

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/576 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01811243.9

[45] 授权公告日 2006 年 5 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1256591C

[22] 申请日 2001.6.14 [21] 申请号 01811243.9  
[30] 优先权  
[32] 2000. 6.15 [33] US [31] 60/212,082  
[32] 2001. 4. 2 [33] US [31] 60/280,811  
[32] 2001. 4. 2 [33] US [31] 60/280,867  
[86] 国际申请 PCT/US2001/019369 2001.6.14  
[87] 国际公布 WO2001/096875 英 2001.12.20  
[85] 进入国家阶段日期 2002.12.16  
[71] 专利权人 希龙公司  
地址 美国加利福尼亚州  
[72] 发明人 D·Y·基恩 P·阿尔坎杰尔  
L·坦德斯基 C·乔治-纳西门托  
D·科伊特 A·梅迪纳-塞尔比  
审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司  
代理人 徐 迅

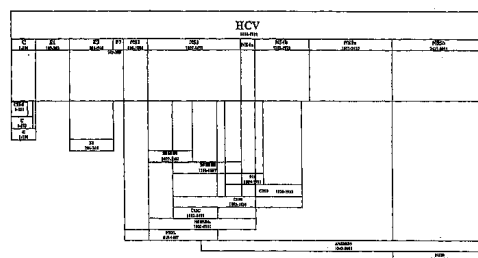
权利要求书 6 页 说明书 38 页 附图 16 页

[54] 发明名称

HCV 抗原/抗体组合试验

[57] 摘要

提供了一种可只使用一种固体基质同时检测样品中所存在的 HCV 抗原和抗体的 HCV 核心抗原和 NS3/4a 抗体组合试验, 以及用于该试验的免疫分析固相载体。



1. 一种免疫分析固相载体, 其特征在于, 包含了结合于该载体上的至少一种丙肝病毒抗核心抗体和至少一种分离的丙肝病毒 NS3/4a 表位。

5        2. 如权利要求 1 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 包含了结合于该载体的至少两个丙肝病毒抗核心抗体。

3. 如权利要求 1 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述至少一个抗核心抗体针对丙肝病毒核心抗原的 N-末端区。

10       4. 如权利要求 3 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体针对丙肝病毒的氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

5. 如权利要求 1 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体是单克隆抗体。

6. 如权利要求 1 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述 NS3/4a 表位是构象表位, 含有图 4A-4D 所述的氨基酸序列。

15       7. 如权利要求 1 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 该载体还结合有多表位融合抗原。

8. 如权利要求 7 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述多表位融合抗原含有图 7A-7F 所述的氨基酸序列, 或与所述序列具有至少 80% 序列相同性, 并存在于来自 HCV 感染个体的生物样品中的抗 HCV 抗体专一性反应的氨基酸序列。

20       9. 如权利要求 8 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述多表位融合抗原含有图 7A-7F 所述的氨基酸序列, 或与所述序列具有至少 90% 序列相同性, 并存在于来自 HCV 感染个体的生物样品中的抗 HCV 抗体专一性反应的氨基酸序列。

10. 如权利要求 8 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述多表位融合抗原含有图 5A-5F 所述的氨基酸序列。

25       11. 一种免疫分析固相载体, 其特征在于, 该载体结合有两个丙肝病毒抗核心单克隆抗体和 HCV NS3/4a 构象表位, 所述构象表位含有图 4A-4D 所述的氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述两种抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 N 末端区。

13. 如权利要求 12 所述的免疫分析固相载体, 其特征在于, 所述两个抗核心抗体针对 HCV 的氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

14. 一种免疫分析固相载体, 其特征在于, 该载体结合有两种丙肝病毒抗核心单克隆抗体、含有图 4A-4D 所述的氨基酸序列的 HCV NS3/4a 构象表位和含有图 5 7A-7F 所述的氨基酸序列的多表位融合抗原。

15. 一种在体外生物学样品中检测丙肝病毒感染的方法, 其特征在于, 该方法包括:

(a) 提供权利要求 1 所述的免疫分析固相载体;

(b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少一种抗核心抗体和 10 NS3/4a 表位分别结合的条件下, 将生物学样品与固相载体混合;

(c) 在复合物形成条件下, 在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少一种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位; (ii) 与来自生物学样品, 与 NS3/4a 表位有反应性的 HCV 抗体反应的抗原; 和(iii) 15 带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与(ii)的抗原反应; 和

(d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 N-末端区域, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 核心抗原 20 的 C-末端区域。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 120-130, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

18. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述与来自生物学样品的 HCV 25 抗体反应的抗原具有 HCV 多蛋白 c33c 区域的表位。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述 c33c 表位与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合, 带可检测标记的第二抗体与所述超氧化物歧化酶的氨基酸序列反应。

20. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述 NS3/4a 表位是构象表位,

具有图 4A-4D 所述的氨基酸序列。

21. 一种检测体外生物学样品中的丙肝病毒感染的方法，其特征在于，所述方法包括：

(a) 提供如权利要求 2 所述的免疫分析固相载体；

5 (b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体和 NS3/4a 表位分别结合的条件下，将生物学样品与固相载体混合；

(c) 在复合物形成条件下，在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体，其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体，其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少两种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位；

10 (ii) 与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位；和(iii) 带可检测标记的第二抗体，其中所述带可检测标记的第二抗体与人超氧化物歧化酶氨基酸序列反应；

(d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物，如存在，作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

15 22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述 NS3/4a 表位是构象表位，具有图 4A-4D 所述的氨基酸序列。

23. 一种检测体外生物学样品中的 HCV 感染的方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 提供权利要求 11 所述的免疫分析固相载体；

20 (b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体和 NS3/4a 构象表位分别结合的条件下，将生物学样品与固相载体混合；

(c) 在复合物形成条件下，在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体，其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体，其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少两种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位；

25 (ii) 与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位；和(iii) 带可检测标记的第二抗体，其中带可检测标记的第二抗体与人超氧化物歧化酶氨基酸序列反应；

(d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物，如存在，作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述至少两种抗核心抗体针对

HCV 核心抗原的 N-末端区域, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 C-末端区域。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其特征在于, 所述至少两种抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号, 所述可检测标记的 HCV 抗核心  
5 抗体针对 HCV 氨基酸 120-130, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

26. 一种检测体外生物学样品中的 HCV 感染的方法, 其特征在于, 该方法包括:

(a) 提供如权利要求 7 所述的免疫分析固相载体;

(b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与所述至少一种抗核心抗  
10 体、所述 NS3/4a 构象表位和所述多表位融合抗原结合的条件下, 将生物学样品与固相载体混合;

(c) 在复合物形成条件下, 在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少一种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位;  
15 (ii) 与来自生物学样品, 与 NS3/4a 表位和多表位融合抗体分别反应的第一和第二抗原; 和(iii)带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与(ii)的抗原反应;

(d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

20 27. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 N-末端区域, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 C-末端区域。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号, 所述可检测标记的 HCV 抗核心  
25 抗体针对 HCV 氨基酸 120-130, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

29. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 所述与来自生物学样品的 HCV 抗体反应的第一抗原具有 HCV 多蛋白 c33c 区域的表位。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其特征在于, 所述 c33c 表位与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合, 带可检测标记的第二抗体与所述超氧化物歧化酶的氨基酸序

列反应。

31. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 所述与来自生物学样品的 HCV 抗体反应的第二抗原含有 HCV 多蛋白 c22 区的表位。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 所述 c22 区域的表位含有 HCV 多蛋白氨基酸 Lys10-Ser99, 具有 47 位 Arg 缺失和 44 位 Trp 到 Leu 取代, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号, 其中所述表位与人超氧化物歧化酶的氨基酸序列融合, 带可检测标记的第二抗体与人超氧化物歧化酶氨基酸序列反应。

33. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 所述多表位融合抗原含有图 7A-7F 所述的氨基酸序列。

34. 一种检测体外生物学样品中 HCV 感染的方法, 其特征在于, 该方法包括:

(a) 提供权利要求 14 所述的免疫分析固相载体;

(b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体、NS3/4a 构象表位和多表位融合抗原分别结合的条件下, 将生物学样品与固相载体混合;

(c) 在复合物形成条件下, 在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少两种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位; (ii) 与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位和与人超氧化物歧化酶氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c22 区的表位; 和(iii)带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与所述人超氧化物歧化酶氨基酸序列反应;

(d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

35. 如权利要求 34 所述的方法, 其特征在于, 所述至少两种抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 N-末端区域, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 C-末端区域。

36. 如权利要求 35 所述的方法, 其特征在于, 所述至少两种抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 10-53, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号, 所述可检测标记的 HCV 抗核心抗体针对 HCV 氨基酸 120-130, 根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

37. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述 c22 区域的表位含有 HCV 多蛋白氨基酸 Lys10-Ser99，具有 Arg47 缺失和 44 位 Trp 到 Leu 取代，根据 HCV1 多蛋白序列进行编号。

38. 一种免疫诊断测试试剂盒，其特征在于，该试剂盒含有权利要求 1-14 任一所述的免疫分析固相载体和进行免疫诊断测试的说明书。

39. 一种制备免疫分析固相载体的方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 提供免疫固相载体；和

(b) 在其上结合至少一种 HCV 抗核心抗体，和分离的 HCV NS3/4a 构象表位。

40. 一种制备免疫分析固相载体的方法，其特征在于，该方法包括：

10 (a) 提供免疫固相载体；和

(b) 在其上结合两种 HCV 抗核心抗体，和至少一种分离的 HCV NS3/4a 构象表位。

41. 如权利要求 40 或 41 所述的方法，其特征在于，该方法还包括在固相载体上结合至少一种多表位融合抗原。

## HCV 抗原/抗体组合试验

## 5 技术领域

本发明主要涉及病毒诊断。特别是本发明涉及用以准确诊断的丙肝病毒感染的抗原/抗体组合试验。

## 发明背景

10 丙肝病毒(HCV)是胃肠外非甲非乙型肝炎(NANBH)的主要原因,它主要通过输血和性接触传播。该病毒存在于 0.4-2.0%供血者中。在约 50%感染者中导致慢性肝炎,其中约 20%被感染的个体产生肝硬化,有时导致肝细胞癌。因此,研究和控制该疾病在医学上是重要的。

Houghten 等首先鉴定并确定 HCV 是 NANBH 的原因。HCV 的病毒基因组序列是已知的,还有获得序列的方法。见例如国际出版物号 W089/04669; W090/11089;  
15 和 W090/14436。HCV 有一个 9.5kb 的正义单链 RNA 基因组,是黄病毒家族的一个成员。基于进化分析,鉴定出至少 6 个不同但相关的 HCV 基因型(Simmonds 等, J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399)。病毒编码一个多蛋白,有 3000 个氨基酸残基(Choo 等, Science(1989)244:359-362; Choo 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1991)88: 2451-2455; Han 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1991)88:1711-1715)。  
20 多蛋白在翻译同时或之后加工成结构和非结构(NS)蛋白。

具体地说,如图 1 所示,HCV 基因组编码几种蛋白质。HCV 多蛋白的切割产物的顺序和命名如下:  $\text{NH}_2$ -C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。宿主蛋白酶催化最初多蛋白的切割,释放三种结构蛋白:N-末端核衣壳蛋白(称为“核心”)和两种包膜糖蛋白“E1”(也称为 E)和“E2”(也称为 E2/NS1),和含有病毒  
25 酶的非结构(NS)蛋白。NS 区称为 NS2、NS3、NS4 和 NS5。NS2 是具有蛋白水解活性的膜内在蛋白。NS2,单独或与 NS3 组合,切开 NS2-NS3 酰胺(sissle)键,从而产生 NS3 N-末端并释放一个大的多蛋白,它含有丝氨酸蛋白酶和 RNA 螺旋酶活性。NS3 蛋白酶加工剩余的多蛋白。多蛋白成熟的完成是由 NS3-NS4a 连接的自身催化切割引发的,这种自身催化切割是由 NS3 丝氨酸蛋白酶催化的。随后 HCV 多蛋白  
30 NS3 介导的切割似乎涉及另一种多蛋白的 NS3 分子。在这些反应中,NS3 释放 NS3 辅助因子(NS4a)、两种蛋白质(NS4b 和 NS5a),和 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶(NS5b)。

人们描述了许多,衍生自 HCV 多蛋白的一般和特异性的多蛋白用作 HCV 的免



疫学和诊断的试剂。参见, 例 Houghton 等, 欧洲出版号 318, 216 和 388, 232; Choo 等, *Science*(1989)244:359-362; Kuo 等, *Science*(1989)244: 362-364; Houghton 等, *Hepatology*(1991)14:381-388; Chien 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:10011-10015; Chien 等, *J. Gastroent. Hepatol.* (1993)8:S33-39; Chien 等, 国际出版号 W0 93/00365; Chien, D.Y., 国际出版号 W094/01778。这些出版物主要对 HCV 和 HCV 多肽免疫学试剂的制备和使用提供了广泛的背景。

灵敏和专一筛查和鉴定 HCV 载体和 HCV 污染的血液或血液制品的方法会对医学带来重要的进步。在约 10%输血的病人中发生输血后肝炎(PTH), 而 HCV 是多达 90%这些病例的原因。病人护理和预防 HCV 通过血液或血液制品, 或通过密切的个人接触传播需要可靠的诊断和预后工具。因此, 人们已开发了几种试验用于 HCV 感染的血清学诊断。见例如 Choo 等, *Science*(1989) 244:359-362; Kuo 等, *Science*(1989)244:362-364; Choo 等, *Br. Med. Bull.* (1990)46:423-441; Ebeling 等, *Lancet*(1990)335:982-983; van der Poel 等, *Lancet*(1990)335:558-560; van der Poel 等, *Lancet*(1991)337:317-319; Chien, D.Y., 国际出版号 W0 94/01778; Valenzuela 等, 国际出版号 W097/44469; 和 Kashiwakuma 等, 美国专利号 5, 871, 904。

一些基于血清学的试验面临的显著问题是, 在病毒感染和检测之间有明显的间隔, 通常超过 80 天。该试验间隔可对输血受体产生更大的危险。为了克服该问题, 开发了直接检测病毒 RNA 的基于核酸的测试(NAT), 和检测病毒抗原而不是抗体反应的 HCV 核心抗原试验。见例如 Kashiwakuma 等, 美国专利号 5, 871, 904; Beld 等, *Transfusion*(2000)40:575-579。

然而, 人们仍然需要灵敏、准确的诊断和预后工具, 以提供充分的病人护理并防止 HCV 通过血液和血液制品, 或密切的个人接触传播。

#### 发明简述

本发明部分是基于发现: HCV 血清转化抗体通常是抗核心和抗 NS3(解旋酶)抗体。因此, 本发明提供了一种 HCV 核心抗原和 NS3 抗体组合的试验, 能用一种固态基质同时检测存在于样品中的 HCV 抗原和抗体。

因此在一个实施例中, 本发明针对一种免疫分析固相载体, 它含有至少一种 HCV 抗核心抗体和至少一种与其结合的分离的 HCV NS3/4a 表位。抗体和 NS3/4a 表位可以是任何本文所述的分子。因此, 固相载体可含有任何本文所述的多表位融合抗原, 例如含有图 7A-7F 所述的氨基酸序列的多表位融合抗原。

在某些实施例中, 固相载体含有至少两个与其相结合的 HCV 抗核心抗体。另

外, 抗核心抗体可以是单克隆抗体。另外, NS3/4a 表位可以是构象表位, 例如含有图 4A-4d 中所述氨基酸序列的构象 NS3/4a 表位。

在另一个实施例中, 本发明针对一种免疫分析固相载体, 它含有至少两种 HCV 抗核心单克隆抗体, 和与其结合的至少一种 NS3/4a 构象表位, 它含有图 4A-4D 所述的氨基酸序列。

在另一个实施例中, 本发明针对一种检测生物学样品中 HCV 感染的方法。该方法包括: (a) 提供如上所述的一种免疫分析固相载体; (b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少一种抗核心抗体和 NS3/4a 表位分别结合的条件下, 将生物学样品与固相载体混合; (c) 在复合物形成条件下, 在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少一种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位; (ii) 与来自生物学样品中, 与 NS3/4 表位有反应性的 HCV 抗体相反应的抗原; 和(iii)带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与(ii)的抗原反应; 和(d)检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。NS3/4a 表位可以是构象表位, 例如具有图 4A-4D 描述的 NS3/4a 序列的构象表位。

在另一个实施例中, 本发明针对一种检测生物学样品中的 HCV 感染的方法。该方法包括: (a) 提供如上所述, 其上结合有至少两种 HCV 抗核心的免疫分析固相载体; (b) 在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体和 NS3/4a 表位分别结合的条件下, 将生物学样品与固相载体混合; (c) 在复合物形成条件下, 在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少一种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位; (ii) 与 hSOD 氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位; 和(iii)带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与 hSOD 氨基酸序列反应; 和(d)检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。NS3/4a 表位可以是构象表位, 例如具有图 4A-4D 描述的 NS3/4a 序列的构象表位。

在上述任一实施例中, 抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 N-末端区, 例如 HCV 的氨基酸 10-53, 数字相对于 HCV1 多蛋白序列, 和/或带可检测标记的 HCV 抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 C-末端区, 例如 HCV 的氨基酸 120-130 位, 数字相对于 HCV 多蛋白序列。另外, 与生物学样品中的 HCV 抗体反应的抗原可来自 NS3 区, 例如 HCV 多蛋白的 c33c 区的表位, 并可以与人超氧化物歧化酶(hSOD)的氨基

酸序列相融合。在该实施例中，带可检测标记的第二抗体与 hSOD 氨基酸序列发生反应。

在另一个实施例中，本发明针对一种检测生物学样品中的 HCV 感染的方法。该方法包括：(a)提供免疫分析固相载体，该载体含有两种 HCV 抗核心抗体和含有图 4A-4D 所述的氨基酸序列的构象表位；(b)在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体和 NS3/4a 构象表位分别结合的条件下，将生物学样品与固相载体混合；(c)在复合物形成条件下，在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体，其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体，其中标记的抗核心抗体针对与固相载体上结合的至少两种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位；(ii)与 hSOD 氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位；和(iii)带可检测标记的第二抗体，其中带可检测标记的第二抗体与 hSOD 氨基酸序列反应；检测抗体和抗原之间形成的复合物，如存在，作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

在某些实施例中，至少两种抗核心抗体针对 HCV 核心抗原的 N-末端区，例如针对 HCV 的氨基酸 10-53，数字对应于 HCV1 多蛋白序列，和/或带可检测标记的 HCV 抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 C-末端区，例如 HCV 的氨基酸 120-130，数字对应于 HCV 多蛋白序列。

在另一个实施例中，本发明针对一种检测生物学样品中的 HCV 感染的方法。该方法包括：(a)提供免疫分析固相载体，该载体含有多个表位融合抗原；(b)在能使存在于生物学样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体、NS3/4a 构象表位和多表位融合抗原结合的条件下，将生物学样品与固相载体混合；(c)在复合物形成条件下，在步骤(b)的固相载体中加入(i)带可检测标记的第一抗体，其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体，其中标记的抗核心抗体针对与固相载体上结合的至少一种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位；(ii)与来自生物学样品，与 NS3/4a 表位和多表位融合抗体分别反应的第一和第二抗原；和(iii)带可检测标记的第二抗体，其中带可检测标记的第二抗体与(ii)的抗原反应；(d)检测抗体和抗原之间形成的复合物，如存在，作为生物学样品中存在 HCV 感染的指标。

抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 N-末端区，所述第一种可检测标记的 HCV 抗-核心抗体可针对 HCV-核心抗原的 C-末端区。另外，与来自生物学样品的 HCV 抗体反应的第一种抗原可含有 HCV 多蛋白 c33c 区的表位，并可以与 hSOD 氨基酸序列融合。在这种情况下，带可检测标记的第二抗体与 hSOD 氨基酸序列反应。另

外, 与来自生物样品中的 HCV 抗体反应的抗原可含有 HCV 多蛋白的 c22 区域的表位, 例如含有 HCV 多蛋白氨基酸 Lys10-Ser99, 具有 47 位 Arg 缺失和 44 位 Trp 被 Leu 取代的表位, 数字对应于 HCV1 多蛋白序列。表位可以与 hSOD 氨基酸序列融合。如果是这样, 带可检测标记的第二抗体与 hSOD 氨基酸序列反应。多表位融合抗原可含有图 7A-7F 的氨基酸序列。

在另一个实施例中, 本发明针对一种检测生物样品中 HCV 感染的方法, 所述方法包括: (a) 提供免疫分析固相载体, 该载体含有与其结合的两种 HCV 抗核心单克隆抗体、含有图 4A-4D 描述的氨基酸序列的 HCV NS3/4a 构象表位、和含有图 7A-7F 描述的氨基酸序列的多个表位融合抗原; (b) 在能使存在于生物样品中的 HCV 抗原和抗体与至少两种抗核心抗体、NS3/4a 构象表位和多表位融合抗原分别结合的条件下, 将生物样品与固相载体混合; (c) 在复合物形成条件下, 在步骤 (b) 的固相载体中加入 (i) 带可检测标记的第一抗体, 其中带可检测标记的第一抗体是带可检测标记的 HCV 抗核心抗体, 其中标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的至少两种抗核心抗体不同的 HCV 核心表位; (ii) 与 hSOD 氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c33c 区的表位和与 hSOD 氨基酸序列融合的 HCV 多蛋白 c22 区的表位; 和 (iii) 带可检测标记的第二抗体, 其中带可检测标记的第二抗体与所述 hSOD 氨基酸序列反应; (d) 检测抗体和抗原之间形成的复合物, 如存在, 作为生物样品中存在 HCV 感染的指标。

在该实施例中, 至少两种抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 N-末端区, 例如 HCV 的氨基酸 10-53, 数字对应于 HCV1 多蛋白序列, 带可检测标记的 HCV 抗核心抗体可针对 HCV 核心抗原的 C-末端区, 例如 HCV 的氨基酸 120-130, 数字对应于 HCV 多蛋白序列。另外, c22 区的表位可含有 HCV 多蛋白氨基酸 Lys10-Ser99, 具有 47 位 Arg 缺失和 44 位 Trp 被 Leu 取代的表位, 数字对应于 HCV1 多蛋白序列。

在其它实施例中, 本发明针对免疫诊断测试试剂盒, 它包括上述免疫分析固相载体和进行该免疫诊断测试的说明书。

在其它实施例中, 本发明指一种制备免疫分析固相载体的方法, 包括: (a) 提供免疫固相载体; 和 (b) 在其上结合至少一种 HCV 抗核心抗体, 例如一种或两种或多种, 和至少一种分离的 HCV NS3/4a 表位, 和可任选的, 多表位融合抗原。抗核心抗体、NS3/4a 表位和多表位融合抗原如上所述。

在其它实施例中, 本发明针对一种多表位融合抗原, 它含有图 7A-7F 描述的氨基酸序列, 或与其至少有 80% 序列相同性, 例如 90% 或以上的序列相同性的氨基酸序列, 它与存在于 HCV 感染个体的生物样品中的抗-HCV 抗体专一性反应。在

一些实施例中，多表位融合抗原是由图 5A-5F 中描述的氨基酸序列构成的。

在其它实施例中，本发明针对一种多核苷酸，它含有上述多表位融合抗原的编码序列，重组载体，它含有该多肽，被重组载体转化的宿主细胞，和产生重组多表位融合抗原的方法，包括：(a)产生上述的一群宿主细胞；和(b)在表达存在于重组载体中的编码序列编码的多表位融合抗原的条件下培养细胞群。

本发明的这些和其它方面在参考下列详述和附图后变得明显。

#### 附图简述

图 1 是 HCV 基因组图学，描述了衍生出本试验试剂(蛋白质和抗体)的多蛋白的各区。

图 2 是示意图，显示本发明的代表性抗体/抗原组合试验。

图 3 描述了用于本试验的代表性 NS3/4a 构象抗原的氨基酸序列。182 位黑体的丙氨酸取代正常存在于该位置的天然丝氨酸。

图 4A-4D 描述了用于本试验的另一种代表性 NS3/4a 构象抗原的 DNA 和对应的氨基酸序列。图 4A-4D 的 403 和 404 位的氨基酸代表 HCV-1 的天然氨基酸序列 Thr 到 pro, Ser 到 Ile 的取代。

图 5 是 pd.HCV1a.ns3ns4aPI 构建的图表。

图 6 是代表 MEFA12 的图。

图 7A-7F 描述了 MEFA12 的 DNA 和对应的氨基酸序列。

图 8 是本发明使用 MEFA12 的代表性免疫试验的示意图。

#### 发明详述

本发明实施除非另外说明，将使用化学、生物化学、重组 DNA 技术和免疫学本领域技术范围内的常规方法。这些技术在文献中有完整的解释。见例如 Foudamental Virology, 第二版, vol. I & II(B.N.Fields 和 D.M.Knipe 编); Handbook of Experimental Immunology, Vols I-IV(D.M.Weir 和 C.C.Blackwell 编, Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc. 最新版); Sambrook 等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, 1989; Methods in Enzymology (S.Colowick 和 N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.)。

需要注意的是，如本说明书中和权利要求中使用的，单数形式“一”、“一个”、“该”包括复数参考，除非内容明显说明。因此，“一抗原”的应用包括两个或多个抗原的混合物等。

在文章中使用了下列氨基酸缩写：

丙氨酸: Ala(A)	精氨酸: Arg(R)
天冬酰胺: Asn(N)	天冬氨酸: Asp(D)
半胱氨酸: Cys(C)	谷氨酰胺: Gln(Q)
谷氨酸: Glu(E)	甘氨酸: Gly(G)
组氨酸: His(H)	异亮氨酸: Ile(I)
亮氨酸: Leu(L)	赖氨酸: Lys(K)
甲硫氨酸: Met(M)	苯丙氨酸: Phe(F)
脯氨酸: Pro(P)	丝氨酸: Ser(S)
苏氨酸: Thr(T)	色氨酸: Trp(W)
酪氨酸: Tyr(Y)	缬氨酸: Val(V)

#### I. 定义

在描述本发明中，使用了下列术语，并如下定义。

术语“多肽”和“蛋白质”指氨基酸残基的聚合物，不限于产物的最小长度。

- 5 因此肽、寡肽、二聚物、多聚物等包括在该定义中。全长的蛋白质及其片段包括在该定义中。术语还包括多肽的表达后修饰，例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。另外，为了本发明的应用，“多肽”指包括天然序列的修饰，例如缺失、添加和取代(通常为性质保守)的蛋白质。只要蛋白质维持所需活性。这些修饰可以通过定点诱变设计，或可以是偶然的，例如通过生产蛋白质的宿主突变，或用 PCR 扩
- 10 增产生的错误。

- HCV 多肽是一种如上所述衍生自 HCV 多蛋白的多肽。多肽不需要物理衍生自 HCV，但可以是合成或重组产生的。另外，多肽可衍生自任意的各种 HCV 株，例如来 HCV 自 1, 2, 3 或 4。在这些病毒株之间有许多保守和可变的区域，一般当两条序列排列比较时，衍生自这些区域的表位的氨基酸序列将具有高度的序列同源性，
- 15 例如大于 30%，优选高于 40%的氨基酸序列的同源性。因此，例如术语“NS3/4a”多肽指任意各种 HCV 株的天然 NS3/4a 和 NS3/4a 类似物、突变蛋白和免疫学片段，如下进一步定义。许多这些病毒株的完整基因型是已知的。见例如美国专利号 6, 150, 087 和 GenBank 登录号 AJ238800 和 AJ238799。

- 术语“类似物”和“突变蛋白”指参照分子的生物学活性衍生物，或这些衍生物保留所需活性，例如在本文所述的试验中的免疫反应性的片段。一般术语“类似物”指具有天然多肽序列和结构，以及相对于天然分子的一个或多个氨基酸添
- 20

加、取代(通常为性质保守)和/或缺失的化合物,只要所修饰不破坏免疫活性。术语“突变蛋白”指具有有一种或多种肽拟物(“类肽”),例如国际出版物号 W091/04282 中所述的。优选类似物或突变蛋白具有与天然分子至少相同的免疫活性。制备多肽类似物和突变蛋白的方法是本领域已知的,如下进一步所述。

- 5       特别优选的类似物包括性质上保守的取代,即这些取代发生在与它们的侧链有关的一类氨基酸中。具体而言,氨基酸一般被分成四类:(1)酸性——天冬氨酸和谷氨酸;(2)碱性——赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性——丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;(4)无电荷的极性氨基酸——甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。有时将苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸归为芳族氨基酸。例如,有理由预测,
- 10       单独用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、用谷氨酸取代天冬氨酸、用丝氨酸取代苏氨酸,或者使用结构上相关的氨基酸取代类似的保守的氨基酸,这样的取代将不会过于影响生物学活性。例如,感兴趣的多肽可包括达到 5-10 个保守的或不保守的氨基酸取代,甚至达到 15-25 个保守的或不保守的氨基酸取代,或者为 2-25 之间的整数,只要该分子的所需功能仍维持完整。本领域的熟练技术人员可结合本领域熟知的 Hopp/Woods 和 Kyte-Doolittle 曲线图,容易地测定感兴趣的分子中可耐受改变的区域。
- 15

- 术语“片段”指仅由完整的全长多肽序列和结构的一部分组成的多肽。该片段可包括该天然多肽的 C 末端删除和/或 N 末端删除。具体的 HCV 蛋白质的“免疫原性片段”一般至少包括该全长分子的约 5-10 个连续的氨基酸残基,较佳至少约含有该全长分子的 15-25 个连续的氨基酸残基,最佳至少约含有该全长分子的 20-50 个或以上的连续的氨基酸残基,这些氨基酸残基限定了一个表位;或者含有 5 个到该全长序列氨基酸数目之间的任何整数的氨基酸残基,只要所述的片段保留了免疫原性活性。例如,优选的免疫片段,包括但不限于 HCV 片段,选自
- 20       例如多蛋白的氨基酸 10-45、67-88 和 120-130,表位 5-1-1(在病毒基因组 NS3 区中)和 HCV 多蛋白的 E1、E2、c33c(NS3)、c100(NS4)、NS3/4a 和 NS5 区衍生的限定的表位,和任何其它各种 HCV 多蛋白中鉴定出的各种表位。见例如 Chien 等, *Preoc. Natl. Acad. Sci. USA*(1992), 89: 10011-10015; Chien 等, *J. Gastroent. Hepatol.*, (1993), 8: S33-39; Chien 等, 国际出版物第 WO 93/00365; Chien, D. Y., 国际出版物第 WO 94/01778; 美国专利号 6,150,087 和 6,121,020。
- 25
- 30

术语“表位”在文中指至少约有 3-5 个、较佳约有 5 到 10 或 15 个、但不超过约 1000 个氨基酸(或其中的任何整数)的序列;它定义了一个其自身或作为更大

序列的一部分而与在对其应答中产生的抗体结合的序列。该片段的长度没有严格的上限，它几乎可含有蛋白质序列的全长，或者甚至可包括含有 HCV 多蛋白的两个或多个表位的融合蛋白。用于本发明的表位并不限于具有其母体蛋白质一部分的该确切序列的多肽。实际上，病毒基因组处于不断变动的状态，它们含有几种在隔离种群间具有高度的变动性的可变的结构域。因而，术语“表位”包括与天然序列相同的序列，以及该天然序列的修饰物，如删除、添加和取代(一般仍保留其性质)。

可使用本领域周知的各种表位作图技术中的任何一种来鉴别包括表位在内的给定多肽的区域。见例如 *Methods in Molecular Biology* 中的 *Epitope Mapping Protocols*, 第 66 卷(Glenn E. Morris 编辑, 1996), Humana Press, Totowa, New Jersey。例如，通过如同时在固相载体上合成大量的对应于蛋白质分子的一些部分的肽，然后在这些肽仍连接在该载体上的情况下使它们与抗体反应，就可测定各线性表位。这些技术在本领域中是已知的，并在美国专利第 4, 708, 871; Geysen 等人(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3998-4002; Geysen 等(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:178-182; Geysen 等(1986), *Molec. Immunol.*, 23: 709-715 中有所描述。用这些技术鉴定出了许多 HCV 表位。见例如 Chien 等, *Viral Hepatitis and Liver Disease*(1994), pp320-324 和下文。类似的，通过使用如 X-射线结晶学和二维核磁共振法测定氨基酸的空间构象，从而可容易地鉴定构象表位。例如参见 *Epitope Mapping Protocols*(同上)。使用如供计算使用的标准的抗原性曲线图和亲水性图，如用 Oxford Molecular Group 获得的 Omega 1.0 版软件计算，也可鉴别出蛋白质的抗原区域。这个计算机程序采用 Hopp/Woods 方法(Hopp 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1981), 78: 3824-3828)绘制抗原性曲线图，使用 Kyte-Doolittle 技术(Kyte 等人, *J. Mol. Biol.*(1982), 157: 105-132)绘制亲水性图。

术语“构象表位”在本文中是指全长蛋白质的一部分，或其类似物或突变蛋白，它具有编码该全长天然蛋白质内的表位的氨基酸序列的结构特征。天然的结构特征包括但不限于糖基化和三维结构。表位限定序列的长度可广泛改变，因为据信这些表位是通过抗原的三维形状形成的(例如折叠)。因此形成该表位的氨基酸可能数量较少，但在全长分子中分散很开(或甚至在二聚物的情况下是不同分子上等)，通过折叠形成正确的表位构象。限定表位的残基之间的抗原部分对于表位的构象结构不是关键的。例如，这些中间序列的缺失或取代可能不影响构象表位，条件是保留对于表位构象关键的序列(例如涉及二硫键形成的半胱氨酸糖基化位点等)。



可用上述方法容易的识别 NS3/4a 区中存在的构象表位。另外, 给定的多肽中构象表位的存在与否可通过用抗体(构象表位的多克隆血清或单克隆抗体)筛查抗原, 并将其反应性与抗原维持仅线性表位(如存在)的变性形式比较来确定。在用多克隆抗体的筛选中, 有利的是首先用变性的抗原吸附多克隆血清, 看它是否保留针对感兴趣抗原的抗体。另外, 在 NS3/4a 的例子中, 保留天然构象的分子还可以具有蛋白酶, 可任选的解旋酶活性。这些活性可用酶试验检测, 如下所述。

优选重组产生的构象表位, 并使它在一种在能保留其所需结构特征的条件下(如表位没有变性)能被抽提出来的细胞中表达。这样的细胞包括细菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。重组构象表位在 HCV 多蛋白中的表达和从中分离的技术在如国际出版物第 WO 96/04301、WO 94/01778、WO 95/33053、WO 92/08734 中有所描述。另外, 可能表达抗原并在回收后恢复其蛋白质性质。还理解化学合成也可提供构象抗原模拟表位, 它与“天然”抗原的构象表位交叉反应。

本文所用的术语“多表位融合抗原”或“MEFA”指一种多肽, 其中多个 HCV 抗原是一条连续的氨基酸链的部分, 该链在天然不存在。HCV 抗原可以通过肽键彼此直接连接, 或通过插入氨基酸序列分隔。融合抗原还可以含有 HCV 多蛋白外源的序列。另外, 存在的 HCV 序列可以来自多基因型和/或 HCV 的分离物。本免疫试验中所用的具体的 MEFA 的例子在例如国际出版号 WO97/44469 中详述, 并在下文中进一步详述。

“抗体”指通过化学或物理方式与感兴趣的多肽专一性结合的分子。因此, HCV 抗体是一种与 HCV 核心蛋白特异性结合的分子。本文所用的术语“抗体”包括多克隆和单克隆制备物获得的抗体, 以及如下: 杂交(嵌合)抗体分子(见例如 Winter 等(1991) Nature 249:293-299; 和美国专利号 4,816,567); F(ab')<sub>2</sub> 和 F(ab) 片段; Fv 分子(非共价杂二聚体, 见例如 Inbar 等(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; 和 Ehrlich 等(1980) Biochem 19:4091-4096); 单链 Fv 分子(sFv)(见例如 Huston 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883); 二聚和三聚抗体片段构建物; 小抗体(见例如 Pack 等(1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber 等(1992) J Immunology 149B: 120-126); 人源化抗体分子(见例如 Riechmann 等(1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyan 等 (1988) Science 239: 1534-1536; 和英国专利申请号 GB 2,276,169, 1994 年 9 月 21 日出版); 和从这些分子获得的任何功能性片段, 其中这些片段维持专利抗体分子的免疫结合性质。

本文所用的术语“单克隆抗体”指具有同源抗体群的抗体组合物。术语不限于抗体种类或来源, 也不受其制备的方式限制。因此, 该术语包括从小鼠杂交瘤

获得的抗体，用人而不是小鼠杂交瘤获得的人单克隆抗体。见例如 Cote 等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p.77。

“重组”蛋白质是一种维持所需活性的蛋白质，它是用本文所述的重组 DNA 技术制备的。一般克隆感兴趣的基因，然后在转化的生物体中表达，如下所述。

- 5 宿主机体表达外源基因，在表达条件下产生蛋白质。

当对多肽使用时，“分离的”意味着所述的分子从发现该分子天然存在的整个生物体中分离和分开，或基本不存在其它相同类型的生物大分子。术语“的”对于多肽是：一种核酸分子，它完全或部分缺乏与其天然结合的序列；或如天然存在的序列，但具有与其结合的异源序列；或染色体分离的分子。

- 10 “ HCV，例如来自 HCV1、2 或 3 的的抗原决定簇。更具体的，已知表位，例如 5-1-1，这些表位在病毒株 1、2 和 3 之间变化。因此，这三种不同病毒株之间的表位 5-1-1 是等价的抗原决定簇，因此是“  
序列具有高度的序列同源性，例如大于 30%、40%的氨基酸序列同源性。

- 15 “同源性”指两条多核苷酸或两条多肽分子之间的相似性百分数。两条 DNA 或两条多肽序列是“基本同源的”，是指在确定的长度内有至少约 50%，优选至少约为 75%、更佳至少约为 80-85%、尤其佳至少约为 90%、最佳至少约为 95-98 %序列相似性。如本文所用的，基本同源也指与特定的 DNA 或多肽序列完全相同的序列。

- 20 通常，“相同性”指两条多核苷酸或多肽序列上准确的核苷酸对核苷酸或者氨基酸对氨基酸对应。通过排列两个分子的序列直接比较它们的序列信息，计算两条排列的序列间匹配的准确数量，将其除以最短序列的长度，然后乘以 100，从而可得到相同性百分数。

- 在相似性和相同性分析中可辅助使用易于获得的计算机程序，如 ALIGH、  
25 Dayhoff、M.O.(*Atlas of Protein Sequence and Structure*、M.O.Dayhoff 编辑, 5 Suppl., 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC), 它适用于 Smith 和 Waterman 分析肽用的局部同源性算法(*Advances in Appl. Math.*, 2: 482-489, 1981)。可从 Wisconsin Sequence Analysis Package(第 8 版, 从 Genetics Computer Group, Madison, WI 获得)获得测定核苷酸序列相同性的程序，例如，  
30 BESTFIT、FASTA 和 GAP 程序，这些程序也依赖于 Smith 和 Waterman 算法。使用制造者建议的和上述 Wisconsin Sequence Analysis Package 所述的默认参数可容易地使用这些程序。例如，可使用 Smith 和 Waterman 的同源性算法的默认计分

表和 6 个核苷酸位置的间隔罚分(gap penalty)测定具体的核苷酸序列与参比序列的相同性百分数。

本发明建立相似性百分数的另一方法是使用版权属于 University of Edinburgh、由 John F. Collins 和 Shane S. Sturrok 开发、由 IntelliGenetics, Inc.(Mountain View, CA)发行的 MPSRCH 程序包。Smith-Waterman 算法可在这套程序包中使用, 其中, 在计分表中使用默认参数(例如, 间隔开放罚分=12, 间隔延伸罚分=1, 间隔=6)。从这批数据产生的“匹配”值反映出“序列相似性”。计算序列间的相同性百分数或相似性百分数的其它合适的程序在本领域中一般都是已知的, 例如, 另一种排列校正程序是 BLAST, 可使用默认参数。例如, 可使用下述默认参数的 BLASTN 和 BLASTP: 基因编码=标准; 过滤=无; 链=二; 截留=60; 期望值=10; 矩阵=BLOSUM62; 描述=50 个序列; 排序=HIGH SCORE; 数据库=无冗余, GenBank+ EMBL+ DDBJ+ PDB+ GenBank CDS 翻译 + Swiss 蛋白+ Spupdate+ PIR。在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> 网址上可查到这些程序的详细描述。

或者, 在各同源区域之间形成稳定的双链的条件下进行多核苷酸杂交, 接着用单链特异性核酸酶消化, 然后测定消化后片段的大小, 从而测出同源性。在如(对具体的体系所定义的)严格条件下进行的 Southern 杂交试验中, 可鉴别基本同源的 DNA 序列。确定适当的杂交条件在本领域熟练技术人员所掌握的知识之内。例如, 参见 Sambrook 等人, 同上; *DNA Cloning*, 同上; *Nucleic Acid Hybridization*, 同上。

“编码序列”或“编码”选定多肽的序列, 是指当它处于适当的调节序列的控制下时, 它在体外或体内被转录(对于 DNA)和翻译(对于 mRNA)成多肽的一种核酸分子。该编码序列的界限可由 5'(氨基)末端的起始密码子和 3'(羧基)末端的翻译终止密码子来限定。转录终止序列可以位于该编码序列的 3'端。

“可操纵性连接”指各元件的排列, 其中, 所述成分被构建在一起, 以便执行它们的预定功能。因而, 可操纵性连接于编码序列的给定的启动子, 在存在正确的转录因子等时, 能使该编码序列有效表达。该启动子不需要与该编码序列邻接, 只要它起到指导该序列表达的功能即可。因此例如, 不参与翻译但转录的序列可存在于启动子序列和编码序列之间, 与可转录的内含子一样; 并且仍可认为该启动子序列“可操纵性连接”于该编码序列。

“控制元件”指帮助与其连接的编码序列表达的多核苷酸。该术语包括启动子、转录终止序列、上游调节结构域、聚腺苷酸化信号、非翻译区域(包括 5'-UTR

和 3'UTR)、适当时还有前导序列和增强子, 这些序列共同使宿主细胞中的编码序列转录和翻译。

“启动子”在本文中指能结合宿主细胞中的 RNA 聚合酶并启动与之操作性连接的下游(3'方向)编码序列的转录的 DNA 调节区域。用于本发明的启动子包含以高于背景值的可检测的水平启动感兴趣的基因的转录所需的最小数量的碱基或元件。在该启动子序列中有转录启动位点以及负责 RNA 聚合酶结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。真核细胞启动子常常(但不总是)含有“TATA”盒和“CAT”盒。

当在 RNA 聚合酶结合到启动子序列时, 控制序列“指导转录”了细胞中的编码序列, 并将该编码序列转录成 mRNA, 之后, 该 mRNA 被翻译成由该编码序列编码的多肽。

“表达盒”或“表达构建物”指能指导感兴趣的序列或基因的表达的装配物。该表达盒包括上述控制元件, 如操作性连接于感兴趣的序列或基因(以指导其转录)的启动子, 该表达盒还常常包括多腺苷酸化序列。在本发明的某些实施例中, 在此所述的表达盒可被包含在质粒构建物中。除了该表达盒的组分外, 该质粒构建物还含有一种或多种选择性标记物、使该质粒构建物以单链 DNA(如 M13 复制源)存在的信号、至少一个多克隆位点和“哺乳动物”复制源(如 SV40 或腺病毒复制源性)。

“转化”在本文中指将外源多核苷酸导入宿主细胞中, 而不考虑插入的方法: 例如, 通过直接摄取、转染、感染等的转化。下文进一步描述具体的转染方法。该外源多核苷酸可维持为未整合的载体, 例如, 游离型载体, 或者可以被整合到宿主基因组中。

“宿主细胞”是已被转化的细胞, 或者能被外源 DNA 序列转化的细胞。

“一般固相载体”指一个固相基质, 本免疫试验所用的 HCV 多肽与其共价或通过非共价方式, 例如疏水性吸附结合。

“免疫反应性”意味着所关心的抗原与存在 HCV 感染的个体的生物学样品中的抗-HCV 抗体反应。

“免疫复合物”意味着当抗体和抗原上的表位结合时, 形成的组合。

本文所用的“生物学样品”指个体分离的组织或液体的样品, 它包括但不限于例如血液、血浆、粪便物质、尿液、骨髓、胆汁、脊髓液、淋巴液、皮肤样品、皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物、泪液、唾液、乳液、血细胞、器官、活组织检查和体外细胞培养组分的样品, 包括但不限于细胞和组织在培养基

中生长获得的条件培养基，例如重组细胞和细胞成分。

本文所用的术语“标记”和“可检测标记”指能检测的分子，包括但不限于放射性同位素、荧光素、化学发光物、生色基团、酶、酶底物、酶辅助因子、酶抑制剂、生色团、染料、金属离子、金属盐、配体(例如生物素、链霉亲和素和肝素)等。术语“荧光素”指能在可检测范围内显示荧光的物质或其部分。可在本发明中使用的特定标记的例子包括但不限于，辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素、FITC、罗丹明、丹磺酰、伞形酮、二甲基吡啶鎓酯(DMAE)、德州红(Texas Red)、鲁米诺、NADPH 和 $\alpha$ - $\beta$ -半乳糖苷酶。

## II.实施本发明的方式

10 在详细描述本发明之前，应理解本发明并非局限于特定的制剂或加工参数，显然它们是可以变化的。还应理解本文所用的术语仅用于说明本发明具体实施例的目的而并非对其限定。

虽然大量与本文所述类似的组合物和方法可用于本发明的实践中，但本文描述了优选的材料和方法。

15 如上所述，本发明的基础是发现了用于精确检测早期 HCV 感染的新型诊断方法。该方法依靠鉴定和使用 HCV 血清转化的早期阶段中存在的高免疫原性的 HCV 抗原，从而增加检测精确性并降低错误结果的发生。该方法可方便地以单次试验形式实施。

更具体的，试验在固相载体上进行，在该载体上结合有一种或多种 HCV 抗核心抗体(针对相同或不同的 HCV 核心表位)和衍生自 HCV 多蛋白 NS3/4a 区域的表位。本发明中有用的具体抗-核心抗体的例子包括但不限于针对氨基酸 10-53；氨基酸 10-45；氨基酸 67-88；氨基酸 120-130 之间发现的核心区域中的表位的单克隆抗体等分子，或针对任何核心表位的抗体，这些核心表位在例如 Houghton 等，美国专利号 5,350,671；Chien 等，Proc.Natl. Acad. Sci. USA  
20 (1992)89:10011-10015；Chien 等，J. Gastroent. Hepatol. (1993)8:S33-39；Chien 等，国际出版物号 W0 93/00365；Chien, D. Y.，国际出版物号 W094/01778；和共有的美国专利申请号 08/403,590 和 08/444,818 中所述。

已有人描述过 HCV 多蛋白的 NS3/4a 结构域，且该蛋白的氨基酸序列和整体结构公开于：如 Yao 等人，Structure(1999 年 11 月)7: 1353-1363；Sali 等人，  
30 Biochem. (1998)37:3392-3401；和 Bartenschlager, R., J. Viral Hepat. (1999)6:165-181。同样，可参见 Dasmahapatra 等人的美国专利 No. 5,843,752。所进行的免疫分析使用至少一种自 NS3/4a 区域衍生的构象表位，其以天然的 HCV

粒子或其传染性产物中所发现的构象存在，这可通过由 NS3/4a 基因产物正常表现的蛋白酶和任选地解旋酶活性的保存和/或抗原与受 HCV 感染的对象的生物学样品中的抗体的免疫反应性以及抗原变性后表位的免疫反应性验证。例如，通过加热、pH 变化至极酸性或碱性或通过添加已知的有机变性剂(如二硫苏糖醇(DTT))或适当的去污剂破坏构象表位。参见，如“蛋白质的纯化方法，实用方法(E. L. Harris 和 S. Angal 编辑，IRL Press)，并将变性的产物与未进行上述处理的产物相比。

可用本领域已知的标准酶试验确定蛋白酶和解旋酶的活性。例如，可用以下实例中所述的方法和本领域已知的方法确定蛋白酶的活性。参见，如 Takeshita 等，Anal. Biochem. (1997)247:242-246；Kakiuchi 等，J. Biochem. (1997)122:749-755；Sali 等，Biochemistry (1998)37:3392-3401；Cho 等，J. Virol. Meth (1998)72:109-115；Cerretani 等，Anal. Biochem. (1999)266:192-197；Zhang 等，Anal. Biochem. (1999)270:268-275；Kakiuchi 等，J. Virol. Meth (1999)80:77-84；Fowler 等，J. Biomol. Screen. (2000)5:153-158；和 Kim 等，Anal. Biochem. (2000)284:42-48。

类似地，解旋酶的活性分析是本领域熟知的，且 NS3/4a 表位的解旋酶活性可用如下方法确定，例如 ELISA 分析(如 Hsu 等，Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998)253:594-599 中所述)；闪烁亲近测定法(如 Kyono 等人，Anal. Biochem. (1998)257:120-126 中所述)；高通量筛选测定法(如 Hicham 等人，Antiviral Res. (2000) 46:181-193 和 Kwong 等，Methods Mol. Med. (2000)24:97-116 中所述的)；以及本领域已知的其它测定法。例如，参见 Khu 等，J. Virol. (2001)75:205-214；Utama 等人，Virology (2000)273:316-324；Paolini 等，J. Gen. Virol. (2000)81:1335-1345；Preugschat 等，Biochemistry (2000)39:5174-5183；Preugschat 等，Methods Mol. Med. (1998)19:353-364；和 Hesson 等，Biochemistry (2000)39:2619-2625。

抗原的长度足以维持免疫反应性的构象表位。通常，含有所用抗原的多肽几乎是全长的，然而也可以截短该多肽，例如用于增加溶解性或改善分泌。一般而言，在细胞中以重组多肽形式表达 NS3/4a 的构象表位，且多肽提供表位所需形式(如下详述)。

图 3 和图 4A-3D 显示了 NS3/4a 多肽的代表性氨基酸序列。图 3 的 182 位的斜体丙氨酸取代该位置发现的天然丝氨酸，以防止分子可能发生的自切割。图 4A-4D 的位置 2-686 所示的氨基酸序列相应于 HCV-1 的 1027-1711 位的氨基酸。在 1 位显示了编码 Met 的起始密码子(ATG)。另外，在 HCV-1 的 1428 位的 Thr(图

3 的氨基酸 403 位)突变为 Pro, 通常在 HCV-1 的 1429 位的 Ser(图 3 的氨基酸 404 位)突变为 Ile。然而, 无论是天然序列(有或无 N-末端 Met)、所示的类似物(有或无 N-末端 Met)或其它类似物和片段都可用于试验, 只要使用保存或恢复表位的天然构象(如保留蛋白酶活性和任选地解旋酶活性)的方法制备该表位。

- 5 Dasmahapatra 等人, 美国专利 No. 5, 843, 752 和 Zhang 等人, 美国专利 No. 5, 990, 276, 它们都描述了 NS3/4a 的类似物。

在约 1027-1207 位发现 NS3/4a 的 NS3 蛋白酶, 相对于 HCV-1 编号, 图 4 上为 2-182 位。NS3 蛋白酶的结构和活性位点是已知的, 参见如 De Francescod 等人, *Antivir. Ther.* (1998)3:99-109; Koch 等人, *Biochemistry* (2001)40:631-640。

- 10 通常可以耐受的天然序列的变化将是分子活性位点以外的变化。具体说, 需要维持图 4 的氨基酸 1-或 2-155(有少量或仅有保守性替代)。155 以外的氨基酸可以耐受更多的变化。另外, 如果使用图 4 中的 NS3/4a 序列的片段, 这些片段通常至少包括氨基酸 1-或 2-155, 较佳地包括氨基酸 1-或 2-175, 且最宜包括氨基酸 1-或 2-182(有或无 N-末端 Met)。发现解旋酶区域约在 HCV-1 的 1193-1657(图 3 的  
15 207-632 位)。因此, 如果需要解旋酶活性, 就要维持分子的该区域有少量或仅有保守性变化。本领域技术人员根据 NS3/4a 的已知结构易确定可以耐受变化的其它区域。

- 固相载体上还可以含有其它抗原。例如, 多表位融合抗原(称为“MEFA”), 如国际出版物 No. W097/44469 所述可以与固相载体结合用于分析试验。这些 MEFA  
20 包括从 HCV 多蛋白的两种或多种不同的病毒区域衍生的多种表位(如图 1 和表 1 所示)。具体说, 如图 1 和表 1 所示, 切割后 HCV 多蛋白产生至少 10 种不同的产物, 其顺序为 NH<sub>2</sub>-核心-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。其中核心多肽的位置为 1-191, 相对于 HCV-1 编号(HCV-1 的基因组可参见, Choo 等人, (1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455)。进一步加工该多肽产生约 1-173  
25 个氨基酸的 HCV 多肽。包膜多肽 E1 和 E2 的位点分别为 192-383 和 384-746。发现 P7 区域为约 747-809 位点。NS2 是具有解蛋白活性的膜内在蛋白, 且约位于多蛋白的 810-1026。NS2, 单独或与 NS3 结合(位于 1027-1657), 切割 NS2-NS3 的酰胺(sissle)键, 从而产生 NS3 N-末端并释放大多蛋白, 具有丝氨酸蛋白酶和 RNA 解旋酶活性。在约 1027-1207 位发现的 NS 蛋白酶在剩下的多蛋白加工中起作用。  
30 在约 1193-1657 位发现解旋酶活性。用在 NS3-NS4a 接头的自动催化(用 NS3 丝氨酸蛋白酶催化)切割引发多蛋白突变的完成。随后的 NS3-介导的 HCV 多蛋白的切割表现为包括另一种多蛋白的 NS3 分子识别多蛋白的切割接头。在这些反应中, NS3

释放出 NS3 辅因子(NS4a, 位置为约 1658-1711)、两种蛋白质(NS4b 的位置为约 1712-1972, 和 NS5a 的位置为约 1973-2420)和 RNA-依赖性 RNA 聚合酶(NS5b 的位置为约 2421-3011)。

表 1	
区域	大约的边界*
C(核心)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

\*相对于 HCV-1 编号。参见 Choo 等人 (1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA  
5 88:2451-2455。

多重 HCV 抗原是氨基酸连续单链(天然不存在的)的一部分。因此, 该表位的直线排列与其基因组中的直线排列不同。宜排列本文所用的 MEFA 序列的直线排列, 使之抗原性最佳。较佳地, 这些本文来自多种 HCV 毒株, 因此增加了在单次分析中检测多种 HCV 毒株的能力。所以, 用于本文的 MEFA 可能包含自上述多蛋白衍生的各种不同的免疫原性区域。另外, 可将由多蛋白核心区域中读框移位产生的蛋白质(如国际出版物 No. W099/63941 所述)用于 MEFA。如果需要, 在融合蛋白中可能发生至少 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 或更多的一种或多种 HCV 多蛋白的表位。

例如, 在 MEFA 抗原中可以包含自如 E2 的高变区衍生的表位, 如跨越氨基酸  
15 384-410 或 390-410 的区域。特别有效的 E2 表位是包含自该区域衍生的共有序列的表位, 如共有序列 Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn, 其代表 1 型 HCV 基因组的氨基酸 390-10 的共有序列。本发明 MEFA 中存在的典型 E2 表位包含跨越氨基酸 390-444 的杂交表位。这种杂交表位可包含表现氨基酸 390-410 的共有序列, 该序列融合于 HCV E2  
20 的氨基酸 411-444 的天然氨基酸序列。

另外, 可从各种 HCV 毒株衍生抗原。已知 HCV 的多种病毒株, 且在融合代表



中可用从任何这些毒株衍生的表位。任何特定品种的生物体的个体间互不相同，而且特定生物体如病毒可以有大量不同的毒株。例如，如上所述，HCV 包括至少 6 种基因型。这些基因型各包括等效的抗原性决定簇。更具体地说，各毒株包括大量抗原性决定簇，它们存在于该病毒的所有毒株中，但各病毒毒株之间略有差异。

- 5 例如，HCV 包括已知为 5-1-1 的抗原性决定簇(参见图 1)。这种特定的抗原性决定簇在 HCV 的三种不同的病毒毒株中有三种不同的形式。因此，在本发明的一个优选实施例中，用于免疫分析的多重表位融合抗原上表现了三种形式的 5-1-1。类似地，也可能存在来自不同 HCV 毒株的核心区域的等效抗原性决定簇。通常，等效抗原性决定簇的氨基酸序列具有高度同源性，序列对比时其同源性程度通常为
- 10 30%或更高，较佳的为 40%或更高。本发明的多重拷贝表位还可包含多重同一表位的精确拷贝。

- 国际出版号 W097/44469 中描述了用于本试验的代表性 MEFA。用于本文的其它代表性 MEFA 包括称为 MEFA12、MEFA13 和 MEFA13.1 的那些。应理解这些 MEFA 仅是代表性的，其它衍生自 HCV 基因组的表位也可用于本发明，并掺入这些和其它 MEFA。
- 15

- 图 7A 到 7F 显示了 MEFA12 的 DNA 序列及相应的氨基酸序列。图 6 显示了 MEFA 12 的结构通式，其如下：hSOD-E1(1 型)-E2 HVR 共有序列(1a 型)-E2 HVR 共有序列(1 和 2 型)-c33c 短(1 型)-5-1-1(1 型)-5-1-1(3 型)-5-1-1(2 型)-c100(1 型)-NS5(1 型)-NS5(1 型)-核心(1+2 型)-核心(1+2 型)。这种多拷贝表位包括以下氨基酸序列，相对于 HCV-1 编号(以下所述的氨基酸编号是按照 Choo 等人(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 中的编号标志进行的，其中氨基酸#1 是由核心区域的编码序列编码的第一个甲硫氨酸)：超氧化物歧化酶的氨基酸 1-69(SOD，用于提高蛋白质的重组表达)；E1 区域多蛋白的氨基酸 303-320；多蛋白的氨基酸 390-410，表现 HCV-1a E2 超变区的共有序列；区域 E2 多蛋白的氨基酸 384-414，表现 HCV-1 和 HCV-2 的 E2 超变区的共有序列；HCV-1 多蛋白的氨基酸 1211-1457，其确定解旋酶；5-1-1，氨基酸 1689-1735 的表位的三种拷贝，一种来自 HCV-1，一种来自 HCV-3，另一种来自 HCV-2，这些拷贝是 HCV 的三种不同病毒毒株的典型抗原性决定簇；HCV-1 的多肽 C100，多蛋白的氨基酸 1901-1936；HCV-1 的 NS5 区域表位的两种精确拷贝，各具有 HCV 多蛋白的氨基酸 2278-2313；
- 20
- 25 和核心区域表位的两种拷贝，一种来自 HCV-1 和一种来自 HCV-2，这两种拷贝是由 HCV-1 的氨基酸 9-32、39-42 和 64-88 以及 HCV-2 的氨基酸 67-84 表现的等效抗原性决定簇。
- 30

表 2 显示了参考本文图 7A-7F 的各种表位的氨基酸位置。表格中的编号是根据 HCV-1。见 Choo 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455。MEFA 13 和 13.1 还共有 MEFA12 上面详述的通式, 具有分别在表 3 和表 4 表明的修改。

表 2 MEFA12

MEFA aa#	5' 末端位点	表位	hcv aa#	病毒株
1-69*	<i>NcoI</i>	hSOD		
72-89	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
92-112	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a 共有	390-410	1
113-143		E2 HVR1+2 共有	384-414	1, 2
146-392	<i>SpeI</i>	C33C 短	1211-1457	1
395-441	<i>SphI</i>	5-1-1	1689-1735	1
444-490	<i>NruI</i>	5-1-1	1689-1735	3
493-539	<i>ClaI</i>	5-1-1	1689-1735	2
542-577	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
580-615	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
618-653	<i>BglII</i>	NS5	2278-2313	1
654-741	<i>NcoI</i>	核心表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
742-829	<i>BaII</i>	核心表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

- 5 \*截短 SOD 蛋白质, 从而检测偶联物、HRP-标记的抗-SOD 抗体不结合 MEFA。核心表位突变, 防止针对 HCV 核心的用于检测的抗体与 MEFA 结合。

表 3 MEFA13

MEFA aa#	5' 末端位点	表位	hcv aa#	病毒株
1-156	<i>NcoI</i>	突变的 hSOD(aa 70-72, ALA)		
161-178	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
181-201	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a 共有	390-410	1
202-232		E2 HVR1+2 共有	384-414	1, 2
235-451		C33C 短	1211-1457	1
454-500	<i>HindIII</i>	5-1-1 PI 突变	1689-1735	1

		*		
503-549	<i>NruI</i>	5-1-1 PI 突变 *	1689-1735	3
552-598	<i>ClaI</i>	5-1-1 PI 突变 *	1689-1735	2
601-636	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
639-674	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
677-712	<i>BglII</i>	NS5	2278-2313	1
713-800		核心 表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
801-888		核心 表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

\*通过消除可能的 NS3/4a 重组蛋白针对的切割位点(CS 或 CA)修饰 5-1-1 表位。序列被变成 PI, 代替 CS 或 CA。另外, SOD 蛋白突变, 从而使 HRP 标记的抗 SOD 抗体不和 MEFA 结合。核心表位突变成防止用于检测的针对 HCV 核心的抗体与 MEFA 结合。

#### 5 表 4 MEFA13.1

MEFA aa#	5' 末端位点	表位	hcv aa#	病毒株
1-86	<i>NcoI</i>	突变的 hSOD(aa 70-72, ALA)		
89-106	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
109-129	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a 共有	390-410	1
130-160		E2 HVR1+2 共有	384-414	1, 2
163-379		C33C 短	1211-1457	1
382-428	<i>HindIII</i>	5-1-1 PI 突变 *	1689-1735	1
431-477	<i>NruI</i>	5-1-1 PI 突变 *	1689-1735	3
480-526	<i>ClaI</i>	5-1-1 PI 突变 *	1689-1735	2
529-564	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
567-602	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1

605-640	<i>Bgl</i> III	NS5	2278-2313	1
641-728		核心 表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
729-816		核心 表位	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

\*通过消除可能的 NS3/4a 重组蛋白针对的切割位点(CS 或 CA)修饰 5-1-1 表位。序列被变成 PI, 代替 CS 或 CA。另外, SOD 蛋白突变, 从而使 HRP 标记的抗 SOD 抗体不和 MEFA 结合。核心表位突变成防止用于检测的针对 HCV 核心的抗体与 MEFA 结合。

- 5 在一个试验模式中, 样品如下所述与固相载体混合, 如果样品被 HCV 感染, 核心抗原和与存在于固相载体表面的 HCV 抗体将与固相载体成分结合。然后加入带可检测标记抗核心抗体。带标记的抗核心抗体针对与固相载体结合的抗核心抗体不同的表位。该抗核心抗体与固相载体上的抗核心抗体捕获的核心抗原结合。

- 还加入了与来自生物样品捕获的 HCV 抗体反应的抗原, 该捕获的样品 HCV  
10 抗体与 NS3/4a 表位反应。该抗原优选是衍生自 HCV 多蛋白 NS3 区的表位。该抗原与样品的捕获的 HCV 抗体结合。已知许多包含这些表位的抗体, 包括但不限于衍生自 c33c 和 c100 区的抗原, 以及含有 NS3 表位, 例如 c25 的融合蛋白。这些和其它 NS3 表位用于本试验, 是本领域已知的, 在 Houghton 等, 美国专利号 5,350,671; Chien 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1992)89:10011-10015; Chien  
15 等, J. Gastroent. Hepatol. (1993)8:S33-39; Chien 等, 国际出版号 W093/00365; Chien, D. Y., 国际出版号 W0 94/01778; 和共有的美国专利申请 No. 08/403,590 和 08/444,818 中有所描述。

- 加入针对上述抗原的带标记的第二抗体。该抗体针对抗原所含的任何表位。例如, 抗体可针对抗原中存在的 NS3 区域。另外, 如果上述抗原表达成融合蛋白,  
20 则带标记的第二抗体可针对融合子的配体。可在试验中加入其它抗原和抗体, 特别是如果固相载体含有 MEFA。这些试验模式如下所解释。

- 本发明中的代表性试验如图 2 所述。如图所示, 固相载体含有两种抗核心单克隆抗体, 称为 c11-3 和 c11-7。这些抗体针对核心蛋白氨基酸 10-53 处发现的 N-区域中发现的一个表位, 数目是根据 HCV1 的多蛋白序列。该固相载体还包括对于  
25 NS3/4a 的表位。在固相载体中加入生物样品。样品中存在的 HCV 核心抗原和针对 NS3/4a 表位的抗体将与固相载体上的捕获试剂结合。

然后加入辣根过氧化物酶(HRP)-标记的抗核心单克隆抗体 c11-14, 针对氨基

酸位置 120-130 发现的核心 C-末端区域, 编号根据 HCV1 多蛋白序列。加入含有人 SOD(hSOD)和来自 c33c 区域的表位的融合蛋白, 作为第二个 HRP 标记的抗体, 针对融合蛋白的 SOD 区域。SOD-c33c 融合蛋白将与抗-NS3 抗体结合, 抗 SOD 抗体还与 S0d-c33c 融合蛋白结合。标记的检测表明 HCV 蛋白的存在。

5 本发明中使用的另一个代表性试验如图 8 所示。抗体试验形式是使用 NS3/4a 和 MEFA12 的抗原-抗体-抗原夹心捕获试验。固相载体包括上述的两个抗-核心单克隆抗体, NS3/4a 的表位, 以及代表性 MEFA、MEFA12, 它包括截短形式的人 SOD。在上述试验中, 在固相载体中加入生物学样品。存在于样品中的 HCV 核心抗原和针对 NS3/4a 表位和 MEFA 表位的抗体, 将与固相载体上的捕获试剂结合。加入两  
10 种抗原, 一种与结合 NS3/4a(如上所述)的样品抗体反应, 一种与结合 MEFA12 的样品抗体反应。在图 8 中, 与 MEFA12/样品抗体复合物反应的抗原是 SOD 分子和 c22ks Δ 47-L44W 之间的融合蛋白。c22ks 抗原来自核心区域, 并包括多蛋白的氨基酸 Lys10-Ser99, 以及通常存在的 Arg47 缺失, 和 44 位的 Leu 取代 Trp。抗体检测偶联物是上述的第二种 HRP-标记的单克隆抗-SOD 抗体。

15 上述抗原/抗体组合试验特别有利, 因为 HCV 核心抗原和针对 NS3/4a 的抗体和/或核心可以在同一试验中用同一载体检测。另外, 如上所述, 其它 HCV 表位, 例如与 c100、5-1-1、NS5 抗原, 以及多蛋白核心区域框架漂移获得的蛋白质(如国际出版物号 WO 99/63941)可用于组合混合物以覆盖其它 HCV 的非结构表位。

20 为了进一步理解本发明, 在下文关于产生用于免疫试验的抗体; 产生用于免疫试验的多肽; 和进行免疫试验的方法部分提供了更详细的讨论。

#### 生产用于 HCV 免疫试验的抗体

如上所述, 本试验利用各种结合于固相载体的抗体(例如一种或多种抗核心抗体)和当样品中存在 HCV 感染时, 能检测形成的抗原/抗体复合物的抗体。这些抗体可以是多克隆或单克隆抗体制备物、单特异性抗血清、人抗体或可以是杂交  
25 或嵌合的抗体, 例如人源化抗体、改变的抗体、F(ab')<sub>2</sub> 片段、F(ab)片段、Fv 片段、单结构域抗体、二聚或三聚抗体片段构建物、小体或其功能性片段, 它能与感兴趣的抗原结合。

利用本领域技术人员熟知的技术生产抗体, 公开于例如: 美国专利号 4,011,308; 4,722,890; 4,016,043; 3,876,504; 3,770,380 和 4,372,745。例如,  
30 多克隆抗体是通过用感兴趣的抗原免疫合适的动物, 例如小鼠、大鼠、家兔、绵羊或山羊产生的。为了增强免疫原性, 抗原可以与载体在免疫接种前连接。这些载体是本领域一般技术人员熟知的。免疫接种通常是通过在盐水, 优选佐剂(例如

弗氏完全佐剂)中混合或乳化抗原,然后在胃肠外(皮下或肌内)注射混合物或乳液进行的。动物在 2-6 周后用一次或多次注射抗原的盐水溶液(优选弗氏完全佐剂)增强免疫动物。抗体还可以通过本领域已知的方法体外免疫接种产生。然后从免疫的动物获得多克隆抗血清。见例如 Houghton 等,美国专利号 5,350,671 对于产生抗 HCV 多克隆抗体的描述。

通常用 Kohler 和 Milstein(1975)Nature 256:495-497 的方法或其改变形式制备单克隆抗体。通常,如上所述接种小鼠或大鼠。然而,不对动物放血提取血清,而是除去脾脏(可任选的几个大的淋巴结)分解成单细胞。如需要,可通过将细胞悬液涂到平板上或用抗原包裹良好,筛选脾细胞(除去非特异性附着的细胞后)。表达对抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的 B 细胞将与平板结合,用剩余的悬液漂洗不去。得到的 B-细胞和所有分散的脾细胞被诱导与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤,并在选择性培养基(例如次黄嘌呤、氨基喋呤、胸腺嘧啶培养基“HAT”)中培养。通过限制性稀释将得到的杂交瘤铺板,并测试与免疫接种的抗原(不和相关抗原)特异性结合的抗体的产生。所选的分泌单克隆抗体的杂交瘤然后体外(例如在组织培养瓶或空心纤维反应器中)或体内(例如作为小鼠中的腹水)培养。

各种抗-HCV 单克隆抗体的产生如 Houghton 等,美国专利号 5,350,671; Chien 等,国际出版号 W093/00365; 共有的美国专利申请号 08/403,590 和 08/444,818; 和 Kashiwakuma 等,美国专利号 5,871,904 中所述。

如上所解释的,保留能识别感兴趣抗原能力的抗体片段也能用于本免疫试验。许多抗体片段是本领域已知的,它们含有能显示完整抗体分子的免疫学结合性质的抗原结合位点。例如,可通过在抗体分子上,使用例如胃蛋白酶切下不负责抗原结合的恒定区产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段,从而产生功能性抗体片段。这些片段将含有两个抗原结合位点,但各重量上缺少一部分恒定区。类似的,如果需要,可产生含有单个抗原结合位点的 Fab 片段,例如通过用木瓜蛋白酶消化多克隆抗体或单克隆抗体。还可产生仅含重链和轻链的可变区的功能性片段。这些片段称为 Fv。见例如 Inbar 等(1972)Proc.Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman 等(1976) Biochem15:2706-2710; 和 Ehrlich 等(1980)Biochem 19:4091-4096。

单链 Fv(“sFv”或“scFv”)多肽是共价连接的 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 异二聚体,它是从含有 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 编码的基因通过肽编码的接头的基因融合物表达的。Huston 等(1988)Proc.Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。已描述了许多方法,来辨别和开发化学结构(接头),用于将来自抗体 V 区域的天然聚集的、但化学分开的轻链和重链多肽转换成 sFv 分子,它将折叠成与抗原结合位点相似的立体结构。见

例如美国专利号 5,091,513、5,132,405 和 4,946,778。sFv 分子可以用本领域所述的方法产生。见例如 Huston 等(1988) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 美国专利号 5,091,513、5,132,405 和 4,946,778。设计条件包括确定跨越一条链的 C-末端和另一条的 N-末端的距离的合适长度, 其中通常用小亲水氨基酸残基形成接头, 它们不会卷曲或形成二级结构。这些方法在本领域中有所描述。见例如美国专利号 5,091,513、5,132,405 和 4,946,778。合适的接头通常包括甘氨酸和丝氨酸残基可替换的组的多肽链, 还可以包括插入以增强稳定性的谷氨酸和赖氨酸残基。

“小抗体”或“小体”也可用于本发明。小体是在 C-末端具有寡聚结构域, 与 sFv 通过铰链区分隔的 sFv 多肽链。Pack 等(1992) Biochem 31:1579-1584。寡聚结构域含有自身结合的 $\alpha$ -螺旋, 例如亮氨酸拉链, 它可以通过额外的二硫键进一步稳定。设计寡聚结构域与跨膜的载体折叠相容, 该过程被认为是促进多肽体内折叠成功能性结合蛋白。一般, 小体是用本领域已知的重组方法产生的。见例如 Pack 等(1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber 等(1992) J Immunology 149B: 120-126。

#### HCV 免疫试验中所用的抗原生产

如上解释的, 本发明分子通常是重组产生的。因此, 本发明所用的编码 HCV 抗原的多核苷酸可用分子生物学的标准技术产生。例如, 编码上述分子的多核苷酸序列可以用重组方法获得, 例如通过筛选来自表达该基因的细胞的 cDNA 和基因组文库, 或通过从已知含有该基因的载体中衍生出该基因。另外, 所需基因可以直接从病毒核酸分子中分离, 使用本领域所描述的技术例如 Houghton 等, 美国专利号 5,350,671。还可以合成产生感兴趣的基因, 而不是用克隆。然后从标准方法制备的重叠寡核苷酸装配完整的序列, 并装配成完整的编码序列。参见, 如 Edge(1981) Nature 292:756; Nambair 等人(1984) Science 223:1299; 和 Jay 等人(1984) J. Biol. Chem. 259: 6311。

因此, 从携带所需序列的载体获得具体的核苷酸序列, 或用本领域已知的各种寡核苷酸合成方法, 如定位诱变和聚合酶链式反应(PCR), 完全或部分合成。参见, 如 Sambrook, 上述。具体说, 获得编码所需序列的核苷酸序列的方法是退火整套用常规的自动多核苷酸合成仪制备的重叠的合成的寡核苷酸, 然后用适当的 DNA 连接酶连接, 并用 PVR 扩增连接的核苷酸序列。参见, 如 Jayaraman 等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088。另外, 在本发明中也可使用寡核苷酸定向的合成(Jones 等人, (1986) Nature 54:75-82)、寡核苷酸定向的原有核

苷酸区域的诱变(Riechmann 等人, (1988)Nature 332:323 -327 和 Verhoeyen 等人(1988)Science 239:1534-1536)和用 T<sub>4</sub>DNA 聚合酶进行的酶促充填带缺口的寡核苷酸(Queen 等人(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033), 以提供抗原结合能力变化或提高的和/或免疫原性降低的分子。

- 5 一旦制备或分离了编码序列, 就可将这些序列克隆入任何适合的载体或复制子中。对本领域技术人员而言各种克隆载体是已知的, 且对适当的克隆载体的筛选仅是一种选择方式。合适的载体包括(但并非限制于): 质粒、噬菌体、转位子、粘粒、染色体或当与适当的控制元件结合时能复制的病毒。

然后将克隆序列置于适当的控制元件的控制下, 这取决于用于表达的系统。

- 10 因此, 可以将编码序列置于启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和任选地操纵子的控制下, 从而由合适的转化体将感兴趣的 DNA 序列转录到 RNA 中。该编码序列可以包含或不包含信号肽或前导序列(随后可由宿主在翻译后加工除去)。参见, 如美国专利 No. 4, 431, 739; 4, 425, 437; 4, 338, 397。

- 除了控制序列外, 可以添加调节序列, 从而可以相对于宿主细胞的生长调节  
15 序列的表达。调节序列是本领域技术人员已知的, 其实例包括那些能导致应答化学或物理刺激(包括调节化合物的存在)启动或关闭基因表达的调节序列。载体中还可存在其它类型的调节元件。例如, 可以使用增强子元件以增加构建物的表达水平。实例包括 SV40 早期基因增强子(Dijkema 等人(1985)EMBO J. 4:761); 从 Rous 肉瘤病毒的长末端重复序列(LTR)衍生的增强子/启动子(Gorman 等人  
20 (1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777); 和从人 CMV 衍生的元件(Boshart 等人, (1985)Cell 41:521), 如 CMV 内含子 A 序列中包括的元件(美国专利 No. 5, 688, 688)。表达盒中还可包括在适合的宿主细胞中自动复制的复制起点、一种或多种可选择的标记物、一个或多个限制内切位点、高拷贝数量的可能性和强启动子。

- 25 构建表达载体, 使具体的编码序列位于该具有适合调节序列的载体中, 相对于控制序列编码序列的位置和起点使编码序列在控制序列的“控制”下转录(即, 结合于控制序列中 DNA 分子的 RNA 聚合酶转录该编码序列)。可能需要对编码感兴趣分子的序列进行修饰来实现此目的。例如, 在一些情况中可能需要修饰该序列, 从而使其连接于适合方向的控制序列, 即维持读框。在插入到载体中之前, 控制  
30 序列和其它调节序列可能连接于编码序列。或者, 可以将编码序列直接克隆入已包含控制序列和合适的限制内切位点的表达载体。

如以上解释, 还可能需要制备感兴趣抗原的突变体或类似物。尤其对 NS3/4a



而言。如此制备的方法在如下文献中有描述，如 Dasmahapatra 等人的美国专利 No. 5, 843, 752 和 Zhang 等人的美国专利 No. 5, 990, 276。通过缺失编码感兴趣多肽的一部分序列、插入序列、和/或替代该序列中的一个或多个核苷酸，可以制备用于分析的这种和其它 HCV 蛋白的突变体或类似物。修饰核苷酸序列的方法，如定向诱变等是本领域技术人员所熟知的。参见，如 Sambrook 等人，上述；Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder 等人 (1987) BioiTechniques 5:786; Zoller 和 Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland 等人 (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:6409。这种分子可以在各种系统中表达，包括本领域熟知的昆虫、哺乳动物、细菌、病毒和酵母表达系统。

例如，昆虫细胞表达系统如杆状病毒系统是本领域技术人员已知的，描述于如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法都是可以试剂盒形式购得的，尤其可从 Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" 试剂盒)。类似地，细菌和哺乳动物序列表达系统也是本领域熟知的，其描述见如 Sambrook 等人，如上。酵母表达系统也是本领域熟知的，其描述见如 Yeast Genetic Engineering (Barr 等人编辑，1989) Butterworths, London。

大量用于上述系统的适合的宿主细胞也是已知的。例如，哺乳动物细胞系是本领域已知的，其包括可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得的永生化的细胞系，如(但并非限制于) 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、Hela 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人胚肾细胞、人肝细胞癌细胞 (如 Hep G2)、Madin-Darby 牛肾 ("MDBK") 细胞等。类似地，在本发明的表达构建物中也可使用细菌宿主，如大肠杆菌、枯草杆菌和链球菌。在本发明中还可使用酵母宿主，特别包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、白假丝酵母 (*Candida maltosa*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、季也蒙毕赤酵母 (*Pichia guillerimondii*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和 *yarrowia lipolytica*。可与杆状病毒表达系统一起使用的昆虫细胞特别包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、桃木菌 (*Autographa californica*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、表皮球菌 (*Spodoptera frugiperda*) 和阴道炎菌 (*Trichoplusia ni*)。

用本领域所熟知的各种基因送递的方法，可将包含感兴趣核苷酸序列的核酸

分子稳定地整合入宿主细胞基因组中或在合适的宿主细胞的稳定的附加型元件上维持。参见，如美国专利 No. 5, 399, 346。

根据所选用的表达系统和宿主，在表达蛋白质的条件下，培养用如上所述的表达载体转化的宿主细胞制备该分子。然后从宿主细胞分离出表达的蛋白质并纯化。如果表达系统将蛋白质分泌到培养基中，则直接从培养基纯化产物。如果不是分泌的，则从细胞裂解液分离。适合的培养条件和回收方法的选择都是本领域技术人员能力之内的。

已描述了各种 HCV 抗原的制备，包括用于如上所述的多重表位融合蛋白的抗原。参见，如 Houghton 等人，美国专利 No. 5, 350, 671 和 5, 683, 864; Chien 等人，J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chien 等人，国际出版物 No. WO 93/00365; Chien, D. Y., 国际出版物 No. WO 94/01778; Chien 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015; Chien, D. Y., 国际出版物 No. WO 94/01778; 和共同拥有的美国专利申请 No. 08/403, 590 和 08/444, 818。

#### 免疫诊断试验

一旦产生，上述抗核心抗体和 NS3/4a 抗原可以置于合适的固相载体上，用于该免疫试验。为了本发明，固相载体可以是任何物质，它是不溶性的基质，并可具有粗糙或半粗糙的表面。示范性的固态支持物包括(但并非限制于)基质如硝化纤维素(如以膜或微量滴定孔形式); 聚氯乙烯(如板或微量滴定孔); 聚苯乙烯乳胶(如珠或微量滴定板); 聚偏二氟乙烯; 重氮化纸; 尼龙膜; 活化的小珠、磁力感应小珠等。具体的支持物包括板、小球、皿、毛细管、空心纤维、针、钉、固体纤维、纤维素小珠、微孔玻璃小珠、硅胶、聚苯乙烯小珠(任选地与二乙烯苯交联)、嫁接的共聚小珠、聚丙烯酰胺小珠、乳胶小珠、二甲基丙烯酰胺小珠(任选地与 N-N'-二-丙烯酰乙烯二胺交联)和用疏水聚合物包膜的玻璃珠。

如果需要，易将待加到固态支持物上的分子功能化，产生苯乙烯或丙烯酸部分，能让该分子掺入聚苯乙烯、聚丙烯酸酯或其它聚合物如聚酰亚胺、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚乙炔、聚二乙炔、聚苯撑-乙烯、多肽、多糖、聚砒、聚吡咯、聚咪唑、聚噻吩、聚醚、环氧树脂、硅石玻璃、硅氧烷、多磷酸盐、水凝胶、琼脂糖、纤维素等。

在一实例中，首先在合适的结合条件下，如让分子充分地固定于支持物上，将固态支持物与 HCV 抗原反应。有时可以提高支持物的固定化，通过首先将抗原和/或抗体与具有较好固相结合特性的蛋白质偶联。适合的偶联蛋白包括(但并非限制于)大分子如血清白蛋白，包括：牛血清白蛋白(BSA)、匙孔蛾血蓝蛋白、免

疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白和本领域技术人员已知的其它蛋白质。其它可用于将分子结合于支持物的试剂包括多糖、聚乳酸、聚羟基乙酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物等。将这些分子与抗原偶联的分子和方法是本领域技术人员所熟知的。参见，如 Brinkley, M. A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:2-13; Hashida 等人 (1984) *J. Appl. Biochem.* 6:56-63; 和 Anjaneyulu 和 Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30:117-124。

在固相支持物上与固相成分反应后，冲洗除去支持物上未固定化的固相成分，然后在适合的结合条件下，将与支持物结合的成分与怀疑含有 HCV 抗体(本文将总称为“配体分子”)的生物样品接触。冲洗除去未结合的配体分子后，在合适的条件下加入针对与载体结合的抗核心抗体所针对的不同的表位的第二种抗核心抗体。加入的抗核心抗体带如上所述的可检测标记，并能结合任何存在于样品中，与载体结合的抗核心抗体反应的任何核心抗原结合。还加入一种或多种能与样品中存在的抗体反应的抗原，这些抗体反过来与 NS3/4a 表位反应。根据上面的解释，抗原通常衍生自 HCV 多蛋白的 NS3 区，特别是来自 HCV 的 c33c 区。见 Houghton 等，美国专利号 5,350,671; Chien 等，*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 89:10011-10015; 国际出版号 WO 93/00365; 和共同拥有的美国专利申请号 08/403,590 和 08/444,818，对于该区域和从其衍生的表位的描述。还加入了针对该抗原的标记的抗体。因此该抗体与抗原结合，它们与存在于样品中的抗 NS3 抗体反应。为此，c33c 表位可方便的作为用 Houghton 等，美国专利号 5,350,671 提供的方法重组产生的 c33c 和人超氧化物歧化酶(hSOD)之间的融合蛋白。人 SOD 的核苷酸和氨基酸序列是已知的，在 Hallewell 等，美国专利号 5,710,033 中报道。因此，针对人 SOD 的标记的抗体可用于检测在 NS3/4a 表位、样品中与该表位反应的任何抗体、和与样品中抗体结合的 HCV 多肽之间形成的复合物的存在。

如果在固相载体表面存在 MEFA，可在试验中加入与来自生物样品抗体的反应性的抗原，所述抗体与存在于 MEFA 上的抗原结合。在该情况下特别有用的一种衍生自 HCV 核心区域的抗原，更具体的是来自 c22 的抗原，它含有 HCV 多蛋白的 119 个 N-末端核心氨基酸。衍生自 c22 的一种特定抗原是 c22ks  $\Delta$  47-L44W，它含有多蛋白的氨基酸 Lys10-Ser99，以及通常存在的 Arg47 的缺失和 44 位的 Trp 到 Leu 的取代。对于上述的 c33c 表位，该抗原可作为与 hSOD 的融合蛋白提供，同一针对人 SOD 的标记抗体可用于检测存在于样品中的抗体和 NS3/4a 和/或 MEFA 形成的复合物的存在，该复合物还和 HCV 抗原(例如 c33c 和 c22)结合。

更具体的，可用 ELISA 法，其中微量滴定板的孔用固相成分包裹。然后在包

裹的孔中加入含有或怀疑含有配体分子的生物样品。一段足够使配体分子与固定的固相载体成分结合的时间后，洗涤平板以除去未结合的分子，加入可检测标记的第二种结合分子(标记的抗核心抗体)、含 NS3 表位的分子和针对含 NS3 表位的分子的抗体。这些分子能与任何捕获的样品抗原和抗体反应，洗涤平板并用本领域熟知的方法检测。

上述试验试剂，包括具有结合的抗体和抗原的免疫试剂固相载体和与捕获样品反应的抗原，可以具有合适的说明书和其它必需试剂的试剂盒提供，以进行如上所述的免疫试验。试剂盒还可以视所用的特定免疫试验而定，含有合适的标记和其它包装的试剂和物质(即洗涤缓冲液等)。标准免疫试验，例如上述的可用这些试剂盒进行。

### III.实验

下面是实施本发明所需的特定实施例的例子。这些实施例仅为了说明，而不是要以任何形式限制本发明的范围。

进行了努力，确保使用的数据(例如量和温度等)的准确性，但应理解一些实验错误和偏差是允许的。

#### 实施例 1

#### HCV 抗原/抗体组合免疫试验

将本 HCV 抗原/抗体组合免疫试验与其它 HCV 试验比较，以测试血清转化检测极限，并如下与其它市售试验获得的比较其极限。

#### A.材料和方法

血液样品：使用了市售人血液平板。这些平板购自例如 Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA(BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); 和 North American Biologics, Inc., Boca Raton, FL(NABI)。表 5 和 6 中指出的日子是从个体收集血液的日子。

单克隆抗体：单克隆抗体 c11-3、c11-7 和 c11-4 从 Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey 获得。c11-3 和 c11-7 抗体针对核心的 N-末端部分(氨基酸 10-53，根据 HCV1 多蛋白编号)。单克隆抗体 c11-14 针对核心的 C-末端部分(氨基酸 120-130，根据 HCV1 多蛋白编号)。c11-14 抗体与辣根过氧化物酶(HRP)用标准方法偶联。

单克隆抗体 5A-3 是抗 SOD 抗体，针对 SOD 的氨基酸 1-65，用标准技术制备。抗体与 HRP 如上偶联。

#### B.抗原：

c33c 抗原(266 氨基酸, HCV1 多蛋白氨基酸 1192-1457)作为内部 SOD 融合多肽在大肠杆菌中用合成 5-1-1 抗原的方法表达(Choo 等, Science(1989) 244:359-362)。重组抗原如 Chien 等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1989) 89:10011-10015 所述纯化。另见 Houghton 等, 美国专利号 5,350,671 产生 SOD-c33c 的方案。

- 5 本试验中使用的 NS3/4a 表位是具有图 3 所示的序列的构象表位。

#### C.免疫试验模式:

Abbott PRISM 试验(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)是市售的, 并且是基于抗体的检测试验。用厂商的说明进行试验。

- 10 ORTHO HCV 3.0 版 ELISA 测试系统(本文中称为 Ortho 3.0 试验, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)是一种基于抗体的检测试验。用厂商的说明进行试验。

Roche Amplicor 试验(Roche,Pleasant,CA)是市售的基于 PCR 的试验。用厂商的说明进行试验。

- 15 Ortho 抗原试验(Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)是基于抗原的检测试验。用厂商的说明进行试验。

- 20 如下进行 HCV 抗原/抗体组合免疫试验。混合 4mg/ml 纯化的单克隆抗体 C11-7 和 C11-3 和 1x 磷酸缓冲盐(PBS), pH7.4 并充分混合。在同一封闭缓冲液中加入 90ngNS3/4a 重组抗原。混合溶液 30 分钟, 然后封闭。在 96 孔 Costar 培养基结合微量滴定板(Corning, Inc.)中每孔加入 200mL 溶液。平板在 15-30℃培养 16-24 小时。用 dH<sub>2</sub>O 洗涤平板两次, 然后用 300 微升/孔封闭后缓冲液(1%牛血清白蛋白(BSA), 1xPBS)1 小时, 300 微升/孔稳定缓冲液(1xPBS, 1%BSA, 甘露醇, 聚乙二醇(PEG), 明胶)1 小时。吹洗平板并在 4℃在冻干器上干燥 24 小时。平板与干燥剂一起入袋。

- 25 为了进行抗原/抗体组合免疫试验, 在平板中加入 100 微升增强裂解缓冲液(1% N-十二烷基肌氨酸, 0.65M NaCl, 50mg/ml 小鼠 IgG 原料级(Sigma,St. Louis, MO), 1% 巯基修饰的 BSA(Bayer), 0.1% 酪蛋白)。然后加入 100ml 样品。这在摇床中 40℃保温 1 小时。用 1xPBS、0.1% Tween-20 在 Ortho Plate Washer 上洗涤平板 6 次。200mL 偶联溶液(1:75 稀释的 c11-14-HRP 和 250ng/试验的 SOD-c33c 抗原加上 1:5000 稀释的小鼠抗-SOD-HRP 的 HCV 3.0 样品稀释剂(来自 ORTHO HCV 3.0 版 ELISA 测试系统, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey), 不含 SOD 提取物, 全部在加入前 30 分钟制备)。溶液 40℃振摇保温 45 分钟如上洗涤 6 次, 30 加入 200ml 底物溶液(1OPD 片剂/10ml)。OPD 片剂含有辣根过氧化物酶反应显色

所需的对苯二胺二盐酸和过氧化氢，购自 Sigma, St. Louis, MO。这避光 15-30 °C 保温 30 分钟。加入 50ml 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应，并在 492nm 阅读平板，相对于 690nm 处的吸光度作为对照。

#### D. 结果:

- 5 各种试验的结果如表 5 和 6 所示，描述了如所示，对接触 HCV 感染的血液样品进行两个独立试验。阴影区表示检测到病毒。如下文所示，Chiron 的组合抗原/抗体试验在所有样品中检测到血清转化，而所有其它基于抗体和抗原的实验不能检测至少一种样品中的血清转化。特别是在至少 18 天前，没有基于抗体的试验能检测血清转化(表 5)。表 6 显示基于抗体的试验在第 22 天都检测不到 HCV 感染的存在。另外，Ortho 基于抗原的试验从第 85 天起不能检测血清转化。
- 10

因此基于上述结果，清楚的是新组合抗体/抗原试验减少了用其它常规基于抗体或抗原的试验的假阴性数量。

表 5 HCV 血清转化

天	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ab
0	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.25	18.6	2.8
4	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.29	19.0	3.1
7	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.52	22.3	1.5
13	0.3	0.1	$>5 \times 10^5$	9.59	26.2	1.7
18	1.3	0.4	$>5 \times 10^5$	9.70	15.9	1.2
21	2.2	1.0	$>5 \times 10^5$	9.39	11.3	1.5
164	4.2	4.4	$4 \times 10^4$	9.28	0.11	2.5

表 6

#### 15 HCV 血清转化

天	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ab
0	0.1	0.0	BLD		0.11	0.5
13	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$		44.0	3.0
20	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$		24.2	1.3
22	0.3	0.0	$>5 \times 10^5$		29.2	1.6

85	5.4	4.7	BQR		0.06	1.1
131	4.3	4.7	BQR		0.09	1.0
135	4.6	4.7	$3 \times 10^3$		0.09	1.2
138	5.5	4.7	BLD		0.08	1.2
146	5.9	4.7	BLD		0.11	2.1
152	5.2	4.7	BQR		0.07	1.8

## 实施例 2

具有 Thr 到 Pro 和 Ser 到 Ile 的取代的 NS3/4a 构象表位的制备

如下获得 NS3/4a 的构象表位。该表位具有图 4A-4D 所述的序列，与 403 位 (HCV-1 全长序列的氨基酸 1428) 和 404 位 (HCV-1 全长序列的氨基酸 1429) 的天然序列不同。具体说，在天然序列 1428 位上通常出现的 Thr 已突变成 Pro，且天然序列 1429 位上出现的 Ser 已突变为 Ile。

具体说，所用的酵母表达载体是 pBS24.1 (如上所述)。如下制备质粒 pd.hcv1a.ns3ns4aPI，其编码用于本发明免疫测定的典型 NS3/4a 表位。使用两步流程。首先，将以下的 DNA 片段连接在一起：(a) 合成的寡核苷酸，其提供 5'*Hind*III 克隆位点，随后接序列 ACAAACAAA，起始密码子 ATG，和 HCV1a 的密码子，从氨基酸 1027 开始继续到氨基酸 1046 的 *Bgl*II 位点；(b) 来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 683bp 的 *Bgl*II-*Cla*I 限制性片段 (编码氨基酸 1046-1274)；和 (c) *Hind*III 和 *Cla*I 消化，去磷酸和凝胶纯化的 pSP72 载体 (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Accession Number X65332)。质粒 pAcHLTns3ns4aPI 衍生自 pAcHLT，一种 BD Pharmingen (San Diego, CA) 购得的杆状病毒表达载体。特别是制备了 pAcHLT *Eco*RI-*Pst*I 载体和如下片段：*Eco*RI-*Alw*nI，935bp，对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1027-1036，*Alw*nI-*Sac*II，247bp，对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1336-1419；*Hin*fI-*Bgl*II，175bp，对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1449-1509；*Bgl*II-*Pst*I，619bp，对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1510-1711，加上转录终止密码子。*Sac*II-*Hin*fI 合成产生的 91bp 片段 (对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1420-1448，含有 PI 突变 (Thr-1428 突变成 Pro，Ser-1429 突变成 Ile)) 与上述的 175bp *Hin*fI-*Bgl*II 和 619bp 的 *Bgl*II-*Pst*I 片段连接，并亚克隆入用 *Sac*II 和 *Pst*I 消化的 pGEM-5Zf(+) 载体。pGEM-5Zf(+) 是市售的大肠杆菌载体 (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL 登录号 X65308)。在转化感受态 HB101 细胞，单个克隆小筛选分析并证实序列后，凝胶纯化 pGEM5.PI 克隆 2 的 885bp 的 *Sac*II-*Pst*I 片段。该片段与上述的 *Eco*RI-*Alw*nI 935bp 片段、*Alw*nI-*Sac*II 247bp 片段和 pAcHLT *Eco*RI-*Pst*I 载体连接。得到的构建物命

名为 pAcHLTns3ns4aPI。

上述连接混合物转化入 HB101-感受态细胞，并铺在含有 100 微克/毫升青霉素的 Luria 琼脂平板上。单个克隆的少量制备物分析鉴定了可能的阳性，扩增了其中两个用 Qiagen Maxiprep 试剂盒制备 pSP72 1aHC，克隆#1 和#2 的质粒 DNA，并测序。

接着，连接下列片段：(a) 来自 pSP721aHC#1761bp *HindIII*-*ClaI* 片段 (pSP72.1aHC 是通过连接下列片段产生的：用 *HindIII* 和 *ClaI* 消化的 pSP72，提供 5'*HindIII* 克隆位点的寡核苷酸，接着是序列 ACAAACAAA，起始密码子 ATG 和 HCV1a 的密码子，从氨基酸 1027 开始，直到氨基酸 1046 处的 *BglII* 位点，和来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 683bp *BglII*-*ClaI* 限制性片段(编码氨基酸 1046-1274))；(b) 酵母杂交启动子 ADH2/GAPDH 的 1353bp 的 *BamHI*-*HindIII* 片段；(c) 来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 1320bp *ClaI*-*SalI* 片段(编码 HCV1a 氨基酸 1046-1711，其中 Thr1428 突变成 Pro，Ser1429 突变成 Ile)；和(d) 被 *BamHI* 和 *SacI* 消化，去磷酸化和凝胶纯化的 pBS23.1 酵母表达载体。该连接混合物转化入感受态 HB101 细胞，并铺在含有 100 微克/毫升青霉素的 Luria 琼脂平板上。单个克隆的小制备物分析鉴定了具有预期的 3446bp 的 *BamHI*-*SalI* 插入的克隆，该片段包括 ADH2/GAPDH 启动子，起始密码子 ATG 和氨基酸 1027-1711 的 HCV1a NS3/4a(显示图 4A-4D 的氨基酸 1-686)，Thr1428(图 4A-4D 的氨基酸位置 403)突变成 Pro，Ser1429(图 4A-4D 的氨基酸位置 404)突变成 Ile。构建物称为 pd.HCV1a.ns3ns4aPI(见图 5)。

用 pd.HCV1a.ns3ns4aPI 转化酿酒酵母株，在耗尽培养基中的葡萄糖后检查单个转化子的表达。在酵母中高水平表达重组蛋白质，如考马斯亮蓝染色检测到的，并由针对解旋酶结构域 NS3 的多克隆抗体来确定。

### 实施例 3

#### NS3/4a 构象表位的纯化

如下纯化 NS3/4a 构象表位。如上所述收集表达 NS3/4a 表位的酿酒酵母细胞。将细胞悬浮在裂解缓冲液(50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.1μM 抑胃酶肽)，并以细胞：缓冲液：玻璃珠 1：1：1 的比例，用 Dyno-Mill(Wab Willy a Bachofen, Basel, Switzerland)或等价装置来裂解。裂解液在 30100xg 中 4℃离心 30 分钟，并在洗涤缓冲液(6ml/g 起始细胞沉淀重量)中加入含有不溶性细胞组分的沉淀团块，室温振摇 15 分钟。洗涤缓冲液含有 50mM NaPO<sub>4</sub> pH8.0、0.3M NaCl、5mM β-巯基乙醇、10%甘油、0.05%辛基葡糖苷、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μM 抑胃酶肽、1μM 亮抑肽酶。30100xg 4℃离心 30 分钟除去细



胞碎片。丢弃上清液并保留沉淀。

如下从沉淀中抽提蛋白质。加入 6ml/g 抽提缓冲液并在室温振摇 15 分钟。抽提缓冲液含有 30mM Tris pH8.0、1M NaCl、5mM  $\beta$ -巯基乙醇、10%甘油、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1 $\mu$ M 抑胃酶肽、1 $\mu$ M 亮抑肽酶。这在 30100xg 4℃离心 30 分钟。保留上清液并用下列配方加入达到 17.55 的硫酸铵：上清液的体积(ml)乘以 5  $x\%$ 硫酸铵/(1- $x\%$ 硫酸铵)=加到上清液中的 4.1M 饱和硫酸铵的毫升数。一边在冰上搅拌，一边滴加硫酸铵，溶液在冰上搅拌 10 分钟。17700xg 4℃离心溶液 30 分钟，保留沉淀，储藏在 2℃-8℃达 48 小时。

重新悬浮沉淀，并 4℃如下过 Poly U 柱(Poly U Sepharose 4B, Amersham 10 Pharmacia)。沉淀重新悬浮在 6ml Poly U 平衡缓冲液/克沉淀重量中。平衡缓冲液含有 25mM HEPES pH8.0、200mM NaCl、5mM DTT(新鲜加入)、10%甘油、1.2% 辛基葡糖苷。4℃振摇溶液 15 分钟，31000xg 离心 30 分钟。

制备 Poly U 柱(1ml 树脂/克起始沉淀重量)。线性流速为 60cm/hr，填充流速为 133% 60cm/hr。用平衡缓冲液平衡柱，并在平衡好的柱上加入重悬浮硫酸铵沉淀的上清液。用平衡缓冲液将柱洗到基线，在一步洗脱中用下列 Poly U 洗脱缓冲液洗脱蛋白质：25mM HEPES pH8.0、1M NaCl、5mM DTT(新鲜加入)、10%甘油、1.2%辛基葡糖苷。在 SDS-PAGE 上走柱洗脱物，冷冻等份并储藏在-80℃。用蛋白质印迹，使用针对 NS3 蛋白酶结构域的多克隆抗体和针对 5-1-1 表位(HCV 4a)的单克隆抗体肯定了 NS3/4a 表位的存在。

20 另外，在纯化过程中如下监测蛋白酶的酶活性。用 90 微升反应缓冲液(25mM Tris, pH7.5, 0.15M NaCl, 0.5mM EDTA, 10%甘油, 0.05 正十二烷基 B-D-麦芽苷, 5mM DTT)稀释 NS4A 肽(KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK)和含有 NS3/4a 构象表位的样品，并在室温下混合 30 分钟。将 90 微升该混合物加到微量滴定板(Costar, Inc., Corning, NY)中，加入 10 微升 HCV 底物(AnaSpec, Inc., San Jose CA)。混合 25 平板并在 Fluostar 平板阅读仪上阅读。结果表达成相对荧光单位(RFU)/分钟。

用这些方法，1M NaCl 抽提物的产物含有 3.7RFU/分钟的活性，硫酸铵沉淀具有 7.5RFU/分钟的活性，Poly U 纯化的产物具有 18.5 RFU/分钟的活性。

#### 实施例 4

##### 竞争性研究

30 进行了下列竞争性研究，以评估 NS3/4a 构象表位检测的抗体是否与其它 HCV 抗原不同。具体说，将 NS3/4a 抗原与 c200 抗原如下比较。

如上所述产生的 0.5 $\mu$ g 和 1.0 $\mu$ g NS3/4a，或 c200(Hepatology (1992) 15:19-25，

在 ORTHO HCv 3.0 版 ELISA 测试系统, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey 中可得)与 20 微升样品 PHV914-5(感染个人获得的早期血清转化血液)以总体积 220 微升(1x PBS)混合。混合物在微孔中 37°C 培养 1 小时。然后将混合物转移到 NS3/4a-包裹的平板中,并在 37°C 培育 1 小时。洗涤平板并如下测试。

- 5 在总体积为约 220 微升的 10 微升样品 PHV914-5 中加入 1 微克 c200 抗原。混合物在微孔中 37°C 保温 1 小时,将 200 微升转移到 NS3/4a-包裹的平板(100ng/试验)中,37°C 保温 1 小时。用 1x PBS、0.1% Tween-20、200 微升偶联溶液(如上所述)洗涤平板 5 次,培养平板并测试。含有 PHV914-5 和 1x PBS(不含抗原)的对照如下处理。

- 10 结果如表 7 所示。栏 4 中所示的百分数抑制结果计算成栏 3 负(栏 2/栏 3 × 100)。如所见,数据显示 NS3/4a 被早血清转化抗体中和,而 c200 没有。当 PHV914-5 c33c 早血清转化组成员中的抗体与平板包裹的 NS34a 反应,显示强信号。c200 抗原不被这些抗体中和。这显示于表 7 的顶部。当 NS34a 与 PHV914-5 样品混合时被中和,因此在样品中不存在与包裹在微量滴定板上的 NS34a 反应的抗体。数据表明 NS34a 检测的抗体类型可能与 c200 检测的不同。

表 7

显示 NS34a 抗原在早期 c33c 血清转化组中,与 c200 检测不同的抗体竞争性研究

	1	2	3	4
c200	+	PHV914-5	对照 1xPBS	%抑制
		s	s	
1 微克		1.450	1.645	12
1 微克		1.545	1.687	8
0.5 微克		1.557	1.913	19
0.5 微克		1.719	1.804	5
NS3/4a	+	PHV914-5		
		s	s	
1 微克		0.054	1.599	97
1 微克		0.037	1.677	98
0.5 微克		0.066	1.672	96
0.5 微克		NA	1.524	NA

### 实施例 5

#### NS3/4a 构象表位的稳定性研究

为了评估 NS3/4a 表位的稳定性对测试表现的影响,进行了下列试验,以测定在温室下 NS3/4a 免疫反应性在室温下对时间的关系。将小等份的储藏 NS3/4a 置于室温下,并在表 8 所示的间隔冷冻。所有小管同时包裹并针对两个 NS3 血清转化组测试。

如表 8 所见,NS3/4a 储液不稳定,免疫反应性随时间下降。另外,维持 NS3/4a 构象是免疫反应性必需的。

如下进行了进一步的稳定性研究。用标准程序针对 NS3/4a 制备的两个构象单克隆抗体替换抗-HCV 早期血清转化组。储藏 NS3/4a 试管在时间间隔 3、6 和 24 小时储藏在室温下。来自冷冻试管的 NS3/4a 以 90ng/ml 被包裹,并用上述方法试验。结果提示两种单克隆实际是构象性的,其反应性对于在室温下搬运 NS3/4a 抗原是敏感的。阳性对照的单克隆抗体的反应性不变。

表 8

时间(hr)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	对照
	A	D	G	H	I	K	N	参照
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
PHV 904-4	3.7	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	4.4
PHV 904-5	4.8	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.3	5.5
PHV 904-6	5.4	2.8	1.1	1.0	0.6	0.5	0.6	5.8
PHV 904-7	5.1	3.4	1.5	1.0	1.1	0.5	0.7	5.4
PHV 914-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-4	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
PHV 914-5	2.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
PHV 914-6	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
PHV 914-7	2.8	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	4.9
PHV 914-8	2.9	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	4.9
酶								
RFU/分钟	8.74	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	

### 实施例 6

#### NS3/4a 构象表位对变性 NS3/4a 的免疫反应性

将如上所述产生的 NS3/4a 构象表位的免疫反应性与通过在 NS3/4a 构象表位制备物中加入 SDS,达到最终浓度 2%而使之变性的 NS3/4a 进行比较。变性的 NS3/4a 和构象 NS3/4a 包裹在微量滴定板上。也将 c200 抗原(Hepatology (1992) 15:19-25, 在 ORTHO HCv 3.0 版 ELISA 测试系统, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey 中可得)包裹在微量滴定板上。用 c200 作为比较,假定它是

非构象的，由于在其配方中存在还原剂(DTT)和去污剂。

针对两个早期 HCV 血清转化组, PHV904 和 PHV914(市售人血样, 购自 Boston Biomeida, Inc., West Bridgewater, MA)。结果如表 9 所示。数据提示 NS3/4a(和 c200) 变性或线性化的形式不能像 NS3/4a 构象表位那么早检测到血清转化组。

5 表 9

NS3/4a 对变性的 NS3/4a								
*掺入 2%SDS 对储藏 NS3/4a								
		NS3/4a	dNS3/4a*	c200		NS3/4a	dNS3/4a*	c200
		OD	OD	OD		s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0.012	0.012	0.009		0.02	0.02	0.01
血清转化	PHV 904-2	0.011	0.009	0.008		0.02	0.01	0.01
	PHV 904-3	1.124	0.071	0.045		1.80	0.11	0.07
	PHV 904-4	2.401	0.273	0.129		3.85	0.44	0.21
	PHV 904-5	3.022	0.793	0.347		4.85	1.28	0.57
	PHV 904-6	2.711	1.472	0.774		4.35	2.37	1.28
	PHV 904-7	3.294	1.860	0.943		5.28	2.99	1.55
	PHV 914-1	0.006	0.004	0.001		0.01	0.01	0.00
	PHV 914-2	0.005	0.004	0.002		0.01	0.01	0.00
	PHV 914-3	0.098	0.003	0.001		0.16	0.00	0.00
	PHV 914-4	1.118	0.006	0.004		1.79	0.01	0.01
	PHV 914-5	2.035	0.044	0.022		3.26	0.07	0.04
	PHV 914-6	2.092	0.074	0.025		3.35	0.12	0.04
	PHV 914-7	2.519	0.281	0.132		4.04	0.45	0.22
	PHV 914-8	2.746	0.907	0.500		4.40	1.46	0.82
	PHV 914-9	3.084	1.730	0.931		4.94	2.78	1.53
HCV 3.0	阴性对照	0.023	0.024	0.008				
对照	阴性对照	0.027	0.024	0.007				
	阴性对照	0.021	0.017	0.005				
	平均	0.024	0.022	0.007				
	截留	0.624	0.622	0.607				
	阳性对照	1.239	0.903	0.575		1.99	1.45	0.95
	阳性对照	1.445	0.916	0.614		2.32	1.47	1.01

还用使用标准程序制备的针对 NS3/4a 的单克隆抗体测试了构象表位的免疫反应性。然后在针对 NS3/4a 和变性 NS3/4a 和 c200 抗原的 ELISA 试验中测试这些单克隆抗体。数据显示抗-NS3/4a 单克隆抗体与 NS3/4a 和变性的 NS3/4a 以与表 10 显示的血清转化组相似的方式反应。该结果还提供了 NS3/4a 天然是构象表位的进一步证据，因为可制备反应性与早期 c33c 血清转化组相似的单克隆抗体。

10

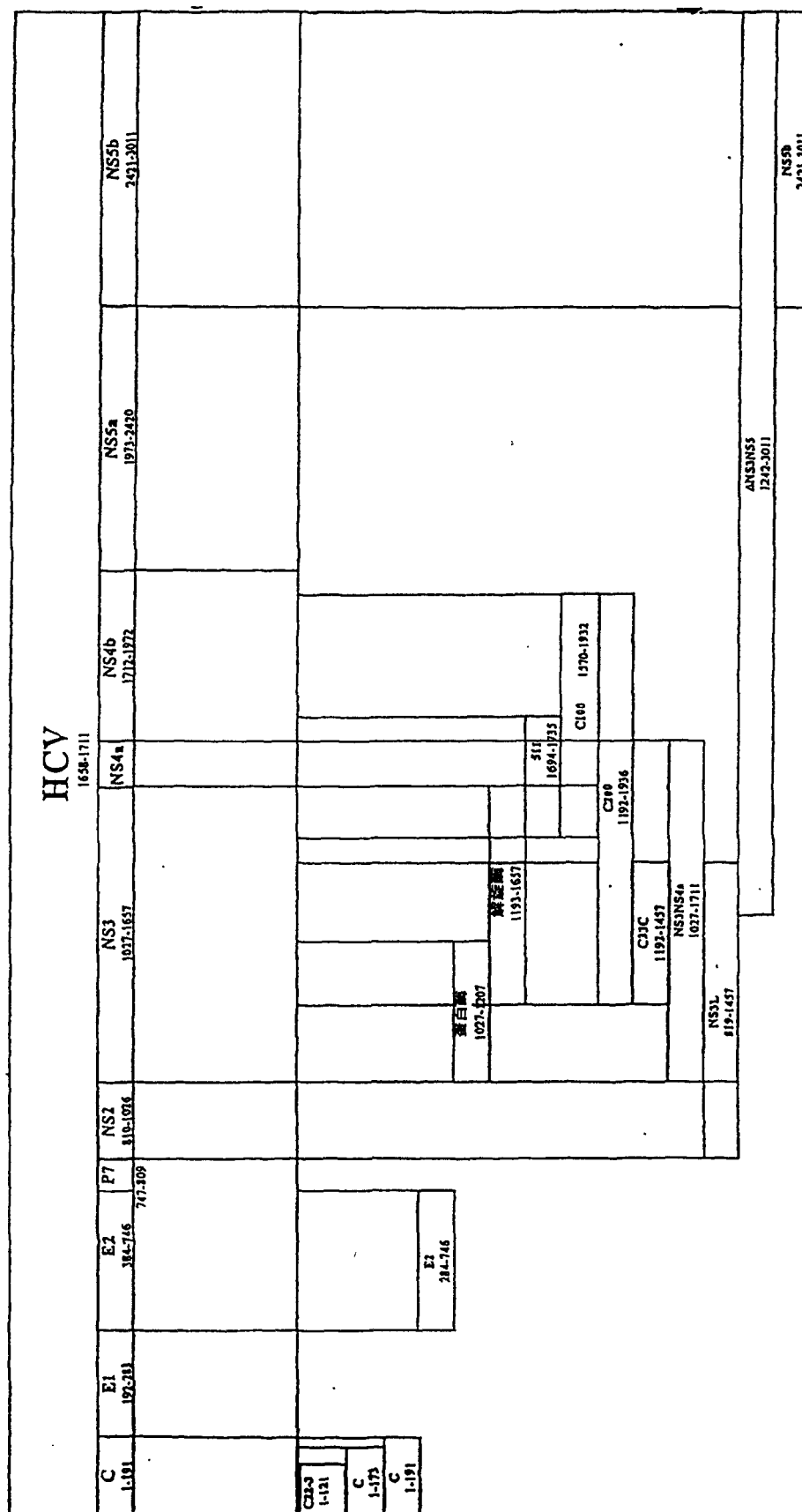
表 10

		平板		
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
单克隆		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1.820	0.616	0.369

	1:1000	1.397	0.380	0.246
	1:10000	0.864	0.173	0.070
	1:20000	0.607	0.116	0.085
5B7/D7	1:100	2.885	0.898	0.436
	1:1000	2.866	0.541	0.267
	1:10000	1.672	0.215	0.086
	1:20000	1.053	0.124	0.059
1A8/H2	1:100	1.020	0.169	0.080
	1:1000	0.921	0.101	0.043
	1:10000	0.653	0.037	0.013
	1:20000	0.337	0.027	0.011

因此，公开了新颖的 HCV 检测试验。从上述可见，应理解虽然本文为了说明描述了本发明的具体实施例，但是可作出许多改变，而不未被本文公开的精神和范围。

## HCV 基因组和重组蛋白



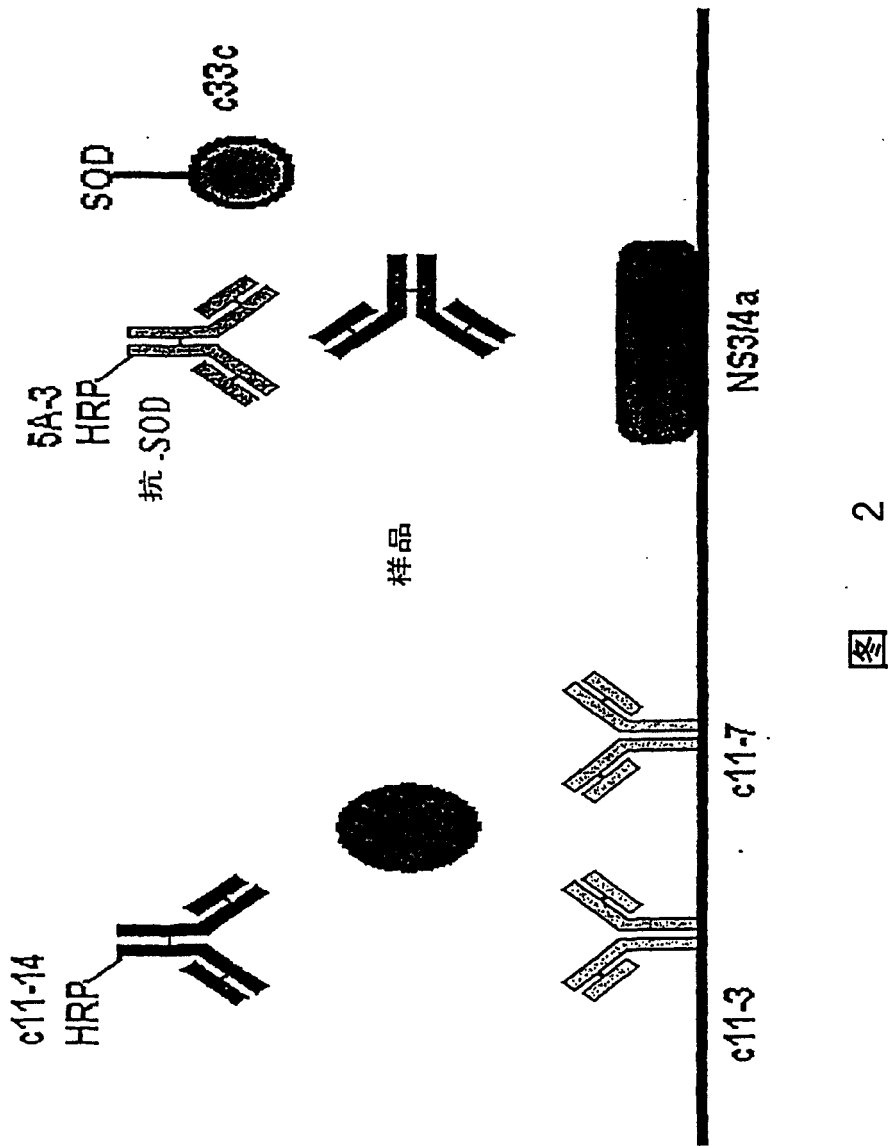


图 2

MSPIDPMQHMHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSIIEFAPITAYAQQTRGLLGCIITSITGRDKNQVE 73  
GEVQIVSTAAQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGFVIQMYTNVDQDLVGWPAHQGTRSLTPCTCGSSD 146  
LYLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRFISYLKGSAGGPLLCAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLE 219  
TTMRSPVFETDNSSPFVVPQSEQVAHLHAPTGSCKSTKVPAAYAAQGYKVLVLPNSVAATLGFGAYMSKAGID 292  
PNIIRTVRTITGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSIIGITVLDQAETAGARLVVLAT 365  
ATPFGSVTPPHNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGGRLIFCHSKKCCDELAJLVALGINAVAYYRGL 438  
DVSVIPPIGDVVVATDALMTGYTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITLPQDAVSRTQRRGRTRG 511  
KPGIYRFVAPGERPSGMFDSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVALRAYMNTFGLPVCQDHLEFWEGVFTGLTH 584  
IDAHFLSQTKQSGENLPYLVAQATVCARAQAPPSWDQMWKCLIRLKPFLHGPTPLLYRLGAVQNEITLTHP 657  
VTKYIMTCMSADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAYCLSTGCVVTVGRVVLGKPAIIPDREVLRYEFDEMEEC 728

图

3



```

      1                                10
      M   A   P   I   T   A   Y   A   Q   Q
      ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

      20
      T   R   G   L   L   G   C   I   I   T   S   L   T   G   R
      ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

      30                                40
      D   K   N   Q   V   E   G   E   V   Q   I   V   S   T   A
      GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

      50
      A   Q   T   F   L   A   T   C   I   N   G   V   C   W   T
      GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                                70
      V   Y   H   G   A   G   T   R   T   I   A   S   P   K   G
      GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

      80
      P   V   I   Q   M   Y   T   N   V   D   Q   D   L   V   G
      CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

      90                                100
      W   P   A   P   Q   G   S   R   S   L   T   P   C   T   C
      TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

      110
      G   S   S   D   L   Y   L   V   T   R   H   A   D   V   I
      GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                                130
      P   V   R   R   R   G   D   S   R   G   S   L   L   S   P
      CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

      140
      R   P   I   S   Y   L   K   G   S   S   G   G   P   L   L
      CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

      150                                160
      C   P   A   G   H   A   V   G   I   F   R   A   A   V   C
      TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

      170
      T   R   G   V   A   K   A   V   D   F   I   P   V   E   N
      ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180                                190
      L   E   T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT

```

4A

```

                200
P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

                210
P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

                220
A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

                230
T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

                240
P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

                250
I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

                260
S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

                270
T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

                280
A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

                290
P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

                300
A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

                310
P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

                320
S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

```

图 4B

```

      390                                     400
    G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
    GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC

      410
    I   P   P   I   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
    ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

      420                                     430
    M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
    ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

      440
    T   C   V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F
    ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

      450                                     460
    T   I   E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T
    ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

      470
    Q   R   R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R
    CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

      480                                     490
    F   V   A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S
    TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

      500
    V   L   C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L
    GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

      510                                     520
    T   P   A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T
    ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC

      530
    P   G   L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G
    CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

      540                                     550
    V   F   T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q
    GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

      560
    T   K   Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q
    ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

      570                                     580
    A   T   V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D
    GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC

```

图 4C

```

                    590
    Q   M   W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G
CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

                    600
    P   T   P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I
CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC

                    610

                    620
    T   L   T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S
ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

                    630
    A   D   L   E   V   V   T   S   T   W   V   L   V   G   G
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

                    640

                    650
    V   L   A   A   L   A   A   Y   C   L   S   T   G   C   V
GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

                    660
    V   I   V   G   R   V   V   L   S   G   K   P   A   I   I
GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                    670

                    680
    P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

686
C
TGC

```


 4D

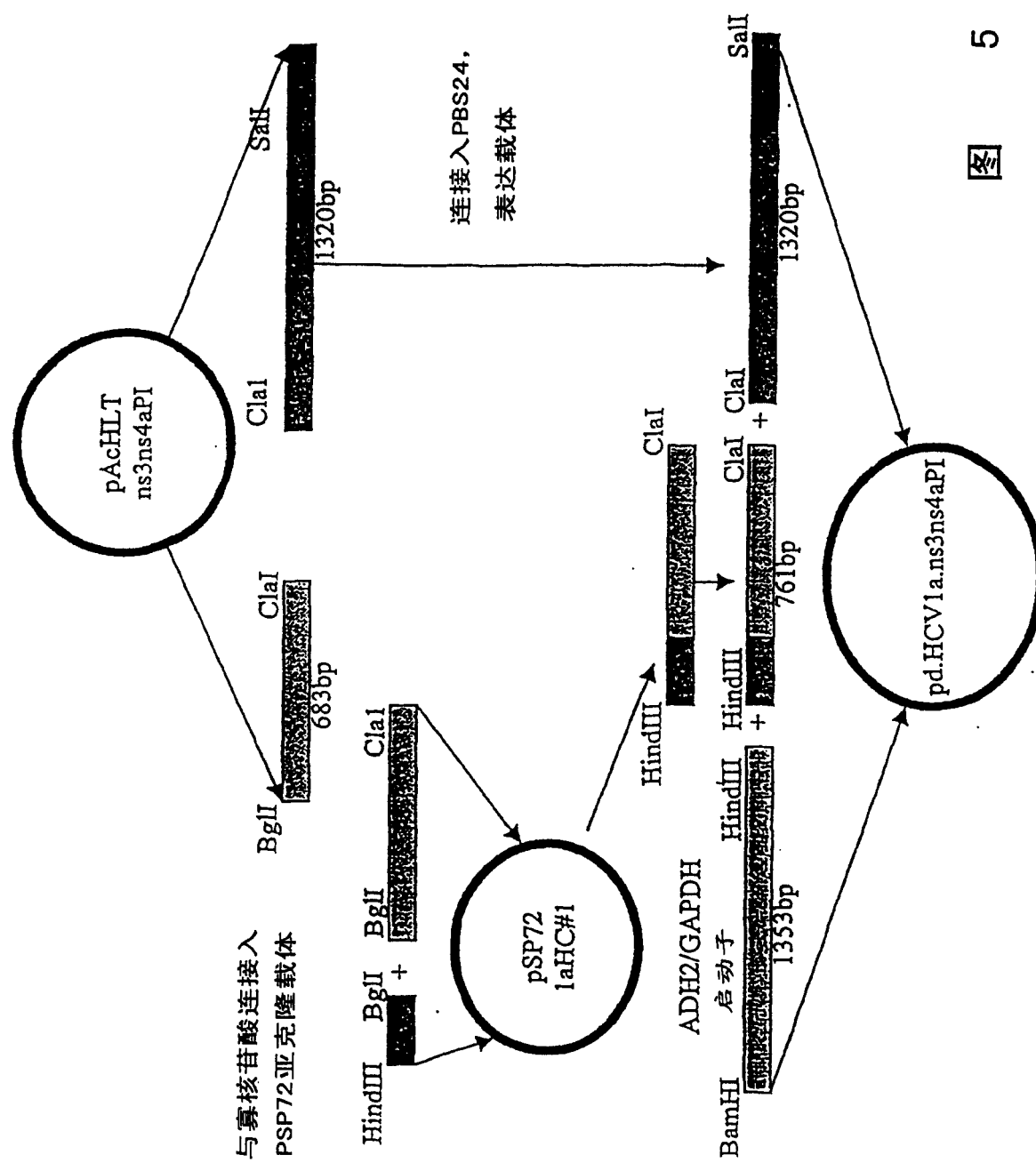


图 5

MEFA 12 抗原构建物

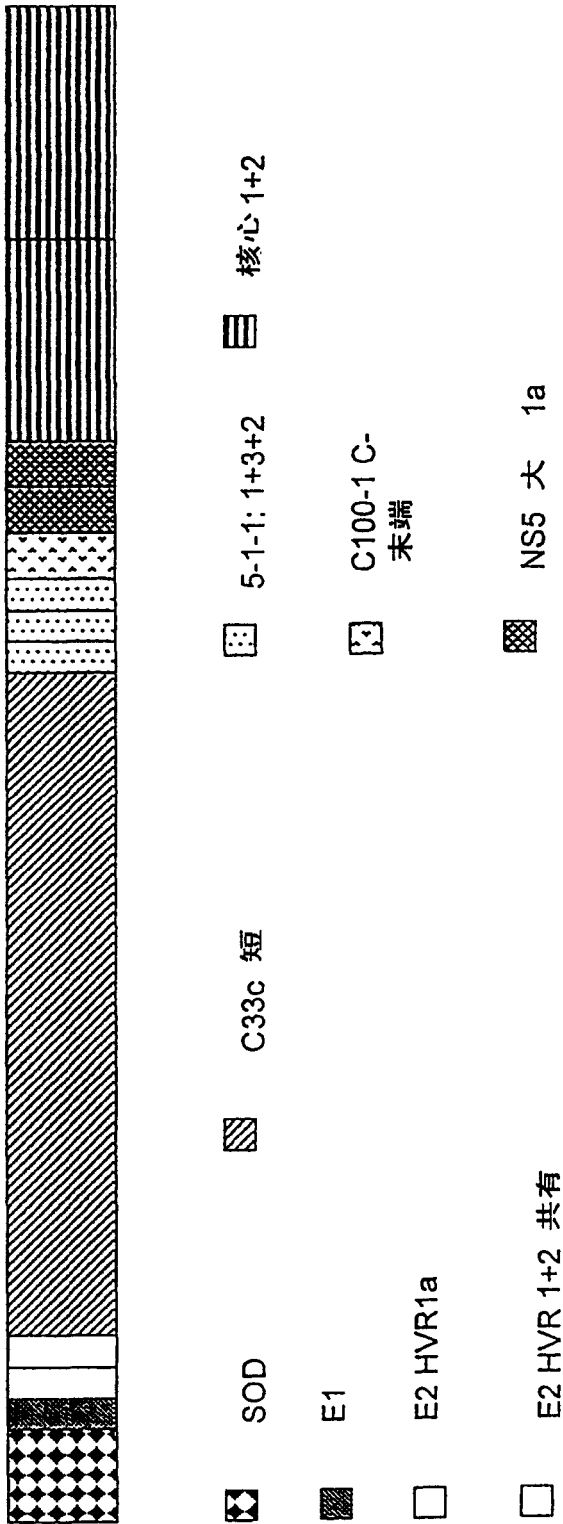


图 6

```

      1                                10
      M   A   T   K   A   V   C   V   L   K   G   D   G   P   V
      ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT  45

                                20                                30
      Q   G   I   I   N   F   E   Q   K   E   S   N   G   P   V
      CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG  90

                                40
      K   V   W   G   S   I   K   G   L   T   E   G   L   H   G
      AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA  135

                                50                                60
      F   H   V   H   E   F   G   D   N   T   A   G   C   T   S
      TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT  180

                                70
      A   G   P   H   F   N   P   L   S   T   R   G   C   N   C
      GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC ACG CGT GGT TGC AAT TGC  225

                                80                                90
      S   I   Y   P   G   H   I   T   G   H   R   M   A   W   K
      TCT ATC TAT CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG  270

                                100
      L   G   S   A   A   R   T   T   S   G   F   V   S   L   F
      CTT GGT TCC GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC  315

                                110                                120
      A   P   G   A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A
      GCC CCA GGT GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA  360

                                130
      A   A   R   T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G
      GCC GCC CGA ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT  405

```

图 7A

```

      140                                150
A   S   Q   N   I   Q   L   I   T   S   T   D   N   S   S
GCC AGC CAA AAC ATT CAA TTG ATT ACT AGT ACG GAT AAC TCC TCT 450

      160
P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT 495

      170                                180
P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA 540

      190
A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA 585

      200                                210
T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT 630

      220
P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC 675

      230                                240
I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC 720

      250
S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC 765

      260                                270
T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA 810

      280
A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC 855

      290                                300
P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT 900

```

图 7B



```

          310
A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC 945

          320
P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT 990

          330
          340
S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG 1035

          350
          360
G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC 1080

          370
I   P   T   S   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC 1125

          380
          390
M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

          400
T   C   A   C   S   G   K   P   A   I   I   P   D   R   E
ACG TGT GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA 1215

          410
          420
V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E   C   S   Q   H
GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

          430
L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A   E   Q   F   K
TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG TTC AAG 1305

          440
          450
Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K   P   A   I   V
CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

          460
P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D   E   M   E   E
CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT GAG ATG GAA GAG 1395

```

图 7C



```

      640
P   D   Y   N   P   P   L   V   E   T   W   K   K   P   D
CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAG 1940

      650
Y   E   P   P   V   V   H   G   R   K   T   K   R   N   T
TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC 1985

      670
N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I
AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC 2030

      680
V   G   G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G
GTT GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT 2075

      700
V   L   A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R
GTG CTC GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG 2120

      710
P   E   G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W   P   L
CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC 2165

      730
Y   G   N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K
TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG 2210

      740
P   G   Y   P   W   P   R   K   T   K   R   N   T   N   R
CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGG 2255

      760
R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I   V   G
CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGT 2300

      770
G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G   V   L
GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT GTG CTC 2345

      790
A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R   P   E
GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG 2390

```

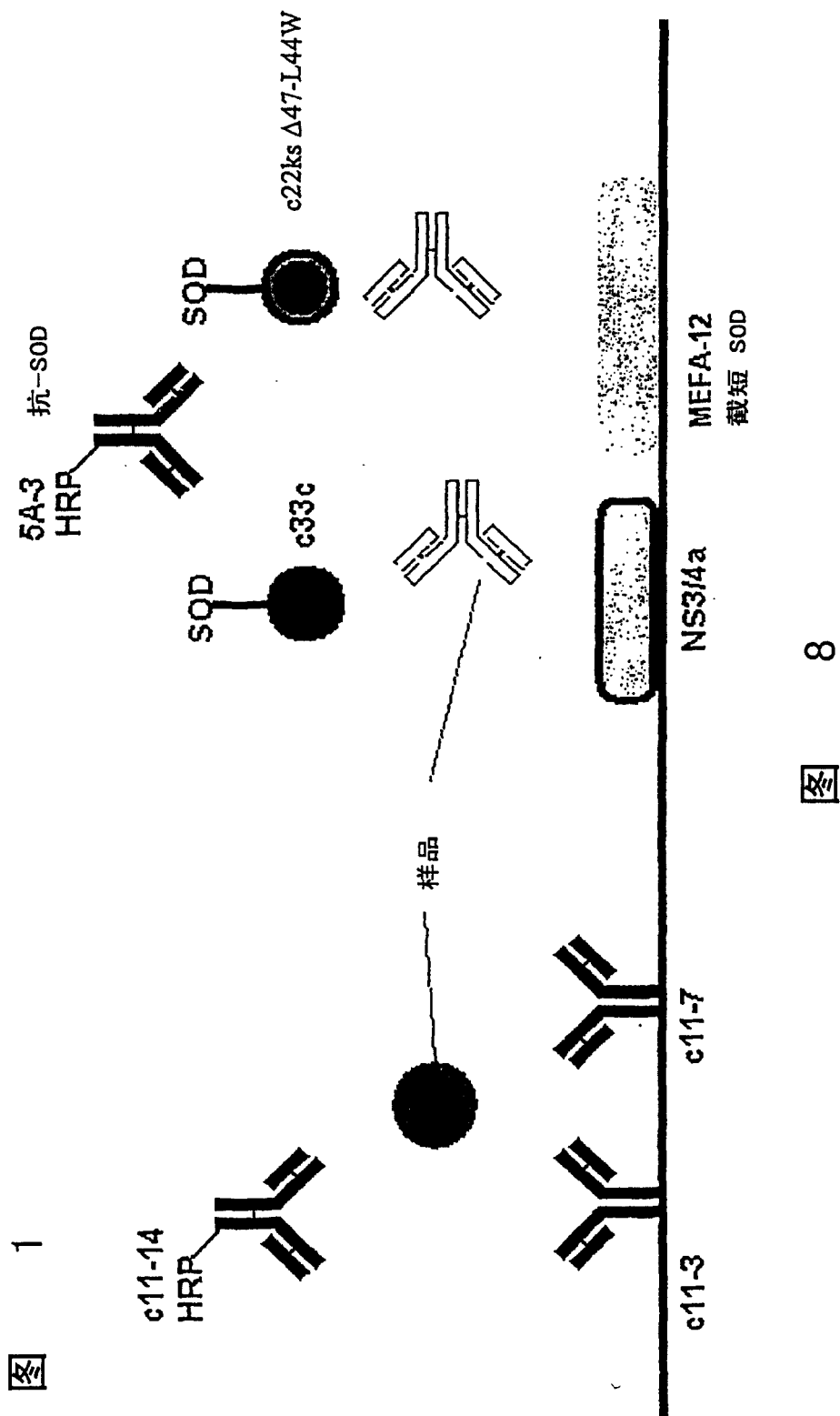
图 7E

800 810  
G R T W A Q P G Y P W P L Y G  
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC 2435

820  
N K D R R S T G K S W G K P G  
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG 2480

829  
Y P W P OC  
TAC CCT TGG CCC TAA TGAGTCGAC

图 7F



专利名称(译)	HCV抗原/抗体组合试验		
公开(公告)号	<a href="#">CN1256591C</a>	公开(公告)日	2006-05-17
申请号	CN01811243.9	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	希龙公司		
当前申请(专利权)人(译)	希龙公司		
[标]发明人	DY基恩 P阿尔坎杰尔 L坦德斯基 D科伊特 A梅迪纳 塞尔比		
发明人	D·Y·基恩 P·阿尔坎杰尔 L·坦德斯基 C·乔治-纳西门托 D·科伊特 A·梅迪纳-塞尔比		
IPC分类号	G01N33/576 C07K14/18 C07K19/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 G01N33/5767 G01N2333/18 G01N2469/10 G01N2469/20		
代理人(译)	徐迅		
优先权	60/212082 2000-06-15 US 60/280811 2001-04-02 US 60/280867 2001-04-02 US		
其他公开文献	CN1489692A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

提供了一种可只使用一种固体基质同时检测样品中所存在的HCV抗原和抗体的HCV核心抗原和NS3/4a抗体组合试验，以及用于该试验的免疫分析固相载体。

