

(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2007-500017

(P2007-500017A)

(43) 公表日 平成19年1月11日(2007.1.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-533645 (P2006-533645)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月8日 (2004.6.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年2月9日 (2006.2.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/018305
 (87) 国際公開番号 W02004/113517
 (87) 国際公開日 平成16年12月29日 (2004.12.29)
 (31) 優先権主張番号 60/477,389
 (32) 優先日 平成15年6月9日 (2003.6.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

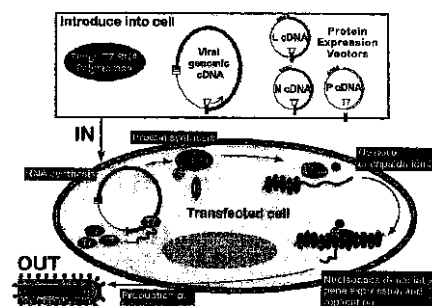
(71) 出願人 591011502
 ワイス
 Wyeth
 アメリカ合衆国07940-0874 ニ
 ュージャージー州マディソン、ファイブ・
 ジラルダ・ファームズ
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 cDNAからの非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの回収のための改良方法

(57) 【要約】

RNAポリメラーゼをエンコードする発現ベクターで一過性にトランスフェクトされた宿主細胞において必須のウイルスタンパク質N、PおよびLと共にウイルスcDNAを共発現させることを含む、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法を提供する。別の方法では、ウイルスcDNA発現ベクターとRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードする1つまたはそれ以上のベクターとを用いて宿主細胞がトランスフェクトされた後に、その宿主細胞は組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝される。その他別の実施形態では、ウイルススレスクューが始まった後に宿主細胞はブランクエキスパンション細胞を含む共培養物中に移され、組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスが共培養物中から回収される。また、本発明中で提供されるものとしては、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための組成物、前記方法を用いて生成される組換えウイルスおよ



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

(a) ウイルス cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで該宿主細胞は N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質を発現し、一過性にトランスフェクトされた発現ベクターから RNA ポリメラーゼを一過性に発現するところの工程；および

10

(b) 該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項 2】

RNA ポリメラーゼが T7 RNA ポリメラーゼであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

一過性にトランスフェクトされた発現ベクターがプラスミドであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ウイルス cDNA 発現ベクターおよび RNA ポリメラーゼをエンコードし、その一過性発現を指令する一過性発現ベクターが、DNA トランスフェクション混合物中で組み合わされており、同調的トランスフェクションを達成するよう宿主細胞培養物中に同時に加えられるところの、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 5】

RNA ポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされる発現ベクターの導入の前に、ウイルス cDNA 発現ベクターが宿主細胞中に導入されるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

RNA ポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされる発現ベクターの導入後であり、該 RNA ポリメラーゼが検出可能なレベルに宿主細胞中で蓄積する前に、ウイルス cDNA 発現ベクターが宿主細胞中に導入されるところの、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 7】

1 つまたはそれ以上のウイルス cDNA 発現ベクターおよび RNA ポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされる発現ベクターが、リン酸カルシウムトランスフェクションまたはエレクトロポレーションにより宿主細胞中に導入されるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

1 つまたはそれ以上のウイルス cDNA 発現ベクターおよび RNA ポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされる発現ベクターが宿主細胞中に導入された後、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 9】

宿主細胞が 37 以上の熱ショック温度に曝されるところの、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

宿主細胞が約 37 ~ 約 50 の範囲の熱ショック温度に曝されるところの、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

宿主細胞が約 41 ~ 約 47 の範囲の熱ショック温度に曝されるところの、請求項 8 記載の方法。

50

【請求項 1 2】

宿主細胞が少なくとも約 5 分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項 8 記載の方法。

【請求項 1 3】

宿主細胞が約 1 5 分～約 2 0 0 分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

宿主細胞が約 3 0 分～約 1 5 0 分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

ウイルス c D N A 発現ベクターおよび R N A ポリメラーゼをエンコードし、その発現を指令する一過性にトランスフェクトされた発現ベクターの発現を可能にするのに十分な時間の経過後に、宿主細胞を同一または異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養し、レスキューされるウイルスがブランクエキспанション細胞まで拡散することを可能とするところの、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 1 6】

宿主細胞がブランクエキспанション細胞の少なくとも 1 つの層に移され、宿主細胞およびブランクエキспанション細胞の共培養を確立するところの、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

宿主細胞がブランクエキспанション細胞と異なる細胞型であるところの、請求項 1 5 記載の方法。

20

【請求項 1 8】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が H E p - 2、H e L a、H E K、B H K、F R h L - D B S 2、L L C - M K 2、M R C - 5 および V e r o 細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

宿主細胞が真核細胞であるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

宿主細胞が脊椎動物細胞であるところの、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 2 1】

宿主細胞が H E p - 2、H e L a、H E K、B H K、F R h L - D B S 2、L L C - M K 2、M R C - 5 および V e r o 細胞から選択されるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 2】

感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスが完全ウイルスであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

1 つまたはそれ以上の N、P および L タンパク質が異種の非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスのものであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチド分子が、野生型の非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの配列をエンコードするところの、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 2 5】

非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスがパラミクソウイルス科のメンバーであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

非分節型、ネガティブ鎖 R n A ウイルスがラブドウイルス科のメンバーであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 7】

50

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスが、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、ヒト・パラインフルエンザウイルス(HPIV)、牛パラインフルエンザウイルス(BPIV)、キメラヒト・牛PIV(HBPIV)、麻疹ウイルス(MV)、または水疱性口内炎ウイルス(VSV)から選択されるところの、請求項1記載の方法。

【請求項28】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、1つまたはそれ以上の弱毒性変異(群)の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項1記載の方法。

【請求項29】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが1つまたはそれ以上の組換え技術的に導入された温度感受性(ts)弱毒性変異を組み込んでいるところの、請求項28記載の方法。

10

【請求項30】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、生物学的に派生した変異非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスにおいて同定された1つまたはそれ以上の弱毒性変異(群)を組み込んでいるところの、請求項28記載の方法。

【請求項31】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、異種の、変異非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスにおいて同定された1つまたはそれ以上の変異に相当する1つまたはそれ以上の弱毒性変異(群)を組み込んでいるところの、請求項28記載の方法。

【請求項32】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、変異を特定するコドン中の2個または3個のヌクレオチド変化により特定される少なくとも1つの弱毒性変異を組み込んでいるところの、請求項28記載の方法。

20

【請求項33】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブラークサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項1記載の方法。

【請求項34】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内のC、C'、D、E、F、G、HA、HN、L、M、M2-1、M2-2、NS1、NS2、SH、V、Y1、および/またはY2読み取り枠(ORF)および/または3'リーダー、5'トレーラー、および/または遺伝子間領域の1つまたはそれ以上を改変する組換え技術的修飾を組み込んでいるところの、請求項33記載の方法。

30

【請求項35】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの1つまたはそれ以上の遺伝子(群)が完全にもしくは部分的に欠失されているか、あるいはRNA修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠(ORF)中に1つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、該遺伝子(群)の発現が減少または除去されているところの、請求項1記載の方法。

40

【請求項36】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように修飾されているところの、請求項1記載の方法。

【請求項37】

該ゲノムまたは該アンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、1つまたはそれ以上の異種病原体(群)の1つまたはそれ以上の抗原決定基(群)をエンコードする1つまたはそれ以上の異種遺伝子(群)またはゲノム分節(群)と組み合わせられている部分的なまたは完全なベクターゲノムまた

50

はアンチゲノムを含むところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 38】

抗原決定基（群）をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が、余剰遺伝子（群）またはゲノム分節（群）として、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域に隣接してまたは非コード領域内に付加されているところの、あるいは、抗原決定基（群）をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）により、部分的なベクターゲノムまたはアンチゲノム中の 1 つまたはそれ以上の対応遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が置換されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子の順序位置（order position）に相当する位置に付加または置換されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に付加または置換されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 41】

ベクターゲノムまたはアンチゲノムが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、異種の非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの異種の抗原ドメイン、断片またはエピトープを 1 つまたはそれ以上組み込んでいるキメラ糖タンパク質をエンコードするように修飾されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 42】

異種病原体が、麻疹ウイルス、サブグループ A およびサブグループ B の呼吸器合胞体ウイルス、ヒト・パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト・パピローマウイルス、1 型および 2 型のヒト免疫不全ウイルス、単純疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒト・メタプネウオモウイルス、エプスタイン・バーウイルス、フィロウイルス、ブンヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、またはインフルエンザウイルスから選択されるところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 43】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、1 つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 44】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス変異体において同定された 1 つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）を組み込んでいる、請求項 37 記載の方法。

【請求項 45】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 46】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、該ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の C、C'、D、E、F、G、HA、HN、L、M、M2-1、M2-2、NS1、NS2、SH、V、Y1、および/または Y2 読み取り枠（ORF）および/または 3' リーダー、5' トレーラーおよび/または遺伝子間領域の 1 つまたはそれ以上を改変する組換え修飾を組み込んでいるところの、請求項 37 記載の方法。

【請求項 47】

キメラゲノムまたはアンチゲノム内の 1 つまたはそれ以上の遺伝子（群）が完全にまた

10

20

30

40

50

は部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子（群）の発現がRNA修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠（ORF）中に1つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項37記載の方法。

【請求項48】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように、修飾されているところの、請求項37記載の方法。

10

【請求項49】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、該非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に遺伝子またはゲノム分節の付加、置換あるいは転座によって修飾されているところの、請求項1記載の方法。

【請求項50】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、遺伝子外性の3'リーダーもしくは5'トレーラー領域、遺伝子開始シグナル、遺伝子終止シグナル、修正領域、遺伝子間領域、または3'もしくは5'非コード領域を含む異種の調節要素を組み込むように修飾されているところの、請求項1記載の方法。

20

【請求項51】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、該ゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域（NCR）中に、完全な読み取り枠（ORF）を欠き、かつ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの弱毒化表現型を特定する長さ150ヌクレオチド（nts）から4,000ヌクレオチドのポリヌクレオチドの挿入をまたは分離した遺伝子単位（GU）として組み込むように修飾されているところの、請求項1記載の方法。

【請求項52】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質（群）のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および/または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項53】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、該ベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を可能とするのに十分な条件下で、好適な宿主細胞中に導入する工程；

40

該宿主細胞をブランクエキспанション細胞を含む共培養物中に移す工程；および

該共培養物中から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項54】

宿主細胞が同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養され、レスキューされるウイルスをブランクエキспанション細胞にまで拡散させるところの、請求項53記載の方法。

【請求項55】

50

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、H E p - 2、H e L a、H E K、B H K、F R h L - D B S 2、L L C - M K 2、M R C - 5、またはV e r o細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 6】

1 つまたはそれ以上のウイルス c D N A 発現ベクターおよび R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 7】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの構造タンパク質（群）のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および／または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 8】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成するための方法であって、以下の工程：

（ a ）ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターを、

（ 1 ） R N A ポリメラーゼ、

（ 2 ） N タンパク質、

（ 3 ） P タンパク質、および

（ 4 ） L タンパク質、

を一過性に発現させる宿主細胞であって、R N A ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質のそれぞれが一過性にトランスフェクトされた発現ベクターから発現される宿主細胞中に導入する工程；および

（ b ）該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項 5 9】

宿主細胞が、ブランクエキспанション細胞に対するレスキューされるウイルスの分散を可能とするために、同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養されるところの、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、H E p - 2、H e L a、H E K、B H K、F R h L - D B S 2、L L C - M K 2、M R C - 5、またはV e r o細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 1】

1 つまたはそれ以上のウイルス c D N A 発現ベクターおよび R N A ポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 2】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの構造タンパク質（群）のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および／または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 3】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルス c D N A 発現ベクターからのウイルス R N A 転写物の合成を指令するために発

10

20

30

40

50

現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞中に導入する工程；

該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収する工程、
を含む方法。

【請求項64】

少なくとも1つのN、PおよびLタンパク質が発現制御プラスミドによってエンコードされているところの、請求項63記載の方法。 10

【請求項65】

宿主細胞が、ブランクエキспанション細胞に対するレスキューされるウイルスの分散を可能とするために、同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養されるところの、請求項63記載の方法。

【請求項66】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項63記載の方法。

【請求項67】

1つまたはそれ以上のウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項63記載の方法。 20

【請求項68】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質(群)のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および/または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項69】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための組成物であって、 30

(a) 好適な宿主細胞においてウイルスcDNAからのウイルスRNA転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター；

(b) 宿主細胞にて

(1) Nタンパク質、

(2) Pタンパク質、および

(3) Lタンパク質、

をエンコードし、その発現を指令する、1つまたはそれ以上の補助ベクター；および、 40

(c) RNAポリメラーゼをエンコードし且つ宿主細胞中で一過性に発現させる一過性発現ベクター、

を含む組成物。

【請求項70】

ウイルスcDNA発現ベクター、N、PおよびLをエンコードする1つまたはそれ以上の補助ベクター、並びにRNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターが、無細胞同時トランスフェクション混合物中にて提供されるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項71】

ウイルスcDNA発現ベクター、N、PおよびLをエンコードする1つまたはそれ以上 50

の補助ベクター、並びにRNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターが宿主細胞中にトランスフェクトされるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項72】

RNAポリメラーゼがT7RNAポリメラーゼであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項73】

RNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターがプラスミドであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項74】

ブランクエキспанション細胞に対する宿主細胞からレスキューされるウイルスの分散を可能とする、宿主細胞と同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞をさらに含む、請求項69記載の組成物。

【請求項75】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞の共培養を確立するために、少なくとも1層のブランクエキспанション細胞をさらに含む、請求項74記載の組成物。

【請求項76】

宿主細胞が、ブランクエキспанション細胞と異なる細胞型であるところの、請求項74記載の組成物。

【請求項77】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項74記載の組成物。

【請求項78】

宿主細胞が真核細胞であるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項79】

宿主細胞が脊椎動物細胞であるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項80】

宿主細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞から選択されるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項81】

感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスが完全ウイルスであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項82】

1つまたはそれ以上のN、PおよびLタンパク質が異種の非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスのものであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項83】

ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチド分子が、野生型非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの配列をエンコードするところの、請求項69記載の組成物。

【請求項84】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科のメンバーであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項85】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスがラブドウイルス科のメンバーであるところの、請求項69記載の組成物。

【請求項86】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスが、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、ヒト・パラインフルエンザウイルス(HPIV)、牛パラインフルエンザウイルス(BPIV)

10

20

30

40

50

、キメラのヒト - 牛 P I V (H B P I V)、麻疹ウイルス (M V)、または水疱性口内炎ウイルス (V S V) から選択されるところの、請求項 6 9 記載の組成物。

【請求項 8 7】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが 1 つまたはそれ以上の弱毒性変異 (群) の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 6 9 記載の組成物。

【請求項 8 8】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、組換え技術的に導入された温度感受性 (t s) 弱毒性変異を 1 つまたはそれ以上組み込んでいるところの、請求項 8 7 記載の組成物。

【請求項 8 9】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、生物学的に派生した変異非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスにおいて同定された弱毒性変異 (群) を 1 つまたはそれ以上組み込んでいるところの、請求項 8 7 記載の組成物。 10

【請求項 9 0】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、異種の、非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスにおいて同定された 1 つまたはそれ以上の変異に相当する弱毒性変異 (群) を 1 つまたはそれ以上組み込んでいるところの、請求項 8 7 記載の組成物。

【請求項 9 1】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、変異を特定するコドン中の 2 個または 3 個のヌクレオチド変化によって特定される弱毒性変異を少なくとも 1 つ組み込んでいるところの、請求項 8 7 記載の組成物。 20

【請求項 9 2】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、プラークサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 6 9 記載の組成物。

【請求項 9 3】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、該ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の C、C'、D、E、F、G、H A、H N、L、M、M 2 - 1、M 2 - 2、N S 1、N S 2、S H、V、Y 1、および / または Y 2 読み取り枠 (O R F) および / または 3' リーダー、5' トレーラー、および / または遺伝子間領域の 1 つまたはそれ以上を改変する組換え技術的修飾を組み込んでいるところの、請求項 6 9 記載の方法。 30

【請求項 9 4】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの 1 つまたはそれ以上の遺伝子 (群) が完全にもしくは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子 (群) の発現が R N A 修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠 (O R F) 中に 1 つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項 6 9 記載の組成物。

【請求項 9 5】

非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスが、サイトカイン、T - ヘルパーエピトープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように修飾されているところの、請求項 6 9 記載の組成物。 40

【請求項 9 6】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、1 つまたはそれ以上の異種病原体 (群) の 1 つまたはそれ以上の抗原決定基 (群) をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子 (群) またはゲノム分節 (群) と組み合わせられている、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムを含むところの、請求項 6 9 記載の組成物。

【請求項 9 7】

抗原決定基（群）をエンコードする１つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が、余剰遺伝子（群）またはゲノム分節（群）として、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域に隣接してまたは非コード領域内に付加されているところの、あるいは、抗原決定基（群）をエンコードする１つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）により、部分的なベクターゲノムまたはアンチゲノム中の１つまたはそれ以上の対応遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が置換されているところの、請求項９６記載の組成物。

【請求項９８】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置に相当する位置に付加または置換されているところの、請求項９６記載の組成物。

10

【請求項９９】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に付加または置換されているところの、請求項９６記載の組成物。

【請求項１００】

ベクターゲノムまたはアンチゲノムが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、異種の非分節型ネガティブ鎖ＲＮＡウイルスの異種の抗原ドメイン、断片またはエピトープを１つまたはそれ以上組み込んでいるキメラ糖タンパク質をエンコードするように修飾されているところの、請求項９６記載の組成物。

20

【請求項１０１】

異種病原体が、麻疹ウイルス、サブグループＡおよびサブグループＢの呼吸器合胞体ウイルス、ヒト・パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト・パピローマウイルス、１型および２型のヒト免疫不全ウイルス、単純疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒト・メタプネウオモウイルス、エプスタイン・バーウイルス、フィロウイルス、ブンヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、またはインフルエンザウイルスから選択されるところの、請求項９６記載の組成物。

【請求項１０２】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、１つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項９６記載の組成物。

30

【請求項１０３】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス変異体において同定された１つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）を組み込んでいるところの、請求項９６記載の組成物。

【請求項１０４】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項９６記載の組成物。

40

【請求項１０５】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内のＣ、Ｃ'、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、ＨＡ、ＨＮ、Ｌ、Ｍ、Ｍ２－１、Ｍ２－２、ＮＳ１、ＮＳ２、ＳＨ、Ｖ、Ｙ１、および／またはＹ２読み取り枠（ＯＲＦｓ）および／または３'リーダー、５'トレーラー、および／または遺伝子間領域の１つまたはそれ以上を改変する組換え技術的修飾を組み込んでいるところの、請求項９６記載の組成物。

【請求項１０６】

キメラゲノムまたはアンチゲノム内の１つまたはそれ以上の遺伝子（群）が完全にまたは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子（群）の発現がＲＮＡ修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺

50

伝子の読み取り枠（ORF）中に1つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項96記載の組成物。

【請求項107】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように修飾されているところの、請求項96記載の組成物。

【請求項108】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置で、遺伝子またはゲノム分節の付加、置換または転座により修飾されているところの、請求項69記載の組成物。

【請求項109】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、遺伝子外性の3'リーダーもしくは5'トレーラー領域、遺伝子開始シグナル、遺伝子終止シグナル、修正領域、遺伝子間領域、または3'もしくは5'非コード領域を含む異種の調節要素を組み込むように修飾されているところの、請求項69記載の組成物。

【請求項110】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、該ゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域（NCR）中に、完全な読み取り枠（ORF）を欠き、かつ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの弱毒性表現型を特定する長さ150ヌクレオチド（nts）から4,000ヌクレオチドのポリヌクレオチド挿入をまたは分離した遺伝子単位（GU）として組み込むように修飾されているところの、請求項69記載の組成物。

【請求項111】

1つまたはそれ以上の発現ベクター（群）が同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質（群）のいずれか、またはいずれかの組み合わせをエンコードするところの、請求項69記載の組成物。

【請求項112】

モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスであって、以下の工程：

ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質をエンコードし、その発現を指令する1つまたはそれ以上の補助ベクター（群）、並びに、RNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞中に導入し；そして

該宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収すること、
によって生成されるウイルス。

【請求項113】

RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼであるところの、請求項112記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルス。

【請求項114】

RNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターがプラスミドであるところの、請求項112記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルス。

【請求項115】

ウイルスcDNA発現ベクター、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエ

10

20

30

40

50

ンコードし且つ発現させる１つまたはそれ以上の補助ベクター（群）、並びにＲＮＡポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターが、ＤＮＡトランスフェクション混合液中に組み合わされており、同調的トランスフェクションを同時に達成するために宿主細胞培養物中に添加されるところの、請求項１１２記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

【請求項１１６】

ウイルスｃＤＮＡ発現ベクター、およびＮタンパク質、Ｐタンパク質およびＬタンパク質をエンコードし且つ発現させる１つまたはそれ以上の補助ベクター（群）が、ＲＮＡポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターの導入前に、宿主細胞中に導入されるところの、請求項１１２記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖

10

【請求項１１７】

ＲＮＡポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターの導入後であるが、ＲＮＡポリメラーゼが宿主細胞中で検出可能レベルに蓄積する前に、ウイルスｃＤＮＡ発現ベクター、およびＮタンパク質、Ｐタンパク質およびＬタンパク質をエンコードし且つ発現させる１つまたはそれ以上の補助ベクター（群）が宿主細胞中に導入されるところの、請求項１１２記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

【請求項１１８】

１つまたはそれ以上の（ａ）ウイルスｃＤＮＡ発現ベクターおよび（ｂ）ＲＮＡポリメラーゼ、Ｎタンパク質、Ｐタンパク質、およびＬタンパク質をエンコードし且つ発現させる１つまたはそれ以上の補助ベクター（群）が、リン酸カルシウムトランスフェクション法またはエレクトロポレーション法により宿主細胞中に導入されるところの、請求項１１２記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

20

【請求項１１９】

１つまたはそれ以上の（ａ）ウイルスｃＤＮＡ発現ベクターおよび（ｂ）Ｎタンパク質、Ｐタンパク質、およびＬタンパク質をエンコードし且つ発現させる１つまたはそれ以上の補助ベクター、並びにＲＮＡポリメラーゼをエンコードし且つ発現させる一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、該宿主細胞が組換えウイルスの回収が向上するのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝さらされるところの、請求項１１２記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

30

【請求項１２０】

宿主細胞が、温度３７以上の熱ショック温度に曝されるところの、請求項１１９記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

【請求項１２１】

宿主細胞が、約３７～約５０の範囲の熱ショック温度に曝されるところの、請求項１１９記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

【請求項１２２】

宿主細胞が、約４１～約４７の範囲の熱ショック温度に曝されるところの、請求項１１９記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

40

【請求項１２３】

宿主細胞が、少なくとも約５分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項１１９記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

【請求項１２４】

宿主細胞が、約１５分～約２００分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項１２３記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖ＲＮＡウイルス。

50

【請求項 1 2 5】

宿主細胞が、約 30 分～約 150 分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項 1 2 4 記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 2 6】

ウィルス cDNA 発現ベクター、N タンパク質、P タンパク質、および L タンパク質をエンコードし且つ発現させる 1 つまたはそれ以上の補助ベクター、並びに RNA ポリメラーゼをエンコードし且つ発現させる一過性発現ベクターの発現を行わせるのに十分な時間の経過後に、該宿主細胞がブランクエキспанション細胞に対するレスキューされるウィルスの分散を可能とする同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養されるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

10

【請求項 1 2 7】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞の共培養を確立するために、宿主細胞が少なくとも 1 層のブランクエキспанション細胞に移されるところの、請求項 1 2 6 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 2 8】

宿主細胞がブランクエキспанション細胞と異なる細胞型であるところの、請求項 1 2 6 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 2 9】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項 1 2 6 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

20

【請求項 1 3 0】

宿主細胞が真核細胞であるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 3 1】

宿主細胞が脊椎動物細胞であるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

30

【請求項 1 3 2】

宿主細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞から選択されるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 3 3】

感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルスが完全ウィルスであるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 3 4】

1 つまたはそれ以上の N、P および L タンパク質が異種の非分節型ネガティブ鎖 RNA ウィルスのものであるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

40

【請求項 1 3 5】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチド分子が、野生型の品文節方ネガティブ鎖 RNA ウィルスの配列をエンコードするところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

【請求項 1 3 6】

非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルスがパラミクソウィルス科のメンバーであるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウィルス。

50

【請求項 1 3 7】

非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスがラブドウイルス科のメンバーであるところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 3 8】

非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、呼吸器合胞体ウイルス (R S V)、ヒト・パラインフルエンザウイルス (H P I V)、牛パラインフルエンザウイルス (B P I V)、キメラのヒト - 牛 P I V (H B P I V)、麻疹ウイルス (M V)、または水疱性口内炎ウイルス (V S V) から選択されるところの、請求項 1 0 1 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

10

【請求項 1 3 9】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、1 つまたはそれ以上の弱毒性変異 (群) の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 0】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、組換え技術的に導入された温度感受性 (t s) 弱毒性変異を 1 つまたはそれ以上組み込んでいるところの、請求項 1 3 9 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 1】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、生物学的に派生した変異非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスにおいて同定される 1 つまたはそれ以上の弱毒性変異 (群) を組み込んでいるところの、請求項 1 3 9 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

20

【請求項 1 4 2】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、異種の、変異非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスにおいて同定される 1 つまたはそれ以上の変異に相当する 1 つまたはそれ以上の弱毒性変異 (群) を組み込んでいるところの、請求項 1 3 9 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 3】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、変異を特定するコドン中の 2 個または 3 個のヌクレオチド変化により特定される少なくとも 1 つの弱毒性変異を組み込んでいるところの、請求項 1 3 9 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

30

【請求項 1 4 4】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 5】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の C、C'、D、E、F、G、HA、HN、L、M、M2 - 1、M2 - 2、NS1、NS2、SH、V、Y1、および / または Y2 読み取り枠 (O R F) および / または 3' リーダー、5' トレーラー、および / または遺伝子間領域の 1 つまたはそれ以上を改変する組換え技術的修飾を組み込んでいるところの、請求項 1 4 4 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

40

【請求項 1 4 6】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの 1 つまたはそれ以上の遺伝子 (群) が完全にもしくは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子 (群) の発現が、RNA 修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠 (O R F) 中に 1 つまたはそれ以上のストップコドンを導入する

50

ことによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 7】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、サイトカイン、T - ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように修飾されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 8】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、1 つまたはそれ以上の異種病原体（群）の 1 つまたはそれ以上の抗原決定基（群）をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）と組み合わされている部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムを含むところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される、感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 4 9】

抗原決定基（群）をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が、余剰遺伝子（群）またはゲノム分節（群）として、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域に隣接してまたは非コード領域内に付加されているところの、あるいは、抗原決定基（群）をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）により、部分的なベクターゲノムまたはアンチゲノム中の 1 つまたはそれ以上の対応遺伝子（群）またはゲノム分節（群）が置換されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 0】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置に相当する位置に付加または置換されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 1】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に付加または置換されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 2】

ベクターゲノムまたはアンチゲノムが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、異種の非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの異種の抗原ドメイン、断片またはエпитープを 1 つまたはそれ以上組み込んでいるキメラ糖タンパク質をエンコードするように修飾されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 3】

異種病原体が、麻疹ウイルス、サブグループ A およびサブグループ B の呼吸器合胞体ウイルス、ヒト・パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト・パピローマウイルス、1 型および 2 型のヒト免疫不全ウイルス、単純疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒト・メタプneuオモウイルス、エプスタイン・バーウイルス、フィロウイルス、ブンヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、またはインフルエンザウイルスから選択されるところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

10

20

30

40

50

【請求項 1 5 4】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、1つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 5】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、生物学的に派生した変異非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスにおいて同定された1つまたはそれ以上の弱毒性変異（群）を組み込んでいるところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 6】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 7】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、該ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の C、C'、D、E、F、G、HA、HN、L、M、M2-1、M2-2、NS1、NS2、SH、V、Y1、および/または Y2 読み取り枠（ORF）および/または 3' リーダー、5' トレーラーおよび/または遺伝子間領域の1つまたはそれ以上を改変する組換え修飾を組み込んでいるところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 8】

キメラゲノムまたはアンチゲノム内の1つまたはそれ以上の遺伝子（群）が完全にまたは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子（群）の発現が RNA 修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠（ORF）中に1つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 5 9】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される非ウイルス性分子をエンコードするように修飾されているところの、請求項 1 4 8 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 6 0】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置で、遺伝子またはゲノム分節の付加、置換または転座により修飾されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 6 1】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、遺伝子外性の 3' リーダーもしくは 5' トレーラー領域、遺伝子開始シグナル、遺伝子終止シグナル、修正領域、遺伝子間領域、または 3' もしくは 5' 非コード領域を含む異種の調節要素を組み込むように修飾されているところの、請求項 1 1 2 記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルス。

【請求項 1 6 2】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、該ゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域（NCR）中に、完全な読み取り枠（ORF）を欠き、かつ非

10

20

30

40

50

分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの弱毒性表現型を特定する長さ150ヌクレオチド(nts)から4,000ヌクレオチドのポリヌクレオチド挿入をまたは分離した遺伝子単位(GU)として組み込むように修飾されているところの、請求項112記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルス。

【請求項163】

手順が、同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質(群)のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および/または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含むところの、請求項112記載の手順に従って生成される感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルス。

【請求項164】

医薬的に許容される担体中に、請求項112記載の手順に従って生成される、単離された感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫原的有効量を含む、免疫原性組成物。

【請求項165】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、 $10^3 \sim 10^7$ PFUの用量にて調剤されるところの、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項166】

上部気道への投与のために調剤される、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項167】

噴霧、液滴またはエアゾールによる投与のために調剤される、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項168】

宿主細胞が、ブランクエキспанション細胞に対するレスキューされるウイルスの分散を可能とする、同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養されるところの、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項169】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞が、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、またはVero細胞からそれぞれ選択されるところの、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項170】

1つまたはそれ以上のウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼをエンコードする一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項171】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質(群)のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および/または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項164記載の免疫原性組成物。

【請求項172】

哺乳動物被検体に非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに対する免疫応答を誘発するために該被検体の免疫系を刺激する方法であって、医薬的に許容される担体中の請求項112記載の手順に従って生成される、単離された感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫原的有効量を、該被検体に投与することを含む方法。

【請求項173】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが $10^3 \sim 10^7$ PFUの用量にて投与されるところの、請求項172記載の方法。

【請求項174】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが上記気道に投与されるところの、請求項172記載の方法。

【請求項175】

10

20

30

40

50

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが噴霧、液滴またはエアゾールによって投与されるところの、請求項172記載の方法。

【請求項176】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

(a) ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクターを、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質を発現し且つ一過性にトランスフェクトされた発現ベクターからRNAポリメラーゼを一過性に発現する宿主細胞中に導入する工程；および

(b) 該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項177】

該ウイルスが、宿主細胞中で組み立てられた後に一回の複製を完結できないところの、請求項176記載の方法。

【請求項178】

該ウイルスは、インビトロでの増殖および/または複製は可能であるが、インビボでの増殖 - または複製 - が欠損しているところの、請求項176記載の方法。

【請求項179】

一過性にトランスフェクトされた発現ベクターがプラスミドであるところの、請求項176記載の方法。

【請求項180】

ウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターがDNAトランスフェクション混合物中で組み合わされており、同時に同調的トランスフェクションを達成するよう宿主細胞培養物中に加えられるところの、請求項176記載の方法。

【請求項181】

ウイルスcDNA発現ベクター、およびN、P、Lタンパク質をエンコードする1つまたはそれ以上の補助ベクター（群）が、RNAポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされた発現ベクターの導入前に、宿主細胞中に導入されるところの、請求項176記載の方法。

【請求項182】

ウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされた発現ベクターが、リン酸カルシウムトランスフェクション法またはエレクトロポレーション法によって宿主細胞中に導入されるところの、請求項176記載の方法。

【請求項183】

ウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼをエンコードする一過性にトランスフェクトされた発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞が組換えウイルスの回収を増大させるのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝されるところの、請求項176記載の方法。

【請求項184】

宿主細胞が37 以上の熱ショック温度に曝されるところの、請求項183記載の方法。

【請求項185】

宿主細胞が、少なくとも約5分間の効果的な熱ショックにかけられるところの、請求項183記載の方法。

【請求項186】

10

20

30

40

50

ウイルス cDNA 発現ベクターおよび RNA ポリメラーゼをエンコードし且つ発現させる一過性にトランスフェクトされた発現ベクターの発現を可能にするのに十分な時間の経過後に、宿主細胞が、ブランクエキспанション細胞に対してレスキューされるウイルスの分散を可能とする、同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養されるところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 187】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞の共培養を確立するために、宿主細胞が少なくとも 1 層のブランクエキспанション細胞に移されるところの、請求項 186 記載の方法。

【請求項 188】

10

宿主細胞がブランクエキспанション細胞と異なる細胞型であるところの、請求項 186 記載の方法。

【請求項 189】

複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスがサブウイルス粒子であるところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 190】

1 つまたはそれ以上の N、P および L タンパク質が異種の非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスのものであるところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 191】

非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスがパラミクソウイルス科のメンバーであるところの、請求項 176 記載の方法。

20

【請求項 192】

非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスがラブドウイルス科のメンバーであるところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 193】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、1 つまたはそれ以上の弱毒性変異 (群) の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 194】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項 176 記載の方法。

30

【請求項 195】

非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの 1 つまたはそれ以上の遺伝子 (群) が完全もしくは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子 (群) の発現が RNA 修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠 (ORF) 中に 1 つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 196】

40

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために、1 つまたはそれ以上の異種病原体 (群) の 1 つまたはそれ以上の抗原決定基 (群) をエンコードする 1 つまたはそれ以上の異種遺伝子 (群) またはゲノム分節 (群) と組み合わせられている部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムを含むところの、請求項 176 記載の方法。

【請求項 197】

異種遺伝子またはゲノム分節が、部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノム内の対応遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に付加または置換されているところの、請求項 196 記載の方法。

50

【請求項 198】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、1つまたはそれ以上の弱毒性変異(群)の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項196記載の方法。

【請求項 199】

キメラゲノムまたはアンチゲノムが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、プラークサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項196記載の方法。

【請求項 200】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置で、遺伝子またはゲノム分節の付加、置換または転座により修飾されているところの、請求項176記載の方法。

【請求項 201】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、遺伝子外性の3'リーダーもしくは5'トレーラー領域、遺伝子開始シグナル、遺伝子終止シグナル、修正領域、遺伝子間領域、または3'もしくは5'非コード領域を含む異種の調節要素を組み込むように修飾されているところの、請求項176記載の方法。

【請求項 202】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、該ゲノムまたはアンチゲノムの非コード領域(NCR)中に、完全な読み取り枠(ORF)を欠き、かつ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの弱毒性表現型を特定する長さ150ヌクレオチド(nt)から4,000ヌクレオチドのポリヌクレオチド挿入をまたは分離した遺伝子単位(GU)として組み込むように修飾されているところの、請求項176記載の方法。

【請求項 203】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質(群)のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および/または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項176記載の方法。

【請求項 204】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、該ベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を可能とするのに十分な条件下で、好適な宿主細胞中に導入する工程；

該宿主細胞をプラークエキスパンション細胞を含む共培養物中に移す工程；および
該共培養物中から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項 205】

複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスが、宿主細胞中で組み立てられた後に一回の複製を完結できないか、あるいは、インビトロでの増殖および/または複製は可能であるが、インビボでの増殖 - または複製 - が欠損しているところの、請求項204記載の方法。

【請求項 206】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイル

10

20

30

40

50

スを生成する方法であって、以下の工程：

(a) ウイルス cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクターを、

- (1) RNA ポリメラーゼ
- (2) N タンパク質、
- (3) P タンパク質、および
- (4) L タンパク質

を一過性に発現する宿主細胞であって、RNA ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質のそれぞれが一過性にトランスフェクトされた発現ベクターから発現される宿主細胞中に導入する工程；および

(b) 該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する工程、を含む方法。

10

【請求項 207】

複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスが、宿主細胞中で組み立てられた後に一回の複製を完結できないか、あるいは、インビトロでの増殖および / または複製は可能であるが、インビボでの増殖 - または複製 - が欠損しているところの、請求項 206 記載の方法。

20

【請求項 208】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの構造タンパク質 (群) のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および / または宿主細胞にて同時発現させることさらに含む、請求項 206 記載の方法。

【請求項 209】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成する方法であって、以下の工程：

ウイルス cDNA 発現ベクターからウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター、並びに RNA ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし、その一過性発現を指令する 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞中に導入する工程；および

30

該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する工程、を含む方法。

【請求項 210】

同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの構造タンパク質 (群) のいずれか、またはいずれかの組み合わせを、宿主細胞中に同時導入および / または宿主細胞にて同時発現させることをさらに含む、請求項 209 記載の方法。

40

【請求項 211】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成するための組成物であって、

(a) ウイルスの cDNA からのウイルス RNA 転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター；

(b) 該宿主細胞にて

- (1) N タンパク質、
- (2) P タンパク質、および

50

(3) L タンパク質

をエンコードし、一過性発現を指令する1つまたはそれ以上の発現ベクター；および
(c) 宿主細胞中にてRNAポリメラーゼをエンコードし、その宿主細胞中で一過性発現を指令する一過性発現ベクター、
を含む組成物。

【請求項212】

該ウイルスが、宿主細胞中で組み立てられた後に一回の複製を完結できないか、あるいは、インビトロでの増殖および/または複製は可能であるが、インビボでの増殖 - または複製 - を欠損しているところの、請求項211記載の組成物。

【請求項213】

RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼであるところの、請求項211記載の組成物。

【請求項214】

一過性にトランスフェクトされた発現ベクターがプラスミドであるところの、請求項211記載の組成物。

【請求項215】

宿主細胞およびブランクエキспанション細胞の共培養を確立するために、少なくとも1層のブランクエキспанション細胞をさらに含む、請求項211記載の組成物。

【請求項216】

複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスがサブウイルス粒子であるところの、請求項211記載の組成物。

【請求項217】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科のメンバーであるところの、請求項211記載の組成物。

【請求項218】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスがラブドウイルス科のメンバーであるところの、請求項211記載の組成物。

【請求項219】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、1つまたはそれ以上の弱毒性変異(群)の導入によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項211記載の組成物。

【請求項220】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、増殖特徴の変化、弱毒性、温度感受性、低温適応、ブランクサイズ、宿主域制限、または免疫原性の変化から選択される、表現型変化を特定するヌクレオチド修飾によって組換え技術的に修飾されているところの、請求項211記載の組成物。

【請求項221】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの1つまたはそれ以上の遺伝子(群)が完全にもしくは部分的に欠失しているか、あるいは、該遺伝子(群)の発現がRNA修正部位における変異によって、フレームシフト変異によって、翻訳開始部位を改変する変異によって、遺伝子の読み取り枠(ORF)中に1つまたはそれ以上のストップコドンを導入することによって、または転写シグナルにおける変異によって、低下または除去されているところの、請求項211記載の組成物。

【請求項222】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、キメラゲノムまたはアンチゲノムを形成するために1つまたはそれ以上の異種病原体(群)の1つまたはそれ以上の抗原決定基(群)をエンコードする1つまたはそれ以上の異種遺伝子(群)またはゲノム分節(群)と組み合わせられている部分的なまたは完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムを含むところの、請求項211記載の組成物。

【請求項223】

該ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドが、非分節型ネガティ

10

20

30

40

50

鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノム内の遺伝子またはゲノム分節の野生型遺伝子順序位置と比較して、よりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置で、遺伝子またはゲノム分節の付加、置換または転座により修飾されているところの、請求項211記載の組成物。

【請求項224】

1つまたはそれ以上の発現ベクターが、同じもしくは異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構造タンパク質(群)の1つ、またはいずれかの組み合わせを付加的にエンコードするところの、請求項211記載の組成物。

【請求項225】

モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスであって、以下の手順： 10

ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物の合成を指令するために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質をエンコードし、その発現を指令する1つまたはそれ以上の補助ベクター(群)、並びにRNAポリメラーゼをエンコードし、その一時性発現を指令する一時性発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し；および

該宿主細胞から組み立てられた増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収すること、 20
によって生成されるウイルス。

【請求項226】

医薬的に許容される担体中に、請求項225記載の手順に従って生成される、単離された増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫原的有効量を含む、免疫原性組成物。

【請求項227】

哺乳動物被検体に非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに対する免疫応答を誘発するために該被検体の免疫系を刺激する方法であって、医薬的に許容される担体中の請求項225記載の手順に従って生成される、単離された増殖 - または複製 - 欠損、感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫原的有効量を、該被検体に投与することを含む方法。 30

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本発明は、出展明示により本発明の一部とする、2003年6月9日出願の米国仮特許出願第60/477,389号の優先権を主張する。

【0002】

技術分野

本発明は、モノネガウイルス(Mononegavirales)と称される目の感染性、複製性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを産生するための、改良された方法および組成物に関する。また、本方法および組成物は、これらのウイルスの増殖 - または複製 - 欠損ウイルスを産生するために応用される。

【0003】

発明の背景

被覆された、非分節型、ネガティブセンス、一本鎖RNAウイルスは独特な組織化および発現をする。ネガティブセンス、一本鎖ウイルスのゲノムRNAは、ヌクレオキャプシッドの状態、メッセンジャーRNA(mRNA)の合成用の鋳型として、およびアンチゲノム(+)鎖の合成用の鋳型としての、2つの鋳型機能を与える。ネガティブセンス、 50

10

20

30

40

50

一本鎖RNAウイルスは、それ自身のRNA依存性RNAポリメラーゼをエンコードし且つパッケージングしている。メッセンジャーRNAは、感染した細胞の細胞質にヌクレオキャプシッドが侵入すると直ぐに合成される。ウイルス複製は、mRNAの合成後に起こり、継続したウイルスタンパク質の合成を要求する。新しく合成されたアンチゲノム(+)鎖は、その(-)鎖ゲノムRNAコピーをさらに作り出すための鋳型として役立つ。

【0004】

RNA依存性ポリメラーゼ複合体は、ゲノムの3'端で、特にプロモーター領域でシス作用性信号と結びつくことで作動し、転写および複製を達成する。次いでウイルス遺伝子は、その3'端から5'端への一方向性の遺伝子鋳型から転写される。上流の隣接遺伝子(例えば、核タンパク遺伝子(N))と比べて、下流遺伝子(例えばポリメラーゼ遺伝子(L))から作られるmRNAは少ない。したがって、ゲノムの3'端と比較して、遺伝子の位置によってmRNA存在量に勾配がある。

10

【0005】

多くの非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスについては、いかなる種類の効果的なワクチンも利用できない。従って、ヒトおよび動物のそのような病原体に対する改良された免疫原性組成物および方法を開発する必要性が強くある。

【0006】

非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスに対する免疫原性組成物および方法を開発する場合、(1)精製された個々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)不活化された全体のウイルス調製物；および(3)生、弱毒化ウイルスの使用を含む、さまざまなアプローチを用いることができる。

20

【0007】

サブユニットワクチンには、組換えDNAの発現方法を含む様々な手段で、純粋で、明確かつ比較的容易に大量生産されるという望ましい特徴がある。現在まで、B型肝炎表面抗原の顕著な例を除いて、特に特定の投薬を受けたことのない受容者におけるウイルスサブユニットワクチンは、通常、短期のおよび/または不十分な免疫を誘発するのみであった。

【0008】

ポリオ(IPV)およびA型肝炎のホルマリン不活化完全ウイルス調製物は安全かつ有効であることが分かった。対照的に、呼吸器合胞体ウイルスおよび麻疹ウイルスワクチンなどの類似の不活化完全ウイルスを用いた免疫感作は、次に天然もしくは「野生型」ウイルスに直面した場合に、ワクチン接種を受けた人が過度のまたは異常な病気に罹患し易くなるという好ましくない免疫応答や応答プロフィールを誘発する。

30

【0009】

幼児に予防接種をする初期の試み(1966年)では、非経口投与用のホルマリン不活化RSVワクチンが用いられた。残念なことに、このワクチンはいくつかの实地試験で、以降のRSVによる自然感染に続いて、異常な特徴を伴う重篤な病気を含む重大な拒絶反応が明らかにされた(Kapikianら、Am J Epidemiol. 4:405-21、1969；Kimら、Am J Epidemiol. 4:422-34、1969；Collinsら、Respiratory Syncytial Virus. In "Field's Virology"、第3版。Lippincott-Raven、1443-1475、2001；Collinsら、Adv. Virus. Res.、54:423-451、1999)。この製剤化されたRSV抗原は、ワクチン接種を受けた人をRSV病に罹患し易くする異常なまたは不安定な免疫応答プロフィールを誘発することが示唆された(Collinsら、Respiratory Syncytial Virus. In "Field's Virology"、第3版。Lippincott-Raven、1443-1475、2001；Collinsら、Adv. Virus. Res.、54:423-451)。

40

【0010】

その後、生、弱毒化RSVワクチン候補体は、低温継代または化学変異誘発によって作り出された。これらのRSV株は、血清陽性の成人では毒性が低下していることが分かった。残念なことに、それらを血清陰性の幼児に与えた場合、過剰に弱毒化されているかまたはほとんど弱毒化されていないことが分かり、また、これらは遺伝子の安定性を欠くことが分かった(Collinsら、Respiratory Syncytial Virus. In "Field's Virology"、第3

50

版. Lippincott-Raven, 1443-1475, 2001; Collinsら、Adv. Virus. Res., 54:423-451)。生ウイルスの非経口投与を用いる別の免疫感作アプローチは効果がなかったため、この方針の努力は中断された (Collinsら、Respiratory Syncytial Virus. In "Field's Virology"、第3版. Lippincott-Raven, 1443-1475, 2001; Collinsら、Adv. Virus. Res., 54:423-451)。これらの生RSVワクチンは、上記のホルマリン不活化RSVワクチンで観察されたような疾病増悪とは全く関係がなかったことは注目に値する。現在、種々の弱毒化RSV変異体を用いた臨床試験が進行中であるが、現段階でヒト投与用に承認されたRSVワクチンはない。

【0011】

野生型ウイルスの適切な弱毒生派生物は、免疫原性組成物および方法の使用に明らかな利点を提供する。生、複製物質として、それらが患者に感染すると、ウイルス遺伝子産物が発現され、プロセッシングされ、その後免疫された対象者の特異的MHCクラスIおよびII分子の状態で存在する。このように、生弱毒化ウイルス候補物質は、自然感染生存者の免疫応答プロファイルに対応する、体液媒介および細胞媒介免疫応答を誘発するのに並びに同調的サイトカインとケモカイン様式を刺激するのに効果的である。

10

【0012】

この好ましい免疫応答様式は、不活化ワクチンまたはサブユニットワクチンによって誘発され、一般的に体液性免疫監視アーム (arm) に大きく制限される限定的な応答と対比される。さらに、幾つかのホルマリン不活化完全ウイルスワクチン、例えば、1960年代に開発された麻疹ウイルスと呼吸器合胞体ウイルスワクチンによって誘発される免疫応答プロファイルは、持続的な保護を提供できないだけでなく、実際にはワクチン受容者が次に野生型ウイルスに直面した場合に異常な、過度でより致死的な病気に罹患し易くなる。

20

【0013】

生、弱毒化ウイルスは、免疫原性組成物および方法での使用に非常に望ましい特徴を有しているが、それらを作り出し、評価することが難しいとされてきた。この困難性の要点は、受容者を感染させて、十分な量の望ましい免疫応答プロファイルを誘発する十分な複製応答力を保持しながら、その病気を引き起こす可能性 (すなわち毒性) を失った野生型ウイルスの派生物を単離する必要性にある。

【0014】

歴史的に、毒性と弱毒性との間の微妙な釣合いは、野生型ウイルス単離体を種々の宿主組織または宿主細胞を通じて増殖条件 (例えば温度) を変更して連続継代することによって提供された。この過程は、ウイルス変種 (変異体) の増殖におそらく好都合であり、その幾つかに弱毒化に好都合な特徴のある。場合によって、更なる弱毒性は、化学変異誘発を通じて同様に達成される。

30

【0015】

この増殖/継代方式は、一般的に、温度感受性 (ts)、低温順応 (ca) および/またはその宿主域 (hr) の改変を1つまたは全てが野生型、疾病起因ウイルスから変化している - すなわち弱毒性と関係し得る変化のあるウイルス派生物の出現につながる。

【0016】

麻疹と耳下腺炎の予防のための生ウイルスワクチン (パラミクソウイルスである)、およびポリオと風疹に対して保護するための生ウイルスワクチン (ポジティブ鎖RNAウイルスである) を含む、種々の生ウイルスワクチンが、このアプローチによって作り出され、世界中で現在の幼児期の免疫処置法の主軸を担っている。

40

【0017】

それにもかかわらず、弱毒化生ウイルスワクチン候補体を作り出すこの過程は長く、ランダムに発生する望ましい弱毒化特徴を有するゲノム変異体を選択する結果に大きく拠っているため、予測し得ない。免疫原性組成物に用いるための結果として得られるウイルス候補体は、免疫される被験者中で弱い弱毒性または過剰な弱毒性を維持することがしばしばある。

50

【 0 0 1 8 】

使用中の現行ワクチンでさえ、改良された免疫原性組成物およびプロトコルを与える、より有効な、生弱毒化ウイルス候補物についての必要性がまだある。例えば、現行の麻疹ワクチンは適度に良い保護を提供する。しかし、最近の麻疹の流行は、現在のワクチンの効能の不足を示唆している。母体免疫にもかかわらず、高い割合の急性麻疹感染症が1歳未満の子供たちに起こっていることは、野生型麻疹感染に続いて作られる抗 - 麻疹抗体レベルに匹敵する抗体レベルを誘導することができないというワクチンの能力を反映している (Griffin、Measles Virus. In "Field's Virology", 第3版. Lippincott-Raven、1401-1442、2001; Cuttsら、J. Infectious. Dis.、170:S32-S41、1994)。その結果として、ワクチン免疫された母は、最初の数か月を越えて新生児に至るまでの生命を保護するのに十分な経胎盤性の誘導された受動抗体 (passive antibodies) を幼児に提供することができない。

【 0 0 1 9 】

以前に予防接種を受けた若者および成年における急性麻疹感染症は更なる問題を指摘する。これらの第2のワクチンの失敗は、大量かつ長期維持される抗ウイルス保護を誘導し維持する現行ワクチンの能力の限界を示している (Atkinsonら、United States. Annu. Rev. Med.、43:451-463、1992)。近年では、さらに別の潜在的な問題が明らかにされた。過去15年に渡って単離された野生型麻疹の血球凝集素タンパク質がワクチン株から次第に離れていっていることが示された。この「抗原ドリフト」は、ワクチン株が最適な保護を提供するために必要とされる理想的な抗原レパートリーを含まない場合があるというもっともな懸念を引き起こす。従って、改良された免疫原性組成物の必要性がある。

【 0 0 2 0 】

cDNAからの組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収は、ウイルスゲノムRNA (vRNA) それ自体の細胞への導入ではウイルス複製を始めるのに十分でないため、特殊なレスキュー系を必要とする。ウイルス複製サイクルの開始にも、ウイルスヌクレオキャプシドとポリメラーゼ複合体の構成要素を含む3つまたはそれ以上のウイルス・トランス - 作用性タンパク質の細胞内合成を必要とする。

【 0 0 2 1 】

いくつかの異なるレスキュープロトコルが、cDNAからの組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収について試みられた。これら報告されたプロトコルの多くは、ウイルスゲノムcDNAクローンに加えて、不可欠なウイルスタンパク質、例えばヌクレオキャプシド・タンパク質 (NまたはNP)、リンタンパク質 (P) および大きなポリメラーゼ・サブユニット (L) をエンコードする発現ベクターを含む複数のプラスミドを用いて、細胞をトランスフェクションする同時トランスフェクション工程を含む。

【 0 0 2 2 】

特に非分節型ネガティブ鎖ウイルスのために設計されたレスキュープロトコルにおいては、トランスフェクションされたDNAの転写を容易にするためにT7 RNAポリメラーゼの細胞内発現が使用されている。T7 RNAポリメラーゼがこの目的のために用いられるのは：i) 適切に設計されたウイルスcDNAプラスミドを用いると、T7ポリメラーゼはウイルスゲノムのvRNA合成を正確な5'端で始めさせることができ、ii) T7 RNAは、この網のウイルスが複製する細胞の細胞質で高レベル発現をさせ、そして、iii) RNAの細胞質合成は、vRNAが核スプライシングまたはポリアデニル化経路により処理され得る可能性をなくすである。これらの特徴は、T7 RNAポリメラーゼに基づくレスキュー系を設計するのに非常に有利である。

【 0 0 2 3 】

レスキュー系でT7 RNAポリメラーゼを使用することに大きな利点があるが、不利な点もある。T7 RNAポリメラーゼの高レベル、細胞内発現を達成するために、大部分のレスキュー系は、トランスフェクションされる細胞もファージ・ポリメラーゼ遺伝子 (例えば、MVA/T7) を発現する組換えワクシニアウイルスに感染していることを必要とする (例えば、Pattnaikら、J. Virol. 64:2948-2957、1990を参照のこと)。この一

般的なレスキュー方法を適用することについては、Lawsonら (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:4477-4481, 1995) が、水泡性口内炎ウイルス (VSV) の好結果の回収を報告した。同様に、2000年3月7日にコンツェルマン (Conzelmann) に発行された米国特許第6,033,886号では、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3で感染された幼若ハムスター肝臓 (BHK) 細胞中に、RVN、PおよびLタンパク質をエンコードするプラスミドと一緒にRV cDNAゲノムを同時トランスフェクションすることによって、cDNAから狂犬病ウイルス (RV) の好結果の回収が報告されている。

【0024】

これら、または他のワクシニアに基づく回収系を含む成功したレポートにもかかわらず、ウイルス回収系で組換えワクシニアウイルスを使用することに関連する大きな不利益が残っている。特に、この回収方法は、所望のウイルスがワクシニアヘルパーウイルスを含まないように精製されることを必要とする。特に、ワクシニアヘルパーウイルスを、回収を達成するためにレスキューされたウイルスから分離しなければならない。この回収を複雑にしているのは、実はワクシニアがレスキューされるウイルスの複製を妨げ得ることである。高い力価で複製するRVおよびVSVのようなウイルスについては、これらが要因の問題は少ない。しかしながら、多くの他の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス、例えば呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ヒト・パラインフルエンザウイルス (HPIVs)、牛パラインフルエンザウイルス3型 (BPIV3) および麻疹ウイルス (MV) は、よりゆっくり増殖するため、ワクシニアに基づく系にて回収させることは困難であろう。ワクシニアに基づく回収系に関連した欠点は、ワクシニアが、何回かの継代を経た後であっても、宿主細胞集団に発症させる場合があるという広域な細胞変性効果 (CPE) に起因する。ワクシニアウイルスに起因するCPEは、レスキューされたウイルスによって形成されるプラークの検出を困難にし、複製を補助するための細胞培養の能力を弱めることによって、レスキューされるウイルスの収量も減少することがある。ワクシニアウイルスによって誘発されるCPEが、トランスフェクションされた細胞が生存可能な期間を制限することで、ゆっくり増殖する、弱毒化ウイルスのレスキューをさらに妨げ、あるいは排除することもあり得る。最後に、レスキューされた、組換えウイルスが、免疫原性組成物を調製するためまたは遺伝子治療ベクターを開発するためのシードストックになる場合、残留するワクシニアウイルスの汚染は重大な懸念材料である。

【0025】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのための別のレスキュー系は、構成的にファージポリメラーゼ遺伝子を発現する特殊な「ヘルパー」細胞系を用いる。典型的なT7ヘルパー細胞系は、効果的にワクシニアウイルスに基づく系と関連する問題を回避することが報告された。Billeterらにより報告された系の1つ (出典明示により本明細書の一部とする国際公開番号WO 97/06270) は、cDNAから感染性麻疹ウイルス (MV) を回収するために開発された。Billeterらの系は、ヘルパーウイルスに替えて、構成的にRNAポリメラーゼ、例えばT7 RNAポリメラーゼを発現するヘルパー細胞系を用いる。またこのヘルパー細胞系は、MVのNおよびPタンパク質の構成的な「ゲノム発現」を提供する。この特別に改変された細胞系に、発現制御配列と作動可能に連結されたMVの完全な (+) 鎖配列を含むcDNAプラスミドを導入する。MV cDNAとともに、MVのLタンパク質をエンコードするプラスミドが同時トランスフェクトされ、ヘルパー細胞系で一過性に発現される。

【0026】

この別の、T7ヘルパー細胞に基づくレスキュー系は、MV回収についての成功する道具として報告されたが、上記のワクシニアヘルパー系にある特定の組の欠点により上手くない。ヘルパーウイルスをMVのNおよびPタンパク質に加えてT7 RNAポリメラーゼを構成的に発現する特定のヘルパー細胞系と交換するBilleterらの系は、他の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのレスキューに適用できないであろうことは、最も重要なことである。代替でそのような特殊なヘルパー細胞系を用いる場合、レスキューされる

10

20

30

40

50

個別のウイルスのために新しい細胞系を造らなければならないであろう。

【 0 0 2 7 】

また、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス回収のための別の細胞系は、ヘルパー細胞中でT7ポリメラーゼのみの構成的発現を特徴とする。従って、Buchholzら（出典明示により本明細書の一部とするJ. Virology, 73:251-259、1999）は、構成的にT7 RNAポリメラーゼを発現するBHK-21細胞系を構築した。この系の利点には、細胞系が特定のウイルスのN、PまたはLタンパク質を構成的に発現しないので、細胞系があまり特殊化されないことと、報告によればこの細胞系は100回継代した後でもT7ポリメラーゼを安定に発現することがある。

【 0 0 2 8 】

それにもかかわらず、全てのヘルパー細胞系は、それらの構築の困難性、および広域の異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収を提供する細胞系の有用性が限定されている点で同様の欠点を有する。現在、高レベルのポリメラーゼを発現し、ウイルスレスキューを補助するわずか2、3のT7ヘルパー細胞系が開発されている。経験により、異なるウイルスと新生株に関する独特の要求を満たす新しいT7細胞系を単離するのは難しいであろうことが示された。このことは、レスキューに利用できる多くのT7細胞系を制限することとなり、また多くの非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスについて適格な細胞系を生産するのに重大な問題を提示する。関連する問題に、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが特定の細胞指向性を示し、幾つかの利用可能なT7ヘルパー細胞系で増殖しないことがある。

【 0 0 2 9 】

生 - 弱毒化非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収と生産に対して多くの利点があるが、これらの病原体に起因する深刻な健康問題を軽減するために安全でかつ効果的な免疫原性組成物を設計するための更なる道具と方法に関し、当分野では明確な必要性がある。この内容で残る課題には、cDNAに基づく回収系を用いる、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスをより効率的にレスキューするための更なる道具についての必要性がある。この目的を容易にするために、cDNAからの非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収に関する既存の方法を発展させなければならない。この内容では、T7 RNAポリメラーゼを構成的に発現するように改変された組換えワクシニアウイルスまたは特殊化された細胞系の使用を必要としない、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのレスキューおよび遺伝子操作のための方法および組成物を開発することは特に望ましい。驚くべきことに、本発明は、本明細書中にて以下に記載するように、これらの要求を満たすとともに、更なる目的および利点を達成する。

【 0 0 3 0 】

発明の概要

本発明は、ヘルパーウイルス（例えばワクシニアウイルス）に依存せず、RNAポリメラーゼを構成的に発現するよう設計された特殊なヘルパー細胞系を必要としない組成物および方法を用いる、クローン化されたcDNAからの多量の非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスの効果的な回収を提供する。

【 0 0 3 1 】

本発明の1つの態様において、モノネガウイルス目の感染性、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法は、ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクターを、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質を発現し、かつ一過性にトランスフェクトされた発現ベクターからのRNAポリメラーゼを一過性に発現する宿主細胞に導入し、次いで、その宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収することを含む。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施形態では、モノネガウイルス目の増殖 - または複製 - 欠損、非分節型

10

20

30

40

50

、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法が提供される。これらの実施形態については、増殖または複製が欠損しているかまたは次のレスキューを行えない欠損ウイルス、例えば、インビトロ (in vitro) またはインビボ (in vivo) で増殖または複製する能力を制限されたウイルスを生成することが望ましい。本発明のこれらの実施形態では、cDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された増殖 - または複製 - 欠損非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするcDNA発現構築物を、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質を発現し、かつ一過性にトランスフェクトされた発現ベクターからのRNAポリメラーゼを一過性に発現する宿主細胞に導入する。その増殖 - または複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスは、その後、免疫原性組成物での使用のために、または他の目的のために宿主細胞から回収される。しばしば、この増殖 - および複製 - 欠損ウイルスおよびサブウイルス粒子は、以下の本明細書中で記載するように、「ベクター」として使用される。

【0033】

本発明の別の実施形態では、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法は、ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクターを、

- (1) RNAポリメラーゼ、
- (2) Nタンパク質、
- (3) Pタンパク質、および
- (4) Lタンパク質、

を一過性に発現する宿主細胞であって、RNAポリメラーゼおよびN、PおよびLタンパク質のそれぞれが一過性にトランスフェクトされた発現ベクターから発現される宿主細胞中に導入し、次いで、その宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを回収することを含む。

【0034】

さらに別の実施形態では、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法は、ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし且つ一過性発現させる1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、好適な宿主細胞に導入し、次いでその宿主細胞から組み立てられた感染性、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを回収することを含む。

【0035】

本発明のより詳細な態様では、モノネガウイルス目の感染性、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための方法は、ウイルスcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし且つ一過性発現させ1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを好適な宿主細胞に導入することを含む。1つまたはそれ以上のウイルスcDNA発現ベクター、およびRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質をエンコードする1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターが宿主細胞中に導入された後に、その宿主細胞は組換えウイルスの回収が増大するのに十分な条件下で効果的な熱ショックに曝される。

【0036】

本発明の別の態様では、モノネガウイルス目の感染性、非分節型ネガティブ鎖RNAウ

ウイルスを生成するための方法は、ウイルス cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター、並びに RNA ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし且つ一過性発現する、1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを、これらベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を達成するのに十分な条件下で、好適な宿主細胞に導入することを含む。次いで、その宿主細胞を一般的に単層のエキスパンション細胞として提供されるブランクエキスパンション細胞を含む共培養に移し、組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを該共培養物から回収する。

10

【0037】

また、本発明の範囲内で提供されるものに、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生産するための組成物がある。この組成物は、好適な宿主細胞中でウイルス cDNA からウイルス RNA 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス cDNA 発現ベクター、および 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクター、および

- (1) RNA ポリメラーゼ、
- (2) N タンパク質、
- (3) P タンパク質、
- (4) L タンパク質、

20

をエンコードし且つ宿主細胞中で一過性発現させる 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクター、並びにその宿主細胞中で RNA ポリメラーゼをエンコードし且つ一過性発現させる一過性発現ベクターを含む。

【0038】

別の実施形態では、非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスが増殖 - または複製 - 欠損ウイルスである、上記の組成物が提供される。本発明の範囲内のこれらの組成物および関連する組成物は、調製または作用製剤および混合物にて提供されることができる。例えば、上記組成物は、ウイルス cDNA 発現ベクターと RNA ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質をエンコードし且つ一過性発現させる 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクター (群) とが同時トランスフェクション混合物中に組み合わされて提供されても良い。あるいは、上記組成物が同時トランスフェクトされた宿主細胞またはトランスフェクトされた宿主細胞およびブランクエキスパンション細胞の共培養物中に組み合わされていても良い。

30

【0039】

本発明の更なる実施形態は、上記方法に従って生成された組換え、非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス、並びに上記ウイルスを含む免疫原性組成物および被検ウイルスおよび免疫原性組成物の投与を含む哺乳動物の患者に免疫応答を誘発するための方法に関する。

【0040】

図面の簡単な説明

40

図 1 は、MVA - T7 よりも T7 を供給するためのプラスミドを用いた RSV のレスキューを表す。

【0041】

図 2 A 2 C は、一過性 T7 ポリメラーゼ発現ベクターであるプラスミド pC1 - Neo - BCL - T7 の典型的な配列 (配列番号: 1) を提供する。ATG は、T7 ポリの開始コドンである。T7 ポリの第 2 のコドンは、翻訳開始状況を最適化するために AAC から gAC (コザック配列) に変えられた。配列 GCCACC も、翻訳開始状況を最適化するために加えられた。配列の小文字の部分 (gct agcctcgagt gatcagaatt c) は、T7 RNA ポリメラーゼコード配列を加える前に、pCI - Neo ベクターの T7 プロモーターの代わりに挿入された。この配列は、NheI、XhoI、BclI と EcoRI の制

50

限部位を含む。

【 0 0 4 2 】

図 3 A と 3 B (パネル A - C) は、異種のネガティブ鎖 R N A ウイルスで同定された種々の変異を、弱毒性または他の所望の表現型変化を生じさせるために本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルス中に (この場合 H P I V 1 構築物中に) 組み込むことができることを実証する。

【 0 0 4 3 】

発明の詳細な説明

本発明は、ヘルパーウイルス (例えばワクシニアウイルス) に依存せず、R N A ポリメラーゼを構成的に発現するように設計された特殊なヘルパー細胞系を必要としない組成物および方法を用いる、クローン化された c D N A から多量の非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを効率的に回収することを提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明の 1 つの態様では、宿主細胞中で被検ウイルスのレスキューを補助することができる R N A ポリメラーゼを一過性に発現する一過性発現ベクターを組み込んだ、非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの効率的なレスキューのための方法および組成物が提供される。一過性ポリメラーゼベクターレスキュー系において、例えば T 7 R N A ポリメラーゼをエンコードする発現ベクターは、ウイルスゲノムまたはアンチゲノム c D N A と共に、ウイルスレスキューを補助するのに必要な必須のウイルスの補助タンパク質 (例えば、N、P および L タンパク質) を発現している宿主細胞中に同調的に導入される。T 7 を補助するためのプラスミドを用いた R S V のレスキューに適用される、本発明のレスキュー系の図解を図 1 に記載する。

【 0 0 4 5 】

このように発明のウイルス回収方法および組成物では、宿主細胞は、一過性にトランスフェクトされたプラスミドにより細胞核で転写される R N A ポリメラーゼを発現し、それによってウイルス不含系において、および種々の非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルス種または型のレスキューに適合した細胞においてウイルスの回収を補助するようプログラムされる。

【 0 0 4 6 】

本明細書中に記載の方法および組成物の有用性および汎用性 (例えば、ワクシニアに基づくおよびヘルパー細胞に基づく回収系との比較において) は、一般に一過性のベクター発現系に伴う低いトランスフェクション効率と短期間の発現のような予想される障害を克服する。全ての細胞が T 7 ポリメラーゼを構成的に発現する T 7 ヘルパー細胞系と対照的に、一過性の発現系のトランスフェクション効率は通常、約 1 0 - 2 0 % と低い。加えて、一過性の発現、例えば T 7 ポリメラーゼの一過性発現は、およそ 7 2 時間という限られた時間内で減衰し停止することが予想される。これに基づけば、一過性 R N A ポリメラーゼの同時トランスフェクション系を用いた、増殖が遅く、弱毒化された多種多様な種および株を含む非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスを効率的にレスキューする、本明細書中にて開示する汎用性のある系は予想外であった。

【 0 0 4 7 】

本発明の一過性の R N A ポリメラーゼ発現系を用いるネガティブ鎖 R N A ウイルスのレスキューは、既存の系に対し幾つかの利点を提供する。特に、R N A ポリメラーゼを提供するために組換えワクシニアウイルスで細胞を感染させる必要がないため、ウイルス回収の効率およびフィデリティー、並びに効率的な免疫原性組成物の開発に影響を及ぼす C P E や他の悪影響を除くことができる。関連した利点は、トランスフェクション期間について、トランスフェクトされた細胞が生存可能な状態で維持され、レスキューの開始後から長時間のウイルスレスキューを補助することである。これは、非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの間に共通する遅く増殖する種と株のレスキューを促進するのを助ける。加えて、このレスキュー系は、所望の組換えウイルスから組換えワクシニアウイルスを精製する必要はない。免疫原性組成物および遺伝子治療ベクターを開発するにあたって、レス

10

20

30

40

50

キューされたウイルス調製物中の組換えワクシニアウイルス汚染に関する懸念もない。最後に、本方法および組成物は、特別なヘルパー細胞系を開発する必要がなく、トランスフェクションされ得るいずれかの細胞系を多種多様な非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの回収のために用いることができる。

【0048】

本発明の方法と組成物は、cDNAからの多種多様な組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスをうまく回収するために実施することができる。ウイルス分類国際委員会によって1993年に修正された再分類に基づいて、モノネガウイルス目と称される非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの目が確立された。この目は、マイナス方向（ネガティブセンス）の一本鎖、非分節型RNAゲノムを有する被覆されたウイルスの3つの科を含む。これらの非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルス科は、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科とフィロウイルス科である。パラミクソウイルス科は、さらに2つの亜族、パラミクソウイルス亜科およびニューモウイルス亜科に分けられる。パラミクソウイルス亜科は、3つの属、レスピロウイルス属（以前パラミクソウイルス属）、ウブラウイルス属と麻疹ウイルス属を含む。ニューモウイルス亜科は、ニューモウイルス属を含む。表1は、本発明の方法および組成物に基づいてレスキューすることが可能な非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの種および属を代表する各々の属の非制限的な実施例に加えて、現行の分類学上のモノネガウイルスの分類を示す。

【表 1】

表 1

モノネガウイルス目の非分節型、ネガティブ鎖、一本鎖RNAウイルスの分類

パラミクロウイルス科

パラミクロウイルス亜科

レスピロウイルス属

仙台ウイルス（マウス・パラインフルエンザウイルス 1 型）

ヒト・パラインフルエンザウイルス（P I V）1 型および 3 型

牛パラインフルエンザウイルス（B P V）3 型

ルブラウイルス属

シミアンウイルス 5（S V）（イヌ・パラインフルエンザウイルス 2 型）

流行性耳下腺炎ウイルス

ニューカッスル病ウイルス（N D V）（鳥類パラミクソウイルス 1）

ヒト・パラインフルエンザウイルス 2 型、4 a 型および 4 b 型

麻疹ウイルス属

麻疹ウイルス（M V）

イルカ麻疹ウイルス属

イヌ・ジステンパーウイルス（C D V）

小反芻動物病ウイルス

アザラシ・ジステンパーウイルス

牛痘ウイルス

未分類

ヘンドラ（Hendra）ウイルス

ニパ（Nipah）ウイルス

パラミクソウイルス亜科

肺炎ウイルス属

ヒト呼吸器合胞体ウイルス（R S V）

ウシ呼吸器合胞体ウイルス

マウスの肺炎ウイルス

メタ肺炎ウイルス属

ヒト・メタ肺炎ウイルス

鳥類の肺炎ウイルス（以前のシチメンチョウの鼻気管炎ウイルス）

ラブドウイルス科

リッサウイルス属

狂犬病ウイルス

ベシクロウイルス属

水疱性口内炎ウイルス

エファメロウイルス（Ephemerovirus）属

ウシ流行熱（Bovine ephemeral fever）ウイルス

フィロウイルス科

フィロウイルス属

マルブルクウイルス

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

モノネガウイルス目のメンバーの現在の分類法は、形態的な基準、ウイルスゲノムの構成、生物学的活性、およびウイルス遺伝子や遺伝子産物の配列の相関性に基いている。パラミクソウイルス亜科に関して被覆されたウイルス間の形態学的に識別できる特徴は、ヌクレオキャプシドの大きさと形である。関連した生物学的特徴には、1) 属のメンバー間の抗原交差反応、および 2) レスピロウイルス属、ルブラウイルス属におけるノイラミ

ニダーゼ活性の存在および麻疹ウイルス属におけるその不存在がある。加えて、ルブラウイルス属に過剰遺伝子 (extra gene) (S H) が存在するために、P 遺伝子をエンコードする可能性の多様性が考えられる。

【0050】

ニューモウイルス亜科は細いヌクレオキャプシドを含むので、ニューモウイルス亜科は形態学的にパラミクソウイルス亜科と区別できる。加えて、肺炎ウイルス属にはタンパク質をエンコードしているシストロンの数 (肺炎ウイルス属 10 個、インチパラミクソウイルス亜科 6 個) とパラミクソウイルス亜科と異なる付着タンパク質 (G) に大きな違いがある。パラミクソウイルスと肺炎ウイルスは機能が相当すると考えられる 6 つのタンパク質 (N、P、M、G/H/HN、F および L) を有しているが、後の 2 つのタンパク質だけは 2 つの亜族間で非常に関連した配列を示す。いくつかの肺炎ウイルスタンパク質は、多くのパラミクソウイルスにある対応物、すなわち、非構造タンパク質 NS 1 および NS 2、弱い疎水性のタンパク質 SH、および第 2 のタンパク質 M 2 が欠損している。幾つかのパラミクソウイルスタンパク質、すなわち、C および V は、肺炎ウイルスで対応物が欠損している。しかしながら、ラウドウイルスとフィロウイルスとのその基本的なゲノム構成が変わらないように、肺炎ウイルスおよびパラミクソウイルスは同じである。

10

【0051】

発明に基づく非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスの一般的な回収手法は、以下のよう

にまとめられる。所望のウイルスゲノムのクローン化された DNA 相当物 (ポジティブ鎖、メッセージセンスである) は、好適な DNA 依存性 RNA ポリメラーゼプロモーター (例えば T 7、T 3 または S P 6 RNA ポリメラーゼプロモーター) と好適な転写ベクター (例えば、増殖性細菌プラスミド) に挿入された自己切断型リボザイム配列 (例えばデルタ型肝炎リボザイム) との間に配置される。この転写ベクターは容易に操作できる DNA 鋳型を提供し、それ由来の RNA ポリメラーゼ (例えば T 7 RNA ポリメラーゼ) は正確な、またはほぼ正確な 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することができる。ゲノムのウイルス DNA コピーおよび隣接プロモーターおよびリボザイム配列の方向が、アンチゲノムまたはゲノム RNA 対応物が転写されるかどうかを決定する。

20

【0052】

また、機能的なヌクレオキャプシドテンプレートに裸の、一本鎖ウイルスアンチゲノムまたはゲノム RNA 転写物をカプセル式に被覆させるのに必要とされるウイルス特異的トランス-作用性補助タンパク質が、発明に基づく新規ウイルス子孫のレスキューのために必要である。これらは、通常、ウイルスヌクレオキャプシド (N) タンパク質、ポリメラーゼに関連するリンタンパク質 (P) とポリメラーゼ (L) タンパク質を含む。異なるウイルス科または属における、これらのタンパク質の命名法はわずかに異なるかもしれない。例えば、ラウドウイルス科では、リンタンパク質は「P」または「NS」と呼ばれる場合がある。レスピロウイルス属とウブラウイルス属では、ヌクレオキャプシドタンパク質は「NP」と呼ばれている。本明細書中で用いる場合には、用語「N タンパク質」および「N 遺伝子」は、適切となるように、N または NP ヌクレオキャプシドタンパク質および遺伝子に言及し、用語「P タンパク質」および「P 遺伝子」は P または NS リンタンパク質および遺伝子に言及する。レスキューで選択される特定のウイルスは、更なるタンパク質を必要とす場合がある。一般的に、もっぱら必要という訳ではないが、非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのレスキューもまた、ウイルス cDNA を含む転写ベクターおよび補助タンパク質をエンコードしているベクターの転写を行わせるために、ウイルス cDNA を運搬する宿主細胞中で発現される RNA ポリメラーゼを要求する。

30

40

【0053】

本発明の範囲内で、cDNA からの非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収する新規のレスキュー方法は、被検ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするウイルス cDNA 発現ベクターを宿主細胞中に導入すること、および RNA ポリメラーゼをエンコードし且つ一過性発現させる一過性のポリメラーゼ発現ベクターを同調的に導入すこ

50

とを含む。この内容での有用なRNAポリメラーゼは、限定するものではないが、T7、T3またはSP6ファージポリメラーゼを含む。また、宿主細胞は、ウイルスcDNAおよび一過性ポリメラーゼ発現ベクターの同調的導入の前、その間、またはその後、宿主細胞中で複製する、感染性ウイルスまたはサブウイルス粒子を生成するのに必要なN、PおよびLタンパク質を発現している。

【0054】

一般的に、ウイルスcDNAおよび一過性ポリメラーゼの発現ベクターは、補助タンパク質をエンコードし且つ発現させる1つまたはそれ以上の更なる発現ベクター（類）と一緒に、宿主細胞に同調的トランスフェクトされる。補助タンパク質は、レスキューされるウイルスの野生型または変異タンパク質であってもよく、異種の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの対応する補助タンパク質（群）から選択されてもよい。別の実施形態では、更なるウイルスタンパク質は、例えば、ポリメラーゼ伸長因子（例えばRSVについてのM21）または本発明方法および組成物の範囲内で回収を可能にするか、向上させる、あるいは他の望ましい結果を提供し得る他のウイルスタンパク質であってもよく、それらが宿主細胞で同時発現されていてもよい。他の実施形態においては、1つまたはそれ以上の補助タンパク質（群）は、宿主細胞で構成的にタンパク質（群）を発現することによって、または補助タンパク質（群）をエンコードしているヘルパーウイルスを用いた宿主細胞の同時感染によって、宿主細胞中で発現されていてもよい。

10

【0055】

本発明のより詳細な態様では、ウイルスcDNA発現ベクターは、そのcDNA発現ベクターからのウイルスRNA転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含む。ウイルスcDNAベクターは、RNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質を一過性に発現している宿主細胞中に導入される。RNAポリメラーゼおよびN、PおよびLタンパク質のそれぞれは、1つまたはそれ以上の一過性にトランスフェクトされた発現ベクター（群）から発現され得る。しばしば、RNAポリメラーゼおよびN、PおよびLタンパク質のそれぞれは、別個の発現ベクターから、一般に一過性の発現プラスミドから発現され得る。好適な条件下で十分な時間が経過した後に、組み立てられた感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスは宿主細胞から回収される。

20

30

【0056】

感染性非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスをゲノムまたはアンチゲノム発現cDNAから生成するために、ゲノムまたはアンチゲノムは、RNA複製できるヌクレオキャプシドを生産するのに、および子孫ヌクレオキャプシドをRNA複製と転写の両方ができるようにするのに必要なウイルスタンパク質と同時発現される。ゲノムヌクレオキャプシドによる転写により他のウイルスタンパク質が提供され、増殖的な感染が始まる。あるいは、増殖的な感染に必要とされる更なるウイルスタンパク質は、同時発現により供給され得る。

【0057】

本発明の特定の実施形態に、転写、複製するウイルスヌクレオキャプシドを作り出すのに必要なタンパク質をエンコードしている相補的配列は、1つまたはそれ以上のヘルパーウイルスによって提供される。そのようなヘルパーウイルスは、野生型または変異型であってもよい。特定の実施形態では、ヘルパーウイルスは、組換えウイルスcDNAによってコードされるウイルスと表現型により区別できる。例えば、組換えウイルスcDNAによってコードされるウイルスではなく、ヘルパーウイルスと免疫学的に反応するモノクローナル抗体を提供することは、望ましであろう。そのような抗体は、中和抗体であってもよい。幾つかの実施形態では、ヘルパーウイルスを組換えウイルスから分離するために、抗体を親和性クロマトグラフィーに用いることができる。そのような抗体の取得する目的で、突然変異を、ヘルパーウイルスの抗原性多様性を提供するためウイルスcDNAに、例えば糖タンパク質遺伝子の導入することができる。

40

【0058】

50

組換えウイルスゲノムまたはアンチゲノムは本発明に用いるために、例えば、クローン化されたcDNA分節を集め、全体で完全なゲノムまたはアンチゲノムを表すことによって、ポリメラーゼ連鎖反応またはウイルスmRNAもしくはゲノムRNAの逆転写されたコピーを用いる類似法によって(PCR; 例えば、米国特許番号第4,683,195号および第4,683,202号、およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Innisら著、アカデミック・プレス(Academic Press)、サンディエゴ、1990に記載されている)、構築され得る。例えば、第一の構築物は、アンチゲノムの左端を含み、適当なプロモーター(例えばT7、T3またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーター)から始まり、そして、適当な発現ベクター(例えば、プラスミド、コスミド、ファージまたはDNAウイルスベクター)に組み立てられているcDNAを含んで、作成されていてもよい。ベクターは、突然変異誘発および/または組み立てを容易にするよう設計された特有の制限部位を含む合成ポリリンカーの挿入によって修飾され得る。右端のアンチゲノムプラスミドは、所望される更なる配列、例えば、隣接リボザイムおよび単一または直列型のT7転写ターミネータを含んでいてもよい。リボザイムは、単一の非ウイルスヌクレオチドを含む3'端を作るハンマーヘッド型であってよく、また、3'端不含の非ウイルスヌクレオチドを与える他の好適なリボザイム、例えばデルタ型肝炎ウイルスのもの(Perrottaら、*Nature* 350:434-436、1991)であってもよい。

【0059】

ウイルスゲノムまたはアンチゲノムをエンコードしているcDNAを構築する別の手段は、サブユニットcDNA構成成分の数を1片か2片程度に下げる改良PCR条件を用いる逆転写PCR(例えば、出典明示により本明細書の一部とするChengら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695-5699、1994に記載されている)を含む。他の実施形態では、種々のプロモーター(例えばT3またはSPQ)を用いることができる。異なるDNAベクター(例えばコスミド)は、より大きなサイズのゲノムまたはアンチゲノムを含ませられることができるため増殖用に用いることができる。

【0060】

非分節型ネガティブ鎖RNAの「感染性のクローン」または「感染性のcDNA」は、ゲノムまたは感染性のウイルスまたはサブウイルス粒子のゲノムを産生するテンプレートとして働くことのできるアンチゲノムウイルスRNA中に転写され、感染性のウイルス粒子中に直接組込まれる得る、cDNAもしくはその産物、合成物もしくはその他のもの、並びにRNAを意味する。上記のように、定義された変異を、ゲノムまたはアンチゲノムのcDNAコピーに種々の慣用技術(例えば部位特異的突然変異誘発)により、感染性のウイルスクローン中に導入することができる。本明細書中に記載するように、完全なゲノムまたはアンチゲノムを組み立てるゲノムまたはアンチゲノムcDNA細断片の使用には、小さいcDNA構築物は大きなcDNA構築物よりも比較的容易に操作でき、次いで完全なcDNA中に容易に集めることができるなど、各領域を分けて操作できるという利点がある。

【0061】

本発明の特定の組換えウイルスは、組換えウイルスの増殖能、複製能力または感染能を制限するために構築または修飾される。そのような増殖-または複製-欠損ウイルスおよびサブウイルス粒子は、そうでない完全な感染性のウイルス(即ち、ほぼ野生型レベルの増殖能や複製能力を有する)を宿主に投与することになるという危険を犯すことがないため、ベクターや免疫原として有効である。複製-欠損は、宿主細胞または哺乳動物被検体中でのその増殖能力および複製能力が制限されているか、またはそうでなければ細胞中または細胞間でその感染能力および/または伝播能力が欠損しているウイルスまたはサブウイルス粒子を意味する。複製-欠損ウイルスは、その複製能が宿主細胞または被検体中ではわずか1回、2回の複製にしばしば制限されている。本明細書中に以下に詳細を記載するように、増殖-および複製-欠損ウイルスおよびサブウイルス粒子は「ベクター」としてしばしば使用される。

【0062】

このように、種々の方法および組成物は、増殖 - および複製 - 欠損、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するために提供される。より詳細な実施形態では、増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、対応する野生型または親ウイルスの増殖、複製および感染能と比べて実質的に損なわれている増殖、複製および感染能特徴を示す。この内容では、増殖、複製および感染能は、インビトロまたはインビボで野生型または親ウイルスの複製および / または感染レベルと比べて少なくともおよそ10 ~ 20 %、20 ~ 50 %、50 ~ 75 % および95 % まで、もしくはそれ以上損なわれていてもよい。

【0063】

様々な増殖または複製欠損の程度を有するウイルスは、以下に詳細に記載するように、組み合わされた熱ショック / T7 - プラスミドレスキュー系を用いることで一般にレスキューされる。典型的な株では、下記のように修飾（例えばC末端Gタンパク質切断または転座遺伝子）を組み込むVSVの非常に強く弱毒化された株を含む（例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Johnsonら、*J. Virol.* 71:5060-5078、1997、Schneillら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11359-11365、1996；Schneillら、*Cell* 90:849-857、1997；Robertsら、*J. Virol.* 72:4704-4711、1998；およびRoseら、*Cell* 106:539-549、2001を参照のこと）。被検ウイルスの幾つかは、例えば、遺伝的相補性を有しないがまだ伝播できる、部分的な損傷のみの欠損を含む。そのような欠損は、本明細書中の記載に基づいて、コード配列、非コード配列および調節配列中にアミノ酸置換、ヌクレオチド置換、部分的もしくは完全な遺伝子欠失またはノックアウト、および類似の方法により、例えばRSV、PIVおよびVSVについて記載するような特定のtsもしくはca表現型に対して実施できる。

【0064】

しばしば、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、重大な増殖損傷とならない、部分的もしくは完全な遺伝子欠失または遺伝子「ノックアウト」を有しており、ウイルスは細胞系で伝播するが天然の宿主では複製を実質的に制限されることとなる。この内容における例示する変異体は、1つまたはそれ以上のSH、NS1、およびNS2遺伝子またはタンパク質の部分的または完全な欠失またはノックアウトを有するRSVを含む。他の実施形態で、増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、遺伝子機能を損なうが複製を妨げない変異または他の変化を導入することによって構築される。例えば、上記の引用例には、Gタンパク質細胞質尾部に影響を及ぼすC末端切断を有する有用なVSV候補物を記載する。これらおよび相当する増殖 - または複製 - 欠損体ウイルスは、例えば、組換えベクターゲノムまたはアンチゲノム中に異種抗原性決定基を組み込むことにより、「ベクター」として有効である。特定の実施例で、MVまたはHIV糖タンパク質、糖タンパク質ドメイン、あるいは1つまたはそれ以上の抗原性決定基（群）を、VSVベクターまたは「バックボーン」中に組み込む。

【0065】

更なる増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、細胞系の増殖に不可欠ではないが、哺乳類宿主の病原性に影響を及ぼすタンパク質の発現を防ぐ塩基置換または小さな欠失を有する。これに関する典型的な構築物は、完全にまたは部分的に除去もしくは欠失されている1つまたはそれ以上のC、Dおよび / またはVORFを有するHPIV（例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Durbinら、*Virology* 261:319-30、1999を参照のこと）、および、欠失またはノックアウトされた全部または一部のVタンパク質を有するMV（出典明示により本明細書の一部とする、Schneiderら、*Virology* 227:314-22、1997）あるいは変異導入された全部または一部のVタンパク質を有するMV（例えば、出典明示により本明細書の一部とする、2003年12月16日にParksに発行された米国特許出願第6,664,066号を参照のこと）を含む。

【0066】

より更なる増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、遺伝子発現を除去（ノックアウト）または減少させる、部分的なもしくは完全な欠失、または別の種類の修飾を有しており、この欠損は部分的により損なわれるが、細胞系での複製を完全に妨げることはない。この内

10

20

30

40

50

容の有用な候補物の例は、マトリックスタンパク質欠損またはノックアウトを有する M V (出典明示により本明細書の一部とする、Cathomenら、EMBO J. 17:3899-908、1998)、および N S 1、N S 2、M 2 - 2 および / または S H の 1 つまたはそれ以上の欠失またはノックアウトを有している R S V (出典明示により本明細書の一部とする、Jinら、Virology 273:210-8、2000、)を含む。

【 0 0 6 7 】

他の実施形態では、増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、結果として増殖能を損なうが複製を妨げない再配列された、または位置的に「シャッフル」された遺伝子を有する。そのような位置的にシャッフルされた種々の R S V 変異体は、本明細書中の一部とされる引例中に記載される。この網の他の典型的な組換え体は、V S V について記載されている (例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Wertzらに 2 0 0 3 年 7 月 2 2 日に発行された米国特許番号第 6,596,529 号 ; Baillyらに 2 0 0 0 年 1 0 月 2 4 日に発行された米国特許番号第 6,136,585 号 ; および Wertzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3501-6、1998を参照のこと)。

10

【 0 0 6 8 】

他の実施形態の範囲内で、増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、増殖を損なう部分的または完全な遺伝子置換を有する。これに関しては、1 つまたはそれ以上のウイルス遺伝子は、H P I V または R S V 抗原決定基を発現する種々の宿主域が制限されたヒト - ウシ P I V (H B P I V) によって (それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Skiadopoulosら、J. Virol. 77:1141-8、2003 ; Baillyら、J. Virol. 74:3188-95、2000、Schmidtら、J. Virol. 75:4594-603、2001) および別の R S V または V S V の F および / または G 遺伝子により置換されている F および / または G 遺伝子を有する R S V (例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Oomensら、J. Virol. 77:3785-98、2003を参照のこと) によって例示されるように、別の種に感染する関連するウイルス由来の遺伝子によって置換されていてもよい。

20

【 0 0 6 9 】

本発明の他の詳細な実施形態では、増殖 - または複製 - 欠損ウイルスは、喪失した機能を提供する相補的な細胞系、ヘルパーウイルス、トランスフェクションまたはその他の手段によって補われなければならない欠損を含めて構築される。典型的な構築物は、G タンパク質の発現が低下または除去された V S V を含む。喪失した G タンパク質発現は、トランスフェクションまたは数種類のヘルパー - ウイルス系により提供される (「仮型性 (pseudotyping)」) (例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Lefkowitzら、Virology 178:373-83、1990を参照のこと)。あるいは、喪失した G 機能は、相補的な細胞系によって (例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Schnellら、Cell 90:849-57、1997を参照のこと)、または G タンパク質融合体を用いて (例えば、V S V G タンパク質は、例えば麻疹の F または H 遺伝子由来の異種配列と融合された V S V の膜貫通配列および細胞質ドメインを含む) (例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Schnellら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11359-11365、1996 ; Schnellら、Cell 90:849-857、1997 ; Robertsら、J. Virol. 72:4704-4711、1998 ; および Roseら、Cell 106:539-549、2001を参照のこと) 提供され得る。本明細書中に記載する 1 つの典型的な実施例では、欠陥のある G 機能を有す組換え V S V は、機能的な G タンパク質をエンコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされた細胞と一緒にウイルストランスフェクトされた細胞を共培養する第 2 の工程を通じて回収される。他の典型的な候補物では、V S V G タンパク質が、特定の細胞、例えば C D 4 + 細胞にウイルスを標的化する受容体を形成する混成 G タンパク質で置換されている (出典明示により本明細書の一部とする、Johnsonら、J. Virol. 71:5060-5078、1997)。

30

40

【 0 0 7 0 】

部分的に増殖または複製が欠損している更なるウイルスは、リーダーまたはトレーラー領域の修飾によって、例えば、トレーラー領域がリーダー配列中に見出された弱いプロモーターのコピーで置換されることによって構築される (出典明示により本明細書の一部と

50

する、Finkeら、J. Virol. 73:3818-25、1999)。

【0071】

容易な調製のために、N、P、Lおよび他の所望のウイルスタンパク質は、1つまたはそれ以上の別々のベクターに組み立てられていてもよい。多くの好適な発現ベクターは当分野で既知であり、それらには、RNAポリメラーゼおよび補助タンパク質をエンコードしているポリヌクレオチドを組み込むのに、および発現させるのに有用なもの、例えば、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、不完全ウイルスペクター、「レプリコン」と呼ばれるもの（例えば、シンドビスおよびベネズエラウマ脳脊髄炎レプリコン）、および一過性および/または構成的に発現させるのに有用な他のベクターが挙げられる。RNAポリメラーゼ並びに、該当する場合には、N、PおよびLタンパク質の一過性の発現は、ポリメラーゼおよび/または補助ベクター（群）と作動可能に一緒にされた一過性発現制御因子により行われる。1つの典型的な実施形態では、RNAポリメラーゼ用の一過性発現制御因子には、最も初期にヒト・サイトメガロウイルス[hCMV]ポロモーターおよびエンハンサーによって実施されたように、RNAポリメラーゼII調節領域がある（例えば、出典明示により本明細書の一部とする、米国特許第5,168,062号を参照のこと）。

【0072】

ウイルscDNA、一過性に発現されるRNAポリメラーゼ、並びにN、PおよびLタンパク質をエンコードするベクターは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、機械的な挿入、形質導入または類似法を含む当分野で既知の種々の方法のいずれかによって、適当な宿主細胞に導入され得る。特定の典型的な実施形態では、被検ベクターは、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション(Wiglerら、Cell 14:725、1978; Corsaroら、Somatic Cell Genetics 7:603、1981; Grahamら、Virology 52:456、1973)、エレクトロポレーション(Neumannら、EMBO J. 1:841-845、1982)、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション(Ausubelら、(著) Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Inc.、NY、1987)、または陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション(Hawley-Nelsonら、Focus 15:73-79、1993)によって、培養細胞中に導入される。別の実施形態では、トランスフェクション促進試薬が細胞によるDNAの取り込みを増加させるために加えられる。これら多くの試薬は当分野で既知である。LIPOFECTACE（登録商標）（ライフ・テクノロジーズ(Life Technologies)、Gaithersburg、MD)およびEFFECTENE（登録商標）（キアゲン(Qiagen)、Valencia、CA)が一般的な例である。LIPOFECTACE（登録商標）およびEFFECTINE（登録商標）は両方ともである。これらの試薬は、DNAを覆って細胞によるDNAの取り込みを増大させる陽イオン性脂質である。LIPOFECTACE（登録商標）がDNAを取り囲むリポソームを形成するのに対し、EFFECTINE（登録商標）はDNAを覆うがリポソームを形成しない。DNAの取り込みを容易にするための他の有用な市販試薬にはLIPOFECTAMINE-2000（登録商標）（インビトロジェン(Invitrogen)、Carlsbad、CA)がある。

【0073】

本発明の範囲内での使用に適当な宿主細胞は、被検非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの増殖的な感染を補助することができ、そして、ウイルス生成を補助するのに必要な必須のベクターおよびそれにコードされた産物の発現が可能である。そのような宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞から選ぶことができる。好適な細胞は、昆虫細胞、例えばSf9およびSf21、適当なプロモーターを有する細菌細胞、例えばイー・コリ(E. coli)、酵母細胞、例えばエス・セレビスイエ(S. cerevisiae)を含む。宿主細胞は、脊椎動物、例えば霊長類の細胞から典型的には選ばれる。本発明で用いられる多くのRNAウイルスはヒト病原体であるため、霊長類の細胞がそのような実施でしばしば用いられる。例えば、麻疹ウイルス(MV)は主に霊長類細胞型に制限される。ヒト以外の哺乳動物に感染するイヌジステンパーウイルスや他の麻疹ウイルスなどの例外はある。幾つかの真核生物細胞系は、ウイルスが伝播するのに他のものよりもよく機能し、幾つかの細胞系

は幾つかのウイルスに関して全く機能しない。一般的に、細胞系は、生存可能なウイルスのレスキューが容易に検出できるように、細胞変性効果を与えるものが用いられる。しばしば、宿主細胞はヒト細胞（例えばヒトの胚腎臓（HEK）細胞）からのものである。Vero細胞（アフリカミドリザルの腎臓細胞）並びに他の多くの細胞型を宿主細胞として用いることができる。麻疹ウイルスおよび潜在的な他のウイルスの場合、ウイルスがVero細胞上で素早く分散し、容易に検出できるプラークを形成するので、トランスフェクトされた細胞はVero細胞上で増殖される。以下は、他の好適な宿主細胞の例である：（１）ヒト２倍体初代細胞系（Human Diploid Primary Cell Line）：例えば、WI-38およびMRC-5細胞；（２）サル２倍体細胞系（Monkey Diploid Cell Line）：例えば、コス（Cos）、アカゲザル胎児肺（FRhL）細胞；（３）準初代連続細胞系（Quasi-Primary Continuous Cell Line）：例えば、AGMK-アフリカアフリカミドリザル腎臓細胞；（４）ヒト293細胞（承認された）および（５）齧歯動物（例えばCHO、BHK）、イヌ科（例えば、マディン-ダービー（Madin-Darby）犬の腎臓（MDCK）および初代ヒナ胚線維芽細胞。本発明の方法と組成物の範囲内で有用な典型的な特定の細胞系は、HEp-2、HeLa、HEK（例えばHEK293）、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5およびVero細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0074】

本明細書中で提供される方法と組成物の範囲内で、宿主細胞へのRNAポリメラーゼベクター、ウイルスcDNAクローンおよび補助ベクター（群）（例えばN、PおよびLをエンコードするプラスミド（群））の同調的導入は同時的であろう。例えば、全ての対象DNAを、１つのDNAトランスフェクション（例えばリン酸カルシウムトランスフェクション）混合物中に組み合わせることができ、同調的トランスフェクションを達成するために同時に宿主細胞培養物に加えてもよい。別の実施形態では、個別のトランスフェクションが、２個またはそれ以上の対象ポリメラーゼ、および補助ベクターおよびウイルスcDNAベクターについて実施されてもよい。一般的に、個別のトランスフェクションは効果的な同時トランスフェクション手順でポリメラーゼおよび補助ベクターおよびウイルスcDNAベクターを同調的に導入するために、近接した時間系列で行われる。そのような同調的トランスフェクションプロトコルでは、ウイルスcDNAおよび／またはN、PおよびL補助プラスミド（群）は、RNAポリメラーゼプラスミドのトランスフェクションの前に宿主細胞に導入される。他の実施形態では、ウイルスcDNAおよび／またはN、P、L補助ベクター（群）は、細胞中へのRNAポリメラーゼプラスミドのトランスフェクションと一緒にまたはその後であるが、宿主細胞中でのRNAポリメラーゼの実質的な発現の前に（例えば、T7ポリメラーゼが検出可能なレベルに蓄積する前に、あるいは、T7プロモーターによって促進されるプラスミドの発現を活性化するのに十分なT7レベルが蓄積する前に）、宿主細胞中に導入される。

【0075】

本発明の他の詳細な態様の範囲内で、感染性、非分節型、ネガティブ鎖RNAウイルスを生成する方法は、組換えウイルスの回収を増大させるために、宿主細胞に対する更なる熱ショック処置を含む。１つまたはそれ以上のウイルスcDNA発現ベクター、並びにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードする１つまたはそれ以上の一過性の発現ベクターが宿主細胞に導入された後、その宿主細胞は組換えウイルスの回収を増大させる効果的な熱ショック刺激に曝される。

【0076】

そのような方法では、宿主細胞は、細胞の熱ショックを達成するのに十分な時間、順次刺激してウイルス回収を向上させる効果的な熱ショック温度に曝される。効果的な熱ショック温度は、被検ウイルスのレスキューを行うために当分野で考えられる、許容される、推薦される、または最適な温度より高い温度である。多くの実施において、効果的な熱ショック温度は37℃以上である。本発明の改変されたレスキュー方法が効果的な熱ショック温度で実施された場合、レスキューが高い温度でなく行われた場合の組換えウイルスの回収レベルよりも、所望の組換えウイルスの回収は増大する。効果的な熱ショック温度お

よび暴露時間は、使用されるレスキュー系に基づいて異なり得る。そのような温度および時間の相違は、選択されるウイルスまたは宿主細胞型の違いから生じる得る。

【0077】

温度により異なるが、効果的な熱ショック温度は、特定の組換えウイルスを用いて種々の試験レスキュー手順を実施し、温度および暴露時間を変えて所望の組換えウイルスのレスキューの百分率を確立することによって、容易に確かめることができる。必然的に、レスキューを行うための温度範囲の上限は、トランスフェクションの構成成分が破壊される温度、またはトランスフェクションで機能するそれらの能力が激減するか減少する温度である。本発明のこの態様の範囲内で用いられる例示する効果的な熱ショック温度範囲は：約37 ~ 約50、約38 ~ 約50、約39 ~ 約49、約39 ~ 約48、約40 ~ 約47、約41 ~ 約47、約41 ~ 約46である。しばしば、選択される効果的な熱ショック温度範囲は約42 ~ 約46である。より詳細な実施形態では、約43、44、45または46の効果的な熱ショック温度が用いられる。

10

【0078】

選択される効果的な熱ショック温度または温度範囲を確立するために試験を行うにあたって、熱ショック手順を実行するため効果的な時間も選択され得る。効果的な熱ショック温度を適用するのに十分な時間は、レスキューが上記の温度増加を行わず実施した場合の組換えウイルスの回収レベル以上に、所望の組換えウイルスのレスキューにおいて検出可能な増分がより長い時間である。効果的な熱ショック時間は、選択したウイルスおよび宿主細胞を含むレスキュー系に基づいて変わり得る。時間により異なるが、効果的な熱ショック温度をかける時間長は、特定の組換えウイルスを用いて種々の試験レスキュー手順を実施し、温度および時間を変えて所望の組換えウイルスの回収速度および百分率を確立することによって、容易に確かめることができる。レスキューに用いられる時間範囲の上限は、トランスフェクションの構成成分が破壊される時間、またはトランスフェクションで機能するそれらの能力が激減するか減少する時間である。組換えウイルスの回収に所望の増加が得られる限り、熱ショック手順のための時間は数分~数時間まで変更し得る。本発明のこの態様の範囲内で使用される例示の効果的な熱ショック時間は、分単位で：約5 ~ 約300分、約5 ~ 約200分、約15 ~ 約300、約15 ~ 約240、約20 ~ 約200、約20 ~ 約150である。しばしば、効果的な熱ショック時間は約30分 ~ 約150分であろう。

20

30

【0079】

多くの手段を、宿主細胞が効果的な熱ショックに曝されることによって、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの改変された回収レベルを決定するために用いることができる。例えば、クロラムフェニコールアセチル転移酵素(CAT)レポーター遺伝子を、既知の方法によって組換えウイルスのレスキューをモニターするのに用いることができる。レポーター遺伝子の対応する活性は、組換えウイルスの発現の基線および改変されたレベルを確立する。他の方法は、得られた組換えウイルスのプラーク数を検出し、配列決定によりレスキューされたウイルス産物を確認することを含む。改変された回収を決定する1つの典型的な方法は、同一のトランスフェクトされた細胞培養物を多数調製し、それらを種々の熱ショック条件(時間および温度が可変)に曝し、次いでこれらの培養物の回収値と対照細胞(例えば、37の定温でトランスフェクトされ、維持された細胞)の対応値とを比較することが含まれる。トランスフェクションの72時間後、トランスフェクトされた細胞は、約75%の密集度で単層のVerob細胞(または組換えウイルスのプラーク形成を決定するために選ばれる細胞型)を含む10cmプレートに移され、プラークが見えるまでインキュベーションする。その後、プラークを数え上げ、対照細胞から得られた値と比較する。最適な熱ショック条件はプラーク数を最大にするである。

40

【0080】

本発明のこれらの実施形態に基づいて、改変されたウイルス回収は、少なくとも約10%または25%、およびしばしば少なくとも約40%であろう。特定の実施形態では、効果的な熱ショック露出による回収される組換えウイルスの増加は、観察または回収される

50

組換えウイルス量の増加は2倍、5倍、最高で10倍以上にまで反映される。

【0081】

本発明のもう1つの実施形態では、ウイルスcDNAおよび一過性のRNAポリメラーゼベクター（および、場合により必要な補助タンパク質をエンコードしている1つまたはそれ以上のベクター（群））が導入された宿主細胞は、「ブランクエキспанション」工程を受ける。この手順は、典型的に、ウイルスcDNA発現ベクターおよびRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質をエンコードし且つ一過性に発現させる1つまたはそれ以上の一過性発現ベクターの発現を行わせるのに十分な時間の経過後（例えば、トランスフェクション後）に実施される。ブランクエキспанションを達成するために、更なるウイルスエキспанションを補助する能力がしばしば弱められた宿主細胞は、同じもしくは異なる細胞型のブランクエキспанション細胞と一緒に共培養される。この共培養工程は、レスキューされたウイルスがブランクエキспанション細胞に対する分散を可能にするため、この工程は生存可能なウイルスのエキспанションに、より敏感である。一般的に、宿主細胞の培養物は、単層または多層（群）のブランクエキспанション細胞に移される。例えば、宿主細胞の培養物は、単層のブランクエキспанション細胞上で分散することができ、次いで非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスはブランクエキспанション細胞に感染し、さらにそこで増大する。別の実施形態では、宿主細胞はブランクエキспанション細胞と同じまたは異なる細胞型である。

10

【0082】

本発明の改変されたブランクエキспанション方法および組成物は、組換えモノネガウイルスを生成するための、改変されたレスキュー方法を提供する。典型的に、本方法は、モノネガウイルス目の非分節型、ネガティブ鎖、一本鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードする単離された核酸分子を含む一過性ベクター、およびRNAポリメラーゼをエンコードし且つ一過性に発現させる一過性発現ベクターを、キャプシド形成、転写および複製に必要なトランス作用性タンパク質をエンコードする少なくとも1つの単離された核酸分子を含む少なくとも1つの発現ベクターと共に、該ベクターの同時発現および組換えウイルスの生成を可能とするに十分な条件下で、宿主細胞中に導入することを、必然的に伴う。その後、その宿主細胞を少なくとも単層のブランクエキспанション細胞上に移動させる。

20

【0083】

ブランクエキспанションを達成するため、一般的に、トランスフェクトされた細胞は、ブランクエキспанション細胞の共培養容器に移される。当分野で既知の様々なプレートまたは容器のいずれをもブランクエキспанション工程に用いることができる。特定の実施形態では、トランスフェクトされた細胞は、少なくとも約50%の密集度の単層のブランクエキспанション細胞上に移される。あるいは、ブランクエキспанション細胞は少なくとも約60%の密集度であるか、さらに少なくとも約75%の密集度である。特定の実施形態では、ブランクエキспанション細胞の表面積は、トランスフェクトされるウイルスを調製するために用いられる表面積より大きい。望ましいのは、増大された表面積の比は、2:1~100:1を用いることができる。少なくとも10:1の増大された表面積がしばしば望ましい。

30

40

【0084】

ブランクエキспанション細胞は、該細胞において好結果の天然または組換えウイルスの増殖に基づいて選択される。しばしば、トランスフェクションを実施するのに用いられる宿主細胞は、所望の組換えウイルスの増殖に最適な宿主ではない。従って、トランスフェクションされた細胞からの組換えウイルスの回収は、天然ウイルスまたは組換えウイルスの増殖が増大されるブランクエキспанション細胞を選択することによって向上する場合がある。上記に従って、種々のブランクエキспанション細胞を、本発明のこの態様の範囲内で用いるために選択することができる。回収を補助するのに用いることができる典型的な特定のブランクエキспанション細胞および本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのエキспанションが、Hep-2、HeLa、HEK、BHK、FRh

50

L - D B S 2、L L C - M K 2、M R C - 5 および V e r o 細胞から選択される。本発明の範囲内で使用するための熱ショックおよびブランクエキスパンション方法に関する更なる詳細は、出典明示により本明細書の一部とする P C T 公開公報 W O 99/63064 で提供される。

【 0 0 8 5 】

また、モノネガウイルス目の感染性、非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルスを生成するための組成物は、発明の範囲内で提供される。組成物は、ウイルス c D N A からのウイルス R N A 転写物を合成させるために発現制御配列と作動可能に連結された非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクター、並びに R N A ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質および L タンパク質をエンコードし且つ宿主細胞で一過性発現させる 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクターを含む。本発明のこの態様の範囲内では、この組成物は、R N A ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質をエンコードし且つ無細胞同時トランスフェクション混合物中で一過性発現させる 1 つまたはそれ以上の一過性発現ベクター（群）を含んでいてもよい。あるいは、ウイルス c D N A 発現ベクター、並びに該 R N A ポリメラーゼ、N、P および L タンパク質をエンコードし且つ一過性発現させる 1 つまたはそれ以上の一過性の発現ベクター（群）は、宿主細胞（例えば、宿主細胞への被検ベクターのトランスフェクションに続けて）内で提供され得る。特定の実施形態で、R N A ポリメラーゼは、T 7、T 3 または S P 6 R N A ポリメラーゼから選択される。他の実施形態では、R N A ポリメラーゼをエンコードしている一過性の発現ベクターはプラスミドである。さらに更なる実施形態で、上記組成物は、宿主細胞からレスキューされたウイルスがブランクエキスパンション細胞に対して分散し、組換えウイルスのエキスパンションを容易にする宿主細胞と同じもしくは異なる細胞型のブランクエキスパンション細胞を更を含む。

10

20

【 0 0 8 6 】

下記の本発明の 1 つの例示する実施形態では、一過性の T 7 R N A ポリメラーゼ発現ベクター（チューリッヒ大学 Martin Billeter 博士により提供された、p S C 6 - T 7）は、全長の麻疹ウイルス（M V +）c D N A クローンを用いて発現制御配列（例えば、T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター）と作動可能に連結された M V N、P および L タンパク質をエンコードするプラスミドと共に、V e r o 細胞中に同時トランスフェクトされ、好結果の M V 回収を示した。

30

【 0 0 8 7 】

他の典型的な実施形態で、本発明の方法と組成物は、R S V A 型および B 型、キメラ A / B R S V および以下に記載の弱毒性変異および / または他の組換え修飾（例えば遺伝子欠失）を 1 つまたはそれ以上組み込んでいる組換え R S V を含む、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）の 40 種の組換え構築物の好都合な回収のために用いられた。更なる具体例が提供され、例えば、ヒト・パラインフルエンザウイルス 3 型（H P I V 3））、キメラ・ヒト・パラインフルエンザウイルス 3 - 1（P I V - 3 の糖タンパク質遺伝子 F および H N は、ヒト・パラインフルエンザウイルス 1 型の糖タンパク質遺伝子 F および H N により置換されている）、キメラ・ヒト・パラインフルエンザウイルス 3 - 2 C T（P I V - 3 の糖タンパク質遺伝子 F および H N の細胞質尾部部分がヒト・パラインフルエンザウイルス 2 型の糖タンパク質遺伝子 F および H N により置換されている）、ウシ P I V 3 型（B P I V 3）、キメラ・ヒト・牛 P I V - 3（牛パラインフルエンザウイルス 3 型の糖タンパク質遺伝子 F および H N が、ヒト P I V - 3 の糖タンパク質遺伝子 F および H N により置換されている）、および水疱性口内炎ウイルス（V S V）の好結果な回収を示した。

40

【 0 0 8 8 】

本発明の他の詳細な実施形態では、一過性 T 7 R N A ポリメラーゼ発現プラスミドは、p C 1 - N e o バックボーン（プロメガ、Madison WI）に基づいて構築された。T 7 R N A ポリメラーゼ遺伝子を挿入する前に、多重クローニング部位の 5' 端にある T 7 プ

50

ロモーターを除去することによって、このベクターを修飾し、pC1 - Neo - BCLを作り出した。T7プロモーターは、細菌増殖中のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子挿入物の安定性を増大させるために除去された。T7 RNAポリメラーゼの過剰発現は細菌に有毒であり得るため、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子がT7 RNAポリメラーゼプロモーターの下流にクローニングされた場合、問題となり得る。

【0089】

クローニングのために用いたT7遺伝子をPCR増幅して、PCRプライマー中に組み込まれたEcoRI (5') およびXbaI (3') 部位を用いてクローニングした。また、高効率タンパク質合成を確実にするため、コザック共通配列を、ATG翻訳開始コードの5' に含ませた。pC1 - Neo - Bcl 中へのT7遺伝子の挿入により、T7遺伝子がhCMVプロモーターおよびエンハンサーの制御下に置かれることとなるpC1 - Neo - Bcl - T7が作成された。結果として生じるプラスミドpC1 - Neo - BCL - T7は、図2 (配列番号: 1) に記載の配列を有し、HCMVプロモーター/エンハンサー、続いてイントロン、T7 RNAポリメラーゼSV40ポリA、SV40プロモーター/エンハンサーおよびNeo^R 要素の順で含む。ネオマイシン耐性遺伝子により表され、SV40プロモーター/エンハンサーにより制御される最適な選択マーカーはT7遺伝子の3' に配置された。ネオマイシンマーカーは、安定にトランスフェクトされた細胞系を選択するのに用いることができるため、プラスミドに汎用性を与える。また、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子の3' 端にSV40エンハンサーを配置することになる選択的なマーカー遺伝子の配置は注目すべきである。SV40エンハンサーの十分に実証された双方向性転写刺激効果は、プラスミドpC1 - Neo - Bcl - T7中のT7 RNAポリメラーゼの過剰発現に大きく寄与し得る。

【0090】

本発明の方法は、それぞれ当分野で周知のレスキューされるウイルスの種々の組換え修飾体と共に実施され得る。例えば、ウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、全遺伝子の欠失、遺伝子の一部の欠失、コード領域中の点突然変異(群)、異種核酸配列(別のウイルス、別の病原体由来の配列、医薬的に有用なポリペプチドをエンコードする配列、または免疫修飾物質をエンコードする配列)による遺伝子の全部もしくは一部の置換、例えば遺伝子間領域中への異種核酸配列の挿入、および遺伝子順序の再配列、並びに他の修飾によって修飾されていてもよい。本明細書中で提供されるレスキュー系は十分に強力で効率的であるため、増殖 - 欠如および/または減弱化組換え体または変異体派生物の回収は好結果に実行され得る。

【0091】

従って、本発明に基づく伝染性、組換え、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、組換えウイルス中への定義された変更の導入を可能とし、かつ定義されたゲノム配列を有する免疫原性組成物に使用するためのウイルス候補体の、高頻度かつ高精度の生成を提供する新規の同時発現系により作り出される。これらの修飾は、予め定められ、定義された弱毒性変異を有している生弱毒化ウイルス株の開発を含む、幅広い適用に有用である。本発明の感染性非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、転写性、複製性ヌクレオキャプシドを作り出すために望ましいもしくは少なくとも必要なウイルスタンパク質をエンコードする1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドと共に、ウイルスゲノムまたはアンチゲノムRNAをエンコードする単離されたポリヌクレオチド分子の1つまたはそれ以上の細胞内同時発現によって生成される。

【0092】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするcDNAは、感染性のウイルスを作り出すため、選択されたウイルスタンパク質と共に細胞内同時発現のために構築される。「非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスアンチゲノム」は、子ウイルスゲノム合成用テンプレートとして用いられる単離されたポジティブ - センスポリヌクレオチド分子を意味する。一般的に、cDNAは、転写性、複製性ヌクレオキャプシドを作り出すために必要とされるタンパク質をエンコードする相補配列のポジティブ

- センス転写物とハイブリダイズする可能性を最小にするために、複製中間物RNA、またはアンチゲノムに相当するウイルスゲノムのポジティブセンス型に、構築される。これとは逆に、上記の、ウイルスゲノムのネガティブセンス型を用いることができる（例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Katoら、Genes to Cells 1:569-579、1996を参照のこと）。

【0093】

本発明の幾つかの実施形態では、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムは、ウイルスまたはサブウイルス粒子がエンコードし、それによって感染性となるのに必要な遺伝子またはその一部を含むことのみ必要である。さらに、その遺伝子またはその一部は1つ以上のポリヌクレオチドによって提供されてもよい、すなわち1つの遺伝子が別個のヌクレオチド分子からの補完または類似の方法により提供されてもよい。他の実施形態では、ウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、プラスミドまたはヘルパー細胞系によって提供されるヘルパーウイルスまたはウイルス機能の関与無しに、ウイルス増殖、複製および感染に必要な全ての機能をエンコードする。

10

【0094】

「組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス」は、組換え発現系から直接または間接的に誘導された、またはそれらから生成されたウイルスまたはサブウイルスから伝播された、完全ウイルスまたは感染性のサブウイルス粒子を意味する。組換え発現系は、作動可能に連結された、少なくともウイルス遺伝子発現の調整的な役割がある遺伝子要素群の会合体を含む転写単位、例えばプロモーター、ウイルスRNAに転写される構造もしくはコード配列、並びに適当な転写開始配列および転写終結配列を含む、組換えウイルス性発現ベクターを使用する。

20

【0095】

非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの感染クローンの効果的なレスキューを提供する方法により、本発明は、多様なウイルス被検体のゲノム（またはアンチゲノム）の範囲内で、組換え技術的に生成され、望ましい特定の表現型が変化する定義された変異を引き起こす広範囲に渡る改変が可能である。組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための、本発明の組成物および方法は、例えば選択したウイルスタンパク質の機能または発現を改変する定義された変異を用いることによって、ウイルスの分子生物学的機構および病原性機構の迅速で詳細な分析と操作を可能にする。関連する診断用途は、当業者であれば容易に認められる。本発明の方法および組成物を用いることで、サイレント付随変異から所望の表現型変化に関与する突然変異を容易に区別することができ、そして、組換え感染性非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムまたはアンチゲノム中に組み込むための表現型特異的変異を容易に選択することができる。

30

【0096】

この内容において、種々のヌクレオチド挿入、欠失、置換と再配列は、組換えウイルスゲノムまたはアンチゲノムでcDNAの構築中もしくはその後に行われる。例えば、特定の望ましいヌクレオチド配列を合成し、都合のよい制限酵素部位を使ってcDNA中の適当な領域に挿入することができる。あるいは、当分野で周知の、部位特異的突然変異誘発、アラニンスキャニング、PCR突然変異誘発または他の技術を、突然変異をcDNAに導入するのに用いることができる。

40

【0097】

例えば、ウイルスの弱毒性および免疫原性を増強するための、望ましくない細胞病理と関連するエピトープを除去するための、抗原ドリフトを調整するためなどの、本発明の範囲内で提供される非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの組換え修飾は、診断および免疫原性組成物で使用するための候補ウイルスの生成に貢献する。これらおよび他の目的を達成するために、本発明の組成物および方法は、感染性、組換えウイルス中に組み込むため、多種多様の修飾を非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムまたはアンチゲノム中に導入することができる。例えば、抗原決定基（例えば防御抗原または免疫原性エピトープ）をエンコードする外来遺伝子または遺伝子断片は、親または「バックボーン」ウイ

50

ルスおよび別の「供与」ウイルスまたは抗原決定基（群）が誘導される病原体物質に対する免疫を誘発することができる組換えウイルスを作り出すウイルスクローン範囲内で加えることができる。あるいは、候補ウイルスの免疫原性を増強するために、免疫系、例えばサイトカインの修飾因子をエンコードする外来遺伝子は、全体または一部にて、挿入されてもよい。他の突然変異、例えば、異種遺伝子または遺伝子断片（例えば糖タンパク質遺伝子の細胞質尾部をエンコードする遺伝子断片）により組換えウイルスクローン中の対応遺伝子または遺伝子断片の置換は、本発明の方法に基づいてレスキューされるウイルスクローン内に含まれることがある。あるいは、ウイルスクローン内の相対的な遺伝子順序を変更することができ、ウイルスゲノムプロモーターまたは他の調節因子をそのアンチゲノム対応物、または機能させなくする（例えば、遺伝子の発現を妨げる停止コドンの導入を含む機能除去によって）選択されたウイルス遺伝子（群）と置換することができる。ウイルスゲノムまたはアンチゲノムの種々の非コード領域またはコード領域中に唯一の制限部位を挿入するなどの、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの他の修飾は、操作を容易するために行うことができる。加えて、非翻訳遺伝子配列は、外来配列を挿入できる受容力を増やすために取り除くことができる。

10

20

30

40

50

【0098】

上記したように、弱毒を増大または減少させるか、別には組換えウイルスの表現型を変える更なる変異を導入することによって、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの表現型を調節することはしばしば望ましい。本発明の範囲内でcDNAから組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するために、および種々の弱毒性変異および他の変異を選択し、導入しおよび試験するために有用な物質および方法は、パラインフルエンザウイルスについて詳細に実施され、本発明の方法および組成物の範囲内ではPIVおよび他の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに一般的に適用可能である（例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Durbinら、Virology 235:323-332、1997；1998年5月22日に出願された米国特許出願番号第09/083,793号；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/458,813号；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/459,062号；1998年5月22日に出願された米国特許出願番号第09/083,793号（国際公開番号W0 98/53078に対応する）およびその優先権の米国仮出願番号第60/047,575号（1997年5月23日に出願された）、および60/059,385（1997年9月19日に出願された）を参照のこと）。特に、上記一部とされる引用例には、感染性ウイルスクローンを生成するのに用いることができる典型的なプラスミドの説明が含まれ、PIVタンパク質と共に同時発現されるPIVゲノムまたはアンチゲノムをエンコードするcDNAの構築および発現により感染性組換えHPIV3を生成する方法が記載されている。不可欠なPIVタンパク質と共に同時発現されるHPIV1組換え体またはキメラゲノムもしくはアンチゲノムをエンコードするcDNAの構築または発現による感染性組換えHPIV1の生成方法は、2001年11月21日に出願された米国仮出願番号第60/331,961号、およびNewmanら、Virus Genes 24:77-92、2002（それぞれ出典明示により本明細書の一部とする）に同様に記載されている。不可欠なPIVタンパク質と共に同時発現されるHPIV2組換え体またはキメラゲノムもしくはアンチゲノムをエンコードするcDNAの構築および発現による感染性組換えHPIV2の生成方法は、2002年9月18日に出願された米国仮出願番号第60/412,053号（出典明示により本明細書の一部とする）に同様に記載されている。

【0099】

同様に、cDNAおよび選択、導入に関連する他の開示物から呼吸器合胞体ウイルス（RSV）をクローニングするための、並びに本発明の範囲内の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構築に用いられる弱毒性変異および他の修飾を試験するための典型的な方法および物質は以下に記載されている（例えば、それぞれ出典明示により全ての目的に関し完全に本明細書の一部とする、1997年4月3日に公開された国際公開番号W0 97/12032に対応する1996年9月27日に出願された米国特許出願番号第08/720,132号、および1995年9月27日に出願された優先権の米国特許仮出願番号第60/007,083号；1996年7月15日に出願された米国特許仮出願番号第60/021,773号；1997年5月9日に出願された米国特許仮出願番

号第60/046,141号；1997年5月23日に出版された米国特許仮出願番号第60/047,634号；1998年1月22日に公開された国際公開番号W0 98/02530に対応する1997年7月15日に出版された米国特許出願番号第08/892,403号；2000年10月19日に公開された国際公開番号 W0 00/61611に対応する1999年4月13日に出版された米国特許出願番号第09/291,894号、および1999年4月13日に出版された優先権の米国暫定特許出願番号第60/129,006号；2000年6月23日に出版された米国特許出願番号第09/602,212号、および2001年1月18日に公開された相当する国際公開番号 W0 01/04335、および1999年4月13日に出版された優先権の米国暫定特許出願番号第60/129,006号、1999年7月9日に出版された第60/143,097号、および1999年7月9日に出版された第60/143,132号；2000年10月19日に公開された国際公開番号 W0 00/61737；Collinsら、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 92:11563-11567、1995；Bukreyevら、J. Virol. 70:6634-41、1996、Juhaszら、J. Virol. 71:5814-5819、1997；Durbinら、Virology 235:323-332、1997；Heら、Virology 237:249-260、1997；Baronら、J. Virol. 71:1265-1271、1997；Whiteheadら、Virology 247:232-9、1998a；Whiteheadら、J. Virol. 72:4467-4471、1998b；Jinら、Virology 251:206-214、1998；およびWhiteheadら、J. Virol. 73:3438-3442、1999、およびBukreyevら、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 96:2367-72、1999を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0100】

上記の一部とされる引用例には、弱毒化変異体株（例えば、温度感受性（t s）、低温継代化（c p）、低温適応（c a）、小さいプラーク（s p）、および、宿主域制限化（h r）変異株）を得るために非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを突然変異誘発し、単離し、特徴づけるための方法および手順、並びに、弱毒化表現型を示す遺伝子変化を同定するための方法および手順が記載されている。これらの方法と併せて、上記一部とされる引用例には、ハムスターまたは齧歯類およびヒト以外の霊長類モデル系を含む、ヒト活性との妥当な相関が認められたモデル系において、生物学的に誘導された、および組換え技術により生成された弱毒化非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの複製、免疫原性、遺伝的安定性および免疫原効果を決定するための手順が詳細に記載されている。加えて、これらの引用例は、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに対する一価および二価の免疫原性組成物を含む免疫原性組成物を開発するおよび試験する一般的な方法が記載されている。

【0101】

また、上記一部とされた引用例中に記載事項に、生物学的に派生した変異、例えば、低温継代化（c p）、低温適応（c a）、宿主域制限化（h r）変異株、小さいプラーク（s p）および/または温度感受性（t s）変異にて同定された表現型特異的変異を組み込むように改変された感染性組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス、例えば、HPIV3 JS c p 45 変異体株（ブタペスト条約の取り扱いの下で、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.Aのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）に、特許寄託番号PTA-2419で寄託された；出典明示により本明細書の一部とされる寄託）を構築し、評価する方法がある。このウイルスおよび他の変異ウイルス（例えば、RSV - 上記引用例を参照のこと）において同定された変異は、以下でさらに詳細に記載するように、本発明の組換えPIVまたは他の感染性非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に容易に組み込むことができる。

【0102】

従って、弱毒性変異および他の修飾は、本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に慣用的に導入することができる。本発明の特定の態様において、生物学的に派生した変異ウイルス由来の変異は、同じもしくは異なるウイルスの組換え株中で同定され、評価され、かつ導入される。本発明の組換えウイルス内に組み込むための生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスにおける弱毒性変異は、自然に生じててもよいし、あるいは野生型株に導入されてもよく、その後、周知の変異誘発手法および分析手法により同定および特徴づけられてもよい。不完全な弱毒化親ウイルス変異株は、上記一部とされた引用例に記載のように、化学変異原が加えられた細胞培養物中でのウイルス増殖中に化学変異原によって、増殖抑制変異を導入するために準最適温度で継代させる選択に

よって、あるいは細胞培養中で小さいブランク (s p) を形成する突然変異誘発されたウイルスの選択によって、生成される。

【 0 1 0 3 】

「生物学的に派生した」は、組換え技術手段で作成されない全てのウイルスを意味する。従って、生物学的に派生したウイルスは、野生型ゲノム配列を有するウイルス、および基準の野生型配列由来の対立性もしくは変異ゲノム変種を有するウイルス、例えば弱毒化表現型を特定する変異を有する生物学的に派生したウイルスを含む。同様に、生物学的に派生したウイルスは、直接的な組換え DNA 操作を含まない、とりわけ、人工の突然変異誘発および選択手順によって、親株から誘導された変異体を含む。

【 0 1 0 4 】

生物学的に派生した変異非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスで同定された突然変異は、所望により単独にまたは組み合わせて、本発明の組換えウイルスを弱毒性、免疫原性、弱毒化表現型からの復帰突然変異に対する遺伝子抵抗性などの適当なレベルに調整するために導入される。上記の説明に従って、cDNA から感染性組換え非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスを能率よく生成する能力は組換えウイルスの幅広い集合体内で特定の設計された変化の導入を可能にする。これら感染性、組換えウイルスは、生物学的に派生した、弱毒化株における特定の変異 (群) 、例えば t s 、 c a 、 a t t および他の表現型を特定する典型的な変異について更なる同定に用いることができる。この方法および他の方法により同定された所望の変異は、他の組換えウイルス株中導入される。新規の本明細書により提供される cDNA から非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスを生成する独特の許容力は、新規のウイルス cDNA クローン中に個々にもしくは種々選択し組み合わせて、これらの変異を慣用法で組み込むことを可能とし、その後導入された変異を含むレスキューされた組換えウイルスの表現型の決定を容易にする。

【 0 1 0 5 】

本発明の他の実施形態では、異種のネガティブ鎖 RNA ウイルスで同定された所望の突然変異は、異種の変異体ウイルスにおいて突然変異マッピングし、慣用の配列アライメントにより受容組換えウイルスの対応部位を同定し、そして異種変異遺伝型で観察されるのと同じもしくは保存的変異に受容ウイルスにおける天然配列を突然変異させることによって「移される」。この変異を移すための一般的な合理的設計方法は、10/19/00にWO 00/61737として公開され、01/08/02に出願された米国出願09/958,292に対応し、1999年4月13日に出願された米国仮特許出願第60/129,006号に対して優先権を主張する、2000年4月12日に出願された国際出願番号第PCT/US00/09695号 (それぞれ出典明示により本明細書の一部とする) に記載されている。本発明のこの態様に関係する更に詳細な記載は、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Newmanら、*Virus Genes* 24:77-92、2002 ; Fellerら、*Virology* 10;276:190-201、2000 ; Skiadopoulosら、*Virology* 260:125-35、1999 ; およびDurbinら、*Virology* 261:319-30、1999にて提供される。

【 0 1 0 6 】

異種変異ウイルスで同定された改変に対して保存的に対応する変異の対象部位における改変をエンコードするように受容組換えウイルスゲノムまたはアンチゲノムを修飾することは、しばしば望ましい。例えば、アミノ酸置換が対応する野生型配列と比較される変異ウイルスの変異部位を明らかにすることで、類似の置換が組換えウイルスの対応する残基 (群) で設計することができる。一般に、置換は、変異ウイルスタンパク質に存在する置換残基に対し同一もしくは保存的なアミノ酸を特定する。しかしながら、変異タンパク質の置換残基に関して非保存的な変異部位の天然のアミノ酸残基を (例えば、野生型残基の機能を破壊もしくは損なわせるために他の任意のアミノ酸も用いることによって) 改変することもできる。例示の突然変異が同定され、本発明の組換えウイルスに移されたネガティブ鎖 RNA ウイルスは、PIV (例えばHPIV1、HPIV2、HPIV3、BPIV3およびMPIV1) 、RSV、ニューカッスル病ウイルス (NDV) 、サル・ウイルス5 (SV5) 、麻疹ウイルス (MV) 、牛痘ウイルス、イヌ・ジステンパーウイルス (CDV) 、流行性耳下腺炎ウイルス、狂犬病ウイルス (RaV) および水疱性口内炎ウイ

10

20

30

40

50

ルス (V S V) を含む。

【 0 1 0 7 】

上記のように、十分に弱毒化され生物学的に派生したウイルス変異体の生産は、様々な既知方法によって実施することができる。そのような手順は、部分的に弱毒化されたウイルスを細胞培養中で徐々に温度を下げて継代することを含む。例えば、部分的に弱毒化された変異体は、準最適温度で細胞培養中に継代することにより生成される。このように、低温順応化 (c a) 変異体または他に部分的に弱毒化されたウイルス株は、培養物中で継代することによって低温で効果的な増殖に適合される。低温継代中の変異ウイルスの選択により、部分的に弱毒化された親と比較して派生株でのいずれかの残留毒性は実質的に減少する。例えば t s 変異を導入するために、またはすでに t s のあるウイルスの場合には、その弱毒化派生体の t s 表現型の弱毒性および / または安定性を増大させるのに十分なさらなる t s 変異を導入するために、部分的に弱毒化された親ウイルスに化学変異誘発を受けさせることによって、生物学的に派生したウイルス中に、特定の変異を導入することができる。非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスへの t s 突然変異の導入のための方法は、一般的な既知の手順に基づいて、5 - フルオロウリジンのような変異誘発物の存在下でウイルスを複製させることを含む。他の化学変異誘発物を用いることもできる。弱毒性はほとんど全てのウイルス遺伝子にある t s 変異から生じるが、特にこの目的に敏感な標的は、ポリメラーゼ (L) 遺伝子であることが見出された。本発明の範囲内で使用する典型的な弱毒化ウイルス複製の温度感受性レベルは、例えば、複製許容温度での複製と幾つかの限定的温度での複製とを比較することによって決定される。ウイルスの複製が複製可能温度での複製と比較して、複製が 1 0 0 倍またはそれ以上減少する温度が最も低い温度で、それをシャットオフ温度と称する。実験動物およびヒトにおいて、非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス複製および毒性は、変異体のシャットオフ温度と相関がある。

【 0 1 0 8 】

図 3 (パネル A - C) で例証するように、異種のネガティブ鎖 RNA ウイルスで同定された種々の変異は、弱毒性または他の望ましい表現型変化を引き起こすために、本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス中に組み込むことができる。図は、H P I V 2 野生型 (w t)、H P I V 3 w t、H P I V 1 w t または B P I V 3 w t の異種ウイルスで既知の弱毒性突然変異を含んでいる同定領域間の典型的な配列アライメントを提供する。これらおよび類似の比較に基づいて、異種ウイルスで既に同定された変異を、本発明の被検組換えウイルスに「移す」(すなわち、アライメントにより同定された同種の部位または対応する部位に置換、欠失または挿入することを潜在的に含む、同一の、保存的もしくは非保存的な突然変異の導入によって)のために、本発明の被検ウイルスの対応部位にマップする。そのような変異の大きな集合は本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス中に組み込むために利用できる(例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Newmanら、Virus Genes 24:77-92、2002; Fellerら、Virology 276:190-201、2000; Skiadopoulosら、Virology 260:125-35、1999; および Durbinら、Virology 261:319-30、1999を参照のこと)。図 3 A および 3 C (パネル A - C) で示されるように、異種のウイルスにおいて(表示の野生型残基が、例えば置換によって改変された場合)表現型変化を与えることが以前に示された対応するアミノ酸部位は、従来の配列アライメントにより同定される。それにより、本発明の被検ウイルス(例えば H P I V 1)の対応アミノ酸位置は、弱毒性または他の望ましい表現型変化を与えるための、組換えウイルスにおける変異についての目標部位として同定される。

【 0 1 0 9 】

特定の詳細な実施形態で、本発明の非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムは、H P I V 3 J S c p 4 5 の T y r 9 4 2、L e u 9 9 2 および / または T h r 1 5 5 8 に対応する位置で以前に同定されたウイルスの L タンパク質中のアミノ酸置換(群)を特定する変異から選択される突然変異(群)の 1 つまたはいずれかの組合せを組み込むために、組換え技術的に修飾される。例えば、これら例示する変異の組み込みのための野生型 (w t) H P I V 2 L の対応する標的は、T y r 9 4 8、A l a 9

98およびLeu1566である。他の例示する実施形態では、組換えHPiVまたは他の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、異種の、変異非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス、例えば、別のHPiV、ヒト以外のPiV、例えばウシPiV3(BPiV3)またはネズミPiV1(MPiV1)、あるいはPiVでないウイルス、例えば呼吸器合胞体ウイルス(RSV)において同定された弱毒性変異のアミノ酸位置と対応するアミノ酸位置に弱毒性変異を組み込むように修飾される。1つの例示する実施形態では、BPiV3ウイルスのLタンパク質のアミノ酸部位Thr1711で確認された弱毒性変異は、従来のアライメント法により同定されるように、組換えHPiV2の対応位置(Ser1724)に組み込まれる(図3Aおよび3C、パネルA-C; また、出典明示により本明細書の一部とする、Schmidtら、*J. Virol.* 74:8922-9、2000を参照のこと)。

10

【0110】

本発明の他の詳細な実施形態では、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのゲノムまたはアンチゲノムは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)で同定された弱毒性変異のアミノ酸位置と対応するアミノ酸位置の弱毒性変異を特定する組換え修飾を組み込む。1つの特定の実施形態では、RSVで同定された弱毒性変異は、RSV Lタンパク質の521部位のフェニルアラニンのアミノ酸置換を含んでおり、それは例えば、HPiV2、HPiV3およびHPiV1のLタンパクでの保存的位置と整合する。HPiV2において、突然変異の典型的な保存された標的部位は、HPiV2 Lタンパク質のPhe460と一致する(図3Aおよび3B(パネルA-C))。従って、1つの例示する実施形態では、HPiV2 Lタンパク質のPhe460は、Leu残基に、あるいは別のアミノ酸に置換される。

20

【0111】

本発明の組換えRSVおよび他の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に組み込むためのRSV由来の種々の典型的な変異を以下の表2に書き記し、さらに以下の実施例において詳細に記載する。

【0112】

【表 2 - 1】

表 2

RSV cDNA 変異

wt RSVおよびRSV cDNA変異体の配列比較。

変異	遺伝子	ヌクレオチド位置	制限部位	ヌクレオチド配列	アミノ酸位置	アミノ酸変化
cp	N	1938		wt. AAA TCA GTT AAA	267	V>I
				mut. AAA TCA ATT AAA		
cp	F	6314		wt. ATA TCA AAT ATA GAA ACT GTG	218	E>A
				mut. ATA TCA AAT ATA GCA ACT GTG		
cp	F	7229		wt.	523	T>I
				mut.		
cp	L	9454	<i>AccI</i> (喪失)	wt. GGA GAT TGT ATA	319	C>Y
				mut. GGA GAT TAC ATA		
cp	L	13566	<i>SacI</i>	wt. CAT ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAA TTA GAA	1690	H>Y
				mut. TAC ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAG CTC GAA		
L248	L	10990		wt. ACT CAT GCT CAA GCA GAT	831	Q>L
				mut. ACT CAT GCT TTA GCA GAT		
L404	L	12047	<i>XhoI</i>	wt. CTT CCA TTG GAT TGT AAC	1183	D>E
				mut. CTT CCA CTC GAG TGT AAC		
L530	L	10061	<i>BstEII</i>	wt. CGT TTC TAT CGT GAG TTT CGG TTG CCT	521	F>L
				mut. CGT CTA TAT CGT GAG TTT CGG TTA CCT		
L955	L	8626	Na	wt. CTC AAA AAT GAT	43	N>I
				mut. CTC AAA ATA GAT		
L1009	L	12003	<i>BstXI</i>	wt. GCC ACT GAG ATG ATG AGG	1169	M>V
				mut. GCC ACT GAG ATG GTC AGG		
L1030	L	12459	<i>Bsu36I</i>	wt. ACC CTT GGG TTA ACA TAT GAA	1321	Y>N
				mut. ACC TTA GGG TTA ACA AAT GAA		
M2 404	M2	7606	<i>XbaI</i>	wt. GGGGCAAAT ATG TCA CGA	na	na
				mut. GGGGCAAAC ATG TCA CGA		
				wt. GGGGCAAAT ATG TCT AGA		

【 0 1 1 3 】

【表 2 - 2】

変異	遺伝子	ヌクレオチド部位	制限部位	ヌクレオチド配列		アミノ酸部位	アミノ酸変化
Site	P	2999、 3002	Aat II	wt.	CCAACA TCA	na	na
				mut.	CCG ACG TCA		
Site	NS2/N	1099	Afl II	wt.	TAATTTAAAA . TTAAGGAGAGAT	na	na
				rA2	TAATTTAAAACTTAAGGAGAGAT		
Site	N	1139-40	Nco I	wt.	GGGGCAAAATACAAAG ATG GCT	na	na
				rA2	GGGGCAAAATACAACC ATG GCT		
Site	F	5709	Pst I (消失)	wt.	ATC CTC ACT GCA GTC	16	サイレント
				rA2	ATC CTC ACC GCA GTC		
Site	G/F IGR	5612、16	Stu I	wt.	TTATCACAAAAAGCCATGACCAACTT	na	na
				rA2	TTATCACAAAAAGGCC TTGACCAACTT		
4C	リ - ダ —	4	na	Wt.	ACGCGAAAAAATGCGTACAACAAACT	na	na
				rA2	ACGGGAAAAAATGCGTACAACAAACT		
7 vs 8 As	P	3243	na	wt.	TAGTTACAAAAAAGGAAAGGGT	na	na
				rA2	TAGTTACAAAAAAA . GGAAAGGGT		

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】

本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスにて設計されることのできる上記

50

で例示した多くの変異は、組換え H P I V 3 に基づく候補体において設計され、回収された（それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Durbinら、Virology 235:323-332、1997；Skiadopoulosら、J. Virol. 72:1762-1768、1998；Skiadopoulosら、J. Virol. 73:1374-1381、1999；1998年5月22日に出願された米国特許出願番号第09/083,793号；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/458,813；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/459,062号；1997年5月23日に出願された米国仮出願番号第60/047,575号（国際公開番号W0 98/53078に対応する）、および1997年9月19日に出願された米国仮出願番号60/059,385）。加えて、上記一部とされた引用例には、例えば、部分的な H P I V 3 バックグラウンドゲノムまたはアンチゲノム中に置換された H P I V 1 の H N 遺伝子および F 遺伝子を有し、さらに H P I V 3 J S c p 4 5 で同定された弱毒性変異の 1 つまたはそれ以上を有するように修飾されている、キメラ P I V 組換え体の構築が記載されている。そのようなキメラ組換え体は、c p 4 5 の L 遺伝子で同定された弱毒性変異の全てを組み込んでいる。異種（H P I V 1）H N 遺伝子および F 遺伝子の外部の c p 4 5 変異の全が H P I V 3 - 1 組換え体に組み込まれ得ることが、示された。

10

20

30

40

50

【0115】

上記のように、生物学的に派生した非分節型、ネガティブ鎖 R N A ウイルス由来のこれらおよび他の変異は、大きな「メニュー」を形成し、本発明の組換えウイルスにおける弱毒性、免疫原性および遺伝子の安定性のレベルを調節するために、それらから個々の突然変異を選択することができるし、他の変異と組み合わせることができる。この内容において、多くの組換えウイルス候補体は、生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスからの突然変異を 1 つまたはそれ以上、しばしば 2 つまたはそれ以上、例えば H P I V 3 J S c p 4 5、B P I V 3 および R S V から同定された変異のいずれか 1 つまたはいずれかの組み合わせを含む。本発明の範囲内にある多くの組換えウイルスは、このように同定された変異の多くを含む。しばしば、これらの突然変異は、突然変異（群）を特定するコドン中の複数のヌクレオチド置換により組換えウイルス中の復帰変異に対して安定である。

【0116】

所望の表現型、例えば c a または t s 表現型と関連する特定の変異を同定し、感染性組換えウイルス中に組み込むことによって、本発明は同定された変異部位でもしくは近接範囲内に他の、部位特異的修飾を提供する。生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスにおいて生成された大部分の弱毒性変異が 1 ヌクレオチド置換であるのに対して、他の「部位特性」変異は本発明の組換えウイルス中に組換え技術により組み込むことができる。本明細書中で用いるように、部位特異的変異は、1 ~ 3、約 5 - 15 まで、またはそれ以上の改変されたヌクレオチド（例えば、野生型ウイルス配列から、選択された変異ウイルス株の配列から、または突然変異誘発を受けさせた親組換えウイルスクローンから改変される）の挿入、置換、欠失または再配列を含む。そのような部位特異的突然変異は、生物学的に派生した点突発変異の領域にまたはその範囲内に組み込まれ得る。あるいは、突然変異は、例えばタンパク質活性部位、結合部位、免疫原性エピトープなどをエンコードするシス作用性制御配列またはヌクレオチド配列で又はその近傍で、組換えウイルスクローンの範囲内で様々な他の内容物に導入することができる。いろいろな実施形態で、例えば既存のシス作用性制御因子を構成するかまたは除去するために、部位特異的ヌクレオチド置換、付加、欠失または再配列が、標的化したヌクレオチド部位に対して 5' または 3' 方向に例えば、1 ~ 3、5 ~ 10 および 15 ヌクレオチドまでもしくはそれ以上、上流または下流に導入される。

【0117】

単一および複数の点突発変異並びに部位特異的変異に加えて、本発明の非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスに対する変化は、1 つまたはそれ以上の遺伝子（群）またはゲノム分節（群）の欠失、挿入、置換または再配列を含む。特に有用なものは、更なる望ましい表現型影響をを与える 1 つまたはそれ以上の遺伝子（群）またはゲノム分節（群）を含む欠失である。この内容における様々な修飾は、H P I V に関して記載されている（例えば

、出典明示により本明細書の一部とする、2002年6月25日にDurbinらに発行された米国特許番号第6,410,023号を参照のこと）。例えば、H P I V 3における、1つまたはそれ以上のC、DまたはV読み取り枠（群）（O R F（群）または別の予備遺伝子の発現は、例えば、開始コドンのコード割り当てを改変する突然変異を組み込む、1個またはそれ以上の停止コドン（群）を導入する、あるいはO R Fのコード配列を全部もしくは一部欠失するように、組換えH P I V 3ゲノムまたはアンチゲノム修飾することによって、減少もしくは除去され得る（例えば、出典明示により本明細書の一部とする、2002年6月25日にDurbinらに発行された米国特許第6,410,023号を参照のこと）。その他H P I V 1およびH P I V 2に関する典型的な修飾は、1つまたはそれ以上のC、C'、Y 1および/またはY 2 O R F（群）または他の予備遺伝子（群）の発現を改変または除去する修飾を含むであらう。これらの組換え体は、免疫原性組成物を開発するために非常に望ましい表現型特徴を有しているであらう。特に、対象となる修飾は非常に安定しており、（i）改変された細胞培養中の増殖特性、（ii）哺乳動物の上気道および/または下気道における弱毒性、（iii）ウイルスブランクサイズの変化、（iv）細胞変性効果の変化、（v）免疫原性の変化、を含む1つまたはそれ以上の所望の表現型変化を特定し得る。

10

【0118】

従って、本発明のより詳細な態様では、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、部分的または完全な遺伝子欠失、ロックアウト変異、または選択された遺伝子からの発現を単純に増大または減少させる変異の1つまたはそれ以上が組み込まれる。これは、例えば、選択されたコード配列内でフレームシフト変異または終止コドンを導入すること、翻訳開始部位を改変すること、遺伝子部位を変更することまたは発現率を改変するために上流開始コドンを導入すること、表現型を改変するために遺伝子-開始（GS）および/または遺伝子終止（GE）転写シグナルを変化させること、あるいはRNA修正部位（editing site）を修飾することによって、（例えば増殖、転写における温度制御など）達成され得る。発明のより詳細な態様では、1つまたはそれ以上の遺伝子（群）の発現が、遺伝子またはその部分の欠失を伴うことなく、例えば、翻訳読み取り枠中に複数の翻訳終止コドンを導入することによって、開始コドンを改変することによって、あるいは修正部位を修飾することによって、翻訳レベルまたは転写レベルが除去された組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが提供される。これらロックアウトウイルスの形成は、しばしば組織培養において低下した増殖速度および小さなブランクサイズを示す。従って、これらの方法は、ウイルス遺伝子、一般的に主なウイルス防御抗原でない遺伝子の発現を除去する更なる種類の弱毒性変異がさらに提供される。この内容において、遺伝子またはゲノム分節の欠失を伴わず生成されるロックアウトウイルス表現型は、標的タンパク質の合成を復元する可能性のある修正変異を効果的に排除するために、記載のように、欠失変異誘発により択一的に生成することができる。他の遺伝子ロックアウトは、当分野で既知の択一的な設計および方法を用いることで作り出すことができる（例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とするKretschmerら、*Virology* 216:309-316、1996；Radeckeら、*Virology* 217:418-421、1996；Katoら、*EMBO J.* 16:578-587、1987；およびSchneiderら、*Virology* 277:314-322、1996に記載のように）。

20

30

【0119】

本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に導入することができるヌクレオチド修飾は、その修飾の性質および所望の効果に応じて、ゲノムまたはアンチゲノムの塩基の少数（例えば、15 - 30塩基、35 - 50塩基までまたはそれ以上）、大きなヌクレオチド塊（例えば、50 - 100、100 - 300、300 - 500、500 - 1,000塩基）またはほぼ完全または完全な遺伝子（例えば、1,000 - 1,500ヌクレオチド、1,500 - 2,500ヌクレオチド、2,500 - 5,000ヌクレオチド、5,000 - 6,000ヌクレオチドまたはそれ以上）を改変できる。例えば、塩基の少数は、免疫原性エピトープを挿入するか、または除去するか、あるいは小さなゲノム分節を変化させるために変えることができるが、大きな塩基の塊（群）は、遺伝子または大きなゲノム分節を付加、置換、欠失もしくは再配列する場合に含まれる。

40

50

【 0 1 2 0 】

関連する態様では、本発明は、同じもしくは異なる遺伝子を更なる修飾された組換えウイルスに関係させている突然変異の更なる種類と共に、生物学的に派生した非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス（例えばc aおよびt s変異体）由来の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに適用される突然変異の補充を提供する。例えば、1つまたはそれ以上の天然または異種の遺伝子を、発現レベルに関して選択的に変更することができ、または、全体または一部で、新しい特徴を示す組換えウイルスを与える他の望ましい修飾を単独でもしくは組み合わせて、付加、欠失または置換することができる。別にまたはさらに、組換えウイルスの中の遺伝子順序を変更することができ、ゲノムプロモーターをそのアンチゲノム対応物またはその逆と置換することができる。操作を容易にするために、配列中に異なるまたは更なる修飾、例えば様々な遺伝子間領域またはその他の領域に唯一の制限部位を挿入することを行ってもよい。非翻訳遺伝子配列は、外来配列を挿入する受容能を増加させるために取り除いてもよい。

10

【 0 1 2 1 】

本発明の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に組み込むための他の突然変異には、ウイルスのミニゲノムの、例えば変異分析によって容易に同定することができる、シス作用性信号を指令する変異が含まれる。例えば、リーダー、トレーラーおよび/またはフランクング配列の挿入分析および欠失分析は、ウイルスのプロモーターおよび転写信号を同定し、RNA複製または転写の減少程度の変異性と関連する一連の突然変異を提供する。これらシス作用性信号の飽和変異誘発（それによって、それぞれの部位が順にヌクレオチド代替物に修飾される）もまた、RNA複製または転写に影響を及ぼす多くの突然変異を確認するために用いることができる。本明細書中で記載するように、これらの突然変異のいずれもがウイルスアンチゲノムまたはゲノムに挿入され得る。上記一部とされた引用例で記載されるように、完全なアンチゲノムcDNAを用いたトランス作用性タンパク質およびシス作用性RNA配列の評価および操作は、ウイルスミニゲノムを用いることが役に立つ。

20

【 0 1 2 2 】

また、本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスにおける更なる変異には、ゲノムの3'端を、RNA複製および転写を変えることに関係しているアンチゲノムまたはその逆からの対応物で置換することが含まれる。1つの典型的な実施形態では、特定のウイルスタンパク質、例えばPIVのHNおよび/またはF防御抗原の発現のレベルは、天然の配列を合成して作られ、効率の良い翻訳となるように設計された配列と置換することによって、増大させることができる。この内容においては、コドン使用頻度が、哺乳類のウイルスタンパク質の翻訳レベルにおける主な要因であり得ることが示された（出典明示により本明細書の一部とする、Haasら、*Current Biol.* 6:315-324、1996）。組換えウイルスの対象タンパク質をエンコードするmRNAのコドン使用頻度の組換え方法による最適化は、これらの遺伝子の改善された発現を提供する。

30

【 0 1 2 3 】

もう1つの典型的な実施形態で、上流の開始コドンを単独でまたは組み合わせて導入して、選択されたウイルス遺伝子付近の配列（しばしば、AUG開始部位に関して-3部位のヌクレオチドを含む）は、翻訳の上流または下流制御を特定することにより遺伝子発現を調整するように修飾される。本明細書中で開示する他の組換え修飾を単独でまたは組み合わせて用い、組換えウイルスの選択された遺伝子（群）のいずれかの遺伝子発現を、転写GSまたはGE信号を改変することにより修飾することができる。他の実施形態では、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの遺伝子発現のレベルは、転写のレベルで修飾される。1つの態様では、選択された遺伝子のウイルスの遺伝子地図中の位置をよりプロモーター近傍またはプロモーター遠位にある位置に変えることで、その遺伝子はそれより良い効率またはより低い効率で発現されるようになる。この態様によると、特定の遺伝子の発現調整は、相互に位置関係を置換された遺伝子の発現レベルは同量程度減少してしばしば減衰され、遺伝子発現が野生型のレベルと比較して2倍、より一般的には4倍

40

50

、10倍までもしくはそれ以上に減少または増大することで達成され得る。これらおよび他の転移変化は、例えばRNA複製に係る選択されたウイルスタンパク質の減少された発現による、弱毒化表現型を有するか、または例えば増大された抗原発現など他の望ましい特徴を有する、新規組換えウイルスを与える。

【0124】

他の実施形態では、免疫原性組成物に有用な組換えウイルスは、循環ウイルス(circulating virus)の抗原ドリフトに対応するために都合よく修飾され得る。一般的に、この修飾は、抗原性糖タンパク質、例えばPIVのHNおよび/またはFタンパク質、またはRSVのF、GもしくはSHタンパク質においてであろう。1つのウイルス株または群からの全ての糖タンパク質遺伝子またはそのれら特定の免疫原性領域をエンコードするゲノム分節は、異なる株または群の受容クローン中の対応領域の置換によって、あるいは例えば複数の抗原型を代表する遺伝子もしくはゲノム分節の1つまたはそれ以上のコピーを付加することによって、組換え体ゲノムまたはアンチゲノムcDNA中に組み込まれる。次いで、修飾された組換えウイルスから生成された子ウイルスを新生株に対する免疫感作に用いることができる。

10

【0125】

本発明の特定の態様では、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのコード配列または非コード配列(例えば、プロモーター、遺伝子-終止、遺伝子-開始、遺伝子間または他のシス作用性因子)は、種々の弱毒性効果または他の表現型効果の可能性を有するキメラウイルスを与えるために、異種の(すなわち、異なるウイルス種または株からの)対応配列と置換されよう。例えば、宿主域および他の望ましい効果は、ウシPIV3(BPIV3)またはネズミPIV1(MPIV1)遺伝子またはゲノム分節を組換えHPIV[バックグラウンド]ゲノムまたはアンチゲノム中に持ち込むように設計されることができ、そのウシまたはネズミ遺伝子はヒト細胞中で(例えば、通常、ウイルスの転写、翻訳、組み立て、その他のための置換された配列またはタンパク質と、あるいは、より一般的には宿主域制限において、許容宿主および許容性の低い宿主間で異なる細胞タンパク質と共同して働く、生物学的に相互作用性のHPIV配列またはタンパク質と、異種配列またはタンパク質との不適合性により)能率的に機能しない。

20

【0126】

典型的な実施形態では、ウシPIV配列は、ウシおよび異種のヒトPIV構造および機能についての既知の態様に基づいて、HPIV中への導入のために選択される。より詳細な態様では、本発明は、HPIVとヒト以外のPIV、例えばMPIV1(仙台ウイルス)、BPIV3、SV5、SV41およびNDVとのキメラ体の構築に基づく組換えHPIV候補物を弱毒化する方法を提供する(例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Schmidtらにより2000年6月1日に出願された米国特許出願番号第09/586,479号(PC T公開公報WO 01/04320に対応する); Schmidtら、*J. Virol.* 74:8922-9、2000に開示されている)。この弱毒化方法は、ヒト以外のPIVの遺伝子(群)またはゲノム分節(群)の1つまたはそれ以上のヒトPIVベクターに基づくキメラウイルスへの導入に起因する、宿主域効果に基づく。例えば、BPIVとHPIVとの間には多くのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列差異が存在し、それらは宿主域の差異に反映される。HPIV3とBPIV3との間には、以下のタンパク質のそれぞれに対して：N(86%)、P(65%)、M(93%)、F(83%)、HN(77%)およびL(91%)のアミノ酸同一性(%)がある。宿主域の差異は、アカゲザルにおけるBPIV3の2種の株の制限された複製と比較して、同一哺乳動物におけるHPIV3の高い許容増殖によって例証される(出典明示により本明細書の一部とする、van Wyke Coelinghら、*J. Infect. Dis.* 157:655-662、1988)。HPIV3とBPIV3との間にある宿主域の差異についての根拠は完全には解明されていないが、複数の遺伝子と複数のアミノ酸の差があることは明らかにされている。それぞれが複数のアミノ酸またはヌクレオチド差を含んでいる、複数の遺伝子と場合によりシス作用する制御配列の関与は、弱毒化についての幅広い基礎、1つには復帰変異に対する高い安定性についての基礎、を与える。このことは、1または

30

40

50

いくつかの点突発変異によって弱毒化される他の生弱毒化 H P I V 3 ウイルスとは対照的である。この場合、個々の突然変異のいずれかの復帰により重大な毒性の再獲得が生じる可能性があり、また、弱毒性を特定する単一残基だけで毒性の再獲得が完了する場合がある。本発明の典型的な実施形態では、組換え H P I V ゲノムまたはアンチゲノムは異種の遺伝子またはゲノム分節、例えば B P I V 3 または別の動物のパラミクソウイルスから誘導される N、P、M または L、O R F と組み合わせられる。

【0127】

それに従って、キメラ P I V ゲノムまたはアンチゲノムを創るため、ヒト以外の P I V の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）と組み合わせられた、H P I V から誘導された又は模して作られた「バックグラウンド」H P I V ゲノムまたはアンチゲノムを部分的または完全に含む、キメラヒト - ウシまたはヒト - ネズミ組換え H P I V が、本明細書中で提供される。本発明の特定の態様では、この様式のキメラ H P I V は、例えば、ウシ P I V 由来の、異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）の 1 つまたはそれ以上と組み合わせられた、部分的または完全な H P I V バックグラウンドゲノムを組み込んでいる。対応物であるヒト以外の P I V の異種遺伝子またはゲノム分節を組み込まれた、部分的または完全なバックグラウンドゲノムまたはアンチゲノムは、受容体バックボーンとして作用する。対応物である P I V からの異種遺伝子またはゲノム分節は、「供与」遺伝子またはポリヌクレオチドを表し、それは、寄与する P I V の一方または双方と比較して新たな表現型特徴を示すキメラ H P I V を与えるために、バックグラウンドゲノムまたはアンチゲノムと組み合わせられ、または置換されている。例えば、選択された受容 H P I V 株の範囲内の異種遺伝子またはゲノム分節の付加または置換は、非修飾の受容体および / または供与体の対応する表現型（群）と比較して、弱毒性、増殖能変化、改変された免疫原性、または他の望ましい表現型の増強または低下をもたらし得る（それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Schmidtらにより2000年6月1日に出願された米国特許出願番号第09/586,479、; Schmidtら、J. Virol. 74:8922-9、2000、）

【0128】

キメラ P I V ベクター内の異種置換または付加としての使用のために選択され得る遺伝子およびゲノム分節は、P I V N（あるいは、N P と称される、ヌクレオキャプシドタンパク質）、V、P、M、F、HN および / または L タンパク質（群）あるいはそれらの一部（群）をエンコードする遺伝子またはゲノム分節またはその部分を含む。加えて、他の P I V ウイルスにて見出されたタンパク質および非 P I V タンパク質（例えば、耳下腺炎ウイルス、R S V ウイルスおよび S V 5 ウイルスで見出されたような S H タンパク質）をエンコードするゲノムおよびゲノム分節は、本発明の更なるキメラ H P I V 組換え体中に組み込まれていてもよく、その逆であってもよい。調整領域、例えば遺伝子外性の 3 ' リーダーもしくは 5 ' トレーラー領域、および遺伝子 - 開始、遺伝子 - 終止、遺伝子間領域、または 3 ' もしくは 5 ' 非コード領域は、異種の置換または付加物としても有用である。典型的な態様では、1 つまたはそれ以上のウシまたはネズミ P I V 遺伝子（群）またはゲノム分節（群）を有するキメラ H P I V は、例えばヒトの P I V 感染症の哺乳類モデル（例えばハムスターやヒト以外の霊長類）の気道において、強い宿主域制限を示す。より詳細な実施形態では、H P I V は、N、M、L、V および P 遺伝子およびゲノム分節から選択される 1 つまたはそれ以上のウシ P I V 3 遺伝子（群）またはゲノム分節（群）を部分的または完全な H P I V バックグラウンドゲノムまたはアンチゲノムに付加または置換することによって、弱毒化される。

【0129】

一般的に、本発明の免疫原性組成物に使用するための、ヒト - ウシおよび他のキメラウイルスにより示される宿主域制限の程度は、それぞれのヒト以外のウイルスまたは他の「供与」株により示される宿主域制限の程度に相当する。特定の実施形態では、この制限は、真の宿主域の表現型と一致するであろう、即ちそれは問題の宿主に特異的でなければならず、好適な細胞系でのインビトロにおける複製を制限してはならない。加えて、1 つまたはそれ以上の異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）を有するキメラウイルスは、受

容ウイルスにより感染され易い宿主において所望の免疫原応答を誘発する。従って、本発明は、宿主域効果に基づいて、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスおよび他の病原体に対する免疫原性組成物を開発するため、生非分節型ネガティブ鎖RNAの弱毒性を提供する。

【0130】

本発明のキメラウイルスにおいて提供される宿主域表現型の効果との組み合わせにおいては、しばしばキメラウイルスの弱毒性を増大または減少する更なる突然変異を導入することによって弱毒性表現型を調節することが望ましい。従って、本発明の更なる態様では、弱毒化キメラウイルスは、そのキメラゲノムまたはアンチゲノムを結果生じるウイルスまたはサブウイルス粒子において弱毒性の表現型を示す弱毒性変異の1つまたはそれ以上を導入することによってさらに修飾して、提供される。これらは、新たに作り出された変異、および上記の合理的なデザイン変異誘発方策に従って弱毒性効果について試験された変異を含んでもよい。例えば、弱毒性変異は既存の生物学的に派生した変異ウイルスで同定されてもよく、その後本発明のキメラウイルスに組み込まれてもよい。典型的な突然変異は、RNA制御配列でまたはコードされたタンパク質で障害を示す。

10

【0131】

本発明の特定の弱毒化ウイルスおよび弱毒化キメラウイルス候補体の、認証された動物モデル（例えば、ハムスター、アカゲザルまたはチンパンジー - ウイルスが、ヒトで見られる対応する複製および免疫原性活性を示す）の下部気道および/または上部気道での複製により特色づけられる弱毒性は、対応する野生型または変異親ウイルス株の増殖能と比較して、少なくとも約2倍、しばしば5倍、10倍もしくは20倍以上、時には50 - 100倍、1,000倍までまたはそれ以上（例えば、感染後3 - 8日の間測定した場合）にまで減少される。

20

【0132】

様々な付加または置換された遺伝子またはゲノム分節は、本発明の組換えウイルスまたはキメラウイルス中に慣例法により導入され得る。例えば、種々の余剰的な異種遺伝子（群）またはゲノム分節（群）は、組換えまたはキメラゲノムまたはアンチゲノム内の種々のいずれかの部位に、例えばHPVにおいてはHPVゲノムまたはアンチゲノムのNに対する3'部位に、N/P、P/Mおよび/またはHN/L遺伝子の間に、あるいは遺伝子間接合点または非コード領域に、挿入されてもよい。挿入された遺伝子は、受容遺伝子と共に共通制御下にあってもよく、または転写信号と独立した組の制御下にあってもよい。この内容で興味ある遺伝子は、サイトカイン、例えば、インターロイキン（IL2 ~ IL18、例えばインターロイキン2（IL-2）、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）、インターロイキン6（IL6）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン18（IL-18）、腫瘍壊死因子アルファ（TNF）、インターフェロン・ガンマ（IFNγ）または顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）をエンコードする遺伝子を含む（例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、2000年7月12日に出願された米国出願番号第09/614,285および優先権 1999年7月13日に出願された米国仮出願番号第60/143,425を参照のこと）。これら更なるタンパク質の同時発現は、本発明の組換えウイルスに対する免疫応答を量的にもおよび/または質的にも修飾しかつ改善する能力を提供する。

30

40

【0133】

本発明の他の態様では、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中への異種ヌクレオチド配列の挿入は、候補組換え体の弱毒性レベル（例えば、上部気道についての）を調整するために分けて行われる。このように、ヌクレオチド配列を哺乳動物宿主中で外来タンパク質を発現させ、ウイルスを弱毒化する組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス中に挿入することが可能であり、または候補ウイルスを弱毒化するために分けてヌクレオチド挿入を用いることが可能である。弱毒性に関して遺伝子挿入の影響を与える幾つかの規則性を明らかにするために、可変長の遺伝子単位を野生型ウイルスのバックボーン中に挿入して、弱毒性におけるその遺伝子単位の長さの影響を調査することができる。

50

遺伝子単位挿入は、その遺伝子から発現されたタンパク質の影響とは無関係に遺伝子の長さの影響を確認できるように、重要なORFを含まないように考慮する。これらの異種配列は、種々の大きさ、例えば長さで約150またはそれ以上のnts、長さで3,000ntsまでもしくはそれ以上のnts、の過剰遺伝子単位として挿入されてもよい。本明細書中で実証されたものとして、長さで約3,000nts以上の遺伝子挿入または伸長である。

【0134】

長さで約1,000または2,000ntsの遺伝子単位(GU)挿入は、哺乳動物被検体の上気道に対して、本発明の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを実質的に弱毒化するであろう。加えて、遺伝子単位挿入は、候補ウイルスを弱毒化すること、および第2のウイルスに対する免疫原性応答を誘発することの二重の影響を与える場合がある。あるいは、更なるタンパク質を発現できないウイルス遺伝子の3'-非コード領域(NCR)における遺伝子伸長は、それ自体に弱毒性を与え、それ自体を弱毒化することもできる。本発明のこの方法の範囲内で、遺伝子挿入の長さは弱毒性の決定要素である。

10

【0135】

本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス内のGUおよびNCR挿入は、インビトロでの効率的な複製およびインビボでの減少された複製によって特徴づけられる弱毒性表現型を生じる。GU挿入の結果生じる弱毒性の機構は、主にインビボで作用する1つまたはそれ以上の次の因子から生じ得る。よりプロモーター近傍にある遺伝子がよりプロモーター遠位にある遺伝子よりも高頻度に転写される転写勾配が存在するため、過剰遺伝子単位の付加により、下流遺伝子の転写レベルが減少し得る。その遺伝子産物が制限される場合、あるいは効率的な複製に要求される遺伝子産物の特定の比率が変えられる場合、そのmRNA量が大幅に減少した結果生じる下流遺伝子産物の減少された発現により弱毒性になり得る。転写勾配は、転写の間におよび遺伝子接合点を横切る移動の途中で、転写酵素複合体がテンプレートから落ちる結果であると考えられる。あるいは、ゲノムの全長の増加および転写された過剰のmRNAが、次にインターフェロン系の抗ウイルス活性レベルを高める可能性のある、作成されたウイルス2本鎖RNAのレベルを増大させる可能性がある。最後に、ゲノムおよびアンチゲノムの長さが増大したために、全体のゲノム複製レベルが低下する可能性がある。これは、ゲノムRNAまたはアンチゲノムRNAの複製の間に、テンプレートからレプリカーゼ複合体の解離が生じた結果であり得る。ウイルス粒子へのパッケージングに利用できるゲノム量の減少は、ウイルス生成量が減少し弱毒性となり得る。

20

30

【0136】

本発明の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス内の欠失、挿入、置換および全体のウイルス遺伝子またはゲノム分節の変更を含む他の突然変異は非常に安定した候補物を与えるが、これは免疫応答が抑制された個体の場合に特に重要である。これら変更の多くは、結果生じる株を弱毒性にするが、その他は異なる様式の所望の表現型変化を表す。例えば、アクセサリー(即ち、インビトロ増殖にとって必須ではない)遺伝子は、宿主の免疫を特異的に妨げるタンパク質をエンコードする優れた候補である(例えば、出典明示により本明細書の一部とする、Katoら、EMBO J. 16:578-87、1997を参照のこと)。候補ウイルス中のそのような遺伝子の除去は、毒性および病因を減少させおよび/または免疫原性を改善することが期待される。

40

【0137】

本発明の他の詳細な実施形態では、キメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、異種病原体の1つまたはそれ以上の抗原決定基を組み込むために組換え技術的に修飾される「ベクター」ゲノムまたはアンチゲノムを用いて構築される。ベクターゲノムまたはアンチゲノムは、部分的または完全な非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムまたはアンチゲノムから成り、それ自体が弱毒性変異などのヌクレオチド修飾を組み込んでいてもよい。ベクターゲノムまたはアンチゲノムは、異種の遺伝子またはゲノム分節の組み込みを通じてキメラ構造を形成するように修飾される。より詳しくは、本発明のキメラウイルス

50

は、異種の抗原決定基（群）をエンコードする１つまたはそれ以上の「供与」ヌクレオチド配列と組み合わされた、部分的または完全なベクターあるいは「バックグラウンド」ウイルスゲノムまたはアンチゲノムを組み込む組換えウイルスを与える、cDNAに基づくウイルス回収系によって構築される。典型的な実施形態では、非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスベクターゲノムまたはアンチゲノムは、異種の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの（例えば、HPIV、HMPV、MVまたはRSVの）および/または非ウイルス病原体の１つまたはそれ以上の抗原決定基（群）をエンコードする１つまたはそれ以上の遺伝子またはゲノム分節を組み込むように修飾される。このように構築された、本発明のキメラウイルスは、特定の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス（例えばHPIV 1、HPIV 2、HPIV 3、RSV-A、RSV-B、HMPVまたはMV）に対するまたは非ウイルス病原体に対する免疫応答を誘発し得る。あるいは、複数の非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス（例えば、多重HPIVs、またはHPIVとRSVまたはMV）に対する多重特異的免疫応答を誘発するための、組成物および方法はキメラウイルスを用いることで提供される。さらに更なる実施形態では、分節型ネガティブ鎖RNAウイルス（例えば、インフルエンザA型もしくはB型またはコロナウイルス）、ポジティブ鎖RNAウイルス（例えば、トガウイルス、アルファウイルス（脳炎ウイルスを含む）、フラウイルス（flaviruses）（ウエストナイルウイルス、デング熱ウイルスを含む）、およびピコルナウイルス（ポリオウイルスおよび他のエンテロウイルスを含む）、またはDNAウイルス（例えば、単純麻疹ウイルスおよび帯状麻疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、およびサイトメガロウイルス）に対する免疫応答を誘発するための、組成物と方法はキメラウイルスを用いることで提供される。

【0138】

より詳細な態様では、部分的または完全なベクターゲノムまたはアンチゲノムは、一般には、遺伝子または異なる病原体の異種遺伝子またはゲノム分節が組み込まれたバックボーンとして作用する。しばしば、異種の病原体は、１つまたはそれ以上の遺伝子（群）またはゲノム分節（群）がベクターゲノムまたはアンチゲノムと組み合わされた、またはで置換された、異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスである。新しい免疫原性特徴を提供することに加えて、ベクターウイルス内の異種の遺伝子またはゲノム分節の付加または置換は、非修飾ベクターおよび供与ウイルスの対応する表現型（群）と比較して、弱毒性、増殖能変化、または他の望ましい表現型変化に増大または減少を与えることがある。

【0139】

キメラウイルスを生成するための異種の免疫原性タンパク質、タンパク質ドメインおよび免疫原性エピトープの導入は、免疫された宿主に新しい免疫応答を引き起こすのに特に有用である。受容ベクターゲノムまたはアンチゲノム内の１つの、供与病原体からの免疫原性遺伝子またはゲノム分節の付加または置換は、供与病原体、ベクターに対する、または供与病原体およびベクターに対する免疫応答を引き起こすことができる。

【0140】

キメラウイルスを設計するのに有用な一般的な方法および組成物が、HPIV 3のために開発された（それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Durbinら、*Virology* 235:323-332、1997；Skiadopoulosら、*J. Virol.* 72:1762-1768、1998；Taoら、*J. Virol.* 72:2955-2961、1998；Skiadopoulosら、*J. Virol.* 73:1374-1381、1999；Skiadopoulosら、*Vaccine* 18:503-510、1999；Taoら、*Vaccine* 17:1100-1108、1999；Taoら、*Vaccine* 18:1359-1366、2000；1998年5月22日に出願された米国特許出願番号第09/083,793号；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/458,813号；1999年12月10日に出願された米国特許出願番号第09/459,062号；1997年5月23日に出願された米国仮出願番号第60/047,575号（国際公開番号WO 98/53078に対応する）、および1997年9月19日に出願された米国仮出願番号60/059,385）。特に、上記一部とされた引用例には、例えば、HPIV 3 JS cp 45で同定された弱毒性変異を１つまたはそれ以上有するようにさらに修飾された部分的なHPIVバックグラウンドゲノムまたはアンチゲノム中に置換されたHPIV 1のHN遺伝子およびF遺伝子を有する、キメラPIV組換え体の構築が記載されて

いる。そのようなキメラ組換え体は、弱毒化、キメラ候補体を与える、異種の（HPIV 1）HN遺伝子およびF遺伝子のc p 4 5の外側で同定された弱毒性変異の全てを組み込んでいる。キメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを作り出すための更なる代表的な開示は、上記の一部とされる引用例中でRSVについて提供される。

【0141】

異種病原体に対する免疫応答を誘発する融合タンパク質を提供するための、キメラタンパク質、例えば、異なる非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスまたは非ウイルス病原体の異種外部ドメインと融合されたベクターに対して特異的な細胞質尾部および/または膜貫通ドメインを有する免疫原性糖タンパク質を発現する、本発明のキメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスも構築されてよい。例えば、HPIV 1またはHPIV 3 HNまたはF糖タンパク質由来の糖タンパク質外部ドメインをエンコードする異種のゲノム分節は、HPIV 1またはHPIV 3に対する免疫応答を誘発するHPIV 2 - 1またはHPIV 2 - 3キメラ糖タンパク質を形成するために、対応するHPIV 2 HNまたはF糖タンパク質細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインをエンコードするゲノム分節と連結されていてもよい。より詳細な実施形態では、異種ゲノム分節群は、糖タンパク質外部ドメインまたはその免疫原性部分もしくはエピトープをエンコードしており、場合により異種のまたは「供与」糖タンパク質の一部、例えばベクターゲノムまたはアンチゲノムにおいて、対応物である糖タンパク質外部膜ドメインおよび膜貫通ドメインに置換された外部膜ドメインおよび膜貫通ドメインの両方を含むことがある。発明のこれらの態様に関する更なる詳細は、Taoらにより1999年12月10日に出願されたアメリカ合衆国出願番号第09/459,062号（出典明示により本明細書の一部とする）に例示されている。

【0142】

本発明の該キメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの別の例は、ウイルスGタンパク質の一部、特にそのカルボキシ末端膜近傍エクトメイン（ectomain）（（「尾部」）部分をエンコードするcDNAと融合され、標的細胞膜への組換えウイルスの融合を促進するために効果的な異種の融合タンパク質またはそのポリペプチド断片であるキメラタンパク質を発現する。1つの実施形態で、異種の融合タンパク質はCD4であり、ウイルスはVSVである。本発明のこれらの態様に関する更なる詳細は、出典明示により本明細書中の一部とされる、Whittらに2002年12月24日発行された米国特許番号第6,497,873号に例示されている。

【0143】

本明細書中で用いられるように、用語「遺伝子」は、一般的に遺伝子 - 開始（GS）信号の上流端から始まり、遺伝子 - 終止（GE）信号の下流端で終わるmRNAをエンコードしている非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスゲノムの一部を一般に意味する。また、用語遺伝子は、特にあるタンパク質が唯一のmRNAから発現されるよりも更なるORFから発現される場合には、用語「翻訳読み取り枠」またはORFと交換可能でもある。ウイルスゲノムは、ウイルス複製および転写に必要なプロモーターの一部、並びに非コード領域および遺伝子間領域を有する、遺伝子外性リーダー領域およびトレーラー領域も含む。転写は3'端で開始し、遺伝子境界で見出される短い保存されたモチーフにより導かれる連続した終止 - 開始機構により進行する。各遺伝子の上流端は、そのそれぞれのmRNAの開始を指示する遺伝子 - 開始（GS）信号を含む。各遺伝子の下流端は、ポリアダニル化および終止を指示する遺伝子 - 終止（GE）モチーフを含む。

【0144】

「ゲノム分節」は、PIVゲノム由来の任意長の連続的ヌクレオチドを意味し、それらはORF、遺伝子または遺伝子外性領域の一部あるいはその組合せであってもよい。対象ゲノム分節が抗原決定基をエンコードする場合、このゲノム分節は哺乳動物宿主において体液または細胞媒介性免疫応答を誘発できる少なくとも1つの免疫原性エピトープをエンコードする。また、ゲノム分節は、免疫原性断片またはタンパク質ドメインをエンコードしていてもよい。他の態様では、供与ゲノム分節は、複数の、繰り返しまたは異なる、免疫原性ドメインまたはエピトープから成る組換え技術的に合成された配列を含む複数の免

疫原性ドメインまたはエピトープをエンコードしていてもよい。

【0145】

本発明のキメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構築に用いられる異種ウイルスの例示的なゲノム配列は、PIV3株JS（ジーンバンク（GenBank）受入番号Z11575（出典明示により本明細書の一部とする）およびワシントン（Washington）（Galinski M.S. In Kingsbury, D.W.（著）、The Paramyxovirus, pp. 537-568, Plenum Press, New York, 1991（出典明示により本明細書の一部とする）について；HPIV1/Wash64（ジーンバンク受入番号AF457102（出典明示により本明細書の一部とする）について；HPIV2（2002年9月18日に出願された米国仮出願番号第60/412,053号（出典明示により本明細書の一部とする）について、ウシPIV3（BPIV3）株910N（ジーンバンク受入番号D80487（出典明示により本明細書の一部とする）について；BPIV3 カンザス（Kansas）（ジーンバンク受入番号AF178654（出典明示により本明細書の一部とする）について；BPIV 船積熱（ジーンバンク受入番号AF178655（出典明示により本明細書の一部とする）について；RSVA2（ジーンバンク受入番号AF035006（出典明示により本明細書の一部とする）について；およびHMPV（ジーンバンク受入番号AF371337（出典明示により本明細書の一部とする）について、記載されている。本発明の範囲内の使用のためのキメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの構築に関する更なる詳細は、例えば、それぞれ出典明示により本明細書の一部とされる、1998年5月22日に米国特許出願番号第09/083,793；1999年12月10日に米国特許出願番号第09/458,813号；1999年12月10日に米国特許出願番号第09/459,062号；1997年5月23日に米国仮出願番号第60/047,575号（国際公開番号W0 98/53078に対応する）、1997年9月19日に米国仮出願番号第60/059,385号；1999年12月10日に米国仮出願番号第60/170,195号；および2000年12月8日に米国特許出願番号第09/733,692号（国際公開番号W0 01/42445A2に対尾する）において提供される。

10

20

【0146】

本発明のキメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、広範囲にわたる病原体の1つまたはそれ以上の主要な抗原決定基を発現するように、容易に修飾され得る。この関連で、本発明は、他にも病原体はあるが、サブグループAおよびサブグループBの呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、HMPV、麻疹ウイルス、ヒト・メタ肺炎ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト・パピローマウイルス、1型および2型のヒト免疫不全ウイルス、単純疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒト・メタプネウオモウイルス、エプスタイン・バーウイルス、フィロウイルス、ブンヤウイルス、フラビウイルス、コロナウイルス（例えば、SARS-関連ヒト・コロナウイルス）、アルファウイルスおよびインフルエンザウイルスの抗原決定基を組み込んだ組換えウイルス、および、抗原決定基に対する有効な免疫応答を誘発することができる組換えウイルスの開発を提供する。本発明の方法に基づいて免疫原性組成物の開発のために標的とされる可能性のある病原体には、ウイルス性および細菌性病原体、並びに原生動物性および多細胞性病原体が挙げられる。この内容において、多くの重要なヒト病原体由来の有用な抗原決定基は既知であるか、本発明のキメラウイルス内に組み込むために容易に同定される。従って、主な病原体は、麻疹ウイルスHAおよびFタンパク質；RSVのF、G、SHおよびM2タンパク質、流行性耳下腺炎ウイルスHNおよびFタンパク質、ヒト・パピローマウイルスL1、L2、E6、またはE7タンパク質、ヒト免疫不全ウイルス1型または2型gp120およびgp160タンパク質、単純疱疹ウイルスおよびサイトメガロウイルスgB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL、およびgMタンパク質、狂犬病ウイルスGタンパク質、ヒト・メタプネウオモウイルスFおよびGタンパク質、エプスタイン・バーウイルスgp350タンパク質；フィロウイルスGタンパク質、ブンヤウイルスGタンパク質、フラビウイルスEおよびNS1タンパク質、メタ肺炎ウイルスGおよびFタンパク質、コロナウイルス・スパイク（S）およびスモールメンブレン（small membrane）（E）タンパク質、およびアルファウイルスEタンパク質を含む、上記例示の病原体について同定された。これら主な抗原並びに列挙された病原体およびその他に関して当分野で

30

40

50

既知の他の抗原は、全長タンパク質およびその構成的抗原ドメイン、断片およびエピトープを含むそれら多くの抗原決定基は良く特徴づけられ、それぞれの免疫活性について同定され、マッピングされ、そして特徴付けされる。

【0147】

多数ある中で、本発明の範囲内での使用のための多様な病原体の主な抗原を同定しかつ特徴付ける典型的なマッピング実験は、HPIV3の血球凝集素-ノイラミニダーゼ(HN)遺伝子に対するエピトープマッピング実験である(出典明示により本明細書の一部とする、van Wyke Coelinghら、*J. Virol.* 61:1473-1477、1987)。この報告は、ノイラミニダーゼ、血球凝集または両方の活性を阻害するHNタンパク質に対するモノクローナル抗体(MAbs)を用いることで選択されたHPIV3変種の16個の抗原性変種についての詳細な抗原性構造分析を提供する。各変種は、HN遺伝子中にHNタンパク質における単一アミノ酸置換をエンコードする単一の点突然変異を有していた。HNタンパク質の活性および地形地図は、置換の相対的な位置とよく相関した。HNタンパク質のコンピューターを利用した分析は、ランダム親水性コイル構造により相互に連結された疎水性シートから主に成る2次構造を予測した。HNエピトープは、予測されたコイル領域にあった。ウイルスのノイラミニダーゼ活動を阻害するMAbsによって認識されるエピトープは、幾つかのパラミクソウイルスHNタンパク質間で構造的に保存されているような領域で、HN分子のシアル酸結合部位を表す可能性のある領域に位置していた。

【0148】

従来の抗原マッピング方法を使用したこの典型的な仕事は、HNエピトープの保全性に重要な1つのアミノ酸を特定した。N末端で固定されるタンパク質に予想されるように、これらのエピトープの多くは分子のC末端半分に位置する(Elangoら、*J. Virol.* 57:481-489、1986)。既に発表されたPIV3 HNの活性および地形地図は、用いたMAbが第3の部位(C)により部分的に架橋される地形的に離れた2つ部位(AおよびB)に体系的に集まった6つの異なるエピトープ群(I~VI)を認識したことを示していた。これらのエピトープ群は、本発明のキメラウイルス内に単独または種々の組み合わせで組み込むことができる、有用な抗原決定基の候補を表す(また、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Coelinghら、*Virology* 143:569-582、1985; Coelinghら、*Virology* 162:137-143、1988; Rayら、*Virology* 148:232-236、1986; Rydbeckら、*J. Gen. Virol.* 67:1531-1542、1986を参照のこと)。

【0149】

van Wyke Coelinghらによる更なる研究(*J. Virol.* 63:375-382、1989)は、本発明の範囲内で使用するためのPIV抗原決定基の選択に関する情報をさらに提供する。この研究において、HPIV3の融合(F)糖タンパク質の抗原性構造、生物学的特性および天然の変異を調査するために、26個のモノクローナル抗体(MAb)(14個の中和抗体および12個の非中和抗体)が用いられた。研究所で選択された抗原性変種の、およびPIV3臨床分離株の分析は、MAbパネルが少なくとも20個のエピトープ、そのうち14個は中和に関与するエピトープを認識することを示した。競合結合アッセイにより、14個の中和エピトープが3つの重なり合わない主な抗原性領域(A、BおよびC)および1つの架橋位置(AB)に系統的に集まっていること、並びに6つの非中和エピトープが4つの部位(D、E、FおよびG)を形成することが確認された。中和MAbの多くは、他の中和エピトープに立体配置変化を誘導することを示唆する、不可逆競合結合反応に関係していた。

【0150】

本発明の範囲内の使用のための他の抗原決定基は、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)について同定され、特徴付けられた。例えば、Beelerら(出典明示により本明細書の一部とするBeelerら、*J. Virol.* 63:2941-2950、1989)は、RSVのA2株の融合糖タンパク質に対する18個の中和性特異的モノクローナル抗体(MAb)を用いて、RSV中和と融合に関与するエピトープの詳細な局在および活動地図を作成した。競合結合アッセイにより、3つの重ならない抗原性領域(A、BおよびC)および1つの架橋位置(AB)が

同定された。13個のMAb-耐性変異体(MARM)が選択され、MARMSまたはRSV臨床株のいずれかをを用いたMAbs中和パターンにより最低16個のエピトープが確認された。6個の部位AおよびAbエピトープに対する抗体で選択されたMARMは小さなブランク表現型を示したが、これはF分子の生物学的活発部位における交互性と一致している。MARMの分析も、これらの中和エピトープが独特の生物学的特性および免疫学的特性を有し、地形上異なる領域を占めるが、立体配置的に相互依存的な領域を占めることを示した。次いで、Fエピトープにおける抗原多様性が、18個の抗-FMAbを用いた交差中和アッセイで23株の臨床分離株(18株のサブグループAおよび5株のサブグループB)を用いて試験された。この分析は、分子上の定常領域、可変領域、および超可変領域領域を同定し、さらにRSVF糖タンパク質の中和エピトープにおける抗原多様性が非累積的な遺伝子の異種混交の結果であることを示した。16個のエピトープのうち、8個は、23株の全て、またはサブグループAまたはサブグループBの臨床分離株の1株を除いた全てで保存されていた。全長タンパク質およびその構成的抗原領域、断片およびエピトープを含む、これらの抗原決定基はすべて、新しい免疫応答を誘発するために、本発明のキメラウイルス内に組み入れるための有用な候補物を表す(また、それぞれ出典明示により本明細書の一部とする、Andersonら、J. Infect. Dis. 151:626-633、1985; Coelinghら、J. Virol. 63:375-382、1989; Fennerら、Scand. J. Immunol. 24:335-340、1986; Fernieら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171:266-271、1982; Satoら、J. Gen. Virol. 66:1397-1409、1985; Walshら、J. Gen. Virol. 67:505-513、1986; Olmstedら、J. Virol. 63:411-420、1989、米国特許第5,639,853号を参照のこと)。

10

20

【0151】

キメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス内に異種病原体の抗原決定基を発現するために、本発明は多数の方法および構築物を提供する。特定の詳細な実施形態では、抗原性タンパク質をエンコードする遺伝子(例えば、麻疹ウイルスHA遺伝子)の読み取り枠(ORF)を含む転写単位を、ベクターゲノムまたはアンチゲノムの様々な位置に付加する。以下で記載する例示的な実施形態では、感染性、弱毒化候補体を生成するために、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)由来の防御抗原をエンコードする異種ヌクレオチド配列を組み込んだキメラウイルスが設計される。1つまたはそれ以上のRSV抗原決定基を組み込んだキメラ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、抗原性RSV糖タンパク質、タンパク質ドメイン(例えば、糖タンパク質外部ドメイン)あるいは1つまたはそれ以上の免疫原性エピトープをエンコードする異種の遺伝子またはゲノム分節と組み合わせられたベクターゲノムまたはアンチゲノムを一般に含む。以下で例証される1つの実施形態で、RSVFおよび/またはG遺伝子由来の遺伝子またはゲノム分節の1つまたはそれ以上は、キメラ(例えば、RSVA/Bキメラ)ウイルス形成するために、異なるサブタイプのRSVベクターゲノムまたはアンチゲノムと組み合わせられる。

30

【0152】

本発明のキメラベクター構築物は、他のウイルスベクター構築物に勝る特定の利点を提供する。ベクターとして用いられている他のモノネガウイルスの大部分は、ヒト病原体(例えば、ネズミPIV1(センドイウイルス)(Sakaiら、FEBS Lett. 456:221-6、1999)、ウシ病原体である水疱性口内炎ウイルス(VSV)(Robertsら、J. Virol. 72:4704-11、1998)およびイヌPIV2(SV5)Heら、Virology 237:249-60、1997))に由来するものではない。これらのヒト以外のウイルスについては、ベクターバックボーン中に存在する抗原によって、いずれのヒトウイルスに対しても免疫をほとんど与えないか、または弱い免疫しか与えない。このように、ヒト病原体についての過剰遺伝子を発現するヒト以外のウイルスベクターは、単一のヒト病原体に対してのみ耐性を誘発する(しかし、このことは幾つかの例では望ましい場合がある)。

40

【0153】

加えて、本発明の方法に従って回収されたキメラベクターウイルス(例えば、RSVまたはHPIVに基づく)の多くは、自然感染を模した鼻腔内経路投与を介して被験者に投与できる。このように、本発明のウイルスおよび免疫原性組成物は、粘膜性免疫と全身性

50

免疫の両方を誘発し、幼児に存在する母親由来の血清 I g G の中和効果および免疫抑制性効果を低下させてあろう。

【 0 1 5 4 】

上記したように、本発明は、所望の表現型変化を特定する定義された変異を引き起こす、組換え非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスに対する広範囲の修飾を包含する。本発明のより詳細な態様において、これらの定義された変異は、一般的にはゲノムまたはアンチゲノム c D N A 細断片を用い、完全なゲノムまたはアンチゲノム c D N A を組み立てることで、ウイルスゲノムまたはアンチゲノムの c D N A コピーに導入される。この構築方法は、各々のゲノムまたはアンチゲノム領域を別々に作動可能であるが、これは小さな c D N A 構築物は大きな c D N A 構築物よりも操作し易く、その後に完全な c D N A に容易に組み立てることができるという利点がある。このように、完全なアンチゲノムまたはゲノム c D N A、または選択されたその細断片は、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発のテンプレートとして用いることができる。これは、例えばバイオラッド・ラボラトリー (Bio-Rad Laboratories) (リッチモンド、カナダ) の MUTA-gen (登録商標) キットを用いた 1 本鎖ファージミド型の中間体を通じて、またはストラタジーン (Stratagene) (ラ・ホーヤ (La Jolla)、カナダ) の CHAMELEON (登録商標) 突然変異誘発キットのようにテンプレートとして二本鎖プラスミドを用いる方法、あるいはオリゴヌクレオチドプライマーもしくは目的の変異 (群) を含むテンプレートのいずれかを用いるポリメラーゼ連鎖反応によって、可能である。次いで、変異させた細断片を、完全なアンチゲノムまたはゲノム c D N A に組み立てることができる。様々な他の突然変異誘発技術が既知であり、本発明のウイルスアンチゲノムまたはゲノム c D N A において興味ある変異の生成に使用するために、慣例的に適用することができる。

10

20

【 0 1 5 5 】

このように、1つの例示的な実施形態では、変異はバイオラッド・ラボラトリーから入手可能な MUTA-gen (登録商標) ファージミド・インビトロ突然変異誘発キットを用いて導入される。要するに、P I V ゲノムまたはアンチゲノムをエンコードする c D N A は、プラスミド p T Z 1 8 U 中にクローン化され、C J 2 3 6 細胞 (ライフ・テクノロジー (Life Technologies)) を形質転換するのに使用される。ファージミド調製は、製造業者により推薦されるように調製される。オリゴヌクレオチドは、ゲノムまたはアンチゲノムの所望の位置に改変されたヌクレオチドを導入することによる突然変異誘発についてデザインされる。次いで、遺伝学的に改変されたゲノムまたはアンチゲノムを含むプラスミドは増幅される。

30

【 0 1 5 6 】

本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルス内の遺伝子またはゲノム分節の特定の置換、挿入、欠失または再配列 (例えば選択されたタンパク質またはタンパク質領域、例えば細胞質尾部、膜貫通ドメインもしくは外部ドメイン、エピトープ部位もしくは領域、結合部位もしくは領域、活性部位もしくは活性部位を含む領域をエンコードするゲノム分節の置換) は、同じもしくは異なるウイルスまたは他の起源に既存の「対応物」遺伝子またはゲノム分節に関連する構造または機能において行われる。そのような修飾は、野生型または親ウイルス株と比較して望ましい表現型変化を有する新規組換え体を与える。例えば、この種の組換え体は、異種のウイルス外部ドメインと融合された、ある非分節型ネガティブ鎖 R N A ウイルスの細胞質尾部および/または膜貫通ドメインを有するキメラタンパク質を発現することができる。この種の他の例示的な組換え体は、二重のタンパク質領域、例えば二重の免疫原性領域を発現する。

40

【 0 1 5 7 】

本明細書にて用いられるように、「対応」遺伝子、ゲノム分節、タンパク質またはタンパク質領域は、一般的に異種起源由来のもの (例えば、異なる遺伝子由来の、あるいは異なるウイルス種または株における同じ (すなわち、同種もしくは対立性) 遺伝子またはゲノム分節を表す) である。この内容で選択される典型的な対応物は、全体の構造的特徴を共有しており、例えば、各対応物は、類似のタンパク質またはタンパク質構造領域、例え

50

ば細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、外部ドメイン、結合部位もしくは領域、エピトープ部位もしくは領域などをエンコードし得る。対応ドメインとそれらをエンコードするゲノム分節は、ドメインまたはゲノム分節変種間で一般の生物学的活動によって定義される領域の大きさおよび配列変種を有する種の集合を包含する。

【0158】

本発明の範囲内で組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを生成するための、本明細書中で開示される対応遺伝子およびゲノム分節並びに他のポリヌクレオチドは、選択されたポリヌクレオチド「参照配列」、例えば別に選択された対応配列と同一の重要な配列をしばしば共有する。本明細書中で用いられるように、「参照配列」は配列比較の基礎として用いられる定義された配列、例えば、全長cDNAまたは遺伝子の分節、あるいは完全なcDNAもしくは遺伝子配列である。通常、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチドの長さ、頻繁には少なくとも25ヌクレオチドの長さ、さらに多くの場合少なくとも50ヌクレオチドの長さである。2つのポリヌクレオチドが、それぞれ(1)2つのポリヌクレオチド間で類似する配列(すなわち完全なポリヌクレオチド配列一部)を含み、(2)2つのポリヌクレオチドの間で異なる配列を更に含んでいることがあるため、2つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチド間の配列比較は、配列類似性の局所的な領域を特定して比較するための「比較ウィンドウ」の上で2つのポリヌクレオチドの配列を比較することによって一般的に実施される。本明細書中に用いる「比較ウィンドウ」は、少なくとも20個の隣接するヌクレオチド位置の概念上の分節を意味し、ポリヌクレオチド配列が少なくとも20個の隣接するヌクレオチドの参照配列と比較され、さらに比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列部分に、2つの配列の最適なアライメントのために、参照配列(これは付加または欠失を含まない)と比較して20パーセントまたはそれ以下の付加または欠失(すなわち隙間)を含ませる場合がある。比較ウィンドウをアラインメントするための配列の最適アライメントは、Smith & Watermanのローカル・ホモロジー演算法(Adv. Appl. Math. 2:482, 1981)によって、Needleman & Wunschのホモロジー・アライメント演算法(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)によって、Pearson & Lipmanの類似方法の調査(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988)によって(それぞれを出典明示により本明細書の一部とする)、これらの演算法のコンピュータによる演算によって(the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0のGAP, BESTFIT, FASTAおよびTFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI、出典明示により本明細書の一部とする)、または検査により実施され、また種々の方法により作り出される最適なアライメント(すなわち、比較ウィンドウの上に配列類似性のパーセンテージが最も高くなる結果が得られる)が選択される。用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列が比較のウィンドウの上で同一である(すなわち、ヌクレオチド-ヌクレオチド基準で)ことを意味する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウ上で2つの最適に配置された配列を比較して、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、UまたはI)の数がよく一致する位置を得るために両方の配列で生じる数の位置を決定し、比較のウィンドウの中(すなわちウィンドウの大きさ)で一致した位置の数を、位置の総数で割り、そして得られた結果に100を掛けることによって配列同一性のパーセンテージを得ることで、計算される。本明細書中に用いられる用語「実質的な同一性」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を意味し、少なくとも20個のヌクレオチド位置の比較ウィンドウ上で、しばしば少なくとも20~50個のヌクレオチドのウィンドウ上の参照配列と比較して、ポリヌクレオチドが少なくとも70パーセントの配列同一性、しばしば85パーセントの配列同一性、場合により少なくとも90~95パーセントの配列同一性、さらに少なくとも99%までの配列同一性を有する配列を含むが、配列同一性のパーセントは、欠失または付加を含むことがあるポリヌクレオチド配列と参照配列を比較することによって、比較ウィンドウ上の参照配列の合計が20パーセントまたはそれ以下と計算される。参照配列は、より大きな配列の部分集合であってもよい。

【0159】

これらのポリヌクレオチド配列の関係に加えて、本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖

10

20

30

40

50

R N A ウイルスによりコードされたタンパク質およびタンパク質領域もまた一般的に、保存的な関係を有するように、すなわち、選択される参照ポリペプチドと実質的に配列同一性または配列類似性を有するように選択される。ポリペプチドに用いられるように、用語「配列同一性」は、ペプチドが対応する位置で同一のアミノ酸を共有することを意味する。用語「配列類似性」は、ペプチドが対応する位置で同一または類似のアミノ酸（すなわち保存的な置換）を有することを意味する。用語「実質的な配列同一性」は、例えばデフォルト隙間重み付けを用いたプログラム G A P または B E S T F I T により最適に配置された場合、2つのペプチド配列が、少なくとも70パーセントの配列同一性、しばしば80パーセントの配列同一性、場合によっては少なくとも90パーセントの配列同一性、さらに少なくとも95パーセントまでの配列同一性またはそれ以上（例えば99パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。用語「実質的な類似性」は、2つのペプチド配列が配列類似性に対応するパーセンテージを共有することを意味する。しばしば、同一でない残基位置は、保存的なアミノ酸置換によって変わる。保守的なアミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基との互換性を意味する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンがあり；脂肪族水酸基側鎖を有するアミノ酸の群には、セリンおよびトレオニンがあり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群には、アスパラギンおよびグルタミンがあり；芳香族の側鎖を有するアミノ酸の群には、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンがあり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群には、リジン、アルギニンおよびヒスチジンがあり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群には、システインおよびメチオニンがある。保存的なアミノ酸置換基群には、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリンおよびアスパラギン - グルタミンがある。本明細書中に用いる20個の天然アミノ酸の省略形は、従来の使用法に従っている（出展明示により本発明の一部とする、Immunology - A Synthesis、第二版、E.S. Golub & D.R. Gren著、Sinauer Associates、Sunderland、MA、1991）。20個の従来型アミノ酸の立体異性体（例えばD - アミノ酸）、異常なアミノ酸、例えば - 二置換アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸および他の非従来型アミノ酸は、本発明のポリペプチドの好適な構成要素でもあってもよい。非従来型アミノ酸の例として、4 - ヒドロキシプロリン、 - カルボキシグルタメート、 - N , N , N , - トリメチルリジン、 - N - アセチルリジン、O - ホスホセリン、N - アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリジン、 - N - メチルアルギニンおよび他の類似のアミノ酸およびイミノ酸（例えば、4 - ヒドロキシプロリン）が挙げられる。さらに、アミノ酸はグリコシル化、リン酸化またはその他によって修飾されていてもよい。

【0160】

本発明に従って候補ウイルスを選択するために、生存能力、弱毒性および免疫原性の基準は、周知の方法により決定される。本発明の免疫原性組成物で最も所望されるウイルスは、生存能力を維持し、安定した弱毒性表現型を有し、免疫された宿主（たとえ低いレベルであっても）で複製を示し、望ましい免疫応答を誘発するのに十分な免疫応答の産物を受容者に誘導しなければならない。本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖R N A ウイルスは、生育可能で適切に弱毒化されているだけでなく、インビボで遺伝学的により安定で - 免疫応答を刺激する能力を持続し、幾つかの例では多重修飾により誘発される免疫応答を拡大させる、例えば異なったウイルス株またはサブグループに対する免疫応答を誘導する、または異なった免疫学的基礎、例えば、分泌腺対血清免疫グロブリン、細胞媒介性免疫および類似物により媒介される応答を刺激する。

【0161】

本発明の非分節型ネガティブ鎖R N A ウイルスは、十分な弱毒、表現型の復帰突然変異に対する抵抗性、および免疫原性を確認するために、周知でかつ一般に受け入れられている種々のインビボおよびインビトロモデルで試験することができる。インビトロアッセイでは、修飾されたウイルス（例えば、複合的に弱毒化された、生物学的に派生したもしくは組換えウイルス）が、例えば、ウイルス複製の温度感度（すなわちts表現型）について

、および小さなブランクについて、または他の望ましい表現型について試験される。修飾されたウイルスは、ウイルス感染の動物モデルでさらに試験される。免疫原性組成物および方法に使用するためのウイルス候補体の弱毒性および免疫原性活性を評価するのに有用な齧歯類およびヒト以外の霊長類モデルを含む様々な動物モデルが、本明細書の一部とした様々な引用例に記載され概説されている。そのようなモデルは当分野で広く受け入れられており、それらから得られたデータは、ヒトにおける本発明の被検ウイルスの感染性、弱毒性および免疫原性と相関がある。

【0162】

前記記載に従って、本発明はまた、免疫原性組成物に使用するための単離された、感染性組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを提供する。免疫原性組成物の構成要素である弱毒化ウイルスは、単離され一般的に精製されている。「単離された」により、例えば感染した個人の鼻咽頭などの、野生型の自然環境以外にある組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスに言及することを意味する。より一般には、「単離された」は、制御された設定にて増殖および特徴づけされる、細胞培養または他の人工培地中の構成要素としての弱毒化ウイルスが含まれることを意味する。例えば、本発明の弱毒化非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、感染された細胞培養により生成され、細胞培養物から分離されて安定剤が加えられてもよい。

10

【0163】

免疫原性組成物に使用する場合、本発明に従って生成された組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、直接製剤化に用いることもできるし、所望により、当業者であれば周知の凍結乾燥プロトコルを用いて凍結乾燥してもよい。凍結乾燥されたウイルスは、一般的に約4で維持される。使用する際に、凍結乾燥されたウイルスは、以下にさらに記載するように、補助剤を含むもしくは含まない、安定化溶液、例えば食塩水またはSPG、 Mg^{++} およびHEPES含有食塩水中に再構成される。

20

【0164】

本発明の免疫原性組成物は、活性成分として、本明細書に記載のように生成された組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫減的有效量を含む。修飾されたウイルスは、生理学的に許容される担体および/または補助剤と一緒に宿主に導入されてもよい。有用な担体は当分野にて周知であり、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などが挙げられる。結果として得られた水性溶液は、使用のために包装しても、あるいは、前記のように凍結乾燥されて、投与前に滅菌水と組み合わせられる凍結乾燥標品とされてもよい。組成物は、生理学的条件に近づけるために要求される医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、張性調整剤、潤滑剤など（例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート(sorbitan monolaurate)、オレイン酸トリエタノールアミンなど）を含んでいてもよい。許容される補助剤には、当分野にて他に周知の多くの好適な補助剤中でとりわけ、不完全なフロイントアジュバント、MPL（登録商標）（3-O-脱アシル化されたモノホスホリル脂質A；Corixa、ハミルトン、モンタナ州）、およびIL-12（ジェネティックス・インスティテュート（Genetics Institute）、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）が含まれる。

30

40

【0165】

本明細書に記載のように、組換え非分節ネガティブ鎖RNAウイルス組成物を用いて免疫感作した場合（例えば、エアロゾル、液滴、口、局所的、筋肉内、鼻腔内、肺、皮下、静脈内またはその他の経路を介して）、宿主の免疫系は、被検ウイルスおよびウイルスベクター構築物の免疫原タンパク質に特異的な抗体を産生することにより免疫原性組成物に応答する。本明細書に記載のように生成された組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの免疫原的有效量を用いた免疫感作の結果として、宿主は標的ウイルスによる感染に対して部分的または完全に免疫性を持つようになるか、あるいは中程度の感染もしくはそれからの重篤な感染に進行することに対して抵抗性を示す。

【0166】

50

免疫原性組成物を投与される宿主は、被検非分節型ネガティブ鎖RNAウイルス（またはキメラベクター構築物の場合は供与ウイルス）によって感染されやすいいずれの哺乳動物であってもよいし、また、その宿主が、免疫ウイルスの抗原に対して免疫応答を引き起こすことができる哺乳動物であってもよい。従って、本発明は多様なヒトおよび獣医学的使用のための免疫原性組成物を作製するための方法を提供する。

【0167】

本発明の組みえ非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスを含む組成物を、被検ウイルス（または供与ウイルス）により感染されやすいかあるいは感染の危険のある宿主に、宿主自体の免疫応答能力を高めるために投与する。その量は、「免疫学的に有効な用量」として定義される。この使用において、有効量の範囲内で投与される組換えウイルスの正確な量は、宿主の健康状態および体重、投与方法、製剤の特性などに依存するが、通常は宿主あたりウイルスが約 10^3 ～約 10^7 プラーク形成単位（PFU）の範囲かそれ以上、より一般的には宿主あたり約 10^4 ～ 10^6 PFUウイルスである。いずれにしても、製剤は対象病原体（群）に対する宿主受動者にて検出可能な免疫応答を誘発するのに十分な本発明の修飾されたウイルスの量を提供すべきであり、例えば、方法のなかでもとりわけ、赤血球凝集阻止、補体結合、酵素結合抗体免疫吸着アッセイにより決定することができる。

10

【0168】

本発明に従って生成された組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスが、多重ウイルス血清型または株に対する望ましい免疫応答を誘発するように、他の血清型または株のウイルスと組み合わせてもよい。あるいは、多重ウイルス血清型または株に対する免疫応答は、本明細書に記載のように、1個のウイルス中に設計された多重の血清型または株の防御エピトープを組み合わせることによって達成することができる。一般に異なるウイルスを投与する場合、それらは混合物中にまとめて同時に投与されるが、それらを別々に投与してもよい。1つの株を用いた免疫感作により、同じもしくは異なる血清型の種々の株に対する免疫を与えることができる。

20

【0169】

新生児と幼児では、多重投与が十分なレベルの免疫を誘発するために要求されであろう。投与は、生後1カ月以内で開始しすることができ、天然の（野生型）ウイルスの感染に対する免疫応答を維持するために、必要に応じて、幼児期を通じて例えば2ヵ月、6ヵ月、1年および2年の間隔で行うことができる。同様に、特に度重なるまたは十度の感染症にかかりやすい成人、例えば医療従事者、デイケア労働者、幼児の家族、年輩者、危険な状態の心肺機能の個人は、免疫応答を確立するため、および/または維持するために多重免疫化感作を必要とし得る。誘発された免疫レベルは、中和分泌抗体および中和血清抗体の量を測定することによってモニターすることができ、投与量は所望の免疫応答レベルを維持するために必要とされるように調整し、または免疫感作を繰り返す。さらに、異なる候補ウイルスを、異なる受容群に投与するために示され得る。

30

【0170】

本発明のさらに別の態様において、組換え非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスは、例えば気道の一過性の遺伝子治療のためのベクターとして使用される。この実施形態によると、組換えウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、目的の遺伝子産物をエンコードすることができる配列を組み込んでいる。目的の遺伝子産物を、ウイルス発現を制御するプロモーターと同じもしくは異なるプロモーターの制御下に置く。目的の遺伝子産物をエンコードする配列を含む感染性の組換えウイルスは、前記したように1つまたはそれ以上の投与経路で投与される。ウイルスは、望ましい遺伝子産物の治療的または予防レベルの発現となるのに十分な量で投与される。この方法の範囲内で組換えウイルスに組み込まれ、投与され得る代表的な遺伝子産物は、一過性の発現に典型的に適しており、例えば、インターロイキン-2、インターロイキン-4、ガンマ-インターフェロン、GM-CSF、G-CSF、エリトロポイエチンおよび他のサイトカイン、グルコセレブロシダーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）、ヒボキサンチン-グアニン・ホスホリボシル転移酵素、細胞障害抗体、腫瘍サプレッサー遺

40

50

伝子、アンチセンスRNAならびに他の候補抗原がある。

【0171】

以下の実施例は、限定するものではないが、例示する様式により提供される。

【0172】

本明細書中に引用される全ての特許文献および刊行物は、出典明示により本明細書の一部とする。

【0173】

実施例 I

Ver o細胞から非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスをレスキューするための一般的なリン酸カルシウムトランスフェクション法のプロトコル

10

溶液

以下の溶液は宿主細胞トランスフェクションに一般的に有用である：

280 mM NaCl [16.4 g NaCl (または56 ml 5 M NaCl)]、50 mM BES [10.7 g BES (酸性型不含)]、および1.5 mM リン酸ナトリウム [0.21 g Na_2HPO_4] の2X BBS (Lにつき) 溶液 (2X BES - 緩衝食塩水)。BBS溶液はNaOHを用いてpH 6.95 ~ 6.98に調整される。次いで、この溶液は濾過滅菌して凍結保存される。

【0174】

総容量100 mlにつき36.8 gの2.5 M CaCl_2 溶液を調製し20 で保存する。この溶液をニトロセルロースを用いて濾過滅菌する。アセチルセルロース濾過器は詰まりの原因となるため避ける。あるいは、トランスフェクション溶液は滅菌のためにオートクレーブされる。しかしながら、2X BBS溶液はオートクレーブによってわずかに変化する可能性があるため、後者は望ましくないであろう。

20

【0175】

以下の溶液は培地として一般に有用である：

10% 熱失活および承認されたFBS、および10 - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (場合によって50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までである) ゲンタマイシンを補充したDMEM (グルタミン含有高グルコース；ギブコ (Gibco) / BRL、[グランドアイランド (Grand Island)、ニューヨーク]) のDMEM + FBS溶液。

【0176】

MEM (グルタミングルタミン、非必須アミノ酸、10% 熱失活および承認されたFBS、および10 - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (場合によって50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までである) 20 - 25 mM ヘベス (Hepes) 緩衝液；ギブコ / BRL) (グランドアイランド、ニューヨーク) および場合によって1Xフンギソンを補充した) のMEM + FBS溶液。

30

【0177】

ヘベス - 緩衝食塩洗浄溶液、20 mMヘベス、pH 7.0、150 mM NaCl、1 mM MgCl_2 のHBS溶液。

【0178】

方法

一般に有用な宿主細胞は、異型 (split) のVer o細胞から選択され、次の日に (6 ウェルプレートまたは12.5 cm^2 フラスコ) およそ50%の密集度 [RSVに関して80 - 90%] となるよう、トランスフェクションの前日にDMEM + FBS中にまく。高細胞密度では効率が悪くなる。次の日、トランスフェクションの前に、それぞれの培養物に4.5 mlのDMEM + FBSを用いて栄養を供給する。次いで、細胞を3% CO_2 および32 に設定された CO_2 インキュベーターに移す。Ver o細胞は、トランスフェクションの際におよそ50%の密集度になるまで一晚以上生育させることができる。

40

【0179】

CaCl_2 / リン酸沈殿物を以下のように得る：BBSおよび CaCl_2 を、始める前に室温にて維持した。DNA混合物を、総容量250 μl で総量プラスミドDNA 2 - 20 μg 、および25 μl CaCl_2 を含む5 mlのポリプロピレンチューブにて調製す

50

る。全長レスキューのためのDNAは、選択された非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの5 µgの全長cDNA構築物、400 ng Nタンパク質、300 ng Pタンパク質、100 - 200 ng Lタンパク質、200 ng M2 (RSVの場合のみ)タンパク質、および5 - 10 µg pC1-Neo-Bcl-T7プラスミド(配列番号: 1; 図2)を含む。Vero細胞におけるレスキューの効率は低いため、レスキューされる全長構築物につき、3 - 6ウェルをトランスフェクトする。

【0180】

DNA/CaCl₂ 溶液を調製した後、2X BBSを加える。これは、通常、連続して低速のボルテックスを行ってチューブを穏やかに攪拌しながら、チューブの側面に250 µlの2X BBSを滴下することによって行われる。これは、全てのチューブについて繰り返され、それらをDNA-リン酸カルシウム沈殿物を形成させるためにさらに15 - 20分間室温で放置する。室温でインキュベーションした後、その沈殿物を細胞培地に滴下して加え、そのプレートを揺さぶって均等に分配する。次いで培地を3% CO₂ に設定したインキュベーター中で3時間インキュベートする。CO₂ レベル3%はBBS/CaCl₂ トランスフェクション技術には重要である、というのは、5% CO₂ ではほとんど作用しないか、場合によっては全く作用しないからである。3% CO₂ は培地のpHを制御し、培地中で効率的なリン酸カルシウムDNA沈殿物形成が可能となる。

10

【0181】

熱ショック手法は場合により、例えばトランスフェクション開始後3時間の時点で実施される。細胞を44 に設定された水槽に移す。細胞をプラスチック保存袋に入れて密封し、培養物を水に浸せるようにした。44 で3時間経過した後、細胞を3% CO₂ に設定された32 のインキュベーターに戻し、一晩中インキュベーションする。

20

【0182】

次の日に、トランスフェクション培地を取り除き、細胞をHBSで2回洗浄する。洗浄後、2 mlの新鮮なDMEM + FBSを加える。PBSおよびハंक(Hank's)緩衝液は、おそらくこれらの緩衝溶液中のリン酸がトランスフェクション培地中からよりCaCl₂ を沈殿させるため、洗浄工程には向いていない。

【0183】

次いで、共培養手法を場合により行う。トランスフェクトされた細胞をトランスフェクション後48 - 72時間で培地中に掻き集め、その細胞入りの培地を50% 密集度の単層Vero細胞を含むT25フラスコに移す。この共培養を始めて6時間で、培地を4 mlのMEM + FBSに替える。次いで、その培養物を5日間インキュベートする。このインキュベーション期間中に培地が枯渇すると、2 mlの培地を取り出し、新鮮なMEM + FBSと交換する。レスキュー中に形成され、培地中に存在し得る少量のウイルスを維持するために、全ての培地を交換することは推奨しない。この共培養段階中にCPEが明白となることがあるが通常はない。CPEが明白でない場合、レスキューを継続することができる。

30

【0184】

共培養を開始してから5日後に、細胞を集める。まず、0.5 mlの2.18 Mシュウクロース、37.6 mM KH₂PO₄、71.0 mM K₂HPO₄、49.0 mM グルタミン酸ナトリウムを培地中に加え、フラスコを揺すって攪拌する。次いで、細胞を培地中に細かくし、ピペティングにより吸い上げ吐き出して攪拌し、次いで輸送用に一部を冷凍用チューブ中に入れてドライアイス/エタノール槽中で急速凍結して、-80 で保存する。

40

【0185】

実施例II

パラミクソウイルスのレスキューのための一般的なリン酸カルシウムトランスフェクション法プロトコル

以下の別のトランスフェクション手法では、出所明示により本明細書の一部とされるChenおよびOkayama、Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752、1987に記載の方法に基づくリン酸力

50

ルシウムトランスフェクションプロトコルを用いる。

【0186】

例示のDNA s：

1. ウイルスゲノムのポジティブセンス鎖の5'端と結合しているT7プロモーターとその3'端と結合しているリボザイムを含む、全長のウイルスゲノムcDNAクローン。

2. スクレオキャプシドタンパク質(NまたはNP)、リントタンパクのタンパク質(P)、およびポリメラーゼタンパク質(L)をエンコードし、T7 RNAポリメラーゼプロモーターにより制御される、タンパク質発現プラスミド。

3. ヒト・サイトメガロウイルスの上記転写調節領域の制御下にあるT7 RNAポリメラーゼタンパク質をエンコードする、プラスミド。

【0187】

例示のリン酸カルシウムトランスフェクション試薬：

1. 2X BES - 緩衝食塩水：50 mM BES (pH 6.95 - 6.98)、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄。

2. 2.5 M CaCl₂。

3. ヘペス - 緩衝食塩水洗浄溶液(HBS)。

【0188】

例示のプロトコル：

1. HEp2、Veroまたは他の好適な細胞系を、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中6ウェルプレートにて約50%~75%の細胞密集度になるよう培養する。

2. トランスフェクション前の1~2時間、トランスフェクションされる各ウェルに4.5 mlの10%ウシ胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を与える。

3. 3%CO₂に設定された32°のインキュベーター中で細胞をインキュベートする。

4. リン酸カルシウム-DNAトランスフェクション混合物を以下*のように調製する：

5. 以下のDNAを5 mlポリプロピレンチューブ中で組み合わせる：400 ng T7-N、300 ng T7-P、100 ng T7-L、および5 µgのウイルスゲノムcDNAクローン、5 µgのhCMV-T7一過性発現ベクター(例えば、pCl-Neo-Bcl-T7プラスミド)。RSVレスキューについては、さらに100 ngのT7-M2(ポリメラーゼ伸長因子)発現プラスミドを含む。

6. 水を用いて容量を225 µlに調整する。

7. 25 µlの2.5 M CaCl₂を加える。

8. チューブをゆっくりボルテックスしながら、250 µlの2X BBSを加えた後、チューブを室温で15-20分間放置する。

* 注釈 各プラスミドDNA量は実施するレスキューのために最適化する必要がある。さらに、実施例1および2のリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコルは本発明において広く有用であるが、別のトランスフェクションプロトコルを用いても成功するであろう。

9. 細胞をインキュベーターから取り出し、培地を穏やかに揺すりながら、リン酸カルシウム-DNA混合物を培地にゆっくり加える。細胞をすばやく32°-3%CO₂インキュベーターに移す。

10. トランスフェクション実験を開始した3時間後に、プラスチック袋中の培養皿を密封し、細胞性熱ショック応答を誘導するために44°に設定された水槽中に完全に3時間浸す。この場合によって行われるの熱ショック工程によりレスキューの結果がしばしば向上する。しかしながら、別の細胞型では異なる効果的な熱ショック温度(例えば、約40~45°の範囲内)で、または異なる効果的な熱ショック期間(例えば、約30分~3時間の範囲内)で、より良い応答を示すであろう。

10

20

30

40

50

11. 熱ショック後に、細胞を30 - 3% CO₂のインキュベーターに戻し、一晩インキュベートする。

12. 次の日に、細胞をHBSで2回洗浄し、2mlの10% FBSを含むDMEMまたは最少必須培地(MEM)を細胞に与える。

この段階で、このプロトコルは、ウイルスの分散を促進するためにトリプシンを必要とする幾つかのPIV株のために変更する。48時間で、細胞をPBSで洗浄して、残留する血清を取り除き、培地を1mlにつきおよそ0.5 µgのトリプシンを含む無血清培地と交換する。

13. トランスフェクションを開始した48時間後に、次の日(トランスフェクション開始から72時間後)に50%密集度の単層を形成するのに十分なVero細胞を10 cm²のプレートに植える。それぞれトランスフェクトされた培養物について10 cm²のプレートを1枚準備する。

14. トランスフェクションの72時間後に、トランスフェクトされた細胞を培地中に細かくし、細胞を含む培地を、前日に準備した10 cm²プレートに移す。これにより、トランスフェクトされた細胞と10 cm²プレートに含まれる細胞との間で共培養が開始される。プレートを5% CO₂に設定された37 インキュベーター中でインキュベートする；温度感受性変異型ウイルスについては適当な低温を用いる。

15. 4～6時間後に、培地を新鮮な10% FBS含有DMEMと交換する。

16. 細胞変性効果を検出するために、細胞を5～7日間モニターする。

【0189】

実施例III

Vero細胞における麻疹ウイルス(MV)のレスキュー

上記の実施例1に典型的なトランスフェクションプロトコルを用いて、Vero細胞にて麻疹ウイルスをレスキューする。T7供与源は、プラスミドpSC6-T7(MVAなし)またはMVA/T7(Wyattら1995)のいずれかであった。非常にうまくいったMVレスキューの結果を以下の表3に示す(A-F列は、別々の日に行った異なるレスキュー実験であり、それぞれの実験は多重トランスフェクション・実験EおよびFについては12回までの別個のトランスフェクション(ウェル)を示す)。

【0190】

【表3】

表3

プラスミドT7またはMVA/T7を用いた麻疹ウイルスのレスキュー

ウェル	実験						T7供与源
	A	B	C	D	E	F	
1	+	+	-	-	-	+	MVA/T7
2	-	+	-	-	+	+	MVA/T7
3	+	-	-	+	-	+	MVA/T7
4	-	-	-	-	-	+	MVA/T7
5	+	+	-	-	-	+	MVA/T7
6	-	+	-	-	-	-	MVA/T7
7					-	+	pSC6-T7
8					+	+	pSC6-T7
9					-	+	pSC6-T7
10					-	+	pSC6-T7
11					-	+	pSC6-T7
12					-	+	pSC6-T7

【0191】

実施例 I V異なるポリメラーゼ発現ベクターを用いた麻疹ウイルス (M V) のレスキュー

一過性 T 7 ポリメラーゼ発現ベクターが、本明細書中の方法に基づいてウイルスレスキューを持続させるのに十分なレベルの T 7 ポリメラーゼを提供することを、この実施例は実証する。細胞を上記実施例 1 記載のプロトコルを用いてトランスフェクトした。レスキューを T 7 R N A ポリメラーゼ発現プラスミドを用いて実施する場合、その D N A をウイルス特異的プラスミドと一緒に同時トランスフェクトした。T 7 R N A ポリメラーゼを提供するために、M V A - T 7 (Wyatt ら、*Virology* 210:202-5、1995) を用いたトランスフェクションを行った場合、トランスフェクションと同時に培地にウイルスを加えて 2 の多重感染で感染させた。この実験で用いた T 7 発現プラスミド (p S C 6 - T 7) は、Billeter ら、(Radeke ら、EMBO J. 14:5773-5784、1995) により既に開示されている。これには、h C M V 転写調節領域の制御下にある T 7 R N A ポリメラーゼ遺伝子が含まれる。この一過性発現プラスミド p C I - N e o - B c l - T 7 (配列番号：1；図 2) を、以下本明細書中に示す全てのウイルスレスキュー手法で用いた。この実施例で用いたこのウイルスゲノムクローンは、麻疹ウイルスのエドモンストン (Edmonston) 研究所の株 (Radecke ら、EMBO J. 14:5773-5784、1995) に相当する c D N A 配列を含む p (+) M V であった。

10

【 0 1 9 2 】

麻疹ウイルスのレスキューの肯定的な結果を以下の表 4 に示す。

【表 4】

20

表 4

プラスミドー T 7 または M V A / T 7 を用いた麻疹ウイルスのレスキュー

実験	トランスフェクトされたウェル	麻疹ウイルスを生成したウェル	T 7 R N A ポリメラーゼ発現の供与源
#1	6	1	M V A - T 7
	6	1	pSC6 - T 7
#2	6	5	M V A - T 7
	6	6	pSC6 - T 7

【 0 1 9 3 】

30

実施例 V組換えパラインフルエンザウイルス (P I V) のレスキュー

上記の実施例 I I 記載の T 7 プラスミドレスキュー系を用いることで、キメラウシ - ヒト P I V - 3 ベクタークローン (H B P I V 3) 株が V e r o 細胞にてレスキューされた。この例示する P I V クローンは、ウシ P I V - 3 ベクターまたはバックボーンでの組換えとしてヒト P I V 3 F および H N 遺伝子を含んでいる。5 個の独立したレスキュー試料は、組換えウイルスの存在を決定するため、感染細胞をギニアブタ (guinea pig) の赤血球 (R B C) と一緒にインキュベートして実施される標準的な血球凝集 (f H A D) アッセイにより陽性と決定された。この結果は、組換えウイルスが期待されるヒト - ウシ混成体であることを確かめるために M / F 遺伝子連結部にまたがった標準的な R T - P C R により、さらに確認された。2 継代目のウイルスストックを R T - P C R のために増殖させた。このストックの力価は V e r o 細胞において $5 \sim 10 \times 10^7$ p f u / m l であった。

40

【 0 1 9 4 】

H B P I V 3 キメラウイルスに加えて、他の組換え P I V 構築物を本発明に従って幾つかレスキューして、その一部を以下の表 5 にまとめた。例示する具体例の 1 つで、弱毒化、キメラ組換え P I V ウイルス株 P I V 3 c p 4 5 (3 - 1) (H P I V 3 c p 4 5 の低温継代変異および相当する P I V 3 遺伝子の代わりに P I v 1 F および G 糖タンパク質を含む) が 5 つのトランスフェクト V e r o 細胞培養物からレスキューされ、これらを次に新鮮な細胞単層を感染するのに用いた。ウイルス吸着後、細胞は 1 m l につき 0 . 5

50

μg のトリプシンの無血清培地中で5日間維持される。次いでこの感染培養物について血球凝集アッセイを行い、陽性レスキューの結果は組換えPIVで感染された細胞によるRBCの吸着によって確認される。

【0195】

【表5】

表5

ウイルス	詳細
PIV3 cp 45-456	L遺伝子における弱毒化変異および低温継代表現型に 関与する変異を有するPIV3
PIV3 cp 45 (3-1)	低温継代変異および対応するPIV3遺伝子に代えて PIV1糖タンパク質遺伝子を有するPIV3
PIV3-2 CT	キメラPIV2糖タンパク質遺伝子を有するPIV3。 細胞質ドメインがPIV3配列によりコードされ、膜貫 通ドメインおよび細胞外ドメインはPIV2に由来す る。
HP-PIV3	同種のウシ遺伝子に代えてhPIV3糖タンパク質を 有するウシPIV。

10

【0196】

別に例示する実施形態において、上記のHP-PIV3細胞質ドメインと融合したHP-PIV2FおよびHN膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを有するキメラ糖タンパク質を含む、HP-PIV3-HP-PIV-2キメラ構築物(PIV3-2CTと称する)が回収された。このキメラ構築物はVer o細胞から回収され、組換えウイルスの同定はRT-PCRに続いて制限部位分析により確認された。

20

【0197】

さらに本発明の方法に従ってレスキューされたPIV組換え体には、「船積熱(Shipping Fever)」(SF)と称されるBP-PIV株(Reisingerら、J. Am. Vet. Med. Assoc. 135:147-152、1959、出所明示により本明細書の一部とされる)および、L遺伝子に弱毒化変異および低温継代表現型に関与する変異を含むPIV3 cp 45-456と称される組換えHP-PIVが含まれる。いずれもVer o細胞にてレスキューされ、それらの同定はRT-PCRと配列決定により行われた。PIV3 cp 45-456は、2個の変異をHNに導入された上記PIV3 cp 45組換え体からのHN遺伝子を修復する2個の変異を有しており、このため生物学的に派生したcp 45変異体の配列から区別される。PIV3 cp 45-456クローンは263残基目がIleおよび370残基目がThrに置換された2個の変異が修飾され、それぞれThrおよびProをエンコードする生物学的に派生した遺伝型に戻っている。

30

【0198】

実施例VI

293細胞における水泡性口内炎ウイルスのレスキュー

40

本発明の一過性RNAポリメラーゼベクター系の改良により、免疫原性組成物の使用について、広域なレパートリーの組換えネガティブ鎖RNAウイルスのレスキューが可能となる。以下の実施例において、この技術を、水泡性口内炎ウイルス(VSV)および関連するVSVベクター株の回収のために最適化する。ほとんどのVSV株が広域な細胞系で非常に効率よく複製するが、これまで組換えVSVのレスキューは非常に難しいと考えられていた。文献記載のVSVレスキュー手法はBHK細胞系およびワクシニアウイルス/T7ヘルパーウイルスを使用するが、その両方ともがヒト臨床で使用するための免疫原性組成物を生成するのに用いられる工程での使用は望ましくない。

【0199】

適格なVer o細胞から組換えVSVをレスキューすることを試みは、初め、熱ショッ

50

クノプラスミド T7 レスキュー プロトコル (上記のパラインフルエンザウイルスおよび麻疹ウイルスのレスキューに行ったもの) を用いたが成功しなかった。この系の制限的なものとして考えられる要因の 1 つに、特に V e r o 細胞を用いた場合の低いトランスフェクション効率があった。この問題は、熱ショック / プラスミド T7 レスキュー系の別個の 2 つの改良により処理された。1 つ目の改良点は、リン酸カルシウムトランスフェクト / 熱ショック方法は大きく変更せずに、別の宿主細胞型を用いたことである。もう 1 つには、異なるトランスフェクションプロトコルを用いて、V e r o 細胞のレスキュー系を最適化した (実施例 V I I を参照のこと) 。

【 0 2 0 0 】

概要すると、以下の改定されたプロトコルに従って、上記の基本的な熱ショック / プラスミド - T7 系を実施することで 2 9 3 細胞から V S V のレスキューに成功した。 10

試薬

プラスミド DNA :

- 1 . 全長ウイルスゲノム c D N A
- 2 . p T 7 - N
- 3 . p T 7 - P
- 4 . p T 7 - L
- 5 . p T 7 - M
- 6 . p T 7 - G
- 7 . p C I - N e o - b c l - T 7 (p 0 0 6 1)

20

【 0 2 0 1 】

リン酸カルシウムトランスフェクション試薬 :

- 1 . 2 X B E S - 緩衝食塩水 : 5 0 m M B E S (p H 6 . 9 5 - 6 . 9 8)、2 8 0 m M N a C l、1 . 5 m M N a₂ H P O₄。
- 2 . 2 . 5 M C a C l₂。
- 3 . ヘベス - 緩衝食塩水洗浄溶液 (H B S) : 2 0 m M ヘベス (p H 7 . 0 - 7 . 5)、1 4 0 m M K C l、1 m M M g C l₂。

【 0 2 0 2 】

細胞培養溶液 :

- 1 . 1 0 % の承認された熱失活 F B S を含む D M E M (E M E M / F B S)。 30
- 2 . 1 0 % の承認された熱失活 F B S を含む I s c o v e 変法最少必須培地 (I M E M) (I M E M / F B S)。
- 3 . ポリ - L - リシン : H₂ O 中 0 . 0 1 %。
- 4 . P B S。
- 5 . ブタのトリプシン / E D T A。

【 0 2 0 3 】

手順

2 9 3 細胞培養 :

2 9 3 細胞は培養するのが難しい場合があり、取り扱い方法について種々の多くの方法がある。現在の方法は、一部の V S V および改変された V S V ベクター構築物のレスキュー系として用いるに成功している。 40

【 0 2 0 4 】

慣例の継代法 :

- 1 . 培地を取り除き、融合性単層 (1 0 c m プレート) を 5 m l の温 P B S で洗浄する ; 細胞が剥がれるのを防ぐために皿の壁面に沿って穏やかにピペティングする (2 9 3 細胞は長時間室温に置かまたは塩基性 (赤色) の培地中で維持すると、剥がれてくる)
- 2 . 2 m l のトリプシンを穏やかに加え、単層全体を覆うようにプレートを揺する。トリプシンを吸出し、プレートを室温中に約 1 分間放置する。このプレートを 4 5 度傾け、細胞を剥がすためにフードの表面を軽く叩く。細胞が剥がれない場合は、もう 1 分室温 50

でインキュベートする（この時点で細胞死を確認することで、激しいピペッティングを避けられる）。

3. 5 ml の DMEM / FBS を穏やかに加え、ゆっくりピペッティングして細胞を分散させる。

4. 9 ml の DMEM / FBS を含むプレートに 1 ml の細胞を加える。

5. 37、5% CO₂ にてインキュベートする。

【0205】

トランスフェクションのための継代：

1. ポリ-L リシンを用いて所望数のプレートを被覆する。プレート 1 枚につき約 3 ~ 4 ml の 0.001% ポリ-L リシンを加え、室温で少なくとも 30 分間放置する。ポリ-L リシン溶液を吸いだす。5 ml の培地でプレートをすすぐ。 10

2. 上記のように細胞をトリプシン処理する。次の日に 50 ~ 75% 密集度のプレートとなるような分割比（1 : 3 ~ 1 : 6）を用いる。

3. 細胞を剥がした後に、MEM / FBS を加え、9 ml の MEM / FBS を含む被覆されたプレートに細胞を移す。トランスフェクション前に細胞を分割し、MEM / FBS 中で一晚生育させることは重要であると考えられる。

4. 37、5% CO₂ にてインキュベートする。

【0206】

トランスフェクション：

1. トランスフェクションの 1 ~ 3 時間目に、9 ml の MEM / FBS を細胞に与え、3% CO₂ に設定された 32 のインキュベーター中で細胞をインキュベートする。 20

2. リン酸カルシウム-DNA トランスフェクション混合物を以下のように調製する：

a. 5 ml ポリプロピレンチューブ中の以下の DNA を組み合わせる：

i. 8 µg T7 - N

ii. 4 µg T7 - P

iii. 1.2 µg T7 - L

iv. 1.0 µg T7 - M

v. 1.0 µg T7 - G

vi. 10 µg のウイルス性ゲノム cDNA クローン 30

vii. 10 µg の hCMV - T7 発現ベクター。

b. 水を用いて終量 450 µl に調整する。

c. 50 µl の 2.5 M CaCl₂ を加える。

d. チューブを穏やかにボルテックスしながら、500 µl の 2X BBS を加え、室温に 15 ~ 20 分間放置する。

3. インキュベーターから細胞を取り出し、培地にリン酸カルシウム-DNA 混合液をゆっくり加え、ゆっくり揺すって沈殿物を分散させる。細胞を 32 - 3% CO₂ インキュベーターにすぐに戻す。

4. トランスフェクションを開始した 3 時間後に、プラスチックの袋で培養皿を密封し、細胞の熱ショック応答を誘導するために 43 に設定した水槽中に完全に 2 時間沈める。 40

5. 熱ショック後に、細胞を 32 - 3% CO₂ インキュベーターに戻し、一晚インキュベートする。

6. 次の日に、細胞を HBS で 2 回洗浄し、10 ml の MEM / FBS を細胞に与える。37、5% CO₂ でインキュベートする。

7. トランスフェクションを開始して 48 ~ 72 時間で、トランスフェクトされた細胞を大きな容器に移すのに十分な 20 ml DMEM / FBS を含む T150 フラスコを準備する。トランスフェクトされた全ての 10 cm のプレートを 1 つの T150 フラスコに移す。

8. 細胞表面から培地を取り除くために単層上の培地を穏やかにピペッティングする 50

ことによって、トランスフェクトされた293細胞を移す。激しいピペッティングを避け、細胞を移動させるのにちょうど良い力で行う。細胞を移動させた後、細胞集団の大きさを小さくするために5回ほどピペッティングしてから、培地と細胞を20mlのIMEM/FBSを含むT150フラスコに移す。

9. その4～6時間後に、培地を新鮮な10%FBS含有DMEMと交換する(細胞がプレートに吸着していない場合、この工程は24時間まで遅らせることができる点に注意する。また、この工程を飛ばしても成功する)。

10. 細胞変性効果の証拠を検出するために、5～7日間細胞をモニターする。

11. CPEが明白に現れた場合、培養上清の50μlを培地と定着した単層のVerob細胞を含む6ウェルプレートのウェルに移す。CPEは、レスキューが生じた場合、翌日に見えるはずである(この工程は、ときどき293細胞がT150フラスコの表面から剥がれたために、実際には感染していないのにVSV-感染したように見えるので、注意を要する)。

12. 単層Verob細胞に少量の試料を移した後に、T150フラスコから細胞と培地を回収し、-70℃で凍結させる。293細胞は、細胞を剥がすために単層上の培地をピペッティングして穏やかに回収することができる。

【0207】

上記の改定したプロトコルを用いて、種々の組換えVSV構築物を293細胞から回収した。これに関連して回収に成功したVSV構築物には、本明細書中で記載するように、基礎となるVSVベクターバックボーン構築物、およびHIVエンVerob遺伝子、またはHIVギャグ遺伝子を含む2個の改変VSVベクターが含まれていた。このように、本発明の一過性RNAポリメラーゼベクター系が、種々の細胞型における実質的に改変された(例えば弱毒化およびベクター)構築物を含む種々の組換えウイルスの範囲にまで適用できることは明らかである。特に、293細胞がVSVレスキューに適応できること、および向上されたトランスフェクション効率がある他の細胞(例えばVerob細胞)におけるVSVレスキューを成しとげるにあたって重要であろうことは、明白である。

【0208】

さらにVSVウイルスおよび麻疹ウイルスレスキュー実験が、選択されたウイルスの構造遺伝子をエンコードする発現プラスミドをさらに含む更なる改変手法を用いることで実施されたことは注目に値する。VSVレスキューの場合においては、GおよびM遺伝子を発現するプラスミドが宿主細胞中に同時トランスフェクトされた(上記の改変プロトコルに記載のように)。MVレスキューの場合は、トランスフェクション混合物にM、FおよびHをエンコードするプラスミドを補助した。従って、本発明に基づく、いずれかの非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスのレスキューには、場合によって同じウイルスまたは異種、サブタイプまたは株のウイルスのタンパク質を含む、構造タンパク質のいずれかもしくははいずれかの組み合わせを同時導入および/または同時発現することが含まれてもよいと認められる。

【0209】

実施例VII

別の方法、エレクトロポレーションで媒介されるトランスフェクション法を介するVerob細胞における水泡性口内炎ウイルスのレスキュー

本発明の一過性RNAポリメラーゼ発現系におけるトランスフェクション効率の役割をさらに評価するために、エレクトロポレーション法をVerob細胞のリン酸カルシウムトランスフェクション法に代えて調査した。Verob細胞のエレクトロポレーション法に関する条件を決定した後、以下に詳細を記載する改変された熱ショック/プラスミド-T7レスキュープロトコル中に組み込んだ。

【0210】

DNA調製:

それぞれのエレクトロポレーション法に関して、以下のプラスミドDNAを微量遠心管において組み合わせる:

10

20

30

40

50

50 μ g T7を発現するプラスミド (pCI - Neo - Bcl - T7)
 0 μ g VSV全長プラスミド
 8 μ g Nプラスミド
 4 μ g Pプラスミド
 1 μ g Lプラスミド
 1 μ g Mプラスミド (VSVについて)
 1 μ g Gプラスミド (VSVについて)。

【0211】

またルシフェラーゼトランスフェクション対照についてのDNAを調製する：

50 μ g (pCI - Neo - Bcl - T7)

5 μ g T7 - ルシフェラーゼプラスミド

a) 生物学的に安全なフード中で作業して、DNA量を滅菌、無ヌクレアーゼ水を用いて250 μ lに調整する。

b) 3M 酢酸ナトリウム (pH 5) を50 μ l加える。

c) 750 μ lの100%エタノールを加え、混合する。

d) -20 で1時間～一晩インキュベートする。

e) 14,000 rpmの遠心を4 で20分間行ってDNAを沈殿させる。

f) 生物学的に安全なフード中で作業し、沈殿物を壊さないように上清を棄てる。

g) チューブを迅速に遠心して、残ったエタノールを底に集め、ピペットを用いて取り除く。

h) 沈殿物を5～10分間 (生物学的に安全なフード中で) 風乾させる。

i) 沈殿物を50 μ lの滅菌、無ヌクレアーゼ水を用いて再懸濁する。

【0212】

溶液：

トリプシン / EDTA

ハंक緩衝食塩水

PBS中で調製された1mlあたり1mgのダイズ・トリプシン阻害因子

培地成分 (以下参照)

培地

【0213】

【表6】

培地 1	培地 2	培地 3
ダルベッコ変法最少必須培地 (DMEM)	Iscove変法ダルベッコ培地 (IMDM)	ダルベッコ変法最少必須培地 (DMEM)
10%熱失活ウシ胎児血清	220 μ M 2-メルカプトエタノール (組織培養グレード)	10%熱失活ウシ胎児血清
220 μ M 2-メルカプトエタノール (組織培養グレード)	1% DMSO (組織培養グレード)	220 μ M 2-メルカプトエタノール (組織培養グレード)
1% 非必須アミノ酸 (10 mM溶液)	1% 非必須アミノ酸 (10 mM溶液)	1% 非必須アミノ酸 (10 mM溶液)
1% ビルビン酸ナトリウム (100 mM溶液)	1% ビルビン酸ナトリウム (100 mM溶液)	1% ビルビン酸ナトリウム (100 mM溶液)
		50 μ g / ml ゲンタマイシン

【0214】

Ver o細胞の調製：

各エレクトロポレーションは、密集度約1.3程度のT150フラスコからの細胞を要

10

20

30

40

50

求する。

1. 細胞単層をおよそ5 mlのハंक緩衝食塩溶液を用いて1回洗浄する。
2. 4 mlのトリプシン/EDTAを加え、溶液が均等に分散するようにフラスコを揺する。
3. 室温で3～5分間インキュベートする。
4. トリプシン溶液を吸い出す。
5. 細胞を剥がすためにフラスコの側面を軽く叩く。
6. 10 mlの培地#1を用いてフラスコ(群)から細胞を集め、細胞を50 mlの円錐管に移す。
7. 1 mlのトリプシン阻害因子(1 mg/ml)を加え穏やかに混合する。 10
8. 室温卓上遠心管にて5分間、細胞を1000 rpmの遠心にかける。
9. 上清を吸い出す。
10. 細胞を10 mlの培地2中に再懸濁する。
11. 1 mlのトリプシン阻害因子を加えて、穏やかに混合する。
12. 上記のように室温卓上遠心にて細胞を1000 rpmの遠心にかける。
13. 培地を吸い出す。
14. 培地2中に細胞を再懸濁する。エレクトロポレーションにつき0.8 ml等量となるように終量中に穏やかに再懸濁する(細胞ピルビン酸ナトリウムが容量に寄与する分を考慮する)。
15. 0.8 mlの細胞懸濁液をプラスミドDNA溶液を含む遠心管に移す。p1000チップを用いて穏やかにピペティングして細胞とDNAを混合する。エレクトロポレーター装置に移す。 20

【0215】

エレクトロポレーション：

BTX820スクエアー・ウェーブ・エレクトロポレーター

1. 細胞/DNAを3回ピペティングして穏やかに混合し、エレクトロポレーション用のキュベットに移す。
2. キュベットをエレクトロポレーション装置に入れる。
3. 細胞をエレクトロポレートする(4パルス、70 msec、140ボルト)。
4. 全ての試料をエレクトロポレーションした後に、キュベット(群)を生物学的に安全なフードに戻し、1 mlの培地1を加える。滅菌プラスチック移動用ピペットを用いて、細胞をキュベットから10 mlの培地1を含む15 mlの遠心管に移す。 30
5. 穏やかに混合し、上記のように遠心して細胞を集める。
6. 培地を吸い出す。
7. 細胞を10 mlの培地1中に再懸濁し、その懸濁液を25 mlの培地1を含むT150フラスコ中に移す。
8. 細胞を37 (5% CO₂)で3時間インキュベートする。
9. 細胞を43 (3～5% CO₂)で3時間熱ショックを与える。
10. 細胞を37 に2時間戻す。
11. 培地を30 mlの培地3に交換し、37 でインキュベートし続ける。 40
12. 細胞変性効果の信号について細胞を日々観察する。VSV複製は3～4日という早い時期に表れるはずであるが、6日目と長くかかる場合もある。

【0216】

前記のエレクトロポレーション法/熱ショック/T7プラスミド手法に関して、組換えVSV, MVおよびPIVはすべてVer o細胞からのレスキューに成功した。特筆すべきは、早期終止(premature termination)を低下させると報告されている1アミノ酸置換(MacDonaldら、*J. Mol. Biol.* 238:145-158、1994、出所明示により本明細書の一部とされる)を含む修飾PC1-Neo-Bc1-T7プラスミドを用いることで、いくつかのVSVレスキューが行われたことである。

【0217】

実施例 V I I IV e r o細胞における呼吸器合胞体ウイルスのレスキュー

この実施例では、本発明の一過性 R N A ポリメラーゼベクター系を用いて（上記の実施例 I I 記載の改変リン酸カルシウム / 熱ショックプロトコルによって実施される）50 個の異なる組換え R S V 株の成功した回収を示す。このように回収された幅広く組み立てられた組換え R S V 候補体を表 6 に示す：それらには、生物学的に派生した R S V 変異体由来の弱毒化変異を 1 つまたはそれ以上組み込むことによって改変されている R S V 組換え体；1 つまたはそれ以上の遺伝子（群）またはゲノム分節（群）（例えば、S H、N S 1、N S 2、M 2 - 2 のもの）を部分的にまたは完全に欠失することによって改変された R S V、あるいは 1 つまたはそれ以上の遺伝子（群）の発現がノックアウトもしくは損なわれる他の修飾によって改変された R S V；R S V - R S V キメラ構築物（例えば、R S V B 糖タンパク質（群）置換を有する R S V A 2 株バックグラウンド）；1 つまたはそれ以上の挿入（群）を有する R S V；および野生型の R S V 遺伝子地図に対応する遺伝子位置と比較して場所がずれている遺伝子（群）を 1 つまたはそれ以上有する（即ち、「遺伝子シャッフリング」）R S V 組換え体が挙げられる。このレスキューされ表 6 にて同定された株には、主として R S V A 2 株の変種および派生体が含まれるが、R S V B 1 株もまた本発明の方法および組成物を用いることで回収に成功した。この表 6 記載の回収された R S V 組換え体の中で、種々の弱毒化ウイルス、多重弱毒化ウイルスおよびキメラウイルスが回収され、並びに前記のおよび上記一部とされた引用例中に記載される全ての、1 つまたはそれ以上の遺伝子欠失を有する R S V 組換え体が回収された。

10

20

【 0 2 1 8 】

【表 7 - 1】

表 6
回収された R S V c D N A クローン

	WV cDNA 構築物/ウイルス (説明)	レスキューされた		ウイルス配 列によ り確認 した
		MVA 方法*	プラスミ ド方法	
1	rA2cp ΔSH M2/404 L248/404 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、M 2 遺伝子の 4 0 4 番目の変異、L 遺 伝子の 2 4 8 番目と 4 0 4 番目の変異)	Yes	Yes	-
2	rA2cp ΔSH M2/404 L248/1030 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、M 2 遺伝子の 4 0 4 番目の変異、L 遺 伝子の 2 4 8 番目と 1 0 3 0 番目の変異)	-	Yes	-
3	rA2cp ΔSH M2/404 L1030 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、M 2 遺伝子の 4 0 4 番目の変異、L 遺 伝子の 1 0 3 0 番目の変異)	-	Yes	-
4	rA2cp ΔSH M2/404 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、M 2 遺伝子の 4 0 4 番目の変異)	-	Yes	-
5	rA2cp ΔSH M2/404 L248 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、M 2 遺伝子の 4 0 4 番目の変異、L 遺 伝子の 2 4 8 番目の変異)	-	Yes	-
6	rA2cp ΔSH (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失)	-	Yes	-
7	rA2cp ΔSH L248 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、L 遺伝子の 2 4 8 番目の変異)	-	Yes	-
8	rA2cp ΔSH L404 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、L 遺伝子の 4 0 4 番目の変異)	-	Yes	-
9	rA2cp ΔSH L248/1030 (A 2 バックボーン、c p 変異、S H 遺伝子の 欠失、L 遺伝子の 2 4 8 番目と 1 0 3 0 番目の 変異)	-	Yes	-

10

20

30

40

【表 7 - 2】

	WV cDNA 構築物/ウイルス (説明)	レスキューされた		ウイルス配列により確認した
		MVA 方法*	プラスミド方法	
10	rA2cp ΔSH L1030 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、L遺伝子の1030番目の変異)	－	Yes	－
11	rA2cp ΔSH L/248/404 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、L遺伝子の248および404番目の変異)	－	Yes	－
12	rA2cp ΔSH L/404/1030 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、L遺伝子の404および1030番目の変異)	－	Yes	－
13	rA2cp M2/404 L248/404/1030 (A2バックボーン、cp変異、M2遺伝子の404番目の変異、248、L遺伝子の404および1030番目の変異)	Yes	Yes	－
14	rA2cpΔSH/404/M2/L248 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の248番目の変異)	－	Yes	－
15	rA2cpΔSH M2/404 L404 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の404番目の変異)	－	Yes	－
16	rA2cpΔSH M2/404 L404/1030 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の404番目と1030番目の変異)	－	Yes	－
17	rA2cpΔSH L248/404/1030 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、L遺伝子の248、404および1030番目の変異)	－	Yes	Yes
18	rA2cpΔSHcpFstb L248/404/1030 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、安定化されたF中のcp変異、L遺伝子の248、404および1030番目の変異)	Yes	Yes	－
19	rA2cp M2/404 L530/1009 (A2バックボーン、cp変異、SH遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の530および1009番目の変異)	Yes	Yes	－
20	rA2cp ΔNS2 M2/404 L530/1009 (A2バックボーン、cp変異、NS2遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の530および1009番目の変異)	－	Yes	－

10

20

30

40

【表 7 - 3】

	WV cDNA 構築物/ウイルス (説明)	レスキューされた		ウイルス配列により確認した
		MVA 方法*	プラスミド方法	
21	rA2cp ΔNS2 M2/404 L248/404 (A2バックボーン、cp変異、NS2遺伝子の欠失、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の248および404番目の変異)	Yes	Yes	—
22	rA2cpΔNS2 530/1009 (A2バックボーン、cp変異、NS2遺伝子の欠失、L遺伝子の530および1009番目の変異)	Yes	Yes	—
23	rA2cp L530/1009/955 M2/404 (A2バックボーン、cp変異、M2遺伝子の404番目の変異、L遺伝子の530、1009および955番目の変異)	—	Yes	Yes
24	rA2cpΔNS2 L530/1009/955 (A2バックボーン、cp変異、NS2遺伝子の欠失、L遺伝子の530、1009および955番目の変異)	—	Yes	—
25	rA2cp530/1009/955 (A2バックボーン、cp変異、L遺伝子の530、1009および955番目の変異)	Yes	Yes	Yes
26	rA2cpΔNS1 (A2バックボーン、cp変異、NS1遺伝子の欠失)	—	Yes	Yes
27	rA2cpΔNS2 (A2バックボーン、cp変異、NS2遺伝子の欠失)	Yes	Yes	Yes
28	rA2wtΔNS1 (A2バックボーン、NS1遺伝子の欠失)	—	Yes	Yes
29	rA2cpΔNS1ΔNS2 (A2バックボーン、cp変異、NS1およびNS2遺伝子の欠失)	—	Yes	—
30	rA2ΔM2/2 (A2バックボーン、M2-2 ORFの欠失)	—	Yes	Yes
31	rA2wtΔNS2 (A2バックボーン、NS2遺伝子の欠失)	—	Yes	Yes
32	rA2wt (RSV A2株に基づくバックボーン)	—	Yes	Yes
33	rA2cpNPM (A2バックボーン、cp変異、3番目部位に挿入されたN遺伝子、4番目部位におけるP、および5番目部位におけるM遺伝子-野生型の順)	—	Yes	Yes
34	rA2cpPNM (A2バックボーン、cp変異、3番目部位に挿入されたP遺伝子、4番目部位におけるN、および5番目部位におけるM遺伝子)	—	Yes	Yes

10

20

30

40

【表 7 - 4】

	WV cDNA 構築物/ウイルス (説明)	レスキューされた		ウイルス配 列により確認 した
		MVA 方法*	プラスミ ド方法	
35	rA2cpPMN (A2バックボーン、cp変異、3番目部位に挿入されたP 遺伝子、4番目部位におけるM、および5番目部位 におけるN遺伝子)	-	Yes	Yes
36	rB1 (RSV B1株に基づくバックボーン)	-	Yes	Yes
37	rB1 ΔNS1 (B1バックボーン、NS1遺伝子の欠失)	-	Yes	Yes
38	rB1t ΔNS2 (B1バックボーン、NS2遺伝子の欠失)	-	Yes	Yes
39	rA2 B1M/G (A2バックボーン、SHおよびG遺伝子のB1、M、SHおよ びG遺伝子による置換)	-	Yes	-
40	rA2ΔNS1 B1M/G (A2バックボーン、SHおよびG遺伝子のB1、M、SHおよ びG遺伝子による置換、NS1遺伝子の欠失)	-	Yes	-
41	rA2ΔNS2 B1M/G (A2バックボーン、SHおよびG遺伝子のB1、M、SHおよ びG遺伝子による置換、NS2遺伝子の欠失)	-	Yes	-
42	rA2ΔNS1ΔNS2 B1M/G (A2バックボーン、SHおよびG遺伝子のB1、M、SHおよ びG遺伝子による置換、NS1およびNS2遺伝子の 欠失)	-	Yes	Yes
43	rA2cpG (B ORF) 248/404/1030 (A2バックボーン、cp変異、M2遺伝子の404番目の変 異、L遺伝子の248、404および1030番目の変異、A 2 G ORFのサブグループ B (V9511) G ORFによる置 換)	-	Yes	-
44	rABcp 530/1009/955 V9511GF (A2バックボーン、cp変異、L遺伝子における530、100 9および955番目の変異、A2 GおよびF ORFのサブ グループ B (V9511) GおよびF ORFそれぞれによる 置換)	-	Yes	Yes
45	rABwt ΔNS1 V9511GF (A2バックボーン、NS1遺伝子の欠失、A2 GおよびF O RFのサブグループ B (V9511) GおよびF ORFそれぞ れによる置換)	-	Yes	-

10

20

30

40

【 0 2 2 2 】

【表 7 - 5】

	WV cDNA 構築物/ウイルス (説明)	レスキューされた		ウイルス配 列により確 認した†
		MVA 方法*	プラスミ ド方法	
46	rABwt ΔNS2 V9511GF (A2バックボーン、NS2遺伝子の欠失、A2 GおよびF 0 RFのサブグループ B(V9511)GおよびF ORFそれぞ れによる置換)	-	Yes	-
47	rA2cpGΔ1 st AUG (A2バックボーン、cp変異、G ORFの第1番目の開始コ ドンの欠失)	-	Yes	Yes
48	rA2cpGΔ2 nd AUG (A2バックボーン、cp変異、G ORFの第2番目の開始コ ドンの欠失)	-	Yes	Yes
49	rA2cpG4CtoR (A2バックボーン、cp変異、G ORFにおける4個のシステ イン残基のアラニンへの変更)	-	Yes	-
50	rA2cpG1F2 530/1009/955 (A2バックボーン、cp変異、L遺伝子の530、1009およ び955番目の変異、ゲノム中の1番目部位へのG遺 伝子転座、ゲノムの2番目部位へのFの転座)	-	Yes	Yes

10

20

*MVA法によりレスキューされたウイルスは全て正しい配列である。

†プラスミドレスキューされた構築物にのみ言及する。

【 0 2 2 3 】

実施例 I X

プラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック法によるさらなるネガティブ鎖ウ

30

この実施例は、上記の実施例 V I I 記載の改変されたプラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック系を用いてさらにネガティブ鎖 RNA ウイルスの成功した回収を示す。この改変された回収法を、非常に多くの更なる弱毒組換え V S V (r V S V) 株並びに異種抗原をエンコードするよう修飾された種々の r V S V および b P I V ベクターが作り出されるように、本明細書中でさらに適用した。r V S V に加えて、プラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック法もまた、V e r o 細胞から種々の他の典型的な、組換えネガティブ鎖 RNA ウイルスを回収するために用いた (下記、表 7)。r V S V について上記したように、これら例示する実施形態ではエレクトロポレーションされる DNA の組成には、C N V - T7、ゲノム c D N A、N、P および L に加えて、マトリックスタンパク質およびウイルスの糖タンパク質が場合により含まれてもよい。マトリックスタンパク質および糖タンパク質をエンコードするプラスミドをさらに含んでいる場合には、それがなければレスキューすることが難しいことが知られているウイルスを回収するにあたって、多大な利益を提供することができる。さらに以上でも記載したように、1 つまたはそれ以上の更なる構造タンパク質 (例えば、R S V の M、S H、N S 1、N S 2、F、および / または G、並びに P I V の M、H N、および / または F) をエンコードする適宜のプラスミドもまた、本発明のこれら (エレクトロポレーション) 方法および組成物の範囲内に含まれ得る。

40

【 0 2 2 4 】

【表 8】

表 7 プラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック方法により回収された更なるネガティブ鎖 RNA ウイルス

	組換えウイルス	レスキューに用いた補助プラスミド
1	イヌジステンパーウイルス (オンダーステポート (Onderstepoort) 株)	N、P、L、M、F、H
2	流行性耳下腺炎ウイルス (ジェリー・リン (Jeryl Lynn) 株)	NP、P、L
3	麻疹ウイルス (エドモントン・ルベオヴァクス (Edmonston Rubeovax) 株)	N、P、L、M、F、H
4	呼吸器合胞体ウイルス ・ r A 2 c p Δ S H / M 2 - 4 0 4 / L 2 4 8 - 4 0 4	N、P、L、M 2
5	ウシ P I V (船積熱 (Shipping Fever) 株)	N、P、L
6	ウシーヒト混成体 P I V (h P I V 3 相同体によって置換された b P I V S F 株の F および H N 遺伝子) h / b P I V キメラウイルスに加えて、単離された R S V A または R S V B を含む 3 種の株 ・ h / b P I V - G a 1 ・ h / b P I V - F a 1 ・ h / b P I V 3 - F b 1	N、P、L 部位 1 における R S V - A 2 G 遺伝子 部位 1 における R S V - A 2 F 遺伝子 部位 1 における R S V - B F 遺伝子

10

20

【 0 2 2 5 】

r V S V に関して、種々の更なる構築物がプラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック方法を用いて作り出され、回収された。これら r V S V 組換え体をレスキューした後に、複製速度をインビトロで試験し、そのウイルスが本発明の免疫原性組成物および方法の使用のために十分弱毒化されたかを、相対的な毒性について、ヒトでの活性 (例えば、弱毒化および免疫原性) を示唆する小動物モデル系にて評価した。

30

【 0 2 2 6 】

例示の実施形態では、異種抗原、例えば H I V G A G タンパク質または H S V - 2 g D 糖タンパク質をエンコードする第 6 番目の遺伝子を含む多くの r V S V が作り出され、回収された。ウイルスの複製を向上させる改変の導入に効果的とされる、以下の 5 つの一般的な方策を実施した: (1) 転写および R N A 複製に関与する遺伝子 (例えば N 遺伝子) またはウイルス粒子成熟に関与する遺伝子 (例えば M もしくは G) を、対応する m R N A の転写が減少することとなる下流部位に転座または「シャッフリング」する (例えば、Ballら、J. Virol. 73:4705-4712、1999; Finkeら、J. Gen. Virol. 84:1613-1621、2003; および Wertzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3501-3506、1998 を参照のこと、出所明示により本明細書の一部とされる); (2) ウイルス付着タンパク質 (例えば G タンパク質) の細胞質尾部ドメインの切断 (C T 欠失) (例えば、Robertsら、J. Virol. 73:3723-3732、1999 を参照のこと、出所明示により本明細書の一部とされる); (3) 温度感受性ポリペプチドをエンコードする相同体を用いてベクターバックボーン中の遺伝子の交換 (例えば、Pringle、J. Virol. 5:559-567、1970; Gallioneら、J. Virol. 54:374-382、1985 を参照のこと、それぞれ出所明示により本明細書の一部とされる); (4) M タンパク質をエンコードする遺伝子中にウイルス粒子成熟速度および細胞変性を減少させる

40

50

変異を導入する（例えば、Jayakarら、J. Virol. 76:8011-8018、2002を参照のこと、出所明示により本明細書の一部とされる）；（５）ＣＴ欠失と、シャッフリングされた遺伝子、*t s* 変異または*M*変異とを組み合わせる。以下の表８で、本方法に従ってレスキューされた種々の弱毒化*r V S V*株の例示を記載する。

【０２２７】

上記方策（３）に関して、温度感受性変異の導入は、生物学的に派生した*t s* 変異ウイルスにおいて同定された遺伝子を用いて野生型もしくは原型遺伝子を置換することで容易に実施できる。*t s* 変異などを有する例示の*r V S V*組換え体の作成にあたって、ＢＨＫ細胞を、例示する生物学的に派生した*t s* 変異体、*t s G 1 1*、*t s G 3 1*、*t s G 4 1* もしくは*t s O 4 5*（例えば、Gallioneら、J. Virol. 54:374-382、1985；Whittら、J. Virol. 64:4907-4913、1990；Pringle、J. Virol. 5:559-567、1970を参照のこと、それぞれ出所明示により本明細書の一部とされる）を用いて感染させ、細胞変性効果が表れるまで複製許容温度（３２）でインキュベートし、培養物のおよそ７５％に明白な細胞変性効果が表れた時点で細胞を培地中で潰し、低速の遠心により収集する。グアニジンチオシアネート－フェノール－クロロホルム抽出法により細胞ペレットから全ての感染された細胞のＲＮＡを抽出し、精製されたＲＮＡを逆転写およびＰＣＲ増幅に用いて、*r V S V c D N A* クローン中の同種遺伝子を置換するために次に用いられるタンパク質コード配列を調製した。クローン化された*t s* 遺伝子配列は、その配列とそれと対応する生物学的に派生した*t s* ウイルスのゲノムＲＮＡから直接決定された配列と比較することで確かめた。配列の確認に続いて、１つまたはそれ以上の*t s* 遺伝子をエンコードする*r V S V* 株を、期待される*t s* 表現型のために３７ではなく３２（熱ショック中を除く）で細胞をインキュベートすることを除いて、上記の電ポレーション／熱ショックプロトコルを用いて、レスキューした。電ポレーション後５～９日で、成功したレスキュー試行では細胞変性効果が明白に表れ、この時点で新規の株を得て、最初のブランク精製に用いた。ブランク精製を３回行った後、ウイルスストックを増幅し、ゲノム配列を決定した。次いで、所望の配列を含むウイルスを種々の温度（３２、３７および３９）でブランクアッセイにかけ、挿入された*t s* 遺伝子の効果を評価した。

【０２２８】

10

20

【表 9】

表 8 プラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック方法により回収されたさらなる r V S V 株

シャッフル	
r V S V - M 5	部位 5 に対しシャッフルされた M 遺伝子
r V S V - G 5	部位 5 に対しシャッフルされた G 遺伝子
r V S V - G A G 1 - N 3 - C T 1	C T 欠失と組み合わされた部位 3 に対しシャッフルされた N 遺伝子。注釈：学名 C T 1 における 1 は、単一アミノ酸のみを含む、切断された細胞質ドメインを意味する。これは、遺伝子の部位を意味するものではない。
r V S V - G A G 1 - N 4 - C T 1	C T 欠失と組み合わされた部位 4 に対しシャッフルされた N 遺伝子
t s 変異	
r V S V - t s N	ウイルス t s 4 1 由来の t s N で置換された N 遺伝子
r V S V - G A G 1 - t s N	部位 1 に挿入された H I V - 1 G A G 遺伝子、ウイルス t s 4 1 由来の t s N で置換された N 遺伝子
r V S V - t s L	ウイルス t s 1 1 由来の t s L で置換された L 遺伝子
r V S V - G A G 1 - t s L	部位 1 に挿入された H I V - 1 G A G 遺伝子、ウイルス t s 1 1 由来の t s L で置換された L 遺伝子
r V S V - g D - t s L	部位 1 に挿入されたヘルペス 2 型 g D 遺伝子、ウイルス t s 2 2 由来の t s L で置換された L 遺伝子
r V S V - t s N + L	ウイルス r s 4 1 由来の t s N およびウイルス t s 1 1 由来の t s L でそれぞれ置換された N および L
r V S V - G A G 1 - t s N + L	部位 1 に挿入された H I V - 1 G A G 遺伝子、ウイルス r s 4 1 由来の r s N およびウイルス t s 1 1 由来の t s L でそれぞれ置換された N および L
r V S V - t s G	t s 0 4 5 由来の t s G で置換された G 遺伝子
r V S V - G A G 1 - t s G	部位 1 に挿入された H I V - 1 G A G 遺伝子、t s 0 4 5 由来の t s G で置換された G 遺伝子
r V S V - t s M	t s 3 1 由来の t s M で痴漢された M 遺伝子
r V S V - G A G 1 - N 4 - C T 9 - t s L	部位 4 に対してシャッフルされた N 遺伝子、9 アミノ酸にまで短くなった G タンパク質の C - 末端尾部 (C T 9)、部位 1 に挿入された H I V G A G 遺伝子
細胞変性 M 遺伝子変異	
r V S V - G A G 1 - M _{n c p 1 2} - C T 1	M 中の n c p 1 2 変異は 2 個下流にある A T G コドンからの翻訳を妨げる。メチオニンコドン (3 3 および 5 5) がアラニンコドンに置換されている。

10

20

30

40

* 学名における注釈：V S V ゲノムは 3' - N (1) - P (2) - M (3) - G (4) - L (5) - 5' に配置された 5 つの遺伝子を含んでいる。C T 改変の注意すべき例外とし

50

て、上記の、数字の命名は、対象となる組換えウイルスの最終的な遺伝子位置を意味する。従って、例えば、「r V S V - M 5」と称されえるウイルスは、その最後または5番目の位置の中にシャッフルされたM遺伝子を含んでいる。第1の遺伝子部位からのH I V G A Gをエンコードする遺伝子挿入を特徴とするr V S V - M 5のベクター派生物は6つの遺伝子を含んでおり、r V S V - G A G 1 - M 6と一致して称される。対象となる組換え体のほとんどがニュージャージー州(N J)抗原型バックボーンから調製された付随ベクターを用いて回収されたが、表8において同定された各V S V組換え体の当初インディアナ抗原型バックボーン中で作られた。「t s」に続く特定の遺伝子または産生物(例えば「t s G」)の命名は、一部とされた引例中に記載のように、組換えウイルスが生物学的に派生した変異型ウイルスで同定された遺伝子または変異を組み込んでいることを意味する。一般に既知の弱毒化された生物学的に派生したウイルスは、組換え体弱毒化ウイルス中に組み込むための変異遺伝子のc D N Aコピーを構築するために用いられる。あるいは、生物学的に派生した変異型ウイルス中で標的変異を特定する遺伝子座(群)は既知であり、対象となる変異は組換えウイルスに直接、例えば部位特異的変異導入によって組み込むことができる。

10

【0229】

免疫原性特異性に所望の変化を生じる、外来のまたは「異種の」抗原もしくは抗原決定基を発現するさらなるr V S Vおよび他のウイルス構築物が作り出され、回収された。例えば、組換えV S V、ウシP I V (b P I V)およびh P I V 3 - c p 4 5は、H I V - 1、インフルエンザウイルスA型およびB型、単純疱疹ウイルス2型、コロナウイルス、およびR S V A型およびB型由来の抗原を運ぶ可能性のあるベクターとして設計され、評価された。これらのベクターは、本明細書中で記載するように次の免疫原性および安全性試験のためにレスキューされた。レスキューされたV S V - H I V G A G構築物および例示するV S V - H S V g D構築物を上記の表8に列挙するが、下記の表9にはウイルス性の呼吸器病原体(R S V、インフルエンザおよびコロナウイルス)由来の糖タンパク質を発現するように設計された典型的なベクターを略記する。

20

【0230】

【表 10】

表 9 プラスミド T7 / エレクトロポレーション / 熱ショック方法により回収されたウイルス性の呼吸器病原体の糖タンパク質を発現する VSV および bPIV ベクター

ベクター	特徴	
RSV 遺伝子		
r VSV - G a 5	部位 5 における RSV A2 G 遺伝子	10
r VSV - G b 5	部位 5 における RSV B G 遺伝子	
r VSV - F a 5	部位 5 における RSV A2 F 遺伝子	
r VSV - F b 5	部位 5 における RSV B G 遺伝子	
h / b PIV - G a 1	HN および F 糖タンパク質がヒト相同体で置換されている b PIV (SF 株) ベクター 部位 1 から発現される RSV A2 G 遺伝子 (SF)	
h / b PIV - F a 1	HN および F 糖タンパク質がヒト相同体で置換されている b PIV (船積熱株) ベクター。 部位 1 から発現される RSV A2 F 遺伝子	20
h / b PIV - F b 1	HN および F 糖タンパク質がヒト相同体で置換されている b PIV (船積熱株) ベクター。 部位 1 から発現される RSV B G 遺伝子	
インフルエンザウイルス遺伝子		
r VSV - HA 5 _{PAN}	部位 5 にて A / パナマからの HA	30
r VSV - HA 5 _{NC}	部位 5 にて A / ニュー・カレドニアからの HA	
r VSV - HA 5 _{HK}	部位 5 にて B / ホンコンからの HA	
r VSV - NA 5 _{PAN}	部位 5 にて A / パナマからの NA	
r VSV - NA 5 _{NC}	部位 5 にて ニュー・カレドニアからの NA	
r VSV - NA 5 _{HK}	部位 5 にて B / ホンコンからの NA	
コロナウイルス遺伝子		
b PIV - コロナウイルス E 1	部位 1 にて コロナウイルス E 糖タンパク質を含む b PIV	40

上記の VSV ベクターがインディアナ抗原型バックボーンにて作られたことに注意を要する。ほとんどの場合、NJ 抗原型バックボーンにて調製された、付随 (companion) ベクターが単離された。

【0231】

実施例 X

G 遺伝子またはゲノム分節を欠く複製 - 欠損 VSV ベクターのレスキュー

上記したように、ワクチン接種した部位から大きく分散することができないが、細胞に感染して、目標の抗原を発現する能力を維持するベクター組換え体を構築することが多く

の場合望ましい。MまたはG遺伝子のような構造遺伝子を欠く典型的なベクターは、この目標を容易に達成できる。MまたはG遺伝子の欠如は、完全ウイルス粒子成熟を妨げることによって感染の後の免疫性ベクターの拡散を好ましく防ぐが、N、PおよびLタンパク質により媒介される転写および遺伝子発現に干渉しないであろう。全てまたは大部分のG遺伝子を欠くrVSVは記載され、本発明の免疫原性組成物および方法に使用するのに魅力的な候補体である（例えば、Robertsら、*J. Virol.* **73**:3723-3732、1999、Jeetendraら、*J. Virol.* **76**:12300-12311、2002；Robisonら、*J. Virol.* **74**:2239-2246、2000参照のこと、それぞれ出所明示により本明細書の一部とされる）。この複製 - 欠損候補体のレスキューおよび増殖を容易とするために、この実施例では、改変されたプラスミドT7/エレクトロポレーション/熱ショック方法を記載する。複製 - 欠損候補体の生産および開発に関し、この改変されたプロトコルの有用性を例証するために、2種類の変異体ウイルスを作り出し回収した。1つ目に例示する種類の変異体は、G遺伝子を完全に欠失している（「G」と称する）。2つ目の変異体は、ウイルス付着に必要とされるGの細胞外ドメインを欠くGタンパク質（「G - 抑止（stem）」と称する）をエンコードしている。この変異遺伝子は、そのほとんどはこのタンパク質が平滑小胞体に挿入され後に切断されるGタンパク質の最初の19個のアミノ酸と、それと融合された膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含む最後の91残基をエンコードしている。複製 - または増殖 - 欠損ネガティブ鎖ウイルスのレスキューについて改変方法（GまたはG - 抑止ウイルスにより例証される）を以下に挙げる。

10

20

30

40

50

【0232】

VSV/Veroエレクトロポレーションレスキュー手法：

溶液

トリプシン/EDTA

ハंक緩衝食塩水

PBS中で調製された1mlにつき1mgのダイズ・トリプシン阻害因子

培地成分（以下に記載する）

培地

【0233】

【表11】

培地1	培地2	培地3
ダルベッコ変法最少必須培地（DMEM）	Iscove変法ダルベッコ培地（IMDM）	ダルベッコ変法最少必須培地（DMEM）
10%熱失活ウシ胎児血清	220μM 2-メルカプトエタノール（組織培養グレード）	10%熱失活ウシ胎児血清
220μM 2-メルカプトエタノール（組織培養グレード）	1% DMSO（組織培養グレード）	220μM 2-メルカプトエタノール（組織培養グレード）
1% 非必須アミノ酸（10mM溶液）	1% 非必須アミノ酸（10mM溶液）	1% 非必須アミノ酸（10mM溶液）
1% ピルビン酸ナトリウム（100mM溶液）	1% ピルビン酸ナトリウム（100mM溶液）	1% ピルビン酸ナトリウム（100mM溶液）
		50μg/ml ゲンタマイシン

【0234】

Vero細胞の調製

各エレクトロポレーションは、密集度約1.3程度のT150フラスコからの細胞を要

求する。

- 1) 細胞単層をおよそ 5 ml のハंक緩衝食塩溶液を用いて 1 回洗浄する。
- 2) 4 ml のトリプシン / EDTA を加え、溶液が均等に分散するようにフラスコを揺する。
- 3) 室温で 3 - 5 分間インキュベートする。
- 4) トリプシン溶液を吸い出す。
- 5) 細胞を剥がすためにフラスコの側面を軽く叩く。
- 6) 10 ml の培地 # 1 を用いてフラスコ (群) から細胞を集め、細胞を 50 ml の円錐管に移す。
- 7) 1 ml のトリプシン阻害因子 (1 mg / ml) を加え穏やかに混合する。 10
- 8) 室温卓上遠心管にて 5 分間、細胞を 1000 rpm の遠心にかける。
- 9) 上清を吸い出す。
- 10) 細胞を 10 ml の培地 2 中に再懸濁する。
- 11) 1 ml のトリプシン阻害因子を加えて、穏やかに混合する。
- 12) 上記のように室温卓上遠心にて細胞を 1000 rpm の遠心にかける。
- 13) 培地を吸い出す。
- 14) 培地 2 中に細胞を再懸濁する。エレクトロポレーションにつき 0.7 ml 等量となるように終量中に穏やかに再懸濁する (細胞ペレットが容量に寄与する分を考慮する)。
- 15) 0.7 ml の細胞懸濁液をプラスミド DNA 溶液を含む遠心管に移す。p100 20
0 チップを用いて穏やかにピペティングして細胞と DNA を混合する。エレクトロポレーター装置に移す。

【0235】

DNA 調製:

各レスキューエレクトロポレーションについては、50 µg の CMV - G をエレクトロポレートする。

- a) 生物学的に安全なフード中で作業して、DNA 量を滅菌、ヌクレアーゼ不含水を用いて 250 µl に調整する
- b) 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5) を 50 µl 加える
- c) 750 µl の 100 % エタノールを加え、混合する 30
- d) -20 で 1 時間 ~ 一晩インキュベートする
- e) 14,000 rpm の遠心を 4 で 20 分間行って DNA を沈殿させる
- f) 生物学的に安全なフード中で作業し、沈殿物を壊さないように上清を棄てる
- g) チューブを迅速に遠心して、残ったエタノールを底に集め、ピペットを用いて取り除く
- h) 沈殿物を 5 ~ 10 分間 (生物学的に安全なフード中で) 風乾させる
- i) 沈殿物を 50 µl の滅菌、無ヌクレアーゼ水を用いて再懸濁する。

【0236】

エレクトロポレーション

BTX 820 スクエアー - ウェーブ・エレクトロポレーター

- 1) 細胞 / DNA を 3 回ピペティングして穏やかに混合し、エレクトロポレーション用のキュベットに移す。 40
- 2) キュベットをエレクトロポレーション装置に入れる。
- 3) 細胞をエレクトロポレートする (4 パルス、70 msec、140 ボルト)。
- 4) 全ての試料をエレクトロポレーションした後に、キュベット (群) を生物学的に安全なフードに戻し、1 ml の培地 1 を加える。滅菌プラスチック移動用ピペットを用いて、細胞をキュベットから 10 ml の培地 1 を含む 15 ml の遠心管に移す。
- 5) 穏やかに混合し、上記のように遠心して細胞を集める。
- 6) 培地を吸い出す。
- 7) 細胞を 10 ml の培地 1 中に再懸濁し、その懸濁液を 20 ml の培地 1 を含む 2 T 50

150 フラスコ中に移す。

8) 細胞を 37 (5% CO₂) で 3 時間インキュベートする。

9) 細胞を 43 (3 ~ 5% CO₂) で 3 時間熱ショックを与える。

10) 細胞を 37 に一晩戻す。

11) 培地を 20 ml の培地 3 に交換する。

12) レスキュー物質を含む 1 T 150 を吸引する。10 ml の培地 3 を加える。培地中に細胞をまき、G 発現細胞を含む 1 T 150 に移し、37 でインキュベートし続ける。

13) 細胞変性効果の信号について細胞を日々観察する。VSV 複製は 3 ~ 4 日という早い時期に表れるはずであるが、6 日目と長くかかる場合もある。

10

【0237】

実施例 V I I に記載する別の典型的な方法と比較して上記の改変されたエレクトロポレーション法において原理的に異なる点は、レスキューのために用いられる細胞を大量の G タンパク質を発現するように作られた細胞と一緒に増殖させる共培養工程を含むところである。簡単には、VSV レスキューは、CMV - T7 プラスミド、ウイルスゲノム cDNA 並びに N、P、L および G をエンコードするベクターを用いて Vero 細胞 (ウイルスレスキュー細胞) をエレクトロポレーションすることによって開始される。次いで、これらの細胞を一晩インキュベーションする前に 3 時間の熱ショックにかける。ウイルスレスキューエレクトロポレーションを実施した場合に、第 2 の一組の Vero 細胞をエレクトロポレートして、大量の G タンパク質を一過性発現する細胞を共培養のために準備する。エレクトロポレーションの次の日に、レスキュー混合物でトランスフェクトされた細胞を培地中にまき、G タンパク質を発現する共培養細胞単層に移す。一般にウイルス性の細胞変性効果は 2 ~ 4 日後に表れる。

20

【0238】

上記の発明を実施例により詳細に記載したが、当業者であれば、実例として記載したものに制限されることなく、添付の特許請求の範囲内で、特定の変更および改変を実施できることは明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0239】

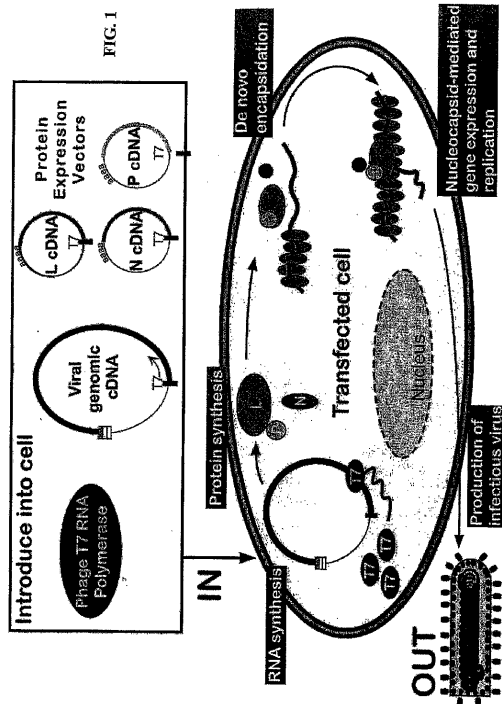
【図 1】MVA - T7 よりも T7 を供給するためのプラスミドを用いた RSV のレスキューを表す。

30

【図 2】一過性 T7 ポリメラーゼ発現ベクターであるプラスミド pC1 - Neo - BCL - T7 の典型的な配列 (配列番号: 1) を示す。

【図 3】異種のネガティブ鎖 RNA ウイルスで同定された種々の変異を、弱毒性または他の所望の表現型変化を生じさせるために本発明の組換え非分節型ネガティブ鎖 RNA ウイルス中に (この場合 HPIV 1 構築物中に) 組み込むことができることを示す。

【 図 1 】



【 圖 2 】

[illegible]

【 図 2 】

[illegible]

【 図 2 】

7401	AGGATCTCTCT	TGAGATCTCT	TTTTTCTCGG	GTAATACGTC	TGCTCTGGAA	CGAAGAAAGG
7501	ACAGCTACGCA	CGAGTGCTTT	TTTCTCCGGA	CAATCACTGA	CCAACTCTAT	CGTACGAAGT
7551	AACCTCTGCTC	AGAGAGAGCGC	AGATACACGA	TACGCTCTTG	CTAGTGTATCT	CGATGTATGAT
7621	CCACACTCTCT	AGAGACTCTCT	CAACACACCG	TACATCACTC	GCTCTGTATCA	CGTCTCTTAC
7651	ATGTGCTCTCT	CGAGCTGGCG	ATAATGCTTG	TTCTCTACGG	TGTGACATCA	CGGCTCTGCT
7701	CGGCTCTCTCT	CGAGCTGGCG	TTTCTCTGAC	CGGCTCTGAC	CGGCTCTGAC	CGGCTCTGAC
7811	CGAGACACGAC	CGACACGAC	TGACATCTCT	ACAGCGTCTG	CTATCTAGAA	CGGACACAGT
7861	TCCGAGAGAG	CGAGAGAGCG	ACAGACTCTG	GTTAGACAGC	AGGGTCTGAA	AGGCTCTGAC
7921	CGACAGAGAG	CTACAGAGCG	TCTTCTCTAC	ATGCTCTTAT	AGTCTCTGAC	GGTCTGCGCA
7971	CGGCTCTCTCT	CGGCTCTCTCT	TTTCTCTGAC	CGGCTCTGAC	CGGCTCTGAC	CGGCTCTGAC
8041	CGACACGAC	CGGCTCTCTT	TACGCTCTCT	GGCTCTTTGC	TGSCCTTTTG	CTCAATATGC
8101	TGCGACAGAT	T				

【 図 3 B 】



FIG. 3B

C.

5. **Intervening F708 mutation in HSPV 1**
 HSPV 1 P1708: (164) KTKGAGGQKQYVERHPY (180)
 HSPV 1 WT: (164) KTKGAGGQKQYVERHPY (180)
 HSPV 1 WT: (164) KTKGAGGQKQYVERHPY (180)
 HSPV 1 P1708: (164) KTKGAGGQKQYVERHPY (180)
 HSPV 1 P1708: (164) KTKGAGGQKQYVERHPY (180)

9. **Intervening F521L mutation in HSPV 1, (P4561 in HSPV3)**
 HSPV 1 P4561: (460) SGGFELTZEPQDDED (467)
 HSPV 1 P4561: (460) SGGFELTZEPQDDED (467)
 HSPV 1 WT: (460) SGGFELTZEPQDDED (467)
 HSPV 1 P4561: (460) SGGFELTZEPQDDED (467)
 HSPV 1 P4561: (460) SGGFELTZEPQDDED (467)

【手続補正書】
【提出日】平成18年2月13日(2006.2.13)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】

2007500017000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/018305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/86 A61K39/12 C12N7/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N 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, EMBASE, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/00883 A (AMERICAN CYANAMID COMPANY; PARKS, CHRISTOPHER, L; SIDHU, MOHINDERJIT,) 3 January 2002 (2002-01-03) * entire document, in particular the cited passages *claims 1,17,46-48 page 18, line 22 - page 19, line 22; examples 4.1,5 page 31, lines 21-26; example 4.1 page 32, lines 5-11 page 32, lines 13-25; example 3.1.4 page 33, lines 6-16 page 33, line 28 - page 34, line 7 ----- -/--	1-111, 176-226
<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 claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 July 2005		Date of mailing of the international search report 14. 11. 2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brenz Verca, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/018305

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/63064 A (AMERICAN CYANAMID COMPANY; PARKS, CHRISTOPHER, L; SIDHU, MOHINDERJIT,) 9 December 1999 (1999-12-09) claim 44 page 15, line 5 - page 17, line 6 page 21, line 22 - page 22, line 16	1-111, 176-226
X	DAS SUBASH C ET AL: "Improved technique for transient expression and negative strand virus rescue using fowlpox T7 recombinant virus in mammalian cells" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 89, no. 1-2, September 2000 (2000-09), pages 119-127, XP002334309 ISSN: 0166-0934 the whole document	1,2, 19-22, 24,25, 58,60, 62-64, 66, 68-72, 78-81, 83,84
A	HARTY RONALD N ET AL: "Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus" JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 513-517, XP009050017 ISSN: 1464-1801 the whole document	
A	MURPHY B R ET AL: "Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 110, no. 1, July 2002 (2002-07), pages 21-27, XP002982924 ISSN: 0021-9738 the whole document	
A	COLLINS P L ET AL: "Respiratory Syncytial Virus: Reverse Genetics and Vaccine Strategies" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 296, no. 2, 10 May 2002 (2002-05-10), pages 204-211, XP004467197 ISSN: 0042-6822 the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/018305

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SKIADOPOULOS M H ET AL: "GENERATION OF A PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 1 VACCINE CANDIDATE BY REPLACING THE HN AND F GLYCOPROTEINS OF THE LIVE-ATTENUATED PIV3 CP45 VACCINE VIRUS WITH THEIR PIV1 COUNTERPARTS" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 18, no. 5/6, 14 October 1999 (1999-10-14), pages 503-510, XP001000985 ISSN: 0264-410X the whole document</p>	
A	<p>SKIADAPOULOS M H ET AL: "A chimeric human-bovine parainfluenza virus type 3 expressing measles virus hemagglutinin is attenuated for replication but is still immunogenic in Rhesus monkeys" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 21, 2001, pages 10498-10504, XP002978184 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	
A	<p>ROBERTS A ET AL: "Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 3723-3732, XP002266675 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	
A	<p>WHITEHEAD S S ET AL: "A Single Nucleotide Substitution in the Transcription Start Signal of the M2 Gene of Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate cpts248/404 Is the Major Determinant of the Temperature-Sensitive and Attenuation Phenotypes" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 247, no. 2, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 232-239, XP004445741 ISSN: 0042-6822 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/018305**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

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

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

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

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

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

1-111, 176-226

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

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

Invention 1: claims 1-111, 176-226

Methods of producing an infectious non-segmented negative-stranded RNA virus of the Order Mononegavirales; compositions for producing an infectious non-segmented negative-stranded RNA virus of the Order Mononegavirales; methods of producing a growth- or replication-defective non-segmented negative-stranded RNA virus of the Order Mononegavirales; composition for producing a growth- or replication-defective non-segmented negative-stranded RNA virus of the Order Mononegavirales.

Inventions 2-94: claims 112-175, 227-229

Infectious non-segmented negative-stranded RNA virus of the order Mononegavirales; immunogenic composition comprising said virus; method of stimulating the immune system of a mammalian comprising the administration of said virus, where each invention encompasses a different virus according to the following list :

Invention 2: Measles Virus in example IV and IX

Inventions 3-6: Parainfluenza Viruses (PIV) of table 5 in example V

Inventions 7-56: Respiratory Syncytial Viruses (RSV) of table 6 in example VIII

invention 57: Canine Distemper Virus (Onderstepoort strain) of table 7 in example IX

invention 58: Mumps Virus (Jeryl Lynn strain) of table 7 in example IX

invention 59: Respiratory syncytial virus rA2cp

deltaSH/M2-404/L248-404 of table 7 in example IX

invention 60: Bovine PIV (Shipping Fever strain) of table 7 in example IX

Inventions 61-64: chimeric bovine-human PIV of table 7 in example IX

Inventions 65-80: Vesicular Stomatitis Viruses (VSV) of table 8 in example IX

Inventions 81-84: VSV comprising gag constructs of table 9 in example IX

Inventions 85-87: h/bPIV of table 9 in example IX

Inventions 88-93: VSV expressing influenza virus glycoproteins of table 9 in example IX

Invention 94: bPIV expressing corona virus glycoprotein of table 9 in example IX

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ation on patent family members

International Application No
PCT/US2004/018305

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200883	A	03-01-2002	AU 7142301 A	08-01-2002
			BR 0112384 A	23-09-2003
			CA 2412621 A1	03-01-2002
			CN 1455816 A	12-11-2003
			EP 1303613 A2	23-04-2003
			JP 2004501646 T	22-01-2004
			MX PA02012404 A	25-04-2003
WO 9963064	A	09-12-1999	AU 761234 B2	29-05-2003
			AU 4414499 A	20-12-1999
			BR 9910929 A	20-02-2001
			CA 2333313 A1	09-12-1999
			CN 1303426 A	11-07-2001
			EP 1090108 A1	11-04-2001
			JP 2002517189 T	18-06-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/205 (2006.01)	A 6 1 K 39/205	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クリストファー・エル・パークス

アメリカ合衆国 0 7 0 0 5 - 2 3 1 0 ニュージャージー州ブーントン、サウス・テラス 1 1 8 番

(72) 発明者 スティーブン・エイ・ウデム

アメリカ合衆国 1 0 0 2 3 - 4 4 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、アパートメント 6 エフノジー、ウエスト・7 0 ストリート 1 5 5 番

(72) 発明者 モディンデルジット・エス・シドウ

アメリカ合衆国 1 0 9 5 6 - 5 4 2 6 ニューヨーク州ニュー・シティ、ローウェル・ドライブ 3 5 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11

4B065 AA95X AA95Y AB04 AB06 BA02 BA24 CA45

4C085 AA03 BA51 BA57 BA64 CC01 CC08 DD01 DD62 GG10

【要約の続き】

び組成物、並びにその組換えウイルスを用いた免疫原性組成物および方法がある。更なる実施形態では、本発明方法および組成物は増殖欠損または複製欠損非分節型ネガティブ鎖 RNA ウィルスおよびサブウィルス粒子が生成されるために用いられる。