

(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2004-513616

(P2004-513616A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 39/155

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/02

F I

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 39/155

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/02

Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 5

4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 140 頁)

(21) 出願番号 特願2002-505816 (P2002-505816)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月21日 (2001.6.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月16日 (2002.12.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/019806
 (87) 国際公開番号 W02002/000694
 (87) 国際公開日 平成14年1月3日 (2002.1.3)
 (31) 優先権主張番号 60/213, 655
 (32) 優先日 平成12年6月23日 (2000.6.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

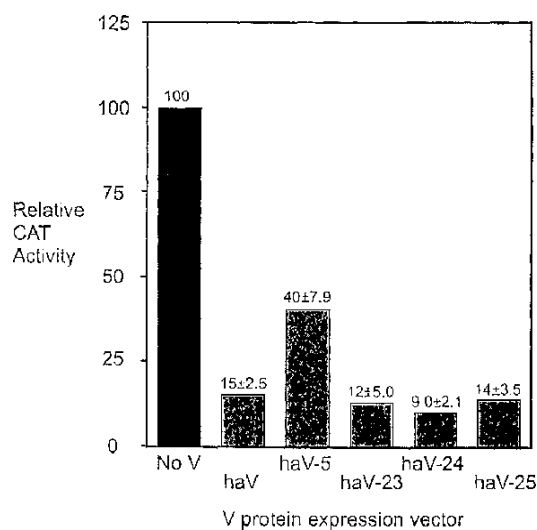
(71) 出願人 591000791
 ワイス・ホールディングズ・コーポレイション
 Wyeth Holdings Corporation
 アメリカ合衆国ニュージャージー州079
 40-0874 マディソン・ファイブジ
 ラルダファームス (番地なし)
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者 パークス, クリストファー・エル
 アメリカ合衆国ニュージャージー州070
 05ブーントン・サウステラス118
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 BA80 CA01 DA02
 EA04 FA02 GA11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変モルビリウイルスタンパク質

(57) 【要約】

アミノ酸113または114の一方または双方が変異されている、麻疹ウイルスVタンパク質のアミノ酸112-134に相当する領域内に少なくとも1個の変異を有する改変モルビリウイルスを記載する。かかる改変モルビリウイルスは、遺伝子発現の低下した抑制を示す。カルボキシ末端領域を含み、ゲノムの他の領域内の追加の変異または欠失が含まれてもよい。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モルビリウイルスVタンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内の変異がアミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の変異よりなる群より選ばれる、モルビリウイルスVタンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を有する、モルビリウイルス属の、単離され、組換え産生され、非セグメント化された、負センスの一本鎖 RNA ウイルス。

【請求項 2】

ウイルスが、麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルス、牛痘ウイルス、小型反芻動物病ウイルス、イルカモルビリウイルスおよびアザラシジステンパーウイルスよりなる群より選ばれる、請求項 1 記載のモルビリウイルス。 10

【請求項 3】

変異がアミノ酸 1 1 3 にある、請求項 1 記載のモルビリウイルス。

【請求項 4】

アミノ酸 1 1 3 における変異がチロシンからアラニンへである、請求項 3 記載のモルビリウイルス。

【請求項 5】

変異がアミノ酸 1 1 4 にある、請求項 1 記載のモルビリウイルス。

【請求項 6】

アミノ酸 1 1 4 における変異がアスパラギン酸からアラニンへである、請求項 5 記載のモルビリウイルス。 20

【請求項 7】

アミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の双方に変異が存在する、請求項 1 記載のモルビリウイルス。

【請求項 8】

アミノ酸 1 1 3 における変異がチロシンからアラニンへであり、そしてアミノ酸 1 1 4 における変異がアスパラギン酸からアラニンへである、請求項 7 記載のモルビリウイルス。

【請求項 9】

ウイルスが麻疹ウイルスである、請求項 2 記載のモルビリウイルス。

【請求項 10】

麻疹ウイルスVタンパク質のアミノ酸 2 3 1 - 2 9 9 に相当するカルボキシ - 末端 (C - 末端) 領域の少なくとも一部分における変異またはその欠失をさらに含んでなる、請求項 3 記載の麻疹ウイルス。 30

【請求項 11】

C - 末端領域における変異が、アミノ酸 2 3 3 および 2 3 4 のそれぞれにある、請求項 10 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 12】

アミノ酸 2 3 3 および 2 3 4 のそれぞれにおける変異がアルギニンからアラニンへである、請求項 11 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 13】

アミノ酸 2 3 3 および 2 3 4 のそれぞれにおける変異がアルギニンからアスパラギン酸へである、請求項 11 記載の麻疹ウイルス。 40

【請求項 14】

欠失が、アミノ酸 2 3 2 から 2 9 9 まで、2 7 9 から 2 9 9 まで、2 6 7 から 2 9 9 まで、2 5 0 から 2 9 9 まで、2 4 3 から 2 9 9 までおよび 2 3 6 から 2 9 9 までよりなる群より選ばれる、請求項 10 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 15】

欠失がアミノ酸 2 3 2 から 2 9 9 までである、請求項 14 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 16】

欠失が C - 末端領域より上流に延び、そしてアミノ酸 2 2 9 から 2 9 9 までである、請求 50

項 1 5 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 1 7】

さらに

(a)ヌクレオチド 2 6 (A T)、ヌクレオチド 4 2 (A TまたはA C)およびヌクレオチド 9 6 (G A)よりなる群より選ばれる 3'ゲノムプロモーター領域内の少なくとも 1 個の弱毒化変異であって、これらのヌクレオチドは正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示され、そして

(b)残基 3 3 1 (イソロイシン トレオニン)、1 4 0 9 (アラニン トレオニン)、1 6 2 4 (トレオニン アラニン)、1 6 4 9 (アルギニン メチオニン)、1 7 1 7 (アスパラギン酸 アラニン)、1 9 3 6 (ヒスチジン チロシン)、2 0 7 4 (グルタミン アルギニン)および 2 1 1 4 (アルギニン リシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる RNA ポリメラーゼ遺伝子内の少なくとも 1 個の弱毒化変異、を含んでなる、請求項 3 記載の麻疹ウイルス。 10

【請求項 1 8】

さらに

(a)N 遺伝子に対して、残基 1 2 9 (グルタミン リシン)、1 4 8 (グルタミン酸 グリシン)および 4 7 9 (セリン トレオニン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化、

(b)P 遺伝子に対して、残基 2 2 5 (グルタミン酸 グリシン)、2 7 5 (システイン チロシン)および 4 3 9 (ロイシン プロリン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化、 20

(c)C 遺伝子に対して、残基 7 3 (アラニン バリン)、1 0 4 (メチオニン トレオニン)および 1 3 4 (セリン チロシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化、および

(d)F 遺伝子 - 末端シグナルに対して、ヌクレオチド 7 2 4 3 (T C)における変化であって、これらのヌクレオチドは、正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示される

よりなる群より選ばれる、少なくとも 1 個の弱毒化変異を含んでなる、請求項 3 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 1 9】

さらに

(a)ヌクレオチド 2 6 (A T)、ヌクレオチド 4 2 (A TまたはA C)およびヌクレオチド 9 6 (G A)よりなる群より選ばれる 3'ゲノムプロモーター領域内の少なくとも 1 個の弱毒化変異であって、これらのヌクレオチドは正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示され、そして

(b)残基 3 3 1 (イソロイシン トレオニン)、1 4 0 9 (アラニン トレオニン)、1 6 2 4 (トレオニン アラニン)、1 6 4 9 (アルギニン メチオニン)、1 7 1 7 (アスパラギン酸 アラニン)、1 9 3 6 (ヒスチジン チロシン)、2 0 7 4 (グルタミン アルギニン)および 2 1 1 4 (アルギニン リシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる RNA ポリメラーゼ遺伝子内の少なくとも 1 個の弱毒化変異、を含んでなる、請求項 1 0 記載の麻疹ウイルス。 40

【請求項 2 0】

(a)N 遺伝子に対して、残基 1 2 9 (グルタミン リシン)、1 4 8 (グルタミン酸 グリシン)および 4 7 9 (セリン トレオニン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化、

(b)P 遺伝子に対して、残基 2 2 5 (グルタミン酸 グリシン)、2 7 5 (システイン チロシン)および 4 3 9 (ロイシン プロリン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化、

(c)C 遺伝子に対して、残基 7 3 (アラニン バリン)、1 0 4 (メチオニン トレオニン)および 1 3 4 (セリン チロシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成 50

するヌクレオチド変化、および

(d) F 遺伝子 - 末端シグナルに対して、ヌクレオチド 7 2 4 3 (T C) における変化であって、ここでこれらのヌクレオチドは、正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示される

よりなる群より選ばれる、少なくとも 1 個の弱毒化変異をさらに含んでなる、請求項 1 0 記載の麻疹ウイルス。

【請求項 2 1】

ウイルスがイヌジステンパーウイルスである、請求項 2 記載のモルビリウイルス。

【請求項 2 2】

イヌジステンパーウイルス V タンパク質のアミノ酸 2 3 1 - 2 9 9 に相当する C - 末端領域の少なくとも一部分における変異またはその欠失をさらに含んでなる、請求項 2 1 記載のイヌジステンパーウイルス。 10

【請求項 2 3】

ウイルスが牛疫ウイルスである、請求項 2 記載のモルビリウイルス。

【請求項 2 4】

牛疫ウイルス V タンパク質のアミノ酸 2 3 1 - 2 9 9 に相当する C - 末端領域の少なくとも一部分における変異またはその欠失をさらに含んでなる、請求項 2 3 記載の牛疫ウイルス。

【請求項 2 5】

ウイルスがイルカモルビリウイルスである、請求項 2 記載のモルビリウイルス。 20

【請求項 2 6】

牛疫ウイルス V タンパク質のアミノ酸 2 3 1 - 3 0 3 に相当する C - 末端領域の少なくとも一部分における変異またはその欠失をさらに含んでなる、請求項 2 2 5 3 記載のイルカモルビリウイルス。

【請求項 2 7】

モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内の変異がアミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の変異よりなる群より選ばれる、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を有する、モルビリウイルス属の、単離され、組換え産生され、非セグメント化された、負センスの一本鎖 R N A ウイルスを、希釈剤またはキャリアーと一緒に含んでなる、免疫原性組成物。 30

【請求項 2 8】

請求項 2 7 記載の免疫原性組成物を個体に投与することを含んでなる、モルビリウイルス属の非セグメント化、負センスの一本鎖 R N A ウイルスに対する防御を誘導するように個体を免疫化するための方法。

【請求項 2 9】

さらにアジュバントを含んでなる、請求項 2 7 記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 記載の免疫原性組成物を個体に投与することを含んでなる、モルビリウイルス属の非セグメント化、負センスの一本鎖 R N A ウイルスに対する防御を誘導するように個体を免疫化するための方法。 40

【請求項 3 1】

モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内の変異が、アミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の変異よりなる群より選ばれる、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入することを含んでなるモルビリウイルス属の V タンパク質により起きる抑制を低減するための方法。

【請求項 3 2】

モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内の変異が、アミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の変異よりなる群より選ばれる、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入することにより改変されたモルビリウイルス V タンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列 50

。

【請求項 3 3】

Vタンパク質をコードする単離された核酸分子の部分が、モルビリウイルスVタンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入するように改変され、該モルビリウイルスVタンパク質のアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 に相当する領域内の変異がアミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 の変異によりなる群より選ばれる、モルビリウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをコードする単離された核酸分子を含んでなる転写ベクターを、キャプシド化、転写および複製のために必要なトランス作用性タンパク質 N、P および L をコードする少なくとも 1 個の単離された核酸分子を含んでなる少なくとも 1 個の発現ベクターと一緒に含んでなり、これにより発現した場合に感染性モルビリウイルスが産生される組成物。 10

【請求項 3 4】

請求項 3 3 記載の少なくとも 2 種のベクターを用いて宿主細胞を形質転換、感染またはトランスフェクションし、そして感染性モルビリウイルスを産生するように、これらのベクターの共発現を許容する条件下で宿主細胞を培養することを含んでなる、感染性モルビリウイルスを産生するための方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、Vタンパク質により正常では起こされる抑制(repression)を低減する 1 個またはそれ以上の変異および/または欠失を有する、モルビリウイルス属の、単離され、組換え産生された、負センスの一本鎖RNAウイルスに関する。 20

【0002】

[発明の背景]

エンベロープを有する負センスの一本鎖RNAウイルスは、特有に構成されそして発現される。負センスの一本鎖ウイルスのゲノムRNAは、ヌクレオキャプシドの範囲内で 2 種の鋳型機能に役立つ：メッセンジャーRNA(mRNA)の合成のための鋳型としておよびアンチゲノム(+)鎖の合成のための鋳型として。ウイルス複製は、mRNAの合成の後に起こりそしてウイルスタンパク質の連続的合成を必要とする。新たに合成されたアンチゲノム(+)鎖は、(-)鎖ゲノムRNAのさらなるコピーを生成するための鋳型として役立つ。 30

【0003】

RNA依存性RNAポリメラーゼ複合体は、ゲノムの3'末端、特にプロモーター領域におけるシス-作用性シグナルと連動することにより転写および複製を起動しそして達成する。次いで、ウイルスゲノムは、その3'末端からその5'末端まで一方向にゲノム鋳型から転写される。

【0004】

ウイルス分類に関する国際委員会(International Committee on the Taxonomy of Viruses)により1993年に改訂された再分類に基づき、モノネガウイルスと呼ばれる目が確定された。この目は、負の極性(負センス)の一本鎖、非セグメント化(nonsegmented)RNAゲノムを有する、エンベロープを有するウイルスの3科を含む。これらの科は、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)およびフィロウイルス科(Filoviridae)である。パラミクソウイルス科はさらに2種の亜科、すなわちパラミクソウイルス亜科(Paramyxovirinae)およびニューモウイルス亜科(Pneumovirinae)に分類されている。パラミクソウイルス亜科は、3種の属、すなわちレスピロウイルス(Respirovirus)属(以前のパラミクソウイルス属)、ルブラウイルス(Rubulavirus)属およびモルビリウイルス(Morbillivirus)属を含む。ニューモウイルス亜科はニューモウイルス(Pneumovirus)属を含む。新しい分類は、形態 50

学的基準、ウイスルゲノムの構成、生物学的活性そして遺伝子および遺伝子産物の配列関連性に基づく。モルビリウイルスの現在の分類学的分類は、下記である。

【 0 0 0 5 】

モノネガウイルス目

パラミクソウイルス科

パラミクソウイルス亜科

モルビリウイルス属

麻疹ウイルス

イルカモルビリウイルス

イヌジステンパーウイルス

小型反芻動物病ウイルス (P e s t e - d e s - p e t i t s - r u m i n a n t s v i r u s)

アザラシジステンパーウイルス

牛痘ウイルス

これらのウイルスの多くに対して、いかなる種類のワクチンも入手できない。従って、このようなヒトおよび動物の病原体に対するワクチンを開発する必要がある。このようなワクチンは、レシピエント内に防御性免疫応答を誘導しなければならない。このような好都合の応答の定性および定量的特徴は、一般にその後いくらかの有意の期間の間同一または高度に関連するウイルスによる再感染から防御される天然ウイルス感染の生存者内で見られるもの、から推論される。

10

20

【 0 0 0 6 】

種々の方法がこのようなワクチンの開発のための探究の際に考慮でき、これらには下記の使用が含まれる：(1) 精製された個別のウイルスタンパク質ワクチン (サブユニットワクチン)、(2) 不活性化された全ウイルス製剤、および (3) 生の弱毒化ウイルス。

【 0 0 0 7 】

サブユニットワクチンは、純粋で、限定可能で、および組換え DNA 発現法を含む種々の手段により大量に比較的容易に産生される、という望ましい特徴を有する。今日まで、B 型肝炎表面抗原の顕著な例を除き、ウイルスサブユニットワクチンは、特に未経験のレシピエントにおいて、一般に誘導された短命および / または不十分な免疫のみを誘導してきた。

30

【 0 0 0 8 】

ポリオ (I P V) および A 型肝炎のホルマリン不活性化全ウイルス製剤は、安全かつ有効なことが証明されている。対照的に、同様に不活性化された全ウイルス、例えば呼吸器合胞体ウイルスおよび麻疹ウイルスワクチンを用いる免疫化は、その後天然または「野生型」ウイルスに直面する場合に、ワクチン被接種者が悪化または異常な疾患に罹患しやすくなる不利な免疫応答および / または応答プロフィールを誘導した。

【 0 0 0 9 】

適切に弱毒化された野生型ウイルスの生の誘導体は、ワクチン候補として明確な利益を与える。生で複製する薬剤として、それらはレシピエント内で感染を開始し、その間にウイルス遺伝子産物を発現し、処理し、およびワクチン被接種者特有の M H C クラス I およびクラス II 分子に関連して提示し、体液性および細胞媒介免疫応答、ならびに天然の感染症の生存者の防御的免疫プロフィールとパラレルなサイトカインおよびケモカインパターンを誘導する。

40

【 0 0 1 0 】

この好ましい免疫応答パターンは、典型的には主として体液的免疫監視アーム (a r m) に制限される不活性化またはサブユニットワクチンにより誘導される限定的な応答とは対照的である。さらに、一部のホルマリン不活性化全ウイルスワクチン、例えば 1 9 6 0 年代に開発された麻疹および呼吸器合胞体ウイルスワクチンにより誘導される免疫応答プロフィールは、持続性防御を与えられないだけでなく、実際に、ワクチン被接種者がその後野生型ウイルスに対抗する場合に、異常で悪化し、さらに致死的でさえある疾病素質に

50

導かれた。

【0011】

生で弱毒化されたウイルスは、ワクチン候補として高度に望ましい特性を有するけれども、それらは開発が困難なことが知られている。困難性の最大の点は、レシピエントを感染しそして適当な豊富さで所望の免疫応答プロフィールを誘導するために十分な複製能力を保持しながら、その疾患発生能力（すなわち毒性）を失った野生型ウイルスの誘導体を単離する必要性にある。

【0012】

歴史的には、毒性と弱毒化との間のこの微妙な均衡は、種々の生育条件（例えば温度）の下で、種々の宿主組織または細胞を介する野生型ウイルス単離物の連続継代により達成されている。この過程はウイルス変種（変異体）の生育に有利と考えられ、その一部は弱毒化の有利な特徴を有する。場合により、化学的変異誘導によってもさらなる弱毒化が達成される。

10

【0013】

この繁殖／継代スキームは、典型的には温度感受性、低温適応性および／またはそれらの宿主範囲を改変されたウイルス誘導体の出現に導き、その1種またはすべては野生型、疾患原因ウイルスからの変化、すなわち弱毒化と関連することもある変化である。

【0014】

麻疹および流行性耳下腺炎（パラミクソウイルスである）の予防のため、およびポリオおよび風疹（正鎖RNAウイルスである）に対する防御のためのものを含む数種の生ウイルスワクチンがこの方法により生成されそして世界中で現在の小児の免疫感染養生法の主力を提供している。

20

【0015】

しかしながら、弱毒化生ウイルスワクチン候補を生成するためのこの手段は、長たらしく、そして最善でも予測不可能であり、所望の弱毒化特性を有するこれらのランダムに発生するゲノム変異体の選択的な自然所産に主として依存する。得られるウイルスは、生体外で所望の表現型を有し、そして動物モデルで弱毒化されているように見えることもある。しかし、これらがワクチン候補として意図されるヒトまたは動物宿主内においてこれらはあまりにもしばしば過少または過剰弱毒化のいずれかのままである。

【0016】

使用されている現在のワクチンに関してさえ、さらに有効なワクチンへの要求がなお存在する。例えば、現在の麻疹ワクチンは、適度に良好な防御を提供する。しかし、最近の麻疹の流行は、現在のワクチンの効力の不足を示唆する。母体の免疫化にもかかわらず、高率の急性麻疹感染が1歳以下の小児で発生しており、野生型麻疹感染の後に発生する抗体レベルと同等の抗麻疹抗体レベルを誘導するためのワクチンの能力がないことを反映する（文献1、2、3）。その結果、ワクチン免疫化された母親は、新生児を生涯の最初の数カ月を越えて防御するため十分な経胎盤由来の受動的抗体をそれらの幼児に提供する能力が低い。

30

【0017】

あらかじめ免疫化された青年および若い成人における急性麻疹感染は、別の問題を指摘する。これらの二次ワクチンの失敗は、豊富で持続性の双方である抗ウイルス防御を誘導しかつ維持するための現在のワクチンの能力の限界を示す（4、5、6）。最近さらに別の潜在的な問題が明らかになった。過去15年間に単離された野生型麻疹の赤血球凝集素タンパク質は、ワクチン株からの距離が次第に増大していることを示している（7）。この「抗原ドリフト」は、ワクチン株が最適な防御を与えるために必要な理想的な抗原レパートリーを含んでいないのではないかとこの合理的な懸念を高める。従って、改良されたワクチンに対する要求がある。

40

【0018】

合理的なワクチン設計は、これらのワクチンのさらに良い理解により、特にウイルスにコードされた毒性の決定因子ならびに弱毒化に関係するこれらのゲノム変化の同定により援

50

助されるであろう。

【0019】

ヒトの罹患率および致死率の主要な原因としてのその重要性のために、麻疹ウイルスは非常に広範に研究されている。麻疹ウイルスは、それぞれ明確な生物学的機能を有する2個の区画、すなわちリボタンパク質膜およびリボ核タンパク質粒子コアから成る大型で比較的球形のエンベロープを有する粒子である(8)。ビリオンエンベロープは、3種のウイルス特異性タンパク質により変化を受ける宿主細胞誘導原形質膜であり：すなわち赤血球凝集素(H；約80キロダルトン(kD))および融合($F_1, 2$ ；約60kD)糖タンパク質は、ビリオン表面に突出しそしてウイルス粒子に宿主細胞付着性および侵入能力を与える(9)。Hおよび/またはFに対する抗体は、これらが感染を開始するためのウイルスの能力を無効にするので、防御性と考えられる(10、11、12)。マトリック

ス(M；約37kD)タンパク質は、膜の内面を覆う両親媒性タンパク質であり、これはビリオン形態形成を調整し、従ってウイルス再産生を完了される(13)。ビリオンコアは15,894ヌクレオチド長さのゲノムRNAを含み、その上には、約60kDヌクレオキャプシド(N)タンパク質の約2600分子と親密に会合することにより鋳型活性が与えられる(14、15、16)。この約1ミクロン長さのラセン状リボ核タンパク質粒子と緩く会合しているのは、ポリメラーゼ補助因子(P；約70kD)と協力するウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ(L；約240kD)の酵素レベルであり、そして多分さらに別のウイルス-特異性ならびに宿主コードされたタンパク質は、麻疹ウイルスゲノム配列を転写および複製する(17)。

10

20

【0020】

麻疹ウイルスの6種のビリオン構造タンパク質は、下記：3'-N-P-M-F-H-L-5'のように配列した6個の連続、非重複遺伝子によりコードされる。これまで確定されていない機能の2種の別の麻疹ウイルス遺伝子も同定されている。C(約20kD)およびV(約45kD)として知られるこれらの2種の非構造タンパク質は、両方共にP遺伝子によりコードされる。Cタンパク質は、P mRNA内の第二読み取り枠によりコードされる。Vタンパク質は、Pのアミノ末端配列およびPタンパク質中には欠いているジ

ンクフィンガー類似でシステインに富むカルボキシ末端ドメインを有するハイブリッドタンパク質をコードする共転写的に編集されたP遺伝子-由来のmRNAによりコードされる(9)。

30

【0021】

すべてのモルビリウイルスはVタンパク質を産生し(18)、これには麻疹ウイルス、牛痘ウイルス、イヌジステンパーウイルスおよびアザラシジステンパーウイルスが含まれる(19)。麻疹ウイルスVタンパク質は、P遺伝子によりコードされる非構造タンパク質である(8)。大部分のパラミクソウイルスと同様に、麻疹ウイルスはVタンパク質、Pタンパク質、およびCタンパク質を含むP遺伝子からの多重タンパク質をコードする(9)。PおよびVタンパク質の翻訳は、最初の230アミノ酸が一致するポリペプチドをもたらし同じメチオニンコドンで開始する。RNAエディティングは、より短く独自のVタンパク質C-末端の翻訳をもたらしフレームシフトを起こす一部のP遺伝子mRNA内に起きるので、Vタンパク質のカルボキシ末端(C-末端)はPタンパク質とは異なる(18)。

Cタンパク質アミノ酸配列は、これが下流の翻訳開始コドンで開始する異なる読み取り枠より完全に翻訳されるので、これはVおよびPタンパク質とは無関係である(20)。

40

【0022】

麻疹ウイルスのPおよびV mRNAは同一の開始コドンを共有しそしてPおよびVタンパク質の最初の230アミノ酸が一致する。V mRNAは、ヌクレオチド2496から2498までの配列"GGG"を拡張して第四の"G"残基を含むようになる"G"残基挿入を含む。余分の非-鋳型指示"G"残基がヌクレオチド2495と2499の間に挿入される場合に、エディティングが転写の間に起き、読み取り枠中にシフトを起こし、これによりPタンパク質のカルボキシ末端276アミノ酸はVタンパク質の68アミノ酸の

50

システインに富むカルボキシ末端で置換される。

【0023】

Vタンパク質の機能は十分には解明されていないが、しかしすべてのモルビリウイルス類はVタンパク質をコードする。これは、Vタンパク質を合成するための能力を保存してモルビリウイルスに有利となる有利な機能をVタンパク質が果たすことを示す。Vタンパク質発現は培養される細胞内のウイルス複製のために本質的ではないことが知られているが(19、21~25)、しかし動物モデル系においてVタンパク質の発現は、感染の重症度に影響するように見える。例えば、センダイウイルス(非-モルビリウイルス パラミクソウイルス)は、マウスモデル系において肺炎を通常は起こさないがしかし、Vタンパク質発現を欠いた組換えウイルスを用いて感染させると毒性が低い(22、26)。組換えヒトパラインフルエンザウイルス タイプ3(別の非-モルビリウイルス パラミクソウイルス)も、Dタンパク質発現での欠失がVタンパク質オープンリーディングフレームでの欠失と組み合わせられた場合に、ネズミおよびサルにおいて弱毒化表現型を示す(23)。

10

【0024】

同様に、麻疹ウイルスのために使用される動物モデル系を用いる研究からの結果も、病原性におけるVタンパク質の役割を示唆する。組換え麻疹ウイルスによるコットンラット(cotton rat)肺の感染は、感染ウイルスがVタンパク質発現を欠く場合にはさらに少ない子孫ウイルスを生成した(27)。また、SCIDマウス内に移植された組織中でのヒト胸腺細胞生存は、感染ウイルスがVタンパク質を発現しない場合には麻疹ウイルスを用いる感染がさらに困難であった(28)。最後に、麻疹ウイルスを頭蓋内接種されたCD46トランスジェニックマウスは、ウイルスがVタンパク質を発現しない場合には高率の生存率を有していた(29)。麻疹ウイルスVタンパク質が病原性に関係するという結論は、病原性がさらに低い変種またはワクチン株内でVタンパク質コード領域変異を発見した配列解析によっても支持される(30、31)。総合すれば、これらの結果は、Vタンパク質が麻疹ウイルスおよび数種の他のパラミクソウイルスの毒性を決定する際に重要な役を演じるという仮説を支持する。

20

【0025】

Vタンパク質が感染の過程に影響できることは明らかと見られるが、この現象の背後にある機構は未知である。多数の研究からの結果は、潜在的な機能をVタンパク質に帰属させて始めている。例えば、Vタンパク質とPタンパク質とに共通するアミノ酸配列がウイルスヌクレオキャプシド(N)タンパク質との相互作用を媒介することが示された(27、32-39)。Vタンパク質とNタンパク質との間のこの相互作用は、Nタンパク質の細胞分布に影響すると考えられ(27、40、41)そしてある種の追加的な未同定の機能を有するらしい。一部のVタンパク質も細胞タンパク質と相互作用することが見いだされ(42、43)、そしてサルウイルス5(SV5)の場合に、細胞タンパク質との相互作用は感染の間のインターフェロンシグナル伝達経路の阻害の原因となることが可能である(44)。Vタンパク質を含むタンパク質-タンパク質相互作用に加えて、数件の研究は、ウイルス遺伝子発現および複製を調節する制御機構にVタンパク質に関連させた。一過性発現系内のセンダイウイルスVタンパク質発現は、欠陥干渉(defective-interfering)(DI)粒子複製を阻害し(45)そして生体外転写反応におけるDI粒子複製も同様に阻害する(35)。Vタンパク質を抑制と関連させるこれらの観察と一致して、Vタンパク質発現を欠く数種のウイルスは、感染の間に高いレベルのゲノムRNA、mRNA、およびウイルスタンパク質を産生することが観察された(21、26、27)。

30

40

【0026】

以上に記載した性質に加えて、すべてのウイルスVタンパク質はシステインに富むC-末端を含む。パラミクソウイルスVタンパク質は、高度のアミノ酸類似性を共有はしないが、しかしこれらはすべて7個の位置が一致するシステイン残基を含む(46)。この際立った特徴は、Vタンパク質が実際はジンクフィンガータンパク質であるのではないか(4

50

7) または少なくとも亜鉛に配位した二次構造のある種の形を形成するのではないかとの見解に導き(48、49、50)、そして実際に、数種のVタンパク質は亜鉛を結合することが見いだされた(51、52、53)。Vタンパク質が亜鉛配位構造を形成する可能性は、これらの構造の形式が核酸相互作用またはタンパク質-タンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインをしばしば形成するためにかなりの興味を引く(48、49、10)。独自のC末端領域を欠く末端切除Vタンパク質を発現する組換えセンダイウイルスも病原性が低く、病原性におけるVタンパク質の役割がこの領域を必要とすることを示唆することも注目値する(24)。

【0027】

ウイルス-特異性タンパク質をコードする配列に加えて、麻疹ウイルスゲノムは、関連ウイルスの転写および複製経路を指示するものに類似する明確な非-タンパク質コード領域を含む(9、54)。これらの調節シグナルは麻疹ウイルスゲノムの3'および5'末端に、そしてそれぞれのシストロン間境界にわたる短い内部領域内に存在する。前者は、ゲノム転写、ゲノムおよびアンチゲノムキャプシド化、および複製を指示する推定プロモーターおよび/または調節配列要素をコードする。後者は、シグナル転写終止およびそれぞれのモノシストロン性ウイルスmRNAのポリアデニル化および次いで次の遺伝子の転写の再開をコードする。一般に、麻疹ウイルスポリメラーゼ複合体は、これらシグナルに対して、他の非-セグメント化負鎖RNAウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼより高く反応するように見える(9、54、55、56)。転写は、麻疹ウイルスゲノムの3'末端またはその近くで開始しそして次いで5'方向に進行してモノシストロン性mRNAを産生する(16、54、57)。

【0028】

麻疹ウイルスは、その末端調節ドメインをリーダーおよびトレーラーコード配列の範囲を越えて延ばしているように見える(54)。麻疹の場合に、これらの領域は107 3'ゲノムヌクレオチド(「3'ゲノムプロモーター領域」、「延長プロモーター」とも呼ばれ、これはリーダー領域をコードする52ヌクレオチド、次いで3個の遺伝子間ヌクレオチド、そしてN mRNAの5'非翻訳領域をコードする52ヌクレオチドを含んでなる)および109 5'末端ヌクレオチド(L mRNAの3'非翻訳領域をコードする69個、遺伝子間の3ヌクレオチドおよびトレーラーをコードする37ヌクレオチド)を包含する。これらの3'末端内で、ゲノムおよびアンチゲノム双方の約100ヌクレオチドは、共有ヌクレオチド配列の2個の短い領域である：すなわちゲノムおよびアンチゲノムの絶対的3'末端の16個のヌクレオチドの中の14個が一致する。これらの末端内部で、絶対配列一致の12ヌクレオチドの追加の領域が位置決定された。麻疹ウイルスゲノムの転写が開始する筈でありそしてアンチゲノムの複製が開始する筈である部位およびその近傍にあるこれらの位置は、これらの短い独自配列ドメインが延長プロモーター領域を包含することを示唆する。

【0029】

これらの区分された配列要素は、転写開始の別の部位、すなわちN遺伝子開始部位での転写開始を命令する内部ドメイン、およびアンチゲノム産生を指示する3'内部ドメインを示すであろう(54、58、59)。転写および複製のシス-作用性決定因子としてのこれらの調節の役割に加えて、これらの3'延長ゲノムおよびアンチゲノムプロモーター領域は、それぞれアンチゲノムおよびゲノムRNAの新生5'末端をコードする。これらの新生RNA内に、ヌクレオキャプシド鑄型形成のためおよびその結果としての転写および複製の増幅のために必要な別の重要な調節要素である、Nタンパク質核形成のためのこれまでに同定されていないシグナルが存在する。

【0030】

すべてのモルビリウイルス類で、複製、転写およびキャプシド化を含む必須的なウイルス機能のために必要なシス作用性シグナルが、非コーディングゲノム末端内に含まれる。機能性のために絶対的なトランス作用性要素は、N、PおよびL遺伝子内に含まれる。追加のトランス作用性因子、例えばVおよびCタンパク質は、機能性を調節するようである。

これらのいずれかの領域内の変異は、ウイルス転写 / 複製効率の低下を含む重要な機能の改変をもたらすようである。

【 0 0 3 1 】

Vタンパク質発現と病原性との間の明瞭な関連、およびワクチン弱毒化への継続する興味は(30、60)、麻疹ウイルスVタンパク質機能をさらに詳細に研究する必要性に導いた。特に、Vタンパク質抑制活性、Vタンパク質とNタンパク質との相互作用、およびRNAを結合するVタンパク質の能力を含む種々のVタンパク質特性を研究するために一過性発現系を用いる必要がある。

【 0 0 3 2 】

[発明の要約]

従って、モルビリウイルスのVタンパク質による遺伝子発現の抑制の原因であるモルビリウイルスのゲノムの領域を同定することが本発明の目的である。遺伝子発現の抑制が低減されるモルビリウイルスのVタンパク質の変異種を生成することが本発明の別の目的である。1種またはそれ以上のかかる変異を含む組換え産生モルビリウイルスを生成することが本発明のさらなる別の目的である。かかる組換え産生モルビリウイルスを含むワクチンまたは免疫原性組成物を処方することが本発明のさらなる別の目的である。本発明の一つの態様において、Vタンパク質は麻疹ウイルス由来である。

【 0 0 3 3 】

以下に考察するような本発明のこれらおよびその他の目的は、モルビリウイルスに対して、アミノ酸113(チロシン)および114(アスパラギン酸)の1個または双方が変異された、これらのモルビリウイルスのVタンパク質のアミノ酸112 - 134(保存領域2; 図2参照)に相当する領域を改変することにより達成される。本発明の一つの態様では、これらのアミノ酸はアラニンに変異される。

【 0 0 3 4 】

Vタンパク質のさらなる改変は、麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルスおよびイルカモルビリウイルスのVタンパク質のアミノ酸231 - 299に、および牛痘ウイルスのアミノ酸231 - 303に相当するモルビリウイルスVタンパク質のカルボキシ末端(C-末端)領域の少なくとも一部分を変異または欠失することにより行ってもよい。

【 0 0 3 5 】

これらの改変は、ミニレプリコン系内のVタンパク質による遺伝子発現の抑制を低下する効果を有する。結果は、当該技術分野では既知でありそして以下に記載する「レスキュー」系の使用により全長感染性モルビリウイルスの回収に容易に拡張される。

【 0 0 3 6 】

一過性アッセイにおけるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)レポーター遺伝子発現を有する麻疹ウイルスミニレプリコンは、Vタンパク質により強力に抑制された。抑制活性は、アミノ酸112 - 134の間のタンパク質のアミノ末端の第三の領域内のアミノ酸置換により、ならびにVタンパク質のシステインに富むC-末端領域(アミノ酸231 - 299)の少なくとも一部分の変異または欠失により低下された。

【 0 0 3 7 】

麻疹ウイルスの場合に、上記の変異は、下記

(1)ヌクレオチド26(A T)、ヌクレオチド42(A TまたはA C)およびヌクレオチド96(G A)よりなる群より選ばれる3'ゲノムプロモーター領域内の少なくとも1個の弱毒化変異であって、これらのヌクレオチドは正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示され、

(2)残基331(イソロイシン トレオニン)、1409(アラニン トレオニン)、1624(トレオニン アラニン)、1649(アルギニン メチオニン)、1717(アスパラギン酸 アラニン)、1936(ヒスチジン チロシン)、2074(グルタミン アルギニン)および2114(アルギニン リシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれるRNAポリメラーゼ遺伝子内の少なくとも1個の弱毒化変異、

10

20

30

40

50

(3) N 遺伝子に対して、残基 129 (グルタミン リシン)、148 (グルタミン酸 グリシン) および 479 (セリン トレオニン) よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも 1 個の弱毒化変異、
(4) P 遺伝子に対して、残基 225 (グルタミン酸 グリシン)、275 (システイン チロシン) および 439 (ロイシン プロリン) よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも 1 個の弱毒化変異、
(5) C 遺伝子に対して、残基 73 (アラニン バリン)、104 (メチオニン トレオニン) および 134 (セリン チロシン) よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも 1 個の弱毒化変異、および
(6) F 遺伝子 - 末端シグナル (シス作用性転写終止シグナル) に対して、ヌクレオチド 7243 (T C) における変化であって、これらのヌクレオチドは、正鎖、アンチゲノム性、すなわちメッセージ (コーディング) センス中に提示される
ような、弱毒化性である変異とさらに組み合わせられてもよい。

10

【0038】

本発明の別の態様では、これらの変異モルビリウイルスは、それぞれのウイルスの野生型に対して防御的免疫反応を発現するワクチンまたは免疫原性組成物を調製するために使用される。

【0039】

本発明のさらなる態様では、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内の変異が、アミノ酸 113 および 114 の変異よりなる群より選ばれる、
モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入することを含んでなるモルビリウイルスの V タンパク質により起きる抑制を低減するための方法が記載される。

20

【0040】

本発明のさらに別の態様では、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内の変異が、アミノ酸 113 および 114 の変異よりなる群より選ばれる、
モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入することにより改変されたモルビリウイルス V タンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列が記載されている。

【0041】

本発明のさらなる別の態様では、V タンパク質をコードする単離された核酸分子の部分が、
モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内の変異がアミノ酸 113 および 114 の変異によりなる群より選ばれる、モルビリウイルス V タンパク質のアミノ酸 112 - 134 に相当する領域内に少なくとも 1 個の変異を挿入するように改変された、モルビリウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをコードする単離された核酸分子を含んでなる転写ベクターを、キャプシド化、転写および複製のために必要なトランス作用性タンパク質 N、P および L をコードする少なくとも 1 個の単離された核酸分子を含んでなる少なくとも 1 個の発現ベクターと一緒に含んでなり、これにより宿主細胞がこれらのベクターを用いて形質転換、感染またはトランスフェクションされそして所望のモルビリウイルスを産生するようにこれらのベクターの共発現を許容する条件下で培養される組成物を提供する。次いで、それぞれのウイルスの野生型形に対して防御性免疫応答を誘導するワクチンまたは免疫原性組成物を調製するためにそれぞれのウイルスを使用する。

30

40

【0042】

[発明の詳細な記述]

麻疹ウイルスを用いて例示するけれども、本発明はイヌジステンパーウイルスおよび牛痘ウイルスを含みこれらに限定はされない他のモルビリウイルス類にも適用できる。

【0043】

麻疹ウイルス弱毒化と遺伝子発現および複製の制御に関する機構との間の潜在的な関連の考慮 (30、60) は、V タンパク質の分析に導いた。タンパク質発現はウイルス病原

50

性(22、23、26-29)にそして遺伝子発現および複製の制御(21、26、27、35、45)にも関連している。目標は、麻疹ウイルス遺伝子発現に対するVタンパク質の効果をさらに解析することであった。

【0044】

変異Vタンパク質発現ベクターを構築する前に、種々の異なるモルビリウイルス類からのVタンパク質の間のアミノ酸類似性を検討した(図2)。高いアミノ酸一致性の領域は重要な機能性ドメインを含み、そしてこれらの保存領域(CR)の1つまたはそれ以上はミニレプリコン抑制に関与するようである。エドモントン(Edmonston)野生型麻疹ウイルス、牛痘ウイルス、イルカモルビリウイルス、およびイヌジステンパーウイルスからのVタンパク質の整列は、C-末端がモルビリウイルス類の間で同様の間隔を有する7個のシステイン残基を含むという初期の観察(46)を確認することに加えて、CR1~6と呼ばれる顕著な配列一致の数個の保存された領域を明らかにした(図2に示す)。数個のCRは、変異Vタンパク質ベクターを生成する間に標的とされた。

10

【0045】

高レベルの一致を含む領域を同定することに加えて、潜在的な機能性モチーフを探すためにコンピューター分析を使用し、そして潜在的な麻疹ウイルスVタンパク質機能性ドメインの可能な位置に関する追加的な鍵に関して文献を検討した。これらの分析の結果を図2中の整列上で説明する。数件の研究は、Nタンパク質との相互作用に影響するVおよびPタンパク質の領域を位置決定した。CR1内に位置するVおよびPタンパク質のアミノ最末端(N-末端)は、ツーハイブリッドアッセイにおいてNタンパク質(34(図2)との相互作用を媒介する配列を含む。V-Nタンパク質-タンパク質相互作用に関与する別の配列は、CR4を包含するアミノ酸204-230の間に位置決定された(27、64)。麻疹ウイルスVタンパク質亜鉛結合ドメイン(51)はC-末端内にありそしてCR5およびCR6中に見いだされる少なくとも数個のシステイン残基を必要とするらしい。システインに富むドメインのN-末端において、CR5の部分である塩基性アミノ酸(229-234)を含む良く保存された領域がある。麻疹ウイルスVタンパク質中の同じ領域の近く(アミノ酸225)は、エドモントンワクチン株内に見いだされるアミノ酸置換である(野生型のグルタミン酸からグリシンへ(30))。最後に、麻疹ウイルスVタンパク質中で、ロイシンジッパーモチーフの記憶であるロイシン反復(アミノ酸93-107)がある(65、66)。多数のこれらのドメインおよびモチーフは、ミニレプリコン系およびVタンパク質変異体発現ベクターを用いるさらなる研究のための魅力的な候補であった。

20

30

【0046】

Vタンパク質発現ベクターを調製することに加えて(図1A)、エドモントン野生型N、PおよびLタンパク質を含む3種の塩基性複製装置成分のためにT7発現プラスミドを調製した。PおよびVタンパク質ベクター内の下流翻訳開始コドンからのCタンパク質発現によるいかなる潜在的な混乱も避けるために、Cタンパク質オープンリーディングフレームをCタンパク質の翻訳を回避するように改変した。Cタンパク質ATGコドンをACGに変換しそしてCタンパク質オープンリーディングフレーム内の第二コドンを終止コドンに変換した(TCAからTAAへ)。これらの改変は、PおよびVタンパク質に関してはサイレントであった。

40

【0047】

Vタンパク質が麻疹ウイルスmRNA転写およびゲノム複製を調節する際に関与するであろうとの指摘(21、26、27、35、45)は、ミニレプリコン系がVタンパク質発現に応答するかどうかをテストするための実験を示唆した。ミニレプリコン系は、野生型Vタンパク質機能に影響するV遺伝子変異が評価でき、そして組換え野生型ウイルスを用いるウイルス弱毒化のさらなる遺伝子研究にこれらの知見を潜在的に適用されるようにエドモントン野生型成分を用いて組み立てられた。エドモントン野生型麻疹ウイルス-ミニレプリコン(図1B、pMVwt107-CAT)は、pMV107-CAT中のワクチンリーダー配列をエドモントン野生型リーダー配列に変換してp107MV-CAT

50

Tミニレプリコン(63)から誘導された(60)。

【0048】

野生型成分が検出可能なミニレプリコン発現を作動させることが可能であることを決定するために、HEp2細胞をミニレプリコンDNAおよびN、PおよびLタンパク質発現ベクターを用いてトランスフェクションし、共にMVA/T7を用いて感染して(62)T7 RNAポリメラーゼを得た。トランスフェクションの48時間後に細胞を採取しそして細胞抽出液をCAT活性に関して分析した。エドモントン野生型ミニレプリコン系は、Lポリメラーゼタンパク質発現ベクターを除くすべてのDNAを用いてトランスフェクションされた負対照中に産生された背景レベルより高いCAT活性を直ちに発生した(図1C、レーン1および2、そしてデータは記載せず)。これは、一過性発現アッセイの間に産生されたCAT活性が特異性でありそして不変の麻疹ウイルス複製装置に依存することを示した。

10

【0049】

次いで、Vタンパク質の発現が一過性発現アッセイにおいてミニレプリコン発現に対して検出可能な効果を有するかどうかを決定するためにミニレプリコン系を使用した。Vタンパク質発現ベクターの増加量を用いてミニレプリコンアッセイトランスフェクションを行った。挿入を欠く発現ベクターの適当な量を含ませてトランスフェクションされたDNAの全量を一定に保った。Vタンパク質発現ベクターの量を0から400ngまで増加した効果を図1Cに示す。レーン1の正対照は、Vタンパク質発現が存在しない場合に得られるCAT活性の量を示した(図1C、レーン1)。レーン2は、Lタンパク質発現ベクターが除外された場合にCAT活性が検出不能であることを示す負対照である。レーン3~7は、Vタンパク質発現ベクターの増加量の負効果を示す。CAT活性の抑制は、Vタンパク質発現ベクター最少の量でも明瞭であり(レーン3および4)そしてさらに高い量では著しく強く、Vタンパク質発現プラスミド400ngをトランスフェクションされた場合に検出可能なミニレプリコン発現を事実的に排除した(レーン7)。レーン3~7で使用されたVタンパク質発現ベクターの2倍増加は、相対CAT活性において観察された低下とも良く相関した。これらの結果は、Vタンパク質機能の一つの局面がミニレプリコンアッセイを用いて観察できることを明確に示す。このミニレプリコンアッセイにおけるVタンパク質発現の容易に検出可能なこの負効果は、Vタンパク質変異体のミニレプリコン抑制表現型をさらに検討するために好都合なフォーマットを提供した。

20

30

【0050】

Vタンパク質変異体の分析を開始するために、Vタンパク質のアミノ酸末端にエピトープタグを含むようにVタンパク質発現ベクター(図1A)を改変した(pMV-haV-wt、図3)。これはトランスフェクションされた細胞からの溶解物中のタンパク質のウエスタンブロット検出を容易としそして変異Vタンパク質の安定性および定常状態レベルの相対比較を可能とするために行われた。野生型Vタンパク質発現ベクターのイニシエーターメチオニンコドンインフルエンザ赤血球凝集素(HA)エピトープタグを用いて置換した(67)。この改変されたVタンパク質ベクター(pMV-haV-wt)は、Cタンパク質の発現を避ける塩基置換も保持した。ミニレプリコン実験におけるpMV-haV-wtの試験は、N-末端HAタグの存在が、ミニレプリコン活性を抑制するVタンパク質の能力に検出可能な効果を持たないことを明らかにした(図4、レーン1~4、そしてデータは記載せず)。

40

【0051】

pMV-haV-wt内に導入した変異の最初のシリーズは、図2に示した配列モリーフの一部分に向けられた。これらの変異の一つは、システイン残基を含む独自のVタンパク質C-末端を欠く末端切除Vタンパク質をもたらした(アミノ酸231-299が欠失)(図3、pMV-haV-1)。プラスミドpMV-haV-2は、野生型Vコーディング配列をエドモントンワクチン配列に変換した(アミノ酸225、グルタミン酸をグリシンへ)。残りの6個の変異(pMV-haV番号3-8)は、一部のCRに向けられたアミノ酸置換であった。最初に、タンパク質構造を大きくは改変しないでVタンパク質内

50

の特定のドメインの機能を改変するための試みとして、アミノ酸置換を導入した。チャージツーアラニン (charge-to-alanine) 法により示唆された戦略を用いて (68、69、70)、荷電または極性アミノ酸残基を規定する2個の連続したアミノ酸コドンをもとに標的とし、そしてこれらをアラニンをコードするコドンに変換する変異を導入した。

【0052】

本発明は野生型残基ではなくてアラニンを有する変異体により例示されているけれども、野生型残基の他の非保存性変異も本発明の範囲内である。例えば、アスパラギン酸は酸性 (負荷電) 分子である。従って、非保存性変異は、酸性分子でもあるグルタミン酸以外のアミノ酸に対して行われるものである。適当な別のアミノ酸は、塩基性 (正荷電) 分子であるアミノ酸のリシン、ヒスチジンおよびアルギニンを含む。適当な別のアミノ酸には、非極性官能基を有するアミノ酸、例えばアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファンおよびバリン、および非荷電極性官能基を有するアミノ酸、例えばアスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニンおよびチロシンをさらに含む。

10

【0053】

同様に、チロシンは非荷電極性分子である。従って、非保存性変異は、非荷電極性分子でもあるアスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリンおよびトレオニン以外のアミノ酸に置換が行われているものである。適当な別のアミノ酸は、塩基性 (正荷電) 分子であるアミノ酸のリシン、ヒスチジンおよびアルギニンを含む。適当な別のアミノ酸は、さらに、非極性官能基を有するアミノ酸、例えばアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファンおよびバリン、および酸性 (負荷電) 官能基を有するアミノ酸、例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。

20

【0054】

ミニレプリコンアッセイにおける変異Vタンパク質ベクター1~8の分析を図4Aに示す。結果は、2種のベクター (pMV-haV-1およびpMV-haV-5) がミニレプリコン活性を抑制する低い能力を有することを示した。一つの変異体 (haV-1) は、Vタンパク質の独自のC-末端 (アミノ酸231-299) を欠く欠失変異体であった。第二の変異体 (haV-5) は、アミノ酸113および114で置換変異を含んでいた (CR2内に位置する。図2参照)。これは、この機能がCR2およびC-末端により独立して部分的に媒介されるであろうことを示唆した。C-末端切除変異体と同様に、CR2変異体も残留抑制活性を保持した。

30

【0055】

図4Aのレーン1および2は、対照試料を含んでいた。レーン1で分析したトランスフェクションはLタンパク質発現ベクターを欠きそして背景CAT活性の低いレベルを表した。レーン2の正対照は、Vタンパク質が存在しない場合に観察された最高活性を示した。HAタグを含む野生型Vタンパク質ベクター (pMV-haV-wt) の200および400ngにより媒介された抑制をレーン3および4に示す。上記のように、N-末端HAタグは、ミニレプリコンを抑制するVタンパク質の能力に対してほとんど効果を持たず、そして本実験で、haV-wtベクターの200および400ngはミニレプリコン活性をそれぞれ約7および16倍抑制した。大部分の変異体は、haV-wtベクターとほぼ同様の効果でCAT活性を抑制し、Vタンパク質ベクター200ngをトランスフェクションした場合に、対照活性 (レーン2) の20%またはそれ未満にCAT活性を低下させた (レーン3、7、9、11、15、17、19)。2種のVタンパク質ベクター (pMV-haV-1、レーン5および6、pMV-haV-5、レーン13および14) は、本実験および反復した実験においてミニレプリコン活性の抑制に著しく効果が低かった。プラスミドpMV-haV-1はシステインに富むVタンパク質C-末端を欠き、一方pMV-haV-5はCR2内に二重のアラニン置換 (アミノ酸113-114) を含んでいた。

40

【0056】

50

抑制に影響を与える両方のドメインは、興味ある特徴を有する。C - 末端は亜鉛結合ドメインを含みそしてRNA結合ドメインも含む(図5)。荷電残基の小さいクラスターが提案されたアルファらせんの一つの面(残基114D、118E、121K、125D)に沿って位置しているであろうとコンピューターモデルが予測するので、CR2の一次アミノ酸配列は注目される。従って、CR2は一部の転写因子内に観察された配列に類似する両親媒性アルファらせんである可能性がある(71)。

【0057】

CR2と関連する抑制活性も、このアミノ酸配列がVおよびPタンパク質の双方中に存在するので興味がある。ポリメラーゼサブユニットおよびヌクレオキャプシド構築因子としてPタンパク質により演じられる本質的な役割(72)は、抑制におけるVタンパク質の非本質的な役割と著しく異なる。しかし、これら2種のタンパク質はアミノ酸配列のかなりの部分を共有している。CR2はVおよびPの範囲内で異なって機能するタンパク質-タンパク質相互作用の部位であるらしい。理論により制約はされないが、Vタンパク質の独特のC - 末端がCR2を暴露する三次構造をVタンパク質に与え、他方ではPタンパク質内でこのドメインが隔離されている間にサブプレッサードメインとして機能することをこれに許容する。

10

【0058】

変異体haV - 1またはhaV - 5により起こされる抑制の低下が少ないタンパク質発現と単純に相関するかどうかを決定するために、抗-HA抗体を用いてウエスタンブロットを行って、トランスフェクションされた細胞内のVタンパク質の相対的存在量を推定した(図4B)。この実験のための細胞は、細胞がN、PおよびLタンパク質ならびにVタンパク質を含むように、ミニレプリコン実験の間に行ったものと正確に同様に行ってトランスフェクションされた。タグを付したタンパク質は、2種の負対照を除いてすべてのトランスフェクション細胞抽出液中に検出できた。レーン1内で抽出液を分析するために使用する細胞にはVタンパク質をトランスフェクションせず、そしてレーン2内では、エピトープタグを含まないVタンパク質をコードするベクターを用いて細胞をトランスフェクションした。レーン3で検出されたタンパク質は、HAタグを付した野生型Vタンパク質であった。レーン4内のタンパク質はC - 末端を欠く末端切除変異体でありそしてその移動度は著しく改変された。残りのタンパク質は、アミノ酸置換を含む変異体(上記のもの)であった(図4B、レーン5~11)。これらのタンパク質の数種は、この12%ポリアクリルアミドゲル中で小さいがしかし認められるほどの移動度変化を有していた(例えばレーン10および11)。しかし、これらのタンパク質内で荷電および極性残基がアラニンに置換されたので、これは意外ではない。すべてのタンパク質の相対存在度はかなり類似すると判定されたが、しかしhaV - 1(レーン4)はこの実験では低くそしてこれは反復実験でも再現可能であったことは除く。これは、haV - 1の低い抑制活性が、より低いタンパク質レベルよりもたらされたようであり、一方、haV - 5の低い抑制活性が不安定なタンパク質により起こされないことを示唆する。

20

30

【0059】

haV - 1が不安定であったという理由によってのみこれが低い抑制であった可能性をさらに検討するために、Vタンパク質ベクターの増加量を用いてミニレプリコンアッセイを行ってhaV - 1タンパク質の細胞内の量の補足を助けた(図4C)。このミニレプリコン実験は、Vタンパク質ベクターの最大量を400ngから1μgに増やした点を除き、上記と同様に行った。DNAの質量は、ベクター骨格DNA(挿入を欠く)の適当量を含むことによりすべてのトランスフェクションにおいて一定に保った。図4C、レーン1は、タンパク質ベクターを付加しないで行った正対照であった。レーン2および3は、100(レーン2)および400(レーン3)ngを加えた野生型ha - Vベクターの効果を示し、これらはこの実験で活性をそれぞれ58%および26%に低下した。haV - 1の増加量の添加は、MV - CATの活性に対してほとんど効果がなくそしてさらに高い抑制のレベルを有するhaV - 1ベクターの増加量を相関するための明確な傾向は観察されなかった。これは、haV - 1の低下した抑制活性が、単に低下した細胞内タンパク質レ

40

50

ベルの低下によるのではなく、むしろ C - 末端の欠失の効果であったことを示唆する。

【0060】

S V 5 Vタンパク質の N - 末端内の第三の塩基性アミノ酸の高い含有量を含む領域は、RNA 結合を媒介する (73)。相同領域は麻疹ウイルス Vタンパク質内では明らかではないが (73)、しかし、麻疹ウイルス Vタンパク質が C - 末端内のジンクフィンガー類似配列を介して RNA 結合もする可能性を検討した (図5)。

【0061】

Vタンパク質の RNA 結合活性を評価するために、数種の細胞 RNA 結合タンパク質の研究に使用して成功した (74 ~ 77) ポリリボヌクレオチドホモポリマー結合アッセイを使用した (図5A)。多数の RNA 結合タンパク質がポリリボヌクレオチドホモポリマーへの特性的親和性を示した。例えば、細胞 hnRNP Uタンパク質はポリ (G) およびポリ (U) に比較的高い親和性で結合するが、しかしポリ (A) およびポリ (C) にはあったとしてもほとんど結合しない (75)。この概念は、トランスフェクションされた細胞抽出液内の Vタンパク質がホモポリマーレジン上に捕捉できたかどうかを決定するために使用された。ミニレプリコントランスフェクションに使用したすべての発現ベクター (N、P、L、V およびミニレプリコン) を用いて細胞をトランスフェクションし、次いで MVA/T7 を用いて感染した。細胞質性細胞溶解物を 48 時間後に調製しそして 4 種のポリリボヌクレオチドホモポリマーの一つと連結したアガロースビーズを用いて 30 ~ 60 分間、4 でインキュベーションした。ビーズを遠心分離により集め、次いで再懸濁しそして細胞溶解緩衝液を用いて 3 回洗浄した。結合タンパク質は、SDS - ゲル添加緩衝液中で煮沸してビーズから溶離させた。

10

20

【0062】

最初に、アッセイをテストするために、トランスフェクションされたプラスミドから発現した既知の RNA 結合タンパク質を捕捉する能力を試験した。このために、Nタンパク質に特異性のモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロットにより、4 種の異なるレジンから溶離したタンパク質を分析した (図5B)。Nタンパク質は、ポリ (G) およびポリ (U) に結合した試料中で直ちに検出された (レーン 2 および 4)。ポリ (G) に結合した Nタンパク質の量が、一般にこの実験および数回の反復実験ではさらに多かった。ポリ (A) またはポリ (C) を用いると Nタンパク質はほとんどまたは全く捕捉されなかった。

30

【0063】

ホモポリマーレジンと相互作用する h a V の能力を分析するために、上記のようにしてこの実験を反復した (図5B、レーン 5 ~ 8)。抗 - HA 抗体を用いるウエスタンブロットの分析は、Nタンパク質の分析後に得られた結果と類似した結果を明らかにした (図5B、レーン 1 ~ 4)。ポリ (G) およびポリ (U) レジンは両方共に h a V に対する親和性を示した (レーン 6 および 8)。Vタンパク質はポリ (G) に最もよく結合しそしてポリ (U) にはさらに弱く、一方ポリ (A) またはポリ (C) にはほとんど結合しなかった。一部の実験では、非常に弱いバンドが見られ、これはポリ (A) との低い親和性相互作用を示す。しかし、通常、この相互作用は検出できない。

【0064】

Vタンパク質がポリ (G) およびポリ (U) に容易に結合しそしてポリ (A) およびポリ (C) には良くないという事実は、アッセイが単にポリアニオンレジンへの親和性を測定するだけではないことを示し、そして Vタンパク質が 2 種のポリヌクレオチドへの優先性を示すことも示した。Vタンパク質および Nタンパク質の双方はポリ (G) およびポリ (U) を優先する (図5)。これは多数の細胞 RNA 結合タンパク質により示された特徴である (74、76、77)。

40

【0065】

h a Vタンパク質の結合プロフィールが Nタンパク質と著しく類似するという事実は、Vタンパク質が Nタンパク質との相互作用を介してポリ (G) およびポリ (U) レジン上に間接的に捕捉され、RNA との直接相互作用ではない可能性を高くする。この可能性を検

50

討するために、h a V タンパク質発現ベクターのみを用いて細胞をトランスフェクションしそして細胞抽出液を調製しそして上記と同様に処理した。ウエスタンブロットによる分析は、h a V タンパク質（図 5 B、レーン 9 ~ 12）がこの場合にもポリ（G）およびポリ（U）に結合することを再び示した。これは、V タンパク質とホモポリマーレジンとの相互作用が他のウイルスタンパク質を必要としないことを示した。実際に、他のウイルスタンパク質が存在しないと、さらに大量の V タンパク質がポリ（G）およびポリ（U）に通常は結合する（レーン 6 と 10 および 8 と 12 を比較すること）。これは、他のウイルスタンパク質の 1 種が V タンパク質とポリリボヌクレオチドとの間の相互作用にわずかに干渉するらしいことを示唆した。

【0066】

10

h a V のポリ（G）への結合に影響する条件の限定された分析も行った（図 5 B、レーン 13 ~ 16）。結合反応への 10 mM E G T A または E D T A（レーン 14 および 15）の添加は、ポリ（G）に結合する V タンパク質の量を低下した。結合反応への酵母 R N A コンペティターの添加（25 μ g / ml）（レーン 16）は、結合にほとんど影響しなかった。しかし、細胞質抽出液は細胞 R N A の相当の量をすでに含んでおりそして酵母 R N A の添加はほとんど影響しないらしいので、これは特に意外ではない。非特異性 R N A（酵母 R N A）の添加はレジンに結合する V タンパク質の量を低下させないように見えるので、これらの結果は、ポリ（G）への V タンパク質の結合が二価陽イオンにより刺激されそして比較的特異性相互作用であることを示唆する。

【0067】

20

R N A 結合がミニレプリコン活性を抑制する能力と相関できるかどうかを決定するために、次に、h a V タンパク質変異体の R N A 結合活性を分析するために、ポリ（G）結合アッセイを使用した。h a V タンパク質変異体（図 3）は、他のいかなるウイルスタンパク質がなくても細胞内に発現された。粗細胞質抽出液を調製しそして上記のようにしてポリ（G）レジンに結合し、そして結合タンパク質をウエスタンブロッティングにより分析した（図 6）。既に示したように、h a V はポリ（G）により捕捉されそしてウエスタンブロット上で抗 - H A 抗体により検出され（レーン 2）、一方 H A - タグがなく V タンパク質を含む試料は（レーン 1）背景シグナルを生成しなかった。変異タンパク質の分析は、大部分の V タンパク質に対するポリ（G）結合活性の同様のレベルを明らかにした（レーン 4 ~ 13）。例外は変異体 h a V - 1 である。この変異タンパク質の非常に低いレベルがポリ（G）に結合した。これは、このタンパク質が結合に関して欠陥であることを明瞭に示した（レーン 3）。低いけれども検出可能な h a V - 1 による結合のレベルは、R N A 結合が本質的に低下されたが、しかし完全に排除されてはいないことを示した。これらの結果は、大部分の変異体が、野生型 h a V とほぼ同等の R N A 結合活性を保持することを証明した。ミニレプリコン抑制に対して欠陥性であった 2 種の変異体の一方（h a V - 5）は、ポリ（G）ならびに野生型 h a V を結合し、一方他の変異体（h a V - 1）は、著しく低いポリ（G）結合活性を示した。これは、ミニレプリコン抑制と V タンパク質の独自の C - 末端により媒介される結合活性との間に相関があるらしいことを示唆する。一方、これは、V タンパク質 R N A 結合活性が、麻疹ウイルス遺伝子発現および複製において調節的な役割を演じるらしいことを示唆した。

30

40

【0068】

V タンパク質と関連する R N A 結合活性とミニレプリコン抑制との間の潜在的な関係は、C - 末端のシステインに富む領域を欠く V タンパク質変異体が R N A とほとんど結合せずそして効力が低いミニレプリコン抑制因子でもあることを示す結果から誘導できた。

【0069】

別の実験において、ミニレプリコン抑制は、N タンパク質を結合する V タンパク質の能力と相関しないことが示された。V - N タンパク質複合体の形成は、V タンパク質媒介ミニレプリコン抑制のために必ずしも必要ではなかった。V タンパク質変異体 h a V - 9 および h a V - 11（図 3）は、N タンパク質と相互作用しないが、しかし完全な抑制活性を保持した（データは記載しない）。

50

【 0 0 7 0 】

Vタンパク質変異体の分析は、高親和性RNA結合のためにC-末端が必要であることを示唆した。亜鉛結合ドメインを含むこの領域の欠失(51)は、ポリ(G)レジン上の捕捉できたタンパク質の量を大幅に低下したが、しかしすべての結合を完全には排除しなかった。これは、Vタンパク質内に第二の弱いRNA結合ドメインが存在することを示唆するらしい。下記により制約はされないが、魅力的な可能性は、C-末端内のジンクフィンガー類似ドメインが核酸結合ドメインの一つの重要な成分を形成し、そしてVタンパク質中の第二のドメインがC-末端と協同して、より高い親和性結合部位を創成することである。

【 0 0 7 1 】

RNA結合のこれらの研究は、Vタンパク質が、粗細胞抽出液中に存在するいかなる追加的ウイルスタンパク質がなくてもRNAと相互作用できたことも示した。これは、Vタンパク質がRNAに直接結合することを示唆する。Vタンパク質が、他方ではRNAへの結合の原因となる細胞タンパク質と相互作用する可能性が残るので、この結論は最終的ではない。このモデルが真であるとする、データは、細胞因子との相互作用の原因となるタンパク質-タンパク質相互作用をC-末端が媒介するらしいことを示す。精製した組換えVタンパク質は、Vタンパク質が直接RNAに結合するかどうかをさらに検討するために重要である。

【 0 0 7 2 】

変異h a V - 5タンパク質はミニレプリコン抑制に対して欠陥であるけれども(図4)、これはRNA(図6)および野生型タンパク質に結合した。従って、CR2に関連するミニレプリコン抑制活性は、分析した他の2種の活性(RNA結合およびNタンパク質との相互作用)と直接には関連しなかった。抑制モチーフとしてCR2を有効に機能させるためには、Vタンパク質のC-末端内に不変のRNA結合ドメインを必要とするらしい。Vタンパク質はある種のRNAポリメラーゼII転写因子と類似するらしくそしてこれはモジュール状構造を有する(78)。

【 0 0 7 3 】

CR2が抑制に直接関与する可能性をさらに完全にテストするために、このドメイン(アミノ酸112-134)を欠失させてh a V - 23を生成した(図7、配列番号9)。意外にも、この欠失は抑制活性に大きくは影響しなかった(図8)。CR2が抑制に影響することなく欠失できるという事実は、CR2が抑制において積極的に関与するドメインを含んでいないことを論証する。その代わりに、h a V - 5中に見いだされたアミノ酸113と114との置換により起きた欠陥(図7および8)が、優性の負効果を生成するように考えられる(以前のウエスタンブロット分析は、抑制の欠陥はh a V - 5不安定性によっては起きないことを示した)。

【 0 0 7 4 】

理論により限定はされないが、h a V - 5中のYDからAAへの置換は、抑制活性を部分的に遮断するVタンパク質の三次構造内に微妙な改変を生成した。あるいは、Vタンパク質と他のウイルスタンパク質または細胞タンパク質との間の相互作用があるかも知れない。二重のアラニン置換は、抑制活性を阻害するかまたは不活性タンパク質複合体中のVタンパク質を隔離するタンパク質-タンパク質相互作用に有利らしい。

【 0 0 7 5 】

弱い抑制表現型が二重のアラニン置換により創成される優性の負効果により起きるという概念を、h a V - 5内に見いだされる置換に非常に類似してはいるがしかし区別される追加のアミノ酸置換を作ってさらにテストした(図7)。h a V - 5内の当初のYDからAAへの置換は、CR2のアミノ境界に位置するVYD Hよりなる良く保存されたモチーフ内で操作された(図2)。このモチーフは、麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルス、牛痘ウイルスおよびイルカモルビリウイルスからのVタンパク質配列中で一致していた。変異体h a V - 24(配列番号10)内で、VYD H配列をVYAAに変換し、そして変異体h a V - 25(配列番号11)中では、VYD HをVAAAに変換した。これらの変

10

20

30

40

50

異体の双方ならびに野生型 h a V タンパク質発現が、M V ミニレプリコン遺伝子発現を抑制した (図 8)。これは h a V - 5 の欠陥が V Y D H から V A A H への置換に著しく特徴的であることを意味する。

【 0 0 7 6 】

C - 末端ジンクフィンガー類似ドメインが抑制に役割を演じるという可能性を C - 末端内のシステイン残基の対内にアミノ酸置換を導入してさらに検討した (図 9)。システイン残基 1 および 2 (アミノ酸 2 5 1 および 2 5 5) をアラニンに変換して変異体 h a V - 1 2 (配列番号 1 4) を生成した。同様に、C - 末端システイン残基 4 および 5 (アミノ酸 2 6 9 および 2 7 2) をアラニンに置換して変異体 h a V - 1 3 (配列番号 1 5) を生成した。システイン残基を対で変異させて、これが C - 末端内のジンクフィンガー類似構造を有意に改変しそして抑制活性に容易に検出できる改変を産生することを期待した。

10

【 0 0 7 7 】

意外にも、これらの変異体の C A T 発現研究 (図 1 0) は、これらがシステイン置換により軽くしか影響されないことを明らかにした。h a V - 1 2 および h a V - 1 3 の双方が野生型 h a V タンパク質抑制活性の大きい部分を保持した (野生型の約 6 5 %)。この結果は、いくぶん意外であった。亜鉛 - 配位システイン残基の置換は抑制を無効とすると予想されていた。多分、7 個のシステイン残基中の 2 個のみの置換が推定されるジンクフィンガー核酸結合構造を完全には破壊しなかったのであろう。あるいは、推定されるジンクフィンガーモチーフが、予め予想されたほどには重要な役割を演じていない可能性がある。従って、変異体の 2 種の追加のシリーズを調製して抑制における C - 末端の役割をさらに試験した。

20

【 0 0 7 8 】

一組の変異において、C - 末端から初めて少しずつ増加する欠失を作った (h a V - 1 4 ~ h a V - 1 9、配列番号 1 6 ~ 2 1)。最少の欠失 (h a V - 1 4) は、C - 末端からアミノ酸 2 1 個を取り去り、一方最大の欠失 (h a V - 1 9) はアミノ酸残基 7 1 個を取り去った。h a V - 1 とほぼ同様ではあるけれども、しかし変異体 h a V - 1 9 を構築した (図 9、配列番号 1 3) が、それは h a V - 1 9 中での欠失は、アミノ酸 2 2 9 - 2 3 4 の間に位置する小さい塩基性モチーフの部分である数個の追加のアミノ酸を取り去り、そして h a V - 1 9 の表現型は h a V - 1 により示される変異体表現型の確認とみなすことができたからである。

30

【 0 0 7 9 】

ミニレプリコンアッセイにおける C - 末端変異体の分析は、大きい欠失変異体 (h a V - 1 および h a V - 1 9) が同様に挙動することを明らかにした。これらはミニレプリコン遺伝子発現が、野生型 h a V により誘導される 5 ~ 8 倍抑制の代わりにただの約 2 倍またはそれ以下の抑制であった (図 1 0)。興味あることには、大きい欠失により示される低下した抑制活性がさらに小さい末端切除変異体よってもすべて再現されたことである。最少の C - 末端欠失 (h a V - 1 4) でも、約 2 倍のみ抑制する V タンパク質をもたらした。この結果は、C - 末端の最末端が完全な状態であることが完全な抑制活性のために本質的であることを意味する。

40

【 0 0 8 0 】

C - 末端欠失変異の効果を分析することに加えて、独自の V タンパク質 C - 末端の開始部分にある塩基性モチーフ (K K G H R R、アミノ酸 2 2 9 - 2 3 7、配列番号 1 2) が抑制に何らかの役割を演じる可能性を検討するために、数種の追加の変異体を生成させた。2 個のアルギニン残基のアラニンへ (h a V - 2 0、配列番号 2 2) またはアスパラギン酸へ (h a V - 2 1、配列番号 2 3) の変換は C - 末端欠失変異体のものと同様の効果を有していた。2 種の置換変異体は、平均して 1 . 5 ~ 3 倍のみでミニレプリコン発現を抑制し、一方、野生型 V タンパク質抑制は通常 5 ~ 8 倍の範囲であった (図 1 0)。これらの結果は、塩基性モチーフの混乱も正常な V タンパク質抑制機能を破壊することを意味する。

【 0 0 8 1 】

50

この結果は、塩基性モチーフを欠失し、一方C - 末端の残部は不変に保ってさらに検討した(図9、h a V - 22、配列番号24)。意外にも、一回の予備実験が、塩基性モチーフの欠失が抑制活性に対して認められるほどの効果を有していないことを示した。h a V - 22はCAT活性を約9倍抑制した(図10)。総合すると、これらの結果は、塩基性モチーフ内のアミノ酸置換がタンパク質三次構造内に好ましくない変化を起こすことにより、多分、抑制活性に対して支配的な負効果を生じることを示唆する。反対に、塩基性モチーフの欠失は、ミニレプリコン遺伝子発現を抑制するVタンパク質の能力をほとんど変化させなかった。

【0082】

麻疹ウイルスVタンパク質ミニレプリコン抑制の機構は未知である。結果は、機構がNタンパク質との相互作用を必要としないが、しかしRNAとの相互作用は関与することを示唆する。RNA結合は、ミニレプリコンアッセイにおいて多数の異なる機構を介してCAT活性の低下をもたらすことができた。例えば、Vタンパク質がウイルスmRNAを結合すると、RNA結合活性は翻訳を抑制できた。Vタンパク質は、これが初期のウイルスRNAに結合しそしてRNAとNタンパク質との会合を妨害する場合に、キャプシド化の速度にも影響できた。反対に、これはヌクレオキャプシド構築をいくらか刺激でき、これによりmRNAの損失を伴ってゲノム長さのRNAを過剰産生するようにミニレプリコン系を強制した。Vタンパク質も、プロモーターにおいてまたはその近傍で結合しそして転写を抑制する転写因子に類似すると予見できた。Vタンパク質が転写因子に類似する場合には、これはゲノム合成とmRNA合成とを均衡させるスイッチの調節因子であろう。

10

20

【0083】

Vタンパク質機能の詳細な解析は、免疫原性組成物内に使用するための候補モルビリウイルス株内に弱毒性変異を導入するための基礎を提供する。公開された研究は、Vタンパク質発現の排除が弱毒化ウイルス複製をもたらすことを示した(19、22、23、26~29)。弱毒化の種々の程度は、Vタンパク質の特異性ドメインへのアミノ酸置換を目的として導入され、むしろこれにより発現を排除する。例えば、Vタンパク質抑制機能の部分的欠損は、独自のC - 末端内の1個またはそれ以上のシステイン残基の変異により達成される。PおよびVに共通の領域内の置換、例えばCR2内のアラニン置換は、これらがPタンパク質に大きい影響を及ぼさないでVタンパク質機能に影響を有する場合には適当である。これらの変異は、当該技術分野で記載される「レスキュー」のための逆遺伝系を用いて評価される(19、79、80、81)。

30

【0084】

裸のゲノムRNAは転写および複製のための鋳型としては役立てないので、本発明の変異を含む感染性モルビリウイルスを生成するためには逆遺伝系を使用しなければならない。むしろ、これらのゲノム配列は、これらがヌクレオキャプシド構造内へNタンパク質により完全にキャプシド化される場合にのみ認められる。これは、ゲノムおよびアンチゲノム性末端プロモーター配列が転写または複製経路を開始するために認識される範囲においてのみである。

【0085】

負センス、一本鎖RNAウイルスゲノムの転写および複製は、リボ核タンパク質コア(ヌクレオキャプシド)に対して作用する多量体(Multimer)性タンパク質の酵素活性を介して達成される。すべてのモルビリウイルスは、3種のウイルスタンパク質、N、PおよびLをこれらの経路を進行させるために必要とする。

40

【0086】

本明細書中に記載の変異は、部位 - 指定変異発現を用いてモルビリウイルス株内に導入される。本明細書中に定義した1種またはそれ以上の変異がモルビリウイルス株内に導入される。変異の種々の組み合わせの累積効果が評価できる。

【0087】

本発明は、ミニレプリコン系を用いて例示される。モルビリウイルスのVタンパク質のCR2およびC - 末端(ならびに麻疹ウイルスのプロモーター領域およびLタンパク質、N

50

、Pおよび/またはCタンパク質および/またはF遺伝子末端シグナル)への変異をコードするヌクレオチド配列内の変化は、当該技術分野では既知の技術を用いて全長ウイルス内に容易に挿入できる。変異は、標準組換えDNA法によりウイルスゲノムのDNAコピー内に導入される。これは、野生型または改変されたウイルスゲノム背景であってもよく、これにより新しいウイルスを生成する。これらの変異を含む感染性クローンまたは粒子はcDNAレスキュー系を用いて生成され、これは種々の負センスRNAウイルスに適用され、これにはセンダイウイルス(82)、麻疹ウイルス(83、88)、呼吸器合胞体ウイルス(84)、PIV-3(85)、狂犬病(86)、水疱性口内炎ウイルス(VSV)(87)、および牛痘ウイルス(89)が含まれ、これらの引用文献は引用することによって本明細書中に編入される。

10

【0088】

簡単にいえば、すべてのモルビリウイルスレスキュー系は以下のように要約できる：各々は、適当なDNA依存性RNAポリメラーゼプロモーター(例えばT7 RNAポリメラーゼプロモーター)および繁殖可能な細菌プラスミド内に挿入された自己切断リボザイム配列(例えばD型肝炎リボザイム)の間に位置する全ウイルスゲノムのクローニングされたDNA相当体を必要とする。この転写ベクターは、RNAポリメラーゼ(例えばT7 RNAポリメラーゼ)が正確に、またはほぼ正確に5'および3'末端を有するウイルスアンチゲノム(またはゲノム)の一本鎖RNAコピーを忠実に転写できる容易に操作できるDNA鋳型を提供する。ウイルスゲノムDNAコピーおよび近接するプロモーターおよびリボザイム配列の方向は、アンチゲノムまたはゲノムRNA相当体が転写されるかどうかを決定する。また、新規のウイルス継代のレスキューのために必要なことは、裸の一本鎖ウイルスアンチゲノムまたはゲノムRNA転写体を機能性ヌクレオキャプシド鋳型内にキャプシド化するために必要なウイルス特異性、トランス作用性タンパク質：すなわちウイルスヌクレオキャプシド(N)タンパク質、ポリメラーゼ-随伴リントタンパク質(P)およびポリメラーゼ(L)タンパク質である。これらのタンパク質は、このヌクレオキャプシド鋳型を転写および複製するためにエンゲージしなければならない活性ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼを含んでなる。

20

【0089】

典型的には、これらのウイルストランス作用性タンパク質は、所要のトランス作用性タンパク質の一部またはすべてが、これらのウイルス特異性遺伝子および遺伝子産物を安定な形質転換体として含みそして発現するための操作された哺乳動物細胞内に産生されてもよいけれども、所要のタンパク質をコードする1種またはそれ以上のプラスミド発現ベクターから生成される。

30

【0090】

レスキューのための(必ずしも排他的ではないけれども)典型的な環境は、ウイルスゲノム性cDNA含有転写ベクターからアンチゲノム(またはゲノム)性一本鎖RNAの転写を作動させるためにT7ポリメラーゼが存在する適当な哺乳動物細胞内部環境を含む。共転写的またはその直後に、このウイルスアンチゲノム(またはゲノム)RNA転写産物は、ヌクレオキャプシドタンパク質により機能性鋳型内にキャプシド化されそして所要のウイルス特異性トランス作用性タンパク質をコードする共トランスフェクションされた発現プラスミドから共に産生された所要のポリメラーゼ成分によりエンゲージされる。これらの出来事および過程は、ウイルスmRNAの所要の転写、新しいゲノムの複製および増幅および、これらにより、新規のウイルス継代の産生、すなわちレスキューに導く。

40

【0091】

非モルビリウイルスの狂犬病、VSVおよびセンダイのレスキューのために、T7ポリメラーゼを組換えワクシニアウイルスVTF7-3により提供する。しかし、この系は、レスキューされたウイルスが、物理的もしくは生化学的手段によりまたはボックスウイルスにとって良い宿主ではない細胞もしくは組織内での反復された継代操作(passaging)によりワクシニアウイルスから分離されることを必要とする。麻疹ウイルスcDNAレスキューのために(そして推測的に他のモルビリウイルスのために)、この要件は

50

、T7ポリメラーゼ、ならびにウイルスNおよびPタンパク質を発現する細胞系統を創成することにより避けられる。レスキューは、ゲノム発現ベクターおよびL遺伝子発現ベクターをヘルパー細胞系統内にトランスフェクションして達成される。哺乳動物内でT7RNAポリメラーゼを発現するが感染性継代をほとんどまたは全く產生しないワクシニアウイルス、MVAT7の宿主域変異体の利点は、麻疹ウイルスおよびその他のモルビリウイルスをレスキューするために開発される。必要なキャプシド化タンパク質の共発現の後、合成全長アンチゲノムウイルスRNAをウイルスポリメラーゼタンパク質によりキャプシド化、複製および転写しそして複製されたゲノムを感染性ビリオン内にパッケージする。かかるアンチゲノムに加えて、現在ではゲノム類似体がセンダイおよびPIV-3でレスキューに成功した(85、90)。

10

【0092】

従って、レスキュー系は、モルビリウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをコードする単離された核酸分子を含んでなる転写ベクターを含んでなる組成物を提供する。核酸分子は、麻疹ウイルスVタンパク質のアミノ酸112-134に相当する領域内に少なくとも1個の変異(および、場合により、本明細書中に記載の他の変異)を、キャプシド化、転写および複製に必要なトランス作用性タンパク質(例えばモルビリウイルスのN、PおよびL)をコードする少なくとも1個の単離された核酸分子を含んでなる少なくとも1種の発現ベクターと一緒に含む。次いで、上記の少なくとも2種の発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換、感染またはトランスフェクションする。宿主細胞は、感染性改変ウイルスを産生するようにこれらのベクターの共発現を許容する条件下で培養される。

20

【0093】

次いで、レスキューされた感染性ウイルスをその所望の表現型(Vタンパク質による低下した抑制、温度感受性、低温適応性、プラーク形態、および転写および複製弱毒化)に関して最初は生態外的手段で試験する。麻疹ウイルスのN、PまたはC遺伝子またはF遺伝子末端シグナル内の変異も、所要のトランス作用性キャプシド化およびポリメラーゼ活性が野生型またはワクチンヘルパーウイルスにより提供されるミニレプリコン形質転換を用い、または遺伝子特異性弱毒化変異を包含するN、Pおよび種々のL遺伝子を発現するプラスミドにより試験される。

【0094】

レスキューされたウイルスの弱毒化表現型が存在する場合には、適当な動物モデル用いて負荷試験を行う。ヒト以外の霊長類は、ヒト疾患の病因論のための好ましい動物モデルを提供する。これらの霊長類は、最初に弱毒化、組換え生成ウイルスを用いて免疫化され、次いでウイルスの野生型を負荷される。サルは、接種の鼻腔内、気管内または皮下経路を含みこれらの限定はされない種々の経路により感染される(91)。実験的に感染されたアカゲザルおよびカニクイザルも、麻疹に対するワクチン誘導防御の研究のための動物モデルとして役立つ(92)。

30

【0095】

防御は、疾患徴候および症状、生存率、ウイルス開放性および抗体力価などの基準により測定される。所要の基準に合致する場合には、組換え産生ウイルスは人体内試験の実行可能な候補ワクチンまたは免疫原性組成物と考えられる。「レスキュー」されたウイルスは、変異を組み込むウイルスの継代および後続の世代として、「組換え産生された」と考えられる。

40

【0096】

「レスキュー」されたウイルスが、ワクチンとして使用するための最適レベルに対して不十分に弱毒化または過剰に弱毒化されている場合でも、これはかかる最適株を開発するために価値がある情報である。

【0097】

最適には、点変異を含むコドンは、点変異のみを有するコドンによりコードされるアミノ酸を変化することなく、コドン内に第二または第二および第三の変異を導入することにより安定化されてもよい。安定化変異を含む感染性ウイルスクローンも、上記のcDNA「

50

レスキュー」系を用いて産生される。

【0098】

以前に、引用することによって本明細書中に編入される国際特許出願公開番号WO98/13501号(93)中に、3'ゲノムプロモーター領域内に少なくとも1個の弱毒性変異を有しそしてRNAポリメラーゼ遺伝子内に少なくとも1個の弱毒化変異を有するモノネガウイルス目(例えば麻疹ウイルス)の組換え産生、弱毒化、非セグメント化、負センス、一本鎖RNAウイルスの生成および単離を開示した。

【0099】

具体的には、これらの変異は、

(1)ヌクレオチド26(A T)、ヌクレオチド42(A TまたはA C)およびヌクレオチド96(G A)よりなる群より選ばれる3'ゲノムプロモーター領域内の少なくとも1個の弱毒化変異であって、これらのヌクレオチドは正鎖、アンチゲノム性、メッセージセンス中に提示され、そして

(2)残基331(イソロイシン トレオニン)、1409(アラニン トレオニン)、1624(トレオニン アラニン)、1649(アルギニン メチオニン)、1717(アスパラギン酸 アラニン)、1936(ヒスチジン チロシン)、2074(グルタミン アルギニン)および2114(アルギニン リシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれるRNAポリメラーゼ遺伝子内の少なくとも1個の弱毒化変異、を含んでなる。

【0100】

さらに引用することにより本明細書中に編入される国際特許出願公開番号WO99/49017号(94)中に、N、PもしくはC遺伝子内またはF遺伝子-末端シグナル内に少なくとも1個の弱毒化変異を有する組換え産生、弱毒化した麻疹ウイルスの生成および単離を開示した。

【0101】

具体的には、これらの変異は、

(1)N遺伝子に対して、残基129(グルタミン リシン)、148(グルタミン酸 グリシン)および479(セリン トレオニン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも1個の弱毒化変異、

(2)P遺伝子に対して、残基225(グルタミン酸 グリシン)、275(システイン チロシン)および439(ロイシン プロリン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも1個の弱毒化変異、

(3)C遺伝子に対して、残基73(アラニン バリン)、104(メチオニン トレオニン)および134(セリン チロシン)よりなる群より選ばれるアミノ酸に変化を生成するヌクレオチド変化よりなる群より選ばれる少なくとも1個の弱毒化変異、および

(4)F遺伝子-末端シグナル(シス作用性転写終止シグナル)に対して、ヌクレオチド7243(T C)における変化であって、これらのヌクレオチドは、正鎖、アンチゲノム性、すなわちメッセージ(コーディング)センス中に提示されるもの

を含んでなる。

【0102】

変異のこれらの組のいずれかまたは双方からの弱毒化変異の個々または組み合わせは、Vタンパク質のアミノ酸112-134に相当する領域内に少なくとも1個の変異を有するものを特異的に含む本発明のモルビリウイルス内に、ならびにアミノ酸112-134内のかかる変異およびアミノ酸231で開始するC-末端領域の少なくとも一部分内の変異またはその欠失の双方を有するものへ組み込むことができる。

【0103】

本発明のウイルスは、ワクチンまたは免疫原性組成物を処方するために使用される。これを行うために、ウイルスを適当な濃度に調整しそしていずれかの適当なアジュバント、希釈剤またはキャリアを用いて処方する。生理学的に受容できる媒体をキャリアおよび/または希釈剤として使用してもよい。これらには、以下に限定はされないが、水、適当

10

20

30

40

50

な等張性媒体、グリセロール、エタノールおよびその他の慣用の溶剤、リン酸緩衝生理食塩水などが含まれる。適当なアジュバントには、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、MPL^{T M} (3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A; RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT、現在はCorixa)、合成脂質A類似物、例えば529 (Corixa)、スチムロン (Stimulon)^{T M} QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) およびIL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA) が含まれ、これらに限定はされない。

【0104】

本発明の一つの態様では、モルビリウイルスを含む処方は、ワクチンまたは免疫原性組成物として使用することを意図する。ウイルスは、凍結防止添加剤または安定剤、例えばタンパク質 (例えばアルブミン、ゼラチン)、糖類 (例えばスクロース、ラクトース、ソルビトール)、アミノ酸 (例えばグルタミン酸ナトリウム)、生理食塩水、またはその他の防御性薬剤と混合してもよい。この混合物を液状に保つか、または次いで輸送および貯蔵のために乾燥または凍結乾燥しそして投与の直前に水と混合する。

10

【0105】

本発明のモルビリウイルスを含んでなる処方は、ウイルスの野生型相当物による感染に対する防御を誘導するためにヒトまたはその他の脊椎動物を免疫化するために有用である。従って、本発明は、上記のようにして生成したウイルスの種類を組み込んだワクチンまたは免疫原性組成物の処方の有効な免疫化量を患者に投与することによる、モルビリウイルスによる感染に対する防御を誘導するために患者を免疫化する方法をさらに提供する。

20

【0106】

投与の適当な回数でワクチンまたは免疫原性組成物の十分な量を免疫応答を誘導するために患者に投与する。当該技術分野の熟練者は、かかる量および投与を容易に決定できる。投与は、あらゆる慣用の有効な形、例えば経鼻、非経口、経口、または局所経路により、いかなる粘膜面、例えば鼻内、口腔、眼、肺、膣または直腸表面に、例えばエアロゾル噴射によって行ってもよい。投与の好ましい手段は鼻内投与である。

【0107】

本明細書中に引用したすべての特許および刊行物は、引用することにより本明細書に編入される。

30

【0108】

本発明をさらに良く理解するために、下記の実施例を記載する。実施例は例示の目的のみでありそして本発明の範囲を限定すると解釈してはならない。

【0109】

実施例

実施例 1

細胞およびウイルス

HEp2細胞を10%ウシ胎児血清を補足したダルベッコ変法イーグル媒体 (DMEM) 内で培養した。チキン胚繊維芽細胞 (CEF; SPAFAS, Inc) を同じ媒体内で維持した。ファージT7 RNAポリメラーゼ (MVA/T7; 62) を発現するワクシニアウイルスの弱毒化株をCEF中で培養した。プラーグアッセイもCEF上で行った。

40

【0110】

実施例 2

組換えDNA

麻疹ウイルスN、PおよびLタンパク質発現クローン (図1A) をそれぞれ感染細胞全RNAから遺伝子特異性プライマーを用いる逆転写およびPCR増幅 (RT/PCR) により、次いで適当なT7 RNAポリメラーゼ依存性発現ベクター内にクローニングして調製した (61)。ベロ (vero) 細胞を麻疹ウイルスのエドモンストン野生型株を用いて感染し、そして細胞の約70%またはそれ以上が細胞改変効果を示した場合に、RNAをガウニジウム (gaunidium) - フェノール抽出法により調製した (95)。

50

RT/PCRは、単管タイタン(one-tube Titan)増幅キット(Roche Molecular Biology)内に含まれたトリ筋芽球症(avian myoblastosis)ウイルスRTおよびPwoポリメラーゼを用いて行った。RT段階は、30~60分間、47℃、次いでPCR増幅の30~35サイクルで行った。増幅したDNAフラグメントを、ベクターのNcoI部位内に位置した翻訳開始コドンを含むT7発現プラスミド(図1(61、83))内にクローニングした。クローニングしたDNAをサイクル-シーケンシング(96)により確認しそしてヌクレオチド置換エラーを、モルフ(Morph)キットを用いるオリゴヌクレオチド変異誘導(5prime-3prime, Inc)により、または以前に記載したような新規増幅DNAフラグメントを用いるサブフラグメントの置換(96)により修正した。

10

【0111】

Vタンパク質コード領域に近接するプラスミドを用いるエドモントン野生型全長cDNAクローンからのPCR増幅により最初のVタンパク質発現クローンを調製した。増幅したDNAをT7発現ベクター内にクローニングしそしてV遺伝子フレームシフトを生成するために必要な追加のGヌクレオチド残基をオリゴヌクレオチド-指示変異誘導によりエディティング部位に加えた(18)。野生型および変異Vタンパク質発現ベクターも、アミノ酸末端のインフルエンザウイルス赤血球凝集素エピトープタグ(HA-タグ;(67))を用いて調製した。開始コドンを含みそしてHA-エピトープタグ(CCATGGCTTATCCTTATGACGTGCCTGAC TATGCC)(配列番号5)を含む配列を含むようにT7ベクタープラスミドを改変し、次いでポリリンカー(プラスミドpT7/HA)により改変した。Vタンパク質コード領域をアミノ末端でHAタグを用いてクローニングした。これは、Vタンパク質イニシエーターメチオニンコドンを置換することに役立ち、pMV-haV-wtと呼ばれるプラスミドの産生をもたらした。Vタンパク質変異体は、オリゴヌクレオチド指示または欠失変異誘導によりpMV-haV-wt骨格内に調製した。

20

【0112】

PおよびVコード領域の5'末端を増幅するように設計されたプライマー(CGGCCATGGCAGAGAGACAGGCACCGCCACCGTAAACGAC)(配列番号6)は、下流Cタンパク質オープンリーディングフレームを破壊する2個の塩基変化(下線付)を含んでいた。これらの変化は、PおよびVオープンリーディングフレームに関してサイレントであった。同様のヌクレオチド変化がpT7MV-haV構築物にも引き継がれた。

30

【0113】

すべてのタンパク質発現構築物に対して、cDNA挿入物は内部リボソームエントリー部位(IRES)の3'をクローニングしてT7RNAポリメラーゼ転写物の翻訳を助けた。50アデノシン残基の部分は3'末端に位置し、次いでT7RNAポリメラーゼターミネーターが位置する。PおよびV発現ベクターの双方は、下流Cタンパク質オープンリーディングフレームからの翻訳開始を妨害するために設計された塩基置換を含んでいた。

【0114】

麻疹ウイルスミニレプリコン(pMVwt107-CAT、図1B)はpMV107-CATの誘導体であった(63)。プラスミドpMV107-CATは麻疹ウイルスのワクチン株内に見いだされたリーダー配列を含み(60)そしてオリゴヌクレオチド-指示変異誘導を用いてプラスミドpMV107wt-CAT(これは野生型リーダーを含んでいた)に変換された。

40

【0115】

実施例3

一過性発現実験

一過性ミニレプリコン発現の分析は、種々の量のウイルスタンパク質発現ベクター(図1B)およびCATレポーター遺伝子を含む麻疹ウイルスミニレプリコン(図1B)を用い

50

て、本質的に以前の記載(96)のようにして行われた。麻疹ウイルスミニレプリコンは、CATレポーター遺伝子および麻疹ウイルスのエドモンストン野生型株からの麻疹リーダー配列を含むpMV107-CATの誘導体であった(63)(60)。細胞が約70~90%集密となると、6ウェルプレート内のHEp2細胞をトランスフェクションに使用した。トランスフェクション混合物は、無血清OptiMEM200μl中のミニレプリコンDNA(50~200ng pMVwt107-CAT)および発現プラスミド(400ng pMVwt-N、300ng pMVwt-P[C⁺])、100ng pMVwt-L)を組み合わせ、調製した。Vタンパク質発現プラスミドは、図1Cに記入したように、25~400ngの範囲の量に従ってこの混合物中に含まれた。リポフェクターセ(Lipofectace)(12~15μl、Invitrogen/Life Technologies)をDNA-媒体混合物に加え、そして20~30分間、室温でインキュベーションした。細胞あたりに約2pfuを用いてトランスフェクションされる細胞のそれぞれのウェルを感染させるために十分なMVAT7を含む無血清OptiMEM0.8mlを提供するために十分な量の別のMVAT7混合物を調製した。トランスフェクションを開始する前に、DNA-媒体-リポフェクターセトランスフェクション混合物をMVAT7-媒体混合物800μlと混合し、そしてピペットを使用しておだやかに混合した。次いで、培養媒体を細胞単層から除去し、そして一緒にした1トランスフェクション混合物を細胞に加えた。

10

【0116】

一晚インキュベーションした後に、10%FBAを補足したDMEMを用いてトランスフェクション混合物および媒体を置換し、そして細胞をさらに一日インキュベーションした。トランスフェクションの開始から約48時間後に、細胞を採取し、そして以前に記載したように(96)CAT活性の分析のために抽出液を調製した。CATの発現を図1Cに示す。一部の実験では、粗細胞抽出液中のタンパク質をウエスタンブロッティングにより分析してタンパク質発現を測定した(97)。トランスフェクションされた細胞を0.2%NP40を補足したTN緩衝液(50mMトリス[pH7.4]、150mM NaCl)を用いて溶解した。細胞抽出液を遠心分離により清澄化して核を除き、そして等量のレムリ(Laemmli)試料緩衝液(62.5mMトリス[pH6.8]、25%グリセロール、2%SDS、0.01%ブromoフェノールブルー)を細胞質抽出液に加えた。約2.5%のβ-メルカプトエタノールを含むように試料を調整し、次いで煮沸した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびエレクトロブロッティングを標準プロトコルを用いて行った(97)。マウスモノクローナル抗体12CA5(Roche Molecular Biology)またはラットモノクローナル抗体3F10(Roche Molecular Biology)のいずれかを用いてエピトープタグしたVタンパク質を検出した。検出は、ペルオキシダーゼ-結合二次抗体(Sigma)および化学蛍光試薬(Roche Molecular BiologyまたはNew England Nuclear)を用いて行った。

20

30

【0117】

実施例4

変異麻疹ウイルスVタンパク質によるミニレプリコン発現の抑制

40

実施例3に記載の一過性ミニレプリコン発現CATアッセイを麻疹ウイルスVタンパク質変異体haV-1~haV-8の種々の量を用いて反復し、これらの変異体は、野生型配列(haV-wt)と下記の点で異なっていた(図3参照)：

haV-1：アミノ酸231-299の欠失

haV-2：アミノ酸225のグルタミン酸のグリシンへの変異

haV-3：アミノ酸229および230のリシンのアラニンへの変異

haV-4：アミノ酸204および209のリシンおよびトレオニンのアラニンへの変異

haV-5：アミノ酸113および114のチロシンおよびアスパラギン酸のアラニンへの変異

haV-6：アミノ酸100および101のロイシンおよびグルタミンのアラニンへの変異

50

異

h a V - 7 : アミノ酸 1 4 および 1 5 のグルタミン酸およびシステインのアラニンへの変異

h a V - 8 : アミノ酸 3 および 4 のグルタミン酸のアラニンへの変異。

【 0 1 1 8 】

それぞれの V プラスミド (野生型または h a V - 1 ~ h a V - 8 タンパク質をコードする) のそれぞれ 2 0 0 または 4 0 0 n g を使用しそして V タンパク質発現ベクターを用いなく行って行ったトランスフェクション (レーン 2) から得られた活性の百分率として相対 C A T 活性を測定した。結果を図 4 A に示す。低い百分率は、C A T 発現の抑制の高い程度と相関する。V タンパク質の発現は、抗 - H A 抗体を用いて分析したウエスタンブロットにより測定された (図 4 B) 。

10

【 0 1 1 9 】

h a V - 1 をコードする V プラスミド増加量 (1 0 0 n g ~ 1 μ g) を用いて C A T アッセイを反復しそして相対活性を図 4 C に示す。

【 0 1 2 0 】

実施例 5

R N A 結合アッセイ

R N A 結合アッセイ (7 4 、 7 6 、 7 7) を行って、ポリリボヌクレオチド (S i g m a) とのアガロースレジンカップルを用いて麻疹ウイルス V タンパク質の R N A への結合を評価した。0 . 5 % N P 4 0 、 5 % グリセロール、1 m M M g C l ₂ 、 1 m M Z n C l ₂ およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e M o l e c u l a r B i o l o g y) を補足した T N 緩衝液を用いて上記のようにしてトランスフェクションされた細胞を溶解した。ポリリボヌクレオチドを含むアガロースレジン (ビーズの沈降した体積で約 2 5 ~ 5 0 μ l) を清澄化した細胞溶解物に加えそして 3 0 ~ 6 0 分間、4 で揺動ながらインキュベーションした。インキュベーションの後、レジンを 3 回洗浄して未結合タンパク質を除去した。2 . 5 % - メルカプトフェノールを補足したレムリ緩衝液中で煮沸してタンパク質をレジンから溶離した。操作を図 5 A の手順図に要約した。ポリヌクレオチドレジンにより捕捉されたタンパク質を上記のようにウエスタンブロッティングにより分析した。アッセイは、最初に野生型 V タンパク質、次いで h a V - 1 ~ h a V - 1 1 を用いて行った。変異体 h a V - 1 ~ h a V - 8 は以上に記載したものである。変異体 h a V - 9 ~ h a V - 1 1 は、野生型配列 (h a V - w t) と下記の相違を有する (図 3 参照) :

20

30

h a V - 9 : アミノ酸 1 - 2 0 の欠失

h a V - 1 0 : アミノ酸 2 0 8 - 2 3 0 の欠失

h a V - 1 1 : アミノ酸 1 - 2 0 および 2 0 8 - 2 3 0 の欠失。

結果を図 5 B (野生型) および 6 (変異体) に示す。

【 0 1 2 1 】

実施例 6

追加の C R 2 変異麻疹ウイルス V タンパク質によるミニレプリコン発現の抑制

実施例 3 および 4 に記載の一過性ミニレプリコン発現 C A T アッセイを、麻疹ウイルス V タンパク質 C R 2 変異体 h a V - 5 および h a V - 2 3 ~ h a V - 2 5 を用いて反復し、これらの変異体は C R 2 (アミノ酸 1 0 0 - 1 4 0 、図 7 参照) 中で野生型配列 (h a V) (配列番号 7) から下記の相違を有する :

40

h a V - 5 : アミノ酸 1 1 3 および 1 1 4 のチロシンおよびアスパラギン酸のアラニンへの変異 (配列番号 8)

h a V - 2 3 : アミノ酸 1 1 2 ~ 1 3 4 の欠失 (配列番号 9)

h a V - 2 4 : アミノ酸 1 1 4 および 1 1 5 のアスパラギン酸およびヒスチジンのアラニンへの変異 (配列番号 1 0)

h a V - 2 5 : アミノ酸 1 1 3 ~ 1 5 5 のチロシン、アスパラギン酸およびヒスチジンの変異 (配列番号 1 1)

50

それぞれのVプラスミド（野生型、h a V - 5またはh a V - 23 ~ h a V - 25 Vタンパク質をコードする）の400 ngを使用し、いかなるVタンパク質発現ベクターも含まないで行ったトランスフェクションから得られた活性（バー1）の百分率として相対CAT活性を測定した。結果を図8に示す。低い百分率は、CAT発現の抑制の高い程度に相関する。

【0122】

実施例7

追加のC - 末端変異麻疹ウイルスVタンパク質によるミニレプリコン発現の抑制

実施例3および4に記載の一過性ミニレプリコン発現CATアッセイを、麻疹ウイルスVタンパク質変異体h a V - 1およびh a V - 12 ~ h a V - 22を用いて反復し、これらの変異体はC - 末端配列（アミノ酸220 - 299、図9参照）中で野生型配列（h a V）（配列番号7）から下記の相違を有する：

h a V - 1：アミノ酸232 ~ 299の欠失（配列番号13）

h a V - 12：アミノ酸251および255のシステインのアラニンへの変異（配列番号14）

h a V - 13：アミノ酸269および272のシステインのアラニンへの変異（配列番号15）

h a V - 14：アミノ酸279 ~ 299の欠失（配列番号16）

h a V - 15：アミノ酸267 ~ 299の欠失（配列番号17）

h a V - 16：アミノ酸250 ~ 299の欠失（配列番号18）

h a V - 17：アミノ酸243 ~ 299の欠失（配列番号19）

h a V - 18：アミノ酸236 ~ 299の欠失（配列番号20）

h a V - 19：アミノ酸229 ~ 299の欠失（配列番号21）

h a V - 20：アミノ酸233および234のアルギニンのアラニンへの変異（配列番号22）

h a V - 21：アミノ酸233および234のアルギニンのアスパラギン酸への変異（配列番号23）

h a V - 22：アミノ酸229 ~ 237の欠失（配列番号24）

それぞれのVプラスミド（野生型、h a V - 1またはh a V - 12 ~ h a V - 22 Vタンパク質をコードする）の400 ngを使用し、いかなるVタンパク質発現ベクターも含まないで行ったトランスフェクションから得られた活性（バー1）の百分率として相対CAT活性を測定した。結果を図10に示す。低い百分率は、CAT発現の抑制の高い程度に相関する。

【0123】

【表1】

参考文献一覧表

1. Black, F.L., et al., Am. J. Epidemiol., 124, 442-452 (1986).
2. Lennon, J.L., and Black, F.L., J. Pediatrics, 108, 671-676 (1986).
3. Pabst, H.F., et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 11, 525-529 (1992).
4. Centers for Disease Control, MMWR, 40, 369-372 (1991).
5. Centers for Disease Control, MMWR, 41:86, 1-12 (1992).
6. King, G.E., et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 10, 883-887 (1991).
7. Rota, J.S., et al., Virology, 188, 135-142 (1992).
8. Griffin, D.E., and Bellini, W.J., pages 1267-1312 of Volume 1, Fields Virology, B.N. Fields, et al., Eds. (3rd ed., Raven Press, 1996).
9. Lamb, R.A., and Kolakosky, D., pages 1177-1204 of Volume 1, Fields Virology, B.N. Fields, et al., Eds. (3rd ed., Raven Press, 1996).
10. Birrer, M.J., et al., Virology, 108, 381-390 (1981).
11. Birrer, M.J., et al., Nature, 293, 67-69 (1981).
12. Norby, E., et al., pages 481-507, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
13. Peebles, M.E., pages 427-456, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
14. Egelman, E.H., et al., J. Virol., 63, 2233-2243 (1989).
15. Udem, S.A., et al., J. Virol. Methods, 8, 123-136 (1984).

10

20

30

40

【 0 1 2 4 】

【 表 2 】

16. Udem, S.A., and Cook, K.A., J. Virol., 49, 57-65 (1984).
17. Moyer, S.A., and Horikami, S.M., pages 249-274, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
18. Cattaneo, R., et al., Cell, 56, 759-764 (1989).
19. Nagai, Y., Rev. Med. Virol., 9, 83-99 (1999).
20. Bellini, W.J., et al., J. Virol., 53, 908-919 (1985).
21. Baron, M.D., and Barrett, T., J. Virol., 74, 2603-2611 (2000).
22. Delenda, C., et al., Virology, 242, 327-337 (1998).
23. Durbin, A.P., et al., Virology, 261, 319-330 (1999).
24. Kato, A., et al., J. Virol., 71, 7266-7272 (1997).
25. Schneider, H., et al., Virology, 227, 314-322 (1997).
26. Kato, A., et al., EMBO J., 16, 578-587 (1997).
27. Tober, C., et al., J. Virol., 72, 8124-8132 (1998).
28. Valsamakis, A., et al., J. Virol., 72, 7754-7761 (1998).
29. Patterson, J.B., et al., Virology, 267, 80-89 (2000).
30. Parks, C.L., et al., J. Virol., 75, 910-920 (2001).
31. Takeda, M., et al., J. Virol., 72, 8690-8696 (1998).
32. Bankamp, B., et al., Virology, 216, 272-277 (1996).
33. Curran, J., et al., J. Virol., 69, 849-855 (1995).

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

【 表 3 】

34. Harty, R.N., and Palese, P., J. Gen Virol., 76, 2863-2867 (1995).
35. Horikami, S.M., et al., Virology, 222, 383-390 (1996).
36. Nishio, M., et al., J. Gen. Virol., 77, 2457-2463 (1996).
37. Randall, R. E., and Bermingham, A., Virology, 224, 121-129 (1996).
38. Shaji, D., and Shaila, M. S., Virology, 258, 415-424 (1999).
39. Watanabe, N., et al., Medical Microbiology & Immunology, 185, 89-94 (1996).
40. Precious, B., et al., J. Virol., 69, 8001-8010 (1995).
41. Watanabe, N., et al., J. Gen. Virol., 77, 327-328 (1996).
42. Lin, G.Y., et al., Virology, 249, 189-200 (1998).
43. Liston, P., et al., Virus Res., 38, 241-259 (1995).
44. Didcock, L., et al., J. Virol., 73, 9928-9933 (1999).
45. Curran, J., et al., EMBO J., 10, 3079-3085 (1991).
46. Baron, M.D., et al., J. Gen. Virol., 74, 299-304 (1993).
47. Thomas, S.M., et al., Cell, 54, 891-902 (1988).
48. Borden, K.L.B., and Freemont, P.S., Curr. Opinion Stuctural Biol., 6, 395-401 (1996).
49. Choo, Y., and Klug, A., Curr. Opinion Structural Biol., 7, 117-125 (1997).
50. O'Halloran, T.,V., Science, 261, 715-725 (1993).
51. Liston, P., and Briedis, D.J., Virology, 198, 399-404 (1994).

10

20

30

40

【 0 1 2 6 】

【 表 4 】

52. Paterson, R.G., et al., Virology, 208, 121-131 (1995).
53. Steward, M., et al., Archives Virol., 140, 1321-1328 (1995).
54. Blumberg, B., et al., pages 235-247, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
55. Berrett, T., et al., pages 83-102, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
56. Tordo, N., et al., Sem. in Virology, 3, 341-357 (1992).
57. Cattaneo, R., et al., EMBO J., 6, 681-688 (1987).
58. Castaneda, S.J., and Wong, T.C., J. Virol., 63, 2977-2986 (1989).
59. Castaneda, S.J., and Wong, T.C., J. Virol., 64, 222-230 (1990).
60. Parks, C.L., et al., J. Virol., 75, 921-933 (2001).
61. Moss, B., et al., Nature, 348, 91-92 (1990).
62. Wyatt, L.S., et al., Virology, 210, 202-205 (1995).
63. Sidhu, M.S., et al., Virology, 208, 800-807 (1995).
64. Huber, M., et al., Virology, 185, 299-308 (1991).
65. Alber, T., Curr. Opin. Genetics Dev., 2, 205-210 (1992).
66. Baxevanis, A.D., and Vinson, C. R., Curr. Opin. Genetics Dev., 3, 278-285 (1993).
67. Kolodziej, P.A., and Young, R.A., Methods Enzymology, 194, 508-519 (1991).
68. Bass, S.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 4498-4502 (1991).

10

20

30

40

【 0 1 2 7 】

【 表 5 】

69. Diamond, S.E., and Kirkegaard, K., J. Virol., 68, 863-876 (1994).
70. Gibbs, C.S., and Zoller, M.J., J. Biol. Chem., 266, 8923-8931 (1991).
71. Giniger, E., and Ptashne, M., Nature, 330, 670-672 (1987).
72. Sedlmeirer, R., and Neubert, W.J., Adv. Virus Res., 50, 101-139 (1998).
73. Lin, G.Y., et al., Virology, 238, 460-469 (1997).
74. Elenbaas, B., et al., Molecular Medicine, 2, 439-451 (1996).
75. Kiledjian, M., and Dreyfuss, G., EMBO J., 11, 2655-2664 (1992).
76. Siomi, H., et al., Cell, 74, 291-298 (1993).
77. Swanson, M., and Dreyfuss, G., Mol. Cell. Biol., 8, 2237-2241 (1988).
78. Mitchell, P., and Tjian, R., Science, 245, 371-378 (1989).
79. Conzelmann, K.K., Annual Review of Genetics, 32, 123-162 (1998).
80. Radecke, F., and Billeter, M.A., Rev. Med. Virology, 7, 49-63 (1997).
81. Roberts, A., and Rose, J.K., Virology, 247, 1-6 (1998).
82. Garcin, D., et al., EMBO J., 14, 6087-6094 (1995).
83. Radecke, F., et al., EMBO J., 14, 5773-5784 (1995).
84. Collins, P.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 11563-11567 (1995).
85. Published International Application No. WO 98/53078.
86. Published European Patent Application No. 702,085.

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

【 表 6 】

87. Rota, J.S., et al., Virus Res., **31**, 317-330 (1994).
88. Published International Application No. WO 97/06270.
89. Baron, M.D., and Barrett, T., J. Virology, **71**, 1265-1271 (1997).
90. Kato, A., et al., Genes to Cells, **1**, 569-579 (1996).
91. Shaffer, M.F., et al., J. Immunol., **41**, 241-256 (1941).
92. Enders, J.F., et al., N. Engl. J. Med., **263**, 153-159 (1960).
93. Published International Application No. WO 98/13501.
94. Published International Application No. WO 99/49017.
95. Chomczynski, P., and Sacchi, N., Analytical Biochem., **162**, 156-159 (1987).
96. Parks, C.L., et al., J. Virol., **73**, 3560-3566 (1999).
97. Ausubel, F.M., et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, NY 1987).

10

20

【図面の簡単な説明】

30

【図 1】

A は、トランスフェクションに使用した 4 種のプラスミド発現ベクターを示す。T7 RNA ポリメラーゼ依存性発現ベクター (61) は、MVA/T7 を用いて感染した細胞内でエドモントン野生型 N、P、L、または V 遺伝子の発現を指示するために調製し (62)、B は、pMV107-CAT から誘導されたミニレプリコンを示す (63)。pMV107-CAT 中のエドモントン麻疹ウイルスワクチンリーダー配列を野生型配列に変換した (60)。T7 RNA ポリメラーゼによるミニレプリコンプラスミド DNA の転写は、トランスフェクションされた細胞中に負センス RNA ミニレプリコンコピーを生成し、C は、一過性発現アッセイにおけるミニレプリコン活性に対する V タンパク質発現の効果を証明する CAT アッセイを示す。レーン 1 は、ミニレプリコン発現を作動するために必要なすべてのプラスミドベクター (N、P および L) を用いてトランスフェクションされた細胞から得られた正対照であった。レーン 2 は、L ポリメラーゼベクターを除くすべてのプラスミドを用いて細胞がトランスフェクションされたことを除いて、レーン 1 と同様であった。レーン 3 ~ 7 では、V タンパク質発現ベクターの増加量をトランスフェクション中に包含させた。トランスフェクションされた DNA の全質量は、挿入がないベクター DNA の適当な量を包含させて一定に保った。相対 CAT 活性は、レーン 1 の 100% 活性に基づいて算出した。

40

【図 2】

4 種の異なるモルビリウイルスからの V タンパク質のアミノ酸配列の比較を示す。エドモントン野生型麻疹ウイルス V タンパク質アミノ酸配列 (ジーンバンク受託番号 (Gen

50

e Bank accession number) AF266288) (配列番号1)を
 イヌジステンパーウイルス (AF014963) (配列番号4)、牛痘ウイルス (Z30
 697) (配列番号2)、およびイルカモルビリウイルス (Z47758) (配列番号3
)と比較した。一致性の高いレベルを含む領域は、斜線のあるバーを用いて上部に示しそ
 して保存領域と呼んだ (CR1~CR6)。別の注目すべき配列は、黒バーの下線を付し
 た。これらは、Nタンパク質とのV (およびP) タンパク質相互作用に含まれる領域 (3
 4)、V-Nタンパク質複合体の細胞局在内に含まれる領域 (27、64)、および亜鉛
 結合ドメインを含むシステインに富む領域 (51)を含む。重要な他の領域は、229 -
 234の間の塩基性領域、位置225における麻疹ウイルスワクチンアミノ酸置換 (グル
 タミン酸からグリシンへ) (30) および位置93 - 107の間のロイシンジッパーのロ
 イシン反復領域残存 (65、66)を含む。VおよびPタンパク質に共通の領域はアミノ
 酸1 - 230の間でありそして独自のVタンパク質配列 (太文字のアミノ酸) は231 -
 299の間である。整列した配列の上部に沿って図中に記載したアミノ酸位置は、麻疹ウ
 イルスVタンパク質のものに相当する。

10

【図3】

変異麻疹ウイルスVタンパク質発現ベクターのマップを示す。これらの研究に使用したエ
 ピトープ-タグを付したVタンパク質発現ベクターを図示する。変異Vタンパク質ベクタ
 ーは、Vタンパク質イニシエーターメチオニンの代わりにインフルエンザウイルスHAタ
 グを有するVタンパク質を発現するベクタープラスミド骨格中に生成された (67)。配
 列の重要部分を図の上部のVタンパク質マップに示しそして上記の図2の記載と関連して
 さらに補完して示す。野生型 (haV-wt) および変異タンパク質 (haV1~11)
 をVタンパク質マップの下に示す。HAタグはアミノ末端において斜線棒として示しそし
 て残りのVタンパク質配列を中空の棒で示す。アミノ酸置換はアミノ酸位置およびアミノ
 酸変化と共に黒色点で示す。欠失または末端切除変異体は中断されたVタンパク質マップ
 で示す。

20

【図4】

Aは、Vタンパク質変異体 (haV-1~haV-8、図3の説明参照) の活性をテスト
 する一過性発現実験の結果を示すCATアッセイの形での変異麻疹ウイルスVタンパク質
 によるミニレプリコン抑制を示す。Vタンパク質ベクターの量 (200または400 ng
) および変異体の名称をCATアッセイの下に図4A中に示す。相対活性は、いかなるV
 タンパク質発現ベクターも用いないで行ったトランスフェクションから誘導されたレーン
 2に対する百分率として算出する。レーン1は、Lタンパク質を用いないで行った負対
 照であり、Bは、一過性発現実験でのVタンパク質発現を測定するために行ったウエスタ
 ンブロットを示す。レーン1および2は、Vタンパク質ベクターの非存在でトランスフェ
 クション (レーン1) またはタグがないVタンパク質を発現するVタンパク質ベクターを
 用いてトランスフェクションした細胞から誘導された負対照である。ウエスタンブロット
 は抗-HA抗体を用いてプローブし、Cは、発現ベクターの増加量 (100 ng ~ 1 µg
) を用いるhaV-1によるミニレプリコン抑制の分析を示す。

30

【図5】

麻疹ウイルスタンパク質と関連するRNA結合活性を示す。NP40溶解によりトランス
 フェクションされた細胞から調製した粗細胞性抽出液をポリリボヌクレオチドホモポリマ
 ーに連結したアガロースビーズを用いてRNA結合活性に関して分析した。操作を説明す
 る手順図を図5Aに示す。図5Bは、ポリリボヌクレオチドレジンを上に捕捉されたタンパ
 ク質を試験するために使用したウエスタンブロットを示す。ミニレプリコン実験に使用し
 たと同様の条件を用いて細胞をトランスフェクションした (レーン1~8) が、一部のト
 ランスフェクションにおいて細胞をhaV発現ベクターのみを用いてトランスフェクショ
 ンしたこと (レーン9~12) を除く。レーン1~4は、4種の異なるポリヌクレオチド
 レジンに結合するNタンパク質の分析を示す。レーン5~12は、haVタンパク質への
 結合フラクションの分析を示す。同様に、レーン9~16は、EGTA (EG)、EDTA
 (ED)、または酵母RNA (RNA) の存在下でポリ (G) に結合したVタンパク質

40

50

の分析を示す。

【図 6】

変異麻疹ウイルス V タンパク質による RNA 結合を示す。図 5 に記載のポリリボヌクレオチドホモポリマー結合アッセイを変異麻疹ウイルス V タンパク質の分析のために使用した (h a V 1 ~ 1 1、レーン 3 ~ 1 3、図 3 の説明参照)。この実験において、V 発現ベクターのみを用いて細胞をトランスフェクションした。レーン 1 で試験した細胞抽出液は、エピトープタグを含まない V タンパク質を含む負対照であった。すべての変異タンパク質を試験するためにポリ (G) を使用した。

【図 7】

h a V と呼ばれる野生型麻疹ウイルス V タンパク質の C R 2 (アミノ酸 1 0 0 - 1 4 0) 内のアミノ酸配列 (配列番号 7) と、h a V - 5 と呼ばれるアミノ酸 1 1 3 のチロシンおよびアミノ酸 1 1 4 のアスパラギン酸がアラニンで置換された変異体 (配列番号 8)、h a V - 2 3 と呼ばれるアミノ酸 1 1 2 - 1 3 4 が欠失した変異体 (配列番号 9)、h a V - 2 4 と呼ばれるアミノ酸 1 1 4 のアスパラギン酸およびアミノ酸 1 1 5 のヒスチジンがアラニンで置換されている変異体 (配列番号 1 0)、および h a V - 2 5 と呼ばれるアミノ酸 1 1 3 のチロシン、アミノ酸 1 1 4 のアスパラギン酸およびアミノ酸 1 1 5 のヒスチジンがアラニンで置換された変異体 (配列番号 1 1) との比較を示す。

【図 8】

C A T アッセイにおける図 7 に記載の C R 2 変異の効果を示し、これは一過性発現アッセイにおけるミニレプリコン活性に対する V タンパク質発現の効果を実証する。バー 1 は、ミニレプリコン発現を作動するために必要なすべてのプラスミドベクター (N、P および L) を用いてトランスフェクションされた細胞から得た正対照であった。バー 2 は、h a V をコードする発現ベクターも用いて細胞をトランスフェクションされたことを除いてバー 1 と同様であった。バー 3 ~ 6 では、指定の C R 2 変異体をコードする発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクションした。相対 C A T 活性は、バー 1 の 1 0 0 % 活性に基づいて算出した。

【図 9】

h a V と呼ばれる野生型麻疹ウイルス V タンパク質の C - 末端 (アミノ酸 2 2 0 - 2 9 9) 中のアミノ酸配列 (配列番号 1 2) と、h a V - 1 と呼ばれるアミノ酸 2 3 2 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 1 3)、h a V - 1 2 と呼ばれるアミノ酸 2 5 1 および 2 5 5 のシステインがアラニンで置換された変異体 (配列番号 1 4)、h a V - 1 3 と呼ばれるアミノ酸 2 6 9 および 2 7 2 のシステインがアラニンで置換された変異体 (配列番号 1 5)、h a V - 1 4 と呼ばれるアミノ酸 2 7 9 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 1 6)、h a V - 1 5 と呼ばれるアミノ酸 2 6 7 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 1 7)、h a V - 1 6 と呼ばれるアミノ酸 2 5 0 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 1 8)、h a V - 1 7 と呼ばれるアミノ酸 2 4 3 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 1 9)、h a V - 1 8 と呼ばれるアミノ酸 2 3 6 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 2 0)、h a V - 1 9 と呼ばれるアミノ酸 2 2 9 ~ 2 9 9 が欠失した変異体 (配列番号 2 1)、h a V - 2 0 と呼ばれるアミノ酸 2 3 3 および 2 3 4 のアルギニンがアラニンで置換された変異体 (配列番号 2 2)、h a V - 2 1 と呼ばれるアミノ酸 2 3 3 および 2 3 4 のアルギニンがアスパラギン酸で置換された変異体 (配列番号 2 3)、および h a V - 2 2 と呼ばれるアミノ酸 2 2 9 ~ 2 3 7 が欠失した変異体 (配列番号 2 4) との比較を示す。

【図 1 0】

一過性発現アッセイでのミニレプリコン活性に対する V タンパク質発現の効果を実証する C A T アッセイにおける図 9 に記載の C - 末端変異体の効果を示す。バー 1 は、ミニレプリコン発現を作動するために必要なすべてのプラスミドベクター (N、P および L) を用いてトランスフェクションされた細胞から得た正対照であった。バー 2 は、h a V をコードする発現ベクターも用いて細胞をトランスフェクションしたことを除いて、バー 1 と同様であった。バー 3 ~ 1 4 では、指定の C - 末端変異をコードする発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクションした。相対 C A T 活性は、バー 1 の 1 0 0 % 活性に基づいて

10

20

30

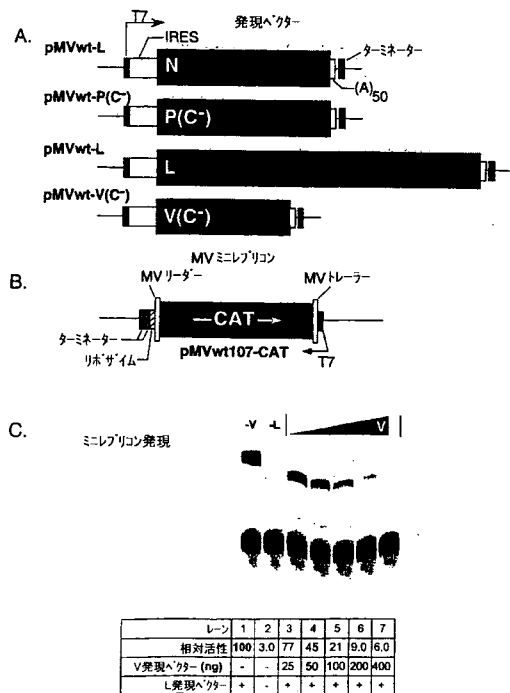
40

50

算出した。

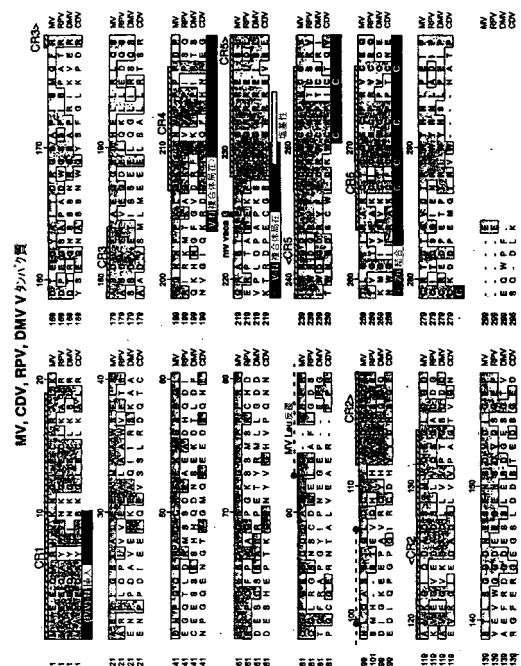
【図 1】

FIGURE 1



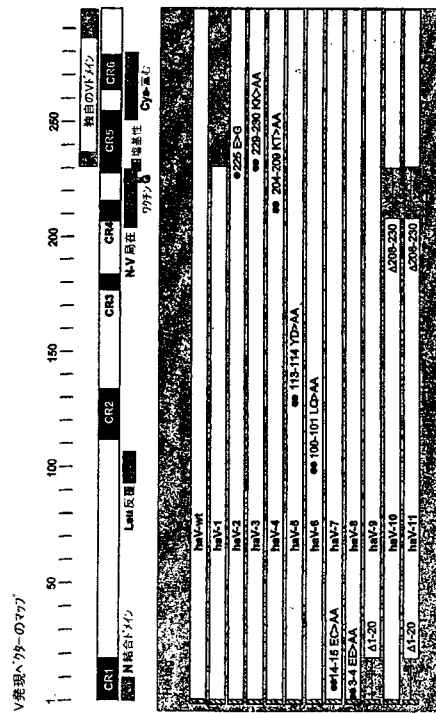
【図 2】

FIGURE 2



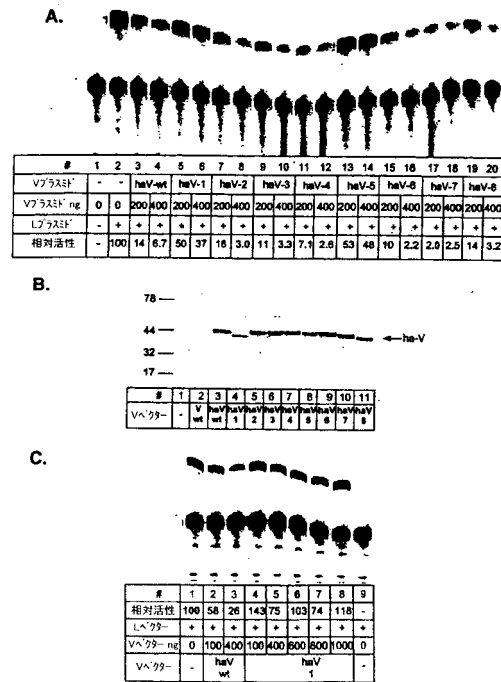
【図 3】

FIGURE 3



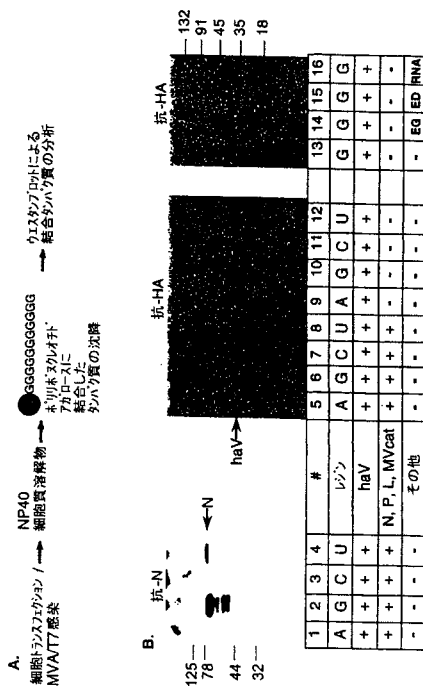
【図 4】

FIGURE 4



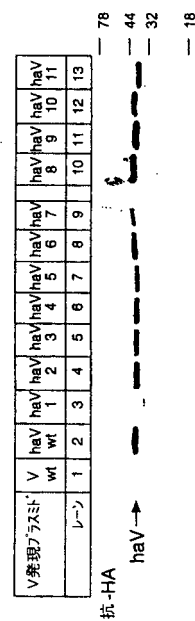
【図 5】

FIGURE 5



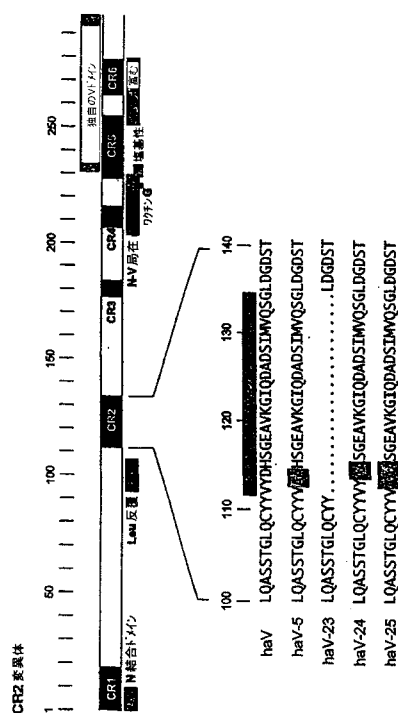
【図 6】

FIGURE 6



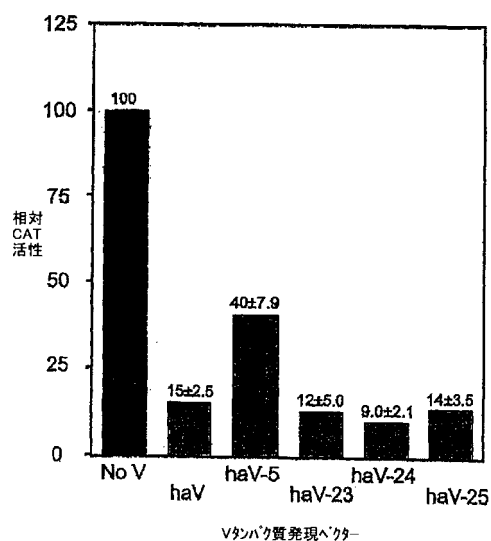
【 圖 7 】

FIGURE 7



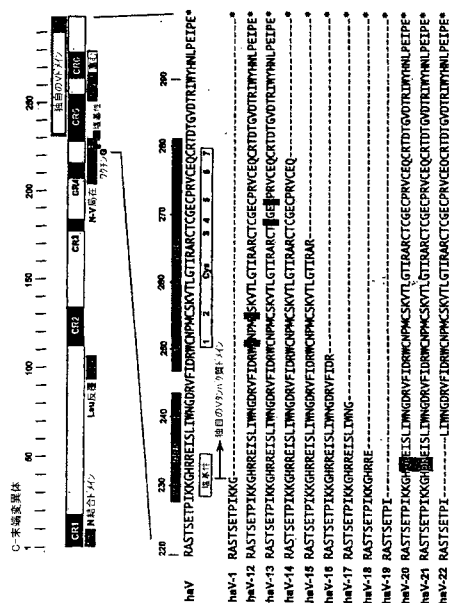
【图 8】

FIGURE 8



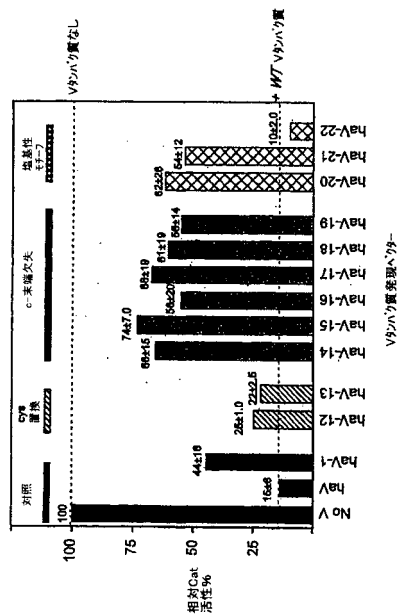
【 図 9 】

FIGURE 9



【 図 1 0 】

FIGURE 10



【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
3 January 2002 (03.01.2002)

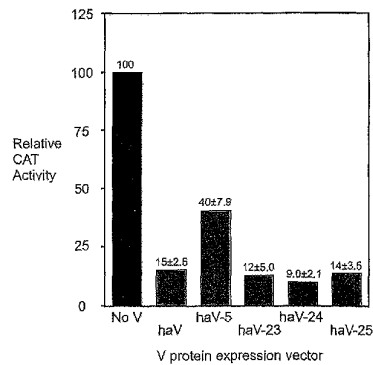
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00694 A2

- (51) International Patent Classification⁷: **C07K 14/12** (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.
- (21) International Application Number: PCT/US01/19806
- (22) International Filing Date: 21 June 2001 (21.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/213,655 23 June 2000 (23.06.2000) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **AMERICAN CYANAMID COMPANY** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (*for US only*): **PARKS, Christopher, L.** [US/US]; 118 South Terrace, Boonton, NJ 07005 (US).
- (74) Agents: **GORDON, Alan, M.**; American Home Products Corporation, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 et al. (US).
- (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

[Continued on next page]

(54) Title: MODIFIED MORBILLIVIRUS V PROTEINS



(57) Abstract: Modified *Morbilliviruses* having at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of the measles virus V protein are described wherein one or both of amino acids 113 or 114 is mutated. Such modified *Morbilliviruses* exhibit reduced repression of gene expression. Additional mutations or deletions in other regions of the genome may be included, including in the carboxy-terminal region.

WO 02/00694 A2

WO 02/00694 A2

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 02/00694

PCT/US01/19806

MODIFIED MORBILLIVIRUS V PROTEINS

Field of the Invention

5 This invention relates to isolated,
recombinantly-generated, negative-sense, single-
stranded RNA viruses of the genus *Morbillivirus* having
one or more mutations and/or deletions which reduce the
repression normally caused by the V protein.

10

Background of the Invention

 Enveloped, negative-sense, single-stranded
RNA viruses are uniquely organized and expressed. The
15 genomic RNA of negative-sense, single-stranded viruses
serves two template functions in the context of a
nucleocapsid: as a template for the synthesis of
messenger RNAs (mRNAs) and as a template for the
synthesis of the antigenome (+) strand. Viral
20 replication occurs after synthesis of the mRNAs and
requires the continuous synthesis of viral proteins.
The newly synthesized antigenome (+) strand serves as
the template for generating further copies of the (-)
strand genomic RNA.

25 The RNA-dependent RNA polymerase complex
actuates and achieves transcription and replication by
engaging the cis-acting signals at the 3' end of the
genome, in particular, the promoter region. Viral
genes are then transcribed from the genome template
30 unidirectionally from its 3' to its 5' end.

 Based on the revised reclassification in 1993
by the International Committee on the Taxonomy of
Viruses, an Order, designated Mononegavirales, has been
established. This Order contains three families of
35 enveloped viruses with single-stranded, nonsegmented
RNA genomes of minus polarity (negative-sense). These

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 2 -

families are the Paramyxoviridae, Rhabdoviridae and
 Filoviridae. The family Paramyxoviridae has been
 further divided into two subfamilies, Paramyxovirinae
 and Pneumovirinae. The subfamily Paramyxovirinae
 5 contains three genera, *Respirovirus* (formerly
Paramyxovirus), *Rubulavirus* and *Morbillivirus*. The
 subfamily Pneumovirinae contains the genus *Pneumovirus*.
 The new classification is based upon morphological
 criteria, the organization of the viral genome,
 10 biological activities and the sequence relatedness of
 the genes and gene products. The current taxonomical
 classification of the *Morbilliviruses* is as follows:

Order Mononegavirales
 15 Family Paramyxoviridae
 Subfamily Paramyxovirinae
 Genus *Morbillivirus*
 Measles virus
 Dolphin morbillivirus
 20 Canine distemper virus
 Peste-des-petits-ruminants virus
 Phocine distemper virus
 Rinderpest virus

25 For many of these viruses, no vaccines of any
 kind are available. Thus, there is a need to develop
 vaccines against such human and animal pathogens. Such
 vaccines would have to elicit a protective immune
 response in the recipient. The qualitative and
 30 quantitative features of such a favorable response are
 extrapolated from those seen in survivors of natural
 virus infection, who, in general, are protected from
 reinfection by the same or highly related viruses for
 some significant duration thereafter.

35 A variety of approaches can be considered in
 seeking to develop such vaccines, including the use of:

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 3 -

(1) purified individual viral protein vaccines (subunit vaccines); (2) inactivated whole virus preparations; and (3) live, attenuated viruses.

5 Subunit vaccines have the desirable feature of being pure, definable and relatively easily produced in abundance by various means, including recombinant DNA expression methods. To date, with the notable exception of hepatitis B surface antigen, viral subunit vaccines have generally only elicited short-lived and/or inadequate immunity, particularly in naive recipients.

10 Formalin inactivated whole virus preparations of polio (IPV) and hepatitis A have proven safe and efficacious. In contrast, immunization with similarly inactivated whole viruses such as respiratory syncytial virus and measles virus vaccines elicited unfavorable immune responses and/or response profiles which predisposed vaccinees to exaggerated or aberrant disease when subsequently confronted with the natural or "wild-type" virus.

20 Appropriately attenuated live derivatives of wild-type viruses offer a distinct advantage as vaccine candidates. As live, replicating agents, they initiate infection in recipients during which viral gene products are expressed, processed and presented in the context of the vaccinee's specific MHC class I and II molecules, eliciting humoral and cell-mediated immune responses, as well as the coordinate cytokine and chemokine patterns, which parallel the protective immune profile of survivors of natural infection.

25 This favorable immune response pattern is contrasted with the delimited responses elicited by inactivated or subunit vaccines, which typically are largely restricted to the humoral immune surveillance arm. Further, the immune response profile elicited by some formalin inactivated whole virus vaccines, e.g.,

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 4 -

measles and respiratory syncytial virus vaccines developed in the 1960's, have not only failed to provide sustained protection, but in fact have led to a predisposition to aberrant, exaggerated, and even fatal illness, when the vaccine recipient later confronted the wild-type virus.

While live, attenuated viruses have highly desirable characteristics as vaccine candidates, they have proven to be difficult to develop. The crux of the difficulty lies in the need to isolate a derivative of the wild-type virus which has lost its disease-producing potential (i.e., virulence), while retaining sufficient replication competence to infect the recipient and elicit the desired immune response profile in adequate abundance.

Historically, this delicate balance between virulence and attenuation has been achieved by serial passage of a wild-type viral isolate through different host tissues or cells under varying growth conditions (such as temperature). This process presumably favors the growth of viral variants (mutants), some of which have the favorable characteristic of attenuation. Occasionally, further attenuation is achieved through chemical mutagenesis as well.

This propagation/passage scheme typically leads to the emergence of virus derivatives which are temperature sensitive, cold-adapted and/or altered in their host range -- one or all of which are changes from the wild-type, disease-causing viruses -- i.e., changes that may be associated with attenuation.

Several live virus vaccines, including those for the prevention of measles and mumps (which are paramyxoviruses), and for protection against polio and rubella (which are positive strand RNA viruses), have been generated by this approach and provide the

- 5 -

mainstay of current childhood immunization regimens throughout the world.

Nevertheless, this means for generating attenuated live virus vaccine candidates is lengthy and, at best, unpredictable, relying largely on the selective outgrowth of those randomly occurring genomic mutants with desirable attenuation characteristics. The resulting viruses may have the desired phenotype *in vitro*, and even appear to be attenuated in animal models. However, all too often they remain either under- or overattenuated in the human or animal host for whom they are intended as vaccine candidates.

Even as to current vaccines in use, there is still a need for more efficacious vaccines. For example, the current measles vaccines provide reasonably good protection. However, recent measles epidemics suggest deficiencies in the efficacy of current vaccines. Despite maternal immunization, high rates of acute measles infection have occurred in children under age one, reflecting the vaccines' inability to induce anti-measles antibody levels comparable to those developed following wild-type measles infection (Bibliography entries 1,2,3). As a result, vaccine-immunized mothers are less able to provide their infants with sufficient transplacentally-derived passive antibodies to protect the newborns beyond the first few months of life.

Acute measles infections in previously immunized adolescents and young adults point to an additional problem. These secondary vaccine failures indicate limitations in the current vaccines' ability to induce and maintain antiviral protection that is both abundant and long-lived (4,5,6). Recently, yet another potential problem was revealed. The hemagglutinin protein of wild-type measles isolated over the past 15 years has shown a progressively

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 6 -

increasing distance from the vaccine strains (7). This "antigenic drift" raises legitimate concerns that the vaccine strains may not contain the ideal antigenic repertoire needed to provide optimal protection. Thus, there is a need for improved vaccines.

Rational vaccine design would be assisted by a better understanding of these viruses, in particular, by the identification of the virally encoded determinants of virulence as well as those genomic changes which are responsible for attenuation.

Because of its significance as a major cause of human morbidity and mortality, measles virus has been quite extensively studied. Measles virus is a large, relatively spherical, enveloped particle composed of two compartments, a lipoprotein membrane and a ribonucleoprotein particle core, each having distinct biological functions (8). The virion envelope is a host cell-derived plasma membrane modified by three virus-specified proteins: The hemagglutinin (H; approximately 80 kilodaltons (kD)) and fusion (F_{1,2}; approximately 60 kD) glycoproteins project on the virion surface and confer host cell attachment and entry capacities to the viral particle (9). Antibodies to H and/or F are considered protective since they neutralize the virus' ability to initiate infection (10,11,12). The matrix (M; approximately 37 kD) protein is the amphipathic protein lining the membrane's inner surface, which is thought to orchestrate virion morphogenesis and thus consummate virus reproduction (13). The virion core contains the 15,894 nucleotide long genomic RNA upon which template activity is conferred by its intimate association with approximately 2600 molecules of the approximately 60 kD nucleocapsid (N) protein (14,15,16). Loosely associated with this approximately one micron long helical ribonucleoprotein particle are enzymatic levels

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 7 -

of the viral RNA-dependent RNA polymerase (L; approximately 240 kD) which in concert with the polymerase cofactor (P; approximately 70 kD), and perhaps yet other virus-specified as well as host-encoded proteins, transcribes and replicates the measles virus genome sequences (17).

The six virion structural proteins of measles virus are encoded by six contiguous, non-overlapping genes which are arrayed as follows: 3'-N-P-M-F-H-L-5'. Two additional measles virus gene products of as yet uncertain function have also been identified. These two nonstructural proteins, known as C (approximately 20 kD) and V (approximately 45 kD), are both encoded by the P gene. The C protein is encoded by a second reading frame within the P mRNA. The V protein is encoded by a cotranscriptionally edited P gene-derived mRNA which encodes a hybrid protein having the amino terminal sequences of P and a zinc finger-like cysteine-rich carboxy terminal domain which is lacking in the P protein (9).

All Morbilliviruses produce a V protein (18), including measles virus, rinderpest virus, canine distemper virus and phocine distemper virus (19). Measles virus V protein is a nonstructural protein encoded by the P gene (8). Like most paramyxoviruses, measles virus encodes multiple proteins from the P gene including V protein, P protein, and C protein (9). Translation of both P and V proteins initiates at the same methionine codon resulting in polypeptides that are identical for the first 230 amino acids. The carboxy-terminus (C-terminus) of V protein differs from P protein because RNA editing occurs in some P gene mRNAs causing a frameshift that results in translation of a shorter, unique V protein C-terminus (18). The C protein amino acid sequence is unrelated to V and P protein because it is translated entirely from a

- 8 -

different reading frame that begins at a downstream translation initiation codon (20).

The P and V mRNAs of measles virus share the same start codon and the first 230 amino acids of the P and V proteins are identical. The V mRNA contains a "G" residue insertion that expands the sequence "GGG" at nucleotides 2496 to 2498 to include a fourth "G" residue. Editing takes place during transcription when an extra non-template-directed "G" residue is inserted between nucleotides 2495 and 2499, causing a shift in the reading frame, whereby the carboxy-terminal 276 amino acids of the P protein are replaced with a 68 amino acid cysteine-rich carboxy-terminus of the V protein.

The function of V protein is not well understood, but all *Morbilliviruses* encode a V protein. This indicates that V protein performs beneficial functions that have made it advantageous for *Morbilliviruses* to conserve the capacity to synthesize V protein. It is known that V protein expression is not essential for viral replication in cultured cells (19,21-25), but in animal model systems expression of V protein seems to influence the severity of infection. For example, Sendai virus (a non-*Morbillivirus* paramyxovirus) normally produces pneumonia in mouse model systems but is less virulent if the infection is performed with a recombinant virus that is defective for V protein expression (22,26). Recombinant human parainfluenza virus type 3 (another non-*Morbillivirus* paramyxovirus) also exhibits an attenuated phenotype in rodents and monkeys if a defect in D protein expression is combined with a defect in the V protein open reading frame (23).

Similarly, results from studies with animal model systems used for measles virus also suggest a role for V protein in pathogenicity. Infection of

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 9 -

cotton rat lungs by recombinant measles virus generates less progeny virus if the infecting virus was defective for V protein expression (27). Also, human thymocyte survival in tissue transplanted in SCID mice was less susceptible to infection with measles virus if the infecting virus did not express V protein (28). Finally, CD46 transgenic mice inoculated intracranially with measles virus had greater rates of survival if the virus did not express V protein (29). The conclusion that measles virus V protein plays a role in pathogenicity also is supported by sequence analyses that have found V protein coding region mutations in less pathogenic variants or vaccine strains (30,31). Taken together, these results support the hypothesis that V protein plays an important role in determining the virulence of measles virus and several other paramyxoviruses.

Although it seems clear that V protein can influence the course of infection, the mechanism behind this phenomenon is not known. Results from a number of studies have begun to assign potential functions to V protein. For example, it has been shown that amino acid sequences shared by V protein and P protein mediate interaction with the viral nucleocapsid (N) protein (27,32-39). This interaction between V protein and N protein seems to affect the cellular distribution of N protein (27,40,41) and probably has some additional unidentified functions. Some V proteins also have been found to interact with cellular proteins (42,43), and in the case of simian virus 5 (SV5), it is possible that interaction with a cellular protein is responsible for inhibition of the interferon signaling pathway during infection (44). In addition to the protein-protein interactions that involve V protein, several studies have linked V protein to control mechanisms that regulate viral gene expression and replication.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 10 -

Sendai virus V protein expression in a transient expression system inhibits defective-interfering (DI) particle replication (45) and similarly inhibits DI particle replication in an *in vitro* transcription reaction (35). Consistent with these observations relating V protein with repression, several viruses defective for V protein expression have been observed to produce elevated levels of genome RNA, mRNA, and viral proteins during infection (21,26,27).

In addition to the properties just described, all of the viral V proteins contain a cysteine-rich C-terminus. The paramyxovirus V proteins do not share a high degree of amino acid similarity, but they all contain seven identically positioned cysteine residues (46). This striking feature has led to speculation (47) that V proteins may actually be zinc-finger proteins or at least form some type of zinc-coordinated secondary structure (48,49,50), and in fact, several V proteins have been found to bind zinc (51,52,53). The possibility that V protein forms a zinc-coordinated structure generates considerable interest because these types of structures often form protein domains that are involved in nucleic acid interaction or protein-protein interaction (48,49,50). It is also noteworthy that a recombinant Sendai virus that expresses a truncated V protein lacking the unique C-terminal region also is less pathogenic, suggesting that the role of V protein in pathogenicity requires this domain (24).

In addition to the sequences encoding the virus-specified proteins, the measles virus genome contains distinctive non-protein coding domains resembling those directing the transcriptional and replicative pathways of related viruses (9,54). These regulatory signals lie at the 3' and 5' ends of the measles virus genome and in short internal regions spanning each intercistronic boundary. The former

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 11 -

5 encode the putative promoter and/or regulatory sequence elements directing genomic transcription, genome and antigenome encapsidation, and replication. The latter signal transcription termination and polyadenylation of each monocistronic viral mRNA and then reinitiation of transcription of the next gene. In general, the measles virus polymerase complex appears to respond to these signals much as the RNA-dependent RNA polymerases of other non-segmented negative strand RNA viruses (9,54,55,56). Transcription initiates at or near the 3' end of the measles virus genome and then proceeds in a 5' direction producing monocistronic mRNAs (16,54,57).

15 Measles virus appears to have extended its terminal regulatory domains beyond the confines of leader and trailer encoding sequences (54). For measles, these regions encompass the 107 3' genomic nucleotides (the "3' genomic promoter region", also referred to as the "extended promoter", which comprises 20 52 nucleotides encoding the leader region, followed by three intergenic nucleotides, and 52 nucleotides encoding the 5' untranslated region of N mRNA) and the 109 5' end nucleotides (69 encoding the 3' untranslated region of L mRNA, the intergenic trinucleotide and 37 nucleotides encoding the trailer). Within these 3' 25 terminal approximately 100 nucleotides of both the genome and antigenome are two short regions of shared nucleotide sequence: 14 of 16 nucleotides at the absolute 3' ends of the genome and antigenome are 30 identical. Internal to those termini, an additional region of 12 nucleotides of absolute sequence identity have been located. Their position at and near the sites at which the transcription of the measles virus genome must initiate and replication of the antigenome must begin, suggests that these short unique sequence 35 domains encompass an extended promoter region.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 12 -

These discrete sequence elements may dictate alternative sites of transcription initiation -- the internal domain mandating transcription initiation at the N gene start site, and the 3' terminal domain directing antigenome production (54,58,59). In addition to their regulatory role as cis-acting determinants of transcription and replication, these 3' extended genomic and antigenomic promoter regions encode the nascent 5' ends of antigenome and genome RNAs, respectively. Within these nascent RNAs reside as yet unidentified signals for N protein nucleation, another key regulatory element required for nucleocapsid template formation and consequently for amplification of transcription and replication.

In all *Morbilliviruses*, the cis-acting signals required for essential viral functions, including replication, transcription and encapsidation are contained in the non-coding genomic termini. The obligatory trans-acting elements for functionality are contained in the N, P and L genes. Additional transacting factors, such as the V and C proteins, may modulate functionality. Mutations in any of these regions may result in alteration of vital functions, including attenuation of viral transcription/- replication efficiency.

The apparent connection between V protein expression and pathogenicity, and continuing interest in vaccine attenuation (30,60) has led to a need to examine measles virus V protein function in more detail. In particular, there is a need to utilize transient expression systems to study several V protein properties including V protein repression activity, the interaction of V protein with N protein, and the ability of V protein to bind RNA.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 13 -

Summary of the Invention

Accordingly, it is an object of this invention to identify regions of the genomes of *Morbilliviruses* responsible for the repression of gene expression by the V protein of those viruses. It is a further object of this invention to generate mutant versions of the V protein of *Morbilliviruses* in which the repression of gene expression is reduced. It is a still further object of this invention to generate recombinantly-generated *Morbilliviruses* containing one or more of such mutations. It is yet another object of this invention to formulate vaccines or immunogenic compositions containing such recombinantly-generated *Morbilliviruses*. In one embodiment of the invention, the V protein is from measles virus.

These and other objects of the invention as discussed below are achieved for *Morbilliviruses* by modifying the region corresponding to amino acids 112-134 (conserved region 2; see Figure 2) of the V protein of these *Morbilliviruses*, wherein one or both of amino acids 113 (a tyrosine) and 114 (asparatic acid) is mutated. In one embodiment of the invention, these amino acids are mutated to alanine.

A further modification of the V protein may be made by mutating or deleting at least a portion of the carboxy-terminal (C-terminal) region of the *Morbillivirus* V protein, corresponding to amino acids 231-299 of the V protein of measles virus, canine distemper virus and dolphin morbillivirus, and to amino acids 231-303 of the rinderpest virus.

These modifications have the effect of reducing the repression of gene expression by the V protein in a minireplicon system. The results are extended readily to the recovery of full-length

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 14 -

infectious *Morbilliviruses* by the use of the "rescue" system known in the art and described below.

Measles virus minireplicon with chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene expression in transient assays was strongly repressed by V protein. Repression activity was diminished by amino acid substitution in a region located in the amino terminal third of the protein between amino acids 112-134, as well as by mutating or deleting at least a portion of the cysteine-rich C-terminal region of V protein (amino acids 231-299).

In the case of measles virus, the mutations described above may be further combined with mutations which are attenuating, as follows:

- (1) at least one attenuating mutation in the 3' genomic promoter region selected from the group consisting of nucleotide 26 (A → T), nucleotide 42 (A → T or A → C) and nucleotide 96 (G → A), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, message sense;
- (2) at least one attenuating mutation in the RNA polymerase gene selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 331 (isoleucine → threonine), 1409 (alanine → threonine), 1624 (threonine → alanine), 1649 (arginine → methionine), 1717 (aspartic acid → alanine), 1936 (histidine → tyrosine), 2074 (glutamine → arginine) and 2114 (arginine → lysine);
- (3) for the N gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 129

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 15 -

(glutamine → lysine), 148 (glutamic acid → glycine) and 479 (serine → threonine);

5 (4) for the P gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 225 (glutamic acid → glycine), 275 (cysteine → tyrosine) and 439 (leucine → proline);

10 (5) for the C gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 73 (alanine → valine), 104 (methionine → threonine) and 134 (serine → tyrosine); and

15 (6) for the F gene-end signal (the cis-acting transcription termination signal), the change at nucleotide 7243 (T → C), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, that is, message (coding) sense.

20 In another embodiment of this invention, these mutant *Morbilliviruses* are used to prepare vaccines or immunogenic compositions which elicit a protective immune response against the wild-type form of each virus.

25 In a further embodiment of this invention, there is described a method for reducing the repression caused by a V protein of *Morbilliviruses* which comprises inserting at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region
30 corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 16 -

In still another embodiment of this invention, there is described an isolated nucleotide sequence encoding a *Morbilliviruses* V protein which has been modified by inserting at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114.

In yet another embodiment of this invention, there is provided a composition which comprises a transcription vector comprising an isolated nucleic acid molecule encoding a genome or antigenome of a *Morbillivirus*, wherein the portion of the isolated nucleic acid molecule encoding the V protein has been modified so as to insert at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114, together with at least one expression vector which comprises at least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting proteins N, P and L necessary for encapsidation, transcription and replication, whereby host cells are transformed, infected or transfected with these vectors and cultured under conditions which permit the co-expression of these vectors so as to produce the desired *Morbillivirus*. Each such virus is then used to prepare vaccines or immunogenic compositions which elicit a protective immune response against the wild-type form of each virus.

- 17 -

Brief Description of the Figures

Figure 1A depicts the four plasmid expression vectors used for transfections. T7 RNA polymerase-dependent expression vectors (61) were prepared to direct expression of Edmonston wild-type N, P, L, or V genes in cells infected with MVA/T7 (62).

Figure 1B depicts the minireplicon which was derived from pMV107-CAT (63). The Edmonston measles virus vaccine leader sequence in pMV107-CAT was converted to the wild-type sequence (60). Transcription of the minireplicon plasmid DNA by T7 RNA polymerase generated a negative-sense RNA minireplicon copy in transfected cells.

Figure 1C depicts a CAT assay that demonstrated the effect of V protein expression on minireplicon activity in a transient expression assay. Lane 1 was the positive control obtained from cells that were transfected with all plasmid vectors (N, P and L) necessary to drive minireplicon expression. Lane 2 was identical to lane 1, except that the cells were transfected with all plasmids except the L polymerase vector. In lanes 3 through 7, increasing amounts of V protein expression vector was included in the transfection. The total mass of transfected DNA was held constant by including the appropriate amount of vector DNA without an insert. Relative CAT activity was calculated based on 100% activity in lane 1.

Figure 2 depicts a comparison of the amino acid sequences of V proteins from four different Morbilliviruses. Edmonston wild-type measles virus V protein amino acid sequence (Gene Bank accession number AF266288) (SEQ ID NO:1) was compared to canine distemper virus (AF014953) (SEQ ID NO:4), rinderpest virus (Z30697) (SEQ ID NO:2), and dolphin morbillivirus (Z47758) (SEQ ID NO:3). Regions containing higher

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 18 -

levels of identity are overlined with a cross-hatched bar and designated as conserved regions (CR1 through CR6). Additional notable sequences are underlined with a black bar. These include regions involved in the V (and P) protein interaction with N protein (34), a region involved in the cellular localization of the V-N protein complex (27,64), and the cysteine-rich region that contains the zinc-binding domain (51). Other sequences of interest include a basic region between 229-234, a measles virus vaccine amino acid substitution (glutamic acid to glycine) at position 225 (30), and a leucine repeat region reminiscent of a leucine zipper between positions 93-107 (65,66). The region common to V and P protein extends from amino acid 1-230 and the unique V protein sequences (bold amino acid letters) extend from 231-299. The amino acid positions given in the Figure along the top of the aligned sequences correspond to those of the measles virus V protein.

Figure 3 depicts a map of mutant measles virus V protein expression vectors. The epitope-tagged V protein expression vectors used in these studies are shown diagrammatically. Mutant V protein vectors were generated in a vector plasmid backbone that expressed V protein with an influenza virus HA tag (67) in place of the V protein initiator methionine. Sequence highlights are shown on a V protein map at the top of the Figure and are described more fully with respect to the description of Figure 2 above. Wild-type (haV-wt) and mutant proteins (haV1-11) are illustrated below the V protein map. The HA tag is drawn as a crosshatched box at the amino-terminus and the remaining V protein sequence is drawn as an open box. Amino acid substitutions are indicated as black dots along with amino acid positions and amino acid changes. Deletion or truncation mutants are drawn with an interrupted V protein map.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 19 -

Figure 4A depicts minireplicon repression by mutant measles virus V proteins, in the form of a CAT assay showing the results of a transient expression experiment testing the activity of V protein mutants (haV-1 to haV-8; see description for Figure 3). The amount of V protein vector (200 or 400ng) and the identity of the mutants are shown in Figure 4A below the CAT assay. Relative activity is calculated as a percentage of the lane 2 that was derived from a transfection performed without any V protein expression vector. Lane 1 was a negative control performed without L protein.

Figure 4B depicts a Western blot performed to monitor V protein expression in transient expression experiments. Lanes 1 and 2 are negative controls derived from cells transfected in the absence of a V protein vector (lane 1) or transfected with a V protein vector that expresses a V protein without a tag. The Western blot was probed with anti-HA antibody.

Figure 4C depicts an analysis of minireplicon repression by haV-1 using increasing amounts (100 ng to 1 μ g) of the expression vector.

Figure 5 depicts the RNA binding activity associated with measles virus V protein. Crude cytoplasmic extracts prepared from transfected cells by NP40 lysis were analyzed for RNA binding activity using agarose beads linked to polyribonucleotide homopolymers. A flow diagram illustrating the procedure is shown in Figure 5A. Figure 5B depicts Western blots used to examine proteins captured on the polyribonucleotide resins. Cells were transfected using the same conditions as used for minireplicon experiments (lanes 1-8), except that in some transfections the cells were transfected only with haV expression vector (lanes 9-12). Lanes 1-4 depict an analysis of N protein binding to the four different

- 20 -

polynucleotide resins. Lanes 5-12 depict an analysis of the bound fraction for haV protein. Similarly, lanes 9-16 depict an analysis of V protein that bound to poly(G) in the presence of EGTA (EG), EDTA (ED), or yeast RNA (RNA).

Figure 6 depicts RNA binding by mutant measles virus V proteins. The polyribonucleotide homopolymer binding assay described in Figure 5 was used for analysis of mutant measles virus V proteins (haV 1-11, lanes 3-13; see description for Figure 3). In this experiment, the cells were transfected with only V expression vectors. The cell extract examined in lane 1 was a negative control that contained V protein that did not contain an epitope tag. Poly(G) was used to test all of the mutant proteins.

Figure 7 depicts a comparison of the amino acid sequences in CR2 (amino acids 100-140) for wild-type measles virus V protein, designated haV (SEQ ID NO:7); a mutant where the tyrosine at amino acid 113 and the aspartic acid at amino acid 114 are substituted with alanines, designated haV-5 (SEQ ID NO:8); a mutant where amino acids 112-134 are deleted, designated haV-23 (SEQ ID NO:9); a mutant where the aspartic acid at amino acid 114 and the histidine at amino acid 115 are substituted with alanines, designated haV-24 (SEQ ID NO:10); and a mutant where the tyrosine at amino acid 113, the aspartic acid at amino acid 114 and the histidine at amino acid 115 are substituted with alanines, designated haV-25 (SEQ ID NO:11).

Figure 8 depicts the effect of the CR2 mutations described in Figure 7 in a CAT assay that demonstrated the effect of V protein expression on minireplicon activity in a transient expression assay. Bar 1 was the positive control obtained from cells that were transfected with all plasmid vectors (N, P and L) necessary to drive minireplicon expression. Bar 2 was

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 21 -

identical to bar 1, except that the cells were also transfected with an expression vector encoding haV; in bars 3-6, the cells were transfected with expression vectors encoding the indicated CR2 mutations. Relative CAT activity was calculated based on 100% activity in bar 1.

Figure 9 depicts a comparison of the amino acid sequences in the C-terminus (amino acids 220-299) for wild-type measles virus V protein, designated haV (SEQ ID NO:12); a mutant where amino acids 232-299 are deleted, designated haV-1 (SEQ ID NO:13); a mutant where the cysteines at amino acids 251 and 255 are substituted with alanines, designated haV-12 (SEQ ID NO:14); a mutant where the cysteines at amino acids 269 and 272 are substituted with alanines, designated haV-13 (SEQ ID NO:15); a mutant where amino acids 279-299 are deleted, designated haV-14 (SEQ ID NO:16); a mutant where amino acids 267-299 are deleted, designated haV-15 (SEQ ID NO:17); a mutant where amino acids 250-299 are deleted, designated haV-16 (SEQ ID NO:18); a mutant where amino acids 243-299 are deleted, designated haV-17 (SEQ ID NO:19); a mutant where amino acids 236-299 are deleted, designated haV-18 (SEQ ID NO:20); a mutant where amino acids 229-299 are deleted, designated haV-19 (SEQ ID NO:21); a mutant where the arginines at amino acids 233 and 234 are substituted with alanines, designated haV-20 (SEQ ID NO:22); a mutant where the arginines at amino acids 233 and 234 are each substituted with aspartic acid, designated haV-21 (SEQ ID NO:23); and a mutant where amino acids 229-237 are deleted, designated haV-22 (SEQ ID NO:24).

Figure 10 depicts the effect of the C-terminal mutations described in Figure 9 in a CAT assay that demonstrated the effect of V protein expression on minireplicon activity in a transient expression assay. Bar 1 was the positive control

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 22 -

obtained from cells that were transfected with all plasmid vectors (N, P and L) necessary to drive minireplicon expression. Bar 2 was identical to bar 1, except that the cells were also transfected with an expression vector encoding haV; in bars 3-14, the cells were transfected with expression vectors encoding the indicated C-terminal mutations. Relative CAT activity was calculated based on 100% activity in bar 1.

Detailed Description of the Invention

Although exemplified with measles virus, the invention is also applicable to other *Morbilliviruses*, including but not limited to canine distemper virus and rinderpest virus.

A consideration of the potential connection between measles virus attenuation and mechanisms involved in the control of gene expression and replication (30,60) led to the analysis of the V protein. V protein expression has been linked to viral pathogenicity (22,23,26-29) and also to control of gene expression and replication (21,26,27,35,45). The goal was to further analyze the effect of V protein on measles virus gene expression.

Before constructing mutant V protein expression vectors, the amino acid similarity between V proteins from several different *Morbilliviruses* was examined (Figure 2). Regions of high amino acid identity may contain important functional domains, and that one or more of these conserved regions (CR) may participate in minireplicon repression. Alignment of V proteins from Edmonston wild-type measles virus, rinderpest virus, dolphin morbillivirus, and canine distemper virus revealed several conserved regions of notable sequence identity designated CR1-6 (shown in

- 23 -

Figure 2), in addition to confirming earlier observations (46) that the C-terminus contained seven cysteine residues spaced identically among the Morbilliviruses. Several of the CRs were targeted while generating mutant V protein vectors.

In addition to identifying regions containing high levels of identity, computer analysis was used to search for potential functional motifs and the literature was examined for additional clues concerning the possible location of potential measles virus V protein functional domains. The results of these analyses are illustrated on the alignment in Figure 2. Several studies have located regions of V and P protein that influence the interaction with N protein. The extreme amino terminus (N-terminus) of V and P protein, located within CR1, contains sequences that mediate interaction with N protein (34) (Figure 2) in a two-hybrid assay. Additional sequences involved in the V-N protein-protein interaction have been located between amino acids 204 to 230 (27,64) which encompasses CR4. The measles virus V protein zinc-binding domain (51) is in the C-terminus and probably requires at least several of the cysteine residues found in CR5 and CR6. At the N-terminal end of the cysteine-rich domain there is a well-conserved region containing basic amino acids (229-234) that is part of CR5. Near the same region (amino acid 225) in the measles virus V protein is an amino acid substitution found in Edmonston vaccine strains (wild-type glutamic acid to glycine (30)). Finally, in measles virus V protein there was a leucine repeat (amino acids 93-107) that was reminiscent of a leucine zipper motif (65,66). A number of these domains and motifs were attractive candidates for further study using the minireplicon system and V protein mutant expression vectors.

- 24 -

In addition to preparing a V protein expression vector (Figure 1A), T7 expression plasmids were prepared for the three basic replication apparatus components including Edmonston wild-type N, P and L proteins. To eliminate any potential confusion due to C protein expression from the downstream translation initiation codon in the P and V protein vectors, the C protein open reading frame was modified to prevent translation of C protein. The C protein ATG codon was converted to ACG and the second codon in the C protein open reading frame was converted to a stop codon (TCA to TAA). These modifications were silent with respect to P and V proteins.

Indications that V protein may be involved in regulating measles virus mRNA transcription and genome replication (21,26,27,35,45) suggested an experiment to test whether a minireplicon system would respond to V protein expression. The minireplicon system was set up with Edmonston wild-type components so that V gene mutations that affect wild-type V protein function could be assessed, and potentially apply these findings to future genetic studies of virus attenuation using recombinant wild-type virus. The Edmonston wild-type measles virus-minireplicon (Figure 1B, pMVwt107-CAT) was derived from the p107MV-CAT minireplicon (63) by converting the vaccine leader sequence in pMV107-CAT to the Edmonston wild-type leader sequence (60).

To determine if the wild-type components were capable of driving detectable minireplicon expression, HEp2 cells were transfected with minireplicon DNA and N, P and L protein expression vectors while simultaneously infecting with MVA/T7 (62) to provide T7 RNA polymerase. At 48 hours after transfection, cells were harvested and cell extracts were analyzed for CAT activity. The Edmonston wild-type minireplicon system readily produced CAT activity over background levels

- 25 -

produced in negative controls that were transfected with all DNAs except the L polymerase protein expression vector (Figure 1C, lanes 1 and 2, and data not shown). This indicated that the CAT activity produced during the transient expression assay was specific and was dependent upon an intact measles virus replication apparatus.

The minireplicon system was then used to determine whether expression of V protein had a detectable effect on minireplicon expression in a transient expression assay. Minireplicon assay transfections were performed with increasing amounts of V protein expression vector. The overall mass of DNA transfected was held constant by including the appropriate amount of expression vector lacking an insert. The effect of increasing the amount of V protein expression vector from 0 to 400 ng is shown in Figure 1C. The positive control in lane 1 showed the amount of CAT activity obtained in the absence of V protein expression (Figure 1C, lane 1). Lane 2 was a negative control that showed that CAT activity was undetectable when the L protein expression vector was omitted. Lanes 3-7 illustrate the negative effect of increasing amounts of V protein expression. Repression of CAT activity was evident at even the lowest amounts of V protein expression vector (lanes 3 and 4) and was very strong at higher amounts, virtually eliminating detectable minireplicon expression when 400 ng of V protein expression plasmid was transfected (lane 7). The two-fold increases in V protein expression vector used in lanes 3-7 also correlated well with observed decreases in relative CAT activity. These results clearly show that one aspect of V protein function can be observed with a minireplicon assay. This readily-detectable negative effect of V protein expression in a minireplicon assay provided a convenient format to

- 26 -

further examine the minireplicon repression phenotype of V protein mutants.

To begin analyzing V protein mutants, the V protein expression vector (Figure 1A) was modified to include an epitope tag at the amino-terminus of V protein (pMV-haV-wt; Figure 3). This was done to facilitate Western blot detection of protein in lysates from transfected cells and to allow a relative comparison of the stability and steady-state levels of mutant V proteins. The initiator methionine codon of the wild-type V protein expression vector was replaced with the influenza hemagglutinin (HA) epitope tag (67). This modified V protein vector (pMV-haV-wt) also retained the base substitutions that prevent expression of C protein. Testing pMV-haV-wt in minireplicon experiments revealed that the presence of the N-terminal HA tag had no detectable effect on the ability of V protein to repress minireplicon activity (Figure 4, lanes 1-4, and data not shown).

The first series of mutations introduced into pMV-haV-wt was directed at some of the sequence motifs illustrated in Figure 2. One of these mutations resulted in a truncated V protein that lacked the unique V protein C-terminus containing the cysteine residues (amino acids 231-299 were deleted) (Figure 3, pMV-haV-1). Plasmid pMV-haV-2 converted the wild-type V coding sequence to the Edmonston vaccine sequence (amino acid codon 225; glutamic acid to glycine). The remaining six mutations (pMV-haV numbers 3-8) were amino acid substitutions directed at some of the CRs. Initially, amino acid substitutions were introduced in an attempt to alter the function of specific domains in V protein without grossly altering the protein structure. Using a strategy suggested by the charge-to-alanine approach (68,69,70), mutations were introduced that primarily targeted two consecutive

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 27 -

amino acid codons that specified charged or polar amino acid residues and converted them to codons encoding alanine.

Although this invention is exemplified by mutants having alanines rather than the wild-type residues, other nonconservative mutations of the wild-type residues are also within the scope of this invention. For example, aspartic acid is an acidic (negatively charged) molecule. Therefore, a nonconservative mutation will be one in which a substitution is made to an amino acid other than glutamic acid, which is also an acidic molecule. Suitable alternative amino acids include the amino acids lysine, histidine and arginine which are basic (positively charged) molecules. Suitable alternative amino acids further include the amino acids with nonpolar functional groups such as alanine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan and valine, and the amino acids with uncharged polar functional groups such as asparagine, cysteine, glutamine, glycine, serine, threonine and tyrosine.

Similarly, tyrosine is an uncharged polar molecule. Therefore, a nonconservative mutation will be one in which a substitution is made to an amino acid other than asparagine, cysteine, glutamine, glycine, serine and threonine, which are also uncharged polar molecules. Suitable alternative amino acids include the amino acids lysine, histidine and arginine which are basic (positively charged) molecules. Suitable alternative amino acids further include the amino acids with nonpolar functional groups such as alanine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tryptophan and valine, and the amino acids with acidic (negatively charged) functional groups such as aspartic acid and glutamic acid.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 28 -

Analysis of the mutant V protein vectors 1 to 8 in a minireplicon assay is shown in Figure 4A. The results indicate that two vectors (pMV-haV-1 and pMV-haV-5) had diminished ability to repress minireplicon activity. One mutant (haV-1) was a deletion mutant that lacked the unique C-terminus of V protein (amino acids 231-299); the second mutant (haV-5) contained substitution mutations at amino acids 113 and 114 (located in CR2; see Figure 2). This suggested that this function could be partially mediated independently by CR2 and the C-terminus. Like the C-terminal truncation mutant, the CR2 mutant also retained residual repression activity.

Lanes 1 and 2 on Figure 4A contained control samples. The transfection analyzed in Lane 1 lacked the L protein expression vector and revealed a low level of background CAT activity. The positive control in lane 2 showed the maximal activity observed in the absence of V protein. Repression mediated by 200 and 400 ng of wild-type V protein vector containing the HA tag (pMV-haV-wt) is shown in lanes 3 and 4. As described above, the N-terminal HA tag had little effect on the ability of V protein to repress the minireplicon, and in this experiment, 200 and 400 ng of haV-wt vector repressed minireplicon activity by about 7 and 16 fold, respectively. Most of the mutants repressed CAT activity nearly as effectively as the haV-wt vector, by reducing CAT activity to 20% or less (lanes 3, 7, 9, 11, 15, 17, 19) of the control activity (lane 2), when 200 ng of V protein vector was transfected. Two V protein vectors (pMV-haV-1, lanes 5 and 6; pMV-haV-5, lanes 13 and 14) were noticeably less effective at repressing minireplicon activity in this and repeat experiments. Plasmid pMV-haV-1 lacked the cysteine-rich V protein C-terminus, while pMV-haV-5

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 29 -

contained a double alanine substitution in CR2 (amino acids 113-114).

Both domains implicated in repression have interesting features. The C-terminus includes the zinc-binding domain and also contains an RNA binding domain (Figure 5). The primary amino acid sequence of CR2 is noteworthy because computer models predict that a small cluster of charged residues may be positioned along one face of a proposed alpha helix (residues 114 D, 118 E, 121 K, 125 D). Thus, CR2 is potentially an amphipathic alpha helix similar to sequences that have been observed in some transcription factors (71).

The repression activity associated with CR2 also is interesting because this amino acid sequence is present in both the V and P proteins. The essential roles played by P protein as polymerase subunit and nucleocapsid assembly factor (72) are quite distinct from the nonessential role of V protein in repression. Yet, these two proteins share a significant amount of amino acid sequence. CR2 may be a site of protein-protein interaction that functions differently in the context of V and P. Without being bound by theory, it may also be possible that the unique C-terminus of V protein imparts a tertiary structure to V protein that exposes CR2, in turn allowing it to function as a repressor domain, while in P protein this domain is sequestered.

To determine if the reduction in repression caused by mutant haV-1 or haV-5 simply correlated with poor protein expression, a Western blot was performed using anti-HA antibody to estimate the relative abundance of V protein in transfected cells (Figure 4B). Cells for this experiment were transfected exactly as performed during minireplicon experiments, so that the cells contained N, P and L proteins as well as V protein. Tagged V proteins were detectable in all

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 30 -

transfected-cell extracts except for two negative controls. No V protein vector was transfected in cells used to make extract analyzed in lane 1, and in lane 2, the cells were transfected with the vector encoding the V protein that does not include an epitope tag. The protein detected in lane 3 was the HA-tagged wild-type V protein. The protein in lane 4 was the truncation mutant that lacked the C-terminus and its mobility was noticeably altered. The remaining proteins were mutants (as described above) that contained amino acid substitutions (Figure 4B, lanes 5-11). Several of these proteins had small but noticeable mobility changes in this 12% polyacrylamide gel (for example, lanes 10 and 11). However, this was not unexpected, since charged and polar residues were replaced by alanines in these proteins. The relative abundance of all the proteins was judged to be quite similar, except that haV-1 (lane 4) was lower in this experiment and this was reproducible in repeat experiments. This suggested that the reduced repression activity of haV-1 may result from lower proteins levels, while the reduced repression activity of haV-5 was not caused by an unstable protein.

To further examine the possibility that haV-1 repressed poorly simply because it was unstable, a minireplicon assay was performed with increasing amounts of V protein vector to help supplement the intracellular quantity of haV-1 protein (Figure 4C). This minireplicon experiment was performed as described above, except that the maximum amount of V protein vector was increased from 400ng to 1 μ g. The mass of DNA was held constant in all transfections by including the appropriate quantity of vector backbone DNA (lacking insert). Figure 4C, lane 1, was the positive control that was performed without added V protein vector. Lanes 2 and 3 show the effect of adding wild-

- 31 -

type ha-V vector at 100 (lane 2) and 400 (lane 3) ng, which reduced activity in this experiment to 58% and 26%, respectively. Addition of increasing amounts of haV-1 had little effect on the activity of MV-CAT and no obvious trend was observed for correlating increasing mass of haV-1 vector with greater levels of repression. This suggested that the diminished repression activity of haV-1 was not simply due to reduced intracellular protein levels and was instead an effect of the loss of the C-terminus.

A region containing a high content of basic amino acids in the N-terminal third of the SV5 V protein mediates RNA binding (73). A homologous region is not apparent in measles virus V protein (73), but the possibility was examined that measles virus V protein may also bind RNA through the zinc finger-like sequences in the C-terminus (Figure 5).

To assess the RNA binding activity of V protein, a polyribonucleotide homopolymer binding assay was used (Figure 5A) that has been used successfully to study several cellular RNA binding proteins (74-77). A number of RNA binding proteins display characteristic affinity for polyribonucleotide homopolymers. For example, the cellular hnRNP U protein binds with relatively high affinity to poly(G) and poly(U,) but binds little if at all to poly(A) or poly(C) (75). This concept was used to determine if V protein in transfected cell extracts could be captured on homopolymer resins. Cells were transfected with all of the expression vectors (N, P, L, V and minireplicon) used in the minireplicon transfection and were then infected with MVA/T7. Cytoplasmic cell lysates were prepared 48 hours later and incubated for 30-60 minutes at 4°C with agarose beads linked to one of the four polyribonucleotide homopolymers. The beads were collected by centrifugation, then resuspended and

- 32 -

washed three times in cell lysis buffer. The bound proteins were eluted from the beads by boiling in SDS-gel loading buffer.

Initially, to test the assay, the ability to capture a known RNA binding protein expressed from a transfected plasmid was examined. Accordingly, proteins eluted from the four different resins were analyzed by Western Blot using monoclonal antibody specific for N protein (Figure 5B). N protein was detected readily in samples bound to poly(G) and poly(U) (lanes 2 and 4). The amount of N protein bound to poly(G) was generally greater in this assay and several repeat experiments. Little or no N protein was captured with poly(A) or poly(C).

The experiment was repeated as described above to analyze the ability of haV protein to interact with the homopolymer resins (Figure 5B, lanes 5-8). Analysis of a Western blot with anti-HA antibody revealed results that were similar to the results obtained after analysis of N protein (Figure 5B, lanes 1-4). The poly(G) and poly(U) resins both displayed affinity for haV (lanes 6 and 8). V protein bound best to poly(G) and more weakly to poly(U), while binding poorly to poly(A) or poly(C). In some experiments, a very weak band was seen, indicating a low affinity interaction with poly(A); however, usually this interaction is undetectable.

The fact that V protein bound readily to poly(G) and poly(U) and not well to poly(A) and poly(C) indicated that the assay was not simply measuring affinity for polyanion resins, and also showed that V protein demonstrated a preference for two polynucleotides. Both V protein and N protein preferred poly(G) and poly(U) (Figure 5); this is a feature displayed by a number of cellular RNA binding proteins (74,76,77).

- 33 -

The fact that the binding profile of haV protein was quite similar to N protein raised the possibility that V protein was captured indirectly on poly(G) and poly(U) resins through interaction with N protein, rather than a direct interaction with RNA. To examine this possibility, cells were transfected only with the haV protein expression vector and cell extracts were prepared and treated as described above. Analysis by Western blot showed that haV protein (Figure 5B, lanes 9-12) was again bound to poly(G) and poly(U). This indicated that the interaction of V protein with homopolymer resins required no other viral protein. In fact, in the absence of other viral proteins, greater quantities of V protein were usually bound to poly(G) and poly(U) (compare lanes 6 to 10 and 8 to 12). This suggested that one of the other viral proteins may slightly interfere with the interaction between V protein and the polyribonucleotides.

A limited analysis of conditions that influence the binding of haV to poly(G) was also performed (Figure 5B, lanes 13-16). Addition of 10 mM EGTA or EDTA (lanes 14 and 15) to the binding reaction reduced the quantity of V protein bound to poly(G). Addition of yeast RNA competitor (lane 16) to the binding reaction (25 μ g per ml) had little effect on binding. However, this was not especially surprising, because the cytoplasmic extracts already contained significant quantities of cellular RNA and addition of yeast RNA likely had little impact. These results suggest that binding of V protein to poly(G) is stimulated by divalent cations and is a relatively specific interaction, because addition of a nonspecific RNA (yeast RNA) did not seem to diminish the amount of V protein bound to the resin.

To determine if RNA binding could be correlated with the ability to repress minireplicon

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 34 -

activity, the poly(G) binding assay was next used to analyze the RNA binding activity of the haV protein mutants. The haV protein mutants (Figure 3) were expressed in cells without any other viral proteins. Crude cytoplasmic extracts were prepared and bound to poly(G) resins as described above, and bound proteins were analyzed by Western blotting (Figure 6). As shown earlier, haV was captured by poly(G) and detected by anti-HA antibody on a Western blot (lane 2), while a sample containing V protein without an HA-tag (lane 1) generated no background signal. Analysis of the mutant proteins revealed similar levels of poly(G) binding activity for most of the V proteins (lanes 4-13). The exception was mutant haV-1. Very low levels of this mutant protein bound to poly(G). This clearly indicated that the protein was defective for binding (lane 3). The low but detectable levels of binding by haV-1 indicated that RNA binding activity was substantially reduced, but not entirely eliminated. These results demonstrated that most of the mutants retained RNA binding activity nearly equivalent to wild-type haV. One of the two mutants that was defective for minireplicon repression (haV-5) bound poly(G) as well as wild-type haV, while the other mutant (haV-1) exhibited significantly reduced poly(G) binding activity. This suggested that there may be a correlation between minireplicon repression and RNA binding activity mediated by the unique C-terminus of V protein. In turn, this suggested that V protein RNA binding activity may play a regulatory role in measles virus gene expression and replication.

A potential connection between RNA binding activity associated with V protein and minireplicon repression could be drawn from the results that showed that a V protein mutant lacking the C-terminus

- 35 -

cysteine-rich region bound RNA poorly and was also a less effective minireplicon repressor.

In a separate experiment, minireplicon repression was shown not to correlate with the ability of V protein to bind N protein. Formation of a V-N protein complex was not necessary for V protein-mediated minireplicon repression; V protein mutants haV-9 and haV-11 (Figure 3) failed to interact with N protein, but retained full repression activity (data not shown).

Analysis of V protein mutants suggested that the C-terminus was required for high affinity RNA binding. Deletion of this region that includes the zinc-binding domain (51) greatly reduced the amount of protein that could be collected on poly(G) resins, but did not entirely eliminate all binding. This may suggest that there is a second weak RNA binding domain in V protein. Without being bound by the following, an attractive possibility is that the zinc finger-like domain in the C-terminus forms one important component of a nucleic acid binding domain, and a second domain in V protein cooperates with the C-terminus to create a higher affinity binding site.

These studies of RNA binding also showed that V protein could interact with RNA without any additional viral proteins present in crude cell extracts. This suggests that V protein directly bound to RNA. This conclusion is not absolute, because it remains possible that V protein interacts with a cellular protein that in turn is responsible for binding to RNA. If this model were true, the data indicates that the C-terminus may mediate the protein-protein interaction responsible for interaction with a cellular factor. Purified recombinant V protein will be important to further examine whether V protein directly binds RNA.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 36 -

Although the mutant haV-5 protein was defective for minireplicon repression (Figure 4), it bound to RNA (Figure 6) as well as the wild-type protein. Thus, the minireplicon repression activity associated with CR2 did not readily correlate with the other two activities analyzed (RNA binding and interaction with N protein). For CR2 to function effectively as a repressing motif, it may require an intact RNA binding domain in the C-terminus of V protein. V protein may be similar to some RNA polymerase II transcription factors and it has a modular structure (78).

To more fully test the possibility that CR2 was directly involved in repression, this domain (amino acids 112-134) was deleted to generate haV-23 (Figure 7; SEQ ID NO:9). Surprisingly, this deletion did not greatly affect repression activity (Figure 8). The fact that CR2 could be deleted without affecting repression argues that CR2 does not contain a domain that actively participates in repression. Instead, it appears that the defect caused by the substitution of amino acids 113 plus 114 found in haV-5 (Figures 7 and 8) generated a dominant-negative effect (previous Western blot analysis indicated that the defect in repression was not caused by haV-5 instability).

Without being bound by theory, the YD to AA substitution in haV-5 generated a subtle alteration in the tertiary structure of V protein that partially blocks repression activity. Alternatively, there may be interaction between V protein and other viral proteins or cellular proteins. The double alanine substitution may favor a protein-protein interaction that inhibits repression activity or sequesters V protein in an inactive protein complex.

The concept that the weak repression phenotype was caused by a dominant-negative effect

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 37 -

created by the double alanine substitution was tested further by making additional amino acid substitutions that were very similar but distinct from the mutations found in haV-5 (Figure 7). The original YD to AA substitution in haV-5 was engineered in a well-conserved motif consisting of VYDH located at the amino boundary of CR2 (Figure 2). This motif was identical in V protein sequences from measles virus, canine distemper virus, rinderpest virus and dolphin morbillivirus. In mutant haV-24 (SEQ ID NO:10), the VYDH sequence was converted to VYAA, and in mutant haV-25 (SEQ ID NO:11), VYDH was converted to VAAA. Both of these mutants repressed MV minireplicon gene expression as well as the wild-type haV protein (Figure 8). This implies that the haV-5 defect is very specific for the VYDH to VAAH substitution.

The possibility that a C-terminal zinc-finger-like domain plays a role in repression was examined further by introducing amino acid substitutions in pairs of cysteine residues in the C-terminus (Figure 9). Mutant haV-12 (SEQ ID NO:14) was generated with cysteine residues 1 and 2 (amino acids 251 and 255) converted to alanines. Similarly, mutant haV-13 (SEQ ID NO:15) was generated with C-terminal cysteine residues 4 and 5 (amino acids 269 and 272) replaced with alanines. Cysteine residues were mutated in pairs expecting that this would significantly alter a zinc-finger-like structure in the C-terminus and produce a readily detectable alteration in repression activity.

Surprisingly, CAT expression studies of these mutants (Figure 10) revealed that they were only mildly affected by the cysteine substitutions; both haV-12 and haV-13 retained a significant proportion of wild-type haV protein repression activity (about 65% of wild-type). This result was somewhat unexpected; it was

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 38 -

predicted that substitution of zinc-coordinating cysteine residues would abolish repression. Possibly, substitution of only two out of seven cysteine residues did not completely disrupt the putative zinc-finger nucleic acid binding structure. Alternatively, it is possible that the putative zinc-finger motif plays a less prominent role in repression than previously predicted. Thus, two additional series of mutations were prepared to further examine the role of the C-terminus in repression.

In one set of mutations, small incremental deletions were made starting from the C-terminus (haV-14 through haV-19; SEQ ID NOS:16-21). The smallest deletion (haV-14) removed 21 amino acids from the C-terminus, whereas the largest deletion (haV-19) removed 71 amino acid residues. Mutant haV-19 was constructed even though it is nearly identical to haV-1 (Figure 9; SEQ ID NO:13), because the deletion in haV-19 removed several additional amino acids that were part of the small basic motif located between amino acids 229-234, and the phenotype of haV-19 could be viewed as verification of the mutant phenotype displayed by haV-1.

Analysis of the C-terminal mutants in the minireplicon assay revealed that the large deletion mutants (haV-1 and haV-19) behaved similarly; they repressed minireplicon gene expression only about two fold or less instead of the 5-8 fold repression induced by wild-type haV (Figure 10). Interestingly, the diminished repression activity displayed by the large deletions was reproduced by all of the smaller truncation mutants. Even the smallest C-terminal deletion (haV-14) resulted in a V protein that repressed only about two fold. This result implied that the integrity of the extreme C-terminus is essential for full repression activity.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 39 -

In addition to analyzing the effect of the C-terminal deletion mutations, several additional mutations were generated to examine the possibility that the basic motif (KKGHR; amino acids 229-237, SEQ ID NO:12) at the beginning of the unique V protein C-terminus played some role in repression. Conversion of the two arginine residues to alanine (haV-20; SEQ ID NO:22) or aspartic acid (haV-21; SEQ ID NO:23) had an effect that was similar to the C-terminal deletion mutations. The two substitution mutants repressed minireplicon expression by an average of only 1.5 to 3 fold whereas wild-type V protein repression normally ranged from 5-8 fold (Figure 10). These results implied that perturbation of the basic motif also disrupted normal V protein repression function.

This result was examined further by deleting the basic motif (Figure 9, haV-22; SEQ ID NO:24), while leaving the remainder of the C-terminus intact. Surprisingly, one preliminary experiment has indicated that deletion of the basic motif had no discernable effect on repression activity; haV-22 repressed CAT activity by about nine-fold (Figure 10). Taken together, these results suggest that amino acid substitutions in the basic motif produce a dominant-negative effect on repression activity possibly by causing an unfavorable change in protein tertiary structure. On the other hand, deletion of the basic motif produced little change in the ability of V protein to repress minireplicon gene expression.

The mechanism of measles virus V protein minireplicon repression is unknown. The results suggest that the mechanism does not require interaction with N protein, but does involve interaction with RNA. RNA binding could result in reduced CAT levels in a minireplicon assay through a number of different mechanisms. For example, RNA binding activity could

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 40 -

repress translation if V protein binds viral mRNAs. V protein could also influence rates of encapsidation if it binds nascent viral RNAs and prevents association of RNA with N protein. Conversely, it could somehow stimulate nucleocapsid assembly, thereby forcing the minireplicon system to overproduce genomic-length RNA at the expense of mRNA. V protein could also be envisioned as analogous to a transcription factor that binds at or near the promoter and represses transcription. If V protein is analogous to a transcription factor, it could be a regulator of the switch that balances genome synthesis and mRNA synthesis.

Dissection of V protein functions provides a basis for introducing attenuating mutations in candidate *Morbillivirus* strains for use in immunogenic compositions. Published studies have shown that elimination of V protein expression results in attenuated viral replication (19,22,23,26-29). Varying degrees of attenuation are introduced by targeting amino acid substitutions to specific domains of V protein, rather than eliminating expression. For example, partial loss of V protein repression function is achieved by mutation of one or more cysteine residues in the unique C-terminus. Substitutions in a region shared by P and V are suitable, such as the alanine substitutions in CR2, if they have an effect on V protein function without much effect on P protein. These mutations are evaluated using the reverse genetic systems for "rescue", as described in the art (19,79,80,81).

The reverse genetics system must be used to generate an infectious *Morbillivirus* containing the mutations of this invention, because naked genomic RNA cannot serve as a template for transcription and replication. Instead, these genomic sequences are

- 41 -

recognized only when they are entirely encapsidated by the N protein into the nucleocapsid structure. It is only in that context that the genomic and antigenomic terminal promoter sequences are recognized to initiate the transcription or replication pathways.

Transcription and replication of negative-sense, single-stranded RNA viral genomes are achieved through the enzymatic activity of a multimeric protein acting on the ribonucleoprotein core (nucleocapsid). All *Morbilliviruses* require the three viral proteins, N, P and L, for these pathways to proceed.

The mutations described herein are introduced into *Morbillivirus* strains by using site-directed mutagenesis. One or more mutations as defined herein are introduced into a *Morbillivirus* strain. Cumulative effects of different combinations of mutations can be assessed.

This invention is exemplified with the minireplicon system. The changes in nucleotide sequences encoding the mutations to the CR2 and the C-terminus of the V protein of *Morbilliviruses* (as well as to the promoter region and L protein, the N, P and/or C proteins and/or the F gene-end signal of measles virus) can be inserted readily into full length viruses using techniques known in the art. The mutations are introduced by standard recombinant DNA methods into a DNA copy of the viral genome. This may be a wild-type or a modified viral genome background, thereby generating a new virus. Infectious clones or particles containing these mutations are generated using the cDNA rescue system, which has been applied to a variety of negative-sense RNA viruses, including Sendai virus (82); measles virus (83,88); respiratory syncytial virus (84); PIV-3 (85); rabies (86); vesicular stomatitis virus (VSV) (87); and rinderpest

- 42 -

virus (89); these references are hereby incorporated by reference.

Briefly, all *Morbillivirus* rescue systems can be summarized as follows: Each requires a cloned DNA equivalent of the entire viral genome placed between a suitable DNA-dependent RNA polymerase promoter (e.g., the T7 RNA polymerase promoter) and a self-cleaving ribozyme sequence (e.g., the hepatitis delta ribozyme) which is inserted into a propagatable bacterial plasmid. This transcription vector provides the readily manipulable DNA template from which the RNA polymerase (e.g., T7 RNA polymerase) can faithfully transcribe a single-stranded RNA copy of the viral antigenome (or genome) with the precise, or nearly precise, 5' and 3' termini. The orientation of the viral genomic DNA copy and the flanking promoter and ribozyme sequences determine whether antigenome or genome RNA equivalents are transcribed. Also required for rescue of new virus progeny are the virus-specific trans-acting proteins needed to encapsidate the naked, single-stranded viral antigenome or genome RNA transcripts into functional nucleocapsid templates: the viral nucleocapsid (N) protein, the polymerase-associated phosphoprotein (P) and the polymerase (L) protein. These proteins comprise the active viral RNA-dependent RNA polymerase which must engage this nucleocapsid template to achieve transcription and replication.

Typically, these viral trans-acting proteins are generated from one or more plasmid expression vectors encoding the required proteins, although some or all of the required trans-acting proteins may be produced within mammalian cells engineered to contain and express these virus-specific genes and gene products as stable transformants.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 43 -

The typical (although not necessarily exclusive) circumstances for rescue include an appropriate mammalian cell milieu in which T7 polymerase is present to drive transcription of the antigenomic (or genomic) single-stranded RNA from the viral genomic cDNA-containing transcription vector. Either cotranscriptionally or shortly thereafter, this viral antigenome (or genome) RNA transcript is encapsidated into functional templates by the nucleocapsid protein and engaged by the required polymerase components produced concurrently from co-transfected expression plasmids encoding the required virus-specific trans-acting proteins. These events and processes lead to the prerequisite transcription of viral mRNAs, the replication and amplification of new genomes and, thereby, the production of novel viral progeny, i.e., rescue.

For the rescue of the non-Morbilliviruses rabies, VSV and Sendai, T7 polymerase is provided by recombinant vaccinia virus VTF7-3. This system, however, requires that the rescued virus be separated from the vaccinia virus by physical or biochemical means or by repeated passaging in cells or tissues that are not a good host for poxvirus. For measles virus cDNA rescue (and presumably for other Morbilliviruses), this requirement is avoided by creating a cell line that expresses T7 polymerase, as well as viral N and P proteins. Rescue is achieved by transfecting the genome expression vector and the L gene expression vector into the helper cell line. Advantages of the host-range mutant of the vaccinia virus, MVA-T7, which expresses the T7 RNA polymerase, but produces little or no infectious progeny in mammalian cells, are exploited to rescue measles virus and other Morbilliviruses. After simultaneous expression of the necessary encapsidating proteins, synthetic full length

- 44 -

antigenomic viral RNA are encapsidated, replicated and transcribed by viral polymerase proteins and replicated genomes are packaged into infectious virions. In addition to such antigenomes, genome analogs have now
5 been successfully rescued for Sendai and PIV-3 (85,90).

The rescue system thus provides a composition which comprises a transcription vector comprising an isolated nucleic acid molecule encoding a genome or antigenome of a *Morbillivirus*. The nucleic acid
10 molecule contains at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of the measles virus V protein (and, optionally, other mutations described herein), together with at least one expression vector which comprises at least one isolated
15 nucleic acid molecule encoding the trans-acting proteins necessary for encapsidation, transcription and replication (e.g., N, P and L for a *Morbillivirus*). Host cells are then transformed, infected or transfected with the at least two expression vectors
20 just described. The host cells are cultured under conditions which permit the co-expression of these vectors so as to produce the infectious modified virus.

The rescued infectious virus is then tested for its desired phenotype (reduced repression by V
25 protein, temperature sensitivity, cold adaptation, plaque morphology, and transcription and replication attenuation), first by *in vitro* means. The mutations in the N, P or C genes or the F gene-end signal of measles virus are also tested using the minireplicon system
30 where the required trans-acting encapsidation and polymerase activities are provided by wild-type or vaccine helper viruses, or by plasmids expressing the N, P and different L genes harboring gene-specific attenuating mutations (63,83).

35 If the attenuated phenotype of the rescued virus is present, challenge experiments are conducted

- 45 -

with an appropriate animal model. Non-human primates provide the preferred animal model for the pathogenesis of human disease. These primates are first immunized with the attenuated, recombinantly-generated virus, then challenged with the wild-type form of the virus. Monkeys are infected by various routes, including but not limited to intranasal, intratracheal or subcutaneous routes of inoculation (91).

Experimentally infected rhesus and cynomolgus macaques have also served as animal models for studies of vaccine-induced protection against measles (92).

Protection is measured by such criteria as disease signs and symptoms, survival, virus shedding and antibody titers. If the desired criteria are met, the recombinantly-generated virus is considered a viable candidate vaccine or immunogenic composition for testing in humans. The "rescued" virus is considered to be "recombinantly-generated", as are the progeny and later generations of the virus, which also incorporate the mutations.

Even if a "rescued" virus is underattenuated or overattenuated relative to optimum levels for vaccine use, this is information which is valuable for developing such optimum strains.

Optimally, a codon containing a point mutation may be stabilized by introducing a second or a second plus a third mutation in the codon without changing the amino acid encoded by the codon bearing only the point mutation. Infectious virus clones containing the stabilizing mutations are also generated using the cDNA "rescue" system described above.

Previously, in published International patent application W098/13501 (93), which is hereby incorporated by reference, the generation and isolation of recombinantly-generated, attenuated, nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA viruses of the

- 46 -

Order Mononegavirales (such as measles virus) having at least one attenuating mutation in the 3' genomic promoter region and having at least one attenuating mutation in the RNA polymerase gene was disclosed.

5 Specifically, these mutations comprised:

(1) at least one attenuating mutation in the 3' genomic promoter region selected from the group consisting of nucleotide 26 (A → T), nucleotide 42 (A → T or A → C) and nucleotide 96 (G → A), where these
10 nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, message sense; and

(2) at least one attenuating mutation in the RNA polymerase gene selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino
15 acid selected from the group consisting of residues 331 (isoleucine → threonine), 1409 (alanine → threonine), 1624 (threonine → alanine), 1649 (arginine → methionine), 1717 (aspartic acid → alanine), 1936 (histidine → tyrosine), 2074 (glutamine → arginine)
20 and 2114 (arginine → lysine).

Furthermore, in in published International patent application WO99/49017 (94), which is hereby incorporated by reference, the generation and isolation of recombinantly-generated, attenuated, measles viruses
25 having at least one attenuating mutation in the N, P or C genes or in the F gene-end signal, was disclosed.

Specifically, these mutations comprised:

(1) for the N gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of
30 nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 129 (glutamine → lysine), 148 (glutamic acid → glycine) and 479 (serine → threonine);

- 47 -

(2) for the P gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 225 (glutamic acid → glycine), 275 (cysteine → tyrosine) and 439 (leucine → proline);

(3) for the C gene, at least one attenuating mutation selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 73 (alanine → valine), 104 (methionine → threonine) and 134 (serine → tyrosine); and

(4) for the F gene-end signal (the cis-acting transcription termination signal), the change at nucleotide 7243 (T → C), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, that is, message (coding) sense.

Individual or combinations of attenuating mutations from either or both of these sets of mutations can be incorporated into the *Morbilliviruses* of this invention, including specifically those with at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of the V protein, as well as to those containing both such a mutation in amino acids 112-134 and a mutation in or deletion of at least a portion of the C-terminal region beginning at amino acid 231.

The viruses of this invention are used to formulate a vaccine or immunogenic composition. To do so, the virus is adjusted to an appropriate concentration and formulated with any suitable adjuvant, diluent or carrier. Physiologically acceptable media may be used as carriers and/or diluents. These include, but are not limited to: water, an appropriate isotonic medium, glycerol, ethanol and other conventional solvents, phosphate

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 48 -

buffered saline and the like. Suitable adjuvants include, but are not limited to aluminum phosphate, aluminum hydroxide, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT, now Corixa), synthetic lipid A analogs such as 529 (Corixa), Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) and IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA).

In one embodiment of this invention, the formulation including the Morbillivirus is intended for use as a vaccine or immunogenic composition. The virus may be mixed with cryoprotective additives or stabilizers such as proteins (e.g., albumin, gelatin), sugars (e.g., sucrose, lactose, sorbitol), amino acids (e.g., sodium glutamate), saline, or other protective agents. This mixture is maintained in a liquid state, or is then dessicated or lyophilized for transport and storage and mixed with water immediately prior to administration.

Formulations comprising the Morbilliviruses of this invention are useful to immunize a human or other vertebrate subject to induce protection against infection by the wild-type counterpart of the virus. Thus, this invention further provides a method of immunizing a subject to induce protection against infection by a Morbillivirus by administering to the subject an effective immunizing amount of a formulation of the vaccine or immunogenic composition incorporating a version of that virus generated as described hereinabove.

A sufficient amount of the vaccine or immunogenic composition in an appropriate number of doses is administered to the subject to elicit an immune response. Persons skilled in the art will readily be able to determine such amounts and dosages. Administration may be by any conventional effective

- 49 -

form, such as intranasally, parenterally, orally, or topically applied to any mucosal surface such as intranasal, oral, eye, lung, vaginal or rectal surface, such as by an aerosol spray. The preferred means of administration is by intranasal administration.

All patents and publications cited herein are hereby incorporated by reference.

In order that this invention may be better understood, the following examples are set forth. The examples are for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the scope of the invention.

Examples

Example 1

Cells and Virus

HEp2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. Chicken embryo fibroblasts (CEFs; SPAFAS, Inc) were maintained in the same media. The attenuated strain of vaccinia virus that expresses phage T7 RNA polymerase (MVA/T7; 62) was grown in CEFs. Plaque assays were performed also on CEFs.

Example 2

Recombinant DNA

The measles virus N, P and L protein expression clones (Figure 1A) were each prepared from infected-cell total RNA by reverse transcription and PCR amplification (RT/PCR) with gene-specific primers, followed by cloning into an appropriate T7 RNA polymerase-dependent expression vector (61). Vero cells were infected with the Edmonston wild-type strain

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 50 -

of measles virus, and when about 70% or more of the cells exhibited a cytopathic effect, RNA was prepared by the guanidinium-phenol extraction method (95). RT/PCR was performed with avian myoblastosis virus RT and Pwo polymerase contained in the one-tube Titan amplification kit (Roche Molecular Biology). The RT step was performed for 30-60 minutes at 47°C, followed by 30-35 cycles of PCR amplification. Amplified DNA fragments were cloned into a T7 expression plasmid (Figure 1; (61,83)) with the translation initiation codon placed in the NcoI site of the vector. Cloned DNAs were checked by cycle-sequencing (96) and nucleotide substitution errors were corrected by oligonucleotide mutagenesis using the Morph kit (5prime-3prime, Inc.) or by replacing subfragments with newly-amplified DNA fragments as described previously (96).

The initial V protein expression clone was prepared by PCR amplification from an Edmonston wild-type full-length cDNA clone using primers flanking the V protein coding region. The amplified DNA was cloned into the T7 expression vector and the additional G nucleotide residue required to generate the V gene frameshift was added at the editing site (18) by oligonucleotide-directed mutagenesis. Wild-type and mutant V protein expression vectors were also prepared with an influenza virus hemmagglutinin epitope tag (HA tag; (67)) at the amino terminus. The T7 vector plasmid was modified to include a sequence that includes an initiation codon and encodes the HA epitope tag (CC ATG GCT TAT CCT TAT GAC GTG CCT GAC TAT GCC) (SEQ ID NO:5), followed by a polylinker (plasmid pT7/HA). The V protein coding region was cloned with the HA tag at the amino terminus. This served to replace the V protein initiator methionine codon, resulting in the generation of a plasmid designated

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 51 -

pMV-haV-wt. V protein mutants were prepared in the pMV-haV-wt backbone by oligonucleotide-directed or deletion mutagenesis.

5 The primer designed to amplify the 5' end of the P and V coding regions (CGGCCATGGCAGAGAGACAGGCACGCCACGTAAAAACGGAC) (SEQ ID NO:6) contained two base changes (underlined) to disrupt the downstream C protein open reading frame. These changes were silent with respect to the P and V open reading frames. The same nucleotide changes were carried over to the pT7MV-haV constructs.

10 For all protein expression constructs, the cDNA insert was cloned 3' of an internal ribosome entry site (IRES) to facilitate translation of the T7 RNA polymerase transcript. A stretch of 50 adenosine residues was located at the 3' end, followed by a T7 RNA polymerase terminator. Both the P and V expression vectors contained base substitutions designed to disrupt translation initiation from the downstream C protein open reading frame.

15 The measles virus minireplicon (pMVwt107-CAT, Figure 1B) was a derivative of pMV107-CAT (63). Plasmid pMV107-CAT contained the leader sequence found in vaccine strains of measles virus (60) and was converted to plasmid pMV107wt-CAT (which contained the wild-type leader) using oligonucleotide-directed mutagenesis.

30 Example 3
Transient Expression Experiments

Analysis of transient minireplicon expression was performed essentially as described previously (96) using varying amounts of viral protein expression vectors (Figure 1B) and a measles virus minireplicon containing the CAT reporter gene (Figure 1B). The

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 52 -

measles virus minireplicon was a derivative of pMV107-CAT (63) containing the CAT reporter gene and the measles leader sequence from the Edmonston wild-type strain of measles virus (60). HEp2 cells in six-well plates were used for transfection when the cells were about 70-90% confluent. Transfection mixes were prepared by combining minireplicon DNA (50-200ng pMVwt107-CAT) and expression plasmids (400 ng pMVwt-N, 300 ng pMVwt-P[C], 100 ng pMVwt-L) in 200 μ l of serum-free OptiMEM. V protein expression plasmids were included in this mix according to the amounts ranging from 25-400ng, as specified in Figure 1C. Lipofectace (12-15 μ l; Invitrogen/Life Technologies) was added to the DNA-medium mixture and incubated for 20 to 30 minutes at room temperature. A separate MVA/T7 mixture was prepared in sufficient quantity to provide 0.8 ml of serum-free OptiMEM containing enough MVA/T7 to infect each well of cells to be transfected with about 2 pfu per cell. Before initiating transfection, the DNA-medium-Lipofectace transfection mix was combined with 800 μ l of the MVA/T7-media mix and mixed gently by pipetting. Next, the culture media was removed from the cell monolayers and the combined 1ml transfection mixture was added to the cells.

After overnight incubation, the transfection mixture and media were replaced with DMEM supplemented with 10% FBS and the cells were incubated an additional day. About 48 hours after the start of transfection, the cells were harvested and extracts prepared for analysis of CAT activity as described previously (96). The expression of CAT is shown in Figure 1C. In some experiments, proteins in crude cell extracts were analyzed by Western blotting to monitor protein expression (97). Transfected cells were lysed using TN buffer (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl) supplemented with 0.2% NP40. The cell extracts were cleared by

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 53 -

centrifugation to remove nuclei and an equal volume of Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue) was added to the cytoplasmic extract. The samples were adjusted to contain approximately 2.5% β -mercaptoethanol and then boiled. SDS polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotting were performed using standard protocols (97). Epitope-tagged V protein was detected using either mouse monoclonal antibody 12CA5 (Roche Molecular Biology) or rat monoclonal antibody 3F10 (Roche Molecular Biology). Detection was performed with a peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma) and chemiluminescence reagents (Roche Molecular Biology or New England Nuclear).

Example 4

Repression of Minireplicon Expression by Mutant Measles Virus V Proteins

The transient minireplicon expression CAT assay described in Example 3 was repeated using varying amounts of the measles virus V protein mutants haV-1 to haV-8, which have the following differences from the wild-type sequence (haV-wt) (see Figure 3):

- haV-1 Deletion of amino acids 231-299
- haV-2 Mutation of glutamic acid at amino acid 225 to glycine
- haV-3 Mutations of lysines at amino acids 229 and 230 to alanines
- haV-4 Mutations of lysine and threonine at amino acids 204 and 209 to alanines
- haV-5 Mutations of tyrosine and aspartic acid at amino acids 113 and 114 to alanines
- haV-6 Mutations of leucine and glutamine at amino acids 100 and 101 to alanines

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 54 -

haV-7 Mutations of glutamic acid and
cysteine at amino acids 14 and 15 to
alanines

haV-8 Mutations of glutamic acid at amino
acids 3 and 4 to alanines

Either 200 or 400ng of each V plasmid
(encoding wild-type or haV-1 through haV-8 V protein)
was used and the relative CAT activity was measured as
a percentage of the activity resulting from a
transfection performed without any V protein expression
vector (lane 2). The results are depicted in Figure
4A. A lower percentage correlates with a higher degree
of repression of CAT expression. The expression of V
protein was monitored by a Western blot which was
analyzed with anti-HA antibody (Figure 4B).

The CAT assay was repeated using increasing
amounts (100ng to 1µg) of the V plasmid encoding haV-1
and the relative activities are depicted in Figure 4C.

Example 5

RNA Binding Assays

RNA binding assays (74,76,77) were performed
to evaluate the binding of measles virus V protein to
RNA, using agarose resins couple with
polyribonucleotides (Sigma). Transfected cells were
lysed as described above using TN buffer supplemented
with 0.5% NP40, 5% glycerol, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂ and
protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biology).
Agarose resins containing polyribonucleotides
(approximately 25-50 µl of settled volume of beads)
were added to the cleared cell lysate and incubated 30-
60 minutes at 4°C with rocking. After incubation, the
resins were washed three times to remove unbound
proteins. Proteins were eluted from the resins by
boiling in Laemmli buffer supplemented with 2.5% β-

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 55 -

mercaptoethanol. The procedure is summarized by the flow diagram of Figure 5A. Proteins captured by the polynucleotide resins were analyzed by Western blotting as described above. The assay was carried out first with wild-type V protein, and then with haV-1 through haV-11. The mutants haV-1 through haV-8 are as described above; the mutants haV-9 through haV-11 have the following differences from the wild-type sequence (haV-wt) (see Figure 3):

haV-9 Deletion of amino acids 1-20
 haV-10 Deletion of amino acids 208-230
 haV-11 Deletion of amino acids 1-20 and 208-230

The results are depicted in Figures 5B (wild-type) and 6 (mutants).

Example 6

Repression of Minireplicon Expression by Additional CR2 Mutant Measles Virus V Proteins

The transient minireplicon expression CAT assay described in Examples 3 and 4 was repeated using the measles virus V protein CR2 mutants haV-5 and haV-23 to haV-25, which have the following differences from the wild-type sequence (haV) (SEQ ID NO:7) in CR2 (amino acids 100-140; see Figure 7):

haV-5 Mutations of tyrosine and aspartic acid at amino acids 113 and 114 to alanines (SEQ ID NO:8)
 haV-23 Deletion of amino acids 112 to 134 (SEQ ID NO:9)
 haV-24 Mutations of aspartic acid and histidine at amino acids 114 and 115 to alanines (SEQ ID NO:10)
 haV-25 Mutations of tyrosine, aspartic acid and histidine at amino acids 113 to

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 56 -

155 (SEQ ID NO:11)

Four hundred nanograms of each V plasmid (encoding wild-type, haV-5 or haV-23 through haV-25 V protein) was used and the relative CAT activity was measured as a percentage of the activity resulting from a transfection performed without any V protein expression vector (bar 1). The results are depicted in Figure 8. A lower percentage correlates with a higher degree of repression of CAT expression.

Example 7Repression of Minireplicon Expression by Additional C-Terminal Mutant Measles Virus V Proteins

The transient minireplicon expression CAT assay described in Examples 3 and 4 was repeated using the measles virus V protein mutants haV-1 and haV-12 to haV-22, which have the following differences from the wild-type sequence (haV) (SEQ ID NO:7) in the C-terminus (amino acids 220-299; see Figure 9):

- haV-1 Deletion of amino acids 232 to 299 (SEQ ID NO:13)
- haV-12 Mutations of cysteines at amino acids 251 and 255 to alanines (SEQ ID NO:14)
- haV-13 Mutations of cysteines at amino acids 269 and 272 to alanines (SEQ ID NO:15)
- haV-14 Deletion of amino acids 279 to 299 (SEQ ID NO:16)
- haV-15 Deletion of amino acids 267 to 299 (SEQ ID NO:17)
- haV-16 Deletion of amino acids 250 to 299 (SEQ ID NO:18)
- haV-17 Deletion of amino acids 243 to 299 (SEQ ID NO:19)
- haV-18 Deletion of amino acids 236 to 299

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 57 -

(SEQ ID NO:20)

haV-19 Deletion of amino acids 229 to 299

(SEQ ID NO:21)

haV-20 Mutations of arginines at amino acids
233 and 234 to alanines (SEQ ID NO:22)haV-21 Mutations of arginines at amino acids
233 and 234 to aspartic acid (SEQ ID
NO:23)

haV-22 Deletion of amino acids 229 to 237

(SEQ ID NO:24)

Four hundred nanograms of each V plasmid
(encoding wild-type, haV-1 or haV-12 through haV-22 V
protein) was used and the relative CAT activity was
measured as a percentage of the activity resulting from
a transfection performed without any V protein
expression vector (bar 1). The results are depicted in
Figure 10. A lower percentage correlates with a higher
degree of repression of CAT expression.

- 58 -

Bibliography

1. Black, F.L., et al., Am. J. Epidemiol., 124, 442-452 (1986).
2. Lennon, J.L., and Black, F.L., J. Pediatrics, 108, 671-676 (1986).
3. Pabst, H.F., et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 11, 525-529 (1992).
4. Centers for Disease Control, MMWR, 40, 369-372 (1991).
5. Centers for Disease Control, MMWR, 41:86, 1-12 (1992).
6. King, G.E., et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 10, 883-887 (1991).
7. Rota, J.S., et al., Virology, 188, 135-142 (1992).
8. Griffin, D.E., and Bellini, W.J., pages 1267-1312 of Volume 1, Fields Virology, B.N. Fields, et al., Eds. (3rd ed., Raven Press, 1996).
9. Lamb, R.A., and Kolakosky, D., pages 1177-1204 of Volume 1, Fields Virology, B.N. Fields, et al., Eds. (3rd ed., Raven Press, 1996).
10. Birrer, M.J., et al., Virology, 108, 381-390 (1981).
11. Birrer, M.J., et al., Nature, 293, 67-69 (1981).
12. Norby, E., et al., pages 481-507, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
13. Peebles, M.E., pages 427-456, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
14. Egelman, E.H., et al., J. Virol., 63, 2233-2243 (1989).
15. Udem, S.A., et al., J. Virol. Methods, 8, 123-136 (1984).

- 59 -

16. Udem, S.A., and Cook, K.A., J. Virol., 49, 57-65 (1984).
17. Moyer, S.A., and Horikami, S.M., pages 249-274, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
18. Cattaneo, R., et al., Cell, 56, 759-764 (1989).
19. Nagai, Y., Rev. Med. Virol., 9, 83-99 (1999).
20. Bellini, W.J., et al., J. Virol., 53, 908-919 (1985).
21. Baron, M.D., and Barrett, T., J. Virol., 74, 2603-2611 (2000).
22. Delenda, C., et al., Virology, 242, 327-337 (1998).
23. Durbin, A.P., et al., Virology, 261, 319-330 (1999).
24. Kato, A., et al., J. Virol., 71, 7266-7272 (1997).
25. Schneider, H., et al., Virology, 227, 314-322 (1997).
26. Kato, A., et al., EMBO J., 16, 578-587 (1997).
27. Tober, C., et al., J. Virol., 72, 8124-8132 (1998).
28. Valsamakis, A., et al., J. Virol., 72, 7754-7761 (1998).
29. Patterson, J.B., et al., Virology, 267, 80-89 (2000).
30. Parks, C.L., et al., J. Virol., 75, 910-920 (2001).
31. Takeda, M., et al., J. Virol., 72, 8690-8696 (1998).
32. Bankamp, B., et al., Virology, 216, 272-277 (1996).
33. Curran, J., et al., J. Virol., 69, 849-855 (1995).

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 60 -

34. Harty, R.N., and Palese, P., J. Gen Virol., 76, 2863-2867 (1995).
35. Horikami, S.M., et al., Virology, 222, 383-390 (1996).
36. Nishio, M., et al., J. Gen. Virol., 77, 2457-2463 (1996).
37. Randall, R. E., and Bermingham, A., Virology, 224, 121-129 (1996).
38. Shaji, D., and Shaila, M. S., Virology, 258, 415-424 (1999).
39. Watanabe, N., et al., Medical Microbiology & Immunology, 185, 89-94 (1996).
40. Precious, B., et al., J. Virol., 69, 8001-8010 (1995).
41. Watanabe, N., et al., J. Gen. Virol., 77, 327-328 (1996).
42. Lin, G.Y., et al., Virology, 249, 189-200 (1998).
43. Liston, P., et al., Virus Res., 38, 241-259 (1995).
44. Didcock, L., et al., J. Virol., 73, 9928-9933 (1999).
45. Curran, J., et al., EMBO J., 10, 3079-3085 (1991).
46. Baron, M.D., et al., J. Gen. Virol., 74, 299-304 (1993).
47. Thomas, S.M., et al., Cell, 54, 891-902 (1988).
48. Borden, K.L.B., and Freemont, P.S., Curr. Opinion Structural Biol., 6, 395-401 (1996).
49. Choo, Y., and Klug, A., Curr. Opinion Structural Biol., 7, 117-125 (1997).
50. O'Halloran, T., V., Science, 261, 715-725 (1993).
51. Liston, P., and Briedis, D.J., Virology, 198, 399-404 (1994).

- 61 -

52. Paterson, R.G., et al., Virology, 208, 121-131 (1995).
53. Steward, M., et al., Archives Virol., 140, 1321-1328 (1995).
54. Blumberg, B., et al., pages 235-247, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
55. Berrett, T., et al., pages 83-102, in The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, Ed. (Plenum Press, 1991).
56. Tordo, N., et al., Sem. in Virology, 3, 341-357 (1992).
57. Cattaneo, R., et al., EMBO J., 6, 681-688 (1987).
58. Castaneda, S.J., and Wong, T.C., J. Virol., 63, 2977-2986 (1989).
59. Castaneda, S.J., and Wong, T.C., J. Virol., 64, 222-230 (1990).
60. Parks, C.L., et al., J. Virol., 75, 921-933 (2001).
61. Moss, B., et al., Nature, 348, 91-92 (1990).
62. Wyatt, L.S., et al., Virology, 210, 202-205 (1995).
63. Sidhu, M.S., et al., Virology, 208, 800-807 (1995).
64. Huber, M., et al., Virology, 185, 299-308 (1991).
65. Alber, T., Curr. Opin. Genetics Dev., 2, 205-210 (1992).
66. Baxevasis, A.D., and Vinson, C. R., Curr. Opin. Genetics Dev., 3, 278-285 (1993).
67. Kolodziej, P.A., and Young, R.A., Methods Enzymology, 194, 508-519 (1991).
68. Bass, S.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 4498-4502 (1991).

- 62 -

69. Diamond, S.E., and Kirkegaard, K., J. Virol., 68, 863-876 (1994).
70. Gibbs, C.S., and Zoller, M.J., J. Biol. Chem., 266, 8923-8931 (1991).
71. Giniger, E., and Ptashne, M., Nature, 330, 670-672 (1987).
72. Sedlmeirer, R., and Neubert, W.J., Adv. Virus Res., 50, 101-139 (1998).
73. Lin, G.Y., et al., Virology, 238, 460-469 (1997).
74. Elenbaas, B., et al., Molecular Medicine, 2, 439-451 (1996).
75. Kiledjian, M., and Dreyfuss, G., EMBO J., 11, 2655-2664 (1992).
76. Siomi, H., et al., Cell, 74, 291-298 (1993).
77. Swanson, M., and Dreyfuss, G., Mol. Cell. Biol., 8, 2237-2241 (1988).
78. Mitchell, P., and Tjian, R., Science, 245, 371-378 (1989).
79. Conzelmann, K.K., Annual Review of Genetics, 32, 123-162 (1998).
80. Radecke, F., and Billeter, M.A., Rev. Med. Virology, 7, 49-63 (1997).
81. Roberts, A., and Rose, J.K., Virology, 247, 1-6 (1998).
82. Garcin, D., et al., EMBO J., 14, 6087-6094 (1995).
83. Radecke, F., et al., EMBO J., 14, 5773-5784 (1995).
84. Collins, P.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 11563-11567 (1995).
85. Published International Application No. WO 98/53078.
86. Published European Patent Application No. 702,085.

WO 02/00694

PCT/US01/19806

- 63 -

87. Rota, J.S., et al., Virus Res., 31, 317-330 (1994).
88. Published International Application No. WO 97/06270.
89. Baron, M.D., and Barrett, T., J. Virology, 71, 1265-1271 (1997).
90. Kato, A., et al., Genes to Cells, 1, 569-579 (1996).
91. Shaffer, M.F., et al., J. Immunol., 41, 241-256 (1941).
92. Enders, J.F., et al., N. Engl. J. Med., 263, 153-159 (1960).
93. Published International Application No. WO 98/13501.
94. Published International Application No. WO 99/49017.
95. Chomczynski, P., and Sacchi, N., Analytical Biochem., 162, 156-159 (1987).
96. Parks, C.L., et al., J. Virol., 73, 3560-3566 (1999).
97. Ausubel, F.M., et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, NY 1987).

- 64 -

What is claimed is:

1. An isolated, recombinantly-generated, nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA virus of the genus *Morbillivirus* having at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114.

2. The *Morbillivirus* of Claim 1 wherein the virus is selected from the group consisting of measles virus, canine distemper virus, rinderpest virus, peste-des-petits ruminants virus, dolphin morbillivirus and phocine distemper virus.

3. The *Morbillivirus* of Claim 1 wherein the mutation is at amino acid 113.

4. The *Morbillivirus* of Claim 3 wherein the mutation at amino acid 113 is from tyrosine to alanine.

5. The *Morbillivirus* of Claim 1 wherein the mutation is at amino acid 114.

6. The *Morbillivirus* of Claim 5 wherein the mutation at amino acid 114 is from aspartic acid to alanine.

7. The *Morbillivirus* of Claim 1 wherein there is a mutation at both amino acids 113 and 114.

8. The *Morbillivirus* of Claim 7 wherein the mutation at amino acid 113 is from tyrosine to alanine and the mutation at amino acid 114 is from aspartic acid to alanine.

9. The *Morbillivirus* of Claim 2 wherein the virus is measles virus.

10. The measles virus of Claim 3 which further comprises a mutation in or deletion of at least a portion of the carboxy-terminal (C-terminal) region

- 65 -

corresponding to amino acids 231-299 of the measles virus V protein.

11. The measles virus of Claim 10 wherein the mutation in the C-terminal region is at each of amino acids 233 and 234.

12. The measles virus of Claim 11 wherein the mutation at each of amino acids 233 and 234 is from arginine to alanine.

13. The measles virus of Claim 11 wherein the mutation at each of amino acids 233 and 234 is from arginine to aspartic acid.

14. The measles virus of Claim 10 wherein the deletion is selected from the group consisting of the deletion of amino acids 232 to 299, 279 to 299, 267 to 299, 250 to 299, 243 to 299 and 236 to 299.

15. The measles virus of Claim 14 wherein the deletion is from amino acids 232 to 299.

16. The measles virus of Claim 15 wherein the deletion extends upstream from the C-terminal region and is from amino acids 229 to 299.

17. The measles virus of Claim 3 which further comprises:

- (a) at least one attenuating mutation in the 3' genomic promoter region selected from the group consisting of nucleotide 26 (A → T), nucleotide 42 (A → T or A → C) and nucleotide 96 (G → A), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, message sense; and
- (b) at least one attenuating mutation in the RNA polymerase gene selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 331 (isoleucine → threonine),

- 66 -

1409 (alanine → threonine), 1624
(threonine → alanine), 1649 (arginine →
methionine), 1717 (aspartic acid →
alanine), 1936 (histidine → tyrosine),
2074 (glutamine → arginine) and 2114
(arginine → lysine).

18. The measles virus of Claim 3 which
further comprises at least one attenuating mutation
selected from the group consisting of:

- (a) for the N gene, nucleotide changes which
produce changes in an amino acid
selected from the group consisting of
residues 129 (glutamine → lysine), 148
(glutamic acid → glycine) and 479
(serine → threonine);
- (b) for the P gene, nucleotide changes which
produce changes in an amino acid
selected from the group consisting of
residues 225 (glutamic acid → glycine),
275 (cysteine → tyrosine) and 439
(leucine → proline);
- (c) for the C gene, nucleotide changes which
produce changes in an amino acid
selected from the group consisting of
residues 73 (alanine → valine), 104
(methionine → threonine) and 134
(serine → tyrosine); and
- (d) for the F gene-end signal, the change at
nucleotide 7243 (T → C), where these
nucleotides are presented in positive
strand, antigenomic, message sense.

- 67 -

19. The measles virus of Claim 10 which further comprises:

- (a) at least one attenuating mutation in the 3' genomic promoter region selected from the group consisting of nucleotide 26 (A → T), nucleotide 42 (A → T or A → C) and nucleotide 96 (G → A), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, message sense; and
- (b) at least one attenuating mutation in the RNA polymerase gene selected from the group consisting of nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 331 (isoleucine → threonine), 1409 (alanine → threonine), 1624 (threonine → alanine), 1649 (arginine → methionine), 1717 (aspartic acid → alanine), 1936 (histidine → tyrosine), 2074 (glutamine → arginine) and 2114 (arginine → lysine).

20. The measles virus of Claim 10 which further comprises at least one attenuating mutation selected from the group consisting of:

- (a) for the N gene, nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 129 (glutamine → lysine), 148 (glutamic acid → glycine) and 479 (serine → threonine);
- (b) for the P gene, nucleotide changes which produce changes in an amino acid

- 68 -

selected from the group consisting of residues 225 (glutamic acid → glycine), 275 (cysteine → tyrosine) and 439 (leucine → proline);

- (c) for the C gene, nucleotide changes which produce changes in an amino acid selected from the group consisting of residues 73 (alanine → valine), 104 (methionine → threonine) and 134 (serine → tyrosine); and
- (d) for the F gene-end signal, the change at nucleotide 7243 (T → C), where these nucleotides are presented in positive strand, antigenomic, message sense.

21. The Morbillivirus of Claim 2 wherein the virus is canine distemper virus.

22. The canine distemper virus of Claim 21 which further comprises a mutation in or deletion of at least a portion of the C-terminal region corresponding to amino acids 231-299 of the canine distemper virus V protein.

23. The Morbillivirus of Claim 2 wherein the virus is rinderpest virus.

24. The rinderpest virus of Claim 23 which further comprises a mutation in or deletion of at least a portion of the C-terminal region corresponding to amino acids 231-299 of the rinderpest virus V protein.

25. The Morbillivirus of Claim 2 wherein the virus is dolphin morbillivirus.

26. The dolphin morbillivirus of Claim 2253 which further comprises a mutation in or deletion of at least a portion of the C-terminal region corresponding to amino acids 231-303 of the rinderpest virus V protein.

- 69 -

27. An immunogenic composition comprising an isolated, recombinantly-generated, nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA virus of the genus *Morbillivirus* having at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114, together with a diluent or carrier.

28. A method for immunizing an individual to induce protection against a nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA virus of the genus *Morbillivirus* which comprises administering to the individual the immunogenic composition of Claim 27.

29. The immunogenic composition of Claim 27 which further comprises an adjuvant.

30. A method for immunizing an individual to induce protection against a nonsegmented, negative-sense, single-stranded RNA virus of the genus *Morbillivirus* which comprises administering to the individual the immunogenic composition of Claim 29.

31. A method for reducing the repression caused by a V protein of the genus *Morbillivirus* which comprises inserting at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114.

32. An isolated nucleotide sequence encoding a *Morbillivirus* V protein which has been modified by inserting at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus*

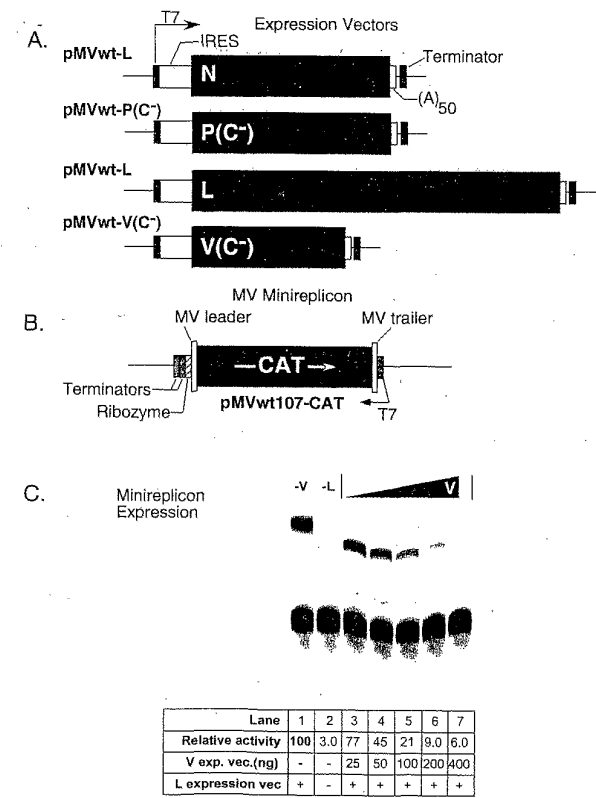
- 70 -

V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114.

33. A composition which comprises a transcription vector comprising an isolated nucleic acid molecule encoding a genome or antigenome of a *Morbillivirus*, wherein the portion of the isolated nucleic acid molecule encoding the V protein has been modified so as to insert at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein, wherein the mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of a *Morbillivirus* V protein is selected from the group consisting of the mutation of amino acids 113 and 114, together with at least one expression vector which comprises at least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting proteins N, P and L necessary for encapsidation, transcription and replication, whereby upon expression an infectious *Morbillivirus* is produced.

34. A method for producing an infectious *Morbillivirus* which comprises transforming, infecting or transfecting host cells with the at least two vectors of Claim 33 and culturing the host cells under conditions which permit the co-expression of these vectors so as to produce the infectious *Morbillivirus*.

FIGURE 1



MV, CDV, RPV, DMV V PROTEIN

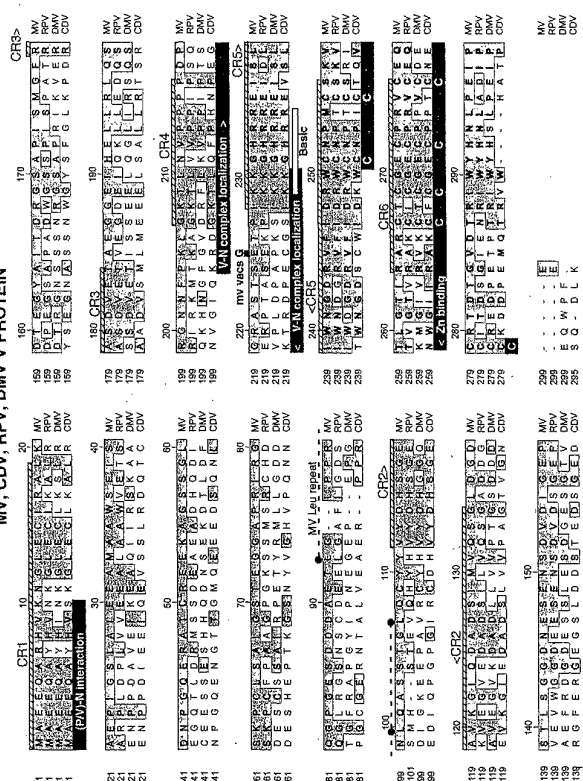


FIGURE 3

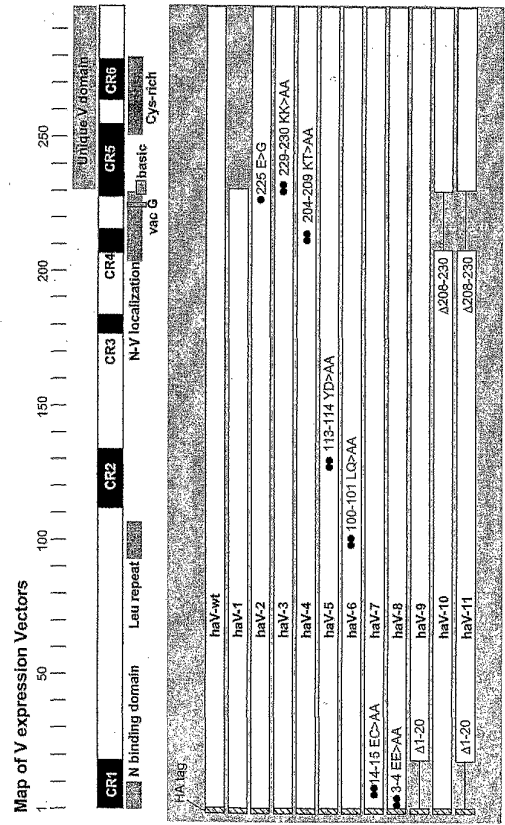


FIGURE 4

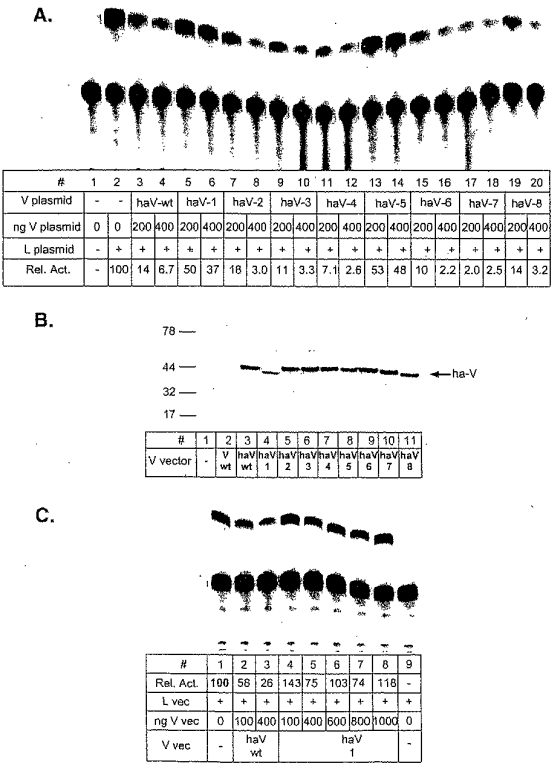


FIGURE 5

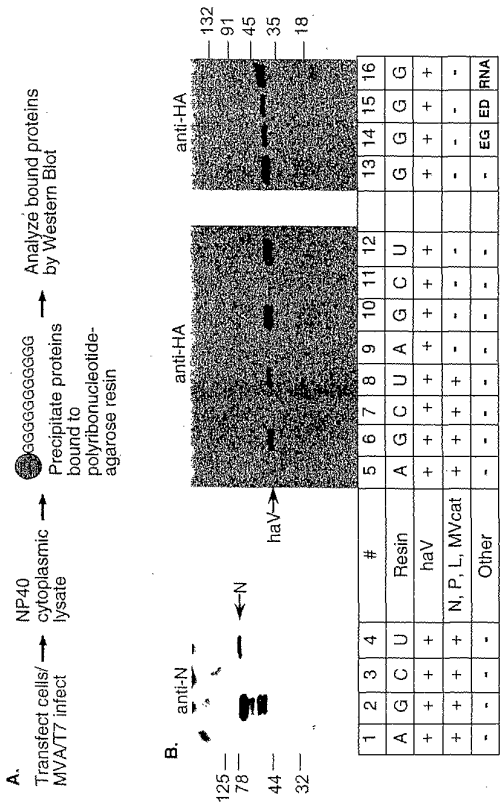


FIGURE 6

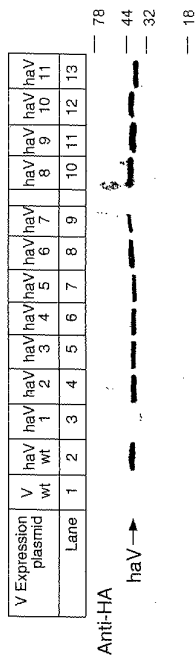
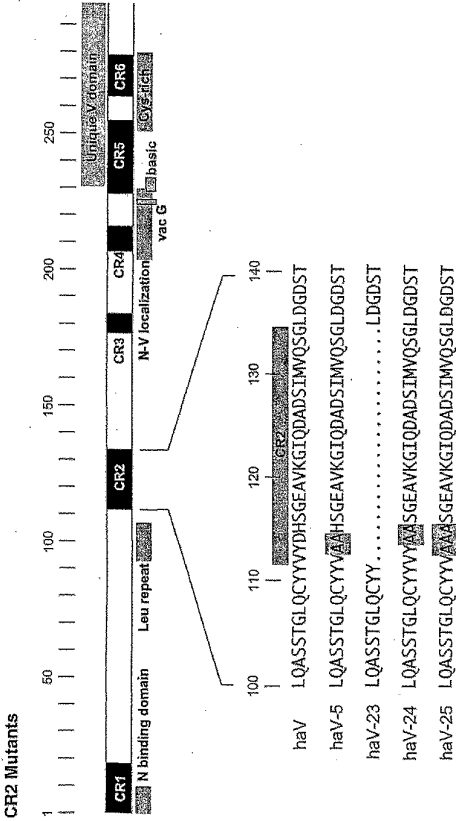


FIGURE 7



WO 02/00694

8/10

PCT/US01/19806

FIGURE 8

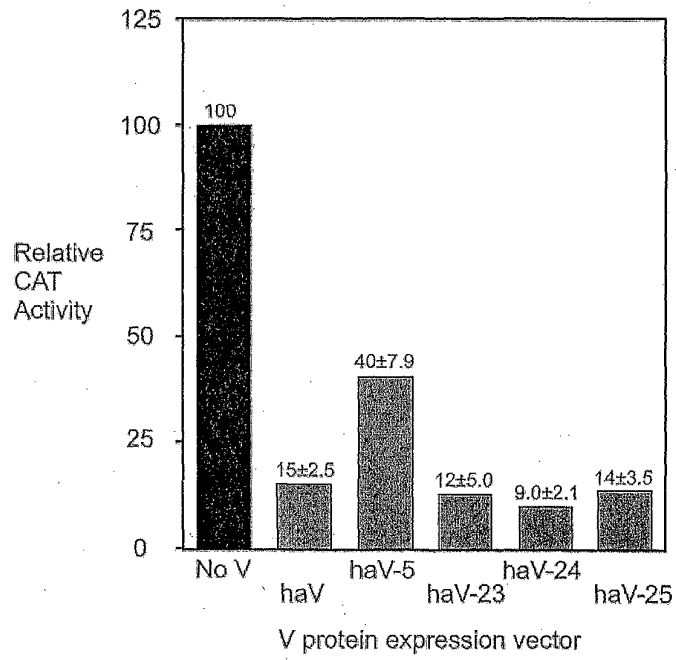
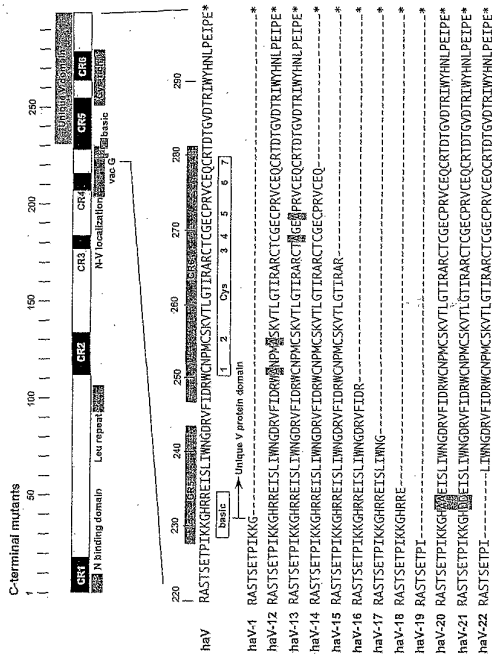


FIGURE 9

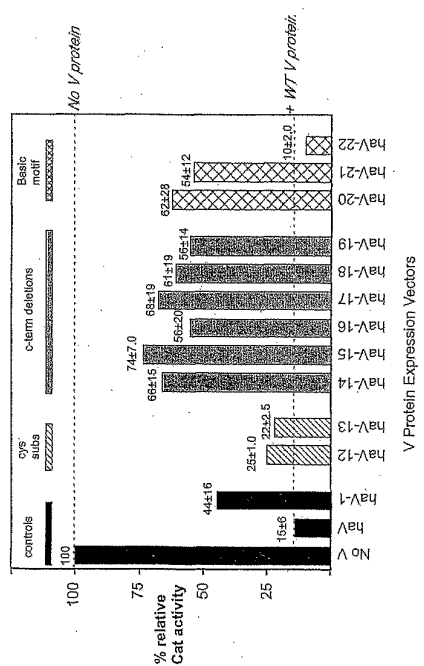


WO 02/00694

PCT/US01/19806

10/10

FIGURE 10



WO 02/00694

PCT/US01/19806

SEQUENCE LISTING

<110> American Cyanamid Company
 <120> Modified Morbillivirus V Proteins
 <130> AM100239PCT
 <140>
 <141>
 <150> US60/213,655
 <151> 2000-06-23
 <160> 24
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Measles virus
 <400> 1
 Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Ile Glu Glu Ala
 20 25 30
 Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser Asp Asn Pro Gly Gln Glu Arg Ala
 35 40 45
 Thr Cys Arg Glu Glu Lys Ala Gly Ser Ser Gly Leu Ser Lys Pro Cys
 50 55 60
 Leu Ser Ala Ile Gly Ser Thr Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Pro Gly Glu Ser Asp Asp Asp Ala Glu Thr Leu Gly Ile Pro
 85 90 95
 Pro Arg Asn Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val
 100 105 110
 Tyr Asp His Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser
 115 120 125
 Ile Met Val Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr Leu Ser Gly Gly
 130 135 140
 Asp Asn Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ile Gly Glu Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 Glu Gly Tyr Ala Ile Thr Asp Arg Gly Ser Ala Pro Ile Ser Met Gly
 165 170 175
 Phe Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Ala Glu Gly Gly Glu Ile His Glu
 180 185 190
 Leu Leu Arg Leu Gln Ser Arg Gly Asn Asn Phe Pro Lys Leu Glu Lys

WO 02/00694

PCT/US01/19806

```

195                200                205
Thr Leu Asn Val Pro Pro Pro Asp Pro Gly Arg Ala Ser Thr Ser
210                215                220

Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Ser Leu Ile Trp
225                230                235                240

Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Met Cys Ser
245                250                255

Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys Thr Cys Gly Glu Cys
260                265                270

Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr Gly Val Asp Thr Arg
275                280                285

Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
290                295

<210> 2
<211> 299
<212> PRT
<213> Rinderpest virus

<400> 2
Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Asn Lys Gly Leu Glu Cys Ile
1      5      10      15

Lys Ala Leu Arg Ala Arg Pro Leu Asp Pro Leu Val Val Glu Glu Ala
20     25     30

Leu Ala Ala Trp Val Glu Thr Ser Glu Gly Gln Thr Leu Asp Arg Met
35     40     45

Ser Ser Asp Glu Ala Glu Ala Asp His Gln Asp Ile Ser Lys Pro Cys
50     55     60

Phe Pro Ala Ala Gly Pro Gly Lys Ser Ser Met Ser Arg Cys His Asp
65     70     75     80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Asn Ser Cys Asp Glu Glu Leu Gly Ala Phe
85     90     95

Ile Gly Asp Ser Ser Met His Ser Thr Glu Val Gln His Tyr His Val
100    105    110

Tyr Asp His Ser Gly Glu Lys Val Glu Gly Val Glu Asp Ala Asp Ser
115    120    125

Ile Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Asp Gly Val Glu Val Trp Gly Gly
130    135    140

Asp Glu Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ser Gly Glu Pro Asp Pro
145    150    155    160

Glu Gly Ser Ala Pro Ala Asp Trp Gly Ser Ser Pro Ile Ser Pro Ala
165    170    175

Thr Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Val Glu Gly Asp Glu Ile Gln Lys

```

WO 02/00694

PCT/US01/19806

```

180          185          190
Leu Leu Glu Asp Gln Ser Arg Ile Arg Lys Met Thr Lys Ala Glu Lys
195          200          205
Thr Leu Val Val Pro Pro Ile Pro Ser Gln Glu Arg Pro Thr Ala Ser
210          215          220
Glu Lys Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Asp Leu Ile Trp
225          230          235          240
Asn Asp Gly Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Thr Cys Ser
245          250          255
Lys Val Thr Val Gly Thr Val Arg Ala Lys Cys Ile Cys Gly Glu Cys
260          265          270
Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Ile Thr Asp Ser Gly Ile Glu Asn Arg
275          280          285
Ile Trp Tyr His Asn Leu Ala Asp Ile Pro Glu
290          295

<210> 3
<211> 303
<212> PRT
<213> Dolphin morbillivirus

<400> 3
Met Ala Glu Glu Ala Tyr His Ile Asn Lys Gly Leu Glu Cys Leu
1          5          10          15
Lys Ser Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ala Val Glu Ile Lys Glu Ala
20          25          30
Gln Ile Ile Arg Ser Lys Ala Ala Cys Glu Glu Ser Ser Glu Ser His
35          40          45
His Gln Asp Asn Ser Glu Lys Asp Thr Leu Asp Phe Asp Glu Ser Cys
50          55          60
Ser Ser Ala Ile Arg Pro Glu Thr Tyr Arg Met Leu Leu Gly Asp Asp
65          70          75          80
Thr Gly Phe Arg Ala Pro Gly Tyr Ile Pro Asn Glu Gly Glu Pro Glu
85          90          95
Pro Gly Asp Ile Gly Lys Glu Glu Pro Ala Val Arg Cys Tyr His Val
100          105          110
Tyr Asp His Gly Gly Gln Ala Val Glu Gly Val Lys Asp Ala Asp Leu
115          120          125
Leu Val Val Pro Thr Gly Ser Asp Asp Asp Ala Glu Phe Arg Asp Gly
130          135          140
Asp Glu Ser Ser Leu Glu Ser Asp Gly Glu Ser Gly Thr Val Asp Thr
145          150          155          160
Arg Gly Asn Ser Ser Ser Asn Arg Gly Ser Ala Pro Arg Ile Lys Val

```

WO 02/00694

PCT/US01/19806

```

          165          170          175
Glu Arg Ser Ser Asp Val Glu Thr Ile Ser Ser Glu Glu Leu Gln Gly
 180          185          190
Leu Ile Arg Ser Gln Ser Gln Lys His Asn Gly Phe Gly Val Asp Arg
 195          200          205
Phe Leu Lys Val Pro Pro Ile Pro Thr Ser Val Pro Leu Asp Pro Ala
 210          215          220
Pro Lys Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Ser Leu Ile Trp
 225          230          235          240
Asp Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Thr Cys Ser
 245          250          255
Arg Ile Lys Met Gly Ile Val Arg Val Lys Cys Thr Cys Gly Glu Cys
 260          265          270
Pro Pro Val Cys Asp Glu Cys Arg Glu Asp Pro Glu Thr Pro Thr Arg
 275          280          285
Ile Trp Tyr His Ser Leu Pro Glu Ile Pro Glu Gln Trp Pro Phe
 290          295          300

```

```

<210> 4
<211> 299
<212> PRT
<213> canine distemper virus

```

```

<400> 4
Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Ser Lys Gly Leu Glu Cys Leu
 1          5          10          15
Lys Ala Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ile Glu Glu Ile Gln Glu Val
 20          25          30
Ser Ser Leu Arg Asp Gln Thr Cys Asn Pro Gly Gln Glu Asn Gly Thr
 35          40          45
Thr Gly Met Gln Glu Glu Glu Asp Ser Gln Asn Leu Asp Glu Ser His
 50          55          60
Glu Pro Thr Lys Gly Ser Asn Tyr Val Gly His Val Pro Gln Asn Asn
 65          70          75          80
Pro Gly Cys Gly Glu Arg Asn Thr Ala Leu Val Glu Ala Glu Arg Pro
 85          90          95
Pro Arg Glu Asp Ile Gln Pro Gly Pro Gly Ile Arg Cys Asp His Val
 100          105          110
Tyr Asp His Ser Gly Glu Glu Val Lys Gly Ile Glu Asp Ala Asp Ser
 115          120          125
Leu Val Val Pro Ala Gly Thr Val Gly Asn Arg Gly Phe Glu Arg Gly
 130          135          140
Glu Gly Ser Leu Asp Asp Ser Thr Glu Asp Ser Gly Glu Asp Tyr Ser

```

WO 02/00694

PCT/US01/19806

```

145          150          155          160
Glu Gly Asn Ala Ser Ser Asn Trp Gly Tyr Ser Phe Gly Leu Lys Pro
          165          170          175
Asp Arg Ala Ala Asp Val Ser Met Leu Met Glu Glu Glu Leu Ser Ala
          180          185          190
Leu Leu Arg Thr Ser Arg Asn Val Gly Ile Gln Lys Arg Asp Gly Lys
          195          200          205
Thr Leu Gln Phe Pro His Asn Pro Glu Gly Lys Thr Arg Asp Pro Glu
          210          215          220
Cys Gly Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Val Ser Leu Thr Trp
          225          230          235          240
Asn Gly Asp Ser Cys Trp Ile Asp Lys Trp Cys Asn Pro Ile Cys Thr
          245          250          255
Gln Val Asn Trp Gly Ile Ile Arg Ala Lys Cys Phe Cys Gly Glu Cys
          260          265          270
Pro Pro Thr Cys Asn Glu Cys Lys Asp Asp Pro Glu Met Gln Thr Arg
          275          280          285
Val Trp His Ala Thr Pro Ser Gln Asp Leu Lys
          290          295

```

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:epitope tag

```

<400> 5
ccatggcctta tccttatgac gtgccttgact atgcc
                                         35

```

<210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

```

<400> 6
cggccatggc agaagagaca ggcacgccac gtaaaaaacg gac
                                         43

```

<210> 7
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Measles virus

```

<400> 7
Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Tyr Asp His

```

WO 02/00694

PCT/US01/19806

1 5 10 15
Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
20 25 30
Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
35 40
<210> 8
<211> 41
<212> PRT
<213> Measles virus
<400> 8
Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Ala Ala His
1 5 10 15
Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
20 25 30
Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
35 40
<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Measles virus
<400> 9
Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Leu Asp Gly Asp
1 5 10 15
Ser Thr
<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> Measles virus
<400> 10
Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Tyr Ala Ala
1 5 10 15
Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
20 25 30
Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
35 40
<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Measles virus
<400> 11
Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Ala Ala Ala

WO 02/00694

PCT/US01/19806

1 5 10 15
 Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
 20 25 30
 Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
 35 40
 <210> 12
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Measles virus
 <400> 12
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
 20 25 30
 Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
 35 40 45
 Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
 50 55 60
 Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65 70 75 80

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 13
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly
 1 5 10

<210> 14
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 14
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Ala
 20 25 30
 Asn Pro Met Ala Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
 35 40 45
 Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
 50 55 60

PCT/US01/19806

<400> 17
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
1 5 10 15

WO 02/00694

PCT/US01/19806

Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
 20 25 30

Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg
 35 40 45

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 18
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg
 20 25 30

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 19
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly
 20

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 20
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 21
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile
 1 5

<210> 22
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 22
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Ala Ala Glu
 1 5 10 15

WO 02/00694

PCT/US01/19806

Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
 20 25 30
 Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
 35 40 45
 Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
 50 55 60
 Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65 70 75 80

<210> 23
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 23
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Asp Asp Glu
 1 5 10 15
 Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
 20 25 30
 Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
 35 40 45
 Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
 50 55 60
 Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65 70 75 80

<210> 24
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Measles virus

<400> 24
 Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu
 20 25 30
 Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys
 35 40 45
 Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His
 50 55 60
 Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu

WO 02/00694

PCT/US01/19806

65

70

【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
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000694 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/115, C12N 7/00, C07K 14/13, A61K 39/165
(74) Agents: GORDON, Alan, M.; American Home Products Corporation, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 et al. (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/19806

(22) International Filing Date: 21 June 2001 (21.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/213,655 23 June 2000 (23.06.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AMERICAN CYANAMID COMPANY [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

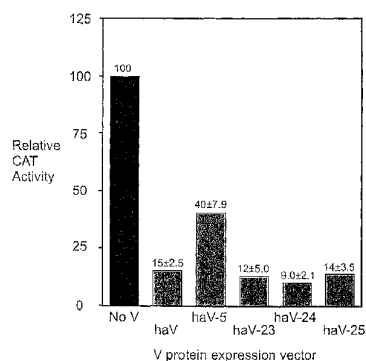
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, 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, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): PARKS, Christopher, L. [US/US]; 118 South Terrace, Boonton, NJ 07005 (US).Published:
— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: MODIFIED MORBILLIVIRUS V PROTEINS



(57) Abstract: Modified Morbilliviruses having at least one mutation in the region corresponding to amino acids 112-134 of the measles virus V protein are described wherein one or both of amino acids 113 or 114 is mutated. Such modified Morbilliviruses exhibit reduced repression of gene expression. Additional mutations or deletions in other regions of the genome may be included, including in the carboxy-terminal region.

WO 02/000694 A3

WO 02/000694 A3

before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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.

(88) Date of publication of the international search report:
10 October 2002

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/US 01/19806
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/115 C12N7/00 C07K14/13 A61K39/165		
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 C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VALSAMAKIS A ET AL.: "RECOMBINANT MEASLES VIRUSES WITH MUTATIONS IN THE C, V, OR F GENE HAVE ALTERED GROWTH PHENOTYPES IN VIVO" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 7754-7761, XP000943629 ISSN: 0022-538X the whole document	1-34
A	PATTERSON J.B. ET AL.: "V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo." VIROLOGY, vol. 267, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 80-89, XP002207894 the whole document	1-34
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" 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 considered 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 29 July 2002		Date of mailing of the international search report 20/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/19806
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 49017 A (SIDHU MOHINDERJIT S ; UDEM STEPHEN A (US); AMERICAN CYANAMID CO (US) 30 September 1999 (1999-09-30) claims 1-25 -----	1-34
A	WO 98 13501 A (SIDHU MOHINDERJIT S ; US HEALTH (US); MURPHY BRIAN R (US); TATEM JO) 2 April 1998 (1998-04-02) claims 1-46 -----	1-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/19806
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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 28-29 (and, as far as a method in vivo is concerned, claim 30) 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. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	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.:	
4. <input type="checkbox"/>	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		
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

Information on patent family members				International Application No PCT/US 01/19806	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9949017	A	30-09-1999	AU	3109599 A	18-10-1999
			BR	9909076 A	05-12-2000
			CA	2323927 A1	30-09-1999
			CN	1294628 T	09-05-2001
			EP	1064358 A2	03-01-2001
			JP	2002507408 T	12-03-2002
			WO	9949017 A2	30-09-1999
WO 9813501	A	02-04-1998	AU	4427897 A	17-04-1998
			BR	9712138 A	18-01-2000
			CN	1232504 A	20-10-1999
			EP	0932684 A2	04-08-1999
			JP	2000517194 T	26-12-2000
			WO	9813501 A2	02-04-1998

フロントページの続き

(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

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 BA01 BA16 CA44 CA45
4C085 AA03 BA57 CC08 DD62 EE06 GG08 GG10