



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101506654 B

(45)授权公告日 2016.12.21

(21)申请号 200780030618.0

(72)发明人 王慧茹

(22)申请日 2007.08.17

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101506654 A

代理人 周建秋 王凤桐

(43)申请公布日 2009.08.12

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

G01N 33/53(2006.01)

60/822,916 2006.08.18 US

(56)对比文件

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.02.17

US 2005/0186223 A1,2005.08.25,
JAVARATHA SRINIVASAPPA, et

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2007/018258 2007.08.17

al.Molecular Mimicry: Frequency of
Reactivity of Monoclonal Antiviral
Antibodies with Normal Tissues.《JOURNAL
OF VIROLOGY》.1986,第57卷(第1期),397-401.

(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/021493 EN 2008.02.21

审查员 陈中伟

(73)专利权人 王慧茹
地址 美国伊利诺伊州

权利要求书1页 说明书21页 附图6页

(54)发明名称

一种鉴定分子模拟的方法及由此产生的应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于对存在于人类、动物、或植物中/上的分子模拟或模拟抗原或模拟分子进行简单快速地检测和鉴定的方法。所述分子模拟可与传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症和其它疾病有关。因此,基于这些模拟抗原或模拟分子,能够开发出用于对传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症、和其它疾病进行诊断、预防和治疗的新方法。此外,本发明还揭示了疫苗和被动免疫的新的功能机理,以及基于这种新的机理能够得到的新型疫苗。

1. 一种用于对能与抗病原的抗体相结合的模拟抗原或模拟分子进行鉴定的方法,该方法包括:

a) 选择至少一种能够与引发宿主传染病的传染原进行反应的抗体;

b) 在体外,将对传染原敏感的细胞系、原代细胞、组织或器官与选择的抗体培养一段时间,在这段时间内足以使抗体与存在于细胞或组织或器官中的模拟抗原或模拟分子相结合;

c) 洗掉未与模拟抗原或模拟分子结合的游离抗体;

d) 用传染原感染细胞系、原代细胞、组织或器官;

e) 检测传染原的感染;

f) 当所述模拟抗原或模拟分子为与传染原进入宿主内有关的受体或因子时,细胞系、原代细胞、组织或器官不被传染原所感染或受到较轻的感染;

其中,所述模拟抗原或模拟分子被不同的传染原所共用;或抗不同传染原的抗体在宿主中能结合到相同的模拟抗原或模拟分子上。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述传染原为病毒、细菌、寄生虫、真菌、类病毒或朊病毒。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述抗体为免疫球蛋白分子。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述传染原为流感病毒毒株H1N1;所述抗体为抗流感病毒毒株H1N1的抗体、抗流感病毒毒株H3N1的抗体、抗流感病毒毒株H5N1型的抗体、抗呼吸道合胞体的抗体、抗腺病毒的抗体或抗甲型肝炎病毒的抗体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述传染原为流感病毒毒株H3N1;所述抗体为抗流感病毒毒株H3N1的抗体、抗流感病毒毒株H1N1的抗体或抗流感病毒毒株H5N1的抗体。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述传染原为流感病毒毒株H5N1;所述抗体为抗流感病毒毒株H5N1的抗体、抗流感病毒毒株H1N1的抗体、抗呼吸道合胞病毒的抗体或抗轮状病毒抗体。

一种鉴定分子模拟的方法及由此产生的应用

[0001] 要求的优先权

[0002] 本申请要求于2006年8月18日提交的题目为“用于鉴定致病生物的模拟的或等价的抗原的方法及由此产生的应用”的美国临时专利申请No. 60/822,916的优先权,其全部的说明书及公开的内容引入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物学、医学和流行病学领域;特别地,本文公开的内容涉及一种或多种用于诊断、预防和/或治疗传染病、自身免疫疾病、癌症和/或其它疾病的方法。更确切地说,本发明涉及一种用于鉴定模拟致病生物或传染原的抗原的方法,以及由此产生的应用。

背景技术

[0004] 分子模拟被定义为外来肽和自身肽在序列或结构上的相似性足以导致由病原来源的肽诱导自体反应性T细胞或B细胞的交叉激活的理论上的可能性。因此,发生分子模拟的先决条件是病原与由细胞或组织产生的免疫显性的自身序列能够共用显性决定簇。对于病原通过进化或者通过偶然的获得与显性决定簇相似的氨基酸序列、或者同源三维晶体结构的机理仍不清楚(Wikipedia,the free encyclopedia)。

[0005] 当宿主无法识别自身抗原为“自身的”时,将会发生自身免疫疾病。随着对自身免疫的研究的不断深入,越来越多的人被诊断患有自身免疫疾病,在普通人群中,31个人中大约有1个患有该疾病。然而,由于不清楚导致这些疾病的原因以及发病机理,使得对自身免疫疾病的快速诊断以及有效地预防和治疗受到了很大的限制。近年来,对可能发生自身免疫疾病的多种不同途径的研究取得了很大的进展,其中之一是分子模拟。

[0006] 传染性疾病是人类或动物中具有明显临床症状的疾病。世界卫生组织对全球的死亡所搜集的信息表明:在2002年,由于传染性疾病引起的世界范围内的死亡占总死亡数的高达25.9%,即导致了1470万人死亡。位于前三名的传染性疾病杀手导致了58%的由传染性疾病引起的死亡,这三种传染性疾病主要与传染病有关的病毒相关,例如,下呼吸道感染、艾滋病毒(HIV/AIDS)和腹泻。到目前为止,对病毒性传染病最有效的医疗方法是接种疫苗。其它对病毒性传染病具有显著效果的药物是有限的。病毒通过结合受体或辅助受体(与天然病毒体结合的宿主细胞表面因子)而进入宿主细胞。所述受体和辅助受体是决定病毒向性、宿主活动范围、以及可能的由年龄决定的特性(仅影响婴儿或儿童)的主要因素。所述受体和辅助受体的组织分布部分地决定了传染病的症状。因此,对所述病毒受体和辅助受体准确地认识,将有助于开发新型的抗病毒策略和疫苗策略。由于缺乏简单有效的技术来鉴定和纯化传染原的受体和辅助受体,因此这样的研究在很大程度上仍处于未被研究的状态。分子模拟对这类研究应用可能是一种有效的工具。

[0007] 癌症是一种以一群生长和分裂不遵守正常限度的细胞侵染并破坏邻近的组织,并可能通过称为转移的过程扩散到远距离的解剖位置为特征的疾病。癌症引发的死亡约为总死亡数的13%。实验和流行病学数据暗示:病毒起了致病的作用,并且病毒对于人类癌症的

发展来说是第二重要的因素,只有烟草的使用对人类癌症的发展的危害超过了它。分子模拟在与传染有关的癌症的发病机理中的作用还从来没有被进行过探究过。

[0008] 为了确定病原和自身之间共用了哪种抗原决定簇,使用了蛋白质的大数据库。世界上蛋白质的最大数据库是SWISS-PROT数据库,该数据库报道了随着数据库的扩展,分子模拟也变得越来越普遍。由于不同蛋白质之间的氨基酸的变化,从可能性观点上来看不应该发生分子模拟。虽然两种多肽的氨基酸序列不同,但是两种多肽的三维结构的相似性能够通过T细胞或B细胞克隆而被识别出来。因此,这揭示了这种大数据库的缺点。这种数据库可以给出抗原决定簇之间的关系的提示,但在这种数据库还不能够搜索得到重要的三维结构。

发明内容

[0009] 本发明涉及对能够模拟对传染病具有特异性的致病生物或传染原,且能够在人类、动物、或植物中表达的分子模拟或模拟抗原或模拟分子进行快速鉴定的简单有效的方法。本发明的方法的主要特征在于以下操作:

[0010] 1)确认至少一种能够与引发宿主传染病的致病生物进行反应的抗体;

[0011] 2)在体内或体外,将所确认的单个抗体或多个抗体与人类的、动物的、或植物的细胞、组织、或器官进行结合,或者与细胞的、组织的、或器官的提取物进行结合;

[0012] 3)通过本领域通用的多种方法,对结合在人类的、动物的、或植物的细胞、组织、或器官上的单个抗体或多个抗体的存在及位置,或者结合在所述细胞的、组织的、或器官的提取物上的单个抗体或多个抗体的存在及位置进行检测;

[0013] 4)通过本领域通用的多种方法,在可利用的动物实验中和/或细胞、或组织的培养系中,使用单个抗体或多个抗体对能够结合所述单个抗体或多个抗体的抗原的功能进行检测;

[0014] 5)通过本领域通用的多种方法,使用单个抗体或多个抗体,对能够结合所述单个抗体或多个抗体的抗原进行纯化;

[0015] 6)通过本领域通用的多种方法,对与抗体结合的抗原进行鉴定;

[0016] 7)使用所述抗体,鉴定出的抗原,该鉴定出的抗原的衍生物、类似物、激动剂、拮抗剂、变体、突变体、片段、合成的肽、重组抗原、或任何其它形式对传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症、和其它与所述抗体和/或所述抗原有关的疾病进行诊断、预防和治疗。

[0017] 本发明的主要特征是公开了一种用于对健康的人类、动物或植物中的致病模拟或模拟抗原或模拟分子进行检测、纯化、和鉴定的新型、简便且有效的策略。这些模拟抗原或模拟分子可以为传染原的识别因子的受体、辅助受体、或配体,或者为传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症和其它疾病的主要的致病因子。

[0018] 本发明还涉及开发应用鉴定出的致病的模拟抗原或模拟分子的新方法,这些方法包括对由这些抗原导致的传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症、和其它疾病进行预防、诊断、和治疗的的方法。这些应用的方法包括但不限于:筛选出的抗原和/或它们的衍生物和/或它们的抗体在配制诊断试剂盒中的应用,所述诊断试剂盒可以用于特定的致病原、或者通常用于传染病和/或疾病(包括自身免疫疾病、癌症、肥胖症、和病原学和/或发病机理已知的或未知的其它疾病);筛选出的抗原和/或它们的衍生物和/或它们的抗体在预防和治疗

由所述抗原或抗体所引发的疾病中的应用;以及筛选出的抗原和/或它们的衍生物和/或它们的抗体在流行病学以及发育和进化生物学领域中的应用。

[0019] 因此,本发明的主要目的是提供一种用于快速鉴定模拟致病生物或传染原抗原的抗原的简单有效的方法,以及由此产生的应用。通过下文的详细的描述和随后的权利要求书,本发明的多个其它目的、特征和优点更显而易见。

附图说明

[0020] 图1为抗病毒血清与人胎儿小肠的组织切片的结合的图示;

[0021] 图2为抗病毒抗体或血清与bulb/c新生乳鼠(newborn pup)的小肠和肺部的组织切片的结合的图示;

[0022] 图3为抗病毒抗体与bulb/c新生乳鼠的小肠、肺、肾脏、脾脏、和心脏的组织切片的结合的图示;

[0023] 图4为抗病毒抗体或血清与bulb/c成年小鼠的肝脏和小肠的组织切片的结合的图示;

[0024] 图5为抗病毒抗体或血清与bulb/c成年小鼠的肾脏和脾脏的组织切片的结合的图示;

[0025] 图6为人血清与bulb/c新生乳鼠的肺和小肠的组织切片的结合的图示;

[0026] 图7为抗病毒抗体和人血清与马-达(Madin-Darby)犬肾细胞系(MDCK)的结合的图示;

[0027] 图8为通过抗病毒抗体和人血清来预防MDCK细胞免受甲型流感病毒毒株H1N1的传染的图示;

[0028] 图9为通过抗病毒抗体和人血清来预防MDCK细胞免受甲型流感病毒毒株H3N1的传染的图示;

[0029] 图10为通过抗病毒抗体和人血清来防止灭活的甲型流感病毒毒株H5N1与MDCK细胞进行结合的图示;

[0030] 图11为在感染轮状病毒之前使用抗轮状病毒的抗体处理的乳鼠的体重变化曲线的图示;

[0031] 图12为在感染轮状病毒之前和之后使用抗轮状病毒的抗体处理的乳鼠的小肠的组织学变化的图示;

[0032] 图13为在感染轮状病毒之前和之后使用抗轮状病毒的抗体处理的乳鼠的小肠的组织切片上的轮状病毒抗原VP6的免疫荧光染色的图示。

具体实施方式

[0033] 尽管本发明的公开的内容可以有多种不同方式的实施方式,但下面将对本发明优选的和可供替换的实施方式进行更加详细的描述。然而应当理解的是,本发明的公开的内容应当被认为是示例性地说明本发明的原理,并不是为了限制本发明的精神实质和范围和/或列举的实施方式的权利要求。

[0034] 本发明的各个方面是基于用于对存在于人类、动物、或植物中的分子模拟、或者模拟抗原或模拟分子进行简单快速地鉴定的步骤或方法。所述分子模拟能够与传染病、自身

免疫疾病、癌症、肥胖症、和其它疾病建立联系。因此,可以开发出对由这些模拟抗原或模拟分子导致的传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症、和其它疾病进行诊断、预防、和治疗的新方法。此外,本发明还揭示了疫苗和被动免疫的新的功能机理以及基于这种新机理可以得到的新的疫苗。

[0035] 病原和抗体

[0036] 本发明的一个方面涉及导致疾病的生物和/或涉及生命进化的生物以及作用于这些生物的抗体。此处所用的术语“传染病”是指宿主生物被外来物种有害地定居;“病原”或“传染原”是指广泛定义的微观生物。适合用于该方法中的对传染病特异的病原或传染原包括但不限于:病毒、细菌、寄生虫、真菌、类病毒、朊病毒等等。

[0037] 此处所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即,含有能够特异地结合(免疫反应)抗原的抗原结合位点的分子。所述抗体包括但不限于:多克隆的、单克隆的、嵌合的、单链、F_{ab}的、F_{ab}'的、和F(ab')₂的片段和Fab表达文库。通常,从人体中获得的抗体分子涉及以下各个种类:IgG、IgM、IgA、IgE、和IgD,它们的分子中的重链的性质互不相同。某些类别中还具有子类,例如,IgG子类1(IgG₁)、IgG子类2(IgG₂)、和其它。此外,在人体中,轻链可以为κ链或λ链。此处提及的抗体包括人类抗体种类的所有类别、子类、抗体片段以及类型。在脊椎动物的血液中或其它体液中发现天然产生的抗体。适用于该过程中的抗体可以对各种感兴趣的生物或传染原具有特异性,所述生物或传染原与人类、动物或植物的传染病、自身免疫疾病或肿瘤有关。

[0038] 适合用于此方法中的优选的抗病毒抗体包括但不限于抗以下病毒的任何类型的抗体或抗体片段:双链DNA病毒、单链DNA病毒、双链RNA病毒、正义RNA病毒、反义RNA病毒、RNA逆转录病毒、DNA逆转录病毒、随伴体、丁型肝炎病毒、类病毒;所述双链DNA病毒包括但不限于:腺病毒科、疱疹病毒科、乳多空病毒科、痘病毒科;所述单链DNA病毒包括但不限于:环病毒科(circoviridae)、双生病毒群科、细小病毒科;所述双链RNA病毒包括但不限于:双RNA病毒科、呼肠孤病毒科;所述正义RNA病毒包括但不限于:星状病毒科(astroviridae)、杯状病毒科、冠形病毒科、黄病毒科、微小RNA病毒科、马铃薯Y病毒组科、烟草花叶病毒科;所述反义RNA病毒包括但不限于:丝状病毒科(filoviridae)、副黏液病毒科、肺病毒科、棒状病毒科、沙粒病毒、布尼亚病毒科、正粘液病毒科;所述RNA逆转录病毒包括但不限于:逆转录病毒科;所述DNA逆转录病毒包括但不限于:杆状DNA病毒(badnavirus)、花椰菜花叶病毒科、嗜肝DNA病毒科;所述随伴体包括但不限于:烟草坏死病毒随伴体;所述类病毒包括但不限于:马铃薯纺锤块茎类病毒、和海绵状脑病因子。更特别地,抗病毒的抗体包括但不限于任何类型的抗以下病毒的抗体:呼肠孤病毒、轮状病毒、巨细胞病毒、流感病毒(包括甲型禽流感病毒)、非洲淋巴瘤病毒、嗜肝DNA病毒、艾滋病毒(HIV)、人类T淋巴细胞白血病病毒(HTLV)、乳头瘤病毒、脊髓灰质炎病毒、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞体病毒、航运热病毒、东西方脑脊髓炎病毒、日本乙型脑脊髓炎病毒、俄国春夏季脑脊髓炎病毒、猪瘟病毒、痘病毒、狂犬病病毒、病毒、瘟热病毒、口蹄疫病毒、鼻病毒、新城疫病毒、牛痘病毒、和伪狂犬病毒等。

[0039] 抗体的结合

[0040] 本发明的一个方面涉及抗致病微生物的抗体在体内或体外与人类、动物、或植物的任何类型细胞、组织、或器官、或者这些细胞、组织、或器官的提取物之间的结合。所述抗

体既可以是纯化的,也可以是被标记的,例如生物素、荧光素或本领域已知方法能够检测到的任何其它物质标记的抗体。如果有必要,可以使用第二和第三试剂来检测抗体/抗原的结合。适合用于本方法的抗体在体内与细胞或组织或器官的结合包括但不限于:向人类、动物、或植物给予抗体。某选定的抗体可以通过静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、腔内、经皮肤、吸入的或其它方法进行给药。适用于本发明的结合抗体还可以用于体内成像,其中,例如,将标记有可检测部分的某选定的抗体给予人类或动物,优选进入血流,检测标记的抗体在宿主中的存在和位置。所述抗体可以标记有能够在人体、动物或植物中被核磁共振、放射方法、荧光分析、或者本领域通用的其它检测方法检测得到的任何标记物。

[0041] 优选将上文描述的在体内和体外的抗体的结合与检测的方法结合用于动物体中。例如,可以将某选定的具有标记物的抗体给予动物,所述抗体将在体内与它的模拟抗原相结合,随后处死动物,收集组织或器官样品,并使用本领域的已知检测方法在体外对所结合的抗体进行检测。

[0042] 适用于本方法的抗体-抗原的结合的检测方法包括但不限于:流式细胞计量术、免疫荧光染色法、免疫化学染色法、蛋白质印记、酶联免疫吸附试验(ELISA)、或本领域已知的用于检测抗原/抗体结合的其它普通技术。

[0043] 通过抗病毒的抗体与人胎儿的、新生乳鼠的、成年小鼠的、和细胞系的组织切片的结合,对多种病毒病原与小鼠和人类的组织或器官之间的分子模拟进行检测的例子表示在图1-7中。

[0044] 细胞、组织、器官、和分子模拟

[0045] 根据本发明,与抗体结合的人类、动物、或植物的细胞、组织、或器官的类型可以为:各种类型的体外培养的细胞;它们包括但不限于:本领域已知的各种细胞系和原代细胞;从新鲜组织中得到的各种类型的细胞;新鲜的、冷冻的、或固定的组织或器官的各种类型的组织切片或涂片;组织或器官的匀浆;或细胞、组织、或器官的各种类型的提取物,等等。

[0046] 此处所用的术语“抗原”或“免疫原”是指能够激发免疫应答的分子。现代的定义包括能够被获得性免疫系统所识别的所有物质。抗原通常为蛋白质或多糖。这包括细菌、病毒、和其它微生物的部分(外衣、荚膜、细胞壁、鞭毛、菌毛、和毒素)。

[0047] 此处所用的术语“分子模拟”或“模拟抗原/分子”或“抗原/分子模拟”是指外源多肽和自身多肽在序列或结构的相似性足以导致通过病原来源的肽而诱导自体反应性T细胞或B细胞的交叉反应的理论上的可能性。单抗体或TCR(T细胞受体)甚至能够被在分子模拟理论中强化了结构同源性的重要性的少数决定性残基所激活。因此,产生分子模拟物的前体条件是所述病原与由细胞或组织生成的免疫显性的自身序列或结构之间能够共用显性决定簇。在一些情况下,致病的模拟物能够具有显著地区别于功能性同源物的结构构造的结构构造。可以假设,通过能模拟由趋同进化得到的宿主蛋白的表面(蛋白折叠或三维构象)的分子表面,这些病毒的蛋白质显示了它们的模拟。

[0048] 根据本发明,抗原模拟或分子模拟可以存在于人类、动物或植物的组织或器官的细胞的表面、贯穿所述细胞的膜、或者位于所述细胞的内部或外部,并贯穿于人类、动物或植物的胚胎、胎儿、新生儿、幼年到成年的整个生命周期中或部分生命周期内。人类和动物的组织或器官可以为但不限于:上皮和腺体;结缔组织;肌肉(包括平滑肌、骨骼肌和心肌);

神经组织(包括中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS));软骨、骨骼和关节;细胞外基质;血液和造血细胞组织(hemopoiesis);骨髓;心血管系统(包括心脏、动脉、毛细血管和静脉);呼吸系统(包括肺、支气管(bronchial tree)、肺泡管和吸泡);消化系统(包括口腔、食管、胃、小肠(十二指肠、空肠和回肠)、和大肠(盲肠、结肠、直肠、肛管和阑尾)、唾液腺、胰腺、肝脏、胆管和胆囊);泌尿系统(包括肾脏、输尿管、膀胱和尿道);雌性生殖系统(包括卵巢、输卵管、子宫和阴道);雄性生殖系统(包括睾丸、生殖管、阴茎、精囊、前列腺、尿道球腺);淋巴(免疫)系统(包括淋巴结、胸腺和脾脏);内分泌腺(包括松果体、脑垂体、甲状腺、副甲状腺和肾上腺);外皮(包括皮肤及其附属物、汗腺、皮脂腺、毛发和指甲)。

[0049] 动物实验

[0050] 本发明的另一个目的在于将本发明筛选出的抗体应用到动物实验中以通过本领域通用的各种方法检测能与所述抗体结合的模拟抗原或模拟分子的功能。在病原传染之前,可以使用筛选出的抗传染性病原(例如某病毒毒株)的抗体对动物给药一段时间,在这段时间内足以使抗体在体内与存在于传染性病原的宿主中的模拟抗原或模拟分子在体内相结合。当所述模拟分子为与病原进入宿主内有关的受体或因子时,所述抗体能够封闭模拟抗原或模拟分子并阻止所述病原进入动物的靶细胞。因此,所述动物将不受该病原的感染或受到较轻的感染。还可以使用同样的动物模型,通过使用筛选出的能够抗病原的抗体在传染后对动物进行给药,以确定所筛选的抗体对相关传染病的治疗效果。这种方法可以用于评价分子模拟的体内功能,并对能够预防和治疗传染病的抗体及其它试剂进行体内筛选。在小鼠模型中使用抗轮状病毒的抗体预防和治疗轮状病毒传染病的例子作为本申请例证的一部分(图12-13)。

[0051] 细胞或组织的培养物分析

[0052] 可以使用细胞或组织的培养物分析来确定能与抗病原的抗体相结合的模拟抗原或模拟分子的功能。可以将本领域已知的对传染原敏感的细胞系(也可以将原代细胞、组织或器官(例如,病毒性传染病的靶器官))与选择的抗体培养一段时间,在这段时间内足以使抗体与存在于细胞或组织或器官中的模拟抗原或模拟分子相结合,未与模拟抗原或模拟分子结合的游离抗体应该被洗掉;然后,用传染原(例如病毒毒株)感染所述细胞或组织或器官。可以通过本领域通用的多种方法(例如,病毒毒株滴定度的检测)来检测所述病原的传染。当所述模拟分子为与病原进入宿主内有关的受体或因子时,所述抗体能够封闭所述模拟抗原或模拟分子,并防止所述病原进入或感染细胞、组织或器官。因此,所述细胞或组织或器官将不被病原所感染或受到较轻的感染。使用抗流感的抗体来预防流感病毒传染的例子作为本发明的例证的一部分(图8-10)。

[0053] 模拟抗原的纯化与鉴定

[0054] 在另一种实施方式中,一种能够简单地对功能重要的模拟抗原或模拟分子进行纯化的方法包括使用筛选到的抗病原的抗体,优选为单克隆抗体。这种方法不需要进行在蛋白质纯化领域中筛选感兴趣的抗原时通常需要进行的繁重的工作。根据本发明,上述提到的人类、动物、或植物的细胞、组织和/或器官有关的可得到的血清、匀浆或提取物,可以通过本领域通用的多种方法用于纯化模拟抗原。

[0055] 采用本领域通用的各种方法对模拟抗原、与模拟抗原和模拟抗原的特定抗体之间的结合相关的重要分子、模拟抗原的激动剂和拮抗剂的序列或结构进行的鉴定也包括在本

发明中。

[0056] 本发明的另一个目的在于将本发明的鉴定出的模拟分子和/或它的衍生物用于如上文所述的动物实验中和/或细胞或组织培养系中,以在体内检测所述鉴定出的模拟分子及其衍生物的功能,以及筛选能够预防和治疗相关疾病的模拟抗原的候选衍生物。

[0057] 本发明的模拟抗原或模拟分子可以为蛋白、糖蛋白、聚糖、多肽、多糖、低聚糖、脂质、糖脂、碳水化合物、凝集素、选择蛋白、粘蛋白、血凝素、胶原、角蛋白、受体(包括病毒受体、铎样受体(toll-like receptor))、细胞成分、癌基因产物、哺乳动物细胞(包括肿瘤细胞)的片段、或其它物质。本发明的分子模拟的主要特征是这种模拟抗原或模拟分子可以为病毒传染病关联受体、辅助受体或因子,或可以为自身免疫疾病的靶抗原或肿瘤关联抗原,并且抗这些模拟抗原的抗体可以为自身免疫疾病或癌症的诱导物。

[0058] 分子模拟的候选物为聚糖和聚糖的识别系统,所述聚糖与生命的起源和进化密切相关。术语聚糖是指多糖或低聚糖。聚糖还可以指糖缀合物(例如,糖蛋白、糖脂、或蛋白聚糖)的碳水化合物部分。聚糖通常由单糖只通过O-糖苷键连接而构成。通常在真核糖蛋白中发现的单糖包括葡萄糖、N-乙酰氨基葡萄糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、甘露糖、海藻糖、木糖和N-乙酰神经氨酸(还称作唾液酸)。发现聚糖能够与蛋白质相连接,成为糖蛋白和蛋白聚糖。它们通常能够在细胞的外表面被发现。O-和N-连接的聚糖在真核生物中非常普遍,并且也能在原核生物中找到,但不怎么常见。

[0059] 聚糖的识别系统包括但不限于:凝集素、包括碳水化合物识别结构域(CRD)的酶、抗聚糖的抗体、细胞因子、伴侣蛋白和转运蛋白。凝集素在自然界中无所不在。已知凝集素在免疫系统中通过识别仅存在于病原中的或者无法进入到宿主细胞中的碳水化合物而起到重要的作用。来自病毒、细菌和原生动物的致病凝集素通过它们的唾液酸识别活性参与感染。一种最佳的研究实例为流行性感冒的血凝素,在传染过程中病毒经此血凝素利用位于宿主细胞表面的唾液酸。

[0060] 唾液酸是作为九碳单糖的神经氨酸的N-或O-取代的衍生物的通用术语。它还是N-乙酰神经氨酸组(Neu5Ac或NANA)大多数成员的通用名称。唾液酸广泛地分布在动物组织和细菌中,特别是在糖蛋白和神经节糖苷脂中。氨基带有乙酰基或羟乙酰基。羟基取代物可以大范围地改变:乙酰基、乳酰基、甲基、硫酸基和磷酸基都曾被发现。富含唾液酸的糖蛋白能够结合人类和其它生物中的选择蛋白(C-型凝集素)。

[0061] 动物聚糖识别蛋白主要可以分成两类:凝集素(其典型地含有进化保守的碳水化合物识别结构域[CRD])和硫酸化的糖胺聚糖(SGAG)-结合蛋白。在生长和发育过程中,结构复杂的GAG的生物合成受到了调节,并且其不同的硫酸化形式以器官特异性和组织特异性暂时地形成。除了抗体和T-细胞受体以外的能够通过类似免疫球蛋白(Ig)的结构域而介导聚糖识别的蛋白质被称作“1-型凝集素”。具有唾液酸(Sia)-结合特性和典型的氨基末端结构特征的1-型凝集素的主要的同源性亚家族被成为“Siglecs”(Sia-识别免疫球蛋白超基因家族凝集素)。

[0062] 粘蛋白可以为含有糖蛋白的唾液酸。粘蛋白分泌在呼吸道和消化道的粘液中。粘蛋白基因编码粘蛋白单体,该粘蛋白单体被整合成杆状的核心蛋白核,该核心蛋白核通过大量的糖基化作用而进行了转录后修饰。在天然的粘蛋白中发现了两种明显不同的区域:1)氨基末端区域和羧基末端区域被轻度糖基化但富含半胱氨酸,半胱氨酸可能参与粘蛋白

单体内部和粘蛋白单体之间的二硫键的建立;2)形成了10-80个残基序列的多重串联重复的大中心区域,在所述的残基序列中,最高到半数的氨基酸为丝氨酸或苏氨酸。这个区域通过数百个O-连接的低聚糖而变得饱和。N-连接的低聚糖也可以在粘蛋白中找到,但数量很少。通过cDNA克隆已经分离出至少19个人类粘蛋白基因--MUC1、2、3A、3B、4、5AC、5B、6-9、11-13、和15-19。主要分泌的气道粘蛋白为MUC5AC和MUC5B,而MUC2主要在肠道中分泌但在气道中也有分泌。增加的粘蛋白产物发生在多种腺癌中,包括胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等等。粘蛋白还可以在肺部疾病中过表达,例如,哮喘、支气管炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、或囊肿性纤维化病。

[0063] 分子模拟的应用

[0064] 本发明的分子模拟具有多种应用。所有的这些应用均适用于人类、动物和植物。

[0065] 分子模拟和传染病

[0066] 一种应用是作为理解传染病的病因学、发病机理、治疗和预防的有用工具。抗原模拟或分子模拟的位置是确定传染原的趋向性、限制在不同的物种之间的宿主范围以及在相同物种中的器官或组织的范围的主要决定因素。例如,抗-RSV的抗体结合到新生乳鼠的肺部表达的模拟抗原上,而不是结合到新生乳鼠的小肠表面表达的模拟抗原上;抗轮状病毒多克隆抗体结合到新生乳鼠的小肠表面表达的模拟抗原上,而不是结合于到新生乳鼠的肺部表达的模拟抗原上(图2),形成RSV和轮状病毒传染病的器官趋向性(分别为小肠或肺部)。

[0067] 在生长发育过程中,模拟抗原或模拟分子可以暂时地形成多种不同的表达方式。模拟抗原或模拟分子在胚胎期和胎儿期大量地表达存在,而随着生长发育或在整个生命周期中,模拟抗原或模拟分子的表达量减少。这可以解释一些仅感染婴儿和儿童的传染病的年龄依赖性属性。例如,抗轮状病毒的抗体和抗RSV的抗体均结合到新生乳鼠的肺部和小肠,而不是成年小鼠的肺部和小肠(图2和图4),构成了轮状病毒和RSV的传染病的年龄属性(仅感染婴儿和儿童)。相反,抗甲型流感病毒的抗体结合到新生乳鼠和成年小鼠的肺部和小肠(图2和图4),符合流感病毒靶向某一生物物种的所有年龄段的事实(例如,小鼠或人类)。

[0068] 或者,模拟抗原或模拟分子的特异类型能够以器官特异性和组织特异性形成。例如,抗轮状病毒的抗体结合到新生乳鼠的小肠,而不是新生乳鼠的肺部(器官特异性,图2);高度岩藻糖化的聚糖在小肠中被特殊地发现,而携带有核2聚糖的硫代Le^x的决定因子则主要在远端结肠中表达(Robbe et al., Biochem. J. (2004) 384, 307-316)(组织特异性)。这种质的差别可与轮状病毒传染病的传染特性有关。

[0069] 分子模拟的其它表达形式在本申请的例证部分有描述。

[0070] 重要的是,对传染病的新的器官趋向性的理解在治疗上可以用于疫苗的开发以及能够控制抗病毒应答反应的治疗。例如,抗HIV的抗体与乳鼠和成年鼠的小肠的较强的结合(图2和图4)揭示了HIV的新的器官趋向性,该趋向性可与HIV的新的病毒贮存场所和/或与HIV感染的新的致病机理有关。因此,基于上述公开内容,可以开发用于预防、诊断和治疗HIV的新的治疗方法。类似地,检测到了抗HAV的抗体和抗HBV的抗体在人胎儿小肠上的结合(图1)。这种简单快速的检测分子模拟的器官趋向性的方法能够扩展到用于鉴定其它传染性病原的新的器官趋向性。

[0071] 分子模拟和自身免疫疾病

[0072] 另一种应用是作为理解自身免疫疾病的病因学、发病机理、治疗和预防的有用工具。当免疫系统错误地将正常的组织视为外来组织并对其进行攻击时,会发生自身免疫疾病。近来在十九世纪七十年代,分子模拟被特定为一种病原能够产生自身免疫反应的机理。线性氨基酸序列或者优势表位的合适构象可以被病原和宿主所共用。这还被称作宿主的自身抗原与病原的显性决定簇之间的“交叉反应性”。然后,产生抗所述抗原决定簇的免疫应答。由于病原与宿主之间的抗原决定簇中的相似的序列同源性,作为自身免疫反应的结果是宿主中与所述蛋白有关联的细胞和组织受到了破坏。在自身免疫破坏中,最普遍的免疫参与物之一是自身抗体。

[0073] 已发现HIV-1病毒在人体内通过分子模拟机理引发中枢神经系统疾病。感染中产生的抗HIV-1的gp41蛋白的抗体,能够作为自身抗体,与人体的中枢神经系统组织中的星形胶质细胞(astrocytes)发生交叉反应(Yamada et al., J. Virol. (1991), 65:1370-1376)。重症肌无力是另一种常见的自身免疫疾病。自身抗原决定簇(受体的 α -亚单位)与产生的抗单纯疱疹病毒(HSV)的抗体之间的交叉反应提示了该病毒与重症肌无力的发生有关(Oleszak et al., Clin. Microbiol. Rev. (2004), 17:174-207)。然而,在人类的多种自身免疫疾病的情况中,没有令人信服的证据表明实验室的研究中被鉴定的抗原的交叉反应是致病的重要因素(Mackay et al., New. Engl. J. Med. (2001), 345, 340-350)。根据本发明,所有被鉴定的抗原的交叉反应均是重要的致病因素,因为所有的抗体均属于每种相关病原的中和抗体。

[0074] 根据本发明,模拟抗原或模拟分子能够集中地存在于生物有机体的正常组织上和/或之中;并且在感染或接种过程中或之后,能够作为诱导的抗致病原抗体的标靶。这能够导致多种类型的自身免疫疾病,包括但不限于:川崎病(Kawasaki disease)、胆道闭锁、原发性胆汁性肝硬化、系统性红斑狼疮、原发性干燥综合症(Sjogren's syndrome)、类风湿性关节炎、青少年型糖尿病、何杰金(氏)和非何杰金(氏)淋巴瘤(Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma)、恶性黑色素瘤、冷球蛋白血症(cryoglobulinaemia)、乙型肝炎病毒传染病、丙型肝炎病毒传染病、韦格纳(氏)肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、炎症性肠病(inflammatory bowel disease)、多发性肌炎、皮炎、多发性内分泌系统衰竭、施密特(氏)综合症(Schmidt's)、葡萄膜炎(autoimmune uveitis)、阿狄森(氏)综合症(Addison's)、肾上腺炎、格雷夫斯(氏)病(Graves' disease)、甲状腺炎、桥本(氏)甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、自身免疫性甲状腺病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、类狼疮肝炎、动脉粥样硬化、早衰性痴呆、脱髓鞘病、多发性硬化症、亚急性皮肤红斑、甲状旁腺功能减退症(hypoparathyroidism)、德雷斯勒(氏)综合症(Dressler's syndrome)、重症肌无力症、自身免疫性血小板增多症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、自身免疫性溶血性贫血、疱疹性皮炎、斑秃、自身免疫性膀胱炎、类天疱疮、硬皮病(scleroderma)、进行性全身性硬化症、CREST综合症(钙质沉着病、雷诺氏食道运动功能障碍(Raynaud's esophageal dysmotility)、指端硬化和毛细血管扩张)、成年型糖尿病(11型糖尿病)、雄性或雌性自身免疫性不育、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、科洛恩病(Crohn's disease)、混合型结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、青少年型类风湿性关节炎、肾小球肾炎、特应性皮炎(Atopic Dermatitis)、特应性鼻炎(atopic rhinitis)、肺出血-肾炎综合征

(Goodpastures syndrome)、查格斯病(Chagas' disease)、结节病(sarcoidosis)、风湿热、哮喘、习惯性流产、抗磷脂综合症、农民肺(farmer's lung)、多形性红斑、寻常天疱疮、天疱疮、大疱性类天疱疮、心脏切开术后综合症、库兴(氏)综合症(Cushing's syndrome)、自身免疫性慢性活动性肝炎、鸟商肺(bird-fancier's lung)、哮喘、过敏性疾病、过敏性脑脊髓炎、毒性坏死性皮炎(toxic necrodermal lysis)、秃顶、阿尔波特(氏)综合症(Alport's syndrome)、肺泡炎、过敏性肺泡炎、纤维化肺泡炎、间质性肺病(interstitial lung disease)、结节性红斑、坏疽性脓皮症、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、锥虫病、慢性疲乏综合症、纤维肌痛(fibromyalgia)、高安(氏)动脉炎(Takayasu's arteritis)、风湿性多肌病、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter's综合症(还称作三体炎(triaditis)、鼻息肉、嗜曙红细胞过多和哮喘)、贝切特(氏)病(Behcet's disease)、卡普兰(氏)综合症(Caplan's syndrome)、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心肌炎、心内膜心肌纤维化症、眼内炎、红斑、持久隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、牛皮癣、胎儿溶血症、嗜曙红性筋膜炎、shulman's综合症(shulman's syndrome)、费耳提(氏)综合症(Felty's syndrome)、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、Fuch's睫状体炎、IgA肾病、过敏性紫癜(Schonlein-Henoch purpura)、肾小球肾炎、移植物抗宿主病、移植排斥、心肌病、阿耳茨海默(氏)病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合症、先天性风疹感染、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、复发性多发软骨炎、Waldenstrom's巨球蛋白血症、流行性腮腺炎病毒感染、血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura)、和任何其它疾病,在所述的任何其它疾病中,宿主被免疫球蛋白、B细胞表面受体(表面免疫球蛋白)或T细胞受体特异性地识别被怀疑或认为在临床疾病的发病机理的各个方面是至关重要的。

[0075] 因此,在感染过程中诱导的抗体可为自身免疫疾病的病因。在感染的过程中诱导的抗体在急性感染期2-3周时通常达到峰值(pick level),当传染性病原被清除以后,由于抗体攻击宿主中的模拟抗原而引发了自身免疫性疾病。所述模拟抗原的组织或器官趋向性有助于筛选引发自身免疫疾病的候选病原。例如,抗腺病毒、EBV和CMV的抗体结合在诸如肺、肾脏、脾脏、和小肠的多个器官上(如图2-6所示);它们可能与狼疮、糖尿病、或者肾病和心脏病有关,例如但不限于:溶血性尿毒综合症和肾炎综合症。另一个例子是抗腺病毒的抗体结合在多个器官的小血管上(如图2-6所示),因此,怀疑其与血管炎症疾病有关,例如但不限于川崎病。因此,对抗病原和宿主的模拟抗原的这些抗体的检测,对确定自身免疫疾病的病因以及对其进行诊断是一种有力的工具。

[0076] 分子模拟和癌症、肥胖症、和其它疾病

[0077] 另一个应用是作为理解癌症、肥胖症、和其它疾病的病原学、发病机理、治疗、和预防的一种有用工具。在生物学中,信号传导是指细胞将从一种形式的信号或刺激转化成另一种形式的任何过程,多数信号传导通常包括细胞内部有序的生物化学反应,这些生物化学反应在酶的催化下进行,并且通过第二信使连接导致了被认为是“第二信使途径”。很多疾病过程(例如,糖尿病、心脏病、自身免疫疾病、癌症和肥胖症)都由于信号传导途径中的缺陷导致的。细胞表面受体为整合的跨膜蛋白,并且能够识别大多数的胞外信号分子。配体在细胞表面受体上的结合,激发了具有能够激发不同的细胞内应答的不同类型的受体的细胞内的一系列事件。在真核细胞中,被配体/受体的相互作用所激活的大多数的细胞内蛋白

具有酶活性。多数的被酶活化,作为信号传递机理的一部分。本发明的受体的具体例子包括但不限于:G-蛋白偶联受体(例如,趋化因子受体)、受体酪氨酸激酶(例如,生长因子受体)、整合素和铯样受体、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族、v RET受体家族、血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族。受体酪氨酸激酶(RTK)不仅是正常细胞过程的主要调节因子,还在多种癌症的发生和进展中起到重要的作用(Roskoski et al., (2004), Biochem.Biophys.Res.Commun.319:1-11)。在多种其它疾病中的疾病(例如,糖尿病和某些形式的垂体癌)都在一定程度上起源于G蛋白的机能障碍(Wikipedia,the free encyclopedia)。传染性疾病和肿瘤生长的发病机理与铯样受体(TLR)信号途径紧密相关(Wikipedia,the free encyclopedia)。这些受体能够充当模拟抗原,并且能够被在感染中诱导的抗体所激发。一些抗体能够诱发信号传导途径中的缺陷,从而导致多种癌症、肥胖症和其它疾病的发生和进展。

[0078] 上文所描述的细胞或组织培养系和动物、或者如作为本申请例证中的一部分所描述的源自癌细胞或癌组织的细胞系,可用于筛选及鉴定可以诱发信号传导途径缺陷的候选抗体。

[0079] 疫苗接种和被动免疫的机理及新型疫苗

[0080] 另一种应用是作为理解疫苗接种和被动免疫的机理以及开发新型疫苗的有力工具。疫苗是用于建立对疾病免疫的抗原制剂。免疫系统将疫苗试剂视为外来物,消灭它们且“记住”它们。当碰到与疫苗对应的病原时,免疫系统以下述方式准备应答:(1)在其进入细胞之前,中和靶病原;(2)在靶病原大量繁殖之前,识别和消灭受感染的细胞。疫苗的这两种功能机理都是靶向疫苗病原或者传染原的。被动免疫是活性体液免疫性以现成的抗体形式从一个个体向另一个个体的转移。当存在传染病的高度危险性并且没有充分的时间使机体引发出其自身的免疫应答时,或者为了减轻正患有的疾病或免疫抑制疾病的症状,可以使用被动免疫。被动免疫或免疫球蛋白疗法的功能机理目前解释为与疫苗的机理相同。然而,大多数的分子(包括抗体)在循环中仅仅维持较短的时间,因为它们会被血管内皮细胞捕获,并被称作代谢作用的过程有效地消灭。因此,疫苗或被动免疫的功能主要基于循环中的游离抗体是不可能的。

[0081] 能够极大地延缓IgG代谢作用的IgG分子受体的存在,在先前已经被提出过。在美国专利No.6,992,234中直接证明了内皮受体FcRn对IgG破坏的保护效果。有假设抗体受体以如下所述的方式行使其功能:在IgG受到破坏之前,与大多数的IgG分子相结合,然后将所结合抗体再循环至血流中,从而增加IgG的半衰期。根据本发明,模拟抗原或模拟分子可以充当在疫苗接种或被动免疫中诱导的抗体的受体。这种抗体与模拟抗原的结合不仅防止了病原进入靶细胞,还保护了抗体免受快速的降解,并且随后将抗体再循环至血流中,从而增加了抗体的半衰期。这种机理可以是疫苗接种和被动免疫的主要功能机理。

[0082] 通常具有许多表型的给定传染原使得疫苗的制备很困难,特别是对具有大量不同株的病原。令人惊喜的是,传染原的一个或多个代表型能够结合到存在于细胞表面上的少数几种受体。仅有少数受体的存在提供了成功征服传染病的乐观可能。因为受体通常是高度特异性的,因此,有可能通过适当的物质实现对受体有控的影响,例如,阻断受体。如果使用能够阻断受体的物质,则能够预防对该受体特异性的病毒向细胞内渗透。用于预防传染病的该种物质,也可以用于治疗扩散性感染。本发明的大多数的模拟抗原或模拟分子可为

传染性病原的受体和/或配体。例如,糖蛋白可以为病毒的受体,蛋白质上的唾液酸充当病原凝集素的配体(该凝集素识别蛋白质上的唾液酸)。因此,通过注重于某一病原的所有株所共用的几种受体或配体,而无需考虑该病原复杂的多种株或表型,疫苗制备可以被显著地简化。

[0083] 例如,唾液酸疫苗或血凝素(hemagglutinin)疫苗能防止以血凝素作为外膜蛋白的病毒的感染。由这种疫苗诱导出的抗体能够与病原和宿主的受体进行反应,这与在美国专利No.5,712,245和No.5,929,220中描述的基于受体的抗病毒感染是不同的(抗体只与宿主反应)。这种“受体疫苗”和/或“配体疫苗”能够利用病原进行开发,从而避免了对宿主受体进行鉴定和纯化的困难,并且克服了由于病原的多个株或表型尤其是具有大量不同株的病原而导致的疫苗开发的困难。

[0084] 值得注意的是,本发明第一时间公开了不同的病原能够共用相同的或不同的受体。如图8所示,流感病毒毒株H1N1对MDCK细胞的感染被以下抗体所抑制:抗毒株H1N1的抗体、抗毒株H3N1的抗体和抗毒株H5N1型的抗体;抗RSV、腺病毒和HAV的不同病原的抗体。图9显示了流感病毒毒株H3N1对MDCK细胞的感染被以下抗体所抑制:抗毒株H3N1的抗体、抗毒株H1N1的抗体和抗毒株H5N1的抗体;图10显示了灭活的H5N1与MDCK细胞的结合被以下抗体所抑制:抗毒株H5N1的抗体、抗毒株H1N1的抗体、抗RSV和轮状病毒的不同病原的抗体。基于本发明,抗病原A的疫苗不仅具有抗A传染病的保护功能还具有抗由病原B、C、D等等引发的传染病的保护性能。这种“多病原疫苗”进一步简化了疫苗的制备方法,并显著地降低了预防传染病的成本。

[0085] 根据本发明,用于受体疫苗和/或配体疫苗和/或病原通用疫苗的候选免疫原包括但不限于:传染原的外膜蛋白;含有血凝素的病毒粘附蛋白;神经氨酸酶;G蛋白;M蛋白;源自病毒、细菌和原生动物的致病凝集素;聚糖;唾液酸;含有唾液酸的糖缀合物、糖蛋白;多肽;多糖;低聚糖;糖脂;碳水化合物;凝集素(包括R-型、M-型、P-型、L-型、C-型和I-型凝集素);钙联接蛋白;半乳凝素;粘蛋白;血凝素;角蛋白;位于酶中的碳水化合物识别结构域(CRD)。

[0086] 传统的疫苗接种目的在于激发高水平的抗疫苗的抗体。由于在接种过程中和/或接种后,诱发出的抗体能够引发自身免疫疾病,甚至癌症,因此疫苗接种的目的应该修正为产生有效的阻断效果而不产生过量的游离抗体。优选通过其天然传染途径对某生物接种疫苗。例如,通过口服和吸入的方式来接种流感疫苗,优选通过口服的方式来接种轮状病毒疫苗。

[0087] 基于分子模拟的预防和治疗

[0088] 本发明还扩展到用于开发对被鉴定的抗原引发的相关疾病进行预防、诊断和治疗的新方法的策略。所有的这些方法均适用于人类、动物和植物。

[0089] 此处所用的术语“预防”是指能够降低疾病的发病率和死亡率的任何活性。这发生在第一级、第二级、和第三级的预防水平。第一级预防避免了疾病的发生。第二级预防行为的目的在于早期的疾病检查,从而增加阻止疾病进展和产生症状的干预机会。第三级预防通过恢复功能以及减轻疾病相关的并发症,来降低已经发病带来的负面作用。

[0090] 此处所用的术语“治疗”是指用于获得有益的或期望的临床结果的方法。对于本发明的目的,所述有益的或期望的临床效果包括但不限于:症状的减轻、疾病程度的减轻、

疾病状态的稳定(例如,未恶化)、避免疾病的扩散(即,转移)、疾病进程的停滞或延缓、疾病状态的改善或减轻、以及可检测到的或不可检测到的好转(部分的或全部的)。“治疗”还可以指与未接受治疗相比生命的延长。

[0091] 本发明的一个目的在于使用抗病原以及存在于人类、动物或植物中的模拟抗原或模拟分子的抗体,来预防(抗体预防)和治疗(抗体治疗)相关的传染病。本发明的抗体预防和抗体治疗在相关传染病的爆发期对于控制世界性传染病来说是一种有效简单且快捷的工具。根据本发明,某一模拟抗原或模拟分子可充当传染原的受体,在该传染病的爆发期,可以使用已存在的抗该病原的抗体、或者诱导产生的抗该病原或其模拟抗原的抗体对某生物体进行给药,优选对人和/或动物进行给药。所述抗体将结合到存在于该生物中或生物上的模拟抗原或模拟分子上,从而阻断受体并防止病原向表达该抗原的细胞内侵入。这种能够预防传染病的相同的物质,如在传染病的早期给向该生物,还能够被用于相同传染病的治疗。使用抗轮状病毒的抗体来预防和治疗轮转病毒传染病的例子如图11-13所示。

[0092] 本发明中的抗体预防和抗体治疗并不限于使用单种的抗体,也可以结合使用抗某种传染原的多种抗体(例如,抗-A.1+抗-A.2)、或者抗不同种传染原的不同种抗体(例如,抗-B和/或抗-C),来预防和治疗该传染病(A传染病)。使用抗轮状病毒的两种抗体的结合来治疗轮状病毒感染的一个例子如图11-13所示。另一个例子显示:在细胞系(MDCK)培养系中,流感病毒H3N1的感染被抗多种流感病毒毒株H1N1、H3N1和H5N1的抗体所阻止(图9)。另一个例子显示:在相同的细胞系(MDCK)培养系中,流感病毒H1N1的感染不仅被抗流感病毒毒株H1N1和H3N1的抗体所阻止,还被抗其它病毒例如RSV、HAV和腺病毒的抗体所阻止(图8)。另一个例子显示,在相同的细胞系(MDCK)培养系中,灭活的流感病毒H5N1的结合不仅被抗流感病毒毒株H1N1和H5N1的抗体所阻止,还被抗其它病毒例如RSV和轮状病毒的抗体所阻止(图10)。以上说明的抗体预防和抗体治疗在世界性传染病(如但不限制于禽流感)的控制中是一种高效简单且快速的工具。

[0093] 人工诱导的被动免疫已经在治疗传染性疾病(例如,白喉、破伤风、肉毒杆菌中毒、甲型肝炎、乙型肝炎、天花、麻疹、狂犬病、牛痘)中应用了一百多年。免疫球蛋白治疗已经应用于严重的呼吸疾病、单纯疱疹病毒(HSV)的感染、水痘带状疱疹病毒、非洲淋巴瘤病毒(EBV)和巨细胞病毒(CMV)的预防和治疗中。在1918年“西班牙流行性感冒”大流行期间,从痊愈的患者体内输出的人血制品将传染病的死亡减少了50%。在1995年埃博拉病毒在刚果爆发期间,使用了从痊愈的患者体内得到的含有抗埃博拉病毒的抗体的全血,来治疗8位患者。相对于典型的80%的埃博拉病的死亡率,仅有1/8的患者死亡。近年来,基于被动免疫的抗体治疗已经应用于小鼠中,用于预防和治疗包括H5N1型流感在内的流行性感冒。在本发明的临时申请提交日以后,还报道了两篇这方面的研究(Hanson et al., Respiratory Research(2006), 7:126; Simmons et al., PLoS.Med.(2007), 4(5):e178)。所有的这些治疗均是基于被动免疫的机理,该机理的目的是对传染原进行中和。

[0094] 根据本发明,抗传染原或者模拟抗原或模拟分子的抗体在传染病的抗体预防或抗体治疗中的应用是基于对存在于宿主中的模拟抗原或模拟分子进行靶向和阻断的机理,所述模拟抗原或模拟分子与传染原的侵入有关(受体、辅助受体或配位体)。这种机理不同于上文中已经说明的现有的疫苗和被动免疫的传统机理。

[0095] 本发明的另一个目的在于使用与由致病的传染病引发的自身免疫疾病有关的致

病性模拟抗原的抗体预防自身免疫疾病。例如,由某传染病引发的自身免疫疾病能够通过给予低剂量的抗该传染病的病原的抗体来阻断所述模拟抗原来进行预防。为实现此目的,使用抗体的剂量范围位于能够产生阻断效力但无过量的游离抗体的范围内。根据本发明,使用特异的、低剂量的抗体预防自身免疫疾病与使用非特异的且高剂量的免疫球蛋白治疗自身免疫性疾病是不同的,后者的目的在于稀释自身抗体的浓度或干扰自身抗体的特异性结合。

[0096] 此处所用术语“衍生物”是指至少在理论上能够由前体化合物形成的化合物;“类似物”或“相似体”是指在结构上与另一种物质相似的物质;“激动剂”是指在细胞内能够与特异性的受体相结合并且能够激发应答的物质。它模拟了能够结合到相同受体上的内源性配体的作用。“部分激动剂”是能够激活受体,但仅产生了完全激动剂的部分生理应答。它们还可以被看作是具有激动作用和拮抗作用的配体。一种共激动剂与其它共激动剂共同工作,以产生所期望的效果。“拮抗剂”阻断了受体被激动剂的激活作用。通过内源的(例如,激素和神经递质)或外源的(例如药物)激动剂和拮抗剂,所述受体能够被激活或灭活,从而导致激发或抑制细胞。能够拓宽传统的药理学定义的新发现,证明了所述配位体能够根据效应物途径对于相同的受体同时充当激动剂和拮抗剂。

[0097] 本发明的另一个目的在于使用存在于人类、动物或植物中的致病性模拟抗原的衍生物、类似物、激动剂或拮抗剂、变体、突变体、或片段,以预防和治疗相关疾病(例如,传染病、自身免疫疾病、癌症、肥胖症和其它疾病)。例如,作为病毒感染的受体的模拟抗原,在相关传染病的爆发期,可以使用所述抗原的类似物或激动剂对生物进行给药,优选对人和/或动物进行给药。激动剂或拮抗剂将结合到位于生物体内/生物体上或者病毒上的模拟抗原上,从而阻断了病毒向表达有抗原的细胞内的侵入。能够以这种方式预防传染病的相同的物质还能够被用于对相同的传染病进行治疗。相似地,模拟抗原的拮抗剂能够通过阻断受体免受激活而用于预防和治疗自身免疫疾病和癌症。为了实现该目的,给药的剂量在能够产生阻断效力但不过量的范围内。给药剂量通常很低。

[0098] 模拟抗原或模拟分子的衍生物、类似物、激动剂或拮抗剂、变体、突变体、或片段的候选物包括但不限于:含有甘露糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺的聚糖,唾液酸,植物凝集素(包括甘露糖特异的、半乳糖特异的、N-乙酰半乳糖胺特异的、和N-乙酰葡萄糖胺特异的植物凝集素),糖蛋白,多肽,多糖,低聚糖,糖脂,碳水化合物,凝集素(包括R-型、M-型、P-型、L-型、C-型和I-型凝集素),钙联接蛋白,半乳凝素,粘蛋白,血凝素、位于酶中的碳水化合物的识别结构域(CRD)。模拟抗原的衍生物例如组织提取物、合成肽、重组抗原、或其它形式的抗原,还能够用于对相关疾病进行治疗。

[0099] 本发明的另一个目的在于使用与生物共用模拟抗原的致病原的灭活颗粒或片段或提取物来预防或治疗相关传染病。例如,在相关感染期间,可以使用与病毒进入宿主相关的宿主模拟抗原共用模拟抗原的病毒的灭活颗粒或片段或提取物对宿主进行给药。所述病毒的灭活颗粒或片段或提取物将结合在宿主中或宿主上的模拟抗原,并阻断和/或竞争受体,并且防止了所述病毒向表达有所述抗原的细胞内的侵入。为此目的,利用传染原的灭活颗粒或片段或提取物的剂量位于能够产生饱和效力而不引发免疫反应的范围内。本发明的传染原的灭活颗粒或片段或提取物在治疗中的应用,与目的在于激发免疫应答的使用灭活病毒作为疫苗的传统接种有所不同。

[0100] 本发明的另一个目的在于使用能够引发自身免疫疾病、癌症、肥胖症、或其它疾病的病原的灭活颗粒或片段或提取物治疗相关疾病。例如,可以对患有自身免疫疾病的生物给予低剂量的与自身免疫疾病有关的灭活病原的颗粒或片段或提取物或与自身免疫疾病相关的模拟抗原。所述灭活病原的颗粒或片段或提取物或模拟抗原将中和该生物体内抗该模拟抗原的自身抗体,并阻断和/或减少自身抗体对表达该模拟抗原的细胞的攻击。模拟抗原的衍生物(例如组织提取物、合成肽、重组蛋白、或其它形式的抗原)还能够被用于治疗相关的自身免疫疾病。为了实现这个目的,灭活的病原、病原的提取物、或模拟抗原的衍生物的使用剂量位于能够产生中和效力而不引发免疫的范围内。本发明的使用灭活病原、病原提取物、或模拟抗原的衍生物进行的治疗,与目的在于激发免疫应答的使用高剂量的灭活病原的传统接种不同。

[0101] 本发明的另一个目的在于使用致病性模拟抗原和/或模拟抗原的抗体(能够引发自身免疫疾病)诊断自身免疫疾病、癌症、和其它相关疾病。可以通过本领域通用的多种方法,来制备含有通过本发明的方法得到的病原或模拟抗原、和/或抗所述病原或模拟抗原的抗体的试剂盒。这种试剂盒用于检测生物样品中是否存在抗所述抗原的抗体。

[0102] 根据本发明,可以根据本领域通用的多种方法(例如,通过药学可接受的载体的混合物),来配制含有以下组分的药学上可用的组合物:模拟抗原和/或它们的抗体,所述抗原的同系物或类似物或拮抗剂,所述抗原的有效衍生物,合成肽,重组蛋白,或者本发明其它形式的抗原。这种组合物含有有效量的抗原、或其它形式的抗原、和/或它们的抗体,以形成适合于有效给药的、药学上可接受的组合物。

[0103] 所述模拟抗原或模拟分子、和/或它们的抗体、所述抗原的类似物或拮抗剂、所述抗原的有效衍生物、合成肽、重组抗原、或本发明的其它形式的抗原的给药剂量是根据多种因素来选择的,所述因素包括抗原的定位和密度,患者的类型、种类、年龄、体重、性别、和疾病状况,待治疗的疾病的严重程度,给药途径,患者的肾脏和肝脏的功能,以及所使用的具体物质。为了使本发明的所述物质的浓度尽可能地精确到能够产生效力但不具有毒性的范围内,需要基于所使用的物质能够到达目标位点的动力学的方案。这包括对本发明所用的物质的分布、平衡、和排泄方面的考虑。

[0104] 本发明还包括提供一种用于预防和治疗的新方法的合适的用于局部的、口腔系统的和胃肠道外的药物配方。含有以下物质作为活性组分的组合物能够以常规载体中的宽范围内的治疗剂量进行给药:模拟抗原和/或它们的抗体、所述抗原的类似物或拮抗剂、所述抗原的有效衍生物、合成肽、重组蛋白、或所述抗原的其它形式。例如,所述抗原和/或它们的抗体能够以口服剂的形式或者注射的方式进行给药,所述口服剂可以为片剂、胶囊(各自包括定时释放的和持续释放的制剂)、丸剂、粉末、颗粒剂、酞剂、酞剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和乳剂。可以通过以下多种途径将药物组合物给予生物体:例如,皮下的、局部封闭式或开放式的、口服的、肌肉内的、静脉内的(大丸剂和输液)、腹膜内的、肌肉内的、皮下的、腔内的、经皮肤的、吸入的、或药学领域通用的其它使用形式。

[0105] 本发明的最后一个目的在于提供一种被鉴定的分子模拟在流行病学以及发育和进化生物学领域中的应用。“流行病学”是对影响群体健康和疾病的因素进行研究,并作为在感兴趣的公共健康以及预防医学中进行干预的基础和逻辑。在进化生物学中,由于它们共有的祖先,同源性是性状之间的任何相似性。所述共有的祖先可以是进化的或发育的祖

先。进化的祖先是指从共同祖先的一些结构中进化来的结构。发育的祖先是指源自胚胎发育中的相同组织中发育得到的结构。流行病学是对影响群体健康和疾病的因素进行的研究,并作为在感兴趣的公共健康以及预防医学中进行干预的基础和逻辑。它考虑了公共卫生研究的基础方法,并高度关注了用于鉴定导致疾病的危险因子的循证医学,并根据临床操作确定了最佳的治疗方法。微生物和其它不同物种之间的分子模拟在流行病学以及发育和进化生物学的研究中是一种有力的工具。

[0106] 说明书的上述内容仅描述了公开内容的优选实施方式和/或可供选择的实施方式。还可以明确地说明除了上文内容以外的其它实施方式。因此,所述术语和表述仅通过举例的方式来对本发明进行描述,而不是对本发明进行限制。可以预期的是:存在尽管区别于上文所述的实施方式且不背离本文公开的内容和权利要求的精神实质和范围的其它的不同的实施方式。

[0107] 例证

[0108] 1、病毒与人类和小鼠之间的分子模拟

[0109] 图1-7表示通过将抗病毒的抗体结合到人胎儿、新生乳鼠和成年小鼠和细胞系的组织切片上,来检测多种病毒病原与小鼠和人类的组织或器官之间的分子模拟的例子。

[0110] 所用抗体的例子包括:抗腺病毒(Adeno)的小鼠多克隆抗体;抗巨细胞病毒(CMV)的小鼠多克隆抗体;抗轮状病毒(RV)的小鼠多克隆抗体;抗呼吸道合胞体病毒(RSV)的小鼠多克隆抗体;抗非洲淋巴瘤病毒(EBV)的小鼠多克隆抗体;鸡抗甲型流感病毒毒株H1N1(甲型流感)的抗体;人抗艾滋病毒(HIV)的抗体,人抗甲型流感病毒毒株H1H1、H3N1和H5N1的抗体,人抗甲型肝炎病毒(HAV)的抗体和人抗乙型肝炎病毒(HBV)的抗体。除了抗EBV的多克隆抗体以外的所有小鼠抗体均被标记有生物素,抗EBV的单克隆抗体被标记有荧光素(FITC)。用于生物素-标记的抗体的第二或第三试剂为荧光(PE)标记的亲合素(streptavidin),荧光(PE)标记的亲合素还被用作仅用第二试剂而无第一抗体的对照,如图3所示。生物素标记的抗人IgG的抗体被用作第二试剂,用于来自H1N1、H3N1和H5N1传染病的人血清。

[0111] 将抗体与以下来源的组织切片进行孵育:26周的人胎儿小肠(图1);buIb/c新生乳鼠的小肠、肺、肾脏、脾脏和心脏(图2、3和6);buIb/c成年小鼠的小肠和肝脏(图4和图5);马-达氏犬肾细胞(MDCK)系的细胞(图7)。洗涤后,加入亲合素-PE或加入生物素标记的抗人IgG与亲合素-PE,并孵育30分钟,随后进行洗涤并用荧光显微镜进行检测。阳性结合显示为明亮的染色区域,阴性结合显示为无明亮染色的区域(暗区)。抗体与组织切片或MDCK细胞系结合的方式如下所述。

[0112] a. 单器官特异性和年龄依赖型:抗-RSV的抗体仅结合在肺部,抗-RV的抗体仅结合在新生乳鼠(图2)或人胎儿(图1)的小肠,而不是成年小鼠的那些器官。

[0113] b. 多器官特异性和非年龄依赖型:抗甲型流感病毒的抗体和新生乳鼠和成年小鼠的肺部和小肠相结合,而不和其它所检测的器官结合(图2和4)。

[0114] c. 组织特异性和非年龄依赖型:抗腺病毒的抗体和新生乳鼠和成年小鼠的所有检测器官的小血管相结合(图2、4、5和6)。

[0115] d. 系统性的和非年龄依赖型交叉反应:抗CMV的抗体结合在buIb/c新生乳鼠的小肠、肺部、肾脏和血细胞上(图3和5)。抗EBV的抗体结合在buIb/c新生乳鼠和成年小鼠的小肠、肺部、肾脏和血细胞上(图3、5和6)。

[0116] e. 物种限制型: 抗-人HAV和人HBV的抗体结合于人胎儿的小肠, 而不是成年小鼠的肝脏(数据未示出)。

[0117] f. 其它方式: 抗HIV的抗体结合在buIb/c新生乳鼠和成年小鼠的小肠上(图2和4)。

[0118] g. 细胞系结合: 抗腺病毒、CMV、EBV、流感病毒H1N1、H3N1、H5N1、HAV、RSV、和RV的抗体结合于MDCK细胞(图7和未给出的数据)。抗流感病毒H1N1、RSV、和RV的抗体还结合于非洲绿猴肾细胞系MA104(数据未示出)。图7A显示了在相同的培养系中的单层MDCK细胞。

[0119] 这种方法能够很容易地扩展到使用抗其它病毒和其它病原的抗体、以及人类、动物和植物的组织切片、或者如上文所述的多种细胞系, 来检测存在于人类、动物和植物体内的其它的分子模拟。

[0120] 2、流感性感胃的预防和治疗

[0121] 病毒血凝反应分析

[0122] 很多病毒都可附着到红细胞表面的分子上。结果是, 在确定的浓度下, 病毒悬浮液可以与红细胞结合(凝集), 从而防止它们从悬浮液中沉降出来。有益的, 凝集反应很少与传染性有关, 因此, 可以在分析中使用弱化的病毒。

[0123] 通过向分析板(一系列体积均一的孔)中滴加一系列稀释的病毒悬浮液, 并加入标准量的血细胞, 能够估算病毒颗粒的数量。可以修改这种分析, 加入抗血清。通过使用标准量的病毒、标准量的血细胞和一系列稀释的抗血清, 能够鉴定所述抗血清的最低抑菌浓度(抑制血细胞凝集的最大稀释度)。

[0124] 图8-10表示预防MDCK细胞的甲型流感病毒感染的例子。将单层的MDCK细胞与多种抗体(1 μ g/ml)或者含有抗体的血清(1:100的稀释度)孵育1小时, 弃去上清液, 洗涤一次, 然后使用甲型流感病毒毒株H1N1和H3N1攻击1小时, 弃去上清液并更换培养基。于24、48和72小时收集培养上清液, 并应用于在微量滴定板中进行的对鸡红细胞(RBC)和甲型流感病毒毒株H1N1(图8)和N3N2(图9)的血细胞凝集抑制试验中。

[0125] 可以采用两种方法来观察血细胞凝集抑制试验的检测结果。当从板的顶部观察时, 能够在孔的底部观察到存在RBC沉淀的阳性(抑制作用)检测结果(图9A2-12和B2-12); 能够在孔的底部观察到无RBC或部分的沉淀的阴性(无抑制作用)检测结果(图9A1和B1)。如果将板翻转90度观察底部, 在孔底部能够观察到泪滴状(tear)的RBC沉淀的阳性(抑制作用)检测结果(图8A2-3、A8-10、B1-3、B6、B8-10和C1-9); 在孔的底部未观察到RBC或无向下流的RBC的阴性(无抑制作用)检测结果(图8A1、A4-7、B4-5、B7、B10和C10)。图8和9的结果分别在概括在表1和表2中。

[0126] 表1. 用甲型流感病毒毒株H1N1感染MDCK细胞的结果

[0127]

栏	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
抗右侧病毒 的抗体	H3N1 ^a	H1N1 ^b	RSV	EBV	RV	腺病毒	CMV	HAV	H1N1 ^c	-	小时
抑制	1+	4+	2+	1+	1+	1+	1+	4+	4+	-	24
	3+	4+	3+	1+	-	4+	1+	4+	4+	-	48
	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	72

[0128] 注: 感染有流感病毒H3N1(a)和H1N1(b)的治愈患者血清、经H1N1(c)免疫的鸡的免

疫血清；栏10为仅使用培养基而未使用抗体的组(病毒对照)。在感染72小时后的抑制效果是由于病毒活性降低导致的。

[0129] 表2.用甲型流感病毒毒株H3N1感染MDCK细胞的结果

[0130]

栏	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
抗 流 感 病 毒 的 抗 体	-	H1N1	H1N1	H1N1	H1N1	H3N1	H3N1	H3N1	H3N1	H3N1	H5N1	H1N1	小 时
排 列	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	48
	-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	72

[0131] 注：血清来自治愈的流行性感冒H1N1、H3N1的不同患者、或者经H1N1(a)免疫的鸡。栏1是仅使用培养基而未使用抗体的组(病毒对照)。

[0132] 上述结果表明，在MDCK细胞培养系中，流感病毒H3N1的感染被抗多种流感病毒毒株H1N1、H3N1和H5N1(图9)的抗体所预防，流感病毒H1N1的感染不仅被抗流感病毒毒株H1N1和H3N1的抗体所预防，还被抗其它病毒例如RSV、HAV和腺病毒的抗体所预防(图8)。

[0133] 图10表明在相同的MDCK细胞培养系中，与未经抗体处理的细胞(图10B)相比，灭活的流感病毒H5N1和MDCK细胞的结合不仅被抗流感病毒毒株H1N1的抗体所抑制(图10C)，还能够被抗其他病毒例如RSV(图10E)和轮状病毒(图10F)的抗体所抑制。图10A显示了相同培养系统中的单层MDCK细胞。

[0134] 鸡胚胎培养系

[0135] a. 鸡胚胎培养系

[0136] 开发了鸡胚胎培养系，以检测抗多种流感病毒株(包括H5N1)抗体和抗其它病原抗体对流感的抑制效果。将中期鸡胚用能够产生阻断效力但无过量的低剂量的候选抗体处理，在第二天用本领域通用的技术进行病毒的接种。在病毒接种后，还可以再使用候选抗体给药一天。用本领域的通用技术，进行包括收获含有病毒的鸡胚培养液以及确定病毒的滴度在内的其余的实验。当用抗体进行处理的鸡胚胎培养系中所含的病毒滴度低于未被抗体处理的对照中所含的病毒滴度时，则表明预防 and 治疗的阳性效果。因各种原因，某些流感的小型动物模型很有限(例流感病毒毒株H5N1的感染)，这种鸡胚培养系则对体内筛选能预防和治疗这类流感的抗体和其它试剂十分有用。

[0137] b. 用于检测分子模拟的鸡胚培养系

[0138] 使用高剂量的候选抗体对后期的鸡胚进行处理。所述候选抗体可以是纯化的或者是标记的。所述抗体在体内结合到它的模拟抗原上，随后处死鸡胚，收集组织或器官样品，并使用本领域通用的检测方法在体外对所结合的抗体进行检测。这种体系可用于检测分子模拟对某些传染病的作用，由于多种原因，可用的小型动物模型对这类传染病(例如流感病毒毒株H5N1的感染)往往有限。

[0139] 动物实验

[0140] 用本领域的通用技术,以能够产生阻断效力但不过量的低剂量,用候选抗体对例如小鼠在内的动物进行处理;第二天进行病毒接种。在病毒接种之后,还可用候选抗体给药一天。用本领域的通用技术包括评价传染病症状和确定病毒的滴度在内的其它实验,比较使用抗体处理后的动物与未使用抗体处理的对照动物的传染病的症状、器官的组织学变化以及病毒的检测结果。这种方法可用于评价分子模拟的功能以及在体内筛选能预防和治疗流行性感冒的候选抗体和其它试剂。

[0141] 3. 轮状病毒传染病的预防和治疗

[0142] 图11-13显示了用抗轮状病毒的抗体来阻断小肠的模拟抗原从而对轮状病毒感染进行预防和治疗。简单地说,单独使用抗轮状病毒的多克隆抗体(Ab-1)或者组合使用Ab-1和抗轮状病毒内部抗原的抗体(Ab-2),对出生后一天或两天的乳鼠进行口服给药,于24小时后(第二天)用恒河猴轮状病毒(RRV)攻击。或者,在RRV感染24小时后,使用Ab-1对乳鼠进行口服给药,以评价该抗体抗RRV感染的治疗效果。在RRV感染之前用抗轮状病毒的抗体处理的乳鼠未被感染或者感染的程度较轻;在RRV感染后一天用抗体处理的乳鼠的康复速度比用生理盐水和RRV感染处理的乳鼠的康复速度快,如图11(体重曲线)、图12(小肠的组织学变化)和图13(RRV抗原VP6的免疫荧光染色)所示。

[0143] 图11表示感染期间乳鼠的生长曲线。在出生后的第一天(P1),用抗体或生理盐水对乳鼠分别进行口服给药,24小时(P2)后经口接种病毒。与仅用生理盐水(图11,实心圆)和仅用病毒(图11,空心圆)进行处理的对照相比,经20 μ g/g体重(BW)的Ab-1(图11A,空心菱形)治疗的乳鼠的生长,以及经20 μ g/g体重的Ab-1和20 μ g/g体重的Ab-2(图11C,空心正方形)治疗的乳鼠的生长没有受到影响。使用40 μ g/g体重的Ab-1(图11B,空心三角形)治疗的乳鼠的生长有所延缓,但仍然比仅用病毒进行处理的对照乳鼠的生长速度快。

[0144] 图12显示了感染期间乳鼠小肠的组织学变化。第1天是病毒感染后的一天。在病毒感染之前(图11,Ab-1+RRV和Ab-1&2+RRV)和之后(图11,RRV+Ab-1),经抗体治疗过的乳鼠小肠的组织损伤的严重程度低于用生理盐水和病毒(图11,仅使用RRV)处理的乳鼠小肠的组织损伤的严重程度,用抗体Ab-1+Ab-2治疗过的乳鼠小肠的组织损伤的严重程度最低。

[0145] 与图11和12相一致,与未经抗体治疗的乳鼠相比(图13,第5天-B),在感染后的第5天,经抗体治疗的乳鼠的小肠中没有检测到病毒抗原(第5天-C、D和E)。与未经过抗体治疗(图13,第5天-B)的乳鼠相比,在感染后的第4天,用Ab-1+Ab-2(图13,第4天-D)治疗的乳鼠的小肠中未检测到病毒抗原;在感染之前(图13,第4天-C)和之后(图13,第4天-E),在经Ab-1治疗的乳鼠的小肠中检测到微量的病毒抗原。

[0146] 上述观察结果表明,使用各自低剂量的两种抗轮状病毒的抗体的组合为预防轮状病毒传染的最有效方法,其治疗效果将通过相同的小鼠模型进行评价。

[0147] 4. 使用唾液酸、含硫化合物和植物凝集素对传染病、自身免疫疾病和癌症进行治疗

[0148] a. 用于筛选的细胞培养系

[0149] 用本领域通用的多种细胞系,将各种浓度的唾液酸、含硫化合物和植物凝集素与某病毒进行共培养,或者在病毒感染一定时间后加入(例如,24小时后)。用本领域通用的各方法确定培养基中病毒的滴度和活力。各种唾液酸、含硫化合物和植物凝集素将通过如下

方式被单独地给药至细胞培养系中或者与其它试剂一起进行给药:

[0150] 1) 分别单独使用唾液酸、含硫化合物、或植物凝集素

[0151] 2) 唾液酸+含硫化合物

[0152] 3) 植物凝集素+含硫化合物

[0153] b. 用于体内功能检测的动物实验

[0154] 在病毒感染的同时或之后, 候选试剂或试剂的组合可以通过多种途径给药至动物, 例如, 皮下的、局部封闭或开放的、口服的、肌肉内的、静脉内的、腹膜内的、肌肉内的、皮下的、腔内的、经皮肤的、吸入的或药物领域通用的其它应用形式。用本领域通用的包括评价传染病的症状和组织变化以及确定病毒的滴度等在内的其它实验, 比较用候选试剂或试剂的组合进行处理的动物与未经过处理的对照动物的传染病症状、器官的组织学变化和病毒的检测结果。这种方法可用于评价某一候选试剂对治疗传染病的体内效果。

[0155] 5. 自身免疫疾病的诊断

[0156] 用本领域通用的技术, 对采自诊断患有川崎病、狼疮、糖尿病、或肾脏和心脏疾病(包括但不限于溶血性尿毒症和肾炎综合症)患者的血清进行抗腺病毒、CMV、EBV等抗体的筛选。检测为阳性的抗体将为与这些疾病相关的候选抗体。

[0157] 对于器官限制性自身免疫疾病, 例如, 糖尿病, 可以使用抗多种病原的多种抗体, 与器官组织(例如胰腺)的切片或提取物相结合。被检测出结合到胰腺的抗体为导致该疾病的候选抗体。

[0158] 6. 疫苗和被动免疫的功能机理的鉴定

[0159] 用在不同的时间点(例如, 第2、4、8、12、16周等)采得经过疫苗免疫的或被病原感染的动物或人的血清, 检测抗所述疫苗和病原的抗体。用在相对应的时间点采得的所述动物的多种器官的组织切片, 及标记的抗所述动物IgG的第二试剂, 检测动物IgG与所述组织或器官的结合。血液中的低抗体水平及所述抗体与组织或器官的结合, 可说明所述抗体与模拟抗原的结合是疫苗的主要功能机理。

[0160] 或者, 将得自一种被免疫的或被感染的物种(例如马)的血清, 给药至另一种物种(例如小鼠); 用与上文描述的方法相同的方法, 检测不同时间点的血液中的抗体水平以及抗体与组织或器官的结合。血液中的低抗体水平及所述抗体与组织或器官的结合, 可说明抗体与模拟抗原的结合是被动免疫的主要功能机理。

[0161] 7. 受体疫苗、配位体疫苗、和多病原疫苗的开发

[0162] a. 用于筛选的细胞培养系

[0163] 将多种抗体或含有抗体的血清与单层细胞系孵育1小时, 除去上清并洗涤1次, 然后使用另一种病原(例如病毒)对其进行攻击, 除去上清并更换培养基。确定病毒的滴度。具有对病毒传染显示出抑制作用的抗体的病原, 将作为多病原疫苗的候选者。所述候选者将在动物实验中进一步测试。

[0164] b. 动物实验

[0165] 对动物进行疫苗或者某病原(病原A)的免疫, 或者对其给予含有抗所述病原抗体的血清, 并使其被至少一种其它病原(病原B)感染。其它病原感染的预防则说明抗病原A的疫苗还能够预防病原B的感染。

[0166] 相似地, 用如上所述的受体疫苗或配位体疫苗的候选免疫原对动物进行免疫, 并

用多种病原对免疫后的动物进行感染。所述病原感染的预防则说明该候选物能够防止那些病原的感染。

[0167] 在多种情况中,受体疫苗或配体疫苗可为多病原疫苗。

[0168] 8. 筛选和鉴定能诱发癌症和肥胖症的抗体

[0169] 将候选抗体与如上所述的细胞或组织培养系统以及源自癌细胞或癌组织的细胞系进行培养。还可以将候选抗体给药至患有实验性癌症的动物体内。用本领域通用的多种方法,比较用抗体处理的细胞与未用抗体处理的对照细胞,确定抗体对细胞增殖、信号传导和癌症的发病机理的作用。

人-胎儿

小肠

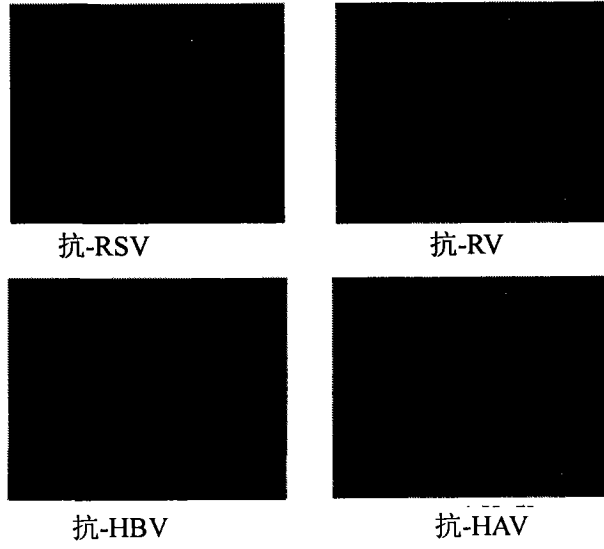


图1

乳鼠

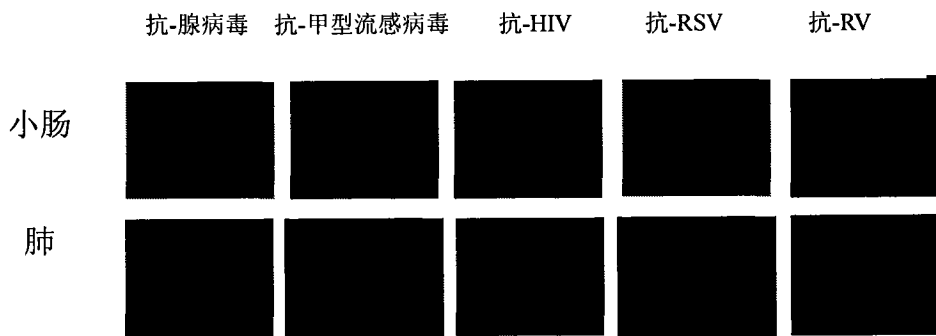


图2

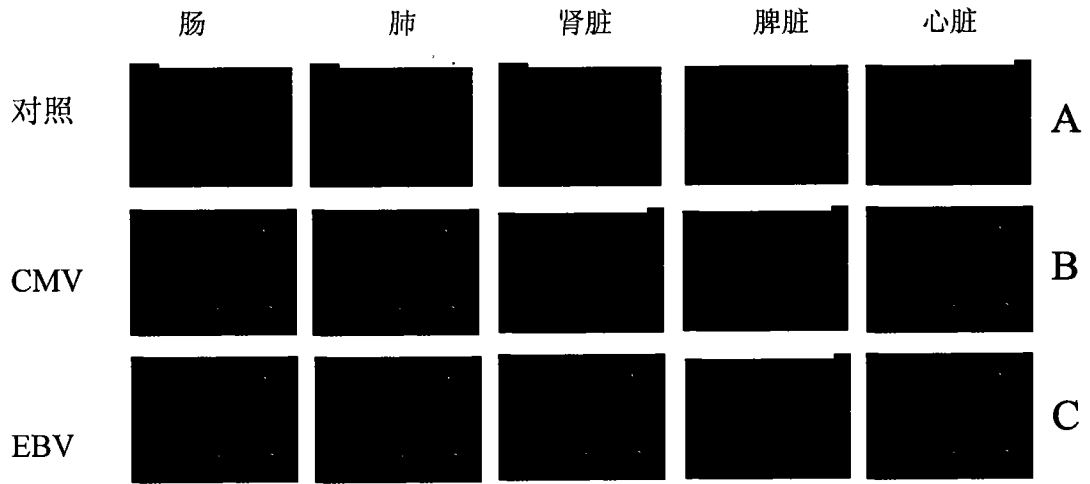


图3

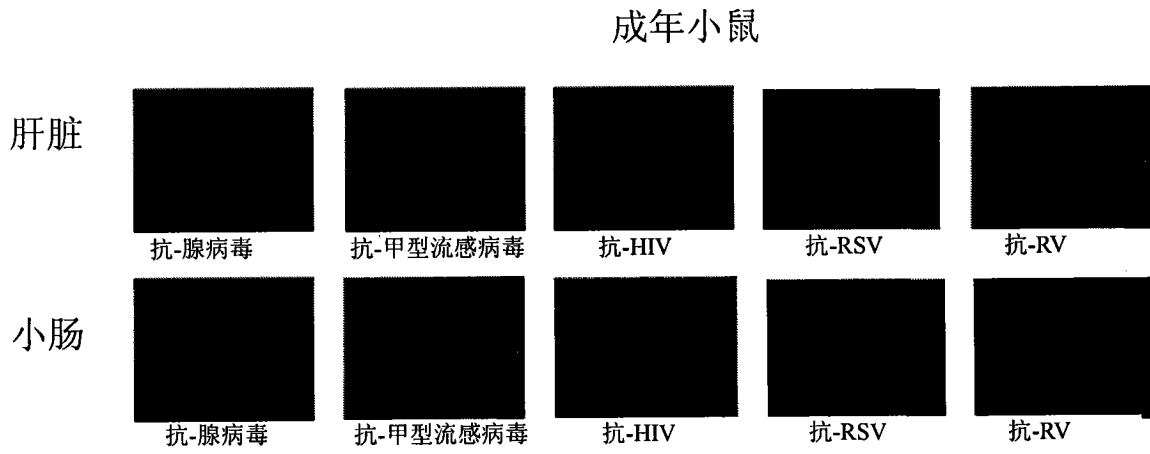


图4

成年小鼠

肾脏

脾脏

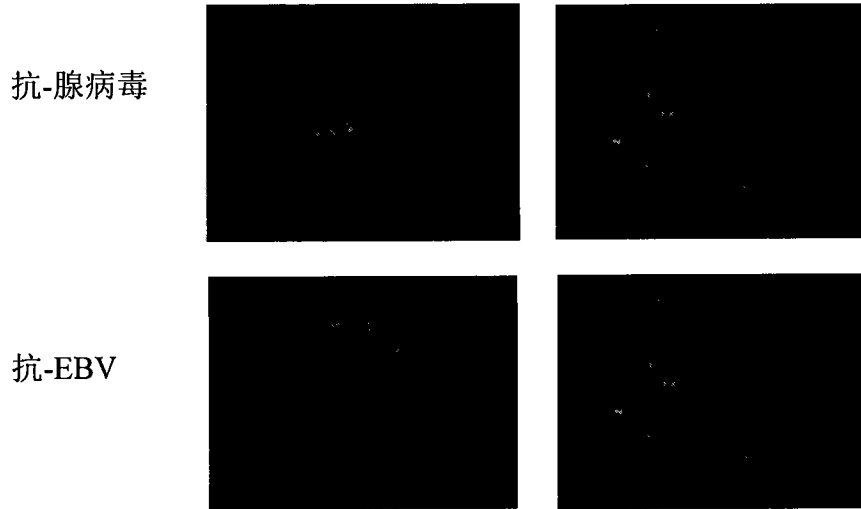


图5

乳鼠

肺

小肠

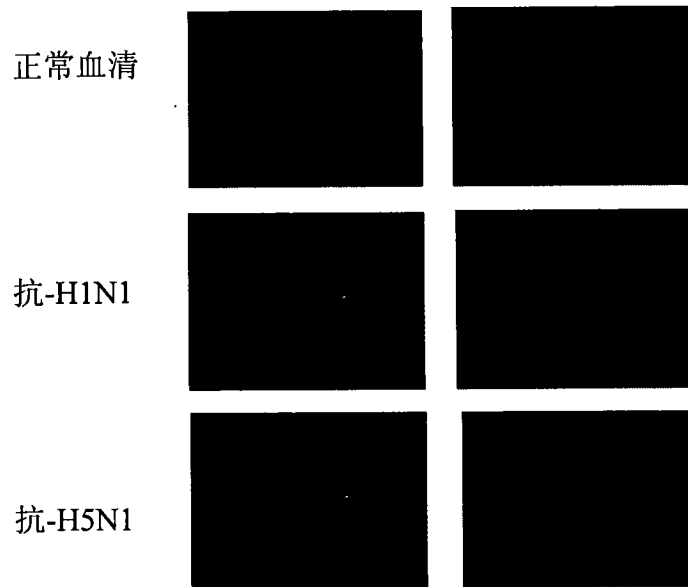


图6

MDCK+抗-病毒抗体

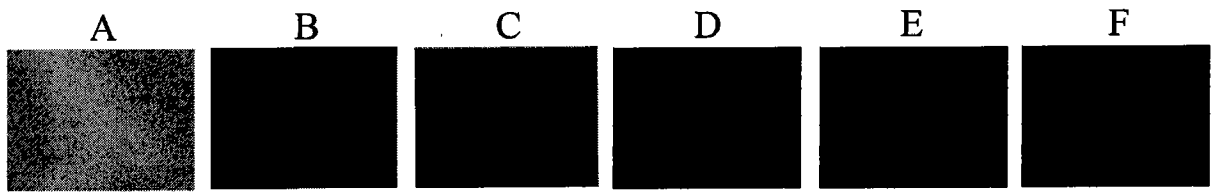


图7

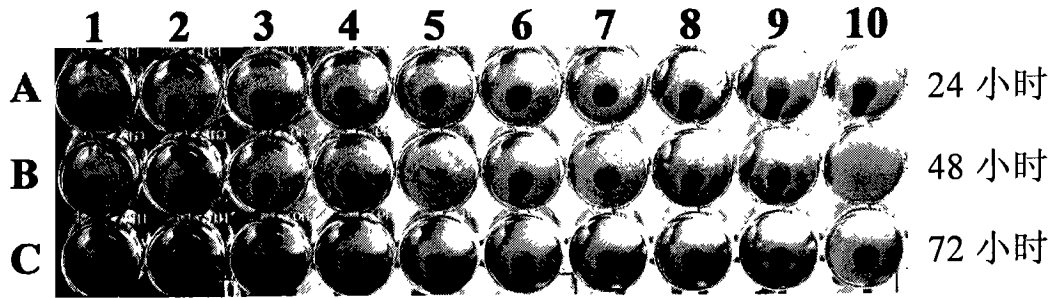


图8

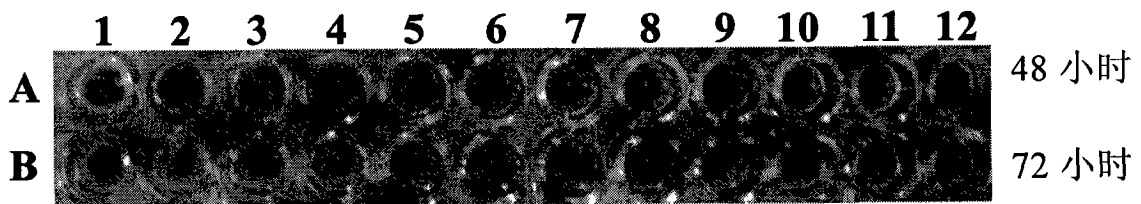


图9

MDCK + H5N1

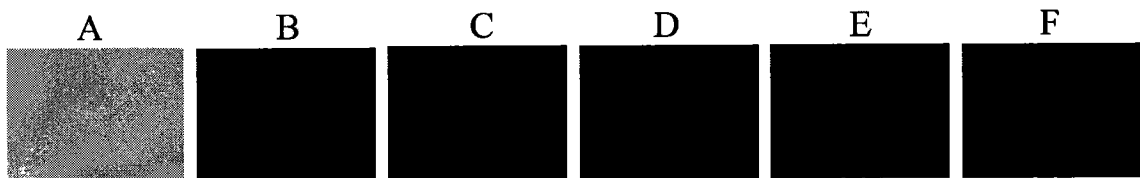


图10

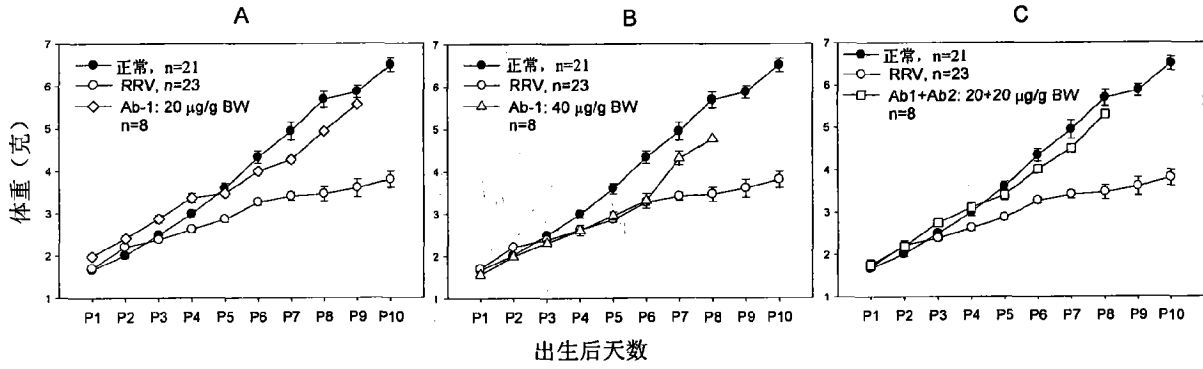


图11

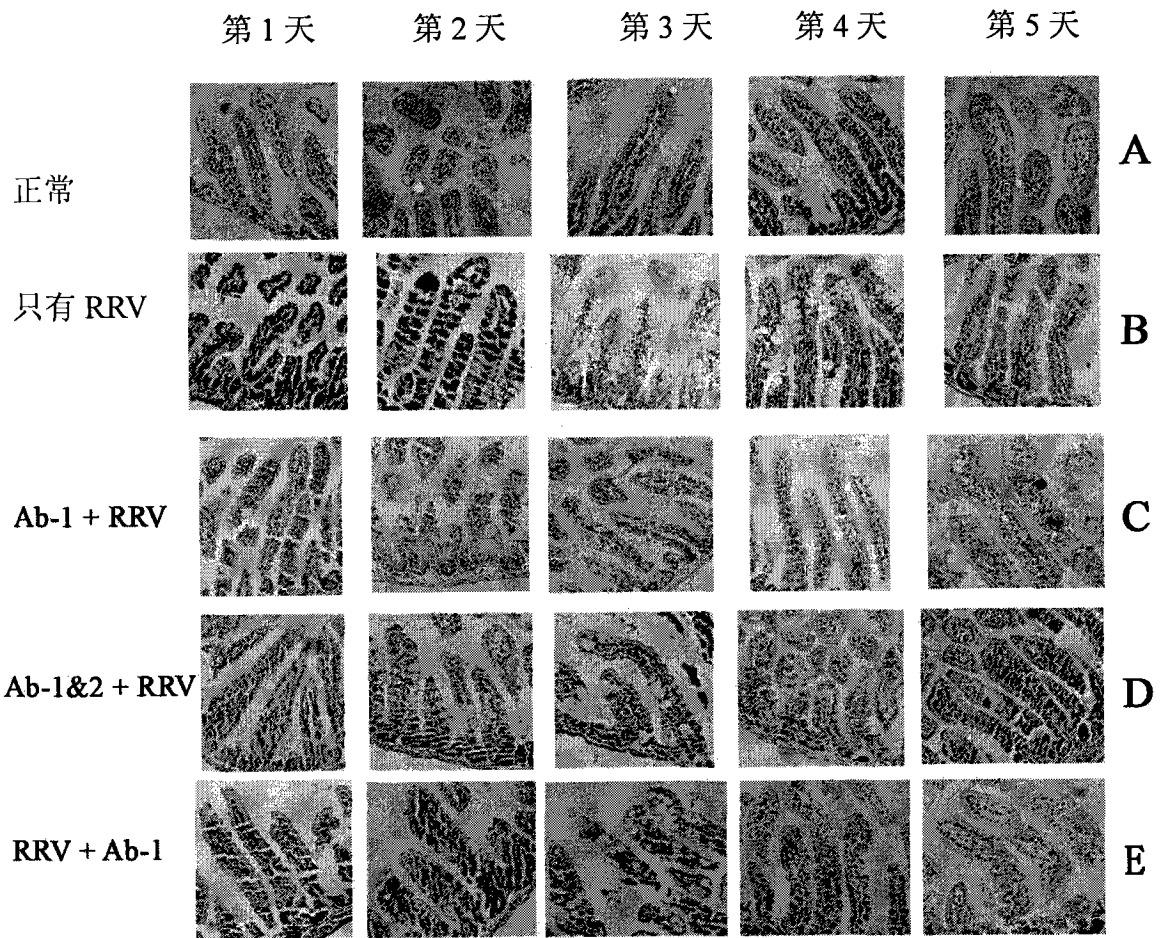


图12

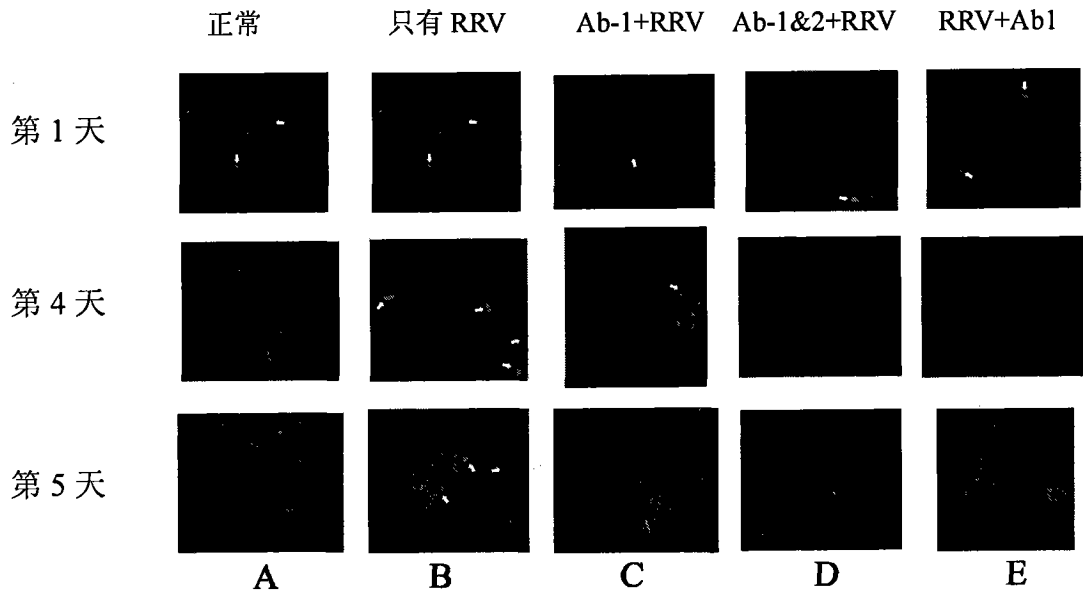


图13

