

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880015324.5

[51] Int. Cl.

*C07K 16/10 (2006.01)*  
*G01N 33/569 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*C40B 30/04 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679514A

[22] 申请日 2008.3.7

[21] 申请号 200880015324.5

[30] 优先权

[32] 2007.3.7 [33] FI [31] 20075159

[32] 2007.3.7 [33] US [31] 60/893,420

[86] 国际申请 PCT/FI2008/050111 2008.3.7

[87] 国际公布 WO2008/107523 英 2008.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.9

[71] 申请人 奈克斯特生物医学技术公司

地址 芬兰赫尔辛基

[72] 发明人 卡尔·萨克塞拉

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 岑晓东

权利要求书3页 说明书9页 序列表1页  
附图1页

[54] 发明名称

用于检测非保守蛋白质中保守的组合或复合表位的融合多肽

[57] 摘要

本发明提供了多表位结合融合多肽，供在生物学样品中检测人免疫缺陷病毒(HIV)的存在的方法中使用。本发明还提供了用于生产多表位结合融合多肽的方法。

1. 一种融合多肽，其同时特异性结合已知为易变的多肽抗原的至少两个表位，所述表位由所述抗原的3至5个相邻定位的保守氨基酸残基组成，且所述结合导致所述融合多肽在结合所述抗原的变体方面的高特异性和广泛覆盖度。
2. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述表位总共由所述抗原的至少8个保守氨基酸残基组成。
3. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述融合多肽特异性结合95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%的所述抗原变体。
4. 依照权利要求1的融合多肽，其包含两个彼此共价连接的单链抗体。
5. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述表位由3至4个、或4至5个相邻的氨基酸残基组成。
6. 依照权利要求5的融合多肽，其中一个或两个表位由3个、4个、或5个相邻的氨基酸残基组成。
7. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述多肽对所述抗原具有 $10^{-12}$ 至 $10^{-15}$ M的亲和力。
8. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述抗原是HIV的p24多肽，而所述表位选自HIV p24多肽的长3至5个氨基酸的区域，其组成如下：NAWVK、FRDY、RAEQ、NPDC、VGGP、AWVK、NAWV、RDY、FRD、AEQ、RAE、PDC、NPD、GGP、VGG、WVK、AWV、NAW、SDI、PVG、GLN、WMT、TLL、EMM、和HKA。
9. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述融合多肽是通过使结合多肽进行连续多轮生物淘选而获得的。
10. 依照权利要求9的融合多肽，其中所述生物淘选是基于噬菌体展示系统的。
11. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述表位不是免疫原性的。
12. 依照权利要求1的融合多肽，其中所述融合多肽是经过标记的。
13. 用于生产能够同时特异性结合已知为易变的多肽抗原的至少两个表位的融合多肽的方法，所述表位由所述抗原的3至5个相邻的保守氨基酸残

基组成，所述方法包括以下步骤：

- a) 通过对所述抗原的已知氨基酸序列的计算分析来选择所述抗原中长3至5个氨基酸的保守区；
  - b) 基于所述抗原的选定保守区来制备肽；
  - c) 使表达结合蛋白的颗粒的文库与一种或多种所述肽接触；
  - d) 分离那些表达如下的结合蛋白的颗粒，所述结合蛋白具有针对所述肽的结合活性；
  - e) 对自步骤d)中分离的颗粒获得或衍生的核酸进行诱变；
  - f) 基于自步骤e)获得的颗粒来制备表达结合蛋白的颗粒的文库；
  - g) 使自步骤f)获得的文库与一种或多种所述肽或其片段接触；
  - h) 分离那些表达如下的结合蛋白的颗粒，所述结合蛋白具有针对所述肽或其片段的改善的结合活性；
  - i) 重复步骤e)至h)一次或多次；
  - j) 从自步骤i)获得的颗粒获得能够特异性结合所述抗原中至少长至少3至5个相邻氨基酸的表位的颗粒；
  - k) 基于步骤j)中分离的颗粒来制备所述融合多肽，即向一种融合多肽中组合如下的两种所述颗粒的结合特异性，所述颗粒具有针对所述抗原的至少两个不同表位的特异性，这产生具有针对所述抗原变体的高特异性的融合多肽。
14. 依照权利要求13的方法，其中步骤k)中获得的所述融合多肽特异性结合95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%的所述抗原变体。
15. 依照权利要求13的方法，其中所述文库是单链抗体的噬菌体文库。
16. 依照权利要求13的方法，其中所述抗原是HIV的p24多肽。
17. 依照权利要求16的方法，其中所述肽选自HIV p24多肽的长3至5个氨基酸的区域，其组成如下：NAWVK、FRDY、RAEQ、NPDC、VGGP、AWVK、NAWV、RDY、FRD、AEQ、RAE、PDC、NPD、GGP、VGG、WVK、AWV、NAW、SDI、PVG、GLN、WMT、TLL、EMM、和HKA。
18. 依照权利要求13的方法，其中所述表位由3至4个、或4至5个相邻的氨基酸残基组成。
19. 依照权利要求13的方法，其中一个或两个表位由3个、4个、或5个相邻

的氨基酸残基组成。

20. 依照权利要求13的方法，其中所述融合多肽对所述抗原具有 $10^{-12}$ 至 $10^{-15}$ M的亲和力。
21. 一种通过依照权利要求13的方法获得的融合多肽，其能够同时特异性结合已知为易变的多肽抗原的至少两个表位，所述表位由所述抗原的3至5个相邻的保守氨基酸残基组成，且所述多肽具有针对所述抗原的变体的高特异性。
22. 依照权利要求21的融合多肽，其中所述融合多肽特异性结合95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%的所述抗原变体。
23. 用于在生物学样品中检测抗原的存在的方法，该方法包括：
  - a) 使所述样品或其级分与依照权利要求1的融合多肽接触；
  - b) 检测所述多肽与抗原的复合物，所述复合物的存在指明所述样品中存在所述抗原。
24. 依照权利要求23的方法，其中所述多肽是依照权利要求8的多肽，所述抗原是HIV的p24多肽，而所述方法是用于检测样品中的HIV的方法。

## 用于检测非保守蛋白质中保守的组合或复合表位的融合多肽

### 发明领域

本发明提供了一种用于高度易变蛋白质的可靠诊断检测的融合多肽，所述高度易变蛋白质缺乏保守的抗体结合表位。这是使用由两个或更多个结合单元构成的多肽经由对同一靶蛋白中独立但相连接的结构决定簇的识别而实现的。用此办法所靶向的结构决定簇由这些其它方面易变的蛋白质中的短的（3-5个残基）保守氨基酸序列组成。使用生物工程化改造的高亲和力结合多肽(BHAP)能有效地靶向这些三肽、四肽、和五肽，但是因为此类短序列可能在感兴趣的标本（例如血清样品）中的许多其它蛋白质中出现，所以这种结合的诊断价值具有有限的价值。然而，可以使用由两个或更多个BHAP构成的、结合多个保守三肽、四肽、或五肽的多表位结合融合多肽(MEBIP)的协作结合来克服此问题，并确保以能够实现所述蛋白质的诊断检测的卓越亲和力特异性靶向感兴趣的蛋白质。重组抗体片段是数种类型的结合蛋白的一个例子，其可以代表MEBIP中的一个或所有BHAP亚单元。因此，本发明提供了一种用于可靠且定量检测由具有高突变能力的病毒（诸如HIV）编码的蛋白质的新手段。

### 发明背景

Schupbach等(*Journal of Medical Virology*, 2001, 65:225-232)披露了热变性的、扩增加强的p24抗原可以用作HIV RNA测试的备选方法，用以监测HIV感染的治疗。Respass等(*Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1):506-508)和Knuchel等(*Journal of Clinical Virology*, 2006, 36:64-67)也披露了超灵敏的p24抗原测定法，用作HIV RNA测试的备选方法。

Boder等(*PNAS*, 2000, 97(20):10701-10705)披露了具有单价飞摩尔抗原结合亲和力的抗体片段的定向进化。Holliger和Hudson (*Nature Biotechnology*, 2005, 23(9):1126-1136)综述了工程化改造的抗体片段。Nygren和Uhlen (*Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7:463-469)和Hosse等(*Protein Science*, 2006, 15:14-27)综述了用于分子识别的蛋白质展示支架的工程化改

造。

Binz等(Nature Biotechnology, 2005, 23(10):1257-1268)和Hey等(Trends in Biotechnology, 2005, 23(10):514-422)综述了来自非免疫球蛋白域的新结合蛋白的工程化改造。

能识别和集合两个不同配体的双特异性重组抗体分子是文献中公知的(参见例如Albrecht等, J Immunol Meth 310: 100-16, 2006)。结合同一蛋白质中的两个不同表位的双特异性重组抗体也有记载(参见例如Neri等, J Mol Biol 246: 367-73, 1995; Zhou, J Mol Biol 329: 1-8, 2003)。与两个重组抗体各自单独的结合相比,组合的结合导致结合亲和力的显著升高。虽然MEBIP可能与双特异性重组抗体的构造具有相似性,但是重要的是理解本创新是新颖的,而且与已有记载的双特异性重组抗体设计和用途无关。

虽然有帮助,但是升高的亲和力(其牵涉超过一个共价连接的BHAP(无论是重组抗体还是其它类型的分子)的协作结合)不是靶向感兴趣的蛋白质中的多个区域的原因。代替地,此创新的关键思想在于将易变蛋白质内散布的短保守肽组合成“虚表位”(virtual epitope),其为检测中的诊断特异性提供足够的复杂性。为了提供此类结构复杂性,线性肽表位应当由至少6个残基组成。然而,浏览可得的序列数据库显示,难以在许多高度易变的微生物蛋白质,特别是RNA病毒蛋白质中找到很保守的连续的6个残基的氨基酸段。例如, HIV-1 p24蛋白不含会在超过99%的已知HIV-1序列中保守的单一六肽(6聚物),这使得可靠的免疫学检测成问题。如下文所讨论的,使用MEBIP办法协作检测保守的三肽、四肽、或五肽的组合可以有助于解决此问题。如此,这种新办法因此容许开发用于诊断检测高度易变的微生物蛋白质(诸如HIV-1 p24)的更好手段。

### 附图简述

图1。一个代表性HIV-1株的p24蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。该图显示了主要的M型HIV-1的进化枝A-K和多种循环重组病毒以及O型和N型病毒和来自黑猩猩的相关SIV中p24的残基的相对保守性。得分1指示超过99.75%的保守,得分2指示大于99.50%的保守,得分3指示大于99.00%的保守,得分4指示大于98.00%的保守,而得分5指示大于97.00%的保守(在每个残基上方显示了得分)。没有对小于97%保守的残基评分。对具有大于99.00%的

总体保守的连续肽段标有下划线，并以粗体指示。

### 发明详述

为本说明书中使用的一些术语提供了下列定义。

“抗体”以其多种语法形式在本文中作为集合名词使用，指一群免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫学活性部分，即含有抗原结合位点或互补位的分子。

“表位”指大分子（诸如多肽）中受到免疫系统（具体是抗体、B细胞、或细胞毒性T细胞）识别的部分。可以将受到抗体识别的大多数表位想象为抗原分子的三维表面特征。这些特征精确地吻合并如此结合抗体。这些表面可依赖于三级蛋白质结构，使得形成表位的残基在蛋白质的氨基酸序列中的定位彼此远离（构象性表位），或者可以由蛋白质内的连续肽区域形成（线性表位）。因此，若蛋白变性（这是抗体的诊断用途中常见的情况），则仅线性表位可用于检测。形成受到抗体识别的线性表位的连续氨基酸残基的数目有所不同，但是通常在六至十（6-10）个的范围。然而，天然抗体能以显著的亲和力识别更短的表位，而且甚至可以将重组抗体靶向结合单个氨基酸残基。

“抗原结合位点”、“互补位”指抗体分子中特异性结合抗原的结构部分。

“单链抗体”（scFv）用于定义如下分子，其中抗体重链和轻链的可变域经由接头肽连接在一起以形成自单一mRNA分子（转录物）合成的连续氨基酸链。

“免疫测定法”指利用一种或多种抗体与其抗原的反应来测量某物质在生物学流体（通常是血清、血浆、尿液、或其它体液）中的水平的生化测试。该测定法利用抗体对其抗原的特异性结合。常常使用单克隆抗体，因为它们通常结合要检测的分子的单一位点，并因此提供更加特异性且准确的测试，其不受样品中其它分子的干扰。所使用的抗体必须具有针对抗原的高亲和力。例如，通过检测微生物特异性分子结构，可以在传染病的诊断中测量抗原的存在。可以通过多种方法来实现抗原数量的检测。最常用的技术之一是标记抗原或抗体。标记物可以由酶（酶免疫测定法，EIA）、荧光(FIA)、发光(LIA)构成，或者它们可以基于凝集、浊度法、比浊法或免疫印迹（Western印迹）。

免疫测定法可以是竞争性的或非竞争性的，而且它们可以是均相的(homogeneous)或异相的(heterogeneous)。在竞争性测定法中，样品中的抗原与经过标记的抗原竞争以与抗体结合。然后测量结合至抗体位点的经标记抗原的量。应答会与样品中抗原的浓度成反比，因为应答越大，样品中可用于与经标记抗原竞争的抗原越少。

在非竞争性免疫测定法（常常称作“三明治式/夹心式测定法”）中，样品中的抗原结合至“捕捉”抗体，并测量该位点上经标记抗体的量。与竞争性测定法的情况不同，结果会与抗原浓度成正比。

异相免疫测定法会要求额外的步骤，用以从该位置除去未结合的抗体或抗原，这通常使用固相材料来进行。均相测定法不要求用于除去未结合的抗体或抗原分子的分离阶段。免疫测定法在HIV的诊断中具有特别重要的作用。

缩写“MEBIP”指“多表位结合融合多肽”，其是经过遗传工程改造的蛋白质构建体，包含结合一种共同靶蛋白中不同位点的两个或更多个独立结合单元。MEBIP内的一个或多个结合单元可以是scFv。

“虚表位”指通常由两段3至5个甚至在其它方面高度易变的蛋白质（诸如许多病毒蛋白质）中都趋于恒定的氨基酸残基形成的结构，并且可充当MEBIP的配体。“虚表位”可以与抗原表位交叠，但是可以不被传统抗体靶向。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”、或“特异性识别”、或表述“具有对表位的结合特异性”指MEBIP或其片段或衍生物与其靶分子之间的低背景和高亲和力结合（即缺乏非特异性结合）。换言之，这些术语（和等同的短语）指在存在蛋白质和其它生物制剂的异质群体的情况中结合模块（例如受体、抗体、配体或抗配体）优先结合特定靶分子（例如配体或抗原）的能力（即对测试样品中存在的其它成分没有显著结合）。典型地，两种实体（诸如配体与受体）之间的特异性结合意味着结合亲和力为至少约 $10^6\text{M}^{-1}$ 、优选至少约 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、或 $10^{10}\text{M}^{-1}$ ，更优选至少约 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、或 $10^{15}\text{M}^{-1}$ 。

术语“特异性”或“高特异性”还可以指结合多肽（诸如MEBIP）结合95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%的其非保守多肽配体变体的能力。

术语“生物淘选”和“噬菌体展示文库”在本文中与美国专利申请No.

2005/0074747 (Arap等)中相同的方式使用。

进一步地,抗原的经典定义是在导入易感动物的组织中后引发免疫应答(例如特异性抗体分子的生成)且能够与所形成的特异性抗体结合的“任何外来物质”。一般而言,抗原具有高分子量,而且通常是蛋白质或多糖。多肽、脂质、核酸和许多其它材料也能起抗原的作用。还可以针对称作半抗原的较小物质产生免疫应答,若它们被化学偶联至较大的载体蛋白的话,诸如牛血清清蛋白、匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)或其它合成基质。多种分子(诸如药物、单糖、氨基酸、小肽、磷脂、或甘油三酯可以起半抗原的作用。如此,给予足够的时间,几乎任何外来物质会被免疫系统鉴定,并引起特异性抗体生成。然而,此特异性免疫应答是高度易变的,而且较大部分地取决于抗原的大小、结构和组成。引发强烈免疫应答的抗原被说成是强烈免疫原性的。

好抗原的特征包括:

- 该分子内结构稳定性和化学复杂性的区域。
- 缺乏广泛重复单元的显著段(significant stretch)。
- 最低分子量为8,000-10,000道尔顿,虽然已经在存在载体蛋白的情况下使用了具有低至200Da分子量的半抗原。
- 被免疫系统加工的能力。
- 抗体形成机制可及的免疫原性区。
- 足够不同于宿主的结构元件。
- 对于肽抗原,含有至少30%的免疫原性氨基酸(K、R、E、D、Q、N)的区域。
- 对于肽抗原,显著的亲水性的或带电荷的残基。

因为抗体结合表位可以仅由少数氨基酸组成,所以它可能不具有任何诊断价值,因为同样的表位可以存在于同一标本(例如血清样品)中的许多其它蛋白质中。如此,在例如人血液中微生物蛋白质的检测中有用的表位不应存在于人血清中,已经估算出人血清包括多达10,000种不同蛋白质。在假设血清蛋白质的平均大小会是50kD(约500个氨基酸),且人蛋白质中会平等地使用所有20种天然氨基酸时,可以计算出在血清中找到任何给定的二肽、三肽或四肽的可能性为基本上100%。在一组10,000种假定的50kD蛋白质中存在给定的五肽(5个氨基酸)的相应可能性是79%,而存在六肽(6个氨基酸)的可能性是7.5%。

如此，可以估计出微生物病原体中所有五聚物抗体表位的79%诊断效用和所有六聚物抗体表位的7.5%诊断效用受到它们在正常血清中的存在的连累。换言之，可预期能够经由识别五聚物线性肽表位而足够紧密地结合微生物蛋白质的抗体（或其它类型的特异性结合蛋白）中仅21%不结合人血清中存在的表位，且如此对于这种微生物的诊断检测是有用的。比较而言，绝大多数识别由6个或更多个残基组成的线性表位的抗微生物抗体没有这种问题。当然，诊断用抗体的效用也可能受到连累，因为它们与由无关肽序列编码的表位起交叉反应，但是靶表位的长度在此复杂情况中的相关性较小。

基于上文的计算，显而易见的是，由5个残基组成的线性表位仅具有有限的价值，而比5个残基短的表位作为微生物诊断学中的检测靶物是没用的。然而，若考虑此类短表位在单一蛋白质中的组合存在，则情况不同。下文（表1）显示了三肽、四肽、和五肽的不同组合在1000种或10,000种假定的长500个残基的多肽中的单一蛋白质中出现的计算可能性。

表1

表位组合	在1000种50kD蛋白质中存在的概率	在10,000种50kD蛋白质中存在的概率
三肽+三肽	97%	约100%
三肽+四肽	17%	85%
三肽+五肽	0.94%	9.0%
四肽+四肽	1.0%	9.3%
四肽+五肽	0.05%	0.5%
五肽+五肽	约0%	0.02%

此分析显示了短至3个或4个残基的表位对于诊断目的可以是非常有用的，若可以检测它们与次最佳长度（四聚物或五聚物）的另一个表位的组合存在的话。此类短的且由此非诊断性的表位合起来可视为有诊断价值的“虚表位”。此概念在试图可靠地检测高度易变的微生物蛋白质（诸如HIV p24抗原）时可以是高度有用的，高度易变的微生物蛋白质含有很少的会彼此紧邻定位且在大多数病毒株和准种中保守的氨基酸残基。

基于上文，本发明提供了一种用于生产能够同时特异性结合已知为易变的多肽抗原的至少两个表位的融合多肽（即MEBIP）的方法，所述连续表位由所述抗原的3个、4个、或5个相邻定位的保守氨基酸残基组成，所述方法

包括以下步骤:

- a) 通过对所述抗原的已知氨基酸序列的计算分析来选择所述抗原中长3至5个氨基酸的保守区;
- b) 基于所述抗原的选定保守区来制备肽;
- c) 使表达结合蛋白的颗粒的文库(诸如单链抗体的噬菌体文库)与所述肽接触;
- d) 分离那些表达如下的结合蛋白的颗粒,所述结合蛋白具有针对所述肽的结合活性;
- e) 对自步骤d)中分离的颗粒获得或衍生的核酸进行诱变;
- f) 基于自步骤e)获得的颗粒来制备表达结合蛋白的颗粒的文库;
- g) 使自步骤f)获得的文库与所述肽或其片段接触;
- h) 分离那些表达如下的结合蛋白的颗粒,所述结合蛋白具有针对所述肽或其片段的改善的结合活性;
- i) 重复步骤e)至h)一次或多次;
- j) 从自步骤i)获得的颗粒获得能够特异性结合所述抗原中长至少3至5个相邻的或不连续的氨基酸的表位的颗粒;
- k) 基于步骤j)中分离的颗粒来制备所述融合多肽,即向一种融合多肽中组合如下的两种所述颗粒的结合特异性,所述颗粒具有针对所述抗原的至少两个不同表位的特异性,这产生具有针对所述抗原变体的高特异性的融合多肽。

优选地,步骤k)中获得的MEBIP特异性结合95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、或超过99%的所述抗原变体,所述抗原优选是HIV的p24多肽。

优选地,步骤b)中的所述肽选自HIV p24多肽的保守肽的长3至5个氨基酸的区域,其组成如下: NAWVK、FRDY、RAEQ、NPDC、VGGP、AWVK、NAWV、RDY、FRD、AEQ、RAE、PDC、NPD、GGP、VGG、WVK、AWV、NAW、SDI、PVG、GLN、WMT、TLL、EMM、和HKA。

本发明还涉及一种融合多肽,即MEBIP,其能够同时特异性结合已知为易变的多肽抗原的至少两个表位,所述表位由所述抗原的长3至5个残基的保守氨基酸残基段组成,且所述多肽具有针对所述抗原的变体的高特异性。通过上文描述的方法能获得此类MEBIP。

## HIV测定法

在检测人免疫缺陷病毒(HIV)的情况中,问题在于病毒的抗原性位点在不断地且快速地改变。本发明的解决办法是提供用于制备MEBIP的手段,所述MEBIP特异性结合两种不同的氨基酸段,其由p24多肽的高度保守的、长3至5个氨基酸残基的表位组成,这用常规的抗体会难以实现或者不可能实现。如此获得的MEBIP可以以与抗体相同的方式在检测方法中使用,且如此在检测人免疫缺陷病毒在生物样品中的存在中是有用的。

本领域技术人员还能容易地将上文的办法应用于其它抗原测定法。如此,本发明提供了一种用于在生物样品中检测抗原的存在的一般方法,该方法包括:

- a) 使所述样品或其级分与MEBIP接触; 并
- b) 检测所述多肽与抗原的复合物,所述复合物的存在指明所述样品中存在所述抗原。

优选地,所述抗原是HIV的p24多肽,而所述方法是用于检测样品中的HIV的方法。

本文通过提及收录本文中用于例示本发明的背景,和特别是用于提供关于其实施的额外详情的出版物和其它材料。本发明进一步记载于下列实施例中,它们并非意图限制本发明的范围。

## 实施例

### 实施例1

为了鉴定HIV p24中可用作虚表位的保守区,将公共数据库(诸如<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)中可得的大量氨基酸序列个体彼此比对,并评估每个氨基酸残基的相对保守性。基于此分析,选择由在超过99%的序列中保守的3个或更多个残基组成的肽段,用于进一步分析(参见图1)。

使用基于亲和力的选择方法,使用含有HIV p24中虚表位的一个或数个潜在保守区的合成肽来筛选能充当MEBIP前体的多肽的大型文库。例如,对由Neri及其同事(Proteomics 5:2340-2350, 2005)生成的、含有 $3 \times 10^9$ 个重组抗体克隆个体的ETH-2-Gold噬菌体展示文库筛选能特异性地与含有保守区的肽相互作用的多肽。也存在含有基于非Ig衍生多肽的潜在配体结合多肽的数个文库(参见例如Nature Biotechnology 23:1257-1268, 2005),或者可以从头

设计，并用于筛选多肽以便开发MEBIP。在用合成肽筛选此类MEBIP前体文库外，含有一个或多个潜在保守区的重组蛋白以及变性的HIV壳体蛋白(p24)也在亲和选择中作为配体使用。在后一种情况中，能实现对具有所述保守区的肽的靶向结合，例如经由使用这些肽洗脱具有想要的结合特异性的噬菌体来实现。

通过例如筛选scFv噬菌体文库（Hoogenboom, Nature Biotechnology 23(9):1105-1116综述了筛选重组抗体文库的基本原理）来生成结合这些肽的潜在MEBIP分子后，使用肽阵列技术来证实引起此结合的残基。图1中所显示的两种或更多种表位的任意组合是要在HIV p24检测中使用的MEBIP结合的潜在组合靶物。

## 实施例2

选择如下MEBIP前体进行进一步开发，所述MEBIP前体结合变性的p24以及含有限定的虚表位的肽。经由反复诱变和亲和选择来使这些前MEBIP的结合亲和力最大化，如发明人在其关于SCA工程的先前研究中所描述的（Biochemistry 41:12729-12738, 2003）。使用了前MEBIP中结合表面的随机诱变以及靶向诱变，或者这些办法的组合，其中随机诱变使用上文所引用的Biochemistry文章中记载的易错PCR或其它类似的技术进行。使用基于M13衍生的噬菌粒的传统噬菌体展示加上辅助噬菌体介导的办法来进行改良的前MEBIP分子的亲和选择和扩增，但是也可以使用其它相关的筛选方法。

随后，如下制备MEBIP（参见例如Albrecht等，2006, Journal of Immunological Methods 310:100-116），即向一种融合多肽中组合两种前MEBIP的结合特异性，所述前MEBIP具有针对p24中虚表位的保守区的特异性，产生融合多肽，即MEBIP。最后，使用与最初用于工程化改造前MEBIP亚单元结合特性的方法相同的方法来进一步优化装配得到的MEBIP对其复合靶物的结合亲和力。

然后详细地表征结合亲和力和其它突出的特性。最佳MEBIP（就这样使用的或者作为多种融合蛋白衍生物使用以建立新的p24检测测定法）的特性包括：1) 对热变性的HIV p24蛋白的高亲和力，优选意味着低于 $10^{-12}$ M的解离常数，2) 虚表位在超过99%的相关病毒株中的绝对保守性，和3) 好的溶解度和易于大规模重组生产。

<110> 奈克斯特生物医学技术公司 (Next Biomed Technologies NBT Oy)  
 <120> 用于检测非保守蛋白质中保守的组合或复合表位的融合多肽  
 <130> 46249  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.1  
  
 <210> 1  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> 人免疫缺陷病毒  
  
 <400> 1  
  
 Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe  
 20 25 30  
 Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr  
 35 40 45  
 Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala  
 50 55 60  
 Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met  
 85 90 95  
 Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln  
 100 105 110  
 Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr His Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu  
 115 120 125  
 Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met  
 130 135 140  
 Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln  
 165 170 175  
 Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln  
 180 185 190  
 Asn Ala Asn Pro Asp Cys Glu Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Gly  
 195 200 205  
 Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro  
 210 215 220  
 Gly His Lys Ala Arg Val Leu

3 5 5 5 3 4 4 4 2 1 3 1 1 2 2 1 3 3 5 3 3 2  
 PIVQNLQGMVHQAI SPRTL NAWVK VVEEKAFSPEVIPM  
 3 4 3 5 2 3 4 3 3 4 3 2 2 3 4 4 1 5 1 3 2  
 FSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAA  
 1 1 3 2 1 2 2 5 4 1 2 3 5 2 2 1 1 2 3 4 5 3 2 2  
 EWDR LHPVHAGPIAPGOMREPRG SDI AGTTSTLQEQIGW  
 4 1 4 4 5 2 1 2 3 2 1 3 1 2 2 3 5 2 2 4 2 5 1 1 4 2 1 3  
 MTHNPPI PVGEI YKRWII L GLN KIVRMYSPTSILDIRQG  
 2 2 4 2 2 2 2 3 3 4 2 3 1 2 1 2 3 2 3 2 2 2 2 2 2 2 2  
 PKEP FRDY VDRFYKTL RAEQ ASQEVKN WMT TLL VQNA N  
 1 2 1 3 1 3 2 2 2 1 2 4 2 2 2 3 2 2 2 2 2 1 2 4 2  
PDC ETILKALGPGATLE EMM TACQG VGGP GHKA RVL

图 1

专利名称(译)	用于检测非保守蛋白质中保守的组合或复合表位的融合多肽		
公开(公告)号	<a href="#">CN101679514A</a>	公开(公告)日	2010-03-24
申请号	CN200880015324.5	申请日	2008-03-07
[标]发明人	卡尔萨克塞拉		
发明人	卡尔·萨克塞拉		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/569 G01N33/53 C40B30/04		
CPC分类号	G01N2333/161 C07K2317/622 C07K2319/00 C07K16/1054		
优先权	60/893420 2007-03-07 US 2007005159 2007-03-07 FI		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了多表位结合融合多肽，供在生物学样品中检测人免疫缺陷病毒(HIV)的存在的方法中使用。本发明还提供了用于生产多表位结合融合多肽的方法。

3 5 5 534 4 421311221 3 35 332  
 PIVQNLQGQMVHQAI SPRTLNNAWVKVVEEKAFSPEVIPM  
 3 4 3 5 234 3343 2 2 34 415132  
 FSALSEGATPQDLN TMLNTVGGHQAAMQLKETINEEAA  
 113 21 22 541 2 352211 2 34 532 2  
 EWDR LHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGW  
 41 445 212 32 13 12235 2242 51142 13  
 MTHNPPIPVGEIYKRWIIGLNKIVRMYSP T S I L D I R Q G  
 22 422223342 31212 3 23 222 222 22 2  
 PKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNAN  
 121 31 32 2 2212422232222 2124 2  
PDCETILKALGPGATLEEMTACQGVGGPGHKARVL