

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 48/00

C12N 15/00 C12N 15/09

C12N 15/40 C12N 15/63

C12N 15/79 C12N 15/85



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01819929.1

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549730A

[22] 申请日 2001.10.4 [21] 申请号 01819929.1

[30] 优先权

[32] 2000.10.4 [33] US [31] 60/237,885

[86] 国际申请 PCT/US2001/031355 2001.10.4

[87] 国际公布 WO2002/028165 英 2002.4.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.2

[71] 申请人 宾西法尼亚大学托管人

地址 美国宾西法尼亚州

[72] 发明人 大卫·B·威那 梁周成

[74] 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司

代理人 黄泽雄

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图 30 页

[54] 发明名称 黄病毒和瘟病毒衣壳蛋白的组成和使用方法

[57] 摘要

本发明提供一种使用黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，比如西尼罗病毒(WNV)衣壳蛋白，和其功能性片段来诱导细胞死亡的方法。本发明也提供通过施用 WNV 或其编码序列药物组合物治疗遭受细胞扩增性疾病的方法。并揭示了鉴定具有抗病毒和/或抗 WNV 和/或抗黄病毒或抗瘟病毒衣壳蛋白或其它蛋白活性的复合物的方法。本发明还提供了包含 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其他病毒衣壳蛋白或其它蛋白，或其功能性片段，或者编码其的核酸分子和一个药用载体的疫苗组合物。本发明也进一步提供了鉴定个体遭受 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其他病毒感染的诊断方法和试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种诱导细胞死亡的方法，其中含有下列步骤：
将分离出来的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段与细胞进行接触，上述衣壳蛋白或其功能性片段的使用量能有效诱导细胞死亡；
或者在上述细胞中引入有黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的编码核苷酸序列的核酸分子，上述核酸分子并不存在于黄病毒或瘟病毒的整个病毒基因组中，其所含的上述的核苷酸序列在上述细胞中表达且其表达水平能有效诱导细胞死亡。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为所用的衣壳蛋白或其功能性片段或核酸分子是从日本脑炎病毒亚属中的一种病毒中分离出来的。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为所用的衣壳蛋白或其功能性片段或核酸分子是从西尼罗病毒（WNV）中分离出来的。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征为所用的功能性片段包含 SEQ ID NO: 8 所述的氨基酸序列。
5. 如权利要求 3 所述的方法中，其特征为所用的核酸分子序列所编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为所用的细胞是肿瘤细胞。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为与细胞接触的是黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为被引入所述细胞的是核酸分子。
9. 一种鉴定能抑制黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段诱导细胞凋亡的化合物的方法，包括的步骤有：
 - a) 当存在待测物时，将细胞与黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段进行接触，衣壳蛋白或其功能性片段的使用量必须足够使其诱导死亡的细胞数目可被检测出；
 - b) 将步骤 a) 所检测的细胞凋亡数目与不存在上述待测组合物时，细胞与黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段接触时所引起的凋亡数目进行比较。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征为与细胞接触的是黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白。
11. 如权利要求 9 所述的方法，其特征为与细胞接触的是黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的功能性片段。
12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征为所用的功能性片段包含 SEQ ID NO: 8 所述的氨基酸序列。
13. 如权利要求 9 所述的方法，其特征为所用的细胞是从含 HeLa 细胞，RD 细胞和 293 细胞中的一种。
14. 如权利要求 9 所述的方法，其特征为所用的检测步骤是一种检测凋亡标记物的分析方法。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征为所用的标记物是磷脂酰丝氨酸(PS)或游离 3'-羟基 DNA 末端。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其特征为所用的检测方法是 TUNEL 法或膜联蛋白 V 流式细胞计数仪分析法。
17. 一种实行权利要求 9 所述方法的试剂盒,包括:
 - a) 一个含黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的容器;和
 - b) 使用说明书,正对照,负对照,描述数据的照片,和数据图中至少一项作为附加成分。
18. 一个可注射的药物组合物,其中包含:
 - a) 病毒和瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段,或者含有黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的编码核苷酸序列的核酸分子;和
 - b) 一个可药用的载体。
19. 如权利要求 18 所述的可注射用的药物组合物,其中包含:
 - a) 含有黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核苷酸序列的核酸分子;和
 - b) 一个可药用的载体。
20. 如权利要求 18 所述的可注射药用组合物,其中包含:
 - a) 黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段;和
 - b) 一个可药用的载体。
21. 如权利要求 18 所述的可注射药用组合物,其中包含:
 - a) WNV 衣壳蛋白或其功能性片段;和
 - b) 一个可药用的载体。
22. 一种治疗已确诊的或被怀疑患有以细胞高度增生为特征的疾病的个体的方法,其中包括给上述个体施用有效剂量的权利要求 18 中所述的可注射药用组合物。
23. 一种治疗已确诊的或被怀疑患有以细胞高度增生为特征的疾病的个体的方法,其中包括给上述个体施用有效剂量的权利要求 19 中所述的可注射药用组合物。
24. 一种治疗已确诊的或被怀疑患有以细胞高度增生为特征的疾病的个体的方法,其中包括给上述个体施用有效剂量的权利要求 20 中所述的可注射药用组合物。
25. 一种治疗已确诊的或被怀疑患有具有不希望的细胞为特征的疾病的方法,其中包括通过给上述个体施用有效剂量的权利要求 18 所述的可注射药用组合物来消除上述不希望的细胞。
26. 如权利要求 24 所述的方法,其特征为所用的衣壳蛋白或其功能性片段是 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段。
27. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为所指的疾病是癌症。
28. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为给药途径是在肿瘤内注射可注射的药用组合物。

29. 一种鉴定感染黄病毒或瘟病毒的个体的方法，其中包含下列步骤：
 - 1) 将抗黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的抗体与个体样本进行接触；
 - 2) 检测上述抗体是否结合于样本中的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，其中检测到与抗体的结合的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白是个体感染黄病毒或瘟病毒的症状指示。
30. 如权利要求 24 所述的方法，其特征为所述的衣壳蛋白是 WNV 衣壳蛋白。
31. 一个鉴定个体被黄病毒或瘟病毒感染的试剂盒，其中包含：
 - a) 第一个装有抗黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的特异抗体的容器；和
 - b) 第二个装有黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的容器。
32. 如权利要求 31 所述的试剂盒，其特征为所述的第一个容器中装有特异于 WNV 衣壳蛋白的抗体，第二个容器中装有 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段。
33. 一种鉴定个体是否被黄病毒或瘟病毒感染的方法，包括的步骤有：
 - a) 将样本与黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白进行接触；和
 - b) 检测在上述样本中的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白是否与抗体结合。其中检测到与黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的结合抗体是个体被黄病毒或瘟病毒感染的病征指示。
34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征为所述的病毒是指 WNV，衣壳蛋白是指 WNV 衣壳蛋白。
35. 一种鉴定个体受黄病毒或瘟病毒感染的试剂盒包括：
 - a) 第一个装有黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的容器；和
 - b) 第二个装有与黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白特异结合抗体的容器。
36. 如权利要求 35 所述的试剂盒，其特征为所述的衣壳蛋白是 WNV 衣壳蛋白。
37. 一种疫苗组合物，其中包含：
 - a) 有效免疫剂量的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段；和
 - b) 一个药用的载体。
38. 如权利要求 37 所述的疫苗，其特征为所述的黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或其免疫原片段是指 WNV 的衣壳蛋白或其免疫原片段。
39. 一种疫苗组合物，其中包含：
 - a) 黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸；和
 - b) 一个药用的载体。
40. 如权利要求 39 所述的疫苗，其特征为所述的核苷酸为 WNV 衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸。
41. 一种治疗感染黄病毒或瘟病毒个体的方法，其治疗方法为施用有治疗效果剂量的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段，或黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸。
42. 如权利要求 41 所述的方法，其特征为所述的感染个体的病毒是 WNV 病毒，所用的衣壳蛋白或其功能性片段，或衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸是从 WNV 中得到的。

-
43. 一种保护个体不受黄病毒或瘟病毒感染的方法，该法为施用具有预防效果的剂量的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段，或黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸。
44. 如权利要求 43 所述的方法，其特征为所述的个体保护所抵抗的病毒是 WNV，所述的衣壳蛋白或其免疫原片段，或衣壳蛋白或其免疫原片段的编码核苷酸是来自 WNV。

黄病毒和瘟病毒衣壳蛋白的组成和使用方法

相关申请专利的互相参考

根据美国法典 35U.S.C. §119 (e), 本专利申请要求以申请日为 2000 年 10 月 4 日, 申请系列号 60/237,885 的美国临时专利为优先权, 文献在此处列出作为参考。

技术领域

本发明涉及使用西尼罗病毒衣壳蛋白以及包括黄病毒和瘟病毒的其他病毒衣壳蛋白和其它蛋白诱导细胞凋亡, 涉及西尼罗病毒及包括黄病毒和瘟病毒的其它病毒感染的疫苗和诊断方法。本发明还涉及通过对能选择性抑制病毒衣壳蛋白诱导细胞凋亡活性的物质的鉴定来筛选抗病毒药物成分的方法。

背景技术

最近, 在欧洲和北美洲的温带地区出现西尼罗病毒 (WNV) 感染, 威胁到人类、马和鸟类的健康。WNV 感染最严重的临床表现为致命的脑炎。WNV 是 1937 年在非洲的乌干达西尼罗河地区首次被分离出来的, 它是一种黄病毒, 属于黄病毒族, 其大小为 40-60nm, 有二十面核壳体包膜, 含有一条 10,000-11,000 个碱基的正义单链 RNA。有关 WNV 最近的综述见 Holloway, 没有被控制住的 2000 爆发。西尼罗病毒引发了对公共健康监督的重新评估, 科学美国, 282:20-22. (Holloway, 2000, Outbreak not contained. West Nile virus triggers a reevaluation of public health surveillance, Sci Am., 282:20-22) 文献在此处列出作为参考。对黄病毒族病毒的综述可参考下列文献: Neyts 等, 1999, 黄病毒族病毒感染, Verh. K. Acad. Geneesk. Belg., 61:661-697, 讨论 697-699 (Neyts *et al.*, 1999, Infections with *Flaviviridae*, Verh. K. Acad. Geneesk. Belg., 61:661-697, discussion 697-699); Leyssen 等, 2000, 黄病毒族病毒感染的治疗观察, 临床微生物研究, 13:67-82 (Leyssen, *et al.*, 2000, *Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae*, Clin. Microbiol. Rev., 13:67-82); Sherlock, 1999, 肝黄病毒族病毒概要, 肝炎病毒杂志, 增刊 6.1:1-5 (Sherlock, 1999, The hepatic *Flaviviridae*: summary, J. Viral. Hepat., 6 Suppl. 1:1-5) 以及 Fields, Knipe 和 Howley 编写, 病毒学领域 (第三版) 卷 I 和 II, Lippincott Williams & Wilkins 出版社, (1996) (Fields, Knipe, & Howley, eds., *Fields Virology* (3rd ed.) Vols. I & II, Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996)), 文献在此处列出作为参考。

预防和治疗黄病毒和瘟病毒感染的方法改进是很需要的。诱导细胞死亡和治疗高度增生细胞性疾病的方法也需要改进。

发明内容

本发明提供诱导细胞死亡的方法。这些方法包括用能有效地诱导细胞死亡的数量的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段接触细胞的步骤。依照本发明的一些具体实例，黄病毒衣壳蛋白或其功能性片段是西尼罗病毒(WNV)的衣壳蛋白或其功能性片段。依照本发明的一些具体实例，细胞与黄病毒和瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段接触，是为了诱导细胞的死亡。依照本发明的一些具体实例，包含黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段编码序列的核酸分子被导入细胞，细胞内编码黄病毒或腺病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸序列的表达，导致黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的在细胞内的产生，从而导致细胞的死亡。依照本发明的一些具体实例，编码黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸序列，要与细胞内序列表达所必须的调控元件可实施地连接起来。依照本发明的一些具体实例，所指的核酸分子是DNA。依照本发明的一些具体实例，所指的细胞是肿瘤细胞。

本发明提供鉴定能抑制黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的诱导细胞凋亡活性的复合物的方法。此方法包括以下步骤：a) 在被测组分存在时，用一个足以诱导一可测量到的细胞凋亡数量的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段来接触细胞，和 b) 比较在被测组分存在和不存在情况下细胞凋亡发生的数量。本发明涉及一个鉴定抑制 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段诱导细胞凋亡能力的物质的方法。此方法包括以下步骤：a) 在被测组分存在时，用一个足以引发一可测量的细胞凋亡数量的 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段来接触细胞，和 b) 比较在被测组分存在和不存在情况下细胞凋亡发生的数量。依照一些具体实例，此方法的测定是通过检测与细胞凋亡相关联的指示物的存在量来实现，这些指示物包括细胞膜中的磷脂酰丝氨酸链(PS)和DNA中的游离3'-羟基末端。

本发明涉及包含一个黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段和一个可药用的载体的药物组合物。依照本发明的一些具体实例，药物组合物包含一个WNV衣壳蛋白或其功能性片段和一个可药用的载体。

本发明涉及包括一个核酸分子和一个可药用的载体的药物组合物，此核酸分子包含一个编码黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的序列。依照本发明的一些具体实例，药物组合物包括一个包含编码黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的序列的核酸分子，并且，此序列要和细胞内表达序列所必须的调控元件可实施性的连接。本发明涉及包括一个核酸分子和一个可药用的载体的药物组合物，此核酸分子包括一个编码WNV衣壳蛋白或其功能性片段的序列。依照本发明的一些具体实例，药物组合物包括一个包含编码WNV衣壳蛋白或其功能性片段序列的核酸分子，并且，此序列要和细胞内表达序列所必须的调控元件可实施性的连接。按照本发明的一些具体实例，药物组合物中包含的核酸分子是DNA。

本发明涉及对诊断为或怀疑为患有高度增生细胞性疾病的个体使用足以杀死高度增生细胞的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的给药步骤和

治疗方法。本发明还涉及对诊断为或怀疑为患有高度增生细胞性疾病的个体使用足以杀死高度增生细胞的 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段的给药步骤和治疗方法。依照一些具体实例，这些方法包括一个对个体使用有效量的 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段的给药步骤。按照本发明的一些具体实例，编码黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的序列，要与细胞内表达序列所必须的调控元件可实施性的连接。按照本发明的一些具体实例，这些方法包括使用有效剂量的核酸分子来对这些个体给药的步骤，此核酸分子包含一个能编码 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段的序列。按照本发明的一些具体实例，编码 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段的序列要与细胞中表达这些序列所必需的调控元件可操作性的连接起来。按照本发明的一些具体实例，这个核酸分子是 DNA。按照本发明的一些具体实例，高度增生细胞性疾病是指癌症或牛皮癣。

本发明涉及包含一个免疫有效数量的 WNV 或黄病毒或瘟病毒的相关成员的衣壳蛋白和一个药用载体的疫苗组合物。按照本发明的一些具体实例，疫苗组合物包括一个可药用的载体和有效剂量的具有免疫原性的衣壳蛋白片段，此片段来自于 WNV 或黄病毒或瘟病毒相关成员的衣壳蛋白。

本发明涉及包括一个可药用载体的疫苗组合物和一个核酸分子，此核酸分子包含一个 WNV 或黄病毒或瘟病毒的相关成员衣壳蛋白的编码核酸序列。按照本发明的一些具体实例，疫苗组合物包括一个可药用的载体和一个核酸分子，此核酸分子包含一个编码 WNV 或黄病毒或瘟病毒相关成员衣壳蛋白免疫原片段的核酸序列。按照本发明的一些具体实例，此核酸分子包含一个编码来自于 WNV 或黄病毒或瘟病毒相关成员衣壳蛋白免疫原片段的序列，此序列要与细胞内表达该序列所必须的调控元件可实施性的连接。按照本发明的一些具体实例，疫苗的组合物包含的核酸分子是 DNA。按照本发明的一些具体实例，疫苗的组合物包含质粒。

本发明涉及使个体对 WNV 或黄病毒或瘟病毒的相关成员产生免疫的方法。产生的免疫反应可以是预防性的或者是治疗性的。这些方法包括用一些免疫有效剂量的物质来对个体给药，这些物质包括 WNV，或黄病毒或瘟病毒相关成员衣壳蛋白，或其具有免疫原性的片段，或能编码这些衣壳蛋白或免疫原片段的核酸分子。

本发明涉及对接触过 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的个体的鉴定，通过用一个能与 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白特异性结合的抗体来检测样品中衣壳蛋白存在的方法，所用抗体最好是单克隆抗体。对个体样本中 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的定量测定可用作被感染个体的病征指示。

本发明涉及鉴定接触过 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的个体的试剂盒以及这些试剂盒中所用的试剂。此试剂盒包含两个容器，第一个容器中含有能与 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白特异性结合的抗体；第二个容器中含有 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白，所用抗体最好是单克隆抗体。试剂盒可以定量测定个体样品中的 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，这个数

据可以用作被感染个体的病征指示。

本发明涉及对接触过 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒的个体的鉴定方法，它是通过使用 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白来检测样品中抗 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白抗体的存在量的方法来实现的。样品中抗 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的抗体量可以用来诊断被感染的个体。

本发明涉及检测接触过 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒的个体的试剂盒及所用试剂。试剂盒包括两个容器，第一个容器中含有在感染 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白时产生的抗体，第二个容器含有 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白。试剂盒可以用来定量测定个体样品中抗 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的抗病毒衣壳蛋白的抗体，这个数据可以用来诊断被感染的个体。

附图简要说明

图 1. 图的上部分为 1999 年在纽约从人体中分离出的 WNV(WNV-HNY1999) 病毒的基因结构图示 (GenBank 序列号 AF202541, Jia 等, 1999, Lancet, 354: 1971-1972, 文献在此处列出作为参考), 衣壳蛋白用“Cp.”表示, 图的下部分为所构建的 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY, 本文中, 这些载体也可能用其它名词表示, 此处的 pWNVc-DJY 也可能用 pWNVCh-DJY 或者 pWNVCh 表示, pWNVy-DJY 在此也可以用 pWNVcy-DJY 或 pWNVcy 表示。

图 2 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVh-DJY 的限制性核酸内切酶图谱。

图 3 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVh-DJY 的特征图谱。

图 4 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVh-DJY 的完整的有注释的双链核苷酸序列, 它是 5864 个核酸碱基对的组合物。限制性核酸内切酶位点、特征和部分的构建载体表达蛋白翻译信息已在注释中指出。上面的核苷酸链是 SEQ ID NO: 1, N-末端 sIgE 前导肽的蛋白序列 (SEQ ID NO: 2) 出现在其编码区 917-970 位核苷酸下面。表达蛋白的 WNV Cp 蛋白部分的序列 (SEQ ID NO: 3) 出现在其编码区 971-1336 位核苷酸下面。

图 5 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVy-DJY 的限制性核酸内切酶图谱。

图 6 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVy-DJY 的特征图谱。

图 7 为 WNV 衣壳蛋白表达载体 pWNVy-DJY 的完整的有注释的双链核苷酸序列, 它是 5864 个核苷酸碱基对的组合物。限制性核酸内切酶位点、特征和部分的构建载体表达蛋白的翻译信息已在注释中指出。上面的核苷酸链是 SEQ ID NO: 4, N-末端 sIgE 前导肽的蛋白序列出现在其编码区 917-970 位核苷酸下面。表达蛋白的 WNV Cp 蛋白部分的序列出现在其编码区 971-1336 位核苷酸下面。

图 8 为两个不同的 WNV 衣壳蛋白表达载体: pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 体外转录/翻译的 ^{35}S 标记的表达物的电泳分离的放射性自显影免疫沉淀图象。左边第一泳道为分子量标记物。箭头指示的是主要的体外翻译蛋白。该蛋白融合于多组氨酸 C 末端标签子并用抗组氨酸抗体进行免疫沉淀。

图 9 为 WNV Cp 蛋白 (SEQ ID NO: 5) 的完整的氨基酸序列。本发明实施例 3

中用到的三个主要组织相容性复合物 (MHC) II 类限制性抗原决定表位肽 WNVC-P1 (SEQ ID NO: 6)、WNVC-P2 (SEQ ID NO: 7) 和 WNVC-P3 (SEQ ID NO: 8) 列在 Cp 氨基酸序列下面。

图 10 为采用流式细胞仪测定 DNA 免疫小鼠脾细胞在体外刺激后细胞内 IFN- γ 表达的结果。给出的数值是双阳性细胞所占的百分比。上面的平板指染色的细胞是 INF- γ 和 CD44; 下面的平板指染色的细胞是 CD4 和 IFN- γ , 上面一行的标记指的是用于免疫小鼠的载体加上用于体外重复刺激脾细胞的刺激物。能引起免疫的载体是 pcDNA3 (pcDNA3.1)、pWNVh-DJY (pWNVCh) 和 pWNVy-DJY (pWNVcy)。“无 Ag”指的是作为体外翻译的对照组的温育的脾细胞 (例 3 中有描述),“蛋白”指的是用 pWNVy-DJY 体外翻译产生的 Cp 蛋白来温育的脾细胞。

图 11 为 HeLa 细胞在用增强的绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达载体 pEGFP2-N1 单独转染, 或者和 pWNVh-DJY 或 pWNVy-DJY 双重转染后, 用膜联蛋白 V 流式细胞分析的结果。给出的数值是膜联蛋白 V 阳性细胞在 EGFP 阳性细胞中所占的百分数。

图 12A, 12B, 和 12C 为免疫后小鼠产生的 WNV 衣壳蛋白 (Cp) 特异性抗体反应。图 12A: 在第零周、第四周和第八周用 100 μ g 的 pCWNVCP 表达载体或对照载体进行肌肉内注射。免疫后的不同时间收集血清样品并分别按为 1 50, 1 100, 1 200 和 1 400 的稀释度来检测 WNV Cp 特异性抗体。免疫后五个月时检测到 WNV Cp 特异性抗体反应, 误差条状图代表免疫动物结果的标准偏差 ($n=3$)。图 12B: WNV Cp 特异性 IgG 抗体反应传导的 IgG 亚类分析。图中给出了免疫五个月后检测的 WNV Cp 特异性 IgG1 和 IgG2a 反应以及 IgG2a/IgG1 的比例。图 12C: WNV Cp 特异性血清抗体用免疫沉淀印迹/免疫印迹法分析。每一个固定的膜条用来自于 pCWNVCP (W) 或 pCDNA3 (P) 的免疫血清温育。用抗-6X 组氨酸单克隆抗体 (+) 温育的膜条作为阳性抗体对照物。

图 13 为通过刺激 T 细胞产生的 IFN- γ (Th1), IL-2 (Th1) 和 IL-4 (Th2)。如实施例 8 中描述的方法免疫小鼠和制备其脾细胞。分离的淋巴细胞用 WNV Cp 多肽库刺激三天。收集上清液, 用 ELISA 试剂盒检测 IFN- γ , IL-2 和 IL-4 情况。每个实验的条状图的误差代表了标准偏差 (S. D.) 值。

图 14 为通过刺激 T 细胞生产的趋化因子。如实施例 8 中描述的方法免疫小鼠和制备其脾细胞。分离的淋巴细胞用 WNV Cp 特异肽库刺激三天。收集上清液, 用 ELISA 试剂盒检测 RANTES 和 MIP-1 β 趋化因子情况。每个实验的条状图的误差代表了标准偏差 (S. D.) 值。

图 15A 和图 15B 为阳性抗原特异性 CTL 反应的诱导。图 15A: 用 WNV 衣壳多肽库处理靶细胞的方法检测免疫小鼠脾细胞的 CTL 反应。图 15B 收集用于 CTL 检测的第五天的刺激效应细胞的上清液, 并检测 IFN- γ 的产量。每个实验的条状图的误差代表了标准偏差 (S. D.) 值。

图 16A, 16B 和 16C 为肌肉组织分析。从 DNA 注射动物体制备冷冻肌肉切片, 并用苏木精和曙红 (H&E) 染色。显示了 pCDNA3 (对照) 载体免疫的小鼠

(图 16A) 和 pCWNVCp 免疫小鼠的肌肉切片 (图 16B) 的染色图。图放大倍率为 40X。图 16C: pCWNVCp 免疫小鼠肌肉渗入细胞的相同性。按照实施例 11 中描述的方法收集细胞, 并用 CD4, CD8, Mac3, CD11c, CD86 和 B220 抗体通过 FACS 进行鉴定。

图 17 为 WNV Cp 蛋白序列和其它的黄病毒衣壳蛋白序列部分的序列比对。上面为 Kunjin 病毒衣壳蛋白的前 123 个氨基酸序列【KJV; GenBank 系列号为 BAA00176 (gi: 221967), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 9) 和 WNV Cp 蛋白的全部 123 个氨基酸序列的比较。中间为日本脑炎病毒衣壳蛋白的前 113 个氨基酸序列【JEV; GenBank 序列号为 NP_059434 (gi: 9626461), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 10) 和 WNV Cp 蛋白的前 114 个氨基酸 (SEQ ID NO: 11) 序列的比较。下面为登革热病毒衣壳蛋白内部氨基酸序列片段【DEN2; GenBank 序列号为 AAG30730 (gi: 11119732), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 12) 和 WNV Cp 蛋白的第 10 到 98 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 13) 的比较。这个排列需要在 DEN2 序列 LTKR 氨基酸延伸中圈出一个赖氨酸 (在排列的上方出现的 K)。括号中的数字表示相同/同源评分。序列比较和对照是用 Mac 载体进行的。

图 18 为 WNV Cp 蛋白序列和其它病毒衣壳蛋白序列片段以及和原调亡蛋白序列片段的比对。WNV Cp 蛋白的全部序列 (氨基酸 1-123) 出现在图的上面。图中给出了 WNV Cp 蛋白和其它 6 个病毒蛋白以及其它 5 个原调亡蛋白的比较结果。用于比较的病毒蛋白序列是: 1) 人体免疫缺乏病毒-1 (HIV-1) 89.6Vpr 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAA81039 (gi: 1055033), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 27) 和 WNV Cp 蛋白的第 68 位到第 110 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 28); 2) 单纯疱疹病毒主要的衣壳蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAC57106 (gi: 1718277), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 29) 和 WNV Cp 蛋白的第 8 位到第 117 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 30); 3) 埃波拉病毒核酸蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAG40164 (gi: 11761746), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 31) 和 WNV Cp 蛋白的第 10 位到第 117 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 32); 4) 埃博拉病毒糖蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAA96744 (gi: 1141779), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 33) 和 WNV Cp 蛋白的第 4 位到第 23 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 34); 5) 埃博拉病毒糖蛋白内部的另一个蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 35) 和 WNV Cp 蛋白的第 50 位到第 73 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 36); 和 6) 风疹病毒衣壳蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 GNWVR4 (gi: 74519), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 37) 和 WNV Cp 蛋白的第 64 位到第 114 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 38)。用于比较的调亡蛋白原蛋白序列是: 1) 人 BAK 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 Q16611 (gi: 2493274), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 39) 和 WNV Cp 蛋白的第 17 位到第 63 位氨基酸序列 (SEQ ID

NO: 40); 2) 人 Bcl-2 相关 X 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 XP-009093 (gi: 15304386), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 41) 和 WNV Cp 蛋白的第 109 位到第 123 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 42); 3) 人 BIK 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 XP-015353 (gi: 13655199), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 43) 和 WNV Cp 蛋白的第 75 位到第 118 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 44); 4) 人 BID 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 XP-009825 (gi: 13647251), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 45) 和 WNV Cp 蛋白的第 84 位到第 95 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 46); 和 5) 人 Bad 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 CAC22429 (gi: 12309966), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 47) 和 WNV Cp 蛋白的第 15 位到第 23 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 48)。括号中的数值是相同/同源评分, 最高可能的评分是 590。序列比较和对照是用 Mac 载体进行的。

图 19 为 HIV-1 89.6Vpr 蛋白序列和其它病毒蛋白的蛋白片段序列以及原调亡蛋白片段序列的序列对照图。图的上部分为 HIV-1 89.6Vpr 蛋白的完整序列 (氨基酸 1-96)。图中给出了 HIV-1 89.6Vpr 蛋白和其它 6 个病毒蛋白以及和其它 6 个原调亡蛋白的比较结果。用于比较的蛋白序列是: 1) 新德毕斯病毒 p230 非结构蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 NP-062889 (gi: 9790318)】(SEQ ID NO: 49) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 22 位到第 59 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 50); 2) WNV Cp 蛋白的第 68 位到第 110 位氨基酸序列 (参考上图 18 中的描述) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 54 位到第 95 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 51); 3) 黄瓜花叶病毒 2A 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 CAB75953 (gi: 7105855), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 52) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 77 位到第 89 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 53); 4) 黄瓜花叶病毒 2A 蛋白内部的另一个蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 54) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 49 位到第 67 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 55); 5) 风疹病毒衣壳蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 56) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 38 位到第 47 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 57); 6) Nipah 病毒融合蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 NP-112026 (gi: 13559813), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 58) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 60 位到第 72 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 59); 和 7) 呼肠病毒次核形式 Mu2 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAK54467 (gi: 14149150), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 60) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 60 位到第 72 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 61)。用于比较的调亡蛋白原序列有: 1) 小鼠 BIM 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 NP-033884 (gi: 6753192), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 62) 和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 7 位到第 74 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 63); 2) 大鼠 BOD 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAC23593 (gi: 3228566), 文

献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 64)和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 23 位到第 74 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 65); 3) 小鼠 Mtd 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列【GenBank 序列号为 AAC53582 (gi: 2689660), 文献在此处列出作为参考】(SEQ ID NO: 66)和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 16 位到第 67 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 67); 4) 人 Bcl-2 相关 X 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 68)和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 18 位到第 75 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 69); 5) 人 Bcl-2 相关 X 蛋白内部的另一个蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 70)和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 18 位到第 42 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 71); 和 6) 人 Bad 蛋白内部的蛋白片段氨基酸序列 (SEQ ID NO: 72)和 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的第 33 位到第 44 位氨基酸序列 (SEQ ID NO: 73)。括号中的数值是同样/同源性评分, 最高可能的评分是 590。序列比较和对照是用 Mac 载体进行的。

具体实施方式

首选具体实例的详细描述

本发明起于 WNV 衣壳蛋白 (Cp) 具有诱导肿瘤来源的细胞产生细胞凋亡的活性的发现。已经发现体外培养的细胞中 WNV 衣壳蛋白的表达导致对细胞凋亡途径的诱导, 并且最终导致高度增生细胞的死亡。研究还观察到 WNV Cp 蛋白 C-末端的 22 个氨基酸残基肽具有诱导细胞凋亡的活性。WNV 衣壳蛋白的诱导细胞凋亡的活性使得 Cp 蛋白和其功能性片段被用于杀死包括癌症细胞在内的快速生长的细胞以及检测抑制诱导细胞凋亡活性组分的筛选系统, 这些组分可用来治疗 WNV 感染。

黄病毒族病毒是正义单链 RNA 病毒, 分为三个属: 1) 瘟病毒, 包括牛腹泻病毒 (BVDV); 2) 丙型肝炎类似病毒, 包括丙型肝炎病毒 (HCV); 3) 黄病毒。除了未分类的病毒, 黄病毒属还包括至少 10 个血清学决定性亚属。WNV 是蚊生日本脑炎病毒族中的成员, 此病毒族也包括与 WNV 高度相关的日本脑炎病毒 (JEV) 和 St. Louis 脑炎病毒 (SLEV)。其它的属于不同的亚属族的黄病毒包括黄热病病毒 (YFV) 和登革热病病毒 (DENV)。核苷酸和氨基酸序列分析揭示了血清群内部和血清群之间的序列的保持性。WNV Cp 蛋白也和其它包括哺乳动物凋亡蛋白原的非病毒蛋白同源。

在本发明的一些具体实例中, 衣壳蛋白源自于瘟病毒。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的瘟病毒是牛腹泻病毒 (BVDV)。在本发明的一些具体实例中, 衣壳蛋白源自于黄病毒。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的黄病毒是日本脑炎病毒 (JEV)。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的黄病毒是 St. Louis 脑炎病毒 (SLEV)。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的黄病毒是黄热病病毒 (YFV)。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的黄病毒是登革热病病毒 (DENV)。在本发明的一些具体实例中, 获得衣壳蛋白的黄病毒是西尼罗病毒 (WNV)。

本发明提供使用包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白和其它蛋白或其功能性片段诱导细胞死亡的方法，在一些具体实例中，衣壳蛋白或其功能性片段来源于 WNV。本发明也提供筛选抑制包括黄病毒或瘟病毒在内的病毒的衣壳蛋白和其它蛋白或其功能性片段的杀死细胞活性的物质组分的方法。在本发明的一些具体实例中，提供了筛选抑制 WNV 衣壳蛋白或其功能性片段的杀死细胞活性的物质组分的方法。此外，本发明还提供了药物组成，其中包含 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的衣壳蛋白或其它蛋白，或其功能性片段，或编码这些衣壳蛋白或其它蛋白或功能性片段的核酸；给出了用这些药物组合物治疗已经患有细胞高度增生性疾病的方法。本发明还提供了疫苗组成，其中包含一个可药用载体以及衣壳蛋白或其它蛋白，或其片段，或编码衣壳蛋白或其它蛋白或其功能性片段的核酸，这些蛋白或其功能性片段来自于 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒。本发明还提供了鉴定接触过 WNV 和包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的诊断方法和试剂盒。

除非另有说明，本发明在实际实施中，运用了传统的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和 DNA 重组技术等学科中的方法。这些技术在文献中有完整的说明，例如：Sambrook 等编辑，分子克隆：实验手册（第二版），冷泉港实验出版社，冷泉港，纽约州（1989）【Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)】；Ausubel 等编辑，现代分子生物学方法，John Wiley & Sons，纽约市，纽约州（2000）【Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (2000)】；Glover 编辑，DNA 克隆：实用手册，卷 I 和 II (Glover, eds., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I & II)；Colowick 和 Kaplan 编辑，酶学方法，学术出版社 (Colowick & Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press)；Weir 和 Blackwell 编辑，实验免疫学手册，卷 I-IV，Blackwell 科学出版社。（1986）【Weir & Blackwell, eds., *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Pubs. (1986)】；Fields, Knipe, Howley 编辑，病毒学领域(第三版)，卷 I 和 II，Lippincott Williams 和 Wilkins 出版社。（1996）【Fields, Knipe, & Howley, eds., *Fields Virology* (3rd ed.) Vols. I & II, Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996)】；Coligan 等编辑，现代免疫学方法，John Wiley & Sons 出版社，纽约市，纽约州（2000）【Coligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, NY (2000)】，在此列出的文献均作为参考。

本文中贯穿着各种定义。多数单词的意思是由技术熟悉人员对这些单词所赋予的意思。在下面或本文其它地方特别为本发明定义的单词，能够为熟悉该技术的人员提供一个完整的特定的理解。

本文中用到的关于细胞死亡或凋亡的术语“诱导”和“产生诱导作用的”是指导致细胞死亡事件开始的行为，包括诱导细胞凋亡途径中的部分步骤并

导致细胞死亡的细胞活动。

本文中用到的“凋亡”指的是真核细胞死亡的一种形式，它与细胞坏死相区别，包括细胞骨架的破裂、细胞质的皱缩和凝聚、细胞膜外表面磷脂酰丝氨酸的表达和膜外突出，导致细胞膜中小囊泡或凋亡小体的形成。关于细胞凋亡的综述可以参考文献，例如：Utz 和 Anderson, 2000, 生死抉择：信号分子蛋白酶解对凋亡的调节，细胞死亡分化，7: 589-602 (Utz & Anderson, 2000, Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules, Cell Death Differ., 7: 589-602)，此处列出作为参考。

本说明书和附加的权利要求书中的单数词“一个”、“这个”除非有明确的规定，否则均包括其复数形式。因此，例如“一个细胞”也包括两个或更多的细胞的混合物。

本文中用到的关于衣壳蛋白或其功能性片段的短语“有效诱导细胞死亡的数量”和“有效诱导细胞死亡的水平”意思是接触细胞的病毒衣壳蛋白或其功能性片段的数量或细胞中表达病毒蛋白或其功能性片段的水平，这个数量和水平能有效的触发能杀死细胞的事件的产生。

本文中用到的名词“蛋白”指的是一个氨基酸残基的聚合物，并且不限定最短的长度。这个定义包括多肽、肽、寡肽、二聚体、多聚体等等。也包括完整长度的蛋白质和它的片段，以及蛋白质表达后的修饰蛋白，包括（不限于）糖基化、乙酰化和磷酸化作用。

本文中用到的关于病毒衣壳蛋白的短语“其功能性片段”指的是小于完整长度蛋白的保持病毒衣壳蛋白的功能并能诱导细胞死亡或凋亡的蛋白片段。

本文中用到的关于病毒衣壳蛋白的短语“其免疫原片段”指的是小于完整长度蛋白的能引起免疫反应的蛋白片段。

本文中用到的名词“核酸”包括 DNA 和 RNA，及其修饰形式，包括糖基修饰、残基修饰或骨架修饰。

本文中用到的关于编码病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸的短语“完整黄病毒或瘟病毒基因组分离形式”指的是以重组体形式、构建载体形式或以其它形式从它在黄病毒或瘟病毒基因组中的自然状态下分离出来的核酸。

本文中用到的关于编码病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸的短语“完整 WNV 基因组分离形式”指的是以重组体形式、构建载体形式或以其它形式从它在 WNV 基因组中的自然状态下分离出来的核酸。

本文中用到的关于细胞凋亡的术语“可检测水平”意思是可以被技术人员用其技术检测和测量的能诱导细胞凋亡的物质的临界的数量或水平。检测技术依靠测定细胞“凋亡指示物”的存在度或增加度来进行。

本文中用到的细胞“凋亡指示物”指的是可以用于指示细胞凋亡的触发和进程的细胞因子或形态学变化。细胞“凋亡指示物”包括（不限于）：暴露的细胞膜磷脂酰丝氨酸（PS）、游离的 DNA 3'-羟基末端和细胞质核小体。

本文中用到的关于 WNA 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的衣壳蛋白或其它蛋白诱导细胞凋亡活性的抑制剂的“复合物”指的是包括(不限于):任何可以识别的化学试剂或分子,包括小分子、肽、多肽、蛋白质、糖、核苷酸或核酸。这些物质可以是自然状态的也可以是合成的。

本文中用到的关于 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白诱导细胞凋亡活性中用到的“抑制”指的是任何干扰此活性的事件。例如“抑制”包括诱导细胞凋亡活性的消除和减弱。对病毒衣壳蛋白诱导细胞凋亡活性的抑制可以通过多种方式检测,包括(不限于)用 TUNEL(末端脱氧核酸转移酶介导的 dUTP-X 平端标记)测定和用膜联蛋白 V 检测 PS。

本文中用到的“可注射的药物组合物”指的是适合病人使用的药物组分,它无菌、无热源,也没有任何微粒子,参考 Remington 药物科学,第 18 版, Gennaro 等, Mack 出版公司, Easton, PA, 1990 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990) 和美国专利:美国.药典标准,在此处列出作为参考。

本文中用到的“可药用载体”包括任何不给接受组合物的个体造成有害影响的载体。例如,“可药用载体”不应引起接受者产生有害抗体。专业的技术人员都很熟悉适当的“可药用载体”,并且在 Remington 药物科学 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*) 一书(出处见前)中也有描述。

本文中用到的“高度增生细胞”指的是那些在不适当的或不正常的时间或地点生长、分化或增生的细胞,它包括已经结束细胞周期的应该处于 G0 期或静止期的细胞。例如,肿瘤细胞就包括在“高度增生细胞”里。以“高度增生细胞”为特征或与之相关的疾病包括癌症、自身免疫疾病、非恶性生长以及牛皮癣。

本文针对患有以“高度增生细胞”为特征或与之相关的疾病或症状的以及暴露于和/或感染 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的个体中用到的名词“治疗”指的是对疾病或症状的改良和/或消除。

本文在治疗患疾病或症状的个体中用到的短语“有效的数量”或“有效量”指的是足够完成治疗和改善和/或消除这种疾病或症状的数量。

本文在疫苗组合物中用到的短语“免疫有效量”指的是足够诱导一个治疗的或预防性的免疫反应的数量。

本文在治疗个体防止病毒感染时用到的短语“预防性免疫反应”指的是个体的免疫反应是预防性的,保护个体免受病毒感染。

本文在治疗感染病毒的个体时中到的短语“治疗性免疫反应”指的是改善和/或消除病毒感染的免疫反应。

本文在给个体用疫苗药物的数量时用到的短语“治疗有效剂量”指的是足够引起个体治疗性免疫反应的量。

本文在给个体用疫苗药物的数量时用到的短语“预防有效剂量”指的是足够引起个体预防性免疫反应的量。

本文中用到的“个体”指的是能用本发明中的药物组合物和疫苗组合物来

治疗的人和非人类的动物。

本文中用到的“给药”包括（不限于）肿瘤内部注射、皮肤接种、肠胃外给药、皮下给药、肌肉内给药、口服和局部传送。

本文在给药时用到的“肿瘤内部注射”指的是药物成分直接注射入肿瘤部位。

本发明的多个方面涉及 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的衣壳蛋白或其功能性片段所具有的抑制细胞增殖的能力。本发明的多个方面也涉及包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒的其它蛋白或其功能性片段所具有的抑制细胞增殖的能力。这些病毒衣壳蛋白或其它蛋白可以诱导细胞凋亡。在一些具体实例中，WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白，或其功能性片段，和/或编码这些衣壳蛋白或片段的核酸分子被用于药物组合物来治疗患以不良细胞、尤其是高度增生细胞性如癌症或与之相关的疾病的个体。WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白提供一个靶标能阻断活病毒的功能。因此，本发明的一个方面就是可以通过鉴定抑制 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白，或其功能性片段的诱导细胞凋亡的活性的鉴别复合物来鉴定抗-WNV 和/或抗-黄病毒或抗-瘟病毒的组分。

本发明也涉及 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白的功能性片段，和/或编码这些片段或蛋白的核酸来诱导细胞凋亡的活性的使用，以及组成包括 WNV 和包括黄病毒或瘟病毒在内的病毒衣壳蛋白或其它蛋白功能性片段，和/或编码这些片段或蛋白的核酸的药物。在这里用到的“WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白”的“功能性片段”指的是 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的保持了诱导细胞凋亡功能的蛋白片段。在这里用到的“WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白”的“功能性片段”指的是 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白的保持了诱导细胞凋亡功能的蛋白片段。WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白的功能性片段至少含有 10 个来自于 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白的氨基酸，它也可以包含不来自于 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒在内的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白的氨基酸序列。

本发明的特定具体实例中，我们也可以观察到一个来自于 WNV Cp 蛋白的 C-末端的 22 个氨基酸残基的肽具有诱导细胞凋亡的活性。如图 10 所示，此肽（“WNVC-P3”，本文也称“肽 3”）出现在 WNV Cp 蛋白的 90-110 位氨基酸残基中。特别要提出的是，依照本发明的一些具体实例，WNV Cp 蛋白的功能性片段包括 WNVC-P3 肽或其片段。WNVC-P3 肽的片段包含至少 3 个氨基酸，这个片段可以有 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 或 21 个氨基酸残基。WNV Cp 蛋白的 WNVC-P3 肽、其片段、包含 WNVC-P3 肽或其片段的 Cp 蛋白片段、Cp 蛋白或包含 Cp 蛋白序列和非 Cp 蛋白序列的融合蛋白都可以被检测，以决定它们是否持有野生 Cp 蛋白的诱导细胞凋亡的功

能。

WNV Cp 衣壳蛋白与其它病毒，包括但不限于黄病毒家族的病毒和许多其它家族的病毒的衣壳蛋白和其它蛋白也享有同源性。WNV Cp 蛋白也与非病毒蛋白，包括哺乳动物来源的原调亡蛋白享有同源性。WNV Cp 和 HIV-1 Vpr 蛋白（具调亡活性）、Kunjin 病毒 Cp 蛋白、日本脑炎病毒 Cp 蛋白、登革热病毒 Cp 蛋白、单纯疱疹病毒主要衣壳蛋白、埃博拉病毒核蛋白、埃博拉病毒糖蛋白、风疹病毒衣壳蛋白和下列非病毒原调亡蛋白：人 BAK 蛋白、人 Bcl-2 相关 X 蛋白、人 BIK 蛋白、人 BID 蛋白和人 Bad 蛋白之间已鉴定了同源/相同的区域。此外同源/相同区域在 HIV-1 Vpr 蛋白和新德毕斯病毒 p230 非结构蛋白、黄瓜花叶病毒 2A 蛋白、风疹病毒衣壳蛋白、Nipah 病毒融合蛋白、呼肠病毒次核形式 Mu2 蛋白，和下列原调亡蛋白：鼠 BIM 蛋白、大鼠 BOD 蛋白、鼠 Mtd 蛋白、人 Bcl-2 相关 X 蛋白和人 Bad 蛋白之间被鉴定到。

通过检测一个蛋白和肽的序列和测试其诱导细胞凋亡的能力，本领域的一般技术人员不需要过多实验就可以很容易的测定一个 WNV 的或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白片段是否具有活性功能。缩短了的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白可以用常规方法和很容易得到的实验材料制备和检测。此处使用的术语“功能性片段”指的是肽、多肽和以非肽键连接的氨基酸序列、或者包含与至少部分的 WNV 衣壳病毒或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白氨基酸序列完全相同或本质同源的氨基酸序列的蛋白，而且它有诱导细胞凋亡的能力。此处的“本质同源”指的是一个保守替代的氨基酸序列。本领域的一般技术人员用本发明中提供的公开说明和已有的公开技术，就可以制造 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的功能性片段。因此，不需要过多的实验我们就可以用已鉴定的功能性片段取代完整长度的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的使用和配制。

本发明也涉及了疫苗组合物，这种疫苗包含了 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的免疫原片段，和/或编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的免疫原片段的核酸，以诱导个体中预防性或治疗性免疫反应。此处使用的“WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白”的“免疫原片段”指的是具有诱导免疫反应能力的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的片段。WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的免疫原片段至少含有 10 个来自于 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的氨基酸，也可以包含不来自于 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的氨基酸序列。本领域的一般技术人员通过用传统的免疫检测来筛选一个蛋白和肽免疫响应产生的抗体，而不需要过多实验就可以很容易的测定一个 WNV 的或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白片段是否具有免疫原性。例如，这些实验包括，1) 酶联免疫吸附实验 (ELISA)，2) 淋巴器官细胞增生测定，3) 细胞对给定抗原所产生的抗体数量的测定。这些标准测试方法的详细描述可以在 Weir 和 Blackwell，实验免疫学手册，Supra 和 Coligan 编写，免疫学通用方法 (Weir & Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, supra and Coligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology) 等

有关免疫学手册中找到。本领域的一般技术人员可以按照本发明提供的公开说明和已有的广为人知的技术来生产和鉴定 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的免疫原片段。因此，不需要过多的实验我们就可以用已鉴定的免疫原片段取代完整长度的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的使用和配制。

本发明在治疗方面的应用包括在药物组合物中使用 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、WNV 的或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的功能性片段、编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的核酸分子、或者编码 WNV 的或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的功能性片段的核酸分子，和对患有癌症或牛皮癣等高度增生细胞性或相关疾病的治疗。

本发明的一个方面是将 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、或编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸分子用于药物组合物中来治疗以不良细胞为特征的疾病，这些疾病包括（不限于）那些以高度增生细胞为特征的疾病，如癌症或牛皮癣。按照本发明，提供的药物组合物包含 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、或由包含编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白及其功能性片段的 DNA 或 RNA 核酸序列。

本发明的另一个方面涉及包含 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、和/或编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸分子和一个可药用的载体或稀释剂的药物组合物，包含 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、和/或编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸分子的药物组合物对治疗具有高度增生细胞性疾病和症状的病人是有用的。如此处所述，由于 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段的定义就是能诱导细胞凋亡的因子，对以不良细胞（如高度增生细胞）为特征的疾病的有效药物组合物就可包括 WNV 和相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、和/或编码黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白及其功能性片段的核酸分子。本发明中药物组合物对以肿瘤为特征的癌症具有特异性的作用。刺激高度增生细胞凋亡的能力提供了一种破坏高度增生细胞的方式，从而使肿瘤缩小。对诸如癌症和牛皮癣等以不适当高度增生细胞为特征的疾病，本药物组合物通过对细胞凋亡的诱导，来阻滞高度增生细胞，从而达到对疾病的治疗。

如前所述，本发明的另一个方面是对患有与高度增生细胞有关疾病的个体的治疗方法，它包含一个对所说的个体的给药步骤，所用的药中含有足以诱导所述细胞凋亡数量的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、和/或编码这些蛋白和片段的核酸分子。

本发明的另一个方面是一个治疗患有不良细胞相关疾病如自身免疫疾病的个体的方法，这个方法包含一个对所述个体的给药步骤，所用的药中含有足以诱导所述细胞凋亡的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段、和/或编码这些蛋白或片段的核酸分子。

本发明的另一个方面涉及疫苗组合物，它包含 WNV 或相关黄病毒或瘟病

毒衣壳蛋白、或其免疫原片段、和/或编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段的核酸分子，和一个可药用的载体或稀释剂。由 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或它们的免疫原片段组合物的疫苗成分能使个体对 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒产生免疫。这个免疫可以是预防性的（防止感染）或治疗性的（治疗感染）。预防性免疫能保护个体不受病毒的侵扰，治疗性免疫能治疗个体当前所受的病毒性感染。

如前所述，本发明的一个方面是一个治疗感染 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒个体的方法，它包含一个对所述个体的给药步骤，所用药物含有足以诱导一个治疗性免疫反应的数量的 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或其免疫原片段组合物。

本发明的另一个方面是一个防止个体感染 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的方法。这个方法包含给所述个体用药的步骤，所用药物含有足够诱导一个预防性免疫反应的 WNV 或一个相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或它们的免疫原片段组合物。

当 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或其功能性片段作为疫苗组分被用于个体时（不论在疫苗中是以直接的蛋白形式或者是以核酸序列表达的形式被使用），衣壳蛋白或其免疫原片段成为一个诱导个体产生免疫反应的靶点，防御个体不受感染（预防性）或者治疗个体的感染（治疗性）。技术人员会认识到这个免疫反应可以同时是治疗性的和预防性的，因为在一个治疗性的医疗后，此个体可被保护以免被病毒进一步感染。

病毒衣壳蛋白

如上所述，WNV 衣壳蛋白或其功能性片段可以用易得的原料和常规方法来生产。我们已经知道编码 WNV 衣壳蛋白的核酸序列和氨基酸序列。许多 WNV 分离株的完整基因组已经公布并可以在基因库（GenBank）中得到，包括 2741 号分离株（序列为 AF206518）、NY99- 火烈鸟 382-99 毒株（序列号为 AF196835）、毒株 HNY1999 的完整的聚蛋白基因（序列号为 AF202541）和序列号为 M12294 的分离株，在此列出作为参考。有许多涉及 WNV 基因组的序列信息的文章，它们的引文都与 GenBank 中的序列信息有关，在这里列出的每个参考文献，包括公开的可利用的序列信息，都作为参考。

其它黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白和核酸的序列信息在 GenBank 中也可以找到。例如（不限于）GenBank 所提供的毒株和分离株的完整基因组序列包括 JEV（序列号为 M18370，D90194 和 D90195），SLEV（序列号为 M16614），YFV（序列号为 AF094612，U17067，U17066，U54798，U21055，U21056 和 X03700），DENV（序列号为 M23027，U88535，U88536 和 U88537）以及 BVDV（序列号为 M31182），此处列出作为参考。

提供一段编码所需蛋白的合适 DNA 序列可以采用已知的重组技术进行蛋白生产。比如，编码序列可以采用 PCR 引物从被感染的细胞中克隆得到，所用的 PCR 引物可以以公开的可利用的序列信息为基础设计。DNA 序列也可以用

DNA 合成仪化学合成。当编码序列采用化学合成时，可以利用该 DNA 表达的宿主细胞的已知密码子偏好性的优点。另外还可改变编码序列，比如点突变，插入或缺失，来产生对照体和衣壳蛋白其他的修改型。

本领域的一般技术人员，使用已知的技术能够得到编码 WNV 或一个相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白的 DNA 分子，并且将该 DNA 分子插入到一个可利用的商业化表达载体使用在众所周知的表达系统中。例如，商业化的质粒 pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA) 可以用于大肠杆菌生产衣壳蛋白。商业化的质粒 pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) 可以用于酵母细胞如酿酒酵母生产衣壳蛋白。商业化的 MaxBac 2.0 Kit (Invitrogen, San Diego, CA)，带有 pBlueBac4 载体，是一个完整的杆状病毒表达系统，可以用于昆虫细胞如 Sf9 细胞生产衣壳蛋白。商业化的 pcDNA I (Invitrogen, San Diego, CA) 可用于在哺乳动物细胞如 CHO 细胞中生产衣壳蛋白。

本领域的一般技术人员，采用常规技术和易得的起始原料，就能够使用这些商业化的表达载体系统或其他系统生产 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白。

本领域的一般技术人员，可以使用其他商业化的表达载体和系统，或者使用已知方法和易得起始原料来构建载体。包含必须的调控序列，如启动子、多腺苷酸化信号，最好包含增强子的表达系统很容易得到并被用于广泛的宿主中。例如，参见 Ausubel 等编写的分子生物学通用方法 (Current Protocols in Molecular Biology) 一书。因此，所需蛋白可在原核和真核系统中生产，并会产生一系列的蛋白加工形式。

尽管能够使用诸如枯草芽胞杆菌、假单胞菌的其他表达系统，最普遍使用的原核表达系统仍然是大肠杆菌表达系统。原核系统合适的调控序列包括组合物型和诱导型启动子，但这些启动子包括 (不限于): lac 启动子、trp 启动子、杂合启动子如 tac 启动子、 λ 噬菌体 P1 启动子。一般而言，在这些宿主中外源蛋白可以以融合蛋白或完整蛋白形式生产。当所需蛋白以完整蛋白形式生产时，生成的序列前面可能会有一个甲硫氨酸，这个甲硫氨酸不必被有效去除。因此，在此所要求的多肽和蛋白在细菌中生产时其 N 末端可能会有甲硫氨酸。而且，可以构建在肽链编码序列前加上一个可操作的信号肽从而导致蛋白分泌表达的表达式。在原核宿主中以这种方式表达时，信号序列在蛋白分泌时被切除。

现在，许多真核宿主也被用来生产重组外源蛋白。尽管在细菌中，原核宿主在被表达系统转化后能直接产生所需蛋白，但更普遍采用的是用信号肽序列来实现蛋白的分泌表达。真核系统有个额外的优点，能够加工内含子，内含子可能在编码高等生物体蛋白的基因组序列中存在。真核系统还提供许多加工机制，例如这些加工机制可以产生糖基化、羧基端酰胺化、某些氨基酸残基的氧化或衍生化、构象调节等。

一般使用的真核体系包括 (不限于): 酵母细胞、真菌细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞、鸟细胞和高等植物细胞。类型的宿主细胞，都有与之相适应

的合适的启动子。另外，还有相应的终止序列和增强子，如杆状病毒多角体增强子。如上所述，启动子可以是组合物型的或诱导型的。例如，在哺乳动物体表达系统中，小鼠金属硫蛋白启动子被重金属离子诱导。

适合所需宿主的表达系统的构建细节对技术人员来说是已知的。对于蛋白的重组生产来说，将编码蛋白的 DNA 序列合适地连接到所选的表达载体上，然后转化合适地宿主细胞，宿主细胞在一定条件下培养表达蛋白。从该培养物中，通过裂解细胞或从培养基中分离得到本发明的蛋白，这些对技术熟悉人员来说是已知的。

一个具有普通技术的技术熟练人员，可以采用已知的技术分离得到用这些表达系统生产的 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白。

除了通过重组技术生产这些蛋白外，多肽合成也可用于 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能片段的生产。需要注意地是如果蛋白是化学合成的，氨基酸可以由不能被基因编码的氨基酸取代。例如，可选的氨基酸残基分子式为 $H_2N(CH_2)_nCOOH$ 的氨基酸，其中 n 为 2~6。这些都是中性非极性氨基酸；肌氨酸 (Sar)、叔丁基丙氨酸 (t-BuAla)、叔丁基甘氨酸 (t-BuGly)、N-甲基异亮氨酸 (N-MeIle)、正亮氨酸 (Nleu) 也属于这类氨基酸。例如，芳香族中性氨基酸苯基甘氨酸能够取代色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸；瓜氨酸 (Cit) 和蛋氨酸亚砷 (MSO) 为极性的中性氨基酸，环己基丙氨酸为非极性中性氨基酸，磺丙氨酸 (Cya) 为酸性氨基酸，鸟氨酸 (Orn) 为碱性氨基酸。如果一个或更多的脯氨酸残基被羟脯氨酸所取代，可得到脯氨酸残基所具有的构象特性。

本发明公开的部分涉及药物组合物，公开的另外部分涉及治疗性或预防性的疫苗组合物。本发明的药物组合物对个体给药以杀死细胞，本发明的疫苗组合物对个体给药是为了诱导预防性或治疗性的抗病毒免疫反应。本发明的药物组合物是以有效诱导细胞凋亡和杀死细胞的数量给药。本发明的疫苗组合物是以有效诱导免疫反应的数量给药。

无论组分被制备成药物或是疫苗，组合物成分的很多方面、配方、剂量、药物和疫苗的给药都是相关的，而且可以是完全相同的，这些很容易被熟悉的技术人员所理解。例如，本发明的药物组分和疫苗两者都可能包含 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或相关的片段。在药物组合物中衣壳蛋白或相关片段将在细胞凋亡方面起作用，而在疫苗当中衣壳蛋白或相关片段是作为免疫原的。本发明的相关方面被认为与药物组分和疫苗都有关。

根据选用的给药方式而确定的药物组合物，技术熟练的技术人员可配制药物组合物。该药物成分被用于治疗以高度增生的细胞为特征性疾病。该药物成分包含有 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段，和一个可药用的载体或稀释剂。可药用的载体描述见 Remington 药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) 一书，该书为该领域标准参考书。

对所有给药途径的共同要求是有效性和容易实施性。本发明的一个具体实例中，药物组分通过注射给药。在一个首选的具体实例方案中，药物给药采用肿瘤内注射。其他的给药方式包括 (不限于)：皮肤给药、皮下给药、腹

膜内给药、粘膜给药或一般的持续给药。

例如，对肠胃外给药，WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段与合适的肠胃外载体可被配制为溶液、悬浮液、乳剂或冻干粉。这样的载体例子有：水、盐水、林格液、葡萄糖溶液、5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体如不挥发油。载体或冻干粉可包含维持等渗性的添加剂（如氯化钠，D-甘露醇）和保持化学稳定的添加剂（如缓冲剂和防腐剂）。制剂通过普遍使用的技术灭菌。例如，适用于注射给药的肠胃外的药物可按 1.5% 的活性成分重量比用 0.9% 氯化钠溶液配制。

尽管个体的需要会有变化，最佳的药物有效剂量范围可用一定的技术方法确定。根据动物研究，很容易推断出人类的剂量，见 Katocs 等，Remington 药物科学，第 18 版，第 27 章，Gennaro 编写，Mack 出版公司，Easton, PA, 1990 (Katocs *et al.*, Chapter 27 In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990)。一般来说，药物剂量要求提供有效的药物量，这个剂量可由熟知该领域的人员进行调整，它根据几个因素而变化，包括年龄、健康、身体情况、体重、受体疾病的类型和程度、治疗频率、同时治疗的特性（如果需要）、和预期效应的性质和范围，见 Nies 等，Goodman 和 Gilman 治疗药物基础，第 9 版，第三章，Hardman 编写，McGraw-Hill，纽约市，纽约州，1996 (Nies *et al.*, Chapter 3 In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill, New York, NY, 1996)。通常，WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段的每日剂量大约为 $1\mu\text{g}^{-100\text{mg/kg}}$ 体重。为了有效的达到预期效果，一般剂量为每天 $0.5\text{mg}^{-50\text{mg/kg}}$ 体重，更合适的剂量为每天 $1\text{mg}^{-10\text{mg/kg}}$ 体重，每天分 1-6 次或以持续释放形式给药。

根据本发明药物组分可以单剂量或多剂量给药。本发明药物组分可以单一治疗制剂或联合其他治疗制剂进行给药。本发明的治疗可以结合常规疗法，可顺序或同时给药。

任何能够使活性成分达到受体体内的作用位点的给药方式都可以用于包含 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段或衍生物的药物给药。由于蛋白通过口服给药会被消化，一般使用肠胃外给药如静脉、皮下、肌肉给药来优化吸收。另外，本发明药物可以在细胞高度增生部位或附近位点注射。例如，给药可以直接对肿瘤硬块注射或注射在直接与之相邻的组织中。如果要治疗患有牛皮癣的个体，WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或功能性片段可用合适的外用载体配制成霜剂、洗液、软膏外用给药。

根据所选用的给药方式确定的药物组合物，技术人员可制备疫苗制剂。该疫苗用于预防或治疗 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒对个体的感染。该疫苗成分包含有 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段，还包含合适的药物载体或稀释剂。合适的药物载体描述见 Remington 药物科学 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*) 一书，该书为该领域标准参考书。

可药用的载体也包括其它任何不会对受体产生有害抗体的载体。适用的载体包括代谢缓慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。这些载体都为对该领域熟悉的人员所知。另外,这些载体可作为免疫刺激试剂(佐剂)。此外,抗原还可以连接到一个细菌类毒素上,如白喉或破伤风的类毒素。

可以和本发明疫苗同时使用的佐剂包括(不限于):(1)铝盐,如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;(2)水包油乳化制剂,如(a)合成佐剂(SAF),Chiron公司(Emeryville, CA), (b)Ribi佐剂系统(RAS)(Corixa, Seattle, WA),该佐剂包含去毒内毒素和分支杆菌细胞壁成分和2%角鲨烷;(3)水包油乳化制剂,如TiterMax, CytRx公司(Norcross, GA);(4)皂角佐剂,如Stimulon(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)或能产生免疫刺激复合物的颗粒;(4)弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(FIA);(5)细胞因子,如白细胞介素(IL-1, IL-2等)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等;(6)能够作为免疫刺激试剂提高疫苗成分免疫效果的其他物质。

典型的本发明的疫苗包含稀释剂如水、盐、甘油、乙醇等。另外,辅助物质如保湿剂或乳化剂, pH缓冲物质等类物质可以存在于载体中。

典型的本发明的疫苗是被制备成溶液或悬浮液形式的血管注射剂。也可以被制备成适合于溶解或悬浮的固体制剂,在注射前用液体载体溶解和悬浮。如上面在可药用的载体中所述那样,为了加强佐剂效果,制剂也可被乳化或包在脂质体中。

本发明疫苗组合物包含有效数量的WNV或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白,或其功能性片段或衍生物。任何能使受体免疫系统产生预防性或治疗性免疫反应的给药方式都可用于该疫苗的给药。WNV或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白,或其功能性片段或衍生物的免疫有效剂量是对个体的给药量,给药无论以单剂量或作为系列给药的一部分进行,对个体预防或治疗都是有效的。用量随以下条件不同而不同:被治疗个体的健康和身体情况、被治疗个体的分类(如非人类灵长目动物、灵长目动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、需保护的程 度、疫苗的配方、药学情况的医师评价及其它相关因素。我们期望药物用量落在一个比较宽的能通过常规试验测定的范围内。

对任何给药途径的一个共同要求是有效性和容易实施性。本发明的一个具体实例中,疫苗通过肠道外给药如注射,可以是皮下注射或肌肉注射。其他的给药方式包括(不限于):皮肤给药、皮下给药、腹膜内给药、粘膜给药或一般的持续给药。剂量处理可以是单剂量或多剂量方案。疫苗可以与其它免疫调节因子和/或其它疫苗联合给药。

核酸

本发明的另一方面涉及含有编码WNV或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白,或其功能性片段的核酸分子及可药用的载体或稀释剂的药物构成。根据本发明,编码WNV或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白,或其功能性片段的遗传物

质以一种能表达的形式导入个体中。遗传物质 DNA 或 RNA 被个体细胞摄取并表达。由此生成的 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段能诱导高度增生细胞的凋亡。因此，含有编码 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段遗传物质的药物和含有 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段的药物一样有用：用于治疗以高度增生细胞为特征的或与之相关的病状的个体。本发明药物构成对治疗以硬肿瘤为特征的癌症特别有用。

本发明进一步的方面涉及治疗患有与高度细胞增生有关疾病的个体的治疗方法。治疗方法包含将一定量的核酸分子给所述个体给药，核酸分子包含编码 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段的核酸序列，并且要可执行的连接到表达这些序列所必须的调控元件上。

本发明的另一方面涉及含有编码来自于 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒的衣壳蛋白，或其免疫原片段的核酸分子及可药用的载体或稀释剂的疫苗。根据本发明，编码衣壳蛋白或其免疫原片段的遗传物质以一种能表达的形式导入个体中。遗传物质 DNA 或 RNA 被个体细胞摄取并表达。由此生成的衣壳蛋白，或其免疫原片段用来诱导个体的免疫反应。因此，含有编码 WNV 或相关的黄病毒、瘟病毒来源的衣壳蛋白，或其免疫原片段的遗传物质的疫苗和衣壳蛋白的疫苗一样可以免疫个体。如果个体未受感染，免疫是预防性的；如果个体已被感染，免疫是治疗性的。因此，本发明更深的方面是关于防止感染或治疗感染个体的方法。

编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒的衣壳蛋白或其功能性片段的核苷酸序列，与个体细胞中表达所必需的调控元件可实施性的连接，可以被作为药物组分使用基因治疗策略来递送，这些策略包括（不限于）使用病毒载体如腺病毒或逆转录病毒载体，或直接的核酸转染。用病毒载体传送感兴趣的蛋白的编码核酸的方法已经有广泛的报道。用常规方法从起始原料中可以得到一个重组病毒载体如逆转录病毒载体、腺病毒或腺关联病毒载体。重组病毒载体包含一个编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核苷酸序列。这个载体与可药用的载体或稀释剂结合，得到的药物制剂可以给个体用药。一旦个体感染病毒载体，被感染的细胞中就会产生 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白、或其功能性片段。

编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其免疫原片段的核苷酸序列，与个体细胞中表达所必需的调控元件可执行性的连接，可以被作为疫苗组分应用，疫苗组分包含病毒载体，例如：腺病毒，腺相关病毒，痘苗病毒或逆转录病毒，或细菌或分支杆菌载体。此外，核苷酸序列也可以与活的和/或减毒的疫苗联合使用。

另一个选择，一个包含编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性或免疫性片段的核酸序列的分子，可以通过直接核酸转移被作为药物组分或疫苗给药，而不使用感染性载体。此核酸分子可以是 DNA 或 RNA，最好是 DNA。此 DNA 分子可以是线性的也可以是环状的，最好是质粒。此核酸分子

可与一个可药用的载体或稀释剂合用。

如上所述，本发明的药学成分和疫苗的组成、配方、剂量和给药的许多方面是相关的，并且可以是相同的。例如：本发明中的药物组合物和疫苗都可包含一个编码 WNV 和相关黄病毒和瘟病毒衣壳蛋白或其片段的核酸。药物组合物中的编码衣壳蛋白或其片段的功能是诱导细胞凋亡的活性，而疫苗中编码的衣壳蛋白或其片段是作为免疫原。相关方面的公开部分被认为与药物组合物和疫苗两部分都有关联。

重要的是，在药物组合物中，核酸的用量必须足以表达出足够的产物来诱导细胞死亡。如果核酸编码的是片段，则此片段必须是功能性片段。免疫原性不是药物组合物相关的特征，然而，在疫苗组合物中，免疫原性是决定性的。疫苗的基本活性是诱导一个预防性的或治疗性的免疫反应。如果核酸编码的是一个片段，则此片段必须是免疫原片段。

按照本发明，包含一个编码 WNV 或一个相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，或其功能性片段的药物成分或疫苗可以直接用于个体给药。遗传物质被引进个体的体细胞内。首选的给药路线包括肌肉注射、腹膜内给药、真皮内给药的以及皮下给药。另一种选择，就是将药物成分通过不同的方法引入从个体中取出的细胞中。例如，这些方法包括：转染、电穿孔和微粒轰击。细胞吸收核酸分子后，将细胞重新植入个体中。期望的是即使此处用的预防接种疫苗的细胞最初来自于另一个个体，这个带有遗传重组体的非免疫原细胞也可以被植入到其他个体中。

遗传重组体可以通过很多工具来给药，包括但不限于：传统的注射器、无针注射设备或“微粒轰击基因枪”。在本发明的一些具体实例，遗传重组体是用无针注射设备对个体给药。在本发明的一些具体实例，遗传重组体是采用无针注射设备同时对个体的真皮、皮下和肌肉给药。无针注射设备是很熟悉的和被广泛使用的一种设备，一般技术人员按照本文的指导，就可以用无针注射设备来给个体的细胞导入遗传物质。无针注射设备非常适合对所有组织导入遗传物质。他们特别适合将遗传物质导入皮肤和肌肉细胞。在一些具体实例中，一个无针注射设备可以被用来注射包含 DNA 分子的液体进入个体皮肤表面，液体以一种足够的速度冲击皮肤，使液体能渗透皮肤的表面，透入其下的皮肤和肌肉组织，因此，遗传物质能同时对真皮、皮下和肌肉给药。在一些具体实例中，为了给某个器官的细胞导入核酸分子，可以使用一个无针注射设备来给这个器官的组织传送遗传物质。

按照本发明，基因疫苗可以被直接给药于个体中使其具有免疫性，或将疫苗导入从个体中取出的细胞中，再将细胞重新植入个体。通过以上的任何一种途径，都可将遗传物质导入个体的体细胞中，给药途径包括但不限于：肌肉给药、腹膜内给药、真皮内给药、皮下给药、静脉内给药、动脉内给药、眼内给药和口服以及皮肤穿透给药（皮下穿刺），或通过吸入剂或栓剂。首选的给药途径包括肌肉给药、腹膜给药、真皮内给药和皮下注射。

按照本发明，药物组合物或疫苗组合物包含约 1 纳克 (ng) 到约 2000 微

克 (μg) 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 5ng 到约 1000 μg 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 10ng 到 800 μg 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 0.1 到 500 μg 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 1 到 350 μg 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 25 到 250 μg 的 DNA。在一些首选的具体实例中, 药物或疫苗组合物包含约 100 到 200 μg 的 DNA。

本发明的药物或疫苗组合物的配方是按照所使用的给药方式来确定的。药物或疫苗组合物是血管注射剂时, 它们是无菌、无热源和无微粒子的。最好使用一个等渗的配方。通常, 维持等渗性的添加剂可以包括 NaCl、葡萄糖、D-甘露醇、山梨醇和乳糖。在一些情况下, 最好用等渗溶液例如磷酸缓冲盐溶液。稳定剂包括凝胶和白蛋白。在一些具体实例中, 在配方中要加入一个血管收缩剂。

在一些具体实例中, 核酸分子与一个多聚核苷酸功能增强子或“基因疫苗助长因子”(GVF) 联合用药被导入细胞。多聚核苷酸功能增强子在下列的美国专利中有描述, 美国专利号 (U. S. Patent No.) 为 5, 593, 972 和 5, 981, 505, 及国际申请序列号 (International Application Serial Number) 为 PCT/US94/00899, 1994 年 1 月 26 日存档。此处列出作为参考。GVF 因子在下列的美国专利中亦有描述, 专利号 (U. S. Patent No.) 为 5, 739, 118 和 5, 837, 533 以及国际申请专利序列号 (International Application Serial Number) 为: PCT/US99/04332, 国际存档日期为 1999 年 2 月 26 日, 此处列出作为参考。

与核酸分子联合给药的联合因子可以与核酸分子混合后给药, 或者与核酸分子分开、同时、或在核酸分子给药之前或之后给药。另外, 其它具有转染因子和/或复制因子和/或刺激性因子功能的因子, 并且它们可以与 GVF 一起或不与其一起联合给药, 这些因子包括生长因子、细胞因子以及淋巴因子如 α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子 (PDGF)、肿瘤坏死因子 (TNF)、表皮生长因子 (EGF)、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、成纤维细胞生长因子, 表面活性剂如免疫刺激复合物 (ISCOMS), 弗氏不完全佐剂, 脂多糖 (LPS) 类似物包括单磷脂 A (MPL)、胞壁酰肽、苯醌类似物、小囊泡、角鲨烯和鲨烯和透明质酸。在一些具体实例中, 一个免疫调节蛋白被作为 GVF 使用。

按照本发明, 导入细胞的核酸分子, 被作为一个遗传模板, 使细胞表达产生预防性和/或治疗性免疫的功能的蛋白。在首选的具体实例中, 核酸分子包含动物细胞中转录和翻译编码区所必需的调整序列。

本发明涉及改良的减毒活疫苗和使用重组载体导入编码抗原的外源基因的改良疫苗, 减毒活疫苗和那些用重组载体来导入外源抗原的疫苗例子在下列美国专利中有描述: 美国专利号为 4, 722, 848; 5, 017, 487; 5, 077, 044; 5, 110, 587; 5, 112, 749; 5, 174, 993; 5, 223, 424; 5, 225, 336; 5, 240, 703;

5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,389,368; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; 和 5,482,713, 每个在此列出的文献均作为参考。基因重组子提供了可执行性的和在疫苗中具有有效表达功能的调节序列连接的编码病毒衣壳蛋白的核苷酸序列。按照本发明,基因重组子是用减毒活疫苗和重组疫苗来产生疫苗的。

按照本发明中药物和疫苗组合物方面的描述,药物和疫苗组合物包含约 0.1 μ g 到约 1000 μ g 的 DNA。在一些首选的具体实例中,药物和疫苗组合物中包含约 1 μ g 到约 500 μ g 的 DNA。在一些首选的具体实例中,药物和疫苗组合物中包含约 25 μ g 到约 250 μ g 的 DNA。最佳的药物和疫苗组合物中 DNA 的含量约为 100 μ g。

按照本发明中药物和疫苗组合物方面的描述,如前讨论,药物和疫苗组合物的配方按照所使用的给药方式来确定,本领域的一般技术人员可以很容易的给出一个编码 WNV 或相关黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段的核酸分子的配方。在选择肌内注射方式给药的情况下,要使用一个等渗的配方。一般来说,维持等渗性的添加剂可以包括 NaCl、葡萄糖、D-甘露醇、山梨醇和乳糖。也可以使用等渗溶液如磷酸缓冲盐溶液。稳定剂包括明胶和白蛋白。在疫苗组合物中,加入佐剂或免疫刺激剂可以更理想。

凋亡试验

本发明另一个方面描述了鉴定能抑制 WNV Cp 或衣壳蛋白,或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的其它蛋白,或其功能性片段诱导细胞凋亡的组合物的方法,该方法包括的步骤为:在待测组合物存在的情况下,将足够诱导出可检测到细胞凋亡的定量 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白或其它蛋白,或其功能性片段与上述细胞进行首先接触;再对上述细胞进行观察以鉴定待测组合物存在时是否发生凋亡。能干扰 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白或其它蛋白,或其功能性片段的凋亡诱导活性的组合物可用作抵抗病毒和治疗 WNV 和包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒感染的药物。

本发明这个方面可用于鉴定能对 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白,或其功能性片段的诱导扩增细胞凋亡活性起抑制作用的组合物。本发明并提供了一种分析方法用来比较待测组合物存在或不存在时,WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白,或其功能性片段对凋亡的诱导作用。用该分析方法可鉴定出能抑制 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白,或其功能性片段的凋亡诱导活性的组合物。该组合物可用于抗 WNV 和/或抗黄病毒或抗瘟病毒的治疗。

本发明中提供的方法包括的步骤有,在待测组合物存在的情况下,细胞与 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白,或其功能性片段进行接触;观察这些细胞以鉴定 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白,或其功能性片段是否能诱导凋亡;将待测组合物不存在时,细胞与 WNV 或包

括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段进行接触的试验作为对照；将不存在 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段时，细胞与待测组合物进行接触的试验作为另一对照。如果当待测组合物存在时，与 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段进行接触的细胞不发生凋亡，则表明待测组合物具有抗凋亡的活性。该活性可通过待测组合物不存在时与 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段进行接触的细胞发生可检测的凋亡，而当不存在 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段时，细胞与待测组合物接触后不发生凋亡这两种情况来证实。

优选以溶液形式提供该待测组合物，系列稀释待测组合物后可用于一系列的分析试验，待测组合物的浓度可从 $0.01\mu\text{M}$ 增加到 1M 。待测组合物最终优选浓度范围为 $10\mu\text{M}$ 到 $100\mu\text{M}$ 。

WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段可以多种方式加入到试验中。在本发明的一些具体实例中，它是作为蛋白与细胞结合。WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段可直接加入细胞培养基中。可用如前所述的已知的技术从广泛使用的起始材料中生产 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段。使用 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段的优选浓度范围为 $1\mu\text{g/ml}$ 到 1mg/ml 。

在本发明的其它具体实例中，分析试验中细胞内的 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段是由核苷酸表达。在一个不限定的实例中，试验中细胞内的 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白，或其功能性片段可在能诱导的启动子的控制下由核苷酸表达。

细胞凋亡可通过检测特征性的细胞变化或“凋亡标志物”的方法来进行观察。比如，在凋亡早期、最终的细胞死亡之前，细胞膜的变化会导致磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜中向外突出。凋亡过程中 PS 的持续暴露使之成为一个有用的“凋亡标志物”和各种检测技术的具吸引力的靶目标。膜联蛋白 V 是一种人内源性蛋白，它与 PS 有很高的亲和性，可作为检测细胞进入凋亡的便利的反应物。荧光标记的膜联蛋白 V 可用于组织学的和细胞分类研究中对凋亡细胞的鉴定。比如，膜联蛋白 V 可与藻红蛋白 (PE) 连接，PE 为含 25 个氟的大分子，是当今使用的最亮的染色剂之一。PE 可购买，也可用已知的分离方法从藻类中分离。结合技术是专业人士知道的，并且结合试剂盒也能购买，如 ProZyme, Inc (San Leandro, CA)。关于可用于流式血球计数仪和其它应用使用的荧光蛋白结合的细节和方案可见 Hardy, R., 流式细胞仪使用的荧光蛋白的纯化和偶联, 第四版. 实验免疫学手册, Weir, Herzenbery, 和 Herzenbery 编写, Blackwell 科学出版社, 波士顿, 1986 (Hardy, R., Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry, 4th Ed. Handbook of Experimental Immunology, Weir, Herzenbery, & Herzenbery, eds., Blackwell Scientific Pubs., Boston,

1986), 文献在此处列出作为参考。此外, 放射性标记的膜联蛋白 V 可用于体内肿瘤中凋亡细胞的放射性药物成像。

游离 3'-羟基 DNA 末端也是一种“凋亡标记物”, 它是由选择性活化的 DNases 内引起的细胞 DNA 的核小体内片段化产生的。这些游离 3'-羟基 DNA 并不在健康细胞的完整的基因组 DNA 中存在, 也不存在于由坏死导致的死亡细胞中。与凋亡相关的游离 3'-羟基 DNA 可通过末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 平端标记试验 (TUNEL) 被原位检测。有关 DNA 分子在细胞凋亡时被切段的检测技术的文献综述见 Kaufmann 等, 2000, 酶分子方法学, 322: 3-15 (Kaufmann *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.*, 322: 3-15)。

凋亡相关的核小体内片段化也可通过夹心式免疫反应检测, 该反应使用了一对核小体两个表位特异的单克隆抗体以捕捉和检测酶联免疫吸附测定试验 (ELLSA) 平板上的细胞质核小体, 详见参考文献 Salgame 等, 1997, 核酸研究, 25: 680-6814 (Salgame, *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25: 680-6814)。该试验也可用于组织培养细胞的大规模筛选。

检测凋亡的试验可通过使用许多不同类型的细胞和用各种方式传送的黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白或其功能性片段来实行。在这方面有基本技能的人按照说明书的指导就可容易地用多种方法来付诸实施。在本发明优选的具体实例中, 试验可使用肿瘤衍生的细胞, 如腺癌衍生的 HeLa 细胞系和横纹肌肉瘤衍生的 RD 细胞系, 或者使用转化细胞, 如腺病毒 DNA 转化的 293 肾细胞系。

本发明进一步描述了将以上方法用于试剂盒来鉴定能抑制 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白, 或其功能性片段的诱导凋亡的活性的组合物。本发明描述的试剂盒由一个装有 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的衣壳蛋白, 或其功能性片段的容器, 和以下中至少一项组合物: 说明书, 对照, 照片或描述数据的图形。此外, 试剂盒可包括含第二个装有检测凋亡试剂的容器, 如藻红蛋白 (PE) 结合的膜联蛋白 V。此外, 说明书能指导试剂盒的使用者使用多种已知的检测凋亡标记物的方法。这个试剂盒也可提供使用者用于试验的细胞。比如, 试剂盒中可包含一瓶深低温保存的肿瘤细胞。

诊断

建立检测 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒蛋白抗体存在的诊断试剂是非常需要的。

本发明描述了用于鉴定待测样本中 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白的存在和/或含量的诊断检测方法。本发明提供了识别 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白的抗衣壳蛋白抗体。个体的待测样本中存在的衣壳蛋白可能是已被感染的良好标志。

本发明描述了通过检测样本中衣壳蛋白的存在来鉴定受到 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒感染的方法。抗体优选单克隆抗体, 最好是采

用人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞或酵母细胞中生产的衣壳蛋白作为抗原所获得的抗体。对个体样本中存在的衣壳蛋白进行定量可用于决定感染个体的病情预断。

本发明描述了与 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白特异性结合的抗体，抗体优选单克隆抗体，最好是采用人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞或酵母细胞中生产的衣壳蛋白作为抗原所获得的抗体。

本发明描述了鉴定受 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒感染的个体的试剂盒，包括第一个装有特异结合 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白的抗体的容器和第二个装有作为正对照的衣壳蛋白的容器。抗体优选单克隆抗体，最好是采用人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞或酵母细胞中生产的衣壳蛋白作为抗原所获得的抗体。该试剂盒可用于个体样本中存在的衣壳蛋白的含量鉴定。

本发明的另一方面描述了鉴定待测样本中抗 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白抗体的存在和/或含量的诊断方法。在本发明的诊断方法中，个体待测样本中抗衣壳蛋白抗体的存在是感染发生的标示。

本发明描述了用衣壳蛋白检测样本中抗 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白抗体的存在来鉴定受到 WNV 或相关的黄病毒或瘟病毒感染的个体的方法。衣壳蛋白优选在人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞和酵母细胞中生产的。个体样本中衣壳蛋白的定量可用于决定感染个体的病情预断。

本发明描述了分离的衣壳蛋白。该衣壳蛋白优选在人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞和酵母细胞生产的。

本发明描述了用于鉴定受 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒感染的个体的试剂盒，该试剂盒包括第一个装有与特异结合 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白的抗体的容器和第二个装有衣壳蛋白的容器。该衣壳蛋白优选在人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞和酵母细胞中生产的。该抗体优选可封闭衣壳蛋白的，在人细胞、CHO 细胞、昆虫细胞或酵母细胞中生产的抗体。该试剂盒可用于对个体样本中的抗衣壳蛋白抗体的含量鉴定。这些信息可用于决定感染个体的病情预断。

检测 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白和抗 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白抗体的试剂盒对研究、诊断和病情预断都是有用的。

检测待测样本中蛋白或抗体的存在的方法是常规的，一个具有普通技能的技术人员可使用已知的方法检测蛋白或抗体的存在与否。一个已知的检测蛋白或抗体存在的方法是结合试验。一个具普通技能的技术人员能轻松的用多种方式来实施检测蛋白或抗体存在的结合试验。比如，抗体可用于检测或定量特异蛋白的免疫试验。抗原也可用于检测或定量特异抗体的免疫试验。一些免疫试验包括使待测样本中的蛋白与一个固相支持结合或与固定于固相支持上的抗体结合。再加入能选择性的结合目的蛋白或者非组合的抗体的可检测抗体。检测可检测抗体的结果表明如果可检测抗体是特异于蛋白的，则目

的蛋白的存在；如果可检测抗体是特异于非组合的抗体，则不含目的蛋白。一些免疫试验包括使待测样本中的抗体结合于固定在固相支持中的抗原，并使用能特异结合于目的抗体或抗原的抗体检测抗原抗体复合物。多种免疫试验过程见80年代免疫试验, A. Voller 等编写, Park 大学(1981)【*Immunoassays for the 80's*, A. Voller *et al.*, eds., University Park (1981)】，文献在此处列出作为参考。

待测样本与固相支持接触时可发生简单结合试验，任何结合到固相支持上的待测样本中存在的蛋白都能被一特异的、可检测的抗体制备物检测。这种技术是点杂交，western 杂交和其它类似试验的本质。待测样本中存在的特异抗体也能用类似的方式检测。特异抗体结合的靶蛋白与待测样本接触，然后与其抗体结合，如果待测样本存在这种结合，专业人士可用多种已知的方法对靶蛋白进行分析。任何存在于待测样本中的抗体与固相支持结合，并用可检测抗原和特异的、可检测的抗体制备物进行检测。

其它免疫试验可以是更加复杂的但能准确提供好结果的。典型的和优选的免疫测定试验包括检测蛋白的“前项”试验，其中结合在固相支持上第一个抗蛋白抗体与待测样本进行接触。经过合适的温育期后，清洗固相支持以除去未结合蛋白。再加入第二个特异于特定蛋白的部分区域而，该区域并不被第一抗体识别的直接抗蛋白抗体。第二抗体优选为可检测的。第二次温育使可检测抗体与通过第一抗体结合到固相支持上的特异蛋白形成复合物。第二次清洗固相支持以除去未结合的可检测抗体。或者，第二抗体可是不可检测的。在这种情况下，在该体系加入能与第二抗体结合的第三可检测抗体，这种“前项夹心式”试验可以是一种决定结合是否发生的简单的是或否的试验，或者是一种通过比较可检测抗体的测量值和从对照中获得的测量值来定量的试验。这种“双位点”或“夹心”试验见参考文献: Wide, 放射免疫分析方法, Kirkham 编写, E. 和 S. Livingstone, Edinburgh (1970) 199-206 页【Wide, *Radioimmune Assay Method*, Kirkham, ed., E & S. Livingstone, Edinburgh (1970) pp. 199-206】。

“前项”试验可应用于存在于待测样本中的抗体，以后可称为“样本抗体”的检测。样本抗体结合的特异靶蛋白结合在固相支持上，并且与待测样本进行接触。经过一段合适的温育期后，清洗固相支持以除去未结合的样本抗体。加入能结合样本抗体 Fc 区域的第一抗体。这个第一抗体优选可检测的。或者，在第一抗体是不可检测的情况下，必须用与第一抗体结合的第二抗体来检测结合。经过第二个合适的、使可检测的抗体与结合在靶蛋白/固相支持上的样本抗体形成复合物的温育期后，清洗固相支持以除去未结合的可检测的抗体。这种“前项夹心”试验也可是一种决定结合是否发生的简单的是或否的试验，也可以是通过比较可检测抗体的测量值和从对照中获得的测量值来进行定量的试验。

其它免疫测定试验类型是所谓的“同时的”或“反向”试验。同时的试验包括一次温育步骤使第一抗体与固相支持结合，同时加入可检测的第二抗体

和待测样本。当温育结束后，清洗固相支持以除去未结合的蛋白。结合于固相支持相可检测抗体存在的检测方法同传统的“前项夹心式”试验一样。这种同时的试验可适用于检测待测样本中抗体的类似方式。

“反向”试验包括逐步的，向待测样本中加入可检测抗体的溶液进行温育，再加入结合于固相支持的抗体再进行一次温育。用传统的方式清洗固相支持以除去未结合的蛋白/抗体复合物和未反应的可检测的抗体。然后，和在“同时的”和“反向”试验进行判定一样，对联系在固相支持上的可检测的抗体进行判定。反向试验也可适用于检测待测样本抗体的类似方式。

免疫测定试验的第一个组合物可以加在能固定蛋白的尼龙膜或其它固相支持上。鉴定待测样本中 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白存在的第一个组合物为抗衣壳蛋白抗体，而检测待测样本中抗衣壳蛋白抗体存在的第一个组合物是衣壳蛋白。“固相支持”或“支持”是指任何可以结合蛋白的材料。已知的固相支持包括玻璃片、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然的或修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。天然的支持物既能是在一定程度上是可溶的，也可针对本发明的目的是不可溶的。支持物的形状可为球形，如圆珠形或圆柱形，也可如试管的内表面形或杆的外表面形。或者表面为扁平的，比如薄层或检测条等形状。专业人士了解许多其它适合的用于蛋白结合的固相支持，或者能通过常规试验的使用对其进行确认。一个优选的固相支持为 96 孔微孔板。

在这种情况下，为了检测蛋白的存在，可使用衣壳蛋白或者抗衣壳蛋白抗体，可检测抗体如抗衣壳蛋白抗体或者抗人抗体。已有一些检测抗体的已知的方法。

检测抗体的一个方法是将抗体与一个酶连接，继而在酶免疫测定 (EIA) 或者酶联免疫吸附试验 (ELISA)，如捕获性 ELISA 中使用该抗体。然后加入酶的底物，酶与底物发生反应产生一个能用分光光度计测量法，荧光测定法或肉眼观察的等方式检测的化合物。用于抗体可检测的标记的酶可以是苹果酸脱氢酶，葡萄球菌核酸酶， δ -5-类固醇异构酶，酵母乙醇脱氢酶， α -甘油磷酸脱氢酶，磷酸丙糖异构酶，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，天冬酰氨酶，葡萄糖氧化酶， β -半乳糖苷酶，核糖核酸酶，尿素酶，过氧化氢酶，葡糖-6-磷酸脱氢酶，葡糖淀粉酶和乙酰胆碱脂酶。专业人士能容易的识别其它也可用的酶。

另一个抗体能被检测的方法是将抗体与放射性同位素连接后用于放射免疫测定 (RIA) 见参考文献，如，Work, T. S. 等，分子生物学实验技术和生物化学。North Holland 出版社公司，纽约 (1978) 【Work, T. S. *et al.*, *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*. North Holland Publishing Co., NY (1978)】。放射性同位素可用 γ 计数器或闪烁扫描计数器等方式进行检测。针对本发明特别有用的同位素是 ^3H ， ^{125}I ， ^{131}I ， ^{35}S 和 ^{14}C 。优选的同位素是 ^{125}I 。专业人士能容易的识别其它也可用的放射性同位素。

也可能用荧光化合物来标记抗体。当适合波长的光线照射荧光标记的抗体时，通过检测其发出的荧光可检测它的存在。最通用的荧光标记化合物为异硫氰酸荧光系，罗丹明，藻红蛋白，藻青蛋白，别藻蓝蛋白，临苯二醛和荧光胺。专业人士能容易的识别其它也可用的荧光化合物。

标记有荧光发射金属如 ^{152}Eu 或其它稀土属金属的抗体也是可检测的。这些金属通过使用金属螯合基团如二乙三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)而粘附上特异蛋白的抗体。专业人士能容易的识别其它也可用的荧光发射金属和其它可使用的金属螯合基团。

标记有化学发光化合物的抗体也是可检测的。化学发光标记抗体的存在可通过检测一系列化学反应中发出的冷光的存在进行鉴定。特别有用的化学发光标记化合物如氨基苯二酰肼，异氨基苯二酰肼，吡啶酯，咪唑，吡啶盐和草酸脂。专业人士能容易的识别其它也可用的化学发光化合物。

同样，一些生物发光物质也可用于标记抗体。生物光物质是一种在生物系统中找到的活性发光物质，在该系统中催化蛋白能增加活性发光反应的效率。生物发光蛋白的存在可通过检测冷光的存在来鉴定。可用于标记的重要生物发光物质为荧光素，荧光素酶和钙敏感蛋白。专业人士能容易的识别其它也可用的生物发光物质。

如果可检测标记为放射性 γ 发射物时，蛋白特异的抗体、抗体片段或衍生物可通过闪烁扫描计数器进行检测。或者，如果标记物为一荧光物质时，可通过荧光计进行检测。在用酶进行标记的情况下，使用酶的底物，并用比色计的方法进行检测。也可参照类似的已设标准肉眼比较底物的酶促反应程度。专业人士能容易的识别其它也可用的、适当的检测方法。

可根据已知的方法鉴定一给定的大量抗体的结合活性。专业人士能通过常规试验容易的鉴定各种鉴定试验的操作和优化试验条件。

在试验中需分别加入含已知量的蛋白的正对照和没有蛋白的负对照。专业人士应该有必要的使用适合的对照的知识。为了鉴定待测样本中衣壳蛋白或抗衣壳蛋白抗体的量，需将待测样本中检测的蛋白量与正对照中检测的蛋白量进行比较。根据正对照的值建立标准曲线，待测样本的蛋白量可从上述标准曲线推断而得。专业人士应该具有构建标准曲线和推断待测样本值的知识。

待测样本包括那些从怀疑感染 WNV 或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒的个体中得到的样本，可由血液，大脑脑髓液，羊水，淋巴液，精液，阴道的液体或其它体液组合物。待测样本也可包括实验室制备的，如那些用于研究目的的样本。如果存在细胞，可用离心或裂解的方法除去。专业人士能容易的鉴别多种用于检测衣壳蛋白或抗衣壳蛋白抗体的待测样本。待测样本可通过用注射针或棉签取出体液等方法获得。专业人士能容易的鉴别其它获得待测样本的方法。

抗体组合物是指检测蛋白所需的一种或多种抗体。比如，用于检测待测样本中衣壳蛋白的抗体组合物包括结合衣壳蛋白的第一抗体和分别结合第一抗体或第二抗体的第二或第三可检测的抗体。

用标准的免疫测定试验来检测待测样本中抗衣壳蛋白抗体的存在。在一定体积的缓冲液中的 10-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的衣壳蛋白被加入到固相支持，如 96 孔微孔板上，每孔加入 50 μl 。温育固相支持足够结合发生的时间后，磷酸缓冲液 (PBS) 清洗以除去未结合的衣壳蛋白。比如，适合的温育时间为室温下 2 小时或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。固相支持再用含 BSA 的 PBS 溶液封闭以防止待测样本中的蛋白非特异的结合在固相支持上。固相支持中加入系列稀释的待测样本后再温育一段足够结合发生的时间。PBS 清洗固相支持以除去未结合的蛋白。再在固相支持混合物中加入识别人抗体 Fc 区域的标记抗人抗体。温育平板足够结合发生的时间后用 PBS 清洗以除去未结合的标记抗人抗体。结合的标记抗人抗体的量既而通过标准技术测定。抗人抗体可用辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体，按使用说明以 1 : 12,000 的比例使用。

用如以下所述的标准的免疫测定试验来检查待测样本中衣壳蛋白的存在。识别衣壳蛋白特异部位的，在一定体积的缓冲液中的第一抗衣壳蛋白抗体被加入到 96 孔微孔板上。温育平板足够结合发生的时间后，PBS 清洗以除去未结合的抗衣壳蛋白抗体。再用含 BSA 的 PBS 溶液封闭平板以防止待测样本中的蛋白非特异的结合在微孔板上。每孔加入系列稀释的待测样本后温育平板一段足够结合发生的时间。PBS 清洗每个孔以除去未结合的蛋白。在每孔中加入识别衣壳蛋白的区域而并不被第一抗衣壳蛋白抗体识别的标记的抗衣壳蛋白抗体。温育平板足够结合发生的时间后用 PBS 清洗以除去未结合的标记抗衣壳蛋白抗体。结合的标记抗衣壳蛋白抗体的量可通过标准技术测定。以 1 : 1000 的比例使用识别衣壳蛋白的兔抗衣壳蛋白抗体。适合的温育条件的例子为室温下 2 小时或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

用于检测待测样本中衣壳蛋白的试剂盒包括固相支持，正对照和负对照，缓冲液，适合的抗衣壳蛋白抗体和同前所述的实施捕获性 ELLSA 的说明书。用于检测待测样本中抗衣壳蛋白抗体的试剂盒包括固相支持，正对照和负对照，缓冲液，衣壳蛋白和同前所述的实施捕获性 ELLSA 的说明书。

尽管公开的关于药物成分和方法的部分主要是描述治疗人的药物和方法，但本发明的成分和方法也能当作兽药使用。治疗非人类动物的方法和治疗人的一样也在本发明的范围内。因此，本发明描述了治疗所有动物，特别是哺乳动物如人，牛，羊，猪，马，狗和猫的方法。

本发明进一步用一些试图对本发明进行说明的例子进行举例说明。这些例子和对它们的解释并不是用于限制本发明的范围。很清楚，本发明还可应用于除了以下描述的特例外的其它方面。各种本发明的修改和变更都可能参考本文的各种条款，因此它们都包括在本发明的范围内。

实施例 1: 构建衣壳蛋白的表达

根据纽约 1999 病毒人体提取物 (WNV-HNY1999) 中报道的多聚蛋白基因序列 (GenBank 序列号 AF202541, Jia *et al.*, 1999, Lancet, 354: 1971-1972), 构建了两个 WNV 衣壳蛋白 (Cp) 的表达载体 (pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY)。

WNV-HNY1999 的基因组结构见图 1 的上半部分。载体构建的框架见图 1 的下半部分。每个构建载体都含 Cp 蛋白开放阅读框及其前面所融合的来源于人 IgE (sIgE) 的信号肽 (前导序列) 编码序列, 并去掉了 Cp 蛋白的第一个氨基酸的编码序列 (去掉了第一个氨基酸 (met))。用含三次分别 PCR 扩增反应的重叠 PCR 的方法构建重组克隆, 并使用设计的, 使在最终的构建载体序列引入物种优化密码子的引物对【Kim 等, 1997, 基因, 199: 293-301 (Kim *et al.*, 1997, Gene, 199: 293-301)】。pWNVh-DJY 含有整个融合 sIgE 信号肽/Cp 蛋白编码序列的人优化密码子。pWNVy-DJY 含有整个信号肽/Cp 蛋白前 6 个氨基酸 (由于除去了第一个氨基酸, 所以为 Cp 蛋白氨基酸残基 2-7) 的酵母优化密码子和剩余 Cp 蛋白编码序列的人优化密码子。此外, 使用 PCR 引物, 在信号肽编码序列的上游引入了一适合的 Kozak 序列。每个编码序列都克隆进入 pcDNA3.1/V5-HisC 表达载体 (Invitrogen, San Diego, CA) 的 HindIII 和 NotI 多克隆位点之间以形成表达载体, 该载体在 CMV 启动子的控制下的表达 Cp-His 融合蛋白。每个构建载体表达相同的蛋白序列, 包括融合于 WNV 的 Cp 蛋白 2-123 氨基酸及其之前的氨基端 sIgE 前导肽和之后的 V5 表位序列和多聚组氨酸的羧基端。

以下为重叠 PCR 构建过程中所使用的 10 个引物:

引物 1. sIgh-VChU1+ (90 碱基)

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGTTGGCCGCGCCACCCGCGTGCACAGCTCTAAGAAACCA
GGAGGCCCCGGCAAGAGCCGCGCC (SEQ ID NO: 14).

引物 2. sIgy-VCyU1.1+ (90 碱基)

ATGGATTGGACTTGGATCTTATTTTTAGTTGCTGCTGCTACTAGAGTTCATTCTTCTAAAAACCA
GGTGGCCCCGGCAAGAGCCGCGCC (SEQ ID NO: 15).

引物 3. sIgh-VChL1- (88 碱基)

GGCTCAGCATGGCGCGCTTCAGGCCAATCAGGCTCAGCACGCGGGGCATGCCGCGCTTCAGCATGT
TCACGGCGCGCTCTTGCCGGG (SEQ ID NO: 16).

引物 4. sIgh-VChU2+ (90 碱基)

GGCCTGAAGCGCGCCATGCTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGCCCCATACGCTTCGTGCTGGCCCTG
CTGGCCTTCTTCGCTTCACCGCC (SEQ ID NO: 17).

引物 5. sIgh-VChL2- (89 碱基)

GGTGCTTCATGGCGGTCTGCTTGTTCACGCCGCGCCAGCGGTCCAGCACGGCGCGGGTGGGGGCAA
TGGCGGTGAAGCGGAAGAAGGCC (SEQ ID NO: 18).

引物 6. sIgh-VChU3+ (89 碱基)

CCGCCATGAAGCACCTGCTGAGCTTCAAGAAGGAGCTGGGCACCCTGACCAGCGCCATCAACCGCC
GCAGCAGCAAGCAGAAGAAGCGC (SEQ ID NO: 19).

引物 7. sIgh-VChL3- (81 碱基)

CGCGCCCACGCTGGCGATCAGGCCAATCATCACGGCAATGCCGGTCTTGCCGCCGCGCTTCTTCTG
CTTGCTGCTGCGGCG (SEQ ID NO: 20).

引物 8. sIgh-VChFS1+ (39 碱基)

CCCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTG (SEQ ID NO: 21).

引物 9. sIgy-VCyFS1.1+ (33 碱基)

CCCAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACTTGG (SEQ ID NO: 22).

引物 10. sIgh-VChFAS2- (37 碱基)

ATAGTTTAGCGGCCGCGCCCACGCTGGCGATCAGGCC (SEQ ID NO: 23).

三套 PCR 扩增引物按以下顺序配对以产生三个重叠 PCR 扩增产物。引物 1 和 3 (对 pWNVh-DJY 进行扩增) 或引物 2 和 3 (对 pWNVy-DJY 进行扩增), 引物 4 和 5, 引物 6 和 7。每套引物都使用 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene, La Jolla, CA)进行自退火和延伸。最后的全长的插入片段用含引物 8 和 10 的引物对(产生 pWNVh-DJY 的插入片段) 或用含引物 9 和 10 的引物对(产生 pWNVy-DJY 的插入片段)进行扩增, 并随之带有 HindIII (5'端) 和 NotI (3'端) 限制性内切酶位点。这些最终的插入片段用 HindIII 和 NotI 进行酶切后, 克隆进入 HindIII/NotI 双酶切的 pcDNA3.1/V5-HisC 载体。产生的重组载体(pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY) 都需经测序证实。图 2 和图 5 分别描述了 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 的限制性内切酶图谱。图 3 和图 6 分别描述了 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 的特征图谱。图 4 和图 7 分别描述了 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 全长的和注释的核苷酸序列。

实施例 2: 由 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 表达的 WNV 衣壳蛋白的生物性质 在组织培养的细胞中由 pWNVh-DJY and pWNVy-DJY 表达的 Cp 蛋白

磷酸钙沉淀法将 2 μ g 纯化的质粒 DNA (pWNVh-DJY 或 pWNVy-DJY) 转染接种于双槽载波片上的 HeLa, RD 或 293 细胞。转染后, 固定细胞并与鼠抗 His 抗体温育后再与 FITC 偶联的羊抗鼠 IgG 抗体温育。紫外显微镜检测基因的表达。Cp 蛋白的表达均可在三种含 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 的细胞系中获得, 并且蛋白定位于细胞质中。使用 FITC 滤光片进行的转染 pWNVh-DJY 的 RD 细胞 Cp 蛋白表达的免疫荧光分析揭示代表 Cp 蛋白定位的绿色荧光。FITC 和罗丹明双滤光片可捕获以区分特异的和背景信号的图像。在双滤光片下的绿色荧光证实了 Cp 蛋白的存在。DAPI 滤光片可用于显示 DAPI (4', 6-二乙酰基-2-苯基吲哚) 染色的细胞核, 并且在光域下 DAPI 滤光片捕获的图像揭示了细胞的形态。

WNV 衣壳蛋白的体外翻译

使用 TNT-T7 偶联的转录/翻译系统 (Promega, Madison, WI) 制备 35 S 标记的蛋白产物。加入 10 μ l 放射性标记的蛋白样品和 1 μ l 抗 His (C 末端) 抗体 (Invitrogen, San Diego, CA) 到 300 μ l RIPA 缓冲液中并轻柔的混匀。4 $^{\circ}$ C 温育 90 min 后, 在蛋白-抗体复合物中加入终浓度为 5 μ g 每管的蛋白 A-琼脂糖微珠 (LKB-Pharmacia Biotech), 样品在旋转摇床上 4 $^{\circ}$ C 温育 90 min。RIPA 缓冲液清洗微珠 3 次, 悬浮微珠于 2x SDS 样品缓冲液中。简单煮沸以从琼脂糖微珠中洗脱免疫沉淀蛋白复合物, 并在 15% 的 SDS-PAGE 上进行分析。比较蛋白样品与商业用的 14 C-甲基化分子量标记 (Sigma) 的迁移率。用 1M

水杨酸钠短暂处理凝胶后，用凝胶干燥仪干燥使凝胶得以固定。干胶过夜在 X 光片 (Kodak) 上曝光。体外翻译的蛋白的分子量为 21.5 kDa (见图 8)。

实施例 3: 表达于 pWNVh-DJY 和 pWNVy-DJY 的 WNV 衣壳蛋白的免疫反应评估多肽

通过能够预测抗原决定区域和亲水区域的 MacVector 软件选择得到了三个 WNV Cp 蛋白的氨基酸序列的组织相容性 (MHC) II 分子限制表位。使用标准多肽合成法合成这些多肽，请序列如下：

多肽名称	WNV Cp 蛋白残基数	氨基酸序列	序列号
WNVC-P1	2-23	SKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPR	SEQ ID NO: 6
WNVC-P2	31-49	KRAMLSLIDGKGPPIRFVLA	SEQ ID NO: 7
WNVC-P3	90-111	TLTSAINRRSSKQKKRGGKTGI	SEQ ID NO: 8

图 8 描述这些多肽在 WNV Cp 蛋白中的排布。

体外翻译的蛋白

使用不含放射性成分的 TNT-T7 偶联的转录/翻译系统 (Promega, Madison, WI)，按实施例 2 所述的方法也可产生非放射性的体外翻译的 Cp 蛋白。使用体外翻译试剂盒 (Invitrogen, San Diego, CA) 中不含表达插入片段的 pcDNA3.1 载体作为体外翻译的对照。

小鼠的 DNA 接种

为了估量针对 WNV Cp 基因产物的 T 细胞调节的免疫反应，建立了一套小鼠体内试验。在 6 周或 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN) 的四头肌内注射 100 μ g 在 PBS 中的 pWNVh-DJY, pWNVy-DJY 或者 pcDNA3.1 (无插入片段) 和 0.25% 盐酸布比卡因 (Sigma, St. Louis, MO)。两周后，小鼠接受另一次 100 μ g DNA 的放大注射。放大注射 13 天后，杀死小鼠收集脾脏，分离淋巴细胞以用于细胞免疫反应的检测。

淋巴增值试验

每组免疫小组取两只小鼠收集脾脏淋巴细胞并按 5×10^6 细胞/ml 的浓度悬浮。立即在 96 孔平底微孔板的每个孔内加入含 5×10^5 细胞的 100 μ l 悬浮液。在各孔内加入终浓度为 5 μ g/ml 和 1 μ g/ml 的重组多肽、体外翻译蛋白或体外翻译对照 (体外翻译蛋白和体外翻译对照蛋白的终浓度为 0.5 μ g/ml)。用伴刀豆球蛋白 A (Con A) 作为正增值对照。设立三个重复实验条件。细胞在 37°C, 5% CO₂ 中温育 3 天。每孔中加入 1 μ Ci 的 ³H 胸苷, 37°C 温育细胞 18 h。收集平板中的细胞后在 Beta 平板测量仪上测量 ³H 参入量 (Wallac, Turku, Finland)。通过以下公司鉴定刺激指数：

刺激指数 (SI) = (试验发生的计数/自然发生的计数)

自然发生的计数小孔包含作为不相关的蛋白对照的 5% 的胎牛血清。结果见表 1。

从 pWNVy-DJY 或 pWNVh-DJY (“H”或“Y”) 免疫小鼠中分离的脾细胞与 WNVC-P3 (“多肽 3”) 或三个全部的 Cp 多肽混合物 (“多肽 123”) 进行温育

后所得到的 SI 值比从基本载体 pcDNA3.1 免疫的小鼠小组分离的脾细胞所得的 SI 值高的多。

表 1

抗原或刺激物	脾细胞来源	蛋白或多肽的浓度		
		5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$
多肽 1	H	0.5	0.7	
	Y	0.8	1.2	
	pcDNA3.1	0.9	1.3	
多肽 2	H	1.7	1.3	
	Y	1.6	1.8	
	pcDNA3.1	0.9	1.0	
多肽 3	H	1.5	2.0	
	Y	1.1	1.4	
	pcDNA3.1	0.8	0.7	
多肽 123	H	2.6	3.9	
	Y	1.8	2.1	
	pcDNA3.1	0.7	1.2	
Y 蛋白	H	0.0	0.8	1.7
	Y	0.0	0.6	1.7
	pcDNA3.1	0.0	1.2	1.2
对照蛋白	H	0.0	0.5	2.7
	Y	0.3	0.4	1.8
	pcDNA3.1	3.8	1.8	1.9
Con A	H	686.5		
	Y	366.9		
	pcDNA3.1	71.8		

表 1 陈述了淋巴增值试验的结果。每个条件下所述的值均为三个小孔的平均刺激指数值。针对每个免疫待测小组，脾细胞是从小组内的两只小鼠中收集来的。“H”是指从 pWNVh-DJY 免疫小组中提取的脾细胞。“Y”是指从 pWNVy-DJY 免疫小组中提取的脾细胞。“pcDNA3.1”是指从 pcDNA3.1 免疫小组中提取的脾细胞。多肽 1, 2 和 3 是指上面描述的 WNVC-P1, WNVC-P2 和 WNVC-P3 多肽。

“多肽 123”是指多肽 1, 2 和 3 的混合物。“Y 蛋白”是指 pWNVy-DJY 重组子体外翻译的 Cp 蛋白。“对照蛋白”是指如上所述的，由不含表达插入片段的 pcDNA3.1 载体的体外表达对照。

流式血球技术仪对细胞内 γ -干扰素的检测

在圆底 96 孔平板的每个小孔中加入 100 μl 添加了 5% 小牛血清 (FBS) 的，含 50 U/ml 重组人白介素 2 (rHuIL-2) (Intergen, Purchase, NY), 10 $\mu\text{g/ml}$ 布雷菲德菌素 A (BD Pharmingen, San Diego, CA), 100 ng/ml 乙酸豆塞外佛波酯 (PMA) (Sigma, St, Louis, MO), 和 1 $\mu\text{g/ml}$ 离子霉素 (Sigma) 的 RPMI-1640 溶液 (R5 培养基)。体外翻译的 Cp 蛋白或对照蛋白按 4 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入到 50 μl 的 R5 培养基中。加入蛋白抗原 (Ag) 以后，每孔加入 50 μl 含 1×10^6 个提取的脾细胞的 R5 培养基。为了补偿流式细胞计数仪，从天然小

鼠中提取的脾细胞只与白介素 2 和布雷菲德菌素 A 温育。平板在 37℃, 5% CO₂ 孵箱中温育 5-6 小时。不含抗原温育的脾细胞作为对照。温育后, 平板在 1200 rpm 离心 5min, 除去上清。每孔的细胞用 200 μl 添加 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 悬浮, 冰上放置 15 min 后 1200rpm 离心, 用 50 μl 含 0.1 μg PE 结合的抗 CD4 抗体和 0.1 μg CyC 结合的 CD44 抗体(均来自 BD PharMingen, San Diego, CA) 的 PBS/1% BSA 重悬。4℃温育 30 min 后, 用 PBS/1% BSA 清洗细胞两次, 吸取细胞并用 100 μl Cytotfix/Cytoperm 溶液 (BD PharMingen, San Diego, CA) 重悬, 4℃温育 20 min。用一倍的 Perm/Wash (BD PharMingen, San Diego, CA) 清洗细胞 2 次, 再用 50 μl 含 0.1 μg 每个样品的浓度的藻胆蛋白 (APC) 结合的抗 γ-干扰素抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA) 的 Perm/Wash 溶液悬浮细胞。4℃温育 30 min 后, 用一倍的 Perm/Wash 溶液清洗细胞两次, 多聚甲醛固定后 4℃保存直到用于流式细胞计数仪分析。

CD44 的表达可作为活化标记。CD44 是广泛表达于造血细胞和非造血细胞中的一种细胞粘连受体。BALB/c 小鼠含相对较多的 CD44^H T 细胞子集。在外围, CD44 表达水平随着 B 细胞, CD4⁺ T 细胞, CD8⁺ T 细胞和记忆细胞的活化而增加, 这种细胞可通过其 CD44^{hi} 表型 (CD44^H 异型的高效表达) 进行鉴定。

CD4⁺ T 细胞依赖性 IFN-γ 的产生可通过流式细胞计数仪进行定量。图 11 陈述的结果表明了对从基本载体 pcDNA3.1 或者 Cp 蛋白表达载体 pWNVh-DJY 或 pWNVy-DJY 免疫的小鼠中提取的脾细胞的抗原特异的 IFN-γ 反应的结果, 从 pWNVy-DJY 免疫小鼠中提取的脾细胞比起从 pWNVh-DJY 免疫小鼠中提取的脾细胞, 在体外翻译的 Cp 蛋白的刺激下能表达更高水平的 IFN-γ。

实施例 4: TUNEL 试验检测凋亡

在 HeLa 细胞, RD 细胞和 293 细胞三个不同的细胞系中, 个体细胞的凋亡可通过 TUNEL 试验鉴定。pWNVh-DJY 或 pWNVy-DJY 构建载体转染的细胞可用 TUNEL 试验检测其凋亡。在三个细胞系中两种构建载体都能诱导凋亡。

TUNEL 试验可使用“原位细胞死亡检测试剂盒, 荧光素”(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 按照使用说明进行试验。DNA 的切割都可由末端转移酶 (TdT) 通过荧光素-dUTP 标记的基因组 DNA 的游离 3'-羟基端进行检测。简而言之, 细胞固定后, 用添加 0.1% Triton-X, 0.1% 柠檬酸钠的 PBS 进行渗透, 然后细胞与含 TdT 和荧光素-dUTP 的“TUNEL 反应混合物”一起温育。通过荧光显微镜检测掺入的荧光素偶联的 dUTP。

使用不同的显微镜滤光片获得数据以鉴定特异信号。由 FITC 滤光片显示的绿色的信号代表凋亡细胞中掺入的荧光素。用 FITC 和罗丹名双滤光片捕获图象以区别特异的凋亡信号和背景信号。在双滤光片下的绿色荧光反映了掺入的荧光素-dUTP 的真实荧光信号。DAPI 滤光片显示了细胞中被 DAPI 染色的核苷酸。并不是所有细胞都是 TUNEL 阳性。在光域中 DAPI 滤光片捕获的图像揭示了细胞的形态, 表明发生凋亡的细胞的核已经收缩。

类似的结果可在含 pWNVy-DJY 构建载体的人成神经细胞瘤 (ATCC #

CRL-2266) 中获得。

实施例 5: 膜联蛋白 V 流式细胞计数仪分析

用含增强的荧光蛋白(EGFP)的 pEGFP2-N1 (Clontech) 表达载体转染 HeLa 细胞为转染标准, 或者用 pEGFP2-N1 与 pWNVh-DJY 或 pWNVy-DJY 的重组载体共同转染 HeLa 细胞。转染两天后, 细胞用藻红蛋白(PE)偶联的膜联蛋白 V 进行染色。染色的细胞用流式细胞计数仪进行分析。膜联蛋白 V 阳性的细胞群体可从 EGFP 阳性事件的阈值开始进行计数, 使用 CellQuest 软件获得所需数据。用 WNV-Cp 处理的细胞所发生的凋亡相对于对照细胞的提高了 10 倍(见图 13)。

实施例 6: WNV Cp 蛋白凋亡诱导区域的分析

实施例 3 和图 11 中所描述的多肽 WNV-Cp 被用于检测其诱导培养中的细胞凋亡的能力。多肽 WNV-Cp 与 SH-SY5Y 成神经细胞瘤细胞(ATCC; Manassas, VA)按 10 μ g 多肽每 1×10^5 细胞的浓度进行温育。24 小时后, 用 TUNEL 试验进行分析。TUNEL 阳性细胞可从用 WNV-Cp 处理的细胞中鉴定, 而不能从胰腺特异性抗原(PSA)的对照多肽处理的细胞中鉴定。

实施例 7: pCWNVCP 免疫诱导抗原特异的体液免疫反应

为调查 DNA 疫苗产生的体内免疫反应水平, 用 pCWNVCP 或对照质粒 pCDNA3 肌肉注射免疫小鼠。在 0, 4 和 8 周时, 向 6-8 星期母 BALB/c 小鼠(Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN)的四头肌中注射含每种 100 μ g 目的 DNA 重组载体的磷酸缓冲液(PBS)和 0.25% 布比卡因-HCl(Sigma, St. Louis, MO)。在注射前和注射后的各个时间点, 小鼠进行眼眶取血, 收集血清以用于以后的分析。收集的血清样品按 1:100, 1:400, 1:800 和 1:1600 的比例稀释, 用 ELLSA 分析反应于 Cp 多肽(WNV-Cp: TLTSAINRRSSKQKKRG GKTGI)的特异性抗体。按前所述的, 参考文献 Kim 等, 1988, CD8 阳性 T 细胞通过趋化因子的表达控制抗原特异性免疫反应, 临床调查杂志, 102:1112-1124 (Kim *et al.*, 1998, CD8 positive T cells controls antigen-specific immune responses through the expression of chemokines, J. Clin. Invest., 102:1112-1124)的方法, 将以 10 μ g/ml 浓度稀释于 PBS 中的 50 μ l WNV-Cp 加入微孔板的微孔中 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS-0.05% Tween-20 清洗平板, 并用含 3% BSA 的 PBS-Tween-20 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。鼠抗血清用 0.05% Tween 进行稀释, 并在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时, 再用 HRP-偶联的羊抗鼠 IgG(Sigma, St. Louis, MO)进行温育。清洗平板后, 用 3'3'5'5' TMD(Sigma)缓冲液显色。

注射前血清(0 天收集的)并不表现任何的 Cp 特异性抗体反应(数据未显示)。用 pCDNA3 对照免疫的小鼠不表现 Cp 特异抗体反应, 但用 pCWNVCP 免疫的小鼠中可检测到有效的抗体反应(图 12A)。值得注意的是, DNA 免疫产生

的 Cp 特异抗体反应水平比从 ATCC (Manassas, VA) 获得的阳性超免疫小鼠血清的 Cp 特异抗体反应水平更有效。

此外, DNA 疫苗诱导产生的 WNVcp 特异 IgGs 的亚族是可鉴定的。据报道, IgG1 同种型由 Th2 性细胞因子诱导, 而 IgG2a 同种型由 Th1 型细胞因子调节【见参考文献 Finkelman 等, 1990, 淋巴因子控制的体内免疫球蛋白同种型选择, 免疫综述年鉴, 8: 303 -333 (Finkelman *et al.*, 1990, Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection, *Ann. Rev. Immunol.*, 8: 303-333)】。为了鉴定 Cp 特异 IgG 亚族的相对水平, 用 HRP 偶联的抗鼠 IgG1 和 IgG2a (Zymed, San Francisco, CA) 替换抗鼠 IgG-HRP。接着再加入 ABTS 底物溶液 (Chemicon, Temecula, CA)。在每一步中, 平板用清洗缓冲液 (PBS+0.05%Tween-20) 清洗 3 次。平板用 Dynatech MR5000 平板读数仪读取 450nm 的光密度。如图 12B 所示, 大多数用 pCWNVcp 进行 DNA 免疫产生的 IgG 反应是 IgG2a 同种型反应。这种强烈的 Th1 型偏差可通过 IgG2a 的放大和 IgG2a 与 IgG1 的相对比例来鉴定。

WNVcp-特异血清抗体可通过免疫沉淀/Western 杂交分析进行鉴定。体外翻译的不带放射性同位素的 WNVcp 蛋白可用抗 6 组氨酸(C 末端)多克隆抗体(MBL, Nagoya, Japan) 进行免疫沉淀, 并在 15% SDS-PAGE 电泳后转移到切成小条的 PDVF 膜 (Millipore) 上。每条与 pCWNVcp 或 pCDNA3 免疫小鼠的小鼠免疫血清 (1:100 稀释) 进行温育, 并与辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗鼠 IgG 以 1:2000 的浓度进行杂交。在浸润后, 膜条用 ECL 化学发光检测试剂盒 (Amersham) 进行显色 (图 12C)。

实施例 8: pCWNVcp 免疫诱导有效的抗原特异 Th1 型细胞免疫反应

T 细胞释放的细胞因子水平反映了免疫反应的指示和放大。刺激 T 细胞产生的 Th1 (IFN- γ 和 IL-2) 和 Th2 (IL-4) 型细胞因子水平是可检测的。IFN- γ 作为原型 Th1 型细胞因子主要由 CD4+ Th1 细胞和 CD8+ T 细胞产生。刺激 T 细胞表达的 IFN- γ 水平反映了 T 细胞反应的放大。IL-2 是主要由外界刺激活化的 T 细胞产生的 Th1 型细胞因子; 它对抗原特异的 T 细胞的增殖和克隆扩增是很关键的【见参考文献 Morgan 等, 1976, 正常人骨髓 T 淋巴细胞的选择性体外生长, *科学*, 193: 1007-1008 (Morgan *et al.*, 1976, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow, *Science*, 193: 1007-1008)】。另一方面, IL-4 是一种在 B 细胞调节的免疫反应中起支配性作用的原型 Th2 型细胞因子【见参考文献 Seder 和 Paul, 1994, 通过 CD4+ T 细胞获得的淋巴因子产生表型, 免疫综述年鉴, 12: 635 -673 Seder & Paul, 1994, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cell. *Annul. Rev. Immunol.*, 12: 635-673)】。

免疫后 CD4+ T 帮助细胞调节的免疫反应水平也是可检测的。每两周分别向小鼠进行两次 DNA 免疫 (每次 100 μ g)。第二次注射后一星期时, 杀死小鼠, 收集脾脏。从脾脏中收集淋巴细胞, 并通过除去红细胞和用新鲜培养基清洗

三次来制备效应细胞, 见参考文献 Kim 等, 1997, 通过共刺激分子基因共传递的 DNA 免疫的体内免疫反应, 自然生物技术, 15: 641-646 (Kim *et al.*, 1997, Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via co-delivery of costimulatory molecule genes, Nat. Biotechnol., 15: 641-646)。分离的悬浮细胞以 5×10^6 细胞/ml 的浓度重悬。吸取 100 μ l 含 5×10^5 细胞的重悬液立即加入到 96 孔平底微孔板的每个小孔中。WNV 衣壳蛋白特异多肽库 (WNVC-P1: SKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPR; WNVC-P2: KRAMLSLIDGKGPIRFVLA; WNVC-P3: TLTSAINRRSSKQKRGKGTGI) 以终浓度为 5 μ g/ml 的浓度一式三份加入到小孔中。在 5%CO₂, 37°C 下温育细胞 4 天。在第四天收集细胞上清并用于使用 ELISA 试剂盒 (Biosource, Camarillo, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN) 的细胞因子 ELISA 检测 IFN- γ , IL-2 或 IL-4 的释放。

如图 13 所示, 在 pCWNVCP 免疫小鼠中可观察到有效表达水平的 IFN- γ 和 IL-2, 而对照免疫小鼠中只观察到背景水平。另一方面, 所有免疫小组的 IL-4 释放水平是类似的。这些结果表明 DNA 疫苗会导致在免疫小鼠中诱导特异的和有效的 Th1 型细胞免疫反应。

实施例 9: 用 pCWNVCP 免疫诱导趋化因子 MIP-1 β 和 RANTES 的抗原特异性产生

通过检测刺激 T 细胞 β -趋化因子 (MIP-1 β 和 RANTES) 的表达情况可延伸疫苗诱导细胞免疫反应的性质。趋化因子对免疫和感染反应起重要的调节作用。它们对于淋巴细胞从导管运输到宿主抵抗的外部位点的分子调节起特别重要的作用。已有报道 T 细胞产生的趋化因子对细胞免疫扩大起关键作用【见上面的 Kim 等 1998, 临床研究杂志, (Kim *et al.*, 1998, J. Clin. Invest., *supra*); 和参考文献 Kim 等, 2000, 巨细胞集落刺激因子 (M-CSF) 能体内调节免疫反应, 吸引树突细胞, 人类基因治疗, 11: 305-321 (Kim *et al.*, 2000, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) can modulate immune responses and attract dendritic cells in vivo, Human Gene Therapy, 11: 305-321)】。因此, 由刺激 T 细胞产生的趋化因子水平能提供额外的对抗原特异细胞免疫反应水平和质量的洞察。按实施例 8 中描述的方法刺激的 T 细胞的上清可用于用 ELISA 试剂盒 (Biosource, Camarillo, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN) 检测 β -趋化因子 MIP-1 β 和 RANTES 的释放情况。用 pCWNVCP 疫苗免疫比用对照载体免疫能显著地诱导更高水平的 MIP-1 β 和 RANTES (图 14)。这些 pCWNVCP 免疫动物的 pMIP-1 β 和 RANTES 水平的增加更加支持上述的 pCWNVCP 免疫诱导抗原特异 T 细胞反应的结论。

实施例 10: pCWNVCP 免疫诱导一抗原特异的 CTL 反应

免疫后抗原特异的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的水平也是可检测的。如前 Kim 等, 1997, 自然生物技术, 上面 (Kim *et al.*, Nat. Biotechnol.,

supra) 所述的方法实行 5 小时 ^{51}Cr 释放体积 CTL 分析实验, 并在测量特异和非特异多肽处理目标所释放的 Cr 之前对效应脾细胞进行体外刺激。在 CTL 培养基中的含 5×10^6 细胞/ml 的效应脾细胞可用 WNV 衣壳多肽库 (KGPIRFVL (SEQ ID NO: 24), GGPGKSRA (SEQ IN NO: 25) 和 IAPTRAVL (SEQ ID NO: 26)) 以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的浓度进行体外刺激 5 天。CTL 培养基包括 RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 10% 胎牛血清 (Gibco-BRL) 和 10% 无 Con A 的 RAT-T-STIM (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)。多肽处理目标可用与 $10 \mu\text{g/ml}$ 浓度的多肽库温育的 P815 鼠肥大细胞瘤 (ATCC, Manassas, VA) 制备。靶细胞用 $100 \mu\text{Ci/ml}$ $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 标记 120 min, 再与刺激效应脾细胞在 37°C 温育 6 h。CTL 裂解在效应细胞 靶细胞 (E T) 为 100 1 和 50 1 比例下测定。特异裂解的百分比可按公式测定:

$$100 \times (\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})$$

最大释放可由含 1% Triton X-100 培养基中靶细胞的裂解来测定。如果“自发释放”计数值超过“最大释放”的 20%, 该分析实验认为是无效的。特异杀死的背景水平可从用 pCDNA3 免疫的对照动物中观察到。然而, 在效应细胞 靶细胞 (E T) 为 100 1 和 50 1 时, 用 pCWNVCP 免疫动物表明阳性 CTL 活性 (图 15A)。此外, 用于 CTL 分析实验体外刺激效应细胞的上清的分析证实了 pCWNVCP 免疫小鼠中 $\text{IFN-}\gamma$ 水平的增加 (图 15B)。

实施例 11: pCWNVCP 免疫诱导淋巴细胞向免疫动物的肌肉内渗入

HIV 和 HSV DNA 免疫模式中疫苗诱导细胞介导的免疫反应的放大与在疫苗注射位点上细胞渗入的水平有很好的相关性【见上面的 Kim 等, 2000, 人类基因治疗, (Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra*); 参考文献 Chattergoon 等, 2000, 通过工程化的 Fas 介导的调亡传递靶抗原到包括树突细胞的抗原呈递细胞, 自然生物技术, 18: 974-979 (Chattergoon *et al.*, 2000, Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis, Nat. Biotechnol., 18: 974-979) 和 Agadjanyan 等, 1999, CD86 (B 7-2) 能起体内驱动 MHC 限制性抗原特异细胞杀伤性 T 淋巴细胞反应当功能, 免疫杂志, 162: 3417-3427 (Agadjanyan *et al.*, 1999, CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted-antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo.*, J. Immunol., 162: 3417-3427)】。为进一步调查 pCWNVCP 免疫诱导的免疫活化的有效性, 在注射位点检测免疫小鼠肌肉组织的免疫组化。

用含 $100 \mu\text{g}$ pCWNVCP 或 pCDNA3 的磷酸缓冲液 (PBS) 和 0.25% 吡比卡因-HCl 肌肉内注射 (进入腔骨肌) 6 至 8 周的母 Balb/c 小鼠 (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA)。转染 48 h 后, 收集腔骨肌。再将新鲜的肌肉组织冻于 O.C.T. 化合物 (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA) 中。用 Leica 1800 冷冻切片机得到 4 微米的冷冻切片。为了检测肌肉中淋巴细胞的存在, 用苏木精和曙红 (H&E) 染液 (Vector Labs) 染色切片。

在尼康 OPTIPHOT 荧光显微镜 (Nikon Inc., Tokyo, Japan) 下用 40 倍物镜 (Nikon Fluo 40X Ph3d2) 观察切片。切片成像可用尼康 UFX-II 曝光控制下的尼康照相机 FX35DX 和柯达 Ektachrome 160T 胶片获得。图 16B 表明免疫细胞显著的渗入到 pCWNVCP 免疫小鼠的肌肉中。

通过 FACS 分析对渗入细胞进行定性。按上面的 Kim 等, 2000, 人类基因治疗, (Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra*) 所述的方法, 从全腿肌肉中解剖肌肉并机械切碎, 从中收集渗入细胞。用带玻璃羊毛塞子的漏斗过滤回收细胞。按前面所述的 Kim 等, 2000, 人类基因治疗, (Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra*) 和参考文献 Chattergoon 等, 1990, 免疫学杂志, 160: 5707-5718 (Chattergoon *et al.*, 1990, J. Immunol., 160: 5707-5718) 所述的方法, 用 CD4, CD8, Mac-3, CD11c, CD86 和 B220 (Pharmingen) 抗体通过 FACS 鉴定渗入细胞。样本通过 Coulter EPICS[®]XL-MCL 流式细胞仪进行分析。pCWNVCP 免疫小鼠中获得到渗入细胞包括 T 细胞 (CD4+ 和 CD8+) 和巨噬细胞 (用抗 Mac3 抗体检测) (图 16C)。免疫肌肉中高水平的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞为高水平 T 细胞的活化提供了进一步证据。另一方面, 从 pCDNA3 (对照) 免疫小鼠中获得肌肉切片并不表现任何细胞渗入的迹象。总而言之, 这些结果证实 DNA 接种能有效的产生抗原特异免疫反应。

实施例 12: WNV 衣壳蛋白与其它黄病毒衣壳蛋白的比对

图 17 显示了 WNV Cp 蛋白与其它黄病毒, 包括 kunjin 病毒 (KJV), 日本脑炎病毒 (JEV) 和登革热病毒 (DEN2) 的衣壳蛋白部分的比对结果, 表明这些蛋白间有很高的相同性。

实施例 13: WNV Cp 蛋白诱导通过线粒体途径的体内和体外调亡

在不存在其它 WNV 基因产物时, 西尼罗病毒 Cp 蛋白在组织培养中诱导快速的核收缩和细胞死亡。调亡是通过线粒体途径诱导的, 因为观察到的线粒体膜位变化与 Caspase 9 活化和下游 Caspase 3 活化是相伴随的。此外, 通过消除突变分析鉴定调亡决定区域位于 WNV Cp 蛋白的 3' 末端。肌肉内注射 WNV Cp 表达盒后, 可清楚地观察到肌肉组织的调亡。更重要的是, WNV Cp 基因向鼠脑的纹状体内的传递导致体内由衣壳蛋白诱导调亡引起的细胞死亡。这些研究表明 WNV 衣壳蛋白的调亡级联的诱导作用是造成病毒发病机理方面的原因, 并且支持抑制这种调亡功能可用于开发有效的治疗 WNV 感染的治疗途径的想法。此外, WNV 衣壳蛋白与一已知的 HIV-1 *vpr* 基因产物的调亡诱导区域有序列上的相同性/同源性。【见参考文献 Ayyavoo 等, 1997, 自然药物, 3: 1117-1123 (Ayyavoo *et al.*, 1997, Nat. Med., 3: 1117-1123); Stewart 等, 1997, 病毒学杂志, 71: 5579-5592 (Stewart *et al.*, 1997, J. Virol., 71: 5579-5592)】(图 18 和 19)

实施例 14: WNV Cp 蛋白和 HIV Vpr 蛋白与其它调亡相关病毒蛋白的比较

Medline 搜查“凋亡”，“脑炎”和“脑膜炎”可得到一系列感染个体为这种病症的各种病毒。这些病毒蛋白的氨基酸序列与 WNV 衣壳蛋白或 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白的氨基酸序列进行比较。

与 WNV 衣壳蛋白的比对 (图 19)

1. HIV-1 - WNV 衣壳蛋白和一已知凋亡诱导蛋白 HIV-1 Vpr 享有的序列同源。
2. **单纯疱疹病毒 (HSV)** - 主要 HSV 衣壳蛋白部分与 WNV Cp 蛋白序列比对结果表明可能的凋亡诱导能力。有趣的是，脑炎的破坏已被暗示与疾病的结果相关联。
3. **埃博拉病毒**是黄病毒家族黄病毒种中的一员。这种病原体被指出能诱导出血性发热。WNV 衣壳蛋白和埃博拉病毒核衣壳蛋白的比对表明在 WNV 和 nef 凋亡区有可检测的氨基酸同源性。与 WNV 衣壳蛋白的糖蛋白比对也显示原凋亡区域同源性。
4. **风疹病毒**是被膜病毒家族的一员，已被指出在体外标准点诱导凋亡。风疹病毒衣壳蛋白的序列比对表明与 WNV 衣壳蛋白，还有 HIV-1 Vpr 蛋白 (见图 19) 和 Tat 蛋白的凋亡区域 (数据未显示) 有同源性。

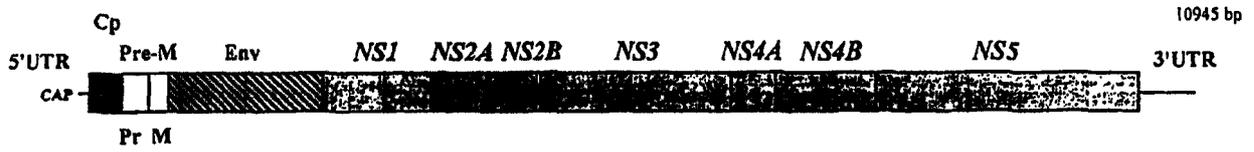
与 HIV-1 89.6 Vpr 蛋白比对 (图 19)

1. **新德毕斯病毒** - 公布数据报告了新德毕斯病毒的凋亡性质，特别是引导神经元细胞死亡。新德毕斯病毒 p230 非结构蛋白与 HIV-1 Vpr 蛋白【和与 Tat 蛋白 (数据未显示)】的比对表明在 Bcl-2 相关的凋亡区域的单独同源性。有趣的是，最近公布数据暗示通过 Bax 新德毕斯凋亡的抑制。
2. **黄瓜花叶病毒** - 以期公布报道已暗示黄瓜花叶病毒能诱导通过坏死完全的细胞杀伤。然而，最近的数据表明西红柿中凋亡性质与细胞死亡相关。有趣的是，我们的 Vpr 89.6 与 CMV 2A 蛋白的序列比对也显示凋亡区域的同源性。与 Tat HIV 基因的比较也认为与 CMV 衣壳蛋白有原凋亡同源性。
3. **HTLV** - 比较这种病毒与 HIV-1 Tat 蛋白为这种病毒的凋亡诱导能力提供了可能的观点。Tat 与 HTLV-1 p27 蛋白的序列比对展示了凋亡区域的序列同源性。
4. **Nipah 病毒** - 这种病毒是副粘病毒家族的一员，能高效使人致死。最近爆发是在新加坡，因此增加了转移到美国的可能性。此外，病毒看起来与西尼罗病毒和其它目标为脑脊髓液，并造成神经脑炎的病毒有类似的临床结果。比较 Nipah 病毒融合蛋白与 HIV 89.6 Vpr 蛋白得到一个有趣的相关性。在 Nipah 融合蛋白的细胞循环停滞区域可见到很强的同源性。这种表面蛋白可是一种强有力的 DNA 疫苗竞争者；所指的意思是它在凋亡发展和细胞周期停滞中起关键作用。
5. **呼肠病毒** - 呼肠病毒诱导神经元细胞的 TRAIL 依赖性凋亡和细胞周期在 G2/M 期停滞。在呼肠病毒次核形式 Mu2 蛋白与 HIV 89.6 Vpr 蛋白之间有同源性。

上述实施例是为了对本发明进行举例说明，并不是用于限制本发明的。专业人士可识别在本发明本质和范围内的修改。



WNV-HNY1999 的基因组结构排列



WNV-HNY1999 衣壳蛋白克隆策略: pWNVh-DIJ, pWNVy-DIJ

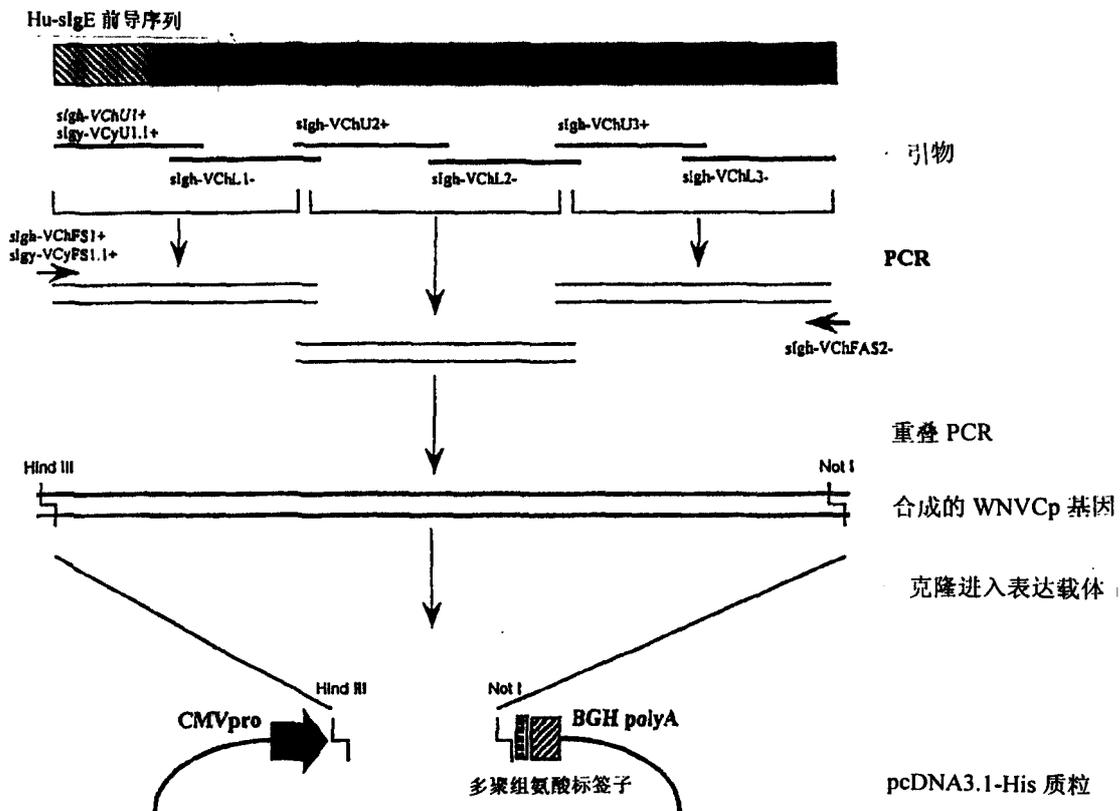


图 1

pWNVh-DJY 的酶切位点图谱

星期二, 9月5号, 2000, 2: 09 PM

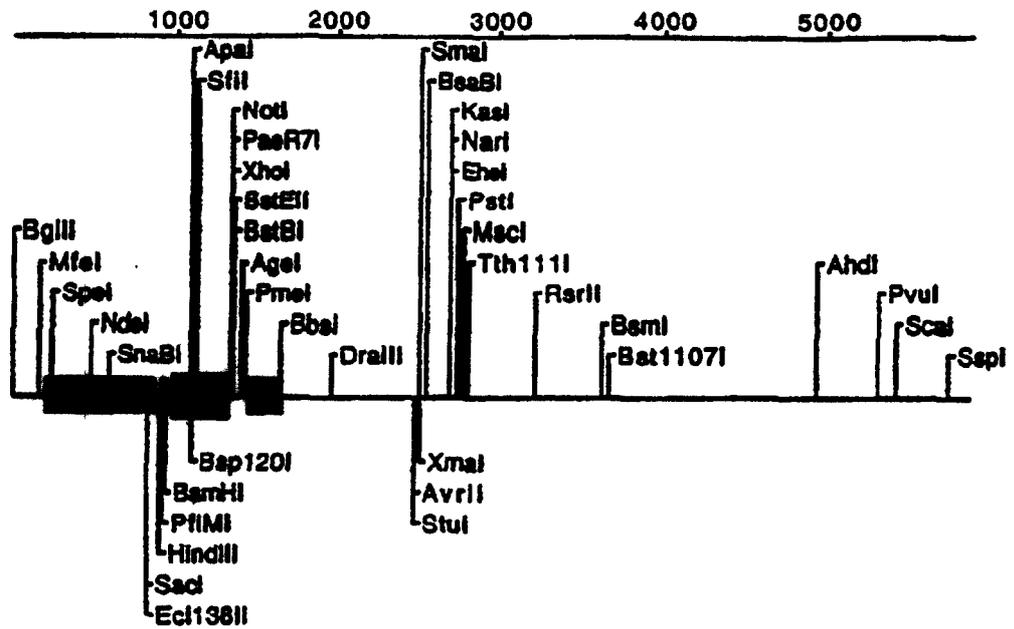


图 2

pWNVh-DJY 的特征图谱

星期二, 9月5号, 2000, 2: 09 PM

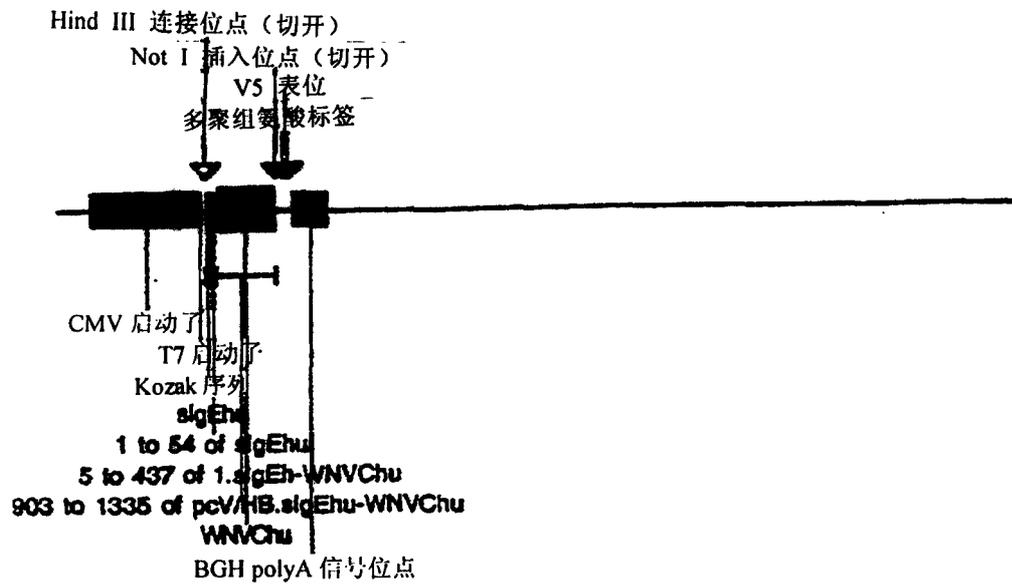


图 3

序列范围: 1-5864

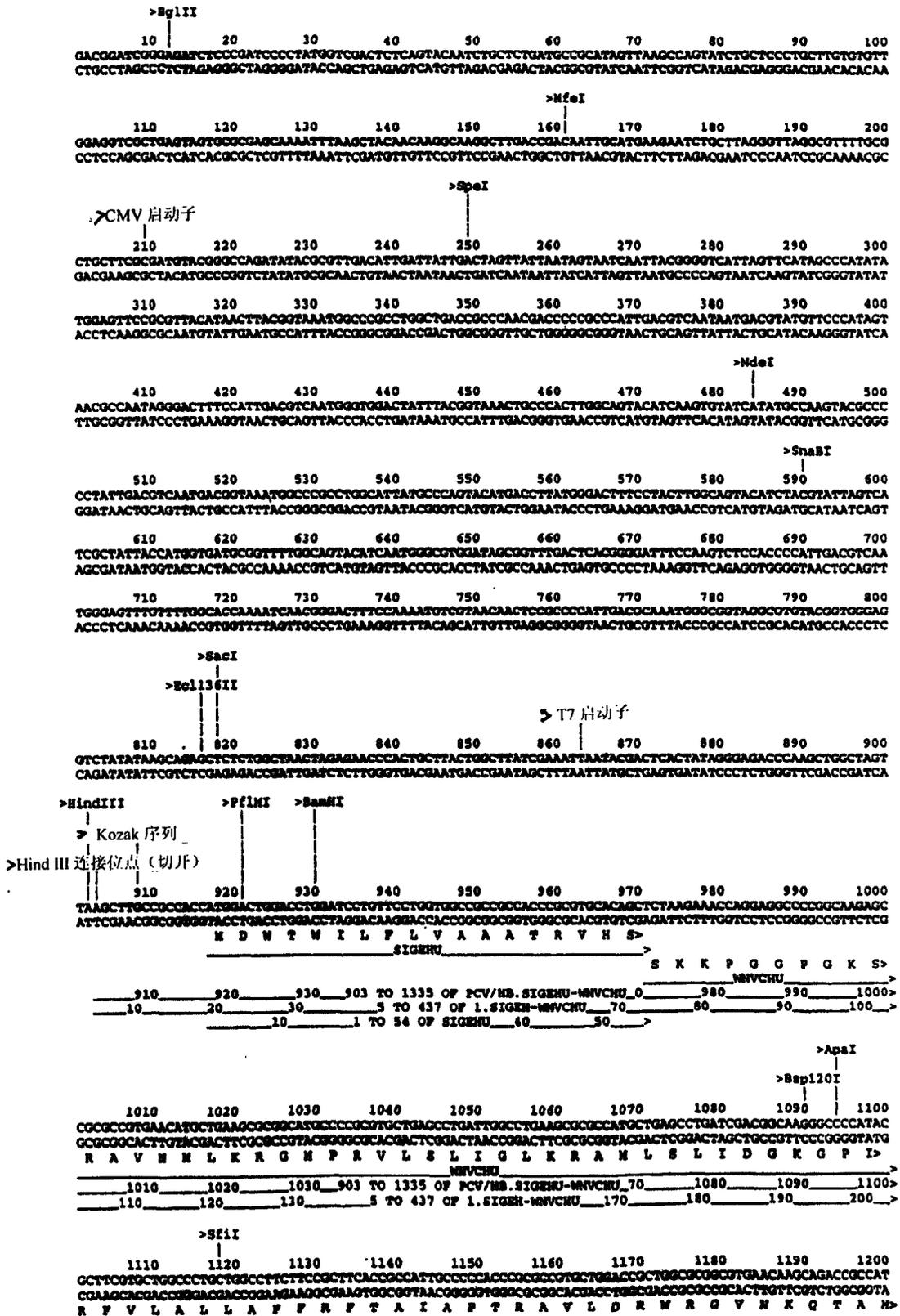
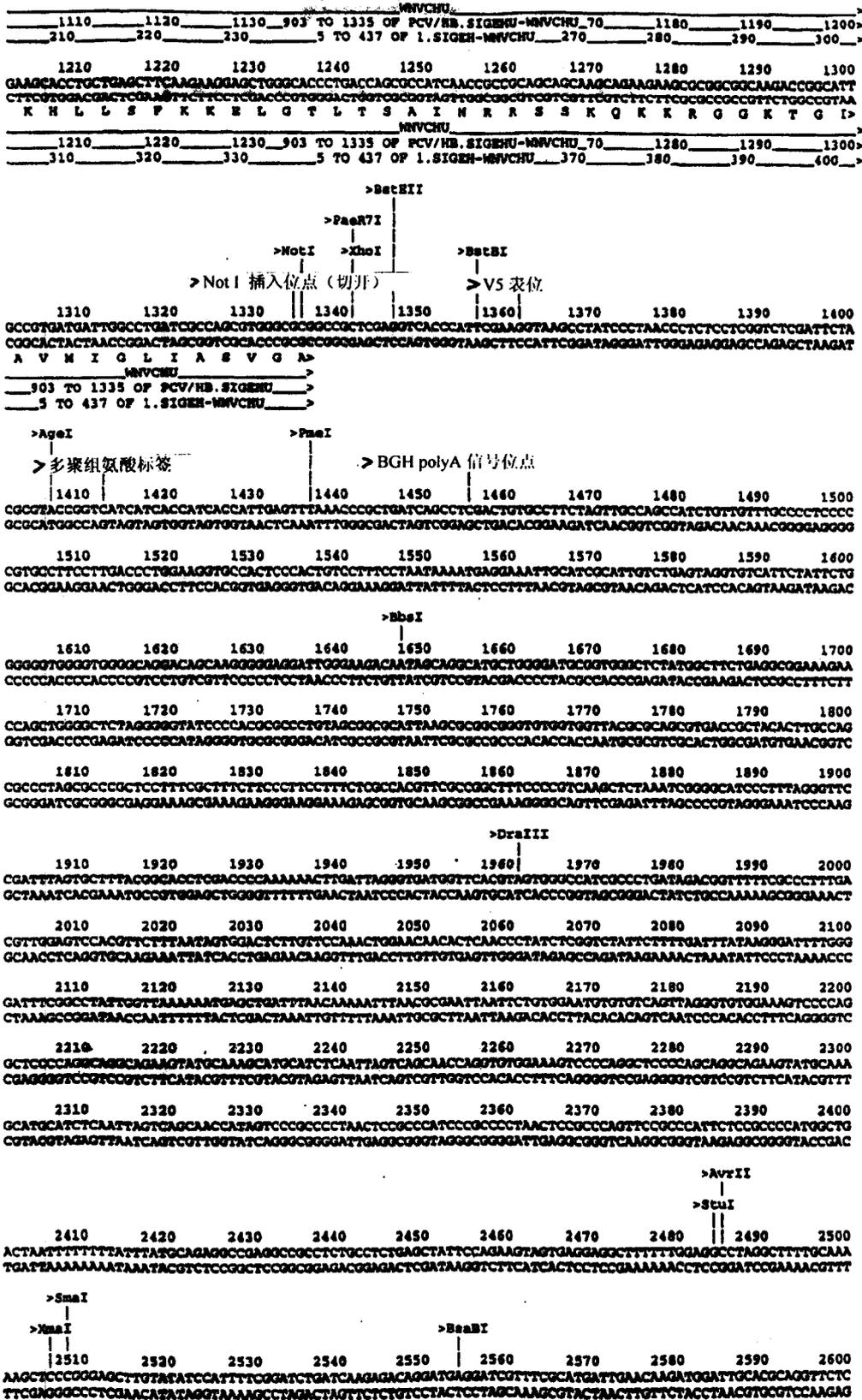


图 4



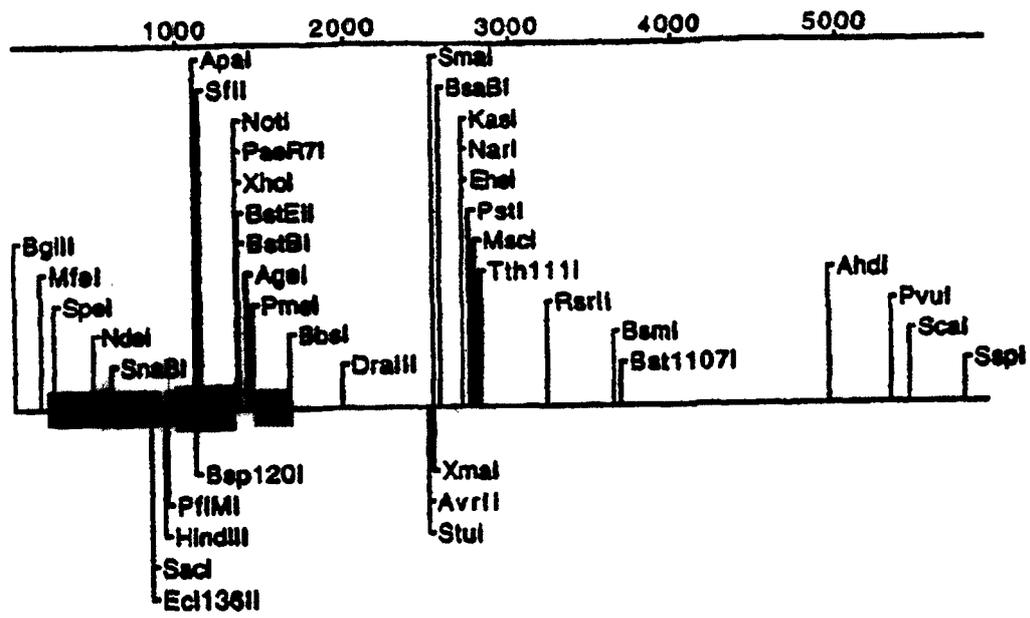


图 5

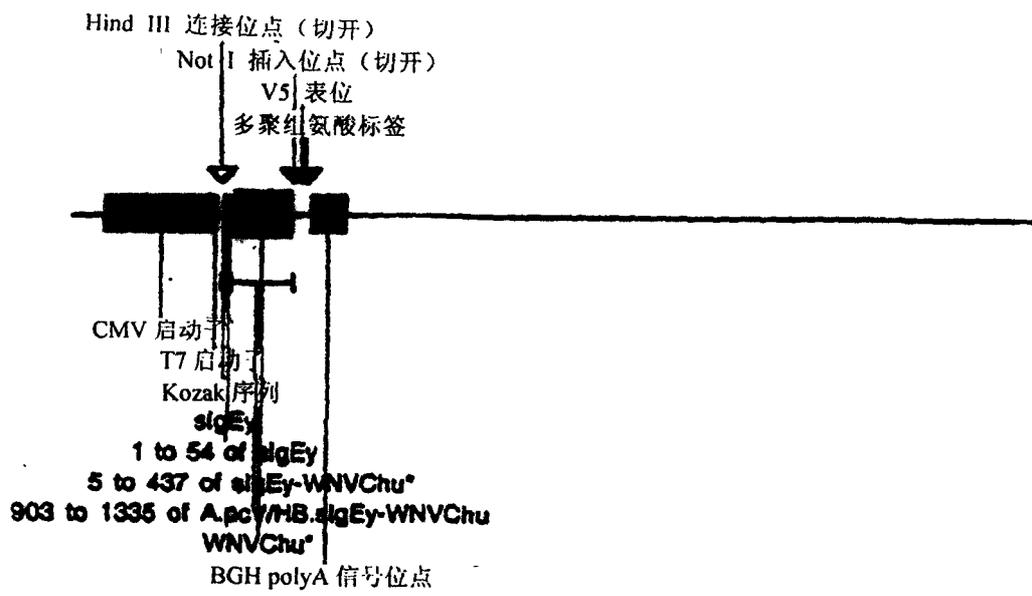


图 6

序列范围: 1-5864

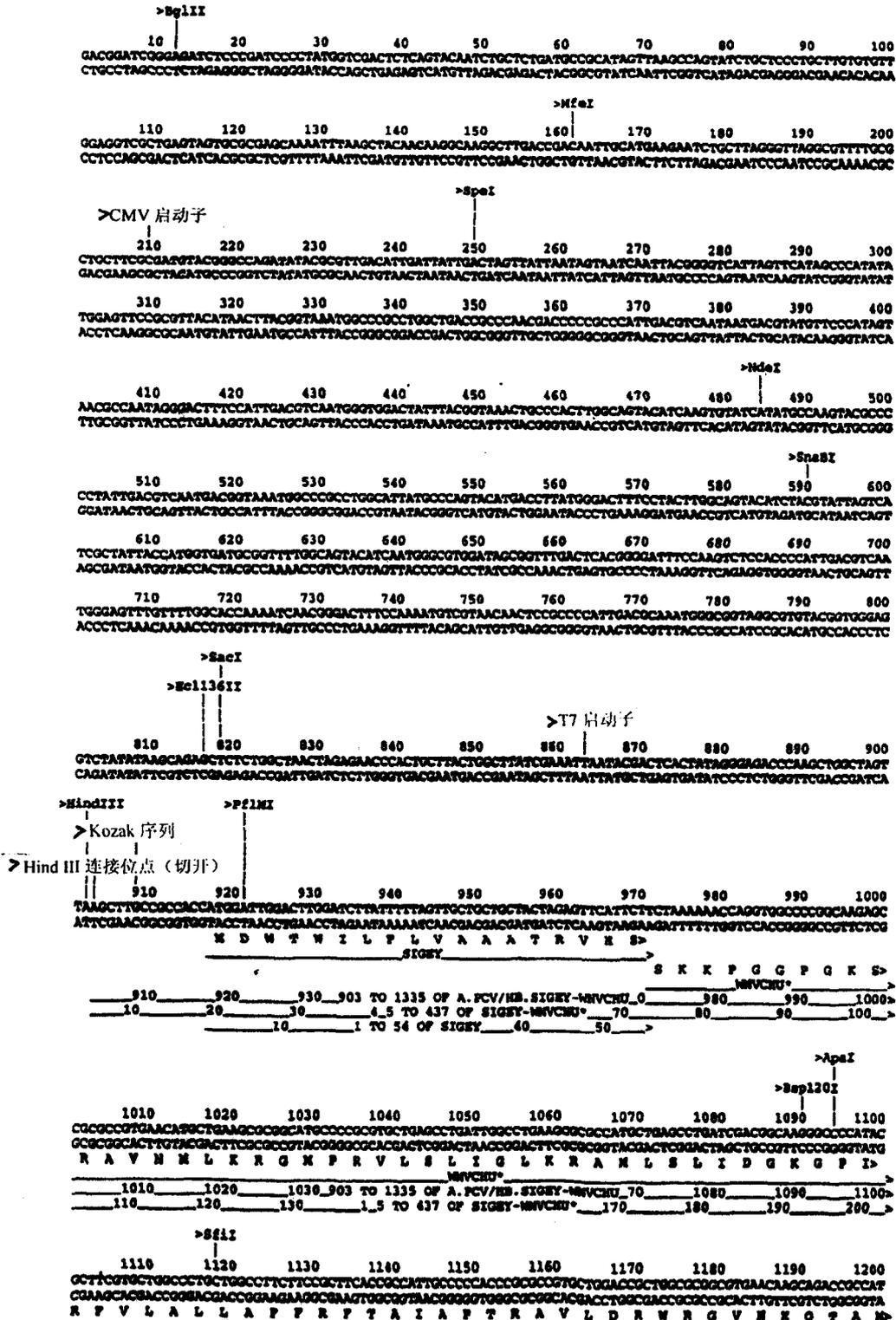


图 7

pWNVCh-DJY 和 pWNVcy-DJY

的 ^{35}S 标记体外翻译产物

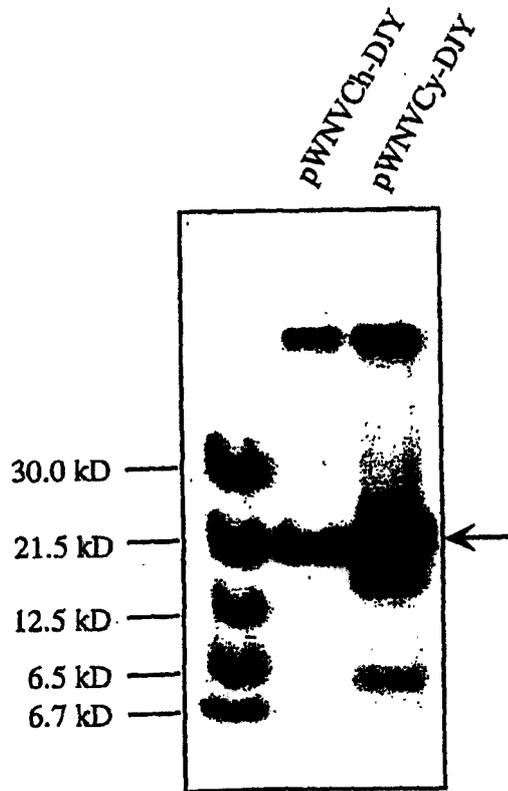


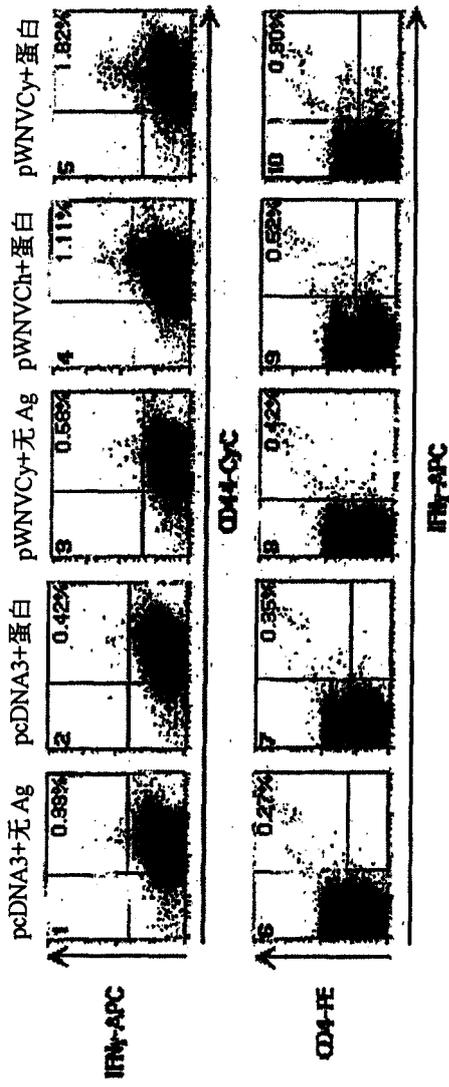
图 8

WNV 衣壳 (Cp) 多肽一定位和序列

WNV Cp	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
氨基酸序列	MSKPKGGPGKSRVAVMLKRGHPRVLSLIGLKRAMLSLIDGKGFIRFVLAALAFRTAIAFTRAVLDWRGYNKOTAMKHLLSEKKELGTLTSAINRRSSKQKRGKGTGIAVNIIGLIASVGA											
多肽序列	SKKPGGPGKSRVAVMLKRGHPR											
多肽名称	WNV-C-P1											
	KRAMLSLIDGKGFIRFVLA											
	WNV-C-P2											
	TLTSAINRRSSKQKRGKGTGJ											
	WNV-C-P3											

图 9

图 10



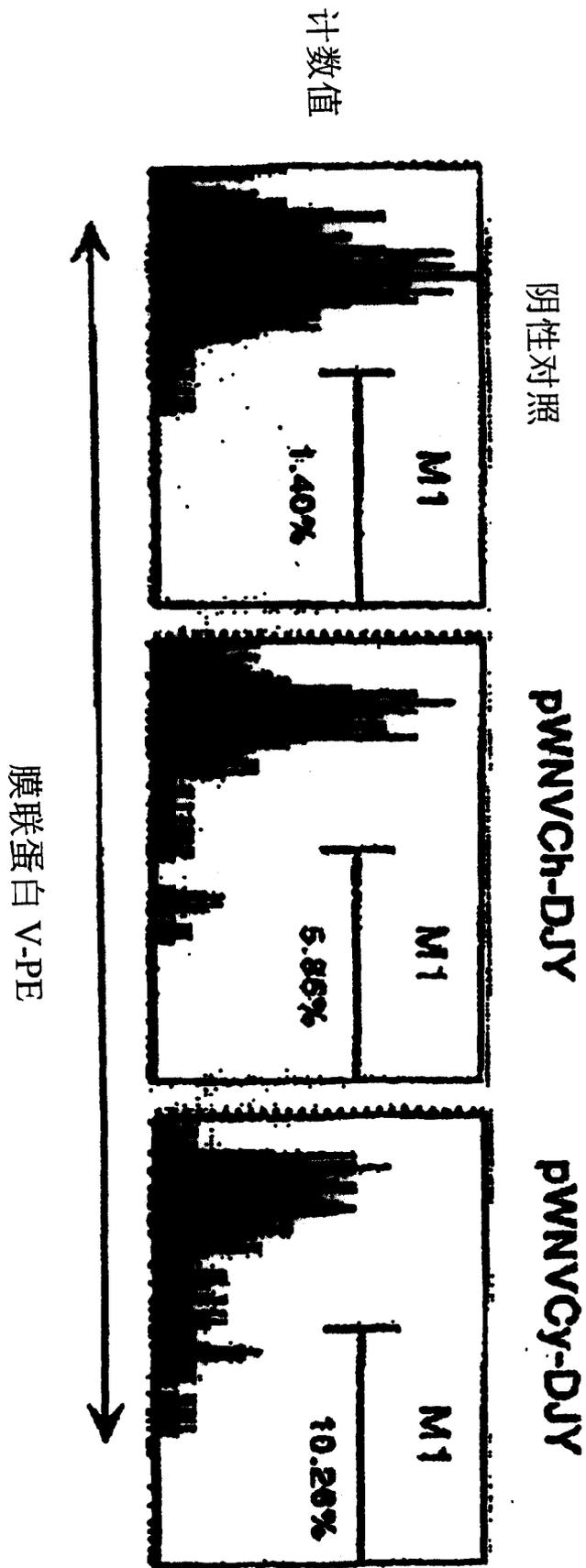


图 11

图 12A

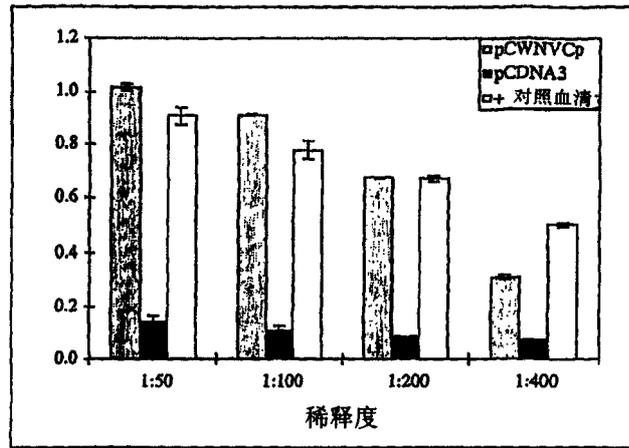


图 12B

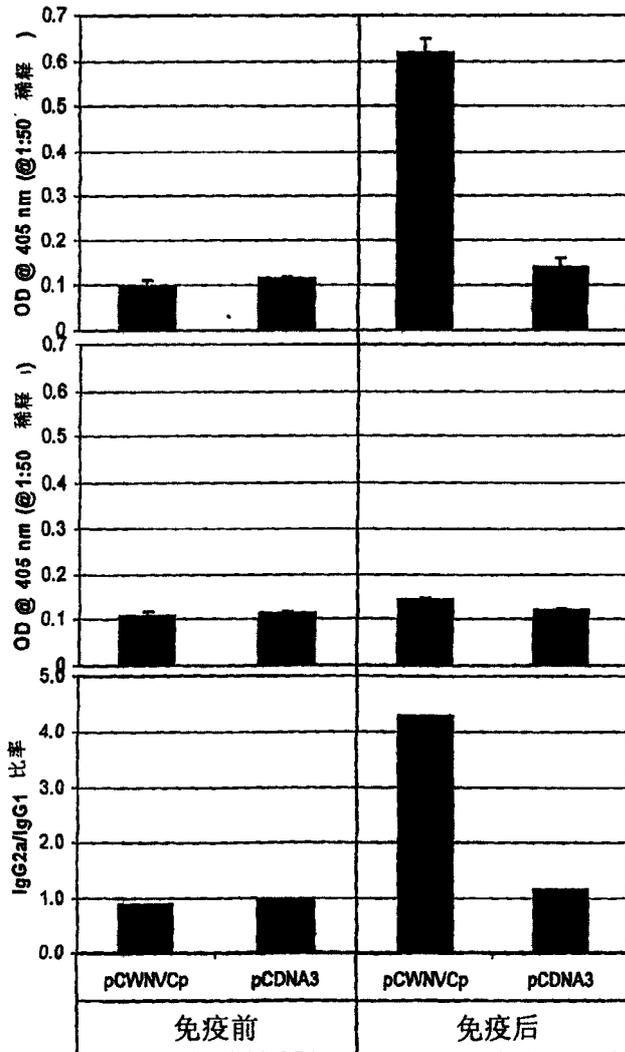
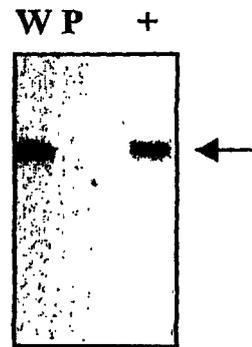


图 12C



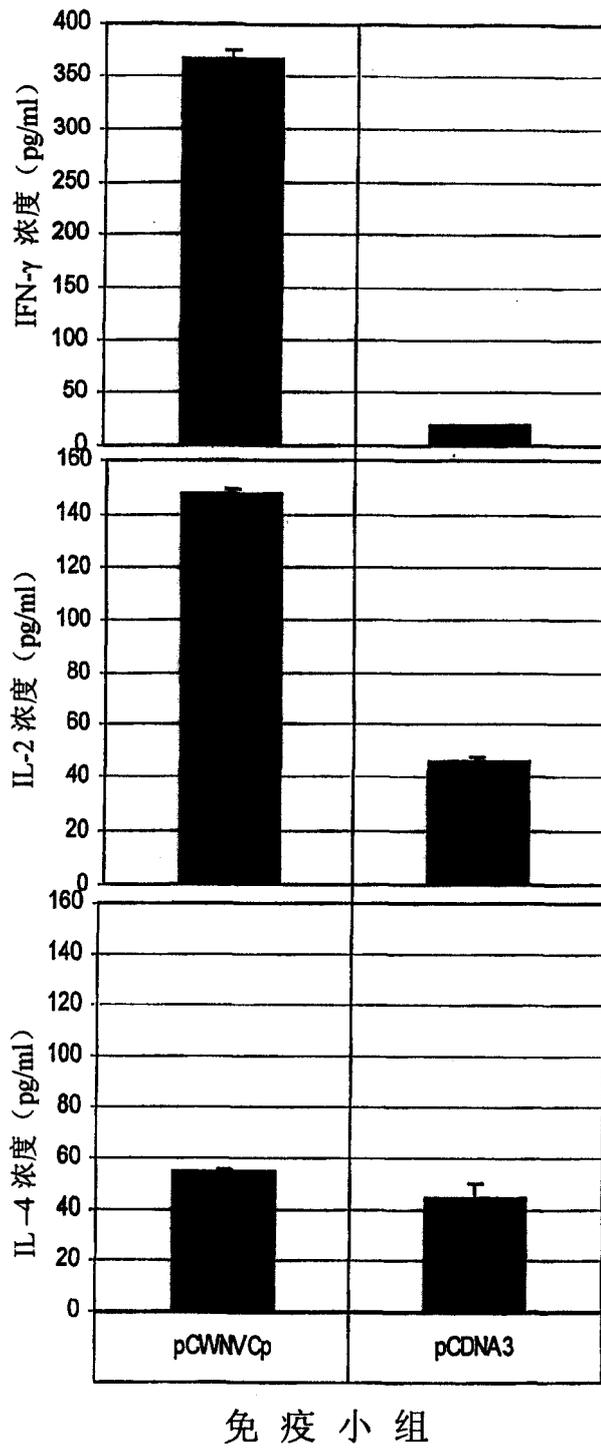


图 13

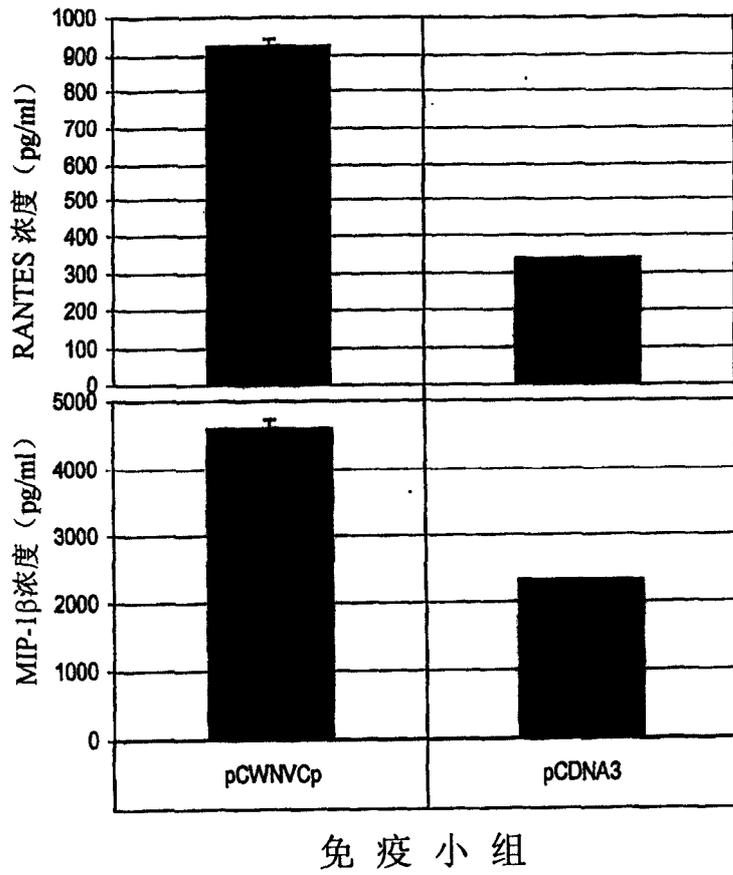


图 14

图 15A

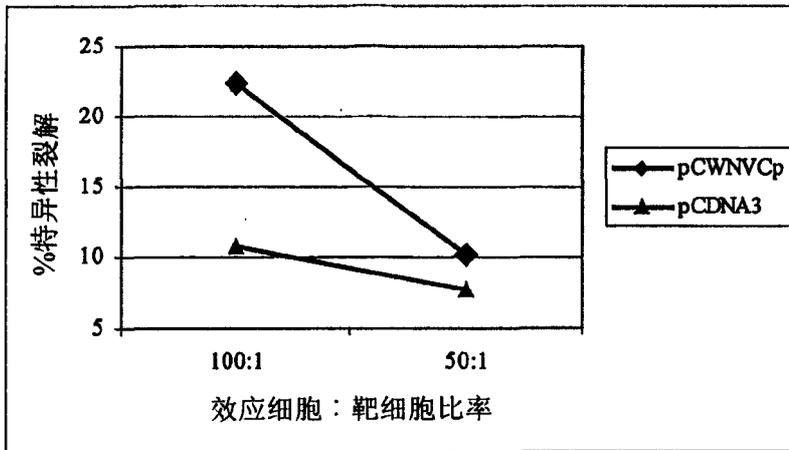


图 15B

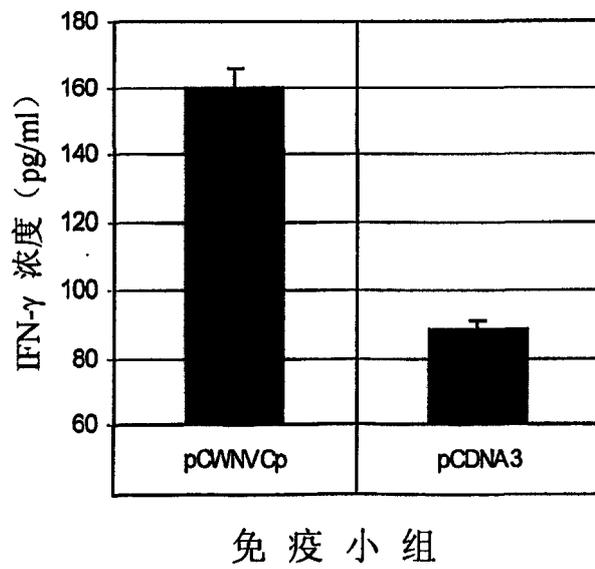


图 16A

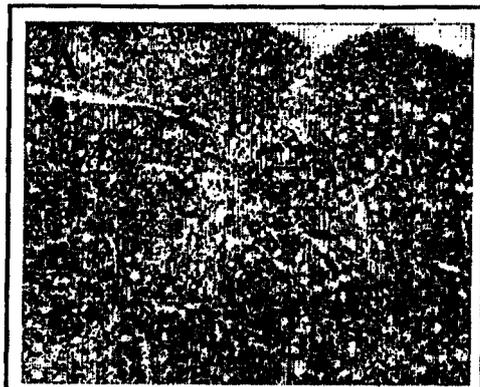
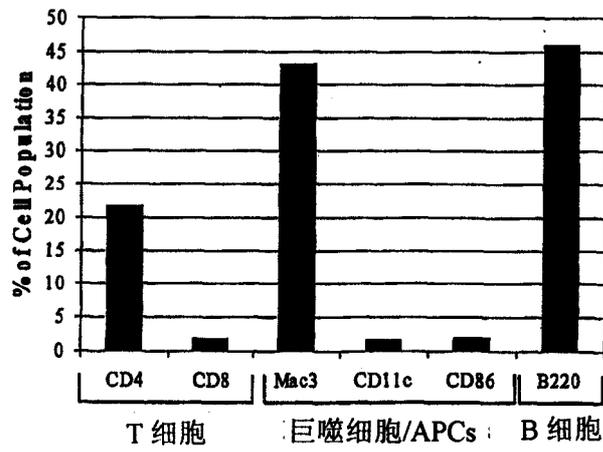


图 16B



图 16C



4. 黄瓜花叶病毒 2A 蛋白
 4. Cumbermos
 [40]
 HIV-1 89.6
 110 120
 EFGNTFSVPDPLR-EVORL>
 |||| | || | || |
 TYGDTWTGVEALIRILQQL

5. 风疹病毒衣壳蛋白
 5. Rubellaca
 [33]
 HIV-1 89.6
 160
 WLWSEGGGAVFY>
 ||| || | ||
 RIWLHSLGQHIY

6. Nipah 病毒融合蛋白
 6. NipahFusi
 [44]
 HIV-1 89.6
 .sky.sd...vf->
 | | | ||||
 LIRLQQLLEFIH

7. 呼肠病毒次核形式 Mu2
 7. Minor-Reo
 [46]
 HIV-1 89.6
 420 430
 IGAVLPKGGSEKSTIMRVLDEMEVLGVRIMPR>
 | | | | | |||| | || |
 EDQGFQREFYNDWTLELLELKLKNEAVRHFFR

150 160
VFQSWDRNLGR>
| | | | | | | | | |
HPRRLWLSLGG

6. HuBad
[36]
HIV-1 89.6

专利名称(译)	黄病毒和瘟病毒衣壳蛋白的组成和使用方法		
公开(公告)号	CN1549730A	公开(公告)日	2004-11-24
申请号	CN01819929.1	申请日	2001-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	宾夕法尼亚大学		
[标]发明人	梁周成		
发明人	大卫·B·威那 梁周成		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/22 A61K38/43 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/16 C07K14/18 C12N15/67 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/00 C12N15/40 C12N15/63 C12N15/79 C12N15/85		
CPC分类号	C12N2770/24122 C07K2319/02 C12N2740/16222 A61K38/162 G01N2469/20 A61K2039/53 C07K14/005 A61K48/00 G01N33/56983 C12N2770/24322 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 Y02A50/39 Y02A50/394		
代理人(译)	黄泽雄		
优先权	60/237885 2000-10-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种使用黄病毒或瘟病毒衣壳蛋白，比如西尼罗病毒(WNV)衣壳蛋白，和其功能性片段来诱导细胞死亡的方法。本发明也提供通过施用WNV或其编码序列药物组合物治疗遭受细胞增殖性疾病的方法。并揭示了鉴定具有抗病毒和/或抗WNV和/或抗黄病毒或抗瘟病毒衣壳蛋白或其它蛋白活性的复合物的方法。本发明还提供了包含WNV或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒衣壳蛋白或其它蛋白，或其功能性片段，或者编码其的核酸分子和一个药用载体的疫苗组合物。本发明也进一步提供了鉴定个体遭受WNV或包括黄病毒或瘟病毒的其它病毒感染的诊断方法和试剂盒。

