

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2019年3月7日(07.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/044927 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/035 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A61K 39/245 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
A61P 31/22 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/032020

(22) 国際出願日: 2018年8月29日(29.08.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-165684 2017年8月30日(30.08.2017) JP

(71) 出願人: K M バイオロジクス株式会社 (KM BIOLOGICS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者: 森 泰亮 (MORI Hiroaki); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KM バイオロジクス株式会社菊池研究所内 Kumamoto (JP). 西村 知裕 (NISHIMURA Tomohiro); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KM バイオロジクス株式会社菊池研究所内 Kumamoto (JP). 清水 裕之 (SHIMIZU Hiroyuki); 〒1080071 東京都港区白金台四丁目5番10号 KM バイオロジクス株式会社東京営業所内 Tokyo (JP). 松本 みゆき (MATSUMOTO Miyuki); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 KM バイオロジクス株式会社菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: MODIFIED HSV GB PROTEIN AND HSV VACCINE INCLUDING SAME

(54) 発明の名称: 改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むHSVワクチン

(57) Abstract: Provided is a modified protein of a herpes simplex virus (HSV) envelope glycoprotein B (gB), wherein, at least one epitope is deactivated (epitope deletion) among epitopes which induce non-neutralizing antibodies (non-neutralizing epitopes) and are present in domain IV and domain I of wild HSV gB.

(57) 要約: 単純ヘルペスウイルス (HSV) のエンベロープ糖タンパク質 B (gB) の改変タンパク質であって、野生型 HSV gB のドメイン IV 及びドメイン I に存在する非中和抗体を誘導するエピトープ (非中和エピトープ) のうち、少なくとも1つのエピトープが不活性化 (脱エピトープ化) された、改変型 HSV gB タンパク質。



WO 2019/044927 A1

## 明 細 書

発明の名称：

改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むHSVワクチン

### 技術分野

[0001] 本発明は、改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むHSVワクチンに関する。

### 背景技術

[0002] 単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus; HSV) は、向神経性の病原体であり、粘膜上皮に初感染後は知覚神経に移行し、三叉神経節又は仙骨神経節にて終生潜伏感染する。潜伏しているHSVはときに再活性化し、様々な病態を引き起こす (非特許文献1)。

[0003] HSVには2つの血清型 (HSV-1、HSV-2) が知られており、HSV-1は主に口唇・角膜ヘルペス、HSV-2は主に性器ヘルペスの原因となる。しかし近年、性行動の多様化等から、しばしばHSV-1が性器ヘルペス、HSV-2が口唇ヘルペスの原因となることもある。日本における抗体陽性者 (既感染者) 比率は、HSV-1で60~80%、HSV-2は10%であり、HSV-2に限ったとしてもワクチンの潜在需要は1000万人と推測される (非特許文献2)。また、米国における抗体陽性者 (既感染者) 比率は、HSV-1が57%、HSV-2が20% (そのうち約10%が顕在性の性器ヘルペス) となっている (非特許文献3)。

[0004] HSVの細胞への感染成立には、吸着と侵入の2段階で5つのエンベロープ糖タンパク質 (glycoprotein) が関与していることが知られている。この5つのエンベロープ糖タンパク質はそれぞれ、エンベロープ糖タンパク質B (gB)、エンベロープ糖タンパク質C (gC)、エンベロープ糖タンパク質D (gD)、エンベロープ糖タンパク質H (gH)、エンベロープ糖タンパク質L (gL) と呼ばれている (非特許文献4)。

[0005] まず、吸着過程は、gB及びgCが細胞表面のヘパラン硫酸に結合するこ

とがきっかけとなる（非特許文献5、6）。この過程はHSVが細胞に侵入する際必須ではないが、より効率的な侵入に関与していると考えられている。次に、侵入過程では、gB及びgDがそれぞれの宿主細胞受容体と結合し、ウイルスエンベロープと宿主細胞膜が融合することによって開始される。

[0006] 宿主細胞受容体としてgB受容体とgD受容体が知られている。gB受容体として、NM-11A（非特許文献7、8）及びMAG（非特許文献9）が同定されている。gD受容体として、ネクチン1（非特許文献10）、HVEM（非特許文献11）、及び3-O-硫酸化ヘパラン硫酸（非特許文献12）が同定されている。また、gH/gLのヘテロダイマーは、gB及びgDと相互作用し膜融合において重要な役割を果たしていることが知られている（非特許文献13）。

[0007] 2006年にHSV-1 gBの構造が解かれた結果、gBは5つのドメインをもった3量体を形成していることが明らかになった（非特許文献14）。また、gBの構造は膜融合タンパク質として知られているVSV（Vesicular stomatitis virus）のgGと似た構造をとっており、このことはgBがHSVの膜融合タンパク質であることを裏付けている。また、gBは他のヘルペスウイルスにおいても高度に保存されており、その機能はヘルペスウイルスに共通するものであると考えられている。

[0008] 感染症を引き起こす病原体は、従来型ワクチンで十分な効果を得ることが出来るClass I群病原体と、従来型ワクチンや病原体感染歴では十分な防御免疫を獲得出来ないClass II群病原体とに大別される。Class II群病原体の防御が難しい理由として、それらが有する巧妙な免疫逃避機構が指摘されている（非特許文献15）。HSVはClass I群病原体に分類されるが、これはHSVが免疫逃避機構を有し、宿主の免疫反応を巧妙にくぐり抜けているからであると考えられている。HSVワクチン開発に関しては、これまで弱毒生ワクチンやアジュバント不活化ワクチンを用いた検討が試みられてきたが、いずれもT細胞免疫、及びB細胞免疫

共に応答が不十分であり、自然感染後に得られる不十分な免疫応答のレベルと大差無いものであった。

### 先行技術文献

### 非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Roizman, B.ら、Herpes simplex viruses, p. 2501-2602. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), 「Fields Virology」, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A. 2007
- 非特許文献2: Hashido M1ら、An epidemiologic study of herpes simplex virus type 1 and 2 infection in Japan based on type-specific serological assays, *Epidemiol Infect.* 1998 Mar; 120(2):179-86
- 非特許文献3: Decision Resources; *Emerging Vaccines 2008*
- 非特許文献4: ウイルス 2010 第60巻第2号, pp.187-196
- 非特許文献5: Herold, B. C.ら、Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol* 1994 75 (Pt 6):1211-22
- 非特許文献6: Herold, B. C.ら、Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* 1991 65:1090-8
- 非特許文献7: Arii, J.ら、Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 2010 467:859-62
- 非特許文献8: Satoh, T.ら、PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 2008 132:935-44
- 非特許文献9: Suenaga, T.ら、Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107:866-71
- 非特許文献10: Geraghty, R. J.ら、Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 1998 280:1618-20

非特許文献11 : Montgomery, R. I.ら、Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell (1996)87:427-36

非特許文献12 : Shukla, D.,ら、A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. Cell 1999 99:13-22

非特許文献13 : Eisenberg RJら、Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. Viruses 2012 4:800-832 10.3390/v4050800

非特許文献14 : SCIENCE 2006 313, 14, 217-220

非特許文献15 : Vaccine 26 (2008) 6189-6199

非特許文献16 : The Journal of Immunology, 1997, 159 279-289.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 上述したように、HSVの治療にはアシクロビル等の抗ウイルス薬が用いられている。しかし、これらの抗ウイルス薬は、ウイルスを完全に除去することはできず、また服用を中止するとウイルスが再活性化する。そのため、HSVの感染そのものを防御する予防用ワクチン或いは再発症状を軽減緩和する治療用ワクチンの開発が望まれるが、現在、有効なワクチンは存在せず、そのアンメットニーズは高い。

[0011] 本発明は、免疫誘導に際して、野生型HSV gBに比べて、HSV gBに対する高い中和活性を示す中和抗体の含有割合が高い抗体を誘導でき、HSV感染症の予防及び治療に利用し得る、改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むワクチンを提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、HSVの主要な防御抗原の一つとして知られているgBタンパクに関して、網羅的なB細胞エピトープ解析を行い、防御活性発現において有益なエピトープ（中和エピトープ）と無益又は有害なエピトープ（非中和エピトープ）とに分類することを試みた。そして、無益又は有害なエピトープを脱エピトープ化し、有益なエピトープを免疫的に際立たせることに

よって、その中和抗体誘導能や感染防御能を増強させた改変型HSV gBタンパク質、及び当該改変型HSV gBタンパク質を含むワクチンを完成させるに至った。

[0013] すなわち、本発明は、以下の各発明に関する。

(1) 単純ヘルペスウイルス (HSV) のエンベロープ糖タンパク質B (gB) の改変タンパク質 (改変型HSV gBタンパク質) であって、野生型HSV gBのドメインI V及びドメインIに存在する非中和抗体を誘導するエピトープ (非中和エピトープ) のうち、少なくとも1つがエピトープとして機能しないように改変された、改変型HSV gBタンパク質。

(2) 非中和エピトープは、野生型HSV gBのエクトドメインの結晶構造の表面において、配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基 (R567)、602番目のアルギニン残基 (R602)、631番目のセリン残基 (S631)、又は199番目のアスパラギン酸残基 (D199) に相当するアミノ酸残基からの距離が1.5nm以下の領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を含むエピトープである、(1)の改変型HSV gBタンパク質。

(3) 非中和エピトープは、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567、R602、S631、又はD199に相当するアミノ酸残基を含むエピトープである、(1)又は(2)の改変型HSV gBタンパク質。

(4) 改変は、アミノ酸残基の置換、及び/又はアミノ酸残基の欠損によって行われる改変を含む、(1)～(3)のいずれかの改変型HSV gBタンパク質。

(5) 改変は、アミノ酸残基の置換又は欠損によって糖鎖導入されることによって行われる改変を含む、(4)の改変型HSV gBタンパク質。

(6) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(1)～(5)のいずれかの改変型HSV gBタンパク質。

(7) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも2つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(1)～(6)のいずれかの改変型HSV-gBタンパク質。

(8) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(7)の改変型HSV-gBタンパク質。

(9) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(8)の改変型HSV-gBタンパク質。

(10) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入するための改変を含む、(7)の改変型HSV-gBタンパク質。

(11) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR602に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、(6)～(10)のいずれかの改変型HSV-gBタンパク質。

(12) 糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR602N、D603A、A604Tのアミノ酸残基置換によって行われる、(11)の改変型HSV-gBタンパク質。

(13) 改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、(5)～(12)のいずれかの改変型HSV-gBタンパク質。

(14) 前記糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199N、D200A、及びH201Tのアミノ酸残基置換によって行われる、(13)の改変型HSV-gBタンパク質。

(15) 前記改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン(R613)に相当するアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む、(4)～(14)のいずれかの改変型HSV-gBタンパク

質。

(16) (1) ~ (15) のいずれかの改変型HSV gBタンパク質を含む、HSVワクチン。

(17) 単純ヘルペスウイルス (HSV) のエンベロープ糖タンパク質B (gB) の改変タンパク質 (改変型HSV gBタンパク質) であって、野生型HSV gBのエクトドメインの結晶構造の表面において、配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基 (R567)、602番目のアルギニン残基 (R602)、631番目のセリン残基 (S631)、又は199番目のアスパラギン酸残基 (D199) に相当するアミノ酸残基からの距離が1.5 nm以下の領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を置換又は欠失させた、改変型HSV gBタンパク質。

(18) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(17) の改変型HSV gBタンパク質。

(19) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、(17) 又は(18) の改変型HSV gBタンパク質。

(20) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン (R613) に相当するアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む、(17) ~ (19) のいずれかの改変型HSV gBタンパク質。

(21) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567に相当するアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(17) ~ (20) のいずれかの改変型HSV gBタンパク質。

(22) 改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるS631に相当するアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、(17) ~ (21) のいずれか改変型HSV gBタンパク質。

(23) (18) ~ (22) のいずれかの改変型HSV gBタンパク質を



含む、HSVワクチン。

### 発明の効果

[0014] 本発明の改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むワクチンによって免疫誘導した場合、野生型HSV gBで免疫誘導した場合に比べて、血清中に中和活性の高い中和抗体が相対的に多く含まれ得る。すなわち、本発明の改変型HSV gBタンパク質及びこれを含むワクチンはイムノ・リフォーカスを誘導し、HSVに対する強い防御効果をもたらすことが可能である。したがって、HSV感染症に対して高い予防・治療効果が期待できる。

### 図面の簡単な説明

- [0015] [図1]実施例2のgBとそのプロテアーゼ切断断片を用いたSDS-PAGE及びWestern Blottingの結果を示す図である。
- [図2]実施例2の競合ELISAにより取得した抗gB抗体を分類し得られた相関図である。
- [図3]実施例3のアラニンスキャングによるgB抗体のエピトープの同定結果のMOE図である。
- [図4]実施例5の改変型gBタンパク質の設計戦略のための模式図を示す図である。
- [図5]実施例5の改変型gBタンパク質の設計戦略のための結晶構造の簡略図を示す図である。
- [図6]実施例5のbc ev 19のマウス免疫原性試験の結果を示す図である。
- [図7]実施例5のbc ev 50のマウス免疫原性試験の結果を示す図である。
- [図8]実施例5のbc ev 19のマウス感染防御試験の生存率の結果を示す図である。
- [図9]実施例5のbc ev 19のマウス感染防御試験の症状スコアの結果を示す図である。
- [図10]実施例5のbc ev 50のマウス感染防御試験の生存率の結果を示す図である。
- [図11]実施例5のbc ev 50のマウス感染防御試験の症状スコアの結果を

示す図である。

[図12]実施例5のbc ev 19のイムノ・リフォーカスの解析結果を示す図である。

[図13]実施例5のbc ev 50のイムノ・リフォーカスの解析結果を示す図である。

[図14]実施例5のゲル濾過クロマトグラフィーによるbc ev 19、bc ev 19'、bc ev 50及びbc ev 50'の性状解析の結果を示す図である。

[図15]実施例5のマウス免疫原性試験のbc ev 19とbc ev 19'の比較結果を示す図である。

[図16]実施例5のマウス免疫原性試験のbc ev 50とbc ev 50'の比較結果を示す図である。

[図17]HSV-1由来gBのアミノ酸配列（配列番号2）及びHSV-2由来gBのアミノ酸配列（配列番号3）を多重整列した比較結果を示した図であり、斜体部はリーダー配列を示し、下線部はHSV-1由来gBのドメインIIの383-388番目のアミノ酸残基（I383-R388）、及び、HSV-2由来gBのドメインIIの386-391番目のアミノ酸残基（I386-R391）を示す。

### 発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0017] 本発明の改変型HSV gBタンパク質は、単純ヘルペスウイルス（HSV）のエンベロープ糖タンパク質B（gB）の改変タンパク質であって、野生型gBのドメインIV及びドメインIに存在する非中和抗体を誘導するエピトープ（非中和エピトープ）のうち、少なくとも1つがエピトープとして機能しないように改変された、改変型HSV gBタンパク質である。

[0018] 本発明は、本発明者らが提案する仮説、HSV gB抗原において「デコイ領域」が存在することに基づくものである。「デコイ領域」は、英語の「

Decoy (おとり)」に由来し、病原体が宿主の免疫反応から逃れる免疫逃避機構の一つと考えられる。「デコイ領域」は、中和抗体活性の無い又は低い抗体を誘導する抗原領域であり、この欺瞞的刷り込み (Deceptive Inprinting; 「免疫偏向」ともいう) によって、中和抗体が産生しないよう、又は産生量が少ないように、病原体が宿主の免疫反応から逃れる機構であると考えられる。

[0019] これまで、HSVにおいてデコイ領域の存在は確認されておらず、デコイ領域の概念すらなかった。本発明者らは、ヒト抗体ライブラリーを用いて実施した抗HSV gB抗体の網羅的探索によって得られた抗gBモノクローナル抗体に対して、詳細なエピトープマッピング解析を行った。その結果、はじめてHSV gBのドメインI V及びドメインIは、無益又は有害なエピトープが集中しているデコイ領域であることを明らかにした。さらにこのデコイ領域において、非中和エピトープを脱エピトープ化することによって、有益なエピトープを免疫的に際立たせることによって、中和活性の高い抗体を誘導できる改変型HSV gBタンパク質を得るに到った。

[0020] 「野生型HSV gB」とは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するHSV-1由来のエンベロープ糖タンパク質B (gB)、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するHSV-2由来のgBの全長を指し、両者を多重整列して比較した結果、その配列同一性は、約87%である (図17)。gBの立体構造も解析されており、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン及びエクトドメインからなることは知られている。HSV-1由来のgBの結晶構造は、例えばScience 313:217-220 (2006) 及びJ. Virol. 84:12924-12933 (2010) によって報告されている。一方、HSV-2由来のgBの結晶構造は、報告されていないが、上記HSV-1由来のgBの結晶方法にしたがって、同様に解析することができる。「野生型HSV gBのエクトドメイン」は、可溶性の、抗原性を有する、野生型HSV gBの細胞外領域を意味する。野生型HSV gBのエクトドメインの一例は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるH

SV-2の333株由来の野生型gBエクトドメイン1-705である。

[0021] gBの結晶構造においては、それぞれ上部（Crown）と下部（Bottom）に位置するドメインⅠV及びドメインⅠは、中間部（Middle）に位置するドメインⅠⅠよりも「目立つ」ため、抗原提示性が高く、実際に血液中の抗体においても、本発明者らが調べたところ、ドメインⅠV及びドメインⅠに対する抗体の割合が高く、ドメインⅠⅠに対する抗体の割合が低い。しかし一方で、本発明者らの研究によれば、野生型HSV gBドメインⅠⅠには、中和抗体を誘導するエピトープ（本明細書においては「中和エピトープ」という）しか存在しないのに対して、野生型HSV gBのドメインⅠV及びドメインⅠには、中和エピトープと、非中和抗体を誘導するエピトープ（本明細書においては「非中和エピトープ」という）との両方が存在することがわかった。非中和抗体は、抗原（すなわち、ウイルス）と結合するものの、ウイルスの活性を抑えることができないため、特にワクチンの製造においては非中和抗体ではなく中和抗体の産生を誘導できることが重要とされている。

[0022] 本発明の改変型HSV gBタンパク質は、中和抗体の産生にあまり有益でない、「目立つ」ドメインⅠV及びドメインⅠを脱エピトープ化し「目立たなく」することで、中和エピトープを有するドメインⅠⅠを「目立たせる」ことにより、中和活性の高い抗体を誘導することができる。

[0023] 「改変型HSV gBタンパク質」（「HSV gBの改変タンパク質」又は「改変体」ともいう。）とは、野生型HSV gBに対して、少なくとも一つのアミノ酸残基又は連続したアミノ酸残基領域が、置換、欠失又は付加されたタンパク質をいい、アミノ酸残基の置換又は欠損によって糖鎖導入されたタンパク質等の野生型に存在しないタンパク質修飾がされたタンパク質も含む。本発明の改変型HSV gBタンパク質は、野生型タンパク質よりも中和抗体誘導活性が高い。

[0024] 「中和抗体誘導活性」とは、抗原タンパク質の中和抗体を誘導できる能力をいい、抗原タンパク質を被検動物に接種することで得られる免疫血清中の

中和抗体価 (neutralizing antibody titer) で評価され得る。「中和抗体」とは、ウイルス粒子の感染性を失わせることができる抗体をいい、例えば被検ウイルスのプラーク数を50%減少させるのに必要な抗体の濃度 (NT50) にてその抗体の中和活性の強度を評価する。

[0025] 「脱エピトープ化」とは、野生型HSV gBにおいてエピトープとして抗体産生に寄与していた部位をエピトープとして機能しないように改変することをいう。脱エピトープ化の方法としては、エピトープの部位にあるアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へと置換する方法、エピトープの部位にあるアミノ酸残基を欠損 (欠失) させる方法、及びエピトープの部位にあるアミノ酸残基の置換又は欠損によって糖鎖を導入する方法等が挙げられる。脱エピトープ化の方法としては、糖鎖を導入する方法、特にN型糖鎖 (N-グリコシド結合糖鎖) を導入する方法が好ましい。これにより、糖鎖を導入した部分のみならず、その嵩高さによって周辺のエピトープをも同時にマスキング可能な点で有効である。gBと相互作用する抗体やレセプター等のタンパク質とのサイズ比を考えると、数アミノ酸程度のごく狭い範囲で結合が形成されるような、点と点の相互作用による可能性が低いと予想される。gBとレセプターとの結合においては、広範囲のアミノ酸が協調的に結合を形成するような面と面での相互作用網が形成されていると考えられる。糖鎖導入は、自身の嵩高さによって周辺残基を広範囲に隠し、同時に結合相手のアクセスを阻害するのに有効な脱エピトープ化の方法であると考えられる。また、糖鎖は抗糖鎖抗体が誘導され難いという報告もあり、改変による新たな免疫原性の出現可能性を低く抑えることが可能であると考えられる。

[0026] 野生型gBのドメインI V及びドメインIに存在する非中和抗体を誘導するエピトープ (非中和エピトープ) の一例としては、野生型HSV gBのエクトドメインの結晶構造の表面において、配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基 (R567)、602番目のアルギニン残基 (R602)、631番目のセリン残基 (S631)、又は199

番目のアスパラギン酸残基（D 1 9 9）に相当するアミノ酸残基からの距離が1.5 nm以下の領域、さらに好ましくは当該アミノ酸残基からの距離が1 nm以下の領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を含むエピトープが挙げられる。ここで「アミノ酸残基からの距離」とは、野生型H S V g Bのエクトドメインの結晶構造の表面の形状に関わらず、上記アミノ酸残基からの直線距離をいう。非中和エピトープは無益又は有害の抗体の産生を誘導し、中和抗原の産生に有益でないため、これらの脱エピトープ化は、無益又は有害の抗体の産生を低減し、また、有益なエピトープを際立たせることで、中和抗体の産生を増加できる。結晶方法は特に限定されないがJ. V i r o l . 8 4 : 1 2 9 2 4 - 1 2 9 3 3 ( 2 0 1 0 ) に記載の結晶方法が挙げられる。例えば、g Bの結晶を、15% P E G 4 0 0 0 - 0 . 3 M N a C l - 0 . 1 M クエン酸ナトリウム ( p H 5 . 5 ) を用いて成長させることができる。

[0027] 非中和エピトープとして、また配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基（R 5 6 7）、602番目のアルギニン残基（R 6 0 2）、631番目のセリン残基（S 6 3 1）、又は199番目のアスパラギン酸残基（D 1 9 9）に相当するアミノ酸残基を含むエピトープが挙げられる。これらのエピトープが非中和エピトープであることが本発明者らによって証明されているため、これらのエピトープの脱エピトープ化は、防御活性発現において無益又は有害の抗体の産生を低減できる。また、これらのエピトープの脱エピトープ化は、有益なエピトープを際立たせることで、中和抗体の産生割合を増加させることができる。

[0028] 脱エピトープのための改変は、アミノ酸残基の置換、アミノ酸残基の欠損、及び／又はアミノ酸残基の置換又は欠損によって糖鎖導入されることによって行われる改変を含む。

[0029] 上記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列における199番目のアスパラギン酸残基（D 1 9 9）、567番目のアルギニン残基（R 5 6 7）、602番目のアルギニン残基（R 6 0 2）、及び631番目のセリン残基（

S 6 3 1) に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含むことが好ましい。配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR 5 6 7及びS 6 3 1に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入をするための改変を含むことが好ましく、該糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR 5 6 7 N、P 5 6 8 S、G 5 6 9 S、S 6 3 1 N、H 6 3 2 T、及びQ 6 3 3 Tのアミノ酸残基置換によって行われることが好ましい。配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD 1 9 9、R 5 6 7、及びS 6 3 1に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入するための改変を含むことがさらに好ましい。改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR 6 0 2に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含むことが好ましく、該糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR 6 0 2 N、D 6 0 3 A、A 6 0 4 Tのアミノ酸残基置換によって行われることが好ましい。改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD 1 9 9に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含むことが好ましく、該糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD 1 9 9 N、D 2 0 0 A、及びH 2 0 1 Tのアミノ酸残基置換によって行われることが好ましい。

[0030] 糖鎖の導入方法は、通常の方法であればよく特に限定されないが、たとえば、N型糖鎖を導入する場合、野生型g Bタンパク質のcDNA (GenBank : M15118.1、配列番号4) をテンプレートとし、N型糖鎖を導入する目的部位の3つの連続したアミノ酸配列が、N-X-S/T (Xはプロリン以外の任意のアミノ酸) となるように、プライマーを設計し、PCRによって変異を導入する。糖鎖導入のための変異は、たとえば、配列番号1に記載のアミノ酸配列における以下の変異が挙げられる：(D 1 9 9 N、D 2 0 0 A、H 2 0 1 T)、(R 5 6 7 N、P 5 6 8 S、G 5 6 9 S)、(S 6 3 1 N、H 6 3 2 A、Q 6 3 3 T)、及び(S 6 3 1 N、H 6 3 2 T、Q 6 3 3 T)。目的の改変型g Bタンパク質の核酸配列、さらに必要あれば6

×His等のタグを連結した核酸配列を適切なベクターにクローニングし、発現させることによってgB改変体を得ることができる。そして、gB改変体の目的部位のアスパラギンに通常の方法によってN型糖鎖を付加する。

[0031] 非中和エピトープの改変はさらに、エピトープである荷電アミノ酸残基を特徴のないアミノ酸残基、たとえばアラニン残基への置換を含んでもよい。この方法はN型糖鎖の導入とは異なり、ピンポイントで脱エピトープ化することができる利点がある。たとえば、アラニン置換として、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン(R613)に相当するアミノ酸残基のアラニンへの置換を含むことが好ましい。

[0032] 改変型HSV gBタンパク質として、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれに糖鎖導入され、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン(R613)に相当するアミノ酸残基がアラニンに置換された、gBタンパク質が好ましい。改変型HSV gBタンパク質の別の例としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれに糖鎖導入され、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン(R613)に相当するアミノ酸残基がアラニンに置換された、gBタンパク質がより好ましい。

[0033] 本発明の改変型HSV gBタンパク質は、遺伝子工学の手法によって作製することができる。作製方法は特に限定されないが、たとえば、野生型gBタンパク質のcDNAをテンプレートとし、目的の変異を導入するためのプライマーを設計して、PCRによって変異が導入された核酸を得て、発現プロモータと機能的に連結し、場合によってタグも連結し、適切な発現ベクターに導入し、発現させることによって得ることができる。また、糖鎖導入による改変体の場合は、上述のとおり得ることができる。

[0034] 作製された改変型HSV gBタンパク質は、必要に応じて精製してもよい。精製方法は特に限定されないが、アフィニティクロマトグラフィーカラ



ムなどによる精製が挙げられる。

[0035] HSV感染症は、HSV-1及びHSV-2による感染症を含み、例えば、口唇ヘルペス、角膜ヘルペス、性器ヘルペス、全身性の新生児ヘルペス、並びに、HSVに起因する口内炎、皮膚疾患、脳炎、髄膜炎、及び脊髄炎が挙げられる。

[0036] 本発明のHSVワクチンは、本発明の改変型HSV gBタンパク質を含む。

[0037] 本実施形態のHSVワクチンの剤形は、例えば、液状、粉末状（凍結乾燥粉末、乾燥粉末）、カプセル状、錠剤、凍結状態であってもよい。

[0038] 本実施形態のHSVワクチンは、医薬として許容されうる担体を含んでもよい。上記担体としては、ワクチン製造に通常用いられる担体を制限なく使用することができ、具体的には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、等張水性緩衝液及びそれらの組み合わせが挙げられる。ワクチンは、乳化剤、保存剤（例えば、チメロサル）、等張化剤、pH調整剤、等が、更に適宜配合されてもよい。

[0039] 本実施形態のHSVワクチンの免疫原性をさらに高めるために、アジュバントを更に含むことも可能である。アジュバントとしては、例えば、アルミニウムアジュバント又はスクアレンを含む水中油型乳濁アジュバント（ASO3、MF59等）、CpG及び3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル lipid A (MPL) 等のToll様受容体のリガンド、サポニン系アジュバント、ポリγ-グルタミン酸等のポリマー系アジュバント、キトサン及びイヌリン等の多糖類が挙げられる。

[0040] 本実施形態のHSVワクチンは、本発明の改変型HSV gBタンパク質と、必要に応じて、担体、アジュバント等とを混合することにより得ることができる。アジュバントは、用時に混合するものであってもよい。

[0041] 本実施形態のHSVワクチンの投与経路は、例えば、経皮投与、舌下投与、点眼投与、皮内投与、筋肉内投与、経口投与、経腸投与、経鼻投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、口から肺への吸入投与であってもよい。

[0042] 本実施形態のHSVワクチンの投与方法は、例えば、シリンジ、経皮的パッチ、マイクロニードル、移植可能な徐放性デバイス、マイクロニードルを付けたシリンジ、無針装置、スプレーによって投与方法であってもよい。

## 実施例

[0043] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

### [0044] 実施例1 抗gB抗体の単離

HSV-2の333株に由来するgBのエクトドメイン1-705aa (gB1-705)のcDNA (配列番号4)をpCAGGS1-dhfr-neoにクローニングした。gBのC末端にはStrep Tag I Iが付加されるようにデザインした。発現には、FreeStyle293又はExpi293発現システム (ライフテクノロジー社)を用いた。発現プラスミドを細胞にトランスフェクションし、4~6日で培養上清を回収した。gBを含む培養上清は、培地中に含まれるビオチンを除くためにUF膜で濃縮した。濃縮した培養上清は、StrepTactinカラムを使った精製を行い、精製gB2を取得した。gBの370から457aaまでのアミノ酸をコードする遺伝子をPCRにより増幅し、pET43.1b (+)にクローニングし、gB370-457発現プラスミドを構築した。このプラスミドには精製を容易にするため、Nus-Tag遺伝子とHis-Tag遺伝子が付加されている。プラスミドをRosetta2 (Novagen)に形質転換した。LB培地中で37℃にて対数増殖期中期まで培養した後、1mM IPTGで発現誘導し、25℃オーバーナイトで培養した。可溶性タンパクの抽出にはBugBuster mixを用いた。得られたタンパクは、Ni NTA Agarose (QIAGEN)を用いて精製した。

[0045] 扁桃腺や脾臓由来のヒトB細胞由来のmRNAからヒトVH及びVL cDNAを使用して調製されたscFv-phageディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、HSV-2のgBへの反応性を有す

る s c F v クローンを 44 クローン単離した。単離した s c F v 遺伝子の V H 鎖及び V L 鎖遺伝子の DNA 塩基配列を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。いずれのクローンも独立した配列を有しており、そのエピトープにバリエーションがあることが期待された。44 クローン以外にも複数 s c F v クローンが取得されたが、その殆どが、D1 又は D2 に似た配列を有していた（データは示さず）。D1 及び D2 は V H 5 ファミリーであり、生体内の抗体のポピュレーションとしては、少ないものである。

[0046] 実施例 2 抗 g B 抗体の分類

<抗体断片 s c F v - h F c の調製>

単離した s c F v 遺伝子の可変領域をヒト F c 遺伝子と連結し、pCAG ベクターにクローニングし、s c F v - h F c 発現プラスミドを構築した。発現には、FreeStyle 293 又は Expi 293 発現システムを用いた。発現プラスミドを細胞にトランスフェクションし、4~6 日で培養上清を回収した。培養上清は、Ab Rapid Pure 10 (プロテノバ) を用いて s c F v - h F c の精製を行った。また、各 s c F v 遺伝子がクローニングされているファージミドベクターを有する大腸菌 TG1 株を 2xYT CG 培地 (37℃) で培養し、M13K07 ヘルパーファージを m o i = 20 で感染させた後、2xYT CK 培地 (25℃)、オーバーナイトでファージの発現を行った。得られた s c F v - p h a g e は 20% - PEG - 2.5M NaCl による濃縮を行った。

[0047] 取得した s c F v - p h a g e 及び s c F v - h F c の結合活性は E L I S A によって評価した。g B 1 - 705 を P B S で 1 μ g / m L に希釈し、MaxiSorp plate (Nunc) に 50 μ L 入れ、4℃でオーバーナイトもしくは室温で 1~2 時間インキュベートすることによって組換え g B を固相化した。固相化後、プレートを P B S で洗浄し、取得した s c F v - p h a g e、I g G をプレートのウェルに 100 μ L 加え、37℃でイ

ンキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、検出抗体 anti-M13/HRP (GEヘルスケア)、もしくは anti-hFc/HRP (コスモバイオ) をプレートのウェルに100 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMBをプレートのウェルに100 $\mu$ L加えることによって発色させた。30分後、1N硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス) で吸光度 (O.D. 450nm/650nm) を測定した (データ示さず)。

[0048] <gBとそのプロテアーゼ切断断片を用いたWestern Blottingによる抗gB抗体の分類>

得られた抗gB抗体44クローンをグルーピングするために、材料としてgB1-705をトリプシン又はキモトリプシンで消化したgB断片、gB1-705及びその切断変異体を用いてWestern blottingを実施した。

[0049] 500ngの変性又は未変性のgB1-705を8-16%SDS-PAGEへLoadし電気泳動した。変性状態のgB1-705は、gB1-705に2% 2-メルカプトエタノールを加え、96 $^{\circ}$ Cで5分間煮沸することで得た。非変性状態のgB1-705はこれらの操作を行わず、直接Loadした。トリプシン又はキモトリプシンで消化したgB断片は、以下のよう<sup>に</sup>得た。0.5M Tris-HCl (pH8.0) に500ngのgB1-705とトリプシン1ng、5ng若しくは1000ng、又はキモトリプシン1ngを加え、37 $^{\circ}$ C、1時間又は3時間静置し酵素処理し、2% 2-メルカプトエタノール (Wako) を添加したSDS-PAGEローディングバッファーを加え、96 $^{\circ}$ Cで5分間煮沸することで反応を停止させた。各検体を8-16%SDS-PAGEへLoadし電気泳動し、ゲルをニトロセルロース膜 (MILLIPORE) へ転写し、2%スキムミルク/PBS-Tを用いてBlockingした。PBS-Tによる洗浄の後、各scFv-hFcを1 $\mu$ g/mL 2%スキムミルク-PBS-Tで室温、30分反応させた。再度の洗浄の後、2%スキムミルク-PBS-T中ant

i-hFc/hFc/HRPを反応させ、Immobilon Western Detection Reagent (Millipore) で発色させた。SDS-PAGEのバンドの検出には、銀染色を行った。

[0050] 結果を図1に示す。図1のSDS-PAGE及びWestern Blottingの各レーンの検体は以下のとおりである。SDS-PAGEにおいて、レーン1：非還元未変性gB1-705、レーン2：煮沸のみのgB1-705、レーン3：煮沸かつ変性剤で変性させたgB1-705、レーン4：煮沸かつ変性剤で変性させたgB370-457、レーン5：37℃で1時間1ng（1：500）のトリプシンで処理して煮沸かつ変性剤で変性させたgB1-705、レーン6：37℃で3時間5ng（1：100）のトリプシンで処理したgB1-705、レーン7：37℃で3時間100ng（1：5）のトリプシンで処理して煮沸かつ変性剤で変性させたgB1-705、レーン8：37℃で1時間1ng（1：500）のキモトリプシンで処理して煮沸かつ変性剤で変性させたgB1-705、レーンM：Benchmark prestained Ladder、及びレーンM'：Magic Western standardとしている。

[0051] gB1-705を非還元で煮沸なしでSDS-PAGEで分析すると、約300kDa付近にバンドを検出した（レーン1）。一方、gB1-705を煮沸することで、約100kDa付近にバンドを検出した（レーン2）。これは、それぞれgBの3量体と単量体を意味しており、煮沸することで3量体から単量体になることから、S-S結合を介して3量体を形成しているのではないことが示唆された。

[0052] トリプシン又はキモトリプシンによる処理によって、gBはそれぞれ断片化した。これらのgBと抗体E7-scFv-hFcの反応性をWestern blottingで検出した。E7-scFv-hFcは、非還元で煮沸していないgB1-705（レーン1）、煮沸したgB1-705（レーン2）、還元で煮沸したgB1-705（レーン3）及びプロテアーゼ処理したgB断片（レーン5、6、7）に反応性を示した（図1）。同様の反

応パターンは抗体E 1 7及びE 3 1で観察された(表1)。これらのことは抗体E 7、E 1 7及びE 3 1 s c F v - h F cが連続エピトープであることを示唆している。抗体A 1 7、D 1、D 2、D 3、D 3 7、D 4 8及びE 1 5 s c F v - h F cは、非還元で煮沸していないg B 1 - 7 0 5、煮沸したg B 1 - 7 0 5、還元で煮沸したg B 1 - 7 0 5及びプロテアーゼ処理したg B断片に反応性を示したが、それらのg B断片との反応性はE 7、E 1 7、E 3 1とは異なるパターンを示した(表1)。D 1及びD 2間の反応パターン、D 3及びD 3 7間の反応パターンが同じであり、それぞれ同一又は近傍のエピトープを認識していることが示唆される。

[0053] g B断片の反応性のパターンから6つのグループに分類できた。E 4 1、F 1 3、F 1 8、F 1 9、F 2 2、F 3 0及びF 7 8 s c F v - h F cは、非還元で煮沸していないg B 1 - 7 0 5のみに反応性を示した(表1)。これらの抗体クローンは、3量体特異的であり、不連続エピトープであることが示唆される。F 7、F 1 1、F 1 2、F 3 3、F 5 2、F 6 5、F 6 7、F 6 8、F 6 9、F 7 6、F 8 0、F 8 7、G 3 9、G 6 4、G 7 6、H 1 5、H 3 4、H 5 7、H 6 1、H 6 5、G 1 0、G 2 5及びG 6 5は、非還元で煮沸していないg B 1 - 7 0 5だけでなく煮沸したg B 1 - 7 0 5への反応性を示した(表1)。これらの抗体クローンは、3量体特異的ではないが、ある程度の立体構造を認識する不連続エピトープであることが示唆される。E 8、E 3 5、E 8 2及びE 8 8は、非還元で煮沸していないg B 1 - 7 0 5、煮沸したg B 1 - 7 0 5及び還元で煮沸したg B 1 - 7 0 5への反応性を示したが、プロテアーゼによる切断断片への反応性は確認できなかった(表1)。これらの抗体クローンは、完全に変性状態のg Bとの反応性を有することから連続エピトープであることが示唆されるが、その領域はプロテアーゼによる影響を受けやすいのかもしれない。以上のg B及びg B断片を用いたWestern blottingによる解析により、取得した抗g B抗体44クローンは9つのグループに分類されることがわかった。このうち、30クローンが不連続エピトープ、14クローンが連続エピトープ

であることが示唆された。

[表1]

表1 抗 gB 抗体における gB1-705 とその断片の反応パターン

クローン	2ME			プロテアーゼ処理 ※2					
	boil- ※1	boil+ ※1	boil+ ※1	断片パターン A ※1	断片パターン B ※1	断片パターン C ※1	断片パターン D ※1	断片パターン E ※1	断片パターン F ※1
A17	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D1	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D2	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D3	+	+	+	-	-	+	-	-	-
D37	+	+	+	-	-	+	-	-	-
D48	+	+	+	-	-	-	+	-	-
E7	+	+	+	-	-	-	-	+	-
E8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E15	+	+	+	-	-	-	-	-	+
E17	+	+	+	-	-	-	-	+	-
E31	+	+	+	-	-	-	-	+	-
E35	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E41	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E82	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E88	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F7	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F11	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F12	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F13	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F18	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F19	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F22	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F30	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F33	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F52	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F65	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F67	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F68	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F69	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F76	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F78	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F80	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F87	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G10	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G25	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G39	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G64	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G65	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G76	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H15	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H34	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H57	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H61	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H65	+	+	-	-	-	-	-	-	-

※1 +; 反応性あり、-; 反応性なし、2ME+; 2メルカプトエタノール処理あり、boil+; 煮沸処理あり

※2 プロテアーゼ処理は、トリプシン及びキモトリプシンで行った。断片化した gB と抗体の反応性のパターンを A、B、C、D、E、F の 6 パターンに分類した。

[0054] <競合ELISAによる取得抗体の分類>

さらに取得抗体44クローンのグルーピングを行うために、各抗gBクローンのscFv-phage及びscFv-hFcを用いた競合ELISAを実施した。

[0055] 取得したscFv-phageとscFv-hFc間の競合をELISAによって評価した。gB1-705をPBSで1 $\mu$ g/mLに希釈し、MaxiSorp plateに50 $\mu$ L入れ、4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトでインキュベートすることによってgB1-705を固相化した。固相化後、プレートをPBSで洗浄し、取得したscFv-hFcをプレートのウェルに50 $\mu$ L加え、25 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、scFv-phageをプレートのウェルに50 $\mu$ L加え、25 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、検出抗体anti-M13/HRPをプレートのウェルに100 $\mu$ L加え、25 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMBをプレートのウェルに100 $\mu$ L加えることによって発色させた。30分後、1N硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで吸光度(O. D. 450nm/650nm)を測定した。

[0056] その結果に基づき、抗体の相関図を作成した(図2)。抗体E41、F18、F19、F13、F78、F22及びF30が含まれるグループは、非還元で煮沸していないgB1-705のみに反応性を示すグループであるが、他のグループとは異なり、競合ELISAの結果から抗体E41、F18、F19、F13及びF78のグループとF22及びF30のグループに分類されることが確認された。一方、他のグループは上述したグループからさらに細分化されることはなかった。よって、抗gBクローンは、計10グループに分類された。またD48はgB370-457との反応性を有していたことからgBの370aaから457aaの中にエピトープが存在することが示唆された。

[0057] 実施例3 アラニンスクラングによるgB抗体のエピトープの同定

gBのエクトドメインである1-705aa中の荷電アミノ酸残基(18



7箇所)をそれぞれアラニンに改変した遺伝子をPCRによって構築し、pCAGGS1-dhfr-neoにクローニングした。発現には、FreeStyle293又はExp293発現システムを用いた。取得したgBアラニン置換体の発現量と、アラニン置換体と抗体断片との結合活性をELISAによって評価した。

[0058] gBアラニン置換体を含む培養上清をMaxiSorp plateに入れ、室温で1時間インキュベートすることによってgBアラニン置換体を固相化した。固相化後、プレートをPBSTで洗浄し、検出抗体StreptActin/HRP(IBA)をプレートのウェルに100 $\mu$ L加え、室温でインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMBをプレートのウェルに100 $\mu$ L加えることによって発色させた。30分後、1N硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで吸光度(O.D. 450nm/650nm)を測定し、発現量を求めた。

[0059] 一方、gBアラニン置換体を含む培養上清をStreptactinを固定化したMaxiSorp plateに入れ、室温で1時間インキュベートすることによってgBアラニン置換体を固相化した。固相化後、プレートをPBSTで洗浄し、抗体断片をプレートのウェルに100 $\mu$ L加え、室温でインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、検出抗体anti-human Fc/HRP(コスモバイオ)をプレートのウェルに100 $\mu$ L加え、室温でインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMBをプレートのウェルに100 $\mu$ L加えることによって発色させた。30分後、1N硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで発色値(O.D. 450nm/650nm)を測定し、結合活性を求めた。アラニン置換していない野生型gB1-705と比較して発現量あたりの反応性が変化しているかどうかでエピトープ候補を選出した。さらに、精査が必要な抗体の場合には、gBアラニン置換体の精製品を用いたELISAでエピトープ候補の絞りこみを行った。

[0060] アラニン置換体と抗体断片との結合活性に基づき、それぞれの抗体のエピ

トープを予測し、その結果を表2に示す。gB3量体のCrown部分を形成するドメインIVに対する抗体が28クローン存在し、最も数が多かった。続いて、Bottom部分を形成するドメインIに対する抗体が8クローン存在しており、Middle部分を形成するドメインIIに対する抗体が1クローンしか存在しなかった。エピトープを同定できた抗体の中には、アミノ酸配列上、離れた位置であるものが多い。MOE (図3)でHSV1のgBをテンプレートとして、HSV2のgBをモデリングし、その位置を確認したが、構造上近接したアミノ酸同士であった(データ示さず)。唯一ドメインIIを認識するD48は、R391とD362が同定されたが、D48がgB37-457と反応していることから、R391がエピトープのキーである可能性が高い。また44クローン中7クローン(E82、E88、F7、F65、F80、G10、G76)のエピトープは同定に至らなかったが、これまでの競合ELISA等のグルーピングによって同グループにエピトープを同定できたクローンが存在するため、その近傍のアミノ酸残基がエピトープである可能性が高い。例えば、E82及びE88のエピトープは同定できなかったが、E8及びE35のエピトープは、R532、R613、H632であることがわかっている。E82及びE88は、E8及びE35と競合ELISAで競合するため、E82及びE88のエピトープは、R532、R613、H632の近傍であることが予想される。エピトープを同定できなかった抗体は、今回の解析が荷電アミノ酸残基に限定しているという意味で荷電アミノ酸以外のアミノ酸残基がエピトープの可能性が高いと考えられる。

[表2]

表2 アラニンスキャンニングによる抗gB抗体のエピトープの同定

クローン		エピトープ				ドメイン
A17	D172	K177	R308			I
D1	R308					I
D2	R308					I
D3	K45	K46	K49	R50	E52	VI
D37	K45	K46	K49	R50	E52	VI
D48	R391	D362				II
E7	D583					IV
E8	R613	R537	H632			IV
E15	R277	E278	H281			I
E17	D583	D554	R563	R580		IV
E31	D583	R563	D554	R277	R379	IV
E35	R532	H632	R379			IV
E41	R458	R277	E278	H281		I
E82	ND					IV
E88	ND					IV
F7	ND					IV
F11	D583	D554	R563	D258		IV
F12	D583	R602				IV
F13	D200	H201	E259			I
F18	D200	D224	K306			I
F19	D199	D200	H201			I
F22	H632					IV
F30	D647	H632				IV
F33	D583	D554	R563			IV
F52	D583	D554	R563			IV
F65	ND					IV
F67	E627	E626	R613	H632		IV
F68	D583					IV
F69	R580	D583	D554			IV
F76	R567					IV
F78	D199	D200	H201	K401		I
F80	ND					IV
F87	H632					IV
G10	ND					IV
G25	R567					IV
G39	H632					IV
G64	D554	R563	D583			IV
G65	H632					IV
G76	ND					IV
H15	D583	D554	R563			IV
H34	D583	D554	R563			IV
H57	D583	R498				IV
H61	D583	D554	R563			IV
H65	R580					IV

ND:検出せず

[0061] 実施例4 中和試験によるgBのCrown部分とBottom部分に中和エプトープと非中和エプトープの存在の解析

<細胞とウイルス>

ウイルスの培養、感染価測定、中和抗体価測定にはVero細胞(CCL-81)をATCCから購入して使用した。中和試験及び感染防御能解析にはHuman herpesvirus 2(HSV-2)MS株[VR-540]を使用した。HSV-1はATCCからKOS株(VR-1493)を購入し使用した。Vero細胞は、10%FBS含有MEM培地でフルシートになるまで培養し、HSV-2 MS株及びHSV-1 KOS株をm. o. i = 0. 01~1で接種し、2-3日間2%FBS含有MEM培地で培養後、3回の凍結融解により細胞内のウイルスを培地中に放出させた。遠心後、上清を回収し、HSV-2ウイルスバンク及びHSV-1ウイルスバンクとした。

[0062] <ウイルス中和試験>

取得した抗gBクローンの中和活性をウイルス中和試験により評価した。中和試験はプラーク数減少活性(プラークリダクション活性)測定とcell to cell感染拡大抑制活性測定の2種類の方法を用いて行った。対象とするウイルスはHSV-2 MS株とHSV-1 KOS株の2種を用いた。プラークリダクション活性測定は、被験抗体を所定の濃度になるように調製し約100PFUのHSV-2 MS株又はHSV-1 KOS株と混合後、37℃1時間反応させた。48ウェルプレートにフルシートになったVero細胞に反応液を播種し、30℃で1時間吸着後に1%メチルセルロース含有培地で24時間培養後、メタノールとエタノールを1対1で混合した50%メタノール/50%エタノール(-20℃)で、-20℃で30分間不活化及び固定を行った。その後、抗HSV gBモノクローナル抗体を37℃で1時間反応させ、抗mouse IgG-HRP(Dako P0447)とTMBH(MOS TMBH-1000)で免疫染色し、ELISPOTアナライザーで各ウェルの画像を取り込み、解析ソフトでプラ

ーク数をカウントした。

[0063] Cell to Cell感染拡大抑制活性測定は、48ウェルプレートにフルシートになったVero細胞に約100PFUのHSV-2 MS株又はHSV-1 KOS株を接種し、30℃で1時間吸着後、所定濃度の被験抗体を含有した1%メチルセルロース培地（抗体濃度は5  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/mL及び125  $\mu$ g/mL）を添加し、HSV-2 MS株は約40時間、HSV-1 KOS株は約48時間培養後、50%メタノール/50%エタノール（-20℃）で、-20℃で30分間不活化及び固定を行った。その後、抗HSV gBモノクローナル抗体を37℃で1時間反応させ、抗mouse IgG-HRP（Dako P0447）とTMBHで免疫染色し、ELISPOTアナライザーで各ウェルの画像を取り込み、解析ソフトでプラークサイズの平均値を解析した。

[0064] 結果を表3に示す。取得した44クローンは、中和抗体と非中和抗体の2つに大別され、中和抗体の中には、HSV-1とHSV-2の両方を中和するクローン、どちらか一方のみを中和する型特異的なクローン、プラーク数減少活性は強いがcell to cell感染拡大抑制活性は無い（弱い）クローン、プラーク数減少活性もcell to cell感染拡大抑制活性も共に強いクローン等が存在していた。また、この中和のパターンは、これまでのグルーピングの結果と連動していることが確認された（表3、図2）。

[表3]

表3: 抗gB抗体の中和活性

クローン	HSV-1 KOS 株		HSV-2 MS 株	
	プラーク数減少	Cell to Cell 拡大抑制	プラーク数減少	Cell to Cell 拡大抑制
A17	++	++	++	N.T.
D1	++	++	-	-
D2	++	++	-	-
D3	-	-	±	±
D37	-	-	±	±
D48	++	++	++	++
E7	++	++	++	++
E8	-	-	-	-
E15	++	++	++	++
E17	++	-	++	++
E31	++	-	++	++
E35	±	-	±	-
E41	++	++	++	++
E82	-	-	-	-
E88	++	N.T.	++	++
F7	-	-	-	-
F11	+	+	+	+
F12	+	+	+	+
F13	-	-	-	-
F18	-	-	-	-
F19	-	-	-	-
F22	-	-	-	-
F30	-	-	-	-
F33	+	+	+	+
F52	+	-	+	+
F65	-	-	-	-
F67	-	-	-	-
F68	-	-	-	-
F69	+	+	+	+
F76	-	-	-	-
F78	-	-	-	-
F80	-	-	-	-
F87	-	-	-	-
G10.3	±	-	±	N.T.
G25	-	-	-	N.T.
G39	-	-	-	N.T.
G64	++	++	++	N.T.
G65	+	+	+	N.T.
G76	+	+	+	N.T.
H15	++	+	++	N.T.
H34	++	+	++	N.T.
H57	++	+	++	N.T.
H61-1	++	+	++	N.T.
H65	++	+	++	N.T.

N.T.:試験せず

[0065] プラーク数減少活性は、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ で解析し、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで中和能が認められるものを「++」、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで中和能が認められるものを「+」、 $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で中和能が認められるものを「±」とした。Cell to Cell感染拡大抑制は、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ で解析を行い、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで中和能が認められるものを「++」、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで中和能が認められるものを「+」、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下まで中和能が認められるものを「±」とした。測定は全てduplicateで実施した。

[0066] 表2から、gB2抗原上のドメインIV及びドメインIに対する抗体が全体の抗体に占める割合が大きかったが、ドメインIV及びドメインIに対する抗体は、一部中和活性を有するものの、大部分が中和活性を示さなかった非中和抗体であった(表3)。これに対して、ドメインIIに対する抗体が全体の抗体に占める割合が小さかったものの、中和抗体であった。各gB抗体のエピトープの同定結果のMOE図(図3)には、これらのエピトープの位置を図示している。これらの結果から、ドメインIV及びドメインIには中和エピトープと非中和エピトープ、ドメインIIに中和エピトープが存在しており、また、ドメインIV及びドメインIには、「目立つ」抗原エピトープが多く存在することが分かった。

[0067] 実施例5 ワクチン抗原の設計と評価

#### <改変型gB抗原設計の戦略>

抗HSV2-gB抗体の網羅的取得、並びにそれらのエピトープマッピング及び機能分類を行った結果、gB2抗原上のドメインIV及びドメインIに中和エピトープと非中和エピトープ、ドメインIIに中和エピトープが存在することが分かった。防御活性発現の観点から、中和エピトープを有益なエピトープとし、非中和エピトープを無益又は有害なエピトープとし、gBドメインI及びドメインIVに存在する非中和エピトープを脱エピトープ化することによる改変型gB抗原を設計した。ベースとなる野生型gBはエク

トドメインgB1-705であり、StrepTactin精製用にC末端側にStreptagIIを付加している(図4(A))。

[0068] まずは、N型糖鎖付加によるgBの改変である。N型糖鎖はO型糖鎖と異なり、コンセンサス配列であるNXT又はNXS(Xはプロリン以外の任意のアミノ酸)の配列に付与される。糖ペプチドに対しては一般的に抗体ができにくく、糖鎖の嵩高さによって、その周辺にも抗体ができにくくなる(非特許文献16)。HSV2-gBのドメインIVは、レセプターとの結合に重要な領域と考えられているが、ウイルス膜表面から最も遠い位置にあり、表面に露呈しているため抗体が結合しやすい。実際、前述の結果のようにヒト血清中には、ドメインIVを認識する抗体が多く含まれていることが示唆されている。そこでドメインIVの非中和エピトープ3カ所にN型糖鎖を導入することとした(図4(B)及び図5)。一方、ドメインIは、gBの根元に位置しており、宿主細胞との融合に重要な領域であるが、エクトドメインのみを発現させた場合には、本来ウイルス膜表面と接触していた領域が表面に露呈する。また、ワクチンの製造に際して、gBのエクトドメインのみを用いたワクチン抗原デザインを想定している。従って、ウイルス膜と接している領域が新たに露呈してくる可能性があり、その非中和エピトープ領域1カ所にN型糖鎖を導入することとした(図4(B)及び図5)。野生型のgBに元々付加されている糖鎖は、HSV-1 gB(PDB No. 3NWF)を参考に、N115、N371、N649に位置すると思われる(図4(B))。新たに糖鎖導入の位置として、D199、R567、R602、S631が選定された。

[0069] 次は、アラニン置換によるgBの改変である。抗体のエピトープとして荷電アミノ酸残基が含まれることが多い。そこで、荷電アミノ酸残基を特徴のないアミノ酸残基へ置換する、脱エピトープ化の方法がとられることがある。この方法はN型糖鎖の導入とは異なり、ピンポイントで脱エピトープ化することができる利点がある。ドメインIVは非中和エピトープ以外にも中和エピトープも存在しており、1カ所アラニン置換(R613A)を行うこと



とした(図4(B)及び図5)。

[0070] <改変型gB1-705の調製>

野生型HSV-2の333株に由来するgBのエクトドメイン(1-705aa)のcDNA(配列番号4)をpCAGGS1-dhfr-neoにクローニングした。gBのC末端にはStrep TagIIが付加されるようにデザインした。この配列をテンプレートに、以下の変異を導入した改変体を設計した。

改変体bcev1-3 : D199N、D200A、H201T

改変体bceg13 : R567N、P568S、G569S

改変体bcev11 : D199N、D200A、H201T、R613A

改変体bcev12 : D199N、D200A、H201T、R567N、P568S、G569S、R613A

改変体bcev13 : D199N、D200A、H201T、R567N、P568S、G569S、R613A、S631N、H632A、Q633T

改変体bcev19 : D199N、D200A、H201T、R567N、P568S、G569S、R613A、S631N、H632T、Q633T

改変体bcev19' : R567N、P568S、G569S、R613A、S631N、H632T、Q633T

改変体bcev50 : D199N、D200A、H201T、R567N、P568S、G569S、R613A、R602N、D603A、A604T、S631N、H632T、Q633T

改変体bcev50' : R567N、P568S、G569S、R613A、R602N、D603A、A604T、S631N、H632T、Q633T

[0071] 発現には、FreeStyle293又はExpi293発現システムを用いた。発現プラスミドを細胞にトランスフェクションし、4~6日で培養

上清を回収した。g Bを含む培養上清は、培地中に含まれるbiotinの影響を抑えるためにUF膜で濃縮した。濃縮した培養上清は、Streptactinカラムを使った精製を行い、精製g Bを取得した。

[0072] 取得した精製g B 1-705の性状は、SDS-PAGE及びゲル濾過クロマトグラフィーによって、多量体状態を確認した。ゲル濾過クロマトグラフィーについては、カラムはSuperdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare)を使用し、濃度100 µg/mLの各改変型g B精製品をアプライした。流速は0.4 mL/minで泳動BufferはD-PBSを使用し、A280を検出した。

[0073] 6種類の改変型g Bの改変部位及びその特徴を表4に示す。

[表4]

クローン	変異部位	発現量 (µg/mL)	多量体状態	人工的糖鎖導入
gB1-705 (野生型)	-	2.25	3量体	0
bcev1-3	D199N, D200A, H201T	4.18	3量体	1
bceg13	R567N, P568S, G569S	0.64	3量体	1
bcev11	D199N, D200A, H201T, R613A	2.04	3量体	1
bcev12	D199N, D200A, H201T, R567N, P568S, G569S, R613A	4.01	3量体	2
bcev19	D199N, D200A, H201T, R567N, P568S, G569S, R613A, S631N, H632T, Q633T	1.38	多量体 3量体	3
bcev50	D199N, D200A, H201T, R567N, P568S, G569S, R613A, R602N, D603A, A604T, S631N, H632T, Q633T	0.35	多量体 3量体	4

N.T.:試験せず

[0074] D199N、D200A、H201Tの改変を加えたbcev1-3は、ドメインIに糖鎖を導入する変異を付加したもので、その発現量が野生型のg B 1-705と比較して約2倍に向上している。本来この領域はウイルス膜表面と接触している状態で安定化していると考えられる。野生型g B 1-705は、分泌発現させたことにより本来溶媒接触していないこの領域が露呈されたため、不安定化し、そこに糖鎖が付加されることでbcev1-3は安定化し、結果として発現量が増したと推測される。

[0075] bceg13は、ドメインIVのR567N、P568S、G569Sの改変を加えたg Bである。bcev1-3とは逆に野生型g B 1-705と

比較して、発現量が0.3倍になっている。野生型と同様の3量体構造は維持しているため、構造を維持するためにクリティカルな変異ではないが、野生型と比較して、単鎖の構造変化やフォールディングの速さが遅くなっているのかもしれない。

[0076] *bcev11*は、*bcev1-3*のD199N、D200A、H201Tの変異に加えて、ドメインIVに位置するR613Aを導入した改変体である。*bcev11*の発現量は、野生型gB1-705と同等であった。

[0077] *bcev1-3*の変異は発現量を向上させていたことを考えるとR613Aの変異は、逆に発現量を低下もしくは、野生型と同等にさせる変異なのかもしれない。

[0078] *bcev11*の性状も野生型と同等であり、3量体を形成していた。

[0079] *bcev12*は、*bcev11*にさらにR567N、P568S、G569Sの改変を加えたgBである。*bce g13*の結果を踏まえると、R567N、P568S、G569Sの変異を加えることで発現量が低下するはずであるが、予想外に発現量が野生型と比較して2倍に向上していた。これはD199N、D200A、H201Tの改変を加えたのみの*bcev1-3*と同等の発現量である。R613Aの変異も発現量低下に寄与するが、R567N、P568S、G569Sも加えることでドメインIVの構造やフォールディング速度が*bcev1-3*に近づいたのかもしれない。

[0080] *bcev19*は、*bcev12*にS631N、H632T、Q633Tの変異を導入したgB改変体である。*bcev19*の発現量は野生型と比較して0.6倍であり、3量体のみならず、微量のmultimerが含まれていた。S631、H632、Q633への別の変異又は、631-633aa以外となる近傍の場所への糖鎖付加も検討したが、性状への大きな改善効果は認められなかった（データ示せず）。

[0081] *bcev50*は、*bcev19*のドメインIVにR602N、D603A、A604Tの変異を導入したgB改変体である。その発現量は*bcev19*よりもさらに低下し、野生型と比較して0.3倍であった。性状も*bce*

v 1 9と同様に3量体は含まれるが、m u l t i m e rも含んでいた。

[0082] <改変型g B 1 - 7 0 5の結合活性試験>

目的である、非中和抗体との反応性が低下又は無くなっていることを確認するため、作製した改変体b c e v 1 - 3、b c e g 1 3、b c e v 1 2、b c e v 1 9及びb c e v 5 0の、44クローンの抗g B 2モノクローナル抗体に対する反応性を、E L I S Aによって評価した。コントロールとして、野生型g B 1 - 7 0 5を用いた。g B 1 - 7 0 5をP B Sで1  $\mu$  g / m Lに希釈し、M a x i S o r p p l a t eに50  $\mu$  L入れ、4  $^{\circ}$  Cでオーバーナイトインキュベートすることによってg B 1 - 7 0 5を固相化した。固相化後、プレートをP B Sで洗浄し、取得した抗体をプレートのウェルに100  $\mu$  L加え、37  $^{\circ}$  Cでインキュベーションした。1時間後、P B S Tで洗浄し、検出抗体a n t i - h u m a n I g G F c / H R P ( R O C K L A N D ) をプレートのウェルに100  $\mu$  L加え、37  $^{\circ}$  Cでインキュベーションした。1時間後、P B S Tで洗浄し、T M Bをプレートのウェルに100  $\mu$  L加えることによって発色させた。30分後、1 N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで吸光度 ( O . D . 4 5 0 n m / 6 5 0 n m ) を測定した。

[0083] 結果を表5に示す。

[表5]

表5 改変型 gB と既取得抗体との反応性

	Ab クローン	gB1-705	bcev1-3	bcegl3	bcev11	bcev12	bcev19	bcev50
非中和抗体	F22	+	+	+	+	+	-	-
	F30	+	+	+	N.T.	±	-	-
	F7	+	+	+	N.T.	+	+	-
	F65	+	+	+	N.T.	+	±	-
	F67	+	+	+	±	-	-	-
	F68	+	+	+	N.T.	+	+	-
	F76	+	+	-	N.T.	-	-	-
	F80	+	+	+	N.T.	±	±	-
	F87	+	+	+	N.T.	-	-	-
	G39	+	+	+	N.T.	±	-	-
	G76	+	+	+	N.T.	-	±	-
	G65	+	+	+	N.T.	-	-	-
	E8	+	+	+	-	-	-	-
	E35	+	+	+	N.T.	+	-	-
	E82	+	+	+	N.T.	-	-	-
	E88	+	+	+	N.T.	-	-	-
	G25	+	+	-	+	-	-	-
	F13	+	-	+	-	-	-	-
	F18	+	+	+	N.T.	±	+	-
	F19	+	-	+	N.T.	-	±	-
F78	+	-	±	N.T.	-	±	-	
中和抗体	E7	+	+	+	N.T.	+	+	±
	E17	+	+	+	N.T.	+	+	+
	E31	+	+	+	+	+	+	-
	F11	+	+	+	N.T.	+	+	-
	F12	+	+	+	+	+	+	-
	F33	+	+	+	N.T.	+	+	±
	F52	+	+	+	N.T.	+	+	±
	F69	+	+	+	+	+	+	-
	G64	+	+	+	N.T.	+	+	+
	H15	+	+	+	N.T.	+	+	-
	H34	+	+	+	N.T.	+	+	±
	H57	+	+	+	N.T.	+	+	±
	H61	+	+	+	N.T.	+	+	-
	H65	+	+	+	N.T.	+	+	-
	G10	+	+	+	N.T.	-	-	-
	D3	+	+	+	±	+	+	+
	D37	+	+	+	N.T.	+	+	+
	D48	+	+	+	+	+	+	+
	E15	+	+	+	+	+	+	+
	D1	+	+	+	+	+	+	±
D2	+	±	+	N.T.	±	+	±	
A17	+	+	+	+	+	+	+	
E41	+	+	+	+	+	+	-	

N.T.:試験せず

- [0084] b c e v 1-3は、D199N、D200A、H201Tの変異を導入することにより、D200、H201をエピトープとするF13、F19、F78との反応性がなくなり、b c e g 13はR567N、P568S、G569Sの変異を導入することにより、R567をエピトープとするF76、G25との反応性がなくなっていた。
- [0085] また、b c e v 1-3の改変、b c e g 13の改変及びR613Aを導入したb c e v 12では、各変異箇所をエピトープとする抗体との反応性がほぼ無くなっていた。
- [0086] b c e v 12にS631N、H632A、Q633Tの変異を導入したb c e v 19は、中和抗体22種類との反応を維持していた一方で、非中和抗体との反応は低下していた。
- [0087] 非中和抗体の21種類のうち、ドメインIVを認識するF7、F65、F68、F80、G76、ドメインIを認識するF18、F19、F78の計8種類は反応性が残っていた。
- [0088] b c e v 19にR602N、D603A、A604Tの変異を導入したb c e v 50は、全ての非中和抗体21種類との反応性がなくなっていた。一方、中和抗体23種類のうち、14種類とは反応性を維持していたが、9種類とは反応が低下していた。
- [0089] これらのことはb c e v 50を免疫することで、非中和抗体は誘導されにくい、中和抗体もやや誘導されにくくなっている可能性を意味する。b c e v 19とb c e v 50の差はドメインIVにR602N、D603A、A604Tの変異があるかないかである。それにもかかわらずドメインIに対する抗体との反応性に差が生じている。ドメインIVを改変することで、3量体は維持しているが、ドメインIの構造が変化していたのかもしれない。総じて、b c e v 19及びb c e v 50は、野生型抗原であるgB1-705と比較して、非中和抗体はできにくくなっており、理想的な免疫応答を誘導し得る新規ワクチン抗原として期待できる。
- [0090] <b c e v 19及びb c e v 50のマウス免疫原性試験>

作製した改変型g B抗原b c e v 1 9及びb c e v 5 0のマウス免疫原性試験を別々に実施した。いずれの実験も抗原量が0. 3  $\mu$ g/匹及び1  $\mu$ g/匹にて2週間間隔で3回皮下免疫した。各群の動物例数はいずれもn = 4として実験を行なった。

[0091] 野生型g B抗原g B 1 - 7 0 5 (g B WT)を陽性対照、s a l i n eを陰性対照として、改変型g B抗原の免疫原性試験を実施した。所定量の抗原を注射用生理食塩水(s a l i n e)に溶解し、M P L A (1 0  $\mu$ g/匹)及びC p G (1  $\mu$ g/匹)と共に、1匹あたり2 0 0  $\mu$ L/匹の容量で、B A L B/cマウス(5週齢、メス)に2週間間隔で合計3回、背部皮下に免疫した。最終免疫(3回目)から2週間後に、個体毎に採血し血清を調製した。調製した血清を段階希釈し、野生型g B抗原に対する結合抗体価(a n t i - g B E L I S A)及びH S V - 2に対する中和抗体価(プラーク数5 0%減少活性)を評価した。

[0092] b c e v 1 9の結果を図6に、b c e v 5 0の結果を図7に示す。グラフ中、n = 4の平均値をプロットし、 $\pm$  S Eエラーバーを付記してある。最終免疫から2週間後に採取した血清を用いて、野生型g B抗原に対する結合抗体誘導活性(a n t i - g B E L I S A)及びH S V - 2に対する中和抗体誘導活性(プラーク数減少率)を評価した結果、b c e v 1 9、b c e v 5 0共に、いずれの投与量においても野生型g B抗原(g B 1 - 7 0 5)よりも少ない結合抗体活性でより高い中和抗体活性を誘導していることが確認された。

[0093] 本結果は、野生型g B抗原上の非中和エピトープ(有害・無益なエピトープ)をN型糖鎖付加及びアラニン置換の手法によって脱エピトープ化することによって、残存している中和エピトープ(有益なエピトープ)に対する免疫応答をより効率的・効果的に誘導することが出来た結果であると考えられる。言い換えれば、野生型g B抗原に対する偏った免疫応答(免疫偏向)を、本発明者らによるイムノ・リフォーカス(i m m u n e r e f o c u s i n g)戦略によって理想的な形に矯正(免疫矯正)することが出来たもの

と言える。

[0094] <b c e v 1 9 及び b c e v 5 0 のマウス感染防御試験>

マウス性器ヘルペス感染モデルを用いて、改変型 g B 抗原 b c e v 1 9 及び b c e v 5 0 の予防的投与における感染防御能を別々に評価した。いずれの実験も陽性対照として野生型 g B 1 - 7 0 5 ( g B W T ) を用いた。抗原は全て、0. 0 3  $\mu$  g / 匹、0. 1  $\mu$  g / 匹、0. 3  $\mu$  g / 匹、1  $\mu$  g / 匹にて2週間間隔で3回皮下免疫した。最終免疫(3回目)から2週間後に行うウイルス接種時の感染効率を向上させるために、ウイルス接種6日前に D e p o - P r o v e r a を 2 m g / 匹 で 皮 下 接 種 した。麻酔下で  $5 \times 10^5$  P F U / 2 0  $\mu$  L / 匹 の H S V - 2 M S 株 を 経 腔 接 種 し、2 1 日 間 経 過 観 察 を 行 った。生存日数(生存率)及び症状スコアを指標に感染防御能を評価した。症状スコアは、腔病変症状及び全身症状の程度により分類し、それぞれ3段階と2段階のスコアを設定した。次に示す腔病変と全身症状のスコアを合算したものを症状スコアとした。腔病変に対するスコア(0:変化なし、1:部分的な紅斑・腫脹、2:広範囲の腫脹・浮腫、3:潰瘍・出血)。全身症状に対するスコア(0:変化なし、1:立毛、2:後肢麻痺)。また、死亡又は犠牲死させたものはスコア6とした。各群の動物例数を  $n = 10$  として実験を行ない、グラフ中にはそれらの平均値をプロットした。

[0095] b c e v 1 9 の 結 果 は、表 6 ( 生 存 日 数 )、図 8 ( 生 存 率 ) 及 び 図 9 ( 症 状 ス コ ア ) に 示 す。g B W T、b c e v 1 9 共 に 設 定 し た 全 て の 投 与 量 ( 0. 0 3 ~ 1  $\mu$  g / 匹 ) に お い て、陰 性 対 照 群 ( s a l i n e 投 与 群 ) に 比 して 有 意 な 生 存 日 数 延 長 効 果 を 示 し た が、g B W T 投 与 群 の 生 存 日 数 中 央 値 ( M S T ) は 明 確 な 用 量 依 存 性 を 示 さ ず、s a l i n e 投 与 群 に 対 す る M S T 比 率 は い ず れ の 投 与 量 に お い て も 2 未 満 に と ど ま っ て い た の に 対 し、b c e v 1 9 投 与 群 の M S T は ほ ぼ 用 量 依 存 性 を 示 し M S T 比 率 も 0. 1  $\mu$  g / 匹 以 上 の 3 用 量 に お い て > 2. 8 で あり、明 確 な 生 存 率 の 改 善 が 認 め ら れ た ( 表 6、図 8 )。症 状 ス コ ア に つ い て も、g B W T 投 与 群 で は 明 確 な 用 量 依 存 性 が 認 め ら れ ず、最 高 用 量 で あり 1  $\mu$  g / 匹 で も シ ビ ア な 症 状 を 伴 っ



ていたが、bcev19投与群の方は用量依存的かつ顕著な改善効果が認められた(図9)。

[表6]

抗原	投与量(μg)	生存日数(日)	MST (days)	MST比率 (vs saline)	有意差検定 (vs saline)
gB1-705 (WT)	1	9,9,10,11,11,12,13,14,>21,>21	11.5	1.9	***
	0.3	6,7,8,8,8,10,10,11,>21,>21	9	1.5	**
	0.1	8,8,8,9,9,10,10,12,>21,>21	9.5	1.6	***
	0.03	6,8,8,8,8,11,17,>21,>21	8	1.3	**
bcev19	1	10,11,14,>21,>21,>21,>21,>21,>21	>21	>3.5	***
	0.3	5,11,12,12,12,>21,>21,>21,>21	>16.5	>2.8	***
	0.1	6,9,9,12,13,>21,>21,>21,>21	>17	>2.8	***
	0.03	5,6,7,7,9,10,14,>21,>21	9.5	1.8	*
saline		5,5,5,6,6,6,7,7,8	6		

MST: 平均生存日数 \*\*\*: p<0.0001 / \*\*: 0.0001<p<0.001 / \*: 0.001<p<0.01 (Kaplan-Meier法)

[0096] bcev50の結果は、表7(生存日数)、図10(生存率)及び図11(症状スコア)に示す。bcev19と同様にbcev50もgB WTに比して、生存日数、生存率、症状スコアのいずれの指標においても、明確な優越性を示した。

[表7]

抗原	投与量(μg)	生存日数(日)	MST (days)	MST比率 (vs saline)	有意差検定 (vs saline)
gB1-705 (WT)	1	8,9,11,13,15,>23,>23,>23	15	2.3	***
	0.3	7,8,8,12,>23,>23,>23,>23,>23	>23	>3.5	**
	0.1	7,7,7,9,9,9,9,>23,>23	9	1.4	**
	0.03	6,6,6,6,7,7,8,11,>23,>23	7	1.1	N.S.
bcev50	1	12,>23,>23,>23,>23,>23,>23,>23	>23	>3.5	***
	0.3	>23,>23,>23,>23,>23,>23,>23,>23	>23	>3.5	***
	0.1	7,9,12,>23,>23,>23,>23,>23,>23	>23	>3.5	***
	0.03	5,6,6,9,11,>23,>23,>23,>23	>17	>2.6	*
saline		6,6,6,6,6,7,7,8,8	6.5		

MST: 平均生存日数 \*\*\*: p<0.0001 / \*\*: 0.0001<p<0.001 / \*: 0.001<p<0.01 (Kaplan-Meier法)

[0097] <イムノ・リフォーカスの解析>

マウス免疫原性試験及びマウス感染防御試験において野生型gB(gB1-705)に比して優越性が認められた改変型gB抗原bcev19及びbcev50の免疫血清について、イムノ・リフォーカスが誘導されているかをそれぞれgB1-457及びgB111-457を固相化したELISAにより解析した。

[0098] bcev19の解析結果を図12に、bcev50の解析結果を図13に示す。野生型gB免疫血清と比較して、bcev19免疫血清及びbcev50免疫血清はいずれもgB1-457及びgB111-457に対する結

合抗体活性が上昇していることが確認された。本結果は、野生型 g B 抗原上のデコイ領域であると考えられるドメイン I V 上に主に存在する非中和エピトープを N 型糖鎖付加及びアラニン置換の手法により脱エピトープ化することによって、ドメイン I 及び I I 上に多く残存している中和エピトープ（有益なエピトープ）に対する免疫応答をより効率的・効果的に誘導することが出来た結果であると考えられる。言い換えれば、野生型 g B 抗原上のデコイ領域に対する偏った免疫応答（免疫偏向）を、イムノ・リフォーカス戦略によって理想的な形に矯正（免疫矯正）することが出来たものと考えられる。

[0099] <g B ドメイン I に導入した N 型糖鎖の効果>

g B 改変体である b c e v 19 は、ドメイン I に D 199 N、D 200 A、H 201 T、ドメイン I V に R 613 A、R 567 N、P 568 S、G 569 S、S 631 N、H 632 T、Q 633 T の改変を導入している。また b c e v 50 は、ドメイン I に D 199 N、D 200 A、H 201 T、ドメイン I V に R 613 A、R 567 N、P 568 S、G 569 S、S 631 N、H 632 T、Q 633 T、R 602 N、D 603 A、A 604 T の改変を導入している。我々は b c e v 19 及び b c e v 50 に導入した改変の効果をもさらに調べるために、b c e v 19 及び b c e v 50 に含まれるドメイン I の改変 D 199 N、D 200 A、H 201 T のみを原体のアミノ酸配列に戻した改変体、それぞれ b c e v 19' 及び b c e v 50' を作出した。

[0100] E x p i 293 発現システムを用いた一過性発現を実施し、その発現量を比較した（表 8）。その結果、b c e v 19、b c e v 19'、b c e v 50、b c e v 50' の発現量は、それぞれ 10.81  $\mu$ g/mL、1.28  $\mu$ g/mL、6.29  $\mu$ g/mL、4.36  $\mu$ g/mL であった。b c e v 19 及び b c e v 19' の発現量を比較すると b c e v 19 の方が b c e v 19' よりも 8.45 倍高く、また b c e v 50 及び b c e v 50' の発現量を比較すると b c e v 50 の方が b c e v 50' よりも 1.44 倍高かった。このことは b c e v 19 及び b c e v 50 における D 199 N、D 200 A、H 201 T が発現量の向上に寄与する変異であることを意味する。ま

たg B 1 - 7 0 5にD 1 9 9 N、D 2 0 0 A、H 2 0 1 T の改変を導入したb c e v 1 - 3においても同様の結果が得られており、このことを支持している（表4）。

[表8]

クローン	変異部位	収率 ( $\mu\text{g/mL}$ )	人工的 糖鎖導入
bcev19	D199N, D200A, H201T, R567N, P568S, G569S, R613A, S631N, H632T, Q633T	10.81	3
bcev19'	R567N, P568S, G569S, R613A, S631N, H632T, Q633T	1.28	2
bcev50	D199N, D200A, H201T, R567N, P568S, G569S, R613A, R602N, D603A, A604T, S631N, H632T, Q633T	6.29	4
bcev50'	R567N, P568S, G569S, R613A, R602N, D603A, A604T, S631N, H632T, Q633T	4.36	3

[0101] 更に、ゲル濾過クロマトグラフィーによるb c e v 1 9、b c e v 1 9'、b c e v 5 0及びb c e v 5 0'の性状解析を行った。その結果を図14に示す。b c e v 1 9の方がb c e v 1 9'よりもネーティブな3量体含量が高く（図14（A））、またb c e v 5 0の方がb c e v 5 0'よりも3量体含量が高かった（図14（B））。このことは、b c e v 1 9及びb c e v 5 0におけるD 1 9 9 N、D 2 0 0 A、H 2 0 1 Tが性状改善に寄与する変異であることを意味する。

[0102] 次に、マウス免疫原性試験において、b c e v 1 9とb c e v 1 9'、b c e v 5 0とb c e v 5 0'をそれぞれ比較した。抗原量はいずれも0.3  $\mu\text{g}$ /匹及び1  $\mu\text{g}$ /匹にて2週間間隔で3回皮下免疫した。各群の動物例数はいずれもn=4として実験を行なった。b c e v 1 9とb c e v 1 9'の比較を図15に、b c e v 5 0とb c e v 5 0'の比較を図16にそれぞれ示した（グラフ中にはn=4の平均値をプロットし±SEエラーバーを付記）。最終免疫から2週間後に採取した血清を用いて、野生型g B抗原に対する結合抗体誘導活性（a n t i - g B E L I S A）及びH S V - 2に対する中和抗体誘導活性（プラーク数減少率）を評価した結果、どちらの指標においてもb c e v 1 9'よりもb c e v 1 9の方が、またb c e v 5 0'

よりも b c e v 5 0 の方が高い抗体誘導能を示す傾向があることが分かった。  
。

[0103] 以上の結果から、改変体 b c e v 1 9 及び b c e v 5 0 に導入した変異のうち、ドメイン I の N 型糖鎖 ( D 1 9 9 N 、 D 2 0 0 A 、 H 2 0 1 T ) は中和抗体誘導能の増強のみならずタンパク発現量の向上及び性状改善にも寄与する変異であることが分かった。

#### 産業上の利用可能性

[0104] 本発明の改変型 H S V g B タンパク質は、H S V 感染症の予防及び治療に効果的なワクチンの作製に使用できる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 単純ヘルペスウイルス（HSV）のエンベロープ糖タンパク質B（gB）の改変タンパク質（改変型HSV gBタンパク質）であって、野生型HSV gBのドメインIV及びドメインIに存在する非中和抗体を誘導するエピトープ（非中和エピトープ）のうち、少なくとも1つがエピトープとして機能しないように改変された、改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項2] 前記非中和エピトープは、野生型HSV gBのエクトドメインの結晶構造の表面において、配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基（R567）、602番目のアルギニン残基（R602）、631番目のセリン残基（S631）、又は199番目のアスパラギン酸残基（D199）に相当するアミノ酸残基からの距離が1.5nm以下の領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を含むエピトープである、請求項1に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項3] 前記非中和エピトープは、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567、R602、S631、又はD199に相当するアミノ酸残基を含むエピトープである、請求項1又は2に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項4] 前記改変は、アミノ酸残基の置換、及び/又はアミノ酸残基の欠損によって行われる改変を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項5] 前記改変は、アミノ酸残基の置換又は欠損によって糖鎖導入されることによって行われる改変を含む、請求項4に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項6] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入

をするための改変を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項7] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも2つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項8] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入をするための改変を含む、請求項7に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項9] 前記糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR567N、P568S、G569S、S631N、H632T、及びQ633Tのアミノ酸残基置換によって行われる、請求項8に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項10] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、及びS631に相当するアミノ酸残基のそれぞれの位置への糖鎖導入するための改変を含む、請求項7に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項11] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR602に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、請求項6～10のいずれか一項に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項12] 前記糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるR602N、D603A、A604Tのアミノ酸残基置換によって行われる、請求項11に記載の改変型HSV g Bタンパク質。

[請求項13] 前記改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、請求項5～12のいずれか一項に記載の改変型HSV g Bタンパ

ク質。

- [請求項14] 前記糖鎖導入は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199N、D200A、及びH201Tのアミノ酸残基置換によって行われる、請求項13に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項15] 前記改変はさらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目のアルギニン（R613）に相当するアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む、請求項4～14のいずれか一項に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項16] 請求項1～15のいずれか一項に記載の改変型HSV gBタンパク質を含む、HSVワクチン。
- [請求項17] 単純ヘルペスウイルス（HSV）のエンベロープ糖タンパク質B（gB）の改変タンパク質（改変型HSV gBタンパク質）であって、野生型HSV gBのエクトドメインの結晶構造の表面において、配列番号1に記載のアミノ酸配列における567番目のアルギニン残基（R567）、602番目のアルギニン残基（R602）、631番目のセリン残基（S631）、又は199番目のアスパラギン酸残基（D199）に相当するアミノ酸残基からの距離が1.5nm以下の領域に存在する少なくとも1つのアミノ酸残基を置換又は欠失させた、改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項18] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199、R567、R602、及びS631に相当するアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、請求項17に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項19] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列におけるD199に相当するアミノ酸残基の位置に糖鎖導入するための改変を含む、請求項17又は18に記載の改変型HSV gBタンパク質。
- [請求項20] 前記改変は、配列番号1に記載のアミノ酸配列における613番目

のアルギニン（R 6 1 3）に相当するアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む、請求項 1 7～1 9 のいずれか一項に記載の改変型 H S V g B タンパク質。

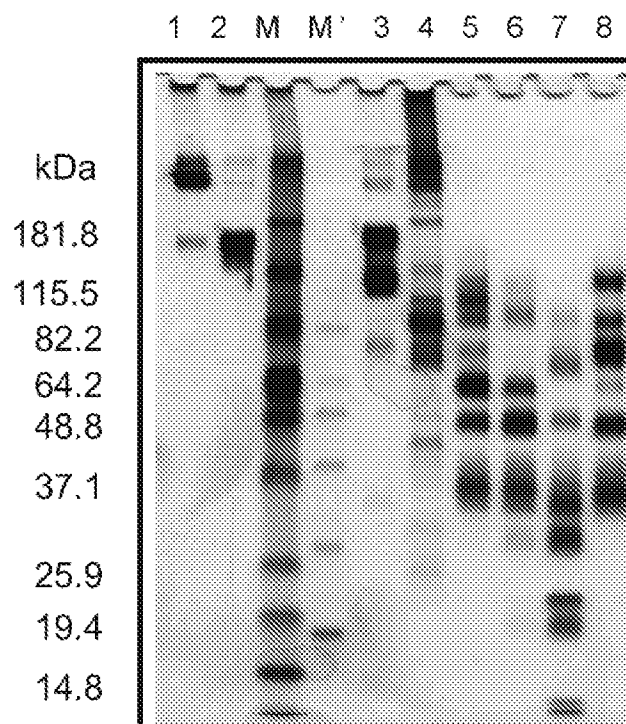
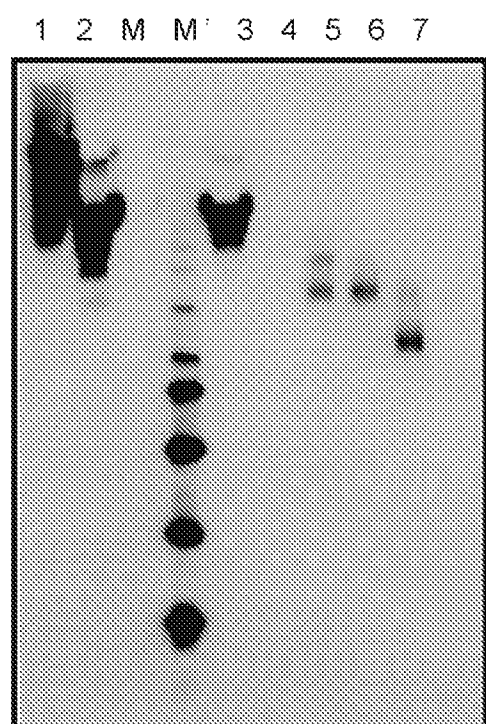
[請求項21] 前記改変は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列における R 5 6 7 に相当するアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、請求項 1 7～2 0 のいずれか一項に記載の改変型 H S V g B タンパク質。

[請求項22] 前記改変は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列における S 6 3 1 に相当するアミノ酸残基の位置への糖鎖導入をするための改変を含む、請求項 1 7～2 1 のいずれか一項に記載の改変型 H S V g B タンパク質。

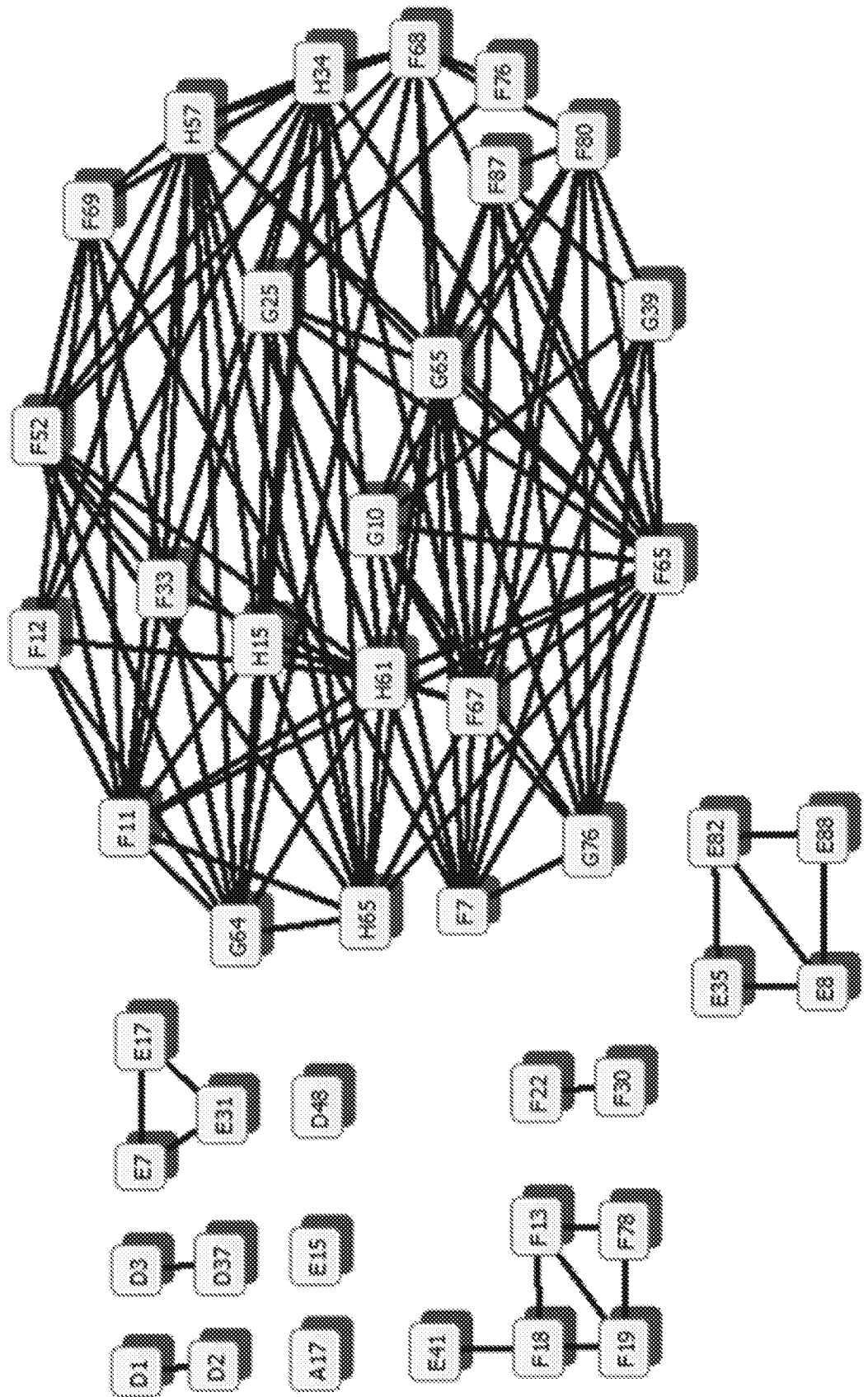
[請求項23] 請求項 1 8～2 2 のいずれか一項に記載の改変型 H S V g B タンパク質を含む、H S V ワクチン。



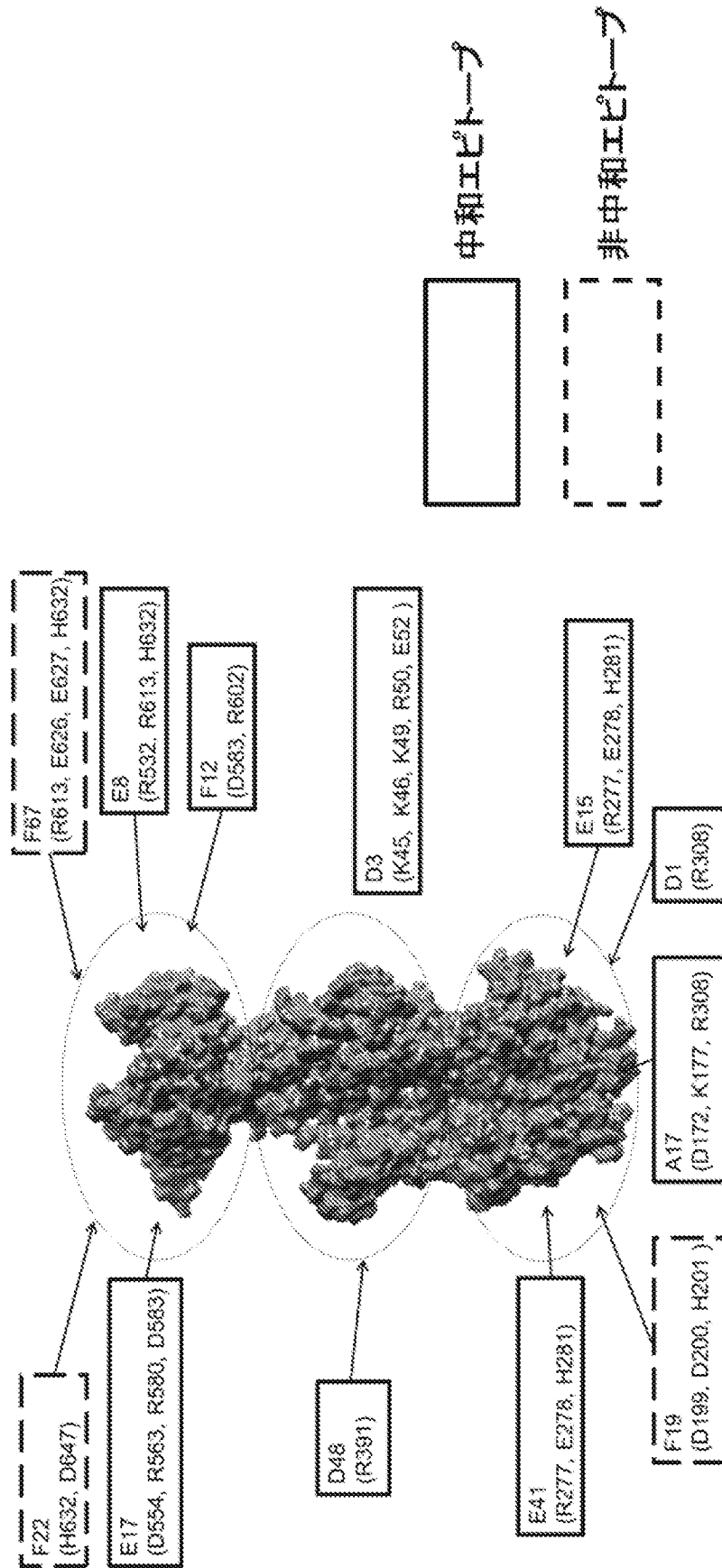
[図1]

**SDS-PAGE****Western Blotting**

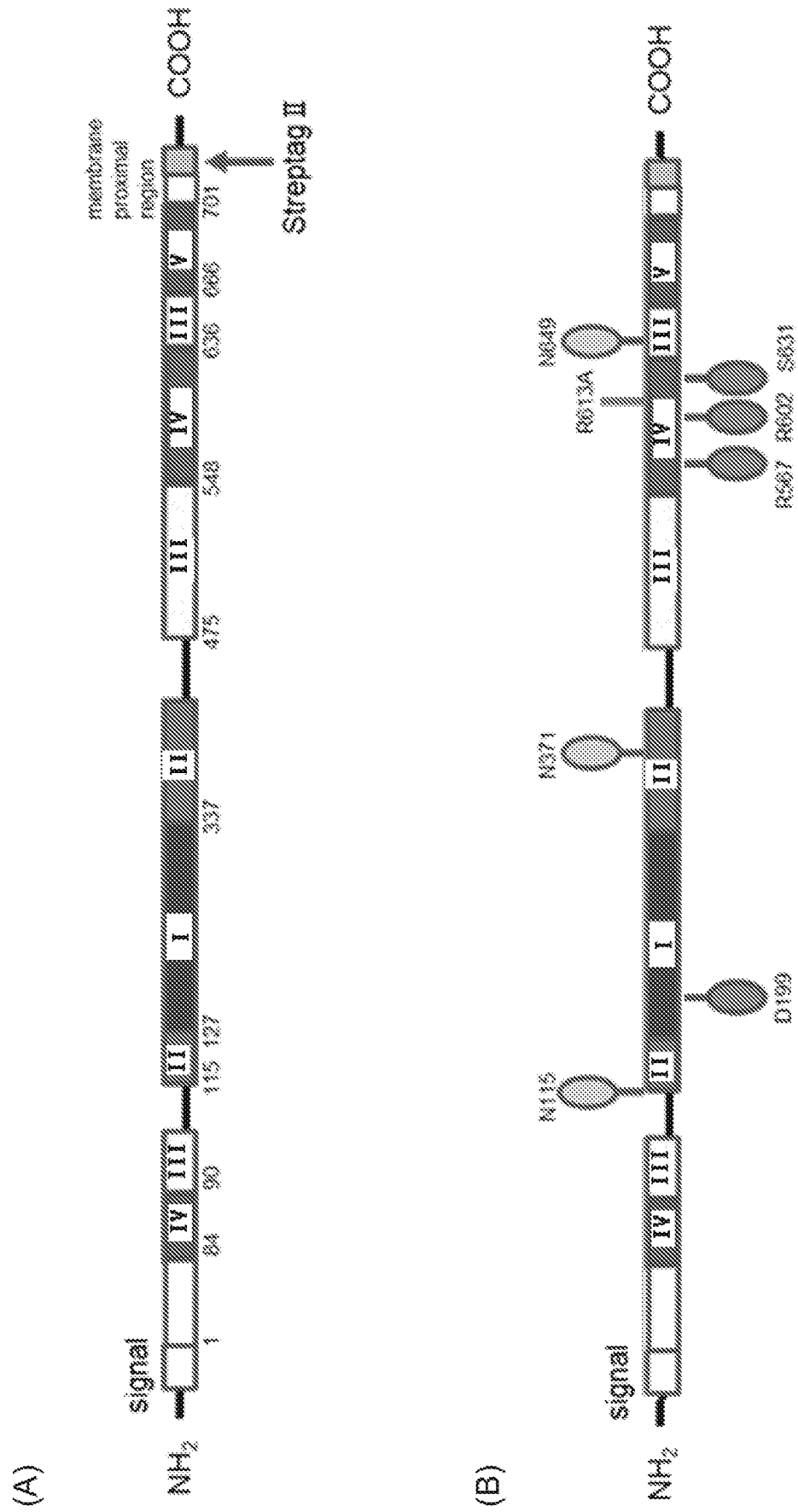
[図2]



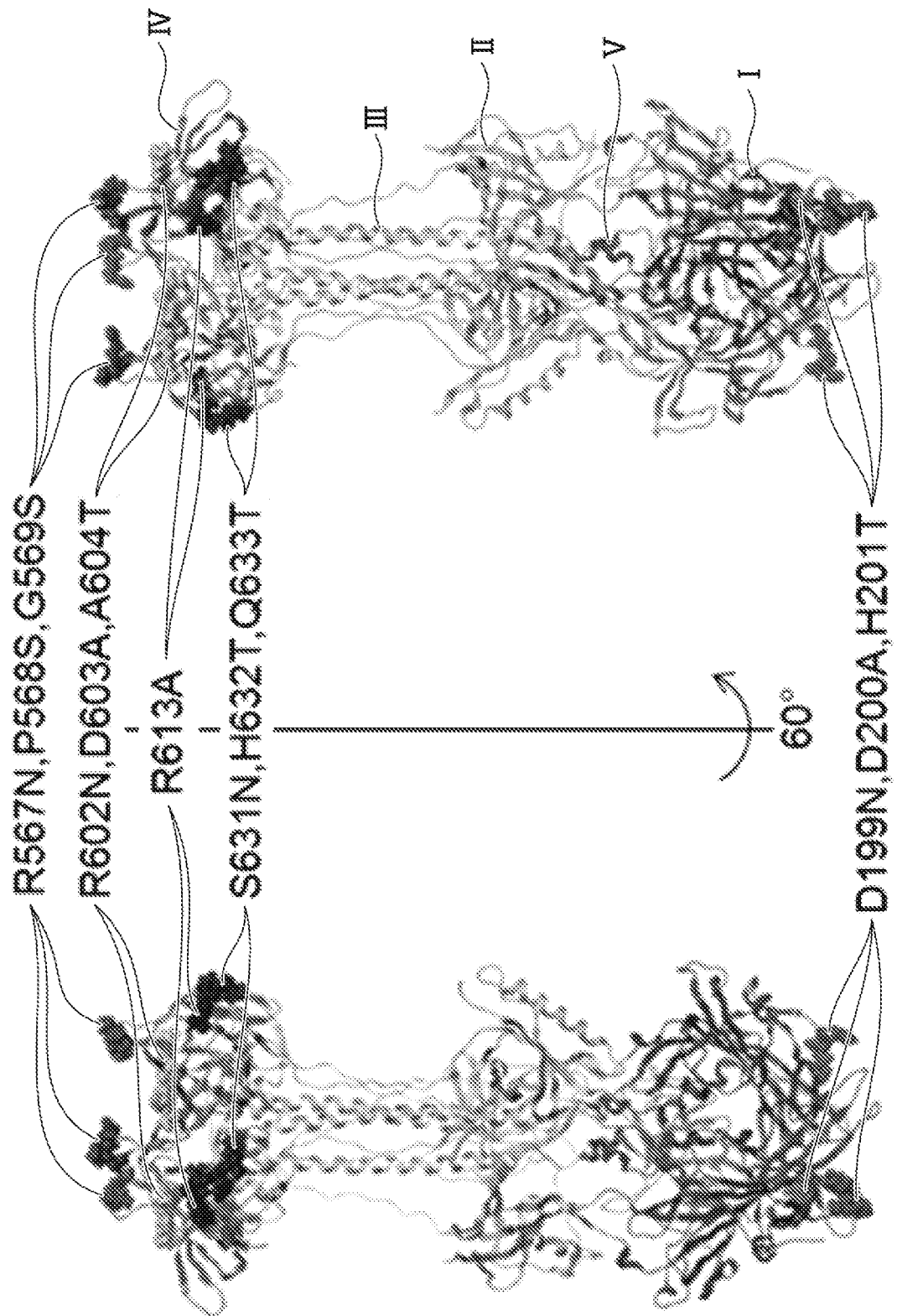
[図3]



[図4]



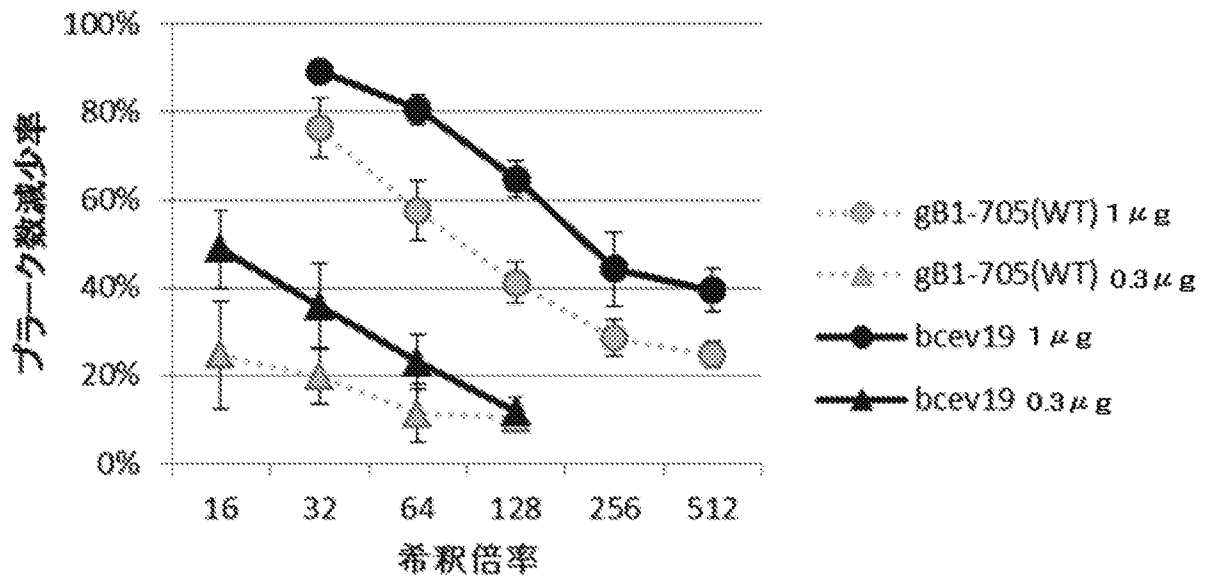
[図5]



[図6]

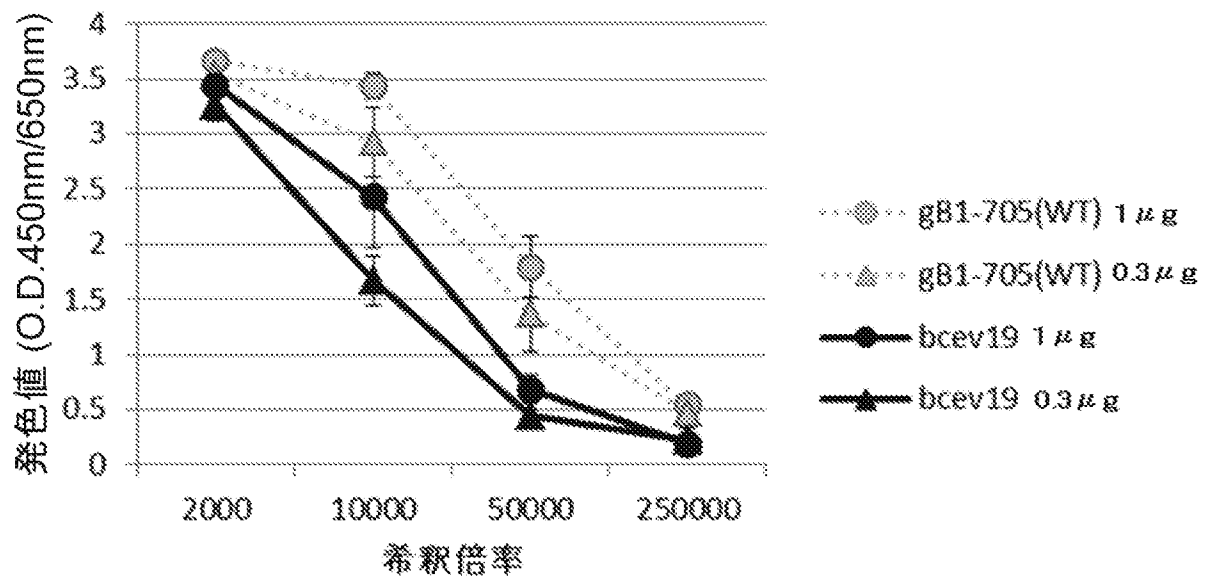
(A)

## 中和抗体誘導活性(HSV-2)



(B)

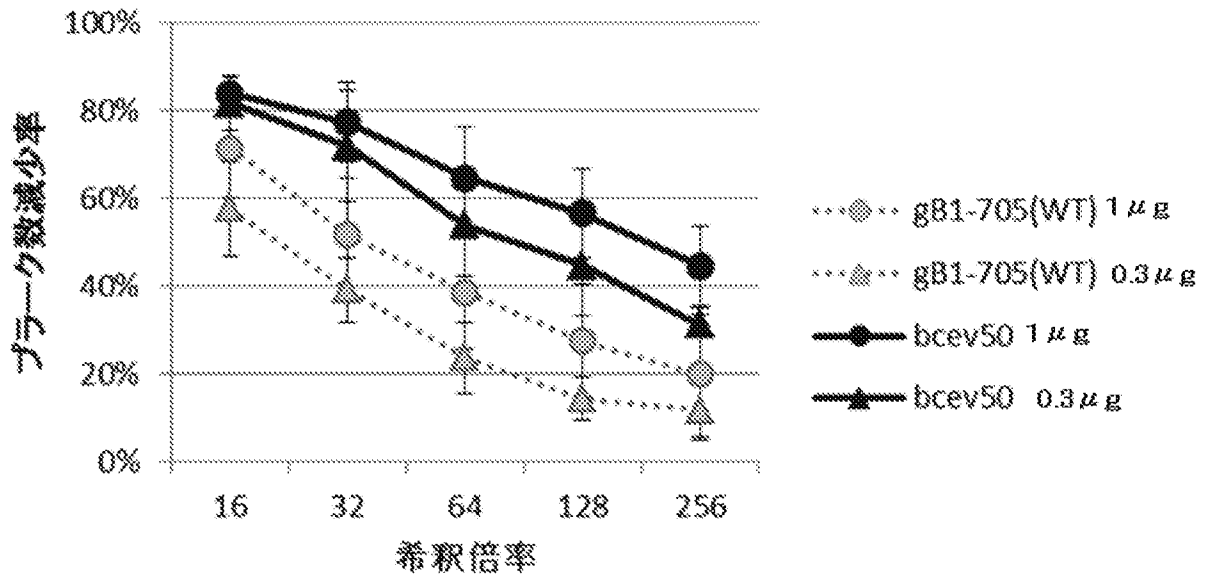
## 抗gB結合抗体誘導活性



[図7]

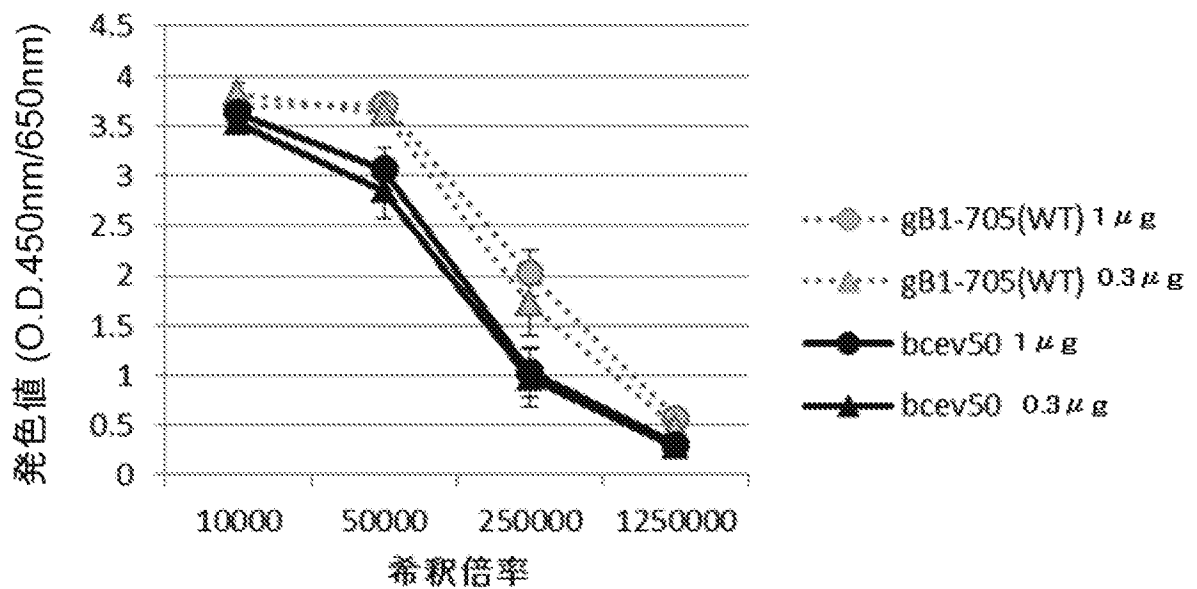
(A)

## 中和抗体誘導活性(HSV-2)

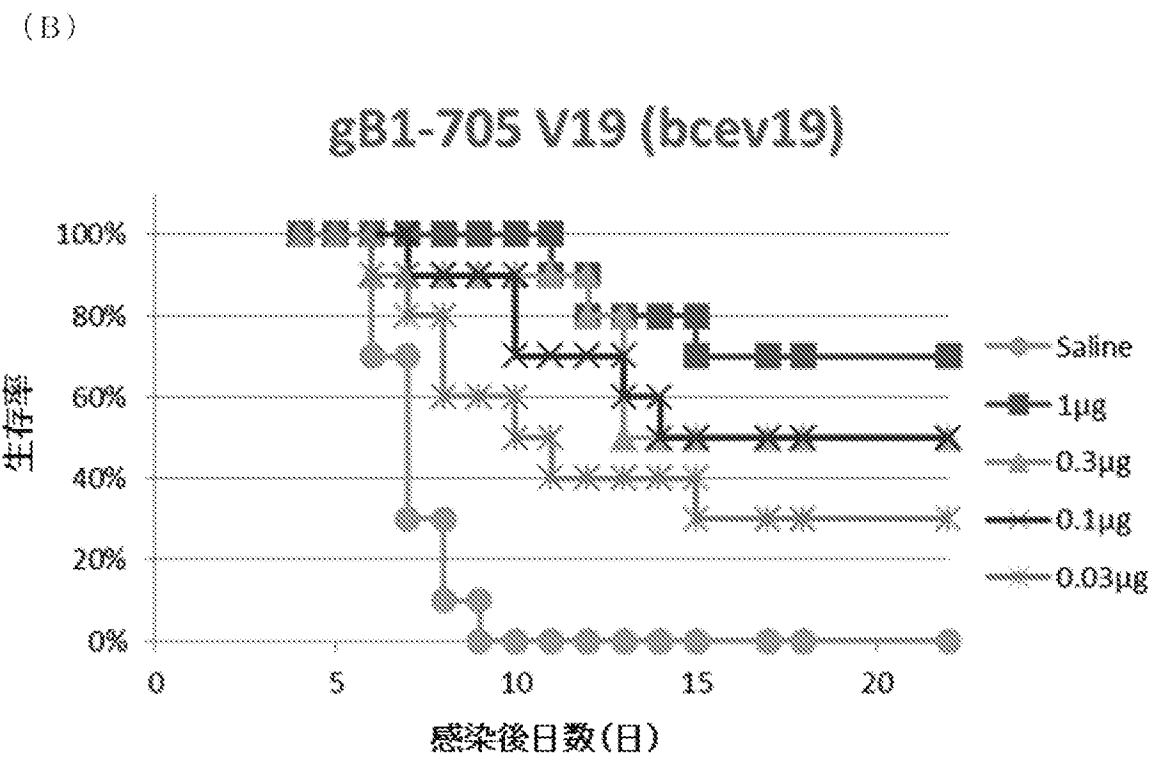
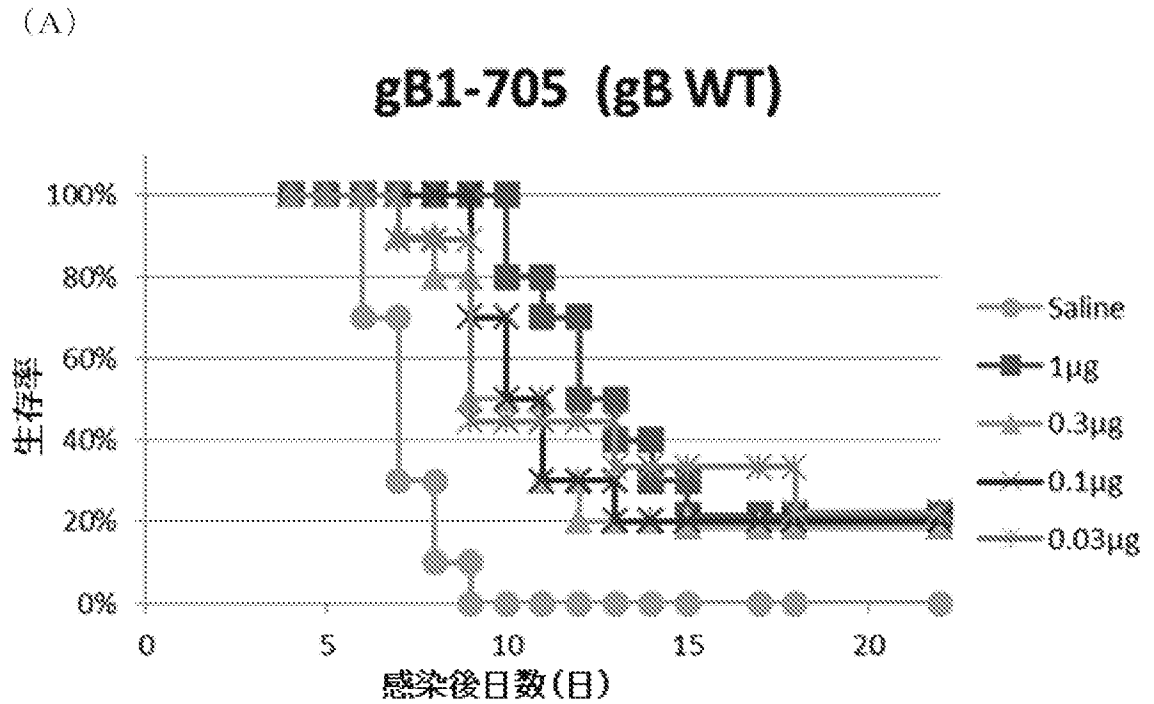


(B)

## 抗gB結合抗体誘導活性

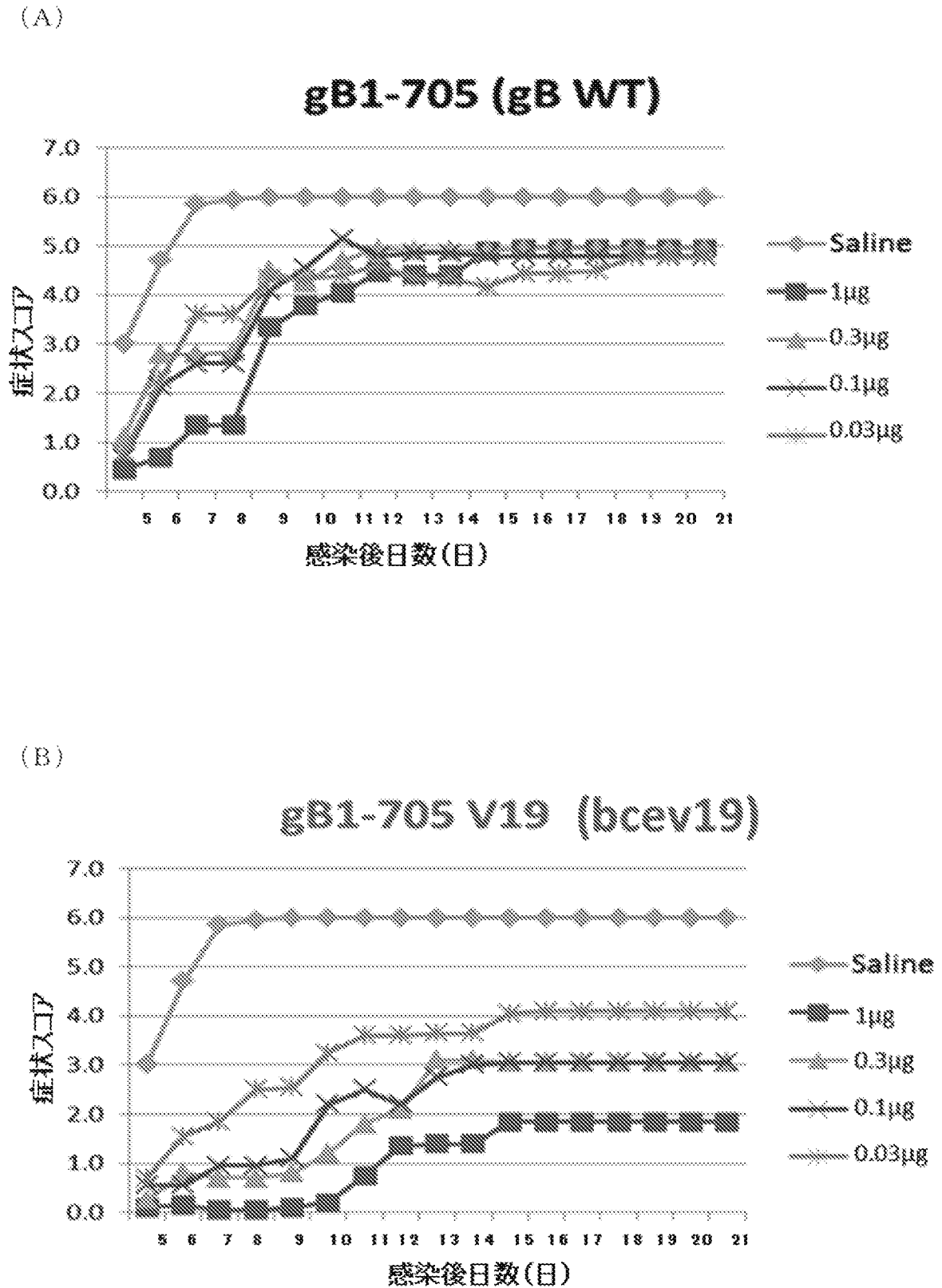


[図8]



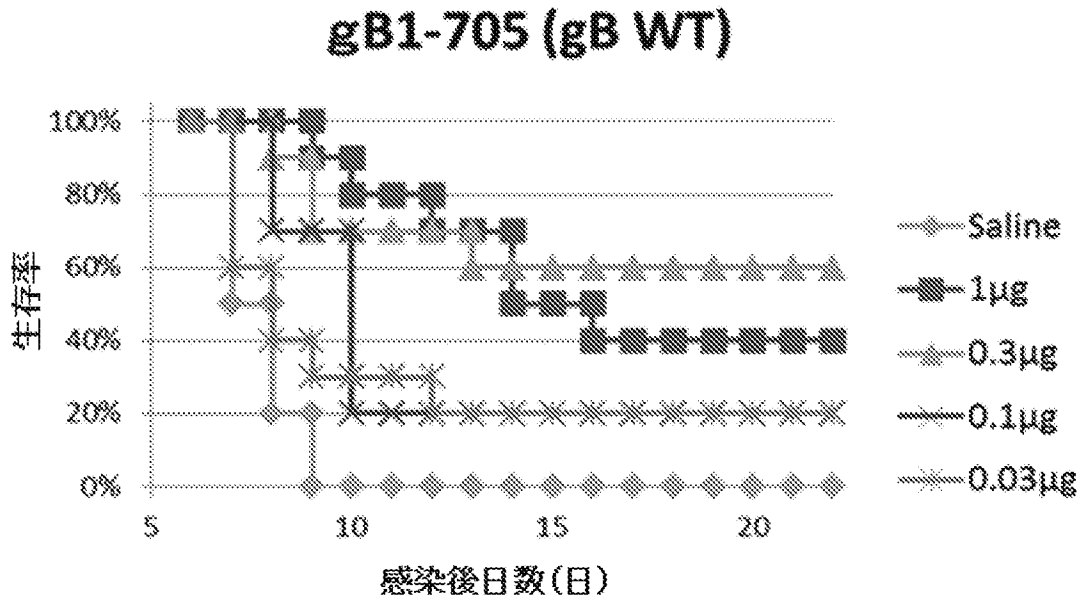


[図9]

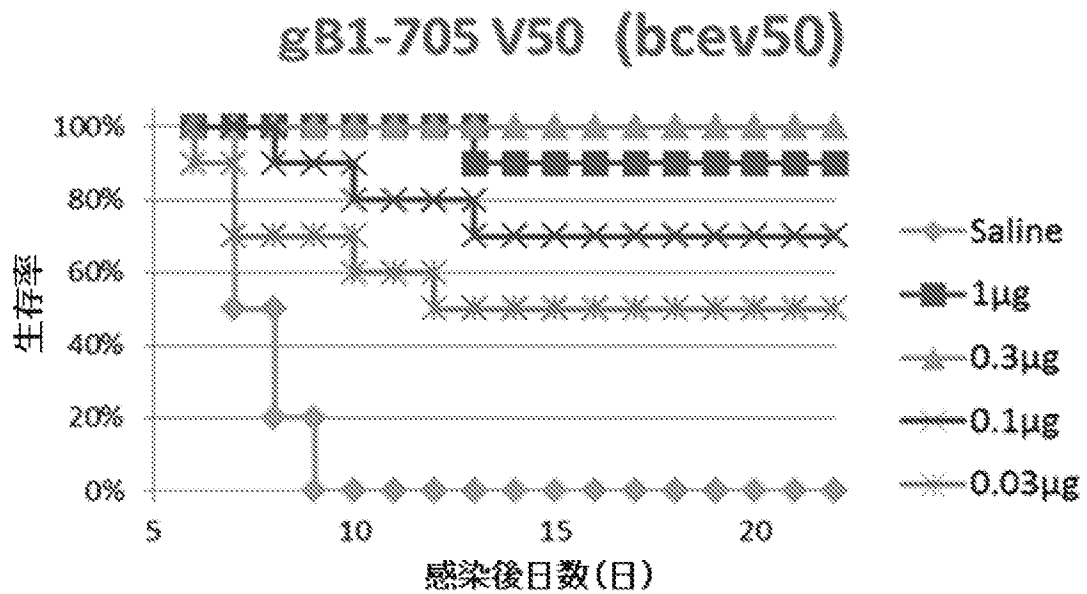


[図10]

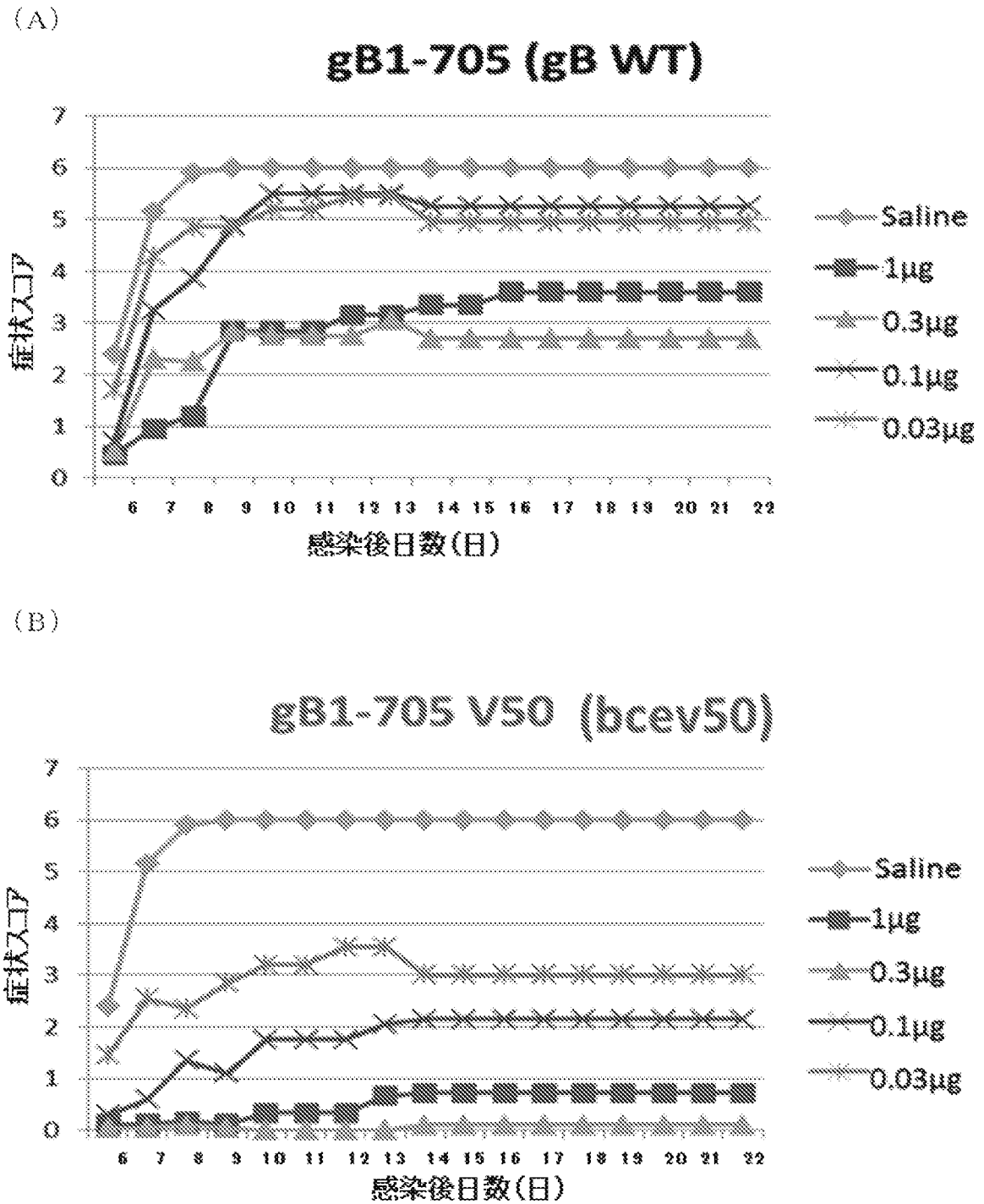
(A)



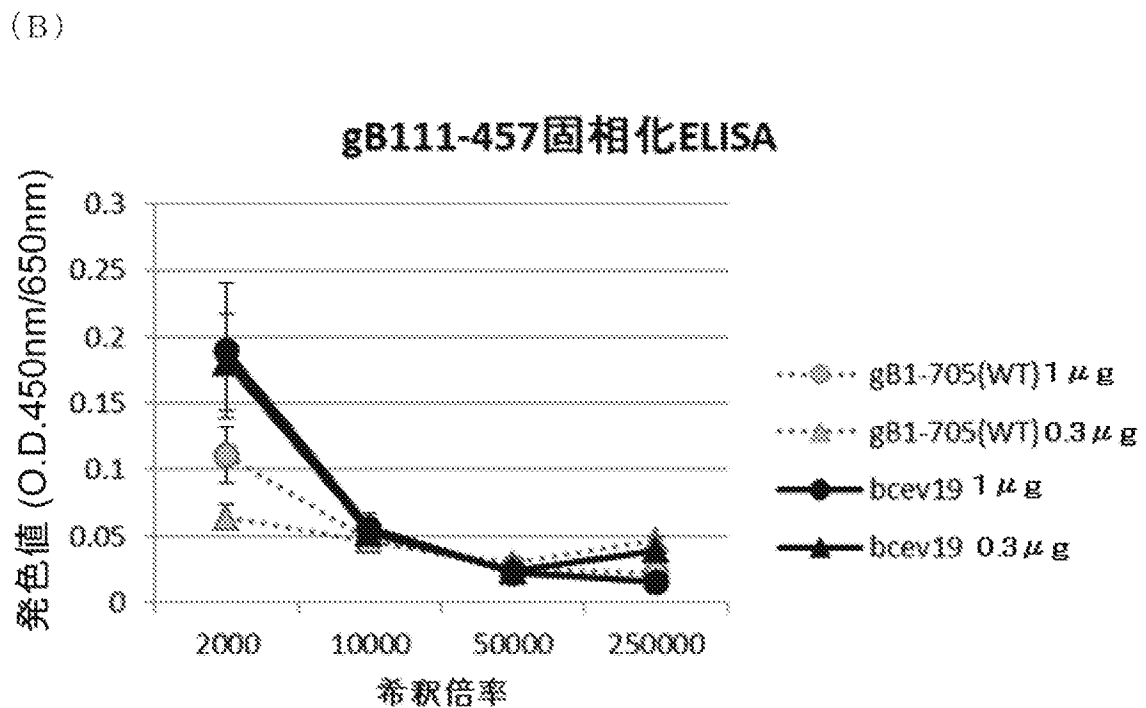
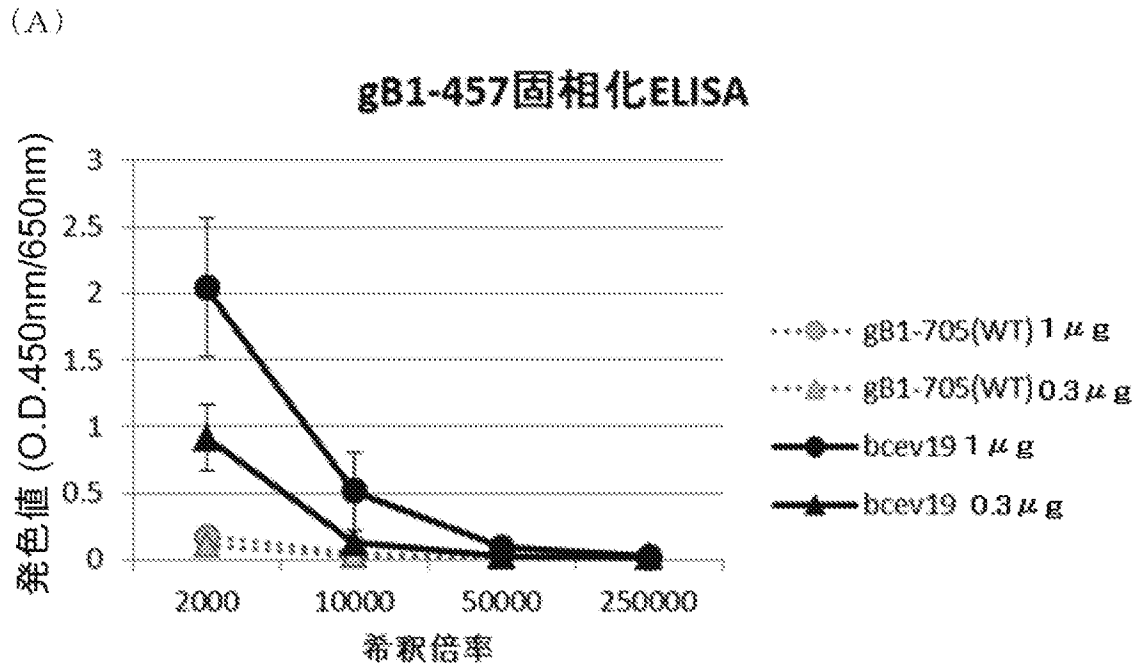
(B)



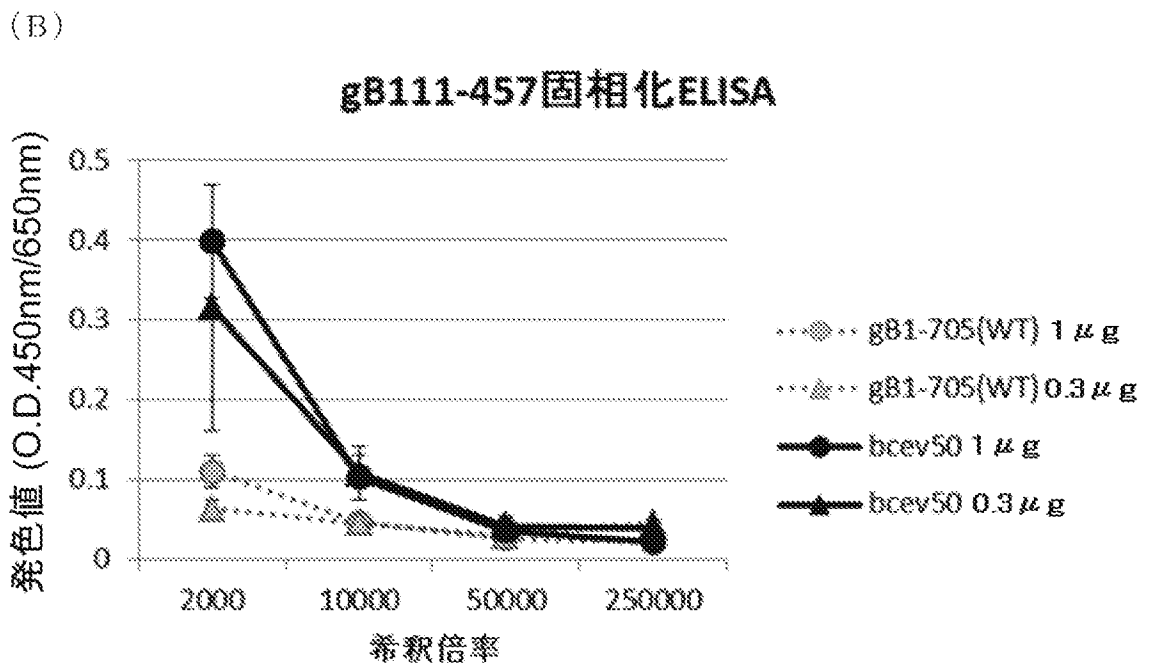
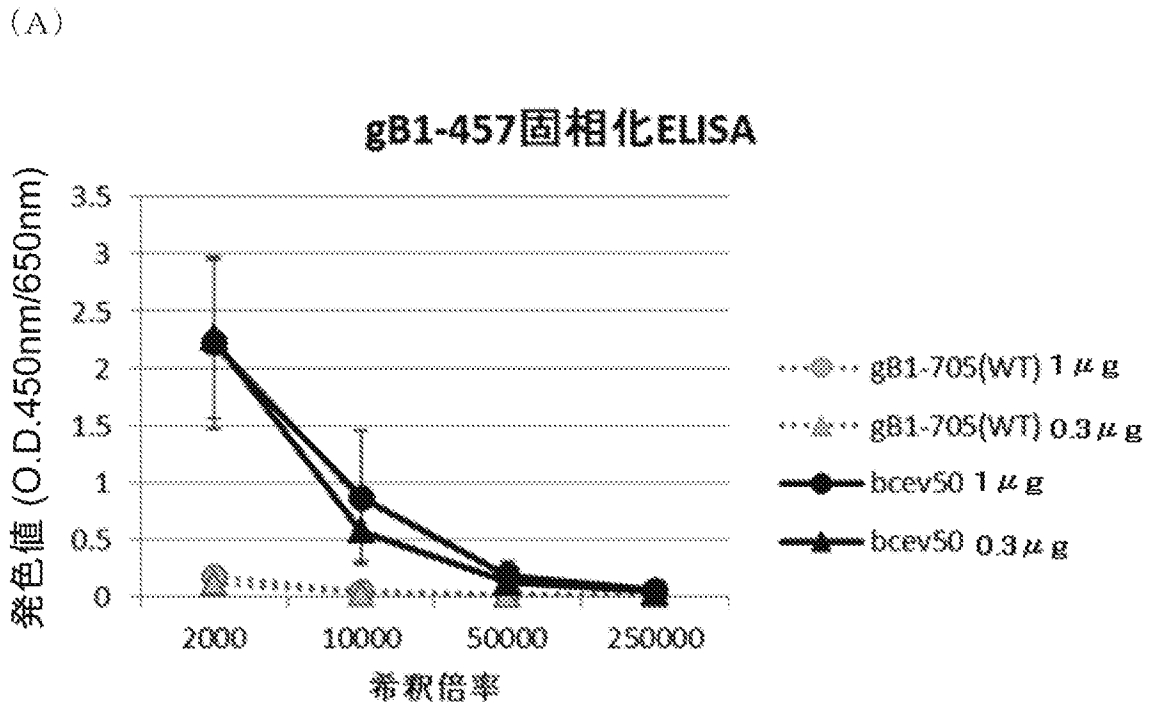
[図11]



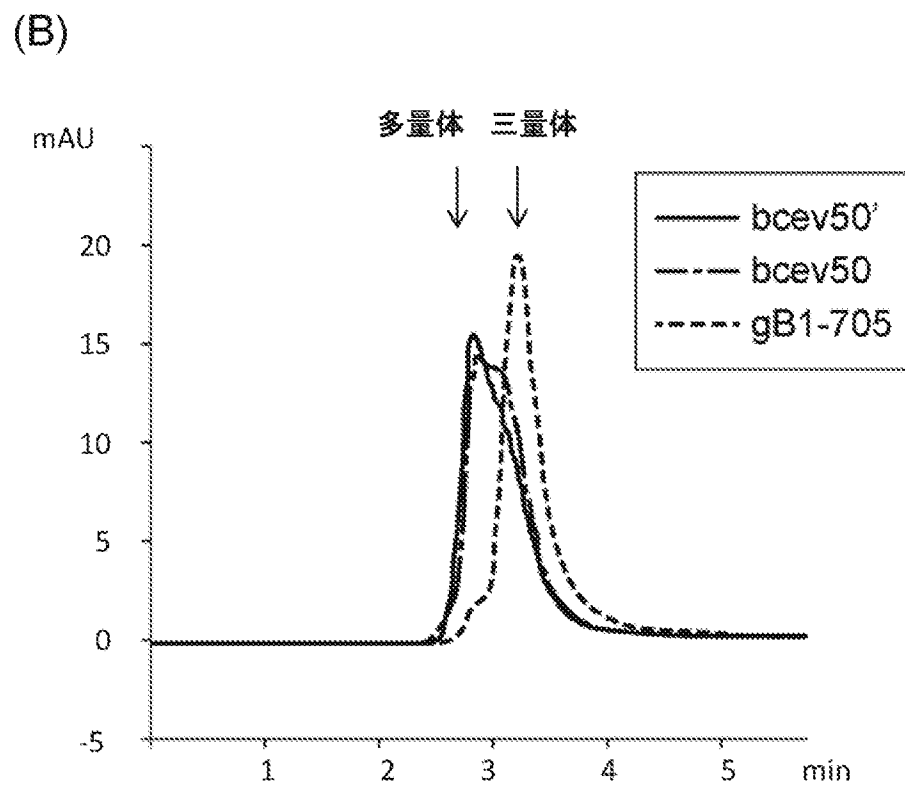
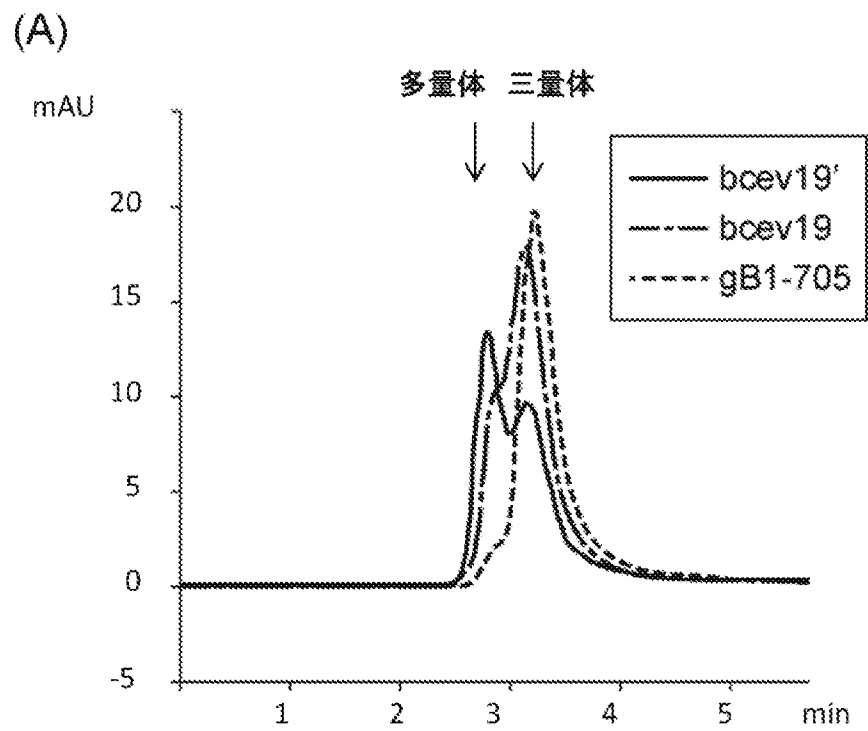
[図12]



[図13]



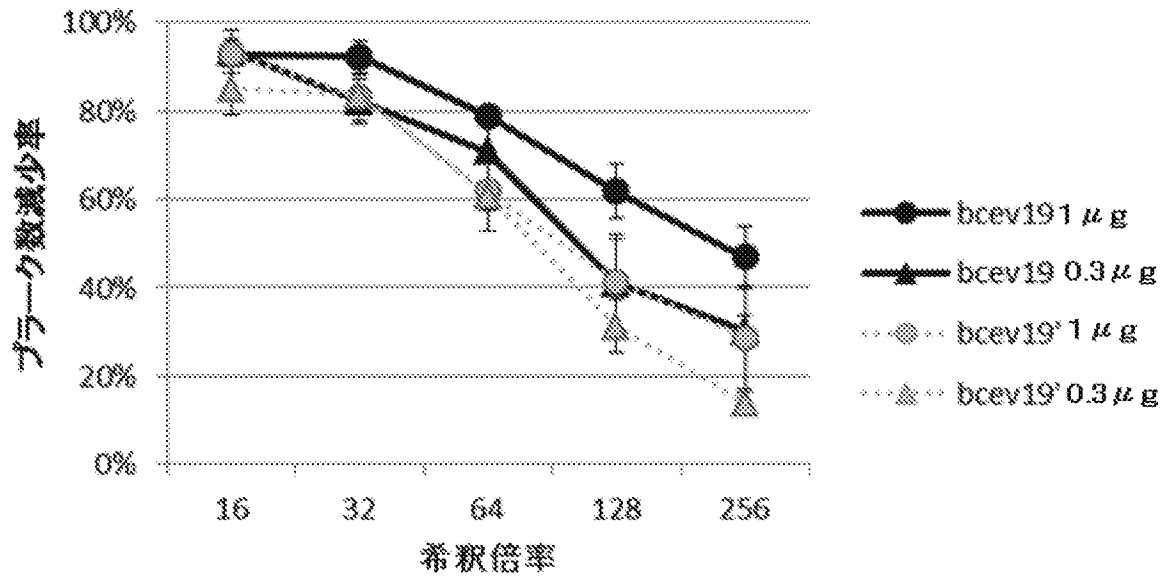
[図14]



[図15]

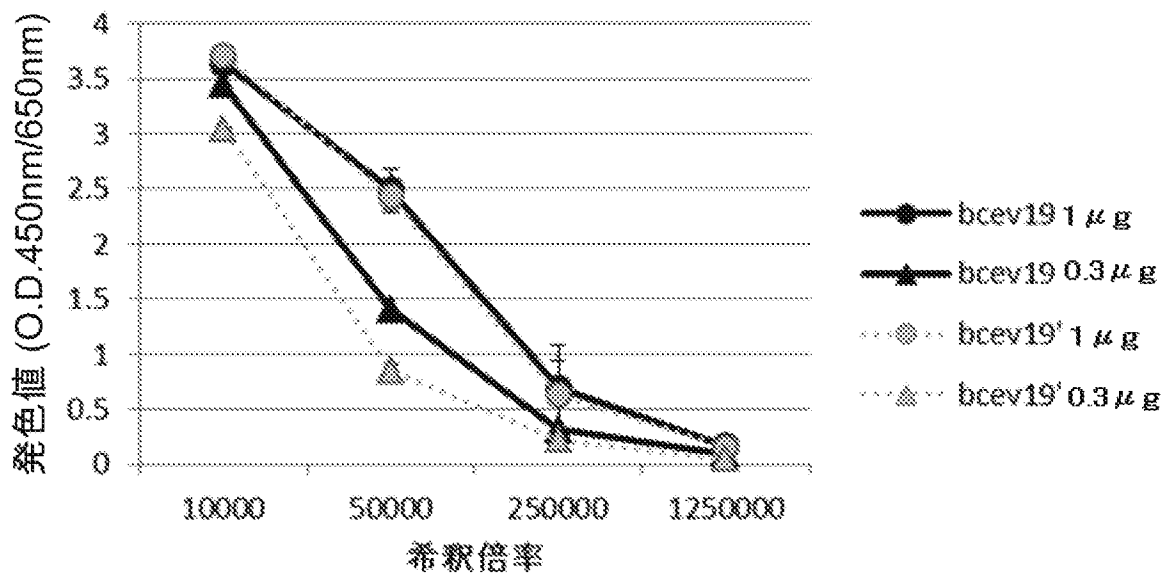
(A)

## 中和抗体誘導活性(HSV-2)



(B)

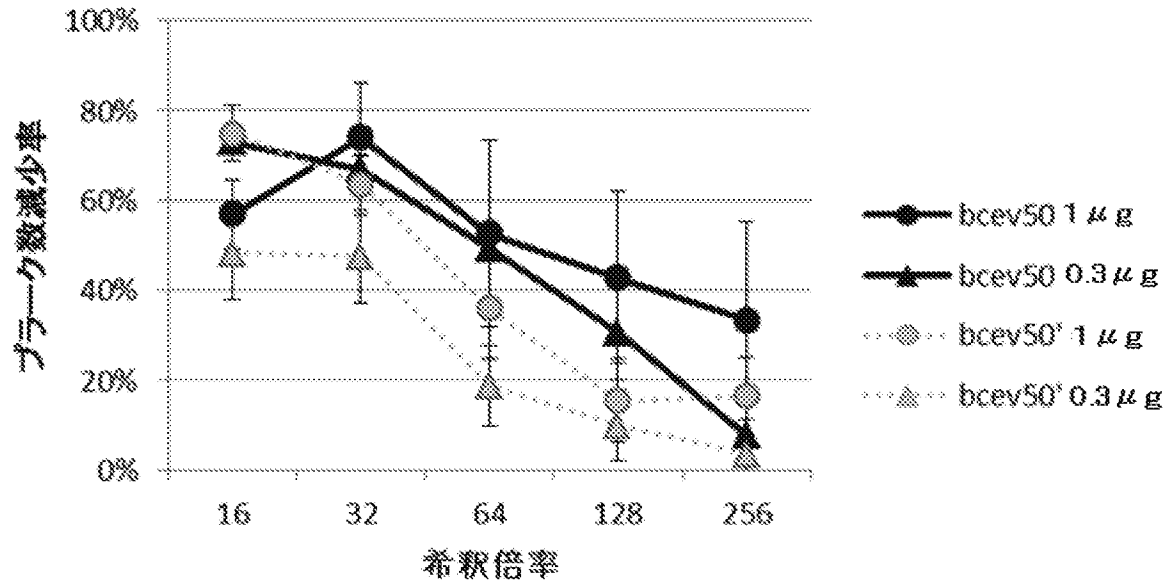
## 抗gB結合抗体誘導活性



[図16]

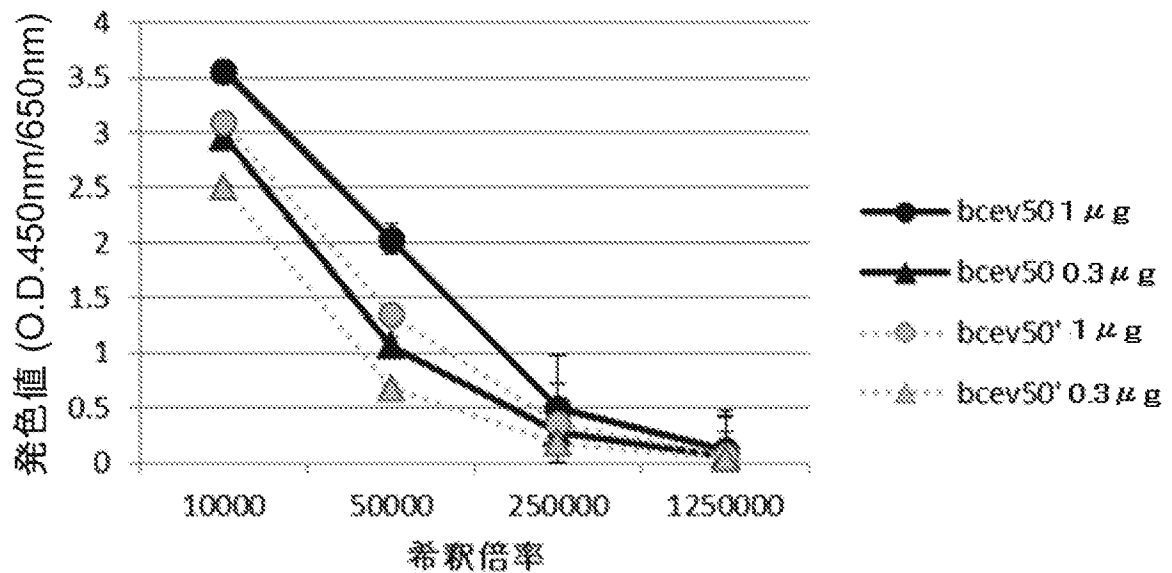
(A)

## 中和抗体誘導活性(HSV-2)



(B)

## 抗gB結合抗体誘導活性





[図17]

HSV1 :MHQGAPSWGRRWFVWVWALLGLTLGVLVASAAPTSPGTP---GVAAATQAANGGPATPAPP 27  
 HSV2 :MRGGGLICALVVGALVA AVASA-----APAAPAAPRASGGVAATVAANGGPASRPPP 30

HSV1 28: PLGAAPTGDPKPKKKNKPKNPTPPRPAAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCP 87  
 HSV2 31: VPSPATTKARKRKTCKPKRPEATPPPDANATVAAGHATLRAHLREIKVENADAQFYVCP 90

HSV1 88: PPTGATVVQFEQPRRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYYKDVTVSQVWFGH 147  
 HSV2 91: PPTGATVVQFEQPRRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYYKDVTVSQVWFGH 150

HSV1 148: RYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPA 207  
 HSV2 151: RYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRSTAKYVRNNMETTAFHRDDHETDMELKPA 210

HSV1 208: NAATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYM 267  
 HSV2 211: KVATRTSRGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYM 270

HSV1 268: SPFYGYREGSHEHTTYAADRFKQVDGFYARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDWV 327  
 HSV2 271: SPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGFYARDLTTKARATSPTTRNLLTTPKFTVAWDWV 330

HSV1 328: PKRPSVCTMTKWQEVDLEMLRSEYGGSFRRSSDAISTTFTTNLTEYPLSRVDLGDCIGKDA 387  
 HSV2 331: PKRPAVCTMTKWQEVDLEMLRAEYGGSFRRSSDAISTTFTTNLTQYSLSRVDLGDCIGRDA 390

HSV1 388: RDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYQANGGFLIAYQPLLSNTLAELYVREHLREQSRKPP 447  
 HSV2 391: REAIDRMFARKYNATHIKVGQPQYYLATGGFLIAYQPLLSNTLAELYVREYMREQDRKPR 450

HSV1 478: NPTPPPP--GASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDMLGRVAIAWCELQNHE 505  
 HSV2 451: NATPAPLREAPSANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDMLGRIAVAWCELQNHE 510

HSV1 506: LTLWNEARKLNPNNAIASVTVGRRVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQNSMRISSRPGA 565  
 HSV2 511: LTLWNEARKLNPNNAIASATVGRRVSARMLGDVMAVSTCVPVAPDNVIVQNSMRVSSRPGT 570

HSV1 566: CYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEEYAY 625  
 HSV2 571: CYSRPLVSFRYEDQGPLIEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEEYAY 630

HSV1 626: SHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR 685  
 HSV2 631: SHQLSRADVTTVSTFIDLNITMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR 690

HSV1 686: FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFEGMGDLGRAVGKVVMGVGGVVS AVSGVSSFMSNPF 745  
 HSV2 691: FADIDTVIRADANAAMFAGLCAFFEGMGDLGRAVGKVVMGVGGVVS AVSGVSSFMSNPF 750

HSV1 746: GALAVGLLVLAGLAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEGEE---G 802  
 HSV2 751: GALAVGLLVLAGLVAAFFAFRYVLQLQRNPMKALYPLTTKELKTSDPGGVGEGEGEAG 810

HSV1 803: GDFDEAKLAEAREMI RYMALVSAMERTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQV 862  
 HSV2 811: GGFDEAKLAEAREMI RYMALVSAMERTEHKARKKKGTSALLSSKVTNMVLKRNRKARYSPL 870

HSV1 863: PNKDGADEDDL 874  
 HSV2 871: HNEDEAGDEDEL 882

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/032020

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 Int.Cl. C07K14/035(2006.01)i, A61K39/245(2006.01)i, A61P31/22(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n  
 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)  
 Int.Cl. C07K14/035, A61K39/245, A61P31/22, A61P37/04, C12N15/09

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	BENDER, FC et al., "Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions", J. Virol., 2007, vol. 81, no. 8, pp. 3827-3841, fig. 1	1, 2, 4, 5, 16, 17, 23 3, 6-15, 18-22
Y A	YU, C. et al., "Replacing the decoy epi tope of PCV2b caps id protein with a protective epitope enhances efficacy of PCV2b vaccine", Vaccine, 2016, vol. 34, no. 50, pp. 6358-6366, abstract	1, 2, 4, 5, 16, 17, 23 3, 6-15, 18-22

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

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 13 November 2018 (13.11.2018)	Date of mailing of the international search report 27 November 2018 (27.11.2018)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032020

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	CLEVELAND, SM et al., "Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response", <i>Virology</i> , 2000, vol. 266, no. 1, pp. 66-78, abstract	1, 2, 4, 5, 16, 17, 23 3, 6-15, 18-22
Y A	NARA, PL et al., "How can vaccines against influenza and other viral diseases be made more effective?", <i>PLoS Biol.</i> , 2010, vol. 8, no. 12, e1000571, fig. 1	1, 2, 4, 5, 16, 17, 23 3, 6-15, 18-22
A	HIGHLANDER, SL et al., "Identification of mar mutations in herpes simplex virus type 1 glycoprotein B which alter antigenic structure and function in virus penetration", <i>J. Virol.</i> , 1989, vol. 63, no. 2, pp. 730-738, abstract	1-23
A	SCHMIDT-CHANASIT, Jet al., "A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany", <i>J. Clin. Virol.</i> , 2010, vol. 48, pp. 208-211, abstract	1-23
A	EP 170169 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SEROTHERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 05 February 1986, fig. 6 & JP 61-139391 A	1-23
A	HELDWEIN, E. et al., "Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1", <i>science</i> , 2006, vol. 313, no. 5784, pp. 217-220, fig. 1	1-23
A	ZWAAGSTRA, JC. et al., "The nucleotide sequence of herpes simplex virus type 2 (333) glycoprotein gB2 and analysis of predicted antigenic sites", <i>Can. J. Microbiol.</i> , 1987, vol. 33, no. 10, pp. 879-887, abstract	1-23
A	JP 2007-246531 A (CHIRON CORPORATION) 27 September 2007, examples & US 5747039 A & WO 1988/002634 A1 & EP 289550 A1, examples	1-23
A	HANNAH, BP. et al., "Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B", <i>J. Virol.</i> , 2007, vol. 81, no.9, pp. 4858-4865, abstract	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032020

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIIU, E. et al., "Extensive mutagenesis of the HSV-1 gB ectodomain reveals remarkable stability of its postfusion form", J. Mol. Biol., 2013, vol. 425, no. 11, pp. 2056-2071, abstract	1-23
A	DE TAEYE SW et al., "Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Envelope Trimers with Reduced Exposure of Non-neutralizing Epitopes", cell, 2015, vol. 163, no. 7, pp. 1702-1715, SUMMARY	1-23
A	FANG, L. et al., "Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus", Virus Genes, 2006, vol. 32, no. 1, pp. 5-11, abstract	1-23

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07K14/035(2006.01)i, A61K39/245(2006.01)i, A61P31/22(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07K14/035, A61K39/245, A61P31/22, A61P37/04, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y = A	BENDER FC et al., Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions, J Virol., 2007, Vol.81, No.8, pp.3827-3841, FIG.1	1, 2, 4, 5, 16, <u>17, 23</u> 3, 6-15, 18-22	
Y = A	YU C et al., Replacing the decoy epitope of PCV2b capsid protein with a protective epitope enhances efficacy of PCV2b vaccine, Vaccine, 2016, Vol.34, No.50, pp.6358-6366, ABSTRACT	1, 2, 4, 5, 16, <u>17, 23</u> 3, 6-15, 18-22	
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 13.11.2018		国際調査報告の発送日 27.11.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 西村 亜希子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	
		4N	3435

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y = A	CLEVELAND SM et al., Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response, <i>Virology</i> , 2000, Vol.266, No. 1, pp.66-78, Abstract	1, 2, 4, 5, 16, <u>17, 23</u> 3, 6-15, 18-22
Y = A	NARA PL et al., How can vaccines against influenza and other viral diseases be made more effective?, <i>PLoS Biol.</i> , 2010, Vol. 8, No. 12, e1000571, Figure1	1, 2, 4, 5, 16, <u>17, 23</u> 3, 6-15, 18-22
A	HIGHLANDER SL et al., Identification of mar mutations in herpes simplex virus type 1 glycoprotein B which alter antigenic structure and function in virus penetration, <i>J. Virol.</i> , 1989, Vol.63, No. 2, pp.730-738, Abstract	1-23
A	SCHMIDT-CHANASIT J et al., A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany, <i>J. Clin. Virol.</i> , 2010, Vol. 48, pp.208-211, ABSTRACT	1-23
A	EP 170169 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 1986.02.05, FIG.6 & JP 61-139391 A	1-23
A	HELDWEIN E et al., Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1, <i>Science</i> , 2006, Vol.313, No.5784, pp.217-220, Fig.1	1-23
A	ZWAAGSTRA JC et al., The nucleotide sequence of herpes simplex virus type 2 (333) glycoprotein gB2 and analysis of predicted antigenic sites, <i>Can. J. Microbiol.</i> , 1987, Vol.33, No.10, pp.879-887, Abstract	1-23
A	JP 2007-246531 A (カイロン コーポレイション) 2007.09.27, 実施例 & US 5747039 A & WO 1988/002634 A1 & EP 289550 A1, Examples	1-23
A	HANNAH BP et al., Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B, <i>J. Virol.</i> , 2007, Vol.81, No.9, pp.4858-4865, Abstract	1-23

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	VITU E et al., Extensive mutagenesis of the HSV-1 gB ectodomain reveals remarkable stability of its postfusion form, J. Mol. Biol., 2013, Vol.425, No.11, pp.2056-2071, Abstract	1-23
A	DE TAEYE SW et al., Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Envelope Trimers with Reduced Exposure of Non-neutralizing Epitopes, Cell, 2015, Vol.163, No.7, pp.1702-1715, SUMMARY	1-23
A	FANG L et al., Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Virus Genes, 2006, Vol.32, No.1, pp.5-11, Abstract	1-23