

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98810491.1

C12N 15/45 (2006.01)

C07K 14/135 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 6 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1259422C

[22] 申请日 1998.9.17 [21] 申请号 98810491.1

[30] 优先权

[32] 1997. 9. 19 [33] US [31] 60/059,684

[32] 1998. 5. 8 [33] US [31] 60/084,863

[86] 国际申请 PCT/US1998/019656 1998.9.17

[87] 国际公布 WO1999/014334 英 1999.3.25

[85] 进入国家阶段日期 2000.4.24

[71] 专利权人 惠氏控股有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 G·E·汉考克 P·W·特伯贝

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余 颖

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 9 页

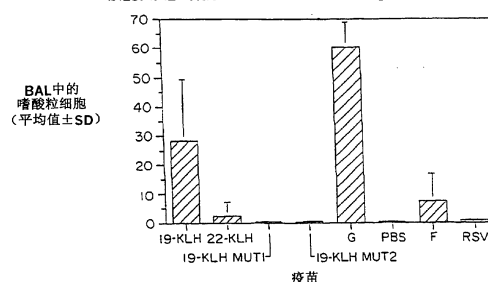
[54] 发明名称

呼吸合胞病毒的吸附(G)蛋白衍生的肽

[57] 摘要

本发明公开了一种改变的 RSV G 蛋白或其部分, 它保留了免疫原性, 当加入到免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情(例如非典型性肺炎, 例如嗜酸粒细胞增多)。具体实施例中, 所述改变的 G 蛋白包含位于氨基酸 184 - 198 区域内的改变。本发明还公开了包含改变的 RSV G 蛋白, 还可以另含 RSV F 蛋白的免疫原性组合物和疫苗。

肽19: AICKRIPNKKPGKKT (SEQ ID NO: 19)
肽19突变1: AICGRGPNGKPGKKT (SEQ ID NO: 32)
肽19突变2: AGCGRGPGGKPGKGT (SEQ ID NO: 33)



1. 一种改变的 RSV G 蛋白或其肽段, 所述的改变位于 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸 184-198, 所述改变的 G 蛋白或其肽段保留了免疫原性, 将其加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。
2. 根据权利要求 1 所述改变的 G 蛋白或其肽段, 所述的改变造成改变的 G 蛋白或其肽段相对于野生型 G 蛋白抑制 IL-5 分泌的引发。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述改变的 G 蛋白或其肽段, 具有 SEQ IN NO:32 所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述改变的 G 蛋白或其肽段, 具有 SEQ IN NO:33 所示的氨基酸序列。
5. 一种核酸分子, 它编码权利要求 1-4 中任一项所述的改变的 RSV G 蛋白或其肽段。
6. 一种核酸结构, 包含与调控序列操作性连接的权利要求 5 所述核酸分子。
7. 一种嵌合核酸结构, 包含:
 - 1) 权利要求 5 所述的核酸分子;
 - 2) 编码完整或部分 RSV F 蛋白的核酸分子; 和
 - 3) 与 1)和 2)操作性连接的调控序列。
8. 一种重组宿主细胞, 包含权利要求 7 所述的核酸结构。
9. 一种产生权利要求 1 至 4 中任一项所述改变的 RSV G 蛋白或其肽段的方法, 包括将权利要求 8 所述的重组宿主细胞维持在适合其表达改变的 G 蛋白或其肽段的条件下。
10. 一种产生嵌合多肽的方法, 包括将权利要求 8 所述的重组宿主细胞维持在适合其表达所编码嵌合蛋白的条件下。
11. 一种免疫原性组合物, 包含生理学上认可的介质和权利要求 1-4 中任一项所述改变的 RSV G 蛋白或其肽段。
12. 根据权利要求 11 所述的免疫原性组合物, 还含有 RSV F 蛋白。
13. 一种疫苗组合物, 包含免疫有效量的权利要求 1-4 中任一项所述改变的 RSV G 蛋白或其肽段。
14. 根据权利要求 13 所述的疫苗组合物, 还含有免疫有效量的 RSV F 蛋白。
15. 权利要求 1-4 中任一项所述改变的 G 蛋白或其肽段用于制造抗 RSV 药

物的用途。

16. 一种疫苗组合物，它包含生理学上认可的载体和有效量的权利要求 5 所述核酸分子。

17. 根据权利要求 16 所述的疫苗组合物，它还包含转染促进剂。

5 18. 一种疫苗组合物，它包含免疫有效量的减毒活病原体，病原体内插入有异源核酸节段，所述核酸节段是权利要求 5 所述的核酸分子。

19. 根据权利要求 18 所述的疫苗组合物，所述的减毒活病原体是减毒细菌。

20. 根据权利要求 19 所述的疫苗组合物，所述的减毒活细菌是沙门氏菌。

21. 根据权利要求 18 所述的疫苗组合物，所述的减毒活病原体是减毒病毒。

10 22. 根据权利要求 21 所述的疫苗组合物，所述的减毒活病毒是减毒的委内瑞拉马脑膜炎病毒。

呼吸合胞病毒的吸附(G)蛋白衍生的肽

5 相关申请

本申请要求 1997 年 9 月 19 日美国临时申请 60/059,684 与 1998 年 5 月 8 日美国临时申请 60/084,863 的权利，以上两申请的内容在此作为参考。

发明背景

- 10 呼吸合胞病毒(RSV)是副粘病毒家族的一种负链病毒，是引起下呼吸道疾病的主要病因之一，尤其是在幼儿和婴儿中。已经发现，肠胃外给予福尔马林灭活的 RSV(FI-RSV)疫苗会加重免疫后被野生型 RSV 感染的 RSV 幼稚(naive)受免疫者(血清阴性)的病情。病情加重的特征是患者外周血与肺部的嗜酸粒细胞比例升高(Kim 等, Am. J. Epidemiol. 89:422-434(1969); Kim 等, Pediatric Res. 10:75-15 78(1976))。最近对鼠进行的研究表明，FI-RSV 诱导 T 辅助细胞 2(TH2)应答，而减毒活病毒疫苗主要与 T 辅助细胞 1(TH1)相关。

- RSV 含两种主要的外包膜糖蛋白，融合(F)蛋白与吸附(G)蛋白，它们对病毒的感染性具有重要意义，因此当然地成为设计 RSV 亚单位疫苗所针对的目标。已知，基于 F 蛋白的疫苗所产生的 RSV 中和抗体会因包含 G 蛋白而显著增加(Hancock 等, J. Virol. 70:7783-7791(1996))。但是，在试图理解 FI-RSV 诱导病情加重的分子基础时已经发现，天然 RSV 吸附(G)蛋白足以引发非典型性肺炎，其特征是肺嗜酸粒细胞增多伴 TH2 细胞因子白介素-5(IL-5)产生水平升高(Hancock 等, J. Virol. 70:7783-7791(1996))。实际上，体内去除 IL-5 显著降低了 G 蛋白免疫后被 RSV 攻击的小鼠支气管肺泡的灌洗液细胞中的嗜酸粒细胞应答。对 G 蛋白的应答被认为是将 G 蛋白特异性 CD4+ T 细胞系转移到幼稚受体小鼠内而由 T 细胞介导的，造成在随后受攻击时发生非典型性肺炎(Alwan 等, J. Exp. Med. 179:81-89(1994))。

发明概述

- 30 本文描述了由天然 G 蛋白和由一系列 G 蛋白第 48 至第 294 位氨基酸的重叠肽(见图 2)引发的免疫应答。在对接种了 G 蛋白的小鼠的脾细胞刺激试验中，有一条肽(19, 跨氨基酸 184-198)刺激脾细胞增殖的能力很突出(图 3)。在没有其他

G 蛋白衍生肽类似作用的情况下, 以肽 19 作为抗原刺激的脾细胞增殖高于背景水平 15 倍。还发现, 肽 19 是 G 蛋白中涉及细胞因子释放的主要区域。在对接种 G 蛋白的 BALB/c 小鼠的脾细胞培养物上清液进行的诱导中, 检测到了 IFN- γ 和 IL-5(图 4A 和 4B)。肽 19(RSV G 蛋白的氨基酸 184-198)在 BALB/c 小鼠内特异性诱导肺嗜酸粒细胞增多。接种了与匙孔蠔血蓝蛋白(KLH)偶联的肽 19 的小鼠在随后以活 RSV 攻击时, 肺嗜酸粒细胞明显增多(占支气管肺泡灌洗液细胞总数的 39.5%)(图 5)。相反, 用与 KLH 偶联的含氨基酸 208-222 的肽(肽 22)免疫的小鼠, 肺嗜酸粒细胞增多最少(3.3%)。肽 19 氨基酸序列内的突变使小鼠易于发生肺嗜酸粒细胞增多的能力丧失(图 6)。

体内去除 CD4⁺细胞使接种了肽 19 结合物的小鼠不发生肺嗜酸粒细胞增多, 而去除 CD8⁺特异性细胞则几乎没有作用(图 8)。以上信息表明, 在对活 RSV 攻击的应答中, RSV G 蛋白的肽 19 与 CD4⁺ T 细胞介导的肺嗜酸粒细胞增多有关联, 说明是肽 19 特异性 CD4⁺ T 细胞引起了肺嗜酸粒细胞增多。在对 43 名人供血者的外周血细胞的分析中, 6 人对 RSV G 蛋白有应答, 3 人对肽 19 有应答(图 7)。该信息提示, 肽 19 可能参与了支气管炎、特异反应和哮喘的发病过程, 这些疾病有时会在血清阴性婴儿受 RSV 感染后见到(Welliver 和 Welliver, Pediatrics in Review 14:134-139(1993))。

所以, 本发明涉及改变了的 RSV G 蛋白或多肽, 它保留了免疫原性, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时提供保护, 而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。在一个具体的实施例, 被加重的病情是非典型性肺炎, 具体是肺嗜酸粒细胞增多。在实施例之一中, 所述的改变位于 RSV G 蛋白的氨基酸 184-198 区域内。另一实施例中, 改变的结果是, 与野生型 G 蛋白相比, 改变后的 G 蛋白或多肽抑制 IL-5 分泌的引发。

本发明还涉及编码被改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子, 所述改变的蛋白或多肽保留了免疫原性, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。实施例之一中, 所述改变位于 RSV G 蛋白的氨基酸 184-198 区域内。

本发明还包括包含所述核酸分子与调控序列操作性连接的 DNA 结构。一具体实施例中, 本发明涉及一种嵌合 DNA 结构, 它包含: (a)编码被改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子, 所述改变的蛋白或多肽保留了免疫原性, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情; (b)编码完整 RSV F 蛋白或其免疫原性部分的核酸分子; 和(c)与 F 蛋白和改

变的 G 蛋白操作性连接的调控序列。

本发明还涉及包含本发明 DNA 结构的重组宿主细胞，以及生产改变的 RSV G 蛋白或多肽的方法，所述的蛋白或多肽保留了免疫原性，当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时，不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情，所述的方法包括将本发明的重组宿主细胞维持在适合表达改变的 G 蛋白或多肽的条件下。

本发明还涉及生产包含改变后 RSV G 蛋白或多肽，以及完整 RSV F 蛋白或其免疫原性部分的嵌合多肽的方法，所述改变的 RSV G 蛋白或多肽保留了免疫原性，当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时，不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

本发明还涉及改变的 G 蛋白或多肽，或表达所述蛋白或多肽的重组宿主细胞的用途，即用于制药，例如疫苗。

本发明还进一步涉及包含生理学上认可的介质与改变的 RSV G 蛋白或多肽的免疫原性组合物，所述的蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。一具体实施例中，与包含野生型 G 蛋白的免疫原性组合物相比，上述免疫原性组合物抑制 IL-5 分泌的引发。实施例之一中，所述的改变位于 RSV G 蛋白的氨基酸 184-198 区域内。免疫原性组合物还可以包含完整的 RSV F 蛋白或其免疫原性部分。

本发明还涉及包含免疫有效量改变的 RSV G 蛋白或多肽的疫苗组合物，所述的蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。实施例之一中，所述的改变位于 RSV G 蛋白的氨基酸 184-198 区域内。疫苗组合物还可以包含完整的 RSV F 蛋白或其免疫原性部分。具体实施例中，疫苗组合物还包含佐剂。

本发明还进一步涉及在脊椎动物接种并随后感染 RSV 后抑制病情加重的方法，包括给予改变的 RSV G 蛋白或多肽，所述改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

本发明还涉及包含生理学上认可的载体和有效量编码改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子的疫苗，所述改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。实施例之一中，所述疫苗还包含转染促进剂。

本发明还涉及在脊椎动物体内诱导免疫应答的方法，包括给所述脊椎动物以诱导免疫应答有效量的编码改变的 RSV G 蛋白或多肽的 DNA，可以同时给予转染促进剂，所述改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

本发明还涉及对脊椎动物进行抗 RSV 免疫的方法，包括给予脊椎动物包含免疫有效量的改变的 RSV G 蛋白或多肽的组合物，所述改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

本发明还涉及对脊椎动物进行抗 RSV 免疫的方法，包括给予脊椎动物包含免疫有效量的编码改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子的组合物，所述改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性，可在加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物后提供保护，而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

实施例之一中，组合物还包含免疫有效量的完整 RSV F 蛋白或其免疫原性部分，或免疫有效量的编码完整 RSV F 蛋白或其免疫原性部分的核酸分子。另一实施例中，脊椎动物是 RSV 血清阴性的人。

附图简述

图 1A 和 1B 是 BAL 内白细胞刺激的动力学图。给 BALB/c 小鼠接种 1 μ g G 蛋白和 StimulonTM QS-21 佐剂(20 μ g/鼠)，天然 RSV A2(1-2 $\times 10^6$ PFU)，或拟 HEp-2 细胞裂解液。二次接种两周后，用 RSV 攻击小鼠，在第 3，5，7，10 天从每个接种组中选取 5 只代表鼠处死，分离出 BAL 细胞。图 1A 显示用台盼蓝排除法计数的白细胞总数。图 1B 显示用细胞染色 Diff-Quik 测得的 BAL 中的嗜酸粒细胞百分比。给出的是 5 只小鼠的平均值，误差栏表示的是标准偏差。

图 2 是合成肽列表(SEQ ID NO.1-31)，对应于 RSV G 蛋白的重叠区。Genosys Biotechnologies Inc.(The Woodlands, TX)合成了一系列重叠肽。这些肽跨 RSV A2 G 蛋白的氨基酸 48(对应于 G 蛋白的第二翻译起始密码子)至 294 区域。用质谱法测定肽的纯度。将冷冻干燥的肽溶解在无菌水中，浓度为 2mg/ml，保存于-20 $^{\circ}$ C。

图 3 是反映用 G 蛋白衍生肽刺激 G 蛋白初次免疫后 BALB/c 小鼠脾细胞的柱状图。在第 0 和 4 周，给 BALB/c 小鼠接种 1 μ g G 蛋白和 StimulonTM QS-21 佐剂。二次接种两周后，取 5 只小鼠分离出脾细胞，汇集后在抗原存在下培养 4 天。给予 50 μ g/ml 的每种合成肽。给予 0.5 和 2.5 μ g/ml 的天然 G 蛋白。伴刀豆球蛋白

A(Con A)刺激脾细胞得到的平均 cpm 为 $94,746 \pm 8005$ 。作为对照,只用介质(Med)或 CRM₁₉₇(CRM)刺激培养物。给出的数据是一式三格的平均值($\pm$ SD)。该实验代表着 5 次独立的实验,每次都显示质量上相似的结果。

图 4A 和 4B 是显示培养物上清液中肽诱导细胞因子(IFN- γ 和 IL-5)分析的柱状图。和图 3 一样,将接种了天然 G 蛋白和 StimulonTM QS-21 佐剂的 BALB/c 小鼠脾细胞与肽抗原一起培养。4 天后,从一式三格中取 100 μ l 上清液汇合,然后用抗原捕捉 ELISA 分析 IFN- γ (图 4A)和 IL-5(图 4B)。给出的数据是两次细胞因子分析的平均 OD₄₉₀。

图 5 是肽 19 在 BALB/c 小鼠内特异性诱导嗜酸粒细胞增多的柱状图。接种了 G 蛋白或 19-KLH 的小鼠与接受 PBS 或 KLH 的对照小鼠相比,有明显的差异(*)。给出的数据代表了结果相似的三次实验。

图 6 是鉴定肽 19 内促进嗜酸粒细胞增多应答的 T 细胞表位的柱状图。在第 0 和 4 周,给 BALB/c 小鼠(5 只一组)肌内接种纯化天然 RSV G 蛋白 1 μ g 与 20 μ g StimulonTM QS-21 佐剂; 250 μ g 肽 19-KLH; 250 μ g 肽 22-KLH; 250 μ g 突变肽 19-1-KLH 或 250 μ g 突变肽 19-2-KLH,或鼻内接种含 10⁶Pfu 的 50 μ l 活 RSV。二次接种 2 周后,用活 RSV 攻击小鼠,7 天后,定量分析 BAL 中的嗜酸粒细胞增多。给出的数据是 BAL 中嗜酸粒细胞的平均百分比($\pm$ 标准偏差)。

图 7 是人 PBMC 对 G 蛋白衍生肽的增殖性应答柱状图。43 名供血者中 6 人的 PBMC 对 RSV G 蛋白有应答,在合成肽 19 和 22 存在下培养这些 PBMC 进行增殖试验。各肽的浓度位 50 μ g/ml。纯化 G 蛋白的浓度为 3 μ g/ml。PHA 刺激全部供血者 PBMC 的结果在 22,945 至 55,619cpm 之间。还单独以介质培养 PBMC,并计算刺激指数。给出的是一式三份培养物得出的平均刺激指数。

图 8 是显示 CD4 T 细胞介导由 RSV G 蛋白和肽 19-KHL 诱导的嗜酸粒细胞增多应答的表格。在第 0 和 4 周,给 BALB/c 小鼠(5 只一组)肌内接种纯化天然 RSV G 蛋白 1 μ g 与 20 μ g StimulonTM QS-21 佐剂; 250 μ g 含 18 μ g 肽 19 的 KLH 和 StimulonTM QS-21 佐剂,或鼻内接种含 10⁶Pfu 的 50 μ l 活 RSV。为了去除 T 细胞亚型,在末次免疫后 14 天和 20 天后,腹腔内给予所示的单克隆抗体(或作为对照的大鼠 Ig),剂量分别为每鼠 750 μ g 和 250 μ g。末次接种后 21 天,用活 RSV 攻击小鼠,7 天后定量分析 BAL 中的嗜酸粒细胞。用抗 CD4 和抗 CD8 荧光抗体进行 FACS 分析。给出的数据是嗜酸粒细胞占 BAL 的平均百分比($\pm$ 标准偏差),和作为脾淋巴细胞总数的函数的 CD4 细胞比 CD8 细胞的百分比。与同样接种,接受大鼠 Ig 的对照小鼠相比,差异明显(**)。

详细说明

RSV G 蛋白显著加强 F 蛋白保护 BALB/c 小鼠抵抗攻击的能力(见后文列表)。这提示应将 G 蛋白加入 RSV 的亚单位疫苗。然而, G 蛋白引发的肺嗜酸粒细胞增多持久而广泛, 使其不适合用作疫苗。在对接种小鼠受攻击后进入 BAL 的白

5 细胞进行的动力学定量分析中可以看出, 在接种 G 蛋白的小鼠中, 最大的细胞浸润(1.42×10^6 个细胞)发生在第 7 天(图 1)。在接种 G 蛋白后 10 天的应答过程中, 始终观察到嗜酸粒细胞, 在第 7 天达到最大值, 占白细胞总数的 65%(图 1B)。

本发明还涉及合成 RSV G 蛋白衍生的蛋白和/或多肽, 它们不会在随后受 RSV 感染时刺激肺嗜酸粒细胞增多。具体地说, 在此所述的工作涉及制备包含改

10 变的 G 蛋白或多肽的组合物和方法, 所述的蛋白或多肽可作为免疫原用于疫苗制剂, 包括多价疫苗, 并可用于主动免疫。这一策略包括改变 G 蛋白序列特定区域内的一个或多个氨基酸, 形成衍生自 RSV G 蛋白, 具有免疫原性但不会引发非典型性肺炎(例如肺嗜酸粒细胞增多)或任何形式 RSV 疾病加重的蛋白或多肽。

野生型(天然)RSV G 蛋白的核苷酸和氨基酸序列在本领域是已知的(Wertz

15 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4075-4079(1985); Satake 等, Nucl. Acids. Res. 13(21):7795-7810(1985))。在此, “改变”或类似的表达表示不同于野生型序列的氨基酸序列, 以及编码的氨基酸序列不同于野生型氨基酸序列的核苷酸序列。所述的改变包括一个或多个核苷酸或氨基酸的插入, 缺失和/或取代。

例如, 改变可以是一个或多个核苷酸的插入或缺失, 造成移码突变; 至少一个核苷酸改变, 造成一个或多个所编码氨基酸改变; 至少一个核苷酸改变, 形成一个提前终止密码子; 数个核苷酸缺失, 造成核苷酸所编码的一个或多个氨基酸

20 缺失; 插入一个或多个核苷酸, 造成基因编码序列中断; 整个或部分基因复制; 整个或部分基因转座; 整个或部分基因重排。一个基因中可能存在一个以上上述突变。这样的序列改变造成基因所编码的 G 蛋白内的改变。例如, 如果是移码突变, 移码可能造成所编码的氨基酸内的改变, 和/或形成一个提前终止密码子, 产生截短的蛋白。

25

例如, 所述改变最好保留天然 G 蛋白的三维构形。而且, 可用本领域的已知技术鉴定出 G 蛋白功能尤其是免疫原性的必需氨基酸。具体地说, 可用的方法包括保守氨基酸鉴定, 定点诱变和丙氨酸扫描诱变(例如, Cunningham 和 Wells,

30 Science 244:1081-1085(1989)), 结晶和核磁共振。可测试用这些方法产生的改变多肽的特定生物活性, 包括免疫原性, 降低肺嗜酸粒细胞增多的能力和抗原性。

具体地说, 进行合适的氨基酸改变可以根据以下几个标准, 包括疏水性、碱

性或酸性特征、电荷、极性、大小、有否官能团(例如, -SH 或糖基化位点), 和芳香性。根据以上特性, 将各种氨基酸分类, 对本领域技术人员来说是显而易见的; 其他合适的氨基酸改变还可参见 Bowie 等(Science 247:1306-1310(1990))。

例如, 参照氨基酸 184-198 区域, 所述改变的形式可以是 184-198 区域(氨基酸序列 AICKRIPNKKPGKKT; SEQ ID NO.19)内的保守性(例如, 甘氨酸取代丙氨酸; 缬氨酸取代异亮氨酸; 天冬酰胺取代谷氨酰胺)定点诱变, 这保留了 G 蛋白该区域在保护性免疫应答中的作用, 但缺失或改变了参与刺激肺嗜酸粒细胞增多的表位(即, 生物学等价体)。改变的形式还可以是非保守性突变(例如赖氨酸取代苏氨酸; 丙氨酸取代脯氨酸), 降低或消除不良的嗜酸粒细胞增多刺激。改变的形式还可以是整个 184-198 区域或其部分的缺失, 而继续应用 RSV G 蛋白的其余部分。为了获得最佳的翻译和/或免疫原性, 可用接头区取代缺失, 保留剩余 G 蛋白或多肽的空间特征。可用各种标准诱变剂或诱变方法进行改变, 例如涉及噬菌体(例如 M13) 的定点诱变或用涉及合成寡核苷酸的聚合酶链反应(PCR)的技术。

所以, 本发明涉及编码改变的 RSV G 蛋白或其部分的核苷酸序列, 所述改变的 G 蛋白或其部分保留了免疫原性。在此, “改变的 G 蛋白”表示保留了免疫原性的 G 蛋白或其部分, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在随后受到 RSV 攻击时诱导疾病加重(例如非典型性肺炎, 例如肺嗜酸粒细胞增多)。在一具体实施例中, 改变的 G 蛋白具有氨基酸 184-198 区域内的改变。

虽然本发明就 RSV G 蛋白的氨基酸 184-198 区域进行了具体的描述, 但在此描述的用于鉴定 182-198 区域方法也可以用于野生型 G 蛋白的其他区域, 以鉴定出可改变的其他区域。例如, 可分析位于在此所研究的氨基酸区域(48 至 198)上游(向氨基端)或下游(向羧基端)的区域, 鉴定可进行有益改变的其他区域。或者, 可用不同的重叠肽重新分析氨基酸 48-294 区域, 鉴定可进行有益改变的其他区域。

本发明的核酸分子可以是例如 mRNA 的 RNA 或例如 cDNA 和基因组 DNA 的 DNA。DNA 分子可以是双链或单链的; 单链 RNA 或 DNA 可以是编码链、有义链或非编码链、反义链。较好的是, 核酸分子包含至少约 14 个核苷酸, 至少约 50 个更好, 至少约 200 个则还要好。所述的核苷酸序列可以只是编码改变的 G 蛋白氨基酸序列的至少一个片段; 或者, 核苷酸序列可包含改变的 G 蛋白氨基酸的至少一段的编码序列以及诸如内含子和 3' 和 5' 非编码序列(例如, 包括调控序列)等非编码序列。此外, 核苷酸序列可与标记序列融合, 例如与协助多肽分离

或纯化的多肽的编码序列融合。这类序列包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和流感血凝素 A 标记肽的编码序列。

“核苷酸序列”包括化学合成或重组得到的核苷酸序列。这样，本发明包括载体包含的重组 DNA。而且，核苷酸序列包括异源宿主细胞内的重组 DNA，以及溶液中部分纯化或完全纯化的 DNA。本发明的核苷酸序列还包括本发明 DNA 分子的体内和体外 RNA 转录产物。上述核酸序列可用于例如制造所编码的改变的 G 蛋白。

本发明还包括本发明核苷酸序列的各种变体，例如编码改变的 G 蛋白某些部分、其类似物或衍生物的核苷酸序列，只要所述的部分、类似物或衍生物包含改变的 G 蛋白。这类变异可以是核苷酸未改变部分的天然变异，例如等位变异，或是非天然变异，例如由各种诱变剂和诱变方法诱导的变异。需要的变异包括但不限于一个或多个核苷酸的增加、缺失和取代，造成保守性或非保守性氨基酸改变，包括氨基酸增加和缺失。

本发明还涉及上述核酸分子的片段。“片段”一词包括本文所述核苷酸序列的一部分，长度为至少 14 个连续核苷酸至至少 50 个连续核苷酸，条件是所述片段编码改变的 G 多肽；这样的片段可用作引物。特别好的引物和探针选择性地与本文编码改变的 G 蛋白的核酸分子杂交。例如，可用编码本文改变的 G 蛋白的抗原性部分的片段。

本发明还涉及在中等，更好的是高度严谨杂交条件(例如选择性杂交条件)下与本发明核苷酸序列杂交的核苷酸序列。合适的严谨性条件是本领域技术人员已知的，或者，可以参见标准教科书，例如 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6。

所以，本发明涉及与本发明改变的核苷酸序列基本相同的核苷酸序列；特别好的是与本发明核苷酸序列一致性至少为 90%，更好的是一致性至少 95%的核苷酸序列。此时，特别好的是所编码多肽的免疫原性与本发明改变的 G 蛋白基本相同的核苷酸序列。

本发明还涉及改变的 RSV G 蛋白或多肽。改变的 G 蛋白或多肽是这样的 RSV G 蛋白或其部分，它保留了免疫原性，当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时，不会在脊椎动物随后受到 RSV 感染时引起疾病加重(例如，非典型性肺炎，例如嗜嗜酸粒细胞增多)。在一具体实施例中，改变的 G 蛋白在氨基酸 184-198 区域内至少有一处改变。本发明改变的 G 蛋白可以是部分或完全纯化的(例如纯化至均一)，和/或基本没有其它蛋白。

改变的 G 蛋白或多肽还可以是融合蛋白，包含与其它组分融合的改变的 G 蛋白氨基酸序列的全部或部分。其它组分，例如放射性同位素和抗原性尾端，可选用来协助多肽的分离或纯化，或延长多肽的半衰期；例如，六组氨酸尾端允许采用简便的镍层析来纯化。或者，改变的 G 蛋白或多肽还可以是这样的融合蛋白，所含的全部或部分改变的 G 蛋白氨基酸序列与完整或部分 RSV F 蛋白氨基酸序列融合(Collins 等，Proc. Natl. Acad. Sci(USA) 81:7683-7687(1984)；美国专利 5,639,853；5,723,130)。

本发明还包括这样的改变的 G 蛋白和多肽，除了在接受改变的 G 蛋白或多肽的脊椎动物中不引起疾病加重所必需的改变之外，它还包含其它氨基酸改变。例如，本发明包括的氨基酸改变有，不会改变由于给予改变蛋白所致的疾病的特征的保守性氨基酸改变。本发明还包括与本发明改变的 G 蛋白或多肽的一致性至少约 40%的多肽。但是，一致性更低的多肽也可以使用，尤其是，如果它们在蛋白的一个或多个特定结构域表现出高(例如至少 40%)一致性时。例如，本发明包括免疫功能和受体结合活性等特定活性的必需结构域具有高度一致性的改变的多肽。本发明的多肽可以化学合成或重组得到。

为了确定两条多肽序列一致性百分比，可排列序列一获取最佳比较结果(例如，可在第一氨基酸序列内引入空隙)。然后比较对应氨基酸位置的氨基酸残基。当第一序列内某位置在第二序列对应位置被相同氨基酸残基占据时，则两分子在该位置是一致的。两序列的一致性百分比与序列间相同位置的数量有关(即，一致性% = 相同位置数/总位数 × 100)。

可通过数学计算确定两序列的一致性百分比。用于比较两序列的一个较好的非限定性数学算法实例是 Karlin 等的算法，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877(1993)。该算法被用在 NBLAST 和 XBLAST 程序中，分值=50，字长=3，以获得与本发明多肽或蛋白分子具有所需一致性的氨基酸序列。为了进行加入空隙的排列以便比较，可用空隙 BLAST, Altschul 等，Nucleic Acids Res, 25:3389-3402(1997)。在使用 BLAST 和空隙 BLAST 程序时，可使用相应程序(例如 NBLAST 和 XBLAST)的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。用于比较序列的数学算法另一个优选非限定性实例是 Myers 等的算法，CABIOS(1989)。该算法被用于 ALIGN 程序(2.0 版)，该程序是 GCG 序列排列软件包的一部分。在使用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时，可使用长度为 12 和 4 的空隙补偿。可用类似以上所述有或没有空隙的技术测定两序列的一致性百分比。在计算一致性百分比时，只计数精确匹配的数量。

本发明还提供表达载体，例如核酸结构，它含有编码改变的 G 蛋白或多肽的核酸序列，该序列与至少一段调控序列操作性连接。许多这类载体是可以买到的，其它合适的载体可由熟练技术人员方便地制得。“操作性连接”指核苷酸序列与调控序列的连接方式使得核酸序列能被表达；这包括直接物理连接和通过接头或中介序列连接。调控序列是本领域的已知技术，被选来产生改变的 G 蛋白或多肽。所以，“调控序列”包括启动子，增强子和其它表达调控元件，参见 Goeddel, Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)。例如，可以使用天然调控序列或宿主细胞本身的调控序列。应该知道，可根据以下因素来设计表达载体，例如欲转化宿主细胞的选择，和/或欲表达蛋白的类型。

例如，可如此产生本发明改变的 G 蛋白或多肽：将核酸分子或其部分连接到适合在原核细胞和/或真核细胞内表达的载体内(参见 Broach 等, Experimental Manipulation of Gene Expression, 编辑: M.Inouye(Academic Press, 1983) p.83; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, 编辑: Sambrook 等(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)第 16 和 17 章)。通常，表达结构含有一个或多个选择标记，包括但不限于编码二氢叶酸还原酶的基因和产生新霉素、四环素、氨卞青霉素、氯霉素、卡那霉素和链霉素抗性的基因。

表达结构可包含调控序列，它与编码改变的 G 蛋白或多肽的核酸分子操作性连接，还可以直接或通过聚核苷酸接头与编码完整或部分 RSV F 蛋白的核酸分子连接。上述表达结构的表达将产生包含改变的 G 蛋白或多肽与完整或部分 F 蛋白或多肽的嵌合体；如果结构中使用了聚核苷酸接头，F 多肽和改变的 G 多肽将通过一个或多个氨基酸连接。制备和表达 F/G 嵌合体的一般方法可参见例如美国专利 5,194,595(Wathen)，其中的说明内容在此作为参考。

本发明还提供了用所述载体转染的原核和真核宿主细胞。例如，可用本发明载体转染的细胞包括但不限于：细菌细胞，例如大肠杆菌(例如大肠杆菌 K12 株)，链霉菌，假单胞菌，粘质沙雷氏菌和鼠伤寒沙门氏菌；昆虫细胞(杆状病毒)，包括嗜露覃菌；真菌细胞，例如酵母；植物细胞和动物细胞，例如胸腺细胞，中国仓鼠卵巢细胞(CHO)，HEp-2 细胞，Vero 细胞和 COS 细胞。

这样，编码本发明改变的 G 蛋白或多肽的核苷酸序列可用来通过微生物或真核细胞加工产生重组蛋白。将聚核苷酸序列连接到例如表达载体等基因结构内，转化或转染到真核(酵母，禽类，昆虫，植物或哺乳动物)或原核(细菌)宿主细胞内是用于产生其它常见蛋白的标准方法。病毒载体包括但不限于腺病毒和委内瑞拉

马脑炎载体。此外，目前用牛痘病毒(VV)在哺乳动物细胞系中或传递到动物模型中表达各种 RSV 蛋白(Olmstead 等, PNAS 83:7462-7466(1986); Wertz 等, J. Virol. 63:4767-4776(1989))。与此类似，可用改变的 RSV G 蛋白的 cDNA 插入 VV 内胸腺嘧啶激酶基因形成的类似结构来合成改变的 G 蛋白或多肽。例如，可用 Ball (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:246-250(1986))或 Olmstead 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7462-7466(1986))说明的方法从牛痘病毒载体表达改变的 G 蛋白或 F 蛋白/改变的 G 蛋白嵌合体。通过微生物方法或组织培养技术，可用类似的方法或其修改法制备本发明的重组蛋白。所以，本发明涉及用重组技术产生改变的 G 蛋白或多肽。

10 除体外产生本发明改变的 G 蛋白或多肽的上述宿主细胞之外，许多系统适合体内表达或传递改变的 G 蛋白和多肽。这些系统应用减毒病原例如细菌或病毒作为传递因子。这些减毒活病原中插入了异源核酸节段，节段的核酸序列编码所需的本发明改变的 G 蛋白或多肽。用这些系统，所需的改变的 G 蛋白或多肽是由减毒活细菌或病毒在脊椎动物体内表达的。

15 减毒活病原的例子包括但不限于：减毒活细菌，例如美国专利 4,837,151 所述的沙门氏菌，它特别适合经口传递；和美国专利 5,643,576 所述的减毒活委内瑞拉马脑炎病毒，它特别适合鼻内或吸入传递。

可用多种方法从重组细胞培养物中分离或纯化(例如，纯化至均一)本发明的蛋白或多肽。这包括但不限于阴离子或阳离子交换层析，乙醇沉淀，亲和性层析和高效液相层析(HPLC)。使用的具体方法取决于多肽的性质和宿主细胞的选择；合适的方法对本领域熟练技术人员来说是显而易见的。

20 本发明还涉及结合改变的 G 蛋白或多肽的抗体。例如，多克隆抗体和单克隆抗体，包括非人的和人抗体，人源化抗体，嵌合抗体和它们的抗原结合性片段(Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.(1994); EP 申请 173,494(Morrison); 国际专利申请 WO86/01533(Neuberger)和美国专利 5,225,539(Winters))，它们结合本发明改变的 G 蛋白。哺乳动物，例如小鼠、大鼠、仓鼠或家兔可用免疫原形式的改变的 G 蛋白进行免疫。使蛋白或多肽具有免疫原性的技术包括与载体偶联或本领域已知的其他技术。蛋白或多肽可与佐剂一同给予。免疫进程可通过检测血浆或血清内抗体效价来监测。可以免疫原作为抗原用标准 ELISA 或其它免疫试验检测抗体水平。

30 免疫后，可获取抗肽的抗血清，并根据需要从中分离出多克隆抗体。也可以用本领域熟知的标准技术制备单克隆抗体(Kohler 和 Milstein, Nature 256: 495-

497(1975); Kozbar 等, *Immunology Today* 4:72(1983); 和 Cole 等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96(1985))。 “抗体”在此包括抗体片段, 例如 Fab 和 F(ab)₂。本文所述的抗体可通过本领域已知的方法用来抑制本文所述改变的 G 蛋白的活性, 尤其是在体外或细胞提取物中。 “抑制”

5 在此指任何程度量或质上的减少, 包括完全丧失。此外, 可以使用连有标记例如放射性标记的抗体检测来自例如组织样品或细胞培养物的细胞内有否表达的蛋白, 以及在免疫吸附方法例如 ELISA 中用于分离改变的 G 蛋白或多肽。可分析的组织样品包括人组织, 例如已分化和未分化的细胞。例如肺、骨髓、胸腺、肾、肝、脑、胰、成纤维细胞和上皮细胞。

10 本发明还包括包含改变的 G 蛋白或多肽的药物组合物。例如, 可将本发明改变的 G 蛋白或多肽或其前药与生理学上认可的介质一起配制成药物组合物(例如免疫原性组合物)。具体的生理学上认可的介质包括但不限于水、盐缓冲液、多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇)和葡萄糖溶液。选定介质中活性成分的最佳浓度可凭经验根据熟知的方法来确定, 这取决于最终所需的药剂。将外源肽引

15 导到处理部位的方法包括但不限于透皮、肌内、腹腔内、静脉、皮下、经口和鼻内。其它合适的引入方法包括基因治疗、可重复加载(rechargeable)或可生物降解的装置、气雾剂和缓释聚合物装置。改变的 G 蛋白可与其它免疫原偶联后给予, 其它免疫原包括完整或部分 RSV F 蛋白; 改变的 G 蛋白或多肽可与其它免疫原分开、先后或同时给予。例如, 改变的 G 蛋白或多肽可与完整或部分 RSV F 蛋白

20 形成混合物一同给予。

改变的 G 蛋白或多肽(或混合物、其融合蛋白或嵌合体)可作为抗原用来在脊椎动物(例如哺乳动物宿主)中激发对抗原的免疫应答。例如, 抗原可以是完整的改变的 G 蛋白或其免疫原性部分, 或是改变的 G 蛋白或多肽与完整的 RSV F 蛋白或其免疫原性部分的嵌合体。本文涉及包含改变的 G 蛋白或多肽的组合物, 这

25 包括包含改变的 G 蛋白或多肽以及完整或部分 RSV F 蛋白的组合物。

本发明的方法包括给予脊椎动物免疫有效量的疫苗组合物, 所述的疫苗组合物包含改变的 G 蛋白或多肽与各种合适的佐剂所成的混合物。在此, “佐剂”指各种足以加强或改善对疫苗抗原的免疫应答的物质。在此, “免疫有效量”的疫苗组合物指适合激发免疫应答的剂量, 具体剂量取决于待治疗脊椎动物的年龄、

30 体重和医疗状况。熟练技术人员很容易确定合适的剂量。疫苗组合物可以包含在药学上或生理学上认可的载体中给予, 所述载体例如生理盐水或多元醇例如甘油或丙二醇。

合适的佐剂包括植物油或其乳液,表面活性剂,例如十六烷基胺、氨基酸十八烷酯、十八烷基胺、溶血卵磷脂、溴二甲基二十八烷基铵、N,N-二十八烷基-N'-N'-二(2-羟基乙基-丙二胺)、甲氧基十六烷基甘油和复合多元醇;聚胺,例如吡喃,硫酸葡聚糖,聚 IC,聚羧乙烯;肽,例如胞壁酰二肽,二甲基甘氨酸, tuftsin; 免疫刺激复合物;乳油;矿物凝胶;铝化合物,例如氢氧化铝和磷酸铝; MPL™(3-O-脱酰基单磷酸酯 A, RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT); 霍乱毒素的脱毒突变体和大肠杆菌热不稳定性毒素;裸 DNA CpG 基序;和 Stimulon™ QS-21(Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA)。本发明改变的 G 蛋白或多肽还可以加入脂质体或 ISCOMS(免疫刺激复合物),并可使用其它活性成分。本发明的抗原还可以与淋巴因子联合给予,所述淋巴因子包括但不限于 IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IFN- γ 和 GM-CSF。

本发明的组合物和疫苗可通过各种途径给予人或动物,包括肠胃外,动脉内,皮内,透皮(例如用缓释聚和物),肌内,腹腔内,静脉内,皮下,经口和鼻内。疫苗中所用改变的 G 蛋白的量取决于给予途径和脊椎动物对象的生理特征。本领域熟练技术人员应该能够调整和操纵所用剂量范围和传统载体抗原,以适合本发明的疫苗。本发明的疫苗是用来治疗未成年或成年脊椎动物的,尤其是人。

为了减弱或加强免疫应答,可将本发明改变的 G 蛋白或多肽与载体分子偶联。合适的载体蛋白包括细菌毒素,即,可安全给予哺乳动物且作为载体具有免疫效应的细菌毒素。例如百日咳,白喉,和破伤风类毒素和无毒突变蛋白(交叉反应性物质(CRM)),例如白喉类毒素的无毒变体,CRM₁₉₇。包含至少一个 T 细胞表位的天然毒素或类毒素的片段也可作为抗原的载体。制备抗原与载体分子偶联的方法是本领域熟知的,可参见例如 Wong, Chemistry of Protein Conjugation(CRC Press Inc., Ann Arbor, MI(1991)); Bernatowicz 和 Matsueda, Analytical Biochemistry 155:95-102(1986); Frisch 等, Bioconjugate Chem. 7:180-186(1996);和 Boeckler 等, J. Immunological Methods 191:1-10(1996)。

此外,如果整个肽 19 区(氨基酸 184-198)缺失,可在缺失区插其它生物(包括但不限于 3 型副流感病毒)的抗原的一个或多个表位,以形成二价疫苗。

本发明还涉及包含编码改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子和生理学上认可的载体的疫苗,所述的改变的 G 蛋白或多肽保留了免疫原性,当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时提供保护,而不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。这样的疫苗在此称为核酸疫苗或 DNA 疫苗,可用于脊椎动物的基因免疫。

“基因免疫”在此指给脊椎动物特别是人接种抗病原特别是 RSV 的核酸疫苗，由此保护脊椎动物抵抗 RSV。本文中的“核酸疫苗”或“DNA 疫苗”是一种核酸结构，它包含编码多肽抗原，特别是本文所述改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子。所述的核酸结构还可以包含转录启动元件，增强元件，剪接信号，终止和聚腺苷酸化信号，以及其它核酸序列。

“抗 RSV 保护”在此指在脊椎动物中形成免疫应答，该免疫应答是保护性(部分或完全)的，能够抵抗 RSV 所致疾病的发生。受到抗 RSV 疾病保护的脊椎动物会感染 RSV，但感染程度比没有免疫的动物低；也可能感染 RSV，但不表现出疾病症状；或者可能感染 RSV，但表现出的疾病症状比没有免疫的动物少。或者，受到抗 RSV 疾病保护的脊椎动物即使接触病毒也完全不受 RSV 感染。然而，无论如何，核酸疫苗不会在脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。

核酸疫苗可用标准方法来制备。例如，可用已知方法将编码改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸(例如 DNA)插入表达载体，形成核酸疫苗(参见，Maniatis 等，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))。

用标准方法给脊椎动物接种核酸疫苗(即给予核酸疫苗)。给脊椎动物接种可通过皮下，静脉，腹腔内，透皮，肌内，局部，口服，直肠，鼻内，颊，阴道，吸入喷雾剂，或植入制剂储存体，其中包含常规无毒、生理学上认可的运载体或载体。或者，可用粒子加速仪(“基因枪”)给脊椎动物接种核酸疫苗。给予的形式(例如胶囊、片剂、溶液，乳液)部分取决于给予的途径。例如，就黏膜给予而言，可使用滴鼻液，吸入剂或栓剂。

核酸疫苗可与各种合适的佐剂联合给予。佐剂需足量给予，该量足以增强对核酸疫苗的应答。佐剂可在接种核酸疫苗之前给予(例如之前 1 天以上)；在接种核酸疫苗的同时给予(例如将佐剂与核酸疫苗混合，然后将混合物给予脊椎动物)；或在接种核酸疫苗后给予(例如之后 1 天以上)。佐剂还可以多次给予(例如，接种核酸疫苗前和接种核酸疫苗后)。在此，“联合”包括各种时间段，包括本文具体指明的时间和本文具体指明的时间段的组合，在此期间可给予佐剂以加强对核酸疫苗的免疫应答(例如，针对核酸疫苗所编码的抗原的抗体效价升高，或针对 RSV 的抗体效价升高)。佐剂与核酸疫苗可在大致相同的部位给予脊椎动物；例如，佐剂与核酸疫苗都在脊椎动物肢体上某标记部位给予。

在一具体实施例中，核酸结构与一转染促进剂共同给予。一优选实施例中，转染促进剂是二辛烷基甘氨酸精胺(DOGS)(PCT 公开 WO96/21356)。另一实施例

中, 转染促进剂是 bupivacaine(美国专利 5,593,972)。

本发明还提供了在脊椎动物体内诱导免疫应答的方法, 包括给予脊椎动物诱导免疫应答有效量的本文所述免疫原性组合物, 疫苗或核酸疫苗。一具体实施例中, 所述的脊椎动物是血清阴性脊椎动物, 例如血清阴性的人。本发明还提供免疫脊椎动物(例如 RSV 血清阴性的人)以抵抗 RSV 的方法, 包括给予脊椎动物包含免疫有效量改变的 RSV G 蛋白或多肽的组合物, 所述蛋白或多肽保留了免疫原性, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。或者, 组合物包含编码免疫有效量改变的 RSV G 蛋白或多肽的核酸分子, 所述蛋白或多肽保留了免疫原性, 当加入免疫原性组合物或疫苗并给予脊椎动物时, 不会在该脊椎动物随后感染 RSV 时加重病情。本发明还涉及免疫接种脊椎动物的方法, 包括给予脊椎动物本文所述的疫苗或核酸疫苗。

总之, 本文数据显示, 再度刺激时, 肽 19(AICKRIPNKKPGKKT)(SEQ ID NO.19)刺激 CD4⁺ T 细胞扩增, 引起与嗜酸粒细胞诱导和募集相关的细胞因子 IL-5 的分泌, 由此引发肺嗜酸粒细胞增多(Coffman 等, Science 245:308-310(1989))。

不想局限于理论, 在此提出一个免疫引发模型, 其中, 一个或多个肽 19 内的 Th 细胞表位控制着随后的免疫应答的性质, 导致向 Th2 表型的深度倾斜(skewing)。先前, 改变肽序列已经证明 T 细胞受体(TCR)-MHC 相互反应中的肽组分能够调整 Th1 和 Th2 表型之间免疫应答的性质(Pfieffer 等, J. Exp. Med. 181:1569-1574(1995); Murray 等, Eur. J. Immunol. 24:2337-2344(1994))。但是, 仍有可能, 肽 19 所含的 15 个氨基酸包含一个以上 T 细胞表位, 各有不同的激发 Th1 或 Th2 应答的能力。支持这一假设的是, 对肽 19 的序列分析显示, 它具有 3 个潜在 T 细胞表位, 都受限于 MHC II 类的 I-E^d, 它们相邻排列在关键的 1, 4, 6 和 9 位锚着残基处(分别是 I, K 或 R, I 和 K)(肽 19 的氨基酸 187, 189 和 192)(Rammensee 等, Immunogenetics 41:178-228(1995))。根据通过生物化学分离 MHC-结合肽或通过肽结合试验得到的已知配体, 以上推定序列都符合 II 类结合(Rammensee 等, Immunogenetics 41:178-228(1995))。将肽 19(AICKRIPNKKPGKKT)(SEQ ID NO.19)突变成能破坏这些潜在 T 细胞表位的 MHC-结合锚着区的序列((AICGRGPNGKPGKKT)(突变体 1; SEQ ID NO.32)或(AGCGRGPGGKPGKGT)(突变体 2; SEQ ID NO.33), 则该肽完全丧失了使小鼠易发肺嗜酸粒细胞增多的能力(图 6)。

本发明的数据确定了包含 G 蛋白氨基酸 184-198 的肽与肺嗜酸粒细胞增多易

感性之间的关联。这样，对血清阴性群体来说，该结果赞成构建 G 蛋白氨基酸 184-198 区域内基因被改变的 RSV 疫苗。该疫苗不会使受体易发非典型性肺炎，但保留了抵抗 RSV 随后攻击的保护能力。HLA 型与对肽 19 反应性的关联为该氨基酸序列在支气管炎，特异性反应或哮喘这些在血清阴性婴儿感染 RSV 后时有所见的疾病发作期的作用提供了更深刻的理解(Welliver 和 Welliver, *Pediatrics in Review* 14:134-139(1993))。这样，对血清阴性群体来说，最好的 RSV 疫苗策略应包含这样的组分，它们不会引发免疫致病性结果，但可获得平衡的免疫应答，从而激发保护性的 CD4⁺和 CD8⁺细胞类型。图 4A 和 4B 中的数据确认了一系列激发 IFN- γ 分泌并具有以上作用的肽(即，肽 10，14，16 和 18)。与此类似，该数据提示了一系列能够激发 PBMC 增殖并足以在没有肽 19 序列存在下提供抗 RSV 攻击保护的肽(例如，对供血者 100 来说，是肽 2，4，9，15 和 29)。

以下实施例用于说明本发明而非限定本发明的范围。本文引用的参考文献的内容均在此作为参考。

15

实施例

材料与方法

小鼠

雌性 BALB/c(H-2^d)小鼠，7-9 周龄，购自 Taconic Farms, Inc.(Germantown, NY)。所有小鼠都笼养在 American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care 设计的设备中。

疫苗抗原的制备与使用

用 RSV A2 毒株感染 HEp2-细胞(ATCC CCL23)，离心澄清培养物上清液去除细胞碎片，制得病毒粒子。由培养在 Vero 细胞(ATCC CCL81)中的 RSV A2 毒株纯化 RSV F 和 G 蛋白。根据现有记载(Hancock 等, *J. Virol.* 70:7783-7791(1996))，用 G 蛋白特异性单克隆抗体 L7(杂交瘤，ATCC HB10233)，通过免疫亲和层析分离 G 蛋白。经 ELISA 和 SDS-PAGE 测定，所得的 G 蛋白纯度>95%。免疫时，每只小鼠在第 0 和 4 周肌内接种含 1 μ g 纯化 G 蛋白和 20 μ g 佐剂 StimulonTMQS-21(Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA)的 0.1ml PBS，除非另作说明。以离子交换层析纯化 F 蛋白，用 3 μ g F 蛋白，以 100 μ g 氢氧化铝(Al(OH)₃)为佐剂进行接种。在 RSV 接种和攻击中，给予 50 μ l 含 1-2 $\times 10^6$ 噬斑形成单位(pfu)

的感染性 RSV A2。用等体积 HEp-2 细胞裂解液进行模拟接种。

肽抗原的制备与使用

由 Genosys Biotechnologies, Inc.(The Woodlands, TX)合成一系列对应于 RSV G 蛋白重叠区的合成肽(图 2)。所得的肽系列涵盖 RSV A2 G 蛋白的氨基酸 48-294(Wertz 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4075-4079(1985))。这些肽经质谱测定的纯度高于 90%。将冻干肽在无菌水中溶解成 2mg/ml, 保存于 -20℃。用 50μg/ml 肽体外刺激人外周血单核细胞(PBMC)或用 G 蛋白初次免疫过小鼠的脾细胞。

用 Imject®活化偶联试剂盒(Pierce Chemical, Rockford, IL)将选定的肽与马来酰亚胺活化的匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)偶联。由于偶联机制的基础是 KLH 内马来酰亚胺基团与肽内 SH 基团间的化学反应, 所以在肽 22 的羧基末端添加一个半胱氨酸。用 Elliman' 试剂(Pierce Chemical)测定肽内巯基的减少来定量检测各种肽的偶联程度。以上反应中的偶联程度(通常每 mg KLH 结合 50-80μg 肽)优于过去肽与 KLH 通过该技术(Tsao 等, Anal. Biochemistry 197:137-142(1991))的偶联。为了研究各种肽对嗜酸粒细胞增多的诱导, 在第 0 和 4 周, 用 250μg 与 KLH 结合的各种肽, 以 20μg Stimulon™ QS-21 为佐剂, 加入 0.1PBS 中肌肉免疫各小鼠。二次接种 2 周后, 通过肌肉给予 50μl 含 $1-2 \times 10^6$ pfu 感染性 RSV A2 进行攻击(Hancock 等, J. Virol. 70:7783-7791(1996))。7 天后, 通过颈椎脱臼处死小鼠, 进行支气管灌洗(BAL)。

20

测定感染性 RSV 的效价

系列稀释 RSV 感染的小鼠的肺匀浆上清液, 用于感染 HEp-2 细胞单层。温育 2 小时后, 吸出接种物, 每测试格覆盖以含 1% Sephadex G-75 的培养基。继续温育 3 天后, 去除凝胶覆盖, 测试格用 80%乙醇固定。用 RSV G 蛋白的单克隆抗体和与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠第二 mAb 鉴定 RSV 噬斑。加入底物, 0.05% 4-氯萘酚/0.09%过氧化氢的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液, 进行显色。计数 RSV 噬斑形成单位(pfu), 将效价表示为 pfu/g 肺组织。

用含纯化自 RSV A2 毒株的天然融合(F)和/或吸附(G)蛋白的多种疫苗之一肌肉注射初次免疫 BALB/c 小鼠。3 组小鼠分别用 3,000, 300 或 30ng F 蛋白/剂次进行初次免疫。另 3 组小鼠用 1,000, 100 或 10ng G 蛋白/剂次初次免疫。再有 3 组小鼠用含 3000+1000, 300+100 或 30+10ng F 与 G 蛋白的组合疫苗初次免疫。全部疫苗均以氢氧化铝(Al(OH)₃, 100μg/剂次)为佐剂。对照鼠 RSV A2 毒株感染, 或

肌内注射 PBS/ AIOH。初次免疫后 4 周，用 RSV A2 毒株攻击全部小鼠。4 天后，处死小鼠，测定肺组织中感染性病毒的数量(下表)。

表：小鼠肺内 RSV 效价的测定

抗原(ng)	GMT RSV ^a
F(3000)+G(1000)	<1.6±0.2
F(300)+G(100)	<2.1±0.7
F(30)+G(10)	<2.8±0.9 ^b
F(3000)	<2.1±0.5
F(300)	<2.5±0.1
F(30)	4.1±0.8
G(1000)	3.5±0.5
G(100)	4.7±0.2
G(10)	4.7±0.2
PBS	5.1±0.2
RSV	<1.6±0.1

- 5
- a. GMT 是 RSV/g 肺组织的几何平均效价(log₁₀)±1 标准偏差。GMT RSV 是在鼻内攻击 4 天后测定的。

b. 接种纯 F(30)，纯 G(10)或 PBS 的组，P<0.05。

支气管肺泡灌洗

- 10
- 进行支气管肺泡灌洗(BAL):用含 1ml 冰冷却的 12mM 盐酸利多卡因的 RPMI 溶液灌注气管，然后抽出，重复至少 5 次(Hancock 等, Vaccine 13:391-400(1995))。然后离心 BAL 悬浮液沉淀出细胞。用 0.2%的台盼蓝 PBS 溶液染色分成等份的细胞，测定白细胞数量。接着，离心细胞，转移到玻片上，用 Diff-Quik(Dade International Inc., Miami, FL)固定并染色。通过分析每玻片至少 400 细胞计数各白
- 15
- 细胞群。表示的结果为每组 5 只小鼠的平均百分比(±SD)。

体内清除 T 细胞亚型

- 20
- 在重组 G 蛋白柱(Pharmacia, Piscataway, NJ)上，从杂交瘤培养物上清液中纯化抗鼠 CD4，GK1.5(ATCC TIB207)和抗鼠 CD8，53-6.72(ATCC TIB105)的单克隆抗体(mAb)。作为对照，从 Calbiochem(San Diego, CA)购得纯化的大鼠 IgG。在末

次免疫后的第 14 天和第 20 天,以每鼠 750 μ g 和 250 μ g 的剂量给予 mAb。然后用活 RSV 攻击小鼠,7 天后,通过分析 BAL 细胞测定肺嗜酸粒细胞的量。在 FACScan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)上进行流动细胞计数,评估清除的效果。用购自 Pharmingen(San Diego, CA)的 PE 抗小鼠 CD4(L3T4)和 FITC 抗小鼠 CD8(Ly-2)进行标准流动细胞计数。

脾免疫细胞的体外扩增

根据现有记载(Hancock 等, J. Virol. 70:7783-7791(1996)),用天然 G 蛋白与 Stimulon™ QS-21 二次接种小鼠,2 周后从 5 个一组的小鼠中分离出脾脏,制成单细胞悬液。用氯化铵裂解去除红细胞,用台盼蓝排除法测定所得脾细胞的量。在 96 格平底培养板上培养细胞,一式三份,浓度为每格 2.5×10^5 个细胞,培养基含 RPMI1640,并补充以 2mM 谷氨酰胺;100U/ml 青霉素和 50 μ g/ml 链霉素; 5×10^{-4} M β -巯基乙醇;10mM HEPES;1%正常小鼠血清(Biocell Labs, Inc., Rancho Dominguez, CA)。在培养基中加入 50 μ g/ml 肽抗原。作为对照,分别加入最终浓度为 0.5 μ g/ml 的纯化 G 蛋白,10 μ g/ml 白喉类毒素交叉反应性蛋白(CRM₁₉₇)和 1 μ g/ml 伴刀豆蛋白 A(ConA)。37°C,5%CO₂ 培养 4 天后,用 1 μ Ci ³H-胸腺嘧啶脉冲处理 18 小时。然后收获细胞,用液相闪烁计数法测定掺入 DNA 的 ³H-胸腺嘧啶。

收集正常成年供血者肝素化人血液,通过 Ficoll-Hypaque(Pharmacia, Piscataway, NJ)离心分离。细胞与上述肽培养在含 10%AB 血清(Biocell)的 PRMI1460 中。作为对照,细胞在培养基中与 CRM₁₉₇(30 μ g/ml),PHA(5 μ g/ml)一起培养,或单独培养。

细胞因子试验:

汇合一式三格的上清液,用抗原-捕捉 ELISA 检测 IFN- γ 和 IL-5。简而言之,最大吸附(maxisorb)板(Nunc)上涂以含捕捉 IFN- γ 的 R4-6A2(3 μ g/ml)或捕捉 IL-5 的 TRFK.5(2.5 μ g/ml)单克隆抗体的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)50 μ l。用含 5%FBS 和 10%奶粉(wt/vol)的 Tris 缓冲液封闭非特异性结合位点。将培养物上清液加到测试格中,一式两份,室温培养 2 小时。用生物素化的抗体 XMG1.2(IFN- γ)(1 μ g/ml)和 TRFK.4(IL-5)(2 μ g/ml)检测结合的细胞因子。细胞因子试验中使用的 4 种单克隆抗体都来自 Pharmacia(San Diego, CA)。用链霉亲和素-碱性磷酸酶以及含 NADP,黄递酶,醇脱氢酶和 INT 紫的底物系统测定细胞因子的量。加入 0.3M

硫酸令底物显色, 在 Dynatech(Chantilly, VA) ELISA 读数仪上, 于 490nm 处测定光密度(OD_{490})。为了确保线性, 用重组 IFN- γ (Genzyme, Cambridge, MA)和 IL-5(Pharmacia, San Diego, CA)得出各细胞因子的标准曲线。给出的是每种抗原的平均 OD_{490} 。

5

嗜酸粒细胞增多的诱导

在第 0 和 4 周, 给 7-9 周龄的雌性 BALB/c 小鼠肌肉接种含 20 μ g Stimulon™ QS-21 佐剂; 1 μ g 纯化 G 蛋白, 250 μ g KLH, 250 μ g 与肽 19 或 22 偶联的 KLH; 或游离肽 19 或 22 的 0.1ml PBS。用购自 Peirce Chemical, Rockford, IL 的 Imject® 活化偶联试剂盒(产品编号 77111)将肽与马来酰亚胺活化 KLH 偶联。通常, 每次偶联反应, 将 80-100 μ g 肽与 1mg KLH 结合。这样, 由于每鼠每次接种接受 250 μ g KLH, 这就相当于接种了 20-25 μ g 相关肽。二次接种 2 周后, 用 50 μ l $1-2 \times 10^6$ PFU 感染性 RSV A2 鼻内攻击。7 天后, 颈椎脱臼处死小鼠, 进行支气管肺泡灌洗。离心细胞, 转移到玻片上, 用 Diff-Quik(Dade Diagnostics)固定和染色。分析每片至少 400 细胞, 计数与白细胞总数相关的嗜酸粒细胞的相对比例。表示的结果(图 5)是每组 5 只小鼠的平均百分比($\pm$ SD)。

统计学分析

用 JMP®统计学软件(SAS Institute Inc., Cary, NC), 用 Tukey-Kramer HSD 多重比较检验测定不同组之间的显著差异。

结果

本文描述了以上工作的结果, 即天然 G 蛋白和一系列 G 蛋白氨基酸 48 至 294 上重叠肽(图 2)所激发的免疫应答。氨基酸 48 对应于 RSV G 蛋白的第二翻译起始密码子。在第 0 和 4 周肌肉(IM)接种天然 G 蛋白的 BALB/c 小鼠, 在活 RSV 鼻内(IN)攻击后第 7 天, 表现出最大的支气管肺泡灌洗(BAL)液中嗜酸粒细胞增多(占白细胞总量的 65%)。相反, 实验感染或初次免疫感染过的小鼠的 BAL 液中嗜酸粒细胞不到 2%(图 1B)。

接种 G 蛋白的 BALB/c 小鼠脾细胞的体外刺激试验显示, 对包含 G 蛋白氨基酸 184-198 的肽发生的优势性增殖应答(图 3)。增殖比背景水平高 16 倍, 且大大超过用其它 G 蛋白衍生肽获得的增殖。此外, 对肽 19 的应答强度与用纯化天然 G 蛋白所得的相当。所以, 以上数据说明, RSV G 蛋白激发 BALB/c 小鼠初次免

疫脾细胞增殖的能力完全包含在蛋白质的 184-198 氨基酸节段内。

分析了培养物上清液与辅助 T 细胞亚型相关的细胞因子，最高水平的 IFN- γ 和 IL-5 出现在肽 19 刺激之后。而且，该水平与用天然 G 蛋白激发所得相当，或更高(图 4A 和 4B)。以上数据说明，氨基酸 184-198 区域包含了 BALB/c 小鼠 T 细胞所识别的 RSV G 蛋白内的优势表位。

初步研究表明，接种 G 蛋白的 BALB/c 小鼠的 BAL 中，肺嗜酸粒细胞最高值出现在攻击后 7 天，为 $65 \pm 5.4\%$ 。为了证实肽 19 在激发小鼠肺嗜酸粒细胞增多中的直接作用，将肽 19 与肽 22 进行了比较。后一肽似乎只激发产生 IFN- γ ，而不激发产生 IL-5(图 4A 和 4B)。

为了确保足够的免疫原性，将肽与马来酰亚胺活化的 KLH 偶联。与只用佐剂接种的小鼠($2.5 \pm 2.0\%$)相比，用肽 19-KLH ($39.5 \pm 8.0\%$)或 G 蛋白($63 \pm 1.9\%$)初次免疫的小鼠，发生统计学意义上明显的肺嗜酸粒细胞增多(图 5)。相反，肽 22-KLH 只引起背景水平的嗜酸粒细胞增多($4.9 \pm 3.3\%$)，尽管数据显示肽 22 具有免疫原性。末次接种后 2 周，接种肽 19-KLH 或肽 22-KLH 的小鼠抗 RSV G 蛋白 IgG 效价的几何平均值分别为 1517 和 5611。所以，虽然对两种肽偶联物都产生体液免疫，但嗜酸粒细胞异常增多的诱导仅限于接种肽 19 的小鼠。用非偶联肽 19 或 22 接种都不激发可测得的体液免疫应答，产生的嗜酸粒细胞相对百分比(分别为 $6.5 \pm 5.2\%$ 和 $2.5 \pm 2.5\%$)与 PBS/Stimulon™ QS-21 对照没有显著差异。

为了评估肽 19 作为致肺嗜酸粒细胞增多诱因，对在 MHC II 类结合位点的关键性 1, 4, 6 和 9 锚着区发生氨基酸取代的肽 19 突变体进行了评估。这些突变消除了致小鼠肺嗜酸粒细胞增多的能力(图 6)。结合图 5，以上数据表明，肽 19 的氨基酸序列与诱导小鼠受随后攻击时肺嗜酸粒细胞增多之间直接相关。

为了确定与肽 19-KLH 相关的嗜酸粒细胞增多是否是由 CD4⁺细胞介导的，用针对 CD4 或 CD8 表面分子的 mAb 进行了一系列缺失试验。FACS 分析是在攻击后 7 天，对接种小鼠脾脏的脾门淋巴细胞群进行的(图 8)。

去除 CD4⁺细胞，在接种 G/Stimulon™ QS-21 或肽 19-KLH/ Stimulon™ QS-21 的小鼠内显著降低了 BAL 中的嗜酸粒细胞增多(图 8)。具体地说，用抗 CD4 mAb 治疗分别将嗜酸粒细胞从 $67.2 \pm 8.5\%$ 和 $29.6 \pm 13.3\%$ 降至 $8.1 \pm 4.7\%$ 和 $0.75 \pm 0.6\%$ 。相应的抗 CD8 mAb 治疗对嗜酸粒细胞增多诱导作用甚微，接种 G 和肽 19-KLH 的小鼠的嗜酸粒细胞水平分别保持在 $63.8 \pm 6.4\%$ 和 $32.8 \pm 10.3\%$ 。如图 8 所示，用 RSV 试验性感染的小鼠的 BAL 中，只有 0.7%嗜酸粒细胞。所以，以上数据说明，对接种了 G 蛋白或肽 19 的 BALB/C 小鼠受攻击时肺嗜酸粒细胞增多应答而言，

CD4+细胞是必需的。

测试了一组供血者外周血单核细胞与纯化 G 蛋白的反应性，以鉴定最近已被感染的个体。接着，获取表现出对 G 蛋白增殖应答的 6 名供血者的细胞，在图 2 中合成肽存在下培养(图 7)。发现供血者 100 对肽 19 有强烈的增殖应答(平均刺激指数，8.5)。此外，供血者 9 和 20 也对肽 19 有增殖应答，平均刺激指数均为 3 倍。

等价性

虽然，参照优选实施例对本发明进行了具体的说明与描述，本领域熟练技术人员知道，在形式和细节上可进行多种改变，这些都属于后文权利要求书的精神和范围内。

序列表

5	<110> 美国氰胺公司 Hancock, Gerald E. Tebbey, Paul W. <120> 对呼吸合胞病毒吸附(G)蛋白的增强免疫应答
10	<130> ACC97-01p2A PCT <140> PCT/US98/19656 <141> 1998-09-17
15	<150> US 60/084,863 <151> 1998-05-08 <150> US 60/059,684 <151> 1997-09-19
20	<160> 33 <170> Windows 3.0 版的 FastSEQ
25	<210> 1 <211> 15 <212> PRT <213> 人造序列
30	<220> <223> 合成肽

<400> 1
Met Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile
1 5 10 15

5 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

10 <220>
<223> 合成肽

<400> 2
15 Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser Ala Asn His Lys Val Thr
1 5 10 15

20 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成肽

25 <400> 3
Ser Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp
1 5 10 15

30 <210> 4
<211> 15
<212> PRT

	<213> 人造序列															
	<220>															
	<223> 合成肽															
5	<400> 4															
	Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr Ser Gln Ile Lys Asn Thr															
	1				5					10					15	
10	<210> 5															
	<211> 15															
	<212> PRT															
	<213> 人造序列															
15	<220>															
	<223> 合成肽															
	<400> 5															
20	Thr Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn															
	1				5					10					15	
	<210> 6															
	<211> 15															
25	<212> PRT															
	<213> 人造序列															
	<220>															
	<223> 合成肽															
30	<400> 6															

Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln Leu Gly Ile Ser Pro Ser

1 5 10 15

<210> 7

5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

10

<223> 合成肽

<400> 7

Pro Gln Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln

15

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

20

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成肽

25

<400> 8

Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr Thr Ile Leu Ala Ser Thr

1 5 10 15

<210> 9

30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成肽

5

<400> 9

Thr Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu

1

5

10

15

<210> 10

10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

15

<223> 合成肽

<400> 10

Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser Thr Thr Val Lys Thr Lys

1

5

10

15

20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

25

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

30

Ser Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln

1

5

10

15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

5

<220>
<223> 合成肽

<400> 12

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

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

15

<220>
<223> 合成肽

20

<400> 13

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

25

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

30

<220>
<223> 合成肽

	<400> 14													
	Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu													
	1			5				10					15	
5	<210> 15													
	<211> 16													
	<212> PRT													
	<213> 人造序列													
10	<220>													
	<223> 合成肽													
	:													
	<400> 15													
	Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser													
15	1			5				10					15	
	<210> 16													
	<211> 14													
	<212> PRT													
20	<213> 人造序列													
	<220>													
	<223> 合成肽													
25	<400> 16													
	Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr													
	1			5				10						
	<210> 17													
30	<211> 17													
	<212> PRT													
	<213> 人造序列													

<220>
<223> 合成肽

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

10 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人造序列

15 <220>
 <223> 合成肽

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

20 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人造序列

25 <220>
 <223> 合成肽

 <400> 19
30 Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
1 5 10 15

	<210> 20
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> 人造序列
5	
	<220>
	<223> 合成肽
	<400> 20
10	Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro
	1 5 10 15
	<210> 21
	<211> 15
15	<212> PRT
	<213> 人造序列
	<220>
	<223> 合成肽
20	
	<400> 21
	Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu Lys Thr Thr Lys Lys Asp
	1 5 10 15
25	
	<210> 22
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> 人造序列
30	
	<220>
	<223> 合成肽

	<400> 22															
	Leu Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser															
	1			5					10						15	
5																
	<210> 23															
	<211> 15															
	<212> PRT															
	<213> 人造序列															
10																
	<220>															
	<223> 合成肽															
	<400> 23															
15	Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro															
	1			5					10						15	
	<210> 24															
	<211> 15															
20	<212> PRT															
	<213> 人造序列															
	<220>															
	<223> 合成肽															
25																
	<400> 24															
	Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr															
	1			5					10						15	
	<210> 25															
30	<211> 15															
	<212> PRT															

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成肽

5

<400> 25

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

10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

15

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

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

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

25

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成肽

30

<400> 27

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

5	<210> 28			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
10	<223> 合成肽			
	<400> 28			
	Pro Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser			
	1	5	10	15
15	<210> 29			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
20	<223> 合成肽			
	<400> 29			
	Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly Asn Pro Ser Pro Ser Gln			
	1	5	10	15
25	<210> 30			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
30	<223> 合成肽			
	<400> 30			
	<210> 31			
	<211> 15			
35	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 31			
40				
	<210> 32			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
45	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 32			
	<210> 33			
50	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
55	<400> 33			
	<210> 34			
	<211> 15			
	<212> PRT			
60	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 34			
65	<210> 35			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
70	<223> 合成肽			
	<400> 35			
	<210> 36			
	<211> 15			
75	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 36			
80				
	<210> 37			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
85	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 37			
	<210> 38			
90	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
95	<400> 38			
	<210> 39			
	<211> 15			
	<212> PRT			
100	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 39			
105	<210> 40			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
110	<223> 合成肽			
	<400> 40			
	<210> 41			
	<211> 15			
115	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 41			
120				
	<210> 42			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
125	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 42			
	<210> 43			
130	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
135	<400> 43			
	<210> 44			
	<211> 15			
	<212> PRT			
140	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 44			
145	<210> 45			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
150	<223> 合成肽			
	<400> 45			
	<210> 46			
	<211> 15			
155	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 46			
160				
	<210> 47			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
165	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 47			
	<210> 48			
170	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
175	<400> 48			
	<210> 49			
	<211> 15			
	<212> PRT			
180	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 49			
185	<210> 50			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
190	<223> 合成肽			
	<400> 50			
	<210> 51			
	<211> 15			
195	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 51			
200				
	<210> 52			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
205	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 52			
	<210> 53			
210	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
215	<400> 53			
	<210> 54			
	<211> 15			
	<212> PRT			
220	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 54			
225	<210> 55			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
230	<223> 合成肽			
	<400> 55			
	<210> 56			
	<211> 15			
235	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 56			
240				
	<210> 57			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
245	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 57			
	<210> 58			
250	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
255	<400> 58			
	<210> 59			
	<211> 15			
	<212> PRT			
260	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 59			
265	<210> 60			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
270	<223> 合成肽			
	<400> 60			
	<210> 61			
	<211> 15			
275	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 61			
280				
	<210> 62			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
285	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 62			
	<210> 63			
290	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
295	<400> 63			
	<210> 64			
	<211> 15			
	<212> PRT			
300	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 64			
305	<210> 65			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
310	<223> 合成肽			
	<400> 65			
	<210> 66			
	<211> 15			
315	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 66			
320				
	<210> 67			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
325	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 67			
	<210> 68			
330	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
335	<400> 68			
	<210> 69			
	<211> 15			
	<212> PRT			
340	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 69			
345	<210> 70			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
350	<223> 合成肽			
	<400> 70			
	<210> 71			
	<211> 15			
355	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 71			
360				
	<210> 72			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
365	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 72			
	<210> 73			
370	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
375	<400> 73			
	<210> 74			
	<211> 15			
	<212> PRT			
380	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 74			
385	<210> 75			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
390	<223> 合成肽			
	<400> 75			
	<210> 76			
	<211> 15			
395	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 76			
400				
	<210> 77			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
405	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 77			
	<210> 78			
410	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
415	<400> 78			
	<210> 79			
	<211> 15			
	<212> PRT			
420	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 79			
425	<210> 80			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
430	<223> 合成肽			
	<400> 80			
	<210> 81			
	<211> 15			
435	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 81			
440				
	<210> 82			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
445	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 82			
	<210> 83			
450	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
455	<400> 83			
	<210> 84			
	<211> 15			
	<212> PRT			
460	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 84			
465	<210> 85			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
470	<223> 合成肽			
	<400> 85			
	<210> 86			
	<211> 15			
475	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 86			
480				
	<210> 87			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
485	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 87			
	<210> 88			
490	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
495	<400> 88			
	<210> 89			
	<211> 15			
	<212> PRT			
500	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 89			
505	<210> 90			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
510	<223> 合成肽			
	<400> 90			
	<210> 91			
	<211> 15			
515	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 91			
520				
	<210> 92			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
525	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 92			
	<210> 93			
530	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
535	<400> 93			
	<210> 94			
	<211> 15			
	<212> PRT			
540	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 94			
545	<210> 95			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
550	<223> 合成肽			
	<400> 95			
	<210> 96			
	<211> 15			
555	<212> PRT			
	<213> 人造序列			
	<220>			
	<223> 合成肽			
	<400> 96			
560				
	&			

<223> 合成肽

<400> 30

Gly Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro

5 1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

10 <213> 人造序列

<220>

<223> 合成肽

15

<400> 31

Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln Pro Ser Ser Pro Pro Asn

1 5 10 15

20 <210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

25 <220>

<223> 合成肽

<400> 32

30 Ala Ile Cys Gly Arg Gly Pro Asn Gly Lys Pro Gly Lys Lys Thr

1 5 10 15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

5

<220>
<223> 合成肽

<400> 33

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

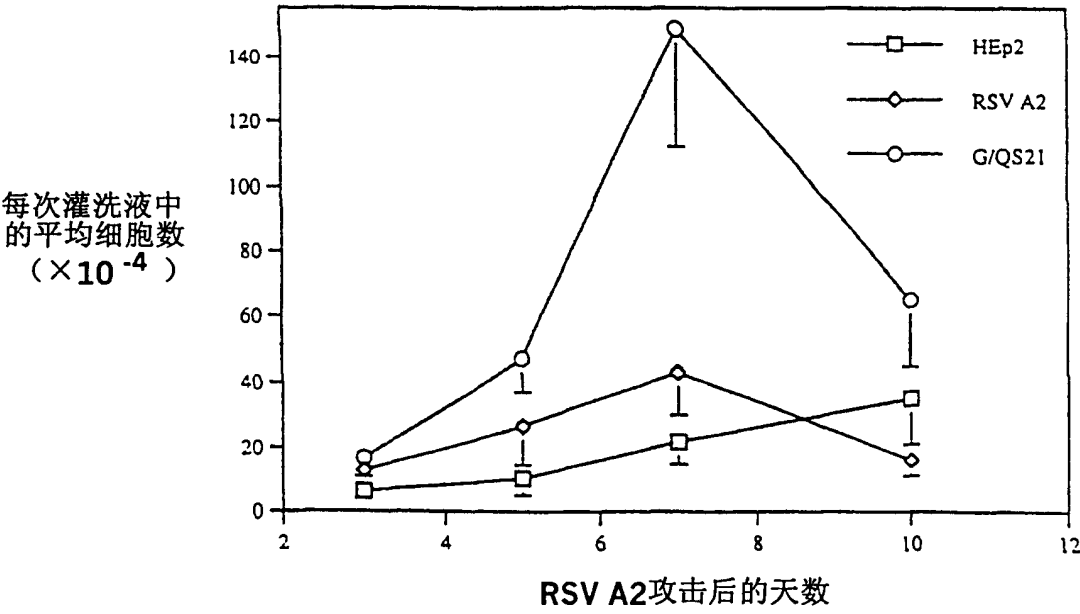


图 1A

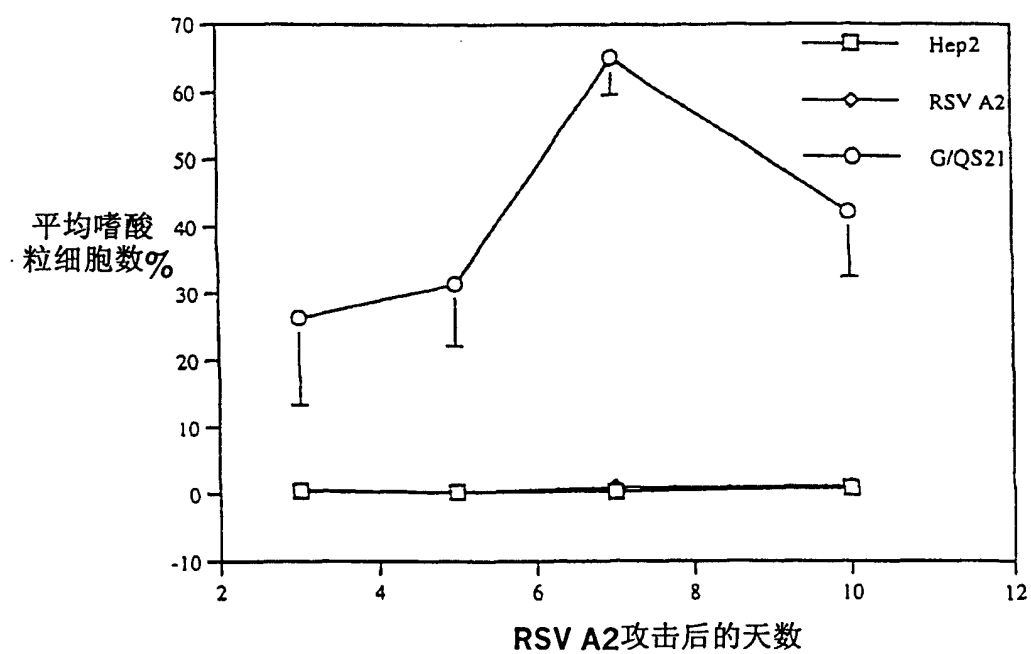


图 1B

肽	氨基酸	序列	SEQ ID NO:
1	48-62	MIISTSLIAAIIFI	1
2	56-70	IAAIIFIASANHKT	2
3	64-78	SANHKVTPTTAIQD	3
4	72-86	TTAIQDATSQIKNT	4
5	80-94	TSQIKNTIPTYLQN	5
6	88-102	PTYLQNPQLGISPS	6
7	95-110	PQLGISPSNPSEITSQ	7
8	104-118	PSEITSQIITILAST	8
9	112-126	TTILASTTPGVKSTL	9
10	120-134	PGVKSTLQSTTVKTK	10
11	128-142	STTVKTKNTTIIQIQ	11
12	136-150	TTTTIQTPSKPTTKQ	12
13	144-158	SKPTTKQRQNKPPSK	13
14	151-166	RQNKPPSKPNNDHFHE	14
15	159-174	PNNDHFHEVFNVPCS	15
16	168-181	FNFVPCSCSNNPT	16
17	171-187	VPCSCSNNPTCWAICK	17
18	176-190	CSNNPTCWAICKRIP	18
19	184-198	AICKRIPNKKPGKKT	19
20	192-206	KKPGKKTITTKTKKP	20
21	200-214	TKPTKKPTLTKTKD	21
22	208-222	LKTTKKDPPKQITKS	22
23	216-230	KPQITKSKEVPTTKP	23
24	224-238	EVPTTKPTEPTINT	24
25	232-246	EEPTINTTKNIIT	25
26	240-254	KTNIITLLTSNTIG	26
27	248-262	LTSNTIGNPELTSQM	27
28	256-270	PELTSQMETFHSSTSS	28
29	264-278	TFHSTSSSEGNPSPSQ	29
30	272-286	GNPSPSQVSTTSEYP	30
31	280-294	STTSEYPSQPSPPPN	31

图 2

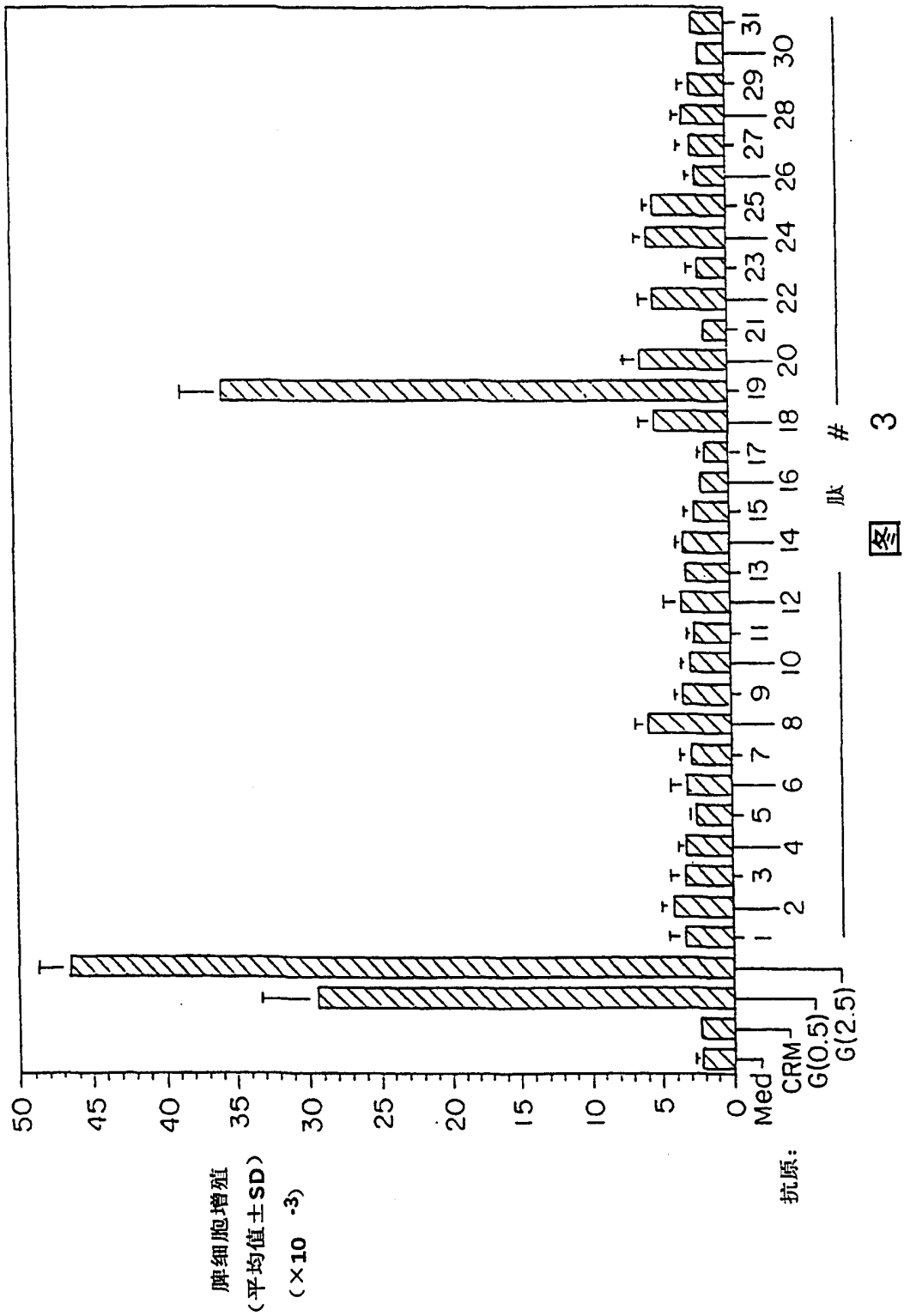


图 3

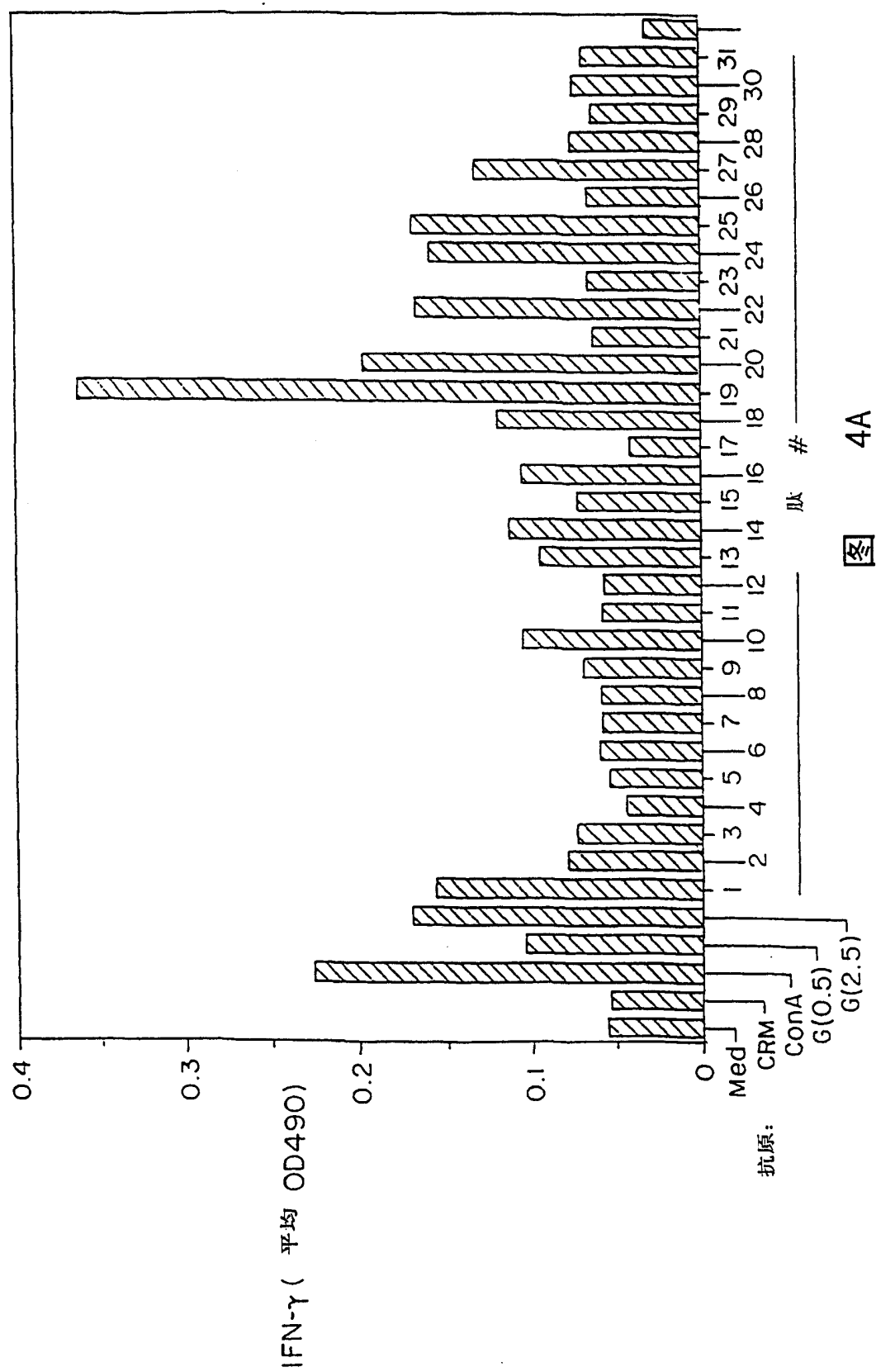


图 4A

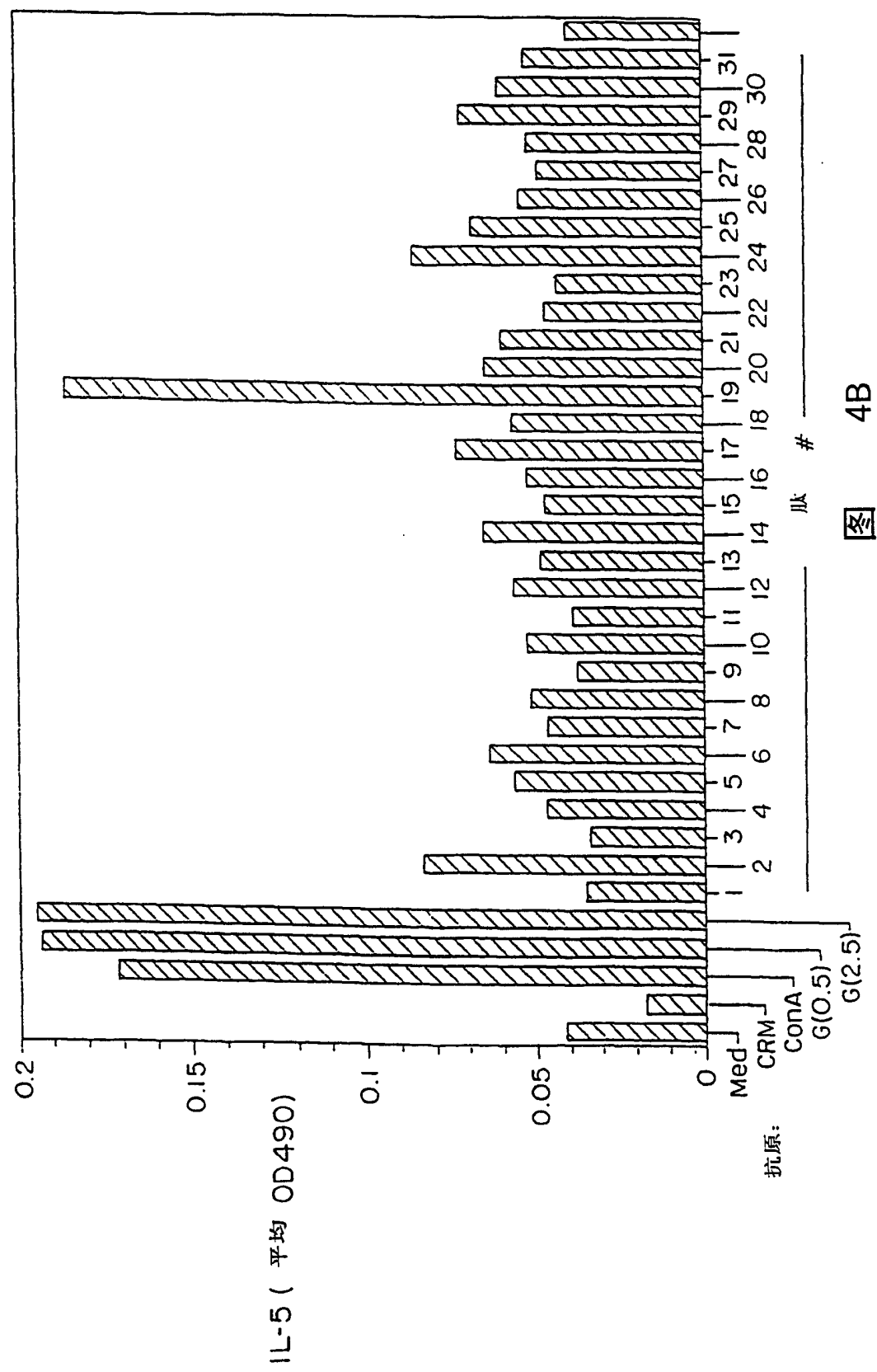


图 4B

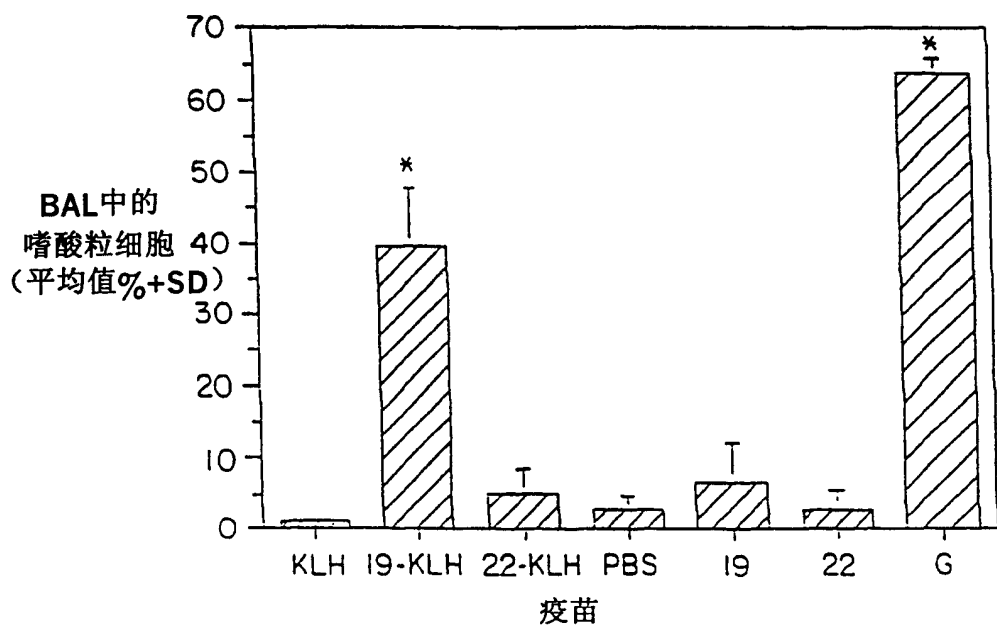


图 5

肽19: AICKRIPNKKPGKKT (SEQ ID NO: 19)

肽19突变1: AICGRGPNGKPGKKT (SEQ ID NO: 32)

肽19突变2: AGCGRGPGGKPGKGT (SEQ ID NO: 33)

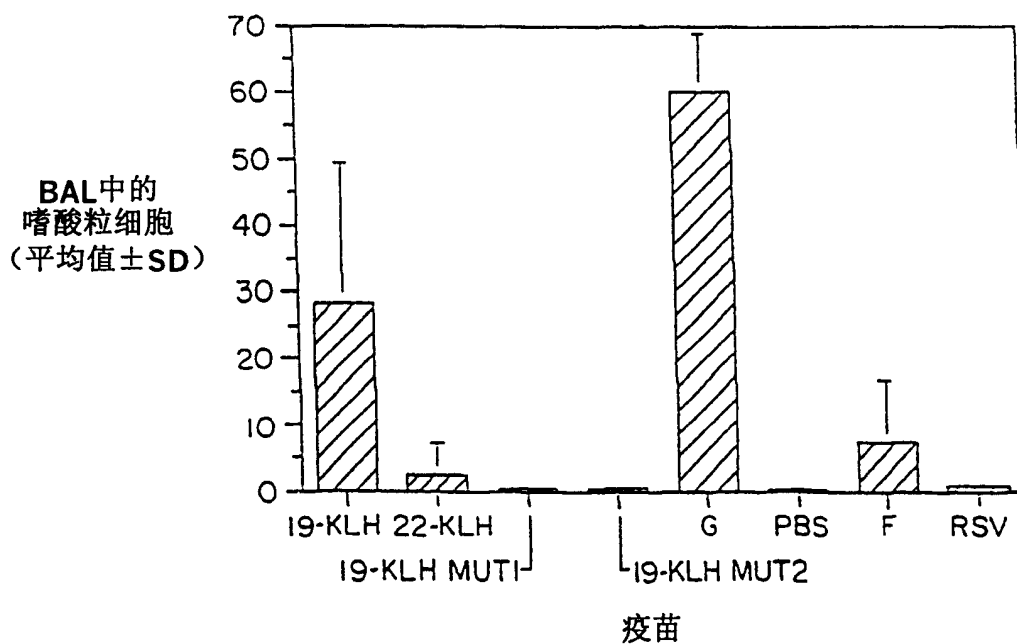


图 6

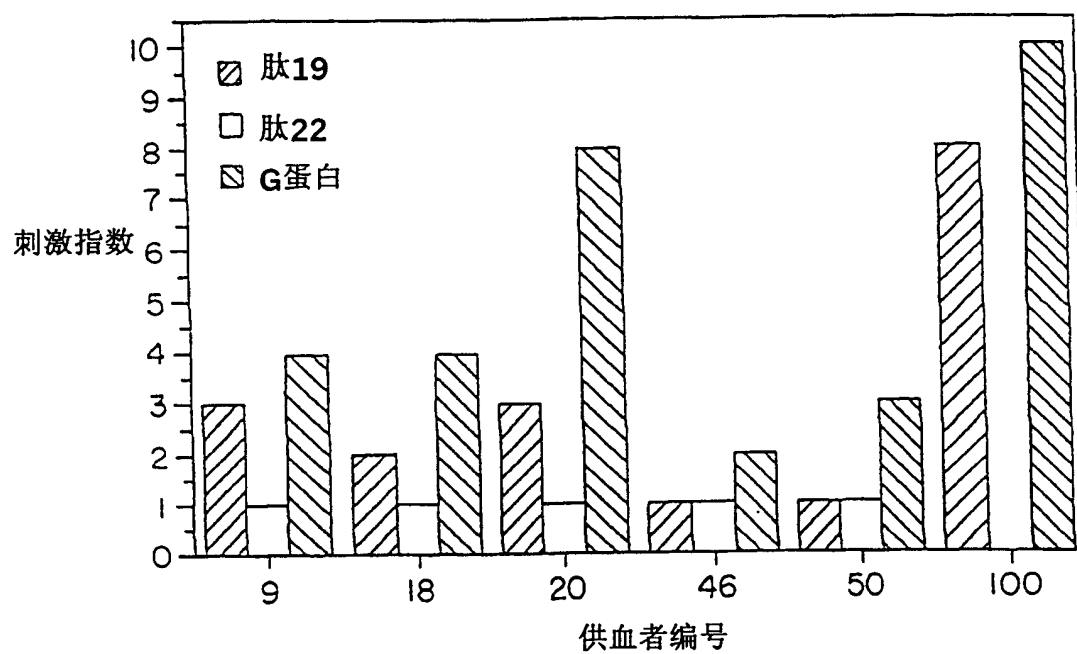


图 7

疫苗	抗体处理	% CD4 ⁺ 细胞	% CD8 ⁺ 细胞	% BAL 嗜酸粒细胞
G/QS21	大鼠Ig	21.2	8.5	67.2 ± 8.5
G/QS21	抗 -CD4	1.5	15.0	8.1 ± 4.7**
G/QS21	抗 -CD8	24.4	2.7	63.8 ± 6.4
肽 19-KLH/QS21	大鼠Ig	19.0	7.7	29.6 ± 13.3
肽 19-KLH/QS21	抗 -CD4	0.3	20.0	0.75 ± 0.6**
肽 19-KLH/QS21	抗 -CD8	27.4	2.8	32.8 ± 10.3
RSV	无	25.8	11.2	0.7 ± 1.0

图 8