

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-510714

(P2004-510714A)

(43) 公表日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 159 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-531803 (P2002-531803)	(71) 出願人	593171363
(86) (22) 出願日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバー
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月4日 (2003.4.4)		シティ・オブ・ペンシルベニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/031355		アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベニア
(87) 国際公開番号	W02002/028165		州フィラデルフィア、チェスナット・スト
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		リート 3 1 6 0、スイート 2 0 0
(31) 優先権主張番号	60/237,885	(74) 代理人	100067817
(32) 優先日	平成12年10月4日 (2000.10.4)		弁理士 倉内 基弘
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100085774
			弁理士 風間 弘志
		(72) 発明者	デイビッド ビー・ワイナー
			アメリカ合衆国 1 9 0 6 6 ペンシルベ
			ニア、メリオン、ビーコン レイン 7 1
			7
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラビウイルス及びベスチウイルス由来のキャプシド蛋白質を使用する組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、西ナイルウイルス (WNV) のキャプシド蛋白質のようなフラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片により細胞死を誘導する方法を提供する。また、本発明は、WNV のキャプシド蛋白質又はこれをコードする核酸分子を含む医薬組成物を投与することにより高増殖性細胞によって特徴付けられる病気を患っている個体を処置する方法も提供する。抗ウイルス及び/又は抗WNV及び/又は抗フラビウイルス及び/又は抗ベスチウイルスのキャプシド蛋白質活性を有する化合物を同定する方法が開示される。また、本発明は、WNV又はフラビウイルス属若しくはベスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド又はその他の蛋白質又はその機能性断片及び製薬上許容できるキャリアーを含むワクチン組成物も提供する。また、本発明は、WNV又はフラビウイルス属若しくはベスチウイルス属を含めたその他のウイルスに感染した個体の診断方法及びその個体を特定するためのキットも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ある細胞を細胞死を誘導するのに有効な量の単離されたフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触させ、或いは該細胞にフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子（該核酸は全フラビウイルス又はペスチウイルスゲノムから遊離しているものとする）を導入する段階を含む細胞死を誘導する方法において、該ヌクレオチド配列が該細胞内で細胞死を誘導するのに有効なレベルで発現することを特徴とする細胞死を誘導する方法。

【請求項 2】

単離されたキャプシド蛋白質又はその機能性断片又は核酸分子が日本脳炎ウイルス群の亜属から選択されるウイルスからのものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

単離されたキャプシド蛋白質又はその機能性断片又は核酸分子が西ナイルウイルス（WNV）からのものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

機能性断片が配列番号 8 を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

核酸分子が配列番号 8 をコードする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞が腫瘍細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞をフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触させる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

核酸分子を前記細胞に導入する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

次の段階：

（a）試験化合物の存在下に、細胞と該細胞において検出可能なレベルのアポトーシスを誘導するのに十分な量のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片とを接触させ、及び

（b）段階（a）で検出されたアポトーシスのレベルと該試験化合物の非存在下に細胞をフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触させたときに生じたアポトーシスのレベルとを比較すること

を含む、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片が細胞のアポトーシスを誘導するのを抑制する化合物を同定する方法。

【請求項 10】

細胞をフラビウイルス又はペスチウイルスキャプシド蛋白質と接触させる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞をフラビウイルス又はペスチウイルスキャプシド蛋白質の機能性断片と接触させる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

機能性断片が配列番号 8 を含む請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

細胞が HeLa 細胞、RD 細胞及び 293 細胞よりなる群から選択される請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

検出段階がアポトーシスマーカーを検出する検定法である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

マーカ―がホスファチジルセリン (P S) 又は遊離の 3 ' - ヒドロキシ D N A 末端である請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

検定法が T U N E L 分析又はアネキシン V フローサイトメトリーである請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

(a) フラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片を含む容器及び (b) 使用説明書、陽性の対照物、陰性の対照物、データを表示する写真及びデータを表示する図よりなる群から選択される少なくとも 1 種の追加の構成要素を含む請求項 9 に記載の方法を実施するためのキット。

10

【請求項 1 8】

(a) フラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片或いはフラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含む注射用医薬組成物。

【請求項 1 9】

(a) フラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含む請求項 1 8 に記載の注射用医薬組成物。

【請求項 2 0】

(a) フラビウイルス属又はベスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含む請求項 1 8 に記載の注射用医薬組成物。

20

【請求項 2 1】

(a) W N V のキャプシド蛋白質又はその機能性断片及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含む請求項 1 8 に記載の注射用医薬組成物。

【請求項 2 2】

有効量の請求項 1 8 に記載の注射用医薬組成物を個体に投与する段階を含む、高増殖性細胞によって特徴付けられる病気と診断された個体又はその病気を患っていると疑われる個体を処置する方法。

【請求項 2 3】

有効量の請求項 1 9 に記載の注射用医薬組成物を個体に投与する段階を含む、高増殖性細胞によって特徴付けられる病気と診断された個体又はその病気を患っていると疑われる個体を処置する方法。

30

【請求項 2 4】

有効量の請求項 2 0 に記載の注射用医薬組成物を個体に投与する段階を含む、高増殖性細胞によって特徴付けられる病気と診断された個体又はその病気を患っていると疑われる個体を処置する方法。

【請求項 2 5】

有効量の請求項 1 8 に記載の注射用医薬組成物を個体に投与することによって望ましくない細胞を除去することを含む、望ましくない細胞によって特徴付けられる病気と診断された個体又はその病気を患っていると疑われる個体を処置する方法。

40

【請求項 2 6】

キャプシド蛋白質又はその機能性断片が W N V キャプシド蛋白質又はその機能性断片である請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

病気が癌である請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

投与段階が注射用医薬組成物の腫瘍内注射によって達成される請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 9】

次の段階：

50

(a) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質に対して特異的な抗体を個体からの試料と接触させ、及び

(b) 該抗体が該試料からのフラビウイルス又はペスチウイルスキャプシド蛋白質に結合するかどうかを検出すること

を含むフラビウイルス又はペスチウイルスに感染した個体を特定する方法において、該抗体のフラビウイルス又はペスチウイルスキャプシド蛋白質への結合の検出が、個体がフラビウイルス又はペスチウイルスに感染したことを示すことを特徴とする該ウイルスに感染した個体を特定する方法。

【請求項 30】

キャプシド蛋白質が WNV キャプシド蛋白質である請求項 24 に記載の方法。

10

【請求項 31】

(a) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質に対して特異的な抗体を含む第 1 容器及び (b) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片を含む第 2 容器を含むフラビウイルス又はペスチウイルスに感染した個体を特定するためのキット。

【請求項 32】

第 1 容器が WNV キャプシド蛋白質に対して特異的な抗体を含み、第 2 容器が WNV のキャプシド蛋白質又はその機能性断片を含む請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】

次の段階：

20

(a) 試料をフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質と接触させ、及び

(b) 該フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質が該試料中の抗体に結合するかどうかを検出すること

を含むフラビウイルス又はペスチウイルスに感染した個体を特定する方法において、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質の結合の検出が、個体がフラビウイルス又はペスチウイルスに感染したことを示すことを特徴とする該ウイルスに感染した個体を特定する方法。

【請求項 34】

ウイルスが WNV であり、キャプシド蛋白質が WNV のキャプシド蛋白質である請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

(a) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質を含む第 1 容器及び (b) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質に特異的に結合する抗体を含有する第 2 容器を含むフラビウイルス又はペスチウイルスに感染した個体を特定するためのキット。

【請求項 36】

キャプシド蛋白質が WNV のキャプシド蛋白質である請求項 35 に記載のキット。

【請求項 37】

(a) 免疫学的に有効な量のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含むワクチン組成物。

40

【請求項 38】

フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片が WNV のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片である請求項 37 に記載のワクチン。

【請求項 39】

(a) フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸及び (b) 製薬上許容できるキャリアーを含むワクチン組成物。

【請求項 40】

核酸が WNV のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする請求項 39 に記載のワクチン。

50

【請求項 4 1】

フラビウイルス又はペスチウイルスからの治療上有効な量のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片或いはフラビウイルス又はペスチウイルスからのキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸を投与することによってフラビウイルス又はペスチウイルスに感染した個体を処置する方法。

【請求項 4 2】

個体が曝されたウイルスが W N V であり、しかもキャプシド蛋白質若しくはその断片又はキャプシド蛋白質若しくはその免疫原性断片をコードする核酸が W N V からのものである請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

フラビウイルス又はペスチウイルスからの予防に有効な量のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片或いはフラビウイルス又はペスチウイルスからのキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸を投与することによってフラビウイルス又はペスチウイルス感染から個体を保護する方法。

【請求項 4 4】

個体が保護されるべきウイルスが W N V であり、しかもキャプシド蛋白質若しくはその断片又はキャプシド蛋白質若しくはその免疫原性断片をコードする核酸が W N V からのものである請求項 4 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

相互参照の関連出願

本出願は、35 U. S. C. § 119 (e) に準じて、2000 年 10 月 4 日申請の米国特許仮出願第 60 / 237, 885 号 (ここに参照して説明に代える) の利益を請求する。

【0002】

発明の分野

本発明は、アポトーシスによって細胞死を誘発するための、西ナイルウイルス由来のキャプシド蛋白質、並びに他のウイルス (フラビウイルス属及びペスチウイルス属のウイルスを含む) の由来のキャプシド蛋白質及び他の蛋白質の使用; 西ナイルウイルスによる、並びに他のウイルス (フラビウイルス属及びペスチウイルス属を含む) による感染に対するワクチン及び診断に関する。本発明は更に、キャプシド蛋白質の有するアポトーシス誘発能を選択的に阻害する化合物を同定することによって、抗ウイルス化合物をスクリーニングする方法に関する。

【0003】

発明の背景

西ナイルウイルス (W N V) 感染は、欧米の温帯で近年発生し、ヒト、ウマ、トリに対する脅威となっている。W N V 感染の最も深刻な発現形態は、致死性脳炎である。1937 年にウガンダの西ナイルで初めて単離された W N V は、寸法 40 - 60 nm のフラビウイルス科フラビウイルス属で、エンペロープに包まれた二十面体のヌクレオキャプシドを有した、10, 000 - 11, 000 塩基の単センス鎖 RNA ゲノムである。W N V の近年の研究については Holloway (2000) Outbreak not contained を参照されたい。この西ナイルウイルスは、公衆衛生監視が見直されるきっかけとなった (Sci. Am., 282: 20, 22。ここに参照して説明に代える)。フラビウイルス科のウイルスについては以下の文献に詳しい記載がある: Neyts 他 (1999) Infections with Flaviviridae、Verh. K. Acad. Geneesk. Belg. 61: 661 - 697、考察 697 - 699; Leyssen 他 (2000) Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae、Clin. Microbiol. Rev. 13: 67 - 82; Sherlock (1999) The hepatic Flaviviridae: summary、J. Viral.

10

20

30

40

50

Hepat. 6 Suppl. 1: 1-5; 及び Fields, Knipe 及び Howley 編、Fields Virology (第3版) 第I、II巻、Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996) (各文献はここに参照して説明に代える)。

【0004】

フラビウイルス属及びペスチウイルス属感染に対する予防及び治療を行う、改良された方法が必要とされている。細胞死を誘発して、高増殖性細胞によって特徴付けられる疾患を治療する、改良された方法が必要とされている。

【0005】

発明の概要

本発明は細胞死を誘発する方法を提供する。本発明の方法は、細胞死を誘発するのに有効な量のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片に、細胞を接触させる段階を包含する。本発明の幾つかの態様によると、フラビウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、西ナイルウイルス(WNV)のキャプシド蛋白質又はその機能性断片である。本発明の幾つかの態様によると、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片に細胞を接触させて、細胞死を誘発する。本発明の幾つかの態様によると、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子を細胞に導入する。フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列が発現すると、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片が細胞内で産生され、細胞死が引き起こされる。本発明の幾つかの態様によると、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結されている。本発明の幾つかの態様によると、核酸分子はDNAである。本発明の幾つかの態様によると、細胞は腫瘍細胞である。

10

20

【0006】

本発明は、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片の有するアポトーシス誘発能を、阻害することのできる化合物を同定する方法を提供する。本発明の方法は、(a)測定可能な量のアポトーシスを細胞内で誘発するのに十分な量のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片に、試験化合物の存在下で細胞を接触させ、そして(b)試験化合物が存在しているときに起こるアポトーシスの量と、試験化合物が存在していないときに起こるアポトーシスの量とを比較する段階を包含する。本発明は、WNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片が細胞内でアポトーシスを誘発するのを抑制する化合物を同定する方法にして、(a)測定可能な量のアポトーシスを細胞内で誘発するのに十分な量のWNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片に、試験化合物の存在下で細胞を接触させ、そして(b)試験化合物が存在しているときに起こるアポトーシスの量と、試験化合物が存在していないときに起こるアポトーシスの量とを比較する段階を包含する方法に関する。幾つかの態様によると、本発明の方法の測定段階は、細胞膜のホスファチジルセリン(PS)やDNA中の遊離3'ヒドロキシ末端等のアポトーシス関連マーカーの存在を検出することによって行う。

30

40

【0007】

本発明は、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片と、薬剤として許容される担体とを包含する薬剤組成物に関する。本発明の幾つかの態様によると、薬剤組成物は、WNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片と、薬剤として許容される担体とを包含する。

【0008】

本発明は、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子と薬剤として許容される担体とを包含する、薬剤組成物に関する。本発明の幾つかの態様によると、薬剤組成物は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結された、フラビウイルス属又はペスチウイルス属

50

のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子を包含する。本発明は、WNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子と薬剤として許容される担体とを包含する薬剤組成物に関する。本発明の幾つかの態様によると、薬剤組成物は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結された、WNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子を包含する。本発明の幾つかの態様によると、薬剤組成物の包含する核酸分子はDNAである。

【0009】

本発明は、高増殖性細胞によって特徴付けられる疾病を診断された又は患っていると思われる個体を治療する方法にして、高増殖性細胞を死滅させるのに十分な量のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片を個体に投与する段階を包含する方法に関する。本発明は、高増殖性細胞によって特徴付けられる疾病を診断された又は患っていると思われる個体を治療する方法にして、高増殖性細胞を死滅させるのに十分な量のWNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片を個体に投与する段階を包含する方法に関する。幾つかの態様によると本方法は、WNVキャプシド蛋白質又はWNVキャプシド蛋白質の機能性断片を有効量でそのような個体に投与する段階を包含する。本発明の幾つかの態様によると、フラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結されている。本発明の幾つかの態様によると、本方法はWNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列を包含する核酸分子を有効量でそのような個体に投与する段階を包含する。本発明の幾つかの態様によると、WNVキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする配列は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結されている。本発明の幾つかの態様によると核酸分子はDNAである。本発明の幾つかの態様によると、高増殖性細胞によって特徴付けられる疾病は癌又は乾癬である。

【0010】

本発明は、免疫学的有効量の、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質と、薬剤として許容される担体とを包含するワクチン組成物に関する。本発明の幾つかの態様によると、ワクチン組成物は、免疫学的有効量の、WNV由来の或いは関連のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質の免疫原性断片と、薬剤として許容される担体とを包含する。

【0011】

本発明は、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質をコードする配列を包含する核酸分子と薬剤として許容される担体とを包含するワクチン組成物に関する。本発明の幾つかの態様によると、ワクチン組成物は、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質の免疫原性断片をコードする配列を包含する核酸分子と、薬剤として許容される担体とを包含する。本発明の幾つかの態様によると、ワクチン組成物は、細胞内で配列が発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結された、WNV又は関連したフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片をコードする配列を包含する核酸分子を包含する。本発明の幾つかの態様によるとワクチン組成物の包含する核酸分子はDNAである。本発明の幾つかの態様によるとワクチン組成物はプラスミドを包含する。

【0012】

本発明は、WNV或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルスに対して個体を免疫化する方法に関する。誘導される免疫応答は予防のためのものであっても治療のためのものであってもよい。本方法は、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片；又はWNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子を、免疫学的有効量で個体に投与する段階

を包含する。

【0013】

本発明は、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質に特異的に結合する抗体を用いて、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質の存在を試料中に同定することによって、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質に接触した個体を同定する方法に関する。抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。個体試料中に存在するWNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質を定量することによって、感染個体の予後を調べることができる。

10

【0014】

本発明は、WNV或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルスに接触した個体を同定するキット、及びそのキットに用いられる試薬に関する。キットは、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質に特異的に結合する抗体を含む第1の容器と、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質を含む第2の容器とを包含する。抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。個体試料中に存在する、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質を定量できるように、キットが改良されていてもよい。得られる情報を用いて、感染個体の予後を調べることができる。

20

【0015】

本発明は、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルス由来のキャプシド蛋白質を用いて、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質に対する抗体の存在を試料中に検出することによって、WNV或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルスに接触した個体を同定する方法に関する。個体の試料中に存在する、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属由来のキャプシド蛋白質に対する抗体を定量することによって、感染個体の予後を調べることができる。

【0016】

本発明は、WNV或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属ウイルスに接触した個体を同定するキット、及びそのキットに用いられる試薬に関する。キットは、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質への接触に応じて産生された抗体を含む第1の容器と、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のウイルス由来のキャプシド蛋白質を含む第2の容器とを包含する。個体試料中に存在する、WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質に対する抗体を定量できるように、キットが改良されていてもよい。得られる情報を用いて、感染個体の予後を調べることができる。

30

【0017】

図面の簡単な説明

図1の上図は、1999年ニューヨークヒト単離WNV(WNV-HNY1999)[GenBank登録番号AF202541、Jia他(1999)、Lancet354:1971-1972。ここに参照して説明に代える]のゲノム構成の概略図である。キャプシド蛋白質は「Cp」と表してある。下図は、WNVキャプシド蛋白質発現ベクターpWNVh-DJY及びpWNVy-DJYの構造の概略図である。これらの発現構造体について、本明細書では別の呼称を用いることもある。pWNVc-DJYをpWNVch-DJY又はpWNVchと称していることもあり、pWNVy-DJYをpWNVcy-DJY又はpWNVcyと称していることもある。

40

【0018】

図2はWNVキャプシド蛋白質発現ベクターpWNVh-DJYの制限エンドヌクレアーゼ地図を示す。

50

【 0 0 1 9 】

図 3 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y の特徴地図を示す。

【 0 0 2 0 】

図 4 は、5 8 6 4 ヌクレオチド塩基対を有する、W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y の二本鎖ヌクレオチド全配列を注釈付きで示したものである。制限エンドヌクレアーゼ部位、特徴、及び構造体が発現する蛋白質の部分に関する翻訳情報は、注釈に記載した。上側のヌクレオチド鎖は配列番号 1 である。アミノ末端 s I g E リーダーペプチドの蛋白質配列（配列番号 2）は、ヌクレオチド 9 1 7 ~ 9 7 0 のコード領域の下に示した。発現された蛋白質の W N V C p 蛋白質部分の蛋白質配列（配列番号 3）は、ヌクレオチド 9 7 1 ~ 1 3 3 6 のコード領域の下に示した。

10

【 0 0 2 1 】

図 5 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の制限エンドヌクレアーゼ地図を示す。

【 0 0 2 2 】

図 6 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の特徴地図を示す。

【 0 0 2 3 】

図 7 は、5 8 6 4 ヌクレオチド塩基対を有する、W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の二本鎖ヌクレオチド全配列を注釈付きで示したものである。制限エンドヌクレアーゼ部位、特徴、及び構造体が発現する蛋白質の部分に関する翻訳情報は、注釈に記載した。上側のヌクレオチド鎖は配列番号 4 である。アミノ末端 s I g E リーダーペプチドの蛋白質配列は、ヌクレオチド 9 1 7 ~ 9 7 0 のコード領域の下に示した。発現された蛋白質の W N V C p 蛋白質部分の蛋白質配列は、ヌクレオチド 9 7 1 ~ 1 3 3 6 のコード領域の下に示した。

20

【 0 0 2 4 】

図 8 は 2 種の異なる W N V キャプシド蛋白質構造体 p W N V h - D J Y 及び p W N V y - D J Y の生体外転写 / 翻訳産物を、³⁵S 標識化し免疫沈降し、電気泳動分離したオートラジオグラフである。左端の列は分子量マーカを含んでいる。矢印は、主要な生体外翻訳蛋白質産物の位置を示す。ポリヒスチジン C 末端標識に結合した蛋白質は、抗 H i s 抗体を用いて免疫沈降した。

【 0 0 2 5 】

図 9 は W N V C p 蛋白質の全アミノ酸配列（配列番号 5）を示す。実施例 3 で用いた、3 種の腫瘍組織適合（M H C）クラス I I 制限エpiteope ペプチド [W N V C - P 1（配列番号 6）、W N V C - P 2（配列番号 7）及び W N V C - P 3（配列番号 8）] を、C p アミノ酸配列の下に示す。

30

【 0 0 2 6 】

図 1 0 は生体外で刺激された、D N A 免疫化マウス由来脾臓細胞における、細胞内 I F N - 発現のフローサイトメトリー分析を示す。数値は二重に陽性の細胞のパーセントである。図の上段では、細胞は I N F - 及び C D 4 4 について染色されている。下段では、細胞は C D 4 及び I F N - について染色されている。最上列の表示は、マウスを免疫化するのに用いたベクターと、脾臓細胞の再刺激に用いられた刺激とを示す。免疫化ベクターは、p c D N A 3（p c D N A 3 . 1）、p W N V h - D J Y（p W N V C h）及び p W N V y - D J Y（p W N V C y）である。「A g なし」は脾臓細胞が生体外翻訳対照物とともに培養されたことを（実施例 3 に記載）、「蛋白質」は脾臓細胞が、p W N V y - D J Y 発現構造体により生体外翻訳された C p 蛋白質産物とともに培養されたことを示す。

40

【 0 0 2 7 】

図 1 1 は、強化緑色蛍光蛋白質（E G F P）発現ベクター p E G F P 2 - N 1 単独で、又は p W N V h - D J Y 又は p W N V y - D J Y と組み合わせてトランスフェクトした後の、H e L a 細胞のアネキシン V フローサイトメトリー分析の結果を示す。数値は、E G F P について陽性の細胞（トランスフェクト細胞）群内で、アネキシン V について陽性であ

50

る細胞のパーセントを示す。

【0028】

図12A、12B及び12Cは、免疫化したマウスにおける、WNVキャプシド蛋白質(Cp)特異的抗体応答を示す。図12A：100 μ gのpCWNV Cp発現カセット又は対照ベクターを、第0、4及び8週目に筋肉内注射した。免疫後、様々な経過日数において血清試料を採取し、1：50、1：100、1：200及び1：400希釈でWNV Cp特異的抗体について検定した。免疫化の5ヶ月後に、WNV Cp特異的抗体応答が検出された。エラーバーは、免疫化動物(n=3)から得た結果の標準偏差を表す。図12B：WNV Cp特異的IgG抗体応答のIgGサブセット分析を行った。免疫化5ヶ月後に調べたWNV Cp特異的IgG1及びIgG2a応答、並びにIgG2a/IgG1比を示す。図12C：WNV Cp特異的血清抗体を、免疫沈降/ウエスタンブロット分析によって調べた。固定化膜片をそれぞれpCWNV Cp(W)又はpCDNA3(P)由来の免疫血清と保温した。陽性の対照物として、膜片を抗6X Hisモノクローナル抗体(+)と保温した。

10

【0029】

図13は、刺激を受けたT細胞によるIFN- γ (Th1)、IL-2 (Th1)及びIL-4 (Th2)の産生を示す。実施例8に記載するように、マウスを免疫化し脾臓細胞を得た。単離リンパ球をWNV Cpペプチドプールで3日間刺激した。上澄みを採取し、ELISAキットを用いてIFN- γ 、IL-2及びIL-4プロファイルについて検定した。エラーバーは、各実験の標準偏差(S.D.)値を表す。

20

【0030】

図14は、刺激を受けたT細胞によるケモカインの産生を示す。実施例8に記載するように、マウスを免疫化し脾臓細胞を得た。単離リンパ球をWNV Cp特異的ペプチドプールで3日間刺激した。上澄みを採取し、RANTES及びMIP-1 α 用ELISAキットを用いてケモカインプロファイルについて検定した。エラーバーは、各実験の標準偏差(S.D.)値を表す。

【0031】

図15A及び図15Bは、陽性の抗原特異的CTL応答の誘導を示す。図15A：WNVキャプシドペプチドプールで処理した標的細胞を用いて、免疫化マウス由来脾臓細胞を、CTL応答について調べた。図15B：CTLアッセイ用に刺激したエフェクター由来の上澄みを第5日目に採取し、IFN- γ 産生について調べた。エラーバーは、各実験の標準偏差(S.D.)値を表す。

30

【0032】

図16A、16B及び16Cは、筋肉組織の分析を示す。DNAを注射した動物から冷凍筋肉片を得て、ヘマトキシリン-エオジン(HE)で染色した。pCDNA3(対照)免疫化マウス(図16A)及びpCWNV Cp免疫化マウス(図16B)から得たスライド試料を示す。図のものは倍率40 \times で示している。図16C：pCWNV Cp免疫化マウスにおける筋肉浸潤性細胞の同定。実施例11に記載するように細胞を採取し、CD4、CD8、Mac3、CD11c、CD86及びB220に対する抗体を用いたFACSによって同定した。

40

【0033】

図17は、WNV Cp蛋白質配列と、他のフラビウイルス属由来のキャプシド蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。上段はクンジンウイルス[KJV; GenBank登録番号BA00176(gi:221967)。ここに参照して説明に代える]由来のCp蛋白質の最初の123アミノ酸(配列番号9)とWNV Cp蛋白質の全123アミノ酸配列とを比較している。中段は日本脳炎ウイルス[JEV; GenBank登録番号NP_059434(gi:9626461)。ここに参照して説明に代える]のCp蛋白質の最初の113アミノ酸(配列番号10)とWNV Cp蛋白質の最初の114アミノ酸(配列番号11)とを比較している。下段はデングウイルス[DEN2; GenBank登録番号AA030730(gi:11119732)。ここに参照して説明に代

50

える]のCp蛋白質の最初の部分のアミノ酸(配列番号12)とWNVCp蛋白質のアミノ酸10~98(配列番号13)とを比較している。このアラインメントには、DEN2配列におけるアミノ酸LTKR領域から、リジン(配列の上に書かれたK)を除外することが必要である。括弧内の数値は同一性/相同性スコアを表し、とりうる最大スコアは590である。比較とアラインメントはMacVectorによって行った。

【0034】

図18は、WNVCp蛋白質配列と、他のウイルス由来の蛋白質の部分配列との、並びにアポトーシス促進性蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。WNVCp蛋白質(アミノ酸1~123)の全配列は、最上段にボールドで示した。WNVCpと他のウイルス蛋白質との比較を6種、WNVCpとアポトーシス促進性蛋白質との比較を5種、示している。ウイルス蛋白質との比較は、以下の通りである。1)ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)89.6Vpr蛋白質[GenBank登録番号AAA81039(gi:1055033)。ここに参照して説明に代える]の、内側部分のアミノ酸(配列番号27)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸68~110(配列番号28);2)単純性疱疹ウイルス主要キャプシド蛋白質[GenBank登録番号AAC57106(gi:1718277)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号29)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸8~117(配列番号30);3)エボラウイルス核蛋白質[GenBank登録番号AAG40164(gi:11761746)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号31)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸10~117(配列番号32);4)エボラウイルス糖蛋白質[GenBank登録番号AAA96744(gi:1141779)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号33)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸4~23(配列番号34);5)エボラウイルス糖蛋白質の内側部分の別のアミノ酸(配列番号35)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸50~73(配列番号36);並びに6)風疹ウイルスキャプシド蛋白質[GenBank登録番号GNWVR4(gi:74519)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号37)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸64~114(配列番号38)。アポトーシス促進性蛋白質との比較は、以下の通りである。1)ヒトBAK蛋白質[GenBank登録番号Q16611(gi:2493274)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号39)とWNVCp蛋白質のアミノ酸17~63(配列番号40);2)ヒトBcl-2関連X蛋白質[GenBank登録番号XP_009093(gi:15304386)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号41)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸109~123(配列番号42);3)ヒトBIK蛋白質[GenBank登録番号XP_015353(gi:13655199)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号43)と、WNVCp蛋白質アミノ酸75~118(配列番号44);4)ヒトBID蛋白質[GenBank登録番号XP_009825(gi:13647251)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号45)と、WNVCp蛋白質のアミノ酸84~95(配列番号46);並びに5)ヒトBad蛋白質[GenBank登録番号CAC22429(gi:12309966)。ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号47)とWNVCp蛋白質のアミノ酸15~23(配列番号48)。括弧内の数値は同一性/相同性スコアを表し、取りうる最大スコアは590である。比較とアラインメントはMacVectorによって行った。

【0035】

図19は、HIV-189.6Vpr蛋白質配列と、他のウイルス蛋白質の部分配列との、並びにアポトーシス促進性蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。HIV-189.6Vpr蛋白質(アミノ酸1~96)の全配列は、最上段にボールドで示した。HIV-189.6Vpr蛋白質と他のウイルス蛋白質との比較を7種、HIV-189.6Vpr蛋白質とアポトーシス促進性蛋白質との比較を6種、示している。ウイルス蛋白質との比較は、以下の通りである。1)シンドビスウイルス[GenBank登録

番号NP__062889 (gi: 9790318)、ここに参照して説明に代える]のp230非構造蛋白質の内側部分のアミノ酸(配列番号49)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸22~59(配列番号50); 2) WNV Cp蛋白質のアミノ酸68~110(図18についての上記説明参照)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸54~95(配列番号51); 3) キュウリモザイクウイルス[GenBank登録番号CAB75953 (gi: 7105855)、ここに参照して説明に代える]の2A蛋白質の内側部分のアミノ酸(配列番号52)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸77~89(配列番号53); 4) キュウリモザイクウイルスの2A蛋白質の内側部分の別のアミノ酸(配列番号54)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸49~67(配列番号55); 5) 風疹ウイルスキャプシド蛋白質の内側部分のアミノ酸(配列番号56)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸38~47(配列番号57); 6) ニパウイルス融合蛋白質[GenBank登録番号NP__112026 (gi: 13559813)、ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号58)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸60~72(配列番号59); 並びに7) レオウイルスコア非主要型Mu2蛋白質[GenBank登録番号AAK54467 (gi: 14149150)、ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号60)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸60~72(配列番号61)。アポトーシス促進性蛋白質との比較は、以下の通りである。1) マウスBIM蛋白質[GenBank登録番号NP__033884 (gi: 6753192)、ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号62)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸7~74(配列番号63); 2) ラットBOD蛋白質[GenBank登録番号AAC23593 (gi: 3228566)、ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号64)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸23~74(配列番号65); 3) マウスMtd蛋白質[GenBank登録番号AAC53582 (gi: 2689660)、ここに参照して説明に代える]の内側部分のアミノ酸(配列番号66)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸16~67(配列番号67); 4) ヒトBcl-2関連X蛋白質の内側部分のアミノ酸(配列番号68)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸18~75(配列番号69); 5) ヒトBcl-2関連X蛋白質の内側部分の別のアミノ酸(配列番号70)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸18~42(配列番号71); 並びに6) ヒトBad蛋白質の内側部分のアミノ酸(配列番号72)と、HIV-1 89.6Vpr蛋白質のアミノ酸33~44(配列番号73)。括弧内の数値は同一性/相同性スコアを表し、取りうる最大スコアは590である。比較とアラインメントはMacVectorによって行った。

【0036】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、腫瘍由来細胞においてWNVキャプシド(Cp)蛋白質がアポトーシス誘発活性を有するという発見に基づくものである。培養細胞においてWNVキャプシド蛋白質が発現すると、アポトーシス経路が誘導され、最終的には高増殖性細胞の死が誘導されることが発見された。WNV Cp蛋白質のカルボキシル末端領域に由来する22アミノ酸残基のペプチドが、アポトーシス誘発活性を有することも認められた。WNV Cp蛋白質にアポトーシス誘発活性があることから、Cp蛋白質とその機能性断片は、急速成長細胞(癌細胞等)を死滅させる方法に有用であり、アポトーシス誘発活性を阻害する化合物を同定するスクリーニングシステムに有用である。このシステムは、WNV感染の治療に有望視されている。

【0037】

単センス鎖RNAゲノムウイルスからなるフラビウイルス科のウイルスは、3属に分類される。ウシ下痢ウイルス(BVDV)等のペスチウイルス属、C型肝炎ウイルス(HCV)等の「C型肝炎様ウイルス」、及びフラビウイルス属である。フラビウイルス属には未分類のウイルスも含まれるが、血清学的分類上少なくとも10種の亜属を含む。WNVは

、蚊を媒介とする日本脳炎ウイルス群の一つである。この群には他にW N Vと密接な同族である、日本脳炎ウイルス（J E V）やセントルイス脳炎ウイルス（S L E V）がある。他のフラビウイルス属としては、黄熱ウイルス（Y F V）やデング熱ウイルス（D E N V）が挙げられるが、これらは別の亜属に分類される。ヌクレオチド配列分析とアミノ酸配列分析によって、血清グループ内または血清グループ間で、配列の保存があることが明らかになった。W N V C p蛋白質は、フラビウイルス科のウイルスや他のウイルス科のウイルスを含む（ただしこれらに限定されるものではない）、他のウイルスのキャプシド及び他の蛋白質と、相同性を有する。W N V C p蛋白質はまた、哺乳動物由来のアポトシス促進性蛋白質を含む非ウイルス蛋白質等の他の蛋白質とも、相同性を有する。

【0038】

本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質はペスチウイルス属に由来するものである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するペスチウイルス属は、B V D Vである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質はフラビウイルス属に由来するものである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するフラビウイルス属は、J E Vである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するフラビウイルス属は、S L E Vである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するフラビウイルス属は、Y F Vである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するフラビウイルス属は、D E N Vである。本発明の幾つかの態様において、キャプシド蛋白質の由来するフラビウイルス属は、W N Vである。

【0039】

本発明は特に、フラビウイルス属又はペスチウイルス属等のウイルス由来のキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片を用いて、細胞死を誘発する方法を提供する。幾つかの態様において、キャプシド蛋白質又はその機能性断片はW N V由来のものである。本発明はまた、フラビウイルス属又はペスチウイルス属等のウイルス由来のキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片の有する、細胞を死滅させる活性を阻害する化合物をスクリーンする方法を提供する。本発明の幾つかの態様において本発明は、W N Vのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の有する、細胞を死滅させる活性を阻害する化合物をスクリーンする方法を提供する。本発明は更に、フラビウイルス属又はペスチウイルス属等のウイルス由来のキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片、或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属等のウイルス由来のキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片をコードする核酸を包含する薬剤組成物；及び高増殖性細胞によって特徴付けられる疾病を有する個体を、これらの薬剤組成物で治療する方法を提供する。本発明は更に、W N V由来或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来の、キャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの断片、或いはキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片をコードする核酸と、薬剤として許容される担体とを包含するワクチン組成物を提供する。本発明はまた、W N V或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスに接触した個体の、診断方法及び同定キットを提供する。

【0040】

本発明の実施においては、特に述べない限りは、ウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学及び組換えDNA技術で従来用いられている方法を、当分野で公知の技術の範囲内で用いる。これらの技術については、詳細に渡って文献に説明されている[例えばS a m b r o o k他編、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l（第2版）C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1989）；A u s u b e l他編、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、J o h n W i l e y & S o n s、ニューヨーク州ニューヨーク（2000）；G l o v e r編、D N A C l o n i n g : A P r a c t i c a l A p p r o a c h第I～II巻；C o l o w i c k及びK a p l a n編、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y、A c a d e m i c P r e s s；W e i r及びB l a c k w e l l編、H a n d b o o k o f

10

20

30

40

50

Experimental Immunology 第 I ~ IV 巻、Blackwell Scientific Pubs. (1986); Fields、Knipe 及び Howley 編、Fields Virology (第 3 版) 第 I ~ II 巻、Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996); Coligan 他編、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク (2000) 参照。それぞれここに参照して説明に代える]。

【0041】

本明細書に渡って様々な定義がなされている。殆どの言葉については、当業者によって使われている言葉と同じ意味である。下記または本明細書の各所で特に定義した言葉は、概して本発明の文脈内で与えられる意味を有するものであり、通常は当業者に理解されるものである。

10

【0042】

ここで細胞死又はアポトーシスについていう「誘発する」及び「誘発」の語は、細胞死の原因となるアポトーシス経路の部分構成する細胞現象を開始する活性といった、細胞死を導く現象を引き起こす活性のことを言う。

【0043】

ここでいう「アポトーシス」の語は、壊死とは区別される真核細胞死の形態を意味し、細胞骨格崩壊、細胞質収縮及び濃縮、細胞膜外面におけるホスファチジルセリンの発現、並びに気泡といった現象であり、結果として細胞膜結合小胞体またはアポトーシス小体を形成することをいう。アポトーシス細胞死の概説については、例えば Utz 及び Anderson (2000) Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules、Cell Death Differ. 7: 589 - 602 (ここに参照して説明に代える) を参照することができる。

20

【0044】

本明細書及び請求項において用いられている単数の表現は、明示しない限りは複数を含むものとする。従って例えば「細胞」の表現は、2 以上の細胞の混合を含むものとする。

【0045】

ここでキャプシド蛋白質又はその機能性断片についていう「細胞死を誘発する有効量」及び「細胞死を誘発する有効レベル」の表現は、細胞に接触するキャプシド蛋白質又はその機能性断片の量、或いは細胞内で発現されるキャプシド蛋白質又はその機能性断片のレベルが、細胞を死滅させる現象を引き起こすのに有効であることを意味する。

30

【0046】

ここでいう「蛋白質」の語はアミノ酸残基の重合体を意味し、長さが最小のものに限定されるものではない。ポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、マルチマーなどが定義に含まれる。全長蛋白質とその断片との両方が定義に含まれる。この語は更に蛋白質発現後の改変を含み、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0047】

ここでキャプシド蛋白質についていう「その機能性断片」の表現は、全長蛋白質より短い断片にして、キャプシド蛋白質の機能を保持し、細胞死又はアポトーシスを誘発することのできる断片のことを言う。

40

【0048】

ここでキャプシド蛋白質についていう「その免疫原性断片」の表現は、全長蛋白質より短い断片にして、それに対して免疫応答を誘発できる断片のことを言う。

【0049】

ここでいう「核酸」の語は、DNA 及び RNA、並びにそれらの改変体、例えば糖、塩基又はバックボーンの改変体を含む。

【0050】

50

ここでキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸についていう「フラビウイルス属又はペスチウイルス属の全ゲノムから遊離した」の表現は、核酸が組換えの形状又は構造体であるか、又はさもなくばフラビウイルス属又はペスチウイルス属ゲノム内で天然に存在する状態から単離された形状であることを意味する。

【0051】

ここでキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸についていう「WNVの全ゲノムをから遊離した」の表現は、核酸が組換えの形状又は構造体であるか、又はさもなくばWNVゲノム内で天然に存在する状態から単離された形状であることを意味する。

【0052】

ここでアポトーシスについていう「検出可能なレベル」の表現は、誘導されたアポトーシスのレベル又は量が、当業者に知られる方法によって検出又は測定可能な閾値にあることをいう。「アポトーシスマーカー」の存在を同定するか、又はその増加を同定するかによって、用いる検出方法は異なる。

10

【0053】

ここでいう「アポトーシスマーカー」の表現は、アポトーシスが引き起こされて細胞のアポトーシス死が進行していることを示す指標となる、細胞要素又は形態的变化のことをいう。「アポトーシスマーカー」の例としては、外面化細胞膜ホスファチジルセリン(PS)、遊離3'ヒドロキシDNA末端及び細胞質ヌクレオソームが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0054】

ここでWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド又は他の蛋白質の有するアポトーシス誘発活性に対する阻害剤についていう「化合物」の語は、同定可能な全ての化学薬品又は分子を含み、例として小分子、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、糖、ヌクレオチド又は核酸などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのような化合物は天然のものであっても合成されたものであってもよい。

20

【0055】

ここでWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド又は他の蛋白質の有するアポトーシス誘発活性についていう「阻害」の語は、この活性に対する全ての干渉を含む。例えば「阻害」の語は、アポトーシス誘発活性の除去と低減との両方を含む。キャプシド蛋白質の有するアポトーシス誘発活性に対する阻害は様々な方法で観察することができ、例えばTUNEL(TdT媒介dUTP-Xニック末端標識化)アッセイを用い、PSをアネキシンVで観察する方法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0056】

ここでいう「注射用薬剤組成物」の表現は、無菌、無発熱源で、かつどのような微粒子も含まない、患者に用いるための薬剤として許容される組成物のことをいう[Remington's Pharmaceutical Sciences第18版、Gennaro編、Mack Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン(1990)及びU.S.P.、the standards of the U.S. Pharmacopeia参照。ここに参照して説明に代える]。

40

【0057】

ここでいう「薬剤として許容される担体」の表現は、組成物を受容する個体に対して有害な影響をそれ自身与えることのない、全ての担体のことをいう。例えば「薬剤として許容される担体」は、レシピエントに有害な抗体の産生を誘発するものであってはならない。好適な「薬剤として許容される担体」は当業者に公知のものであり、Remington's Pharmaceutical Sciences(上述)に記載されている。

【0058】

ここでいう「高増殖性細胞」の語は、不適当な又は正常でない速度又は場所で成長、分裂又は増殖している細胞のことを意味し、G₀又は静止状態にあるべき時に細胞周期に入っ

50

ている細胞を含む。例えば腫瘍細胞が「高増殖性細胞」の定義に含まれる。「高増殖性細胞」に特徴付けられる又は関する疾病又は病状としては、癌、自己免疫疾患、非悪性成長及び乾癬などが挙げられる。

【0059】

ここでいう「治療」の語は、疾病又は病状の改善及び／又は除去を含む。「治療」の語は、高増殖性細胞に特徴付けられる又は関連した疾病又は病状を患っている個体について、またWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスに接触した及び／又は感染した個体についても、用いられる。

【0060】

ここで疾病又は病状を有する個体の治療についていう「有効量」の表現は、治療を遂行し、かつ疾病又は病状を改善及び／又は除去するのに十分な量を意味する。 10

【0061】

ここでワクチン組成物についていう「免疫学的有効量」の表現は、治療のための又は予防のための免疫応答を誘発するのに十分な量を意味する。

【0062】

ここでウイルスに感染した個体の処理についていう「予防のための免疫応答」の表現は、ウイルスによる攻撃から予防し防御するための免疫応答を意味する。

【0063】

ここでウイルスに感染した個体の処理についていう「治療のための免疫応答」の表現は、ウイルス感染を改善する及び／又は除去する免疫応答を意味する。 20

【0064】

ここで個体に投与されるワクチンの量についていう「治療的有效量」の語は、治療のための免疫応答を個体に誘発するのに十分な量を意味する。

【0065】

ここで個体に投与されるワクチンの量についていう「予防的有效量」の語は、予防のための免疫応答を個体に誘発するのに十分な量を意味する。

【0066】

ここでいう「個体」とは、本発明の薬剤組成物又はワクチン組成物で治療することのできるヒト又は非ヒト動物を意味する。

【0067】

ここでいう「投与」には腫瘍内注射、経皮、非経口、皮下、筋肉内、経口及び局所的投与が含まれるが、これらに限定されるものではない。 30

【0068】

ここで薬剤組成物の投与についていう「腫瘍内注射」の語は、薬剤組成物を注射によって腫瘍内に直接導入することをいう。

【0069】

本発明の幾つかの形態は、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその機能性断片の有する、細胞増殖抑制能に関する。本発明の幾つかの形態はまた、フラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来の他のウイルス性蛋白質又はその機能性断片の有する、細胞増殖抑制能 40
に関する。キャプシド又は他の蛋白質は、細胞にアポトーシスを誘発する。幾つかの態様において、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその機能性断片、及び／又はそれらをコードする核酸分子が、望ましくない細胞、特に癌などの高増殖性細胞に特徴付けられる又は関連する疾病を患っている個体を治療する薬剤組成物に用いられる。WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド又は他の蛋白質は、ウイルス活動に必須であるウイルス機能を阻害するための標的を提供する。従って、本発明の一つの形態においては、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質、他の蛋白質又はそれらの機能性断片の有するアポトーシス誘発活性を阻害する化合物を同定することによって、抗ウイルスの及び／又は抗WNVの及 50

びノ又は抗フラビウイルス属又は抗ペスチウイルス属の化合物を同定することができる。

【0070】

本発明はさらに、細胞にアポトーシスを誘導することを目的とした、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質の機能性断片、及びノ又はWNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質の機能性断片をコードする核酸の使用に関し、またWNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質の機能性断片、及びノ又はWNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質の機能性断片をコードする核酸を包含する、薬剤組成物に関する。ここでいう「WNV由来の或いは同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質」の「機能性断片」とは、細胞のアポトーシスを誘発する能力を保持している、WNV又は同族のフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質の断片のことをいう。ここでいう「WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質」の「機能性断片」とは、細胞のアポトーシスを誘発する能力を保持している、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスの断片のことをいう。WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又は他の蛋白質の機能性断片は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド又は他の蛋白質に由来する、長さが少なくとも約10個のアミノ酸であり、WNVの或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド又は他の蛋白質に由来しないアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

20

【0071】

WNV Cp蛋白質のカルボキシル末端領域に由来する22アミノ酸残基のペプチドが、本発明のある態様においてアポトーシス誘発活性を有することも観察されている。図10に示すこのペプチド(「WNV C-P3」、或いは「ペプチド3」と称する)は、WNV Cp蛋白質のアミノ酸残基90~110にあたる。特に、本発明の幾つかの態様によると、WNV Cp蛋白質の機能性断片は、ペプチドWNV C-P3又はその断片を含む。ペプチドWNV C-P3の断片は、少なくとも3個のアミノ酸を包含する。ペプチドWNV C-P3の断片は、長さが3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21アミノ酸残基であってもよい。WNV Cp蛋白質のペプチドWNV C-P3又はその断片；ペプチドWNV C-P3又はその断片を含むCp蛋白質の断片；Cp蛋白質又；又はCp蛋白質配列と非Cp蛋白質配列とを包含する融合蛋白質のいずれにおいても、野生型Cp蛋白質の有するアポトーシス機能を有するかどうかについて調べることができる。

30

【0072】

WNV Cp由来のキャプシド蛋白質は、フラビウイルス科のウイルスや他の多くのウイルス科のウイルスを含む(ただしこれらに限定されるものではない)、他のウイルスのキャプシド及び他の蛋白質とも、相同性を有する。WNV Cp蛋白質はまた、哺乳動物由来のアポトーシス促進性蛋白質等の非ウイルス蛋白質とも、相同性を有する。相同性/同一性領域は、WNV Cpと(アポトーシス活性を有する)HIV-1 Vpr蛋白質、クンジンウイルスCp蛋白質、日本脳炎ウイルスCp蛋白質、デング熱ウイルスCp蛋白質、単純性疱疹ウイルス主要キャプシド蛋白質、エボラウイルス核蛋白質、エボラウイルス糖蛋白質、風疹ウイルスキャプシド蛋白質との間や、アポトーシス促進性非ウイルス蛋白質(ヒトBAK蛋白質、ヒトBcl-2関連X蛋白質、ヒトBIK蛋白質、ヒトBID蛋白質、ヒトBad蛋白質など)との間において同定されている。その上更に、相同性/同一性領域は、HIV-1 Vpr蛋白質と、シンドビスウイルスのp230非構造蛋白質、キュウリモザイクウイルスの2A蛋白質、風疹ウイルスキャプシド蛋白質、ニパウイルス融合蛋白質、レオウイルスコア非主要型Mu2蛋白質との間や、アポトーシス促進

40

50

性蛋白質（マウスBIM蛋白質、ラットBOD蛋白質、マウスMtd蛋白質、ヒトBcl-2関連X蛋白質、ヒトBad蛋白質など）との間において同定されている。

【0073】

当業者は不必要な実験を行うことなく、配列と細胞におけるアポトーシス誘発能とを調べることによって、蛋白質又はペプチドが、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質の機能性断片であるかどうかを容易に調べることができる。WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の末端を切除したものを、容易に入手可能な出発原料から一般的な方法で調製して試験することができる。ここでいう「機能性断片」の語は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質アミノ酸配列と同一である又は少なくとも一部分に実質的に相同性を有するアミノ酸配列を包含し、アポトーシスを誘発することのできる、ペプチド、ポリペプチド、非ペプチド結合で連結したアミノ酸配列、あるいは蛋白質を意味する。「実質的に相同性を有する」とは、保存的置換を有するアミノ酸配列のことをいう。当業者は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の機能性断片を、本明細書の開示並びに公知の技術に従って作成することができる。このように同定された機能性断片は、不必要な実験を行うことなく、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスの全長キャプシド蛋白質の代わりに用いることができ、配合することができる。

10

【0074】

本発明はまた、個体において予防又は治療のための免疫応答を誘発することを目的とした、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片、及び/又はWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片をコードする核酸を包含するワクチンに関する。ここでいう「WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質」の「免疫原性断片」とは、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の断片で、免疫応答を誘発することのできる断片を意味する。WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片は、長さが少なくとも約10アミノ酸で、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質に由来するものであり、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質に由来しないアミノ酸配列を包含していてもよい。当業者は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の断片による免疫化に应答して起こる抗体産生をスクリーニングする標準的な免疫アッセイを用いることによって、ある蛋白質又はペプチドが、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片であるかどうかを容易に調べることができる。このような方法の例としては、1) 酵素免疫検定法(ELISA)、2) リンパ系器官由来の細胞を用いた増殖アッセイ、並びに3) 所定の抗原に対する抗体を産生する細胞数の評価などが挙げられる。これら標準的なアッセイの詳細なプロトコルについては、Weir & Blackwell 編、Handbook of Experimental Immunology (上述) やColligan他編、Current Protocols in Immunology (上述) などの免疫学マニュアルが参照できる。当業者は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の免疫原性断片を、本明細書の開示並びに公知の技術に従って作成し同定することができる。こうして同定された免疫原性断片は、不必要な実験を行うことなく、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスの全長キャプシド蛋白質の代わりに用いることができ、配合することができる。

20

30

40

【0075】

本発明の治療上の形態は、癌又は乾癬などの高増殖性細胞に特徴付けられる或いは関連し

50

た疾病を患う個体の治療に有用な薬剤組成物における、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の機能性断片、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質をコードする核酸分子、又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質の機能性断片をコードする核酸分子の使用を含む。

【 0 0 7 6 】

本発明の一つの形態は、癌又は乾癬などの細胞の高増殖によって特徴付けられる疾病など（ただしこれらに限定されるものではない）の、望ましくない細胞によって特徴付けられる疾病に対処するための薬剤組成物において、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片；又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を使用することにある。本発明によると、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片；又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするD N A 又はR N A 配列を包含する核酸分子、のいずれかを包含する薬剤組成物が提供される。

10

【 0 0 7 7 】

本発明の別の形態は、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片、及び／又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子と、薬剤として許容される担体又は希釈液とを包含する薬剤組成物に関する。W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片及び／又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を包含する薬剤組成物は、高増殖性細胞に特徴付けられる病理又は病状を有する個体の治療に有用である。ここに記載するように、高増殖性細胞等の望ましくない細胞によって特徴付けられる疾病の治療に用いられる薬剤組成物は、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片、及び／又はフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を包含しうる。というのは、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は明らかに、細胞にアポトーシス死を誘発する作用物質であるからである。本発明の薬剤組成物は、充実性腫瘍によって特徴付けられる癌に特に有用である。高増殖性細胞を刺激してアポトーシス死を引き起こす能力によって、細胞の高増殖を阻害する手段を提供し、よって腫瘍を縮小させる。細胞の不適当な高増殖によって特徴付けられる癌及び乾癬などの疾病において、アポトーシス細胞死の誘導を通じた高増殖の阻止に本薬剤組成物が有用であり、これによって疾病の治療を行う。

20

30

【 0 0 7 8 】

従って本発明の別の形態は、高増殖性細胞に関連した疾病を患う個体を治療する方法にして、前記細胞にアポトーシスを誘発するのに十分な量の、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片、及び／又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を、個体に投与する段階を包含する方法である。

40

【 0 0 7 9 】

本発明の別の形態は、自己免疫疾患等の望ましくない細胞に関連した疾病を患う個体を治療する方法にして、前記細胞にアポトーシスを誘発するのに十分な量の、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片、及び／又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウ

50

イルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を、個体に投与する段階を包含する方法である。

【0080】

本発明の別の形態は、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片及び／又はW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子と、薬剤として許容される担体又は希釈液とを包含するワクチン組成物に関する。W N V 由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片を包含するワクチン組成物は、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスに対して個体を免疫化するのに有用である。免疫は予防的（感染を防ぐためのもの）であってもよいし、治療的（感染を治療するためのもの）であってもよい。免疫が予防的である場合には、個体はウイルスによる攻撃から守られる。免疫が治療的である場合には、個体のかかっているウイルス感染が治療される。

10

【0081】

従って本発明の一つの形態は、W N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスによる感染を患う個体を治療する方法にして、W N V 由来或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片を、治療のための免疫応答を刺激するのに十分な量で個体に投与する段階を包含する方法である。

20

【0082】

本発明の別の形態は、個体におけるW N V 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスによる感染を予防する方法にして、W N V 由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片を、予防のための免疫応答を刺激するのに十分な量で個体に投与する段階を包含する方法である。

【0083】

W N V 由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片が、ワクチン中の成分として個体に（蛋白質として直接に、あるいはワクチンで投与された核酸から体内で発現するものとして）投与される場合、キャプシド蛋白質又はその免疫原性断片が標的となり、これに対して個体中で免疫応答、感染の予防（予防的）又は感染の治療（治療的）が発達する。処理後にはウイルスによる攻撃から個体が保護されるという点で、免疫応答が治療及び予防の両方を目的としてもよいことが当業者には理解できよう。

30

【0084】

キャプシド蛋白質

W N V キャプシド蛋白質又はその機能性断片は上記したように、容易に入手可能な出発原料を用いて一般的な方法で作成することができる。W N V キャプシド蛋白質をコードする核酸配列、並びに蛋白質のアミノ酸配列は公知のものである。下記のような多くのW N V 単離体について全ゲノムが文献に記載されており、GenBankより入手可能である。単離体2741（登録番号AF206518）、NY99-フラミンゴ382-99株（登録番号AF196835）、HNY1999株の全ポリプロテイン遺伝子（登録番号AF202541）、並びに登録番号M12294として認識されている単離体が挙げられる（それぞれここに参照して説明に代える）。W N V ゲノムの配列情報について様々な文献が出されており、その引用はGenBankの配列情報にリンクしている。公的に入手可能な配列情報を含むこれらの文献それぞれは、ここに参照して説明に代える。

40

【0085】

他のフラビウイルス属又はペスチウイルス属に由来するキャプシド蛋白質及び核酸の配列情報も、GenBankで入手することができる。例えばGenBankにより提供される株及び単離体の全ゲノム配列の例としては、JEV（登録番号M18370、D901

50

94及びD90195)、SLEV(登録番号M16614)、YFV(登録番号AF094612、U17067、U17066、U54798、U21055、U21056及びX03700)、DENV(登録番号M23027、U88535、U88536及びU88537)及びBV DV(登録番号M31182)(それぞれここに参照して説明に代える)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0086】

目的の蛋白質をコードする好適なDNA配列を用意することによって、公知の組換え技術を用いた蛋白質産生が可能になる。コード配列は例えば、公的に入手可能な配列情報に基づいて作成したPCRプライマーを用いて、感染細胞からクローニングすることで得ることができる。DNA配列は、DNA合成装置を用いて化学的に調製することもできる。コードDNAを合成によって調製する場合には、DNAの発現される宿主に対して既知のコードに偏向があるという点を利用することができる。更に、点突然変異、挿入又は欠失といった改変をコード配列に導入して、対照物を作成したりキャプシド蛋白質の他の改変体を作成することができる。

10

【0087】

当業者は公知の方法を用いて、WNVキャプシド蛋白質或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質をコードするDNA分子を作成し、市販の発現ベクターに前記DNA分子を挿入し、公知の発現系に用いることができる。例えば市販のプラスミドpSE420(Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ)を用いて、大腸菌細胞内でキャプシド蛋白質を産生することができる。市販のプラスミドpYES2(Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ)を、*S. cerevisiae*等の酵母菌内での産生に用いることができる。市販のMaxBac2.0キット(Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ)にpBlueBac4ベクターを用いて、Sf9細胞などの昆虫細胞内でキャプシド蛋白質を産生するためのバキュロウイルス発現系を構築することができる。市販のプラスミドpcDNA I(Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ)を用いて、チャイニーズハムスター卵巣細胞等の哺乳動物細胞内で、キャプシド蛋白質を産生することができる。

20

【0088】

当業者は、これら市販の発現ベクター系又は他の系を利用して、容易に入手可能な出発原料を用いて一般的な方法によってWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質を産生することができる。

30

【0089】

当業者は、他の市販の発現ベクター及び系を用いることもできるし、あるいは容易に入手可能な出発材料を用いて公知の方法によってベクターを作成することもできる。プロモーターやポリAシグナル、さらに好ましくはエンハンサーなどの必須制御配列を含む発現系は、容易に入手可能であり、様々な宿主に使用可能なものが当分野で知られている(例えばAusubel他編、*Current Protocols in Molecular Biology*、上述参照)。従って、目的の蛋白質を原核細胞系及び真核細胞系の両方で調製することができ、多様な処理形状の蛋白質を得ることができる。

【0090】

原核細胞系として大腸菌が最も一般的に用いられているが、枯草菌やシュードモナス属などの他の系も有用である。原核細胞系について好適な制御配列には構造的プロモーターと誘発性プロモーターの両方があり、例としてlacプロモーター、trpプロモーター、ハイブリッドプロモーター(tacプロモーターなど)及びファージP1プロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。一般に異種蛋白質は、これらの宿主内で融合蛋白質又は成熟型蛋白質のいずれかとして産生することができる。目的の配列が成熟型蛋白質として産生される場合には、産生される配列において、除去しにくいメチオニンが配列の先に来る可能性がある。従って、ここに請求するペプチド及び蛋白質は、バクテリア内で産生された場合にはN末端Metが配列の一番目に来るものを含むものとする。その上更に、操作可能なシグナルペプチドがペプチドのコード配列の最初に来る構造体

40

50

を作成することができ、これによって蛋白質を分泌させることができる。原核細胞宿主内でこのように産生される場合、分泌時にシグナル配列は除去される。

【0091】

現在、組換え異種蛋白質の産生用に、様々な真核細胞宿主を入手することができる。細菌の場合と同様に、目的の蛋白質を直接産生する発現系で真核細胞宿主を形質転換させてもよいが、より一般的にはシグナル配列を用いて、蛋白質を分泌させる。真核細胞系は、高等生物の蛋白質をコードするゲノム配列中に生じうるイントロンを加工処理する能力があるという点で、更に利点がある。真核細胞系は更に、例えば特定のアミノ酸残基のグリコシレーション、カルボキシル末端アミド化、酸化又は変性化、配座制御といった、様々な加工機構を提供する。

10

【0092】

一般的な真核細胞系の例としては、酵母菌、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞及び高等植物細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの異なった宿主細胞それぞれについて、適合性があり操作可能な好適なプロモーターが入手可能である。例えばバキュロウイルス多面体プロモーターなどの末端配列及びエンハンサーの入手も可能である。上記したように、プロモーターは構造的であっても誘発性であってもよい。例えば哺乳動物系において、重金属イオンを添加することによって、マウスメタロチオネインプロモーターを誘発することができる。

【0093】

望ましい宿主に好適な発現系の構造の詳細は、当業者に公知のものである。蛋白質の組換え産生においては、その蛋白質をコードするDNAを任意の発現ベクター内に好適に連結し、得られるベクターで適合性のある宿主を形質転換し、次いで異種遺伝子が発現する条件下で培養・維持する。このように産生された本発明の蛋白質を、細胞溶解から又は直接培養基から、当業者に適当であると判断される方法で回収する。

20

【0094】

当業者は、そのような発現系を用いて産生したWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質を、公知の方法を用いて単離することができる。

【0095】

WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の産生においては、組換え技術による産生に加えて、アミノ酸自動合成装置を用いる方法もある。なお、本明細書に記載の蛋白質を合成により得る場合、蛋白質は遺伝子によってコードされていないアミノ酸によって置換されていてもよい。置き換えられる残基の例としては、式 $H_2N(CH_2)_nCOOH$ (ここで $n = 2 \sim 6$) で表されるアミノ酸が挙げられる。これらは、サルコシン (Sar)、t-ブチルアラニン (t-BuAla)、t-ブチルグリシン (t-BuGly)、N-メチルイソロイシン (N-Melle)、及びノルロイシン (Nleu) などの、中性で非極性のアミノ酸である。例えばフェニルグリシンを、芳香族中性アミノ酸である Trp、Tyr 又は Phe の代わりに用いる。シトルリン (Cit) 及びメチオニンスルホキシド (MSO) は極性だが中性であり、シクロヘキシルアラニン (Cha) は中性かつ非極性であり、システイン酸 (Cya) は酸性であり、オルニチン (Orn) は塩基性である。これらのうち1個以上がヒドロキシプロリン (Hyp) で置換されている場合には、プロリン残基の特徴を与える配座を得ることができる。

30

40

【0096】

本開示の一部は、薬剤組成物に関し、本開示の別の部分は、治療用又は予防用ワクチンに関する。本発明の薬剤組成物は、細胞を死滅させるために個体に投与することを企図しており、本発明のワクチン組成物は、ウイルス感染に対する予防的又は治療的免疫応答を誘発する目的で、個体に投与されることを企図される。本発明の薬剤組成物は、アポトーシスを誘発し細胞を死滅させるのに有効な量で投与される。本発明のワクチン組成物は、免疫応答を誘発する目的を達するのに有効な量で投与される。

50

【0097】

組成物が薬剤又はワクチンのいずれとして調製されるにせよ、本発明の薬剤組成物とワクチン組成物とについての数多くある組成、配合、投与量、投与方法の形態は、相関するものであり、同一であってもよいということは、当業者によって容易に理解されよう。例えば本発明の薬剤組成物とワクチンとの両方が、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその断片を包含していてもよい。薬剤組成物中のキャプシド蛋白質又はその断片がアポトーシス活性において機能を持つものに対して、ワクチン中のキャプシド蛋白質又はその断片は、免疫原性を持つ。相関した形態に関して開示された部分は、薬剤組成物とワクチンとの両方にあてはまるものとする。

【0098】

当業者は、高増殖性細胞に特徴付けられる疾病を治療するのに用いられる、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と薬剤として許容される担体又は希釈液とを包含する薬剤組成物を、任意の投与方法に応じて選択された組成物を用いて配合することができる。好適な薬学的担体は、当分野の標準的な参考書である Remington's Pharmaceutical Sciences (上述) に記載がある。

【0099】

全ての投与経路について、効果的かつ容易に運搬されることが共通の必須条件である。本発明の一つの態様において、薬剤組成物は注射によって投与される。好ましい態様において、組成物は腫瘍内注射によって投与される。他の投与方法の例としては、経皮 (transdermal)、経皮 (transcutaneous)、皮下、腹腔内、粘膜又は一般的な持続性投与が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0100】

非経口投与については、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片を、例えば薬剤として許容される非経口賦形剤と組み合わせた液体、懸濁液、乳濁液、又は凍結乾燥粉末として配合することができる。そのような賦形剤の例としては、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液及び 5 % ヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソーム及び非水系賦形剤 (固定油等) を用いることもできる。賦形剤又は凍結乾燥粉末は、等張性を保持する添加物 (例えば塩化ナトリウム、マンニトール) 及び化学的安定性を保持する添加物 (例えば緩衝剤及び保存剤) を含んでいてもよい。配合は一般的な方法で滅菌される。例えば、0.9 % 塩化ナトリウム溶液に 1.5 重量 % の活性成分を溶解することによって、注射投与に適した非経口組成物を調製する。

【0101】

個体によって必要条件は様々であるが、配合の有効量についての最適な範囲は、当業者が決定できるものである。ヒトにおける投与量は、動物を用いた研究のデータに基づいて容易に推定することができる [Katocs 他、Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版、第 27 章: Gennaro 編、Mack Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン (1990)。ここに参照して説明に代える]。一般に、配合の有効量を提供するのに必要な投与量 (これは当業者によって調節することができる) は、レシピエントの年齢、健康状態、身体状態、体重、疾病又は疾患の種類及び程度、治療の頻度、平行して行われる治療の性質、(或いは更に必要であれば目的とする効果の性質及び範囲) など数々の要因によって異なる [Nies 他、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 第 9 版、第 3 章: Hardman 他編、McGraw-Hill、ニューヨーク州ニューヨーク (1996)。ここに参照して説明に代える]。通常、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の一日の投与量は、約 $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{ ミリグラム} / \text{kg}$ (体重) とすることができる。一般に $0.5 \sim 50$ 、好ましくは $1 \sim 10 \text{ ミリグラム} / \text{kg} / \text{日}$ の量で 1 日につき 1 ~ 6 回に分割して、あるいは持続放出の形状で投与するの

10

20

30

40

50

が、望ましい結果を得るのに有効である。

【0102】

本発明の薬剤組成物は、1回で投与してもよいし、複数回で投与してもよい。本発明の薬剤組成物は、単独の治療薬として投与してもよいし、他の治療薬と組み合わせて投与してもよい。本発明の治療法は、従来の治療法と組み合わせることが可能であり、順次又は同時に行うことができる。

【0103】

WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質、その機能性断片又はその誘導体を包含する薬剤組成物の投与には、レシピエント体内において活性物質をその作用部位に到達させることができる手段であればどのようなものを用いてもよい。蛋白質は経口投与された場合消化されてしまうので、通常は非経口投与、すなわち静脈内、皮下、筋肉内投与を行って、吸収を最適化する。加えて本発明の薬剤組成物は、高増殖成長の部位又はその近傍に注射することができる。例えば投与を充実性腫瘍塊内に直接注射して行ってもよいし、それに隣接する組織内に注射して行ってもよい。治療対象の個体が乾癬を患っている場合には、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片を、薬剤として許容される局所担体と共に配合し、その配合を例えばクリーム、ローション又は軟膏として局所に塗布してもよい。

10

【0104】

当業者は、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスに感染した個体の予防又は治療処理に用いられる、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と薬剤として許容される担体又は希釈液とを包含するワクチン組成物を、任意の投与方法に応じて選択された組成物を用いて配合することができる。ワクチンに用いられる好適な薬学的担体は、当分野において標準的な参考文献である Remington's Pharmaceutical Sciences (上述) に記載があり、組成物を受容する個体にとって有害な抗体の産生を誘発することのない担体であれば、どのようなものを用いてもよい。好適な担体の例としては、蛋白質類、多糖類、ポリ乳酸類、ポリグリコール酸類、高分子量アミノ酸類、アミノ酸共重合体類、及び脂質凝集物(油滴又はリポソームなど)等の緩代謝性高分子が挙げられる。そのような担体は当業者に公知のものである。これらの担体は免疫促進剤(「アジュバント」)としても機能することができる。その上更に、ジフテリア又は破傷風のトキソイドといった、細菌トキソイドに抗原を結合させることができる。

20

30

【0105】

本発明のワクチン組成物と共に用いることのできるアジュバントの例としては、(1)アルミニウム塩(明礬)、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム等；(2)水中油型乳剤配合物、例えば(a)合成アジュバント配合物(SAF) [Chiron (カリフォルニア州エメリービル)より入手可能]、及び(b)2%スクアレン中に解毒化内毒素及びマイコバクテリウム細胞壁成分を含むRibibioアジュバント系(RAS) (Corixa、ワシントン州シアトル)等；(3)TiterMax [CytRx (ジョージア州ノークロス)より入手可能]等の油中水配合物；(4)Stimulon (Cambridge Bioscience、マサチューセッツ州ウスター)等のサポニンアジュバント、又はそれから調製したISCOMS (免疫促進複合体)等の粒子；(4)フロイント完全アジュバント(FCA)及びフロイント不完全アジュバント(FIA)；(5)サイトカイン、例えばインターロイキン(IL-1、IL-2等)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)及び腫瘍壊死因子(TNF)等；及び(6)ワクチン組成物の免疫有効性を促進する免疫促進剤として作用するその他の物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0106】

通常、本発明のワクチン組成物は水、食塩水、グリセロール、エタノール等の希釈液を含んでいる。更に、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質等の補助物質が前記賦形剤に存在していて

50

もよい。

【0107】

通常、本発明のワクチン組成物は液体溶液又は懸濁液いずれかの形状の注射用薬剤として調製される。注射前に液体賦形剤に溶解又は懸濁するのに好適な固体状配合物として調製してもよい。薬剤として許容される担体について上記したように、アジュバント効果を促進する目的で、調製物を乳化するか又はリポソーム内に封入してもよい。

【0108】

本発明のワクチン組成物は、免疫学的有効量のWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質、その機能性断片又はその誘導体を包含していてもよく、レシピエントの免疫系が予防の又は治療の免疫応答を発生することができる手段であればどのようなものによって投与してもよい。WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質、その機能性断片又はその誘導体の免疫学的有効量とは、一回で又は一連投与の部分として個体に投与される、個体の治療的又は予防的処置に有効である量のことを言う。この量は、治療される個体の健康状態や身体状態、治療される個体の分類群（例えばヒト以外の霊長類、霊長類等）、個体の免疫系が抗体を産生する能力、目的とする保護の程度、ワクチンの配合、治療を行う医者による医療状況の評価、及び他の関連要因によって異なる。投与量は比較的広い範囲に渡ると予想されるが、一般的な試行によって決定することができる。

10

【0109】

全ての投与経路に共通の必須条件として、効率と容易な運搬が挙げられる。本発明の一つの態様において、ワクチン組成物は非経口で、例えば皮下又は筋肉内のいずれかの注射によって、投与される。他の投与手段の例としては、経皮（transdermal）、経皮（transcutaneous）、腹腔内、粘膜、又は一般的な持続性投与が挙げられるが、これらに限定されるものではない。投与治療は一回で行ってもよいし、複数回で行ってもよい。ワクチンは他の免疫調整剤及び/又は他のワクチンと組み合わせて投与してもよい。

20

【0110】

核酸

本発明の別の形態は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子と薬剤として許容される担体又は希釈液とを包含する薬剤組成物に関する。本発明によると、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする遺伝物質は、発現可能な形態で個体に運搬される。遺伝物質であるDNA又はRNAは、個体の細胞に取り込まれて発現される。そのように産生されたWNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、高増殖性細胞のアポトーシス死を誘発することができる。従って、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする遺伝物質を包含する薬剤組成物は、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片を包含する薬剤組成物と同様に、高増殖性細胞に特徴付けられる又は関連する病理又は病状を有する個体の治療に有用である。本発明の薬剤組成物は、充実性腫瘍によって特徴付けられる癌の治療に特に有用である。

30

40

【0111】

従って本発明の更なる形態は、発現に必要な調節因子に操作可能に連結した、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を包含する核酸を、ある量で個体に投与する段階を包含する、高増殖性細胞に関連した疾病を持つ個体を治療する方法に関する。

【0112】

本発明の別の形態は、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子と、薬

50

剤として許容される担体又は希釈液とを包含するワクチン組成物に関する。本発明によると、キャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする遺伝物質は、発現可能な形態で個体に運搬される。遺伝物質であるDNA又はRNAは、個体の細胞に取り込まれて発現される。そのように産生されたキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片は、個体内で免疫応答を誘発する。従って、WNV由来の或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルス由来のキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードする遺伝物質を包含するワクチン組成物は、キャプシド蛋白質を包含するワクチン組成物と同様にして、個体を免疫化するのに有用である。免疫性は、個体が感染していない場合には予防的であり、個体が感染している場合には治療的である。従って本発明の更なる形態は、感染を回避する又は感染した個体を治療する方法に関する。

10

【0113】

個体の細胞内で発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結された、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列は、ウイルスベクター（アデノウイルス又はレトロウイルスベクター等）又は核酸の直接移入のいずれか（しかしこれらに限定されるものではない）を用いた遺伝子治療によって、薬剤組成物として運搬することができる。目的の蛋白質をコードする核酸の運搬方法として、ウイルスベクターを用いるものが広く使用されている。レトロウイルスベクター、アデノウイルス又はアデノ関連性ウイルスベクター等の組換えウイルスベクターは、一般的な出発原料を用いて、一般的な方法で調製することができる。組換えウイルスベクターは、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードするヌクレオチド配列を包含する。そのようなベクターは、薬剤として許容される担体又は希釈液と組み合わせられる。得られる薬剤組成物は個体に投与することができる。ウイルスベクターで個体を感染すると、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片が、感染細胞内で産生される。

20

【0114】

個体の細胞内で発現するのに必要な調節因子に操作可能に連結された、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその免疫原性断片をコードするヌクレオチド配列は、ウイルスベクター（アデノウイルス、アデノ関連性ウイルス、ワクシニアウイルス又はレトロウイルスベクター等）或いは細菌又はマイコバクテリウムベクターを包含するワクチン組成物として投与することができる。その上更に、ヌクレオチド配列を、生菌及び/又は弱毒ワクチン内に組み込むことができる。

30

【0115】

あるいは、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片又は免疫原性断片をコードする、ヌクレオチド配列を包含する分子は、薬剤組成物又はワクチンとして、感染性ベクターを用いずに直接の核酸移入によって投与することができる。核酸分子はDNAであってもRNAであってもよく、好ましくはDNAである。DNA分子は線形であっても環状であってもよく、好ましくはプラスミドである。核酸分子は薬剤として許容される担体又は希釈液と組み合わせられる。

40

【0116】

上記したように、本発明の薬剤組成物とワクチンとは、組成物、配合、投与量及び投与について多くの点で相関しており、同一であってもよい。例えば、本発明の薬剤組成物とワクチンは両方とも、WNV或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその断片をコードする核酸を包含してもよい。薬剤組成物中のコードされるキャプシド蛋白質又はその断片は、アポトーシス活性について機能性を有するのに対し、ワクチン中のコードされるキャプシド蛋白質又はその断片は免疫原性を有する。相関した形態に関して開示された部分は、薬剤組成物とワクチンとの両方にあてはまるものとする。

【0117】

50

薬剤組成物における核酸の量は、十分に発現されて細胞死を誘発するに足る量でなければならない。核酸が断片をコードするものである場合には、断片は機能性断片でなければならない。薬剤組成物においては、免疫原性は対象となる特徴ではない。一方ワクチン組成物において、免疫原性が重要である。ワクチンの主な活性は、予防的又は治療的免疫応答の誘導にある。断片が核酸によってコードされる場合には、免疫原性断片でなければならない。

【0118】

本発明によると、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸配列を包含する薬剤組成物又はワクチンを、個体に直接投与してもよい。個体本体内に存在する細胞内に遺伝物質を導入する。投与の好適な経路の例としては、筋肉内、腹腔内、皮内及び皮下注射が挙げられる。あるいは薬剤組成物は、個体から除去した細胞内に様々な手段で導入してもよい。そのような手段の例としては、トランスフェクション、電気穿孔法及び微粒子銃が挙げられる。核酸分子が細胞に取り込まれてから、個体に再移植する。あるいは、ワクチン接種細胞が別の個体から採取されたものであったとしても、内部に遺伝構造体が組み込まれた非免疫原性細胞を個体内に移植することができると考えられる。

10

【0119】

遺伝構造体は、一般的な注射器、無針式注射装置、又は「微粒子遺伝子銃」等（ただしこれらに限定されるものではない）の手段によって投与してもよい。本発明の幾つかの態様によると、遺伝子構造体を無針式注射装置によって個体に投与する。本発明の幾つかの態様によると、遺伝子構造体を、無針式注射装置を用いて、皮内、皮下、筋肉内で同時に個体に投与する。針のない注射装置は公知のものであり容易に入手可能である。本明細書の記載に従えば、当業者は無針式注射装置を使用して個体の細胞に遺伝物質を運搬することができる。針のない注射装置は、全ての組織に対して遺伝物質を運搬するのに好適である。上記装置は、遺伝物質を皮膚又は筋肉細胞に運搬するのに特に有用である。幾つかの態様において、無針式注射装置は、DNA 分子を含む液体を、個体の皮膚表面に向けて発射するのに用いられる。液体は、皮膚表面を貫通するのに十分な速度で発射され、皮膚とその下の筋肉組織に浸透する。従って遺伝物質は、皮内、皮下及び筋肉内に同時に投与される。幾つかの態様において、他の器官の細胞に核酸分子を導入する目的で、無針式注射装置を用いてその器官の組織に遺伝物質を運搬する。

20

30

【0120】

本発明によると、遺伝ワクチンを個体に直接投与して免疫化してもよいし、個体から分離した細胞にエキスピボで投与して投与後に再移植してもよい。いずれの経路によっても、個体本体内に存在する細胞内に遺伝物質が導入される。投与経路の例としては、筋肉内、腹腔内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、眼内、経口、経皮、吸入式、座薬が挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましい投与経路としては、筋肉内、腹腔内、皮内及び皮下注射が挙げられる。

【0121】

本発明による薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 1 ナノグラム～約 2000 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、本発明による薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 5 ナノグラム～約 1000 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 10 ナノグラム～約 800 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 0.1～約 500 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 1～約 350 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 25～約 250 ミクログラムの DNA を包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物又はワクチン組成物は、約 100～約 200 ミクログラムの DNA を包含する。

40

【0122】

本発明による薬剤組成物又はワクチン組成物は、使用される投与方法に応じて配合される

50

。薬剤組成物又はワクチン組成物が注射用薬剤組成物である場合には、それらは滅菌され、発熱源を含まず、かつどのような微粒子も含まないものとする。好ましくは等張性の配合が用いられる。一般に、等張性を得る添加剤の例としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースが挙げられる。幾つかの場合においては、リン酸緩衝食塩水などの等張液が好ましい。安定剤の例としては、ゼラチン及びアルブミンが挙げられる。幾つかの態様においては、血管収縮剤が配合に添加される。

【0123】

幾つかの態様においては、ポリヌクレオチド機能に対するエンハンサー又は「遺伝的ワクチン促進」(GVF)剤の投与と組合せて、核酸分子を細胞に運搬する。ポリヌクレオチド機能のエンハンサーについては、米国特許第5,593,972号、米国特許第5,981,505号及びPCT/US94/00899(申請日1994年1月26日)に記載がある(それぞれここに参照して説明に代える)。GVF剤については、米国特許第5,739,118号、米国特許第5,837,533号及びPCT/US99/04332(国際出願日1999年2月26日)に記載がある(それぞれここに参照して説明に代える)。

10

【0124】

核酸分子と組み合わせて投与される共作用剤は、核酸分子との混合物として投与してもよいし、核酸分子の投与とは別々に、同時に、あるいはその投与前に又はその投与後に、投与してもよい。加えて、トランスフェクション剤及び/又は複製剤及び/又は炎症剤として機能しうる他の作用剤であって、GVFと共に又はGVF無しで投与することのできる作用剤の例として、成長因子、サイトカイン及びリンフォカイン[γ -インターフェロン、 β -インターフェロン、血小板由来成長因子(PDGF)、腫瘍壊死因子(TNF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インターロイキン-1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10及びIL-12等]並びに繊維芽細胞成長因子；界面活性剤[免疫促進複合体(ISCOMS)、フロイント不完全アジュバント等]；リポ多糖類(LPS)類似体[ノホスホリルリピッドA(MPL)等]、ムラミルペプチド、キノン類似体、小胞体、スクアレン、ヒアルロン酸等が挙げられる。幾つかの態様において、免疫調節蛋白質をGVFとして用いることができる。

20

【0125】

本発明に従って細胞に運搬される核酸分子は、予防及び/又は治療性免疫剤として機能する蛋白質の遺伝的鑄型として用いることができる。好ましい態様において核酸分子は、動物の細胞内でコード領域を転写及び翻訳するために必須の調節配列を包含する。

30

【0126】

本発明は、抗原をコードする異種遺伝子の運搬に組換えベクターを用いる、改良された弱毒生菌ワクチン及び改良されたワクチンに関する。異種抗原の運搬に組換えベクターを用いる弱毒生菌ワクチン及びワクチンの例は、米国特許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；及び5,482,713(それぞれここに参照して説明に代える)に記載がある。遺伝子構造体は、ワクチン内で発現を遂行する機能を有する調節配列に操作可能に連結した、キャプシド蛋白質をコードするヌクレオチド配列を包含するものとして提供される。遺伝子構造体を弱毒生菌ワクチン及び組換えワクチンに組み込んで、本発明によるワクチンを得る。

40

【0127】

本発明のこの形態による薬剤組成物及びワクチン組成物は、約0.1 μ g～約1000 μ gのDNAを包含する。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物及びワクチン組成物は約1 μ g～約500 μ gのDNAを含む。幾つかの好ましい態様において、薬剤組成物及びワクチン組成物は約25 μ g～約250 μ gのDNAを含む。最も好ましくは、薬剤

50

組成物及びワクチン組成物は約 100 μ g の DNA を含む。

【0128】

本発明のこの形態による薬剤組成物及びワクチン組成物は、上記したように、用いられる投与方法に応じて配合することができる。当業者は、WNV 或いはフラビウイルス属又はペスチウイルス属を含む他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片をコードする核酸分子を容易に配合することができる。投与方法として筋肉内投与が選択された場合には、等張性配合が用いられる。一般に、等張性を保持する添加物の例としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール及びラクトースが挙げられる。リン酸緩衝食塩水等の等張溶液を用いてもよい。安定剤としてはゼラチン及びアルブミンが挙げられる。ワクチン組成物において、アジュバント又は免疫促進剤を添加するのが望ましい。

10

【0129】

アポトーシス検定

本発明を別の側面からみれば、次の段階：

まず試験化合物の存在下に細胞を検出可能なレベルのアポトーシスを誘導するのに十分な量の WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド又はその他の蛋白質或いはその機能性断片と接触させ、

次いで該細胞を観察して該試験化合物の存在下にアポトーシスが起こったかどうかを決定すること

を含む WNV Cp 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド又はその他の蛋白質或いはその機能性断片がアポトーシスを受けるように細胞を誘導するのを抑制する化合物を同定する方法に関するものである。WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド又はその他の蛋白質或いはその機能性断片のアポトーシス誘導活性を阻害する化合物は、ウイルスを除去し且つ WNV 感染症及びフラビウイルス又はペスチウイルス感染症を含めたその他のウイルス感染症を治療するための薬剤として有用であり得る。

20

【0130】

本発明のこの側面によれば、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の高増殖性細胞におけるアポトーシス誘導能力を抑制する化合物が同定される。試験化合物の存在下又は非存在下に、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片によるアポトーシス誘導を比較する検定法が提供される。この検定法を使用すると、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片のアポトーシス誘導活性を阻害する化合物が同定できる。このような化合物は、抗 WNV 及びノ又は抗フラビウイルス若しくは抗ペスチウイルス治療薬として有用であり得る。

30

【0131】

本発明の方法は、試験化合物の存在下に、細胞を WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触させる段階を含む。次いで、この細胞を観察して WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片がアポトーシスを誘導するかどうかを決定する。試験化合物の非存在下に細胞を WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触させる対照法が提供され得る。さらに、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の非存在下に試験化合物を細胞と接触させる対照法が提供され得る。試験化合物の存在下に WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触した細胞がアポトーシスを受けていなければ、その時には抗アポトーシス活性がこの試験化合物について示される。これは、試験化合物の非存在下に WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたそ

40

50

の他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片と接触した細胞がアポトーシスを検出可能に受け、しかもWNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の非存在下に試験化合物と接触した細胞がアポトーシスを受けない場合に確認できる。

【0132】

試験化合物は、好ましくは溶液状で与えられる。試験化合物の階段希釈が一連の検定法で利用できる。試験化合物は、 $0.01 \mu\text{M} \sim 1 \text{M}$ の濃度で添加できる。試験化合物の終濃度の好ましい範囲は、 $10 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ である。

【0133】

WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、様々な手段によってこの検定に添加できる。本発明のいくつかの具体例では、このものは蛋白質として細胞と混合される。WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、細胞培地に直接添加できる。WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、上記のような周知技術を使用して広く利用できる出発原料から産生され得る。使用されるWNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片の好ましい濃度範囲は、約 $1 \mu\text{g/ml} \sim 1 \text{mg/ml}$ である。

10

【0134】

本発明のその他の具体例では、WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、検定の細胞内で核酸から発現される。制限されない例では、WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片は、誘導可能プロモーターの調節下に検定の細胞内で核酸から発現され得る。

20

【0135】

細胞のアポトーシスの観察は、ホールマーク細胞の変化又は「アポトーシスマーカー」を検出する方法によって実施される。例えば、アポトーシス期間の初期には、最終的な細胞死に先立って、細胞膜の変化が細胞膜におけるホスファチジルセリン (PS) の外面化を生じさせる。アポトーシス中のPSの一定の露出は、このものを有用な「アポトーシスマーカー」にさせ且つ様々な検出技術のための魅力的な標的にさせる。PSとの高い親和性を有する内因性ヒト蛋白質であるアネキシンVは、アポトーシスを受ける細胞を同定するための都合のよい試薬を与える。蛍光標識したアネキシンVは、アポトーシス細胞を同定するために組織学的研究及び細胞選別の研究のために使用できる。例えば、アネキシンVは、25個の蛍光体を含有する大分子であり且つ現在使用される最も明るい色素の1種であるフィコエリトリン (PE) に結合できる。PEは、商業的に購入でき、或いは周知の単離技術によって藻類から単離できる。結合技術は当業者に周知であり、結合用キットは、ポリザイム社 (サンリアンドロ, CA) を含めて様々な供給メーカーから購入できる。フローサイトメトリー及びその他の用途に使用するために蛍光蛋白質を結合させることについての更なる詳細及びプロトコルに関しては、「ウィアー・ハーゼンバーグ編 Handbook of Experimental Immunology 第4版のフローサイトメトリーに使用するための蛍光蛋白質の精製及びカップリング (ハーディー・R及びハーゼンバーグ著), ブラックウェル・サイエンティフィック出版社, ボストン, 1986」を参照されたい。本発明はこれを参照している。さらに、放射性同位元素標識したアネキシンVも体内で腫瘍内アポトーシス細胞を影像化する放射性薬品のために有用である。

30

40

【0136】

別の「アポトーシスマーカー」は、選択的に活性化されたDNアーゼによる細胞性DNAのヌクレオソーム間での断片化によって生じた遊離3'-ヒドロキシDNA末端によって表される。このような遊離3'-ヒドロキシDNA末端は、正常な細胞のそのままのゲノムDNAには存在しないだけでなく、細胞がネクローシスによって死滅するときにも存在

50

しない。アポトーシスに関連した遊離 3' - ヒドロキシ DNA 末端は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 仲介 dUTP ニック末端標識 (TUNEL) 検定法によってその場で検出できる。アポトーシス中の DNA 切断を検出するための技術の調査のために、「Method Enzymol, 322: 3-15, 2000, カウフマン等」を参照されたい。本明細書はこれを参照している。

【0137】

また、アポトーシスに関連したヌクレオソーム間の断片化は、2種のヌクレオソームエピトープに特異的な一対のモノクローナル抗体を使用して細胞質のヌクレオソームを酵素免疫測定法 (ELISA) 用プレート上で捕捉し且つ検出するサンドイッチ検定法によって検出することもできる。「サルゲーム等, 1997, Nucleic Acid Res., 25: 680-681」を参照されたい。本発明はこれを参照している。この検定法は、組織培養細胞の大規模スクリーニングに特に適している。

10

【0138】

アポトーシス検出検定は、多くの異なるタイプの細胞及び様々な手段によるフラビウイルス属又はペスチウイルス属のキャプシド蛋白質又はその機能性断片の産生を使用して実施できる。当業者であれば、本明細書の教示に従って、本発明のこの側面を実施するためのいくつかの方法を容易に認識できる。本発明の好ましい具体例では、この検定法は、腺癌由来の HeLa 細胞系及び黄紋筋肉腫由来の RD 細胞系のような腫瘍由来の細胞系を使用して、或いはアデノウイルス DNA で形質転換された腎臓細胞系 293 のような形質転換細胞を使用して実施される。

20

【0139】

本発明のさらなる側面は、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片のアポトーシス誘導活性を抑制する化合物を同定する上記の方法を実施するためのキットに関するものである。本発明のこの側面に従うキットは、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスのキャプシド蛋白質又はその機能性断片を含む容器及び次の少なくとも 1 種：説明書、対照物及びデータを表す写真又は図を含む。加えて、キットは、フィコエリトリン (PE) 結合アネキシン V のようなアポトーシスを検出するための試薬を含む第 2 容器を含むことができる。別法では、説明書は、このキットの使用者にアポトーシスマーカーを検出する多数の既知の方法のいずれかを利用するように指示することができる。また、このキットは、使用者に検定を実施させるように細胞を提供することもできる。例えば、小瓶一本の低温保存された腫瘍細胞がこのキットに含まれ得る。

30

【0140】

診断

WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからの蛋白質に対する抗体の存在を検出することによる診断試験法を開発するための大きなニーズが存在する。

【0141】

本発明は、試験試料中の WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド蛋白質の存在及び / 又は量を決定する診断試験法に関するものである。本発明は、WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他ウイルスからのキャプシド蛋白質を認識する抗キャプシド蛋白質抗体を提供する。また、個体からの試験試料中のキャプシド蛋白質の存在は、感染についての優れた標識でもあり得る。

40

【0142】

本発明は、試料中のキャプシド蛋白質の存在を検出することによって WNV 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスに感染した個体を特定する方法に関する。抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。この抗体は、好ましくは、ヒト細胞、CHO 細胞、昆虫細胞又は酵母細胞中で作られるキャプシド蛋白質に対して産生される。個体の試料中に存在するキャプシド蛋白質の量の定量化は、感染した個体の

50

予後を決定する際に使用できる。

【0143】

本発明は、WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド蛋白質に特異的に結合する抗体に関するものである。この抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。この抗体は、好ましくは、ヒト細胞、CHO細胞、昆虫細胞又は酵母細胞中で作られるキャプシド蛋白質に対して産生される。

【0144】

本発明は、WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド蛋白質に特異的に結合する抗体を含む第1容器及びキャプシド蛋白質を含む第2容器を含むWNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスに感染した個体を特定するためのキットに関するものである。このキャプシド蛋白質は、好ましくは、ヒト細胞、CHO細胞、昆虫細胞又は酵母細胞中で産生される。この抗体は、好ましくは、ヒト細胞、CHO細胞、昆虫細胞又は酵母細胞中で作られるキャプシドに対して産生される。このキットは、個体の試料中に存在する抗キャプシド蛋白質抗体の量を定量化するのに適している。このような情報は、感染した個体の予後を決定する際に使用できる。

10

【0145】

WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド蛋白質及び抗キャプシド蛋白質(WNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルス由来の)抗体を検出するためのキットは、調査並びに診断及び予後の目的に有用である。

20

【0146】

試験試料中の蛋白質又は抗体の存在を検出するための手段は日常的なものであり、当業者であれば、周知の方法を使用して蛋白質又は抗体の有無を検出することができる。蛋白質又は抗体の存在を検出する一つの周知の方法は、結合検定である。当業者であれば、結合検定を実施して蛋白質又は抗体の存在を検出するための多数の方法を容易に認識できる。例えば、抗体は、特定の蛋白質を検出又は定量する免疫検定法のために有用である。抗原は、特定の抗体を検出又は定量する免疫検定法のために有用である。ある種の免疫検定法は、試験試料中の蛋白質を固相担体に又は固相に固定された抗体に結合させることを含む。次いで、対象の蛋白質又は複合体を形成していない抗体のいずれかに選択的に結合する検出可能な抗体を添加する。この検出可能な抗体の検出は、この検出可能な抗体が対象の蛋白質に対して特異的であるならばその蛋白質が存在すること示し、或いはこの検出可能な抗体が複合体を形成していない抗体に対して特異的であるならば対象の蛋白質が存在しないことを示す。ある種の免疫検定法は、試験試料中の抗体を固相担体に固定された抗原に結合させ、対象の抗体又は抗原のいずれかに結合する検出可能な抗体を使用して抗原/抗体の複合体を検出することを含む。様々な免疫検定法の手順は、フォラー等著、「Immunoassays for the 80's」,ユニバーシティパーク出版社,ボルチモア(1981)に記載されている。本明細書はこれを参照している。

30

【0147】

固相担体を試験試料と接触させる簡単な結合検定が実行できる。試験試料中に存在するいかなる蛋白質も固相担体に結合し且つ特異的な検出可能な抗体の調製によって検出できる。このような技術は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びその他のそのような類似の検定法の基本的要素である。また、試験試料中の特異的な抗体の存在は、類似の態様で検出することもできる。特定の抗体が結合する標的蛋白質を試験試料と接触させ、次に抗体への結合(該試験試料中に存在するならば)を当業者に周知の様々な方法によって分析する。試験試料中に存在するいかなる抗体も固相担体に結合し且つ検出可能な抗原又は特異的な検出可能な抗体の調製によって検出できる。

40

【0148】

その他の免疫検定法はより複雑であり得るが、実際には優れた結果が得られる。典型的且つ好ましい免疫学的検定法には、固相担体に結合した第1抗蛋白質抗体を試験試料に接触

50

させる蛋白質の検出のための「正」検定が含まれる。好適なインキュベーション期間の後に、固相担体を洗浄して結合していない蛋白質を除去する。次いで、第1抗体によって認識されない特定の蛋白質の一部分に対して特異的である別の第2の抗蛋白質抗体を添加する。この第2抗体は、好ましくは検出可能である。この検出可能な抗体が第1抗体を介して固相担体に結合した特定の蛋白質と複合体を形成するのを可能にする第2インキュベーション期間の後に、この固相担体を2回洗浄して結合していない検出可能な抗体を除去する。別法では、この第2抗体は検出可能でなくてもよい。この場合には、この第2抗体に結合する第3の検出可能な抗体がこの系に添加される。このタイプの「正のサンドイッチ」検定法は、結合が起こったかどうかを決定するための単純な結合/非結合検定であることができ、或いは検出可能な抗体の量と対照で得られた量との比較によって定量することができる。このような「2部位」又は「サンドイッチ」検定は、ワイドによる「Radioimmuno Assay Method」, カークハム編, イーアンドエス・リビングストーン, エジンバラ(1970) pp. 199-206に記載されている。本明細書はこれを参照している。

10

【0149】

また、この「正」検定法は、試験試料中に存在し得る抗体(以後、「試料抗体」と呼ぶ)の検出にも適し得る。試料抗体が結合する特異的な標的蛋白質は、固相担体に結合し且つ試験試料と接触される。好適なインキュベーション期間の後に、この固相担体を洗浄して結合していない試料抗体を除去する。試料抗体のFc部分に結合する第1抗体が添加される。この第1抗体は、好ましくは検出可能である。別法として第1抗体が検出可能でない場合には、第1抗体に結合する第2の検出可能な抗体をその結合を検出するために使用しなければならない。検出可能な抗体が標的蛋白質/固相担体に結合した試料抗体と複合体を形成するのを可能にする第2インキュベーション期間の後に、この固相担体を2回洗浄して結合していない検出可能な抗体を除去する。また、このタイプの「正のサンドイッチ」検定法は、結合が起こったかどうかを決定するための単純な結合/非結合検定であることもでき、或いは検出可能な抗体の量と対照で得られた量とを比較することによって定量することもできる。

20

【0150】

その他のタイプの免疫学的検定法は、いわゆる「同時」及び「逆」検定法である。同時検定法は、固相担体に結合した第1抗体、第2の検出可能な抗体及び試験試料を同時に添加する単一インキュベーション段階を包含する。このインキュベーションが完了した後に、固相担体を洗浄して結合していない蛋白質を除去する。次いで、固相担体に結合した検出可能な抗体の存在を慣用型の「正のサンドイッチ」検定と同様に判定する。また、この同時検定法は、試験試料中の抗体の検出にも類似の態様で応用できる。

30

【0151】

「逆」検定法は、検出可能な抗体溶液の試験試料への段階的な添加、その後のインキュベーション期間及び固相担体に結合した抗体の添加、その後の追加のインキュベーション期間を含む。固相担体を慣用法で洗浄して結合していない蛋白質/抗体複合体及び未反応の検出可能な抗体を除去する。次いで、固相担体に結合した検出可能な抗体の存在を「同時」及び「正」検定と同様に判定する。また、この逆検定法は、試験試料中の抗体の検出にも類似の態様で応用できる。

40

【0152】

この免疫学的検定法の第1成分は、ニトロセルロース又は蛋白質を固定できるその他の固相担体に添加され得る。試験試料中のWNV又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスからのキャプシド蛋白質の存在を判定するための第1成分は抗キャプシド蛋白質抗体であるのに対して、試験試料中の抗キャプシド蛋白質抗体の存在について検査するための第1成分はキャプシド蛋白質である。「固相担体」又は「担体」とは、蛋白質を結合することのできる任意の材料を意図するものである。周知の固相担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及び磁鉄鉱

50

が含まれる。担体の性質は、本発明の目的のためにある程度まで可溶であるか又は不溶であるかのいずれかであることができる。この担体の形状は、ビーズのように球状であり又は試験管の内部表面若しくは棒材の外部表面のように円柱状であることができる。別法として、その表面は、シート、試験用ストリップなどのように平坦であることができる。当業者であれば、蛋白質を結合させるための多くの他の好適な「固相担体」を熟知しており、或いは日常的な実験法を使用することによってこのものを確認することができるであろう。好ましい固相担体は、96ウェルマイクロタイタープレートである。

【0153】

蛋白質（この場合、キャプシド蛋白質又は抗キャプシド蛋白質抗体のいずれか）の存在を検出するために、抗キャプシド蛋白質抗体又は抗ヒト抗体のような検出可能な抗体が使用される。抗体を検出するためのいくつかの方法は周知である。

10

【0154】

抗体を検出する方法一つとして、抗体をある種の酵素に結合させ、次いで酵素免疫測定法（EIA）又は（ELISA）、例えば捕捉ELISAの抗体を使用する方法が挙げられる。この酵素は、その後基質に曝されたときにその基質と反応し、そして、例えば、分光学的、蛍光的又は視覚的な手段によって検出できる化学的部分を生じさせる。抗体を検出可能に標識するのに使用できる酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、
- 5 - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、
- グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、
- ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに制限されない。当業者であれば、使用できるその他の酵素を容易に認識しよう。

20

【0155】

抗体が検出できるその他の方法としては、引き続き放射性免疫測定法（RIA）で使用するために抗体を放射性同位元素に結合させる方法が挙げられる（例えば、ワーク等の「Techniques and Biochemistry in Molecular Biology」, ノースオランダパブリッシング社, ニューヨーク（1978）を参照されたい。本明細書はこれを参照している）。放射性同位元素は、線計数器又はシンチレーション計数管を使用するような手段によって、或いはオートラジオグラフィーによって検出できる。本発明の目的のために特に有用である同位元素は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及び ^{14}C である。 ^{125}I が好ましい同位体である。当業者であれば、使用できるその他の放射性同位元素を認識しよう。

30

【0156】

また、抗体を蛍光性化合物で標識することも可能である。蛍光標識した抗体が適切な波長の光源に曝されるときに、その蛍光のためにその存在が検出できる。最も一般的に使用される蛍光標識用化合物のなかでは、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド及びフルオレサミンである。当業者であれば、使用できるその他の蛍光性化合物を容易に認識しよう。

40

【0157】

また、抗体は、 ^{152}Eu 又はランタニド系列のその他のもののような蛍光発光性金属を使用して検出可能に標識されることもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）又はエチレンジアミン四酢酸のような金属キレート基を使用して蛋白質に特異的な抗体に結合できる。当業者であれば、使用できるその他の蛍光発光性金属並びにその他の金属キレート基を容易に認識しよう。

【0158】

また、抗体は、化学発光化合物に結合させることによって検出可能に標識することもできる。化学発光化合物を標識した抗体の存在は、化学反応の過程に生じる発光の存在を検

50

出することによって決定される。特に有用な化学発光標識用化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチック (t h e r o m a t i c) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及び蓚酸エステルである。当業者であれば、使用できるその他の化学発光化合物を容易に認識しよう。

【 0 1 5 9 】

同様に、生物発光化合物も抗体を標識するのに使用できる。生物発光化合物は、触媒蛋白質が化学発光反応の効率を上昇させる生体系で発見された化学発光体のタイプである。生物発光蛋白質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識する目的のために重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。当業者であれば、使用できるその他の生物発光化合物を容易に認識しよう。

10

【 0 1 6 0 】

蛋白質特異的抗体、断片又は誘導体の検出は、例えば検出可能な標識が放射性的 放射体であるならばシンチレーション計数管によって達成できる。別法として、検出は、例えば標識が蛍光物質であるならば蛍光測定器によって達成できる。酵素標識の場合には、その検出は、その酵素のための基質を使用する比色法によって達成できる。また、検出は、基質の酵素反応の程度を同様に調製した標準物と比較する肉眼的な比較によっても達成できる。当業者であれば、使用できるその他の適切な検出方法を容易に認識しよう。

【 0 1 6 1 】

所定ロットの抗体の結合活性は、周知の方法にしたがって決定できる。当業者であれば、日常的な実験法を使用することによってそれぞれの決定のための有効且つ最適な検定条件を決定することができるであろう。

20

【 0 1 6 2 】

既知量の蛋白質を検定法に加える及び蛋白質を全く加えないそれぞれ陽性及び陰性の対照法が実行できる。当業者であれば、適切な対照法を実施するのに必要な知識を有していよう。試験試料中のキャプシド蛋白質又は抗キャプシド蛋白質抗体の量を決定するために、試験試料中で検出される蛋白質の量は、陽性の対照で検出される蛋白質の量と比較される。この陽性の対照値から標準曲線が描かれ、この標準曲線から試験試料中の蛋白質の量が推定される。当業者であれば、標準曲線を作成し且つ試験試料の値を推定するための知識を有していよう。

【 0 1 6 3 】

試験試料には、血液、大脳の髄液、羊水、リンパ液、精液、膺分泌液又はその他の体液から構成され得る W N V 又はフラビウイルス属若しくはペスチウイルス属を含めたその他のウイルスに感染していることが疑われる個体から得られる試料が含まれる。また、試験試料には、調査の目的のために使用されるもののような研究室で調製された試料も含まれる。存在するならば、細胞は、遠心分離又は溶解のような方法によって除去され得る。当業者であれば、キャプシド蛋白質又は抗キャプシド蛋白質抗体について検査できる試験試料の多様性を容易に認識しよう。試験試料は、針により流体を取り出すような方法によって又は綿棒によって得られ得る。当業者であれば、試験試料を得るその他の方法を容易に認識しよう。

30

【 0 1 6 4 】

「抗体組成物」とは、蛋白質の検出のために必要とされる抗体のことをいうものとする。例えば、試験試料中のキャプシド蛋白質の検出のために使用される抗体組成物は、キャプシド蛋白質に結合する第 1 抗体並びに第 2 又は第 3 の検出可能な抗体 (これらの抗体は、それぞれ第 1 抗体又は第 2 抗体に結合する) を含む。

40

【 0 1 6 5 】

抗キャプシド蛋白質抗体の存在について試験試料を検査するために、標準的な免疫学的検定法が実施できる。10 ~ 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のキャプシド蛋白質が 96 ウェルマイクロタイタープレートのような固相担体に大量の緩衝液で添加される。50 μl が 1 ウェル毎に添加される。固相担体は、結合が起こるのに十分な期間にわたってインキュベートされ、次いでリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) で洗浄されて結合していないキャプシド蛋白質が

50

除去される。適切な条件の例は、室温で2時間又は4 ー晩である。次いで、この固相担体をPBS / BSA溶液でブロックして試験試料中の蛋白質がこの固相担体に非特異的に結合しないようにする。連続希釈の試験試料が固相担体に添加され、次いで結合が起こるのに十分な時間にわたってインキュベートされる。この固相担体をPBSで洗浄して結合していない蛋白質を除去する。ヒト抗体のFc領域を認識する標識抗ヒト抗体がこの固相担体混合物に添加される。このプレートは、結合が起こるのに十分な時間にわたってインキュベートされ、次いでPBSで洗浄されて結合していない標識抗ヒト抗体が除去される。次いで、結合した標識抗ヒト抗体の量が標準的技術によって決定される。使用できる抗ヒト抗体には、製品説明書に従って1 : 12000で使用される西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒト抗体（ベーリンガー・マンハイム社製）が含まれる。

10

【0166】

キャプシド蛋白質の存在について試験試料を検査するために、以下に記載されるような標準的な免疫学的検定法が実施できる。キャプシド蛋白質の特定の部分を認識する第1抗キャプシド蛋白質抗体を96ウェルマイクロタイタープレートに大量の緩衝液で添加する。このプレートを結合が起こるのに十分な時間にわたってインキュベートし、次いでPBSで洗浄して結合していない抗キャプシド蛋白質抗体を除去する。次いで、このプレートをPBS / BSA溶液でブロックして試料蛋白質がマイクロタイタープレートに非特異的に結合しないようにする。次いで、連続希釈の試験試料をウェルに添加し、このプレートを結合が起こるのに十分な時間にわたってインキュベートする。このウェルをPBSで洗浄して結合していない蛋白質を除去する。第1抗キャプシド蛋白質抗体によって認識されない

20

【0167】

試験試料中のキャプシド蛋白質の検出のために有用であるキットは、固相担体、陽性及び陰性の対照物、緩衝液、適切な抗キャプシド蛋白質抗体及び基本的には先述したような捕捉ELISA検定を実施するための説明書を含む。試験試料中の抗キャプシド蛋白質抗体

30

【0168】

治療組成物及び治療方法に関する本明細書中の開示の部分は、主としてヒトを治療する治療学及び方法に関するものであるが、本発明の組成物及び方法は、同様に獣医学に適用できる。ヒトでないもの並びにヒト個体を治療する方法を提供することは本発明の範囲内にある。従って、本発明は、全ての動物、特に、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ及びネコ種を含めたほ乳類種を治療する方法に関するものである。

【0169】

本発明は、本発明を説明することを意図した次の実施例によってさらに例示される。これらの例は、本発明の範囲を限定するように意図されるものでなく、またそのように解釈すべきではない。本発明が特にここで記載されたものとは別の方法で実施できることが明らかになるであろう。本発明の多数の変更及び改変は、ここでの技術からみて可能であるので、これらは本発明の範囲内にある。

40

【0170】

（実施例）

例1：キャプシド蛋白質発現用構築物

2種のWNVのキャプシド蛋白質（Cp）発現ベクター（pWNVh-DJY及びpWNVy-DJY）を、ニューヨーク1999年ヒト単離ウイルス（WNV-HNY1999

50

）についての報告されたそのポリプロテイン遺伝子配列を基にして構築した（GeneBank登録番号AF202541，チャ等，1999、ランセット，354：1971-1972）。WNV-HNY1999のゲノム構成を図1の上部分に示す。ベクターの構築を図1の下部分に概略的に示す。それぞれの構築物は、Cpの最初のアミノ酸についてのコード配列がない（最初のアミノ酸残基（met）が欠失している）Cpのオープンリーディングフレーム（ORF）の5'上流に融合されたヒトIgE（slgE）からのシグナルペプチド（リーダー配列）についてのコード配列を含有する。このクローンを、種最適化コドンを経済的に最終構成物に導入するように設計されたプライマーのセット[キム等，1997，Gene，199：293-301（本明細書はこれを参照している）]を使用する3つの別々のPCR反応による重複PCR法を使用して構築した。pWNVh-DJY構築物は、完全な融合slgEシグナルペプチド/Cpコード配列についてのヒト最適化コドンを含む。pWNVy-DJY構築物は、シグナルペプチドについての酵母最適化コドンとCp蛋白質のアミノ酸残基2～6個についてのコドン及びCpコード配列の残余についてのヒト最適化コドンを含む。さらに、適切なコザック配列を、PCRプライマーの使用によりシグナルペプチドコード配列の上流に導入した。それぞれのコード配列を、Cp-Hisタグ融合蛋白質を発現させるCMVプロモーターの制御下での発現用構築物を生じさせるために、pcDNA3.1/V5-HisC（インビトロゲン社製，カリフォルニア州サンディエゴ）にHindIII及びNotIのポリクロニング部位間でクローン化した。両者の構築物は、WNV Cp蛋白質の2～123個のアミノ酸、次いでV5エピトープを融合したアミノ末端slgEリーダーペプチド及びポリヒスチジンカルボキシ末端テールを有する同一の蛋白質をコードする。

【0171】

重複PCR構築は、次の10個のプライマーを使用した。

プライマー1．slgh-VChU1+（90mer）

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGCCA
CCCGCGTGCACAGCTCTAAGAAACCAAGGAGGCCCGGCAAG
GAGCCGCGGCC（配列番号14）

プライマー2．slgy-VCyU1．1+（90mer）

ATGGATTGGACTTGGATCTTATTTTATAGTTTGCTGCTGCTA
CTAGAGTTTCATTCTCTAATAAACCAGGTGGCCCGGCAAG
GAGCCGCGGCC（配列番号15）

プライマー3．slgh-VChL1-（88mer）

GGCTCAGCATGGCGCGCTTCAAGGCCAATCAGGCTCAGCAC
GCGGGGCGATGCCGCGCTTCAAGCATGTTCACGGCGCGGCTC
TTGCCCGGG（配列番号16）

プライマー4．slgh-VChU2+（90mer）

GGCCTGAAGCGCGCCATGCTGAGCCTGATCGAGGCCAAGG
GCCCCATACGCTTCGTGCTGGCCCTGCTGGCCCTTCTTCCG
CTTCAACCGCC（配列番号17）

プライマー5．slgh-VChL2-（89mer）

GGTGTCTTCATGGCGGGTCTGCTTGTTCACGCCGCGCCAGCG
GTCCAGCACGGCGCGGGTGGGGGCAATGGCGGGTGAAGCGG
AAGAAAGGCC（配列番号18）

プライマー6．slgh-VChU3+（89mer）

CCGCCATGAAGCACCTGCTGAGCTTCAAGAAAGGAGCTGGG
CACCCCTGACCAAGCGCCATCAACCAGCCAGGAGCAAGCAG
AAGAAAGGCC（配列番号19）

プライマー7．slgh-VChL3-（81mer）

CGCGCCCAAGCTGGCGATCAGGCCAATCATCACGGGCAATG
CCGGTCTTGCAGCGCGCTTCTTCTGCTTGTGCTGCGGC

10

20

30

40

50

G (配列番号 20)

プライマー 8 . s I g h - V C h F S 1 + (3 9 m e r)

C C C A A G C T T G C C G C C A C C A T G G A C T G G A C C T G G A T C C T G (配列番号 21)

プライマー 9 . s I g y - V C y F S 1 . 1 + (3 3 m e r)

C C C A A G C T T G C C G C C A C C A T G G A T T G G A C T T G G (配列番号 22)

プライマー 10 . s I g h - V C h F A S 2 - (3 7 m e r)

A T A G T T T A G C G G C C G C G C C C A C G C T G G C G A T C A G G C C (配列番号 23)。

10

【0172】

3セットのプライマーをPCR反応のために一組にして次の3種の重複PCR生成物を生じさせた。プライマー1と3 (pWNVh - DJYのための)又はプライマー2と3 (pWNVy - DJYのための)、プライマー4と5及びプライマー6と7である。それぞれのセットのプライマーを自己アニールさせ且つpfuDNAポリメラーゼによって伸長させた (Stratagene, La Jolla, CA)。最後に、全長の挿入物を1セットのプライマーのプライマー8と10 (pWNVh - DJYのための挿入物を生じさせる)又はプライマー9と10 (pWNVy - DJYのために挿入物を生じさせる)で増幅し、次いでHindIII (5'末端)及びNotI (3'末端)のエンドヌクレアーゼ制限部位で末端を切断した。これらの最終挿入生成物は、HindIII及びNotIで制限されており、HindIII/NotI消化したpcDNA3.1/V5-HisCにクローン化した。得られた組換えベクター (pWNVh - DJY及びpWNVy - DJY)をシーケンス法によって確認した。図2及び5は、それぞれpWNVh - DJY及びpWNVy - DJYの制限エンドヌクレアーゼ地図を示している。図3及び6は、それぞれpWNVh - DJY及びpWNVy - DJYの特徴地図を示している。図4及び7は、それぞれpWNVh - DJY及びpWNVy - DJYについての全ヌクレオチド配列を注釈付きで示している。

20

【0173】

例2 . pWNVy - DJY及びpWNVh - DJYから発現されたWNVキャプシド蛋白質の生物学的特徴。

30

組織培養細胞中でのpWNVy - DJY及びpWNVh - DJYからのCp蛋白質の発現
2チャンバースライド上に接種したHeLa、RD又は293細胞をCaPO₄共沈法によって2µgの精製プラスミドDNA (pWNVy - DJY又はpWNVh - DJYのいずれか)でトランスフェクトした。トランスフェクションの後に、この細胞を固定し、マウス抗His mAbと共にインキュベートし、次いでFITC結合ヤギ抗マウスIgG抗体と共にインキュベートした。その遺伝子発現をUVランプ顕微鏡で検査した。Cp蛋白質の発現は、構築pWNVy - DJY及びpWNVh - DJYの両者から3種の細胞系の全てで達成され、その蛋白質は、細胞質に局在していた。pWNVh - DJYでトランスフェクトされたRD細胞におけるCp蛋白質発現の免疫蛍光分析は、FITCフィルターを使用して局在Cp蛋白質を表す緑色のシグナルを明らかにした。また、この画像を、特定のシグナルと背景のシグナルとを区別するためにFITCの二重フィルター及びローダミンで捕捉した。二重フィルター下での緑色蛍光は、Cp蛋白質の存在を立証した。細胞の核酸を明らかにするためにDAPIフィルターを使用し [核酸は、DAPI (4', 6 - ジアミジン - 2' - フェニルインドール二塩化水素化物)で染色した]、細胞形態は、その画像を光照射野内でDAPIフィルターによって捕捉したときに明らかになった。

40

【0174】

WNVキャプシド蛋白質の試験管内での翻訳

³⁵S 標識した蛋白質生成物を、TNT-T7を一緒にした転写/翻訳システム (プロメガ社, マジソン, WI)を使用して調製した。10µlの放射性同位元素標識した蛋白質試料及び1µlの抗His (C末端) (インビトロゲン社, サンディエゴ, CA)抗体を

50

300 μ l の R I P A 緩衝液に添加し、穏やかに混合した。4 で 90 分間インキュベートした後、プロテイン A セファロースビーズ (L K B - フアルマシアバイオテック社) を蛋白質と抗体の複合体に 1 本の試験管当たり 5 μ g の終濃度で添加し、この試料を回転振とう器中で 4 で 90 分間インキュベートした。このビーズを R I P A 緩衝液で 3 回洗浄し、2 \times S D S 試料緩衝液に懸濁した。免疫沈降した蛋白質複合体をセファロースビーズから短時間の煮沸によって溶離させ、S D S - P A G E (15 %) ゲルで分離した。この蛋白質試料の移動度を商業的に入手可能な^{1 4} C メチル化分子量マーカー (シグマ社) の移動度と比較した。このゲルを固定し、1 M のサリチル酸ナトリウム溶液で簡単に処理し、ゲル乾燥機 (バイオラド社) 中で乾燥させた。乾燥したゲルを X 線フィルム (コダック社) に一晚暴露した。この試験管内で翻訳された蛋白質は、21.5 k D a の見掛けの分子寸法を有していた。

【 0 1 7 5 】

例 3 . p W N V y - D J Y 及び p W N V h - D J Y から発現された W N V キャプシド蛋白質に対する免疫応答の評価。

ペプチド

W N V C p アミノ酸配列の 3 種の主要組織適合性 (M H C) クラス I I 制限エピートープを M a c ベクターソフトフェア (オックスフォードモレキュラーグループ, M A) を使用して選択した (このものは、抗原決定基及び親水性領域を予測することができる) 。このペプチドを標準的なペプチド合成によって合成した。次に示す。

ペプチド名	WNVCp タンパク質 残基	アミノ酸配列	配列番号
WNVC-P1	2~23	SKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPR	配列番号6
WNVC-P2	31~49	KRAMLSLIDGKGPIRFVLA	配列番号7
WNVC-P3	90~111	TLTSAINRRSSKQKKRGGKGTGI	配列番号8

図 8 は、W N V C p 蛋白質の全長に従って並んだこれらのペプチドを示している。

【 0 1 7 6 】

試験管内で翻訳された蛋白質

また、放射性活性のない試験管内で翻訳される C p 蛋白質を、上の例 2 に記載したように、T N T - T 7 を一緒にした転写 / 翻訳システム (プロメガ社, マジソン, W I) を使用して非放射性成分により生成した。試験管内翻訳の対照物を、試験管内翻訳キットを使用して発現できる挿入物を欠失させた p c D N A 3 . 1 ベクター (インビトロゲン社, サンディエゴ, C A) により生成した。

【 0 1 7 7 】

マウスの D N A 接種

W N V C p 遺伝子産物に対する T 細胞仲介免疫応答を評価するために、生体内でのマウスの実験を組み立てた。6 ~ 8 週間の雌の B A L B / c マウス (ハーレン・スピローグ・ドーリー社, インディアナポリス, I N) の大腿四頭筋に 100 μ g の p W N V h - D J Y、p W N V y - D J Y 又は p c D N A 3 . 1 (挿入物なし) の P B S 及び 0 . 25 % ブピバカイン・H C l (シグマ社, セントルイス, M O) 溶液を注射した。2 週間後、このマウスは、さらに 100 μ g の D N A 注射の増量を受けた。この増量注射の 30 日後に、このマウスを犠牲にし、その脾臓を採取し、そしてそのリンパ球を単離し、細胞の免疫応答について試験した。

【 0 1 7 8 】

リンパ増殖性検定

採取された脾臓リンパ球を、それぞれの免疫化された群につき 2 匹のマウスについて貯留し、5 \times 10⁶ 細胞 / m l の濃度に懸濁した。5 \times 10⁵ の細胞を含有する 100 μ l のアリコートに 96 ウェル平底マイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに直ちに添加

した。再構成ペプチド、試験管内翻訳蛋白質又は試験管内翻訳対照物を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (並びに試験管内翻訳蛋白質及び試験管内翻訳対照蛋白質について $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) の濃度でウェルに添加した。コンカナバリン A (Con A) を陽性の増殖性対照物として使用した。この検定条件を 3 通りで組み立てた。この細胞を 5 % の CO_2 中 35 で 3 日間培養した。 $1 \mu\text{Ci}$ のトリチウムチミジンをそれぞれのウェルに添加し、その細胞を 37 で 18 時間培養した。プレートを採取し、取り込まれたトリチウムチミジンの量をベータプレート読みとり装置 (ウォレス社, トウルク, フィンランド) で測定した。刺激指数を次式から決定した。

刺激指数 (SI) = (実験的計数 / 自発的計数)。

自発的計数のウェルには、無関係の蛋白質の対照として与えた 5 % のウシ胎仔血清が含まれた。結果を表 2 に示す。 10

【0179】

pWNVy-DJY 又は pWNVh-DJY (「H」又は「Y」) のいずれかで免疫化されたマウスから単離され且つ WNVc-P3 (「ペプチド 3」) 又は全 3 種の Cp ペプチド (「ペプチド 123」) の混合物と共に培養された脾臓細胞は、基礎ベクター pcDNA3.1 で免疫化された群中のマウスから単離された脾臓細胞よりも有意に高い SI 値をもたらした。

【表 1】

表 2

抗原又は 刺激物	脾臓細胞源	蛋白質又はペプチドの濃度		
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
ペプチド 1	H	0.5	0.7	
	Y	0.8	1.2	
	pcDNA3.1	0.9	1.3	
ペプチド 2	H	1.7	1.3	
	Y	1.6	1.8	
	pcDNA3.1	0.9	1.0	
ペプチド 3	H	1.5	2.0	
	Y	1.1	1.4	
	pcDNA3.1	0.8	0.7	
ペプチド 123	H	2.6	3.9	
	Y	1.8	2.1	
	pcDNA3.1	0.7	1.2	
Y 蛋白質	H	0.0	0.8	1.7
	Y	0.0	0.6	1.7
	pcDNA3.1	0.0	1.2	1.2
対照蛋白質	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		

20

30

40

50

表2は、リンパ球増殖性検定の結果を示している。それぞれの条件について示された値は、3組のウェルについて平均された刺激指数である。試験されたそれぞれの免疫化の群について、脾臓細胞をこの群内の2匹のマウスから貯留した。「H」は、pWNVh-DJYで免疫化した群からの脾臓細胞を示す。「Y」は、pWNVy-DJYで免疫化されたマウスの群からの脾臓細胞を示す。「pcDNA3.1」は、pcDNA3.1で免疫化されたマウスの対照群からの脾臓細胞を示す。ペプチド1、2及び3は、上記のWNV C-P1、WNV C-P2及びWNV C-P3ペプチドである。「ペプチド123」は、ペプチド1、2及び3の混合物を示す。「Y蛋白質」は、pWNVy-DJY構築物から試験管内で翻訳されたCp蛋白質を示す。「対照タンパク」は、上述したように、発現できる挿入物を全く含有しないpcDNA3.1ベクターにより生じた試験管内翻訳対照物を示している。

10

【0180】

フローサイトメトリーによる細胞内IFN- γ の検出

5%のウシ胎仔血清(FBS)(R5媒体)が追加され、50U/mlの組換えヒトインターロイキン2(rHuIL-2)(インタージェン社, パーチェス, NY)を含有する100 μ lのRPMI-1640、10 μ g/mlのブレフェルジンA(BDファーマーミンジェン社, サンディエゴ, CA)、100ng/mlのホルボール12ミリステート13-アセテート(PMA)(シグマ社, セントルイス, MO)及び1 μ g/mlのイノマイシン(シグマ社)を丸底96ウェルプレートのそれぞれのウェルに添加した。4 μ g/mlでの試験管内翻訳Cp蛋白質又は試験管内翻訳対照蛋白質を50 μ lのR5媒体中で添加した。蛋白質抗原(Ag)を添加した後に、単離した脾臓細胞をそれぞれのウェルに1 $\times 10^6$ 細胞で50 μ lのR5媒体中で添加した。フローサイトメトリーの補正のために、実験を受けていないマウスからの脾臓細胞をIL-2及びブレフェルジンAのみでインキュベートした。このプレートを37 $^{\circ}$ Cの5%CO $_2$ インキュベーター中で5~6時間インキュベートした。また、対照として、脾臓細胞を抗原なしでインキュベートした。インキュベーション後に、プレートを1200rpmで5分間回転させ、上澄み液を捨てた。それぞれのウェル中の細胞を1%のウシ血清アルブミン(BSA)が追加された200 μ lのPBSで再懸濁し、氷上に15分間置き、1200rpmで回転させ、そして0.1 μ gのPE結合抗CD-4m抗体及び0.1 μ gのCyC結合抗CD44m抗体(両者はBDファーマーミンジェン社(サンディエゴ, CA)製である。)を含有する50 μ lのPBS/1%BSAで再懸濁した。30分間4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、細胞をPBS/1%BSAで2回洗浄し、この細胞ペレットを100 μ lのCytofix/Cytoperm溶液(BDファーマーミンジェン社, サンディエゴ, CA)に再懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした。細胞を1 \times Perm/Wash(BDファーマーミンジェン社, サンディエゴ, CA)で2回洗浄し、アロフィコシアニン(APC)結合抗IFN- γ 抗体(BDファーマーミンジェン社, サンディエゴ, CA)を0.1 μ g/試料の濃度で含有する50 μ lのPerm/Wash溶液に再懸濁した。4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした後、細胞を1 \times Perm/Wash溶液で2回洗浄し、2%のp-ホルムアルデヒドで固定し、そしてフローサイトメトリーによって分析されるまで4 $^{\circ}$ Cで保管した。

20

30

【0181】

CD44の発現を活性化マーカーとして使用する。CD44は、造血及び非造血細胞で広く発現する細胞接着受容体である。BALB/cマウスは、CD44 $^{+}$ T細胞の比較的大きな部分集合を有する。末梢では、CD44発現のレベルは、B細胞、CD4 $^{+}$ T細胞、CD8 $^{+}$ T細胞及び記憶細胞の活性化により増加し、これは、それらのCD44hi表現型(高レベルのCD44Hアイソフォームを発現する)によって同定できる。

40

【0182】

CD4 $^{+}$ T細胞依存性細胞内IFN- γ 産生をフローサイトメトリーによって定量した。その結果は、図10に示すように、基礎ベクターpcDNA3.1又はCp蛋白質発現用構築物のpWNVh-DJY若しくはpWNVy-DJYによって免疫化されたマウスからの脾臓細胞について抗原に特異的なIFN- γ の応答を示す。pWNVy-DJY免疫

50

化マウスから単離された脾臓細胞は、試験管内で翻訳されたCp蛋白質による刺激に基づいて、pWNVh-DJY免疫化マウスから単離された脾臓細胞よりも高レベルのIFN- γ を発現した。

【0183】

例4：TUNEL検定によるアポトーシスの検査

個々の細胞のアポトーシスをTUNEL検定によって3種の異なる細胞系：HeLa細胞、RD細胞及び293細胞で決定した。細胞をpWNVh-DJY又はpWNVy-DJY構築物のいずれかでトランスフェクトし、TUNEL検定によってアポトーシスについて検査した。両構築物は、3種の細胞系の全てでアポトーシスを誘導した。

【0184】

TUNEL検定を「フルオレセイン In situ 細胞死検出キット」(ロシュモレキュラーバイオケミカルズ社、インディアナポリス、IN)を製品プロトコルに従って使用して実施した。DNAの切断を、ゲノムDNAの遊離3'末端をフルオレセイン-dUTPで標識するターミナルトランスフェラーゼ(TdT)によって検出した。簡単に言うと、細胞を固定し且つ0.1%のTriton-X、0.1%のクエン酸ナトリウムが追加されたPBSで浸透化させ、次いでこの細胞を、TdT及びフルオレセイン-dUTPを含有する「TUNEL反応混合液」でインキュベートした。フルオレセインを結合し、取り込まれたdUTPを蛍光顕微鏡で検出した。

【0185】

pWNVh-DJY又はpWNVy-DJY構築物のいずれかでトランスフェクトされたHeLa細胞、RD細胞及び293細胞の分析のためのデータは、特異的なシグナルを特定するために顕微鏡において異なるフィルターで捕捉した。FITCフィルターによって明らかにされるような緑色のシグナルは、アポトーシス細胞に取り込まれたフルオレセインを表していた。また、この細胞の画像は、特定のアポトーシスシグナルと背景のシグナルとを分けるためにFITCの二重フィルター及びローダミンで捕捉した。二重フィルター下の緑色蛍光は、取り込まれたフルオレセイン-dUTPからの正しい蛍光シグナルを示していた。DAPIフィルターを使用して細胞の核酸(このものはDAPIで染色した)を明らかにした。全ての細胞がTUNEL陽性であったわけではなかった。細胞形態は、その画像が照射野内でDAPIフィルターで捕捉されたときに明らかになった。

【0186】

類似の結果がヒト神経芽細胞腫細胞系(ATCC#CRL-2266)内のpWNVy-DJY構築物によって得られた。

【0187】

例5：アネキシンVフローサイトメトリー分析

HeLa細胞を、強化緑色蛍光蛋白質(EGFP)発現ベクターpEGFP2-N1(クローンテック社)単独で(トランスフェクションのマーカーとして)又はpWNVh-DJY若しくはpWNVy-DJYのいずれかを組み合わせたpEGFP2-N1でトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、この細胞をフィコエリトリン(PE)結合アネキシンVで染色した。染色細胞をフローサイトメトリーによって分析した。アネキシンV陽性細胞の母集団をEGFP陽性の事象のゲートから計数し、そのデータをCellQuestソフトウェアを使用して取得した。対照細胞と比較して10倍までのアポトーシスの誘導がWNV-Cpによる処理によって観察された(図13)。

【0188】

例6：WNV-Cp蛋白質のアポトーシス誘導ドメインの分析

上記の例3及び図11に記載されるように、ペプチドWNV-C-P3を、培養細胞のアポトーシスを誘導するその能力について試験した。ペプチドWNV-C-P3をSH-SY5Y神経芽細胞腫細胞(ATCC, マナッサス, VA)と共に 1×10^5 細胞当たり10 μ gのペプチド濃度でインキュベートした。24時間後に、TUNEL分析を実施した。TUNEL陽性細胞がWNV-C-P3ペプチドで処理した細胞について同定されたが、前立腺特異的抗原(PSA)からの対照ペプチドで処理した細胞については同定されなかった

10

20

30

40

50

。

【0189】

例7：pCWNVCpによる免疫化は抗原特異的体液性免疫応答を誘導する。

DNAワクチンによって生じた生体内での免疫応答のレベルを調査するために、マウスをpCWNVCp又はpCDNA3対照プラスミドで筋肉注射により免疫化させた。6～8週間の雌のBALB/cマウス（ハラン・スピログ・ドーリー社，インディアナポリス，IN）の大腿四頭筋にリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）及び0.25%のブピバカイン-HCl（シグマ社，セントルイス，MO）中に処方された対象となる100μgの各DNA構築物を0、4及び8週間時に注射した。注射前及び注射後の様々な時点で、このマウスを眼窩後で出血させ、その血清を後の分析のために集めた。集めた血清試料をELISAにより1：100、1：400、1：800及び1：1600の希釈でCpペプチド（WNVC-P3：TLTSAINRRSSSKQKKRGKGKTGI）に対する特異的な抗体の応答について分析した。PBSで10μg/mlの濃度に希釈した50μlのWNVC-P3を、キム等の「CD8陽性T細胞はケモカインの発現を介して抗原特異的免疫応答を制御する」，J. Clin. Invest.，102：1112-1124（本明細書はこれを参照している）に前もって記載されたように、マイクロタイターのウェル上に一晚4で吸着させた。このプレートをPBS-0.05%Tween-20で洗浄し、0.05%のTween-20を含む3%のBSAのPBS溶液で35で1時間にわたってブロックした。マウス抗血清を0.05%のTween-20で希釈し、37で1時間インキュベートし、次いでHRP結合ヤギ抗マウスIgG（シグマ社，セントルイス，MO）と共にインキュベートした。このプレートを洗浄し、3'3'5'5'TMB（シグマ社）緩衝液で展開した。

10

20

【0190】

注射前の血清（0日目に集めた）は、いかなるCp特異的抗体応答も示さなかった（データは示さない）。pCDNA3対照物で免疫化されたマウスはいかなるCp特異的抗体応答も示さなかったが、pCWNVCpで免疫化されたマウスでは強力なCp特異的抗体応答が検出された。特に、DNA免疫化によって生じたCp特異的抗体応答のレベルは、ATCC（マナッサス，VA）から得られた陽性の高度免疫マウス血清のそのレベルよりも強力であった。

【0191】

さらに、DNAワクチンによって誘導されたWNVCp特異的IgGのサブクラスを決定した。IgG1のイソタイプの産生はTh2型サイトカインによって誘導されるが、IgG2aイソタイプはTh1型サイトカインによって調節されることが報告された（フィンケルマン等，1990，「生体内での免疫グロブリンイソタイプ選択のリンホカインの制御」，Ann. Rev. Immunol.，8：303-333、本明細書はこれを参照している）。Cp特異的IgGサブクラスの相対的レベルの決定のために、HRPを結合した抗ネズミIgG1及びIgG2a（Zymed社，サンフランシスコ，CA）を抗ネズミIgG-HRPの代わりに使用した。その後、これにABTA基質溶液（ケミコン社，テメキュウラ，CA）を添加した。それぞれの段階において、プレートを洗浄用緩衝液（PBS+0.05%Tween-20）で3回洗浄した。このプレートをダイナテックMR5000プレート読み取り器で450nmでの光学密度でもって読みとった。図12Bに示すように、DNA免疫化から生じたpCWNVCpによるIgG応答の大部分は、IgG2aイソタイプのものであった。この強いTh1型の偏りは、IgG2aの大きさ及びIgG2a対IgG1（Th1対Th2）の相対比の両方によって証明された。

30

40

【0192】

WNVCp特異的血清抗体を免疫沈降/ウェスタンブロット分析によって決定した。放射性同位元素なしに試験管内で翻訳されたWNVCp蛋白質を抗6XHis（C末端）ポリクローナル抗体（NBL社，名古屋，日本）で免疫沈降させ、15%のSDS-PAGEゲルで分離し、PDVF膜（ミリポア社）に移行させ、このものを帯状に切った。それぞれの帯状物をpCWNVCp又はpCDNA3で免疫化したマウス（1：100希釈で）

50

からのマウス免疫血清と共にインキュベートし、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 結合抗マウス I g G と 1 : 2 0 0 0 の濃度でハイブリッド形成させた。すすぎ後に、この帯状物を E C L 化学発光検出キット (アマーシャム社) で現像した (図 1 2 C)。

【 0 1 9 3 】

例 8 : p C W N V C p による免疫化は強力な抗原特異的 T h 1 型細胞性免疫応答を誘導する。

T 細胞によって放出されたサイトカインのレベルは、免疫応答の動向及び大きさを反映する。刺激された T 細胞によって産生された T h 1 (I F N - と I L - 2) 及び T h 2 (I L - 4) 型サイトカインを検査した。原型的な T h 1 型サイトカインである I F N - は、C D 4 ⁺ T h 1 細胞及び C D 8 ⁺ T 細胞によって主に産生される。刺激された T 細胞によって発現される I F N - のレベルは、T 細胞応答の大きさを反映する。I L - 2 は、外部刺激によって活性化された T 細胞により主に産生される。このことは、抗原特異的 T 細胞の増殖及びクローン性増殖にとって重要である (モーガン等, 1976, 「通常のヒト骨髄からの T リンパ球の選択的な試験管内での培養」, S c i e n c e , 193: 1007 - 1008、本発明はこれを参照している)。一方、I L - 4 は、B 細胞仲介免疫応答において主要な役割を果たす原型的な T h 2 型サイトカインである (シーダー及びボール, 1994, 「C D 4 + T 細胞によるリンホカイン産生表現型の獲得」, A n n u . R e v . I m m u n o l . , 12: 635 - 673、本明細書はこれを参照している)。

10

【 0 1 9 4 】

また、免疫化後の C D 4 ⁺ ヘルパー T 細胞仲介免疫応答のレベルも検査した。マウスは、2 週に区切られた 2 種の D N A 免疫化 (それぞれ 100 μ g) を受けた。2 回目の注射後 1 週間で、このマウスを安楽死させ、脾臓を採取した。リンパ球を脾臓から採取し、赤血球を除去し且つキム等, 1997, 「補助的刺激分子の共放出を介した D N A 免疫化に対する生体内免疫応答の工学技術」, N a t . B i o t e c h n o l . , 15: 641 - 646 (本明細書はこれを参照している) に記載されたような新鮮な媒体で数回洗浄することによってエフェクター細胞として調製した。単離細胞懸濁液を 5 \times 10⁶ 細胞 / m l の濃度に再懸濁した。5 \times 10⁵ 細胞を含有する 100 μ l のアリコートに 96 ウェルマイクロタイター平底プレートのそれぞれのウェルに直ちに添加した。5 μ g / m l の終濃度での W N V キャプシド特異的ペプチドプール (W N V C - P 1 : S K K P G G P G K S R A V N M L K R G M P R、W N V C - P 2 : K R A M L S L I D G K G P I R F V L A、W N V C - P 3 : T L T S A I N R R S S K Q K K R G G K T G I) を 3 通りでウェルに添加した。この細胞を 5 % C O₂ 中で 37 で 4 日間インキュベートした。これらのウェルから上澄み液を 4 日目に集め、E L I S A キット (バイオソース社, カマリ口, C A、R アンド D システムズ社, ミネアポリス, M N) を使用してサイトカイン E L I S A 法によって I F N - 、I L - 2 又は I L - 4 の放出について試験した。

20

30

【 0 1 9 5 】

図 1 3 に示すように、p C W N V C p 免疫化マウスから I F N - 及び I L - 2 の有意な発現レベルが観察されたが、対照の免疫化マウスからは背景レベルのみが観察された。一方、全ての免疫化された群から放出された I L - 4 のレベルは類似していた。これらの結果は、D N A ワクチン接種が免疫化マウスにおいて特異的且つ強力な T h - 1 型細胞性免疫応答の誘導を生じさせたことを示している。

40

【 0 1 9 6 】

例 9 : p C W N V C p による免疫化はケモカイン M I P - 1 及び R A N T E S の抗原特異的な産生を誘導する。

ワクチンで誘導された細胞性免疫応答の特徴付けは、刺激された T 細胞からの - ケモカイン (M I P - 1 及び R A N T E S) の発現プロファイルを検査することによって拡大された。ケモカインは、免疫及び炎症応答の重要なモジュレーターである。これらのものは、白血球を血管から宿主防衛の周辺部位に輸送する分子調節に特に重要である。T 細胞産生ケモカインは、細胞の免疫の拡大に重要な役割を果たすことが報告された (キム等, 1998, J . C l i n . I n v e s t . , 「s u p r a」、キム等, 2000, 「顆粒球

50

コロニー刺激因子 (M-CSF) は、生体内で免疫応答を調節し且つ樹状細胞を引き寄せ得る」, Human Gene Therapy, 11:305-321、本明細書はこれらを参照している)。従って、刺激されたT細胞によって産生されたケモカインのレベルは、抗原に特異的な細胞性免疫応答のレベル及び資質についてさらなる見識を与える。例8に記載されたように、刺激されたT細胞からの上澄み液をELISAキット(バイオソース社, カマリロ, CA、RアンドDシステムズ社, ミネアポリス, MN)を使用して - ケモカインMIP-1 及びRANTESの放出について試験した。pCWNVCpワクチンによる免疫化は、対照ベクターの免疫化よりも大きいレベルのMIP-1 及びRANTESの発現を有意に誘導した(図14)。pCWNVCp免疫化動物からのMIP-1 及びRANTESのこれらの増加レベルは、pCWNVCp免疫化が上に観察された抗原特異的T細胞応答を誘発したという結論をさらに支持するものである。

10

例10: pCWNVCpによる免疫化は抗原特異的CTL応答を誘導する。

また、免疫化後の抗原特異的障害性Tリンパ球(CTL)応答のレベルも検査した。5時間の ^{51}Cr 放出の大量CTL検定を、先に記載したように(キム等, 1997, Nat. Biotechnol., 「supra」)、エフェクター脾臓細胞を試験管内で刺激し、その後特異的及び非特異的なペプチド処理標的からのクロム放出を測定することによって実施した。エフェクター脾臓細胞を 5×10^6 細胞/mlでのCTL培地中でWNVCyapシドペプチド(KGP I R F V L (配列番号24)、GGPGK S R A (配列番号25)及びI A P T R A V L (配列番号26))のプールで $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で5日間にわたって試験管内で刺激した。CTL培地は、RPMI 1640 (ジブコ-BRL社, グランドアイランド, NY)、10%のウシ胎仔血清(ジブコ-BRL)及びConAなしの10% R A T - T - S T I M (ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社, ベッドフォード, MA)からなる。ペプチド処理標的物をP815マウスの肥満細胞腫を $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度のペプチドプールと共にインキュベートすることによって調製した。この標的細胞を $100 \mu\text{Ci/ml}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で120分にわたって標識し、刺激されたエフェクター脾臓細胞と共に37で6時間インキュベートした。CTLの溶解を100:1及び50:1のエフェクター:標的物(E:T)比で決定した。特定の溶解の%を次式:

20

$100 \times (\text{実験に基づく放出} - \text{自発的な放出}) / (\text{最大の放出} - \text{自発的な放出})$

から決定した。最大の放出を1%のTriton X-100を含有する培地中で標的細胞を溶解させることによって決定した。「自発的な放出」数についての値が「最大の放出」の20%を超過したならば検定が有効であるとはみなさなかった。pCDNA3で免疫化された対照動物から背景レベルの特異的な致死が観察された。しかしながら、pCWNVCpで免疫化された動物は、100:1及び50:1のエフェクター対標的物(E:T)の比で正のCTL活性を示した(図15A)。さらに、CTL検定のための試験管内で刺激されたエフェクター細胞からの上澄み液の分析は、免疫化マウスからの増加レベルのIFN- γ 産生を示した(図15B)。

30

例11: pCWNVCpによる免疫化はリンパ球の免疫化動物の筋肉への浸潤を誘導する。

HI V及びHS VのDNA免疫化モデルにおけるワクチン誘導細胞仲介免疫応答の大きさは、ワクチン注射の部位での細胞浸潤のレベルとよく相関することが分かった[キム等, 2000, Human Gene Therapy, 「supra」、カッターグリーン等, 2000, 「人工的に作り出されたFas仲介アポトーシスによる樹状細胞を含めた抗原提示細胞への標的抗原の送達」, Nat. Biotechnol., 18:974-979 (本明細書はこれを参照している)、アガジャニアン等, 1999, 「CD86(B7-2)は生体内でMHC制限抗原特異的細胞障害性Tリンパ球応答を促進させるように機能し得る」, J. Immunol., 162:3417-3427 (本明細書はこれを参照している)]。pCWNVCp免疫化によって誘導された免疫活性化の力価をさらに調査するために、免疫化マウスの筋肉組織を注射部位で免疫組織化学的に検査した。

40

【0197】

50

6～8週間の雌のB a l b / cマウス(チャールズリバーラボラトリーズ社, ウィルミントン, MA)にリン酸緩衝化生理食塩水(P B S)及び0.25%のブピバカイン-H C l(シグマ社, セントルイス, MO)中の100 µgのp C W N V C p又はp c D N A 3を筋肉注射した。トランスフェクションの48時間後に、頸骨筋を採取した。次いで、この新鮮な筋肉組織をO. C. T化合物(サクラファインテックU S A社, トランス, CA)中で冷凍した。4ミクロンの冷凍薄片をライカ1800定温維持装置(ライカ社, ディアフィールド, IL)を使用して作製した。筋肉中のリンパ球の存在を検出するために、スライドをヘマトキシリン及びエオシン(H及びE)染色液(ベクターラボ社)で染色した。このスライドをニコンO P T I P H O T蛍光顕微鏡(株式会社ニコン, 東京, 日本)で40倍の対物レンズ(ニコンF l u o 4 0 × P h 3 D 2)を使用して観察した。ニコンU F X - I Iによる露出調節のニコンカメラF X 3 5 D X及びコダックE k t a c h r o m e 1 6 0 Tスライドフィルムを使用してスライド写真を得た。p C W N V C pにより免疫化されたマウスの筋肉への免疫細胞の劇的な浸潤を図16Bに示している。

10

【0198】

この浸潤細胞をF A C S分析によって特徴付けた。この浸潤細胞を、「キム等, 2000, Human Gene Therapy, Supra」で先述されるように、全脚部筋肉を切開し且つ機械的力でミンチにすることによって筋肉から採取した。この細胞をガラスウール栓付き漏斗によって濾過することにより回収した。この浸潤細胞を、「キム等, 2000, Human Gene Therapy, supra」及び「カッターグリーン等, 1990, J. Immunol., 160: 5707-5718(本明細書はこれを参照している)」で先述されるように、C D 4、C D 8、M a c - 3、C D 1 1 c及びB 2 2 0(ファージン社)に対する抗体を使用してF A C Sにより同定した。試料は、コールターE P C S(登録商標)X L - M C L流動血球計算器を使用して分析した。p C W N V C pで免疫化されたマウスからの浸潤細胞には、T細胞(C D 4⁺とC D 8⁺の両方)及びマクロファージ(抗M a c 3抗体で検出した)が含まれた(図16C)。免疫化された筋肉中のこの高レベルのC D 4⁺及びC D 8⁺T細胞は、高レベルのT細胞活性化のさらなる証拠を提供する。一方、p c D N A 3(対照)で免疫化されたマウスから抽出された筋肉薄片は、細胞浸潤のいかなる痕跡も示さなかった。総合すれば、これらの結果は、抗原特異的免疫応答がD N Aワクチン接種によって効率的に生じ得ることを示している。

20

30

例12: W N Vキャプシド蛋白質とその他のフラビウイルスキャプシド蛋白質とのアラインメント。

図17は、W N Vのキャプシド蛋白質とクンジンウイルス(K J V)、日本脳炎ウイルス(J E V)及びデングウイルス(D E N 2)を含めたその他のフラビウイルスからのキャプシド蛋白質の部分とのアラインメントを示しており、これらの蛋白質の中で高い一致性があることを示している。

【0199】

例13: W N V C p蛋白質はミトコンドリア経路によって生体内及び試験管内でアポトーシスを誘導する。

西ナイルウイルスのC p蛋白質は、その他のW N V遺伝子産物の非存在下では、組織培養の際に速やかに核凝集及び細胞死を誘導する。アポトーシスはミトコンドリア経路によって誘導される。なぜならばミトコンドリア膜電位の観察された変化は、カスパーゼ9の活性化及び下流のカスパーゼ3の活性化を伴ったからである。さらに、アポトーシス決定ドメインは、欠失変異分析によってW N V C p蛋白質の3'末端にあることが同定された。W N V C p発現カセットの筋肉注射後に、筋肉組織でアポトーシスがはっきりと観察された。最も重要なことには、W N V C p遺伝子のマウス脳の線条体への送達、生体内でキャプシド誘導アポトーシスによる細胞死を生じさせた。これらの研究は、W N Vのキャプシド蛋白質がアポトーシスカスケードの誘導によってウイルス性病原の側面を司ることを示し、このアポトーシス機能の抑制をW N V感染の治療のための実行可能な治療方法として利用できるという技術思想を支持するものである。さらに、W N Vキャプシド蛋白質と

40

50

H I V - 1 v p r 遺伝子産物の既知のアポトーシス誘導領域との間には配列の一致性 / 相
同性がある (アヤボー等, 1997, Nat. Med., 3: 1117 - 1123、スチ
ュアート等, 1997, J. Virol., 71: 5579 - 5592、本明細書はこれ
らのいずれも参照している) (図 18 及び 19)。

【 0 2 0 0 】

例 14 : W N V C p 及び H I V V p r とその他のアポトーシス関連ウイルスの蛋白質との
比較。

用語「アポトーシス」、「脳炎」及び「脳膜炎」についての M e d l i n e 検索は、感染
した個体のこのような症状によって同定された様々なウイルスのリストをもたらした。こ
れらのウイルス蛋白質のアミノ酸配列を W N V キャプシド蛋白質又は H I V - 1 8 9 . 6
蛋白質についてのアミノ酸配列と比較した。

W N V キャプシド蛋白質のアラインメント (図 19)

1 . H I V : W N V キャプシド蛋白質と H I V - 1 V p r (既知のアポトーシス誘導性蛋
白質) とは、配列相同性を共有する。

2 . 単純ヘルペスウイルス (H S V) : H S V の主要なキャプシド蛋白質と W N V C p の
配列アラインメントは、可能性のあるアポトーシス誘導能力を示した。興味深いことに、
脳炎による破壊は、病気の結果と相関するように関係していた。

3 . エボラウイルスは、フィロウイルス科内のフィロウイルス属の一員である。この病原
体は、出血熱の誘導と結びつけられてきた。W N V キャプシド蛋白質とエボラヌクレオキ
ャプシド蛋白質のアラインメントは、W N V と n e f アポトーシスドメインのなかで検出
可能なアミノ酸の相同性を示した。また、W N V キャプシド蛋白質との糖蛋白質のアライ
ンメントは、前アポトーシスドメインの相同性を示した。

4 . 風疹ウイルスは、トガウイルス科の一員であり且つ試験管内の観点からアポトーシス
誘導に結びつけられてきた。風疹ウイルスキャプシド蛋白質の配列アラインメントは、W
N V キャプシド蛋白質並びにアポトーシスドメインの中で H I V - 1 V p r 蛋白質 (図 1
9 参照) 及び T a t 蛋白質 (データは示さない) と相同性を示した。

H I V - 1 8 9 . 6 V p r とのアラインメント (図 19)

1 . シンドビスウイルス : 公開されたデータでは、特に、神経細胞の細胞死に至るシンド
ビスウイルスのアポトーシスの性質が報告されている。シンドビスウイルスの p 2 3 0 非
構造蛋白質と H I V - 1 V p r 蛋白質 (及び T a t 蛋白質 (データは示さない)) とのア
ラインメントは、B c l - 2 会合アポトーシス領域内で孤立した相同性を示した。興味深
いことに、近年公開されたデータでは、B a x によるシンドビスアポトーシスの抑制が示
された。

2 . キュウリモザイクウイルス : 以前に公開された報告では、キュウリモザイクウイルス
がネクローシスによる深刻な細胞致死を誘導することが示された。しかしながら、近年の
データでは、トマト内で細胞死に関連したアポトーシス特性が示された。興味深いことに
、我々の v p r 8 9 . 6 と C M V 2 A 蛋白質の配列アラインメントもアポトーシスドメイ
ンの相同性を示した。また、T a t H I V 遺伝子との比較は、C M V キャプシド蛋白質と
の前アポトーシス相同性も与えた。

3 . H T L V : このウイルスと H I V - 1 の T a t 蛋白質との比較は、このウイルスのア
ポトーシス誘導能力について可能性のある見識を与えた。T a t と H T L V - 1 p 2 7 蛋
白質との配列アラインメントは、アポトーシスドメイン内で配列の相同性を示した。

4 . ニバウイルス : このウイルスは、パラミクソウイルス科の一員であり且つヒトにおい
て非常に致命的であり得る。近年の発生は、シンガポールで観察され、しかして米国に移
動する可能性を増大させた。さらに、このウイルスは、西ナイルウイルス及び脳脊髄液を
標的とするその他にウイルスに類似する臨床転帰を有し且つ神経脳炎を引き起こすように
思われる。ニバウイルスの融合蛋白質と H I V 8 9 . 6 V p r 蛋白質との比較は、興味深
い相関関係を与えた。強い相同性がニバ融合蛋白質内の細胞周期停止ドメインで見いださ
れた。この表面蛋白質は、有力な D N A ワクチンの候補であるかもしれない。この意味は
、このものがアポトーシス及び細胞周期停止の発生に重要な役割を果たすということであ

10

20

30

40

50

る。

5. レオウイルス：レオウイルスは、神経細胞で T R A I L 依存性アポトーシスを誘導し且つ G 2 / M 期の細胞周期停止を誘導する。レオウイルスのコアマイナー型 M u 2 蛋白質の一部分と H I V 8 9 . 6 V p r 蛋白質との間で相同性が確認された。

【 0 2 0 1 】

前述の例は、本発明を例示することを意図し且ついかなる方法でも本発明を限定するように解釈すべきではない。当業者であれば、本発明の精神及び範囲内にある変更を認識するであろう。

【 0 2 0 2 】

ここで引用した全ての参考文献は、その全体を参照することによってここに盛り込まれる 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 の上図は、1999 年ニューヨークヒト単離 W N V のゲノム構成の概略図である。下図は、W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y 及び p W N V y - D J Y の構造の概略図である。

【図 2】

図 2 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y の制限エンドヌクレアーゼ地図を示す。

【図 3】

図 3 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y の特徴地図を示す。 20

【図 4】

図 4 は、5864ヌクレオチド塩基対を有する、W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V h - D J Y の二本鎖ヌクレオチド全配列を注釈付きで示したものである。上側のヌクレオチド鎖は配列番号 1 である。アミノ末端 s I g E リーダーペプチドの蛋白質配列（配列番号 2）は、ヌクレオチド 917 ~ 970 のコード領域の下に示した。発現された蛋白質の W N V C p 蛋白質部分の蛋白質配列（配列番号 3）は、ヌクレオチド 971 ~ 1336 のコード領域の下に示した。

【図 5】

図 5 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の制限エンドヌクレアーゼ地図を示す。 30

【図 6】

図 6 は W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の特徴地図を示す。

【図 7】

図 7 は、5864ヌクレオチド塩基対を有する、W N V キャプシド蛋白質発現ベクター p W N V y - D J Y の二本鎖ヌクレオチド全配列を注釈付きで示したものである。上側のヌクレオチド鎖は配列番号 4 である。アミノ末端 s I g E リーダーペプチドの蛋白質配列は、ヌクレオチド 917 ~ 970 のコード領域の下に示した。発現された蛋白質の W N V C p 蛋白質部分の蛋白質配列は、ヌクレオチド 971 ~ 1336 のコード領域の下に示した。 40

【図 8】

図 8 は 2 種の異なる W N V キャプシド蛋白質構造体 p W N V h - D J Y 及び p W N V y - D J Y の生体外転写 / 翻訳産物を、³⁵S 標識化し免疫沈降し、電気泳動分離したオートラジオグラフである。

【図 9】

図 9 は W N V C p 蛋白質の全アミノ酸配列（配列番号 5）を示す。実施例 3 で用いた、3 種の腫瘍組織適合（M H C）クラス I I 制限エピトープペプチド [W N V C - P 1（配列番号 6）、W N V C - P 2（配列番号 7）及び W N V C - P 3（配列番号 8）] を、C p アミノ酸配列の下に示す。

【図 10】

図 10 は生体外で刺激された、DNA 免疫化マウス由来脾臓細胞における、細胞内 IFN - 発現のフローサイトメトリー分析を示す。図の上段では、細胞は IFN - 及び CD 44 について染色されている。下段では、細胞は CD 4 及び IFN - について染色されている。

【図 11】

図 11 は、強化緑色蛍光蛋白質 (EGFP) 発現ベクター pEGFP2-N1 単独で、又は pWNVh-DJY 又は pWNVy-DJY と組み合わせてトランスフェクトした後の、HeLa 細胞のアネキシン V フローサイトメトリー分析の結果を示す。

【図 12】

図 12 A は、免疫化したマウスにおける、WNV キャプシド蛋白質 (Cp) 特異的抗体応答を示す。図 12 B は免疫化マウスにおける WNV Cp 特異的 IgG 抗体応答の IgG サブセット分析を行い、免疫化 5 ヶ月後に調べた WNV Cp 特異的 IgG1 及び IgG2a 応答、並びに IgG2a / IgG1 比を示す。図 12 C は免疫化マウスにおける WNV Cp 特異的血清抗体を、免疫沈降 / ウエスタンブロット分析によって調べた結果を示す。

10

【図 13】

図 13 は、刺激を受けた T 細胞による IFN - (Th1)、IL - 2 (Th1) 及び IL - 4 (Th2) の産生を示す。

【図 14】

図 14 は、刺激を受けた T 細胞によるケモカインの産生を示す。

20

【図 15】

図 15 A 及び図 15 B は、陽性の抗原特異的 CTL 応答の誘導を示す。

【図 16】

図 16 A、16 B 及び 16 C は、筋肉組織の分析を示す。

【図 17】

図 17 は、WNV Cp 蛋白質配列と、他のフラビウイルス属由来のキャプシド蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。上段はクンジンウイルス由来の Cp 蛋白質の最初の 123 アミノ酸 (配列番号 9) と WNV Cp 蛋白質の全 123 アミノ酸配列とを比較している。中段は日本脳炎ウイルスの Cp 蛋白質の最初の 113 アミノ酸 (配列番号 10) と WNV Cp 蛋白質の最初の 114 アミノ酸 (配列番号 11) とを比較している。下段はデングウイルスの Cp 蛋白質の最初の部分のアミノ酸 (配列番号 12) と WNV Cp 蛋白質のアミノ酸 10 ~ 98 (配列番号 13) とを比較している。

30

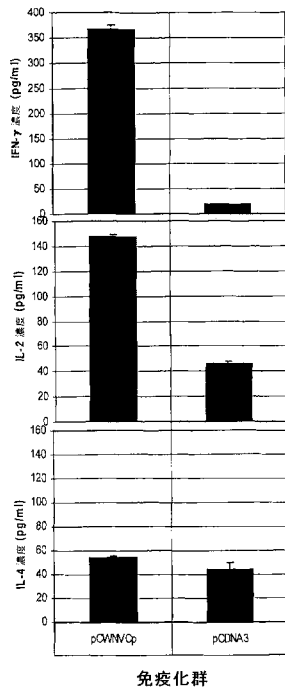
【図 18】

図 18 は、WNV Cp 蛋白質配列と、他のウイルス由来の蛋白質の部分配列との、並びにアポトーシス促進性蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。WNV Cp 蛋白質 (アミノ酸 1 ~ 123) の全配列は、最上段にボールドで示した。

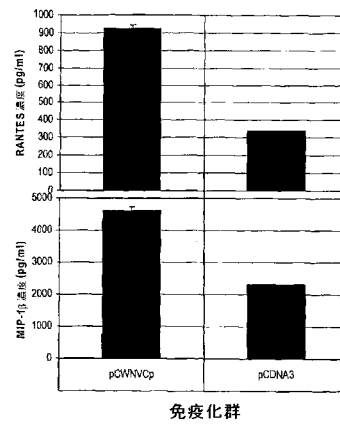
【図 19】

図 19 は、HIV - 1 89.6 Vpr 蛋白質配列と、他のウイルス蛋白質の部分配列との、並びにアポトーシス促進性蛋白質の部分配列とのアラインメントを示す。

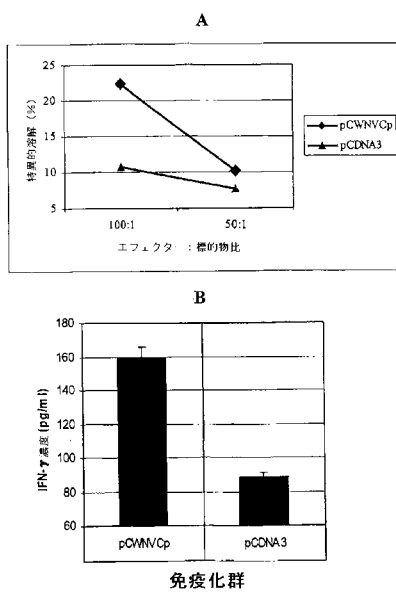
【図 13】



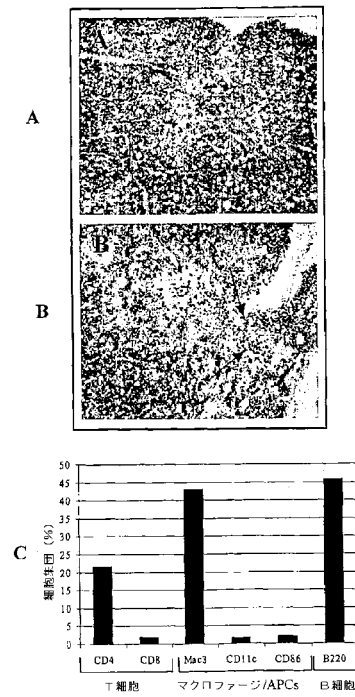
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/28165 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number: PCT/US01/31355

(22) International Filing Date: 4 October 2001 (04.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/237,885 4 October 2000 (04.10.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): **THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA** [US/US]; 3700 Market Street, Suite 300, Philadelphia, PA 19104-3147 (US).

(72) Inventors: and

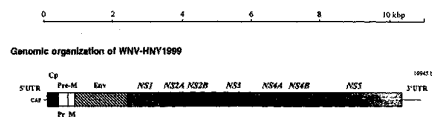
(75) Inventors/Applicants (for US only): **WEINER, David,****B.** [US/US]; 717 Biacom Lane, Merion, PA 19066 (US).
YANG, Joo-Sung [KR/US]; 102 South 42nd Street, Apartment 1, Philadelphia, PA 19104 (US).(74) Agents: **DELUCA, Mark** et al.; Woodcock Washburn LLP, One Liberty Place, 46 floor, Philadelphia, PA 19103 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

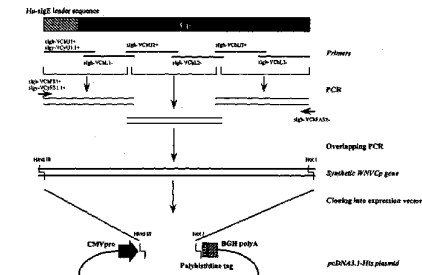
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF USING CAPSID PROTEIN FROM FLAVIVIRUSES AND PESTIVIRUSES



Cloning Strategy for WNV-HNY1999 Capsid Gene: pWNVh-DJY, pWNVy-DJY



(57) Abstract: This invention provides methods of inducing cell death with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, such as West Nile virus (WNV) capsid protein, and functional fragments thereof. The invention also provides methods of treating patients suffering from diseases characterized by hyper-proliferating cells by administering pharmaceutical compositions WNV or encoding the same. Methods of identifying compounds which have anti-viral and/or anti-WNV and/or anti-*Flavivirus* and/or anti-*Pestivirus* capsid or other protein activity are disclosed. The invention also provides vaccine compositions comprising capsid or other proteins, or fragments thereof, or nucleic acids encoding same, from WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* and a pharmaceutically acceptable carrier. The invention also provides diagnostic methods and kits for identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*.

WO 02/28165 A2

WO 02/28165 A2

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 02/28165

PCT/US01/31355

**COMPOSITIONS AND METHODS OF USING
CAPSID PROTEIN FROM FLAVIVIRUSES AND PESTIVIRUSES**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims benefit under 35 U.S.C. §119(e) of U.S. Provisional Patent Application Serial Number 60/237,885, filed October 4, 2000, incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to the use of the capsid protein from West Nile virus, and capsid and other proteins from other viruses including viruses of the *Flavivirus* and *Pestivirus* genera, to induce the death of cells by apoptosis, and to vaccines and diagnostics for West Nile virus and other viruses including *Flavivirus* and *Pestivirus* infections. The invention also relates to methods of screening for antiviral compounds by identifying compounds that selectively inhibit the ability of capsid protein to induce apoptosis.

BACKGROUND OF THE INVENTION

West Nile virus (WNV) infection has recently emerged in temperate regions of Europe and North America, presenting a threat to humans, horses, and birds. The most serious manifestations of WNV infection is fatal encephalitis. WNV, originally isolated in the West Nile District of Uganda in 1937, is a *Flavivirus* of the *Flaviviridae* family, having a size of 40 - 60 nm, an enveloped, icosahedral nucleocapsid, and a positive-sense, single-stranded RNA genome of 10,000 - 11,000 bases. For a recent review of WNV, see Holloway, 2000, Outbreak not contained. West Nile virus triggers a reevaluation of public health surveillance, *Sci. Am.*, 282:20, 22, which is incorporated herein by reference. Reviews of the viruses in the *Flaviviridae*

WO 02/28165

PCT/US01/31355

family are provided in the following references: Neyts *et al.*, 1999, Infections with *Flaviviridae*, Verh. K. Acad. Geneeskd. Belg., 61:661-697, discussion 697-699; Leyssen, *et al.*, 2000, Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*, Clin. Microbiol. Rev., 13:67-82; Sherlock, 1999, The hepatic *Flaviviridae*: summary, J. Viral. Hepat., 6 Suppl. 1:1-5; and Fields, Knipe, & Howley, eds., Fields Virology (3rd ed.) Vols. I & II, Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996), each of which is incorporated herein, in its entirety, by reference.

There is a need for improved methods of prophylactic and therapeutic treatment of *Flavivirus* and *Pestivirus* infection. There is a need for improved methods of inducing cell death and of treating diseases characterized by hyperproliferating cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods of inducing the death of cells. The methods of the invention comprise the step of contacting cells with an amount of a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, effective to induce cell death. According to some embodiments of the invention, the *Flavivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, is the capsid protein, or functional fragment thereof, of West Nile virus (WNV). According to some embodiments of the present invention, cells are contacted with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, in order to induce the cells to die. According to some embodiments of the present invention, a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, is introduced into the cells. Expression of the sequence that encodes the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, results in the production of the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, within the cell, causing the cell to die. According to some embodiments of the present invention, the sequence which encodes the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, is operably linked to regulatory elements which are necessary for expression of the sequence in the cell. According to some embodiments of the present invention, the nucleic acid molecule is DNA. According to some embodiments of the invention, the cells are tumor cells.

The present invention provides methods of identifying compounds that inhibit the ability of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments thereof, to induce apoptosis. Methods of the invention comprise the steps of (a) contacting cells, in the presence of a test compound, with an amount of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment

WO 02/28165

PCT/US01/31355

thereof, sufficient to induce a measurable amount of apoptosis in the cells, and (b) comparing the amount of apoptosis that occurs when the test compound is present with the amount of apoptosis that occurs when the test compound is absent. The present invention relates to a method of identifying compounds that inhibit WNV capsid protein, or functional fragments thereof, from inducing apoptosis in cells that comprises the steps of (a) contacting cells, in the presence of a test compound, with an amount of WNV capsid protein, or a functional fragment thereof, sufficient to induce a measurable amount of apoptosis in the cells, and (b) comparing the amount of apoptosis that occurs when the test compound is present with the amount of apoptosis that occurs when the test compound is absent. According to some embodiments, the measuring step of the method is accomplished by detecting the presence of apoptosis-related markers, including phosphatidylserine (PS) of the cellular membrane, and free 3'-hydroxy termini in DNA.

The present invention relates to pharmaceutical compositions that comprise a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition comprises WNV capsid protein, or a functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

The present invention relates to pharmaceutical compositions that comprise a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition comprises a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, that is operably linked to regulatory elements which are necessary for expression of the sequence in the cell. The present invention relates to pharmaceutical compositions that comprise a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes WNV capsid protein, or a functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition comprises a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes WNV capsid protein, or a functional fragment thereof, that is operably linked to regulatory elements which are necessary for expression of the sequence in the cell. According to some embodiments of the present invention, a pharmaceutical composition comprises a nucleic acid molecule that is DNA.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The present invention relates to methods of treating individuals diagnosed with or suspected of suffering from diseases characterized by hyperproliferating cells which comprise the step of administering to an individual an amount of a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, sufficient to kill the hyperproliferating cells. The present invention relates to methods of treating individuals diagnosed with or suspected of suffering from diseases characterized by hyperproliferating cells which comprise the step of administering to an individual an amount of WNV capsid protein, or a functional fragment thereof, sufficient to kill the hyperproliferating cells. According to some embodiments, methods comprise the steps of administering to such individuals, an effective amount of WNV capsid protein, or a functional fragment of WNV capsid protein. According to some embodiments of the present invention, the sequence that encodes the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, is operably linked to regulatory elements which are necessary for expression of the sequence in cells. According to some embodiments of the present invention, methods comprise the steps of administering to such individuals, an effective amount of a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes WNV capsid protein, or a functional fragment thereof. According to some embodiments of the present invention, the sequence that encodes the WNV capsid protein, or functional fragment thereof, is operably linked to regulatory elements which are necessary for expression of the sequence in cells. According to some embodiments of the present invention, the nucleic acid molecule is DNA. According to some embodiments of the present invention, the disease characterized by hyperproliferating cells is cancer or psoriasis.

The present invention relates to vaccine compositions that comprise an immunologically effective amount of capsid protein from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses* and a pharmaceutically acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the vaccine composition comprises an immunologically effective amount of an immunogenic fragment of capsid protein from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses* and a pharmaceutically acceptable carrier.

The present invention relates to vaccine compositions that comprise a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes capsid protein from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses* and a pharmaceutically acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the vaccine composition comprises a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes an immunogenic fragment of capsid protein from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses* and a pharmaceutically

WO 02/28165

PCT/US01/31355

acceptable carrier. According to some embodiments of the present invention, the vaccine composition comprises a nucleic acid molecule that comprises a sequence which encodes and immunogenic fragment of WNV or related *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, operably linked to regulatory elements necessary for expression of the sequence in a cell. According to some embodiments of the present invention, a vaccine composition comprises a nucleic acid molecule that is DNA. According to some embodiments of the present invention, a vaccine composition comprises a plasmid.

The present invention relates to methods of immunizing individuals against WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses*. The immune responses generated may be prophylactic or therapeutic. The methods comprise the steps of administering to the individual an immunologically effective amount of capsid protein, or immunogenic fragment thereof, from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or a nucleic acid molecule that encodes capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from WNV or a related member of the *Flaviviruses* or *Pestiviruses*.

The present invention relates to methods of identifying individuals exposed to capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* by detecting the presence of capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* in a sample using antibodies which specifically bind to capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus*. The antibodies are preferably monoclonal antibodies. Quantification of the amount of capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* present in a sample of an individual may be used in determining the prognosis of an infected individual.

The present invention relates to kits for identifying individuals exposed to WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* and reagents used in such kits. The kits comprise a first container which contains antibodies which specifically bind to capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* and a second container which contains capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus*. The antibodies are preferably monoclonal antibodies. The kits may be adapted for quantifying of the amount of capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* present in a sample of an individual. Such information may be used in determining the prognosis of an infected individual.

The present invention relates to methods of identifying individuals exposed to WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* by detecting the presence of antibodies against capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* in a sample using capsid protein from WNV or

WO 02/28165

PCT/US01/31355

a related *Flavivirus* or *Pestivirus*. Quantification of the amount of anti-capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* antibodies present in a sample of an individual may be used in determining the prognosis of an infected individual.

The present invention relates to kits for identifying individuals exposed to WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* and reagents used therein. The kits comprise a first container which contains antibodies which were produced in response to exposure to capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* and a second container which contains capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus*. The kits may be adapted for quantifying the amount of anti-capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus* antibodies present in a sample of an individual. Such information may be used in determining the prognosis of an infected individual.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 presents, at the top, a schematic representation of the genomic organization of the 1999 New York human isolate of WNV (WNV-HNY 1999) (GenBank accession number AF202541, Jia *et al.*, 1999, Lancet, 354:1971-1972, which is incorporated herein by reference). The capsid protein is indicated as "Cp." The bottom of the figure presents a schematic representation of the construction of WNV capsid protein expression vectors pWNVh-DJY and pWNVy-DJY. These expression constructs may also be referred to herein by alternate terms. pWNVc-DJY may be referred to herein as pWNVCh-DJY or pWNVCh, and pWNVy-DJY may be referred to herein as pWNVcy-DJY or pWNVcy.

Figure 2 presents the restriction endonuclease map of WNV capsid protein expression vector pWNVh-DJY.

Figure 3 presents the feature map of WNV capsid protein expression vector pWNVh-DJY.

Figure 4 presents the complete, annotated, double-stranded nucleotide sequence of WNV capsid protein expression vector pWNVh-DJY, having 5864 nucleotide base pairs. Restriction endonuclease sites, features, and translation information for parts of the protein that the construct expresses are indicated in the annotations. The top nucleotide strand is SEQ ID NO:1. The protein sequence of the amino-terminal sIgE leader peptide (SEQ ID NO:2) is presented below its coding region of nucleotides 917 through 970. The protein sequence of the WNV Cp protein

WO 02/28165

PCT/US01/31355

portion of the expressed protein (SEQ ID NO:3) is presented below its coding region of nucleotides 971 through 1336.

Figure 5 presents the restriction endonuclease map of WNV capsid protein expression vector pWNVy-DJY.

Figure 6 presents the feature map of WNV capsid protein expression vector pWNVy-DJY.

Figure 7 presents the complete, annotated, double-stranded nucleotide sequence of WNV capsid protein expression vector pWNVy-DJY, having 5864 nucleotide base pairs. Restriction endonuclease sites, features, and translation information for parts of the protein that the construct expresses are indicated in the annotations. The top nucleotide strand is SEQ ID NO:4. The protein sequence of the amino-terminal sIgE leader peptide is presented below its coding region of nucleotides 917 through 970. The protein sequence of the WNV Cp protein portion of the expressed protein is presented below its coding region of nucleotides 971 through 1336.

Figure 8 presents an autoradiograph of electrophoretically resolved, immunoprecipitated, ³⁵S-labeled, *in vitro* transcription/translation products of the two different WNV capsid protein constructs: pWNVh-DJY and pWNVy-DJY. The first lane on the left contains molecular weight markers. The arrow indicates the position of the major *in vitro* translated protein product. The proteins, which are fusions with polyhistidine C-terminal tags, were immunoprecipitated using an anti-His antibody.

Figure 9 shows the complete amino acid sequence of WNV Cp protein (SEQ ID NO:5). The three major histocompatibility (MHC) class II-restricted epitope peptides (WNVC-P1 (SEQ ID NO:6), WNVC-P2 (SEQ ID NO:7), and WNVC-P3 (SEQ ID NO:8)), used in the studies presented herein in Example 3, are shown below the Cp amino acid sequence.

Figure 10 presents the flow cytometry analysis of intracellular IFN- γ expression in *in vitro* stimulated splenocytes from DNA immunized mice. Values presented are the percentage dual positive cells. In the upper panels, the cells were stained for INF- γ and CD44; in the lower panels the cells were stained for CD4 and IFN- γ . The labeling across the top indicates the vector used to immunize the mice plus the stimulus used for the *in vitro* restimulation of the splenocytes. The immunizing vectors were pcDNA3 (pcDNA3.1), pWNVh-DJY (pWNVCh), and pWNVy-DJY (pWNVCy). "No Ag" indicates that the splenocytes were incubated with an *in vitro* translation control (described in Example 3), "protein" indicates that the splenocytes

WO 02/28165

PCT/US01/31355

were incubated with *in vitro* translated Cp protein product from the pWNVy-DJY expression construct.

Figure 11 depicts the results of annexin V flow cytometry analysis of HeLa cells following transfection with enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression vector, pEGFP2-N1 alone, or in combination with pWNVh-DJY or pWNVy-DJY. Values represent percentage annexin V-positive cells within the EGFP-positive (transfected cells) population.

Figures 12A, 12B, and 12C show the WNV Capsid protein (Cp)-specific antibody response in mice following immunization. Fig. 12A: 100 µg of pCWNVCP expression cassette or control vector was injected intramuscularly at weeks 0, 4, and 8. The sera samples were collected at various days post-immunization and assayed for WNVCP-specific antibody at 1:50, 1:100, 1:200, and 1:400 dilutions. At five months post-immunization, WNVCP-specific antibody responses were detected. The error bars represent the standard deviation of the results from the immunized animals (n=3). Fig. 12B: IgG-subset analysis of WNVCP-specific IgG antibody responses was conducted. WNVCP-specific IgG1 and IgG2a responses examined at 5 months post-immunization as well as the IgG2a/IgG1 ratio are shown. Fig. 12C: WNVCP-specific serum antibody was determined by immunoprecipitation/Western blot analysis. Each immobilized membrane strip was incubated with immune sera from pCWNVCP (W) or pCDNA3 (P). As a positive control, a strip was incubated with an anti-6X His monoclonal antibody (+).

Figure 13 shows production of IFN-γ (Th1), IL-2 (Th1) and IL-4 (Th2) by stimulated T cells. Mice were immunized and their splenocytes were prepared as described in Example 8. The isolated lymphocytes were stimulated for 3 days with WNV Cp pooled peptides. Supernatants were collected and assayed for IFN-γ, IL-2, and IL-4 profiles using ELISA kits. The error bars represent standard deviation (S.D.) values for each experiment.

Figure 14 shows the production of chemokines by stimulated T cells. Mice were immunized and their splenocytes were prepared as described in Example 8. The isolated lymphocytes were stimulated for 3 days with WNV Cp-specific peptide pools. Supernatants were collected and assayed for chemokine profiles using ELISA kits for RANTES and MIP-1β. The error bars represent standard deviation (S.D.) values of each experiment.

Figures 15A and Figure 15B show the induction of positive antigen-specific CTL response. Fig. 15A: Splenocytes from immunized mice were tested for CTL response using target cells treated with pooled WNV Capsid peptides. Fig15B: Supernatants from effectors

WO 02/28165

PCT/US01/31355

stimulated for CTL assay were collected at day five and tested for IFN- γ production. The error bars represent standard deviation (S.D.) values for each experiment.

Figures 16A, 16B, and 16C show the analyses of muscle tissue. Frozen muscle sections were prepared from DNA injected animals and stained with hematoxylin and eosin (H&E) stain. Slides from pCDNA3 (control) immunized mice (Fig. 16A) and pCWNVCP immunized mice (Fig. 16B) are shown. The panels shown are at 40X magnification. Fig. 16C: Identity of the muscle infiltrating cells in pCWNVCP immunized mice. The cells were harvested as described in Example 11, and were identified by FACS using antibodies to CD4, CD8, Mac3, CD11c, CD86, and B220.

Figure 17 shows the alignment of WNV Cp protein sequence with portions of the sequences of capsid proteins from other *Flaviviruses*. The top comparison is between the first 123 amino acids of Cp protein from Kunjin virus (KJV; GenBank accession number BAA00176 (gi:221967), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:9) and the complete 123 amino acid sequence of WNV Cp protein. The middle comparison is between the first 113 amino acids of Cp protein of a Japanese encephalitis virus (JEV; GenBank accession number NP_059434 (gi:9626461), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:10) and the first 114 amino acids of WNV Cp protein (SEQ ID NO:11). The bottom comparison is between amino acids from an internal portion of the Cp protein of a Dengue virus (DEN2; GenBank accession number AAG30730 (gi:11119732), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:12) and amino acids 10 through 98 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:13). This alignment required looping out of a lysine (K appearing above the line) from the stretch of amino acids LTKR in the DEN2 sequence. The values in brackets are identity/homology scores, where a maximum possible score is 590. Comparisons and alignments were generated by MacVector.

Figure 18 shows the alignment of the WNV Cp protein sequence with portions of the sequences of proteins from other viruses and with portions of the sequences of proapoptotic proteins. The complete sequence of the WNV Cp protein (amino acids 1 - 123) appears at the top in bold. Shown are 6 comparisons of WNV Cp with other viral proteins and 5 comparisons of WNV Cp with proapoptotic proteins. The viral protein comparisons are as follows: 1) amino acids from an internal portion of Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) 89.6 Vpr protein (GenBank accession number AAA81039 (gi:1055033), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:27) and amino acids 68 through 110 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:28); 2) amino acids from an internal portion of Herpes Simplex Virus major capsid protein

WO 02/28165

PCT/US01/31355

(GenBank accession number AAC57106 (gi:1718277), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:29) and amino acids 8 through 117 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:30); 3) amino acids from an internal portion of Ebola virus nuclear protein (GenBank accession number AAG40164 (gi:11761746), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:31) and amino acids 10 through 117 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:32); 4) amino acids from an internal portion of Ebola virus glycoprotein (GenBank accession number AAA96744 (gi:1141779), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:33) and amino acids 4 through 23 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:34); 5) amino acids from another internal portion of Ebola virus glycoprotein (SEQ ID NO:35) and amino acids 50 through 73 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:36); and 6) amino acids from an internal portion of Rubella virus capsid protein (GenBank accession number GNWVR4 (gi:74519), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:37) and amino acids 64 through 114 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:38). The proapoptotic protein comparisons are as follows: 1) amino acids from an internal portion of the human BAK protein (GenBank accession number Q16611 (gi:2493274), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:39) and amino acids 17 through 63 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:40); 2) amino acids from an internal portion of the human Bcl-2 associated X protein (GenBank accession number XP_009093 (gi:15304386), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:41) and amino acids 109 through 123 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:42); 3) amino acids from an internal portion of the human BIK protein (GenBank accession number XP_015353 (gi:13655199), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:43) and amino acids 75 through 118 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:44); 4) amino acids from an internal portion of the human BID protein (GenBank accession number XP_009825 (gi:13647251), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:45) and amino acids 84 through 95 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:46); and 5) amino acids from an internal portion of the human Bad protein (GenBank accession number CAC22429 (gi:12309966), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:47) and amino acids 15 through 23 of WNV Cp protein (SEQ ID NO:48). The values in brackets are identity/homology scores, where a maximum possible score is 590. Comparisons and alignments were generated by MacVector.

Figure 19 shows the alignment of the HIV-1 89.6 Vpr protein sequence with portions of the sequences of proteins from other viruses and with portions of the sequences of proapoptotic proteins. The complete sequence of the HIV-1 89.6 Vpr protein (amino acids 1 - 96) appears at

WO 02/28165

PCT/US01/31355

the top in bold. Shown are 7 comparisons of HIV-1 89.6 Vpr protein with other viral proteins and 6 comparisons of HIV-1 89.6 Vpr protein with proapoptotic proteins. The viral protein comparisons are as follows: 1) amino acids from an internal portion of the p230 nonstructural protein of Sindbis virus (GenBank accession number NP_062889 (gi:9790318), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:49) and amino acids 22 through 59 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:50); 2) amino acids 68 through 110 of WNV Cp protein (see description for Fig. 18 above) and amino acids 54 through 95 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:51); 3) amino acids from an internal portion of the 2A protein of Cucumber mosaic virus (GenBank accession number CAB75953 (gi:7105855), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:52) and amino acids 77 through 89 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:53); 4) amino acids from another internal portion of the 2A protein of Cucumber mosaic virus (SEQ ID NO:54) and amino acids 49 through 67 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:55); 5) amino acids from an internal portion of the Rubella virus capsid protein (SEQ ID NO:56) and amino acids 38 through 47 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:57); 6) amino acids from an internal portion of the Nipah virus fusion protein (GenBank accession number NP_112026 (gi:13559813), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:58) and amino acids 60 through 72 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:59); and 7) amino acids from an internal portion of the reovirus core-minor form Mu2 protein (GenBank accession number AAK54467 (gi:14149150), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:60) and amino acids 60 through 72 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:61). The proapoptotic protein comparisons are as follows: 1) amino acids from an internal portion of the mouse BIM protein (GenBank accession number NP_033884 (gi:6753192), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:62) and amino acids 7 through 74 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:63); 2) amino acids from an internal portion of the rat BOD protein (GenBank accession number AAC23593 (gi:3228566), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:64) and amino acids 23 through 74 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:65); 3) amino acids from an internal portion of the mouse Mtd protein (GenBank accession number AAC53582 (gi:2689660), which is incorporated herein by reference) (SEQ ID NO:66) and amino acids 16 through 67 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:67); 4) amino acids from an internal portion of the human Bcl-2 associated X protein (SEQ ID NO:68) and amino acids 18 through 75 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:69); 5) amino acids from another internal portion of the human Bcl-2 associated X protein (SEQ ID NO:70) and amino acids 18 through 42 of HIV-1

WO 02/28165

PCT/US01/31355

89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:71); and 6) amino acids from an internal portion of the human Bad protein (SEQ ID NO:72) and amino acids 33 through 44 of HIV-1 89.6 Vpr protein (SEQ ID NO:73). The values in brackets are identity/homology scores, where a maximum possible score is 590. Comparisons and alignments were generated by MacVector.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention arises out of the discovery of the apoptosis-inducing activity of the WNV capsid (Cp) protein in tumor-derived cells. It has been discovered that expression of WNV capsid protein in cells in culture leads to the induction of an apoptotic pathway and, ultimately, to the death of hyperproliferating cells. It has also been observed that a 22 amino acid residue peptide from the carboxy-terminal region of WNV Cp protein has apoptosis-inducing activity. The apoptosis-inducing activity of WNV capsid protein renders Cp protein, and functional fragments thereof, useful in methods of killing rapidly growing cells, including cancer cells, and in screening systems to identify compounds that inhibit the apoptosis-inducing activity, which may be used for treatment of WNV infection.

The virus family *Flaviviridae* is composed of positive-sense, single-stranded RNA genome viruses classified into three genera: *Pestiviruses*, which include bovine diarrhea virus (BVDV), "Hepatitis C-like viruses," which include hepatitis C virus (HCV), and *Flaviviruses*. The *Flavivirus* genus includes at least ten serologically-defined subgenus groups, as well as unclassified viruses. WNV is a member of the mosquito-borne Japanese encephalitis virus group, which also includes, among others, Japanese encephalitis virus (JEV) and St. Louis encephalitis virus (SLEV), that are highly related to WNV. Other *Flaviviruses* include Yellow fever virus (YFV) and Dengue viruses (DENV), which are in different subgenus groups. Nucleotide and amino acid sequence analyses reveal conservation of sequences within and between serogroups. The WNV Cp protein shares homology with capsid and other proteins of other viruses, including, but not limited to, viruses in the *Flaviviridae* family, and viruses from many other virus families. The WNV Cp protein also shares homology and with other proteins, including, non-viral proteins, including proapoptotic proteins of mammalian origin.

In some embodiments of the invention, the capsid protein is derived from a *Pestivirus*. In some embodiments of the invention, the *Pestivirus* from which the capsid protein is derived is BVDV. In some embodiments of the invention, the capsid protein is derived from a *Flavivirus*. In some embodiments of the invention, the *Flavivirus* from which the capsid protein

WO 02/28165

PCT/US01/31355

is derived is JEV. In some embodiments of the invention, the *Flavivirus* from which the capsid protein is derived is SLEV. In some embodiments of the invention, the *Flavivirus* from which the capsid protein is derived is YFV. In some embodiments of the invention, the *Flavivirus* from which the capsid protein is derived is DENV. In some embodiments of the invention, the *Flavivirus* from which the capsid protein is derived is WNV.

The invention provides, *inter alia*, methods of inducing the death of cells using capsid proteins and other proteins from viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, or functional fragments thereof. In some embodiments the capsid protein, or functional fragments thereof are from WNV. The invention also provides methods of screening for compounds that inhibit the cell killing activity of capsid protein and other proteins from viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, or functional fragments thereof. In some embodiments of the invention, methods are provided for screening for compounds that inhibit the cell killing activity of WNV capsid protein, or functional fragments thereof. The invention further provides pharmaceutical compositions comprising capsid proteins or other proteins from viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or functional fragments thereof, or nucleic acids encoding capsid proteins or other proteins from viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or functional fragments thereof, and methods of treating individuals having diseases characterized by hyperproliferating cells with these pharmaceutical compositions. The invention further provides vaccine compositions comprising capsid proteins or other proteins, or fragments thereof, or nucleic acids encoding capsid proteins or other proteins, or functional fragments thereof, from WNV or from other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* and a pharmaceutically acceptable carrier. The invention also provides diagnostic methods and kits for identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*.

The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional methods of virology, immunology, microbiology, molecular biology and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (2000); Glover, ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I & II; Colowick & Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press; Weir & Blackwell, eds., *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Pubs. (1986); Fields, Knipe, & Howley, eds., *Fields Virology* (3rd ed.) Vols.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

I & II, Lippincott Williams & Wilkins Pubs. (1996); Coligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, NY (2000), each of which is incorporated herein by reference.

Various definitions are made throughout this document. Most words have the meaning that would be attributed to those words by one skilled in the art. Words specifically defined either below or elsewhere in this document have the meaning provided in the context of the present invention as a whole and as typically understood by those skilled in the art.

As used herein, the terms "induce" and "inducing" in reference to cell death or apoptosis refer to activities that initiate events that lead to cell death, including activities that initiate cellular events that are part of an apoptotic pathway that contribute to cell death.

As used herein, the term "apoptosis" refers to the form of eukaryotic cellular death, which is distinct from necrosis, and which includes cytoskeletal disruption, cytoplasmic shrinkage and condensation, expression of phosphatidylserine on the outer surface of the cell membrane and blebbing, resulting in the formation of cell membrane bound vesicles or apoptotic bodies. For a review of apoptotic cell death see, *e.g.*, Utz & Anderson, 2000, Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules, Cell Death Differ., 7:589-602, which is incorporated herein by reference.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a cell" includes a mixture of two or more cells.

As used herein, the phrases "amount effective to induce cell death" and "level effective to induce cell death" in reference to capsid protein, or functional fragments thereof, means that the amount of capsid protein, or functional fragment thereof, in contact with a cell, or the level of capsid protein, or functional fragment thereof, expressed in the cell, is effective to trigger the events that will kill the cell.

As used herein, the term "protein" refers to a polymer of amino acid residues, and is not limited to a minimum length. Polypeptides, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included in the definition. Both full length proteins and fragments thereof are contemplated by the definition. The term also includes post-expression modifications to the protein, including, but not limited to, glycosylation, acetylation, phosphorylation.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

As used herein, the phrase "functional fragment thereof" in reference to capsid protein, refers to fragments of less than the full length of the protein that maintain the function of the capsid protein, and are capable of inducing cell death or inducing apoptosis.

As used herein, the phrase "immunogenic fragment thereof" in reference to capsid protein, refers to fragments of less than the full length of the protein against which an immune response can be induced.

As used herein, "nucleic acid" includes DNA and RNA, as well as modified forms thereof, including modified sugars, bases, or backbone.

As used herein, the phrase "free from an entire *Flavivirus* or *Pestivirus* genome" used in reference to a nucleic acid encoding a capsid protein, or functional fragment thereof, indicates that the nucleic acid is in a form that is in a recombinant form or construct, or that it is otherwise isolated from its natural state in a *Flavivirus* or *Pestivirus* genome.

As used herein, the phrase "free from an entire WNV genome" used in reference to a nucleic acid encoding a capsid protein, or functional fragment thereof, indicates that the nucleic acid is in a form that is in a recombinant form or construct, or that it is otherwise isolated from its natural state in a WNV genome.

As used herein, "detectable level" in reference to apoptosis, means that the level or amount of apoptosis elicited is at a threshold level that can be detected or measured by techniques known to those of skill in the art. Detection techniques depend on the identification of the presence or increased presence of "markers of apoptosis."

As used herein, "marker of apoptosis" refers to cellular factors or morphological changes that serve as indicators that apoptosis has been triggered and that cells are undergoing apoptotic death. "Markers of apoptosis" include, but are not limited to, exposed cellular membrane phosphatidylserine (PS), free 3'-hydroxy DNA termini, and cytoplasmic nucleosomes.

As used herein, the term "compound" in reference to inhibitors of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein apoptosis-inducing activity includes, but is not limited to, any identifiable chemical or molecule, including, but not limited to small molecules, peptides, polypeptides, proteins, sugars, nucleotides, or nucleic acids. Such compounds can be natural or synthetic.

As used herein, "inhibit" in reference to WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein apoptosis-inducing activity, refers to any interference with this activity. For example, the term "inhibit" includes both the elimination and reduction of

WO 02/28165

PCT/US01/31355

apoptosis-inducing activity. The inhibition of capsid protein apoptosis-inducing activity can be monitored in many ways, including, but not limited to, use of the TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) assay and monitoring of PS with annexin V.

As used herein, "injectable pharmaceutical composition" refers to pharmaceutically acceptable compositions for use in patients that are sterile, pyrogen-free, and free of any particulates. See, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 and U.S.P., the standards of the U. S. Pharmacopeia, which is incorporated herein by reference.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any carrier that does not itself induce a harmful effect to the individual receiving the composition. For example, a "pharmaceutically acceptable carrier" should not induce the production of antibodies harmful to the recipient. Suitable "pharmaceutically acceptable carriers" are known to those of skill in the art and are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*.

As used herein, "hyperproliferating cells" refers to cells that are growing, dividing, or proliferating at an inappropriate or non-normal time or place, and includes cells that have entered the cell cycle when they should be in G₀ or in a quiescent state. For example, tumor cells are included within the meaning of "hyperproliferating cells." Diseases or conditions characterized by or associated with "hyperproliferating cells" include cancer, autoimmunity, non-malignant growths, and psoriasis.

As used herein, "treating" includes the amelioration and/or elimination of a disease or condition. The term "treating" is used in reference to individuals suffering from a disease or condition characterized by or associated with hyperproliferating cells and is also used in reference to individuals exposed to and/or infected with WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*.

As used herein, the phrase "effective amount" in reference to treating an individual having a disease or condition, means a quantity sufficient to effectuate treatment and ameliorate and/or eliminate the disease or condition.

As used herein, the phrase "immunologically effective amount" in reference to vaccine compositions, means a quantity sufficient to induce a therapeutic or prophylactic immune response.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

As used herein, the phrase "prophylactic immune response" in reference to treating an individual against infection from a virus, means an immune response that is prophylactic and protects from challenge with the virus.

As used herein, the phrase "therapeutic immune response" in reference to treating an individual infected with a virus, means an immune response that ameliorates and/or eliminates the viral infection.

As used herein, the phrase "therapeutically effective amount" in reference to the amount of a vaccine administered to an individual, means a quantity sufficient to induce a therapeutic immune response in the individual.

As used herein, the phrase "prophylactically effective amount" in reference to the amount of a vaccine administered to an individual, means a quantity sufficient to induce a prophylactic immune response in the individual.

As used herein, "individual" refers to human and non-human animals that can be treated with pharmaceutical compositions or vaccine compositions of the invention.

As used herein, the term "administering" includes, but is not limited to, intra-tumoral injection, transdermal, parenteral, subcutaneous, intra-muscular, oral, and topical delivery.

As used herein, "intra-tumoral injection" in reference to administration of pharmaceutical compositions refers to the direct introduction of the pharmaceutical composition into a tumor site by injection.

Several aspects of the invention relate to the ability of capsid protein from WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or functional fragments thereof, to inhibit cell proliferation. Several aspects of the invention also relate to the ability of other viral proteins from other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or functional fragments thereof, to inhibit cell proliferation. The capsid or other protein induces cells to undergo apoptosis. In some embodiments, capsid protein from WNV or other virus including *Flaviviruses* or *Pestiviruses*, or a functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule that encodes it, is used in a pharmaceutical composition to treat individuals suffering from diseases characterized by or associated with undesirable cells, particularly hyperproliferating cells such as cancer. The WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid or other protein presents a target for the interruption of a vital viral function. Accordingly, in one aspect of the invention, anti-viral and/or anti-WNV and/or anti-*Flavivirus* or anti-*Pestivirus* compounds may be identified by

WO 02/28165

PCT/US01/31355

identifying compounds that inhibit the apoptosis-inducing activity of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein, or functional fragments thereof.

The present invention also relates to the use of functional fragments of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein, and/or a nucleic acid encoding functional fragments of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein, to induce apoptosis in cells, and to pharmaceutical compositions that comprise functional fragments of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein, and/or a nucleic acid encoding functional fragments of WNV or other viruses including *Flaviviruses* or *Pestiviruses* capsid or other protein. As used herein, a "functional fragment" of "capsid protein from WNV or a related *Flavivirus* or *Pestivirus*" refers to a fragment of WNV or related *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein which retains its ability to induce apoptosis of cells. As used herein, a "functional fragment" of "capsid or other protein from WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus*" refers to a fragment of WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* which retains its ability to induce apoptosis of cells. Functional fragments of WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid or other protein are at least about 10 amino acids in length, derived from WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid or other protein, and may comprise amino acid sequences that are not derived from the capsid or other protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*.

It has also been observed that a 22 amino acid residue peptide from the carboxy-terminal region of WNV Cp protein has apoptosis-inducing activity for certain embodiments of the invention. This peptide ("WNVC-P3", also referred to herein as "Peptide 3") is shown in Figure 10, and represents amino acid residues 90 through 110 of the WNV Cp protein. In particular, according to some embodiments of the invention, a functional fragment of WNV Cp protein includes peptide WNVC-P3, or a fragment thereof. The fragment of peptide WNVC-P3 comprises at least 3 amino acids. The fragment of peptide WNVC-P3 can be 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, or 21 amino acid residues in length. Peptide WNVC-P3 of WNV Cp protein, a fragment thereof, a fragment of Cp protein that includes peptide WNVC-P3 or fragment thereof, the Cp protein or a fusion protein, comprising Cp protein sequences and non-Cp protein sequences, can all be tested to determine whether they possess the apoptotic function of the wild type Cp protein.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Capsid protein from WNV Cp also shares homology with capsid and other proteins of other viruses, including, but not limited to, viruses in the *Flaviviridae* family, and viruses from many other virus families. The WNV Cp protein also shares homology and with non-viral proteins, including proapoptotic proteins of mammalian origin. Regions of homology/identity have been identified between the WNV Cp and the HIV-1 Vpr protein (which has apoptosis activity), Cp protein from Kunjin virus, Cp protein from Japanese encephalitis virus, Cp protein from Dengue virus, major capsid protein from herpes simplex virus, Ebola virus nuclear protein, Ebola virus glycoprotein, Rubella virus capsid protein, and with the following proapoptotic, non-viral proteins: human BAK protein, human Bcl-2 associated X protein, human BIK protein, human BID protein, and human Bad protein. Moreover, regions of homology/identity have been identified between HIV-1 Vpr protein and the p230 nonstructural protein of Sindbis virus, the 2A protein of cucumber mosaic virus, Rubella virus capsid protein, Nipah virus fusion protein, reovirus core-minor form Mu2 protein, and with the following the proapoptotic proteins: mouse BIM protein, rat BOD protein, mouse Mtd protein, human Bcl-2 associated X protein, and human Bad protein.

One having ordinary skill in the art can readily determine whether a protein or peptide is a functional fragment of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein by examining its sequence and testing its ability to induce apoptosis in cells without undue experimentation. Truncated versions of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein may be prepared and tested using routine methods and readily available starting material. As used herein, the term "functional fragment" is also meant to refer to peptides, polypeptides, and amino acid sequences linked by non-peptide bonds, or proteins which comprise an amino acid sequence that is identical to, or substantially homologous to at least a portion of the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein amino acid sequence, and which are capable of inducing apoptosis. The term "substantially homologous" refers to an amino acid sequence that has conservative substitutions. One having ordinary skill in the art can produce functional fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein following the disclosure provided herein and well known techniques. The functional fragments thus identified may be used and formulated in place of full length WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein without undue experimentation.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The present invention also relates to vaccines comprising immunogenic fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, and/or a nucleic acid encoding immunogenic fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, to induce prophylactic or therapeutic immune responses in individuals. As used herein, an "immunogenic fragment" of "capsid protein from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*" refers to a fragment of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein which is capable of inducing an immune response. Immunogenic fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein are at least about 10 amino acids in length, derived from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, and may comprise amino acid sequences that are not derived from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein. One having ordinary skill in the art can readily determine whether a protein or peptide is an immunogenic fragment of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein by the use of classical immunological assays to screen for antibody production in response to immunizations with fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein. These include, for example, 1) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 2) proliferation assays of cells from lymphoid organs, and 3) evaluation of the number of cells producing antibodies to a given antigen. Detailed protocols for these standard assays can be found in such manuals on immunology as Weir & Blackwell, eds., *Handbook of Experimental Immunology*, *supra* and Coligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, *supra*. One having ordinary skill in the art can produce and identify immunogenic fragments of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein following the disclosure provided herein and well known techniques. The immunogenic fragments thus identified may be used and formulated in place of full length WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein without undue experimentation.

Therapeutic aspects of the invention include use of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, a functional fragment of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, nucleic acid molecules encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or nucleic acid molecules encoding a functional fragment of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein in pharmaceutical compositions useful to treat an individual suffering from diseases characterized by or associated with hyperproliferating cells, such as cancer or psoriasis.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

One aspect of the present invention is to use WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, or nucleic acid molecules encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, in a pharmaceutical composition to combat diseases that are characterized by undesirable cells such as, but not limited to, those diseases characterized by the hyperproliferation of cells, such as cancer or psoriasis. According to the invention, pharmaceutical compositions are provided which comprise either WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, or a nucleic acid molecule which comprises a DNA or RNA sequence that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof.

Another aspect of the present invention relates to pharmaceutical compositions that comprise WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. Pharmaceutical compositions comprising WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, are useful for treating an individual having a pathology or condition characterized by hyperproliferating cells. As described herein, pharmaceutical compositions useful for treating diseases characterized by undesirable cells such as hyperproliferating cells may include WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, since WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, are by definition, agents which induce apoptotic death in cells. Pharmaceutical compositions of the present invention are particularly useful for treating cancer characterized by solid tumors. The ability to stimulate hyperproliferating cells to undergo apoptotic death provides a means to disrupt the hyperproliferation of the cells, thereby decreasing the tumor. In diseases such as cancer and psoriasis which are characterized by the inappropriate hyperproliferation of cells, the pharmaceutical composition is useful to arrest the hyperproliferation through an induction of an apoptotic cell death, thereby effectuating a treatment of the disease.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Accordingly, another aspect of the present invention is a method of treating an individual suffering from a disease associated with hyperproliferating cells, which comprises the step of administering to said individual an amount of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, sufficient to induce the apoptosis of said cells.

Another aspect of the present invention is a method of treating an individual suffering from a disease associated by undesirable cells such as autoimmune diseases, which comprises the step of administering to said individual an amount of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, sufficient to induce the apoptosis of said cells.

Another aspect of the present invention relates to vaccine compositions that comprise WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, and/or a nucleic acid molecule encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. Vaccine compositions comprising capsid protein from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, or an immunogenic fragment thereof, are useful for immunizing an individual against WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*. The immunity may be prophylactic (to prevent infection) or therapeutic (to treat infection). Where the immunity is prophylactic, the individual is protected against challenge with the virus. Where the immunity is therapeutic, the individual's current viral infection is treated.

Accordingly, an aspect of the present invention is a method of treating an individual suffering from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* infection, which comprises the step of administering to said individual an amount of capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, sufficient to stimulate a therapeutic immune response.

Another aspect of the present invention is a method of preventing WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* infection in an individual, which comprises the step of administering to said individual an amount of capsid protein, or an immunogenic fragment

WO 02/28165

PCT/US01/31355

thereof, from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, sufficient to stimulate a prophylactic immune response.

When capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, is delivered to an individual as a component in a vaccine (either directly as protein or by subsequent expression from a nucleic acid delivered in the vaccine), the capsid protein, or immunogenic fragment thereof, becomes a target against which the individual develops an immune response, protecting from infection (prophylactic), or treating an infection (therapeutic). Those of skill in the art will recognize that the immune response can be both therapeutic and prophylactic, in that following a therapeutic treatment, the individual may be protected from further challenge with the virus.

Capsid protein

WNV capsid protein, or functional fragments thereof, may be produced by routine means using readily available starting materials as described above. The nucleic acid sequence encoding WNV capsid protein as well as the amino acid sequence of the protein are well known. The entire genome for a number of WNV isolates are published and available in GenBank, including isolate 2741 (accession number AF206518), strain NY99-flamingo382-99 (accession number AF196835), the complete polyprotein gene of strain HNY1999 (accession number AF202541) and the isolate identified as accession number M12294, each of which is incorporated herein by reference. There are a variety of publications relating to sequence information for the WNV genome, citations of which are linked to the sequence information in GenBank. Each of these references, including the publicly available sequence information, is incorporated herein by reference.

Sequence information for capsid proteins and nucleic acids from other *Flaviviruses* or *Pestiviruses* can also be found in GenBank. By way of non-limiting examples, complete genome sequences of strains and isolates provided in GenBank include, JEV (accession number M18370, D90194, and D90195), SLEV (accession number M16614), YFV (accession numbers AF094612, U17067, U17066, U54798, U21055, U21056, and X03700), DENV (accession numbers M23027, U88535, U88536, and U88537), and BVDV (accession number M31182), each of which is incorporated herein by reference.

Provision of a suitable DNA sequence encoding a desired protein permits the production of the protein using recombinant techniques now known in the art. The coding sequence can be

WO 02/28165

PCT/US01/31355

obtained by, for example, cloning it from infected cells, using PCR primers designed based upon the publicly available sequence information. The DNA sequence may also be prepared chemically using a DNA synthesizer. When the coding DNA is prepared synthetically, advantage can be taken of known codon preferences of the intended host where the DNA is to be expressed. Additionally, changes may be introduced into the coding sequence, such as point mutations, insertions, or deletions, to create controls and other modified forms of the capsid protein.

One having ordinary skill in the art can, using well known techniques, obtain a DNA molecule encoding the WNV capsid protein or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein and insert that DNA molecule into a commercially available expression vector for use in well known expression systems. For example, the commercially available plasmid pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA) may be used for capsid protein production in *E. coli* bacteria cells. The commercially available plasmid pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) may be used for production in yeast cells, such as *S. cerevisiae*. The commercially available MaxBac 2.0 Kit (Invitrogen, San Diego, CA), with the pBlueBac4 vector, is a complete baculovirus expression system that may be used for the production of capsid protein in insect cells, such as Sf9 cells. The commercially available plasmid pcDNA I (Invitrogen, San Diego, CA) may be used for the production of capsid protein in mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells.

One having ordinary skill in the art can use these commercial expression vectors systems or others to produce WNV and other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid proteins using routine techniques and readily available starting materials.

One having ordinary skill in the art may use other commercially available expression vectors and systems or produce vectors using well known methods and readily available starting materials. Expression systems containing the requisite control sequences, such as promoters and polyadenylation signals, and preferably enhancers, are readily available and known in the art for a variety of hosts. See, e.g., Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols in Molecular Biology, *supra*. Thus, the desired proteins can be prepared in both prokaryotic and eukaryotic systems, resulting in a spectrum of processed forms of the protein.

The most commonly used prokaryotic system remains *E. coli*, although other systems such as *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* are also useful. Suitable control sequences for prokaryotic systems include both constitutive and inducible promoters including, but not limited

WO 02/28165

PCT/US01/31355

to, the *lac* promoter, the *trp* promoter, hybrid promoters such as the *tac* promoter, the lambda phage P1 promoter. In general, foreign proteins may be produced in these hosts either as fusion or mature proteins. When the desired sequences are produced as mature proteins, the sequence produced may be preceded by a methionine which is not necessarily efficiently removed. Accordingly, the peptides and proteins claimed herein may be preceded by an N-terminal Met when produced in bacteria. Moreover, constructs may be made wherein the coding sequence for the peptide is preceded by an operable signal peptide which results in the secretion of the protein. When produced in prokaryotic hosts in this matter, the signal sequence is removed upon secretion.

A wide variety of eukaryotic hosts are also now available for production of recombinant foreign proteins. As in bacteria, eukaryotic hosts may be transformed with expression systems which produce the desired protein directly, but more commonly signal sequences are provided to effect the secretion of the protein. Eukaryotic systems have the additional advantage that they are able to process introns which may occur in the genomic sequences encoding proteins of higher organisms. Eukaryotic systems also provide a variety of processing mechanisms which result in, for example, glycosylation, carboxy-terminal amidation, oxidation or derivatization of certain amino acid residues, conformational control, and so forth.

Commonly used eukaryotic systems include, but are not limited to, yeast cells, fungal cells, insect cells, mammalian cells, avian cells, and cells of higher plants. Suitable promoters are available which are compatible and operable for use in each of these host cell types. Also available, are termination sequences and enhancers, such as, for example, the baculovirus polyhedron promoter. As described above, promoters can be either constitutive or inducible. For example, in mammalian systems, the mouse metallothionein promoter can be induced by the addition of heavy metal ions.

The particulars for the construction of expression systems suitable for desired hosts are known to those in the art. For recombinant production of the protein, the DNA encoding it is suitably ligated into the expression vector of choice and then used to transform the compatible host which is then cultured and maintained under conditions wherein expression of the foreign gene takes place. The protein of the present invention thus produced is recovered from the culture, either by lysing the cells or from the culture medium as appropriate and known to those in the art.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

One having ordinary skill in the art can, using well known techniques, isolate the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein produced using such expression systems.

In addition to producing these proteins by recombinant techniques, automated amino acid synthesizers may also be employed to produce WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments thereof. It should be further noted that if the proteins herein are made synthetically, substitution by amino acids which are not encoded by the gene may also be made. Alternative residues include, for example, the amino acids of the formula $H_2N(CH_2)_nCOOH$ wherein n is 2-6. These are neutral, nonpolar amino acids, as are sarcosine (Sar), t-butylalanine (t-BuAla), t-butylglycine (t-BuGly), N-methyl isoleucine (N-Melle), and norleucine (Nleu). Phenylglycine, for example, can be substituted for Trp, Tyr or Phe, an aromatic neutral amino acid; citrulline (Cit) and methionine sulfoxide (MSO) are polar but neutral, cyclohexyl alanine (Cha) is neutral and nonpolar, cysteic acid (Cya) is acidic, and ornithine (Orn) is basic. The conformation conferring properties of the proline residues may be obtained if one or more of these is substituted by hydroxyproline (Hyp).

Portions of this disclosure relate to pharmaceutical compositions and other portions of the disclosure relate to therapeutic or prophylactic vaccines. The pharmaceutical compositions of the invention are intended to be administered to an individual for the purpose of killing cells and the vaccine compositions of the invention are intended to be administered to an individual for the purpose of inducing a prophylactic or therapeutic immune response against virus infection. The pharmaceutical compositions of the invention are administered in an amount effective for inducing apoptosis and killing cells. The vaccine compositions of the invention are administered in an amount effective for the purpose of inducing an immune response.

Whether the compositions are being prepared as pharmaceuticals or vaccines, many aspects of the composition, formulation, dosing, and administration of the pharmaceutical compositions and vaccine compositions of the invention are related, and can be identical, as will be readily appreciated by those of skill in the art. For example, both pharmaceutical compositions and vaccines of the invention may comprise WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a fragment thereof. The capsid protein, or fragment thereof, in the pharmaceutical composition will be functional in apoptosis activity, whereas, the capsid protein, or fragment thereof, in the vaccine will be immunogenic. Portions of the

WO 02/28165

PCT/US01/31355

disclosure concerning related aspects are considered to be relevant to both pharmaceutical compositions and to vaccines.

Pharmaceutical compositions used for treating diseases characterized by hyperproliferating cells comprising a WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent may be formulated by one of skill in the art with compositions selected depending upon the chosen mode of administration. Suitable pharmaceutical carriers are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.*, a standard reference text in this field.

A common requirement for any route of administration is efficient and easy delivery. In one embodiment of the invention, the pharmaceutical compositions are administered by injection. In a preferred embodiment, the compositions are administered by intra-tumoral injection. Other means of administration include, but are not limited to, transdermal, transcutaneous, subcutaneous, intraperitoneal, mucosal, or general persistent administration.

For parenteral administration, the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, can be, for example, formulated as a solution, suspension, emulsion or lyophilized powder in association with a pharmaceutically acceptable parenteral vehicle. Examples of such vehicles are water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and nonaqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The vehicle or lyophilized powder may contain additives that maintain isotonicity (e.g., sodium chloride, mannitol) and chemical stability (e.g., buffers and preservatives). The formulation is sterilized by commonly used techniques. For example, a parenteral composition suitable for administration by injection is prepared by dissolving 1.5% by weight of active ingredient in 0.9% sodium chloride solution.

Although individual needs may vary, the determination of optimal ranges for effective amounts of formulations is within the skill of the art. Human doses can also readily be extrapolated from animal studies (Katocs *et al.*, Chapter 27 In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, which is incorporated herein by reference). Generally, the dosage required to provide an effective amount of a formulation, which can be adjusted by one skilled in the art, will vary depending on several factors, including the age, health, physical condition, weight, type and extent of the disease or disorder of the recipient, frequency of treatment, the nature of concurrent therapy, if required, and the nature and scope of the desired effect(s) (Nies *et al.*, Chapter 3 In: *Goodman & Gilman's*

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.*, eds., McGraw-Hill, New York, NY, 1996, which is incorporated herein by reference). Usually, a daily dosage of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, can be about 1 µg to 100 milligrams per kilogram of body weight. Ordinarily 0.5 to 50, and preferably 1 to 10 milligrams per kilogram per day given in divided doses 1 to 6 times a day or in sustained release form is effective to obtain desired results.

The pharmaceutical compositions according to the present invention may be administered as a single doses or in multiple doses. The pharmaceutical compositions of the present invention may be administered either as individual therapeutic agents or in combination with other therapeutic agents. The treatments of the present invention may be combined with conventional therapies, which may be administered sequentially or simultaneously.

The pharmaceutical compositions comprising WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments or derivatives thereof, may be administered by any means that enables the active agent to reach the agent's site of action in the body of the recipient. Because proteins are subject to digestion when administered orally, parenteral administration, *i.e.*, intravenous, subcutaneous, intramuscular, would ordinarily be used to optimize absorption. In addition, the pharmaceutical compositions of the present invention may be injected at a site at or near hyperproliferative growth. For example, administration may be by direct injection into a solid tumor mass or in the tissue directly adjacent thereto. If the individual to be treated is suffering from psoriasis, the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, may be formulated with a pharmaceutically acceptable topical carrier and the formulation may be administered topically as a creme, lotion or ointment for example.

Vaccine compositions, used for prophylactic or therapeutic treatment against WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* infection in an individual, comprising a WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent, may be formulated by one of skill in the art with compositions selected depending upon the chosen mode of administration. Suitable pharmaceutical carriers for vaccines are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.*, a standard reference text in this field, and can include any carrier that does not itself induce the production of antibodies harmful to the individual receiving the composition. Suitable carriers include large, slowly metabolized macromolecules, such as proteins,

WO 02/28165

PCT/US01/31355

polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Such carriers are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, these carriers may function as immunostimulating agents ("adjuvants"). Furthermore, the antigen may be conjugated to a bacterial toxoid, such as a toxoid from diphtheria or tetanus.

Adjuvants that can be used with the vaccine compositions of the invention include, but are not limited to, (1) aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate, etc.; (2) oil-in-water emulsion formulations, such as for example, (a) Synthetic Adjuvant Formulation (SAF), available from Chiron (Emeryville, CA), and (b) Ribi Adjuvant System (RAS), (Corixa, Seattle, WA) containing detoxified endotoxin and mycobacterial cell wall components in 2% squalene; (3) water-in-oil formulations such as TiterMax, available from CytRx (Norcross, GA); (4) saponin adjuvants, such as Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) may be used or particles generated therefrom such as ISCOMS (immune-stimulating complexes); (4) Freund's Complete Adjuvant (FCA) and Freund's Incomplete Adjuvant (FIA); (5) cytokines, such as interleukins (IL-1, IL-2, etc.), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), and tumor necrosis factor (TNF), etc; and (6) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the immunological effectiveness of the vaccine composition.

Vaccine compositions of the invention typically will contain diluents, such as water, saline, glycerol, ethanol, etc. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH-buffering substances, and the like, may be present in such vehicles.

Vaccine compositions of the invention typically are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. Solid formulations, suitable for dissolving in, or suspending in, liquid vehicles prior to injection, may also be prepared. The preparation also may be emulsified or encapsulated in liposomes for enhanced adjuvant effect, as discussed above under pharmaceutically acceptable carriers.

The vaccine compositions of the present invention comprise an immunologically effective amount of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments or derivatives thereof, and may be administered by any means that enables the recipient's immune system to generate a prophylactic or therapeutic immune response. The immunologically effective amount of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments or derivatives thereof, is the quantity administered to an

WO 02/28165

PCT/US01/31355

individual, either in a single dose or as part of a series, that is effective for therapeutic or prophylactic treatment of the individual. This amount varies depending upon the health and physical condition of the individual to be treated, the taxonomic group of individual to be treated (e.g., nonhuman primate, primate, etc.), the capacity of the individual's immune system to synthesize antibodies, the degree of protection desired, the formulation of the vaccine, the treating physician's assessment of the medical situation, and other relevant factors. It is expected that the amount will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials.

A common requirement for any route of administration is efficient and easy delivery. In one embodiment of the invention, the vaccine compositions are administered parenterally, e.g., by injection, either subcutaneous or intramuscular injection. Other means of administration include, but are not limited to, transdermal, transcutaneous, intraperitoneal, mucosal, or general persistent administration. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule. The vaccine may be administered in conjunction with other immunoregulatory agents and/or in conjunction with other vaccines.

Nucleic acid

Another aspect of the present invention relates to pharmaceutical compositions that comprise a nucleic acid molecule that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. According to the present invention, genetic material that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, is delivered to an individual in an expressible form. The genetic material, DNA or RNA, is taken up by the cells of the individual and expressed. The WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, that is thereby produced can induce the apoptotic death of the hyperproliferating cells. Thus, pharmaceutical compositions comprising genetic material that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, are useful in the same manner as pharmaceutical compositions comprising WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments thereof: for treating an individual having a pathology or condition characterized by or associated with hyperproliferating cells. Pharmaceutical compositions of the present invention are particularly useful for treating cancer characterized by solid tumors.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Thus, a further aspect of the present invention relates to a method of treating an individual suffering from a disease associated with hyperproliferating cells which comprises the step of administering to said individual an amount of nucleic acid that comprises a nucleotide sequence that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, operably linked to regulatory elements necessary for expression.

Another aspect of the present invention relates to vaccine compositions that comprise a nucleic acid molecule that encodes capsid protein, or immunogenic fragment thereof, from WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. According to the present invention, genetic material that encodes capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, is delivered to an individual in an expressible form. The genetic material, DNA or RNA, is taken up by the cells of the individual and expressed. The capsid protein, or immunogenic fragment thereof, that is thereby produced serves to induce an immune response in the individual. Thus, vaccine compositions comprising genetic material that encodes capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, are useful in the same manner as vaccine compositions comprising capsid protein: for immunizing individuals. The immunity can be prophylactic if the individual is uninfected and therapeutic if the individual is infected. Accordingly, further aspects of the present invention relate to a method of preventing infection or treating infected individuals.

Nucleotide sequences that encode WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, operably linked to regulatory elements necessary for expression in the individual's cell, may be delivered as pharmaceutical compositions using gene therapy strategies which include, but are not limited to, either viral vectors such as adenovirus or retrovirus vectors or direct nucleic acid transfer. Methods of delivery of nucleic acids encoding proteins of interest, using viral vectors are widely reported. A recombinant viral vector such as a retroviral vector, adenovirus or adeno-associated viral vector is prepared using routine methods and starting materials. The recombinant viral vector comprises a nucleotide sequence that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof. Such a vector is combined with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The resulting pharmaceutical preparation may be administered to an individual. Once an individual is infected with the viral vector, WNV or

WO 02/28165

PCT/US01/31355

other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, is produced in the infected cells.

Nucleotide sequences that encode WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or immunogenic fragments thereof, operably linked to regulatory elements necessary for expression in the individual's cell, may be delivered as vaccine compositions comprising viral vectors, such as adenovirus, adeno-associated virus, vaccinia virus or retrovirus vectors, or bacterial or mycobacterial vectors. Furthermore, the nucleotide sequences can be incorporated within live and/or attenuated vaccines.

Alternatively, a molecule which comprises a nucleotide sequence that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional or immunogenic fragment thereof, can be administered as a pharmaceutical composition or vaccine by direct nucleic acid transfer, without the use of infectious vectors. The nucleic acid molecule may be DNA or RNA, preferably DNA. The DNA molecule may be linear or circular; it is preferably a plasmid. The nucleic acid molecule is combined with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

As described above, many aspects of the composition, formulation, dosing, and administration of the pharmaceutical compositions and vaccines of the invention are related, and can be identical. For example, both pharmaceutical compositions and vaccines of the invention may comprise a nucleic acid encoding WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or fragment thereof. The encoded capsid protein, or fragment thereof, in the pharmaceutical composition will be functional in apoptosis activity, whereas, the encoded capsid protein, or fragment thereof, in the vaccine will be immunogenic. Portions of the disclosure concerning related aspects are considered to be relevant to both pharmaceutical compositions and to vaccines.

Importantly, in pharmaceutical compositions, the amount of nucleic acid must be sufficient so that it will be sufficiently expressed to induce cell death. If the nucleic acid encodes a fragment, the fragment must be a functional fragment. The immunogenicity is not a relevant feature in the pharmaceutical composition. In the vaccine compositions, on the other hand, the immunogenicity is critical. The primary activity of vaccines is in the induction of a prophylactic or therapeutic immune response. If a fragment is encoded by the nucleic acid it must be an immunogenic fragment.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

According to the invention, the pharmaceutical composition or vaccine comprising a nucleic acid sequence that encodes WNV or a other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, may be administered directly into the individual. The genetic material is introduced into cells which are present in the body of the individual. Preferred routes of administration include intramuscular, intraperitoneal, intradermal and subcutaneous injection. Alternatively, the pharmaceutical composition may be introduced by various means into cells that are removed from the individual. Such means include, for example, transfection, electroporation and microprojectile bombardment. After the nucleic acid molecule is taken up by the cells, they are reimplanted into the individual. It is contemplated that otherwise non-immunogenic cells that have genetic constructs incorporated therein can be implanted into the individual even if the vaccinated cells were originally taken from another individual.

Genetic constructs may be administered by means including, but not limited to, traditional syringes, needleless injection devices, or "microprojectile bombardment gene guns." According to some embodiments of the present invention, the genetic construct is administered to an individual using a needleless injection device. According to some embodiments of the present invention, the genetic construct is simultaneously administered to an individual intradermally, subcutaneously and intramuscularly using a needleless injection device. Needleless injection devices are well known and widely available. One having ordinary skill in the art can, following the teachings herein, use needleless injection devices to deliver genetic material to cells of an individual. Needleless injection devices are well suited to deliver genetic material to all tissue. They are particularly useful to deliver genetic material to skin and muscle cells. In some embodiments, a needleless injection device may be used to propel a liquid that contains DNA molecules toward the surface of the individual's skin. The liquid is propelled at a sufficient velocity such that upon impact with the skin the liquid penetrates the surface of the skin, permeates the skin and muscle tissue therebeneath. Thus, the genetic material is simultaneously administered intradermally, subcutaneously and intramuscularly. In some embodiments, a needleless injection device may be used to deliver genetic material to tissue of other organs in order to introduce a nucleic acid molecule to cells of that organ.

According to the invention, the genetic vaccine may be administered directly into the individual to be immunized or *ex vivo* into removed cells of the individual which are reimplanted after administration. By either route, the genetic material is introduced into cells which are

WO 02/28165

PCT/US01/31355

present in the body of the individual. Routes of administration include, but are not limited to, intramuscular, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous, intravenous, intraarterially, intraocularly and oral as well as transdermally or by inhalation or suppository. Preferred routes of administration include intramuscular, intraperitoneal, intradermal and subcutaneous injection.

The pharmaceutical or vaccine compositions according to the present invention comprise about 1 nanogram to about 2000 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, pharmaceutical or vaccine compositions according to the present invention comprise about 5 nanogram to about 1000 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical or vaccine compositions contain about 10 nanograms to about 800 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical or vaccine compositions contain about 0.1 to about 500 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical or vaccine compositions contain about 1 to about 350 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical or vaccine compositions contain about 25 to about 250 micrograms of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical or vaccine compositions contain about 100 to about 200 micrograms DNA.

The pharmaceutical or vaccine compositions according to the present invention are formulated according to the mode of administration to be used. In cases where pharmaceutical or vaccine compositions are injectable pharmaceutical compositions, they are sterile, pyrogen free and particulate free. An isotonic formulation is preferably used. Generally, additives for isotonicity can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol and lactose. In some cases, isotonic solutions such as phosphate buffered saline are preferred. Stabilizers include gelatin and albumin. In some embodiments, a vasoconstriction agent is added to the formulation.

In some embodiments, nucleic acid molecules are delivered to the cells in conjunction with administration of a polynucleotide function enhancer or a "genetic vaccine facilitator" (GVF) agent. Polynucleotide function enhancers are described in U.S. Patent No. 5,593,972, U.S. Patent No. 5,981,505, and International Application Serial Number PCT/US94/00899, filed January 26, 1994, which are each incorporated herein by reference. GVF agents are described in U.S. Patent No. 5,739,118, U.S. Patent No. 5,837,533, and International Application Serial Number PCT/US99/04332, international filing date February 26, 1999, each of which is incorporated herein by reference.

The co-agents, which are administered in conjunction with nucleic acid molecules, may be administered as a mixture with the nucleic acid molecule, or may be administered separately,

WO 02/28165

PCT/US01/31355

simultaneously, before, or after administration of the nucleic acid molecules. In addition, other agents which may function as transfecting agents and/or replicating agents and/or inflammatory agents, and which may be co-administered with or without a GVF, include growth factors, cytokines, and lymphokines, such as α -interferon, γ -interferon, platelet derived growth factor (PDGF), tumor necrosis factor (TNF), epidermal growth factor (EGF), interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12, as well as fibroblast growth factor, surface active agents, such as immune-stimulating complexes (ISCMS), Freund's incomplete adjuvant, lipopolysaccharide (LPS) analogs, including monophosphoryl Lipid A (MPL), muramyl peptides, quinone analogs, vesicles, squalene, and squalene and hyaluronic acid. In some embodiments, an immunomodulating protein may be used as a GVF.

Nucleic acid molecules which are delivered to cells according to the invention may serve as genetic templates for proteins that function as prophylactic and/or therapeutic immunizing agents. In preferred embodiments, the nucleic acid the nucleic acid molecules comprise the necessary regulatory sequences for transcription and translation of the coding region in the cells of the animal.

The present invention relates to improved attenuated live vaccines and improved vaccines which use recombinant vectors to deliver foreign genes that encode antigens. Examples of attenuated live vaccines and those using recombinant vectors to deliver foreign antigens are described in U.S. Patent Nos.: 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; and 5,482,713, each of which is incorporated herein by reference. Gene constructs are provided which include the nucleotide sequence that encodes the capsid protein is operably linked to regulatory sequences that can function in the vaccinee to effect expression. The gene constructs are incorporated in the attenuated live vaccines and recombinant vaccines to produce vaccines according to the invention.

The pharmaceutical and vaccine compositions according to this aspect of the present invention comprise about 0.1 μ g to about 1000 μ g of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical and vaccine compositions contain about 1 μ g to about 500 μ g of DNA. In some preferred embodiments, the pharmaceutical and vaccine compositions contain about 25 μ g to about 250 μ g of DNA. Most preferably, the pharmaceutical and vaccine compositions contain about 100 μ g DNA.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The pharmaceutical and vaccine compositions according to this aspect of the present invention are formulated according to the mode of administration to be used, as discussed above. One having ordinary skill in the art can readily formulate a nucleic acid molecule that encodes WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof. In cases where intramuscular injection is the chosen mode of administration, an isotonic formulation is used. Generally, additives for isotonicity can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol and lactose. Isotonic solutions such as phosphate buffered saline may be used. Stabilizers include gelatin and albumin. In vaccine compositions, the addition of adjuvants or immunostimulating agents may be desirable.

Apoptosis assay

Another aspect of the present invention relates to a method of identifying compounds which inhibit the WNV Cp or capsid or other protein of other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*, or a functional fragment thereof, from inducing cells to undergo apoptosis which comprises the steps of first contacting, in the presence of a test compound, said cells with an amount of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid or other protein, or a functional fragment thereof, sufficient to induce a detectable level of apoptosis, and then observing said cells to determine if apoptosis occurs in the presence of the test compound. Compounds which interfere with the apoptosis-inducing activity of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid or other protein, or functional fragments thereof, may be useful as drugs for combating the virus and treating WNV and other virus infections including *Flavivirus* or *Pestivirus* infections.

According to this aspect of the invention, compounds are identified which inhibit the ability of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments thereof, to induce apoptosis in hyperproliferating cells. An assay is provided which compares apoptosis induction by WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, in the presence or absence of test compounds. Using this assay, compounds can be identified that inhibit the apoptosis-inducing activity of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragments thereof. Such compounds may be useful as anti-WNV and/or anti-*Flavivirus* or anti-*Pestivirus* therapeutics.

The method of the present invention comprises the step of contacting cells with WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof,

WO 02/28165

PCT/US01/31355

in the presence of a test compound. The cells can then be observed to determine if the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, induces apoptosis. A control may be provided in which cells are contacted with WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, in the absence of test compound. A further control may be provided in which the test compound is contacted with cells in the absence of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof. If the cells contacted with WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, in the presence of the test compound do not undergo apoptosis, then an anti-apoptotic activity is indicated for the test compound. This can be confirmed if cells contacted with WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, in the absence of the test compound detectably undergo apoptosis and the cells contacted with the test compound in the absence of WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, do not.

A test compound is provided, preferably in solution. Serial dilutions of test compounds may be used in a series of assays. Test compounds may be added at concentrations from 0.01 μ M to 1M. A preferred range of final concentrations of a test compound is from 10 μ M to 100 μ M.

WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, may be added into the assay by a variety of means. In some embodiments of the invention, it is combined with cells as a protein. The WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, may be added directly to cell culture medium. WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, may be produced from widely available starting materials using well known techniques, such as those described above. A preferred concentration range of the WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, used is about 1 μ g/ml to 1 mg/ml.

In other embodiments of the invention, WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, is expressed from a nucleic acid, in the cells in the assay. In a non-limiting example, WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, may be expressed within the cells of the assay from a nucleic acid, under the control of an inducible promoter.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The observation of apoptosis in the cells is carried out by methods that detect the hallmark cellular changes or "markers of apoptosis." For example, early during apoptosis, alterations to the cellular membrane result in an externalization of phosphatidylserine (PS) in the cell membrane prior to eventual cell death. The constant exposure of PS during apoptosis makes it a useful "marker of apoptosis," and an attractive target for a variety of detection techniques. Annexin V, which is an endogenous human protein having a high affinity for PS, presents a convenient reagent for identifying cells undergoing apoptosis. Fluorescence-labeled annexin V can be used for histologic and cell-sorting studies to identify apoptotic cells. For example, annexin V can be conjugated to phycoerythrin (PE), a large molecule containing 25 fluorophores, and one of the brightest dyes used today. PE can be purchased commercially, or isolated from algae by known isolation techniques. Conjugation techniques are known to those skilled in that art, and conjugation kits can be purchased from various vendors, including ProZyme, Inc. (San Leandro, CA). For further details and protocols on conjugating fluorescent proteins for use in flow cytometry and other applications, see Hardy, R., Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry, *in* Handbook of Experimental Immunology, 4th ed., Weir, Herzenberg, & Herzenberg, eds., Blackwell Scientific Pubs., Boston, 1986, which is incorporated herein by reference. Additionally, radiolabeled annexin V is useful for radiopharmaceutical imaging of apoptosing cells within tumors in the body.

Another "marker of apoptosis" is represented by the free 3'-hydroxy DNA termini, generated by the internucleosomal fragmentation of the cellular DNA by selectively activated DNases. Such free 3'-hydroxy DNA termini are not present in the intact genomic DNA of healthy cells, nor are they present when cells die via necrosis. Apoptosis-associated free 3'-hydroxy DNA termini can be detected *in situ* by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. For a review of techniques for detecting DNA cleavage during apoptosis, see Kaufmann *et al.*, 2000, Methods Enzymol., 322:3-15, which is incorporated herein by reference.

The internucleosomal fragmentation associated with apoptosis can also be detected by a sandwich assay that uses a pair of monoclonal antibodies specific for two nucleosomal epitopes to capture and detect cytoplasmic nucleosomes onto an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate. Salgame, *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res., 25:680-681, which is incorporated herein by reference. This assay is particularly amenable to large scale screening of tissue culture cells.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

The apoptosis detection assay may be performed using many different types of cells and delivery of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, through a variety of means. One having ordinary skill in the art, following the teachings of the Specification, can readily appreciate the several ways to practice this aspect of the present invention. In preferred embodiments of the invention, the assay is performed using tumor-derived cell lines, such as the adenocarcinoma-derived HeLa cell line and the rhabdomyosarcoma-derived RD cell line, or using transformed cells, such as the adenovirus DNA-transformed kidney cell line 293.

A further aspect of the present invention relates to kits for practicing the above described method of identifying compounds which inhibit WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, apoptosis-inducing activity. Kits according to this aspect of the invention comprise a container comprising WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof, and at least one of the following: instructions, controls, and photos or figures depicting data. Additionally, a kit may comprise a second container comprising a reagent for detecting apoptosis, such as phycoerythrin (PE)-conjugated annexin V. Alternately, the instructions can direct the user of the kit to utilize any of the many known methods of detecting markers of apoptosis. The kit may also provide the user with the cells to carry out the assay. For example, a vial of cryopreserved tumor cells may be included with the kit.

Diagnostics

There is a great need to develop diagnostic tests by which to detect the presence of antibodies to proteins from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*.

The present invention relates to a diagnostic test in which the presence and/or amount of capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* in a test sample is determined. The present invention provides anti-capsid protein antibodies that recognize capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*. The presence of capsid protein in a test sample from an individual may also be an excellent indicator of infection.

The present invention relates to methods of identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* by detecting presence of capsid protein in a sample. The antibodies are preferably monoclonal antibodies. The antibodies are preferably raised against capsid protein made in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Quantification of the amount of capsid protein present in a sample of an individual may be used in determining the prognosis of an infected individual.

The present invention relates to antibodies which specifically bind to capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*. The antibodies are preferably monoclonal antibodies. The antibodies are preferably raised against capsid protein made in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells.

The present invention relates to kits for identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising a first container which contains antibodies which specifically bind to capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* and a second container which contains capsid protein as a positive control. The antibodies are preferably monoclonal antibodies. The antibodies are preferably raised against capsid protein made in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells. The capsid protein is preferably made in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells. The kits may be adapted for quantifying of the amount of capsid protein present in a sample of an individual.

Another aspect of the invention is a diagnostic test in which the presence and/or amount of anti-capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* antibodies in a test sample is determined. In the diagnostic method of the present invention, the presence of anti-capsid protein antibodies in a test sample from an individual is an indicator of infection.

The present invention relates to methods of identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* by detecting presence of antibodies against capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* in sample using capsid protein. The capsid protein is preferably produced in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells. Quantification of the amount of anti-capsid protein antibodies present in a sample of an individual may be used in determining the prognosis of an infected individual.

The present invention relates to isolated capsid protein. The capsid protein is preferably produced in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells.

The present invention relates to kits for identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising a first container which contains antibodies which specifically bind to capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* and a second container which contains capsid protein. The capsid protein is preferably produced in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells. The antibodies are preferably raised against capsid made in human cells, CHO cells, insect cells or yeast cells. The kits may

WO 02/28165

PCT/US01/31355

be adapted for quantifying the amount of anti-capsid protein antibodies present in a sample of an individual. Such information may be used in determining the prognosis of an infected individual.

Kits for the detection of capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* and anti-capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* antibodies are useful for research as well as diagnostic and prognostic purposes.

The means to detect the presence of a protein or an antibody in a test sample are routine and one having ordinary skill in the art can detect the presence or absence of a protein or an antibody using well known methods. One well known method of detecting the presence of a protein or an antibody is in a binding assay. One having ordinary skill in the art can readily appreciate the multitude of ways to practice a binding assay to detect the presence of a protein or an antibody. For example, antibodies are useful for immunoassays which detect or quantitate a specific protein. Antigens are useful for immunoassays which detect or quantitate a specific antibody. Some immunoassays comprise allowing proteins in the test sample to bind a solid phase support or to antibodies fixed to a solid phase. Detectable antibodies are then added which selectively binding to either the protein of interest or the uncomplexed antibody. Detection of the detectable antibody indicates the presence of the protein of interest if the detectable antibody is specific for the protein or the absence of the protein of interest if the detectable antibody is specific for uncomplexed antibody. Some immunoassays comprise allowing antibodies in the test sample to bind to an antigen that is fixed to a solid phase support and detecting the antigen/antibody complex using a detectable antibody which binds to either the antibody of interest or the antigen. Various immunoassay procedures are described in *Immunoassays for the 80's*, A. Voller *et al.*, eds., University Park Press, Baltimore (1981), which is incorporated herein by reference.

Simple binding assays may be performed in which a solid phase support is contacted with the test sample. Any proteins present in the test sample bind the solid phase support and can be detected by a specific, detectable antibody preparation. Such a technique is the essence of the dot blot, Western blot and other such similar assays. The presence of specific antibodies in a test sample may also be detected in a similar manner. A target protein, to which the specific antibody binds, is contacted with the test sample and the subsequent binding to antibodies, if present in the test sample, is analyzed by a variety of methods known to those skilled in the art.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Any antibodies present in the test sample bind the solid phase support and can be detected by detectable antigen or a specific, detectable antibody preparation.

Other immunoassays may be more complicated but actually provide excellent results. Typical and preferred immunometric assays include "forward" assays for the detection of a protein in which a first anti-protein antibody bound to a solid phase support is contacted with the test sample. After a suitable incubation period, the solid phase support is washed to remove unbound protein. A second, distinct anti-protein antibody is then added which is specific for a portion of the specific protein not recognized by the first antibody. The second antibody is preferably detectable. After a second incubation period to permit the detectable antibody to complex with the specific protein bound to the solid phase support through the first antibody, the solid phase support is washed a second time to remove the unbound detectable antibody. Alternatively, the second antibody may not be detectable. In this case, a third detectable antibody, which binds the second antibody is added to the system. This type of "forward sandwich" assay may be a simple yes/no assay to determine whether binding has occurred or may be made quantitative by comparing the amount of detectable antibody with that obtained in a control. Such "two-site" or "sandwich" assays are described by Wide, *Radioimmune Assay Method*, Kirkham, ed., E. & S. Livingstone, Edinburgh (1970) pp. 199-206, which is incorporated herein by reference.

The "forward" assay may also be adapted for the detection of antibodies that may be present in a test sample, henceforth referred to as "sample antibodies." The specific target protein to which the sample antibodies bind is bound to the solid phase support and contacted with the test sample. After a suitable incubation period, the solid phase support is washed to remove unbound sample antibodies. A first antibody that binds to the Fc portion of the sample antibodies is added. This first antibody is preferably detectable. Alternative, in the case where the first antibody is not detectable, a second detectable antibody which binds the first antibody must be used to detect the binding. After a second incubation period to permit the detectable antibody to complex with the sample antibody bound to the target protein/solid phase support, the solid phase support is washed a second time to remove the unbound detectable antibody. This type of "forward sandwich" assay may also be a simple yes/no assay to determine whether binding has occurred or may be made quantitative by comparing the measure of detectable antibody with that obtained in a control.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Other types of immunometric assays are the so-called "simultaneous" and "reverse" assays. A simultaneous assay involves a single incubation step wherein the first antibody bound to the solid phase support, the second, detectable antibody and the test sample are added at the same time. After the incubation is completed, the solid phase support is washed to remove unbound proteins. The presence of detectable antibody associated with the solid support is then determined as it would be in a conventional "forward sandwich" assay. The simultaneous assay may also be adapted in a similar manner for the detection of antibodies in a test sample.

The "reverse" assay comprises the stepwise addition of a solution of detectable antibody to the test sample followed by an incubation period and the addition of antibody bound to a solid phase support after an additional incubation period. The solid phase support is washed in conventional fashion to remove unbound protein/antibody complexes and unreacted detectable antibody. The determination of detectable antibody associated with the solid phase support is then determined as in the "simultaneous" and "forward" assays. The reverse assay may also be adapted in a similar manner for the detection of antibodies in a test sample.

The first component of the immunometric assay may be added to nitrocellulose or other solid phase support which is capable of immobilizing proteins. The first component for determining the presence of capsid protein from WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* in a test sample is anti-capsid protein antibody, whereas the first component for examining for the presence of anti-capsid protein antibodies in a test sample is capsid protein. By "solid phase support" or "support" is intended any material capable of binding proteins. Well-known solid phase supports include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses, and magnetite. The nature of the support can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Those skilled in the art will know many other suitable "solid phase supports" for binding proteins or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation. A preferred solid phase support is a 96-well microtiter plate.

To detect the presence of a protein, in this case either capsid protein or anti-capsid protein antibodies, detectable antibodies, such as anti-capsid protein antibodies or anti-human antibodies, are used. Several methods are well known for the detection of antibodies.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

One method in which the antibodies can be detected is by linking the antibodies to an enzyme and subsequently using the antibodies in an enzyme immunoassay (EIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), such as a capture ELISA. The enzyme, when subsequently exposed to its substrate, reacts with the substrate and generates a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or visual means. Enzymes which can be used to detectably label antibodies include, but are not limited to malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. One skilled in the art would readily recognize other enzymes which may also be used.

Another method in which antibodies can be detected is by linking the antibodies to radioactive isotopes for subsequent use in a radioimmunoassay (RIA) (*see*, for example, Work, T.S. *et al.*, *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, North Holland Publishing Co., NY (1978), which is incorporated herein by reference). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography. Isotopes which are particularly useful for the purpose of the present invention are ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , and ^{14}C . Preferably ^{125}I is the isotope. One skilled in the art would readily recognize other radioisotopes which may also be used.

It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When the fluorescent-labeled antibody is exposed to light of the proper wave length, its presence can be detected due to its fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, 9-phthaldehyde and fluorescamine. One skilled in the art would readily recognize other fluorescent compounds which may also be used.

Antibodies can also be detectably labeled using fluorescence-emitting metals such as ^{152}Eu , or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the protein-specific antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA). One skilled in the art would readily recognize other fluorescence-emitting metals as well as other metal chelating groups which may also be used.

Antibodies can also be detectably labeled by coupling to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-labeled antibody is determined by detecting the presence

WO 02/28165

PCT/US01/31355

of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, thionin acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester. One skilled in the art would readily recognize other chemiluminescent compounds which may also be used.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label antibodies. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase, and aequorin. One skilled in the art would readily recognize other bioluminescent compounds which may also be used.

Detection of the protein-specific antibody, fragment or derivative may be accomplished by a scintillation counter if, for example, the detectable label is a radioactive gamma emitter. Alternatively, detection may be accomplished by a fluorometer if, for example, the label is a fluorescent material. In the case of an enzyme label, the detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards. One skilled in the art would readily recognize other appropriate methods of detection which may also be used.

The binding activity of a given lot of antibodies may be determined according to well known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

Positive and negative controls may be performed in which known amounts of protein and no protein, respectively, are added to the assay. One skilled in the art would have the necessary knowledge to perform the appropriate controls. To determine the quantity of capsid protein or anti-capsid protein antibodies in a test sample, the amount of protein detected in the test sample is compared to the amount of protein detected in the positive control. A standard curve is generated from the positive control values and the amount of protein in the test sample is extrapolated from said standard curve. One skilled in the art would have the knowledge to construct a standard curve and extrapolate the value of the test sample.

Test samples include those samples that are obtained from individuals suspected of being infected by WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus* may consist of blood, cerebral spinal fluid, amniotic fluid, lymph, semen, vaginal fluid or other body fluids. Test

WO 02/28165

PCT/US01/31355

samples also include those samples prepared in the laboratory, such as those used for research purposes. Cells, if present, may be removed by methods such as centrifugation or lysis. One skilled in the art would readily appreciate the variety of test samples that may be examined for capsid protein and anti-capsid protein antibodies. Test samples may be obtained by such methods as withdrawing fluid with a needle or by a swab. One skilled in the art would readily recognize other methods of obtaining test samples.

An "antibody composition" refers to the antibody or antibodies required for the detection of the protein. For example, the antibody composition used for the detection of capsid protein in a test sample comprises a first antibody that binds to capsid protein as well as a second or third detectable antibody that binds the first or second antibody, respectively.

To examine a test sample for the presence of anti-capsid protein antibodies, a standard immunometric assay may be performed. 10-50 µg/ml of capsid protein is added to a solid phase support, such as a 96-well microtiter plate, in a volume of buffer. 50 µl are added per well. The solid phase support is incubated for a period of time sufficient for binding to occur and subsequently washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove unbound capsid protein. Examples of appropriate conditions are 2 hours at room temperature or 4°C overnight. The solid phase support is then blocked with a PBS/BSA solution to prevent proteins in the test sample from nonspecifically binding the solid phase support. Serial dilutions of test sample are added to the solid phase support which is subsequently incubated for a period of time sufficient for binding to occur. The solid phase support is washed with PBS to remove unbound protein. Labeled anti-human antibodies, which recognize the Fc region of human antibodies, are added to the solid phase support mixture. The plate is incubated for a period of time sufficient for binding to occur and subsequently washed with PBS to remove unbound labeled anti-human antibody. The amount of bound labeled anti-human antibodies is subsequently determined by standard techniques. The anti-human antibodies that may be used include horseradish peroxidase-labeled, goat anti-human antibodies (Boehringer Mannheim), used at 1:12,000 according to the manufacturer's directions.

To examine a test sample for the presence of capsid protein, a standard immunometric assay such as the one described below may be performed. A first anti-capsid protein antibody, which recognizes a specific portion of capsid protein is added to a 96-well microtiter plate in a volume of buffer. The plate is incubated for a period of time sufficient for binding to occur and subsequently washed with PBS to remove unbound anti-capsid protein antibody. The plate is

WO 02/28165

PCT/US01/31355

then blocked with a PBS/BSA solution to prevent sample proteins from nonspecifically binding the microtiter plate. Serial dilutions of test sample are subsequently added to the wells and the plate is incubated for a period of time sufficient for binding to occur. The wells are washed with PBS to remove unbound protein. Labeled anti-capsid protein antibodies, which recognize portions of capsid protein not recognized by the first anti-capsid protein antibody are added to the wells. The plate is incubated for a period of time sufficient for binding to occur and subsequently washed with PBS to remove unbound, labeled anti-capsid protein antibody. The amount of bound labeled anti-capsid protein antibody is subsequently determined by standard techniques. A rabbit anti-capsid antibody that recognizes capsid protein is used at 1:1000. Examples of appropriate conditions are 2 hours at room temperature or 4°C overnight.

Kits which are useful for the detection of capsid protein in a test sample, comprise solid support, positive and negative controls, buffer, appropriate anti-capsid protein antibodies and instructions for carrying out the capture ELISA assay essentially as previously described. Kits which are useful for the detection of anti-capsid protein antibodies in a test sample, comprise solid support, positive and negative controls, buffer, capsid protein and instructions for carrying out the capture ELISA assay essentially as previously described.

While the portions of the disclosure herein which relate to therapeutic compositions and methods primarily relate to therapeutics and methods of treating humans, the compositions and methods of the present invention can be applied to veterinary medical uses as well. It is within the scope of the present invention to provide methods of treating non-human as well as human individuals. Accordingly, the present invention relates to a method of treating all animals, particularly mammalian species including human, bovine, ovine, porcine, equine, canine and feline species.

The invention is further illustrated by way of the following examples which are intended to elucidate the invention. These examples are not intended, nor are they to be construed, as limiting the scope of the invention. It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as particularly described herein. Numerous modifications and variations of the present invention are possible in view of the teachings herein and, therefore, are within the scope of the invention.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

EXAMPLES**Example 1: Capsid Protein Expression Constructs.**

Two WNV capsid protein (Cp) expression vectors (pWNVh-DJY and pWNVy-DJY) were constructed, based on the reported polyprotein gene sequence for the New York 1999 human isolate of the virus (WNV-HNY1999) (GenBank accession number AF202541, Jia *et al.*, 1999, Lancet, 354:1971-1972). The genomic organization of WNV-HNY1999 is presented in the top portion of Figure 1. The construction of the vectors is presented schematically in the bottom portion of Figure 1. Each construct contains the coding sequence for a signal peptide (leader sequence) from a human IgE (sIgE) fused 5' upstream of the Cp open reading frame (ORF), minus the coding sequence for the first amino acid of Cp (the first amino acid residue (met) is deleted). The clones were constructed using an overlapping PCR approach with three separate PCR reactions, using primer sets designed to introduce species-optimized codons (Kim *et al.*, 1997, Gene, 199:293-301, which is incorporated herein by reference) into the final constructs. The pWNVh-DJY construct contains human-optimized codons for the entire fused sIgE signal peptide/Cp coding sequence. The pWNVy-DJY construct contains yeast-optimized codons for the signal peptide and codons for Cp protein amino acid residues 2 through 6, and human-optimized codons for the rest of the Cp coding sequence. In addition, a proper Kozak sequence was introduced upstream of the signal peptide coding sequence, by use of the PCR primers. Each coding sequence was cloned into pcDNA3.1/V5-HisC (Invitrogen, San Diego, CA), between the HindIII and NotI polycloning sites, to yield expression constructs under the control of the CMV promoter that will express a Cp-His tag fusion protein. Both constructs encode identical proteins having an amino-terminal sIgE leader peptide, fused to amino acids 2 through 123 of WNV Cp protein, followed by the V5 epitope, and a polyhistidine carboxy-terminal tail.

The overlapping PCR construction made use of the following ten primers:

Primer 1. sIgh-VChU1+ (90mer)

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTCTGGTGGCCGCCGCCACCCGCGTGACAGCT
CTAAGAAACCAGGAGGCCCGGCAAGAGCCGCGCC (SEQ ID NO:14).

Primer 2. sIgy-VCyU1.1+ (90mer)

ATGGATTGGACTTGGATCTTATTTTAGTTGCTGCTGCTACTAGAGTTCATTCTTC
TAAAAAACAGGTGGCCCGGCAAGAGCCGCGCC (SEQ ID NO:15).

Primer 3. sIgh-VChL1- (88mer)

WO 02/28165

PCT/US01/31355

GGCTCAGCATGGCGCGCTTCAGGCCAATCAGGCTCAGCACGCGGGGCATGCCGC
GCTTCAGCATGTTACGCGCGGCTCTTGCCGGG (SEQ ID NO:16).

Primer 4. sIgh-VChU2+ (90mer)

GGCCTGAAGCGCGCCATGCTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGCCCCATACGCTTC
GTGCTGGCCCTGCTGGCCTTCTTCCGCTTACCGCC (SEQ ID NO:17).

Primer 5. sIgh-VChL2- (89mer)

GGTGCTTCATGGCGGTCTGCTTGTTCACGCCGCGCCAGCGGTCCAGCACGGCGCG
GGTGGGGCAATGCGGTGAAGCGGAAGAAGGCC (SEQ ID NO:18).

Primer 6. sIgh-VChU3+ (89mer)

CCGCCATGAAGCACCTGCTGAGCTTCAAGAAGGAGCTGGGCACCCTGACCAGCG
CCATCAACCGCCGAGCAGCAAGCAGAAGAAGCGC (SEQ ID NO:19).

Primer 7. sIgh-VChL3- (81mer)

CGCGCCACGCTGGCGATCAGGCCAATCATCACGGCAATGCCGGTCTTGCCGCC
GCGCTTCTTCTGCTTGTGCTGCGGCG (SEQ ID NO:20).

Primer 8. sIgh-VChFS1+ (39mer)

CCCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTG (SEQ ID NO:21).

Primer 9. sIgh-VChFS1.1+ (33mer)

CCCAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACTTGG (SEQ ID NO:22).

Primer 10. sIgh-VChFAS2- (37mer)

ATAGTTTAGCGGCGCGCCACGCTGGCGATCAGGCC (SEQ ID NO:23).

Three sets of primers were paired for PCR reactions to generate three overlapping PCR products as follows: primers 1 and 3 (for pWNVh-DJY) or primers 2 and 3 (for pWNVy-DJY), primers 4 and 5, and primers 6 and 7. Each set of primers was self-annealed and extended by *Pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA). The final, full-length inserts were amplified with a primer set of primers 8 and 10 (to generate the insert for pWNVh-DJY) or primers 9 and 10 (to generate the insert for pWNVy-DJY), and subsequently tailed with HindIII (5' end) and NotI (3' end) endonuclease restriction sites. These final insert products were restricted with HindIII and NotI, and cloned into HindIII/NotI-digested pcDNA3.1/V5-HisC. The resultant recombinant vectors (pWNVh-DJY and pWNVy-DJY) were confirmed by sequencing. Figures 2 and 5 present the restriction endonuclease maps of pWNVh-DJY and pWNVy-DJY, respectively. Figures 3 and 6 present the feature maps of pWNVh-DJY and pWNVy-DJY,

WO 02/28165

PCT/US01/31355

respectively. Figures 4 and 7 present the complete, annotated nucleotide sequences for pWNVh-DJY and pWNVy-DJY, respectively.

Example 2: Biological Characterization of WNV Capsid Protein Expressed from pWNVy-DJY and pWNVh-DJY.

Expression of Cp protein from pWNVy-DJY and pWNVh-DJY in tissue culture cells

HeLa, RD, or 293 cells, seeded onto two-chamber slides, were transfected by the CaPO_4 precipitation method with 2 μg of purified plasmid DNA (either pWNVy-DJY or pWNVh-DJY). Following transfection, the cells were fixed and incubated with mouse anti-His mAb and then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG Ab. The gene expression was examined with UV lamp microscope. Expression of Cp protein was achieved in all three cell lines from both constructs pWNVy-DJY and pWNVh-DJY, and the protein was localized in the cytoplasm. Immunofluorescence analysis of the expression of Cp protein in RD cells transfected with pWNVh-DJY revealed a green signal representing localized Cp protein using a FITC filter. The images were also captured with a dual filter of FITC and rhodamine to distinguish between specific and background signals. Green fluorescence under the dual filter confirmed the presence of Cp protein. A DAPI filter was used to reveal the nuclei of the cells, which were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride), and cellular morphology was revealed when the image was captured with a DAPI filter in the light field.

***In vitro* translation of WNV capsid protein**

^{35}S -labeled protein products were prepared using the TNT-T7 coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, WI). Ten μl of radiolabeled protein samples and 1 μl of anti-His (C-term) (Invitrogen, San Diego, CA) antibody were added to 300 μl of RIPA buffer and mixed gently. After an incubation at 4°C for 90 minutes, Protein A-Sepharose beads (LKB-Pharmacia Biotech) were added to the protein-antibody complexes at a final concentration of 5 μg per tube and the samples were incubated at 4°C for 90 minutes in a rotating shaker. The beads were washed three times with RIPA buffer and suspended in 2X SDS sample buffer. The immunoprecipitated protein complexes were eluted from the Sepharose beads by brief boiling and resolved in SDS-PAGE (15%) gels. The mobilities of the protein samples were compared with that of commercially available, ^{14}C -methylated molecular weight markers (Sigma). The gel was fixed, treated briefly with 1M sodium salicylate solution and

WO 02/28165

PCT/US01/31355

dried in a gel dryer (BioRad). The dried gel was exposed overnight to X-ray film (Kodak). The *in vitro* translated proteins had an apparent molecular size of 21.5 kDa (Figure 8).

Example 3: Evaluation of Immune Response Against WNV Capsid Protein Expressed from pWNVy-DJY and pWNVh-DJY.

Peptides

Three major histocompatibility (MHC) class II-restricted epitopes of the WNV Cp amino acid sequence were chosen using MacVector software (Oxford Molecular Group, MA), which is capable of predicting antigenic determinants and hydrophilic regions. The peptides were synthesized by standard peptide synthesis, and were as follows:

<u>Peptide Name</u>	<u>WNV Cp</u>	<u>Amino Acid Sequence</u>	<u>SEQ ID NO</u>
	<u>Protein</u>		
WNVC-P1	<u>Residues</u> 2 - 23	SKKPGGPGKSRVAVNMLKRGMPR	SEQ ID NO:6
WNVC-P2	31 - 49	KRAMLSLIDGKGPFRVLA	SEQ ID NO:7
WNVC-P3	90 - 111	TLTSAINRRSSKQKRGKGTGI	SEQ ID NO:8

Figure 8 presents these peptides aligned along the length of the WNV Cp protein.

***In vitro* translated protein**

Non-radioactive, *in vitro* translated Cp protein was also generated as described above in Example 2, using the TNT-T7 coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, WI) with non-radioactive components. An *in vitro* translation control was generated using the *in vitro* translation kit with the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, San Diego, CA), lacking an expressible insert.

DNA inoculation of mice

To evaluate the T cell-mediated immune response against the WNV Cp gene product, an *in vivo* mouse experiment was set up. The quadriceps muscles of 6- to 8-week-old female BALB/c mice (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN) were injected with 100 µg of pWNVh-DJY, pWNVy-DJY, or pcDNA3.1 (without an insert) in PBS and 0.25% bupivacaine-HCl (Sigma, St. Louis, MO). Two weeks later, the mice received a boost of another 100µg DNA injections. Thirteen days after the boost injection, the mice were sacrificed, the spleens were harvested, and the lymphocytes were isolated and tested for cellular immune responses.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Lymphoproliferative assay

Harvested splenic lymphocytes were pooled for two mice in each immunized group and suspended to a concentration of 5×10^6 cells/ml. A 100 μ l aliquot, containing 5×10^5 cells, was immediately added to each well of a 96-well, flat bottom microtiter plate. Reconstituted peptide, *in vitro* translated protein, or *in vitro* translation control were added to the wells, at concentrations of 5 μ g/ml and 1 μ g/ml (and 0.5 μ g/ml for *in vitro* translated protein and *in vitro* translation control protein). Concanavalin A (Con A) was used as a positive proliferation control. The assay conditions were set up in triplicate. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ for three days. One μ Ci of tritiated thymidine was added to each well and the cells were incubated for 18 hours at 37°C. The plate was harvested and the amount of incorporated tritiated thymidine was measured in a Beta Plate reader (Wallac, Turku, Finland). Stimulation Index was determined from the formula:

Stimulation Index (SI) = (experimental count / spontaneous count).

Spontaneous count wells included 5 % fetal bovine serum which served as an irrelevant protein control. The results are presented in Table 1.

Splenocytes isolated from mice immunized with either pWNVy-DJY or pWNVh-DJY ("H" or "Y") and incubated with WNVC-P3 ("Peptide 3") or a mixture of all three Cp peptides ("Peptide 123") yielded SI values significantly higher than did splenocytes isolated from mice in the group immunized with the base vector pcDNA3.1.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Table 1

Antigen or Stimulus	Splenocyte Source	Concentration of Protein or Peptide		
		5 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
Peptide 1	H	0.5	0.7	
	Y	0.8	1.2	
	pcDNA3.1	0.9	1.3	
Peptide 2	H	1.7	1.3	
	Y	1.6	1.8	
	pcDNA3.1	0.9	1.0	
Peptide 3	H	1.5	2.0	
	Y	1.1	1.4	
	pcDNA3.1	0.8	0.7	
Peptide 123	H	2.6	3.9	
	Y	1.8	2.1	
	pcDNA3.1	0.7	1.2	
Y protein	H	0.0	0.8	1.7
	Y	0.0	0.6	1.7
	pcDNA3.1	0.0	1.2	1.2
Ctrl pro	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		

Table 1 presents the results of the lymphoproliferation assay. The values presented for each condition are stimulation indices averaged over triplicate wells. For each immunization group tested, splenocytes were pooled from two mice within the group. "H" indicates splenocytes from the pWNVh-DJY-immunized group. "Y" indicates splenocytes from the pWNVh-DJY-immunized group of mice. "pcDNA3.1" indicates splenocytes from the pcDNA3.1-immunized control group of mice. Peptides 1, 2, and 3 are the WNVC-P1, WNVC-P2, and WNVC-P3 peptides described above. "Peptide 123" indicates a mixture of peptide 1, 2, and 3. "Y protein"

WO 02/28165

PCT/US01/31355

indicates the Cp protein *in vitro* translated from the pWNVy-DJY construct. "Ctrl pro" indicates the *in vitro* translation control, generated with pcDNA3.1 vector containing no expressible insert, as described above.

Detection of intracellular IFN- γ by flow cytometry

100 μ l RPMI-1640, supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS) (R5 medium), containing 50 U/ml recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) (Intergen, Purchase, NY), 10 μ g/ml brefeldin A (BD PharMingen, San Diego, CA), 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, MO), and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma), was added to each well of a round-bottom 96-well plate. *In vitro* translated Cp protein or *in vitro* translated control protein, at 4 μ g/ml, was added in 50 μ l of R5 medium. After adding the protein antigens (Ag), isolated splenocytes were added to each well at 1×10^6 cells in 50 μ l of R5 medium. For the compensation in flow cytometry, splenocytes from naïve mice were incubated with only IL-2 and brefeldin A. The plates were incubated in a 37°C, 5% CO₂ incubator for 5 to 6 hours. As a control, splenocytes were also incubated without Ag. After incubation, plates were spun at 1200 rpm for 5 minutes and supernatants were discarded. The cells in each well were resuspended with 200 μ l of PBS, supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA), put on ice for 15 minutes, spun at 1200 rpm, and resuspended with in 50 μ l PBS/1% BSA containing 0.1 μ g of PE-conjugated, anti-CD4 mAb and 0.1 μ g CyC-conjugated anti-CD44 mAb (both from BD PharMingen, San Diego, CA). After incubating for 30 minutes at 4°C, the cells were washed twice with PBS/1% BSA, the cell pellets were resuspended with 100 μ l of Cytofix/Cytoperm solution (BD PharMingen, San Diego, CA), and incubated for 20 minutes at 4°C. The cells were washed twice with 1 x Perm/Wash (BD PharMingen, San Diego, CA), and resuspended with 50 μ l of Perm/Wash solution containing allophycocyanin (APC)-conjugated anti-IFN- γ antibody (BD PharMingen, San Diego, CA) at 0.1 μ g/sample concentration. After incubation for 30 minutes at 4°C, the cells were washed twice with 1 x Perm/Wash solution and fixed with 2% paraformaldehyde and stored at 4°C until being analyzed by flow cytometry.

CD44 expression is used as an activation marker. CD44 is a cell adhesion receptor, widely expressed on hematopoietic and non-hematopoietic cells. BALB/c mice have relatively large subsets of CD44H+ T cells. In the periphery, the level of CD44 expression increases upon activation of B cells, CD4+ T cells, CD8+ T cells, and memory cells, which can be identified by their CD44hi phenotype (expressing high levels of CD44H isoform).

WO 02/28165

PCT/US01/31355

CD4⁺ T cell-dependent intracellular IFN- γ production was quantitated by flow cytometry. The results, as presented in Figure 10, show an antigen-specific, IFN- γ response for splenocytes from mice immunized with base vector pcDNA3.1 or Cp protein expression constructs pWNVh-DJY or pWNVy-DJY. Splenocytes isolated from pWNVy-DJY-immunized mice, expressed higher levels of IFN- γ upon stimulation with *in vitro* translated Cp protein, than did the splenocytes isolated from pWNVh-DJY-immunized mice.

Example 4: Examination of Apoptosis by the TUNEL Assay.

Apoptosis in individual cells was determined by the TUNEL assay, in three different cell lines: HeLa cells, RD cells, and 293 cells. Cells were transfected with either the pWNVh-DJY or pWNVy-DJY construct and examined for apoptosis by the TUNEL assay. Both constructs induced apoptosis in all three cell lines.

The TUNEL assay was carried out using the "In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's protocol. DNA cleavage was detected by terminal transferase (TdT) labeling of free 3'-hydroxy termini in genomic DNA with fluorescein-dUTP. Briefly, cells were fixed and permeabilized with PBS, supplemented with 0.1% Triton-X, 0.1% sodium citrate, and then the cells were incubated with "TUNEL reaction mixture," containing TdT and fluorescein-dUTP. The fluorescein-linked, incorporated dUTP was detected by fluorescence microscopy.

The data for analysis of HeLa cells, RD cells, and 293 cells transfected with either pWNVh-DJY or pWNVy-DJY construct were captured with different filters in the microscope to identify specific signals. A green signal represented incorporated fluorescein into the apoptotic cells, as revealed by a FITC filter. Images of the cells were also captured with a dual filter of FITC and rhodamine to distinguish between specific apoptotic signals and background signals. Green fluorescence under the dual filter reflected a true fluorescent signal from incorporated fluorescein-dUTP. A DAPI filter was used to reveal the nuclei of the cells, which were stained with DAPI. Not all cells were TUNEL positive. Cellular morphology was revealed when the image was captured with a DAPI filter in the light field, and showed that the nuclei of the apoptotic cells were condensed.

Similar results have been obtained with the pWNVy-DJY construct in the human neuroblastoma cell line (ATCC # CRL-2266).

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Example 5: Annexin V Flow Cytometry Analysis.

HeLa cells were transfected with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression vector pEGFP2-N1 (Clontech) alone, as a marker of transfection, or with pEGFP2-N1 in combination with either pWNVh-DJY or pWNVy-DJY. Two days post transfection, the cells were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated annexin V. Stained cells were analyzed by flow cytometry. Annexin V positive cell populations were counted from the gate of EGFP-positive events, and the data were acquired using CellQuest software. Up to ten-fold induction of apoptosis over the control cells was observed by treatment with WNV-Cp (Figure 13).

Example 6: Analysis of Apoptosis-Inducing Domains of WNV Cp Protein.

Peptide WNVC-P3, as described in Example 3 and Figure 11 above, was tested for its ability to induce apoptosis in cells in culture. Peptide WNVC-P3 was incubated with SH-SY5Y neuroblastoma cells (ATCC; Manassas, VA) at a concentration of 10 µg peptide per 1×10^5 cells. After 24 hours, TUNEL analyses were carried out. TUNEL-positive cells were identified for cells treated with the WNVC-P3 peptide, but not for cells treated with a control peptide from prostate-specific antigen (PSA).

Example 7: Immunization with pCWNVCP Induces Antigen-Specific Humoral Immune Responses.

To investigate the levels of *in vivo* immune responses generated by the DNA vaccine, mice were immunized intramuscularly with pCWNVCP or pCDNA3 control plasmid. The quadriceps muscles of 6 to 8 weeks old female BALB/c mice (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN) were injected with 100 µg of each DNA construct of interest formulated in phosphate buffered saline (PBS) and 0.25% bupivacaine-HCl (Sigma, St. Louis, MO), at 0, 4, and 8 weeks. Prior to injection and at various time points following injection, the mice were bled retro-orbitally and the sera were collected for later analysis. The collected sera samples were analyzed for specific antibody responses against Cp peptide (WNVC-P3: TLTSAINRRSSKQKKRGGKTGI) by ELISA at 1:100, 1:400, 1:800, and 1:1600 dilution. 50 µl of WNVC-P3, diluted in PBS to a concentration of 10 µg/ml, was adsorbed onto microtiter wells overnight at 4°C, as previously described in Kim *et al.*, 1998, CD8 positive T cells controls antigen-specific immune responses through the expression of chemokines, J. Clin. Invest., 102:1112-1124, which is incorporated herein by reference. The plates were washed with

WO 02/28165

PCT/US01/31355

PBS-0.05% Tween-20 and blocked with 3% BSA in PBS with 0.05% Tween-20 for one hour at 37°C. Mouse antisera was diluted with 0.05% Tween-20 and incubated for one hour at 37°C, then incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO). The plates were washed and developed with 3'3'5'5' TMB (Sigma) buffer solution.

The pre-injection sera (collected at day 0) did not show any Cp-specific antibody response (Data not shown). The mice immunized with pCDNA3 control did not show any Cp-specific antibody response, but potent Cp-specific antibody responses were detected for mice immunized with pCWNVCP (Figure 12A). Notably, the level of Cp-specific antibody response generated by DNA immunization was more potent than that of the positive hyper-immune mouse sera obtained from ATCC (Manassas, VA).

Additionally, the subclasses of WNVCP-specific IgGs induced by the DNA vaccines were determined. It has been reported that production of IgG1 isotype is induced by Th2 type cytokines, whereas the IgG2a isotype is regulated by Th1 type cytokines (Finkelman *et al.*, 1990, Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection, *Ann. Rev. Immunol.*, 8:303-333, which is incorporated herein by reference). For the determination of relative levels of Cp-specific IgG subclasses, anti-murine IgG1 and IgG2a conjugated with HRP (Zymed, San Francisco, CA) were substituted for anti-murine IgG-HRP. This was followed by addition of the ABTS substrate solution (Chemicon, Temecula, CA). In each step, plates were washed 3 times with the wash buffer (PBS + 0.05% Tween-20). The plates were read on a Dynatech MR5000 plate reader with the optical density at 450 nm. As shown in Figure 12B, most of the IgG response generated from DNA immunization with pCWNVCP was of the IgG2a isotype. This strong Th1-type bias was demonstrated by both the magnitude of IgG2a and the relative ratio of IgG2a to IgG1 (Th1 to Th2).

WNVCP-specific serum antibody was determined by immunoprecipitation/Western blot analysis. WNVCP protein, translated *in vitro* without radioisotope, was immunoprecipitated with an anti-6X His (C-term) polyclonal Ab (MBL, Nagoya, Japan) and resolved on a 15 % of SDS-PAGE gel and transferred to a PDVF membrane (Millipore), which was cut into strips. Each strip was incubated with mouse immune sera from pCWNVCP or pCDNA3 immunized mice (at 1:100 dilution) and hybridized with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG at a concentration of 1:2000. After rinsing, the strips were developed with ECL Chemiluminescent detection Kit (Amersham) (Figure 12C).

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Example 8: Immunization with pCWNVCP Induces Potent Antigen-Specific Th1-Type Cellular Immune Responses.

The level of cytokines released by T cells reflects the direction and magnitude of the immune response. The level of Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-4) type cytokines produced by stimulated T cells were examined. IFN- γ , a prototypical Th1-type cytokine, is produced predominantly by CD4+ Th1 cells and CD8+ T cells. The level of IFN- γ expressed by stimulated T cells reflects the magnitude of the T cell response. IL-2 is a Th1-type cytokine produced primarily by T cells activated by external stimulation; it is critical for the proliferation and clonal expansion of antigen-specific T cells (Morgan *et al.*, 1976, *Selective in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows, *Science*, 193:1007-1008, which is incorporated herein by reference). On the other hand, IL-4 is a prototypical Th2-type cytokine that plays a dominant role in B cell-mediated immune responses (Seder & Paul, 1994, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:635-673, which is incorporated herein by reference).

The level of CD4+ T helper cell-mediated immune responses following immunization was also examined. Mice received two DNA immunizations (100 μ g each) separated by two weeks. At one week after the second injection, the mice were euthanized, the spleens harvested. Lymphocytes were harvested from spleens and prepared as effector cells by removing the erythrocytes and by washing several times with fresh media as described in 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, which is incorporated herein by reference. The isolated cell suspensions were resuspended to a concentration of 5×10^6 cells/ml. A 100 μ l aliquot containing 5×10^5 cells was immediately added to each well of a 96 well microtiter flat bottom plate. WNV capsid-specific peptide pools (WNVC-P1: SKKPGGPGKSRAVNMLKRGMPR; WNVC-P2: KRAMLSLIDGKGPIRFVLA; WNVC-P3: TLTSAINRRSSKQKKRGGKTGI) at the final concentration of 5 μ g/ml were added to wells in triplicate. The cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4 days. Supernatants from these wells were collected at day 4 and tested for the release of IFN- γ , IL-2, or IL-4 by cytokine ELISA using ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN).

As shown in Figure 13, significant expression levels of IFN- γ and IL-2 were observed from pCWNVCP-immunized mice, while only background levels were observed from control-

WO 02/28165

PCT/US01/31355

immunized mice. On the other hand, the level of IL-4 released from all immunized groups was similar. These results show that DNA vaccination resulted in induction of specific and potent Th1-type cellular immune responses in immunized mice.

Example 9: Immunization with pCWNVCP Induces Antigen-Specific Production of Chemokines MIP-1 β and RANTES.

The characterization of vaccine-induced cellular immune responses was extended by examining the expression profiles of β -chemokines (MIP-1 β and RANTES) from stimulated T cells. Chemokines are important modulators of immune and inflammatory responses. They are especially important in the molecular regulation of trafficking of leukocytes from the vessels to the peripheral sites of host defense. T cell-produced chemokines have been reported to play a critical role in cellular immune expansion (Kim *et al.*, 1998, J. Clin. Invest., *supra*; 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, which is incorporated herein by reference). Therefore, the level of chemokines produced by stimulated T cells may provide additional insight on the level and the quality of antigen-specific cellular immune responses. Supernatant from the T cells stimulated as described in Example 8 was tested for the release of β -chemokines MIP-1 β and RANTES using ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA; R&D Systems, Minneapolis, MN). Immunization with pCWNVCP vaccine induced significantly greater levels of expression of MIP-1 β and RANTES over those of control vector immunization (Figure 14). These increased levels of MIP-1 β and RANTES from pCWNVCP immunized animals further support the conclusion that pCWNVCP immunization induced the antigen-specific T cell responses observed above.

Example 10: Immunization with pCWNVCP Induces an Antigen-Specific CTL Response.

The level of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses following immunization was also examined. A five hour ^{51}Cr release bulk CTL assay was performed, as previously described Kim *et al.*, 1997, Nat. Biotechnol., *supra*, with *in vitro* stimulation of effector splenocytes prior to measuring chromium release from specific and non-specific peptide treated targets. Effector splenocytes were stimulated *in vitro* with a pool of WNV Capsid peptides (KGPIRFVL (SEQ ID NO:24), GGPGKSRA (SEQ ID NO:25), and IAPTRAVL (SEQ ID NO:26)) at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ for five days in CTL culture media at 5×10^6 cells/ml.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

CTL culture media consists of RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 10% fetal calf serum (Gibco-BRL) and 10% RAT-T-STIM without Con A (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Peptide treated targets were prepared by incubating P815 mouse mastocytoma cells (ATCC, Manassas, VA) with 10 µg/ml concentration of the peptide pool. The target cells were labeled with 100 µCi/ml Na₂⁵¹CrO₄ for 120 minutes and incubated with the stimulated effector splenocytes for six hours at 37°C. CTL lysis was determined at 100:1 and 50:1 effector:target (E:T) ratios. Percent specific lysis was determined from the formula:

$$100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$$

Maximum release was determined by lysis of target cells in 1% Triton X-100 containing medium. An assay was not considered valid if the value for the 'spontaneous release' counts were in excess of 20% of the 'maximum release.' A background level of specific killing was observed from the control animals immunized with pCDNA3. However, the animals immunized with pCWNVCP showed positive CTL activities at 100:1 and 50:1 effector to target (E:T) ratios (Figure 15A). In addition, an analysis of the supernatant from the *in vitro* stimulated effector cells for the CTL assay demonstrated an increased level of IFN-γ production from pCWNVCP-immunized mice (Figure 15B).

Example 11: Immunization with pCWNVCP Induces Infiltration of Lymphocytes into the Muscle of Immunized Animals.

The magnitude of vaccine-induced cell-mediated immune responses in HIV and HSV DNA immunization models has been found to correlate well with the level of cellular infiltration at the site of vaccine injection (Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra*; Chattergoon *et al.*, 2000, Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis, Nat. Biotechnol., 18:974-979, which is incorporated herein by reference; 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, which is incorporated herein by reference). To further investigate the potency of immune activation induced by pCWNVCP immunization, the muscle tissues of immunized mice were examined immunohistochemically at the site of injection.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Six- to eight-week-old female Balb/c mice (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) were injected intramuscularly (into the tibialis muscle) with 100 µg of pCWNVCP or pCDNA3 in phosphate buffered saline (PBS) and 0.25% bupivacaine-HCl (Sigma, St. Louis, MO). After 48 hr of transfection, the tibialis muscle was harvested. The fresh muscle tissue was then frozen in O.C.T. compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA). Four micron frozen sections were made using a Leica 1800 cryostat (Leica Inc., Deerfield, IL). To detect the presence of lymphocytes in muscle, the slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) stain (Vector Labs). The slides were viewed with a Nikon OPTIPHOT fluorescence microscope (Nikon Inc., Tokyo, Japan) using a 40X objective (Nikon Fluo 40X Ph3D2). Slide photographs were obtained using Nikon camera FX35DX with exposure control by Nikon UFX-II and Kodak Ektachrome 160T slide film. A dramatic infiltration of immune cells into the muscle of mice immunized with pCWNVCP is shown in Figure 16B.

The infiltrating cells were characterized by FACS analysis. The infiltrating cells were harvested from muscle by dissecting out the whole leg muscle and mincing with mechanical force as previously described in Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra*. The cells were recovered by filtering them through a funnel with a glass wool plug. The infiltrating cells were identified by FACS using antibodies to CD4, CD8, Mac-3, CD11c, CD86, and B220 (Pharmingen) as previously described in Kim *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, *supra* and Chattergoon *et al.*, 1990, J. Immunol., 160:5707-5718, which is incorporated herein by reference. Samples were analyzed using a Coulter EPICS[®]XL-MCL flow cytometer. The infiltrating cells from the mice immunized with pCWNVCP included T cells (both CD4+ and CD8+) and macrophages (detected with anti-Mac3 antibodies) (Figure 16C). The high levels of CD4+ and CD8+ T cells in the immunized muscle provides further evidence of a high level of T cell activation. On the other hand, the muscle section extracted from the mice immunized with pCDNA3 (control) did not show any sign of cellular infiltration. Taken together, these results demonstrate that antigen-specific immune responses can be efficiently generated via DNA vaccination.

Example 12: Alignment of WNV Capsid Protein with Other *Flavivirus* Capsid Proteins.

Figure 17 shows the alignment of WNV Cp protein with portions of capsid proteins from other *Flaviviruses*, including Kunjin virus (KJV), Japanese encephalitis virus (JEV), and dengue virus (DEN2), indicating that there is a high degree of identity among these proteins.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

Example 13: WNV Cp Protein Induces Apoptosis *In Vivo* and *In Vitro* Through the Mitochondrial Pathway.

The West Nile virus Cp protein, in the absence of other WNV gene products induces rapid nuclear condensation and cell death in tissue culture. Apoptosis is induced through the mitochondrial pathway, as the observed changes in mitochondrial membrane potential were accompanied by Caspase 9 activation and downstream Caspase 3 activation. Moreover, the apoptosis determinant domain was identified to reside in the 3' terminus of the WNV Cp protein by deletion mutation analysis. Following intramuscular injection of a WNV Cp expression cassette, apoptosis in muscle tissue was clearly observed. Most importantly, WNV Cp gene delivery into the striatum of mouse brain resulted in cell death through capsid induced apoptosis *in vivo*. These studies suggest that the capsid protein of the WNV is responsible for aspects of viral pathogenesis through induction of the apoptotic cascade, supporting the idea that inhibiting this apoptotic function can be exploited as a viable therapeutic approach for the treatment of WNV infection. Additionally, there is sequence identity/homology between the WNV capsid protein and a known apoptosis-inducing region of the HIV-1 *vpr* gene product (Ayyavoo *et al.*, 1997, Nat. Med., 3:1117-1123; Stewart *et al.*, 1997, J. Virol., 71:5579-5592, each of which is incorporated by reference) (Figs. 18 and 19).

Example 14: Comparison of WNV Cp and HIV Vpr with the Proteins of Other Apoptosis-Associated Viruses.

A Medline search for the terms "apoptosis," "encephalitis," and "meningitis" yielded a list of various viruses identified with such symptoms in infected individuals. The amino acid sequences of the proteins of these viruses were compared with the amino acid sequence for WNV capsid protein or HIV-1 89.6 Vpr protein.

Alignments with WNV capsid protein (Fig. 19)

1. **HIV-1** - The WNV capsid protein and the HIV-1 Vpr, a known apoptosis-inducing protein, share sequence homology.
2. **Herpes Simplex Virus (HSV)** - Sequence alignment of the major capsid protein of the HSV with the WNV Cp indicated possible apoptotic inducing capabilities. Interestingly, destruction via encephalitis has been implicated to correlate with the outcome of the disease.
3. **Ebola Virus** is a member of the *Filovirus* genus within the *Filoviridae* family. This pathogen has been implicated with inducing hemorrhagic fever. The alignment of WNV capsid protein

WO 02/28165

PCT/US01/31355

and the Ebola nucleocapsid protein indicated detectable amino acid homology within the WNV and nef apoptosis domains. The glycoprotein alignment with the WNV capsid protein also displayed pro-apoptotic domain homology.

4. Rubella Virus is a member of the *Togaviridae* family, and has been implicated in inducing apoptosis from an *in vitro* standpoint. Sequence alignment of the Rubella virus capsid protein indicated homology with the WNV capsid protein, as well as with HIV-1 Vpr protein (see Fig 19), and Tat proteins (data not shown) within the apoptotic domains.

Alignment with HIV-1 89.6 Vpr (Fig. 19)

1. Sindbis Virus – Published data report the apoptotic nature of the Sindbis Virus, especially leading to neuronal cell death. Alignment of the p230 nonstructural protein of Sindbis Virus with HIV-1 Vpr protein (and with Tat protein (data not shown)), indicated isolated homology within the Bcl-2 associated apoptotic regions. Interestingly, recently published data implicated inhibition of Sindbis apoptosis via Bax.

2. Cucumber Mosaic Virus – Previously published reports have implicated cucumber mosaic virus in inducing profound cell killing by necrosis. However, recent data have indicated apoptotic characteristics associated with cell death within tomatoes. Interestingly, our sequence alignment with the vpr 89.6 with the CMV 2A protein also displayed apoptotic domain homology. Comparison with the Tat HIV gene also gave pro-apoptotic homology with the CMV capsid protein.

3. HTLV – Comparisons of this virus with the Tat protein of HIV-1 provided possible insights in apoptotic inducing capability of this virus. Sequence alignment of Tat with the HTLV-1 p27 protein exhibited sequence homology within an apoptotic domain.

4. Nipah Virus – This virus is a member of the *Paramyxoviridae* family and can be highly lethal in humans. A recent outbreak was observed in Singapore, thus increasing the possibilities of transference into the United States. In addition, the virus seems to have similar clinical outcomes to the West Nile Virus and to other viruses that target the cerebrospinal fluid and cause neural encephalitis. A comparison of the fusion protein of Nipah virus with HIV 89.6 Vpr protein gave an interesting correlation. Strong homology was seen in a cell cycle arrest domain within the Nipah fusion protein. This surface protein could be a strong DNA vaccine candidate; the implications are that it plays a crucial role in the development of apoptosis and cell cycle arrest.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

5. Reovirus – Reovirus induces TRAIL-dependent apoptosis in neuronal cells and cell cycle arrest in G2/M phase. Homology was identified between a portion of the core-minor form Mu2 protein of reovirus and HIV 89.6 Vpr protein.

The foregoing examples are meant to illustrate the invention and are not to be construed to limit the invention in any way. Those skilled in the art will recognize modifications that are within the spirit and scope of the invention.

All references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

CLAIMS

1. A method of inducing cell death comprising the step of contacting a cell with an amount of isolated *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, effective to induce cell death; or introducing into said cell a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, said nucleic acid being free from an entire *Flavivirus* or *Pestivirus* virus genome, wherein said nucleotide sequence is expressed in said cell at a level effective to induce cell death.
2. The method of claim 1, wherein the isolated capsid protein, or functional fragment thereof, or the nucleic acid molecule is from a virus selected from the Japanese encephalitis virus group subgenus.
3. The method of claim 1, wherein the isolated capsid protein, or functional fragment thereof, or the nucleic acid molecule is from West Nile virus (WNV).
4. The method of claim 3, wherein the functional fragment comprises SEQ ID NO:8.
5. The method of claim 3, wherein the nucleic acid molecule encodes SEQ ID NO:8.
6. The method of claim 1, wherein the cell is a tumor cell.
7. The method of claim 1, wherein the cell is contacted with the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof.
8. The method of claim 1, wherein the nucleic acid molecule is introduced into said cell.
9. A method of identifying compounds that inhibit *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, from inducing apoptosis in cells comprising the steps of

WO 02/28165

PCT/US01/31355

- a) contacting the cells, in the presence of a test compound, with an amount of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, sufficient to induce a detectable level of apoptosis in the cells; and
 - b) comparing the level of apoptosis detected in step (a) with the level of apoptosis that occurs when cells are contacted with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, in the absence of said test compound.
10. The method of claim 9, wherein the cells are contacted with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein.
11. The method of claim 9, wherein the cells are contacted with a functional fragment of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein.
12. The method of claim 11, wherein the functional fragment comprises SEQ ID NO:8.
13. The method of claim 9, wherein the cells are selected from the group consisting of HeLa cells, RD cells, and 293 cells.
14. The method of claim 9, wherein the detecting step is an assay that detects a marker of apoptosis.
15. The method of claim 14, wherein the marker is phosphatidylserine (PS) or free 3'-hydroxy DNA termini.
16. The method of claim 15, wherein the assay is TUNEL analysis or annexin V flow cytometry.
17. A kit for performing the method of claim 9 comprising
- a) a container comprising *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or functional fragment thereof; and

WO 02/28165

PCT/US01/31355

- b) at least one additional component selected from the group consisting of: instructions, positive controls, negative controls, photos depicting data, and figures depicting data.
18. An injectable pharmaceutical composition comprising
- a) a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof, or a nucleic acid molecule that comprises a nucleotide sequence that encodes a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein or a functional fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.
19. The injectable pharmaceutical composition of claim 18 comprising
- a) a nucleic acid molecule that comprises a nucleotide sequence that encodes a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein or a functional fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.
20. The injectable pharmaceutical composition of claim 18 comprising
- a) a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a functional fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.
21. The injectable pharmaceutical composition of claim 18 comprising
- a) a WNV capsid protein, or a functional fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.
22. A method of treating an individual diagnosed with or suspected of suffering from a disease characterized by hyperproliferating cells which comprises the step of administering to said individual an effective amount of the injectable pharmaceutical composition of claim 18.
23. A method of treating an individual diagnosed with or suspected of suffering from a disease characterized by hyperproliferating cells which comprises the step of administering to said individual an effective amount of the injectable pharmaceutical composition of claim 19.

WO 02/28165

PCT/US01/31355

24. A method of treating an individual diagnosed with or suspected of suffering from a disease characterized by hyperproliferating cells which comprises the step of administering to said individual an effective amount of the injectable pharmaceutical composition of claim 20.
25. A method of treating an individual diagnosed with or suspected of suffering from a disease characterized by undesirable cells comprising eliminating the undesirable cells by administering to said individual an effective amount of the injectable pharmaceutical composition of claim 18.
26. The method of claim 24, wherein the capsid protein, or functional fragment thereof, is WNV capsid protein, or functional fragment thereof.
27. The method of claim 22, wherein the disease is cancer.
28. The method of claim 22, wherein the administration step is accomplished by intra-tumoral injection of the injectable pharmaceutical composition.
29. A method of identifying an individual exposed to *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising the steps of:
- a) contacting antibodies specific for *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein with a sample from the individual; and
 - b) detecting whether said antibodies are bound to *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein from the sample,
- wherein detection of binding of the antibodies to *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein is indicative of exposure of the individual to *Flavivirus* or *Pestivirus*.
30. The method of claim 24, wherein the capsid protein is WNV capsid protein.
31. A kit for identifying individuals exposed to a *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising

WO 02/28165

PCT/US01/31355

- a) a first container comprising antibodies specific for a *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein; and
 - b) a second container comprising *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or a fragment thereof.
32. The kit of claim 31, wherein the first container comprises antibodies specific for WNV capsid protein and the second container comprises WNV capsid protein, or a fragment thereof.
33. A method of identifying an individual exposed to a *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising the steps of:
- a) contacting a sample with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein; and
 - b) detecting whether said *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein is bound to antibodies in said sample,
- wherein detection of binding of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein is indicative of exposure of the individual to *Flavivirus* or *Pestivirus*.
34. The method of claim 33, wherein the virus is WNV and the capsid protein is WNV capsid protein.
35. A kit for identifying individuals exposed to a *Flavivirus* or *Pestivirus* comprising
- a) a first container comprising *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein; and
 - b) a second container which contains antibodies which specifically bind to *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein.
36. The kit of claim 35, wherein the capsid protein is WNV capsid protein.
37. A vaccine composition comprising
- a) an immunologically effective amount of *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or an immunogenic fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/28165

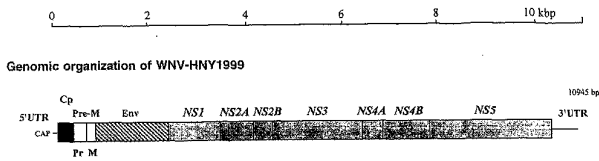
PCT/US01/31355

38. The vaccine of claim 37, wherein the *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or immunogenic fragment thereof, is WNV capsid protein, or immunogenic fragment thereof.
39. A vaccine composition comprising
- a) nucleic acid encoding *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, or an immunogenic fragment thereof; and
 - b) a pharmaceutically acceptable carrier.
40. The vaccine of claim 39, wherein the nucleic acid encodes WNV capsid protein, or an immunogenic fragment thereof.
41. A method of treating an individual exposed to a *Flavivirus* or *Pestivirus* by administering a therapeutically effective amount of capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from a *Flavivirus* or *Pestivirus*, or a nucleic acid encoding capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from a *Flavivirus* or *Pestivirus*.
42. The method of claim 41, wherein the virus to which the individual is exposed is WNV, and wherein the capsid protein, or fragment thereof, or the nucleic acid encoding the capsid protein, or immunogenic fragment thereof, is from WNV.
43. A method of protecting an individual from *Flavivirus* or *Pestivirus* infection by administering a prophylactically effective amount of capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from a *Flavivirus* or *Pestivirus*, or a nucleic acid encoding capsid protein, or an immunogenic fragment thereof, from a *Flavivirus* or *Pestivirus*.
44. The method of claim 43, wherein the virus against which the individual is to be protected is WNV, and wherein the capsid protein, or fragment thereof, or the nucleic acid encoding the capsid protein, or immunogenic fragment thereof, is from WNV.

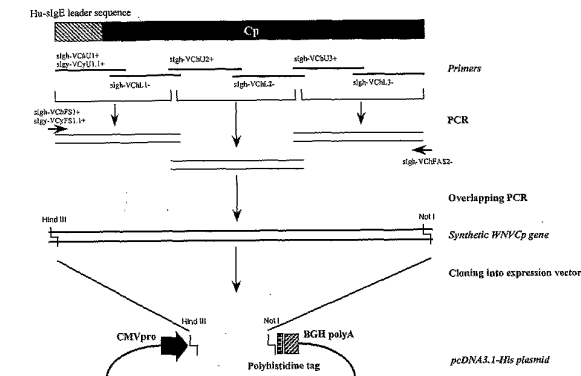
WO 02/28165

1/30

PCT/US01/31355



Cloning Strategy for WNV-HNY1999 Capsid Gene: pWNVh-DJY, pWNVy-DJY



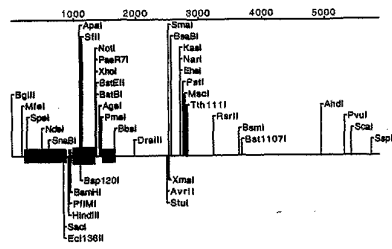


FIG. 2

WO 02/28165

3/30

PCT/US01/31355

pWVb-DJY Cut Site Map
Tuesday, September 5, 2000 2:09 PM

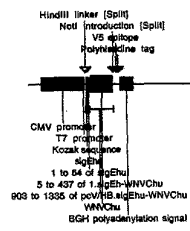


FIG. 3

Fig 4

[illegible]


```

>EhaI
|
>Nari
||
>Kasi

```

[illegible]

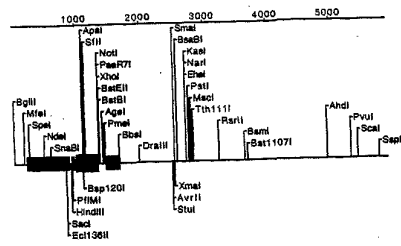


FIG. 5

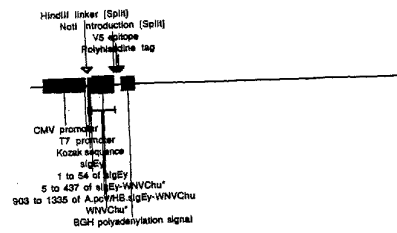


FIG. 6

FIG 7

[illegible]

PCT/US01/31355

[illegible]

[illegible]

**³⁵S-Labelled *in vitro* Translated Products of
pWNVCh-DJY and pWNVcy-DJY**

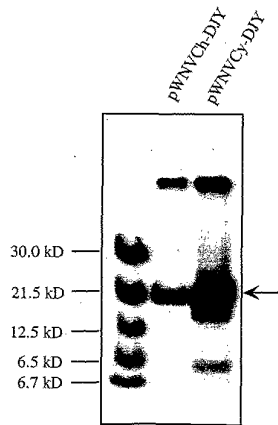


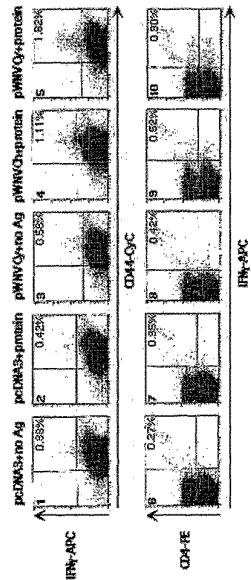
Fig 8

WNV Capsid (Cp) Peptides - Location and Sequences

WNV Cp	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Amino Acid	NSKEGSGSRSAVWMLKSGHPVLSLGLKFNMLSLDCKGPIRFVLLALAFNFRTAFATFVLDNRGSHVHKGTAMHLLSFKELGTLTSAINRSGKQKRGKGI	ANWMLGLASVGA										
Sequence												
Peptide Seq.	SKKEGSGSRSAVWMLKSGHPVLSLGLKFNMLSLDCKGPIRFVLLALAFNFRTAFATFVLDNRGSHVHKGTAMHLLSFKELGTLTSAINRSGKQKRGKGI											
Peptide Name	WNV-P1	WNV-P2	WNV-P3									

FIG. 9

Fig. 10



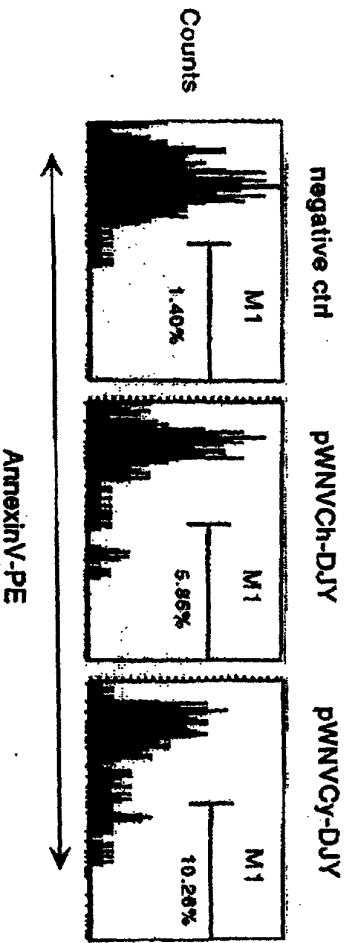


FIG. 11

Fig. 12A

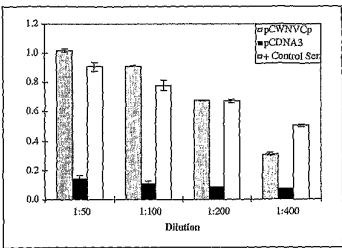


Fig. 12B

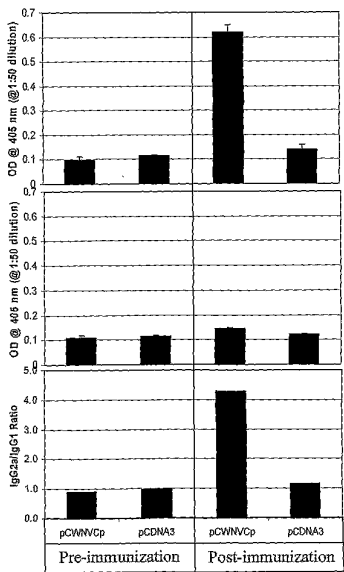
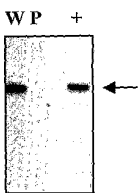


Fig. 12C



WO 02/28165

19/30

PCT/US01/31355

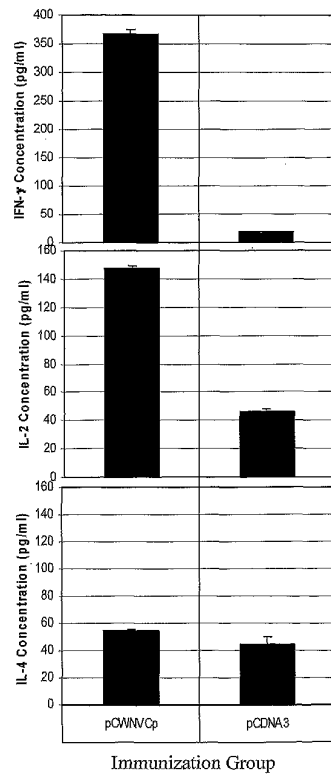


Figure 13

WO 02/28165

20/30

PCT/US01/31355

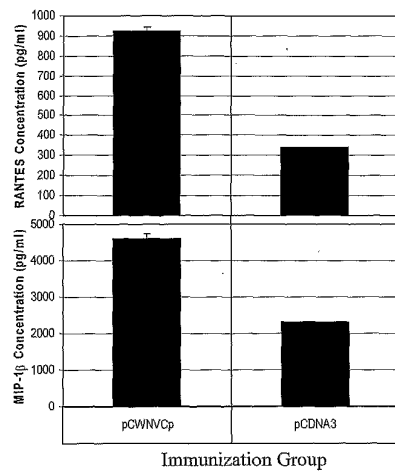
**Figure 14**

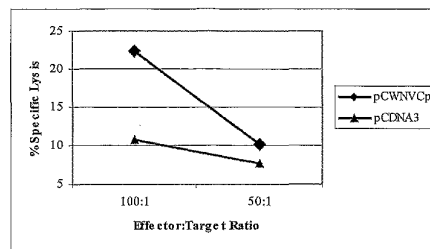
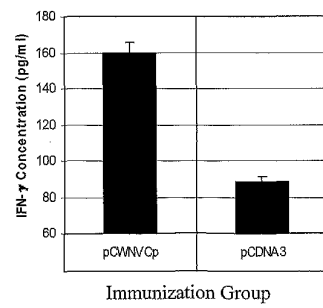
Fig. 15A**Fig. 15B**

Fig. 16A



Fig. 16B

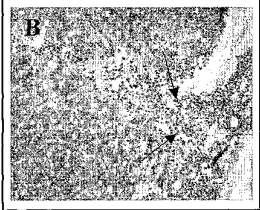
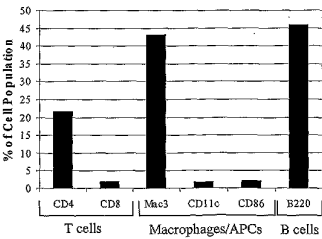


Fig. 16C



[illegible]

Search Analysis for Sequence: WNVcAa
 Search from 1 to 123 where origin = 1
 Date: June 15, 2001
 Time: 19:48:02
 Matrix: pam250 matrix
 Score Region from 1 to 123
 Maximum possible score: 590
 Database: UserFolder: Alignment-AC6/01

[illegible]

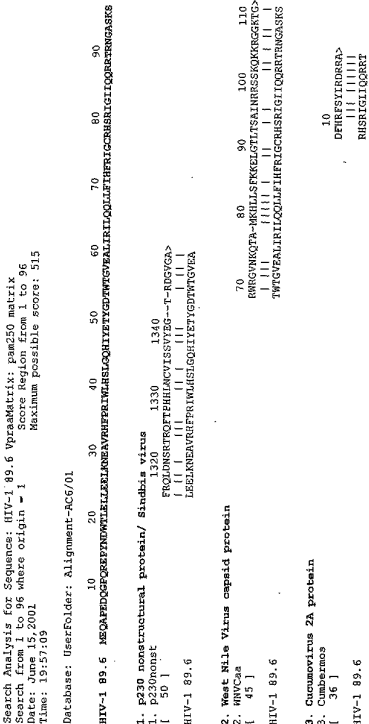
```

270      260      290      300      310
RSARHPRI-R-FGAPQAFEG-LLATVAVGTAR-AGLQF-RADMAEPTL>
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
RAVLDWRFVGNKQTANKHLLSEKELGTLTSAINRRSSKKKKRGKGTGTAVM

```

[illegible]

Fig. 19 Alignment of HIV-1 89.6 Vpr protein sequence to other viral proteins



4. Chimeric 2A protein
(40)
HIV-1 89,6
110 120
EFGMTFVEDPR-EVQL>
|||||
TGGATGCTHILIGD
5. Rubella virus capsid protein
(33)
HIV-1 89,6
160
KIASGGQGVY>
|||||
KNIKSGQHTY
6. Nipah virus fusion protein
(44)
HIV-1 89,6
sky sd...vf->
|||||
LIALQLLHF
7. Revirus core-minor form 2
(46)
HIV-1 89,6
430
IGNVLEGGSTHRLVLEMLVLRN>
|||||
EGPGCFINQVLELLEKLVNFRN

10	20	30	40	50	60	70	80	90
104	105	106	107	108	109	110	111	112
113	114	115	116	117	118	119	120	121
122	123	124	125	126	127	128	129	130
131	132	133	134	135	136	137	138	139
140	141	142	143	144	145	146	147	148
149	150	151	152	153	154	155	156	157
158	159	160	161	162	163	164	165	166
167	168	169	170	171	172	173	174	175
176	177	178	179	180	181	182	183	184
185	186	187	188	189	190	191	192	193
194	195	196	197	198	199	200	201	202
203	204	205	206	207	208	209	210	211
212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229
230	231	232	233	234	235	236	237	238
239	240	241	242	243	244	245	246	247
248	249	250	251	252	253	254	255	256
257	258	259	260	261	262	263	264	265
266	267	268	269	270	271	272	273	274
275	276	277	278	279	280	281	282	283
284	285	286	287	288	289	290	291	292
293	294	295	296	297	298	299	300	301
302	303	304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317	318	319
320	321	322	323	324	325	326	327	328
329	330	331	332	333	334	335	336	337
338	339	340	341	342	343	344	345	346
347	348	349	350	351	352	353	354	355
356	357	358	359	360	361	362	363	364
365	366	367	368	369	370	371	372	373
374	375	376	377	378	379	380	381	382
383	384	385	386	387	388	389	390	391
392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409
410	411	412	413	414	415	416	417	418
419	420	421	422	423	424	425	426	427
428	429	430	431	432	433	434	435	436
437	438	439	440	441	442	443	444	445
446	447	448	449	450	451	452	453	454
455	456	457	458	459	460	461	462	463
464	465	466	467	468	469	470	471	472
473	474	475	476	477	478	479	480	481
482	483	484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497	498	499
500	501	502	503	504	505	506	507	508
509	510	511	512	513	514	515	516	517
518	519	520	521	522	523	524	525	526
527	528	529	530	531	532	533	534	535
536	537	538	539	540	541	542	543	544
545	546	547	548	549	550	551	552	553
554	555	556	557	558	559	560	561	562
563	564	565	566	567				

WO 02/28165

30/30

PCT/US01/31355

150 160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000
10010
10020
10030
10040
10050
10060
10070
10080
10090
10100
10110
10120
10130
10140
10150
10160
10170
10180
10190
10200
10210
10220
10230
10240
10250
10260
10270
10280
10290
10300
10310
10320
10330
10340
10350
10360
10370
10380
10390
10400
10410
10420
10430
10440
10450
10460
10470
10480
10490
10500
10510
10520
10530
10540
10550
10560
10570
10580
10590
10600
10610
10620
10630
10640
10650
10660
10670
10680
10690
10700
10710
10720
10730
10740
10750
10760
10770
10780
10790
10800
10810
10820
10830
10840
10850
10860
10870
10880
10890
10900
10910
10920
10930
10940
10950
10960
10970
10980
10990
11000
11010
11020
11030
11040
11050
11060
11070
11080
11090
11100
11110
11120
11130
11140
11150
11160
11170
11180
11190
11200
11210
11220
11230
11240
11250
11260
11270
11280
11290
11300
11310
11320
11330
11340
11350
11360
11370
11380
11390
11400
11410
11420
11430
11440
11450
11460
11470
11480
11490
11500
11510
11520
11530
11540
11550
11560
11570
11580
11590
11600
11610
11620
11630
11640
11650
11660
11670
11680
11690
11700
11710
11720
11730
11740
11750
11760
11770
11780
11790
11800
11810
11820
11830
11840
11850
11860
11870
11880
11890
11900
11910
11920
11930
11940
11950
11960
11970
11980
11990
12000
12010
12020
12030
12040
12050
12060
12070
12080
12090
12100
12110
12120
12130
12140
12150
12160
12170
12180
12190
12200
12210
12220
12230
12240
12250
12260
12270
12280
12290
12300
12310
12320
12330
12340
12350
12360
12370
12380
12390
12400
12410
12420
12430
12440
12450
12460
12470
12480
12490
12500
12510
12520
12530
12540
12550
12560
12570
12580
12590
12600
12610
12620
12630
12640
12650
12660
12670
12680
12690
12700
12710
12720
12730
12740
12750
12760
12770
12780
12790
12800
12810
12820
12830
12840
12850
12860
12870
12880
12890
12900
12910
12920
12930
12940
12950
12960
12970
12980
12990
13000
13010
13020
13030
13040
13050
13060
13070
13080
13090
13100
13110
13120
13130
13140
13150
13160
13170
13180
13190
13200
13210
13220
13230
13240
13250
13260
13270
13280
13290
13300
13310
13320
13330
13340
13350
13360
13370
13380
13390
13400
13410
13420
13430
13440
13450
13460
13470
13480
13490
13500
13510
13520
13530
13540
13550
13560
13570
13580
13590
13600
13610
13620
13630
13640
13650
13660
13670
13680
13690
13700
13710
13720
13730
13740
13750
13760
13770
13780
13790
13800
13810
13820
13830
13840
13850
13860
13870
13880
13890
13900
13910
13920
13930
13940
13950
13960
13970
13980
13990
14000
14010
14020
14030
14040
14050
14060
14070
14080
14090
14100
14110
14120
14130
14140
14150
14160
14170
14180
14190
14200
14210
14220
14230
14240
14250
14260
14270
14280
14290
14300
14310
14320
14330
14340
14350
14360
14370
14380
14390
14400
14410
14420
14430
14440
14450
14460
14470
14480
14490
14500
14510
14520
14530
14540
14550
14560
14570
14580
14590
14600
14610
14620
14630
14640
14650
14660
14670
14680
14690
14700
14710
14720
14730
14740
14750
14760
14770
14780
14790
14800
14810
14820
14830
14840
14850
14860
14870
14880
14890
14900
14910
14920
14930
14940
14950
14960
14970
14980
14990
15000
15010
15020
15030
15040
15050
15060
15070
15080
15090
15100
15110
15120
15130
15140
15150
15160
15170
15180
15190
15200
15210
15220
15230
15240
15250
15260
15270
15280
15290
15300
15310
15320
15330
15340
15350
15360
15370
15380
15390
15400
15410
15420
15430
15440
15450
15460
15470
15480
15490
15500
15510
15520
15530
15540
15550
15560
15570
15580
15590
15600
15610
15620
15630
15640
15650
15660
15670
15680
15690
15700
15710
15720
15730
15740
15750
15760
15770
15780
15790
15800
15810
15820
15830
15840
15850
15860
15870
15880
15890
15900
15910
15920
15930
15940
15950
15960
15970
15980
15990
16000
16010
16020
16030
16040
16050
16060
16070
16080
16090
16100
16110
16120
16130
16140
16150
16160
16170
16180
16190
16200
16210
16220
16230
16240
16250
16260
16270
16280
16290
16300
16310
16320
16330
16340
16350
16360
16370
16380
16390
16400
16410
16420
16430
16440
16450
16460
16470
16480
16490
16500
16510
16520
16530
16540
16550
16560
16570
16580
16590
16600
16610
16620
16630
16640
16650
16660
16670
16680
16690
16700
16710
16720
16730
16740
16750
16760
16770
16780
16790
16800
16810
16820
16830
16840
16850
16860
16870
16880
16890
16900
16910
16920
16930
16940
16950
16960
16970
16980
16990
17000
17010
17020
17030
17040
17050
17060
17070
17080
17090
17100
17110
17120
17130
17140
17150
17160
17170
17180
17190
17200
17210
17220
17230
17240
17250
17260
17270
17280
17290
17300
17310
17320
17330
17340
17350
17360
17370
17380
17390
17400
17410
17420
17430
17440
17450
17460
17470
17480
17490
17500
17510
17520
17530
17540
17550
17560
17570
17580
17590
17600
17610
17620
17630
17640
17650
17660
17670
17680
17690
17700
17710
17720
17730
17740
17750
17760
17770
17780
17790
17800
17810
17820
17830
17840
17850
17860
17870
17880
17890
17900
17910
17920
17930
17940
17950
17960
17970
17980
17990
18000
18010
18020
18030
18040
18050
18060
18070
18080
18090
18100
18110
18120
18130
18140
18150
18160
18170
18180
18190
18200
18210
18220
18230
18240
18250
18260
18270
18280
18290
18300
18310
18320
18330
18340
18350
18360
18370
18380
18390
18400
18410
18420
18430
18440
18450
18460
18470
18480
18490
18500
18510
18520
18530
18540
18550
18560
18570
18580
18590
18600
18610
18620
18630
18640
18650
18660
18670
18680
18690
18700
18710
18720
18730
18740
18750
18760
18770
18780
18790
18800
18810
18820
18830
18840
18850
18860
18870
18880
18890
18900
18910
18920
18930
18940
18950
18960
18970
18980
18990
19000
19010
190

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/028165 A3(51) International Patent Classification: A61K 48/00,
C12N 15/00, 15/09, 15/40, 15/63, 15/79, 15/85

(21) International Application Number: PCT/US01/31355

(22) International Filing Date: 4 October 2001 (04.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/237,885 4 October 2000 (04.10.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENN-
SYLVANIA [US/US]; 3700 Market Street, Suite 300,
Philadelphia, PA 19104-3147 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
8 August 2002

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WEINER, David,
B. [US/US]; 717 Biocom Lane, Merion, PA 19066 (US).
YANG, Joo-Sung [KR/US]; 102 South 42nd Street, Apart-
ment 1, Philadelphia, PA 19104 (US).(74) Agents: DELUCA, Mark et al.; Woodcock Washburn
LLP, One Liberty Place, 46 floor, Philadelphia, PA 19103
(US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/028165 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF USING CAPSID PROTEIN FROM FLAVIVIRUSES AND PESTIVIRUSES

(57) Abstract: This invention provides methods of inducing cell death with *Flavivirus* or *Pestivirus* capsid protein, such as West Nile virus (WNV) capsid protein, and functional fragments thereof. The invention also provides methods of treating patients suffering from diseases characterized by hyperproliferating cells by administering pharmaceutical compositions WNV or encoding the same. Methods of identifying compounds which have anti-viral and/or anti-WNV and/or anti-*Flavivirus* and/or anti-*Pestivirus* capsid or other protein activity are disclosed. The invention also provides vaccine compositions comprising capsid or other proteins, or fragments thereof, or nucleic acids encoding same, from WNV or other virus including *Flavivirus* or *Pestivirus* and a pharmaceutically acceptable carrier. The invention also provides diagnostic methods and kits for identifying individuals exposed to WNV or other viruses including *Flavivirus* or *Pestivirus*.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/31355
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 48/00; C12N 15/00, 15/09, 15/40, 15/63, 15/79, 15/85 US CL : 435/320, 355; 514/44; 536/23.1, 23.7, 23.72 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/320, 355; 514/44; 536/23.1, 23.7, 23.72 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,744,140 A (PAOLETTI et al.) 28 April 1998 (28.04.1998), column 99, lines 33-35.	18, 19
A	ANDERSON et al. Isolation of West Nile virus from mosquitos, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. Science. December 1999, Vol. 286, pages 2331-2333.	2, 3, 5
A	Database GENBANK, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AF206517. ANDERSON et al. "West Nile virus isolate 2728 from USA polyprotein gene, partial cds," complete record, 28 December 1999.	2, 3, 5
A	ZHU et al. Hepatitis V virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. Journal of Virology. May 1998, Vol. 72, No. 5, pages 3691-3697, especially page 3691-3692.	1, 6, 8, 18-19
X		1, 6, 8, 18-19
A	CHEN et al. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. Journal of Virology. December 1997, Vol. 71, No. 12, pages 9417-9426, especially 9418, 9422.	1, 6, 9, 18-19
X		1, 6, 9, 18-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents: * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance * "E" earlier application or patent published on or after the international filing date * "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art * "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 February 2002 (06.02.2002)		Date of mailing of the international search report 24 APR 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Scott D. Priebe Telephone No. (703) 308-0196 SCOTT D. PRIEBE, PH.D. PRIMARY EXAMINER <i>Scott D. Priebe</i>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/31355
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A — X	RUGGIERI et al. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. <i>Virology</i> . 1997, Vol. 229, pages 68-76, especially page 68-70, 72.	1, 6, 9, 18-19 ----- 1, 6, 9, 18-19
A — X	RAY et al. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. <i>Virology</i> . 1996, Vol. 226, pages 176-182, especially page 177.	1-3, 5-6, 8, 18-19, 22- 23, 25, 27-28 ----- 18-19
A — X	RAY et al. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. <i>Journal of Biological Chemistry</i> , January 1998, Vol. 273, No. 4, pages 2256-2259, especially page 2257.	1-3, 5-6, 8, 18-19, 22- 23, 25, 27-28 ----- 18-19
A — X	SHRIVASTAVA et al. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. <i>Journal of Virology</i> . December 1998, Vol. 72, No. 12, pages 9722-9728, especially page 2723.	1-3, 5-6, 8, 18-19, 22- 23, 25, 27-28 ----- 18-19
A — X	MARUSAWA et al. Hepatitis C core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. <i>Journal of Virology</i> . June 1998, Vol. 73, No. 6, pages 4713-4720, especially page 4714.	1-3, 5-6, 8, 18-19, 22- 23, 25, 27-28 ----- 18-19
T	PARQUET et al. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. <i>FEBS Letters</i> . June 2001, Vol. 500, No. 1-2, pages 17-24.	1-3, 5-6, 8, 18-19, 22- 23, 25, 27-28
P,X	YANG et al. Induction of potent Th1-type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile virus New York isolate (WNV-NY1999). <i>Journal of Infectious Diseases</i> . 01 October 2001, Vol. 184, No. 7, pages 809-816, especially pages 809-810.	18-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/31355
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 5-6, 8, 18-19, 22-23, 25, 27-28 (directed to nucleic acids only)
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/31355

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-3, 5-6, 8, 18-19, 22-23, 25, 27-28, drawn to method for inducing apoptosis in a cell using nucleic acid encoding a flaviviral or pestiviral capsid protein.

Group II, claim(s) 1-4, 6-7, 18, 20-22, 24-28, drawn to method for inducing apoptosis in a cell using a flaviviral or pestiviral capsid protein.

Group III, claim(s) 9-17, drawn to method for identification of apoptosis inhibitors using the capsid protein.

Group IV, claim(s) 29-32, drawn to diagnosis method using antibodies to the capsid protein.

Group V, claim(s) 33-36, drawn to diagnosis method using capsid protein.

Group VI, claim(s) 37-38, 41-44, drawn to vaccine comprising capsid protein.

Group VII, claim(s) 39-44, drawn to vaccine comprising nucleic acid encoding capsid protein.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I and VII are directed to methods of using nucleic acids that encode flaviviral or pestiviral capsid proteins and products designed for that use. Groups II, III, V and VI are directed to methods of using flaviviral or pestiviral capsid proteins and products designed for that use. Group IV is directed to a method of using antibodies to flaviviral or pestiviral capsid proteins and products designed for that use. Each of the three sets of groups use different products having different structure and function. Furthermore, as clearly indicated in the description, e.g. Fig. 17, these capsid proteins and the nucleic acids encoding them were known in the prior art. Consequently, there is no special technical feature that links these three sets of groups.

Groups I-II, induction of apoptosis; group III, identification of inhibitors of apoptosis; groups IV and V, diagnosis of viral disease; and groups VI and VII, protection from viral disease are directed to different uses of nucleic acids, capsid proteins and antibodies. The goals of these different sets of groups are different, and the method steps and products used are likewise different. Consequently, there is no special technical feature linking these sets of groups, i.e. they are directed to materially or procedurally different methods of using prior art products.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

GENBANK, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS, SCISEARCH, USPAT, EPO

search terms: flavivir\$, pestivir\$, (west nile, hepatitis c, kunjin, dengue, yellow fever, bovine diarrhea, japanese or louis encephalitis) w/ vir\$, apoptosis, cell death, capsid or core protein, dna or genetic w/ vaccin\$ or immuniz\$, Weiner, D

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	L
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ジョースン ヤン

アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベニア、フィラデルフィア、サウス フォーティーセカンド ストリート 1 0 2、アパートメント 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37
 DA61 FA37 FB03 JA04
 4B024 AA01 AA11 BA32 CA02 DA03 HA11 HA17
 4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QX01
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA35 CA01 MA17 MA22 MA23 MA31
 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB212 ZB262
 ZB332
 4C085 AA03 BA51 BB11 CC08 CC21 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08

专利名称(译)	使用衍生自黄病毒和瘟病毒的衣壳蛋白的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2004510714A	公开(公告)日	2004-04-08
申请号	JP2002531803	申请日	2001-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	宾夕法尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	宾夕法尼亚大学的受托人		
[标]发明人	デイビッドビーワイナー ジョースンヤン		
发明人	デイビッド ビー.ワイナー ジョースン ヤン		
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		
CPC分类号	A61K38/162 A61K48/00 A61K2039/53 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/005 C07K2319/02 C12N2740/16222 C12N2770/24122 C12N2770/24322 G01N33/56983 G01N2469/20 Y02A50/39 Y02A50/394		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K39/12 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/569.L C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA61 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/JA04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/CA01 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA31 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08		
优先权	60/237885 2000-10-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过黄病毒属或瘟病毒属的衣壳蛋白诱导细胞死亡的方法，例如西尼罗河病毒 (WNV) 的衣壳蛋白或其功能片段。本发明还提供了通过给予包含WNV衣壳蛋白或编码其的核酸分子的药物组合物治疗患有特征在于过度增殖细胞的病症的个体的方法。公开了鉴定具有抗病毒和/或抗WNV和/或抗黄病毒和/或抗瘟病毒的衣壳蛋白活性的化合物的方法。本发明还提供了一种疫苗组合物，包含衣壳或其他蛋白或其功能性片段和来自其它病毒，包括WNV或黄病毒或瘟病毒可药用载体。

(43) 公表日				平成16年4月8日(20)	
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)			
A 61 K 38/00	A 61 K 37/02	Z N A	2 G 0 4 5		
A 61 K 39/12	A 61 K 39/12		4 B 0 2 4		
A 61 K 48/00	A 61 K 48/00		4 B 0 6 3		
A 61 P 35/00	A 61 P 35/00		4 C 0 8 4		
A 61 P 43/00	A 61 P 43/00	1 0 5	4 C 0 8 5		
審査請求 未請求		予備審査請求 有	(全 159 頁) 最終頁		
<hr/>					
(21) 出願番号	特願2002-531803 (P2002-531803)		(71) 出願人	593171363	
(86) (22) 出願日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)		ザ・トラステーズ・オブ・ザ・ユ		
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月4日 (2003. 4. 4)		シティ・オブ・ペンシルベニア		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/031355		アメリカ合衆国19104ペンシル		
(87) 国際公開番号	W02002/028165		州フィラデルフィア、チェスナット		
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002. 4. 11)		リート3160、スイート200		
(31) 優先権主張番号	60/237, 885		(74) 代理人	100067817	
(32) 優先日	平成12年10月4日 (2000. 10. 4)		弁理士 倉内 基弘		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	100085774	
			弁理士 風間 弘志		
			(72) 発明者	デイビッド ビー. ワイナー	
			アメリカ合衆国 19066 ペン		
			ニア、メリオン、ビーコン レイン		
			7		
			最終頁に		