



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 28 365 T2** 2007.04.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 171 454 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 365.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB00/00564**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 917 245.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/063242**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.04.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/145** (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
129501 P **15.04.1999** **US**

(73) Patentinhaber:
Institut Pasteur, Paris, FR

(74) Vertreter:
Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**JACOB, Yves, F-28130 Maintenon, FR; PERRIN,
Pierre, F-92120 Montrouge, FR; TORDO, Noel,
F-75002 Paris, FR; BAHLOUL, Chokri, Tunis, TN**

(54) Bezeichnung: **CHIMÄRE NUKLEINSÄUREN UND POLYPEPTIDE AUS LYSSAVIRUS**

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

[0001] Die Erfindung betrifft Trägermoleküle, welche chimäre Lyssavirus-Nukleinsäuren enthalten, und chimäre Polypeptide und Proteine, die durch diese Nukleinsäuren kodiert werden. Insbesondere betrifft die Erfindung eine immunogene Zusammensetzung, welche chimäre Lyssavirus-Nukleinsäuren und Proteine umfasst.

[0002] Tollwut ist eine enzephalopathische Erkrankung, die durch Mitglieder der Gattung Lyssavirus innerhalb der Familie Rhabdoviridae hervorgerufen wird. Tollwut infiziert alle Warmblüter und verläuft bei Menschen nahezu ausnahmslos tödlich, wenn sie nicht behandelt wird. Auf der Grundlage von Nukleotidsequenzvergleichen und phylogenetischen Analysen ist die Gattung Lyssavirus in 7 Genotypen (GT) unterteilt worden. GT1 umfasst die klassischen Tollwutviren und Impfstämme, wohingegen GT2 bis GT7 mit Tollwut verwandten Viren entsprechen, einschließlich des „Lagos bat“ (Lagos-Fledermaus-)-Virus (GT2), Mokola-Virus (GT3); Duvenhage-Virus (GT4); „European bat“ (Europäische Fledermaus-)-Lyssavirus 1 (EBL-1; GT5); „European bat“ (Europäische Fledermaus-)-Lyssavirus 2 (EBL-2; GT6); und „Australian bat“ (Australische Fledermaus-)-Lyssavirus (GT7).

[0003] Basierend auf Antigenität war die Gattung Lyssavirus zunächst in vier Serotypen unterteilt worden. Unlängst war diese Gattung in zwei Hauptgruppen entsprechend der Kreuzreaktivität von Virus-neutralisierendem Antikörper (VNAb) unterteilt worden: Gruppe 1 besteht aus GT1, GT4, GT5, GT6 und GT7, während Gruppe 2 aus GT2 und GT3 besteht. Viren der Gruppe 2 sind nicht pathogen, wenn sie Mäusen peripher injiziert werden. Die Virulenz von Lyssaviren ist, wenigstens teilweise, abhängig von dem in der Virushülle vorhandenen Glycoprotein. Interessanterweise zeigen die Glycoproteine der Gruppe 2 in der Region, welche Aminosäuren, die eine Schlüsselrolle bei der Pathogenität spielen, enthält, ein hohes Ausmaß an Identität zu der entsprechenden Sequenz von avirulenten GT1-Viren (siehe beispielsweise Coulon et al., 1998, „An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro“, J. Virol. 72: 273–278).

[0004] Das Tollwutvirus-Glycoprotein (G) besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer Ektodomäne. Das Glycoprotein ist ein Trimer, wobei die Ektodomänen auf der Virusoberfläche exponiert sind. Die Ektodomäne ist an der Induktion von sowohl der VNAb-Produktion als auch dem Schutz nach einer Impfung, sowohl vor als auch nach einer Exposition gegenüber dem Virus, beteiligt. Dementsprechend ist bei der Entwicklung von Tollwut-Untereinheiten-Impfstoffen viel Aufmerksamkeit auf G konzentriert worden. Strukturell gesehen enthält G drei Regionen, die aminoterminal (N-terminale) Region, eine „Gelenk“ („hinge“) oder „Linker“-Region und die carboxyterminale (C-terminale) Region. (Siehe Fig. 1).

[0005] Wie in Fig. 1 gezeigt, wird allgemein angenommen, dass die Glycoprotein (G)-Ektodomäne zwei hauptsächliche antigene Stellen, Stelle II und Stelle III, aufweist, die durch ungefähr 72,5% (Stelle II) bzw. 24% (Stelle III) der neutralisierenden monoklonalen Antikörper (MAb) erkannt werden. Die Stelle II befindet sich in der N-terminalen Hälfte des Proteins und die Stelle III befindet sich in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Die beiden Hälften sind durch ein flexibles Gelenk im Bereich der linearen Region (Aminosäuren 253 bis 257) voneinander getrennt.

[0006] Die G-Ektodomäne enthält des Weiteren eine geringfügigere Stelle (Stelle a) und mehrere Epitope, die durch einzelne MAbs erkannt werden (I: Aminosäurerest 231; V: Rest 294; und VI: Rest 264) (5, 10, 18, 21 Ref. 2). Die Stelle II ist konformational und diskontinuierlich (Aminosäurereste 34 bis 42 und Aminosäurereste 198 bis 200, die durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind), wohingegen die Stelle III konformational und kontinuierlich ist (Reste 330 bis 338). In Stelle III spielen Lysin 330 und Arginin 333 eine Schlüsselrolle bei der Neurovirulenz und können an der Erkennung von neuronalen Rezeptoren beteiligt sein (siehe beispielsweise Coulon et al., a.a.O., und Tuffreau et al., 1998, „Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells“, J. Virol. 72: 1085–1091). Die Stellen II und III scheinen in der dreidimensionalen Struktur nahe beieinander zu liegen und an der Oberfläche des Proteins exponiert zu sein (Gaudin, Y., 1997, „Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones“, J. Virol. 71: 3742–3750). Jedoch nimmt das G-Molekül bei niedrigem pH eine Fusions-inaktive Konformation an, in welcher die Stelle II für MAbs nicht zugänglich ist, wohingegen die Stellen a und III mehr oder weniger exponiert bleiben (Gaudin, Y., et al., 1995, „Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation“, J. Virol. 69: 5528–5533; Gaudin, Y., et al., 1991, „Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein“, J. Virol. 65: 4853–4859).

[0007] Darüber hinaus sind mehrere Regionen, die entlang der Ektodomäne verteilt sind, an der Induktion von T-Helfer (Th)-Zellen beteiligt (MacFarlan, R., et al., 1984, „T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein

and to synthetic peptides", *J. Immunol.* 133: 2748–2752; Wunner, W., et al., 1985, „Localization of immunogenic domains on the rabies virus glycoprotein", *Ann. Inst. Pasteur*, 136 E: 353–362). Basierend auf diesen strukturellen und immunologischen Eigenschaften ist vermutet worden, dass das G-Molekül möglicherweise zwei immunologisch aktive Teile, von welchen jeder potentiell in der Lage ist, sowohl VNAb als auch Th-Zellen zu induzieren, enthält (Bahloul, C., et al., 1998, „DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses", *Vaccine* 16: 417–425).

[0008] Gegenwärtig verfügbare Impfstoffe bestehen hauptsächlich aus, oder sind abgeleitet von, GT1-Viren, gegen welche sie Schutz verleihen. Viele Impfstämme sind gegen GT4 nicht wirksam und keiner ist wirksam gegen GT2 oder GT3. Jedoch hängt der gegen GT4 bis 6 erzeugte Schutz von dem Impfstamm ab. Beispielsweise ist der Schutz vor den Europäische Fledermaus-Lyssaviren (GT5 und GT6), deren Isolierung in den letzten Jahren häufiger geworden ist, durch den Tollwut-Impfstamm PM (Pitman-Moore) nicht anhaltend. Der Stamm PM induziert einen schwächeren Schutz gegen EBL1 (GT5) als den Schutz, den er gegen den Stamm PV (Pasteur-Virus) gewährleistet.

[0009] Aufgrund, teilweise, der Bedeutung von Tollwut im Bereich der Weltgesundheit gibt es einen andauernden Bedarf, sichere, wirksame, schnell wirkende Impfstoffe und immunogene Zusammensetzungen, um diese Erkrankung zu behandeln und zu verhüten, bereitzustellen. Viele andere Strategien als die Verwendung von Ganzvirus-Präparaten sind vorgeschlagen und/oder verfolgt worden, um eine wirkungsvolle, kosteneffiziente immunogene Zusammensetzung, welche für Tollwut-Viren spezifisch ist, bereitzustellen. Beispielsweise sind, wie oben diskutiert, Untereinheiten-Impfstoffe entwickelt worden. Es sind auch Impfstoffe, die eine Immunantwort gegen eine Mehrzahl von Tollwut-Serotypen wie auch verschiedene andere Pathogene erzeugen könnten, als von einem gewissen Wert vorgeschlagen worden (Europäische Kommission COST/STD-3, 1996, „Advantages of combined vaccines", *Vaccine* 14: 693–700). Tatsächlich ist unlängst über die Verwendung eines kombinierten Diphtherie-, Tetanus-, Ganzzell-Pertussis-, Poliomyelitis, inaktiviert, und Tollwut-Impfstoffs berichtet worden (Lang, J., et al., 1997, „Randomised Feasibility trial of pre-exposure rabies vaccination with DTP-IPV in infants", *The Lancet* 349: 1663–1665). Kombinierte Impfstoffe, welche Tollwut mit umfassen, sind auch für eine Immunisierung von Hunden („Distemper-" (Staupe-), Hepatitis-, Leptospirose und Hunde-Parvoviren („parvo-canine viruses")), Katzen (Panleukopenie, Calici- und Katzen-Parvoviren („parvo-feline viruses")) und Rindern (Maul- und Klauenseuche-Virus) verwendet worden (Pastoret, P-P., et al., 1997, „Vaccination against rabies", in: *Veterinary Vaccinology*, Pastoret, P-P., et al., Hrsg. (Elsevier): 616–628 23).

[0010] Darüber hinaus sind Impfstoffe, die in Gewebekultur hergestellt werden, teuer herzustellen trotz einiger Versuche, deren Kosten zu verringern. Dementsprechend würden DNA-Impfstoffe, die weniger teuer in der Herstellung sind und viele Vorteile bieten, eine wertvolle Alternative bilden. Berichte über DNA-Impfungen umfassen eine Inokulation von Mäusen mit Plasmiden, die das das Tollwutvirus-Glycoprotein (G) kodierende Gen enthalten. Eine solche Inokulation ist sehr wirkungsvoll bei der Induktion von humoralen und zellulären Immunantworten in Kombination mit einem Schutz gegen eine intrazerebrale Provokation („challenge") (siehe beispielsweise Lodmell, D., et al. 1998, „DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus", *Science Med.* 4: 949–952; Xiang, Z., et al., 1994, „Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus", *Virol.* 199: 132–140; und Lodmell, D., et al., 1998, „Gene gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection", *Vaccine* 16, 115). Eine DNA-Immunisierung kann auch nicht-menschliche Primaten vor Tollwut schützen (Lodmell et al., 1998, a.a.O.)

[0011] Wir können auch die Dokumente Jollet, C., et al., 1999, (*J. Virol.*, 73(1): 225–233) und Bahlosi, C., et al., 1998 (*Vaccine*, 16(4): 417–425) zitieren, die Plasmid-Vektoren, welche Polynukleotidsequenzen, welche die Stelle III oder Stelle II des Lyssavirus-Glycoproteins und andere Lyssavirus-Antigene als eine Stelle III oder II kodieren, enthalten, und deren Verwendungen als Impfstoff, um einen Schutz nach Provokation mit Lyssaviren zu induzieren, offenbaren.

[0012] Da die Verabreichung von Plasmid-DNA humorale und zelluläre Immunantworten, einschließlich der Produktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), erzeugt (für eine Übersicht siehe Donnelly, J., et al., 1997, „DNA Vaccines", *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617–648) und auf einer vielseitigen Technologie basiert, könnte eine Immunisierung mit Plasmid-DNA zufrieden stellende Aussichten für multivalente Impfstoffe bieten. Jedoch wird angenommen, dass die Verwendung einer Mischung von Plasmiden oder eines einzelnen Plasmids, welches mehrere Antigene exprimiert, Interferenzprobleme sowohl auf transkriptioneller als auch immunologischer Ebene induzieren kann (Thomson, S., et al., 1998, „Delivery of multiple CD8 cytotoxic cell epitopes by DNA vaccination", *J. Immunol.* 160, 1717–1723). Dementsprechend besteht eine Notwendigkeit, multivalente, auf DNA basierende Impfstoffe zu entwickeln und herzustellen, die gegen Tollwut und verschiedene andere Er-

krankungen wirksam sind, die sicher sind und die kosteneffizient herzustellen und zu verwenden sind.

[0013] Die Erfindung stellt ein Trägermolekül, wie einen DNA-Expressionsvektor, bereit, welches eine chimäre Polynukleotidsequenz umfasst, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz eine Sequenz, welche einen Teil eines Glycoproteins, welches wenigstens die Stelle III des Lyssavirus-Glycoproteins enthält, kodiert, umfasst und des Weiteren eine Sequenz, welche ein heterologes Antigen, welches etwas anderes als ein Antigen aus einem Lyssavirus ist, kodiert, umfasst. Das Trägermolekül der Erfindung kann als eine immunogene Zusammensetzung oder als Teil einer immunogenen Zusammensetzung verwendet werden, um die gewünschte Immunantwort auszulösen. Es wird beschrieben, dass die gewünschte Immunantwort eine schützende Antwort gegen Tollwut oder mit Tollwut verwandten Viren wie auch andere Organismen oder Polypeptide sein kann. Dementsprechend können die Trägermoleküle der Erfindung verwendet werden, um eine immunogene Zusammensetzung, die verwendet werden kann, um ein Individuum zu behandeln, herzustellen. Das Trägermolekül kann auch verwendet werden, um ein chimäres Polypeptid herzustellen.

[0014] Die Erfindung stellt auch ein Polypeptid bereit, das durch die Nukleinsäure, welche in dem Trägermolekül der Erfindung vorhanden ist, kodiert wird. Es wird beschrieben, dass das Polypeptid der Erfindung verwendet werden kann, um eine immunogene Antwort in einem Individuum auszulösen. Dementsprechend kann das chimäre Polypeptid der Erfindung verwendet werden, um eine immunogene Zusammensetzung, die verwendet werden kann, um ein Individuum zu behandeln, herzustellen.

[0015] Die Erfindung umfasst immunogene Zusammensetzungen, welche das Trägermolekül der Erfindung, welches eine Polynukleotidsequenz, die ein chimäres (oder Fusions-)Polypeptid kodiert, enthält, oder das so kodierte chimäre Polypeptid umfassen, welche verwendet werden können, um die Immunantwort auszulösen.

[0016] Die Erfinder haben chimäre Nukleinsäuresequenzen erzeugt, die chimäre Polypeptide kodieren, die immunogene Antworten in Individuen induzieren. Wie oben diskutiert, ist in diesem Fachgebiet bekannt, dass DNA sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten auslösen kann. Da dies so ist, ist es möglich, dass die Nukleinsäuren ihrerseits wenigstens einen Teil der immunogenen Antwort induzieren können. Dementsprechend können die chimären Nukleinsäuren und Trägermoleküle eine immunogene Antwort bereitstellen oder fördern.

[0017] Wie hier verwendet, werden „chimär“ und „Fusion“ gegeneinander austauschbar und in Bezug auf sowohl Nukleinsäuren als auch Polypeptide verwendet. Diese Begriffe beziehen sich auf Nukleinsäuren und Polypeptide, die Sequenzen umfassen, die in der Natur nicht miteinander assoziiert gefunden werden in der Reihenfolge oder dem Kontext, in welche(n) sie gemäß der Erfindung platziert werden. Ein chimäres Glycoprotein kann beispielsweise eine C-terminale Region aus einem Tollwut-GT1 und eine N-terminale Region aus einem Tollwut-GT3 oder -GT5 umfassen. Des Weiteren kann eine chimäre Nukleinsäure ein kurzes Segment aus einem Abschnitt eines Tollwut-Genotyps direkt verknüpft mit einem anderen Segment aus dem gleichen Genotyp, wobei die beiden Segmente in der Natur nicht aneinander angrenzen, umfassen. Dementsprechend umfasst ein(e) chimäre(s) oder Fusionsnukleinsäure oder -polypeptid nicht die natürliche Sequenz eines Tollwut-Virus in ihrer Gänze und kann heterologe (aus einem anderen Lyssavirus-Stamm oder aus einem vollständig anderen Organismus) Sequenzen umfassen. Fusions-/chimäre Proteine weisen die zwei (oder mehr) heterologen Segmente miteinander durch normale Peptidbindungen verknüpft auf, während in Fusions-/chimären Nukleinsäuren die zwei (oder mehr) heterologen Segmente miteinander durch normale Phosphodiester-Bindungen verknüpft sind.

[0018] Unter einem Aspekt der Erfindung umfassen die chimären Nukleinsäuren, die in dem Trägermolekül der Erfindung enthalten sind, a) eine Sequenz, welche einen Teil eines Glycoproteins, welches wenigstens die Stelle III des Lyssavirus-Glycoproteins enthält, kodiert, und umfassen des Weiteren eine Sequenz, welche eine Transmembrandomäne (oder einen Abschnitt davon, der funktionell zu der Transmembrandomäne äquivalent ist) oder ein Transmembranprotein kodiert. In bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung umfassen die chimären Nukleinsäuren, die in dem Trägermolekül der Erfindung enthalten sind, des Weiteren eine Sequenz, welche die zytoplasmatische Domäne des Glycoproteins des Lyssavirus kodiert. In ebenfalls bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung umfassen die chimären Nukleinsäuren des Weiteren eine Sequenz, welche wenigstens die C-terminale Hälfte eines Lyssavirus-Glycoproteins kodiert. Es wird beschrieben, dass die Sequenz, welche die Transmembrandomäne (oder einen Abschnitt davon) kodiert, eine Sequenz aus einem Transmembranglycoprotein eines Lyssavirus ist oder aus einem anderen Transmembranglycoprotein als einem Glycoprotein aus einem Lyssavirus stammt. Sie kann beispielsweise aus einem Glycoprotein aus einem anderen Organismus oder aus einem Transmembranprotein, das kein Glycoprotein ist, stammen. In Ausführungsformen stammen die Sequenz, welche die Transmembrandomäne (oder einen

Abschnitt davon) kodiert, und die Sequenz, welche die zytoplasmatische Domäne kodiert, aus dem gleichen Lyssavirus. Die Sequenzen, welche Stelle III und die zytoplasmatische Domäne kodieren, stammen aus dem gleichen Lyssavirus-Glycoprotein.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung umfasst die chimäre Nukleinsäure, die in dem Trägermolekül der Erfindung enthalten ist, Sequenzen, die eine Stelle III-Sequenz eines Lyssavirus-Glycoproteins, ein anderes heterologes Antigen als ein Antigen aus einem Lyssavirus, eine Stelle II-Sequenz von einem Lyssavirus-Glycoprotein, eine Transmembrandomäne eines Transmembranproteins und eine zytoplasmatische Domäne eines Transmembranproteins kodieren. Es wird beschrieben, dass die chimäre Nukleinsäure der Erfindung Sequenzen, welche ein antigenes Protein (oder einen antigenen Abschnitt davon) kodieren, insbesondere zwischen den Sequenzen, welche die Stellen II und III kodieren, umfasst.

[0020] Es wird beschrieben, dass die Sequenzen, welche Stelle II und Stelle III kodieren, Sequenzen sind, welche die Stelle II bzw. Stelle III eines Glycoproteins eines Lyssavirus umfassen. In Ausführungsformen ist die Sequenz, welche die Stelle III kodiert, nicht identisch mit irgendeiner der bekannten Stelle III-Sequenzen von Lyssaviren, sondern zeigt wenigstens 60% Identität mit einer der Lyssavirus-Sequenzen, wobei sie sich 30 bp auf jeder Seite der Stelle III-Sequenz erstreckt. Sequenzanalyse und phylogenetische Untersuchungen werden unter Verwendung von verschiedenen Software-Paketen ausgeführt: GCG (Version 8.1, 1994). CLUSTAL W (Thompson, 1994, #1040), PHYLIP (Version 3.5; Felsenstein, 1993, #1042) und GDE (Genetic Data Environment, Version 2.2; Institute Pasteur Scientific Computer Service – S. I. S.).

[0021] Im Rahmen dieser Erfindung wird beschrieben, dass die Stelle III-Sequenz aus dem Tollwutvirus-Stamm PV stammt oder wenigstens 60% Identität mit jener Stelle III-Sequenz zeigt. Hochgradig zufrieden stellende Ergebnisse werden mit den folgenden Konstrukten, welche in **Fig. 1** gezeigt sind, erhalten: PV-PV oder PV III oder EBL1-PV oder MOK-PV. Das Basismodul muss wenigstens eine PV III-Sequenz enthalten.

[0022] Die Erfinder haben festgestellt, dass das Vorhandensein von Stelle III der Lyssavirus-Glycoproteine die Immunogenität von Zusammensetzungen, welche das Glycoprotein oder Abschnitte davon umfassen, verbessert. Die Erfindung beschreibt chimäre Nukleinsäuren, die eine Sequenz umfassen, welche Stelle III eines Lyssavirus-Glycoproteins kodiert, welche funktional, operativ und körperlich verknüpft ist mit einer homologen oder heterologen Sequenz, welche eine Transmembrandomäne aus einer natürlichen oder synthetischen Sequenz, welche ein Transmembranprotein kodiert, (oder einen Abschnitt davon, welcher funktionell zu der Transmembrandomäne äquivalent ist,) kodiert, und einer Sequenz, welche eine zytoplasmatische Domäne (oder einen Abschnitt davon, welcher ausreichend ist, um zytoplasmatisch stabil zu existieren) aus einem Glycoprotein kodiert. Das Glycoprotein ist jenes von einem Virus und insbesondere jenes von einem Lyssavirus. Die chimären Nukleinsäuresequenzen können alle von dem gleichen Lyssavirus stammen, können aus verschiedenen Lyssaviren ausgewählt werden oder können sowohl aus Lyssaviren als auch aus anderen Viren und Organismen stammen. In bevorzugten Ausführungsformen stammen die Nukleinsäuresequenzen, welche die Stelle III und die zytoplasmatische Domäne kodieren, aus dem gleichen Lyssavirus.

[0023] Die chimäre Nukleinsäure des Trägermoleküls der Erfindung umfasst eine Sequenz, welche ein anderes heterologes Antigen als ein Antigen aus einem Lyssavirus oder einen antigenen Abschnitt davon kodiert. Es wird beispielsweise beschrieben, dass die chimäre Nukleinsäure zusätzlich zu den oben dargelegten Elementen eine Sequenz umfassen kann, welche ein Epitop aus Leishmanien, den Diphtherie-, Tetanus-, Poliomyelitis-Erregern, dem Maul- und Klauenseuche-Virus, den Herpes-Viren, den Staupeviren, Parvoviren und dem Katzen-Immundefizienz-Virus („feline immunodeficiency virus“) kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die chimäre Nukleinsäure, die in dem Trägermolekül der Erfindung enthalten ist, eine Sequenz, welche ein Tumorantigen kodiert. Die das heterologe Polypeptid (oder einen antigenen Abschnitt davon) kodierende Sequenz ist fusioniert (im Raster) mit der oben detailliert dargelegten kodierenden Sequenz an einer jeglichen Stelle, die zu einem funktionsfähigen Produkt führt. Es wird beschrieben, dass auf diese Weise die chimäre Nukleinsäure die kodierende Sequenz für eine Mehrzahl von antigenen Determinanten, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Tollwutvirus-Epitope, umfassen kann.

[0024] Das Trägermolekül der Erfindung kann verwendet werden, um eine immunogene Zusammensetzung herzustellen. Die immunogene Zusammensetzung kann im Wesentlichen aus der chimären Nukleinsäure bestehen oder kann die chimäre Nukleinsäure zusätzlich zu anderen Bestandteilen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Adjuvantien, Trägersubstanzen/Vehikel, Stabilisatoren, supramolekulare Vektoren, wie in dem Europäischen Patent Nr. 696,191 (Samain et al.) beschrieben, und Antigene, umfassen. Die in immunogenen Zusammensetzungen typischerweise enthaltenen Bestandteile sind dem Fachmann auf diesem Gebiet wohl bekannt wie dies die Techniken zur Herstellung von immunogenen Zusammensetzungen, wie Impfstoffen,

sind. Dementsprechend kann die Herstellung der immunogenen Zusammensetzung durch den Fachmann unter Verwendung von wohlbekannten Techniken ohne unangemessene oder übermäßige Experimente erzielt werden.

[0025] Der Kern des Trägermoleküls kann ein jegliches Molekül sein, das dafür bekannt ist, nützlich zu sein, um eine ein heterologes Polypeptid kodierende Nukleinsäure zu beherbergen und vorzugsweise zu exprimieren. Der Kern des Trägermoleküls kann beispielsweise ein Plasmid, ein Phage, ein Phagemid, ein Cosmid, ein Virus oder ein künstliches Hefechromosom (YAC) sein. Solche Kern-Trägermoleküle werden auch üblicherweise als Vektoren oder Expressionsvektoren bezeichnet und sind den Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt und stehen der Öffentlichkeit in großem Umfang zur Verfügung. Das Trägermolekül der Erfindung kann als eine nackte Nukleinsäure oder verpackt, wie in einer Virusschale oder -hülle, bereitgestellt werden. Das Trägermolekül kann als DNA oder RNA bereitgestellt werden. Modifizierte Formen von diesen beiden Nukleinsäuren sind innerhalb des Umfangs der Erfindung mit enthalten. Das Trägermolekül kann Sequenzen umfassen, die eine Transkription der chimären Nukleinsäuren erlauben. Diese Sequenzen sind funktionsfähig mit den chimären Nukleinsäuren der Erfindung verknüpft (d.h. ihr(e) Betrieb/Funktion beeinflusst direkt die Expression der chimären Nukleinsäure). In Ausführungsformen umfassen diese Sequenzen regulatorische Elemente, die eine kontrollierte Expression der chimären Nukleinsäuren erlauben, so dass die Expression der chimären Nukleinsäuren reguliert werden kann, indem beispielsweise die Expression verzögert wird, bis sie gewünscht wird, oder die chimären Nukleinsäuren nur in bestimmten Geweben oder Zellarten exprimiert werden. Solche Kontrollelemente sind dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt und können unter Verwendung von wohlbekannten Techniken und Reagenzien der Molekularbiologie routinemäßig inseriert oder aus den Trägermolekülen entfernt werden, wie gewünscht wird oder erforderlich ist.

[0026] Unter einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein chimäres Polypeptid oder Protein, welches durch die chimäre Nukleinsäuresequenz des Trägermoleküls der Erfindung kodiert und/oder exprimiert wird, bereit.

[0027] Es wird beschrieben, dass Stelle II und Stelle III aus einem jeglichen Lyssavirus erhalten werden können und beide aus dem gleichen Lyssavirus stammen können, nicht aber notwendigerweise stammen müssen. Des Weiteren muss die Sequenz von Stelle II und/oder Stelle III nicht mit einer Stelle II oder Stelle III eines Glycoproteins eines Lyssavirus identisch sein. Die Sequenz von einer oder beiden ist nicht identisch mit einer jeglichen der bekannten Stelle II- oder Stelle III-Sequenzen von Lyssaviren, sondern zeigt wenigstens 60% Identität mit einer der Lyssavirus-Sequenzen, wobei sie sich 10 Reste auf jeder Seite der Stelle II- oder Stelle III-Sequenzen erstreckt.

[0028] Die Erfindung stellt auch ein chimäres Polypeptid mit einer Mehrzahl von Antigenen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Tollwut-Antigene, bereit. Das chimäre Polypeptid kann verwendet werden als oder als Teil einer immunogenen Zusammensetzung, wie eines Impfstoffs. Dementsprechend ist das Polypeptid der Erfindung ein immunogenes Polypeptid, das wenigstens eine Region (die als ein Fragment isoliert werden kann), welche eine immunogene Antwort induziert, enthält. In Ausführungsformen, wo eine Stelle II, eine Stelle III und eine andere antigene Determinante vorhanden sind, ist es bevorzugt, aber nicht notwendig, dass sich die andere antigene Determinante zwischen der Stelle II und der Stelle III in der linearen (primären) Aminosäuresequenz des Polypeptids befindet. Ein bevorzugtes anderes Antigen als eine Stelle II oder Stelle III ist ein Tumorantigen aus einer Tumorzelle.

[0029] Die Trägermoleküle und chimären Polypeptide (die „Moleküle“) der Erfindung können isoliert und/oder gereinigt sein. Die Begriffe „isoliert“ und „gereinigt“ beziehen sich auf ein Ausmaß an Reinheit, welches unter Verwendung von gegenwärtig verfügbarer Technologie erzielbar ist. Die Moleküle der Erfindung müssen nicht absolut rein sein (d.h. absolut keine Moleküle von anderen zellulären Makromolekülen enthalten), sondern sollten ausreichend rein sein, so dass ein Fachmann auf diesem Gebiet erkennen würde, dass sie sich nicht länger in der Umgebung, in welcher sie ursprünglich gefunden worden sind (d.h. dem zellulären Milieu), befinden. So ist ein gereinigtes oder isoliertes Molekül eines, das von wenigstens einem anderen Makromolekül, welches in der natürlichen Umgebung, in welcher es gefunden worden ist, vorhanden ist, entfernt worden ist. Die Moleküle der Erfindung können im Wesentlichen gereinigt und/oder isoliert sein, was bedeutet, dass die Zusammensetzung, in welcher sie vorliegen, nahezu vollständig oder sogar absolut frei ist von anderen Makromolekülen, die in der Umgebung, in welcher die Moleküle der Erfindung ursprünglich gefunden werden, gefunden werden. Isolierung und Reinigung erfolgen dementsprechend nicht durch Hinzufügen oder Entfernung von Salzen, Lösemitteln oder Elementen des Periodensystems, sondern müssen die Entfernung von wenigstens einigen Makromolekülen umfassen.

[0030] Wie aus der obigen Offenbarung ersehen werden kann, stellt die Erfindung eine immunogene Zusam-

mensetzung bereit, welche das chimäre Protein oder Trägermolekül der Erfindung umfasst. Die chimären Polypeptide der Erfindung können beispielsweise verwendet werden, um eine immunogene Zusammensetzung herzustellen. Die immunogene Zusammensetzung kann im Wesentlichen aus dem chimären Polypeptid bestehen oder kann das chimäre Polypeptid zusätzlich zu anderen Bestandteilen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Adjuvantien, Trägermaterialien/Vehikel, Stabilisatoren, supramolekulare Vektoren (EP 696,191, Samain et al.) und Antigene, umfassen. Die Bestandteile, die in immunogenen Zusammensetzungen typischerweise enthalten sind, sind dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt wie dies auch die Techniken für die Herstellung von immunogenen Zusammensetzungen, wie Impfstoffen, sind. Dementsprechend kann die Herstellung der immunogenen Zusammensetzung durch den Fachmann unter Verwendung von wohlbekanntem Techniken ohne unangemessenes oder übermäßiges Experimentieren erzielt werden.

[0031] Es wird beschrieben, dass eine immunogene Zusammensetzung gemäß der Erfindung eine Zusammensetzung ist, welche eine Immunantwort zumindest gegen Lyssaviren auslöst. Da die Trägermoleküle und Polypeptide der Erfindung antigene Determinanten aus den verschiedenen Lyssavirus-Genotypen in verschiedenen Kombinationen umfassen können, kann die immunogene Zusammensetzung der Erfindung ein breites Spektrum von Schutz gegen Lyssaviren, die Enzephalomyelitis induzieren, einschließlich Tollwutviren, bereitstellen. Da Sequenzen, die eine Mehrzahl von Lyssavirus-Epitopen kodieren, in eine chimäre Nukleinsäure aufgenommen werden können, kann die immunogene Zusammensetzung der Erfindung darüber hinaus eine Immunantwort gegen eine Mehrzahl (einschließlich aller) der Lyssavirus-Genotypen bewirken. Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung löst vorzugsweise sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort aus.

[0032] Zusätzlich stellt die immunogene Zusammensetzung der Erfindung Epitope nicht nur aus Lyssaviren, sondern ebenso aus einem jeglichen anderen Organismus bereit (einschließlich Antigene, die durch menschliche Zellen produziert werden, wie unerwünschte Antigene, die auf der Oberfläche von Krebszellen gefunden werden). Dies erlaubt die Konstruktion von immunogenen Zusammensetzungen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Impfstoffe, welche eine breite Anwendbarkeit aufweisen, indem eine einzelne Zusammensetzung verwendet werden kann, um eine Immunantwort gegen eine Mehrzahl von Pathogenen auszulösen. Es kann beispielsweise eine immunogene Zusammensetzung hergestellt werden, die eine schützende immunologische Antwort gegen ein breites Spektrum von Lyssaviren bereitstellt, während sie zur gleichen Zeit eine schützende Antwort gegen andere Viren, wie Polio und Influenza, bereitstellt. Eine solche multivalente immunogene Zusammensetzung wird aufgrund der chimären Natur der Nukleinsäuren und Polypeptide der Erfindung wie auch der Anwesenheit von Stelle III eines Lyssavirus, welche eine starke immunogene Antwort gegen die Epitope des antigenen Polypeptids vermittelt, bereitgestellt.

[0033] Die immunogene Zusammensetzung der Erfindung löst in Individuen, welchen sie verabreicht wird, eine immunogene Antwort aus. Die immunogene Antwort kann eine schützende Immunantwort auslösen, aber eine solche Antwort ist nicht erforderlich. Die immunogenen Antworten können verstärkt oder in anderer Weise modifiziert werden durch die Aufnahme von Bestandteilen zusätzlich zu den chimären Nukleinsäuren, chimären Proteinen und Trägermolekülen der Erfindung. Alternativ können die immunogenen Zusammensetzungen im Wesentlichen aus den chimären Nukleinsäuren, chimären Proteinen und Trägermolekülen der Erfindung bestehen.

[0034] Die Erfindung beschrieb ein Verfahren zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Isolieren und/oder das Reinigen der chimären Nukleinsäure oder des chimären Polypeptids oder des Trägermoleküls. In einer anderen Ausführungsform umfasst das Verfahren das Isolieren der Nukleinsäure oder des Polypeptids oder des Trägermoleküls, dann das Kombinieren von dieser/diesem mit zusätzlichen Bestandteilen. Die zusätzlichen Bestandteile können eine jegliche geeignete Verbindung, die keine abträgliche Wirkung auf die Immunogenität, Sicherheit oder Wirksamkeit der Nukleinsäure, des Polypeptids oder Trägermoleküls der Erfindung hat, sein. Die zusätzlichen Bestandteile umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Verbindungen und Zusatzstoffe, die typischerweise zu immunogenen Zusammensetzungen hinzugefügt werden, um Immunogenität, Stabilität und biologische Verfügbarkeit zu erhöhen. Solche Zusatzstoffe werden oben offenbart und sind den Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt.

[0035] In einer anderen Ausführungsform ist das Verfahren zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung ein Verfahren zur Expression eines chimären (hybriden) Polypeptids für eine Verwendung bei der Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung. In dieser Ausführungsform wird die chimäre Nukleinsäure des Trägermoleküls der Erfindung exprimiert (transkribiert und translatiert) derart, dass das chimäre Polypeptid hergestellt wird. Das so hergestellte chimäre Polypeptid wird dann bis zu einem annehmbaren Ausmaß isoliert und/oder gereinigt, so dass es verwendet werden kann, um eine immunogene Zusammensetzung herzustellen.

len. Wie hier verwendet, ist ein Polypeptid ein Polymer aus Aminosäuren und umfasst Peptide (mehr als 3 Aminosäuren Länge) und Proteine (mehr als 100 Aminosäuren Länge). Die Produktion des chimären Polypeptids kann in vivo oder in vitro ausgeführt werden. Die Produktion erfolgt vorzugsweise in vivo durch Expression in Bakterien- oder Gewebekulturen und das chimäre Polypeptid wird aus jenen Kulturen unter Verwendung von bekannten Proteinreinigungstechniken isoliert.

[0036] Es werden auch Verfahren zur Herstellung der Trägermoleküle und chimären Polypeptide der Erfindung offenbart. Die Verfahren umfassen allgemein bekannte Techniken der Gentechnologie, die dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt sind. Es kann eine jegliche bekannte Technik, die durch den Fachmann routinemäßig praktiziert wird, verwendet werden, um die chimären Moleküle des Trägermoleküls der Erfindung herzustellen und zu reinigen. Die Neuheit der Erfindung liegt nicht in diesen Techniken, sondern in den durch die Verwendung von diesen konstruierten chimären Molekülen. Unter diesem Aspekt können die Verfahren verwendet werden, um eine Nukleinsäure oder ein Trägermolekül für eine Verwendung bei der Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung, wie eines DNA-Impfstoffs, herzustellen.

[0037] Die Erfindung offenbart auch Verfahren zur Behandlung von Individuen mit den immunogenen Zusammensetzungen der Erfindung. Das Verfahren ist vorzugsweise ein Impfverfahren. Das Verfahren umfasst, die immunogenen Zusammensetzungen an Individuen oder Patienten, welche einer Behandlung bedürfen, von welchen vermutet wird, dass sie eine Behandlung benötigen, oder welche eine prophylaktische (einen Schutz verleihende) Behandlung für eine Erkrankung oder Störung wünschen, zu verabreichen. Es kann eine jegliche bekannte Verabreichungsmethode im Rahmen dieses Aspekts der Erfindung verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Injektion mittels Spritze und Nadel (z.B. subkutan, intramuskulär, intravenös), orale oder mukosale Verabreichung, Inhalation, topische Verabreichung (z.B. direktes Auftragen auf die Haut) und mittels Zäpfchen.

[0038] Es wird auch ein Verfahren beschrieben, welches umfasst, die chimären Nukleinsäuren des Trägermoleküls der Erfindung an ein Individuum zu verabreichen in einer Menge, welche ausreichend ist, um in dem Empfänger eine immunogene Reaktion auszulösen. Diese Antwort ist vorzugsweise eine einen Schutz bewirkende Antwort. Die Nukleinsäuremenge, die für eine solche Immunisierung erforderlich ist, kann durch die Fachleute auf diesem Gebiet ohne unangemessene oder übermäßige Experimente bestimmt werden. Es können beispielsweise Zusammensetzungen, welche die chimären Nukleinsäuren und Trägermoleküle der Erfindung umfassen, in einer Menge von 40 bis 100 µg intramuskulär in einer oder mehreren Injektionen verabreicht werden. Für Hunde ist im Allgemeinen eine Dosis von 100 µg nützlich und eine Dosis von 40 µg für Mäuse (Gewicht 20 g).

[0039] Es wird auch ein Verfahren beschrieben, welches umfasst, die chimären Polypeptide der Erfindung an ein Individuum zu verabreichen. Die Antwort ist vorzugsweise eine einen Schutz bewirkende Antwort. Die Menge an Polypeptid, die für eine solche Immunisierung erforderlich ist, kann durch die Fachleute auf diesem Gebiet ohne unangemessene oder übermäßige Experimente bestimmt werden. Es können beispielsweise Zusammensetzungen, welche die chimären Polypeptide der Erfindung umfassen, in einer Menge von 1 bis 10 µg intramuskulär in einer oder mehreren Injektionen verabreicht werden.

[0040] Es wird auch ein Verfahren beschrieben, welches umfasst, das Trägermolekül der Erfindung an ein Individuum zu verabreichen. Die Antwort ist vorzugsweise eine einen Schutz bewirkende Antwort. Die Menge an Trägermolekül, die für eine solche Immunisierung erforderlich ist, kann durch die Fachleute auf diesem Gebiet ohne unangemessene oder übermäßige Experimente bestimmt werden. Es können beispielsweise Zusammensetzungen, welche die Trägermoleküle der Erfindung umfassen, in einer Menge von 40 bis 100 µg intramuskulär in einer oder mehreren Injektionen verabreicht werden.

[0041] Es wird auch ein Verfahren beschrieben, welches umfasst, eine jegliche Kombination der chimären Nukleinsäuren, der chimären Polypeptide und des Trägermoleküls der Erfindung an ein Individuum zu verabreichen. Das Individuum kann ein Tier und vorzugsweise ein Säugetier sein. Das Säugetier wird mehr bevorzugt aus der Gruppe bestehend aus einem Menschen, einem Hund, einer Katze, einem Rind, einem Schwein und einem Pferd ausgewählt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Säugetier ein Mensch.

[0042] Es werden auch Behandlungsverfahren beschrieben, welche umfassen, immunogene Zusammensetzungen, welche Polypeptide umfassen, aber ebenso Zusammensetzungen, welche Nukleinsäuren (einschließlich des Trägermoleküls) umfassen, zu verabreichen. Die Fachleute auf diesem Gebiet verfügen über Kenntnisse hinsichtlich des Konzepts, der Anwendung und der Wirksamkeit von Nukleinsäure-Impfstoffen (z.B. DNA-Impfstoffen) und hinsichtlich der Nukleinsäure-Impfstoff-Technologie wie auch hinsichtlich auf Pro-

teinen und Polypeptiden basierenden Technologien. Die auf Nukleinsäuren basierende Technologie ermöglicht die Verabreichung von Nukleinsäuren, nackt oder verkapselt, direkt an Gewebe und Zellen ohne die Notwendigkeit einer Produktion von kodierten Proteinen vor der Verabreichung. Die Technologie beruht auf der Fähigkeit dieser Nukleinsäuren, durch Zellen des Empfängerorganismus aufgenommen und exprimiert zu werden, um eine immunogene Determinante, auf welche das Immunsystem des Empfängers anspricht, herzustellen. Die exprimierten Antigene werden typischerweise auf der Zelloberfläche von Zellen, die die Nukleinsäuren aufgenommen und exprimiert haben, präsentiert, aber die kodierten Antigene können exprimiert und in das Kreislaufsystem des Empfängerindividuums exportiert werden. Eine solche Nukleinsäure-Impfstoff-Technologie umfasst die Abgabe von nackter DNA und RNA und eine Abgabe von Expressionsvektoren, welche Polypeptide von Interesse (Trägermoleküle) kodieren, ist aber nicht darauf beschränkt. Obwohl die Technologie als „Impfstoff“ bezeichnet wird, ist sie gleichfalls auf immunogene Zusammensetzungen, die nicht zu einer einen Schutz bewirkenden Antwort führen, anwendbar.

[0043] Die Erfindung offenbart auch die Abgabe von Nukleinsäuren als Teil von größeren oder komplexeren Zusammensetzungen. In diesen Abgabesystemen enthalten sind Viren, virusartige Partikel oder Bakterien, die die chimäre Nukleinsäure oder das Trägermolekül der Erfindung enthalten. Es sind auch Komplexe der Nukleinsäuren und Trägermoleküle der Erfindung mit zellpermeabilisierenden Verbindungen, wie Liposomen, im Umfang der Erfindung enthalten. Andere Verbindungen, supramolekulare Vektoren (EP 696,191, Samain et al.) und Abgabesysteme für Nukleinsäure-Impfstoffe sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt und in WO 90 111 092 und WO 93 06223 (Patente von Vical) exemplifiziert und können ohne unangemessene und übermäßige Experimente hergestellt und verwendet werden.

[0044] Die Verfahren zum Behandeln von Individuen umfassen eine prophylaktische Behandlung, therapeutische Behandlung und kurative Behandlung. Eine prophylaktische Behandlung ist eine Behandlung eines Individuums unter Verwendung der Verfahren der Erfindung, bevor ein jegliches klinisches Anzeichen einer Erkrankung oder Infektion identifiziert wird. Dementsprechend ist eine prophylaktische Behandlung eine präventive Behandlung und umfasst eine Impfung. Eine prophylaktische Behandlung umfasst auch eine Behandlung, die nach einer aktuellen Infektion oder einem aktuellen Krankheitsanfang begonnen wird, aber bevor wenigstens ein klinisches Anzeichen der Erkrankung oder Infektion beobachtet wird. Eine therapeutische Behandlung ist eine Behandlung eines Individuums, nachdem wenigstens ein klinisches Anzeichen einer Erkrankung oder Infektion identifiziert worden ist oder nachdem von einem Individuum bekannt geworden ist oder mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen wird, dass es einer Menge eines Mittels, welche ausreichend ist, um eine Erkrankung oder Infektion hervorzurufen, ausgesetzt worden ist. Therapeutische Behandlungsverfahren führen nicht notwendigerweise zu einer Beseitigung der Erkrankung oder Infektion; sie bewirken jedoch eine klinisch nachweisbare Verbesserung bei wenigstens einem klinischen Anzeichen der Erkrankung oder Infektion. Kurative Behandlungsverfahren führen zu der vollständigen Beseitigung der klinischen Anzeichen der Erkrankung oder Infektion bei dem behandelten Individuum. In den kurativen Behandlungsverfahren enthalten sind jene, die zu einer vollständigen Entfernung des verursachenden Agens der Infektion oder Erkrankung führen, sei dieses ein Virus, ein Bakterium oder eine Wirtszelle (wie eine Krebszelle). In kurativen Behandlungsverfahren auch enthalten sind jene, die eine vollständige Remission einer Erkrankung bewirken, d.h. eine vollständige Beseitigung aller äußerlichen klinischen Anzeichen einer Infektion oder Erkrankung und eine Repression aller nachweisbarer klinischer Manifestationen der Infektion oder Erkrankung.

[0045] Hinsichtlich einer Tollwutimpfung ist bekannt, dass das Virus sowohl prophylaktisch (z.B. durch Impfung von Hunden) als auch kurativ (z.B. durch eine Reihe von Injektionen für einen Menschen, der zuvor durch einen tollwütigen Hund gebissen worden ist) behandelt werden kann. Dementsprechend wird auch ein Verfahren zum Impfen eines Individuums mit einem Impfstoff, welcher die immunogene Zusammensetzung der Erfindung umfasst, beschrieben. Wie oben diskutiert, wird offenbart, dass die immunogene Zusammensetzung der Erfindung eine Mehrzahl von antigenen Determinanten umfassen (oder kodieren) kann. Dementsprechend kann das beschriebene Behandlungsverfahren eine Mehrzahl von Behandlungsarten für eine Mehrzahl von Arten von Erkrankungen oder Infektionen umfassen. Ein einzelnes Behandlungsverfahren kann beispielsweise eine prophylaktische Behandlung von Polio, eine prophylaktische und therapeutische Behandlung von Tollwut und eine prophylaktische Behandlung von Influenza umfassen.

[0046] Für die Fachleute auf diesem Gebiet wird ersichtlich sein, dass verschiedene Modifizierungen und Variationen an der Konstruktion der Moleküle der Erfindung vorgenommen werden können, ohne von dem Umfang oder Geist der Erfindung abzuweichen. Die Erfindung wird jetzt detaillierter unter Bezugnahme auf spezielle Beispiele der Erfindung beschrieben werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN UND TABELLEN

[0047] Die Erfindung wird detaillierter unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben, in denen:

[0048] Fig. 1 Lyssavirus-Glycoproteine und chimäre Konstrukte von Lyssavirus-Glycoproteinen zeigt. SP – Signalpeptid; TM – Transmembrandomäne; S₁ – NL-Aminosäurereste; S₂ – NS-Aminosäurereste; S₃ – LFAV-Aminosäurereste.

(A) Schematische Darstellung des Lyssavirus PV-Glycoproteins (G), wobei Regionen angegeben sind, welche die Stelle II, die Stelle III und die Epitope I, V und VI umfassen; ebenso ist die Transmembrandomäne (TM) oben drüber angegeben. Chimäre Polypeptide sind schematisch in den anderen Zeilen angegeben, wobei Deletions- und/oder Fusionsstellen durch Restenummern angegeben sind. Die Nummern sind die Positionen von Aminosäureresten in dem reifen Protein (Signalpeptid abgespalten).

(B) Aminosäuresequenzen der chimären Polypeptide an den Fusionsstellen. Die lineare Region, welche das Epitop VI (Aminosäure 264) trägt, wird durch Unterstreichung bei den Resten 251–275 angegeben. Schwarz und grau ausgefüllte Rahmen geben die EBL-1- bzw. Mok-Sequenzen an. Gedankenstriche repräsentieren Aminosäuren, die ähnlich zu jenen der PV-Sequenz sind, und Punkte entsprechen Lücken.

(C) Schematische Darstellung der inserierten Sequenzen, welche das C3-Poliiovirus-Epitop, welches an der Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern beteiligt ist (B), und das lymphozytäre Choriomeningitis-Virus(LCMV)-Nukleoprotein CD8 H-2^d (CTL)-Zell-Epitop, welches an der Induktion von sowohl zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) als auch eines Schutzes gegenüber einer LCMV-Provokation beteiligt ist, kodieren, in dem verkürzten (GPVIII) und chimären Lyssavirus-G-Protein (GEBL1-PV).

(D) Die mutmaßliche PEST-Sequenz-Analyse im Bereich der Verbindung des Endes des EBL1-Anteils und des Beginns des B-Zell-Epitops ist ebenfalls angegeben.

(E) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von G-Proteinen von ausgewählten Lyssaviren. Die Consensus-Sequenz ist als die unten angegebene Sequenz aufgeführt. Hellgrau ausgefüllte Rahmen zeigen die hauptsächlich antigenen Stellen an. Dunkelgrau ausgefüllte Rahmen zeigen das hydrophobe Signalpeptid (SP) und die Transmembrandomäne (TM) an. Unterstrichene NX(S/T)-Motive sind potentielle N-Glycosylierungsstellen.

[0049] Fig. 2 zeigt eine indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie der Lyssavirus-G-Produktion in Neuro-2a-Zellen 48 h nach einer vorübergehenden (transienten) Transfektion mit verschiedenen Plasmiden: pG-PV-PV (A, B und C), pG-PVIII (D, E und F), pGEBL1-PV (G, H und I), pGMok-PV (J, K und L) und pGPV-Mok (M, N und O). Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden Zellen permeabilisiert und mit Antikörpern angefärbt: anti-PV G PAb (A, D, G, J und M), PV D1 anti-native PV G-Stelle III-MAb (B, E, H und K), 6B1 anti-denaturierte G-Stelle III-MAb (8 und F), anti-EBL-1 G PAb (I), anti-Mok G PAb (L und N) und Serum aus einer nicht-immunisierten Maus (O).

[0050] Fig. 3 zeigt die Ergebnisse einer kinetischen Untersuchung der Antigen-Synthese in vorübergehend mit pGPV-PV (a), pGEBL1-PV (b) oder pG-PVIII (c) transfizierten Neuro-2a-Zellen. Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten permeabilisiert und mit PV PAb (gepunkteter Balken) oder anti-denaturierte G-Stelle III 6B1-MAb (schraffierter Balken) angefärbt.

[0051] Fig. 4 zeigt die Ergebnisse einer Induktion von IL-2-produzierenden Zellen durch Plasmide, welche verschiedene Lyssavirus-G-Proteine kodieren. BALB/c-Mäusen (zwei Tiere für jedes Plasmid) wurden i.m. (50 µl in jeden Tibialis-anterior-Muskel) 40 µg Plasmid (pGPV-PV, pG-PVIII, pGEBL1-PV, pGMok-PV und pG-PV-Mok) injiziert. 21 Tage später wurden die Milzorgane entfernt und Milzzellen wurden in vitro spezifisch durch inaktivierte und gereinigte Viren (PV, EBL1 oder Mok), G-PV stimuliert oder polyklonal durch Concanavalin A (ConA) stimuliert. Die Menge von freigesetztem IL-2 wurden dann dreifach mittels Bioassay bestimmt und die Titer als E/ml ausgedrückt.

[0052] Fig. 5 zeigt die Induktion von VNAb gegen die europäischen Lyssavirus-Genotypen durch Plasmide. BALB/c-Mäusen wurden 40 µg Plasmid in den Tibialis-Muskel injiziert.

(A) Injektion von pGPV-PV. Mäuse erhielten eine Auffrischungsimpfung („booster“) am Tag 30. Seren (Pool von 3 Proben) wurden an den Tagen 27 und 40 einem Assay auf VNAb gegen Viren der Genotypen 1 (CVS und PV), 5 (EBL1b) und 6 (EBL2b) unterzogen.

(B) Injektion von pGEBL1-PV. Vier Mäuse erhielten nur eine Injektion von Plasmid und Blutproben wurden in unterschiedlichen Zeitabständen durch transorbitale Punktion gesammelt. Seren wurden für die VNAb-Bestimmung durch RFFIT unter Verwendung von PV- und EBL1b-Viren gemessen.

[0053] Fig. 6 zeigt im Vergleich den Schutz, welcher durch die Plasmide pGPV-PV, pGEBL1-PV und Toll-

wut-PM- und -PV-Impfstoffe vor CVS, EBL-1b und EBL-2b induziert wird. BALB/c-Mäusen (9 Tiere pro Reihe) wurden i.p. an den Tagen 0 und 7 0,5 ml auf 1/10 verdünnter PM-Impfstoff (ausgefüllte Kreise) oder 2 µg inaktiviertes und gereinigtes PV-Virus (ausgefüllte Quadrate) injiziert. Für auf DNA basierende Immunisierungen wurden BALB/c-Mäusen (5 Tiere für jedes Plasmid) in den Tibialis-Muskel PBS (leere Kreise) oder 40 µg der verschiedenen Plasmide pGPV-PV (Diamant), EBL1-PV (ausgefülltes Dreieck), pCIneo-Grundgerüst (Kreuz) injiziert. Swiss-Mäusen (6 Tiere) wurde pGPV-PV (leeres Quadrat) injiziert.

- (a) Es wurde inaktiviertes Virus injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ CVS provoziert („challenge“).
- (b) Es wurde inaktiviertes Virus injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ EBL-1b provoziert („challenge“).
- (c) Es wurde inaktiviertes Virus injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ EBL-2b provoziert („challenge“).
- (d) Es wurde DNA injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ CVS provoziert („challenge“).
- (e) Es wurde DNA injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ EBL-1b provoziert („challenge“).
- (f) Es wurde DNA injiziert. BALB/c- und Swiss-Mäuse wurden i.c. am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ EBL-2b provoziert („challenge“).

[0054] Fig. 7 zeigt eine indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von Antigenen, die in mit Plasmiden transfizierten Neuro-2a-Zellen exprimiert werden.

- (A) Zellen waren mit dem Plasmid pGEBL1-(B-CTL)₂-PV transfiziert und mit dem Tollwut-D1-MAb angefärbt worden.
- (B) Zellen waren mit dem Plasmid pGEBL1-(B-CTL)₂-PV transfiziert und mit dem Poliovirus-C3-MAb angefärbt worden.
- (C) Zellen waren mit dem Plasmid pGEBL1-(B-CTL)₂-PV transfiziert und mit dem Antipoliovirus Typ 1-PAb angefärbt worden.
- (D) Zellen waren mit dem Plasmid pCIneo transfiziert und mit entweder 1) dem Tollwut-D1-MAb, 2) dem Poliovirus-C3-MAb oder 3) dem Antipoliovirus Typ 1-PAb angefärbt worden.

[0055] Fig. 8 zeigt die Induktion von IL2-produzierenden Zellen durch pGPVIII (A) oder pGEBL1-PV (B), welche Poliovirus- und LCMV-Epitope tragen. BALB/c-Mäusen (zwei Tiere für jedes Plasmid) wurden i.m. (50 µg in jeden Tibialis-anterior-Muskel) Plasmide injiziert. Milzorgane wurden 14 Tage später entfernt und Milzzellen wurden in vitro durch Zellkulturmedium (Balken mit Kreuzchen), spezifisch durch inaktivierte und gereinigte Lyssaviren (IPLV PV: schraffierter Balken; IPLV EBL: leichte Schraffierungen) oder polyklonal durch ConA (gepunkteter Balken) stimuliert. Die Menge von freigesetztem IL-2 wurden dann dreifach mittels Bioassay bestimmt und Titer als E/ml ausgedrückt.

- (A) Die injizierten Plasmide waren pCIneo – leeres Plasmid-, pGPVIII und p(B-CTL)₂-GPVIII.
- (B) Die injizierten Plasmide waren pCIneo, pGEBL1-PV, pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV, pGEBL1-(B-CTL)₂-PV.

[0056] Fig. 9 zeigt eine kinetische Untersuchung der Antikörperproduktion, welche durch p(B-CTL)₂-GPVIII oder pGPVIII induziert wird, in BALB/c-Mäusen gegen Poliovirus-Peptid und Tollwutvirus. Drei Mäusen wurden 40 µg p(B-CTL)₂-GPVIII (Quadrat und Kreis) oder pGPVIII (Dreieck) oder leerer pCIneo (Diamant) injiziert. Nach Punktion über die retroorbitale Route zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Seren durch ELISA zur Bestimmung von Antikörpern gegen Poliovirus-Peptid (Quadrat und Diamant) oder Tollwutvirus (Kreis, Dreieck und Diamant) einem Assay unterzogen.

[0057] Fig. 10 zeigt den Einfluss eines Primings auf die Poliovirus-Antipeptid-Antikörperproduktion, welche durch p(B-CTL)₂-GPVIII induziert wird. Fünf Gruppen von drei Mäusen erhielten am Tag 0 PBS (2 Gruppen), p(B-CTL)₂-GPVIII (2 Gruppen) oder pPVIII. Eine Gruppe (welcher p(B-CTL)₂-GPVIII injiziert worden war) erhielt keine Auffrischungsimpfung („booster“), wohingegen die Gruppe, welcher pPVIII injiziert worden war, am Tag 26 eine Auffrischungsimpfung mit p(B-CTL)₂-GPVIII erhielt. Eine Gruppe (welcher p(B-CTL)₂-GPVIII injiziert worden war) erhielt eine Auffrischungsimpfung mit p(B-CTL)₂-GPVIII am Tag 14. Alle Tiere wurden hinsichtlich der Antipeptid-Antikörper-Produktion am Tag 39 durch ELISA kontrolliert.

[0058] Fig. 11 zeigt die Produktion von Tollwutvirus-neutralisierenden Antikörpern gegenüber dem Provokations-Virus-Standard (EVS) nach Injektion des vollständigen homogenen Plasmids pGPV in Beagle-Hunde. Gruppe A: Injektion von 100 µg Plasmid in eine Stelle an den Tagen 0, 21, 42 und 175. Gruppe B: Injektion von 33 µg Plasmid in drei Stellen an den Tagen 0, 21, 42 und 175.

Gruppe C: Injektion von 100 µg Plasmid in eine Stelle an den Tagen 0 und 175.

Gruppe D: Injektion von Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Kontrolle).

[0059] [Fig. 12](#) zeigt die individuelle neutralisierender Antikörper-Antwort gegen ein wildes Tollwut-Virus (Fuchs-Form aus Frankreich, „fox wild rabies“-Virus (FWR)) nach einer Injektion des vollständigen homogenen Plasmids pGPV in Beagle-Hunde. Sie zeigt auch den Schutz, der gegenüber einer intramuskulären Provokation mit einem wilden, aus tollwütigen Hunden isolierten Tollwut-Virus, welche am Tag 175 ausgeführt wird, induziert wird.

Hunde Nr. 1 bis 3 =	Gruppe A
Hunde Nr. 4 bis 6 =	Gruppe B
Hunde Nr. 7 bis 9 =	Gruppe C
Hunde Nr. 10 bis 12 =	Gruppe D.

[0060] [Fig. 13](#) zeigt N2A-Zellen, die mit dem Plasmid DBL-3/PVIII (Fugene, Roche Molecular Biochemicals) transfiziert und mit Aceton (80%) 10 min auf Eis fixiert worden sind. A.) Maus-anti-DBL-3-GST-Fusionsprotein (Verdünnung 1/1000) B.) Kaninchen-anti-PVIII (Verdünnung 1/400). Es sind Hintergrund-Reaktivitäten, die mit dem zweiten Antikörper, der mit FITC konjugiert ist, festgestellt werden, gezeigt. Diese Figur zeigt klar, dass sowohl DBL-3- als auch PVIII-Regionen effizient an der Membran der transfizierten Zellen exprimiert wurden.

BEISPIELE

[0061] Für die Beispiele wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet, sofern nicht speziell anders angegeben.

[0062] Mäuse. Weibliche BALB/c-(H-2^d BALB/C), 6 bis 8 Wochen alt, und Swiss-(14 bis 16 g)-Mäuse wurden vom „Centre d'Elevage et de Recherche" Janvier (Legenest St. Isle, Frankreich) erworben.

[0063] Zellen und Lyssaviren. Die für die Produktion und Titration von Lyssaviren verwendeten BHK-21-Zellen wurden in „Eagle's minimal essential medium" (MEM), enthaltend 5% fötales Rinderserum (FBS) und 5% neugeborenes Kälberserum, kultiviert (Perrin, P., 1996, „Techniques for the preparation of rabies conjugates", in: Laboratory techniques in rabies, Meslin, F-X., Kaplan, M., und Koprowski, H., Hrsg., (WHO Genf): 433–445). Neuroblastomzellen (Neuro-2a), die für Transfektionsuntersuchungen mit Plasmiden verwendet wurden, wurden in MEM, welches 8% FBS enthielt, kultiviert.

[0064] Die Interleukin-2(IL-2)-abhängige zytotoxische T-Zelllinie (CTLL) wurde kultiviert, wie zuvor beschrieben (Perrin, P., et al., 1988, „Interleukin-2 increases protection against experimental rabies", Immunobiol. 177: 199–209) in RPMI-1640-Medium (Gibco: Flowbio, Courbevoie, Frankreich), enthaltend 10% FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, HEPES-Puffer (Flow Laboratories, Bethesda, USA) und 5 bis 10 Einheiten (für 1×10^4 Zellen) Ratten-IL-2 (Überstand von mit Concanavalin A: ConA stimulierten Milzzellen). Zellen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre, welche 7,5% CO₂ enthielt, inkubiert.

[0065] Fixierte PV-Paris/BHK-21, CVS-Tollwutstämme wie auch mit Stämme von mit Tollwut verwandten Viren (EBL1b, EBL2b, LCMV und Mok) wurden in BHK-21-Zellen vervielfacht (passagiert), wie zuvor von Perrin, P., 1996, a.a.O., beschrieben. Die verwendeten Europäische Fledermaus-Lyssaviren waren EBL1b (Stamm-Nr. 8916FRA), welches aus einem Fledermaus-Isolat aus Frankreich abgeleitet worden ist, und EBL2b (Stamm-Nr. 9007FIN; ein Geschenk von H. Bouhry), welches aus einem Menschen in Finnland isoliert worden ist (Amengal, B., et al., 1997, „Evolution of European bat lyssaviruses", J. Gen. Virol. 78: 2319–2328). Der LCMV-Stamm Arm/53b wurde freundlicherweise von den Drs. M. Oldstone und M. McChesney (Scripps Clinic, La Jolla, CA) zur Verfügung gestellt.

[0066] Tollwutvirus-Antigene und Impfstoffe. Inaktivierte und gereinigte Lyssaviren (IPRV) wurden hergestellt, wie von Perrin, P., 1996, a.a.O., beschrieben. Virus wurde aus inaktivierten (β-Propiolacton) und geklärten Überständen von infizierten Zellen durch Ultrazentrifugation durch einen Saccharose-Gradienten gereinigt. Das PV-Glycoprotein wurde aus IPRV solubilisiert und gereinigt (G PV), wie zuvor von Perrin, P., 1996, a.a.O. und Perrin, P. et al., 1985, „Rabies immunosomes (subunit vaccine) structure and immunogenicity", Vaccine, 3: 325–332, beschrieben.

[0067] Die zwei inaktivierten Tollwutviren, die für vergleichende Schutzuntersuchungen verwendet wurden,

wurden mittels zweier unterschiedlicher Stämme hergestellt: 1) PM als kommerzieller Impfstoff für eine Anwendung beim Menschen; (Pasteur Vaccins, Marnes-la-Coquette, Frankreich; Charge Y0047); 2) PV als ein Impfstoff zur Verwendung im Labor (IPRV).

[0068] Konstruktion von Plasmiden, welche Lyssavirus-G-Gene exprimieren. Die Region (Aminosäuren 253–275), welche das einzige nicht-konformationale Epitop (VI) überlappte (**Fig. 1**), wurde für die Konstruktion von chimären Genen ausgewählt, da sie mutmaßlich weniger strukturell eingeschränkt als die beiden hauptsächlich antigenen Stellen II und III ist. Die homogenen und chimären Lyssavirus-G-Gene (siehe **Fig. 1**) wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCIneo (Promega) eingeführt, in dem *E. coli*-Stamm DH5 α durch Standardprotokolle der molekularen Klonierung, die dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt sind, vermehrt und amplifiziert. Die Plasmide pGPV-PV und pGMok-PV wurden hergestellt, wie zuvor beschrieben (Bahloul, C., et al., 1998, „DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses“, *Vaccine* 16: 417–425). Die Plasmide pGPV-Mok, pG-PVIII und pGEBL1-PV wurden erhalten, wie folgt.

[0069] Für pGPV-Mok wurde die kodierende Sequenz des Stelle II-Anteils von G PV (Aminosäuren 1–257) amplifiziert durch RT-PCR unter Verwendung der degenerierten Primer:

PVXbal: (SEQ ID NR.: 1)

PVBclI: (SEQ ID NR.: 2)

[0070] Das PCR-Produkt wurde in die SmaI-Stelle von pUC19 inseriert, dann mit BclI und EcoRI herausgeschnitten und zwischen die gleichen Stellen in pGMok-Mok ligiert, wodurch pGPV-Mok erzeugt wurde, welches eine im Raster vorliegende Fusion der Aminosäuren 1–257 aus G PV mit den Aminosäuren 258–503 von G Mok enthält.

[0071] Das pG-PVIII-Gen mit einer internen, im Raster vorliegenden Deletion zwischen dem Ende des PV-Signalpeptids und dem Rest 253 wurde erhalten, indem ein synthetischer Adaptor zwischen die EcoRI- und BclI-Restriktionsstellen des pGMok-PV-Plasmids eingeführt wurde. Dieser PV-Adaptor, welcher eine einzige EcoRI-Stelle enthält, wurde erzeugt, indem 200 pmol von jedem Primer in 250 mM Tris-HCl, pH 7,7, anhybridisiert wurden. pG-PVIII wurde am 22. Dezember 1998 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) Paris, Frankreich, hinterlegt und erhielt die Aufnahme Nummer I-2115.

PVp1: (SEQ ID NR.: 3)

PVp2: (SEQ ID NR.: 4)

[0072] Um das pGEBL1-PV-Gen zu erzeugen, wurde ein synthetischer Adaptor, welcher den Aminosäuren 2–14 von EBL-1a (Stamm 8615POL) entsprach, (1) einzelne BstEII- und EcoRI-Restriktionsstellen wurden auf die gleiche Weise wie jene für pG-PVIII erzeugt durch Anhybridisieren von:

EBL1p1: (SEQ ID NR.: 5)

EBL1p2: (SEQ ID NR.: 6)

[0073] Dieser EBL1-Adaptor wurde im Raster in die EcoRI-Stelle von pG-PVIII ligiert. Ein Fragment, welches den Aminosäuren 15–253 von EBL-1a (Stamm 8615POL) entsprach, wurde dann durch RT-PCR von viraler RNA erzeugt unter Verwendung der Primer EBL1p3 und EBL1p4:

EBL1p3: (SEQ ID NR.: 7)

EBL1p4: (SEQ ID NR.: 8)

[0074] Das RT/PCR-Produkt wurde mit BstEII und EcoRI verdaut und wurde in die gleichen Stellen, die über den EBL1-Adaptor eingeführt worden waren, ligiert, was zu einer im Raster vorliegenden Fusion zwischen dem PV-Signalpeptid, dem Stelle II-Anteil von EBL 1a und dem Stelle III-Anteil von PV führte. Die Identität von jedem Konstrukt wurde durch automatische Sequenzierung mittels „dye terminator“-Reaktion an einem ABI 377-Sequenziergerät (Perkin-Elmer) bestätigt. pEBL1-PV wurde bei der CNCM am 22. Dezember 1998 hinterlegt und erhielt die Aufnahme Nummer I-2114.

[0075] Insertion von fremden B- und CD8-Zell-Epitopen in verkürzte oder chimäre G-Gene. Die verkürzten (pGPVIII) und chimären Gene (pGEBL1-PV), über die zuvor berichtet worden war, welche eine einzige EcoRI-Klonierungsstelle enthalten, wurden für die Insertion von fremden B- und CD8-Zell-Epitopen verwendet. Lyssavirus-G-Gene wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCIneo (Promega) eingeführt, in dem *Escherichia coli*-Stamm DH5 α durch Standardprotokolle der molekularen Klonierung vermehrt und amplifiziert.

[0076] B- und CD8-Zell-Epitope wurden in die EcoRI-Restriktionsstelle der verkürzten oder chimären Lyssa-

virus-G-Gene in der Gelenkregion (Aminosäuren 253 bis 275) des Moleküls an Position 253 inseriert. Das B-Zell-Epitop (bezeichnet als *B+) entsprach dem Fragment C3 (Aminosäuren 93 bis 103: DNPASTTNKDK: SEQ ID NR.: 9) des Poliovirus-VP1-Proteins. Das CD8-Zell-Epitop (bezeichnet als *CTL+) entsprach den Aminosäuren 119–127 (PQASGVYMG: SEQ ID NR.: 10) oder den Aminosäuren 117–132 (ERPQASGVYMGNL-TAQ: SEQ ID NR.: 11) des Nukleoproteins des Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus. Die Plasmide p(B-CTL)2-GPVIII, pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV, pGEBL1-(B-CTL)-PV, pGEBL1-(B-CTL)₂-PV und pGEBL1-(CTL-B)-PV wurden erhalten, wie folgt (siehe auch Fig. 1).

[0077] Das p(G-CTL)2-GPVIII-Gen wurde durch eine zweistufige Klonierung eines synthetischen Adaptors in die einzige EcoRI-Restriktionsstelle erzeugt durch Anhybridisieren von 200 pmol von jedem Primer:

*B-CTLp1+: (SEQ ID NR.: 12)

*B-CTLp2+: (SEQ ID NR.: 13)

[0078] Für pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL)-PV waren die für die Insertion verwendeten synthetischen Adaptoren jeweils:

B: *Bp3+: (SEQ ID NR.: 14)

*Bp4+: (SEQ ID NR.: 15)

CTL: *CTLp5+: (SEQ ID NR.: 16)

*CTLp6+: (SEQ ID NR.: 17).

[0079] Für die Konstruktion der pGEBL1-(B-CTL)-PV- und pGEBL1-(CTL-B)-PV-Plasmide wurden pGEBL1-(B)-PV und pGEBL1-(CTL)-PV unter den gleichen Bedingungen wie oben verwendet, um CTL- bzw. B-Sequenzen in die chimären Gene zu inserieren.

[0080] Die Identität von jedem Konstrukt wurde durch automatische Sequenzierung mittels der „dye terminator“-Reaktion an einem ABI 377-Sequenziergerät (Perkin-Elmer) bestätigt.

[0081] Vorübergehende Expressionsexperimente. Die Fähigkeit von Plasmiden, eine vorübergehende Expression von mit G verwandten Antigenen zu induzieren, wurde nach einer Transfektion von Neuro 2a-Zellen unter Verwendung der durch kationische DOTAP-Liposomen vermittelten Methode gemäß den Anweisungen des Herstellers (Boehringer Mannheim) getestet. Jede Vertiefung einer Zellkultur-Mikroplatte (Falcon) wurde mit 3×10^4 Zellen (in MEM, 10% FBS) inokuliert und 24 h bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre, welche 7,5% CO₂ enthielt, inkubiert. Die Platte wurde dann mit MEM ohne FBS gewaschen und, wie oben, 1 h inkubiert. Der Zellüberstand wurde entfernt und die Vertiefungen wurden gewaschen und mit einem Gesamtvolumen von 50 µl Transfektionslösung, welche 0,1 µg Plasmid und 6 µl DOTAP ((N-(1,2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat) in steriler HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (150 mM NaCl, 20 mM HEPES) enthielten, welche zuvor bei Raumtemperatur 15 min inkubiert worden waren, gefüllt. Die Platten wurden 5 h bei 37°C in Gegenwart von 7,5% CO₂ inkubiert. Zweihundert µl MEM, enthaltend 2% FBS, wurden zu jeder Vertiefung hinzugesetzt und die Platte wurde 24 bis 140 h unter den gleichen Bedingungen vor der Analyse der vorübergehenden Expression durch indirekte Immunfluoreszenz inkubiert.

[0082] Die Fähigkeit von Plasmiden, eine vorübergehende Expression von G und fremden verwandten Antigenen zu induzieren, wurde nach Transfektion von Neuro 2a-Zellen unter Verwendung des FuGENE 6-Transfektionsreagens gemäß den Anweisungen des Herstellers (Boehringer Mannheim) getestet. Jede Vertiefung einer Nunc-Labtek-Zellkulturkammer (Life Technologies) wurde mit 3×10^4 Zellen (in MEM, 10% FBS) inokuliert und 24 h bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre, welche 7,5% CO₂ enthielt, inkubiert. Die Platten wurden dann mit MEM ohne FBS gewaschen und Vertiefungen mit 50 µl Transfektionslösung: 0,1 µg Plasmid, 3 µl FuGENE 6-Transfektionsreagens und 47 µl Medium, gefüllt. Die Platte wurde 18 h bei 37°C in Gegenwart von 7,5% CO₂ inkubiert. Zweihundert µl MEM, enthaltend 5% FBS, wurden zu jeder Vertiefung hinzugesetzt und die Platte wurde weitere 24 h unter den gleichen Bedingungen vor einer Analyse der vorübergehenden Expression durch indirekte Immunfluoreszenz inkubiert.

[0083] Antikörper. Polyklonale Antikörper (PAb), die gegen PV und Mok G gerichtet waren, wurden, wie von Perrin, P., 1996, „Techniques for the preparation of rabies conjugates“, in: Laboratory techniques in rabies, Meslin, F-X., Kaplan, M., und Koprowski, H., Hrsg. (WHO Genf): 433–445, beschrieben, durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem Virus-Glycoprotein erhalten. PAb gegen EBL-1b-Virus wurde durch Immunisierung von Mäusen mit inaktiviertem und gereinigtem Virus erhalten.

[0084] Es wurden auch drei monoklonale Antikörper (MAb), die gegen PV G gerichtet waren, verwendet. PVE12 MAb (ein MAb, der von M. Lafon et al., 1985, „Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies

vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay", J. Biol. Standard 13: 295–301, entwickelt worden ist) erkennt die Stelle II von nativem G. D1 MAb (IgG 1-Isotyp), der in unserem Labor hergestellt worden ist, erkennt die Stelle III von nativem, nicht aber von mit SDS behandeltem G. 6A1 MAb (ein MAb, über welchen in 18 von 2 berichtet worden ist) erkennt mit SDS denaturiertes G-Protein und genauer zwei Peptide, die sich strangabwärts von der Stelle III befinden, nahe dem COOH-terminalen Teil der G-Ektodomäne (Aminosäuren 342–433 und 397–450).

[0085] Immunfluoreszenzmikroskopie. Eine vorübergehende Expression von G-Antigenen in transfizierten Zellen wurde mit und ohne Permeabilisierung (30 min Inkubation mit 80% Aceton auf Eis, gefolgt durch Lufttrocknung) bestimmt. Transfizierte Zellen wurden 1 h bei 37°C mit PAb oder MAb inkubiert. Sie wurden mit PBS gewaschen und 1 h bei 37°C mit mit FITC konjugiertem sekundärem Ziege-anti-Kaninchen- oder -anti-Maus-Antikörper (Nordic Immunol. Labs, Niederlande) inkubiert. Zellen wurden gewaschen, mit Glycerol eingedeckt und in einem umgekehrten Leica-Fluoreszenzmikroskop untersucht.

[0086] Zwei monoklonale Maus-Antikörper, die gegen PV G (D1 MAb IgG 1-Isotyp) und Poliovirus (C3-MAb) gerichtet waren, wurden für eine Antigen-Anfärbung durch indirekte Immunfluoreszenz (IIF) verwendet. D1 MAb erkennt die Stelle III von nativem, nicht aber von mit SDS behandeltem G und der C3-MAb erkennt die 93–103-Region des PV-1-Kapsid-VP1-Proteins. Es wurde auch ein polyklonaler neutralisierender Kaninchen-Antikörper, der gegen das native Poliovirus vom Typ 1 gerichtet war, verwendet.

[0087] Die vorübergehende Expression wurde nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd (Sigma) (20 min Inkubation bei Raumtemperatur) ohne Permeabilisierung bestimmt. Fixierte Zellen wurden 1 h bei Raumtemperatur mit MAb inkubiert. Sie wurden mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit mit FITC konjugiertem sekundärem Ziege-anti-Maus- oder -anti-Kaninchen-Antikörper (Nordic Immunol. Labs, Niederlande) inkubiert. Zellen wurden gewaschen, mit Mowiol (Sigma) eingedeckt und in einem umgekehrten Leica-Fluoreszenzmikroskop untersucht.

[0088] Mutmaßliche PEST-Sequenz-Analyse. Polypeptid-PEST-Sequenzen, die potentiell an dem schnellen Abbau von Protein beteiligt sind, wurden mittels des Computerprogramms PEST find, welches gemäß Rogers, S., et al., 1986, „Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis", Science 234: 364–369, entwickelt worden ist, analysiert.

[0089] Injektion von Plasmiden in Mäuse. Für immunologische Untersuchungen wurden BALB/c-Mäuse mit Pentobarbital (30 mg/kg) anästhesiert und 20–50 µg Plasmid (verdünnt in PBS) wurden in jeden Tibialis-anterior-Muskel injiziert. Dies war wirkungsvoller als eine Injektion über die Quadrizeps-Route (persönliche Beobachtung). Für Antikörperassays von Serum wurde an verschiedenen Tagen durch retroorbitale Punktion Blut abgenommen.

[0090] Für Untersuchungen des Schutzes vor LCMV erhielten Mäuse 3,5 µg Cardiotoxin (Latoxan A. P., Les Ulis, Frankreich) in jedes Bein vier Tage vor der Anästhesie und Immunisierung, um den Muskel zu degenerieren.

[0091] Interleukin-2-Freisetzungssassay. Vierzehn Tage nach der Injektion wurden die Milzorgane aus naiven oder mittels einer Plasmid-Injektion behandelten BALB/c-Mäusen entfernt. Milzzellen (1 ml-Aliquots, welche 6×10^6 enthielten) wurden mit 0,5 µg Lyssavirus-Antigen (z.B. IPLV-PV und IPLV-EBL1) oder 5 µg Concanavalin A (Miles) in Platten mit 24 Vertiefungen (Nuclon-Delta, Nunc) stimuliert und gemäß Standardprozeduren in RP-MI-1640-Medium (Gibco), welches 10% FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES-Puffer (Flow Laboratories) enthielt, kultiviert. Zellen wurden 24 h bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre, welche 7% CO₂ enthielt, inkubiert. Unter diesen Bedingungen sind IL2 produzierende Zellen hauptsächlich CD4⁺-Zellen. In Überständen von Milzzell-Kulturen produziertes IL-2 wurde durch einen Bioassay unter Verwendung von CTLL-Zellen titriert, wie zuvor von Perrin, P. et al., 1996, „The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses", Res. Virol. 147: 289–299, beschrieben. Die Zellproliferation wurde dreifach basierend auf der Aufnahme von ³H-Thymidin (New England Nuclear) bestimmt. Die IL-2-Konzentration wurde als Einheiten pro ml (E/ml) unter Verwendung von rekombinantem IL-2 aus der Maus (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) als Referenz bestimmt. CTLL-Zellen vermehrten sich in Gegenwart von Mäuse-IL-2 und anti-IL-4-Antikörpern, nicht aber in Gegenwart von IL-4 (bis zu 10 E/ml) und in Abwesenheit von IL-2. So wurde durch diese Technik vornehmlich IL-2 detektiert.

[0092] Antikörperassays. Für einen Antikörperassay von Serum wurde Blut an verschiedenen Tagen durch

retroorbitale Punktion abgenommen. Tollwut-IgG wurden durch Enzymimmunoassay (ELISA) unter Verwendung von Mikroplatten, die mit gereinigtem Tollwut-Glycoprotein beschichtet waren, titriert. Die Titer entsprachen dem Kehrwert der Verdünnung der Serumprobe, welche eine optische Dichte ergab, welche äquivalent zum Zweifachen von derjenigen, die durch Serum (1/20 verdünnt) von Mäusen, denen PBS injiziert worden war, erhalten worden ist, ist. Die gesamten Anti-Tollwut-IgG- oder -IgG1-, -IgG2a- und -IgG3-Isotypen wurden durch einen ELISA unter Verwendung von mit IPRV beschichteten Mikroplatten, wie zuvor von Perrin, P., et al., 1986, „The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus“, J. Biol. Standard. 14: 95 beschrieben, mit Kaninchen-anti-Maus-IgG-Isotypen-Seren als sekundärem Antikörper (Nordic Immunol. Labs, Niederlande) und einem Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Nordic Immunol. Labs, Niederlande) als tertiärem Antikörper bestimmt.

[0093] Lyssavirus neutralisierende Antikörper wurden durch den schnellen fluoreszierenden Focus-Inhibitionstest („rapid fluorescent focus inhibition test“; RFFIT) (beschrieben von Smith, J., et al., 1996, „A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining virus-neutralizing antibody“, in: Laboratory techniques in rabies, 4. Auflage (Hrsg. Meslin, F-X., Kaplan, M., und Koprowski, H) WHO, Genf.: 181–189) mit den zuvor beschriebenen Modifikationen von Perrin, P., et al., 1986, J. Biol. Standard, 14: 95, titriert. Es wurden infizierte Zellüberstände (PV-, CVS- und EBL2-Viren) und gereinigte Viren (Mok- und EBL1-Viren) verwendet. Anti-PV- oder -CVS-Antikörpertiter sind in internationalen Einheiten pro ml (IE/ml) unter Verwendung des 2nd International Standard (Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark) als Referenz ausgedrückt. Für die Bestimmung des Antikörpertiters gegen andere Lyssaviren wurde die Serumverdünnung, welche 50% Inhibition der fluoreszierenden Focus-Rate bewirkte, so definiert, dass sie den gleichen VNAb-Titer wie für eine Referenz, die gegenüber CVS getestet wurde, aufwies.

[0094] Antikörper gegen PV-1 wurden durch ELISA bestimmt, wie zuvor beschrieben, unter Verwendung von Mikroplatten, die mit einem synthetischen Peptid, welches durch ein Trimer der Aminosäuren 93–103 von VP1 gebildet wurde, beschichtet waren. Die anti-LCM-IgG-Produktion wurde ebenfalls durch ELISA getestet.

[0095] Schutz-Test. Die schützende Aktivität von Impfstoffen und Plasmiden wurde gemäß dem NIH-Wirkkraft-Test („NIH potency test“) bestimmt. Impfstoff-Verdünnungen wurden intraperitoneal (i.p.) an den Tagen 0 und 7 Mäusen injiziert, wohingegen Plasmide (40 µg) in jeden Tibialis anterior-Muskel nur am Tag 0 injiziert wurden. Mäuse wurden dann intrazerebral (i.c.) am Tag 21 mit ungefähr 30 LD₅₀ von verschiedenen Lyssaviren (CVS, LCMV, EBL1b oder EBL2b) provoziert. Die Tiere wurden 28 Tage beobachtet oder alternativ am Tag 21 nach der Provokation getötet und Blutproben gesammelt, um die Virus-Clearance und die anti-LCMV-IgG-Produktion zu kontrollieren.

Beispiel 1

Vorübergehende Expression von Lyssavirus-G-Genen

[0096] Plasmide, welche homogene (pGPV-PV), verkürzte (pG-PV_{III}) und chimäre (pGEBL1-PV, pGMok-PV und pGPV-Mok) Lyssavirus-G-Gene enthielten, wurden verwendet, um Neuro 2a-Zellen zu transfizieren. In [Fig. 2](#) ist die Zellanfärbung durch indirekte Immunfluoreszenz angegeben und kann, wie folgt, zusammengefasst werden.

[0097] Nach einer Transfektion mit pGPV-PV wurde Antigen mit PV-PAb (**Fig. 2A**), PV D1-MAb (**Fig. 2B**) oder PV-E12-MAb (nicht gezeigt) detektiert, hauptsächlich an der Zellmembran (ähnliche Ergebnisse mit nicht-permeabilisierten Zellen, Daten nicht gezeigt), und sehr wenige wurden mit dem 6A1-MAb detektiert (**Fig. 2C**). Zellen, die mit pG-PV_{III} transfiziert worden waren, waren von runder Gestalt und wurden vollständig (sowohl Zytoplasma als auch Membran) mit PV PAb (**Fig. 2D**) oder 6A1-MAb (**Fig. 2F**), nicht aber mit PV D1-MAb (**Fig. 2E**) angefärbt. Mit pGEBL1-PV transfizierte Zellen wurden hauptsächlich an der Zellmembran mit PV PAb (**Fig. 2G**), PV D1-MAb (**Fig. 2H**) oder EBL-1-PAb (**Fig. 2I**) angefärbt. Mit pGMok-PV transfizierte Zellen wurden (hauptsächlich an der Membran) mit PV-PAb (**Fig. 2J**), PV D1-MAb (**Fig. 2K**), Mok-PAb (**Fig. 2L**) angefärbt und sehr wenige mit dem 6A1-MAb angefärbt (nicht gezeigt). Mit pGPV-Mok transfizierte Zellen wurden mit PV-PAb (**Fig. 2M**) oder Mok-PAb angefärbt und waren von runder Gestalt (**Fig. 2N**). Die Zelltransfektion unterscheidet zwei Arten von G-Antigenen: 1) färbte hauptsächlich an der Membran von Zellen normaler Gestalt an, insbesondere bei Verwendung von neutralisierendem MAb, welcher gegen Stelle II (PV E12) und III (PV D1) gerichtet war; und 2) färbte sowohl im Zytoplasma als auch an der Membran von Zellen runder Gestalt an, insbesondere bei Verwendung von MAb (6A1), welcher das denaturierte G-Molekül erkennt.

[0098] Die Kinetiken der G-Protein-Expression wurden nach Transfektion von Zellen mit drei repräsentativen

Plasmiden untersucht: pGPV-PV (homogen), pGEBL1-PV (chimär) und pG-PVIII (verkürzt). pGPV-PV produzierte G-Antigene in ungefähr 60% der Zellen, wenn mit PV-PAb angefärbt wurde, wohingegen zu einem jeglichen Zeitpunkt nur sehr wenige Zellen mit PV 6A1-MAb angefärbt wurden (**Fig. 3a**). Ungefähr 55% der mit pGEBL1-PV transfizierten Zellen wurden mit PV-PAb und bis zu 15% mit 6A1-MAb angefärbt (**Fig. 3b**), was anzeigt, dass einige G-Moleküle denaturiert waren. Zehn bis zwanzig Prozent der mit pG-PVIII transfizierten Zellen waren von runder Gestalt und wurden mit PV-PAb angefärbt, wohingegen 5 bis 10% mit 6A1-MAb positiv waren, was anzeigt, dass G-Moleküle denaturiert waren (**Fig. 3C**).

Beispiel 2

Induktion von IL-2-produzierenden Zellen

[0099] Die Fähigkeit der Plasmide pGPV-PV, pG-PVIII, pGEBL1-PV, pGMok-PV und pGPV-Mok, IL-2-produzierende Zellen zu induzieren, wurde mittels eines Assays bestimmt und die Ergebnisse sind in **Fig. 4** gezeigt. Plasmide mit dem Stelle III-Anteil von PV, unabhängig davon, ob unfusioniert (pG-PVIII) oder mit einem jeglichen Lyssavirus-Stelle-II-Anteil (pGPV-PV, pGEBL1-PV und pGMok-PV), induzierten effizient IL-2-produzierende Zellen (240 bis 550 mE/ml). Dies traf sogar für pG-PVIII zu, welches jedoch nur geringe Effizienz sowohl bei der Zelltransfektion (siehe oben) als auch bei der Antikörper-Induktion (siehe unten) hatte. Für die chimären Plasmide EBL1-PV und Mok-PV war die T-Zell-Antwort größer nach einer Stimulation mit inaktiviertem und gereinigtem PV als mit EBL-1b- oder Mok-Viren. Dies war nicht auf die Qualität der gereinigten Antigene zurückzuführen, da eine Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit PV-, EBL-1b- oder inaktiviertem und gereinigtem Mok-Virus, gefolgt von einer in vitro-Stimulation mit dem gleichen Antigen, ähnliche Niveaus der IL-2-Produktion induzierte (PV: 250 mE/ml, EBL-1b: 350 mE/ml und Mok: 400 mE/ml). Im Gegensatz dazu induzierte das Plasmid pGPV-Mok nur eine schwache Th-Zell-Antwort (IL-2-Titer: 50 mE/ml), die in ähnlicher Weise in vitro nach einer Stimulation mit entweder inaktiviertem und gereinigtem PV- oder Mok-Virus erzeugt wurde.

Beispiel 3

Serologische Assays

[0100] Das verkürzte pG-PVIII-Plasmid induzierte nicht die Produktion von Tollwut-Antikörpern, wenn die Bestimmungen durch RFFIT und ELISA vorgenommen wurden. Wenn jedoch IL-2 zusammen mit pG-PVIII und dann 7 Tage später allein injiziert wurde, wurden Antikörper am Tag 21 nur durch ELISA detektiert (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wurde der Stelle III-Anteil in vivo exprimiert und induzierte eine schwache Produktion von nicht-neutralisierenden Antikörpern, welche durch exogenes IL-2 geboostet wurde.

[0101] Wenn der Stelle III-Anteil von PV mit dem homologen Stelle II-Anteil verknüpft wurde wie in pGPV-PV, zeigte er im Gegensatz dazu starke Immunogenität. Eine einzelne Injektion von pGPV-PV-Plasmid in Mäuse führte zu hohen Konzentrationen von VNAb, gemessen 27 Tage später, gegen sowohl die homologen PV- und CVS-Viren als auch das heterologe EBL-2b-Virus (**Fig. 5a**). Der induzierte Antikörper-Isotyp war hauptsächlich IgG 2a, aber es wurde auch eine schwache IgG 1-Antwort beobachtet (Daten nicht gezeigt). Jedoch war die Korrelation zwischen den VNAb-Titern gegen PV stärker mit dem IgG 2a- ($r = 0,974$) als mit dem IgG 1-Titer ($r = 0,71$), was anzeigt, dass durch auf DNA basierende Immunisierung induzierte VNAb hauptsächlich IgG 2a waren. Der VNAb-Titer gegen die homologen PV- und CVS-Viren nahm zu, wenn Mäuse am Tag 30 eine Auffrischungsimpfungsinjektion erhielten und deren Seren am Tag 40 überprüft wurden, nicht aber die VNAb-Titer gegen das heterologe EBL-2b-Virus, welche unverändert blieben (**Fig. 5a**). Unter diesen Bedingungen zeigten wir auch eine Beziehung zwischen der durch pGPV-PV induzierten VNAb-Konzentration und dem Schutz von Mäusen gegen eine i.c.-Provokation mit CVS: alle Tiere mit einem VNAb-Titer (am Tag 20) über 1,5 IE/ml überlebten die Provokation am Tag 21 (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde nach einer einzelnen Injektion oder nach einer Auffrischungsimpfung keine signifikante Menge von VNAb gegen EBL-1b erzeugt.

[0102] Dementsprechend untersuchten wir die Fähigkeit des Stelle III-Anteils von PV, den Stelle II-Anteil von heterologem EBL1 zu tragen, gemäß unserer früheren Beobachtung, dass das chimäre Plasmid pGMok-PV VNAb gegen sowohl PV- als auch Mok-Viren induzierte. Eine einzelne Injektion des chimären Plasmids pGEBL1-PV induzierte in ähnlicher Weise VNAb gegen sowohl PV- als auch EBL-1b-Viren (**Fig. 5b**). Vierzehn Tage nach der Injektion betrug die Titer 2 IE/ml und sie nahmen nach 80 Tagen auf 17 IE/ml zu. Das Ausmaß der VNAb-Produktion gegen EBL-1b war stets höher als jenes gegen PV, aber der Unterschied war nicht signifikant.

[0103] Zusammengefasst, zeigen diese Ergebnisse klar, dass chimäre G-Gene, welche den Stelle III-An-

teil von PV und den Stelle II-Anteil von G von anderen Lyssaviren, wie EBL-1b oder Mok, kodieren, sehr starke Induktoren von VNAb gegen beide Ausgangsviren sind. Im Gegensatz dazu induzierte das symmetrische pG-PV-Mok-Konstrukt VNAb weder gegen PV- noch Mok-Viren (nicht gezeigt).

Beispiel 4

Schutz-Assays gegen europäische Lyssaviren

[0104] Wir testeten die Fähigkeit sowohl des homogenen pGPV-PV- als auch des chimären pGEBL1-PV-Plasmids, einen Schutz gegen eine i.c.-Provokation mit Viren, die Lyssavirus-Genotypen, welche an der Übertragung von Enzephalomyelitis in Europa beteiligt sind, repräsentieren (CVS für GT1, EBL1b für GT5 und EBL2b für GT6), zu induzieren. Wir verglichen deren Wirksamkeit mit jener eines kommerziell erhältlichen Impfstoffs (PM-Stamm: GT1) und eines Laborpräparats (PV-Stamm: GT1) ([Fig. 6](#)).

[0105] Das Plasmid-Grundgerüst (pCIneo) induzierte keinen Schutz gegen ein jegliches Virus (**Fig. 6d, e und f**). Im Gegensatz dazu schützte pGPV-PV 70% von BALB/c (und 85% von Swiss)-Mäusen vor CVS (**Fig. 6d**), 30% vor EBL1b (**Fig. 6e**) und 72% vor EBL2b (**Fig. 6f**). Unter den gleichen Bedingungen schützte pGEBL1-PV 60% von BALB/c-Mäusen vor CVS (**Fig. 6d**), 75% vor EBL1b (**Fig. 6e**) und 80% vor EBL2b (**Fig. 6f**). Wenn eine Immunisierung mit einem jeglichen der beiden Plasmide dementsprechend keinen signifikanten Unterschied bei dem Schutz vor CVS (GT1) und EBL2b (GT6) zeigte, war das chimäre pGEBL1-PV weit wirkungsvoller gegenüber EBL1b (GT5) und ist eindeutig der beste Kandidat für einen Schutz mittels auf DNA basierender Immunisierung gegen die drei europäischen Lyssavirus-Genotypen.

[0106] Bezüglich des Schutzes, welcher durch inaktivierte Zellkultur-Impfstoffe unter Verwendung der PM- und PV-Stämme gegen die gleichen Provokationen induziert wird: eine humane Dosis von PM-Impfstoff, 1/10 verdünnt, schützte 80% der Mäuse vor CVS (**Fig. 6a**), 36% vor EBL1b (**Fig. 6b**) und 80% vor EBL2b (**Fig. 6c**). Unter den gleichen Bedingungen schützten 2 µg PV-IPRV 100% der Mäuse vor sowohl CVS (**Fig. 6a**) als auch EBL1b (**Fig. 6b**) und 85% vor EBL2b (**Fig. 6c**). Es scheint, dass für eine Impfstoffdosis, die 80 bis 85% der Tiere vor EBL2b schützte, der PV-Stamm 100% und der PM-Stamm nur 36% vor EBL1b schützte. Dementsprechend ist der PM-Stamm weniger wirkungsvoll gegen EBL1b als der PV-Stamm.

Beispiel 5

Vorübergehende Expression von Lyssavirus-G-Genen

[0107] Plasmide, welche das fremde Antigen, welches mit den verkürzten (pG-PV^{III}) oder chimären (pGEBL1-PV) Lyssavirus-G-Genen assoziierte Sequenzen kodiert, enthalten, wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Neuro 2a-Zellen vorübergehend (transient) zu transfizieren, getestet. Mit Ausnahme von pG(B-CTL)₂-PV^{II}, welches eine IIF-Anfärbung (im Zytoplasma) nur nach Permeabilisierung induzierte, induzierten alle Plasmide die Expression von mit Polio- und Lyssaviren verwandten Antigenen an der Zellmembran von nicht-permeabilisierten Zellen, wie zuvor für die gleichen Plasmide ohne fremde Epitope berichtet worden war.

[0108] Zur Veranschaulichung sind mit pGEBL1-(B-CTL)₂-PV erhaltene Transfektionsergebnisse in [Fig. 7](#) angegeben. Es wurden sowohl der Tollwutvirus-G-Teil, der durch PV D1-MAb erkannt wird (**Fig. 7A**), als auch das Poliovirus-Insert, welches durch entweder den C3-MAb (**Fig. 7B**) oder den anti-Poliovirus Typ 1-PAb (**Fig. 7C**) erkannt wird, nachgewiesen, wohingegen mit den gleichen MAb und PAb bei durch pCIneo transfizierten Zellen keine Anfärbung beobachtet wurde (**Fig. 7D**). Dies zeigt eindeutig an, dass mit Ausnahme von pG(B-CTL)₂-PV^{III} das chimäre pGEBL1-PV-Glycoprotein die Expression des Poliovirus-B-Zell-Epitops allein oder in Kombination mit dem LCMV-CTL-Zell-Epitop an der Zelloberflächenmembran unter einer nativen Form ermöglichte, wohingegen die Expression von Lyssavirus-G beibehalten wurde.

Beispiel 6

Immunogenität von fremden Epitopen, welche durch das verkürzte Glycoprotein getragen werden

[0109] Das verkürzte pGPV^{III}-Gen wurde verwendet, um C3 VP1 B-Zell- und LCMV CD8⁺-CTL-Epitope aufzunehmen und in Mäusen nach einer auf DNA basierenden Immunisierung zu exprimieren.

[0110] Während das pGPV^{III}-Gen IL-2 produzierende Zellen induzierte, die in vitro durch IPRV 21 Tage nach der Injektion stimuliert werden können, wurde nach 14 Tagen keine Produktion beobachtet (**Fig. 8A**). Jedoch

wurde nach 14 Tagen eine signifikante Produktion mit pG(B-CTL)₂-GPVIII beobachtet (**Fig. 8A**). Dies zeigt an, dass die Fusion von fremden Epitopen mit GPVIII die Produktion von Th-Zellen, welche gegen den Stelle III-Anteil von Tollwut-G gerichtet sind, signifikant verstärkt.

[0111] Obwohl pGPVIII keine Anti-Tollwut-Antikörper in Abwesenheit von exogenem IL-2 induzierte (**Fig. 9**), zeigte die kinetische Untersuchung von Antikörpern, die durch pG(B-CTL)₂-GPVIII induziert wurden, dass eine signifikante Antikörperproduktion gegen sowohl das Tollwut-G als auch das Poliovirus-Peptid auftrat (**Fig. 9**). Dies zeigt auch an, dass die Fusion von fremden Epitopen mit GPVIII die Produktion von gegen den Stelle III-Anteil von Tollwut-PV G gerichteten Antikörpern signifikant verstärkt. Darüber hinaus war das verkürzte GP-VIII in der Lage, das Poliovirus-B-Zell-Epitop aufzunehmen und die Expression dieses Poliovirus B-Zell-Epitops in vivo mit Antikörperproduktion zu erlauben.

[0112] Die Produktion von durch p(B-CTL)₂-GPVIII gegen ein Poliovirus-Peptid induzierten Antikörpern wurde auch nach einem Priming mit entweder pGPVIII oder p(B-CTL)₂-GPVIII selbst getestet (**Fig. 10**). Wenn p(B-CTL)₂-GPVIII ohne Priming injiziert und 13 Tage (PBS/p(B-CTL)₂-GPVIII – D26 –) oder 39 Tage später (p(B-CTL)₂-GPVIII – D0 –) kontrolliert wurde, betrug der Anti-Peptid-Antikörpertiter 65 bzw. 80. Wenn jedoch ein Priming mit pGPVIII oder p(B-CTL)₂-GPVIII ausgeführt worden war, betrug der Titer 200 bzw. 600. Dies zeigt klar, dass die beiden Arten von Priming die Antikörperproduktion gegen ein Poliovirus-Peptid verstärkten.

Beispiel 7

Immunogenität von fremden Epitopen, die durch das chimäre Glycoprotein getragen werden

[0113] Die Immunogenität von sowohl B- als auch CD8-T-Zell-Epitopen und die Konsequenz von deren Insertion auf die Immunogenität des chimären Glycoproteins wurden gemäß den humoralen und Zell-vermittelten Immunantworten nach einer auf DNA basierenden Immunisierung analysiert. Wenn Epitope in das chimäre pGEBL1-PV-Plasmid inseriert wurden, hing die Induktion von IL-2-produzierenden Zellen, welche in der Lage waren, durch IPLV stimuliert zu werden, von den inserierten Epitopen ab. Es wurden zwei Arten von Ergebnissen erhalten und sind in **Fig. 8B** gezeigt: i) die durch pGEBL1-(B-CTL)₂-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV und pGEBL1-(CTL)-PV induzierte IL-2-Produktion war ähnlich zu jener, die durch pGEBL1-PV induziert wurde; und ii) die durch pGEBL1-(B-CTL)-PV (Daten nicht gezeigt) und pGEBL1-(B)-PV induzierte IL-2-Produktion wurde gehemmt. Folglich scheint es, dass das chimäre G EBL1-PV fremde B- und CD8-T-Zell-Epitope ohne negative Auswirkungen auf dessen Fähigkeit, IL-2-produzierende Zellen zu induzieren, tragen kann. Jedoch wurde bezüglich des B-Zell-Epitops ein Positionseffekt beobachtet, da dessen Insertion unmittelbar hinter der EBL1-Sequenz für die Induktion von T-Helferzellen, die durch Lyssavirus G stimuliert werden, schädlich war. Dieses Phänomen wurde jedoch mit pGEBL1-(B-CTL)₂-PV nicht nachgewiesen.

[0114] Eine Insertion von fremden Epitopen in pGEBL1-PV wurde auch hinsichtlich deren Folge für die Induktion von Antikörpern gegen Poliovirus-Peptid und VNAb gegen sowohl PV- als auch EBL1-Lyssaviren untersucht (Tabelle 1). Die vier Plasmide, welche das B-Zell-Epitop enthielten (pGEBL1-(B)-PV, pGEBL1-(CTL-B)-PV, pGEBL1-(B-CTL)₂-PV und pGEBL1-(B-CTL)-PV) induzierten Antikörper gegen das Poliovirus-Peptid. Wenn jedoch das B-Zell-Epitop der EBL1-Sequenz folgte (pGEBL1-(B-CTL)-PV und pGEBL1-(B)-PV), war die Antikörperproduktion schwächer, als wenn das B-Epitop durch das CD8-Zell-Epitop davon getrennt war (pGEBL1-(CTL-B)-PV). Die Ergebnisse für pGEBL1-(B-CTL)₂-PV waren intermediär. Die Insertion von fremden Epitopen induzierte eine Verringerung der Anti-Lyssavirus-VNAb-Produktion, diese wurde aber in einem hohen Niveau beibehalten, wenn Tieren pGEBL1-(CTL)-PV oder pGEBL1-(CTL-B)-PV injiziert wurde. Wenn das B-Zell-Epitop jedoch unmittelbar hinter der EBL1-Sequenz inseriert wurde, wurde keine so große Anti-Lyssavirus-VNAb-Produktion beobachtet.

[0115] Zusammengefasst, kann das chimäre G EBL1-PV sowohl Polioviren als auch Lyssaviren neutralisierende B-Zell-Epitope tragen und deren in vivo-Expression ermöglichen; jedoch ist das Vorhandensein des Poliovirus-B-Zell-Epitops unmittelbar hinter der EBL1-Sequenz (mit Ausnahme einer (B-CTL)₂-Insertion) schädlich für die Immunogenität von sowohl dem Stelle II- als auch dem Stelle III-Anteil des chimären Glycoproteins. Andererseits kann, wenn die fremden Epitope mit dem verkürzten G PVIII fusioniert worden waren, die Produktion sowohl von T-Helferzellen als auch von nicht-neutralisierenden Antikörpern induziert werden.

Beispiel 8

Schutz gegen eine letale Dosis von LCMV

[0116] Da das CD8-T-Zell-Epitop an der Induktion eines Schutzes gegen LCMV beteiligt ist, wurden das verkürzte und das chimäre G, welche das LCMV CD8⁺-T-Zell-Epitop tragen, hinsichtlich ihrer Schutz verleihenden Aktivität getestet (Tabelle 2). Das verkürzte p(B-CTL)₂-GPVIII induzierte nur einen partiellen Schutz. Wenn die B- und CD8-T-Zell-Epitope in das chimäre GEBL1-PV inseriert wurden, wurde ein signifikanter Schutz beobachtet mit pGEBL1-(CTL-B)-PV gegenüber einer letalen Provokation mit LCMV (70% der Mäuse überlebten). Unter diesen Bedingungen eliminieren die überlebenden Tiere das Virus vollständig, wenn durch RT-PCR 21 Tage nach der Infektion kontrolliert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt an, dass das chimäre G sehr wirkungsvoll ist, ein schützendes CD8-Zell-Epitop zu tragen. Jedoch induzierte wie bei Anti-Lyssavirus- und -Poliovirus-Immunantworten die Insertion des Poliovirus-B-Zell-Epitops unmittelbar hinter der EBL1-Sequenz eine Inhibition der schützenden Aktivität des folgenden CD8-Zell-Epitops.

Beispiel 9

Mutmaßliche PEST-Sequenz

[0117] Da eindeutig ein schädlicher Positionseffekt für die Position der Insertion des B-Zell-Epitops vor oder nach dem CTL-Zell-Epitop beobachtet worden war, wurde das Vorhandensein von mutmaßlichen PEST-Sequenzen in den verschiedenen Plasmiden analysiert ([Fig. 1d](#)). Nur zwei Plasmide (pGEBL1-(B)-PV und pGEBL1-(B-CTL)₂-PV) enthielten mutmaßliche PEST-Sequenzen aufgrund der Verbindung des Endes der EBL1- und der B-Zell-Epitop-Sequenzen. Jedoch verringerte die Substitution des Serins (S) in pGEBL1-(B-CTL)₂-PV durch ein Leucin (L) in pGEBL1-(B)-PV den PEST-Wert von +8,38 auf +4,20.

Beispiel 10

Immunisierung und Provokation („challenge“) von Hunden

[0118] Beagle-Hunde, deren Alter von 4 bis 8 Jahren reichte, wurden in vier Versuchsgruppen eingeteilt (Tabelle 3). Sie wurden in isolierten Käfigen gehalten und mit kommerziellem Futter gefüttert (400 g täglich). Ihnen wurde intramuskulär in den Oberschenkel entweder 100 µg Plasmid (Gruppe A, B und C) oder PBS (Gruppe D) injiziert. Plasmid wurde in eine Stelle am Tag 0, 21, 42 und 175 (Gruppe A) oder am Tag 0 und 175 (Gruppe C) injiziert. Es wurde auch in drei Stellen (3 × 33 µg) am Tag 0, 21, 42 und 175 injiziert (Gruppe B). Blutproben wurden am Tag 0, 28, 49, 70, 120, 175 und 189 gesammelt (aus Venenpunktion).

[0119] Lyssavirus-neutralisierende Antikörper wurden durch den schnellen fluoreszierenden Focus-Inhibitionstest (RFFIT) mit den zuvor beschriebenen Modifikationen von (28 der Hunde) unter Verwendung von PV-, CVS- oder FWR-Viren) Zelle titriert. Neutralisierende anti-PV-, -CVS- oder -FWR-Antikörper-Titer sind ausgedrückt als Internationale Einheiten pro ml (IE/ml) unter Verwendung des 2nd International Standard (Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark) als Referenz oder als der Kehrwert der Serumverdünnung, welche 50% der fluoreszierenden Foci inhibiert. Unter diesen Bedingungen war ein Titer von 40, 70 oder 60 (Kehrwert der Serumverdünnung) äquivalent zu 0,5 IE/ml gegenüber PV, CVS bzw. FWR.

[0120] Wie in [Fig. 11](#) gezeigt, kann ein Virus neutralisierender Antikörper (VNAb) induziert werden durch das Plasmid, welches das die G-Protein-Gruppen kodierende Gen enthält (A, B und D), wohingegen unabhängig vom Injektionsprotokoll kein Antikörper in Tieren, welchen PBS injiziert worden war, detektiert wurde (Gruppe D). Erhöhte VNAb-Konzentrationen wurden nach einer Injektion und einer Auffrischungsimpfung („boost“) am Tag 21 (Gruppe A) oder am Tag 175 (Gruppe C) erhalten. Da die Serokonversion bei 0,5 IE/ml erfolgt, kann daraus geschlossen werden, dass alle Tiere eine Serokonversion zeigen. Darüber hinaus kann gemäß der Literatur auch geschlossen werden, dass die gesamten Hunde, denen Plasmid injiziert worden war, vor einer Provokation durch Tollwut-Virus geschützt sind.

[0121] Diese Ergebnisse sind repräsentativ und die Dosierung kann auf andere gegenüber Tollwut empfindliche Tiere, einschließlich Menschen, extrapoliert werden.

pG-PVIII als ein Träger für fremdes Protein: P. falciparum-Domäne, welche die Adhäsion an Chondroitinsulfat A: einen Rezeptor für humane placentale Infektionen, vermittelt

[0122] Malaria während der ersten Schwangerschaft verursacht eine hohe Todesrate bei Föten und Neugeborenen. Die abnehmende Anfälligkeit während nachfolgender Schwangerschaften korreliert mit dem Erwerb von Antikörpern, die die Bindung von infizierten roten Blutkörperchen an Chondroitinsulfat A (CSA), einen Rezeptor für Parasiten in der Placenta, blockieren. Unlängst haben die Erfinder eine Domäne innerhalb eines bestimmten Plasmodium falciparum-Erythrozytenmembran-Proteins 1 (PfEMP-1) identifiziert, die CSA bindet (Buffet et al., P. falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: A receptor for human placental infection (1999) P. N. A. S. 96: 12743–12748). Die Erfinder haben ein var-Gen, welches in CSA-bindenden, von Parasiten befallenen roten Blutzellen (PRBCs) exprimiert wird, kloniert. Das Gen hatte acht rezeptorartige Domänen und die Erfinder haben gezeigt, dass die Duffy-Bindungs-artige („Duffy-binding-like“; DBL) Domäne, welche als DBL-3 bezeichnet wird, CSA band und die gleiche Bindungsspezifität wie PRBCs zeigt.

[0123] Da nach einer Schwangerschaft vorhandene schützende Antikörper die Bindung von Parasiten aus unterschiedlichen Teilen der Welt an CSA blockieren, könnte DBL-3, obwohl abgewandelt, möglicherweise eine kreuzreaktive Immunität, die schwangere Frauen und deren Föten schützen wird, induzieren. Dementsprechend wird die DBL-3-Domäne zu einem Kandidaten als Impfstoff für schwangere Frauen in Afrika.

[0124] Die DBL-3-Domäne enthält eine Anzahl von Cysteinen, die für die korrekte Faltung der CSA-Bindungsregion entscheidend zu sein scheinen. Diese Faltung kann höchstwahrscheinlich in bakteriellen Expressionssystemen nicht erzielt werden (unveröffentlichte Daten). Eine wichtige Strategie, um Antikörper zu induzieren, welche in der Lage sind, mit der CSA-Bindung von infizierten Erythrozyten zu interferieren, besteht darin, eine DNA-Impfstrategie unter Verwendung der DBL-3-Domäne, welche mit dem Tollwut-PV-III-Anteil fusioniert ist, anzuwenden. Es ist gezeigt worden, dass der Tollwut-Glycoprotein PVIII-Anteil eine effiziente Helferfunktion fördert.

TABELLE 1. Durch das chimäre pGEBL1-PV-Plasmid, welches verschiedene Kombinationen von fremden B- und CD8⁺-T-Zell-Epitopen trägt, induzierte Antikörperproduktion

Injiziertes Plasmid	Neutralisierender Antikörper (IE/ml) gegen:		Poliovirus-anti-Peptid-Antikörper (Kehrwert der Verdünnung)
	Tollwut-Virus	Europäische Fledermaus-Lyssavirus 1	
pGEBL1-(B-CTL)2-PV	0,9 (0,05)	1,1 (0,07)	1100 (200)
pGEBL1-(CTL-B)-PV	1,8 (0,2)	8,0 (1,0)	1510 (490)
pGEBL1-(B-CTL)-PV	0,06 (0,06)	0,6 (0,07)	810 (210)
pGEBL1-(CTL)-PV	2,6 (0,2)	5,2 (0,2)	0 (0)
pGEBL1-(B)-PV	0,1 (0,01)	0,21 (0,09)	355 (45)
pGEBL1-PV	5,9 (2,1)	21,9 (1,8)	0 (0)
pCIneo	0 (0)	0 (0)	0 (0)

[0125] TABELLE 1 zeigt die durch das chimäre pGEBL1-PV-Plasmid, welches verschiedene fremde Epitope trägt, induzierte Antikörperproduktion. BALB/c-Mäusen (drei für jedes Plasmid) wurden 50 µg von verschiedenen Plasmiden in jeden Tibialis-Muskel injiziert. Seren wurden am Tag 21 hinsichtlich Tollwut oder EBL1-Virus-neutralisierende Antikörper durch die RFFIT-Methode (Titer ausgedrückt in IE/ml) und hinsichtlich Poliovirus-anti-Peptid-Antikörper durch ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind als der mittlere Titer ausgedrückt und die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

TABELLE 2. Schutz, welcher durch das verkürzte pGPVIII-Plasmid und das chimäre pGEBL1-PV-Plasmid, welches das LCMV-CD8⁺-Epitop kodiert, induziert wird

Injiziertes Plasmid	Überleben der Tiere (%)
pCIneo	0/10 (0)
p(B-CTL)2-GPVIII	2/5 (40)
pGEBL1-(B-CTL)-PV	0/10 (0)
pGEBL1-(CTL-B)-PV	7/10 (70)

[0126] TABELLE 2 zeigt den Schutz, welcher durch das chimäre pGEBL1-PV-Plasmid, welches die LCMV-CD8⁺-Epitope trägt, induziert wird. BALB/c-Mäusen (drei für jedes Plasmid) wurden 40 µg von verschiedenen Plasmiden injiziert und diese wurden am Tag 21 einer Provokation („challenge“) i.c. unterzogen. Der Prozentsatz der überlebenden Tiere ist in Klammern angegeben.

TABELLE 3: Merkmale der Hunde und Injektionsprotokoll

Gruppe	Hund Nr.	Geschlecht*	Alter (Jahre)	Injektion		
				Injiziertes Produkt	Anzahl Stellen	Tag
A	1	M	8	Plasmid	1	0, 21, 42 und 175
	2	F	6	Plasmid	1	0, 21, 42 und 175
	3	F	6	Plasmid	1	0, 21, 42 und 175
B	4	F	6	Plasmid	3	0, 21, 42 und 175
	5	M	6	Plasmid	3	0, 21, 42 und 175
	6	F	8	Plasmid	3	0, 21, 42 und 175
C	7	M	4	Plasmid	1	0 und 175
	8	F	7	Plasmid	1	0 und 175
	9	F	4	Plasmid	1	0 und 175
D	10**	M	4	PBS	1	0, 21, 42 und 175
	11	M	4	PBS	1	0, 21, 42 und 175
	12	M	4	PBS	1	0, 21, 42 und 175

* M: männlich; F: weiblich

** Am Tag 160 getötet (krank)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Institut Pasteur

<120> Chimäre Lyssavirus-Nukleinsäuren und -Polypeptide

<130> d18780

<150> US60/129501

<151> 1999-04-15

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Tollwut-Virus

<400> 1

ttctagagcc accatggttc ctcaggctct cctg

34

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Tollwut-Virus

<400> 2

attgatcaac tgaccgggag ggc

23

<210> 3

<211> 98

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische
Adaptor-Primer

<400> 3

aattctagag ccgccacat ggttcctcag gctctcctgt ttgtaccct tctggtttt 60
ccattgtgtt ttggaagaa ttccccccc ggtcagtt 98

<210> 4

<211> 98

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische
Adaptor-Primer

<400> 4

gatcaactga ccggggggg aattcttccc aaacacaat ggaaaaacca gaaggggtac 60
aaacaggaga gcctgaggaa ccatggtggc ggetctag 98

<210> 5
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> **Künstliche Sequenz**

 <220>
 <223> **Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische
 Adaptor-Primer**

 <400> 5
 aatttcccaa tetacacat cccggataaa atcggaccgt ggtcacctat tccg 54

 <210> 6
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> **Künstliche Sequenz**

 <220>
 <223> **Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische
 Adaptor-Primer**

 <400> 6
 aattcgaat aggtgaccac ggtccgattt tatccgggat ggtgtagatt ggga 54

 <210> 7
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> **Tollwut-Virus**

 <400> 7
 ccgtggtcac ctattgatat aaaccatctc agctgccccaa acaacttgat cgtggaagat 60
 gag 63

 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> **Tollwut-Virus**

 <400> 8
 ggaattcgag caccattctg gagcttc 27

 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> **Poliovirus-VP1-Protein**

 <400> 9
 Asp Asn Pro Ala Ser Thr Thr Asn Lys Asp Lys
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> **Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus-Nukleoprotein**

<400> 10

Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly
1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> **Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus-Nukleoprotein**

<400> 11

Glu Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Thr Ala Gln
1 5 10 15

<210> 12

<211> 78

<212> DNA

<213> **Künstliche Sequenz**

<220>

<223> **Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer**

<400> 12

aattcagata acccggcgtc gaccactaac aaggataagc tgttcgcagt gcctcaggcc 60
tctggtgtgt atatgggt 78

<210> 13

<211> 78

<212> DNA

<213> **Künstliche Sequenz**

<220>

<223> **Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer**

<400> 13

aattacccat atacacacca gaggcctgag gcactgcaa cagcttatcc ttgtagtg 60
tcgacgccgg gttatctg 78

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> **Künstliche Sequenz**

<220>

<223> **Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer**

<400> 14

aatttgata acccggcgtc gaccactaac aa 32

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer

<400> 15

aattcttatac cttgtagtg gtcgacgccg gg

32

<210> 16

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer

<400> 16

aattggaga gacctcaggc ctctggtgtg tatatgggta atcttacggc ccag

54

<210> 17

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetische Adaptor-Primer

<400> 17

aattctggga agtaagatta cccatataca caccagaggc ctgaggtctc tcca

54

Patentansprüche

1. Trägermolekül, welches eine chimäre Polynukleotidsequenz enthält, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz eine Sequenz, welche einen Teil eines Glycoproteins, welches wenigstens die Stelle III des Lyssavirus-Glycoproteins enthält, kodiert, umfasst und des Weiteren eine Sequenz, welche ein heterologes Antigen, welches etwas anderes als ein Antigen aus einem Lyssavirus ist, kodiert, umfasst.

2. Trägermolekül nach Anspruch 1, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz des Weiteren eine Sequenz umfasst, welche eine Transmembrandomäne eines Transmembranproteins kodiert.

3. Trägermolekül nach Anspruch 2, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz des Weiteren eine Sequenz umfasst, welche eine zytoplasmatische Domäne des Glycoproteins des Lyssavirus kodiert.

4. Trägermolekül nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz eine Sequenz umfasst, welche wenigstens die C-terminale Hälfte eines Lyssavirus-Glycoproteins kodiert.

5. Trägermolekül nach Anspruch 1, wobei die chimäre Polynukleotidsequenz des Weiteren umfasst:

- a) eine Sequenz, welche eine Stelle II-Sequenz eines Glycoproteins eines Lyssavirus kodiert;
- b) eine Transmembrandomäne eines Transmembranproteins; und
- c) eine zytoplasmatische Domäne eines Transmembranproteins.

6. Trägermolekül nach den Ansprüchen 1 bis 5, wobei das Antigen ein Tumorantigen ist.

7. Trägermolekül nach den Ansprüchen 2, 3 oder 5, wobei die Transmembrandomäne von einem Protein, welches etwas anderes als ein Lyssavirus-Glycoprotein ist, stammt.

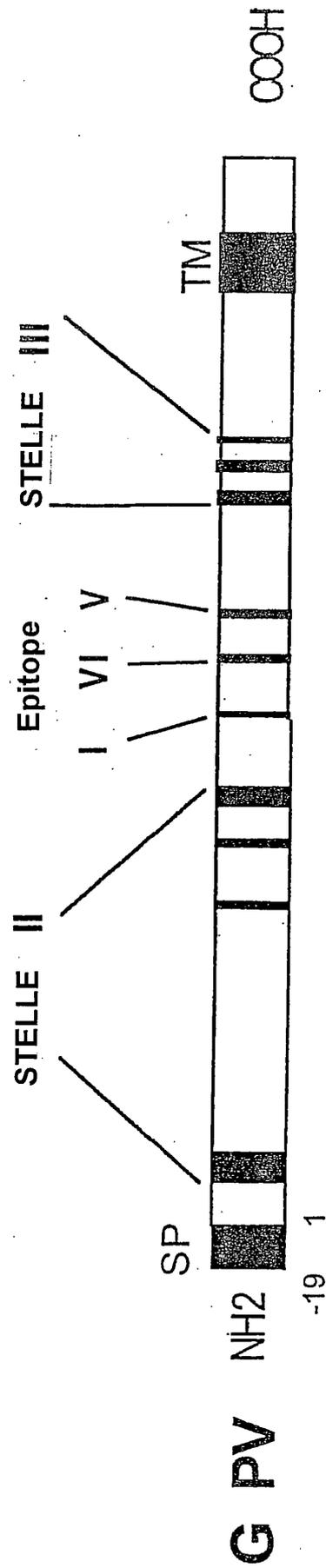
8. Polypeptid, welches durch die chimäre Polynukleotidsequenz des Trägermoleküls nach den Ansprüchen

1 bis 7 kodiert wird.

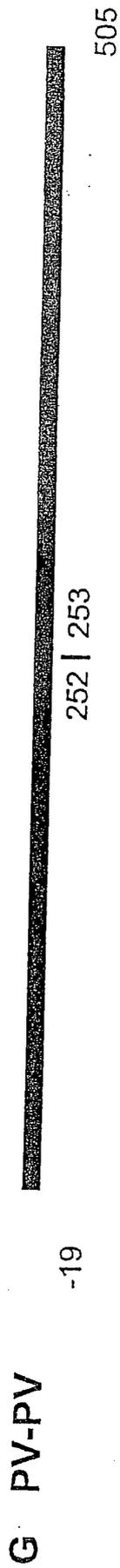
9. Immunogene Zusammensetzung, welche das Trägermolekül nach den Ansprüchen 1 bis 7 oder ein Polypeptid nach Anspruch 8 umfasst.

Es folgen 29 Blatt Zeichnungen

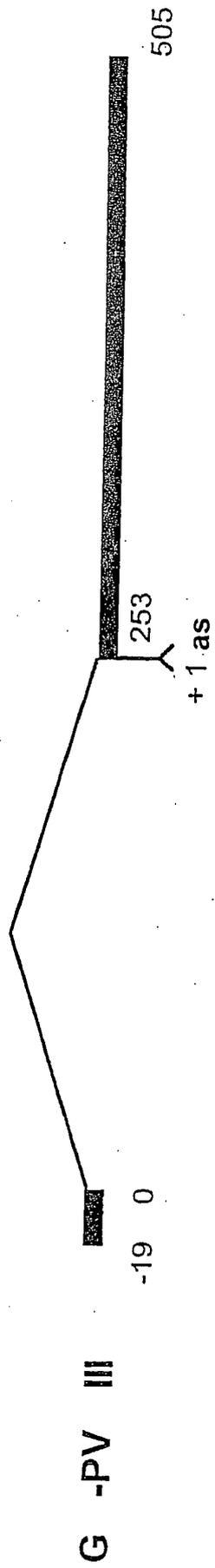
Anhängende Zeichnungen



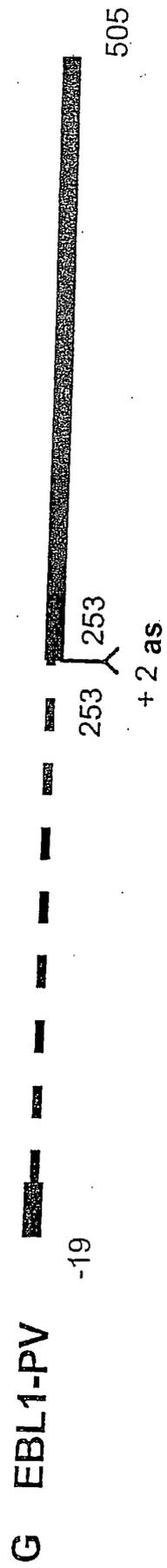
Figur 1A



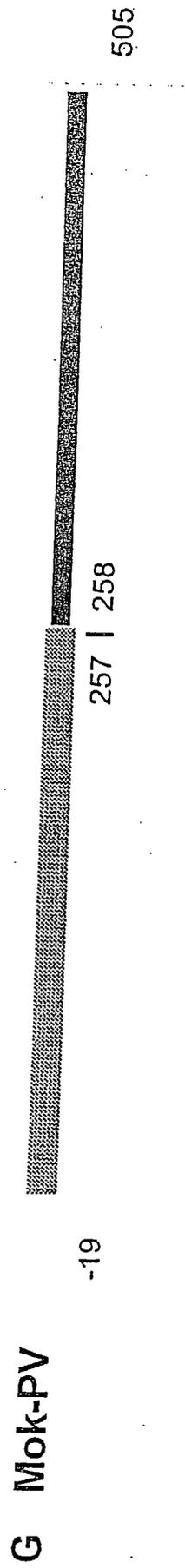
Figur 1A (Fortsetzung)



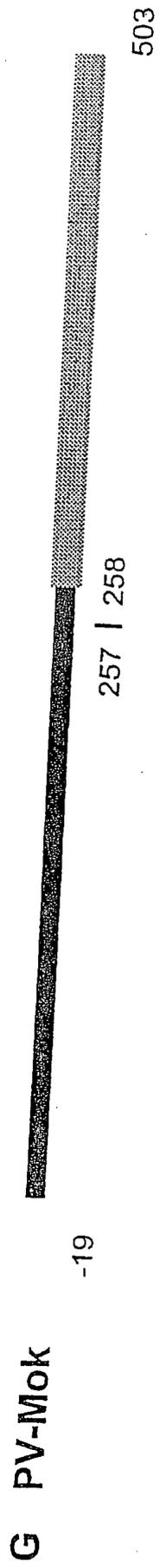
Figur 1A (Fortsetzung)



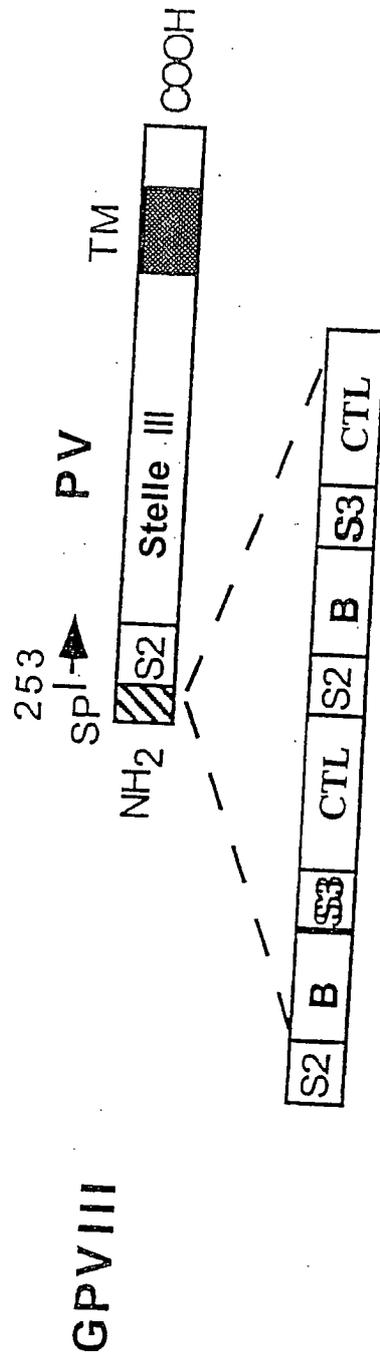
Figur. 1A (Fortsetzung)



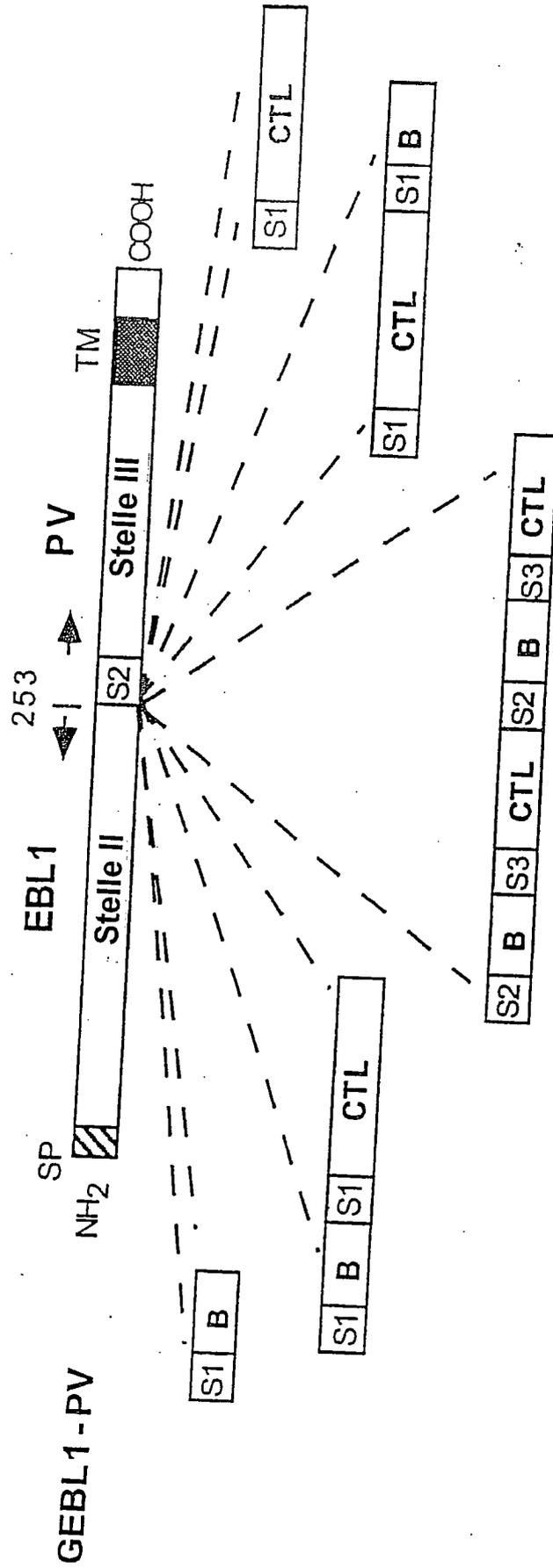
Figur 1A (Fortsetzung)



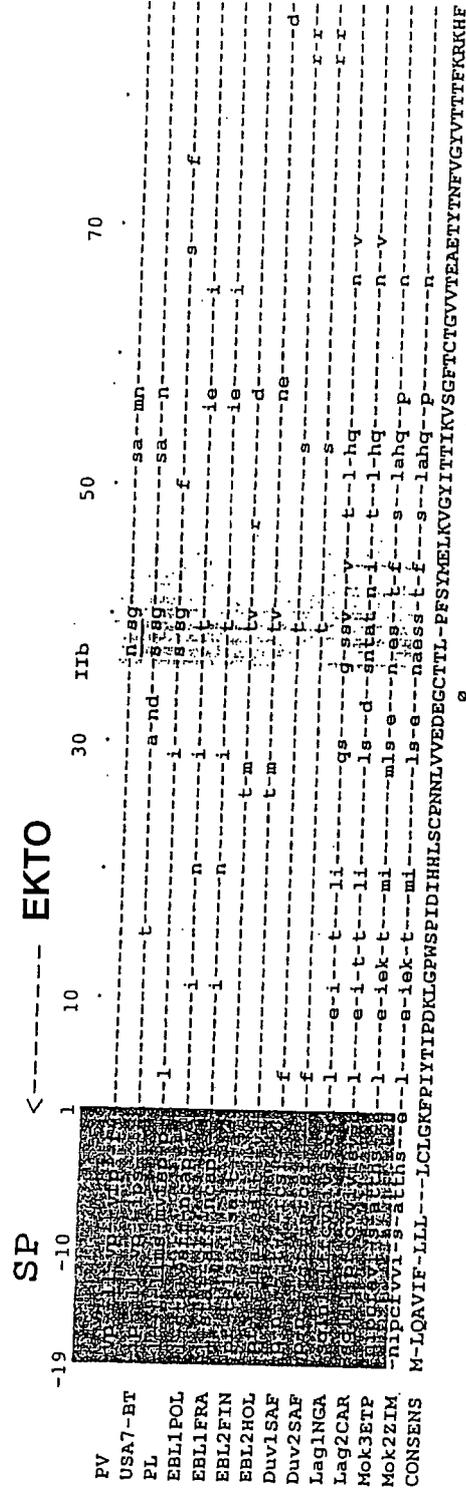
Figur 1A (Fortsetzung)



Figur. 1C



Figur 1D



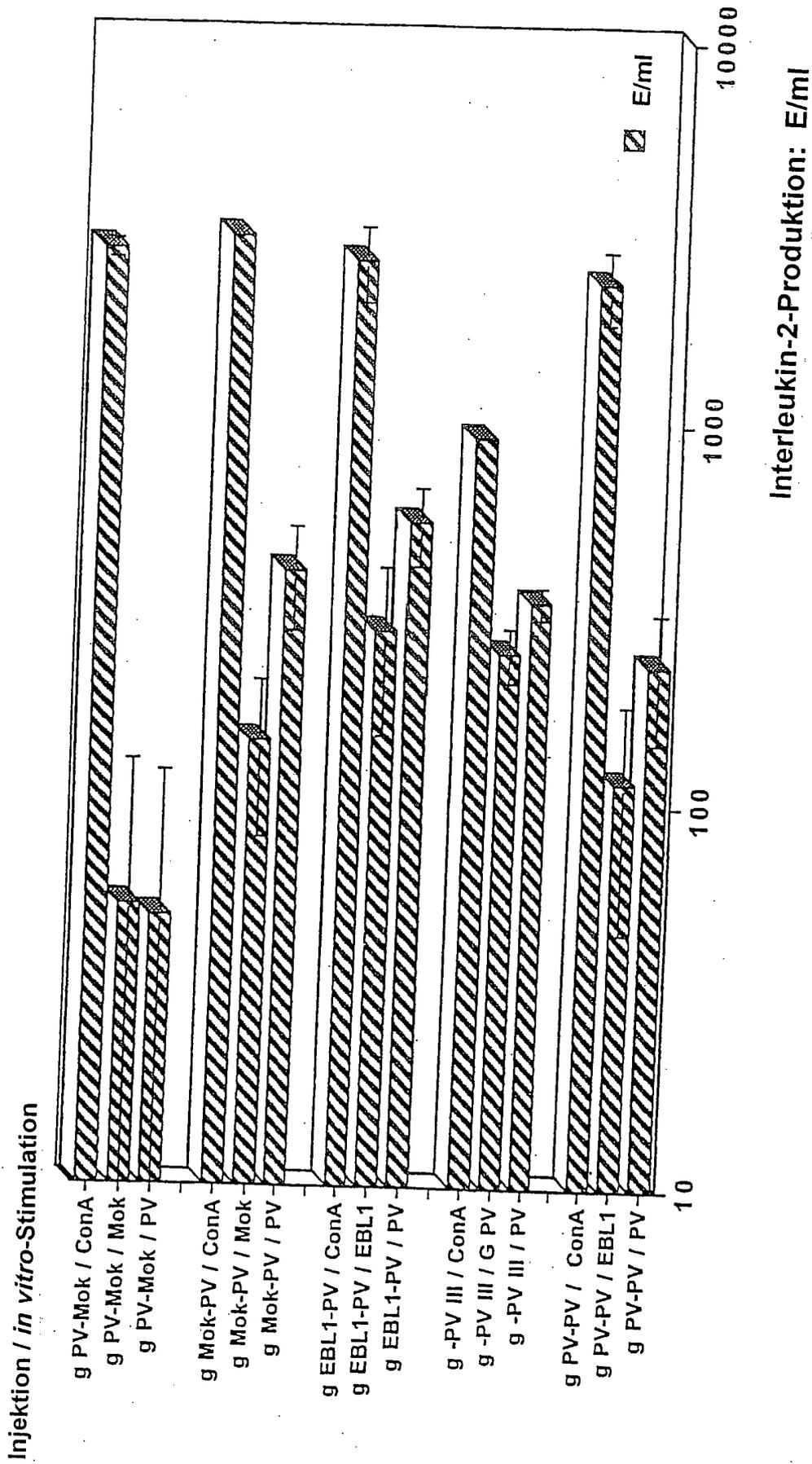
FIGUR 1.E

```

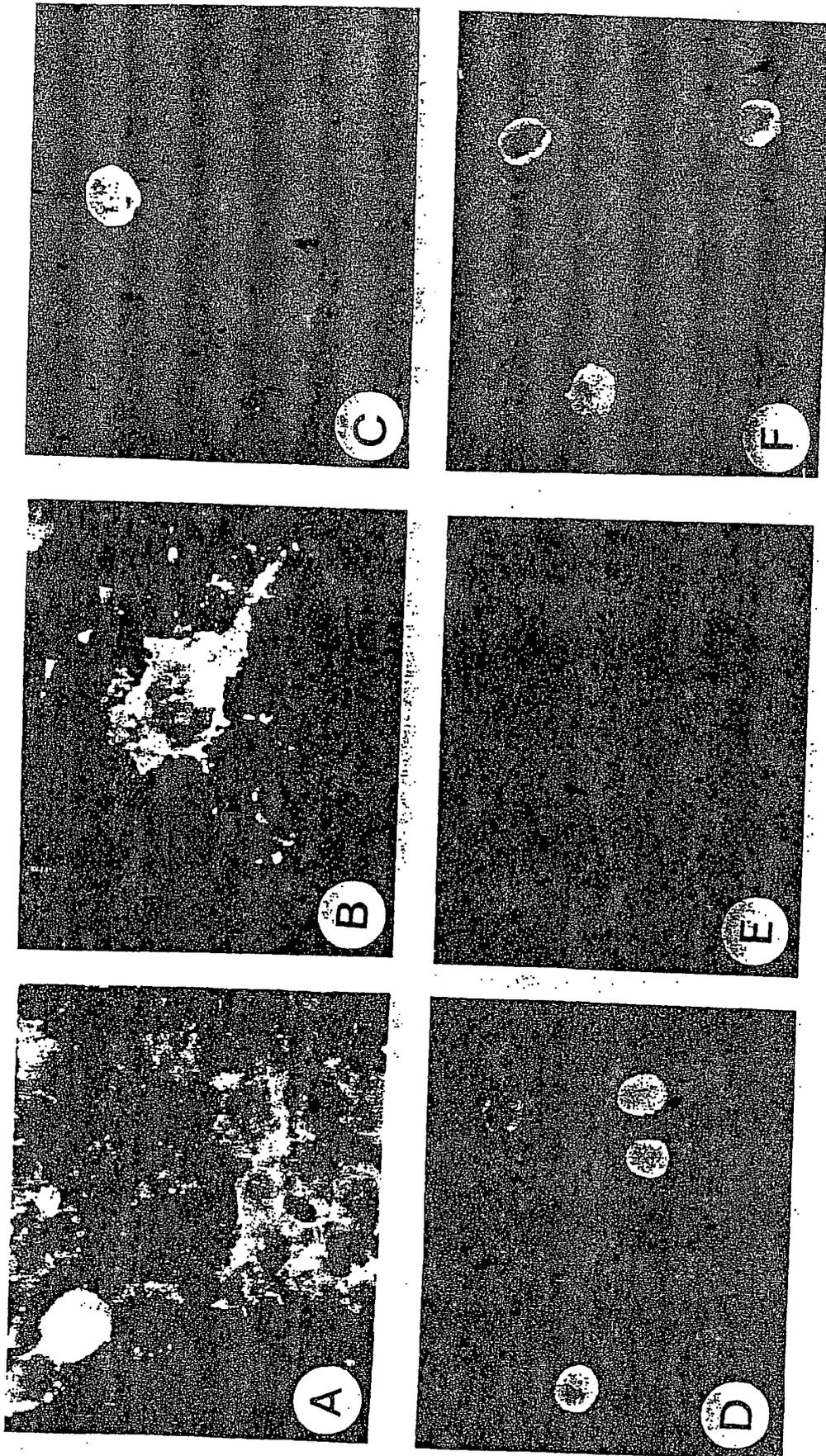
PV          110          130          150          170          190
USA7-BT    d--a--m-----y-----k-----v-----a-l-p-rs--rv-g-n--vav-ty-s      II  190
PL          d--a-hd-m-----d-g-y-----k-----v-----a-l-p-s--rv-s--l-itv-ty-s      .
EBL1POL    ef-n-v-----v-----y-----y-----k-----v-----a-l-p-s--rv-s--l-itv-ty-s      .
EBL1FRA    s-----t-----t-----y-----y-----k-----v-----a-l-p-s--rv-s--l-itv-ty-s      .
EBL2FIN    s-----s-n-----sc-t-----v-----a-----n-----y-----i-l-----v-gv-----s      .
EBL2HOL    ns-----h-----fh-----s-----t-----t-----s-----a-----i-----g-----r-----ei-----g-----p-----e-----ss-----i-----r-----m
Duv1SAF    l-----l-----ns-----ns-----t-----t-----ns-----ns-----i-----e-----v-----sr-----t-----rfy-----s-----a-----l-----dd-----ls-----a-----v-----t
Lag1NGA    a-----vs-----vs-----t-----t-----s-----a-----i-----e-----i-----gr-----t-----p-----s-----v-----nv-----v-----s-----e-----l-----l-----d-----sls-----v-----s-----n
Mok3ETP    -ACRDAYNKIAGDPRYEESLHNPYDPSHWLRFVTTKESLIIISPSVVDADAYDKTLHSMFPNGKCSG-SPSPSFFC-TNHXYTIMPEFNPEGLSCLDIFTTSKG
Mok2ZIM    0
CONSENS    0

```

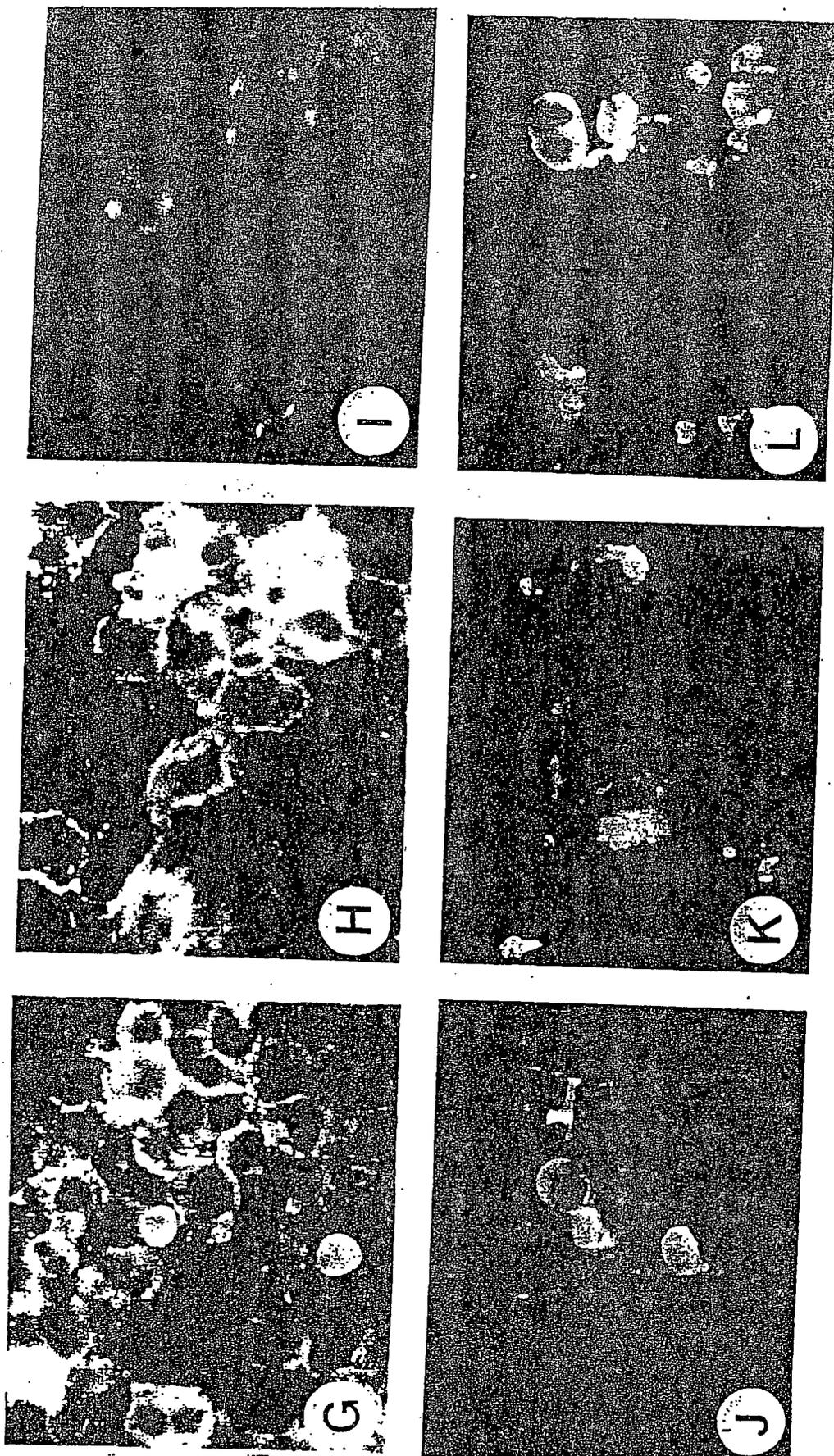
FIGUR 1.E, Fortsetzung



Figur 4



Figur 2



Figur 2 (Fortsetzung)

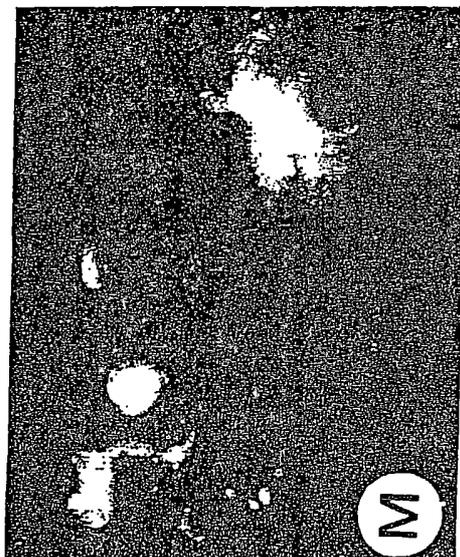
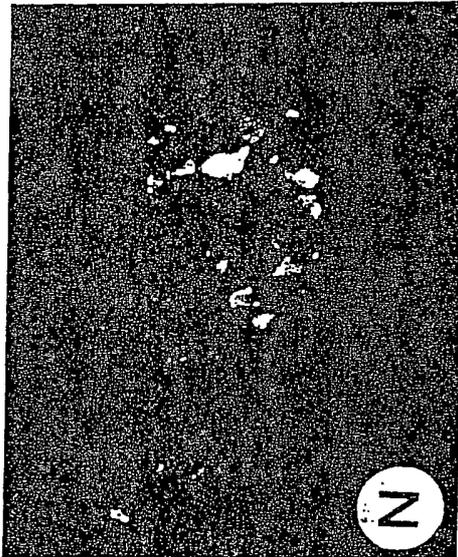
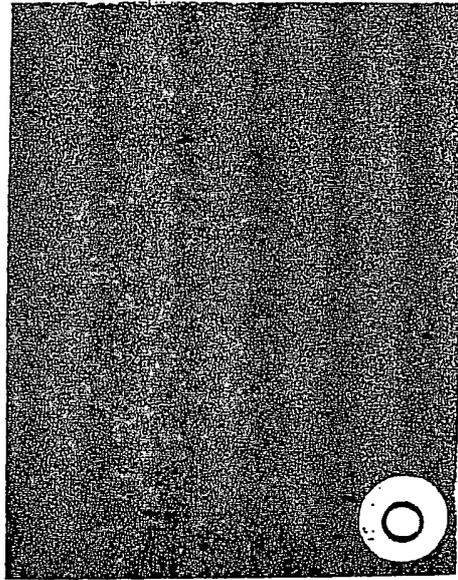
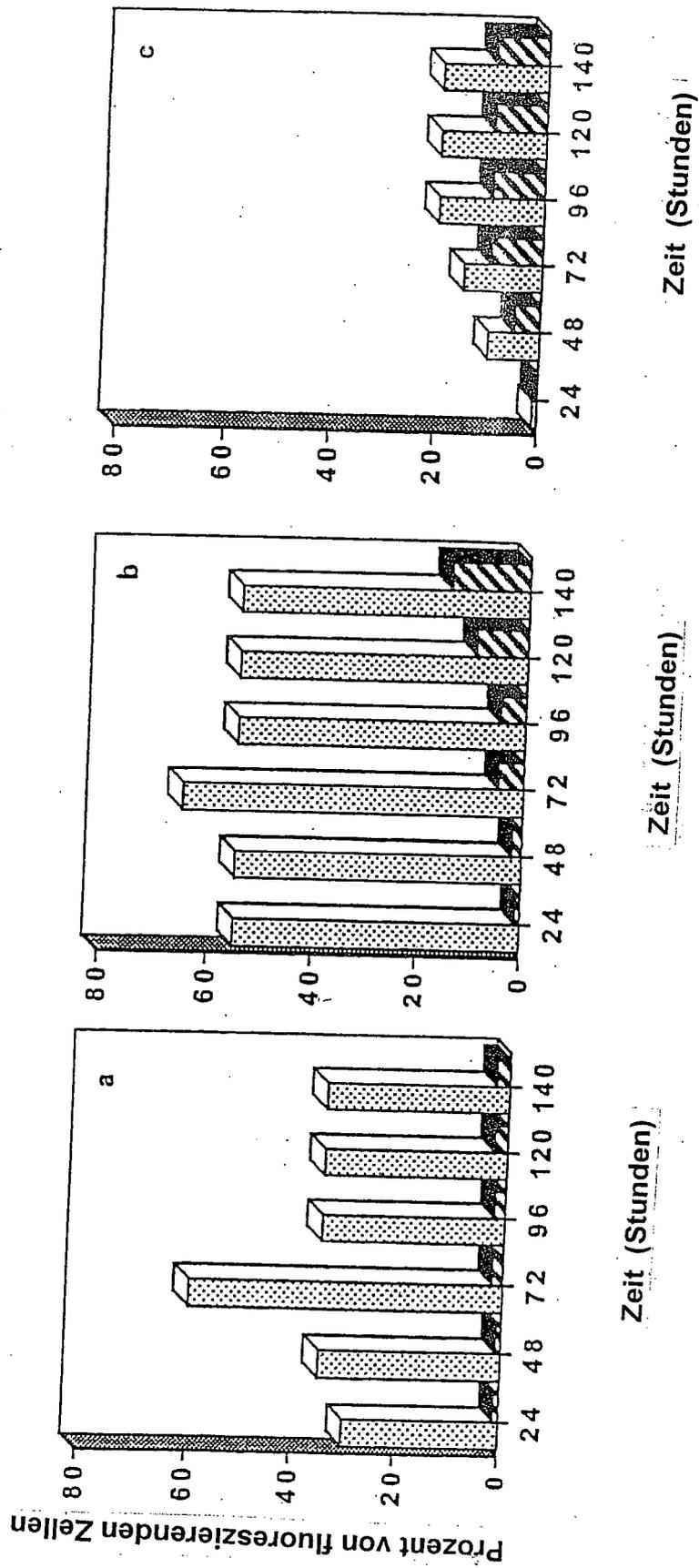
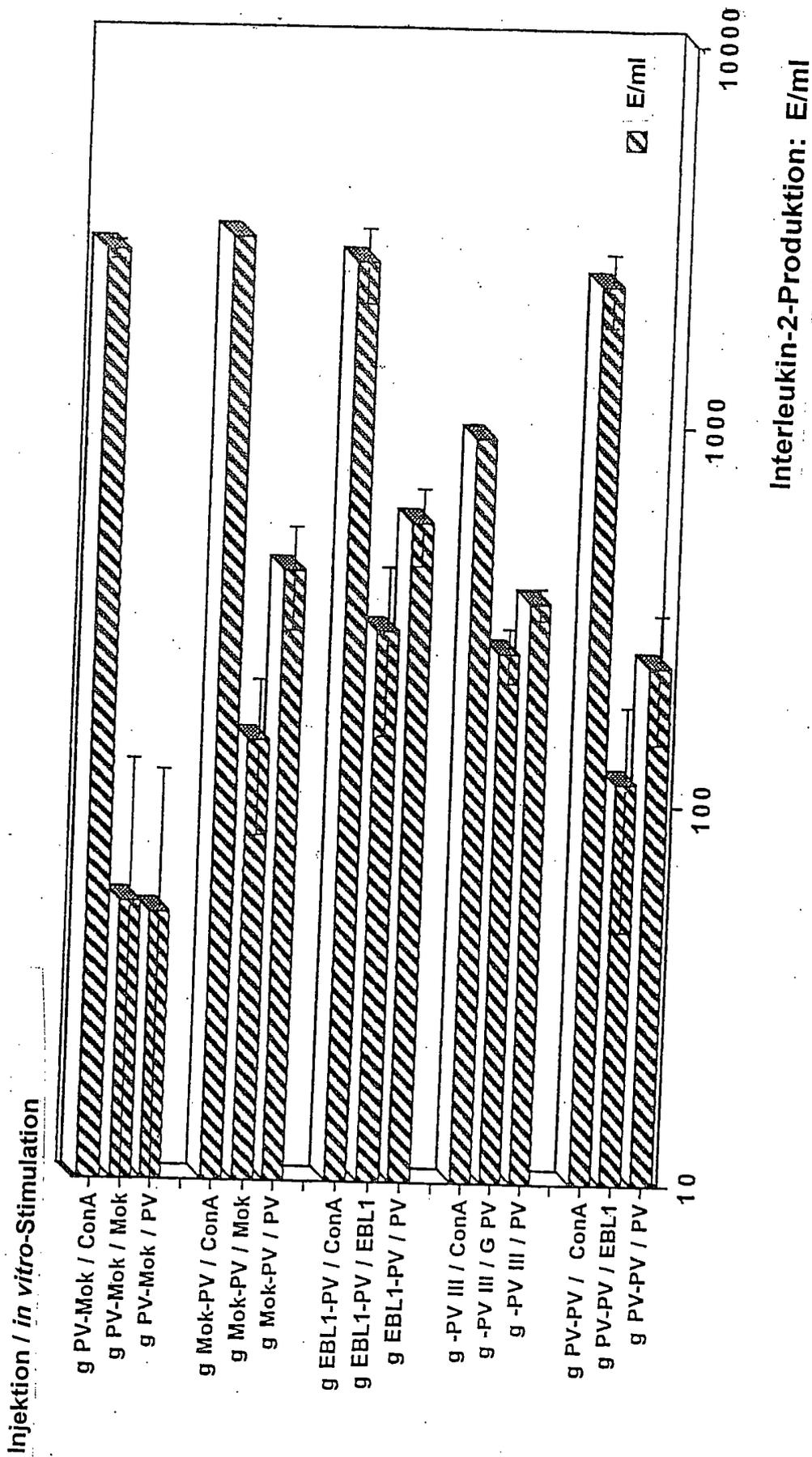


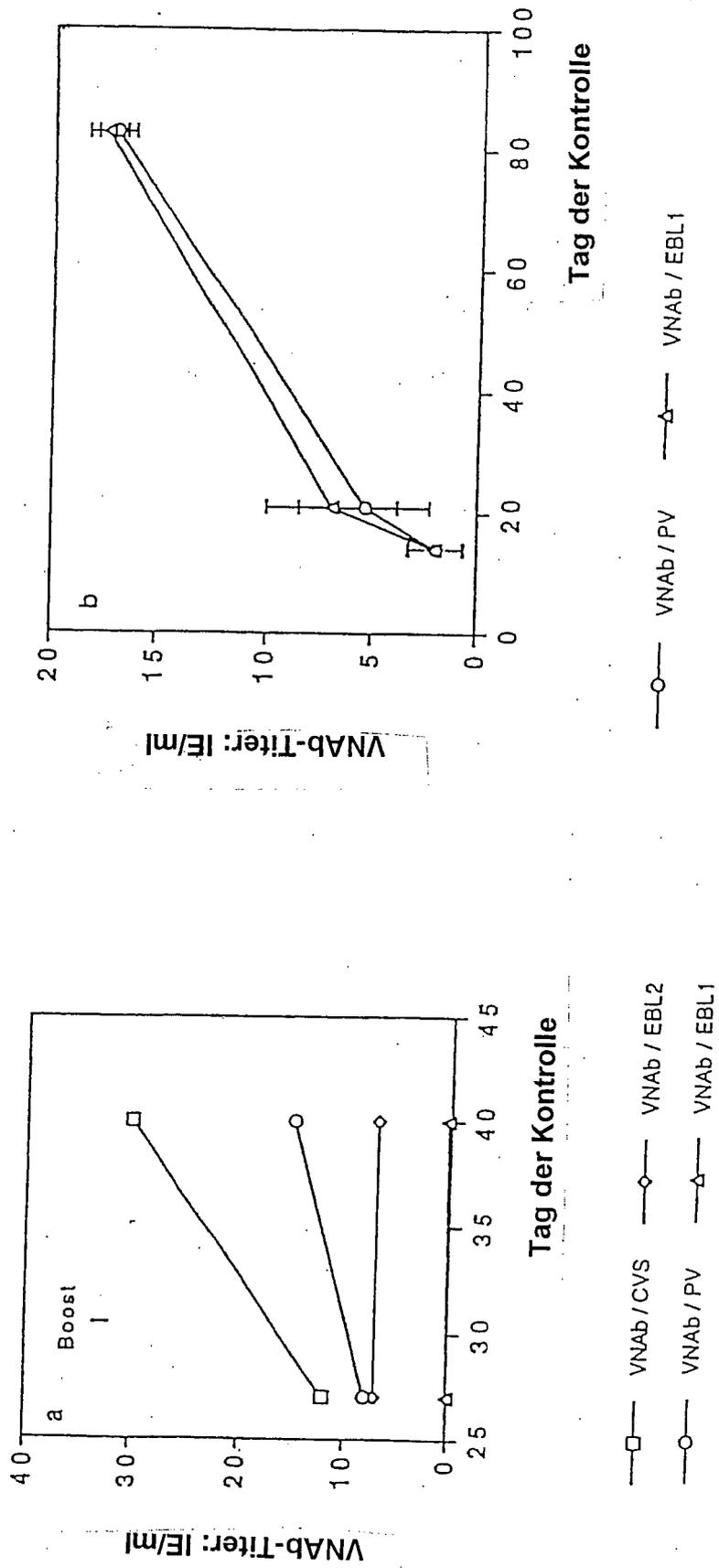
Figure 2 (Fortsetzung)



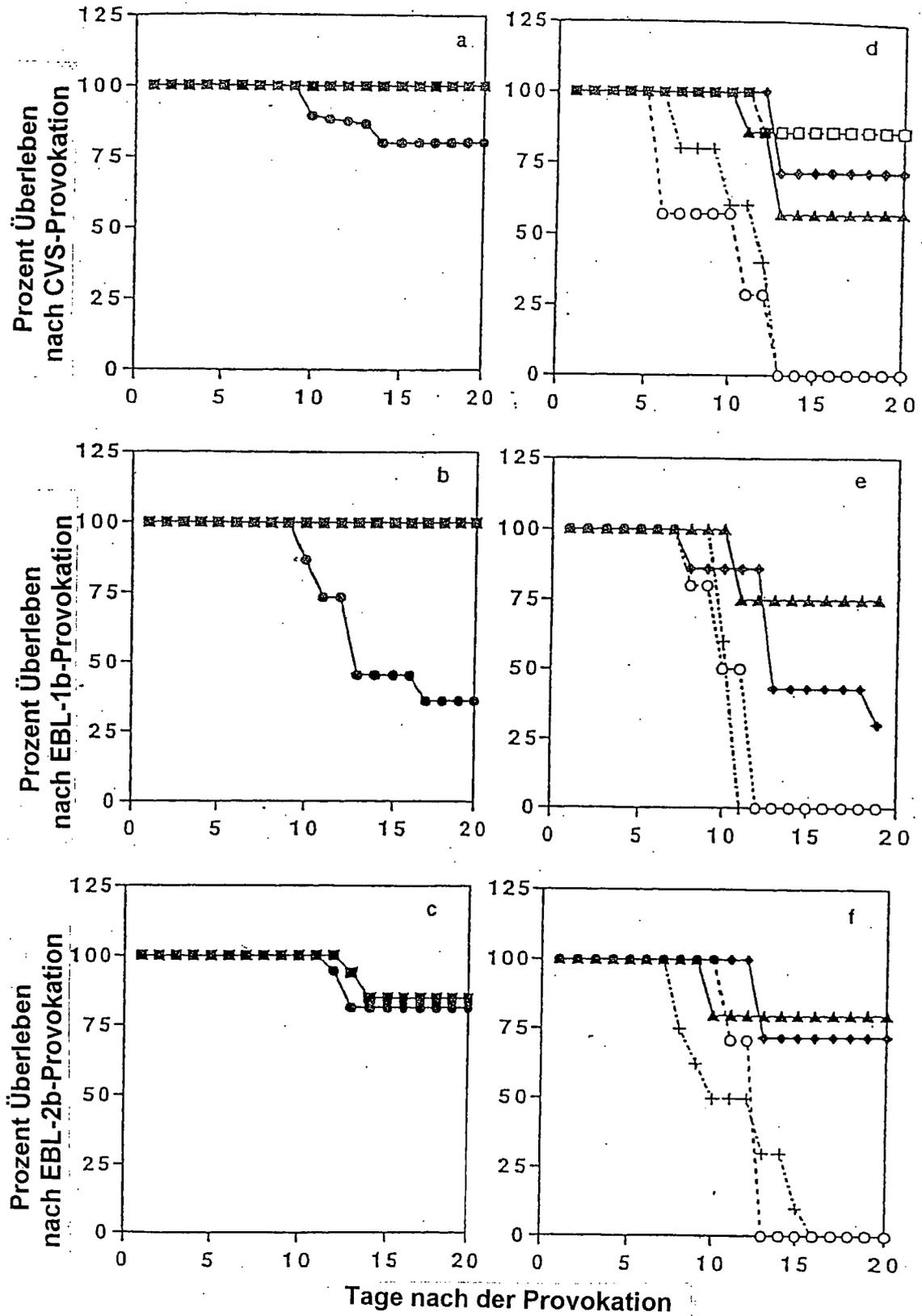
Figur 3



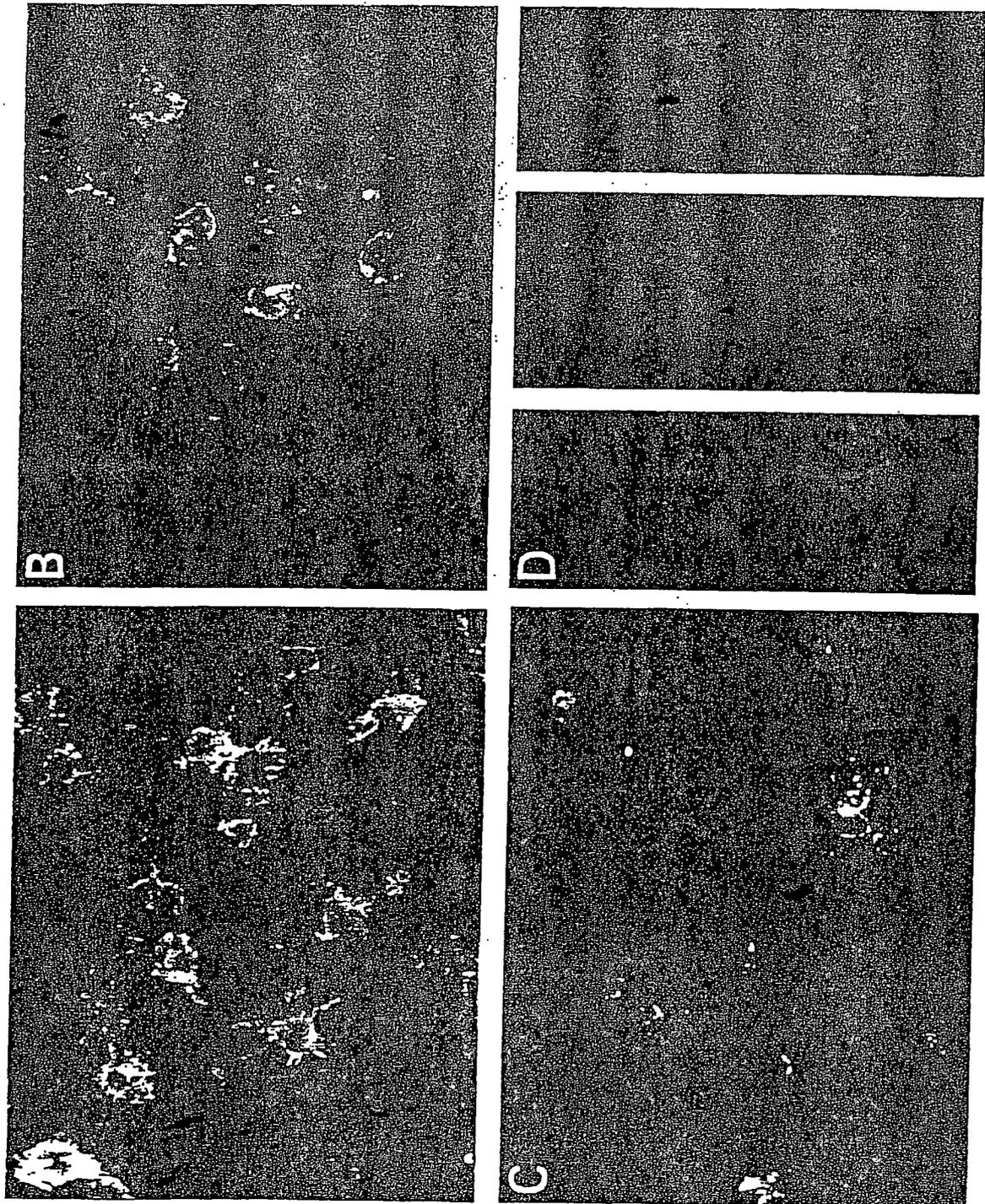
Figur 4



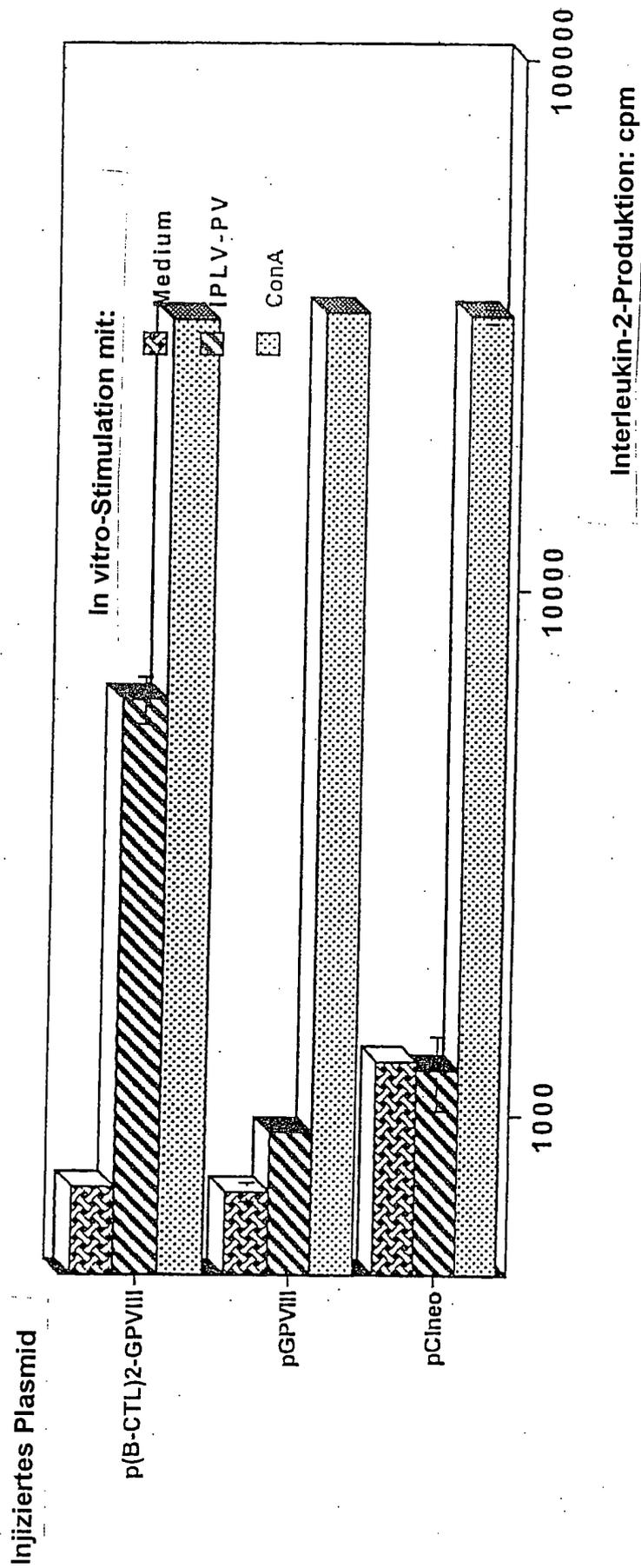
FIGUR 5



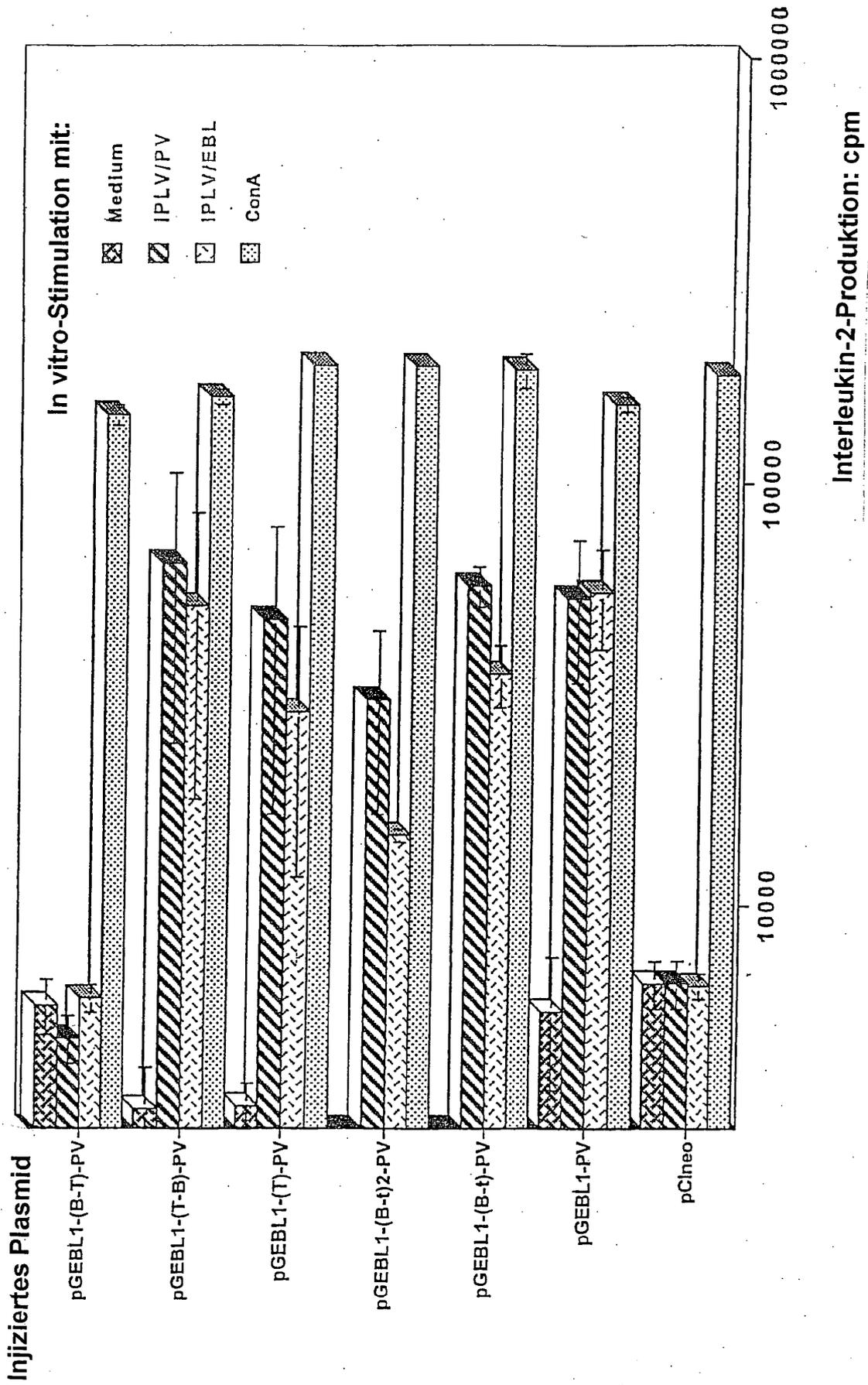
FIGUR 6



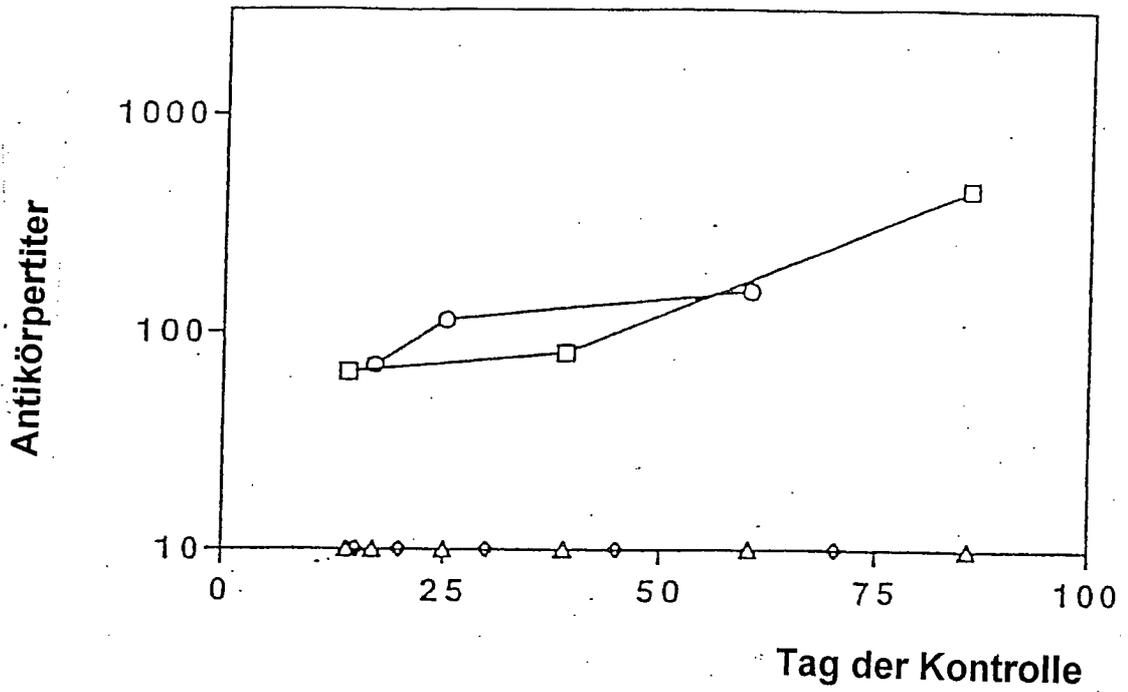
Figur: 7



Figur 8



Figur 8 (Fortsetzung)

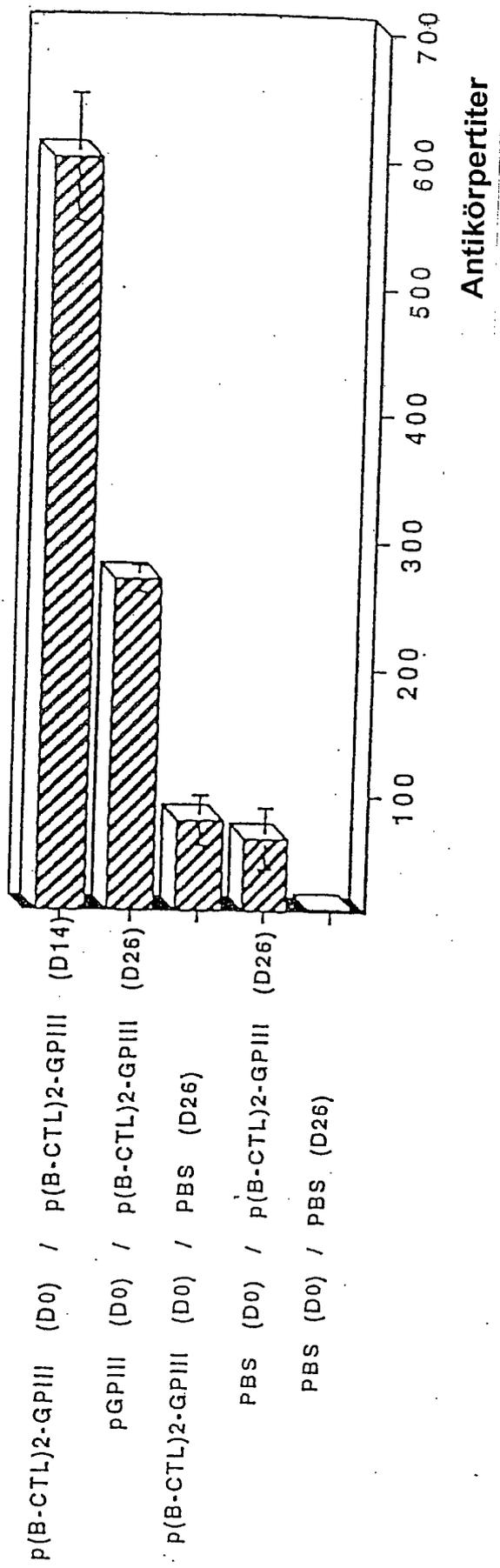


- p(B-CTL)2-GPVIII (Pollo)
- p(B-CTL)2-GPVIII (Tollwut)
- △— pGPVIII (Tollwut)
- ◇— pCINeo (Tollwut, Polio)

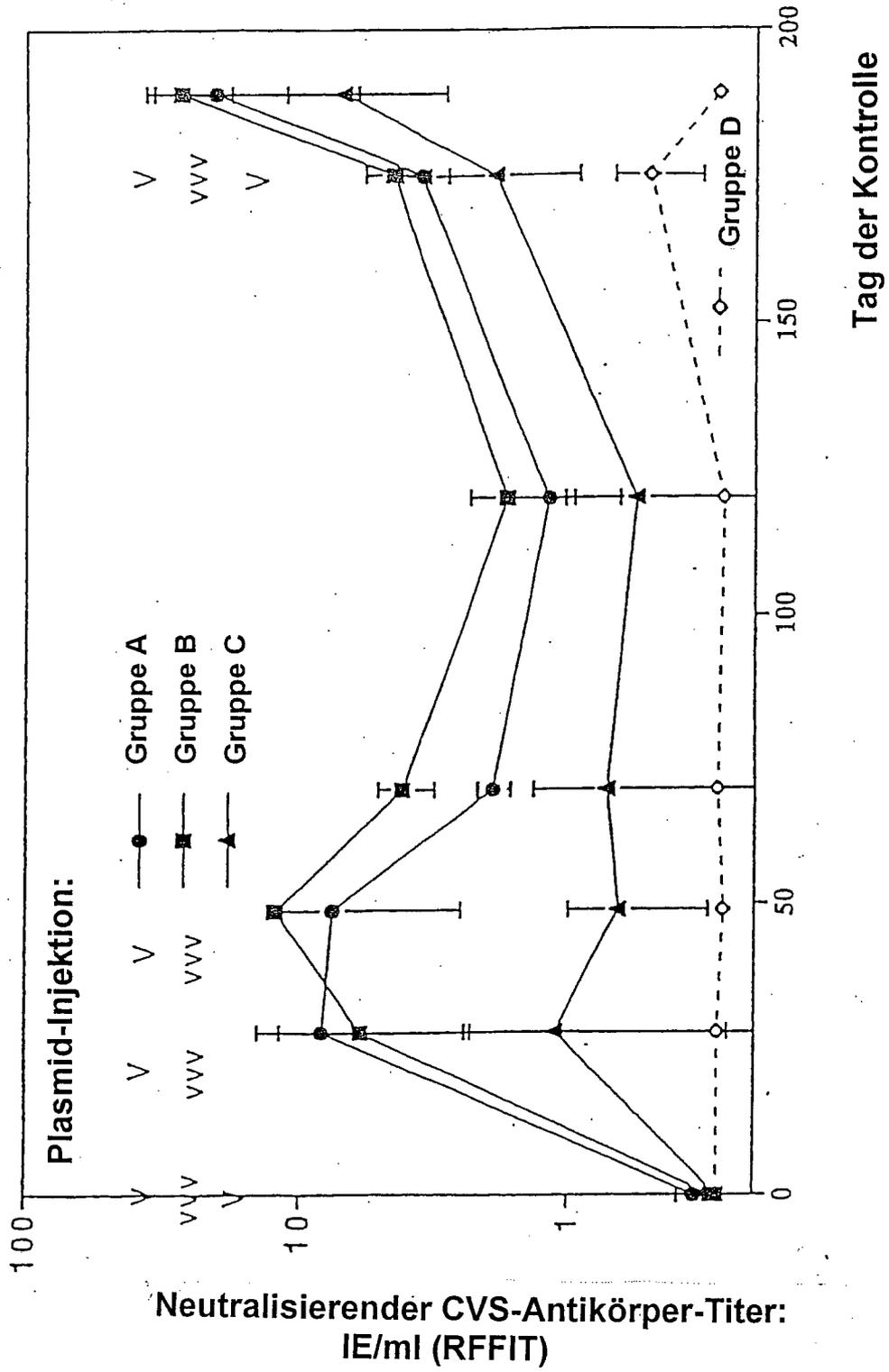
FIGUR 9

Injiziertes Plasmid:

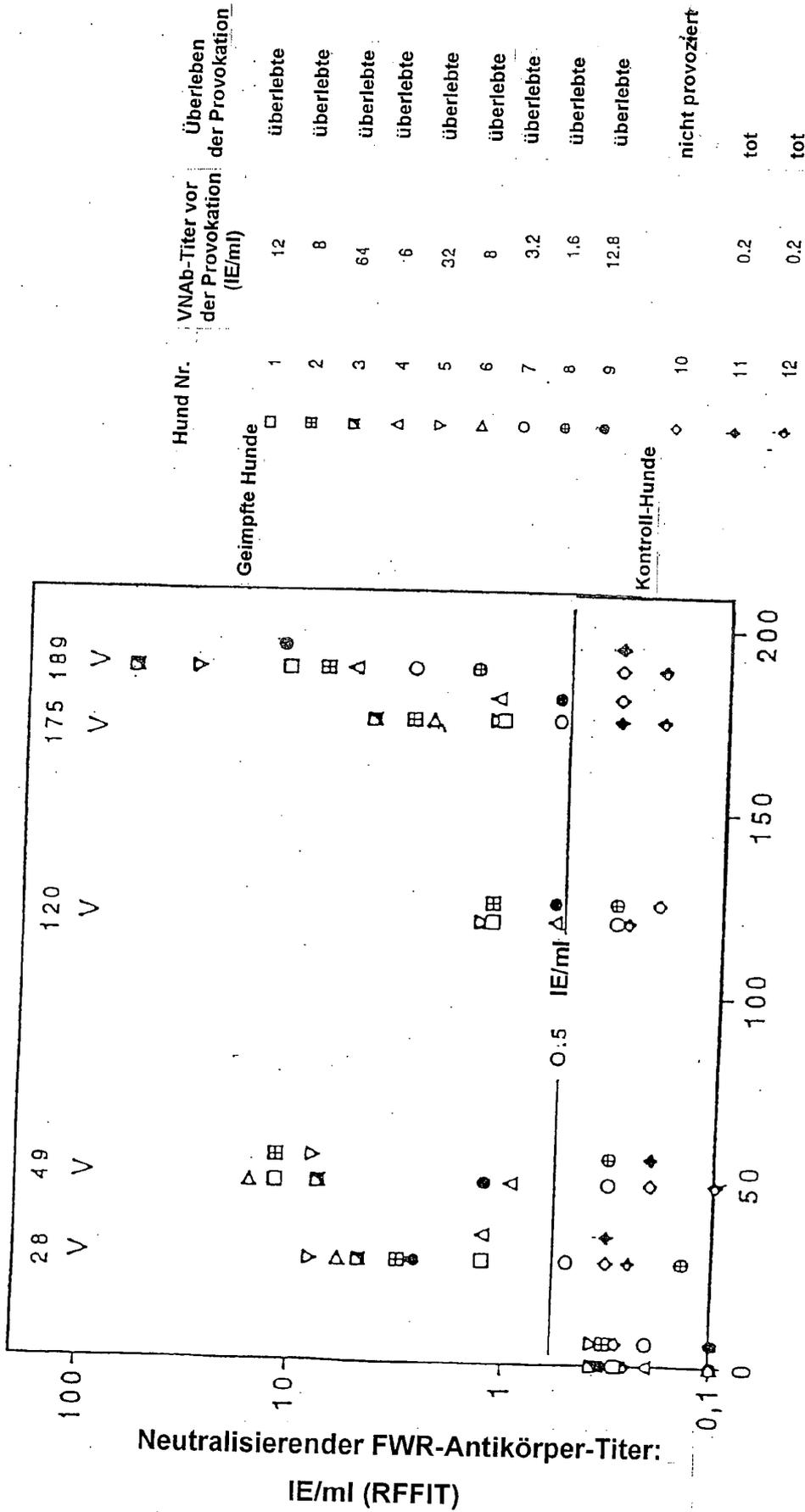
erste Injektion / zweite Injektion



FIGUR 10

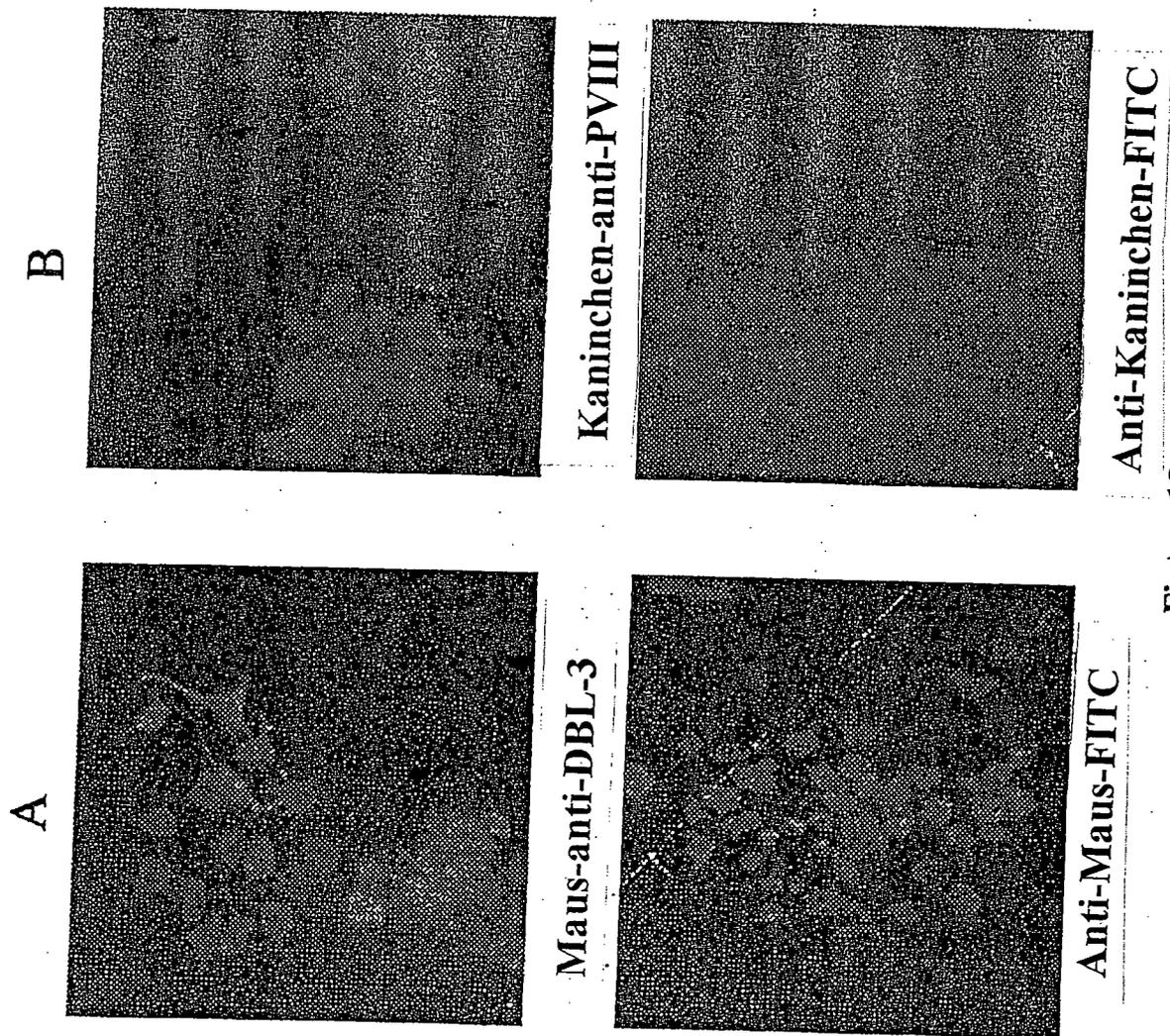


FIGUR 11



Tag der Kontrolle

Figur 12



Figur 13