

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 7/04  
C07K 14/135

(11) 공개번호 특1999-0063811  
(43) 공개일자 1999년07월26일

(21) 출원번호	10-1998-0702279		
(22) 출원일자	1998년03월27일		
번역문제출일자	1998년03월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1996/15524	(87) 국제공개번호	WO 1997/12032
(86) 국제출원출원일자	1996년09월27일	(87) 국제공개일자	1997년04월03일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본		
(30) 우선권주장	60/007,083 1995년09월27일 미국(US)		
(71) 출원인	더 가변먼트 오브 더 유나이티드 스테이츠 오브 아메리카, 에즈 레프리젠티드 바이 더 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비시즈 벤슨 로버트 미국 메릴랜드 20892 베세스다 박스 오티티 콜린스 피터 엘.		
(72) 발명자	미국 메릴랜드 20852 록크빌 빌리지 스퀘어 테라스 12304 #401 박장원		
(74) 대리인	박장원		

**심사청구 : 없음**

**(54) 클론된 뉴클레오타이드 서열로부터 감염성 호흡장애 바이러스의 생산 방법**

**요약**

분리된 폴리뉴클레오타이드는 RSV의 안티게놈 및 게놈을 제공하며, 사람, 소, 또는 쥐의 RSV 또는 RSV-유사 바이러스 또는 그의 키메라를 포함한다. 재조합 게놈 또는 안티게놈을 뉴클레오프시드 단백질(N), 뉴클레오프시드 인단백질(P), 큰(L) 폴리머라제 단백질 및 RNA폴리머라제 연장인자와 함께 발현하여 분리된 감염성 RSV 입자를 생산할 수 있다. 재조합 RSV게놈 또는 안티게놈을 변형하여 백신용 약화된 바이러스와 같이 원하는 표현형 변화를 생성할 수 있다.

**명세서**

**배경기술**

사람의 호흡장애 바이러스 (RSV)는 세계에서 가장 중요한 소아과의 호흡계 병원체이다. 이 널리 존재하고 매우 감염성이 있는 이들 병원체는 주기적인 유행성으로 매년 나타난다. 거의 모든 사람이 생후 첫 2년이 내에 적어도 한 번 감염된다. 특히 매우 어린 아이에 있어서 RSV 질병이 상당히 큰 질병들과 사망률의 원인이며, 특히 매우 어린아이에게 그러하다; 그 질병에 의해 미국에서 매년 91,000명이 입원하고 4500명이 사망하는 것으로 추정되며, 가난한 나라에서는 그 영향이 훨씬 더 크다. 또한 RSV는 면역무방비 (immunocomprised) 상태의 어린이와 노인에게 가장 중요한 질병원으로 인식되어 왔다.

자연적인 감염으로 유도된, RSV 재감염에 대한 저항력은 불완전하나 반복적인 노출로 점점 증가한다. 그러므로 유년기와 생애동안 RSV에 여러 번 감염될 수 있으나, 심각한 질병은 일반적으로는 첫 번째 감염과 때때로 두 번째 감염에 한정된다. RSV 면역학적 예방의 최소한의 목적은 충분한 저항력을 유도하여 최초 감염에 수반되는 심각한 질병을 예방하는 것이다.

다수의 약화된(attenuated) RSV균주가 개발되어 1960년대, 1970년대에 백신으로 평가되었다, 그러나 그것은 약화정도가 지나치거나 부족한 것으로 밝혀졌고, 몇몇 경우에 단일사슬 RNA 바이러스에 흔히 있는 유전학적 불안정성을 나타냈다. RSV 백신 개발을 위한 연구에서 현재의 방법은 주로 정제된 바이러스 항원을 비경구적(parenteral)으로 투여하거나 또는 비강내(intranasal) 투여를 위해 약화된 생RSV을 개발하는 것이다. 비강내 투여 경로는 국부적인 면역을 직접적으로 증강시킨다. 또한 이는 아주 어린 아이에서 일반적으로 발견되는 어머니로부터 유래된 RSV에 특이한 혈장항체의 면역억제 효과를 부분적으로 없앤다. 불활성화된 RSV나 정제된 RSV를 실험동물에게 경구로 투여하면 1960년대에 평가된 포르말린으로 불활성화시킨 백신과 관련하여 RSV질병이 향상되는 것과 유사하게, 이후의 바이러스 감염에 있어 면역병의 향상과 관련을 나타낸다. 그러나 이러한 효과가 호흡기관의 RSV감염에는 관찰된 바 없다는 사실은 약화된 생바이러스가 안전성 면에서 중요한 잇점을 가진다는 것을 암시한다. 그러나 오늘날 RSV에 대한 인가된 백신이

나 매우 효과적인 항바이러스 치료법은 없다.

적합한 RSV백신을 제조하기 위한 연구노력을 방해요인으로서는 조직배양에서 바이러스의 성장이 나쁘고, 복제주기가 길고, 비리온(virion)이 불안정하고, 바이러스가 (-)센스 RNA게놈을 가지며, 게놈의 조직과 유전자 산물이 복잡하다는 것이다. RSV는 파라믹소바이러스(paramyxovirus)와 뉴모바이러스(pneumovirus) 속의 일원이며, 15,222 뉴클레오타이드의 단일사슬 (-)센스 RNA게놈은 야생형 균주 A2 바이러스, 그것의 약화된 유도균주에 대해 완전히 서열이 밝혀져 있다.

RSV RNA 합성의 몇몇 측면에서 비분절(nonsegmented) (-)사슬 바이러스의 일반적인 양상을 따른다. 주형 게놈은 주요 뉴클레오타이드 단백질(N)로 뭉뚱하게 캡시드화되어 있고, 인단백질(P) 및 폴리머라제의 큰 서브유닛 단백질과 연결되어 있다. 3' 쪽 유전자 밖의 리더부위에서 전사를 시작하여 유전자를 둘러싼 주형의 짧은 신호에 의해 유도되는 종료-개시 기작에 의해 순차적으로 전체 길이를 따라서 진행된다. 이에 의해 적어도 10개의 주요한 단백질을 코드하는 mRNA가 적어도 10개 생산된다. 완전한 길이의 (+)센스 '안티게놈'의 합성으로 전환함으로써 RNA복제가 일어난다. 안티게놈은 또한 뭉뚱하게 캡시드화되어 있고 자손게놈의 합성을 위한 주형으로 작용한다.

(-)사슬 바이러스의 게놈RNA는 그 자체만으로는 감염성이 없다. 비리온이나 세포내에서, 바이러스 RNA는 라이보뉴클레오 단백질 응어리 형태로 뭉뚱하게 캡시드화되어 있다. 이러한 뉴클레오캡시드는 전사와 복제에 필요한 바이러스 단백질을 포함하며, 오랫동안 감염성의 최소단위로 여겨져왔다. (Brown 등., J. Virol. 1: 368-373 (1967)). 따라서 cDNA로부터 생물학적으로 활성이 있는 합성 바이러스 RNA의 생성은 바이러스 단백질의 보충이 필수적이며, 기능적인 뉴클레오캡시드가 되도록 한다고 인식되어 왔다(Collins 등., Virology 195: 252-256 (1993)). 생RSV를 제조하는 능력은 안전하고 효과적인 RSV 백신을 제조하기 위한 노력에 있어 매우 중요하며, 이에 의해 약화 돌연변이를 포함하여 특수하게 가공된 변화를 도입함으로써 감염성 바이러스게놈을 가능하게 한다.

예컨대, 게놈이나 안티게놈의 내부가 결실된 동족체(소게놈(minigenome))가 세포내에서 적절한 바이러스 단백질의 존재하에서 합성될 때 전사와 복제에 참여한다고 보고되었다. 두 가지 라브도바이러스(rhabdovirus) 즉 라비(rabies)와 소낭구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)의 경우, N, P, L 단백질의 존재하에 cDNA에 의해 코드되는 완전한 안티게놈 RNA를 함께 발현하여 감염성 바이러스를 제조해 왔다(Schnell 등., EMBO J. 13: 4195-4203 (1995) 와 Lawson 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481 (1995)).

RSV가 지닌 다수의 특징으로 RSV 및 뉴모바이러스 속의 다른 균과 더 특징화가 잘된 파라믹소바이러스, 루볼라바이러스(Rubulavirus), 모르빌리바이러스(Morbillivirus)와 구별된다. 이러한 차이로는 mRNA수가 더 많고, 게놈의 3' 쪽끝의 유전자 순서가 다르고, 당단백질과 M2유전자의 순서가 종간에 다양하며, 유전자간 영역에 다양성이 크고, 유신(mucin) 유사 특징을 나타내는 부착 단백질이 있고, 균주간에 DNA서열이 광범위하게 다양하며, 몇몇 단백질이 다른 비분절 (-)사슬 RNA 바이러스의 모두 또는 대부분에서 발견되지 않는다.

유아 및 어린이에 있어서 심각한 하부 호흡기관의 바이러스 질병의 가장 흔한 원인은 여전히 RSV이다. 따라서 이러한 집단에서 입원이 필요할 만큼 심각한 질병을 예방할 수 있는 안전하고 효과적인 백신을 가공할 수 있는 능력은 여전히 긴급히 필요하다. 놀랍게도, 본 발명은 특정되고 확정된 변화를 감염성 RSV에 도입하는 방법을 제공하여, 안전하고 효과적인 백신과 관련된 다른 필요한 것을 달성한다.

#### 발명의 요약

본 발명은 재조합 게놈 또는 안티게놈, 뉴클레오캡시드 단백질(N), 뉴클레오캡시드 인단백질(P), 큰 폴리머라제 단백질(L), RNA폴리머라제 연장인자를 포함하는, 분리된 감염성 RSV 입자를 제공하는 것이다. RNA폴리머라제 연장인자는 RSV의 M2(ORF1)일 수 있다. 분리된 감염성 RSV 입자는 바이러스 또는 서브바이러스 입자일 수 있다. 분리된 감염성 RSV 바이러스는 사람의 RSV일 수 있으며, 소나 쥐의 RSV, 또는 게놈이나 안티게놈은, 예컨대 사람과 소의 RSV 유래의 뉴클레오타이드 단편과 같이 20이상의 다른 RSV게놈의 키메라일 수 있다.

다른 구체예에서 본 발명은 RSV를 코드하는 10이상의 분리된 폴리뉴클레오타이드로부터 감염성 RSV를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 10이상 포함하는 발현벡터와, N, P, L, RNA폴리머라제 연장인자 단백질을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 10이상 포함하는 발현벡터를 세포나 세포용해물에서 함께 발현함으로써 감염성 RSV 입자를 제조한다. RSV 게놈 또는 안티게놈 및 N, P, L, RNA폴리머라제 연장인자 단백질을 동일 또는 다른 발현벡터로 함께 발현할 수 있다. 몇가지 예에서, N, P, L, RNA폴리머라제 연장인자 단백질이 다른 발현벡터에 각각 코드된다. RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자는 사람, 소, 쥐의 RSV 서열에서 유래되며, 사람의 RSV 균주 서열과 적어도 하나의 인간이외의 RSV 서열의 키메라일 수 있으며, 또한 야생형 RSV 균주의 게놈이나 안티게놈을 코드할 수 있다. 뉴클레오타이드의 삽입, 재배열, 결실, 치환에 의해 야생형 RSV 균주로부터 RSV 게놈 또는 안티게놈을 변형할 수 있으며, 그 결과 RSV의 약화, 온도-민감성, 추위-적응, 작은 크기의 플라크(plaque), 숙주 범위의 제한, 면역성 에피토프의 변화와 같은 표현형의 변화를 코드한다. 폴리뉴클레오타이드는 사람이외의 RSV 바이러스의 게놈 또는 안티게놈을 코드할 수 있으며, 사람이외의 RSV와 적어도 하나의 사람이외의 사람이외의 기원인 다른 RSV와의 키메라 일 수 있다. 사이토키닌, T-헬퍼 에피토프, 다른 RSV 서브그룹의 G단백질, 제한효소 작용부위 표지, 목적하는 숙주의 보호 면역반응을 제거할 수 있는 미생물 병원체(예, 바이러스, 세균, 곰팡이)의 단백질을 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 변형시킬 수 있다.

다른 구체예에서, 본 발명은 세포나 무세포 용해물을 제공하는 것으로서, 이에 RSV 게놈이나 안티게놈을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 발현벡터와 RSV의 N, P, L, RNA폴리머라제 연장인자 단백질을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 하나이상 포함하는 발현벡터를 포함한다. 발현할 때 게놈이나 안티게놈과 N, P, L, RNA폴리머라제 연장인자 단백질이 결합되어 바이러스 입자 또는 서브바이러스 입자와 같은 감염성 RSV 입자를 제조한다.

또다른 면에서, 본 발명은 기능적으로 연결된 전사프로모터, RSV 게놈이나 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 전사 종결인자를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공하는 것이다. RSV 게놈 또는 안티게놈은 사람의 RSV 서열 및 그것의 변형된 서열일 수 있다. 예로는 SEQ ID NO:1(5'에서 3'으로 (+)센스 서열이나 게놈 자체는 (-)센스를 나타낸다.)이 있다. 폴리뉴클레오타이드는 사람이외의 RSV 바이러스의 게놈이나 안티게놈을 코드할 수 있으며, 또한 사람이외의 RSV와 사람이나 사람이외의 기원인 적어도 하나의 다른 RSV와의 키메라를 코드할 수도 있다.

### 도면의 간단한 설명

그림 1A와 1B는 RSV 안티게놈 RNA를 코드하는 cDNA의 구조를 나타내며, 그림 1A는 cDNA의 구조와 코드된 안티게놈 RNA를 나타낸다(축척으로 그림을 그린 것은 아님). 안티게놈의 도식은 다음의 특징, 즉 T7 프로모터가 주는 5' 말단의 비바이러스성 G트리플렛(triplet), 1099(길이에 하나의 뉴클레오타이드가 첨가됨), 1139, 5611, 7559(새로운 제한효소자리의 첫 번째 염기부터 숫자를 셈)위치에서 4개의 서열 표지, 라이보자임(ribozyme)과 나란한(tandem)T7종결인자, 라이보자임의 절단(절단자리는 화살표로 나타냄)에 의해 3' 쪽말단에 부여된 하나의 비바이러스성 3'-인산화 U잔기를 포함한다. 완전한 안티게놈의 조합체에서 클론된 cDNA 단편도 보여진다. 박스는 BamHI 자리의 제거를 나타내며, 이는 조합(assembly)을 용이하게 하는 변형이다: 자연적으로 존재하는 BamHI-SalI 단편(BamHI 자리는 윗줄에 (+)센스에 나타나며, 밑줄을 그음)은 PCR-생성 BglI-SalI 단편으로 대체된다(BglI 자리는 아랫줄에 밑줄로 나타냄; 그의 4-뉴클레오타이드 점착말단(sticky-end) [이탈릭체로 나타냄]은 BamHI의 말단과 호환성이 있다). 그 결과로 아미노산 서열에는 나타나지 않지만 1nt변화가 생긴다.

그림 1B는 cDNA가 코드하는 안티게놈 RNA에 포함된 서열표지를 나타내며, 여기서 서열을 (+)센스이고, 리더영역 보충물의 첫 번째 nt를 1로 하여 상대적으로 숫자를 센다; 각각 서브그룹 A, B를 나타내는 균주A2와 18537간의 같은 점은 점으로 표시한다.; cDNA상의 제한효소자리를 나타내는 서열은 밑줄을 그음; 유전자-개시(GS)와 유전자-종료(GE)의 전사신호는 박스로 나타냄; 1141에 있는 N번역 ORF의 개시코돈은 이탈릭체로 나타내며, 서열 표지는 각 서열의 아래에 나타낸다. 윗줄 서열에서, 하나의 C잔기를 1099위치에 삽입하여 NS1-N유전자간 영역에 AflI 자리를 만들고, N번역ORF의 바로 상류에 1139와 1140위치에 AG를 CC로 대체하여 새로운 NcoI 자리를 만들었다. 중간줄 서열에서, 5612와 5616위치 각각에서 G와 U를 지환하여 G-F 유전자간 영역에 StuI 자리를 만들었다. 아랫줄 서열에서, 7560위치에서 하나의 C를 대체하여 F-M2 유전자간 영역에 새로운 SphI 자리를 만들었다.

그림 2는 RSV 전사신호로 둘러싸인 CAT ORF를 포함하는 RSV 안티게놈을 코드하는 D46/1024CAT cDNA의 구조를 나타낸다(실제 크기 비율이 아님). RSV-특수한 단편은 실선 박스로 CAT서열은 점선박스로 나타낸다). CAT 유전자의 전사 카세트의 출처는 RSV-CAT 소게놈cDNA 6196이었다(윗줄에 도식). RSV-CAT 소게놈은 리더영역, 유전자-개시(GS), 유전자-종료신호(GE), 코드되지 않는 RSV유전자 서열, CAT ORF 및 GS신호와 GE신호와의 XmaI 제한효소 자리를 포함한다. 이들 요소의 nt길이를 나타내며, XmaI 자리를 둘러싼 서열은 도식 위에 보여진다. 부모 플라스미드 D46의 StuI 자리에 8-nt XmaI 링커를 삽입하여 플라스미드 D46/1024를 만들었다. 맨 아래에 보이는 D46 cDNA에 의해 코드되는 RNA는 T7 프로모터에 의해 부여되는 5-말단에 비바이러스성 G잔기 3개와 해머헤드(hammer head) 라이보자임의 절단으로 부여되는 3-말단 인산화된 U잔기를 포함한다.; 이들 비바이러스성 nt들은 nt길이에 포함되지 않는다. L유전자는 유전자의 중복을 나타내기 위해 단을 낮추어 그려져 있다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 cDNA로부터 감염성 RSV를 제조하는 것이다. 감염성 RSV는 게놈 또는 안티게놈 RNA를 코드하는 cDNA를 전사, 복제하는 뉴클레오텍시드를 위해 필요한 바이러스 단백질과 함께 세포내에서 발현하여 제조되며, 바람직하게는 주요한 뉴클레오텍시드(N, 또는 NP) 단백질, 뉴클레오텍시드 인산단백질(P), 큰 폴리머라제 단백질(L), M2(ORF1)단백질을 코드하는 10이상의 서열과 함께 세포내에서 발현하여 제조한다. 재조합 체계로 감염성 RSV 입자를 제조한다. 재조합 제조 체계에 의해 특정한 변화를 도입하여 다음과 같은 다양한 적용에 유용한 감염성 RSV를 제조할 수 있다; 특정되고 확정된 약화 돌연변이를 갖는 약화된 생백신균주의 개발; RSV 단백질의 기능이나 발현을 변화시키는 특정한 돌연변이 등에 유용한 RSV의 분자생물학 및 병원을 분석; 배양시 생장의 향상; 존재하는 약화된 돌연변이의 확인 또는 부수적인 표현형의 변화가 없는(silent) 돌연변이와 표현형의 변화가 있는 돌연변이를 구별하여 미래의 백신균주의 확인; 항원연속 변이에 적응하는 변형된 백신 바이러스의 제조; 백신 면역성의 향상; 바람직하지 않은 면역병과 관련된 에피토프의 제거; 보호항체를 코드하는 유전자를 부분적이나 전체적으로 삽입하여 보호항체를 유도하는 RSV 및 바이러스나 작용제에 대한 면역을 유도할 수 있는 RSV 균주를 생성; 사이토키닌, T-세포 에피토프와 같은 면역체계의 조절자를 코드하는 외부 유전자를 부분적이나 전체적으로 삽입하여 백신 바이러스의 면역성을 증가 등.

본 발명에 따르면, 감염성 RSV의 형성에 필요한 바이러스 단백질과 함께 세포내 또는 세포외에서 발현하여 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 cDNA를 만든다. 'RSV 안티게놈'이란 자손 RSV 게놈의 합성을 위한 주형으로 작용하는 분리된 (+)센스 폴리뉴클레오타이드 분자를 의미한다. 바람직하게는 RSV 게놈의 (+)센스 RNA인 cDNA를 방금 복제되는 RNA에 상응하도록 만든다. 그 결과 전사, 복사하는 뉴클레오텍시드를 생성하기에 필요한 단백질을 코드하는 상보적인 서열, 즉 N, P, L, M2(ORF1) 단백질을 코드하는 서열의 (+)센스 전사체와의 혼성화 가능성을 최소화한다. RSV 소게놈 체계에서, 게놈과 안티게놈은 RSV나 플라스미드에 의해 보충되든지 간에 회수에 있어 동등한 활성이 있었다는 사실은 게놈이나 안티게놈이 사용될 수 있음을 나타내므로, 방법론적으로나 다른 이유에 따라 양자를 선택할 수 있다. 천연 RSV는 일반적으로 (-)센스 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하며, 이는 상보적인 바이러스 mRNA를 통해 11종의 바이러스 단백질, 즉 비구조적(nonstructured) 중 NS1과 NS2, N, P, matrix (M), 작은 소수성 단백질(SH), 당단백질(G), 융합(F), M2(ORF1), M2(ORF2), L을 코드하며, Mink 등의 Virology 185: 615-624 (1991), Stec 등의 Virology 183: 273-287 (1991), Connor 등의 Virol 208:478-484 (1995) 문헌(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)에 충분히 보고되어 있다. 본 발명을 위해서 재조합 RSV의 게놈 또는 안티게놈은 그들 유전자에 의해 코드되는 바이러스나 서브바이러스 입자의 감염성에 필요한 유전자들 또는 그 유전자의 일부분만을 포

함할 필요가 있다. 더욱이, 10이상의 폴리뉴클레오타이드로 그들 유전자나 그 일부분을 제공할 수도 있다. 예컨대, 별개의 뉴클레오타이드 분자로부터 보충 또는 그와 유사한 방법으로 유전자를 제공할 수도 있다. 재조합 RSV라 함은 재조합 발현체계로 부터 직간접적으로 유래되거나 또는 그들로 부터 생산된 바이러스나 서브바이러스 입자로부터 증식된 RSV 또는 RSV-유사 바이러스를 의미한다. 재조합 발현체계는 재조합 발현벡터를 포함하는데, 이는 RSV 유전자의 발현에서 조절기능을 가지는 적어도 하나의 유전적 구성요소(element) 또는 구성요소들의 조합체를 포함하는, 기능적으로 연결된 전사 단위를 포함하며, 구성요소의 예로는 프로모터, RSV mRNA로 전사되는 구조 또는 코딩 서열, 적절한 전사 개시와 종결 서열이 있다.

cDNA-발현 계능 또는 안티계능으로부터 감염성 RSV를 제조하기 위해, i) RNA를 복제할 수 있는 뉴클레오타이드 및 ii) 자손 뉴클레오타이드가 RNA복제와 전사를 가능하도록 하기위해서 필요한 이들 RSV 단백질을 계능 또는 안티계능과 함께 발현한다. 계능의 뉴클레오타이드에 의한 전사에 의해 다른 RSV 단백질을 제공하고, 생산적인 감염을 개시한다. 혹은 생산적인 감염을 위해서 필요한 추가적인 단백질은 공동 발현으로 공급된다

본 발명에서 사용하기 위해 클론된 cDNA 단편들을 조합하거나, 완전한 안티계능 조합체에서 나타나거나, 또는 RSV mRNA 또는 계능의 역전사된 복사체(copies)를 PCR(PCR; 미국특허번호. 4,683,195 및 4,683,202, PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications, Innis등, Academic Press출판, San Diego (1990), 명세서에 참고문헌으로 병합됨)에 의해 RSV 안티계능을 제조할 수도 있다. 예컨대, 안티계능의 왼쪽말단을 포함하는 cDNA는 적절한 프로모터와 SH유전자를 보충하는 리더 영역으로부터 범위가 시작되며, 플라스미드, (예, pBR322) 이용 가능한 여러 코스미드(cosmid), 파지, 또는 DNA바이러스 벡터와 같은 적절한 발현벡터에서 조합된다. 조합을 용이하게 할 목적으로 돌연변이 유발 및/또는 유일한 제한효소 자리를 포함하는 합성된 폴리링크를 삽입하여 벡터를 변형할 수도 있다. 예컨대, 본 명세서에 기재된 플라스미드 벡터는 pBR322로부터 유래된 것으로서 편리한 제한효소 자리를 포함하는 합성 DNA로 Pst I - Eco I 단편을 치환하였다. pBR322가 RSV 서열의 nt3716-3732를 안정화했으며, 그렇지 않았다면 뉴클레오타이드의 결실이나 삽입을 계속했을 것이다. 그리고 그렇지 않았다면 nt4499 근처에서 일어났을 인위적인 중복과 삽입을 피하기 위해 플라스미드는 박테리아 균주 DH10B에서 증식했다. 기재된 바와 같이 안티계능 플라스미드의 오른쪽 말단(즉, L 및 트레일러(trailer) 서열)은 둘러싼 라이보솜, 나란한 T7 전사종결인자 등과 같은 부가적인 서열을 포함할 수도 있다. 라이보솜은 하나의 비바이러스성 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 말단을 양산하는 헤머헤드 유형(Grosfeld 등, J.Virology 69: 5677-5686 (1995)) 또는 다른 적절한 라이보솜유형, 예를 들면 RSV뉴클레오타이드이외의 서열이 없는 3' 말단을 양산하는 헤파티티스 델타 바이러스(hepatitis delta virus)(Perrpitta등, Nature350: 434-436 (1991))의 라이보자임일 수도 있다. 중간 단편(즉, G내지 M2 부분)은 리더 내지 SH 플라스미드에 있는 적절한 제한효소 자리에 삽입되며, 이번에는 L-트레일러(trailer)-라이보솜-종결인자 단편에 대한 수용체가 되어 완전한 안티계능을 양산한다. 그림 1A에서 보여진 예에서, 리더의 끝은 T7 RNA폴리머라제에 대한, T7 폴리머라제의 적절한 활성을 위해서는 전사된 3개의 G 잔기를 포함하는 프로모터에 인접되게 제조되었다.; 3개의 비바이러스성G를 전사에 의해 안티계능의 5' 말단에 준다. 이들 3개의 비바이러스성 G잔기는 제거되어 비바이러스성 뉴클레오타이드가 없는 5' 말단을 양산될 수도 있다. 거의 정확한 3' 말단을 생성하기 위해서는, 트레일러(trailer)끝은 헤머헤드 라이보자임에 인접하게 제조되었으며, 헤머헤드 라이보자임은 절단시에 코드된 RNA의 3' 말단에 3인산화된 하나의 U잔기를 줄 것이다.

RSV 계능과 안티계능에서 여러 가지 뉴클레오타이드의 삽입과 결실이 행해질 수 있다. 사람의 RSV 야생형의 계능의 뉴클레오타이드 길이는 6배수이며, 파라믹소바이러스(Paramyxovirus), (모빌리바이러스(Morbillivirus) 속도 일반적으로 '6배수 규칙'을 지킨다. 즉 계능(또는 소계능)의 뉴클레오타이드 길이가 6의 배수인 경우에만 복제한다(캡시드화하는 NP단백질에 대해 상대적인 뉴클레오타이드의 정확한 간격을 위해 필요성이려 여겨짐). 잔기 1개씩의 증가로 RSV의 길이를 변화시키는 경우 복제의 효율성에는 영향이 없었으며, 다음 문단에 기재된 몇몇 다른 소계능의 돌연변이의 서열분석에 의하면 보충적인 길이 차이는 변화가 없다면 유지된다고 보고되었다. 따라서 RSV는 계능길이가 6배수가 되어야하는 필요성이 엄격하지 않으며, 본 발명의 재조합 RSV의 복제를 방해하지 않고 RSV 계능이나 안티계능에 RSV 뉴클레오타이드의 삽입, 결실을 행할 수 있다.

계능 또는 안티계능을 코드하는 cDNA를 제조하는 또다른 방법은 서브유닛 cDNA성분의 수가 1 또는 2개의 단편으로 감소시키기 위해, 개선된 PCR조건을 사용하여 역전사-PCR을 포함한다. (예, Cheng 등의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699 (1994)) 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨) 다른 구체예에서 다른 프로모터(예, T3, SP6) 또는 다른 라이보자임(Dp, hepatitis delta virus)을 사용할 수 있다. 더 큰 크기의 계능 또는 안티계능을 더 잘 수용할 수 있도록 증식하기 위해 다른 DNA 벡터(예, 코스미드)가 사용될 수 있다.

본 발명에 의해 감염성 재조합 RSV로 병합하기 위해 RSV 계능 또는 안티계능 상에서 여러 가지 변화가 가능하다. 예컨대, 외부 유전자를 삽입하거나, 유전자의 순서를 변화시키거나, 유전자의 중복을 제거하거나, RSV 계능의 프로모터를 RSV 안티계능의 프로모터로 대체하거나, 유전자의 일부분을 제거하거나(예, 당단백질 유전자의 세포질쪽 부위(tail)), 심지어 전체 유전자를 제거할 수도 있다. 유일한 제한효소 자리를 여러 유전자간 영역(예, G와 F유전자 사이에 유일한 Stu I 자리) 또는 다른 곳에 삽입하는 등의 조작을 용이하게 하기 위해 서열을 변형시킬 수도 있다. 외부 유전자 서열을 삽입하기 위해 변형되지 않는 유전자 서열을 제거할 수 있다.

cDNA-발현 계능 또는 안티계능으로부터 제조된 감염성 RSV는 RSV이나 RSV-유사 균주중에 어느 것(예, 사람, 소, 쥐 등), 또는 뉴모바이러스(pneumovirus)중 어느 것(예, 생쥐의 뉴모바이러스, 칠면조의 리노트레치티스 바이러스(rhinotrachetis virus)). 보호면역반응을 생성키 위해, 사람을 면역시키기 위해 사람 RSV를 사용하는 것과 같이 RSV 균주는 면역된 피험자에 내생적인(endogenous) 바이러스일 수 있다. 그러나 여러 가지 유형으로부터 RSV 유전자를 발현시키기 위해 계능 또는 안티계능을 변형할 수 있다. 따라서 약화 등을 위해 사람투여용 감염성 RSV는 소나 쥐의 RSV 유형으로부터 얻은 유전자를 포함하도록 변화시킨 사람 RSV 일 수도 있으며, 또는 소 RSV는 사람 RSV의 감염에 대한 방어를 제거하는 에피토프나 단백질을 코드하는 유전자를 포함하도록 변형할 수 있다. 예컨대, 사람 RSV의 당단백질 유전자를 소의 당단백질 유전자로 대체하여 숙주인 사람에서 제한된 복제능을 가지도록 하여, 사람 RSV 균주에 대한 사람에서 보

호면역반응을 제거한다.

RNA 복제에 필요한 N, P, L 단백질은 지속적인 전사를 위해서는 M2(ORF1)와 같은 RNA 폴리머라제 연장인자를 필요로 한다. 따라서 M2(ORF1)나 실질적으로 동등한 (-)사슬 RNA 바이러스의 전사 연장인자가 감염성 RSV의 제조에 필요하며, 생산적인 감염동안 기능적인 뉴클레오타이드의 필수성분이다. 이는 M2(ORF1) 단백질의 필수적인 전사 연장인자라는 그의 역할과 일치한다. 본 발명의 특징은 (-)사슬 RNA 바이러스에 있어 RNA 폴리머라제의 연장인자 단백질의 발현 필요성이다. 비록 완전한 M2 유전자에서 ORF2가 발현되어 RNA 복제에 저해 효과를 나타낼지라도 완전한 M2 유전자의 발현으로 M2(ORF1)를 공급할 수 있다. 따라서, 완전한 M2 유전자를 이용하여 감염성 바이러스를 제조하기 위해서는 M(ORF2)이 RNA 복제를 저해하지 않으나 M2(ORF1)가 전사 연장 활성을 제공하기에 충분한 발현이 가능하도록 두 ORF의 활성이 균형을 이루어야 한다. 혹은, ORF2가 없는 가공된 cDNA 또는 불완전한 ORF2를 코드하는 cDNA로부터 ORF1 단백질을 제공한다. 외피의 구성성분(예, SH, M, G, F 단백질)을 코드하는 부가적인 바이러스 단백질 유전자를 함께 발현함으로써 또한 바이러스 제조의 효율성을 향상시킬 수도 있다.

게놈이나 안티게놈 및 각각의 N, P, L, M2(ORF1) 단백질을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드(예, cDNA)를 형질감염(transfection), 일렉트로포레이션(electroporation), 기계적인 삽입, 형질도입과 같은 방법으로 세포에 도입하며, HEp-2, FRhL-DBS2, MRC, Vero 세포와 같이 세포는 생산적인 RSV 감염을 도와 줄 수 있는 세포이다. 예컨대 인산화칼슘-매개 형질감염(Wigler 등, Cell 14: 725 (1978); Corsaro and Pearson, Somatic cell Genetics 7: 603 (1981); Graham and Vander Eb, Virology 52: 456 (1973)), 일렉트로포레이션(electroporation), DEAE-덱스트란 매개 형질감염(Hawley-Nelson 등, (ed) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc, NY (1987), 명세서에 참고문헌으로 병합됨) 케티온릭 지질(cationic lipid)-매개 형질감염(Hawley-Nelson 등, Focus 15: 73-79 (1993)), LipopectACE (Life Technologies)와 같이 상업적으로 이용할 수 있는 형질감염용 시약으로 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열의 형질감염을 배양세포에 이용하수도 있다. N, P, L, M2(ORF1) 단백질은 10이상의 발현벡터에 의해 코드되며, 발현벡터는 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 벡터와 같거나 별개일 수 있고, 그들의 다양한 조합이 가능하다. 바람직하게는 부가적인 단백질은 그 자체의 벡터, N, P, L, M2(ORF1)를 코드하는 벡터 또는 완전한 게놈이나 안티게놈을 코드하는 벡터 위에 코드되는 것을 포함할 수도 있다. 형질감염된 플라스미드로부터 게놈이나 안티게놈 및 단백질을 T7 RNA 폴리머라제 프로모터의 조절하에 있는 각각의 cDNA에 의해 발현할 수 있으며, 우두 바이러스 MVA 재조합 균주와 같이 T7 RNA 폴리머라제의 발현체계를 감염, 형질감염, 형질도입에 의해 공급한다(Wyatt 등, VIROLOGY, 210: 202-205 (1995), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨). 바이러스의 단백질 및/또는 T7 RNA 폴리머라제는 형질전환된 포유류 세포로부터 또는 미리 형성된 mRNA이나 단백질을 형질감염함으로써 또한 제공될 수 있다.

혹은, 게놈이나 안티게놈의 합성을 상기에 언급된 바이러스 단백질과 함께 결합된 전사-번역 반응으로 세포외에서 행하여, 세포로 형질감염하여 행할 수 있다. 또는 세포외에서 게놈이나 안티게놈 RNA를 합성하여 RSV 단백질을 발현하는 세포에 형질감염하여 합성할 수 있다.

본 발명의 감염성 클론으로써 특정된 돌연변이를 도입하여 RSV 게놈(또는 안티게놈)을 변형할 수 있다. '감염성 클론'이란 cDNA 또는 그의 산물을 의미하며, 합성되거나 그렇지 않을 수도 있으며, 주형으로 작용할 수 있는 게놈이나 안티게놈으로 전사되어 감염성 바이러스 또는 서브바이러스 입자를 생산할 수 있다. 전통적인 방법(예, 부위-특이적 돌연변이)으로 특정된 돌연변이를 게놈이나 안티게놈의 cDNA에 도입할 수 있다. 완전한 안티게놈 cDNA를 조합하기 위해 안티게놈 cDNA의 서브단편(subfragment)을 사용하는 방법의 장점은 각 영역이 별개로 다루어져서 완전한 cDNA로 쉽게 조합할 수 있는 점이다. 따라서, 완전한 게놈이나 안티게놈 cDNA 또는 그의 어떠한 서브단편을 올리고뉴클레오타이드-특이적 돌연변이를 위한 주형으로 사용할 수 있다. 이것은 바이오-라드(Bio-Rad)의 유타-겐 키트(Muta-gen kit)을 사용하는 단일사슬 파지미드 형태를 매개체로 사용하거나, 또는 스트라타겐(Stratagene)의 카멜레온 돌연변이유발 키트(Chameleon mutagenesis kit)와 같이 이중사슬 플라스미드를 직접 주형으로 사용하는 방법, 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머나 원하는 돌연변이를 포함하는 주형을 사용하는 PCR 방법으로 행할 수 있다. 그런 후에 돌연변이된 서브단편을 완전한 게놈이나 안티게놈 cDNA로 조합할 수 있다. 여러 가지 다른 돌연변이유발 기술이 알려져 있으며, RSV 게놈이나 안티게놈 cDNA상에 원하는 돌연변이를 일으키기 위해 사용될 수 있다. 돌연변이는 1개의 뉴클레오타이드 변화에서부터 10이상의 유전자나 게놈영역을 포함하는 큰 cDNA의 치환까지 다양하다.

예시적인 한 구체예에서, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA의 세포외 돌연변이유발 유타-겐(Muta-gen) 파지미드를 사용함으로써 돌연변이를 도입한다. 요약하면 RSV 게놈이나 안티게놈을 플라스미드 pTZ18U로 클론하고, DH5 $\alpha$  F를 형질전환에 사용된다(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). 제조자들이 추천하는 대로 파지미드 배합물(preparation)은 준비한다. 돌연변이를 위한 올리고뉴클레오타이드는 게놈이나 안티게놈의 원하는 위치에 변형된 뉴클레오타이드를 도입하여 만든다. 그런 후에, 유전적으로 변화된 게놈이나 안티게놈을 포함하는 플라스미드를 증폭한다.

특정된 돌연변이를 감염성 RSV로 도입하는 능력 때문에 많은 응용이 가능하며, 이에는 RSV의 분자생물학 및 발병학(pathogenesis)이 포함된다. 예컨대, NS1, NS2, SH, M2(ORF1), M2(ORF2) 단백질을 포함하는 RSV 단백질의 기능을 이들 단백질의 발현수준을 제거 또는 감소시키는 돌연변이, 또는 돌연변이된 단백질을 양산하는 돌연변이를 도입함으로써 조사할 수 있다.

또다른 실시예에서, F 단백질의 절단위치, G 단백질에서 추정되는 부착영역을 조직배양에서 성장, 실험동물에서 감염 및 발병에 영향을 미치도록 변화시킬 수 있다.

게놈 RNA의 다양한 특징, 즉 프로모터, 유전자간 영역, 유전자 중복, 전사신호의 역할을 본 발명의 방법과 조성물을 이용하여 평가할 수 있다. 완전한 안티게놈 cDNA를 사용하여 트랜스(trans)-작용 단백질과 시스(cis)-작용 RNA 서열의 평가는 RSV 소게놈을 함께 사용하여 행해질 수 있으며 (예, Grosfeld 등, J. Virol. 69: 5677-5686 (1995), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨), 이러한 헬퍼-의존 상태는 복제-독립적인 감염성 바이러스에서 지나치게 저해 효과가 커서 회복될 수 없는 돌연변이의 특성을 나타내는데 유용하다.

비강내 투여용 백신의 후보로서 다수의 약화된 RSV 균주를 여러 번 화학적 돌연변이를 사용하여 저온-계 대배양하는 동안 이미 약화된 다중 돌연변이를 유도하는 방법으로 개발해 왔다(예, Connor 등, *Virology* 298: 478-484 (1995); Crowe 등, *Vaccine* 12: 691-699 (1994); Crowe 등, *Vaccine* 12: 783-790 (1994), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨). 들쥐, 침팬지, 성인, 유아에서 행해진 평가에 의하면, 어떤 후보 백신균주는 상대적인 유전적 안정성, 높은 면역성을 나타내며, 만족할 만큼 약화될 수도 있다. 이들 약화된 몇몇의 바이러스 뉴클레오타이드 서열 분석에 의하면, 각각 만족할 정도의 증가수준은 20이상의 새로운 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열의 치환과 관련됨을 나타낸다(Conner 등, *supra*). 본 발명은 감염성 야생형 RSV의 게놈이나 안티게놈에 각각이나 다양한 조합으로 돌연변이를 도입함으로써 부수적인 표현형의 변화가 없는(silent) 돌연변이와 표현형의 변화가 있는 돌연변이를 구별하는 능력을 제공한다. 이러한 과정에 의해 약화, 온도 민감성, 저온적응, 작은 크기의 플라크, 숙주범위의 제한 등과 같은 표현형을 변화시키는 돌연변이를 확인할 수 있다. 바람직하게는, 그 다음에 이 메뉴로부터 돌연변이를 다양한 조합으로 도입하여 약화 등의 수준을 적절히 하기 위해 백신 바이러스를 조절할 수 있다. 게다가, 본 발명은 여러 바이러스 균주에서 하나의 균주로 돌연변이를 모을 수 있는 능력을 제공한다.

또한 본 발명은 새로운 약화 방법을 제공한다. 예컨대 사람 RSV에 있는 각각의 내부유전자를 소, 쥐, 다른 RSV의 대응 유전자로 치환할 수 있다. 이는 10이상의 NS1, NS2, N, P, M, SH, M2(ORF1), M2(ORF2), L 유전자의 전부나 일부분, 또는 G와 F 유전자의 비면역성 부분을 포함할 수 있다. 반대로, 본 발명은 사람의 약화된 유전자를 소 RSV 게놈이나 안티게놈에 삽입하여 살아있는 약화된 소 RSV를 제조하는 방법을 제공한다. 소 RSV단백질을 포함하는 사람의 RSV는 사람의 백신제제(preparation)용으로 유익한 숙주범위 제한을 제공한다. 본 발명에서 사용되는 소 RSV 서열은 다음의 문헌에 기재되어 있으며, .Pastey 등, *J. Gen. Viol.* 76: 193-197 (1993); Pastey 등, *Virus Res.* 29: 195-202 (1993); Zamora 등, *J. Gen. Viol.* 73: 737-741 (1992); Mallipeddi 등, *J. Gen. Viol.* 74: 2001-2004 (1993); Mallipeddi 등, *J. Gen. Viol.* 73: 2441-2444 (1992); Zamora 등, *Virus Res.* 24: 115-121 (1992), 각각은 본 명세서에 참고문헌으로 병합되어 있다.

또한 본 발명은 다른 유형의 약화 돌연변이를 분석하고, 백신이나 다른 용도를 위해 이들을 감염성 RSV로 병합하는 능력을 제공한다. 예컨대, 조직배양에 적응된 비병원성 쥐의 뉴모바이러스 균주(RSV의 쥐의 대응부)는 G단백질의 세포질쪽 부위(tail)가 없다(Ramdhawa 등, *Virology* 207 : 240-245 (1995)). 유사하게, 약화를 위해 RSV 단백질, F, G, SH 각각의 세포질 영역과 막관통 영역을 제거 또는 변형시킬 수 있다.

본 발명의 감염성 RSV에서 사용할 수 있는 다른 돌연변이에는 RSV 소게놈의 돌연변이 분석 중에 확인된 시스-작용 신호상에서의 돌연변이가 포함된다. 예컨대, 리더, 트레일러(trailer), 바이러스의 프로모터와 전사신호로 확인된 측면서열의 삽입과 결실을 분석하면, 일련의 돌연변이가 RNA전사나 복제가 다양한 정도로 감소한다는 점과 관련됨을 나타낸다. 이들 시스-작용 신호의 포화(saturation) 돌연변이(이에 의해 차례로 각 위치가 각각의 대응 뉴클레오타이드로 변형된다.)에 의해 RNA 전사나 복제 감소된(또는 한 경우에 증가) 다수의 돌연변이를 확인해 왔다. 이들 돌연변이중 어떤 것은 본 명세서에 기재된 바에 따라 완전한 게놈이나 안티게놈으로 삽입될 수 있다. 다른 돌연변이는 게놈의 3' 말단을 안티게놈의 대응부분으로 치환한 것을 포함하며, 이는 RNA 전사나 복제의 변화와 관련된다. 게다가, 유전자간 영역(Collins 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4594-4598 (1986), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)을 단축, 연장 또는 서열변화를 할 수 있고, 자연적으로 일어나는 유전자의 중복(Collins 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5134-5138 (1987), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)을 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제거하거나 다른 유전자간 영역으로 바꿀 수 있다.

또다른 구체예에서, 백신제제(formulation)에 유용한 RSV를 순환하는 바이러스에서 항원변이(antigenic drift)를 수용할 수 있도록 간편하게 변형할 수 있다. 일반적으로 변형은 G 및/또는 F단백질에서 변형이 일어날 것이다. 감염성 클론상에서 상응하는 영역을 치환하거나 몇 가지의 항체형태를 나타내도록 10이상의 유전자 복사체(copy)를 추가하여, G또는 F 전체 유전자, 또는 그들의 특수한 면역성 영역을 코드하는 단편을 RSV 게놈이나 안티게놈에 병합한다. 변형된 RSV cDNA에서 생산된 자손 바이러스를 최근에 생긴 균주에 대한 접종 프로토콜(vaccination protocol)에 사용한다. 게다가, RSV 서브그룹 B의 G단백질 유전자를 포함한 경우, 사람에게 존재하는 상대적으로 다양한 서브그룹 A와 B가 더 넓은 스펙트럼 범위에 걸치도록 반응을 넓힐 수 있었을 것이다.

또한 본 발명의 감염성 RSV 클론을 가공하여 그의 면역성을 향상할 수 있으며, 자연적인 감염에 의한 것보다 보호수준을 더 크게 유도할 수 있으며, 반대로 바람직하지 않은 면역병리학적 반응을 확인, 제거할 수 있다. 본 발명으로 제조된 백신의 면역성 향상으로 RSV를 제어함에 있어 가장 큰 장애중 하나인 자연적 감염으로 유도되는 면역성의 불완전한 특성을 제거한다. 독립적인 세트의 전사신호의 조절하에 있는 RSV 게놈이나 안티게놈 또는 그 근처에 부가적인 유전자를 삽입할 수 있다. 목적하는 유전자는 사이토키닌(예, IL-15를 통한 IL-2, 특히 IL-3, IL-6, IL-7 등),  $\gamma$ -인터페론, T-helper 세포의 에피토프가 많은 단백질을 코드하는 유전자를 포함한다. 부가적인 단백질은 별개의 단백질, 또는 SH등과 같은 RSV단백질중 하나의 두 번째 복사체로부터 가공된 키메라로 발현될 수 있다.

백신 용도로 사용할 때, 본 발명에 따라 제조된 바이러스를 백신제제로 직접적으로 사용하거나, 바람직하게는 전문가에게 잘 알려져 있는 동결건조방법을 사용하여 동결건조할 수 있다. 동결건조된 바이러스를 일반적으로 약 4°C에서 유지한다. 사용을 위해 준비할 때, 동결건조된 바이러스를 안정화 액에서 재구성한다. 안정화액의 예는 다음에서 자세히 기재된 바와 같이 부형제가 있거나 없는, 식염수, 또는 SPG, Mg, HEPES을 포함하는 용액이다.

따라서, 본 발명의 RSV 백신은 활성 성분으로서 본 발명에 기재된 대로 제조된 RSV를 면역적으로 효과적인 양으로 포함한다. 생리학적으로 수용할 수 있는 운반체 및/또는 부형제로 변형된 바이러스를 숙주에 도입할 수도 있다. 유용한 운반체가 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 물, 완충액, 0.4%식염, 0.3% 글라이신, 히알루로닉산(hyaluronic acid)과 같은 것을 포함한다. 상기의 결과 수용액을 사용을 위해 포장하거나, 동결건조하거나, 동결건조된 제제를 투여하기 전에 살균용액과 혼합할 수 있다. 상기 조성물은 생리적 조건과 근접하기 위해 필요한, 약리적으로 수용할 수 있는 보조물질, 즉 pH 조절 및 완충 용액, 토니시티(tonicity) 조절제, 습윤제, 아세트산나트륨, 젯산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 솔비탄

모노로레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 포함한다. 수용가능한 부형제로는 불완전한 Freund's 부형제, 알루미늄포스페이트, 알루미늄하이드록시드, 알루미늄 등이며, 이 모든 물질은 기술분야에서 잘 알려져 있다.

RSV조성물을 명세서에 기재된 대로, 에어로졸을 경유하거나, 소적(小滴)으로, 경구로, 국소적인 또는 다른 루트로 면역한 경우, 숙주의 면역체계는 F, G단백질과 같은 RSV 바이러스 단백질에 특이한 항체를 생성하여 백신에 반응한다. 접종결과, 숙주는 RSV 감염에 대해 적어도 부분적으로나 완전히 면역을 갖게되거나, 또는 보통이나 심각한 RSV 감염의 진전에 대해 저항성이 있으며, 특히 하부 호흡관에서 그러하다.

백신이 투여될 숙주는 RSV나 밀접하게 관련된 바이러스에 감염되기 쉬우며, 접종의 균주의 항원에 대한 보호면역반응을 일으킬 수 있는 어떠한 포유류일 수도 있다. 따라서, 적합한 숙주로는 사람, 사람 이외의 척추동물, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 설치류 등을 포함한다. 따라서, 본 발명은 사람이나 수의학적인 다수용도의 백신을 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 RSV를 포함하는 백신 조성물을 RSV 감염이 쉽거나 감염의 위험성이 있는 숙주에게 투여하여, 숙주 자체의 면역반응을 향상시킨다. 이러한 양을 '면역학적으로 효과적인 양'으로 정의한다. 이러한 용도에서, 다시 정확한 양은 숙주의 건강상태나 몸무게, 투여방식, 제제의 특성 등에 의존한다. 그러나 일반적으로 약  $10^3$  내지  $10^6$  PFU(plaque forming unit)범위나 그 이상, 또는 흔히 약  $10^4$  내지  $10^5$  PFU바이러스/숙주이다. 어떤 경우, 심각하거나 생명에 치명적인 RSV감염에 대해 숙주인 환자를 보호하기에 충분한 양으로 본 발명의 변형된 RSV의 백신제제를 공급해야 한다.

본 발명에 따라 제조된 RSV를 다중 RSV 서브그룹이나 균주에 대해 보호할 수 있도록 다른 서브그룹이나 균주의 바이러스와 결합할 수 있으며, 또한 이들 균주의 보호 에피토프를 본 발명에 기재된 대로 하나의 바이러스로 가공할 수 있다. 일반적으로 여러 바이러스가 혼합물로 있을 수 있고 동시에 투여될 수도 있으나, 각각 투여될 수도 있다. 예컨대, 두 RSV 서브그룹의 F단백질은 아미노산서열이 약 1% 다르며, 이러한 유사성이 RSV나 F항원으로 면역된 동물에서 관찰되며, 상이한 균주에서 거부되는 크로스-보호면역반응의 기본이 된다. 따라서, 한 균주에 의한 면역으로 동일하거나 상이한 서브그룹의 여러 균주에 대해 보호할 수도 있다.

몇몇 예에서, 본 발명의 RSV백신과 다른 항원, 특히 어린이의 다른 바이러스에 대한 보호반응을 유도하는 백신과 결합하는 것이 바람직할 수도 있다. 예컨대, 본 발명의 RSV 백신을 파라인플루엔자 (parainfluenza) 바이러스 백신(예, Clements 등, J. Clin.Microbiol. 29: 1175-1182 (1991)에 기재, 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)과 동시에 투여할 수 있다. 본 발명의 또다른 측면에서, 보호항원을 코드하는 서열을 본 명세서에 기재된 감염성 RSV를 제조하기 위해 사용되는 RSV 계놈이나 안티계놈에 병합하여, RSV를 파라인플루엔자와 같은 다른 호흡관의 보호 항원용 벡터로 이용할 수 있다.

본 발명의 백신 조성물을 한 번 또는 여러 번 투여할 수 있다. 신생아나 유아에게는 충분한 면역수준을 유도하기 위해 여러 번 투여할 필요가 있다. 투여는 생후 1개월내에 시작해야 하며, 유년시절동안 2개월, 6개월, 1년, 2년등과 같이 자연적(야생형) RSV감염에 대해 충분한 수준의 면역에 필요한 간격을 두고 행해져야 한다. 비슷하게, 건강에 대한 서비스업 종사자, 보육업 종사자, 어린이나 노인이 있는 가족의 일원, 심폐기능이 무방비 상태인 사람 등과 같이 반복적 또는 심각한 RSV감염의 위험성이 있는 성인들도 보호면역반응을 수립 및/또는 유지하기 위해서 여러 번 면역할 필요가 있을 수 있다. 분비되는 혈장항체를 없애는 양 및 원하는 보호수준을 유지하기 위해 필요할 정도로 반복되는 접종이나 조절되는 양을 측정함으로써 유도된 면역 수준을 측정할 수 있다. 게다가, 상이한 수용체 그룹에게는 상이한 백신 바이러스가 유리할 수 있다. 예컨대 T-세포 에피토프가 많은 부가적인 단백질을 발현하는, 가공된 RSV 균주는 특히 유아보다는 성인에게 유리할 수도 있다.

본 발명의 또다른 측면에서는, RSV를 호흡관의 일시적인 유전자 요법을 위한 벡터로 사용한다. 이 구체예에 따라서, 재조합 RSV 계놈이나 안티계놈을 목적하는 유전자 산물을 코드할 수 있는 서열에 병합한다. 목적하는 유전자산물은 RSV 발현을 제어하는 유전자로부터 유래된 동일 또는 상이한 프로모터의 조절하에 있다. 재조합 RSV 계놈이나 안티계놈과 함께 N, P, L, M2(ORF1)단백질을 발현하여 제조된, 목적하는 유전자산물을 코드하는 서열을 포함한 감염성 RSV를 환자에게 투여한다. 일반적으로 에어로졸, 분무기, 치료받는 환자의 호흡관에 대해 국소적인 다른 응용으로 투여된다. 원하는 유전자 산물을 면역학적으로 예방이나 치료가 나타나기에 충분한 수준으로 재조합 RSV를 투여한다. 이러한 방법으로 투여되는 대표적인 유전자는 특히 일시적인 발현에 적절한 것으로, 예컨대 인터루킨-2, 인터루킨-4,  $\gamma$ -인터페론, GM-CSF, G-CSF, 에리트로포이에틴(erythropoietin), 다른 사이토키닌, 글루코세레브로시다제(Glucocerebrosidase), 페닐알라닌 하이드록시다제, CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), HGPRT(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), 사이토신(cytosine), 종양억제 유전자, 안티센스 RNA, 백신 항원을 코드하는 것을 포함한다. 다음의 실시예는 예시로서 제공된 것이며, 발명을 제한하는 것은 아니다.

## 실시예 1

### RSV 안티계놈을 코드하는 cDNA의 제조

RSV균주A2의 안티계놈을 코드하는 cDNA클론을 그림 1A에 나타낸 대로 제조했다. 합성 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하고 및 세포내 RSV mRNA또는 정제된 비리온으로부터 분리된 계놈RNA를 주형으로 하여 PCR과 RT에 의해 단편으로 cDNA를 합성하였다. 최적활성을 위해서는 전사된 3개의 G간기를 포함하는, T7 RNA폴리머라제의 프로모터가 최종 cDNA는 리더의 말단에서 둘러싸여 있다.; 전사결과 이들 바이러스성 3개 G를 안티계놈의 5' 말단에 공여하게 되었을 것이다. 거의 정확한 3' 말단을 생성하기 위해서는, cDNA 트레일러(trailer)말단은 이전에 기재된 해머헤드 라이보자임의 근처에 제조되며, 라이보자임 절단에 의해 3' -인산화된 잔기를 코드된 RNA 말단에 공여했을 것이다(Grosfeld 등, J. Virol. 69: 5677-5686). 라이보자임 서열 뒤에는 T7 RNA폴리머라제의 나란한(tandem) 종결인자가 한쌍 있었다. (CAT 리포터 유전자(reporter gene)를 함유하는 cDNA-코드 RSV 소계놈에 3개의 5' G와 1개의 3' U간기를 부가한 경우, RSV에 의해 보충할 때에 CAT의 발현에 영향이 없었다.)

그림 1A는 cDNA와 코드된 안티게놈 RNA의 구조를 보여준다. (실제 크기 비율은 아님) 맨위의 안티게놈 도식은 다음의 특징 즉, T7 프로모터에 의해 제공된 5' 말단의 비바이러스성 G 트리플렛, 1099(그 길이에 1nt를 부가함), 1139, 5611, 7559 위치에 있는 4개의 서열표지, 라이보자임 및 나란한 T7 종결인자, 라이보자임의 절단(절단위치는 화살표로 나타냈다.)에 의해 3' 말단에 제공된 1개의 비바이러스성 3' -인산화 U잔기를 포함한다.

완전한 안티게놈의 집합체(aggregate)에서 나타나는 클론된 cDNA 단편(그림 1A, 중간)을 RSV mRNA 또는 RNA를 RT-PCR에 의해 제조했다. 안티게놈의 왼쪽 말단을 포함하는, 보존한 T7 프로모터 및 리더 영역 내지 SH 유전자까지 이르는 cDNA를 변형된 pBR322(그림 1A, 맨 아래)에 모았으며, 자연적으로 존재하는 BamHI 자리를 돌연변이로 제거했고 집합을 용이하도록 하기 위해 Pst I-EcoRI 단편을 유일한 제한효소 자리(BstBI, BstXI, PacI, BamHI, MluI를 포함)를 포함하는 합성 폴리링커(polylinker)로 대체하여 pBR322를 변형했다. 그림 1A의 박스는 BamHI 자리의 제거를 보여준다. 자연적으로 존재하는 BamHI-Sal I 단편(BamHI 자리는 (+)센스에 있는 맨 윗줄에 밑줄을 그어 나타냄)을 PCR-제조된 BglII-Sal I (BglII 자리는 맨 아랫줄에 밑줄을 그어 나타냄); 그의 4-nt sticky말단(이탈릭체)은 BamHI 것과 호환성이 있다.) 단편으로 대체했다. 이 결과 아미노산 수준에서는 변화가 없이(silent) 1-nt가 변화되었다. 백터상의 이러한 변형에 의해 안티게놈 cDNA상의 유일한 BamHI 자리를 만듦으로써 cDNA의 제조를 용이하게 했다.

L, 트레일러(trailer), 측면의 라이보자임 서열 및 나란한 T7 전사 종결인자와 같은 G, F, M2유전자를 별개의 플라스미드에 집합했다. 그리고 나서 G 내지 M2 단편을 리더 내지 SH-플라스미드의 PacI-BamHI 윈도우(window)에 삽입했다. 반대로 이것이 L-트레일러(trailer)-라이보자임 서열-T7 전사 종결인자 단편을 BamHI-MluI 윈도우(window)에 삽입하여 완전한 안티게놈을 양산하기 위한 수용체가 되었다.

4개의 제한효소 자리 표지(그림 1B)를 RT-PCR의 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 변화를 병합하여 안티게놈 cDNA에 도입하였다. 이는 집합을 용이하게 하고, 재조합 바이러스를 확인하는 방법을 제공하고, 감염성 RSV에 염기변형의 도입을 예시하기 위해 행해졌다. 3개의 제한효소 자리는 유전자간 영역에 있고 4번째 자리는 유전자의 비번역(nontranslation) 자리에 위치하고, 그들은 모두 5-nt 치환과 1-nt 삽입을 포함했다. 이것은 코드되는 안티게놈의 길이를 야생형 안티게놈에 비해 1-nt만큼 증가시켜 전체가 15,223 nt(SEQ ID NO: 1, 게놈 자체는 (-)센스임에 반해 SEQ ID NO: 1은 5'에서3'의 (+)센스 서열임)가 되었다.

서열표지를 그림 1B에 나타난 바와 같이 cDNA-코드한 안티게놈 RNA에 삽입하였다. 서열은 (+)센스이며, 리더영역 보충물의 첫 번째 nt를 1로하여 상대적으로 번호를 매겼다. ; 서브그룹 A와 서브그룹 B를 각각 대표하는 균주 A2와 18537을 동일성을 점으로 나타냈다; cDNA상에서 제한효소 자리를 나타내는 서열은 밑줄을 그었다; 전사 신호인 유전자의 개시(GS)와 유전자의 종료(GE)는 박스로 나타났다. ; 1141위치에 N번역 ORF의 개시코돈은 이탈릭체로 나타냈으며, 서열 표지는 각서열의 아래에 나타났다. 맨위의 서열에서, 1개의 C잔기를 1099위치에 삽입하여 NS11-N 유전자간 영역에 AflIII를 만들었으며, N번역 ORF의 바로 상류에 1139 및 1140위치의 AG를 CC로 치환하여 새로운 NcoI 자리를 만들었다. 중간에 위치한 서열에서, 5612 및 5616위치의 G와 U를 각각 치환하여 G-F 유전자간 영역에 새로운 StuI 자리를 만들었다. 그리고, 그림 1B의 맨 아래의 서열에서, 7561위치의 C를 치환하여 F-M2 유전자간 영역에 새로운 SphI 자리를 만들었다.

집합하기에 앞서, 모든 cDNA는 완전한 상태로, 대부분의 경우 몇몇의 독립된 cDNA의 상태로 시퀀싱(sequencing)을 했다. 각각의 RSV를 코드하는 플라스미드는 다음의 문헌에 기재되어 있으며, Grosfeld 등, J. Virol. 69: 5677-5686 (1995) and Collins 등, Proc. Natl. Sci. USA (1995), 각각은 문명세서에 참고문헌으로 병합되어 있다.

## 실시예 2

### 재조합 RSV의 형질전환 및 회수

cDNA-발현 안티게놈으로 부터 감염성 RSV를 제조하기 위한 방법에는 (i) RNA복제가 가능한 안티게놈 뉴클레오캡시드의 제조 및 (ii) 자손게놈 뉴클레오캡시드가 RNA 복제와 전사를 모두 할 수 있도록 하기에 충분한 RSV 단백질과 함께 발현하는 것을 포함한다. 게놈 뉴클레오캡시드에 의한 전사로 다른 모든 RSV 단백질을 제공하여 생산적 감염을 개시한다.

N, P, L, M2(ORF1) 단백질을 코드하는 플라스미드와 함께 안티게놈을 코드하는 플라스미드-생산된 cDNA를 HEp-2세포에 형질감염했으며, HEp-2세포는 T7 RNA폴리머라제를 발현하는, 최근에 보고된 우두 바이러스인 재조합 MVA 균주가 이미 감염되어 있었다(Wyatt 등, Virol. 210: 202-205 (1995), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨). MVA균주는 조류 세포에서는 허용되게(permissively) 성장하나 포유류 세포에서는 비리온 성숙의 마지막 단계에서 저해가 일어나 감염성 바이러스의 생산이 크게 감소하는 숙주범위를 지닌 돌연변이이다. HEp-2세포에서, 재조합 MVA T7RNA폴리머라제의 발현 수준 및 세포병원성에 관해서 더 흔히 사용되는 WR-기초한 재조합과 유사했으나, 자손 생산 수준은 너무 낮기 때문에 최소한의 세포병원성으로 상징액을 새로운 세포로 계대점종(繼代接種)할 수 있었을 것이다. 이것은 형질감염된, 우두 바이러스가 감염된 세포에서 생산될 수 있는 어떠한 재조합 RSV의 회수를 용이하게 했을 것이다.

재조합 RSV의 형질감염과 회수를 다음과 같이 행했다. HEp-2세포의 단층배양에 6개 웰의 디쉬중 하나의 웰당, 5가지 플라스미드가 안티게놈, N, P 플라스미드 각각 0.4µg, L, M2(ORF1) 플라스미드 각각 0.1µg를 혼합하여 최종부피가 Opti-MEM(Life Technologies)배지 0.1ml가 되도록 제조된 감염-형질감염 배지 1ml를 더했다. 그런 후 여기에 12µl LifofectACE (Life Technologies)를 포함하는 Opti-MEM 0.1ml를 더했다. 실온에서 15분간 배양후에, 여기에 2% 가열-불활성화 송아지 태아 혈청 및  $1.5 \times 10^6$  pfu의 T7 RNA 폴리머라제를 코드하는 재조합 MVA 우두바이러스 균주를 포함하는 Opti-MEM 0.8ml을 더했다(Wyatt 등, supra). 이것을 세포에 첨가하고 1일이 경과한 후에, 2% 혈청을 포함하는 Opti-MEM으로 대체했다. 32°C에서 배양한 후에 3일째에 수확했다. 32°C에서 배양한 이유는 MVA바이러스는 약간 온도-민감성이 있으며, 이러한 저온에서 더 효과적이라는 발견 때문이다. 형질감염후 3일에 청징한 배양 상징액을 새로운 HEp-2세포에 계대배양하고, 그 위에 메틸셀룰로스(다음의 항원 염색을 위해) 또는 아가로스(플라크의 분리를

위해)를 깔았다. 메틸셀룰로스를 처리하여 5일 동안 배양한 후, 세포를 고정하고, 간접적인 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)방법으로 염색하며, 이방법은 RSV F단백질에 대한 3가지 쥐의 단클론 항체의 혼합물을 사용한후에 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)에 연결된 안티-생쥐의 항체를 처리하는 것이며 Murphy등, Vaccine 8: 497-502 (1990)에 기재된 일반적인 절차를 따랐다.

MVA-T7 재조합 바이러스의 낮은 수준의 원인이라 여겨지는 세포병원성을 참고자료로 하여 다수의 RSV-유사 플라크를 검출했다. 많은 양의 RSV F단백질을 함유하는 플라크는 갈색-검은색으로 나타나며, RSV의 특징인 세포병원성 효과를 나타냈으며, 특히 신시티움(syncytium)을 생성했다.

병행하여 준비했으나 아가로스로 배양한 플레이트(plate)에서 RSV-유사 플라크를 골라내어 뉴트럴 레드(neutral red)로 염색했다. 이들을 증식하여 실험실 균주인 RSV균주A2와 비교했다. 형질감염된 배양물로부터 유래된 플라크는 실험실 균주와 매우 유사했다. 한가지 차이점은 형질감염된 배양물로부터 유래된 플라크가 실험실 균주의 것보다 약간 작고, 중앙부가 덜 선명하다는 점이었다. 재조합 바이러스는 분리된 이 특별한 야생형과 표현형에서 다르며, 아마도 세포-세포 확산이 약간 더 제한되어 있으며, 낮은 살균율을 나타낸다는 점이었다. 방출된 바이러스의 증식에 관하여, HEp-2세포에서 32°C 또는 37°C에서, 실험실 바이러스와 재조합 바이러스의 수율이 동일했다. 사전연구에서, 실험실 바이러스와 재조합 바이러스를 세포내 RSV mRNA와 단백질의 축적면에서 구별할 수 없었다.

4개의 삽입된 표지를 측면에 지닌 3개의 프라이머쌍을 사용한 RT-PCR으로 플라크-정제된, 3회-계대배양된 재조합 RSV를 실험실 바이러스와 병행하여 분석했다. 3개의 독립적인 플라크-정제된 재조합 RSV 분리균을 감염되지 않은 대조배양과 병행하여 증식했다. 청징된 배지 상정액을 폴리에틸렌 글리콜 및 고염(Zoller and Smith, DNA 3: 479-488 (1984))으로 처리하여 바이러스를 침전시킨 다음, TrizolTM(Life Technologies)으로 응집체로부터 RNA를 추출했다. RNA를 첨가하지 않거나 또는 균주 A2의 실험실 분리균의 RNA 0.1µg인 추가적인 대조군과 병행하여, 상기의 RNA에 디엔아제(DNase)를 처리하여 재정제하고, 각각 임의의 헥사머(hexamer) 50ng과 냉각하여 복원시키고, 역전사효소가 있는 또는 없는 표준 RT조건(40 µl 반응)하에서 반응시켰다(Conner등, Virology, 208: 478-484 (1995)). 각 반응의 부분표본을 3개의 다른 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 사용하여 PCR(45초동안 94°C로, 30초동안 37°C, 1분동안 72°C로 35회)로 반응시켰다. 프라이머쌍(A) : (+)센스, 925-942 및 (-)센스, 1421-1440, NS2와 N 유전자의 접합부 및 N유전자에서 각각 삽입된 AflII 와 NcoI 자리를 포함하는 516bp(재조합 바이러스의 경우는 517bp)의 예상된 산물을 생산. 프라이머쌍(B) : (+)센스, 5412-5429위치 및 (-)센스, 5930-5949, G와 F유전자 사이의 접합부에 삽입된 SphI 자리에 이르는 538bp의 예상된 산물을 생산. 프라이머쌍(C) : (+)센스, 7280-7297위치 및 (-)센스, 7690-7707, G와 M2유전자사이의 접합부에 삽입된 SphI 자리에 이르는 428bp의 단편을 생산. 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하여 보이게 하고 HaeIII로 분해된 X174DNA분자길이 표지와 함께, 1% 아가로스겔 및 2% 저용해 아가로스를 포함하는 중성겔상에서 전기영동으로 PCR 산물을 분석하였다. 예상된 크기의 PCR산물이 생성되었다. 각각의 생산이 RT단계에 의존한다는 사실은 각각이 오염된 cDNA보다는 RNA에서 유래되었음을 나타냈다.

PCR산물을 제한효소로 분해하여 분석했다. AflII 또는 NcoI 를 포함하는 프라이머쌍(A)산물의 분해물은 예상된 177 및 340bp (AflII) 또는 217 및 300bp(NcoI)에 상응하는 단편을 생성했다. SphI 을 포함하는 프라이머쌍(B)산물의 분해물은 예상된 201 및 337bp 에 상응하는 단편을 생성했다. SphI 을 포함하는 프라이머쌍(C)산물의 분해물은 예상된 147 및 281bp 에 상응하는 단편을 생성했다. 상기의 분해물을 상기에 사용된 겔 전기영동으로 분석했다. AflII를 가진, 분해되지 않고 남아있는 PCR산물이 존재하는 것은 불완전한 분해 때문이며, 이는 재분해에 의해 확산할 수 있었다. 따라서 제한효소 분해에 의하면, 재조합 바이러스를 나타내는 PCR 산물은 예상된 제한효소 자리 표지를 포함하는 반면에, 실험실 균주는 그러하지 않았음을 나타냈다. 클론된 PCR 산물의 뉴클레오타이드 서열의 분석에 의해 제한효소 자리 표지에 이르는 서열을 확인했다.

표1에서 보여지는 바와 같이, N, P, L, M2(ORF1)를 포함한 경우에 RSV 생산은 상대적으로 높으며, 3회 실험에서 0.4µg 투입 안티게놈 cDNA 및 1.5X10<sup>6</sup>세포당 평균 9.9내지 94.8플라크 범위였다. 이들 플라크는 계대배양으로부터 유래되었기에 최초 형질감염 각 웰당 존재하는 감염된 세포수는 알려져 있지 않았다. 감염된 세포(표1에서 56중에 54) 거의 모두가 바이러스를 생산했다. 일반적으로 감염된 세포당 방출된 RSV의 수율은 심지어 이상적인 조건하에서도 매우 낮고(~10PFU) 다수의 웰이 상기 양으로 여러 번 생산했기 때문에(표1에서 169플라크까지), 형질감염된 세포가 있는 다수의 웰에서 몇몇 RSV를 생산하는 세포가 존재할 것이다.

어떤 플라스미드를 제거하면 RSV는 회수될 수 없었다(예, 표1에서 나타낸바와 같이). 투입된 완전한 유전자, 즉 M2(ORF1+2)의 cDNA의 수준이 낮은 경우(0.016µg /1.5X10<sup>6</sup> 세포), 완전한 유전자로서도 M2(ORF1)의 필요성을 충족시킬 수 있었을 것이다. 높은 수준에서 바이러스의 생산이 크게 감소했다는 사실로 M2(ORF2)와 관련된 소계놈 RNA의 합성저해가 또한 생산적인 감염동안에 완전한 계놈에도 작용한다는 것을 시사했다.

이들 결과에 의해 감염성 RSV의 생산이 N, P, L, 단백질 뿐만 아니라 M2(ORF1)단백질의 발현에 매우 의존성을 나타냈다. 게다가, 비록 두 ORF를 모두 포함하는 완전한 DNA가 RSV 생산을 도울지라도, M2(ORF1)를 발현하는 최적 방법은 ORF1이 결실되게 가공된 cDNA로부터임을 나타냈다.

따라서, 본 발명의 일부로서, 종전에 불려진 22K 또는 M2 및 여기서 M2(ORF1)로 기재된 4번째 단백질을 필요로 한다는 점에서, RSV에 의한 전사는 앞에 기재된 비단편성 (-)센스RNA바이러스와 달랐다(Collins등, J. Virol. 54: 65-71 (1985)). M2(ORF1)단백질을 계속적이고 순차적인 전사를 위해 필수적인 RNA폴리머라제 연장인자임이 밝혀졌다. 본 발명의 일부로서, 이러한 필요성에 의해 특이적이고 미리 결정된 변화를 감염성 바이러스에 도입하기 위한 능력이 제공되었다.

## [표 1]

감염성 RSV의 생산은 M2(ORF1)의 발현에 의존적이었다.

보충플라스미드( $\mu$ g cDNA /1.5X10 <sup>6</sup> 세포 및 안티게놈 cDNA)	감염성 RSV의 생산 (#플라크 X #웰) <sup>a</sup>			
	실험. 1	실험. 2	실험. 3	
N (0.4)	0 X 24	0 X 12	0 X 12	
P (0.4)				
L (0.1)				
N (0.4)	0 X 19 <sup>b</sup>	0 X 4	9 X 1	
P (0.4)	1 X 2	3 X 1	10 X 1	
L (0.1)	2 X 2	5 X 1	14 X 2	
M2[ORF 1] (0.016)	3 X 1	6 X 1	22 X 1	
		9 X 1	28 X 1	
		10 X 1	32 X 1	
		13 X 1	49 X 2	
		34 X 1	70 X 1	
		51 X 1	166 X 1	
			169 X 1	
		평균. 0.38.		
			평균. 48.6	
N(0.4)	0 X 1	11 X 1	0 X 1	55 X 1
P(0.4)	1 X 1	12 X 1	2 X 1	59 X 1
L)(0.1)	2 X 2	13 X 1	4 X 1	65 X 1
M2 [ORF 1](0.1)	3 X 2	21 X 1	5 X 1	71 X 1
	4 X 1	24 X 1	8 X 2	72 X 1
	5 X 2	26 X 1	10 X 3	87 X 1
	6 X 4	30 X 2	19 X 1	97 X 1
	7 X 2	33 X 2	20 X 1	100 X 1
	9 X 1	42 X 1	23 X 1	109 X 1
	10 X 2	73 X 1		128 X 1
			평균. 9.9	147 X 1
	평균. 13.7			148 X 1
				평균. 94.8

<sup>a</sup> 감염된 배양(10<sup>6</sup> 세포/ 웰)의 상정액을 새로운 HEp-2세포에 계대배양하고, 메틸 셀룰로스로 중추하고, 및 F-특이 단클론 항체로 염색했다.

<sup>b</sup> 다음과 같다: 19웰은 플라크이 없고, 2웰은 각각 1플라크를 가지며, 2웰은 각각 2플라크를 가지며, 1웰은 3플라크를 가진다.

### 실시에 3

원하는 표현형을 부여하기 위해 미리 결정된 돌연변이를 지닌 감염성 RSV 의 제조

이 실시예는 본 명세서에서 상기에 기재된 방법을 사용하여 감염성 재조합 RSV에 특이하게 미리 결정된 돌연변이를 도입하는 것을 설명한다. 용이하게 조작하기 위해, 안티게놈 cDNA를 별개의 플라스미드에 두 개의 분리된 단편으로 클론했다: 하나의 단편(왼쪽 끝)은 1-nt내지 8501nt에 있는 BamHI 자리이고 T7 프로모터를 포함하며(cDNA D50), 다른 하나의 단편(오른쪽 끝)은 BamHI 자리 내지 15223 nt이고 라이보자임 및 T7 전사 종결인자를 포함한다(cDNA D39). D39를 2개의 단편으로 더 분리했고 각각은 별개의 파지미드 플라스미드에 위치했다.: 하나의 단편(왼쪽 반, cDNA L1)은 BamHI 자리 내지 12255nt에 Pml I 자리까지이며, 다른 하나의 단편(오른쪽 반, cDNA L2)은 Pml I 자리 내지 T7 종결인자의 말단까지임. 제한효소 자리로 할당된 서열위치를 설명적인 안내자로 여기며, 관련된 모든 뉴클레오타이드의 위치를 정확히 정의하지는 않았다.

Kunkel 등의 Meth. Enzymol. 54: 367-382 (1987)(본 명세서에 참고문헌으로 병합됨)의 일반적인 절차에 따라, E. coli 균주 CJ236의 dut ung균주에서 증식했으며, 헬퍼파지, M13K07로 감염하여 단일사슬 DNA를 준비했다. 각각 10이상의 관심있는 뉴클레오타이드의 변화를 포함하는, 인산화된 합성 올리고뉴클레오타이드를 준비하여, 단일사슬 주형에 단독으로 또는 한 번에 10이상으로 냉각복원(annealing)하였으며, T4 DNA 폴리머라제에 의한 직접적인 DNA 합성을 위해 사용되었다. 이 산물을 연결하여 E. coli 균주의 non-dut ung균주, 즉 DH5 $\alpha$  또는 DH10B로 형질전환했다. 제한효소 분해 또는 서열분석으로 돌연변이 플라스미드가 포함되는 콜로니(colonies)를 확인했다. 다른 돌연변이유발 방법을 쉽게 사용할 수도 있다.

안티게놈 플라스미드에서 드물거나 없는 다른 제한효소 몇몇에 대한 수개의 인식자리를 결합하기 위해서, 위에서 기재한 L1 및 L2를 변형했다. ; 코드되는 L단백질의 아미노산서열상 변화가 없는 뉴클레오타이드 치환을 이용하여 이들 자리를 도입했다. 게다가, ts 표현형이라 믿어지는 돌연변이를 포함하도록 L1을 변형했다. L1의 2개 변형을 만들었다. 한 변형에서, L1을 1회의 돌연변이에서, cDNA530 L1자리를 양상하는 530이라 불려지는 돌연변이 및 새로운 Bsu36 I (9399-nt)과 SnaB I 자리(11848-nt)를 포함하도록 변형했다. 생물학적으로-유래된 바이러스 cpts530-RSV의 서열을 분석함으로써 530돌연변이를 확인했으며, L단백질의 521아미노산의 변하는(Phe에서 Leu으로) 10060위치에서 1-nt변화를 포함한다. 두 번째 변형에서, L1을 1회 돌연변이유발로 변화시켜 Bsu36 I 와 SnaB I 자리를 포함하여 결과적으로 cDNA L1자리가 되었다. L2를 1회의 돌연변이유발로 변화시켜 새로운 Pme I (13342), Rsr II (14083), SnaB I (14477)을 포함했다. 2회째 Bst III (14318)를 추가했으며, 자연적으로 존재하는 SnaB I 자리를 제거했다. 이것이 L2자리를 양상했다.

선택된 L1 및 L2 돌연변이 cDNA 또는 그의 단편을 D39에 도입하여 D50과 결합하여 3개의 완전한 안티게놈 cDNA를 만들었다. 안티게놈 cDNA 'D53자리'는 L1, L2자리를 포함한다. cDNA '530D53'은 530L1자리(이는 503돌연변이 및 Bsu36 I 을 포함한다.)단편을 포함한다. cDNA '530D53'은 530L1자리와 L2자리를 포함했다 (표2). 재조합 바이러스를 본 발명의 방법을 이용하여 3완전한 돌연변이 안티게놈 cDNA 각각으로부터 회수하여, 적어도 2회 계대배양하고, 직접적으로 또는 다음의 플라크 정제 및 증폭을 하여 분석했다. 바이러스 RNA의 RT-PCR후에 제한효소 분해분석 또는 뉴클레오타이드 서열 분석을 이용하여나 둘다를 이용하여 돌연변이의 존재를 확인했다.

HEp-2 세포에서 32 $^{\circ}$ C, 39 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C온도에서 두 비재조합(nonrecombinant)생물학적-유래 바이러스와 야생형 균주 A2 바이러스인 HEK 및 병행하여, 가공된 바이러스의 플라크 형성능을 평가했다. 2 비재조합 생물학적-유래 바이러스는 야생형 균주 A2 바이러스인 HEK 및 서열분석으로 확인된 530돌연변이유래의 cpts530이다(표2). 이러한 비교에 의해 모든 3 가공된 바이러스가 32 $^{\circ}$ C에서 플라크를 형성했음을 나타냈으며, 여러 바이러스 제제의 양을 2 log<sub>10</sub>단위 범위내이며, 이는 일반적으로 RSV의 독립적인 제제사이의 실험적인 오차라고 보여졌다. 530돌연변이를 포함하는 재조합 바이러스는 cpts530비해, 39 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C에서 플라크를 형성하는 능력에 큰 손상을 입었다. 530D50에 비해 530D50자리에 부가적인 제한효소 자리의 존재는 ts표현형에 식별할 수 있는 영향을 미치지 못했다. 표현형의 변화가 없는 제한효소 자리를 포함하나 530돌연변이가 없는 D53자리 바이러스는 야생형에 비해 고온에서 플라크 형성능을 보유했다. 이것에 의해 본 발명에 따라 점돌연변이를 재조합 RSV에 체계적으로 도입할 수 있음을 나타냈을 뿐만 아니라, cpts530 RSV 표현형에 530돌연변이가 관련된 것을 명백히 확인했다. 이러한 경우, 가공된 바이러스의 결과적인 표현형은 모균주와 완전히 일치했으며, 약화 돌연변이의 재구성 및 직접적인 확신을 제공했다.

## [표 2]

cDNA클론으로부터 회수된 RSV에 대한 생물학적으로-유래된 RSV의 ts표현형의 특성

바이러스	표시된 온도에서 플라크 형성의 효율성(log <sub>10</sub> )		
	32	39	40
생물학적으로 유래된 바이러스			
HEK <sup>a</sup>	8.7	8.6	8.5
cpts530RSV <sup>b</sup>	6.8	<0.7	<0.7
cDNA-유래 바이러스			
D53 자리 <sup>c</sup>	6.9	6.9	6.7
530D53	7.9	<0.7	<0.7
539D53 자리 <sup>e</sup>	7.6	<0.7	<0.7
a = 야생형 RSV A2			
b = ts 바이러스			
c = 6개의 제한효소자리를 포함하고, 1개의 자연적으로-존재하는 자리가 없다			
d = 1개 새로운 제한효소자리, 530돌연변이를 포함.			
e = 6개 새로운 제한효소자리, 503돌연변이를 포함하고, 1개의 자연적으로 존재하는 자리가 없음			

## 실시예 4

### 부가적인 외래 유전자를 발현하는 감염성 RSV의 회수

상기에 기재된 방법을 사용하여 CAT 유전자(chloramphenicol acetyl transferase)를 코드하는 부가적인 유전자를 포함하는 재조합 RSV를 제조했다. 바이러스 RNA 의존성 RNA폴리머라제의 전사신호인 RSV특이 유전

자-개시 및 유전자-종료로 CAT 코딩서열을 둘러싸고 있었다. RSV/CAT 키메라 전사 카세트를 완전한 cDNA 코드 (+)센스 RSV 안티게놈의 G와 F유전자의 유전자간 영역에 삽입하였으며, 감염성 CAT를 발현하는 재조합 RSV를 회수했다. CAT mRNA는 효율적으로 발현되었으며, G와 F mRNA 수준은 야생형 재조합 RSV가 발현하는 것과 비슷했다. CAT-포함 바이러스 및 야생형 바이러스는 주요한 바이러스 단백질의 합성수준면에서 비슷했다.

CAT 유전자함유 RSV 안티게놈 RNA를 코딩하는 cDNA를 만들기 위해 플라스미드 D46을 사용하였다(플라스미드 D46 및 D50(후자는 실시예3에서 언급했음)은 동일한 안티게놈 cDNA의 다른 제재이다). D46(완전한 15223-nt RSV 안티게놈을 코딩하는)을 사용하여 상기의 감염성 재조합 RSV를 제조했다. 그 제조동안, 안티게놈 cDNA를 변형하여 표지로서 4개의 새로운 제한효소 자리를 포함케 했다. 이들 중 하나인, G와 F유전자간 영역(야생형 게놈의 3'에서 5' 서열상에서 5611-5616위치) 위치한 Stu I 자리를 외래 CAT 유전자의 삽입위치로 선택했다. CAT ORF는 상류끝은 RSV GS신호와 하류끝은 RSV GE신호로 둘러싸여 있으며, 앞에 기재한 RSV-CAT 소개놈으로부터 유래되었다(Collins등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9663-9667 (1991) and Kuo등, J. Virol 70: 6892-6901 (1996), 본 명세서에 참고문헌으로 병합됨). 이 RSV/CAT 전사 카세트를 Stu I 자리에 삽입하여 D46/1024CAT cDNA에 의해 코딩되는 안티게놈의 길이가 전체 15984-nt로 증가했다. 야생형 RSV는 10 주요한 서브게놈 mRNA를 코딩함에 반해, D46/1024CAT 안티게놈으로부터 예상되는 재조합 바이러스는 11 mRNA로 CAT 유전자를 코딩했을 것이다. 제조방법은 그림 2에서 나타나 있다.

상기에서 설명한대로, cDNA코드 안티게놈 RNA로부터 감염성 RSV를 생산하는 것에는 HEP-2세포에서 안티게놈 RNA, N, P, L, M2(ORF1) 단백질을 각각 코딩하는 5 cDNA와 함께 발현하는 것을 포함하며, 이는 바이러스 RNA의 복제와 전사를 위해 필요, 충분하다. T7 RNA폴리머라제로 cDNA발현을 하며, 이 효소는 MVA균주에 기초를 둔 우두-T7 재조합 바이러스에 의해 공급된다. MVA-T7 재조합 바이러스는 계대배양에서 광범위한 세포병원성을 일으킬 수 있도록 감염성 자손 바이러스를 충분히 생산하였다. 따라서 우두 바이러스 복제의 저해제인 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside)를 형질감염후 24시간 후에 첨가했고, 처음 6회 계대배양동안 유지했다.

RSV 회수에 대해 2 안티게놈 cDNA를 시험했다: D46 cDNA, D46/1024CAT cDNA. 각각은 감염성 재조합 RSV를 생산했다. D46/1024CAT 재조합 바이러스로 감염된 세포는 CAT 효소를 풍부한 수준으로 발현했다. 각 바이러스에 있어서, 형질감염 상징액을 새로운 세포로 계대배양했으며, 감염 배율은 0.1 PFU/세포로 5내지 6일 간격으로 전체 8회의 계대배양을 했다.

D46/1024CAT 게놈상의 CAT서열은 RSV GS과 GE신호에 의해 둘러싸여 있으며, 부가적인 별개의 폴리아데닐레이트 mRNA로서 발현되어야 했을 것이다. 이 예상된 mRNA의 존재를 8회 계대배양에서 D46/1024CAT 또는 D46바이러스로 감염된 세포로부터 추출된 mRNA의 노던 블롯 하이브리제이션(northern blot hybridization)으로 시험했다. (-)센스 CAT-특이 RNA프로브(probe)와 혼성화 하여 예상된 CAT mRNA에 적절한 크기인 큰 밴드를 탐지했으며, 이는 폴리(A)가 없는 735-nt를 포함했을 것이다. 이 종을 올리고(dT)라텍스 입자로 완전히 보유했다는 것은 그것이 폴리아데닐레이트되어 있음을 보여주었다. 몇몇 경우 G-CAT전체의 mRNA로 적절한 크기인, 더 큰 종의 작은 밴드를 탐지했다. 세포내 RNA를 준비하기 위한 감염전에, D46/1024CAT 바이러스를 낮은 감염비율로 8회까지 계대배양했다. CAT유전자의 결실이 있었다면 일어났을 수도 있는 더 짧은 형태의 CAT mRNA에 대한 증거는 없었다.

(-)센스 RNA프로브로 복제 블롯을 혼성화 했으며, 이 프로브는 CAT, SH, G, 또는 F유전자에 특이적이고 G와 F유전자는 삽입된 CAT 유전자를 둘러싸고 있다. 블롯에 의해 서브게놈인 SH, G, F mRNA에 발현은 두 바이러스에서 비슷하다는 것을 나타냈다. D46/1024CAT 및 D46에 대한 3 RSV mRNA 각각에서 혼성화된 방사선활성(radioactivity)의 양을 비교하기 위해서 포스포이미제리(phosphoimagery)를 사용했다. D46/1024CAT 및 D46사이의 방사선활성의 비율을 각각의 mRNA에 대해 결정했다: SH, 0.77; G, 0.87; 및 F, 0.78. 단일성과의 편차는 비록 전체 mRNA 축적수준이 D46/1024CAT에 대해 더 적을 수 있더라도, D46에 비해 D46/1024CAT의 경우 약간 더 적은 RNA를 올려놓았다는 것을 나타냈다. 세 비율이 비슷하다는 실험에 의해 이들 각 RNA의 발현수준이 대략 D46에 비해 D46/1024CAT에 대해 동일함을 확실히 했다. 따라서 (this) G와 F유전자사이에 CAT유전자의 삽입으로 각 유전자의 전사수준에 큰 영향을 끼치지 못했다.

바이러스 단백질의 합성을 특징화하기 위해, 감염된 HEP-2세포를 [<sup>35</sup>S]메타이오닌으로 표지하고, 세포 용해물을 직접적으로 PAGE에 의하거나 또는 표지된 항원이 필수적으로 완전히 회수되는 조건에서 다음의 면역침전법에 의하여 분석했다. 정제된 RSV에 대한 나타난 토기항원으로 침전함으로써 D46/1024CAT 및 D46 바이러스는 둘다 주요한 바이러스 단백질 즉, F1, N, P, M, M2를 발현했음을 나타냈다. 각 바이러스에 대해 M2바이러스를 비슷한 수준으로 회수했다는 것은 주목할만했으며, 이는 이들 유전자가 삽입된 CAT유전자의 아래에 위치하기 때문이다. 또한 세 안티-F단클론항체의 혼합물을 사용하여 면역침전법으로 삽입 위치의 바로 아래에 위치한 유전자에 의해 코딩되는 F단백질의 축적을 조사했다. 상기의 주요한 바이러스 단백질의 포스포이미제리(phosphoimagery)분석에 의해 몇몇 독립적인 실험을 행했으며, 샘플간의 다양성은 있으나, 회수된 단백질 수준면에서는 두 바이러스 전체를 구별할 수 없음을 나타냈다. 안티-CAT 항체를 사용하는 침전으로 D46/1024D46에 대한 1종을 회수했으나, D46에 대해서는 없었다. 전체 표지된 단백질의 분석에 의해, N, P, M단백질을 면역침전없이 탐지할 수 있음을 나타냈으며(비록 후자가 세포내 종과 함께 이동함으로써 그의 탐지를 복잡하게 했을 지라도), 두 바이러스가 비슷한 양상을 나타냈다는 것을 확실히 했다. CAT단백질의 위치에 상응하는 위치는 D46에 비해 D46/1024CAT 패턴에서 더 큰 방사선활성을 함유했으며, 독립적인 실험의 포스포이미제리(phosphoimagery)로 확실히 했다. 이는 면역침전 없이도 전체의 표지된 단백질 중에서 CAT 단백질을 탐지할 수 있음을 나타냈으며, 비록 감염되지 않은 및 D46-감염된 패턴에서 함께 이동하는 배경밴드의 존재로 인해 이러한 실험을 복잡하게 했다.

RT-PCR을 사용하여 CAT유전자가 재조합 RSV 게놈의 예상된 위치에 존재함을 확실히 했다. D46/1024D46 및 D46 RSV의 8회 계대배양된 세포용집체로부터 전체 세포내 RNA를 분리했다. 삽입위치 즉, RSV 5611-1616에 Stu I 제한효소 자리를 둘러싼 두 프라이머를 선택했다. : 상류 (+)센스 프라이머는 5412-5429 위치에 일치하고, 하류 (-)센스 프라이머는 5730-5711에 일치한다.(+)센스 프라이머를 RT단계에 사용했으며, 두 프라이머를 PCR에 사용했다.

D46바이러스의 RT-PCR은 예상된 318뉴클레오타이드 단편에 일치하는 하나의 산물을 생산했으며 이 산물은 부가적 외래 서열이 없는 G/F유전자 접합을 나타냈다. D46/1024D46 바이러스 RNA의 분석으로 전기영동상의 이동성이 예상된 1079뉴클레오타이드 단편과 잘 일치하는 하나의 산물이 생성되었으며, 이는 삽입된 CAT전사 카세트를 포함하는 G/F유전자 접합을 나타냈다. 나중의 PCR은 하나의 큰 밴드를 나타냈다: 탐지할 수 있는 더 작은 산물이 없음을 재조합 게놈 집단은 이 영역에서 결실이 있는 다수의 분자를 포함하지 않음을 나타냈다. RT 단계없이 D46/1024CAT 바이러스 RNA를 PCR분석을 했을 때, 어떠한 밴드도 없었으며, 이는 그 분석이 RNA에 특이적임을 확실히 했다. 따라서, RT-PCR분석에 의해 D46/1024CAT 재조합 바이러스 RNA 게놈의 예상된 위치에 예상된 길이의 삽입이 있음을 확실히 했다.

효소발현을 사용하여 CAT 유전자의 안전성을 측정했다. 3번째로 시작하는 모든 계대배양으로부터 얻은 세포 용출물을 CAT 발현에 대해 시험하였다. 바이러스 D46/1024CAT에 대해, 이들 모든 시험은 [ $^{14}$ C]표지 클로로아미페니콜이 아세틸 형태로의 전환을 나타냈다. 발현의 안전성을 조사하기 위해, 3회 또는 8회 계대배양된 20 또는 25 각 플라크로부터 얻은 바이러스를 각각 CAT발현에 대해 분석하였다. 모든 샘플은 양성이었다고, CAT 발현수준은 8회 계대배양된 25분리원 각각에 대해 비슷하였으며, 이는 상응하는 세포용해물의 부분표본의 시험에 의해 판단된 것과 같았다. 이것은 각 분리군에 의해 코드되는 CAT단백질의 활성이 돌연변이에 의해 손상받지 않은 분리군에 남아있음을 결정했다.

플라크의 형태와 크기를 결정하기 위해, 2번째 계대배양에서 시작하며, 각 계대배양 단계에서 수확한 1/8 배지 상정액을 사용하여 6개 웰 플레이트에 새로운 HEp-2세포를 감염하여, 메틸 셀룰로스를 중추하여 5내지 7일간 배양했다. 상기 세포를 고정한 후 RSV F단백질에 대한 단클론 항체로 배양함으로써 염색했으며, 그 다음 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)에 연결된 두 번째 항체로 처리했다. 종전에, D46으로부터 생성되는 재조합 RNA는 세포외 온도범위 이상에서 플라크를 형성하는 능력, 이전에 감염되지 않은 침팬지의 호흡관에서 배양시에 질병을 야기하고 복제를 일으키는 능력면에서 자연적으로 존재하는 야생형 RSV 분리군과 구별할 수 없다고 관찰되었다. 따라서, D46재조합 RSV를 병원성 야생형 RSV균주로 여겼다. D46 및 D46/1024CAT가 생성하는 플라크를 항체 염색으로 비교하였다. 비록 CAT-함유 재조합 플라크의 평균 직경이 D46 바이러스의 것의 90%였을 지라도, 플라크의 형태는 두 바이러스에서 매우 비슷했으며, 이는 각 바이러스에 대해 임의로 선택한 30개의 플라크를 측정함에 기초하였다.

D46 및 D46/1024CAT 바이러스의 조직배양에서 복제의 효율성을 단일단계 성장 주기에서 비교했다. 상층의 세포단층을 두 바이러스 중 어느 하나로 감염하였고, 샘플을 12시간 간격으로 채취했으며, 플라크 분석으로 정량화했다. 이 결과에 의해 D46에 비해 46/1024CAT 바이러스의 생성은 지연되었으며, 최대양이 20배 낮았음을 나타냈다.

이들 결과에 의하면 재조합체, 외래 유전자(이 경우는 CAT유전자)를 발현하는 헬퍼-독립 RSV를 제조하는 것이 가능함을 나타냈다. 재조합 RSV는 CAT유전자를 코드하는, 예상된 폴리아데닐레이트 서브게놈mRNA의 발현을 지시했으며, CAT단백질을 효소시험 및 방사선 면역침전법으로 탐지했다. 다른 실시예에서, 동일한 CAT 삽입위치에 루시페라제(luciferase)유전자가 삽입된 또는 SH와 G유전자사이에 CAT 또는 루시페라제 유전자가 삽입된 재조합 RSV를 생산했다. 이들 바이러스 또한 생장이 감소했으나, 반면에 회수된 다수의 야생형 바이러스는 생장이 감소하지 않았다. 이것은 성장감소가 게놈상 다른 위치에서 우연히 일어난 돌연변이가 보기보다는 삽입된 유전자와 관련됨을 가리킨다. 재조합 RSV에 외래 유전자의 삽입으로 복제수준이 감소하고 세포외 계대배양동안 안전성이 있다는 발견에 의해, 이것이 백신용 약화에 영향을 미치기 위한 다른 방법을 제공함을 암시한다. 그리고, 이들 결과에 의해 본 명세서에 기재된 방법으로 생장이 제한된 바이러스를 회수할 수 있음을 설명한다.

또한 이들 결과에 의해 비분절 (-)사슬 바이러스 유전자의 발현 방법의 장점을 설명하며, 즉 외래 유전자를 코드하는 서열을 별개의 mRNA로 발현되는 별개의 전사 카세트로서 도입할 수 있다. 또한 이들 결과에 의해 CAT유전자를 삽입하여 전체가 15,983-nt인 경우(야생형 RSV의 1.05배)에 RSV는 762게놈길이 증가를 견딜 수 있다. 성공적으로 회수된 루시페라제 유전자는 거의 3배나 길다.

바이러스RNA-의존성 RNA 폴리머라제는 교정(proofreading)과 수복(repair) 기작이 없기에 복제착오-용이한(error-prone) 성질을 가진다고 알려져 있다. RNA 바이러스게놈에서, 돌연변이 확률은 평균 위치당  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  만큼 높다고 추정된다(Holland등, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 176:120 (1992) and 본 명세서의 참고문헌). 여기서 생산된 재조합 D46/1024CAT RSV의 경우, 외래 유전자의 정확한 발현을 바이러스 복제에 부적절했을 것이며, 자유로이 돌연변이를 축적했을 것이다. 여기서 기재된 계대배양에는 감염비율이 0.1 PFU/세포보다 작게 포함되며, 각 계대배양 단계의 기간에 의해 수회의 감염이 포함됨을 나타냈다. RSV-감염된 조직배양 세포의 감염성 바이러스의 수율은 일반적으로 낮고 세포내 거대분자의 합성이 힘들며, 감염성 바이러스의 낮은 수율은 RNA복제수준이 낮기보다는 팩키징(packaging)단계의 비효율성을 나타내는 거 같다. 따라서 8번의 계대배양동안 CAT의 유지에는 수회의 RNA 복제를 필요로 한다. 놀랍게도, 비필수 CAT유전자가 완전하게 남아있었고 8번째 계대배양에서 시험된 25 분리군 각각에서 완전히 기능적인 단백질을 코드할 수 있었다. 또한 8번째 계대배양에서 분리된 RNA의 RT-PCR 분석으로 CAT유전자내의 결실을 탐지하지 못했다.

두 RSV 항원 서브그룹간의 항원 차이점의 대부분은 G단백질에 존재하며, 재조합 RSV를 제조하여 부가적인 유전자로서 다른 서브그룹의 G단백질을 발현함으로써 2가의 백신을 생산할 수도 있다. 사람의 파라인플루엔자(parainfluenza) 3 바이러스 등과 같은 몇몇 다른 호흡장애 바이러스의 외피단백질을 또한 재조합 RSV로 발현하기 위해 삽입할 수도 있다. 다른 용도로는 인터루킨 6 와 같은 면역조절자를 함께 발현하여 감염성 RSV의 면역성을 향상시키는 것을 포함한다. 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이 변형된 RSV를 유전자 요법을 위한 벡터로 이용할 수 있는 것과 같은 다른 용도도 제공되어 있다.

다음의 발명이 명료한 이해를 위해, 비록 예시나 실시예에 의해 약간 자세하게 기재되어 있으나, 어떠한 변화 및 변형을 다음에 부착된 특허청구범위의 범위내에서 행할 수 있음은 명백할 것이다.

서열 리스트

## (1) 일반적인 정보

## ( i ) 출원인:

- (A) 이름: 미합중국 정부,
- (B) 거리: 박스 OTT
- (C) 도시: 베세스다
- (D) 주: 메릴랜드
- (E) 국가: 미합중국
- (F) 우편번호 (ZIP) : 20892
- (G) 전화: (301) 496-7056
- (H) 텔레팩스: (301) 402-0220
- (I) 텔렉스

( ii ) 발명의 명칭: 클론된 뉴클레오타이드 서열로부터 감염성 호흡장애 바이러스의 생산.

## ( iii ) 서열수: 1

## ( iv ) 컴퓨터가 판독할 수 있는 정보:

- (A) 매체유형: 플로피 디스크
- (B) 컴퓨터: 아이비엠 PC 호환성
- (C) 작동시스템: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어: 패턴트인 릴리즈(patent In Release) #1.0, 버전#1.25

## ( v ) 현재의 출원 자료:

- (A) 출원번호:
- (B) 출원일자:
- (C) 분류

## ( vi ) 우선권 출원 자료:

- (A) 출원번호: W0
- (B) 출원일자: 287-9-1995

## ( vii ) 대리인/에이전트 자료:

- (A) 이름: 파멜리, 스티븐 W.
- (B) 등록번호: 31,990
- (C) 참고/일람번호: 15280-250-1PC

## ( viii ) 통신:

- (A) 전화: 206-467-9600
- (B) 텔레 팩스: 415-576-0300

## (2) SEQ ID NO:1:

## ( i ) 서열의 특징:

- (A) 길이: 15223 bp
- (B) 유형: 핵산
- (C) 사슬: 단일
- (D) 형태(Topology): 선형

## ( ii ) 분자 유형: 다름(other)

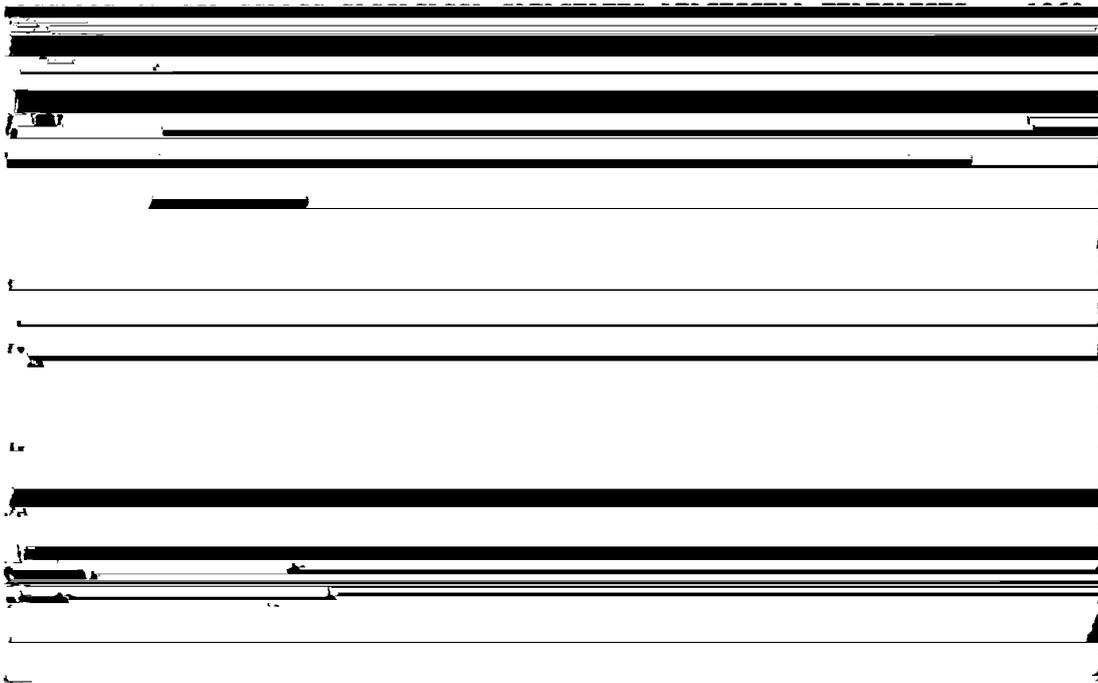
## (xi) 서열 기재: SEQ ID NO:1:

ACGSGAAAA	ATGCGTACAA	CAAACCTGCA	TAAACCAAAA	AAATGGGGCA	AATAAGAATT	60
TGATAAGTAC	CACTTAAATT	TAACCTCCCTT	GGTTAGAGAT	GGGCAGCAAT	TCATTGAGTA	120
CCGAGGAATC	AAGATCTATA	TGATGCAGCA	AAGGCATATG	CTGAACAAC	CAAAGAAAAT	220
GGTGTGATTA	ACTACAGTGT	ACTAGACTTG	ACAGCAGAAG	AACTAGAGGC	TATCAAACAT	280
CAGCTTAATC	CAAAGATAA	TGATGTAGAG	CTTTGAGTTA	ATAAAAAATG	GGGCAAATAA	2340
ATCATCATGG	AAAAGTTTGC	TCCTGAATTC	CATGGAGAAG	ATGCAAAACA	CAGGGCTACT	2400
AAATTCCTAG	AATCAATAAA	GGGCAAATTC	ACATCACCCA	AAGATCCCAA	GAAAAAGAT	2460
AGTATCATAT	CTGTCAACTC	AATAGATATA	GAAGTAACCA	AAGAAAGCCC	TATAACATCA	2520
AATTCAACTA	TTATCAACCC	AACAAATGAG	ACAGATGATA	CTGCAGGGAA	CAAGCCCAAT	2580
TATCAAAGAA	AACCTCTAGT	AAGTTTCAAA	GAAGACCCTA	CACCAAGTGA	TAATCCCTTT	2640
TCTAAACTAT	ACAAGAAAC	CATAGAAACA	TTTGATAACA	ATGAAGAAGA	ATCCAGCTAT	2700
TCATACGAAG	AAATAAATGA	TCAGACAAAC	GATAATATAA	CAGCAAGATT	AGATAGGATT	2760
GATGAAAAAT	TAAGTGAAT	ACTAGGAATG	CTTCACACAT	TAGTAGTGGC	AAGTGCAGGA	2820
CCTACATCTG	CTCGGGATGG	TATAAGAGAT	GCCATGGTTG	GTTTAAGAGA	AGAAATGATA	2880
GAAAAAATCA	GAAGTGAAGC	ATTAATGACC	AATGACAGAT	TAGAAGCTAT	GGCAAGACTC	2940
AGGAATGAGG	AAAGTAAAA	GATGGCAAAA	GACACATCAG	ATGAAGTGTC	TCTCAATCCA	3000
ACATCAGAGA	AATTGAACAA	CCTATTGGAA	GGGAATGATA	GTGACAATGA	TCTATCACTT	3060
GAAGATTTCT	GATTAGTTAC	CAATCTTCAC	ATCAACACAC	AATACCAACA	GAAGACCAAC	3120
AAACTAACCA	ACCCAATCAT	CCAACCAAC	ATCCATCCGC	CAATCAGCCA	AACAGCCAAC	3180
AAAACAACCA	GCCAATCCAA	AACTAACCAC	CCGGAAAAAA	TCTATAATAT	AGTTACAAAA	3240
AAAGGAAAGG	GTGGGGCAAA	TATGGAACA	TACGTGAACA	AGCTTCACGA	AGGCTCCACA	3300
TACACAGCTG	CTGTTCAATA	CAATGTCTTA	GAAAAAGACG	ATGACCCTGC	ATCACTTACA	3360
ATATGGGTGC	CCATGTTCCA	ATCATCTATG	CCAGCAGATT	TACTTATAAA	AGAAGTAGCT	3420
AATGTCAACA	TACTAGTGAA	ACAAATATCC	ACACCAAGG	GACCTTCACT	AAGAGTCATG	3480
ATAAACTCAA	GAAGTGCAGT	GCTAGCACAA	ATGCCAGCA	AATTTACCAT	ATGCGCTAAT	3540
GTGTCCTTGG	ATGAAAGAAG	CAAACAGCA	TATGATGTAA	CCACACCCTG	TGAAATCAAG	3600
GCATGTAGTC	TAACATGCCT	AAAATCAAAA	AATATGTTGA	CTACAGTTAA	AGATCTCACT	3660
ATGAAGACAC	TCAACCTTAC	ACATGATATT	ATTGCTTTAT	GTGAATTTGA	AAACATAGTA	3720
ACATCAAAAA	AAGTCATAAT	ACCAACATAC	CTAAGATCCA	TCAGTGTGAG	AAATAAAGAT	3780
CTGAACACAC	TTGAAAATAT	AACAACCACT	GAATTCAAAA	ATGCTATCAC	AAATGCAAAA	3840
ATCATCCCTT	ACTCAGGATT	ACTATTAGTC	ATCACAGTGA	CTGACAACAA	AGGAGCATTG	3900
AAATACATAA	AGCCACAAAG	TCAATTCATA	GTAGATCTTG	GAGCTTACCT	AGAAAAAGAA	3960
AGTATATATT	ATGTTACCAC	AAATTGGAAG	CACACAGCTA	CACGATTTGC	AATCAAACCC	4020
ATGGAAGATT	AACCTTTTTT	CTCTACATCA	GTGTGTTAAT	TCATACAAAC	TTTCTACCTA	4080
CATTCTTCAC	TTCACCATCA	CAATCACAAA	CACTCTGTGG	TTCAACCAAT	CAAACAAAAC	4140
TTATCTGAAG	TCCCAGATCA	TCCAAGTCA	TTGTTTATCA	GATCTAGTAC	TCAAATAAGT	4200

TAATAAAAAA	TATACACATG	GGGCAAATAA	TCATTGGAGG	AAATCCAACT	AATCACAATA	4260
TCTGTTAACA	TAGACAAGTC	CACACACCAT	ACAGAATCAA	CCAATGGAAA	ATACATCCAT	4320
AACAATAGAA	TTCTCAAGCA	AATTCTGGCC	TTACTTTTACA	CTAATACACA	TGATCACAAC	4380
AATAATCTCT	TTGCTAATCA	TAATCTCCAT	CATGATTGCA	ATACTAAACA	AACTTTGTGA	4440
ATATAACGTA	TTCCATAACA	AAACCTTTGA	GTTACCAAGA	GCTCGAGTCA	ACACATAGCA	4500
TTCATCAATC	CAACAGCCCA	AAACAGTAAC	CTTGCCATTTA	AAAATGAACA	ACCCCTACCT	4560
CTTTACAACA	CCTCATTAAC	ATCCCACCAT	GCAAACCACT	ATCCATACTA	TAAAGTAGTT	4620
AATTAAAAAT	AGTCATAACA	ATGAACTAGG	ATATCAAGAC	TAACAATAAC	ATTGGGGCAA	4680
ATGCAACAT	GTCCAAAAAC	AAGGACCAAC	GCACCCTAA	GACATTAGAA	AGGACCTGGG	4740
ACACTCTCAA	TCATTTATTA	TTCATATCAT	CGTGCCTTATA	TAAGTTAAAT	CTTAAATCTG	4800
TAGCACAAT	CACATTATCC	ATTCTGGCAA	TGATAATCTC	AACCTCACTT	ATAATTGCAG	4860
CCATCATATT	CATAGCCTCG	GCAAACCACA	AAGTCACACC	AACAACCTGCA	ATCATAACAAG	4920
ATGCAACAAG	CCAGATCAAG	AACACAACCC	CAACATACCT	CACCCAGAAT	CCTCAGCTTG	4980
GAATCAGTCC	CTCTAATCCG	TCTGAAATTA	CATCACAAAT	CACCACCATA	CTAGCTTCAA	5040
CAACACCAGG	AGTCAAGTCA	ACCCTGCAAT	CCACAACAGT	CAAGACCAA	AACACAACAA	5100
CAACTCAAAC	ACAACCCAGC	AAGCCACCA	CAAAACAACG	CAAAAACAAA	CCACCAAGCA	5160
AACCCAATAA	TGATTTTCAC	TTTGAAGTGT	TCAACTTTGT	ACCCTGCAGC	ATATGCAGCA	5220
ACAATCCAAC	CTGCTGGGCT	ATCTGCAAAA	GAATACCAA	CAAAAACCA	GGAAAGAAAA	5280
CCACTACCAA	GCCCAAAAA	AAACCAACCC	TCAAGACAAC	CAAAAAGAT	CCCAAACCTC	5340
AAACCACTAA	ATCAAAGGAA	GTACCCACCA	CCAAGCCAC	AGAAGAGCCA	ACCATCAACA	5400
CCACCAAAAC	AAACATCATA	ACTACACTAC	TCACCTCCAA	CACCACAGGA	AATCCAGAAC	5460
TCACAAGTCA	AATGGAAACC	TTCCACTCAA	CTTCCTCCGA	AGGCAATCCA	AGCCCTTCTC	5520
AAGTCTCTAC	AACATCCGAG	TACCCATCAC	AACCTTCATC	TCCACCCAAC	ACACCACGCC	5580
AGTAGTTACT	TAAAAACATA	TTATCACAAA	AGGCCTTGAC	CAACTTAAAC	AGAATCAAAA	5640
TAAACTCTGG	GGCAAATAAC	AATGGAGTTG	CTAATCCTCA	AAGCAAATGC	AATTACCACA	5700
ATCCTCACTG	CAGTCACATT	TTGTTTTGCT	TCTGGTCAAA	ACATCACTGA	AGAATTTTAT	5760
CAATCAACAT	GCAGTGCAGT	TAGCAAAGGC	TATCTTAGTG	CTCTGAGAAC	TGGTTGGTAT	5820
ACCAGTGTTA	TAACATATAGA	ATTAAGTAAT	ATCAAGAAAA	ATAAGTGTA	TGGAACAGAT	5880
GCTAAGGTAA	AATTGATAAA	ACAAGAATTA	GATAAATATA	AAAATGCTGT	AACAGAATTG	5940
CAGTTGCTCA	TGCAAAGCAC	ACAAGCAACA	AACAATCGAG	CCAGAAGAGA	ACTACCAAGG	6000
TTTATGAATT	ATACACTCAA	CAATGCCAAA	AAAACCAATG	TAACATTAAG	CAAGAAAAGG	6060
AAAAGAAGAT	TTCTTGGTTT	TTTGTTAGGT	GTTGGATCTG	CAATCGCCAG	TGGCGTTGCT	6120
GTATCTAAGG	TCCTGCACCT	AGAAGGGGAA	GTGAACAAGA	TCAAAAGTGC	TCTACTATCC	6180
ACAAACAAGG	CTGTAGTCAG	CTTATCAAAT	GGAGTTAGTG	TTTTAACCAG	CAAAGTGTTA	6240

GACCTCAAAA	ACTATATAGA	TAAACAATTG	TTACCTATTG	TGAACAAGCA	AAGCTGCAGC	6300
ATATCAAATA	TAGAAACTGT	GATAGAGTTC	CAACAAAAGA	ACAACAGACT	ACTAGAGATT	6360
ACCAGGGAAT	TTAGTGTTAA	TGCAGGCGTA	ACTACACCTG	TAAGCACTTA	CATGTTAACT	6420
AATAGTGAAT	TATTGTTCATT	AATCAATGAT	ATGCCTATAA	CAAATGATCA	GAAAAAGTTA	6480
ATGTCCAACA	ATGTTCAAAT	AGTTAGACAG	CAAAGTTACT	CTATCATGTC	CATAATAAAA	6540
GAGGAAGTCT	TAGCATATGT	AGTACAATTA	CCACTATATG	GTGTTATAGA	TACACCCTGT	6600
TGGAAACTAC	ACACATCCCC	TCTATGTACA	ACCAACACAA	AAGAAGGGTC	CAACATCTGT	6660
TTAACAAGAA	CTGACAGAGG	ATGGTACTGT	GACAATGCAG	GATCAGTATC	TTTCTFCCCA	6720
CAAGCTGAAA	CATGTAAAGT	TCAATCAAAT	CGAGTATTTT	GTGACACAAT	GAACAGTTTA	6780
ACATTACCAA	GTGAAGTAAA	TCTCTGCAAT	GTTGACATAT	TCAACCCCAA	ATATGATTGT	6840
AAAATTATGA	CTTCAAAAAC	AGATGTAAGC	AGTCCGTTA	TCACATCTCT	AGGAGCCATT	6900
GTGTCACTGT	ATGGCAAAAAC	TAAATGTACA	GCATCCAATA	AAAATCGTGG	AATCATAAAG	6960
ACATTTTCTA	ACGGGTGCGA	TTATGTATCA	AATAAAGGGG	TGGACACTGT	GTCTGTAGGT	7020
AACACATTAT	ATTATGTAAA	TAAGCAAGAA	GGTAAAAGTC	TCTATGTAAA	AGGTGAACCA	7080
ATAATAAATT	TCTATGACCC	ATTAGTATTC	CCCTCTGATG	AATTTGATGC	ATCAATATCT	7140
CAAGTCAACG	AGAAGATTAA	CCAGAGCCTA	GCATTTATTC	GTAAATCCGA	TGAATTATTA	7200
CATAATGTAA	ATGCTGGTAA	ATCCACCACA	AATATCATGA	TAACTACTAT	AATTATAGTG	7260
ATTATAGTAA	TATTTGTTATC	ATTAATTGCT	GTTGGACTGC	TCTTATACTG	TAAGGCCAGA	7320
AGCACACCAG	TCACACTAAG	CAAAGATCAA	CTGAGTGGTA	TAAATAATAT	TGCATTTAGT	7380
AACTAAATAA	AAATAGCACC	TAATCATGTT	CTTACAATGG	TTTACTATCT	GCTCATAGAC	7440
AACCCATCTG	TCATTTGATT	TTCTTAAAAT	CTGAACTTCA	TCGAACTCT	CATCTATAAA	7500
CCATCTCACT	TACACTATTT	AAGTAGATTC	CTAGTTTATA	GTTATATAAA	ACACAATTGC	7560
ATGCCAGATT	AACCTTACCAT	CTGTAAAAAT	GAAAACCTGG	GCAAATATGT	CACGAAGGAA	7620
TCCTTGCAAA	TTTGAAATTC	GAGGTCAATTG	CTTAAATGGT	AAGAGGTGTC	ATTTTAGTCA	7680
TAATTATTTT	GAATGGCCAC	CCCATGCACT	GCTTGTAAGA	CAAACTTTA	TGTTAAACAG	7740
AATACTTAAG	TCTATGGATA	AAAGTATAGA	TACCTTATCA	GAAATAAGTG	GAGCTGCAGA	7800
GTTGGACAGA	ACAGAAGAGT	ATGCTCTTGG	TGTAGTTGGA	GTGCTAGAGA	GTTATATAGG	7860
ATCAATAAAC	AATATAACTA	AACAATCAGC	ATGTGTTGCC	ATGAGCAAAC	TCCTCACTGA	7920
ACTCAATAGT	GATGATATCA	AAAAGCTGAG	GGACAATGAA	GAGCTAAATT	CACCCAAGAT	7980
AAGAGTGTAC	AATACTGTCA	TATCATATAT	TGAAAGCAAC	AGGAAAAACA	ATAAACAAAC	8040
TATCCATCTG	TTAAAAAGAT	TGCCAGCAGA	CGTATTGAAG	AAAACCATCA	AAAACACATT	8100
GGATATCCAT	AAGAGCATAA	CCATCAACAA	CCCAAAGAA	TCAACTGTTA	GTGATACAAA	8160
TGACCATGCC	AAAAATAATG	ATACTACCTG	ACAAATATCC	TTGTAGTATA	ACTTCCATAC	8220
TAATAACAAG	TAGATGTAGA	GTTACTATGT	ATAATCAAAA	GAACACACTA	TATTTCAATC	8280

TGATAAAAGT	TAGATTACAA	AATTTGTTTG	ACAATGATGA	AGTAGCATTG	TTAAAAATAA	180
CATGCTATAC	TGATAAATTA	ATACATTTAA	CTAATGCTTT	GGCTAAGGCA	GTGATACATA	240
CAATCAAAT	GAATGGCATT	GTGTTTGTGC	ATGTTATTAC	AAGTAGTGAT	ATTGCCCCTA	300
ATAATAATAT	TGTAGTAAAA	TCCAATTTCA	CAACAATGCC	AGTACTACAA	AATGGAGGTT	360
ATATATGGGA	AATGATGGAA	TTAACACATT	GCTCTCAACC	TAATGGTCTA	CTAGATGACA	420
ATTGTGAAAT	TAAATTCTCC	AAAAAACTAA	GTGATTCAAC	AATGACCAAT	TATATGAATC	480
AATTATCTGA	ATTACTTGGA	TTTGATCTTA	ATCCATAAAT	TATAATTAAT	ATCAACTAGC	540
AAATCAATGT	CACTAACACC	ATTAGTTAAT	ATAAACTTA	ACAGAAGACA	AAAATGGGGC	600
AAATAAATCA	ATTCAGCCAA	CCCAACCATG	GACACAACCC	ACAATGATAA	TACACCACAA	660
AGACTGATGA	TCACAGACAT	GAGACCGTTG	TCACTTGAGA	CCATAATAAC	ATCACTAACC	720
AGAGACATCA	TAACACACAA	ATTTATATAC	TTGATAAATC	ATGAATGCAT	AGTGAGAAAA	780
CTTGATGAAA	AGCAGGCCAC	ATTACATTC	CTGGTCAACT	ATGAAATGAA	ACTATTACAC	840
AAAGTAGGAA	GCACTAAATA	TAAAAAATAT	ACTGAATACA	ACACAAAATA	TGGCACTTTC	900
CCTATGCCAA	TATTCATCAA	TCATGATGGG	TTCTTAGAAT	GCATTGGCAT	TAAGCCTACA	960
AAGCATACTC	CCATAATATA	CAAGTATGAT	CTCAATCCAT	AAATTTCAAC	ACAATATTCA	1020
CACAATCTAA	AACAACAAC	CTATGCATAA	CTATACTCCA	TAGTCCAGAT	GGAGCCTGAA	1080
AATTATAGTA	ATTTAAAAC	TAAGGAGAGA	TATAAGATAG	AAGATGGGGC	AAATACAACC	1140
ATGGCTCTTA	GCAAAGTCAA	GTTGAATGAT	ACACTCAACA	AAGATCAACT	TCTGTCTATCC	1200



AAAACAACCC	AAATAACCAT	ATGTACTCAC	CGAATCAAAC	ATTCAATGAA	ATCCATTGGA	8340
CCTCTCAAGA	ATTGATTGAC	ACAATTCAAA	ATTTTCTACA	ACATCTAGGT	ATTATTGAGG	8400
ATATATATAC	AATATATATA	TTAGTGTGAT	AACACTCAAT	TCTAACACTC	ACCACATCGT	8460
TACATTATTA	ATCAAAACAA	TTCAAGTTGT	GGGACAAAAT	GGATCCCATT	ATTAATGGAA	8520
ATTCTGCTAA	TGTTTATCTA	ACCGATAGTT	ATTTAAAAGG	TGTTATCTCT	TTCTCAGAGT	8580
GTAATGCTTT	AGGAAGTTAC	ATATTCAATG	GTCCTTATCT	CAAAAATGAT	TATACCAACT	8640
TAATTAGTAG	ACAAAATCCA	TTAATAGAAC	ACATGAATCT	AAAGAACTA	AATATAACAC	8700
AGTCCTTAAT	ATCTAAGTAT	CATAAAGGTG	AAATAAAATT	AGAAGAACCT	ACTTATTTTC	8760
AGTCATTACT	TATGACATAC	AAGAGTATGA	CCTCGTCAGA	ACAGATTGCT	ACCACTAATT	8820
TACTTAAAAA	GATAATAAGA	AGAGCTATAG	AAATAAGTGA	TGTCAAAGTC	TATGCTATAT	8880
TGAATAAACT	AGGGCTTAAA	GAAAAGGACA	AGATTAAATC	CAACAATGGA	CAAGATGAAG	8940
ACAACTCAGT	TATTACGACC	ATAATCAAAG	ATGATATACT	TTCAGCTGTT	AAAGATAATC	9000
AATCTCATCT	TAAAGCAGAC	AAAAATCACT	CTACAAAACA	AAAAGACACA	ATCAAAACAA	9060
CACTCTTGAA	GAAATGATG	TGTTCAATGC	AACATCCTCC	ATCATGGTTA	ATACATTGGT	9120
TTAACTTATA	CACAAAATTA	AACAACATAT	TAACACAGTA	TCGATCAAAT	GAGGTAAAAA	9180
ACCATGGGTT	TACATTGATA	GATAATCAAA	CTCTTAGTGG	ATTTCAATTT	ATTTTGAACC	9240
AATATGGTTG	TATAGTTTAT	CATAAGGAAC	TCAAAAGAAT	TACTGTGACA	ACCTATAATC	9300
AATTCCTTGAC	ATGGAAAGAT	ATTAGCCTTA	GTAGATTAAA	TGTTTGTTTA	ATTACATGGA	9360
TTAGTAACTG	CTTGAACACA	TTAAATAAAA	GCTTAGGCTT	AAGATGCGGA	TTCAATAATG	9420
TTATCTTGAC	ACAACTATTC	CTTTATGGAG	ATTGTATACT	AAAGCTATTT	CACAATGAGG	9480
GGTTCACAT	AATAAAAGAG	GTAGAGGGAT	TTATTATGTC	TCTAATTTTA	AATATAACAG	9540
AAGAAGATCA	ATTCAGAAAA	CGATTTTATA	ATAGTATGCT	CAACAACATC	ACAGATGCTG	9600
CTAATAAAGC	TCAGAAAAAT	CTGCTATCAA	GAGTATGTCA	TACATTATTA	GATAAGACAG	9660
TGTCCGATAA	TATAATAAAT	GGCAGATGGA	TAATTCTATT	AAGTAAGTTC	CTTAAATTAA	9720
TTAAGCTTGC	AGGTGACAAT	AACCTTAACA	ATCTGAGTGA	ACTATATTTT	TTGTTGAGAA	9780
TATTTGGACA	CCCAATGGTA	GATGAAAGAC	AAGCCATGGA	TGCTGTTAAA	ATTAATTGCA	9840
ATGAGACCAA	ATTTTACTTG	TTAAGCAGTC	TGAGTATGTT	AAGAGGTGCC	TTTATATATA	9900
GAATTATAAA	AGGGTTTGTA	AATAATTACA	ACAGATGGCC	TACTTTAAGA	AATGCTATTG	9960
TTTTACCCTT	AAGATGGTTA	ACTTACTATA	AACTAAACAC	TTATCCTTCT	TTGTTGGAAC	10020
TTACAGAAAG	AGATTTGATT	GTGTTATCAG	GACTACGTTT	CTATCGTGAG	TTTCGGTTGC	10080
CTAAAAAAGT	GGATCTTGAA	ATGATTATAA	ATGATAAAGC	TATATCACCT	CCTAAAAATT	10140
TGATATGGAC	TAGTTTCCCT	AGAAATTACA	TGCCATCACA	CATACAAAAC	TATATAGAAC	10200
ATGAAAAATT	AAAATTTTCC	GAGAGTGATA	AATCAAGAAG	AGTATTAGAG	TATTATTTAA	10260
GAGATAACAA	ATTCAATGAA	TGTGATTTAT	ACAACGTGTT	AGTTAATCAA	AGTTATCTCA	10320

ACAACCCTAA	TCATGTGGTA	TCATTGACAG	GCAAAGAAAG	AGAACTCAGT	GTAGGTAGAA	10380
TGTTTGCAAT	GCAACCGGGA	ATGTTTCAGAC	AGGTTCAAAT	ATTGGCAGAG	AAAATGATAG	10440
CTGAAAACAT	TTTACAATTC	TTTCCTGAAA	GTCTTACAAG	ATATGGTGAT	CTAGAACTAC	10500
AAAAAATATT	AGAACTGAAA	GCAGGAATAA	GTAACAAATC	AAATCGCTAC	AATGATAATT	10560
ACAACAATTA	CATTAGTAAG	TGCTCTATCA	TCACAGATCT	CAGCAAATTC	AATCAAGCAT	10620
TTCGATATGA	AACGTCATGT	ATTTGTAGTG	ATGTGCTGGA	TGAACTGCAT	GGTGTACAAT	10680
CTCTATTTTC	CTGGTTACAT	TTAACTATTC	CTCATGTCAC	AATAATATGC	ACATATAGGC	10740
ATGCACCCCC	CTATATAGGA	GATCATATTG	TAGATCTTAA	CAATGTAGAT	GAACAAAGTG	10800
GATTATATAG	ATATCACATG	GGTGGCATCG	AAGGGTGGTG	TCAAAAATA	TGGACCATAG	10860
AAGCTATATC	ACTATTGGAT	CTAATATCTC	TCAAAGGGAA	ATTCTCAATT	ACTGCTTTAA	10920
TTAATGGTGA	CAATCAATCA	ATAGATATAA	GCAAACCAAT	CAGACTCATG	GAAGGTCAA	10980
CTCATGCTCA	AGCAGATTAT	TTGCTAGCAT	TAAATAGCCT	TAAATTAATG	TATAAAGAGT	11040
ATGCAGGCAT	AGGCCACAAA	TTAAAAGGAA	CTGAGACTTA	TATATCACGA	GATATGCAAT	11100
TTATGAGTAA	AACAATTCAA	CATAACGGTG	TATATTACCC	AGCTAGTATA	AAGAAAGTCC	11160
TAAGAGTGGG	ACCGTGGATA	AACACTATAC	TTGATGATTT	CAAAGTGAGT	CTAGAATCTA	11220
TAGGTAGTTT	GACACAAGAA	TTAGAATATA	GAGGTGAAAG	TCTATTATGC	AGTTTAATAT	11280
TTAGAAAATGT	ATGGTTATAT	AATCAGATTG	CTCTACAATT	AAAAAATCAT	GCATTATGTA	11340
ACAATAAACT	ATATTTGGAC	ATATTAAGG	TTCTGAAACA	CTTAAAAACC	TTTTTTAATC	11400
TTGATAAATAT	TGATACAGCA	TTAACATTGT	ATATGAATTT	ACCCATGTTA	TTTGGTGGTG	11460
GTGATCCCAA	CTTGTTATAT	CGAAGTTTCT	ATAGAAGAAC	TCCTGACTTC	CTCACAGAGG	11520
CTATAGTTCA	CTCTGTGTTC	ATACTTAGTT	ATTATACAAA	CCATGACTTA	AAAGATAAAC	11580
TTCAAGATCT	GTCAGATGAT	AGATTGAATA	AGTTCCTAAC	ATGCATAATC	ACGTTTGACA	11640
AAAACCCTAA	TGCTGAATTC	GTAACATTGA	TGAGAGATCC	TCAAGCTTTA	GGGTCTGAGA	11700
GACAAGCTAA	AATTACTAGC	GAAATCAATA	GACTGGCAGT	TACAGAGGTT	TTGAGTACAG	11760
CTCCAAAACA	AATATTCCTC	AAAAGTGCAC	AACATTATAC	TACTACAGAG	ATAGATCTAA	11820
ATGATATTAT	GCAAAATATA	GAACCTACAT	ATCCTCATGG	GCTAAGAGTT	GTTTATGAAA	11880
GTTTACCCTT	TTATAAAGCA	GAGAAAATAG	TAAATCTTAT	ATCAGGTACA	AAATCTATAA	11940
CTAACATACT	GGAAAAAAT	TCTGCCATAG	ACTTAACAGA	TATTGATAGA	GCCACTGAGA	12000
TGATGAGGAA	AAACATAACT	TTGCTTATAA	GGATACTTCC	ATTGGATTGT	AACAGAGATA	12060
AAAGAGAGAT	ATTGAGTATG	GAAAACCTAA	GTATTACTGA	ATTAAGCAA	TATGTTAGGG	12120
AAAGATCTTG	GTCTTTATCC	AATATAGTTG	GTGTTACATC	ACCCAGTATC	ATGTATACAA	12180
TGGACATCAA	ATATACTACA	AGCACTATAT	CTAGTGGCAT	AATTATAGAG	AAATATAATG	12240
TTAACAGTTT	AACACGTGGT	GAGAGAGGAC	CCACTAAACC	ATGGGTTGGT	TCATCTACAC	12300
AAGAGAAAAA	AACAATGCCA	GTTTATAATA	GACAAGTCTT	AACCAAAAAA	CAGAGAGATC	12360

AAATAGATCT	ATTAGCAAAA	TTGGATTGGG	TGTATGCATC	TATAGATAAC	AAGGATGAAT	12420
TCATGGAAGA	ACTCAGCATA	GGAACCCCTG	GGTTAACATA	TGAAAAGGCC	AAGAAATTAT	12480
TTCCACAATA	TTTAAGTGTG	AATTATTTGC	ATCGCCTTAC	AGTCAGTAGT	AGACCATGTG	12540
AATTCCCTGC	ATCAATACCA	GCTTATAGAA	CAACAAATTA	TCACTTTGAC	ACTAGCCCTA	12600
TTAATCGCAT	ATTAACAGAA	AAGTATGGTG	ATGAAGATAT	TGACATAGTA	TTCCAAAAC	12660
GTATAAGCTT	TGGCCTTAGT	TTAATGTCAG	TAGTAGAACA	ATTTACTAAT	GTATGTCCTA	12720
ACAGAATTAT	TCTCATACCT	AAGCTTAATG	AGATACATTT	GATGAAACCT	CCCATATTCA	12780
CAGGTGATGT	TGATATTCAC	AAGTTAAAC	AAGTGATACA	AAAACAGCAT	ATGTTTTTAC	12840
CAGACAAAAT	AAGTTTGACT	CAATATGTGG	AATTATTCTT	AAGTAATAAA	ACACTCAAAT	12900
CTGGATCTCA	TGTTAATTCT	AATTTAATAT	TGGCACATAA	AATATCTGAC	TATTTTCATA	12960
ATACTTACAT	TTTAAGTACT	AATTTAGCTG	GACATTTGGAT	TCTGATTATA	CAACTTATGA	13020
AAGATTCTAA	AGGTATTTTT	GAAAAAGATT	GGGGAGAGGG	ATATATAACT	GATCATATGT	13080
TTATTAATTT	GAAAGTTTTC	TTCAATGCTT	ATAAGACCTA	TCTCTTGTGT	TTTCATAAAG	13140
GTTATGGCAA	AGCAAAGCTG	GAGTGTGATA	TGAACACTTC	AGATCTTCTA	TGTGTATTGG	13200
AATTAATAGA	CAGTAGTTAT	TGGAAGTCTA	TGTCTAAGGT	ATTTTTAGAA	CAAAAAGTTA	13260
TCAAATACAT	TCTTAGCCAA	GATGCAAGTT	TACATAGAGT	AAAAGGATGT	CATAGCTTCA	13320
AATTATGGTT	TCTTAAACGT	CTTAATGTAG	CAGAATTCAC	AGTTTGCCCT	TGGGTTGTTA	13380
ACATAGATTA	TCATCCAACA	CATATGAAAG	CAATATTAAC	TTATATAGAT	CTTGTTAGAA	13440
TGGGATTGAT	AAATATAGAT	AGAATACACA	TTAAAAATAA	ACACAAATTC	AATGATGAAT	13500
TTTATACTTC	TAATCTCTTC	TACATTAATT	ATAACTTCTC	AGATAATACT	CATCTATTAA	13560
CTAAACATAT	AAGGATTGCT	AATCTGAAT	TAGAAAATAA	TTACAACAAA	TTATATCATC	13620
CTACACCAGA	AACCTAGAG	AATATACTAG	CCAATCCGAT	TAAAAGTAAT	GACAAAAAGA	13680
CACTGAATGA	CTATTGTATA	GGTAAAAATG	TTGACTCAAT	AATGTTACCA	TTGTTATCTA	13740
ATAAGAAGCT	TATTAAATCG	TCTGCAATGA	TTAGAACCAA	TTACAGCAAA	CAAGATTTGT	13800
ATAATTTATT	CCCTATGGTT	GTGATTGATA	GAATTATAGA	TCATTCAGGC	AATACAGCCA	13860
AATCCAACCA	ACTTTACACT	ACTACTTCCC	ACCAAATATC	CTTAGTGCAC	AATAGCACAT	13920
CACTTTACTG	CATGCTTCCT	TGGCATCATA	TTAATAGATT	CAATTTTGTA	TTTAGTTCTA	13980
CAGGTTGTAA	AATTAGTATA	GAGTATATTT	TAAAAGATCT	TAAAATTAAT	GATCCCAATT	14040
GTATAGCATT	CATAGGTGAA	GGAGCAGGGA	ATTTATTATT	GCGTACAGTA	GTGGAACCTC	14100
ATCCTGACAT	AAGATATATT	TACAGAAGTC	TGAAAGATTG	CAATGATCAT	AGTTTACCTA	14160
TTGAGTTTTT	AAGGCTGTAC	AATGGACATA	TCAACATTGA	TTATGGTGAA	AATTTGACCA	14220
TTCTTGCTAC	AGATGCAACC	AACAACATTC	ATTGGTCTTA	TTTACATATA	AAGTTTGCTG	14280
AACCTATCAG	TCTTTTTGTC	TGTGATGCCG	AATTGCTGT	AACAGTCAAC	TGGAGTAAAA	14340
TTATAATAGA	ATGGAGCAAG	CATGTAAGAA	AGTGCAAGTA	CTGTTCCCTCA	GTTAATAAAT	14400

```

GTATGTTAAT AGTAAAATAT CATGCTCAAG ATGATATTGA TTTCAAATTA GACAATATAA 14460
CTATATTTAAA AACTTATGTA TGCTTAGGCA GTAAGTTAAA GGGATCGGAG GTTTACTTAG 14520
TCCTTACAAT AGGTCCTGCG AATATATTCC CAGTATTTAA TGTAGTACAA AATGCTAAAT 14580
TGATACTATC AAGAACCAAA AATTCATCA TGCCTAAGAA AGCTGATAAA GAGTCTATTG 14640
ATGCAAATAT TAAAAGTTTG ATACCCTTTC TTTGTTACCC TATAACAAAA AAAGGAATTA 14700
ATACTGCATT GTCAAAACATA AAGAGTGTTG TTAGTGGAGA TATACTATCA TATTCTATAG 14760
CTGGACGTAA TGAAGTTTTT AGCAATAAAC TTATAAATCA TAAGCATATG AACATCTTAA 14820
AATGGTTCAA TCATGTTTTA AATTCAGAT CAACAGAACT AAACATAAC CATTTATATA 14880
TGGTAGAATC TACATATCCT TACCTAAGTG AATTGTTAAA CAGCTTGACA ACCAATGAAC 14940
TTAAAAAACT GATTAAAATC ACAGGTAGTC TGTATACAA CTTTCATAAT GAATAATGAA 15000
TAAAGATCTT ATAATAAAAA TTCCCATAGC TATACACTAA CACTGTATTC AATTATAGTT 15060
ATTAAAAATT AAAAAATCATA TAATTTTTTA AATAACTTTT AGTGAACATA TCCTAAAGTT 15120
ATCATTTTTA TCTTGAGGGA ATAAATTTAA ACCCTAATCT AATTGGTTTA TATGTGTATT 15180
AACTAAATTA CGAGATATTA GTTTTTGACA CTTTTTTTCT CGT 15223

```

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

재조합 RSV 계놈 또는 안티계놈, 뉴클레오텍시드 단백질(N), 뉴클레오텍시드 인산단백질(P), 큰 폴리머라제 단백질(L), 및 RNA 폴리머라제 연장 인자를 포함하는 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 RNA 폴리머라제 연장인자가 RSV의 M2(ORF1)단백질인 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 서브바이러스 입자인 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 바이러스인 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, RSV 안티계놈이 포함된 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 재조합 RSV 안티계놈이 포함된 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 7

제3항에 있어서, RSV 계놈이 포함된 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 재조합 RSV 계놈이 포함된 분리된 감염성 RSV 입자.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 사람의 RSV인 분리된 감염성 RSV 바이러스.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 소 또는 쥐의 RSV인 분리된 감염성 RSV 바이러스.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 20이상의 다른 RSV 계놈의 키메라인 계놈 또는 안티계놈을 가지는 분리된 감염성 RSV.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 키메라 계놈 또는 안티계놈이 사람 및 소의 RSV유래의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 분리된 감염성 RSV 바이러스.

#### 청구항 13

RSV 계놈 또는 안티계놈을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 및 N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자를 코드하는 하나이상의 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 발현벡터를 세포

또는 무세포 용해물에서 함께 발현하여 감염성 RSV 입자를 제조하는 것을 포함하는, RSV를 코드하는 하나 이상의 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자로 부터 감염성 RSV입자를 제조하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈 및 N, P, L 및 RNA 폴리머라제의 연장인자 단백질을 동일한 발현벡터에 의해 발현하는 방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 발현벡터 및 N, P, L 및 RNA 폴리머라제의 연장인자 단백질을 코드하는 발현벡터가 다른 방법.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, N, P, L 및 RNA 폴리머라제의 연장인자 단백질이 2이상의 다른 발현벡터에서 코드되는 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, N, P, L 및 RNA 폴리머라제의 연장인자 단백질이 각각 다른 발현벡터에서 코드되는 방법.

#### 청구항 18

제13항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자가 cDNA인 방법.

#### 청구항 19

제13항에 있어서, 감염성 RSV 입자가 바이러스인 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자가 사람, 소, 또는 쥐의 RSV 서열에서 유래한 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자가 사람의 RSV균주 서열 및 적어도 하나의 사람이외의 RSV 서열로된 키메라인 방법.

#### 청구항 22

제13항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자가 야생형 RSV균주의 서열을 코드하는 방법.

#### 청구항 23

제13항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 분자가 뉴클레오타이드의 삽입, 재배열, 결실 또는 치환에 의해 야생형 RSV 균주를 변형시킨 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기의 변형이 표현형의 변화를 코드하는 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 분자가 사람이외의 RSV의 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 방법.

#### 청구항 26

제24항에 있어서, 상기의 표현형 변화의 결과가 악화, 온도-민감성, 저온-적응성, 작은 크기의 플라크 (PLAQUE) 또는 숙주범위의 제한인 방법.

#### 청구항 27

제23항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 사람이외의 RSV 바이러스의 게놈 또는 안티게놈을 코드하거나, 또는 사람이외의 RSV와 사람이나 사람이외의 기원인 적어도 하나의 다른 RSV의 키메라인 방법.

#### 청구항 28

제13항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 분자가 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형된 RSV 사람 백신 균주의 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 방법.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 상기의 변형이 표현형의 변화를 코드하는 방법.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 상기의 표현형 변화의 결과가 악화, 온도-민감성, 저온-적응성, 작은 크기의 플라크 (PLAQUE) 또는 숙주범위의 제한인 방법.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 상기의 표현형의 변화가 RSV의 면역성 에피토프를 변화시키는 방법.

**청구항 32**

제23항에 있어서, 사이토킨 또는 T-헬퍼 에피토프를 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입하여 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 변화시키는 방법.

**청구항 33**

제23항에 있어서, 제한효소 자리 표지를 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입하여 RSV균주의 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 변화시키는 방법.

**청구항 34**

제23항에 있어서, 상기의 RSV균주의 G단백질과는 다른 RSV 서브그룹의 G단백질을 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입하여 RSV균주의 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 변화시키는 방법.

**청구항 35**

제23항에 있어서, 보호면역반응을 제거할 수 있는 미생물 병원체의 단백질을 코드하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입하여 RSV균주의 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 변화시키는 방법.

**청구항 36**

제13항에 있어서, RSV와 함께 감염하여 적어도 하나의 바이러스 단백질을 공급하는 방법.

**청구항 37**

RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 및 N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자를 코드하는 하나이상의 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 발현벡터를 포함하고, 상기 발현벡터들이 발현됨으로써 상기 RSV 게놈 또는 안티게놈 및 N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자 단백질이 결합되어 감염성 RSV 입자를 생산하는 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 38**

제37항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈 및 N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자 단백질을 동일한 발현벡터에 의해 코드하는 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 39**

제37항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 발현벡터와 N, P, L, RNA폴리머라제의 연장인자 단백질을 코드하는 발현벡터가 다른 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 40**

제37항에 있어서, N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자 단백질을 2이상의 발현벡터에 의해 코드하는 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 41**

제40항에 있어서, N, P, L 및 RNA폴리머라제의 연장인자 단백질을 각각 다른 발현벡터에 의해 코드하는 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 42**

제37항에 있어서, 감염성 RSV 입자가 바이러스인 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 43**

제37항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 분자가 사람, 소 또는 쥐의 RSV 서열인 세포 또는 무세포 용해물.

**청구항 44**

작동가능하게 연결된 전사 프로모터, RSV 게놈 또는 안티게놈 및 전사 종결인자(terminator)를 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

**청구항 45**

제44항에 있어서, RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 사람의 RSV 서열인 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

**청구항 46**

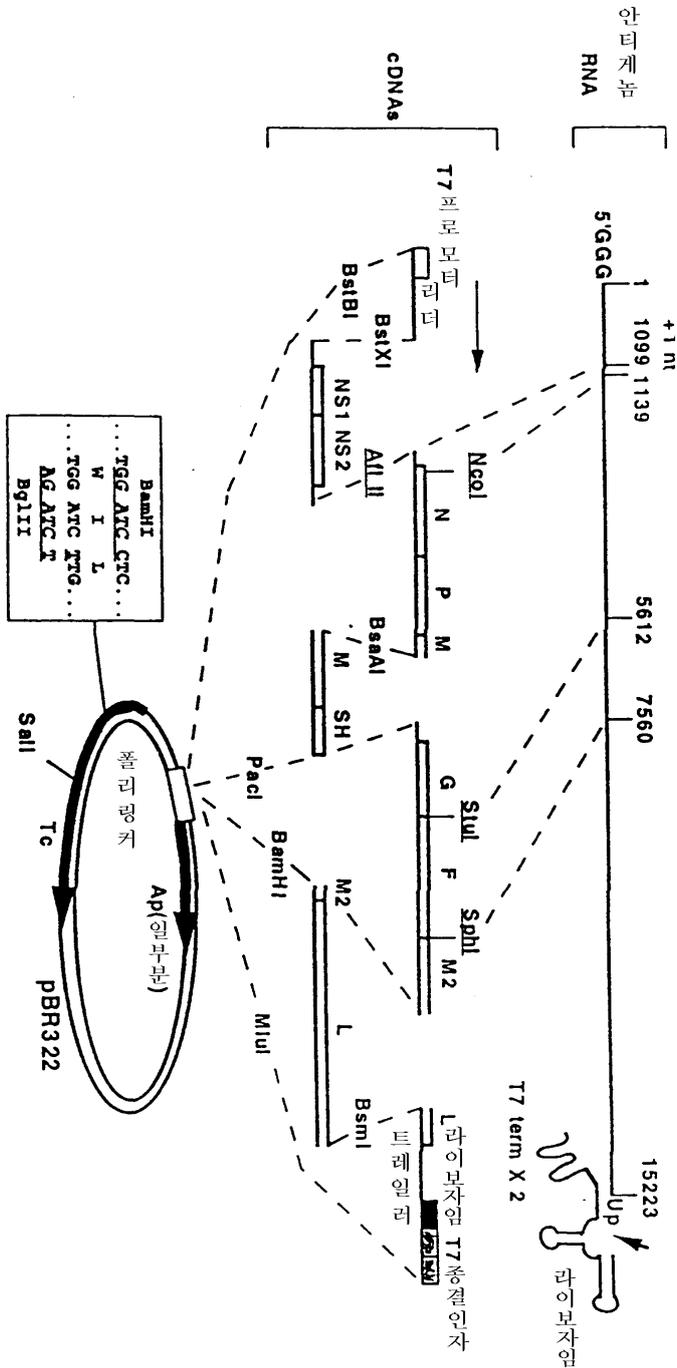
제45항에 있어서, 사람의 RSV 게놈 또는 안티게놈을 코드하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 SEQ ID NO:1인 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 47

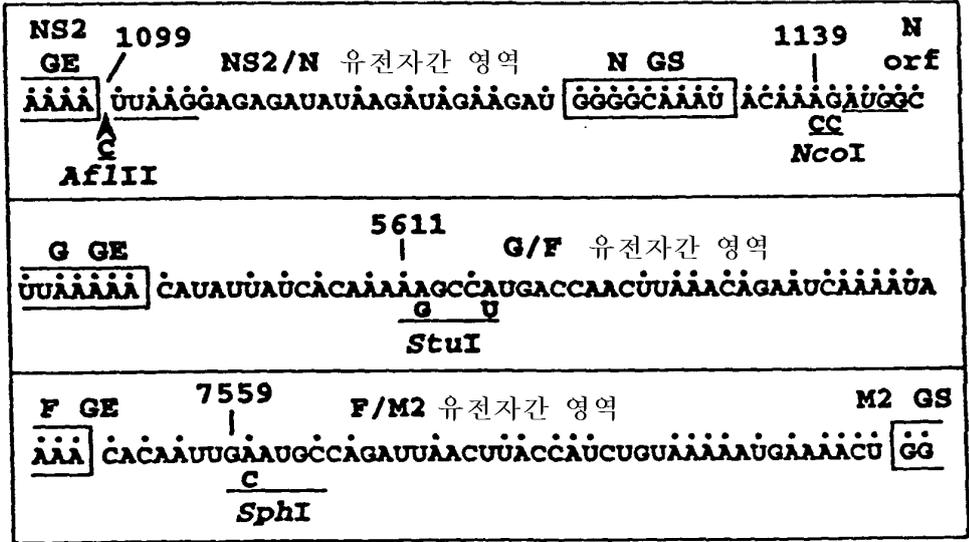
제44항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 사람이외의 RSV 바이러스의 게놈 또는 안티게놈을 코드하거나, 또는 사람이외의 RSV와 사람이나 사람이외의 기원인 적어도 하나의 다른 RSV의 키메라인 분리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

도면

도면1A



도면 1B



도면2

