



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 28 801 T2** 2005.07.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 015 595 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 28 801.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/19656**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 949 392.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/014334**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.01.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.07.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/45**

**C07K 14/135, C12N 15/62, A61K 39/155,
A61K 48/00**

(30) Unionspriorität:

59684 P 19.09.1997 US

84863 P 08.05.1998 US

(73) Patentinhaber:

Wyeth Holdings Corp., Madison, N.J., US

(74) Vertreter:

Wächtershäuser und Kollegen, 80333 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HANCOCK, E., Gerald, Honeoye Falls, US;
TEBBEY, W., Paul, Rochester, US**

(54) Bezeichnung: **PEPTIDE, ABGELEITET VOM ANGELAGERTEN G-PROTEIN DES RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Respiratory Syncytial Virus (RSV), ein negativsträngiger Virus der Paramyxoviridae-Familie, ist ein Hauptgrund für eine Erkrankung des unteren Lungentrakts, insbesondere bei kleinen Kindern und Säuglingen. Die parenterale Verabreichung von Formalin-inaktiviertem RSV (FI-RSV) als Vakzine wurde mit einer gesteigerten Erkrankung in RSV-naiven Empfängern (seronegativ) begleitet, die nachfolgend mit Wild-Typ-RSV infiziert wurden. Die gesteigerte Erkrankung wurde charakterisiert durch einen erhöhten Anteil an Eosinophilen im peripheren Blut und den Lungen von befallenen Individuen (Kim et al., *Am. J. Epidemiol.* 89:422–434 (1969); Kim et al., *Pediatric Res.* 10:75–78 (1976)). Neuere Untersuchungen an Nagern haben gezeigt, dass FI-RSV eine T-Helfer-2-(TH2)-Immunantwort induziert, während lebende attenuierte virale Vakzinen vorzugsweise mit T-Helfer-1-(TH1)-Antworten verbunden sind.

[0002] RSV enthält zwei bekannte äußere Hüllen-Glykoproteine, Fusion-(F)-Protein und Einlagerungs-(G)-Protein, die für die virale Infektivität wichtig sind, und deshalb als vernünftige Ziele für das Design einer Untereinheit-Vakzine für RSV dienen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Bildung neutralisierender Antikörper gegenüber RSV durch eine Vakzine auf F-Protein-Basis durch den Einschluss von G-Protein stark erhöht werden kann (Hancock et al., *J. Virol.* 70:7783–7791 (1996)). Beim Versuch, die molekulare Basis einer FI-RSV-induzierten gesteigerten Erkrankung zu verstehen, wurde jedoch früher gezeigt, dass das native eingelagerte G-Glykoprotein von RSV ausreicht, um eine atypische Lungenentzündung zu verursachen, charakterisiert durch eine pulmonäre Eosinophilie, verbunden mit einer hohen Bildung von Interleukin-5 (IL-5), einem TH2-Cytokin (Hancock et al., *J. Virol.* 70:7783–7791 (1996)). Die in-vivo-Verarmung von IL-5 verringert tatsächlich die eosinophile Antwort in bronchiolo-alveolären Waschzellen (lavage cells) von mit G-Protein immunisierten, mit RSV angegriffenen Mäusen beträchtlich. Es wurde gezeigt, dass die Antwort auf G-Protein durch Übertragung von G-Protein-spezifischen CD4+ T-Zelllinien in naive Empfängermäuse T-Zellen-vermittelt ist, was nach folgendem Angriff zu atypischen pulmonär entzündlichen Antworten führt (Alwan et al., *J. Exp. Med.* 179:81–89 (1994)).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0003] Die Immunantworten, die durch natives G-Protein und eine Reihe überlappender Peptide (in [Fig. 2](#) dargestellt), die sich von den Aminosäuren 48 bis 294 von G-Protein erstrecken, hervorgerufen wurden, wurden, wie hier beschrieben, charakterisiert. In Stimulierungsversuchen von Splenozyten aus mit G-Protein-vakzinieren Mäusen war ein Peptid (19, die Aminosäuren 184 bis 198 überspannend) in seiner Fähigkeit, die Milzzellenvermehrung zu stimulieren, dominant ([Fig. 3](#)). In Abwesenheit irgendeines ähnlichen Effektes aus anderen von G-Protein abgeleiteten Peptiden ergab die Verwendung von Peptid 19 als Antigen eine Stimulierung der Milzzellen-Vermehrung um das 15-fache über die Hintergrundwerte. Es wurde auch gefunden, dass Peptid 19 die Hauptregion des G-Proteins ist, die an der Cytokin-Freisetzung beteiligt ist. Bei der Induktion von Überständen aus Kulturen von mit G-Protein vakzinieren BALB/c-Mäusen abgeleiteten Splenozyten wurden IFN- γ und IL-5 festgestellt ([Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)). Peptid 19 (Aminosäuren 184 bis 188 des RSV-G-Proteins) induziert spezifisch pulmonale Eosinophilie in BALB-Mäusen. Mit Schlüssellock-Napfschnecken-Hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin)(KHL) konjugiertem Peptid 19 vakzinieren Mäuse zeigten eine signifikante pulmonale Eosinophilie (39,5% der gesamten bronchiolo-alveolären Waschzellen) bei nachfolgender Verabreichung von lebenden RSV. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit einem Peptid mit den Aminosäuren 208 bis 222 (Peptid 22), konjugiert mit KLH, immunisiert waren, eine minimale pulmonale Eosinophilie (3,3%). Mutationen in der Aminosäure-Sequenz des Peptids 19 fehlte die Fähigkeit, Mäuse auf pulmonale Eosinophilie zu prädisponieren ([Fig. 6](#)).

[0004] Die in-vivo-Verarmung von CD4+-Zellen beseitigte die pulmonale Eosinophilie in mit dem Peptid 19-Konjugat vakzinieren Mäusen, während die Verarmung von CD8+-T-Zellen einen zu vernachlässigenden Effekt zeigte ([Fig. 8](#)). Diese Daten zeigen eine Assoziation zwischen Peptid 19 von RSV-G-Protein und der CD4+-T-Zellen-vermittelten Induktion von pulmonaler Eosinophilie als Antwort auf eine Herausforderung durch lebendes RSV, was nahe legt, dass Peptid 19-spezifische CD4+-T-Zellen das verursachende Mittel für pulmonale Eosinophilie ist. Bei der Untersuchung von menschlichen peripheren Blutzellen aus 43 Spendern zeigten 6 eine Reaktivität gegenüber RSV-G-Protein, 3 von ihnen eine Antwort auf Peptid 19 ([Fig. 7](#)). Diese Daten legen nahe, dass Peptid 19 beim Ausbruch von Bronchiolitis, Atopie oder Asthma eine Rolle spielen könnte, die manchmal als Folge einer RSV-Infektion seronegativer Säuglinge beobachtet werden (Welliver und Welliver, *Pediatrics in Review* 14:134–139 (1993)).

[0005] Die Erfindung betrifft deshalb ein verändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV nach Anspruch 1, das Immunogenität besitzt, und das, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und an ein Wirbeltier verabreicht wird, Schutz verleiht, ohne bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV eine gesteigerte Erkrankung zu induzieren. In einer besonderen Ausführungsform ist die gesteigerter Erkrankung eine atypische Lungenentzündung, insbesondere pulmonale Eosinophilie. Erfindungsgemäß ist die Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198 des RSV-G-Proteins.

[0006] In einer anderen Ausführungsform ergibt die Veränderung eine Inhibierung des Primers zur IL-5-Sekretion durch das veränderte G-Protein oder Polypeptid im Vergleich zu Wild-Typ-G-Protein.

[0007] Die Erfindung betrifft auch ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 6, das ein verändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, wobei das geänderte Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist, und, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung induziert. Erfindungsgemäß liegt die Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198 des RSV-G-Proteins.

[0008] Die Erfindung umfasst auch DNA-Konstruktionen, die ein hier beschriebenes Nucleinsäure-Molekül an eine regulatorische Sequenz operativ gebunden aufweisen. In einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chimäre DNA-Konstruktion, die aufweist: (a) ein Nucleinsäure-Molekül, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, wobei das geänderte Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist und, wenn in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht, wird nach nachfolgender Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung induziert; (b) ein Nucleinsäure-Molekül, das das gesamte oder einen immunogenen Teil des F-Proteins von RSV kodiert; und (c) eine an die F- und geänderten G-Proteine operativ gebundene regulatorische Sequenz.

[0009] Die Erfindung betrifft auch eine rekombinante Wirtszelle, die eine hier beschriebene DNA-Konstruktion aufweist, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines geänderten Proteins oder Polypeptids von RSV, das Immunogenität aufweist, und das, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, keine bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV verstärkte Erkrankung induziert, umfassend das Belassen einer erfindungsgemäßen rekombinanten Wirtszelle unter Bedingungen, die zur Expression des geänderten G-Proteins oder Polypeptids geeignet sind.

[0010] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines chimären Polypeptids, umfassend ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV, das Immunogenität aufweist und, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung induziert, und das gesamte oder einen immunogenen Anteil von F-Protein oder RSV.

[0011] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des geänderten G-Proteins oder Polypeptids oder einer rekombinanten Wirtszelle zu ihrer Expression, zur Herstellung eines Arzneimittels, wie z.B. einer Vakzine.

[0012] Die Erfindung betrifft ferner eine immunogene Zusammensetzung, umfassend ein physiologisch annehmbares Medium und ein erfindungsgemäßes geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV, das Immunogenität aufweist und das, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung ergibt. In einer besonderen Ausführungsform führt die immunogene Zusammensetzung zu einer Inhibierung des Primers zur IL-5-Sekretion im Vergleich zu einer immunogenen Zusammensetzung, die ein Wild-Typ-G-Protein aufweist. Erfindungsgemäß liegt die Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198 des RSV-G-Proteins. Die immunogene Zusammensetzung kann auch das gesamte oder einen Teil des RSV-F-Proteins umfassen.

[0013] Die Erfindung betrifft auch eine Vakzine-Zusammensetzung, die eine immunologisch wirksame Menge des geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV aufweist, das Immunogenität aufweist und das, wenn es in eine Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, Schutz verleiht, ohne bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV eine gesteigerte Erkrankung zu induzieren. Erfindungsgemäß liegt die Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198. Die Vakzine-Zusammensetzung kann auch eine immunologisch wirksame Menge des gesamten oder eines Teils von RSV-F-Protein umfassen. In besonderen Ausführungsformen umfassen die Vakzine-Zusammensetzung ferner ein Adjuvans.

[0014] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Inhibierung der Induktion einer gesteigerten Erkrankung nach Vakzination und nachfolgender Infektion eines Wirbeltiers mit RSV, umfassend das Verabreichen eines geänderten RSV-G-Proteins oder Polypeptids, wobei das geänderte G-Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist und, wenn es in eine Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, Schutz verleiht, ohne bei nachfolgender Infektion des Wirbeltiers mit RSV eine gesteigerte Erkrankung zu induzieren.

[0015] Die Erfindung betrifft auch eine Vakzine, die einen physiologisch annehmbaren Träger und eine wirksame Menge eines Nucleinsäure-Moleküls aufweist, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, wobei das geänderte G-Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist, und, wenn es in eine Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, Schutz verleiht, ohne bei nachfolgender Infektion des Wirbeltiers mit RSV eine gesteigerte Erkrankung zu induzieren. In einer Ausführungsform umfasst die Vakzine ferner ein die Transfektion förderndes Mittel.

[0016] Es wird auch ein Verfahren zum Induzieren einer Immunantwort in einem Wirbeltier beschrieben, das umfasst das Verabreichen an das Wirbeltier einer Menge von DNA, die ein geändertes RSV-G-Protein oder Polypeptid kodiert, und wirksam ist, um eine Immunantwort zu induzieren, gegebenenfalls zusammen mit einem die Transfektion fördernden Mittel, wobei das geänderte G-Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist, und wenn es in eine Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, Schutz verleiht, ohne bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV eine gesteigerte Erkrankung zu induzieren.

[0017] Es wird auch ein Verfahren beschrieben zum Immunisieren eines Wirbeltiers gegen RSV, das umfasst das Verabreichen an das Wirbeltier einer Zusammensetzung, die eine immunologisch wirksame Menge des geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV aufweist, das Immunogenität aufweist und das, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung zu induziert.

[0018] Es wird auch ein Verfahren zum Immunisieren eines Wirbeltiers gegen RSV beschrieben, das umfasst das Verabreichen an das Wirbeltier einer Zusammensetzung, die eine immunologisch wirksame Menge eines Nucleinsäure-Moleküls aufweist, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, wobei das geänderte G-Protein oder Polypeptid Immunogenität aufweist, und, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung induziert.

[0019] In einer Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung ferner eine immunologisch wirksame Menge des gesamten oder eines Teils von RSV-F-Protein oder eines Nucleinsäure-Moleküls, das eine immunologisch wirksame Menge des gesamten oder eines Teils von RSV-F-Protein kodiert. In einer anderen Ausführungsform ist das Wirbeltier ein RSV-seronegativer Mensch.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0020] Die [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) sind Diagramme, die die Kinetik der Leukozytenstimulation in BAL zeigen. BALB/c-Mäuse wurden entweder mit 1 µg G-Protein, mit Stimulon™ QS-21 (20 µg/Maus) als Adjuvans, nativem RSV A2 ($1-2 \times 10^6$ PFU) oder nachgeahmtem (mock) HEp-2-Zelllysat vakzinert. 2 Wochen nach der zweiten Vakzination wurde den Mäusen RSV verabreicht und danach 5 Repräsentanten jeder Vakzinierungsgruppe an den Tagen 3, 5, 7 und 10 getötet und BAL-Zellen isoliert. Die [Fig. 1A](#) zeigt die gesamte Leukozytenzählung, die mittels Trypan-Blau durchgeführt wurde. Die [Fig. 1B](#) zeigt den Anteil an Eosinophilen (%) in BAL, die unter Verwendung der Zellfärbung Diff-Quik bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind als mittlere Zahl von 5 Mäusen mit Fehlerabweichungsmarkierungen, die die Standardabweichung darstellen, angegeben.

[0021] Die [Fig. 2](#) ist eine Tabelle synthetischer Peptide (SEQ ID NOS: 1-31), die den überlappenden Regionen des G-Proteins von RSV entsprechen. Eine Serie von überlappenden Peptiden wurde von Genosys Biotechnologies, Inc. (The Woodlands, TX), synthetisiert. Die Peptide überspannen die Region von Aminosäure 48 (das dem zweiten Translations-Startkodon von G-Protein entspricht) bis Aminosäure 294 vom RSV-A2-G-Protein. Die Reinheit der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt. Lyophilisierte Peptide wurden in sterilem Wasser bis auf eine Konzentration von 2 mg/ml solubilisiert und bei -20°C gelagert.

[0022] Die [Fig. 3](#) ist ein Säulendiagramm, das die Stimulierung von G-Protein-geprägten Splenozyten von BALB/c-Mäusen mit von G-Protein abgeleiteten Peptiden zeigt. BALB/c-Mäuse wurden bei 0 bis 4 Wochen mit 1 µg G-Protein mit zugesetztem Stimulon™ QS-21 vakzinert. 2 Wochen nach der zweiten Vakzinierung wurden Splenozyten von 5 Mäusen isoliert, gesammelt und in Gegenwart von Antigen 4 Tage lang kultiviert. Jedes syn-

thetische Peptid wurde bei einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Natives G-Protein wurde bei Konzentrationen von 0,5 und 2,5 µg/ml zugegeben. Concanavalin A (ConA)-Stimulierung von Splenozyten ergab eine mittlere cpm von 94.746 ± 8005 . Als Kontrolle wurden auch Kulturen mit dem Medium allein (Med) oder CRM₁₉₇(CRM) stimuliert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (\pm SD) von drei Vertiefungen angegeben. Das Experiment ist für fünf unabhängige Experimente repräsentativ, von denen jedes qualitative ähnliche Ergebnisse zeigte.

[0023] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) sind Säulendiagramme, die eine Analyse von Peptid-induzierten Cytokinen (IFN- γ und IL-5) in Kulturüberständen zeigen. Splenozyten von BALB/c-Mäusen, die mit nativem G-Protein und Stimulon™ QS-21 vakziniert waren, wurden mit den Peptid-Antigenen, wie in der Beschreibung der [Fig. 3](#) beschrieben, kultiviert. Nach 4 Tagen Kultur wurde 100 µl des Überstandes aus drei Vertiefungen gesammelt und danach auf IFN- γ ([Fig. 4A](#)) und IL-5 ([Fig. 4B](#)) durch Antigen-Assay ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert OD₄₉₀ von zwei Cytokin-Analysen angegeben.

[0024] Die [Fig. 5](#) ist ein Säulendiagramm, das die spezifische Induktion von pulmonaler Eosinophilie in BALB/c-Mäusen durch Peptid 19 zeigt. Signifikante Differenzen (*) sind mit G-Protein oder 19-KLH vakzinierter Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen, die entweder PBS oder KLH erhielten, angegeben. Die Ergebnisse sind für drei Experimente, in denen ähnliche Ergebnisse erhalten wurden, repräsentativ.

[0025] [Fig. 6](#) ist ein Säulendiagramm, das die Identifizierung eines T-Zell-Epitops im Peptid 19 zeigt, das die eosinophile Antwort fördert. BALB/c-Mäuse (5 pro Gruppe) wurden intramuskulär nach 0 und 4 Wochen entweder mit 1 µg nativem gereinigtem RSV-G-Protein und 20 µg Stimulon™ QS-21, 250 µg Peptid 19-KLH, 250 µg Peptid 22-KLH, 250 µg Mutantenpeptid, 19-1-KLH oder 250 µg Mutantenpeptid 19-2-KLH vakziniert oder internasal mit einem Volumen von 50 µl lebendem RSV, das 10⁶ PFU enthielt. 2 Wochen nach der zweiten Vakzinierung wurde den Mäusen lebendes RSV verabreicht und die pulmonale Eosinophilie mittels Analyse von BAL 7 Tage danach quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (%) von Eosinophilen in BAL (\pm Standardabweichung) angegeben.

[0026] Die [Fig. 7](#) ist ein Säulendiagramm, das die proliferativen Antworten von menschlichem PBMC gegenüber von G-Protein abgeleiteten Peptiden zeigt. PBMC aus 6 von 43 Spendern, die Reaktivität auf RSV-G-Protein zeigten, wurden auf die Proliferation durch Kultur in Gegenwart der synthetischen Peptide 19 und 22 geprüft. Jedes Peptid wurde bei der Konzentration von 50 µl/ml zugegeben. Die PHA-Stimulierung von PBMC lag für alle Spender im Bereich von 22.945 bis 55.619 cpm. PBMC wurden auch in einem Medium allein kultiviert, und der Stimulierungsindex berechnet. Die Ergebnisse sind als aus drei Kulturen erhaltener mittlerer Stimulierungsindex angegeben.

[0027] Die [Fig. 8](#) ist eine Tabelle, die zeigt, dass CD4-T-Zellen die durch RSV-G-Protein und Peptid 19-KLH induzierte eosinophile Antwort vermitteln. BALB/c-Mäuse (5 pro Gruppe) wurden intramuskulär nach 0 und 4 Wochen mit entweder 1 µg gereinigtem natürlichem RSV-G-Protein in 20 µg Stimulon™ QS-21, 250 µg KLH, das 18 µg Peptid 19 mit Stimulon™ QS-21 als Adjuvans enthielt: intramuskulär vakziniert oder intranasal mit 50 µl lebender RSV, die 10⁶ PFU enthielt. Um T-Zellen-Subsets auszuschalten, wurden die angegebenen monoklonalen Antikörper (oder Ratten-Ig als Kontrolle) intraperitoneal 14 und 20 Tage nach der End-Immunsierung in Dosen von 750 µg bzw. 250 µg pro Maus verabreicht. Am Tag 21 nach Endvakzinierung wurde den Mäusen lebendes RSV verabreicht und 7 Tage danach die pulmonale Eosinophilie mittels Analyse von BAL quantifiziert. FACS-Analyse wurde von Anti-CD4- und Anti-CD8-fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwerte (%) von Eosinophilen in BAL (\pm Standardabweichung) angegeben, und die Werte (%) von CD4+- bis CD8+-Zellen als Funktion der gesamten Milzlymphozyten.

[0028] Signifikante Differenzen (**) sind im Vergleich zu ähnlich vakzinierten Kontrollmäusen, die Ratten-Ig erhielten, angegeben.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0029] RSV-G-Protein erhöht die Fähigkeit von F-Protein, BALB/c-Mäuse gegen einen Angriff zu schützen, wesentlich (Tabelle). Das legt den Einfluss von G-Protein einer Untereinheit-Vakzine (subunit vaccine) gegen RSV nahe. Das Primen auf pulmonale Eosinophilie durch G-Protein ist jedoch andauernd und beträchtlich, was es im allgemeinen für die Verwendung als Vakzine ungeeignet macht. Bei der Quantifizierung der Kinetik des Zuflusses weißer Blutzellen in BAL von vakzinierten Mäusen nach der Verabreichung ist es ersichtlich, dass das größte zelluläre Infiltrat ($1,42 \times 10^6$ Zellen) am Tag 7 in mit G-Protein vakzinierten Mäusen auftritt ([Fig. 1A](#)). Während des 10-tägigen Verlaufs wurden Eosinophile als Antwort auf die Vakzinierung mit G-Protein festge-

stellt, die am Tag 7 ein Maximum von 65% der gesamten weißen Blutzellen erreichen ([Fig. 1B](#)).

[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft die Synthese von von RSV-G-Protein abgeleiteten Proteinen und/oder Polypeptiden, die bei einer nachfolgenden RSV-Infektion nicht zu einer Stimulierung von pulmonaler Eosinophilie führen. Die hier beschriebenen Ausführungen sind spezifisch auf Zusammensetzungen und Verfahren zur Herstellung von Proteinen und/oder Polypeptiden gerichtet, die geänderte G-Proteine oder Polypeptide umfassen, die als Immunogene in Vakzine-Formulierungen, einschließlich polyvalenter Vakzine, verwendet werden können, und die für eine aktive Immunisierung verwendet werden können. Die Strategie umfasst die Veränderung einer oder mehrerer Aminosäuren in einer spezifischen Region der G-Protein-Sequenz, was zu einem von RSV-G-Protein abgeleiteten Protein oder Polypeptid führt, das immunogen ist, ohne als Primer für eine atypische Lungenentzündung (z.B. pulmonale Eosinophilie) oder eine andere Form einer gesteigerten RSV-Erkrankung zu wirken.

[0031] Das Wild-Typ-(native)-Nucleotid und die Aminosäure-Sequenzen des RSV-G-Proteins sind bekannt (Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4075–4079 (1985); Satake et al., Nucl. Acids. Res. 13(21), 7795–7810 (1985)). Der hier verwendete Ausdruck "Veränderung" und ihre Derivate sollen eine Aminosäure-Sequenz bedeuten, die von der Wild-Typ-Sequenz verschieden ist, sowie eine Nucleotid-Sequenz, die eine Aminosäure-Sequenz kodiert, die von der Wild-Typ-Aminosäure-Sequenz verschieden ist. Veränderungen umfassen Insertion, Deletion und/oder Substitution eines oder mehrerer Nucleotide oder Aminosäuren.

[0032] Die Veränderung kann z.B. die Insertion oder Deletion eines einzelnen Nucleotids oder von mehr als einem Nucleotid sein, was zu einer Frameshift-Mutation führt; die Veränderung von mindestens einem Nucleotid, die zu einer Veränderung von einer oder mehreren kodierten Aminosäuren führt; die Veränderung von mindestens einem Nucleotid, die zur Bildung eines frühzeitigen Stoppkodons führt; die Deletion einiger Nucleotide, die zu einer Deletion einer oder mehrerer von den Nucleotiden kodierten Aminosäuren führt; die Insertion eines oder mehrerer Nucleotide, die zu einer Unterbrechung der Kodiersequenz des Gens führt; die Duplikation des gesamten oder eines Teils des Gens; die Transposition des gesamten oder eines Teils des Gens; oder die Umordnung des gesamten oder eines Teils des Gens. In einem einzelnen Gen kann mehr als eine solche Mutation vorhanden sein. Solche Sequenzveränderungen verursachen eine Veränderung in dem durch das Gen kodierten G-Protein. Wenn die Veränderung eine Frameshift-Mutation ist, kann die Frameshift z.B. zu einer Veränderung der kodierten Aminosäuren führen, und/oder kann zur Bildung eines frühzeitigen Stoppkodons führen, was zur Bildung eines verkürzten Proteins führt.

[0033] Die Veränderung(en) kann (können) z.B. vorzugsweise die dreidimensionale Konfiguration des nativen G-Proteins erhalten. Darüber hinaus können Aminosäuren, die für die Funktion des G-Proteins essentiell sind, insbesondere für die Immunogenität, durch auf diesem Gebiet bekannte Methoden identifiziert werden. Besonders brauchbare Methoden umfassen die Identifizierung konservierter Aminosäuren, die Site-directed-Mutagenese und Alanin-Scanning-Mutagenese (vergleiche z.B.: Cunningham und Wells, Science 244:1081–1085 ((989)), die Kristallisation und die kernmagnetische Resonanz. Die durch diese Methoden gebildeten geänderten Polypeptide können auf besondere biologische Aktivitäten getestet werden, einschließlich der Immunogenität, Verringerung der pulmonalen Eosinophilie und Antigenizität.

[0034] Spezifischerweise können geeignete Aminosäure-Veränderungen auf der Basis mehrerer Kriterien gemacht werden, einschließlich Hydrophobizität, basischem oder saurem Charakter, Ladung, Polarität, Größe, Gegenwart oder Abwesenheit einer funktionellen Gruppe (z.B. -SH oder eine Glykosylierungsstelle), und eines aromatischen Charakters. Die Zuordnung verschiedener Aminosäuren zu ähnlichen Gruppen auf der Basis der obigen Eigenschaften ist für einen Fachmann auf diesem Gebiet leicht ersichtlich; andere geeignete Aminosäure-Veränderungen können auch gefunden werden bei Bowie et al. (Science 247:1306–1310 (1990)). Im Hinblick auf die Region der Aminosäure 184 bis 198 kann die Veränderung die Form einer konservativen (z.B. Glycin für Alanin; Valin für Isoleucin; Asparagin für Glutamin) Site-directed-Mutation der Region 184 bis 198 (Aminosäure-Sequenz AICKRIPNKKPGKKT; SEQ ID NO: 19) annehmen, die Eigenschaften der Region des G-Proteins, die mit schützenden Immunantworten verbunden sind, erhält, aber Epitope, die mit der Stimulierung von pulmonaler Eosinophilie verbunden sind, löscht oder modifiziert (d.h., ein biologisches Äquivalent). Die Veränderung kann auch die Form nicht-konservativer Mutationen (z.B. Lysin für Threonin; Alanin für Prolin) annehmen, worin die schädliche Stimulierung von Eosinophilie verringert oder aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die Form einer vollständigen Deletion der Region 184 bis 198 oder eines Teils davon annehmen, mit einer fortgesetzten Verwendung der verbleibenden von RSV-G-Protein abgeleiteten Einheit. Die Deletionen können durch Linker-Regionen ersetzt werden, die den Raumbedarf des verbleibenden G-Proteins oder Polypeptids für eine optimale Translation und/oder Immunogenität erhalten. Veränderungen können mit irgendeinem Standard-Mutagen oder mutagenen Verfahren durchgeführt werden, wie z.B. Site-directed-Muta-

tion mit Phagen (z.B. M13), oder unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Technik mit synthetischen Oligonucleotiden.

[0035] Die Erfindung betrifft deshalb eine Nucleotid-Sequenz, die ein verändertes G-Protein von RSV kodiert, oder einen Teil davon, worin das geänderte G-Protein oder ein Teil davon Immunogenität beibehält. Der hier verwendete Ausdruck "geändertes G-Protein" ("altered G-protein") soll ein G-Protein (oder einen Teil davon) von RSV bezeichnen, der Immunogenität beibehält und der, wenn er in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, keine gesteigerte Erkrankung (z.B. atypische Lungenentzündung, wie z.B. pulmonale Eosinophilie) bei nachfolgender Infektion mit RSV induziert. Das geänderte G-Protein umfasst eine Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198.

[0036] Obwohl die Erfindung spezifisch unter Bezugnahme auf die Region des RSV-G-Proteins, die die Aminosäure 184 bis 198 umfasst, beschrieben wird, soll es bedeuten, dass die hier zur Identifizierung der 184- bis 198-Region beschriebenen Methoden auf zusätzliche Regionen des Wild-Typ-G-Proteins angewandt werden können, um zusätzliche Regionen auf eine Veränderung zu untersuchen. Die Regionen flussaufwärts (in Richtung des Amino-Endes) und flussabwärts (in Richtung des Carboxy-Endes) der untersuchten Aminosäure-Region (48 bis 294) kann z.B. auf zusätzliche Domänen analysiert werden, in denen eine Veränderung günstige Effekte ausbildet. Alternativ kann die Region von Aminosäuren von 48 bis 294 wieder mit Peptiden analysiert werden, die verschiedene Überlappungen aufweisen, um andere Domänen zu identifizieren, in denen eine Veränderung nützlich wäre.

[0037] Geeignete Nucleinsäure-Moleküle der vorliegenden Erfindung können z.B. sein RNA, mRNA oder DNA, wie z.B. cDNA und genomische DNA. DNA-Moleküle können doppelsträngig oder einzelsträngig sein; einzelsträngige RNA oder DNA kann z.B. der kodierende oder Sense-Strang oder der nicht-kodierende oder Antisense-Strang sein. Vorzugsweise weist das Nucleinsäure-Molekül mindestens 14 Nucleotide, insbesondere mindestens ca. 50 Nucleotide auf und in erster Linie mindestens ca. 200 Nucleotide auf. Die Nucleotid-Sequenz kann nur die sein, die mindestens ein Fragment der Aminosäure-Sequenz des geänderten G-Proteins kodiert; alternativ kann die Nucleotid-Sequenz mindestens ein Fragment der geänderten G-Protein-Aminosäure-Kodierfrequenz zusammen mit zusätzlichen nicht-kodierenden Sequenzen, wie z.B. Introns, und nicht-kodierende 3'- und 5'-Sequenzen (z.B. einschließlich regulatorischer Sequenzen) sein. Zusätzlich kann die Nucleotid-Sequenz mit einer Marker-Sequenz verbunden sein, z.B. einer Sequenz, die ein Polypeptid, das bei der Isolierung oder Reinigung des Polypeptids hilft, kodiert. Solche Sequenzen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, solche, die ein Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein kodieren, und solche, die einen Hemmagglutinin-A-(HA)-Peptid-Marker von Grippe kodieren.

[0038] Der Ausdruck "Nucleotid-Sequenz" kann eine Nucleotid-Sequenz umfassen, die chemisch oder mittels rekombinanter Techniken synthetisiert wird. Eine in einem Vektor enthaltene rekombinante DNA wird somit erfindungsgemäß umfasst. Nucleotid-Sequenzen umfassen außerdem rekombinante DNA-Moleküle in heterologen Wirtszellen sowie teilweise oder im wesentlichen gereinigte DNA-Moleküle in Lösung. In-vivo- und in-vitro-RNA-Transkripte der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle werden durch die erfindungsgemäßen Nucleotid-Sequenzen ebenfalls umfasst. Solche Nucleotid-Sequenzen sind z.B. bei der Herstellung des kodierten geänderten G-Proteins geeignet.

[0039] Die Erfindung umfasst auch Variationen der erfindungsgemäßen Nucleotid-Sequenzen, wie z.B. solche, die Teile, Analoge oder Derivate des geänderten G-Proteins kodieren, unter der Voraussetzung, dass der Teil, das Analog oder das Derivat das geänderte G-Protein umfasst. Solche Variationen können natürlich auftretende Variationen in dem unveränderten Teil der Nucleotid-Sequenz sein, wie z.B. im Falle der allelen Variation oder nicht-natürlich auftretende, wie z.B. die, die durch verschiedene mutagene und mutagene Verfahren induziert werden. Infrage kommende Variationen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die Addition, Deletion und Substitution eines oder mehrerer Nucleotide, die zu konservativen oder nicht-konservativen Aminosäure-Veränderungen führen können, einschließlich von Additionen und Deletionen.

[0040] Die hier angegebene Beschreibung bezieht sich auch auf Fragmente der vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle. Der Ausdruck "Fragment" soll einen Teil einer hier beschriebenen Nucleotid-Sequenz umfassen, mit einer Länge von mindestens 14 zusammenhängenden Nucleotiden bis mindestens ca. 50 zusammenhängenden Nucleotiden oder länger, vorausgesetzt, dass solche Fragmente ein geändertes G-Polypeptid kodieren; solche Fragmente sind als Primer geeignet. Besonders bevorzugte Primer und Sonden hybridisieren selektiv mit dem das hier beschriebene geänderte G-Protein kodierenden Nucleinsäure-Molekül. Zum Beispiel sind Fragmente, die antigene Teile des hier beschriebenen geänderten G-Proteins kodieren, brauchbar.

[0041] Die Beschreibung bezieht sich auch auf Nucleotid-Sequenzen, die unter mittleren, und insbesondere sehr scharfen Hybridisierungsbedingungen (z.B. für eine selektive Hybridisierung) mit einer hier beschriebenen Nucleotid-Sequenz hybridisieren. Geeignete scharfe Bedingungen sind für einen Fachmann auf diesem Gebiet bekannt oder können in Standardbüchern, wie z.B. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 gefunden werden.

[0042] Die Beschreibung bezieht sich deshalb auch auf Nucleotid-Sequenzen, die eine wesentliche Identität mit den hier beschriebenen geänderten Nucleotid-Sequenzen aufweisen; besonders bevorzugt sind Nucleotid-Sequenzen, die mindestens ca. 90%, und insbesondere mindestens ca. 95%, Identität mit den hier beschriebenen Nucleotid-Sequenzen aufweisen. In diesem Fall sind besonders bevorzugt Nucleotid-Sequenzen, die Polypeptide kodieren, die im wesentlichen eine gleiche immunogene Aktivität wie das hier beschriebene geänderte G-Protein aufweisen.

[0043] Die Erfindung betrifft auch ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV. Das geänderte G-Protein oder Polypeptid ist ein G-Protein (oder Teil davon) von RSV, das Immunogenität beibehält und das, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, keine verstärkte Erkrankung (z.B. atypische Lungenentzündung) bei der nachfolgenden Infektion mit RSV induziert. Das geänderte G-Protein umfasst mindestens eine Veränderung in der Region von Aminosäure 184 bis Aminosäure 198. Das erfindungsgemäße geänderte G-Protein kann teilweise oder im wesentlichen gereinigt sein (z.B. auf Homogenität gereinigt) und/oder ist mit wesentlichen frei von anderen Proteinen.

[0044] Das geänderte G-Protein oder Polypeptid kann auch ein Fusionsprotein sein, das die gesamte oder einen Teil der geänderten G-Protein-Aminosäure-Sequenz, an eine zusätzliche Komponente gebunden, umfasst. Zusätzliche Komponenten, wie z.B. Radioisotope und antigene Marker, können ausgewählt werden, um die Isolierung oder Reinigung des Polypeptids zu unterstützen, oder um die Halbwertszeit des Polypeptids zu verlängern; z.B. würde ein Hexahistidin-Marker eine leichte Reinigung durch Nickelchromatographie ermöglichen. Alternativ kann das G-Protein oder Polypeptid ein Fusionsprotein sein, das die gesamte oder einen Teil der geänderten G-Protein-Aminosäure-Sequenz, an die gesamte oder einen Teil der RSV-F-Protein-Aminosäure-Sequenz gebunden, umfasst (Collies et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81:7683–7687 (1984); US-Patent Nr. 5 639 853; US-Patent Nr. 5 723 130).

[0045] Die Erfindung umfasst auch geänderte G-Proteine und Polypeptide, die zusätzlich Aminosäure-Veränderungen aufweisen, die über die Veränderungen, die zur Verhinderung der Bildung einer verstärkten Erkrankung in einem Wirbeltier, dem das geänderte Protein oder Polypeptid verabreicht wird, notwendig sind, hinausgehen. Zum Beispiel sind Aminosäure-Veränderungen, z.B. konservative Aminosäure-Veränderungen, die aus der Verabreichung des geänderten Proteins resultierenden Erkrankungserscheinungen nicht stark beeinflussen, umfasst. Erfindungsgemäß ebenfalls umfasst sind Polypeptide, die mindestens ca. 40% identisch mit dem hier beschriebenen geänderten G-Protein oder Polypeptid sind. Es sind jedoch auch Polypeptide, die einen geringeren Identitätsgrad zeigen, geeignet, insbesondere wenn sie eine hohe, z.B. mindestens ca. 40%ige Identität gegenüber einer oder mehreren bestimmten Domänen des Proteins zeigen. Geänderte Polypeptide, die hohe Identitätsgrade mit Domänen zeigen, die für bestimmte Aktivitäten notwendig sind, einschließlich einer immunogenen Funktion und Rezeptor-Bindungsaktivität, sind z.B. umfasst. Hier beschriebene Polypeptide können chemisch synthetisiert oder rekombinant hergestellt werden. Um den Identitätsgrad (in Prozent) von zwei Polypeptid-Sequenzen zu bestimmen, werden die Sequenzen zum Zwecke eines optimalen Vergleichs angeordnet (z.B. können Lücken in die Sequenz einer ersten Aminosäure-Sequenz eingeführt werden). Die Aminosäure-Reste an entsprechenden Aminosäure-Positionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in der ersten Sequenz durch den gleichen Aminosäure-Rest wie die entsprechende Position in der zweiten Sequenz eingenommen wird, dann sind die Moleküle an dieser Position identisch. Der Identitätsgrad (in Prozent) zwischen den zwei Aminosäure-Sequenzen ist eine Funktion der Zahl der identischen Positionen, die von den sequenzen geteilt werden (d.h., % Identität = # der identischen Positionen/gesamte # der Positionen × 100).

[0046] Die Bestimmung der Identität (Prozent) zwischen zwei Sequenzen kann unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus erzielt werden. Ein bevorzugtes nicht-einschränkendes Beispiel eines für den Vergleich von zwei Sequenzen verwendeten mathematischen Algorithmus ist der Algorithmus von Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873–5877 (1993). Ein solcher Algorithmus wird in das NBLAST- und XBLAST-Programm, Punktbewertung = 50, Wortlänge = 3, um Aminosäure-Sequenzen mit der zu den erfindungsgemäßen Polypeptid- oder Proteinmolekülen gewünschten Identität zu erhalten. Um mit Lücken versehene Anordnungen für Vergleichszwecke zu erhalten, kann Gapped BLAST verwendet werden, beschrieben in Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997). Wenn BLAST- und Gapped BLAST-Programme verwendet werden, können die Standardparameter der entsprechenden Programme (z.B. XBLAST und

NBLAST) verwendet werden. Siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Ein anderes bevorzugtes nichtbeschränkendes Beispiel eines zum Vergleich von Sequenzen verwendeten mathematischen Algorithmus ist der Algorithmus von Myers et al., CABIOS (1989). Ein solcher Algorithmus wird in das ALIGN-Programm (Version 2.0), das Teil des GCG-Sequenz-Anordnungs-Software-Pakets ist, eingearbeitet. Wenn das ALIGN-Programm zum Vergleich von Aminosäure-Sequenzen verwendet wird, können eine PAM 120-Gewichtsrest-Tabelle, eine Lückenlängen-Penalty von 12 und eine Lücken-Penalty von 4 verwendet werden. Die Identität (Prozent) zwischen zwei Sequenzen kann unter Verwendung von Verfahren bestimmt werden, die denen der vorstehend beschriebenen ähnlich sind, mit oder ohne Lücken. Bei der Berechnung der Identität (Prozent) werden nur exakte Übereinstimmungen gezählt.

[0047] Erfindungsgemäß werden Expressionsvektoren bereitgestellt, z.B. Nucleinsäure-Konstruktionen, die eine Nucleinsäure-Sequenz enthalten, die ein geändertes G-Protein oder Polypeptid kodiert, operativ an mindestens eine regulatorische Sequenz gebunden. Viele solcher Vektoren sind im Handel erhältlich, und andere geeignete Vektoren können leicht von einem Fachmann auf diesem Gebiet hergestellt werden. "Operativ gebunden" soll bedeuten, dass die Nucleotid-Sequenz an eine regulatorische Sequenz auf eine Weise gebunden ist, die eine Expression der Nucleinsäure-Sequenz ermöglicht; dieser Ausdruck soll eine direkte physikalische Bindung und eine Bindung mittels eines Linkers oder einer intervenierenden Sequenz umfassen. Regulatorische Sequenzen sind bekannt und werden ausgewählt, um ein Polypeptid herzustellen, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid ist. Der Ausdruck "regulatorische Sequenz" umfasst deshalb Promoter-Enhancer und andere Expressionskontrollelemente, die beschrieben sind in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Die nativen regulatorischen Sequenzen oder regulatorischen Sequenzen, die zur transformierten Wirtszelle nativ sind, können z.B. verwendet werden. Es sollte verständlich sein, dass das Design des Expressionsvektors von solchen Faktoren abhängen kann, wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle und/oder der Art des Proteins, dessen Expression gewünscht wird.

[0048] Die geänderten G-Proteine und Polypeptide der vorliegenden Erfindung können z.B. hergestellt werden durch Ligation des Nucleinsäuremoleküls oder eines Teils davon in einen Vektor, der zur Expression in prokaryotischen Zellen, eukaryotischen Zellen oder beiden geeignet ist (siehe z.B. Broach et al., *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Hg. M. Inouye (Academic Press, 1983), S. 83; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Hg. Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), Kapitel 16 und 17). Typischerweise enthalten Expressionskonstruktionen einen oder mehrere selektierbare Marker, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, des Gens, das Dihydrofolat-Reduktase kodiert, und der Gene, die Resistenz gegenüber Neomycin, Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Streptomycin verleihen.

[0049] Die Expressionskonstruktion kann eine regulatorische Sequenz, operativ an ein Nucleinsäuremolekül gebunden, enthalten, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid kodiert, gegebenenfalls entweder direkt oder mittels eines Polynucleotid-Linkers, an ein Nucleinsäuremolekül gebunden, das das gesamte oder einen Teil des RSV-F-Proteins kodiert. Die Expression einer solchen Expressionskonstruktion ergibt ein Chimäres, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid und das gesamte oder einen Teil eines F-Proteins oder Polypeptids umfasst; wenn ein Polynucleotid-Linker in der Konstruktion verwendet wird, werden die F- und geänderten G-Polypeptide durch eine oder mehrere Aminosäuren gebunden sein. Allgemeine Verfahren zur Herstellung und Expression von F-/G-Chimären werden z.B. beschrieben im US-Patent Nr. 5 194 594 (Wathen), deren Lehren durch Bezugnahme darauf Bestandteil dieser Beschreibung sind.

[0050] Mit den beschriebenen Vektoren transfektierte prokaryotische und eukaryotische Wirtszellen werden ebenfalls erfindungsgemäß bereitgestellt. Zellen, die mit den erfindungsgemäßen Vektoren transfektiert sein können, umfassen z.B. ohne darauf beschränkt zu sein, Bakterienzellen, wie z.B. *E. coli* (z.B. *E. coli*-K12-Stämme), *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Serratia marcescens* und *Salmonella typhimurium*, Insektzellen (*Baculovirus*), einschließlich *Drosophila*, Pilzzellen, wie z.B. Hefezellen, Pflanzenzellen und Säugetierzellen, wie z.B. Thymozyten, Chinese Hamster ovary cells (CHO), HEp-2-Zellen, Vero-Zellen und COS-Zellen.

[0051] Eine Nucleotid-Sequenz, die das hier beschriebene geänderte G-Protein oder Polypeptid kodiert, kann somit verwendet werden, um eine rekombinante Form des Proteins via mikrobieller oder eukaryotischer Zellverfahren herzustellen. Die Ligation der Polynucleotid-Sequenz in eine Gen-Konstruktion, wie z.B. einen Expressionsvektor, und die Transformation oder Transfektion in Wirtszellen, entweder eukaryotische (Hefe, Vögel, Insekten, Pflanzen oder Säuger) oder prokaryotische (bakterielle Zellen), sind Standardverfahren, die zur Herstellung anderer allgemein bekannter Proteine verwendet werden. Virale Vektoren umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Adenoviren und Venezuelanischer Pferde-Enzephalitis-Vektor (venezuelan equine encephalitis vector). Zusätzlich wurde Vaccinia-Virus (VV) verwendet, um verschiedene Proteine von RSV in Säu-

getier-Zelllinien zu exprimieren oder an die Tiermodelle abzugeben (Olmstead et al., PNAS 83:7462–7466 (1986); Wertz et al., J. Virol. 63:4767–4776 (1989)). Auf gleiche Weise können ähnliche Konstruktionen mit der geänderten cDNA für RSV-Protein, in das Thymidinkinase-Gen von VV inseriert, verwendet werden, um das geänderte G-Protein oder Polypeptid zu synthetisieren. Zum Beispiel können die von Ball et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:246–250 (1986)) oder Olmstead et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7462–7466 (1986)) detailliert beschriebenen Methoden verwendet werden, um das geänderte G-Protein oder das F-Protein/geändertes G-Protein-Chimäre von Vaccinia-Virus-Vektoren zu exprimieren. Ähnliche Verfahren oder Modifikationen davon können verwendet werden, um erfindungsgemäße rekombinante Proteine auf mikrobiellem Weg oder durch Gewebekultur-Technologie herzustellen. Die Erfindung betrifft deshalb auch die Herstellung von geänderten G-Proteinen oder Polypeptiden durch rekombinante Technologien.

[0052] Zusätzlich zu den vorstehend genannten Wirtszell-Systemen, in denen die geänderten G-Proteine oder Polypeptide der vorliegenden Erfindung in vitro hergestellt werden, sind eine Vielzahl von Systemen zur Expression und Bereitstellung solcher geänderter G-Proteine und Polypeptide in vivo geeignet. Diese Systeme verwenden attenuierte Pathogene, wie z.B. Bakterien oder Viren, als Verabreichungsmittel. Diese lebenden attenuierten Pathogene haben als heterologisches Nucleinsäure-Segment darin eingeführt die Nucleinsäure-Sequenz, die die gewünschten geänderten G-Proteine oder Polypeptide der vorliegenden Erfindung kodieren. Unter Verwendung dieser Systeme werden die gewünschten geänderten G-Proteine oder Polypeptide durch ein lebendes attenuiertes Bakterium oder einen Virus innerhalb des Körpers eines Wirbeltiers exprimiert.

[0053] Beispiele für solche lebenden attenuierten Pathogene umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die lebenden attenuierten Bakterien, wie z.B. Salmonella, die im US-Patent Nr. 4 837 151 beschrieben sind, die insbesondere für eine orale Verabreichung geeignet sind, und den lebenden attenuierten venezuelanischen Pferde-Enzephalitis-Virus (Venezuelan Equine Encephalitis virus), beschrieben im US-Patent Nr. 5 643 576, der besonders für eine intranasale Verabreichung oder Verabreichung durch Inhalation geeignet ist. Die erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können aus rekombinanten Zellkulturen durch eine Vielzahl von Verfahren isoliert oder gereinigt werden (z.B. zur Homogenität). Diese umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Anionen- oder Kationen-Austauschchromatographie, Ethanol-fällung, Affinitätschromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die bestimmte verwendete Methode wird von den Eigenschaften des Polypeptids unter Auswahl der Wirtszelle abhängen; geeignete Methoden sind für einen Fachmann auf diesem Gebiet leicht festzustellen.

[0054] Es werden auch Antikörper beschrieben, die mit einem geänderten G-Protein oder Polypeptid binden. Zum Beispiel werden beschrieben polyklonale und monoklonale Antikörper, einschließlich nicht-menschlicher und menschlicher Antikörper, humanisierter Antikörper, chimärer Antikörper und Antigen-bindenden Fragmenten davon (Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y. (1994); EP-Anmeldung 173 494 (Morrison); Internationale Patentanmeldung WO 86/01533 (Neuberger) und US-Patent Nr. 5 225 539 (Winters), die an das beschriebene geänderte G-Protein binden. Ein Säuger, wie z.B. eine Maus, eine Ratte, ein Hamster oder ein Kaninchen, können mit einer immunogenen Form des geänderten G-Proteins oder Polypeptids immunisiert werden. Methoden zur Verleihung der Immunogenität an ein Protein oder Peptid umfassen die Konjugation mit Trägern oder andere auf diesem Gebiet allgemein bekannte Verfahren. Das Protein oder Polypeptid kann in Gegenwart eines Adjuvans verabreicht werden. Der Ablauf der Immunisierung kann durch Bestimmen von Antikörper-Titern im Plasma oder Serum verfolgt werden. Mit dem Immunogen als Antigen können Standard-ELISA-Verfahren oder andere Immunoassays verwendet werden, um den Antikörper-Gehalt zu bestimmen.

[0055] Nach der Immunisierung können Anti-Peptid-Antiseren erhalten werden, und, wenn erwünscht, können aus dem Serum polyklonale Antikörper isoliert werden. Monoklonale Antikörper können mittels Standard-Techniken, die allgemein bekannt sind, ebenfalls gebildet werden (Kohler und Milstein, Nature 256:495–97 (1975); Kozbar et al., Immunology Today 4:72 (1983); Therapy, Alan R. Liss, Inc., S. 77–96 (1985)). Der Ausdruck "Antikörper", wie er hier verwendet wird, umfasst auch Fragmente davon, wie Fab und F(ab)₂. Die beschriebenen Antikörper können verwendet werden, um die Aktivität des hier beschriebenen geänderten G-Proteins zu inhibieren, insbesondere in vitro und in Zellextrakten, unter Verwendung allgemein bekannter Methoden. Der hier verwendete Ausdruck "Inhibierung" soll irgendeine Verringerung in der Quantität oder Qualität bedeuten, einschließlich einer vollständigen Abwesenheit. Zusätzlich können solche Antikörper in Verbindung mit einem Marker, wie z.B. einer radioaktiven Markierung, verwendet werden, um auf die Gegenwart des exprimierten Proteins in einer Zelle aus z.B. einer Gewebeprobe oder Zellkultur zu prüfen, und können in einem Immunoabsorptionsverfahren, wie z.B. ELISA, verwendet werden, um das geänderte G-Protein oder Polypeptid zu isolieren. Gewebeproben, die untersucht werden können, umfassen menschliche Gewebe, wie z.B. differenzierte und nicht differenzierte Zellen. Beispiele umfassen Lunge-Knochenmark, Thy-

mus, Niere, Leber, Gehirn, Pankreas, Fibroblasten und Epithel.

[0056] Die vorliegende Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die hier beschriebene geänderte G-Proteine und Polypeptide umfassen. Ein erfindungsgemäßes geändertes G-Polypeptid oder Protein oder eine Prodrug davon können z.B. mit einem physiologisch annehmbaren Medium formuliert werden, um eine pharmazeutische Zusammensetzung (z.B. eine immunogene Zusammensetzung) herzustellen. Das besondere physiologische Medium kann, ohne darauf beschränkt zu sein, umfassen Wasser, gepufferte Salzlösung, Polyole (z.B. Glycerin, Propylenglykol, flüssiges Polyethylenglykol) und Dextroselösungen. Die optimale Konzentration des aktiven Bestandteils (der aktiven Bestandteile) in dem ausgewählten Medium kann nach allgemein bekannten Methoden bestimmt werden und hängt von der gewünschten pharmazeutischen Formulierung ab. Methoden zur Einführung exogener Peptide an der Stelle der Behandlung umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, intradermale, intramuskuläre, intraperitoneale, intravenöse, subkutane, orale und intranasale Methoden. Andere geeignete Methoden der Einführung können auch umfassen eine Gentherapie, wiederbefüllbare oder biologisch abbaubare Vorrichtungen, Aerosole und Polymere zur langsamen Freisetzung. Das geänderte G-Protein kann zusammen mit zusätzlichen Immunogenen, einschließlich des gesamten oder eines Teils von RSV-F-Protein, verabreicht werden; das geänderte G-Protein oder Polypeptid kann mit dem zusätzlichen Immunogen getrennt, darauf folgend oder gleichzeitig verabreicht werden. Das geänderte G-Protein oder Polypeptid kann z.B. in einer Mischung mit dem gesamten oder einem Teil des RSV-F-Proteins verabreicht werden.

[0057] Das geänderte G-Protein oder Polypeptid (oder eine Mischung, ein Fusionsprotein oder ein Chimäres davon) kann als Antigen verwendet werden, um in einem Wirbeltier, z.B. einem Säuger, eine Immunantwort auf das Antigen hervorzurufen. Das Antigen kann z.B. das gesamte oder ein immunogener Teil des geänderten G-Proteins oder ein Chimäres des geänderten G-Proteins oder Polypeptids und des gesamten oder eines immunogenen Teils des RSV-F-Proteins sein. Die hier gegebenen Beschreibungen, die sich auf Zusammensetzungen beziehen, die ein geändertes G-Protein oder Polypeptid umfassen, schließen auch Zusammensetzungen ein, die ein geändertes G-Protein oder Polypeptid zusammen mit dem gesamten oder einem Teil des RSV-F-Proteins aufweisen.

[0058] Die Methode umfasst das Verabreichen einer immunologisch wirksamen Dosis einer Vakzine-Zusammensetzung, die eine Mischung eines geänderten G-Proteins oder Polypeptids und irgendein geeignetes Adjuvans umfasst, an ein Wirbeltier. Der hier verwendete Ausdruck "Adjuvans" soll irgendein Agens bezeichnen, das die Immunantwort gegenüber dem Vakzine-Antigen verstärken oder modifizieren kann. Der hier verwendete Ausdruck "immunologisch wirksame" Dosis der Vakzine-Zusammensetzung ist eine Dosis, die dazu geeignet ist, eine Immunantwort hervorzurufen. Die besondere Dosis wird vom Alter, Gewicht und medizinischem Zustand des zu behandelnden Wirbeltieres abhängen, sowie von dem Verabreichungsweg. Geeignete Dosen können von einem Fachmann auf diesem Gebiet leicht bestimmt werden. Die Vakzine-Zusammensetzung kann gegebenenfalls in einem pharmazeutisch oder physiologisch annehmbaren Träger verabreicht werden, wie z.B. physiologischer Kochsalzlösung oder Ethanol, Polyolen, wie z.B. Glycerin oder Propylenglykol.

[0059] Geeignete Adjuvantien umfassen pflanzliche Öle oder Emulsionen davon, oberflächenaktive Substanzen, z.B. Hexadecylamin, Octadecylaminosäureester, Octadecylamin, Lysolecithin, Dimethyldioctadecylammoniumbromid, N,N-Dioctadecyl-N'-N'-bis-(2-hydroxyethylpropandi-amin), Methoxyhexadecylglycerin und Pluronic-Polyole; Polyamine, wie z.B. Pyran, Dextransulfat, Poly IC, Carbopol; Peptide, z.B. Muramyl-dipeptid, Dimethylglycin, Tuftsin; immunstimulierende Komplexe; Ölemulsionen; Mineralgele; Aluminiumverbindungen, wie z.B. Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat; MPL™ (3-O-deacyliertes Monophosphoryllipid A. RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT); detoxifizierte Mutanten von Cholera-toxin und E. coli-hitze-labilem Toxin (E. coli heat labile toxin); nackte DNA CpG-Strukturen; und Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA). Das erfindungsgemäße geänderte G-Protein oder Polypeptid kann auch in Liposome oder ISCOMS (immunosimulierende Komplexe) eingebaut werden, und ergänzende aktive Bestandteile können ebenfalls verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Antigene können auch in Kombination mit Lymphokinen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IFN- γ und GM-CSF, verabreicht werden.

[0060] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Vakzine können einem Menschen oder Tier auf eine Vielzahl von Wegen verabreicht werden, einschließlich parenteraler, intraarterieller, intradermaler, transdermaler (z.B. unter Verwendung eines Polymers zur langsamen Freisetzung), intramuskulärer, intraperitonealer, intravenöser, subkutaner, oraler und intranasaler Verabreichungswege. Die in solchen Vakzinen verwendete Menge an geändertem G-Protein wird abhängig vom Verabreichungsweg und den physikalischen Eigenschaften des Wirbeltiers variieren. Die Einstellung und Handhabung der mit traditionellen Träger-Antigenen zur

Adaption an die vorliegende Vakzine verwendeten festgesetzten Dosisbereiche liegt im Bereich der Fähigkeit eines Durchschnittsfachmanns. Die erfindungsgemäßen Vakzinen werden zur Behandlung nicht erwachsener und erwachsener Wirbeltiere, und insbesondere Menschen, verwendet.

[0061] Das erfindungsgemäße geänderte G-Protein oder Polypeptid kann mit einem Träger-Molekül gekoppelt werden, um die Immunantwort zu modulieren oder zu verstärken. Geeignete Träger-Proteine umfassen bakterielle Toxine, die zur Verabreichung an Wirbeltiere sicher und als Träger immunologisch wirksam sind. Beispiele umfassen Keuchhusten-, Diphtherie- und Tetanus-Toxoide und nicht-toxische Mutantenproteine (kreuzreagierende Materialien (CRM)), wie z.B. die nicht-toxische Variante von Diphtherie-Toxoid CRM₁₉₇. Fragmente der nativen Toxine oder Toxoide, die mindestens ein T-Zellen-Epitop enthalten, sind ebenfalls als Träger für Antigene brauchbar. Methoden zur Herstellung von Konjugaten von Antigenen und Träger-Molekülen sind allgemein bekannt und können z.B. gefunden werden in Wong, *Chemistry of Protein Conjugation* (CRC Press Inc., Ann Arbor, MI (1991)); Bernatowicz und Matsuida, *Analytical Biochemistry* 155:95–102 (1986); Frisch et al., *Bioconjugate Chem.* 7:180–186 (1996); und Boeckler et al., *J. Immunological Methods* 191:1–10 (1996).

[0062] Wenn die gesamte Peptid-19-Region (Aminosäuren 184 bis 198) fehlt, können zusätzlich ein oder mehrere Epitope aus einem Antigen von einem anderen Organismus, einschließlich des Parainfluenza-Virus Typ 3, aber nicht darauf beschränkt, in die gelöschte Region eingefügt werden, um eine bivalente Vakzine auszubilden.

[0063] Die Erfindung betrifft auch eine Vakzine, die ein Nucleinsäure-Molekül, das ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, umfasst, wobei das geänderte G-Protein oder Polypeptid die Immunogenität beibehält, und, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, einen Schutz ergibt; ohne eine verstärkte Erkrankung bei nachfolgender Infektion des Wirbeltiers mit RSV zu induzieren, und einen physiologisch annehmbaren Träger. Eine solche Vakzine wird hier als Nucleinsäure-Vakzine oder DNA-Vakzine bezeichnet und ist für die genetische Immunisierung von Wirbeltieren nützlich.

[0064] Der Ausdruck "genetische Immunisierung", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die Inokulation eines Wirbeltiers, insbesondere eines Säugers, mit einer Nucleinsäure-Vakzine, die gegen ein pathogenes Agens, insbesondere RSV, gerichtet ist, und einen Schutz des Wirbeltiers gegen RSV ergibt. Der Ausdruck "Nucleinsäure-Vakzine" oder "DNA-Vakzine", wie er hier verwendet wird, bedeutet eine Nucleinsäure-Konstruktion, die ein Nucleinsäure-Molekül, das ein Polypeptid-Antigen, insbesondere ein hier beschriebenes geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert. Die Nucleinsäure-Konstruktion kann auch Transkriptions-Promotorelemente, verstärkte Elemente, Spleißsignale, Terminierungs- und Polyadenylierungssignale und andere Nucleinsäure-Sequenzen umfassen.

[0065] Der Ausdruck "Schutz gegen RSV", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die Ausbildung einer Immunantwort im Wirbeltier, wobei die Immunantwort Schutz (teilweise oder ganz) gegen das Auftreten der durch RSV verursachten Erkrankung verleiht. Ein Wirbeltier, das gegen ein durch den RSV-Virus verursachte Erkrankung geschützt ist, kann mit RSV infiziert werden, aber in einem geringeren Grad, als der der ohne Immunisierung auftreten würde, kann mit RSV infiziert sein, zeigt aber nicht die Krankheitssymptome, oder kann mit RSV infiziert sein, zeigt aber weniger Krankheitssymptome als sie ohne Immunisierung auftreten würden. Alternativ kann das Wirbeltier, das gegen durch RSV verursachte Erkrankung geschützt ist, trotz einem Ausgesetztsein gegenüber dem Virus, überhaupt nicht mit dem RSV-Virus infiziert werden. In allen Fällen induziert aber die Nucleinsäure-Vakzine keine verstärkte Erkrankung bei einer nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV.

[0066] Die Nucleinsäure-Vakzine kann mittels Standardmethoden erzeugt werden. Unter Verwendung bekannter Methoden kann z.B. eine Nucleinsäure (z.B. DNA), die ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV kodiert, in einen Expressionsvektor eingeführt werden, um eine Nucleinsäure-Vakzine zu bilden (siehe Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

[0067] Das individuelle Wirbeltier wird unter Verwendung von Standardmethoden mit der Nucleinsäure-Vakzine inokuliert (d.h., die Nucleinsäure-Vakzine wird verabreicht). Das Wirbeltier kann subkutan, intravenös, intraperitoneal, intradermal, intramuskulär, topisch, oral, rektal, nasal, bukkal, vaginal, durch Inhalationsspray oder über ein implantiertes Vorratsgefäß mit Dosisformulierungen, die konventionelle, nicht-toxische physiologisch annehmbare Trägersubstanzen oder Träger enthalten, inokuliert werden. Alternativ wird das Wirbeltier

mit der Nucleinsäure-Vakzine unter Verwendung eines Teilchenbeschleunigungsinstruments (einer "Gen-Kanone"; "gene gun") inokuliert. Die Form, in der sie verabreicht wird (z.B. Kapsel, Tablette, Lösung, Emulsion), hängt zum Teil vom Verabreichungsweg ab. Für eine mucosale Administration können Nasentropfen, Inhalationsmittel oder Suppositorien verwendet werden.

[0068] Die Nucleinsäure-Vakzine kann in Verbindung mit irgendeinem geeigneten Adjuvans verabreicht werden. Das Adjuvans wird in einer ausreichenden Menge verabreicht, das ist die Menge, die ausreicht, um eine verstärkte Immunantwort gegenüber der Nucleinsäure-Vakzine auszubilden. Das Adjuvans kann vor der Inokulation mit der Nucleinsäure-Vakzine (z.B. ein oder mehr Tage vorher) verabreicht werden; gleichzeitig mit der Inokulation mit der Nucleinsäure-Vakzine (z.B. innerhalb von 24 Stunden); zusammen (simultan) mit der Nucleinsäure-Vakzine (das Adjuvans wird z.B. mit der Nucleinsäure-Vakzine gemischt, und die Mischung wird an das Wirbeltier verabreicht); oder nach Inokulation mit der Nucleinsäure-Vakzine (z.B. ein oder mehrere Tage danach). Das Adjuvans kann auch mehr als einmal verabreicht werden (z.B. vor der Inokulation mit der Nucleinsäure-Vakzine und auch nach der Inokulation mit der Nucleinsäure-Vakzine). Der hier verwendete Ausdruck "in Verbindung mit" umfasst jede Zeitperiode, einschließlich der hier spezifisch beschriebenen, und Kombinationen der hier spezifisch beschriebenen Zeitperioden, während denen das Adjuvans verabreicht werden kann, um der Nucleinsäure-Vakzine eine verstärkte Immunantwort zu verleihen (z.B. einen erhöhten Antikörpertiter gegen das durch die Nucleinsäure-Vakzine kodierte Antigen, oder einen erhöhten Antikörpertiter gegen RSV). Das Adjuvans und die Nucleinsäure-Vakzine können dem Wirbeltier an etwa der gleichen Stelle verabreicht werden; z.B. können das Adjuvans und die Nucleinsäure-Vakzine an einer markierten Stelle eines Glieds des Wirbeltiers verabreicht werden.

[0069] In einer besonderen Ausführungsform wird die Nucleinsäure-Konstruktion zusammen mit einem die Transfektion fördernden Agens verabreicht. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das die Transfektion fördernde Agens Dioctylglycylspermin (DOGS) (veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. WO 96/21356). In einer anderen Ausführungsform ist das die Transfektion fördernde Mittel Bupivicain (US-Patent 5 593 972).

[0070] Die Beschreibung offenbart auch eine Methode zur Induzierung einer Immunantwort in einem Wirbeltier, umfassend das Verabreichen einer hier beschriebenen immunogenen Zusammensetzung, Vakzine oder Nucleinsäure-Vakzine in einer wirksamen Menge, um eine Immunantwort zu induzieren, an ein Wirbeltier. In einer besonderen Ausführungsform ist das Wirbeltier ein seronegatives Wirbeltier, z.B. ein seronegativer Mensch. Die Beschreibung offenbart auch ein Verfahren zum Immunisieren eines Wirbeltiers, z.B. eines RSV-seronegativen Menschen, gegen RSV, umfassend das Verabreichen einer Zusammensetzung an das Wirbeltier, die eine immunologisch wirksame Menge eines geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV umfasst, die Immunogenität beibehält, und die, wenn sie in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, keine verstärkte Erkrankung bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV induziert. Alternativ umfasst die Zusammensetzung ein Nucleinsäure-Molekül, das eine immunologisch wirksame Menge eines geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV kodiert, die Immunogenität beibehält, und die, wenn sie in eine immunogene Zusammensetzung oder Vakzine eingebaut und einem Wirbeltier verabreicht wird, bei der nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine verstärkte Erkrankung induziert. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren der Vakzinierung eines Wirbeltiers, umfassend das Verabreichen einer hier beschriebenen Vakzine oder Nucleinsäure-Vakzine an das Wirbeltier.

[0071] Gemeinsam zeigen die hier beschriebenen Daten, dass Peptid 19 (AICKRIPNKKPGKKT)(SEQ ID NO: 19) als Primer für pulmonale Eosinophilie wirkt, indem es die Expansion von CD4⁺-T-Zellen stimuliert, die IL-5 abscheiden, ein mit der Induktion und Verstärkung von Eosinophilen bei der Restimulierung damit verbundenes Cytokin (Coffman et al., Science 245:308–310 (1989)).

[0072] Ohne sich auf eine Theorie festzulegen, wird ein Modell für einen Immun-Primer vorgeschlagen, indem eine oder mehrere Th-Zell-Epitope innerhalb des Peptids 19 die qualitative Natur der folgenden Immunantworten kontrollieren, was zu einer starken Abweichung zum Th2-Phenotyp führt. Dass die Peptid-Komponente der T-Zellen-Rezeptor-(TCR)-MHC-Wechselwirkung die Qualität der Immunantwort zwischen Th1- und Th2-Phenotypen modulieren kann, wurde bereits durch Veränderung der Peptid-Sequenzen gezeigt (Pfeiffer et al., J. Exp. Med. 181:1569–1574 (1995); Murray et al., Eur. J. Immunol. 24:2337–2344 (1994)). Es bleibt jedoch möglich, dass die 15 Aminosäuren, die Peptid 19 bilden, mehr als ein T-Zellen-Epitop enthalten, jedes mit einer gesonderten Fähigkeit, eine Th1- gegen eine Th2-Antwort zu stimulieren. Zugunsten dieser Hypothese zeigt eine Analyse der Sequenz von Peptid 19, dass es auf MHC-Klasse II I-E^d beschränkte potentielle T-Zellen-Epitope enthält, die sich eng an die kritischen 1, 4, 6 und 9 Ankerreste (I, K oder R, I bzw. K) (Aminosäuren 187, 189 und 192 des Peptids 19) ausrichten (Rammensee et al., Immunogenetics 41:178–228 (1995)). Jede dieser vermeintlichen Sequenzen ist mit einem Klasse II-Binden konsistent auf der Basis der Publikation bekannter

Liganden, die durch biochemische Isolierung von MHC-assoziierten Peptiden oder durch Peptid-Bindungsassays gebildet werden (Rammensee et al., Immunogenetics 41:178–228 (1995)). Die Mutation von Peptid 19 (AICRKIPNKKPGKKT) (SEQ ID NO: 19) zu einer Sequenz- die die kritischen MHC-Bindungs-Ankerregionen der potentiellen T-Zellen-Epitope spaltet (AICGRGPNKPGKKT) (Mutant 1; SEQ ID NO: 32) oder AGCGRG-PGGKPGKGT (Mutant 2; SEQ ID NO: 33) beseitigt die Fähigkeit dieses Peptids, Mäuse für eine pulmonale Eosinophilie zu prädestinieren, vollständig ([Fig. 6](#)).

[0073] Die hier angegebenen Daten zeigen eine positive Beziehung zwischen dem Peptid, das Aminosäuren 184 bis 198 von G-Protein umfasst, und der Anfälligkeit für pulmonale Eosinophilie. Für seronegative Populationen sprechen deshalb die Ergebnisse für eine Konstruktion einer Vakzine für RSV, die in der Region der Aminosäuren 184 bis 198 des G-Proteins genetisch modifiziert ist. Diese Vakzine würde Empfänger nicht für eine atypische Lungenerkrankung empfänglich machen, sondern würde eine Fähigkeit beibehalten gegen einen nachfolgende RSV-Angriff zu schützen. Die Ausrichtung des HLA-Typs mit der Reaktivität gegenüber Peptid 19 kann ein besseres Verstehen der Rolle dieser Aminosäure-Sequenz beim Ausbruch von Bronchiolitis, Atopie oder Asthma liefern, die manchmal als Folge einer RSV-Infektion seronegativer Kinder beobachtet werden (Welliver und Welliver, Pediatrics in Review 14:134-139 (1993)). Die beste RSV-Vakzine-Strategie für seronegative Populationen würde deshalb aus Komponenten bestehen die während sie immunopathologische Auswirkungen nicht verursachen, eine ausgeglichene Immunantwort in der Stimulierung von schützenden CD4- und CD8⁺-Zell-Typen ergeben. Die in den [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) angegebenen Daten identifizieren eine Anzahl von Peptiden, die IFN- γ -Sekretion stimulieren und diese Rolle spielen könnten (viz: Peptide 10, 14, 16 und 18). Auf ähnliche Weise legen die Daten eine Anzahl von Peptiden nahe (z.B. für Donor 100; Peptide 2, 4, 9, 15 und 29), die dazu fähig sind, die Vermehrung von PBMC zu stimulieren, und die für einen Schutz gegen einen RSV-Angriff in Abwesenheit der Sequenz, die Peptid 19 umfasst, ausreichen sollten.

[0074] Die folgenden Beispiele werden zum Zwecke der Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung angegeben, und sollen keinesfalls den Rahmen der Erfindung beschränken. Die Lehren aller hier zitierten Literatur- und Patentangaben werden durch Bezugnahme darauf Bestandteil dieser Beschreibung.

BEISPIELE

MATERIALIEN UND METHODEN

Mäuse

[0075] Weibliche BALB/c-(H-2^d)-Mäuse, 7 bis 9 Wochen alt, wurden von Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY) bezogen. Alle Mäuse wurden in einer von der American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care entworfenen Einrichtung untergebracht.

Herstellung und Verwendung von Vakzine-Antigenen:

[0076] Virale Teilchen aus Stamm A2 von RSV wurden hergestellt durch Infizieren von HEp-2-Zellen (ATCC CCL 23) und nachfolgendes Isolieren des Virus durch Zentrifugieren von Kulturüberständen zur Entfernung von Zelltrümmern. RSV-F- und -G-Proteine wurden aus dem A2-Stamm von RSV, der in Vero-Zellen (ATCC CCL 81) gezüchtet wurde, gereinigt. G-Protein wurde unter Verwendung der Immunoaffinitätschromatographie mit dem G-Protein-spezifischen monoklonalen Antikörper L7 (Hybridoma, hinterlegt als ATCC HB10233), wie bereits beschrieben (Hancock et al., J. Virol. 70:7783-7791 (1996)). Das resultierende G-Protein wurde mittels ELISA und SDS-PAGE als > 95% rein bestimmt. Für Immunisierungen wurde, wenn nicht anders angegeben, jede Maus intramuskulär bei 0 und 4 Wochen mit 0,1 ml PBS, das 1 μ g gereinigtes G-Protein und 20 μ g StimulonTM QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framington, MA) als Adjuvans enthielt, vakziniert. F-Protein wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt und 3 μ g in Vakzinationen mit einem Zusatz von 100 μ g Aluminiumhydroxid (AlOH) verwendet. Für RSV-Vakzinationen und -Verabreichungen wurden ein bis zweimal $\times 10^6$ Plaque-bildende Einheiten (pfu) von infektiösem RSV A2 intranasal in einem Volumen von 50 μ l verabreicht. Ein gleiches Volumen von HEp-2-Zellysate wurde als Scheinvakzination verwendet.

Herstellung und Verwendung von Peptid-Antigenen

[0077] Von Genosys/The Woodlands, TX) wurde eine Reihe synthetischer Peptide, die den überlappenden Regionen des G-Proteins von RSV entsprechen, synthetisiert ([Fig. 2](#)). Die resultierenden Reihen umfassten die Aminosäure 48 bis 294 von RSV-A2-G-Protein (Wertz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4075-4079 (1985)). Die Reinheit der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie als mehr als 90% festgestellt. Lyophil-

sierte Peptide wurden in sterilem Wasser in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet, um menschliche periphere einkernige Blutzellen (PBMC) oder G-Protein-geprimte Mäuse Milzzellen *in vitro* zu stimulieren.

[0078] Ausgewählte Peptide wurden an Maleinimid-aktiviertes (Partis et al., *J. Prot. Chem.* 2:263-277 (1983)) Schlüsselloch-Nacktschnecken-Hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin; KLH) unter Verwendung eines Imject®-aktivierten Konjugations-Kits (Pierce Chemical, Rockford, IL) konjugiert. Da der Mechanismus der Konjugation von der chemischen Reaktion zwischen den Maleinimidgruppen in KHL- und den SH-Gruppen im Peptid abhängig war, wurde dem Carboxy-terminierten Ende von Peptid 22 Cystein zugegeben. Der Grad, bis zu dem die verschiedenen Peptide konjugiert waren, wurde durch Bestimmen des Verlustes an Thiolgruppen im Peptid unter Verwendung von Ellmann's-Reagenz (Pierce Chemical) quantifiziert. Das Ausmaß der Konjugation (typischerweise 50 bis 80 µg Peptid pro mg KHL), das in diesen Reaktionen gefunden wurde, passte gut zu dem früher für die Anlagerung von Peptiden an KLH durch diese Technik gefundenen Ausmaß (Tsao et al., *Anal. Biochemistry* 197:137-142 (1991)). Zur Untersuchung der Induktion von Eosinophilie durch verschiedene Peptide wurden 250 µg KLH, konjugiert zu den entsprechenden Peptiden, mit 20 µg Stimulon™ QS-21 in 0,1 ml PBS versetzt und zur intramuskulären Immunisierung jeder Maus bei Woche 0 und 4 verwendet. Zwei Wochen nach der zweiten Vakzination wurde den Mäusen $1-2 \times 10^6$ PFU von infektiösem RSV A2 intranasal in einem Volumen von 50 µl verabreicht (Hancock et al., *J. Virol.* 70:7783-7791 (1996)). Sieben Tage später wurden die Mäuse durch Zervikal-Dislokation getötet und eine bronchiolo-alveoläre Waschung (BAL) durchgeführt.

Titration von infektiösem RSV

[0079] Aus den homogenisierten Lungen von RSV-infizierten Mäusen abgeleitete Überstände wurden seriell verdünnt und mit ihnen Monoschichten von HEp-2-Zellen infiziert. Nach einer 2-stündigen Inkubation wurde das Inokulum abgesaugt und jede Vertiefung mit 1% Sephadex G-75 im Medium überschichtet. Nach einer weiteren 3-tägigen Inkubation wurde der Gel-Überzug entfernt und die Vertiefungen in 80% Methanol fixiert. RSV-Plaques wurden unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen RSV-G-Protein und eines sekundären mAb von Ziegen-Anti-Maus, konjugiert an Meerrettisch-Peroxidase, identifiziert. Die Farbe wurde durch Zugabe des Substrats, 0,05% 4-Chlornaphthol/0,09% Wasserstoffperoxid in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entwickelt. RSV-Plaque-bildende Einheiten (pfu) wurden gezählt, und die Titer als pfu pro Gramm Lungengewebe angegeben.

[0080] BALB/c-Mäuse wurden intramuskulär mit einem von mehreren Vakzinen aus den nativen Fusions-(F)- und/oder Anlagerungs-(G)-Proteinen, aus dem A2-Stamm von RSV isoliert, geprimt. Drei Gruppen von Mäusen wurden mit entweder 3.000, 300 oder 30 ng F-Protein/Dosis geprimt. Drei getrennte Gruppen von Mäusen wurden mit 1.000, 100 oder 10 ng G-Protein/Dosis geprimt. Ebenso wurden drei Gruppen von Mäusen mit einer Kombinations-Vakzine, enthaltend 3.000 + 1.000; 300 + 100; oder 30 + 10 ng F- bzw. G-Protein geprimt. Alle Vakzine-Zusammensetzungen wurden mit Aluminiumhydroxid (AlOH, 100 µg/Dosis) formuliert. Kontrollmäuse wurden entweder mit dem A2-Stamm von RSV infiziert oder erhielten eine intramuskuläre Injektion von PBS/AlOH. Vier Wochen nach der ersten Immunisierung wurde allen Mäusen der A2-Stamm von RSV verabreicht. Vier Tage später wurden die Mäuse getötet und die Lungengewebe zur Quantifizierung des infektiösen Virus verarbeitet (Tabelle).

Tabelle: Bestimmung von RSV-Titern in Mäuse-Lunge

ANTIGEN (ng)	GMT RSV ^a
F(3000) + G(1000)	< 1,6 ± 0,2
F(300) + G(100)	< 2,1 ± 0,7
F(30) + G(10)	< 2,8 ± 0, ^b
F(3000)	< 2,1 ± 0,5
F(300)	< 2,5 ± 1,0
(F(30)	< 4,1 ± 0,8
G(1000)	< 3,5 ± 0,5
G(100)	< 4,7 ± 0,2
G(10)	< 4,7 ± 0,2
PBS	5,1 ± 0,2
RSV	< 1,6 ± 0,1

^a GMT ist der geometrische mittlere Titer (Log_{10}) ± 1 Standardabweichung von RSV pro Gramm Lungengewebe. Der GMT-RSV wurde 4 Tage nach intranasaler Verabreichung bestimmt.

^b $p < 0,05$ vs. mit F(30) allein, G(10) allein oder PBS vakzinieren Gruppen.

Bronchio-alveoläre Waschungen

[0081] Bronchio-alveoläre Waschungen (BAL) wurden durchgeführt, indem man mit einem Minimum von fünf Wiederholungen eine Lösung in die Luftröhre infundierte und wieder abzog, die 1 ml eiskaltes 12 mM Lidocain HCl in RPMI enthielt (Hancock et al., Vaccine 13:391-400 (1995)). Die BAL-Suspension wurde dann zur Pelletierung der Zellen zentrifugiert. Leukozyten wurden durch Anfärbung eines Aliquots der Zellen mit 0,2% Trypan-Blau in PBS quantifiziert. Danach wurden die Zellen auf Glasobjektträger abzentrifugiert, fixiert und mit Diff-Quik (Dade International Inc., Miami, FL) angefärbt. Individuelle Leukozyten-Populationen wurden durch Analysieren eines Minimums von 400 Zellen pro Objektträger gezählt. Die Ergebnisse sind als mittlere Prozentwert (+SD) von fünf Mäusen pro Gruppe angegeben.

In-vivo-Abreicherung von T-Zellen-Untergruppen

[0082] Monoklonale Antikörper (mAbs) gegen Mäuse CD4, GK1.5 (ATCC TIB 207) und Mäuse-CD8, 53-6.72 (ATCC TIB 105) wurden von Hybridoma-Kulturüberständen über eine rekombinante Protein-G-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ) gereinigt. Als Kontrolle wurde gereinigtes Ratten-IgG von Calbiochem (San Diego, CA) bezogen. Die mAbs wurden an den Tagen 14 und 20 nach der letzten Immunisierung in Dosen von 750 µg bzw. 250 µg pro Maus verabreicht. Den Mäusen wurde dann lebender RSV verabreicht und pulmonale Eosinophilie wurde durch Analyse von BAL-abgeleiteten Zellen 7 Tage danach quantitativ festgestellt. An einem FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) wurde eine Fließzytometrie durchgeführt, um die Wirksamkeit des Abreicherungssystems zu bewerten. Unter Verwendung von PE-Anti-Mäuse CD4 (L3T4) und FITC-Anti-Mäuse CD8 (Ly-2), bezogen von Pharmingen (San Diego, CA), wurden Durchflusszytometrie-Standardverfahren verwendet.

In-vitro-Expansion von Milz-Immunozyten

[0083] Milz wurde aus Gruppen von fünf Mäusen 2 Wochen nach der zweiten Vakzinierung mit nativem G-Protein und Stimulon™ QS-21 isoliert und in einzelne Zell-Suspensionen, wie früher beschrieben, überführt (Hancock et al., J. Virol. 70:7783-7791 (1996)). Unter Verwendung einer Ammoniumchlorid-Lyse wurden Erythrozyten entfernt und die resultierenden Milzzellen durch Trypan-Blau-Ausschluß quantifiziert. Die Zellen wurden dreifach in Flachbodenplatten mit 96 Vertiefungen bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ pro Vertiefung kultiviert, in einem Medium, enthaltend RPMI 1640, ergänzt mit 2 mM Glutamin; 100 U Pencillin und 50 µg Streptomycin pro ml; 5×10^{-4} M β-Mercaptoethanol; 10 mM HEPES; 1% normales Mäuseserum (Biocell Labs, Inc., Rancho Dominguez, CA). Zum Kulturmedium wurden bei einer Konzentration von 50 µg pro ml Peptid-Antigene zugegeben. Als Kontrolle wurde gereinigtes G-Protein, Diphtherie-Toxoidkreuzreagierendes Protein (CRM₁₉₇) und Concanavalin erhalten (ConA) bei Endkonzentrationen von 0,5 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 1 µg/ml zugegeben. 4 Tage nach Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 1 µCi von ³H-Thymidin weitere 18 Stunden lang impulsweise behandelt. Die Zellen wurden danach geerntet und in DNA-Eingebautes ³H-Thymidin mittels Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt.

[0084] Aus normalen erwachsenen Spendern wurde heparinisieretes menschliches Blut gesammelt und unter Verwendung von Ficoll-Hypaque-(Pharmacia, Piscataway, NJ)-Zentrifugation abgetrennt. Die Zellen wurden mit Peptiden, wie vorstehend beschrieben, in RPMI 1640-Medium, enthaltend 10% AB-Serum (Biocell) kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit CRM₁₉₇ (30 µg/ml), PHA (5 µg/ml) oder im Medium allein kultiviert.

Cytokin-Assays:

[0085] Gesammelte Überstände aus dreifachen Vertiefungen wurden auf IFN-γ und IL-5 durch Antigen-Einfang-ELISA untersucht. Maxisorb-Platten (Nunc) wurden mit 50 µl Carbonat-Bicarbonat-Puffern (pH 9,6), der entweder R4-6A2 (3 µg/ml) oder TRFK.5 (2,5 µg/ml) monoklonale Antikörper für den Einfang von IFN-γ und IL-5 enthielt, beschichtet. Nicht-spezifische Bindungsstellen wurden unter Verwendung von Trisgepufferter Salzlösung, die 5% FBS und 10% Milchpulver (Gew./Vol.) enthielt, blockiert. Zu den Vertiefungen wurden Kulturüberstände zweifach zugegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden lang inkubieren gelassen. Um das gebundene Cytokin zu bestimmen, wurden biotinylierte Antikörper XMG1,2 (IFN-γ) und TRFK4 (IL-5) bei Konzentrationen von 1 µg/ml bzw. 2 µg/ml verwendet. Alle vier, in den Cytokin-Assays verwendeten monoklonalen Antikörper wurden von Pharmingen (San Diego, CA) erhalten. Cytokine wurden unter Verwendung von Streptavidin-alkalischer Phosphatase mit einem Substrat-System aus NADP, Diaphorase, Alkoholdehydrogenase und INT-Violett quantifiziert. Die Substratfarbentwicklung erfolgte durch Zugeben von 0,3 M Schwefelsäure und die optische Dichte wurde bei 490 nm (OD₄₉₀) mit einem Dynatech-(Chantilly, VA)-ELISA-Anzeigegerät bestimmt. Von jedem Cytokin unter Verwendung von rekombinantem IFN-γ (Genzyme, Cambridge, MA) und IL-5 (Pharmingen, San Diego, CA) wurden Standardkurven gebildet, um die Linearität sicherzustellen. Die Daten sind als mittlere OD₄₉₀ für jedes Antigen angegeben.

Induktion von pulmonaler Eosinophilie:

[0086] Weibliche BALB/c-(H-2^d)-Mäuse in einem Alter von 7 bis 9 Wochen (5 Mäuse pro Gruppe) wurden intramuskulär bei 0 und 4 Wochen mit 0,1 ml PBS, mit 20 µg Stimulon™ QS-21 ergänzt und enthaltend entweder 1 µg gereinigtes G-Protein; 250 µg KLH; 250 µg KLH, konjugiert an Peptiden 19 oder 22 oder 250 µg freies Peptid 19 oder 22, vakzinieren. Die Peptide wurden an Maleinimid-aktiviertes KLH unter Verwendung eines Imject®-aktivierten Konjugations-Kits (Produkt Nr. 77111), bezogen von Pierce Chemical, Rockford, IL, konjugiert. Typischerweise wurden für jede Konjugationsreaktion 80 bis 100 µg Peptid an 1 µg KLH gebunden. Da jede Maus 250 µg KHL pro Vakzinierung erhielt, entspricht dies 20 bis 25 µg des relevanten Peptids. 2 Wochen nach der zweiten Vakzinierung wurde den Mäusen 1–2 × 10⁶ PFU von infektiösem RSV-A2 durch intranasale Instillation in einem Volumen von 50 µl verabreicht. 7 Tage später wurden die Mäuse durch Zervikal-Dislokation getötet und eine bronchio-alveoläre Waschung durchgeführt. Die Zellen wurden auf Glasobjektträger aufzentrifugiert, fixiert und mit Diff-Quik (Dade Diagnostics) angefärbt. Der relative Anteil von Eosinophilen als Funktion der gesamten weißen Zellen wurde durch Analysieren eines Minimums von 400 Zellen pro Objektträger bestimmt. Die Ergebnisse ([Fig. 5](#)) sind als mittlerer Prozentwert (+SD) von fünf Mäusen pro Gruppe angegeben.

Statistische Analysen

[0087] Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen wurden durch Tukey-Kramer HSD-multiple Vergleichstests bestimmt unter Verwendung von JMP® Statistical Discovery Software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

ERGEBNISSE

[0088] Die Immunantworten, hervorgerufen durch natives G-Protein und eine Reihe von überlappenden Peptiden (in [Fig. 2](#) angegeben), die sich von Aminosäuren 48 bis 294 von G-Protein erstrecken, wurden als Ergebnis der hier beschriebenen Untersuchungen charakterisiert. Aminosäure 48 entspricht dem zweiten Translations-Start-Kodon von RSV-G-Protein. BALB/c-Mäuse, die eine intramuskuläre (IM) Vakzination von nativem G-Protein nach 0 und 4 Wochen erhielten, zeigten eine maximale bronchio-alveoläre Waschungs-(BAL)-Eosinophilie (65% der gesamten weißen Zellen) 7 Tage nach einer intranasalen (IN) Verabreichung von lebendem RSV. Im Gegensatz dazu enthielten die BAL-Fluide von Mäusen, die durch experimentelle Infektion vakzinieren waren oder eine primäre Infektion zeigten, weniger als 2% Eosinophile ([Fig. 1B](#)).

[0089] In-vitro-Stimulierungs-Assays von Milzzellen aus G-Protein-vakzinieren BALB/c-Mäusen zeigten eine dominante Vermehrungsreaktion gegenüber einem Peptid, das die Aminosäure 184–198 von G-Protein umfasste ([Fig. 3](#)). Die Vermehrung betrug das 16-fache der Hintergrund-Niveaus und übertraf die durch andere von G-Protein abgeleiteten Peptide stark. Die Größe der Reaktion gegenüber Peptid 19 war außerdem vergleichbar mit der mit gereinigtem nativem G-Protein. Die Daten zeigen deshalb, dass die Fähigkeit von

RSV-G-Protein, die Vermehrung von geprimten Splenozyten von BALB/c-Mäusen zu stimulieren, vollständig innerhalb des Pigments des Proteins, das die Aminosäuren 184–198 aufweist, enthalten ist.

[0090] Die Analyse von Kulturüberständen aus Cytokinen, assoziiert mit Helfer-T-Zellen-Untergruppen, zeigte, dass der höchste Gehalt an IFN- γ und IL-5 nach Stimulierung mit Peptid 19 beobachtet wurde. Darüber hinaus waren die Werte äquivalent zu oder größer als die nach Restimulierung mit nativem G-Protein erhaltenen ([Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)). Diese Daten zeigen, dass eine Region, die die Aminosäuren 184 bis 198 überspannt, das dominante Epitop (dominante Epitope) in RSV-G-Protein, das von T-Zellen in BALB/c-Mäusen erkannt wird, enthält.

[0091] Voruntersuchungen zeigten, dass die pulmonale Eosinophilie in BALB/c-Mäusen, die mit G-Protein vakziniert waren, bei $65 \pm 5,4\%$ 7 Tage nach der Verabreichung einen Peak zeigte. Um die direkte Rolle von Peptid 19 beim Primieren auf pulmonale Eosinophilie in Mäusen zu bestätigen, wurde Peptid 19 mit Peptid 22 verglichen. Das letztere Peptid schien die IFN- γ -Produktion zu stimulieren, ohne Stimulierung von IL-5 ([Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)).

[0092] Um eine ausreichende Immunogenität sicherzustellen, wurden die Peptide an Maleinimid-aktiviertes KLH konjugiert. Eine statistisch signifikante pulmonale Eosinophilie wurde in Mäusen beobachtet, die mit Peptid 19-KLH ($39,5 \pm 8,0\%$) oder G-Protein ($63 \pm 1,9\%$) geprimt wurden, im Vergleich zu Mäusen, die mit Adjuvans allein ($2,5 \pm 2,0\%$) vakziniert waren ([Fig. 5](#)). Im Gegensatz dazu war die Stärke der mit Peptid 22-KLH verbundene Eosinophilie ($4,9 \pm 3,3\%$) bei Hintergrundwerten, trotz der Daten, das Peptid 22 immunogen war. 2 Wochen nach der endgültigen Vakzination betrug die geometrischen mittleren Anti-RSV-G-Protein-IgG-Titer von mit Peptid 19-KLH oder Peptid 22-KLH vakzinierten Mäusen 1517 bzw. 5611. Obwohl also humorale Immunantworten gegen jedes der Peptid-Konjugate ausgebildet wurden, war die Induktion von aberrierender Eosinophilie auf solche Mäuse beschränkt, die Peptid 19 erhielten. Die Immunisierung mit unkonjugiertem Peptid 19 oder 22 rief keine bestimmbar humorale Immunantwort hervor und ergab relative Prozentwerte von Eosinophilie ($6,5 \pm 5,2\%$ bzw. $2,5 \pm 2,5\%$), die von PBS/Stimulon™ QS-21-Kontrollen nicht signifikant verschieden waren.

[0093] Um Peptid 19 als verursachendes Agens für pulmonale Eosinophilie zu bewerten, wurden Mutanten von Peptid 19 mit Aminosäure-Substitutionen an den kritischen 1, 4, 6 und 9 Ankerregionen der MHC Klasse II-Bindungsstelle bewertet. Diesen Mutationen fehlte die Fähigkeit, Mäuse für pulmonale Eosinophilie zu prädestinieren ([Fig. 6](#)). Im Zusammenhang mit [Fig. 5](#) zeigen diese Daten eine direkte Beziehung zwischen der Aminosäure-Sequenz von Peptid 19 und der Induktion von pulmonaler Eosinophilie in Mäusen bei darauf folgender Verabreichung.

[0094] Um zu bestimmen, ob die Peptid 19-KLH-assoziierte Eosinophilie durch CD4⁺-Zellen vermittelt wurde, wurde eine Reihe von Abreicherungsexperimenten unter Verwendung von mAbs gegen CD4- oder CD8-Oberflächenmoleküle durchgeführt. Eine FACS-Analyse wurde an Populationen von Lymphozyten aus der Milz vakzinierter Mäuse 7 Tage nach Verabreichung durchgeführt ([Fig. 8](#)).

[0095] Die Abreicherung von CD4⁺-Zellen ergab eine signifikante Reduktion in der BAL-Eosinophilie in Mäusen, die entweder mit G-Stimulon™ QS-21 oder Peptid 19-KLH/Stimulon™ QS-21 vakziniert waren ([Fig. 8](#)). Die Behandlung mit Anti-CD4-mAb verringerte die pulmonale Eosinophilie signifikant von $67,2 \pm 8,5\%$ und $29,6 \pm 13,3\%$ auf $4,7\%$ bzw. $0,75 \pm 0,6\%$. Der entsprechende Effekt einer Anti-CD8-mAb-Behandlung hatte auf die Induktion von Eosinophilie nur eine geringe Wirkung, da die Stärken bei $63,8 \pm 6,4\%$ und $32,8 \pm 10,3\%$ für G- bzw. Peptid-19-KLH-vakzinierter Mäuse blieben. Wie in [Fig. 8](#) gezeigt, wurde in der BAL von Mäusen, die experimentell mit RSV infiziert wurden, nur $0,7\%$ Eosinophilie beobachtet. Die Daten zeigen deshalb, dass CD4⁺-Zellen für die pulmonale Eosinophilie-Reaktion, die bei G-Protein- oder Peptid-19-immunisierten BALB/c-Mäusen nach Verabreichung festgestellt wurde, erforderlich sind.

[0096] Die peripheren einkernigen Blutzellen aus einem Donor-Panel wurden auf ihre Reaktivität gegen gereinigtes G-Protein getestet, um die Individuen zu identifizieren, die vor kurzem eine Infektion erlitten hatten. Danach wurden die Zellen von sechs Spendern, die eine proliferative Reaktion auf G-Protein zeigten, in Gegenwart der in [Fig. 2](#) beschriebenen synthetischen Peptide kultiviert ([Fig. 7](#)). Eine starke proliferative Reaktion gegenüber Peptid 19 wurde für Donor 100 (mittlerer Stimulierungsindex 8,5) beobachtet. Zusätzlich traten proliferative Reaktionen gegenüber Peptid 19 bei den Spendern 9 und 20 mit mittleren Stimulierungsindices, die in jedem Fall das 3-fache betrug, festzustellen.

ÄQUIVALENTE

[0097] Obwohl die Erfindung insbesondere unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen dargestellt und beschrieben wurde, ist es für einen Fachmann auf diesem Gebiet verständlich, dass verschiedene Veränderungen in der Art und in Details durchgeführt werden können, ohne sich von der in den anliegenden Ansprüchen definierten Erfindung zu entfernen.

SEQUENZLISTE

<110> American Cyanamid Company
Hancock, Gerald E.
Tebbey, Paul W.

<120> VERSTÄRKTE IMMUNANTWORT AUF ANGELAGERTES
G-PROTEIN VON RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

<130> ACC97 - 01p2A PCT

<140> PCT/US9E/19656

<141> 1998-09-17

<150> US 60/064,863

<151> US 60/059,684

<106> 33

<170> FastSEQ für Windows Version 3,0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 1

Met Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Synthetisches Peptid

<400> 2

Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser Ala Asn His Lys Val Thr
1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 3
 Ser Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 4
 Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr Ser Gln Ile Lys Asn Thr
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 5
 Thr Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 6
 Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln Leu Gly Ile Ser Pro Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 7
 Pro Gln Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 3
 Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr Thr Ile Leu Ala Ser Thr
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 3
 Thr Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 10
 Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser Thr Thr Val Lys Thr Lys
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 11

Ser Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 12

Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 13

Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 14

Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 15
 Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 15
 Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 17
 Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys
 1 5 10 15
 Lys

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 18
 Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 19

Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 20

Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 22

Leu Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 23

Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 24

Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 25

Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys Thr Asn Ile Ile Thr Thr
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 26

Lys Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 27

Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro Glu Leu Thr Ser Gln Met
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 23
 Pro Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 29
 Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly Asn Pro Ser Pro Ser Gln
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 30
 Gly Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 31
 Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln Pro Ser Ser Pro Pro Asn
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 32
 Ala Ile Cys Gly Arg Gly Pro Asn Gly Lys Pro Gly Lys Lys Thr
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Synthetisches Peptid

<400> 33
 Ala Gly Cys Gly Arg Gly Pro Gly Gly Lys Pro Gly Lys Gly Thr
 1 5 10 15

Patentansprüche

1. Geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV, worin die Veränderung mindestens in der Region der Aminosäuren 184 bis 198 einer Wildtyp-Sequenz ist, wobei
 (i) das Protein oder Polypeptid Immunogenität besitzt, wenn es in eine immunogene Zusammensetzung oder eine Vakzine eingebracht und einem Wirbeltier verabreicht wird; und
 (ii) das Protein oder Polypeptid bei einer nachfolgenden Infektion des Wirbeltiers mit RSV keine gesteigerte Erkrankung induziert.

2. Geändertes G-Protein oder Polypeptid nach Anspruch 1, das in der in SEQ ID NO: 19 angegebenen Region geändert ist.

3. Geändertes G-Protein oder Polypeptid nach Anspruch 1, worin die Veränderung in der Region mit der Aminosäure-Sequenz Alanin-Isoleucin-Cystein-Lysin-Arginin-Isoleucin-Prolin-Asparagin-Lysin-Lysin-Prolin-Glycin-Lysin-Lysin-Threonin oder biologischen Äquivalenten davon besteht.

4. Geändertes G-Protein oder Polypeptid nach Anspruch 1, worin die Veränderung zu einer Inhibierung des Primers zur IL-5-Sekretion durch das isolierte geänderte G-Protein oder Polypeptid im Vergleich zum Wildtyp-G-Protein führt.

5. Geändertes G-Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Protein oder Polypeptid eine in SEQ ID NO: 32 angegebene Aminosäure-Sequenz aufweist.

6. Nucleinsäure-Molekül, das das geänderte G-Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert.

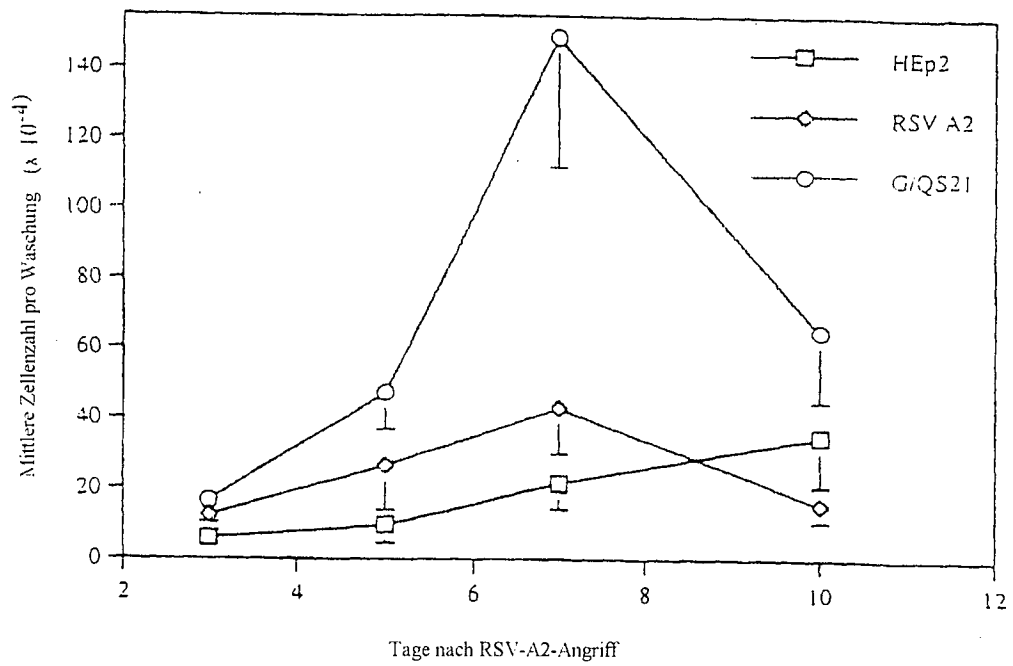
7. Nucleinsäure-Konstruktion, die das Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 6 an eine regulatorische Sequenz operativ gebunden aufweist.

8. Chimäre Nucleinsäure-Konstruktion, die aufweist:
 (1) ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 6,
 (2) ein Nucleinsäure-Molekül, das das gesamte oder einen immunogenen Teil des F-Protein(s) von RSV kodiert; und
 (3) eine an (1) und (2) operativ gebundene regulatorische Sequenz.

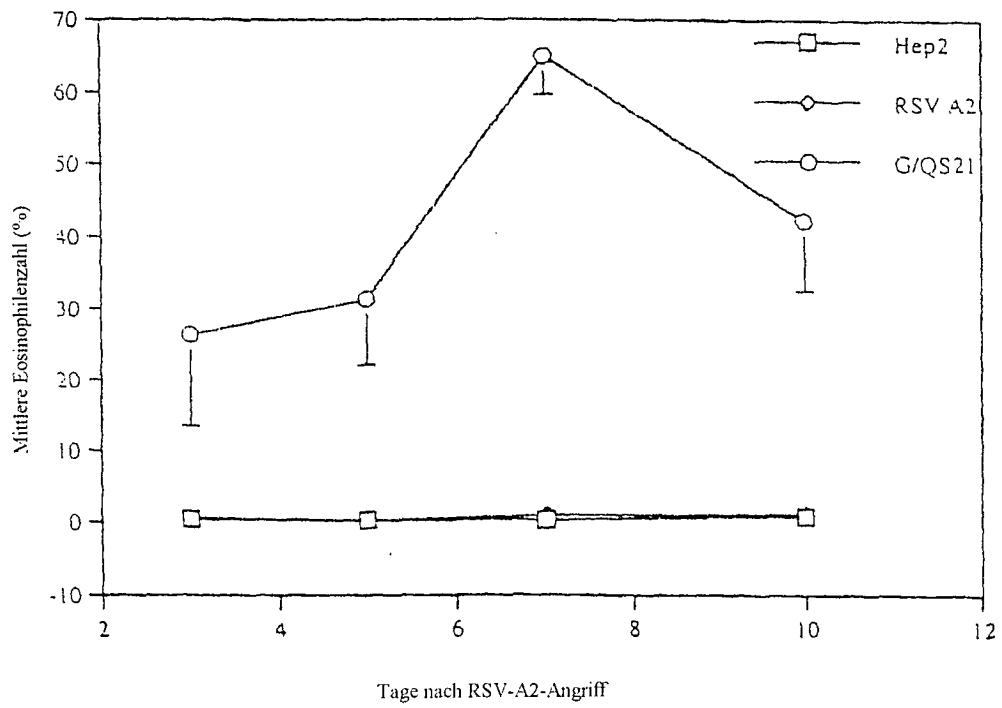
9. Rekombinante Wirtszelle, die eine Nucleinsäure-Konstruktion nach Anspruch 7 oder 8 aufweist.
10. Verfahren zur Herstellung eines geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend das Belassen einer rekombinanten Wirtszelle nach Anspruch 9 unter Bedingungen, die zur Expression des geänderten G-Proteins oder Polypeptids geeignet sind.
11. Verfahren zur Herstellung eines chimären Polypeptids, umfassend das Belassen einer rekombinanten Wirtszelle nach Anspruch 9 unter Bedingungen, die zur Expression des kodierten chimären Proteins geeignet sind.
12. Immunogene Zusammensetzung, die ein physiologisch annehmbares Medium und ein geändertes G-Protein oder Polypeptid von RSV nach einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.
13. Immunogene Zusammensetzung nach Anspruch 12, die ferner F-Protein von RSV aufweist.
14. Vakzine-Zusammensetzung, die eine immunologisch wirksame Menge eines geänderten G-Proteins oder Polypeptids von RSV nach einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.
15. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 14, die ferner eine immunologisch wirksame Menge des gesamten oder eines Teils von F-Protein von RSV aufweist.
16. Verwendung des geänderten G-Proteins oder Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Arzneimittels, wie einer Vakzine.
17. Vakzine-Zusammensetzung, umfassend einen physiologisch annehmbaren Träger und eine wirksame Menge eines Nucleinsäure-Moleküls nach Anspruch 6.
18. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 17, die ferner ein die Transfektion förderndes Mittel aufweist.
19. Vakzine-Zusammensetzung, umfassend eine immunologisch wirksame Menge eines lebenden attenuierten Pathogens, das als darin eingefügtes heterologes Nucleinsäure-Segment eine Nucleinsäure-Sequenz nach Anspruch 6 aufweist.
20. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das lebende attenuierte Pathogen ein attenuiertes Bakterium ist.
21. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das lebende attenuierte Bakterium Salmonella ist.
22. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das lebende attenuierte Pathogen ein attenuiertes Virus ist.
23. Vakzine-Zusammensetzung nach Anspruch 22, worin das lebende attenuierte Virus ein attenuiertes venezuelanisches Pferde-Enzephalitis-Virus (Venezuelan Equine Encephalitis Virus) ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1A



Figur 1B

Peptid	Aminosäuren	Sequenz	SEQ ID NO:
1	48-62	MIISTLIJAAIFI	1
2	56-70	IAAIFIASANHKVT	2
3	64-78	SANHKVPTTAAIQD	3
4	72-86	TTAAIQDATSQIKNT	4
5	80-94	TSQIKNTTPTYLTON	5
6	88-102	PTYLIQNPLGIGSPS	6
7	95-110	PQLGIGSPSNPSEITSQ	7
8	104-118	PSEITSQITILAST	8
9	112-126	TTILASTIPGVKSTL	9
10	120-134	PGVKSTLQSTIVYTK	10
11	128-142	STIVYTKNTTTIQIQ	11
12	136-150	TTTTIQIQPSKPTTKQ	12
13	144-158	SKPTTKQRQNKPPSK	13
14	151-166	RQNKPPSKPNDFHFE	14
15	159-174	PNDFHFEVFNFPVPCS	15
16	168-181	FNFPVCSICSNNPT	16
17	171-187	VPCSICSNNPTCWAICK	17
18	176-190	CSNNPTCWAICKRIP	18
19	184-198	AICKRIPNKKPGKKT	19
20	192-206	KKPGKKTITKPTKIP	20
21	200-214	TKPTKPTLKTTKKD	21
22	208-222	LKTTKKDKPKPQTTKS	22
23	216-230	KPQTTKSKEVPTTKP	23
24	224-238	EVPTTKPTEEPTINT	24
25	232-246	EEPTINTTKNIT	25
26	240-254	KNITITLLISNTIG	26
27	248-262	LTSNTIGNPELISQOM	27
28	256-270	PELTSQOMETFHSISS	28
29	264-278	TFHSTISSEGNPSPSQ	29
30	272-286	GNPSPSQVSTTSEYP	30
31	280-294	STTSEYPSQPSSPPN	31

Figur 2

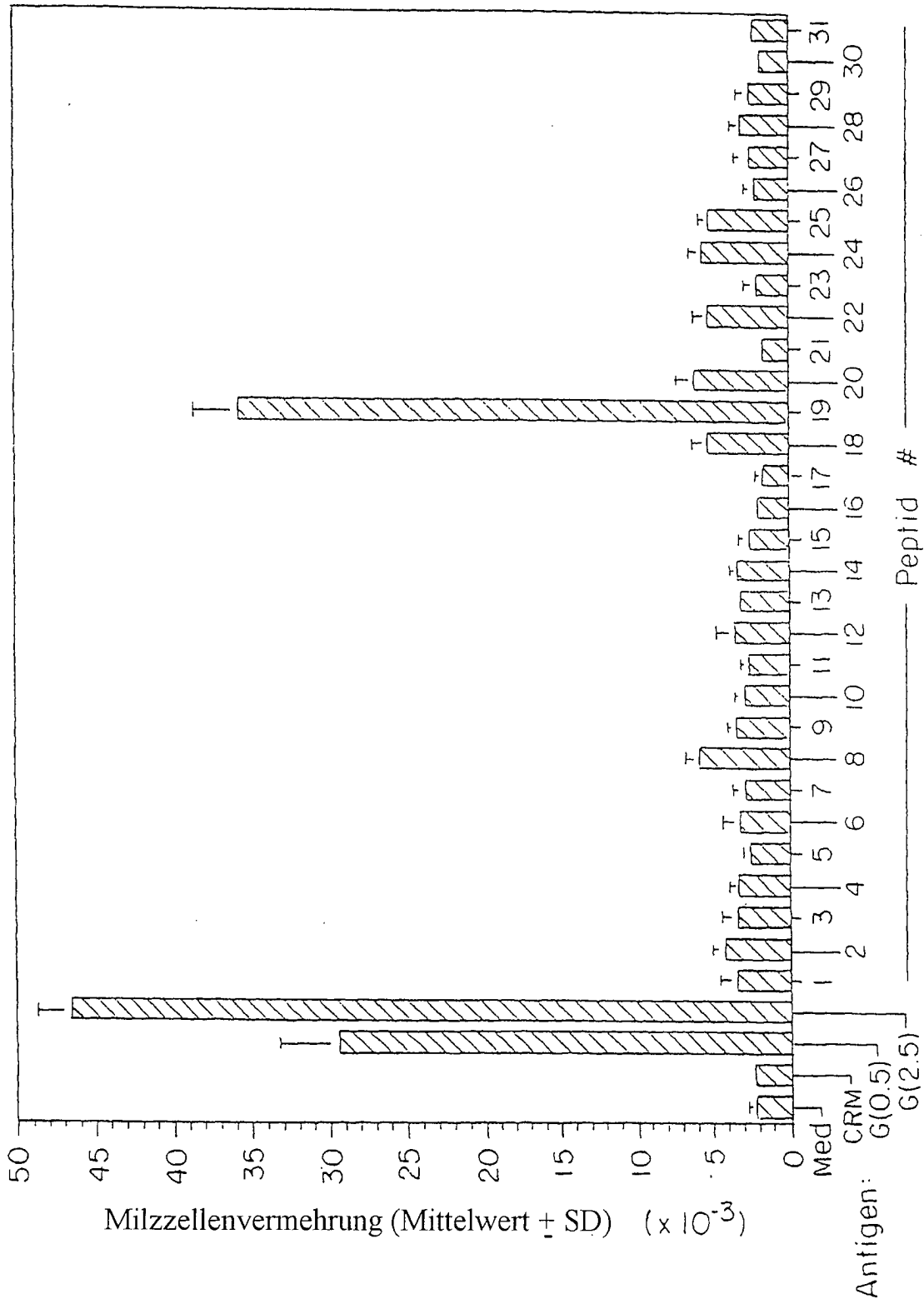


FIG. 3

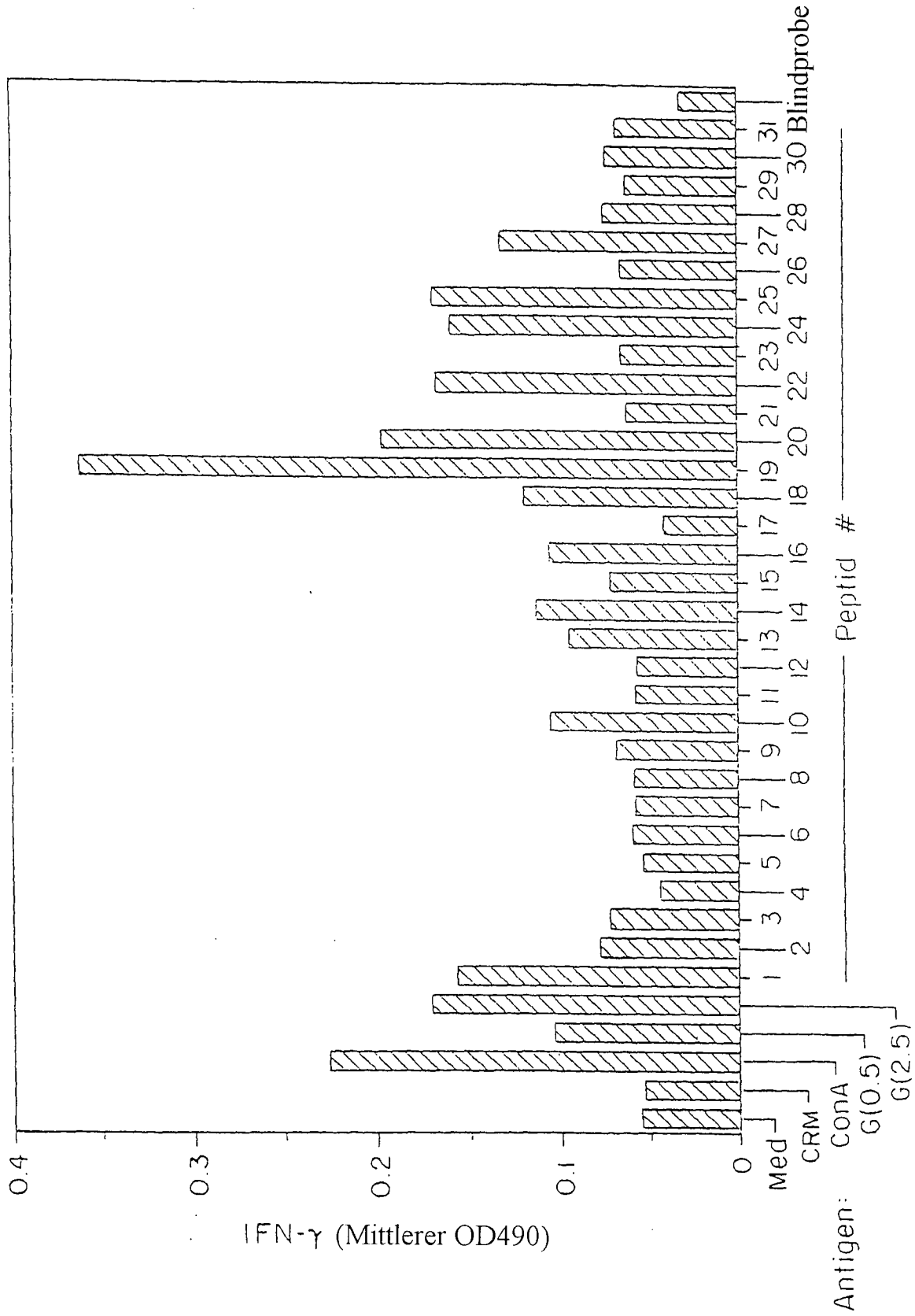


FIG. 4A

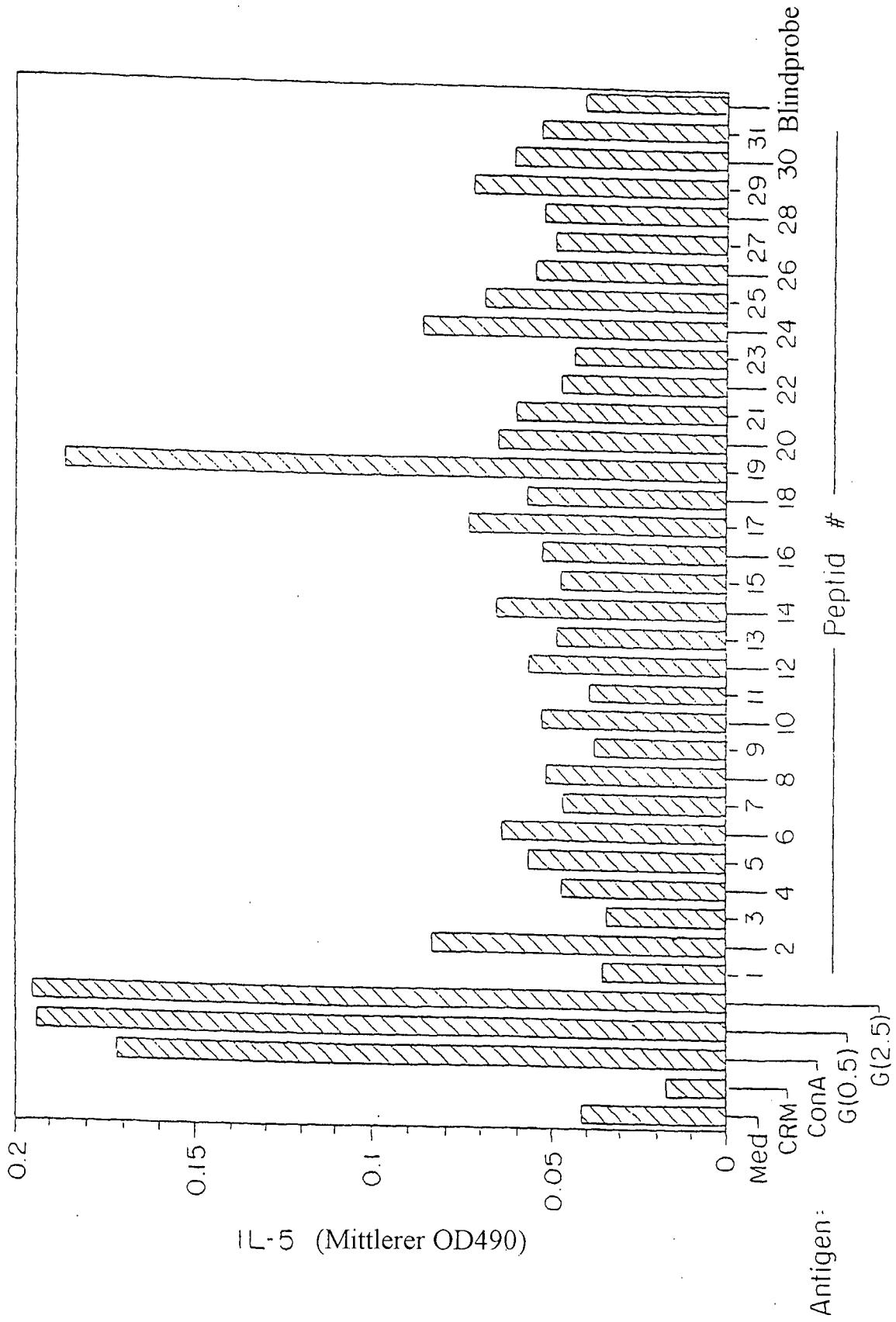


FIG. 4B

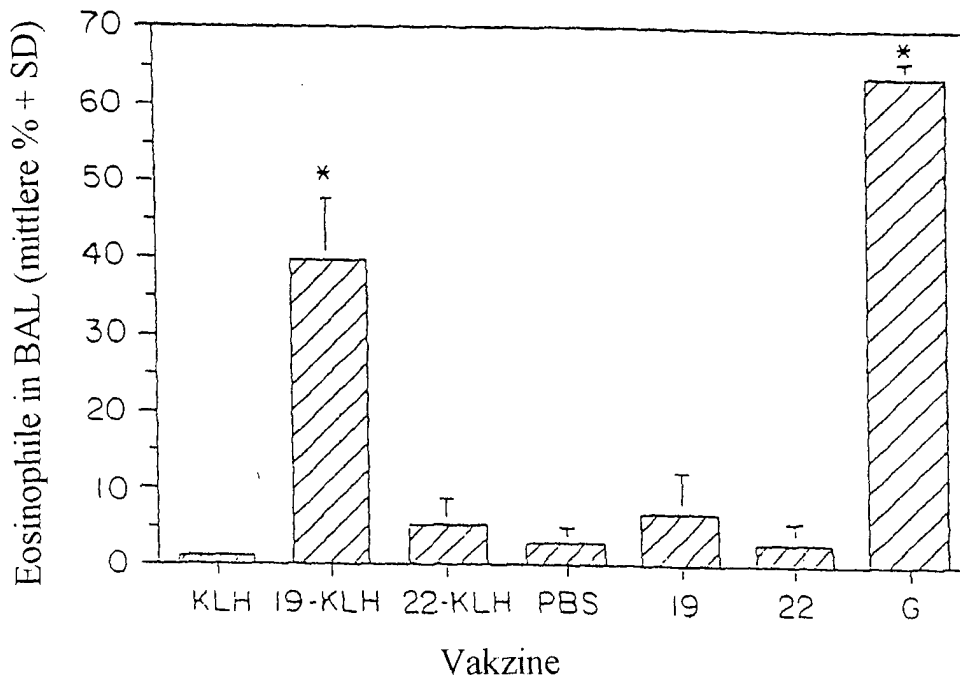


FIG. 5

Peptid 19: AICKRIPNKKPGKKT (SEQ ID NO: 19)

Peptid 19 Mutant 1: AICGRGPNGKPGKKT (SEQ ID NO: 32)

Peptid 19 Mutant 2: AGCGRGPGGKPGKGT (SEQ ID NO: 33)

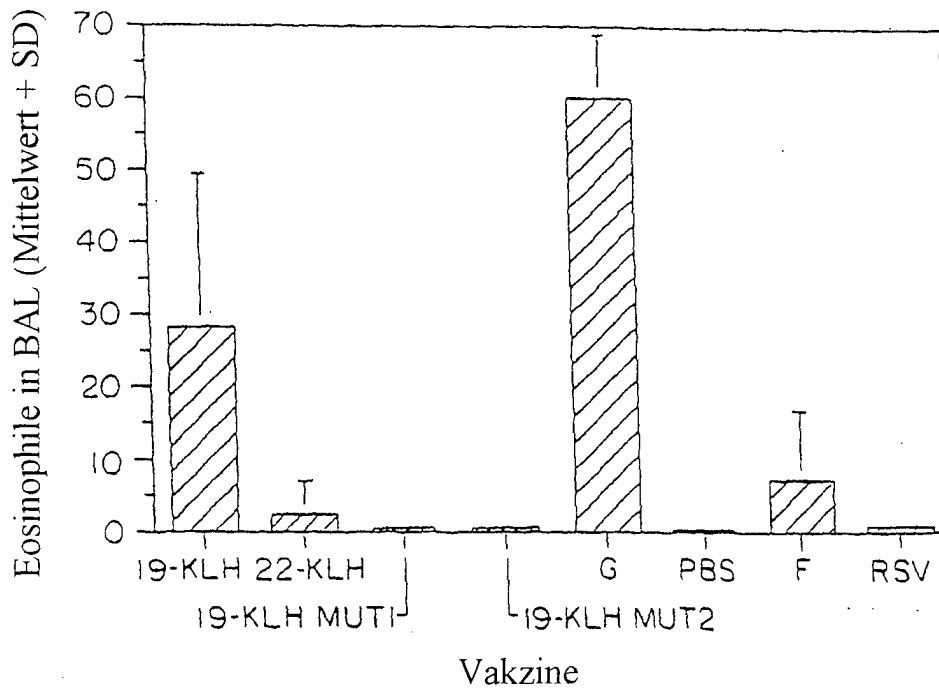


FIG. 6

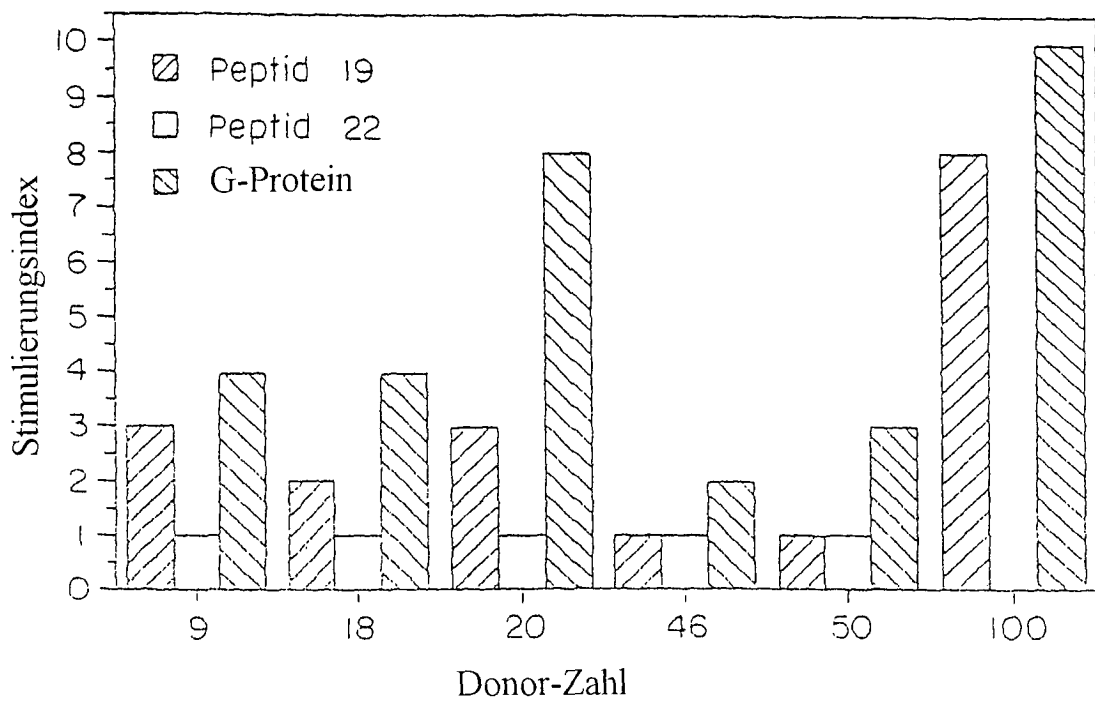


FIG. 7

Vakzine	Antikörper- behandlung	% CD4 ⁺ - Zellen	% CD8 ⁺ - Zellen	% BAL- Eosinophile
G/QS21	Ratten-Ig	21.2	8.5	67.2 ± 8.5
G/QS21	anti-CD4	1.5	15.0	8.1 ± 4.7**
G/QS21	anti-CD8	24.4	2.7	63.8 ± 6.4
Peptid 19-KLH/QS21	Ratten-Ig	19.0	7.7	29.6 ± 13.3
Peptid 19-KLH/QS21	anti-CD4	0.3	20.0	0.75 ± 0.6**
Peptid 19-KLH/QS21	anti-CD8	27.4	2.8	32.8 ± 10.3
RSV	keine	25.8	11.2	0.7 ± 1.0

Figur 8