



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-101162

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO 1. ATENUACIÓN SINERGISTICA DE VIRUS
DE ESTOMATITIS VESICULAR, VECTORES DE
ESTOS Y COMPOSICIONES"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/86

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUOVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P. 20281

22. BOGOTÁ, D. C., OCTUBRE 06, 2006

PETITORIO

00001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-101162- -00000-0000
Fec 2006-10-06 16:22:13 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTE/II
Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION
Folios: 273

radicación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

09-Nov-06

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio. Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono.

Fax

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C

☐

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre. ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono 634 1500

Fax 376 2211

E-Mail: office bogota@bakemel.com

IDENTIFICACION

C C

☒ X

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

79 143 366 de

Us acuéñ

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre CLARKE, David Kirkwood, HENDRY, Roger Michael, UDEM, Stephen A y PARKS, Chnstopher Lee

Dirección 3205 Whisperng Hills, Chester, NY 10918, Estados Unidos de América; 6 Vista Court, Warwick, NY 10990, Estados Unidos de América, 155 West 70th Street, Apt 6F/G, NY10023, Estados Unidos de América y 118 South Terrace, Boonton, NJ 07005 Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio Estadounidenses

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No PCT/US2005/011499

Fecha 05/04/2005

Publicación Internacional No. WO 2005/098009

Fecha 20/10/2005

⑥

Título (54)

ATENUACIÓN SINERGÍSTICA DE VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR, VECTORES DE ESTOS Y COMPOSICIONES

INMUNOGÉNICAS DE ESTOS

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/86

⑧

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐

(33) País de Ongen

US

US

(32) Fecha

09/04/2004

19/01/2005

(31) Número de Solicitud

60/561,214

60/644,902

⑨

Comprobante de pago No

6-64875

Fecha 24-AGO-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

00002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Opinión Escrita, Notificación de presentación de prondad, Modificación a las Reivindicaciones, Extractos

11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA

C.C.

79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-101162- -00000-0000
Fec: 2006-10-06 18:22:13 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEIYI
Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 273

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

BO OFICIAL DE CAJA : 06 - 64.875
FECHA : AGOSTO 24 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAUL BECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49367693	24/08/2006	65,767,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau**



(43) International Publication Date
20 October 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/098009 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/86

NY 10023 (US) PARKS, Christopher, Lee [US/US], 118
South Terrace, Boonton, NJ 07005 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/011499

(74) Agent: **BRAZIL, BILL, T.**, Wyeth, Patent Law Department,
Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US)

(22) International Filing Date: 5 April 2005 (05.04.2005)

(81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(25) Filing Language: English

(26) **Publication Language:** English

(30) Priority Data:		
60/561,214	9 April 2004 (09.04 2004)	US
60/644,902	19 January 2005 (19.01 2005)	US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US], Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US)

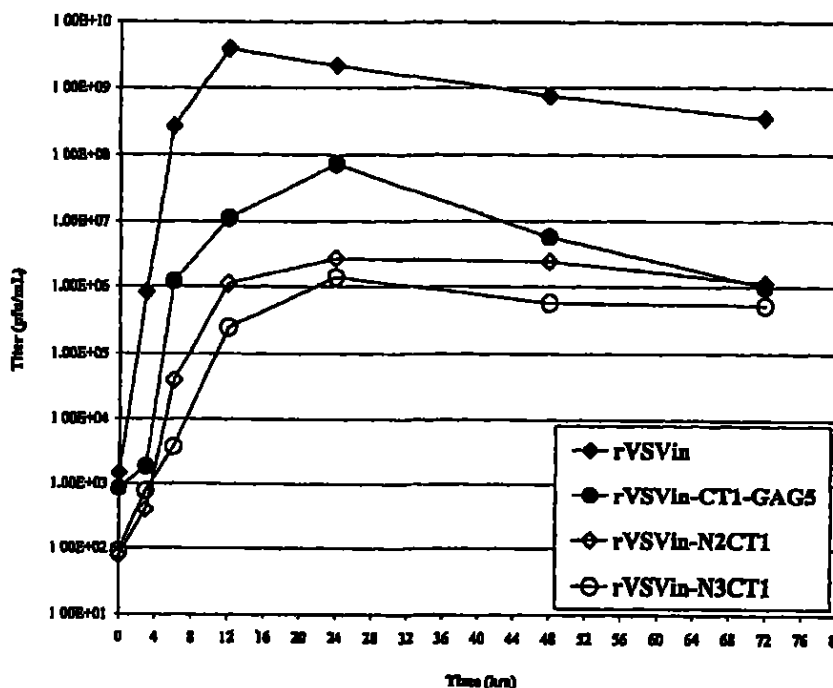
(72) Inventors; and

(75) **Inventors/Applicants (for US only):** CLARKE, David, Kirkwood [US/US], 3205 Whispering Hills, Chester, NY 10918 (US) HENDRY, Roger, Michael [US/US], 6 Vista Court, Warwick, NY 10990 (US) UDEM, Stephen, A. [US/US], 155 West 70th Street, Apt. 6F/G, New York.

(84) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: SYNERGISTIC ATTENUATION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VECTORS THEREOF AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS THEREOF



(57) Abstract: The present invention broadly relates to the synergistic attenuation of vesicular stomatitis virus (VSV). More particularly, the invention relates to the identification of combined mutation classes which synergistically attenuate the pathogenicity of VSV vectors in mammals and immunogenic compositions thereof.

Declarations under Rule 4.17:

- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4 17(iii)) for all designations*

Published:

- (88) Date of publication of the international search report:**
29 December 2005

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



(43) International Publication Date
20 October 2005 (20.10.2005)

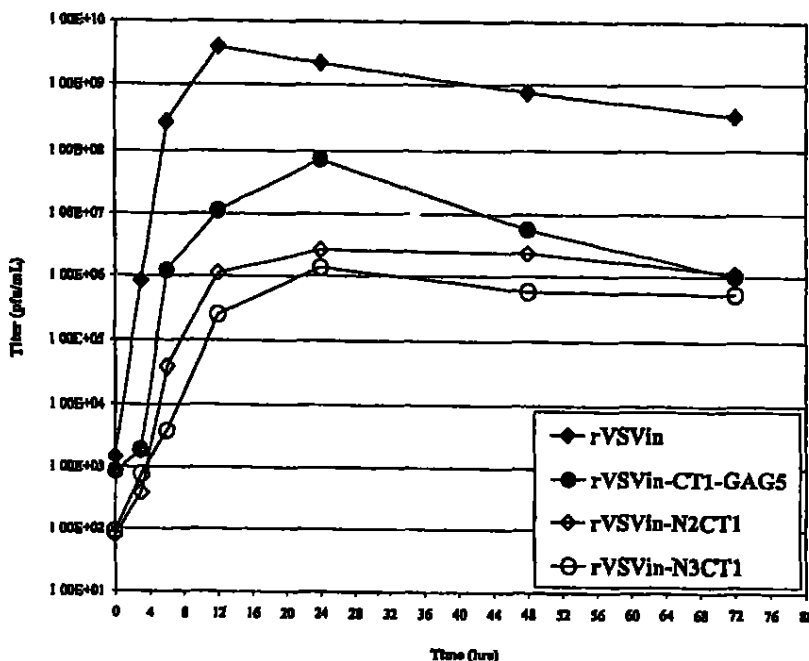
PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/098009 A2

- (51) **International Patent Classification⁷:** C12N 15/86
NY 10023 (US) PARKS, Christopher, Lee [US/US], 118 South Terrace, Boonton, NJ 07005 (US)
- (21) **International Application Number:** PCT/US2005/011499
(74) **Agent:** BRAZIL, Bill, T., Wyeth, Patent Law Department, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US)
- (22) **International Filing Date:** 5 April 2005 (05.04.2005)
(81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
60/561,214 9 April 2004 (09 04 2004) US
60/644,902 19 January 2005 (19.01 2005) US
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** WYETH [US/US], Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US)
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants (for US only):** CLARKE, David, Kirkwood [US/US], 3205 Whispering Hills, Chester, NY 10918 (US) HENDRY, Roger, Michael [US/US], 6 Vista Court, Warwick, NY 10990 (US). UDEM, Stephen, A. [US/US], 155 West 70th Street, Apt. 6F/G, New York,
- (84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: SYNERGISTIC ATTENUATION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VECTORS THEREOF AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS THEREOF



(57) Abstract: The present invention broadly relates to the synergistic attenuation of vesicular stomatitis virus (VSV). More particularly, the invention relates to the identification of combined mutation classes which synergistically attenuate the pathogenicity of VSV vectors in mammals and mrPWNogenic compositions thereof.

WO 2005/098009 A2

SYNERGISTIC ATTENUATION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VECTORS THEREOF AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The present invention generally relates to the fields of virology, microbiology, infectious disease and immunology. More particularly, the invention relates to the synergistic attenuation of vesicular stomatitis virus and vectors thereof, by combination of different classes of mutation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Vesicular stomatitis virus (VSV), a member of the Rhabdoviridae family, has a non-segmented, negative-sense, single-stranded RNA genome. Its eleven kb genome has five genes which encode five structural proteins of the virus; the nucleocapsid protein (N), which is required in stoichiometric amounts for encapsidation of the replicated RNA; the phosphoprotein (P), which is a cofactor of the RNA-dependent RNA polymerase (L); the matrix protein (M) and the attachment glycoprotein (G) (e.g., see Gallione et al. 1981, Rose and Gallione, 1981; Rose and Schubert, 1987 and Schubert et al., 1985; U.S. Patent 6,033,886; U.S. Patent 6,168,943).

VSV is an arthropod borne virus that can be transmitted to a variety of mammalian hosts, most commonly cattle, horses, swine and rodents. VSV infection of humans is uncommon, and in general is either asymptomatic or characterized by mild flu-like symptoms that resolve in three to eight days without complications. Because VSV is not considered a human pathogen, and pre-existing immunity to VSV is rare in the human population, the development of VSV derived vectors has been a focus in areas such as immunogenic compositions and gene therapy. For

example, studies have established that VSV can serve as a highly effective vector for immunogenic compositions, expressing influenza virus haemagglutinin (Roberts *et al.*, 1999), measles virus H protein (Schlereth *et al.*, 2000) and HIV-1 env and gag proteins (Rose *et al.*, 2001). Other characteristics of VSV that render it an attractive
5 vector include: (a) the ability to replicate robustly in cell culture; (b) the inability to either integrate into host cell DNA or undergo genetic recombination; (c) the existence of multiple serotypes, allowing the possibility for prime-boost immunization strategies; (d) foreign genes of interest can be inserted into the VSV genome and expressed abundantly by the viral transcriptase; and (e) the development of a highly
10 specialized system for the rescue of infectious virus from a cDNA copy of the virus genome (U.S. Patent 6,033,886; U.S. Patent 6,168,943).

Although there is little evidence of VSV neurological involvement during natural infection, animals (*e.g.*, primates, rodents, herd animals) that are inoculated intracerebrally (and in the case of rodents intranasally) with wild-type virus, mouse
15 brain passaged wild-type virus or cell culture adapted wild-type virus, can develop clinical signs of disease, and usually die two to eight days post inoculation. Because of these observations, and the need to produce a vector for immunogenic compositions for use in humans that has an exceptional safety profile, VSV vectors under development are tested in stringent, primate and small animal neurovirulence
20 models. These tests are designed to detect any residual virulence in attenuated VSV vectors before consideration for advancement to human clinical trials.

The attenuation of prototypic-VSV vectors resulted from the accumulation of multiple nucleotide substitutions throughout the virus genome during serial passage *in vitro* and the synthesis and assembly of the genome cDNA. These mutations had
25 pleiotropic effects that rendered the virus less pathogenic in mice than the lab-adapted virus from which it was derived (*e.g.*, see Roberts *et al.*, 1998). Prototypic further attenuated VSV vectors were also developed by truncation of the cytoplasmic tail region of the virus G protein, leading to VSV mutants that were defective in budding from the plasma membrane of infected cells (Schnell *et al.*, 1998).

30 Currently known VSV vectors, putatively attenuated or not, have had unacceptable levels of residual virulence when tested in small animal and non-human primate neurovirulence models. The development of a VSV vector for uses such as a vector for immunogenic compositions, a gene therapy vector and the like,

will require VSV vectors having minimal to non-detectable levels of pathogenicity in animal neurovirulence models. Thus, there is presently a need in the art of viral vectors to identify genetically modified, attenuated VSV mutants having significantly reduced (or eliminated) pathogenicity in mammals.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention broadly relates to the synergistic attenuation of vesicular stomatitis virus (VSV). More particularly, the invention relates to the identification of combined mutation classes which synergistically attenuate the pathogenicity of VSV vectors in mammals and immunogenic compositions thereof.

10

Thus, in certain embodiments, the invention is directed to a genetically modified VSV comprising at least two different classes of mutations in its genome, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity. In one particular embodiment, VSV pathogenicity is further defined as neurovirulence. In another embodiment, the classes of mutations are a temperature-sensitive (ts) mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

15

In one particular embodiment, the two VSV mutations are a truncated G gene mutation (hereinafter, "G_(α)") and a N gene shuffling mutation (that is, the N gene is moved away from its wild-type 3' promoter-proximal first position, to a more distal position in the gene order of VSV). In another embodiment, the VSV G protein encoded by the truncated G gene has a deletion in the last twenty carboxy-terminal amino acids (hereinafter, "G_(α-8)"). In yet another embodiment, the VSV G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids (hereinafter, "G_(α-1)"). In still another embodiment, the VSV N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G is the gene encoding the attachment glycoprotein and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein. In certain embodiments, the VSV comprises a mutated genome of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-8)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' or 3'-PMNG_(α-8)L-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is

20

25

30

00011

the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, $G_{(ct-1)}$ is the gene encoding the attachment glycoprotein having a cytoplasmic tail region consisting of one amino acid, $G_{(ct-9)}$ is the gene encoding the attachment glycoprotein having a cytoplasmic tail region consisting of nine amino acids and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein. In one particular embodiment, the mutated VSV genome is 3'-PMNG $_{(ct-1)}$ L-5'. In another particular embodiment, the mutated VSV genome is 3'-PNMG $_{(ct-1)}$ L-5'. In another embodiment, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an ambisense RNA mutation, a G-stem mutation, a G gene insertion, a gene deletion or a non-cytopathic M gene mutation.

In certain embodiments, the modified VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In certain other embodiments, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 1,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In still other embodiments, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 10,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In yet other embodiments, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.

In other embodiments of the invention, the two VSV mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation. In certain embodiments, the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid ($G_{(ct-1)}$) or a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids ($G_{(ct-9)}$). In other embodiments, the M gene non-cytopathic mutation (hereinafter, " $M_{(ncp)}$ ") is a mutation of methionine to alanine at position 33 (M33A) and a mutation of methionine to alanine at position 51 (M51A) of the M protein. In one particular embodiment, the VSV comprises a mutated genome of 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-1)}$ L-5' or 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-9)}$ L-5'. In another embodiment, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, an ambisense RNA mutation, a gene shuffling mutation, a gene deletion

mutation, a gene insertion mutation, a G gene insertion mutation, a G-stem mutation or a point mutation.

As set forth below in Section A.3, a ts mutation of any one the VSV G, M, N, P or L genes is a separate "mutation class" of the invention. Thus, in certain
 5 embodiments of the invention, the two VSV mutations are a ts N gene mutation (hereinafter, "N_(ts)") and a ts L gene mutation (hereinafter, "L_(ts)"). In one particular embodiment, the VSV comprises a mutated genome of 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'. In certain other embodiments, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-
 10 stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation or a gene deletion mutation.

In certain embodiments, the two VSV mutations are a G-stem mutation (hereinafter, "G_(stem)") and a gene shuffling mutation. In other embodiments, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a
 15 point mutation, a ts mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

In another embodiment, the invention is directed to a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and
 20 at least one foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity. As defined hereinafter, a "foreign RNA" sequence is any polynucleotide sequence which is not endogenous to genome of wild-type VSV. In one particular embodiment, vector pathogenicity is
 25 further defined as neurovirulence. In certain other embodiments, the foreign RNA is defined as an open reading frame (ORF). In certain other embodiments, the classes of mutations are selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene
 30 insertion mutation and a gene deletion mutation.

In one particular embodiment, the two VSV vector mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation. In another embodiment, the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-

terminal amino acids or a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids. In certain other embodiments, the N gene VSV vector is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5'. In one particular embodiment, the VSV vector comprises a mutated genome of 3'-
 5 PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-9)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-5'. In one particular embodiment, the mutated vector genome is 3'-PMNG_(α-1)L-5'. In another embodiment, the mutated vector genome is 3'-PNMG_(α-1)L-5'.

In yet other embodiments, the VSV vector further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an
 10 ambisense RNA mutation, a G-stem mutation, a G gene insertion mutation, a gene deletion mutation or a non-cytopathic M gene mutation. In certain other embodiments, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In still other embodiments, the modified VSV
 15 injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 1,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In yet other embodiments, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 10,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice. In another
 20 embodiment, the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.

In certain other embodiments, the foreign RNA inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication is selected from the group
 25 consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella
 30 virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholera* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a

Neisseria gonorrhoeae gene, a *Corynebacteria diphtheria* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a cytokine gene, a T-helper epitope, a CTL epitope, an adjuvant gene and a co-factor gene. In one particular embodiment, the foreign RNA is a HIV gene selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* and *vpu*. In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one or at position five. In particular embodiments, the genome of the mutated VSV vector is 3'-*gag*₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-9)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-*gag*₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-*gag*₅-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-*gag*₅-5'.

In another embodiment, the foreign RNA expresses a tumor specific antigen or tumor-associated antigen, for induction of a protective immune response against a tumor (e.g., a malignant tumor). Such tumor-specific or tumor-associated antigens include, but are not limited to, KS 1/4 pan-carcinoma antigen; ovarian carcinoma antigen (CA125); prostatic acid phosphate; prostate specific antigen; melanoma-associated antigen p97; melanoma antigen gp75; high molecular weight melanoma antigen and prostate specific membrane antigen.

In certain other embodiments, the two VSV vector mutations are a G_(α) mutation and a M_(nsp) mutation. In certain embodiments, the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid (G_(α-1)) or a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids (G_(α-9)). In yet other embodiments, the M_(nsp) mutation is a mutation of methionine to alanine at position 33 (M33A) and a mutation of methionine to alanine at position 51 (M51A) of the M protein.. In one particular embodiment, the mutated genome is 3'-NPM_(nsp)G_(α-1)L-5' or 3'-NPM_(nsp)G_(α-9)L-5'. In another embodiment, the vector further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In certain embodiments, the VSV vector comprises an HIV gene selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*. In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-

00015

$\text{NPM}_{(\text{nep})}\text{G}_{(\text{ct-1})}\text{L-5'}$, $3'\text{-gag}_1\text{-NPM}_{(\text{nep})}\text{G}_{(\text{ct-9})}\text{L-5'}$, $3'\text{-NPM}_{(\text{nep})}\text{G}_{(\text{ct-1})}\text{L-gag}_5\text{-5'}$ or $3'\text{-NPM}_{(\text{nep})}\text{G}_{(\text{ct-9})}\text{L-gag}_5\text{-5'}$.

In still other embodiments, the two VSV vector mutations are a $\text{N}_{(\text{ts})}$ gene mutation and a $\text{L}_{(\text{ts})}$ gene mutation. In one particular embodiment, the vector
 5 comprises a mutated genome of $3'\text{-N}_{(\text{ts})}\text{PMGL}_{(\text{ts})}\text{-5'}$. In other embodiments, the vector further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In certain
 10 embodiments, the VSV vector comprises an HIV gene selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*. In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the mutated genome is $3'\text{-gag}_1\text{-N}_{(\text{ts})}\text{PMGL}_{(\text{ts})}\text{-5'}$ or $3'\text{-N}_{(\text{ts})}\text{PMGL}_{(\text{ts})}\text{-gag}_5\text{-5'}$.

As set forth below in Section A.1, the insertion of a foreign nucleic acid
 15 sequence (e.g., HIV *gag*) into the VSV genome 3' to any of the N, P, M, G or L genes effectively results in a "gene shuffling mutation". Thus, in certain embodiments, the two VSV vector mutations are $\text{G}_{(\text{stem})}$ mutation and a gene shuffling mutation. In one embodiment, the mutated vector genome is $3'\text{-gag}_1\text{-NPMG}_{(\text{stem})}\text{L-5'}$. In other embodiments, the VSV vector further comprises a third
 20 class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a *ts* mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

In another embodiment, the invention is directed to an immunogenic
 25 composition comprising an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity. In another embodiment, the classes of
 30 mutations are selected from the group consisting of a *ts* mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

00016

In certain embodiments, the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation. In particular embodiments, the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid ($G_{(\alpha-1)}$) or a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids ($G_{(\alpha-9)}$). In still other embodiments, the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5'. In certain embodiments, the VSV vector of the immunogenic composition comprises a mutated genome of 3'-PNMG $_{(\alpha-1)}$ L-5', 3'-PNMG $_{(\alpha-9)}$ L-5', 3'-PMNG $_{(\alpha-1)}$ L-5' or 3'-PMNG $_{(\alpha-9)}$ L-5'. In one particular embodiment, the mutated vector genome of the immunogenic composition is 3'-PMNG $_{(\alpha-1)}$ L-5'. In another embodiment, the mutated vector genome is 3'-PNMG $_{(\alpha-1)}$ L-5'. In other embodiments, the VSV vector of the immunogenic composition further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, an ambisense RNA mutation, a point mutation, a G-stem mutation, a G gene insertion mutation, a gene deletion mutant or a non-cytopathic M gene mutation.

In certain other embodiments, the foreign RNA inserted into the genetically modified VSV vector of the immunogenic composition is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholera* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheria* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a cytokine gene, a T-helper epitope, a CTL epitope, an adjuvant gene and a co-factor gene. In one particular embodiment, the foreign RNA encodes a HIV protein selected from the group consisting of gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev and vpu. In one particular embodiment, the HIV gene is gag, wherein the gag gene is inserted into the VSV genome at position one or at

position five of the genome. In another embodiment, the VSV vector of the immunogenic composition comprises a mutated genome of 3'-gag₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-9)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-gag₅-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-gag₅-5'.

- 5 In certain other embodiments, the VSV vector of the immunogenic composition comprises a G_(α) mutation and a M_(ncp) mutation. In another embodiment, the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid (G_(α-1)) or a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids (G_(α-9)). In another embodiment, the M_(ncp) mutation is a mutation of methionine to alanine at position 33 (M33A) and a mutation of methionine to alanine at position 51 (M51A) of the M protein.. In one particular embodiment, the immunogenic composition comprises a mutated VSV genome of 3'-NPM_(ncp)G_(α-1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α-9)L-5'. In yet other embodiments, the VSV vector of the immunogenic composition further comprises a third class of mutation in its genome,
- 10 where the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In yet other embodiments, the foreign RNA inserted into the genetically modified VSV vector of the immunogenic composition is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an Influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene,
- 15 a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor. In certain embodiments, the HIV gene is selected from the group consisting of gag, env, pol,
- 20
- 25
- 30

00018

vif, nef, tat, vpr, rev or *vpu*. In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(α-8)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(α-1)L-*gag*₅-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α-8)L-*gag*₅-5'.

In certain other embodiments, the immunogenic composition comprises a N_(ns) gene mutation and a L_(ns) gene mutation. In one particular embodiment, the immunogenic composition comprises a mutated VSV genome of 3'-N_(ns)PMGL_(ns)-5'. In other embodiments, the immunogenic composition further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation. In yet other embodiments, the foreign RNA inserted into the genetically modified VSV vector of the immunogenic composition is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor. In certain embodiments, the HIV gene is selected from the group consisting of *gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev* or *vpu*. In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-N_(ns)PMGL_(ns)-5' or 3'-N_(ns)PMGL_(ns)-*gag*₅-5'.

In certain other embodiments, the immunogenic composition comprises a G_(stem) mutation and a gene shuffling mutation. In one particular embodiment, the immunogenic composition comprises a mutated genome of 3'-*gag*₁-NPMG_(stem)L-5'. In other embodiments, the immunogenic composition further comprises a third class

00019

of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a ts mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

5 In still another embodiment, an immunogenic composition of the invention is administered by any conventional route selected from the group consisting of intravenous, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, oral, rectal, intranasal, buccal, vaginal and *ex vivo*.

10 In another embodiment, the invention is directed to a method of immunizing a mammalian subject against HIV infection comprising administering to the subject an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one HIV RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV
15 pathogenicity and the HIV RNA encodes an antigen selected from the group consisting gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev and vpu. In certain embodiments, the VSV vector is 3'-gag₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-9)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(α-9)L-gag₅-5', 3'-gag₁-NPM_(nsp)G_(α-1)L-5', 3'-gag₁-NPM_(nsp)G_(α-9)L-5',
20 3'-NPM_(nsp)G_(α-1)L-gag₅-5', 3'-NPM_(nsp)G_(α-9)L-gag₅-5', 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' or 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-gag₅-5'.

In certain other embodiments, the invention is directed to a method of immunizing a mammalian host against bacterial infection comprising administering an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising (a) at least
25 two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity and
30 (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA encodes a bacterial protein selected from the group consisting of a *Vibrio cholerae* protein, a *Streptococcus pneumoniae* protein, *Streptococcus pyogenes* protein, a *Streptococcus agalactiae*

protein, a *Helicobacter pylori* protein, a *Neisseria meningitidis* protein, a *Neisseria gonorrhoeae* protein, a *Corynebacteria diphtheriae* protein, a *Clostridium tetani* protein, a *Bordetella pertussis* protein, a *Haemophilus* protein, a *Chlamydia* protein and a *Escherichia coli* protein.

5 In one particular embodiment, the two mutations are a $G_{(\alpha)}$ mutation and a N gene shuffling mutation. In certain embodiments, the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid ($G_{(\alpha-1)}$) or a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids $G_{(\alpha-9)}$. In certain other
 10 embodiments, the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5'. In other embodiments, the mutated VSV genome is 3'-PNMG $_{(\alpha-1)}$ L-5', 3'-PNMG $_{(\alpha-9)}$ L-5', 3'-PMNG $_{(\alpha-1)}$ L-5' or 3'-PMNG $_{(\alpha-9)}$ L-5'. In one particular embodiment, the mutated genome is 3'-PMNG $_{(\alpha-1)}$ L-5' or 3'-PNMG $_{(\alpha-1)}$ L-5'.

15 In other embodiments, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a G-stem mutation, a G gene insertion mutation, a gene insertion mutation or a non-cytopathic M gene mutation.

In another embodiment, the invention is directed to a method of immunizing a mammalian host against viral infection comprising administering an immunogenic
 20 dose of a genetically modified VSV vector comprising (a) at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two
 25 mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity and (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA encodes a viral protein selected from the group consisting of a HIV protein, a HTLV protein, a SIV protein, a RSV protein, a PIV protein, a HSV protein, a CMV protein, an Epstein-Barr virus protein, a Varicella-Zoster virus protein, a mumps virus protein, a measles virus protein, an influenza
 30 virus protein, a poliovirus protein, a rhinovirus protein, a hepatitis A virus protein, a hepatitis B virus protein, a hepatitis C virus protein, a Norwalk virus protein, a togavirus protein, an alphavirus protein, a rubella virus protein, a rabies virus protein,

a Marburg virus protein, an Ebola virus protein, a papilloma virus protein, a polyoma virus protein, a metapneumovirus protein and a coronavirus protein. In one particular embodiment, the RNA is a HIV gene selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.

5 In certain embodiments, the two mutations are a $G_{(ct)}$ mutation and a N gene shuffling mutation. In one particular embodiment, the mutated VSV genome is 3'-PNMG $_{(ct-1)}$ L-5', 3'-PNMG $_{(ct-9)}$ L-5', 3'-PMNG $_{(ct-1)}$ L-5' or 3'-PMNG $_{(ct-9)}$ L-5'. In another embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one or at position five, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-
10 PNMG $_{(ct-1)}$ L-5', 3'-gag₁-PNMG $_{(ct-9)}$ L-5', 3'-gag₁-PMNG $_{(ct-1)}$ L-5', 3'-gag₁-PMNG $_{(ct-9)}$ L-5', 3'-PNMG $_{(ct-1)}$ L-gag₅-5', 3'-PNMG $_{(ct-9)}$ L-gag₅-5', 3'-PMNG $_{(ct-1)}$ L-gag₅-5' or 3'-PMNG $_{(ct-9)}$ L-gag₅-5'. In another embodiment, the VSV further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a G-stem mutation, s G gene
15 insertion mutation, a gene insertion mutation or a non-cytopathic M gene mutation.

In other embodiments of the method of immunizing a mammalian host against viral infection, the two VSV mutations are a $G_{(ct)}$ mutation and $M_{(ncp)}$ mutation. In one particular embodiment, the mutated VSV genome is 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-1)}$ L-5' or 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-9)}$ L-5'. In another embodiment, the mutated VSV genome is 3'-gag₁-
20 NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-1)}$ L-5', 3'-gag₁-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-9)}$ L-5', 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-1)}$ L-gag₅-5' or 3'-NPM $_{(ncp)}$ G $_{(ct-9)}$ L-gag₅-5'. In another embodiment, the VSV genome further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

25 In other embodiments of the method of immunizing a mammalian host against viral infection, the two VSV mutations are a $N_{(ts)}$ gene mutation and a $L_{(ts)}$ gene mutation. In one particular embodiment, the mutated VSV genome is 3'-N $_{(ts)}$ PMGL $_{(ts)}$ -5', 3'-gag₁-N $_{(ts)}$ PMGL $_{(ts)}$ -5' or 3'-N $_{(ts)}$ PMGL $_{(ts)}$ -gag₅-5'. In another embodiment, the VSV genome further comprises a third class of mutation in its
30 genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a

n n n 2 2

truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

In other embodiments of the method of immunizing a mammalian host against viral infection, the two VSV mutations are a $G_{(ctam)}$ mutation and a gene shuffling mutation. In one embodiment, the mutated genome is 3'-gag₁-NPMG_(ctam)L-5'. In another embodiment, the VSV genome further comprises a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a ts mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, from the preferred embodiments thereof, and from the claims.

15

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the growth kinetics (pfu/mL versus time) of wild-type VSV (3'-NPMGL-5'), N shuffled VSV mutants (3'-PNMGL-5' [N2], 3'-PMNGL-5' [N3] and 3'-PMGNL-5' [N4]), G protein cytoplasmic tail (ct) truncation VSV mutants (3'-NPMG_(ct-9)L-5' [CT9] and 3'-NPMG_(ct-1)L-gag₅-5' [CT1-GAG5]) and combined VSV N shuffled/G protein ct truncation mutants (3'-PNMG_(ct-1)L-5' [N2CT1], 3'-PNMG_(ct-9)L-5' [N2CT9], 3'-PMNG_(ct-1)L-5' [N3CT1] and 3'-PMNG_(ct-9)L-5' [N3CT9]). The abbreviation "in" shown in the inset figure legend represents the Indiana strain of VSV.

25

Figure 2 is a comparison of the growth kinetics of N shuffled VSV mutants (3'-PNMGL-5', 3'-PMNGL-5' and 3'-PMGNL-5') relative to wild-type VSV (3'-NPMGL-5') and G protein ct-1 VSV mutant (3'-NPMG_(ct-9)L-gag₅-5').

Figure 3 shows a comparison of the growth rates of combined VSV N shuffled/G protein ct-1 mutants (3'-PNMG_(ct-1)L-5' and 3'-PMNG_(ct-1)L-5') relative to wild-type VSV (3'-NPMGL-5') and a G protein ct-1 VSV mutant (3'-NPMG_(ct-1)L-gag₅-5').

. 00023

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention described hereinafter addresses a need in the art for vesicular stomatitis virus (VSV) vectors having significantly attenuated pathogenicity in mammals, particularly attenuated neuropathogenicity as revealed in animal neurovirulence models. As described above, VSV has many characteristics which make it an appealing vector for immunogenic compositions and/or gene therapy. For example, VSV infection of humans is uncommon and is either asymptomatic or characterized by mild flu-like symptoms that resolve in three to eight days without complications, and as such, VSV is not considered a human pathogen. Other characteristics of VSV that render it an attractive vector include: (a) the ability to replicate robustly in cell culture; (b) the inability to either integrate into host cell DNA or undergo genetic recombination; (c) the existence of multiple serotypes, allowing the possibility for prime-boost immunization strategies; (d) foreign genes of interest can be inserted into the VSV genome and expressed abundantly by the viral transcriptase; (e) the development of a highly specialized system for the rescue of infectious virus from a cDNA copy of the virus genome (U.S. Patent 6,033,886; U.S. Patent 6,168,943) and (f) pre-existing immunity to VSV in the human population is infrequent.

An early class of attenuated VSV vectors described in the art were referred to as temperature-sensitive (ts) mutants, wherein the ts mutants failed to produce virions at a restrictive temperature. For example, various VSV ts mutants are known in the art (e.g., see Holloway *et al.*, 1970; Pringle *et al.*, 1971; Evans *et al.*, 1979; Pringle *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1987; Gopalakrishna and Lenard, 1985). In addition, further classes of attenuated VSV mutants have also been described in the art and include VSV G protein truncated cytoplasmic tail (ct) mutations (Schnell *et al.*, 1998), gene shuffling (or gene order rearrangement) mutations (Wertz *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999; Flanagan *et al.*, 2001; U.S. Patent 6,596,529), G-stem mutations (Jeetendra *et al.*, 2003; Jeetendra *et al.*, 2002; Robinson and Whitt, 2000), non-cytopathic M protein mutations (Jayakar *et al.*, 2000; Jayakar and Whitt, 2002) and ambisense RNA mutations (Finke and Conzelmann, 1997; Finke and Conzelmann 1999). However, as stated above, currently available attenuated VSV vectors retain residual virulence when tested in animal models, and as such, are not likely vector candidates for advancement to human clinical trials.

00024

As set forth in detail herein, the present invention relates to the unexpected and surprising observations that combinations of two or more known attenuating mutation classes (gene shuffling mutations, G protein insertion and truncation mutations, ts mutations and other point mutations, non-cytopathic M gene mutations, G-stem mutations, ambisense RNA mutations, gene deletion mutations, and the like) have a synergistic effect (in contrast to an additive effect) on the resulting level of attenuation of pathogenicity achieved. For example, it is demonstrated herein, that VSV G protein truncation mutants, when combined with shuffled N gene mutants, exerted a synergistic attenuation of VSV growth (Example 2) and neurovirulence (Example 3). In addition, certain embodiments of the present invention are directed to combinations of other classes of mutation, which also have a synergistic effect on VSV attenuation. Such classes include, but are not limited to: ts mutations, point mutations, gene shuffling mutations (including N, P, M, G and L gene shuffles), G-stem mutations, G gene insertions, non-cytopathic M gene mutations, truncated G gene mutations (e.g., a ct mutant), ambisense RNA mutations and gene deletion mutations.

Thus, in certain embodiments, the invention is directed to a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity. In certain other embodiments, the invention is directed to immunogenic compositions comprising a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.

A. VESICULAR STOMATITIS VIRUS MUTATION CLASSES

As stated above, a genetically modified VSV vector of the invention comprises at least two different classes of mutations in its genome. As defined hereinafter, the terms "mutation class", "mutation classes" or "classes of mutation" are used interchangeably, and refer to mutations known in the art, when used singly,

to attenuate VSV. For example, a "mutation class" of the invention includes, but is not limited to, a VSV temperature-sensitive N gene mutation (hereinafter, "N_(ts)"), a temperature-sensitive L gene mutation (hereinafter, "L_(ts)"), a point mutation, a G-stem mutation (hereinafter, "G_(stem)"), a non-cytopathic M gene mutation (hereinafter, "M_(ncp)"), a gene shuffling or rearrangement mutation, a truncated G gene mutation (hereinafter, "G_(ct)"), an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation, a gene deletion mutation and the like. As defined hereinafter, a "mutation" includes mutations known in the art as insertions, deletions, substitutions, gene rearrangement or shuffling modifications.

As defined hereinafter, the term "synergistic" attenuation refers to a level of VSV attenuation which is greater than additive. For example, a synergistic attenuation of VSV according to the present invention comprises combining at least two classes of mutation in the same VSV genome, thereby resulting in a reduction of VSV pathogenicity much greater than an additive attenuation level observed for each VSV mutation class alone. Thus, in certain embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD₅₀ at least greater than the additive attenuation level observed for each mutation class alone (i.e., the sum of the two mutation classes), wherein attenuation levels (i.e., the LD₅₀) are determined in a small animal neurovirulence model.

By way of a non-limiting example, if equation (1) describes an "additive attenuation" of VSV:

$$(1) \quad \Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50} = x_{LD50};$$

wherein Δa_{LD50} is the LD₅₀ of a VSV having a first mutation class in its genome, Δb_{LD50} is the LD₅₀ of a VSV having a second mutation class in its genome and x_{LD50} is the sum of Δa_{LD50} and Δb_{LD50} ; then a VSV "synergistic attenuation" of the invention, having a LD₅₀ at least greater than the additive attenuation level observed for each mutation class alone, is described by equation (2):

$$(2) \quad \Delta a,b_{LD50} > (\Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50});$$

wherein $\Delta a,b_{LD50}$ is the LD₅₀ of a VSV having a combination of two mutation classes in its genome, Δa_{LD50} is the LD₅₀ of a VSV having a first mutation class in its genome and Δb_{LD50} is the LD₅₀ of a VSV having a second mutation class in its genome. Thus, in certain embodiments, the synergy of VSV attenuation (i.e., two mutation classes in the same VSV genome) is described relative to the LD₅₀ of two VSV constructs (each

VSV construct having a single mutation class in its genome), wherein the synergistic attenuation of the VSV having two mutation classes in its genome is defined as a LD_{50} at least greater than the additive LD_{50} of the two VSV constructs having a single mutation class in their genome (e.g., see VSV LD_{50} values in Table 7).

5 In certain other embodiments, the synergy of VSV attenuation is described relative to the LD_{50} of a wild-type VSV. Thus, in one embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In one
10 embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 10-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In another embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 100-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In another
15 embodiment, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 1,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In yet other embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 10,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. In
20 certain other embodiments, a synergistic attenuation of VSV is defined as a LD_{50} that is at least 100,000-fold greater than the LD_{50} of wild-type VSV, wherein the LD_{50} is determined in an animal neurovirulence model. The determination of a 50% lethal dose (LD_{50}) for a particular VSV vector is readily determined by a person of skill in the art using known testing methods and animal models (e.g., see Example 1).

Thus, in certain embodiments, the invention is directed to a genetically
25 modified VSV comprising at least two different classes of mutations set forth below.

1. GENE SHUFFLING MUTATIONS

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a gene shuffling mutation in its genome. As defined herein, the terms
30 "gene shuffling", "shuffled gene", "shuffled", "shuffling", "gene rearrangement" and "gene translocation" are used interchangeably, and refer to a change (mutation) in the order of the wild-type VSV genome. As defined herein, a wild-type VSV genome has the following gene order: 3'-NPMGL-5'.

00027

It is known in the art, that the position of a VSV gene relative to the 3' promoter determines the level of expression and virus attenuation (U.S. Patent 6,596,529 and Wertz *et al.*, 1998, each specifically incorporated herein by reference). The nucleotide sequences encoding VSV G, M, N, P and L proteins are known in the art (Rose and Gallione, 1981; Gallione *et al.*, 1981). For example, U.S. Patent 6,596,529 describes gene shuffling mutations in which the gene for the N protein is translocated (shuffled) from its wild-type promoter-proximal first position to successively more distal positions on the genome (e.g., 3'-PNMGL-5', 3'-PMNGL-5', 3'-PMGNL-5', referred to as N2, N3 and N4, respectively). Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises a gene shuffling mutation in its genome. In one class of mutation, in one particular embodiment, a genetically modified VSV comprises a gene shuffling mutation comprising a translocation of the N gene (e.g., 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5').

It should be noted herein, that the insertion of a foreign nucleic acid sequence (e.g., HIV *gag*) into the VSV genome 3' to any of the N, P, M, G or L genes, effectively results in a "gene shuffling mutation" as defined above. For example, when the HIV *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one (e.g., 3'-*gag*₁-NPMGL-5'), the N, P, M, G and L genes are each moved from their wild-type positions to more distal positions on the genome. Thus, in certain embodiments of the invention, a gene shuffling mutation includes the insertion of a foreign nucleic acid sequence into the VSV genome 3' to any of the N, P, M, G or L genes (e.g., 3'-*gag*₁-NPMGL-5', 3'-N-*gag*₂-PMGL-5', 3'-NP-*gag*₃-MGL-5', etc.)

2. G PROTEIN INSERTION AND TRUNCATION MUTANTS

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutated G gene, wherein the encoded G protein is truncated at its cytoplasmic domain (carboxy-terminus), also referred to as the "cytoplasmic tail region" of the G protein. It is known in the art that G gene mutations which truncate the carboxy-terminus of the cytoplasmic domain influence VSV budding and attenuate virus production (Schnell *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). The cytoplasmic domain of wild-type VSV G protein comprises twenty-nine amino acids (RVGIHLICIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK-COOH; SEQ ID NO:1).

- 2 - 00028

In certain embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein in which the last twenty-eight carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted (retaining only arginine from the twenty-nine amino acid wild-type cytoplasmic domain of SEQ ID NO:1). In certain other embodiments,

5 a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein in which the last twenty carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted (relative to the twenty-nine amino acid wild-type cytoplasmic domain of SEQ ID NO:1).

In certain other embodiments, a truncated VSV G gene of the invention

10 encodes a G protein comprising a single amino acid in its cytoplasmic domain (cytoplasmic tail region), wherein the single amino acid is any naturally occurring amino acid. In still other embodiments, a truncated VSV G gene of the invention encodes a G protein comprising nine amino acids in its cytoplasmic domain (cytoplasmic tail region), wherein the nine amino acids are any naturally occurring

15 amino acids. In certain other embodiments, a mutated VSV gene of the invention encodes a G protein containing an insertion representing a foreign epitope. Such mutants are known in the art (e.g., see Schlehuber and Rose, 2003).

As defined herein, a G gene mutant encoding a G protein in which the last twenty-eight carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are

20 deleted, relative to the wild-type sequence of SEQ ID NO:1, is designated "G_(α -1)", wherein the cytoplasmic domain of the G_(α -1) has an amino acid sequence of (R-COOH). As defined herein, a G gene mutant encoding a G protein in which the last twenty carboxy-terminal amino acid residues of the cytoplasmic domain are deleted, relative to the wild-type sequence of SEQ ID NO:1, is designated "G_(α -9)", wherein the

25 cytoplasmic domain of the G_(α -9) has an amino acid sequence of (RVGIHLCK-COOH; SEQ ID NO:2). Thus, in certain embodiments of the invention, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutated G gene, wherein the encoded G protein is a G_(α -1) or G_(α -9).

30 3. TEMPERATURE-SENSITIVE AND OTHER POINT MUTATIONS

A VSV "temperature-sensitive" ("ts") mutation, as defined hereinafter, is a mutation in the VSV genome which restricts VSV growth at a non-permissive temperature. For example, a VSV ts mutant of the invention grows normally and to

high titer at the permissive temperature (e.g., 31°C), but their growth or reproduction is restricted at non-permissive temperatures (e.g., 37°C or 39°C). The generation of ts mutants by chemical and site directed mutagenesis are well known in the art (e.g., see Pringle, 1970; Li *et al.*, 1988); and numerous ts mutants have been characterized and described (e.g., see Flamand and Pringle, 1971; Flamand and Bishop, 1973; Printz and Wagner, 1971; Gopalakrishna and Lenard, 1985; Pringle *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988; Rabinowitz *et al.*, 1977; Lundh *et al.*, 1988; Dal Canto *et al.*, 1976; Rabinowitz *et al.*, 1976). In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a ts mutation in its genome, wherein the ts mutation is one or more mutations of a nucleic acid sequence encoding the G, M, N, P or L protein.

As defined herein, a ts mutation of any one of the VSV G, M, N, P or L genes is a separate "mutation class" of the invention. For example, in certain embodiments of the invention, a genetically modified VSV comprising at least two different classes of mutations in its genome (wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity) comprises one or more ts N gene mutation(s) (hereinafter, "N_{ts}") as a first class of mutation and one or more ts L gene mutation(s) (hereinafter, "L_{ts}") as a second class of mutation. As a non-limiting example, a genetically modified VSV comprising a genome such as 3'-N_{ts}PMGL_{ts}-5' comprises two classes of mutations (i.e., (1) an N_{ts} gene mutation and (2) an L_{ts} gene mutation) and a genetically modified VSV comprising a genome such as 3'-gag₁-N_{ts}PMGL_{ts}-5' comprises three classes of mutations (i.e., (1) an N_{ts} gene mutation, (2) an L_{ts} gene mutation and (3) by way gag₁ insertion, a gene shuffling mutation).

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a point mutation in its genome, wherein the point mutation is one or more mutations of a nucleic acid sequence encoding the G, M, N, P or L protein, wherein the mutation confers an attenuating phenotype such as cold-adaptation, decreased fusion or cytopathogenic efficiency (e.g., see Fredericksen and Whitt, 1998; Ahmed and Lyles, 1997). For example, Fredericksen and Whitt (1998) describe three attenuating point mutations of the G gene (e.g., D137-L, E139-L or DE-SS) which have a shifted pH threshold for fusion activity. Ahmed and Lyles (1997) described an attenuating point mutation of the M gene (N1 63D) that was highly defective in inhibition of host gene expression and was turned over more rapidly than wild-type M

protein. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises one or more point mutations in its genome.

4. NON-CYTOPATHIC M GENE MUTATIONS

5 In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene. The VSV (Indiana serotype) M gene encodes a 229 amino acid M (matrix) protein, wherein the first thirty amino acids of the NH₂-terminus comprise a proline-rich PPPY (PY) motif (Harty *et al.*, 1999). The PY motif of VSV M protein is located at amino acid positions 24-27 in
10 both VSV Indiana (Genbank Accession Number X04452) and New Jersey (Genbank Accession Number M14553) serotypes. It was demonstrated by Jayakar *et al.* (2000), that mutations in the PY motif (e.g., APPY, AAPY, PPAY, APPA, AAPA and PPPA) reduce virus yield by blocking a late stage in virus budding. Thus, in certain
15 embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene, wherein the mutation is in the PPPY motif of the encoded M protein.

It has recently been reported that the M mRNA further encodes two additional proteins, referred to as M2 and M3 (Jayakar and Whitt, 2002). The M2 and M3 proteins are synthesized from downstream methionines in the same reading frame
20 that encodes the 229 amino acid M protein (referred to as M1), and lack the first thirty-two (M2 protein) or fifty (M3 protein) amino acids of the M1 protein. It has been observed that cells infected with a recombinant VSV that expresses the M protein, but not M2 and M3, exhibit a delayed onset of cytopathic effect (in certain cell types), yet produce a normal virus yield. Thus, in certain embodiments, a genetically
25 modified VSV of the invention comprises a non-cytopathic mutation in the M gene, wherein the M gene mutation results in a virus that does not express the M2 or M3 protein (e.g., see Jayakar and Whitt, 2002).

Also contemplated herein are amino acid mutations (e.g., deletions, substitutions, insertions, etc.) into the M protein PSAIP (PS) motif described by Irie *et al.* (2004).
30

5. G-STEM MUTATIONS

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutation in the G gene, wherein the encoded G protein has a mutation in the membrane-proximal stem region of the G protein ectodomain, referred to as
5 G-stem protein. The G-stem region comprises amino acid residues 421 through 462 of the G protein. Recent studies have demonstrated the attenuation of VSV via insertion and/or deletion (e.g., truncation) mutations in the G-stem of the G protein (Robinson and Whitt, 2000; Jeetendra *et al.*, 2002; Jeetendra *et al.*, 2003). Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises a G-stem insertion,
10 deletion, substitution or a combination thereof. In one particular embodiment, a genetically modified VSV vector of the invention comprising a G-stem mutation (and immunogenic compositions thereof), comprises a genome of 3'-gag₁-NPMG_(stem)-L-5'.

6. AMBISENSE RNA MUTATIONS

15 In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises an ambisense RNA mutation, in which the 5' antigenome promoter (AGP) is replaced with a copy of the 3' genome promoter (GP). The 5' AGP of VSV, as well as other nonsegmented, negative strand RNA viruses, acts as a strong replication promoter while the 3' GP acts as a transcription promoter and a weak replication
20 promoter. In the normal course of VSV infection, there is a 3- to 4-fold predominance of genome copies over antigenome copies; this ratio is even higher for rabies virus, another member of the Rhabdovirus family (Finke and Conzelmann, 1999). Previous work with rabies virus demonstrated that replacing the 5' AGP with a copy of the GP (known as an ambisense RNA mutation) led to equal levels of
25 genome and antigenome RNA copies within infected cells. In addition, a foreign gene was expressed from the copy of the GP placed at the 5' end of the genome. When serially passaged in cultured cells, the rabies virus containing the ambisense RNA mutation consistently replicated to 10- to 15-fold lower titers than a recombinant wild type rabies virus (Finke and Conzelmann, 1997). Such a mutation is used in
30 VSV vectors to both attenuate the virus replication and express foreign genes. Thus, in certain embodiments, a genetically modified VSV comprises an ambisense RNA mutation.

7. GENE DELETIONS

In certain other embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a virus in which a VSV gene (such as G or M) is deleted from the genome. For example, Roberts *et al.* (1999) described a VSV vector in which the entire gene encoding the G protein was deleted (Δ G) and substituted with influenza haemagglutinin (HA) protein, wherein the VSV vector (Δ G-HA) demonstrated attenuated pathogenesis.

B. RECOMBINANT VESICULAR STOMATITIS VIRUS VECTORS

In certain embodiments, the invention provides a genetically modified (recombinant) VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence inserted as a separate transcriptional unit into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication.

Methods of producing recombinant RNA virus are referred to in the art as "rescue" or "reverse genetics" methods. Exemplary rescue methods for VSV are described in U.S. Patent 6,033,886, U.S. Patent 6,596,529 and WO 2004/113517, each incorporated herein by reference. The transcription and replication of negative-sense, single stranded, non-segmented, RNA viral genomes are achieved through the enzymatic activity of a multimeric protein complex acting on the ribonucleoprotein core (nucleocapsid). Naked genomic RNA cannot serve as a template. Instead, these genomic sequences are recognized only when they are entirely encapsidated by the N protein into the nucleocapsid structure. It is only in that context that the genomic and antigenomic terminal promoter sequences are recognized to initiate the transcriptional or replication pathways.

A cloned DNA equivalent of the VSV genome is placed between a suitable DNA-dependent RNA polymerase promoter (e.g., the T7 RNA polymerase promoter) and a self-cleaving ribozyme sequence (e.g., the hepatitis delta ribozyme), which is inserted into a suitable transcription vector (e.g., a propagatable bacterial plasmid).

This transcription vector provides the readily manipulable DNA template from which the RNA polymerase (e.g., T7 RNA polymerase) can faithfully transcribe a single-stranded RNA copy of the VSV antigenome (or genome) with the precise, or nearly precise, 5' and 3' termini. The orientation of the VSV genomic DNA copy and the

flanking promoter and ribozyme sequences determine whether antigenome or genome RNA equivalents are transcribed. Also required for rescue of new VSV progeny are the VSV-specific trans-acting support proteins needed to encapsidate the naked, single-stranded VSV antigenome or genome RNA transcripts into functional nucleocapsid templates: the viral nucleocapsid (N) protein, the polymerase-associated phosphoprotein (P) and the polymerase (L) protein. These proteins comprise the active viral RNA-dependent RNA polymerase which must engage this nucleocapsid template to achieve transcription and replication.

Thus, a genetically modified and attenuated VSV of the invention, comprising at least two different classes of mutations in its genome (e.g., see Section A), is produced according to rescue methods known in the art. For example, a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome is generated using (1) a transcription vector comprising an isolated nucleic acid molecule which comprises a polynucleotide sequence encoding a genome or antigenome of a VSV and (2) at least one expression vector which comprises at least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting N, P and L proteins necessary for encapsidation, transcription and replication; in a host cell under conditions sufficient to permit the co-expression of these vectors and the production of the recombinant VSV. Any suitable VSV strain or serotype may be used according to the present invention, including, but not limited to, VSV Indiana, VSV New Jersey, VSV Chandipura, VSV Isfahan, VSV San Juan, VSV Glasgow, and the like.

In addition to polynucleotide sequences encoding attenuated forms of VSV, the polynucleotide sequence may also encode one or more heterologous (or foreign) polynucleotide sequences or open reading frames (ORFs) (e.g., see Section C). The heterologous polynucleotide sequences can vary as desired, and include, but are not limited to, a co-factor, a cytokine (such as an Interleukin), a T-helper epitope, a CTL epitope, a restriction marker, an adjuvant, or a protein of a different microbial pathogen (e.g. virus, bacterium, parasite or fungus), especially proteins capable of eliciting desirable immune responses. In certain embodiments, a heterologous ORF contains an HIV gene (e.g., *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vp1*). In one particular embodiment, the HIV gene is *gag*, wherein the *gag* gene is inserted into the VSV genome at position one (3'-*gag*₁-NPMGL-5') or at position five (3'-NPMG-

00034

gag₅-L-5'). The heterologous polynucleotide is also used to provide agents which are used for gene therapy. In another embodiment, the heterologous polynucleotide sequence further encodes a cytokine, such as interleukin-12, which are selected to improve the prophylactic or therapeutic characteristics of the recombinant VSV.

5 In certain embodiments, a genetically modified and attenuated VSV of the invention is mutated by conventional means, such as chemical mutagenesis. For example, during virus growth in cell cultures, a chemical mutagen is added, followed by: (a) selection of virus that has been subjected to passage at suboptimal temperature in order to select temperature-sensitive and/or cold adapted mutations,
10 (b) identification of mutant virus that produce small plaques in cell culture, and (c) passage through heterologous hosts to select for host range mutations. In other embodiments, attenuating mutations comprise making predetermined mutations using site-directed mutagenesis (e.g., see Section A) and then rescuing virus containing these mutations. As set forth previously, a genetically modified VSV of
15 the invention comprises at least two classes of mutation in its genome. In certain embodiments, one or more classes of mutation further comprises multiple mutations, such as a G-stem mutation class having a double mutation (e.g., a deletion, insertion, substitution, etc.), a triple mutation and the like. These attenuated VSV vectors are then screened for attenuation of their virulence in an animal model (e.g.,
20 see Example 1 and Example 3).

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

The transcription vector and expression vector are typically plasmid vectors designed for expression in the host cell. The expression vector which comprises at

00035

least one isolated nucleic acid molecule encoding the trans-acting proteins necessary for encapsidation, transcription and replication expresses these proteins from the same expression vector or at least two different vectors. These vectors are generally known from the basic rescue methods, and they need not be altered for use in the improved methods of this invention.

Additional techniques for conducting rescue of viruses such as VSV, are described in U.S. Patent 6,673,572 and U.S. Provisional Patent 60/477,389, which are hereby incorporated by reference.

The host cells used in the rescue of VSV are those which permit the expression from the vectors of the requisite constituents necessary for the production of recombinant VSV. Such host cells can be selected from a prokaryotic cell or a eukaryotic cell, and preferably a vertebrate cell. In general, host cells are derived from a human cell, such as a human embryonic kidney cell (e.g., 293). Vero cells, as well as many other types of cells are also used as host cells. The following are non-limiting examples of suitable host cells: (1) Human Diploid Primary Cell Lines (e.g. WI-38 and MRC5 cells); (2) Monkey Diploid Cell Line (e.g. FRhL-Fetal Rhesus Lung cells); (3) Quasi-Primary Continuous Cell Line (e.g. AGMK-African green monkey kidney cells); (4) Human 293 cells and (5) other potential cell lines, such as, CHO, MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), primary chick embryo fibroblasts. In certain embodiments, a transfection facilitating reagent is added to increase DNA uptake by cells. Many of these reagents are known in the art (e.g., calcium phosphate). Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and Effectene (Qiagen, Valencia, CA) are common examples. Lipofectace and Effectene are both cationic lipids. They both coat DNA and enhance DNA uptake by cells. Lipofectace forms a liposome that surrounds the DNA while Effectene coats the DNA but does not form a liposome.

The rescued attenuated VSV is then tested for its desired phenotype (temperature sensitivity, cold adaptation, plaque morphology, and transcription and replication attenuation), first by *in vitro* means. The mutations are also tested using a minireplicon system where the required trans-acting encapsidation and polymerase activities are provided by wild-type or vaccine helper viruses, or by plasmids expressing the N, P and different L genes harboring gene-specific attenuating mutations. The attenuated VSV is also tested *in vivo* for synergistic attenuation in an

00036

animal neurovirulence model. For example, mouse and/or ferret models are established for detecting neurovirulence. Briefly, groups of ten mice are injected intra-cranially (IC) with each of a range of virus concentrations that span the anticipated LD₅₀ dose (a dose that is lethal for 50% of animals). For example, IC inoculations with virus at 10², 10³, 10⁴ and 10⁵ pfu are used where the anticipated LD₅₀ for the virus is in the range 10³-10⁴pfu. Virus formulations are prepared by serial dilution of purified virus stocks in PBS. Mice are then injected through the top of the cranium with the requisite dose, in 50-100 µl of PBS. Animals are monitored daily for weight loss, morbidity and death. The LD₅₀ for a virus vector is then calculated from the cumulative death of mice over the range of concentrations tested.

C. HETEROLOGOUS NUCLEIC ACID SEQUENCES AND ANTIGENS

In certain embodiments, the invention provides synergistically attenuated VSV further comprising a foreign RNA sequence as a separate transcriptional unit inserted into or replacing a site of the genome nonessential for replication, wherein the foreign RNA sequence (which is in the negative sense) directs the production of a protein capable of being expressed in a host cell infected by VSV. This recombinant genome is originally produced by insertion of foreign DNA encoding the protein into the VSV cDNA. In certain embodiments, any DNA sequence which encodes an immunogenic antigen, which produces prophylactic or therapeutic immunity against a disease or disorder, when expressed as a fusion or non-fusion protein in a recombinant synergistically attenuated VSV of the invention, alone or in combination with other antigens expressed by the same or a different VSV, is isolated and incorporated in the VSV vector for use in the immunogenic compositions of the present invention.

In certain embodiments, expression of an antigen by a synergistically attenuated recombinant VSV induces an immune response against a pathogenic microorganism. For example, an antigen may display the immunogenicity or antigenicity of an antigen found on bacteria, parasites, viruses, or fungi which are causative agents of diseases or disorders. In one embodiment, antigens displaying the antigenicity or immunogenicity of an antigen of a human pathogen or other antigens of interest are used.

To determine immunogenicity or antigenicity by detecting binding to antibody, various immunoassays known in the art are used, including but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radiolotope labels, for example), western blots, immunoprecipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, neutralization assays, etc. In one embodiment, antibody binding is measured by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by measuring binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay. In one embodiment for detecting immunogenicity, T cell-mediated responses are assayed by standard methods, e.g., *in vitro* or *in vivo* cytotoxicity assays, tetramer assays, elispot assays or *in vivo* delayed-type hypersensitivity assays.

Parasites and bacteria expressing epitopes (antigenic determinants) that are expressed by synergistically attenuated VSV (wherein the foreign RNA directs the production of an antigen of the parasite or bacteria or a derivative thereof containing an epitope thereof) include but are not limited to those listed in Table 1.

nnn38

TABLE 1
PARASITES AND BACTERIA EXPRESSING EPITOPES THAT CAN BE EXPRESSED BY VSV

	PARASITES
5	plasmodium spp.
	Eimeria spp.
	nematodes
	schisto
	leishmania
10	BACTERIA
	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Neisseria meningitidis</i>
15	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Corynebacteria diphtheriae</i>
	<i>Clostridium tetani</i>
	<i>Bordetella pertussis</i>
	<i>Haemophilus</i> spp. (e.g., <i>Influenzae</i>)
20	<i>Chlamydia</i> spp.
	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
	mycobacteria

25 In another embodiment, the antigen comprises an epitope of an antigen of a nematode, to protect against disorders caused by such worms. In another embodiment, any DNA sequence which encodes a Plasmodium epitope, which when expressed by a recombinant VSV, is immunogenic in a vertebrate host, is isolated for insertion into VSV (-) DNA according to the present invention. The species of
30 Plasmodium which serve as DNA sources include, but are not limited to, the human malaria parasites *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, and the animal malaria parasites *P. berghei*, *P. yoelli*, *P. knowlesi*, and *P. cynomolgi*. In yet another embodiment, the antigen comprises a peptide of the β -subunit of Cholera toxin.

. 00039

Viruses expressing epitopes that are expressed by synergistically attenuated VSV (wherein the foreign RNA directs the production of an antigen of the virus or a derivative thereof comprising an epitope thereof) include, but are not limited to, those listed in Table 2, which lists such viruses by family for purposes of convenience and not limitation.

TABLE 2
VIRUSES EXPRESSING EPITOPES THAT CAN BE EXPRESSED BY VSV

I. Picornaviridae
Enteroviruses
Poliovirus
Coxsackievirus
Echovirus
Rhinoviruses
Hepatitis A Virus
II. Caliciviridae
Norwalk group of viruses
III. Togaviridae and Flaviviridae
Togaviruses (e.g., Dengue virus)
Alphaviruses
Flaviviruses (e.g., Hepatitis C virus)
Rubella virus
IV. Coronaviridae
Coronaviruses
V. Rhabdoviridae
Rabies virus
VI. Filoviridae
Marburg viruses
Ebola viruses

00020

TABLE 2 (CONTINUED)

VIRUSES EXPRESSING EPITOPES THAT CAN BE EXPRESSED BY VSV

VII. Paramyxoviridae
Parainfluenza virus
Mumps virus
Measles virus
Respiratory syncytial virus
Metapneumovirus
VIII. Orthomyxoviridae
Orthomyxoviruses (e.g., Influenza virus)
IX. Bunyaviridae
Bunyaviruses
X. Arenaviridae
Arenaviruses
XI. Reoviridae
Reoviruses
Rotaviruses
Orbiviruses
XII. Retroviridae
Human T Cell Leukemia Virus type I
Human T Cell Leukemia Virus type II
Human Immunodeficiency Viruses (e.g., type I and type II)
Simian Immunodeficiency Virus
Lentiviruses
XIII. Papoviridae
Polyomaviruses
Papillomaviruses

TABLE 2 (CONTINUED)

VIRUSES EXPRESSING EPITOPES THAT CAN BE EXPRESSED BY VSV

XIV. Parvoviridae
Parvoviruses
XV. Herpesviridae
Herpes Simplex Viruses
Epstein-Barr virus
Cytomegalovirus
Varicella-Zoster virus
Human Herpesvirus-6
human herpesvirus-7
Cercopithecine Herpes Virus 1 (B virus)
XVI. Poxviridae
Poxviruses
XVIII. Hepadnaviridae
Hepatitis B virus
XIX. Adenoviridae

- 5 In specific embodiments, the antigen encoded by the foreign sequences that is expressed upon infection of a host by the attenuated VSV, displays the antigenicity or immunogenicity of an influenza virus hemagglutinin; human respiratory syncytial virus G glycoprotein (G); measles virus hemagglutinin or herpes simplex virus type-2 glycoprotein gD.
- 10 Other antigens that are expressed by attenuated VSV include, but are not limited to, those displaying the antigenicity or immunogenicity of the following antigens: Poliovirus I VP1; envelope glycoproteins of HIV I; Hepatitis B surface antigen; Diphtheria toxin; streptococcus 24M epitope, SpeA, SpeB, SpeC or C5a peptidease; and gonococcal pilin.
- 15 In other embodiments, the antigen expressed by the attenuated VSV displays the antigenicity or immunogenicity of pseudorabies virus g50 (gpD), pseudorabies virus II (gpB), pseudorabies virus gIII (gpC), pseudorabies virus glycoprotein H, pseudorabies virus glycoprotein E, transmissible gastroenteritis glycoprotein 195, transmissible gastroenteritis matrix protein, swine rotavirus glycoprotein 38, swine

parvovirus capsid protein, *Serpulina hydodysenteriae* protective antigen, Bovine Viral Diarrhea glycoprotein 55, Newcastle Disease Virus hemagglutinin-neuraminidase, swine flu hemagglutinin, or swine flu neuraminidase.

5 In certain embodiments, an antigen expressed by the attenuated VSV displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen derived from a canine or feline pathogen, including, but not limited to, feline leukemia virus, canine distemper virus, canine adenovirus, canine parvovirus and the like.

10 In certain other embodiments, the antigen expressed by the attenuated VSV displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen derived from *Serpulina hydodysenteriae*, Foot and Mouth Disease Virus, Hog Colera Virus, swine influenza virus, African Swine Fever Virus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, infectious bovine rhinotracheitis virus (e.g., infectious bovine rhinotracheitis virus glycoprotein E or glycoprotein G), or infectious laryngotracheitis virus (e.g., infectious laryngotracheitis virus glycoprotein G or glycoprotein I).

15 In another embodiment, the antigen displays the antigenicity or immunogenicity of a glycoprotein of La Crosse Virus, Neonatal Calf Diarrhea Virus, Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus, Punta Toro Virus, Murine Leukemia Virus or Mouse Mammary Tumor Virus.

20 In other embodiments, the antigen displays the antigenicity or immunogenicity of an antigen of a human pathogen, including but not limited to human herpesvirus, herpes simplex virus-1, herpes simplex virus-2, human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Varicella-Zoster virus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human influenza virus, human immunodeficiency virus (type 1 and/or type 2), rabies virus, measles virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, 25 *Plasmodium falciparum*, and *Bordetella pertussis*.

Potentially useful antigens or derivatives thereof for use as antigens expressed by attenuated VSV are identified by various criteria, such as the antigen's involvement in neutralization of a pathogen's infectivity, type or group specificity, recognition by patients' antisera or immune cells, and/or the demonstration of 30 protective effects of antisera or immune cells specific for the antigen.

In another embodiment, foreign RNA of the attenuated VSV directs the production of an antigen comprising an epitope, which when the attenuated VSV is introduced into a desired host, induces an immune response that protects against a

00043

condition or disorder caused by an entity containing the epitope. For example, the antigen can be a tumor specific antigen or tumor-associated antigen, for induction of a protective immune response against a tumor (e.g., a malignant tumor). Such tumor-specific or tumor-associated antigens include, but are not limited to, KS 1/4
5 pan-carcinoma antigen; ovarian carcinoma antigen (CA125); prostatic acid phosphate; prostate specific antigen; melanoma-associated antigen p97; melanoma antigen gp75; high molecular weight melanoma antigen and prostate specific membrane antigen.

The foreign DNA encoding the antigen, that is inserted into a non-essential
10 site of the attenuated VSV DNA, optionally further comprises a foreign DNA sequence encoding a cytokine capable of being expressed and stimulating an immune response in a host infected by the attenuated VSV. For example, such cytokines include but are not limited to interleukins 1 α , 1 β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13,
14, 15, 16, 17 and 18, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , granulocyte colony
15 stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor and the tumor necrosis factors α and β .

D. IMMUNOGENIC AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

In certain embodiments, the invention is directed to an immunogenic
20 composition comprising an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome and at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.

25 The synergistically attenuated VSV vectors of the invention are formulated for administration to a mammalian subject (e.g., a human). Such compositions typically comprise the VSV vector and a pharmaceutically acceptable carrier. As used hereinafter the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include
30 any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the VSV vector, such media are

. . 00044

used in the immunogenic compositions of the invention. Supplementary active compounds may also be incorporated into the compositions.

Thus, a VSV immunogenic composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral (e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal) and mucosal (e.g., oral, rectal, intranasal, buccal, vaginal, respiratory). Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH is adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier is a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity is maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms is achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and the like. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols

such as manitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions is brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the VSV vector in the required amount (or dose) in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant (e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer). Systemic administration can also be by mucosal or transdermal means. For mucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for mucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Mucosal administration is accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. The compounds are also prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In certain embodiments, it is advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used hereinafter refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

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

D. EXAMPLES

5 The following examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. The following examples are presented for illustrative purpose, and should not be construed in any way limiting the scope of this invention.

10

EXAMPLE 1

MATERIALS AND METHODS

VSV G Protein Cytoplasmic Tail Mutants

15 The methods used for the generation of G protein cytoplasmic tail mutants of the present invention are known in the art and described in detail by Schnell *et al.*, (1998). These G protein mutants retained either a single amino acid ($G_{(\alpha-1)}$) or nine amino acids ($G_{(\alpha-9)}$) in the G cytoplasmic tail domain compared to the twenty-nine amino acid cytoplasmic tail domain of wild type VSV Indiana strain (SEQ ID NO:1). The cytoplasmic tail truncations were generated by moving the translation stop
20 codon either 60 nucleotides or 84 nucleotides (*i.e.*, nine amino acid cytoplasmic tail and one amino acid cytoplasmic tail, respectively) upstream of the authentic stop codon and resulting in truncation of the G protein.

VSV N Gene Shuffled Mutants

25 The N gene translocation mutants (N shuffles) were generated by repositioning the N gene as either the second, third or fourth gene from the 3' end of the virus genome. For example the authentic gene order for wild-type VSV, 3'-NPMGL-5', was mutated to 3'-PNMGL-5' and 3'-PMNGL-5'. Translocation of the N gene further away from the unique 3' RNA transcription promoter causes a
30 proportionate drop in the level of N gene expression (*e.g.*, see U.S. Patent 6,596,529, specifically incorporated herein by reference in its entirety). A reduction in the level of N protein in infected cells slows the formation of viral nucleocapsid

. 00047

formation, ultimately reducing the rate of genome replication and virus particle formation. The methods used for N gene translocations are described below.

For the first step in the production of the N gene shuffles, the N gene was removed entirely from the full-length virus genome cDNA, with the result that the P gene was then immediately adjacent to the virus leader, in place of the N gene. To delete the N gene, two PCR products were made with a full-length genome cDNA as template. The first PCR product contained sequence stretching from a natural BsaAI site upstream of the T7 promoter, to the end of the virus leader and an added downstream BsmBI site. The second PCR product contained sequence stretching from the natural XbaI site in the P gene to the transcription start signal for the P gene, adjacent to an added upstream BsmBI site. The BsmBI sites were arranged in a way that both PCR products could be joined seamlessly (following digestion and ligation) to give a single DNA fragment that contained the virus leader immediately adjacent to the P gene. This DNA fragment was then ligated into the XbaI/BsaAI sites of full-length genome cDNA, effectively eliminating the N gene from the virus genome.

In the next step of the generation of N gene shuffles, the N gene was inserted between either the P and M genes, or the M and G genes, or the G and L genes of the deleted N genome cDNA. For insertion of the N gene between the P and M genes, three PCR products were prepared with full-length genome cDNA as template. The first PCR product contained sequence stretching from the natural XbaI site in the P gene, to the transcription start signal of the M gene, with an added flanking BsmBI site. The second PCR product contained sequence stretching from the transcription start signal of the N gene to the conserved TATG sequence adjacent to the 3' -AAAAAAA- polyadenylation signal in the N gene, with an added flanking BsmBI site. The third PCR product contained sequence stretching from the natural MluI site at the beginning of the G gene to the conserved TATGAAAAAAA polyadenylation signal of the P gene, with an added flanking BsmBI site. All three fragments were then digested with BsmBI, and religated to form a single DNA fragment with the N gene flanked by part of the P gene and the M gene. This DNA fragment was then digested with XbaI and MluI and ligated into the XbaI/ MluI sites of the delta-N virus genome to form the 3'-PNMGL-5' cDNA .

.. 00048

To generate the 3'-PMNGL-5' genome cDNA, two separate PCR products were prepared. The first PCR product contained sequence stretching from the natural XbaI site in the P gene to the transcription start signal (5'-AACAG-3') of the G gene, with an added flanking BsmBI site. The second PCR product contained the entire N gene sequence from the transcription start signal, with an added flanking upstream BsmBI site, to the N gene transcription stop/polyadenylation signal, with flanking sequence stretching from the G transcription start signal to the natural MluI site in the G gene. The G gene specific sequence was added to the N gene sequence as part of one of the PCR primers. Both PCR products were digested with BsmBI and ligated to form a single DNA fragment, which was then digested with XbaI and MluI and ligated into the XbaI/MluI sites of the deleted N genome cDNA to give a 5'-PMNGL-3' gene arrangement.

To generate a 5'-PMGNL-5' genome cDNA, three PCR products were prepared from a complete genome cDNA template. The first PCR product contained sequence stretching from the natural SmaI site in the G gene to the transcription start signal for the L gene, flanked by an added BsmBI site. The second PCR product contained sequence for the entire N gene, from transcription start signal to transcription stop signal, flanked at both ends by added BsmBI sites. The third PCR product contained sequence stretching from the L gene transcription start, flanked by an added BsmBI site, to a natural HpaI site in the L gene. All three PCR products were digested with BsmBI and ligated to form a single DNA fragment, which was then digested with SmaI and HpaI, and ligated into the SmaI/HpaI sites of the deleted N genome cDNA, resulting in a 5'-PMGNL-3' gene arrangement. In all three rearranged genomes the sequence-integrity of each gene and flanking regulatory sequences were identical to the unaltered virus; only the position of the N gene was different.

Combination of G Protein Cytoplasmic Tail Mutations and N Shuffle Mutations

The combination of both the N gene shuffles and the G protein cytoplasmic tail truncations resulted in doubly mutated genomes (*i.e.*, two mutation classes), for example 3'-PNMG_(α -9)L-5', 3'-PNMG_(α -1)L-5', and 3'-PMNG_(α -9)L-5', 3'-PMNG_(α -1)L-5'. The double mutant genome cDNAs were constructed by swapping the natural G gene in the N shuffled genomes, with either the truncated G_(α -1) or G_(α -9) genes

described above. The swap was performed by digestion of donor cDNAs (5'-NPM G_(α-1)L-3' and 5'-NPM G_(α-6)L-3') with MluI and HpaI, followed by ligation of the purified, truncated G genes into the MluI/HpaI sites of the N shuffled cDNA genomes. These double mutants were rescued from cDNA, triple plaque purified, amplified and characterized in cell culture by plaque size and growth kinetics as described below.

Non-Cytopathic M Gene Mutations

The VSV M gene encodes the virus matrix (M) protein, and two smaller in-frame polypeptides (M2 and M3). The M2 and M3 polypeptides are translated from the same open reading frame (ORF) as the M protein, and lack the first 33 and 51 amino acids respectively. A recombinant VSV vector comprising non-cytopathic M gene mutations (i.e., VSV vectors that also do not express M2 and M3 proteins) was generated as described below, and further comprised one or more additional mutation(s) thereby resulting in a VSV vector that was highly attenuated in cell culture and in animals.

The non-cytopathic M gene mutations (M_(ncp)), which result in the conversion of methionines 33 and 51 to alanines (M33A, M51A) were generated using a PCR based cloning strategy, where the necessary nucleotide substitutions (AUG to GCT) were incorporated into the PCR primers (Jayakar and Whitt, 2002; Jayakay *et al.*, 2000). The resulting PCR products containing the M33,51A mutations were then cloned into the full length VSV cDNA genome, allowing rescue of virus that does not express M2 and M3 polypeptides.

The M33,51A mutations present in the recombinant VSV vector cDNA designed by Jayakar and Whitt, were transferred to the VSV vector(s) cDNA by exchanging the XbaI-MluI fragment (spanning the entire M gene and part of the P gene). The cDNA fragment swap did not result in any additional amino acid coding changes over and above the M33,51A mutations.

Combination of G Protein Cytoplasmic Tail Mutations and Non-Cytopathic M Gene Mutations

The combination of both the G protein cytoplasmic tail truncations and non-cytopathic M gene mutations resulted in doubly mutated genomes (i.e., two mutation

classes), for example 3'-NPMncpGct-1L-5' or 3'-NPMncpGct-9L-5'. The double mutant genome cDNA's were constructed by swapping M gene cDNA containing the mutations that give rise to the non-cytopathic phenotype, into full length genome cDNA that contained either G_(α-1) or G_(α-9) mutations. In each case, the swapped cDNA fragment stretched from the unique Xba I site in the P gene to the unique Mlu I site in the 5' non-translated region of the G gene, and included the entire non-cytopathic M gene sequence.

As described previously the non-cytopathic M protein differed from the M protein it replaced, by only two amino acid substitutions (M33A and M51A), which give rise to the non-cytopathic phenotype. These doubly mutated genomes were then further modified by insertion of the HIV-1 gag gene at position 5 in the genome, between the G and L genes, to permit expression of gag protein for immunogenicity studies. As for other virus rVSV vectors the gag gene was cloned into the unique Xho I/Nhe I sites at position 5 of the genome cDNA.

VSV N Gene Temperature Sensitive Mutations and/or VSV L Gene Temperature Sensitive Mutations

A recombinant VSV (rVSV) encoding HIV Gag protein from the first 3' cistron in the viral genome (rVSV-Gag₁) was modified by replacing the N gene and/or L gene with homologous coding sequences derived from known biologically-derived VSV temperature sensitive (ts) mutants (Pringle, 1970). The resulting vectors, (i) rVSV-Gag₁tsN (i.e., 3'-gag₁-N_(ts)PMGL-5') contained the ts N gene from VSV strain ts41, (ii) rVSV-Gag₁tsL (i.e., 3'-gag₁-NPMGL_(ts)-5') contained the L gene from VSV strain ts11 and (iii) rVSV-Gag₁tsN+L (i.e., 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5') contained both the ts N gene from VSV strain ts41 and the L gene from VSV strain ts11. VSV strains ts41 and ts11 are also known in the art as tsG41 and tsG11, respectively.

Both biologically-derived ts gene-donor strains were isolated by Pringle (Pringle, 1970) after subjecting a laboratory-adapted VSV (the Glasgow strain of the Indiana Serotype) to chemical mutagenesis. Pringle also mapped the ts mutations to the N or L gene.

The ts41 N and ts11 L genes were cloned from infected-cell RNA. Briefly, BHK cells were infected with ts11 or ts41 at permissive temperature (31-32°C). The infection was allowed to proceed until cytopathic effect was evident in more than

00051

75% of the cell monolayer, at which time total RNA was extracted and purified. The RNA then was reverse-transcribed using gene-specific primers to direct cDNA synthesis after which the cDNA was amplified by PCR. The amplified cDNAs were then cloned into the rVSV vector genomic cDNA and verified by sequence analysis.

5 The complete genomic sequence of ts11, ts41, and their progenitor strain (Glasgow) was determined to identify coding changes that contribute to the ts phenotype. By comparing coding sequences from the rVSV vector background, the Pringle ts mutants, and the Glasgow progenitor virus, it is possible to predict which coding changes contribute to the ts phenotypes of rVSV-Gag,tsN, rVSV-Gag,tsL and
10 rVSV-Gag,tsN+L vectors.

Table 3 is a comparison of N protein amino acid sequences. It is apparent from the data, that replacement of the rVSV vector N gene with the ts41 homolog resulted in 4 amino acid substitutions. Any of these changes may affect N protein function in the context of the vector genetic background and contribute to the ts phenotype. It was notable that only one change (Tyr to Cys at position 74, residues shown in *italics*) distinguished ts41 from its progenitor virus (Glasgow), suggesting that this substitution may be a critical ts determinant.

TABLE 3
COMPARISON OF VSV N PROTEINS

Amino Acid No.	Virus Strain		
	XN2	ts41	Glasgow
14	Val	Ile	Ile
74	Tyr	Cys	Tyr
128	Ser	Arg	Arg
353	Asn	Ser	Ser

Similarly, Table 4 provides the L protein comparison. Replacement of the L gene in the rVSV vector with the ts11 counterpart resulted in 13 amino acid coding changes. As mentioned above for the N gene, any of these coding changes may contribute to the observed ts phenotype produced by replacement of the L gene, but several of these coding mutations (shown in *italics*) are of greater interest because they also differentiate ts11 from its Glasgow progenitor virus, potentially identifying these amino acid substitutions as key contributors to the ts phenotype.

TABLE 4
COMPARISON OF VSV L PROTEIN

Amino Acid No.	Virus Strain		
	XN2	ts11	Glasgow
87	Pro	Ser	Ser
88	Thr	Ala	Thr
202	Ile	Leu	Leu
203	Arg	Lys	Lys
268	Tyr	His	Tyr
367	Thr	Ala	Ala
1112	Pro	Ser	Pro
1374	Ala	Val	Val
1519	Ile	Leu	Leu
1792	Leu	Val	Val
1793	Ile	Val	Ile
2042	Leu	Ser	Leu
2075	Arg	Lys	Lys

G-Stem Mutations and G-Stem/Gene Shuffling Mutations

In certain embodiments, a genetically modified VSV of the invention comprises a mutation in the G gene, wherein the encoded G protein has a mutation in the membrane-proximal stem region of the G protein ectodomain, referred to as G-stem protein. The G-stem mutation was introduced by replacing the G gene in the VSV XN vector genetic background (Schnell et al., 1996) with a modified G gene encoding G-stem. G-stem (Robison, 2000) is composed of 108 out of 512 G protein amino acids including: 1) the first 17 amino acids of G protein, which encompasses the signal sequence that targets the polypeptide for membrane insertion; 2) 42 amino acids of the membrane-proximal extracellular domain referred to as the stem; 3) the 20 amino acid membrane-spanning domain; and 4) the 29 amino acid carboxy-terminal intracellular tail. This configuration of the G-stem polypeptide contains sufficient G protein sequence to mediate maturation of viral particles, but lacks sequences necessary to act as a cell attachment protein. Consequently, cells infected with a G-stem vector will express viral proteins and the encoded foreign antigen, but will produce progeny viral particles that are not infectious because the G-stem vector does not encode a fully functional G protein.

To produce G-stem vector particles that contain functional G protein needed to infect a target cell, full-length G protein must be provided in *trans*. This can be accomplished during virus rescue and subsequent vaccine production by one of several procedures: 1) cell lines can be developed that express G protein; 2) a
5 complementing viral vector that expresses G protein can be employed, such as adenovirus, MVA, or VEE; or 3) cells used for production can be transfected with a plasmid DNA vector or mRNA encoding G protein.

Presently, G-stem vector is produced by transient complementation in cells transfected with a plasmid designed to express G protein. This avoids the need to
10 generate cell lines that express G protein, which are difficult to produce because G protein is toxic, and also avoids introduction of a biological reagent like helper-virus into the production process. In some configurations of the G-stem vector, the cistrons encoding viral proteins have been shuffled downstream to permit insertion of a foreign gene into the first genome position. This attenuates the virus and places
15 the foreign antigen gene proximal to the promoter ensuring high levels of expression.

As described above in Section A1, insertion of the HIV *gag* gene (or any other gene) into the VSV genome at position 1 (3'-*gag*₁-NPMGL-5') effectively results in a gene shuffling mutation, wherein the N, P, M, G and L genes are each moved from their wild-type positions to more distal positions on the genome. Thus,
20 the combination of both the G_(stem) mutation and the insertion of *gag* into the VSV genome at position 1 (*gag*₁), resulted in a doubly mutated genome 3'-*gag*₁-NPMG_(stem)L-5'.

Rescue of Vesicular Stomatitis Viruses in 293 Cells

The successful rescue of VSV from 293 cells was achieved using the basic heat shock/plasmid-T7 system described in International application WO 2004/113517 (specifically incorporated herein by reference), according to the following revised protocol.

Materials

Plasmid DNAs: 1) Full-length viral genomic cDNA, 2) pT7-N, 3) pT7-P, 4) pT7-L, 5) pT7-M, 6) pT7-G and 7) pCI-Neo-bcl-T7 (p0061).

Calcium-phosphate transfection reagents: 1) 2X BES-buffered saline: 50 mM BES (pH 6.95-6.98), 280 mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄, 2) 2.5 M CaCl₂ and 3) Hepes-buffered saline wash solution (HBS): 20 mM hepes (pH7.0-7.5), 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂.

Cell Culture Solutions: 1) DMEM supplemented with 10% certified, heat-inactivated FBS (DMEM/FBS), 2) Iscoves Modified Minimal Essential Medium (IMEM) supplemented with 10% certified, heat-inactivated FBS (IMEM/FBS), 3) Poly-L-Lysine: 0.01% in H₂O, 4) PBS and 5) Porcine trypsin/EDTA.

Procedures

293 Cell Culture: 293 cells can be difficult to culture, and there are number of different methods to handle them. The current method has been used successfully as part of a rescue system for VSV and modified VSV vector constructs.

Routine Subculturing:

1) Remove medium and wash the confluent monolayer (10 cm plate) with 5 ml of warm PBS; Pipet gently along the side of the dish to prevent detachment of the cells (293 cells left at room temperature for too long, or in media that become basic (red), will detach).

2) Gently add 2 ml of trypsin and rock the plate to cover the entire monolayer. Aspirate the trypsin and allow the plate to stand at room temperature for about a minute. Tilt the plate on a 45-degree angle and tap it against the working surface of

the hood to detach the cells. If the cells do not detach, incubate another minute at room temperature (make sure the cells detach at this stage so that vigorous pipeting can be avoided).

3) Gently add 5 ml of DMEM/FBS and pipet up and down slowly to disperse the cells.

4) Add 1 ml of cells to a plate containing 9 ml of DMEM/FBS.

5) Incubate at 37°C, 5% CO₂.

Subculture for transfection:

1) Coat the desired number of plates with poly-L lysine. Add about 3-4 ml of 0.001% poly-L lysine per plate and allow it to stand at room temperature for at least 30 minutes. Aspirate the poly-L lysine solution. Rinse the plate with 5 ml of medium.

2) Trypsinize the cells as described above. Use a split ratio that will yield a 50-75% confluent plate the following day (1:3 to 1:6).

3) After detaching the cells add IMEM/FBS and transfer the cells to the coated plate containing 9 ml of IMEM/FBS. It seems to be important to split the cells and allow overnight growth in IMEM/FBS before transfection.

4) Incubate at 37°C, 5% CO₂.

Transfection:

1) 1-3 hours prior to transfection, feed the cells with 9 ml of IMEM/FBS and incubate the cells in a 32°C incubator set at 3% CO₂.

2) Prepare the calcium-phosphate-DNA transfection mixture as follows:

a) Combine the following DNAs in a 5ml polypropylene tube: (i) 8 µg T7-N, (ii) 4 µg T7-P, (iii) 1.2 µg T7 L, (iv) 1.0 µg T7-M, (v) 1.0 µg T7-G (vi) 10µg of viral genomic cDNA clone and (vii) 10µg of hCMV-T7 expression vector.

b) Adjust the volume to a final volume of 450 µl with water.

c) Add 50 µl 2.5M CaCl₂.

d) While gently vortexing the tube, add 500 µl of 2XBBS then allow the tube to stand at room temperature for 15-20 minutes.

3) Remove the cells from the incubator and slowly add the calcium-phosphate-DNA mixture to the culture medium and swirl gently to distribute the precipitate. Immediately return the cells to the 32°C-3%CO₂ incubator.

5 4) Three hours after initiating transfection, seal the culture dishes in a plastic bag and fully submerge in a water bath set at 43°C for 2 hours to induce the cellular heat shock response.

5) After heat shock, return the cells to the 32°C-3% CO₂ incubator and continue incubation overnight.

10 6) The following day, wash the cells 2 times with HBS and feed the cells with 10ml of IMEM/FBS. Incubate at 37°C, 5% CO₂.

7) At 48-72 hours after initiating transfection, set up sufficient T150 flasks containing 20 ml DMEM/FBS for transfer of transfected cells to the larger vessel. One T150 flask for every 10cm plate that was transfected.

15 8) Transfer the transfected 293 cells by gently pipeting the culture medium over the monolayer to dislodge it from the cell surface. Avoid vigorous pipeting and use just enough force to dislodge the cells. After the cells are dislodged, pipet up and down about 5 times to reduce the size of the cell clumps then transfer the medium and cells to a T150 flask containing the 20 ml of IMEM/FBS.

20 9) Four to 6 hours later, replace the medium with fresh DMEM supplemented with 10% FBS (note that this step can be delayed until 24 hours if the cells are not adhering to the plate. Also, this step has been skipped successfully).

10) Monitor the cells for 5-7 days to detect evidence of cytopathic effect.

25 11) When CPE appears evident, transfer 50 ul of medium supernatant to well in a six well plate that contains medium and an established Vero cell monolayer. CPE should be visible the following day if rescue has occurred. (Note that this step is important because the 293 cells do at times detach from the surface of the T150 flask and appear VSV-Infected when they actually are not).

30 12) After transferring the small sample to the Vero cell monolayer, harvest the cells and medium from the T150 flask and freeze at -70. The 293 cells can generally be harvested by pipeting the medium over the monolayer to detach the cells.

Rescue of Vesicular Stomatitis Viruses in Vero Cells

Solutions

The following solutions are generally useful for host cell transfection:

5 1) A 2XBBS (per L) solution (2XBES-buffered saline) of 280 mM NaCl [16.4 g NaCl (or 56 ml 5M NaCl)], 50 mM BES [10.7 g BES (free acid form)], and 1.5 mM sodium phosphate [0.21 g Na_2HPO_4]. The BBS solution is adjusted to pH 6.95-6.98 with NaOH. The solution is then filter-sterilized and stored frozen.

10 2) A 2.5 M CaCl_2 solution of 36.8 g per 100 ml total volume is prepared and stored at -20°C . The solution is filter-sterilized using nitrocellulose. Cellulose acetate filters are to be avoided because they clog. Alternatively, the transfection solutions are autoclaved for sterilization. However, the latter procedure may be less desirable, because the 2XBBS solution may change slightly during autoclaving.

The following solutions are generally useful for the medium:

15 1) A DMEM+FBS solution of DMEM (high glucose with glutamine; Gibco/BRL, [Grand Island, NY]), supplemented with 10% heat-inactivated and certified FBS, and 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (optionally up to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gentamicin.

20 2) An MEM+FBS solution of MEM (supplemented with glutamine, nonessential amino acids, 10% heat-inactivated and certified FBS, and 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (optionally up to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 20-25mM Hepes buffer; Gibco/BRL) (Grand Island, NY) and optionally including 1X Fungizone).

3) An HBS solution of Hepes-buffered saline wash solution, 20mM hepes, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1mM MgCl_2 .

25 Methods

A generally useful host cell can be selected from split Vero cells, which are placed in DMEM+FBS the day before transfection so they will be approximately 50% confluent [80-90% for RSV] the following day (in six-well plates or 12.5 cm^2 flasks). Higher cell densities work less effectively. The following day, each culture is fed 1-4
30 hours before transfection with 4.5 ml of DMEM+FBS. The cells are then transferred to a CO_2 incubator set at 3% CO_2 and 32°C . The Vero cells can be grown longer than overnight as long as they are approximately 50% confluent at the time of transfection.

A CaCl_2 /phosphate precipitate is obtained as follows: BBS and CaCl_2 are maintained at room temperature before starting. The DNA mix is prepared in a 5ml polypropylene tube containing a total volume of 250 μl , with plasmid DNA 2-20 μg total, and 25 μl CaCl_2 . The DNAs for full-length rescue include 5 μg of a full-length cDNA construct for VSV, 400 ng N protein, 300 ng P protein, 100-200 ng L protein, and 5-10 μg pCI-Neo-Bcl-T7 plasmid (SEQ ID NO: 1; Figure 2). The efficiency of rescue in Vero cells is low, so 3-6 wells are transfected per full-length construct being rescued.

After all DNA/ CaCl_2 solutions are prepared, 2XBBS is added. This is usually done by gently agitating a tube by continuous low-speed vortexing and adding 250 μl of 2XBBS dropwise down the side of the tube. This is repeated for all tubes, which are allowed to stand at room temperature for an additional 15-20 minutes to permit the DNA-Calcium-Phosphate precipitate to form. After the room temperature incubation, the precipitate is added dropwise to the cell culture medium and distributed evenly by rocking the plate. The medium is then incubated for three hours in an incubator set at 3% CO_2 . A level of 3% CO_2 is important for the BBS/ CaCl_2 transfection technique; 5% CO_2 works very poorly, if at all. The 3% CO_2 controls the pH of the medium and allows formation of an effective calcium-phosphate-DNA precipitate in the medium.

A heat shock procedure is then optionally carried out, for example at three hours after initiation of transfection. The cells are transferred to a water bath set at 44°C. The cells are sealed in a plastic storage bag so the cultures can be fully submersed in water. After three hours at 44°C, the cells are transferred back to a 32°C incubator set at 3% CO_2 and the incubation is continued overnight.

On the following day, the transfection medium is removed and the cells are washed two times with HBS. After washing, 2 ml of fresh DMEM+FBS are added. PBS and Hank's buffer works poorly for the wash step, probably because the phosphate in these buffers causes more CaCl_2 to precipitate out of the transfection medium.

A co-culture procedure is then optionally performed. The transfected cells are harvested at 48-72 hours post-transfection by scraping them into the medium and transferring the cells plus medium to a T25 flask that contained a 50% confluent monolayer of Vero cells. Six hours after initiating this co-culture, the medium is

replaced with 4 ml of MEM+FBS. The cultures are then incubated for five days. If the medium begins to appear exhausted during this incubation period, 2 ml of media are removed and replaced with fresh MEM+FBS. It is not recommended that all of the media be replaced, in order to conserve any small amount of virus being generated during rescue which may be in the media. During this co-culture phase, CPE may become evident, but this is usually not the case. If no CPE is evident, the rescue can be continued.

The cells are harvested five days after initiating the co-culture. First, 0.5 ml of 2.18M Sucrose, 37.6 mM KH_2PO_4 , 71.0 mM K_2HPO_4 , 49.0 mM sodium glutamate are added to the medium and mixed by rocking the flask. Then the cells are scraped into the medium, pipetted up-and-down to mix, and then aliquoted into freezer tubes for shipping and then quick-frozen in a dry-ice/ethanol bath and stored at -80°C .

VSV Vector Purification

Rescued VSV vectors were plaque-purified from the supernatants of transfected cells. After three successive rounds of plaque purifications, virus was amplified on BHK cells to produce a seed stock, which in turn was further amplified on BHK cells to produce a virus working stock. In order to prepare large amounts of virus for animal experiments, the working stock was used to infect 10-20 T-150 flasks of confluent BHK cells, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5-1.0 plaque forming units (pfu)/cell. After 48 hours at 32°C , the infected cell supernatants were clarified by centrifugation at $4,000 \times g$. Virus was then concentrated from the supernatants by centrifugation in a SW 28 rotor at 25,000 rpm for one hour, through a 10% sucrose cushion. Virus pellets were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and snap frozen in an ethanol/dry ice bath. The concentrated virus stock was then titrated on Vero cell monolayers to determine the number of infectious particles in the preparation.

Virus Titration

The number of infectious virus particles in a virus preparation was determined by a standard plaque assay. Briefly, freshly confluent overnight Vero cell monolayers in six-well plates were infected with ten-fold serial dilutions of the virus preparation. To do this, growth medium was aspirated from the cell monolayers and

000000

100 μ l aliquots of each virus dilution in DMEM were transferred in triplicate to the center of cell monolayers. To prevent cell desiccation 400 μ l of DMEM was then added to each cell monolayer and the plates were held at room temperature for fifteen minutes, followed by thirty minute incubation at 37°C, 5% CO₂, with occasional rocking. The virus inoculum was then removed and each cell monolayer was overlaid with 3 ml of 0.8% agarose in DMEM. Plates were then incubated at 37°C, 5% CO₂ for 1-4 days to allow plaque formation. The agarose plugs were then removed, and cells were stained with crystal violet (2% crystal violet in 50% methanol) for ten minutes at room temperature. Excess stain was then removed and the cell monolayers were rinsed thoroughly with water. Virus plaques were then visualized in the cell monolayer as small holes that did not stain blue.

Quantitation of Viral RNA by Real Time PCR

A quantitative Real-Time PCR (RT/PCR) assay was used for detection and quantitation of VSV genomes in the tissue of animals. The assay utilizes a 2-step RT/PCR approach that specifically detects the negative sense virus genomic RNA and uses a synthetic oligonucleotide of the entire amplicon for development of a standard curve. Briefly, brain tissues from monkeys, ferrets and mice were homogenized as 20% W/V slurry in SPG. The slurry was centrifuged at 3,000 x g for fifteen minutes to pellet particulate matter. The supernatant was then further centrifuged at 14,000 x g, and total RNA was extracted from the resulting supernatant. This RNA was used as template for reverse transcription, with virus specific primers, and the products were then used for the Real-Time PCR assay.

Determination of 50% Lethal Dose (LD₅₀) of VSV vectors in mice

The mouse LD₅₀ model was used as a measure of the relative attenuation of the VSV vectors. Several log-fold dilutions of wild-type VSV, 3'-NPMG_(α -1)L-5', 3'-PNMG_(α -1)L-5', and 3'-PMNG_(α -1)L-5' were injected intracranially into four-and-a-half-week-old female Swiss Webster mice (6-10 mice per group). Mice were followed for weight loss, paralysis and death (LD₅₀) for three weeks. The LD₅₀ was calculated from the cumulative percent mortality by the method of Reed and Muench.

Mouse Immunogenicity Studies

Mice (n=15) were immunized intramuscularly with 1×10^7 pfu of the indicated VSV vectors (Indiana serotype) set forth in Example 4. Splenocytes from one set of mice ("Prime", n=5) were isolated at the peak of the effector phase 7 days post priming. Two sets of mice (n=10) were boosted with 1×10^7 pfu of the indicated VSV vector (NJ-G-switch version). Splenocytes from one set of mice ("Boost", n=5) were isolated at the peak of the effector phase 5 days post boosting. Splenocytes from another set of mice (Memory, n=5) were isolated during the memory phase 30 days post boosting. Gag specific CD8 T cell frequencies were determined by tetramer staining. Gag specific IFN- γ secretion was determined by ELISPOT after overnight stimulation with the gag immunodominant peptide.

EXAMPLE 2

CHARACTERIZATION OF VSV MUTANTS

Substantial differences between the plaque sizes of the combined two mutation class VSV vectors described in Example 1 (N shuffled/G protein ct truncation) versus single class mutation VSV vectors were observed (Table 5). Typically, single class mutation VSV vectors formed plaques of countable size in a twenty-four hour plaque assay, while some of the N shuffled/G protein ct truncation vectors required three to four days to form equivalent sized plaques. The relative differences in plaque size for the VSV vectors also paralleled relative differences observed during growth kinetics studies in cell culture (FIG. 1 through FIG. 3).

TABLE 5
RELATIVE PLAQUE SIZE OF VSV VECTORS

VSV Vector	Plaque Size at 48 hours post infection
3'-NPMGL-5'	5+ 
3'-PMNGL-5'	3+ 
3'-NPMG _(α-1) L-5'	2+ 
3'-PNMG _(α-1) L-5'	1+ 
3'-PMNG _(α-1) L-5'	0.5+ 

EXAMPLE 3

5 VSV NEUROVIRULENCE STUDIES

The synergistic attenuation of VSV comprising a combination of two or more mutation classes, relative to the single class VSV mutant vectors, was evaluated in a series of mouse, ferret and monkey neurovirulence studies, the methods of which are described in Example 1. Mice are highly permissive for VSV replication and this property allows them to be used to discriminate different levels of virus growth and attenuation. A distinct gradient of pathogenicity/attenuation was observed in mice for the different VSV vectors (Table 6 and Table 7). For example, the LD₅₀ in mice inoculated intracranially with 3'-NPMGL-5', 3'-NPMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-5' or 3'-PMNG_(α-1)L-5' (Table 6), indicated the following relative attenuation gradient: 3'-PMNG_(α-1)L-5' (LD₅₀ = 2 x 10⁵) > 3'-PNMG_(α-1)L-5' (LD₅₀ = 1 x 10⁴) > 3'-NPMG_(α-1)L-5' (LD₅₀ = 14.5) > 3'-NPMGL-5' (LD₅₀ = 3.2).

TABLE 6
NUMBER OF MICE DEAD OR PARALYZED

Vector	IC Dose (pfu)					
	1	10	100	1000	10000	100000
3'-NPMG _(α-1) L-5' (LD ₅₀ = 14.5 pfu)	ND	3 Died	5 Died	6 Died	6 Died	ND
3'-PNMG _(α-1) L-5' (LD ₅₀ = 1 x 10 ⁴ pfu)	ND	2 Paralyzed	3 Died 1 Paralyzed	1 Died 1 Paralyzed	1 Died 1 Paralyzed	ND
3'-PMNG _(α-1) L-5' (LD ₅₀ > 2 x 10 ⁵ pfu)	ND	ND	1 Died 1 Paralyzed	1 Paralyzed	3 Paralyzed	2 Died 4 Paralyzed
3'-NPMGL-5' (wt) (LD ₅₀ = 3.2 pfu)	1 Died	5 Died	6 Died	6 Died	ND	ND

6 mice were inoculated intracranially (IC) with each of the vectors above.

5 The LD₅₀ in mice injected intracranially with VSV vectors having zero (wild-type VSV), one, two, three and four (*gag* gene insertion) mutation classes, shown below in Table 7, also exhibited a similar attenuation gradient. Furthermore, mice injected intracranially with VSV vectors 3'-*gag*₁-PMNG_(α1)L-5', 3'-*gag*₁-N_(α)PMGL_(α)-5, 3'-*gag*₁-NPMGL_(α)-5', 3'-*gag*₁-NPM_(nsp)G_(α1)L-5, 3'-*gag*₁-PMNG_(αβ)L_(α)-5' and 3'-*gag*₁-NPMG_(stem)L-5', exhibited no mortality.

10

TABLE 7
INTRACRANIAL NEUROVIRULENCE OF VSV VECTORS IN MICE

Vector	LD ₅₀ (pfu)	No. of Mutation Classes
3'-NPMGL-5' (VSV wt)	3.2	0
3'-NPMGL-5' (ΔVSV)	10	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	10	1
3'-PNMGL-5'	12	1
3'-PMNGL-5'	14	1
3'-NPMG _(α-1) -L-5'	14.5	1
3'-NPMG _(α-1) -gag ₅ -L-5'	24	2
3'-gag ₁ -NPMGL-5'	115	1
3'-PNMG _(α-1) -L-5'	1×10 ⁴	2
3'-PMNG _(α-1) -L-5'	2×10 ⁵	2
3'-gag ₁ -PMNG _(α-5) -L-5'	1×10 ⁵	3
3'-gag ₁ -PNMG _(α-1) -L-5'	1×10 ⁵	3
3'-NPM _(ncp) G-gag ₅ -L-5'	>1×10 ⁵	2
3'-gag ₁ -N _(ns) PMGL-5'	8×10 ⁵	2
3'-PMNG _(α-1) -gag ₅ -L-5'	1×10 ⁷	3
3'-NPM _(ncp) G _(α-1) -gag ₅ -L-5'	>1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(α-1) -L-5'	>1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -N _(ns) PMGL _(ns) -5'	>1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -NPMGL _(ns) -5'	>1×10 ⁷	2
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(α-1) -L-5'	>1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(α-5) -L _(ns) -5'	>1×10 ⁷	4
3'-gag ₁ -NPMG _(stam) -L-5'	>1×10 ⁷	2

5 Histopathology data from Cynomolgus monkeys inoculated intrathalamically
with the same series of vectors indicated a very similar gradient of attenuation. Both
sets of animal data were further corroborated by results from a series of ferret
neurovirulence studies, where infectious virus and levels of genomic RNA present in
the brains of intracranially inoculated animals were measured periodically by plaque
assay and Real-Time PCR, respectively. Collectively these data demonstrate that
10 the combination of two or more mutation classes possess a level of attenuation that
is substantially greater than the single mutation class VSV vectors. The mouse LD₅₀

titers strongly indicate there is a powerful synergistic effect on attenuation by combining two different classes of mutation in the same VSV vector.

EXAMPLE 4

5 ENHANCED IMMUNOGENICITY OF ATTENUATED VSV VECTORS

10 The immunogenicity of attenuated VSV vectors 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(cbs)L-5' and 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' were compared to VSV prototype vectors 3'-NPMG-gag₅-L-5' and 3'-NPMGL-5'. Mice were immunized with one of the above VSV vectors, as described in Example 1. The attenuated VSV vectors induced immune responses that were stronger than those induced by the prototype VSV-Gag₅ vector (3'-NPMG-gag₅-L-5'). Most notable was 3'-gag₁-PMNG_(cbs)L-5', which induced statistically significant higher Gag specific T cell frequencies than were induced by the prototype when assessed after priming and boosting, as well as during the memory phase of the response (Table 8).

15 TABLE 8
 GAG SPECIFIC CD8 T CELL FREQUENCIES

Vector	Percent Gag Tetramer Positive CD8 T-cells		
	Prime	Boost	Memory
3'-NPMGL-5'	0.24	0.15	0.21
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	1.46	2.29	0.92
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) L-5'	0.96	3.42	2.25
3'-gag ₁ -PMNG _(cbs) L-5'	2.29*	8.68*	3.13*
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	0.66	3.59	0.21

* = Response significantly higher than seen for 3'-NPMG-gag₅-L-5' (student's t test, p<0.05).

20 3'-gag₁-PMNG_(cbs)L-5' also induced IFN-γ secretion that trended higher than induced by the prototype 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Table 9). Responses to 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5' and 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' also trended higher than those induced by the prototype 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Table 9).

TABLE 9
GAG IFN-γ ELISPOT

Vector	IFN-γ Spots per 1×10 ⁶ Spleen Cells		
	Prime	Boost	Memory
3'-NPMGL-5'	0	1	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	680	887	196
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) -L-5'	372	984	668*
3'-gag ₁ -PMNG _(ct8) -L-5'	908	1,552	496
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	129	632	413

* = Response significantly higher than seen for 3'-NPMG-gag₅-L-5' (student's t test, p<0.05).

5

EXAMPLE 5

IMMUNOGENICITY OF INTRAMUSCULAR AND INTRANASAL DELIVERY OF ATTENUATED VSV
VECTORS EXPRESSING HIV GAG IN RHESUS MACAQUES

10 The following studies are designed to measure the immune responses elicited in Rhesus macaques, following immunization with attenuated VSV vectors expressing HIV gag protein.

15 The study set forth in Table 10 is performed with a total of twenty-four genetically unselected male rhesus macaques, wherein each group of animals (*i.e.*, Groups 1-6) is immunized either intramuscularly or intranasally with one of the following VSV vectors at a dose of 1×10⁷ (pfu): 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' (TsN+L), 3'-gag₁-PMNG_(ct8)-L-5' (N4CT9) or 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

20 The study set forth in Table 11 is performed with a total of twenty-four genetically unselected male rhesus macaques, wherein each group of animals (*i.e.*, Groups 1-8) is immunized either intramuscularly or intranasally with one of the following VSV vectors at a dose of 1×10⁷ (pfu): 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)-L-5' (MncpCT1), 3'-gag₁-NPMG_(stem)-L-5' (G Stem), 3'-gag₁-PMNG_(ct1)-L-5' (N4CT1) or 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

Generally, the following assays are used to examine systemic and humoral immune responses and VSV shedding from each animal:

Cellular Immune Responses: HIV gag peptide specific IFN- γ ELISPOT response and VSV N peptide specific IFN- γ ELISPOT response. Humoral Immune Response:

- 5
- Serum anti-HIV gag antibody titers by ELISA, serum anti-VSV antibody titers by ELISA and serum anti-VSV neutralization antibody titers.

TABLE 10
PRIMATE IMMUNOGENICITY STUDY

Group	# Animals	Prime (Indiana serotype)	Boost (New Jersey serotype)	Dose	Route
1	5	TsN+L	TsN+L	1x10 ⁷	IM
2	5	TsN+L	TsN+L	1x10 ⁷	IN
3	5	N4CT9	N4CT9	1x10 ⁷	IM
4	5	N4CT9	N4CT9	1x10 ⁷	IN
5	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IM
6	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IN

Route IM is Intramuscular.
Route IN is Intranasal.

TABLE 11
PRIMATE IMMUNOGENICITY STUDY

Group	# Animals	Prime (Indiana serotype)	Boost (New Jersey serotype)	Dose	Route
1	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1x10 ⁷	IM
2	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1x10 ⁷	IN
3	5	G Stem	G Stem	1x10 ⁷	IM
4	5	G Stem	G Stem	1x10 ⁷	IN
5	5	N4CT1	N4CT1	1x10 ⁷	IM
6	5	N4CT1	N4CT1	1x10 ⁷	IN
7	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IM
8	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IN

Route IM is Intramuscular.
Route IN is Intranasal.

REFERENCES

- U.S. Patent 5,258,454
 U.S. Patent 5,556,747
 5 U.S. Patent 5,789,166
 U.S. Patent 6,391,548
 U.S. Patent 5,817,879
 U.S. Patent 6,168,943
 U.S. Patent 6,596,529
 10 U.S. Patent 6,033,886
 U.S. Patent 6,673,572
 U.S. Provisional Patent 60/477,389
- Ahmed and Lyles, "Identification of a Consensus Mutation in M Protein of Vesicular
 15 Stomatitis Virus from Persistently Infected Cells that Affects Inhibition of
 Host-directed Gene Expression" *Virology*, 237(1): 378-88, 1997.
 Atkinson *et al.*, *United States. Annu. Rev. Med.*, 43:451-463, 1992.
 Ball *et al.*, "Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of
 vesicular stomatitis virus" *Journal of virology*, 73(6):4705-4712, 1999.
 20 Bellini *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, 4:29-35, 1998.
 Canto *et al.*, "Status Spongiosus Resulting from Intracerebral Infection of Mice with
 Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Br. J. exp.*
Path., 57:321-330, 1976.
 Collins *et al.*, *Adv. Virus. Res.*, 54:423-451, 1999.
 25 Collins *et al.*, *Respiratory Syncytial Virus*. In "Field's Virology", 3rd Edition,
 Lippincott-Raven, 1443-1475, 2001.
 Cutts *et al.*, *J. Infectious Dis.*, 170:S32-S41, 1994.
 Evans *et al.*, "Temperature-sensitive mutants of complementation group E of
 vesicular stomatitis virus New Jersey serotype possess altered NS
 30 polypeptides", *Journal of Virology*, 31(2):325-333, 1979.
 Finke and Conzelmann, "Ambisense gene expression from recombinant rabies virus:
 random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein
 complexes into rabies virions", *J. Virol.*, 71:7281-7288, 1997.

- Finke and Conzelmann, "Virus promoters determine Interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus", *J. Virol.*, 73: 3818-3825, 1999.
- 5 Flamand and Bishop, "Primary In Vivo Transcription of Vesicular Stomatitis Virus and Temperature-Sensitive Mutants of Five Vesicular Stomatitis Virus Complementation Groups", *J. of Virology*, 12(6):1238-1252, 1973.
- Flamand and Pringle, "The homologues of spontaneous and temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus isolated in chick embryos and BHK-21 cells", *J. Gen. Virol.*, 11:81-85, 1971.
- 10 Flanagan *et al.*, "Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development", *J. Virology*, 75:6107-6114, 2001.
- Fredericksen and Whitt, "Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness", *Virology*, 240: 349-58, 15 1997.
- Gallione *et al.*, "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus N and NS Proteins", *J. Virol.*, 39:529-535, 1981.
- Gopalakrishna and Lenard, "Sequence alterations in temperature-sensitive M-protein mutants (complementation group III) of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 56(3):655-659, 1985.
- 20 Griffin, Measles Virus. In "Field's Virology", 3rd Edition, Lippincott-Raven, 1401-1442, 2001.
- Harty *et al.*, "A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding", *J. Virology*, 73(4):2921-2929, 1999.
- 25 Holloway *et al.*, "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus", *Virology*, 42(4):917-26, 1970.
- Irie *et al.*, "Functional Analysis of Late-Budding Domain Activity Associated with the PSAP Motif within the Vesicular Stomatitis Virus M Protein", *J. Virology*, 78(14):7823-7827, 2004.
- 30

00070

- Jayakar and Whitt, "Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus Cytopathology", *Journal of Virology*, 76(16):8011-8018, 2002.
- Jayakar *et al.*, "Mutations in The PPPY Motif of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Reduce Virus Budding by Inhibiting a Late Step in Virion Release", *Journal of Virology*, 74(21):9818-27, 2000.
- Jeetendra *et al.*, "The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion", *Journal of Virology*, 76(23):12300-11, 2002.
- Jeetendra *et al.*, "The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity", *Journal of Virology*, 77(23):12807-18, 2003.
- Kapikian *et al.*, *Am. J. Epidemiol.* 4:405-21, 1969.
- Kim *et al.*, *Am. J. Epidemiol.* 4:422-34, 1969.
- Li *et al.*, "Site-specific mutations in vectors that express antigenic and temperature-sensitive phenotypes of the M gene of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 62(10):3729-3737, 1988.
- Lundh *et al.*, "Non-Lethal Infection of Aminergic Reticular Core Nuerons: Age-Dependent Spread of ts Mutant Vesicular Stomatitis Virus from the Nose", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 47(5):497-506, 1988.
- Morita *et al.*, "Phenotypic revertants of temperature-sensitive M protein mutants of vesicular stomatitis virus: sequence analysis and functional characterization", *Journal of Virology*, 61(2):256-263, 1987.
- Pringle *et al.*, "Enhanced mutability associated with a temperature-sensitive mutant of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 39(2):377-389, 1981.
- Pringle *et al.*, "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype", *Journal of Virology*, 8(6):836-841, 1971.
- Pringle, "Genetic Characteristics of Conditional Lethal Mutants of Vesicular Stomatitis Virus Induced by 5-Fluorouracil, 5-Azacytidine, and Ethyl Methane Sulfonate", *Journal of Virology*, 5(5):559-567, 1970.

00071

- Printz and Wagner, "Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus: Synthesis of Virus Specific Proteins", *J. of Virology*, 7(5):651-662, 1971.
- Rabinowitz *et al.*, "Comparison of Central Nervous System Disease Produced by Wild-Type and Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus",
 5 *Infection and Immunity*, 13(4):1242-1249, 1976.
- Rabinowitz *et al.*, "The Uncoupled Relationship Between the Temperature-Sensitivity and Neurovirulence in Mice of Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *J. gen. Virol*, 35:237-249, 1977.
- Roberts *et al.*, "Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus
 10 Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge", *Journal of Virology*, 73:3723-3732, 1999.
- Robinson and Whitt, "The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly", *Journal of Virology*, 74(5):2239-2246, 2000.
- 15 Rose and Gallione, "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus G and M Proteins Determined from cDNA Clones Containing the Complete Coding Regions", *J. Virol*, 39:519+-528, 1981.
- Rose *et al.*, "An Effective Aids Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants", *Cell*, 106(5):539-49, 2001.
- 20 Rose *et al.*, "Glycoprotein Exchange Vectors Based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1", *Journal of Virology*, 74(23):10903-10, 2000.
- Schlehuber and Rose, "Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Recombinants Expressing
 25 the HIV-1 2F5 Epitope Within the VSV G Protein", Abstract Number 321, AIDS Vaccine 2003, New York, September, 2003.
- Schlereth *et al.*, "Successful Mucosal Immunization of Cotton Rats in the Presence of Measles-Specific Antibodies Depends on Degree of Attenuation of Vaccine Vector and Virus Dose", *Journal of General Virology*, 84:2145-2151, 2003.
- 30 Schlereth *et al.*, "Successful vaccine-induced seroconversion by single-dose immunization in the presence of measles virus-specific maternal antibodies", *J. Virology*, 74:4652-4657, 2000.

Schnell *et al.*, "Requirement for a Non-Specific Glycoprotein Cytoplasmic Domain Sequence to Drive Efficient Budding of Vesicular Stomatitis Virus", *The EMBO Journal*, 17(5):1289-1296, 1998.

5 Schnell *et al.*, "Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles", *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 93:11359-11365, 1996.

Wagner, "Pathogenicity and Immunogenicity for Mice of Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Infection and Immunity*, 10(2):309-315, 1974.

10 Wertz *et al.*, "Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3501-3506, 1998.

What is Claimed is:

1. A genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) comprising at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a temperature-sensitive (ts) mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.
2. The VSV of claim 1, wherein pathogenicity is further defined as neurovirulence.
3. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.
4. The VSV of claim 3, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.
5. The VSV of claim 3, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
6. The VSV of claim 3, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
7. The VSV of claim 3, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
8. The VSV of claim 3, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G is the gene

encoding the attachment glycoprotein and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.

9. The VSV of claim 3, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-9)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' and 3'-PMNG_(α-9)L-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G_(α-1) is G is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids, G_(α-9) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.
10. The VSV of claim 9, wherein the mutated genome is 3'-PMNG_(α-1)L-5'.
11. The VSV of claim 9, wherein the mutated genome is 3'-PNMG_(α-1)L-5'.
12. The VSV of claim 9, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, an ambisense RNA mutation, a non-cytopathic M gene mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation or a point mutation.
13. The VSV of claim 1, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
14. The VSV of claim 1, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 1,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
15. The VSV of claim 1, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 10,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.

00075

16. The VSV of claim 1, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
17. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation.
18. The VSV of claim 17, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.
19. The VSV of claim 17, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
20. The VSV of claim 17, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
21. The VSV of claim 17, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
22. The VSV of claim 17, wherein the M gene non-cytopathic (M_(ncp)) mutation is a mutation at methionine 33 and methionine 51 of the M gene.
23. The VSV of claim 17, comprising a mutated genome of 3'-NPM_(ncp)G_(α-1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α-2)L-5'.
24. The VSV of claim 17, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, an ambisense RNA mutation, a gene shuffling mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation, a G gene insertion mutation, a G-stem mutation, or a point mutation.

25. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are ts N gene mutation ($N_{(ts)}$) and a ts L gene mutation ($L_{(ts)}$).
26. The VSV of claim 25, comprising a mutated genome of 3'- $N_{(ts)}$ PMGL $_{(ts)}$ -5'.
27. The VSV of claim 25, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
28. The VSV of claim 1, wherein one mutation class is a G-stem mutation.
29. A genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation and at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.
30. The vector of claim 29, wherein pathogenicity is further defined as neurovirulence.
31. The vector of claim 29, wherein the foreign RNA is further defined as an open reading frame (ORF).
32. The vector of claim 29, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.
33. The vector of claim 32, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.

34. The vector of claim 32, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
- 5 35. The vector of claim 32, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
36. The vector of claim 32, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
- 10 37. The vector of claim 32, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G is the gene encoding the attachment glycoprotein and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.
- 15 38. The vector of claim 32, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-2)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' and 3'-PMNG_(α-2)L-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G_(α-1) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids, G_(α-2) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.
- 20 39. The vector of claim 38, wherein the mutated genome is 3'-PMNG_(α-1)L-5'.
- 25 40. The vector of claim 38, wherein the mutated genome is 3'-PNMG_(α-1)L-5'.
- 30 41. The vector of claim 38, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an

ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation or a non-cytopathic M gene mutation.

42. The vector of claim 32, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
43. The vector of claim 32, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 1,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
44. The vector of claim 32, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 10,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
45. The vector of claim 32, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
46. The vector of claim 32, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene

00079

encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.

47. The vector of claim 46, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
48. The vector of claim 47, wherein the HIV gene is *gag*.
49. The vector of claim 48, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-9)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-*gag*₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-*gag*₅-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-*gag*₅-5'.
50. The vector of claim 29, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation.
51. The vector of claim 50, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
52. The vector of claim 50, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
53. The vector of claim 50, wherein the M gene non-cytopathic (M_(ncp)) mutation is a mutation at methionine 33 and methionine 51 of the M gene.
54. The VSV of claim 50, comprising a mutated genome of 3'-NPM_(ncp)G_(α-1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α-9)L-5'.
55. The vector of claim 50, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

56. The vector of claim 50, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
57. The vector of claim 56, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
58. The vector of claim 57, wherein the HIV gene is *gag*.
59. The vector of claim 58, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-8)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-*gag*₅-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(ct-8)L-*gag*₅-5'
60. The vector of claim 29, wherein the two mutations are ts N gene mutation (N_(ts)) and a ts L gene mutation (L_(ts)).
61. The vector of claim 60, comprising a mutated genome of 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.
62. The vector of claim 60, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation,

a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambi-sense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

- 5 63. The vector of claim 60, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
- 10
- 15
- 20
64. The vector of claim 63, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
- 25 65. The vector of claim 64, wherein the HIV gene is *gag*.
66. The vector of claim 65, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-N₍₁₀₎PMGL₍₁₀₎-5' or 3'-N₍₁₀₎PMGL₍₁₀₎-*gag*₅-5'.
- 30 67. The vector of claim 29, wherein the two mutations are G stem mutation G_(stem) and a gene shuffling mutation.

68. The vector of claim 67, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-NPMG_(stem)L-5'
- 5 69. The vector of claim 68, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a ts mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
- 10 70. The vector of claim 67, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
- 15 20 25 30 71. An immunogenic composition comprising an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation and at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of

the VSV genome non-essential for replication, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.

- 5 72. The immunogenic composition of claim 71, wherein pathogenicity is further defined as neurovirulence.
73. The immunogenic composition of claim 71, wherein the foreign RNA is further defined as an open reading frame (ORF).
- 10 74. The immunogenic composition of claim 71, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.
- 15 75. The immunogenic composition of claim 74, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.
- 20 76. The immunogenic composition of claim 74, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
77. The immunogenic composition of claim 74, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
- 25 78. The immunogenic composition of claim 74, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
- 30 79. The immunogenic composition of claim 74, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix

protein, G is the gene encoding the attachment glycoprotein and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.

- 5 80. The immunogenic composition of claim 74, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-9)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' and 3'-PMNG_(α-9)L-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G_(α-1) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids, G_(α-9) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.
- 10 81. The immunogenic composition of claim 80, wherein the mutated genome is 3'-PMNG_(α-1)L-5'.
- 15 82. The immunogenic composition of claim 80, wherein the mutated genome is 3'-PNMG_(α-1)L-5'.
- 20 83. The immunogenic composition of claim 80, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation an ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation or a non-cytopathic M gene mutation.
- 25 84. The immunogenic composition of claim 71, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a
- 30

- coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding a T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
85. The immunogenic composition of claim 84, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
86. The immunogenic composition of claim 85, wherein the HIV gene is *gag*.
87. The immunogenic composition of claim 86, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(α-9)L-5', 3'-PNMG_(α-1)L-*gag*₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-*gag*₅-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-*gag*₅-5'.
88. The immunogenic composition of claim 71, wherein the composition is administered by a route selected from the group consisting of intravenous, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, oral, rectal, intranasal, buccal, vaginal and *ex vivo*.
89. The immunogenic composition of claim 71, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation.
90. The immunogenic composition of claim 89, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.

91. The immunogenic composition of claim 89, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
- 5 92. The immunogenic composition of claim 89, wherein the M gene non-cytopathic ($M_{(ncp)}$) mutation is a mutation at methionine 33 and methionine 51 of the M gene.
- 10 93. The immunogenic composition of claim 89, comprising a mutated genome of 3'-NPM_(ncp)G_(α -1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α -9)L-5'.
- 15 94. The immunogenic composition of claim 89, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
- 20 95. The immunogenic composition of claim 89, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an Influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
- 30

96. The immunogenic composition of claim 95, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
- 5 97. The immunogenic composition of claim 96, wherein the HIV gene is *gag*.
98. The immunogenic composition of claim 97, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(α-1)L-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(α-4)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(α-1)L-gag₅-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(α-4)L-gag₅-5'
- 10 99. The immunogenic composition of claim 71, wherein the two mutations are a ts N gene mutation (N_(ts)) and a ts L gene mutation (L_(ts)).
100. The immunogenic composition of claim 99, comprising a mutated genome of 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.
- 15 101. The immunogenic composition of claim 99, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
- 20 102. The immunogenic composition of claim 99, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a
- 25 30

nnngg

- Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.
103. The immunogenic composition of claim 102, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
104. The immunogenic composition of claim 103, wherein the HIV gene is *gag*.
105. The immunogenic composition of claim 104, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' or 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.
106. The immunogenic composition of claim 71, wherein the two mutations are G_(stem) mutation and a gene shuffling mutation.
107. The immunogenic composition of claim 106, wherein the mutated genome is 3'-*gag*₁-NPMG_(stem)L-5'
108. The immunogenic composition of claim 106, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a *ts* mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
109. The vector of claim 108, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a

hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a
 togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene,
 a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a
 polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio*
cholerae gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes*
 gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a
Neisseria meningitidis gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria*
diphtheriae gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a
Haemophilus gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene
 encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a
 CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor.

110. A method of immunizing a mammalian host against bacterial infection
 comprising administering an immunogenic dose of a genetically modified
 VSV vector comprising:
- (a) at least two different classes of mutations in its genome, the
 mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point
 mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-
 cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated
 G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion
 mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV
 pathogenicity; and
 - (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region
 of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA
 encodes a bacterial protein selected from the group consisting of a
Vibrio cholerae protein, a *Streptococcus pneumoniae* protein,
Streptococcus pyogenes protein, a *Streptococcus agalactiae* protein,
 a *Helicobacter pylori* protein, a *Neisseria meningitidis* protein, a
Neisseria gonorrhoeae protein, a *Corynebacteria diphtheriae* protein, a
Clostridium tetani protein, a *Bordetella pertussis* protein, a
Haemophilus protein, a *Chlamydia* protein and a *Escherichia coli*
 protein.

111. The method of claim 110, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.
- 5 112. The method of claim 111, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.
113. The method of claim 111, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
- 10 114. The method of claim 111, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
115. The method of claim 111, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
- 15 116. The method of claim 111, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5'.
- 20 117. The method of claim 111, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-9)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' and 3'-PMNG_(α-9)L-5'.
- 25 118. The method of claim 103, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation or a non-cytopathic M gene mutation.
- 30 119. A method of immunizing a mammalian host against viral infection comprising administering an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising:
- (a) at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-

00091

cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity; and

- 5 (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA encodes a viral protein selected from the group consisting of a HIV protein, a HTLV protein, a SIV protein, a RSV protein, a PIV protein, a HSV protein, a CMV protein, an Epstein-Barr virus protein, a Varicella-Zoster virus protein, a mumps virus protein, a measles virus protein, 10 an Influenza virus protein, a poliovirus protein, a rhinovirus protein, a hepatitis A virus protein, a hepatitis B virus protein, a hepatitis C virus protein, a Norwalk virus protein, a togavirus protein, an alphavirus protein, a rubella virus protein, a rabies virus protein, a Marburg virus protein, an Ebola virus protein, a papilloma virus protein, a polyoma virus protein, a metapneumovirus protein and a coronavirus protein.

120. The method of claim 119 wherein the RNA is a HIV gene selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.

121. The method of claim 120, wherein the HIV gene is *gag*.

122. The method of claim 119, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.

123. The method of claim 122, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids.

124. The method of claim 122, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.

125. The method of claim 122, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.

nnng2

126. The method of claim 122, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of nine amino acids.
- 5 127. The method of claim 122, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5'.
128. The method of claim 122, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(α-1)L-5', 3'-PNMG_(α-9)L-5', 3'-PMNG_(α-1)L-5' and
10 3'-PMNG_(α-9)L-5'.
129. The method of claim 122, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, an ambisense RNA mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion
15 mutation or a non-cytopathic M gene mutation.
130. The method of claim 122, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-PNMG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PNMG_(α-9)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(α-9)L-5',
20 3'-PNMG_(α-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(α-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(α-1)L-gag₅-5' or 3'-PMNG_(α-9)L-gag₅-5'.
131. The method of claim 119, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation.
- 25 132. The method of claim 131, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
133. The method of claim 131, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one amino acid.
30
134. The method of claim 131, wherein the M gene non-cytopathic (M_(ncp)) mutation is a mutation at methionine 33 and methionine 51 of the M gene.

135. The method of claim 131, comprising a mutated genome of 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5'.
- 5 136. The method of claim 123, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, an ambisense RNA mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
- 10 137. The method of claim 123, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-gag₅-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-gag₅-5'.
138. The method of claim 119, wherein the two mutations are a ts N gene mutation (N_(ts)) and a ts L gene mutation (L_(ts)).
- 15 139. The method of claim 138, comprising a mutated genome of 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.
- 20 140. The method of claim 138, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.
- 25 141. The method of claim 139, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' or 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-gag₅-5'.
142. The method of claim 119, wherein the two mutations are G_(stem) mutation and a gene shuffling mutation.
- 30 143. The method of claim 142, wherein the mutated genome is 3'-gag₁-NPMG_(stem)L-5'.

144. The method of claim 142, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a point mutation, a ts mutation, a gene shuffling mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation.

5

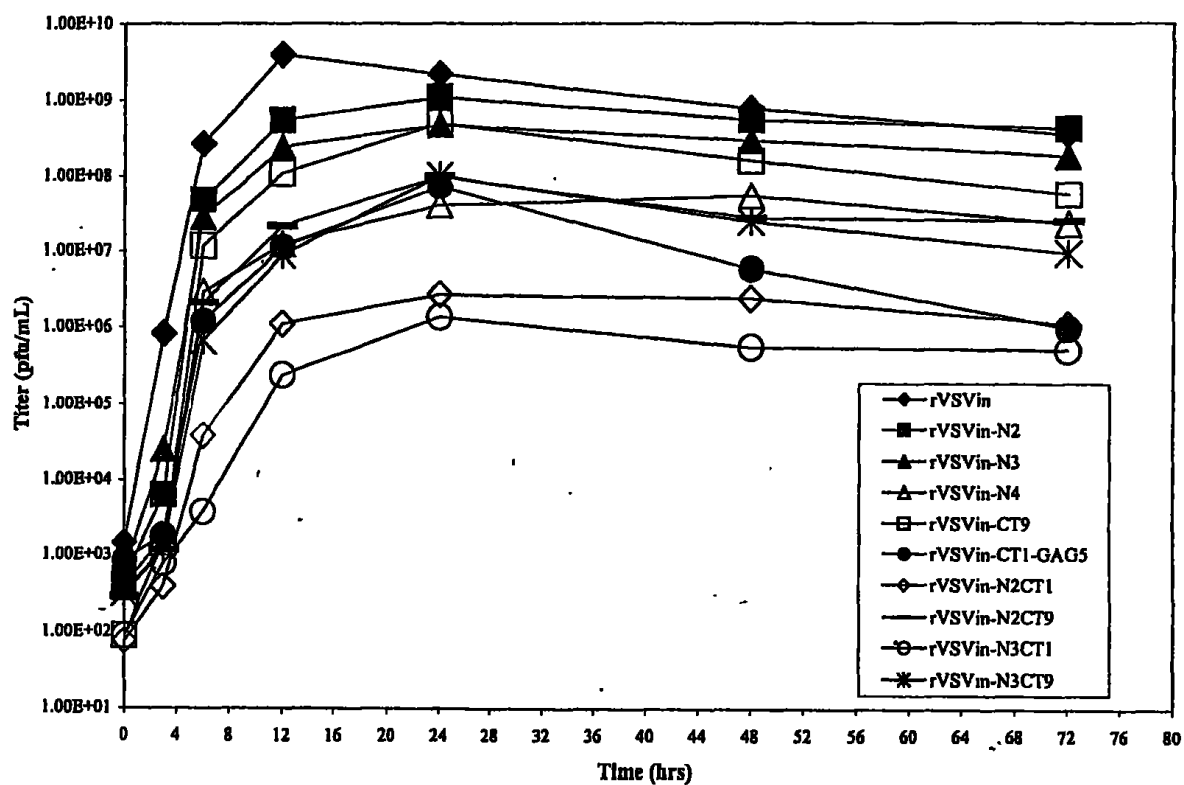


FIG. 1

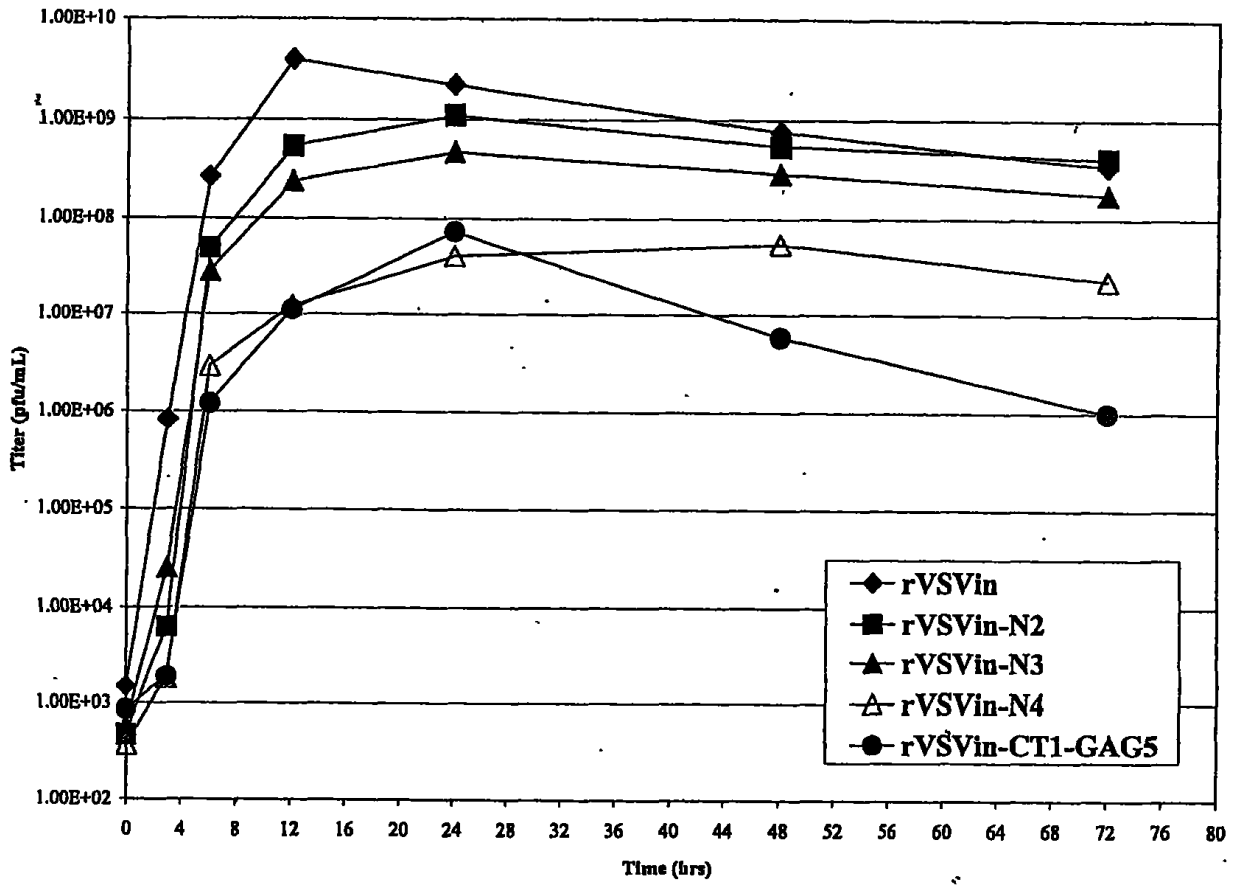


FIG. 2

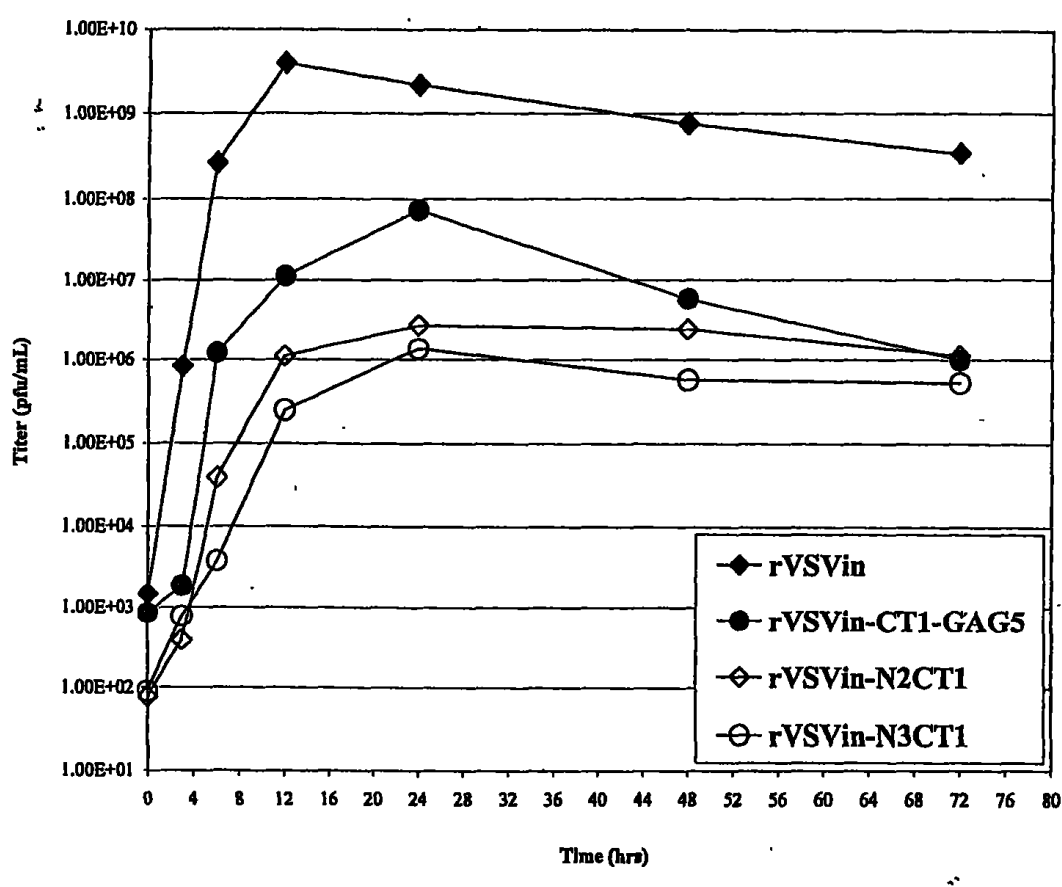


FIG. 3

AM101651PCT (03-22-2005).ST25
SEQUENCE LISTING

~~00000~~

98

**<110> wyeth
Clarke, David K
Hendry, Michael
Udem, Stephen
Parks, Christopher**

<120> SYNERGISTIC ATTENUATION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VECTORS THEREOF AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS THEREOF

<130> AM101651PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 1

Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg
1 5 10 15

Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
20 25

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Vesicular stomatitis virus

<400> 2

Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys
1 5

ATENUACIÓN SINERGÍSTICA DE VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR,
VECTORES DE ESTOS Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ESTOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona de forma general con los campos de la virología, microbiología, enfermedades infecciosas e inmunología. Más particularmente, la invención se relaciona con la atenuación sinérgica de virus de estomatitis vesicular y vectores de estos, mediante la combinación de diferentes clases de mutaciones.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

El virus de la estomatitis vesicular (VSV), un miembro de la familia Rhabdoviridae, tiene un genoma de ARN de hebra sencilla, sentido negativo, no segmentado. Su genoma Kb once tiene cinco genes que codifican cinco proteínas estructurales del virus; la proteína de nucleocápsido (N), que se requiere en cantidades estequiométricas para encapsidación del ARN replicado; la fosfoproteína (P), que es un cofactor de la polimerasa de ARN dependiente de ARN (L); la matriz de proteína (M) y la glicoproteína (G) (por ejemplo, ver Gallione et al. 1981, Rose and Gallione, 1981; Rose and Schubert, 1987 and Schubert et al., 1985; U.S. Patente Estadounidense 6,033,886; Patente Estadounidense 6,168,943).

El VSV es un virus nacido en artópodos que se puede transmitir a una variedad de huéspedes mamíferos, más comúnmente

ganado, caballos, cerdos y roedores. La infección por VSV de humanos no es común, y en general es asintomática o se caracteriza por síntomas similares a la gripe suave que se resuelve en tres a ocho días sin complicaciones. En razón a que el VSV no se considera un patógeno humano, y la inmunidad preexistente para el VSV es rara en la población humana, el desarrollo de VSV derivado de vectores ha sido un foco en áreas tales como las composiciones inmunogénicas y terapia de genes. Por ejemplo, se han establecido estudios en donde el VSV puede servir como un vector altamente efectivo para composiciones inmunogénicas, que expresan la hemaglutinina del virus de la influenza (Roberts et al., 1999), proteína H de virus de sarampión (Schlereth et al., 2000) y proteínas gag y nv HIV-1 (Rose et al., 2001). Otras características del VSV que le dan un vector atractivo incluyen (a) la capacidad de replicar robustamente en el cultivo celular; (b) la incapacidad de integrarse en el ADN de la célula huésped o experimentar recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos, que permiten la posibilidad para estrategias de inmunización prime-boost; (d) genes externos de interés que se pueden insertar en el genoma VSV y expresados abundantemente por la transcriptasa viral; y e el desarrollo de un sistema altamente especializado para el rescate de virus infeccioso de una copia de cADN del genoma de virus (Patente Estadounidense 6,033,886; Patente Estadounidense 6,168,943).

Aunque existe poca evidencia de compromiso neurológico VSV durante la infección natural, los animales (por ejemplo, primates, roedores, animales de manadas, que se inoculan

intracerebralmente (y en el caso de roedores intranasalmente) con el virus de tipo silvestre, cerebros de ratones pasados por virus de tipo silvestre o cultivos de células adaptados al tipo silvestre, se pueden desarrollar signos clínicos de la enfermedad, y usualmente mueren dos a ocho días post inoculación. Debido a estas observaciones, y a la necesidad de producir un vector para composiciones inmunogénicas para uso en humanos que tiene un perfil de seguridad excepcional, los vectores VSV bajo desarrollo se ensayan modelos de neurovirulencia animal pequeños y primates, rigurosos. Estos ensayos se diseñan para detectar cualquier virulencia residual en vectores VSV atenuados antes de consideración para avance a ensayos clínicos humanos.

La atenuación de los vectores prototípicos VSV resultan de la acumulación de sustituciones de nucleótido múltiples a través del genoma del virus durante pasaje en serie in Vitro y la síntesis y ensamble del genoma cADN. Estas mutaciones tienen efectos pleiotrópicos que dejan el virus menos patogénico en ratones que los virus adaptados en laboratorio de los cuales este se deriva (por ejemplo, ver Roberts et al., 1998). También se desarrollan vectores VSV atenuados adicionales de prototipo mediante truncación de la región de cola citoplásmica de la proteína G del virus, lo que conduce a mutantes VSV que son defectuosos en ciernes desde la membrana de plasma de las células infectadas ((Schnell et al., 1998).

Vectores VSV actualmente conocidos, atenuados putativamente o no, han tenido niveles inaceptables de virulencia residual cuando se ensayan en animales pequeños y modelos de

.. 00102

neurovirulencia de primates no humanos. El desarrollo de un vector VSV para uso tal como un vector para composiciones inmunogénicas, un vector de terapia de gen y similar, requerirá vectores VSV que tienen niveles mínimos a no detectables de patogenicidad en modelos de neurovirulencia animal. Así, actualmente subsiste la necesidad en la técnica de vectores virales para identificar genéticamente mutantes VSV atenuados, modificados que tienen significativamente patogenicidad reducida en mamíferos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona ampliamente con la atenuación sinérgica de virus de estomatitis vesicular (VSV). Más particularmente, la invención se relaciona con la identificación de clases de mutación combinada que atenúan sinérgicamente la patogenicidad de los vectores VSV en mamíferos y composiciones inmunogénicas de estos.

Así, en ciertas modalidades, la invención se dirige a un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, en donde las dos mutaciones VSV atenúan sinérgicamente la patogenicidad. En una modalidad particular, la patogenicidad del VSV se define adicionalmente como neurovirulencia. En otra modalidad, las clases de mutaciones son una mutación sensible a la temperatura (TS), una mutación de punto, un gen de mutación de mezcla, una mutación G-stem, una mutación de gen M no citofático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncada, una

mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.

En una modalidad particular, las dos mutaciones VSV son una mutación gen G truncada (aquí en adelante, "G_(ct)") y una mutación de mezcla de gen N, (que es, el gen N que se mueve lejos de su primer posición próxima al promotor 3' tipo silvestre, a una posición más distante en el orden de gen de VSV). En otra modalidad, la proteína G VSV modificada por el gen G truncado tiene una eliminación en al menos veinte aminoácidos de Terminal-carboxi (aquí en adelante, "G_(CT-9)"). En aún otra modalidad, la proteína G VSV codificada por el gen G truncado tiene una eliminación de al menos veintiocho aminoácidos en el Terminal carboxi (aquí en adelante, "G_(CT-1)"). En todavía otra modalidad, el gen N VSV se mezcla con el 3'-PNMGL-5 o 3'-PNMGL-5, relacionado con el genoma VSV tipo silvestre 3'NPMGL-5 en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocáspido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de matriz, G es el que codifica la glicoproteína de unión y L es el gen que codifica la proteína de polimerasa ARN dependiente de ARN. En ciertas modalidades, el VSV comprende un genoma mutado de 3'-PNMG_(CT-1)L-5', 3'-PNMG_(CT-9)L-5, 3'-PNMG_(CT-1)L-5 o 3'-PNMG_(CT-9)L-5, en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocáspido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de matriz "G_(CT-1)", G es el que codifica la glicoproteína de unión que tiene una región de cola citoplásmica que consiste de un aminoácido, G_(CT-9) es el gen que codifica la glicoproteína que tiene una región de cola citoplásmica que consiste de nueve aminoácidos y L es el gen que

codifica la proteína de polimerasa ARN dependiente de ARN. En una modalidad, el genoma VSV mutado es 3'-PNMG_(CT-1)L-5. En otra modalidad particular, el genoma VSV mutado es 3'-PNMG_(CT-1)L-5. En otra modalidad, el VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación TS, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación G-stem, una inserción de gen G, una eliminación de gen o una mutación de gen M no citopático.

En ciertas modalidades, el VSV modificado inyectado intracranelamente en cuatro ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad tiene un LD₅₀ cien veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad. En ciertas otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad. En todavía otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad, tienen un LD₅₀ 10,000 mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad. En todavía otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad tiene un LD₅₀ 100,000 mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad.

En otras modalidades de la invención, las dos mutaciones VSV son una mutación de gen G truncado y una mutación de gen M no citopático. En ciertas modalidades, la proteína G codificada por

.. 00105

el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmico que consiste de un aminoácido ($G_{(CT-1)}$) o un dominio de cola citoplásmico que consiste de nueve aminoácidos ($G_{(CT-9)}$). En otras modalidades, la mutación no citopática del gen M (aquí en adelante, " $M_{(ncp)}$ ") es una mutación de metionina a alanina en la posición 33 (M33A) y una mutación de metionina a alanina en la posición 51 (M51A) de la proteína M. En una modalidad particular, el VSV comprende un genoma mutado de $3'NPM_{(ncp)}-G_{(ct-1)}L-5$ o $3'NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5$. En otra modalidad, el VSV comprende adicionalmente comprende una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación TS, una mutación ARN ambisentido, un gen de mutación de mezcla, una mutación de eliminación de gen, una mutación de inserción de gen, una mutación de gen G, una mutación G-stem o una mutación de punto.

Como se establece adelante en la sección A.3, una mutación ts de una cualquiera de los genes VSV, G, M, P o L es una "clase de mutación" separada de la invención. Así, en ciertas modalidades de la invención, las dos mutaciones VSV son una mutación de gen Nts (aquí en adelante " $N_{(ts)}$ ") y una mutación de gen Lts (aquí en adelante " $L_{(ts)}$ "). En una modalidad particular, el VSV comprende un genoma mutado de $3'-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-5'$. En ciertas otras modalidades, el VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de g-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G o una mutación de eliminación de gen.

En ciertas modalidades, las dos mutaciones VSV son una mutación G-stem (aquí en adelante "G_(stem)") y una mutación de mezcla de gen. En otras modalidades, el VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de mezcla de gen, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.

En otra modalidad, la invención se dirige a un vector VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia ARN externa como una unidad transcripcional separada insertada en o que reemplaza un región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV. Como se defina aquí en adelante, una secuencia "ARN externo" es cualquier secuencia de polinucleótido que no es endógena al genoma de VSV tipo silvestre. En una modalidad particular, la patogenicidad del vector se define adicionalmente como neurovirulencia. En ciertas otras modalidades, el ARN externo se define como una estructura de lectura abierta (ORF). En ciertas otras modalidades, las clases de mutaciones se seleccionan del grupo que consiste de una mutación ts, un punto de mutación, una mutación de mezcla de gen, una mutación de G-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una

. 00107

mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen.

En una modalidad particular, las dos mutaciones de vector VSV son una mutación de gen G truncada y una mutación de mezcla de gen N. En otra modalidad, la proteína codificada por el gen G truncado tiene una eliminación de al menos veinte aminoácidos en el Terminal carboxi o una eliminación de al menos veintiocho aminoácidos en el Terminal carboxi. En ciertas otras modalidades, el vector VSV de gen N se mezcla con 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL5', relacionado con 3'-PNMGL-5' de genoma VSV tipo silvestre. En otra modalidad particular, el vector VSV comprende un genoma mutado de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5'. En una modalidad particular, el genoma de vector mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'. En otra modalidad, el genoma de vector mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5.

En todavía otras modalidades, el vector VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación G-stem, una mutación de inserción de gen G, una mutación de eliminación de gen o una mutación de gen M no citopático. En ciertas otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad tiene un LD₅₀ 100 veces mayor que el de los ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad inyectados intracranealmente VSV tipo silvestre. En todavía otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas de edad tiene un LD₅₀

. 00108

1,000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster de hembras de cuatro semanas de edad. En aún otras modalidades, el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembra de cuatro semanas de edad tiene un LD₅₀ 10,000 veces mayor que el VSV silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En otra modalidad, los ratones Swiss-Webster hembras de 4 semanas de edad tiene un LD₅₀ 100,000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de 4 semanas de edad.

En ciertas otras modalidades, el ARN externo insertado en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para replicación se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen SMV, un gen del virus Epstein-bar, un gen del virus varicela-Zoster, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen togavirus, un gen alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marbug, un gen del virus del ébola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen del metaneumovirus, un gen coronavirus, un gen *Vibrio cólera*, un gen *estreptococos nemoniae*, un gen *Streptococcus piogenes*, un gen *Streptococcus agalactiae*, un gen *Neisseria meningitidis*, un *Neisseria gonorrhoeae*, un gen *Corynebacteria difteria*, un gen *Clostridium tetani*, un gen *Bordetella pertussis*, un gen *Helicobacter pilori*, un gen

Haemophilus, un gen *Chlamydia*, un gen *Eschericia Coli*, un gen citoquina, un epítipo T-auxiliar, un epítipo CTL, un gen adyuvante, y un cofactor de gen. En una modalidad partícula, el ARN externo es un gen HIV seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*. En una modalidad particular el gen de HIV es *gag* en donde el gen *gag* se inserta en el genoma VSV en una posición uno o en la posición cinco. En modalidades particulares, el genoma del vector VSV mutado es 3'-*gag*₁PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁PMNG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-*gag*₅5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-*gag*₅-5'.

En otra modalidad, el ARN externo que expresa un antígeno específico de tumor o antígeno asociado con tumor, para inducción de una respuesta inmune protectora contra un tumor (por ejemplo, un tumor maligno). Tal antígeno asociado con tumor o específico de tumor incluye, pero no está limitado a, KS 1/4 pan-carcinoma; antígeno de carcinoma de ovario (CA125); fosfato de ácido prostático; antígeno específico de próstata; antígeno p97 asociado con melanoma; antígeno gp75 de melanoma; antígeno de melanoma de alto peso molecular y antígeno de membrana específica de próstata.

En ciertas otras modalidades, las dos mutaciones de vector VSV son una mutación G_(ct) y una mutación M_(ncp). En ciertas modalidades, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmico que consiste de un aminoácido (G_(ct-1)) o un dominio de cola citoplásmico que consiste de nueva aminoácidos (G_(ct-9)). En aún otras modalidades, la mutación M_(ncp)

00110

es una mutación de la metionina a alanina en la posición 33(M33A) y una mutación de metionina a alanina en la posición (51a) de la proteína M. En una modalidad particular, el genoma mutado es 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5' o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5'. En otra modalidad, el vector comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, un punto de mutación, una mutación de mezcla de gen, una mutación G-stem, una mutación ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G, y y una mutación de eliminación de gen. En ciertas modalidades, el vector VSV comprende un HIV seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*. En una modalidad particular el gen HIV es *gag*, en donde el genoma mutado es 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-*gag*₅-5' o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-*gag*₅-5'.

En todavía otras modalidades, las dos mutaciones de vector VSV son una mutación de gen N_(ts) y una mutación de gen L_(ts). En una modalidad particular, el vector comprende un genoma mutado de -N_(ts)PMGL_(ts)-5'. En otras modalidades, el vector comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma. En donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de G-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen. En ciertas modalidades, el vector VSV comprende un gen HIV seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*. En una modalidad particular, el gen HIV es *gag*, en donde el genoma mutado es 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.

. 00111

Como se establece adelante en la sección A.1, la inserción de una secuencia de ácido nucleico externo (por ejemplo, gag HIV) dentro del genoma 3'VSV a cualquiera de los genes N, P, M, o L resulta efectivamente en una "mutación de mezcla de gen". Así, en ciertas modalidades, las dos mutaciones de vector VSV son mutaciones G_{stem} y una mutación de mezcla de gen. En una modalidad, el genoma de vector mutado es 3'-gag₁-NPMG_(stem)L-5',. En otras modalidades, el vector VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de mezcla de gen, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen.

En otra modalidad, la invención se dirige a una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN externa como una unidad transcripcional separada insertada o en que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV. En otra modalidad, las clases de mutaciones se seleccionan del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de G-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen.

En ciertas modalidades, las dos mutaciones son una mutación de gen G truncada y una mutación de mezcla de gen N. en modalidades particulares, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmico que consiste de un aminoácido ($G_{(ct-1)}$) o un dominio de cola citoplásmico que consiste de nueve aminoácidos ($G_{(ct-9)}$). En otras modalidades, el gen N se mezcla con 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', relacionado con el 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5' tipos silvestre. En una modalidad particular, el genoma de vector mutado de la composición inmunogénica es 3-PMNG_(ct-1)L-5'. En otra modalidad, el genoma de vector mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'. En otras modalidades, el vector VSV de la composición inmunogénica comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de G-stem, una mutación de eliminación de gen o una mutación de gen M no citopático.

En ciertas otra modalidades, el ARN externo insertado en el vector VSV modificado genéticamente de la composición inmunogénica se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen SMV, un gen del virus Epstein-bar, un gen del virus varicela-Zoster, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen togavirus, un gen alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus

Marbug, un gen del virus del ébola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen del metaneumovirus, un gen coronavirus, un gen *Vibrio cholera*, un gen *estreptococos nemoniae*, un gen *Streptococcus piogenes*, un gen *Streptococcus agalactiae*, un gen *Neisseria meningitidis*, un *Neisseria gonorrhoeae*, un gen *Corynebacteria difteria*, un gen *Clostridium tetani*, un gen *Bordetella pertussis*, un gen *Helicobacter pilori*, un gen *Haemophilus*, un gen *Chlamydia*, un gen *Eschericia Coli*, un gen citoquina, un epítipo T-auxiliar, un epítipo CTL, un gen adyuvante, y un cofactor de gen. En una modalidad partícula, el ARN externo es un gen HIV seleccionado del grupo que consiste de gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev y vpu. En una modalidad particular el gen de HIV es gag en donde el gen gag se inserta en el genoma VSV en una posición uno o en la posición cinco. En modalidades particulares, el genoma del vector VSV mutado es 3'-gag₁PNMG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁PNMG_(ct-9)L-5', 3'-gag₁PMNG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-gag₅5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-gag₅-5'.

En ciertas otras modalidades, el vector VSV de la composición inmunogénica comprende una mutación G_(ct) y una mutación M_(ncp). En otra modalidad, la proteína G codificada la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmico que consiste de un aminoácido (G_(ct-1)) o un dominio de cola citoplásmico que consiste de nueve aminoácidos (G_(ct-9)). En otras modalidades, la mutación no citopática del gen M (aquí en adelante, "M_(ncp)" es una mutación de meteonina a alanina en la posición 33 (M33A) y una mutación de meteonina a alanina en la posición 51 (M51A) de la proteína M. En una

00114

modalidad particular, el VSV comprende un genoma mutado de 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5 o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5. En aún otras modalidades, el vector VSV de la composición inmunogénica comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de g-stem, una mutación ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen. En todavía otras modalidades, el ARN externo insertado en el vector VSV modificado genéticamente de la composición inmunogénica se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen SMV, un gen del virus Epstein-bar, un gen del virus varicela-Zoster, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen togavirus, un gen alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marbug, un gen del virus del ébola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen del metaneumovirus, un gen coronavirus, un gen *Vibrio cholera*, un gen *estreptococos nemoniae*, un gen *Streptococcus piogenes*, un gen *Helicobacter pilori*, un gen *Streptococcus agalactiae*, un gen *Neisseria meningitidis*, un gen *Neisseria gonorrhoeae*, un gen *Corynebacteria difteria*, un gen *Clostridium tetani*, un gen *Bordetella pertussis*, un gen *Haemophilus*, un gen *Chlamydia*, un gen *Eschericia Coli*, un gen citoquina, un epítipo T-auxiliar, un epítipo CTL, un gen adyuvante, y un cofactor de gen. En una modalidad particula, el

. 00115

ARN externo es un gen HIV seleccionado del grupo que consiste de gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev y vpu. En una modalidad particular el gen de HIV es gag en donde el gen gag se inserta en el genoma VSV en una posición uno o en la posición cinco. En modalidades particulares, el genoma del vector VSV mutado es 3'-gag₁NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-gag₁NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-gag₁NPM_(ncp)G_(ct-1)L-gag₅-5', o 3'-gag₁NPM_(ncp)G_(ct-9)L-gag₅-5'.

En ciertas otras modalidades, la composición inmunogénica comprende un gen N_(ts) y una mutación de gen L_(ts). En una modalidad particular, la composición inmunogénica comprende un genoma VSV mutado de 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'. En otras modalidades, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación TS, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación G-stem, una mutación de gen no citopático, una mutación de gen G truncada, una inserción de gen G y una eliminación de gen. En aún otras modalidades, el ARN externo insertado del vector VSV modificado genéticamente de la composición inmunogénica se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen SMV, un gen del virus Epstein-bar, un gen del virus varicela-Zoster, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen togavirus, un gen alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marbug,

un gen del virus del ébola, un gen del virus papiloma, un gen del virus polioma, un gen del metaneumovirus, un gen coronavirus, un gen *Vibrio cólera*, un gen *estreptococos nemoniae*, un gen *Streptococcus piogenes*, un gen *Streptococcus agalactiae*, un gen *Neisseria meningitidis*, un *Neisseria gonorrhoeae*, un gen *Corynebacteria difteria*, un gen *Clostridium tetani*, un gen *Bordetella pertussis*, un gen *Helicobacter pilori*, un gen *Haemophilus*, un gen *Chlamydia*, un gen *Eschericia Coli*, un gen citoquina, un epítipo T-auxiliar, un epítipo CTL, un gen adyuvante, y un cofactor de gen. En una modalidad particula, el ARN externo es un gen HIV seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*. En una modalidad particular el gen de HIV es *gag* en donde el gen *gag* se inserta en el genoma VSV en una posición uno o en la posición cinco. En modalidades particulares, el genoma del vector VSV mutado es 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.

En ciertas otras modalidades, la composición inmunogénica comprende una mutación G_(steam) y un gen de mutación de mezcla. En una modalidad particular, la composición inmunogénica comprende un genoma mutado de 3'-*gag*₁-NPMG_(stem)L-5'. En otras modalidades, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de mezcla de gen, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen y una mutación de eliminación de gen.

. 00117

En todavía otra modalidad, una composición inmunogénica de la invención se administra por cualquier ruta convencional seleccionada del grupo que consiste de intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal y exvivo.

En otra modalidad, la invención se dirige a un método para inmunizar un sujeto mamífero contra la infección por HIV que comprende administrar al sujeto una dosis inmunogénica de un vector VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia ARN HIV como una unidad transcripcional separada insertada en o que reemplaza una región de genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones sinérgicamente atenúan la patogenicidad de SV y el ARN HIV codifica un antígeno seleccionado del grupo que consiste de gag, env, pol, vif, nef, tat, vpr, rev y vpu. En ciertas modalidades, el vector VSV es 3'-gag₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)gag₅-5'.

En ciertas otras modalidades, la invención se dirige a un método para inmunizar un huésped mamífero contra infección bacteriana que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector VSV modificado genéticamente que comprende (a) al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, las mutaciones

00118

seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación G-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad de VSV y (b) al menos una secuencia de ARN externa insertada en o que reemplaza un región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde el ARN codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste de una proteína *Vibrio cholerae*, una proteína *Streptococcus pneumoniae*, una proteína *Streptococcus pyogenes*, una proteína *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis*, un *Neisseria gonorrhoeae*, una proteína *Corynebacteria diphtheriae*, una proteína *Clostridium tetani*, una proteína *Bordetella pertussis*, una proteína *Helicobacter pylori*, una proteína *Haemophilus*, una proteína *Chlamydia*, y una proteína *Escherichia Coli*.

En una modalidad particular, las dos mutaciones son una mutación $G_{(ct)}$ y una mutación de mezcla de gen N. En ciertas modalidades, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmico que consiste dominio de cola citoplásmico que consiste de un aminoácido ($G_{(ct-1)}$) o un dominio de cola citoplásmico que consiste de nueve aminoácidos ($G_{(ct-9)}$). En ciertas otras modalidades, el gen N se mezcla con 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5' relacionado con el 3'-PNMGL-5' de genoma VSV tipo silvestre. En otras modalidades, el genoma VSV mutado en 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5', o 3'-PMNG_(ct-9)L-

5',. En una modalidad particular, el genoma mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PNMG_(ct-1)L-5'.

En otras modalidades, el VSV adicional comprende una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una eliminación de gen, una mutación G-stem, una inserción de gen G, o una mutación de gen M no citopático.

En otra modalidad, la invención se dirige a un método para inmunizar un huésped mamífero contra infección viral que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector VSV modificado que comprende (a) al al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación G-stem, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad de VSV y (b) al menos una secuencia de ARN externa insertada en o que reemplaza un región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde el ARN codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste de una proteína del virus poliovirus, proteína del virus rinovirus, proteína del virus de hepatitis A, proteína del virus de hepatitis B, proteína del virus de hepatitis C, del virus Norwalk, proteína del virus togavirus, proteína del virus alfavirus, proteína del virus de rubéola, proteína del virus de la rabia, proteína del virus Marburg, proteína virus del ébola,

proteína del virus papiloma, proteína del virus polioma, proteína del metaneumovirus, proteína del virus coronavirus. En una modalidad particular, el ARN es un gen HIV seleccionado de un grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.

En ciertas modalidades, las dos mutaciones son mutación $G_{(ct)}$ y una mutación de mezcla de gen N. En otra modalidad particular, el genoma VSV mutado es $3'-PNMG_{(ct-1)}L-5'$, $3'-PNMG_{(ct-9)}L-5'$, $3'-PMNG_{(ct-1)}L-5'$ o $3'-PMNG_{(ct-9)}L-5'$. En otra modalidad, el gen HIV es *gag*, en donde el gen *gag* se inserta en el genoma VSV en la posición uno o en la posición cinco, en donde el genoma mutado es $3'-gag_1-PNMG_{(ct-1)}L-5'$, $3'-gag_1-PNMG_{(ct-9)}L-5'$, $3'-gag_1-PMNG_{(ct-1)}L-5'$, $3'-gag_1-PMNG_{(ct-9)}L-5'$, $3'-gag_1-PNMG_{(ct-1)}L-gag_5-5'$, $3'-gag_1-PMNG_{(ct-9)}L-gag_5-5'$, $3'-PMNG_{(ct-1)}L-gag_5-5'$ o $3'-PMNG_{(ct-9)}L-gag_5-5'$. En otra modalidad, el VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación *ts*, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de eliminación de gen, una mutación G-stem, una mutación de inserción de gen G, una mutación de inserción de gen o una mutación de gen M no citopático.

En otra modalidades el método para inmunizar un huésped mamífero contra una infección viral, las dos mutaciones VSV son una mutación $G_{(ct)}$ y mutación $M_{(ncp)}$. En una modalidad particular, el genoma VSV mutado es $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$. En otra modalidad, el genoma VSV es $3'-gag_1-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-5'$, $3'-gag_1-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$, $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-gag_5-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-gag_5-5'$. En otra modalidad, el genoma VSV comprende

adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de mezcla de gen, una mutación G-stem, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen.

En otras modalidades del método para inmunizar un huésped mamífero contra infección viral, las dos mutaciones VSV son una mutación de gen $N_{(ts)}$ y una mutación de gen $L_{(ts)}$. En una modalidad particular, el genoma VSV mutado es $3'-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-5'$, $3'-gag_1-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-5'$ o $3'-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-gag_5-5'$. En otra modalidad, el genoma VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de mezcla de gen, una mutación G-stem, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G, y una mutación de eliminación de gen.

En otras modalidades del método para inmunizar un huésped mamífero contra infección viral, las dos mutaciones VSV son una mutación $G_{(stem)}$ y una mutación de mezcla de gen. En una modalidad, el genoma mutado es $3'^g1-NPMG_{(stem)}L-5'$. En otra modalidad, el genoma VSV comprende adicionalmente una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de mezcla de gen, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen y una mutación de eliminación de gen.

- nº122

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, de las modalidades preferidas de esta, y de las reivindicaciones..

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las cinéticas de crecimiento (pfu/mL versus tiempo) de VSV tipo silvestre (3'-PNMGL-5'), mutantes VSV mezclados N (3'-PNMGL-5'[N2], 3'-PMNGL-5' [N3] y 3'-PMGNL-5' [N4]), mutación VSV de truncación (ct) de cola citoplásmica de proteína G (3'-NPMG_(ct-9)L-5' [CT9] y 3'-NPMG_(ct-1)L-gag₅-5' [CT1-GAG5]) y mutantes de truncación VSV N mezclado/G combinados (3'-PNMG_(c-1)L-5' [N2CT1], 3'-PNMG_(ct-9)L-5' [N2CT9], 3'-PMNG_(ct-1)L-5' [N3CT1] y 3'-PMNG_(c-9)L-5' [N3CT9]). La abreviatura "en" mostrada en la leyenda de la figura representa la cepa indiana del VSV.

La Figura 2 es una comparación de la cinética de crecimiento en mutantes VSV mezclados N (3'-PNMGL-5', 3'-PMNGL-5' y 3'-PMGNL-5') relacionados con VSV tipo silvestre (3'-NPMGL-5') y un mutante VSV ct-1 de proteína G 1 VSV mutant (3'-NPMG_(ct-9)L-gag₅-5').

La figura 3 muestra una comparación de las tasas de crecimiento de mutantes ct-1 de proteína G/mezclada VSV N combinadas (3'-PNMG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(c-1)L-5') relacionados con VSV tipo silvestre (3'-NPMGL-5') y y un mutante VSV ct-1 de proteína (3'-NPMG_(ct-1)L-gag₅-5').

00123

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención descrita aquí dirige una necesidad en la técnica para vectores (VSV) de virus de estomatitis vesicular que tienen patogenicidad significativamente atenuada en mamíferos, particularmente neuropatogenicidad atenuada como se revela en modelos de neurovirulencia animal. Como se describió anteriormente, el VSV tiene muchas características que lo hacen un vector de interés para composiciones inmunogénicas y/o terapia de gen. Por ejemplo, la infección por VSV de humano no es común o es asintomática o se caracteriza por síntomas similares a la gripa suave que se resuelve en tres a ocho días sin complicaciones, y tal VSV no se considera un patógeno humano. Otras características del VSV es que le da un vector atractivo que incluye: (a) la capacidad de replicar robustamente en cultivos celulares (b) la incapacidad de integrarse en el ADN de célula huésped o experimentar recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos, que permiten la posibilidad de estrategias de inmunización prime-boost; (d) genes externos de interés se pueden insertar en el genoma VSV y expresar abundantemente por vía de transcriptasa viral; (e) el desarrollo de un sistema altamente especializado para el rescate de virus infeccioso de una copia de cADN de genoma de virus (Patente Estadounidense 6,033,886; Patente Estadounidense 6,168,943) y (f) inmunidad preexistente al VSV en la población humana es infrecuente.

Una clase anterior de vectores VSV atenuados descritos en la técnica se refieren como mutantes (ts) sensibles a la

temperatura, en donde los mutantes ts fallan en producir bidiones a una temperatura restrictiva. Por ejemplo, se conocen en la técnica varios mutantes ts VSV (por ejemplo, ver Holloway et al., 1970; Pringle et al., 1971; Evans et al., 1979; Pringle et al., 1981; Morita et al., 1987; Gopalakrishna and Lenard, 1985). Y adicionalmente, clases adicionales de mutantes VSV atenuados también se han descrito en la técnica e incluyen mutaciones (ct) de cola citoplásmica truncada de proteína G VSV (Schnell et al., 1998), mutaciones de mezcla de gen (o redistribución de orden de gen) (Wertz et al., 1998; Ball et al., 1999; Flanagan et al., 2001; Patente Estadounidense 6,596,529), mutaciones G-stem (Jeetendra et al., 2003; Jeetendra et al., 2002; Robinson y Whitt, 2000), mutaciones de proteína M non-citopática (Jayakar et al., 2000; Jayakar and Whitt, 2002) y mutaciones de ARN ambisentido (Finke and Conzelmann, 1997; Finke and Conzelmann 1999). Sin embargo, como se estableció anteriormente actualmente los vectores VSV atenuados disponibles retienen virulencia residual cuando se prueban en modelos animales, y como tal no son candidatos de vectores probables para el avance a ensayos clínicos en humanos.

Como se establece en detalle aquí, la presente invención se relaciona con observaciones inesperadas y sorprendentes de combinaciones de dos o más clases de mutación de atenuación conocidas (mutaciones de mezcla de gen, mutaciones de truncación e inserción de proteína g, mutaciones ts y otras mutaciones de punto, mutaciones de gen M no citopático, mutaciones G-stem, mutaciones de ARN en disentido, mutaciones de eliminación de gen, y similares) tienen un efecto sinérgico (en contraste con un

. 00125

efecto aditivo) en el nivel resultante de atenuación de patogenicidad alcanzado. Por ejemplo, se demuestra aquí, que los mutantes de truncación de proteína G VSV, cuando se combinan con mutantes de gen N mezclados ejercen una atenuación sinérgica del crecimiento VSV (ejemplo 2) y neurovirulencia (ejemplo 3). Adicionalmente, ciertas modalidades de la presente invención se dirigen a combinaciones de otras clases de mutación, que también pueden tener un efecto sinérgico sobre la atenuación VSV. Tales clases incluyen, pero no están limitadas a: Mutaciones ts, mutaciones de punto, mutaciones de mezcla de gen (que incluyen mezclas de gen N, P, M, G y L), mutaciones G-stem, inserciones de gen G, mutaciones de gen M no citopático, mutaciones de gen G truncadas (por ejemplo, un mutante ct), mutaciones de ARN ambisentido y mutaciones de eliminación de gen.

Así, en ciertas modalidades, la invención se dirige a un vector VSV genéticamente modificado que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN externa como una unidad de transcripción separada insertada o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV. En ciertas otras modalidades, la invención se dirige a composiciones inmunogénicas que comprenden un vector VSV genéticamente modificado que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN externa como una unidad de transcripción separada insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV.

A. CLASES DE MUTACIÓN DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Como se estableció anteriormente, un vector VSV genéticamente modificado de la invención comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma. Como se define aquí en adelante, los términos "clases de mutación", "mutación de clases" o "clases de mutación" se utilizan intercambiabilmente y se refieren a mutaciones conocidas en la técnica, cuando se utilizan individualmente, para atenuar el VSV. Por ejemplo, una "clase de mutación" de la invención incluye, pero no está limitado a una mutación de gen N sensible a la temperatura VSV (aquí en adelante, "N_(ts)"), una mutación de gen L sensible a la temperatura (de aquí en adelante "L_(ts)"), una mutación de punto, una mutación de gen stem (aquí en adelante, "steam", una mutación de gen M no citopático (aquí en adelante "M_(ncp)"), una mutación de arreglo o mezcla de gen, una mutación de gen G truncado (aquí en adelante "G_(ct)"), una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen y similares. Como se define aquí, una "mutación" incluye mutaciones conocidas en la técnica como inserciones, eliminaciones, sustituciones, rearrreglos de gen o modificaciones de mezclas.

Como se define aquí en adelante, el término atenuación "sinérgica" se refiere a un nivel de atenuación VSV que es mayor que el aditivo. Por ejemplo, una atenuación sinérgica de VSV de acuerdo con la presente invención comprende combinar al menos dos clases de mutación en el mismo genoma VSV, resultando

. 00127

por lo tanto en una reducción de la patogenicidad VSV mucho mayor que un nivel de atenuación de aditivo observada para cada clase de mutación VSV sola. Así, en ciertas modalidades, una atenuación sinérgica de VSV se define como un LD₅₀ al menos mayor que el nivel de atenuación de aditivo observada para cada clase de mutación sola (es decir, la suma de las dos clases de mutación), en donde los niveles de atenuación (es decir, el un LD₅₀) se determina en un modelo de neurovirulencia animal pequeño.

Por vía de ejemplo no limitante, si la ecuación (1) describe un "atenuación de aditivo" de VSV:

$$(1) \Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50} = X_{LD50C}.$$

En donde Δa_{LD50} es el LD50 de un VSV que tiene una primer clase de mutación en su genoma, Δb_{LD50} es el LD50 de una VSV que tiene una segunda clase de mutación en su genoma y X_{LD50C} es la suma de Δa_{LD50} y Δb_{LD50} ; luego una "atenuación sinérgica" VSV de la invención, que tiene un LD₅₀ que el nivel de atenuación de aditivo observado para cada clase de mutación sola, se describe por la ecuación (2):

$$(2) \Delta a,b_{LD50} > (\Delta a_{LD50} + \Delta b_{LD50})$$

En donde $\Delta a,b_{LD50}$ es el LD50 de un VSV que tiene una combinación de dos o más clases de mutación en su genoma, Δa_{LD50} es el LD50 de un VSV que tiene una primer clase de mutación en su genoma y Δb_{LD50} es el LD50 de un VSV que tiene una segunda clase de mutación en su genoma. Así, en ciertas modalidades, la

sinergia de la atenuación VSV (es decir., dos clases de mutación en el mismo genoma VSV) se describe con relación al LD₅₀ de dos construcciones VSV (cada construcción VSV tiene una clase de mutación sencilla en su genoma), en donde la atenuación sinérgica del VSV que tiene dos clases de mutación en su genoma se define como un LD₅₀ al menos mayor que el aditivo LD₅₀ de las dos construcciones VSV que tienen una clase de mutación sencilla en su genoma (por ejemplo, ver VSV LD₅₀ valores en la Tabla 7).

En ciertas otras modalidades, la sinergia de la atenuación VSV se describe con relación al LD₅₀ de un VSV tipo silvestre. Así, en una modalidad, una atenuación sinérgica del VSV se define como un LD₅₀ que es al menos mayor que el LD₅₀ del VSV tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En una modalidad, una atenuación sinérgica del VSV se define como un LD₅₀ que es al menos diez veces mayor que el LD₅₀ de VSV tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra modalidad, una atenuación sinérgica de VSV se define como un LD₅₀ que es al menos 100 veces mayor que el LD₅₀ del VSV de tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra modalidad, una atenuación sinérgica del VSV se define como un LD₅₀ que es al menos 100 veces mayor que el LD₅₀ del VSV tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En aún otras modalidades, una atenuación sinérgica del VSV se define como un LD₅₀ que es al menos 10,000 veces mayor que el LD₅₀ del VSV tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de

neurovirulencia animal. En ciertas otras modalidades, una atenuación sinérgica del VSV se define como un LD₅₀ que es al menos 100,000 veces mayor que el LD₅₀ del VSV tipo silvestre, en donde el LD₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. La determinación de una 50% de dosis letal LD₅₀ para un vector VSV particular se determina fácilmente por una persona experta en la técnica utilizando métodos de prueba conocidos y modelos animales (por ejemplo, ver ejemplo 1).

Así, en ciertas modalidades, la invención se dirige a un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones establecidas adelante.

1. MUTACIÓN DE MEZCLA DE GEN

En ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación de mezcla de gen en su genoma. Como se define aquí, los términos "mezcla de gen", "gen mezclado", "mezclado", "de mezcla", "redisposición de gen" y "translocación de gen" se utilizan intercambiablemente, y se refieren a un cambio (mutación) en el orden del genoma VSV de tipo silvestre. Como se define aquí, genoma VSV de tipo silvestre tiene el siguiente orden de gen: 3'-NPMGL-5'.

Se conoce en la técnica, que la posición de un gen VSV relacionado con el promotor 3' determina el nivel de expresión y atenuación del virus (Patente Estadounidense 6,596,529 and Wertz et al., 1998, cada uno incorporada específicamente aquí como referencia). Las secuencias de nucleótido que codifican las

proteínas VSV G, M, N, P y L se conocen en la técnica (Rose and Gallione, 1981 ; Gallione et al., 1981). Por ejemplo, Patente Estadounidense 6,596,529 describe mutaciones de mezcla de gen en la que el gen para la proteína N se transloca (mezcla) de su primera posición próxima a promotor tipo silvestre a posiciones más distantes sucesivamente en el genoma (por ejemplo, 3'-PNMGL-5' 3'-PMNGL-5', 3'-PMGNL-S', referido como N2, N3 y N4, respectivamente). Así, en ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente una mutación de mezcla de gen en su genoma. En una clase de mutación, en una modalidad particular, un VSV genéticamente modificado comprende una mutación de mezcla de gen que comprende una translocación del gen N (por ejemplo, 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5').

Se debe notar aquí, que la inserción de una secuencia de ácido nucleico externa (por ejemplo, gag HIV) en el genoma VSV 3' a cualquiera de los genes N, P, M, G o L resulta reffectivamente en una "mutación de mezcla de gen" como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando el gen gag HIV se inserta en el genoma VSV en la posición 1 (por ejemplo 3'-gag₁-NPMGL-5'), los genes N, P, M, G y L se mueven cada uno de sus posiciones tipo silvestre a posiciones más distantes en el genoma. Así, en ciertas modalidades de la invención, una mutación de mezcla de gen que incluye la inserción de una secuencia de ácido nucleico externa en el genoma VSV 3' a cualquiera de los genes N, P, M, G o L (por ejemplo, 3'-gag₁-NPMGL-5', 3'-N-gag₂-PMGL-5', 3'-NP-gag₃-MGL-5' etc.).

2. MUTANTES DE TRUNCACIÓN E INSERCIÓN DE PROTEÍNA G

En ciertas otras modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un gen G mutado, en donde la proteína G codificada se trunca en su dominio citoplásmico (Terminal carboxi), también referida como "región de cola citoplásmica" de la proteína G. Se conoce en la técnica que las mutaciones de gen G que truncan el Terminal carboxi del dominio citoplásmico influyen el budding VSV y la producción de virus atenuada (Schnell et al., 1998; Roberts et al., 1999). El dominio citoplásmico de la proteína G VSV tipos silvestre comprende veintinueve aminoácidos RVGIHLCKIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK-COOH; SEQ ID NO:1).

En ciertas modalidades, un gen VSV truncado de la invención codifica una proteína G en la que al menos 28 residuos de aminoácidos de terminal carboxi del dominio citoplásmico se eliminan (solo retienen arginina de los 29 aminoácidos de dominios citoplásmico tipo silvestre SEQ ID NO:1). En ciertas otras modalidades, un gen G VSV truncado de la invención codifica una proteína G en la que al menos 20 residuos de aminoácidos de terminal carboxi del dominio citoplásmico se eliminan (relacionados con 29 dominios citoplásmicos tipo silvestre SEQ ID NO:1).

En ciertas otras modalidades, un gen G VSV truncado de la invención codifica una proteína G que comprende un aminoácido sencillo en su dominio citoplásmico (región de colas citoplásmica), en donde los aminoácidos sencillo es cualquiera

aminoácido de ocurrencia natural. En todavía otras modalidades, un gen G VSV truncado de la invención codifica una proteína G que comprende nueve aminoácidos en su dominios citoplásmico (región de colas citoplásmica). En donde los nueve aminoácidos son cualquier aminoácido de ocurrencia natural. En ciertas otras modalidades, un gen VSV mutado de la invención codifica una proteína G que contiene una inserción que representa un epítipo externo. Tales mutantes son conocidos en la técnica (por ejemplo, ver Schlehuber and Rose, 2003).

Como se define aquí, un mutante de gen G que codifica una proteína G en la que al menos 28 residuos de aminoácidos de terminal carboxi del dominios citoplásmico se eliminan, con relación a la secuencia tipo silvestre de la SEQ ID NO:1, se designan "G_(ct-1)" en donde el dominios citoplásmico del G_(ct-1) tiene una secuencia de aminoácido de (R-COOH). Como se define aquí, un mutante de gen G que codifica una proteína G en la que al menos 20 residuos de aminoácidos de terminal carboxi del dominios citoplásmico se eliminan, relacionadas con la secuencia de tipo silvestre de la SEQ ID NO:1, se designan "G_(ct-9)", en donde el dominios citoplásmico del G_(ct-9) tiene una secuencia de aminoácido de (RVGIHLCIK-COOH; SEQ ID NO:2). Así, en ciertas modalidades de la invención, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un gen G mutado, en donde la proteína G codificada es un G_(ct-1) o G_(ct-9).

3. Mutaciones de Punto y Otras Mutaciones Sensibles a Temperatura

Una mutación ("ts") "sensible a la temperatura" VSV, como se define de aquí en adelante, es una mutación en el genoma VSV que restringe que el crecimiento VSV a una temperatura no permisiva. Por ejemplo un mutante ts VSV de la invención crece normalmente y un alto titulo en una temperatura permisiva (Por ejemplo, 31°C), pero su crecimiento o reproducción se restringe a temperaturas no permisivas (Por ejemplo. 37°C o 39°C). la generación de mutantes ts por mutagénesis dirigida al sitio y química son bien conocidos en la técnica (Por ejemplo, ver Pringle, 1970; Li et al., 1988); y numerosos mutantes ts que se han caracterizado y descrito (Por ejemplo, ver Flamand and Pringle, 1971; Flamand and Bishop, 1973; Printz and Wagner, 1971; Gopalakrishna and Lenard, 1985; Pringle et al., 1981; Morita et a/., 1987; Li et al., 1988; Rabinowitz et al., 1977; Lundh et a/., 1988; DaI Canto et al., 1976; Rabinowitz et al., 1976). En ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación ts en su genoma, en donde la mutación ts es una o mas mutaciones de una secuencia ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L.

Como se definió aquí, una mutación ts de uno cualquiera de los genes VSV G, M, N, P o L es una "clase de mutación" separada de la invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades de la invención, un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutación en su genoma (en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV) comprende uno o más mutaciones de gen N (aquí en adelante,

"N_(ts)") como una primer clase de mutación y una o mas mutaciones de gen L (aquí en adelante, "L_(ts)") como una segunda clase de mutación. Como un ejemplo no limitante, un VSV modificado genéticamente que comprende un genoma tal como 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5' que comprende dos clases de mutaciones (es decir, (1) una mutación de gen N_(ts) y (2) una mutación de gen L_(ts)) un VSV modificado genéticamente que comprende un genoma tal como 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' comprende tres clases de mutaciones (es decir (1) una mutación de gen N_(ts), (2) una mutación de gen L_(ts) y (3) por vía de inserción del gag₁, una mutación de mezcla de gen).

En ciertas otras modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación de punto en su genoma, en donde la mutación de punto es una o mas mutaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L, en donde la mutación confiere un fenotipo de atenuación tal como adaptación al frío, fusión reducida o eficiencia citopatogénica (Por ejemplo, ver Fredericksen and Whitt, 1998; Ahmed and Lyles, 1997). Por ejemplo Fredericksen and Whitt (1998) describe tres mutaciones de punto de atenuación del gen G (Por ejemplo, D137-L, E139-L o DE-SS) que tiene un umbral de pH cambiado para actividad de fusión. Ahmed and Lyles (1997) describe una mutación de punto de atenuación del gen M (N1 63D) que fue altamente defectuosa en la inhibición de la expresión del gen anfitrión y se convirtió mas rápidamente que la proteína tipo silvestre M.

4. Mutaciones de Gen M No Citopático

En ciertas otras modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M. el gen M (serotipo Indiana) VSV codifica una proteína (matriz) M de aminoácidos 229, en donde los primeros 30 aminoácidos del terminal NH₂ comprenden un motivo PPPY (PY) rico en prolina (Harty et al., 1999). El motivo PY de la proteína M VSV se ubica en las posiciones aminoácidos 24-27 en los serotipos Indiana VSV (número de acceso Genbank X04452) y serotipo New Jersey (número de acceso Genbank M14553). Se demuestra por Jayakar et al. (2000), que las mutaciones en el motivo PY (Por ejemplo APPY, AAPY, PPAY, APPA, AAPA y PPPA) reduce producción de virus al bloquear la última tapa en brote de virus. Así, en ciertas modalidades un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M, en donde la mutación esta en el motivo PPPY de la proteína M codificada.

Se ha reportado recientemente que mRNA M codifica adicionalmente dos proteínas adicionales referidas como M2 y M3 (Jayakar and Whitt, 2002). Las proteínas M2 y M3 se sintetizan de metioninas corriente abajo en la misma estructura de lectura que codifica la proteína M de aminoácido 229 (referida como M1), y que le falta los primeros 32 (proteína M2) o 50 (proteína M3) aminoácidos de la proteína M1. Se ha observado que las células infectadas con VSV recombinante que expresa la proteína M, pero M2 y M3, exhibe una inserción retrasada del efecto citopático (en ciertos tipos de células), produce a un producto de virus normal. Así, en ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente de

la invención comprende una mutación no citopática en el gen M en donde la mutación del gen M resulta en un virus que no expresa la proteína M2 o M3 (Por ejemplo ver Jayakar and Whitt, 2002).

También se contempla aquí mutaciones de aminoácidos (Por ejemplo, eliminaciones, sustituciones, inserciones, etc.) el motivo (PS) PSAP de proteína M descrito por Irie et al. (2004).

5. Mutaciones G-Stem

En ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación en el gen G, en donde la proteína G codificada tiene una mutación en la región Stem próxima a la membrana de electrodominio de proteína G, referido como proteína G-Stem. La región G-Stem comprende residuos de aminoácidos 421 a 462 de la proteína G. estudios recientes han demostrado la atenuación del VSV vía inserción y/o eliminación (Por ejemplo truncación) de mutaciones en el G-Stem de la proteína G (Robinson and Whitt, 2000; Jeetendra et al., 2002; Jeetendra et al., 2003). Así, en ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente comprenden una inserción G-Stem, eliminación, sustitución o una combinación de estos. En una modalidad particular, un vector VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación G-Stem (y composiciones inmunogénicas de estos), que comprenden un genoma de 3'-gag₁-NPMG_(stem)L-5'.

6. Mutaciones de ARN Ambisentido

En ciertas modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación de ARN ambisentido en la que el promotor antigenoma 5' (AGP) se reemplaza con una copia del promotor de genoma 3' (GP). El AGP 5' de VSV, así como también otros virus de ARN de hebra negativa no segmentados, actúan como un promotor de replicación fuerte mientras el GP 3' actúa como un promotor de transcripción y un promotor de replicación débil. En el curso normal de la infección VSV, hay predominancia de 3 a 4 veces de copias de genoma sobre copias de antigenoma; esta proporción es aun mayor para los virus de la rabia, otro miembro de la familia Rhabdovirus (Finke and Conzelmann, 1999). Trabajos previos con virus de rabia demuestran que reemplazar el AGP 5' con una copia del GP (conocido como una mutación ARN ambisentido) conduce a niveles iguales de genoma y copias de ARN antigenomas dentro de células infectadas. Adicionalmente, un gen externo se expresa de la copia del GP colocadas en el extremo 5' del genoma. Cuando se pasa serialmente en células de cultivo, el virus de la rabia contiene la mutación ARN ambisentido replicada consistentemente 10 a 15 veces menos títulos que un virus de la rabia tipo silvestre recombinante (Finke and Conzelmann, 1997). Tal una mutación se utiliza en vectores VSV para atenuar los virus replicados y expresar los genes externos. Así, en ciertas modalidades un VSV modificado genéticamente comprende una mutación de ARN ambisentido.

7. Eliminaciones de Gen

En ciertas otras modalidades, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un virus en el que un gen VSV (tal como G o M) se elimina de genoma. Por ejemplo, Roberts et al. (1999) describe un vector VSV en el que el gen completo codifica la proteína G que se elimina (Δ G) y lo sustituye con una proteína (HA), hemaglutinina influenza, en donde el vector VSV (Δ G-HA) demuestra patogénesis atenuada.

B. Vectores de Virus de Estomatitis Vesicular Recombinante

En ciertas modalidades, la invención suministra un vector VSV (recombinante) modificado que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN externa insertada como una unidad transcripcional separada o reemplaza una región del genoma VSV no esencial para replicación.

Métodos para producir virus ARN recombinante se refieren a en la técnica como métodos "rescate" o "genéticas reversas". Métodos rescate de ejemplo para VSV se describe en la patente U.S. 6,033,886, patente U.S. 6,596,529 y WO 2004/113517, cada una incorporada aquí como referencia. La transcripción y replicación de genomas virales de ARN no segmentados de hebras sencilla de sentido negativo se alcanzan a través de actividad de enzimática de un complejo de proteína multimerico en el núcleo de ribonucleoproteína (nucleocápsido). El ARN genómico desnudo no puede servir como plantilla. En cambio, estas secuencias genómicas se reconocen solo cuando ellas son encapsidadas

completamente por la proteína M en la estructura de nucleocápsido. Es solo en ese contexto que las secuencias promotor de terminal genómico y antígenómico se reconocen por iniciar las trayectorias de transcripción o replicación.

El ADN clonado equivalente del genoma VSV se coloca entre un promotor de polimerasa de ARN dependiente de ADN al cual (Por ejemplo, el promotor de polimerasa ARN T7) y una secuencia de ribozima auto clivante (Por ejemplo, ribozima delta hepatitis), que se inserta en un vector de transcripción adecuado (Por ejemplo un plásmido bacterial propagable). Este vector de transcripción suministra una plantilla de ADN manipulable fácilmente de la que la polimerasa de ARN (por ejemplo polimerasa ARN T7) puede transcribir una copia de ARN de hebra sencilla del antígenoma VSV (o genomas) con el terminal 5' y 3' preciso o cercano. La orientación de la copia de ADN genómico VSV y el promotor de flanco y las secuencias de ribosita determinan si el antígenoma o ARN genoma equivalentes se transcriben. También se requieren para rescate de nueva progenie VSV están las proteína de soporte trans-acción VSV-específicos necesarios para encapsidar las transcripciones de ARN antígenoma o VSV antígenoma de hebra sencillas desnudos en plantillas de nucleocápsidos funcionales: las proteína (N) de nucleocápsido viral, la fosfoproteína asociada con polimerasa (P) y la proteína (L) de polimerasa. Estas proteína comprende la polimerasa ARN dependiente de ARN viral activa que debe enganchar esta plantilla de nucleocápsido para alcanzar transcripción y replicación.

Así, un VSV atenuado y modificado genéticamente de la invención, que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma (por ejemplo, ver sección A), se produce de acuerdo con métodos de rescate conocidos en la técnica. Por ejemplo, un vector VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferente de mutaciones en su genoma se genera utilizando (1) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un genoma o antígenoma de un VSV y (2) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas N, P y L trans-activación necesarias para encapsidación, transcripción y replicación; en una célula bajo condiciones suficientes para permitir la coexpresión de estos vectores y la producción del VSV recombinante, cualquier sepavsv adecuada o serotipos se puede utilizar de acuerdo con la presente invención, que incluye, pero no esta limitada a, Indiana VSV, VSV New Jersey, VSV Chandipura, VSV Isfahan, VSV San Juan, VSV Glasgow, y similares.

En adición a la secuencia de polinucleótido que codifica en formas atenuadas del VSV la secuencia de polinucleótido también puede codificar uno o mas secuencias de polinucleótido heterólogo (o externa) o abrir estructuras de lectura (ORF) (por ejemplo ver sección C). las secuencias de polinucleótido heterólogo pueden variar según se desee, que incluyen, pero no están limitadas, un cofactor, un citoquina (tal como una interleuquina), una epítipo auxiliar T, un epítipo CTL, un marcador de restricción, un adyuvante, o una proteína de un patogen microbial diferente (por ejemplo virus, bacterias, parásitos, u hongos), proteínas

00141

especialmente capaces de elicitar respuestas inmunes deseadas. En ciertas modalidades, un ORF heterólogo contiene un gen HIV (por ejemplo *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*). En una modalidad particular, el gen HIV es *gag*, en donde el gen *gag* se inserta en el genoma VSV ácido nucleico la posición uno (3'-*gag*₁-NPMGL-5') o en la posición cinco (3'-NPMG-*gag*₅-L-5'). El polinucleótido heterólogo también se utiliza para suministrar agentes que se utilizan para terapia de gen. En otra modalidad, la secuencia de polinucleótido heterólogo adicionalmente codifica una citoquina, tal como interloquina-12, que se selecciona para mejorar la características profilácticas o terapéuticas del VSV recombinante.

En ciertas modalidades, un VSV atenuado y modificado genéticamente de la invención se muta por medios convencionales, tal como mutagénesis química, por ejemplo, durante varios cultivos celulares en crecimiento, se agrega un mutagen químico, seguido por: (a) selección de virus que se ha sometido para pasar a temperaturas subóptima con el fin de seleccionar mutaciones adaptadas al frío y/o sensibles a la temperatura, (b) identificación de virus mutantes que producen placas pequeñas en cultivos celulares, y (c) pasaje a través de huéspedes heterólogos para seleccionar mutaciones de rango de huésped. En otras modalidades, atenuar las mutaciones comprende hacer mutaciones predeterminadas utilizando mutagénesis dirigida a sitio (por ejemplo, ver sección A) y luego rescatar virus que contienen estas mutaciones. Como se estableció previamente, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende al menos dos clases de mutación en su genoma. En ciertas modalidades, un o

mas clases de mutación comprende adicionalmente múltiples mutaciones, tal como clase de mutación G-stem que tiene una mutación doble (por ejemplo, una eliminación, inserción, sustitución, etc.), una mutación triple y similares. Estos vectores VSV atenuados se seleccionan entonces para atenuación en subvirulencia en un modelo animal (por ejemplo ver ejemplo 1 y ejemplo 3).

Las circunstancias típicas (aunque no necesariamente exclusivas) para rescate incluyen un milio de célula de mamífero apropiada en la que la polimerasa T7 esta presente para dirigir la transcripción del ARN de hebra sencilla (o genómicos) antígenómico del vector de transcripción que contiene cADN genómico viral. Ya sea cotranscripcionalmente o brevemente de aquí en adelante, esta transcripción de ARN de antígenoma viral (o genomas) se encapsida dentro de plantillas funcionales por proteína de nucleocápsido y se engancha por los componentes de polimerasa requeridos producidos concurrentemente de los plasmados de presión cotransfectadas que codifican las proteínas trans-activación de virus específico. Estos eventos y procesos conducen a la transcripción prerequisite de mRNA viral, la replicación y amplificación de nuevas genomas y por lo tanto la producción de progenie VSV novedosa, es decir, rescate.

El vector de transcripción y el vector de expresión son típicamente vectores plásmidos diseñados para expresión en la célula huésped. El vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas trans-activación necesarias para encapsidación, transcripción, y

replicación expresa estas proteínas del mismo vector de expresión o la menos dos vectores diferentes. Estos vectores se conocen generalmente de los métodos de rescate básicos, y no necesitan ser alterados para uso en los métodos mejorados de esta invención.

Técnicas adicionales para conducir rescate de virus tales como VSV, se describe en la patente U.S. 6,673,572 y la solicitud de la patente U.S. Provisional 60/477,389, que se incorpora aquí como referencia.

Las células huésped utilizadas en el rescate VSV son aquellas que permiten la expresión de los vectores de los requisitos constituyentes necesarios para la producción del VSV recombinante. Tales células huésped se pueden seleccionar de una célula procariótica o una célula eucariótica, y preferiblemente una célula de vertebrado. En general, las células huésped se derivan de una célula humana, tal como una célula de riñón embrionario humano (por ejemplo, 293). Células vero, así como también muchos otros tipos de células también se utilizan como células huésped. Los siguientes son ejemplos no limitantes de células huésped adecuados: (1) Líneas de Células Primarias Diploide Humano (por ejemplo células WI-38 y MRC5); (2) Línea de Célula Diploide de Mono (por ejemplo células de pulmón Rhesus Fetal-FRHL); (3) Línea de Células Continuas Primarias Quasi (por ejemplo células de riñón de mono verde Africano AGMK); (4) Células 293 Humanas y (5) otras líneas de células potenciales, tales como, CHO, MDCK (Riñón de canino Darby-Madin), fibroblastos de embrión de pollo primario. En ciertas modalidades, un reactivo

que facilita la transacción se agrega para incrementar la toma de ADN por las células. Muchos de estos reactivos se conocen en la técnica (por ejemplo fosfato de calcio). Son ejemplos comunes la Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y Efecttene (Qiagen, Valencia, CA). El Lipofectace y Effecttene son ambos lípidos catiónicos. Ellos cubren el ADN y mejoran la toma de ADN por las células. El Lipofectace forma una liposoma que rodea el ADN mientras que el Effecttene cubre el ADN pero no forma una liposoma.

El VSV atenuado rescatado se prueba luego para u fenotipo deseado (sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, morfología de placa, y atenuación de replicación y transcripción), primero por medios *in vitro*. Las mutaciones también se ensayan utilizando el sistema de mini replicón en donde se suministran actividades de polimerasa y encapsidación trans-activación requeridas por vacuna de virus auxiliar o tipo silvestre, por plásmido que expresan los diferentes genes L, N, y P que cultivan las mutaciones de atenuación específicas de gen. El VSV atenuado también se prueba *in vivo* para atenuación sinérgica en un modelo de neurovirulencia animal. Por ejemplo, modelos de hurón y/o ratón se establecen para detectar neurovirulencia. En resumen, grupos de 10 ratones se inyectan intracranealmente (IC) con cada uno de un rango de varias concentraciones que desvían las dosis LD₅₀ anticipada (una dosis que es letal para 50% de los animales). Por ejemplo, las inoculaciones IC con virus en 10², 10³, 10⁴ y 10⁵ pfu se utilizan en donde el LD₅₀ para el virus esta en el rango de 10³-10⁴ pfu. Las formulaciones de virus se preparan por dilución serial de

depósitos de virus purificados en PBS. Se inyectan luego ratones a través de la parte superior del cráneo con la dosis de requisito, en 50-100 μ l de PBS. Se monitorean los animales diariamente para la pérdida de peso, mordibidad y muerte. El LD₅₀ para un vector de virus se calcula luego a partir de la muerte acumulativa de ratones sobre el rango de concentraciones ensayadas.

C. Secuencias de Ácido Nucleico Heterólogo Y Antígenos

En ciertas modalidades, la invención suministra VSV atenuado sinérgicamente que comprende adicionalmente una secuencia de ARN externo como una unidad transcripcional separada insertada en o que reemplaza un sitio del genoma no esencial para replicación, en donde la secuencia de ARN externa (que esta en sentido negativo) dirige la producción de una proteína capaz de ser expresada en una célula huésped insertada por VSV. Este genoma recombinante se produce originalmente por inserción del ADN externo que codifica la proteína en el cADN VSV. En ciertas modalidades, cualquier secuencia de ADN que codifica un antígeno inmunogénico, que produce inmunidad terapéutica profiláctica contra una enfermedad o trastorno, cuando se expresa como una proteína de fusión o no fusión en un VSV atenuado sinérgicamente recombinante de la invención, solo o en combinación con otros antígenos expresados por el mismo o por un VSV diferente, se aísla e incorpora en el vector VSV para uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

En ciertas modalidades, la expresión de un antígeno por un VSV recombinante atenuado sinérgicamente induce una respuesta inmune contra un microorganismo patogénico. Por ejemplo, un antígeno puede exhibir la inmunogenicidad o antigenicidad del antígeno encontrado nueva bacteria, parásitos, virus, u hongos que son agentes causantes de enfermedades o trastornos. En una modalidad, los antígenos que exhiben la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano u otro antígeno de interés se utiliza.

Los virus que expresan epítomos que se expresan por VSV atenuados sinérgicamente (en donde el ARN externo dirige la producción de un antígeno del virus o un derivado de esta que comprende un epítomo de este) incluye, pero no está limitado a, aquellos listados en la tabla 2, que listan tales virus por familia para propósitos de conveniencia y no de limitación

Tabla 2

Virus que Expresan Epítomos Que Se Pueden Expresar Por VSV.

I. Picornaviridae
Enterovirus
Poliovirus
Coxsackievirus
Echovirus
Rhinovirus
Virus de la Hepatitis A

II. Caliciviridae
Grupo de virus Norwalk
III. Togaviridae y Flaviviridae
Togavirus (por ejemplo, virus de Dengue)
Alphaviruses
Flavivirus (por ejemplo, virus de la Hepatitis C)
Virus de la Rubéola
IV. Coronaviridae
Coronavirus
V. Rhabdoviridae
Virus de la Rabia
VI. Filoviridae
Virus de Marburg
Virus de Ebola

Para determinar la inmunogenicidad o antigenicidad al detectar la unión anticuerpo, varios inmunoensayos conocidos en la técnica se utilizan, que incluyen pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que utilizan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima), inmunoensayos "emparedados", ensayos inmoradioradiométricos, reacciones de precipitan de fusión gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (que utilizan etiquetas de radioisótopo de enzima, coloidal dorado, por ejemplo), western blot, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo ensayos de aglutinación de gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína

A, y ensayos de inmunolectroforesis, ensayos de neutralización, etc. En una modalidad, el anticuerpo de unión se mide al detectar una etiqueta en el anticuerpo primario. En otra modalidad, el anticuerpo primario se detecta al medir la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una modalidad adicional, el anticuerpo secundario se etiqueta. Se conocen, muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo. En una modalidad para detectar la inmunogenicidad, se ensayan respuestas mediadas por célula T por método estándar, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, ensayos tetrámeros, ensayos elispot o ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado.

Epítomos que expresan bacterias y parásitos (determinantes antigénicos) que se expresan por VSV atenuados sinérgicamente (en donde el ARN externo dirige la producción de un antígeno de parásito de bacteria o un derivado de estos que contiene un epítomo de estos) incluye pero no están limitado aquellos listados en la tabla 1.

Tabla 1

**Parásitos Y Bacterias Que Expresan Epítomos Que Se Pueden
Expresar Por VSV**

PARÁSITOS
Plasmodium spp.
Eimeria spp.

Nematodos
Leshmania
BACTERIA
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Corynebacteria diphtheriae</i>
<i>Clostridium tetani</i>
<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Haemophilus</i> spp. (por ejemplo, <i>influenzae</i>)
<i>Chlamydia</i> spp.
Enterotoxigénico <i>Escherichia coli</i>
<i>Helicobacter pylori</i>
Micobacteria

En otra modalidad, en antígeno comprende un epítipo de un antígeno de un nematodo, para proteger contra trastorno originados por tales gusanos. En otra modalidad, cualquier secuencia de ADN que codifica un epítipo de Plasmodium, que cuando se expresa por un VSV recombinante es inmunogénico en huésped vertebrado, se aísla para inserción en ADN VSV (-) de acuerdo con la presente invención. Las especies de plasmodium que sirven como fuentes de ADN incluyen, pero no están limitadas a, los parásitos de malaria humana *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, y los parásitos de malaria animal *P. berghei*, *P.*

yoelii, P. knowlesi, y P. cynomolgi. En aun otra modalidad, el antígeno comprende un peptido de β -subunidad de toxina Colera.

Tabla 2 (Continuación)

Virus que Expresan Epítomos Que Se Pueden Expresar Por VSV.

VII. Paramyxoviridae
Virus parainfluenza
Virus sarampión
Virus paperas
Virus sincitial respiratoria
Metapneunovirus
VIII. Orthomyxoviridae
Orthomyxovirus (por ejemplo, virus de la Influenza)
IX. Bunyaviridae
Bunyavirus
X. Arenaviridae
Arenavirus
XI. Reoviridae
Reovirus
Rotavirus
Orbivirus
XII. Retroviridae
Virus de Leucemia de Célula T Humana tipo I
Virus de Leucemia de Célula T Humana tipo II
Virus de la Inmunodeficiencia Humana (por ejemplo, tipo I y tipo II)
Virus de Inmunodeficiencia de Simio
Lentivirus
XIII. Papoviridae
Poliomavirus
Papilomavirus

00151

Tabla 2 (Continuación)

Virus que Expresan Epítomos Que Se Pueden Expresar Por VSV.

XLV. Parvoviridae
Parvovirus
XV. Herpesviridae
Virus Herpes Simplex
Virus Epstein-Barr
Cytomegalovirus
Virus Varicella-Zoster
Herpes virus-6 Humano
Herpes virus-7 Humano
Virus Herpes Cercopitecina 1 (virus B)
XVI. Poxviridae
Poxvirus
XVIII. Hepadnaviridae
Virus de la Hepatitis B
XIX. Adenoviridae

En modalidades específicas, el antígeno codificado por las secuencias externas que se expresan luego de infección de huésped por el VSV atenuado, exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad de hemaglutinina de virus de influenza; glicoproteína G de virus sincitial respiratoria humano (G); hemaglutinina de virus de sarampión o glicoproteína G de tipo 2 de virus del herpes simples.

Otros antígenos que se expresan por VSV atenuado incluyen, pero no se limitan a, aquellos que exhiben la antigenicidad o inmunogenicidad de los siguientes antígenos: Poliovirus I VP1; envoltura de glicoproteínas de HIV I; antígeno de superficie de

Hepatitis B; toxina Dipteria; epítipo de streptococcus 24M, peptidasa SpeA, SpeB, SpeC o C5a; y pilin gonococal.

En otras modalidades, el antígeno expresado por el VSV atenuado exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad del virus pseudorabia g50 (gpD), virus de pseudorabia II (gpB), virus de pseudorabia gIII (gpC), glicoproteína H del virus de pseudorabia, glicoproteína E del virus de pseudorabia, glicoproteína 195 de gastroenteritis transmisibile, proteína de matriz de gastroenteritis transmisibile, glicoproteína 38 de rotavirus de cerdos, proteína de cápsido de parvovirus de cerdos, antígeno protector de hidodisenteria Serpulina, glicoproteína de diarrea viral de bovino 55, hemaglutitina neuraminidasa de virus de enfermedad de Newcastle, hemaglutitina de gripa de cerdos, o neuraminidasa de gripa de cerdos.

En ciertas modalidades, un antígeno expresado por VSV atenuado exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de un canino o patógeno felino, que incluye, pero no está limitado a, virus de leucemia felina, virus distemper canino, adenovirus canino, parvovirus canino y similares.

En ciertas otra modalidades, el antígeno expresado por el VSV atenuado exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de iodisenteria serpulina, virus de enfermedad de boca y pie, virus del cólera Hog, virus de influenza de cerdos, virus de la fiebre en cerdo africano, hiponeumonia micoplasma, virus de rinotraqueitis bovina infecciosa (por ejemplo, glicoproteína E de virus de rinotraqueitis bovina

infecciosa o glicoproteína G), o virus de laringotraqueitis infecciosa (por ejemplo, virus de laringotraqueitis infecciosa glicoproteína G o glicoproteína 1).

En otra modalidad, el antígeno exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad de una glicoproteína del virus La Crosse, virus de diarrea de becerro neonatal, virus de encefalomiелitis equina venezolana, virus de toro punta, virus de leucemia murino o virus de tumor mamario de ratón.

En otras modalidades, al antígeno exhibe la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano, que incluye pero no está limitado a herpes virus humano, herpes simples virus -1, herpes simples virus-2, citomegalovirus humano, virus Epstein Barr, virus varicela zoster, herpes virus-6 humano, herpes virus-7 humano, virus de la influenza humana, virus de la inmunodeficiencia humana, (tipo 1 y/o tipo2), virus de rabia, virus del sarampión, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, Falciparum Plasmodium, y Bordetella pertussis.

Antígenos potencialmente útiles o derivados de estos para uso como antígenos expresados por VSV atenuado se identifican por varios criterios, tal como involucramiento de antígeno en neutralización de una infectividad de patógeno, tipo o grupo específico, reconocimiento de antisera de paciente o células inmunes, y/o la demostración de efectos protectores de antisera o células inmunes específicas para el antígeno.

En otra modalidad, el ARN externo del VSV atenuado dirige la producción de un antígeno que comprende un epítipo, que cuando el VSV atenuado se introduce en un huésped deseado, induce una respuesta humana que protege contra una condición o trastorno originado por una entidad que contiene el epítipo. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor o antígeno asociado con tumor, para inducción de una respuesta inmune protectora contra un tumor (por ejemplo, un tumor maligno). Tales antígenos asociados con tumor o específicos de tumor incluyen, pero no se limitan a, antígeno KS $\frac{1}{4}$; antígeno de carcinoma de ovario (CA125); fosfato de ácido prostático; antígeno específico de próstata; antígeno asociado con melanoma P97; antígeno de melanoma GP75; antígeno de melanoma de alto peso molecular y antígeno de membrana específico de próstata.

El ADN externo que codifica el antígeno, que se inserta en un sitio no esencial del ADN VSV atenuado, comprende además opcionalmente una secuencia de ADN externo que codifica una citoquina capaz de ser expresada y estimular una respuesta inmune en un huésped infectado por el VSV atenuado. Por ejemplo, tales citoquinas incluyen pero no están limitadas a interloquinas 1α , 1β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, y 18, interferón- α interferón- β interferon-gamma, factor estimulador de colonia de granulocito, factor estimulador de colonia de macrófago granulocito y los factores de necrosis de tumor α y β .

00155

D. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS E INMUNOGÉNICAS

En ciertas modalidades, la invención se dirige a una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN externa insertada en o que reemplaza un región de genoma VSV no esencial para replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV.

Los vectores VSV atenuados sinérgicamente de la invención se formulan para administración a un sujeto mamífero (por ejemplo, un humano). Tales composiciones comprenden típicamente el vector VSV y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí en adelante, el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquiera y todos los solvente, y medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacteriales, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares, compatibles con administración farmacéutica. El uso de tales medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cualquier medio convencional o agente es incompatible con el vector VSV, tales medios se utilizan en las composiciones inmunogénicas de la invención. Compuestos activos complementarios también se pueden incorporar dentro de las composiciones.

Así, una composición inmunogénica VSV de la invención se formula por ser compatible con su ruta de administración

propuesta. Ejemplos de rutas de administración incluyen parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intermuscular, intraperitoneal, y de mucosa (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal, respiratoria). Soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación subcutánea parental, intradérmica, incluyen los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros solventes sintéticos; agentes antibacteriales tales como alcohol benzilo o metil parabenos antioxidantes tales como ácido ascórbico o binsulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminotetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajuste de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se ajusta con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en donde son solubles en agua) o dispersiones o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o dispersión. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen salina fisiológica, agua bacterioestática, cremofol LTM basc, paricipani, NJ) o salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida para que exista fácil alcance y jeringabilidad. Esta debe ser adecuada bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se

nn157

debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador es un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etano, poliol (por ejemplo, glicerol), propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se alcanza por varios agentes antibacteriales y antifúngico, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido ascórbico, y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes.

Tal como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables es efectuada al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles son preparadas al incorporar el vector VSV en la cantidad requerida (o dosis) en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguida por esterilización filtrada. De manera general, las dispersiones son preparadas al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son

el secado con vacío y el secado por congelamiento que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional proveniente de una solución filtrada previamente estéril de ésta.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos son suministrados en la forma de un pulverizado de aerosol proveniente de un recipiente presurizado o un dispensador que contiene un propulsor adecuado (por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador). La administración sistémica también puede ser por medios de mucosa o transdérmicos. Para la administración por mucosa o transdérmica, los penetrantes apropiados a la barrera a ser permeada son utilizados en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración de mucosa, detergentes, sales de bilis, y derivados de ácido fusídico. La administración a la mucosa se logra a través del uso de pulverizados nasales o supositorios. Los compuestos también son preparados en la forma de supositorios (por ejemplo, con base de supositorio convencional tal como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

En varias modalidades, es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosis para la fácil administración y la uniformidad de la dosis. La forma unitaria de dosis como se utiliza aquí se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico

.

deseado en asocio con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la invención son dictadas y directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a ser logrado, y de las limitaciones inherentes en la técnica de los compuestos tal como el compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Todas las patentes y publicaciones citadas aquí se incorporan aquí mediante referencia.

D. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son llevados a cabo utilizando técnicas estándar, que son bien conocidas y de rutina por aquellos expertos en la técnica, excepto donde se describe en detalle otra cosa. Los siguientes ejemplos se presentan con propósito ilustrativo, y no deben ser considerados de ninguna manera limitante del alcance de esta invención.

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Mutantes de Cola Citoplásmica de Proteína VSV G

Los métodos utilizados para la generación de los mutantes de cola citoplásmica de proteína G de la presente invención son conocidos en la técnica y se describen con detalle por Schnell et al., (1998). Estos mutantes de proteína G retienen un amino

ácido simple ($G_{(ct-1)}$) o nueve amino ácidos ($G_{(ct-9)}$) en el dominio de cola citoplásmica G comparado con el dominio de cola citoplásmico de veintinueve amino ácidos de la sepa Indiana VSV tipo silvestre (SEQ ID NO:1). Los truncamientos de cola citoplásmica fueron generados al mover el codón de parada de traducción 60 nucleótidos u 84 nucleótidos (es decir, la cola citoplásmica de nueve amino ácidos y la cola citoplásmica de un amino ácido, respectivamente) corriente arriba del codón de parada auténtico y que da como resultado el intercambio de la proteína G.

Mutantes Mezclados de Gen VSV N

Los mutantes de translocación del gene N (mezclados de N) fueron generados al reposicionar el gen N como el segundo, tercer o cuarto gen desde el extremo 3' del genoma del virus. Por ejemplo el orden del gen autentico para el VSV tipo silvestre, 3'-NPMGL-5', fue mutado a 3'-PNMGL-5' y 3'PMNGL-5'. La translocación del gen N alejada del promotor de transcripción de ARN 3' único causa una caída proporcional en el nivel de expresión del gen N (por ejemplo, ver la Patente U. S. 6,596,529, incorporada específicamente aquí mediante referencia en su totalidad. Una reducción en el nivel de la proteína N en las células infectadas hace más lenta la formación del nucleocápsido viral, finalmente reduciendo la proporción de replicación del genoma y la formación de partícula de virus. Los métodos utilizados para las translocaciones del gen N se describen adelante.

Para la primera etapa de la producción de los mezclados del gen N, el gen N se removió completamente desde el genoma del virus de longitud completa cADN, con el resultado de que el gen P estaba entonces inmediatamente adyacente al virus líder, en lugar del gen N. Para suprimir el gen N, fueron hechos dos productos PCR con un cADN de genoma de longitud completa como molde. El primer producto PCR contenía el alargamiento de secuencia de un sitio BsaAI corriente arriba del promotor T7, al extremo del virus líder y un sitio BsmBI corriente abajo agregado. El segundo producto PCR contenía alargamiento de secuencia desde el sitio XbaI natural en el gen P a la señal de inicio de transcripción para el gen P, adyacente al sitio BsmBI corriente arriba agregado. Los sitios BsmBI estaban dispuestos de una manera que ambos productos PCR se podrían unir sin costura (luego de la digestión y ligamiento) para dar un fragmento de ADN simple que contenía el virus líder inmediatamente adyacente al gen P. Este fragmento de ADN fue luego ligado en los sitios XbaI/BsaAI del cADN del genoma de longitud completa, eliminando efectivamente el gen N del genoma del virus.

En la siguiente etapa de la generación de las mezclas del gen N, el gen N se insertó entre los genes P y M, o los genes M y G, o los genes G y el cADN del genoma N suprimido. Para la inserción del gen N entre los genes P y M, se prepararon tres productos PCR con el cADN del genoma de longitud completo como molde. El primer producto PCR contenía el alargamiento de secuencia desde el sitio XbaI natural en el gen P, a la señal de inicio de transcripción del gen M, con un sitio BsmBI de flanco agregado. El segundo producto PCR contenía alargamiento de la

.. 00162

secuencia desde la señal de inicio de transcripción del gen N a la secuencia TATG conservada adyacente a la señal de poliadenilación 3'-AAAAAAA- en el gen N, con un sitio BsmBI de flanqueo agregado. El tercer producto PCR contenía el alargamiento de secuencia desde el sitio MluI natural al inicio del gen G a la señal de poliadenilación TATGAAAAAAA conservada del gen P, con el sitio BsmBI de flanqueo agregado. Todos los tres fragmentos fueron entonces digeridos con BsmBI, y religados para formar un fragmento de ADN simple con el gen N flanqueado por parte del gen P y el gen M. Este fragmento de ADN fue entonces digerido con XbaI y MluI y ligado en los sitios XbaI/MluI del genoma del virus delta-N para formar el cADN 3'-PNMGL.5'.

Para generar cADN del genoma 3'-PMNGL-5', se prepararon dos productos PCR separados. El primer producto PCR contenía el alargamiento de secuencia desde el sitio XbaI natural en el gen P a la señal de inicio de la transcripción (5'-AACAG-3') del gen G, con un sitio BsmBI de flanqueo agregado. El segundo producto PCR contenía la secuencia del gen N entero proveniente de la señal de inicio de transcripción, con un sitio BsmBI corriente arriba de flanqueo agregado, a la señal parada/poliadenilación de la transcripción del gen N, con un alargamiento de la secuencia de flanqueo de la señal de inicio de transcripción G al sitio MluI natural en el gen G. La secuencia específica del gen G se agregó a la secuencia del gen N como parte de uno de los iniciadores PCR. Ambos productos PCR fueron digeridos con BsmBI y ligados para formar un fragmento de ADN simple, que fue entonces digerido con XbaI y MluI y ligado a los sitios XbaI/MluI del cADN del genoma N suprimido para dar una disposición de gen 5'-PMNGL-3'.

Para generar un cADN de genoma 5'-PMGNL-5', se prepararon tres productos PCR de un molde de cADN de genoma completo. El primer producto PCR contenía el alargamiento de secuencia del sitio *SwaI* natural en el gen G a la señal de inicio de la transcripción para el gen L, flanqueado por un sitio *BsmBI* agregado. El segundo producto PCR contenía la secuencia del gen N entero proveniente desde la señal de inicio de transcripción hasta la señal de parada de transcripción, flanqueado en ambos extremos por los sitios *BsmBI* agregados. El tercer producto PCR contenía alargamiento de secuencia desde el inicio de transcripción del gen L, flanqueado por un sitio *BsmBI* agregado, a un sitio *HpaI* natural en el gen L. Todos los tres productos PCR fueron digeridos con *BsmBI* y religados para formar un fragmento de ADN simple, que fue luego digerido con *SwaI* y *HpaI*, y ligado a los sitios *SwaI/HpaI* del cADN del genoma N suprimido, dando como resultado una disposición del gen 5'-PMGNL.3'. En todos los tres genomas predispuestos la secuencia de integridad de cada gen y las secuencias reguladoras de flaqueo fueron indicadas al virus no alterado; solamente la posición del gen N era diferente.

Combinación de las Mutaciones de Cola Citoplásmica de Proteína G y las Mutaciones de Mezcla N

La combinación tanto de las mezclas de gen N como de los truncamientos de cola citoplásmica de la proteína G tienen como resultado genomas doblemente mutados (es decir, dos clases de mutación), por ejemplo, 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5', y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5'. Los cADN de genoma de mutante

doble fueron contruidos al permutar el gen G natural en los genomas mezclados N, con los genes $G_{(ct-1)}$ o $G_{(ct-9)}$ truncados descritos anteriormente. La permuta fue desarrollada mediante la digestión de los cADN donadores ($5'$ -NPM $G_{(ct-1)}$ L- $3'$ y $5'$ -NPM $G_{(ct-9)}$ L- $3'$) con MluI y HpaI, seguido por el ligamiento de los genes G truncados purificados, en los sitios MluI/HpaI de los genomas cADN mezclados N. Estos mutantes dobles fueron rescatados del cADN, purificados en triple placa, amplificados y caracterizados en el cultivo de célula por el tamaño de la placa y las cinéticas de crecimiento como se describe adelante.

Mutaciones del Gen M no Citopático

El gen VSV M codifica la proteína de matriz de virus (M), y dos polipéptidos en estructura pequeños (M2 y M3). Los polipéptidos M2 y M3 son traducidos de la misma estructura de lectura abierta (ORF) como la proteína M, y por la falta de los primeros amino ácidos 33 y 51 respectivamente. Un vector VSV recombinante que comprende mutaciones de gen M no citopático (es decir, los vectores VSV que tampoco expresan las proteínas M2 y M3) se generó como se describió adelante, y comprende además una o más mutaciones adicionales resultando de esta manera un vector VSV que estaba altamente atenuado en el cultivo de la célula y en los animales.

Las mutaciones del gen M no citopático ($M_{(ncp)}$), que dio como resultado la conversión de las metiolinas 33 y 51 a la alaninas (M33A, M51A) se generó utilizando una estrategia de clonación basada en PCR, donde las sustituciones de nucleótido necesarias

00165

(AUG a GCT) se incorporaron en los iniciadores PCR (Jayakar and Whitt, 2002; Jayakay et al., 2000). Los productos PCR resultantes que contenían las mutaciones M33,51A fueron entonces clonados en el genoma del cADN del VSV de longitud completa, permitiendo el rescate del virus que no expresa los polipéptidos M2 y M3.

Las mutaciones M33,51A presentes en el cADN del vector VSV recombinante diseñada por Jayakar y Whitt, fueron transferidas a el cADN de él o los vectores VSV por intercambio del fragmento XbaI-MluI (espaciando el gen M completo y parte del gen P). La permuta al fragmento de cADN no dio como resultado ningún amino ácido adicional que codifica los cambios por encima y por debajo de las mutaciones M33,51A.

Combinación de las Mutaciones de Cola Citoplásmica de proteína G y las Mutaciones del gen M no Citopático

La combinación tanto de los truncamientos de la cola citoplásmica de la proteína G como de las mutaciones del gen M no citopático en genomas doblemente mutados (es decir, dos clases de mutación), por ejemplo 3'-NPMncpGct-1L-5' o 3'-NPMncpGct-9L-5'. Los cADN del genoma mutante doble fueron contruidos al mutar el cADN del gen M que contiene las mutaciones que dan origen al fenotipo no citopático, en un cADN de genoma de longitud completa que contiene cualquiera de las mutaciones G_(ct-1) o G_(ct-9). En cada caso, el fragmento de cADN permutado se estiró desde el sitio XbaI único en el genoma P al sitio MluI único en la región no traducida 5' del gen G, e incluyó la secuencia de gen M no citopático completa.

Como se describió previamente la proteína M no citopática difirió de la proteína M que ésta reemplazó, por solamente dos sustituciones de amino ácido (M33A y M51A), la cual dio origen al fenotipo no citopático. Estos genomas doblemente mutados fueron entonces modificados adicionalmente mediante la inserción del gen HIV-1 gag en la posición 5 en el genoma, entre los genes G y L, para permitir la expresión de la proteína gag para los estudios de inmunogenicidad. Como para los otros vectores rVSV de virus el gen gag fue clonado en los sitios Xho I/Nhe I únicos en la posición 5 del genoma del cADN.

Mutaciones Sensibles a la Temperatura del Gen VSV N y/o

Mutaciones Sensibles a la Temperatura del Gen VSV L

Una proteína HIV Gag¹ que codifica un VSV (rVSV) recombinante de el primer cistron 3' del genoma viral (rVSV-Gag₁) se modificó al reemplazar el gen N y/o el gen L con secuencias de codificación homólogas derivadas de los mutantes sensibles (ts) a temperatura VSV biológicamente derivados conocidos (Pringle, 1970). Los vectores resultantes, (i) rVSV-Gag₁tsN (es decir, 3'-gag₁-N_(ts)PMGL-5') contenían el gen N de la sepa VSV ts41, (ii) rVSV-Gag₁tsL (es decir, 3'-gag₁-NPMGL_(ts)-5') contenían el gen L de la sepa VSV ts11 y (iii) rVSV-Gag₁tsN+L (es decir, 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5') contenían tanto el gen N de la sepa VSV ts41 como el gen L de la sepa VSV ts11. Las sepas VSV ts41 y ts11 también son conocidas en la técnica como tsG41 y tsG11, respectivamente.

Ambas sepas donadoras de genes biológicamente derivadas fueron aisladas por Pringle (Pringle, 1970) después de someter un VSV adaptable en laboratorio (la sepa Glasgow del Serotipo Indiana) a mutagénesis química. Pringle también mapeo las mutaciones ts al gen N o L.

Los genes ts41 N y ts11 L fueron clonados del ARN infectado con célula. En resumen, las células BHK fueron infectadas con ts11 o ts41 a una temperatura permisiva (31-32°C). La infección se le permitió continuar hasta que el efecto citopático fue evidente en más del 75% de la mono capa de célula, momento en el cual el ARN fue extraído y purificado. El ARN entonces fue transcrito de manera inversa utilizando iniciadores específicos de gen para dirigir la síntesis de cADN después de lo cual el cADN fue amplificado por PCR. Los cADN amplificados fueron entonces clonados en el cADN genómico del vector rVSV y verificados mediante análisis de secuencia.

La secuencia genómica completa del ts11, ts41, y su sepa progenitora (Glasgow) se determinó para identificar los cambios de codificación que contribuyeron al fenotipo ts. Al comparar las secuencias codificantes del antecedente del vector rVSV, los mutantes ts Pringle, y el virus progenitor Glasgow, es posible predecir que los cambios de codificación contribuyeron a los fenotipos de los vectores rVSV-Gag₁tsN, rVSV-Gag₁tsL y rVSV-Gag₁tsN+L.

La Tabla 3 es una comparación de las secuencias de amino ácido de la proteína N. Es evidente de los datos, que el

00168

reemplazo del gen N del vector rVSV con el homólogo ts41 dio como resultado las 4 sustituciones de amino ácido. Cualquiera de estos cambios puede afectar la función de la proteína N en el contexto del antecedente genético del vector y contribuyen al fenotipo ts. Fue notable que solamente un cambio (Tyr a Cys en la posición 74, residuos mostrados en *itálicas*) distinguiera el ts41 de su virus progenitor (Glasgow), sugiriendo que la sustitución puede ser un determinante ts crítico.

TABLA 3
COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VSV N

Amino Acido No.	Sepa de Virus		
	XN2	ts41	Glasgow
14	Val	Ile	Ile
74	Tyr	Cys	Tyr
128	Ser	Arg	Arg
353	Asn	Ser	Ser

De manera similar, la Tabla 4 suministra la comparación de la proteína L. El reemplazo del gen L en el vector rVSV con la contraparte ts11 dio como resultado cambios en la codificación de 13 amino ácidos. Como se mencionó anteriormente en el gen N, cualquiera de estos cambios de codificación pueden contribuir al fenotipo ts observado producido mediante el reemplazo del gen N, pero varias de estas mutaciones de codificación (*mostradas en itálicas*) son de mayor interés porque ellas también diferencian el ts11 de su virus progenitor Glasgow, identificando potencialmente estas sustituciones de amino ácido como los contribuyentes clave al fenotipo ts.

TABLA 4

COMPARACIÓN DE LA PROTEÍNA VSV L

Amino Acido No.	Sepa de Virus		
	XN2	ts11	Glasgow
87	Pro	Ser	Ser
88	Thr	Ala	Thr
202	Ile	Leu	Leu
203	Arg	Lys	Lys
268	Tyr	His	Tyr
367	Thr	Ala	Ala
1112	Pro	Ser	Pro
1374	Ala	Val	Val
1519	Ile	Leu	Leu
1792	Leu	Val	Val
1793	Ile	Val	Ile
2042	Leu	Ser	Leu
2075	Arg	Lys	Lys

Mutaciones Madre G y Mutaciones de Mezcla Madre G/Gen

En ciertas modalidades, un VSV genéticamente modificado de la invención comprende una mutación en el gen G, en donde la proteína G codificada tiene una mutación en la región madre próxima a la membrana del ectodominio de la proteína G, denominado como proteína madre G. La mutación madre G fue introducida al reemplazar el gen G en el antecedente genético del vector VSV XN (Schnell et al., 1996) con el gen G modificado que codifica la madre G. La madre G (Robinson, 2000) esta compuesto de 108 de los 512 amino ácidos de proteína G que incluyen: 1) los primeros 17 amino ácidos de la proteína G, que comprenden la secuencia de señal que apunta al polipéptido para la inserción de membrana; 2) 42 amino ácidos del domino extracelular próximo a la membrana denominado como la madre; 3) dominio con un espaciamiento de membrana de 20 amino ácidos; y 4) la cola intracelular carboxi terminal de 29 amino ácidos. Esta

configuración del polipéptido madre G contiene suficiente secuencia de proteína G para mediar la maduración de las partículas virales, pero le falta las secuencias necesarias para actuar como una proteína de unión de célula. Consecuentemente, las células infectadas con el vector madre G expresaran las proteínas de virus y el antígeno extraño codificado, pero producirá partículas virales de progenie que no son infecciosas por que el vector madre G no codifica una proteína G de función completa.

Para producir las partículas del vector madre G que contienen la proteína G funcional necesaria para infectar la célula blanco, la proteína G de longitud completa se debe suministrar en trans. Esto se puede lograr durante el rescate de virus y la subsecuente producción de vacuna por uno de varios procedimientos: 1) las líneas celulares se pueden desarrollar que expresen la proteína G; 2) un vector viral complementario que exprese la proteína G se puede emplear, tal como el adenovirus, MVA, o VEE; 3) las células utilizadas para la producción que se pueden transfectar con un vector de ADN de plásmido o la proteína G que codifica el ARN.

Actualmente, el vector madre G es producido por una complementación transitoria en las células transfectadas con un plásmido designado para expresar la proteína G. Esto evita la necesidad de generar líneas de célula que expresen la proteína G, que sean difíciles de producir porque la proteína G es tóxica, y también evita la introducción de reactivos biológicos como el virus ayudante en el proceso de producción. En algunas

configuraciones del vector madre G, los castrones que codifican las proteínas virales han sido mezclados corriente abajo para permitir la inserción del gen extraño en la primer posición del genoma. Esto atenúa el virus y coloca el gen del antígeno extraño próximo al promotor que asegura altos niveles de expresión.

Como se describió anteriormente en la Sección A1, la inserción del gen HIV gag (o cualquier otro gen) en el genoma VSV en la posición 1 (3'-gag₁NPMGL-5') efectivamente resulta en una mutación de mezcla de gen, en donde los genes N, P, M, G y L son cada uno movidos desde sus posiciones tipo silvestre a posiciones más distantes en el genoma. Así, la combinación tanto de la mutación G_(madre) y la inserción del gag en el genoma VSV en la posición 1 (gag₁), da como resultado un genoma doblemente mutado 3'-gag₁-NPMG_(madre)L-5'.

Rescate de los Virus de Somatitis Vesicular en 293 células

El rescate exitoso del VSV proveniente de 293 células fue logrado utilizando el sistema choque de calor básico/plásmido-T7 descrito en la solicitud internacional WO 2004/113517 (específicamente incorporado aquí como referencia), de acuerdo con el siguiente protocolo revisado.

Materiales

ADN de Plásmido: 1) cADN genómico viral de longitud completa, 2) pT7-N, 3) pT7-P, 4) pT7-L, 5) pT7-M, 6) pT7-G y 7) pCI-Neo-bcl-T7 (p0061).

00172

Reactivos de transfección de calcio-fosfato: 1) solución salina amortiguada 2X BES: 50 mM BES (Ph 6.95 - 6.98), 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂ HPO₄, 2) 2_5 M CaCl₂ y 3) solución de lavado salina amortiguada Hepes (HBS): 20 mM hepes (pH 7.0 - 7.5), 140 mM KCl, 1mM MgCl₂.

Soluciones de cultivo de célula: 1) DMEM solventado con 10% de FBS inactivado con calor certificado (DMEM/FBS), 2) Medio Esencial Mínimo Modificado Iscoves (IMEM) suplementado con 10% de FBS inactivado con calor certificado (IMEM/FBS), 3) Poli-L-Lisina: 0.01% en H₂O, 4) PBS y 5) tripsina/EDTA porcina.

Procedimientos

Cultivo de 293 Células: 293 células pueden ser difíciles de cultivar, y existen numerosos métodos diferentes para manejarlas. El método habitual ha sido utilizado exitosamente como parte del sistema de rescate para las construcciones de vector VSV y VSV modificado.

Subcultivo de Rutina:

1) Remover el medio y lavar la mono capa confluyente (10 cm placa) con 5ml de PBS caliente; pipetea suavemente a lo largo del lado del plato para evitar el desprendimiento de las células (293 células dejadas a temperatura ambiente durante demasiado tiempo, o en un medio que se vuelva básico (rojo), se separará).

2) Agregar suavemente 2 ml de tripsina y girar el plato para cubrir la mono capa completa. Aspirar la tripsina y permitirle al plato permanecer a temperatura ambiente durante aproximadamente un minuto. Inclinar el plato a un ángulo de 45 grados y unirlo contra la superficie de trabajo de la caperuza para despegar las células "hood". Si las células no se despegan, incubar otro minuto a temperatura ambiente (estar seguro de que las células se separen en esta etapa de tal forma que se pueda evitar un pipeteado vigoroso).

3) Agregar suavemente 5 ml de DMEM/FBS y pipetear hacia arriba y hacia abajo lentamente para dispersar las células.

4) Agregar 1 ml de células a la placa que contiene 9 ml de DMEM/FBS.

5) Incubar a 37°C, 5% de CO₂.

Subcultivo para transfección:

1) Recubrir el número deseado de placas con poli-L lisina. Agregar aproximadamente 3-4 ml de 0.001% de poli-L lisina por plato y permitirle permanecer a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Aspirar la solución de poli-L lisina. Enjuagar el plato con 5 ml de medio.

2) Tripsinizar las células como se describió anteriormente. Utilizar una proporción de división que producirá 50-75% de la placa confluyente el siguiente día (1:3 a 1:6).

3) Después de separar las células y agregar IMEM/FBS y transferir las células a la placa recubierta que contiene 9 ml de IMEM/FBS. Parece que es importante dividir las células y permitir el crecimiento durante toda la noche en IMEM/FBS antes de la transfección.

4) Incubar a 37°C, a 5% de CO₂.

Transfección:

1) 1-3 horas antes de la transfección, alimentar las células con 9 ml de IMEM/FBS e incubar las células en una incubadora a 32°C ajustada al 3% de CO₂.

2) Preparar la mezcla de transfección de calcio-fosfato-ADN como sigue:

a) Combinar los siguientes ADN en un tubo de polipropileno de 5 ml : (i) 8 µg T7-N, (ii) 4µg T7-P, (iii) 1.2 µg T7-L, (iv) 1.0 µg T7-M, (v) 1.0 µg T7-G, (vi) 10 µg de clon de cADN genómico viral y (vii) 10 µg de vector de expresión hCMV-T7.

b) Ajustar el volumen a un volumen final de 450 µl con agua.

c) Agregar 50 µl 2.5 M de CaCl₂.

d) Mientras se gira suavemente el tubo, agregar 500 µl de 2XBBS luego permitirle al tubo permanecer a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.

3) Remover las células de la incubadora y agregar lentamente la mezcla de fosfato de calcio-ADN al medio de cultivo y revolver suavemente para distribuir el precipitado. Inmediatamente al regresar las células a la incubadora a 32°C -3% CO₂.

4) Tres horas después de iniciar la transfección, sellar los platos de cultivo en una bolsa plástica y sumergirla completamente en un baño de agua ajustado a 43°C durante 2 horas para inducir la respuesta de choque de calor celular.

5) Después del choque de calor, regresar las células a la incubadora a 32°C- 3% CO₂ y continuar la incubación durante toda la noche.

6) Al siguiente día, lavar las células 2 veces con HBS y alimentar las células con 10 ml de IMEM/FBS. Incubar a 37°C, 5% CO₂.

7) A las 48-72 horas después de iniciar la transfección, configurar suficientes recipientes T 150 que contienen 20 ml de DMEM/FBS para transferir las células transfectadas al recipiente mayor. Un recipiente T 150 para cada placa de 10 cm que fue transfectada.

8) Transferir las 293 células transfectadas a pipetear suavemente el medio de cultivo sobre la mono capa para desalojarla de la superficie celular. Evitar el pipeteo vigoroso y utilizar solo la fuerza suficiente para desalojar las células. Después de que las células son desalojadas, pipetear hacia arriba

y hacia abajo aproximadamente 5 veces para reducir el tamaño de los grumos de células y luego transferir el medio y las células a un recipiente T 150 que contiene 20 ml de IMEM/FBS.

9) Cuatro a 6 horas después, reemplazar el medio con DMEM fresco suplementado con 10% FBS (notar que esta etapa se puede retrasar hasta 24 horas si las células no son adheridas al plato. También, esta etapa ha sido pasada por alto exitosamente.

10) Monitorear las células durante 5-7 días para detectar evidencia del efecto citopático.

11) Cuando el CPE aparece de manera evidente, transferir 50 μ l de supernadante de medio a los pozos en una placa de seis pozos que contiene medio y una mono capa de célula Vero establecida. El CPE debe ser visible al siguiente día si ha ocurrido el rescate. (Note que esta etapa es importante porque las 293 células a veces se separan de la superficie en el recipiente T 150 y aparecen infectadas con VSV cuando de hecho no lo están).

12) Después de transferir la muestra pequeña a la mono capa de célula Vero, cosechar las células y el medio del recipiente T 150 y congelar a -70. Las 293 células se pueden cosechar generalmente al pipetear el medio sobre la mono capa y separar las células.

Rescate del Virus de la Estomatitis Vesicular en Células Vero

Soluciones

Las siguientes soluciones son generalmente útiles para transfección de célula huésped:

1) Una solución 2XBBS (por L) (solución salina amortiguada 2XBES) de 280 mM NaCl [16.4 g NaCl (o 56 ml 5M NaCl)], 50 mM BES [10.7 g BES (forma de ácido libre)], y 1.5 mM de fosfato de sodio [0.21 g Na_2HPO_4]. La solución BBS se ajusta a pH 6.95 - 6.98 con NaOH. La solución es luego esterilizada con filtro y almacenada congelada.

2) Una solución de CaCl_2 2.5 M de 36.8 g por 100 ml de volumen total se prepara y se almacena a -20°C . La solución es esterilizada con filtro utilizando nitro celulosa. Los filtros de acetato de celulosa deben ser evitados porque ellos se taponan. Alternativamente, las soluciones de transfección son sometidas a auto clave para esterilización. Sin embargo, el último procedimiento puede ser menos deseable, en razón a que la solución 2XBBS puede cambiar ligeramente durante el proceso de auto clave.

Las siguientes soluciones son generalmente útiles para el medio:

- 1) Una solución DMEM + FBS de DMEM (alta glucosa con glutamina; Gibco/BRL [Grand Island, NY], complementado con 10% de FBS certificado e inactivado por calor, y 10-20 ug/mL (opcionalmente hasta 50ug/mL) de gentamicina.
- 2) Una solución MEM + FBS de MEM (complementada con glutamina, amino ácidos no esenciales, 10% de FBS

certificado e inactivado por calor, y 10-20 Ug/mL (opcionalmente hasta 50ug/mL) 20-25 mM de amortiguador Hepes; Gibco/BRL) (Grand Island, NY) e incluye opcionalmente 1x de Fungizone).

- 3) Una solución HBS de solución de salina amortiguada HEPES, 20 Mm, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1Mm MgCl₂.

MÉTODOS

Una célula huésped útil se puede seleccionar generalmente de células Vero divididas, que se colocan en DMEM+FBS el día antes de transfección de tal manera que ellas sean aproximadamente 50% confluentes [80-90% para RSV] al siguiente día (en placas de 6 pozos o frascos de 12.5 cm²). Las densidades celulares mayores trabajan menos efectivamente. El siguiente día, se alimenta cada cultivo 1-4 horas antes de transfección con 4.5 ml de DMEM+FBS. Las células se transfectan luego a un incubado de CO₂ establecido en 3% de CO₂ y 32°C. Las células Vero pueden crecer más durante la noche tanto como aproximadamente 50% confluyente al tiempo de transfección.

Un precipitado de CaCl₂/fosfato se obtiene como sigue: BBS y CaCl₂ se mantienen a temperatura ambiente antes del inicio. La mezcla de ADN se prepara en un tubo de propileno de 5ml que contiene un volumen total de 250 µl, con un ADN de plásmido 2-20 µg en total y 25 µl de CaCl₂. Los ADN para rescate de longitud completa incluyen 5µg de una construcción de cADN de longitud completa para VSV, 400 ng de proteína N, 300 ng de proteína P,

100-200 ng de proteína L, y 5-10 µg de plásmido pCl-Neo-Bcl-T7 (SEQ ID NO: 1; Figura 2). La eficiencia del rescate en las células Vero es baja, así 3-6 pozo son transfectados por construcción de longitud completa que es rescatada.

Después de que son preparadas todas las soluciones ADN/CaCl₂, se agrega 2XBBS. Esto se hace usualmente al agitar suavemente un tubo mediante girado a baja velocidad y agregar 250 µl de 2XBBS gota a gota hacia abajo por el lado del tubo. Esto se repite para todos los tubos, a los cuales se les permite permanecer a temperatura ambiente durante 15-20 minutos adicionales para permitirle al precipitado ADN-Calcio-Fosfato formarse. Después de la temperatura ambiente de la incubación, el precipitado se agrega gota a gota al medio de cultivo de célula y se distribuye homogéneamente al girar la placa. El medio es luego incubado durante 3 horas en una incubadora ajustada al 3% de CO₂. Un nivel de 3% de CO₂ es importante para la técnica de transfección BBS/CaCl₂; 5% de CO₂ trabaja muy pobremente, si es que trabaja. El 3% del CO₂ controla el pH del medio y permite la formación de un precipitado de Calcio-Fosfato-ADN efectivo en el medio.

El procedimiento de choque de calor es luego opcionalmente llevado a cabo, por ejemplo 3 horas después del inicio de la transfección. Las células son transferidas a un baño de agua ajustado a 44° C. Las células son selladas en una bolsa de almacenamiento plástica de tal forma que los cultivos se pueden sumergir completamente en agua. Después de 3 horas a 44° C, las células son transferidas de regreso a una incubadora a 32° C

.. 00180

ajustada a 3% CO₂ y la incubación se continua durante toda la noche.

Al siguiente día, el medio de transfección se remueve y las células son lavadas dos veces con HBS. Después del lavado, se agregan 2 ml de DMEM+FBS fresco. PBS y el amortiguador de Hank's trabajan pobremente para la etapa de lavado, probablemente por que el fosfato en estos amortiguadores origina que se precipite más CaCl₂ por fuera del medio de transfección.

Un procedimiento de co-cultivo es luego opcionalmente desarrollado. Las células transferidas son cosechadas a 48-72 horas post transfección al pelarlas del medio y transferir las células más el medio a recipientes o a frascos T25 que contienen el 50% de monocapa confluyente de células Vero. Seis horas después de iniciar el co-cultivo, el medio es remplazado con 4 ml de MEM+FBS. Los cultivos son incubados durante cinco días. Si el medio inicia por aparecer exhausto durante este periodo de incubación, 2 ml de medios son removidos y reemplazados con MEM+FBS fresco. No se recomienda que todo el medio se remplazado, con el fin de conservar alguna pequeña parte del virus que esta siendo generado durante el rescate que puede estar en el medio. Durante esta fase de co-cultivo, el CPE puede ser evidente pero este usualmente no es el caso. Si ningún CPE es evidente, el rescate se puede continuar.

Las células son cosechadas cinco días después de iniciar el co-cultivo. Primero, 0.5 ml de 2.18M de Sucrosa, 37.6 mM de KH₂PO₄, 71.0 mM de K₂HPO₄, 49.0 mM de glutamato de sodio se

. 00181

agregan al medio y se mezclan al girar los frascos. Luego las células son peladas en el medio, pipeteadas hacia arriba y hacia abajo para mezclarlas, y luego puestas en alícuotas en tubos congelados para embarque y luego congelados rápidamente en un baño de hielo seco/etanol y almacenadas -80° C.

Purificación del vector VSV

Los vectores VSV rescatados fueron purificados con placa de los supernadantes de las células transfectadas. Después de tres rondas sucesivas de purificaciones de placa, el virus fue amplificado sobre las células BHK para producir un almacenamiento de semilla, el cual a su vez fue adicionalmente amplificado sobre las células BHK para producir un almacenamiento que trabaja con virus. Con el fin de preparar grandes cantidades de virus para experimentos animales, el almacenamiento de trabajo se utilizó para infectar 10-20 T-150 recipientes o frascos de células BHK confluyentes a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5-1.0 unidades formadoras de placa (pfu)/cell. Después de 48 horas a 32°C , los supernadantes de las células infectadas fueron clarificadas mediante centrifugación a 4,000 x g. los virus fueron entonces concentrados de los supernadantes mediante centrifugación en un rotor SW 28 a 25,000 rpm durante una hora, a través de un cojín de sucrosa al 10%. Los glóbulos del virus fueron resuspendidos en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y congeladas de golpe en un baño de etanol/hielo seco. El almacenamiento de virus concentrado fue entonces titulado sobre monocapas de células Vero para determinar el número de partículas infecciosas en la preparación.

Titulación de virus

El número de partículas de virus infecciosa en la preparación de virus se determino mediante un ensayo de placa estándar. El resumen, monocapas de célula Vero recientemente confluyentes durante toda la noche en placas de 6 pozos fueron infectadas con diluciones en serie de 10 veces de la preparación del virus. Para hacer esto, el medio de crecimiento se aspiró de las monocapas de la célula y alícuotas de 100 µl de cada una de las diluciones de virus de DMEM fueron transferidas en triplicado al centro de las monocapas de célula. Para evitar la desecación de la célula 400 µl de DMEM fueron entonces agregados a cada monocapa de célula y las placas fueron mantenidas a una temperatura ambiente durante 15 minutos seguido por 30 minutos de incubación a 37°C 5% de CO₂, con un girado ocasional el inóculo del virus fue entonces removido y cada monocapa de célula fue sobrepuesta con 3 ml de 0.8% de agarosa en DMEM. Las placas fueron entonces incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante 1-4 días para permitir la formación de placa. Los tarugos de agarosa fueron entonces removidos, y las células fueron teñidas con violeta cristal (2% violeta cristal en 50% de metanol) durante diez minutos a temperatura ambiente. El exceso de teñido fue entonces removido y las monocapas de células fueron enjuagadas completamente con agua. Las placas de virus fueron entonces visualizadas en la monocapa de célula como huecos pequeños que no se tiñen de azul.

Cuantificación del ARN viral mediante PCR en tiempo real

Un ensayo PCR en tiempo real cuantitativo (RT/PCR) se utilizó para la detección y cuantificación de los genomas VSV en el tejido de los animales. El ensayo utiliza una aproximación RT/PCR de 2 etapas que detecta específicamente el ARN genómico del virus en sentido negativo y utiliza un oligonucleótido sintético del amplicón completo para el desarrollo de una curva estándar. En resumen, los tejidos de cerebro de monos, hurones y ratones fueron homogenizados como 20 % P/V de suspensión en SPG. La suspensión fue centrifugada a 3,000 x g durante quince minutos hasta peletizar la materia particulada. El supernadante fue entonces adicionalmente centrifugado a 14,000 x g y el ARN total se extrajo del supernadante resultante. Este ARN se utilizó como molde para la transcripción inversa, con los iniciadores específicos de virus, y los productos fueron entonces utilizados para el ensayo PCR en tiempo real.

Determinación del 50% de la dosis letal (LD₅₀) de los vectores**VSV en ratones**

El modelo LD₅₀ de ratón se utilizó como una medida para la atenuación relativa de los vectores VSV. Varias diluciones "Several log-fold" de VSV tipo silvestre, 3'-NPMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5', y 3'-PMNG_(ct-1)L-5' fueron inyectadas intracranealmente en ratones Swiss Webster hembras de cuatro y medio semanas (6-10 ratones por grupo). A los ratones les siguió pérdida de peso, parálisis y muerte (LD₅₀) durante tres semanas. El LD₅₀ fue

00184

calculado de la mortalidad porcentual acumulada mediante el método de Reed y Muench.

Estudios de inmunogenicidad en ratón

Los ratones (n=15) fueron inmunizados intramuscularmente con 1×10^7 pfu de los vectores VSV indicados (serotipo indiana) establecido ejemplo 4. Los esplenocitos provenientes de un conjunto de ratones ("primeros" n=5) fueron aislados en el pico de la fase efectuada siete días luego del inicio. Dos conjuntos de ratones (n=10) fueron reforzados con 1×10^7 pfu del vector VSV indicado (NJ-G-versión de cambio). Los esplenocitos provenientes de un conjunto de ratones ("reforzado", n=5) fueron aislados en el pico de la fase efectuada cinco días post refuerzo. Los esplenocitos provenientes de otro conjunto de ratones (memoria, n=5) fueron aislados durante la fase de memoria 30 días después del refuerzo. Las frecuencias de las células CD8 T específicas para Gag fueron determinadas por el teñido de tetrámero. La secreción del IFN- γ específico para Gag se determinó mediante ELISPOT después de simulación durante toda la noche con un péptido inmunodominante gag.

EJEMPLO 2

CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES VSV

Diferencias sustanciales entre los tamaños de placa de los vectores VSV de las dos clases de mutación combinadas descritas en el ejemplo 1 (truncamiento ct mezclado N/proteína G) versus los vectores VSV de mutación de clase simple fue observada (tabla

5). Típicamente, los vectores VSV de mutación de clase simple formaron placas de tamaño contable en un ensayo de placa de 24 horas, mientras que algunos de los vectores de truncamiento ct mezclado N/proteína G requirieron tres a cuatro días para formar placas de tamaño equivalente. Las diferencias relativas del tamaño de la placa para los vectores VSV también paralelas con relación a las diferencias observadas durante los estudios de simétrica de crecimiento en el cultivo de célula (figura 1 a figura 3).

TABLA 5
TAMAÑO DE PLACA RELATIVO DE LOS VECTORES VSV

Vector VSV	Tamaño de placa a 48 horas Post infección
3'-NPMLG-5'	5 + ●
3'-PMNGL-5'	3 + ●
3'NPMG _(ct-1) L-5'	2 + ●
3'-PNMG _(ct-1) L-5'	1 + ●
3'-PMNG _(ct-1) L-5'	0.5 + ●

EJEMPLO 3
ESTUDIOS DE NEUROVIRULENCIA VSV

La atenuación sinérgica del VSV que comprende una combinación de dos o más clases de mutación, con relación a los vectores mutantes VSV de clase simple, fue evaluada en una serie de estudios de neurovirulencia en ratones, hurones y monos, cuyos

.. 00186

métodos son descritos en ejemplo 1. Los ratones son hartamente permisivos para la replicación VSV y esta propiedad les permite ser utilizados para discriminar diferentes niveles de crecimiento de virus y atenuación. Un gradiente distinto de patogenicidad/atenuación se observo en ratones para los diferentes vectores VSV (tabla 6 y tabla 7). Por ejemplo, el LD₅₀ en ratones inoculados intracranealmente con 3'-NPMGL-5', 3'-NPMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5' O 3'-PMNG_(ct-1)L-5 (Tabla 6), indico el siguiente gradiente de atenuación relativa: 3'-PMNG_(ct-1)L-5' (LD₅₀=2 x 10⁵)> 3'-PMNG_(ct-1)L-5' (LD₅₀=1 x 10⁴)> 3'-NPMG_(ct-1)L-5' (LD₅₀=14.5)> 3'-NPMGL-5' (LD₅₀=3.2) .

TABLA 6
NÚMERO DE RATONES MUERTOS O PARALIZADOS

Vector	Dosis IC (pfu)					
	1	10	100	1000	10000	100000
3'-NPMG _(ct-1) L-5' (LD ₅₀ =14.5pfu)	ND	3 Muerto	5 Muerto	6 Muertos	6 Muertos	ND
3'-PNMG _(ct-1) L-5' (LD ₅₀ =1x10 ⁴ pfu)	ND	2 Paralizado	3 Muerto 1 Paralizado	1 muerto 1 Paralizado	1 Muerto 1Paralizado	ND
3'-PMNG _(ct-1) L-5' (LD ₅₀ >2x10 ⁵ pfu)	ND	ND	1 Muerto 1 Paralizado	1 Paralizado	1paralizado	2 Muertos 4Paralizados
3'-NPMGL-5' (WT) (LD ₅₀ =3 2pfu)	1 Muerto	5 Muerto	6 muertos	6 Muertos	ND	ND

6 ratones fueron inoculados intracranealmente (IC) con cada uno de los vectores anteriores

El LD₅₀ en ratones inyectados intracranealmente con vectores VSV que tienen zero (VSV tipo silvestre) uno, dos, tres y cuatro (inserción de gen gag) clases de mutación, mostrados adelante en la tabla 7, también exhibieron un gradiente de atenuación similar. Adicionalmente, los ratones inyectados intracranealmente

con vectores VSV 3'-gag₁-PMNG_(CT1)L-5', 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5, 3'-gag₁-NPMGL_(ts)-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(CT9)L_(ts)5' y 3'-gag₁-NPMG_(stem)L-5', no exhibieron mortalidad.

TABLA 7

NEUROVIRULENCIA INTRACRANEAL DE LOS VECTORES VSV EN RATONES

Vector	LD50 (pfu)	No. de clases de mutación
3'-NPMGL-5' (VSV wt)	3.2	0
3'-NPMGL-5' (rVSV)	10	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	10	1
3'-PNMGL-5'	12	1
3'-PNMGL-5'	14	1
3'-NPMG _(ct-1) L-5'	14.5	1
3'-NPMG _(ct-1) -gag ₅ -L-5'	24	2
3'-gag ₁ -NPMGL-5'	115	1
3'-PNMGL _(ct-1) L-5'	1x10 ⁴	2
3'-PNMGL _(ct-1) L-5'	2x10 ⁵	2
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-9) L-5	1x10 ⁶	3
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-1) L-5'	1x10 ⁶	3
3'-NPM _(ncp) G-gag ₅ -L-5'	>1x10 ⁶	2
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL-5'	8x10 ⁶	2
3'-PMNG _(CT-1) gag ₅ -L-5'	1x10 ⁷	3
3'-NPM _(ncp) G _(ct-1) -gag ₅ -L-5'	>1x10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-1) L-5'	>1x10 ⁷	3
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	>1x10 ⁷	3
3'-gag ₁ -NPMGL _(ts) -5'	>1x10 ⁷	2
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct-1) L-5'	>1x10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(CT-9) L _(ts) 5'	>1x10 ⁷	4
3'-gag ₁ -(stem)L-5'	>1x10 ⁷	2

Los datos de histopatología de los monos Cinomolgus inoculados intratalámicamente con la misma serie de vectores indicaron un gradiente muy similar de atenuación. Ambos conjuntos de datos de animales fueron adicionalmente corroborados por los resultados de una serie de estudios de neurovirulencia donde los virus infecciosos y los niveles de ARN genómico presentes en los cerebros de Animales intracranealmente inoculados fueron medidos periódicamente mediante ensayo de placa y PCR en tiempo real,

00188

respectivamente. Colectivamente estos datos demuestran que la combinación de dos o más clases de mutación posee un nivel de atenuación que es sustancialmente mayor que los vectores VSV con clase de mutación simple. Los títulos LD₅₀ de ratón indican fuertemente que hay un efecto sinérgico poderoso en la atenuación al combinar dos diferentes clases de mutación en el mismo vector VSV.

EJEMPLO 4

INMUNOGENICIDAD MEJORADA DE VECTORES VSV ATENUADOS.

La inmunogenicidad de los vectores VSV atenuados 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5', y 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' se comparó con los vectores prototipo VSV y 3'-npgm-gag₅-L-5' y 3'-NPMGL-5'. Los ratones fueron inmunizados con uno de los vectores VSV anteriores, como se describió en el ejemplo 1. Los vectores VSV atenuados indujeron repuestas inmunes que fueron más fuertes que aquellas inducidas por el vector VSV-Gag₅ prototipo (3'-NPMG-gag₅-L-5'). El más notable fue la secuencia que indujo frecuencias de célula T específicas Gag superiores estadísticamente significativas que fueron inducidas por el prototipo cuando se evaluó después de la iniciación y el refuerzo, así como también durante la fase de memoria de la respuesta

TABLA 8

FRECUENCIAS DE CÉLULAS CD8 ESPECÍFICAS GAG

	Porcentaje del tetramero Gag Células T de CD8 positivas		
Vector	Iniciador	Refuerzo	Memoria
3'-NPMGL-5'	0.24	0.15	0.21
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	1.46	2.29	0.92
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) L-5'	0.96	3.42	2.25
3'-gag ₁ -PMNG _(ct9) L-5'	2.29*	8.68*	3.13*
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	0.66	3.59	0.21

*= respuesta significativamente superior que la vista para

3'-NPMG-gag₅-L-5' (prueba t studen't p<0.05).

El 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5' también indujo secreción IFN-γ que tuvo una tendencia superior que la inducida por el prototipo 3'-NPMG-gag₅-L-5' (tabla 9). Las respuestas al 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5' y 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' también tuvo una tendencia superior que aquellas inducidas por el prototipo 3'-NPMG-gag₅-L-5' (tabla 9)

TABLA 9

ELISPOT IFN-γ GAG

	Spots IFN-γ por 1x10 ⁶ de Células de vaso		
Vector	Iniciador	Refuerzo	Memoria
3'-NPMGL-5'	0	1	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	680	887	196
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) L-5'	372	984	668*
3'-gag ₁ -PMNG _(ct9) L-5'	908	1,552	496
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	129	632	413

*= Respuesta significativamente superior que la vista para 3'-

NPMG-gag₅-L-5' (prueba t studen't p<0.05).

EJEMPLO 5

INMUNOGENICIDAD DEL SUMINISTRO INTRAMUSCULAR E INTRANASAL DE
VECTORES VSV ATENUADOS QUE EXPRESAN HIV GAG EN RHESUS MACAQUES

Los siguientes estudios fueron diseñados para medir las respuestas inmunes solicitadas en Rhesus macaques, luego de la inmunización con vectores VSV atenuados que expresan la proteína HIV gag.

El estudio establecido en la tabla 10 se desarrollo con un total de 24 Rhesus macaques machos genéticamente no seleccionados, en donde cada grupo de animales (es decir los grupos 1-6) se inmunizan intramuscular o intranasal mente con uno de los siguientes vectores VSV a una dosis de 1×10^7 (pfu): 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' (TsN+L), 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5' (N4CT9) o 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

El estudio establecido en la tabla 11 se desarrollo con un total de 24 Rhesus macaques macho genéticamente no seleccionados, en donde cada grupo de animales (es decir los grupos 1-8) se inmunizaron intramuscular o intranasal mente con uno de los siguientes vectores VSV a una dosis de 1×10^7 (pfu): 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5' (MncpCT1), 3'-gag₁-NPMg_(stem)L-5' (G stem), 3'-gag₁-PMNG_(ct1)L-5' (N4CT1) O 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

De manera general, los siguientes ensayos se utilizaron para examinar las respuestas inmunes sistémica y humoral y la mezcla VSV de cada animal:

Respuestas Inmunes Celulares: la respuesta IFN- γ ELISPOT específica del péptido HIV gag y la respuesta IFN- γ ELISPOT específica del péptido VSV N. Respuesta Inmune Humoral: títulos

n^o 191

de anticuerpo gag anti-HIV de suero por ELISA, títulos de anticuerpo anti-VSV de suero por ELISA y títulos de anticuerpo de neutralización anti-VSV de suero.

TABLA 10
ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD EN PRIMATES

Grupo	# Animales	Inicial (serotipo Indiana)	Refuerzo (serotipo New Jersey)	Dosis	Ruta
1	5	TsN+L	TsN+L	1x10 ⁷	IM
2	5	TsN+L	TsN+L	1x10 ⁷	IN
3	5	N4CT9	N4CT9	1x10 ⁷	IN
4	5	N4CT9	N4CT9	1x10 ⁷	IN
5	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IN
6	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IN

Ruta IM es intramuscular

Ruta IN es intranasal

TABLA 11
ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD EN PRIMATES

Grupo	# Animales	Inicial (serotipo Indiana)	Refuerzo (serotipo New Jersey)	Dosis	Ruta
1	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1x10 ⁷	IM
2	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1x10 ⁷	IN
3	5	G Stem	G Stem	1x10 ⁷	IN
4	5	G Stem	G Stem	1x10 ⁷	IN
5	5	N4CT1	N4CT1	1x10 ⁷	IN
6	5	N4CT1	N4CT1	1x10 ⁷	IN
7	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IM
8	2	Gag 5	Gag 5	1x10 ⁷	IN

Ruta IM es intramuscular

Ruta IN es intranasal

REFERENCIAS

Patente U.S. 5,258,454

Patente U.S. 5,556,747

Patente U.S. 5,789.166

Patente U.S. 6,391,548

Patente U.S. 5,817,879

Patente U.S. 6,168,943

Patente U.S. 6,596,529

Patente U.S. 6,033,886

Patente U.S. 6,673.572

Patente Provisional U.S. 60/477,389

Ahmed and Lyles, "Identification of a Consensus Mutation in M Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Persistently Infected Cells that Affects Inhibition of Host-directed Gene Expression" *Virology*, 237(1): 378-88, 1997.

Atkinson et al., *United States. Annu. Rev. Med.*, 43:451-463, 1992.

Ball et al., "Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus" *Journal of virology*, 73(6):4705-4712, 1999. Bellini et al., *Emerging Infectious Diseases*, 4:29-35, 1998.

Canto et al., "Status Spongiosus Resulting from Intracerebral Infection of Mice with Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Br. J. exp.*

00193

Path., 57:321-330, 1976.

Collins et al., *Adv. Virus. Res.*, 54:423-451, 1999.

Collins et al., *Respiratory Syncytial Virus*. In "Field's Virology", 3rd Edition, Lippincott-Raven, 1443-1475, 2001.

Cutts et al., *J. Infectious Dis.*, 170:S32-S41, 1994.

Evans et al., "Temperature-sensitive mutants of complementation group E of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype possess altered NS polypeptides", *Journal of Virology*, 31 (2):325-333, 1979.

Finke and Conzelmann, "Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions", *J. Virol.*, 71:7281-7288, 1997.

Finke and Conzelmann, "Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus", *J. Virol.*, 73: 3818-3825, 1999.

Flamand and Bishop, "Primary In Vivo Transcription of Vesicular Stomatitis Virus and Temperature-Sensitive Mutants of Five Vesicular Stomatitis Virus Complementation Groups", *J. of Virology*, 12(6):1238-1252, 1973.

Flamand and Pringle, "The homologies of spontaneous and temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus isolated in chick embryos and BHK-21 cells", *J. Gen. Virol.*, 11:81-85, 1971.

. 00194

Flanagan et al., "Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development", *J. Virology*, 75:6107-6114, 2001.

Fredericksen and Whitt, "Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness", *Virology*, 240: 349-58, 1997.

Gallione et al., "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus N and NS Proteins", *J. Virol.*, 39:529-535, 1981. Gopalakrishna and Lenard, "Sequence alterations in temperature-sensitive M-protein mutants (complementation group III) of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 56(3):655-659, 1985.

Griffin, Measles Virus. In "Field's Virology", 3rd Edition, Lippincott-Raven, 1401- 1442, 2001.

Harty et al., "A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding", *J. Virology*, 73(4):2921-2929, 1999.

Holloway et al., "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus", *Virology*, 42(4):917-26, 1970.

Irrie et al., "Functional Analysis of Late-Budding Domain Activity Associated with the PSAP Motif within the Vesicular

Stomatitis Virus M Protein", *J. Virology*, 78(14):7823-7827, 2004.

Jayakar and Whitt, "Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus Cytopathology", *Journal of Virology*, 76(16):8011-8018, 2002.

Jayakar et al., "Mutations in The PPPY Motif of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Reduce Virus Budding by Inhibiting a Late Step in Virion Release", *Journal of Virology*, 74(21):9818-27, 2000.

Jeetendra et al., "The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion", *Journal of Virology*, 76(23):12300-11, 2002.

Jeetendra et al., "The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity", *Journal of Virology*, 77(23):12807-18, 2003.

Kapikian et al., *Am. J. Epidemiol.* 4:405-21, 1969.

Kim et al., *Am. J. Epidemiol.* 4:422-34, 1969.

Li et al., "Site-specific mutations in vectors that express antigenic and temperature-sensitive phenotypes of the M gene of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 62(10):3729-3737, 1988.

00196

Lundh et al., "Non-Lethal Infection of Aminergic Reticular Core Nuerons: Age- Dependent Spread of ts Mutant Vesicular Stomatitis Virus from the Nose", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 47(5):497-506, 1988.

Morita et al., "Phenotypic revertants of temperature-sensitive M protein mutants of vesicular stomatitis virus: sequence analysis and functional characterization", *Journal of Virology*, 61(2):256-263, 1987.

Pringle et al., "Enhanced mutability associated with a temperature-sensitive mutant of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 39(2):377-389, 1981.

Pringle et al., "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype", *Journal of Virology*, 8(6):836-841, 1971.

Pringle, "Genetic Characteristics of Conditional Lethal Mutants of Vesicular Stomatitis Virus Induced by 5-Fluorouracil, 5-Azacytidine, and Ethyl Methane Sulfonate", *Journal of Virology*, 5(5):559-567, 1970.

Printz and Wagner, "Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus: Synthesis of Virus Specific Proteins", *J. of Virology*, 7(5):651-662, 1971.

Rabinowitz et al., "Comparison of Central Nervous System Disease Produced by Wild-Type and Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Infection and Immunity*, 13(4):1242-1249, 1976.

00197

Rabinowitz et al., "The Uncoupled Relationship Between the Temperature-Sensitivity and Neurovirulence in Mice of Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *J. gen. Virol*, 35:237-249, 1977.

Roberts et al., "Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge", *Journal of Virology*, 73:3723-3732, 1999.

Robinson and Whitt, "The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly", *Journal of Virology*, 74(5):2239-2246, 2000.

Rose and Gallione, "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus G and M Proteins Determined from cDNA Clones Containing the Complete Coding Regions", *J. Virol*, 39:519+-528, 1981.

Rose et al., "An Effective Aids Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants", *Cell*, 106(5):539-49, 2001.

Rose et al., "Glycoprotein Exchange Vectors Based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1", *Journal of Virology*, 74(23):10903-10, 2000.

Schlehuber and Rose, "Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Recombinants Expressing the HIV-1 2F5 Epitope Within the VSV

. 00198

G Protein", Abstract Number 321, AIDS Vaccine 2003, New York, September, 2003.

Schlereth et al., "Successful Mucosal Immunization of Cotton Rats in the Presence of Measles-Specific Antibodies Depends on Degree of Attenuation of Vaccine Vector and Virus Dose", *Journal of General Virology*, 84:2145-2151, 2003.

Schlereth et al., "Successful vaccine-induced seroconversion by single-dose immunization in the presence of measles virus-specific maternal antibodies", *J. Virology*, 74:4652-4657, 2000.

Schnell et al., "Requirement for a Non-Specific Glycoprotein Cytoplasmic Domain Sequence to Drive Efficient Budding of Vesicular Stomatitis Virus", *The EMBO Journal*, 17(5):1289-1296, 1998.

Schnell et al., "Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles", *Proc. Natl. Acad. Sci, U SA*, 93:11359-11365, 1996.

Wagner, "Pathogenicity and Immunogenicity for Mice of Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Infection and Immunity*, 10(2):309- 315, 1974.

Wertz et al, "Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus" *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:3501-3506, 1998.

REIVINDICACIONES

1. Un virus de estomatitis vesicular genéticamente modificado (VSV) que comprende al menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación sensible a temperatura (ts), una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación madre G, una mutación de gen M no citopática, una mutación ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación por supresión de gen, en donde las dos mutaciones sinérgicamente atenúan la patogenicidad VSV.
2. El VSV de la reivindicación 1, en donde la patogenicidad se define adicionalmente como neurovirulencia.
3. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son mutaciones de gen G truncado y una mutación de mezcla de gen N.
4. El VSV de la reivindicación 3, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veinte aminoácidos carboxi-terminales.
5. El VSV de la reivindicación 3, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veintiocho aminoácidos carboxi-terminales.

(

00200

6. El VSV de la reivindicación 3, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de un amino ácido.
7. El VSV de la reivindicación 3, en donde la proteína G codificada por el G gen truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de nueve amino ácidos.
8. El VSV de la reivindicación 3, en donde el gen N es mezclado con 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', con relación al genoma VSV tipo silvestre 3'-NPMGL-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfo proteína, M es el gen que codifica la proteína de matriz, G es el gen que codifica la glicoproteína de unión y L es el gen que codifica la proteína de polimerasa ARN dependiente de ARN.
9. El VSV de la reivindicación 3, que comprende un genoma mutado seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5' y 3'-PMNG_(ct-1)L-3' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de matriz, G_(ct-1) es el G que codifica la glicoproteína de unión que tiene una supresión de los últimos 88 amino ácidos carboxi-terminales, G_(ct-9) es el gen que codifica la glicoproteína de unión que tiene una supresión de los últimos veinte amino ácidos carboxiterminmales y L es el gen que

codifica la proteína de polimerasa ARN dependiente de ARN.

10. El VSV de la reivindicación 9, en donde el genoma mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'.
11. El VSV de la reivindicación 9, en donde el genoma mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'.
12. El VSV de la reivindicación 9, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación ARN ambisentido, una mutación de de gen M no citopática, una mutación de supresión de gen, una mutación de inserción de gen, o una mutación de punto.
13. El VSV de la reivindicación 1, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatrero semanas tiene un LD₅₀ 100 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
14. El VSV de la reivindicación 1, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatrero semanas tiene un LD₅₀ 1000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.

15. El VSV de la reivindicación 1, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 10,000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
16. El VSV de la reivindicación 1, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 100, 000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
17. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son una mutación de gen G truncado y una mutación de gen G ni citopático.
18. El VSV de la reivindicación 17, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veinte Amino ácidos carboxi-terminales.
19. El VSV de la reivindicación 17, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veintiocho amino ácidos carboxi terminales.
20. El VSV de la reivindicación 17, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmática que consiste de un amono ácido.

21. El VSV de la reivindicación 17, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de nueve amino ácidos.
22. El VSV de la reivindicación 17, en donde la mutación no citopática ($M_{(ncp)}$) del gen M es una mutación en la metionina 33 y la metionina 51 fr gen M.
23. El VSV de la reivindicación 17, que comprende un genoma mutado de $3'-NPM_{(cnp)}G_{(ct-1)}L-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$.
24. El VSV de la reivindicación 17, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación ARN ambisentido, una mutación de mezcla de gen, una mutación de supresión de gen, una mutación de inserción de gen, una mutación de inserción de gen G, una mutación de madre G, o una mutación de punto.
25. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son la mutación del gen $N_{(ts)}$ y una mutación de gen L ts ($L_{(ts)}$).
26. El VSV de la reivindicación 25, que comprende un genoma mutado de $3'-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-5'$.
27. El VSV de la reivindicación 25, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde las mutaciones son mutación de punto, una mutación de mezcla

nn2n4

de gen, una mutación de madre gen, una mutación de gen M no citopática, una mutación ARN ambisentido, una mutación gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de supresión de gen.

28. El VSV de la reivindicación 1, en donde una clase de mutación es una mutación madre G.
29. Un vector VSV prácticamente modificado que comprende la menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación de gen M no citopática, una mutación ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación por inserción de gen G y una mutación por supresión de gen, y al menos una secuencia ARN insertada o que reemplaza una región de genoma VSV no esencial para la replicación en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV.
30. El vector de la reivindicación 29, en donde la patogenicidad es además definida como neurovirulencia.
31. El vector de la reivindicación 29, en donde el ARN extraño está además definido como una estructura de lectura abierta (ORF).

32. El vector de la reivindicación 29, en donde las dos mutaciones son una mutación de gen G truncada y una mutación de mezcla de gen G.
33. El vector de la reivindicación 32, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veinte amino ácidos carboxi-terminales.
34. El vector de la reivindicación 32, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veintiocho amino ácidos carboxi-terminales.
35. El vector de la reivindicación 32, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmática que consiste de un amino ácido.
36. El vector de la reivindicación 32, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de nueve amino ácidos.
37. El vector de la reivindicación 32, en donde el gen N es mezclado al 3'PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', con relación al genoma VSV tipo silvestre 3'-NPMGL-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína,, M es el gen que codifica la proteína de matriz, G es el gen que codifica la glicoproteína de unión y L es el gen que codifica la proteína de ARN polimerasa dependiente de ARN.

. 00205

38. El vector de la reivindicación 32, que comprende un genoma mutado, seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'PMNG_(ct-9)L-5' y 3'PMNG_(ct-1)L-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de matriz, G_(ct-1) es el gen que codifica la glicoproteína de unión que tiene una supresión de los últimos veintiocho amino ácidos carboxi-terminales, G_(ct-9) es el gen que codifica la lipoproteína de unión que tiene una supresión de los últimos veinte amino ácidos carboxiterminales y L es el gen que codifica la proteína de ARN polimerasa dependiente de ARN.
39. El vector de la reivindicación 38, en donde el genoma mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'.
40. El vector de la reivindicación 38, en donde el genoma mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'.
41. El vector de la reivindicación 38, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación ARN ambisentido, una mutación de supresión de gen, una mutación por inserción de gen, o una mutación de gen M no citopático.
42. El vector de la reivindicación 32, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 100 veces mayor

que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.

43. El vector de la reivindicación 32, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 1,000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
44. El vector de la reivindicación 32, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 10,000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
45. El vector de la reivindicación 32, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ 100, 000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas.
46. El vector de la reivindicación 32, en donde el ARN extraño se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen de virus Epstein-Barr, un gen de virus de varicelà-Zoster, un gen de virus de paperas, un gen de virus de sarampión, un gen de virus de influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un

00208

gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen de togavirus, un gen de alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen de virus de rabia, un gen de virus Marburg, un gen de virus Ebola, un gen de virus de papiloma, un gen de virus de polioma, un gen de metaneumovirus, un gen de coronavirus, un gen de *Vibrio colera*, un gen de *Streptococcus neumoniae*, un gen de *Streptococcus piogenes*, un gen de *Helicobacter pilori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhea*, un gen de *Corynebacteria difteria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citoquina, un gen que codifica un epitopo T-helper, un gen que codifica un epitopo CT, un gen que codifica un adyuvante, un gen que codifica un co-factor.

47. El vector de la reivindicación 46, en donde el gen HIV se selecciona del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev*, o *vpu*.
48. El vector de la reivindicación 47, en donde el gen HIV es *gag*.
49. El vector de la reivindicación 48, en donde el gen de mutado es 3'-*gag*₁-*PNMG*_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-*PNMG*_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-*PMNG*_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-*PMNG*_(ct-9)L-5', 3'-*PNMG*_(ct-1)L-*gag*₅-5', 3'-*PNMG*_(ct-9)L-*gag*₅-5' o 3'-*PMNG*_(ct-9)L-*gag*₅-5'.

00209

50. El vector de la reivindicación 29, en donde las dos mutaciones son mutación de gen G truncado y una mutación de gen M no citopática.
51. El vector de la reivindicación 50, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veintiocho amino ácidos carboxi-terminales.
52. El vector de la reivindicación 50, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de un amino ácido.
53. El vector de la reivindicación 50, en donde la mutación no citopática ($M_{(ncp)}$) del gen M es una mutación en la metionina 33 y metionina 51 del gen M.
54. El VSV de la reivindicación 50, que comprende un genoma mutado de $3' - NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L - 5'$ o $3' - NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L - 5'$.
55. El vector de la reivindicación 50, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punta, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre gen, una mutación de ARN ambisentido, una mutación por inserción de gen G, y una mutación por supresión de genes.
56. El vector de la reivindicación 50, en donde el ARN extraño se selecciona del grupo que consiste de un gen

HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen de virus Epstein-Barr, un gen de virus de varicela-Zoster, un gen de virus de paperas, un gen de virus de sarampión, un gen de virus de influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen de togavirus, un gen de alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen de virus de rabia, un gen de virus Marburg, un gen de virus Ebola, un gen de virus de papiloma, un gen de virus de polioma, un gen de metaneumovirus, un gen de coronavirus, un gen de *Vibrio colera*, un gen de *Streptococcus neumoniae*, un gen de *Streptococcus piogenes*, un gen de *Helicobacter pilori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhea*, un gen de *Corynebacteria difteria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citoquina, un gen que codifica un epitopo T-helper, un gen que codifica un epitopo CT, un gen que codifica un adyuvante, un gen que codifica un co-factor.

57. El vector de la reivindicación 56, en donde el gen HIV se selecciona del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev*, o *vpu*.
58. El vector de la reivindicación 57, en donde el gen HIV es *gag*.

59. El vector de la reivindicación 58, en donde el gen de mutado es 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5, '3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-gag₅-5', o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-gag₅-5'.
60. El vector de la reivindicación 29 en donde las dos mutaciones son mutación del gen N (N_(ts)) y en la mutación de L ts (L_(ts)).
61. El vector de la reivindicación 60, que comprende el genoma mutado de 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.
62. el vector de la reivindicación 60, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de madre G, una mutación de gen M no citopático, una mutación ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación de inserción gen G, y una mutación por supresión de gen.
63. El vector de la reivindicación 60, en donde el ARN extraño se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen de virus Epstein-Barr, un gen de virus de varicela-Zoster, un gen de virus de paperas, un gen de virus de sarampión, un gen de virus de influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus

Norwalk, un gen de togavirus, un gen de alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen de virus de rabia, un gen de virus Marburg, un gen de virus Ebola, un gen de virus de papiloma, un gen de virus de polioma, un gen de metaneumovirus, un gen de coronavirus, un gen de *Vibrio colera*, un gen de *Streptococcus neumoniae*, un gen de *Streptococcus piogenes*, un gen de *Helicobacter pilori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhea*, un gen de *Corynebacteria difteria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citoquina, un gen que codifica un epitopo T-helper, un gen que codifica un epitopo CT, un gen que codifica un adyuvante, un gen que codifica un co-factor.

64. El vector de la reivindicación 63, en donde el gen HIV se selecciona del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev*, o *vpu*.
65. El vector de la reivindicación 64, en donde el gen HIV es *gag*.
66. El vector de la reivindicación 65, en donde el genoma mutado es de mutado es 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5', o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.

. 00213

67. El vector de la reivindicación 29, en donde las dos mutaciones son mutaciones madre G G_(stem) y una mutación de mezcla de gen.
68. El vector de la reivindicación 67, en donde el genoma mutado es 3-gag1-NPMG_(stem)L-5'.
69. El vector de la reivindicación 68, que comprende además una tercer clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de mezcla de gen, una mutación de gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación por inserción de gen G, y una mutación por supresión de gen.
70. El vector de la reivindicación 67, en donde el ARN extraño se selecciona del grupo que consiste de un gen HIV, un gen HTLV, un gen SIV, un gen RSV, un gen PIV, un gen HSV, un gen CMV, un gen de virus Epstein-Barr, un gen de virus de varicela-Zoster, un gen de virus de paperas, un gen de virus de sarampión, un gen de virus de influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen de virus de hepatitis A, un gen de virus de hepatitis B, un gen de virus de hepatitis C, un gen de virus Norwalk, un gen de togavirus, un gen de alfavirus, un gen de virus de rubéola, un gen de virus de rabia, un gen de virus Marburg, un gen de virus Ebola, un gen de virus de papiloma, un gen de virus de polioma, un gen de metaneumovirus, un gen de coronavirus, un gen de *Vibrio*

00214

colera, un gen de *Streptococcus neumoniae*, un gen de *Streptococcus piogenes*, un gen de *Helicobacter pilori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhea*, un gen de *Corynebacteria difteria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citoquina, un gen que codifica un epitopo T-helper, un gen que codifica un epitopo CT, un gen que codifica un adyuvante, un gen que codifica un co-factor.

71. Una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector VSV genéticamente modificado que comprende al menos dos diferentes clases de mutaciones en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación por mezcla de gen, una mutación madre G, una mutación de gen G no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de gen G truncado, una mutación por inserción de gen G, y una mutación por supresión de gen y al menos una secuencia de ARN está insertada o reemplazando una región de genoma VSV no esencial para la replicación, en donde las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad VSV.
72. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde la patogenicidad se define adicionalmente como neurovirulencia.

73. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde el ARN extraño se define adicionalmente como una estructura de lectura abierta (ORF).
74. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde las dos mutaciones son una mutación de gen G truncado y una mutación de mezcla de gen G.
75. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos veinte amino ácidos carboxi-terminales.
76. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una supresión de los últimos 28 amino ácidos carboxi-terminales.
77. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de un amino ácido.
78. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, en donde la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmático que consiste de 9 amino ácidos.

79. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, en donde el gen N está mezclado al 3'-PNMGL-5' O 3'-PMNGL-5', con relación al genoma VSV tipo silvestre 3'-NPMGL-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la matriz. Proteína, G es el gen que codifica la sujeción de la glicoproteína y L es el gen que codifica la proteína de ARN polimerasa dependiente de ARN.
80. La composición inmunogénica de la reivindicación 74, que comprende un genoma mutado seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', en donde es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína matriz, G_(ct-1) es el gen que codifica la sujeción de la glicoproteína que tiene una eliminación en los ultimo 28 aminoácidos el terminal carboxi, G_(ct-9) es el gen que codifica la sujeción de la glicoproteína que tiene una eliminación en los últimos 20 aminoácidos del terminal carboxi y L es el gen que codifica la proteína de ARN polimerasa dependiente de ARN.
81. La composición inmunogénica de la reivindicación 80, en donde el genoma mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'.
82. La composición inmunogénica, en donde el genoma mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'.

83. La composición inmunogénica de la reivindicación 80, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de eliminación de gen, una mutación de inserción de gen o una mutación de del gen M no citopático.
84. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde el ARN extraño es seleccionado del grupo que consiste de un gen de HIV, un gen de HTLV, un gen de SIV, un gen de RSV, un gen de PIV, un gen de HSV, un gen de CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus de polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen del *Vibrio cholerae*, un gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen del *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen del *Neisseria gonorrhoeae*, un gen del *Corynebacteria diphtheriae*, un gen del *Clostridium tetani*, un gen del *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de

Escherichia coli, un gen que codifica una citosina, un gen que codifica un epítipo T-ayudador, un gen que codifica un epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.

85. La composición inmunogénica de la reivindicación 84, en donde el gen de HIV es seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.
86. La composición inmunogénica de la reivindicación 85, en donde el gen de HIV es *gag*.
87. La composición inmunogénica de la reivindicación 86, en donde el genoma mutado es 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'- *gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3' *gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'- *gag*₁-PMNG_(ct-9)L-5' 3'-PNMG_(ct-1)L- *gag*₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-*gag*₅-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-*gag*₅-5'.
88. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde la composición es administrada por una vía seleccionada del grupo que consiste de intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal y ex vivo.
89. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncado y una mutación del gen M no citopático.

90. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, en donde la proteína G codificado por el gen G truncado tiene una eliminación de los últimos 28 aminoácidos del terminal carboxi.
91. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, en donde la proteína G codificado por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de un aminoácido.
92. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, en donde el gen M no citopático ($M_{(ncp)}$) es una mutación en la metionina 33 y metionina 51 del gen M.
93. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, que comprende un genoma mutado de $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$.
94. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de mezcla de gen, una mutación de vástago G, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.
95. La composición inmunogénica de la reivindicación 89, en donde el ARN extraño es seleccionado del grupo que consiste de un gen de HIV, un gen de HTLV, un gen de SIV, un gen de

RSV, un gen de PIV, un gen de HSV, un gen de CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rhinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus de polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen del *Vibrio cholerae*, un gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen del *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen del *Neisseria gonorrhoeae*, un gen del *Corynebacteria diphtheriae*, un gen del *Clostridium tetani*, un gen del *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citosina, un gen que codifica un epítipo T-ayudador, un gen que codifica un epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.

96. La composición inmunogénica de la reivindicación 95, en donde el gen de HIV es seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.

97. La composición inmunogénica de la reivindicación 96, en donde el gen de HIV es *gag*.

98. La composición inmunogénica de la reivindicación 97, en donde el genoma mutado es 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-gag₅-5' o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-gag₅-5'.
99. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde dos de las mutaciones son una mutación del gen ts N (N_(ts)) y una mutación del gen ts L (L_(ts)).
100. La composición inmunogénica de la reivindicación 99, que comprende un genoma mutado de 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.
101. La composición inmunogénica de la reivindicación 99, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación del gen de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.
102. La composición inmunogénica de la reivindicación 99, en donde el ARN extraño es seleccionado del grupo que consiste de un gen de HIV, un gen de HTLV, un gen de SIV, un gen de RSV, un gen de PIV, un gen de HSV, un gen de CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un

gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus de polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen del *Vibrio cholerae*, un gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen del *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen del *Neisseria gonorrhoeae*, un gen del *Corynebacteria diphtheriae*, un gen del *Clostridium tetani*, un gen del *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citosina, un gen que codifica un epítipo T-ayudador, un gen que codifica un epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.

103. La composición inmunogénica de la reivindicación 102, en donde el gen de HIV es seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.

104. La composición inmunogénica de la reivindicación 103, en donde el gen de HIV es *gag*.

105. La composición inmunogénica de la reivindicación 104, en donde el genoma mutado es 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.

106. La composición inmunogénica de la reivindicación 71, en donde dos de las mutaciones la mutación $G_{(vástago)}$ y una mutación de cambio de gen.
107. La composición inmunogénica de la reivindicación 106, en donde el genoma mutado es 3'-gag₁-NPMG_(vástago)L-5'.
108. La composición inmunogénica de la reivindicación 106, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de ts, una mutación de cambio de gen, una mutación M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.
109. El vector de la reivindicación 108, en donde el ARN extraño es seleccionado del grupo que consiste de un gen de HIV, un gen de HTLV, un gen de SIV, un gen de RSV, un gen de PIV, un gen de HSV, un gen de CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus de polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen del

Vibrio cholerae, un gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen del *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen del *Neisseria gonorrhoeae*, un gen del *Corynebacteria diphtheriae*, un gen del *Clostridium tetani*, un gen del *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citosina, un gen que codifica un epítipo T-ayudador, un gen que codifica un epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.

110. Un método para inmunizar un anfitrión mamífero contra una infección bacteriana que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector de VSV genéticamente modificado que comprende:

- (b) Por lo menos dos clases diferentes en su genoma, las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV; y
- (c) Por lo menos una secuencia de ARN extraño insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para

la aplicación, en donde el ARN codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste de una proteína *Vibrio cholerae*, una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, una proteína de *Streptococcus pyogenes*, una proteína del *Streptococcus agalactiae*, una proteína de *Helicobacter pylori*, una proteína de *Neisseria meningitidis*, una proteína de *Neisseria gonorrhoeae*, una proteína de *Corynebacteria diphtheriae*, una proteína de *Clostridium tetani*, una proteína de *Bordetella pertussis*, una proteína de *Haemophilus*, una proteína de *Chlamydia*, y una proteína de *Escherichia coli*.

111. El método de la reivindicación 110, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncada y una mutación del cambio de gen N.

112. El método de la reivindicación 111, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veinte aminoácidos del terminal carboxi.

113. El método de la reivindicación 111, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veintiocho aminoácidos del terminal carboxi.

114. El método de la reivindicación 111, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de un aminoácido.

115. El método de la reivindicación 111, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de nueve aminoácido.
116. El método de la reivindicación 111, en donde el gen N es cambiado a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', con relación al tipo silvestre del genoma VSV de 3'-NPMGL-5'.
117. El método de la reivindicación 111, que comprende un genoma mutado seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5'.
118. El método de la reivindicación 103, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de eliminación de gen, una mutación de inserción de gen G o una mutación del gen M no citopático.
119. Un método para inmunizar un anfitrión mamífero contra una infección viral que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector de VSV genéticamente modificado que comprende:
- (a) Por lo menos dos clases diferentes de mutación en su genoma, las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del

ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV; y

- (b) Por lo menos una secuencia de ARN extraño insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para la aplicación, en donde el ARN codifica una proteína viral seleccionada del grupo que consiste de una proteína de HIV, una proteína de HTLV , una proteína de SIV , una proteína de RSV, una proteína de PIV, una proteína de HSV, una proteína de CMV, una proteína del virus Epstein-Barr, una proteína del virus Varicella-Zoster, una proteína del virus de las paperas, una proteína del virus de sarampión, una proteína del virus de la influenza, una proteína de poliovirus, una proteína de rinovirus, una proteína del virus de la hepatitis A, una proteína del virus de la hepatitis B, una proteína del virus de la hepatitis C, una proteína del virus Norwalk, una proteína del togavirus, una proteína del alfavirus, una proteína del virus de la rubéola, una proteína del virus de la rabia, una proteína del virus Marburg, una proteína del virus Ebola, una proteína del virus papiloma, una proteína del virus de polioma, una proteína del metapneumovirus, y una proteína de coronavirus.

n0228

120. El método de la reivindicación 119 en donde el ARN en un gen de HIV seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.
121. El método de la reivindicación 120, en donde el gen de HIV es *gag*.
122. El método de la de reivindicación 119, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncado y una mutación del cambio de gen N.
123. El método de la reivindicación 122, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veinte aminoácidos del terminal carboxi.
124. El método de la reivindicación 122, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veintiocho aminoácidos del terminal carboxi.
125. El método de la reivindicación 122, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de un aminoácido.
126. El método de la reivindicación 122, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de nueve aminoácido.

~~00'20~~

127. El método de la reivindicación 122, en donde el gen N es cambiado a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', en relación al tipo silvestre del genoma VSV de 3'-NPMGL-5'.
128. El método de la reivindicación 122, que comprende un genoma mutado seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5'.
129. El método de la reivindicación 122, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de eliminación de gen, una mutación de inserción de gen G o una mutación del gen M no citopático.
130. El método de la reivindicación 122, en donde el genoma mutado es 3'-gag₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-gag₅-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-gag₅-5'.
131. El método de la reivindicación 119, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncado y una mutación del cambio de gen N.
132. El método de la reivindicación 131, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veintiocho aminoácidos del terminal carboxi.

133. El método de la reivindicación 131, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de un aminoácido.
134. El método de la reivindicación 131, en donde la mutación ($M_{(ncp)}$) del gen M no citopático es una mutación en la metionina 33 y la metionina 51 del gen M.
135. El método de la reivindicación 131, que comprende un genoma mutado de $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$.
136. El método de la reivindicación 123, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación de ARN ambisentido, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.
137. El método de la reivindicación 123, en donde el genoma mutado es $3'-gag_1-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-5'$, $3'-gag_1-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-5'$, $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-1)}L-gag_5-5'$ o $3'-NPM_{(ncp)}G_{(ct-9)}L-gag_5-5'$.
138. El método de la reivindicación 119, en donde las dos mutaciones son una mutación ($N_{(ts)}$) del gen ts N y una mutación ($L_{(ts)}$) del gen ts L.
139. El método de la reivindicación 138, que comprende un genoma mutado de $3'-N_{(ts)}PMGL_{(ts)}-5'$.

140. El método de la reivindicación 138, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen.
141. El método de la reivindicación 139, en donde el genoma mutado es 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-gag₅-5'.
142. El método de la reivindicación 119, en donde las dos mutaciones son la mutación de G_(vástago) y una mutación de cambio de gen
143. El método de la reivindicación 142, en donde el genoma mutado es 3'-gag₁-NPMG_(vástago)L-5'.
144. El método de la reivindicación 142, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación de punto, una mutación ts, una mutación de cambio de gen, una mutación del gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción del gen G y una mutación de eliminación de gen.

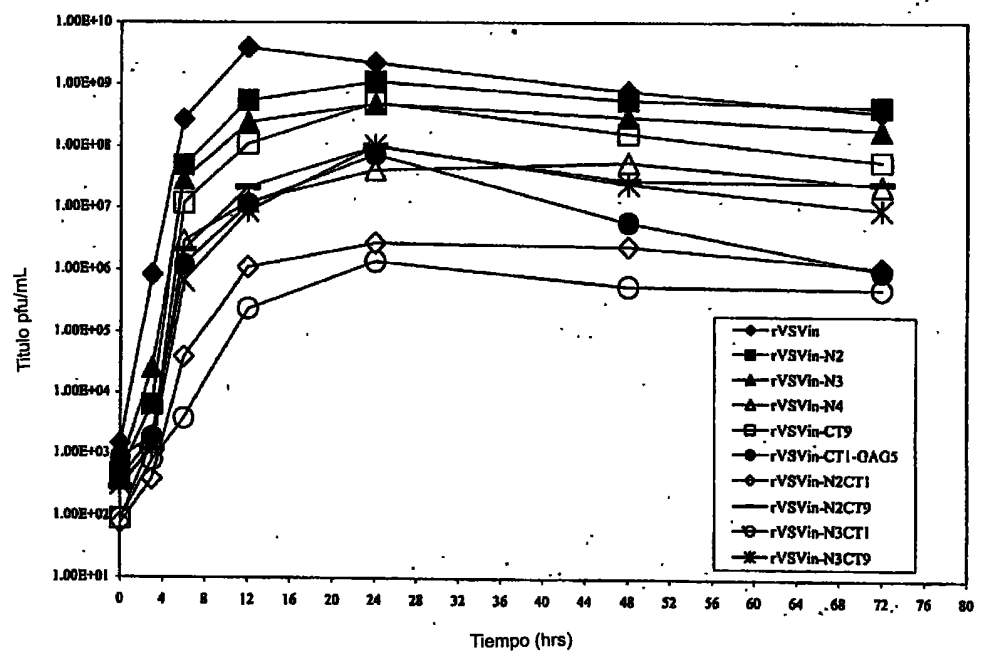


FIG. 1

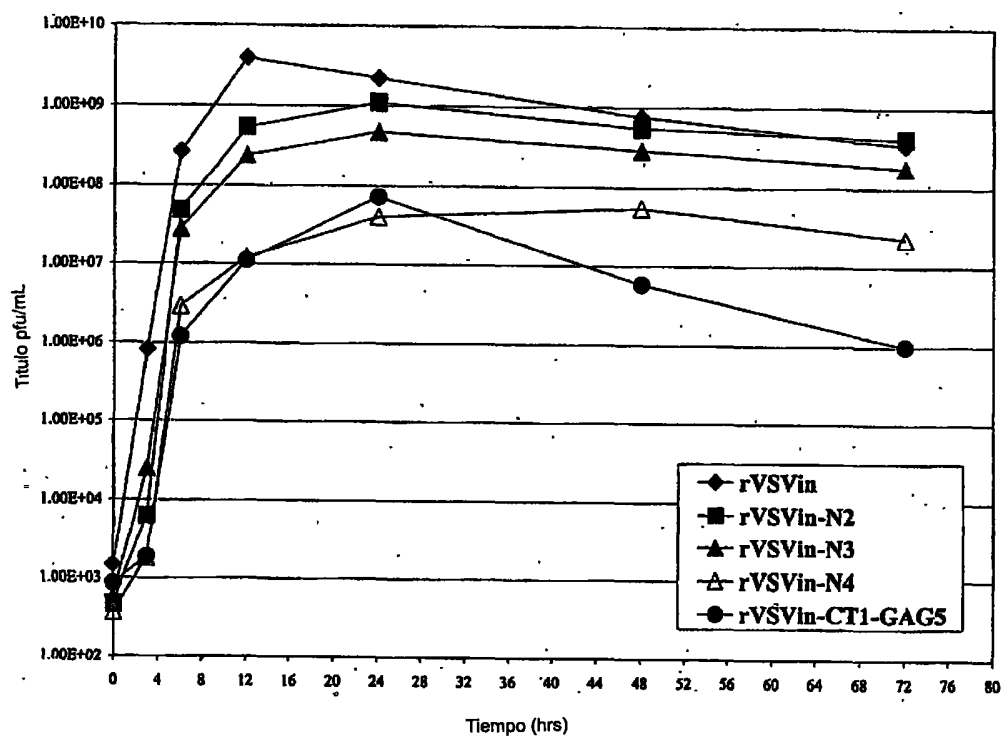


FIG. 2

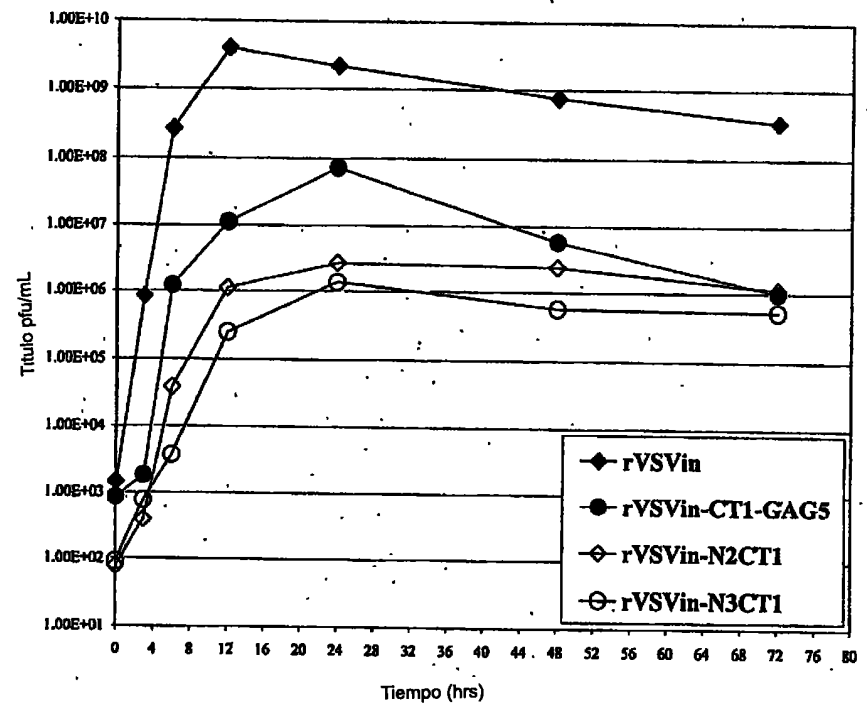


FIG. 3

AM101651PCT (03-22-2005).ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
Clarke, David K
Hendry, Michael
Udem, Stephen
Parks, Christopher

<120> ATENUACIÓN SINERGÍSTICA DEL VIRUS ESTOMATITIS VESICULAR,
VECTORES DEL MISMO Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DEL MISMO

<130> AM101651PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Virus estomatitis vesicular

<400> 1

Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg
1 5 10 15

Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
20 25

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus estomatitis vesicular

<400> 2

Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys
1 5

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un virus de estomatitis vesicular genéticamente modificado (VSV) que comprende por lo menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura (ts), una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV.
2. El VSV de la reivindicación 1, en donde la patogenicidad es definida adicionalmente como neurovirilencia.
3. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncado y una mutación del cambio de gen N.
4. El VSV de la reivindicación 1, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene una eliminación de los últimos veinte o veintiocho aminoácidos del terminal carboxi.
5. El VSV de la reivindicación 1, en donde la proteína G codificada por el gen G truncada tiene un dominio de cola citoplásmica que consiste de uno o nueve aminoácidos.

6. El VSV de la reivindicación 3, en donde el gen N es cambiado a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', con relación al 3'-NPMGL-5' del genoma VSV tipo silvestre, en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína matriz, G es el gen que codifica la glicoproteína de sujeción y L es gen que codifica la proteína del ARN polimerasa dependiente de ARN.
7. El VSV de la reivindicación 3, que comprende un genoma seleccionado del grupo que consiste de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', en donde N es el gen que codifica la proteína de nucleocápsido, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína matriz, G_(ct-1) es G el gen que codifica la glicoproteína de sujeción que tiene una eliminación de los últimos veintiocho aminoácidos del terminal carboxi, G_(ct-9) es el gen que codifica la glicoproteína de sujeción que tiene una eliminación de los últimos veintiocho aminoácidos del terminal carboxi y L es gen que codifica la proteína del ARN polimerasa dependiente de ARN.
8. El VSV de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente una tercera clase de mutación en su genoma, en donde la mutación es una mutación (ts), una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen M no citopático, una mutación de eliminación de gen, una mutación de inserción de gen G o una mutación de punto.

00238

9. El VSV de la reivindicación 1, en donde el VSV inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembras de cuatro semanas tiene un LD₅₀ de 100 veces, 1000 veces, 10000 veces o 100000 veces mayor que el VSV tipo silvestre inyectado intracranealmente en ratones Swiss-Webster hembra de cuatro semanas.
10. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son una mutación del gen G truncado y una mutación del gen M no citopático.
11. El VSV de la reivindicación 10, en donde la mutación (M_(ncp)) del gen M no citopático es una mutación en la metionina 33 y la metionina 51 del gen M.
12. El VSV de la reivindicación 10, que comprende un genoma mutado de 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5' o 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5'.
13. El VSV de la reivindicación 1, en donde las dos mutaciones son la mutación (N_(ts)) del gen N y una mutación (L_(ts)) del gen L.
14. El VSV de la reivindicación 13, que comprende un genoma mutado de 3'-N_(ts)PMGL_(TS)-5'.
15. El VSV de la reivindicación 1, en donde una clase de mutación es una mutación del vástago G.

00239

16. Un vector VSV modificado genéticamente que comprende el VSV de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente por lo menos una secuencia de ARN extraña insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para la replicación.
17. El vector de la reivindicación 16, en donde el ARN extraño es definido adicionalmente como un marco de lectura abierta (ORF).
18. El vector de la reivindicación 16, en donde el ARN extraño seleccionado del grupo que consiste de un gen de HIV, , un gen de HTLV, un gen de SIV, un gen de RSV, un gen de PIV, un gen de HSV, un gen de CMV, un gen del virus Epstein-Barr, un gen del virus Varicella-Zoster, un gen del virus de las paperas, un gen del virus de sarampión, un gen del virus de la influenza, un gen de poliovirus, un gen de rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus Ebola, un gen del virus papiloma, un gen del virus de polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen del *Vibrio cholerae*, un gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen del *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen del *Neisseria gonorrhoeae*, un gen del *Corynebacteria diphtheriae*, un gen del *Clostridium*

~~00240~~

240

tetani, un gen del *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citosina, un gen que codifica un epítipo T-ayudador, un gen que codifica un epítipo CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.

19. El vector de la reivindicación 18, en donde el gen HIV es seleccionado del grupo que consiste de *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.
20. El vector de la reivindicación 19, en donde el gen de HIV es *gag* y el genoma mutado es 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-*gag*₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-*gag*₅-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-*gag*₅-5'.
21. Una composición inmunogénica que comprende un dosis inmunogénica de un vector de VSV genéticamente modificado de la reivindicación 16.
22. Un método para inmunizar un anfitrión mamífero contra una infección bacteriana que comprende administrar una dosis de inmunogénica de un vector de VSV genéticamente modificado que comprende:
 - (a) Por lo menos dos clases diferentes de mutación en su genoma, las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una

00241

mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV; y

(b) Por lo menos una secuencia de ARN extraño insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para la aplicación, en donde el ARN codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste de una proteína de *Vibrio cholerae*, una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, una proteína de *Streptococcus pyogenes*, una proteína del *Streptococcus agalactiae*, una proteína de *Helicobacter pylori*, una proteína de *Neisseria meningitidis*, una proteína de *Neisseria gonorrhoeae*, una proteína de *Corynebacteria diphtheriae*, una proteína de *Clostridium tetani*, una proteína de *Bordetella pertussis*, una proteína de *Haemophilus*, una proteína de *Chlamydia*, y una proteína de *Escherichia coli*.

23. Un método para inmunizar un anfitrión mamífero contra una infección viral que comprende administrar una dosis de inmunogénica de un vector de VSV genéticamente modificado que comprende:

(a) Por lo menos dos clases de mutación en su genoma, las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste de una mutación ts, una mutación de punto, una mutación de

no 42 242

cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación del ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenúan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV; y

- (b) Por lo menos una secuencia de ARN extraño insertada en o que reemplaza una región del genoma VSV no esencial para la reaplicación, en donde el ARN codifica una proteína viral seleccionada del grupo que consiste de una proteína de HIV, una proteína de HTLV , una proteína de SIV , una proteína de RSV, una proteína de PIV, una proteína de HSV, una proteína de CMV, una proteína del virus Epstein-Barr, una proteína del virus Varicella-Zoster, una proteína del virus de las paperas, una proteína del virus de sarampión, una proteína del virus de la influenza, una proteína de poliovirus, una proteína de rinovirus, una proteína del virus de la hepatitis A, una proteína del virus de la hepatitis B, una proteína del virus de la hepatitis C, una proteína del virus Norwalk, una proteína del togavirus, una proteína del alfavirus, una proteína del virus de la rubéola, una proteína del virus de la rabia, una proteína del virus Marburg, una proteína del virus Ebola, una proteína del virus papiloma, una proteína del virus de polioma, una proteína del metapneumovirus, y una proteína de coronavirus.

AMENDED CLAIMS

1. A genetically modified vesicular stomatitis virus (VSV) comprising at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a temperature-sensitive (ts) mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity.
2. The VSV of claim 1, wherein pathogenicity is further defined as neurovirulence.
3. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a N gene shuffling mutation.
4. The VSV of claim 1, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a deletion of the last twenty or twenty-eight carboxy-terminal amino acids.
5. The VSV of claim 1, wherein the G protein encoded by the truncated G gene has a cytoplasmic tail domain consisting of one or nine amino acids.
6. The VSV of claim 3, wherein the N gene is shuffled to 3'-PNMGL-5' or 3'-PMNGL-5', relative to the wild-type VSV genome 3'-NPMGL-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G is the gene encoding the attachment glycoprotein and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.
7. The VSV of claim 3, comprising a mutated genome selected from the group consisting of 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' and 3'-PMNG_(ct-9)L-5', wherein N is the gene encoding the nucleocapsid protein, P is the

gene encoding the phosphoprotein, M is the gene encoding the matrix protein, G_(ct-1) is G is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty-eight carboxy-terminal amino acids, G_(ct-9) is the gene encoding the attachment glycoprotein having a deletion of the last twenty carboxy-terminal amino acids and L is the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein.

8. The VSV of claim 7, further comprising a third class of mutation in its genome, wherein the mutation is a ts mutation, an ambisense RNA mutation, a non-cytopathic M gene mutation, a gene deletion mutation, a gene insertion mutation or a point mutation.
- 9 The VSV of claim 1, wherein the VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice has a LD₅₀ 100-fold, 1,000-fold, 10,000-fold, or 100,000-fold greater than wild-type VSV injected intracranially in 4-week old female Swiss-Webster mice.
10. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are a truncated G gene mutation and a non-cytopathic M gene mutation.
- 11 The VSV of claim 10, wherein the M gene non-cytopathic (M_(ncp)) mutation is a mutation at methionine 33 and methionine 51 of the M gene.
- 12 The VSV of claim 10, comprising a mutated genome of 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5' or 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5'.
13. The VSV of claim 1, wherein the two mutations are ts N gene mutation (N_(ts)) and a ts L gene mutation (L_(ts)).
14. The VSV of claim 13, comprising a mutated genome of 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5'.

15. The VSV of claim 1, wherein one mutation class is a G-stem mutation.
16. A genetically modified VSV vector comprising the VSV of claim 1, further comprising at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication.
17. The vector of claim 16, wherein the foreign RNA is further defined as an open reading frame (ORF).
18. The vector of claim 16, wherein the foreign RNA is selected from the group consisting of a HIV gene, a HTLV gene, a SIV gene, a RSV gene, a PIV gene, a HSV gene, a CMV gene, an Epstein-Barr virus gene, a Varicella-Zoster virus gene, a mumps virus gene, a measles virus gene, an influenza virus gene, a poliovirus gene, a rhinovirus gene, a hepatitis A virus gene, a hepatitis B virus gene, a hepatitis C virus gene, a Norwalk virus gene, a togavirus gene, an alphavirus gene, a rubella virus gene, a rabies virus gene, a Marburg virus gene, an Ebola virus gene, a papilloma virus gene, a polyoma virus gene, a metapneumovirus gene, a coronavirus gene, a *Vibrio cholerae* gene, a *Streptococcus pneumoniae* gene, *Streptococcus pyogenes* gene, a *Helicobacter pylori* gene, a *Streptococcus agalactiae* gene, a *Neisseria meningitidis* gene, a *Neisseria gonorrhoeae* gene, a *Corynebacteria diphtheriae* gene, a *Clostridium tetani* gene, a *Bordetella pertussis* gene, a *Haemophilus* gene, a *Chlamydia* gene, a *Escherichia coli* gene, a gene encoding a cytokine, a gene encoding T-helper epitope, a gene encoding a CTL epitope, a gene encoding an adjuvant and a gene encoding a co-factor
19. The vector of claim 18, wherein the HIV gene is selected from the group consisting of *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* or *vpu*.
20. The vector of claim 19, wherein the HIV gene is *gag* and the mutated genome is 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-

PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-gag₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-gag₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-gag₅-5' or 3'-PMNG_(ct-9)L-gag₅-5'.

21. An immunogenic composition comprising an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector of claim 16. -
22. A method of immunizing a mammalian host against bacterial infection comprising administering an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising:
 - (a) at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity; and
 - (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA encodes a bacterial protein selected from the group consisting of a *Vibrio cholerae* protein, a *Streptococcus pneumoniae* protein, *Streptococcus pyogenes* protein, a *Streptococcus agalactiae* protein, a *Helicobacter pylori* protein, a *Neisseria meningitidis* protein, a *Neisseria gonorrhoeae* protein, a *Corynebacteria diphtheriae* protein, a *Clostridium tetani* protein, a *Bordetella pertussis* protein, a *Haemophilus* protein, a *Chlamydia* protein and a *Escherichia coli* protein.
23. A method of immunizing a mammalian host against viral infection comprising administering an immunogenic dose of a genetically modified VSV vector comprising:
 - (a) at least two different classes of mutations in its genome, the mutations selected from the group consisting of a ts mutation, a point mutation, a gene shuffling mutation, a G-stem mutation, a non-cytopathic M gene

mutation, an ambisense RNA mutation, a truncated G gene mutation, a G gene insertion mutation and a gene deletion mutation, wherein the two mutations synergistically attenuate VSV pathogenicity, and

- (b) at least one foreign RNA sequence inserted into or replacing a region of the VSV genome non-essential for replication, wherein the RNA encodes a viral protein selected from the group consisting of a HIV protein, a HTLV protein, a SIV protein, a RSV protein, a PIV protein, a HSV protein, a CMV protein, an Epstein-Barr virus protein, a Varicella-Zoster virus protein, a mumps virus protein, a measles virus protein, an influenza virus protein, a poliovirus protein, a rhinovirus protein, a hepatitis A virus protein, a hepatitis B virus protein, a hepatitis C virus protein, a Norwalk virus protein, a togavirus protein, an alphavirus protein, a rubella virus protein, a rabies virus protein, a Marburg virus protein, an Ebola virus protein, a papilloma virus protein, a polyoma virus protein, a metapneumovirus protein and a coronavirus protein.

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT. 00248

To WYETH Patent Law Department Attn. Brazil, Bill T Five Giralda Farms Madison, New Jersey 07940 UNITED STATES OF AMERICA		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
RECEIVED NOV 23 2005		(PCT Rule 44.1)	
		22/11/2005	
Applicant's or agent's file reference AM101651		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No PCT/US2005/011499		International filing date (day/month/year) 05/04/2005	
Applicant WYETH			

- 1 ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith
- Filing of amendments and statement under Article 19**
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48)
- When?** The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report, however, for more details, see the notes on the accompanying sheet
- Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No. (41-22) 740 14 35
- For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet
- 2 ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith
- 3 ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices
- ☐ no decision has been made yet on the protest, the applicant will be notified as soon as a decision is made
- 4 **Reminders**
- Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis 1 and 90bis 3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication
- The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date
- Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later), otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices
- In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months
- See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Christian Pozzi
--	---

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.



The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged,
- (ii) the claim is cancelled,
- (iii) the claim is new,
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed,
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter.

- 1 [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers, claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added"
- 2 [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11"
- 3 [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged, claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added" or
"Claims 7 to 13 cancelled, new claims 15, 16 and 17 added, all other claims unchanged"
- 4 [Where various kinds of amendments are made]
"Claims 1-10 unchanged, claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled, claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14, claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17, new claims 20 and 21 added"

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1))

The statement will be published with the international application and the amended claims

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence)

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AM101651	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No PCT/US2005/011499	International filing date (day/month/year) 05/04/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 09/04/2004
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2 ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3 ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4 With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5 With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6 With regard to the drawings,

a the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 3

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/011499 **00252**

Box No 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1 b of the first sheet)

- 1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of
 - a type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
- 2 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 3 Additional comments

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/86		
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) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	ROSE N F ET AL "An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 106, no. 5, 7 September 2001 (2001-09-07), pages 539-549, XP002297996 ISSN: 0092-8674	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
Y	the whole document	9-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117, 118, 128-144
----- -/-		
☒ 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 9 November 2005		Date of mailing of the international search report 22/11/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilat, D

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 98/50529 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 12, November 1998 (1998-11-12)	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
Y	the whole document	9-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117,118, 128-144
X	HAGLUND K ET AL: "Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Precursor and Envelope Proteins from a Vesicular Stomatitis Virus Recombinant: High-Level Production of Virus-like Particles Containing HIV Envelope" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 268, no. 1, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 112-121, XP004436135 ISSN: 0042-6822 figure 1 the whole document	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
X	ROBERTS A ET AL: "Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 3723-3732, XP002266675 ISSN: 0022-538X abstract; figure 1	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
X	KAHN J S ET AL: "Replication-competent or attenuated, nonpropagating vesicular stomatitis viruses expressing respiratory syncytial virus (RSV) antigens protect mice against RSV challenge." JOURNAL OF VIROLOGY. NOV 2001, vol. 75, no. 22, November 2001 (2001-11), pages 11079-11087, XP002353198 ISSN: 0022-538X abstract; figure 1	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
	----- -/-	

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	FLANAGAN E B ET AL: "Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host new strategy for vaccine development " JOURNAL OF VIROLOGY. JUL 2001, vol 75, no. 13, July 2001 (2001-07), pages 6107-6114, XP002353200 ISSN: 0022-538X abstract	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
X	FLANAGAN E BRIAN ET AL: "Vesicular stomatitis viruses with rearranged genomes have altered invasiveness and neuropathogenesis in mice." JOURNAL OF VIROLOGY MAY 2003, vol. 77, no. 10, May 2003 (2003-05), pages 5740-5748, XP002353201 ISSN: 0022-538X abstract	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
Y	US 2003/099671 A1 (FU ZHEN FANG) 29 May 2003 (2003-05-29) pages 189,205,, column 206	9-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117,118, 128-144
P,X	PUBLICOVER JEAN ET AL: "Characterization of nonpathogenic, live, viral vaccine vectors inducing potent cellular immune responses." JOURNAL OF VIROLOGY. SEP 2004, vol. 78, no. 17, September 2004 (2004-09), pages 9317-9324, XP002353199 ISSN: 0022-538X abstract; figure 1	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
P,X	WO 2004/113517 A (WYETH; PARKS, CHRISTOPHER, L; UDEM, STEPHEN, A; SIDHU, MODINDERJIT, S) 29 December 2004 (2004-12-29) page 199 - page 203	1-144
	-/--	

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
T	FINKE S ET AL. "Replication strategies of rabies virus" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 111, no 2, August 2005 (2005-08), pages 120-131, XP004962561 ISSN: 0168-1702 page 128, column 1	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 110-144 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.

The applicant's attention is drawn to the fact that 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. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP2005/011499 10258

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850529	A	12-11-1998	AU 739597 B2	18-10-2001
			AU 7278198 A	27-11-1998
			CA 2288434 A1	12-11-1998
			EP 1005535 A1	07-06-2000
			JP 2001527409 T	25-12-2001
US 2003099671	A1	29-05-2003	US 2004208900 A1	21-10-2004
WO 2004113517	A	29-12-2004	NONE	

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

no 259

To see form PCT/ISA/220	PCT WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)
Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
International application No PCT/US2005/011499	International filing date (day/month/year) 05 04 2005
Priority date (day/month/year) 09 04 2004	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C12N15/88	
Applicant WYETH	

- 1 This opinion contains indications relating to the following items**
- ☒ Box No I Basis of the opinion
 - ☐ Box No II Priority
 - ☒ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
 - ☒ Box No VI Certain documents cited
 - ☐ Box No VII Certain defects in the international application
 - ☒ Box No VIII Certain observations on the international application
- 2 FURTHER ACTION**
- If a demand for International preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 65 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.
- If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.
- For further options, see Form PCT/ISA/220
- 3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220**

Name and mailing address of the ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Pilat, D Telephone No +49 89 2399-8858
--	---

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/011499

nn260

Box No. I Basis of the opinion

- 1 With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- 2 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of
 - a type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
- 3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
4. Additional comments

nn261

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application,

☒ claims Nos 110-144

because

☒ the said international application, or the said claims Nos 110-144 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

nn252

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	9-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117-118, 128-144
	No	Claims	1-8, 13-16, 29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127
Inventive step (IS)	Yes	Claims	
	No	Claims	9-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117-118, 128-144
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1-109
	No	Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1 Certain published documents (Rules 43bis 1 and 70 10)

and / or

2 Non-written disclosures (Rules 43bis 1 and 70 9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made

see separate sheet

Re Item I

Basis of the report

- D1: ROSE N F ET AL. "An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 106, no. 5, 7 September 2001 (2001-09-07), pages 539-549, XP002297996 ISSN 0092-8674
- D2: WO 98/50529 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 12 November 1998 (1998-11-12)
- D3: HAGLUND K ET AL. "Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Precursor and Envelope Proteins from a Vesicular Stomatitis Virus Recombinant: High-Level Production of Virus-like Particles Containing HIV Envelope" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 268, no. 1, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 112-121, XP004436135 ISSN: 0042-6822
- D4: ROBERTS A ET AL. "Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 3723-3732, XP002266675 ISSN: 0022-538X
- D5: KAHN J S ET AL. "Replication-competent or attenuated, nonpropagating vesicular stomatitis viruses expressing respiratory syncytial virus (RSV) antigens protect mice against RSV challenge." JOURNAL OF VIROLOGY. NOV 2001, vol. 75, no. 22, November 2001 (2001-11), pages 11079-11087, XP002353198 ISSN 0022-538X
- D6: FLANAGAN E B ET AL. "Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host. new strategy for vaccine development." JOURNAL OF VIROLOGY. JUL 2001, vol. 75, no. 13, July 2001 (2001-07), pages 6107-6114, XP002353200 ISSN: 0022-538X
- D7: FLANAGAN E BRIAN ET AL. "Vesicular stomatitis viruses with rearranged genomes have altered invasiveness and neuropathogenesis in mice " JOURNAL OF VIROLOGY MAY 2003, vol. 77, no. 10, May 2003 (2003-05), pages 5740-5748, XP002353201 ISSN: 0022-538X
- D8: US 2003/099671 A1 (FU ZHEN FANG) 29 May 2003 (2003-05-29)
- D9: WO 2004/113517 A (WYETH, PARKS, CHRISTOPHER, L, UDEM, STEPHEN, A; SIDHU, MODINDERJIT, S) 29 December 2004 (2004-12-29)

D10 FINKE S ET AL "Replication strategies of rabies virus" VIRUS RESEARCH,
AMSTERDAM, NL, vol. 111, no 2, August 2005 (2005-08), pages 120-131,
XP004962561 ISSN 0168-1702

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. For the assessment of the present claims 110-144 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

3. Novelty (Article 33 (2) PCT)

- 3.1 The present application states that the insertion of a foreign nucleic acid sequence (e.g., HIV gag) into the VSV genome 3' to any of the N, P, M, G or L genes effectively results in a "gene shuffling mutation". Thus, in certain embodiments, the two VSV vector mutations are G(stem) mutation and a gene shuffling mutation (see p.8 lines 14-18 and p.20 lines 20-22).

In certain embodiments of the application, a genetically modified VSV comprising at least two different classes of mutations in its genome comprises one or more ts N gene mutation(s) (hereinafter, "N (ts)") a first class of mutation and one or more ts L gene mutation (s) (hereinafter, "L(ts)") as a second class of mutation

By analogy rearrangements of a first and a second gene within the VSV genome are therefore embraced by this definition

3.2 WO9850529 describes an infectious cDNA clone of the prototypic vesicular stomatitis virus (VSV). It was manipulated to rearrange the order of four of the five viral genes. Infectious viruses were recovered from each of these rearranged cDNAs and examined for their levels of gene expression, growth potential in cell culture, and virulence in mice. Method of attenuating a virus and making them useful for vaccine are also disclosed (see p 3 to 4 and example 8, Table 3, especially example 22, Fig 1). Two differently rearranged genes are disclosed (see G1N2 or G1N4 in Figure 1).

Haglund et al describes two genes that can be expressed simultaneously from a single, live-attenuated VSV recombinant. The genes used encode the Pr55<gag> protein precursor of HIV-1 (1.7-kb gene) and an HIV-1 envelope (Env) protein (2.4 kb gene) (see also Fig 1 VSVgagEnvG). This construct rearranges G gene towards a 5' position compared to their wild type position and replaces a second G gene with an Env insert except for a 29 amino acid VSV G cytoplasmic domain. This construct comprises a rearranged VSV G gene and a truncated form of one G gene in which an Env gene has been inserted

Rose et al tested the ability of VSV recombinants expressing Env and Gag proteins to immunize rhesus monkeys against the highly pathogenic SHIV 89.6P virus (see p.540 col 1 last paragraph). It used also boosting vectors that are based on the same attenuated VSV recombinant used in the first vaccinations, but have the VSV G protein (GI) replaced with either the G protein of the (GNJ) or (Gch). Since the G proteins include multiple differences at the amino acid sequence level (mutations), the construct used includes a gene shuffling mutation, due to the insertion of Gag and Env genes, and a G gene insertion and/or deletion mutation. No pathogenesis associated with these vectors were observed

However if further attenuation is required there are also well characterized VSV deletion mutants that are completely or partially attenuated for pathogenesis in young mice (see p.547 col 1 first paragraph).

Roberts et al. describes VSV vectors expressing HA which are completely attenuated for pathogenesis in the mouse model. The first vector has a truncation of the cytoplasmic domain of the VSV G protein and expresses influenza virus HA

(CT1-HA) A second vector with VSV G deleted and expressing HA (DeltaG-HA) is also protective (see abstract, p.3724 col 1 first full paragraph) The construct CT1-HA of Fig 1 comprises a truncated VSV G gene and an insertion of a heterologous gene between the CT1-G and L genes (see Fig 1)

Kahn et al describes expression of RSV F and G glycoproteins in attenuated, nonpropagating VSVs which lack the VSV G gene (VSVDeltaG) and the incorporation of these RSV proteins into recombinant virions (see abstract) The VSVdeltaG-RSV F G construct of Fig.1 disclose a G deletion mutation and a M and/or L gene shuffling mutation

In view of the content of these documents claims 1-8,13-16,29-37, 42-49, 71-79, 84-86, 88, 110-116, 119-127 lack novelty

4. Inventive step (Article 33 (3) PCT)

- 4.1 Document Rose et al is considered to represent the most relevant state of the art. It discloses VSV recombinants expressing ENv and Gag proteins to immunize rhesus monkeys against the highly pathogenic SHIV 89.6P virus (see also above item 3.2) The difference between the subject-matter of claim 9 and the content of Rose et al is that it provides a different additional mutation which synergistically attenuate VSV pathogenicity.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to obtain genetically modified, attenuated VSV mutants having significantly reduced (or eliminated) pathogenicity in mammals.

Starting with Rose et al the skilled person would have known that if further attenuation is required there are also well characterized VSV deletion mutants that are completely or partially attenuated for pathogenesis in young mice (see p.547 col 1 first paragraph). The literature is replete of VSV attenuation methods.

Thus, to solve the problem posed, the skilled person would have combined the teaching of Rose et al with any of the prior art additional way to attenuate VSV and would have combined said mutations within one construct. The skilled person would have even more been motivated to do so in view of the teaching of US20030099671, which discloses that avirulent rabies virus are constructed by reshuffling rabies virus

genes within the rabies virus genome, particularly by moving the G from the fourth position to the first position and reshuffling the P, M and G genes. In addition, the G mutation at arginine 333 is incorporated into each and every reshuffled virus to further attenuate the rabies virus.

Thus, the solution proposed in claim 9 of the present application does not seem to involve an inventive step.

- 4.2 The same conclusion applies to independent claims relating to vectors, immunogenic compositions, method of immunizing a mammalian host and to their dependent claims which introduces modifications which amounts to a selection among different mutations types generally known to the person skilled in the art to be interchangeable. Thus, claims 10-12, 17-28, 38-41, 50-70, 80-83, 87, 89-109, 117-118, 128-144 lack an inventive step.

5. Industrial applicability (Article 34(4)(a)(I) PCT)

- 5.1 Claims 110-144 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2004/1135517	29.12.2004	8.6.2004	9.6.2003

6. WO2004/1135517 discloses rVSVs. Various additional constructs have been generated and recovered using the plasmid T7/electroporation/heat shock method.

After these rVSV recombinants are rescued, replication rates are examined in vitro, and relative virulence is evaluated in small animal model systems predictive of activity (e.g., attenuation and immunogenicity) in humans, to determine whether the virus is attenuated sufficiently for use in immunogenic compositions and methods of the invention. Table 8 sets forth various exemplary, attenuated rVSV strains that were rescued according to these methods. Table 9 discloses also other VSV vectors expressing RSV glycoproteins.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

7. Clarity (Article 6 PCT)

- 7.1 Claim 1 relates to a product. This product is not characterized by means of its essential features, but only in that it contains two different classes of type of mutations. The claimed product is functionally characterized in that it has to synergistically have an attenuated pathogenicity.
- 7.2 Claim 1 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved which merely amounts to a statement of the underlying problem. All the constructs satisfying this functional requirement are covered. The technical features necessary for achieving this result must however still be identified in the claim.
- 7.3 It is furthermore unclear in which host the pathogenicity has to be measured and how this pathogenicity has to be experimentally assessed.
- 7.4 It is stressed that claimed products characterized additionally by parameters, which have not been measured in the prior art, while otherwise identical to the prior art products are nevertheless considered to be anticipated by said prior art products, until technical features distinguishing them from the prior art are introduced (see PCT Guidelines Chapter 12 paragraph 12.04).

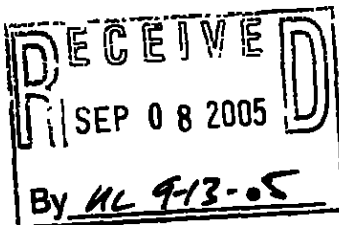
8 Support (Article 6 PCT)

8.1 Claim 1 relates to a VSV construct comprising at least two different classes of mutations in its genome. The mutations were selected from temperature sensitive mutation, gene shuffling mutation, G-stem mutation, non-cytopathic M gene mutation, ambisense RNA mutation, truncation of G gene, a G gene insertion and deletion mutation. The engineered VSV virus shows a synergistically attenuated VSV pathogenicity.

Disregarding the fact that neither the host nor how the attenuated pathogenicity has to be assessed is identified in the claim, the claimed subject-matter is directed to any double mutated VSV wherein the two different mutations lead to synergistically attenuated VSV pathogenicity. There are many examples of mutated VSV in the prior art. However, the present description states that currently available attenuated VSV vectors retain residual virulence when tested in animal models, and as such, are not likely vector candidates for advancement to human clinical trials (see p 16 lines 31-33). Thus, a majority of examples in prior art VSV covered by the claim do not achieve the technical effect underlying the present application.

According to Article 6 PCT the claimed protection should correspond to the technical contribution to the art made by the disclosure of the invention described therein, which excludes protection being extended to subject-matter which, after reading the application, would still not be at the disposal of the skilled person. The available information must therefore enable the skilled person to achieve the envisaged result within the whole ambit of the claim. Hence, this is not the case.

As a consequence, claim 1 lacks support.



n° 00270

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To

BRAZIL, Bill, T.
Wyeth
Patent Law Department
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

CC: PRINCIPAL

Date of mailing (day/month/year) 26 August 2005 (26.08.2005)	
Applicant's or agent's file reference AM101651	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No PCT/US2005/011499	International filing date (day/month/year) 05 April 2005 (05.04 2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 09 April 2004 (09 04.2004)
Applicant WYETH et al	

- 1 By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- 2 (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 3 (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
09 April 2004 (09 04 2004)	60/561,214	US	12 August 2005 (12 08 2005)
19 January 2005 (19 01 2005)	60/644,902	US	NR

DOCKETED
DUE DATE _____
STAT DATE _____
BY: HL 9-13-05

CC: JARLOW

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Eglantine POIGNAND

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		00271
(21) N° de solicitud 06 -01162		(51) Int Cl C12N 15/86		
22) Fecha de solicitud 06/10/06		(71) Solicitante(s) WYETH		
(30) Prioridad	(31) No. 60/561,214 60/644,902	(32) Fecha 09/04/2004 19/01/2005	(33) País US US	(72) Inventor(es) CLARKE, David Kirkwood. Otros
				(74) Apoderado ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional 09/11/06		(87) Publicación internacional		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha 20/10/2005		
Fecha de presentación de la solicitud 05/04/2005		N° publicación WO 2005/098009		
No de solicitud PCT/US2005/011499				
(54) Título ATENUACIÓN SINERGÍSTICA DE VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR, VECTORES DE ESTOS Y COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE ESTOS				

Reivindicación(es)

1 Un virus de estomatitis vesicular genéticamente modificado (VSV) que comprende por lo menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste de una mutación sensible a la temperatura (ts), una mutación de punto, una mutación de cambio de gen, una mutación de vástago G, una mutación del gen M no citopático, una mutación de ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación de inserción de gen G y una mutación de eliminación de gen, en donde las dos mutaciones atenuan de manera sinérgica la patogenicidad del VSV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-101162-00000-0000
Fee: 2006-10-06 16 22 13 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEYII
Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION
Folios 273

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

[1]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

INCOMPLETA []

◆	Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	[]
◆	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[]
◆	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	[]
◆	Comprobante de pago de las tasas establecidas	[]

INCOMPLETA []

◆	Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado	[]
◆	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[]
◆	Representación gráfica del esquema trazado	[]
◆	Comprobante de pago de las tasas establecidas	[]

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha **06/07**

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

273 ²⁷⁵

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	6 101162
	Solicitud internacional	PCT/US2005/011499
	Fecha inicio fase nacional	09/11/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	13900

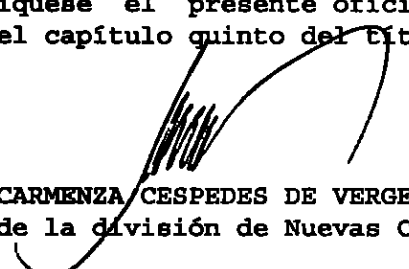
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del Título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 DIC. 2006 aalvarado