

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-515218

(P2004-515218A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 B O 6 5
C 1 2 N 7/00	C 1 2 N 7/00	4 C O 8 5
C 1 2 N 7/02	C 1 2 N 7/02	
C 1 2 N 7/04	C 1 2 N 7/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 286 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-505815 (P2002-505815)	(71) 出願人	300008988
(86) (22) 出願日	平成13年6月22日 (2001.6.22)		アメリカ合衆国
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月24日 (2002.12.24)		アメリカ合衆国 メリーランド 2085
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020107		2-3804, ロックビル, エグゼキュー
(87) 国際公開番号	W02002/000693		ティブ プールバード 6011, スイー
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)		ト 325, オフィス オブ テクノロジ
(31) 優先権主張番号	60/213,708		ー トランスファー, ナショナル インス
(32) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		ティチューツ オブ ヘルス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 プロモータへ隣接する遺伝子から保護抗原を発現する呼吸器系合胞体ウイルスワクチン

(57) 【要約】

組み換えウイルスのゲノム又はアンチゲノム内にて変位される遺伝子の位置を有す、組換え呼吸器系合胞体ウイルス (H R S V) が、ヒト及び他の哺乳動物において、感染性を有し且つ弱毒化される。遺伝子の変位した (s h i f t) R S V が、組換えゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子又はゲノム分節を挿入、欠失、又は再配列することにより構成され、そして抗 R S V 免疫応答を誘発するためのワクチンを生成する際にも有益である。更に提供されるものは、単離されたポリヌクレオチド分子、及びベクターを組み込みした組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムであり、この場合前記遺伝子又は遺伝子分節が、R S V 遺伝子地図中の野生型遺伝子の位置と比較してゲノム又はアンチゲノム内による有意的にプロモータへ隣接か、又はプロモータへ遠位な位置に変位される。この方法において遺伝子位置を変位することは、位置を変位させる性質又は変位の程度により、遺伝子発現の選択的な増大又は減少を提供する。1例において、R S V 糖タンパク質が、1又は複数の糖タンパク質コードする遺伝子を有意的にプロモータ隣接位置に変位させることにより上限調節される。遺伝子位置を変位した R S V を生成するための関心のある遺伝子には、N S 1、N S 2、N、S H、M 2 (O R F 1)、M 2 (O R F 2)、L、F 又は G 遺伝子、又は遺伝の一部又は遺伝子外領域であるゲノム分節が含まれる。望ましい表現型及び構造的効果を得るために、種々の付加的な突然変異、及びヌクレオチドの修飾が、本発明の遺伝子位置を変位した R S V 内にて提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

主要なヌクレオキャプシド（N）タンパク質、ヌクレオキャプシドリン酸タンパク質（P）、大型ポリメラーゼタンパク質（L）、RNAポリメラーゼ伸長因子、及び一部又は完全な組換えRSVゲノムまたはアンチゲノムを含んで成り、前記一部又は完全な組換えRSVゲノムまたはアンチゲノムが、野生型RSVゲノム又はアンチゲノム内の前記RSV遺伝子又はゲノム分節の位置に対してプロモータへ有意的に隣接するか、又はプロモータへ遠位の位置に、位置的に変位される前記組換え型ゲノム又はアンチゲノム内に、1又は複数の変位されたRSV遺伝子又はゲノム分節を有する、単離された感染性呼吸器合胞体ウイルス（RSV）。

10

【請求項 2】

前記一部又は完全な組換え型RSVゲノム又はアンチゲノム内の1又は複数の置換ポリヌクレオチドの欠失又は挿入により、前記1又は複数の変位された遺伝子又はゲノム分節を、プロモータへ有意的に隣接する位置、又はプロモータへ遠位の位置に変位される請求項1記載の単離された感染性組換えRSV。

【請求項 3】

前記置換ポリヌクレオチドが、ゲノム又はアンチゲノムの非コード領域（NCR）に挿入されるか、又は別々の遺伝子単位（GU）として存在する150ヌクレオチド（nts）と4000ヌクレオチド間の長さの1又は複数のポリヌクレオチド挿入部を含んで成り、前記ポリヌクレオチド挿入部が、完全なオープンリーディングフレーム（ORF）を欠損し、そして前記組換え型RSVにおける弱毒化表現型を特定する請求項2記載の単離された感染性組換えRSV。

20

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチド挿入部が、1又は複数のRSV遺伝子又はゲノム分節を含んで成る請求項3記載の単離された感染性組換えRSV。

【請求項 5】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSVのNS1、NS2、N、P、M、M2（ORF1）、M2（ORF2）、L、F及びG遺伝子及びゲノム分節から選択される1又は複数のRSV遺伝子又はゲノム分節、及び前記RSVゲノムの先導部、尾部及び遺伝子間領域、及びその分節を含んで成る請求項2記載の単離された感染性組換えRSV。

30

【請求項 6】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSVのNS1、NS2、N、P、M、SH、M2（ORF1）、M2（ORF2）、L、F及びG遺伝子又はゲノム分節から選択される1又は複数のウシRSV（BRSV）又はヒトRSV（HRSV）遺伝子又はゲノム分節、及び前記RSVゲノム及びその分節の先導部、尾部及び遺伝子間領域を含んで成る請求項2記載の単離された感染性組換えRSV。

【請求項 7】

野生型RSVゲノム又はアンチゲノム内の前記RSV遺伝子又はゲノム分節の位置に対してプロモータへ有意的に隣接する位置に、前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の前記1又は複数の変位されたRSV遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させる組換えRSVゲノム又はアンチゲノムを形成するために、前記置換ポリヌクレオチドを欠失させる請求項6記載の単離された感染性組換えRSV。

40

【請求項 8】

組換えRSVゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失された前記置換ポリヌクレオチドが、1又は複数のRSVのNS1、NS2、SH、M2（ORF2）、又はG遺伝子又はそのゲノム分節を含んで成る請求項7記載の単離された感染性組換えRSV。

【請求項 9】

RSVのNS1遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項8記載の単離された感染性組換えRSV。

【請求項 10】

50

R S V の N S 2 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 1】

R S V の S H 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 2】

R S V の M 2 (O R F 2) を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 3】

R S V の G 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。 10

【請求項 1 4】

R S V の F 及び G 遺伝子の両方が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 5】

R S V の N S 1 及び N S 2 遺伝子の両方が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 6】

R S V の S H 及び N S 2 遺伝子の両方が組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。 20

【請求項 1 7】

R S V の S H, N S 1 及び N S 2 遺伝子が全て組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 8】

R S V オープンリーディングフレームの開始又は終了点、又は R S V ゲノムの 3 ' 先導部、又は 5 ' 尾部において、前記置換ポリヌクレオチドが、非翻訳配列内の 1 又は複数の欠失を含んで成る請求項 7 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 9】

前記置換ポリヌクレオチドが、1 部遺伝子の欠失を含んで成る請求項 1 8 記載の単離された感染性組換え R S V。 30

【請求項 2 0】

前記遺伝子の 1 部欠失が、S H 遺伝子の 1 部欠失である請求項 1 9 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 2 1】

前記 S H 遺伝子の 1 部欠失が、S H 下流の非翻訳領域内の欠失を含んで成る請求項 2 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 2 2】

組換え R S V アンチゲノムの位置 4 4 9 9 - 4 6 1 0 における 1 1 2 ヌクレオチドの欠失を有する R S V 6 1 2 0 である請求項 2 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 2 3】

前記置換ポリヌクレオチドが、R S V 遺伝子下流の非翻訳配列の 1 又は複数の領域から選択される請求項 7 記載の単離された感染性組換え R S V。 40

【請求項 2 4】

前記下流の非翻訳配列が、N S 1 (位置 5 1 9 - 5 6 3) より、N S 2 (位置 1 0 0 3 - 1 0 8 6)、P (位置 3 0 7 3 - 3 2 3 0)、M (位置 4 0 3 3 - 4 1 9 7)、F (位置 7 3 8 7 - 7 5 3 9) 及び／又は M 2 (位置 8 4 3 3 - 8 4 9 0) 遺伝子である請求項 2 3 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 2 5】

前記置換ポリヌクレオチドが、R S V 遺伝子上流の非翻訳配列の 1 又は複数の領域から選択される請求項 7 記載の単離された感染性組換え R S V。 50

【請求項 26】

前記 1 又は複数の上流の非翻訳配列が、NS1（位置 55－96）、NS2（位置 606－624）、及び／又は SH（位置 4231－4300）である請求項 25 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 27】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSV の G 遺伝子の 4683 から 4685 のヌクレオチドの欠失を含んで成る請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 28】

前記置換ポリヌクレオチドが、1 又は複数の RSV 遺伝子間配列から選択される請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

10

【請求項 29】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSV の 5' 尾部領域内のヌクレオチドから選択される請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 30】

L 遺伝子のすぐ後に続く 5' 尾部領域の部分では、完全な 5' ゲノム末端を残して、75 ヌクレオチド、100 ヌクレオチド、125 ヌクレオチド又はそれ以上のサイズを減少させる請求項 29 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 31】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSV の 3' の先導部領域内のポリヌクレオチドから選択される請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

20

【請求項 32】

3' 先導部から最初の 11 ヌクレオチド内に配置されたウイルスプロモータの中核部分を除く 3' 尾部領域の 1 部分が、欠失される請求項 31 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 33】

RSV の NS1、NS2、SH、F 及び／又は M2 遺伝子を 1 又は任意の組み合わせから 1 部又は完全な欠失が、ゲノム長 1－806 間のヌクレオチドにおいて調節可能な減少を得ることのできる請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 34】

1 又は任意に組み合わせた RSV 遺伝子間領域を 1 部又は完全に欠失した遺伝子が、ゲノム長 1－198 間のヌクレオチドにおいて、調節可能な減少を得ることのできる請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

30

【請求項 35】

1 又は任意に組み合わせた RSV 遺伝子間領域の 1 部又は完全に欠失した遺伝子が、ゲノム長 1－198 間のヌクレオチドにおいて、調節可能な減少を得ることのできる請求項 7 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 36】

前記置換ポリヌクレオチドが、野生型 RSV ゲノム又はアンチゲノム内の前記 RSV 遺伝子又はゲノム分節の位置に対してプロモータへ有意的に隣接する位置に、又はプロモータへ遠位な位置に、前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の前記 1 又は複数の変位された RSV 遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させる組換え RSV ゲノム又はアンチゲノム内にて、付加、置換、又は再配列される請求項 6 記載の単離された感染性組換え RSV。

40

【請求項 37】

組換え RSV ゲノム又はアンチゲノム内にて付加、置換、又は再配列された前記置換ポリヌクレオチドが、1 つ又は複数の RSV の NS1、NS2、SH、M2（ORF2）、F、及び／又は G 遺伝子又はそのゲノム分節を含んで成る請求項 36 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 38】

前記置換ポリヌクレオチドが、1 又は複数の RSV 糖タンパク質又は免疫原ドメイン又はそのエピトープをコードする 1 又は複数の RSV 遺伝子又はゲノム分節を含んで成る請求

50

項 3 6 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 3 9】

前記置換ポリヌクレオチドが、R S V の F、G 及び／又は S H 糖タンパク質、又は免疫遺伝子ドメイン又はそのエピトープをコードする遺伝子又はゲノム分節から選択される請求項 3 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 0】

R S V の F、G 及び S H の 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子又はゲノム分節が、前記 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する位置に、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内に付加、置換、又は再配列される請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

10

【請求項 4 1】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、G の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 2】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G を、R S V ゲノム又はアンチゲノム内遺伝子順位の位置 1 に変位する請求項 4 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 3】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、F の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

20

【請求項 4 4】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F を、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内遺伝子順位の位置 1 に変位する請求項 4 3 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 5】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F が、G 及び F の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 6】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G を、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内遺伝子順位の位置 1 に、そして前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F を、その遺伝子順位の位置 2 に変位する請求項 4 5 記載の単離された感染性組換え R S V。

30

【請求項 4 7】

組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムにおいて、1 又は複数の R S V の N S 1、N S 2、S H、M 2 (O R F 2) 又は G 遺伝子又はそのゲノム分節が、欠失される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 8】

R S V の N S 1 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 4 9】

R S V の N S 2 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

40

【請求項 5 0】

R S V の S H 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 1】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、G の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内に、再配列される請求項 5 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 2】

50

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内に、
遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 5 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 3】

G 1 / Δ S H である請求項 5 2 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 4】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、F の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータ
へ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に対して、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲ
ノム内にて再配列される請求項 5 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 5】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて 10
遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 5 4 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 6】

F 1 / Δ S H である請求項 5 5 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 7】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F の両方が、G 及び F の野生型遺伝子順位の位置と
比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に前記組換え型 R S V ゲノム又
はアンチゲノム内にて、再配列される請求項 5 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 8】

前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が
、遺伝子順位の位置 1 に、且つ前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、遺伝子順位の位置 2 20
に変位される請求項 5 7 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 5 9】

G 1 F 2 / Δ S H である請求項 5 8 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 0】

前記 R S V の S H 及び N S 2 遺伝子の両方が、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノ
ムを形成するために欠失される、請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 1】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F の両方が、G 及び F の野生型遺伝子順位の位置と
比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に前記組換え型 R S V ゲノム又
はアンチゲノム内にて、再配列される請求項 6 0 記載の単離された感染性組換え R S V。 30

【請求項 6 2】

前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が
、遺伝子順位の位置 1 に、且つ前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、遺伝子順位の位置 2
に変位される請求項 6 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 3】

G 1 F 2 / Δ N S 2 Δ S H である請求項 6 2 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 4】

R S V の S H, S H, N S 1 及び N S 2 遺伝子が、前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチ
ゲノムを形成するために全て欠失される、請求項 4 0 記載の単離された感染性組換え R S
V。 40

【請求項 6 5】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F の両方が、G 及び F の野生型遺伝子順位の位置と
比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に前記組換え型 R S V ゲノム又
はアンチゲノム内にて、再配列される請求項 6 4 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 6】

前記組換え型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が
、遺伝子順位の位置 1 に、そして前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、遺伝子順位の位置
2 に変位される請求項 6 5 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 6 7】

G 1 F 2 / Δ N S 2 Δ N S 2 Δ S H である請求項 6 6 記載の単離された感染性組換え R S 50

V。

【請求項 68】

ヒト子牛キメラ R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために、1又は複数の不均一遺伝子又は相違する R S V からのゲノム分節により結合された一部又は完全なヒト R S V (H R S V)、又は牛 R S V (B R S V)を背景とするゲノム又はアンチゲノムを含んで成る請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 69】

一部又は完全な H R S V、又は B R S Vを背景とするゲノム又はアンチゲノム内の同等の遺伝子又はゲノム分節に野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する位置か、又はプロモータへ遠位の位置に、不均一遺伝子又はゲノム分節が付加されるか、又は置換される請求項 68 記載の単離された感染性組換え R S V。 10

【請求項 70】

一部ウシ R S Vを背景とするゲノム又はアンチゲノムにおいて、野生型遺伝子の 7 と 8 の位置にそれぞれ欠失される同等の G 及び F 糖タンパク質遺伝子に置き換えるために、ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 G と F の両方が、遺伝子順位の位置 1 と 2 にそれぞれ置換される請求項 69 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 71】

r B R S V / A 2 - G 1 F 2 である請求項 70 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 72】

N S 1, N S 2, F, G, S H 及び M から選択される 1 又は複数のヒト R S V の非構造的、及び / 又はエンベロープ関連遺伝子が、一部又は完全なウシ R S V 背景のゲノム又はアンチゲノム内に付加、又は置換される請求項 69 記載の単離された感染性組換え R S V。 20

【請求項 73】

F, G, S H 及び M から選択される 1 又は複数のヒト R S V エンベロープ関連遺伝子が、F, G, S H 及び M から選択される 1 又は複数のヒト R S V エンベロープ関連遺伝子が欠失される一部ウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノム内にて、付加、又は置換される請求項 69 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 74】

ヒト R S V エンベロープ関連遺伝子 F, G 及び M が、エンベロープ関連遺伝子 F, G 及び M の全てが欠失される、一部ウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノム内に、付加される請求項 73 記載の単離された感染性組換え R S V。 30

【請求項 75】

r B R S V / A 2 - M G F である請求項 74 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 76】

ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 G と F の両方が、一部ウシ R S V を背景としたゲノム又はアンチゲノムにおいて、それぞれ野生型の位置 7 と 8 にて欠失される同等の G 及び F 糖タンパク質遺伝子を置き換えるために、遺伝子順位の位置 3 と 4 にそれぞれ置換される請求項 69 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 77】

r B R S V / A 2 - G 3 F 4 である請求項 76 記載の単離された感染性組換え R S V。 40

【請求項 78】

ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 G と F の両方が、野生型の位置 7 と 8 にてそれぞれ欠失された同等の G 及び F 糖タンパク質遺伝子を置き換えるために、遺伝子順位の位置 1 と 2 にてそれぞれ置換され、そして前記 R S V 遺伝子 N S 1 及び N S 2 が、一部ウシ R S V を背景としたゲノム又はアンチゲノムにおいて、これらウシの同等の遺伝子として、置換される請求項 69 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 79】

r B R S V / A 2 - G 1 F 2 N S 3 N S 4 である請求項 78 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 80】

R S V の M 2 (O R F 1) を、組換えウイルスの転写を上限調節するために、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内においてプロモータへ有意的に隣接する位置に変位する請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 1】

組み込みゲノム又はアンチゲノムが、1 パネルの変異ヒト R S V 菌株内に存在する変異体の弱毒化する少なくとも 1 つ及び全部の補体を組み込み、前記パネルが、c p t s R S V 2 4 8 (A T C C V R 2 4 5 0) , c p t s R S V 2 4 8 / 4 0 4 (A T C C V R 2 4 5 4) , c p t s R S V 2 4 8 / 9 5 5 (A T C C V R 2 4 5 3) , c p t s R S V 5 3 0 (A T C C V R 2 4 5 2) , c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 0 9 (A T C C V R 2 4 5 1) , c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 3 0 (A T C C V R 2 4 5 5) , R S V B - 1 c p 5 2 / 2 B 5 (A T C C V R 2 5 4 2) , 及び R S V B - 1 c p - 2 3 (A T C C V R 2 5 7 9) を含んで成る請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 2】

前記組換えゲノム又はアンチゲノムが、異なる変異体 R S V 菌株から採用された弱毒変異体を組み込む請求項 8 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 3】

前記組換えゲノム又はアンチゲノムが、R S V の N 遺伝子の V a l 2 6 7、R S V の F 遺伝子の G l u 2 1 8 及び／又は T h r 5 2 3、R S V ポリメラーゼ遺伝子 L の A s n 4 3、C y s 3 1 9、P h e 5 2 1、G l n 8 3 1、M e t 1 1 6 9、T y r 1 3 2 1 及び／又は H i s 1 6 9 0 にてアミノ酸の置換、び遺伝子 M 2 遺伝子の開始配列におけるヌクレオチド置換を特定する弱毒化変異体の少なくとも 1 つ、又は最大限として十分な補体を組み込む請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 4】

組換えゲノム又はアンチゲノムが、少なくとも 2 の弱毒化変異体を組み込む請求項 8 3 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 5】

組換えゲノム又はアンチゲノムが、変異体に特異性のあるコドンにおける複数のヌクレオチドの変化によって安定化する少なくとも 1 つの弱毒化変異体を含んで成る請求項 8 3 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 6】

さらに組換えゲノム又はアンチゲノムが、弱毒性、温度感受性、低温適応性、プラークサイズ、宿主の範囲制限 (h o s t - r a n g e r e s t r i c t i o n) を特徴とする増殖の変化、又は免疫原性の変化から選択される表現型の変化を特定するヌクレオチド修飾を含んで成る請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 7】

ヌクレオチドの修飾が、組換えウイルスの S H、N S 1、N S 2、M 2 O R F 2、又は G 遺伝子を変化させる請求項 8 6 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 8】

遺伝子のオープンリーディングフレームにおける 1 又は複数のコドンを導入することによって、組換えウイルスの S H、N S 1、N S 2、M 2 の O R F 2、又は G 遺伝子が、全体的、又は 1 部が欠失された、又は前記遺伝子の発現が除去される請求項 8 7 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 8 9】

前記遺伝子修飾が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の選択された遺伝子のシス作用調節配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、置換、追加、又は再配列を含んで成る請求項 8 6 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 0】

N S 1 又は N S 2 遺伝子の遺伝子末端 (G E) シグナルが修飾される請求項 8 9 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 1】

ヌクレオチドの修飾は、R S V ゲノム又はアンチゲノム内の翻訳開始部位の挿入、欠失、又は再配列を含んで成る請求項 8 9 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 2】

R S V G 糖タンパク質の選択された形状の転写開始部位が除去される請求項 9 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 3】

哺乳動物の宿主内の前記病原体に対する保護としての免疫応答を惹起することのできる、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限酵素部位マーカ、又は微生物病原体のタンパク質から選択される非 R S V 分子をコードするために、組換えゲノム又はアンチゲノムが修飾される請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。 10

【請求項 9 4】

パラインフルエンザウイルス (P I V) から 1 又は複数の遺伝子、及び／又はゲノム分節を組み込む請求項 9 3 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 5】

前記組換えゲノム又はアンチゲノムが、HN又はF糖タンパク質、又はP I V 1, P I V 2 又はP I V 3 のHN又はFのエクトドメイン又は免疫原エピトープをコードする請求項 9 4 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 6】

ウイルスである請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。 20

【請求項 9 7】

サブウイルス粒子である請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 8】

前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内に追加されるか、又はその非コード領域から欠失される請求項 2 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 9 9】

組換えゲノム又はアンチゲノムが、ヒト R S V のサブグループ A とサブグループ B の一方又は両方から抗原決定基を組み込む請求項 1 記載の単離された感染性組換え R S V。

【請求項 1 0 0】

生理学的に受け入れ可能な担体により結合された請求項 1 記載の組換え R S V の免疫学的に十分な量を個体に投与することを含めて R S V に対する保護を誘発するための個体の免疫系を刺激するための方法。 30

【請求項 1 0 1】

前記組換え R S V が、 10^3 から 10^6 P F U の用量にて投与される請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記組換え R S V が、気道上部に投与される請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記組換え R S V が、噴霧 (s p r a y)、小滴、エアロゾルにより投与される請求項 1 0 0 記載の方法。 40

【請求項 1 0 4】

前記組換え R S V が、R S V に対する抗体として血清陰性の個体に、あるいは R S V に対する胎盤通過に必要な母性への抗体を所有するために投与される請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記組換え R S V が、ヒト R S V A か R S V B のいずれかに免疫応答を誘発する請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記組換え R S V が、ヒト R S V A と R S V B の両方に免疫応答を誘発する請求項 1 0 0 記載の方法。 50

【請求項 107】

前記組換え RSV が、ヒト RSV A か RSV B のいずれかに免疫応答を誘発し、そしてヒト RSV A かあるいは RSV B に免疫応答を誘発できる第 2 の弱毒化 RSV の免疫学的に十分な量により、併用投与されることにより、免疫応答が、ヒト RSV A と RSV B の両方に対して誘発される請求項 100 記載の方法。

【請求項 108】

前記組換え RSV 及び第 2 の弱毒化 RSV が、混合して同時に投与される請求項 107 記載の方法。

【請求項 109】

生理的に受け入れ可能な担体において、請求項 1 の組換え RSV の免疫学的に十分な量を含む RSV に対する免疫応答を誘発する免疫原組成物。 10

【請求項 110】

10^3 から 10^6 PFU の容量にて形成される請求項 109 記載の方法。

【請求項 111】

前記組換え RSV が、噴霧 (spray)、小滴、エアロゾルにより気道上部に投与するために処方される請求項 109 記載の免疫原組成物。

【請求項 112】

前記組換え RSV が、ヒト RSV A か RSV B のいずれかに、又はヒト RSV A と RSV B の両方に対して免疫応答を誘発する請求項 109 記載の免疫原組成物。

【請求項 113】

前記組換えゲノム又はアンチゲノムが、1 又は複数の異種病原体の 1 又は複数の抗原決定基をコードする 1 又は複数の異種遺伝子又はゲノム分節により結合した 1 部又は完全な RSV ベクターゲノム又はアンチゲノムを含んで成る請求項 1 記載の単離された感染性組換え RSV。 20

【請求項 114】

前記 1 又は複数の異種病原体が、異種 RSV であり、そして前記異種遺伝子又はゲノム文節が、1 又は複数の RSV の NS1、NS2、N、P、SH、M2 (ORF1)、M2 (ORF2)、L、F 又は G タンパク質又はその断片をコードする請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 115】

前記ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な RSV A ゲノム又はアンチゲノムであり、そして抗原決定基をコードする異種遺伝子又はゲノム分節が、RSV B サブグループウイルスのものである請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。 30

【請求項 116】

キメラゲノム又はアンチゲノムが、弱毒化を特定する BRSV の 1 又は複数の遺伝子又はゲノム分節を組み込む請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 117】

1 又は複数の HN 及び／又は F 糖タンパク質、又抗原ドメイン、断片又はそのエピトープをコードする前記 1 又は複数の HPIV1、HPIV2 又は HPIV3 遺伝子、又はゲノム文節が、1 部又は完全な HRSV ベクターのゲノム又はアンチゲノム内に付加されるか、又は組み込まれている請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。 40

【請求項 118】

前記ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な BRSV ゲノム又はアンチゲノムであり、そして抗原決定基をコードする異種遺伝子又はゲノム分節が 1 又は複数の HRSV (s) からである請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 119】

前記 1 部又は完全な BRSV ゲノム又はアンチゲノムが、F、G 及び SH から選択される 1 又は複数の HRSV 糖タンパク質遺伝子をコードする遺伝子又はゲノム分節 (segment)、あるいは細胞形質ドメイン、貫通膜ドメイン、エクトドメイン、又は免疫原エピトープ部位をコードする HRSV の F、G 及び／又は SH の 1 又は複数のゲノムセグメ 50

ントを組み込む請求項 118 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 120】

前記ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な HRSV 又は BRSV ゲノムまたはアンチゲノムであり、そして前記異種病原体が、麻疹ウイルス (measles virus)、サブグループ A 及びサブグループ B の呼吸器合胞ウイルス、ムンプスウイルス (mumps)、ヒト乳頭腫ウイルス、1 型と 2 型のヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ラビーウイルス、エプステイン・バーウイルス (Epstein Barr Virus)、フィロウイルス (filoviruses)、ブンヤウイルス (bunyaviruses)、フラビウイルス (flaviviruses)、アルファウイルス (alphaviruses)、及びインフルエンザウイルスから選択される請求項 113 記載の単離された感染性組換え RSV。 10

【請求項 121】

前記 1 又は複数の異種抗原決定基が、麻疹ウイルス (measles virus) HA 及び F タンパク質、サブグループ A 又はサブグループ B の呼吸器合胞ウイルス F, G, SH 及び M2 タンパク質、ムンプスウイルス (mumps) NH 及び F タンパク質、ヒト乳頭腫ウイルス L1 タンパク質、1 型と 2 型のヒト免疫不全ウイルスの gp160 タンパク質、単純ヘルペスウイルス及びサイトメガロウイルスの gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, 及び gM タンパク質、ラビーウイルス G タンパク質、エプステイン・バーウイルス (Epstein Barr Virus) の gp350 タンパク質、フィロウイルス (filoviruses) G タンパク質、ブンヤウイルス (bunyaviruses) G タンパク質、フラビウイルス (flaviviruses) の E 及び NS1 タンパク質、及びアルファウイルス (alphaviruses) E タンパク質、及び抗原ドメイン、断片及びそのエピトープから選択される請求項 120 記載の単離された感染性組換え RSV。 20

【請求項 122】

前記異種病原体が、麻疹ウイルス (measles virus) であり、そして異種抗原決定基が、麻疹ウイルス (measles virus) HA 及び F タンパク質及び抗原ドメイン、断片及びそのエピトープから選択される請求項 121 記載の単離された感染性組換え RSV。

【請求項 123】

前記麻疹ウイルス (measles virus) HA 遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) を含む転写単位が、HRSV ベクターゲノム又はアンチゲノム内に付加されるか、又は組み込まれている請求項 121 記載の単離された感染性組換え RSV。 30

【請求項 124】

野生型 RSV ゲノムまたはアンチゲノム内に前記 RSV 遺伝子又はゲノムセグメントの位置に対してプロモータへ有意的に隣接する位置又はプロモータへ遠位な位置に、位置的に変位される前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の 1 又は複数の変位された RSV 遺伝子又はゲノムを有する組換え RSV ゲノム又はアンチゲノムを含む単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 125】

前記 1 又は複数の転座遺伝子又はゲノム分節が、前記 1 部又は完全な組み換え RSV ゲノム又はアンチゲノム内により 1 又は複数の置換ポリヌクレオチドの挿入又は欠失により有意的にプロモータへ隣接する位置に変位される請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 40

【請求項 126】

前記置換ポリヌクレオチドが、ゲノム又はアンチゲノムの非コード領域 (NCR) に、又は別々の遺伝子単位 (GU) として挿入される長さが 150 ヌクレオチド (nts) と 4,000 ヌクレオチドの間の 1 又は複数のポリヌクレオチドの挿入を含み、前記ポリヌクレオチドの挿入には、完全なオープンリーディングフレーム (ORF) を欠損し、前記組換え RSV の弱毒化表現型を特定する請求項 125 記載の単離されたポリヌクレオチド分子 50

。

【請求項 1 2 7】

前記ポリヌクレオチドの挿入体は、1 又は複数の R S V 遺伝子又はゲノム分節を含んで成る請求項 1 2 6 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 2 8】

前記置換ポリヌクレオチドが、R S V の N S 1、N S 2、N、P、M、S H、M 2 (O R F 1)、M 2 (O R F 2)、L、F、及び G 遺伝子又はゲノム分節あるいは、R S V ゲノム又はその分節の先導部、尾部及び遺伝子間領域から選択される 1 又は複数のウシ R S V (B R S V) 又はヒト R S V (H R S V) 遺伝子又はゲノム分節を含んで成る請求項 1 2 7 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 1 2 9】

野生型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて前記 R S V 遺伝子又はゲノム分節の位置に対して有意的なプロモータ隣接位置に、前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の前記 1 又は複数の変位された R S V 遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させる組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために、前記置換ポリヌクレオチドが欠失される請求項 1 2 8 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 0】

組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される前記置換ポリヌクレオチドが、1 又は複数の R S V の N S 1、N S 2、S H、M 2 (O R F 2)、又は G 遺伝子又はそのゲノム分節を含んで成る請求項 1 2 9 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

20

【請求項 1 3 1】

R S V の N S 1 遺伝子を含む前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 2】

R S V の N S 2 遺伝子を含む前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 3】

R S V の S H 遺伝子を含む前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

30

。

【請求項 1 3 4】

R S V の M 2 (O R F 2) 遺伝子を含む前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 5】

R S V の G 遺伝子を含む前記置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 6】

R S V の F 及び G 遺伝子が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために共に欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

40

【請求項 1 3 7】

R S V の N S 1 及び N S 2 遺伝子が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために共に欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 8】

R S V の S H 及び N S 2 遺伝子が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために共に欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 3 9】

R S V の S H、N S 1 及び N S 2 遺伝子が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成

50

するために全て欠失される請求項 1 3 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 0】

野生型 R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて前記 R S V 遺伝子又はゲノム分節の位置に対して有意的なプロモータ隣接位置に、又はプロモータへ遠位な位置に、前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の前記 1 又は複数の変位された R S V 遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させる組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、前記置換ポリヌクレオチドが付加、置換、再配列される請求項 1 2 8 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 1】

組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて付加、置換、又は再配列される前記置換ポリヌクレオチドが、1 又は複数の R S V の N S 1, N S 2, S H, M 2 (O R F 2)、F 及び／又は G 遺伝子又はそのゲノム分節を含んで成る請求項 1 4 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 10

【請求項 1 4 2】

前記置換ポリヌクレオチドが、1 又は複数の R S V の糖タンパク質又は免疫原ドメイン又はそのエピトープをコードする 1 又は複数の R S V 遺伝子又はゲノム分節を含んで成る請求項 1 4 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 3】

前記置換ポリヌクレオチドが、R S V の F, G 及び／又は S H の糖タンパク質、又は免疫原ドメイン又はそのエピトープをコードする遺伝子又はゲノム分節から選択される請求項 1 4 1 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 20

【請求項 1 4 4】

F, G 及び S H から選択される 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子が、前記 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子における野生型遺伝子順位の位置と比較して有意的にプロモータへ隣接する位置に、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて付加、置換又は再配列される請求項 1 4 3 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 5】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、G の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 6】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 1 4 5 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 30

【請求項 1 4 7】

前記糖タンパク質遺伝子 F が、F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 8】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 1 4 7 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4 9】

前記糖タンパク質遺伝子 G 及び F が共に、G 及び F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 40

【請求項 1 5 0】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 1 に変位され、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 2 に変位される請求項 1 4 9 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 1】

1 又は複数の R S V の N S 1, N S 2, S H, M 2 (O R F 2)、又は G 遺伝子又はその 50

ゲノム分節が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムにおいて欠失される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 2】

R S V の N S 1 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 3】

R S V の N S 2 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 4】

R S V の S H 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 10

【請求項 1 5 5】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、G の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 5 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 6】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 1 5 5 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 7】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 5 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 20

【請求項 1 5 8】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて遺伝子順位の位置 1 に変位される請求項 1 5 7 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 5 9】

F 1 / Δ S H である請求項 1 5 8 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 0】

前記糖タンパク質遺伝子 G 及び F が共に、G 及び F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 5 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 30

【請求項 1 6 1】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 1 に変位され、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 2 に変位される請求項 1 6 0 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 2】

R S V の S H 及び N S 2 遺伝子の両方が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失される請求項 1 4 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 3】

前記糖タンパク質遺伝子 G 及び F が共に、G 及び F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 6 2 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 40

【請求項 1 6 4】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 1 に変位され、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 2 に変位される請求項 1 6 3 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 5】

R S V の S H, N S 1 及び N S 2 遺伝子が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成 50

するために全て欠失される請求項 1 6 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 6】

前記糖タンパク質遺伝子 G 及び F が共に、G 及び F の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する遺伝子配列の位置に対して、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される請求項 1 6 5 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 7】

前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 1 に変位され、前記 R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位の位置 2 に変位される請求項 1 6 6 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 1 6 8】

前記組換えゲノム又はアンチゲノムが、ヒト・ウシ・キメラゲノム又はアンチゲノムを形成するために、異なる R S V から 1 又は複数の異種遺伝子及び／又はゲノム分節と結合する 1 部又は完全なヒト又はウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノムを含んで成る請求項 1 2 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6 9】

1 部ウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノムにおける F 及び G の糖タンパク質遺伝子の一方又は両方の等価物に置き換えるため、ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 F 及び G の一方又は両方が、置換される請求項 1 6 8 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 7 0】

1 部ウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノムにおける同等の F 及び G の糖タンパク質遺伝子に置き換えるため、ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 F 及び G が共に置換される請求項 1 6 9 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

20

【請求項 1 7 1】

1 部又は完全なウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノム内に同等の遺伝子又はゲノム分節の野生型遺伝子配列の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する位置にて、F、G 及び S H から選択される 1 又は複数のヒト R S V 糖タンパク質遺伝子が、付加又は置換される請求項 1 6 8 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 7 2】

1 部ウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノムにおいて、野生型位置 7 及び 8 にそれぞれ欠失される同等の G 及び F 糖タンパク質遺伝子を置き換えるために、ヒト R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F が共に置換される請求項 1 7 1 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

30

【請求項 1 7 3】

遺伝子の安定性を増大するため、又は組み換えウイルスの培養において弱毒化、反応の誘発性、又は増殖を変化させるために 1 部又は完全なウシを背景とするゲノム又はアンチゲノム内により、1 又は複数の付加的な異種遺伝子又はゲノム文節のヒトの R S V から付加又は又は置換によって、組換えゲノム又はアンチゲノムが、さらに修飾される請求項 1 2 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 7 4】

組み換えゲノム又はアンチゲノムが、ヒト R S V のサブグループ A とサブグループ B の両方から抗原決定基を組み込む請求項 1 2 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

40

【請求項 1 7 5】

組み換えゲノム又はアンチゲノムが、1 又は複数の弱毒化する変異化を組み込むことによりさらに修飾される請求項 1 2 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 7 6】

組み換えゲノム又はアンチゲノムが、増殖の特徴、弱毒化、温度感受性、低温適応性、プラークの大きさ、宿主範囲の制限の変化、又は免疫原性の変化から選択される表現型の変化を特定するヌクレオチド修飾を組み込むことによりさらに修飾される請求項 1 2 4 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

50

【請求項 177】

SH、S1、NS2、M2ORF2又はG遺伝子が修飾される請求項176記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 178】

上記SH、NS1、NS2、M2ORF2又はG遺伝子が、一部又は全体において欠失され、上記遺伝子の発現が、遺伝子のオープンリーディングフレームの1又は複数の停止コドンを導入することにより除去される請求項177記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 179】

ヌクレオチドの修飾が、組み換えゲノム又はアンチゲノム内の選択されるRSV遺伝子のシス作用調節配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、付加又は再配列を含んで成る請求項176記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 10

【請求項 180】

前記置換ポリヌクレオチドが、RSVのオープンリーディングフレームの開始部又は終了部における、又は遺伝子間領域に、又はRSVゲノムの3'先導部又は5'尾部における非翻訳配列内にて1又は複数の欠失を含んで成る請求項124記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 181】

前記置換ポリヌクレオチドが、完全か、1部欠失した遺伝子を含んで成る請求項180記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 20

【請求項 182】

一部欠失した前記遺伝子が、一部欠失したSH遺伝子である請求項181記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 183】

前記SH遺伝子の1部欠失が、SH下流の非翻訳領域内を欠失することを含んで成る請求項182記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 184】

組換えRSVアンチゲノムにおける位置4499-4610の112ヌクレオチドを欠失したRSV6120である請求項183記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 185】

前記置換ヌクレオチドが、RSV遺伝子下流の非翻訳配列の1又は複数の領域から選択される請求項124記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 30

【請求項 186】

前記下流の非翻訳配列は、NS1（位置519-563）、NS2（位置1003-1086）、P（位置3073-3230）、M（位置4033-4197）、F（位置7387-7539）、及び／又はM2（位置8433-8490）遺伝子からである請求項185記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 187】

前記置換ヌクレオチドが、RSV遺伝子上流の非翻訳配列の1又は複数の領域から選択される請求項124記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 40

【請求項 188】

前記1又は複数の上流の非翻訳配列は、NS1（位置55-96）、NS2（位置606-624）、及び／又はSH（位置4231-4300）遺伝子からである請求項187記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 189】

前記置換ヌクレオチドが、RSVのG遺伝子のヌクレオチド4683から4685の欠失を含んで成る請求項124記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 190】

前記置換ヌクレオチドが、1又は複数のRSV遺伝子間配列から選択される請求項124記載の単離されたポリヌクレオチド分子。 50

【請求項 191】

前記置換ヌクレオチドが、SV5' 尾部領域内のヌクレオチドから選択される請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 192】

L 遺伝子のすぐ後に続く 5' 尾部領域部分を、無傷な 5' ゲノム末端を残して、サイズが 75ヌクレオチド、100ヌクレオチド、125ヌクレオチド、又はそれ以上減少させる請求項 191 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 193】

前記置換ヌクレオチドが、RSV3' 先導部領域内のヌクレオチドから選択される請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 194】

3' 先導部領域の最初の 11ヌクレオチドに配置されるウイルスプロモータの中核部分を除いて 3' 尾部領域部を欠失する請求項 191 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 195】

RSVのNS1, NS2, SH, F及び／又はM2 遺伝子の 1又は任意の組み合わせから 1部又は完全な欠失により、1-806間のヌクレオチドのゲノム長に調整可能な減少を得ることのできる請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 196】

RSVの遺伝子間領域の 1又は任意の組み合わせから 1部又は完全な欠失により、1-198間のヌクレオチドのゲノム長に調整可能な減少を得ることのできる請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

20

【請求項 197】

RSVの遺伝子間領域の 1又は任意の組み合わせから 1部又は完全な欠失により、1-198間のヌクレオチドのゲノム長に調整可能な減少を得ることのできる請求項 124 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 198】

前記RSVをコードする 1又は複数の単離されたポリヌクレオチド分子から感染性弱毒化組換えRSV粒子を製造するための方法であって、野生型RSVゲノム又はアンチゲノム内の前記RSV遺伝子又はゲノム分節、位置に対してプロモータへ有意的に隣接するか、又はプロモータへ遠位な位置に位置的に変位される前記組換えゲノム又はアンチゲノム内の 1又は複数の変位されたRSV遺伝子又はゲノム、あるいはゲノム分節を有する組換えRSVゲノム又はアンチゲノム、及びRSVのN, P, L及びRNAポリメラーゼ伸長因子タンパク質を含む発現ベクターを、細胞又は細胞の無い溶離産物中にて発現させることを含んでいる感染性弱毒化組換えRSV粒子を製造するための方法。

30

【請求項 199】

組換えRSVゲノム又はアンチゲノム、及びRSVのN, P, L及びRNAポリメラーゼ伸長因子タンパク質が、1又は複数の異なる発現ベクターにより発現される請求項 198 記載の方法。

【請求項 200】

ヒトウシキメラRSVゲノム又はアンチゲノムを形成するために、RSVのNS1、NS2、M、G、及び／又はFの異種遺伝子及び／又はゲノム分節から選択されるヒトRSVの複数の異種遺伝子及び／又はゲノム分節と組み合わされる主要なヌクレオキャプシド(N)タンパク質、ヌクレオキャプシドリン酸タンパク質(P)、大型ポリメラーゼタンパク質(L)、RNAポリメラーゼ伸長因子、及び1部又は完全なウシRSVを背景とするゲノム又はアンチゲノムを含んでいる単離された感染性キメラ呼吸器合胞体ウイルス(RSV)。

40

【請求項 201】

ヒトのNS1とNS2 遺伝子の両方を、ウシの同等なNS1及びNS2 遺伝子にて置換する請求項 200 記載の単離された感染性RSV。

【請求項 202】

50

r B R S V / A 2 - N S 1 + 2 である請求項 2 0 1 記載の単離された感染性 R S V。

【請求項 2 0 3】

ヒト N S 1, N S 2, G, 及び F 遺伝子を、ウシの同等な N S 1, N S 2, G, 及び F 遺伝子にて置換する請求項 2 0 0 記載の単離された感染性 R S V。

【請求項 2 0 4】

r B R S V / A 2 - N S 1 + 2 G F である請求項 2 0 3 記載の単離された感染性 R S V。

【請求項 2 0 5】

ヒト M、S H、G 及び F 遺伝子を、ウシの同等な M、S H、G 及び F 遺伝子に置換する請求項 2 0 0 記載の単離された感染性 R S V。

【請求項 2 0 6】

r B R S V / A 2 - M S H G F である請求項 2 0 3 記載の単離された感染性 R S V。

【請求項 2 0 7】

ヒト・ウシ・キメラ R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために、R S V の N S 1、N S 2、M、S H、G、及び／又は F 遺伝子の異種遺伝子及び／又はゲノム分節から選択される複数の異種遺伝子及び／又はゲノム分節と組み合わせられた一部又は完全なウシ R S V を背景とするゲノム又はアンチゲノムを含む組替え R S V ゲノム又はアンチゲノムを含んでいる単離されたポリヌクレオチド分子。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の背景

ヒト呼吸器系合胞体ウイルス (H R S V) は、世界中に重篤な小児気道疾患を起こしている主たるウイルス因子 (C o l l i n s, ら、F i e l d s V i r o l o g y 2 : 1 3 1 3 - 1 3 5 2, 1 9 9 6) である。R S V が、1 歳未満の乳児の肺炎や細気管支炎の原因として他のあらゆる微生物病原を越えている。事実上全ての子供が、2 歳までに感染し、再感染が年長の子供、及び大人として若年者が、再感染をかなり高い頻度で起っている (C h a n o c k e t a l., i n V i r a l I n f e c t i o n s o f H u m a n s, 3^{r d} e d., A. S. E v a n s, e d., P l e n u m P r e s s, N. Y., 1 9 8 9)。気道疾患が原因の小児入院患者の 5 名のうち 2 名以上は、R S V が原因となっており、R S V は米国だけでも 1 0 万人の入院患者が発生し、年間 4, 5 0 0 人の死亡者を出している (H e i l m a n, J I n f e c t D i s 1 6 1 : 4 0 2 - 6, 1 9 9 0)。さらに幼若にて重篤な気道疾患の感染に罹ると、喘息を発症するか又は喘息を悪化させたりすることを実証している (S i g u r s, e t a l., P e d i a t r i c s 9 5 : 5 0 0 - 5, 1 9 9 5)。

【0 0 0 2】

ヒト R S V は、通常小児患者集団の状況下にて考えられるが、さらに加齢者における重篤な疾患に対する重要な薬剤としても認識される (F a l s e y ら、J. I n f e c t. D i s. 1 7 2 : 3 8 9 - 3 9 4, 1 9 9 5)。ヒト R S V が、ヒト骨髄移植のレシユペントなど、ある種の免疫不全の個体において、生命の脅威となる疾患を引き起こす (F o u i l l a r d, e t a l., B o n e M a r r o w T r a n s p l a n t 9 : 9 7 - 1 0 0, 1 9 9 2)。

【0 0 0 3】

ヒト R S V を治療として、1 つの化学的治療剤であるリバビリンが、利用することができる。しかしながら、その効果やその使用性は、論議されるところである。さらに、少ないドナー I g G (G r o o t h u i s e t a l., N E n g l J M e d 3 2 9 : 1 5 2 4 - 3 0, 1 9 9 3)、又は人に向けた R S V - 特異的モノクローナル抗体を組み合わされた R S V 介在産生物が認可された。これらは、高リスクな個体に受動的 (p a s s i v e) な免疫保護剤として投与される。これらの産生物は有益であるが、コストが高く、長期にわたり効果がないなど、他の要因により、広範囲な使用を適切でなくしている。別の欠点としては、血液・骨によりウイルスを移植する可能性、調製及び保存が難しく、コストがかかることを含む。さらに、感染疾患、及びウイルスを資源となる疾患を管理する

10

20

30

40

50

履歴が、ワクチンの重要な中核となることを示している。

【0004】

R S Vに対して有効なワクチン剤を開発するために数十年にわたる研究にもかかわらず、R S V感染に関係する厳しい罹病率及び有意的な死亡を防止するための安全で有効なワクチンが、全く実現されなかった。有効なワクチンが開発されないことは、小さい幼児達が、血清、及びR S V抗原に应答して分泌する抗体が減少していたという事実において、ある部分に関係している。したがって、これらの個体が、R S Vのより重篤な感染にかかる、免疫性が累積しウイルスのより深刻な衝撃に対して、年齢を経た子供達及び成人を保護するものと見える。

【0005】

R S V感染における免疫性の機構が、最近中心的な課題となっている。分泌性の抗体が、上部気道を保護する際最も重要であると見られ、そのことから高レベルな血清抗体が、下部気道におけるR S Vの感染に対する抵抗性に主要な役割を有すると見られる。誘発される別の有効なアームとして、R S V-特異的な細胞毒性T細胞が、R S Vの感染を解決する際にも重要である。しかしながら、ウイルスの攻撃に対する抵抗性を増大させるために、後者のエフェクターを、前の免疫化により論議できるが、その効果としての有効性が短で、F及びGの表面Gタンパク質が、R S Vの2の主要な保護抗原であり、そしてR S Vを中和する抗体を誘発、及び攻撃に対して長期に抵抗するために示されたわずか2のR S Vタンパク質である(Collins et al., Fields Virology, Fields et al., eds., 2:1313-1352, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; Connors et al., J. Virol. 65(3):163-7, 1991)。第3のR S V表面タンパク質、SHが、R S Vを中和する抗体、又はR S Vの攻撃に有意的に抵抗を誘発しなかった。

【0006】

R S V生ワクチンを開発する上で障害となるのは、これは、部分的に弱毒化されたウイルスの遺伝的な不安定性、細胞培養におけるR S Vの比較的貧弱な増殖、及びウイルス粒子の不安定性により、弱毒化と免疫原性の間に適切なバランスを実現することが、困難である。加えて、自然感染により誘発される免疫性が、後の感染に対して十分に保護するわけではない。多くの因子が、気道の管腔表面へのウイルス感染を制限する免疫系の相対的な非効率性、局所粘膜免疫が短期寿命であるという性質、迅速にて、拡張性のあるウイルスの複製、免疫性が未成熟による幼児の免疫応答性の減少、胎盤経由で誘導される母体の血清抗体による免疫抑制、及びGタンパク質の高度なグリコシル化などウイルスの幾つかの性質を含めて、これにおそらく関与している。さらに下記のように、ヒトR S Vが、抗原のサブグループA及びBとして存在し、一方のサブグループに対する免疫性が、もう一方のサブグループに対する効果を減少させる。

【0007】

R S Vに、生存中複数回にわたり再感染するが、通常再感染が、前回の感染により誘発される保護免疫性により、その重篤度が低減され、従って免疫学的予防が可能である。生の弱毒化R S Vワクチンが、免疫性を与える軽度な免疫となる感染を開始するために、鼻から投与されることになる。これは、非経口経路と比較して、簡単で安全であるという利点がある。さらに、局部気道の免疫性を直接的な刺激を提供し、R S Vに対する抵抗性に主要な役割を果たす。さらに、この方法は、幼若期に典型的に見られるR S V特異的な母体から血清抗体の免疫抑制効果を阻止している。また、R S V抗原の非経口投与が、時に免疫病理学的合併症を併発することがあるが(Murphy et al., Vaccine 8(5):497-502, 1990)、これは生のウイルスでは観察されていない。

【0008】

ホルマリンによる不活化ウイルスワクチンを、1960年代の半ばにR S Vに対して試験したが、R S V感染又は疾病に対して保護することができず、実際にウイルスによる後の感染時に症状をさらに悪くした(Kim et al., Am. J. Epidemiol. 89:422-434, 1969, Chin et al., Am J. Epidemiol

10

20

30

40

50

. 89: 449-463、1969、Kapikian et al.、Am. J. Epidemiol. 89: 405-421、1969)。

【0009】

最近では、RSVに対するワクチンの開発は、弱毒化したRSV変異体に焦点が当てられている。Friedewald et al.、(J. Amer. Med. Assoc. 204: 690-694、1968)が、ワクチンの候補になるように、充分弱毒化されると見られるRSVの低温継代培養の変異体(c p RSV)について報告している。この変異体が、その野生型親ウイルスと比較して、26℃にて増殖効率がわずかに高いことを示したが、その複製体は、温度感受性も、有意的な低温適応性もなかった。しかしながら、この低温継代培養された変異体が、成人に対して弱毒化される。C p RSV変異体が、以前にRSVに感染したことがある乳児及び子供(すなわち、血清反応陽性の個体)に対して満足できる弱毒化、及び免疫原性があるが、血清反応陰性の乳児の上部気道に対しては低レベルの発病力を保持していた。

【0010】

同様に、Gharpure et al.、(J. Virol. 3: 414-421、1969)が、ワクチン候補として期待できる温度感受性RSV(t s RSV)変異体の分離について報告している。

一つ変異体、t s-1が、研究室内でまたボランティアを募って広範囲にわたり評価された。この変異体は、成人のボランティアに無症候性の感染を形成し、そして免疫化45日後に野生型ウイルスによる攻撃に対する抵抗力を付与した。

【0011】

さらに、血清反応陽性の乳児及び子供を、無症候性の感染を経験させたが、血清反応陰性の乳児は鼻炎の兆候、及び他の軽い症状を呈した。さらに、t s表現型の不安定性が検出された。1部又は完全な温度感受性を喪失しているウイルスが、ワクチン接種者から回収できる少集団のウイルスを示しているが、これは軽い鼻炎以外の疾病兆候とは関連性がなかった。

【0012】

ある種の低温継代及び温度感受性のRSV菌株は、弱毒化が不十分で、何人かのワクチン接種者、特に血清反応陰性の乳児において、疾病の軽い症状を引き起こすが、一方ではRSV菌株が、過度に弱毒化され、保護免疫応答を惹起するために、十分に複製することができないことが、上記の研究及び他の研究によって示した(Wright et al.、Infect. Immun.、37: 397-400、1982)。さらに、候補ワクチンの変異体の遺伝的な不安定性が、その温度感受性表現型を喪失することになり、さらには有効なRSVワクチンの開発を妨げる結果となっている。(Hodes et al.、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1158-1164、1974; McIntosh et al.、Pediatr. Res. 8: 689-696、1974; and Belshé et al.、J. Med. Virol. 3: 101-110、1978)を一般論として参照。

【0013】

選択肢として生の弱毒化RSVワクチンに対し、さらに研究者が、精製されたRSVエンベロープ糖タンパク質を使って、サブユニットワクチン候補を試験した。この糖タンパク質が、コットンラットの肺内にRSウイルス感染に対する抵抗性を誘発(Walsh et al.、J. Infect. Dis. 155: 1198-1204、1987)したが、前記抗体が、極めて弱い中和作用を有し、精製されたサブユニットワクチンによるげっ歯類の免疫化が、疾病を相乗作用する結果となった(Murphy et al.、Vaccine 8: 497-502、1990)。

【0014】

さらにF及びGエンベロープ糖タンパク質を発現する組換え型種痘ウイルスワクチンを調査した。これらの組換え型が、真正ウイルス相当体から区別できないRSV糖タンパク質を発現し、種痘RSVのF及びG組換え型により皮内に感染したげっ歯類から、ウイルス

の感染性を中和した高レベルの特異的抗体を生成した。実際に種痘F組換え型によるコトニラットの感染には、下部気道においてRSVの複製対するほぼ完全な抵抗性、そして上部気道において有意的な抵抗性を刺激した(Olmsted et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7462-7466, 1986)。しかしながら、種痘F及びG組換え型によるチンパンジーの免疫化により提供されるものが、上部気道へRSVの攻撃に対してほとんど保護されなく(Collins et al., Vaccine 8: 164-168, 1990)、下部気道へ継続して保護することができない(Crowe et al., Vaccine 11: 1395-1404, 1993)。

【0015】

10

有効なRSVワクチンの開発のため種々の努力にもかかわらず、認可されるワクチンとして、まだRSVに対して全く承認されていない。先に取りられたアプローチが実現されなかったことから、RSV開発を目指し新しい戦略の必要性を、特に、変動可能な、弱毒化されたRSV組換え型において新しい表現型の特質を生み出す遺伝子的な変化を組み込むための組換えRSVを操作する方法の必要性が、強調される。しかしながら、RSVのゲノムRNA及び他の非分節性ネガティブセンスRNAウイルスを操作することは、これまで困難であるとされてきた。この点に関する主要な障害には、これらウイルスの裸ゲノムRNAの非感染性、組織培養における貧弱なウイルス増殖、長期に渡る複製サイクル、ビリオンの不安定さ、複合ゲノム、遺伝子産物の治療不応性組織が含まれる。

【0016】

20

組換えDNAの技術により、感染を起こす非分節性負鎖RNAウイルスをcDNAから回復すること、新規なワクチン候補を構成するためにウイルスクローンを遺伝子的に操作すること、さらにその弱毒化及び表現型安定性のこれらレベルを迅速に評価することが可能となった(Conzelmann, J. Gen. Virol. 77: 381-89, 1996; Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 11354-58, 1996以下を参照のこと)。この状況において、組換えレスキューとしては、ウイルスの必須タンパク質の存在下、cDNAがコードされるアンチゲノムRNAから、感染性の呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、パラインフルエンザウイルス(PIV)、狂犬病ウイルス(RaV)、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、麻疹ウイルス(MeV)、牛痘及びセンダイウイルス(SeV)などに関しより報告されてきた(たとえばGarcin et al., EMBO J. 14: 6087-6094, 1995; Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 4477-81, 1995; Radecke et al., EMBO J. 14: 5773-5784, 1995; Schnell et al., EMBO J. 13: 4195-203, 1994; Whelan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 8388-92, 1995; Hoffman et al., J. Virol. 71: 4272-4277, 1997; Pecters et al., J. Virol. 73: 5001-5009, 1999; Kato et al., Genes to Cells 1: 569-579, 1996; Roberts et al., Virology 247(1), 1-6, 1998; Baron et al., J. Virol. 71: 1265-1271, 1997、国際公開番号W097/06270、1995年9月27日に提出された米国特許仮出願番号60/007,083、1996年9月27日に提出された米国特許出願番号08/720,132、1996年7月15日に提出された米国特許仮出願番号60/021,773、1997年5月9日に提出された米国特許仮出願番号60/046,141、1997年5月23日に提出された米国特許仮出願番号60/047,634、1999年11月30日に発行された米国特許番号5,993,824(国際公開番号W098/02530に対応する)、Collins et al.により1999年4月13日に提出された米国特許出願番号09/291,894、Murphy et al.により1999年4月13日に提出された米国特許仮出願番号60/129,006、Collins et al., Proc Nat. Aca

30

40

50

d. Sci. U. S. A. 92:11563-11567、1995、Bukreyev et al.、J. Virol. 70:6634-41、1996、Juhász et al.、J. Virol. 71(8):5814-5819、1997、Durbin et al.、Virology 235:323-332、1997、He et al.、Virology 237:249-260、1997、Barone et al.、J. Virol. 71:1265-1271、1997、Whitehead et al.、Virology 247(2):232-9、1998a、Buchholz et al.、J. Virol. 73:251-9、1999、Whitehead et al.、J. Virol. 72(5):4467-4471、1998b、Jin et al.、Virology 251:206-214、1998、and Whitehead et al.、J. Virol. 73(4):3438-3442、1999、and Bukreyev et al.、Proc Nat Acad Sci. USA 96:2367-72、1999、を参照、各々が、あらゆる目的のためその全体を引例として本明細書に組み込まれている)。

【0017】

前記開発により、現在、cDNAから感染性RSVを回収させ、新規なワクチン候補を構成するために、RSVクローンに種々の遺伝子操作を設計し、順次実行することが可能となった。以後他の所望の表現型特性における、弱毒化及び表現型の安定性のレベルが評価され、調整することができる。従って残っている問題点は、広範囲なワクチンを使用するために有用な感染性を弱毒化したRSVクローンを構成するために、単独の遺伝子操作又は他の型の遺伝子操作と組み合わせて用いることのできる遺伝子操作の広範囲にて、多様なメニューを開発することである。このような状況において、安全で有効なワクチンを遺伝子操作することで、RSVに帰する健康上深刻な問題を取り除くことができる付加的ツール及び方法に対する技術において、差し迫った必要性が依然として存在する。驚いたことに、本発明は、感染性の弱毒化されたRSVワクチン候補を構成するために追加ツールを提供することによって、この必要性を満たすものである。

【0018】

発明の要約

本発明は、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内の1又は複数の遺伝子又はゲノム分節を相対的な遺伝子順位又は離れた位置に変位させることにより修飾される組換え呼吸器合胞体ウイルス(RSVs)を提供することであり、すなわちヒト又は他の哺乳動物に感染性、弱毒化、及び免疫原性がある組換えワクチンウイルスを生成するためである。本発明の組換えRSVsが、主要ヌクレオキャプシド(N)タンパク質、ヌクレオキャプシドリン酸タンパク質(P)、大型のポリマーゼタンパク質(L)、RNAポリマーゼ伸長因子、及び組換えゲノム又はアンチゲノム内の1又は複数の変位されたRSV遺伝子又はゲノム分節を有する1部又は完全な組換えRSVゲノム又はアンチゲノムを、典型的に含んでいる。本発明のある観点においては、組換えRSVが、1部又は完全な組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内の1つ又は複数の置換ポリヌクレオチドを挿入、欠失、又は再配列することによりプロモータへ有意的に隣接する又はプロモータへ遠位の位置に変位可能な1又は複数の位置的に変位される遺伝子又はゲノム分節を特徴とする。置換ポリヌクレオチドが、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムの非コード領域(NCR)に挿入又は再配置できるか、あるいは別々の遺伝子単位(GU)として、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムに組み込むことができる。

【0019】

本発明の実施例では、単離された感染性組換えRSVが、RSVのNS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F及びG遺伝子及びゲノム分節から選択される1又は複数のRSV遺伝子又はゲノム分節、及び上記RSVゲノム及びその分節の先導部、尾部及び遺伝子間領域から選択可能な1又は複数の置換ポリヌクレオチドを追加、欠失、又は再配列することにより構成される。

【0020】

より詳細な例において、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノム内の、ポリヌクレオチド挿入要素、欠失又は再配列要素が、R S VのN S 1、N S 2、N、P、M、S H、M 2（O R F 1）、M 2（O R F 2）、L、F及びG遺伝子又はゲノム分節から選択される1又は複数のウシR S V（B R S V）又はヒトR S V（H R S V）遺伝子又はゲノム分節、及び上記R S Vゲノム又はその分節の先導部、尾部及び遺伝子間領域から選択される。

【0021】

本発明の幾つかの観点において、置換ポリヌクレオチドが、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムが形成するために欠失される。置換ポリヌクレオチドをこの方法にて欠失すると、野生型R S V（たとえばH R S V A 2又はB R S Vカンサス菌株）ゲノム又はアンチゲノム内の変位された遺伝子又はゲノム分節の位置に対して、プロモータへ有意的に隣接する位置に、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノム内の1又は複数の「変位」R S V遺伝子又はゲノム分節の位置的な変位を起こす。組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するためにこの方法にて欠失することのできる典型的な置換ポリヌクレオチドが、1又は複数のR S VのN S 1、N S 2、S H、M 2（O R F 2）、又はG遺伝子又はそのゲノム分節から選択することができる。

【0022】

本発明のさらに詳細な例において、R S VのN S 1遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドを、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失する。他の選択肢として、R S VのN S 2遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドを、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失することができる。他の選択肢として、R S VのS H遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドを、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失することができる。他の選択肢として、R S VのM 2（O R F）を含む置換ポリヌクレオチドを、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失することができる。他の選択肢として、R S VのG遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドを、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失することができる。

【0023】

さらに追加的な例において、R S V遺伝子又はゲノム分節から成る複数の置換ポリヌクレオチドを、欠失することができる。例えば、R S VのF及びG遺伝子の双方を組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失することができる。他の選択肢として、R S VのN S 1及びN S 2遺伝子を、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために、双方を欠失することができる。他の選択肢として、R S VのS H及びN S 2遺伝子を、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために、双方を欠失することができる。他の選択肢として、R S VのS H、N S 1及びN S 2遺伝子を、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを形成するために、全部欠失することができる。

【0024】

本発明の異なる例において、1又は複数の変位されたR S V遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させるために、組換えR S Vゲノム又はアンチゲノム内にて、上記1又は複数の置換ヌクレオチドが、付加、置換、又は再配列される、単離された感染性組換えR S Vが提供される。

【0025】

これらの修飾のうち、遺伝子及びゲノム分節を挿入及び再配列により、相当する（たとえばウシ又はヒト）野生型R S Vゲノム又はアンチゲノム内にて、各対象の（挿入又は再配列された）遺伝子又はゲノム分節のそれぞれの位置に対してプロモータへ有意的に隣接する、又はプロモータへ遠位な位置に対象遺伝子又はゲノム分節を導入又は再配列することができる。組換えR S Vゲノム又はアンチゲノム内に、付加、置換、又は再配列される置換ポリヌクレオチドが、1又は複数のR S VのN S 1、N S 2、S H、M 2（O R F 2）、F、および／またはG遺伝子、又はそのゲノム分節から選択することができる。

【0026】

さらに詳細な例において、置換ポリヌクレオチドが、1又は複数のR S V糖タンパク質又はその免疫原性ドメインまたはR S V糖タンパク質のエピトープをコードした、1又は複

10

20

30

40

50

数の R S V 遺伝子又はゲノム分節を含む組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、挿入又は再配列するために選択される。典型的な例において、これらの置換ポリヌクレオチドが、その R S V の F、G、及び／又は S H 糖タンパク質又は免疫原性領域またはエピトープから選択される。例えば、F、G 及び S H から選択された 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子が、その遺伝子の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接する又はプロモータ遠位である位置に、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、付加、置換、又は再配列することができる。

【0027】

典型的な例において、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、野生型遺伝子順位の G の位置と比較して、よりプロモータへ隣接している遺伝子順位の位置に再配列される。より詳細な観点において、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、前記組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位位置 1 に変位される。他の典型的な例において、R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内に、よりプロモータへ隣接する位置に、例えば、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子順位位置 1 に F 遺伝子を変位させることにより、再配列される。さらに別の典型的な例においては、R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F の双方が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、それぞれの野生型遺伝子順位の位置と比較してよりプロモータへ隣接する遺伝子順位位置に再配列される。さらに詳細な観点において、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、遺伝子順位位置 1 に変位され、そして R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、遺伝子順位位置 2 に変位される。

10

20

【0028】

糖タンパク質の遺伝子変位を特徴とするさらに追加的な構成において、組み換え R S V が、F、G 及び S H から選択される 1 又は複数の R S V 糖タンパク質遺伝子、又はそれらのゲノム分節を有し、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて付加、置換、又は再配列されるが、前記 1 又は複数の R S V の N S 1、N S 2、S H、M 2 (O R F 2)、又は G 遺伝子、あるいはそのゲノム分節が欠失されるよう、生成される。従って、R S V の F、G、又は S H の遺伝子又はゲノム分節は、R S V の N S 1 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失されるという背景において、付加、置換、又は再配列することができる。他の選択肢として、R S V の F、G、又は S H の遺伝子又はゲノム分節は、R S V の N S 2 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失されるという背景において、付加、置換、又は再配列することができる。他の選択肢として、R S V の F、G、又は S H の遺伝子又はゲノム分節は、R S V の S H 遺伝子を含む置換ポリヌクレオチドが、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムを形成するために欠失されるという背景において、付加、置換、又は再配列することができる。

30

【0029】

下記の一例において、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、野生型遺伝子 G の順位位置と比較して、よりプロモータへ隣接する遺伝子順位位置に S H 遺伝子を欠失する組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、再配列される。さらに詳細な観点において、組換えワクチン候補 G 1 / Δ S H に例示されるように、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、遺伝子順位位置 1 に変位される。また別の例において、R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、よりプロモータへ隣接する位置に S H 遺伝子を欠失する組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて再配列される。さらに詳細な観点において、組換え F 1 Δ S H により例示されるように、F 遺伝子が、遺伝子順位位置 1 に変位される。さらに別の例では、R S V 糖タンパク質遺伝子 G 及び F の双方が、 Δ S H 組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、G 及び F の野生型遺伝子の順位位置と比較して、よりプロモータへ隣接する遺伝子順位の位置に再配列される。さらに詳細なる観点において、組換え G 1 F 2 / Δ S H により例示されるように、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、R S V 糖タンパク質遺伝子 G が、遺伝子順位位置 1 に変位され、そして R S V 糖タンパク質遺伝子 F が、遺伝子順位位置 1 に変位される。

40

50

【0030】

さらに別の例における、遺伝子位置が変位されるRSVが、F、G及びSHから選択された糖タンパク質遺伝子の変位を特徴として提供される。この例は、RSVのNS1、NS2、SH、M2（ORF2）、及びG遺伝子から選択される複数の遺伝子又はゲノム分節、あるいは欠失されるゲノム分節を有する、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内にて生成される、変位を特徴とする糖タンパク質を提供する。一例において、RSVのSH及びNS2遺伝子が、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムを形成するために共に欠失され、そしてRSV糖タンパク質遺伝子G及びFの1つ又は双方が、組換えRSVゲノム内にて、プロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に再配列される。さらに詳細な観点において、組換えG1F2／△NS2△SHに例示されるように、Gが遺伝子順位位置1に、Fは遺伝子順位位置2に変位される。また別の例において、組換えワクチン候補G1F2／△NS2△NS2△SHに例示されるように、RSVのSH、NS1及びNS2遺伝子の全てが、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム又を形成するために欠失され、またRSV糖タンパク質遺伝子G及びFの1つ又は双方が、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内にて、プロモータへ有意的に隣接する遺伝子順位の位置に再配列される。本発明のまた別の観点において、遺伝子位置を変位されたRSVが、ヒトウシのキメラRSVと組み合わせられるか、あるいはその中に組み込まれている。これらの観点にて、組換えゲノム又はアンチゲノムが、異なるRSVからヒトウシのキメラRSVゲノム又はアンチゲノムに対し、1又は複数の異種遺伝子、又はゲノム分節と組み合わせられた1部又は完全なヒトRSV（HRSV）又はウシRSV（BRSV）を背景とするゲノム又はアンチゲノムを含んでいる。相違するHRSV又はBRSVの異種遺伝子またはゲノム分節が、1部又は完全なHRSV又はBRSVを背景としたゲノム又はアンチゲノム内の同等のゲノム又はアンチゲノム分節の野生型遺伝子順位の位置と比較してプロモータへ有意的に隣接するか、プロモータへ遠位の位置にて、付加又は置換することができる。本明細書に提供される例において、組換えウイルスrBRSV／A2－G1F2により例示されるように、ヒトRSV糖タンパク質遺伝子G及びFが共に、1部ウシRSVを背景とするゲノム又はアンチゲノムにおいて、野生型の位置7及び8のそれぞれに欠失される同等のG及びF糖タンパク質遺伝子を置き換えるために、遺伝子順位位置1及び2にて置換される。他の例において、F、G、SH、及びMから選択される1又は複数のヒトRSVエンベロップ関連遺伝子が、1部又は完全なウシRSVを背景とするゲノム又はアンチゲノム内にて付加又は置換される。より詳細な観点において、F、G、SH、及びMから選択される1又は複数のヒトRSVエンベロップ関連遺伝子が欠失される1部ウシRSVを背景とするゲノム又はアンチゲノム内にて、付加又は置換される。

【0031】

下記の一例において、組換えウイルスrBRSV／A2－MGFにより例示されるように、ヒトRSVエンベロップ関連遺伝子F、G、及びMは、エンベロップ関連遺伝子F、G、SH、Mのすべてが欠失される1部ウシRSVを背景とするゲノム又はアンチゲノム内にて付加される。

【0032】

本発明の別の選択肢としての例において、単離された感染性組換えRSVが、提供される。この感染性組換えRSVは、RSVのM2（ORF1）が、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内にて、よりプロモータへ隣接する位置に変位する。この遺伝子変位により、組換えウイルスの変位が上限に調節される。本発明のまた別の観点において、弱毒化された遺伝子位置を変位したRSVが生成される。この弱毒化遺伝子位置を変位したRSVでは、組換えゲノム又はアンチゲノムが、1又は複数の弱毒化変異を導入することにより、さらに修飾される。結果として生成されるウイルス又はサブウイルス粒子「たんぱく質などウイルスを構成する組成粒子のこと」において弱毒化する表現型が特定される。これらの弱毒化変異が新規に生成し、適切に設計した変異生成方法により弱毒化作用を試験することができ、あるいは、弱毒化変異が、既存の生物学的に誘導される変異体RSV内で同

定され、次に本発明の遺伝子位置が変位された R S V に組み込まれている場合がある。

【0033】

本発明の組換え R S V に導入される遺伝子位置の変化と組み合わせて、キメラウイルスの弱毒化を増大、又は低下させる付加的な変異化を導入することにより、弱毒化表現型を調節することが好ましいことが良くある。

【0034】

従って、候補のワクチン菌株を、少なくとも1つ、好ましくは二つ以上の異種の変異体（例えば、既知の生物学的に得られた変異 R S V 菌株のパネルから同定される変異）を組み込むことにより、さらに弱毒化することが可能である。典型的なヒト変異体 R S V 菌株は、低温継代培養及び／又は温度感受性（t s）の変異体で、例えば、以下の名称を有する変異体である：「c p t s R S V 2 4 8 (A T C C V R 2 4 5 0)、c p t s R S V 2 4 8 / 4 0 4 (A T C C V R 2 4 5 4)、c p t s R S V 2 4 8 / 9 5 5 (A T C C V R 2 4 5 3)、c p t s R S V 5 3 0 (A T C C V R 2 4 5 2)、c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 0 9 (A T C C V R 2 4 5 1)、c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 3 0 (A T C C V R 2 4 5 5)、R S V B - 1 c p 5 2 / 2 B 5 (A T C C V R 2 5 4 2)、及び R S V B - 1 c p - 2 3 (A T C C V R 2 5 7 9)」(各々の変異体が、ブタペスト条約の条件下、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) o f 1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d、M a n a s s a s、V i r g i n i a 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9、U . S . A . に保管されて、上記同定の登録番号が付与される)。この生物学的に誘導される変異体の例示パネルから、多数の弱毒化変異体の「メニュー」が提供され、これら各弱毒化変異体が、ワクチンを使用するめ、組換え体のヒト-ウシキメラ R S V における弱毒化の程度を較正するために、パネル内により別の変異体と組み合わせることができる。

【0035】

またさらなる変異化では、例えば、小プラーク（s p）、低温適応型（c a）又は宿主範囲制限（h r）変異菌株において同定される非 t s 及び非 c p の弱毒化する変異株を有する R S V から誘導される。本出願書に引例として組み入れられる米国特許仮出願番号 6 0 / 1 2 9, 0 0 6 (M u l p h y e t a l., A p r i l 1 3, 1 9 9 9) に記載されているように、変異体を、ヒトカウシのいずれかのアンチゲノム配列に組み込まれ、入れられてよく、ヒト-ウシ、又は他の R S V 変異体において同定された弱毒化による変異体を、異種 R S V レシピエントゲノムにおける相当する、相同部位に対して変異化部位をマッピングし、さらに変異体遺伝子型に対するレシピエントにおける天然の配列を（同一又は保存型変異化により）に変異化することによって、異種 R S V レシピエント（例えば、それぞれウシ又はヒトの R S V）に移入することができる。

【0036】

従って、本発明のさらに詳細な例において、遺伝子位置を変位した R S V が提供される。この遺伝子位置を変位した R S V では、組換えゲノム又はアンチゲノムが、ヒト R S V 菌株のパネル内で起こる弱毒化変異の少なくとも1つ、最大で全ての相補体で組み込まれている。当該パネルは、c p t s R S V 2 4 8 (A T C C V R 2 4 5 0)、c p t s R S V 2 4 8 / 4 0 4 (A T C C V R 2 4 5 4)、c p t s R S V 2 4 8 / 9 5 5 (A T C C V R 2 4 5 3)、c p t s R S V 5 3 0 (A T C C V R 2 4 5 2)、c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 0 9 (A T C C V R 2 4 5 1)、c p t s R S V 5 3 0 / 1 0 3 0 (A T C C V R 2 4 5 5)、R S V B - 1 c p 5 2 / 2 B 5 (A T C C V R 2 5 4 2)、and R S V B - 1 c p - 2 3 (A T C C V R 2 5 7 9) から構成される。幾つかの例において、組換えゲノム又はアンチゲノムが、異種変異 R S V 菌株から採られた弱毒化変異体を組み込んでいる。

【0037】

ワクチンを使用するために設計、選択され、遺伝子位置を変位した R S V が、臨床的に広範囲に使用するために適切な程度の弱毒化を実現するため、少なくとも2、時には3、またはそれ以上の弱毒化変異体を有することが良くある。一例として少なくとも1つの弱毒

化変異体が、R S Vポリメラーゼ遺伝子Lに生成し（ドナー遺伝子又はレシピエント遺伝子のいずれかにおいて）、温度感受性（t s）表現型を含むかどうかに関わらず、弱毒化表現型を特定するポリメラーゼタンパク質におけるアミノ酸の変化を特定する1又は複数のヌクレオチド置換体を含んでいる。本発明の遺伝子位置を変位したR S Vは、L遺伝子を加えて、任意の付加R S V遺伝子、例えば、M 2遺伝子における弱毒化変異体を組み込むことができる。しかしながらこの状況において好ましいヒトウシキメラR S Vが、大型ポリメラーゼ遺伝子Lにおける1又は複数のヌクレオチド置換体を組み込み、その結果、R S Vポリメラーゼ遺伝子Lにあるアミノ酸A s n 4 3、C y s 3 1 9、P h e 5 2 1、G l n 8 3 1、M e t 1 1 6 9、T y r 1 3 2 1及び／又はH i s 1 6 9 0にて、アミノ酸が変化して、例示のような変化、すなわちA s n 4 3に対してI l e、P h e 5 2 1 10
に対してL e u、G l n 8 3 1に対してL e u、M e t 1 1 6 9に対してV a l、及びT y r 1 3 2 1に対してA s nなどに変化する。他の選択肢としてアミノ酸の変化、特に同定された変異体残基に対して保守的な変化が、もちろんこれらの位置にて、同定される同様の効果を得るために、変異置換体作成することができる。本発明のヒトウシキメラR S Vに組み込むために所望の付加変異体が、R S VのN遺伝子におけるV a l 2 6 7、R S VのF遺伝子におけるG l u e 2 1 8及び／又はT h r 5 2 3、及び遺伝子M 2の遺伝子開始配列におけるヌクレオチドの置換を特定する弱毒化変異体を含んでいる。

【0038】

これらの最大十分、又は十分である相補性変異体を含む、本明細書に同定される1又は複数の弱毒化変異体における任意の組み合わせ体を、ワクチンレシユペントの選択された集団、又は広範囲な集団に使用するため適切に弱毒化された組み換えウイルスを生成するために、ヒトウシキメラR S Vに組み込むことも可能である。 20

【0039】

他のより詳細な本発明の例において、組換えゲノム又はアンチゲノムが、R S VのN遺伝子においてV a l 2 6 7、R S VのF遺伝子においてG l u 2 1 8及び／又はT h r 5 2 3、R S Vのポリメラーゼ遺伝子LにおけるA s n 4 3、C y s 3 1 9、P h e 5 2 1、G l n 8 3 1、M e t 1 1 6 9、T y r 1 3 2 1及び／又はH i s 1 6 9 0、及び遺伝子M 2の遺伝子開始配列におけるヌクレオチド置換体にてアミノ酸の置換を特定する弱毒する変異体の相補体を少なくとも1又は最大で十分に組み込んでいる、遺伝子位置を変位したR S Vが提供される。 30

【0040】

ある観点において、組換えゲノム又はアンチゲノムは、これらの弱毒化変異の、少なくとも2、一般的には3、4又は5、時には全部の相補体を組み込んでいる。多くの場合、少なくとも1つの弱毒化する変異体を、この変異化を特定するコドンの複数のヌクレオチド変化により安定化することがよくある。

【0041】

本発明のヒトウシキメラR S Vに組み込むための弱毒化変異体が、供与又はレシピエントR S V遺伝子のコード部分、又はc i s調節配列など非コード領域にて選択ことができる。例示的な非コード変異体が、M 2遺伝子開始配列におけるヌクレオチド7 6 0 5（組換え配列におけるヌクレオチド7 6 0 6）にて、単一又は複数の塩基置換によって例示されるように、遺伝子開始配列の単一又は複数の塩基の変化が含まれる。 40

【0042】

本発明による感染性R S Vが、いかなるタイプの異種任意のR S Vウイルス又はR S V様ウイルス、例えば、ヒト、ウシ、マウス（マウスの肺炎ウイルス）、又は鳥（シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス）肺炎ウイルスから、又は別のエンベロープウイルス、たとえばパラインフルエンザウイルス（P I V）からのもの、異種性のコード又は非コードヌクレオチド配列を組み込むことができる。例示的な異種配列は、異なるヒトR S V菌株からの配列と組み合わせたヒトR S V菌株からのR S V配列、又はウシR S V菌株からの配列と組み合わせたヒトR S V菌株からのR S V配列を含んでいる。

【0043】

本発明の遺伝子位置が変異された R S V が、2 またはそれ以上の野生型、又は変異体 R S V 菌株、たとえば c p t s R S V 2 4 8、c p t s 2 4 8 / 4 0 4、c p t s 2 4 8 / 9 5 5、c p t s R S V 5 3 0、c p t s 5 5 3 0 / 1 0 0 9、又は c p t s 5 3 0 / 1 0 3 0 から選択される変異 R S V 菌株から配列を組み込むことができる。

【0044】

選択肢として、キメラ R S V は、2 又はそれ以上の野生型又は変異化 R S V のサブグループ、例えばヒト R S V サブグループ A とサブグループ B 配列を組み合わせた配列を組み込むことができる。

【0045】

さらにまた別の観点において、1 又は複数のヒト R S V コード又は非コードポリヌクレオチドが、新規な弱毒化されたワクチン菌株を生成するために、単独か、又は 1 又は複数の選択された弱毒化変異体、例えば c p 及び / 又は t s 変異体と組み合わせて異種 R S V 又は非 R S V ウイルスから同等の配列により置換される。

10

【0046】

本発明による遺伝子位置を変位した R S V の c D N A s、ベクター、及びウイルス粒子内に組み込まれた変異が、個別、に導入することも、又は全長 R S V の c D N A を組み合わせて導入することができ、そして導入された変異体を含む表現型のレスキューウイルスを、容易に決定することができる。

【0047】

典型的な例として、野生型 R S V に対する、弱毒化され生物学的に誘導されるウイルスによって示されるアミノ酸の変化、例えば、c p R S V 又は t s R S V により示される変化が、所望の弱毒化レベルを生成するために、遺伝子位置を変位した R S V 内で組み合わせて、組み込まれる。

20

【0048】

遺伝子位置を変位した R S V が、複数の R S V 菌株又はグループ（例えばヒト R S V A 及び R S V B サブグループの双方）を含む異なる病原体、H P I V 3、H P I V 2 及び H P I V 1 を含むヒトパラインフルエンザウイルス（H P I V）、麻疹ウイルス及び他の病原（例えば、以下を参照：米国特許仮出願番号 6 0 / 1 7 0、1 9 5、米国特許出願番号 0 9 / 4 5 8、8 1 3、及び米国特許出願番号 0 9 / 4 5 9、0 6 2、各文献を引例として本明細書に組み入れられる）から抗原決定基組み込むための「ベクター」として、容易に設計することができる。様々な例において、組換えゲノム又はアンチゲノムが、1 又は複数の異種病原体の 1 又は複数の抗原決定基をコードする異種遺伝子又はゲノム分節により組み合わされた、1 部又は完全な R S V 「ベクターゲノム又はアンチゲノム」を含んでいる。異種病原が、異種 R S V （すなわち、異種菌株又はサブグループの R S V）にて可能であり、そして異種遺伝子又はゲノム分節が、R S V の N S 1、N S 2、N、P、M、S H、M 2（O R F 1）、M 2（O R F 2）、L、F 又は G タンパク質又はその断片（例えば、免疫原性領域又はエピトープ）をコードすることができる。例えば、ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な R S V A ゲノム又はアンチゲノムであってよく、そして異種遺伝子又はゲノム分節が、R S V B サブグループウイルスの抗原決定基をコード化することができる。

30

40

【0049】

これに代わる例では、遺伝子位置を変位した R S V ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な B R S V ゲノム又はアンチゲノムであり、そして抗原決定基をコードする異種遺伝子又はゲノム分節が、1 又は複数の H R S V である。

【0050】

例えば、1 部又は完全な B R S V ゲノム又はアンチゲノムが、F、G 及び S H から選択される 1 又は複数の H R V の糖タンパク質遺伝子をコードする 1 又は複数の遺伝子又はゲノム分節、又は細胞質ドメイン、膜間ドメイン、細胞外ドメインまたは H R S V の F、G、及び / 又は S H の免疫原性エピトープ部分をコードする 1 又は複数のゲノム分節を組み込むことができる。上記のように、異種抗原決定基を伝達するためベクターとして設計した

50

遺伝子位置を変位した R S V が、ヒトパラインフルエンザウイルス (H P I V) など非 R S V 病原の 1 又は複数の抗原決定基を組み込むことができる。典型的な 1 例として、1 又は複数の H N 及び／又は F 糖タンパク質又は抗原ドメイン、その断片、又はエピトープをコードする 1 又は複数の H P I V 1、H P I V 2、又は H P I V 3 遺伝子又はゲノム分節が、1 部又は完全な H R S V ベクターゲノム又はアンチゲノムに付加されるか、又はそれに組み込まれる。さらに詳細な実施例では、H P I V 1、H P I V 2、又は H P I V 3 の H N 又は F 遺伝子のオープンリーディングフレーム (O R F) を含む転写単位が、組換えベクターゲノム又はアンチゲノムに付加されるか、又はそれに組み込まれる。選択肢としてさらに別の例において、ベクターゲノム又はアンチゲノムが、1 部又は完全な H R S V 又は B R S V ゲノム又はアンチゲノムを含み、そして異種病原体が、麻疹ウイルス、サブグループ A 及びサブグループ B 呼吸器系合胞体ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、タイプ 1 及びタイプ 2 の免疫不全ウイルス、単純性疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、エプスタインバーウイルス、フィロウイルス、ブニヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス及びインフルエンザウイルスから選択される。候補病原の典型的なリストにより、基づいて特定した異種性抗原決定基を、以下の病原、すなわち、麻疹ウイルス H A 及び F タンパク質、サブグループ A 及びサブグループ B 呼吸器系合胞体ウイルス F、G、S H 及び M 2 タンパク質、流行性耳下腺炎ウイルス H N 及び F タンパク質、ヒト乳頭腫ウイルス L 1 タンパク質、タイプ 1 及びタイプ 2 の免疫不全ウイルス g p 1 6 0 タンパク質、単純性疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルス g B、g C、g D、g E、g G、g H、g I、g J、g K、g L、及び g M タンパク質、狂犬病ウイルス G タンパク質、エプスタインバーウイルス g p 3 5 0 タンパク質、フィロウイルス G タンパク質、ブニヤウイルス G タンパク質、フラビウイルス E 及び N S 1 タンパク質、及びアルファウイルス E タンパク質、及びそれらの抗原ドメイン、断片及びエピトープなどから選択することができる。1 例として、異種病原体が、麻疹ウイルスであり、異種性抗原決定基は、麻疹ウイルス H A 及び F タンパク質及びそれらの抗原ドメイン、その断片及びエピトープから選択される。こうしたキメラ構造を実現するために、麻疹ウイルス H A 遺伝子のオープンリーディングフレーム (O R F) を含む転写単位が、H R S V ベクターゲノム又はアンチゲノムに、付加されるか又はそれに組み込まれる。

【0051】

従って本発明は、弱毒化された感染性ウイルス、又はサブウイルス粒子を生成するために、遺伝子位置を変位した R S V ゲノム又はアンチゲノムに選択的に組み合わせて導入される複数の表現型特異的変異体を組み込むことのできる遺伝子位置を変位した R S V クローン、ポリヌクレオチド発現構成体 (ベクターとも呼ばれている) 及び粒子を提供する。

【0052】

一定の表現型評価と結び付けられた本方法は、弱毒化、温度感受性、変更された免疫原性、低温適応性、小型プラーク、ホスト範囲制限などの所望の特徴を有する、遺伝子位置が変位された R S V を提供する。従って、同定された変異体が、「メニュー」にまとめられ、そして選択されたレベルの弱毒化、免疫原性、及び安定性に対して、ワクチンウイルスを較正するように種々組み合わせて導入される。

【0053】

さらに本発明の追加的な観点において、弱毒化する変異化を伴うか、又は伴わない遺伝子位置を変位した R S V が、所望の表現型、構成的、又は機能的な変化を形成するために、ヌクレオチドの修飾を有するように構成される。一般的に、選択されたヌクレオチドの修飾が、表現型変化、例えば増殖特性、弱毒化、温度感受性、低温適応性、プラークのサイズ、ホスト範囲の制限、又は免疫原性等の変化を特定することになる。この状況における構造の変化には、操作及び同定を容易にするために、c D N A s をコードする R S V の制限部位を導入又は除去することを含んでいる。

【0054】

幾つかの例において、遺伝子位置を変位した R S V 内のヌクレオチドの変化には、遺伝子の欠失、あるいはその発現を除去することによるウイルス遺伝子の修飾を含んでいる。こ

の状況における変異に向けた標的遺伝子が、結合（G）タンパク質、融合（F）タンパク質、小型疎水性（SH）、RNA結合タンパク質（N）、リンタンパク質（P）、大型ポリマーゼタンパク質（L）、転写伸長因子（M2ORF1）、RNA制御因子M2-2ORF2、基質（M）タンパク質、及び2種の非構成タンパク質、NS1及びNS2を含んでいる。これらのタンパク質の各々が、新規のキメラRSV組換えを作製するために、全部又はその一部を、単独か、あるいは所望の他の修飾と組み合わせて、全体的か1部において、選択的に欠失、置換、又は再配列することができる。

【0055】

本発明の1の観点において、SH、NS1、NS2、G又はM2-2遺伝子が、遺伝子位置を変位したRSVにおいて修飾される。

10

【0056】

例えば、これらの各遺伝子が、増殖、弱毒化、免疫原性、又は他の所望の表現型特徴を改良するために、得られた組換えRSVクロンの表現型を変更するように（たとえば停止コドンの導入により）、欠失されるか、又はその発現が削除される。例えば、組換えゲノム又はアンチゲノムにおけるSH遺伝子を欠失させることにより、*in vitro*における増殖及び／又は*in vivo*における弱毒化を増強するなどの新規な表現型の特徴を有するRSVを、作製することができる。これに関連した観点において、SH遺伝子の欠失、又はNS1、NS2、G又はM2-2遺伝子の欠失など、他に選択された非必須遺伝子又はゲノム分節の欠失が、遺伝子位置を変位したRSV内に、単独か又は弱毒化された表現型を特定する、例えば生物学的に導入される弱毒化RSV変異体から直接適応される（又は、例えば変異化を特定するコドンにおける複数のヌクレオチドの変化を導入することにより、修飾した形状）点変異にて、1又は複数の異なる変異体と組み合わせて構成される。例えば、SH、NS1、NS2、G又はM2-2遺伝子が、ウイルスの収率の増大、弱毒化の強化、異なる変異体の有効な組み合わせにより、弱毒化された表現型から免疫性及び復帰に対する遺伝子抵抗性を改良させた遺伝子位置を変位したRSVを生成するために、c p t s 248/404、c p t s 530/1009、c p t s 530/1030、から適応される1又は複数のc p及び／又はt s変異体、又は別に選択された変異体RSV菌株と組み合わせて欠失することができる。

20

【0057】

これに代わるヌクレオチド修飾には、遺伝子位置を変位したRSVにある選択された遺伝子のため、シス作用調節配列を欠失、挿入、付加、又は再配列することを含むことができる。一例では、1つのRSV遺伝子のシス作用調節配列を、異種調節配列に対応して変化して、それが、異なるRSVにおける同じ遺伝子の相当するシス作用調節配列か、あるいは異なるRSV遺伝子のシス作用調節配列にて可能である。例えば、遺伝子終了シグナルが、同一RSV菌株にある異種の遺伝子の遺伝子終了シグナルへ変換又は置換することにより、修飾することができる。他の例において、ヌクレオチドの修飾が、例えば、タンパク質の選択される形状としてそれぞれの翻訳開始部位を除去するため、キメラゲノム又はアンチゲノム内の翻訳開始部位を挿入、欠失、置換、又は再配列することを含んでいる。一例では、RSVのGタンパク質の分泌される形状として翻訳開始部位を、Gタンパク質のこの型の発現を修飾するために除去し、それにより所望の*in vivo*における効果を創り出す。

30

40

【0058】

加えて、多様な他の遺伝子化修飾が、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムにおいて、単独又は生物学的に誘導される変異体RSVから適応される1又は複数の弱毒化変異体と共に生成することができる。例えば、非RSV資源からの遺伝子又はゲノム分節が、1部、又は全体を挿入することができる。非翻訳遺伝子配列を、例えば、外来配列を挿入するための容量を増加させるために、除去することができる。さらにまた別の観点において、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムをコードするポリヌクレオチド分子又はベクターを、非RSV配列をコードするため、例えば、サイトカイン、T-ヘルパーエピトープ、制限部位マーカ、又は意図されたホストに保護免疫反応を惹

50

起できる微生物病原（例えば、ウイルス、バクテリア、又は菌類）のタンパク質を修飾することができる。遺伝子位置を変位したR S Vアンチゲノムにおける差異又は付加的な修飾を、種々の遺伝子間領域（例えば、G遺伝子とF遺伝子の間にある固有のユニークなS t u I 部位）又は他の領域への挿入など、操作を容易にするために行うことができる。

【0059】

点変異体、部位特異的ヌクレオチドの変化、及び遺伝子又はゲノム分節全体に関与する変化を形成するために、ヌクレオチドの挿入、采配列、欠失、又は置換を含む遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノム内の前記修飾の全てが、1部か完全なR S Vゲノム又はアンチゲノムのいずれかに、又はキメラR S Vのゲノム又はアンチゲノムを背景として異種ドーナ遺伝子又はゲノム分節、あるいはレシペント内により行うことができる。10
それぞれの場合、これらの変更が、弱毒化、温度感受性、低温適応性、小プラークサイズ、ホスト範囲の制限、遺伝子発現の変更又は免疫原性エピトープの変化となる表現型変化など、もたらされる組換えR S V内の1又は複数の表現型変化を特定することが好ましい。

【0060】

本発明のまた別の観点において、組成物（例えば、R S Vをコードするc D N Aを組み込む単離されたポリヌクレオチド及びベクター）及び方法が、単離された感染性遺伝子位置を変位したR S Vを生成するために提供される。これらの組成物及び方法を用いて、単離された感染性遺伝子位置を変位したR S V粒子又はサブウイルス粒子が、ヌクレオキャプシド（N）タンパク質、ヌクレオキャプシドリンタンパク質（P）、大型（L）ポリメラーゼタンパク質、及びR N Aポリメラーゼ伸長因子により同時発現される組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムから生成される。本発明の関連する観点において、組成物及び方法が、感染性の弱毒化されたワクチンウイルスを生成するために、組換え遺伝子位置を変位したR S Vに導入するための提供される。20

【0061】

一例において、遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノムをコードする単離されたポリヌクレオチド分子を含んでいる、発現ベクターが提供される。さらに提供されるものは、この発現ベクターは、N、P、L及びR N Aポリメラーゼ伸長因子タンパク質をコードする1又は複数の単離されたポリヌクレオチド分子を含んでいる同一又は異なる発現ベクターである。またこれらのタンパク質が、ゲノム又はアンチゲノムc D N Aから直接発現することができる。上記ベクターが、好ましくは、細胞の又は細胞のない溶離物において、発現又は同時に発現させ、それにより、感染性遺伝子位置を変位したR S V粒子又はサブウイルス粒子を生成することが好ましい。30

【0062】

R S Vゲノムまたはアンチゲノム、又はN、P、L及びR N Aポリメラーゼ伸長因子（好ましくは、R S VのM 2（O R F 1）の生成物）タンパク質が、同一又は異種の発現ベクターにより、同時発現されてよい。ある場合においては、N、P、L及びR N Aポリメラーゼ伸長因子タンパク質が、それぞれ異なった発現ベクター上にコードされる。遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチド分子が、操作により、感染性ウイルスから生成されるウイルス粒子を生成できるようにするため、これらの調節配列に加えられる。本発明のこれに代わる観点において、遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノムは、複数のヒトR S V菌株又はサブグループ（AとB）及び他の非ヒト（例えばマウスの）R S V配列からの配列を含むことが可能である。40
またこれに代わる観点において、遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノムは、非R S V配列を組み込むことが可能である。非R S V配列の例としては、ヌクレオチド又はポリヌクレオチドの操作で加わったヒト及びウシR S Vからの配列を含むポリヌクレオチドがある。そのヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、P I Vの点変異、タンパク質、タンパク質ドメイン又は免疫原性エピトープ選択肢として別の陰性二本鎖m m Aウイルスをコードしている。

【0063】

上記の遺伝子位置を変位したRSV生成のための方法及び組成により、感染性ウイルス又はサブウイルス粒子、あるいはその誘導体を生成する。感染性ウイルスは真正RSVウイルス粒子と比較され、同様に感染性がある。感染性ウイルスが、新鮮な細胞を直接感染させる。感染性サブウイルス粒子が、一般的にウイルス粒子の組成物であり、適切な状況下で感染を起こすものである。例えば、ゲノム又はアンチゲノムRNA及びN、P、L及びM2（ORF1）タンパク質を含むヌクレオキャプシドは、細胞の細胞質に導入されれば感染を起こすことができるサブウイルス粒子の一例である。本発明にて提供されるサブウイルス粒子は、1又は複数のタンパク質、タンパク質分節、又は感染性に必須ではない他のウイルス組成物などを持たないウイルス粒子を含む。

【0064】

10

他の例において、本発明は、上記のように遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムをコードする、単離されたポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター、及びRSVのN、P、L及びRNAポリアミラーゼ伸長因子タンパク質をコードする、1又は複数の単離されたポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター（同一又は異種のベクター）を含んでいる細胞又は細胞のない溶解質を提供する。さらにこれらのタンパク質が、1又は複数のゲノム又はアンチゲノムcDNAから発現することができる。発現により、ゲノム又はアンチゲノム及びN、P、L及びRNAポリアミラーゼ伸長因子タンパク質が、感染性遺伝子位置を変位したRSVウイルス又はサブウイルスの粒子を作製するために、組み合わされる。

【0065】

20

本発明の弱毒化された遺伝子位置を変位したRSVが、感染したヒトのホストに保護免疫反応を惹起することができ、さらに免疫処置を受けたホストに重篤な気道疾病による受け入れ不可能な症状を起こさないように、十分に弱毒化される。弱毒化されたウイルス又はサブウイルス粒子が、培養から単離された、又は部分的にまたは完全に精製された細胞培養上清に存在することが可能である。

このウイルスはまた、凍結乾燥してよく、保管又はホストへの接種のためには必要に応じて、他の多様な組成物と混合してよい。

【0066】

本発明はさらに、生理的に許容できる担体及び／又はアジュバント、及び単離された弱毒化遺伝子位置変位RSVを含む新規なワクチンを提供している。一例において、ワクチンが、上記のように、少なくとも1、好ましくは2又はそれ以上の弱毒化する変異体又は他のヌクレオチド修飾を有する、遺伝子位置が変位されたRSV1個から成る。このワクチンは、弱毒化されたウイルスの 10^3 から 10^6 PFUの用量にて処方することができる。このワクチンが、単一のRSV菌株又は抗原サブグループ例えばA又はB、又は複数のRSV菌株あるいはサブグループに対して免疫反応を惹起する弱毒化された遺伝子位置を変位したRSVを含むことができる。この点に関して、本発明の遺伝子位置を変位したRSVは、単一特異性の免疫反応又は多特異性の免疫反応を、複数のRSV菌株又はサブグループに対して、個別に惹起することができる。遺伝子位置を変位したRSVが、一つ又は複数のRSV菌株又はサブグループに対するより効果的に保護するため異なる免疫原性特質を有する他のRSVsと、ワクチン処方において組み合わせることができる。

30

40

【0067】

関連する観点において、本発明は、哺乳動物の対象動物における1又は複数の菌株またはサブグループに対する免疫反応を惹起するために、個体の免疫系を刺激するための方法を提供する。この方法は、生理的に許容できる担体及び／又はアジュバントに、弱毒化され、遺伝子位置が変位されたRSVを免疫学的に十分な量により処方して投与することを含む。1例において、免疫原性組成物が、上記のように所望の表現型を特定する少なくとも1つの、好ましくは2又はそれ以上の弱毒化する変異体、又は他のヌクレオチドの修飾を有する、遺伝子位置が変位されたRSVから成るワクチンである。このワクチンは、弱毒化されたウイルスを 10^3 から 10^6 PFUの用量にて処方することができる。このワクチンが、単一のRSV菌株又は抗原サブグループ、例えば、AまたはBに対して、又は複

50

数の R S V 菌株又はサブグループに対して、免疫反応を惹起する弱毒化された遺伝子位置を変位した R S V を含んでいる。この状況において、この遺伝子位置が変位された R S V は、複数の R S V 菌株又はサブグループに対して、単一特異性の免疫反応又は多特異性の免疫反応を惹起することができる。選択肢として、異なる免疫原性の特徴を有する遺伝子位置が変位された R S V は、単一の R S V 菌株に対し、又は複数の R S V 菌株、あるいはサブグループに対してより効果的に保護されるように、配合治療プロトコルによりワクチン混合物にて組み合わせることができるか、又は個別に投与することができる。好ましくは、この免疫原性組成物は、上気道に、例えば、噴霧、液滴、又はエアゾルとして投与されるのがよい。多くの場合、この組成物が、R S V に対する抗体血清反応陰性のヒト、又は胎盤經由にて獲得された母体からの R S V に対する抗体を有しているヒトに、投与されることになる。

10

【0068】

特定の実施例の説明

本発明は、ヒト及び他の哺乳動物における感染性、及び弱毒化されたワクチンを作成するために、組換えゲノム又はアンチゲノム内に 1 又は複数の遺伝子の遺伝子順位又は空間的位置を、変位させることにより修飾された組換え呼吸器合胞体ウイルス (R S V s) を提供する。一般的に、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムが、上記ゲノム内に第 2 の「置換ポリヌクレオチド」を導入、欠失、又は再配列を介して 1 又は複数の「変位」遺伝子又はゲノム分節を直接的に又は間接的に再配置することにより修飾され、その結果、プロモータへ隣接するか、またはプロモータへ遠位の位置に対象の「変位」遺伝子又はゲノム分節を位置的に変位させることになる。この状況における遺伝子又はゲノム分節の位置を変位することが、遺伝子変位を導入する前に、親 R S V ゲノム又はアンチゲノムの対象遺伝子又はゲノム分節の位置に対して、例えば、遺伝子を変位する前に、本明細書に記載のように、野生型 R S V ゲノム又はアンチゲノム (例えば、H R S V A 2 又は B R S V カンザス菌株) における、又は親組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムにおける対象遺伝子又はゲノム分節の位置に対して決定される。

20

【0069】

本発明のある観点において、遺伝子位置を変位した R S V は、1 部又は完全な組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、1 又は複数の置換ポリヌクレオチドを挿入、欠失、又は再配列することにより、プロモータ隣接又はプロモータ遠位に変位された 1 又は複数の変位された遺伝子又はゲノム分節を有することを特徴としている。置換ポリヌクレオチドが、相違した、又は「異種」R S V からの遺伝子又はゲノム分節 (例えば、異なる R S V のゲノム又はアンチゲノムに挿入される異種遺伝子又はゲノム分節の場合において) を含む、R S V 遺伝子又はゲノム分節を含むことができる。選択肢として、置換ポリヌクレオチドが、パラインフルエンザ (P I V) 又は麻疹ウイルスのような非 R S V 病原ウイルスを含む、非 R S V 資源からのものであってもよい。置換ポリヌクレオチドが、糖タンパク質の免疫原性領域又はエピトープのようなタンパク質又はタンパク質の一部をコードしてよく、又は置換ポリヌクレオチドが、非コード及びナンセンスポリヌクレオチド配列を含む、不完全又は損傷されたコード配列を表わすものであってもよい。

30

【0070】

本発明のある観点において、組換え R S V は、1 部又は完全な組換え R S V ゲノム又はアンチゲノム内にて、1 又は複数の置換ポリヌクレオチドを挿入、欠失、又は再配列することにより、プロモータ隣接又はプロモータ遠位の位置に、変位された 1 又は複数の変位された遺伝子又はゲノム分節を有することを特徴とする。ある観点において、置換ポリヌクレオチドが、R S V ゲノム又はゲノム分節である。他の観点において、置換ポリヌクレオチドが、完全なオープンリーディングフレーム (O R F) に欠けている。さらに詳細な実施例では、置換ポリヌクレオチドが、150 個から 4,000 個のヌクレオチド (n t s) の長さを有するポリヌクレオチドが組み込まれる。置換ポリヌクレオチドが、組換えゲノム又はアンチゲノムの非コード領域 (N C R) に、挿入又は再配列されてよく、また、組換え R S V ゲノム又はアンチゲノムに、別個の遺伝子ユニット (G U) として、組み込む

40

50

ことができる。

【0071】

本発明の組換えR S V内の遺伝子位置の変位は、一般的に、ゲノム又はアンチゲノム「プロモータ」に関連して決定される。R S Vプロモータが、ポリメラーゼ開始部位を含み、これはポリメラーゼにより認識される保守された配列要素である。プロモータは、およそ30の3'末端ヌクレオチド内の、ゲノム又はアンチゲノムの3'末端に位置している。R S Vゲノムの場合、プロモータが、転写と複製の双方を指示している。しかし、転写シグナルに欠け自然状態にて複製のみ制御するアンチゲノム「プロモータ」は、既知の転写シグナルを挿入することにより、転写を指示するように修飾することができる。本発明を説明するために、このように、R S Vプロモータはゲノム又はアンチゲノムの3'末端に存在すると解釈され、それに故、本明細書にて使われている「プロモータ隣接」及び「プロモータ遠位」という用語が、代替的に、それぞれゲノム又はアンチゲノムの3'末端に向かう方向又は離れる方向を意味する。

【0072】

このように、本発明により提供されるのは、単離されたポリヌクレオチド分子、ベクター（発現の構成）、及び組換えR S Vゲノム又はアンチゲノムを組み込んでいる組換えウイルスであり、この中で1又は複数のゲノム又はゲノム分節が、組換えゲノム又はアンチゲノム内にて、親又は野生型のR S V遺伝子地図における遺伝子部位に比して、よりプロモータ隣接及びプロモータ遠位の位置に変位される。この方法にて遺伝子の位置を変位させることにより、位置的な変位の性質及び程度によって、1又は複数の位置的に「変位」された遺伝子の発現を、望み通りに増加させたり又は減少させたりすることができる。一例では、R S V糖タンパク質が、1又は複数の糖タンパク質コードする遺伝子をよりプロモータ隣接の部位に変位させることにより、アップレギュレートされる。遺伝子位置を変位したR S Vを作製するための操作対象の遺伝子は、N S 1、N S 2、N、P、M、S H、M 2（O m m 1）、M 2（O R F 2）、L、F又はG遺伝子のどれでもよく、また遺伝子の一部又は遺伝子外であるゲノム分節でもよい。望みの表現型及び構造的上の効果を得るために、本発明の遺伝子位置を変位したR S V内にて、多様な他の変異及びヌクレオチド修飾が提供される。

【0073】

ヒトーウシR S Vの組換え構成により、哺乳動物、とくにヒトに感染性を有し、臨床使用目的の免疫原性組成物を生成する上で有用であるウイルス粒子又はサブウイルス粒子が得られる。本発明ではまた、弱毒化された遺伝子位置を変位したR S V及びR S V感染の予防法及び治療のための新しい方法及び組成物をも提供している。本発明による遺伝子位置を変位したR S V及び免疫原性組成物は、特異性をもつR S Vサブグループ又は菌株に対して免疫反応を惹起するか、選択肢として、R S Vサブグループ又は菌株に対して複数の多特異性反応を惹起することが可能である。本発明の遺伝子位置を変位したR S Vは、このように、ヒト及び他の哺乳動物に感染性を持ち且つ弱毒化される。関係する観点において、本発明は、様々な組成物に有用な弱毒化された遺伝子位置を変位したR S Vを設計し作製するための新しい方法を提供し、その結果、R S V感染に脆弱であるホストにおいてR S Vに対し必要な免疫反応を生成している。本発明のこれらの観点に含まれるのは、新しい分離ポリヌクレオチド分子、ベクター、及び遺伝子位置を変位したR S Vゲノム又はアンチゲノムから成るそのような分子を組み込んでいる感染細胞である。本発明による遺伝子位置を変位したR S Vは、特異性を有するR S Vサブグループ又は菌株に対して免疫反応を、又は複数のR S Vサブグループ又は菌株に対して複数の多特異性反応を、惹起することができる。さらにまた、関心の持たれている異種の病原に対する望みの免疫反応を生成するために、他の病原の抗原決定基を組み込むためのベクターとして、弱毒化された遺伝子位置を変位したR S Vを設計し作製するための別の組成物又は方法が提供される。また、本発明では、R S V及び他の病原により引き起こされる感染及び疾病の予防及び治療のために、遺伝子位置を変位したR S Vを挿入する方法又は組成物が提供される。

【0074】

本発明は、結果的に、近年、感染性の組換えRSVをcDNAから生成する方法が出現し改良されてきたことに基づく、継続した発見の流れを補うものである。この業績に基づいて、RSV遺伝子発現及び複製におけるRNA及びタンパク質構造の働きを直接研究することが今や可能となった。これらの研究は、以下に説明、報告がされる：1995年9月27日に提出された米国特許仮出願番号60/007,083、1996年9月27日に提出された米国特許出願番号08/720,132、1996年7月15日米国特許仮出願番号60/021,773、1997年5月9日に提出された米国特許仮出願番号60/046,141、1997年5月23日に提出された米国特許仮出願番号60/047,634、1999年11月30日に発行された米国特許番号5,993,824（国際公開番号W098/02530に対応する）、Coninset al. により1999年4月13日に提出された米国特許出願番号09/291,894、Murphy et al. により4月13日に提出された米国特許仮出願番号60/129,006、Crowe et al.、Vaccine 12:691-699,1994;and Crowe et al.、Vaccine 12:783-790,1994;Collins、et al.、Proc Nat. Acad. Sci. USA 92:11563-11567、1995;Bukreyev、et al.、J. Virol 70:6634-41,1996、Juhasz et al.、J. Virol. 71(8):5814-5819、1997、Durbin et al.、Virology 235:323-332、1997;Karron et al.、J. Infect. Dis. 176:1428-1436、1997、He et al.、Virology 237:249-260、1997;Baron et al.、J. Virol. 71:1265-1271、1997;Whitehead et al.、Virology 247(2):232-9、1998a;Whitehead et al.、J. Virol. 72(5):4467-4471、1998b;Jin et al.、Virology 251:206-214、1998;Bukreyev、et al.、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:2367-2372、1999;Birmingham and Collins、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11259-11264、1999 Juhasz et al.、Vaccine 17:1416-1424、1999;Juhasz et al.、J. Virol. 73:5176-5180、1999;Teng and Collins、J. Virol. 73:466-73、1999;Whitehead et al.、J. Virol. 73:9773-9780、1999;Whitehead et al.、J. Virol. 73:871-877、1999;and Whitehead et al.、J. Virol. 73:3438-3442、1999;Jin et al.、Virology 273:210-8、2000、Jin et al.、J. Virol. 74:74-82、2000;Teng et al.、J. Virol. 74:9317-21、2000（上記各文献を引例として本明細書に組み込まれている）。

【0075】

本発明の遺伝子位置を変位したRSVに関連して、上記の本書に組み込まれた多数の開示は、天然に生成するRSVにおける遺伝子配列の修飾に焦点を当てている。例えば、NS1、NS2、SH及びG遺伝子の各々は、感染性RSV組換え体において個別に首尾良く欠失されており、それにより、下流遺伝子の部位をウイルスプロモータへ関連して変位させている。本発明の他の組換え体においては、NS1及びNS2遺伝子の両方が欠失され、プロモータ隣接方向へ残りの遺伝子を、組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内にて、変位させている。

【0076】

例えば、NS1及びNS2遺伝子の両方が欠失される場合、Nを部位3から部位1へ変位させ、Pを部位4から部位2へ変位させるというようにする。本発明のこれに代わる実施例での他のRSV遺伝子のどれを欠失しても、同様に（プロモータへ関連して）さらに下流に部位するそれらの遺伝子の部位を変位することになる。例えば、SHは野生型ウイル

スの部位 6 に存在し、そのを欠失しても部位 5 にある M に（上流にある遺伝子のどれにも）影響を及ぼさないが、G がプロモータへ関連して部位 7 から 6 に変位することになる。遺伝子の欠失は、稀ではあるが、生物学的に得られる変異ウイルスにおいても起こり得るということの特筆しておく（Karron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13961-13966, 1997、引例により本明細書に組み込まれている）。「上流」及び「下流」は、それぞれ、プロモータ隣接及びプロモータ遠位方向を、意味していることに注意されたい（プロモータはネガティブセンスゲノム m m A の 3' 先端部末端に存在する）。

【0077】

本発明の遺伝子位置を変位した R S V によって、遺伝子配列変位の修飾（すなわち、1 又は複数の遺伝子を、組換えウイルスゲノム内にて、よりプロモータ隣接又はプロモータ遠位の場所へ部位的に修飾すること）を行うと、変化した生物学的特性を有するウイルスが生成される。例えば、N S 1、N S 2、S H、G、N S 1 及び N S 2 を全て欠いている R S V、又は S H 及び G を共に欠いている R S V は、*in vitro* において及び *in vivo* において、又はその両方にて、弱毒化されることが示される。おそらく、この表現型は、主として特異性を有するウイルスタンパク質の発現に起因するものであったと考えられる。しかしながら、改造された遺伝子地図はまた、おそらく観察された表現型に寄与したと思われる。この効果は、S H 欠失ウイルスにより、よく記載されている。S H 欠失ウイルスは、ある細胞種の野生型に比べてより効果的に増殖したが、その原因には、おそらくその遺伝子欠失により転写、複製、又はその双方の効率が高まったこと、さらに欠失によって起こった遺伝子順位及びゲノムサイズが変化したことが考えられる。N S 1 及び／又は N S 2 が欠失された R S V のような、他のウイルスでは、おそらく遺伝子配列の変化に起因する増殖の変化が、R S V タンパク質の発現が喪失されたために、より優性な表現型によって不明確にされる傾向であった。

【0078】

さらにまた別の変化が導入され、R S V の遺伝子配列を変え、弱毒化生ワクチンとしてのその特質を改良させ、好結果を産んでいる。本発明の有効性を論証する特定な例においては、R S V G 及び F 遺伝子が、個別にそして直列に、それらの野生型の遺伝子配列に比して、よりプロモータ隣接の部位へ変位される。これら二つのタンパク質は、通常、R S V 遺伝子順位（N S 1-N S 2-N-P-M-S H-G-F-M 2-L）における部位 7（G）及び 8（F）を占める。発見が好結果を産む可能性を高めるために、G 及び F に関するこの配列操作が、S H 遺伝子が欠失された R S V バージョン（例えば、以下を参照：*whitehead et al.*, J. Virol. 73: 3438-42 (1999)、引例として本明細書に組み込まれている）で行なわれた。このウイルスはより大型のプラークを *in vitro* にて生成するため、これによりウイルスの回収が促進される（*Bukreyev et al.*, J. Virol. 71: 8973-82, 1997、引例として本明細書に組み込まれている）。G 及び F が、その後、個別に部位 1 へ、又は同時に各々部位 1 及び 2 へ、変位された。

【0079】

G 又は F が部位 1 へ変位された組換え R S V、又は G 及び F がそれぞれ部位 1 及び 2 へ変位された組換え R S V は、予想外に容易に回収された。この結果は、単一 V S V 糖タンパク質遺伝子の位置を 2 つ変位するだけで、ウイルス増殖は大きく阻害されたという水泡性口炎ウイルス（V S V）に関する以前の研究と著しく異なっていた（*Ball et al.*, J. Virol. 73: 4705-4712, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）。R S V の複製が非効率的であり、R S V が複雑な遺伝子順位を有しており、さらに糖タンパク質遺伝子の動きには多数の部位変化が関連していたことから考えると、これらの変更ウイルスを回収する能力は予想外であった。実に、再配列された R S V は少なくとも、野生型遺伝子順位を有するた直近の親と同等に増殖した。これは R S V にとっては特に重要である。なぜなら、上記のように、野生型ウイルスの細胞培養の増殖は非効率的であり、この増殖効率が加 γ 伽複製においてはさらに下がることを考えれば、

ワクチン作成は実行不可能となるからである。このように、NS1-NS2-N-P-Mタンパク質の全てが、増殖の健全性を著しく損なうことなく、プロモータへ関連して一つまたは二つだけ部位を置き換えることが可能であるというのは驚くべきことである。加えて、G糖タンパク質の発現を検査してみると、その親ウイルスの発現の数倍にまで発現が高まっていることがわかった。これにより、G及び／又はFを第1部位に含むワクチンウイルスは、これらの感染保護抗原を他のウイルスタンパク質に比べてより高いモル量にて発現し、その結果、望まれるワクチン特質を有するウイルスであることが示された。

【0080】

同様に二つの高度に弱毒化されたRSVワクチン候補について広範囲に及ぶ遺伝子配列の修飾が成された。これらのRSVワクチン候補は、先に引用される文献により詳しく述べられているように、NS2遺伝子が自然状態にて欠失されたか、又はNS1及びNS2遺伝子の両方が欠失されたものである。これらの二つのワクチン候補において、G及びF糖タンパク質が、共にそれぞれ部位1及び2へ変位され、G、F及びSH糖タンパク質がそれらの本来の下流部位から欠失された。このように、回収されたウイルスであるG1F2△NS2△SH及びG1F2／△NS1△NS2△SHは、G及びF遺伝子の変位に加えて、二つ又は三つの遺伝子がそれぞれ欠失される。行った変化の程度を分かりやすく示すために、遺伝子順位を、野生型RSV(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)とG1F2／△NS2△SHウイルス(G-F-NS1-N-P-M-M2-L)又は△NS1△NS2△SH(G-F-N-P-M-M2-L)間にて、比較することができる。この比較により、殆ど又は全部の遺伝子の部位が、プロモータへ関連して変更されたことがわかる。しかし、これらの高度に弱毒化された誘導体は、細胞培養にて増殖する能力を保持した。

【0081】

さらにまた別の変化を導入し、ヒト-ウシキメラRSVにおけるRSVの遺伝子配列を変更し、弱毒化生ワクチンとしてその特性を改良し、好結果を出している(以下を参照のこと: Bucholz et al. により2000年6月23日に提出された米国特許出願番号09/602, 212、2001年1月18日にW0 01/04335として公表されたそれに対応する特許協力条約申請書、及び1999年7月9日提出のその優先仮出願である米国特許出願番号60/143, 132。各々本書に文献として挿入される)。下記の例に記載されているように、G及びF遺伝子が組換えウシRSV(rBRSV)背景内に置換されるところの、感染性組換えヒト-ウシキメラRSV(rBRSV/HRSV)が、順調に構成され回収される。作製されたヒト-ウシキメラは、HRSVからの二つの遺伝子、すなわちGとF、及びBRSVからの8つの遺伝子、すなわちNS1、NS2、N、P、M、SH、M2、Lを含む。この基本的な置換糖タンパク質の構成に加えて、HRSVG及びF遺伝子が、rBRSV骨格内のよりプロモータ隣接の部位へ(すなわち、RSVゲノムにおけるF及びG遺伝子の野生型の部位遺伝子配列部位に比べて)変位される。具体的には、F及びG遺伝子が、プロモータへ関連したそれらの通常の場合、すなわち遺伝子部位7及び8から、それぞれ部位1及び2へ変位していることである。作製されたキメラ組換えウイルスであるrBRSV/A2-G1F2は、免疫蛍光法により検査されたところによると、F及びGタンパク質発現のレベルが、wtHRSVの発現と非常に類似している。この結果、G及びF糖タンパク質の発現が強まったのは、それらの遺伝子のプロモータ隣接への変位が原因であると解釈される。このrBRSV/A2-G1F2ウイルスは、その遺伝子背景にあるBRSV遺伝子と同一の配列を有しているのでホスト範囲の制限が強いこの表現型をおそらく共有すると思われる。この状況において、in vitroにおけるこの二つの保護抗原の増強された発現が、このウイルスの免疫原性を高め、極めて望ましいワクチン特性を生成することになる。

【0082】

RSVは、モノネガウイルス目(Mononegavirales)の非分節型マイナス鎖のRNAウイルスである。モノネガウイルス目は、4つの科を含む巨大で多様な目を構成している。すなわち、水泡性口炎ウイルス(VSV)及び狂犬病ウイルスに代表される

ラブドウイルス科 (rhabdoviridae)、ボルナ病ウイルスに代表されるボルナウイルス科 (Bornaviridae)、マルブルグウイルス及びエボラウイルスに代表されるフィロウイルス科 (Filoviridae)、及びパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) などである。この最後の科はさらに、仙台、はしか、流行性耳下腺炎及びパラインフルエンザを含むパラミクソウイルス亜科、及び呼吸器系胞体ウイルスを含むニューモウイルス亜科 (Paramyxoviridae) の二つの亜科に分けられる。

【0083】

モノネガウイルス目ウイルスのゲノムは、線状に整列配置された5 (VS) から11 (RS) の遺伝子を含む単一のRNAである。モノネガウイルスβウイルスのゲノムは、タンパク質を直接コードせず（故に「ネガティブセンス」）、それぞれが1又は複数のタンパク質をコードする補体ポジティブセンスmRNAsを、コードする。一般的に、遺伝子は、短い遺伝子開始シグナルにて始まり、短い遺伝子終了シグナルで終る。これらのシグナルは、通常、8個から12個のヌクレオチドから成り、通常、あるウイルスの遺伝子間において高度に保存されており、関連ウイルス間においてはその保存性は下がる。

10

【0084】

RSVの場合、ゲノムは15.2 kb以上の長さがあり、11個の同定されたタンパク質をコードする10個の別のmRNAsに転写される。具体的には、RSVの遺伝子配列は3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'であり、M2のmRNAは重なっているORFsからM2-1及びM2-2という二つのタンパク質をコードする。RSVの遺伝子開始及び遺伝子終了シグナルは、RNA複製とプロモータ機能に参与する配列と共に、あらゆる進行中の研究により同定され、分析される (Bukreyev et al., J. Virol. 70: 6634-6641, 1996, Collin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9663-9667, 1991, Minnket al., Virology 185: 615-624, 1991, Grosfeld et al., J. Virol. 69: 5677-5686, 1995, Hardy and Wertz, J. Virol. 72: 520-526, 1998; Hardy et al., J. Virol. 73: 170-176, 1999, Kuo et al., J. Virol. 70: 6143-6150, 1996, Kuo et al., J. Virol. 70: 6892-6901, 1996, Samal and Collins, J. Virol. 70: 5075-5082, 1996, Kuo et al., J. Virol. 71: 4944-4953, 1997, Feams and Collins, J. Virol. 73: 388-397, 1999、各文献を引例として本明細書に組み込まれている)。

20

30

【0085】

モノネガウイルス目ウイルスのゲノムの3'末端は、ポリメラーゼのエントリーを司るプロモータを含んでいる (Lamb and Kolakofsky, Fields Virology, 1: 1177-1204, 1996, and Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136, 1996、各文献を引例として本明細書に組み込まれている)。このプロモータは、ゲノムの3'末端にある遺伝子外先導部領域に、完全に又は部分的に含まれている。ポリメラーゼはその後、遺伝子開始及び遺伝子終了シグナルに導かれて、線形に、終了したり再開したりしながら、3'側から5'側のゲノムを、転写する。各々の遺伝子の遺伝子開始シグナルは、対応するmRNAの合成の開始を司り、遺伝子終了シグナルは対応するmRNAのポリアダニル化、終了及び放出を司る。ポリメラーゼはその後も、テンプレートに結合されたままにて、次の下流遺伝子開始シグナルにて再開する。このプロセスが繰り返され、3'側から5'側に順次遺伝子を転写される (Lamb and Kolakofsky, Fields Virology, 1: 1177-1204, 1996; and Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136, 1996; Abraham and Banerjee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 50

40

50

1504-1508、1976; Ball and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 442-446、1976; Ball, J. Virol. 21: 411-414、1977; Banerjee et al., J. Gen. Virol. 34: 1-8、1977; Iverson and Rose, Cell 23: 477-484、1981; Iverson and Rose, J. Virol. 44: 356-365、1982; Banerjee et al., Pharmacol. Ther. 51: 47-70、1991; 引例により本明細書に組み込まれている)。

上に列挙されるRSVタンパク質の4つは、ヌクレオキャプシドノポリメラーゼタンパク質、すなわち主要ヌクレオキャプシドNタンパク質、リンタンパク質P、及びポリメラーゼタンパク質L、及び抗転写終結タンパク質M2-1である。3つは、表面糖タンパク質、すなわち結合Gタンパク質、貫通及びシンシチウム形成を行う融合性Fタンパク質、機能の不明な小型の疎水性SHタンパク質である。基質Mタンパク質は、ウイルス粒子形成に関与する内部ウイルス粒子タンパク質である。機能不明な非構造的な二つのタンパク質NS1及びNS2がある。最後に、M2mRNAに第2のオープンリーディングフレーム(ORF)があり、これはRNA制御因子であるM2-2をコードする。

【0086】

G及びFタンパク質は、主要な中和及び保護抗原である(Collins, et al., Fields Virology 2: 1313-1352、1996; Connors, et al., J. Virol. 66: 1277-81、1992)。RSVによる再感染への抵抗力は、大部分は、これらのタンパク質に対して特異性を有する血清及び粘膜抗体により仲介される。RSV特異性細胞傷害性T細胞もまた、RSV感染により誘発され、多数の異種のタンパク質に対して制御されることが可能だが、このエフェクターは再感染に対する長期にわたる抵抗力の重要要因になるとは現在のところ報告されていない。しかしながら、CD8+及びCD4+細胞は双方とも、免疫反応を制御する上で重要である可能性があり、双方ともウイルス病因に関与しているとなる(Johnson, et al., J. Virol. 28: 71-80、1998; Shkiatkhachorn and Braciale, J. Exp. Med. 186: 421-32、1997)。このように、F及びGは、最も重要な抗原決定基であるが、他のタンパク質もまた免疫系において重要な役割を果たしている可能性がある。

【0087】

RSV単離株は、モノクローナル抗体の活性により、二つの抗原サブグループA及びBに分けることができる(Anderson, et al., J. Infect. Dis. 151: 626-33、1985; Mufson, et al., J. Gen. Virol. 66: 2111-24、1985)。これらの二つのサブグループは、ゲノム間にて差異を呈するが、Gタンパク質の外領域において最も大きい多様性を示す。Gタンパク質の外領域では、アミノ酸配列の多様性の割合が50%を越えることがあり、単一特異性ポリクローナル抗血清の活性に基づく抗原の多様性が95%になる(Johnson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5625-9、1987; Johnson, et al., J. Virol. 61: 3163-6、1987)。Fタンパク質は、アミノ酸配列にて約10%の多様性があり、抗原的にはRSVA及びBサブグループ間にて50%の多様性がある(Johnson, et al., J. Virol. 61: 3163-6、1987; Johnson and Collins, J. Gen. Virol. 69: 2623-8、1988)。このように、双方のサブグループは、ワクチンの代表例となる。

【0088】

RSV及び他のモノネガウイルス目は、徐々に遺伝子の転写効率を減少させるため、その結果、最もプロモータ隣接のにある遺伝子が最も効果的に転写され、その後並ぶ遺伝子の転写効率は徐々に下がると報告される(Lamb and Kolakofsky, Fields Virology, 1: 1177-1204、1996; Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136、1996; Abr

10

20

30

40

50

aham and Banerjee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1504-1508, 1976, Ball and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:442-446, 1976, all, J. Virol. 21:411-414, 1977; Banerjee et al., J. Gen. Virol., 34:1-8, 1977, Iverson and Rose, Cell 23:477-484, 1981, Iverson and Rose, J. Virol. 44:356-365, 1982, Banerjee et al., Pharmacol. Ther. 51:47-70, 1991, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0089】

この遺伝子発現の減少傾向は、これまでも報告されており、RSVの特徴の一つである (Collins and Wertz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3208-3212, 1983; Collins et al., J. Virol. 49:572-578, 1984, Dickens et al., J. Virol. 52:364-369, 1984, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。この減少傾向は、部分的には、配列の転写中に起こるポリメラーゼの「減少」が原因であると考えられている。モノネガウイルス目のウイルスの中で最も単純であるラブドウイルスVSVについての研究によると、減少は主として遺伝子間領域にて起こるという (Iverson and Rose, Cell 23:477-15484, 1981, Iverson and Rose, J. Virol. 44:356-365, 1982, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。しかし、大型LmRNAの量が極端に低いため、遺伝子内の減少もその結果として当然であるとも言える。

【0090】

モノネガウイルス目のウイルスについて報告される遺伝子転写の減少傾向は、感染細胞内の多様なウイルスmRNAsの相対的モル率を決定する主要な因子であると考えられている。この現象は、言い換えると、ウイルスのタンパク質の相対的モル率を決定する主要な因子であると考えられている。モノネガウイルス目のウイルスはどれもみな、次の5つのタンパク質に対応するものをコードする遺伝子を有している。すなわち、RNA結合ヌクレオキャプシドタンパク質N、リンタンパク質P、内部ウイルス粒子基質タンパク質M、結合タンパク質G、HA、又はHN、及び大型ポリメラーゼタンパク質Lなどである。さらに、これらは、必ず3'→5'に向かってN-P-M-G-Lの順になっている。

【0091】

これから解釈できることは、このゲノム構成は、モノネガウイルス目のウイルス共通の二一ズが、N及びPタンパク質の量が多く、Lの量が少なく、さらにM及びGの量が中程度であることを反映している。選択肢として、モノネガウイルス目のウイルス内の相同性組換え体の欠落は、結果的に、ウイルスにとって必ずしも最適ではない先祖の遺伝子配列の保持につながることを示唆される (Ball et al., J. Virol. 73:4705-4712, 1999, 引例として本明細書に組み込まれている)。抑制遺伝子の順位及び転写の極性が、モノネガウイルス目のウイルスの遺伝子発現の制御における重要な因子として提案される。しかしながら、他の二次的な因子もまた、1又は複数のモノネガウイルスにおけるタンパク質の発現の相対的レベルに影響を及ぼすと考えられている。二次的因子には、シス作用性RNAシグナルの効率における差異、多様なmRNAsの翻訳の効率における差異、及びタンパク質の処理及び安定性における差異などが含まれる。

【0092】

単純な原型モノネガウイルスVSVは、5つの遺伝子を有している (Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136, 1996, Schubert et al., J. Virol. 51:505-514, 1984, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。しかしながら、他のモノネガウイルスは、11 (RSV) 又は12 (ネズミの肺炎ウイルス) もの遺伝子を有している (Barr et al., J. Virol., 68:5330-5334, 1994, 本書に文献として挿入さ

10

20

30

40

50

れる)。これらには、パラミクソウイルス及びニューモウイルスの全てに見られる融合性 F 遺伝子などのタンパク質、パラミクソウイルスの一部に見られる C、D 及び V 遺伝子、さらにニューモウイルスの殆どに見られる NS1、NS2、SH 及び M2 遺伝子が含まれる。また、VSV と RSV に共通である可能性がある 5 つのタンパク質 (N、P、M、G 及び L) についても、L に対してのみ明瞭な配列関連性があり、その関連性は低い (Pochet et al., Embo. J. 8: 3867-3674, 1989, Stec et al., Virology 183: 273-287, 1991、各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0093】

遺伝子生成物の整列及び構造におけるこの広範囲に渡る差異、さらにトランス作用性とシス作用性組成物の構造及び機能における差異を考慮すれば、1 つのモノネガウイルス、例えば VSV の特徴及び特質は、直接他のモノネガウイルス、例えば RSV に当てはめることはできない。この不確実性は、RSV ポリメラーゼが 3 つではなく 4 つのタンパク質から成り、余分な 1 つは M2-1 抗転写終結因子であり、VSV にはそれに対応するタンパク質がないという研究成果により例示される (Hardy and Wertz, J. Virol. 72: 520-526, 1998; Hardy et al., J. Virol. 73: 170-176, 1999, Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 81-85, 1996; Fearn and Collins, J. Virol. 73: 5852-5864, 1999、各々引例として本明細書に組み込まれている)。これが、組換え RSV の効率的な回収に非常に重要であることが論証される。(Collins et al., Virology 259: 251-255, 1999; 引例として本明細書に組み込まれている)。加えて、RSV の RNA の合成は、少なくとも二つのタンパク質 NS1 及び M2-2 によりさらに制御されており、この二つのタンパク質は、VSV 内にこれらに対応する物質を有するていない (Bermingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-64, 1999; Whltehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999; Atreya et al., J. Virol. 72: 1452-61, 1998, Jin et al., J. Virol. 74: 74-82; 2000; 各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0094】

VSV 遺伝子の発現及び制御に関する多くの重要な特徴も、多くの他のモノネガウイルス、特に RSV には、なんらの関連性もないように思われる。これらの VSV 遺伝子の発現及び制御に関する特徴には、次のようなものがある。すなわし、VSV 遺伝子の発現を補完的に制御している末端基の関与 (Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8587-8591, 1994; Whelan and Wertz, J. Virol. 73: 297-306, 1999, Peoples and Collins, J. Virol. 74: 146-155, 2000、各々引例として本明細書に組み込まれている)、直接遺伝子発現に関与する高度に保存された VSV の遺伝子間領域 (RSV の遺伝子間領域はこうではないが (Barr et al., J. Virol. 71: 1794-1801, 1997、引例として本明細書に組み込まれている)) (Kuo et al., J. Virol. 70: 6143-6150, 1996、引例として本明細書に組み込まれている)、他のモノネガウイルスグループには見られない VSV ゲノム・パッケージング・シグナル (Whelan and Wertz, J. Virol. 73: 307-315, 1999、引例として本明細書に組み込まれている)、及び N タンパク質による VSV 遺伝子の発現及び複製の制御 (Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136, 1996, Feams et al., Virology 236: 188-201, 1997、引例として本明細書に組み込まれている)。これらの特徴は、RSV には起こらないようであり (Peoples and Collins, J. Virol. 74: 146-155, 2000、引例として本明細書に組み込まれている)、一方対照的に、RSV には、VSV では起こらない遺

10

20

30

40

50

伝子の発現及び制御に関する重要な特徴がある。その特徴には次のようなものがある。すなわち、シス作用性の機能的要素を欠く多様な遺伝子間配列（Kuo et al. , J. Virol. 70 : 6143-6150, 1996、引例として本明細書に組み込まれている）、部位特異性の弱毒を伝達する遺伝子の重なり1箇所（Feams and Collins, J. Virol. 73 : 388-397, 1999、Collins et al. , proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 5134-5138, 1987、引例として本明細書に組み込まれている）、及びL遺伝子の発現に非常に重要であるポリメラーゼのバックトラッキング・メカ必要性μの存在（Feams and Collins, J. Virol. 73 : 5388-5397, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）などである。特に、配列の転写を調節する抗転写終結因子の存在（Feams and Collins, J. Virol. 73 : 5852-5864, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）、特異性を有する制御タンパク質、部位特異性の弱毒化、さらに転写の遺伝子結合特異性のモジュレーション（Hardy et al. , J. Virol. 73 : 170-176, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）は、VSVでの状況と全く対照的である。

【0095】

本発明のある実施例では、遺伝子位置の変位が、RSVのNS1、NS2、SH及び／又はG遺伝子の1又は複数の欠失により行なわれており、それらの欠失が、個別に上記の文献に記載される。これらに代わる遺伝子又はゲノム分節の欠失が、上記に同定されるRSV遺伝子又はゲノム分節のどれを使っても構成することができ、残りのRSV遺伝子の遺伝子部位を修飾することができる。より詳細な例では、NS1及びNS2遺伝子を対で欠失する上記の文献に例示されるように、複数の遺伝子又はゲノム分節が欠失される（Bukreyev et al. , J. Virol. 71 : 8973-8982, 1997、Teng and Collins, J. Virol. 73 : 466-473, 1999、Whltehead et al. , J. Virol. 73 : 3438-3442, 1999、文献として挿入される）。

【0096】

組換えRSVゲノム又はアンチゲノム内にて、1又は複数の遺伝子またはゲノム分節を欠失することが、全ての下流の遺伝子をプロモータへ隣接する位置に変位させるという効果を有する（例えば、下流の遺伝子をその位置にて1又は複数のプロモータへ隣接する方向へ変位させることにより）。例えば、RSVのNS1及びNS2遺伝子が、ゲノム地図において第1及び第2の遺伝子であり、それらを同等に欠失させることにより、残りの遺伝子全ての位置を修飾する。

【0097】

このように、NS1及びNS2を共に欠失する場合、Nは部位3から部位1へPは部位4から部位2へというように変位される。選択肢として、この遺伝子配列内の他のどの遺伝子を欠失しても、それよりさらに下流にある遺伝子の部位（プロモータを基準として）にのみ影響を及ぼす。例えば、SHが、野生型ウイルスにおいて部位6を占めているが、それを欠失しても部位5にあるM（又は他のどの上流遺伝子にも）には影響を及ぼさないが、Gをプロモータ基準として部位7から6へ変位させる。遺伝子欠失はまた、稀ではあるが、生物学的に得られるウイルスにも起こり得ることを特筆しておく。例えば、細胞培養にて大規模に継代培養したサブグループBRSVが、自然発生的にSH及びG遺伝子を欠失している（Karron et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 13961-13966, 1997；引例として本明細書に組み込まれている）。「上流」及び「下流」とは、それぞれ、プロモータへ隣接及びプロモータへ遠位の方

【0098】

本発明において有用な遺伝子の再配列における第2の例が、遺伝子順位を修飾するために、又はプロモータを基準とした遺伝子部位の変位を組換えゲノム又はアンチゲノムに導入

するために、遺伝子、ゲノム分節又は異種性ポリヌクレオチド配列を、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムに、挿入することに関連している（例えば以下を参照。Bukreyev et al.、J. Virol. 70: 6634-6641、1996；Bukreyev et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2367-2372、1999、Monya et al.、FEBS Lett. 425: 105-111、1998、Singh and Billeter、J. Gen. Virol. 80: 101-106、1999、引例として本明細書に組み込まれている）。

【0099】

組み込まれた遺伝子の各々が、全て下流の遺伝子を、プロモータを基準として、1箇所だけ置き換える。これら及び他の置換ポリヌクレオチドが、組換えゲノム又はアンチゲノムを非コード領域（NCR）に、挿入又は再配列することも、又は組換えゲノム又はアンチゲノムに、別個の遺伝子ユニット（GU）として、挿入することもある。本明細書に用いられているように、「RSV遺伝子」という用語は、通常上流末端にて、1ヌクレオチド遺伝子開始（GS）シグナルを開始、下流末端で12から13、1ヌクレオチド遺伝子終了（GE）シグナルで終了する一般的にmRNAをコードするRSVゲノムの一部を意味する。本発明にて使用する10個の遺伝子が、RSVとして知られているので、すなわちNS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2及びLである。「遺伝子」という用語はまた、本明細書にては「翻訳オープンリーディングフレーム（ORF）」のことを指すのにも使われている。ORFが、重要なRSVタンパク質1個をコードする翻訳オープンリーディングフレームとして、より詳しく定義される。重要なタンパク質のうち、現在、NS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2-1（又はM2（ORF1））、M2-2（又はM2（ORF2））、及びLの11個が認識されている。このように、「遺伝子」という用語は、サブゲノムRNAをコードするゲノムRNA配列、及びORFを意味し、これらは同じことを意味する（後者の用語は特に、異なったタンパク質をコードする二つの重なり合うORFが1つのmRNAにあるRSVのM2遺伝子の場合にあてはまる）。（Collins et al.、J. Gen. Virol. 71: 13015-3020、1990、Birmingham and Collins、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-11264、1999、Ahmadian et al.、EMBO J. 19: 2681-2689、2000、Jin et al.、J. Virol. 74: 74-82、2000（各々引例として本明細書に組み込まれている）。「遺伝子」という用語がプロモータの位置を基準として遺伝子の位置を決定する状況により使われる場合は、この用語は通常厳密には転写遺伝子開始及び遺伝子終了シグナルモチーフにより区切られるmRNAコード配列を指す（Collins et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4594-4598、1986、Kuo et al.、J. Virol. 70: 6892-6901、1996、各々引例として本明細書に組み込まれている）。

【0100】

「ゲノム分節」という用語は、あらゆる長さのRSVゲノムからの連続性ヌクレオチドを指し、ゲノム分節が、ORF、遺伝子、または遺伝子外領域の組み合わせの一部であってよい。

【0101】

本発明の遺伝子位置を変位したRSV内にて挿入部、置換部、欠失要素、又は再配列要素に使用するために選択される遺伝子及びゲノム分節には、NS1、NS2、N、P、M、SH、M2（ORF1）、M2（ORF2）、L、FまたはGタンパク質又はそれらのタンパク質をコードする遺伝子又はゲノム分節が含まれる。遺伝子外先導部又は尾部領域のような、制御領域もまた、考慮対象になり得る。本発明の好ましい例では、キメラRSVはRSVのF、GまたはSH糖タンパク質をコードする1又は複数の異種遺伝子を組み込んでいる。選択肢として、組換えRSVは、RSVのF、GまたはSH糖タンパク質の細胞質ドメイン、膜間ドメイン、外部ドメイン又は免疫原性エピトープをコードするゲノム分節を組み込むこともできる。これらの免疫原性タンパク質、ドメイン及びエピトープが

10

20

30

40

50

、新しい免疫反応を免疫化するホストに生成するため、遺伝子位置を変位したRSVにおいて、特に有用である。特に、G及びFタンパク質、及びそれらに含まれるドメインとエプिटープが、主要な中和及び感染保護抗原を提供し得る。さらに、例えば、流行性耳下腺炎及びRSVウイルスに見出されるSHタンパク質のような、非RSVタンパクをコードする遺伝子及びゲノム分節を、本発明の遺伝子位置を変位したRSVに組み込むことが可能である。遺伝子外3'先導部または5'尾部領域、遺伝子開始領域、遺伝子終了領域、遺伝子間領域、又は3'または5'非コード領域のような、制御領域もまた、異種性（異種のRSV菌株またはサブグループ、又はPIV、麻疹、流行性耳下腺炎などの非RSV資源からするもの）置換又は付加として有用である。

【0102】

例えば、ヒトRSVサブグループ又は菌株からする1又は複数の遺伝子又はゲノム分節を、ウシレシピエントゲノム又はアンチゲノムに付加又は置換またはその内にて付加又は置換することにより、1又は複数の特異性を有するヒトRSVサブグループ又は菌株を含むヒト供与ウイルスを対象とする、免疫反応を生成する能力を有する組換えキメラサブウイルス粒子を生成し、一方でウシ骨格が、弱毒化された表現型を与え、このキメラが、ワクチン開発に有用な候補となる。そのような一例では、感染しやすいホストが、抗ヒトRSV免疫反応を惹起する弱毒化され、そして感染性を有するヒトウシキメラを作製するために、1又は複数のヒトRSV糖タンパク質遺伝子F、SH、及び／又はGが、1部又は完全なウシゲノム又はアンチゲノムに付加又は置換、あるいはその内にて付加又は置換される。他の「キメラ」実施例では、遺伝子位置を変位したRSVが、例えば、RSVサブグループA及びBからするF又はGタンパク質らの免疫原性部分のような、複数のヒトRSV菌株からする免疫原性タンパク質、タンパク質ドメイン、又はエプिटープをコードする異種性の遺伝子又はゲノム分節を組み込んでいる。さらに別のこれに代わる例では、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムが、ヒト及びウシ双方の糖タンパク質ドメイン又は免疫原性エプिटープを有する組換えウイルス又はサブウイルス粒子内にて、キメラ糖タンパク質をコードしている。例えば、ヒトRSVのF、SH又はG糖タンパク質から糖タンパク質外ドメインをコードする異種性ゲノム分節、背景のウシゲノム又はアンチゲノム内にて対応するウシF、SH又はG糖タンパク質細胞質ドメイン及び内部ドメインをコードするゲノム分節に組み合わせることもできる。

【0103】

本発明の方法によると、ヒトウシキメラRSVが、異種性遺伝子又はゲノム分節を、それらに対応する遺伝子又はゲノム分節と、部分的RSV背景ゲノム又はアンチゲノムにおいて、置換することにより、構成することができる。選択肢として、異種性遺伝子又はゲノム分節を、完全な（別の遺伝子又はゲノム分節が欠失される場合は、部分的な）RSV背景ゲノム又はアンチゲノムと組み合わせ、過量の遺伝子又はゲノム分節として付加することができる。例えば、RSVサブグループA及びBのそれぞれから1つ、合計二つのヒトRSV G又はF遺伝子又はゲノム分節を、含めることができる。

【0104】

多くの場合、置換遺伝子又はゲノム分節（異種性の遺伝子又はゲノム分節を含めて）が、1部又は完全なRSVゲノム又はアンチゲノム内の遺伝子間部位にて付加される。選択肢として、遺伝子又はゲノム分節が、そのゲノムの他の非コード領域内に配置してもよい。例えば、5'側又は3'側の非コード領域内、又はヌクレオチドの非コードが、1部又は完全なゲノム又はアンチゲノム内にて起こる他の部位などである。一観点においては、非コード制御領域が、効率のよい複製に必要なシス作用性シグナル、転写、及び翻訳を含み、従がって置換遺伝子又はゲノム分節を本発明に開示されるように導入することにより、これらの機能の修飾を行う目的部位にもなっている。本発明のさらに詳細な観点において、弱毒化変異が、シス作用性制御領域に、例えば以下を生成するために導入される。

【0105】

すなわち、(1)組織特異性の弱毒化 (Gromeller et al., J. Virol . 73: 958-64, 1999; Zimmermann et al., J. Virol

10

20

30

40

50

. 71: 4145-9, 1997)、(2) インターフェロンに対する高い感受性 (Zimmermann et al., J. Virol. 71: 4145-9, 1997)、(3) 温度感受性 (Whitehead et al., Virology 247: 232-9, 1998)、(4) 複製のレベルにおける一般的制限 (Men et al., J. Virol. 70: 3930-7, 1996; Muster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5177-5181, 1991)、及び/又は(5) 複製のホスト特異性制限 (Cahour et al., Virology 207: 68-76, 1995) などである。これらの弱毒化変異は、あらゆる方法にて達成でき、例えば、点変異、関連ウイルス間の配列交換、又は欠失により、本発明の弱毒化遺伝子変位された RSV を作成できる。

10

【0106】

本発明のこれらに代わる他の実施例では、遺伝子位置を変位した RSV が提供されており、この遺伝子位置を変位した RSV では、複数の遺伝子又はゲノム分節を欠失、挿入、置換、又は再配列することにより、組換え RSV が修飾される。ある例では、選択された「遺伝子の組み込み」を、組換え RSV ゲノム又はアンチゲノムへ、その内にて又はそこから、これらの手段の 1 つを用いて、連係して変位する。個別に又は連係して変位される遺伝子群が選択される可能性のある RSV 遺伝子群には、RSV の N、P、NS1、NS2、M2-1 及び M 遺伝子が含まれ、これらが、弱毒化された遺伝子位置の変位誘導体を生成するために、ヒト又はウシ RSV ゲノム又はアンチゲノム内にて、単独、又は任意の組み合わせにより変位することができる。さらに詳細な観点において、ヒト又はウシ RSV の N 及び P 遺伝子の双方が、連係されて欠失、挿入、置換、又は再配列される（例えば、HRSV ゲノム又はアンチゲノムにおける、ウシ RSV からの対応 N 及び P 遺伝子による、連係した欠失又は置換により）。この配列された遺伝子の変位が、RSV ゲノムに存在するある種の遺伝子間の機能的な協調性により促進される。この協調性が、ゲノム内の隣接する遺伝子の対にしばしば起こるものである。このように、他の前記に代わる実施例では、NS1 及び NS2 遺伝子の双方が、例えば、ウシ RSV から NS1 及び NS2 遺伝子によるヒト RSV の置換などにより、連係して変位する。さらにまた別の例では、RSV の M2-1、M2-2 及び L 遺伝子の 2 またはそれ以上連係して変位する。ホスト範囲制限が高レベルであることが望まれる本発明のある種のワクチン候補については、ヒト RSV の N、P、NS1、NS2、M2-1 及び M 遺伝子のそれぞれが、ウシ RSV からの対応遺伝子 N、P、NS1、NS2、M2-1 及び M により置き換えられている。

20

30

【0107】

ヒト-ウシキメラ RSV 内の連係された遺伝子の変位がまた、ウシ背景ゲノム又はアンチゲノム内へのヒト抗原遺伝子の導入に通じている。幾つかの例では、F、G、SH、及び M から選択された 1 又は複数のヒト RSV エンベロープ関連遺伝子を、部分的な又は完全なウシ RSV 背景ゲノム又はアンチゲノム内にて、付加、又は置換する。例えば、F、G、SH、及び M から選択された 1 又は複数のヒト RSV エンベロープ関連遺伝子を、1 部又は完全なウシ RSV 背景ゲノム又はアンチゲノム内にて、付加、又は置換させることもあり、その中で F、G、SH、及び M から選択された 1 又は複数のエンベロープ関連遺伝子を欠失する。さらに詳細な観点において、ヒト RSV エンベロープ関連遺伝子 F、G、及び M として定義される遺伝子セットからする 1 又は複数の遺伝子が、エンベロープ関連遺伝子 F、G、SH、及び M を欠失する部分的なウシ RSV 背景ゲノム又はアンチゲノム内にて付加される。下記の例に記載されているこれらの特徴を有する典型的なヒトウシキメラ RSV は、rBRSV/A2-MGF である。

40

【0108】

本発明の他の観点において、RSV ワクチン候補へ異種性ヌクレオチド配列を組み込むことが、候補ワクチン組換え体の弱毒化レベルを調整するために、個別に行なわれている（例えば、上気道用に）。このように、外来タンパク質の発現を司り、同時に動物のホストにおけるウイルスを弱毒化するヌクレオチド配列を rRSV へ挿入することが可能であり、また、ヌクレオチド挿入を別個に用いて候補ワクチンウイルスを弱毒化することが可能

50

である。本発明のこれらの観点を達成する一般的なツールと方法は、例えば、以下の文献に提供される。

【0109】

すなわち、仮出願番号60/170,195、米国特許出願番号09/458,813、及び米国特許出願番号09/459,062（各々本書に文献として挿入される）。したがって、本発明の典型的な例では、選択されたRSV遺伝子間結合間にはしかHAORFを組み込むことにより、*in vivo*におけるウイルス複製を制限している。本発明のこれらの観点において、選択された遺伝子の挿入量は、比較的多い（約1900nts以上）。この状況において、挿入のサイズにより、結果として作製される組換えウイルスの弱毒化のレベルを特定し選択できる。例えば、単一の遺伝子単位（GUs）として導入され、重要なORFを欠失するように特に設計するなど、異種性のウイルスからする様々な長さの置換配列が、ゲノムの長さを増加させたため（すなわち、付加mRNAの発現と比較して）、選択可能な弱毒化効果を呈する。類似したサイズを組み込むことが下流の非コード領域（NCR）に導入されるよう他の構成も本発明では有用である。

10

【0110】

遺伝子挿入による弱毒化への効果を左右する法則を定義するため、多様な長さの遺伝子ユニットを、野生型RSV骨格に組み込みし、遺伝子単位の長さの弱毒化への効果を調べることができる。重要なORFを含まないように設計された遺伝子単位を組み込むことにより、その遺伝子の発現タンパク質の効果の影響を受けずに、遺伝子単位長の効果だけを評価することができる。これらの異種性配列が、HNとL遺伝子の間の、168ntから3918ntのサイズを有する追加遺伝子ユニットとして、PIV骨格に挿入された。さらに、制御cDNA構成及びウイルスを生成し、その中で同様のサイズの挿入がPIVのHN遺伝子の3'非コード領域に置かれ、そして余分な遺伝子の付加が行なわれなかった。これらのウイルスを、ゲノム全長の増加及び遺伝子数の増加の、弱毒化への効果を測るために作製した。追加遺伝子単位の組み込みにより、挿入部位から下流の遺伝子の転写が低下すると考えられており、この転写の低下は発現タンパク質の全体の量的存在度及び発現率の双方に影響すると考えられる。本明細書に記載されているように、約3000ntsの長さを越える遺伝子挿入又は拡張により、ハムスターの上気道及び下気道に感染する野生型ウイルスが弱毒化された。約2000ntsの長さを有する遺伝子挿入により、同上気道に感染するrHPIV3cp45Lワクチン候補がさらに弱毒化された。

20

30

【0111】

RSVへ類似した遺伝子を挿入することが、このように候補ワクチンウイルスを弱毒化すること、及び第2のウイルスに対して感染保護効果を誘発することの二重の効果がある。ある遺伝子の3'非コード領域における遺伝子拡張は、付加タンパク質を発現することはできないが、遺伝子拡張内、及び遺伝子拡張自体の弱毒化を起こすこともできる。本発明のこれらの方法において、遺伝子挿入長は、弱毒化の決定因子である。

【0112】

本発明にて使用される遺伝子再配列の別の例では、かなり長いポリヌクレオチド（例えば、100個を超えるヌクレオチド）を導入することも、欠失することもせずに、天然にて生成する1又は複数の遺伝子の部位を、天然にて生成する他の遺伝子に関連して変更することを含んでいる。例えば、ヒト又はヒトウシキメラRSVのF及びG遺伝子が、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムの長さを大幅に変更することなく、それら天然の遺伝子配列部位から、プロモータへ有意に隣接へ、それらの遺伝子の組換えゲノム又はアンチゲノムへ、切除及び再挿入することにより変位することができる。

40

【0113】

遺伝子部位及び／又は遺伝子順位におけるこれらの修飾により、一般的に、修飾された生物学的特質を有するウイルスを生成する。例えば、1又は複数の選択された遺伝子（例えば、NS1、NS2、SH、又はG、NS1とNS2を共に、及びSHとGを共に）を欠損する本発明の組換えRSVが、*in vitro*において、又は*in vivo*にて、あるいはその両方にて弱毒化することができる。この表現型が、主としてたぶん特異性

50

を有するウイルスタンパク質の発現を喪失することが、原因にて起こると考えられるが、さらに修飾された遺伝子地図によりこの表現型が起こるとも考えられる。このことが、SH遺伝子を欠失したウイルスにて観察した結果により裏付けられる。このSH遺伝子欠失ウイルスを、ある細胞種の野生型に比べより効果的に増殖したが、それはおそらくこの遺伝子欠失及び欠失の結果として起こる遺伝子配列の変化及びおそらくゲノムサイズの変化に起因する転写、複製、又はその双方の効率の増大によると考えられる。cDNAから感染性RSVを生成する能力を利用して、cDNA中間体を通して感染性ウイルスに所定の変更を導入する方法が提供される。

【0114】

この方法は、野生型の組換えRSV菌株A2の一連の感染性弱毒化誘導体を生成するために使われてきた。これらの誘導体には、例えば、シス作用性RNAシグナルにおける1又は複数のヌクレオチド置換、及び／又は1又は複数のウイルスタンパク質におけるアミノ酸置換、及び／または1又は複数の遺伝子の欠失、又はその発現の除去を含む、弱毒化変異が含まれている (Bukreyev et al., J. Virol. 71: 18973-8982, 1997; Whitehead et al., J. Virol. 72: 4467-4471, 1998; Whitehead et al., Virology 247: 232-239, 1998; Birmingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-11264, 1999; Juhasz et al., Vaccine 17: 1416-1424, 1999; Juhasz et al., J. Virol. 73: 5176-5180, 1999; Teng and Collins, J. Virol. 73: 466-473, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73: 871-877, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999; Collins et al., Adv. Virus Res. 54: 423-451, 1999; 1999年7月9日に提出された米国特許出願番号60/143,097、米国特許出願番号09/611,829及びW001/04321として公開されたその対応特許協力条約出願書、各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0115】

菌株A2が、抗原サブグループAを代表するものであり、効果的なワクチンRSVもまたもう1つの抗原サブグループBを代表するものである。G及びF糖タンパク質が、主要な抗原決定基であり、そして主な感染保護RSV抗体である (Connors et al., J. Virol. 65: 1634-1637, 1991; Mulphy et al., Virus Research 32: 13-36, 1994; Collins et al., Fields Virology 2: 1313-1352, 1996, and Crowe et al., New Generation Vaccines, 711-725, 1997、各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0116】

従って、組換えA2のG及びF遺伝子が、抗原サブグループBのB1菌株からそれらに対応する遺伝子と置き換えられた (Whitehead et al., J. Virol. 73: 9773-9780, 1999、本明細書の引例として組み込まれて)。これは、野生型により弱毒化された菌株A2骨格を使って行なわれた。組換えウイルスが得られ、この「キメラ化」が、ウイルス複製を殆ど妨げなかった。このことにより、ワクチンウイルス作製の迅速な方法が示された。具体的には、弱毒化された菌株A2骨格を使って、サブグループBの抗原決定基を発現することである (特許出願中)。このように、適切に弱毒化されたサブグループA遺伝子位置を変位したRSVワクチンウイルスが臨床検査により同定されると、その骨格を修飾して、同等のサブグループBワクチンを迅速な方法を使って生成することができ、これらの二つのウイルスを混合して2価のワクチンを作製することができる。

【0117】

上記の文献に示されるように、本発明で有用なRSVが、余分な遺伝子つまり過剰の遺伝

10

20

30

40

50

子として、あらゆるゲノム部位の1箇所に、好ましくは遺伝子間領域に、配置された付加外来遺伝子を発現し得る。この概念が、過剰遺伝子としてのサブグループBのG糖タンパク質を発現した組換え菌株A2ウイルスを作製するために利用された。このように、単一のウイルスが、二つのサブグループの抗原決定基を発現した。本明細書に組み込まれたさらに別の例には、付加遺伝子としてのインターフェロンガンマの発現が関連しており、この例は、免疫原性を減少させることなく弱毒化させることができ、さらにTヘルパーリンパ球サブセット2の刺激の相対的レベルを下げる方法を提供し、これがRSVに対する免疫病原性反応を仲介するとされる（例えば以下を参照：1999年7月13日に提出された米国仮出願番号60/143,425、米国特許出願番号09/614,285及びW001/04271として公開された特許協力条約出願書、各々引例として本明細書に組み込まれている）。 10

【0118】

本発明の上記に代わる例では、遺伝子部位の変位を組み込んだ生のウイルスワクチンを弱毒化した異なった基盤が提供される。これは、弱毒化が部分的に宿主範囲の効果に基づいている。この点において、簡略な開示例が、HRSV/BRSV間に、ゲノム分節、全部の遺伝子、複数の遺伝子を導入することにより、弱毒化キメラRSVを提供している。HRSVとBRSV間の宿主範囲の違う例示として、BRSVの増殖がチンパンジーにおいて微かに認められるか認識できない程度であるのに比べて、HRSVではチンパンジーにおいて高度に自由な増殖を見せていることを挙げている。チンパンジーが、ヒトにおけるRSV感染及び免疫抗原活性について広く利用されるモデルであり、ヒトに類似したウイルス複製及び疾病を呈する。下記に示すように、チンパンジーにおいて観察されるキメラRSVの宿主範囲の違いが、細胞培養において観察された宿主範囲の違いと相関関係があり、便利な予備アッセイ法を提供する結果となった。 20

【0119】

本発明のキメラヒト-ウシRSVにて観察された宿主範囲の効果は、一般的にHRSV/BRSV間にて観察されるヌクレオチド及びアミノ酸配列の差異に関連している。例えば、次に挙げるタンパク質の各々についてHRSV/BRSV間のアミノ酸の相同性の割合が、次のようになっている。すなわち、NS1（69%）、NS2（84%）、N（93%）、P（81%）、M（89%）、SH（38%）、G（30%）、F（81%）、M2-1（80%）、L（77%）である。HRSV/BRSV間における遺伝子の多様性が著しいため（例えば、HRSVのN遺伝子をBRSVのN遺伝子と置き換えると、およそ26のアミノ酸の差異が関与してくる）、本発明のキメラウシ-ヒトRSVは、特に有用なワクチン候補である。下記に例示されるように、BRSVG及びF糖タンパク質をHRSVの対応糖タンパク質に置換すると、チンパンジーにおける複製について組換えBRSVの許容度が高まる。アミノ酸又はヌクレオチドに複数め差異を有する複数の遺伝子及びゲノム分節を関与させることにより、表現型の復帰に非常に安定性を示す広範な弱毒化の基盤が提供できる。この弱毒化モードが、個々において変異する表現型の復帰により、かなり又は完全な病原性毒性の再獲得が得られる、1つ又は幾つかの点変異により弱毒化されたHRSVウイルスと極めて対照的である。これに加えて、HRSVにおける既知の弱毒化点変異が、一般的に温度感受性の表現型を生成する。これは、温度感受性の表現型が、抗変HRSVを抗変異原物質に暴露した後に修飾された子孫を同定する、第1のスクリーニングとして特に使用されるからである。温度感受性に関わる弱毒化の問題の1つは、このウイルスの下気道における複製が過度に制限されるが、上気道においては弱毒化が不十分であり得ることである。これが、下気道においては温度が高い（制限性が高い）が、上気道においては温度が低い（制限性が低い）という、気道の温度勾配があるためである。上気道において複製する弱毒化ウイルスの能力が、鬱血、鼻炎、発熱、中耳炎などの併発症を結果として起こす可能性がある。このように、温度感受性の変異のみにより達成された弱毒化は、理想的でないかもしれない。対照的に、本発明の遺伝子位置を変位したRSVにみられる宿主範囲変異は、殆どの場合、温度感受性を持たない。従って、この新しい弱毒化方法は、次の性質を呈する。つまり（i）遺伝子的にも表現型的にもよ 30 40 50

り安定している、(ii)他の生きたワクチンアプローチに比べて、上気道における残留毒力に關与する可能性が低いことである。

【0120】

BRSV/HRSV間における配列の多様性は、先に述べたHRSV A/Bサブグループ間における多様性の約二倍である。このように、Fタンパク質が、BRSV/HRSV間においてアミノ酸多様性が約20%で、Gタンパク質が70%の多様性を有している (Lerch, et al, J. Virol. 64: 5559-69, 1990; Lerch, et al., Virology 181: 118-31, 1991, Mallipeddi and Samal, J. Gen. Virol. 74: 2001-4, 1993; Mallipeddi and Samal, Vet. Microbiol. 36: 359-67, 1993, Samal et al., Virology 180: 453-456, 1991; Samal and zamora, J. Gen. Virol. 72: 1717-1720, 1991, Zamora and Samal, Virus Res. 24: 115-121, 1992; ibid, et al., J. Gen. Virol. 73: 737-741, 1992, Mallipeddi and Samal, J. Gen. Virol. 73: 2441-2444, 1992, Pastey and Samal, J. Gen. Virol. 76: 193-197, 1995, Walravens et al., J. Gen. Virol. 71: 3009-3014, 1990, Yunnus et al., J. Gen. Virol. 79: 2231-2238, 1998, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0121】

本明細書に挿入される先の文献では、組換えBRSVが修飾され、G及びF BRSV遺伝子が、そのヒトRSVの対応する遺伝子と置き換えられた。その結果として作製されたキメラBRSV/HRSVウイルスが、BRSVの骨格にヒトRSVの抗原決定基を持ち、チンパンジーにおいてそのBRSV親と比較して有意に効率的に複製したが、高い弱毒化程度を維持した。これにより、G及びF遺伝子がBRSVの宿主範囲制限の一因であったことがわかるが、1又は複数の遺伝子もまたこの宿主範囲制限を特定したことがわかる。これは、上記に記載されているような遺伝子部位変化を特徴とし、さらにヒトRSVG及びF抗原決定基を含む最適なBRSV/HRSVキメラウイルス構成の開始点になる。

【0122】

このBRSV/HRSVキメラウイルスにおいては、結果として生成される組換えRSVは、宿主範囲制限の特質を与える1又は複数のBRSV遺伝子の存在により弱毒化される (Buchholz et al., J. Virol. 1187-1199, 2000, 1999年7月9日に提出された米国特許出願番号60/143, 132, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0123】

cDNAから組換えRSVを作製するため、及び本発明の付加的観点として本明細書に開示される変異化及びヌクレオチドの修飾を全範囲にわたり作成および試験するため、物質及び方法に関する詳細なる記載が、例えば、1995年9月27日に提出された米国特許仮出願番号60/007, 083, 1996年9月27日に提出された米国特許出願番号08/20, 132, 1996年7月15日に提出された米国特許仮出願番号60/021, 773及び現在米国特許番号5, 993, 824として発行される米国特許出願番号08/892, 403, 1997年5月9日に提出された米国特許仮出願番号60/046, 141, 1997年5月23日に提出された米国特許仮出願番号60/047, 634, 1999年11月30日に提出された米国特許番号5, 993, 824 (国際公開番号W0 98/02530に対応する)、Collinset al. により1999年4月13日に提出された米国特許出願番号09/291, 894及びその対応特許協力条約出願W0 00/61737, Murphy et al. により1999年4月13日に提出された米国特許仮出願番号60/129, 006, Crowe et al., Vac

cine 12: 691-699、1994、and Crowe et al.、Vaccine 12: 783-790、1994; Collins, et al.、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567、1995; Bukreyev, et al.、J. Virol. 70: 6634-41、1996、Juhász et al.、J. Virol. 71 (8): 5814-5819、1997; Durbin et al.、Virology 235: 323-332、1997; Karron et al.、J. Infect. Dis. 176: 1428-1436、1997; He et al.、Virology 237: 249-260、1997; Baron et al.、J. Virol. 71: 1265-1271、1997; Whitehead et al.、Virology 247 (2): 232-9、1998a; Whitehead et al.、J. Virol. 72 (5): 4467-4471、1998b; Jin et al.、Virology 251: 206-214、1998; Bukreyev, et al.、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 2367-2372、1999; Birmingham and Collins、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-11264、1999 Juhász et al.、Vaccine 17: 1416-1424、1999; Juhász et al.、J. Virol. 73: 5176-5180、1999; Teng and Collins、J. Virol. 73: 466-473、1999、Whitehead et al.、J. Virol. 73: 9773-9780、1999、Whitehead et al.、J. Virol. 73: 871-877、1999; and Whitehead et al.、J. Virol. 73: 3438-3442、1999.、に示されている。

【0124】

cDNAから組換えRSVを作製する典型的な方法は、RSVアンチゲノムRNA及びRSVのN、P、M2-1とLタンパク質の細胞内同時発現（通常、組織培養細胞に同時トランスフェクションされたプラスミドにからする）に関するものである。これが、結果としてcDNAから感染性ウイルスを生産させる増殖的な感染の開始点となり、このウイルスが組換えウイルスと呼ばれる。一旦生成されると、組換えRSVを、生物学的に得られるウイルスと同様に容易に増殖し、組換えウイルスとその生物学的に得られた対応ウイルスが、前者が1又は複数の導入された変化をマーカとして含まない限り区別することができない。

【0125】

さらに詳細な観点において、上記の引用文献には、本発明で有用な、弱毒化された変異菌株（例：温度感受性（ts）、低温継代培養（cp）、低温適応性（ca）、小型プラーク（sp）、及び宿主範囲制限（hr）の変異菌株）を得るための変異誘発やRSVの単離及び特徴付けの方法及び手順、及び弱毒化された表現型を特定する遺伝子変化を同定する方法及び手順が記載されている。これらの方法と関連して、上記の文献は、ヒトRSVA及びBサブグループをはじめとする、生物学的に得られたヒトRSV及び組換えにより生成された弱毒化ヒトRSVの複製、免疫原性、遺伝子の安定性及び感染保護効率を、マウス及び霊長類のモデル系を含む容認されたモデル系を用いて、決定する手順について詳細に記している。加えて、これらの文献は、1価及び2価のワクチンを含む免疫学的組成物を、RSV感染の予防及び治療のために、開発し検査する一般的方法について説明している。感染性のRSVをcDNAから生成する能力により、前もって決定された変化を感染性ウイルスにcDNA中間体を用いて導入する方法が提供される。

【0126】

この方法は、広範囲の感染性弱毒化RSVの誘導体を生成するとして記載されている。その例は、ウイルスのタンパク質における1又は複数のアミノ酸置換、遺伝子発現の除去、及び／又は望みの効果をウイルスの表現型に生成するシス作用性RNAシグナルにおける1又は複数のヌクレオチド置換を含む組換えワクチン候補である（参照例Bukreyev et al.、J. Virol. 71: 8973-8982、1997、Whiteh

ead et al., J. Virol. 72: 4467-4471、1998、hltehead et al., Virology 247: 232-239、1998、Bemingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-11264、1999、Juhasz et al., Vaccine 17: 1416-1424、1999、Juhasz et al., J. Virol. 73: 5176-5180、1999、Teng and Collins, J. Virol. 73: 466-473、1999; Whltehead et al., J. Virol. 73: 871-877、1999、Whltehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442、1999、and Collins et al., Adv. Virus Res. 54: 423-451、1999、各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0127】

上記の指導の模範例は、生物学的に得られたRSV変異により同定された表現型特異性の変異体を組み入れるように修飾された感染性組換えRSVを構成及び評価する方法である。生物学的に得られたRSV変異体の例には、以下の名称を有する生物学的に得られた変異から組換えRSVにより識別されるcp及びts変異体であるcpt s RSV 248 (ATCC VR2450)、cpt s RSV 248/404 (ATCC VR2454)、cpt s RSV 248/955 (ATCC VR2453)、cpt s RSV 530 (ATCC VR2452)、cpt s RSV 530/1009 (ATCC VR2451)、cpt s RSV 530/1030 (ATCC VR2455)、RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR2542)、and RSV B-1 cp-3 (ATCC VR2579)がある。これらの方法が、本発明の組換え遺伝子位置を変位したRSVの構成するために容易に改造される。このようにして得られた組換えRSVが、同一の又は異種の生物学的に得られたRSV変異からする二つ以上のts変異体(例えば、248/404、248/955、530/1009、又は530/1030の生物学的変異の1つ以上)を、組み入れることができる。後者の状況では、増強弱毒化組換え体は、二つ、三つ以上の生物学的変異からする弱毒化変異体を組み合わせ(例えば、RSV変異530/1009/404、248/404/1009、248/404/1030、又は248/404/1009/1030変異にからする弱毒化変異の組み合わせ)を有することもある。典型的な例においては、1又は複数の弱毒化変異が、RSVポリメラーゼ遺伝子内のアミノ酸Asn43、Phe521、Gln831、Met1169、又はTyr1321における温度感受性を置換、及び遺伝子M2の遺伝子開始配列における温度感受性のヌクレオチド置換を特定している。好ましくは、これらの変異体が、同一の又は保存型の変化を、生物学的に得られる変異RSVにより同定される次の変化と共に有する。例えば、Lポリメラーゼ遺伝子により同定される次の置換に関連した保存型の変化、Asn43に対してIle、Phe521に対してLeu、Gln831に対してLeu、Met1169に対してVal、及びTyr1321に対してAsnなどである。

【0128】

本発明の遺伝子位置を変位したRSVに組み込むことのできる付加的な変異体が、例えば、異種性RSV又は関連性の薄い負鎖RNAウイルス内により同定される弱毒化などの変異体である。特に、単一のネガチブ菌株のRNAウイルスにて同定される弱毒化変異又は他の望まれる変異体が、ヒト又はウシRSVゲノム又はアンチゲノム内の対応する部位に、遺伝子位置を変位したRSV内により、又は遺伝子位置を変位したRSV構成手段として、「変位」(例えば、コピー)されてよい。簡単に言えば、異種性一本負鎖RNAウイルスにおいて望まれる変異体が、RSVレシピエントに(例えば、それぞれ、ウシ又はヒトRSVに)変位される。これは、異種性ウイルスにおける変異のマッピングが関与し、そうすることにより、配列の並びでヒト又はウシRSVにおける対応部位を同定し、(同一変異又は保存型変異により)RSVレシピエントにおける本来の配列を変異遺伝子型に変異させる。(以下を参照のこと: MurPhy et al. により1999年4月13日に提出された米国特許仮出願番号60/129,006、引例として本明細書に組み込ま

れている)。この開示が導くように、キメラゲノム又はアンチゲノムを、異種性変異ウイルスにより同定された変化に保存的に対応する変異体の対象部位にて、その変化をコードするように修飾するのが好ましい。例えば、アミノ酸置換が変異ウイルスにおける変異部位に対応する野生型配列に比較してマークする場合、類似した置換が組換えウイルスにおける対応残基に設計されるべきである。好ましくは、置換が、同一の又は保存型のアミノ酸を、変異ウイルスタンパク質内に存在する残基に関連させるのが望ましい。しかし、本来のアミノ酸残基を変異部位にて、変異タンパク質における置換残基に関連して非保存型に修飾することもできる（例えば、他のあらゆるアミノ酸を用いて、野生型残基の機能を途絶し損なうことにより）。典型的な変異が同定され本発明の遺伝子位置を変位したRSVに変位される負鎖RNAウイルス群には、他のRSVs（例えば、マウスのRSV）、PIV、センダイウイルス（SeV）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、シミアンウイルス5（SV5）、麻疹ウイルス（MeV）、牛痘ウイルス、イヌジステンバーウイルス（CDV）、狂犬病ウイルス（RaV）及び水泡性口炎ウイルス（VSV）がある。RSVLタンパク質の部位521でのフェニルアラニンのアミノ酸置換（HPIV3Lタンパク質の位置456でのフェニルアラニンの置換に対応する）を含むがそれに限定されない、様々な典型的な変異が開示される。欠失又は挿入でマークされる場合は、これらを、欠失又は挿入されたタンパク質断片のサイズ及びアミノ酸配列がいかにより異なろうとも、組換えウイルスへの対応欠失又は挿入として、導入することができる。

さらに多様なタイプの変異体もまた、上記の文献に記載されており、弱毒化及び免疫原性を校正し、他の有利な構造的及び／又は表現型的な効果を提供するために、本発明の組換え遺伝子位置を変位したRSVに容易に作製され得る。例えば、制限部位マーカが、cDNA構成及び操作を促進するために、ルーチンとして、遺伝子位置の変位ゲノム又はアンチゲノム内に導入される。本書の文献には、また迅速な方法の発明にて有用な点又は部位特異性変異の他に、広範囲のヌクレオチド修飾が記載されている。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyl transferase（CAT）又はルシフェラーゼ遺伝子のような、追加の外来遺伝子を発現する組換えRSVを生成する方法及び組成物が開示される。そのような組換え体は、一般的に、挿入遺伝子に関連して増殖が鈍る。この弱毒化が、挿入遺伝子の長さと共に高まる。組換えRSVへの外来遺伝子の挿入は複製のレベルを下げ、その挿入はin vitroの継代培養中は安定しているという研究結果により、ワクチンに使用するためにRSVを弱毒化する効果的な方法がもうひとつ提供できる。類似又は改良された効果が、こうした他の選択遺伝子（例えば、インターフェロン γ 、インターロイキン2、インターロイキン4及びGM-CSFなどのサイトカイン）の組み込みにより達成される。

【0129】

本発明の方法では、追加の遺伝子又はゲノム分節を、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノム内に又はそれに隣接して組み込むこともできる。これらの遺伝子が、レシピエント遺伝子の共通の制御下にあってもよく、又は転写シグナルの独立したセットの制御下にあってもよい。ターゲット遺伝子には、上記に同定されるRSV遺伝子、さらに非RSV遺伝子が含まれる。ターゲット非RSV遺伝子は、サイトカイン（例えば、IL-2からIL-18まで、特に、IL-2、IL-6及びIL-12、IL-18など）、 γ インターフェロン、及びTヘルパー細胞エピトープを多く含むタンパク質をコードする遺伝子が含まれる。さらにこれらの付加的なタンパク質を、別個のタンパク質として、又はSHのようなRSVタンパク質の第2のコピーから作製されたキメラとして発現することができる。これにより、RSVに対する免疫反応を量的にも質的にも修飾及び改良する能力が提供される。

【0130】

ゲノム長を増やすと、部分的には挿入物の長さに依るが、結果として作成されるRSVの弱毒化に繋がる。さらに、非RSV遺伝子からの遺伝子位置を変位したRSVに組み込まれる特定タンパク質（例えばサイトカイン）の発現が、そのタンパク質の作用により、ウイルスの弱毒化に繋がる。感染性、そして弱毒化されたウイルスの表現型及びRSVトラ

10

20

30

40

50

ンスフェクション細胞から高レベルのサイトカイン発現を生む典型的なサイトカインには、インターロイキン-2 (IL-2)、IL-4、GM-CSF、及びγ-インターフェロンが含まれる。サイトカイン遺伝子を本発明の部位変位されたRSVへ導入することにより、結果として、細胞性又は体液性の免疫反応の増大を含む別の効果を生ずる。

【0131】

本発明の遺伝子位置を変位したRSV内にてのウイルス遺伝子又はゲノム分節の全体の変更を伴う欠失、挿入、置換及び他の変異が、非常に安定したワクチン候補を産み、これらのワクチン候補が、免疫抑制された個体に特に重要である。これらの変更の多くは結果として作製されたワクチン菌株の弱毒化を結果としてもたらし、一方他の変更が別のタイプの必要な表現型変更を特定する。例えば、アクセサリー（つまり、*in vitro*において必須でない）遺伝子が、ホストの免疫性に特異的に干渉するタンパク質をコードする優れた候補である（以下参照例Kato et al.、EMBO J. 16:578-87、1997、本書に文献として組み入れられる）。キメラワクチンウイルスにおいてそのような遺伝子を除去すると、毒力及び病因及び／又は免疫原性を下げると考えられている。

10

【0132】

組換え遺伝子位置を変位したRSVに組み込まれるものとして、上記文献に記載されるさらにまた別の独立したヌクレオチド修飾には、選択されたRSV遺伝子の1部又は完全な欠失又は除去が含まれる。このように、RSVのNS1、NS2、N、P、M、G、F、SH、M2 (ORF1)、M2 (ORF2) 及び／又はL遺伝子のオープンリーディングフレーム及び／又はシス作用性制御配列の1部又は完全な欠失を含めて、RSV遺伝子又はゲノム分節を欠失することもできる。一例では、SH mRNAとタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を除去することによりSH遺伝子の発現が除去された組換えRSVが作製される。SH遺伝子を欠失することにより、回収可能な感染性のRSVだけでなく、感染性ウイルス及びプラークの双方の産出量に基づいて、組織培養の増殖がかなり改良されたRSVも得られた。

20

【0133】

SH欠失により特定されたこの組織培養における改良された増殖が、例えば培養におけるRSVの産生量が乏しいという問題を克服することにより、遺伝子位置を変位したRSVワクチンを開発する有用なツールを提供している。さらに、これらの欠失が、遺伝的復帰に対して高度に安定しており、それから得られるRSVクローンをワクチン剤として特に有用なものとしている。SHが取り除かれたRSV組換え体はまた、マウスの上気道に部位特異性の弱毒化を呈し、これはワクチン開発にとって新しい利点となる。ウイルスワクチンとして評価対象となった現行のRSV菌株（例えば、cp変異）が、組織培養において著しく修飾された増殖を呈さない。これらはホスト範囲関連の変異であり、チンパンジー及びヒトの気道での複製を、下気道での複製の約100倍制限する。またべつの典型的な種の変異体であるts変異が、上気道から下気道へ向かう体温の上昇勾配のために、好んで下気道におけるウイルス複製を制限する。これらのcp及びts変異と対照的に、SHが取り除かれたRSV組換え体が、上気道における強力な制限を呈する特異な表現型群を有する。上気道での複製を制限することが、主に鼻で呼吸する脆弱な年齢集団に安全にワクチンを投与するため必須であるため、極めて幼若な乳児に使用するワクチンとして、このワクチンが特に望ましい。さらにいかなる年齢集団においても、上気道での複製が押えられることにより、中耳炎の罹患率が下がる。これらの利点に加えて、例えば約400 nt及びmRNA全体を除去することを伴うSH欠失変異体の性質は、復帰に対する高度に不応性を呈する変異のタイプを表わしている。同時に遺伝子位置の変位を指図する（例えば、F及びG糖タンパク質遺伝子発現を上限調節する）ための「置換ポリヌクレオチド」としてSH欠失の効用を、下記の例に詳細に明らかにする。

30

40

【0134】

SH遺伝子修飾の状況においてさらに記載されていることが、有用なRSV組換えワクチンを生成するため付加的なツールおよび方法を提供するために、ヒト及びウシのRSVs

50

、及び他のニューモウイルスを含む異種のRSVsでのSH遺伝子を比較することである。例えば、2RSV抗原サブグループA及びBが、ある種のSHドメインにおける比較的高度の保存性を呈している。そのような2つのドメインでは、RSV A及びBのN末端領域及び膜貫通ドメインが、アミノ酸レベルで84%の相同性を示すが、推定C末端外部ドメインはもっと多様性がある(約50%の同一性)。RSVサブグループB菌株2つ(8/60及び18537)のSH遺伝子を比較すると、アミノ酸の差異が1つだけあった(Anderseonet al., 上述)。ヒトーウシRSV間のSHタンパク質が、約40%同一で、以下に示す主要な構造的特徴を共有している。すなわち、(i)保存された残基の非対称な分布、(ii)非常に類似した疎水性の特質、(iii)1部位が疎水性領域のそれぞれの側にある2つのN連鎖糖鎖形成部位の存在、(iv)各々のSHタンパク質の中心疎水領域にあるカルボキシ末端側の単一システイン残基(Anderseonet al., 上記)である。これらの及び他の配列間の類似点及び相違点を評価することにより、感染性の遺伝子位置を変位したRSVクローン内での置換及び挿入の対象となる異種性配列を選択することが可能となる。これは、例えば、多特異性の免疫原性効果又は／加えて弱毒化のような望ましい効果を有するワクチンを作成するためである。

【0135】

本発明の上記に代わる実施例では、望ましい表現型の変化を得るために、部分的な遺伝子欠失又は他の限定されたヌクレオチド欠失を、組換えRSVに設計する。一例では、RSVゲノム長が、SH遺伝子の下流非コード領域から配列を欠失することにより短縮される。このな典型的な部分的遺伝子欠失が、G-F遺伝子間領域にあるXmaI部位を含むアンチゲノムcDNAのバージョンを使って構成されたが、この変化自体が、コードされたウイルスに影響を及ぼすと考えられていなかった。RSV/6120という名称が与えられたこのコードされたウイルスが、SH ORFの最後の3コドン及び終了コドンにおいてサイレント・ヌクレオチドを有しており、またSH下流の非翻訳領域(組換えアンチゲノム内の部位4499から4610まで)から112個のヌクレオチドが欠失される。この欠失により、遺伝子終了「(Bukreyev, et al.), J. Virol. 70: 6634-41、1996、文献として本書に組み込まれている」がそのまま残る。これらの点変異及び112-ntの欠失には、いかなるウイルスタンパク質のコードされたアミノ酸も修飾されず、いかなる既知のウイルスRNAシグナルをさえぎることも、コードされたmRNAsの数が変わることもなし、6120ウイルスを、複数ステップの増殖の効率についてその全長対応ウイルスであるD53と一緒に分析し、増殖性において、1.5倍から2倍の係数分、D53ウイルスのそれより高いピーク力価を示した。このように、112-ntと非コード配列を有するSH遺伝子の小規模で部分的な欠失が、in vivoにおける増殖効率を著しく上昇させた。

他の部分的遺伝子の欠失及び小規模なヌクレオチドの欠失を、容易に本発明の組換えRSVに、以下におけるヌクレオチド欠失を含むウイルス表現型を修飾するために設計することができる。すなわち、(1)シス作用性RNAシグナルから離れた多様なORFsの最初及び／又は最後にある非翻訳配列、(2)遺伝子間領域、及び(3)プロモータ活性に必須でない3'先導部及び5'尾部の領域である。欠失又は挿入に適した非翻訳遺伝子配列の例には、NS1、NS2、P、M、F、及びM2遺伝子下流の非翻訳領域にて次の領域が含まれる。すなわち、配列部位519-563、1003-1086、3073-3230、4033-4197、7387-7539及び8433-8490であり、それぞれ組換えアンチゲノムに沿って番号が付けられている。また、さらに別の例では、nt 55-96、nt 606-624、nt 4231-4300もまた、NS1、NS2及びSH遺伝子上流の非翻訳領域からそれぞれ欠失することができる。これらの配列の1又は複数の1部又は完全な欠失が、本明細書の従って行なうことができる。本明細書の教示により、選択された欠失により特定される利益をもたらす表現型の変化が、容易にスクリーニングされ得る候補を提供するものである。RSVゲノム内のさらに別の非翻訳領域もまた有用である。遺伝子開始及び遺伝子終了シグナルが、重要な位置に関して地図付け、および特徴付けられているため(Kuo, et al., J. Virol. 71: 494-

4953、1997、Harmon, et al. J. Virol. 75: 36-44、2001、各々引例として本明細書に組み込まれている）、1つ又は少量（例えば3-10、10-20、20-45）ntに關与する欠失又は修飾を、考慮することができる。ある場合には、特異な新しい利点を得られる可能性がある。例えば、G遺伝子においては、4683から4685を欠失（遺伝子開始シグナルの1nt及び非翻訳配列の2ntを含む）することにより、mRNAの第1のAUGを除去し、これにより重要なORFを開始しないが、GORFを開始する次のAUGからのリボソームを方向転換させると考えられている。さらにこの欠失により、GSシグナルを回復し、GORFの翻訳開始部位が保持される。このように、修飾の非翻訳部位を、ゲノムの知識に基づいて選択することができ、無作為に選択され、本発明の方法により迅速に検査することができる。

10

【0136】

遺伝子間配列については、ミニゲノムに関する研究により、遺伝子間領域を、転写及びRNA複製に影響を及ぼすことなく、単一ntに減じるか又は全く欠失する可能性があることを示している。A2菌株の遺伝子間領域は、凝集状態にいける別の207ntを表している（組換えアンチゲノムのNS2-N遺伝子間領域が、その生物学的対応領域より1nt長く設計した、参照例：Collins, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52: 11563-11567, 1995、本書に文献として組み入れられる）。

【0137】

RSVの5'尾部領域は155ntの長さで、殆どのモノネガウイルスのその対応領域より100nt長く、RSV先導部領域より111nt長い。ミニゲノムに関する研究によると、この配列の多くは必須ではなく、修飾の候補であるということが示唆される（Kuo, et al., J. Virol. 70: 6892-901、1996、本明細書に引例として組み込まれる）。例えば、L遺伝子のすぐ後に続く尾部領域が、75nt、100nt、125nt以上のサイズに下げることが可能で、5'ゲノム末端（これはアンチゲノムプロモータを含めて3'末端コードする）をそのまま残すことができる。同様に、44-nt先導部領域を修飾することができる。例えば、3'先導部末端にある最初の11ntが、ウイルスプロモータのコアを形成するため、先導部領域の残りの領域にある配列が、欠失されるか又は修飾される。

20

【0138】

本発明のある例においては、NS1、NS2、SH、F及びM2遺伝子について上記の非翻訳配列の1又は複数の（1部又は完全に）欠失することにより、結果として、806ntまでのゲノム長（簡易例に記載されている112-ntの欠失に比べて、7倍を超える長さ）における調整可能な減少に繋がることになる。最初の9遺伝子間の遺伝子間領域の1又は複数の1部又は完全に欠失すると（それぞれ1ntの最低長まで）、さらに198ntまでの調整可能な欠失が得られる。尾部領域及び／又は先導部から部分的な又は完全な欠失を行うと、50、75、100、以上のntまでの更なる欠失を生む。このように例えば、非翻訳遺伝子配列の806ntを、遺伝子間領域の198ntと尾部の100ntと組み合わせると、凝集状態で1104ntが得られ、これはここに記載されている112-ntの欠失に比べて約10倍の大きさの欠失となる（RSVゲノムの7%以上を占める）。

30

40

【0139】

上記の文献に記載されている別の例では、NS2遺伝子の発現が停止コドンで翻訳オープンリーディングフレーム（ORF）に導入することにより除去される。感染性ウイルスの放出率が、このNS2ノックアウトウイルスについて、野生型に比べて減少した。加えて、変異体と野生型間にてプラークを比較してみると、NS2ノックアウトのプラークのサイズが著しく減少ことがわかった。この種の変異体が、このように、増殖可能な組換え遺伝子位置の変位をRSVに組み込み、修飾表現型を（この場合は、低ウイルス増殖率及びin vitroにおける小プラークサイズも）作製することができる。これらの方法と他のノックアウト方法及び変異体が、従ってin vitroにおける小プラークサイズと

50

*in vivo*における弱毒化の間の既知の相関関係に基づいて、さらに別の組換えRSVワクチン剤を提供するとなる。また、NS2遺伝子を完全に取り除くことにより除去しても、類似した表現型を有するウイルスを作製することができた。

【0140】

欠失して好結果を生んだ他のRSV遺伝子が、NS1及びM2-2遺伝子である。前者はそれぞれのタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を取り除くことにより、後者はフレーム変位を導入することにより又は翻訳開始部位を導入し停止コドンを導入することにより欠失した。興味をそそるのが、回収されたNS1除去ウイルスは、NS2欠失ウイルスのサイズほど小さくはないが、組織培養にてサイズの小さいプラークを形成することである。NS1除去ウイルスが、低い効率であっても、増殖するとい事実により、NS1タンパク質がアクセサリタンパク質であること、つまりウイルス増殖に必要なでないタンパク質であることがわかる。NS1除去ウイルスのプラークサイズが、翻訳停止コドンをコード配列に導入することによりNS2タンパク質の発現が、除去されたNS2ノックアウトウイルスのそれに類似していた。小プラーク表現型が、通常、弱毒化変異と関連している。この種の変異は、このように独立して、増殖可能な組換えRSV内に組み込み、修飾表現型を作製することができる。これらの方法と他のノックアウト方法及び変異体が、従って、*in vitro*における小プラークサイズと*in vivo*における弱毒化間の既知の相関関係に基づいて、さらに別の組換えRSVワクチン剤を提供するとなる。NS2ノックアウト変異体が、ナイーブなチンパンジーの上気道にて適度に弱毒化された表現型を、また高度に弱毒化された表現型を下気道にて示した。この変異体はまた、チンパンジーにおいて著しく減じられた疾病症状を惹起し、その上野生型ウイルスによる攻撃に対する顕著な抵抗力を刺激した(Whithead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999、引例として本明細書に組み込まれている)。

10

20

【0141】

文献に記載されており、本発明にて有用である、さらに別の方法及び組成物には、キメラゲノム又はアンチゲノム内のシス作用性制御配列を修飾する遺伝子位置を変位したRSVの別の異なったヌクレオチド修飾を伴うものである。例えば、RSVG糖タンパク質の分泌型に対する翻訳開始部位が、G糖タンパク質のこの型の発現を粉砕するために、欠失することが可能である。

30

【0142】

RSVGタンパク質は、二つの型に合成される。すなわち固定タイプII細胞膜内タンパク質、及び全ての細胞膜アンカーを欠失して分泌されるN末端切除型である(Hendricks et al., J. Virol. 62: 2228-2233, 1988)。これらの2の型は、2つの異なった開始部位における翻訳開始により得られると報告される。すなわち、長い方の型は、GORFの第1のAUGで開始し、もう1つの型はコドン48にあるORFの第2のAUGにて開始タンパク質分解により、さらに処理される(Roberts et al., J. Virol. 68: 4538-4546, 1994)。この第2の開始部位は高度に保存型で、現在までのところ、ヒトウシ、ヒツジのRSVにおける全ての菌株に存在する。

40

【0143】

可溶性のGタンパク質が中和抗体をだますおとりとして作用することにより宿主免疫を軽減するということが示唆される。また、可溶性Gが、Th2表現型に偏った反応を優先的に刺激すると暗に示されており、これは同様にそれに続いてRSVに暴露されると同時に、免疫病理が強化することと関連しているように思われる。RSVワクチンウイルスに関して言えば、抗原トラッピング及び免疫システムのバランスが崩れた刺激を最小限にすることが、大変望ましいことから、Gタンパク質の分泌型の発現を除去することが望ましいとなる。これを、組換えウイルスにて既に達成している。このように、この変異体が、ウイルスを直接弱毒化することよりむしろ、組換えウイルスにより惹起された宿主免疫反応を質的及び／又は量的に修飾する上で特に有用である。

50

【0144】

文献にはまた、典型的な遺伝子（例えばNS1及びNS2）のシス作用性転写シグナルを変更することによる組換えRSVの表現型の修飾が記載されている。これらのヌクレオチド修飾の結果は、例えば、リードスルーmRNAsのレベルを下げ、下流遺伝子のタンパク質を増加させるためにシス作用性要素を変更して遺伝子発現を修飾したことと一致している。結果として作製される組換えウイルスが、好ましくは、高い増殖反応速度及び大型のプラークサイズを呈するものがよい。シス作用性制御配列に対する典型的な修飾には、RSV遺伝子に関連する遺伝子終了（GE）及び遺伝子開始（GS）シグナルへの修飾が含まれる。この状況において、典型的な変化には、NS1及びNS2遺伝子のGEシグナルの変更が含まれ、変更によりこれらのシグナルが、RSVのN遺伝子の天然の状態にて形成されるGEシグナルと同一になる。結果として作製される組換えウイルスが、高い増殖反応速度及び大型のプラークサイズを呈し、従って、遺伝子位置を変位したRSVワクチン候補の表現型を有益に修飾するための新たな手段を提供する。 10

【0145】

上記の文献により提供される方法及び組成物を使用し、例えば、RSVA又はBワクチン又は2価のRSV/VBワクチンを生成するために、RSVサブグループA及びBの双方の配列からなる弱毒化された遺伝子位置を変位したRSVワクチンウイルスを作製することが、また可能になる（参照例：米国特許出願番号、09/291,894、filed by Collins et al.、on April 13, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）。この状況で本発明をさらに改良する過程にて、キメラRSA/Bウイルスに組み込まれていた挿入された特定な弱毒化変異には、以下が含まれている。すなわち、(i) 5つのcp変異体のうち3つ、すなわちN(V2671)における変異及びL(C319Y及びH1690Y)における2の変異、ただしFにおける2の変異は含まない（これらはBLF遺伝子の置換により取り除かれているため）、(ii) 248(Q831L)、1030(Y1321N)、及び任意に、弱毒化された菌株A2ウイルスにて同定された404-L(D1183E)変異、(iii) M2遺伝子の遺伝子開始シグナルにおける部位9での単一ヌクレオチド置換、(iv) SH遺伝子の欠失などである。RSVA及び／又はRSVB遺伝子、あるいはゲノム分節を有する遺伝子位置を変位したRSVにおける他の即座に利用できる変異には、NS1、NS、G、又はM2-2遺伝子の欠失、及び530と1009変異の単独、又は組み合わせを含んでいるが、それらに限定されるものではない。 20 30

【0146】

本発明の他の詳細な観点において、遺伝子位置の変位RSは、他のRSVs及び非RSVウイルス及び非ウイルス病原を含む異種性の病原に対する感染保護抗体「ベクター」として利用される。これらの観点においては、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムが、1又は複数の相同性病原の1又は複数の抗原決定基をコードする1又は複数の相同性遺伝子又はゲノム分節と組み合わせられる。それらは、1部又は完全なRSVの「ベクターゲノム又はアンチゲノム」から成り立っている（参照例：米国特許仮出願番号60/170,195、米国特許出願番号09/458,813、及び米国特許出願番号09/459,062、各々本書に文献として挿入される）。この状況における異種性病原は、異種性RSV（例えば、異種のRSV菌株又はサブグループ）にて、異種性遺伝子又はゲノム分節は、上記で同定されたRSVタンパク質の1、又は複数の、及びそれらのタンパク質ドメイン、断片、及び免疫原性領域又はエピトープをコードするように選択されることができる。このように構成されたRSVベクターワクチンは、多特異性の免疫反応を惹起するため、併用投与されるか、又は相応する投与プロトコルにより他のワクチン剤と共に投与されてよい。 40

【0147】

他の病原のベクターとして設計した遺伝子位置を変位したRSVは、部分的な又は完全なHRSVゲノム、又はアンチゲノムであるベクターゲノム又はアンチゲノムから構成されることもある。このベクターゲノムは、1又は複数の異種性RSV(s)の抗原決定基をコードする1又は複数の異種性遺伝子又はゲノム分節と組み合わせられるか、又はそれらを 50

組み込むように修飾される。異種性 R S V には、H R S V A 又は H R S V B からの異種性 H R S V s が含まれる。上記に代わる観点においては、ベクターゲノムあるいはアンチゲノムは部分的な又は完全な H R S V ゲノム又はアンチゲノムであり、抗原決定基をコードしている異種性遺伝子又はゲノム分節は 1 又は複数の非 R S V 病原である。このベクターゲノム又はアンチゲノムは、弱毒化を特定する B R S V の 1 又は複数の遺伝子又はゲノム分節をさらに組み込むことが可能である。選択肢として、このベクターウイルスは、1 又は複数の H R S V 遺伝子又はゲノム分節を組み込んでいる、1 部又は完全な B R S V 背景ゲノム又はアンチゲノムから構成されることもある。ここで、遺伝子位置を変位した R S V ベクターウイルスは、非 R S V 病原の抗原決定基を 1 個コードする 1 又は複数のドナー遺伝子又はゲノム分節を含むように修飾される。

10

【0148】

このように、本発明のある詳細な観点において、遺伝子位置を変位した R S V が、ある範囲の非 R S V 病原のベクターとして、提供される（参照例：米国特許仮出願番号 60/170,195、米国特許出願番号 09/458,813、及び米国特許出願番号 09/459,062、各々引例として本明細書に組み込まれている）。本発明のこれらの観点で使用されるベクターゲノム又はアンチゲノムは、それぞれ異種性の H R S V または B R S V 遺伝子又はゲノム分節を組み込んでいる部分的な又は完全な B R S V または H R S V ゲノム又はアンチゲノムから構成され、異種性の病原は、麻疹ウイルス、サブグループ A 及び B 呼吸器系胞体ウイルス、H P I V 1、H P I V 2、H P I V 3、流行性耳下腺炎、ヒト乳頭腫ウイルス、タイプ 1 及びタイプ 2 ヒト免疫不全ウイルス、単純性疱疹ウイルス、

20

【0149】

例えば、本発明の遺伝子位置を変位した R S V を構成するための H R S V 又は B R S V のベクターゲノム又はアンチゲノムは、麻疹ウイルス H A 及び F タンパク質、又はその抗原ドメイン、断片及びエピトープから選択された異種性抗原決定基を挿入することもある。典型的な実施例では、麻疹ウイルス H A 遺伝子のオープンリーディングフレーム（O R F）から構成される転写ユニットが、B R S V 又は H R S V 3 ベクターゲノム又はアンチゲノム内に、付加又は挿入される。選択肢として、本発明の遺伝子位置を変位した R S V は、

30

【0150】

異種性の免疫原性タンパク質、ドメイン及びエピトープの遺伝子位置を変位した R S V 内に導入することが、免疫化されたホストに新しい免疫反応を生成する上で、特に有用である。例えば、ドナー R S V サブグループ又は菌株からの免疫原性の遺伝子又はゲノム分節を、異種の R S V サブグループ又は菌株のレシピエントゲノム又はアンチゲノム内にて、付加又は置換することに関連している。一般的に、シス作用性制御因子及び遺伝子間配列のような、非コードヌクレオチドは、ドナー遺伝子コード領域と共に変位される必要がない。このように、ある特定の遺伝子のコード配列（例えば、部分的な又は完全なオープンリーディングフレーム（O R F））を、部分的な又は完全な背景ゲノム又はアンチゲノムに、付加又は置換しすることができる。この付加又は置換は、ドナー配列に比較して対応する遺伝子又は異種遺伝子の異種プロモータ（例えば、背景ゲノム又はアンチゲノムに存在しているプロモータ）の制御下にて行なわれる。多様なまた別のゲノム又はアンチゲノムが、新しい有用な特質を有する遺伝子位置を変位した R S V を発現するために、キメラゲノム又はアンチゲノム内に含めることができる有用なドナーポリヌクレオチドを提供している。例えば、異種性のゲノム分節は、ヒト又はウシ R S V からの選択された糖タンパク質細胞質尾部領域、膜間ドメイン、又は外部ドメイン、エピトープ部位又は領域、結合部

40

50

位又は結合部位を含む領域、活性部位又は活性部位を含む領域等の一部又は全部をコードすることができる。これらの及び他のゲノム分節を、完全な背景ゲノム又はアンチゲノムに付加し、又はそこで対応ゲノム分節に置換し、新しいキメラR S V組換え体を作製することができる。ある組換え体が、キメラタンパク質、例えば、別のR S Vの外ドメインに融合されたR S Vの細胞質の尾部及び／又は膜間ドメインを有するタンパク質を発現する。

【0151】

本発明の遺伝子位置を変位したR S Vにて使用される遺伝子及びゲノム分節は、サイズ及び配列が多様な代替のポリヌクレオチドの集団を含んでいる。この点で有用なゲノム分節は、タンパク質の小規模な機能的ドメイン（例えば、エピトープ部位）をコードするゲノム分節の場合で、約15－35ヌクレオチドの範囲であり、大規模なドメイン又はタンパク質領域をコードするゲノム分節の場合で、約50、75、100、200－500、及び500－1,500以上のヌクレオチドの範囲である。対応遺伝子及びゲノム分節の選択は、対象となる対応物間のゲノムにおける配列同一性又は直線性の相関性による。この状況において、選択されたヒト又はウシのポリヌクレオチド「基準配列」は、ドナー又はレシピエントゲノム又はアンチゲノムに存在する配列又はその一部として定義される。この基準配列は、配列をその対応する異種性配列と比較する場合の、理論的根拠の基盤を与えるための定義された配列として使われる。例えば基準配列は、cDNAまたは遺伝子、又は完全なcDNAまたは遺伝子配列の一分節として定義されてよい。一般的に、対応する遺伝子及びゲノム分節を定義することに使われる基準配列は、少なくとも20ヌクレオチドの長さで、しばしば少なくとも25ヌクレオチドの長さで、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のポリヌクレオチドが、それぞれ(1)これら2のポリヌクレオチドの間にて類似している配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部）から成り、また(2)さらにこれら2のポリヌクレオチドの間で異なっている配列から成っている。そこで、2又はそれ以上のポリヌクレオチド間の比較は、一般的に、配列類似性の局所領域を同定及び比較する「比較ウィンドウ」の2のポリヌクレオチドの配列を比較することにより行なわれる。「比較ウィンドウ」は、本明細書にて使われているように、少なくとも20の隣接ヌクレオチド部位の概念的な分節を表わす。この概念的な分節では、ポリヌクレオチドの配列が、少なくとも20ヌクレオチドの基準配列に比較される。さらに、「比較ウィンドウ」内のポリヌクレオチド配列の部分が、これら2の配列を最適に整列させるために、基準配列（付加も欠失も含まない）に比べて20パーセント以下の付加又は欠失（すなわち、間隙）から構成される。比較ウィンドウを整列させる最適な配列は、以下により行なわれる。つまり、局部相同性アルゴリズム（Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981）、相同性整列アルゴリズム（Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970）、類似性方法の探索（Pearson & Lipman, proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988）（各々引例として本明細書に組み込まれている）、これらのアルゴリズムのコンピューター化して実行（GAP、BESTFIT、FASTA、and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI、引例として本明細書に組み込まれている）、又はあらゆる方法により生成された調査及び最高の整列（つまり、比較ウィンドウにより、配列類似性が最高のパーセンテージなった場合）である。「配列同一性」という用語は、2のポリヌクレオチド配列が、比較のウィンドウにより同一である（すなわち、ヌクレオチドを比較して）ということの意味する。「配列同一性のパーセンテージ」は、最適に整列された2の配列を比較ウィンドウで比較することにより計算され、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、又は $\bar{U}$ ）が双方の配列に起こる部位の数を判断し、一致する部位の数を算出し、その一致する部位数をウィンドウの総数（すなわち、ウィンドウのサイズ）で除し、その商に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを算出する。

10

20

30

40

50

【0152】

例えば、2つの異なるヒトRSVs、又はウシ及びヒトのRSVのような対応する残基部位が、異なっているか、同一であるか、又は保存型アミノ酸置換が異なっているなどの可能性がある。保存型アミノ酸置換とは、類似した側鎖を有する残基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保存型1群として、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の1群が、セリン及びトレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギン及びグルタミンであり、芳香性側鎖を有するアミノ酸の1群が、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり、基本側鎖を有するアミノ酸の1群が、リジン、アルギニン、及びヒスチジンであり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の1群が、システイン及びメチオニンである。好ましい保存型アミノ酸1群が、バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リジンーアルギニン、アラニンーバリン、及びアルパラギンーグルタミンである。20個の従来型アミノ酸の立体異性体（例：Dアミノ酸）、 α 、 α 2置換型アミノ酸のような非天然アミノ酸、Nアルキルアミノ酸、乳酸、及び他の非従来型アミノ酸もまた、本発明のポリペプチドの構成要素として適切である。非従来型アミノ酸の例として、4ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、 ϵ -N, N-トリメチルリジン、 ϵ -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、 ω -N-メチルアルギニン、及び他のアミノ酸とイミノ酸類（4-ヒドロキシプロリンなど）が挙げられる。さらに、アミノ酸は、グルコシル化、リン酸化等により、修飾されてよい。

【0153】

本発明は、多様な組換え体である遺伝子位置を変位したRSVウイルス及びサブウイルス粒子を構成するためにcDNAに基づく方法を用いている。これらの組換えRSVは、弱毒化及び免疫原性について、ワクチン剤としての使用に適した改良された特徴を呈する。遺伝子位置を変位したRSVに挿入される望ましい表現型変化には、次のものが含まれるがそれらに限定するものではない。すなわち、培養における又は選択された宿主環境における弱毒化、弱毒化表現型からの復帰に対する抵抗力、改良された免疫原性特徴（例：引き出された反応の改良性又は削減により決定される）、選択されたウイルス生成物の転写及び／又は翻訳の上限調節又は下限調節などである。本発明の好適な観点において、弱毒化された遺伝子位置を変位したRSVが生成されており、そのRSVでは、キメラゲノム又はアンチゲノムが、弱毒化表現型を特定する、1又は複数の弱毒化変異体を導入することにより、さらに修飾される。これらの変異体が、新規に生成されその弱毒化効果が上記の文献に記載されている、合理的設計の変異誘発策に従って試験される。選択肢として、弱毒化変異体が、生物学的に得られた変異RSVにて同定され、本来の遺伝子位置を変位したRSVに挿入される。

【0154】

遺伝子位置を変位したRSVワクチン菌株に挿入される生物学的に得られるRSV内の弱毒化変異体を、天然に生成することもあるが、よく知られた変異誘発操作により野生型RSV菌株に導入することができる。例えば、不完全に弱毒化された親RSV菌株は、ここに概要としてまた以下の文献（US SN U. S. Patent No. 5, 922, 326, issued July 13, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）に詳説されるように、以下の三つの方法によって、生成することができる。すなわち、化学的変異原性物質が付加された細胞培養におけるウイルス増殖中の化学的変異誘発、増殖制限変異を作製するために最適以下の温度での継代培養にさらされたウイルスの選択、細胞培養により小型のプラーク（sp）を生成する変異誘発されたウイルスの選択である。

【0155】

「生物学的に得られたRSV」とは、組換え手段により生成されていないRSVを指す。そのため、生物学的に得られたRSVには、天然で生成する全てのサブグループ及び菌株のRSVが含まれ、その例としては、野生型ゲノム配列を有する天然にて生成するRSV、及び参照野生型RSV配列からのゲノム変異を有するRSV（例：弱毒化を起こす表現

型を特定する変異を有するRSV)がある。同様に、生物学的に得られたRSVには、親RSV菌株から得られたRSV変異が含まれ、とりわけ、人工的変異誘発及び選択操作により得られたものが含まれる。

【0156】

十分に弱毒化されたRSVを生物学的に得られた菌株から生成するには、不完全に又は部分的に弱毒化された親菌株に、よく知られたRSVサブグループAにおけるA2菌株のts-1又はts-1NG又はcpRSV変異、又はその誘導体又はサブクローンのような変異が適宜導入される。これらの及び他の部分的に弱毒化された菌株を利用して、その菌株をより一層弱毒化する(例えば、ワクチンによる感染保護を与えるに十分な免疫原性を保持する一方で、哺乳動物のホストにおける複製制限レベルを望ましいレベルまで下げる)さらにまた別の変異を生成することができる。 10

【0157】

サブグループA又はBウイルスの部分的に弱毒化された変異は、以下のよく知られた方法により、生成することができる。これらの方法は、野生型ウイルスを容認された細胞基質でクロニングし、その低温継代培養変異体を生成する、対象ウイルスを化学的変異誘発法にさらしts変異体を得る、又は小型プラーク表現型又は類似表現型をもつ変異を選択する(参照例:Murphy et al.による国際公開番号W093 21310、引例として本明細書に組み込まれている)などである。サブグループBのウイルスについては、典型的な部分的に弱毒化された親ウイルスはcp23であり、これはサブグループBのB1菌株の変異である。 20

【0158】

あらゆる既知の先端技術を組み合わせて、本項に記載されているようなさらなる展開に有用である非弱毒化サブグループA又はB菌株から、部分的に弱毒化された変異を作製することができる。また、弱毒化された表現型を特定する変異を、個別に、又は不完全に弱毒化されたサブグループA又はBと組み合わせて導入し、望ましいレベルの弱毒化及びワクチン接種を受けるヒトに対し免疫原性を与える、複数の定義された弱毒化変異ワクチンウイルスを生成することができる。

【0159】

上記のように、十分に弱毒化された生物学的に得られるRSV変異の作製は、いくつかの既知の方法により、達成することができる。そのような操作の1つは、部分的に弱毒化されたウイルスを、暫時低下する弱毒化を起こす温度で、細胞培養の継代にさらす方法に関連している。例えば、野生型ウイルスが通常約34-37℃で培養されるのに対して、部分的に弱毒化された変異体が、細胞培養(例えば、初代ウシ肝臓細胞)の継代で最適以下の温度、例えば20-26℃で生成される。このように、cp変異又は他の部分的に弱毒化された菌株(例えば、ts-1又はspRSV)が、低温でMRC-5又はペロ細胞の継代により、20-24℃、好ましくは20-22℃の温度で、効率のよい増殖をするように順応される。低温継代培養時に変異RSVを選択することにより、部分的に弱毒化された親に比較して、誘導体菌株のいかなる残留毒力をも大幅に減じる。 30

【0160】

選択肢として、特定の変異が、生物学的に得られたRSVに、部分的に弱毒化された親ウイルスを化学的変異誘導法に暴露することにより、導入されてよい。化学的変異誘導法の例としては、ts変異を導入する方法があり、すでにtsであるウイルスの場合は、弱毒化を高めるために及び/又は弱毒化誘導体のts表現型の安定性を高めるために、充分なだけts変異を付加する。ts変異をRSVへ導入する手段には、5フルオロウリジン又は5フルオロウラシルのような抗変異原物質の存在の下で、約 10^{-3} から 10^{-5} M、好ましくは 10^{-4} Mの濃度で、そのウイルスを複製すること、以下の文献(Ghapure et al, J. Virol. 3:414-421, 1969 and Richardson et al, J. Med. Virol. 3:91-100, 1978)に記載されている操作に従って、ウイルスをニトロソグアニジンに100 µg/km1の濃度でさらすこと、又は特定のts変異の遺伝子的導入が含まれる。他の化学的変異誘導方法も 40 50

、用いられてよい。この目的について特に有望な標的が、ポリメラーゼ（L）遺伝子であることがわかったが、弱毒化は、どんなRSV遺伝子にもあるts変異の結果として発生することが可能である。

【0161】

本発明で使用される典型的な弱毒化RSV複製時の温度感受性のレベルは、許容温度での複製と制限温度数力所での複製を比較することにより決定される。ウイルスの複製が、許容温度時に比較して1/100以下に減じられる時の最低温度を、遮断温度と呼ぶ。実験動物やヒトでは、複製とRSVの毒力は、変異の遮断温度と相関関係を示す。39℃の遮断温度での変異の複製は適度に制限されるのに対し、変異は38℃の遮断温度ではより低い効率で複製し、疾病の症状は主として上気道に制限される。35℃から37℃の遮断温度を有するウイルスは、通常、チンパンジーにおいては完全に弱毒化され、ヒトにおいてはかなり弱毒化される。このように、ts変異である、生物学的に得られる弱毒化変異及び本発明の遺伝子位置を変位したRSVは、約35℃から39℃、及び好ましくは35℃から38℃の範囲の遮断温度を有する。ts変異を部分的に弱毒化された菌株へ導入することにより、本発明のワクチン組成物で有用である複数の弱毒化されたウイルスが得られる。

10

【0162】

鼻腔内投与用の候補ワクチンとしての多くの弱毒化RSV菌株が、低温継代培養中に、既に弱毒化されたウイルスに複数の変異を導入する化学的変異誘発を繰り返して行うことにより開発された（例Connors et al., Virology 208: 478-484、1995、Crowe et al., Vaccine 12: 691-699、1994; and Crowe et al., Vaccine 12: 2783-790、1994、引例として本明細書に組み込まれている）。げっ歯類、チンパンジー、成人及び乳幼児での評価により、これらの候補ワクチン菌株のいくつかは遺伝子的に比較的安定しており、免疫原性が高く、十分に弱毒化される可能性がある。これら弱毒化ウイルスのいくつかのヌクレオチド配列を分析することにより、高められた弱毒化のレベルは、特異性を有するヌクレオチドとアミノ酸の置換に関連していることがわかった。上記の文献には、また、変異を個別に又はあらゆる組み合わせで、感染性RSVクロンのゲノム又はアンチゲノムに導入することにより、ルーチンとしてどのように、サイレントな偶発的変異と表現型の差異を引き起こす変異とを区別するかが開示される。このプロセスを、親及び誘導体の表現型特徴を評価することと共に行うことにより、弱毒化、温度感受性、低温適応性、小型のプラークサイズ、ホスト範囲制限など、好ましい特徴を引き起こす変異を同定することができる。

20

30

【0163】

このように同定された変異体を、「メニュー」に編集し、単独又は様々な組み合わせにて導入して、遺伝子位置を変位したRSVワクチンウイルスを、弱毒化、免疫原性、弱毒化表現型の復帰遺伝的抵抗力等に対する適切なレベルに、較正する。好ましくは、本発明のキメラRSVが、そのようなメニューから同定された少なくとも1または複数の、好ましくは2又はそれ以上の弱毒化した変異体を組み込むことにより弱毒化される。このメニューを、生物学的に得られた変異RSV菌株のパネル内の既知の変異グループとして定義することができる。この変異RSV菌株の典型的なパネルは、低温継代培養（cp）及び/又は温度感受性（ts）であり、その例は、以下の名称が与えられているRSV変異パネルである。すなわちcpt s RSV 248（ATCC VR2450）、cpt s RSV 248/404（ATCC VR2454）、cpt s RSV 248/955（ATCC VR2453）、cpt s RSV 530（ATCC VR2452）、cpt s RSV 530/1009（ATCC VR2451）、cpt s RSV 530/1030（ATCC VR2455）、RSVB-1 cp52/2B5（ATCC VR2542）、及びRSVB-1 cp-23（ATCC VR2579）（各々の変異体は、Budapest Treatyの条件の下American Type Culture Collection（ATCC）（10801 University Boulevard

40

50

、Manassas, Virginia 20110-2209、U. S. A.) に保管されており、上記の同定登録番号を付与される) などである。

【0164】

こうした生物学的に得られた変異の典型的なパネルから、多くの弱毒化変異体が提供されており、ワクチンの使用ために組換え遺伝子位置を変位したRSVの弱毒化のレベルを較正するために、その各々をパネル内における他のいずれの変異体とも組み合わせることができる。さらに別の変異体、例えば小型プラーク (sp)、低温適応 (ca)、又はホスト範囲制限 (hr) 変異菌株において同定された非ts及び非cp弱毒化変異を有するRSVからも得ることができる。弱毒化変異体を、ドナーのコード部分およびレシピエントRSV遺伝子、又はシス制御配列のような非コード領域内で選択することができる。例えば、弱毒化変異には、遺伝子開始配列における単一又は複数の塩基変化が含まれることもあり、これが、ヌクレオチド7605でのM2遺伝子開始配列における単一又は複数の塩基置換により例示される。

10

【0165】

ワクチンに使用するために設計され、選択された遺伝子位置を変位したRSVが、広範囲な臨床使用目的に十分なレベルの弱毒化を達成するために、多くの場合少なくとも2、時には3又はそれ以上の弱毒化変異体を有している。一例において、少なくとも1つの弱毒化変異体がRSVポリメラーゼ遺伝子 (ドナー又はレシピエント遺伝子のどちらか) において発生し、その変異体が、温度感受性 (ts) 表現型を特定するポリメラーゼタンパク質におけるアミノ酸変化を特定するヌクレオチド置換に関連している。この状況における典型的な遺伝子位置を変位したRSVが、大型のポリメラーゼ遺伝子Lに1又は複数のヌクレオチド置換を組み込んでおり、その結果、アミノ酸部位Asn43、Phe521、Gln831、Met1169、又はTyr1321でアミノ酸が変化しており、その変化として、Phe521ではLeu、Gln831ではLeu、Met1169ではVal、及びTyr1321ではAsnが例示される。上記に代わるものとして、又は上記に加えて、本発明の遺伝子位置を変位したRSVが、ts変異を異種のRSV遺伝子、例えば、M2遺伝子に挿入することもできる。好ましくは、2またはそれ以上のヌクレオチドの変化が、弱毒化変異体を特定するコドン、例えば、ts変異を特定するコドンに組み込まれ、その結果、弱毒化表現型からの復帰の可能性が低下する。

20

【0166】

本発明の方法により、生物学的に得られた変異RSV菌株のパネルに表示される少なくとも1つ及び最大限の弱毒化変異を挿入する遺伝子位置を変位したRSVを、容易に構成し、特徴付けることができる。このように、変異体が、以下に表示された変異体の選択されるパネルから、いかなる組み合わせも組み立てることができる。すなわち、cpt s RSV 248 (ATCC VR2450)、cpt s RSV 248/404 (ATCC VR2454)、cpt s RSV 248/955 (ATCC VR2453)、cpt s RSV 530 (ATCC VR2452)、cpt s RSV 530/1009 (ATCC VR2451)、cpt s RSV 530/1030 (ATCC VR2455)、RSVB-1 cp 52/2B5 (ATCC VR2542)、及びRSVB-1 cp-23 (ATCC VR2579) などである。この方法で、組換えワクチン候補の弱毒化を、血清反応陰性の乳幼児を含めて、1又は複数の患者タイプに対して、精密に較正することができる。

30

40

【0167】

より詳細な実施例では、ワクチン用遺伝子位置を変位したRSVが、温度感受性、及び/又はRSVポリメラーゼ遺伝子LにおけるAsn43、Phe521、Gln831、Met1169又はTyr1321での弱毒化アミノ酸の置換、又は遺伝子M2遺伝子の開始配列における温度感受性ヌクレオチドの置換を特定する、少なくとも1つ及び最大限の弱毒化変異体を挿入している。上記に代わるものとして、又は上記に付け加えて、本発明の遺伝子位置を変位したRSVが、低温継代培養弱毒化RSVから、1つ及び最大限の弱毒化変異を組み込むことができる。例えば、RSVのN遺伝子におけるVal267、R

50

S VのF遺伝子におけるG l u 2 1 8又はT h r 5 2 3、R S Vポリメラーゼ遺伝子Lにおけるc y s 3 1 9又はH i s 1 6 9 0でのアミノ酸置換を特定する1又は複数の変異体などである。

【0168】

他の詳細な実施例では、本発明の遺伝子位置を変位したR S Vが、以下から選択された弱毒化変異体を組み込むようにさらに修飾する。すなわち、(i) R S Vポリメラーゼ遺伝子Lにおける温度感受性のアミノ酸置換(G l n 8 3 1からL e u、及びT y r 1 3 2 1からA s n)を特定する変異のパネル、(i i) 遺伝子M 2の遺伝子開始配列における温度感受性のヌクレオチド置換、(i i i) アミノ酸配列置換、すなわち、R S VのN遺伝子におけるI l e、R S Vポリメラーゼ遺伝子LにおけるC y s 3 1 9 T y r及びH i s 1 6 9 0 T y r、を特定する低温継代培養R S Vから採取された変異対の弱毒化のパネル、(i v) R S VのS H、N S 1、N S 2、G及びM 2-2遺伝子の1又は複数の欠失又は除去などである。好ましくは、遺伝子位置を変位したR S Vのこれらの例及び他の例は、生物学的に得られた変異R S Vから採取された少なくとも2の弱毒化変異を組み込んでおり、これらの変異体を、同一又は異種の生物学的に得られた変異R S V菌株から得ることができる。また、好ましくは、これらの典型的な変異体が、変異を特定するコドン内の複数のヌクレオチド変化によって安定化される、1又は複数の弱毒化変異体を有している。

10

【0169】

上記の説明に従って、c D N Aから感染性のR S Vを作製できることが、遺伝子位置を変位したR S V内に特定の遺伝子操作による変化を導入することができる。特に、感染性の組換えR S Vは、特定の変異(例えば、t s、c a、a t t及び他の表現型を特定する変異)を、生物学的に得られた弱毒化R S V菌株で、同定するために用いられている。望ましい変異が、このように同定され、組換え遺伝子位置を変位したR S Vワクチン菌株に導入された。c D N Aからウイルスを作製する能力により、これらの変異を、ルーチンとして、個別に又はあらゆる組み合わせで、全長のc D N Aクローンに組み込むことができ、それにより、導入された変異を含むレスキュー組換えウイルスの表現型を容易に決定する。

20

【0170】

望ましい表現型(例えば、c p又はt s表現型)と関連している特定な生物学的に得られた変異体を同定し、感染性キメラR S Vクローンに組み込むことにより、本発明は他の部位特異的な修飾を、同定された変異箇所、又は極めて接近した中にて提供する。生物学的に得られたR S Vで生成されたほとんどの弱毒化変異体が単一ヌクレオチドの変化であるため、他の「部位特異性」の変異もまた、組換え技術により生物学的に得られたR S V又は組換えR S Vに組み込むことができる。本発明で利用されるように、部位特異性の変異には、1-3個から5-10個まで、又はそれ以上の修飾ヌクレオチドの挿入、置換、欠失又は再配列が含まれる(例:野生型R S Vから、選択された変異、R S V菌株の配列から、又は化学的変異誘発方法に暴露された親組換えR S V Cクローンからの修飾)。そのような部位特異性の変異は、選択され、生物学的に得られた変異体に、又はその領域に、組み込むことができる。選択肢として、変異は、R S Vクローン内のあらゆる他の状況で(例: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等をコードするシス作用性制御配列又はヌクレオチド配列又はその近くにて)、導入することができる。

30

40

【0171】

部位特異性のR S V変異体が、通常、望ましい弱毒化表現型を保持するが、それに加えて弱毒化に関係ない修飾された表現型の特徴(例えば、改良された又は拡大された免疫原性、及び/又は増殖)をも呈することもある。望ましい部位特異性の変異体には、付加的な安定化ヌクレオチド変異を、弱毒化変異体を特定するコドンに組み入れるように設計した組換えR S Vが含まれる。可能な場合は、2又はそれ以上のヌクレオチド置換が、弱毒化アミノ酸変化を親変異体又は組換えR S Vクローンにおいて特定するコドンによって導入され、その結果、弱毒化表現型からの復帰に対して遺伝子的抵抗力を有するた生物学的に

50

得られる R S V 又は組換え R S V を作製する。他の実施例では、部位特異性のヌクレオチド置換、付加、欠失又は再配列が、上流（N 末端方向）又は下流（C 末端方向）に導入される（例：既存のシス作用性制御因子の構成、又は除去を目的とした、ターゲットヌクレオチド部位から 5' 又は 3' の方向へ、1-3 または 5-10、あるいは 15 ヌクレオチド分以上離れた位置）。

【0172】

単一及び複数の点変異及び部位特異性の変異体に加えて、本発明で開示される遺伝子位置を変位した R S V への変化には、全部の遺伝子又はゲノム分節の欠失、挿入、置換又は再配列が含まれる。これらの変異体が、ドナー又はレシピエントゲノム又はアンチゲノムにある少数の塩基（例えば 515-30 個の塩基から、35-50 個の塩基まで、又はそれ以上）、ヌクレオチドの大型ブロック（例えば、50-100、100-300、300-500、500-1,000 個の塩基）、又はほとんど完全な又は完全な遺伝子（例えば、1,000-1,500 個のヌクレオチド、1,500-2,500 個のヌクレオチド、2,500-5,000 ヌクレオチド、ヌクレオチド 5,000-6,500 個以上）を、変化の特徴に応じて修飾する。これは、すなわち、少数の塩基が、免疫原性エピトープを挿入又は除去するように変更されるか、又は小型のゲノム分節を変化するように変更されるが、塩基の大型ブロックは遺伝子や大型ブロックが付加、置換、欠失又は再配列された場合に関与してくる。

【0173】

本発明の上記に代わる観点において、cDNA 発現ゲノム又はアンチゲノムから作成された感染性遺伝子位置を変位した R S V が、R S V 又は R S V 様の菌株のどれでもよく（ヒトウシ、マウス等）、又はニューモウイルスのどれでもよい（マウス鶏ニューモウイルスの肺炎ウイルス、以前はシチメンチョウ鼻気管炎ウイルスと呼ばれていた）。感染保護免疫反応を発生させるためには、R S V 菌株が、免疫化される対象に対して内因性である菌株（ヒトを免疫化するために使われるヒト R S V など）であってよい。しかしながら、内因性 R S V のゲノム又はアンチゲノムを、異種の菌株資源と組み合わせ（例：異種の R S V 種、サブグループ、又は菌株から、又は R S V 選択肢として P I V のような別の呼吸系病原からの、遺伝子又はゲノム分節を組み合わせ）からの R S V 遺伝子又はゲノム分節を発現するように修飾することができる。

【0174】

上記の定義された変異体の感染性遺伝子位置を変位した R S V クローンへの導入は、様々な既知方法により、達成できる。DNA に関連した「感染性のクローン」というのは、cDNA 又はその生成物（合成又は非合成）であり、それらを、感染性ウイルス又はサブウイルス粒子のゲノムを生成するテンプレートとしての機能を果たすことができるゲノム又はアンチゲノム RNA へ転写することができる。このように、定義された変異体を、従来の技術（例：部位指定変異誘発）により、ゲノム又はアンチゲノムの cDNA コピーに導入することができる。アンチゲノム又はゲノム cDNA の副断片を使って、本発明に記載されているように、完全なアンチゲノム又はゲノム cDNA を組み立てることには、それぞれの領域が別個に操作され（小さい cDNA s が大きい cDNA s より、操作しやすい）、容易に完全な cDNA に組み込まれるという利点がある。このように、アンチゲノム又はゲノム cDNA、又はそのいかなる副断片も、オリゴヌクレオチド指令型変異誘発方法のテンプレートとして使用できる。これは、1 本鎖ファージミド型の中間体を通して実行することができるが、これは、Bio-Rad Laboratories 社（Richmond, CA）の Mutagenesis Kit（商標）キットを用いて、又は Stratagene 社（La Jolla, CA）の Chameleon 変異誘発キットのような二本鎖プラスミドを直接テンプレートとして用いたり、又は目的の変異を含むオリゴヌクレオチド・プライマー又はテンプレートのどちらかを用いたポリメラーゼ連鎖反応を利用する。

【0175】

変異させた副断片を、完全なアンチゲノム又はゲノム cDNA に組み立てることができる

。他の変異誘発技術が知られており、RSVアンチゲノム又はゲノムcDNAに目的の変異体を作製するために利用できる。変異は、単一ヌクレオチドの変化から、1又は複数の遺伝子又はゲノム領域を含む大型のcDNA切片の置き換えに至るまで多様である。

【0176】

このように、説明に役立つ一例では、Bio-Rad社から入手できるMutagenプラスミドin vitroにおける変異誘導キットを用いて変異体が導入される。要するに、RSVゲノム又はアンチゲノムの一部をコードするcDNAが、プラスミドpTZ18Uにクローニングされ、CJ236細胞を転換するために使われる(Life Technologies)。ファージミド製剤は、製造会社の推奨方法に従って調製される。オリゴヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドをゲノム又はアンチゲノムの望ましい部位に導入することにより、変異誘発用に設計される。遺伝子的に修飾されたゲノム又はアンチゲノムの断片を含むプラスミドは、その後増殖され、変異された切片が、全長ゲノム又はアンチゲノムクローンに、再導入される。

【0177】

本発明はまた、1又は複数の単離されたポリヌクレオチド(例えば、1又は複数のcDNAs)から、感染性遺伝子位置を変位したRSVを作製する方法を提供する。本発明によると、RSVゲノム又はアンチゲノムをコードするcDNAが、感染RSVを形成するために必要なウイルスタンパク質と、細胞内又はin vitroに同時発現させるために構成される。「RSVアンチゲノム」とは、子孫RSVゲノムを合成するテンプレートとして機能する単離されたポジティブ・センスのポリヌクレオチド分子を指す。好ましくは、複製中間体RNA又はアンチゲノムに対応する、RSVゲノムのポジティブ・センスバージョンであるcDNAが、構成される。この目的は、転写及び複製されるヌクレオキャプシド(すなわち、N、P、L及びM2(ORF1)タンパク質をコードする配列)の生成に必要なタンパク質をコードする、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限に留めることである。RSVのミニゲノムシステムでは、ゲノム又はアンチゲノムが、RSVにより補完されていても又はプラスミドにより補完されていても、同等にレスキューにおいて活性であり、これにより、ゲノム又はアンチゲノムのどちらかが使用されることがわかり、その選択は方法論又は他の理由によって行われる。

【0178】

天然のRSVゲノムは、一般的に、ネガティブ・センス・ポリヌクレオチド分子から構成されており、これは、相補的なウイルスマRNAsを通して、以下の11種のウイルスタンパク質をコードする。すなわち、非構造的種であるNS1及びNS2、N、P、基質(M)、小型疎水性(SH)、糖タンパク質(G)、融合(F)、M2(ORF1)、M2(ORF2)、及びLなどである。これは、以下に詳しく説明されており(Mink et al.、Virology 185: 615-624、1991、Stec et al.、irology 183: 273-287、991、and Connors et al.、Vlrol. 208: 478-484、995、Collins et al.、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 81-85、1996)、各々引例として本明細書に組み込まれている。本発明の目的にとって、本発明で必要とする組換えRSVのゲノム又はアンチゲノムは、単にウイルス又はサブウイルス粒子がそれにより感染性としてコードされるのに必要な、それらの遺伝子とそのタンパク質を含んでいることである。

【0179】

さらに、遺伝子又はその部分を、1又は複数のポリヌクレオチド分子により、提供することができる。すなわち、遺伝子が、別個のヌクレオチド分子からの相補性又はそれに類似したものにより提供され、cDNAのゲノム又はアンチゲノムから直接発現されることができる。

「組換えRSV」は、組換え発現システムから直接的に又は間接的に得られた、又はそれから作製されたウイルス又はサブウイルス粒子から増殖された、RSV又はRSV様のウイルス又はサブウイルス粒子を指す。組換え発現システムは、組換え発現ベクターを利用

している。

【0180】

このベクターは、操作上連結した転写ユニットを含み、この転写ユニットが、集合体を含み、この集合体が少なくとも遺伝子的要素又はRSV遺伝子発現において制御役割を有する要素群を含んでいる。これらの要素の例には、プロモーター、RSV RNAの転写される構造的又はコード配列、及び適切な転写開始及び終了配列がある。

【0181】

cDNA発現ゲノム又はアンチゲノムから感染性RSVを作製するには、ゲノム又はアンチゲノムが、それらのRSVタンパク質と同時に発現される。これらのタンパク質は、(i) RNA複製ができるヌクレオキャプシドを生成するために必要であり、また、(ii) 子孫のヌクレオキャプシドをRNA複製及び転写ができるようにするために必要である。ゲノムヌクレオキャプシドによる転写により、他のRSVタンパク質が提供され、増殖感染が開始される。選択肢として、増殖感染に必要なさらに別のRSVタンパク質が、同時発現により供給される。

【0182】

RSVアンチゲノムが、本発明で使用するために、RSVのmRNAの逆転写されたコピー又はゲノムRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR; 例えば以下に記載されている: 米国特許番号4, 683, 195及び4, 683, 202, 及びPCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, 1990、本明細書に引例として組み込まれている)を用いて、凝集状態で完全なアンチゲノムであるクロニングされたcDNA分節を、組み立てることにより構成される。例えば、アンチゲノムの左側の末端を含むcDNAsが、適切なプロモータ(例えば、T7 RNAポリメラーゼプロモータ)及びSH遺伝子に相補する先導部領域に広がり、プラスミド(例えば、pBR322)又は多様な利用可能なコスミド、ファージ、又はDNAウイルスベクターのような適切な発現ベクター内で組み立てられる。このベクターが、変異誘発法及び/または組み立てを促進するように設計されたユニークな制限部位を含む合成ポリリンカーを組み入れることにより修飾される。例えば、本発明で記載されているプラスミドベクターが、Pst I-EcoR I断片を、都合のよい制限酵素部位を含む合成DNAと置き換えることにより、pBR322から得られる。pBR322をベクターとして使用することにより、RSV配列におけるヌクレオチド3716-3732が安定化された。そのベクターを使用しない場合は、ヌクレオチド欠失又は挿入が起こった。人工的な重複及び挿入を避けるためにプラスミドの増殖を、細菌性の菌株Dh10Bにて行った。そうしない場合は、nt 4499の近隣で人工的な重複及び挿入が起こった。調製を簡単にするため、G、F及びM2遺伝子を、別個のベクターにて組み立てられることができ、これはL及び尾部配列についても同様である。アンチゲノムプラスミドの右側末端(例えば、L及び尾部配列)が、必要に応じて付加の配列(例えば、側面に配置するリボザイム及びタンデムT7転写ターミネーター)を含んでよい。リボザイムはハンマーヘッド型(例Grosfeld et al., J. Virol. 69: 5677-5686, 1995)(このタイプは単一の非ウイルスヌクレオチドを含む3'末端を生成する)であってよく、又は肝炎デルタウイルスのリボザイム(Perrotta et al., Nature 350: 434-436, 1991)(非RSVヌクレオチドの無い3'末端を生成する)のような他のいかなる適したリボザイムであってよい。中間の分節1個(例えば、G-M2切片)が、リーダーSHプラスミド(これは同様にL-尾部リボザイムターミネーター切片のレシピエントである)の適切な制限部位に挿入され、完全なアンチゲノムを作成する。本発明で記載されている実例では、先導部末端が、最適な活性を産むための3つの転写G残基を含むT7 RNAポリメラーゼのプロモータと接するように、構成された。転写により、これら3つの非ウイルスのGが、アンチゲノムの5'末端に供与される。これら3つの非ウイルスのG残基を、省略して、非ウイルスのヌクレオチドの無い5'末端を作製するために欠失することができる。ほぼ正しい3'末端を生成するには、尾部

末端が、ハンマーヘッド・リボザイムに隣接するように構成された。これにより、分割直後に単一の3'-リン酸化U残基を、コードされたRNAの3'末端に寄与する。

本発明のある実施例においては、RSVヌクレオチドを転写及び複製するために必要なタンパク質をコードする相補配列が、1又は複数のヘルパーウイルスにより提供される。そのようなヘルパーウイルスが、野生型でも変異型であってもよい。好ましくは、このヘルパーウイルスを、表現型において、RSVのcDNAによりコードされたウイルスと区別することができる。例えば、ヘルパーウイルスには免疫学的に反応するがRSV cDNAによりコードされたウイルスには反応しないモノクローナル抗体を提供することが望ましい。そのような抗体が、中和抗体であり得る。ある実施例においては、このような抗体を使って、ヘルパーウイルス背景を中和し、組換えウイルスの同定及び回収を促進することが可能であり、又はアフィニティー・クロマトグラフィーでヘルパーウイルスを組換えウイルスと分離することが可能である。そのような抗体で組換えRSVを非反応性に又は抵抗力を有するように変える変異を、RSV cDNAに導入することができる。

10

【0183】

様々なヌクレオチド挿入及び欠失を、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノム内にて、適切に弱毒化されたクローンを生成するために行なうことが可能である。野生ヒトRSVのゲノムのヌクレオチド長(15,222個のヌクレオチド)は、6の倍数で、パラミクソウイルス及び麻疹ウイルス属のウイルスが、一般的に、ゲノム又はミニゲノムは、そのヌクレオチド長が6の倍数である時のみ、効率よく複製するという「6の規則」に従っている(キャプシド形成NPタンパク質を基準にしたヌクレオチド残基の正確な間隔を推測するために必要であると考えられている)。残基を1個ずつ増やしてRSVゲノム長を修飾しても、複製の効率にはなんの影響も及ぼさず、継代培養後の異種のミニゲノム変異数種について配列分析をしたところ、埋め合わせとなる変化がなくても、長さの違いは維持されることがわかった。このように、RSVは、ゲノム長が6の倍数でなければならないという厳格な要件を持たず、ヌクレオチド挿入及び欠失を、RSVゲノム又はアンチゲノム内にて、本発明の組換えRSVの複製を損なうことなく行うことができる。

20

【0184】

遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムをコードするcDNAを構成する別な手段で、上記に代わるものには、サブユニットcDNA組成物の数を1つ又は2つまで減らすように改良したPCR条件を利用した逆転写PCRが含まれる(例えば以下に記載されているCheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994, Samal et al., J. Virol. 70:5075-5082, 1996、各々引例として本明細書に組み込まれている)。他の実施例では、異種のプロモータ(例:T3、SP6)又は異種のリボザイム(例:肝炎デルタウイルスのリボザイム)を利用することができる。大型ゲノム又はアンチゲノムの収容を改良するために、異種のDNAベクター(例えば、コスミド)を増殖に利用できるRNA複製に必要であるN、P及びLタンパク質は、開始後の前進的転写用のM2(ORF1)タンパク質のようなRNAポリメラーゼ伸長因子を要する。このように、負鎖RNAウイルス用のM2(ORF1)又は実質的に同等の転写伸長因子が、感染性RSVの増殖に必要であり、増殖性感染時にヌクレオチドを機能させるために必要な要素である。

30

40

【0185】

M2(ORF1)タンパク質の必要性は、転写伸長因子としてのその役割と一致している。ポジティブ鎖のRNAウイルスに向けたRNAポリメラーゼ伸長因子タンパク質の発現の必要性は、本発明の特徴の1つである。M2(ORF1)は、完全なM2遺伝子の発現により供給され、その発現はキメラゲノム又はアンチゲノムによるか、又はそれらとの同時発現によって行なわれる。尤も、この型では、第2のORF2が発現され、RNA複製に抑制効果を有する。従って、完全なM2遺伝子を使って感染性ウイルスの増殖を行う場合には、M2(ORF1)の発現を十分に許容し、M2(ORF2)がRNA複製を抑制しないような程度の転写伸長因子の活性をもたらすように、2のORFsの活性にバランスが取れている必要がある。選択肢として、ORF1タンパク質は、ORF2を欠くように

50

設計した cDNA、又は欠損 ORF 2 をコードする cDNA から提供される。ウイルス増殖の効率は、例えば、エンベロープ成分をコードするタンパク質（すなわち、SH、M、G、F タンパク質）などの、付加的なウイルスタンパク質遺伝子の同時発現により、改良されることもある。

M2 (ORF 2) に関するこれらの結果に基づいて、本発明のまた別の典型的な実施例が提供される。この例においては、M2 (ORF 2) の変異体を挿入する遺伝子位置を変位した RSV が構成されており (Collins and Wertz, J. Virol. 54: 65-71, 1985, Collins et al., J. Gen. Virol. 71: 3015-3020, 1990, Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 81-85, 1996、各々引例として本明細書に組み込まれている)、新しい RSV ワクチン候補を作成している (以下を参照のこと: アメリカ合衆国特許仮出願認識 5 番号: 60/143, 097, filed by Collins et al. on July 9, 1999、引例として本明細書に組み込まれている)。ある観点においては、組換えゲノム又はアンチゲノムを修飾することにより、M2 ORF 2 の発現が減じられるか、除去され、その結果、M2 ORF 2 内にフレーム変位変異又は 1 又は複数の終止コドンを挿入し、「ノックアウト」ウイルスクローンを得ることになる。選択肢として、M2 ORF 2 を、全部又は 1 部欠失し M2-2 タンパク質を部分的に又は全く機能しないものとするか、又はその発現を完全に途絶させ、M2 ORF 2 「欠失変異」キメラ RSV を作製する。選択肢として、M2-2 ORF が、M2-2 遺伝子の自然状態の遺伝子配列部位に比べて、よりプロモータへ隣接又はプロモータ遠位に変位し、M2-2 ORF の発現を上限調節又は下限調節する。

10

20

【0186】

さらに別の実施例では、M2-2 ORF がゲノム又はアンチゲノム内に、遺伝子開始及び遺伝子終了シグナルを有する個別の遺伝子として挿入され、この修飾の結果、M2-2 ORF が上限調節される。M2 ORF 2 の変異を挿入する本発明の遺伝子位置を変位した RSV が、ワクチン開発に大変望ましい表現型を有している。組換えゲノム又はアンチゲノムにおける上記の修飾は、結果として作製されたウイルス又はサブウイルス粒子において 1 又は複数の望ましい表現型を特定している。以下のような特徴が 1 つ以上同定されたワクチン候補が、このようにして生成される。すなわち、(i) mRNA 転写における変化、(ii) ウイルスタンパク質発現のレベルにおける変化、(iii) ゲノム又はアンチゲノム RNA 複製における変化、(iv) ウイルス増殖の特徴における変化、(v) ウイルスプラークのサイズにおける変化、及び/又は (vi) 細胞病原性における変更などである。

30

【0187】

M2 ORF 2 欠失又はノックアウト変異を挿入する典型的な RSV 組換え体では、望ましい表現型の変化として、対応する野生型又は変異体の親 RSV 菌株の増殖に比べて、ウイルス増殖における弱毒化過程が含まれている。

【0188】

より詳細な観点において、細胞培養におけるウイルス増殖が、M2 ORF 2 における変異のため、約 10 倍以上弱毒化される。ウイルス増殖の増殖反応速度もまた、ワクチン開発に役に立つように修飾されたことが示される。

40

本発明には、M2-ORF 2 の欠失及びノックアウト変異 RSV も含まれている。これらは、対応する野生型又は変異体親 RSV 菌株に比べて、ウイルス mRNA 合成の増殖反応速度が遅い。このような遅い転写増殖反応速度にもかかわらず、これらの新しいワクチン候補は、親ウイルスに比べて、蓄積 mRNA 合成が向上している。これらの表現型の変化が、一般的に、野生型又は他の親 RSV 菌株に感染した細胞におけるタンパク質の蓄積に比べて、感染細胞におけるウイルスタンパク質の蓄積を向上している。同時に、ウイルス RNA 複製は、正常な M2 ORF 2 の機能を有する親 RSV 菌株の複製に比べ、M2 ORF 2 遺伝子位置を変位した RSV において減少し、それによってゲノム又はアンチゲノム RNA の蓄積を減少する。

50

【0189】

本発明の好ましい観点において、キメラM2ORF2欠失及び「ノックアウト」RSVを設計し、非減少又はより一般的には向上したウイルス抗原を発現し、一方では、弱毒化された表現型を呈している。このように、免疫原性上の可能性が、非減少又は向上したmRNA転写及び抗原発現により、保たれ、その上、異種性の遺伝子又はゲノム分節を挿入したこと、及びそれに付随して起こったRNA複製の減少、及びM2-ORF2の欠失及びノックアウト変異に起因するウイルス増殖を通して、弱毒化が達成された。表現型形質のこの新しいセットは、ワクチン開発に非常に望ましい。M2ORF2欠失及びノックアウト遺伝子位置を変位したRSVで見られる他の有用な表現型変化には、対応する野生型又は変異体親RSV菌株に比べて、大型プラーク表現型及び修飾された細胞病原性が含まれている。

10

【0190】

遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムをコードする単離されたポリヌクレオチド（例えばcDNA）及びN、P、L及びM2（ORF1）タンパク質（個別に、又はシスで、又はアンチゲノム又はゲノムcDNAから発現された状態で）が、トランスフェクション、エレクトロポレーション、機械的挿入、形質導入又は類似法により、増殖性RSV感染をサポートすることができる細胞（例えば、HEp-2、FRhL-DBS2、MRC、及びペロ細胞）に挿入される。単離されたポリヌクレオチドのトランスフェクションは、例えば以下の方法により、培養細胞に導入されることもある。すなわち、カルシウムリン酸介在トランスフェクション（Wigler et al., Cell 14: 725, 1978, Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981, Graham and Vander Eb, Virology 52: 456, 973）、エレクトロポレーション（Neumann et al., EMBO J. 1: 841-845, 1982）、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション（Ausubel et al., (ed) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987）カチオン脂質媒介トランスフェクション（Haley-Nelson et al., Focus 15: 73-79, 1993）、又は市販されるトランスフェクションキット（例えば、Infect Technologies社のLipofect ACE（商標））（上記の各々の文献は本書に挿入される）などである。

20

30

【0191】

N、P、L及びM2（ORF1）タンパク質は、1又は複数のcDNAs及び発現ベクターによりコードされる。この発現ベクターは、ゲノム又はアンチゲノムまたその多様な組換え体をコードするものと同一である場合も別な場合もある。さらにまた別のタンパク質を必要に応じて加えてもよく、これらのタンパク質は、それ自身のベクターにより、又はN、P、L、又はM2（ORF1）タンパク質及び／又は完全なゲノム又はアンチゲノムをコードするベクターにより、コードすることができる。トランスフェクションされたプラスミドからのゲノム又はアンチゲノム及びタンパク質の発現は、例えば、T7 RNAポリメラーゼのプロモータの制御下にある各々のcDNAにより達成され、その結果、T7 RNAポリメラーゼ（例えば、T7 RNAポリメラーゼを発現するワクチンウイルスMVA菌株組換え体）の発現システムと共に、感染、トランスフェクション又は形質導入により供給される（Wyatt et al., Virology, 210: 202-205, 1995、引例として本明細書に組み込まれている）。ウイルスタンパク質及び／又はT7 RNAポリメラーゼは、転換された哺乳動物の細胞から提供されるか、選択肢として前もって形成されたmRNA又はタンパク質のトランスフェクションにより提供される。

40

【0192】

選択肢として、アンチゲノム又はゲノムは、in vitro（細胞なし）で結合転写翻訳反応、続いて細胞へのトランスフェクションにより、合成が可能である。選択肢として

50

、アンチゲノム又はゲノムRNAを、*in vitro*で合成され、RSVタンパク質を発現する細胞にトランスフェクションすることが可能である。

【0193】

本発明により候補になるワクチンウイルスを選択するには、既知の方法に従って、生存能力、弱毒化及び免疫原性の判断基準が決定される。本発明のワクチンにおいて最も望ましいウイルスは、生存能力を維持し、安定した弱毒化表現型を有し、免疫化された宿主において複製を呈し（低レベルであっても）、さらに野生型ウイルスによる二次感染により引き起こされる重篤な疾病に対し、感染保護を与えるに十分な免疫反応を効果的に惹起するものでなければならない。明らかに、これまでに知られ報告されたRSウイルス変異体が、これらの判断基準をすべて満たしてはいない。実は、既知の弱毒化RSVについて報告された結果に基づいた予想に反して、本発明のウイルスが、以前の研究における変異に比べて生（なま）であり適切に弱毒化されるのみならず、以前の研究における変異に比べて*in vivo*で遺伝子的により安定しており、その結果、感染保護免疫反応を刺激し、ある事例においては複数の修飾によりもたらされた感染保護を拡大する（例えば、異種のウイルス菌株又はサブグループに対する感染保護又は異種の免疫基盤による感染保護を誘発するなど）能力を保持した（異種の免疫基盤例には、分泌及び血清免疫グロブリン、細胞性免疫性などが含まれる）。本発明が開示される以前は、*in vivo*複製後のts表現型の遺伝子的不安定さは、tsウイルスにとって一般的であった（Mulphy et al.、Infect. Immun. 37: 235-242、1982）。

【0194】

遺伝子位置を変位したRSVをワクチンに使用する及び他のために増殖するには、RSV増殖を許容する多数の細胞ラインが利用できる。RSVが、あらゆるヒト及び動物細胞にて増殖する。ワクチンに使用する弱毒化RSウイルスを増殖するための好ましい細胞ラインには、DBS-FRhL-2、MRC-5、及びベロ細胞が含まれる。高いウイルス産生物が、通常、ベロ細胞のような上皮細胞にて達成される。細胞は、一般的に、O.OO1から1.0以上の範囲の感染多重度で、ウイルスにより免疫化されており、さらに、ウイルスの複製を許容する条件下で培養される（例えば、30-37℃で3-5日間、又はウイルスが適切な力価に達するまで）。ウイルスが、細胞培養から取り除かれ、細胞性要素から、既知の澄清化方法、例えば遠心分離法により分離され、さらにこの分野での常法を用いて、記載されているように精製される。

【0195】

弱毒化され、又は本発明で記載されているように修飾された遺伝子位置を変位したRSVが、あらゆる既知の一般的に受け入れられた*in vitro*及び*in vivo*モデルを使って、適切な弱毒化、表現型復帰への抵抗力、及びワクチンに使用するための免疫原性を試験することができる。*in vitro*アッセイでは、修飾されたウイルス（例えば、幾重にも弱毒化された生物学的に得られたRSV又は組換えRSV）を、ウイルス複製の温度感受性（すなわち、ts表現型）及び小型プラーク表現型について試験する。修飾されたウイルスを、さらにRSV感染の動物モデルにて試験する。あらゆる動物モデルが、以下の文献で説明及び要約される（Meignier et al.、eds.、Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infection、Merieux Foundation Publication、1991、引例として本明細書に組み込まれている）。RSV感染コットンラットのモデルが、以下の文献に説明されており（U. S. 4, 800, 078 and Prince et al.、J. Virol Res. 3: 193-206、1985、引例として本明細書に組み込まれている）、これは、ヒト及び非ヒトの霊長類における弱毒化と効用を予測するものである。さらに、チンパンジーを用いたRSV感染の霊長類モデルは、以下の文献に詳細に記載されているように、ヒトにおける弱毒化と効用を予測するものである（Richardson et al.、J. Med. Virol. 3: 91-100、1978、Wright et al.、Infect. Immun. 37: 397-400、1982、Crowe et al.、Vaccine 11: 1395-1404、

1993, 各々引例として本明細書に組み込まれている)。

【0196】

R S V ワクチン候補の弱毒化と及び感染力を評価するげっ歯類及びチンパンジーを含む R S V モデルシステムが、分野に広く受け入れられており、それから得られたデータが、R S V 感染及び弱毒化との間に高い相関関係を示している。マウス及びコットンラットのモデルが、候補の R S V ウイルスがチンパンジーにおいて不適切な増殖を呈する事例において、例えば、R S V サブグループ B ウイルスの事例において、特に有用である。

【0197】

上記の説明及び下記の例に従って、本発明はまた、ワクチン用の単離された感染性の遺伝子位置転位 R S V を提供する。ワクチンの一組成物である弱毒化されたキメラウイルスが、単離され一般的に精製された型に属する。「単離された」という用語は、感染された個体の鼻咽喉のような、野生型ウイルスの天然の環境以外に属する R S V を指す。もっと一般的に言えば、「単離された」という用語は、細胞培養又は他の人工的な媒体（ウイルスが増殖され制御された設定で特徴付けがされるもの）の組成物としての弱毒化されたウイルスを含む意味がある。例えば、本発明の弱毒化 R S V は、感染された細胞培養により生成され、細胞培養から単離され、安定剤に加えられる。

【0198】

本発明の R S V ワクチンが、本明細書に記載されているように、活性成分として、免疫原性的に効果的な量の R S V を含んでいる。生物学的に得られた R S V 又は組換え R S V が、直接ワクチン製剤に使用され、選択肢として凍結乾燥もできる。凍結乾燥されたウイルスは、一般的に約 4℃ で保存される。使用時には、凍結乾燥されたウイルスは、下記により詳細に記載されているように、安定化剤溶液（例えば、生理食塩水又は S P G、M g + + 及び H E P E S からなる溶液）にて、アジュバント（抗原性補強剤）とともに、又はなしにて調製される。生物学的に得られたウイルス又は組換えウイルスが、生理的に受け入れられる担体及び／又はアジュバントと共に、ホストに導入されてよい。有用な担体は分野でよく知られているが、例えば、水、緩衝水、0.4% の生理食塩水、200.3% のグリシン、ヒアルロン酸等が含まれる。結果として生成される水溶液が、そのままパッケージに詰められことも、又は凍結乾燥することもできる。上記に記載されているように、凍結乾燥調剤は、投与する前に消毒液と混合する。

【0199】

組成物は、生理的状态に近づけるために必要に応じて、薬剤学的に受け入れられている補助剤を含んでも構わない。補助剤の例としては、p H 調整剤及び緩衝剤、張性（浸透圧）調整剤、湿潤剤等があり、その例には、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、ラウリル酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン等がある。受け入れられているアジュバントには、不完全 F r e u d アジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンが含まれ、これらは分野でよく知られた物質である。好ましいアジュバントにはまた、S t i m u l o n（商標）Q S - 2 1（A q u i l a B i o p h a r m a c e u t i c a l s, I n c.、F r a m i n g h a R N A）、M P L（商標）（3 - 0 - d e a c y l a t e d m o n o p h o s p h o r y l l i p i d A、C o r i x a、H a m i l t o n、M T）、及びインターロイキン-12（G e n e t i c s I n s t i t u t e、C a m b r i d g e、M A）が含まれている。

【0200】

本発明で記載されているように、エアロゾル、液滴、経口、局所又は他の経路で、遺伝子部位転位 R S V ワクチン組成物で免疫化を施した直後、ホストの免疫系は、1 又は複数の R S V ウイルスタンパク質（F 及び／又は G 糖タンパク質）に特異性を有する抗体を生成することにより、ワクチンに反応する。免疫化の結果、ホストは、特に下気道で、R S V 感染性に対し少なくとも部分的に又は完全に免疫力ができるか、又は軽いまたは重篤な R S V 疾病の発病に対し抵抗力ができる。

【0201】

10

20

30

40

50

本発明の遺伝子の位置を変位したRSVワクチンが、単一のRSV菌株又は抗原サブグループ（例えば、A及びB）、又は複数のRSV菌株またはサブグループに対する免疫反応を惹起する弱毒化されたウイルスを含む。この状況において、遺伝子位置を変位したRSVが、単一特異性の免疫反応又は多特異性の免疫反応を、複数のRSV菌株またはサブグループに対して惹起する。選択肢として、異種の免疫原性を特徴付けする遺伝子位置を変位したRSVを、ワクチン混合物と混合し、相応する治療プロトコルで別個に投与し、1個のRSV菌株に対して、又は複数のRSV菌株又はサブグループに対して、より効果的な感染保護を惹起することもできる。

【0202】

ワクチンが投与されるホストは、RSV又は密接に関連したウイルスによる感染に罹りやすい哺乳動物で、接種しているウイルスの抗原に対する感染保護免疫反応を生成することができる哺乳動物であってよい。このように、適したホストには、ヒト、ヒト以外の霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ目、げっ歯類等が含まれる。これに応じて、本発明は、多様なヒトおよび獣医学的用法のためにワクチンを作成する方法を提供する。

【0203】

本発明の弱毒化遺伝子部位転位RSVを含むワクチン組成物は、感染しやすい又はRSV感染のリスクがある患者に、「免疫学的に効果のある投与量」（個体のRSVに対する免疫反応能力を誘発又は向上させるに十分な量）にて投与される。ヒトの被験者の場合、本発明の弱毒化ウイルスが、以下の文献に記載されているように、確立されたヒトRSVワクチンプロトコルに従って、投与され（Wright et al, Infect. Immun. 37: 397-400, 1982, Kim et al., Pediatrics 52: 56-63, 1973, and Wright et al., J. Pediatr. 88: 931-936, 1976）、これらはそれぞれ引例として本明細書に組み込まれている。要約すれば、成人及び子供は、鼻腔内経路で液滴により、免疫学的に効果のあるRSVワクチン投与量を以って（通常、生理的に受け入れられる希釈剤又は担体0.5mlの量を以って）、免疫化される。この方法には、非複製ワクチンの非経口的経路の免疫化に比べて、簡単で安全であるという利点がある。この方法はまた、局所の気道の免疫を直接刺激し、このことはRSVに対する抵抗力において主要な役割を果たすものである。さらに、このモデルのワクチンは、乳児によく見られるRSV特異性を有する母親からの血清抗体の免疫抑制効果を効果的に無視する。また、RSV抗原の非経口的投与は時に、免疫病理学的な併発症を起こすことがあるが、これは生ウイルスに関しては未だ観察されていない。

【0204】

全ての患者において、遺伝子部位転位RSVワクチンの正確な投与量、タイミング及び投与回数々が、患者の健康状態、体重、投与方法、製剤の性質等に基づいて決定される。投与量は、一般的に、患者1人につき約 10^3 から 10^6 プラーク形成ユニット（PFU）以上のウイルス量であり、より一般的には、患者201人につき約 10^4 から 10^5 （PFU）のウイルスの範囲である。いずれにしても、ワクチン製剤は、本発明の弱毒化されたRSVが、アンチRSV免疫反応を刺激又は誘発するために十分な量を提供する必要がある。これは、補体結合、プラーク中和、及び／又は酵素免疫測定法等により決定される。この点で、患者は、上気道の疾病の兆候及び症状がないかどうか、モニターされる。チンパンジーへの投与に見られるように、ワクチンの弱毒化ウイルスは、接種を受けた個体の鼻咽喉で、野生型ウイルスに比べて約1/10以下の低いレベルで、また不完全に弱毒化されたRSVのレベルと比較して約1/10以下の低いレベルで増殖する。

【0205】

新生児及び乳児においては、十分なレベルの免疫性を惹起するには、複数回の投与が必要となる。投与は、生後一ヶ月以内に開始するべきであり、幼児期には、生後2ヶ月、6ヶ月、1年及び2年という間隔において、天然（野生型）のRSV感染に対する感染保護の十分なレベルを保つために必要に応じて、行うべきである。同様に、繰り返して重篤なR

S V 感染に罹りやすい成人（例えば、医療勤務者、保育所勤務者、乳幼児のいる家庭、高齢者、心肺性機能の脆弱な者）は、感染保護免疫反応を確立及び／又は維持するために複数回の免疫化が必要となる。誘発された免疫のレベルは、中和分泌及び血清抗体によりモニターすることが可能であり、感染保護の望ましいレベルを維持するために必要に応じて、投与量を調整し、免疫化を繰り返すことができる。

【0206】

さらに、様々なワクチンウイルスが、多様な被接種患者グループへ投与できると示唆される。例えば、サイトカイン選択肢として別の細胞エピトープが多く含まれるタンパク質を発現するように作製された遺伝子位置を変位した R S V 菌株は、乳児よりも成人に特に好適である。本発明により作製された R S V ワクチンは、R S V の別のサブグループ又は菌株の抗原を発現する R S V ワクチンと混合して、複数の R S V サブグループ又は菌株に対する感染保護をもたらすことができる。選択肢として、ワクチンウイルスは、本発明に記載されているように、1 個の R S V クローンに作製された複数の R S V 菌株又はサブグループの感染保護エピトープを、挿入することが可能である。

10

【0207】

一般的に、ワクチンウイルスを使用する場合、混合剤で同時に投与されるが、個別に投与されることもある。例えば、2 の R S V サブグループの F 糖タンパク質はアミノ酸配列において差異が 10 % しかないことから、この類似性は交差保護免疫反応の基盤となる。このことは、R S V または F 抗体で免疫された動物又は、異種性の菌株で攻撃された動物において観察される。

20

【0208】

このように、1 個の菌株による免疫化により、同一又は異種のサブグループに対する感染保護をもたらされる。しかしながら、最適な感染保護には、おそらく双方のサブグループに対して免疫化を行うことが必要である。

【0209】

本発明の遺伝子部位転位 R S V ワクチンが、患者が以前に野生型 R S V に感染している場合に、例えば、肺炎及び細気管支炎のような重篤な下気道疾病に対する感染保護をもたらす免疫反応の生成を惹起する。自然状態で存在するウイルスは、感染を起こすことができるが（特に上気道に）、免疫化の結果として鼻炎の可能性が大きく減じられ、さらに野生型ウイルスによる次の感染に対する抵抗力を増強する可能性が出る。ワクチン投与後、検出できるレベルの宿主産生血清及び分泌抗体が見られ、これは異種性（同一のサブグループからの）の野生型ウイルスを、*in vitro* 及び *in vivo* にて中和することができる。

30

【0210】

多くの場合、宿主抗体もまた、異種の非ワクチンサブグループの野生型ウイルスを、中和する。本発明の好ましい遺伝子位置を変位した R S V は、自然状態でヒトに存在する野生型ウイルスに比較して、非常に著しい毒性力の減少を呈している。遺伝子部位転位ウイルスは、十分に弱毒化されるので、感染の症状はほとんどの免疫化された患者では起こらない。ある事例においては、弱毒化されたウイルスは、免疫化されていない患者に伝播する能力は依然としてあるが、その毒性力は十分に無効化されるので、免疫化された又は偶発的な宿主での重篤な下気道感染は起こらない。

40

【0211】

遺伝子部位転位 R S V ワクチンウイルスの弱毒化のレベルは、例えば、免疫化された患者の気道に存在するウイルスの量を測り、その量を野生型 R S V 又はワクチン菌株候補として評価された他の R S V により生成された量と比較することにより、決定することができる。例えば、本発明の弱毒化されたキメラウイルスは、野生型ウイルスの複製レベルに比べて（例えば、1 / 10 倍から 1 / 1000 倍低い）、チンパンジーのような罹患しやすい宿主の上気道での複製を非常に制限する。また、弱毒化された R S V ワクチン菌株のチンパンジーの上気道での複製レベルが、R S V の A 2 t s - 1 変異体のそれより低くなければならないが、これは血清反応陰性のヒト乳児にて不完全に弱毒化されるとして先に

50

示された。上気道でのウイルスの複製と関連している鼻漏の発病をさらに減少させるためには、理想的なワクチン候補ウイルスが、上気道及び下気道の両方にての複製を制限するものでなければならない。

【0212】

しかしながら、本発明の弱毒化ウイルスは、免疫化された患者に感染保護を与えるように、ヒトにおいて十分な感染性及び免疫原性を持たねばならない。

【0213】

感染したホストの鼻咽喉におけるRSウイルスのレベルを決定する方法は、上記の文献でよく知られている。検体は、検査法による組織培養又はその他により定量化された鼻咽喉分泌及びウイルスからの吸引又は洗浄により得られる。次はその参照例である。すなわち (Belsh et al., J. Med. Virology 1: 157-162, 1977; Fnedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204: 690-694, 1968, Ghali pure et al., J. Virol. 3: 414-421, 1969 and Wright et al., Arch. Ges. Virusforsch. 41: 238-247, 1973 (各々引例として本明細書に組み込まれている) など。ウイルスが、チンパンジーのような宿主動物の鼻咽喉にて、簡易に測定することができる。

【0214】

ある場合においては、本発明の遺伝子位置を変位したRSVワクチンを、他の病因、特に、他の小児期ウイルスに対する感染保護反応を誘発するワクチンと組み合わせることが望ましいとなる。例えば、本発明の遺伝子位置を変位したRSVワクチンは、以下に記載されているように (Clements et al., J. Clin. Microbiol. 29: 1175-1182, 1991, 引例として本明細書に組み込まれている)、パラインフルエンザウイルスワクチンと同時に投与することができる。本発明のまた別の観点において、キメラRSVを、PIVのような他の気道病原の感染保護抗体用ベクターとして、用いることが可能である。これは、本発明で記載されているように、それらの感染保護抗体をコードする配列を、感染性組換えRSVを生成するのに使用される遺伝子部位転位RSVゲノム又はアンチゲノムに組み入れることにより達成される。

【0215】

本発明のさらにまた別の観点において、遺伝子部位転位RSVが、気道一過性の遺伝子療法用のベクターとして用いられている。この実施例によると、遺伝子位置を変位したRSVゲノム又はアンチゲノムを、目的の遺伝子生成物をコードすることができる配列を組み込んでいる。この目的の遺伝子生成物は、RSVの発現を制御するプロモータと同一の又は異種のプロモータの制御下にある。

【0216】

組換えRSVゲノム又はアンチゲノムをN、P、L及びM2 (ORF1) タンパク質と同時に発現することにより、また目的の遺伝子生成物をコードする配列を含むことにより、作製された感染性RSVが患者に投与される。これは、完全に感染性である (すなわち、培養細胞を感染させ感染性の子孫を増殖する能力があるということ) 組換えRSVとおそらく関与しており、選択肢として、例えば、G、F及びSH表面糖タンパク質遺伝子の1又は複数が欠損し、安定した又は一過性の発現によりトランス部位でこれらのタンパク質の1又は複数を提供する細胞において増殖する組換えRSVであってよい。そのような事例では、作製された組換えウイルスは、効果的な感染を起こす能力はあるが、感染性の粒子を作製する上では非常に非効率的となる。発現された細胞表面糖タンパク質がないことにより、感染細胞を除去する上で宿主免疫システムの効率が下がる。これらの特徴により、外来遺伝子の発現の耐性及び安全性が上がる。

【0217】

遺伝子療法に関しては、投与は、一般的に、治療を受けている患者の気道へのエアゾル、噴霧、又は他の局所散布による。遺伝子部位位置を変位したRSVは、希望の遺伝子生成物の治療又は予防レベルの発現を結果として起こすに十分な量で投与される。この方法で投

与される代表的な遺伝子生成物の例には、例えば、一過性の発現に特に適しているものをコードする遺伝子生成物がある。その例としては、インターロイキン-2、インターロイキン-4、 γ インターフェロン、GM-CSF、G-CSF、エリスロポエチン、及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、嚢胞性線維性膜貫通調節因子 (CFTR)、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT)、細胞毒、腫瘍抑制遺伝子、アンチセンスRNAs、及びワクチン抗原がある。以下の例は、分かりやすく説明するために提示されており、これに限定するわけではない。

【0218】

実施例 1

G及びF遺伝子が、単独又は組み合わせて、プロモータ隣接した位置に再配列されるている組換えRSVの構成

本実施例は、感染性RSVの遺伝子配列の再配列を記録したものである。この感染性RSVにおいては、G及び／又はF遺伝子により例示される抗原決定基をコードする1又は複数の遺伝子又はゲノム分節が、プロモータへ有意的に隣接する位置に変位される。下記の一例では、G及び／又はF遺伝子が、その野生型遺伝子順位の位置から、組換えRSVゲノム又はアンチゲノムにおける再配列位置1及び2を占めるように、共に変位される。先に記載されているように、この操作は、SH遺伝子が欠失されたRSVアンチゲノムRNA (RSV Δ SH)のクローン作製cDNAで行なわれた (参照例Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999, 引例として本明細書に組み込まれている)。SH遺伝子が欠失された野生RSV型は、完全な野生型RSVと同等又はそれより多少良く *in vitro* で増殖し、マウスの上気道で及びチンパンジーの上気道及び下気道で多少弱毒化される (Bukreyev et al., J. Virol. 71: 8973-8982, 1997, Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999, 引例として本明細書に組み込まれている)。その免疫原性及び感染保護効用は、野生型ウイルスのものと大変近い。このように、RSV Δ SHウイルスは野生型ウイルスに比べて、多少弱毒化されるが、それ以外は類似した特質を有する。このRSV Δ SHウイルスが、これらの研究における親ウイルスである。SH欠損ウイルスのこれらの特徴は、一般のRSV欠失変異の遺伝子的安定性と共にこの背景を、遺伝子配列変位されたRSVを作製するための親組換え体として特に有用なものとし、変異誘導体の回収と操作を促進している。

【0219】

アンチゲノムcDNAが操作され、組換えウイルスが、上記手順及び方法を利用して回収された (更なる参照例Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567, 1995, Bukreyev et al., J. Virol. 70: 6634-6641, 1996, Bukreyev et al., J. Virol. 71: 8973-8982, 1997, Whitehead et al., J. Virol. 72: 4467-4471, 1998, Whitehead et al., Virology 247: 232-239, 1998, Bermingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11259-11264, 1999, Collins et al., Virology 259: 251-255, 1999; Bukreyev et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2367-2372, 1999, Juhasz et al., Vaccine 17: 1416-1424, 1999; Juhasz et al., J. Virol. 73: 5176-5180, 1999; Teng and Collins, J. Virol. 73: 466-473, 1999, Whitehead et al., J. Virol. 73: 9773-9780, 1999, Whitehead et al., J. Virol. 73: 871-877, 1999, Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999, 米国特許出願番号5,993,824、各々引例として本明細書に組み込まれている

10

20

30

40

50

）。

【0220】

このアンチゲノム cDNA を、3つのサブクローンとして操作した。第1のサブクローン D51/△SH が、先導部領域から M 遺伝子の下流末端におけるゲノム、T7 プロモータと左側末端を含む。第2のサブクローン pUC19-GFM2 が、ゲノムの中心部から G、F 及び M2 遺伝子を含む。第3のサブクローン D39 は、L 遺伝子、その後にはゲノムの右側末端からの尾部が続き、さらにその後には自己開裂リボソーム配列及びタンデム T7 転写ターミネーターを含む。

【0221】

変異誘発プライマーによる PCR 法を使って、G 及び F 遺伝子を別個に又は同時に単一の G-F cDNA として含んでいる cDNA の末端を、増幅及び修飾した（図1）。挿入用に G 遺伝子だけの cDNA を作製するために、PCR 法を使って、完全な組換え RSV アンチゲノム配列（GORF を開始する ATG から G 遺伝子終了シグナルの下流末端に及ぶ）のヌクレオチド 4692-5596 を増幅した。PCR 法プライマーを、G 遺伝子終了シグナルの直後に、G-F 遺伝子間（IG）領域の最初の6つのヌクレオチドを付加し、その後に NS1 遺伝子の 10-ヌクレオチド GS シグナルのコピーが続くように設計した（図1）。PCR 法プライマーはまた、BlpI 部位を増幅した cDNA の両方の末端に付加するように設計した。挿入用に F 遺伝子だけの cDNA を作製するために、PCR 法を使って、完全なアンチゲノム配列（FORF を開始する ATG から F 遺伝子終了シグナルの下流末端に及ぶ）のヌクレオチド 5662-7551 を増幅した。PCR 法プライマーは、F 遺伝子終了シグナルの直後に、F-M21G の最初の6ヌクレオチドを付加し、その後に 10ヌクレオチド NS1 遺伝子開始シグナルのコピーが続くように設計した。PCR 法プライマーは、BlpI 部位を cDNA の両方の末端に配置した。

【0222】

挿入用に G 及び F 遺伝子を含む cDNA を作製するために、PCR 法を使って、完全なアンチゲノム配列（GORF の ATG から F 遺伝子終了シグナルの下流末端に及ぶ）のヌクレオチド 4692-7551 を増幅した（図1）。PCR 法プライマーは、F 遺伝子終了シグナルの直後に、F-M21G の最初の6ヌクレオチドを付加し、その後に NS1 遺伝子開始シグナルのコピーが続くように設計した。PCR 法プライマーはまた、BlpI 部位を cDNA の両方の末端に付加するように設計した。全ての cDNA は、全体の配列が決定され構造が確認された。

【0223】

G、F、又は G-F cDNA の挿入用にプロモータ隣接部位を作製するため、NS1 遺伝子上流非コード領域が、アンチゲノム位置 92（G から C、ポジティブセンス）及び 97（A から C）におけるヌクレオチド置換により修飾され、それにより助1部位が作られた（図1）。この操作は、RSV アンチゲノム RNA の最初の 419 のヌクレオチドを含む BstBI-MfeI サブクローンで行なわれた。ヌクレオチド置換は、PCR 法により、完全なプラスミド上で導入された（Byrappa et al.、Genome Research 5: 404-407、1995、引例として本明細書に組み込まれている）。修飾された BstBI-MfeI 断片は、D51/△SH に再挿入され、このサブクローンは同様に、上記のように構成された G、F、及び G-F blpI の cDNA 断片のレシピエントとして機能した。BlpI は、非対称 7 量体識別配列を有するため、断片は正しい配向にのみ挿入することが可能である。

【0224】

G、F、又は G-F cDNA 遺伝子がプロモータ隣接する位置に配列された場合、それに対応する遺伝子はその通常の下流位置から欠失され、その結果各々の組換えゲノムが G 及び F の単一のコピーを組み込んだ（図1）。G 遺伝子のみを欠失するには、PCR 法が pUC19-G-F-M2 で行なわれ、StuI-HpaI 断片（ヌクレオチド 5611-6419、the G-F IG から F 遺伝子の中ほどに及ぶ）が増幅された。さらに、この PCR 法は配列：TTAATTAAAAACATATTATCACAAA（配列 ID

番号：3)を、cDNAの上流末端に付加した。この配列は、PacI部位(先頭8文字)を含み、これはアンチゲノムcDNAではSH遺伝子終了シグナル内に位置している。この切片は、その後、PacI-HpaI断片として、修飾されていないpUC19-GFM2のPacI-HpaIウィンドウに導入することができ、それによってG遺伝子を欠失した。PCR法に暴露したこのcDNA断片の配列を、ジデキシヌクレオチド配列決定により確認した。

【0225】

又は、F遺伝子のみを欠失するには、PCR法がpUC19-GFM2で行なわれ、ヌクレオチド部4618にあるPacI部位からヌクレオチド5596にあるG遺伝子終了シグナルまで及ぶ断片を増幅した。さらにこのPCR法は、配列CACAAATTGCATGC(配列ID番号4)を、cDNAの下流末端に付加した。この配列は、F-M21G配列の上流部分を含み、その後に組換えRSVアンチゲノムのF-M21GにあるSphI部位(後部6文字)が続く。このcDNAをPacI-SpaI断片として、修飾されていないpUC19-GFM2のPacI-SpaIウィンドウにクローンすると、その結果、F遺伝子が欠失された。PCR法に暴露されたcDNA断片の配列を、ジデキシヌクレオチド配列決定により確認した。

【0226】

G及びF遺伝子を双方とも(SphI-BamHI断片)欠失するために、Byrappaの方法によるPCR法(Byrappa et al., Genome Research, 5:404-407(1995))を使って、TTAATTAAAAACACAATT(配列ID番号:5)の配列がcDNAの上流末端に付加されたpUC-GFM2(F-M21GからM2/L重複部分まで及ぶ)のヌクレオチド7559-8506が増幅された。その結果として作製されるcDNA挿入には、PacI部位(先導部8文字)及びSphI部位のすぐ隣にあるF-M21G配列の上流部分が含まれるが、G及びF遺伝子を欠いている。PCR法に暴露されていたcDNA断片の配列は、ジデキシヌクレオチド配列決定により確認された。

完全なアンチゲノムcDNAsは、次いで、上述のように組み立てられる(さらなる参照例Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567, 1995; Bukreyev et al., J. Virol. 70:6634-6641, 1996; Bukreyev et al., J. Virol. 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., J. Virol. 72:4467-4471, 1998; Whitehead et al., Virology 247:232-239, 1998; ermgham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11259-11264, 1999; Collins et al., Virology 259:251-255, 1999; Bukreyev et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2367-2372, 1999; Juhasz et al., Vaccine 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., J. Virol. 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, J. Virol. 73:466-473, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:9773-9780, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:871-877, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:3438-3442, 1999、及び米国特許出願番号5,993,8244、各々引例として本明細書に組み込まれている)。この組み立てにより、Blp/△SH、G1/△SH、F1/△SH、及びG1F2/△SHアンチゲノムcDNAsをコードするcDNAsが生成された。

【0227】

これらのcDNAsは、別々にN、P、M2-1及びLサポートプラスミドと共にHEp-2細胞にトランスフェクションされ、32℃でインキュベートされた(参照例Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1156

10

20

30

40

50

3-11567、1995、Collins et al.、Virology 259: 251-255、1999、米国特許出願番号5,993,824、各々引例として本明細書に組み込まれている)。トランスフェクションされた上澄物が3日後に新鮮な細胞に継代培養にかけられ、3日から7日の間隔で採取して、37℃にてHEp-2細胞の連続的な継代培養にかけた。間隔を短くすることが、F1/△SH及びG1F2/△SHウイルスにより感染された単一層に必要であった。なぜならばこれらの単一層は迅速な胞体形成及びそれに続く細胞破壊を呈したからである。これは、F遺伝子タンパク質における修飾のため、膜融合Fタンパク質の発現が高められることを反映していると解釈される。図2に示すように、それぞれの採取された上澄液の培養液分取を、瞬間冷凍し、後に重複して滴定にかけた。これらの結果により、G1F2/△SH及びF1/△SHウイルスの回収及び増幅は、Blp/△SH又はG1/△SHウイルスのそれを上回ることがわかった。10
同じ知見がまたSH欠損ウイルス及び野生型ウイルスについて確認した。

【0228】

総RNAは組換えウイルスのそれぞれを、感染された細胞から単離し、適切なゲノム分節のRT-PCR法が行なわれた。それにより、作製されたゲノム構造が設計及び構成された通りであることを確認した。加えてノーザンブロット法により、適切なサブゲノムmRNAsの発現を確認した。

【0229】

その後、次のウイルスの増殖反応速度及び*in vitro*にて抗原増殖を比較した、すなわち野生型RSV (SH遺伝子を含むもの)、SH欠損(SH遺伝子が欠失されるがNS1非コード領域にBlpI部位を含まないもの)、Blp/△SH、G1/△SH、及びG1F2/△SHなどである。HEp-2細胞及びベロ細胞の複製単一層培養は、一細胞あたり0.1のプラーク形成ユニット(PFU)のMOIで、1時間(-1から0時間)の吸着期間にて感染した。これらの単一層をその後、3回洗浄し37℃にてインキュベートした。ウイルス当り2の複製単一層を12時間の間隔にて、吸着直後(t=0時間)に採取した。培養液の上澄物を瞬間冷凍し、後に放出された感染性ウイルスを定量化するプラークアッセイ法による分析に備えた(図3A)。これにより、これらのウイルスが、ベロ(図3A、上方パネル)及びHEp-2(図3A、下方パネル)細胞において感染性のウイルスを増殖させるその能力において、同等であることがわかった。20

【0230】

同一の実験において、各々の時刻からベロ細胞単一層(図3A、上方パネル)を採取し、ウェスタンブロット法により分析し、Gタンパク質の発現を特徴付けた(図4)。各々の時刻からの総感染細胞の検体を、性質を変容させるポリアクリルアミドゲルにて電気泳動させ、ニトロセルロースに変位させて、さらにGタンパク質のあるペプチドに特異性を有する抗血清とインキュベートすることにより分析した。結合した抗体を、市販の化学発光キットを用いて、検索し定量した。抗体が、Gタンパク質のこの2の主な細胞関連型(すなわち大型の90kDa完全成熟型及び小型の50kDa不完全グリコシル化型)に結合した。この比較により、感染性の粒子の増殖が、全てのウイルスにて類似しているが(図3A、上方パネル)、細胞関連型Gタンパク質の量は、G1/△SHまたはG1F2/△SHウイルスに感染した細胞においてかなり多いこと(図104)が判明した。露光フィルムのデンスitrometryによるゲルバンドの定量化により、G1/△SH及びG1F2/△SHウイルスが、Blp/△SHウイルスに比べて、それぞれ6倍から4倍多いGタンパク質を発現していたことがわかった。30

【0231】

上記のように、F1/△SH又はG1F2/△SHウイルスにより感染された細胞単一層が、合胞体形成を含む細胞変性効果を急速に開始した。これは、Fタンパク質の発現が高められたことを反映されると解釈された。この高められた細胞変性効果が、このウイルスをワクチンとして用いることに否定しない。というものの、ワクチンウイルスによる*in vivo*での感染が、これらの散在する細胞の細胞変性の開始が、より急速であるか否かにかかわらず、死んで置換される少量の上皮細胞しか含まないためである。しかしながら40

、*in vitro*での細胞病原性の速度が遅ければ、より高いウイルスの力価が達成することができる。これらの因子の解明することが、遺伝子配列変位されたRSVをより高度に弱毒化された背景に構成することにより達成される。この状況において、遺伝子変位はRSVの増殖を妨げなかったが、Gタンパク質の総発現を数倍高めたということは特筆に価する。

【0232】

更なる研究において、遺伝子配列変位ウイルスのHEp-2、及びペロ細胞単一層における複製能力を、感染多重度が3.0に設定された実験と比較した(図3B)。これは、2の個別実験にて行なわれ類似した結果が得られた。

【0233】

これらの実験の1つから提供されるデータを、図3Bに示す。この単一サイクルの増殖アッセイでは、プロモータへ隣接する位置にG及び／又はFを含む3つのウイルスG1/△SH、F1/△SH、及びG1F2/△SHのそれぞれが、対照ウイルスBlp/△SHに比較してより効率的に複製された。さらに、差異は、HEp-2細胞よりペロ細胞において大きかった。例として、HEp-2細胞におけるBlp/△SH対照ウイルスの 6.8×10^6 PFU/mlに比較して、G1/△SHウイルスの力価は感染24h後 7.2×10^6 PFU/mlであり、その差は $0.41 \log_{10}$ であった。それに対して、ペロ細胞におけるそれぞれの価は、G1/△SHウイルスで 6.6×10^6 PFU/ml、Blp/△SH対照ウイルスで 5.6×10^6 PFU/mlであり、その差は $1.01 \log_{10}$ であった。他の遺伝子変位ウイルスの各値はまた、対照ウイルスの力価を越える値を有していた。このように、この例のように、G及び／又はF遺伝子をプロモータ隣接へ変位することより、HEp-2及びペロ細胞におけるウイルス産出量が増加され、その最大産出量は、大規模なウイルス増殖に有用な細胞ラインであるペロ細胞において10倍であった。

【0234】

さらに遺伝子変位組換えウイルスを、BALB/cマウスの上気道及び下気道における複製能力について検査した(表1)。1グループ18匹のマウスのそれぞれを、1匹につき 10^6 PFUのG1/△SH、F1/△SH、G1F2/△SH、又は対照ウイルスBlp/△SHにて感染させた。各々のグループから6匹を、感染後3、4及び5日後に屠殺し、その鼻甲介及び肺が採取し、プラークアッセイ法により分析し、それぞれ上気道及び下気道におけるウイルス力価を測定した。表1に示されるように、Blp/△SH及びF1/△SHウイルスの複製レベルが、ほとんど識別し難い。このように、後者のウイルスは*in vitro*でいくらか効率的に複製したが、*in vivo*での複製は変わらなかった。複製又は毒性力が高まらなかったことにより、遺伝子変位ウイルスの修飾が、弱毒化変異の付加により簡素化された。G1F2/△SHウイルスの複製が、「野生型」Blp/△SH対照ウイルスの複製に比べてかろうじて低く、G1/△SHウイルスの複製もまた、特に感染の初期において低かった。例えば、3日目には、G1/△SHウイルスが、上気道及び下気道の双方において、Blp/△SH対照ウイルスに比べ $0.71 \log_{10}$ 低かった。

【0235】

表1. G及び／又はF遺伝子をプロモータ隣接に含む組換えRSVのマウスの上気道及び下気道における複製

【0236】

【表1】

10

20

30

40

ウイルス ¹	日 3	Nasal Turbinates 平均力価±SE (log ₁₀ PFU/g組織)	日 5	日 3	Lungs 平均力価±SE (log ₁₀ PFU/g組織)	日 4	日 5
B1p/△SH	4.2±0.17	4.0±0.32	3.5±0.2	3.6±0.26	4.1±0.37		4.5±0.09
G1/△SH	3.5±0.24	3.4±0.54	3.5±0.24	2.9±0.2	3.9±0.34		4.6±0.13
F1/△SH	4.4±0.11	4.1±0.1	3.9±0.12	3.9±0.09	4.7±0.08		4.9±0.16
G1F2/△SH	3.3±0.50	3.5±0.13	3.3±0.13	3.1±0.13	4.2±0.28		4.1±0.07

10

20

30

40

【0237】

1. 1群18匹のBALB/Cマウスに、鼻腔内経由で、1匹あたり106PFUの表示されたウイルスが接種された(0日目)。3、4、及び5日目に、1グループにつき6匹のマウスを屠殺し、その鼻の鼻介骨及び肺を採取して、ウイルス力価をプラークアッセイ法により決定した。平均力価を、表示された標準誤差と共に示す。

【0238】

このように、1又は複数の遺伝子をプロモータ隣接する位置に変位又はRSV遺伝子一般

50

を再配列することにより、ウイルスを *in vivo* で複製するために、多少弱毒化することができる。これは、弱毒化の有用な方法のメニューに加えることができるので、弱毒化ワクチン菌株を設計する上での価値がある。さらに、異種のクラス又は型の弱毒化を起こす変異（例：温度感受性点変異、非温度感受性点変異、遺伝子欠失等）を含めることが重要である。様々な型の変異は、様々な様式でウイルスの表現型に影響を及ぼし、単一のワクチンウイルスにおける複数の型の変異が存在することにより、安定性が高まる。遺伝子変位による弱毒化が、この状況においてさらに新しい有用な弱毒化変異のクラスとなる。本発明の遺伝子変位はある程度の弱毒化をもたらすことができるという知見により、ワクチン菌株の弱毒化表現型をきめ細かく調整する有用な新規ツールが提供される。

【0239】

本発明のある種の有用な弱毒化変異は、「条件で左右される」種であり、この種では弱毒化が特定の条件下において（例えば、*in vitro* で）最小で、他の条件下において（例えば、*in vivo* で）は最大である。*in vitro* で最小限又は作用しない弱毒化表現型は、ワクチンウイルスの増殖を効率よくさせるが、これは細胞培養で増殖が悪い RSV 及び他のウイルスの事例において特に重要である。勿論、本明細書に記載されているように、ワクチンウイルスの疾病及び副作用を減らすためには、弱毒化表現型は *in vivo* で作用しなければならない。

【0240】

本明細書に示される G1/ΔSH 組換え体が、遺伝子変位の結果生成される特に望ましい特質の組み合わせを例示している。特に、*in vitro* でのその増殖が実際 10 倍まで増幅され、一方 *in vivo* でのその複製は多少減じられた。これにより、上記のように、ワクチン増殖の効果及び抗原発現が改良するという利点をもたらされた。

【0241】

in vivo での遺伝子配列変位ウイルスの免疫原性を、BALB/c マウスについて研究した。1 グループ 6 匹のマウスを、前記記載されているように、別々のウイルスにより感染させ、血清検体を接種の 1 日前及び、接種の 28 日及び 56 日後に採取した（表 2）。血清検体を、IgG 専用の糖タンパク質特異的酵素免疫測定法（ELISA）により分析した（表 2）。G タンパク質特異性 IgG の分析により、F1/ΔSH 及び G1F2/ΔSH ウイルスに対する反応が、20B1p/ΔSH 対照ウイルスのそれと非常に類似しているということがわかった。それと反対に、G1/ΔSH ウイルスに対する G 特異性の反応が、多少（最高で 4 倍まで）下がった。これは、少なくとも部分的には、表 1 に記載されているように、このウイルスの複製が、下がったことによると考えられる。F 特異性の反応により、F1/ΔSH 及び G1F2/ΔSH ウイルスが、抗原レベルにおいて G1/ΔSH 及び B1p/ΔSH ウイルスと比較して、2.5 から 4 倍の緩和な上昇を呈したということが判明した。この知見は、F 遺伝子をよりプロモータ隣接に変位させることにより、結果として *in vivo* での抗原発現及び免疫原性を増幅するという解釈と一致している。さらに、これらの結果により、遺伝子変位が、免疫化を起こすウイルスの全体の複製が変わらないという条件下において、*in vivo* での免疫原性を増大することができることが判明した。これは、野生型親ウイルスと比較して、特異的により高い免疫原性を有する RSV ワクチンを作成する特定の方法を提供するために非常に望ましい結果である。マウスモデルを使ってウイルスの生物学的特質を同定及び特徴付けることができ、さらに本明細書に示すように新しい望ましい特質を明らかにすることができるということに留意されたい。

【0242】

表 2. プロモータへ隣接する位置に G 及び / 又は F 遺伝子を含む組み換え RSV により感染した後のマウスにて、糖タンパク質特異的酵素免疫測定法（ELISA）、又は血清抗原反応による測定

【0243】

【表 2】

10

20

30

40

血清免疫グロブリンG ELISA 力価 (平均値の逆数 $\log_2 \pm \text{SE}$) against 指定 RSV タンパク質							
ウイルス ¹	群当りの動物の数	前	抗RSV GIgG 日28	日56	前	抗RSV FIgG 日28	日56
B1p/ Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.6 ± 0.6	11.7 ± 0.8	$\leq 5.3 \pm 0$	10.3 ± 0.4	12.0 ± 0.4
G1 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.0 ± 0.6	9.6 ± 0.6	$\leq 5.3 \pm 0$	10.0 ± 0.4	12.0 ± 0.7
F1 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.6 ± 0.9	11.6 ± 0.6	$\leq 5.3 \pm 0$	11.6 ± 0.3	13.6 ± 0.3
G1F2 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.3 ± 0.7	11.6 ± 0.8	$\leq 5.3 \pm 0$	12.3 ± 0.4	14.0 ± 0.4

10

20

30

40

50

【0244】

1. 1群につき6匹のBALB/Cマウスに、接種材料0.1ml (106PFUのウイルス)が鼻腔内接種された(0日目)。

【0245】

2. 表示されるように、血清検体が接種の1日前(接種前)、28日目、及び56日目に採取され、RSVG又はFタンパク質と比較して、IgG抗原専用の糖タンパク質特異的酵素免疫測定法(ELISA)により、分析された。平均力価は、表示された標準誤差

と共に示される。

実施例 I I

GおよびF遺伝子を高度に弱毒化された背景においてプロモータへ隣接した変位位置に組み込んだ組換えRSV

先に記載されている遺伝子の変位された変異体は、SH遺伝子が欠失された遺伝子的背景とする状況下にて導入された。野生型ウイルスにおいて、この欠失が、細胞培養における増殖を多少改良し、*in vivo*において適度な弱毒化を呈する (Bukreyev et al., J. Virol. 71: 8973-8982, 1997, Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999, 引例として本明細書に組み込まれている)。しかしながら、RSVに未罹患の乳児及び幼児に投与するために安全なRSVワクチンウイルスは、△SH欠損のみにより提供される弱毒化より、高い弱毒化が必要である。従って、本実施例は、本発明の遺伝子の変位された変異体が、高度に弱毒化された背景にうまく回収できることを、実証するために提供される。

10

【0246】

本発明のこの観点为例示するために2の背景が選択された。一方では、SH及びNS2遺伝子の双方を欠損している背景、もう一方では、SH、NS1及びNS2遺伝子を欠損している背景である。上記の文献に記載されているように、△NS2及び△NS1の欠失は、それだけで、それぞれ高度に弱毒化を呈する (参照例Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999)。ワクチン増殖条件下において、野生型のウイルスの産生量が、△NS2ウイルスの産生量と同等になるが、*In vitro*では、どちらかの変異を含むウイルスの増殖を、遅延及び減少する。チンパンジーにおいては、△NS2及び△NS1ウイルスが、それぞれ複製及び疾病に対し高度に弱毒化されており、RSVの攻撃に対して高度の免疫原性及び感染保護性を呈する。各々の変異体のみが、組換えワクチンウイルスにおけるそれ自体か他の変異体との組み合わせるかのいずれかを含められる優れた候補である。△NS1及び△NS2変異は共に、△NS2ウイルスに比較して、*in vitro*においてさらに高度に弱毒化されたウイルスを生成する。本実施例においては、これらの欠失を有するさらなる組換え体が構成され、さらに遺伝子配列変位変異をサポートする能力を検査した。

20

【0247】

G及びF遺伝子を、NS2及びSH遺伝子を欠失したアンチゲノムの1位及び2位に変位した (G1F2 △NS2 △SH) (図5、パネルA)、又はNS1、NS2及びSH遺伝子を欠失したアンチゲノムの1位及び2位へ変位した (G1F2 / △NS1 △NS2 △SH) (図5、パネルB)、アンチゲノムcDNAsが構成された。これらのアンチゲノムcDNAsを、上記の実施例1に記載されているように、組換えウイルスを回収するために使用した。双方の事例において、組換えウイルスを、容易に*in vitro*にて回収及び増殖した。このように、本実施例は、G及びF遺伝子がプロモータへ隣接する位置に変位された複数の変異体を含む遺伝子配列を変位したRSVが、容易に作製及び回収されることを例示する。これら及び他の遺伝子配列を変位したRSVが、本発明に記載されている方法により適切なワクチン候補を選択するために、複製及び抗原発現のレベル、さらに*in vivo*にて増殖、免疫原性及び感染保護効果について分析した。

30

40

【0248】

上記の実施例において、弱毒化生ワクチンとしての特性を改良するために、ワクチンRSVの遺伝子配列に典型的な変化が行われた。特に、G及びF遺伝子が、単独で又は共に、プロモータへ隣接する位置に変位した。これらのタンパク質が、通常、RSV遺伝子配列 (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L) において、位置7 (G) 及び8 (F) を占める。回収について好結果の可能性を高めるために、SH遺伝子が欠失されたRSVバージョンにて、遺伝子操作を行った。

【0249】

G及びF遺伝子の双方をその後、個別に位置1へ又は位置1及び2へそれぞれ共に変位させた。意外なことに、G及びF遺伝子が位置1へ変位された組換えRSV、又はG及びF

50

遺伝子が位置 1 及び 2 へそれぞれ共に変位された R S V が、容易に回収された。この結果は、単一の V S V 糖タンパク質遺伝子を 2 位置だけ変位させることにより、ウイルス増殖が著しく妨げられたという V S V に関する以前の研究と大いに異なる。R S V が非効率的に複製し、R S V が複雑な遺伝子配列を持ち、糖タンパク質遺伝子の変位には多くの位置変化が含まれるという理由から、これらの修飾されたウイルスを回収する能力はまた意外であった。実際、再配列された R S V が、少なくとも野生型の遺伝子配列を有するその直接の親と同等に増殖する。上記のように野生型ウイルスの細胞培養での増殖が非効率で、*in vitro* 複製においてさらに効率が低下することによりワクチン処方が実現不可能になるという理由から、これは R S V には特に重要である。

【0250】

10

N S 1-N S 2-N-P-M タンパク質の全てが、増殖の健全性を損なわずに、プロモータを基準として 1 又は 2 位置だけ動かすことができるということは、驚くべきことである。加えて、G 糖タンパク質の発現を調べてみると、その親ウイルスの発現と比較して、数倍高まっていることがわかった。これにより、G 及び／又は F 遺伝子を最初の位置に含むワクチンウイルスが、他のウイルスタンパク質と比較して、これらの感染保護抗原の分子量が多いということを示し、従ってこのワクチンウイルスは大変望ましいワクチン特性を有するウイルスとなる。

【0251】

さらに、遺伝子配列の修飾が、以前の研究により作製された 2 つの高度に弱毒化されたワクチン候補について行なわれた。これらのワクチン候補は、上記のように N S 2 遺伝子を単独にて欠失したもの、及び N S 1 及び N S 2 遺伝子の両方を欠失したものである。これらの 2 つのワクチン候補において、G 及び F 糖タンパク質を共に位置 1 及び 2 へそれぞれ変位させ、G、F 及び S H 糖タンパク質をその元の下流位置から欠失させた。このように、回収されたウイルス G 1 F 2 Δ N S 2 Δ S H 及び G 1 F 2 / Δ N S 1 Δ N S 2 Δ S H が、G 及び F 遺伝子の変位に加えて、2 つ及び 3 つの遺伝子がそれぞれ欠失していた。行なわれた変化の程度を分かりやすく示すために、野生型 R S V の遺伝子配列 (N S 1-N S 2-N-P-M-S H-G-F-M 2-L) と G 1 F 2 / Δ N S 2 Δ S H の遺伝子配列 (G-F-N S 1-N-P-M-M 2-L) 又は Δ N S 1 Δ N S 2 Δ S H の遺伝子配列 (G-F-N-P-M-M 2-L) を比較することができる。これにより、ほとんど又は全ての遺伝子の位置が、プロモータを基準として、変更されることがわかった。しかしながら、これらの高度に弱毒化された誘導体は細胞培養で増殖する能力を保持した。これは、これらの誘導体が候補ワクチンウイルスの開発に明らかな有用性を有することを示している。

20

30

【0252】

実施例 I I I

プロモータへ隣接して変位された位置に H R S V の G 及び F 遺伝子を含むキメラ B R S V / H R S V の構成

本実施例は、H R S V G 及び F 遺伝子が組換えウシ R S V (r B R S V) を背景に置換される感染性 r B R S V / H R S V キメラの構成について説明している。その結果作製されたヒトウシキメラが、H R S V からの 2 の遺伝子 (すなわち、G 及び F)、B R S V からの 8 つの遺伝子 (すなわち、N S 1、N S 2、N、P、M、S H、M 2 及び L) を含む。ヒト G 及び F 遺伝子がウシ R S V 背景 (r B R S V / A 2 と名称が与えられている) に対応する野生型の位置にて置換されるヒトウシ R S V 構成を説明する、より詳細な情報を以下に提示する。すなわち、B u c h o l z e t a l. により 2000 年 6 月 23 日提出された米国特許出願番号 09 / 602, 212、2001 年 1 月 18 日に W O O 1 / 04335 として公開されるその対応特許協力条約出願、及びその 1999 年 7 月 9 日に提出された優先権仮出願による米国出願識別番号 60 / 143, 132 ; 各々引例として本明細書に組み込まれている。

40

【0253】

r B R S V / A 2 の基本的置換糖タンパク質構成に加えて、本実施例では H R S V G 及び

50

F 遺伝子が、B R S V ゲノムの F 及び G 遺伝子の野生型遺伝子配列に比して、r B R S V 骨格におけるよりプロモータ隣接に変位された。より具体的には、F 及び G 遺伝子を、プロモータを基準としてその通常の位置から、すなわち、7 位及び 8 位からそれぞれ 1 位及び 2 位へ変位させた。この目的を達成するために、ユニークな M o t I、S a l I 及び X h o I 部位を 6 7、4、6 7 3 及び 7、4 7 1 位においてそれぞれ作製するためにヌクレオチド置換を行い、完全な感染性 r B R S V を構成した（図 6、パネル A）（更なる参照例 B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 3：2 5 1－2 5 9、1 9 9 9、B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 4：1 1 8 7－1 1 9 9、2 0 0 0、引例として本明細書に組み込まれている）。N o t I 部位が、B R S V の N S 1 遺伝子の上流非翻訳領域に含まれており、S a l I 及び X h o I 部位が、遺伝子間領域にある。S a l I 及び X h o I 部位を有する r B R S V アンチゲノム c D N A の消化により、B R S V の G 及び F 遺伝子を完全に切除して、結合された適合性のある相補末端が作製された（図 6、パネル B）。この結果、G 及び F 遺伝子を欠損し、以下の配列を有する 6 4 ヌクレオチド S H－M 2 遺伝子間領域を含む r B R S V アンチゲノム c D N A を作製した。

T T A A A C T T A A A A A T G G T T T A T G t c g a G G A A T A A A A T C G A T
T A A C A A C C A A T C A T T C A A A A A G A T（配列 I D 番号：6）（本来の開裂した S a l I 及び X h o I 部位のテトラヌクレオチド相補末端を小文字にて表示）。比較のため、自然状態で発生する B R S V の F－M 2 遺伝子間配列は、5 5 ヌクレオチドの長さである。

10

20

30

40

50

【0 2 5 4】

H R S V の G 及び F 遺伝子を含む c D N A は、c D N A 末端を修飾するために使用される変異プライマーを用いて、P C R 法により作成される。具体的には、P C R 法を使って、完全な H R S V アンチゲノム c D N A（G O R F の A T G から F 遺伝子終了シグナルの末端まで及ぶ）のヌクレオチド 4 6 9 2－7 5 5 1 が増幅され、プライマーが、F 遺伝子終了シグナルの直後に、F－M 2 1 G の最初の 6 ヌクレオチドを付加し、その後に N S 1 遺伝子開始シグナルのコピーが続くように設計した。この P C R プライマーはまた、B l p I 部位及び M o r I 部位を、c D N A の両末端に付加するように設計した。p C R 法に暴露された c D N A 断片を、ジデキシヌクレオチド配列決定により確認した。この c D N A は、その後、N o t I 断片として、上記のように G 及び F 遺伝子を欠損する r B R S V アンチゲノム c D N A のユニークな N o t I 部位に挿入された。正しい組換え体が制限断片マッピングにより同定され、r B R S V／A 2－G l F 2 と名称が与えられた。コードされたゲノム R N A の構造は、図 6 パネル C に示される。図にあるように、この c D N A では、G 及び F 遺伝子が、プロモータを基準として 7 位及び 8 位から、位置 1 及び 2 へ変位される。

【0 2 5 5】

r B R S V／A 2－G l F 2 のアンチゲノム R N A をコードするプラスミドは、N、P、M 2－1 及び L サポートタンパク質をコードするプラスミドと共に、B S R T 7／5 細胞に、トランスフェクションされた。その結果、上記のように T 7 RNA ポリメラーゼを安定して発現し（更なる参照例 B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 3：2 5 1－2 5 9、1 9 9 9、B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 4：1 1 8 7－1 1 9 9、2 0 0 0、各々引例として本明細書に組み込まれている）、感染性のウイルスを回収した。回収された r B R S V A 2－G l F 2 ウイルスを、ヒト H E p－2 細胞及びウシ M D B K 細胞における多サイクル増殖の効率について、r B R S V、r H R S V（r A 2 と呼ばれている）及び r B R S V／A 2 と比較した。上記のように（さらなる参照例 B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 4：1 1 8 7－1 1 9 9、2 0 0 0、引例として本明細書に組み込まれている）、r H R S V は H E p－2 細胞において r B R S V に比べてより効率的に増殖し、r B R S V／A 2 ウイルスが、各々親の増殖効率における中間の効率にて増殖する。図 7 に示されるように、r B R S V／A 2－G l F 2 の複製効率が、r B R S V／A 2 の効率と区別できなかった。このように期待に反して、G 及び F 遺伝子の位置における変更により、i n v i t r o での増殖効率

は下がらなかった。この新しい結果により、R S Vワクチンウイルスの効率的な増殖が可能となった。

【0256】

免疫蛍光法が、wt H R S V又はキメラウイルスであるr B R S V/A 2またはr B R S V/A 2-G 1 F 2により感染されたH E p-2細胞について行なわれた。これは、H R S V G又はFタンパク質に特異性を有するモノクローナル抗体（それぞれ0 2 1/0 1 G及び4 4 F）を用いて行なわれた（L o p e z e t a l.、J. V i r o l. 7 2: 6 9 2 2-6 9 2 8、1 9 9 8、e l e r o e t a l.、J. G e n. V i r o l. 7 8: 2 4 1 1-2 4 1 8、1 9 9 7、各々引例として本明細書に組み込まれている）。染色が、それぞれのモノクローナル抗体について別個に行なわれた。このアッセイが、半定量的測定でしかないが、先にこのアッセイによりwt r B R S Vとr B R S V/A 2が確実に区別できるということが確認される（後者はr B R S V骨格における通常のゲノム位置にH R S VのG及びF遺伝子を有する）。特に、wt H R S Vは非常に強力に広範な免疫蛍光パターンを与え、それに対してr B R S V/A 2は弱く拡散した広範囲でないパターンを与える（B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 4: 1 1 8 7-1 1 9 9、2 0 0 0、引例として本明細書に組み込まれている）。r B R S V/A 2-G 1 F 2について行なわれた同等のアッセイによると（図8）、このプロモータへ変位したキメラの免疫蛍光パターンが、wt H R S Vと非常に類似していることがわかった。この結果は、G及びF糖タンパク質の発現の増大と一致している。同時に、r B R S V/A 2-G 1 F 2の細胞の変性効果が、wt H R S Vに比べて下がっており、r B R S V/A 2のそれに大

変類似していた（B u c h h o l z e t a l.、J. V i r o l. 7 4: 1 1 8 7-1 1 9 9、2 0 0 0、引例として本明細書に組み込まれている）。具体的には、r B R S V/A 2及びr B R S V/A 2-G 1 F 2が、胞体の数及びサイズの減少を誘発した。このように、本実施例は、r B R S V/A 2ヒトウシキメラR S Vウイルスの修飾を記録している。この修飾ウイルスには、H R S Vの主要な感染保護抗原に対する遺伝子、すなわち、G及びFタンパク質が、霊長類の気道で複製されるために強力に弱毒化されるB R S Vの背景に含んでいる。r B R S V/A 2ウイルスが、強力な宿主範囲制限の表現型を有し、そのためこのウイルスは霊長類において強く弱毒化される。本遺伝子配列変位r B R S V/A 2-G 1 F 2ウイルスが、その遺伝子的背景においてB R S V遺伝子と同一の型を有しているため、この強力な宿主範囲制限の表現型を共有している可能性があり、それによりこの2つの主な感染保護抗原の発現が高まる。これら2つの主要な感染保護抗原のi n v i v oにおける発現が高まれば、さらにこのウイルスの免疫原性も高まると予測される。このように、本実施例は、r B R S V/A 2ウイルスを、H R S V遺伝子をプロモータ隣接する位置に変位させることによって修飾及び改良した。この規模の位置変位、すなわち、プロモータに対して野生型の位置7及び8から新しい位置1及び2へ変位されたことが、これまでに記載されなかった。

【0257】

実施例1 V

H R S Vから誘導されるエンベロープ関連M、G及びFタンパク質を伴うキメラB R S V/H R S Vの構成

本実施例は、ヒトウシキメラ背景内にて作製されるさらにまた別の遺伝子配列が変位されたR S Vを例示している。この遺伝子配列が変位されたR S Vでは、上記のように、r B R S V/A 2キメラ（H R S V G及びF感染保護抗原遺伝子をB R S V宿主範囲弱毒化背景において有する）に似たアンチゲノムキメラウイルスの修飾を含む。B R S V及びH R S Vは双方とも、4つのエンベロープ関連のタンパク質、すなわち主な保護抗原であるG及びF糖タンパク質、中和されるように見られない未知の機能の小型疎水性S Hタンパク質又はH R Vに対する保護抗原（W h i t e h e a d e t a l.、J. V i r o l. 7 3: 3 4 3 8-3 4 4 2、1 9 9 9、C o n n o r s e t a l.、J. V i r o l. 6 5: 1 6 3 4-1 6 3 7、1 9 9 1、各々引例として本明細書に組み込まれている）、及び感染保護抗原ではないがビリオンを組み立てる際重要であるグリコシル化されてい

ない内部基質 (M) タンパク質 (Teng and Collins, J. Virol. 72: 5707-16, 1998, 引例として本明細書に組み込まれている) を有している。

【0258】

この実施例では、このキメラウイルスが、4つのエンベロープ関連のタンパク質、すなわち BRSVM、SH、G 及び F を全て欠失した、そして 3 つ HRSV のエンベロープ関連タンパク質遺伝子、すなわち、M、G 及び F を、それらの位置に挿入した、BRSV/HRSV キメラウイルスを構成した。これにより、F 及び G 糖タンパク質遺伝子が、プロモータへ隣接する位置に、SH 遺伝子の長さに対応する一遺伝子の距離だけ変位させることができる。

10

【0259】

上記の rBRSV/A2 構成 (さらなる参照例 Buchholz et al., J. Virol. 74: 1187-1199, 2000, 引例として本明細書に組み込まれている) には、P と M 遺伝子の間の領域に、ユニークな MluI 部位を位置 3204 に含むように修飾した (図 9、パネル A; P-MIG)。これは、5 ヌクレオチド置換の導入を含むものであった。ヌクレオチド配列位置番号は、完全な rBRSV アンチゲノムに対応している (Buchholz et al., J. Virol. 73: 251-259, 1999, Buchholz et al., J. Virol. 74: 1187-1199, 2000, GenBank accession number AF092942 or completer HRSV antigenome in Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567, 1995, 各々引例として本明細書に組み込まれている)、HRSV 配列を表わす配列位置番号には、下線が引かれている。MluI-SalI 断片が、切除され、M 遺伝子を有する MluI-SalI 断片と置き換えられた。

20

【0260】

図 9、パネル B では、HRSVM 遺伝子を含んだ cDNA を、PCR 法により cDNA の両末端に変化を導入したプライマーを用いて、増幅及び修飾した。具体的には、McDNA を修飾し、その結果その上流末端に MluI 部位を含み、その後順に、P-M 遺伝子間領域の最後のヌクレオチド (これは、HRSV 及び BRSV において同じ)、完全な HRSVM 遺伝子、BRSV の SH-G 遺伝子間領域における最初の 4 つのヌクレオチド、さらに SalI 部位が続いた。この cDNA の全配列が正しいことを確認した。この配列では、MluI と SalI とが共に消化され、rBRSV アンチゲノムの MluI-SalI ウィンドウにクローンされた。この結果 rBRSV/A2-MGF を作製した。図 9、パネル C に示されるように、このキメラを、6 つの BRSV 遺伝子、すなわち、NS1、NS2、N、P、M2 及び L、及び 3 つのエンベロープ関連タンパク質遺伝子、すなわち、M、G 及び F を含んでいた。

30

【0261】

このアンチゲノムプラスミドが、上に詳しく記載されているように、N、P、M2-1 及び L サポートタンパク質をコードするプラスミドと共に BSR T7/5 細胞に、トランスフェクションされ、それにより、T7/RNA ポリメラーゼを安定して発現し (Buchholz et al., J. Virol. 73: 251-259, 1999, Buchholz et al., J. Virol. 74: 1187-1199, 2000, 各々引例として本明細書に組み込まれている)、さらに感染性のウイルスが回収された。このように、本実施例は、G 及び F 遺伝子のプロモータへ隣接して変位することにより生ずる遺伝子欠失を含む遺伝子配列を変位した RSV が、容易に作製及び回収されることができるとを例示している。この及び他の遺伝子配列を変位した RSV が、本発明に記載されている方法に従って適切なワクチンを選択するために、複製及び抗原の発現、さらに in vivo での増殖、免疫原性及び感染保護効力について分析される。

40

【0262】

実施例 V

50

B R S V 骨格内に置換された H R S V の非構造的及び／又はエンベロープ関連タンパク質を含む追加的 B R S V／H R S V キメラウイルスの構成及び回収 B R S V

H R S V 骨格に置換された H R S V の非構造的な N S 1 及び N S 2 及び／又はエンベロープ関連の M、S H、G 及び／又は F 遺伝子を含む、付加的な B R S V／H R S V キメラウイルスが構成された。これらのキメラウイルスのほとんどが、H R S V からの G 及び F 遺伝子を含んでいるが、これは、これらが主な保護抗原をコードするものであり、効果的な H R S V ワクチンにとって重要であることから、所望の特質である。

【0263】

典型的なウイルス内で、B R S V の N S 1 及び N S 2 遺伝子を、それに対応する H R S V 遺伝子に置換した。N S 1 及び N S 2 が、近年 1 型インターフェロン媒介抗ウイルス形状の拮抗体であることが判明しており (Schlender, et al., J. Virol. 74: 8234-42, 2000、引例として本明細書に組み込まれている)、これらの遺伝子の置換を行うことにより、増殖特質及びワクチンウイルスの毒性力を修飾する道がもたらされた。これは、インターフェロン拮抗体が、宿主特異性である傾向があるという、一般的知見による (Young, et al., Virology, 269: 383-90, 2000; Didcock, et al., J. Virol., 73: 3125-33, 1999、Didcock, et al., J. Virol., 73: 9928-33, 1999、各々引例として本明細書に組み込まれている)。このように、B R S V 特異性を有する N S 1 及び N S 2 遺伝子をワクチンウイルスに含めることが、ウシ細胞においてその増殖を改良することになるが、霊長類の細胞における及びヒトワクチンにおける増殖に関して、弱毒化を起こす変異になる。

【0264】

逆に、H R S V 特異性を有する N S 1 及び N S 2 遺伝子が、ヒト細胞におけるワクチンウイルスの増殖を改良する道を提供する。これにより、ワクチンウイルスの増殖特質及び反応誘発性を操作する新しい方法が提供される。また別のウイルスでは、H R S V 特異性を有する細胞膜関連遺伝子、すなわち、M、S H、G 及び F の完全な型が、B R S V 骨格に配置された。

【0265】

このウイルス粒子のあらゆるタンパク質が、遺伝子発現時、ゲノム複製時、及びビリオン増殖時に、あらゆる形で相互に作用すると考えられているから、多様な組換え体を作製する能力により、ワクチン候補に関する豊富な情報資源が提供される。

【0266】

最後に、さらに別の典型的なウイルスパネルには、遺伝子配列を変化させずに置換された遺伝子の例、置換されたウイルスの遺伝子配列が修飾されていた他の例、さらに B R S V 骨格に関して他の例では配列を変化させたことに反して、置換された遺伝子は、配列を変化させなかった例が含まれていた。このように、このパネルにより c D N A からのウイルスを、多様なキメラウイルスを作製するために、さらに修飾された望ましい生物学的特質を有する増殖可能なウイルスを回収するために、操作する能力を測る厳しい検査が提供された。

【0267】

r B R S V 骨格の N S 1 及び N S 2 遺伝子を、取り除き、H R S V の N S 1 及び N S 2 遺伝子及び置換された B R S V／H R S V キメラウイルスが、構成され、r B R S V／A 2-N S 1+2 と呼ばれるウイルスを作製した (図 10、上から 2 つ目の構成図)。この構成の骨格が、ユニークな N o t 1、K p n 1、S a l 1 及び X h o 1 部位 (図 10、最上の構成に図解される) を含むように修飾された r B R S V アンチゲノム c D N A であった (先に詳しく記載されている) (Buchholz, et al., J. Virol., 73: 251-9, 1999、Buchholz, et al., J. Virol., 74: 1187-1199, 2000、各々引例として本明細書に組み込まれている)。H R S V の N S 1 及び N S 2 コード配列を、P C R 法により、完全な H R S V アンチゲノム配列の 75 から 1036 に及び、H R S V の N S 1 O R F、N S 1／N S 2 遺伝子間結

10

20

30

40

50

合、及びNS2 ORFを含む単一断片として増幅させた。この断片の上流末端はまた、NotI部位をHRSV配列の直前に付加しており、さらにBlnI部位をHRSV位置91にあるNS1 ORFの非翻訳配列上流に付加している。PCR cDNAの下流末端には、KpnI部位が含まれており、その直前にHRSV配列があった。

【0268】

このPCR生成物をクローンして、その配列が確認された。それが、NotI-KpnI断片として対応するrBRSV骨格のウィンドウに挿入された。

【0269】

RBRSVにおける以下4つの遺伝子NS1、NS2、G及びFを、そのHRSV対応遺伝子に置換し、さらに別のBRSV/HRSVキメラウイルスを作製した。このウイルスは、rBRSV/A2-NS1+2GFと名称が与えられている（図10、上から3つ目の構成）。この構成が、rBRSV/A2-NS1+2及び先に説明されたrBRSV/A2からの断片を組み合わせることにより作製され（参照：図7及び8；米国特許出願番号09/602,212、Buchholz, et al., *J. Virol.* 74:1187-1199、2000、各々引例として本明細書に組み込まれている）、本明細書においては任意にrBRSV/A2-GFと称す。具体的には、双方の構成がともに、先端部領域のプラスミド配列上流にXmaI部位、及び図10に図解されるKpnI部位を有する。

10

【0270】

rBRSV/A2-NS1+2のXmaI-KpnI断片を、rBRSV/A2-GFプラスミドの対応するウィンドウに変位した。rBRSVの次の4遺伝子M、SH、G及びFを、そのHRSV対応遺伝子に置換し、また別のBRSV/HRSVキメラウイルスを作製した。このウイルスは、rBRSV/A2-MSHGFと名称が与えられている（図10、上から4つ目の構成）。これには、P-M遺伝子間領域にMluI部位を加えたrBRSV骨格が含まれていた（図9参照）。このように、図9に示されるように、挿入HRSV配列が、その上流及び下流境界として、MluI及びXhoI位置を有していた。MluI及びXhoI部位に囲まれているHRSVのM-SH-G-F配列を有するこのHRSV挿入が、PCR法により作製され、その結果として作製される生成物がクローンされ、その配列が確認された。MluI-XhoI断片を、その後、rBRSV骨格の対応ウィンドウにクローンした。

20

30

【0271】

G及びF遺伝子とそのHRSV対応遺伝子と置き換えられ、それらの置換対応遺伝子がrBRSV骨格にある第3位及び第4位に配列されたまた別のBRSV/HRSVキメラウイルスが作製された。このウイルスは、rBRSV/A2-G3F4と名称が与えられた（図10、上から5つ目の構成）。この構成には、PCR法が使用され、HRSVG及びFORFsを増幅した。このPCRプライマーは、上流末端Gに次の特徴を付加するように設計した：KpnI部位101個、BRSV遺伝子末端シグナル（5'-AGTTATT T T A A A A A）及び3nt遺伝子間配列（CAT）、この後にHRSVG及びF遺伝子が続いた。この増幅された断片の下流末端が、HRSVのF遺伝子の下流非翻訳領域、HRSVアンチゲノム位置7420で終了し、この後に付加されたKpnI部位が続いた。PCR産生物をクローン化し、その配列を確認した。HRSVG及びF配列を有するKpnI断片を、その後、rBRSV cDNA（図6、パネルBに示されるように、G及びF遺伝子を欠損する）のKpnI部位にクローン化した。正しい配向の挿入を含む組換え体を、制限分析により同定した。

40

【0272】

次の遺伝子（NS1、NS2、G及びF）を、rBRSV骨格におけるプロモータ隣接のG及びF遺伝子にて置換し、そして別のBRSV/HRSVキメラウイルスを作製した。この構成は、Hex、又はrBRSV/A2-G1F2NS3NS4と名称が与えられている（図10、最下の構成）。このキメラが、rBRSV/A2-NS1+2を修飾して、BRSVG及びF遺伝子をそのHRSV対応遺伝子により、第1及び第2の位置で置換

50

して作製された。これは、*r B R S V* / *A 2* - *G 1 F 2* の構成についての上記の説明と同じで方法ある（実施例 *I I I*、図 6、パネル B）。具体的には、上記のように、*B R S V G* 及び *F* 遺伝子を、*r B R S V* / *A 2* - *N S 1* + 2 アンチゲノム *c D N A* から *S a l I* 及び *X h o I* 部位の消化により切除した（実施例 *I I I*）。

【0273】

次いで、上記のように（実施例 *I I I*、図 6、パネル B）*H R S V G* 及び *F* 遺伝子を含む *N o t I* 断片を、*r B R S V* / *A 2* - *N S 1* + 2 アンチゲノム *c D N A* の *N S 1* 非コード領域にある *H R S V* 配列の直前に位置する単数の *N o t I* 部位にクローンした。正しい配向の挿入を含む組換え体が、制限分析により同定された。

【0274】

上記に一覧に示されるウイルスが、それぞれ容易に *c D N A* から回収され、現在まで設計したウイルスにて回収不能であったものはない。新しい *r B R S V* / *A 2* - *G 3 F 4* 及び *H E x* ウイルスを、以前の研究で検査して *r B R S V* / *A 2* - *G F* 及び *r B R S V* / *A 2* - *G F* ウイルスと、*i n v i t r o* における増殖の効率性について、比較された（先記のように、先の実施例では最後のウイルスを *r B R S V* / *A 2* と称したが、ここでは新しい構成と明確に比較できるように改名した）。ペロ細胞の単一層培養物を、感染多重度 0.1 にて感染させ 37℃ にてインキュベートした。培養液分取を図 11 に示される時刻において採取し、ウイルス毒性力を、プラークアッセイにより測定した。これらの条件下で、*B R S V* が *H R S V* に比べて、やや低い効率で複製し、霊長類の細胞におけるその宿主範囲制限特質を反映していた。図 11 の最上パネルに示されるように、*r B R S V* / *A 2* - *G 3 F 4* が、他のキメラウイルス及び *r B R S V* に比較して、*i n v i t r o* での増殖における改良傾向を呈した。実際、その増殖効率が、組換え *H R S V* (*r A 2*) に類似していた。このように、*r B R S V* ウイルスの増殖が、*B R S V G* 及び *F* 遺伝子を *H R S V* 対応遺伝子で置換することにより改良され（*r B R S V* / *A 2* - *G F* にあるように）、また、*H R S V* 遺伝子をプロモータへ隣接して配列することによりさらに改良され（*r B R S V* / *A 2* - *G 1 F 2* にあるように）、また *H R S V G* 及び *F* 遺伝子を位置 3 及び 4 に配置することにより、さらに再改良された（*r B R S V* / *A 2* - *G 3 F 4* にあるように）。これらの結果により、ウイルス遺伝子のからの順位を操作することにより、どのようにして体系的に本発明の特質を調整できるかを示している。

【0275】

H E x ウイルスを、同様にして評価した（図 11、最下のパネル）。このウイルスの増殖が *r B R S V* 及び *r A 2* の増殖の中間であることから、これらの 4 つの遺伝子の置換が *i n v i t r o* での複製の健全性を保持し、実際はその *r B R S V* 親の複製を凌いだことがわかった。ペロ細胞が 1 型インターフェロンに対する構造的遺伝子を欠損しているため、インターフェロン特異性の効果が評価できないということに留意されたい。これに反して、ペロ細胞が、大規模なワクチン増殖のための有用な基質であり、これらの細胞における効率の良い増殖が、ワクチンウイルスのために重要な特徴である。

【0276】

r B R S V / *H R S V* キメラウイルスのパネルが、*H E p - 2* 及び *M D B K* 細胞におけるプラークサイズによる増殖効率についてさらに評価した。これらの細胞は、前者がヒトからであり、後者がウシからである（図 12、それぞれ、最上及び最下のパネル）。この比較にはまた、先に述べた実施例にて説明されたキメラウイルス、すなわち、*r B R S V* / *A 2* - *G F*（先には、*r B R S V* / *A 2* と呼ばれた）、*r B R S V* / *A 2* - *M G F*、及び *r B R S V* - *G 1 F 2* をも含む。*H E p - 2* 細胞において、*r H R S V* は *r B R S V* に比べてより大型のプラークを生成したが、これは宿主範囲の制限と一致する（図 12、最上パネル）。まずこの論議において、*N S 1* 及び *N S 2* 遺伝子が、*B R S V* からのままであるウイルスを考慮する。このグループでは、*r B R S V* / *A 2* - *G 3 F 4*、*r B R S V* / *A 2* - *G 1 F 2* 及び *r B R S V* / *A 2* - *G F* ウイルスが、*H R S V* と *B R S V* の中間サイズのプラークを形成し、プラークサイズが、上記の順位にて減少した。これは、増殖反応速度データと完全に一致し、*H R S V G* 及び *F* 遺伝子を *r B R S V* 骨格に導入すること

により、H E p - 2 細胞におけるその増殖を改良し、これらの遺伝子の位置を修飾することによって、さらなる改良が得られるということを確認した。r B R S V / A 2 - M G F 及び r B R S V / A 2 - M S H G F ウイルスが、r B R S V のプラークより小型のプラークを形成した。この実施例により、これらのウイルスが回収及び操作可能であることがわかるが、それらの増殖特質の完全な特徴付けを決定するためには、さらに i n v i t r o 及び i n v i v o において特徴付けが必要である。

【0277】

N S 1 及び N S 2 遺伝子が H R S V からであるこれらのウイルスの H E p - 2 細胞における増殖をまた検査した。具体的には、N S 1 及び N S 2 遺伝子のから資源以外は同一であるウイルスの対が比較された。それぞれの対に H R S V の N S 1 及び N S 2 遺伝子を有するウイルスが、それぞれ対、すなわち r B R S V 対 r B R S V / A 2 - N S 1 + 2 ; r B R S V / A 2 - G F 対 r B R S V / A 2 - N S 1 + 2 G F ; r B R S V / A 2 - G I F 2 対 H e x である順序にして、これらの対が順次列挙される。各々の事例において、H R S V からの N S 1 及び N S 2 遺伝子があることにより、プラークサイズが大型化し、これにより宿主範囲制限の調整が示された。このことから、N S 1 及び N S 2 遺伝子からの資源が、H R S V ワクチンの増殖特質を予期的に調整する方法としてどのように選択されるかを示している。この例では、2つの遺伝子が対として操作されたが、本明細書に記載されている知識に従って、単独で操作されることも当然可能である。

【0278】

M D B K ウシ細胞におけるこれらのウイルスの特徴が、図 1 2、最下のパネルに示される。これらの細胞における宿主範囲制限特質が、上記の H E p - 2 細胞における比較と比べて逆になっており、B R S V が H R S V に比べてより大型のプラークを形成した。r B R S V 骨格に H R S V G 及び F 遺伝子があることにより、増殖に大きな影響はもたらされなかったが、H R S V からの N S 1 と N S 2 遺伝子の存在により、ウイルスは弱毒化された。その理由は、これらの H R S V からのインターフェロン拮抗体のウシ細胞における作用の効率が低い可能性がある。ウシの細胞及びウシの宿主が、これらの候補 H R S V ワクチンの重要なターゲットではないため、M D B K 細胞に関するこれらの知見は主として、これらのタンパク質の機能及び増殖に対する影響について、より明確に理解するためのものである。

【0279】

要約すれば、上記の例は、広範囲の望ましい増殖特質を呈する組換え H R S V ワクチン候補のパネルが、どのようにして容易に作製され得るかを示している。本発明の方法によるワクチン候補の最適化を導く水準点が、選択された候補の臨床評価により提供される。以前の研究によると、r B R S V 及びその r B R S V / A 2 - G F 誘導体は、後者のウイルスが r B R S V の改良種であるにもかかわらず、チンパンジーにおいて過剰に弱毒化された (B u c h h o l z , e t a l . , J . V i r o l . 7 4 : 1 1 8 7 - 1 1 9 9 , 2 0 0 0、引例として本明細書に組み込まれている)。このように、本発明で得られた増殖に関して優良種と交配することによって得られたさらなる改良種が、R S V ワクチン組換え体の最適化を目指す実質的進歩を表わすものである。

【0280】

実施例 V 1

H R S V 又は B R S V からの N S 1 及び N S 2 タンパク質を伴う B R S V 骨格に N および / または P 遺伝子を置換することを含む付加的 B R S V / H R S V キメラウイルスの構成及び回収

ヒトパラインフルエンザ 3 型ウイルス (H P I V 3) が、霊長類において宿主範囲制限を呈するウシの対応ウイルス (B P I V 3) を持ち、従って、H P I V 3 / B P I V 3 キメラウイルスに基づく弱毒化された H P I V 3 ワクチンを開発する基盤を提供している。

1 つの有望なキメラは、N O R F がその B P I V 3 対応物と置換される H P I V 3 骨格から成る。驚くべきことに、このキメラウイルスが、細胞培養にて効率的に複製し、霊長類において弱毒化表現型を呈する (B a i l l y , e t a l . , J . V i r o l . 7 4

10

20

30

40

50

：3188-95、2000、引例として本明細書に組み込まれている）。

【0281】

本実施例では、個々のBRSV遺伝子が、そのHRSV対応遺伝子と置換可能であるか否かを判断するために研究が行なわれている。具体的には、N遺伝子及びP遺伝子を個別に置換した（図13A）。これら2つの遺伝子が同時に置換可能であるか否かを判断するために、さらに研究が行なわれた。最後に、遺伝子置換がまたHRSVのNS1及びNS2遺伝子を含む骨格でも行うことが可能であるか否かを判断するために、さらに研究が行なわれた（図13B）。

【0282】

これらの置換は、BRSVのG及びF遺伝子を有するrBRSV骨格で行なわれたことに留意されたい。最適なHRSVワクチンを作成するには、本書で上述してきた指導的内容に従って、これらの遺伝子をそのHRSV対応遺伝子と置換し、自然状態での遺伝子順位の位置又は他の位置に挿入する。本発明には、そのような置換が容易に作製でき、実際にほとんどの場合において増殖特質を改良させることが可能であることが記載されている。

【0283】

BRSVのNコード配列がHRSVのそれと置換されたBRSV/HRSVキメラが、構成された。このキメラは、rBRSV/A2-Nと名称が与えられている（図13A）。この構成のために、N ORF最後の3コドン内に位置する、nt2305-2310にあるrBRSVのN遺伝子に、AatII部位が作製された。この置換は、アミノ酸レベルでは、サイレントであった。同一部位を、HRSVアンチゲノムcDNAのHRSVのN ORFに作製した。さらに、このHRSVアンチゲノムcDNAを、NS2の下流非翻訳領域のアンチゲノムnt1037-1042がKpnI部位に変更されるように、修飾した。KpnI-AatII HRSV断片を、N ORFのほとんどを変位させながらrBRSVのその対応ウィンドウにクローンした。BRSVとHRSVのN ORFの最終コドンが、同一のアミノ酸コード割当を有しているため、残りのBRSVのN ORFの数少ないntが、完全なHRSVのNタンパク質をコードするために影響している。

【0284】

BRSV P遺伝子がそのHRSV対応遺伝子と置換されたBRSV/HRSVキメラが、構成された。このキメラは、rBRSV/A2-Pと名称が与えられている（図13A）。これには、上記のAatII部位、さらに先に説明されたMluI部位を用いた（図9参照）。このHRSV断片を、rBRSVのその対応ウィンドウ変位させることにより、完全なP遺伝子を変位させた。上記のように、この断片に変位された少数のN ORF ntが、BRSV及びHRSVにおいて、同一のコード配分を有する。

【0285】

上記のHRSVのN及びP配列をrBRSVに変位したBRSV/HRSVキメラが構成され、rBRSV/A2-NPが作製された（図13A）。このキメラには、上記のKpnI及びMluI部位を用いた。

【0286】

同一の変位が、HRSVのNS1及びNS2遺伝子を含むrBRSV骨格（すなわち、上記の例で記載されているrBRSV/A2-NS1+2骨格）に導入された。この変位により、結果として、rBRSV/A2-NS1+2N、rBRSV/A2-NS1+2P、及びrBRSV/A2-NS1+2NPが作製された（図13B）。上記の組換えウイルスを、それぞれcDNAから容易に回収した。rBRSV/A2-Pウイルスを、MDBK細胞において野生型rBRSVと同等に複製したがrBRSV/A2-Nの複製は約10倍低く、さらにrBRSV/A2-NPウイルスの複製が、これら2つのウイルスの中間であった。このように、あらゆる増殖特質が得られた。

【0287】

上記の方法に従って、これらのウイルスが、HRSV G及びF遺伝子を有するように修飾することができる。加えて、同等の遺伝子置換をrHRSV骨格に導入することができ

る。すなわち、H R S VのN及び／又はP遺伝子を、そのB R S V対応遺伝子と置換することができる。N S 1及びN S 2遺伝子の置換の状況でこれらの置換を行う能力は、最適レベルの*in vitro*ワクチンの生成、及びワクチン接種を受ける患者における弱毒化と免疫原性を得ることに對しさらに柔軟性をもたらされる。

【0288】

上記の例に示されるように、遺伝子位置を、変位したR S Vにて変位される遺伝子を選択し、その結果、R S V構造／機能に関して利用できる知識に基づいて、機能的にまた構造的に相互作用し易いようにできる。これらの遺伝子位置を変位したR S V内での変更及び他の修飾は、相互作用するタンパク質（例えば、N、Pヌクレオキャプシドタンパク質、M、SH、F及びGエンベロープタンパク質、及びM2-1、M2-2及びLポリメラーゼ組成物）はゲノムにおいて並列されるという事実により、さらに簡素化される。このように、本発明によるさらなる候補ワクチン菌株が、例えば、2又はそれ以上の並列された遺伝子を組み込むことにより得られる。このような並列遺伝子の例には、N及びPから選択された遺伝子、M、SH、F及びGエンベロープ遺伝子の2又はそれ以上、又はM2-1、M2-2及びL遺伝子の2又はそれ以上あり、これらを共に異種性の挿入又は置換の単位として、レシピエント又は背景のゲノム又はアンチゲノムに組み込むことができる。

10

【0289】

例えば、M及びSH遺伝子を共に、r B R S V／A2において、そのH R S V対応遺伝子と置換することができる。これにより、ウイルスのエンベロープタンパク質（G、F、SH及びM）が全てH R S Vからで、内部タンパク質がB R S Vからであるウイルスが作製される。この工程の後に、必要に応じて、また別のB R S V遺伝子を、そのヒト対応遺伝子（例えば、NとPの対、N S 1とN S 2の対、及びM2-1、M2-2とLのグループ）と置換してもよい。各々の遺伝子の対を並列させることにより、置換が簡素化される。また同時に、個々のB R S V遺伝子をH R S Vの挿入し、H R S VのG及びF遺伝子抗原決定基をそのまま残すという逆のアプローチを取ることによっても、本発明の望ましいワクチンを作成することができる。例えば、ヒトR S VのN、P、M2-1及びM遺伝子の1又はそれ以上は、個別にそのウシ対応遺伝子と置換することができる。回収された組換えウイルスを、その後本発明で例示されるように、弱毒化表現型にて、細胞培養、げっ歯類、及び非ヒト霊長類において評価した。このように本発明は、あらゆる対象における治療及び予防を目的とした弱毒化及び感染保護の望ましいレベルを有するヒトウシキメラR S Vワクチンウイルス候補の同定法を提供している。

20

30

【0290】

実施例 V I I

一部遺伝子を欠失したR S Vワクチンウイルスの*in vitro*での改良された複製
上記の説明によると、R S Vの*in vitro*における複製の効率が、ゲノムのヌクレオチド長における変化の影響を受け易いということがわかっている。ヌクレオチド長の増幅に関しては、組換えR S Vの増殖表現型を調整するある型の修飾に、外来遺伝子をコードする付加的な遺伝子の挿入が含むことができる。例えば、細菌性クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、蛍光ルシフェラーゼ、マウスインターフェロンガンマ（IFN γ ）、マウスインターロイキン2（IL-2）、及びマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）のコードする配列が、これまで個別にG-F遺伝子間領域に挿入されてきた。これらの挿入の各々に、*in vitro*でのウイルス増殖の効率を下げる効果が見られた。一事例においては、約0.76 kbのCAT転写カセットを、G-F遺伝子間領域に挿入することにより、*in vitro*でのウイルス増殖が20分の一に下がった。リンフォカインが、マウスからにてヒトからのHEp-2細胞にて活性を有するとは予測されていなかった。また、同等のサイズのあらゆる挿入に、*in vitro*でのR S V増殖の効率を下げる同等の規模の効果が見られた。これらの研究で報告される抑制効果が、あらゆるコードされた外来タンパク質の発現に原因があるためはなく、配列を付加すること自体に原因がある可能性がある。

40

【0291】

50

1. 75 kb のルシフェラーゼカセットをこの同一の遺伝子間領域に挿入することにより、ウイルス複製に遥に強い抑制効果が得られた（50 分の一を越える減少）。これは、挿入が大きいほど、強い抑制効果が得られることを示唆している。一方では、この効果はまたゲノム内の挿入位置に依る可能性もあるという根拠もあった。例えば、0.8 kb の転写カセットを NS1 遺伝子の非コード領域に挿入し、プロモータ隣接に配列すると、ウイルス増殖への抑制効果は非常に微弱であった（Hallak, et al., J. Virol. 74:10508-13, 2000、引例として本明細書に組み込まれている）。観察された効果が、ヌクレオチド長の増加に依るのか、選択肢として別の mRNA コードユニットの付加に依るのか、選択肢としてその双方に依るのかは、依然として定かではない。

10

【0292】

他の例においては、組換え RSV の nt 長の増幅が、単一の遺伝子間領域で行われた。現在までに分析された自然状態で発生する RSV 遺伝子間領域は、1 から 56 nt の長さである。SH 遺伝子を欠損する組換えウイルスでは、M-SH 遺伝子間領域が最大限で 160 nt 増幅され、増殖への抑制効果は微弱であった。

【0293】

さらにまた別の例では、RSV ゲノムが減じられ、ウイルス表現型に望ましい効果をもたらしている。優れた実施例では、NS1、NS2、SH、G 及び M2-2 の組みから 1 つまたはそれ以上の遺伝子が、単独で又はある種の組み合わせで、ウイルスの感染性を奪うことなく、欠失された。欠失により、結果としてそれぞれの欠失されたタンパク質の発現が喪失され、さらに殆どの場合において、in vitro 及び in vivo でのウイルス増殖の効率が低下している。唯一の例外は、SH 欠損ウイルスの増殖が in vitro で低下せず、ある細胞ラインにおいて微弱ながら向上したということである。RSV 菌株 A2 と B1 の間に作製されたキメラウイルスの構成に関するまた別の例においては、G と F 遺伝子間の遺伝子間領域が 52 nt から 5 nt まで、短縮された（参照例 Whitehead, et al., J. Virol. 73:9773-80, 1999、引例として本明細書に組み込まれている）。

20

【0294】

多くの先行文献が、遺伝子又は遺伝子間配列の欠失を含む組換え RSV の作製について論じている（Birmingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96:11259-64, 1999、Bukreyev, et al., J. Virol., 71:8973-82, 1997、Jin, et al., Virology, 273:210-8, 2000、Jin, et al., J. Virol. 74:74-82, 2000、Teng and Collins, J. Virol. 73:466-473, 1999、Teng, et al., Journal of Virology, 2000、Whitehead, et al., J. Virol. 73:3438-42, 1999、各々引例として本明細書に組み込まれている）。しかし、各々の事例において、欠失がオープンリーディングフレーム又は他の重要なゲノム特徴の修飾を伴っているため、ウイルス表現型に対するヌクレオチド欠失の効果が不確かなものとなった。

40

【0295】

本実施例では、SH 遺伝子の下流非コード領域から配列を除去することにより RSV ゲノム長を減じることの効果が例示されている。この典型的な部分的な遺伝子欠失（図 14 に略図で示される）が、XmaI 部位を G-F 遺伝子間領域に含むアンチゲノム cDNA のバージョンを使って構成されたが、その変化自体がコードされたウイルスの影響を及ぼすと予測されていなかった。

【0296】

SH ORF の末端から SH 遺伝子終了シグナルまで及ぶ 141-bp XhoI-PacI ウィンドウが、次の 2 のヌクレオチドから形成された合成 DNA と置換された。すなわち、TcGAGTtAA tAC tTg aTAAAGTAGTTAA T（配列 ID 番号：7

50

）及びT A A C T A C T T T A t c A a G T a T T a A c（配列ID番号：8）（x h o I及びP a c I制限部位の部分は太字で、SHオープンリーディングフレーム及び終止コードのヌクレオチドは下線で、またサイレントヌクレオチド変化は小文字で、表示される）。R S V／6 1 2 0と名称が与えられたコードされたウイルスには、SH O R Fの最後の3コドン及び終止コードにサイレントヌクレオチド置換があり、さらにSH下流非翻訳領域から1 1 2のヌクレオチドが欠失されるが（組換えアンチゲノム内の位置4 4 9 9－4 6 1 0）、遺伝子終了シグナルはそのまま残った（B u k r e y e v、et al.、J. V i r o l. 7 0：6 6 3 4－4 1、1 9 9 6、引例として本明細書に組み込まれている）（図1 4）。これらの点変異及び1 1 2－nt欠失により、いかなるウイルスタンパク質のコードされたアミノ酸も修飾されず、いかなる既知のウイルスRNAシグナルも修飾されず、さらにコードされたm R N A sの数も修飾されなかった。

【0 2 9 7】

SH遺伝子の末端における非コード変更が行なわれたのは、この領域が細菌での増殖段階における不安定さに影響されやすいからである。実際、これらの変更は、結果として、細菌での安定性を著しく向上させた。この特質は、アンチゲノムプラスミドの操作及び増殖に重要である。このように、R S V／6 1 2 0は、コードされたタンパク質、RNAシグナル、又はコードされたm R N A s内の変更が引き起こす二次的及び三次的な効果を混同せずに、ゲノム配列を欠失する効果を調べる機会を提供している。SH O R Fの最終いくつかのコドンに作製された5つの点変異が、コードウイルスの生物学的特質に影響を及ぼさないとすると予測される。これは、マーカーとして組換えR S V及びヒトとウシのパラインフルエンザウイルス3型などのあらゆる遺伝子（生物学的な特質の著しい変化に関連していないもの）に導入された点変異の研究により証拠付けられている（C o l l i n s、et al.、Adv. Virus Res.、5 4：4 2 3－5 1、1 9 9 9、S c h m i d t、et al.、J. V i r o l. 7 4：8 9 2 2－9、2 0 0 0、S c h m i d t、et al.、J. V i r o l. 7 5：4 5 9 4－6 0 3、2 0 0 1、S k l a d o p o u l o s、et al.、J. V i r o l. 7 2：1 7 6 2－8、1 9 9 8、S k l a d o p o u l o s、et al.、J. V i r o l. 7 3：1 3 7 4－8 1、1 9 9 9、W h i t e h e a d、et al.、J. V i r o l. 7 2：4 4 6 7－4 4 7 1、1 9 9 8、W h i t e h e a d、et al.、J. V i r o l. 7 3：8 7 1－7、1 9 9 9、各々引例として本明細書に組み込まれている）。

【0 2 9 8】

6 1 2 0ウイルスを、多段階の増殖の効率について、別個の感染事例3 1 0組において、その全長の対応ウイルスであるD 5 3と比較分析した（図1 5 A、1 5 B及び1 5 C）。図に示されるように、6 1 2 0ウイルスのピーク力価は、増殖において、D 5 3ウイルスのそれに比べて、1. 5から2倍の率で高かった。このように、SH遺伝子に加えられた修飾、特に1 1 2－ntヌクレオチドの欠失（ゲノム長の0. 7%にあたる）が、結果として、in v i t r oでの増殖効率に実質的な向上をもたらした。In v i t y oでの増殖効率における向上が、いかなるものであっても、R S Vワクチン作製には有利である。これは、R S Vの特徴である比較的弱い増殖が、ワクチン開発にとって重要な問題であり、ワクチン作成上の困難となることが予測されるからである。

【0 2 9 9】

本発明で記載されている特定の定義された修飾が、組換えワクチンウイルスの増殖及び他の表現型特徴を最適化するために、多様な状況に応用することができる一般的なツールとなる。本発明の知見に基づいて、R S Vの1 5. 2 k bのゲノムが、部分的な遺伝子欠失又は他のヌクレオチド欠失による修飾のためのターゲット部位の多くの組み合わせ材料を提供している。一般的に、この点に関して選択される変化には、1 1個のウイルスO R F s及びその翻訳開始部位が含まれない（参照例K o z a k、Gene、2 3 4：1 8 7－2 0 8、1 9 9 9、引例として本明細書に組み込まれている）。ウイルスO R F sはゲノムの9 0%以上を占めるから、部分的欠失修飾のためのターゲット部位の一般的な選択は、残りの部分、つまり非翻訳領域（非コード領域とも呼ばれる）にて行なわれる。加えて

、この点に関するヌクレオチド欠失のためのターゲット部位が、通常、シス作用性複製及び翻訳シグナルを除外する。除外される部位には、それぞれの遺伝子を囲む10-nt遺伝子開始及び12-から13-nt遺伝子終了シグナル（参照例：Collins、et al.、Fields Virology、2：1313-1352、1996、引例として本明細書に組み込まれている）、さらにゲノムの3'末端にある1個の11-ntコアプロモータ、及びゲノムの5'末端にあるアンチゲノムプロモータの相補体がある。

【0300】

本実施例は、予想に反して、RSVの*in vitro*における増殖効率が、非翻訳配列（例えば、ウイルスORFsを囲む配列、又は遺伝子の間にある配列、又は遺伝子に続く配列、又は3'及び5'遺伝子外領域にある配列）を変位させることにより、実質的に高められることができることを例示している。この実施例は、配列の欠失が小規模でも、ウイルス増殖を改良し得ることを例示している。*In vivo*での増殖効率の改良は、大規模なワクチン開発及び病態的な症状生産を促進することから、これは非常に望ましい結果である。

10

【0301】

微生物の寄託に関する情報

以下に示す細胞及び細菌が、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110-2209に、ブタペスト条約に基づいて寄託されて、以下のように登録される。

20

【0302】

【表3】

<u>プラスミド</u>	<u>アクセス番号</u>	<u>寄託日</u>
cpts RSV 248	ATCC VR 2450	March 22, 1994
cpts RSV 248/404	ATCC VR 2454	March 22, 1994
cpts RSV 248/955	ATCC VR 2453	March 22, 1994
cpts RSV 530	ATCC VR 2452	March 22, 1994
cpts RSV 530/1009	ATCC VR 2451	March 22, 1994
cpts RSV 530/1030	ATCC VR 2455	March 22, 1994
RSV B-1 cp52/2B5	ATCC VR 2542	September 26, 1996
RSV B-1 cp-23	ATCC VR 2579	July 15, 1997
p3/7(131)	ATCC 97990	April 18, 1997
p3/7(131)2G	ATCC 97989	April 18, 1997
p218(131)	ATCC 97991	April 18, 1997

30

【0303】

理解を明確にするために、前記の本発明を、例示をもって詳細に記載してきたが、ある種の変化及び変更が、限定されない図示する方法により提示される添付の請求項の範囲内で実施できることが、当業者に対して明らかになる。この状況において、あらゆる出版物、及び他の文献が、説明を省くため上記開示の範囲内にて引用される。これらの各文献が、あらゆる目的のためにその内容を引用として本明細書に組み込まれている。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 G遺伝子、又はF遺伝子、又はGとF遺伝子双方の、RSVゲノム内のプロモータ隣接部位への変位を示している。略図の上部には、RSVゲノムから指定されたBlp/△SHを示し、そのSH遺伝子が、先に記載されたように欠失されており（Whiteh

50

ead et al.、J. Virol. 73:3438-3442、1999、本明細書に引例として組み入れられている）、そしてBlpI制限酵素部位がプロモータ隣接NS1遺伝子上流の非コード領域に付加されていた。M遺伝子の遺伝子終了（GE）シグナルに星印を付け、先に記載の（Whitehead et al.、J. Virol. 73:3438-3442、1999、引例として本明細書に組み入れられる）天然に生成するSHGEシグナルに同定するようにSH遺伝子の欠失中に組み込まれている単一ヌクレオチドの変化を含むことを示している。略図における下方の2の囲み部分は、ゲノムBlp/△SHの詳細な構成、及びゲノムGl/△SH、F1/△SH及びGlF2/△SHを生成するために、△SH/Blpゲノムのプロモータ隣接末端に（左側の囲み）、及びM-G-F-M2領域に（右側の囲み）作成された修飾を示している。全ての操作は、RSVアンチゲノムRNAのクローンcDNA（Collins et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567、1995、Collins et al.、Virology 259:251-255、1999、and Whitehead et al.、J. Virol. 73:3438-3442、1999、引例として本明細書に組み入れ）を用いて行われ、そしてスクレオリドの位置が、野生型組換えRSV（SH遺伝子を含んでいる）（Collins et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567、1995、の完全なアンチゲノム配列に従ってコードが付される（SH遺伝子を含んでいる）（Collins et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567、1995、Murphy et al.、United States 特許番号第5,993,824号、それぞれ引例として本明細書に組み入れられる）；それぞれ文献として本明細書に挿入される）の完全なアンチゲノム配列に従って数値付けされている。なお「上流」及び「下流」とは、それぞれ、プロモータへ隣接、及びプロモータへ遠位な方向を示していることに留意されたい（前記プロモータが、ネガティブセンス・ゲノムRNAの3'先導部であり、図1記載の左側末端部である）。

ゲノムBlp/△SH：RSVの上記SH欠失変異体（Whitehead et al.、J. Virol. 73:3438-3442、1999、引例として本明細書に組み入れられる）のヌクレオチド92及び97にて、G及びAを（左側囲み部分の略図の上部において小文字により指示される）それぞれを、C及びC（太線の大文字）に変えることにより、NS1オープンリーディングフレーム（ORF）のATG翻訳開始コドン（斜体、太字）の前のBlpI部位（下線付き）の1個のヌクレオチドを作製している。Blp/△SHゲノムのM-G-F領域（右の囲み部分）が、SHの欠失を示している（通常SH遺伝子がM遺伝子とG遺伝子の間にある）。

ゲノムGl/△SH：このゲノムは、プロモータ隣接し、BlpI部位に挿入されたG遺伝子を含む（左の囲み部分）。このGのcDNA挿入体が、以下のように構成され、すなわち、完全なGのORF及び下流のG非コード配列及びGEシグナル（ヌクレオチド4692から5596まで）を、後に6一ヌクレオチドIG配列がこれらに続くように設計され（天然にて生成するG-FIG配列の最初の6ヌクレオチド、CATATT（配列ID番号1）を表わしている）、続いてNS1遺伝子のGSシグナルにおけり10ヌクレオチドのコピー（ボックス状に囲まれている）となるよう遺伝子操作される。このクローン化された配列が、BlpI部位にて側面に配置され、ゲノムBlp/△SHのBlpI部位にクローンされた。この操作により、GのORFを、RSVのGS及びGEシグナルの制御下で、プロモータへ隣接した位置に配置した。同一のゲノムにおいて、G遺伝子が、M遺伝子とF遺伝子間の下流の位置から欠失され（欠失点は、大きな矢印により示される）、そしてMとF遺伝子が、G-FIG配列によりのみ分離された。

ゲノムF1/△SH：このゲノムは、プロモータ隣接位置に、BlpI部位に挿入されるF遺伝子を含む。このFのcDNA挿入体は、以下のように構成される、すなわち、完全なFのORF及び下流の非コード配列及びGEシグナル（ヌクレオチド5662から7551まで）を、6一ヌクレオチドのIG配列（天然に形成するF-M2の1G配列の最初の6ヌクレオチド、CACAAAT（配列ID番号第2）を表わしている）、それに続きN

s l 遺伝子の 10 ヌクレオチドの G S シグナルとなるように、遺伝子操作をする。このクローン化された配列を、B l p I 部位にて側面に配列されて、ゲノム B l p / Δ S H の B l p I 部位にクローン化された。この操作により、R S V の G S 及び G E シグナルの制御下で、プロモータ隣接位置に F の O R F を配置した。同一のゲノムにおいて、F 遺伝子を、G 遺伝子と M 2 遺伝子間の下流部位から欠失して（欠失点は、大きな矢印により示される）、そしてこれら 2 の遺伝子が、F - M 2 の 1 G 配列によってのみ分離された。

ゲノム G l F 2 / Δ S H : このゲノムが、B l p I 部位に 1 本鎖 c D N A として挿入される第 1 及び第 2 のプロモータ隣接位置にそれぞれ G 及び F 遺伝子を含んでいる。この G - F の c D N A の挿入には、完全な G の O R F 、その下流の非コード及び G E シグナル、G - F I G 配列、完全な F 遺伝子、F - M 2 の 1 G 配列の 6 ヌクレオチド (C A C A A T) (配列 I D 番号第 2 号)、及び N S 1 の G S シグナル（上流から下流へ向かう順位で）を含むように構成される。この c D N A は、B l p I 部位の側面に配列されて、ゲノム B l p / Δ S H の B l p I 部位にクローン化された。この操作により、プロモータへ対してそれぞれ位置 1 及び 2 へ、G 及び F 遺伝子を配置した。同一ゲノムにおいて、G 及び F 遺伝子を、M 遺伝子と M 2 遺伝子間の下流の位置から欠失され（欠失点は、大きな矢印により示される）、そして M 及び M 2 遺伝子が、F - M 2 の 1 G 配列によってのみ分離された。

【図 2】

図 2 は、トランスフェクト中の感染性組換えイウルの生成、及び *i n v i t r o* における初期継代を示している。H E p - 2 細胞を、記載のような (M u l p h y e t a l . , U n i t e d S t a t e s P a t e n t 5 , 9 9 3 , 8 2 4) 、指示される個々のアンチゲノムプラスミド及び N 、 P 、 L 及び M 2 - 1 のサポートプラスミドによりトランスフェクトした。培地の上澄物を 3 日後に採取して、3 日から 7 日の間隔にて採取される培地の上澄物により、H E p - 2 細胞において連続した非希釈継代にかけた。採取毎に試料を取り、瞬時冷凍しその後プラークアッセイ法により並行して分析した。これらのウイルスとしては、それぞれの c D N A s と同じく明示した、すなわち B l p / Δ S H 及び G 1 / Δ S H 等が提供された。データは、B l p / Δ S H 、 G 1 / Δ S H 、 F 1 / Δ S H 及び G l F 2 / Δ S H として示される。トランスフェクトは、32 °C であり、その後の継代培養を 37 °C であった。

【図 3 A】

図 3 A は、0 . 1 の感染の入力多重度 (M O I) で感染後の、組換え w t R S V (S H 遺伝子を含む) 、及び Δ S H (B l p I 部位を含まない) 、 B l p / Δ S H 、 G 1 / Δ S H 及び G l F 2 / Δ S H 変異ウイルスの *i n v i t r o* における複製を示す。ペロ細胞 (上方パネル) 又は H E p - 2 細胞 (最下パネル) の複製培養体を、感染させそして 37 °C にてインキュベートした。指示時刻にて、二重化した単一層を各ウイルスとして採集し、そして培地の上澄物を瞬間冷凍した。その後これらを、プラークアッセイ法により並行して分析した。

【図 3 B】

図 3 B は、3 . 0 のインプット感染多重度 (M O I) にて、H e p - 2 (最上) 及びペロ細胞 (最下) 細胞単一層の感染後の、B l p / S H 、 G 1 / S H 、 F 1 / S H 及び G l F 2 / S H ウイルスの単一工程の増殖を示している。複製細胞の単一層を感染し、37 °C にてインキュベートして、そして指示された時刻にて、二重化モノレイヤーを採集し、そして培地の上澄物を瞬間冷凍した。

【図 4】

図 4 は、ペロ細胞の B l p / Δ S H 、 G 1 / Δ S H 及び G l F 2 / Δ S H ウイルスにより G タンパク質発現のウェスタンブロット分析法を示す。図 3 A の上面パネルにおける各時点からの細胞を採集し、そして総タンパク質をゲル電気泳動法及びウェスタンブロット分析法により分析した。プロットが、G タンパク質のペプチドに特異的なウサギ抗血清により、インキュベートすることにより作成した。次に結合した抗体を、化学的蛍光により可視化した。G タンパク質を、二つの形状、すなわち 90 k D a の成熟形状及び 50 k D a の不完全グリコシル化した形状として変位する。

10

20

30

40

50

【図 5】

図 5 は、G 及び F 遺伝子が部位 1 及び 2 に変位される弱毒化された R S V s の構造を示す。パネル A : S H 及び N S 2 遺伝子が、記載のように (Teng and Collins, J. Virol. 73: 466-473, 1999, Whitehead et al., J. Virol. 73: 3438-3442, 1999、例として本明細書に組み込まれている) 欠失され、そして G 及び F 遺伝子を、図 1 の上記のように、位置 1 及び 2 にそれぞれ変位した組換え R S V の G 1 F 2 / Δ N S 2 Δ S H の構造。パネル B : S H、N S 1 及び N S 2 遺伝子が欠失され、そして G 及び F 遺伝子が、位置 1 及び 2 にそれぞれ変位した組換え R S V の G 1 F 2 / Δ N S 1 Δ N S 2 Δ S H の構造。

【図 6】

図 6 は、B R S V G 及び F 遺伝子が欠失され、H R S V の G 及び F 遺伝子がプロモータ隣接に配置されたキメラ r B R S V / H R S V ゲノムの構成を詳細に示す。B R S V 遺伝子を暗色にて、H R S V 遺伝子を明色にて示している。ヌクレオチド配列の位置数は、完全な r B R S V アンチゲノムに対応しており (Buchholz et al., J. Virol. 73: 251-259, 1999; Buchholz et al., J. Virol. 74: 1187-1199, 2000; GenBank accession number AF092942 or complete H R S V antigenome in Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-11567, 1995; 各引例として本明細書に組み込まれている)、H R S V を指している配列位置数には、下線が引かれている。図 6 のパネル A は、r B R S V の構成には、前の操作にて付加された M o t I, S a l I 及び X h o I 部位を含む r B R S V 構成の詳細である (Buchholz et al., J. Virol. 73: 251-259, 1999, Buchholz et al., J. Virol. 74: 1187-1199, 2000)。図 6 のパネル B は、r B R S V / A 2 - G 1 F 2 を生成するために r B R S V に対する修飾を示している。B R S V の G 及び F 遺伝子が、S a l I 及び X h o I による消化により欠失され、そして得られた適合可能な付着末端を再結合する。G 及び F 遺伝子を含むヌクレオチド 4692 から 7557 までの H R S V のゲノムの領域を、c D N A の各末端に組み込まれているように、所望の変化を含むプライマーを用いて P C R によって増幅した。増幅された P C R 産物には、以下を (上流から下流の順位にて)、すなわち N o t I 部位、B l p I 部位、完全な H R S V の G O R F、その下流の非コード及び G E シグナル、H R S V の G - F I G 配列、完全な H R S V の F 遺伝子、H R S V の F - M 21 G 配列からの 6 ヌクレオチド (C A C A A T)、N S 1 の G S シグナル、B l p I 部位、及び N o t I 部位が含まれた。この c D N A を、r B R S V の位置 67 にて、固有の N o t I 部位にクロー化された。図 6 のパネル C は、r B R S V / A 2 - G 1 F 2 のゲノム R N A の構造を示している。

【図 7】

図 7 は、H E p - 2 ヒト (左側パネル) 及び M D B K ウシ (右側パネル) 細胞の r B R S V、r H R S V (r A 2)、r B R S V / A 2、及び r B R S V / A 2 - G 1 F 2 の多段サイクルによる増殖を表わしている。複製細胞の単一層を、0.1 の感染多重度 (M O I) により示されるウイルスを用いて感染させ、37℃にてインキュベートし、そして培地の滴量を指示時間にて採取し、瞬時冷凍して-70℃にて保存し、その後二重に滴定した。各々の値は、二つのウェルにおける平均力価の値である。

【図 8】

図 8 は、r B R S V / A 2 - G 1 F 2、r B R S V / A 2、又は r A 2 により感染された H E p - 2 細胞の間接的免疫蛍光法を示している。細胞を、0.1 の M O I にて感染し、37℃にて96時間インキュベートし、アセトンにより固定し、H R S V の G タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体 021 / 1 G、又は H R S V の F タンパク質に特異的なモノクローナル抗体 44 F により透過及び反応した。抗体の結合を、マウス I g G に特異的なタグ付き抗体による反応によって可視化した。

【図 9】

10

20

30

40

50

図9は、HRSVのM、G及びF遺伝子を含むキメラrBRSV/HRSV構成を詳細に示す。BRSV遺伝子を暗色にて、HRSV遺伝子を明色にて示す。HRSV遺伝子を指す配列の位置数に、下線が引いてある。図9のパネルAは、ユニークMZ μ 1部位を、PとM遺伝子間の遺伝子間領域（P-MIG）内にて、位置3204にて固有のMluI部位を含むためのrBRSV/A2の修飾を示している。IGの配列が、元のヌクレオチドに当てられた位置を指示するため、小文字にて示される。下線付きの文字は、5ヌクレオチド置換により生成されるMluI部位を表わしている。ヌクレオチド配列の位置数は、完全なrBRSVアンチゲノムに対応しており（Buchholz et al.、J. Virol. 73:251-259、1999；Buchholz et al.、J. Virol. 74:1187-1199、2000；GenBank accession number AF092942 or complete rHRSV antigenome in Collins et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567、1995）；HRSV配列を表わす配列位置数には、下線が引かれている。図9のパネルBは、rBRSV/A2-MGFを生成するためのrBRSV/A2の修飾を示している。BRSVのM及びSH遺伝子を含むMluI-SalI断片が切除され、そしてHRSVのM遺伝子を含むMluI-SalI断片により置換された。HRSVのM遺伝子を含むMluI-SalI断片が、ボックス状囲み内に示される。さらに、BRSVのP遺伝子末端配列を含むMluI部位のすぐ上流の配列、及びM及びG遺伝子間の遺伝子間配列（M-GIG）、HRSVのG遺伝子開始シグナル、及びGのORFを開始するATG（太字、斜体字）を含むSalI部位のすぐ下流の配列を示している。図9のパネルCは、rBRSV/A2-MGFのゲノムの構造を示している。

【図10】

図10は、特異的なBRSV遺伝子（暗色の長方形）を、そのHRSV相当体（明色の長方形）と置換した、組換えBRSV（rBRSV、最上）及び5 BRSV/HRSVキメラウイルスのゲノムの構造を示している。加えて、最下パネルにおいて、2のウイルスのG及びF遺伝子を、その通常の位置から、3と4又は1と2に変位する。rBRSVの概要図では、幾つかの制限部位が指示される。種々の構造に用いられる制限部位が示される、すなわち、KpnI部位が自然に形成され、他の部位では必要に応じて導入された（Buchholz, et al.、J. Virol. 73:251-9、1999；Buchholz, et al.、J. Virol. 74:1187-1199、2000、各々引例として本明細書に組み込まれている）。

【図11】

図11は、rHRSV（rA2）及びrBRSVの親ウイルス及び前に記載されたキメラウイルスrBRSV/A2-GF（以前はrBRSV/A2と呼ばれていた；Buchholz, 2000, supra）及びrBRSV/A2-G1F2と比較して、BRSV/HRSVキメラウイルスrBRSV/A2-G3F4（最上パネル）及びHex（最下パネル）の多サイクルによる増殖を表している。ベロ細胞の培養による単一層を、0.1のインプット感染多重度において感染させ、37℃にてインキュベートした。培地上部にある試料を指示時刻にて採取し、ウイルスの力価が限界希釈法により決定した。ウェル当り連続10倍のウイルス希釈液0.1mlに、104BHK-21細胞を0.1ml容量に加えた。48時間後、細胞を80%のアセトンにて固定し、BRSVのMタンパク質に対して特異的があり、HRSVのMタンパク質と交差反応性の抗体を用いる間接免疫蛍光法により分析され、感染された細胞の病巣を計数した（see, Buchholz et al.、J. Virol. 73:251-9、1999、を参照（引例として本明細書に組み込まれている））。

【図12】

図12は、ヒトHEp-2細胞（最上パネル）対ウシMDBK細胞（最下）にて、指示ウイルスにより形成されるプラーク又は病巣のサイズを比較して、HRSV（HEp-2細胞）又はBRSV（MDBK細胞）と比較される百分率として表わしている。

【図 1 3】

図 1 3 A 及び図 1 3 B は、N 及び／又は P 遺伝子が、それらの H R S V 相当体にて置換される組換え B R S V のゲノムの構造を示している。図 1 3 A は、これらの置換が r B R S V 骨格で行なわれたキメラを示しており、図 1 3 B は、その骨格が r B R S V / A 2 - N S 1 + 2 ウイルスであるキメラを示している。

【図 1 4】

図 1 4 は、ネガティブセンス RNA として、3' から 5' 側に描かれた S H 遺伝子における欠失を含む組換え r R S V / 6 1 2 0 ウイルスのゲノム RNA の概要図であり、コードされた各 m R N A が長方形にて示される、そして m R N A の非コードする遺伝子外及び遺伝子間領域が水平な線として示される。親 R S V アンチゲノム c D N A は、上記のように (Collins, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 11563-11567, 1995), G-F 遺伝子間領域の X m a I 部位にさらなる修飾を有するている (Bukreyev, et al., J. Virol. 70 : 6634-6641, 1996, 引例として本明細書に組み込まれている)。この c D N A を、(i) 翻訳停止コドンを含む S H の O R F 最後 4 つのコドン内に、5 つの翻訳としてサイレントなヌクレオチド置換基を含み、そして (ii) S H 遺伝子 (囲み) の下流の非翻訳領域から完全なアンチゲノム配列の 1 1 2 ヌクレオチド (位置 4 4 9 9 から 4 6 1 0 まで) を欠失するために、修飾した。この構成において用いられる X h o I 及び P a c I 部位は、斜字で示され、ラベルが付けられ、S H 遺伝子-終了シグナルに下線が引かれて、S H のコドンが、トリプレットとして示され、ヌクレオチド置換は小文字で示され、欠失される配列を、配列を示すボックスにより表される。

10

20

【図 1 5】

図 1 5 A - 1 5 B は、組換え r R S V 親 D 5 3 のその全長と比較した、S H 遺伝子の欠失を含め r R S V / 6 1 2 0 の増殖反応速度を示している。H E p - 2 細胞の 3 組の単一層培養物 (Fig. 1 5 A, Fig. 1 5 B 及び Fig 1 5 C) をの感染は、指定のウイルスを用いて 0.005 のインプット感染多重度にて、指示ウイルスにより感染させた。吸着期間の後、細胞を 37℃にてインキュベートした。12 時間の間隔にて、その培地を完全に採集して、滴量を後の滴定のために瞬時冷凍した。前記細胞を 3 回洗浄し、そして新鮮な培地を加えて、続けてインキュベートした。実験の最後に、試料をプラークアッセイ法により分析し、ウイルスの力価が決定した。

30

【图 2】

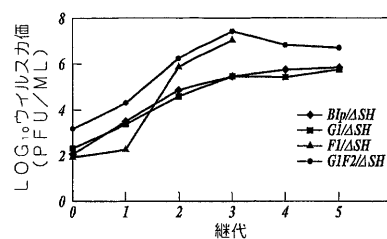
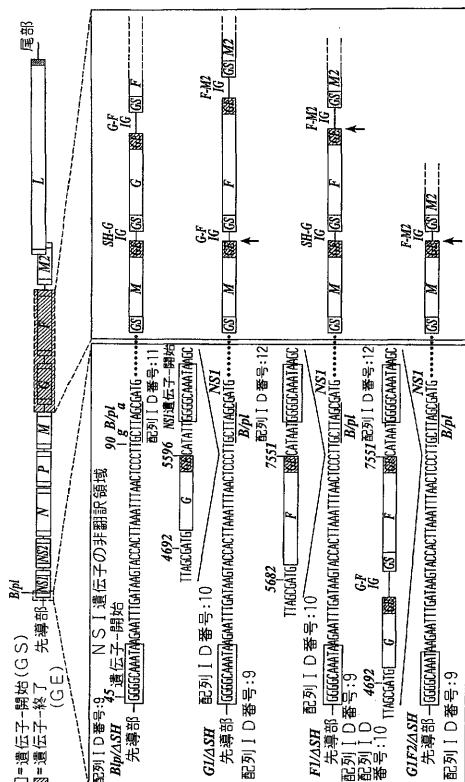


Fig. 2.

【 図 3 B 】

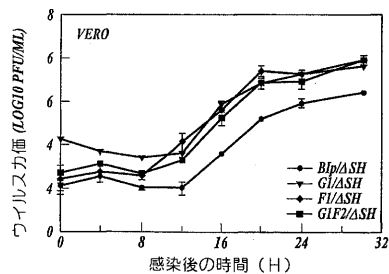
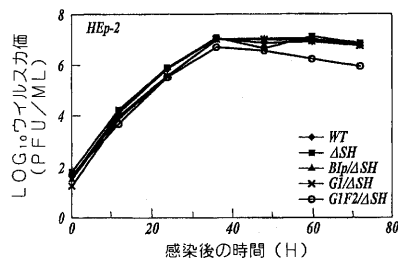
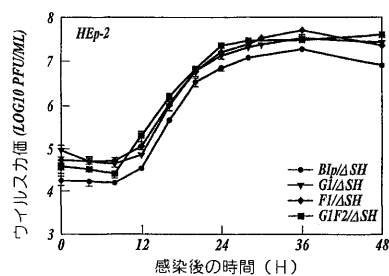
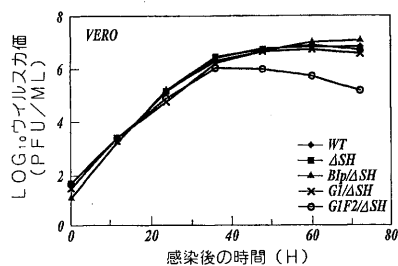


Fig. 3A.

Fig. 3B.

【図 4】

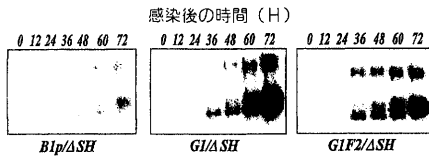
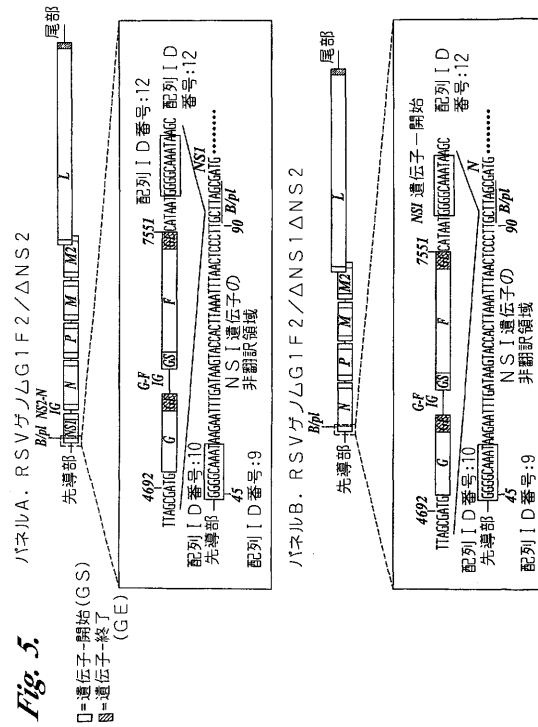
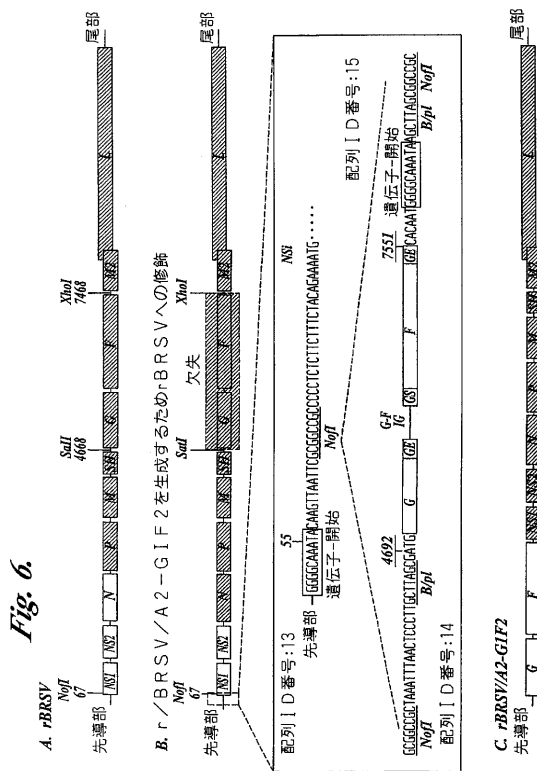


Fig. 4.

【図 5】



【图 6】



【图 7】

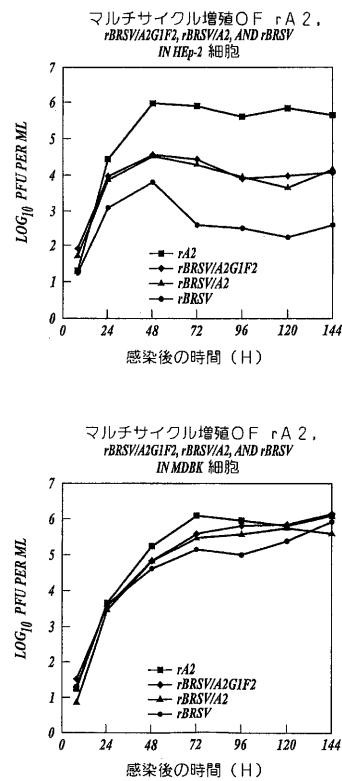


Fig. 7.

【 図 8 】

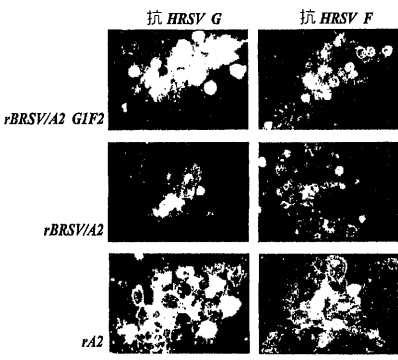
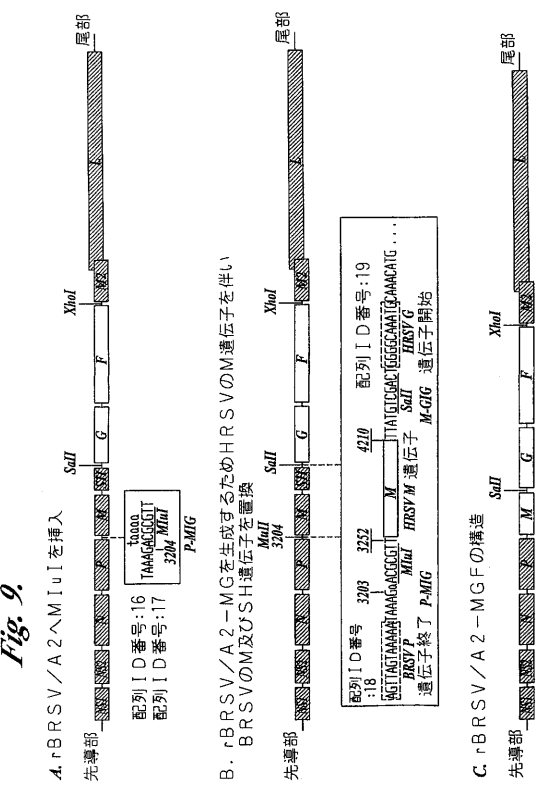


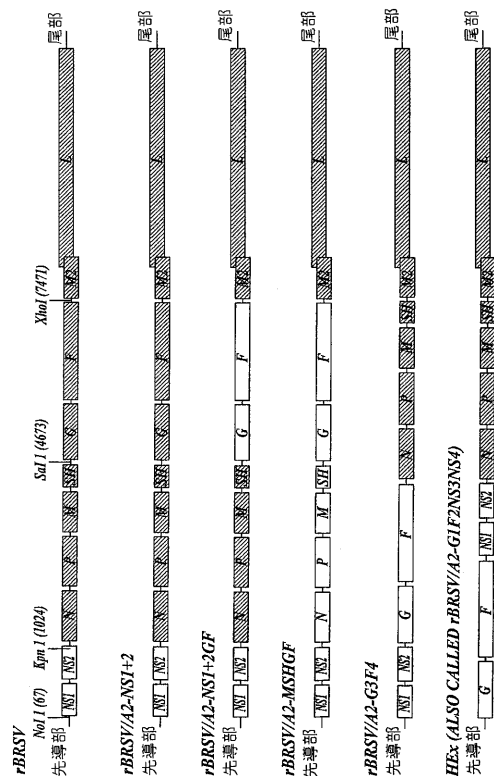
Fig. 8.

【 図 9 】



【 図 10 】

Fig. 10.



【 図 11 】

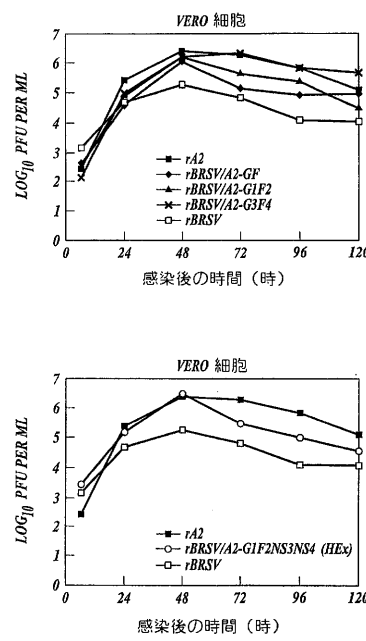


Fig. 11.

【図 1 2】

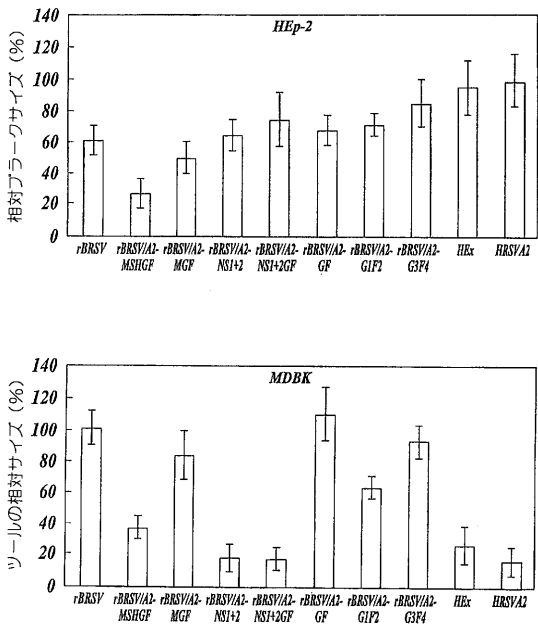
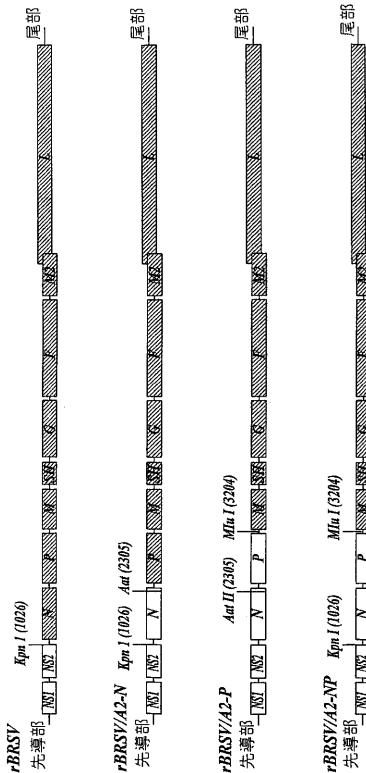


Fig. 12.

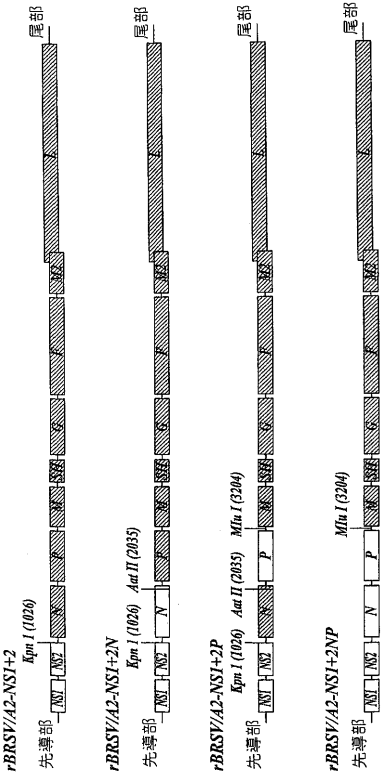
【図 1 3 A】

Fig. 13A.



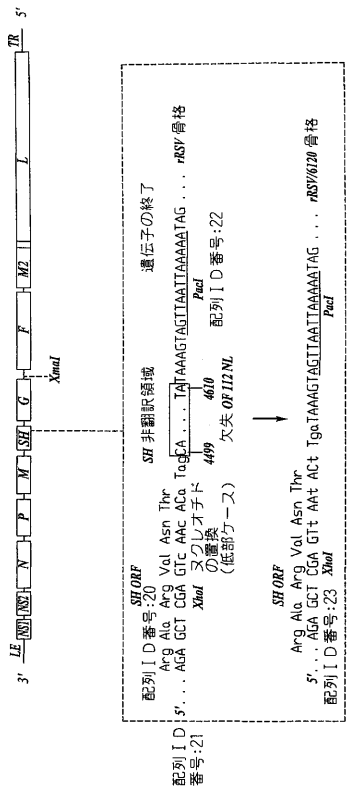
【図 1 3 B】

Fig. 13B.



【図 1 4】

Fig. 14.



【図 1 5 A】

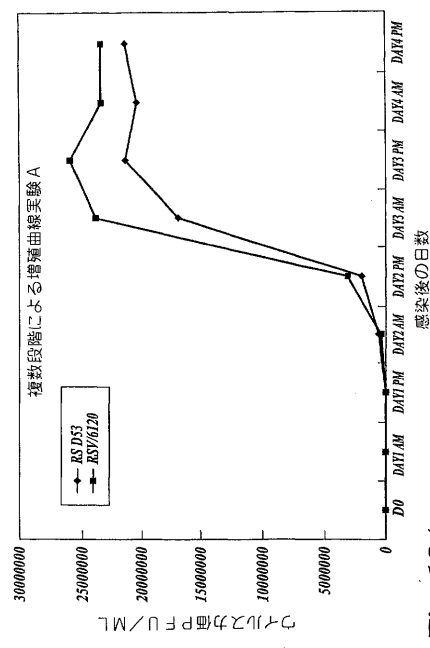


Fig. 15A.

【図 1 5 B】

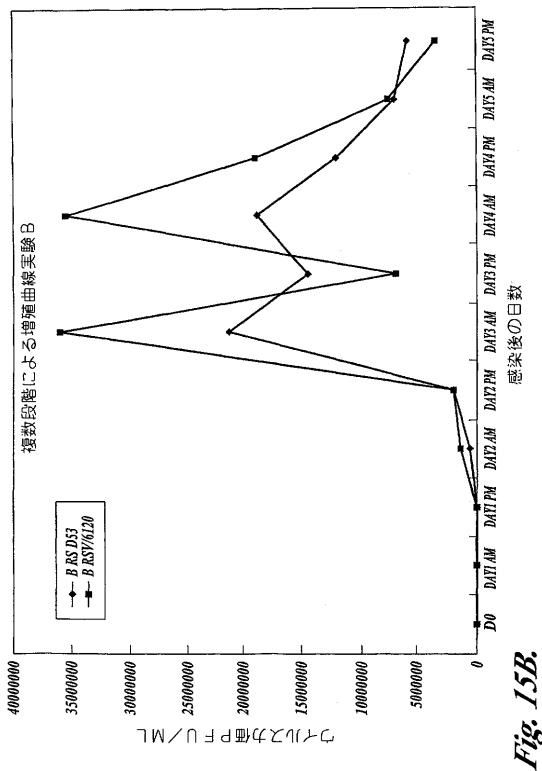


Fig. 15B.

【図 1 5 C】

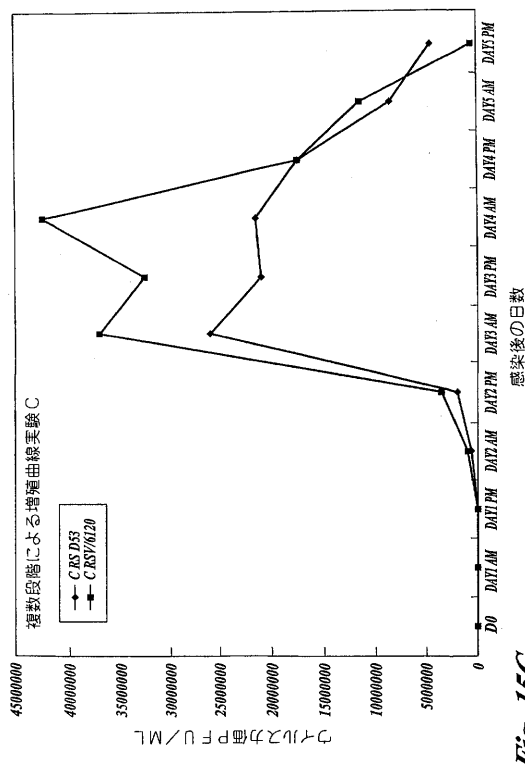


Fig. 15C.

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00693 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/005

(21) International Application Number: PCT/US01/20107

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/213,708 23 June 2000 (23.06.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA** [US/US]; National Institutes of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, MD 20852 (US).

(72) Inventors; and

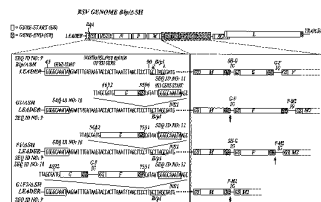
(75) Inventors/Applicants (for US only): **KREMPL, Christine, D.** [DE/US]; 12512 Village Square, Apt. 102, Rockville, MD 20852 (US). **COLLINS, Peter, L.**[US/US]; 12304 Village Square, Apt. 401, Rockville, MD 20852 (US). **MURPHY, Brian, R.** [US/US]; 5410 Tuscarawas Road, Bethesda, MD 20816 (US). **BUCHHOLZ, Ursula** [DE/DE]; Boddenblick 10, 17498 Insel Riems (DE). **WHITEHEAD, Stephen, S.** [US/US]; 7 Prairie Rose Lane, Gaithersburg, MD 20878 (US).(74) Agents: **KING, Jeffrey, J.** et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111 (US).

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

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINES EXPRESSING PROTECTIVE ANTIGENS FROM PROMOTOR-PROXIMAL GENES



(57) Abstract: Recombinant respiratory syncytial virus (RSV) having the position of genes shifted within the genome or antigenome of the recombinant virus are infectious and attenuated in humans and other mammals. Gene shifted RSV are constructed by insertion, deletion or rearrangement of genes or genome segments within the recombinant genome or antigenome and are useful in vaccine formulations for eliciting an anti-RSV immune response. Also provided are isolated polynucleotide molecules and vectors incorporating a recombinant RSV genome or antigenome wherein a gene or gene segment is shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position within the genome or antigenome compared to a wild type position of the gene in the RSV gene map. Shifting the position of genes in this manner provides for a selected increase or decrease in expression of the gene, depending on the nature and degree of the positional shift. In one embodiment, RSV glycoproteins are upregulated by shifting one or more glycoprotein-encoding genes to a more promoter-proximal position. Genes of interest for manipulation to create gene position-shifted RSV include any of the NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F or G genes or a genome segment that may be part of a gene or extragenic. A variety of additional mutations and nucleotide modifications are provided within the gene position-shifted RSV of the invention to yield desired phenotypic and structural effects.

WO 02/00693 A2

WO 02/00693 A2

**Published:**

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINES EXPRESSING
PROTECTIVE ANTIGENS FROM PROMOTOR-PROXIMAL GENES

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

- 5 This application claims the priority benefit of U.S. Provisional Application
No. 60/213,708, filed by Krempf et al. on June 23, 2000.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the leading viral agent of
10 serious pediatric respiratory tract disease worldwide (Collins, *et al.*, Fields Virology
2:1313-1352, 1996). RSV outranks all other microbial pathogens as a cause of
pneumonia and bronchiolitis in infants under one year of age. Virtually all children are
infected by two years of age, and reinfection occurs with appreciable frequency in older
children and young adults (Chanock *et al.*, in Viral Infections of Humans, 3rd ed., A.S.
15 Evans, ed., Plenum Press, N.Y., 1989). RSV is responsible for more than one in five
pediatric hospital admissions due to respiratory tract disease, and in the United States
alone causes nearly 100,000 hospitalizations and 4,500 deaths yearly. (Heilmann, J Infect
Dis 161:402-6, 1990). In addition, there is evidence that serious respiratory tract
infection early in life can initiate or exacerbate asthma (Sigurs, *et al.*, Pediatrics 95:500-5,
20 1995).

- While human RSV usually is thought of in the context of the pediatric
population, it also is recognized as an important agent of serious disease in the elderly
(Falscy, *et al.*, J. Infect. Dis. 172:389-394, 1995). Human RSV also causes life-
threatening disease in certain immunocompromised individuals, such as bone marrow
25 transplant recipients (Fouillard, *et al.*, Bone Marrow Transplant 9:97-100, 1992).

- For treatment of human RSV, one chemotherapeutic agent, ribavirin, is
available. However, its efficacy and use is controversial. There are also licensed
products for RSV intervention which are composed of pooled donor IgG (Groothuis, *et*
al., N Engl J Med 329:1524-30, 1993) or a humanized RSV-specific monoclonal
30 antibody. These are administered as passive immunoprophylaxis agents to high risk
individuals. While these products are useful, their high cost and other factors, such as
lack of long term effectiveness, make them inappropriate for widespread use. Other

WO 02/00693

PCT/US01/20107

disadvantages include the possibility of transmitting blood-borne viruses and the difficulty and expense in preparation and storage. Moreover, the history of the control of infectious diseases, and especially diseases of viral origin, indicates the primary importance of vaccines.

- 5 Despite decades of investigation to develop effective vaccine agents against RSV, no safe and effective vaccine has yet been achieved to prevent the severe morbidity and significant mortality associated with RSV infection. Failure to develop successful vaccines relates in part to the fact that small infants have diminished serum and secretory antibody responses to RSV antigens. Thus, these individuals suffer more severe
10 infections from RSV, whereas cumulative immunity appears to protect older children and adults against more serious impacts of the virus.

- The mechanisms of immunity in RSV infection have recently come into focus. Secretory antibodies appear to be most important in protecting the upper respiratory tract, whereas high levels of serum antibodies are thought to have a major role
15 in resistance to RSV infection in the lower respiratory tract. RSV-specific cytotoxic T cells, another effector arm of induced immunity, are also important in resolving an RSV infection. However, while this latter effector can be augmented by prior immunization to yield increased resistance to virus challenge, the effect is short-lived. The F and G surface glycoproteins are the two major protective antigens of RSV, and are the only two
20 RSV proteins which have been shown to induce RSV neutralizing antibodies and long term resistance to challenge (Collins *et al.*, *Fields Virology*, Fields *et al.*, eds., 2:1313-1352, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; Connors *et al.*, *J. Virol.* 65(3):1634-7, 1991). The third RSV surface protein, SH, did not induce RSV-neutralizing antibodies or significant resistance to RSV challenge.

- 25 An obstacle to developing live RSV vaccines is the difficulty in achieving an appropriate balance between attenuation and immunogenicity, partly due to the genetic instability of some attenuated viruses, the relatively poor growth of RSV in cell culture, and the instability of the virus particle. In addition the immunity which is induced by natural infection is not fully protective against subsequent infection. A number of factors
30 probably contribute to this, including the relative inefficiency of the immune system in restricting virus infection on the luminal surface of the respiratory tract, the short-lived nature of local mucosal immunity, rapid and extensive virus replication, reduced immune

WO 02/00693

PCT/US01/20107

responses in the young due to immunological immaturity, immunosuppression by transplacentally derived maternal serum antibodies, and certain features of the virus such as a high degree of glycosylation of the G protein. Also, as will be described below, human RSV exists as two antigenic subgroups A and B, and immunity against one
5 subgroup is of reduced effectiveness against the other.

Although RSV can reinfect multiple times during life, reinfections usually are reduced in severity due to protective immunity induced by prior infection, and thus immunoprophylaxis is feasible. A live-attenuated RSV vaccine would be administered intranasally to initiate a mild immunizing infection. This has the advantage of simplicity
10 and safety compared to a parenteral route. It also provides direct stimulation of local respiratory tract immunity, which plays a major role in resistance to RSV. It also abrogates the immunosuppressive effects of RSV-specific maternally-derived serum antibodies, which typically are found in the very young. Also, while the parenteral administration of RSV antigens can sometimes be associated with immunopathologic
15 complications (Murphy *et al.*, Vaccine 8(5):497-502, 1990), this has never been observed with a live virus.

A formalin-inactivated virus vaccine was tested against RSV in the mid-1960s, but failed to protect against RSV infection or disease, and in fact exacerbated symptoms during subsequent infection by the virus. (Kim *et al.*, Am. J. Epidemiol.,
20 89:422-434, 1969; Chin *et al.*, Am. J. Epidemiol., 89:449-463, 1969; Kapikian *et al.*, Am. J. Epidemiol., 89:405-421, 1969).

More recently, vaccine development for RSV has focused on attenuated RSV mutants. Friedewald *et al.*, (J. Amer. Med. Assoc. 204:690-694, 1968) reported a cold passaged mutant of RSV (cpRSV) which appeared to be sufficiently attenuated to be
25 a candidate vaccine. This mutant exhibited a slight increased efficiency of growth at 26°C compared to its wild-type (wt) parental virus, but its replication was neither temperature sensitive nor significantly cold-adapted. The cold-passaged mutant, however, was attenuated for adults. Although satisfactorily attenuated and immunogenic for infants and children who had been previously infected with RSV (*i.e.*, seropositive
30 individuals), the cpRSV mutant retained a low level virulence for the upper respiratory tract of seronegative infants.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Similarly, Gharpure *et al.*, (*J. Virol.* 3:414-421, 1969) reported the isolation of temperature sensitive RSV (tsRSV) mutants which also were promising vaccine candidates. One mutant, ts-1, was evaluated extensively in the laboratory and in volunteers. The mutant produced asymptomatic infection in adult volunteers and
 5 conferred resistance to challenge with wild-type virus 45 days after immunization. Again, while seropositive infants and children underwent asymptomatic infection, seronegative infants developed signs of rhinitis and other mild symptoms. Furthermore, instability of the ts phenotype was detected. Although virus exhibiting a partial or complete loss of temperature sensitivity represented a small proportion of virus
 10 recoverable from vaccinees, it was not associated with signs of disease other than mild rhinitis.

These and other studies revealed that certain cold-passaged and temperature sensitive RSV strains were underattenuated and caused mild symptoms of disease in some vaccinees, particularly seronegative infants, while others were
 15 overattenuated and failed to replicate sufficiently to elicit a protective immune response, (Wright *et al.*, *Infect. Immun.*, 37:397-400, 1982). Moreover, genetic instability of candidate vaccine mutants has resulted in loss of their temperature sensitive phenotype, further hindering development of effective RSV vaccines. See generally, (Hodes *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145:1158-1164, 1974; McIntosh *et al.*, *Pediatr. Res.* 8:689-
 20 696, 1974; and Belshe *et al.*, *J. Med. Virol.*, 3:101-110, 1978).

As an alternative to live-attenuated RSV vaccines, investigators have also tested subunit vaccine candidates using purified RSV envelope glycoproteins. The glycoproteins induced resistance to RS virus infection in the lungs of cotton rats, (Walsh
 25 *et al.*, *J. Infect. Dis.* 155:1198-1204, 1987), but the antibodies had very weak neutralizing activity and immunization of rodents with purified subunit vaccine led to disease potentiation (Murphy *et al.*, *Vaccine* 8:497-502, 1990).

Recombinant vaccinia virus vaccines which express the F or G envelope glycoprotein have also been explored. These recombinants express RSV glycoproteins which are indistinguishable from the authentic viral counterpart, and rodents infected
 30 intradermally with vaccinia-RSV F and G recombinants developed high levels of specific antibodies that neutralized viral infectivity. Indeed, infection of cotton rats with vaccinia-F recombinants stimulated almost complete resistance to replication of RSV in the lower

WO 02/00693

PCT/US01/20107

respiratory tract and significant resistance in the upper tract. (Olmsted *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:7462-7466, 1986). However, immunization of chimpanzees with vaccinia-F and -G recombinant provided almost no protection against RSV challenge in the upper respiratory tract (Collins *et al.*, Vaccine **8**:164-168, 1990) and inconsistent
 5 protection in the lower respiratory tract (Crowe *et al.*, Vaccine **11**:1395-1404, 1993).

Despite these various efforts to develop an effective RSV vaccine, no licensed vaccine has yet been approved for RSV. The unfulfilled promises of prior approaches underscores a need for new strategies to develop RSV vaccines, and in particular methods for manipulating recombinant RSV to incorporate genetic changes that
 10 yield new phenotypic properties in viable, attenuated RSV recombinants. However, manipulation of the genomic RNA of RSV and other non-segmented negative-sense RNA viruses has heretofore proven difficult. Major obstacles in this regard include non-infectivity of naked genomic RNA of these viruses, poor viral growth in tissue culture, lengthy replication cycles, virion instability, a complex genome, and a refractory
 15 organization of gene products.

Recombinant DNA technology has made it possible to recover infectious non-segmented negative-stranded RNA viruses from cDNA, to genetically manipulate viral clones to construct novel vaccine candidates, and to rapidly evaluate their level of attenuation and phenotypic stability (for reviews, see Conzelmann, J. Gen. Virol. **77**:381-
 20 89, 1996; Palese *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**:11354-58, 1996). In this context, recombinant rescue has been reported for infectious respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus (PIV), rabies virus (RaV), vesicular stomatitis virus (VSV), measles virus (MeV), rinderpest virus and Sendai virus (SeV) from cDNA-encoded antigenomic RNA in the presence of essential viral proteins (see, *e.g.*, Garcin *et al.*, EMBO J. **14**:6087-
 25 6094, 1995; Lawson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**:4477-81, 1995; Radecke *et al.*, EMBO J. **14**:5773-5784, 1995; Schnell *et al.*, EMBO J. **13**:4195-203, 1994; Whelan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**:8388-92, 1995; Hoffman *et al.*, J. Virol. **71**:4272-4277, 1997; Pecters *et al.*, J. Virol. **73**:5001-5009, 1999; Kato *et al.*, Genes to Cells **1**:569-579, 1996; Roberts *et al.*, Virology **247**(1), 1-6, 1998; Baron *et al.*, J. Virol. **71**:1265-1271, 1997; International Publication No. WO 97/06270; U.S. Provisional Patent Application No. 60/007,083, filed September 27, 1995; U.S. Patent Application No. 08/720,132, filed September 27, 1996; U.S. Provisional Patent Application No.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

60/021,773, filed July 15, 1996; U.S. Provisional Patent Application No. 60/046,141, filed May 9, 1997; U.S. Provisional Patent Application No. 60/047,634, filed May 23, 1997; U.S. Patent No. 5,993,824, issued November 30, 1999 (corresponding to International Publication No. WO 98/02530); U.S. Patent Application No. 09/291,894, filed by Collins *et al.* on April 13, 1999; U.S. Provisional Patent Application No. 60/129,006, filed by Murphy *et al.* on April 13, 1999; Collins, *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A. 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, *et al.*, J. Virol. 70:6634-41, 1996; Juhasz *et al.*, J. Virol. 71(8):5814-5819, 1997; Durbin *et al.*, Virology 235:323-332, 1997; He *et al.*, Virology 237:249-260, 1997; Baron *et al.*, J. Virol. 71:1265-1271, 1997; Whitehead *et al.*, Virology 247(2):232-9, 1998a; Buchholz *et al.*, J. Virol. 73:251-9, 1999; Whitehead *et al.*, J. Virol. 72(5):4467-4471, 1998b; Jin *et al.*, Virology 251:206-214, 1998; and Whitehead *et al.*, J. Virol. 73(4):3438-3442, 1999, and Bukreyev, *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA 96:2367-72, 1999, each incorporated herein by reference in its entirety for all purposes).

Based on the foregoing developments, it is now possible to recover infectious RSV from cDNA and to design and implement various genetic manipulations to RSV clones to construct novel vaccine candidates. Thereafter, the level of attenuation and phenotypic stability, among other desired phenotypic characteristics, can be evaluated and adjusted. The challenge which thus remains is to develop a broad and diverse menu of genetic manipulations that can be employed, alone or in combination with other types of genetic manipulations, to construct infectious, attenuated RSV clones that are useful for broad vaccine use. In this context, an urgent need remains in the art for additional tools and methods that will allow engineering of safe and effective vaccines to alleviate the serious health problems attributable to RSV. Surprisingly, the present invention fulfills this need by providing additional tools for constructing infectious, attenuated RSV vaccine candidates.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides recombinant respiratory syncytial viruses (RSVs) which are modified by shifting a relative gene order or spatial position of one or more genes or genome segments within a recombinant RSV genome or antigenome—to generate a recombinant vaccine virus that is infectious, attenuated and immunogenic in humans and other mammals. The recombinant RSVs of the invention typically comprise a major nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large polymerase

WO 02/00693

PCT/US01/20107

protein (L), a RNA polymerase elongation factor, and a partial or complete recombinant RSV genome or antigenome having one or more positionally shifted RSV genes or genome segments within the recombinant genome or antigenome. In certain aspects of the invention, the recombinant RSV features one or more positionally shifted genes or genome segments that may be shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position by insertion, deletion, or rearrangement of one or more displacement polynucleotides within the partial or complete recombinant RSV genome or antigenome. Displacement polynucleotides may be inserted or rearranged into a non-coding region (NCR) of the recombinant genome or antigenome, or may be incorporated in the recombinant RSV genome or antigenome as a separate gene unit (GU).

In exemplary embodiments of the invention, isolated infectious recombinant RSV are constructed by addition, deletion, or rearrangement of one or more displacement polynucleotides that may be selected from one or more RSV gene(s) or genome segment(s) selected from RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F and G genes and genome segments and leader, trailer and intergenic regions of the RSV genome and segments thereof. In more detailed embodiments, polynucleotide inserts, and deleted or rearranged elements within the recombinant RSV genome or antigenome are selected from one or more bovine RSV (BRSV) or human RSV (HRSV) gene(s) or genome segment(s) selected from RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F and G gene(s) or genome segment(s) and leader, trailer and intergenic regions of the RSV genome or segments thereof.

In certain aspects of the invention, displacement polynucleotides are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Deletion of a displacement polynucleotide in this manner causes a positional shift of one or more "shifted" RSV genes or genome segments within the recombinant genome or antigenome to a more promoter-proximal position relative to a position of the shifted gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV (e.g., HRSV A2 or BRSV kansas strain) genome or antigenome. Exemplary displacement polynucleotides that may be deleted in this manner to form the recombinant RSV genome or antigenome may be selected from one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof.

In more detailed embodiments of the invention, a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the recombinant RSV

WO 02/00693

PCT/US01/20107

genome or antigenome. Alternatively, a displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene may be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Alternatively, a displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene may be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Alternatively, a displacement polynucleotide comprising RSV M2(ORF2) can be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Alternatively, a displacement polynucleotide comprising a RSV G gene may be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

In yet additional embodiments, multiple displacement polynucleotides comprising RSV genes or genome segments may be deleted. For example, RSV F and G genes may both be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome. Alternatively, the RSV NS1 and NS2 genes may both be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome. Alternatively, the RSV SH and NS2 genes may both be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome. Alternatively, the RSV SH, NS1 and NS2 genes can all be deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

In different embodiments of the invention, isolated infectious recombinant RSV are provided wherein one or more displacement polynucleotides is/are added, substituted, or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to cause a positional shift of one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s). Among these modifications, gene and genome segment insertions and rearrangements may introduce or rearrange the subject genes or genome segments to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a respective position of each subject (inserted or rearranged) gene or genome segment within a corresponding (*e.g.*, bovine or human) wild type RSV genome or antigenome. Displacement polynucleotides which may be added, substituted, or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome can be selected from one or more of the RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), F, and/or G gene(s) or genome segment(s) thereof.

In more detailed embodiments, displacement polynucleotides are selected for insertion or rearrangement within the recombinant RSV genome or antigenome which comprises one or more RSV genes or genome segments that encoded one or more RSV glycoproteins or immunogenic domains or epitopes of RSV glycoproteins. In exemplary

WO 02/00693

PCT/US01/20107

embodiments, these displacement polynucleotides are selected from genes or genome segments encoding RSV F, G, and/or SH glycoproteins or immunogenic domains or epitopes thereof. For example, one or more RSV glycoprotein gene(s) selected from F, G and SH may be added, substituted or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to a position that is more promoter-proximal or promoter-distal compared to the wild type gene order position of the gene(s).

In exemplary embodiments, the RSV glycoprotein gene G is rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of G. In more detailed aspects, the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome. In other exemplary embodiments, the RSV glycoprotein gene F is rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to a more promoter-proximal position, for example by shifting the F gene to gene order position 1 within the recombinant genome or antigenome. In yet additional exemplary embodiments, both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to their respective wild type gene order positions. In more detailed aspects, the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2.

In yet additional constructs featuring glycoprotein gene shifts, recombinant RSV are produced having one or more RSV glycoprotein gene(s) selected from F, G and SH, or a genome segment thereof, added, substituted or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome, wherein one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof is/are deleted. Thus, a gene or genome segment of RSV F, G, or SH may be added, substituted or rearranged in a background wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Alternatively, a gene or genome segment of RSV F, G, or SH may be added, substituted or rearranged in a background wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome. Alternatively, a gene or genome segment of RSV F, G, or SH may be added, substituted or rearranged in a

WO 02/00693

PCT/US01/20107

background wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

In one example below, the RSV glycoprotein gene G is rearranged within a recombinant RSV genome or antigenome having an SH gene deletion to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of G. In more detailed aspects, the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within the recombinant RSV genome or antigenome, as exemplified by the recombinant vaccine candidate G1/ Δ SH. In another example, the RSV glycoprotein gene F is rearranged within a recombinant RSV genome or antigenome having an SH gene deletion to a more promoter-proximal proximal position. In more detailed aspects, the F gene is shifted to gene order position 1, as exemplified by the recombinant F1/ Δ SH. In yet another example below, both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within a Δ SH recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F. In more detailed aspects, the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 1 within the recombinant RSV genome or antigenome, as exemplified by the recombinant G1F2/ Δ SH.

Yet additional examples of gene position-shifted RSV are provided featuring shifts of glycoprotein gene(s) selected from F, G and SH, which are produced within a recombinant RSV genome or antigenome having multiple genes or genome segments selected from RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), and G gene(s) or genome segment(s) deleted. In one example, the RSV SH and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome, and one or both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within the recombinant RSV genome to more promoter-proximal gene order positions. In more detailed aspects, G is shifted to gene order position 1 and F is shifted to gene order position 2, as exemplified by the recombinant G1F2/ Δ NS2 Δ SH. In another example, all of the RSV SH, NS1 and NS2 genes are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome, and one or both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to more promoter-proximal positions, as exemplified by the recombinant vaccine candidate G1F2/ Δ NS2 Δ NS2 Δ SH.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In yet additional aspects of the invention, gene position-shifted RSV are combined with or incorporated within human-bovine chimeric RSV. Within these aspects, the recombinant genome or antigenome comprises a partial or complete human RSV (HRSV) or bovine RSV (BRSV) background genome or antigenome combined with one or more heterologous gene(s) or genome segment(s) from a different RSV to form a human-bovine chimeric RSV genome or antigenome. The heterologous gene or genome segment of the different, HRSV or BRSV may be added or substituted at a position that is more promoter-proximal or promoter-distal compared to a wild type gene order position of a counterpart gene or genome segment within the partial or complete HRSV or BRSV background genome or antigenome. In one such example provided herein, both human RSV glycoprotein genes G and F are substituted at gene order positions 1 and 2, respectively, to replace counterpart G and F glycoprotein genes deleted at wild type positions 7 and 8, respectively in a partial bovine RSV background genome or antigenome, as exemplified by the recombinant virus rBRSV/A2-G1F2. In other embodiments, one or more human RSV envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are added or substituted within a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome. In more detailed aspects, one or more human RSV envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are added or substituted within a partial bovine RSV background genome or antigenome in which one or more envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are deleted. In one example described below, human RSV envelope-associated genes F, G, and M are added within a partial bovine RSV background genome or antigenome in which all of the envelope-associated genes F, G, SH, and M are deleted, as exemplified by the recombinant virus rBRSV/A2-MGF.

In another alternate embodiment of the invention, isolated infectious recombinant RSV are provided in which the RSV M2(ORF1) is shifted to a more promoter-proximal position within the recombinant RSV genome or antigenome. The result of this gene shift is to upregulate transcription of the recombinant virus.

In additional aspects of the invention, attenuated, gene position-shifted RSV are produced in which the recombinant genome or antigenome is further modified by introducing one or more attenuating mutations specifying an attenuating phenotype in the resultant virus or subviral particle. These attenuating mutations may be generated de

WO 02/00693

PCT/US01/20107

novo and tested for attenuating effects according to a rational design mutagenesis strategy. Alternatively, the attenuating mutations may be identified in existing biologically derived mutant RSV and thereafter incorporated into a gene position-shifted RSV of the invention.

5 In combination with the gene positional changes introduced in recombinant RSV of the invention, it is often desirable to adjust the attenuation phenotype by introducing additional mutations that increase or decrease attenuation of the chimeric virus. Thus, candidate vaccine strains can be further attenuated by incorporation of at least one, and preferably two or more different attenuating mutations, for example
10 mutations identified from a panel of known, biologically derived mutant RSV strains. Preferred human mutant RSV strains are cold passaged (cp) and/or temperature sensitive (ts) mutants, for example the mutants designated "cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC
15 VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)" (each deposited under the terms of the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC) of 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., and granted the above identified accession numbers). From this exemplary panel of biologically derived mutants, a large "menu" of attenuating mutations are provided
20 which can each be combined with any other mutation(s) within the panel for calibrating the level of attenuation in the recombinant, human-bovine chimeric RSV for vaccine use. Additional mutations may be derived from RSV having non-ts and non-cp attenuating mutations as identified, e.g., in small plaque (sp), cold-adapted (ca) or host-range restricted (hr) mutant strains. The mutations may be incorporated in either a human or
25 bovine antigenomic sequence, and attenuating mutations identified in a human, bovine or other RSV mutant may be transferred to the heterologous RSV recipient (e.g., bovine or human RSV, respectively) by mapping the mutation to the corresponding, homologous site in the recipient genome and mutating the native sequence in the recipient to the mutant genotype (either by an identical or conservative mutation), as described in U.S.
30 Provisional Patent Application No. 60/129,006, filed by Murphy et al. on April 13, 1999, incorporated herein by reference.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- Thus, in more detailed embodiments of the invention, gene position-shifted RSV are provided wherein the recombinant genome or antigenome incorporates at least one and up to a full complement of attenuating mutations present within a panel of mutant human RSV strains, said panel comprising cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). In certain embodiments, the recombinant genome or antigenome incorporates attenuating mutations adopted from different mutant RSV strains.
- Gene position-shifted RSV designed and selected for vaccine use often have at least two and sometimes three or more attenuating mutations to achieve a satisfactory level of attenuation for broad clinical use. In one embodiment, at least one attenuating mutation occurs in the RSV polymerase gene L (either in the donor or recipient gene) and involves one or more nucleotide substitution(s) specifying an amino acid change in the polymerase protein specifying an attenuation phenotype which may or may not involve a temperature-sensitive (ts) phenotype. Gene position-shifted RSV of the invention may incorporate an attenuating mutation in any additional RSV gene besides L, e.g., in the M2 gene. However, preferred human-bovine chimeric RSV in this context incorporate one or more nucleotide substitutions in the large polymerase gene L resulting in an amino acid change at amino acid Asn43, Cys319, Phe 521, Gln831, Met1169, Tyr1321 and/or His 1690 in the RSV polymerase gene L, as exemplified by the changes, Ile for Asn43, Leu for Phe521, Leu for Gln831, Val for Met1169, and Asn for Tyr1321. Other alternative amino acid changes, particularly conservative changes with respect to identified mutant residues, at these positions can of course be made to yield a similar effect as the identified, mutant substitution. Additional desired mutations for incorporation into human-bovine chimeric RSV of the invention include attenuating mutations specifying an amino acid substitution at Val267 in the RSV N gene, Glu218 and/or Thr523 in the RSV F gene, and a nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2. Any combination of one or more attenuating mutations identified herein, up to and including a full complement of these mutations, may be incorporated in human-bovine chimeric RSV to yield a suitably attenuated recombinant virus for use in selected populations or broad populations of vaccine recipients.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In other more detailed embodiments of the invention, gene position-shifted RSV are provided wherein the recombinant genome or antigenome incorporates at least one and up to a full complement of attenuating mutations specifying an amino acid substitution at Val267 in the RSV N gene, Glu218 and/or Thr523 in the RSV F gene, 5 Asn43, Cys319, Phe 521, Gln831, Met1169, Tyr1321 and/or His 1690 in the RSV polymerase gene L, and a nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2. In certain aspects, the recombinant genome or antigenome incorporates at least two, commonly three, four or five, and sometimes a full complement comprising all of these attenuating mutations. Often, at least one attenuating mutation is stabilized by multiple 10 nucleotide changes in a codon specifying the mutation.

Attenuating mutations for incorporation in human-bovine chimeric RSV of the invention may be selected in coding portions of a donor or recipient RSV gene or in non-coding regions such as a cis-regulatory sequence. Exemplary non-coding mutations include single or multiple base changes in a gene start sequence, as exemplified by a 15 single or multiple base substitution in the M2 gene start sequence at nucleotide 7605 (nucleotide 7606 in recombinant sequence).

Infectious RSV according to the invention can incorporate heterologous, coding or non-coding nucleotide sequences from any heterologous RSV or RSV-like virus, e.g., human, bovine, murine (pneumonia virus of mice), or avian (turkey 20 rhinotracheitis virus) pneumovirus, or from another enveloped virus, e.g., parainfluenza virus (PIV). Exemplary heterologous sequences include RSV sequences from one human RSV strain combined with sequences from a different human RSV strain, or RSV sequences from a human RSV strain combined with sequences from a bovine RSV strain. Gene position-shifted RSV of the invention may incorporate sequences from two or more 25 wild-type or mutant RSV strains, for example mutant strains selected from cpts RSV 248, cpts 248/404, cpts 248/955, cpts RSV 530, cpts 530/1009, or cpts 530/1030. Alternatively, chimeric RSV may incorporate sequences from two or more, wild-type or mutant human RSV subgroups, for example a combination of human RSV subgroup A and subgroup B sequences. In yet additional aspects, one or more human RSV coding or 30 non-coding polynucleotides are substituted with a counterpart sequence from a heterologous RSV or non-RSV virus, alone or in combination with one or more selected

WO 02/00693

PCT/US01/20107

attenuating mutations, e.g., cp and/or ts mutations, to yield novel attenuated vaccine strains.

5 Mutations incorporated within gene position-shifted RSV cDNAs, vectors and viral particles of the invention can be introduced individually or in combination into a full-length RSV cDNA, and the phenotypes of rescued virus containing the introduced mutations can be readily determined. In exemplary embodiments, amino acid changes displayed by attenuated, biologically-derived viruses versus a wild-type RSV, for example changes exhibited by cpRSV or tsRSV, are incorporated in combination within a gene position-shifted RSV to yield a desired level of attenuation.

10 In additional aspects of the invention, gene position-shifted RSV can be readily designed as "vectors" to incorporate antigenic determinants from different pathogens, including more than one RSV strain or group (e.g., both human RSV A and RSV B subgroups), human parainfluenza virus (HPIV) including HPIV3, HPIV2 and HPIV1, measles virus and other pathogens (see, e.g., U.S. Provisional Patent Application
15 Serial No. 60/170,195; U.S. Patent Application No. 09/458,813; and U.S. Patent Application No. 09/459,062, each incorporated herein by reference). Within various embodiments, the recombinant genome or antigenome comprises a partial or complete RSV "vector genome or antigenome" combined with one or more heterologous genes or genome segments encoding one or more antigenic determinants of one or more
20 heterologous pathogens. The heterologous pathogen may be a heterologous RSV (i.e., a RSV of a different strain or subgroup), and the heterologous gene or genome segment may encode a RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F or G protein or fragment (e.g., a immunogenic domain or epitope) thereof. For example, the vector genome or antigenome may be a partial or complete RSV A genome or antigenome and
25 the heterologous gene(s) or genome segment(s) may encode antigenic determinant(s) of a RSV B subgroup virus.

In alternative embodiments, the gene position-shifted RSV vector genome or antigenome is a partial or complete BRSV genome or antigenome and the heterologous gene(s) or genome segment(s) encoding the antigenic determinant(s) is/are of one or more
30 HRSV(s). For example, the partial or complete BRSV genome or antigenome may incorporate one or more gene(s) or genome segment(s) encoding one or more HRSV glycoprotein genes selected from F, G and SH, or one or more genome segment(s)

WO 02/00693

PCT/US01/20107

encoding cytoplasmic domain, transmembrane domain, ectodomain or immunogenic epitope portion(s) of F, G, and/or SH of HRSV.

As noted above, gene position-shifted RSV designed as vectors for carrying heterologous antigenic determinants may incorporate one or more antigenic determinants of a non-RSV pathogen, such as a human parainfluenza virus (HPIV). In one exemplary embodiment, one or more HPIV1, HPIV2, or HPIV3 gene(s) or genome segment(s) encoding one or more HN and/or F glycoprotein(s) or antigenic domain(s), fragment(s) or epitope(s) thereof is/are added to or incorporated within the partial or complete HRSV vector genome or antigenome. In more detailed embodiments, a transcription unit comprising an open reading frame (ORF) of an HPIV1, HPIV2, or HPIV3 HN or F gene is added to or incorporated within the recombinant vector genome or antigenome.

In yet additional alternate embodiments, the vector genome or antigenome comprises a partial or complete HRSV or BRSV genome or antigenome and the heterologous pathogen is selected from measles virus, subgroup A and subgroup B respiratory syncytial viruses, mumps virus, human papilloma viruses, type 1 and type 2 human immunodeficiency viruses, herpes simplex viruses, cytomegalovirus, rabies virus, Epstein Barr virus, filoviruses, bunyaviruses, flaviviruses, alphaviruses and influenza viruses. Based on this exemplary list of candidate pathogens, the selected heterologous antigenic determinant(s) may be selected from measles virus HA and F proteins, subgroup A or subgroup B respiratory syncytial virus F, G, SH and M2 proteins, mumps virus HN and F proteins, human papilloma virus L1 protein, type 1 or type 2 human immunodeficiency virus gp160 protein, herpes simplex virus and cytomegalovirus gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, and gM proteins, rabies virus G protein, Epstein Barr Virus gp350 protein; filovirus G protein, bunyavirus G protein, Flavivirus E and NS1 proteins, and alphavirus E protein, and antigenic domains, fragments and epitopes thereof. In one embodiment, the heterologous pathogen is measles virus and the heterologous antigenic determinant(s) is/are selected from the measles virus HA and F proteins and antigenic domains, fragments and epitopes thereof. To achieve such a chimeric construct, a transcription unit comprising an open reading frame (ORF) of a measles virus HA gene may be added to or incorporated within a HRSV vector genome or antigenome.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

The present invention thus provides gene position-shifted RSV clones, polynucleotide expression constructs (also referred to as vectors) and particles which can incorporate multiple, phenotype-specific mutations introduced in selected combinations into the gene position-shifted RSV genome or antigenome to produce an attenuated, infectious virus or subviral particle. This process coupled with routine phenotypic evaluation provides gene position-shifted RSV having such desired characteristics as attenuation, temperature sensitivity, altered immunogenicity, cold-adaptation, small plaque size, host range restriction, etc. Mutations thus identified are compiled into a "menu" and introduced in various combinations to calibrate a vaccine virus to a selected level of attenuation, immunogenicity and stability.

In yet additional aspects of the invention, gene position-shifted RSV, with or without attenuating mutations, are constructed to have a nucleotide modification to yield a desired phenotypic, structural, or functional change. Typically, the selected nucleotide modification will specify a phenotypic change, for example a change in growth characteristics, attenuation, temperature-sensitivity, cold-adaptation, plaque size, host range restriction, or immunogenicity. Structural changes in this context include introduction or ablation of restriction sites into RSV encoding cDNAs for ease of manipulation and identification.

In certain embodiments, nucleotide changes within gene position-shifted RSV include modification of a viral gene by deletion of the gene or ablation of its expression. Target genes for mutation in this context include the attachment (G) protein, fusion (F) protein, small hydrophobic (SH), RNA binding protein (N), phosphoprotein (P), the large polymerase protein (L), the transcription elongation factor (M2 ORF1), the RNA regulatory factor M2 ORF2, the matrix (M) protein, and two nonstructural proteins, NS1 and NS2. Each of these proteins can be selectively deleted, substituted or rearranged, in whole or in part, alone or in combination with other desired modifications, to achieve novel chimeric RSV recombinants.

In one aspect of the invention, an SH, NS1, NS2, G or M2-2 gene is modified in the gene position-shifted RSV. For example, each of these genes may be deleted or its expression ablated (e.g., by introduction of a stop codon) to alter the phenotype of the resultant recombinant RSV clone to improve growth, attenuation, immunogenicity or other desired phenotypic characteristics. For example, deletion of the

WO 02/00693

PCT/US01/20107

SH gene in the recombinant genome or antigenome will yield a RSV having novel phenotypic characteristics such as enhanced growth *in vitro* and/or attenuation *in vivo*. In a related aspect, an SH gene deletion, or deletion of another selected non-essential gene or genome segment such as a NS1, NS2, G or M2-2 gene deletion is constructed in a gene position-shifted RSV, alone or in combination with one or more different mutations specifying an attenuated phenotype, e.g., a point mutation adopted directly (or in modified form, e.g., by introducing multiple nucleotide changes in a codon specifying the mutation) from a biologically derived attenuated RSV mutant. For example, the SH, NS1, NS2, G or M2-2 gene may be deleted in combination with one or more cp and/or ts mutations adopted from cpts248/404, cpts530/1009, cpts530/1030 or another selected mutant RSV strain, to yield a gene position-shifted RSV having increased yield of virus, enhanced attenuation, improved immunogenicity and genetic resistance to reversion from an attenuated phenotype due to the combined effects of the different mutations.

Alternative nucleotide modifications can include a deletion, insertion, addition or rearrangement of a cis-acting regulatory sequence for a selected gene in the gene position-shifted RSV. In one example, a cis-acting regulatory sequence of one RSV gene is changed to correspond to a heterologous regulatory sequence, which may be a counterpart cis-acting regulatory sequence of the same gene in a different RSV or a cis-acting regulatory sequence of a different RSV gene. For example, a gene end signal may be modified by conversion or substitution to a gene end signal of a different gene in the same RSV strain. In other embodiments, the nucleotide modification may comprise an insertion, deletion, substitution, or rearrangement of a translational start site within the chimeric genome or antigenome, e.g., to ablate an alternative translational start site for a selected form of a protein. In one example, the translational start site for a secreted form of the RSV G protein is ablated to modify expression of this form of the G protein and thereby produce desired *in vivo* effects.

In addition, a variety of other genetic alterations can be produced in a gene position-shifted RSV genome or antigenome, alone or together with one or more attenuating mutations adopted from a biologically derived mutant RSV. For example, genes or genome segments from non-RSV sources may be inserted in whole or in part. Nontranslated gene sequences can be removed, e.g., to increase capacity for inserting foreign sequences. In yet additional aspects, polynucleotide molecules or vectors

WO 02/00693

PCT/US01/20107

encoding the gene position-shifted RSV genome or antigenome can be modified to encode non-RSV sequences, e.g., a cytokine, a T-helper epitope, a restriction site marker, or a protein of a microbial pathogen (e.g., virus, bacterium or fungus) capable of eliciting a protective immune response in an intended host. Different or additional modifications

5 in the gene position-shifted RSV antigenome can be made to facilitate manipulations, such as the insertion of unique restriction sites in various intergenic regions (e.g., a unique StuI site between the G and F genes) or elsewhere.

All of the foregoing modifications within the gene position-shifted RSV genome or antigenome, including nucleotide insertions, rearrangements, deletions or

10 substitutions yielding point mutations, site-specific nucleotide changes, and changes involving entire genes or genome segments, may be made to either a partial or complete RSV genome or antigenome, or within a heterologous donor gene or genome segment or recipient, background genome or antigenome in a chimeric RSV. In each case, these alterations will preferably specify one or more phenotypic change(s) in the resulting

15 recombinant RSV, such as a phenotypic change that results in attenuation, temperature-sensitivity, cold-adaptation, small plaque size, host range restriction, alteration in gene expression, or a change in an immunogenic epitope.

In another aspect of the invention, compositions (e.g., isolated polynucleotides and vectors incorporating an RSV-encoding cDNA) and methods are

20 provided for producing an isolated infectious gene position-shifted RSV. Using these compositions and methods, infectious gene position-shifted RSV particles or subviral particles are generated from a recombinant RSV genome or antigenome coexpressed with a nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large (L) polymerase protein, and an RNA polymerase elongation factor. In related aspects of the invention,

25 compositions and methods are provided for introducing the aforementioned structural and phenotypic changes into a recombinant gene position-shifted RSV to yield infectious, attenuated vaccine viruses.

In one embodiment, an expression vector is provided which comprises an isolated polynucleotide molecule encoding a gene position-shifted RSV genome or

30 antigenome. Also provided is the same or different expression vector comprising one or more isolated polynucleotide molecules encoding N, P, L and RNA polymerase elongation factor proteins. These proteins also can be expressed directly from the

WO 02/00693

PCT/US01/20107

genome or antigenome cDNA. The vector(s) is/are preferably expressed or coexpressed in a cell or cell-free lysate, thereby producing an infectious gene position-shifted RSV particle or subviral particle.

5 The RSV genome or antigenome and the N, P, L and RNA polymerase elongation factor (preferably the product of the M2(ORF1) of RSV) proteins can be coexpressed by the same or different expression vectors. In some instances the N, P, L and RNA polymerase elongation factor proteins are each encoded on different expression vectors. The polynucleotide molecule encoding the gene position-shifted RSV genome or antigenome is operably joined to these control sequences to allow production of
10 infectious virus or viral particles therefrom. In alternative aspects of the invention, the gene position-shifted RSV genome or antigenome can include sequences from multiple human RSV strains or subgroups (A and B), as well as other non-human (e.g., murine) RSV sequences. In other alternate aspects, the gene position-shifted RSV genome or antigenome can incorporate non-RSV sequences, for example a polynucleotide containing
15 sequences from human and bovine RSV operably joined with a nucleotide or polynucleotide encoding a point mutation, protein, protein domain or immunogenic epitope of PIV or another negative stranded RNA virus.

The above methods and compositions for producing gene position-shifted RSV yield infectious viral or subviral particles, or derivatives thereof. An infectious
20 virus is comparable to the authentic RSV virus particle and is infectious as is. It can directly infect fresh cells. An infectious subviral particle typically is a subcomponent of the virus particle which can initiate an infection under appropriate conditions. For example, a nucleocapsid containing the genomic or antigenomic RNA and the N, P, L and M2(ORF1) proteins is an example of a subviral particle which can initiate an infection if
25 introduced into the cytoplasm of cells. Subviral particles provided within the invention include viral particles which lack one or more protein(s), protein segment(s), or other viral component(s) not essential for infectivity.

In other embodiments the invention provides a cell or cell-free lysate containing an expression vector which comprises an isolated polynucleotide molecule
30 encoding a gene position-shifted RSV genome or antigenome as described above, and an expression vector (the same or different vector) which comprises one or more isolated polynucleotide molecules encoding the N, P, L and RNA polymerase elongation factor

WO 02/00693

PCT/US01/20107

proteins of RSV. One or more of these proteins also can be expressed from the genome or antigenome cDNA. Upon expression the genome or antigenome and N, P, L, and RNA polymerase elongation factor proteins combine to produce an infectious gene position-shifted RSV viral or subviral particle.

5 Attenuated gene position-shifted RSV of the invention is capable of eliciting a protective immune response in an infected human host, yet is sufficiently attenuated so as to not cause unacceptable symptoms of severe respiratory disease in the immunized host. The attenuated virus or subviral particle may be present in a cell culture supernatant, isolated from the culture, or partially or completely purified. The virus may
10 also be lyophilized, and can be combined with a variety of other components for storage or delivery to a host, as desired.

The invention further provides novel vaccines comprising a physiologically acceptable carrier and/or adjuvant and an isolated attenuated gene position-shifted RSV. In one embodiment, the vaccine is comprised of a gene position-
15 shifted RSV having at least one, and preferably two or more attenuating mutations or other nucleotide modifications as described above. The vaccine can be formulated in a dose of 10^3 to 10^6 PFU of attenuated virus. The vaccine may comprise attenuated gene position-shifted RSV that elicits an immune response against a single RSV strain or antigenic subgroup, e.g. A or B, or against multiple RSV strains or subgroups. In this
20 regard, gene position-shifted RSV of the invention can individually elicit a monospecific immune response or a polyspecific immune response against multiple RSV strains or subgroups. Gene position-shifted RSV can be combined in vaccine formulations with other RSVs having different immunogenic characteristics for more effective protection against one or multiple RSV strains or subgroups.

25 In related aspects, the invention provides a method for stimulating the immune system of an individual to elicit an immune response against one or more strains or subgroups of RSV in a mammalian subject. The method comprises administering a formulation of an immunologically sufficient amount of an attenuated, gene position-shifted RSV in a physiologically acceptable carrier and/or adjuvant. In one embodiment,
30 the immunogenic composition is a vaccine comprised of gene position-shifted RSV having at least one, and preferably two or more attenuating mutations or other nucleotide modifications specifying a desired phenotype as described above. The vaccine can be

WO 02/00693

PCT/US01/20107

formulated in a dose of 10^3 to 10^6 PFU of attenuated virus. The vaccine may comprise attenuated gene position-shifted RSV virus that elicits an immune response against a single RSV strain or antigenic subgroup, e.g. A or B, or against multiple RSV strains or subgroups. In this context, the gene position-shifted RSV can elicit a monospecific
 5 immune response or a polyspecific immune response against multiple RSV strains or subgroups. Alternatively, gene position-shifted RSV having different immunogenic characteristics can be combined in a vaccine mixture or administered separately in a coordinated treatment protocol to elicit more effective protection against one RSV strain, or against multiple RSV strains or subgroups. Preferably the immunogenic composition
 10 is administered to the upper respiratory tract, e.g., by spray, droplet or aerosol. Often, the composition will be administered to an individual seronegative for antibodies to RSV or possessing transplacentally acquired maternal antibodies to RSV.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

15 Fig. 1. Shift of the G gene, or the F gene, or the G and F genes together, to a promoter-proximal position within the RSV genome. The diagram at the top illustrates the RSV genome designated *Blp*/ΔSH, in which the SH gene has been deleted as described previously (Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; incorporated herein by reference) and a *Blp*I restriction enzyme site has been added to the upstream
 20 noncoding region of the promoter-proximal NS1 gene. The gene-end (GE) signal of the M gene has an asterisk to indicate that it contains a single nucleotide change incorporated during deletion of the SH gene that makes it identical to the naturally-occurring SH GE signal, as described previously (Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; incorporated herein by reference). The two boxes underneath the diagram show details of
 25 the structure of genome *Blp*/ΔSH as well as modifications that were made to the promoter-proximal end (left hand box) and M-G-F-M2 region (right hand box) of the ΔSH/*Blp* genome to create genomes G1/ΔSH, F1/ΔSH and G1F2/ΔSH. All manipulations were performed with a cloned cDNA of RSV antigenomic RNA (Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; Collins et al., *Virology* 259:251-
 30 255, 1999; and Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; incorporated herein by reference), and nucleotide positions are numbered according to the complete antigenomic sequence of wild type recombinant RSV (containing the SH gene) (Collins et al., *Proc.*

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567, 1995; Murphy et al., United States Patent No. 5,993,824; each incorporated herein by reference). Note that "upstream" and "downstream" refer to the promoter-proximal and promoter-distal directions, respectively (the promoter is at the 3' leader end of negative-sense genomic RNA, which is at the left hand end as drawn in Fig. 1).

Genome *Blp/ΔSH*: nucleotides 92 and 97 of the previously-described SH-deletion mutant of RSV (Whitehead et al., J. Virol. 73:3438-3442, 1999; incorporated herein by reference) were changed from G and A (indicated in the top diagram in the left hand box with small case letters), respectively, to C and C (bold capital letters), thereby creating a *BlpI* site (underlined) one nucleotide in front of the ATG translational start codon (italicized, bold) of the NS1 open reading frame (ORF). The M-G-F region of the *Blp/ΔSH* genome (right hand box) illustrates the SH deletion (the SH gene normally lies between the M and G genes).

Genome G1/ΔSH: This genome contains the G gene in the promoter-proximal position, inserted into the *BlpI* site (left hand box). The G cDNA insert was constructed as follows: the complete G ORF and downstream G noncoding sequence and GE signal (nucleotides 4692 to 5596) were engineered to be followed by a 6-nucleotide IG sequence (representing the first 6 nucleotides of the naturally-occurring G-F IG sequence, CATATT (SEQ ID NO: 1) followed by a copy of the 10-nucleotide GS signal of the NS1 gene (boxed). This cloned sequence was flanked by *BlpI* sites, and was cloned into the *BlpI* site of genome *Blp/ΔSH*. This placed the G ORF, under the control of RSV GS and GE signals, into the promoter-proximal position. In the same genome, the G gene was deleted from its downstream position between the M and F genes (the point of deletion is indicated with a large arrow), and the M and F genes were now separated only by the G-F IG sequence.

Genome F1/ΔSH: This genome contains the F gene in the promoter-proximal position, inserted into the *BlpI* site. The F cDNA insert was constructed as follows: the complete F ORF and downstream noncoding sequence and GE signal (nucleotides 5662 to 7551) were engineered to be followed by a 6-nucleotide IG sequence (representing the first 6 nucleotides of the naturally-occurring F-M2 IG sequence, CACAAT (SEQ ID NO: 2) followed by the 10-nucleotide GS signal of the NS1 gene.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

This cloned sequence was flanked by *BlnI* sites and was cloned into the *BlnI* site of genome *BlnI*/ΔSH. This placed the F ORF, under the control of RSV GS and GE signals, into the promoter-proximal position. In the same genome, the F gene was deleted from its downstream position between the G and M2 genes (the point of deletion is indicated with a large arrow), and these two genes were now separated only by the F-M2 IG sequence.

Genome G1F2/ΔSH: This genome contains the G and F genes in the first and second promoter-proximal locations, respectively, inserted as a single cDNA into the *BlnI* site. This G-F cDNA insert was constructed to contain (in upstream to downstream order): the complete G ORF, its downstream noncoding and GE signal, the G-F IG sequence, the complete F gene, 6 nucleotides from the F-M2 IG sequence (CACAAAT) (SEQ ID NO: 2), and the NS1 GS signal. This cDNA was flanked by *BlnI* sites and was cloned into the *BlnI* site of genome *BlnI*/ΔSH. This placed the G and F genes into positions 1 and 2, respectively, relative to the promoter. In the same genome, the G and F genes were deleted from their downstream positions between the M and M2 genes (the point of deletion is indicated with a large arrow), and M and M2 genes were now separated only by the F-M2 IG sequence.

Fig. 2. Production of infectious recombinant virus during the transfection and initial passages *in vitro*. HEp-2 cells were transfected with the indicated individual antigenomic plasmid and the N, P, L and M2-1 support plasmids as described (Murphy et al., United States Patent 5,993,824). The medium supernatants were harvested 3 days later and subjected to serial undiluted passage in HEp-2 cells, with the medium supernatant harvested at 3- to 7-day intervals. Samples of each harvest were taken, flash-frozen, and analyzed later in parallel by plaque assay. The viruses were given the same designations as their respective cDNAs, i.e. *BlnI*/ΔSH, G1/ΔSH etc. Data are shown for *BlnI*/ΔSH, G1/ΔSH, F1/ΔSH and G1F2/ΔSH. Transfection was at 32°C and subsequent passages were at 37°C.

Fig. 3A Replication *in vitro* of recombinant wt RSV (containing the SH gene), and the ΔSH (not containing a *BlnI* site), *BlnI*/ΔSH, G1/ΔSH and G1F2/ΔSH mutant viruses following infection at an input multiplicity of infection (MOI) of 0.1. Replicate cultures of Vero (top panel) or HEp-2 cells (lower panel) were infected and incubated at

WO 02/00693

PCT/US01/20107

37°C. At the indicated time points, duplicate monolayers were harvested for each virus and the medium supernatants were flash-frozen. These were analyzed later in parallel by plaque assay.

- Fig. 3B depicts single-step growth of the B1p/SH, G1/SH, F1/SH and
- 5 G1F2/SH viruses following infection of Hep-2 (top) and Vero (bottom) cell monolayers at an input multiplicity of infection of 3.0. Replicate cell monolayers were infected and incubated at 37°C, and at the indicated time points duplicate monolayers were harvested and the medium supernatants were flash-frozen.

- Fig. 4. Western blot analysis of the expression of the G protein by
- 10 B1p/ΔSH, G1/ΔSH and G1F2/ΔSH viruses in Vero cells. The cells from each time point in the top panel of Fig. 3A were harvested and the total protein was analyzed by gel electrophoresis and Western blotting. The blots were developed by incubation with a rabbit antiserum specific to peptide of the G protein. Bound antibodies were then visualized by chemiluminescence. The G protein migrates as two forms: the 90 kDa
- 15 mature form and a 50 kDa incompletely-glycosylated form.

- Fig. 5. Structures of attenuated RSV's in which the G and F genes have been shifted to positions 1 and 2. Panel A: Structure of recombinant RSV G1F2/ΔNS2ΔSH, in which the SH and NS2 genes were deleted as described (Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999;
- 20 incorporated herein by reference), and the G and F genes were moved into positions 1 and 2, respectively, as described above in Fig. 1. Panel B: Structure of recombinant RSV G1F2/ΔNS1ΔNS2ΔSH, in which the SH, NS1 and NS2 genes were deleted and the G and F genes were moved into positions 1 and 2, respectively.

- Fig. 6 details construction of a chimeric rBRSV/HRSV genome in which
- 25 the BRSV G and F genes have been deleted and the G and F genes of HRSV have been placed in a promoter-proximal position. BRSV genes are shaded; HRSV genes are clear. Nucleotide sequence position numbers are relative to the complete rBRSV antigenome (Buchholz et al., *J. Virol.* 73:251-259, 1999; Buchholz et al., *J. Virol.* 74:1187-1199, 2000; GenBank accession number AF092942 or complete rHRSV antigenome in Collins
- 30 et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; each incorporated herein by reference); sequence position numbers that refer to the HRSV sequence are underlined.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Fig. 6, panel A details structure of rBRSV containing *NotI*, *SalI* and *XhoI* sites that were added in previous work (Buchholz et al., J. Virol. 73:251-259, 1999; Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000). Fig. 6, panel B depicts modifications to rBRSV to create rBRSV/A2-G1F2. The BRSV G and F genes were deleted by digestion with *SalI* and *XhoI* and religation of the resulting compatible cohesive ends. The region of the genome of HRSV from nucleotides 4692 to 7557, containing the G and F genes, was amplified by PCR using primers that contained desired changes to be incorporated into each end of the cDNA. The amplified PCR product contained (in upstream to downstream order): a *NotI* site, a *BspI* site, the complete HRSV G ORF, its downstream noncoding and GE signal, the HRSV G-F IG sequence, the complete HRSV F gene, 6 nucleotides from the HRSV F-M2 IG sequence (CACAAT), the NS1 GS signal, a *BspI* site and a *NotI* site. This cDNA was cloned into the unique *NotI* site at position 67 of rBRSV. Fig. 6, panel C illustrates structure of the genomic RNA of rBRSV/A2-G1 F2.

Fig. 7 depicts multicycle growth of RBRV, rHRSV(rA2), rBRSV/A2, and rBRSV/A2-G1 F2 in HEP-2 human (left panel) and MDBK bovine (right panel) cells. Duplicate cell monolayers were infected with the indicated virus at an MOI of 0.1 and incubated at 37°C, and medium aliquots were harvested at the indicated times, flash frozen, stored at -70°C and titrated later in duplicate. Each value is the mean titer of two wells.

Fig. 8 shows indirect immunofluorescence of HEP-2 cells infected with rBRSV/A2-G1F2, rBRSV/A2, or rA2. Cells were infected at an MOI of 0.1, incubated at 37°C for 96 hours, fixed with acetone, permeabilized and reacted with monoclonal antibody 021/1G, specific to the G protein of HRSV, or with monoclonal antibody 44F, specific to the F protein of HRSV. Antibody binding was visualized by reaction with a tagged antibody specific to murine IgG.

Fig. 9 details construction of a chimeric rBRSV/HRSV containing the M, G and F genes of HRSV. BRSV genes are shaded; HRSV genes are clear. Sequence position numbers that refer to HRSV genes are underlined. Fig. 9, panel A depicts modification of rBRSV/A2 to contain a unique *MluI* site at position 3204, within the intergenic region between the P and M genes (P-M IG). The sequence of the IG is shown, with small case letters indicating the original nucleotide assignments. The underlined letters indicate the *MluI* site created by the 5 nucleotide substitutions.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Nucleotide sequence position numbers are relative to the complete rBRSV antigenome (Buchholz et al., *J. Virol.* 73:251-259, 1999; Buchholz et al., *J. Virol.* 74:1187-1199, 2000; GenBank accession number AF092942 or complete rHRSV antigenome in Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995); sequence position numbers that refer to the HRSV sequence are underlined. Fig. 9, panel B illustrates modification of rBRSV/A2 to create rBRSV/A2-MGF. The *MluI-SalI* fragment containing the BRSV M and SH genes was excised and replaced with an *MluI-SalI* fragment containing the HRSV M gene. The *MluI-SalI* fragment containing the HRSV M gene is shown in the box. Also shown is the sequence immediately upstream of the *MluI* site, including the BRSV P gene-end sequence, and the sequence immediately downstream of the *SalI* site, including the intergenic sequence between the M and G genes (M-G IG), the HRSV G gene-start signal, and the ATG (bold, italics) that begins the G ORF. Fig., 9, panel C depicts the structure of the genome of rBRSV/A2-MGF.

Fig. 10 depicts the structures of the genomes of recombinant BRSV (rBRSV, top) and five BRSV/HRSV chimeric viruses in which specific BRSV genes (shaded rectangles) were replaced with their HRSV counterparts (open rectangles). In addition, in the bottom two viruses the G and F genes were moved from their normal positions to positions 3 and 4 or 1 and 2. In the diagram of rBRSV, several restriction sites are indicated. Restriction sites used in the various constructions are indicated: the KpnI site occurs naturally and the others were introduced as necessary (Buchholz, *et al.*, *J. Virol.* 73:251-9, 1999; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.* 74:1187-1199, 2000, each incorporated herein by reference).

Fig. 11 depicts multicycle growth of the BRSV/HRSV chimeric viruses rBRSV/A2-G3F4 (top panel) and HEx (bottom panel) compared to rHRSV (rA2) and rBRSV parental viruses as well as the previously-described chimeric viruses rBRSV/A2-GF (previously called rBRSV/A2; Buchholz, 2000, *supra*) and rBRSV/A2-G1F2. Monolayer cultures of Vero cells were infected at an input multiplicity of infection of 0.1 and incubated at 37°C. Samples from the overlying medium were harvested at the indicated times and virus titers were determined by the limiting dilution method. To 0.1 ml of serial 10-fold virus dilutions per well, 104 BHK-21 cells were added in a 0.1 ml volume. After 48 hours, cells were fixed in 80% acetone, and an indirect immunofluorescence assay using an antibody specific to the BRSV M protein, cross-

WO 02/00693

PCT/US01/20107

reactive with the HRSV M protein, was done, and foci of infected cells were counted (see, Buchholz et al., *J. Virol.* 73:251-9, 1999 (incorporated herein by reference).

Fig. 12 compares the size of the plaque or focus formed by the indicated viruses on human HEP-2 cells (top panel) versus bovine MDBK cells (bottom panel), expressed as a percentage compared to HRSV (HEP-2 cells) or BRSV (MDBK cells).

Fig. 13A and 13B depict the structures of the genomes of recombinant BRSV in which the N and/or P genes were replaced by their HRSV counterparts. Fig. 13A shows chimeras in which these substitutions were made in the rBRSV backbone, and Fig. 13B shows chimeras in which the backbone was the rBRSV/A2-NS1+2 virus.

Fig. 14 Diagram of the genomic RNA of the recombinant rRSV/6120 virus containing a deletion in the SH gene, drawn as the negative sense RNA, 3' to 5', with each encoded mRNA indicated with a rectangle and non mRNA-coding extragenic and intergenic regions as a horizontal line. The parent RSV antigenomic cDNA was as described previously (Collins, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995), with the further modification of an XmaI site in the G-F intergenic region (Bukreyev, et al., *J. Virol.* 70:6634-6641, 1996, incorporated herein by reference). This cDNA was modified (i) to contain five translationally-silent nucleotide substitutions in the last four codons of the SH ORF including the translational stop codon and (ii) to delete 112 nucleotides (positions 4499-4610) of the complete antigenomic sequence from the downstream non-translated region of the SH gene (box). The XhoI and PacI sites used in the construction are italicized and labeled, the SH gene-end signal is underlined, the SH codons are shown as triplets, nucleotide substitutions are in small case, and the deleted sequence is represented with a box with the sequence positions indicated.

Fig.s 15A-15B Growth kinetics of rRSV/6120, containing a deletion in the SH gene, compared to its full length recombinant rRSV parent D53. Three sets (Fig. 15A, Fig. 15B and Fig 15C) of monolayer cultures of HEP-2 cells were infected with the indicated virus at an input multiplicity of infection of 0.005. Following an adsorption period, cells were incubated at 37°C. At 12 h intervals, the medium was harvested in its entirety and aliquots were flash-frozen for later titration. The cells were washed three times and fresh medium was added and the incubation continued. At the end of the experiment, the samples were analyzed by plaque assay to determine virus titer.

DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS

The present invention provides recombinant respiratory syncytial viruses (RSVs) which are modified by shifting a gene order or spatial position of one or more genes within a recombinant RSV genome or antigenome to generate a vaccine virus that is infectious and attenuated in humans and other mammals. Typically, the recombinant RSV genome or antigenome is modified by repositioning one or more "shifted" genes or gene segments, directly or indirectly via introduction, deletion or rearrangement of a second, "displacement polynucleotide" within the genome, resulting in a positional shift of the subject "shifted" gene or genome segment to a more promoter-proximal or promoter-distal position. Shifting of gene or genome segment positions in this context is determined to a position of the subject gene or genome segment in a parent RSV genome or antigenome prior to introduction of the gene shift, for example relative to the position of the subject gene or genome segment in a wild type RSV genome or antigenome (e.g., HRSV A2 or BRSV kansas strains) or in a parental recombinant RSV genome or antigenome as disclosed herein, prior to the gene shift.

In certain aspects of the invention, the gene position-shifted RSV features one or more shifted genes or genome segments that are shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position by insertion, deletion, or rearrangement of one or more displacement polynucleotides within the partial or complete recombinant RSV genome or antigenome. The displacement polynucleotides may comprise an RSV gene or genome segment, including an RSV gene or genome segment from a different or "heterologous" RSV (e.g., in the case of a heterologous gene or genome segment inserted into genome or antigenome of a different RSV). Alternatively, the displacement polynucleotides may be from a non-RSV source, including from a non-RSV pathogen such as parainfluenza virus (PIV) or measles virus. The displacement polynucleotides may encode a protein or a portion of a protein, such an immunogenic domain or epitope of a glycoprotein, or they may represent an incomplete or impaired coding sequence, including non-coding and nonsense polynucleotide sequences.

In certain aspects of the invention, the recombinant RSV features one or more positionally shifted genes or genome segments that may be shifted to a more

WO 02/00693

PCT/US01/20107

promoter-proximal or promoter-distal position by insertion, deletion, or rearrangement of one or more displacement polynucleotides within the partial or complete recombinant RSV genome or antigenome. In certain aspects, the displacement polynucleotides are RSV genes or genome segments. In other aspects, displacement polynucleotides lack a complete open reading frame (ORF). Within more detailed embodiments, displacement polynucleotides comprise polynucleotide inserts of between 150 nucleotides (nts) and 4,000 nucleotides in length. Displacement polynucleotides may be inserted or rearranged into a non-coding region (NCR) of the recombinant genome or antigenome, or may be incorporated in the recombinant RSV genome or antigenome as a separate gene unit (GU).

Gene position shifts within the recombinant RSV of the invention are typically determined relative to the genome or antigenome "promoter". The RSV promoter contains the polymerase initiation site, which is a conserved sequence element recognized by the polymerase. The promoter is located at the 3' end of the genome or antigenome, within approximately the thirty 3'-terminal nucleotides. In the case of the RSV genome, the promoter directs both transcription and replication. However, the antigenome "promoter" which lacks transcription signals and only naturally controls replication can be modified to direct transcription by insertion of known transcription signals. For the purposes of describing the invention, the RSV promoter is thus construed to reside at the 3' end of either the genome or antigenome, whereby the terms "promoter-proximal" and "promoter-distal" used herein alternately refer to a direction toward, or away from, respectively, the 3' end of the genome or antigenome.

Thus provided within the invention are isolated polynucleotide molecules, vectors (expression constructs), and recombinant viruses incorporating a recombinant RSV genome or antigenome—wherein one or more genes or gene segments is/are shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position within the recombinant genome or antigenome compared to a parental or wild type position of the gene in the RSV gene map. Shifting the position of genes in this manner provides for a selected increase or decrease in expression of one or more positionally "shifted" genes, depending on the nature and degree of the positional shift. In one embodiment, RSV glycoproteins are upregulated by shifting one or more glycoprotein-encoding genes to a more promoter-proximal position. Genes of interest for manipulation to create gene position-shifted RSV

WO 02/00693

PCT/US01/20107

include any of the NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F or G genes or a genome segment that may be part of a gene or extragenic. A variety of additional mutations and nucleotide modifications are provided within the gene position-shifted RSV of the invention to yield desired phenotypic and structural effects.

5 The recombinant construction of human-bovine RSV yields a viral particle or subviral particle that is infectious in mammals, particularly humans, and useful for generating immunogenic compositions for clinical use. Also provided within the invention are novel methods and compositions for designing and producing attenuated, gene position-shifted RSV, as well as methods and compositions for the prophylaxis and
10 treatment of RSV infection. Gene position-shifted RSV and immunogenic compositions according to the invention may elicit an immune response to a specific RSV subgroup or strain, or they may elicit a polyspecific response against multiple RSV subgroups or strains. Gene position-shifted RSV of the invention are thus infectious and attenuated in humans and other mammals. In related aspects, the invention provides novel methods for
15 designing and producing attenuated, gene position-shifted RSV that are useful in various compositions to generate a desired immune response against RSV in a host susceptible to RSV infection. Included within these aspects of the invention are novel, isolated polynucleotide molecules, vectors, and infected cells incorporating such molecules that comprise a gene position-shifted RSV genome or antigenome. Gene position-shifted
20 RSV according to the invention may elicit an immune response to a specific RSV subgroup or strain, or a polyspecific response against multiple RSV subgroups or strains. Yet additional compositions and methods are provided for designing and producing attenuated, gene position-shifted RSV as vectors for incorporating antigenic determinants of other pathogens to generate a desired immune response against different pathogens of
25 interest. Also provided within the invention are methods and compositions incorporating gene position-shifted RSV for prophylaxis and treatment of infection and disease caused by RSV and other pathogens.

 The present invention culminates and supplements a continuing line of discovery founded upon the recent advent and refinement of methods for producing
30 infectious recombinant RSV from cDNA. Based upon this work, it has been possible to directly investigate the roles of RNA and protein structures in RSV gene expression and replication. These investigations are described or reported in U.S. Provisional Patent

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- Application No. 60/007,083, filed September 27, 1995; U.S. Patent Application No. 08/720,132, filed September 27, 1996; U.S. Provisional Patent Application No. 60/021,773, filed July 15, 1996; U.S. Provisional Patent Application No. 60/046,141, filed May 9, 1997; U.S. Provisional Patent Application No. 60/047,634, filed May 23, 1997; U.S. Patent No. 5,993,824, issued November 30, 1999 (corresponding to International Publication No. WO 98/02530); U.S. Patent Application No. 09/291,894, filed by Collins et al. on April 13, 1999; U.S. Provisional Patent Application No. 60/129,006, filed by Murphy et al. on April 13, 1999; Crowe et al., Vaccine 12: 691-699, 1994; and Crowe et al., Vaccine 12: 783-790, 1994; Collins, et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, et al., J Virol 70:6634-41, 1996; Juhasz et al., J. Virol. 71(8):5814-5819, 1997; Durbin et al., Virology 235:323-332, 1997; Karron et al., J. Infect. Dis. 176:1428-1436, 1997; He et al. Virology 237:249-260, 1997; Baron et al. J. Virol. 71:1265-1271, 1997; Whitehead et al., Virology 247(2):232-9, 1998a; Whitehead et al., J. Virol. 72(5):4467-4471, 1998b; Jin et al. Virology 251:206-214, 1998; Bukreyev, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:2367-2372, 1999; Bermingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11259-11264, 1999 Juhasz et al., Vaccine 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., J. Virol. 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, J. Virol. 73:466-473, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:9773-9780, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:871-877, 1999; and Whitehead et al., J. Virol. 73:3438-3442, 1999, Jin, et al., Virology, 273:210-8, 2000; Jin, et al., J. Virol., 74:74-82, 2000; Teng, et al., J. Virol. 74:9317-21, 2000, each of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes).

- With regard to gene position-shifted RSV of the invention, a number of the foregoing incorporated disclosures have focused on modification of the naturally-occurring gene order in RSV. For example, each of the NS1, NS2, SH and G genes have been successfully deleted individually in infectious RSV recombinants, thereby shifting the position of downstream genes relative to the viral promoter. In other recombinants within the invention, the NS1 and NS2 gene were deleted together, shifting the remaining genes in promoter-proximal direction within the recombinant RSV genome or antigenome. For example, when NS1 and NS2 are deleted together, N is moved from position 3 to position 1, P from position 4 to position 2, and so on. Deletion of any other RSV gene within alternate embodiments of the invention will similarly shift the position (relative to the promoter) of those genes which are located further downstream. For example, SH occupies position 6 in wild type virus, and its deletion does not affect M at

WO 02/00693

PCT/US01/20107

position 5 (or any other upstream gene) but moves G from position 7 to 6 relative to the promoter. It should be noted that gene deletion also can occur (rarely) in a biologically-derived mutant virus (Karron et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13961-13966, 1997; incorporated herein by reference). Note that "upstream" and "downstream" refer to the
 5 promoter-proximal and promoter-distal directions, respectively (the promoter is at the 3' leader end of negative-sense genomic RNA).

Gene order shifting modifications (i.e., positional modifications moving one or more genes to a more promoter-proximal or promoter-distal location in the recombinant viral genome) with gene position-shifted RSV of the invention result in
 10 viruses with altered biological properties. For example, RSV lacking NS1, NS2, SH, G, NS1 and NS2 together, or SH and G together, have been shown to be attenuated *in vitro*, *in vivo*, or both. It is likely that this phenotype was due primarily to the loss of expression of the specific viral protein. However, the altered gene map also likely contributed to the observed phenotype. This effect is well-illustrated by the SH-deletion virus, which grew
 15 more efficiently than wild type in some cell types, probably due to an increase in the efficiency of transcription, replication or both resulting from the gene deletion and resulting change in gene order and possibly genome size. In other viruses, such as RSV in which NS1 and/or NS2 were deleted, altered growth that might have occurred due to the change in gene order likely was obscured by the more dominant phenotype due to the
 20 loss of expression of the RSV protein(s).

Yet additional changes have been successfully introduced to change the gene order of RSV to improve its properties as a live-attenuated vaccine. In specific examples demonstrating efficacy of the invention, the RSV G and F genes were shifted, singly and in tandem, to a more promoter-proximal position relative to their wild-type
 25 gene order. These two proteins normally occupy positions 7 (G) and 8 (F) in the RSV gene order (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L). In order to increase the possibility of successful recovery, these positional manipulations of G and F were performed in a version of RSV in which the SH gene had been deleted (see, e.g., Whitehead et al., J. Virol., 73:3438-42 (1999), incorporated herein by reference). This facilitates viral
 30 recovery because this virus makes larger plaques *in vitro* (Bukreyev et al., J. Virol., 71:8973-82, 1997, incorporated herein by reference). G and F were then moved individually to position 1, or were moved together to positions 1 and 2, respectively.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Surprisingly, recombinant RSV were readily recovered in which G or F were moved to position 1, or in which G and F were moved to positions 1 and 2, respectively. This result differed greatly from previous reported studies with vesicular stomatitis virus (VSV), where movement of the single VSV glycoprotein gene by only two positions was very deleterious to virus growth (Ball et al., *J. Virol.* 73:4705-4712, 1999, incorporated herein by reference). The ability to recover these altered viruses also was surprising because RSV replicates inefficiently and because RSV has a complex gene order and movement of the glycoprotein genes involved a large number of position changes. Indeed, the rearranged RSV's grew at least as well as their immediate parent having the wild type order of genes. As indicated above, this is particularly important for RSV, since the wild type virus grows inefficiently in cell culture and a further reduction in replication *in vitro* would likely render vaccine preparation unfeasible. Thus, it is remarkable that all of the NS1-NS2-N-P-M proteins could be displaced by one or two positions relative to the promoter without a significant decrease in growth fitness. In addition, examination of the expression of the G glycoprotein showed that it was increased up to several-fold over that of its parent virus. This indicated that a vaccine virus containing G and/or F in the first position expresses a higher molar amount of these protective antigens compared to the other viral proteins, and thus represent a virus with desired vaccine properties.

Similarly extensive modifications in gene order also were achieved with two highly attenuated RSV vaccine candidates in which the NS2 gene was deleted on its own, or in which the NS1 and NS2 genes were deleted together, as described in more detail in the above-incorporated references. In these two vaccine candidates, the G and F glycoproteins were moved together to positions 1 and 2 respectively, and the G, F and SH glycoproteins were deleted from their original downstream position. Thus, the recovered viruses G1F2ΔNS2ΔSH and G1F2/ΔNS1ΔNS2ΔSH had two and three genes deleted respectively in addition to the shift of the G and F genes. To illustrate the extent of the changes involved, the gene orders of wild type RSV (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L) and the G1F2/ΔNS2ΔSH virus (G-F-NS1-N-P-M-M2-L) or the ΔNS1ΔNS2ΔSH (G-F-N-P-M-M2-L) can be compared. This shows that the positions of most or all of the genes relative to the promoter were changed. Nonetheless, these highly attenuated derivatives retained the capacity to be grown in cell culture.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- Yet additional changes have been successfully introduced to change the gene order of RSV in a human-bovine chimeric RSV to improve its properties as a live-attenuated vaccine (See, U.S. Patent Application Serial No. 09/602,212, filed by Buchholz et al. on June 23, 2000, its corresponding PCT application published as WO 01/04335 on January 18, 2001, and its priority provisional U.S. Application No. 60/143,132 filed on July 9, 1999, each incorporated herein by reference). As illustrated in the examples below, an infectious recombinant human-bovine chimeric RSV (rBRSV/HRSV) was successfully constructed and recovered in which the HRSV G and F genes are substituted into a recombinant bovine RSV (rBRSV) background. The resulting human-bovine chimera contains two genes of HRSV, namely G and F, and eight genes from BRSV, namely NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 and L. In addition to this basic substituted glycoprotein construction, the HRSV G and F genes are shifted to a more promoter-proximal position in the rBRSV backbone, i.e., relative to the wild-type gene order position of the F and G genes in the RSV genome. More specifically, the F and G genes were moved from their usual location relative to the promoter, namely gene positions 7 and 8, respectively, to positions 1 and 2, respectively. The resulting chimeric recombinant virus, rBRSV/A2-G1F2, is very similar in its levels of F and G protein expression as detected by immunofluorescence to that of wt HRSV, which result is interpreted to show increased expression of the G and F glycoproteins attributed to the promoter-proximal shift of the genes. Since the present rBRSV/A2-G1F2 virus bears the same constellation of BRSV genes in its genetic background, it is likely to share this strong host range restriction phenotype. In this context, the increased expression of the two protective antigens *in vivo* will increase the immunogenicity of this virus to produce highly desirable vaccine properties.
- RSV is a nonsegmented negative strand RNA virus of Order *Mononegavirales*. The mononegaviruses constitute a large and diverse Order that includes four families: Family *Rhabdoviridae*, represented by vesicular stomatitis virus (VSV) and rabies virus; Family *Bornaviridae*, represented by borna disease virus; Family *Filoviridae*, represented by Marburg and Ebola viruses, and Family *Paramyxoviridae*. This latter family is further divided into two subfamilies: *Paramyxovirinae*, which includes Sendai, measles, mumps and parainfluenza viruses, and *Pneumovirinae*, which includes respiratory syncytial virus.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

The genome of a mononegavirus is a single strand of RNA that contains from 5 (VSV) to 11 (RSV) genes arranged in a linear array. The mononegavirus genome does not encode protein directly (hence the designation "negative sense"), but rather encodes complementary positive-sense mRNAs that each encode one or more proteins.

- 5 Typically, a gene begins with a short gene-start signal and ends with a short gene-end signal. These signals usually consist of 8 to 12 nucleotides and usually are highly conserved between genes of a given virus and to a lesser extent between related viruses.

In the case of RSV, the genome is more than 15.2 kb in length and is transcribed into 10 separate major mRNAs that encode 11 identified proteins.

- 10 Specifically, the RSV gene order is 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', and the M2 mRNA encodes two proteins, M2-1 and M2-2 from overlapping ORFs. The gene-start and gene-end signals of RSV, together with sequences involved in RNA replication and in promoter function, also have been identified and analyzed in ongoing work (Bukreyev et al., *J. Virol.* 70:6634-6641, 1996; Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9663-9667, 1991; Mink et al., *Virology* 185:615-624, 1991; Grosfeld et al., *J. Virol.* 69:5677-5686, 1995; Hardy and Wertz, *J. Virol.* 72:520-526, 1998; Hardy et al., *J. Virol.* 73:170-176, 1999; Kuo et al., *J. Virol.* 70:6143-6150, 1996; Kuo et al., *J. Virol.* 70:6892-6901, 1996; Samal and Collins, *J. Virol.* 70:5075-5082, 1996; Kuo et al., *J. Virol.* 71:4944-4953, 1997; Fearn and Collins, *J. Virol.* 73:388-397, 1999; each incorporated herein by reference).
- 20

- The 3' end of a mononegavirus genome contains a promoter that directs entry of the polymerase (Lamb and Kolakofsky, *Fields Virology*, 1:1177-1204, 1996; and Wagner and Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; each incorporated herein by reference). This promoter is contained completely or in part in an extragenic leader region at the 3' end of the genome. The polymerase then transcribes the genome 3'-to-5' in a linear, stop-restart manner guided by the gene-start and gene-end signals. The gene-start signal of each gene directs initiation of the synthesis of the corresponding mRNA and the gene-end signal directs polyadenylation, termination and release of the corresponding mRNA. The polymerase then remains template-bound and reinitiates at the next downstream gene-start signal. This process is repeated to transcribe one gene after another in their 3'-to-5' order (Lamb and Kolakofsky, *Fields Virology* 1:1177-1204, 1996; Wagner and Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Abraham and Banerjee, *Proc.*
- 25
- 30

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Natl. Acad. Sci. USA 73:1504-1508, 1976; Ball and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:442-446, 1976; Ball, J. Virol. 21:411-414, 1977; Banerjee et al., J. Gen. Virol. 34:1-8, 1977; Iverson and Rose, Cell 23:477-484, 1981; Iverson and Rose, J. Virol. 44:356-365, 1982; Banerjee et al., Pharmacol. Ther. 51:47-70, 1991; each incorporated herein by reference).

Four of the RSV proteins enumerated above are nucleocapsid/polymerase proteins, namely the major nucleocapsid N protein, the phosphoprotein P, and polymerase protein L, and the transcription antitermination protein M2-1. Three are surface glycoproteins, namely the attachment G protein, the fusion F glycoprotein responsible for penetration and syncytium formation, and the small hydrophobic SH protein of unknown function. The matrix M protein is an internal virion protein involved in virion formation. There are two nonstructural proteins NS1 and NS2 of unknown function. Finally, there is a second open reading frame (ORF) in the M2 mRNA which encodes an RNA regulatory factor M2-2.

The G and F proteins are the major neutralization and protective antigens (Collins, et al., Fields Virology 2:1313-1352, 1996; Connors, et al., J. Virol. 66:1277-81, 1992). Resistance to reinfection by RSV is largely mediated by serum and mucosal antibodies specific against these proteins. RSV-specific cytotoxic T cells are also induced by RSV infection and can be directed against a number of different proteins, but this effector has not yet been shown to be an important contributor to long term resistance to reinfection. However, both CD8+ and CD4+ cells can be important in regulating the immune response, and both may be involved in viral pathogenesis (Johnson, et al., J. Virol. 72:2871-80, 1998; Srikiatkachorn and Braciale, J. Exp. Med. 186:421-32, 1997). Thus, F and G are the most important antigenic determinants, but other proteins can also play important roles in the immune response.

RSV isolates can be segregated into two antigenic subgroups, A and B, by reactivity with monoclonal antibodies (Anderson, et al., J. Infect. Dis. 151:626-33, 1985; Mufson, et al., J. Gen. Virol. 66:2111-24, 1985). The two subgroups exhibit differences across the genome, but are the most divergent in the ectodomain of the G protein where the percent amino acid sequence divergence can exceed 50% and the antigenic divergence is 95% based on reactivity of monospecific polyclonal antisera (Johnson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5625-9, 1987; Johnson, et al., J. Virol. 61:3163-6, 1987). The F

WO 02/00693

PCT/US01/20107

protein is approximately 10% divergent by amino acid sequence and 50% divergent antigenically between RSV A and B subgroups (Johnson, et al., *J. Virol.* 61:3163-6, 1987; Johnson and Collins, *J. Gen. Virol.* 69:2623-8, 1988). Thus, both subgroups should be represented in a vaccine.

- 5 RSV and other mononegaviruses have been reported to exhibit a gradient of decreasing gene transcription, such that the most promoter-proximal gene is transcribed the most efficiently, and each gene thereafter displays an incrementally-decreasing efficiency of transcription (Lamb and Kolakofsky, *Fields Virology*, 1:1177-1204, 1996; Wagner and Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Abraham and
- 10 Banerjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1504-1508, 1976; Ball and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:442-446, 1976; Ball, *J. Virol.* 21:411-414, 1977; Banerjee et al., *J. Gen. Virol.* 34:1-8, 1977; Iverson and Rose, *Cell* 23:477-484, 1981; Iverson and Rose, *J. Virol.* 44:356-365, 1982; Banerjee et al., *Pharmacol. Ther.* 51:47-70, 1991; each incorporated herein by reference). This gradient of gene expression has been reported
- 15 and partially characterized for RSV (Collins and Wertz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3208-3212, 1983; Collins et al., *J. Virol.* 49:572-578, 1984; Dickens et al., *J. Virol.* 52:364-369, 1984; each incorporated herein by reference). This gradient is thought to be partially attributed to "fall-off" of the polymerase during sequential transcription. Studies with the rhabdovirus VSV, one of the simplest of the mononegaviruses, suggest that fall-
- 20 off occurs primarily at the intergenic regions (Iverson and Rose, *Cell* 23:477-484, 1981; Iverson and Rose, *J. Virol.* 44:356-365, 1982; each incorporated herein by reference), although the disproportionately low abundance of the large L mRNA suggests that there also is significant fall-off within genes.

- The gradient of gene transcription reported among mononegaviruses is
- 25 thought to be a major factor that determines the relative molar ratios of the various viral mRNAs within an infected cell. This phenomenon in turn is thought to be a major factor determining the relative molar ratios of viral proteins. All mononegaviruses have genes encoding the following five proteins or counterparts thereof: an RNA-binding nucleocapsid protein N, a phosphoprotein P, an internal virion matrix protein M, an
- 30 attachment protein G, HA, or HN, and a large polymerase protein L. Furthermore, these are always found in the 3'-to-5' order N-P-M-G-L. One interpretation is that this genomic organization reflects a common need among the mononegaviruses for large

WO 02/00693

PCT/US01/20107

amounts of the N and P proteins, a small amount of L, and intermediate amounts of M and G. Alternatively, it has been suggested that the lack of homologous recombination in mononegaviruses has resulted in the retention of an ancestral gene order that is not necessarily optimal for the virus (Ball et al., *J. Virol.*, **73**:4705-4712, 1999; incorporated
5 herein by reference).

The constrained gene order and polar nature of transcription has been proposed as an important factor in the regulation of gene expression among mononegaviruses. However, other secondary factors are also believed to affect the relative levels of expression of one or more of the mononegaviral proteins, including
10 differences in the efficiencies of cis-acting RNA signals, differences in efficiencies of translation of various mRNAs, and differences in processing and stability of proteins.

The simple, prototypic mononegavirus, VSV, has 5 genes (Wagner and Rose, *Fields Virology*, 1121-1136, 1996; Schubert et al., *J. Virol.*, **51**:505-514, 1984; each incorporated herein by reference). However, other mononegaviruses have as many as 11
15 (RSV) or 12 (pneumonia virus of mice) genes (Barr et al., *J. Virol.*, **68**:5330-5334, 1994; incorporated herein by reference). These include proteins such as the fusion F gene found in all paramyxoviruses and pneumoviruses, the C, D and V genes found in some paramyxoviruses, and the NS1, NS2, SH and M2 genes found in most pneumoviruses. Also, even among the five proteins that may be common to VSV and RSV (N, P, M, G
20 and L), there is clear sequence relatedness only for L, and that relatedness is low (Poch et al., *Embo. J.*, **8**:3867-3674, 1989; Stec et al., *Virology* **183**:273-287, 1991; each incorporated herein by reference).

Given this extensive difference in the array and structure of gene products, taken together with differences in the structure and function of trans- and cis-acting
25 components, the features and properties of one mononegavirus, e.g., VSV, cannot be directly extrapolated to other mononegaviruses, such as RSV. This uncertainty is exemplified by the finding that the RSV polymerase consists of 4 rather than 3 proteins, with the additional one being the M2-1 transcription antitermination factor that has no counterpart in VSV (Hardy and Wertz, *J. Virol.*, **72**:520-526, 1998; Hardy et al., *J. Virol.*,
30 **73**:170-176, 1999; Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:81-85, 1996; Fearn and Collins, *J. Virol.*, **73**:5852-5864, 1999; each incorporated herein by reference). This proved to be critical for the efficient recovery of recombinant RSV (Collins et al.,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Virology 259:251-255, 1999; incorporated herein by reference). In addition, RSV RNA synthesis is further regulated by at least two proteins, NS1 and M2-2, which do not have counterparts in VSV (Bermingham and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11259-64, 1999; Whitehead et al., J. Virol. 73:3438-3442, 1999; Atreya et al., J. Virol. 72:1452-61, 1998; Jin et al., J. Virol. 74:74-82, 2000; each incorporated herein by reference).

A number of important features of VSV gene expression and regulation also do not appear to have any relevance to many other mononegaviruses and in particular to RSV, such as the involvement of terminal complementarity in control of VSV gene expression (Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8587-8591, 1994; Whelan and Wertz, J. Virol. 73:297-306, 1999; Peeples and Collins, J. Virol. 74:146-155, 2000; each incorporated herein by reference), the highly conserved VSV intergenic regions that are directly involved in gene expression (Barr et al., J. Virol. 71:1794-1801, 1997; incorporated herein by reference) whereas those of RSV are not (Kuo et al., J. Virol. 70:6143-6150, 1996; incorporated herein by reference), a VSV genomic packaging signal (Whelan and Wertz, J. Virol. 73:307-315, 1999; incorporated herein by reference) not found in other mononegavirus groups, and a control of VSV gene expression and replication by N protein (Wagner and Rose, Fields Virology, 1121-1136, 1996; Fearn et al., Virology 236:188-201, 1997; incorporated herein by reference). These features do not appear to occur in RSV (Peeples and Collins, J. Virol. 74:146-155, 2000; incorporated herein by reference), while in contrast RSV has important features of gene expression and regulation that do not occur in VSV, including divergent intergenic sequences that lack cis-acting functional elements (Kuo et al., J. Virol. 70:6143-6150, 1996; incorporated herein by reference), a gene overlap that mediates site-specific attenuation (Fearn and Collins, J. Virol. 73:388-397, 1999; Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5134-5138, 1987; incorporated herein by reference), and the existence of a polymerase backtracking mechanism critical for expression of the L gene (Fearn and Collins, J. Virol. 73:388-397, 1999; incorporated herein by reference). In particular, the existence of a transcription antitermination factor that modulates sequential transcription (Fearn and Collins, J. Virol. 73:5852-5864, 1999; incorporated herein by reference), specific regulatory proteins, site-specific attenuation, and gene-junction-specific modulation of transcription (Hardy et al., J. Virol. 73:170-176, 1999; incorporated herein by reference) contrast sharply with the situation with VSV.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In certain embodiments of the invention, gene position shifts are achieved by deletion of one or more of the RSV NS1, NS2, SH and/or G genes, which deletions are disclosed individually in the above-incorporated references. Alternative gene or genome segment deletions can be constructed involving any of the above identified RSV genes or
 5 genome segments, to alter gene position for remaining RSV genes. In more detailed embodiments, multiple genes or genome segments are deleted, as exemplified in the above-incorporated references by pairwise deletion of the NS1 and NS2 genes (Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; incorporated herein by reference).

10 Deletion of one or more genes or genome segments within a recombinant RSV genome or antigenome has the effect of moving all downstream genes closer to the promoter (e.g., by shifting the downstream genes one or more gene positions in a promoter-proximal direction). For example, the RSV NS1 and NS2 genes are the first and second genes in the genome map, and their coordinate deletion alters the position of
 15 all of the remaining genes. Thus, when NS1 and NS2 are deleted together, N is moved from position 3 to position 1, P from position 4 to position 2, and so on. Alternatively, deletion of any other gene within the gene order will affect the position (relative to the promoter) only of those genes which are located even further downstream. For example, SH occupies position 6 in wild type virus, and its deletion does not affect M at position 5
 20 (or any other upstream gene) but moves G from position 7 to 6 relative to the promoter. It should be noted that gene deletion also can occur (rarely) in biologically-derived virus. For example, a subgroup B RSV that had been passaged extensively in cell culture spontaneously deleted the SH and G genes (Karron et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13961-13966, 1997; incorporated herein by reference). Note that "upstream" and
 25 "downstream" refer to the promoter-proximal and promoter-distal directions, respectively (the promoter is at the 3' leader end of negative-sense genomic RNA).

A second example of gene order rearrangement useful within the invention involves the insertion of a gene, genome segment or heterologous polynucleotide sequence into the recombinant RSV genome or antigenome to alter gene order or
 30 introduce a promoter-relative gene position shift in the recombinant genome or antigenome (see, e.g., Bukreyev et al., *J. Virol.* 70:6634-6641, 1996; Bukreyev et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2367-2372, 1999; Moriya et al., *FEBS Lett.* 425:105-111,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

1998; Singh and Billeter, J. Gen. Virol. 80:101-106, 1999; incorporated herein by reference). Each inserted gene displaces all downstream genes by one position relative to the promoter. These and other displacement polynucleotides may be inserted or rearranged into a non-coding region (NCR) of the recombinant genome or antigenome, or
 5 may be incorporated in the recombinant RSV genome or antigenome as a separate gene unit (GU).

As used herein, "RSV gene" generally refers to a portion of the RSV genome encoding an mRNA and typically begins at the upstream end with the 10-nucleotide gene-start (GS) signal and ends at the downstream end with the 12 to 13-nucleotide gene-end (GE) signal. Ten such genes for use within the invention are known for RSV, namely NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 and L. The term "gene" is also used herein to refer to a "translational open reading frame" (ORF). ORF is more specifically defined as a translational open reading frame encoding a significant RSV protein, of which 11 are currently recognized: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1 (alternatively,
 15 M2(ORF1)), M2-2 (alternatively, M2(ORF2)), and L. Thus, the term "gene" interchangeably refers to a genomic RNA sequence that encodes a subgenomic RNA, and to a ORF (the latter term applies particularly in a situation such as in the case of the RSV M2 gene, where a single mRNA contains two overlapping ORFs that encode distinct proteins). Collins et al., J. Gen. Virol. 71:3015-3020, 1990; Bermingham and Collins,
 20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11259-11264, 1999; Ahmadian et al., EMBO J. 19:2681-2689, 2000; Jin et al., J. Virol. 74:74-82, 2000 (each incorporated herein by reference). When the term "gene" is used in the context of determining gene position relative to a promoter position, the term ordinarily refers strictly to an mRNA-encoding sequence bordered by transcription gene-start and gene-end signal motifs (Collins et al., Proc. Natl.
 25 Acad. Sci. USA 83:4594-4598, 1986; Kuo et al., J. Virol. 70:6892-6901, 1996; each incorporated herein by reference).

By "genome segment" is meant any length of continuous nucleotides from the RSV genome, which may be part of an ORF, a gene, or an extragenic region, or a combination thereof.

30 Genes and genome segments that may be selected for use as inserts, substitutions, deleted elements, or rearranged elements within gene position-shifted RSV of the invention include genes or genome segments encoding a NS1, NS2, N, P, M, SH,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

M2(ORF1), M2(ORF2), L, F or G protein or portion thereof. Regulatory regions, such as the extragenic leader or trailer regions, can also be considered. In preferred embodiments of the invention, chimeric RSV incorporates one or more heterologous gene(s) that encode an RSV F, G or SH glycoprotein. Alternatively, the recombinant RSV may

5 incorporate a genome segment encoding a cytoplasmic domain, transmembrane domain, ectodomain or immunogenic epitope of a RSV F, G or SH glycoprotein. These immunogenic proteins, domains and epitopes are particularly useful within gene position-shifted RSV because they generate novel immune responses in an immunized host. In particular, the G and F proteins, and immunogenic domains and epitopes therein, provide

10 major neutralization and protective antigens. In addition, genes and genome segments encoding non-RSV proteins, for example, an SH protein as found in mumps and SV5 viruses, may be incorporated within gene position-shifted RSV of the invention. Regulatory regions, such as the extragenic 3' leader or 5' trailer regions, and gene-start, gene-end, intergenic regions, or 3' or 5' non-coding regions, are also useful as

15 heterologous (originating from a different RSV strain or subgroup or from a non-RSV source such as PIV, measles, mumps, etc.) substitutions or additions.

For example, addition or substitution of one or more immunogenic gene(s) or genome segment(s) from a human RSV subgroup or strain to or within a bovine recipient genome or antigenome yields a recombinant, chimeric virus or subviral particle

20 capable of generating an immune response directed against the human donor virus, including one or more specific human RSV subgroups or strains, while the bovine backbone confers an attenuated phenotype making the chimera a useful candidate for vaccine development. In one such exemplary embodiment, one or more human RSV glycoprotein genes F, SH, and/or G are added to or substituted within a partial or

25 complete bovine genome or antigenome to yield an attenuated, infectious human-bovine chimera that elicits an anti-human RSV immune response in a susceptible host. In other "chimeric" embodiments gene position-shifted RSV incorporate a heterologous gene or genome segment encoding an immunogenic protein, protein domain or epitope from multiple human RSV strains, for example two F or G proteins or immunogenic portions

30 thereof from both RSV subgroups A and B. In yet additional alternate embodiments a gene position-shifted RSV genome or antigenome encodes a chimeric glycoprotein in the recombinant virus or subviral particle having both human and bovine glycoprotein domains or immunogenic epitopes. For example, a heterologous genome segment

WO 02/00693

PCT/US01/20107

encoding a glycoprotein ectodomain from a human RSV F, SH or G glycoprotein may be joined with a genome segment encoding corresponding bovine F, SH or G glycoprotein cytoplasmic and endodomains in the background bovine genome or antigenome.

- According to the methods of the invention, human-bovine chimeric RSV
- 5 may be constructed by substituting the heterologous gene or genome segment for a counterpart gene or genome segment in a partial RSV background genome or antigenome. Alternatively, the heterologous gene or genome segment may be added as a supernumerary gene or genome segment in combination with a complete (or partial if another gene or genome segment is deleted) RSV background genome or antigenome.
- 10 For example, two human RSV G or F genes or genome segments can be included, one each from RSV subgroups A and B.

- Often, displacement genes or genome segments (including heterologous genes or genome segments) are added at an intergenic position within a partial or complete RSV genome or antigenome. Alternatively, the gene or genome segment can be
- 15 placed in other noncoding regions of the genome, for example, within the 5' or 3' noncoding regions or in other positions where noncoding nucleotides occur within the partial or complete genome or antigenome. In one aspect, noncoding regulatory regions contain cis-acting signals required for efficient replication, transcription, and translation, and therefore represent target sites for modification of these functions by introducing a
- 20 displacement gene or genome segment or other mutation as disclosed herein. In more detailed aspects of the invention, attenuating mutations are introduced into cis-acting regulatory regions to yield, e.g., (1) a tissue specific attenuation (Gromeier et al., *J. Virol.* 73:958-64, 1999; Zimmermann et al., *J. Virol.* 71:4145-9, 1997), (2) increased sensitivity to interferon (Zimmermann et al., *J. Virol.* 71:4145-9, 1997), (3) temperature sensitivity
- 25 (Whitehead et al., *Virology*, 247:232-9, 1998), (4) a general restriction in level of replication (Men et al., *J. Virol.* 70:3930-7, 1996; Muster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5177-5181, 1991), and/or (5) host specific restriction of replication (Cahour et al., *Virology* 207:68-76, 1995). These attenuating mutations can be achieved in various ways to produce an attenuated gene position-shifted RSV of the invention, for example by
- 30 point mutations, exchanges of sequences between related viruses, or deletions.

In other alternative embodiments of the invention, gene position-shifted RSV are provided wherein the recombinant RSV is modified by deletion, insertion

WO 02/00693

PCT/US01/20107

substitution, or rearrangement of a plurality of genes or genome segments. In certain embodiments selected "gene sets" are coordinately transferred by one of these means into, within, or from the recombinant RSV genome or antigenome. Exemplary RSV genes from which individual or coordinately transferred groups of genes may be selected

5 include the RSV N, P, NS1, NS2, M2-1 and M genes, which may be transferred singly or in any combination in a human or bovine RSV genome or antigenome to yield an attenuated, gene-shifted derivative. In more detailed aspects, both N and P genes of a human or bovine RSV are deleted, inserted, substituted or rearranged coordinately (e.g., by coordinate deletion or substitution in a HRSV genome or antigenome by counterpart N

10 and P genes from a bovine RSV). This coordinate gene transfer is facilitated by functional cooperativity between certain genes in the RSV genome, which often arises in the case of neighboring gene pairs in the genome. Thus, in other alternative embodiments, both NS1 and NS2 genes are coordinately transferred, e.g., by substitution in a human RSV by counterpart NS1 and NS2 genes from a bovine RSV. In yet

15 additional embodiments, two or more of the M2-1, M2-2 and L genes of a RSV are coordinately transferred. For certain vaccine candidates within the invention for which a high level of host-range restriction is desired, each of the N, P, NS1, NS2, M2-1 and M genes of a human RSV are replaced by counterpart N, P, NS1, NS2, M2-1 and M genes from a bovine RSV.

20 Coordinate gene transfers within human-bovine chimeric RSV are also directed to introduction of human antigenic genes within a bovine background genome or antigenome. In certain embodiments, one or more human RSV envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are added or substituted within a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome. For example, one or more

25 human RSV envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M may be added or substituted within a partial bovine RSV background genome or antigenome in which one or more envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are deleted. In more detailed aspects, one or more genes from a gene set defined as human RSV envelope-associated genes F, G, and M are added within a partial bovine RSV background genome

30 or antigenome in which envelope-associated genes F, G, SH, and M are deleted. An exemplary human-bovine chimeric RSV bearing these features describe in the examples below is rBRSV/A2-MGF.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In other aspects of the invention, insertion of heterologous nucleotide sequences into RSV vaccine candidates are employed separately to modulate the level of attenuation of candidate vaccine recombinants, e.g., for the upper respiratory tract. Thus, it is possible to insert nucleotide sequences into a rRSV that both direct the expression of a foreign protein and that attenuate the virus in an animal host, or to use nucleotide insertions separately to attenuate candidate vaccine viruses. General tools and methods for achieving these aspects of the invention are provided, e.g., in U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/170,195, U.S. Patent Application No. 09/458,813, and U.S. Patent Application No. 09/459,062 (each incorporated herein by reference). In one exemplary embodiment of the invention thus provided, insertion of the measles HA ORF between a selected RSV gene junction will restrict viral replication *in vivo*. In these aspects of the invention, the selected gene insert may be relatively large (approximately 1900 nts or greater). In this context, size of the insert specifies a selectable level of attenuation of the resulting recombinant virus. Displacement sequences of various lengths derived from a heterologous virus, e.g., introduced as single gene units (GUs) and designed specifically to lack any significant ORF, reveal selectable attenuation effects due to increased genome length (i.e., versus expression of an additional mRNA). Other constructs in which inserts of similar sizes are introduced into a downstream noncoding region (NCR) of a RSV gene are also useful within the invention.

To define some of the rules that govern the effect of gene insertion on attenuation, gene units of varying lengths can be inserted into a wild type RSV backbone and the effects of gene unit length on attenuation examined. Gene unit insertions engineered to not contain a significant ORF permit evaluation of the effect of gene unit length independently of an effect of the expressed protein of that gene. These heterologous sequences were inserted in a PIV backbone as an extra gene unit of sizes between 168 nt and 3918 nt between the HN and L genes. In addition, control cDNA constructions and viruses were made in which insertions of similar sizes were placed in the 3'-noncoding region of the HN gene of PIV and hence did not involve the addition of an extra gene. These viruses were made to assess the effect of an increase in the overall genome length and in gene number on attenuation. The insertion of an extra gene unit is expected to decrease the transcription of genes downstream of the insertion site which will affect both the overall abundance and ratios of the expressed proteins. As demonstrated herein, gene insertions or extensions larger than about 3000 nts in length

WO 02/00693

PCT/US01/20107

attenuated the wild type virus for the upper and lower respiratory tract of hamsters. Gene insertions of about 2000 nts in length further attenuated the rHPIV3_{cp45L} vaccine candidate for the upper respiratory tract. Comparable gene insertions in RSV thus can have the dual effect of both attenuating a candidate vaccine virus and inducing a
 5 protective effect against a second virus. Gene extensions in the 3'-noncoding region of a gene, which cannot express additional proteins, can also be attenuating in and of themselves. Within these methods of the invention, gene insertion length is a determinant of attenuation.

A separate example of gene order rearrangement for use within the
 10 invention involves changing the position of one or more naturally-occurring genes relative to other naturally-occurring genes, without the introduction or deletion of substantial lengths of polynucleotides (e.g., greater than 100 nucleotides). For example, the F and G genes of a human or human-bovine chimeric RSV can be shifted from their natural gene order position to a more promoter proximal position by excision and
 15 reinsertion of the genes into the recombinant genome or antigenome, without substantially altering the length of the recombinant RSV genome or antigenome.

These modifications in gene position and/or gene order typically result in viruses with altered biological properties. For example, recombinant RSV of the invention lacking one or more selected genes, for example NS1, NS2, SH, or G, NS1 and
 20 NS2 together, and SH and G together, may be attenuated *in vitro*, *in vivo*, or both. Whereas this phenotype is likely attributable primarily to the loss of expression of specific viral protein, it is also likely that the altered gene map contributed to the phenotype. This is supported by the results observed with the SH-deletion virus, which grew more efficiently than wild type in some cell types—probably due to an increase in
 25 the efficiency of transcription, replication or both resulting from the gene deletion and resulting change in gene order and possibly genome size.

The ability to generate infectious RSV from cDNA provides a method for introducing predetermined changes into infectious virus via the cDNA intermediate. This method has been used to produce a series of infectious attenuated derivatives of wild type
 30 recombinant RSV strain A2 that contain attenuating mutations including, for example, one or more nucleotide substitutions in cis-acting RNA signals and/or one or more amino acid substitutions in one or more viral proteins and/or deletion of one or more genes or

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- ablation its/their expression (Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., *J. Virol.* 72:4467-4471, 1998; Whitehead et al., *Virology* 247:232-239, 1998; Bermingham and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11259-11264, 1999; Juhasz et al., *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., *J. Virol.* 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:871-877, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; Collins et al., *Adv. Virus Res.* 54:423-451, 1999; U.S. Provisional Patent Application 60/143,097, filed July 9, 1999, U.S. Patent Application Serial No. 09/611,829 and its corresponding PCT application published as WO 01/04321; each incorporated herein by reference).
- 10 Strain A2 represents antigenic subgroup A, and an effective RSV vaccine also should represent the other antigenic subgroup, subgroup B. The G and F glycoproteins are the major antigenic determinants and the major protective RSV antigens (Connors et al., *J. Virol.* 65:1634-1637, 1991; Murphy et al., *Virus Research* 32:13-36, 1994; Collins et al., *Fields Virology* 2:1313-1352, 1996; and Crowe et al., *New*
- 15 *Generation Vaccines*, 711-725, 1997; each incorporated herein by reference). Therefore, the G and F genes of recombinant strain A2 were replaced with their counterparts from the B1 strain of antigenic subgroup B (Whitehead et al., *J. Virol.* 73:9773-9780, 1999, incorporated herein by reference). This was done using wild type and attenuated strain A2 backbones. Recombinant virus was obtained, and the "chimerization" did not
- 20 detectably interfere with virus replication. This demonstrated an expedited method for making vaccine virus: specifically, to use attenuated strain A2 backbones to express the antigenic determinants of subgroup B (pending application). Thus, once an appropriately-attenuated subgroup A gene position-shifted RSV vaccine virus is identified in clinical trials, its backbone can be modified to produce a comparable
- 25 subgroup B vaccine in an expedited manner, and the two viruses can be combined to make a bivalent vaccine.

- It has also been demonstrated in the above-incorporated references that RSV useful within the invention can express a foreign gene added as an extra, supernumerary gene placed at any of a variety of genomic locations, preferably in an
- 30 intergenic region. This concept has been used to make a recombinant strain A2 virus that also expressed the G glycoprotein of subgroup B as a supernumerary gene. Thus, a single virus expressed antigenic determinants of the two subgroups. Another example

WO 02/00693

PCT/US01/20107

incorporated herein involves the expression of interferon gamma as an added gene, which resulted in attenuation without a reduction in immunogenicity, and also provided a method to reduce the relative level of stimulation of T helper lymphocyte subset 2, which has been proposed to mediate immunopathogenic responses to RSV (see, e.g., United States Provisional Application No. 60/143,425, filed July 13, 1999, U.S. Patent Application Serial No. 09/614,285 and its corresponding PCT application published as WO 01/04271, each incorporated herein by reference).

In alternate embodiments of the invention, a different basis for attenuation of a live virus vaccine incorporating a gene positional shift is provided, which attenuation is based in part on host range effects. In this regard, the instant disclosure provides attenuated, chimeric RSV by the introduction of genome segments, entire genes or multiple genes between HRSV and BRSV. Host range differences between HRSV and BRSV are exemplified by the highly permissive growth of HRSV in chimpanzees compared to the barely detectable or undetectable growth of BRSV in the same animal. The chimpanzee is a widely accepted model of RSV infection and immunogenic activity in humans, exhibiting virus replication and disease comparable to that of humans. As illustrated herein below, host range differences of chimeric RSV observed in chimpanzees are correlated with host range differences observed in cell culture, providing a convenient preliminary assay.

Host range effects observed in chimeric, human-bovine RSV of the invention are generally related to nucleotide and amino acid sequence differences observed between HRSV and BRSV. For example, the percent amino acid identity between HRSV and BRSV for each of the following proteins is: NS1 (69%), NS2 (84%), N (93%), P (81%), M (89%), SH (38%), G (30%), F (81%), M2-1 (80%), L (77%). Because of the extensive genetic divergence between HRSV and BRSV (replacement of the N gene of HRSV with that of BRSV, for example, involves approximately 26 amino acid differences), chimeric bovine-human RSV of the invention are particularly useful vaccine candidates. As exemplified herein below, replacement of the BRSV G and F glycoproteins with those of HRSV increases the permissivity of recombinant BRSV for replication in chimpanzees. The involvement of multiple genes and genome segments each conferring multiple amino acid or nucleotide differences provides a broad basis for attenuation which is highly stable to reversion. This mode of attenuation contrasts

WO 02/00693

PCT/US01/20107

sharply to HRSV viruses attenuated by one or several point mutations, where reversion of an individual mutation will yield a significant or complete reacquisition of virulence. In addition, known attenuating point mutations in HRSV typically yield a temperature sensitive phenotype. This is because the temperature sensitive phenotype was specifically used as the first screen to identify altered progeny following exposure of HRSV to mutagens. One problem with attenuation associated with temperature sensitivity is that the virus can be overly restricted for replication in the lower respiratory tract while being under attenuated in the upper respiratory tract. This is because there is a temperature gradient within the respiratory tract, with temperature being higher (and more restrictive) in the lower respiratory tract and lower (less restrictive) in the upper respiratory tract. The ability of an attenuated virus to replicate in the upper respiratory tract can result in complications including congestion, rhinitis, fever and otitis media. Thus, attenuation achieved solely by temperature sensitive mutations may not be ideal. In contrast, host range mutations present in gene position-shifted RSV of the invention will not in most cases confer temperature sensitivity. Therefore, this novel method of attenuation will (i) be more stable genetically and phenotypically, and (ii) be less likely to be associated with residual virulence in the upper respiratory tract than other live vaccine approaches.

The amount of sequence divergence between BRSV and HRSV is about twice as much as between the HRSV A and B subgroups noted above. Thus, the F proteins have approximately 20% amino acid divergence between BRSV and HRSV, and the G proteins approximately 70% divergence (Lerch, et al., *J. Virol.* 64:5559-69, 1990; Lerch, et al., *Virology* 181:118-31, 1991; Mallipeddi and Samal, *J. Gen. Virol.* 74:2001-4, 1993; Mallipeddi and Samal, *Vet. Microbiol.* 36:359-67, 1993; Samal et al., *Virology* 180:453-456, 1991; Samal and Zamora, *J. Gen. Virol.* 72:1717-1720, 1991; Zamora and Samal, *Virus Res.* 24:115-121, 1992; *ibid.*, *J. Gen. Virol.* 73:737-741, 1992; Mallipeddi and Samal, *J. Gen. Virol.* 73:2441-2444, 1992; Pastey and Samal, *J. Gen. Virol.* 76:193-197, 1995; Walravens et al., *J. Gen. Virol.* 71:3009-3014, 1990; Yunnus et al., *J. Gen. Virol.* 79:2231-2238, 1998, each incorporated herein by reference).

In the prior disclosures incorporated herein, recombinant BRSV was modified to replace the G and F BRSV genes with their human RSV counterparts. The resulting chimeric BRSV/HRSV virus, bearing the antigenic determinants of human RSV on the BRSV backbone, replicated more efficiently in chimpanzees than did its BRSV parent, but remained highly attenuated. This indicated that the G and F genes contributed to the host range restriction of BRSV, but showed that one or more other genes also

WO 02/00693

PCT/US01/20107

specified the host range restriction. This represents a starting point for constructing an optimal BRSV/HRSV chimeric virus that features a gene positional change as described above and which contains the human RSV G and F antigenic determinants, wherein the resulting recombinant RSV is attenuated by the presence of one or more BRSV genes to confer a host range restriction (Buchholz et al., *J. Virol.* 74:1187-1199, 2000; United States Patent Application No. 60/143,132, filed July 9, 1999; each incorporated herein by reference).

Detailed descriptions of the materials and methods for producing recombinant RSV from cDNA, and for making and testing the full range of mutations and nucleotide modifications disclosed herein as supplemental aspects of the present invention, are set forth in, e.g., U.S. Provisional Patent Application No. 60/007,083, filed September 27, 1995; U.S. Patent Application No. 08/720,132, filed September 27, 1996; U.S. Provisional Patent Application No. 60/021,773, filed July 15, 1996 and U.S. Patent Application No. 08/892,403, now issued as U.S. Patent No. 5,993,824; U.S. Provisional Patent Application No. 60/046,141, filed May 9, 1997; U.S. Provisional Patent Application No. 60/047,634, filed May 23, 1997; U.S. Patent No. 5,993,824, issued November 30, 1999 (corresponding to International Publication No. WO 98/02530); U.S. Patent Application No. 09/291,894, filed by Collins et al. on April 13, 1999 and corresponding to published PCT application WO 00/61737; U.S. Provisional Patent Application No. 60/129,006, filed by Murphy et al. on April 13, 1999; Crowe et al., *Vaccine* 12: 691-699, 1994; and Crowe et al., *Vaccine* 12: 783-790, 1994; Collins, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; Bukreyev, et al., *J. Virol.* 70:6634-41, 1996; Juhasz et al., *J. Virol.* 71(8):5814-5819, 1997; Durbin et al., *Virology* 235:323-332, 1997; Karron et al., *J. Infect. Dis.* 176:1428-1436, 1997; He et al., *Virology* 237:249-260, 1997; Baron et al., *J. Virol.* 71:1265-1271, 1997; Whitehead et al., *Virology* 247(2):232-9, 1998a; Whitehead et al., *J. Virol.* 72(5):4467-4471, 1998b; Jin et al., *Virology* 251:206-214, 1998; Bukreyev, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96:2367-2372, 1999; Bermingham and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11259-11264, 1999 Juhasz et al., *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., *J. Virol.* 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:9773-9780, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:871-877, 1999; and Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Exemplary methods for producing recombinant RSV from cDNA involve intracellular coexpression, typically from plasmids cotransfected into tissue culture cells, of an RSV antigenomic RNA and the RSV N, P, M2-1 and L proteins. This launches a productive infection that results in the production of infectious cDNA-derived virus, which is termed recombinant virus. Once generated, recombinant RSV is readily propagated in the same manner as biologically-derived virus, and a recombinant virus and a counterpart biologically-derived virus cannot be distinguished unless the former had been modified to contain one or more introduced changes as markers.

In more detailed aspects, the foregoing incorporated documents describe methods and procedures useful within the invention for mutagenizing, isolating and characterizing RSV to obtain attenuated mutant strains (e.g., temperature sensitive (ts), cold passaged (cp) cold-adapted (ca), small plaque (sp) and host-range restricted (hr) mutant strains) and for identifying the genetic changes that specify the attenuated phenotype. In conjunction with these methods, the foregoing documents detail procedures for determining replication, immunogenicity, genetic stability and protective efficacy of biologically derived and recombinantly produced attenuated human RSV, including human RSV A and B subgroups, in accepted model systems, including murine and non-human primate model systems. In addition, these documents describe general methods for developing and testing immunogenic compositions, including monovalent and bivalent vaccines, for prophylaxis and treatment of RSV infection.

The ability to generate infectious RSV from cDNA provides a method for introducing predetermined changes into infectious virus via the cDNA intermediate. This method has been demonstrated to produce a wide range of infectious, attenuated derivatives of RSV, for example recombinant vaccine candidates containing one or more amino acid substitutions in a viral protein, deletion of one or more genes or ablation of gene expression, and/or one or more nucleotide substitutions in cis-acting RNA signals yielding desired effects on viral phenotype (see, e.g., Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., *J. Virol.* 72:4467-4471, 1998; Whitehead et al., *Virology* 247:232-239, 1998; Bermingham and Collins, *Prog. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11259-11264, 1999; Juhasz et al., *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., *J. Virol.* 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.*

WO 02/00693

PCT/US01/20107

73:871-877, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999; and Collins et al., *Adv. Virus Res.*, 54:423-451, 1999, each incorporated herein by reference).

Exemplary of the foregoing teachings are methods for constructing and evaluating infectious recombinant RSV modified to incorporate phenotype-specific mutations identified in biologically-derived RSV mutants, e.g., cp and ts mutations adopted in recombinant RSV from biologically derived designated cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). These methods are readily adapted for construction of recombinant gene position-shifted RSV of the invention. The recombinant RSV thus provided may incorporate two or more ts mutations from the same, or different, biologically derived RSV mutant(s), for example one or more of the 248/404, 248/955, 530/1009, or 530/1030 biological mutants. In the latter context, multiply attenuated recombinants may have a combination of attenuating mutations from two, three or more biological mutants, e.g., a combination of attenuating mutations from the RSV mutants 530/1009/404, 248/404/1009, 248/404/1030, or 248/404/1009/1030 mutants. In exemplary embodiments, one or more attenuating mutations specify a temperature-sensitive substitution at amino acid Asn43, Phe521, Gln831, Met1169, or Tyr1321 in the RSV polymerase gene or a temperature-sensitive nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2. Preferably, these mutations involve identical or conservative changes with the following changes identified in biologically derived mutant RSV, for example changes conservative to the following substitutions identified in the L polymerase gene: Ile for Asn43, Leu for Phe521, Leu for Gln831, Val for Met1169, and Asn for Tyr1321.

Yet additional mutations that may be incorporated in gene position-shifted RSV of the invention are mutations, e.g., attenuating mutations, identified in heterologous RSV or more distantly related negative stranded RNA viruses. In particular, attenuating and other desired mutations identified in one negative stranded RNA virus may be "transferred", e.g., copied, to a corresponding position within a human or bovine RSV genome or antigenome, either within the gene position-shifted RSV or as a means of constructing the gene position-shifted RSV. Briefly, desired mutations in one

WO 02/00693

PCT/US01/20107

heterologous negative stranded RNA virus are transferred to the RSV recipient (e.g., bovine or human RSV, respectively). This involves mapping the mutation in the heterologous virus, thus identifying by sequence alignment the corresponding site in human or bovine RSV, and mutating the native sequence in the RSV recipient to the mutant genotype (either by an identical or conservative mutation), as described in U.S. Provisional Patent Application No. 60/129,006, filed by Murphy et al. on April 13, 1999, incorporated herein by reference. As this disclosure teaches, it is preferable to modify the chimeric genome or antigenome to encode an alteration at the subject site of mutation that corresponds conservatively to the alteration identified in the heterologous mutant virus.

For example, if an amino acid substitution marks a site of mutation in the mutant virus compared to the corresponding wild-type sequence, then a similar substitution should be engineered at the corresponding residue(s) in the recombinant virus. Preferably the substitution will involve an identical or conservative amino acid to the substitute residue present in the mutant viral protein. However, it is also possible to alter the native amino acid residue at the site of mutation non-conservatively with respect to the substitute residue in the mutant protein (e.g., by using any other amino acid to disrupt or impair the function of the wild-type residue). Negative stranded RNA viruses from which exemplary mutations are identified and transferred into a gene position-shifted RSV of the invention include other RSVs (e.g., murine), PIV, Sendai virus (SeV), Newcastle disease virus (NDV), simian virus 5 (SV5), measles virus (MeV), rindepest virus, canine distemper virus (CDV), rabies virus (RaV) and vesicular stomatitis virus (VSV). A variety of exemplary mutations are disclosed, including but not limited to an amino acid substitution of phenylalanine at position 521 of the RSV L protein (corresponding to a substitution of phenylalanine at position 456 of the HPIV3 L protein). In the case of mutations marked by deletions or insertions, these can be introduced as corresponding deletions or insertions into the recombinant virus, however the particular size and amino acid sequence of the deleted or inserted protein fragment can vary.

A variety of additional types of mutations are also disclosed in the foregoing incorporated references and can be readily engineered into a recombinant gene position-shifted RSV of the invention to calibrate attenuation, immunogenicity or provide other advantageous structural and/or phenotypic effects. For example, restriction site markers are routinely introduced within the gene position-shifted genome or antigenome to facilitate cDNA construction and manipulation. Also described in the incorporated

WO 02/00693

PCT/US01/20107

references are a wide range of nucleotide modifications other than point or site-specific mutations that are useful within the instant invention. For example, methods and compositions are disclosed for producing recombinant RSV expressing an additional foreign gene, e.g., a chloramphenicol acetyl transferase (CAT) or luciferase gene. Such recombinants generally exhibit reduced growth associated with the inserted gene. This attenuation appears to increase with increasing length of the inserted gene. The finding that insertion of a foreign gene into recombinant RSV reduces level of replication and is stable during passage *in vitro* provides another effective method for attenuating RSV for vaccine use. Similar or improved effects can thus be achieved by insertion of other desired genes, for example cytokines such as interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4 and GM-CSF, among others.

Within the methods of the invention, additional genes or genome segments may be inserted into or proximate to the gene position-shifted RSV genome or antigenome. These genes may be under common control with recipient genes, or may be under the control of an independent set of transcription signals. Genes of interest include the RSV genes identified above, as well as non-RSV genes. Non-RSV genes of interest include those encoding cytokines (e.g., IL-2 through IL-18, especially IL-2, IL-6 and IL-12, IL-18, etc.), gamma-interferon, and proteins rich in T helper cell epitopes. These additional proteins can be expressed either as a separate protein, or as a chimera engineered from a second copy of one of the RSV proteins, such as SH. This provides the ability to modify and improve the immune responses against RSV both quantitatively and qualitatively.

Increased genome length results in attenuation of the resultant RSV, dependent in part upon the length of the insert. In addition, the expression of certain proteins, e.g. a cytokine, from a non-RSV gene inserted into gene position-shifted RSV will result in attenuation of the virus due to the action of the protein. Exemplary cytokines that yield an infectious, attenuated viral phenotype and high level cytokine expression from RSV transfected cells include interleukin-2 (IL-2), IL-4, GM-CSF, and γ -interferon. Additional effects including augmentation of cellular and or humoral immune responses will also attend introduction of cytokines into gene position-shifted RSV of the invention.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Deletions, insertions, substitutions and other mutations involving changes of whole viral genes or genome segments within gene position-shifted RSV of the invention yield highly stable vaccine candidates, which are particularly important in the case of immunosuppressed individuals. Many of these changes will result in attenuation of resultant vaccine strains, whereas others will specify different types of desired phenotypic changes. For example, accessory (i.e., not essential for *in vitro* growth) genes are excellent candidates to encode proteins that specifically interfere with host immunity (see, e.g., Kato et al., EMBO J. 16:578-87, 1997, incorporated herein by reference). Ablation of such genes in chimeric vaccine viruses is expected to reduce virulence and pathogenesis and/or improve immunogenicity.

Additional, independent nucleotide modifications disclosed in the foregoing references for incorporation into recombinant gene position-shifted RSV of the invention include partial or complete deletion or ablation of a selected RSV gene. Thus, RSV genes or genome segments may be deleted, including partial or complete deletions of open reading frames and/or cis-acting regulatory sequences of the RSV NS1, NS2, N, P, M, G, F, SH, M2(ORF1), M2(ORF2) and/or L genes. In one example, a recombinant RSV was generated in which expression of the SH gene was been ablated by removal of a polynucleotide sequence encoding the SH mRNA and protein. Deletion of the SH gene yielded not only recoverable, infectious RSV, but one which exhibited substantially improved growth in tissue culture based on both yield of infectious virus and plaque size. This improved growth in tissue culture specified by the SH deletion provides useful tools for developing gene position-shifted RSV vaccines, for example by overcoming problems of poor RSV yields in culture. Moreover, these deletions are highly stable against genetic reversion, rendering RSV clones derived therefrom particularly useful as vaccine agents.

SH-minus RSV recombinants also exhibit site-specific attenuation in the upper respiratory tract of mice, which presents novel advantages for vaccine development. Current RSV strains under evaluation as live virus vaccines, for example cp mutants, do not exhibit significantly altered growth in tissue culture. These are host range mutations and they restrict replication in the respiratory tract of chimpanzees and humans approximately 100-fold in the lower respiratory tract. Another exemplary type of mutation, ts mutations, tend to preferentially restrict virus replication in the lower respiratory tract due to the gradient of increasing body temperature from the upper to the

WO 02/00693

PCT/US01/20107

lower respiratory tract. In contrast to these cp and ts mutants, SH-minus RSV mutants have distinct phenotypes of greater restriction in the upper respiratory tract. This is particularly desirable for vaccine viruses for use in very young infants, because restriction of replication in the upper respiratory tract is required to ensure safe vaccine administration in this vulnerable age group whose members breathe predominantly through the nose. Further, in any age group, reduced replication in the upper respiratory tract will reduce morbidity from otitis media. In addition to these advantages, the nature of SH deletion mutations, involving e.g., nearly 400 nt and ablation of an entire mRNA, represents a type of mutation which will be highly refractory to reversion. The utility of the SH-minus deletion as a "displacement polynucleotide" for simultaneously directing a gene position-shift, e.g., to upregulate F and G glycoprotein gene expression, is amply evinced in the examples below.

Also discussed in the context of SH gene modifications is a comparison of SH genes among different RSVs, including human and bovine RSVs, and other pneumoviruses to provide additional tools and methods for generating useful RSV recombinant vaccines. For example, the two RSV antigenic subgroups, A and B, exhibit a relatively high degree of conservation in certain SH domains. In two such domains, the N-terminal region and putative membrane-spanning domains of RSV A and B display 84% identity at the amino acid level, while the C-terminal putative ectodomains are more divergent (approx. 50% identity). Comparison of the SH genes of two human RSV subgroup B strains, 8/60 and 18537, identified only a single amino acid difference (Anderson et al., supra). The SH proteins of human versus bovine RSV are approximately 40% identical, and share major structural features including (i) an asymmetric distribution of conserved residues; (ii) very similar hydrophobicity profiles; (iii) the presence of two N-linked glycosylation sites with one site being on each side of the hydrophobic region; and (iv) a single cysteine residue on the carboxyterminal side of the central hydrophobic region of each SH protein. (Anderson et al., supra). By evaluating these and other sequence similarities and differences, selections can be made of heterologous sequence(s) that can be substituted or inserted within infectious gene position-shifted RSV clones, for example to yield vaccines having multi-specific immunogenic effects or, alternatively or in addition, desirable effects such as attenuation.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- In alternate embodiments of the invention, partial gene deletions or other limited nucleotide deletions are engineered into recombinant RSV to yield desired phenotypic changes. In one example, the length of the RSV genome is reduced by deleting sequence from the downstream noncoding region of the SH gene. This
- 5 exemplary partial gene deletion was constructed using a version of the antigenome cDNA containing an XmaI site in the G-F intergenic region, a change which of itself would not be expected to affect the encoded virus. The encoded virus, designated RSV/6120, has silent nucleotide substitutions in the last three codons and termination codon of the SH ORF and has a deletion of 112 nucleotides from the SH downstream non-translated
- 10 region (positions 4499-4610 in the recombinant antigenome). This deletion leaves the gene-end signal (Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996, incorporated herein by reference) intact. These point mutations and 112-nt deletion do not alter the encoded amino acids of any of the viral proteins, nor do they interrupt any of the known viral RNA signals or change the number of encoded mRNAs.
- 15 The 6120 virus was analyzed for the efficiency of multi-step growth in parallel with its full-length counterpart, D53, and showed a peak titer that was reproducibly higher than that of the D53 virus by a factor of 1.5- to 2-fold. Thus, the small, partial deletion in the SH gene of a 112-nt noncoding sequence resulted in a substantial increase in growth efficiency *in vitro*.
- 20 Other partial gene deletions and small nucleotide deletions can be readily engineered in recombinant RSV of the invention to alter viral phenotype, including nucleotide deletions in: (1) nontranslated sequence at the beginning and/or end of the various ORFs apart from the cis-acting RNA signal, (2) intergenic regions, and (3) the regions of the 3' leader and 5' trailer that are not essential for promoter activity.
- 25 Examples of nontranslated gene sequence for deletion or insertion include the following regions of the downstream untranslated region of the NS1, NS2, P, M, F, and M2 genes: namely, sequence positions 519-563, 1003-1086, 3073-3230, 4033-4197, 7387-7539 and 8433-8490, respectively, numbered according to the recombinant antigenome. Also, as additional examples, nt 55-96, nt 606-624, nt 4231-4300 can be deleted from the
- 30 upstream nontranslated region of the NS1, NS2 and SH genes respectively. Any partial or complete deletion in one or more of these sequences can be achieved in accordance with the teachings herein to provide candidates that are readily screened for beneficial

WO 02/00693

PCT/US01/20107

phenotypic changes specified by selected deletions. Additional nontranslated regions within the RSV genome are also useful in this regard. Since the gene-start and gene-end signals have been mapped and characterized with regard to important positions (Kuo, *et al.*, *J. Virol.*, **71**:4944-4953; 1997; Harmon, *et al.*, *J. Virol.*, **75**:36-44, 2001, each incorporated herein by reference), deletions or modifications that involve one or a few (e.g., 3-10, 10-20, 20-45) nt can be considered. In some cases, specific additional advantages may be obtained. For example, in the G gene, deletion of nt 4683 to 4685, which includes one nt of the gene-start signal and two nt of nontranslated sequence, ablates the first AUG in the mRNA, which does not initiate a significant ORF but is thought to divert ribosomes from the next AUG which initiates the G ORF. In addition, this deletion restores the GS signal and retains the translation start site of the G ORF. Thus, nontranslated sites for modification can be selected based on knowledge of the genome, or can be selected at random and tested expeditiously by the methods of the present invention.

With regard to intergenic sequences, studies with minigenomes show that an intergenic region can be reduced to a single nt or deleted altogether without affecting transcription and RNA replication. The intergenic regions of strain A2 represent another 207 nt in aggregate (noting that the NS2-N intergenic region of the recombinant antigenome was engineered to be 1 nt longer than its biological equivalent; see, e.g., Collins, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:11563-11567, 1995, incorporated herein by reference).

The RSV 5' trailer region is 155 nt in length and thus is approximately 100 nt longer than the corresponding region of most mononegaviruses and is 111 nt longer than the RSV leader region. Studies with minigenomes suggest that much of this sequence is not essential and is a candidate for modification (Kuo, *et al.*, *J. Virol.*, **70**:6892-901, 1996, incorporated herein by reference). For example, the region of trailer that immediately follows the L gene could be reduced in size by 75 nt, 100 nt, 125 nt or more, leaving intact the 5' genomic terminus (which encodes the 3' end of the antigenome, including the antigenome promoter). Similarly, the 44-nt leader region might be modified. For example, the first 11 nt at the 3' leader end form the core of the viral promoter, and thus sequence from the remainder of the leader region might be deleted or otherwise modified.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- In certain embodiments of the invention, deleting one or more of the nontranslated sequences (partially or completely) described above for the NS1, NS2, SH, F and M2 genes will result in an adjustable reduction in genome length of up to 806 nt—more than 7-fold greater than the 112-nt deletion described in the instant example.
- 5 Deleting partially or completely one or more of the intergenic regions between the first nine genes (e.g., down to a minimal length of one nt each) would yield up to an additional 198 nt of adjustable deletion. Partial or complete deletions from the trailer and/or leader can yield up to 50, 75, 100, or more nt in additional deletion. Thus, for example, combining 806 nt from nontranslated gene sequence with 198 nt from the intergenic
- 10 regions and 100 nt from the trailer yields 1104 nt in aggregate, representing nearly a 10-fold greater deletion than 112-nt deletion described here (and representing more than 7% of the RSV genome).

- In another example described in the above-incorporated references, expression of the NS2 gene is ablated by introduction of stop codons into the translational
- 15 open reading frame (ORF). The rate of release of infectious virus was reduced for this NS2 knock-out virus compared to wild-type. In addition, comparison of the plaques of the mutant and wild-type viruses showed that those of the NS2 knock-out were greatly reduced in size. This type of mutation can thus be incorporated within viable recombinant gene position-shifted RSV to yield altered phenotypes, in this case reduced
- 20 rate of virus growth and reduced plaque size *in vitro*. These and other knock-out methods and mutants will therefore provide for yet additional recombinant RSV vaccine agents, based on the known correlation between reduced plaque size *in vitro* and attenuation *in vivo*. Expression of the NS2 gene also was ablated by complete removal of the NS2 gene, yielding a virus with a similar phenotype.

- 25 Other RSV genes which have been successfully deleted include the NS1 and M2-2 genes. The former was deleted by removal of the polynucleotide sequence encoding the respective protein, and the latter by introducing a frame-shift or altering translational start sites and introducing stop codons. Interestingly, recovered NS1-minus virus produce small plaques in tissue culture albeit not as small as those of the NS2
- 30 deletion virus. The fact that the NS1-minus virus can grow, albeit with reduced efficiency, identifies the NS1 protein as an accessory protein, one that is dispensable to virus growth. The plaque size of the NS1-minus virus was similar to that of NS2 knock-

WO 02/00693

PCT/US01/20107

out virus in which expression of the NS2 protein was ablated by introducing translational stop codons into its coding sequence. The small plaque phenotype is commonly associated with attenuating mutations. This type of mutation can thus be independently incorporated within viable recombinant RSV to yield altered phenotypes. These and
 5 other knock-out methods and mutants will therefore provide for yet additional recombinant gene position-shifted RSV vaccine agents, based on the known correlation between plaque size *in vitro* and attenuation *in vivo*. The NS2 knock-out mutant exhibited a moderately attenuated phenotype in the upper respiratory tract and a highly attenuated phenotype in the lower respiratory tract in naive chimpanzees. This mutant
 10 also elicited greatly reduced disease symptoms in chimps while stimulating significant resistance to challenge by the wild-type virus (Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999, incorporated herein by reference).

Yet additional methods and compositions provided within the incorporated references and useful within the invention involve different nucleotide modifications
 15 within gene position-shifted RSV that alter cis-acting regulatory sequences within the chimeric genome or antigenome. For example, a translational start site for a secreted form of the RSV G glycoprotein can be deleted to disrupt expression of this form of the G glycoprotein. The RSV G protein is synthesized in two forms: as an anchored type II integral membrane protein and as a N-terminally resected form which lacks essentially all
 20 of the membrane anchor and is secreted (Hendricks et al., *J. Virol.* 62:2228-2233, 1988). The two forms have been shown to be derived by translational initiation at two different start sites: the longer form initiates at the first AUG of the G ORF, and the second initiates at the second AUG of the ORF at codon 48 and is further processed by proteolysis (Roberts et al., *J. Virol.* 68: 4538-4546, 1994). The presence of this second
 25 start site is highly conserved, being present in all strains of human, bovine and ovine RSV sequenced to date. It has been suggested that the soluble form of the G protein might mitigate host immunity by acting as a decoy to trap neutralizing antibodies. Also, soluble G has been implicated in preferential stimulation of a Th2-biased response, which in turn appears to be associated with enhanced immunopathology upon subsequent exposure to
 30 RSV. With regard to an RSV vaccine virus, it is highly desirable to minimize antibody trapping or imbalanced stimulation of the immune system, and so it would be desirable to ablate expression of the secreted form of the G protein. This has been achieved in recombinant virus. Thus, this mutation is particularly useful to qualitatively and/or

WO 02/00693

PCT/US01/20107

quantitatively alter the host immune response elicited by the recombinant virus, rather than to directly attenuate the virus.

The incorporated references also describe modulation of the phenotype of recombinant RSV by altering cis-acting transcription signals of exemplary genes, e.g., NS1 and NS2. The results of these nucleotide modifications are consistent with modification of gene expression by altering cis-regulatory elements, for example to decrease levels of readthrough mRNAs and increase expression of proteins from downstream genes. The resulting recombinant viruses will preferably exhibit increased growth kinetics and increased plaque size. Exemplary modifications to cis-acting regulatory sequences include modifications to gene end (GE) and gene start (GS) signals associated with RSV genes. In this context, exemplary changes include alterations of the GE signals of the NS1 and NS2 genes rendering these signals identical to the naturally-occurring GE signal of the RSV N gene. The resulting recombinant virus exhibits increased growth kinetics and plaque size and therefore provide yet additional means for beneficially modifying phenotypes of gene position-shifted RSV vaccine candidates.

Methods and compositions provided in the above-incorporated references also allow production of attenuated gene position-shifted RSV vaccine viruses comprising sequences from both RSV subgroups A and B, e.g., to yield a RSV A or B vaccine or a bivalent RSV A/B vaccine (see, e.g., U.S. Patent Application No. 09/291,894, filed by Collins et al. on April 13, 1999, incorporated herein by reference). Further augmenting the invention in this context, specific attenuating mutations have been incorporated into chimeric RSV A/B viruses include: (i) three of the five cp mutations, namely the mutation in N (V267I) and the two in L (C319Y and H1690Y), but not the two in F since these are removed by substitution with the B1 F gene; (ii) the 248 (Q831L), 1030 (Y1321N) and, optionally, 404-L (D1183E) mutations which have been identified in attenuated strain A2 viruses; (iii) the single nucleotide substitution at position 9 in the gene-start signal of the M2 gene, and (iv) deletion of the SH gene. Other immediately available mutations in gene position-shifted RSV carrying RSV A and or RSV B genes or genome segments include, but are not limited to, NS1, NS2, G, or M2-2 gene deletions, and the 530 and 1009 mutations, alone or in combination.

In other detailed aspects of the invention, gene position-shifted RSV are employed as "vectors" for protective antigens of heterologous pathogens, including other

WO 02/00693

PCT/US01/20107

RSVs and non-RSV viruses and non-viral pathogens. Within these aspects, the gene position-shifted RSV genome or antigenome comprises a partial or complete RSV "vector genome or antigenome" combined with one or more heterologous genes or genome segments encoding one or more antigenic determinants of one or more heterologous pathogens (see, e.g., U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/170,195; U.S. Patent Application No. 09/458,813; and U.S. Patent Application No. 09/459,062, each incorporated herein by reference). The heterologous pathogen in this context may be a heterologous RSV (e.g., a different RSV strain or subgroup) and the heterologous gene(s) or genome segment(s) can be selected to encode one or more of the above identified RSV proteins, as well as protein domains, fragments, and immunogenic regions or epitopes thereof. RSV vector vaccines thus constructed may elicit a polyspecific immune response and may be administered simultaneously or in a coordinate administration protocol with other vaccine agents.

Gene position-shifted RSV engineered as vectors for other pathogens may comprise a vector genome or antigenome that is a partial or complete HRSV genome or antigenome, which is combined with or is modified to incorporate one or more heterologous genes or genome segments encoding antigenic determinant(s) of one or more heterologous RSV(s), including heterologous HRSVs selected from HRSV A or HRSV B. In alternative aspects, the vector genome or antigenome is a partial or complete HRSV genome or antigenome and the heterologous gene(s) or genome segment(s) encoding the antigenic determinant(s) is/are of one or more non-RSV pathogens. The vector genome or antigenome may further incorporate one or more gene(s) or genome segment(s) of a BRSV that specifies attenuation. Alternatively, the vector virus may be comprise a partial or complete BRSV background genome or antigenome incorporating one or more HRSV genes or genome segments, wherein the gene position-shifted RSV vector virus is modified to include one or more donor gene(s) or genome segment(s) encoding an antigenic determinant of a non-RSV pathogen.

Thus, in certain detailed aspects of the invention, gene position-shifted RSV are provided as vectors for a range of non-RSV pathogens (see, e.g., U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/170,195; U.S. Patent Application No. 09/458,813; and U.S. Patent Application No. 09/459,062, each incorporated herein by reference). The vector genome or antigenome for use within these aspects of the

WO 02/00693

PCT/US01/20107

invention may comprise a partial or complete BRSV or HRSV genome or antigenome incorporating, respectively, a heterologous HRSV or BRSV gene or genome segment, and the heterologous pathogen may be selected from measles virus, subgroup A and subgroup B respiratory syncytial viruses, HPIV1, HPIV2, HPIV3, mumps virus, human papilloma
 5 viruses, type 1 and type 2 human immunodeficiency viruses, herpes simplex viruses, cytomegalovirus, rabies virus, Epstein Barr virus, filoviruses, bunyaviruses, flaviviruses, alphaviruses and influenza viruses.

For example, a HRSV or BRSV vector genome or antigenome for constructing gene position-shifted RSV of the invention may incorporate heterologous
 10 antigenic determinant(s) selected from the measles virus HA and F proteins, or antigenic domains, fragments and epitopes thereof. In exemplary embodiments, a transcription unit comprising an open reading frame (ORF) of a measles virus HA gene is added to or incorporated within a BRSV or HRSV3 vector genome or antigenome. Alternatively
 15 gene position-shifted RSV of the invention may be used as vectors to incorporate heterologous antigenic determinant(s) from a parainfluenza virus (PIV), for example by incorporating one or more genes or genome segments that encode(s) a HPIV1, HPIV2, or HPIV3 HN or F glycoprotein or immunogenic domain(s) or epitope(s) thereof.

The introduction of heterologous immunogenic proteins, domains and epitopes within gene position-shifted RSV is particularly useful to generate novel
 20 immune responses in an immunized host. For example, addition or substitution of an immunogenic gene or genome segment from one, donor RSV subgroup or strain within a recipient genome or antigenome of a different RSV subgroup or strain can generate an immune response directed against the donor subgroup or strain, the recipient subgroup or strain, or against both the donor and recipient subgroup or strain. To achieve this
 25 purpose, gene position-shifted RSV may also be constructed that express a chimeric protein, e.g., an immunogenic glycoprotein having a cytoplasmic tail and/or transmembrane domain specific to one RSV fused to an ectodomain of a different RSV to provide, e.g., a human-bovine fusion protein, or a fusion protein incorporating domains from two different human RSV subgroups or strains. In a preferred embodiment, a gene
 30 position-shifted RSV genome or antigenome encodes a chimeric glycoprotein in the recombinant virus or subviral particle having both human and bovine glycoprotein domains or immunogenic epitopes. For example, a heterologous genome segment

WO 02/00693

PCT/US01/20107

encoding a glycoprotein ectodomain from a human RSV F, SH or G glycoprotein may be joined with a polynucleotide sequence (i.e., a genome segment) encoding the corresponding bovine F, SH or G glycoprotein cytoplasmic and endo domains to form the gene position-shifted RSV genome or antigenome.

5 In other embodiments, gene position-shifted RSV useful in a vaccine formulation can be conveniently modified to accommodate antigenic drift in circulating virus. Typically the modification will be in the G and/or F proteins. An entire G or F gene, or a genome segment encoding a particular immunogenic region thereof, from one RSV strain is incorporated into a gene position-shifted RSV genome or antigenome
10 cDNA by replacement of a corresponding region in a recipient clone of a different RSV strain or subgroup, or by adding one or more copies of the gene, such that several antigenic forms are represented. Progeny virus produced from the modified RSV clone can then be used in vaccination protocols against emerging RSV strains.

A variety of additional embodiments of the invention involve the addition
15 or substitution of only a portion of a donor gene of interest to the recipient gene position-shifted RSV genome or antigenome. Commonly, non-coding nucleotides such as cis-acting regulatory elements and intergenic sequences need not be transferred with the donor gene coding region. Thus, a coding sequence (e.g., a partial or complete open reading frame (ORF)) of a particular gene may be added or substituted to the partial or
20 complete background genome or antigenome under control of a heterologous promoter (e.g., a promoter existing in the background genome or antigenome) of a counterpart gene or different gene as compared to the donor sequence. A variety of additional genome segments provide useful donor polynucleotides for inclusion within a chimeric genome or antigenome to express gene position-shifted RSV having novel and useful properties. For
25 example, heterologous genome segments may encode part or all of a glycoprotein cytoplasmic tail region, transmembrane domain or ectodomain, an epitopic site or region, a binding site or region containing a binding site, an active site or region containing an active site, etc., of a selected protein from a human or bovine RSV. These and other genome segments can be added to a complete background genome or antigenome or
30 substituted therein for a counterpart genome segment to yield novel chimeric RSV recombinants. Certain recombinants will express a chimeric protein, e.g., a protein

WO 02/00693

PCT/US01/20107

having a cytoplasmic tail and/or transmembrane domain of one RSV fused to an ectodomain of another RSV.

Genes and genome segments for use within the gene position-shifted RSV of the invention embrace an assemblage of alternate polynucleotides having a range of size and sequence variation. Useful genome segments in this regard range from about 15-35 nucleotides in the case of genome segments encoding small functional domains of proteins, e.g., epitopic sites, to about 50, 75, 100, 200-500, and 500-1,500 or more nucleotides for genome segments encoding larger domains or protein regions. Selection of counterpart genes and genome segments relies on sequence identity or linear correspondence in the genome between the subject counterparts. In this context, a selected human or bovine polynucleotide "reference sequence" is defined as a sequence or portion thereof present in either the donor or recipient genome or antigenome. This reference sequence is used as a defined sequence to provide a rationale basis for sequence comparison with the counterpart heterologous sequence. For example, the reference sequence may be defined a segment of a cDNA or gene, or a complete cDNA or gene sequence. Generally, a reference sequence for use in defining counterpart genes and genome segments is at least 20 nucleotides in length, frequently at least 25 nucleotides in length, and often at least 50 nucleotides in length. Since two polynucleotides may each (1) comprise a sequence (i.e., a portion of the complete polynucleotide sequence) that is similar between the two polynucleotides, and (2) may further comprise a sequence that is divergent between the two polynucleotides, sequence comparisons between two (or more) polynucleotides are typically performed by comparing sequences of the two polynucleotides over a "comparison window" to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window", as used herein, refers to a conceptual segment of at least 20 contiguous nucleotide positions wherein a polynucleotide sequence may be compared to a reference sequence of at least 20 contiguous nucleotides and wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may be conducted by the local homology algorithm of (Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981), by the homology alignment algorithm of (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970), by the search for similarity method

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- of (Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988) (each of which is incorporated by reference), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, incorporated herein by reference), or by inspection, and the best alignment (i.e., resulting in the highest percentage of sequence similarity over the comparison window) generated by the various methods is selected. The term "sequence identity" means that two polynucleotide sequences are identical (i.e., on a nucleotide-by-nucleotide basis) over the window of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over the window of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the window of comparison (i.e., the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity.
- Corresponding residue positions, e.g., two different human RSVs or between a bovine and human RSV, may be divergent, identical or may differ by conservative amino acid substitutions. Conservative amino acid substitutions refer to the interchangeability of residues having similar side chains. For example, a conservative group of amino acids having aliphatic side chains is glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; a group of amino acids having aliphatic-hydroxyl side chains is serine and threonine; a group of amino acids having amide-containing side chains is asparagine and glutamine; a group of amino acids having aromatic side chains is phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; a group of amino acids having basic side chains is lysine, arginine, and histidine; and a group of amino acids having sulfur-containing side chains is cysteine and methionine. Preferred conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, and asparagine-glutamine. Stereoisomers (e.g., D-amino acids) of the twenty conventional amino acids, unnatural amino acids such as α,α -disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic acid, and other unconventional amino acids may also be suitable components for polypeptides of the present invention. Examples of unconventional amino acids include: 4-hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, ϵ -N,N,N-trimethyllysine, ϵ -N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

ω -N-methylarginine, and other amino and imino acids (e.g., 4-hydroxyproline).
Moreover, amino acids may be modified by glycosylation, phosphorylation and the like;

The present invention employs cDNA-based methods to construct a variety of recombinant, gene position-shifted RSV viruses and subviral particles. These recombinant RSV offer improved characteristics of attenuation and immunogenicity for use as vaccine agents. Desired phenotypic changes that are engineered into gene position-shifted RSV include, but are not limited to, attenuation in culture or in a selected host environment, resistance to reversion from the attenuated phenotype, enhanced immunogenic characteristics (e.g., as determined by enhancement, or diminution, of an elicited immune response), upregulation or downregulation of transcription and/or translation of selected viral products, etc. In preferred aspects of the invention, attenuated, gene position-shifted RSV are produced in which the chimeric genome or antigenome is further modified by introducing one or more attenuating mutations specifying an attenuating phenotype. These mutations may be generated de novo and tested for attenuating effects according to a rational design mutagenesis strategy as described in the above-incorporated references. Alternatively, the attenuating mutations can be identified in a biologically derived mutant RSV and thereafter incorporated into the gene position-shifted RSV of the invention.

Attenuating mutations in biologically derived RSV for incorporation within a gene position-shifted RSV vaccine strain may occur naturally or may be introduced into wild-type RSV strains by well known mutagenesis procedures. For example, incompletely attenuated parental RSV strains can be produced by chemical mutagenesis during virus growth in cell cultures to which a chemical mutagen has been added, by selection of virus that has been subjected to passage at suboptimal temperatures in order to introduce growth restriction mutations, or by selection of a mutagenized virus that produces small plaques (sp) in cell culture, as generally described herein and in USSN U.S. Patent No. 5,922,326, issued July 13, 1999, incorporated herein by reference.

By "biologically derived RSV" is meant any RSV not produced by recombinant means. Thus, biologically derived RSV include naturally occurring RSV of all subgroups and strains, including, e.g., naturally occurring RSV having a wild-type genomic sequence and RSV having genomic variations from a reference wild-type RSV sequence, e.g., RSV having a mutation specifying an attenuated phenotype. Likewise,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

biologically derived RSV include RSV mutants derived from a parental RSV strain by, inter alia, artificial mutagenesis and selection procedures.

To produce a satisfactorily attenuated RSV from biologically derived strains, mutations are preferably introduced into a parental strain which has been incompletely or partially attenuated, such as the well known ts-1 or ts-1NG or cpRSV mutants of the A2 strain of RSV subgroup A, or derivatives or subclones thereof. Using these and other partially attenuated strains additional mutation(s) can be generated that further attenuate the strain, e.g., to a desired level of restricted replication in a mammalian host, while retaining sufficient immunogenicity to confer protection in vaccinees.

Partially attenuated mutants of the subgroup A or B virus can be produced by well known methods of biologically cloning wild-type virus in an acceptable cell substrate and developing, e.g., cold-passaged mutants thereof, subjecting the virus to chemical mutagenesis to produce ts mutants, or selecting small plaque or similar phenotypic mutants (see, e.g., Murphy et al., International Publication WO 93/21310, incorporated herein by reference). For virus of subgroup B, an exemplary, partially attenuated parental virus is cp 23, which is a mutant of the B1 strain of subgroup B.

Various known selection techniques may be combined to produce partially attenuated mutants from non-attenuated subgroup A or B strains which are useful for further derivatization as described herein. Further, mutations specifying attenuated phenotypes may be introduced individually or in combination in incompletely attenuated subgroup A or B virus to produce vaccine virus having multiple, defined attenuating mutations that confer a desired level of attenuation and immunogenicity in vaccinees.

As noted above, production of a sufficiently attenuated biologically derived RSV mutant can be accomplished by several known methods. One such procedure involves subjecting a partially attenuated virus to passage in cell culture at progressively lower, attenuating temperatures. For example, whereas wild-type virus is typically cultivated at about 34–37°C, the partially attenuated mutants are produced by passage in cell cultures (e.g., primary bovine kidney cells) at suboptimal temperatures, e.g., 20–26°C. Thus, the cp mutant or other partially attenuated strain, e.g., ts-1 or spRSV, is adapted to efficient growth at a lower temperature by passage in MRC-5 or Vero cells, down to a temperature of about 20–24°C, preferably 20–22°C. This selection

WO 02/00693

PCT/US01/20107

of mutant RSV during cold-passages substantially reduces any residual virulence in the derivative strains as compared to the partially attenuated parent.

Alternatively, specific mutations can be introduced into biologically derived RSV by subjecting a partially attenuated parent virus to chemical mutagenesis, e.g., to introduce ts mutations or, in the case of viruses which are already ts, additional ts mutations sufficient to confer increased attenuation and/or stability of the ts phenotype of the attenuated derivative. Means for the introduction of ts mutations into RSV include replication of the virus in the presence of a mutagen such as 5-fluorouridine or 5-fluorouracil in a concentration of about 10^{-3} to 10^{-5} M, preferably about 10^{-4} M, exposure of virus to nitrosoguanidine at a concentration of about 100 µg/ml, according to the general procedure described in, e.g., (Charpure et al., *J. Virol.* 3:414-421, 1969 and Richardson et al., *J. Med. Virol.* 3:91-100, 1978), or genetic introduction of specific ts mutations. Other chemical mutagens can also be used. Attenuation can result from a ts mutation in almost any RSV gene, although a particularly amenable target for this purpose has been found to be the polymerase (L) gene.

The level of temperature sensitivity of replication in exemplary attenuated RSV for use within the invention is determined by comparing its replication at a permissive temperature with that at several restrictive temperatures. The lowest temperature at which the replication of the virus is reduced 100-fold or more in comparison with its replication at the permissive temperature is termed the shutoff temperature. In experimental animals and humans, both the replication and virulence of RSV correlate with the mutant's shutoff temperature. Replication of mutants with a shutoff temperature of 39°C is moderately restricted, whereas mutants with a shutoff of 38°C replicate less well and symptoms of illness are mainly restricted to the upper respiratory tract. A virus with a shutoff temperature of 35°C to 37°C will typically be fully attenuated in chimpanzees and substantially attenuated in humans. Thus, attenuated biologically derived mutant and gene position-shifted RSV of the invention which are ts will have a shutoff temperature in the range of about 35°C to 39°C, and preferably from 35°C to 38°C. The addition of a ts mutation into a partially attenuated strain produces a multiply attenuated virus useful within vaccine compositions of the invention.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

A number of attenuated RSV strains as candidate vaccines for intranasal administration have been developed using multiple rounds of chemical mutagenesis to introduce multiple mutations into a virus which had already been attenuated during cold-passage (e.g., Connors et al., *Virology* 208: 478-484, 1995; Crowe et al., *Vaccine* 12: 691-699, 1994; and Crowe et al., *Vaccine* 12: 783-790, 1994, incorporated herein by reference). Evaluation in rodents, chimpanzees, adults and infants indicate that certain of these candidate vaccine strains are relatively stable genetically, are highly immunogenic, and may be satisfactorily attenuated. Nucleotide sequence analysis of some of these attenuated viruses indicates that each level of increased attenuation is associated with specific nucleotide and amino acid substitutions. The above-incorporated references also disclose how to routinely distinguish between silent incidental mutations and those responsible for phenotype differences by introducing the mutations, separately and in various combinations, into the genome or antigenome of infectious RSV clones. This process coupled with evaluation of phenotype characteristics of parental and derivative virus identifies mutations responsible for such desired characteristics as attenuation, temperature sensitivity, cold-adaptation, small plaque size, host range restriction, etc.

Mutations thus identified are compiled into a "menu" and are then introduced as desired, singly or in combination, to calibrate a gene position-shifted RSV vaccine virus to an appropriate level of attenuation, immunogenicity, genetic resistance to reversion from an attenuated phenotype, etc., as desired. Preferably, the chimeric RSV of the invention are attenuated by incorporation of at least one, and more preferably two or more, attenuating mutations identified from such a menu, which may be defined as a group of known mutations within a panel of biologically derived mutant RSV strains. Preferred panels of mutant RSV strains described herein are cold passaged (cp) and/or temperature sensitive (ts) mutants, for example a panel comprised of RSV mutants designated cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579) (each deposited under the terms of the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC) of 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., and granted the above identified accession numbers).

WO 02/00693

PCT/US01/20107

From this exemplary panel of biologically derived mutants, a large menu of attenuating mutations are provided which can each be combined with any other mutation(s) within the panel for calibrating the level of attenuation in a recombinant, gene position-shifted RSV for vaccine use. Additional mutations may be derived from RSV having non-ts and non-cp attenuating mutations as identified, e.g., in small plaque (sp), cold-adapted (ca) or host-range restricted (hr) mutant strains. Attenuating mutations may be selected in coding portions of a donor or recipient RSV gene or in non-coding regions such as a cis-regulatory sequence. For example, attenuating mutations may include single or multiple base changes in a gene start sequence, as exemplified by a single or multiple base substitution in the M2 gene start sequence at nucleotide 7605.

Gene position-shifted RSV designed and selected for vaccine use often have at least two and sometimes three or more attenuating mutations to achieve a satisfactory level of attenuation for broad clinical use. In one embodiment, at least one attenuating mutation occurs in the RSV polymerase gene (either in the donor or recipient gene) and involves a nucleotide substitution specifying an amino acid change in the polymerase protein specifying a temperature-sensitive (ts) phenotype. Exemplary gene position-shifted RSV in this context incorporate one or more nucleotide substitutions in the large polymerase gene L resulting in an amino acid change at amino acid Asn43, Phe521, Gln831, Met1169, or Tyr1321, as exemplified by the changes, Leu for Phe521, Leu for Gln831, Val for Met1169, and Asn for Tyr1321. Alternately or additionally, gene position-shifted RSV of the invention may incorporate a ts mutation in a different RSV gene, e.g., in the M2 gene. Preferably, two or more nucleotide changes are incorporated in a codon specifying an attenuating mutation, e.g., in a codon specifying a ts mutation, thereby decreasing the likelihood of reversion from an attenuated phenotype.

In accordance with the methods of the invention, gene position-shifted RSV can be readily constructed and characterized that incorporate at least one and up to a full complement of attenuating mutations present within a panel of biologically derived mutant RSV strains. Thus, mutations can be assembled in any combination from a selected panel of mutants, for example, cps RSV 248 (ATCC VR 2450), cps RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cps RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cps RSV 530 (ATCC VR 2452), cps RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cps RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579). In this

WO 02/00693

PCT/US01/20107

manner, attenuation of recombinant vaccine candidates can be finely calibrated for use in one or more classes of patients, including seronegative infants.

In more specific embodiments, gene position-shifted RSV for vaccine use incorporate at least one and up to a full complement of attenuating mutations specifying a temperature-sensitive and/or attenuating amino acid substitution at Asn43, Phe521, Gln831, Met1169 or Tyr1321 in the RSV polymerase gene L, or a temperature-sensitive nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2. Alternatively or additionally, gene position-shifted RSV of claim may incorporate at least one and up to a full complement of mutations from cold-passaged attenuated RSV, for example one or more mutations specifying an amino acid substitution at Val267 in the RSV N gene, Glu218 or Thr523 in the RSV F gene, Cys319 or His1690 in the RSV polymerase gene L.

In other detailed embodiments, the gene position-shifted RSV of the invention is further modified to incorporate attenuating mutations selected from (i) a panel of mutations specifying temperature-sensitive amino acid substitutions Gln831 to Leu, and Tyr1321 to Asn in the RSV polymerase gene L; (ii) a temperature-sensitive nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2; (iii) an attenuating panel of mutations adopted from cold-passaged RSV specifying amino acid substitutions Val267 Ile in the RSV N gene, and Cys319 Tyr and His1690 Tyr in the RSV polymerase gene L; or (iv) deletion or ablation of expression of one or more of the RSV SH, NS1, NS2, G and M2-2 genes. Preferably, these and other examples of gene position-shifted RSV incorporate at least two attenuating mutations adopted from biologically derived mutant RSV, which may be derived from the same or different biologically derived mutant RSV strains. Also preferably, these exemplary mutants have one or more of their attenuating mutations stabilized by multiple nucleotide changes in a codon specifying the mutation.

In accordance with the foregoing description, the ability to produce infectious RSV from cDNA permits introduction of specific engineered changes within gene position-shifted RSV. In particular, infectious, recombinant RSV are employed for identification of specific mutation(s) in biologically derived, attenuated RSV strains, for example mutations which specify ts, ca, att and other phenotypes. Desired mutations are thus identified and introduced into recombinant, gene position-shifted RSV vaccine strains. The capability of producing virus from cDNA allows for routine incorporation of these mutations, individually or in various selected combinations, into a full-length cDNA

WO 02/00693

PCT/US01/20107

clone, whereafter the phenotypes of rescued recombinant viruses containing the introduced mutations to be readily determined.

- By identifying and incorporating specific, biologically derived mutations associated with desired phenotypes, e.g., a cp or ts phenotype, into infectious chimeric RSV clones, the invention provides for other, site-specific modifications at, or within close proximity to, the identified mutation. Whereas most attenuating mutations produced in biologically derived RSV are single nucleotide changes, other "site specific" mutations can also be incorporated by recombinant techniques into biologically derived or recombinant RSV. As used herein, site-specific mutations include insertions, substitutions, deletions or rearrangements of from 1 to 3, up to about 5-15 or more altered nucleotides (e.g., altered from a wild-type RSV sequence, from a sequence of a selected mutant RSV strain, or from a parent recombinant RSV clone subjected to mutagenesis). Such site-specific mutations may be incorporated at, or within the region of, a selected, biologically derived mutation. Alternatively, the mutations can be introduced in various other contexts within an RSV clone, for example at or near a cis-acting regulatory sequence or nucleotide sequence encoding a protein active site, binding site, immunogenic epitope, etc. Site-specific RSV mutants typically retain a desired attenuating phenotype, but may additionally exhibit altered phenotypic characteristics unrelated to attenuation, e.g., enhanced or broadened immunogenicity, and/or improved growth. Further examples of desired, site-specific mutants include recombinant RSV designed to incorporate additional, stabilizing nucleotide mutations in a codon specifying an attenuating mutation. Where possible, two or more nucleotide substitutions are introduced at codons that specify attenuating amino acid changes in a parent mutant or recombinant RSV clone, yielding a biologically derived or recombinant RSV having genetic resistance to reversion from an attenuated phenotype. In other embodiments, site-specific nucleotide substitutions, additions, deletions or rearrangements are introduced upstream (N-terminal direction) or downstream (C-terminal direction), e.g., from 1 to 3, 5-10 and up to 15 nucleotides or more 5' or 3', relative to a targeted nucleotide position, e.g., to construct or ablate an existing cis-acting regulatory element.
- In addition to single and multiple point mutations and site-specific mutations, changes to gene position-shifted RSV disclosed herein include deletions, insertions, substitutions or rearrangements of whole genes or genome segments. These

WO 02/00693

PCT/US01/20107

mutations may alter small numbers of bases (e.g., from 15-30 bases, up to 35-50 bases or more), large blocks of nucleotides (e.g., 50-100, 100-300, 300-500, 500-1,000 bases), or nearly complete or complete genes (e.g., 1,000-1,500 nucleotides, 1,500-2,500 nucleotides, 2,500-5,000, nucleotides, 5,00-6,500 nucleotides or more) in the donor or
 5 recipient genome or antigenome, depending upon the nature of the change (i.e., a small number of bases may be changed to insert or ablate an immunogenic epitope or change a small genome segment, whereas large block(s) of bases are involved when genes or large genome segments are added, substituted, deleted or rearranged.

In alternative aspects of the invention, the infectious gene position-shifted
 10 RSV produced from a cDNA-expressed genome or antigenome can be any of the RSV or RSV-like strains, e.g., human, bovine, murine, etc., or of any pneumovirus, e.g., pneumonia virus of mice avian pneumovirus (previously called turkey rhinotracheitis virus). To engender a protective immune response, the RSV strain may be one which is endogenous to the subject being immunized, such as human RSV being used to immunize
 15 humans. The genome or antigenome of endogenous RSV can be modified, however, to express RSV genes or genome segments from a combination of different sources, e.g., a combination of genes or genome segments from different RSV species, subgroups, or strains, or from an RSV and another respiratory pathogen such as PIV.

Introduction of the foregoing defined mutations into an infectious, gene
 20 position-shifted RSV clone can be achieved by a variety of well known methods. By "infectious clone" with regard to DNA is meant cDNA or its product, synthetic or otherwise, which can be transcribed into genomic or antigenomic RNA capable of serving as template to produce the genome of an infectious virus or subviral particle. Thus, defined mutations can be introduced by conventional techniques (e.g., site-directed
 25 mutagenesis) into a cDNA copy of the genome or antigenome. The use of antigenome or genome cDNA subfragments to assemble a complete antigenome or genome cDNA as described herein has the advantage that each region can be manipulated separately (smaller cDNAs are easier to manipulate than large ones) and then readily assembled into a complete cDNA. Thus, the complete antigenome or genome cDNA, or any
 30 subfragment thereof, can be used as template for oligonucleotide-directed mutagenesis. This can be through the intermediate of a single-stranded phagemid form, such as using the Muta-gene® kit of Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) or a method using a

WO 02/00693

PCT/US01/20107

double-stranded plasmid directly as template such as the Chameleon mutagenesis kit of Stratagene (La Jolla, CA), or by the polymerase chain reaction employing either an oligonucleotide primer or template which contains the mutation(s) of interest. A mutated subfragment can then be assembled into the complete antigenome or genome cDNA. A variety of other mutagenesis techniques are known and available for use in producing the mutations of interest in the RSV antigenome or genome cDNA. Mutations can vary from single nucleotide changes to replacement of large cDNA pieces containing one or more genes or genome regions.

Thus, in one illustrative embodiment mutations are introduced by using the Muta-gene phagemid *in vitro* mutagenesis kit available from Bio-Rad. In brief, cDNA encoding a portion of an RSV genome or antigenome is cloned into the plasmid pTZ18U, and used to transform CJ236 cells (Life Technologies). Phagemid preparations are prepared as recommended by the manufacturer. Oligonucleotides are designed for mutagenesis by introduction of an altered nucleotide at the desired position of the genome or antigenome. The plasmid containing the genetically altered genome or antigenome fragment is then amplified and the mutated piece is then reintroduced into the full-length genome or antigenome clone.

The invention also provides methods for producing an infectious gene position-shifted RSV from one or more isolated polynucleotides, e.g., one or more cDNAs. According to the present invention cDNA encoding a RSV genome or antigenome is constructed for intracellular or *in vitro* coexpression with the necessary viral proteins to form infectious RSV. By "RSV antigenome" is meant an isolated positive-sense polynucleotide molecule which serves as the template for the synthesis of progeny RSV genome. Preferably a cDNA is constructed which is a positive-sense version of the RSV genome, corresponding to the replicative intermediate RNA, or antigenome, so as to minimize the possibility of hybridizing with positive-sense transcripts of the complementing sequences that encode proteins necessary to generate a transcribing, replicating nucleocapsid, i.e., sequences that encode N, P, L and M2(ORF1) protein. In an RSV minigenome system, genome and antigenome were equally active in rescue, whether complemented by RSV or by plasmids, indicating that either genome or antigenome can be used and thus the choice can be made on methodologic or other grounds.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

A native RSV genome typically comprises a negative-sense polynucleotide molecule which, through complementary viral mRNAs, encodes eleven species of viral proteins, i.e., the nonstructural species NS1 and NS2, N, P, matrix (M), small hydrophobic (SH), glycoprotein (G), fusion (F), M2(ORF1), M2(ORF2), and L, substantially as described in (Mink et al., Virology 185:615-624, 1991; Stec et al., Virology 183:273-287, 1991; and Connors et al., Virology 208:478-484, 1995; Collins et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:81-85, 1996), each incorporated herein by reference. For purposes of the present invention the genome or antigenome of the recombinant RSV of the invention need only contain those genes or portions thereof necessary to render the viral or subviral particles encoded thereby infectious. Further, the genes or portions thereof may be provided by more than one polynucleotide molecule, i.e., a gene may be provided by complementation or the like from a separate nucleotide molecule, or can be expressed directly from the genome or antigenome cDNA.

By recombinant RSV is meant a RSV or RSV-like viral or subviral particle derived directly or indirectly from a recombinant expression system or propagated from virus or subviral particles produced therefrom. The recombinant expression system will employ a recombinant expression vector which comprises an operably linked transcriptional unit comprising an assembly of at least a genetic element or elements having a regulatory role in RSV gene expression, for example, a promoter, a structural or coding sequence which is transcribed into RSV RNA, and appropriate transcription initiation and termination sequences.

To produce infectious RSV from cDNA-expressed genome or antigenome, the genome or antigenome is coexpressed with those RSV proteins necessary to (i) produce a nucleocapsid capable of RNA replication, and (ii) render progeny nucleocapsids competent for both RNA replication and transcription. Transcription by the genome nucleocapsid provides the other RSV proteins and initiates a productive infection. Alternatively, additional RSV proteins needed for a productive infection can be supplied by coexpression.

An RSV antigenome may be constructed for use in the present invention by assembling cloned cDNA segments, representing in aggregate the complete antigenome, by polymerase chain reaction (PCR; described in, e.g., U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202, and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, 1990, incorporated herein by reference) of reverse-transcribed copies of RSV mRNA or genome RNA. For example, cDNAs containing the lefthand end of the antigenome, spanning from an appropriate promoter (e.g., T7 RNA polymerase promoter) and the leader region complement to the SH gene, are assembled in an appropriate expression vector, such as a plasmid (e.g., pBR322) or various available cosmid, phage, or DNA virus vectors. The vector may be modified by mutagenesis and/or insertion of synthetic polylinker containing unique restriction sites designed to facilitate assembly. For example, a plasmid vector described herein was derived from pBR322 by replacement of the PstI-EcoRI fragment with a synthetic DNA containing convenient restriction enzyme sites. Use of pBR322 as a vector stabilized nucleotides 3716-3732 of the RSV sequence, which otherwise sustained nucleotide deletions or insertions, and propagation of the plasmid was in bacterial strain DH10B to avoid an artifactual duplication and insertion which otherwise occurred in the vicinity of nt 4499. For ease of preparation the G, F and M2 genes can be assembled in a separate vector, as can be the L and trailer sequences. The right-hand end (e.g., L and trailer sequences) of the antigenome plasmid may contain additional sequences as desired, such as a flanking ribozyme and tandem T7 transcriptional terminators. The ribozyme can be hammerhead type (e.g., Grosfeld et al., *J. Virol.* 69:5677-5686, 1995), which would yield a 3' end containing a single nonviral nucleotide, or can any of the other suitable ribozymes such as that of hepatitis delta virus (Perrotta et al., *Nature* 350:434-436, 1991) which would yield a 3' end free of non-RSV nucleotides. A middle segment (e.g., G-to-M2 piece) is inserted into an appropriate restriction site of the leader-to-SH plasmid, which in turn is the recipient for the L-trailer-ribozyme-terminator piece, yielding a complete antigenome. In an illustrative example described herein, the leader end was constructed to abut the promoter for T7 RNA polymerase which included three transcribed G residues for optimal activity; transcription donates these three nonviral G's to the 5' end of the antigenome. These three nonviral G residues can be omitted to yield a 5' end free of nonviral nucleotides. To generate a nearly correct 3' end, the trailer end was constructed to be adjacent to a hammerhead ribozyme, which upon cleavage would donate a single 3'-phosphorylated U residue to the 3' end of the encoded RNA.

In certain embodiments of the invention, complementing sequences encoding proteins necessary to generate a transcribing, replicating RSV nucleocapsid are provided by one or more helper viruses. Such helper viruses can be wild-type or mutant.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Preferably, the helper virus can be distinguished phenotypically from the virus encoded by the RSV cDNA. For example, it is desirable to provide monoclonal antibodies which react immunologically with the helper virus but not the virus encoded by the RSV cDNA. Such antibodies can be neutralizing antibodies. In some embodiments, the antibodies can
 5 be used to neutralize the helper virus background to facilitate identification and recovery of the recombinant virus, or in affinity chromatography to separate the helper virus from the recombinant virus. Mutations can be introduced into the RSV cDNA which render the recombinant RSV nonreactive or resistant to neutralization with such antibodies.

A variety of nucleotide insertions and deletions can be made in the gene
 10 position-shifted RSV genome or antigenome to generate a properly attenuated clone. The nucleotide length of the genome of wild-type human RSV (15,222 nucleotides) is a multiple of six, and members of the Paramyxovirus and Morbillivirus genera typically abide by a "rule of six," i.e., genomes (or minigenomes) replicate efficiently only when their nucleotide length is a multiple of six (thought to be a requirement for precise
 15 spacing of nucleotide residues relative to encapsidating NP protein). Alteration of RSV genome length by single residue increments had no effect on the efficiency of replication, and sequence analysis of several different minigenome mutants following passage showed that the length differences were maintained without compensatory changes. Thus, RSV lacks the strict requirement of genome length being a multiple of six, and
 20 nucleotide insertions and deletions can be made in the RSV genome or antigenome without defeating replication of the recombinant RSV of the present invention.

Alternative means to construct cDNA encoding a gene position-shifted RSV genome or antigenome include by reverse transcription-PCR using improved PCR conditions (e.g., as described in Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695-5699,
 25 1994; Samal et al., *J. Virol.* 70:5075-5082, 1996, each incorporated herein by reference) to reduce the number of subunit cDNA components to as few as one or two pieces. In other embodiments different promoters can be used (e.g., T3, SP6) or different ribozymes (e.g., that of hepatitis delta virus. Different DNA vectors (e.g., cosmids) can be used for propagation to better accommodate the large size genome or antigenome.

30 The N, P and L proteins, necessary for RNA replication, require an RNA polymerase elongation factor such as the M2(ORF1) protein for processive transcription. Thus M2(ORF1) or a substantially equivalent transcription elongation factor for negative

WO 02/00693

PCT/US01/20107

strand RNA viruses is required for the production of infectious RSV and is a necessary component of functional nucleocapsids during productive infection.

The need for the M2(ORF1) protein is consistent with its role as a transcription elongation factor. The need for expression of the RNA polymerase elongation factor protein for negative strand RNA viruses is a feature of the present invention. M2(ORF1) can be supplied by expression of the complete M2-gene, either by the chimeric genome or antigenome or by coexpression therewith, although in this form the second ORF2 may also be expressed and have an inhibitory effect on RNA replication. Therefore, for production of infectious virus using the complete M2 gene the activities of the two ORFs should be balanced to permit sufficient expression of M2(ORF1) to provide transcription elongation activity yet not so much of M2(ORF2) to inhibit RNA replication. Alternatively, the ORF1 protein is provided from a cDNA engineered to lack ORF2 or which encodes a defective ORF2. Efficiency of virus production may also be improved by co-expression of additional viral protein genes, such as those encoding envelope constituents (i.e., SH, M, G, F proteins).

In accordance with these results concerning M2(ORF2), another exemplary embodiment of the invention is provided comprising a gene position-shifted RSV that incorporate a mutation of M2(ORF2) (Collins and Wertz, *J. Virol.* 54:65-71, 1985; Collins et al., *J. Gen. Virol.* 71:3015-3020, 1990, Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:81-85, 1996, each incorporated herein by reference) to yield novel RSV vaccine candidates (see U.S. Provisional Patent Application No. 60/143,097, filed by Collins et al. on July 9, 1999, incorporated herein by reference). In certain aspects, expression of M2 ORF2 is reduced or ablated by modifying the recombinant RSV genome or antigenome to incorporate a frame shift mutation or one or stop codons in M2 ORF2 yielding a "knock out" viral clone. Alternatively, M2 ORF2 is deleted in whole or in part to render the M2-2 protein partially or entirely non-functional or to disrupt its expression altogether to yield a M2 ORF2 "deletion mutant" chimeric RSV. Alternatively, the M2-2 ORF may be transpositioned in the genome or antigenome to a more promoter-proximal or promoter-distal position compared to the natural gene order position of M2-2 gene to up-regulate or down-regulate expression of the M2-2 ORF. In additional embodiments, the M2-2 ORF is incorporated in the genome or antigenome as a

WO 02/00693

PCT/US01/20107

separate gene having a gene start and gene end signal, which modification results in up-regulation of the M2-2 ORF.

The gene position-shifted RSV of the invention that incorporate mutations in M2 ORF2 possess highly desirable phenotypic characteristics for vaccine development. The above identified modifications in the recombinant genome or antigenome specify one or more desired phenotypic changes in the resulting virus or subviral particle. Vaccine candidates are thus generated that exhibit one or more characteristics identified as (i) a change in mRNA transcription, (ii) a change in the level of viral protein expression; (iii) a change in genomic or antigenomic RNA replication, (iv) a change in viral growth characteristics, (v), a change in viral plaque size, and/or (vi) a change in cytopathogenicity.

In exemplary RSV recombinants incorporating an M2 ORF 2 deletion or knock out mutation, desired phenotypic changes include attenuation of viral growth compared to growth of a corresponding wild-type or mutant parental RSV strain. In more detailed aspects, viral growth in cell culture may be attenuated by approximately 10-fold or more attributable to mutations in M2 ORF2. Kinetics of viral growth are also shown to be modified in a manner that is beneficial for vaccine development.

Also included within the invention are M2-ORF 2 deletion and knock out mutant RSV that exhibit delayed kinetics of viral mRNA synthesis compared to kinetics of mRNA synthesis of corresponding wild-type or mutant parental RSV strains. Despite these delayed transcription kinetics, these novel vaccine candidates exhibit an increase in cumulative mRNA synthesis compared to parental virus. These phenotypic changes typically are associated with an increase in viral protein accumulation in infected cells compared to protein accumulation in cells infected with wild-type or other parental RSV strains. At the same time, viral RNA replication is reduced in M2 ORF2 gene position-shifted RSV compared to that of a parental RSV strain having normal M2 ORF2 function, whereby accumulation of genomic or antigenomic RNA is reduced.

Within preferred aspects of the invention, chimeric M2 ORF2 deletion and "knock out" RSV are engineered to express undiminished or, more typically, increased levels of viral antigen(s) while also exhibiting an attenuated phenotype. Immunogenic potential is thus preserved due to the undiminished or increased mRNA transcription and

WO 02/00693

PCT/US01/20107

antigen expression, while attenuation is achieved through incorporation of the heterologous gene(s) or gene segment(s) and concomitant reductions in RNA replication and virus growth attributable to the M2-ORF 2 deletion and knock out mutation. This novel suite of phenotypic traits is highly desired for vaccine development. Other useful phenotypic changes that are observed in M2 ORF2 deletion and knock out gene position-shifted RSV include a large plaque phenotype and altered cytopathogenicity compared to corresponding wild-type or mutant parental RSV strains.

Isolated polynucleotides (e.g., cDNA) encoding a gene position-shifted RSV genome or antigenome and, separately, or in cis, or expressed from the antigenome or genome cDNA, the N, P, L and M2(ORF1) proteins, are inserted by transfection, electroporation, mechanical insertion, transduction or the like, into cells which are capable of supporting a productive RSV infection, e.g., HEp-2, FRhL-DBS2, MRC, and Vero cells. Transfection of isolated polynucleotide sequences may be introduced into cultured cells by, for example, calcium phosphate-mediated transfection (Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973), electroporation (Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982), DEAE-dextran mediated transfection (Ausubel et al., (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987, cationic lipid-mediated transfection (Hawley-Nelson et al., *Focus* 15:73-79, 1993) or a commercially available transfection reagent, e.g., LipofectACE® (Life Technologies) (each of the foregoing references are incorporated herein by reference).

The N, P, L and M2(ORF1) proteins are encoded by one or more cDNAs and expression vectors which can be the same or separate from that which encodes the genome or antigenome, and various combinations thereof. Additional proteins may be included as desired, encoded by its own vector or by a vector encoding a N, P, L, or M2(ORF1) protein and/or the complete genome or antigenome. Expression of the genome or antigenome and proteins from transfected plasmids can be achieved, for example, by each cDNA being under the control of a promoter for T7 RNA polymerase, which in turn is supplied by infection, transfection or transduction with an expression system for the T7 RNA polymerase, e.g., a vaccinia virus MVA strain recombinant which expresses the T7 RNA polymerase (Wyatt et al., *Virology*, 210:202-205, 1995, incorporated herein by reference). The viral proteins, and/or T7 RNA polymerase, can

WO 02/00693

PCT/US01/20107

also be provided from transformed mammalian cells, or by transfection of preformed mRNA or protein.

Alternatively, synthesis of antigenome or genome can be conducted *in vitro* (cell-free) in a combined transcription-translation reaction, followed by transfection into cells. Or, antigenome or genome RNA can be synthesized *in vitro* and transfected into cells expressing RSV proteins.

To select candidate vaccine viruses according to the invention, the criteria of viability, attenuation and immunogenicity are determined according to well known methods. Viruses which will be most desired in vaccines of the invention must maintain viability, have a stable attenuation phenotype, exhibit replication in an immunized host (albeit at lower levels), and effectively elicit production of an immune response in a vaccinee sufficient to confer protection against serious disease caused by subsequent infection from wild-type virus. Clearly, the heretofore known and reported RS virus mutants do not meet all of these criteria. Indeed, contrary to expectations based on the results reported for known attenuated RSV, viruses of the invention are not only viable and more appropriately attenuated than previous mutants, but are more stable genetically *in vivo* than those previously studied mutants--retaining the ability to stimulate a protective immune response and in some instances to expand the protection afforded by multiple modifications, e.g., induce protection against different viral strains or subgroups, or protection by a different immunologic basis, e.g., secretory versus serum immunoglobulins, cellular immunity, and the like. Prior to the invention, genetic instability of the ts phenotype following replication *in vivo* has been common for ts viruses (Murphy et al., Infect. Immun. 37:235-242, 1982).

To propagate a gene position-shifted RSV virus for vaccine use and other purposes, a number of cell lines which allow for RSV growth may be used. RSV grows in a variety of human and animal cells. Preferred cell lines for propagating attenuated RS virus for vaccine use include DBS-FRhl-2, MRC-5, and Vero cells. Highest virus yields are usually achieved with epithelial cell lines such as Vero cells. Cells are typically inoculated with virus at a multiplicity of infection ranging from about 0.001 to 1.0 or more, and are cultivated under conditions permissive for replication of the virus, e.g., at about 30-37°C and for about 3-5 days, or as long as necessary for virus to reach an adequate titer. Virus is removed from cell culture and separated from cellular

WO 02/00693

PCT/US01/20107

components, typically by well known clarification procedures, e.g., centrifugation, and may be further purified as desired using procedures well known to those skilled in the art.

Gene position-shifted RSV which has been attenuated and otherwise modified as described herein can be tested in various well known and generally accepted *in vitro* and *in vivo* models to confirm adequate attenuation, resistance to phenotypic reversion, and immunogenicity for vaccine use. In *in vitro* assays, the modified virus (e.g., a multiply attenuated, biologically derived or recombinant RSV) is tested for temperature sensitivity of virus replication, i.e. its phenotype, and for the small plaque phenotype. Modified viruses are further tested in animal models of RSV infection. A variety of animal models have been described and are summarized in (Meignier et al., eds., Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infection, Merieux Foundation Publication, 1991, which is incorporated herein by reference). A cotton rat model of RSV infection is described in (U.S. 4,800,078 and Prince et al., Virus Res. 2:193-206, 1985), which are incorporated herein by reference, and is considered predictive of attenuation and efficacy in humans and non-human primates. In addition, a primate model of RSV infection using the chimpanzee is predictive of attenuation and efficacy in humans, as is described in detail in (Richardson et al., J. Med. Virol. 3:91-100, 1978; Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400, 1982; Crowe et al., Vaccine 11:1395-1404, 1993, each incorporated herein by reference).

RSV model systems, including rodents and chimpanzees for evaluating attenuation and infectivity of RSV vaccine candidates are widely accepted in the art and the data obtained therefrom correlate well with RSV infection and attenuation. The mouse and cotton rat models are especially useful in those instances in which candidate RSV viruses display inadequate growth in chimpanzees, for example in the case of RSV subgroup B viruses.

In accordance with the foregoing description and based on the examples below, the invention also provides isolated, infectious gene position-shifted RSV compositions for vaccine use. The attenuated chimeric virus which is a component of a vaccine is in an isolated and typically purified form. By isolated is meant to refer to RSV which is in other than a native environment of a wild-type virus, such as the nasopharynx of an infected individual. More generally, isolated is meant to include the attenuated virus as a component of a cell culture or other artificial medium where it can be

WO 02/00693

PCT/US01/20107

propagated and characterized in a controlled setting. For example, attenuated RSV of the invention may be produced by an infected cell culture, separated from the cell culture and added to a stabilizer.

- RSV vaccines of the invention contain as an active ingredient an
- 5 immunogenically effective amount of RSV produced as described herein. Biologically derived or recombinant RSV can be used directly in vaccine formulations, or lyophilized. Lyophilized virus will typically be maintained at about 4°C. When ready for use the lyophilized virus is reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or comprising SPG, Mg++ and HEPES, with or without adjuvant, as further described below. The
- 10 biologically derived or recombinantly modified virus may be introduced into a host with a physiologically acceptable carrier and/or adjuvant. Useful carriers are well known in the art, and include, e.g., water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, hyaluronic acid and the like. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to
- 15 administration, as mentioned above. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sorbitan monolaurate, triethanolamine oleate, and the like. Acceptable
- 20 adjuvants include incomplete Freund's adjuvant, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, or alum, which are materials well known in the art. Preferred adjuvants also include Stimulon® QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA), MPL® (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, MT), and interleukin-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA).
- 25 Upon immunization with a gene position-shifted RSV vaccine composition as described herein, via aerosol, droplet, oral, topical or other route, the immune system of the host responds to the vaccine by producing antibodies specific for one or more RSV virus proteins, e.g., F and/or G glycoproteins. As a result of the vaccination the host becomes at least partially or completely immune to RSV infection, or resistant to
- 30 developing moderate or severe RSV disease, particularly of the lower respiratory tract.

Gene position-shifted RSV vaccines of the invention may comprise attenuated virus that elicits an immune response against a single RSV strain or antigenic

WO 02/00693

PCT/US01/20107

subgroup, e.g. A or B, or against multiple RSV strains or subgroups. In this context, the gene position-shifted RSV can elicit a monospecific immune response or a polyspecific immune response against multiple RSV strains or subgroups. Alternatively, gene position-shifted RSV having different immunogenic characteristics can be combined in a vaccine mixture or administered separately in a coordinated treatment protocol to elicit more effective protection against one RSV strain, or against multiple RSV strains or subgroups.

The host to which the vaccine is administered can be any mammal susceptible to infection by RSV or a closely related virus and capable of generating a protective immune response to antigens of the vaccinating virus. Thus, suitable hosts include humans, non-human primates, bovine, equine, swine, ovine, caprine, lagomorph, rodents, etc. Accordingly, the invention provides methods for creating vaccines for a variety of human and veterinary uses.

The vaccine compositions containing the attenuated gene position-shifted RSV of the invention are administered to a patient susceptible to or otherwise at risk of RSV infection in an "immunogenically effective dose" which is sufficient to induce or enhance the individual's immune response capabilities against RSV. In the case of human subjects, the attenuated virus of the invention is administered according to well established human RSV vaccine protocols, as described in, e.g., (Wright et al., *Infect. Immun.* 37:397-400, 1982; Kim et al., *Pediatrics* 52:56-63, 1973; and Wright et al., *J. Pediatr.* 88:931-936, 1976), which are each incorporated herein by reference. Briefly, adults or children are inoculated intranasally via droplet with an immunogenically effective dose of RSV vaccine, typically in a volume of 0.5 ml of a physiologically acceptable diluent or carrier. This has the advantage of simplicity and safety compared to parenteral immunization with a non-replicating vaccine. It also provides direct stimulation of local respiratory tract immunity, which plays a major role in resistance to RSV. Further, this mode of vaccination effectively bypasses the immunosuppressive effects of RSV-specific maternally-derived serum antibodies, which typically are found in the very young. Also, while the parenteral administration of RSV antigens can sometimes be associated with immunopathologic complications, this has never been observed with a live virus.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- In all subjects, the precise amount of gene position-shifted RSV vaccine administered and the timing and repetition of administration will be determined based on the patient's state of health and weight, the mode of administration, the nature of the formulation, etc. Dosages will generally range from about 10^3 to about 10^6 plaque forming units (PFU) or more of virus per patient, more commonly from about 10^4 to 10^5 PFU virus per patient. In any event, the vaccine formulations should provide a quantity of attenuated RSV of the invention sufficient to effectively stimulate or induce an anti-RSV immune response, e.g., as can be determined by complement fixation, plaque neutralization, and/or enzyme-linked immunosorbent assay, among other methods. In this regard, individuals are also monitored for signs and symptoms of upper respiratory illness. As with administration to chimpanzees, the attenuated virus of the vaccine grows in the nasopharynx of vaccinees at levels approximately 10-fold or more lower than wild-type virus, or approximately 10-fold or more lower when compared to levels of incompletely attenuated RSV.
- In neonates and infants, multiple administration may be required to elicit sufficient levels of immunity. Administration should begin within the first month of life, and at intervals throughout childhood, such as at two months, six months, one year and two years, as necessary to maintain sufficient levels of protection against native (wild-type) RSV infection. Similarly, adults who are particularly susceptible to repeated or serious RSV infection, such as, for example, health care workers, day care workers, family members of young children, the elderly, individuals with compromised cardiopulmonary function, may require multiple immunizations to establish and/or maintain protective immune responses. Levels of induced immunity can be monitored by measuring amounts of neutralizing secretory and serum antibodies, and dosages adjusted or vaccinations repeated as necessary to maintain desired levels of protection. Further, different vaccine viruses may be indicated for administration to different recipient groups. For example, an engineered gene position-shifted RSV strain expressing a cytokine or an additional protein rich in T cell epitopes may be particularly advantageous for adults rather than for infants. RSV vaccines produced in accordance with the present invention can be combined with viruses expressing antigens of another subgroup or strain of RSV to achieve protection against multiple RSV subgroups or strains. Alternatively, the vaccine virus may incorporate protective epitopes of multiple RSV strains or subgroups engineered into one RSV clone as described herein.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Typically when different vaccine viruses are used they will be administered in an admixture simultaneously, but they may also be administered separately. For example, as the F glycoproteins of the two RSV subgroups differ by only about 10% in amino acid sequence, this similarity is the basis for a cross-protective
5 immune response as observed in animals immunized with RSV or F antigen and challenged with a heterologous strain. Thus, immunization with one strain may protect against different strains of the same or different subgroup. However, optimal protection probably will require immunization against both subgroups.

The gene position-shifted RSV vaccines of the invention elicit production
10 of an immune response that is protective against serious lower respiratory tract disease, such as pneumonia and bronchiolitis when the individual is subsequently infected with wild-type RSV. While the naturally circulating virus is still capable of causing infection, particularly in the upper respiratory tract, there is a very greatly reduced possibility of rhinitis as a result of the vaccination and possible boosting of resistance by subsequent
15 infection by wild-type virus. Following vaccination, there are detectable levels of host engendered serum and secretory antibodies which are capable of neutralizing homologous (of the same subgroup) wild-type virus *in vitro* and *in vivo*. In many instances the host antibodies will also neutralize wild-type virus of a different, non-vaccine subgroup.

Preferred gene position-shifted RSV of the present invention exhibit a very
20 substantial diminution of virulence when compared to wild-type virus that is circulating naturally in humans. The gene position-shifted virus is sufficiently attenuated so that symptoms of infection will not occur in most immunized individuals. In some instances the attenuated virus may still be capable of dissemination to unvaccinated individuals. However, its virulence is sufficiently abrogated such that severe lower respiratory tract
25 infections in the vaccinated or incidental host do not occur.

The level of attenuation of gene position-shifted RSV vaccine virus may be determined by, for example, quantifying the amount of virus present in the respiratory tract of an immunized host and comparing the amount to that produced by wild-type RSV or other attenuated RSV which have been evaluated as candidate vaccine strains. For
30 example, the attenuated chimeric virus of the invention will have a greater degree of restriction of replication in the upper respiratory tract of a highly susceptible host, such as a chimpanzee, compared to the levels of replication of wild-type virus, e.g., 10- to 1000-

WO 02/00693

PCT/US01/20107

fold less. Also, the level of replication of the attenuated RSV vaccine strain in the upper respiratory tract of the chimpanzee should be less than that of the RSV A2 ts-1 mutant, which was demonstrated previously to be incompletely attenuated in seronegative human infants. In order to further reduce the development of rhinorrhea, which is associated with the replication of virus in the upper respiratory tract, an ideal vaccine candidate virus should exhibit a restricted level of replication in both the upper and lower respiratory tract. However, the attenuated viruses of the invention must be sufficiently infectious and immunogenic in humans to confer protection in vaccinated individuals. Methods for determining levels of RS virus in the nasopharynx of an infected host are well known in the literature. Specimens are obtained by aspiration or washing out of nasopharyngeal secretions and virus quantified in tissue culture or other by laboratory procedure. See, for example, (Belshe et al., J. Med. Virology 1:157-162, 1977; Friedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204:690-694, 1968; Gharpure et al., J. Virol. 3:414-421, 1969; and Wright et al., Arch. Ges. Virusforsch. 41:238-247, 1973), each incorporated herein by reference.

15 The virus can conveniently be measured in the nasopharynx of host animals, such as chimpanzees.

In some instances it may be desirable to combine the gene position-shifted RSV vaccines of the invention with vaccines which induce protective responses to other agents, particularly other childhood viruses. For example, a gene position-shifted RSV vaccine of the present invention can be administered simultaneously with parainfluenza virus vaccine, such as described in Clements et al., J. Clin. Microbiol. 29:1175-1182, 1991), which is incorporated herein by reference. In another aspect of the invention the chimeric RSV can be employed as a vector for protective antigens of other respiratory tract pathogens, such as PIV, by incorporating the sequences encoding those protective antigens into the gene position-shifted RSV genome or antigenome which is used to produce infectious recombinant RSV, as described herein.

20

25

In yet another aspect of the invention a gene position-shifted RSV is employed as a vector for transient gene therapy of the respiratory tract. According to this embodiment the gene position-shifted RSV genome or antigenome incorporates a sequence which is capable of encoding a gene product of interest. The gene product of interest is under control of the same or a different promoter from that which controls RSV expression. The infectious RSV produced by coexpressing the recombinant RSV genome

30

WO 02/00693

PCT/US01/20107

or antigenome with the N, P, L and M2(ORF1) proteins and containing a sequence encoding the gene product of interest is administered to a patient. This can involve a recombinant RSV which is fully infectious (i.e., competent to infect cultured cells and produce infectious progeny), or can be a recombinant RSV which, for example, lacks one or more of the G, F and SH surface glycoprotein genes and is propagated in cells which provide one or more of these proteins in trans by stable or transient expression. In such a case, the recombinant virus produced would be competent for efficient infection, but would be highly inefficient in producing infectious particles. The lack of expressed cell surface glycoproteins also would reduce the efficiency of the host immune system in eliminating the infected cells. These features would increase the durability and safety of expression of the foreign gene.

With regard to gene therapy, administration is typically by aerosol, nebulizer, or other topical application to the respiratory tract of the patient being treated. Gene position-shifted RSV is administered in an amount sufficient to result in the expression of therapeutic or prophylactic levels of the desired gene product. Examples of representative gene products which are administered in this method include those which encode, for example, those particularly suitable for transient expression, e.g., interleukin-2, interleukin-4, gamma-interferon, GM-CSF, G-CSF, erythropoietin, and other cytokines, glucocerebrosidase, phenylalanine hydroxylase, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, cytotoxins, tumor suppressor genes, antisense RNAs, and vaccine antigens.

The following examples are provided by way of illustration, not limitation.

EXAMPLE I

25 Construction of Recombinant RSV in which the G and F Genes Have Been Rearranged to a Promoter-Proximal Position Singly or in Combination

The present example documents rearrangement of the gene order of infectious RSV whereby one or more gene(s) or genome segment(s) encoding an antigenic determinant, exemplified by the G and/or F gene(s), is shifted to a more promoter-proximal position. In one example presented below, the G and F genes are

WO 02/00693

PCT/US01/20107

moved coordinately from their wild type gene order positions to occupy rearranged positions 1 and 2 of the recombinant RSV genome or antigenome. This manipulation was performed with a cloned cDNA of RSV antigenomic RNA from which the SH gene was deleted (RSV Δ SH), as described above (see, e.g., Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999, incorporated herein by reference). Wild type RSV from which the SH gene is deleted grows as well or slightly better than complete wild type RSV *in vitro*, and is slightly attenuated in the upper respiratory tract of mice and in the upper and lower respiratory tracts of chimpanzee (Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999, incorporated herein by reference). Its levels of immunogenicity and protective efficacy are closely comparable to those of wild type virus. Thus, RSV Δ SH virus is slightly attenuated compared to wild type virus but otherwise has very similar biological properties, and it represents the parent virus in these studies. These characteristics of the Δ SH virus, combined with the increased genetic stability of RSV deletion mutants in general, render this background particularly useful as a parent recombinant for production of gene position-shifted RSV, facilitating recovery and manipulation of mutant derivatives.

The antigenomic cDNA was manipulated and recombinant virus recovered using procedures and strategies described above (see also, Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; Bukreyev et al., *J. Virol.* 70:6634-6641, 1996; Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., *J. Virol.* 72:4467-4471, 1998; Whitehead et al., *Virology* 247:232-239, 1998; Bermingham and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11259-11264, 1999; Collins et al., *Virology* 259:251-255, 1999; Bukreyev et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2367-2372, 1999; Juhasz et al., *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., *J. Virol.* 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:9773-9780, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:871-877, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; United States Patent No. 5,993,824; each incorporated herein by reference). The antigenomic cDNA was manipulated as three subclones. One subclone, D51/ Δ SH, contains the T7 promoter and left hand end of the genome from the leader region to the downstream end of the M gene. The second subclone, pUC19-GFM2, contains the G, F and M2 genes from the middle of the genome. The third subclone, D39, contains the L gene followed by the trailer from the right hand end of the genome followed by a self-cleaving ribosome sequence and tandem T7 transcription terminators.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- PCR with mutagenic primers was used to amplify and modify the ends of cDNAs containing the G and F genes separately or together as a single G-F cDNA (Fig. 1). To make a cDNA of G alone for insertion, PCR was used to amplify nucleotides 4692-5596 of the complete recombinant RSV antigenomic sequence (spanning from the
- 5 ATG that initiates the G ORF to the downstream end of the G gene-end signal). The PCR primers were designed to add, immediately after the G gene-end signal, the first 6 nucleotides of the G-F intergenic (IG) region followed by a copy of the 10-nucleotide GS signal of the NS1 gene (Fig. 1). The PCR primers also were designed to add a *BspI* site at both ends of the amplified cDNA. To make a cDNA of the F gene alone for insertion,
- 10 PCR was used to amplify nucleotides 5662-7551 of the complete antigenomic sequence (spanning from the ATG that initiates the F ORF to the end of the F gene-end signal). The PCR primers were designed to add, immediately after the F gene-end signal, the first 6 nucleotides of the F-M2 IG followed by a copy of the NS1 gene-start signal. The PCR primers also placed a *BspI* site on both ends of the cDNA.
- 15 To make a cDNA containing the G and F genes for insertion, PCR was used to amplify nucleotides 4692-7551 of the complete antigenomic cDNA (spanning from the ATG of the G ORF to the end of the F gene-end signal) (Fig. 1). The PCR primers were designed to add, immediately after the F gene-end signal, the first 6 nucleotides of the F-M2 IG followed by a copy of the NS1 gene-start signal. The PCR
- 20 primers also were designed to add a *BspI* site on both ends of the cDNA. All cDNAs were sequenced in their entirety to confirm structures.

- In order to make a promoter-proximal site for insertion of the G, F, or G-F cDNA, the upstream noncoding region of the NS1 gene was modified by nucleotide substitutions at antigenome positions 92 (G to C, positive-sense) and 97 (A to C), thereby
- 25 creating a *BspI* site (Fig. 1). This manipulation was performed on a *BstBI-MfeI* subclone containing the first 419 nucleotides of the RSV antigenomic RNA. The nucleotide substitutions were introduced by PCR on complete plasmid (Byrappa et al., Genome Research 5:404-407, 1995; incorporated herein by reference). The modified *BstBI-MfeI* fragment was reinserted into D51/ΔSH, and this subclone served in turn as the recipient
- 30 for the G, F, and G-F *BspI* cDNA fragments constructed as described above. Because *BspI* has an asymmetric heptameric recognition sequence, the fragments can only be inserted in the correct orientation.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

When the G, F, or G-F cDNA was placed in the promoter-proximal position, the corresponding gene(s) was/were deleted from the normal downstream position, so that each recombinant genome incorporated a single copy of G and F (Fig. 1). To delete G alone, PCR was performed on pUC19-G-F-M2 to amplify the *StuI-HpaI* fragment (nucleotides 5611-6419, spanning from the G-F IG into the middle of the F gene). In addition, this PCR added the sequence *TTAATTAAAAACATATTATCACAAA* (SEQ ID NO: 3) to the upstream end of the cDNA. This sequence contains a *PacI* site (italicized), which in the antigenomic cDNA is located within the SH gene-end signal. This piece could then be introduced as a *PacI-HpaI* fragment into the *PacI-HpaI* window of unmodified pUC19-GFM2, thereby deleting the G gene. The sequence of the cDNA fragment that had been subjected to PCR was confirmed by dideoxynucleotide sequencing.

Alternatively, to delete F alone, PCR was performed on pUC19-GFM2 to amplify the fragment that runs from the *PacI* site at nucleotide 4618 to the G gene-end signal at nucleotide 5596. In addition, this PCR added the sequence *CACAATTGCATGC* (SEQ ID NO: 4) to the downstream end of the cDNA. This sequence contained the upstream part of the F-M2 IG sequence followed by an *SphI* site (italicized) that is present in the F-M2 IG of the recombinant RSV antigenome. Cloning this cDNA as a *PacI-SphI* fragment into the *PacI-SphI* window of unmodified pUC19-GFM2 resulted in deletion of the F gene. The sequence of the cDNA fragment that had been subjected to PCR was confirmed by dideoxynucleotide sequencing.

To delete both the G and F genes, the *SphI-BamHI* fragment, PCR by the method of Byrappa (Byrappa et al., *Genome Research*, 5:404-407 (1995)) et al. was used to amplify nucleotides 7559-8506 of pUC-GFM2 (spanning from the F-M2 IG to the M2/L overlap) with the following sequence added to the upstream end of the cDNA: *TTAATTAAAAACACAATT* (SEQ ID NO: 5). The resulting cDNA insert contains a *PacI* site (italicized) and the upstream part of the F-M2 IG sequence that immediately precedes the *SphI* site, but lacks the G and F genes. The sequence of the cDNA fragment that had been subjected to PCR was confirmed by dideoxynucleotide sequencing.

Complete antigenomic cDNAs were then assembled as described above (see also, Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; Bukreyev et al., *J. Virol.* 70:6634-6641, 1996; Bukreyev et al., *J. Virol.* 71:8973-8982, 1997;

WO 02/00693

PCT/US01/20107

- Whitehead et al., *J. Virol.* 72:4467-4471, 1998; Whitehead et al., *Virology* 247:232-239, 1998; Bermingham and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11259-11264, 1999; Collins et al., *Virology* 259:251-255, 1999; Bukreyev et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2367-2372, 1999; Juhasz et al., *Vaccine* 17:1416-1424, 1999; Juhasz et al., *J. Virol.* 73:5176-5180, 1999; Teng and Collins, *J. Virol.* 73:466-473, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:9773-9780, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:871-877, 1999; Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; and U.S. Patent No. 5,993,824; each incorporated herein by reference). This assembly yielded cDNAs encoding *B1p/ΔSH*, *G1/ΔSH*, *F1/ΔSH*, and *G1F2/ΔSH* antigenomic cDNAs.
- 10 These cDNAs were transfected individually into HEp-2 cells together with N, P, M2-1 and L support plasmids and incubated at 32°C (see, e.g., Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11563-11567, 1995; Collins et al., *Virology* 259:251-255, 1999; U.S. Patent No. 5,993,824, each incorporated herein by reference). The transfection supernatants were passaged to fresh cells 3 days later, and then subjected to serial passage
- 15 in HEp-2 cells at 37°C with intervals of harvest of 3 to 7 days. The shorter time intervals were necessary for monolayers infected with the *F1/ΔSH* and *G1F2/ΔSH* viruses because they exhibited a more rapid development of syncytia and subsequent cell destruction. This was interpreted to reflect increased expression of the fusogenic F protein due to the alteration in F gene position. Aliquots of each harvested supernatant were flash-frozen
- 20 and titrated later in parallel, as shown in Fig. 2. These results indicate that the efficiency of recovery and amplification of the *G1F2/ΔSH* and *F1/ΔSH* viruses exceeded those of the *B1p/ΔSH* or *G1/ΔSH* virus, as was also determined relative to the Δ SH virus and wild type virus.
- Total RNA was isolated from cells infected with each of the recombinant
- 25 viruses, and RT-PCR of appropriate genome segments was performed which confirmed that the engineered genomic structures were as designed and constructed. In addition, Northern blot analysis confirmed expression of the appropriate subgenomic mRNAs.
- The following viruses were then compared with regard to kinetics of growth and antigen production *in vitro*: wild type RSV (containing the SH gene), Δ SH
- 30 (with the SH gene deleted but not containing a *B1pI* site in the NS1 noncoding region), *B1p/ΔSH*, *G1/ΔSH*, and *G1F2/ΔSH*. Replicate monolayer cultures of HEp-2 cells and

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Vero cells were infected at an MOI of 0.1 plaque forming units (PFU) per cell with an adsorption period of 1 h (-1 to 0 hours). The monolayers were then washed three times and incubated at 37°C. Two duplicate monolayers per virus were harvested at 12 h intervals, beginning immediately post-adsorption at t=0 hours. The medium supernatants
 5 were flash-frozen for analysis later by plaque assay to quantitate released infectious virus (Fig. 3A). This showed that the viruses were comparable in their ability to produce infectious virus in Vero (Fig. 3A, upper panel) and HEp-2 (Fig. 3A, lower panel) cells.

In the same experiment, the Vero cell monolayers from each time point (Fig. 3A, upper panel) were harvested and analyzed by Western blotting to characterize
 10 the expression of G protein (Fig. 4). A sample of total infected-cell protein from each time point was electrophoresed in denaturing polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and analyzed by incubation with an antiserum specific to a peptide of the G protein. Bound antibodies were detected and quantitated using a commercial chemiluminescence kit. The antibody bound to the two major cell-associated forms of the
 15 G protein, namely the larger 90 kDa fully-mature form and the smaller 50 kDa incompletely-glycosylated form. This comparison showed that, although the production of infectious particles was similar for all viruses (Fig. 3A, upper panel), the amount of cell-associated G protein was considerably greater in cells infected with the G1/ΔSH or G1F2/ΔSH virus (Fig. 4). Quantitation of the gel bands by densitometry of the exposed
 20 film indicated that the G1/ΔSH and G1F2/ΔSH viruses expressed 6-fold and 4-fold, respectively, more G protein than did the B1p/ΔSH virus.

Cell monolayers infected with the F1/ΔSH or G1F2/ΔSH viruses exhibited a rapid onset of cytopathic effect involving syncytium formation, as mentioned above. This was interpreted to reflect increased expression of the F protein. This enhanced
 25 cytopathic effect would not contraindicate the use of this virus as a vaccine, since infection *in vivo* with a vaccine virus involves only a small amount of epithelial cells which die and are replaced whether the onset of cytopathogenicity for these scattered cells is more rapid or not. However, it may be that higher titers of virus might have been achieved if the cytopathogenicity *in vitro* had been less rapid. Resolution of these factors
 30 will be achieved by construction of gene position-shifted RSV in backgrounds that are more highly attenuated. It is notable in this context that the gene shifts did not interfere with the growth of RSV but did increase the total expression of G protein by several fold.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In further studies, the ability of the gene-shift viruses to replicate in HEP-2 and Vero cell monolayers was compared in an experiment in which the multiplicity of infection was 3.0 (Fig. 3B). This was done in two separate experiments that yielded similar results. Data for one of the experiments are shown in Fig. 3B. In this single-cycle growth assay, each of the three viruses containing G and/or F in the promoter-proximal position, namely G1/ΔSH, F1/ΔSH, and G1F2/ΔSH, replicated more efficiently than the control virus B1p/ΔSH. Furthermore, the difference was greater in Vero cells than in HEP-2 cells. For example, at 24 h post infection, the titer of the G1/ΔSH virus was 7.2×10^6 PFU/ml, compared to 6.8×10^6 PFU/ml for the B1p/ΔSH control in HEP-2 cells, a difference of 0.4 log₁₀ whereas the respective values in Vero cells were 6.6×10^6 PFU/ml for the G1/ΔSH virus and 5.6×10^6 PFU/ml for the B1p/ΔSH control virus, a difference of 1.0 log₁₀. Each of the other gene-shift viruses also had titers in excess of that of the control virus. Thus, the shift of G and/or F to the promoter proximal position provided, in this example, an increase in virus yield in both HEP-2 and Vero cells, with a maximum yield of 10-fold in Vero cells, which is a cell line that is useful for large-scale virus production.

The gene-shift recombinant viruses also were examined for the ability to replicate in the upper and lower respiratory tract of BALB/c mice (Table 1). Mice in groups of 18 animals each were infected with 106 PFU per animal of G1/ΔSH, F1/ΔSH, G1F2/ΔSH, or the control virus B1p/ΔSH. Six animals from each group were sacrificed on days 3, 4 and 5 post-infection, and the nasal turbinates and lungs were harvested and analyzed by plaque assay to determine virus titers in the upper and lower respiratory tracts, respectively. As shown in Table 1, the level of replication of the B1p/ΔSH and F1/ΔSH viruses were essentially indistinguishable. Thus, although the latter virus replicated somewhat more efficiently *in vitro*, its replication *in vivo* was not changed. The absence of increased replication or virulence would simplify modification of the gene-shift viruses by the addition of attenuating mutations. The replication of the G1F2/ΔSH virus was marginally lower than that of the "wild type" B1p/ΔSH control, and the replication of the G1/ΔSH virus also was lower, particularly early in the infection. For example, on day 3 the G1/ΔSH virus was 0.7 log₁₀ lower in both the upper and lower respiratory tract compared to the B1p/ΔSH control.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Table 1. Replication, in the upper and lower respiratory tract of mice, of recombinant RSV containing the G and/or F genes in the promotor-proximal position.

Virus ¹	Day 3	Nasal Turbinates mean titer $\pm$ SE (log ₁₀ PFU/g tissue) Day 4	Day 5	Day 3	Lungs Mean titer $\pm$ SE (log ₁₀ PFU/g tissue) Day 4	Day 5
B1p/ Δ SH	4.2 $\pm$ 0.17	4.0 $\pm$ 0.32	3.5 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.26	4.1 $\pm$ 0.37	4.5 $\pm$ 0.09
G1/ Δ SH	3.5 $\pm$ 0.24	3.4 $\pm$ 0.54	3.5 $\pm$ 0.24	2.9 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.34	4.6 $\pm$ 0.13
F1/ Δ SH	4.4 $\pm$ 0.11	4.1 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.12	3.9 $\pm$ 0.09	4.7 $\pm$ 0.08	4.9 $\pm$ 0.16
G1F2/ Δ SH	3.3 $\pm$ 0.50	3.5 $\pm$ 0.13	3.3 $\pm$ 0.13	3.1 $\pm$ 0.13	4.2 $\pm$ 0.28	4.1 $\pm$ 0.07

- 5 1. BALB/C mice in groups of 18 were inoculated intranasally with 10⁶ PFU per mouse of the indicated virus on day 0. On days 3, 4, and 5, six mice per group were sacrificed and the nasal turbinates and lungs were harvested and virus titers were determined by plaque assay. Mean titers are shown with the standard error indicated.

- Thus, shifting one or more genes to the promoter proximal position, or
 10 rearranging RSV genes in general, can modestly attenuate the virus for replication *in vivo*. This has value for designing an attenuated vaccine strain, since it adds to the menu of useful methods of attenuation. Furthermore, it is important to have attenuating mutations that represent different classes or types, such as temperature-sensitive point mutations, non-temperature-sensitive point mutations, gene deletions, and so forth. Different types
 15 of mutation operate in different ways to affect viral phenotype, and the presence of multiple types of mutations in a single vaccine virus confers increased stability. Attenuation by gene shift represents an additional useful class of attenuating mutations in this context. The finding that gene shifts according to the invention can confer a modest degree of attenuation provides useful new tools for fine-tuning the attenuation phenotype
 20 of vaccine strains.

Certain useful attenuating mutations within the invention are of a "conditional" variety, where attenuation is minimal under specified conditions (e.g., *in vitro*) and maximal under other conditions (e.g., *in vivo*). An attenuation phenotype that is minimal or not operant *in vitro* permits efficient production of vaccine virus, which is

WO 02/00693

PCT/US01/20107

particularly important in the case of RSV and other viruses that grow poorly in cell culture. Of course, as illustrated here, the attenuation phenotype must be operant *in vivo* in order to reduce disease and reactogenicity of the vaccine virus.

- The G1/ΔSH recombinant shown here illustrates a particularly desirable combination of traits resulting from the gene-shift. Specifically, its growth *in vitro* actually was increased up to 10-fold, while its replication *in vivo* was decreased moderately. This provides the advantage of improved efficiency of vaccine production in conjunction with attenuation *in vivo*, and improved antigen expression, as described above.
- The immunogenicity of the gene-shift viruses *in vivo* was investigated in BALB/c mice. Mice in groups of six were infected with the individual viruses as described immediately above, and serum samples were taken 1 day prior to inoculation and 28 and 56 days post inoculation (Table 2). The serum samples were analyzed by glycoprotein-specific enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) specific to IgG (Table 2). Analysis of G protein-specific IgG showed that the responses to the F1/ΔSH and G1F2/ΔSH viruses were very similar to that for the B1p/ΔSH control virus. On the other hand, the G-specific response to the G1/ΔSH virus moderately decreased (up to four-fold). This likely is due at least in part to the reduced replication of this virus, as described above in Table 1. Analysis of F-specific responses showed that the F1/ΔSH and G1F2/ΔSH viruses had moderate increases (2.5- to 4-fold) in antibody levels compared to the G1/ΔSH and B1p/ΔSH viruses, which is consistent with the interpretation that moving the F gene to the promoter-proximal position results in increased antigen expression *in vivo* and increased immunogenicity. Furthermore, these results indicated that the gene-shift can result in increased immunogenicity *in vivo* under conditions where overall replication of the immunizing virus is not changed. This is a highly desirable outcome, since it provides a specific method to make an RSV vaccine that is Δis inherently more immunogenic than the wild type parent virus. It should be noted that the mouse model can be used to identify and characterize biological properties of a virus and can reveal desirable new features such as shown here.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Table 2. Measurement, by glycoprotein-specific enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), or serum antibody responses in mice following infection with recombinant RSV containing G and/or F gene in the promotor-proximal position.

Serum immunoglobulin G ELISA titer (mean reciprocal $\log_2 \pm$ SE) against indicated RSV protein ²							
Virus ¹	No. of animals per group	Pre	Anti RSV G IgG Day 28	Day 56	Pre	Anti RSV F IgG Day 28	Day 56
B1p/ Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.6 ± 0.6	11.7 ± 0.8	$\leq 5.3 \pm 0$	10.3 ± 0.4	12.0 ± 0.4
G1 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.0 ± 0.6	9.6 ± 0.6	$\leq 5.3 \pm 0$	10.0 ± 0.4	12.0 ± 0.7
F1 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.6 ± 0.9	11.6 ± 0.6	$\leq 5.3 \pm 0$	11.6 ± 0.3	13.6 ± 0.3
G1F2 Δ SH	6	$\leq 5.3 \pm 0$	9.3 ± 0.7	11.6 ± 0.8	$\leq 5.3 \pm 0$	12.3 ± 0.4	14.0 ± 0.4

- 5 1. BALB/C mice in groups of six were inoculated intranasally with 10^6 PFU of virus in a 0.1 ml inoculum on day 0.
2. Serum samples were taken 1 day prior to inoculation (Pre) and 28 and 56 days post inoculation, and were analyzed by glycoprotein-specific ELISA for IgG antibodies against the RSV G or F protein, as indicated. Mean titers are shown with standard error
- 10 indicated.

EXAMPLE II

Recombinant RSV Incorporating the G and F genes in a Promoter-Proximal Shifted Position in a Highly Attenuated Background

- 15 The gene shift mutations described above were introduced in the context of a genetic background from which the SH gene was deleted. In wild type virus, this deletion modestly improves growth in cell culture, and is moderately attenuating *in vivo* (Bukreyev et al., *J. Virol.*, 71:8973-8982, 1997; Whitehead et al., *J. Virol.*, 73:3438-3442, 1999, incorporated herein by reference). However, an RSV vaccine virus that is safe for
- 20 administration to RSV-naïve infants and children requires further attenuation than is

WO 02/00693

PCT/US01/20107

provided by the Δ SH deletion alone. Therefore, the present example is provided to demonstrate that gene shift mutants of the invention can be recovered successfully in a highly attenuated background.

Two backgrounds were chosen to exemplify this aspect of the invention, one lacking both the SH and NS2 genes and one lacking the SH, NS1 and NS2 genes. As described in the above-incorporated references, the Δ NS2 and Δ NS1 deletions are each highly attenuating on its own (see, e.g., Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999). *In vitro*, the production of virus containing either mutation is delayed and reduced, although under vaccine production conditions a yield of Δ NS2 virus is achieved comparable to that of wild type virus. In chimpanzees, the Δ NS2 and Δ NS1 viruses each are highly attenuated for replication and disease and are highly immunogenic and protective against RSV challenge. Each mutation alone is an excellent candidate to be included in a recombinant vaccine virus, either on its own or in combination with other mutations. The Δ NS1 and Δ NS2 mutations together result in a virus that is even more highly attenuated *in vitro* than the Δ NS2 virus. In the present example, further combinations of these deletions were constructed and tested for their ability to support further gene position-shifted mutations.

Antigenomic cDNAs were constructed in which the G and F genes were moved to positions 1 and 2 of an antigenome from which the NS2 and SH genes had been deleted, designated G1F2/ Δ NS2 Δ SH (Fig. 5, panel A), or to positions 1 and 2 of an antigenome in which the NS1, NS2 and SH genes were deleted, designated G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (Fig. 5, panel B). These antigenomic cDNAs were used to recover recombinant virus as described in Example I above. In both cases, recombinant virus was readily recovered and propagated *in vitro*. Thus, the present example demonstrates that gene position-shifted RSVs containing multiple attenuating mutations with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions can be readily produced and recovered. These and other gene position-shifted RSVs will be analyzed for levels of replication and antigen expression, as well as growth, immunogenicity and protective efficacy *in vivo* to select suitable vaccine candidates in accordance with the methods described herein.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In the foregoing examples, representative changes were made in the gene order of RSV to improve its properties as a live-attenuated vaccine. In particular, the G and F genes were moved, singly and in tandem, to a more promoter-proximal position. These two proteins normally occupy positions 7 (G) and 8 (F) in the RSV gene order (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L). In order to increase the possibility of successful recovery, the manipulations were performed in a version of RSV in which the SH gene had been deleted. G and F were then moved individually to position 1, or were moved together to positions 1 and 2, respectively. Surprisingly, recombinant RSV were readily recovered in which G or F were moved to position 1, or in which G and F were moved to positions 1 and 2, respectively. This result differed greatly from previous studies with VSV, where movement of the single VSV glycoprotein gene by only two positions was very deleterious to virus growth. The ability to recover these altered viruses also was surprising because RSV replicates inefficiently and because RSV has a complex gene order and movement of the glycoprotein genes involved a large number of position changes. Indeed, the rearranged RSV's grow at least as well as does their immediate parent having the wild type order of genes. As indicated above, this is particularly important for RSV, since the wild type virus grows inefficiently in cell culture and a further reduction in replication *in vitro* would likely render vaccine preparation unfeasible. It is remarkable that all of the NS1-NS2-N-P-M proteins could be displaced by one or two positions relative to the promoter without a significant decrease in growth fitness. In addition, examination of the expression of the G glycoprotein showed that it was increased up to several-fold over that of its parent virus. This indicated that a vaccine virus containing G and/or F in the first position expresses a higher molar amount of these protective antigens compared to the other viral proteins, and thus represent a virus with highly desirable vaccine properties.

Furthermore, the modification in gene order also was achieved with two highly attenuated vaccine candidates produced in previous work, in which the NS2 gene was deleted on its own as described previously, or in which the NS1 and NS2 genes were deleted together. In these two vaccine candidates, the G and F glycoproteins were moved together to positions 1 and 2 respectively, and the G, F and SH glycoproteins were deleted from their original downstream position. Thus, the recovered viruses G1F2 Δ NS2 Δ SH and G1F2 Δ NS1 Δ NS2 Δ SH had two and three genes deleted respectively in addition to the shift of the G and F genes. To illustrate the extent of the changes

WO 02/00693

PCT/US01/20107

involved, the gene orders of wild type RSV (NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L) and the G1F2/ Δ NS2 Δ SH virus (G-F-NS1-N-P-M-M2-L) or the Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (G-F-N-P-M-M2-L) can be compared. This shows that the positions of most or all of the genes relative to the promoter were changed. Nonetheless, these highly attenuated derivatives retained the capacity to be grown in cell culture, indicating their clear utility for development of candidate vaccine viruses.

EXAMPLE III

Construction of a Chimeric BRSV/HRSV Containing the HRSV G and F Genes in a Promoter-Proximal Shifted Position

The present example describes construction of an infectious rBRSV/HRSV chimera in which the HRSV G and F genes are substituted into a recombinant bovine RSV (rBRSV) background. The resulting human-bovine chimera contains two genes of HRSV, namely G and F, and eight genes from BRSV, namely NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 and L. Additional detail describing a human-bovine RSV construct having the human G and F genes substituted at their corresponding, wild type positions in a bovine RSV background (designated rBRSV/A2) is provided in U.S. Patent Application Serial No. 09/602,212, filed by Bucholz et al. on June 23, 2000, its corresponding PCT application published as WO 01/04335 on January 18, 2001, and its priority provisional U.S. Application No. 60/143,132 filed on July 9, 1999, each incorporated herein by reference.

In addition to the basic substituted glycoprotein construction of rBRSV/A2, the HRSV G and F genes were shifted in the present example to a more promoter-proximal position in the rBRSV backbone relative to a wild type gene order position of the F and G genes in the BRSV genome. More specifically, the F and G genes were moved from their usual location relative to the promoter, namely gene positions 7 and 8, respectively, to positions 1 and 2, respectively. To achieve this objective, complete infectious rBRSV was constructed in which nucleotide substitutions were made to create unique *NotI*, *SalI* and *XhoI* sites at positions 67, 4,673 and 7,471, respectively

WO 02/00693

PCT/US01/20107

(Fig. 6, panel A) (see also, Buchholz et al., *J. Virol.* 73:251-259, 1999; Buchholz et al., *J. Virol.* 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference). The *NotI* site is contained within the upstream nontranslated region of the BRSV NS1 gene, and the *SalI* and *XhoI* sites are in intergenic regions. Digestion of the rBRSV antigenomic cDNA with *SalI* and *XhoI* excised the BRSV G and F genes in their entirety and created compatible cohesive ends that were ligated (Fig. 6, panel B). This resulted in an rBRSV antigenomic cDNA lacking the G and F genes and containing a 64-nucleotide SH-M2 intergenic region with the following sequence:

TTAAACTTAAAAATGGTTTATGtcgaGGAATAAAATCGATTAAACAACCAATCAT
 10 TCAAAAAGAT (SEQ ID NO: 6) (the tetranucleotide cohesive ends of the original
 cleaved *SalI* and *XhoI* sites are in small case). For comparison, the naturally-occurring
 BRSV F-M2 intergenic sequence is 55 nucleotides in length.

A cDNA containing the HRSV G and F genes was prepared by PCR with mutagenic primers used to modify the cDNA ends. Specifically, PCR was used to
 15 amplify nucleotides 4692-7551 of the complete HRSV antigenomic cDNA (spanning
 from the ATG of the G ORF to the end of the F gene-end signal), and the primers were
 designed to add, immediately after the F gene-end signal, the first 6 nucleotides of the F-
 M2 IG followed by a copy of the NS1 gene-start signal. The PCR primers also were
 designed to add a *BspI* site and an *NotI* site each on both ends of the cDNA. The
 20 sequence of the cDNA fragment that was subjected to PCR was confirmed by
 dideoxynucleotide sequencing. This cDNA was then inserted as a *NotI* fragment into the
 unique *NotI* site of the rBRSV antigenomic cDNA lacking the G and F genes as described
 above. A correct recombinant was identified by restriction fragment mapping, and was
 designated rBRSV/A2-G1F2. The structure of the encoded genomic RNA is shown in
 25 Fig. 6, panel C. As shown, in this cDNA the G and F genes were moved from positions 7
 and 8 relative to the promoter to positions 1 and 2.

A plasmid encoding the antigenomic RNA of rBRSV/A2-G1 F2 was
 transfected, together with plasmids encoding the N, P, M2-1 and L support proteins, into
 BSR T7/5 cells, which stably express the T7 RNA polymerase, as described above (see
 30 also, Buchholz et al., *J. Virol.* 73:251-259, 1999; Buchholz et al., *J. Virol.* 74:1187-1199,
 2000, each incorporated herein by reference), and infectious virus was recovered. The

WO 02/00693

PCT/US01/20107

recovered rBRSV/A2-G1F2 virus was compared to rBRSV, rHRSV (also called rA2) and rBRSV/A2 with regard to the efficiency of multicycle growth in human HEP-2 cells and bovine MDBK cells. As described above (see also, Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference), rHRSV grows much more efficiently than

5 rBRSV in HEP-2 cells, and the rBRSV/A2 virus grows with an efficiency intermediate between that of each parent. As shown in Fig. 7, the efficiency of replication of rBRSV/A2-G1F2 was indistinguishable from that of rBRSV/A2. Thus, unexpectedly, the change in the location of the G and F genes did not reduce the efficiency of growth *in vitro*, which novel result allows for efficient production of RSV vaccine virus.

10 Immunofluorescence was performed on HEP-2 cells infected with wt HRSV or the chimeric viruses rBRSV/A2 or rBRSV/A2-G1F2. This was performed using two monoclonal antibodies specific to the HRSV G or F proteins, namely 021/01G and 44F, respectively (Lopez et al., J. Virol. 72:6922-6928, 1998; Melero et al., J. Gen. Virol. 78:2411-2418, 1997, each incorporated herein by reference). The staining was

15 done with each monoclonal antibody individually. Although this assay is only semi-quantitative, it has been previously determined that the assay distinguishes reliably between wt rBRSV and rBRSV/A2 (the latter bearing the HRSV G and F genes in the normal genome location in the rBRSV backbone). In particular, wt HRSV gives a very strong, extensive pattern of immunofluorescence indicative of efficient and extensive

20 antigen expression, while rBRSV/A2 gives a weaker, more diffuse, less extensive pattern (Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference). A comparable assay conducted for rBRSV/A2-G1F2 (Fig. 8), shows that the pattern of immunofluorescence for this promoter-shifted chimeric virus was very similar to that of wt HRSV. This result is consistent with increased expression of the G and F

25 glycoproteins. At the same time, the cytopathic effect associated with rBRSV/A2-G1F2 was reduced compared to wt HRSV, and more closely resembled that of rBRSV/A2 (Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference). Specifically, rBRSV/A2 and rBRSV/A2-G1F2 induced fewer and smaller syncytia.

Thus, the present example documents modification of the rBRSV/A2

30 human-bovine chimeric RSV virus, which contains the genes for the major protective antigens of HRSV, the G and F proteins, in the background of BRSV which is strongly

WO 02/00693

PCT/US01/20107

attenuated for replication in the respiratory tract of primates. The rBRSV/A2 virus has a strong host range restriction that renders it highly attenuated in primates. Since the present gene position-shifted rBRSV/A2-G1F2 virus bears the same constellation of BRSV genes in its genetic background, it is likely to share this strong host range
5 restriction phenotype, thereby increasing the expression of the two major protective antigens. The increased expression of these two protective antigens *in vivo* is further expected to increase the immunogenicity of this virus. Thus, the present example modified and improved the rBRSV/A2 virus by moving the HRSV genes to a promoter proximal location. A positional shift of this magnitude, i.e., where the G and F genes
10 were moved from wild type positions 7 and 8 relative to the promoter to new positions 1 and 2, has not been described previously.

EXAMPLE IV

15 Construction of a Chimeric BRSV/HRSV With Envelope-Associated M, G and F Proteins Derived From HRSV

The present example demonstrates yet another gene position-shifted RSV generated within a human-bovine chimeric background which involves modification of an antigenic chimeric virus resembling the rBRSV/A2 chimera (having the HRSV G and F protective antigen genes in a BRSV host-range-attenuated background), described above.
20 Both BRSV and HRSV have 4 envelope-associated proteins: the G and F glycoproteins which are the major protective antigens; the small hydrophobic SH protein of unknown function which does not appear to be a neutralization or protective antigen for HRSV (Whitehead et al., *J. Virol.* 73:3438-3442, 1999; Connors et al., *J. Virol.* 65:1634-1637, 1991, each incorporated herein by reference); and the nonglycosylated internal matrix M
25 protein, which is not a protective antigen but is important in virion assembly (Teng and Collins, *J. Virol.* 72:5707-16, 1998, incorporated herein by reference).

In this example, a BRSV/HRSV chimeric virus was constructed in which all four BRSV envelope-associated protein genes were deleted, namely BRSV M, SH, G and F, and in which three HRSV envelope-associated protein genes, namely M, G and F,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

were inserted in their place. This yields a promoter-proximal gene shift of the F and G glycoprotein genes by the distance of one gene, corresponding to the length of the SH gene.

The above-described rBRSV/A2 construct (see also, Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference) was modified to contain a unique *MluI* site at position 3204, within the intergenic region between the P and M genes (Fig. 9, panel A; P-M IG). This involved the introduction of 5 nucleotide substitutions. Nucleotide sequence position numbers are relative to the complete rBRSV antigenome (Buchholz et al., J. Virol. 73:251-259, 1999; Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000; GenBank accession number AF092942 or complete rHRSV antigenome in Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567, 1995; each incorporated herein by reference), and sequence position numbers that refer to the HRSV sequence are underlined. The *MluI-SalI* fragment was excised and replaced by the *MluI-SalI* fragment bearing the M gene.

Referring to Fig. 9, panel B, a cDNA containing the HRSV M gene was amplified and modified by PCR using primers that introduced changes to the ends of the cDNAs. Specifically, the M cDNA was modified so that its upstream end contained an *MluI* site, followed by the last nucleotide of the P-M intergenic region (which is the same in HRSV and BRSV), followed by the complete HRSV M gene, followed by the first 4 nucleotides of the BRSV SH-G intergenic region, followed by a *SalI* site. The sequence of this cDNA was confirmed to be correct in its entirety. It was digested with *MluI* and *SalI* and cloned into the *MluI-SalI* window of the rBRSV antigenome. This resulted in rBRSV/A2-MGF. As shown in Fig. 9, panel C, this chimera contained a backbone of six BRSV genes, namely NS1, NS2, N, P, M2 and L, and three HRSV envelope-associated protein genes, namely M, G and F.

This antigenomic plasmid was transfected, together with plasmids encoding the N, P, M2-1 and L support proteins, into BSR T7/5 cells, which stably express the T7 RNA polymerase, as described in detail previously (Buchholz et al., J. Virol. 73:251-259, 1999; Buchholz et al., J. Virol. 74:1187-1199, 2000, each incorporated herein by reference), and infectious virus was recovered. Thus, the present example also demonstrates that gene position-shifted RSVs containing a gene deletion resulting in a

WO 02/00693

PCT/US01/20107

promoter proximal shift of the G and F genes can be readily produced and recovered. This and other gene position-shifted RSVs will be analyzed for levels of replication and antigen expression, as well as growth, immunogenicity and protective efficacy *in vivo* to select suitable vaccine candidates in accordance with the methods described herein.

5

EXAMPLE V

**Construction and Recovery of Additional BRSV/HRSV Chimeric Viruses
Containing Nonstructural and/or Envelope-Associated Proteins of HRSV
Substituted Into the BRSV Backbone**

Additional BRSV/HRSV chimeric viruses were constructed that contained
10 HRSV nonstructural NS1 and NS2 genes and/or envelope-associated M, SH, G and/or F
genes substituted into the BRSV backbone. Most of these chimeric viruses contained G
and F genes derived from HRSV, a desirable feature since these encode the major
protective antigens and would be important for an effective HRSV vaccine.

In certain exemplary viruses, the BRSV NS1 and NS2 genes were replaced
15 by their HRSV counterparts. NS1 and NS2 have recently been shown to be antagonists of
the type I interferon-mediate antiviral state (Schlender, *et al.*, *J. Virol.*, 74:8234-42, 2000,
incorporated herein by reference) and substitution of these genes offers a way of
modifying the growth properties and virulence of a vaccine virus. This is due to the
general finding that interferon antagonists tend to be host specific (Young, *et al.*,
20 *Virology*, 269:383-90, 2000; Didcock, *et al.*, *J. Virol.*, 73:3125-33, 1999; Didcock, *et al.*,
J. Virol., 73:9928-33, 1999, each incorporated herein by reference). Thus, inclusion of
BRSV-specific NS1 and NS2 genes in a vaccine virus would improve its growth in
bovine cells but would constitute an attenuating mutation with regard to growth in
primate cells and in the human vaccinees.

25 Conversely, HRSV-specific NS1 and NS2 genes would offer a way of
improving the growth of a vaccine virus in human cells. Thus, this provides a new
method for manipulating the growth properties and reactogenicity of a vaccine virus. In
another virus, the complete constellation of HRSV-specific membrane associated genes,
namely M, SH, G and F, was placed in the BRSV backbone. Since the various proteins
30 of the virus particle are thought to interact in various ways during gene expression,

WO 02/00693

PCT/US01/20107

genome replication, and virion production, the ability to make a variety of combinations provides a rich source of vaccine candidates.

Finally, this additional exemplary panel of viruses contained examples of genes that were substituted without a change in gene order, others in which the gene order of the substituted viruses was altered, as well as ones in which some of the substituted genes did not have a change in order with regard to the BRSV backbone whereas others did. Thus, this panel provided a stringent test of the ability to manipulate cDNA-derived virus to make a wide array of chimeric viruses, and to recover viable viruses with altered and desirable biological properties.

A BRSV/HRSV chimeric virus was constructed in which the NS1 and NS2 genes of the rBRSV backbone were removed and replaced with the NS1 and NS2 genes of HRSV, creating a virus called rBRSV/A2-NS1+2 (Fig. 10, second construct from the top). The backbone for this construction was the rBRSV antigenomic cDNA which had been modified to contain the unique NotI, KpnI, Sall and XhoI sites illustrated in Fig. 10 (top construct) and described in detail previously (Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 73:251-9, 1999; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000, each incorporated herein by reference). The HRSV NS1 and NS2 coding sequences were amplified by PCR as a single fragment which spanned positions 75 to 1036 of the complete HRSV antigenomic sequence and included the HRSV NS1 ORF, the NS1/NS2 gene junction, and the NS2 ORF. The upstream end of the fragment also contained an added NotI site immediately before the HRSV sequence and a BlnI site added in the nontranslated sequence upstream of the NS1 ORF at HRSV position 91. The downstream end of the PCR cDNA contained a KpnI site immediately following the HRSV sequence. This PCR product was cloned and its sequence confirmed. It was then inserted as a NotI-KpnI fragment into the corresponding window of the rBRSV backbone.

Another BRSV/HRSV chimeric virus was made in which the following four genes in rBRSV were replaced with their HRSV counterparts: NS1, NS2, G and F. This virus is designated rBRSV/A2-NS1+2GF (Fig. 10, third construct from the top). This construct was made by combining fragments from rBRSV/A2-NS1+2 and the previously described rBRSV/A2 (see, Figs. 7 and 8; U.S. Patent Application Serial No. 09/602,212; Buchholz, *et al.*, *J. Virol.*, 74:1187-1199, 2000, each incorporated herein by reference), which is optionally termed herein rBRSV/A2-GF. Specifically both

WO 02/00693

PCT/US01/20107

constructs contained a XmaI site in the plasmid sequence upstream of the leader region and the KpnI site illustrated in Fig. 10. The XmaI-KpnI fragment of rBRSV/A2-NS1+2 was transferred into the corresponding window of the rBRSV/A2-GF plasmid.

Another BRSV/HRSV chimeric virus was made in which the following
 5 four genes in rBRSV were replaced by their HRSV counterparts: M, SH, G and F. This virus was designated rBRSV/A2-MSHGF (Fig. 10, fourth construct from the top). This involved a rBRSV backbone in which a MluI site was added in addition to the P-M intergenic region (see Fig. 9). Thus, the inserted HRSV sequence had as its upstream and downstream boundaries the MluI and XhoI sites shown in Fig. 9. This HRSV insert,
 10 bearing the M-SH-G-F sequence of HRSV flanked by MluI and XhoI sites, was prepared by PCR, and the resulting product was cloned and its sequence confirmed. The MluI-XhoI fragment was then cloned into the corresponding window in the rBRSV backbone.

Another BRSV/HRSV chimeric virus was made in which the G and F
 genes were replaced by their HRSV counterpart placed in the third and fourth positions in
 15 the rBRSV backbone. This virus was designated rBRSV/A2-G3F4 (Fig. 10, fifth construct from the top). For this construction, PCR was used to amplify the HRSV G and F ORFs. The PCR primers were designed to add to the upstream end of G the following features: a Kpn I site, a BRSV gene end signal (5'-AGTTATTAAAA) and a three nt intergenic sequence (CAT), which was then followed by the HRSV G and F genes. The
 20 downstream end of the amplified fragment ended in the downstream nontranslated region of the HRSV F gene, at HRSV antigenomic position 7420, followed by an added Kpn I site. This PCR product was cloned and its sequence confirmed. The Kpn I fragment bearing the HRSV G and F sequence was then cloned into the Kpn I site of the rBRSV cDNA lacking the G and F genes as shown in Fig. 6, panel B. A recombinant containing
 25 the insert in the correct orientation was identified by restriction analysis.

Another BRSV/HRSV chimeric virus was made in which the following
 genes were replaced in the rBRSV backbone: NS1, NS2, G and F, with the G and F genes
 in the promoter-proximal position. This construct is designated HEx, or rBRSV/A2-
 G1F2NS3NS4 (Fig. 10, bottom construct). This chimera was generated by modifying
 30 rBRSV/A2-NS1+2 to replace the BRSV G and F genes by their HRSV counterparts in the first and second position, in the same way as described above for the construction of rBRSV/A2-G1F2 (Example III, Fig. 6, panel B). Specifically, the BRSV G and F genes

WO 02/00693

PCT/US01/20107

were excised from the rBRSV/A2-NS1+2 antigenomic cDNA by digestion with SalI and XhoI, as described above (Example III). Subsequently, a NotI fragment containing the HRSV G and F genes as described above (Example III, Fig. 6, panel B) was cloned into the singular NotI site which is located immediately before the HRSV sequence in the NS1 noncoding region of the rBRSV/A2-NS1+2 antigenomic cDNA. A recombinant containing the insert in the correct orientation was identified by restriction analysis.

Each of the viruses listed above was readily recovered from cDNA, and in no case to date was a virus designed that could not be recovered.

The new rBRSV/A2-G3F4 and HEx viruses were compared for growth efficiency *in vitro* in parallel with the previously-tested rBRSV/A2-GF and rBRSV/A2-GF viruses (as noted above, the last virus was called rBRSV/A2 in previous examples but was renamed here for clarity compared to the new constructions). Monolayer cultures of Vero cells were infected at a multiplicity of infection of 0.1 and incubated at 37°C. Aliquots were taken at the time points shown in Fig 11, and the virus titer was determined by plaque assay. Under these conditions, BRSV replicates somewhat less efficiently than HRSV, reflecting its host range restriction in primate cells. As shown in Fig. 11, top panel, the rBRSV/A2-G3F4 exhibited improved growth *in vitro* compared to the other chimeric viruses and rBRSV. Indeed, its growth efficiency was similar to that of recombinant HRSV (rA2). Thus, the growth of the rBRSV virus was improved by replacing the BRSV G and F genes with their HRSV counterparts (as in rBRSV/A2-GF), and was further improved by placing the HRSV genes in the promoter-proximal position (as in rBRSV/A2-G1F2), and was yet again further improved by placing the HRSV G and F genes in positions 3 and 4 (as in rBRSV/A2-G3F4). These results demonstrate how the properties of viruses within the invention can be systematically adjusted by manipulating the origin and order of the viral genes.

The HEx virus was evaluated in the same way (Fig. 11, bottom panel). Its growth was intermediate to that of rBRSV and rA2, indicating that this four-gene replacement retained replication fitness *in vitro* and indeed exceeded that of its rBRSV parent. It should be noted that Vero cells lack the structural genes for type I interferons, and hence interferon-specific effects cannot be evaluated. On the other hand, Vero cells are a useful substrate for large scale vaccine production, and efficient growth in these cells is an important feature for a vaccine virus.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

The panel of rBRSV/HRSV chimeric viruses was further evaluated for growth on the basis of plaque size in HEp-2 and MDBK cells, the former of human origin and the latter bovine (Fig. 12, top and bottom panels, respectively). This comparison also included chimeric viruses described in previous examples, namely rBRSV/A2-GF (previously called rBRSV/A2), rBRSV/A2-MGF, and rBRSV-G1F2. In HEp-2 cells, rHRSV produced larger plaques than did rBRSV, consistent with the host range restriction (Fig. 12, top panel). This discussion first considers those viruses in which the NS1 and NS2 genes remained of BRSV origin. In this group, the rBRSV/A2-G3F4, rBRSV/A2-G1F2 and rBRSV/A2-GF viruses produced plaques that were intermediate in size between HRSV and BRSV and which decreased in the order given. This is fully consistent with growth kinetic data, and confirms the idea that the introduction of the HRSV G and F genes into the rBRSV backbone improves its growth in HEp-2 cells, and that further improvement can be obtained by modifying the positions of these genes. The rBRSV/A2-MGF and rBRSV/A2-MSHGF viruses produced plaques that were smaller than those of rBRSV. While this example shows that these viruses can be recovered and manipulated, further characterization *in vitro* and *in vivo* will be needed to determine the full characterization of their growth properties.

Growth in HEp-2 cells was also examined for those viruses in which the NS1 and NS2 genes were of HRSV origin. Specifically, pairs of viruses were compared that were identical except for the origin of the NS1 and NS2 genes. These pairs are listed next, ordered such that the virus having NS1 and NS2 genes of HRSV is in each pair: rBRSV versus rBRSV/A2-NS1+2; rBRSV/A2-GF versus rBRSV/A2-NS1+2GF; rBRSV/A2-G1F2 versus HEx. In each case, the presence of the NS1 and NS2 genes of HRSV origin provided an increase in plaque size, indicating a modulation of the host range restriction. This illustrates how the origin of the NS1 and NS2 genes can be selected as a method of predictably modulating growth properties of an HRSV vaccine. In this example, the two genes were manipulated as a pair, although it is clear that they can also be manipulated singly according to the teachings herein.

The characteristics of these viruses in MDBK bovine cells also is shown in Fig. 12, bottom panel. The host range restriction in these cells is reversed in comparison with the preceding comparison in HEp-2 cells, such that BRSV produced larger plaques than HRSV. The presence of HRSV G and F genes in the rBRSV backbone did not have

WO 02/00693

PCT/US01/20107

much effect on growth, while the presence of NS1 and NS2 genes of HRSV origin attenuated the virus, presumably because these HRSV-derived interferon antagonists operated less efficiently in bovine cells. Since bovine cells and bovine hosts are not an important target for these candidate HRSV vaccines, these findings with MDBK cells
5 serve mainly to provide a clearer understanding of the functions of these proteins and their contribution to growth.

In summary, the foregoing example illustrates how a panel of recombinant HRSV vaccine candidates can be readily generated that exhibit a spectrum of desired growth properties. Clinical evaluation of selected candidates will provide benchmarks to
10 guide optimization of vaccine candidates by the methods of this invention. Previous studies indicated that rBRSV and its rBRSV/A2-GF derivative were over attenuated in chimpanzees, although the latter virus was an improvement over rBRSV (Buchholz, *et al.*, J. Virol., 74:1187-1199, 2000, incorporated herein by reference). Thus, the further, graded improvements in growth that were obtained here represent a substantial advance
15 toward optimization of RSV vaccine recombinants.

EXAMPLE VI

**Construction and Recovery of Additional BRSV/HRSV Chimeric Viruses
Containing Substitutions of the N and/or P gene in BRSV Backbones with NS1 and
20 NS2 Proteins of HRSV or BRSV Origin.**

Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) has a bovine counterpart (BPIV3) that exhibits a host range restriction in primates and thus provides the basis for developing attenuated HPIV3 vaccines based on HPIV3/BPIV3 chimeric viruses. One promising chimera consists of the HPIV3 backbone in which the N ORF was replaced by
25 its BPIV3 counterpart. Remarkably, this chimeric virus replicates efficiently in cell culture and exhibits an attenuation phenotype in primates (Bailly, *et al.*, J. Virol., 74:3188-95, 2000, incorporated herein by reference).

Within the present example, investigations were undertaken to determine whether individual BRSV genes could be replaced by their HRSV counterparts.
30 Specifically, the N gene and the P gene were individually substituted (Fig. 13A).

WO 02/00693

PCT/US01/20107

Additional studies were undertaken to determine whether two genes could be replaced together. Finally, additional investigations were conducted to determine if gene replacements also could be made in a backbone containing the HRSV NS1 and NS2 genes (Fig. 13B). It should be noted that these substitutions were made in the rBRSV backbone, bearing the BRSV G and F genes. In order to make an optimal HRSV vaccine, these would be replaced by their HRSV counterparts, inserted either in the natural gene order positions or in other positions, following the teachings set forth herein above which demonstrate that such substitutions can be readily made, and indeed generally provide improved growth properties.

10 A BRSV/HRSV chimera was constructed in which the BRSV N coding sequence was replaced by that of HRSV. This chimera is designated rBRSV/A2-N (Fig. 13A). For this construction, an Aat II site was engineered into the rBRSV N gene at nt 2305-2310, which is located within the last three codons of the N ORF. The substitution was silent at the amino acid level. The same site was engineered into the HRSV N ORF of the HRSV antigenomic cDNA. In addition, the HRSV antigenomic cDNA was modified so that antigenomic nt 1037-1042 in the downstream nontranslated region of NS2 were changed to a Kpn I site. This Kpn I-Aat II HRSV fragment was cloned into the corresponding window of rBRSV, transferring most of the N ORF. The very last few codons of the N ORF of BRSV and HRSV have the same amino acid coding assignments, and so the few nt of BRSV N ORF that remain contribute to encode a complete HRSV N protein.

A BRSV/HRSV chimera was constructed in which the BRSV P gene was replaced by its HRSV counterpart. This chimera is designated rBRSV/A2-P (Fig. 13A). This employed the above-mentioned Aat II site as well as a previously-described Mlu I site (see Fig. 9). Transfer of this HRSV fragment to the corresponding window of rBRSV transferred the complete P gene. As indicated above, the few N ORF nt that were transferred in this fragment have the same coding assignment in BRSV and HRSV.

A BRSV/HRSV chimera was constructed in which the above-mentioned N and P sequences of HRSV were transferred to rBRSV, resulting in rBRSV/A2-NP (Fig. 13A). This employed the Kpn I and Mlu I sites mentioned above.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

The same transfers also were made into a rBRSV backbone containing the HRSV NS1 and NS2 genes, namely the rBRSV/A2-NS1+2 backbone described in the previous example. This resulted in rBRSV/A2-NS1+2N, rBRSV/A2-NS1+2P, and rBRSV/A2-NS1+2NP (Fig. 13B).

- 5 Each of the foregoing recombinant viruses was readily recovered from cDNA. The rBRSV/A2-P virus replicated in MDBK cells comparably to wild-type rBRSV, whereas the replication of the rBRSV/A2-N was approximately 10-fold lower and that of the rBRSV/A2-NP virus was intermediate between these two. Thus, a spectrum of growth properties was obtained. Following the methods described above,
- 10 these viruses can be modified to bear HRSV G and F genes. In addition, comparable gene substitutions can be made in the rHRSV backbone. Namely, the HRSV N and/or P gene can be substituted by the BRSV counterpart. The ability to make these substitutions in the context of substitutions of the NS1 and NS2 genes offers further flexibility in obtaining an optimal level of vaccine production *in vitro* and attenuation and
- 15 immunogenicity in the human vaccinee.

- As indicated by the foregoing examples, genes to be transferred in gene position-shifted RSV can be selected that are likely to interact functionally or structurally based on available knowledge of RSV structure/function. These exchanges and other modifications within gene position-shifted RSV are further simplified by the fact that
- 20 proteins that interact are juxtaposed in the genome, for example the N and P nucleocapsid proteins, the M, SH, F and G envelope proteins, and the M2-1, M2-2 and L polymerase components. Thus, additional candidate vaccine strains according to the invention can be achieved, for example, by incorporating two or more juxtaposed genes, e.g., selected from N and P, two or more of the M, SH, F and G envelope genes, or two or more of the M2-1,
- 25 M2-2 and L genes, together as a heterologous insert or substitution unit in a recipient or background genome or antigenome.

- For example, the M and SH genes can be replaced together in rBRSV/A2 with their HRSV counterparts. This will result in a virus in which the viral envelope proteins (G, F, SH and M) are all of HRSV, while the internal proteins are of BRSV.
- 30 This can be followed, as needed, by replacement of additional BRSV genes with their human counterparts, for example, N and P as another pair, NS1 and NS2 as another, and

WO 02/00693

PCT/US01/20107

M2-1, M2-2 and L as another group. The juxtaposition of each pair of genes will simplify the substitutions. At the same time, the converse approach of inserting individual BRSV genes into HRSV, leaving the HRSV G and F antigenic determinants undisturbed, will also yield desired vaccine candidates within the invention. For
 5 example, one or more of the N, P, M2-1 and M genes of a human RSV can be individually replaced by their bovine counterparts. Recovered recombinant viruses are then evaluated for the attenuation phenotype in cell culture, rodents, and nonhuman primates, as exemplified herein. In this manner, the invention provides for identification of candidate human-bovine chimeric RSV vaccine viruses having desired levels of
 10 attenuation and protective efficacy for treatment and prophylaxis of RSV in various subjects.

EXAMPLE VII

Improved *in vitro* Replication of RSV Vaccine Viruses Having a Partial Gene Deletion

15 In accordance with the foregoing description, it has been shown that the efficiency of *in vitro* replication of RSV is sensitive to changes in the nucleotide length of the genome. With regard to increases in length, one type of modification to adjust growth phenotype of recombinant RSV can involve the insertion of an additional gene encoding a foreign protein. For example, the coding sequences for bacterial chloramphenicol acetyl
 20 transferase (CAT), firefly luciferase, murine interferon gamma (IFN γ), murine interleukin 2 (IL-2), and murine granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) have been inserted individually into the G-F intergenic region. Each of these insertions had the effect of reducing the efficiency of virus growth *in vitro*. In one instance, insertion of a CAT transcription cassette of approximately 0.76 kb into the G-F intergenic region
 25 reduced virus growth *in vitro* 20-fold. The lymphokines were of murine origin and would not be expected to be active in the HEP-2 cells of human origin. Also, the various inserts of comparable size had an effect of comparable magnitude in reducing RSV growth *in vitro*. The inhibition reported in these studies may be attributable to the addition of sequence per se, as opposed to the expression of the various encoded foreign proteins.

30 Insertion of a 1.75 kb luciferase cassette into this same intergenic region had a much greater inhibitory effect on virus replication (greater than 50-fold reduction),

WO 02/00693

PCT/US01/20107

suggesting that larger inserts are more inhibitory. On the other hand, there was some evidence that this effect also might depend on the location of the insert in the genome. For example, the insertion of a 0.8 kb transcription cassette into the noncoding region of the NS1 gene, placing it in a promoter-proximal position, had only a marginal inhibitory effect on virus growth (Hallak, *et al.*, *J Virol.*, 74:10508-13, 2000, incorporated herein by reference). It remains uncertain whether the observed effect was due to the increase in nucleotide length alone, or due to the addition of another mRNA-coding unit, or both.

In other examples, increases in the nt length of recombinant RSV were made in a single intergenic region. The naturally-occurring RSV intergenic regions that have been analyzed to date range in length from 1 to 56 nt. In a recombinant virus lacking the SH gene, the M-SH intergenic region was increased up to 160 nt with a marginal inhibitory effect on growth.

In additional examples, the RSV genome is decreased to yield a desired effect on viral phenotype. In selected embodiments, one or more genes from the set NS1, NS2, SH, G and M2-2 were deleted singly, or in certain combinations, from recombinant virus without ablating viral infectivity. Each deletion results in a loss of expression of the deleted protein, and in most cases resulted in a reduced efficiency of viral growth *in vitro* and *in vivo*. The only exception is that the growth of the SH-deletion virus was not reduced *in vitro* and, in some cell lines, was marginally increased. In another example involving the construction of a chimeric virus between RSV strains A2 and B1, the intergenic region between the G and F genes was shortened from 52 nt to 5 nt (see, e.g., Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 73:9773-80, 1999, incorporated herein by reference).

A number of prior reports have discussed production of recombinant RSV with gene or intergenic sequences deleted (Bermingham and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:11259-64, 1999; Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 71:8973-82, 1997; Jin, *et al.*, *Virology*, 273:210-8, 2000; Jin, *et al.*, *J. Virol.*, 74:74-82, 2000; Teng and Collins, *J. Virol.*, 73:466-473, 1999; Teng, *et al.*, *Journal of Virology*, 2000; Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 73:3438-42, 1999, each incorporated herein by reference). However, in each case the deletion was accompanied by modification of open reading frames or other significant genomic features, rendering uncertain the effect of the nucleotide deletion on viral phenotype.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

In the present example, the effect of reducing the length of the RSV genome by deleting sequence from the downstream noncoding region of the SH gene is demonstrated. This exemplary partial gene deletion (schematically illustrated in Fig. 14) was constructed using a version of the antigenome cDNA containing an XmaI site in the G-F intergenic region, a change which of itself would not be expected to affect the encoded virus. The 141-bp XhoI-PacI window that runs from the end of the SH ORF to the SH gene-end signal was replaced with a synthetic DNA formed from the following two oligonucleotides: TCGAGTtAAAtACtTgaTAAAGTAGTTAAT (SEQ ID NO: 7) and TAACTACTTTAtcAaGTaTTaAC (SEQ ID NO: 8) (parts of the XhoI and PacI restriction sites are in bold, nucleotides of the SH open reading frame and termination codon are underlined, and silent nucleotide changes are indicated in small case). The encoded virus, which was designated RSV/6120, has silent nucleotide substitutions in the last three codons and termination codon of the SH ORF and has a deletion of 112 nucleotides from the SH downstream non-translated region (positions 4499-4610 in the recombinant antigenome) that leaves the gene-end signal intact (Bukreyev, *et al.*, *J. Virol.*, 70:6634-41, 1996, incorporated herein by reference) (Fig. 14). These point mutations and 112-nt deletion thus did not alter the encoded amino acids of any of the viral proteins, did not interrupt any of the known viral RNA signals, and did not change the number of encoded mRNAs.

The noncoding changes at the end of the SH gene were made because this region is susceptible to instability during growth in bacteria. Indeed, these changes resulted in greatly improved stability in bacteria, a property that is important for the manipulation and propagation of the antigenome plasmid. Thus, RSV/6120 provided the opportunity to examine the effect of deleting sequence from the genome in the absence of confounding secondary and tertiary effects due to alterations in encoded proteins, RNA signals, or number of encoded mRNAs. It is expected that the five point mutations made in the last few codons of the SH ORF will not affect the biological properties of the encoded virus, as evinced by studies of point mutations introduced as markers into various genes of recombinant RSV and human and bovine parainfluenza virus type 3 which are not associated with significant change in biological properties (Collins, *et al.*, *Adv. Virus Res.*, 54:423-51, 1999; Schmidt, *et al.*, *J. Virol.*, 74:8922-9, 2000; Schmidt, *et al.*, *J. Virol.*, 75:4594-603, 2001; Skiadopoulos, *et al.*, *J. Virol.*, 72:1762-8, 1998; Skiadopoulos, *et al.*, *J. Virol.*, 73:1374-81, 1999; Whitehead, *et al.*, *J. Virol.*, 72:4467-

WO 02/00693

PCT/US01/20107

4471, 1998; Whitehead, *et al.*, J. Virol., 73:871-7, 1999, each incorporated herein by reference).

The 6120 virus was analyzed for the efficiency of multi-step growth in parallel with its full-length counterpart, called D53 in three separate sets of infections (Fig.s 15A, 15B and 15C). As shown in the figures, the peak titer of the 6120 virus was reproducibly higher than that of the D53 virus by a factor of 1.5- to 2-fold. Thus, the modifications made to the SH gene, in particular the 112-nt noncoding deletion (representing 0.7% of the genome length), resulted in a substantial increase in growth efficiency *in vitro*. Any increase in growth efficiency *in vitro* is an advantage for RSV vaccine production, since the relatively non-robust growth that is characteristic of RSV is an important problem for vaccine development and is anticipated to be a complication for vaccine production.

The specific, defined modifications described here provide a general tool that can be applied in a variety of contexts to optimize recombinant vaccine virus growth and other phenotypic characteristics. Based on the present findings, the 15.2 kb genome of RSV provides a large assemblage of target sites for modification by partial gene deletion or other nucleotide deletions. Typically, changes to be selected in this regard will not involve the 11 viral ORFs and their translation start sites (see, e.g., Kozak, Gene, 234:187-208, 1999, incorporated herein by reference). The viral ORFs account for more than 90% of the genome, and thus the typical selection of target sites for partial deletional modification will be within the remaining, non-translated regions (alternatively referred to as noncoding regions). In addition, target sites for nucleotide deletions in this regard will generally exclude cis-acting replication and transcription signals, including the 10-nt gene start and 12- to 13-nt gene end signal that flank each gene (see, e.g., Collins, *et al.*, Fields Virology, 2:1313-1352, 1996, incorporated herein by reference), as well as an 11-nt core promoter found at the 3' end of the genome and the complement of the antigenomic promoter found at the 5' end of the genome.

The present example illustrates that, unexpectedly, the efficiency of *in vitro* growth by RSV can be increased substantially by removing nontranslated sequence, such as sequence flanking the viral ORFs or located between or following genes or in the 3' and 5' extragenic regions. The example demonstrates that even small deletions of sequence can yield improved viral growth. This is a highly desired result, since the

WO 02/00693

PCT/US01/20107

improvement of growth efficiency *in vitro* facilitates large scale vaccine development and production.

5

Microorganism Deposit Information

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, under the conditions of the Budapest Treaty and designated as follows:

	<u>Plasmid</u>	<u>Accession No.</u>	<u>Deposit Date</u>
10	cpts RSV 248	ATCC VR 2450	March 22, 1994
	cpts RSV 248/404	ATCC VR 2454	March 22, 1994
	cpts RSV 248/955	ATCC VR 2453	March 22, 1994
	cpts RSV 530	ATCC VR 2452	March 22, 1994
	cpts RSV 530/1009	ATCC VR 2451	March 22, 1994
15	cpts RSV 530/1030	ATCC VR 2455	March 22, 1994
	RSV B-1 cp52/2B5	ATCC VR 2542	September 26, 1996
	RSV B-1 cp-23	ATCC VR 2579	July 15, 1997
	p3/7(131)	ATCC 97990	April 18, 1997
	p3/7(131)2G	ATCC 97989	April 18, 1997
20	p218(131)	ATCC 97991	April 18, 1997

Although the foregoing invention has been described in detail by way of example for purposes of clarity of understanding, it will be apparent to the artisan that certain changes and modifications may be practice within the scope of the appended claims which are presented by way of illustration not limitation. In this context, various publications and other references have been cited within the foregoing disclosure for economy of description. Each of these references are incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated infectious recombinant respiratory syncytial virus (RSV) comprising a major nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large polymerase protein (L), a RNA polymerase elongation factor, and a partial or complete recombinant RSV genome or antigenome having one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome that is/are positionally shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.
2. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein said one or more shifted gene(s) or genome segment(s) is/are shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position by deletion or insertion of one or more displacement polynucleotide(s) within said partial or complete recombinant RSV genome or antigenome.
3. The isolated infectious recombinant RSV of claim 2, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more polynucleotide insert(s) of between 150 nucleotides (nts) and 4,000 nucleotides in length which is inserted in a non-coding region (NCR) of the genome or antigenome or as a separate gene unit (GU), said polynucleotide insert lacking a complete open reading frame (ORF) and specifying an attenuated phenotype in said recombinant RSV.
4. The isolated infectious recombinant RSV of claim 3, wherein said polynucleotide insert(s) comprises one or more RSV gene(s) or genome segment(s).
5. The isolated infectious recombinant RSV of claim 2, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more RSV gene(s) or genome segment(s) selected from RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F and G genes and genome segments and leader, trailer and intergenic regions of the RSV genome and segments thereof.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

6. The isolated infectious recombinant RSV of claim 2, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more bovine RSV (BRSV) or human RSV (HRSV) gene(s) or genome segment(s) selected from RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F and G gene(s) or genome segment(s) and leader, trailer and intergenic regions of the RSV genome or segments thereof.
7. The isolated infectious recombinant RSV of claim 6, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome to cause a positional shift of said one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome to a more promoter-proximal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.
8. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) that is/are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome comprise one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof.
9. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
10. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
11. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
12. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein a displacement polynucleotide comprising RSV M2(ORF2) is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

13. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV G gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
14. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein the
5 RSV F and G genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
15. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein the RSV NS1 and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
- 10 16. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein the RSV SH and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
17. The isolated infectious recombinant RSV of claim 8, wherein the RSV SH, NS1 and NS2 genes are all deleted to form the recombinant RSV genome or
15 antigenome or antigenome.
18. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more deletion(s) within a nontranslated sequence at the beginning or end of an RSV open reading frame or in an intergenic region or 3' leader or 5' trailer portion of the RSV genome.
- 20 19. The isolated infectious recombinant RSV of claim 18, wherein said displacement polynucleotides comprise a partial gene deletion.
20. The isolated infectious recombinant RSV of claim 19, wherein said partial gene deletion is a partial deletion of the SH gene.
21. The isolated infectious recombinant RSV of claim 20, wherein said
25 partial deletion of the SH gene comprises a deletion within the SH downstream non-translated region.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

22. The isolated infectious recombinant RSV of claim 21, which is RSV 6120 having a deletion of 112 nucleotides at positions 4499-4610 in the recombinant RSV antigenome.
23. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more region(s) of a downstream untranslated sequence of an RSV gene.
24. The isolated infectious recombinant RSV of claim 23, wherein said downstream untranslated sequence(s) is/are from NS1 (positions 519-563), NS2 (positions 1003-1086), P (positions 3073-3230), M (positions 4033-4197), F(positions 7387-7539), and/or M2 (positions 8433-8490) genes.
25. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more region(s) of a upstream untranslated sequence of an RSV gene.
26. The isolated infectious recombinant RSV of claim 25, wherein said one or more upstream untranslated sequences is/are from NS1 (positions 55-96), NS2 (positions 606-624) and/or SH (positions 4231-4300).
27. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide comprises a deletion of nucleotides 4683 to 4685 of the RSV G gene.
28. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more RSV intergenic sequences.
29. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from nucleotides within the RSV 5' trailer region.
30. The isolated infectious recombinant RSV of claim 29, wherein a portion of the 5' trailer region that immediately follows the L gene is reduced in size by

WO 02/00693

PCT/US01/20107

75 nucleotides, 100 nucleotides, 125 nucleotides, or more, leaving intact the 5' genomic terminus.

31. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from nucleotides within the RSV 3' leader region.

32. The isolated infectious recombinant RSV of claim 31, wherein a portion of the 3' trailer region that excludes a core portion of the viral promoter located within the first 11 nucleotides of the 3' leader is deleted.

33. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of the RSV NS1, NS2, SH, F and/or M2 genes yields an adjustable reduction in genome length of between 1-806 nucleotides.

34. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of RSV intergenic regions yields an adjustable reduction in genome length of between 1-198 nucleotides.

35. The isolated infectious recombinant RSV of claim 7, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of RSV intergenic regions yields an adjustable reduction in genome length of between 1-198 nucleotides.

36. The isolated infectious recombinant RSV of claim 6, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are added, substituted, or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to cause a positional shift of said one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.

37. The isolated infectious recombinant RSV of claim 36, wherein said displacement polynucleotide(s) added, substituted, or rearranged within the recombinant

WO 02/00693

PCT/US01/20107

RSV genome or antigenome comprise(s) one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), F, and/or G gene(s) or genome segment(s) thereof.

38. The isolated infectious recombinant RSV of claim 36, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more RSV gene(s) or genome segment(s) encoding one or more RSV glycoprotein(s) or immunogenic domain(s) or epitope(s) thereof.

39. The isolated infectious recombinant RSV of claim 38, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from gene(s) or genome segment(s) encoding RSV F, G, and/or SH glycoprotein(s) or immunogenic domain(s) or epitope(s) thereof.

40. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein one or more RSV glycoprotein gene(s) or genome segments of RSV F, G and SH is/are added, substituted or rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a position that is more promoter-proximal compared to a wild type gene order position of said one or more RSV glycoprotein gene(s).

41. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein the RSV glycoprotein gene G is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of G.

42. The isolated infectious recombinant RSV of claim 41, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.

43. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein the RSV glycoprotein gene F is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of F.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

44. The isolated infectious recombinant RSV of claim 43, wherein the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.
45. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein both
5 RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.
46. The isolated infectious recombinant RSV of claim 45, wherein the
10 RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.
47. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof is/are deleted in the recombinant RSV genome or antigenome.
- 15 48. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
49. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein a
20 displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
50. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40 wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
51. The isolated infectious recombinant RSV of claim 50, wherein the
25 RSV glycoprotein gene G is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of G.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

52. The isolated infectious recombinant RSV of claim 51, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.
53. The isolated infectious recombinant RSV of claim 52, which is
5 G1/ΔSH.
54. The isolated infectious recombinant RSV of claim 50, wherein the RSV glycoprotein gene F is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of F.
- 10 55. The isolated infectious recombinant RSV of claim 54, wherein the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.
56. The isolated infectious recombinant RSV of claim 55, which is
F1/ΔSH.
- 15 57. The isolated infectious recombinant RSV of claim 50, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.
58. The isolated infectious recombinant RSV of claim 57, wherein the
20 RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.
59. The isolated infectious recombinant RSV of claim 58, which is
G1F2/ΔSH.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

60. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein the RSV SH and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
61. The isolated infectious recombinant RSV of claim 60, wherein both
5 RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.
62. The isolated infectious recombinant RSV of claim 61, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein
10 gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.
63. The isolated infectious recombinant RSV of claim 62, which is G1F2/ Δ NS2 Δ SH.
64. The isolated infectious recombinant RSV of claim 40, wherein the
15 RSV SH, NS1 and NS2 genes are all deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.
65. The isolated infectious recombinant RSV of claim 64, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the
20 wild type gene order positions of G and F.
66. The isolated infectious recombinant RSV of claim 65, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.
- 25 67. The isolated infectious recombinant RSV of claim 66, which is G1F2/ Δ NS2 Δ NS2 Δ SH.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

68. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome comprises a partial or complete human RSV (HRSV) or bovine RSV (BRSV) background genome or antigenome combined with one or more heterologous gene(s) or genome segment(s) from a different RSV to form a human-
5 bovine chimeric RSV genome or antigenome.
69. The isolated infectious recombinant RSV of claim 68, wherein the heterologous gene or genome segment is added or substituted at a position that is more promoter-proximal or promoter-distal compared to a wild type gene order position of a counterpart gene or genome segment within the partial or complete HRSV or BRSV
10 background genome or antigenome.
70. The isolated infectious recombinant RSV of claim 69, wherein both human RSV glycoprotein genes G and F are substituted at gene order positions 1 and 2, respectively, to replace counterpart G and F glycoprotein genes deleted at wild type positions 7 and 8, respectively in a partial bovine RSV background genome or
15 antigenome.
71. The isolated infectious recombinant RSV of claim 70, which is rBRSV/A2-G1F2.
72. The isolated infectious recombinant RSV of claim 69, wherein one or more human RSV non-structural and/or envelope-associated genes selected from NS1,
20 NS2, F, G, SH, and M is/are added or substituted within a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome.
73. The isolated infectious recombinant RSV of claim 69, wherein one or more human RSV envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are added or substituted within a partial bovine RSV background genome or antigenome in
25 which one or more envelope-associated genes selected from F, G, SH, and M is/are deleted.
74. The isolated infectious recombinant RSV of claim 73, wherein human RSV envelope-associated genes F, G, and M are added within a partial bovine

WO 02/00693

PCT/US01/20107

RSV background genome or antigenome in which all of the envelope-associated genes F, G, SH, and M are deleted.

75. The isolated infectious recombinant RSV of claim 74, which is rBRSV/A2-MGF.
- 5 76. The isolated infectious recombinant RSV of claim 69, wherein both human RSV glycoprotein genes G and F are substituted at gene order positions 3 and 4, respectively, to replace counterpart G and F glycoprotein genes deleted at wild type positions 7 and 8, respectively in a partial bovine RSV background genome or antigenome.
- 10 77. The isolated infectious recombinant RSV of claim 76, which is rBRSV/A2-G3F4.
78. The isolated infectious recombinant RSV of claim 69, wherein both human RSV glycoprotein genes G and F are substituted at gene order positions 1 and 2, respectively, to replace counterpart G and F glycoprotein genes deleted at wild type
15 positions 7 and 8, respectively, and wherein human RSV genes NS1 and NS2 are substituted for their bovine counterpart genes, in a partial bovine RSV background genome or antigenome.
79. The isolated infectious recombinant RSV of claim 78, which is rBRSV/A2-G1F2NS3NS4.
- 20 80. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, in which RSV M2(ORF1) is shifted to a more promoter-proximal position within the recombinant RSV genome or antigenome to upregulate transcription of the recombinant virus.
81. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates at least one and up to a full complement
25 of attenuating mutations present within a panel of mutant human RSV strains, said panel comprising cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009

WO 02/00693

PCT/US01/20107

(ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579).

82. The isolated infectious recombinant RSV of claim 81, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates attenuating mutations adopted from
5 different mutant RSV strains.

83. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates at least one and up to a full complement of attenuating mutations specifying an amino acid substitution at Val267 in the RSV N gene, Glu218 and/or Thr523 in the RSV F gene, Asn43, Cys319, Phe 521, Gln831,
10 Met1169, Tyr1321 and/or His 1690 in the RSV polymerase gene L, and a nucleotide substitution in the gene-start sequence of gene M2.

84. The isolated infectious recombinant RSV of claim 83, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates at least two attenuating mutations.

85. The isolated infectious recombinant RSV of claim 83, wherein the
15 recombinant genome or antigenome includes at least one attenuating mutation stabilized by multiple nucleotide changes in a codon specifying the mutation.

86. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome further comprises a nucleotide modification specifying a phenotypic change selected from a change in growth characteristics,
20 attenuation, temperature-sensitivity, cold-adaptation, plaque size, host-range restriction, or a change in immunogenicity.

87. The isolated infectious recombinant RSV of claim 86, wherein the nucleotide modification alters a SH, NS1, NS2, M2ORF2, or G gene of the recombinant virus.

25 88. The isolated infectious recombinant RSV of claim 87, wherein a SH, NS1, NS2, M2 ORF2, or G gene of the recombinant virus is deleted in whole or in

WO 02/00693

PCT/US01/20107

part or expression of the gene is ablated by introduction of one or more stop codons in an open reading frame of the gene.

89. The isolated infectious recombinant RSV of claim 86, wherein the nucleotide modification comprises a nucleotide deletion, insertion, substitution, addition or rearrangement of a cis-acting regulatory sequence of a selected gene within the recombinant RSV genome or antigenome.
90. The isolated infectious recombinant RSV of claim 89, wherein a gene end (GE) signal of the NS1 or NS2 gene is modified.
91. The isolated infectious recombinant RSV of claim 89, wherein the nucleotide modification comprises an insertion, deletion, substitution, or rearrangement of a translational start site within the recombinant genome or antigenome.
92. The isolated infectious recombinant RSV of claim 91, wherein the translational start site for a secreted form of the RSV G glycoprotein is ablated.
93. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome is modified to encode a non-RSV molecule selected from a cytokine, a T-helper epitope, a restriction site marker, or a protein of a microbial pathogen capable of eliciting a protective immune response against said pathogen in a mammalian host.
94. The isolated infectious recombinant RSV of claim 93, which incorporates one or more gene(s) and/or genome segment(s) from parainfluenza virus (PIV).
95. The isolated infectious recombinant RSV of claim 94, wherein the recombinant genome or antigenome encodes a HN or F glycoprotein, or an ectodomain or immunogenic epitope of HN or F, of PIV1, PIV2, or PIV3.
96. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1 which is a virus.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

97. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1 which is a subviral particle.
98. The isolated infectious recombinant RSV of claim 2, wherein said displacement polynucleotide is added within or deleted from a noncoding region of the recombinant RSV genome or antigenome.
99. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates antigenic determinants from one or both subgroup A and subgroup B human RSV.
100. A method for stimulating the immune system of an individual to induce protection against RSV which comprises administering to the individual an immunologically sufficient amount of the recombinant RSV of claim 1 combined with a physiologically acceptable carrier.
101. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV is administered in a dose of 10^3 to 10^6 PFU.
102. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV is administered to the upper respiratory tract.
103. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV is administered by spray, droplet or aerosol.
104. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV is administered to an individual seronegative for antibodies to RSV or possessing transplacentally acquired maternal antibodies to RSV.
105. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV elicits an immune response against either human RSV A or RSV B.
106. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV elicits an immune response against both human RSV A and RSV B.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

107. The method of claim 100, wherein the recombinant RSV elicits an immune response against either human RSV A or RSV B and is co-administered with an immunologically sufficient amount of a second attenuated RSV capable of eliciting an immune response against human RSV A or RSV B, whereby an immune response is elicited against both human RSV A and RSV B.
108. The method of claim 107, wherein the recombinant RSV and second attenuated RSV are administered simultaneously as a mixture.
109. An immunogenic composition to elicit an immune response against RSV comprising an immunologically sufficient amount of the recombinant RSV of claim 1 in a physiologically acceptable carrier.
110. The immunogenic composition of claim 109, formulated in a dose of 10^3 to 10^6 PFU.
111. The immunogenic composition of claim 109, formulated for administration to the upper respiratory tract by spray, droplet or aerosol.
112. The immunogenic composition of claim 109, wherein the recombinant RSV elicits an immune response against either human RSV A or RSV B or both human RSV A and RSV B.
113. The isolated infectious recombinant RSV of claim 1, wherein the recombinant genome or antigenome comprises a partial or complete RSV vector genome or antigenome combined with one or more heterologous genes or genome segments encoding one or more antigenic determinants of one or more heterologous pathogens.
114. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein said one or more heterologous pathogens is a heterologous RSV and said heterologous gene(s) or genome segment(s) encode(s) one or more RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F or G protein(s) or fragment(s) thereof.
115. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein the vector genome or antigenome is a partial or complete RSV A genome or antigenome and

WO 02/00693

PCT/US01/20107

the heterologous gene(s) or genome segment(s) encoding the antigenic determinant(s) is/are of a RSV B subgroup virus.

116. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein the chimeric genome or antigenome incorporates one or more gene(s) or genome segment(s) of a BRSV that specifies attenuation.

117. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein one or more HPIV1, HPIV2, or HPIV3 gene(s) or genome segment(s) encoding one or more HN and/or F glycoprotein(s) or antigenic domain(s), fragment(s) or epitope(s) thereof is/are added to or incorporated within the partial or complete HRSV vector genome or antigenome.

118. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein the vector genome or antigenome is a partial or complete BRSV genome or antigenome and the heterologous gene(s) or genome segment(s) encoding the antigenic determinant(s) is/are of one or more HRSV(s).

119. The isolated infectious recombinant RSV of claim 118, wherein the partial or complete BRSV genome or antigenome incorporates one or more gene(s) or genome segment(s) encoding one or more HRSV glycoprotein genes selected from F, G and SH, or one or more genome segment(s) encoding cytoplasmic domain, transmembrane domain, ectodomain or immunogenic epitope portion(s) of F, G, and/or SH of HRSV.

120. The isolated infectious recombinant RSV of claim 113, wherein the vector genome or antigenome is a partial or complete HRSV or BRSV genome or antigenome and the heterologous pathogen is selected from measles virus, subgroup A and subgroup B respiratory syncytial viruses, mumps virus, human papilloma viruses, type 1 and type 2 human immunodeficiency viruses, herpes simplex viruses, cytomegalovirus, rabies virus, Epstein Barr virus, filoviruses, bunyaviruses, flaviviruses, alphaviruses and influenza viruses.

121. The isolated infectious recombinant RSV of claim 120, wherein said one or more heterologous antigenic determinant(s) is/are selected from measles virus

WO 02/00693

PCT/US01/20107

HA and F proteins, subgroup A or subgroup B respiratory syncytial virus F, G, SH and M2 proteins, mumps virus HN and F proteins, human papilloma virus L1 protein, type 1 or type 2 human immunodeficiency virus gp160 protein, herpes simplex virus and cytomegalovirus gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, and gM proteins, rabies virus G protein, Epstein Barr Virus gp350 protein; filovirus G protein, bunyavirus G protein, 5 Flavivirus E and NS1 proteins, and alphavirus E protein, and antigenic domains, fragments and epitopes thereof.

122. The isolated infectious recombinant RSV of claim 121, wherein the heterologous pathogen is measles virus and the heterologous antigenic determinant(s) 10 is/are selected from the measles virus HA and F proteins and antigenic domains, fragments and epitopes thereof.

123. The isolated infectious recombinant RSV of claim 122, wherein a transcription unit comprising an open reading frame (ORF) of a measles virus HA gene is added to or incorporated within a HRSV vector genome or antigenome.

15 124. An isolated polynucleotide molecule comprising a recombinant RSV genome or antigenome having one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome that is/are positionally shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.

20 125. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said one or more shifted gene(s) or genome segment(s) is/are shifted to a more promoter-proximal position by insertion or deletion of one or more displacement polynucleotide(s) within said partial or complete recombinant RSV genome or antigenome.

126. The isolated polynucleotide molecule of claim 125, wherein said 25 displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more polynucleotide insert(s) of between 150 nucleotides (nts) and 4,000 nucleotides in length which is inserted in a non-coding region (NCR) of the genome or antigenome or as a separate gene unit (GU), said polynucleotide insert lacking a complete open reading frame (ORF) and specifying an attenuated phenotype in said recombinant RSV.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

127. The isolated polynucleotide molecule of claim 126, wherein said polynucleotide insert(s) comprises one or more RSV gene(s) or genome segment(s).

128. The isolated polynucleotide molecule of claim 127, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more bovine RSV (BRSV) or human RSV (HRSV) gene(s) or genome segment(s) selected from RSV NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, F and G gene(s) or genome segment(s) and leader, trailer and intergenic regions of the RSV genome or segments thereof.

129. The isolated polynucleotide molecule of claim 128, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome to cause a positional shift of said one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome to a more promoter-proximal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.

130. The isolated polynucleotide molecule of claim 129, wherein said displacement polynucleotide(s) that is/are deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome comprise one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof.

131. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

132. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

133. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

134. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein a displacement polynucleotide comprising RSV M2(ORF2) is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

135. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV G gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

5 136. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein the RSV F and G genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

137. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein the RSV NS1 and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

10 138. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein the RSV SH and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

139. The isolated polynucleotide molecule of claim 130, wherein the RSV SH, NS1 and NS2 genes are all deleted to form the recombinant RSV genome or
15 antigenome or antigenome.

140. The isolated polynucleotide molecule of claim 128, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are added, substituted, or rearranged within the recombinant RSV genome or antigenome to cause a positional shift of said one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or
20 antigenome to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.

141. The isolated polynucleotide molecule of claim 140, wherein said displacement polynucleotide(s) added, substituted, or rearranged within the recombinant
25 RSV genome or antigenome comprise(s) one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), F, and/or G gene(s) or genome segment(s) thereof.

142. The isolated polynucleotide molecule of claim 140, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more RSV gene(s) or genome

WO 02/00693

PCT/US01/20107

segment(s) encoding one or more RSV glycoprotein(s) or immunogenic domain(s) or epitope(s) thereof.

143. The isolated polynucleotide molecule of claim 141, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from gene(s) or genome segment(s)
5 encoding RSV F, G, and/or SH glycoprotein(s) or immunogenic domain(s) or epitope(s) thereof.

144. The isolated polynucleotide molecule of claim 143, wherein one or more RSV glycoprotein gene(s) selected from F, G and SH is/are added, substituted or rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a position that is more
10 promoter-proximal compared to a wild type gene order position of said one or more RSV glycoprotein gene(s).

145. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein the RSV glycoprotein gene G is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild
15 type gene order position of G.

146. The isolated polynucleotide molecule of claim 145, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.

147. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein the
20 RSV glycoprotein gene F is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of F.

148. The isolated polynucleotide molecule of claim 147, wherein the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV
25 genome or antigenome.

149. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

150. The isolated polynucleotide molecule of claim 149, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.
- 5 151. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein one or more RSV NS1, NS2, SH, M2(ORF2), or G gene(s) or genome segment(s) thereof is/are deleted in the recombinant RSV genome or antigenome.
152. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS1 gene is deleted to form the
10 recombinant RSV genome or antigenome.
153. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein a displacement polynucleotide comprising a RSV NS2 gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
154. The isolated polynucleotide molecule of claim 144 wherein a
15 displacement polynucleotide comprising a RSV SH gene is deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome.
155. The isolated polynucleotide molecule of claim 154, wherein the RSV glycoprotein gene G is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild
20 type gene order position of G.
156. The isolated polynucleotide molecule of claim 155, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.
157. The isolated polynucleotide molecule of claim 154, wherein the
25 RSV glycoprotein gene F is rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to a gene order position that is more promoter-proximal compared to the wild type gene order position of F.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

158. The isolated polynucleotide molecule of claim 157, wherein the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 1 within said recombinant RSV genome or antigenome.

159. The isolated polynucleotide molecule of claim 158, which is
5 F1/ Δ SH.

160. The isolated polynucleotide molecule of claim 154, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.

10 161. The isolated polynucleotide molecule of claim 160, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.

15 162. The isolated polynucleotide molecule of claim 144, wherein the RSV SH and NS2 genes are both deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

163. The isolated polynucleotide molecule of claim 162, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the
20 wild type gene order positions of G and F.

164. The isolated polynucleotide molecule of claim 163, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.

25 165. The isolated polynucleotide molecule of claim 164, wherein the RSV SH, NS1 and NS2 genes are all deleted to form the recombinant RSV genome or antigenome or antigenome.

166. The isolated polynucleotide molecule of claim 165, wherein both RSV glycoprotein genes G and F are rearranged within said recombinant RSV genome or

WO 02/00693

PCT/US01/20107

antigenome to gene order positions that are more promoter-proximal compared to the wild type gene order positions of G and F.

167. The isolated polynucleotide molecule of claim 166, wherein the RSV glycoprotein gene G is shifted to gene order position 1 and the RSV glycoprotein gene F is shifted to gene order position 2 within said recombinant RSV genome or antigenome.

168. The isolated polynucleotide of claim 124, wherein the recombinant genome or antigenome comprises a partial or complete human or bovine RSV background genome or antigenome combined with one or more heterologous gene(s) and/or genome segment(s) from a different RSV to form a human-bovine chimeric genome or antigenome.

169. The isolated polynucleotide of claim 168, wherein one or both human RSV glycoprotein genes F and G is/are substituted to replace one or both counterpart F and G glycoprotein genes in a partial bovine RSV background genome or antigenome.

170. The isolated polynucleotide of claim 169, wherein both human RSV glycoprotein genes F and G are substituted to replace counterpart F and G glycoprotein genes in the bovine RSV background genome or antigenome.

171. The isolated polynucleotide of claim 168, wherein one or more human RSV glycoprotein genes selected from F, G and SH is/are added or substituted at a position that is more promoter-proximal compared to a wild-type gene order position of a counterpart gene or genome segment within a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome.

172. The isolated polynucleotide of claim 171, wherein both human RSV glycoprotein genes G and F are substituted at gene order positions 1 and 2, respectively, to replace counterpart G and F glycoprotein genes deleted at wild type positions 7 and 8, respectively in a partial bovine RSV background genome or antigenome.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

173. The isolated polynucleotide of claim 124, wherein the recombinant genome or antigenome is further modified by addition or substitution of one or more additional heterologous gene(s) or genome segment(s) from a human RSV within the partial or complete bovine background genome or antigenome to increase genetic stability or alter attenuation, reactogenicity or growth in culture of the recombinant virus.

174. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein the recombinant genome or antigenome incorporates antigenic determinants from both subgroup A and subgroup B human RSV.

175. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein the recombinant genome or antigenome is further modified by incorporation of one or more attenuating mutations.

176. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein the recombinant genome or antigenome is further modified by incorporation of a nucleotide modification specifying a phenotypic change selected from a change in growth characteristics, attenuation, temperature-sensitivity, cold-adaptation, plaque size, host-range restriction, or a change in immunogenicity.

177. The isolated polynucleotide molecule of claim 176, wherein a SH, NS1, NS2, M2ORF2, or G gene is modified.

178. The isolated polynucleotide molecule of claim 177, wherein the SH, NS1, NS2, M2 ORF2, or G gene is deleted in whole or in part or expression of the gene is ablated by introduction of one or more stop codons in an open reading frame of the gene.

179. The isolated polynucleotide molecule of claim 176, wherein the nucleotide modification comprises a nucleotide deletion, insertion, addition or rearrangement of a cis-acting regulatory sequence of a selected RSV gene within the recombinant RSV genome or antigenome.

180. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) comprise(s) one or more deletion(s) within a

WO 02/00693

PCT/US01/20107

nontranslated sequence at the beginning or end of an RSV open reading frame or in an intergenic region or 3' leader or 5' trailer portion of the RSV genome.

181. The isolated polynucleotide molecule of claim 180, wherein said displacement polynucleotides comprise or partial gene deletion.

5 182. The isolated polynucleotide molecule of claim 181, wherein said partial gene deletion is a partial deletion of the SH gene.

183. The isolated polynucleotide molecule of claim 182, wherein said partial deletion of the SH gene comprises a deletion within the SH downstream non-translated region.

10 184. The isolated polynucleotide molecule of claim 183, which is RSV 6120 having a deletion of 112 nucleotides at positions 4499-4610 in the recombinant RSV antigenome.

15 185. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more region(s) of a downstream untranslated sequence of an RSV gene.

186. The isolated polynucleotide molecule of claim 185, wherein said downstream untranslated sequence(s) is/are from NS1 (positions 519-563), NS2 (positions 1003-1086), P (positions 3073-3230), M (positions 4033-4197), F (positions 7387-7539), and/or M2 (positions 8433-8490) genes.

20 187. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more region(s) of a upstream untranslated sequence of an RSV gene.

25 188. The isolated polynucleotide molecule of claim 187, wherein said one or more upstream untranslated sequences is/are from NS1 (positions 55-96), NS2 (positions 606-624) and/or SH (positions 4231-4300).

189. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide comprises a deletion of nucleotides 4683 to 4685 of the RSV G gene.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

190. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from one or more RSV intergenic sequences.
191. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from nucleotides within the RSV 5' trailer region.
192. The isolated polynucleotide molecule of claim 191, wherein a portion of the 5' trailer region that immediately follows the L gene is reduced in size by 75 nucleotides, 100 nucleotides, 125 nucleotides, or more, leaving intact the 5' genomic terminus.
193. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein said displacement polynucleotide(s) is/are selected from nucleotides within the RSV 3' leader region.
194. The isolated polynucleotide molecule of claim 193, wherein a portion of the 3' trailer region that excludes a core portion of the viral promoter located within the first 11 nucleotides of the 3' leader is deleted.
195. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of the RSV NS1, NS2, SH, F and/or M2 genes yields an adjustable reduction in genome length of between 1-806 nucleotides.
196. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of RSV intergenic regions yields an adjustable reduction in genome length of between 1-198 nucleotides.
197. The isolated polynucleotide molecule of claim 124, wherein a partial or complete deletion from one or any combination of RSV intergenic regions yields an adjustable reduction in genome length of between 1-198 nucleotides.
198. A method for producing an infectious attenuated recombinant RSV particle from one or more isolated polynucleotide molecules encoding said RSV, comprising:

WO 02/00693

PCT/US01/20107

expressing in a cell or cell-free lysate an expression vector comprising an isolated polynucleotide comprising a recombinant RSV genome or antigenome having one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome that is/are positionally shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome, and RSV N, P, L and RNA polymerase elongation factor proteins.

199. The method of claim 198, wherein the recombinant RSV genome or antigenome and the N, P, L and RNA polymerase elongation factor proteins are expressed by two or more different expression vectors.

200. An isolated infectious chimeric respiratory syncytial virus (RSV) comprising a major nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large polymerase protein (L), a RNA polymerase elongation factor, and a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome combined with a plurality of heterogeneous gene(s) and/or genome segment(s) of a human RSV selected from heterogeneous gene(s) and/or genome segment(s) of RSV NS1, NS2, M, SH, G, and/or F, to form a human-bovine chimeric RSV genome or antigenome.

201. The isolated infectious RSV of claim 200, wherein both human NS1 and NS2 genes are substituted for their bovine counterpart NS1 and NS2 genes.

202. The isolated infectious RSV of claim 201, which is rBRSV/A2-NS1+2.

203. The isolated infectious RSV of claim 200, wherein human NS1, NS2, G, and F are substituted for their bovine counterpart NS1, NS2, G and F genes.

204. The isolated infectious RSV of claim 203, which is rBRSV/A2-NS1+2GF.

205. The isolated infectious RSV of claim 200, wherein human M, SH, G, and F are substituted for their bovine counterpart M, SH, G and F genes.

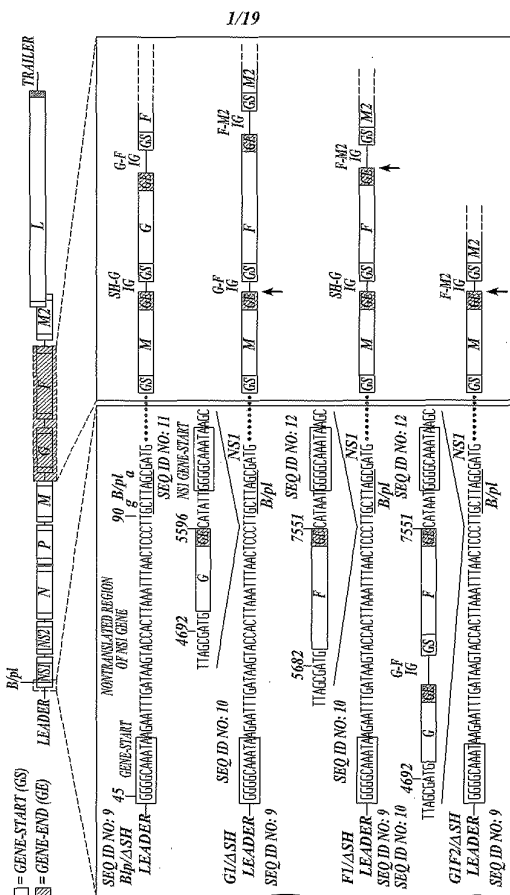
206. The isolated infectious RSV of claim 203, which is rBRSV/A2-MSHGF.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

207. An isolated polynucleotide molecule comprising a recombinant RSV genome or antigenome comprising a partial or complete bovine RSV background genome or antigenome combined with a plurality of heterologous gene(s) and/or genome segment(s) of a human RSV selected from heterologous gene(s) and/or genome segment(s) of RSV NS1, NS2, M, SH, G, and/or F genes, to form a human-bovine chimeric RSV genome or antigenome.

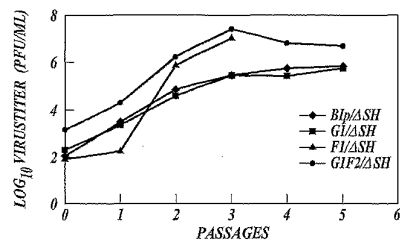
Fig. 1.



WO 02/00693

PCT/US01/20107

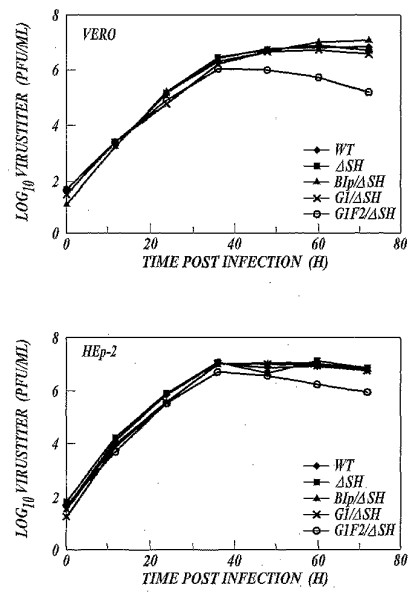
2/19

*Fig. 2.*

WO 02/00693

PCT/US01/20107

3/19

*Fig. 3A.*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4/19

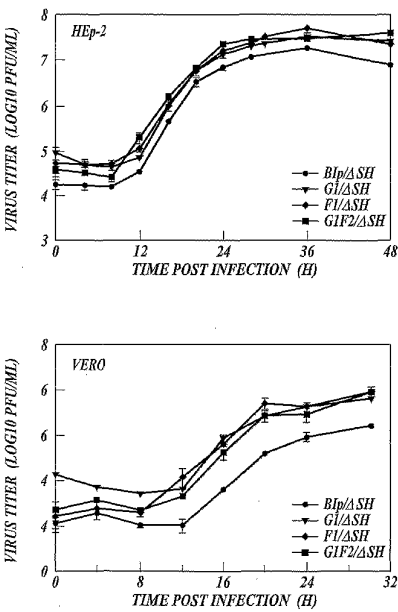


Fig. 3B.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

5/19

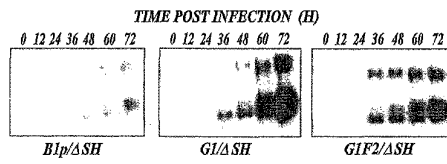
*Fig. 4.*

Fig. 5.

□ = GENE-START (GS)
▨ = GENE-END (GE)

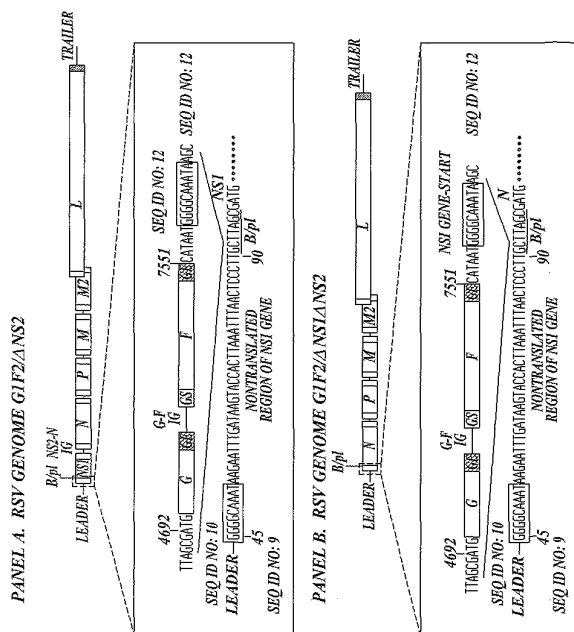
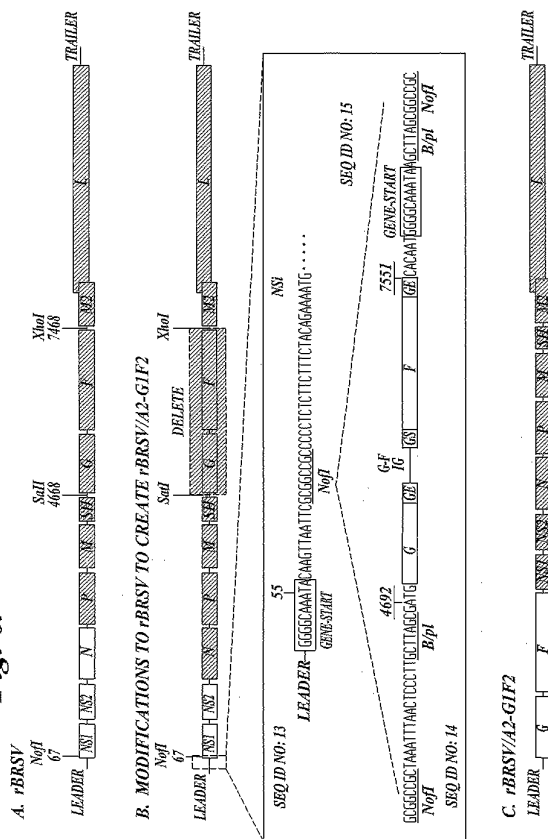


Fig. 6.



WO 02/00693

PCT/US01/20107

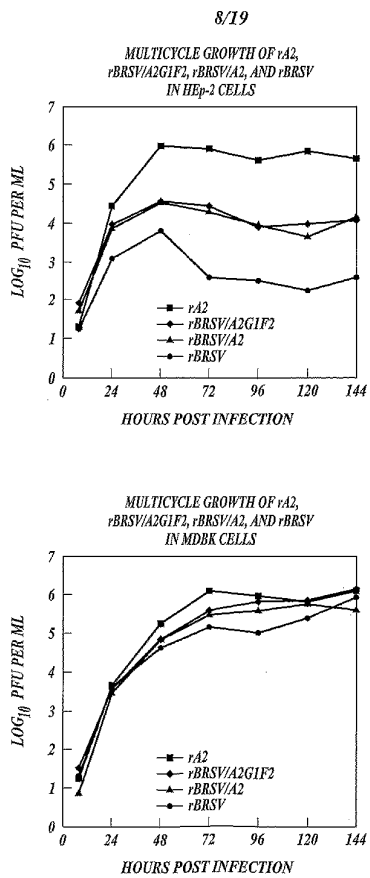
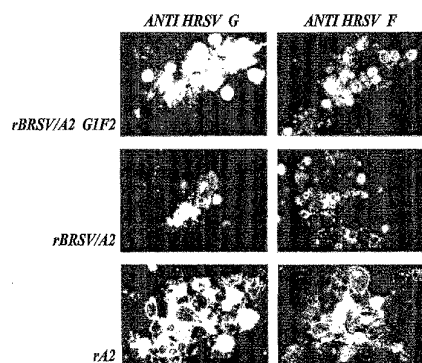


Fig. 7.

WO 02/00693

PCT/US01/20107

9/19

*Fig. 8.*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/00693

PCT/US01/20107

10/19

Fig. 9.

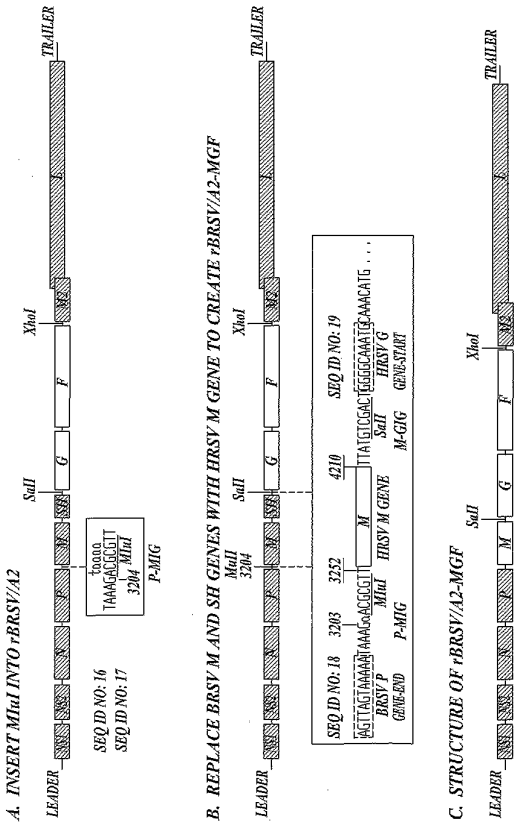
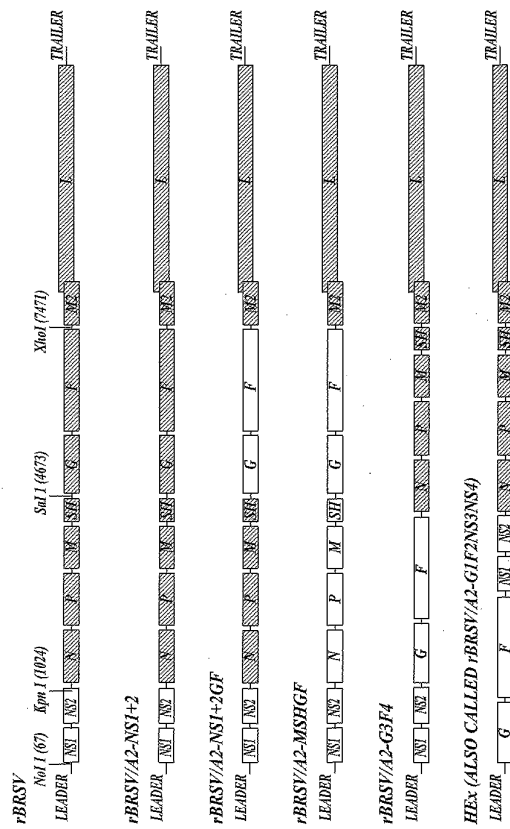


Fig. 10.



WO 02/00693

PCT/US01/20107

12/19

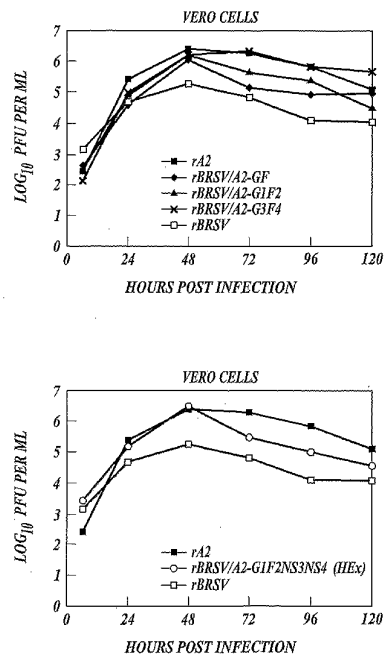


Fig. 11.

13/19

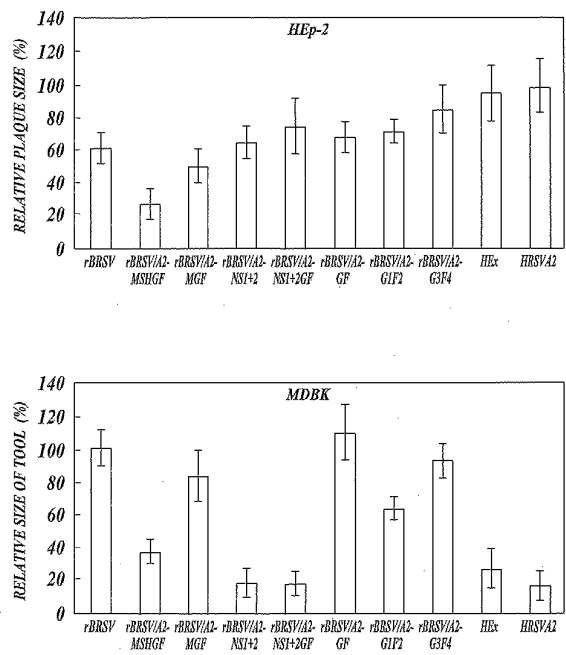
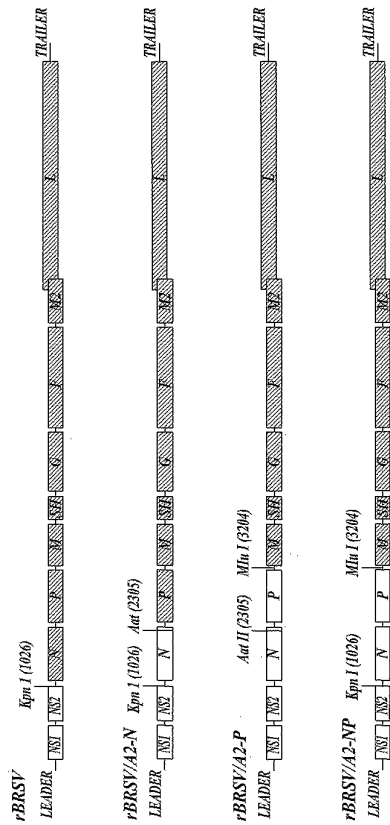


Fig. 12.

Fig. 13A.



WO 02/00693

PCT/US01/20107

15/19

Fig. 13B.

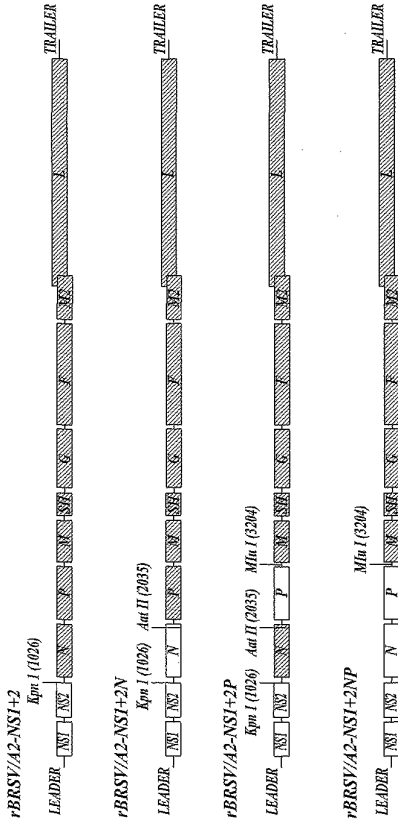
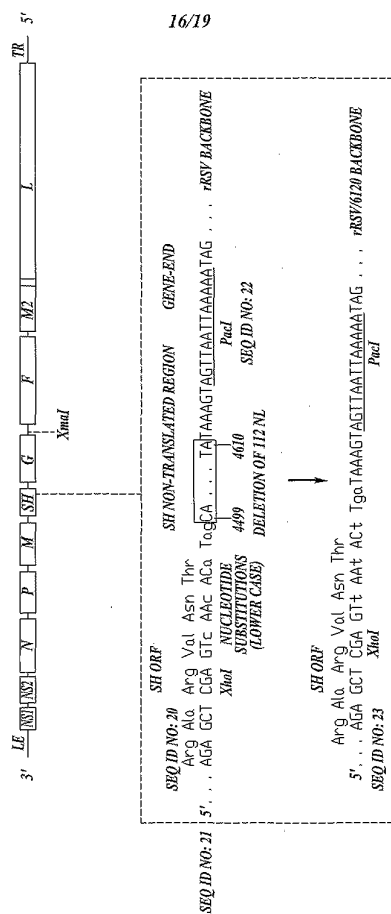


Fig. 14.



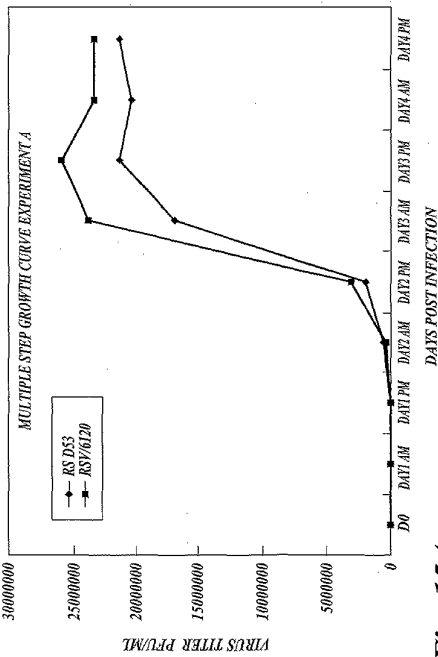


Fig. 15A.

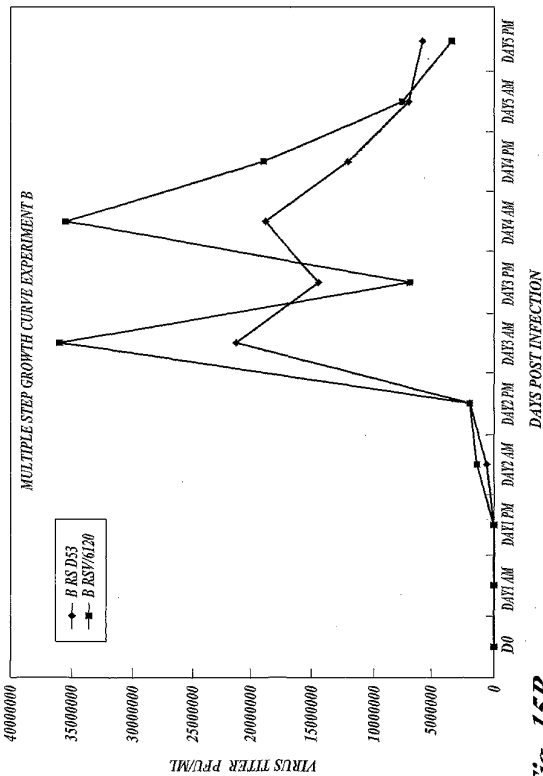


Fig. 15B.

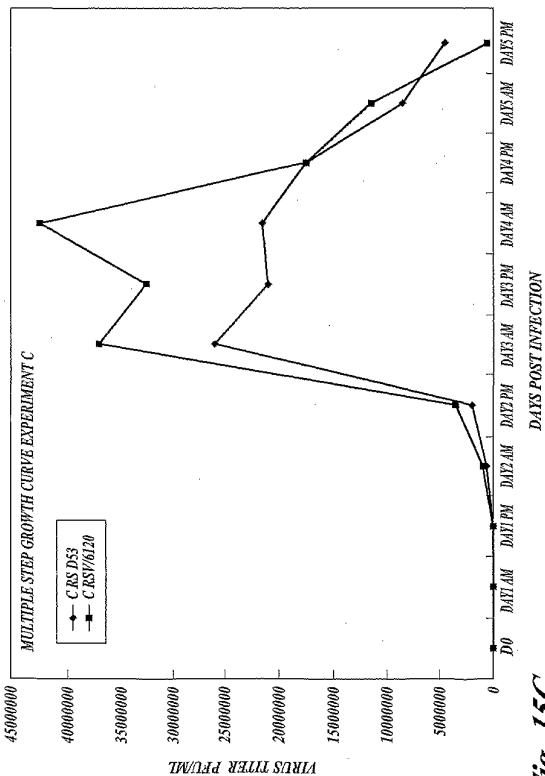


Fig. 15C.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000693 A3(51) International Patent Classification: C12N 7/00, (74) Agents: KING, Jeffrey, J. et al.; Woodcock Washburn
A61K 39/155, A61P 31/14 LLP, 46th floor, One Liberty Place, Philadelphia, PA 19103
(US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20107

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/213,708 23 June 2000 (23.06.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA [US/US]; National Institutes of Health, 6011
Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, MD 20852
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KREMPL, Chris-
tine, D. [DE/US]; 12512 Village Square, Apt. 102,
Rockville, MD 20852 (US); COLLINS, Peter, L.
[US/US]; 12304 Village Square, Apt. 401, Rockville, MD
20852 (US); MURPHY, Brian, R. [US/US]; 5410 Tus-
cawaras Road, Bethesda, MD 20816 (US); BUCHHOLZ,
Ursula [DE/DE]; Buddenblick 10, 17498 Insel Riems
(DE); WHITEHEAD, Stephen, S. [US/US]; 7 Prairie
Rose Lane, Gaithersburg, MD 20878 (US).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINES EXPRESSING PROTECTIVE ANTIGENS FROM PROMOTOR-
PROXIMAL GENUS(57) Abstract: Recombinant respiratory syncytial virus (RSV) having the position of genes shifted within the genome or antigenome
of the recombinant virus are infectious and attenuated in humans and other mammals. Gene shifted RSV are constructed by insertion,
deletion or rearrangement of genes or genome segments within the recombinant genome or antigenome and are useful in vaccine
formulations for eliciting an anti-RSV immune response. Also provided are isolated polynucleotide molecules and vectors incor-
porating a recombinant RSV genome or antigenome wherein a gene or gene segment is shifted to a more promoter-proximal or
promoter-distal position within the genome or antigenome compared to a wild type position of the gene in the RSV gene map. Shifting
the position of genes in this manner provides for a selected increase or decrease in expression of the gene, depending on the
nature and degree of the positional shift. In one embodiment, RSV glycoproteins are upregulated by shifting one or more glycopro-
tein-encoding genes to a more promoter-proximal position. Genes of interest for manipulation to create gene position-shifted RSV
include any of the NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L, 1¹ or G genes or a genome segment that may be part of a gene
or extragenic. A variety of additional mutations and nucleotide modifications are provided within the gene position-shifted RSV of
the invention to yield desired phenotypic and structural effects.

WO 02/000693 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20107
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N/00 A61K39/155 A61P31/14		
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 A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WHITEHEAD S.S. ET AL.: "Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees" J. VIROL., vol. 73, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 3438-3442, XP002192810 cited in the application figure 1 --- -/--	22,184
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 March 2002		Date of mailing of the international search report 1 0.07.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5518 Patentamt 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 346-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/20107

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 98 02530 A (WHITEHEAD STEPHEN S ;US HEALTH (US); COLLINS PETER L (US); JUHASZ) 22 January 1998 (1998-01-22) in particular, page 43, line 28-page 44, line 14, but see also page 11, line 21 - line 26 page 13, line 18 - line 37 page 31, line 19 - line 37 page 35, line 24 -page 38, line 7 page 40, line 22 -page 41, line 8 examples 13,17,18 claims 20-28,35,40-42,45,47	1-23,25, 28-52, 55,57, 58, 60-62, 64-66, 68-70, 72-74, 76,78, 80-185, 187
A	BUCHHOLZ U.J. ET AL.: "Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus /HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated vaccine." J. VIROL., vol. 74, no. 3, February 2000 (2000-02), pages 1187-1199, XP002192812 cited in the application the whole document	71,75, 77,79
X,P	BUKREYEV A. ET AL.: "Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo." J. VIROL., vol. 74, no. 23, December 2000 (2000-12), pages 11017-11026, XP002192811 the whole document -----	1-23,25, 28-52, 55,57, 58, 60-62, 64-66, 68-70, 72-74, 76,78, 80-185, 187

Form: PCTASAP10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/20107
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 100-108 and, as far as methods in vivo are envisaged, claim 198 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/219	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
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.: 22, 184 and where applicable, partly 1-21, 23, 25, 28-52, 55, 57, 58, 60-62, 64-66, 68-70, 72-74, 76, 78, 80-183, 185, 187	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/20107

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible.

Furthermore, most claims relate to a large number of possible recombinant constructs. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of such constructs. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be supported, disclosed, clear and concise, to wit:

- (1) the general concept of "shifting" to a promoter-proximal or promoter-distal position or
- (2) the general concept of bovine-human chimeric RSV (not involving "shifting") and
- (2) the specific constructs described in the application (examples),

which have been searched insofar as the corresponding search fees have been paid.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 01/20107

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 22,184 and, where applicable, partly 1-21,23,25, 28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

An isolated infectious recombinant respiratory syncytial virus (RSV) comprising a major nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large polymerase (L) protein, a RNA polymerase elongation factor, and a partial or complete recombinant RSV genome or antigenome having one or more shifted RSV gene(s) or genome segment(s) within said recombinant genome or antigenome that is/are positionally shifted to a more promoter-proximal or promoter-distal position relative to a position of said RSV gene(s) or genome segment(s) within a wild type RSV genome or antigenome.

Said RSV being RSV3120, bearing a deletion of nt 4499-4610.

2. Claims: partly 24, 186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 519-563.

3. Claims: partly 24,186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 1003-1086.

4. Claims: partly 24,186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 3073-3230.

5. Claims: partly 24,186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

International Application No. PCT/US 01/20107

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 4033-4197.

6. Claims: partly 24,186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 7387-7539.

7. Claims: partly 24,186 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 8433-8490.

8. Claims: partly 26,188 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 55-96.

9. Claims: partly 26,188 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 606-624.

10. Claims: partly 26,188 and, where applicable, partly 1-21, 23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a deletion of nt 4231-4300.

11. Claims: 27,189 and, where applicable, partly 1-21,23,25, 28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to an RSV bearing a

International Application No. PCT/US 01/20167

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

deletion of nt 4683-4685.

12. Claims: 53,59,63,67,71,79 and, where applicable, partly 1-21,23,25,28-52,55,57,58,60-62,64-66, 68-70,72-74,76,78,80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to RSV G1/dSH, G1F2/dSH, G1F2/dNS2dSH, G1F2/dNS1dNS2dSH as well as chimeric viruses rBRSV/A2-G1F2, rBRSV/A2G1F2NS3NS4.

13. Claims: 56,159 and, where applicable, partly 1-21,23,25, 28-52,55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78, 80-183,185,187

Idem as subject-matter 1, but relating to RSV F1/deltaSH.

14. Claims: 75 and, where applicable, partly 1-21,23,25,28-52, 55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78,80-183,185, 187

Idem as subject-matter 1, but relating to chimeric rBRSV/A2-MGF.

15. Claims: 77 and, where applicable, partly 1-21,23,25,28-52, 55,57,58,60-62,64-66,68-70,72-74,76,78,80-183,185, 187

Idem as subject-matter 1, but relating to chimeric rBRSV/A2-G3F4

16. Claims: 202 and, where applicable, partly 200,201,203,205, 207

An isolated infectious recombinant respiratory syncytial virus (RSV) comprising a major nucleocapsid (N) protein, a nucleocapsid phosphoprotein (P), a large polymerase (L) protein, a RNA polymerase elongation factor, and a partial or complete bovine RSV genome or antigenome combined with a plurality of heterologous gene(s) and/or genome segment(s) of a human RSV selected from heterologous gene(s) and/or genome segment(s) of RSV NS1, NS2,M, SH, G, and/or F to form a human-bovine chimeric RSV genome or antigenome.

Said chimeric RSV being rBRSV/A2-NS1+2.

International Application No. PCT/US 01/20107

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

17. Claims: 204 and, where applicable, partly 200,201,203,205,
207

Idem as subject-matter 16, but relating to rBRSV/A2-NS1+2GF.

18. Claims: 206 and, where applicable, partly 200,201,203,205,
207

Idem as subject-matter 16, but relating to rBRSV/A2-MSHGF.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/20107

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802530	A	22-01-1998	AU 3799797 A 09-02-1998
		BR 9710363 A 11-01-2000	
		CA 2257823 A1 22-01-1998	
		EP 0912724 A1 06-05-1999	
		JP 2002511731 T 16-04-2002	
		WO 9802530 A1 22-01-1998	
		US 5993824 A 30-11-1999	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 クレンブル, クリスティーン ディー.

アメリカ合衆国, メリーランド 20852, ロックビル, ビレッジ スクエア 12512, アパートメント 102

(72)発明者 コリンズ, ピーター エル.

アメリカ合衆国, メリーランド 20852, ロックビル, ビレッジ スクエア 12304, アパートメント 401

(72)発明者 マーフィー, ブライアン アール.

アメリカ合衆国, メリーランド 20816, ベセスダ, トウスカワラス ロード 5410

(72)発明者 ブフホルツ, ウルズラ

ドイツ連邦共和国, 17498 インゼル リームス, ボッデンプリック 10

(72)発明者 ホワイトヘッド, スティーブン エス.

アメリカ合衆国, メリーランド 20878, ゲイザーズバーク, プレイリー ローズ レーン 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA07 DA02 EA02 FA02 GA11

4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 CA45

4C085 AA03 BA51 DD62