sputum, serum, plasma, saliva, cerebrospinal fluid and urine. In one embodiment, the diagnostic kits comprise one or more of the polypeptides or fusion proteins disclosed herein in combination with a detection reagent. In yet another embodiment, the diagnostic kits comprise either a monoclonal antibody or a polyclonal antibody that binds with a polypeptide of the present invention.

The present invention also provides methods for detecting HSV infection comprising: (a) obtaining a biological sample from a patient; (b) contacting the sample with at least two oligonucleotide primers in a polymerase chain reaction, at least one of the oligonucleotide primers being specific for a polynucleotide sequence disclosed herein; and (c) detecting in the sample a polynucleotide sequence that amplifies in the presence of the oligonucleotide primers. In one embodiment, the oligonucleotide

WO 02/02131

PCT/US01/20981

5

primer comprises at about 10 contiguous nucleotides of a polynucleotide sequence peptide disclosed herein, or of a sequence that hybridizes thereto.

In a further aspect, the present invention provides a method for detecting HSV infection in a patient comprising: (a) obtaining a biological sample from the patient; (b) contacting the sample with an oligonucleotide probe specific for a polynucleotide sequence disclosed herein; and (c) detecting in the sample a polynucleotide sequence that hybridizes to the oligonucleotide probe. In one embodiment, the oligonucleotide probe comprises at least about 15 contiguous nucleotides of a polynucleotide sequence disclosed herein, or a sequence that hybridizes thereto.

These and other aspects of the present invention will become apparent upon reference to the following detailed description. All references disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entirety as if each was incorporated individually.

SEQUENCE IDENTIFIERS

SEQ ID NO: 1 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2I_UL39fragH12A12;

SEQ ID NO: 2 sets forth an amino acid sequence, designated H12A12orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 3 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 UL39 protein;

SEQ ID NO: 4 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_US8AfragD6.B_B11_T7Trc.seq;

SEQ ID NO: 5 sets forth an amino acid sequence, designated D6Borf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 4;

SEQ ID NO: 6 sets forth an amino acid sequence, designated D6Borf2.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 4;

WO 02/02131

PCT/US01/20981

6

SEQ ID NO: 7 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 US8A protein;

SEQ ID NO: 8 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_US4fragF10B3_T7Trc.seq;

SEQ ID NO: 9 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_US3fragF10B3_T7P.seq;

SEQ ID NO: 10 sets forth an amino acid sequence, designated F10B3orf2.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 8;

SEQ ID NO: 11 sets forth an amino acid sequence, designated 8F10B3orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 9;

SEQ ID NO: 12 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 US3 protein;

SEQ ID NO: 13 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_UL46fragF11F5_T7Trc.seq

SEQ ID NO: 14 sets forth an amino acid sequence, designated F11F5orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 15 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 UL46 protein;

SEQ ID NO: 16 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_UL27fragH2C7_T7Trc.seq

SEQ ID NO: 17 sets forth an amino acid sequence, designated H2C7orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 18 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 UL27 protein;

SEQ ID NO: 19 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_UL18fragF10A1_rc.seq;

WO 02/02131

PCT/US01/20981

7

SEQ ID NO: 20 sets forth an amino acid sequence, designated F10A1orf3.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 19;

SEQ ID NO: 21 sets forth an amino acid sequence, designated F10A1orf2.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 19;

SEQ ID NO: 22 sets forth an amino acid sequence, designated F10A1orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 19;

SEQ ID NO: 23 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 UL18 protein;

SEQ ID NO: 24 sets forth a polynucleotide sequence of an isolated clone designated HSV2II_UL15fragF10A12_rc.seq;

SEQ ID NO: 25 sets forth an amino acid sequence, designated F10A12orf1.pro, of an open reading frame encoded within the polynucleotide of SEQ ID NO: 24;

SEQ ID NO: 26 sets forth the amino acid sequence of the full length HSV-2 UL15 protein;

SEQ ID NO:27 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL46 gene;

SEQ ID NO:28 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL46 gene;

SEQ ID NO:29 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL46 gene;

SEQ ID NO:30 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL46 gene;

SEQ ID NO:31 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL46 gene;

SEQ ID NO:32 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL18 gene;

SEQ ID NO:33 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL18 gene;

SEQ ID NO:34 sets forth a nucleotide sequence of an isolated clone designated RL2_E9A4_5_consensus.seq;

SEQ ID NO:35 sets forth the nucleotide sequence of the full length HSV-2 RL2 gene;

SEQ ID NO:36 sets for the nucleotide sequence of an isolated clone designated UL23_22_C12A12_consensus.seq;

SEQ ID NO:37 sets forth the nucleotide sequence of the full length HSV-2 UL23 protein;

SEQ ID NO:38 sets forth the nucleotide sequence of the full length HSV-2 UL22 protein;

SEQ ID NO:39 sets forth an amino acid sequence, designated HSV2_UL23, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO: 37;

SEQ ID NO:40 sets forth an amino acid sequence designated HSV2_UL23 of an open reading frame encoded within the polynucleotides of SEQ ID NO:36;

SEQ ID NO:41 sets forth an amino acid sequence designated HSV2_UL22 of an open reading frame encoded within the polynucleotides of SEQ ID NO:36;

SEQ ID NO:42 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL23 gene;

SEQ ID NO:43 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL23 gene;

SEQ ID NO:44 sets forth the amino acid sequence of a 15-mer polypeptide derived from an immunogenic portion of the HSVII UL23 gene;

SEQ ID NO:45 sets forth an amino acid sequence, designated HSV2_UL22, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:38;

WO 02/02131

PCT/US01/20981

9

SEQ ID NO:46 sets forth an amino acid sequence, designated RL2_E9A4_5_consensus.seq, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:34;

SEQ ID NO:47 sets forth an amino acid sequence, designated HSV2_RL2, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:35;

SEQ ID NO:48 sets forth a nucleotide sequence of an isolated clone designated G10_UL37consensus.seq;

SEQ ID NO:49 sets forth the nucleotide sequence of the full length HSV-2 UL37 gene;

SEQ ID NO:50 sets forth an amino acid sequence, designated HSV2_UL37, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:48; and

SEQ ID NO:51 sets forth an amino acid sequence, designated HSV2_UL37, of an open reading frame encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:49;

SEQ ID NO:52 sets forth the DNA sequence derived from the insert of clone UL46fragF11F5;

SEQ ID NO:53 sets forth the DNA sequence derived from the insert of clone G10;

SEQ ID NO:54 sets forth the amino acid sequence derived from the insert of clone UL46fragF11F5;

SEQ ID NO:55 sets forth the amino acid sequence derived from the insert of clone G10;

SEQ ID NO:56 is amino acid sequence of peptide #23 (amino acids 688-702) of the HSV-2 gene UL15;

SEQ ID NO:57 is amino acid sequence of peptide #30 (amino acids 716-730) of the HSV-2 gene UL15;

SEQ ID NO:58 is amino acid sequence of peptide #7 (amino acids 265-279) of the HSV-2 gene UL23;

WO 02/02131

PCT/US01/20981

10

SEQ ID NO:59 is amino acid sequence of peptide #2 (amino acids 621-635) of the HSV-2 gene UL46;

SEQ ID NO:60 is amino acid sequence of peptide #8 (amino acids 645-659) of the HSV-2 gene UL46;

SEQ ID NO:61 is amino acid sequence of peptide #9 (amino acids 649-663) of the HSV-2 gene UL46;

SEQ ID NO:62 is amino acid sequence of peptide #11 (amino acids 657-671) of the HSV-2 gene UL46;

SEQ ID NO:63 is amino acid sequence of peptide #33 (amino acids 262-276) of the HSV-2 gene US3;

SEQ ID NO:64 is amino acid sequence of peptide #5 (amino acids 99-113) of the HSV-2 gene US8A.

DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

As noted above, the present invention is generally directed to compositions and methods for making and using the compositions, particularly in the therapy and diagnosis of HSV infection. Certain illustrative compositions described herein include HSV polypeptides, polynucleotides encoding such polypeptides, binding agents such as antibodies, antigen presenting cells (APCs) and/or immune system cells (e.g., T cells). Certain HSV proteins and immunogenic portions thereof comprise HSV polypeptides that react detectably (within an immunoassay, such as an ELISA or Western blot) with antisera of a patient infected with HSV.

Therefore, the present invention provides illustrative polynucleotide compositions, illustrative polypeptide compositions, immunogenic portions of said polynucleotide and polypeptide compositions, antibody compositions capable of binding such polypeptides, and numerous additional embodiments employing such compositions, for example in the detection, diagnosis and/or therapy of human HSV infections.

POLYNUCLEOTIDE COMPOSITIONS

As used herein, the terms "DNA segment" and "polynucleotide" refer to a DNA molecule that has been isolated free of total genomic DNA of a particular

species. Therefore, a DNA segment encoding a polypeptide refers to a DNA segment that contains one or more coding sequences yet is substantially isolated away from, or purified free from, total genomic DNA of the species from which the DNA segment is obtained. Included within the terms "DNA segment" and "polynucleotide" are DNA segments and smaller fragments of such segments, and also recombinant vectors, including, for example, plasmids, cosmids, phagemids, phage, viruses, and the like.

As will be understood by those skilled in the art, the DNA segments of this invention can include genomic sequences, extra-genomic and plasmid-encoded sequences and smaller engineered gene segments that express, or may be adapted to express, proteins, polypeptides, peptides and the like. Such segments may be naturally isolated, or modified synthetically by the hand of man.

"Isolated," as used herein, means that a polynucleotide is substantially away from other coding sequences, and that the DNA segment does not contain large portions of unrelated coding DNA, such as large chromosomal fragments or other functional genes or polypeptide coding regions. Of course, this refers to the DNA segment as originally isolated, and does not exclude genes or coding regions later added to the segment by the hand of man.

As will be recognized by the skilled artisan, polynucleotides may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules. RNA molecules include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

Polynucleotides may comprise a native sequence (*i.e.*, an endogenous sequence that encodes an HSV protein or a portion thereof) or may comprise a variant, or a biological or antigenic functional equivalent of such a sequence. Polynucleotide variants may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions, as further described below, preferably such that the immunogenicity of the encoded polypeptide is not diminished, relative to a native HSV protein. The effect on the

immunogenicity of the encoded polypeptide may generally be assessed as described herein. The term "variants" also encompasses homologous genes of xenogenic origin.

When comparing polynucleotide or polypeptide sequences, two sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides or amino acids in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence, as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins – Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) *Comb. Theor* 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy – the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726-730.

Alternatively, optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482, by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, by the search for similarity methods of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics

Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection.

One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides and polypeptides of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. In one illustrative example, cumulative scores can be calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always >0) and N (penalty score for mismatching residues; always <0). For amino acid sequences, a scoring matrix can be used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments, (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands.

Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide or polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (*i.e.*, gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the

total number of positions in the reference sequence (*i.e.*, the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

Therefore, the present invention encompasses polynucleotide and polypeptide sequences having substantial identity to the sequences disclosed herein, for example those comprising at least 50% sequence identity, preferably at least 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or higher, sequence identity compared to a polynucleotide or polypeptide sequence of this invention using the methods described herein, (e.g., BLAST analysis using standard parameters, as described below). One skilled in this art will recognize that these values can be appropriately adjusted to determine corresponding identity of proteins encoded by two nucleotide sequences by taking into account codon degeneracy, amino acid similarity, reading frame positioning and the like.

In additional embodiments, the present invention provides isolated polynucleotides and polypeptides comprising various lengths of contiguous stretches of sequence identical to or complementary to one or more of the sequences disclosed herein. For example, polynucleotides are provided by this invention that comprise at least about 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 or 1000 or more contiguous nucleotides of one or more of the sequences disclosed herein as well as all intermediate lengths there between. It will be readily understood that "intermediate lengths", in this context, means any length between the quoted values, such as 16, 17, 18, 19, *etc.*; 21, 22, 23, *etc.*; 30, 31, 32, *etc.*; 50, 51, 52, 53, *etc.*; 100, 101, 102, 103, *etc.*; 150, 151, 152, 153, *etc.*; including all integers through 200-500; 500-1,000, and the like.

The polynucleotides of the present invention, or fragments thereof, regardless of the length of the coding sequence itself, may be combined with other DNA sequences, such as promoters, polyadenylation signals, additional restriction enzyme sites, multiple cloning sites, other coding segments, and the like, such that their overall length may vary considerably. It is therefore contemplated that a nucleic acid fragment of almost any length may be employed, with the total length preferably being limited by the ease of preparation and use in the intended recombinant DNA protocol. For example, illustrative DNA segments with total lengths of about 10,000, about 5000,

about 3000, about 2,000, about 1,000, about 500, about 200, about 100, about 50 base pairs in length, and the like, (including all intermediate lengths) are contemplated to be useful in many implementations of this invention.

In other embodiments, the present invention is directed to polynucleotides that are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a polynucleotide sequence provided herein, or a fragment thereof, or a complementary sequence thereof. Hybridization techniques are well known in the art of molecular biology. For purposes of illustration, suitable moderately stringent conditions for testing the hybridization of a polynucleotide of this invention with other polynucleotides include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1% SDS.

Moreover, it will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

PROBES AND PRIMERS

In other embodiments of the present invention, the polynucleotide sequences provided herein can be advantageously used as probes or primers for nucleic acid hybridization. As such, it is contemplated that nucleic acid segments that comprise a sequence region of at least about 15 nucleotide long contiguous sequence that has the same sequence as, or is complementary to, a 15 nucleotide long contiguous sequence

disclosed herein will find particular utility. Longer contiguous identical or complementary sequences, *e.g.*, those of about 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (including all intermediate lengths) and even up to full length sequences will also be of use in certain embodiments.

The ability of such nucleic acid probes to specifically hybridize to a sequence of interest will enable them to be of use in detecting the presence of complementary sequences in a given sample. However, other uses are also envisioned, such as the use of the sequence information for the preparation of mutant species primers, or primers for use in preparing other genetic constructions.

Polynucleotide molecules having sequence regions consisting of contiguous nucleotide stretches of 10-14, 15-20, 30, 50, or even of 100-200 nucleotides or so (including intermediate lengths as well), identical or complementary to a polynucleotide sequence disclosed herein, are particularly contemplated as hybridization probes for use in, *e.g.*, Southern and Northern blotting. This would allow a gene product, or fragment thereof, to be analyzed, both in diverse cell types and also in various bacterial cells. The total size of fragment, as well as the size of the complementary stretch(es), will ultimately depend on the intended use or application of the particular nucleic acid segment. Smaller fragments will generally find use in hybridization embodiments, wherein the length of the contiguous complementary region may be varied, such as between about 15 and about 100 nucleotides, but larger contiguous complementarity stretches may be used, according to the length complementary sequences one wishes to detect.

The use of a hybridization probe of about 15-25 nucleotides in length allows the formation of a duplex molecule that is both stable and selective. Molecules having contiguous complementary sequences over stretches greater than 15 bases in length are generally preferred, though, in order to increase stability and selectivity of the hybrid, and thereby improve the quality and degree of specific hybrid molecules obtained. One will generally prefer to design nucleic acid molecules having gene-complementary stretches of 15 to 25 contiguous nucleotides, or even longer where desired.

Hybridization probes may be selected from any portion of any of the sequences disclosed herein. All that is required is to review the sequence set forth in the sequences disclosed herein, or to any continuous portion of the sequence, from about 15-25 nucleotides in length up to and including the full length sequence, that one wishes to utilize as a probe or primer. The choice of probe and primer sequences may be governed by various factors. For example, one may wish to employ primers from towards the termini of the total sequence.

Small polynucleotide segments or fragments may be readily prepared by, for example, directly synthesizing the fragment by chemical means, as is commonly practiced using an automated oligonucleotide synthesizer. Also, fragments may be obtained by application of nucleic acid reproduction technology, such as the PCR™ technology of U. S. Patent 4,683,202 (incorporated herein by reference), by introducing selected sequences into recombinant vectors for recombinant production, and by other recombinant DNA techniques generally known to those of skill in the art of molecular biology.

The nucleotide sequences of the invention may be used for their ability to selectively form duplex molecules with complementary stretches of the entire gene or gene fragments of interest. Depending on the application envisioned, one will typically desire to employ varying conditions of hybridization to achieve varying degrees of selectivity of probe towards target sequence. For applications requiring high selectivity, one will typically desire to employ relatively stringent conditions to form the hybrids, *e.g.*, one will select relatively low salt and/or high temperature conditions, such as provided by a salt concentration of from about 0.02 M to about 0.15 M salt at temperatures of from about 50°C to about 70°C. Such selective conditions tolerate little, if any, mismatch between the probe and the template or target strand, and would be particularly suitable for isolating related sequences.

Of course, for some applications, for example, where one desires to prepare mutants employing a mutant primer strand hybridized to an underlying template, less stringent (reduced stringency) hybridization conditions will typically be needed in order to allow formation of the heteroduplex. In these circumstances, one may desire to employ salt conditions such as those of from about 0.15 M to about 0.9 M

salt, at temperatures ranging from about 20°C to about 55°C. Cross-hybridizing species can thereby be readily identified as positively hybridizing signals with respect to control hybridizations. In any case, it is generally appreciated that conditions can be rendered more stringent by the addition of increasing amounts of formamide, which serves to destabilize the hybrid duplex in the same manner as increased temperature. Thus, hybridization conditions can be readily manipulated, and thus will generally be a method of choice depending on the desired results.

POLYNUCLEOTIDE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION

Polynucleotides may be identified, prepared and/or manipulated using any of a variety of well established techniques. For example, a polynucleotide may be identified, as described in more detail below, by screening a microarray of cDNAs for HSV-associated expression (*i.e.*, expression that is at least two fold greater in infected versus normal tissue, as determined using a representative assay provided herein). Such screens may be performed, for example, using a Synteni microarray (Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions (and essentially as described by Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619, 1996 and Heller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-2155, 1997). Alternatively, polynucleotides may be amplified from cDNA prepared from cells expressing the proteins described herein. Such polynucleotides may be amplified via polymerase chain reaction (PCR). For this approach, sequence-specific primers may be designed based on the sequences provided herein, and may be purchased or synthesized.

An amplified portion of a polynucleotide of the present invention may be used to isolate a full length gene from a suitable library (*e.g.*, an HSV cDNA library) using well known techniques. Within such techniques, a library (cDNA or genomic) is screened using one or more polynucleotide probes or primers suitable for amplification. Preferably, a library is size-selected to include larger molecules. Random primed libraries may also be preferred for identifying 5' and upstream regions of genes. Genomic libraries are preferred for obtaining introns and extending 5' sequences.

For hybridization techniques, a partial sequence may be labeled (*e.g.*, by nick-translation or end-labeling with ³²P) using well known techniques. A bacterial or

bacteriophage library is then generally screened by hybridizing filters containing denatured bacterial colonies (or lawns containing phage plaques) with the labeled probe (see Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Hybridizing colonies or plaques are selected and expanded, and the DNA is isolated for further analysis. cDNA clones may be analyzed to determine the amount of additional sequence by, for example, PCR using a primer from the partial sequence and a primer from the vector. Restriction maps and partial sequences may be generated to identify one or more overlapping clones. The complete sequence may then be determined using standard techniques, which may involve generating a series of deletion clones. The resulting overlapping sequences can then be assembled into a single contiguous sequence. A full length cDNA molecule can be generated by ligating suitable fragments, using well known techniques.

Alternatively, there are numerous amplification techniques for obtaining a full length coding sequence from a partial cDNA sequence. Within such techniques, amplification is generally performed via PCR. Any of a variety of commercially available kits may be used to perform the amplification step. Primers may be designed using, for example, software well known in the art. Primers are preferably 22-30 nucleotides in length, have a GC content of at least 50% and anneal to the target sequence at temperatures of about 68°C to 72°C. The amplified region may be sequenced as described above, and overlapping sequences assembled into a contiguous sequence.

One such amplification technique is inverse PCR (see Triglia et al., *Nucl. Acids Res.* 16:8186, 1988), which uses restriction enzymes to generate a fragment in the known region of the gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a template for PCR with divergent primers derived from the known region. Within an alternative approach, sequences adjacent to a partial sequence may be retrieved by amplification with a primer to a linker sequence and a primer specific to a known region. The amplified sequences are typically subjected to a second round of amplification with the same linker primer and a second primer specific to the known region. A variation on this procedure, which employs two primers that initiate extension in opposite directions from the known sequence, is described in WO

96/38591. Another such technique is known as "rapid amplification of cDNA ends" or RACE. This technique involves the use of an internal primer and an external primer, which hybridizes to a polyA region or vector sequence, to identify sequences that are 5' and 3' of a known sequence. Additional techniques include capture PCR (Lagerstrom et al., *PCR Methods Applic. 1*:111-19, 1991) and walking PCR (Parker et al., *Nucl. Acids. Res. 19*:3055-60, 1991). Other methods employing amplification may also be employed to obtain a full length cDNA sequence.

In certain instances, it is possible to obtain a full length cDNA sequence by analysis of sequences provided in an expressed sequence tag (EST) database, such as that available from GenBank. Searches for overlapping ESTs may generally be performed using well known programs (e.g., NCBI BLAST searches), and such ESTs may be used to generate a contiguous full length sequence. Full length DNA sequences may also be obtained by analysis of genomic fragments.

POLYNUCLEOTIDE EXPRESSION IN HOST CELLS

In other embodiments of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode polypeptides of the invention, or fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used in recombinant DNA molecules to direct expression of a polypeptide in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences that encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be produced and these sequences may be used to clone and express a given polypeptide.

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous in some instances to produce polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

Moreover, the polynucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter polypeptide encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations

which modify the cloning, processing, and/or expression of the gene product. For example, DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. In addition, site-directed mutagenesis may be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, or introduce mutations, and so forth.

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, to screen peptide libraries for inhibitors of polypeptide activity, it may be useful to encode a chimeric protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between the polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the polypeptide may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

Sequences encoding a desired polypeptide may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers, M. H. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, Horn, T. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232). Alternatively, the protein itself may be produced using chemical methods to synthesize the amino acid sequence of a polypeptide, or a portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge, J. Y. et al. (1995) *Science* 269:202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

A newly synthesized peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton, T. (1983) *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y.) or other comparable techniques available in the art. The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure). Additionally, the amino acid sequence of a polypeptide, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with

sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

In order to express a desired polypeptide, the nucleotide sequences encoding the polypeptide, or functional equivalents, may be inserted into appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding a polypeptide of interest and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. Such techniques are described in Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., and Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express polynucleotide sequences. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems.

The "control elements" or "regulatory sequences" present in an expression vector are those non-translated regions of the vector--enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions--which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements may vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the PBLUESCRIPT phagemid (Stratagene, La Jolla, Calif.) or PSPORT1 plasmid (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and the like may be used. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian

viruses are generally preferred. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of the sequence encoding a polypeptide, vectors based on SV40 or EBV may be advantageously used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, a number of expression vectors may be selected depending upon the use intended for the expressed polypeptide. For example, when large quantities are needed, for example for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified may be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene), in which the sequence encoding the polypeptide of interest may be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509); and the like. pGEX Vectors (Promega, Madison, Wis.) may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems may be designed to include heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH may be used. For reviews, see Ausubel et al. (supra) and Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544.

In cases where plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding polypeptides may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV may be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311. Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used (Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991)

Results Probl. Cell Differ. 17:85-105). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (see, for example, Hobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

An insect system may also be used to express a polypeptide of interest. For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequences encoding the polypeptide may be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of the polypeptide-encoding sequence will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses may then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which the polypeptide of interest may be expressed (Engelhard, E. K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :3224-3227).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems are generally available. For example, in cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding a polypeptide of interest may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain a viable virus which is capable of expressing the polypeptide in infected host cells (Logan, J. and Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells.

Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding a polypeptide of interest. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding the polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a portion

thereof, is inserted, exogenous translational control signals including the ATG initiation codon should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used, such as those described in the literature (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162).

In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein may also be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells such as CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38, which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities, may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is generally preferred. For example, cell lines which stably express a polynucleotide of interest may be transformed using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, I. et al. (1990) *Cell* 22:817-23) genes which can be employed in tk.sup.- or

aprt.sup.- cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr which confers resistance to methotrexate (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); npt, which confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin, F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14); and als or pat, which confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry, *supra*). Additional selectable genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51). Recently, the use of visible markers has gained popularity with such markers as anthocyanins, beta-glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, being widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding a polypeptide is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing sequences can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a polypeptide-encoding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

Alternatively, host cells which contain and express a desired polynucleotide sequence may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of polynucleotide-encoded products, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the product are known in the art. Examples include enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a given polypeptide may be preferred for some applications, but a competitive binding assay may also be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton, R. et al. (1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn.) and Maddox, D. E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides include oligolabeling, nick translation, end-labeling or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences, or any portions thereof may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits. Suitable reporter molecules or labels, which may be used include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Host cells transformed with a polynucleotide sequence of interest may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides of the invention may be designed to contain signal sequences which direct secretion of the encoded polypeptide through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may be used to join sequences encoding a polypeptide of interest to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on

immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, Calif.) between the purification domain and the encoded polypeptide may be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a polypeptide of interest and a nucleic acid encoding 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMIAC (immobilized metal ion affinity chromatography) as described in Porath, J. et al. (1992, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281) while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the desired polypeptide from the fusion protein. A discussion of vectors which contain fusion proteins is provided in Kroll, D. J. et al. (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453).

In addition to recombinant production methods, polypeptides of the invention, and fragments thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Alternatively, various fragments may be chemically synthesized separately and combined using chemical methods to produce the full length molecule.

SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS

Site-specific mutagenesis is a technique useful in the preparation of individual peptides, or biologically functional equivalent polypeptides, through specific mutagenesis of the underlying polynucleotides that encode them. The technique, well-known to those of skill in the art, further provides a ready ability to prepare and test sequence variants, for example, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the DNA. Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through the use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of

sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Mutations may be employed in a selected polynucleotide sequence to improve, alter, decrease, modify, or otherwise change the properties of the polynucleotide itself, and/or alter the properties, activity, composition, stability, or primary sequence of the encoded polypeptide.

In certain embodiments of the present invention, the inventors contemplate the mutagenesis of the disclosed polynucleotide sequences to alter one or more properties of the encoded polypeptide, such as the antigenicity of a polypeptide vaccine. The techniques of site-specific mutagenesis are well-known in the art, and are widely used to create variants of both polypeptides and polynucleotides. For example, site-specific mutagenesis is often used to alter a specific portion of a DNA molecule. In such embodiments, a primer comprising typically about 14 to about 25 nucleotides or so in length is employed, with about 5 to about 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

As will be appreciated by those of skill in the art, site-specific mutagenesis techniques have often employed a phage vector that exists in both a single stranded and double stranded form. Typical vectors useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage. These phage are readily commercially-available and their use is generally well-known to those skilled in the art. Double-stranded plasmids are also routinely employed in site directed mutagenesis that eliminates the step of transferring the gene of interest from a plasmid to a phage.

In general, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-stranded vector or melting apart of two strands of a double-stranded vector that includes within its sequence a DNA sequence that encodes the desired peptide. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared, generally synthetically. This primer is then annealed with the single-stranded vector, and subjected to DNA polymerizing enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is

then used to transform appropriate cells, such as *E. coli* cells, and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutated sequence arrangement.

The preparation of sequence variants of the selected peptide-encoding DNA segments using site-directed mutagenesis provides a means of producing potentially useful species and is not meant to be limiting as there are other ways in which sequence variants of peptides and the DNA sequences encoding them may be obtained. For example, recombinant vectors encoding the desired peptide sequence may be treated with mutagenic agents, such as hydroxylamine, to obtain sequence variants. Specific details regarding these methods and protocols are found in the teachings of Maloy *et al.*, 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; and Maniatis *et al.*, 1982, each incorporated herein by reference, for that purpose.

As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" refers to template-dependent processes and vector-mediated propagation which result in an increase in the concentration of a specific nucleic acid molecule relative to its initial concentration, or in an increase in the concentration of a detectable signal, such as amplification. As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" is intended to refer to a process that involves the template-dependent extension of a primer molecule. The term template dependent process refers to nucleic acid synthesis of an RNA or a DNA molecule wherein the sequence of the newly synthesized strand of nucleic acid is dictated by the well-known rules of complementary base pairing (see, for example, Watson, 1987). Typically, vector mediated methodologies involve the introduction of the nucleic acid fragment into a DNA or RNA vector, the clonal amplification of the vector, and the recovery of the amplified nucleic acid fragment. Examples of such methodologies are provided by U. S. Patent No. 4,237,224, specifically incorporated herein by reference in its entirety.

POLYNUCLEOTIDE AMPLIFICATION TECHNIQUES

A number of template dependent processes are available to amplify the target sequences of interest present in a sample. One of the best known amplification methods is the polymerase chain reaction (PCR™) which is described in detail in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, each of which is incorporated herein

by reference in its entirety. Briefly, in PCRTM, two primer sequences are prepared which are complementary to regions on opposite complementary strands of the target sequence. An excess of deoxynucleoside triphosphates is added to a reaction mixture along with a DNA polymerase (e.g., *Taq* polymerase). If the target sequence is present in a sample, the primers will bind to the target and the polymerase will cause the primers to be extended along the target sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will dissociate from the target to form reaction products, excess primers will bind to the target and to the reaction product and the process is repeated. Preferably reverse transcription and PCRTM amplification procedure may be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified. Polymerase chain reaction methodologies are well known in the art.

Another method for amplification is the ligase chain reaction (referred to as LCR), disclosed in Eur. Pat. Appl. Publ. No. 320,308 (specifically incorporated herein by reference in its entirety). In LCR, two complementary probe pairs are prepared, and in the presence of the target sequence, each pair will bind to opposite complementary strands of the target such that they abut. In the presence of a ligase, the two probe pairs will link to form a single unit. By temperature cycling, as in PCRTM, bound ligated units dissociate from the target and then serve as "target sequences" for ligation of excess probe pairs. U.S. Patent No. 4,883,750, incorporated herein by reference in its entirety, describes an alternative method of amplification similar to LCR for binding probe pairs to a target sequence.

Qbeta Replicase, described in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US87/00880, incorporated herein by reference in its entirety, may also be used as still another amplification method in the present invention. In this method, a replicative sequence of RNA that has a region complementary to that of a target is added to a sample in the presence of an RNA polymerase. The polymerase will copy the replicative sequence that can then be detected.

An isothermal amplification method, in which restriction endonucleases and ligases are used to achieve the amplification of target molecules that contain nucleotide 5'-[α -thio]triphosphates in one strand of a restriction site (Walker *et al.*,

1992, incorporated herein by reference in its entirety), may also be useful in the amplification of nucleic acids in the present invention.

Strand Displacement Amplification (SDA) is another method of carrying out isothermal amplification of nucleic acids which involves multiple rounds of strand displacement and synthesis, *i.e.* nick translation. A similar method, called Repair Chain Reaction (RCR) is another method of amplification which may be useful in the present invention and is involves annealing several probes throughout a region targeted for amplification, followed by a repair reaction in which only two of the four bases are present. The other two bases can be added as biotinylated derivatives for easy detection. A similar approach is used in SDA.

Sequences can also be detected using a cyclic probe reaction (CPR). In CPR, a probe having a 3' and 5' sequences of non-target DNA and an internal or "middle" sequence of the target protein specific RNA is hybridized to DNA which is present in a sample. Upon hybridization, the reaction is treated with RNaseH, and the products of the probe are identified as distinctive products by generating a signal that is released after digestion. The original template is annealed to another cycling probe and the reaction is repeated. Thus, CPR involves amplifying a signal generated by hybridization of a probe to a target gene specific expressed nucleic acid.

Still other amplification methods described in Great Britain Pat. Appl. No. 2 202 328, and in PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. PCT/US89/01025, each of which is incorporated herein by reference in its entirety, may be used in accordance with the present invention. In the former application, "modified" primers are used in a PCR-like, template and enzyme dependent synthesis. The primers may be modified by labeling with a capture moiety (*e.g.*, biotin) and/or a detector moiety (*e.g.*, enzyme). In the latter application, an excess of labeled probes is added to a sample. In the presence of the target sequence, the probe binds and is cleaved catalytically. After cleavage, the target sequence is released intact to be bound by excess probe. Cleavage of the labeled probe signals the presence of the target sequence.

Other nucleic acid amplification procedures include transcription-based amplification systems (TAS) (Kwoh *et al.*, 1989; PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 88/10315, incorporated herein by reference in its entirety), including nucleic acid

sequence based amplification (NASBA) and 3SR. In NASBA, the nucleic acids can be prepared for amplification by standard phenol/chloroform extraction, heat denaturation of a sample, treatment with lysis buffer and minispin columns for isolation of DNA and RNA or guanidinium chloride extraction of RNA. These amplification techniques involve annealing a primer that has sequences specific to the target sequence. Following polymerization, DNA/RNA hybrids are digested with RNase H while double stranded DNA molecules are heat-denatured again. In either case the single stranded DNA is made fully double stranded by addition of second target-specific primer, followed by polymerization. The double stranded DNA molecules are then multiply transcribed by a polymerase such as T7 or SP6. In an isothermal cyclic reaction, the RNAs are reverse transcribed into DNA, and transcribed once again with a polymerase such as T7 or SP6. The resulting products, whether truncated or complete, indicate target-specific sequences.

Eur. Pat. Appl. Publ. No. 329,822, incorporated herein by reference in its entirety, disclose a nucleic acid amplification process involving cyclically synthesizing single-stranded RNA ("ssRNA"), ssDNA, and double-stranded DNA (dsDNA), which may be used in accordance with the present invention. The ssRNA is a first template for a first primer oligonucleotide, which is elongated by reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase). The RNA is then removed from resulting DNA:RNA duplex by the action of ribonuclease H (RNase H, an RNase specific for RNA in a duplex with either DNA or RNA). The resultant ssDNA is a second template for a second primer, which also includes the sequences of an RNA polymerase promoter (exemplified by T7 RNA polymerase) 5' to its homology to its template. This primer is then extended by DNA polymerase (exemplified by the large "Klenow" fragment of *E. coli* DNA polymerase I), resulting as a double-stranded DNA ("dsDNA") molecule, having a sequence identical to that of the original RNA between the primers and having additionally, at one end, a promoter sequence. This promoter sequence can be used by the appropriate RNA polymerase to make many RNA copies of the DNA. These copies can then re-enter the cycle leading to very swift amplification. With proper choice of enzymes, this amplification can be done isothermally without addition of enzymes at

each cycle. Because of the cyclical nature of this process, the starting sequence can be chosen to be in the form of either DNA or RNA.

PCT Intl. Pat. Appl. Publ. No. WO 89/06700, incorporated herein by reference in its entirety, disclose a nucleic acid sequence amplification scheme based on the hybridization of a promoter/primer sequence to a target single-stranded DNA ("ssDNA") followed by transcription of many RNA copies of the sequence. This scheme is not cyclic; i.e. new templates are not produced from the resultant RNA transcripts. Other amplification methods include "RACE" (Frohman, 1990), and "one-sided PCR" (Ohara, 1989) which are well-known to those of skill in the art.

Methods based on ligation of two (or more) oligonucleotides in the presence of nucleic acid having the sequence of the resulting "di-oligonucleotide", thereby amplifying the di-oligonucleotide (Wu and Dean, 1996, incorporated herein by reference in its entirety), may also be used in the amplification of DNA sequences of the present invention.

BIOLOGICAL FUNCTIONAL EQUIVALENTS

Modification and changes may be made in the structure of the polynucleotides and polypeptides of the present invention and still obtain a functional molecule that encodes a polypeptide with desirable characteristics. As mentioned above, it is often desirable to introduce one or more mutations into a specific polynucleotide sequence. In certain circumstances, the resulting encoded polypeptide sequence is altered by this mutation, or in other cases, the sequence of the polypeptide is unchanged by one or more mutations in the encoding polynucleotide.

When it is desirable to alter the amino acid sequence of a polypeptide to create an equivalent, or even an improved, second-generation molecule, the amino acid changes may be achieved by changing one or more of the codons of the encoding DNA sequence, according to Table I.

For example, certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with structures such as, for example, antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules. Since it is the interactive capacity and nature of a protein that

defines that protein's biological functional activity, certain amino acid sequence substitutions can be made in a protein sequence, and, of course, its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like properties. It is thus contemplated by the inventors that various changes may be made in the peptide sequences of the disclosed compositions, or corresponding DNA sequences which encode said peptides without appreciable loss of their biological utility or activity.

TABLE 1

Amino Acids			Codons						
Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cysteine	Cys	C	UGC	UGU					
Aspartic acid	Asp	D	GAC	GAU					
Glutamic acid	Glu	E	GAA	GAG					
Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU					
Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidine	His	H	CAC	CAU					
Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lysine	Lys	K	AAA	AAG					
Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Methionine	Met	M	AUG						
Asparagine	Asn	N	AAC	AAU					
Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Tryptophan	Trp	W	UGG						
Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU					

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. The importance of the hydropathic amino acid index in conferring

interactive biologic function on a protein is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, 1982, incorporated herein by reference). It is accepted that the relative hydrophobic character of the amino acid contributes to the secondary structure of the resultant protein, which in turn defines the interaction of the protein with other molecules, for example, enzymes, substrates, receptors, DNA, antibodies, antigens, and the like. Each amino acid has been assigned a hydrophobic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics (Kyte and Doolittle, 1982). These values are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is known in the art that certain amino acids may be substituted by other amino acids having a similar hydrophobic index or score and still result in a protein with similar biological activity, *i.e.* still obtain a biological functionally equivalent protein. In making such changes, the substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. U. S. Patent 4,554,101 (specifically incorporated herein by reference in its entirety), states that the greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with a biological property of the protein.

As detailed in U. S. Patent 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent protein. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2

is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally therefore based on the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

In addition, any polynucleotide may be further modified to increase stability *in vivo*. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends; the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages in the backbone; and/or the inclusion of nontraditional bases such as inosine, queosine and wybutosine, as well as acetyl-methyl-, thio- and other modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine and uridine.

IN VIVO POLYNUCLEOTIDE DELIVERY TECHNIQUES

In additional embodiments, genetic constructs comprising one or more of the polynucleotides of the invention are introduced into cells *in vivo*. This may be achieved using any of a variety of well known approaches, several of which are outlined below for the purpose of illustration.

1. ADENOVIRUS

One of the preferred methods for *in vivo* delivery of one or more nucleic acid sequences involves the use of an adenovirus expression vector. "Adenovirus expression vector" is meant to include those constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to express a polynucleotide that has been cloned therein in a sense or antisense orientation. Of course, in the context of an antisense construct, expression does not require that the gene product be synthesized.

The expression vector comprises a genetically engineered form of an adenovirus. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kb, linear,

double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7 kb (Grunhaus and Horwitz, 1992). In contrast to retrovirus, the adenoviral infection of host cells does not result in chromosomal integration because adenoviral DNA can replicate in an episomal manner without potential genotoxicity. Also, adenoviruses are structurally stable, and no genome rearrangement has been detected after extensive amplification. Adenovirus can infect virtually all epithelial cells regardless of their cell cycle stage. So far, adenoviral infection appears to be linked only to mild disease such as acute respiratory disease in humans.

Adenovirus is particularly suitable for use as a gene transfer vector because of its mid-sized genome, ease of manipulation, high titer, wide target-cell range and high infectivity. Both ends of the viral genome contain 100-200 base pair inverted repeats (ITRs), which are *cis* elements necessary for viral DNA replication and packaging. The early (E) and late (L) regions of the genome contain different transcription units that are divided by the onset of viral DNA replication. The E1 region (E1A and E1B) encodes proteins responsible for the regulation of transcription of the viral genome and a few cellular genes. The expression of the E2 region (E2A and E2B) results in the synthesis of the proteins for viral DNA replication. These proteins are involved in DNA replication, late gene expression and host cell shut-off (Renan, 1990). The products of the late genes, including the majority of the viral capsid proteins, are expressed only after significant processing of a single primary transcript issued by the major late promoter (MLP). The MLP, (located at 16.8 m.u.) is particularly efficient during the late phase of infection, and all the mRNA's issued from this promoter possess a 5'-tripartite leader (TPL) sequence which makes them preferred mRNA's for translation.

In a current system, recombinant adenovirus is generated from homologous recombination between shuttle vector and provirus vector. Due to the possible recombination between two proviral vectors, wild-type adenovirus may be generated from this process. Therefore, it is critical to isolate a single clone of virus from an individual plaque and examine its genomic structure.

Generation and propagation of the current adenovirus vectors, which are replication deficient, depend on a unique helper cell line, designated 293, which was

transformed from human embryonic kidney cells by Ad5 DNA fragments and constitutively expresses E1 proteins (Graham *et al.*, 1977). Since the E3 region is dispensable from the adenovirus genome (Jones and Shenk, 1978), the current adenovirus vectors, with the help of 293 cells, carry foreign DNA in either the E1, the D3 or both regions (Graham and Prevec, 1991). In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987), providing capacity for about 2 extra kB of DNA. Combined with the approximately 5.5 kB of DNA that is replaceable in the E1 and E3 regions, the maximum capacity of the current adenovirus vector is under 7.5 kB, or about 15% of the total length of the vector. More than 80% of the adenovirus viral genome remains in the vector backbone and is the source of vector-borne cytotoxicity. Also, the replication deficiency of the E1-deleted virus is incomplete. For example, leakage of viral gene expression has been observed with the currently available vectors at high multiplicities of infection (MOI) (Mulligan, 1993).

Helper cell lines may be derived from human cells such as human embryonic kidney cells, muscle cells, hematopoietic cells or other human embryonic mesenchymal or epithelial cells. Alternatively, the helper cells may be derived from the cells of other mammalian species that are permissive for human adenovirus. Such cells include, *e.g.*, Vero cells or other monkey embryonic mesenchymal or epithelial cells. As stated above, the currently preferred helper cell line is 293.

Recently, Racher *et al.* (1995) disclosed improved methods for culturing 293 cells and propagating adenovirus. In one format, natural cell aggregates are grown by inoculating individual cells into 1 liter siliconized spinner flasks (Techne, Cambridge, UK) containing 100-200 ml of medium. Following stirring at 40 rpm, the cell viability is estimated with trypan blue. In another format, Fibracel microcarriers (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5 g/l) is employed as follows. A cell inoculum, resuspended in 5 ml of medium, is added to the carrier (50 ml) in a 250 ml Erlenmeyer flask and left stationary, with occasional agitation, for 1 to 4 h. The medium is then replaced with 50 ml of fresh medium and shaking initiated. For virus production, cells are allowed to grow to about 80% confluence, after which time the medium is replaced (to 25% of the final volume) and adenovirus added at an MOI of 0.05. Cultures are left

stationary overnight, following which the volume is increased to 100% and shaking commenced for another 72 h.

Other than the requirement that the adenovirus vector be replication defective, or at least conditionally defective, the nature of the adenovirus vector is not believed to be crucial to the successful practice of the invention. The adenovirus may be of any of the 42 different known serotypes or subgroups A-F. Adenovirus type 5 of subgroup C is the preferred starting material in order to obtain a conditional replication-defective adenovirus vector for use in the present invention, since Adenovirus type 5 is a human adenovirus about which a great deal of biochemical and genetic information is known, and it has historically been used for most constructions employing adenovirus as a vector.

As stated above, the typical vector according to the present invention is replication defective and will not have an adenovirus E1 region. Thus, it will be most convenient to introduce the polynucleotide encoding the gene of interest at the position from which the E1-coding sequences have been removed. However, the position of insertion of the construct within the adenovirus sequences is not critical to the invention. The polynucleotide encoding the gene of interest may also be inserted in lieu of the deleted E3 region in E3 replacement vectors as described by Karlsson *et al.* (1986) or in the E4 region where a helper cell line or helper virus complements the E4 defect.

Adenovirus is easy to grow and manipulate and exhibits broad host range *in vitro* and *in vivo*. This group of viruses can be obtained in high titers, *e.g.*, 10^9 - 10^{11} plaque-forming units per ml, and they are highly infective. The life cycle of adenovirus does not require integration into the host cell genome. The foreign genes delivered by adenovirus vectors are episomal and, therefore, have low genotoxicity to host cells. No side effects have been reported in studies of vaccination with wild-type adenovirus (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), demonstrating their safety and therapeutic potential as *in vivo* gene transfer vectors.

Adenovirus vectors have been used in eukaryotic gene expression (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) and vaccine development (Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1992). Recently, animal studies suggested that

recombinant adenovirus could be used for gene therapy (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Studies in administering recombinant adenovirus to different tissues include trachea instillation (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), muscle injection (Ragot *et al.*, 1993), peripheral intravenous injections (Herz and Gerard, 1993) and stereotactic inoculation into the brain (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

2. RETROVIRUSES

The retroviruses are a group of single-stranded RNA viruses characterized by an ability to convert their RNA to double-stranded DNA in infected cells by a process of reverse-transcription (Coffin, 1990). The resulting DNA then stably integrates into cellular chromosomes as a provirus and directs synthesis of viral proteins. The integration results in the retention of the viral gene sequences in the recipient cell and its descendants. The retroviral genome contains three genes, gag, pol, and env that code for capsid proteins, polymerase enzyme, and envelope components, respectively. A sequence found upstream from the gag gene contains a signal for packaging of the genome into virions. Two long terminal repeat (LTR) sequences are present at the 5' and 3' ends of the viral genome. These contain strong promoter and enhancer sequences and are also required for integration in the host cell genome (Coffin, 1990).

In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding one or more oligonucleotide or polynucleotide sequences of interest is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a packaging cell line containing the gag, pol, and env genes but without the LTR and packaging components is constructed (Mann *et al.*, 1983). When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation for example), the packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad

variety of cell types. However, integration and stable expression require the division of host cells (Paskind *et al.*, 1975).

A novel approach designed to allow specific targeting of retrovirus vectors was recently developed based on the chemical modification of a retrovirus by the chemical addition of lactose residues to the viral envelope. This modification could permit the specific infection of hepatocytes *via* sialoglycoprotein receptors.

A different approach to targeting of recombinant retroviruses was designed in which biotinylated antibodies against a retroviral envelope protein and against a specific cell receptor were used. The antibodies were coupled *via* the biotin components by using streptavidin (Roux *et al.*, 1989). Using antibodies against major histocompatibility complex class I and class II antigens, they demonstrated the infection of a variety of human cells that bore those surface antigens with an ecotropic virus *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

3. ADENO-ASSOCIATED VIRUSES

AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat and Muzyczka, 1984) is a parovirus, discovered as a contamination of adenoviral stocks. It is a ubiquitous virus (antibodies are present in 85% of the US human population) that has not been linked to any disease. It is also classified as a dependovirus, because its replications is dependent on the presence of a helper virus, such as adenovirus. Five serotypes have been isolated, of which AAV-2 is the best characterized. AAV has a single-stranded linear DNA that is encapsidated into capsid proteins VP1, VP2 and VP3 to form an icosahedral virion of 20 to 24 nm in diameter (Muzyczka and McLaughlin, 1988).

The AAV DNA is approximately 4.7 kilobases long. It contains two open reading frames and is flanked by two ITRs (FIG. 2). There are two major genes in the AAV genome: *rep* and *cap*. The *rep* gene codes for proteins responsible for viral replications, whereas *cap* codes for capsid protein VP1-3. Each ITR forms a T-shaped hairpin structure. These terminal repeats are the only essential *cis* components of the AAV for chromosomal integration. Therefore, the AAV can be used as a vector with all viral coding sequences removed and replaced by the cassette of genes for delivery. Three viral promoters have been identified and named p5, p19, and p40, according to their map position. Transcription from p5 and p19 results in production of rep proteins,

and transcription from p40 produces the capsid proteins (Hermonat and Muzyczka, 1984).

There are several factors that prompted researchers to study the possibility of using rAAV as an expression vector. One is that the requirements for delivering a gene to integrate into the host chromosome are surprisingly few. It is necessary to have the 145-bp ITRs, which are only 6% of the AAV genome. This leaves room in the vector to assemble a 4.5-kb DNA insertion. While this carrying capacity may prevent the AAV from delivering large genes, it is amply suited for delivering the antisense constructs of the present invention.

AAV is also a good choice of delivery vehicles due to its safety. There is a relatively complicated rescue mechanism: not only wild type adenovirus but also AAV genes are required to mobilize rAAV. Likewise, AAV is not pathogenic and not associated with any disease. The removal of viral coding sequences minimizes immune reactions to viral gene expression, and therefore, rAAV does not evoke an inflammatory response.

4. OTHER VIRAL VECTORS AS EXPRESSION CONSTRUCTS

Other viral vectors may be employed as expression constructs in the present invention for the delivery of oligonucleotide or polynucleotide sequences to a host cell. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Coupar *et al.*, 1988), lentiviruses, polio viruses and herpes viruses may be employed. They offer several attractive features for various mammalian cells (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

With the recent recognition of defective hepatitis B viruses, new insight was gained into the structure-function relationship of different viral sequences. *In vitro* studies showed that the virus could retain the ability for helper-dependent packaging and reverse transcription despite the deletion of up to 80% of its genome (Horwich *et al.*, 1990). This suggested that large portions of the genome could be replaced with foreign genetic material. The hepatotropism and persistence (integration) were particularly attractive properties for liver-directed gene transfer. Chang *et al.* (1991) introduced the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene into duck hepatitis B virus genome in the place of the polymerase, surface, and pre-surface coding sequences.

It was cotransfected with wild-type virus into an avian hepatoma cell line. Culture media containing high titers of the recombinant virus were used to infect primary duckling hepatocytes. Stable CAT gene expression was detected for at least 24 days after transfection (Chang *et al.*, 1991).

5. NON-VIRAL VECTORS

In order to effect expression of the oligonucleotide or polynucleotide sequences of the present invention, the expression construct must be delivered into a cell. This delivery may be accomplished *in vitro*, as in laboratory procedures for transforming cells lines, or *in vivo* or *ex vivo*, as in the treatment of certain disease states. As described above, one preferred mechanism for delivery is *via* viral infection where the expression construct is encapsulated in an infectious viral particle.

Once the expression construct has been delivered into the cell the nucleic acid encoding the desired oligonucleotide or polynucleotide sequences may be positioned and expressed at different sites. In certain embodiments, the nucleic acid encoding the construct may be stably integrated into the genome of the cell. This integration may be in the specific location and orientation *via* homologous recombination (gene replacement) or it may be integrated in a random, non-specific location (gene augmentation). In yet further embodiments, the nucleic acid may be stably maintained in the cell as a separate, episomal segment of DNA. Such nucleic acid segments or "episomes" encode sequences sufficient to permit maintenance and replication independent of or in synchronization with the host cell cycle. How the expression construct is delivered to a cell and where in the cell the nucleic acid remains is dependent on the type of expression construct employed.

In certain embodiments of the invention, the expression construct comprising one or more oligonucleotide or polynucleotide sequences may simply consist of naked recombinant DNA or plasmids. Transfer of the construct may be performed by any of the methods mentioned above which physically or chemically permeabilize the cell membrane. This is particularly applicable for transfer *in vitro* but it may be applied to *in vivo* use as well. Dubensky *et al.* (1984) successfully injected polyomavirus DNA in the form of calcium phosphate precipitates into liver and spleen of adult and newborn mice demonstrating active viral replication and acute infection.

Benvenisty and Reshef (1986) also demonstrated that direct intraperitoneal injection of calcium phosphate-precipitated plasmids results in expression of the transfected genes. It is envisioned that DNA encoding a gene of interest may also be transferred in a similar manner *in vivo* and express the gene product.

Another embodiment of the invention for transferring a naked DNA expression construct into cells may involve particle bombardment. This method depends on the ability to accelerate DNA-coated microprojectiles to a high velocity allowing them to pierce cell membranes and enter cells without killing them (Klein *et al.*, 1987). Several devices for accelerating small particles have been developed. One such device relies on a high voltage discharge to generate an electrical current, which in turn provides the motive force (Yang *et al.*, 1990). The microprojectiles used have consisted of biologically inert substances such as tungsten or gold beads.

Selected organs including the liver, skin, and muscle tissue of rats and mice have been bombarded *in vivo* (Yang *et al.*, 1990; Zelenin *et al.*, 1991). This may require surgical exposure of the tissue or cells, to eliminate any intervening tissue between the gun and the target organ, *i.e. ex vivo* treatment. Again, DNA encoding a particular gene may be delivered *via* this method and still be incorporated by the present invention.

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES

The end result of the flow of genetic information is the synthesis of protein. DNA is transcribed by polymerases into messenger RNA and translated on the ribosome to yield a folded, functional protein. Thus there are several steps along the route where protein synthesis can be inhibited. The native DNA segment coding for a polypeptide described herein, as all such mammalian DNA strands, has two strands: a sense strand and an antisense strand held together by hydrogen bonding. The messenger RNA coding for polypeptide has the same nucleotide sequence as the sense DNA strand except that the DNA thymidine is replaced by uridine. Thus, synthetic antisense nucleotide sequences will bind to a mRNA and inhibit expression of the protein encoded by that mRNA.

The targeting of antisense oligonucleotides to mRNA is thus one mechanism to shut down protein synthesis, and, consequently, represents a powerful and targeted therapeutic approach. For example, the synthesis of polygalacturonase and the muscarine type 2 acetylcholine receptor are inhibited by antisense oligonucleotides directed to their respective mRNA sequences (U. S. Patent 5,739,119 and U. S. Patent 5,759,829, each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Further, examples of antisense inhibition have been demonstrated with the nuclear protein cyclin, the multiple drug resistance gene (MDG1), ICAM-1, E-selectin, STK-1, striatal GABA_A receptor and human EGF (Jaskulski *et al.*, 1988; Vasanthakumar and Ahmed, 1989; Peris *et al.*, 1998; U. S. Patent 5,801,154; U. S. Patent 5,789,573; U. S. Patent 5,718,709 and U. S. Patent 5,610,288, each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Antisense constructs have also been described that inhibit and can be used to treat a variety of abnormal cellular proliferations, e.g. cancer (U. S. Patent 5,747,470; U. S. Patent 5,591,317 and U. S. Patent 5,783,683, each specifically incorporated herein by reference in its entirety).

Therefore, in exemplary embodiments, the invention provides oligonucleotide sequences that comprise all, or a portion of, any sequence that is capable of specifically binding to polynucleotide sequence described herein, or a complement thereof. In one embodiment, the antisense oligonucleotides comprise DNA or derivatives thereof. In another embodiment, the oligonucleotides comprise RNA or derivatives thereof. In a third embodiment, the oligonucleotides are modified DNAs comprising a phosphorothioated modified backbone. In a fourth embodiment, the oligonucleotide sequences comprise peptide nucleic acids or derivatives thereof. In each case, preferred compositions comprise a sequence region that is complementary, and more preferably substantially-complementary, and even more preferably, completely complementary to one or more portions of polynucleotides disclosed herein.

Selection of antisense compositions specific for a given gene sequence is based upon analysis of the chosen target sequence (*i.e.* in these illustrative examples the rat and human sequences) and determination of secondary structure, T_m , binding energy, relative stability, and antisense compositions were selected based upon their relative

inability to form dimers, hairpins, or other secondary structures that would reduce or prohibit specific binding to the target mRNA in a host cell.

Highly preferred target regions of the mRNA, are those which are at or near the AUG translation initiation codon, and those sequences which were substantially complementary to 5' regions of the mRNA. These secondary structure analyses and target site selection considerations were performed using v.4 of the OLIGO primer analysis software (Rychlik, 1997) and the BLASTN 2.0.5 algorithm software (Altschul *et al.*, 1997).

The use of an antisense delivery method employing a short peptide vector, termed MPG (27 residues), is also contemplated. The MPG peptide contains a hydrophobic domain derived from the fusion sequence of HIV gp41 and a hydrophilic domain from the nuclear localization sequence of SV40 T-antigen (Morris *et al.*, 1997). It has been demonstrated that several molecules of the MPG peptide coat the antisense oligonucleotides and can be delivered into cultured mammalian cells in less than 1 hour with relatively high efficiency (90%). Further, the interaction with MPG strongly increases both the stability of the oligonucleotide to nuclease and the ability to cross the plasma membrane (Morris *et al.*, 1997).

RIBOZYMES

Although proteins traditionally have been used for catalysis of nucleic acids, another class of macromolecules has emerged as useful in this endeavor. Ribozymes are RNA-protein complexes that cleave nucleic acids in a site-specific fashion. Ribozymes have specific catalytic domains that possess endonuclease activity (Kim and Cech, 1987; Gerlach *et al.*, 1987; Forster and Symons, 1987). For example, a large number of ribozymes accelerate phosphoester transfer reactions with a high degree of specificity, often cleaving only one of several phosphoesters in an oligonucleotide substrate (Cech *et al.*, 1981; Michel and Westhof, 1990; Reinhold-Hurek and Shub, 1992). This specificity has been attributed to the requirement that the substrate bind via specific base-pairing interactions to the internal guide sequence ("IGS") of the ribozyme prior to chemical reaction.

Ribozyme catalysis has primarily been observed as part of sequence-specific cleavage/ligation reactions involving nucleic acids (Joyce, 1989; Cech *et al.*, 1981). For example, U. S. Patent No. 5,354,855 (specifically incorporated herein by reference) reports that certain ribozymes can act as endonucleases with a sequence specificity greater than that of known ribonucleases and approaching that of the DNA restriction enzymes. Thus, sequence-specific ribozyme-mediated inhibition of gene expression may be particularly suited to therapeutic applications (Scanlon *et al.*, 1991; Sarver *et al.*, 1990). Recently, it was reported that ribozymes elicited genetic changes in some cells lines to which they were applied; the altered genes included the oncogenes *H-ras*, *c-fos* and genes of HIV. Most of this work involved the modification of a target mRNA, based on a specific mutant codon that is cleaved by a specific ribozyme.

Six basic varieties of naturally-occurring enzymatic RNAs are known presently. Each can catalyze the hydrolysis of RNA phosphodiester bonds *in trans* (and thus can cleave other RNA molecules) under physiological conditions. In general, enzymatic nucleic acids act by first binding to a target RNA. Such binding occurs through the target binding portion of a enzymatic nucleic acid which is held in close proximity to an enzymatic portion of the molecule that acts to cleave the target RNA. Thus, the enzymatic nucleic acid first recognizes and then binds a target RNA through complementary base-pairing, and once bound to the correct site, acts enzymatically to cut the target RNA. Strategic cleavage of such a target RNA will destroy its ability to direct synthesis of an encoded protein. After an enzymatic nucleic acid has bound and cleaved its RNA target, it is released from that RNA to search for another target and can repeatedly bind and cleave new targets.

The enzymatic nature of a ribozyme is advantageous over many technologies, such as antisense technology (where a nucleic acid molecule simply binds to a nucleic acid target to block its translation) since the concentration of ribozyme necessary to affect a therapeutic treatment is lower than that of an antisense oligonucleotide. This advantage reflects the ability of the ribozyme to act enzymatically. Thus, a single ribozyme molecule is able to cleave many molecules of target RNA. In addition, the ribozyme is a highly specific inhibitor, with the specificity of inhibition depending not only on the base pairing mechanism of binding to the target

RNA, but also on the mechanism of target RNA cleavage. Single mismatches, or base-substitutions, near the site of cleavage can completely eliminate catalytic activity of a ribozyme. Similar mismatches in antisense molecules do not prevent their action (Woolf *et al.*, 1992). Thus, the specificity of action of a ribozyme is greater than that of an antisense oligonucleotide binding the same RNA site.

The enzymatic nucleic acid molecule may be formed in a hammerhead, hairpin, a hepatitis δ virus, group I intron or RNaseP RNA (in association with an RNA guide sequence) or Neurospora VS RNA motif. Examples of hammerhead motifs are described by Rossi *et al.* (1992). Examples of hairpin motifs are described by Hampel *et al.* (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257), Hampel and Tritz (1989), Hampel *et al.* (1990) and U. S. Patent 5,631,359 (specifically incorporated herein by reference). An example of the hepatitis δ virus motif is described by Perrotta and Been (1992); an example of the RNaseP motif is described by Guerrier-Takada *et al.* (1983); Neurospora VS RNA ribozyme motif is described by Collins (Saville and Collins, 1990; Saville and Collins, 1991; Collins and Olive, 1993); and an example of the Group I intron is described in (U. S. Patent 4,987,071, specifically incorporated herein by reference). All that is important in an enzymatic nucleic acid molecule of this invention is that it has a specific substrate binding site which is complementary to one or more of the target gene RNA regions, and that it have nucleotide sequences within or surrounding that substrate binding site which impart an RNA cleaving activity to the molecule. Thus the ribozyme constructs need not be limited to specific motifs mentioned herein.

In certain embodiments, it may be important to produce enzymatic cleaving agents which exhibit a high degree of specificity for the RNA of a desired target, such as one of the sequences disclosed herein. The enzymatic nucleic acid molecule is preferably targeted to a highly conserved sequence region of a target mRNA. Such enzymatic nucleic acid molecules can be delivered exogenously to specific cells as required. Alternatively, the ribozymes can be expressed from DNA or RNA vectors that are delivered to specific cells.

Small enzymatic nucleic acid motifs (*e.g.*, of the hammerhead or the hairpin structure) may also be used for exogenous delivery. The simple structure of these molecules increases the ability of the enzymatic nucleic acid to invade targeted

regions of the mRNA structure. Alternatively, catalytic RNA molecules can be expressed within cells from eukaryotic promoters (*e.g.*, Scanlon *et al.*, 1991; Kashani-Sabet *et al.*, 1992; Dropulic *et al.*, 1992; Weerasinghe *et al.*, 1991; Ojwang *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1992; Sarver *et al.*, 1990). Those skilled in the art realize that any ribozyme can be expressed in eukaryotic cells from the appropriate DNA vector. The activity of such ribozymes can be augmented by their release from the primary transcript by a second ribozyme (Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569, and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595, both hereby incorporated by reference; Ohkawa *et al.*, 1992; Taira *et al.*, 1991; and Ventura *et al.*, 1993).

Ribozymes may be added directly, or can be complexed with cationic lipids, lipid complexes, packaged within liposomes, or otherwise delivered to target cells. The RNA or RNA complexes can be locally administered to relevant tissues *ex vivo*, or *in vivo* through injection, aerosol inhalation, infusion pump or stent, with or without their incorporation in biopolymers.

Ribozymes may be designed as described in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595, each specifically incorporated herein by reference) and synthesized to be tested *in vitro* and *in vivo*, as described. Such ribozymes can also be optimized for delivery. While specific examples are provided, those in the art will recognize that equivalent RNA targets in other species can be utilized when necessary.

Hammerhead or hairpin ribozymes may be individually analyzed by computer folding (Jaeger *et al.*, 1989) to assess whether the ribozyme sequences fold into the appropriate secondary structure. Those ribozymes with unfavorable intramolecular interactions between the binding arms and the catalytic core are eliminated from consideration. Varying binding arm lengths can be chosen to optimize activity. Generally, at least 5 or so bases on each arm are able to bind to, or otherwise interact with, the target RNA.

Ribozymes of the hammerhead or hairpin motif may be designed to anneal to various sites in the mRNA message, and can be chemically synthesized. The method of synthesis used follows the procedure for normal RNA synthesis as described in Usman *et al.* (1987) and in Scaringe *et al.* (1990) and makes use of common nucleic

acid protecting and coupling groups, such as dimethoxytrityl at the 5'-end, and phosphoramidites at the 3'-end. Average stepwise coupling yields are typically >98%. Hairpin ribozymes may be synthesized in two parts and annealed to reconstruct an active ribozyme (Chowrira and Burke, 1992). Ribozymes may be modified extensively to enhance stability by modification with nuclease resistant groups, for example, 2'-amino, 2'-C-allyl, 2'-fluoro, 2'-o-methyl, 2'-H (for a review see *e.g.*, Usman and Cedergren, 1992). Ribozymes may be purified by gel electrophoresis using general methods or by high pressure liquid chromatography and resuspended in water.

Ribozyme activity can be optimized by altering the length of the ribozyme binding arms, or chemically synthesizing ribozymes with modifications that prevent their degradation by serum ribonucleases (see *e.g.*, Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 92/07065; Perrault *et al.*, 1990; Picken *et al.*, 1991; Usman and Cedergren, 1992; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/15187; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 91/03162; Eur. Pat. Appl. Publ. No. 92110298.4; U. S. Patent 5,334,711; and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/13688, which describe various chemical modifications that can be made to the sugar moieties of enzymatic RNA molecules), modifications which enhance their efficacy in cells, and removal of stem II bases to shorten RNA synthesis times and reduce chemical requirements.

Sullivan *et al.* (Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595) describes the general methods for delivery of enzymatic RNA molecules. Ribozymes may be administered to cells by a variety of methods known to those familiar to the art, including, but not restricted to, encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by incorporation into other vehicles, such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive microspheres. For some indications, ribozymes may be directly delivered *ex vivo* to cells or tissues with or without the aforementioned vehicles. Alternatively, the RNA/vehicle combination may be locally delivered by direct inhalation, by direct injection or by use of a catheter, infusion pump or stent. Other routes of delivery include, but are not limited to, intravascular, intramuscular, subcutaneous or joint injection, aerosol inhalation, oral (tablet or pill form), topical, systemic, ocular, intraperitoneal and/or intrathecal delivery. More detailed descriptions of ribozyme delivery and administration are provided in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO

94/02595 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569, each specifically incorporated herein by reference.

Another means of accumulating high concentrations of a ribozyme(s) within cells is to incorporate the ribozyme-encoding sequences into a DNA expression vector. Transcription of the ribozyme sequences are driven from a promoter for eukaryotic RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II), or RNA polymerase III (pol III). Transcripts from pol II or pol III promoters will be expressed at high levels in all cells; the levels of a given pol II promoter in a given cell type will depend on the nature of the gene regulatory sequences (enhancers, silencers, *etc.*) present nearby. Prokaryotic RNA polymerase promoters may also be used, providing that the prokaryotic RNA polymerase enzyme is expressed in the appropriate cells (Elroy-Stein and Moss, 1990; Gao and Huang, 1993; Lieber *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1990). Ribozymes expressed from such promoters can function in mammalian cells (*e.g.* Kashani-Saber *et al.*, 1992; Ojwang *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993; LHuillier *et al.*, 1992; Lisiewicz *et al.*, 1993). Such transcription units can be incorporated into a variety of vectors for introduction into mammalian cells, including but not restricted to, plasmid DNA vectors, viral DNA vectors (such as adenovirus or adeno-associated vectors), or viral RNA vectors (such as retroviral, semliki forest virus, sindbis virus vectors).

Ribozymes may be used as diagnostic tools to examine genetic drift and mutations within diseased cells. They can also be used to assess levels of the target RNA molecule. The close relationship between ribozyme activity and the structure of the target RNA allows the detection of mutations in any region of the molecule which alters the base-pairing and three-dimensional structure of the target RNA. By using multiple ribozymes, one may map nucleotide changes which are important to RNA structure and function *in vitro*, as well as in cells and tissues. Cleavage of target RNAs with ribozymes may be used to inhibit gene expression and define the role (essentially) of specified gene products in the progression of disease. In this manner, other genetic targets may be defined as important mediators of the disease. These studies will lead to better treatment of the disease progression by affording the possibility of combinational therapies (*e.g.*, multiple ribozymes targeted to different genes, ribozymes coupled with

known small molecule inhibitors, or intermittent treatment with combinations of ribozymes and/or other chemical or biological molecules). Other *in vitro* uses of ribozymes are well known in the art, and include detection of the presence of mRNA associated with an IL-5 related condition. Such RNA is detected by determining the presence of a cleavage product after treatment with a ribozyme using standard methodology.

PEPTIDE NUCLEIC ACIDS

In certain embodiments, the inventors contemplate the use of peptide nucleic acids (PNAs) in the practice of the methods of the invention. PNA is a DNA mimic in which the nucleobases are attached to a pseudopeptide backbone (Good and Nielsen, 1997). PNA is able to be utilized in a number of methods that traditionally have used RNA or DNA. Often PNA sequences perform better in techniques than the corresponding RNA or DNA sequences and have utilities that are not inherent to RNA or DNA. A review of PNA including methods of making, characteristics of, and methods of using, is provided by Corey (1997) and is incorporated herein by reference. As such, in certain embodiments, one may prepare PNA sequences that are complementary to one or more portions of the ACE mRNA sequence, and such PNA compositions may be used to regulate, alter, decrease, or reduce the translation of ACE-specific mRNA, and thereby alter the level of ACE activity in a host cell to which such PNA compositions have been administered.

PNAs have 2-aminoethyl-glycine linkages replacing the normal phosphodiester backbone of DNA (Nielsen *et al.*, 1991; Hanvey *et al.*, 1992; Hyrup and Nielsen, 1996; Nielsen, 1996). This chemistry has three important consequences: firstly, in contrast to DNA or phosphorothioate oligonucleotides, PNAs are neutral molecules; secondly, PNAs are achiral, which avoids the need to develop a stereoselective synthesis; and thirdly, PNA synthesis uses standard Boc (Dueholm *et al.*, 1994) or Fmoc (Thomson *et al.*, 1995) protocols for solid-phase peptide synthesis, although other methods, including a modified Merrifield method, have been used (Christensen *et al.*, 1995).

PNA monomers or ready-made oligomers are commercially available from PerSeptive Biosystems (Framingham, MA). PNA syntheses by either Boc or Fmoc protocols are straightforward using manual or automated protocols (Norton *et al.*, 1995). The manual protocol lends itself to the production of chemically modified PNAs or the simultaneous synthesis of families of closely related PNAs.

As with peptide synthesis, the success of a particular PNA synthesis will depend on the properties of the chosen sequence. For example, while in theory PNAs can incorporate any combination of nucleotide bases, the presence of adjacent purines can lead to deletions of one or more residues in the product. In expectation of this difficulty, it is suggested that, in producing PNAs with adjacent purines, one should repeat the coupling of residues likely to be added inefficiently. This should be followed by the purification of PNAs by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (Norton *et al.*, 1995) providing yields and purity of product similar to those observed during the synthesis of peptides.

Modifications of PNAs for a given application may be accomplished by coupling amino acids during solid-phase synthesis or by attaching compounds that contain a carboxylic acid group to the exposed N-terminal amine. Alternatively, PNAs can be modified after synthesis by coupling to an introduced lysine or cysteine. The ease with which PNAs can be modified facilitates optimization for better solubility or for specific functional requirements. Once synthesized, the identity of PNAs and their derivatives can be confirmed by mass spectrometry. Several studies have made and utilized modifications of PNAs (Norton *et al.*, 1995; Haaima *et al.*, 1996; Stetsenko *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 1995; Ulmann *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1995; Orum *et al.*, 1995; Footer *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1995; Kremisky *et al.*, 1996; Pardridge *et al.*, 1995; Boffa *et al.*, 1995; Landsdorp *et al.*, 1996; Gambacorti-Passerini *et al.*, 1996; Armitage *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 1997; Ruskowski *et al.*, 1997). U.S. Patent No. 5,700,922 discusses PNA-DNA-PNA chimeric molecules and their uses in diagnostics, modulating protein in organisms, and treatment of conditions susceptible to therapeutics.

In contrast to DNA and RNA, which contain negatively charged linkages, the PNA backbone is neutral. In spite of this dramatic alteration, PNAs

recognize complementary DNA and RNA by Watson-Crick pairing (Egholm *et al.*, 1993), validating the initial modeling by Nielsen *et al.* (1991). PNAs lack 3' to 5' polarity and can bind in either parallel or antiparallel fashion, with the antiparallel mode being preferred (Egholm *et al.*, 1993).

Hybridization of DNA oligonucleotides to DNA and RNA is destabilized by electrostatic repulsion between the negatively charged phosphate backbones of the complementary strands. By contrast, the absence of charge repulsion in PNA-DNA or PNA-RNA duplexes increases the melting temperature (T_m) and reduces the dependence of T_m on the concentration of mono- or divalent cations (Nielsen *et al.*, 1991). The enhanced rate and affinity of hybridization are significant because they are responsible for the surprising ability of PNAs to perform strand invasion of complementary sequences within relaxed double-stranded DNA. In addition, the efficient hybridization at inverted repeats suggests that PNAs can recognize secondary structure effectively within double-stranded DNA. Enhanced recognition also occurs with PNAs immobilized on surfaces, and Wang *et al.* have shown that support-bound PNAs can be used to detect hybridization events (Wang *et al.*, 1996).

One might expect that tight binding of PNAs to complementary sequences would also increase binding to similar (but not identical) sequences, reducing the sequence specificity of PNA recognition. As with DNA hybridization, however, selective recognition can be achieved by balancing oligomer length and incubation temperature. Moreover, selective hybridization of PNAs is encouraged by PNA-DNA hybridization being less tolerant of base mismatches than DNA-DNA hybridization. For example, a single mismatch within a 16 bp PNA-DNA duplex can reduce the T_m by up to 15°C (Egholm *et al.*, 1993). This high level of discrimination has allowed the development of several PNA-based strategies for the analysis of point mutations (Wang *et al.*, 1996; Carlsson *et al.*, 1996; Thiede *et al.*, 1996; Webb and Hurskainen, 1996; Perry-O'Keefe *et al.*, 1996).

High-affinity binding provides clear advantages for molecular recognition and the development of new applications for PNAs. For example, 11-13 nucleotide PNAs inhibit the activity of telomerase, a ribonucleo-protein that extends

telomere ends using an essential RNA template, while the analogous DNA oligomers do not (Norton *et al.*, 1996).

Neutral PNAs are more hydrophobic than analogous DNA oligomers, and this can lead to difficulty solubilizing them at neutral pH, especially if the PNAs have a high purine content or if they have the potential to form secondary structures. Their solubility can be enhanced by attaching one or more positive charges to the PNA termini (Nielsen *et al.*, 1991).

Findings by Allfrey and colleagues suggest that strand invasion will occur spontaneously at sequences within chromosomal DNA (Boffa *et al.*, 1995; Boffa *et al.*, 1996). These studies targeted PNAs to triplet repeats of the nucleotides CAG and used this recognition to purify transcriptionally active DNA (Boffa *et al.*, 1995) and to inhibit transcription (Boffa *et al.*, 1996). This result suggests that if PNAs can be delivered within cells then they will have the potential to be general sequence-specific regulators of gene expression. Studies and reviews concerning the use of PNAs as antisense and anti-gene agents include Nielsen *et al.* (1993b), Hanvey *et al.* (1992), and Good and Nielsen (1997). Koppelhus *et al.* (1997) have used PNAs to inhibit HIV-1 inverse transcription, showing that PNAs may be used for antiviral therapies.

Methods of characterizing the antisense binding properties of PNAs are discussed in Rose (1993) and Jensen *et al.* (1997). Rose uses capillary gel electrophoresis to determine binding of PNAs to their complementary oligonucleotide, measuring the relative binding kinetics and stoichiometry. Similar types of measurements were made by Jensen *et al.* using BIAcore™ technology.

Other applications of PNAs include use in DNA strand invasion (Nielsen *et al.*, 1991), antisense inhibition (Hanvey *et al.*, 1992), mutational analysis (Orum *et al.*, 1993), enhancers of transcription (Mollegaard *et al.*, 1994), nucleic acid purification (Orum *et al.*, 1995), isolation of transcriptionally active genes (Boffa *et al.*, 1995), blocking of transcription factor binding (Vickers *et al.*, 1995), genome cleavage (Veselkov *et al.*, 1996), biosensors (Wang *et al.*, 1996), *in situ* hybridization (Thisted *et al.*, 1996), and in an alternative to Southern blotting (Perry-O'Keefe, 1996).

POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

The present invention, in other aspects, provides polypeptide compositions. Generally, a polypeptide of the invention will be an isolated polypeptide (or an epitope, variant, or active fragment thereof) derived from HSV. Preferably, the polypeptide is encoded by a polynucleotide sequence disclosed herein or a sequence which hybridizes under moderate or highly stringent conditions to a polynucleotide sequence disclosed herein. Alternatively, the polypeptide may be defined as a polypeptide which comprises a contiguous amino acid sequence from an amino acid sequence disclosed herein, or which polypeptide comprises an entire amino acid sequence disclosed herein.

In the present invention, a polypeptide composition is also understood to comprise one or more polypeptides that are immunologically reactive with antibodies and/or T cells generated against a polypeptide of the invention, particularly a polypeptide having amino acid sequences disclosed herein, or to active fragments, or to variants or biological functional equivalents thereof.

Likewise, a polypeptide composition of the present invention is understood to comprise one or more polypeptides that are capable of eliciting antibodies or T cells that are immunologically reactive with one or more polypeptides encoded by one or more contiguous nucleic acid sequences contained in the amino acid sequences disclosed herein, or to active fragments, or to variants thereof, or to one or more nucleic acid sequences which hybridize to one or more of these sequences under conditions of moderate to high stringency. Particularly illustrative polypeptides comprise the amino acid sequence disclosed in SEQ ID NO: 2, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 17, 20, 21, 22 and 25.

As used herein, an active fragment of a polypeptide includes a whole or a portion of a polypeptide which is modified by conventional techniques, *e.g.*, mutagenesis, or by addition, deletion, or substitution, but which active fragment exhibits substantially the same structure function, antigenicity, etc., as a polypeptide as described herein.

In certain illustrative embodiments, the polypeptides of the invention will comprise at least an immunogenic portion of an HSV antigen or a variant or biological functional equivalent thereof, as described herein. Polypeptides as described

herein may be of any length. Additional sequences derived from the native protein and/or heterologous sequences may be present, and such sequences may (but need not) possess further immunogenic or antigenic properties.

An "immunogenic portion," as used herein is a portion of a protein that is recognized (*i.e.*, specifically bound) by a B-cell and/or T-cell surface antigen receptor. Such immunogenic portions generally comprise at least 5 amino acid residues, more preferably at least 10, and still more preferably at least 20 amino acid residues of an HSV protein or a variant thereof. Certain preferred immunogenic portions include peptides in which an N-terminal leader sequence and/or transmembrane domain have been deleted. Other preferred immunogenic portions may contain a small N- and/or C-terminal deletion (*e.g.*, 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids), relative to the mature protein.

Immunogenic portions may generally be identified using well known techniques, such as those summarized in Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) and references cited therein. Such techniques include screening polypeptides for the ability to react with antigen-specific antibodies, antisera and/or T-cell lines or clones. As used herein, antisera and antibodies are "antigen-specific" if they specifically bind to an antigen (*i.e.*, they react with the protein in an ELISA or other immunoassay, and do not react detectably with unrelated proteins). Such antisera and antibodies may be prepared as described herein, and using well known techniques. An immunogenic portion of a native HSV protein is a portion that reacts with such antisera and/or T-cells at a level that is not substantially less than the reactivity of the full length polypeptide (*e.g.*, in an ELISA and/or T-cell reactivity assay). Such immunogenic portions may react within such assays at a level that is similar to or greater than the reactivity of the full length polypeptide. Such screens may generally be performed using methods well known to those of ordinary skill in the art, such as those described in Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. For example, a polypeptide may be immobilized on a solid support and contacted with patient sera to allow binding of antibodies within the sera to the immobilized polypeptide. Unbound sera may then be removed and bound antibodies detected using, for example, ¹²⁵I-labeled Protein A.

As noted above, a composition may comprise a variant of a native HSV protein. A polypeptide "variant," as used herein, is a polypeptide that differs from a native HSV protein in one or more substitutions, deletions, additions and/or insertions, such that the immunogenicity of the polypeptide is not substantially diminished. In other words, the ability of a variant to react with antigen-specific antisera may be enhanced or unchanged, relative to the native protein, or may be diminished by less than 50%, and preferably less than 20%, relative to the native protein. Such variants may generally be identified by modifying one of the above polypeptide sequences and evaluating the reactivity of the modified polypeptide with antigen-specific antibodies or antisera as described herein. Preferred variants include those in which one or more portions, such as an N-terminal leader sequence or transmembrane domain, have been removed. Other preferred variants include variants in which a small portion (*e.g.*, 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids) has been removed from the N- and/or C-terminal of the mature protein.

Polypeptide variants encompassed by the present invention include those exhibiting at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or more identity (determined as described above) to the polypeptides disclosed herein.

Preferably, a variant contains conservative substitutions. A "conservative substitution" is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide to be substantially unchanged. Amino acid substitutions may generally be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity and/or the amphipathic nature of the residues. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; and serine, threonine, phenylalanine and tyrosine. Other groups of amino acids that may represent conservative changes include: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe;

(4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. A variant may also, or alternatively, contain nonconservative changes. In a preferred embodiment, variant polypeptides differ from a native sequence by substitution, deletion or addition of five amino acids or fewer. Variants may also (or alternatively) be modified by, for example, the deletion or addition of amino acids that have minimal influence on the immunogenicity, secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide.

As noted above, polypeptides may comprise a signal (or leader) sequence at the N-terminal end of the protein, which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein. The polypeptide may also be conjugated to a linker or other sequence for ease of synthesis, purification or identification of the polypeptide (e.g., poly-His), or to enhance binding of the polypeptide to a solid support. For example, a polypeptide may be conjugated to an immunoglobulin Fc region.

Polypeptides may be prepared using any of a variety of well known techniques. Recombinant polypeptides encoded by DNA sequences as described above may be readily prepared from the DNA sequences using any of a variety of expression vectors known to those of ordinary skill in the art. Expression may be achieved in any appropriate host cell that has been transformed or transfected with an expression vector containing a DNA molecule that encodes a recombinant polypeptide. Suitable host cells include prokaryotes, yeast, and higher eukaryotic cells, such as mammalian cells and plant cells. Preferably, the host cells employed are *E. coli*, yeast or a mammalian cell line such as COS or CHO. Supernatants from suitable host/vector systems which secrete recombinant protein or polypeptide into culture media may be first concentrated using a commercially available filter. Following concentration, the concentrate may be applied to a suitable purification matrix such as an affinity matrix or an ion exchange resin. Finally, one or more reverse phase HPLC steps can be employed to further purify a recombinant polypeptide.

Portions and other variants having less than about 100 amino acids, and generally less than about 50 amino acids, may also be generated by synthetic means, using techniques well known to those of ordinary skill in the art. For example, such polypeptides may be synthesized using any of the commercially available solid-phase techniques, such as the Merrifield solid-phase synthesis method, where amino acids are

sequentially added to a growing amino acid chain. See Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963. Equipment for automated synthesis of polypeptides is commercially available from suppliers such as Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), and may be operated according to the manufacturer's instructions.

Within certain specific embodiments, a polypeptide may be a fusion protein that comprises multiple polypeptides as described herein, or that comprises at least one polypeptide as described herein and an unrelated sequence, such as a known protein. A fusion partner may, for example, assist in providing T helper epitopes (an immunological fusion partner), preferably T helper epitopes recognized by humans, or may assist in expressing the protein (an expression enhancer) at higher yields than the native recombinant protein. Certain preferred fusion partners are both immunological and expression enhancing fusion partners. Other fusion partners may be selected so as to increase the solubility of the protein or to enable the protein to be targeted to desired intracellular compartments. Still further fusion partners include affinity tags, which facilitate purification of the protein.

Fusion proteins may generally be prepared using standard techniques, including chemical conjugation. Preferably, a fusion protein is expressed as a recombinant protein, allowing the production of increased levels, relative to a non-fused protein, in an expression system. Briefly, DNA sequences encoding the polypeptide components may be assembled separately, and ligated into an appropriate expression vector. The 3' end of the DNA sequence encoding one polypeptide component is ligated, with or without a peptide linker, to the 5' end of a DNA sequence encoding the second polypeptide component so that the reading frames of the sequences are in phase. This permits translation into a single fusion protein that retains the biological activity of both component polypeptides.

A peptide linker sequence may be employed to separate the first and second polypeptide components by a distance sufficient to ensure that each polypeptide folds into its secondary and tertiary structures. Such a peptide linker sequence is incorporated into the fusion protein using standard techniques well known in the art. Suitable peptide linker sequences may be chosen based on the following factors:

(1) their ability to adopt a flexible extended conformation; (2) their inability to adopt a secondary structure that could interact with functional epitopes on the first and second polypeptides; and (3) the lack of hydrophobic or charged residues that might react with the polypeptide functional epitopes. Preferred peptide linker sequences contain Gly, Asn and Ser residues. Other near neutral amino acids, such as Thr and Ala may also be used in the linker sequence. Amino acid sequences which may be usefully employed as linkers include those disclosed in Maratea et al., *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; U.S. Patent No. 4,935,233 and U.S. Patent No. 4,751,180. The linker sequence may generally be from 1 to about 50 amino acids in length. Linker sequences are not required when the first and second polypeptides have non-essential N-terminal amino acid regions that can be used to separate the functional domains and prevent steric interference.

The ligated DNA sequences are operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements. The regulatory elements responsible for expression of DNA are located only 5' to the DNA sequence encoding the first polypeptides. Similarly, stop codons required to end translation and transcription termination signals are only present 3' to the DNA sequence encoding the second polypeptide.

Fusion proteins are also provided. Such proteins comprise a polypeptide as described herein together with an unrelated immunogenic protein. Preferably the immunogenic protein is capable of eliciting a recall response. Examples of such proteins include tetanus, tuberculosis and hepatitis proteins (*see*, for example, Stoute et al. *New Engl. J. Med.*, 336:86-91, 1997).

Within preferred embodiments, an immunological fusion partner is derived from protein D, a surface protein of the gram-negative bacterium *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Preferably, a protein D derivative comprises approximately the first third of the protein (e.g., the first N-terminal 100-110 amino acids), and a protein D derivative may be lipidated. Within certain preferred embodiments, the first 109 residues of a Lipoprotein D fusion partner is included on the N-terminus to provide the polypeptide with additional exogenous T-cell epitopes and to increase the expression level in *E. coli* (thus functioning as an expression enhancer).

The lipid tail ensures optimal presentation of the antigen to antigen presenting cells. Other fusion partners include the non-structural protein from influenzae virus, NS1 (hemagglutinin). Typically, the N-terminal 81 amino acids are used, although different fragments that include T-helper epitopes may be used.

In another embodiment, a *Mycobacterium tuberculosis*-derived Ra12 polynucleotide is linked to at least an immunogenic portion of an HSV polynucleotide of this invention. Ra12 compositions and methods for their use in enhancing expression of heterologous polynucleotide sequences is described in U.S. Patent Application 60/158,585, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, Ra12 refers to a polynucleotide region that is a subsequence of a *Mycobacterium tuberculosis* MTB32A nucleic acid. MTB32A is a serine protease of 32 KD molecular weight encoded by a gene in virulent and avirulent strains of *M. tuberculosis*. The nucleotide sequence and amino acid sequence of MTB32A have been disclosed (U.S. Patent Application 60/158,585; see also, Skeiky *et al.*, *Infection and Immunity* (1999) 67:3998-4007, incorporated herein by reference). The Ra12 C-terminal fragment of the MTB32A coding sequence expresses at high levels on its own and remains as a soluble protein throughout the purification process. Moreover, the presence of Ra12 polypeptide fragments in a fusion polypeptide may enhance the immunogenicity of the heterologous antigenic HSV polypeptides with which Ra12 is fused. In one embodiment, the Ra12 polypeptide sequence present in a fusion polypeptide with an HSV antigen comprises some or all of amino acid residues 192 to 323 of MTB32A.

In another embodiment, the immunological fusion partner is the protein known as LYTA, or a portion thereof (preferably a C-terminal portion). LYTA is derived from *Streptococcus pneumoniae*, which synthesizes an N-acetyl-L-alanine amidase known as amidase LYTA (encoded by the *LytA* gene; *Gene* 43:265-292, 1986). LYTA is an autolysin that specifically degrades certain bonds in the peptidoglycan backbone. The C-terminal domain of the LYTA protein is responsible for the affinity to the choline or to some choline analogues such as DEAE. This property has been exploited for the development of *E. coli* C-LYTA expressing plasmids useful for expression of fusion proteins. Purification of hybrid proteins containing the C-LYTA

fragment at the amino terminus has been described (*see Biotechnology 10:795-798, 1992*). Within a preferred embodiment, a repeat portion of LYTA may be incorporated into a fusion protein. A repeat portion is found in the C-terminal region starting at residue 178. A particularly preferred repeat portion incorporates residues 188-305.

In general, polypeptides (including fusion proteins) and polynucleotides as described herein are isolated. An "isolated" polypeptide or polynucleotide is one that is removed from its original environment. For example, a naturally-occurring protein is isolated if it is separated from some or all of the coexisting materials in the natural system. Preferably, such polypeptides are at least about 90% pure, more preferably at least about 95% pure and most preferably at least about 99% pure. A polynucleotide is considered to be isolated if, for example, it is cloned into a vector that is not a part of the natural environment.

BINDING AGENTS

The present invention further provides agents, such as antibodies and antigen-binding fragments thereof, that specifically bind to a HSV protein. As used herein, an antibody, or antigen-binding fragment thereof, is said to "specifically bind" to a HSV protein if it reacts at a detectable level (within, for example, an ELISA) with a HSV protein, and does not react detectably with unrelated proteins under similar conditions. As used herein, "binding" refers to a noncovalent association between two separate molecules such that a complex is formed. The ability to bind may be evaluated by, for example, determining a binding constant for the formation of the complex. The binding constant is the value obtained when the concentration of the complex is divided by the product of the component concentrations. In general, two compounds are said to "bind," in the context of the present invention, when the binding constant for complex formation exceeds about 10^3 L/mol. The binding constant may be determined using methods well known in the art.

Binding agents may be further capable of differentiating between patients with and without HSV infection using the representative assays provided herein. For example, preferably, antibodies or other binding agents that bind to a HSV protein will generate a signal indicating the presence of infection in at least about 20% of patients

with the disease, and will generate a negative signal indicating the absence of the disease in at least about 90% of individuals without an HSV infection. To determine whether a binding agent satisfies this requirement, biological samples (*e.g.*, blood, sera, sputum, urine and/or biopsies) from patients with and without HSV (as determined using standard clinical tests) may be assayed as described herein for the presence of polypeptides that bind to the binding agent. It will be apparent that a statistically significant number of samples with and without the disease should be assayed. Each binding agent should satisfy the above criteria; however, those of ordinary skill in the art will recognize that binding agents may be used in combination to improve sensitivity.

Any agent that satisfies the above requirements may be a binding agent. For example, a binding agent may be a ribosome, with or without a peptide component, an RNA molecule or a polypeptide. In a preferred embodiment, a binding agent is an antibody or an antigen-binding fragment thereof. Antibodies may be prepared by any of a variety of techniques known to those of ordinary skill in the art. *See, e.g.*, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In general, antibodies can be produced by cell culture techniques, including the generation of monoclonal antibodies as described herein, or via transfection of antibody genes into suitable bacterial or mammalian cell hosts, in order to allow for the production of recombinant antibodies. In one technique, an immunogen comprising the polypeptide is initially injected into any of a wide variety of mammals (*e.g.*, mice, rats, rabbits, sheep or goats). In this step, the polypeptides of this invention may serve as the immunogen without modification. Alternatively, particularly for relatively short polypeptides, a superior immune response may be elicited if the polypeptide is joined to a carrier protein, such as bovine serum albumin or keyhole limpet hemocyanin. The immunogen is injected into the animal host, preferably according to a predetermined schedule incorporating one or more booster immunizations, and the animals are bled periodically. Polyclonal antibodies specific for the polypeptide may then be purified from such antisera by, for example, affinity chromatography using the polypeptide coupled to a suitable solid support.

Monoclonal antibodies specific for an antigenic polypeptide of interest

may be prepared, for example, using the technique of Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, and improvements thereto. Briefly, these methods involve the preparation of immortal cell lines capable of producing antibodies having the desired specificity (*i.e.*, reactivity with the polypeptide of interest). Such cell lines may be produced, for example, from spleen cells obtained from an animal immunized as described above. The spleen cells are then immortalized by, for example, fusion with a myeloma cell fusion partner, preferably one that is syngeneic with the immunized animal. A variety of fusion techniques may be employed. For example, the spleen cells and myeloma cells may be combined with a nonionic detergent for a few minutes and then plated at low density on a selective medium that supports the growth of hybrid cells, but not myeloma cells. A preferred selection technique uses HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) selection. After a sufficient time, usually about 1 to 2 weeks, colonies of hybrids are observed. Single colonies are selected and their culture supernatants tested for binding activity against the polypeptide. Hybridomas having high reactivity and specificity are preferred.

Monoclonal antibodies may be isolated from the supernatants of growing hybridoma colonies. In addition, various techniques may be employed to enhance the yield, such as injection of the hybridoma cell line into the peritoneal cavity of a suitable vertebrate host, such as a mouse. Monoclonal antibodies may then be harvested from the ascites fluid or the blood. Contaminants may be removed from the antibodies by conventional techniques, such as chromatography, gel filtration, precipitation, and extraction. The polypeptides of this invention may be used in the purification process in, for example, an affinity chromatography step.

Within certain embodiments, the use of antigen-binding fragments of antibodies may be preferred. Such fragments include Fab fragments, which may be prepared using standard techniques. Briefly, immunoglobulins may be purified from rabbit serum by affinity chromatography on Protein A bead columns (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) and digested by papain to yield Fab and Fc fragments. The Fab and Fc fragments may be separated by affinity chromatography on protein A bead columns.

Monoclonal antibodies of the present invention may be coupled to one or

more therapeutic agents. Suitable agents in this regard include radionuclides, differentiation inducers, drugs, toxins, and derivatives thereof. Preferred radionuclides include ^{90}Y , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , and ^{212}Bi . Preferred drugs include methotrexate, and pyrimidine and purine analogs. Preferred differentiation inducers include phorbol esters and butyric acid. Preferred toxins include ricin, abrin, diphtheria toxin, cholera toxin, gelonin, *Pseudomonas* exotoxin, *Shigella* toxin, and pokeweed antiviral protein.

A therapeutic agent may be coupled (*e.g.*, covalently bonded) to a suitable monoclonal antibody either directly or indirectly (*e.g.*, via a linker group). A direct reaction between an agent and an antibody is possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (*e.g.*, a halide) on the other.

Alternatively, it may be desirable to couple a therapeutic agent and an antibody via a linker group. A linker group can function as a spacer to distance an antibody from an agent in order to avoid interference with binding capabilities. A linker group can also serve to increase the chemical reactivity of a substituent on an agent or an antibody, and thus increase the coupling efficiency. An increase in chemical reactivity may also facilitate the use of agents, or functional groups on agents, which otherwise would not be possible.

It will be evident to those skilled in the art that a variety of bifunctional or polyfunctional reagents, both homo- and hetero-functional (such as those described in the catalog of the Pierce Chemical Co., Rockford, IL), may be employed as the linker group. Coupling may be effected, for example, through amino groups, carboxyl groups, sulfhydryl groups or oxidized carbohydrate residues. There are numerous references describing such methodology, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,671,958, to Rodwell et al.

Where a therapeutic agent is more potent when free from the antibody portion of the immunoconjugates of the present invention, it may be desirable to use a linker group which is cleavable during or upon internalization into a cell. A number of different cleavable linker groups have been described. The mechanisms for the

intracellular release of an agent from these linker groups include cleavage by reduction of a disulfide bond (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,489,710, to Spitler), by irradiation of a photolabile bond (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,625,014, to Senter et al.), by hydrolysis of derivatized amino acid side chains (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,638,045, to Kohn et al.), by serum complement-mediated hydrolysis (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,671,958, to Rodwell et al.), and acid-catalyzed hydrolysis (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,569,789, to Blattler et al.).

It may be desirable to couple more than one agent to an antibody. In one embodiment, multiple molecules of an agent are coupled to one antibody molecule. In another embodiment, more than one type of agent may be coupled to one antibody. Regardless of the particular embodiment, immunoconjugates with more than one agent may be prepared in a variety of ways. For example, more than one agent may be coupled directly to an antibody molecule, or linkers that provide multiple sites for attachment can be used. Alternatively, a carrier can be used.

A carrier may bear the agents in a variety of ways, including covalent bonding either directly or via a linker group. Suitable carriers include proteins such as albumins (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,507,234, to Kato et al.), peptides and polysaccharides such as aminodextran (*e.g.*, U.S. Patent No. 4,699,784, to Shih et al.). A carrier may also bear an agent by noncovalent bonding or by encapsulation, such as within a liposome vesicle (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,429,008 and 4,873,088). Carriers specific for radionuclide agents include radiohalogenated small molecules and chelating compounds. For example, U.S. Patent No. 4,735,792 discloses representative radiohalogenated small molecules and their synthesis. A radionuclide chelate may be formed from chelating compounds that include those containing nitrogen and sulfur atoms as the donor atoms for binding the metal, or metal oxide, radionuclide. For example, U.S. Patent No. 4,673,562, to Davison et al. discloses representative chelating compounds and their synthesis.

A variety of routes of administration for the antibodies and immunoconjugates may be used. Typically, administration will be intravenous, intramuscular, subcutaneous and the like. It will be evident that the precise dose of the antibody/immunoconjugate will vary depending upon the antibody used, the antigen density, and the rate of clearance of the antibody.

T CELLS

Immunotherapeutic compositions may also, or alternatively, comprise T cells specific for HSV protein. Such cells may generally be prepared *in vitro* or *ex vivo*, using standard procedures. For example, T cells may be isolated from bone marrow, peripheral blood, or a fraction of bone marrow or peripheral blood of a patient, using a commercially available cell separation system, such as the Isolex™ System, available from Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; see also U.S. Patent No. 5,240,856; U.S. Patent No. 5,215,926; WO 89/06280; WO 91/16116 and WO 92/07243). Alternatively, T cells may be derived from related or unrelated humans, non-human mammals, cell lines or cultures.

T cells may be stimulated with a HSV polypeptide, polynucleotide encoding a HSV polypeptide and/or an antigen presenting cell (APC) that expresses such a polypeptide. Such stimulation is performed under conditions and for a time sufficient to permit the generation of T cells that are specific for the polypeptide. In certain embodiments, HSV polypeptide or polynucleotide is present within a delivery vehicle, such as a microsphere, to facilitate the generation of specific T cells.

T cells are considered to be specific for a HSV polypeptide if the T cells specifically proliferate, secrete cytokines or kill target cells coated with the polypeptide or expressing a gene encoding the polypeptide. T cell specificity may be evaluated using any of a variety of standard techniques. For example, within a chromium release assay or proliferation assay, a stimulation index of more than two fold increase in lysis and/or proliferation, compared to negative controls, indicates T cell specificity. Such assays may be performed, for example, as described in Chen et al., *Cancer Res.* 54:1065-1070, 1994. Alternatively, detection of the proliferation of T cells may be accomplished by a variety of known techniques. For example, T cell proliferation can be detected by measuring an increased rate of DNA synthesis (*e.g.*, by pulse-labeling cultures of T cells with tritiated thymidine and measuring the amount of tritiated thymidine incorporated into DNA). Contact with a HSV polypeptide (100 ng/ml - 100 µg/ml, preferably 200 ng/ml - 25 µg/ml) for 3 - 7 days should result in at least a two fold increase in proliferation of the T cells. Contact as described above for 2-3 hours

should result in activation of the T cells, as measured using standard cytokine assays in which a two fold increase in the level of cytokine release (*e.g.*, TNF or IFN- γ) is indicative of T cell activation (*see* Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998)). T cells that have been activated in response to a HSV polypeptide, polynucleotide or polypeptide-expressing APC may be CD4⁺ and/or CD8⁺. HSV protein-specific T cells may be expanded using standard techniques. Within preferred embodiments, the T cells are derived from a patient, a related donor or an unrelated donor, and are administered to the patient following stimulation and expansion.

For therapeutic purposes, CD4⁺ or CD8⁺ T cells that proliferate in response to a HSV polypeptide, polynucleotide or APC can be expanded in number either *in vitro* or *in vivo*. Proliferation of such T cells *in vitro* may be accomplished in a variety of ways. For example, the T cells can be re-exposed to a HSV polypeptide, or a short peptide corresponding to an immunogenic portion of such a polypeptide, with or without the addition of T cell growth factors, such as interleukin-2, and/or stimulator cells that synthesize a HSV polypeptide. Alternatively, one or more T cells that proliferate in the presence of a HSV protein can be expanded in number by cloning. Methods for cloning cells are well known in the art, and include limiting dilution.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

In additional embodiments, the present invention concerns formulation of one or more of the polynucleotide, polypeptide, T-cell and/or antibody compositions disclosed herein in pharmaceutically-acceptable solutions for administration to a cell or an animal, either alone, or in combination with one or more other modalities of therapy.

It will also be understood that, if desired, the nucleic acid segment, RNA, DNA or PNA compositions that express a polypeptide as disclosed herein may be administered in combination with other agents as well, such as, *e.g.*, other proteins or polypeptides or various pharmaceutically-active agents. In fact, there is virtually no limit to other components that may also be included, given that the additional agents do not cause a significant adverse effect upon contact with the target cells or host tissues. The compositions may thus be delivered along with various other agents as required in

the particular instance. Such compositions may be purified from host cells or other biological sources, or alternatively may be chemically synthesized as described herein. Likewise, such compositions may further comprise substituted or derivatized RNA or DNA compositions.

Formulation of pharmaceutically-acceptable excipients and carrier solutions is well-known to those of skill in the art, as is the development of suitable dosing and treatment regimens for using the particular compositions described herein in a variety of treatment regimens, including *e.g.*, oral, parenteral, intravenous, intranasal, and intramuscular administration and formulation.

1. ORAL DELIVERY

In certain applications, the pharmaceutical compositions disclosed herein may be delivered *via* oral administration to an animal. As such, these compositions may be formulated with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or they may be enclosed in hard- or soft-shell gelatin capsule, or they may be compressed into tablets, or they may be incorporated directly with the food of the diet.

The active compounds may even be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tables, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like (Mathiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; U. S. Patent 5,641,515; U. S. Patent 5,580,579 and U. S. Patent 5,792,451, each specifically incorporated herein by reference in its entirety). The tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the following: a binder, as gum tragacanth, acacia, cornstarch, or gelatin; excipients, such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent, such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant, such as magnesium stearate; and a sweetening agent, such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent, such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar, or both. A syrup or elixir may contain the active compound sucrose as a sweetening agent methyl and

propylparabens as preservatives, a dye and flavoring, such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compounds may be incorporated into sustained-release preparation and formulations.

Typically, these formulations may contain at least about 0.1% of the active compound or more, although the percentage of the active ingredient(s) may, of course, be varied and may conveniently be between about 1 or 2% and about 60% or 70% or more of the weight or volume of the total formulation. Naturally, the amount of active compound(s) in each therapeutically useful composition may be prepared is such a way that a suitable dosage will be obtained in any given unit dose of the compound. Factors such as solubility, bioavailability, biological half-life, route of administration, product shelf life, as well as other pharmacological considerations will be contemplated by one skilled in the art of preparing such pharmaceutical formulations, and as such, a variety of dosages and treatment regimens may be desirable.

For oral administration the compositions of the present invention may alternatively be incorporated with one or more excipients in the form of a mouthwash, dentifrice, buccal tablet, oral spray, or sublingual orally-administered formulation. For example, a mouthwash may be prepared incorporating the active ingredient in the required amount in an appropriate solvent, such as a sodium borate solution (Dobell's Solution). Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an oral solution such as one containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate, or dispersed in a dentifrice, or added in a therapeutically-effective amount to a composition that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants. Alternatively the compositions may be fashioned into a tablet or solution form that may be placed under the tongue or otherwise dissolved in the mouth.

2. INJECTABLE DELIVERY

In certain circumstances it will be desirable to deliver the pharmaceutical compositions disclosed herein parenterally, intravenously, intramuscularly, or even intraperitoneally as described in U. S. Patent 5,543,158; U. S. Patent 5,641,515 and U.

S. Patent 5,399,363 (each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts may be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions may also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions (U. S. Patent 5,466,468, specifically incorporated herein by reference in its entirety). In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and/or vegetable oils. Proper fluidity may be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be facilitated by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, a sterile aqueous medium that can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one

dosage may be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, and the general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

The compositions disclosed herein may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts, include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug-release capsules, and the like.

As used herein, "carrier" includes any and all solvents, dispersion media, vehicles, coatings, diluents, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption

delaying agents, buffers, carrier solutions, suspensions, colloids, and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

The phrase "pharmaceutically-acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an allergic or similar untoward reaction when administered to a human. The preparation of an aqueous composition that contains a protein as an active ingredient is well understood in the art. Typically, such compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified.

3. NASAL DELIVERY

In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may be delivered by intranasal sprays, inhalation, and/or other aerosol delivery vehicles. Methods for delivering genes, nucleic acids, and peptide compositions directly to the lungs *via* nasal aerosol sprays has been described *e.g.*, in U. S. Patent 5,756,353 and U. S. Patent 5,804,212 (each specifically incorporated herein by reference in its entirety). Likewise, the delivery of drugs using intranasal microparticle resins (Takenaga *et al.*, 1998) and lysophosphatidyl-glycerol compounds (U. S. Patent 5,725,871, specifically incorporated herein by reference in its entirety) are also well-known in the pharmaceutical arts. Likewise, transmucosal drug delivery in the form of a polytetrafluoroethylene support matrix is described in U. S. Patent 5,780,045 (specifically incorporated herein by reference in its entirety).

4. LIPOSOME-, NANOCAPSULE-, AND MICROPARTICLE-MEDIATED DELIVERY

In certain embodiments, the inventors contemplate the use of liposomes, nanocapsules, microparticles, microspheres, lipid particles, vesicles, and the like, for the introduction of the compositions of the present invention into suitable host cells. In particular, the compositions of the present invention may be formulated for delivery

either encapsulated in a lipid particle, a liposome, a vesicle, a nanosphere, or a nanoparticle or the like.

Such formulations may be preferred for the introduction of pharmaceutically-acceptable formulations of the nucleic acids or constructs disclosed herein. The formation and use of liposomes is generally known to those of skill in the art (see for example, Couvreur *et al.*, 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998; which describes the use of liposomes and nanocapsules in the targeted antibiotic therapy for intracellular bacterial infections and diseases). Recently, liposomes were developed with improved serum stability and circulation half-times (Gabizon and Papahadjopoulos, 1988; Allen and Choun, 1987; U. S. Patent 5,741,516, specifically incorporated herein by reference in its entirety). Further, various methods of liposome and liposome like preparations as potential drug carriers have been reviewed (Takakura, 1998; Chandran *et al.*, 1997; Margalit, 1995; U. S. Patent 5,567,434; U. S. Patent 5,552,157; U. S. Patent 5,565,213; U. S. Patent 5,738,868 and U. S. Patent 5,795,587, each specifically incorporated herein by reference in its entirety).

Liposomes have been used successfully with a number of cell types that are normally resistant to transfection by other procedures including T cell suspensions, primary hepatocyte cultures and PC 12 cells (Renneisen *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1990). In addition, liposomes are free of the DNA length constraints that are typical of viral-based delivery systems. Liposomes have been used effectively to introduce genes, drugs (Heath and Martin, 1986; Heath *et al.*, 1986; Balazsovits *et al.*, 1989; Fresta and Puglisi, 1996), radiotherapeutic agents (Pikul *et al.*, 1987), enzymes (Imaizumi *et al.*, 1990a; Imaizumi *et al.*, 1990b), viruses (Faller and Baltimore, 1984), transcription factors and allosteric effectors (Nicolau and Gersonde, 1979) into a variety of cultured cell lines and animals. In addition, several successful clinical trials examining the effectiveness of liposome-mediated drug delivery have been completed (Lopez-Berestein *et al.*, 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier *et al.*, 1988). Furthermore, several studies suggest that the use of liposomes is not associated with autoimmune responses, toxicity or gonadal localization after systemic delivery (Mori and Fukatsu, 1992).

Liposomes are formed from phospholipids that are dispersed in an aqueous medium and spontaneously form multilamellar concentric bilayer vesicles (also

termed multilamellar vesicles (MLVs). MLVs generally have diameters of from 25 nm to 4 μm . Sonication of MLVs results in the formation of small unilamellar vesicles (SUVs) with diameters in the range of 200 to 500 Å, containing an aqueous solution in the core.

Liposomes bear resemblance to cellular membranes and are contemplated for use in connection with the present invention as carriers for the peptide compositions. They are widely suitable as both water- and lipid-soluble substances can be entrapped, *i.e.* in the aqueous spaces and within the bilayer itself, respectively. It is possible that the drug-bearing liposomes may even be employed for site-specific delivery of active agents by selectively modifying the liposomal formulation.

In addition to the teachings of Couvreur *et al.* (1977; 1988), the following information may be utilized in generating liposomal formulations. Phospholipids can form a variety of structures other than liposomes when dispersed in water, depending on the molar ratio of lipid to water. At low ratios the liposome is the preferred structure. The physical characteristics of liposomes depend on pH, ionic strength and the presence of divalent cations. Liposomes can show low permeability to ionic and polar substances, but at elevated temperatures undergo a phase transition which markedly alters their permeability. The phase transition involves a change from a closely packed, ordered structure, known as the gel state, to a loosely packed, less-ordered structure, known as the fluid state. This occurs at a characteristic phase-transition temperature and results in an increase in permeability to ions, sugars and drugs.

In addition to temperature, exposure to proteins can alter the permeability of liposomes. Certain soluble proteins, such as cytochrome c, bind, deform and penetrate the bilayer, thereby causing changes in permeability. Cholesterol inhibits this penetration of proteins, apparently by packing the phospholipids more tightly. It is contemplated that the most useful liposome formations for antibiotic and inhibitor delivery will contain cholesterol.

The ability to trap solutes varies between different types of liposomes. For example, MLVs are moderately efficient at trapping solutes, but SUVs are extremely inefficient. SUVs offer the advantage of homogeneity and reproducibility in

size distribution, however, and a compromise between size and trapping efficiency is offered by large unilamellar vesicles (LUVs). These are prepared by ether evaporation and are three to four times more efficient at solute entrapment than MLVs.

In addition to liposome characteristics, an important determinant in entrapping compounds is the physicochemical properties of the compound itself. Polar compounds are trapped in the aqueous spaces and nonpolar compounds bind to the lipid bilayer of the vesicle. Polar compounds are released through permeation or when the bilayer is broken, but nonpolar compounds remain affiliated with the bilayer unless it is disrupted by temperature or exposure to lipoproteins. Both types show maximum efflux rates at the phase transition temperature.

Liposomes interact with cells *via* four different mechanisms: endocytosis by phagocytic cells of the reticuloendothelial system such as macrophages and neutrophils; adsorption to the cell surface, either by nonspecific weak hydrophobic or electrostatic forces, or by specific interactions with cell-surface components; fusion with the plasma cell membrane by insertion of the lipid bilayer of the liposome into the plasma membrane, with simultaneous release of liposomal contents into the cytoplasm; and by transfer of liposomal lipids to cellular or subcellular membranes, or vice versa, without any association of the liposome contents. It often is difficult to determine which mechanism is operative and more than one may operate at the same time.

The fate and disposition of intravenously injected liposomes depend on their physical properties, such as size, fluidity, and surface charge. They may persist in tissues for h or days, depending on their composition, and half lives in the blood range from min to several h. Larger liposomes, such as MLVs and LUVs, are taken up rapidly by phagocytic cells of the reticuloendothelial system, but physiology of the circulatory system restrains the exit of such large species at most sites. They can exit only in places where large openings or pores exist in the capillary endothelium, such as the sinusoids of the liver or spleen. Thus, these organs are the predominate site of uptake. On the other hand, SUVs show a broader tissue distribution but still are sequestered highly in the liver and spleen. In general, this *in vivo* behavior limits the potential targeting of liposomes to only those organs and tissues accessible to their large size. These include the blood, liver, spleen, bone marrow, and lymphoid organs.

Targeting is generally not a limitation in terms of the present invention. However, should specific targeting be desired, methods are available for this to be accomplished. Antibodies may be used to bind to the liposome surface and to direct the antibody and its drug contents to specific antigenic receptors located on a particular cell-type surface. Carbohydrate determinants (glycoprotein or glycolipid cell-surface components that play a role in cell-cell recognition, interaction and adhesion) may also be used as recognition sites as they have potential in directing liposomes to particular cell types. Mostly, it is contemplated that intravenous injection of liposomal preparations would be used, but other routes of administration are also conceivable.

Alternatively, the invention provides for pharmaceutically-acceptable nanocapsule formulations of the compositions of the present invention. Nanocapsules can generally entrap compounds in a stable and reproducible way (Henry-Michelland *et al.*, 1987; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 1987). To avoid side effects due to intracellular polymeric overloading, such ultrafine particles (sized around 0.1 μm) should be designed using polymers able to be degraded *in vivo*. Biodegradable polyalkyl-cyanoacrylate nanoparticles that meet these requirements are contemplated for use in the present invention. Such particles may be easily made, as described (Couvreur *et al.*, 1980; 1988; zur Muhlen *et al.*, 1998; Zambaux *et al.* 1998; Pinto-Alphandry *et al.*, 1995 and U. S. Patent 5,145,684, specifically incorporated herein by reference in its entirety).

VACCINES

In certain preferred embodiments of the present invention, vaccines are provided. The vaccines will generally comprise one or more pharmaceutical compositions, such as those discussed above, in combination with an immunostimulant. An immunostimulant may be any substance that enhances or potentiates an immune response (antibody and/or cell-mediated) to an exogenous antigen. Examples of immunostimulants include adjuvants, biodegradable microspheres (*e.g.*, polylactic galactide) and liposomes (into which the compound is incorporated; *see e.g.*, Fullerton, U.S. Patent No. 4,235,877). Vaccine preparation is generally described in, for example, M.F. Powell and M.J. Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant

approach)," Plenum Press (NY, 1995). Pharmaceutical compositions and vaccines within the scope of the present invention may also contain other compounds, which may be biologically active or inactive. For example, one or more immunogenic portions of other HSV antigens may be present, either incorporated into a fusion polypeptide or as a separate compound, within the composition or vaccine.

Illustrative vaccines may contain DNA encoding one or more of the polypeptides as described above, such that the polypeptide is generated *in situ*. As noted above, the DNA may be present within any of a variety of delivery systems known to those of ordinary skill in the art, including nucleic acid expression systems, bacteria and viral expression systems. Numerous gene delivery techniques are well known in the art, such as those described by Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998, and references cited therein. Appropriate nucleic acid expression systems contain the necessary DNA sequences for expression in the patient (such as a suitable promoter and terminating signal). Bacterial delivery systems involve the administration of a bacterium (such as *Bacillus-Calmette-Guerrin*) that expresses an immunogenic portion of the polypeptide on its cell surface or secretes such an epitope. In a preferred embodiment, the DNA may be introduced using a viral expression system (e.g., vaccinia or other pox virus, retrovirus, or adenovirus), which may involve the use of a non-pathogenic (defective), replication competent virus. Suitable systems are disclosed, for example, in Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8:17-21, 1990; U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330, and 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88:2838-2848, 1993; and Guzman et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993. Techniques for incorporating DNA into such expression systems are well known to those of ordinary skill in the art. The DNA may also be "naked," as described, for example, in Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993 and reviewed by Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. The uptake of naked DNA may be increased by coating the DNA onto biodegradable beads, which are

efficiently transported into the cells. It will be apparent that a vaccine may comprise both a polynucleotide and a polypeptide component. Such vaccines may provide for an enhanced immune response.

It will be apparent that a vaccine may contain pharmaceutically acceptable salts of the polynucleotides and polypeptides provided herein. Such salts may be prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic bases, including organic bases (*e.g.*, salts of primary, secondary and tertiary amines and basic amino acids) and inorganic bases (*e.g.*, sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts).

While any suitable carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed in the vaccine compositions of this invention, the type of carrier will vary depending on the mode of administration. Compositions of the present invention may be formulated for any appropriate manner of administration, including for example, topical, oral, nasal, intravenous, intracranial, intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular administration. For parenteral administration, such as subcutaneous injection, the carrier preferably comprises water, saline, alcohol, a fat, a wax or a buffer. For oral administration, any of the above carriers or a solid carrier, such as mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, talcum, cellulose, glucose, sucrose, and magnesium carbonate, may be employed. Biodegradable microspheres (*e.g.*, polylactate polyglycolate) may also be employed as carriers for the pharmaceutical compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344 and 5,942,252. Modified hepatitis B core protein carrier systems are also suitable, such as those described in WO/99 40934, and references cited therein, all incorporated herein by reference. One may also employ a carrier comprising the particulate-protein complexes described in U.S. Patent No. 5,928,647, which are capable of inducing a class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses in a host.

Such compositions may also comprise buffers (*e.g.*, neutral buffered saline or phosphate buffered saline), carbohydrates (*e.g.*, glucose, mannose, sucrose or dextrans), mannitol, proteins, polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, bacteriostats, chelating agents such as EDTA or glutathione, adjuvants (*e.g.*, aluminum

hydroxide), solutes that render the formulation isotonic, hypotonic or weakly hypertonic with the blood of a recipient, suspending agents, thickening agents and/or preservatives. Alternatively, compositions of the present invention may be formulated as a lyophilizate. Compounds may also be encapsulated within liposomes using well known technology.

Any of a variety of immunostimulants may be employed in the vaccines of this invention. For example, an adjuvant may be included. Most adjuvants contain a substance designed to protect the antigen from rapid catabolism, such as aluminum hydroxide or mineral oil, and a stimulator of immune responses, such as lipid A, *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* derived proteins. Suitable adjuvants are commercially available as, for example, Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminum salts such as aluminum hydroxide gel (alum) or aluminum phosphate; salts of calcium, iron or zinc; an insoluble suspension of acylated tyrosine; acylated sugars; cationically or anionically derivatized polysaccharides; polyphosphazenes; biodegradable microspheres; monophosphoryl lipid A and quil A. Cytokines, such as GM-CSF or interleukin-2, -7, or -12, may also be used as adjuvants.

Within the vaccines provided herein, the adjuvant composition is preferably designed to induce an immune response predominantly of the Th1 type. High levels of Th1-type cytokines (*e.g.*, IFN- γ , TNF α , IL-2 and IL-12) tend to favor the induction of cell mediated immune responses to an administered antigen. In contrast, high levels of Th2-type cytokines (*e.g.*, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10) tend to favor the induction of humoral immune responses. Following application of a vaccine as provided herein, a patient will support an immune response that includes Th1- and Th2-type responses. Within a preferred embodiment, in which a response is predominantly Th1-type, the level of Th1-type cytokines will increase to a greater extent than the level of Th2-type cytokines. The levels of these cytokines may be readily assessed using standard assays. For a review of the families of cytokines, see Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Preferred adjuvants for use in eliciting a predominantly Th1-type

response include, for example, a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL), together with an aluminum salt. MPL adjuvants are available from Corixa Corporation (Seattle, WA; *see* US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094). CpG-containing oligonucleotides (in which the CpG dinucleotide is unmethylated) also induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,008,200 and 5,856,462. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Another preferred adjuvant is a saponin, preferably QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), which may be used alone or in combination with other adjuvants. For example, an enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and saponin derivative, such as the combination of QS21 and 3D-MPL as described in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described in WO 95/17210.

Other preferred adjuvants include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), the SBAS series of adjuvants (*e.g.*, SBAS-2 or SBAS-4, available from SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) and other aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs), such as those described in pending U.S. Patent Application Serial Nos. 08/853,826 and 09/074,720, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties. Other preferred adjuvants comprise polyoxyethylene ethers, such as those described in WO 99/52549A1.

Any vaccine provided herein may be prepared using well known methods that result in a combination of antigen, immune response enhancer and a suitable carrier or excipient. The compositions described herein may be administered as part of a sustained release formulation (*i.e.*, a formulation such as a capsule, sponge or gel (composed of polysaccharides, for example) that effects a slow release of compound

following administration). Such formulations may generally be prepared using well known technology (*see, e.g.*, Coombes et al., *Vaccine* 14:1429-1438, 1996) and administered by, for example, oral, rectal or subcutaneous implantation, or by implantation at the desired target site. Sustained-release formulations may contain a polypeptide, polynucleotide or antibody dispersed in a carrier matrix and/or contained within a reservoir surrounded by a rate controlling membrane.

Carriers for use within such formulations are biocompatible, and may also be biodegradable; preferably the formulation provides a relatively constant level of active component release. Such carriers include microparticles of poly(lactide-co-glycolide), polyacrylate, latex, starch, cellulose, dextran and the like. Other delayed-release carriers include supramolecular biovectors, which comprise a non-liquid hydrophilic core (*e.g.*, a cross-linked polysaccharide or oligosaccharide) and, optionally, an external layer comprising an amphiphilic compound, such as a phospholipid (*see e.g.*, U.S. Patent No. 5,151,254 and PCT applications WO 94/20078, WO/94/23701 and WO 96/06638). The amount of active compound contained within a sustained release formulation depends upon the site of implantation, the rate and expected duration of release and the nature of the condition to be treated or prevented.

Any of a variety of delivery vehicles may be employed within pharmaceutical compositions and vaccines to facilitate production of an antigen-specific immune response that targets HSV-infected cells. Delivery vehicles include antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells, macrophages, B cells, monocytes and other cells that may be engineered to be efficient APCs. Such cells may, but need not, be genetically modified to increase the capacity for presenting the antigen, to improve activation and/or maintenance of the T cell response, to have anti-HSV effects *per se* and/or to be immunologically compatible with the receiver (*i.e.*, matched HLA haplotype). APCs may generally be isolated from any of a variety of biological fluids and organs and may be autologous, allogeneic, syngeneic or xenogeneic cells.

Certain preferred embodiments of the present invention use dendritic cells or progenitors thereof as antigen-presenting cells. Dendritic cells are highly potent APCs (Banchereau and Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998) and have been shown to be effective as a physiological adjuvant for eliciting prophylactic or therapeutic

immunity (*see* Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). In general, dendritic cells may be identified based on their typical shape (stellate *in situ*, with marked cytoplasmic processes (dendrites) visible *in vitro*), their ability to take up, process and present antigens with high efficiency and their ability to activate naïve T cell responses. Dendritic cells may, of course, be engineered to express specific cell-surface receptors or ligands that are not commonly found on dendritic cells *in vivo* or *ex vivo*, and such modified dendritic cells are contemplated by the present invention. As an alternative to dendritic cells, secreted vesicles antigen-loaded dendritic cells (called exosomes) may be used within a vaccine (*see* Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).

Dendritic cells and progenitors may be obtained from peripheral blood, bone marrow, lymph nodes, spleen, skin, umbilical cord blood or any other suitable tissue or fluid. For example, dendritic cells may be differentiated *ex vivo* by adding a combination of cytokines such as GM-CSF, IL-4, IL-13 and/or TNF α to cultures of monocytes harvested from peripheral blood. Alternatively, CD34 positive cells harvested from peripheral blood, umbilical cord blood or bone marrow may be differentiated into dendritic cells by adding to the culture medium combinations of GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 ligand, LPS, flt3 ligand and/or other compound(s) that induce differentiation, maturation and proliferation of dendritic cells.

Dendritic cells are conveniently categorized as "immature" and "mature" cells, which allows a simple way to discriminate between two well characterized phenotypes. However, this nomenclature should not be construed to exclude all possible intermediate stages of differentiation. Immature dendritic cells are characterized as APC with a high capacity for antigen uptake and processing, which correlates with the high expression of Fc γ receptor and mannose receptor. The mature phenotype is typically characterized by a lower expression of these markers, but a high expression of cell surface molecules responsible for T cell activation such as class I and class II MHC, adhesion molecules (*e.g.*, CD54 and CD11) and costimulatory molecules (*e.g.*, CD40, CD80, CD86 and 4-1BB).

APCs may generally be transfected with a polynucleotide encoding a HSV protein (or portion or other variant thereof) such that the HSV polypeptide, or an

immunogenic portion thereof, is expressed on the cell surface. Such transfection may take place *ex vivo*, and a composition or vaccine comprising such transfected cells may then be used for therapeutic purposes, as described herein. Alternatively, a gene delivery vehicle that targets a dendritic or other antigen presenting cell may be administered to a patient, resulting in transfection that occurs *in vivo*. *In vivo* and *ex vivo* transfection of dendritic cells, for example, may generally be performed using any methods known in the art, such as those described in WO 97/24447, or the gene gun approach described by Mahvi et al., *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997. Antigen loading of dendritic cells may be achieved by incubating dendritic cells or progenitor cells with the HSV polypeptide, DNA (naked or within a plasmid vector) or RNA; or with antigen-expressing recombinant bacterium or viruses (e.g., vaccinia, fowlpox, adenovirus or lentivirus vectors). Prior to loading, the polypeptide may be covalently conjugated to an immunological partner that provides T cell help (e.g., a carrier molecule). Alternatively, a dendritic cell may be pulsed with a non-conjugated immunological partner, separately or in the presence of the polypeptide.

Vaccines and pharmaceutical compositions may be presented in unit-dose or multi-dose containers, such as sealed ampoules or vials. Such containers are preferably hermetically sealed to preserve sterility of the formulation until use. In general, formulations may be stored as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles. Alternatively, a vaccine or pharmaceutical composition may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier immediately prior to use.

IMMUNOTHERAPEUTIC APPLICATIONS

In further aspects of the present invention, the compositions described herein may be used for immunotherapy of HSV infections. Within such methods, pharmaceutical compositions and vaccines are typically administered to a patient. As used herein, a "patient" refers to any warm-blooded animal, preferably a human. The above pharmaceutical compositions and vaccines may be used to prophylactically prevent or ameliorate the extent of infection by HSV or to treat a patient already infected with HSV. Administration may be by any suitable method, including

administration by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal, anal, vaginal, topical, and oral routes.

Within certain embodiments, immunotherapy may be active immunotherapy, in which treatment relies on the *in vivo* stimulation of the endogenous host immune system to react against HSV infection with the administration of immune response-modifying agents (such as polypeptides and polynucleotides as provided herein).

Within other embodiments, immunotherapy may be passive immunotherapy, in which treatment involves the delivery of agents with established HSV-immune reactivity (such as effector cells or antibodies) that can directly or indirectly mediate therapeutic effects and does not necessarily depend on an intact host immune system. Examples of effector cells include T cells as discussed above, T lymphocytes (such as CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and CD4⁺ T-helper lymphocytes), killer cells (such as Natural Killer cells and lymphokine-activated killer cells), B cells and antigen-presenting cells (such as dendritic cells and macrophages) expressing a polypeptide provided herein. T cell receptors and antibody receptors specific for the polypeptides recited herein may be cloned, expressed and transferred into other vectors or effector cells for adoptive immunotherapy. The polypeptides provided herein may also be used to generate antibodies or anti-idiotypic antibodies (as described above and in U.S. Patent No. 4,918,164) for passive immunotherapy.

Effector cells may generally be obtained in sufficient quantities for adoptive immunotherapy by growth *in vitro*, as described herein. Culture conditions for expanding single antigen-specific effector cells to several billion in number with retention of antigen recognition *in vivo* are well known in the art. Such *in vitro* culture conditions typically use intermittent stimulation with antigen, often in the presence of cytokines (such as IL-2) and non-dividing feeder cells. As noted above, immunoreactive polypeptides as provided herein may be used to rapidly expand antigen-specific T cell cultures in order to generate a sufficient number of cells for immunotherapy. In particular, antigen-presenting cells, such as dendritic, macrophage, monocyte, fibroblast and/or B cells, may be pulsed with immunoreactive polypeptides or transfected with one or more polynucleotides using standard techniques well known

in the art. For example, antigen-presenting cells can be transfected with a polynucleotide having a promoter appropriate for increasing expression in a recombinant virus or other expression system. Cultured effector cells for use in therapy must be able to grow and distribute widely, and to survive long term *in vivo*. Studies have shown that cultured effector cells can be induced to grow *in vivo* and to survive long term in substantial numbers by repeated stimulation with antigen supplemented with IL-2 (see, for example, Cheever et al., *Immunological Reviews* 157:177, 1997).

Alternatively, a vector expressing a polypeptide recited herein may be introduced into antigen presenting cells taken from a patient and clonally propagated *ex vivo* for transplant back into the same patient. Transfected cells may be reintroduced into the patient using any means known in the art, preferably in sterile form by intravenous, intracavitary or intraperitoneal.

Routes and frequency of administration of the therapeutic compositions described herein, as well as dosage, will vary from individual to individual, but may be readily established using standard techniques. In one embodiment, between 1 and about 10 doses may be administered over a 52 week period. In another embodiment, about 6 doses are administered, at intervals of about 1 month, and booster vaccinations are typically be given periodically thereafter. Alternate protocols may be appropriate for individual patients.

A suitable dose is an amount of a compound that, when administered as described above, is capable of promoting an anti-HSV immune response, and is preferably at least 10-50% above the basal (*i.e.*, untreated) level. Such response can be monitored, for example, by measuring the anti-HSV antibodies in a patient. Such vaccines should also be capable of causing an immune response that leads to an improved clinical outcome (*e.g.*, more frequent remissions, complete or partial or longer disease-free survival) in vaccinated patients as compared to non-vaccinated patients. In general, for pharmaceutical compositions and vaccines comprising one or more polypeptides, the amount of each polypeptide present in a dose ranges from about 25 µg to 5 mg per kg of host. Suitable dose sizes will vary with the size of the patient, but will typically range from about 0.1 mL to about 5 mL.

In general, an appropriate dosage and treatment regimen provides the

active compound(s) in an amount sufficient to provide therapeutic and/or prophylactic benefit. Such a response can be monitored by establishing an improved clinical outcome (e.g., more frequent remissions, complete or partial, or longer disease-free survival) in treated patients as compared to non-treated patients. Increases in preexisting immune responses to a HSV protein may correlate with an improved clinical outcome. Such immune responses may generally be evaluated using standard proliferation, cytotoxicity or cytokine assays, which may be performed using samples obtained from a patient before and after treatment.

HSV DETECTION AND DIAGNOSIS

In general, HSV may be detected in a patient based on the presence of one or more HSV proteins and/or polynucleotides encoding such proteins in a biological sample (for example, blood, sera, sputum urine and/or other appropriate tissue) obtained from the patient. In other words, such proteins may be used as markers to indicate the presence or absence of HSV in a patient. The binding agents provided herein generally permit detection of the level of antigen that binds to the agent in the biological sample. Polynucleotide primers and probes may be used to detect the level of mRNA encoding a HSV protein, which is also indicative of the presence or absence of HSV infection.

There are a variety of assay formats known to those of ordinary skill in the art for using a binding agent to detect polypeptide markers in a sample. See, e.g., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In general, the presence or absence of HSV in a patient may be determined by contacting a biological sample obtained from a patient with a binding agent and detecting in the sample a level of polypeptide that binds to the binding agent.

In a preferred embodiment, the assay involves the use of binding agent immobilized on a solid support to bind to and remove the polypeptide from the remainder of the sample. The bound polypeptide may then be detected using a detection reagent that contains a reporter group and specifically binds to the binding agent/polypeptide complex. Such detection reagents may comprise, for example, a binding agent that specifically binds to the polypeptide or an antibody or other agent that specifically binds to the binding agent, such as an anti-immunoglobulin, protein G,

protein A or a lectin. Alternatively, a competitive assay may be utilized, in which a polypeptide is labeled with a reporter group and allowed to bind to the immobilized binding agent after incubation of the binding agent with the sample. The extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the binding agent is indicative of the reactivity of the sample with the immobilized binding agent. Suitable polypeptides for use within such assays include full length HSV proteins and portions thereof to which the binding agent binds, as described above.

The solid support may be any material known to those of ordinary skill in the art to which the protein may be attached. For example, the solid support may be a test well in a microtiter plate or a nitrocellulose or other suitable membrane. Alternatively, the support may be a bead or disc, such as glass, fiberglass, latex or a plastic material such as polystyrene or polyvinylchloride. The support may also be a magnetic particle or a fiber optic sensor, such as those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,359,681. The binding agent may be immobilized on the solid support using a variety of techniques known to those of skill in the art, which are amply described in the patent and scientific literature. In the context of the present invention, the term "immobilization" refers to both noncovalent association, such as adsorption, and covalent attachment (which may be a direct linkage between the agent and functional groups on the support or may be a linkage by way of a cross-linking agent). Immobilization by adsorption to a well in a microtiter plate or to a membrane is preferred. In such cases, adsorption may be achieved by contacting the binding agent, in a suitable buffer, with the solid support for a suitable amount of time. The contact time varies with temperature, but is typically between about 1 hour and about 1 day. In general, contacting a well of a plastic microtiter plate (such as polystyrene or polyvinylchloride) with an amount of binding agent ranging from about 10 ng to about 10 μ g, and preferably about 100 ng to about 1 μ g, is sufficient to immobilize an adequate amount of binding agent.

Covalent attachment of binding agent to a solid support may generally be achieved by first reacting the support with a bifunctional reagent that will react with both the support and a functional group, such as a hydroxyl or amino group, on the binding agent. For example, the binding agent may be covalently attached to supports

having an appropriate polymer coating using benzoquinone or by condensation of an aldehyde group on the support with an amine and an active hydrogen on the binding partner (*see, e.g.,* Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13).

In certain embodiments, the assay is a two-antibody sandwich assay. This assay may be performed by first contacting an antibody that has been immobilized on a solid support, commonly the well of a microtiter plate, with the sample, such that polypeptides within the sample are allowed to bind to the immobilized antibody. Unbound sample is then removed from the immobilized polypeptide-antibody complexes and a detection reagent (preferably a second antibody capable of binding to a different site on the polypeptide) containing a reporter group is added. The amount of detection reagent that remains bound to the solid support is then determined using a method appropriate for the specific reporter group.

More specifically, once the antibody is immobilized on the support as described above, the remaining protein binding sites on the support are typically blocked. Any suitable blocking agent known to those of ordinary skill in the art, such as bovine serum albumin or Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The immobilized antibody is then incubated with the sample, and polypeptide is allowed to bind to the antibody. The sample may be diluted with a suitable diluent, such as phosphate-buffered saline (PBS) prior to incubation. In general, an appropriate contact time (*i.e.,* incubation time) is a period of time that is sufficient to detect the presence of polypeptide within a sample obtained from an individual with an HSV infection. Preferably, the contact time is sufficient to achieve a level of binding that is at least about 95% of that achieved at equilibrium between bound and unbound polypeptide. Those of ordinary skill in the art will recognize that the time necessary to achieve equilibrium may be readily determined by assaying the level of binding that occurs over a period of time. At room temperature, an incubation time of about 30 minutes is generally sufficient.

Unbound sample may then be removed by washing the solid support with an appropriate buffer, such as PBS containing 0.1% Tween 20™. The second antibody, which contains a reporter group, may then be added to the solid support.

Preferred reporter groups include those groups recited above.

The detection reagent is then incubated with the immobilized antibody-polypeptide complex for an amount of time sufficient to detect the bound polypeptide. An appropriate amount of time may generally be determined by assaying the level of binding that occurs over a period of time. Unbound detection reagent is then removed and bound detection reagent is detected using the reporter group. The method employed for detecting the reporter group depends upon the nature of the reporter group. For radioactive groups, scintillation counting or autoradiographic methods are generally appropriate. Spectroscopic methods may be used to detect dyes, luminescent groups and fluorescent groups. Biotin may be detected using avidin, coupled to a different reporter group (commonly a radioactive or fluorescent group or an enzyme). Enzyme reporter groups may generally be detected by the addition of substrate (generally for a specific period of time), followed by spectroscopic or other analysis of the reaction products.

To determine the presence or absence of HSV, the signal detected from the reporter group that remains bound to the solid support is generally compared to a signal that corresponds to a predetermined cut-off value. In one embodiment, the cut-off value for the detection of HSV is the average mean signal obtained when the immobilized antibody is incubated with samples from patients without HSV. In an alternate embodiment, the cut-off value is determined using a Receiver Operator Curve, according to the method of Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. Briefly, in this embodiment, the cut-off value may be determined from a plot of pairs of true positive rates (*i.e.*, sensitivity) and false positive rates (100%-specificity) that correspond to each possible cut-off value for the diagnostic test result. The cut-off value on the plot that is the closest to the upper left-hand corner (*i.e.*, the value that encloses the largest area) is the most accurate cut-off value, and a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method may be considered positive. Alternatively, the cut-off value may be shifted to the left along the plot, to minimize the false positive rate, or to the right, to minimize the false negative rate. In general, a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method is considered positive.

In a related embodiment, the assay is performed in a flow-through or strip test format, wherein the binding agent is immobilized on a membrane, such as nitrocellulose. In the flow-through test, polypeptides within the sample bind to the immobilized binding agent as the sample passes through the membrane. A second, labeled binding agent then binds to the binding agent-polypeptide complex as a solution containing the second binding agent flows through the membrane. The detection of bound second binding agent may then be performed as described above. In the strip test format, one end of the membrane to which binding agent is bound is immersed in a solution containing the sample. The sample migrates along the membrane through a region containing second binding agent and to the area of immobilized binding agent. Concentration of second binding agent at the area of immobilized antibody indicates the presence of HSV. Typically, the concentration of second binding agent at that site generates a pattern, such as a line, that can be read visually. The absence of such a pattern indicates a negative result. In general, the amount of binding agent immobilized on the membrane is selected to generate a visually discernible pattern when the biological sample contains a level of polypeptide that would be sufficient to generate a positive signal in the two-antibody sandwich assay, in the format discussed above. Preferred binding agents for use in such assays are antibodies and antigen-binding fragments thereof. Preferably, the amount of antibody immobilized on the membrane ranges from about 25 ng to about 1 µg, and more preferably from about 50 ng to about 500 ng. Such tests can typically be performed with a very small amount of biological sample.

Of course, numerous other assay protocols exist that are suitable for use with the HSV proteins or binding agents of the present invention. The above descriptions are intended to be exemplary only. For example, it will be apparent to those of ordinary skill in the art that the above protocols may be readily modified to use HSV polypeptides to detect antibodies that bind to such polypeptides in a biological sample. The detection of such protein-specific antibodies can allow for the identification of HSV infection.

HSV infection may also, or alternatively, be detected based on the presence of T cells that specifically react with a HSV protein in a biological sample.

Within certain methods, a biological sample comprising CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells isolated from a patient is incubated with a HSV polypeptide, a polynucleotide encoding such a polypeptide and/or an APC that expresses at least an immunogenic portion of such a polypeptide, and the presence or absence of specific activation of the T cells is detected. Suitable biological samples include, but are not limited to, isolated T cells. For example, T cells may be isolated from a patient by routine techniques (such as by Ficoll/Hypaque density gradient centrifugation of peripheral blood lymphocytes). T cells may be incubated *in vitro* for about 2-9 days (typically about 4 days) at 37°C with polypeptide (*e.g.*, 5 - 25 µg/ml). It may be desirable to incubate another aliquot of a T cell sample in the absence of HSV polypeptide to serve as a control. For CD4⁺ T cells, activation is preferably detected by evaluating proliferation of the T cells. For CD8⁺ T cells, activation is preferably detected by evaluating cytolytic activity. A level of proliferation that is at least two fold greater and/or a level of cytolytic activity that is at least 20% greater than in disease-free patients indicates the presence of HSV in the patient.

As noted above, HSV infection may also, or alternatively, be detected based on the level of mRNA encoding a HSV protein in a biological sample. For example, at least two oligonucleotide primers may be employed in a polymerase chain reaction (PCR) based assay to amplify a portion of a HSV cDNA derived from a biological sample, wherein at least one of the oligonucleotide primers is specific for (*i.e.*, hybridizes to) a polynucleotide encoding the HSV protein. The amplified cDNA is then separated and detected using techniques well known in the art, such as gel electrophoresis. Similarly, oligonucleotide probes that specifically hybridize to a polynucleotide encoding a HSV protein may be used in a hybridization assay to detect the presence of polynucleotide encoding the HSV protein in a biological sample.

To permit hybridization under assay conditions, oligonucleotide primers and probes should comprise an oligonucleotide sequence that has at least about 60%, preferably at least about 75% and more preferably at least about 90%, identity to a portion of a polynucleotide encoding a HSV protein that is at least 10 nucleotides, and preferably at least 20 nucleotides, in length. Preferably, oligonucleotide primers and/or probes hybridize to a polynucleotide encoding a polypeptide described herein under

moderately stringent conditions, as defined above. Oligonucleotide primers and/or probes which may be usefully employed in the diagnostic methods described herein preferably are at least 10-40 nucleotides in length. In a preferred embodiment, the oligonucleotide primers comprise at least 10 contiguous nucleotides, more preferably at least 15 contiguous nucleotides, of a DNA molecule having a sequence disclosed herein. Techniques for both PCR based assays and hybridization assays are well known in the art (*see, for example, Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989*).

One preferred assay employs RT-PCR, in which PCR is applied in conjunction with reverse transcription. Typically, RNA is extracted from a biological sample, such as biopsy tissue, and is reverse transcribed to produce cDNA molecules. PCR amplification using at least one specific primer generates a cDNA molecule, which may be separated and visualized using, for example, gel electrophoresis. Amplification may be performed on biological samples taken from a test patient and from an individual who is not infected with HSV. The amplification reaction may be performed on several dilutions of cDNA, for example spanning two orders of magnitude.

As noted above, to improve sensitivity, multiple HSV protein markers may be assayed within a given sample. It will be apparent that binding agents specific for different HSV polypeptides may be combined within a single assay. Further, multiple primers or probes may be used concurrently. The selection of HSV protein markers may be based on routine experiments to determine combinations that results in optimal sensitivity. In addition, or alternatively, assays for HSV proteins provided herein may be combined with assays for other known HSV antigens.

The present invention further provides kits for use within any of the above diagnostic and/or therapeutic methods. Such kits typically comprise two or more components necessary for performing a diagnostic and/or therapeutic assay and will further comprise instructions for the use of said kit. Components may be compounds, reagents, containers and/or equipment. For example, one container within a diagnostic kit may contain a monoclonal antibody or fragment thereof that specifically binds to a HSV protein. Such antibodies or fragments may be provided attached to a support material, as described above. One or more additional containers may enclose elements,

such as reagents or buffers, to be used in the assay. Such kits may also, or alternatively, contain a detection reagent as described above that contains a reporter group suitable for direct or indirect detection of antibody binding.

Alternatively, a kit may be designed to detect the level of mRNA encoding a HSV protein in a biological sample. Such kits generally comprise at least one oligonucleotide probe or primer, as described above, that hybridizes to a polynucleotide encoding a HSV protein. Such an oligonucleotide may be used, for example, within a PCR or hybridization assay. Additional components that may be present within such kits include a second oligonucleotide and/or a diagnostic reagent or container to facilitate the detection of a polynucleotide encoding a HSV protein.

The following Examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

Example 1

Identification of HSV-2 Antigens

The following examples are presented to illustrate certain embodiments of the present invention and to assist one of ordinary skill in making and using the same. The examples are not intended in any way to otherwise limit the scope of the invention.

Source of HSV-2 positive donors: Lymphocytes were obtained from two types of donors: Group A) seropositive donors with unknown clinical status, and Group B) seropositive donors with well characterized clinical status (viral shedding and ano-genital lesion recurrences).

Group A: Blood samples (50 ml) were obtained from 13 potential donors. No information regarding clinical history of HSV-2 infection was requested. The blood was screened for serum antibody against HSV-1 and HSV-2 by Western blot. PBMCs were also screened for specific proliferative T cell responses to HSV-1 and HSV-2 lysate antigens (ABI; Columbia, MD). Three donors (AD104, AD116, and AD120) were positive for HSV-2 serum antibody and their PBMCs specifically proliferated in response to HSV-2 antigen. Leukopheresis PBMC were collected from these donors and cryopreserved in liquid nitrogen.

Group B: Ano-genital lesion biopsies were obtained from donors DK21318 and JR5032. Lesion biopsy lymphocytes were expanded in vitro with IL-2 and PHA in the presence of 50 uM acyclovir and subsequently cryopreserved in liquid nitrogen. Typically 5×10^6 to 5×10^7 lymphocytes are obtained after two weeks. Autologous PBMC were also collected from the blood of DK2318 and JR5032 and cryopreserved in liquid nitrogen.

Generation of CD4+ T cell lines: Cryopreserved PBMCs or lesion-biopsy lymphocytes were thawed and stimulated in vitro with 1 ug/ml HSV-2 antigen (ABI) in RPMI 1640 + 10% human serum + 10 ng/ml IL-7. Irradiated autologous PBMC were added as antigen presenting cells for the lesion biopsy lymphocytes only. Recombinant IL-2 (1 ng/ml) was added on days 1 and 4. The cells were harvested,

washed, and replated in fresh medium containing IL-2 and IL-7 on day 7. Recombinant IL-2 was again added on day 10. The T cells were harvested, washed, and restimulated in vitro with HSV-2 antigen plus irradiated autologous PBMC in the same manner on day 14 of culture. The T cell lines were cryopreserved at 1×10^7 cells/vial in liquid nitrogen on day 11-12 of the secondary stimulation. After thawing, the cryopreserved T cells retained the ability to specifically proliferate to HSV-2 antigen in vitro. These T cells were subsequently used to screen HSV-2 gene-fragment expression cloning libraries prepared in *E. coli*, as described below.

Preparation of HSV-2 (333) DNA: HSV-2 strain 333 virus was grown in Vero cells cultured in roller bottles in 200 ml/bottle of Medium 199 (Gibco) + 5% FCS. Vero cells are transformed African green monkey fibroblast-like cells that were obtained from ATCC (Cat. # CCL-81). Near-confluence Vero cells (10 roller bottles) were infected with HSV-2 strain 333 virus at an MOI of 0.01 in 50 ml/bottle of Medium 199 + 1% FCS. Cells and medium were harvested from the roller bottles and the cells pelleted. The supernatant was saved on ice and the cell pellets were resuspended in fresh Medium 199 + 1% FCS and lysed by 6 cycles of freezing/thawing. The cell debris in the lysates was pelleted and the supernatant pooled with the saved culture supernatant. Virus was pelleted from the pooled supernatants by ultracentrifugation (12,000g, 2 hours, 4°C) and resuspended in 2 ml of fresh Medium 199 + 1% FCS. The virus was further purified on a 5 – 15% linear Ficoll gradient by ultracentrifugation (19,000 g, 2 hours, 4°C) as previously described (Chapter 10: Herpes simplex virus vectors of Molecular Virology: A Practical Approach (1993); Authors: F.J. Rixon and J. McClaughlan, Editors: A.J. Davison and R.M. Elliott; Publisher: Oxford University Press, Inc, New York, N.Y.). The HSV-2 virus-containing band was extracted from the gradient, diluted 10-fold with Medium 199, and the virus pelleted by ultracentrifugation at 19,000 g for 4 hours at 4°C. The virus pellet was recovered and resuspended in 10 ml of Tris/EDTA (TE) buffer. Intact virions were treated with DNase and RNase to remove cellular DNA and RNA. The enzymes were then inactivated by addition of EDTA and incubation at 65°C. DNA was prepared from the gradient-purified virus by lysis of the viral particles with SDS in the presence of EDTA, followed by

phenol/chloroform extraction to purify the genomic viral DNA. HSV-2 DNA was precipitated with EtOH and the DNA pellet was dried and resuspended in 1 ml of Tris/EDTA buffer. The concentration and purity of the DNA was determined by reading the OD 260 and OD 280 on a UV spectrophotometer. Genomic DNA prepared in this manner was used for construction of an HSV-2 genomic fragment expression library in *E. coli*.

Construction of HSV-2 DNA fragment libraries in the pET17b vector:

The HSV2-I library was constructed as follows. DNA fragments were generated by sonicating genomic HSV-2 DNA for 4 seconds at 15% output with a Fisher "60 SonicDismembrator" (Fisher). The sonicated DNA was then precipitated, pelleted, and resuspended in 11 μ L TE buffer. The approximate size of the DNA fragments was measured by agarose gel electrophoresis of 1 μ L of the fragmented HSV-2 genomic DNA vs. 1.5 μ g unsonicated material. The average size of the DNA fragments was determined to be approx. 500 bp when visualized after ethidium bromide staining of the gel. Incomplete DNA fragment ends were filled in (blunted) using T4 DNA polymerase. EcoRI adapters were then ligated to the blunt ends of the DNA fragments using T4 DNA ligase. The DNA was then kinased using T4 Polynucleotide Kinase, purified using a manually loaded column of S-400-HR Sephacryl (Sigma) and ligated into the pET17b expression vector. The HSV2-II library was constructed in a similar fashion. The average size of inserts in this library was determined to be approximately 1000bp.

Generation of the HSV-2 fragment expression library in *E. coli*:

The HSV2-I library was transformed into *E. coli* for preparation of glycerol stocks and testing of HSV-2 DNA insert representation. The DNA was transformed into ElectroMAX DH10B *E. coli* (Gibco) in order to prepare a large quantity of HSV-2/pET17b library DNA. Transformed bacteria were grown up on 3 LB/Ampicillin plates (approx. 750 CFU/plate), a small subset of colonies were picked for sequencing of DNA inserts, and the remaining bacteria from each plate collected as a pool for preparation of plasmid DNA. These pools were named HSV-2 Pools 9, 10 and 11. Glycerol stocks of a portion of these bacterial pools were stored at -80° C. Plasmids were purified from the remainder of the pools. Equal quantities of plasmid DNA from each of the 3 pools was

combined to make a single pool of plasmid DNA. The transformation efficiency of the pooled DNA was empirically determined using JM109(DE3) *E. coli* bacteria. JM109(DE3) bacteria were then transformed with an amount of the final pool of library DNA that was expected to yield 15 colony-forming units (CFU) per plate. The transformed bacteria were then plated on 100 LB/amp plates. Twenty CFU (on average) were actually observed on each of the 100 plates; therefore the pool size of this HSV-2 library was about 20 clones/pool. The bacterial colonies were collected as a pool from each plate in approximately 800 μ l/plate of LB + 20% glycerol. Each pool was distributed equally (200 μ l/well) among four 96-well U-bottom plates and these "master stock" plates were stored at -80°C . The size of this HSV-2 gene-fragment library (hereafter referred to as HSV2I) was therefore 96 pools of 20 clones/pool. Plasmid DNA was prepared from 20 randomly picked colonies and the inserts sequenced. Approximately 15% (3/20) contained HSV-2 DNA as insert, 80% (16/20) contained non-HSV-2 DNA (*E. coli* or Vero cell DNA), and 5% (1/20) contained no insert DNA. The HSV2-II DNA library was transformed into *E. coli* and random colonies analyzed in a similar manner. Relevant differences in the construction of library HSV2-II included the transformation of the HSV-2/pET17b ligation product into NovaBlue (Novagen) chemically competent *E. coli* instead of using electroporation for preparation of a larger quantity of plasmid for pooling and transformation into JM109(DE3) bacteria for empirical evaluation. Additionally, plasmid DNA was prepared from 10 pools averaging 160 colonies/plate. These 10 plasmid pools were combined in an equivalent fashion (normalized based on spectrophotometer readings) into one pool for transformation into JM109(DE3) as per previously, yielding an average of 20 colonies(clones)/plate for harvesting into glycerol stock pools as before. Approximately 25% contained HSV-2 DNA as insert, with the remaining 75% containing *E. coli* DNA as insert.

Induction of the HSV-2 fragment expression library for screening with human CD4+ T cells. One of the master HSV2I library 96-well plates was thawed at room temperature. An aliquot (20 μ L) was transferred from each well to a new 96 well plate containing 180 μ L/well of LB medium + ampicillin. The bacteria were grown up

overnight and then 40 μ l transferred into two new 96-well plates containing 160 μ L 2xYT medium + ampicillin. The bacteria were grown for 1 hr.15 min at 37°C. Protein expression was then induced by addition of IPTG to 200 mM. The bacteria were cultured for an additional 3 hrs. One of these plates was used to obtain spectrophotometer readings to normalize bacterial numbers/well. The second, normalized plate was used for screening with CD4+ T cells after pelleting the bacteria (approx. 2×10^7 /well) and removing the supernatants. The HSV2-II library was grown and induced in a similar fashion.

Preparation of autologous dendritic APC's: Dendritic cells (DCs) were generated by culture of plastic-adherent donor cells (derived from 1×10^8 PBMC) in 6 well plates (Costar 3506) in RPMI 1640 + 10% of a 1:1 mix of FCS:HS + 10 ng/ml GM-CSF + 10 ng/ml IL-4 at 37°C. Non-adherent DCs were collected from plates on day 6 of culture and irradiated with 3300 Rads. The DCs were then plated at 1×10^4 /well in flat-bottom 96-well plates (Costar 3596) and cultured overnight at 37°C. The following day, the DCs were pulsed with the induced HSV2-I or HSV2-II library pools by resuspending the bacterial pellets in 200 μ l RPMI 1640 + 10 %FCS without antibiotics and transferring 10 μ l/well to the wells containing the DCs in 190 μ l of the same medium without antibiotics. The DCs and bacteria were co-cultured for 90 minutes at 37°C. The DCs were then washed and resuspended in 100 μ l/well RPMI 1640 + 10% HS + L-glut. + 50 μ g/ml gentamicin antibiotic.

Preparation of responder T cells: Cryopreserved CD4+ T cell lines were thawed 5 days before use and cultured at 37°C in RPMI 1640 + 10% HS + 1 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-7. After 2 days, the medium was replaced with fresh medium without IL-2 and IL-7.

Primary screening of the HSV2 libraries: The T cells were resuspended in fresh RPMI 1640 + 10% HS and added at 2×10^4 /well to the plates containing the E. coli-pulsed autologous DC's. After 3 days, 100 μ l/well of supernatant was removed and transferred to new 96 well plates. Half of the supernatant was subsequently tested for IFN-gamma content by ELISA and the remainder was stored at -20°C. The T cells were

then pulsed with 1 uCi/well of [3H]-Thymidine (Amersham/Pharmacia; Piscataway, NJ) for about 8 hours at 37°C. The 3H-pulsed cells were then harvested onto UniFilter GF/C plates (Packard; Downers Grove, IL) and the CPM of [3H]-incorporated subsequently measured using a scintillation counter (Top-Count; Packard). ELISA assays were performed on cell supernatants following a standard cytokine-capture ELISA protocol for human IFN-g.

From the HSV2-I library screening with T cells from D104, wells HSV2I_H10 and HSV2I_H12, for which both CPM and IFN-g levels were significantly above background, were scored as positive.

Breakdown of positive HSV2I library pools: The positive wells (HSV2I_H10 and HSV2I_H12) from the initial CD4+ T cell screening experiment were grown up again from the master glycerol stock plate. Forty-eight sub-clones from each pool were randomly picked, grown up and IPTG-induced as described previously. The subclones were screened against the AD104 CD4+ T cell line as described above. A clone (HSV2I_H12A12) from the HSV2I_H12 pool breakdown scored positive. This positive result was verified in a second AD104 CD4+ T cell assay.

Identification of UL39 as a CD4+ T cell antigen: The positive clone (HSV2I_H12A12) was subcloned and 10 clones picked for restriction digest analysis with EcoRI NB#675 pg. 34. All 10 clones contained DNA insert of the same size (approximately 900 bp in length). Three of these clones (HSV2I_H12A12_1, 7, and 8) were chosen for sequencing and all contained identical insert sequences at both the 5' and 3' ends of the inserts. The DNA sequence of the insert is set forth in SEQ ID NO:1, and contains an open reading frame set forth in SEQ ID NO:2. The insert sequence was compared to the complete genomic sequence of HSV-2 strain HGS2 (NCBI site, Accession #Z86099) and the sequence was determined have a high degree of homology to UL39 (a.k.a. ICP6), the large subunit (140 kD) of the HSV ribonucleotide reductase, the sequence of which is set forth in SEQ ID NO:3. The insert sequence set forth in SEQ ID NO: 1 spans nucleotides 876 – 1690 of the UL39 open reading frame (3,432 bp) and encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, which has a high

degree of homology to amino acids 292 – 563 of UL39 (full length = 1143 aa).

Identification of US8A, US3/US4, UL15, UL18, UL27 and UL46 as CD4+ T cell antigens: In a manner essentially identical to that described above for the identification of UL39 as a T cell antigen, an additional HSV2 gene fragment expression cloning library, referred to as HSV2-II, was prepared, expressed in E. coli, and screened with donor T cells.

Screening the HSV2-II library with T cells from donor AD116 identified the clone HSV2II_US8AfragD6.B_B11_T7Trc.seq, determined to have an insert sequence set forth in SEQ ID NO:4, encoding open reading frames having amino acid sequences set forth in SEQ ID NO:5 and 6, with the sequence of SEQ ID NO:5 having a high degree of homology with the HSV2 US8A protein, the sequence of which is set forth in SEQ ID NO:7.

In addition, screening the HSV2-II library with T cells from donor AD104 identified the following clone inserts:

SEQ ID NO:8, corresponding to clone HSV2II_US3/US4 fragF10B3_T7Trc.seq, containing a potential open reading frame having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10;

SEQ ID NO:9, corresponding to clone HSV2II_US3/US4 fragF10B3_T7P.seq, containing an open reading frame having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 11, sharing a high degree of homology with the HSV-2 US3 protein (SEQ ID NO: 12);

SEQ ID NO:13, corresponding to clone HSV2II_UL46fragF11F5_T7Trc.seq, containing an open reading frame having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 14, sharing a high degree of homology with the HSV-2 UL46 protein (SEQ ID NO: 15);

SEQ ID NO:16, corresponding to clone HSV2II_UL27frag-H2C7_T7Trc.seq, containing an open reading frame having an amino acid sequence set

forth in SEQ ID NO:17, sharing a high degree of homology with the HSV-2 UL27 protein (SEQ ID NO:18);

SEQ ID NO:19, corresponding to clone HSV2II_UL18fragF10A1_rc.seq, containing open reading frames having amino acid sequences set forth in SEQ ID NO:20, 21 and 22, with SEQ ID NO:22 sharing a high degree of homology with the HSV-2 UL18 protein (SEQ ID NO: 23); and

SEQ ID NO:24, corresponding to clone HSV2II_UL15fragF10A12_rc.seq, containing an open reading frame having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 25, sharing a high degree of homology with the HSV-2 UL15 protein (SEQ ID NO: 26).

EXAMPLE 2

Identification of HSV-2 Antigens

CD4⁺ T cells from AD104 were found to recognize inserts from clones HSV2II_UL46fragF11F5_T7Trc.seq (SEQ ID NO: 13) and HSV2II_UL18fragF10A1_rc.seq (SEQ ID NO: 19) as described in detail in Example 1. The sequences from these clones share a high degree of homology to the HSV2-I genes, UL46 (SEQ ID NO: 15) and UL18 (SEQ ID NO:23), respectively. Therefore to further characterize the epitopes recognized by these T cells, overlapping 15-mer peptides were made across the clone insert fragments of UL18 and UL46. Peptide recognition by AD104's CD4⁺ T cells was tested in a 48 hour IFN- γ ELISPOT assay. ELISPOTS were performed by adding 1×10^4 autologous EBV-transformed B cells (LCL) or DCs per well in 96 well ELISPOT plates. 2×10^4 AD104 CD4⁺ T cells from AD104's line were added per well with 5 μ g/ml of the HSV2 peptides. AD104 CD4⁺ T cells recognized peptides 20 and 21 (SEQ ID NO: 32 and 33) of UL18, and peptides 1, 4, 9, 10, and 20 of UL46 (SEQ ID NO: 27-31).

EXAMPLE 3

Identification of HSV-2 Antigens

CD4+ T cell lines were generated from DK2318 and JR5032 lesion-biopsy. The CD4+ lymphocytes were stimulated twice in vitro on irradiated autologous PBMC and HSV2 antigen as described in example 1. The lines were tested for their antigen specificity as described in example 1 and cryopreserved. The CD4+ T cell lines were screened against the HSV2-II expression-cloning library generated in Example 1.

DK2318 was shown to react with clones C12 and G10. Clone C12 was determined to have an insert sequence set forth in SEQ ID NO:36. This insert was found to have sequence homology with fragments of 2 HSV-II genes, nucleotides 723-1311 of UL23 and nucleotides 1-852 of UL22. These sequences correspond to amino acids 241-376 of UL23 as set forth in SEQ ID NO:40 and amino acids 1-284 as set forth in SEQ ID NO:41. The DNA sequence of SEQ ID NO:36 was searched against public databases including Genbank and shown to have a high degree of sequence homology to the HSV2 genes UL23 and UL22 set forth in SEQ ID NO:37 and 38 respectively. The protein sequences encoded by SEQ ID NO:37 and 38 are set forth in SEQ ID NO:39 and 45. Clone G10 was determined to have an insert sequence which is set forth in SEQ ID NO:48, encoding open reading frames having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:50, with the sequence of SEQ ID NO:48 having a high degree of sequence homology with HSV2 UL37, the sequence of which is set forth in SEQ ID NO:49, encoding open reading frames having the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO:51. DK2318's CD4+ T cell line was screened against overlapping 15 mers covering the UL23 protein. DK2318's CD4 line was shown to react against three UL23 specific peptides (SEQ ID NO:41-43) suggesting that UL23 is a target.

The CD4+ T cell line generated from JR5032 was found to react with clone E9 which contained an insert sequence set forth in SEQ ID NO: 34, encoding open reading frames having amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 46, with SEQ ID NO: 34 having a high degree of sequence homology with HSV2 RL2 (also referred to as ICP0), the sequence of which is set forth in SEQ ID NO:35, encoding an open reading frame having the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO:47.

EXAMPLE 4

CHARACTERIZATION OF CD4 CLONES F11F5 AND G10A9

Examples 2 and 3 describe the generation of CD4 T cell lines from donors AD104 and DK2313 which were screened against cDNA libraries generated using the HSV-2 333 strain. AD104 was found to react against the clone HSV2II_UL46fragF11F5. This insert was partially sequenced with the sequence being disclosed in SEQ ID NO:13. Full length sequencing of the insert revealed that it encoded a fragment of UL46 which was derived from the HSV-2 333 strain. The DNA and amino acid sequences from this insert are disclosed in SEQ ID NO:52 and 54, respectively.

DK2312 was found to react against the clone G10. This insert was partially sequenced and the sequence was disclosed in SEQ ID NO:48. Full length sequencing revealed that it encoded a fragment of UL37 which was derived from the HSV-2 333 strain. The DNA and amino acid sequences from this insert are disclosed in SEQ ID NO:53 and 55, respectively.

EXAMPLE 5

IDENTIFICATION OF CD8-SPECIFIC IMMUNOREACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM HSV-2.

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from the normal donors AD104, AD116, AD120, and D477. These donors were HLA typed using low-resolution DNA-typing methodology and the results are presented in Table 2.

Table 2

DONOR	AD104	AD116	AD120	D477
HLA-A	24, 33	0206, 24	0211, 3303	0201, 2501
HLA-B	45, 58	0702, 35	1505, 4403	1501, 5101
HLA-C	01, 0302	0702, 1203	0303, 0706	0304, 12

In order to determine which epitopes of HSV-2 were immunoreactive, synthetic peptides were synthesized. These peptides were 15 amino acids in length overlapping by 11 amino acids. The peptides were synthesized across the following regions of the following HSV-2 genes: UL15 (aa 600-734), UL18 (aa 1-110), UL23 (aa

241-376), UL46 (aa 617-722), US3 (aa125-276), and US8A (aa 83-146).

CD8⁺ T cells were purified from the PBMC of each of the donors described above using negative selection. The purified CD8⁺ T cells were then tested for their reactivity against the HSV-2 specific peptides. Co-cultures containing 2×10^5 CD8⁺ T cells, 1×10^4 autologous dendritic cells and 10 μ g/ml of a peptide pool (on average containing 10 peptides/pool) were established in 96 well ELISPOT plates that had been pre-coated with anti-human IFN- γ antibody (1D1K: mAbTech). After 24 hours, the ELISPOT plates were developed using a standard protocol well known to one of skill in the art. The number of spots per well were then counted using an automated video microscopy ELISPOT plate reader. CD8⁺ T cells from donors demonstrating a positive response against a peptide pool were then subsequently tested against the individual peptides in that pool in a second ELISPOT assay. The results of peptide reactivity are presented in Table 3.

Table 3.

Donor	HSV-2 Gene	Peptide # (amino acid numbering)	SEQ ID NO
AD104	US3	#33 (262-276)	63
AD116	UL15	#23(688-702)	56
		#30(716-730)	57
	UL23	#7(265-279)	58
	UL46	#2(621-635)	59
		#8(645-659)	60
		#9(649-663)	61
		#11(657-671)	62
	US8A	#5(99-113)	64
AD120	UL46	Peptides: #1-12	-
D477	UL18	Peptides: #1-12	-
	UL23	Peptides: #1-20	-
	UL46	Peptides: #1-12	-

Those skilled in the art will appreciate that the conceptions and specific embodiments disclosed in the foregoing description may be readily utilized as a basis for modifying or designing other embodiments for carrying out the same purposes of the present invention. Those skilled in the art will also appreciate that such equivalent embodiments do not depart from the spirit and scope of the invention as set forth in the appended claims.

Claims

What is Claimed:

1. An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of an HSV antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 2-3, 5-7, 10-12, 14-15, 17-18, 20-23, 25-26, 39-41, 45-47, 50-51, and 54-55.
2. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
3. An isolated polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide comprises a sequence set forth in any one of SEQ ID NO: 1, 4, 8-9, 13, 16, 19, 24, 34-38, 48-49, and 52-53.
4. An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of a HSV UL46 antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 15, and wherein said immunogenic portion is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 27-33 and 59-62.
5. An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of a HSV UL15 antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 26, and wherein said immunogenic portion is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 56-57.
6. An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of a HSV US3 antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 12, and wherein said immunogenic portion comprises SEQ ID NO: 63.
7. An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of a HSV US8A antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7, and wherein said immunogenic portion comprises SEQ ID NO: 64.

8. A fusion protein comprising a polypeptide according to claim 1 and a fusion partner.

9. A fusion protein according to claim 8, wherein the fusion partner comprises an expression enhancer that increases expression of the fusion protein in a host cell transfected with a polynucleotide encoding the fusion protein.

10. A fusion protein according to claim 8, wherein the fusion partner comprises a T helper epitope that is not present within the polypeptide of claim 1.

11. A fusion protein according to claim 8, wherein the fusion partner comprises an affinity tag.

12. An isolated polynucleotide encoding a fusion protein according to claim 8.

13. An isolated monoclonal or polyclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, that specifically binds to a polypeptide of claim 1.

14. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide according to claim 1 or a polynucleotide encoding said polypeptide, and a physiologically acceptable carrier.

15. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide according to claim 1, or a polynucleotide encoding said polypeptide, and an immunostimulant.

16. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the immunostimulant is selected from the group consisting of a monophosphoryl lipid A, aminoalkyl glucosaminide phosphate, saponin, or a combination thereof.

17. A method for stimulating an immune response in a patient,

WO 02/02131

PCT/US01/20981

111

comprising administering to a patient a pharmaceutical composition according to any one of claims 14-16.

18. A method for detecting HSV infection in a patient, comprising:

- (a) obtaining a biological sample from the patient;
- (b) contacting the sample with a polypeptide according to claim 1;

and

- (c) detecting the presence of antibodies that bind to the polypeptide.

19. The method according to claim 18, wherein the biological sample is selected from the group consisting of whole blood, serum, plasma, saliva, cerebrospinal fluid and urine.

20. A method for detecting HSV infection in a biological sample, comprising:

- (a) contacting the biological sample with a binding agent which is capable of binding to a polypeptide according to claim 1; and
- (b) detecting in the sample a polypeptide that binds to the binding agent, thereby detecting HSV infection in the biological sample.

21. The method of claim 20, wherein the binding agent is a monoclonal antibody.

22. The method of claim 20, wherein the binding agent is a polyclonal antibody.

23. The method of claim 20 wherein the biological sample is selected from the group consisting of whole blood, sputum, serum, plasma, saliva, cerebrospinal fluid and urine.

24. A diagnostic kit comprising a component selected from the group consisting of:

- (a) a polypeptide according to claim 1;
- (b) a fusion protein according to claim 8;
- (c) at least one antibody, or antigen-binding fragment thereof, according to claim 13; and
- (d) a detection reagent.

25. The kit according to claim 24, wherein the polypeptide is immobilized on a solid support.

26. The kit according to claim 24, wherein the detection reagent comprises a reporter group conjugated to a binding agent.

27. The kit of claim 26, wherein the binding agent is selected from the group consisting of anti-immunoglobulins, Protein G, Protein A and lectins.

28. The kit of claim 26, wherein the reporter group is selected from the group consisting of radioisotopes, fluorescent groups, luminescent groups, enzymes, biotin and dye particles.

29. A method for treating HSV infection in a patient, comprising the steps of:

- (a) obtaining peripheral blood cells from the patient;
- (b) incubating the cells in the presence of at least one polypeptide according to claim 1, such that T cells proliferate; and
- (c) administering to the patient the proliferated T cells.

30. The method of claim 29, wherein the step of incubating the T cells is repeated one or more times.

31. The method of claim 29, wherein step (a) further comprises

WO 02/02131

PCT/US01/20981

113

separating T cells from the peripheral blood cells, and the cells incubated in step (b) are the T cells.

32. The method of claim 29, wherein step (a) further comprises separating CD4+ cells or CD8+ T cells from the peripheral blood cells, and the cells proliferated in step (b) are CD4+ or CD8+ T cells.

33. The method of claim 29, wherein step (a) further comprises separating gamma/delta T lymphocytes from the peripheral blood cells, and the cells proliferated in step (b) are gamma/delta T lymphocytes.

34. The method of claim 29, wherein step (b) further comprises cloning one or more T cells that proliferated in the presence of the polypeptide.

35. A pharmaceutical composition for the treatment of HSV infection in a patient, comprising T cells proliferated in the presence of a polypeptide of claim 1, in combination with a physiologically acceptable carrier.

36. A method for treating HSV infection in a patient, comprising the steps of:

- (a) incubating antigen presenting cells in the presence of at least one polypeptide of claim 1;
- (b) administering to the patient the incubated antigen presenting cells.

37. The method of claim 36, wherein the antigen presenting cells are selected from the group consisting of dendritic cells, macrophage cells, B cells, fibroblast cells, monocyte cells, and stem cells.

38. A pharmaceutical composition for the treatment of HSV infection in a patient, comprising antigen presenting cells incubated in the presence of a polypeptide of claim 1, in combination with a physiologically acceptable carrier.

WO 02/02131

PCT/US01/20981

1

SEQUENCE LISTING

<110> Corixa Corporation
Hosken, Nancy Ann
Day, Craig
Dillon Davin C.
McGowan, Patrick
Sleath, Paul R.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND
TREATMENT OF HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

<130> 210121.538PC

<140> PCT

<141> 2001-06-28

<160> 64

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 815

<212> DNA

<213> Herpes simplex virus

<400> 1
ccacgcccgc gcaccccagg cggacgtggc gccggttctg gacagccagc ccactgtggg 60
aacggacccc ggctacccag tcccctaga actcaagccc gagaacgagg aggcggtggc 120
gccgtttctg ggggacgccc togacccgga gcccgcgctc atgctggagt acttctgtcg 180
gtgcccgcgc gaggagagca agcgcgtggc cccacgaacc ttgggcagcg ccccgcgcct 240
cacggaggac gactttgggc tccfgaacta cgcgcgcgtc gagatgcgac gccctgtgct 300
ggacottccc ccgttccccc ccaacgcata cagcgcctat catctgaggg agtalgcgac 360
gccgctgggtt aacgggttca aacccctggg gccggcgctc gcccgccctg atcgatccct 420
gggatttctg gttcacctgc gcatccgtac ccgggaggcc tcccttgagg aatggatggc 480
ctccaaggag gtggacctgg acttcgggct gacggaagg cttgcggaac acgaggccca 540
gctaagtatc ctggcccagg cccggaaccc ctacgactgt ctgatccaca gcaccccgaa 600
cacgctctgc gacggggggc tycagtgggc gctgaagtac gaagagtttt aactccagcg 660
cttcggcggg cactacatgg agtcggtctt ccagatgtac acccgcatcg ccgggttccct 720
ggcgtgccgg gcgacccgag gcatcgccca catcgccctg gggcgacagg ggtcgtggtg 780
ggaaatgttc aagttctttt tccaccgcct ctacg 815

<210> 2

<211> 271

<212> PRT

<213> Herpes simplex virus

<400> 2

His Ala Ala Ala Pro Gln Ala Asp Val Ala Pro Val Leu Asp Ser Gln
1 5 10 15
Pro Thr Val Gly Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Val Pro Leu Glu Leu Thr
20 25 30
Pro Glu Asn Ala Glu Ala Val Ala Arg Phe Leu Gly Asp Ala Val Asp
35 40 45
Arg Glu Pro Ala Leu Met Leu Glu Tyr Phe Cys Arg Cys Ala Arg Glu
50 55 60
Glu Ser Lys Arg Val Pro Pro Arg Thr Phe Gly Ser Ala Pro Arg Leu

WO 02/02131

PCT/US01/20981

2

```

65      70      75      80
Thr Glu Asp Asp Phe Gly Leu Leu Asn Tyr Ala Leu Ala Glu Met Arg
      85      90      95
Arg Leu Cys Leu Asp Leu Pro Pro Val Pro Pro Asn Ala Tyr Thr Pro
      100      105      110
Tyr His Leu Arg Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Val Asn Gly Phe Lys Pro
      115      120      125
Leu Val Arg Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Arg Ile Leu Gly Ile Leu Val
      130      135      140
His Leu Arg Ile Arg Thr Arg Glu Ala Ser Phe Glu Glu Trp Met Arg
      145      150      155
Ser Lys Glu Val Asp Leu Asp Phe Gly Leu Thr Glu Arg Leu Arg Glu
      160      165      170
His Glu Ala Gln Leu Met Ile Leu Ala Gln Ala Leu Asn Pro Tyr Asp
      175      180      185
Cys Leu Ile His Ser Thr Pro Asn Thr Leu Val Glu Arg Gly Leu Gln
      190      195      200
Ser Ala Leu Lys Tyr Glu Glu Phe Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly His
      205      210      215
Tyr Met Glu Ser Val Phe Gln Met Tyr Thr Arg Ile Ala Gly Phe Leu
      220      225      230
Ala Cys Arg Ala Thr Arg Gly Met Arg His Ile Ala Leu Gly Arg Gln
      235      240      245
Gly Ser Trp Trp Glu Met Phe Lys Phe Phe His Arg Leu Tyr
      245      250      255
      260      265      270

```

```

<210> 3
<211> 1142
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

```

```

<400> 3
Met Ala Asn Arg Pro Ala Ala Ser Ala Leu Ala Gly Ala Arg Ser Pro
1      5      10      15
Ser Glu Arg Gln Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Ala Pro Pro Gly Gly
20      25      30
Asp His Val Phe Cys Arg Lys Val Ser Gly Val Met Val Leu Ser Ser
35      40      45
Asp Pro Pro Gly Pro Ala Ala Tyr Arg Ile Ser Asp Ser Ser Phe Val
50      55      60
Gln Cys Gly Ser Asn Cys Ser Met Ile Ile Asp Gly Asp Val Ala Arg
65      70      75      80
Gly His Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Thr Ser Thr Gly Ala Phe Val
85      90      95
Ala Ile Ser Asn Val Ala Ala Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ala Val Val
100      105      110
Ala Leu Gly Gly Thr Ser Gly Pro Ser Ala Thr Thr Ser Val Gly Thr
115      120      125
Gln Thr Ser Gly Glu Phe Leu His Gly Asn Pro Arg Thr Pro Glu Pro
130      135      140
Gln Gly Pro Gln Ala Val Pro Pro Pro Pro Pro Phe Pro Trp
145      150      155
Gly His Glu Cys Cys Ala Arg Arg Asp Ala Arg Gly Gly Ala Glu Lys
160      165      170
Asp Val Gly Ala Ala Glu Ser Trp Ser Asp Gly Pro Ser Ser Asp Ser
175      180      185
Glu Thr Glu Asp Ser Asp Ser Asp Glu Asp Thr Gly Ser Glu Thr
190      195      200      205

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

3

Leu Ser Arg Ser Ser Ser Ile Trp Ala Ala Gly Ala Thr Asp Asp Asp
210 215 220
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Arg Ser Asp Asp Ser Val Gln Pro Asp Val
225 230 235 240
Val Val Arg Arg Arg Trp Ser Asp Gly Pro Ala Pro Val Ala Phe Pro
245 250 255
Lys Pro Arg Arg Pro Gly Asp Ser Pro Gly Asn Pro Gly Leu Gly Ala
260 265 270
Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ala Thr Asp Pro Arg Ala Ser Ala Asp Ser
275 280 285
Asp Ser Ala Ala His Ala Ala Ala Pro Gln Ala Asp Val Ala Pro Val
290 295 300
Leu Asp Ser Gln Pro Thr Val Gly Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Val Pro
305 310 315 320
Leu Glu Leu Thr Pro Glu Asn Ala Glu Ala Val Ala Arg Phe Leu Gly
325 330 335
Asp Ala Val Asp Arg Glu Pro Ala Leu Met Leu Glu Tyr Phe Cys Arg
340 345 350
Cys Ala Arg Glu Glu Ser Lys Arg Val Pro Pro Arg Thr Phe Gly Ser
355 360 365
Ala Pro Arg Leu Thr Glu Asp Asp Phe Gly Leu Leu Asn Tyr Ala Leu
370 375 380
Ala Glu Met Arg Arg Leu Cys Leu Asp Leu Pro Pro Val Pro Pro Asn
385 390 395 400
Ala Tyr Thr Pro Tyr His Leu Arg Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Val Asn
405 410 415
Gly Phe Lys Pro Leu Val Arg Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Arg Ile Leu
420 425 430
Gly Val Leu Val His Leu Arg Ile Arg Thr Arg Glu Ala Ser Phe Glu
435 440 445
Glu Trp Met Arg Ser Lys Glu Val Asp Leu Asp Phe Gly Leu Thr Glu
450 455 460
Arg Leu Arg Glu His Glu Ala Gln Leu Met Ile Leu Ala Gln Ala Leu
465 470 475 480
Asn Pro Tyr Asp Cys Leu Ile His Ser Thr Pro Asn Thr Leu Val Glu
485 490 495
Arg Gly Leu Gln Ser Ala Leu Lys Tyr Glu Glu Phe Tyr Leu Lys Arg
500 505 510
Phe Gly Gly His Tyr Met Glu Ser Val Phe Gln Met Tyr Thr Arg Ile
515 520 525
Ala Gly Phe Leu Ala Cys Arg Ala Thr Arg Gly Met Arg His Ile Ala
530 535 540
Leu Gly Arg Gln Gly Ser Trp Trp Glu Met Phe Lys Phe Phe Phe His
545 550 555 560
Arg Leu Tyr Asp His Gln Ile Val Pro Ser Thr Pro Ala Met Leu Asn
565 570 575
Leu Gly Thr Arg Asn Tyr Tyr Thr Ser Ser Cys Tyr Leu Val Asn Pro
580 585 590
Gln Ala Thr Thr Asn Gln Ala Thr Leu Arg Ala Ile Thr Gly Asn Val
595 600 605
Ser Ala Ile Leu Ala Arg Asn Gly Gly Ile Gly Leu Cys Met Gln Ala
610 615 620
Phe Asn Asp Ala Ser Pro Gly Thr Ala Ser Ile Met Pro Ala Leu Lys
625 630 635 640
Val Leu Asp Ser Leu Val Ala Ala His Asn Lys Gln Ser Thr Arg Pro
645 650 655
Thr Gly Ala Cys Val Tyr Leu Glu Pro Trp His Ser Asp Val Arg Ala
660 665 670

WO 02/02131

PCT/US01/20981

4

Val Leu Arg Met Lys Gly Val Leu Ala Gly Glu Glu Ala Gln Arg Cys
 675 680 685
 Asp Asn Ile Phe Ser Ala Leu Trp Met Pro Asp Leu Phe Phe Lys Arg
 690 695 700
 Leu Ile Arg His Leu Asp Gly Glu Lys Asn Val Thr Trp Ser Leu Phe
 705 710 715 720
 Asp Arg Asp Thr Ser Met Ser Leu Ala Asp Phe His Gly Glu Glu Phe
 725 730 735
 Glu Lys Leu Tyr Glu His Leu Glu Ala Met Gly Phe Gly Glu Thr Ile
 740 745 750
 Pro Ile Gln Asp Leu Ala Tyr Ala Ile Val Arg Ser Ala Ala Thr Thr
 755 760 765
 Gly Ser Pro Phe Ile Met Phe Lys Asp Ala Val Asn Arg His Tyr Ile
 770 775 780
 Tyr Asp Thr Gln Gly Ala Ala Ile Ala Gly Ser Asn Leu Cys Thr Glu
 785 790 795 800
 Ile Val His Pro Ala Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Cys Asn Leu Gly
 805 810 815
 Ser Val Asn Leu Ala Arg Cys Val Ser Arg Gln Thr Phe Asp Phe Gly
 820 825 830
 Arg Leu Arg Asp Ala Val Gln Ala Cys Val Leu Met Val Asn Ile Met
 835 840 845
 Ile Asp Ser Thr Leu Gln Pro Thr Pro Gln Cys Thr Arg Gly Asn Asp
 850 855 860
 Asn Leu Arg Ser Met Gly Ile Gly Met Gln Gly Leu His Thr Ala Cys
 865 870 875 880
 Leu Lys Met Gly Leu Asp Leu Glu Ser Ala Glu Phe Arg Asp Leu Asn
 885 890 895
 Thr His Ile Ala Glu Val Met Leu Leu Ala Ala Met Lys Thr Ser Asn
 900 905 910
 Ala Leu Cys Val Arg Gly Ala Arg Pro Phe Ser His Phe Lys Arg Ser
 915 920 925
 Met Tyr Arg Ala Gly Arg Phe His Trp Glu Arg Phe Ser Asn Ala Ser
 930 935 940
 Pro Arg Tyr Glu Gly Glu Trp Glu Met Leu Arg Gln Ser Met Met Lys
 945 950 955 960
 His Gly Leu Arg Asn Ser Gln Phe Ile Ala Leu Met Pro Thr Ala Ala
 965 970 975
 Ser Ala Gln Ile Ser Asp Val Ser Glu Gly Phe Ala Pro Leu Phe Thr
 980 985 990
 Asn Leu Phe Ser Lys Val Thr Arg Asp Gly Glu Thr Leu Arg Pro Asn
 995 1000 1005
 Thr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Glu Arg Thr Phe Gly Gly Lys Arg Leu
 1010 1015 1020
 Leu Asp Ala Met Asp Gly Leu Glu Ala Lys Gln Trp Ser Val Ala Gln
 1025 1030 1035 1040
 Ala Leu Pro Cys Leu Asp Pro Ala His Pro Leu Arg Arg Phe Lys Thr
 1045 1050 1055
 Ala Phe Asp Tyr Asp Gln Glu Leu Leu Ile Asp Leu Cys Ala Asp Arg
 1060 1065 1070
 Ala Pro Tyr Val Asp His Ser Gln Ser Met Thr Leu Tyr Val Thr Glu
 1075 1080 1085
 Lys Ala Asp Gly Thr Leu Pro Ala Ser Thr Leu Val Arg Leu Leu Val
 1090 1095 1100
 His Ala Tyr Lys Arg Gly Leu Lys Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Lys Val
 1105 1110 1115 1120
 Arg Lys Ala Thr Asn Ser Gly Val Phe Ala Gly Asp Asp Asn Ile Val
 1125 1130 1135

WO 02/02131

PCT/US01/20981

5

Cys Thr Ser Cys Ala Leu
1140

<210> 4
<211> 208
<212> DNA
<213> Herpes simplex virus

<400> 4
gcgcgcgcgc cgcgtgcgcg agaccacctc gcgcgcgcgc cccgcgcgcg ttccocgtgg 60
ccctccacgc cgtggacgccc cctcccaat tcgtcacctg gctgcgcgtg cgtgcgtgc 120
ggggggcggt gggtctcggg gcgtctctgt gcgggattgc gttttacgtg acgtcaatcg 180
cccgaggcgc ataaaggtcc gcgcgcga 208

<210> 5
<211> 64
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 5
Gly Ala Ala Pro Ala Cys Arg Arg Pro Pro Arg Gly Gly Ser Pro Ala
1 5 10 15
Ala Phe Pro Val Ala Leu His Ala Val Asp Ala Pro Ser Gln Phe Val
20 25 30
Thr Trp Leu Ala Val Arg Trp Leu Arg Gly Ala Val Gly Leu Gly Ala
35 40 45
Val Leu Cys Gly Ile Ala Phe Tyr Val Thr Ser Ile Ala Arg Gly Ala
50 55 60

<210> 6
<211> 70
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 6
Arg Arg Ala Arg Val Pro Gln Thr Thr Ser Arg Arg Leu Pro Arg Gly
1 5 10 15
Leu Ser Arg Gly Pro Pro Arg Arg Gly Arg Pro Leu Pro Ile Arg His
20 25 30
Leu Ala Arg Arg Ala Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ser Arg Gly Arg
35 40 45
Pro Val Arg Asp Cys Val Leu Arg Asp Val Asn Arg Pro Arg Arg Ile
50 55 60
Lys Val Arg Arg Pro Ala
65 70

<210> 7
<211> 146
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 7
Met Asp Pro Ala Leu Arg Ser Tyr His Gln Arg Leu Arg Leu Tyr Thr
1 5 10 15
Pro Ile Ala Arg Gly Val Asn Leu Ala Ala Arg Ser Pro Pro Leu Val
20 25 30
Arg Glu Ala Arg Ala Val Val Thr Pro Arg Pro Pro Ile Arg Pro Ser
35 40 45

WO 02/02131

PCT/US01/20981

6

Ser Gly Lys Ala Ser Ser Asp Asp Ala Asp Val Gly Asp Glu Leu Ile
 50 55 60
 Ala Ile Ala Asp Ala Arg Gly Asp Pro Pro Glu Thr Leu Pro Pro Gly
 65 70 75 80
 Ala Gly Gly Ala Ala Pro Ala Cys Arg Arg Pro Pro Arg Gly Gly Ser
 85 90 95
 Pro Ala Ala Phe Pro Val Ala Leu His Ala Val Asp Ala Pro Ser Gln
 100 105 110
 Phe Val Thr Trp Leu Ala Val Arg Trp Leu Arg Gly Ala Val Gly Leu
 115 120 125
 Gly Ala Val Leu Cys Gly Ile Ala Phe Tyr Val Thr Ser Ile Ala Arg
 130 135 140
 Gly Ala
 145
 <210> 8
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus
 <400> 8
 cccacccgcc cccccacagg cggcgcgtgc ggagggcggc ccgtgcgtcc ccccggtccc 60
 cgcgggcgcc ccgtggcgct cggtgccccc ggtatggtat tccgccccca acccggggtt 120
 tcgtggcctg cgtttcc 137
 <210> 9
 <211> 430
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus
 <400> 9
 atggaccggg aggcacttcg ggccatcagc cgcgggtgca agcccccttc gaccctggca 60
 aaactggtga cgggctggg attcgcgac caccgagcgc tcatcccggg gtcggagggg 120
 tgtgtctttg atagcagcca cccgaactac cctcatcggt taatcgtcaa ggcgggggtg 180
 tacgccagca cgaaccacga ggcgcggtcg ctgagacgcc tgaaccaccc cgcgatccta 240
 cccctcctgg acctgcacgt cgtttctggg gtcacgtgtc tggtcctccc caagtatcac 300
 tgcgacctgt atacctatct gagcaagcgc ccgtctcgt tgggccaact acagataacc 360
 gcggtctccc ggcagctctt gagcgccatc gactacgtcc actgcgaagg catcatccac 420
 cgcgatatta 430
 <210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus
 <400> 10
 Trp Thr Gly Arg His Phe Gly Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ser Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Pro Trp Gln Asn Trp
 20
 <210> 11
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus
 <400> 11
 Met Asp Arg Glu Ala Leu Arg Ala Ile Ser Arg Gly Cys Lys Pro Pro

WO 02/02131

PCT/US01/20981

7

```

1           5           10           15
Ser Thr Leu Ala Lys Leu Val Thr Gly Leu Gly Phe Ala Ile His Gly
20           25           30
Ala Leu Ile Pro Gly Ser Glu Gly Cys Val Phe Asp Ser Ser His Pro
35           40           45
Asn Tyr Pro His Arg Val Ile Val Lys Ala Gly Trp Tyr Ala Ser Thr
50           55           60
Asn His Glu Ala Arg Leu Leu Arg Arg Leu Asn His Pro Ala Ile Leu
65           70           75
Pro Leu Leu Asp Leu His Val Val Ser Gly Val Thr Cys Leu Val Leu
85           90           95
Pro Lys Tyr His Cys Asp Leu Tyr Thr Tyr Leu Ser Lys Arg Pro Ser
100          105          110
Pro Leu Gly His Leu Gln Ile Thr Ala Val Ser Arg Gln Leu Leu Ser
115          120          125
Ala Ile Asp Tyr Val His Cys Glu Gly Ile Ile His Arg Asp Ile
130          135          140

<210> 12
<211> 481
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 12
Met Ala Cys Arg Lys Phe Cys Gly Val Tyr Arg Arg Pro Asp Lys Arg
1           5           10           15
Gln Glu Ala Ser Val Pro Pro Glu Thr Asn Thr Ala Pro Ala Phe Pro
20           25           30
Ala Ser Thr Phe Tyr Thr Pro Ala Glu Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Gly
35           40           45
Pro Pro Glu Thr Ile His Pro Ser Arg Pro Pro Ser Pro Gly Glu Ala
50           55           60
Ala Arg Leu Cys Gln Leu Gln Glu Ile Leu Ala Gln Met His Ser Asp
65           70           75
Glu Asp Tyr Pro Ile Val Asp Ala Ala Gly Ala Glu Glu Glu Asp Glu
85           90           95
Ala Asp Asp Asp Ala Pro Asp Asp Val Ala Tyr Pro Glu Asp Tyr Ala
100          105          110
Glu Gly Arg Phe Leu Ser Met Val Ser Ala Ala Pro Leu Pro Gly Ala
115          120          125
Ser Gly His Pro Pro Val Pro Gly Arg Ala Ala Pro Pro Asp Val Arg
130          135          140
Thr Cys Asp Thr Gly Lys Val Gly Ala Thr Gly Phe Thr Pro Glu Glu
145          150          155
Leu Asp Thr Met Asp Arg Glu Ala Leu Arg Ala Ile Ser Arg Gly Cys
165          170          175
Lys Pro Pro Ser Thr Leu Ala Lys Leu Val Thr Gly Leu Gly Phe Ala
180          185          190
Ile His Gly Ala Leu Ile Pro Gly Ser Glu Gly Cys Val Phe Asp Ser
195          200          205
Ser His Pro Asn Tyr Pro His Arg Val Ile Val Lys Ala Gly Trp Tyr
210          215          220
Ala Ser Thr Ser His Glu Ala Arg Leu Leu Arg Arg Leu Asn His Pro
225          230          235
Ala Ile Leu Pro Leu Leu Asp Leu His Val Val Ser Gly Val Thr Cys
245          250          255
Leu Val Leu Pro Lys Tyr His Cys Asp Leu Tyr Thr Tyr Leu Ser Lys
260          265          270

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

8

```

Arg Pro Ser Pro Leu Gly His Leu Gln Ile Thr Ala Val Ser Arg Gln
275                280                285
Leu Leu Ser Ala Ile Asp Tyr Val His Cys Lys Gly Ile Ile His Arg
290                295                300
Asp Ile Lys Thr Glu Asn Ile Phe Ile Asn Thr Pro Glu Asn Ile Cys
305                310                315
Leu Gly Asp Phe Gly Ala Ala Cys Phe Val Arg Gly Cys Arg Ser Ser
325                330                335
Pro Phe His Tyr Gly Ile Ala Gly Thr Ile Asp Thr Asn Ala Pro Glu
340                345                350
Val Leu Ala Gly Asp Pro Tyr Thr Gln Val Ile Asp Ile Trp Ser Ala
355                360                365
Gly Leu Val Ile Phe Glu Thr Ala Val His Thr Ala Ser Leu Phe Ser
370                375                380
Ala Pro Arg Asp Pro Glu Arg Arg Pro Cys Asp Asn Gln Ile Ala Arg
385                390                395
Ile Ile Arg Gln Ala Gln Val His Val Asp Glu Phe Pro Thr His Ala
405                410                415
Glu Ser Arg Leu Thr Ala His Tyr Arg Ser Arg Ala Ala Gly Asn Asn
420                425                430
Arg Pro Ala Trp Thr Arg Pro Ala Trp Thr Arg Tyr Tyr Lys Ile His
435                440                445
Thr Asp Val Glu Tyr Leu Ile Cys Lys Ala Leu Thr Phe Asp Ala Ala
450                455                460
Leu Arg Pro Ser Ala Ala Glu Leu Leu Arg Leu Pro Leu Phe His Pro
465                470                475
Lys                                480

```

```

<210> 13
<211> 501
<212> DNA
<213> Herpes simplex virus

```

```

<400> 13
gggggcgcggt ctacgaggag atccccctggg ttcgggtata cgaaaacatc tgccttcgcc 60
ggcaagacgc cggcggggcg gccccgccgg gagacgcccc gaactccccg tacatcgagg 120
cggaatatcc cctgtacgac tggggcgggt ctgccctott ctcccccccg ggggccacac 180
gcgcgccgga cccgggacta agcctgtcgc ccatgcccgc ccgccccccg accaacgcgc 240
tggccaacga cggcccgaca aacgtgcgcg cctcagcgc cctgttgacg aagctcaaac 300
gcggccgaca ccagagccat taataaaatg cgaccgccgg cccacccgtc tcggttttcg 360
gcccccttcc cgtatgtct gttttcaata aaaagtaaca aacagagaaa aaaaaacagc 420
gagttccgca tggtttgtcg tacgcaatta gctgtttatt gttttttttt tggggggggg 480
aagagaaaaa gaaaaaagga g                                501

```

```

<210> 14
<211> 106
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

```

```

<400> 14
Gly Arg Val Tyr Glu Glu Ile Pro Trp Val Arg Val Tyr Glu Asn Ile
1          5          10          15
Cys Leu Arg Arg Gln Asp Ala Gly Gly Ala Ala Pro Pro Gly Asp Ala
20          25          30
Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp Gly
35          40          45
Gly Ser Ala Leu Phe Ser Pro Pro Gly Ala Thr Arg Ala Pro Asp Pro

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

9

50 55 60
 Gly Leu Ser Leu Ser Pro Met Pro Ala Arg Pro Arg Thr Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 Ala Asn Asp Gly Pro Thr Asn Val Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Thr
 85 90 95
 Lys Leu Lys Arg Gly Arg His Gln Ser His
 100 105

<210> 15
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus

<400> 15
 Met Gln Arg Arg Ala Arg Gly Ala Ser Ser Leu Arg Leu Ala Arg Cys
 1 5 10 15
 Leu Thr Pro Ala Asn Leu Ile Arg Gly Ala Asn Ala Gly Val Pro Glu
 20 25 30
 Arg Arg Ile Phe Ala Gly Cys Leu Leu Pro Thr Pro Glu Gly Leu Leu
 35 40 45
 Ser Ala Ala Val Gly Val Leu Arg Gln Arg Ala Asp Asp Leu Gln Pro
 50 55 60
 Ala Phe Leu Thr Gly Ala Asp Arg Ser Val Arg Leu Ala Ala Arg His
 65 70 75 80
 His Asn Thr Val Pro Glu Ser Leu Ile Val Asp Gly Leu Ala Ser Asp
 85 90 95
 Pro His Tyr Asp Tyr Ile Arg His Tyr Ala Ser Ala Ala Lys Gln Ala
 100 105 110
 Leu Gly Glu Val Glu Leu Ser Gly Gly Gln Leu Ser Arg Ala Ile Leu
 115 120 125
 Ala Gln Tyr Trp Lys Tyr Leu Gln Thr Val Val Pro Ser Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ile Pro Asp Asp Pro Ala Gly Asp Cys Asp Pro Ser Leu His Val Leu
 145 150 155 160
 Leu Arg Pro Thr Leu Leu Pro Lys Leu Leu Val Arg Ala Pro Phe Lys
 165 170 175
 Ser Gly Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Ala Val Ala Gly Leu Arg
 180 185 190
 Asp Ala Ala His Arg Leu Gln Gln Tyr Met Phe Phe Met Arg Pro Ala
 195 200 205
 Asp Pro Ser Arg Pro Ser Thr Asp Thr Ala Leu Arg Leu Ser Glu Leu
 210 215 220
 Leu Ala Tyr Val Ser Val Leu Tyr His Trp Ala Ser Trp Met Leu Trp
 225 230 235 240
 Thr Ala Asp Lys Tyr Val Cys Arg Arg Leu Gly Pro Ala Asp Arg Arg
 245 250 255
 Phe Val Ala Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ala Pro Ala Glu Thr Phe Ala
 260 265 270
 Arg His Leu Asp Arg Gly Pro Ser Gly Thr Thr Gly Ser Met Gln Cys
 275 280 285
 Met Ala Leu Arg Ala Ala Val Ser Asp Val Leu Gly His Leu Thr Arg
 290 295 300
 Leu Ala His Leu Trp Glu Thr Gly Lys Arg Ser Gly Gly Thr Tyr Gly
 305 310 315 320
 Ile Val Asp Ala Ile Val Ser Thr Val Glu Val Leu Ser Ile Val His
 325 330 335
 His His Ala Gln Tyr Ile Ile Asn Ala Thr Leu Thr Gly Tyr Val Val
 340 345 350

WO 02/02131

PCT/US01/20981

10

Trp Ala Ser Asp Ser Leu Asn Asn Glu Tyr Leu Thr Ala Ala Val Asp
 355 360 365
 Ser Gln Glu Arg Phe Cys Arg Thr Ala Ala Pro Leu Phe Pro Thr Met
 370 375 380
 Thr Ala Pro Ser Trp Ala Arg Met Glu Leu Ser Ile Lys Ser Trp Phe
 385 390 395 400
 Gly Ala Ala Leu Ala Pro Asp Leu Leu Arg Ser Gly Thr Pro Ser Pro
 405 410 415
 His Tyr Glu Ser Ile Leu Arg Leu Ala Ala Ser Gly Pro Pro Gly Gly
 420 425 430
 Arg Gly Ala Val Gly Gly Ser Cys Arg Asp Lys Ile Gln Arg Thr Arg
 435 440 445
 Arg Asp Asn Ala Pro Pro Pro Leu Pro Arg Ala Arg Pro His Ser Thr
 450 455 460
 Pro Ala Ala Pro Arg Arg Cys Arg Arg His Arg Glu Asp Leu Pro Glu
 465 470 475 480
 Pro Pro His Val Asp Ala Ala Asp Arg Gly Pro Glu Pro Cys Ala Gly
 485 490 495
 Arg Pro Ala Thr Tyr Tyr Thr His Met Ala Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 500 505 510
 Pro Pro Arg Asn Pro Ala Pro Pro Glu Gln Arg Pro Ala Ala Ala Ala
 515 520 525
 Arg Pro Leu Ala Ala Gln Arg Glu Ala Ala Gly Val Tyr Asp Ala Val
 530 535 540
 Arg Thr Trp Gly Pro Asp Ala Glu Ala Glu Pro Asp Gln Met Glu Asn
 545 550 555 560
 Thr Tyr Leu Leu Pro Asp Asp Ala Ala Met Pro Ala Gly Val Gly
 565 570 575
 Leu Gly Ala Thr Pro Ala Ala Asp Thr Thr Ala Ala Ala Ala Trp Pro
 580 585 590
 Ala Glu Ser His Ala Pro Arg Ala Pro Ser Glu Asp Ala Asp Ser Ile
 595 600 605
 Tyr Glu Ser Val Gly Glu Asp Gly Gly Arg Val Tyr Glu Glu Ile Pro
 610 615 620
 Trp Val Arg Val Tyr Glu Asn Ile Cys Pro Arg Arg Arg Leu Ala Gly
 625 630 635 640
 Gly Ala Ala Leu Pro Gly Asp Ala Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala
 645 650 655
 Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp Gly Gly Ser Ala Leu Phe Ser Pro Arg
 660 665 670
 Arg Ala Thr Arg Ala Pro Asp Pro Gly Leu Ser Leu Ser Pro Met Pro
 675 680 685
 Ala Arg Pro Arg Thr Asn Ala Leu Ala Asn Asp Gly Pro Thr Asn Val
 690 695 700
 Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Thr Lys Leu Lys Arg Gly Arg His Gln
 705 710 715 720
 Ser His

<210> 16
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus

<400> 16
 actgcaacgc aatcccatga aggcctgtga tcgcctcacc accaaggaac tcaagacttc 60
 cgaccccggg ggcgtgggcg gggaggggga ggaaggcgcg gaggggggag ggtttgacga 120
 ggccaagtgt gccgaggccc gagaaatgat ccgatatatg gctttggtgt cgcccatgga 180

WO 02/02131

PCT/US01/20981

11

gcgacaggaa cacaaggcca

200

<210> 17
<211> 66
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 17
Leu Gln Arg Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu
1 5 10 15
Leu Lys Thr Ser Asp Pro Gly Gly Val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly
20 25 30
Ala Glu Gly Gly Gly Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu
35 40 45
Met Ile Arg Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His
50 55 60
Lys Ala
65

<210> 18
<211> 904
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 18
Met Arg Gly Gly Gly Leu Ile Cys Ala Leu Val Val Gly Ala Leu Val
1 5 10 15
Ala Ala Val Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Ala
20 25 30
Ser Gly Gly Val Ala Ala Thr Val Ala Ala Asn Gly Gly Pro Ala Ser
35 40 45
Arg Pro Pro Pro Val Pro Ser Pro Ala Thr Thr Lys Ala Arg Lys Arg
50 55 60
Lys Thr Lys Lys Pro Pro Lys Arg Pro Glu Ala Thr Pro Pro Pro Asp
65 70 75 80
Ala Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Ala His Leu
85 90 95
Arg Glu Ile Lys Val Glu Asn Ala Asp Ala Gln Phe Tyr Val Cys Pro
100 105 110
Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys
115 120 125
Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val
130 135 140
Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr
145 150 155 160
Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln
165 170 175
Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val
180 185 190
Ile Asp Lys Ile Asn Thr Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr
195 200 205
Val Arg Asn Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu
210 215 220
Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Lys Val Ala Thr Arg Thr Ser Arg
225 230 235 240
Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala
245 250 255
Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp

WO 02/02131

PCT/US01/20981

12

```

260      265      270
Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp
275      280      285
Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr
290      295      300
Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe
305      310      315
Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ser Pro Thr Thr
320      325      330
Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val
335      340      345
Pro Lys Arg Pro Ala Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp
350      355      360
Glu Met Leu Arg Ala Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp
365      370      375
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Ser
380      385      390
Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Arg Asp Ala Arg Glu Ala Ile
395      400      405
Asp Arg Met Phe Ala Arg Lys Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly
410      415      420
Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Thr Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln
425      430      435
Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr Val Arg Glu Tyr Met
440      445      450
Arg Glu Gln Asp Arg Lys Pro Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Arg
455      460      465
Glu Ala Pro Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser
470      475      480
Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Arg
485      490      495
His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Ile Ala Val Ala Trp Cys Glu Leu
500      505      510
Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro
515      520      525
Asn Ala Ile Ala Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met
530      535      540
545      550      555
Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Pro Asp
560      565      570
Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Val Ser Ser Arg Pro Gly Thr
575      580      585
Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln Gly Pro
590      595      600
Leu Ile Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg
605      610      615
Asp Ala Leu Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Ile Phe
620      625      630
Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His Gln Leu
635      640      645
Ser Arg Ala Asp Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile
650      655      660
Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg
665      670      675
His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg
680      685      690
Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile
695      700      705
Arg Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Cys Ala Phe Phe
710      715      720

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

13

725 730 735
 Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val Met Gly
 740 745 750
 Val Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser Ser Phe Met
 755 760 765
 Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly
 770 775 780
 Leu Val Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Leu Gln Leu Gln Arg
 785 790 795 800
 Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu Lys Thr
 805 810 815
 Ser Asp Pro Gly Gly Val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly
 820 825 830
 Gly Gly Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg
 835 840 845
 Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Arg
 850 855 860
 Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ser Lys Val Thr Asn Met Val
 865 870 875 880
 Leu Arg Lys Arg Asn Lys Ala Arg Tyr Ser Pro Leu His Asn Glu Asp
 885 890 895
 Glu Ala Gly Asp Glu Asp Glu Leu
 900

<210> 19
 <211> 443
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus

<400> 19
 ccctctccca cacggctgggt gccccccatc tctgtttcat catcgtcccg gttgogttgc 60
 gctttccggc cctcccgac ccccggttc cgggtgtctcg cggcccgcg ccatgatcac 120
 ggattgttcc gaagcagaca tcgcgatcc ctgggtatc tcgcgcccg atgcgcgggc 180
 gctgcagcgg tcgaggggtc gattggtctt tctgccgacc atccgccgc agctggcgct 240
 cgggacgtg gcgcacgaat cgttcgtctc cggaggagtt agtcccgaca cgttgggggt 300
 gttgctggcg taccgcaggc gttcccccgc ggtaatcac cgggtgctgc ccacgcgaat 360
 cgtgcctgc ccgtgggacc tggggctcac gcacgccgc accgtcaatc tccgcaacac 420
 ctccccctgc gacctctgca acg 443

<210> 20
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus

<400> 20
 Pro Leu Pro His Gly Arg Cys Pro Pro Ser Leu Phe His His Arg Pro
 1 5 10 15
 Gly Cys Val Ala Leu Ser Gly Pro Pro Ala Pro Pro Arg Ser Gly Val
 20 25 30
 Ser Arg Pro Gly Ala
 35

<210> 21
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus
 <400> 21

WO 02/02131

PCT/US01/20981

14

```

Pro Leu Pro His Gly Arg Cys Pro Pro Ser Leu Phe His His Arg Pro
1      5      10      15
Gly Cys Val Ala Leu Ser Gly Pro Pro Ala Pro Pro Arg Ser Gly Val
20      25      30
Ser Arg Pro Gly Ala Met Ile Thr Asp Cys Phe Glu Ala Asp Ile Ala
35      40      45
Ile Pro Ser Gly Ile Ser Arg Pro Asp Ala Ala Ala Leu Gln Arg Cys
50      55      60
Glu Gly Arg Val Val Phe Leu Pro Thr Ile Arg Arg Gln Leu Ala Leu
65      70      75      80
Ala Asp Val Ala His Glu Ser Phe Val Ser Gly Gly Val Ser Pro Asp
85      90      95
Thr Leu Gly Leu Leu Leu Ala Tyr Arg Arg Arg Phe Pro Ala Val Ile
100     105     110
Thr Arg Val Leu Pro Thr Arg Ile Val Ala Cys Pro Val Asp Leu Gly
115     120     125
Leu Thr His Ala Gly Thr Val Asn Leu Arg Asn Thr Ser Pro Val Asp
130     135     140
Leu Cys Asn
145

```

```

<210> 22
<211> 110
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

```

```

<400> 22
Met Ile Thr Asp Cys Phe Glu Ala Asp Ile Ala Ile Pro Ser Gly Ile
1      5      10      15
Ser Arg Pro Asp Ala Ala Ala Leu Gln Arg Cys Glu Gly Arg Val Val
20      25      30
Phe Leu Pro Thr Ile Arg Arg Gln Leu Ala Leu Ala Asp Val Ala His
35      40      45
Glu Ser Phe Val Ser Gly Gly Val Ser Pro Asp Thr Leu Gly Leu Leu
50      55      60
Leu Ala Tyr Arg Arg Arg Phe Pro Ala Val Ile Thr Arg Val Leu Pro
65      70      75      80
Thr Arg Ile Val Ala Cys Pro Val Asp Leu Gly Leu Thr His Ala Gly
85      90      95
Thr Val Asn Leu Arg Asn Thr Ser Pro Val Asp Leu Cys Asn
100     105     110

```

```

<210> 23
<211> 318
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

```

```

<400> 23
Met Ile Thr Asp Cys Phe Glu Ala Asp Ile Ala Ile Pro Ser Gly Ile
1      5      10      15
Ser Arg Pro Asp Ala Ala Ala Leu Gln Arg Cys Glu Gly Arg Val Val
20      25      30
Phe Leu Pro Thr Ile Arg Arg Gln Leu Ala Leu Ala Asp Val Ala His
35      40      45
Glu Ser Phe Val Ser Gly Gly Val Ser Pro Asp Thr Leu Gly Leu Leu
50      55      60
Leu Ala Tyr Arg Arg Arg Phe Pro Ala Val Ile Thr Arg Val Leu Pro
65      70      75      80

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

15

Thr Arg Ile Val Ala Cys Pro Val Asp Leu Gly Leu Thr His Ala Gly
 85 90 95
 Thr Val Asn Leu Arg Asn Thr Ser Pro Val Asp Leu Cys Asn Gly Asp
 100 105 110
 Pro Val Ser Leu Val Pro Pro Val Phe Glu Gly Gln Ala Thr Asp Val
 115 120 125
 Arg Leu Glu Ser Leu Asp Leu Thr Leu Arg Phe Pro Val Pro Leu Pro
 130 135 140
 Thr Pro Leu Ala Arg Glu Ile Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gly Ile
 145 150 155 160
 Arg Asp Leu Asn Pro Asp Pro Arg Thr Pro Gly Glu Leu Pro Asp Leu
 165 170 175
 Asn Val Leu Tyr Tyr Asn Gly Ala Arg Leu Ser Leu Val Ala Asp Val
 180 185 190
 Gln Gln Leu Ala Ser Val Asn Thr Glu Leu Arg Ser Leu Val Leu Asn
 195 200 205
 Met Val Tyr Ser Ile Thr Glu Gly Thr Thr Leu Ile Leu Thr Leu Ile
 210 215 220
 Pro Arg Leu Leu Ala Leu Ser Ala Gln Asp Gly Tyr Val Asn Ala Leu
 225 230 235 240
 Leu Gln Met Gln Ser Val Thr Arg Glu Ala Ala Gln Leu Ile His Pro
 245 250 255
 Glu Ala Pro Met Leu Met Gln Asp Gly Glu Arg Arg Leu Pro Leu Tyr
 260 265 270
 Glu Ala Leu Val Ala Trp Leu Ala His Ala Gly Gln Leu Gly Asp Ile
 275 280 285
 Leu Ala Leu Ala Pro Ala Val Arg Val Cys Thr Phe Asp Gly Ala Ala
 290 295 300
 Val Val Gln Ser Gly Asp Met Ala Pro Val Ile Arg Tyr Pro
 305 310 315

<210> 24
 <211> 502
 <212> DNA
 <213> Herpes simplex virus

<400> 24
 actgtgttag gggggaaaac acagtccgg gaaggcggtt attgcggaga gaggggggaa 60
 agaaagagaa acaaaagaaa cggcaagaaa gactcaagac gtgcgcgtga tcggaaaaaa 120
 ggccgggggg atcccggtcg gggcccgccg gtaaatggcc atgatgaacc cgaccatgag 180
 gtctcccgcg gcaccgttgc gttttccgga gtacatgcgg acgtcggtgt tgggagagac 240
 ggtttcgatg aggttgttga gctgctcgga cagatactcg accgggtcgg tctgcaggcg 300
 caccgtcacg gagacgagct cctgggaagc catgacgccc ccggaagtga actttttgat 360
 aaagtattcg aaggcgggcg tcttctgttt gttgagcaga aagaagggtt acaataccgc 420
 gccgccggcg ggtcgcagc gatagaagag gagctcgggc ccggggccgt tggcccccgc 480
 cgaggccagg atgcggtgca tc 502

<210> 25
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Herpes simplex virus

<400> 25
 Met His Arg Ile Leu Ala Ser Ala Gly Ala Asn Gly Pro Gly Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Tyr His Cys Glu Pro Pro Gly Gly Ala Val Leu Tyr Pro
 20 25 30
 Phe Phe Leu Leu Asn Lys Gln Lys Thr Pro Ala Phe Glu Tyr Phe Ile

WO 02/02131

PCT/US01/20981

16

35 40 45
Lys Lys Phe Asn Ser Gly Gly Val Met Ala Ser Gln Glu Leu Val Ser
50 55 60
Val Thr Val Arg Leu Gln Thr Asp Pro Val Glu Tyr Leu Ser Glu Gln
65 70 75 80
Leu Asn Asn Leu Ile Glu Thr Val Ser Pro Asn Thr Asp Val Arg Met
85 90 95
Tyr Ser Gly Lys Arg Asn Gly Ala Ala Asp Asp Leu Met Val Ala Val
100 105 110
Ile Met Ala Ile Tyr Leu Ala Ala Pro Thr Gly Ile Pro Ala Phe
115 120 125
Phe Pro Ile Thr Arg Thr Ser
130 135

<210> 26
<211> 734
<212> PRT
<213> Herpes simplex virus

<400> 26
Met Phe Gly Gln Gln Leu Ala Ser Asp Val Gln Gln Tyr Leu Glu Arg
1 5 10 15
Leu Glu Lys Gln Arg Gln Gln Lys Val Gly Val Asp Glu Ala Ser Ala
20 25 30
Gly Leu Thr Leu Gly Gly Asp Ala Leu Arg Val Pro Phe Leu Asp Phe
35 40 45
Ala Thr Ala Thr Pro Lys Arg His Gln Thr Val Val Pro Gly Val Gly
50 55 60
Thr Leu His Asp Cys Cys Glu His Ser Pro Leu Phe Ser Ala Val Ala
65 70 75 80
Arg Arg Leu Leu Phe Asn Ser Leu Val Pro Ala Gln Leu Arg Gly Arg
85 90 95
Asp Phe Gly Gly Asp His Thr Ala Lys Leu Glu Phe Leu Ala Pro Glu
100 105 110
Leu Val Arg Ala Val Ala Arg Leu Arg Phe Arg Glu Cys Ala Pro Glu
115 120 125
Asp Ala Val Pro Gln Arg Asn Ala Tyr Tyr Ser Val Leu Asn Thr Phe
130 135 140
Gln Ala Leu His Arg Ser Glu Ala Phe Arg Gln Leu Val His Phe Val
145 150 155 160
Arg Asp Phe Ala Gln Leu Leu Lys Thr Ser Phe Arg Ala Ser Ser Leu
165 170 175
Ala Glu Thr Thr Gly Pro Pro Lys Lys Arg Ala Lys Val Asp Val Ala
180 185 190
Thr His Gly Gln Thr Tyr Gly Thr Leu Glu Leu Phe Gln Lys Met Ile
195 200 205
Leu Met His Ala Thr Tyr Phe Leu Ala Ala Val Leu Leu Gly Asp His
210 215 220
Ala Glu Gln Val Asn Thr Phe Leu Arg Leu Val Phe Glu Ile Pro Leu
225 230 235 240
Phe Ser Asp Thr Ala Val Arg His Phe Arg Gln Arg Ala Thr Val Phe
245 250 255
Leu Val Pro Arg Arg His Gly Lys Thr Trp Phe Leu Val Pro Leu Ile
260 265 270
Ala Leu Ser Leu Ala Ser Phe Arg Gly Ile Lys Ile Gly Tyr Thr Ala
275 280 285
His Ile Arg Lys Ala Thr Glu Pro Val Phe Asp Glu Ile Asp Ala Cys
290 295 300

WO 02/02131

PCT/US01/20981

17

```

Leu Arg Gly Trp Phe Gly Ser Ser Arg Val Asp His Val Lys Gly Glu
305          310          315          320
Thr Ile Ser Phe Ser Phe Pro Asp Gly Ser Arg Ser Thr Ile Val Phe
325          330          335
Ala Ser Ser His Asn Thr Asn Gly Ile Arg Gly Gln Asp Phe Asn Leu
340          345          350
Leu Phe Val Asp Glu Ala Asn Phe Ile Arg Pro Asp Ala Val Gln Thr
355          360          365
Ile Met Gly Phe Leu Asn Gln Ala Asn Cys Lys Ile Ile Phe Val Ser
370          375          380
Ser Thr Asn Thr Gly Lys Ala Ser Thr Ser Phe Leu Tyr Asn Leu Arg
385          390          395          400
Gly Ala Ala Asp Glu Leu Leu Asn Val Val Thr Tyr Ile Cys Asp Asp
405          410          415
His Met Pro Arg Val Val Thr His Thr Asn Ala Thr Ala Cys Ser Cys
420          425          430
Tyr Ile Leu Asn Lys Pro Val Phe Ile Thr Met Asp Gly Ala Val Arg
435          440          445
Arg Thr Ala Asp Leu Phe Leu Pro Asp Ser Phe Met Gln Glu Ile Ile
450          455          460
Gly Gly Gln Ala Arg Glu Thr Gly Asp Asp Arg Pro Val Leu Thr Lys
465          470          475          480
Ser Ala Gly Glu Arg Phe Leu Leu Tyr Arg Pro Ser Thr Thr Thr Asn
485          490          495
Ser Gly Leu Met Ala Pro Glu Leu Tyr Val Tyr Val Asp Pro Ala Phe
500          505          510
Thr Ala Asn Thr Arg Ala Ser Gly Thr Gly Ile Ala Val Val Gly Arg
515          520          525
Tyr Arg Asp Asp Phe Ile Ile Phe Ala Leu Glu His Phe Phe Leu Arg
530          535          540
Ala Leu Thr Gly Ser Ala Pro Ala Asp Ile Ala Arg Cys Val Val His
545          550          555          560
Ser Leu Ala Gln Val Leu Ala Leu His Pro Gly Ala Phe Arg Ser Val
565          570          575
Arg Val Ala Val Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Ala Val Ala Ile
580          585          590
Ala Thr His Val His Thr Glu Met His Arg Ile Leu Ala Ser Ala Gly
595          600          605
Ala Asn Gly Pro Gly Pro Glu Leu Leu Phe Tyr His Cys Glu Pro Pro
610          615          620
Gly Gly Ala Val Leu Tyr Pro Phe Phe Leu Leu Asn Lys Gln Lys Thr
625          630          635          640
Pro Ala Phe Glu Tyr Phe Ile Lys Lys Phe Asn Ser Gly Gly Val Met
645          650          655
Ala Ser Gln Glu Leu Val Ser Val Thr Val Arg Leu Gln Thr Asp Pro
660          665          670
Val Glu Tyr Leu Ser Glu Gln Leu Asn Asn Leu Ile Glu Thr Val Ser
675          680          685
Pro Asn Thr Asp Val Arg Met Tyr Ser Gly Lys Arg Asn Gly Ala Ala
690          695          700
Asp Asp Leu Met Val Ala Val Ile Met Ala Ile Tyr Leu Ala Ala Pro
705          710          715          720
Thr Gly Ile Pro Pro Ala Phe Phe Pro Ile Thr Arg Thr Ser
725          730

```

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT

WO 02/02131

PCT/US01/20981

18

<213> HSV-2

<400> 27

Gly Arg Val Tyr Glu Glu Ile Pro Trp Val Arg Val Tyr Glu Asn
5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 28

Tyr Glu Asn Ile Cys Leu Arg Arg Gln Asp Ala Gly Gly Ala Ala
5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 29

Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp
5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 30

Tyr Ile Glu Ala Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp Gly Gly Ser Ala
5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 31

Thr Asn Ala Leu Ala Asn Asp Gly Pro Thr Asn Val Ala Ala Leu
5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 32

Arg Val Leu Pro Thr Arg Ile Val Ala Cys Pro Val Asp Leu Gly
5 10 15

<210> 33

WO 02/02131

PCT/US01/20981

19

<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 33
Thr Arg Ile Val Ala Cys Pro Val Asp Leu Gly Leu Thr His Ala
5 10 15

<210> 34
<211> 661
<212> DNA
<213> HSV-2

<400> 34
ctctctctcc ggcctctctc cctcctcttc cgcctctctc tctctctctc cgcctctctc 60
ctctgcgggc ggggctggtg ggagcgtgc gtccgctcc ggctgtggg agagacgaga 120
aacctccctc ggcctccgct ctgctgcgc gcgggggcg aggaagtgt ccaggaagac 180
ggcacaagcg gagggcgggc cggagccgc ggccgcgac cggcgcccg ggcctcagcg 240
ctacctgccc atcgcggggg tctcgagct cgtggccctg gcgccttac tgaacaagac 300
ggtcacgggg gactgcctgc cgtcctgga catggagac ggccacatag gggcctacgt 360
ggctcctcgtg gaccagaagg ggaacgtgg gacactgct cggcccgcg ccccgcggtg 420
gagccgcgc accctgctcc cggagcagc gcgcaactg gtgagggccc ccgactacc 480
gacgcccccc gctcggagt ggaacagct ctggatgac ccggtgggca acatgctctt 540
tgaccagggc accctggtgg gcgcgtgga ctccacggc ctccggtgc gccaccgtg 600
gtctcgggag caggggcggc cgcgcgggc cggcgacgc ccccgggcc acggggagta 661
g

<210> 35
<211> 2481
<212> DNA
<213> HSV-2

<400> 35
atggaacccc ggcccgccac gagctccgg gcggacccc gccccgagcg gcccccgcg 60
cagaccccc gcagcgagcc cgcgcgccgc cagcctggg ggaatgtcaa cgaatgcag 120
tggtcgcca gagcgactc ggaggaggag accgaggtg gaatctctga cgaagacctt 180
caccgcgact ccaactccga ggccggcagc acggacacgc agatgttcca ggccggcgtg 240
atggacgcgg ccacgcccc ggcccgccgc cggcccgagc gccagggcag cccacgccc 300
gccgacgcgc agggatccct tgggggtggg cccgtgggtg agggaggaag ggaagcggga 360
ggggggggcg acgtgtgtgc cgtgtgcaag gacagatcg ccccgccct gcgctgccag 420
agtttccct gcctgcaccc ctctgcacg ccgtgcacga agacctggat tccgttcgc 480
aacacgtgtc cctgtgcaa caccgcgtg gcgtacctga tagtgggct gaacgccag 540
gggtcgttca gccacatccc gatagtgaac gaccccgga cccgctgga ggccgaggcg 600
gcctgcgggg ccggcacggc cgtggacttt atctggagcg gcaaccccg gacggcccg 660
cgctccctgt cgtgggggg acacacggtc cgcgccctgt cgcaccccc cccgtggccc 720
ggcacggagc acgaggacga tgacctggcc gaoggtgtg actacgtccc gcccgcccc 780
cgaagagcgc ccggggcgcg gggcgccgt gcgggggga cccgcgaaac ctccagcccc 840
cccgcgaccc gacccggccc cctggcgcc cggcgaggga gacgcagcgg cggcgcccc 900
ttgcggggcg ggtgggac tgggtctggg ggccgacct cgtcgcgcg cgtcgtgcg 960
agagtgacct ctctccccc tgcggcgcc gggggagcgc gcagggcgc gccggtggg 1020
gaagagcccg cggcgcgga ggacaggag ccccccgcga gacagcccc cgcggccag 1080
gagcccccga tagtcatcag cgaactctcc cgcgcctct cgcgcgcgcc cgcggcccc 1140
ggcccgctct ccttctctc ctccctctcc gcaaggtgt cctcgggccc cgggggggga 1200
gggtctccac agtctcggt gcgcgcgcgc cgcgcccgcg cggcgctgc cccgcgcgtc 1260
cggagtccgc ccgcgcgcgc cgcgcgcgcc gtggtgtct cgaagcgga cgcggccgg 1320
cccgcgccgc ccgcgcgtgc ggtggacgc caccgcgcgc cccggtcgc catgaaccag 1380
gtcagacgc acaccacaag acagagtctg ggccggcgag gcgcgacga cgcgcgcgg 1440

WO 02/02131

PCT/US01/20981

20

```

tcgggagggc cgggcgcgga gggaggaccc ggggtcccc gcggcaccac ccccccggt 1500
gcgcgcccc acgcgcgcga gggggcgggc gcccgcccc ggaagaggcg cgggtcggac 1560
tcgggcccc cggcctcgto ctccgctctt tctccgcgc ccccgcgctc gccctcgcc 1620
cccgaggggg tgggggccaa gaggcgggcg ccgcgcggg ccccggaact ggaactcggc 1680
gacgcggccc agggcgcggt cgcgcgcggc tccgcggcg ccgcgcccc gtccgggtct 1740
cgtgtctccc aggcgcgggt cgcgcgcggc tctctctct tctctctct ccgctcctc ctctccgccc 1800
tctctctct ccgctctctc ctctcggggc ggggtcgtg ggaagctcgc gtcgggtcc 1860
ggcgcgggg agagacgaga aacctccctc ggcgcgcgc ctgtcgcgcc ggcggggcg 1920
ggcgcgggg ccctcagcg ctacctgccc atcgcgggg tctcgagcgt cgtggcctg 1980
aggagtggt ccaggagagc gcgcacgcgc gactgcctg ccgtcctgga catggagacg 2040
ccgcgcggcg gccctcagcg ctacctgccc gactgcctg ccgtcctgga catggagacg 2100
gcgccttaag tgaacaagac ggtcacgggg gactgcctg ccgtcctgga catggagacg 2160
ggcgcacatg gggcctacgt ggtcctcggt ggaacgtgg ggaactgctg 2220
ccgcgcggcg ccccgcggtg ggcgcgcgc acctgtccc ccgagcagcg gcgcaactgc 2280
gtgagggccc ccgactcccc gacgcgcgcc cgtcgagat ggaacagcct ctgagatgac 2340
ccggtgggga acatgctctt tgaacagggc acctgtgtg ccgcgcggga ctccacggc 2400
ctccggtcgc gccacccgtg gttcggggg cagggcgcgc ccgcgcggcg cggcgacgccc 2460
ccgcgcggcg acggggagta g 2481

```

<210> 36
 <211> 1603
 <212> DNA
 <213> HSV-2

```

<400> 36
cggcgaggag gctgtccgc atcgatatca cgagcccoat gaagcccttc ccgtatcgcg 60
gcgcacagag cgcgcgcgtc caccggaacg ccagcccgcc cgtcgtccag acgcccacgg 120
gccacgtcga ggcgcagcgg gagggtacac cgtaccgacc cggagtcogt agcaggcccc 180
tggcggccag ccaggtcagc gatgcgttgt gcagatgcgc gatgctcagg ttctgtcgtc 240
gatgcctcgt tgtcccgcg ggcgcgcgcg gggcgcgccg gttcgtcagg ccgtccgggt 300
gcctctcggt cgcgcgcgtc tctcccgcg ggaacgtaag cccctcgcg tccgcgcgcg 360
cgcgaatggt acccagggcc ggcgcgcgca cagcgcgagc gcgcgcgggt tgtgcgacag 420
tcctctgagc tgggtcacct cgcgcggggg acgggacgtg ggcgcgcct ccgggagctc 480
ggcgaggtcc cgttcagag gccgcgcgag cagataggtc tttgggatgt aaagcagctg 540
cccggggtcc cgaggaaact cgcgcgtggt gaccaacacg aaacaaaagc gctcgcgcta 600
ccacgaaagc atgggcacg atgcgtagt caggttgagt tcgcccgggg gcgcacagcg 660
tcgcgcgtag ggtgcgtg cgtcgggggt tgttgggcaa ccacagacgc ccggtgtttt 720
gtcgcgccag tacgtcgggg ccaacccagc accgtgcaaa aaccacgggt cgatttgcct 780
cgtccagtac gtgtcatggc ccccgcaac cccacccag accccatca ccacccacag 840
accggggccc atggtcgtcc gtcgcgcgtc ccagtcgcga gatggggggg ggtgtccgta 900
ccacggcccc aaagaggtcc cgcacctcgg aggtatcgg aggcctttg ttgcgtaag 960
cgcgggcaaa aggatgggtg ggggtgaggg taaagacaca aaggaggtac cagaccgaaa 1020
acaaggacgg atcggccgcg tccgttttcc ggtgggtgct tgatacggtg ccagccctgg 1080
cccgaacccc ccgcgttat ggcacaccca cagacaaca atgcctttta ttctgttctt 1140
ttatgcccgt catcgccgg aggccttcog ttccggcttc cgtgtttgaa cttaactccc 1200
ccacctcgc ggcgaacgt gcgcgcagg tcggtatct ccggcagtag cccggcggtt 1260
gtgacgcggg ttgggacat cccgcgggt aggcgcaca ggcgtctcg acacccgacg 1320
ggcactgat cgtaatccag gacaaataga tgatcggaa ggaagcggtc ggcgaagacg 1380
tccacagccc aggcacacgt gtcgtcagat tccccgttg ggcgcagcag ctccgggaacg 1440
cgggaacagg caaacacggt gtcctcagat cgggcagag acccgcgcc gtcccgggg 1500
tcgggcgcgc ggtcgcgcg ggcgcgcgcc gtcagcggcg cccagtcctc ccgcacacctc 1560
ccgcgcgcgt gcaggtaccg cacgtgttg gcagtagat cgt 1603

```

<210> 37
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> HSV-2

WO 02/02131

PCT/US01/20981

21

<400> 37
 atgggtttctc acgcccggcca acagcaacgg cctggttgc gtcaggctgc tctgtggagc 60
 gggcctaacg acggccgggc ggcttccgt cctagccatc gccagggggc ctccggagcc 120
 cgcggggatc cggagctgcc caagctgctg cgggtttata tagacggacc ccacggggtg 180
 gggaagacca ccacctccgc gaagctgatg gaggcctgg ggcccgagc caatactgtc 240
 tacttccccc agccgatgac ttactggcag gtgctggggg cctccagagc cctgacgaac 300
 atctacaaca cgcagcacgc ttggaccgc ggccagatat cggccgggga ggccgggtg 360
 gtaatgacca ggcgccagat acaatgagc agccttatg cggcgacgga cgcgttttg 420
 gctcctcata tgggggggga ggctgtgggc ccgcaagccc cgcgccggc cctcacctt 480
 gtittcgacc ggacccctat cgcctccctg ctgtgtacc cggcccgccg gtacctcatg 540
 ggaagcatga ccccccaygc cgtgttggcg ttctgtggcc tcatgcccc gaccgcgcc 600
 gccacgaacc tggctctggg tgtccttccg gaggcgaac acgcccagcc cctggccaga 660
 ggcacaagcc cggcgagcgc gcttgacctg gccatgctgt ccgcattcg ccgtgtctac 720
 gatctactcg ccaacacggt gccgtacctg cagccggcgc ggaggtggcg ggagactgg 780
 ggcgggatga cgggggtgc cgcggcgacc ccgcgccccc accccagga cggcggggg 840
 ttctctcccc gcatcgagga cagcctgttt gccctgttc cgtttccgga gctgctggcc 900
 cccaacgggg acttgtaaca catttttgc tgggtcttgg acgtcttggc gacgcgcctc 960
 ctcccgatgc atctatttgt cctggattac gatcagtgc ccgtcgggtg tccgagccgc 1020
 ctgttgccgc tcaccggcg gatgatcca acccgctca caaccggcg gtccatcgcc 1080
 gagatagcgc acctggcgcg cacttttgc cgcaggtgg gggagttta g 1131

<210> 38
 <211> 2517
 <212> DNA
 <213> HSV-2

<400> 38
 atggggccccc gtctgtgggt ggtgatgggg gtctgtgtgg gcgttgccgg gggccatgac 60
 acgtactgga cggagcaaat cgaccctgg tttttgcacg gtctggggtt ggcccgacg 120
 tactggcgcg acacaaacac cggcgctctg ttgttgccca acaccccaga cccagcgac 180
 cccacgcgcg gacgcttggc gcccccgggc gaactcaacc tgactacggc atccgtgcc 240
 atgctctggt ggtacggcga gcgcttttgt ttctgttggg tcacacggcg cagatttct 300
 cgggaccccg ggacgctgct ttacatccca aagacctatc tgcctggcgc gctcgggaa 360
 gcgagcctgc ccgagctccc cgagggcggg cccacgtccc gtccccccgc cagagtgacc 420
 cagctcaagg gactgtcgca caaccccggc gcctccgcgc tgttgccgtc ccgggctgg 480
 gtaacattcg cggcccgccc ggacccggag gggcttactg tcccgcgggg agacgacgg 540
 gcgacggaga ggacccggga cggccgacgc aacgcgcgcg ccccggggcc gcccggggg 600
 acaccgaggg atccgacgac gaacctgagc atcgcgcacg tgcaacaacg atccgtgacc 660
 tggctggcgc ccagggggcct gctacggaac ccgggtcggg acgtgtacct ctcccgtcg 720
 gctcgaagct ggcccggtgg cgtctggagc acggggggcg tggcgttcgg gtcgagccgc 780
 gcgctcgtgc gcgcgcgata cgggaagggc ttcatggggc tctgataac gatcggggac 840
 agccctccgg ccgagatcat agtggtagct ggggacaaga cctcgcctcg ggtcggaat 900
 ccgaccgacg aaaaagcccc cgcggtgctc ccggggcctc cggccggccc caggtatcg 960
 gtctttgtcc tggggggccc gaagccccc gacaaaggct cggcgctgga cgcctccgg 1020
 cgggtggcgc gtaaccccca ggaagacag aactacgccc agtatatgtc gggggcctat 1080
 cggagatttt tgggggagga cccgggtccc ggcacggagc cgcgtccgtc cctgttctgg 1140
 cgcctcgcgg ggctgctcgc ctcgtcgagg ttttgcgtcg tcaacggcg ccacgcccac 1200
 gacgcgattc gctctccaga cctgctgggc gcggaactcg tgttctgaa cgtgtccgtg 1260
 ctggcccccg ggggagcagc ggcctggcgc gcgcgctcg ggcatacgt ggcccgctg 1320
 ttgaccccg cggcccgccct gcgctggag gcgcgctcg ggcatacgt ggcccgctg 1380
 ctcgacggag agcagagcct ggtggcgcac cgcgtggcct atcagctgag gttcgtctg 1440
 gacagccccc cgcctatgg ccgggtggcc ccgagcgagg cccgctgat cgaagccctg 1500
 tacgcagagt ttctcggcgg ccgcgcgcta accgcccaga tggctccgcg agcgtcttt 1560
 taacccaagg ccgtcctccg ggcccgcttc ctggcgggcg cgcctcggc cgaagcagcg 1620
 gaacgcgccc gccggggcct cctcataacc acggccctgt gtacgtccga cgtccggcg 1680
 gcgaccccag ccgatctccg ggccgcgcta gccaggaccg accaccagaa aaacctcttc 1740
 tggctcccg accacttttc cccatgcgca gcttccctgc ccttgatct cgcggaggg 1800
 gggttcatcc tggacgcgct ggccatggcc accgatccg acatcccgcc ggaagtcctg 1860

WO 02/02131

PCT/US01/20981

22

gcacaacaga cccgcggggt ggctccggtt ctcacgcgt gggcgacta caacgcctg 1920
 atccggcctc tcttcccgga ggccaccac cagtgtagc gccgtcgca caacgcggag 1980
 ccccggtatc tctgtcccat caaccacac gccagctacg tctgcacca caccctcctg 2040
 ccccggggga cggatacaaa gcttaacgggc gttgacgtcc gccgcccgtc gtttaccacc 2100
 tatctcaccg ccacctgcga agggcaccgag cgggagattg agcggagcg gctggtgcgc 2160
 accgaaaacc ggccgcacct cggctcctg cgggacgtgt ttctgcgcta caccctcgcc 2220
 ggggaggtca tctcgtgtgt gctggtggac accgatgcca cccaacagca gctggccgac 2280
 gggccggtgg cgggcacccc gaacgtgttt tccagcgacg tgcctcctg ggcctgttg 2340
 ttgttcccca accgaactgt gattoatctg ctggcctttg acacgtgac catcgcaacc 2400
 atgcctcccg ggtttctgac cgcgtccgcg ctgggggtcg ttatgattac cgcggcctg 2460
 gcgggcctcc ttaggggtgt ccgaacgtgc gtcccatctt tgtggagac cgaataa 2517

<210> 39
 <211> 376
 <212> FRT
 <213> HSV-2

<400> 39
 Met Ala Ser His Ala Gly Gln Gln His Ala Pro Ala Phe Gly Gln Ala
 5 10 15
 Ala Arg Ala Ser Gly Pro Thr Asp Gly Arg Ala Ala Ser Arg Pro Ser
 20 25 30
 His Arg Gln Gly Ala Ser Gly Ala Arg Gly Asp Pro Glu Leu Pro Thr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Val Gly Lys Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Ala Gln Leu Met Glu Ala Leu Gly Pro Arg Asp Asn Ile Val
 65 70 75 80
 Tyr Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu
 85 90 95
 Thr Leu Thr Asn Ile Tyr Asn Thr Gln His Arg Leu Asp Arg Gly Glu
 100 105 110
 Ile Ser Ala Gly Glu Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr
 115 120 125
 Met Ser Thr Pro Tyr Ala Ala Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile
 130 135 140
 Gly Gly Glu Ala Val Gly Pro Gln Ala Pro Pro Ala Leu Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ser Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala
 165 170 175
 Arg Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val
 180 185 190
 Ala Leu Met Pro Pro Thr Ala Pro Gly Thr Asn Leu Val Leu Gly Val
 195 200 205
 Leu Pro Glu Ala Glu His Ala Asp Arg Leu Ala Arg Arg Gln Arg Pro
 210 215 220
 Gly Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ser Ala Ile Arg Arg Val Tyr
 225 230 235 240
 Asp Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Arg Gly Gly Arg Trp
 245 250 255
 Arg Glu Asp Trp Gly Arg Leu Thr Gly Val Ala Ala Ala Thr Pro Arg
 260 265 270
 Pro Asp Pro Glu Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ile Glu Asp Thr
 275 280 285
 Leu Phe Ala Leu Phe Arg Val Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp
 290 295 300
 Leu Tyr His Ile Phe Ala Trp Val Leu Asp Val Leu Ala Asp Arg Leu
 305 310 315 320

WO 02/02131

PCT/US01/20981

23

Leu Pro Met His Leu Phe Val Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Val Gly
 325 330 335
 Cys Arg Asp Ala Leu Leu Arg Leu Thr Ala Gly Met Ile Pro Thr Arg
 340 345 350
 Val Thr Thr Ala Gly Ser Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Ala Arg Thr
 355 360 365
 Phe Ala Arg Glu Val Gly Gly Val
 370 375

<210> 40
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 40
 Asp Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Arg Gly Gly Arg Trp
 5 10 15
 Arg Glu Asp Trp Gly Arg Leu Thr Gly Val Ala Ala Thr Pro Arg
 20 25 30
 Pro Asp Pro Glu Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ile Glu Asp Thr
 35 40 45
 Leu Phe Ala Leu Phe Arg Val Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp
 50 55 60
 Leu Tyr His Ile Phe Ala Trp Val Leu Asp Val Leu Ala Asp Arg Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Met His Leu Phe Val Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Val Gly
 85 90 95
 Cys Arg Asp Ala Leu Leu Arg Leu Thr Ala Gly Met Ile Pro Thr Arg
 100 105 110
 Val Thr Thr Ala Gly Ser Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Ala Arg Thr
 115 120 125
 Phe Ala Arg Glu Val Gly Gly Val
 130 135

<210> 41
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 41
 Met Gly Pro Gly Leu Trp Val Val Met Gly Val Leu Val Gly Val Ala
 5 10 15
 Gly Gly His Asp Thr Tyr Trp Thr Glu Gln Ile Asp Pro Trp Phe Leu
 20 25 30
 His Gly Leu Gly Leu Ala Arg Thr Tyr Trp Arg Asp Thr Asn Thr Gly
 35 40 45
 Arg Leu Trp Leu Pro Asn Thr Pro Asp Ala Ser Asp Pro Gln Arg Gly
 50 55 60
 Arg Leu Ala Pro Pro Gly Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Met Leu Arg Trp Tyr Ala Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu Val Thr Thr
 85 90 95
 Ala Glu Phe Pro Arg Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile Pro Lys Thr
 100 105 110
 Tyr Leu Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Ser Leu Pro Glu Leu Pro Glu
 115 120 125
 Ala Gly Pro Thr Ser Arg Pro Pro Ala Glu Val Thr Gln Leu Lys Gly

WO 02/02131

PCT/US01/20981

24

```

130          135          140
Leu Ser His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Leu Leu Arg Ser Arg Ala Trp
145          150          155          160
Val Thr Phe Ala Ala Pro Asp Arg Glu Gly Leu Thr Phe Pro Arg
165          170          175
Gly Asp Asp Gly Ala Thr Glu Arg His Pro Asp Gly Arg Arg Asn Ala
180          185          190
Pro Pro Pro Gly Pro Pro Ala Gly Thr Pro Arg His Pro Thr Thr Asn
195          200          205
Leu Ser Ile Ala His Leu His Asn Ala Ser Val Thr Trp Leu Ala Ala
210          215          220
Arg Gly Leu Leu Arg Thr Pro Gly Arg Tyr Val Tyr Leu Ser Pro Ser
225          230          235          240
Ala Ser Thr Trp Pro Val Gly Val Trp Thr Thr Gly Gly Leu Ala Phe
245          250          255
Gly Cys Asp Ala Ala Leu Val Arg Ala Arg Tyr Gly Lys Gly Phe Met
260          265          270
Gly Leu Val Ile Ser Met Arg Asp Ser Pro Pro Ala
275          280

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 42
Ser Leu Pro Arg Ile Glu Asp Thr Leu Phe Ala Leu Phe Arg Val
      5              10              15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 43
Gly Ser Ile Ala Glu Ile Arg Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg
      5              10              15

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 44
Glu Ile Arg Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Val Gly Gly Val
      5              10              15

<210> 45
<211> 838
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 45
Met Gly Pro Gly Leu Trp Val Val Met Gly Val Leu Val Gly Val Ala
      5              10              15
Gly Gly His Asp Thr Tyr Trp Thr Glu Gln Ile Asp Pro Trp Phe Leu

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

25

20 25 30
 His Gly Leu Gly Leu Ala Arg Thr Tyr Trp Arg Asp Thr Asn Thr Gly
 35 40 45
 Arg Leu Trp Leu Pro Asn Thr Pro Asp Ala Ser Asp Pro Gln Arg Gly
 50 55 60
 Arg Leu Ala Pro Pro Gly Glu Leu Asn Leu Thr Thr Ala Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Met Leu Arg Trp Tyr Ala Glu Arg Phe Cys Phe Val Leu Val Thr Thr
 85 90 95
 Ala Glu Phe Pro Arg Asp Pro Gly Gln Leu Leu Tyr Ile Pro Lys Thr
 100 105 110
 Tyr Leu Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Ser Leu Pro Glu Leu Pro Glu
 115 120 125
 Ala Gly Pro Thr Ser Arg Pro Pro Ala Glu Val Thr Gln Leu Lys Gly
 130 135 140
 Leu Ser His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Leu Leu Arg Ser Arg Ala Trp
 145 150 155 160
 Val Thr Phe Ala Ala Ala Pro Asp Arg Glu Gly Leu Thr Phe Pro Arg
 165 170 175
 Gly Asp Asp Gly Ala Thr Glu Arg His Pro Asp Gly Arg Arg Asn Ala
 180 185 190
 Pro Pro Gly Pro Pro Ala Gly Thr Pro Arg His Pro Thr Thr Asn
 195 200 205
 Leu Ser Ile Ala His Leu His Asn Ala Ser Val Thr Trp Leu Ala Ala
 210 215 220
 Arg Gly Leu Leu Arg Thr Pro Gly Arg Tyr Val Tyr Leu Ser Pro Ser
 225 230 235 240
 Ala Ser Thr Trp Pro Val Gly Val Trp Thr Thr Gly Gly Leu Ala Phe
 245 250 255
 Gly Cys Asp Ala Ala Leu Val Arg Ala Arg Tyr Gly Lys Gly Phe Met
 260 265 270
 Gly Leu Val Ile Ser Met Arg Asp Ser Pro Pro Ala Glu Ile Ile Val
 275 280 285
 Val Pro Ala Asp Lys Thr Leu Ala Arg Val Gly Asn Pro Thr Asp Glu
 290 295 300
 Asn Ala Pro Ala Val Leu Pro Gly Pro Pro Ala Gly Pro Arg Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Phe Val Leu Gly Ala Pro Thr Pro Ala Asp Asn Gly Ser Ala Leu
 325 330 335
 Asp Ala Leu Arg Arg Val Ala Gly Tyr Pro Glu Glu Ser Thr Asn Tyr
 340 345 350
 Ala Gln Tyr Met Ser Arg Ala Tyr Ala Glu Phe Leu Gly Glu Asp Pro
 355 360 365
 Gly Ser Gly Thr Asp Ala Arg Pro Ser Leu Phe Trp Arg Leu Ala Gly
 370 375 380
 Leu Leu Ala Ser Ser Gly Phe Ala Phe Val Asn Ala Ala His Ala His
 385 390 395 400
 Asp Ala Ile Arg Leu Ser Asp Leu Leu Gly Phe Leu Ala His Ser Arg
 405 410 415
 Val Leu Ala Gly Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Asp
 420 425 430
 Ser Val Phe Leu Asn Val Ser Val Leu Asp Pro Ala Ala Arg Leu Arg
 435 440 445
 Leu Glu Ala Arg Leu Gly His Leu Val Ala Ala Ile Leu Glu Arg Glu
 450 455 460
 Gln Ser Leu Val Ala His Ala Leu Gly Tyr Gln Leu Ala Phe Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Pro Ala Ala Tyr Gly Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala Arg Leu

WO 02/02131

PCT/US01/20981

26

```

      485      490      495
Ile Asp Ala Leu Tyr Ala Glu Phe Leu Gly Gly Arg Ala Leu Thr Ala
500      505      510
Pro Met Val Arg Arg Ala Leu Phe Tyr Ala Thr Ala Val Leu Arg Ala
515      520      525
Pro Phe Leu Ala Gly Ala Pro Ser Ala Glu Gln Arg Glu Arg Ala Arg
530      535      540
Arg Gly Leu Leu Ile Thr Thr Ala Leu Cys Thr Ser Asp Val Ala Ala
545      550      555      560
Ala Thr His Ala Asp Leu Arg Ala Ala Leu Ala Arg Thr Asp His Gln
565      570      575
Lys Asn Leu Phe Trp Leu Pro Asp His Phe Ser Pro Cys Ala Ala Ser
580      585      590
Leu Arg Phe Asp Leu Ala Glu Gly Phe Ile Leu Asp Ala Leu Ala
595      600      605
Met Ala Thr Arg Ser Asp Ile Pro Ala Asp Val Met Ala Gln Gln Thr
610      615      620
Arg Gly Val Ala Ser Val Leu Thr Arg Trp Ala His Tyr Asn Ala Leu
625      630      635      640
Ile Arg Ala Phe Val Pro Glu Ala Thr His Gln Cys Ser Gly Pro Ser
645      650      655
His Asn Ala Glu Pro Arg Ile Leu Val Pro Ile Thr His Asn Ala Ser
660      665      670
Tyr Val Val Thr His Thr Pro Leu Pro Arg Gly Ile Gly Tyr Lys Leu
675      680      685
Thr Gly Val Asp Val Arg Arg Pro Leu Phe Ile Thr Tyr Leu Thr Ala
690      695      700
Thr Cys Glu Gly His Ala Arg Glu Ile Glu Pro Lys Arg Leu Val Arg
705      710      715      720
Thr Glu Asn Arg Arg Asp Leu Gly Leu Val Gly Ala Val Phe Leu Arg
725      730      735
Tyr Thr Pro Ala Gly Glu Val Met Ser Val Leu Leu Val Asp Thr Asp
740      745      750
Ala Thr Gln Gln Gln Leu Ala Gln Gly Pro Val Ala Gly Thr Pro Asn
755      760      765
Val Phe Ser Ser Asp Val Pro Ser Val Ala Leu Leu Phe Pro Asn
770      775      780
Gly Thr Val Ile His Leu Leu Ala Phe Asp Thr Leu Pro Ile Ala Thr
785      790      795      800
Ile Ala Pro Gly Phe Leu Ala Ala Ser Ala Leu Gly Val Val Met Ile
805      810      815
Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ile Leu Arg Val Val Arg Thr Cys Val Pro
820      825      830
Phe Leu Trp Arg Arg Glu
835
<210> 46
<211> 215
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 46
Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser
5      10      15
Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Ser Gly Ala Gly
20      25      30
Glu Arg Arg Glu Thr Ser Leu Gly Pro Arg Ala Ala Ala Pro Arg Gly
35      40      45

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

27

Pro Arg Lys Cys Ala Arg Lys Thr Arg His Ala Glu Gly Gly Pro Glu
 50 55 60
 Pro Gly Ala Arg Asp Pro Ala Pro Gly Leu Thr Arg Tyr Leu Pro Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Ser Ser Val Val Ala Leu Ala Pro Tyr Val Asn Lys Thr
 85 90 95
 Val Thr Gly Asp Cys Leu Pro Val Leu Asp Met Glu Thr Gly His Ile
 100 105 110
 Gly Ala Tyr Val Val Leu Val Asp Gln Thr Gly Asn Val Ala Asp Leu
 115 120 125
 Leu Arg Ala Ala Ala Pro Ala Trp Ser Arg Arg Thr Leu Leu Pro Glu
 130 135 140
 His Ala Arg Asn Cys Val Arg Pro Pro Asp Tyr Pro Thr Pro Pro Ala
 145 150 155 160
 Ser Glu Trp Asn Ser Leu Trp Met Thr Pro Val Gly Asn Met Leu Phe
 165 170 175
 Asp Gln Gly Thr Leu Val Gly Ala Leu Asp Phe His Gly Leu Arg Ser
 180 185 190
 Arg His Pro Trp Ser Arg Glu Gln Gly Ala Pro Ala Pro Ala Gly Asp
 195 200 205
 Ala Pro Ala Gly His Gly Glu
 210 215

<210> 47
 <211> 826
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 47
 Met Glu Pro Arg Pro Gly Thr Ser Ser Arg Ala Asp Pro Gly Pro Glu
 5 10 15
 Arg Pro Pro Arg Gln Thr Pro Gly Thr Gln Pro Ala Ala Pro His Ala
 20 25 30
 Trp Gly Met Leu Asn Asp Met Gln Trp Leu Ala Ser Ser Asp Ser Glu
 35 40 45
 Glu Glu Thr Glu Val Gly Ile Ser Asp Asp Asp Leu His Arg Asp Ser
 50 55 60
 Thr Ser Glu Ala Gly Ser Thr Asp Thr Glu Met Phe Glu Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Met Asp Ala Ala Thr Pro Pro Ala Arg Pro Pro Ala Glu Arg Gln Gly
 85 90 95
 Ser Pro Thr Pro Ala Asp Ala Gln Gly Ser Cys Gly Gly Gly Pro Val
 100 105 110
 Gly Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly Gly Gly Gly Asp Val Cys Ala Val
 115 120 125
 Cys Thr Asp Glu Ile Ala Pro Pro Leu Arg Cys Gln Ser Phe Pro Cys
 130 135 140
 Leu His Pro Phe Cys Ile Pro Cys Met Lys Thr Trp Ile Pro Leu Arg
 145 150 155 160
 Asn Thr Cys Pro Leu Cys Asn Thr Pro Val Ala Tyr Leu Ile Val Gly
 165 170 175
 Val Thr Ala Ser Gly Ser Phe Ser Thr Ile Pro Ile Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Arg Thr Arg Val Glu Ala Glu Ala Val Arg Ala Gly Thr Ala Val
 195 200 205
 Asp Phe Ile Trp Thr Gly Asn Pro Arg Thr Ala Pro Arg Ser Leu Ser
 210 215 220

WO 02/02131

PCT/US01/20981

28

Leu Gly Gly His Thr Val Arg Ala Leu Ser Pro Thr Pro Pro Trp Pro
225 230 235 240
Gly Thr Asp Asp Glu Asp Asp Asp Leu Ala Asp Gly Val Asp Tyr Val
245 250 255
Pro Pro Ala Pro Arg Arg Ala Pro Arg Gly Gly Gly Gly Ala Gly
260 265 270
Ala Thr Arg Gly Thr Ser Gln Pro Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Pro
275 280 285
Gly Ala Pro Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ala Pro Leu Arg Ala Gly
290 295 300
Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Pro Ala Val Ala Val Val Pro
305 310 315 320
Arg Val Ala Ser Leu Pro Pro Ala Ala Gly Gly Arg Ala Gln Ala
325 330 335
Arg Arg Val Gly Glu Asp Ala Ala Ala Ala Glu Gly Arg Thr Pro Pro
340 345 350

Ala Arg Gln Pro Arg Ala Ala Gln Glu Pro Pro Ile Val Ile Ser Asp
355 360 365
Ser Pro Pro Pro Ser Pro Arg Arg Pro Ala Gly Pro Gly Pro Leu Ser
370 375 380
Phe Val Ser Ser Ser Ser Ala Gln Val Ser Ser Gly Pro Gly Gly Gly
385 390 395 400
Gly Leu Pro Gln Ser Ser Gly Arg Ala Ala Arg Pro Arg Ala Val
405 410 415
Ala Pro Arg Val Arg Ser Pro Pro Arg Ala Ala Ala Val Val Val
420 425 430
Ser Ala Ser Ala Asp Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Val Pro Val
435 440 445
Asp Ala His Arg Ala Pro Arg Ser Arg Met Thr Gln Ala Gln Thr Asp
450 455 460
Thr Gln Ala Gln Ser Leu Gly Arg Ala Gly Ala Thr Asp Ala Arg Gly
465 470 475 480
Ser Gly Gly Pro Gly Ala Glu Gly Gly Pro Gly Val Pro Arg Gly Thr
485 490 495
Asn Thr Pro Gly Ala Ala Pro His Ala Ala Glu Gly Ala Ala Arg
500 505 510
Pro Arg Lys Arg Arg Gly Ser Asp Ser Gly Pro Ala Ala Ser Ser Ser
515 520 525
Ala Ser Ser Ser Ala Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Gln Gly Val
530 535 540
Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Arg Arg Ala Pro Asp Ser Asp Ser Gly
545 550 555 560
Asp Arg Gly His Gly Pro Leu Ala Pro Ala Ser Ala Gly Ala Ala Pro
565 570 575
Pro Ser Ala Ser Pro Ser Ser Gln Ala Val Ala Ala Ala Ser Ser
580 585 590
Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser
595 600 605
Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser
610 615 620
Ala Ser Ser Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Ser
625 630 635 640
Gly Ala Gly Glu Arg Arg Glu Thr Ser Leu Gly Pro Arg Ala Ala Ala
645 650 655
Pro Arg Gly Pro Arg Lys Cys Ala Arg Lys Thr Arg His Ala Glu Gly
660 665 670
Gly Pro Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Ala Pro Gly Leu Thr Arg Tyr

WO 02/02131

PCT/US01/20981

29

```

        675          680          685
Leu Pro Ile Ala Gly Val Ser Ser Val Val Ala Leu Ala Pro Tyr Val
690          695          700
Asn Lys Thr Val Thr Gly Asp Cys Leu Pro Val Leu Asp Met Glu Thr
705          710          715          720
Gly His Ile Gly Ala Tyr Val Val Leu Val Asp Gln Thr Gly Asn Val
725          730          735
Ala Asp Leu Leu Arg Ala Ala Ala Pro Ala Trp Ser Arg Arg Thr Leu
740          745          750
Leu Pro Glu His Ala Arg Asn Cys Val Arg Pro Pro Asp Tyr Pro Thr
755          760          765
Pro Pro Ala Ser Glu Trp Asn Ser Leu Trp Met Thr Pro Val Gly Asn
770          775          780
Met Leu Phe Asp Gln Gly Thr Leu Val Gly Ala Leu Asp Phe His Gly
785          790          795          800
Leu Arg Ser Arg His Pro Trp Ser Arg Glu Gln Gly Ala Pro Ala Pro
805          810          815
Ala Gly Asp Ala Pro Ala Gly His Gly Glu
820          825

```

<210> 48
 <211> 3350
 <212> DNA
 <213> HSV-2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1027, 1034, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1060, 1061,
 1062, 1063, 1064, 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071,
 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1080, 1081,
 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1090
 <223> n = A,T,C or G

<221> misc_feature
 <222> 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100,
 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1110,
 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1120,
 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129
 <223> n = A,T,C or G

<221> misc_feature
 <222> 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139,
 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149,
 1150, 1151, 1152, 1327, 1364, 1390, 1392
 <223> n = A,T,C or G

<400> 48
 cgtcgtgaga cctgcaggag ctggtttatt aatagccagt ccatgctcag cgtagcggcc 60
 agccocctggg gagacaggtc caccgagtc ggaaccaccc tcggctgacc caggggcccc 120
 aggtctgtagt ccccccaggc ccccaagtc tgaocggttcg tgagcacgac gaggtctgcg 180
 gcccggtctgg gggggcgtctc ctccgtcgcg tgggccaatc cctcctgaat ggctgcggcg 240
 cgctgatcgg ccgagctggc gaaggcgcc acgaccacgc cgcgctcctg ctgcaggccc 300
 ttccacgtgt cgtggagttc ctgaacgaac tcggccaccc gctcggggcc cgtggccgcg 360
 cgcgcgccct gatagccggc cgagaggcgc cgccagcgcg ccaggaaactg actcatgtaa 420
 cagaaccocgg ggaacctgtc ccccgacatc aactttgacg cctcggcgctg gatgcccgac 480
 acgatggcca ggaaccocgtg gatttcccgc cgacagcgg ccagcagctt accctcgtgc 540
 gagacctggg ccgccagctc gtccataacc ccgaggtgcg ccgtcgtctc ggtgaacgac 600
 gaccgcagcc ccgcagggga ccgcaccagc gcgcgcttgg cgtcgtgata catgcgcgac 660

WO 02/02131

PCT/US01/20981

30

tactggctca cggcgtagc catggcctcg gggcgccagg gcccaggcg ctgctggcg 720
 tctgcgacca cggcgtagc gggcgtagc tgcctctcga accggcactc aaagaaggcg 760
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 840
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 900
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 960
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1020
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1080
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1140
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1200
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1260
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1320
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1380
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1440
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1500
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1560
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1620
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1680
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1740
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1800
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1860
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1920
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 1980
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2040
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2100
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2160
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2220
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2280
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2340
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2400
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2460
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2520
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2580
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2640
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2700
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2760
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2820
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2880
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 2940
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3000
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3060
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3120
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3180
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3240
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3300
 gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc gggcgtagc 3350

<210> 49
 <211> 3345
 <212> DNA
 <213> HSV-2

<400> 49
 atgtcgagca ggcgctcca ggtcccgagg cccgcccga tgaacccccc gtcgctcca 60
 cccccaacac gaccgttga ggtcctgttg gggagcctga ccaactccg ccggcgccc 120
 tccccctcga ggcgcccgg gggcagccgg gacgagccg cgtttctgtc ccggcccga 180
 ctgcacgccc ccaaggccgg gtttctgttg tgggcccgg ccgtccggc ggcgagggc 240
 cggcgctgct ggcacccgct cctggagcaa ctgtgcgct tgcacgggc ccacgggctt 300
 cgggagacgg cgtctctgga cagaacact cccgggctgc tgggacacg catcgcggtg 360

WO 02/02131

PCT/US01/20981

31

```

ggcgtcccc agacccccga ggccggcctc cgggagatgg aogtcatcaa ggacacggtc 420
ctggcgatca ccggctccga cagcaccac gcgctggagg ccgcccggct gcgcaccacg 480
ggggccctgg ggccggtgag cgtccgcccag tctgcccgtg agtggatcga ccgctggcgg 540
acgtcaacc agagctgcct ggccatgaa cccgggacct cctggaggc cctcggggag 600
atgtcgctta agatgtcccc ggttccctc ggccaacog gcgccaacct gaccaaccog 660
ggtacagcc tctcttccc gttcccagtc gtccaagagg gctccgggtt cttggccctg 720
gtcagcaatt gggtgaagct gttctcgccg caactacagc gcatcgagca cggcccccgt 780
acccccctca cgcgggcccgt gtttacgctg gcgctgggtg acgactacct gacgaccccc 840
gatcggggcg cgggtggtccc gcgcgcgctg ctggcccagt ttccagacac ggtcggggag 900
atcgacccgg ctatcatgat cccgcccctc gaggccacca aaatggttcg cagtccggag 960
gaggtgcccg tctcgaccgc cctaagccgc gtcagcccg gcgcccggct cggcccccgg 1020
ggagacgctga tggcgccgct ggcgagcgac gcgcccgtct togaccccga cgtcccggtt 1080
ctgagtccgt cggcgctggc catcttcgt ccggccgtca ccgcccgtgt gcagctaggg 1140
gagcccccct ccgcccgggc ccagcaacgg ctccctcgcc tgcctgacga gacgtgggtt 1200
ttggtccaga acagcaactc gccctccgtg gtgatcaaca cgttaccca cggggggttc 1260
acgcccggcg actgacacca gtacatctcg gccctgagg ggtttttgtt ggggggggtt 1320
cccgccgaga ccccccccg ccacgggctc agcagatcc agcagctctt tgggtgcatt 1380
gccccttggg ggccgaacgt gttcgggctc gcgcccggagt acgggcaact cggccgctac 1440
gtgaaaacgt tccggcgcat ccaggcgccc agcgaagaca cgcacggcg gctctgtgag 1500
ggggtcggcc tctggcgccg cgtccctcag cagacgctgg cgcgcatcat gggcccggcc 1560
tgcgcagccg aacacctggc gagcctcgcg cgcacgctcg tgggggagtt tgagacggcc 1620
gagcgcgctc tcagcgccgg ccagcccagc ctccctcgcg agacggcgct catctggctc 1680
gagctgtacg gccagaccca ctgggacctg acccccacca ccccgccac cgcgctgtcc 1740
cgctgtctcc cgtcgggccc gcctagccac gcccccctcg ttcaactgg cggcgccacc 1800
aagatccgct tccggcccct ggaggcgcat caccaccaag tccctcgcca cccggggttc 1860
gtcccttaag tctggcccct ggtggtcggg gacgcgtga gggccacgtg caacgctgcc 1920
taccgcccgc gccccatcga gtttgcctg cgggtgctgg cctggcgcg cgaactcgcc 1980
ctgggctatc tccccccgt cagggggcac ccacaaaaat tggcgcgct gatcacctc 2040
ctcgaaacgg ccaccgggc cggcgctcgg ccacagatgc agatggcca caacatcgag 2100
cagctgctgc ggcagctgta cgtgatcgcc agggggcgcg tcgagcagct cggcccccgg 2160
gtccagctgc ctcccccca gccctccgag gtgggcagca gctgctgct gatcagatg 2220
tacgcccgtg cggcccgggg ggtgctgcag gagctcgcc agcgcgcga ccccctggct 2280
cgcagctgg aggaagcgat cgtgctgctg cggctgcaca tgcgcagct cggcccttc 2340
tttgagtccc ggttcgagag cgaaggccac cgcctgtac cgtggtcgc agacgcacac 2400
gagcgcctgg ggccctggcg ccccgaggcc atggcgagc cgtgagcca gtactcgcc 2460
atgtatcag acgccaagcg cgcctggtc ggtccctcg cgggctgct gtcgctgct 2520
accgagcga cggcgcaact cggggtatgc gacgagctgg cggccaggt ctgcagcag 2580
ggtaacgtgc tggcgctcgt gggggggaaa atccacgggt tccctggcat cgtgtcgcc 2640
atccagcca gggcgtaaaa gttgatgtcg ggggaaccag tcccgggtt cgtttaatg 2700
agtcagttcc tggcgctcgt gggcgccctc tcggccggct acagggccc acgcccggcc 2760
acgggcccgg agcgggtggc cgaattcgtt caggaaactcc acgacacgtg gaaggcgctg 2820
cagagggagg ggcgctggt cgtggcgccg ttccgagct cggccgatca ggcacccga 2880
gccattcagg aggtgatggc ccacggagcc gaggacgccc ccccgagcc ggcgcagac 2940
ctcgtctgct tcaagaacgg tcatgacctg ggggcctgg gggactacg cctggggccc 3000
ctgggtcagc cagcgttgg tccggactcc gttggactgt ctcocaggg gctggcgct 3060
aogctgagca tggacttggc attaataaac gagctcctgc aggtcacga cggcgtgtt 3120
cgcgctcgg cgtttcggc ttccgcccgg cccggggccc cgggggaact ggaggccaa 3180
gatgcggcg gtagcacc ccgaacccag acaacccggc cagaggacac gacggccc 3240
gcgctcgga cgcgccggc gggccgagc acggtccctt ggcccaacac cccggtggag 3300
gacgagcaga tgacgcccga ggagacacca ccggtacac cgtag 3345

```

<210> 50
 <211> 993
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 50
 Glu Pro Ala Gly Ser Ala Asp Glu Pro Ala Phe Leu Ser Ala Ala Lys

WO 02/02131

PCT/US01/20981

32

5 10 15
Leu His Ala Ala Thr Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Val Gly
20 25 30
Pro Ala Glu Ala Arg Ala Cys Trp His Pro Leu Leu Glu Gln Leu Cys
35 40 45
Ala Leu His Arg Ala His Gly Leu Pro Glu Thr Ala Leu Leu Ala Glu
50 55 60
Asn Leu Pro Gly Leu Leu Val His Arg Met Ala Val Ala Leu Pro Glu
65 70 75 80
Thr Pro Glu Ala Ala Phe Arg Glu Met Asp Val Ile Lys Asp Thr Val
85 90 95
Leu Ala Ile Thr Gly Ser Asp Thr Thr His Ala Leu Glu Ala Ala Gly
100 105 110
Leu Arg Thr Thr Ala Ala Leu Gly Pro Val Arg Val Arg Gln Cys Ala
115 120 125
Val Glu Trp Ile Asp Arg Trp Arg Thr Val Thr Gln Ser Cys Leu Ala
130 135 140
Met Asn Pro Arg Thr Ser Leu Glu Ala Leu Gly Glu Met Ser Leu Lys
145 150 155 160
Met Ser Pro Val Pro Leu Gly Gln Pro Gly Ala Asn Leu Thr Thr Pro
165 170 175
Ala Tyr Ser Leu Leu Phe Pro Ser Pro Ile Val Gln Glu Gly Leu Arg
180 185 190
Phe Leu Ala Leu Val Ser Asn Trp Val Thr Leu Phe Ser Ala His Leu
195 200 205
Gln Arg Ile Asp Asp Ala Ala Leu Thr Pro Leu Thr Arg Ala Leu Phe
210 215 220
Thr Leu Ala Leu Val Asp Asp Tyr Leu Thr Thr Pro Asp Arg Gly Ala
225 230 235 240
Val Val Pro Pro Pro Leu Leu Ala Gln Phe Gln His Thr Val Arg Glu
245 250 255
Ile Asp Pro Ala Ile Met Ile Pro Pro Leu Glu Ala Thr Lys Met Val
260 265 270
Arg Ser Arg Glu Glu Val Arg Val Ser Thr Ala Leu Ser Arg Val Ser
275 280 285
Pro Arg Ser Ala Cys Ala Pro Pro Gly Thr Leu Met Ala Arg Val Arg
290 295 300
Thr Asp Ala Ala Val Phe Asp Pro Asp Val Pro Phe Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320
Ala Leu Ala Ile Phe Arg Pro Ala Val Thr Gly Leu Leu Gln Leu Gly
325 330 335
Glu Pro Pro Ser Ala Gly Ala Gln Gln Arg Leu Leu Ala Leu Leu Gln
340 345 350
Gln Thr Trp Ala Leu Val Gln Asn Ser Asn Ser Pro Ser Val Val Ile
355 360 365
Asn Thr Leu Thr Asp Ala Gly Phe Thr Pro Ala His Cys Thr Gln Tyr
370 375 380
Ile Ser Ala Leu Glu Gly Phe Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Arg Thr
385 390 395 400
Pro Pro Gly His Gly Leu Ser Glu Ile Gln Gln Leu Phe Gly Cys Ile
405 410 415
Ala Leu Ala Gly Ala Asn Val Phe Gly Leu Ala Arg Glu Tyr Gly His
420 425 430
Tyr Ala Gly Tyr Val Lys Thr Phe Arg Arg Ile Gln Gly Ala Ser Glu
435 440 445
His Thr His Gly Arg Leu Cys Glu Ala Val Gly Leu Ser Gly Gly Val
450 455 460
Leu Ser Gln Thr Leu Ala Arg Ile Met Gly Pro Ala Val Pro Thr Glu

WO 02/02131

PCT/US01/20981

33

465 470 475 480
His Leu Ala Ser Leu Arg Arg Thr Leu Val Gly Glu Phe Glu Thr Ala
485 490 495
Glu Arg Arg Phe Ser Ala Gly Gln Pro Ser Leu Leu Arg Glu Thr Ala
500 505 510
Leu Ile Trp Leu Asp Val Tyr Gly Gln Thr His Trp Asp Leu Thr Pro
515 520 525
Thr Thr Pro Ala Thr Pro Leu Ser Ala Leu Leu Pro Val Gly Pro Pro
530 535 540
Ser His Ala Pro Ser Val His Leu Ala Ala Thr Lys Ile Arg Phe
545 550 555
Pro Ala Leu Glu Gly Ile His Pro Asn Val Leu Ala Asp Pro Gly Phe
565 570 575
Val Pro Tyr Val Leu Ala Leu Val Val Gly Asp Ala Leu Arg Ala Thr
580 585 590
Cys Asn Ala Ala Tyr Leu Pro Arg Pro Ile Glu Phe Ala Leu Arg Val
595 600 605
Leu Ala Trp Ala Arg Asp Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Pro Thr Val Glu
610 615 620
Gly His Arg Thr Lys Leu Gly Ala Leu Ile Thr Leu Leu Glu Pro Ala
625 630 635
Thr Arg Ala Gly Val Gly Pro Thr Met Gln Met Ala Asp Asn Ile Glu
645 650 655
Gln Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Val Ile Ala Arg Gly Ala Val Glu Gln
660 665 670
Leu Arg Pro Ala Val Gln Leu Pro Pro Gln Pro Pro Glu Val Gly
675 680 685
Ser Ser Leu Leu Leu Ile Ser Met Tyr Ala Leu Ala Ala Arg Gly Val
690 695 700
Leu Gln Glu Leu Ala Glu Arg Ala Asp Pro Leu Val Arg Gln Leu Glu
705 710 715 720
Asp Ala Ile Val Leu Leu Arg Leu His Met Arg Thr Leu Ala Ala Phe
725 730 735
Phe Glu Cys Arg Phe Glu Ser Asp Gly His Arg Leu Tyr Ala Val Val
740 745 750
Ala Asp Ala His Glu Arg Leu Gly Pro Trp Arg Pro Glu Ala Met Gly
755 760 765
Asp Ala Val Ser Gln Tyr Cys Gly Met Tyr His Asp Ala Lys Arg Ala
770 775 780
Leu Val Ala Ser Leu Ala Gly Leu Arg Ser Val Val Thr Glu Thr Thr
785 790 795 800
Ala His Leu Gly Val Cys Asp Glu Leu Ala Ala Gln Val Ser His Glu
805 810 815
Gly Asn Val Leu Ala Val Val Arg Arg Glu Ile His Gly Phe Leu Ala
820 825 830
Ile Val Ser Gly Ile His Ala Arg Ala Ser Lys Leu Met Ser Gly Asp
835 840 845
Gln Val Pro Gly Phe Cys Tyr Met Ser Gln Phe Leu Ala Arg Trp Arg
850 855 860
Arg Leu Ser Ala Gly Tyr Gln Ala Ala Arg Ala Thr Gly Pro Glu
865 870 875 880
Arg Val Ala Glu Phe Val Gln Glu Leu His Asp Thr Trp Lys Gly Leu
885 890 895
Gln Thr Glu Arg Ala Leu Val Val Ala Arg Phe Ala Ser Ser Ala Asp
900 905 910
Gln Arg Thr Ala Ala Ile Gln Glu Val Met Ala His Ala Thr Glu Asp
915 920 925
Ala Pro Pro Ser Pro Ala Ala Asp Leu Val Val Leu Thr Asn Arg His

WO 02/02131

PCT/US01/20981

34

930 935 940
Asp Leu Gly Ala Trp Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Pro Leu Gly Gln Pro
945 950 955 960
Thr Val Val Pro Asp Ser Val Asp Leu Ser Pro Gln Gly Leu Ala Ala
965 970 975
Thr Leu Ser Met Asp Trp Leu Leu Ile Asn Glu Leu Leu Gln Val Thr
980 985 990
Asp

<210> 51
<211> 1113
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 51
Met Ser Asp Ser Ala Leu Gln Val Pro Ala Pro Ala Gly Met Thr Pro
5 10 15
Pro Ser Ala Pro Pro Pro Asn Gly Pro Leu Gln Val Leu Leu Gly Ser
20 25 30
Leu Thr Asn Leu Arg Arg Pro Pro Ser Pro Ser Ser Glu Pro Ala Gly
35 40 45
Ser Ala Asp Glu Pro Ala Phe Leu Ser Ala Ala Lys Leu His Ala Ala
50 55 60
Thr Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Val Gly Pro Ala Glu Ala
65 70 75 80
Arg Ala Cys Trp His Pro Leu Leu Glu Leu Cys Ala Leu His Arg
85 90 95
Ala His Gly Leu Pro Glu Thr Ala Leu Leu Ala Glu Asn Leu Pro Gly
100 105 110
Leu Leu Val His Arg Met Ala Val Ala Leu Pro Glu Thr Pro Glu Ala
115 120 125
Ala Phe Arg Glu Met Asp Val Ile Lys Asp Thr Val Leu Ala Ile Thr
130 135 140
Gly Ser Asp Thr Thr His Ala Leu Glu Ala Ala Gly Leu Arg Thr Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Pro Val Arg Val Arg Gln Cys Ala Val Glu Trp Ile
165 170 175
Asp Arg Trp Arg Thr Val Thr Gln Ser Cys Leu Ala Met Asn Pro Arg
180 185 190
Thr Ser Leu Glu Ala Leu Gly Glu Met Ser Leu Lys Met Ser Pro Val
195 200 205
Pro Leu Gly Gln Pro Gly Ala Asn Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Ser Leu
210 215 220
Leu Phe Pro Ser Pro Ile Val Gln Glu Gly Leu Arg Phe Leu Ala Leu
225 230 235 240
Val Ser Asn Trp Val Thr Leu Phe Ser Ala His Leu Gln Arg Ile Asp
245 250 255
Asp Ala Ala Leu Thr Pro Leu Thr Arg Ala Leu Phe Thr Leu Ala Leu
260 265 270
Val Asp Asp Tyr Leu Thr Thr Pro Asp Arg Gly Ala Val Val Pro Pro
275 280 285
Pro Leu Leu Ala Gln Phe Gln His Thr Val Arg Glu Ile Asp Pro Ala
290 295 300
Ile Met Ile Pro Pro Leu Glu Ala Thr Lys Met Val Arg Ser Arg Glu
305 310 315 320
Glu Val Arg Val Ser Thr Ala Leu Ser Arg Val Ser Pro Arg Ser Ala
325 330 335
Cys Ala Pro Pro Gly Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Thr Asp Ala Ala

WO 02/02131

PCT/US01/20981

35

```

340          345          350
Val Phe Asp Pro Asp Val Pro Phe Leu Ser Ala Ser Ala Leu Ala Ile
355
Phe Arg Pro Ala Val Thr Gly Leu Leu Gln Leu Gly Glu Pro Pro Ser
370
Ala Gly Ala Gln Gln Arg Leu Leu Ala Leu Leu Gln Gln Thr Trp Ala
385
Leu Val Gln Asn Ser Asn Ser Pro Ser Val Val Ile Asn Thr Leu Thr
405
Asp Ala Gly Phe Thr Pro Ala His Cys Thr Gln Tyr Ile Ser Ala Leu
420
Glu Gly Phe Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Arg Thr Pro Gly His
435
Gly Leu Ser Glu Ile Gln Gln Leu Phe Gly Cys Ile Ala Leu Ala Gly
450
Ala Asn Val Phe Gly Leu Ala Arg Glu Tyr Gly His Tyr Ala Gly Tyr
465
Val Lys Thr Phe Arg Arg Ile Gln Gly Ala Ser Glu His Thr His Gly
485
Arg Leu Cys Glu Ala Val Gly Leu Ser Gly Gly Val Leu Ser Gln Thr
500
Leu Ala Arg Ile Met Gly Pro Ala Val Pro Thr Glu His Leu Ala Ser
515
Leu Arg Arg Thr Leu Val Gly Glu Phe Glu Thr Ala Glu Arg Arg Phe
530
Ser Ala Gly Gln Pro Ser Leu Leu Arg Glu Thr Ala Leu Ile Trp Leu
545
Asp Val Tyr Gly Gln Thr His Trp Asp Leu Thr Pro Thr Thr Pro Ala
565
Thr Pro Leu Ser Ala Leu Leu Pro Val Gly Pro Pro Ser His Ala Pro
580
Ser Val His Leu Ala Ala Ala Thr Lys Ile Arg Phe Pro Ala Leu Glu
595
Gly Ile His Pro Asn Val Leu Ala Asp Pro Gly Phe Val Pro Tyr Val
610
Leu Ala Leu Val Val Gly Asp Ala Leu Arg Ala Thr Cys Asn Ala Ala
625
Tyr Leu Pro Arg Pro Ile Glu Phe Ala Leu Arg Val Leu Ala Trp Ala
645
Arg Asp Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Pro Thr Val Glu Gly His Arg Thr
660
Lys Leu Gly Ala Leu Ile Thr Leu Leu Glu Pro Ala Thr Arg Ala Gly
675
Val Gly Pro Thr Met Gln Met Ala Asp Asn Ile Glu Gln Leu Leu Arg
690
Glu Leu Tyr Val Ile Ala Arg Gly Ala Val Glu Gln Leu Arg Pro Ala
705
Val Gln Leu Pro Pro Gln Pro Pro Glu Val Gly Ser Ser Leu Leu
725
Leu Ile Ser Met Tyr Ala Leu Ala Ala Arg Gly Val Leu Gln Glu Leu
740
Ala Glu Arg Ala Asp Pro Leu Val Arg Gln Leu Glu Asp Ala Ile Val
755
Leu Leu Arg Leu His Met Arg Thr Leu Ala Ala Phe Phe Glu Cys Arg
770
Phe Glu Ser Asp Gly His Arg Leu Tyr Ala Val Val Ala Asp Ala His
785
Glu Arg Leu Gly Pro Trp Arg Pro Glu Ala Met Gly Asp Ala Val Ser
800

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

36

805 810 815
Gln Tyr Cys Gly Met Tyr His Asp Ala Lys Arg Ala Leu Val Ala Ser
820 825 830
Leu Ala Gly Leu Arg Ser Val Val Thr Glu Thr Thr Ala His Leu Gly
835 840 845
Val Cys Asp Glu Leu Ala Ala Gln Val Ser His Glu Gly Asn Val Leu
850 855 860
Ala Val Val Arg Arg Glu Ile His Gly Phe Leu Ala Ile Val Ser Gly
865 870 875
Ile His Ala Arg Ala Ser Lys Leu Met Ser Gly Asp Gln Val Pro Gly
885 890 895
Phe Cys Tyr Met Ser Gln Phe Leu Ala Arg Trp Arg Arg Leu Ser Ala
900 905 910
Gly Tyr Gln Ala Ala Arg Ala Ala Thr Gly Pro Glu Arg Val Ala Glu
915 920 925
Phe Val Gln Glu Leu His Asp Thr Trp Lys Gly Leu Gln Thr Glu Arg
930 935 940
Ala Leu Val Val Ala Arg Phe Ala Ser Ser Ala Asp Gln Arg Thr Ala
945 950 955
Ala Ile Gln Glu Val Met Ala His Ala Thr Glu Asp Ala Pro Pro Ser
965 970 975
Pro Ala Ala Asp Leu Val Val Leu Thr Asn Arg His Asp Leu Gly Ala
980 985 990
Trp Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Pro Leu Gly Gln Pro Thr Val Val Pro
995 1000 1005
Asp Ser Val Asp Leu Ser Pro Gln Gly Leu Ala Ala Thr Leu Ser Met
1010 1015 1020
Asp Trp Leu Leu Ile Asn Glu Leu Leu Gln Val Thr Asp Gly Val Phe
1025 1030 1035
Arg Ala Ser Ala Phe Arg Pro Ser Ala Gly Pro Gly Ala Pro Gly Asp
1045 1050 1055
Leu Glu Ala Gln Asp Ala Gly Gly Ser Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro
1060 1065 1070
Gly Pro Gln Asp Thr Gln Ala Arg Ala Pro Ser Thr Pro Ala Gly Arg
1075 1080 1085
Glu Thr Val Pro Trp Pro Asn Thr Pro Val Glu Asp Glu Met Thr
1090 1095 1100
Pro Gln Glu Thr Pro Pro Val His Pro
1105 1110

<210> 52
<211> 3113
<212> DNA
<213> HSV-2

<400> 52
atgtcggaca gcgcgtcca ggtcccgcg ccgcgcggca tgaccccccc gtccgctcca 60
cccccaacg gaccgttgca ggtccgttg gggagccctga ccaacctccg ccggccggccc 120
tccocctoga gcgagcggc ggcagcgcg gacgagccgg cgtttctgtc ccggcccaaa 180
ctgcgcgcgc ccacggcggc gttctgttg tcggcgccgg cgttcggccc ggcggaggcg 240
cgggcggtgt ggcacccgct cctggagcaa ctgtgcgcct tgcaccggc caacgggctt 300
ccggagacgg cgtctctggc cgagaacctc ccggggtgc tggtagacgg catggcggtg 360
gcgtccccc agacccccga ggcggccttc cggagatgg acgtcataaa ggaacaggtc 420
ctggcgatca ccggctccga cagcacccac cgcctggagg ccggccggct cgcacccacg 480
gcggccctgg ggcgggtgcg cgtccggcag tgtgccgtgg agtggatcga ccgtggcgcg 540
accgtacccc agagctgcct ggccatgaac ccgcggacct cctggagggc cctgggggag 600
atgtcgttta agatgtcccc ggttccctcg gggcaaccg ggcacaacct gaccaccccg 660

WO 02/02131

PCT/US01/20981

37

```

gogtagacgg tgccttccg gtcacacgg gtcacacgg gtcacacgg gtcacacgg 720
gtcagcaatt ggttgacgct gttctcggcg caactacagc gcatcgacga cgcgcgcctg 780
aoccccccac cgcgggccc gtttacgctg gcgtcgtgg acgagtaact gacgaccccc 840
gatcgggggc cgttggtccc gcccgcgctg ctggcccagt ttcagcaacc ggtgcggggg 900
atcgaccccg ctatcatgat cccgcocctc gaggccacca aaatggttcg cgtgcggggg 960
gaggtgcgct gtcgacccg cctaagccgc gtcagccccc ggtcggcgctg cgcgcgcctg 1020
gggacgctga tggcgcgctg cgggacggac gcggcgcctc tgcagcccca cgtgcgcttt 1080
ctgagtgcgt cggcgctggc catcttcgtt cggcgctcga cggcgcgtg gtagctaggg 1140
gagccgcctc cgcgcggggc ccagcaacgg ctctcgcgc tgcgcaaga gacgtgggct 1200
ttgttcacga acagcaactc gcccctcgtg gtgatcaaa cgtttaccga cgcgggggtc 1260
acgcgcgcgc actgcaccca gtacatatcg gccctggagg ggttttttgt ggccgggggtg 1320
cccgcgcgga cgcgcgcgcg ccacgggctc agcgagatcc agcagctctt tgggtgcatt 1380
gcccctgcgg tggcggaact gttcgggctc gcgcgggagt acgggcaact cgcgcgcctc 1440
gtgaaacact tccgcgagat ccaggggcgc agcgagcaaa cgcagcggtg gctctgtgag 1500
gcgctcggcg tgcggggcg cgtcctcagc cagacgctgg cgcgcctcat gggcccgccc 1560
gtgcgcgcgc aacacctggc gacgctcggc cgcacgctcg tgggggagtt tgagacggcc 1620
gagcgccgct tcagcgcccg ccagcccagc ctctcgcgc agacggcgct catctggctc 1680
gagcgtgata ccagacacca ctgggacgtt acccccacca ccccgccacc cgcgctgtcc 1740
gcgctgcgct cgcgcggggc gcttagccac gcccctcgtg ttcaactggc cgcgcgcacc 1800
aagatcgcgt tcccgccctt gtaggggcat caccaccaac tctcgcgga cccgggggtc 1860
gtcccttaag tgcggggcg ggtggtcggg gacgctgga gggccacgtg caacgctgcc 1920
taacctcccc gcccacatga gtttgcctcg cgggtgctgg cctggcgcgct cgccttcggc 1980
ctgggctatc tcccacactg ctagggggcac cgcacaaaa tggggcgctg gatcacctc 2040
ctcgacccgg ccacccgggc cgcgctcggg cccacgatgc agatggcga caacatcgag 2100
cagctgctgc cgcagctgta cgtgatcgcc agggggggcg tcagcagct cgcgcgcgcg 2160
gtccagctgc ctccccacca gcccctcggg gtagggcaga gctcgtgct gatcagcatg 2220
tacgctcgcg cgcgcggggg ggtgctgcag gacgtcgcgc agcgcgcga cccctggctc 2280
cgcagctgct aggacgggat cgtgctgctg cggcttcaca tgcgcagct cgcgcgcctc 2340
tttgagtgcg ggttcgagag cgcagggcac cgcctgtacg ccgtggtcgc agacccacc 2400
gagcgcctg ggcctcggcg ccccgaggcc atggcgagc cgtgtagcca gtagctcggc 2460
atgtatcacg acgccaagcg cgcgctggtc gacgagctgg cggccaggt ctgcacagag 2520
accgagcaga cggcgacact cggggtatgc gacgagctgg cgcgcgcctc ctgcacagag 2580
ggttaactgc tggcgtcgtg cggcggggaa atccacgggt tccctggcat ctgttcgggc 2640
atccacacca gggcgtcaaa gttgatgctg ggggacagc tcccggggt ctgttacatg 2700
agtacgttcc tggcgcgctg cggcgccctc cagggaactc acgacacgtg gaaggcgctg 2760
acgggccccg agcgggtggc cgtggtcgtt cagggaactc acgacacgtg gaaggcgctg 2820
cagacgggag cgcgctgggt cgtggtcgtt ttcgacagct cggcgatca ggcacccga 2880
gcccattcag aggtgatggc ccacgcgacc gaggacgcgc ccccgaccc ggcgcgagac 2940
ctcgtcgtgc tcaogaacgg tcatgacctg ggggctggg gggactacag cctggggccc 3000
ctgggtcagc cgcggtggtt tccggaactc gtagacctg ctccccagg gctggcgctg 3060
acgctgagca tggactggct attaatatac gacgtcctgc aggtcacga cgg 3113

```

<210> 53
 <211> 761
 <212> DNA
 <213> HSV-2

```

<400> 53
gccccgcctc gggcctcagc ggcaggccgc cgggggttac gacgcggtgc ggacctgggg 60
gcccagacgcg gaggccgaac cggacacgat ggaacacacg tatctgctgc ccagcagatga 120
cgcgcgcctat cccgcgggag tgggcttgg cgcacccccc cgcgcgcgaca ccacgcgcgc 180
cgcctcggcg cgcgaaagcc acgccccccc cgcgcctccc gaggacgcag attccattta 240
cgcgtcgggt agcagggatg gggggcgctt ctacgaggag atccctggg ttccgggtata 300
cgaaacacatc tgccttcgcc ggcaagacgc cgcggggggc gcccgcggg gagacgccc 360
ggactccccg tacatcgagg cggaaaaatc cctgtaogac tggggcggtt ctgcctcttt 420
ctccccccgc ggggccacac gcgccccgga cccgggacta agcctgtcgc ccatgccgcg 480
ccgccccccg accaacgcgc tggccaaaga cgcgcgcaga aacgtcgcgc cctcagcgc 540

```

WO 02/02131

PCT/US01/20981

38

```
cctgttgacg aagctcaaac ggggcccaga ccagagccat taaaaaaatg cgaccgccgg 600
ccccaccgtc tcggtttccg gcccttttcc ccgtatgtct gttttcaata aaaagtaaca 660
aacagagaaa aaaaaacagc gatttcogca tggtttgcg tacgcaatta gctgtttatt 720
gttttttttt tggggggggg aagagaaaaa gaaaaaagga g 761
```

<210> 54
<211> 1037
<212> FRF
<213> HSV-2

<400> 54
Met Ser Asp Ser Ala Leu Gln Val Pro Ala Pro Ala Gly Met Thr Pro
5 10 15
Pro Ser Ala Pro Pro Pro Asn Gly Pro Leu Gln Val Leu Leu Gly Ser
20 25 30
Leu Thr Asn Leu Arg Arg Pro Pro Ser Pro Ser Ser Glu Pro Ala Gly
35 40 45
Ser Ala Asp Glu Pro Ala Phe Leu Ser Ala Ala Lys Leu Arg Ala Ala
50 55 60
Thr Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Val Gly Pro Ala Glu Ala
65 70 75 80
Arg Ala Cys Trp His Pro Leu Leu Glu Gln Leu Cys Ala Leu His Arg
85 90 95
Ala His Gly Leu Pro Glu Thr Ala Leu Leu Ala Glu Asn Leu Pro Gly
100 105 110
Leu Leu Val His Arg Met Ala Val Ala Leu Pro Glu Thr Pro Glu Ala
115 120 125
Ala Phe Arg Glu Met Asp Val Ile Lys Asp Thr Val Leu Ala Ile Thr
130 135 140
Gly Ser Asp Thr Thr His Ala Leu Glu Ala Ala Gly Leu Arg Thr Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Pro Val Arg Val Arg Gln Cys Ala Val Glu Trp Ile
165 170 175
Asp Arg Trp Arg Thr Val Thr Gln Ser Cys Leu Ala Met Asn Pro Arg
180 185 190
Thr Ser Leu Glu Ala Leu Gly Glu Met Ser Leu Lys Met Ser Pro Val
195 200 205
Pro Leu Gly Gln Pro Gly Ala Asn Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Ser Leu
210 215 220
Leu Phe Pro Ser Pro Ile Val Gln Glu Gly Leu Arg Phe Leu Ala Leu
225 230 235 240
Val Ser Asn Trp Val Thr Leu Phe Ser Ala His Leu Gln Arg Ile Asp
245 250 255

WO 02/02131

PCT/US01/20981

39

Asp Ala Ala Leu Thr Pro Leu Thr Arg Ala Leu Phe Thr Leu Ala Leu
 260 265 270
 Val Asp Glu Tyr Leu Thr Thr Pro Asp Arg Gly Ala Val Val Pro Pro
 275 280 285
 Pro Leu Leu Ala Gln Phe Gln His Thr Val Arg Glu Ile Asp Pro Ala
 290 295 300
 Ile Met Ile Pro Pro Leu Glu Ala Thr Lys Met Val Arg Ser Arg Glu
 305 310 315 320
 Glu Val Arg Val Ser Thr Ala Leu Ser Arg Val Ser Pro Arg Ser Ala
 325 330 335
 Cys Ala Pro Pro Gly Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Thr Asp Ala Ala
 340 345 350
 Val Phe Asp Pro Asp Val Pro Phe Leu Ser Ala Ser Ala Leu Ala Ile
 355 360 365
 Phe Arg Pro Ala Val Thr Gly Leu Leu Gln Leu Gly Glu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Ala Gly Ala Gln Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gln Gln Thr Trp Ala
 385 390 395 400
 Leu Val Gln Asn Ser Asn Ser Pro Ser Val Val Ile Asn Thr Leu Thr
 405 410 415
 Asp Ala Gly Phe Thr Pro Ala His Cys Thr Gln Tyr Ile Ser Ala Leu
 420 425 430
 Glu Gly Phe Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Arg Thr Pro Pro Gly His
 435 440 445
 Gly Leu Ser Glu Ile Gln Gln Leu Phe Gly Cys Ile Ala Leu Ala Gly
 450 455 460
 Ala Asn Val Phe Gly Leu Ala Arg Glu Tyr Gly His Tyr Ala Gly Tyr
 465 470 475 480
 Val Lys Thr Phe Arg Arg Ile Gln Gly Ala Ser Glu His Thr His Gly
 485 490 495
 Arg Leu Cys Glu Ala Val Gly Leu Ser Gly Gly Val Leu Ser Gln Thr
 500 505 510
 Leu Ala Arg Ile Met Gly Pro Ala Val Pro Thr Glu His Leu Ala Ser
 515 520 525
 Leu Arg Arg Thr Leu Val Gly Glu Phe Glu Thr Ala Glu Arg Arg Phe
 530 535 540
 Ser Ala Gly Gln Pro Ser Leu Leu Arg Glu Thr Ala Leu Ile Trp Leu
 545 550 555 560

WO 02/02131

PCT/US01/20981

40

Asp Val Tyr Gly Gln Thr His Trp Asp Leu Thr Pro Thr Thr Pro Ala
 565 570 575
 Thr Pro Leu Ser Ala Leu Leu Pro Val Gly Pro Pro Ser His Ala Pro
 580 585 590
 Ser Val His Leu Ala Ala Ala Thr Lys Ile Arg Phe Pro Ala Leu Glu
 595 600 605
 Gly Ile His Pro Asn Val Leu Ala Asp Pro Gly Phe Val Pro Tyr Val
 610 615 620
 Leu Ala Leu Val Val Gly Asp Ala Leu Arg Ala Thr Cys Asn Ala Ala
 625 630 635 640
 Tyr Leu Pro Arg Pro Ile Glu Phe Ala Leu Arg Val Leu Ala Trp Ala
 645 650 655
 Arg Asp Phe Gly Leu Gly Tyr Leu Pro Thr Val Glu Gly His Arg Thr
 660 665 670
 Lys Leu Gly Ala Leu Ile Thr Leu Leu Glu Pro Ala Thr Arg Ala Gly
 675 680 685
 Val Gly Pro Thr Met Gln Met Ala Asp Asn Ile Glu Gln Leu Leu Arg
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Val Ile Ala Arg Gly Ala Val Glu Gln Leu Arg Pro Ala
 705 710 715 720
 Val Gln Leu Pro Pro Pro Gln Pro Pro Glu Val Gly Ser Ser Leu Leu
 725 730 735
 Leu Ile Ser Met Tyr Ala Leu Ala Ala Arg Gly Val Leu Gln Glu Leu
 740 745 750
 Ala Glu Arg Ala Asp Pro Leu Val Arg Gln Leu Glu Asp Ala Ile Val
 755 760 765
 Leu Leu Arg Leu His Met Arg Thr Leu Ala Ala Phe Phe Glu Cys Arg
 770 775 780
 Phe Glu Ser Asp Gly His Arg Leu Tyr Ala Val Val Ala Asp Ala His
 785 790 795 800
 Glu Arg Leu Gly Pro Trp Arg Pro Glu Ala Met Gly Asp Ala Val Ser
 805 810 815
 Gln Tyr Cys Gly Met Tyr His Asp Ala Lys Arg Ala Leu Val Ala Ser
 820 825 830
 Leu Ala Gly Leu Arg Ser Val Val Thr Glu Thr Thr Ala His Leu Gly
 835 840 845
 Val Cys Asp Glu Leu Ala Ala Gln Val Ser His Glu Gly Asn Val Leu
 850 855 860
 Ala Val Val Arg Arg Glu Ile His Gly Phe Leu Ala Ile Val Ser Gly

PCT/US01/20981

[illegible]

WO 02/02131

PCT/US01/20981

42

100 105 110
 Ala Ala Pro Pro Gly Asp Ala Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala Glu
 115 120 125
 Asn Pro Leu Tyr Asp Trp Gly Gly Ser Ala Leu Phe Ser Pro Pro Gly
 130 135 140
 Ala Thr Arg Ala Pro Asp Pro Gly Leu Ser Leu Ser Pro Met Pro Ala
 145 150 155 160
 Arg Pro Arg Thr Asn Ala Leu Ala Asn Asp Gly Pro Thr Asn Val Ala
 165 170 175
 Ala Leu Ser Ala Leu Leu Thr Lys Leu Lys Arg Gly Arg His Gln Ser
 180 185 190

His

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 56
 Ser Pro Asn Thr Asp Val Arg Met Tyr Ser Gly Lys Arg Asn Gly
 5 10 15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 57
 Tyr Leu Ala Ala Pro Thr Gly Ile Pro Pro Ala Phe Phe Pro Ile
 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 58
 Gly Val Ala Ala Ala Thr Pro Arg Pro Asp Pro Glu Asp Gly Ala
 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HSV-2

<400> 59
 Glu Glu Ile Pro Trp Val Arg Val Tyr Glu Asn Ile Cys Pro Arg
 5 10 15

WO 02/02131

PCT/US01/20981

43

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 60
Pro Gly Asp Ala Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala Glu Asn Pro
5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 61
Pro Asp Ser Pro Tyr Ile Glu Ala Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp
5 10 15

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 62
Glu Asn Pro Leu Tyr Asp Trp Gly Gly Ser Ala Leu Phe Ser Pro
5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 63
Ala Ile Asp Tyr Val His Cys Glu Gly Ile Ile His Arg Asp Ile
5 10 15

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> HSV-2

<400> 64
Ala Phe Pro Val Ala Leu His Ala Val Asp Ala Pro Ser Gln Phe
5 10 15

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002131 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/38,
15/62, C07K 14/035, 16/08, A61K 38/16, 39/245, G01N
33/571, A61P 31/22(74) Agents: POTTER, Jane, E., R. et al.; Seed Intellectual
Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue,
Seattle, WA 98104-7092 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20981

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/215,458 29 June 2000 (29.06.2000) US
60/277,438 20 March 2001 (20.03.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): CORINA
CORPORATION [US/US]; 1124 Columbia Street, Suite
200, Seattle, WA 98104 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOSKEN, Nancy,
A. [US/US]; 2314 North 56th Street, Seattle, WA 98103
(US). DAY, Craig, H. [US/US]; 11501 Stone Avenue N.,
C122, Seattle, WA 98133-8317 (US). DILLON, Davin,
C. [US/US]; 18112 N.W. Montreux Drive, Issaquah, WA
98027 (US). MCGOWAN, Patrick [US/US]; 2319 44th
Avenue S.W., Seattle, WA 98116 (US). SLEATH, Paul,
R. [GB/US]; 1623 Eighth Avenue W., Seattle, WA 98119
(US).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
3 January 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/002131 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HERPES SIMPLEX VIRUS
INFECTION

(57) Abstract: Compounds and methods for the diagnosis and treatment of HSV infection are provided. The compounds comprise polypeptides that contain at least one antigenic portion of an HSV polypeptide and DNA sequences encoding such polypeptides. Pharmaceutical compositions and vaccines comprising such polypeptides or DNA sequences are also provided, together with antibodies directed against such polypeptides. Diagnostic kits are also provided comprising such polypeptides and/or DNA sequences and a suitable detection reagent for the detection of HSV infection in patients and in biological samples.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20981
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/38 C12N15/62 C07K14/035 C07K16/08 A61K38/16 A61K39/245 G01N33/571 A61P31/22		
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) IPC 7 C12N C07K A61K G01N A61P		
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 practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, EMBL, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 1 October 1996 (1996-10-01) "HSV2 ribonucleotide reductase 136 kDa subunit t (UL39)" retrieved from EMBL Database accession no. P09853 XP002187044 the whole document	1-3, 8-34, 36, 37
A	--- ---	35, 38
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document 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 claim 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:		Date of mailing of the International search report
5 June 2002		05. 06. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2070, Tx. 31 851 apo nl Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Gallin, I

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/20981

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 1 May 1997 (1997-05-01) "Herpes Simplex Virus type 2 tegument protein" retrieved from EMBL Database accession no. P89466 XP002201190 the whole document	1-4, 8-34,36, 37
A	----- EP 0 531 728 A (AMERICAN CYANAMID CO) 17 March 1993 (1993-03-17) examples 1-3	35,38 1-3,8-38
A	----- WO 98 55145 A (CHIRON CORP) 10 December 1998 (1998-12-10) abstract table 6	1-3,8-38
T	----- VERJANS G.M.G.M. ET AL.: "Intraocular T cells of patients with Herpes Simplex Virus (HSV)-induced acute retinal necrosis recognize HSV tegument proteins VP11/12 and VP13/14." J. INFECTIOUS DISEASES, vol. 182, September 2000 (2000-09), pages 923-927, XP002201189 abstract	35,38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/20981**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:
Although claims 17, 29-34, 36-37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
1-4, 8-38
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.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/20981

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: partly 1-3,8-38

An isolated polypeptide comprising at least an immunogenic portion of an HSV antigen, wherein said antigen comprises an amino acid sequence set forth in seq. 2 or 3. Corresponding nucleic acid, set forth in Seq. ID 1 (UL39). Fusion proteins and their coding nucleic acids, antibodies, pharmaceutical compositions, therapeutic and diagnostic applications.

2. Claims: 7 and partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 4-7,64 (US8).

3. Claims: 6 and partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 8-12,63 (US3).

4. Claims: 4 and partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 13-15,27-31,52,54,59-62 (UL46).

5. Claims: partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 16-18 (UL27).

6. Claims: partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 19-23,32-33 (UL18).

7. Claims: 5 and partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 24-26,56-57 (UL15).

8. Claims: partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 36-45,58 (UL22/23).

9. Claims: partly 1-3,8-38

International Application No. PCT/US 01/20981

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 34-35,46-47
(RI2).

10. Claims: partly 1-3,8-38

Idem as subject-matter 1 but limited to Seq. IDs 48-51,53,55
(UI37).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 01/20981	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
EP 0531728	A	17-03-1993	AU	2355392 A	18-03-1993
			CA	2078087 A1	14-03-1993
			EP	0531728 A1	17-03-1993
			FI	924080 A	14-03-1993
			JP	5252965 A	05-10-1993
			NO	923548 A	15-03-1993
WO 9855145	A	10-12-1998	AU	7597998 A	21-12-1998
			EP	0984790 A1	15-03-2000
			JP	2002503251 T	29-01-2002
			WO	9855145 A1	10-12-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 31/22	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/22	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/04	C 0 7 K 14/03	
C 0 7 K 14/03	C 0 7 K 16/08	
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	G 0 1 N 33/569	J
G 0 1 N 33/569	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 デイ, クレイグ エイチ.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 3 3-8 3 1 7, シアトル, シー 1 2 2, ストーン
アベニュー エヌ. 1 1 5 0 1

(72)発明者 ディロン, ダビン シー.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 7, イサクア, エヌ. ダブリュー. モントリユー
ドライブ 1 8 1 1 2

(72)発明者 マックゴーワン, パトリック

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 6, シアトル, 4 4 ティーエイチ アベニュー エス
. ダブリュー. 2 3 1 9

(72)発明者 スリース, ポール アール.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 9, シアトル, エイス アベニュー ダブリュー.
1 6 2 3

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 BA41 CA03 CA07 DA03 FA06 GA11 HA15
HA17

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA15

4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 MA02 NA14

ZB072 ZB331

4C085 AA03 BA78 CC03 DD23 EE01

4C086 AA01 DA41 MA02 MA05 NA14 ZB07 ZB33

4H045 AA10 AA30 BA10 BA20 BA41 CA03 DA75 DA76 DA86 EA29

EA31 EA52 FA72 FA74