



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110178031 A

(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201780083444.8

(22)申请日 2017.12.01

(30)优先权数据

62/428,845 2016.12.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/064167 2017.12.01

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/102659 EN 2018.06.07

(71)申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会

地址 美国纽约

(72)发明人 W·I·利普金 N·米什拉

T·布里斯 A·柯楚拉

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 刘文娜 郗名悦

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/547(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

C07K 16/08(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/38(2006.01)

C07K 14/08(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页

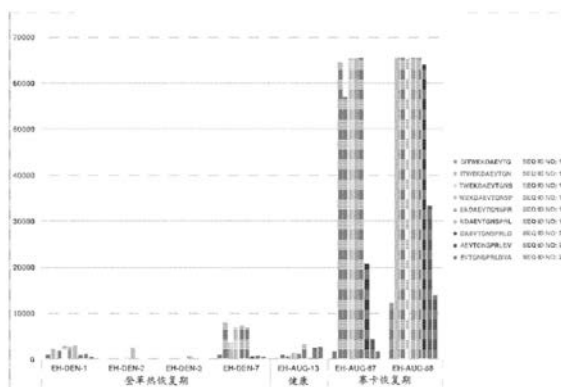
序列表8页 附图3页

(54)发明名称

寨卡病毒感染的血清学测定

(57)摘要

本发明提供了用于检测向某些病毒的暴露和受某些病毒的感染的组合物、方法和试剂盒。具体地,本发明允许对向病毒的暴露和受病毒的感染进行快速差异血清学检测。具体而言,本发明允许对向寨卡病毒(ZIKV)的暴露和受寨卡病毒(ZIKV)的感染进行快速血清学检测。



1. 一种与寨卡病毒抗体具有强烈反应性并且对寨卡病毒抗体具有特异性的分离的肽的集合,其中所述肽包含在包含选自由SEQ ID NO:1-13或其组合组成的组的氨基酸序列的至少一个肽上移动了一个残基的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的分离的肽的集合,其中所述肽的长度范围为约6个氨基酸至12个氨基酸。

3. 如权利要求1所述的分离的肽的集合,其中所述分离的肽中的一个或多个与配体、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、酶或金属纳米颗粒或纳米壳缀合或经生物素化。

4. 如权利要求1所述的分离的肽的集合,其中所述分离的肽中的一个或多个固定至固体支持物。

5. 一种与寨卡病毒抗体具有强烈反应性并且对寨卡病毒抗体具有特异性的分离的肽的集合,其中所述肽包含在包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽上移动了一个残基的氨基酸序列。

6. 如权利要求5所述的分离的肽的集合,其中所述肽的长度范围为约6个氨基酸至12个氨基酸。

7. 如权利要求5所述的分离的肽的集合,其中所述分离的肽中的一个或多个与配体、亲和素、链霉亲和素、中性亲和素、血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、酶或金属纳米颗粒或纳米壳缀合或经生物素化。

8. 如权利要求5所述的分离的肽的集合,其中所述分离的肽中的一个或多个固定至固体支持物。

9. 如权利要求5所述的分离的肽的集合,其包含含有SEQ ID NO:14-22的氨基酸序列的肽。

10. 一种肽微阵列,其包含如权利要求1所述的分离的肽的集合。

11. 一种肽微阵列,其包含如权利要求5所述的分离的肽的集合。

12. 一种肽微阵列,其包含如权利要求9所述的分离的肽的集合。

13. 一种肽微阵列,其包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽;或选自由包括氨基酸序列SEQ ID NO:2-13的肽组成的组的肽;或包含在包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或包含在选自由包含氨基酸序列SEQ ID NO:2-13的肽组成的组的至少一个肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组。

14. 一种与寨卡病毒抗体具有强烈反应性并且对寨卡病毒抗体具有特异性的分离的肽,其包含选自由SEQ ID NO:1-13组成的组的氨基酸序列。

15. 一种与寨卡病毒抗体具有强烈反应性并且对寨卡病毒抗体具有特异性的分离的肽,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1。

16. 一种用于对样品中的寨卡病毒抗体进行血清学检测的方法,其包括:

a. 使所述样品与如权利要求1所述的肽的集合在足以允许一种或多种抗体与一种或多种肽结合的条件下进行接触;以及

b. 检测包含所述集合中的所述一种或多种肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成指示所述样品中存在针对寨卡抗原表位的抗体。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述样品来自受试者。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述受试者为人类女性。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述受试者已怀孕或正试图怀孕。
20. 如权利要求17所述的方法,其中所述受试者是已经施用寨卡病毒疫苗或免疫调节剂的受试者。
21. 如权利要求17所述的方法,其中所述受试者对酶联免疫吸附测定(ELISA)具有血清阳性结果。
22. 如权利要求17所述的方法,其中所述样品选自由鼻咽吸出物、血液、脑脊髓液、唾液、血清、血浆、尿液、痰液、支气管灌洗液、心包液和腹膜液组成的组
23. 如权利要求17所述的方法,其中所述样品是血清、血浆或尿液。
24. 如权利要求16所述的方法,其中所述样品选自由用于开发药剂和治疗剂的细胞、细胞培养物、细胞培养基和组合物组成的组。
25. 如权利要求16所述的方法,其中所述肽的集合固定至固体支持物。
26. 如权利要求16所述的方法,其中所述检测步骤包括进行ELISA测定。
27. 一种用于对样品中的寨卡病毒抗体进行血清学检测的方法,其包括:
 - a. 使所述样品与如权利要求5所述的肽的集合在足以允许一种或多种抗体与一种或多种肽结合的条件下进行接触;以及
 - b. 检测包含所述集合中的所述一种或多种肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成指示所述样品中存在针对寨卡抗原表位的抗体。
28. 如权利要求27所述的方法,其中所述样品来自受试者。
29. 如权利要求28所述的方法,其中所述受试者为人类女性。
30. 如权利要求29所述的方法,其中所述受试者已怀孕或正试图怀孕。
31. 如权利要求28所述的方法,其中所述受试者是已经施用寨卡病毒疫苗或免疫调节剂的测试受试者。
32. 如权利要求28所述的方法,其中所述受试者对酶联免疫吸附测定(ELISA)具有血清阳性结果。
33. 如权利要求28所述的方法,其中所述样品选自由鼻咽吸出物、血液、脑脊髓液、唾液、血清、血浆、尿液、痰液、支气管灌洗液、心包液和腹膜液组成的组
34. 如权利要求33所述的方法,其中所述样品是血清、血浆或尿液。
35. 如权利要求27所述的方法,其中所述样品选自由用于开发药剂和治疗剂的细胞、细胞培养物、细胞培养基和组合物组成的组。
36. 如权利要求27所述的方法,其中所述肽的集合固定至固体支持物。
37. 如权利要求27所述的方法,其中所述检测步骤包括进行ELISA测定。
38. 如权利要求27所述的方法,其中所述肽的集合包括含有氨基酸序列SEQ ID NO:14-22的肽。
39. 一种用于对样品中的寨卡病毒抗体进行血清学检测的方法,其包括:
 - a. 使所述样品与如权利要求13所述的肽微阵列在足以允许一种或多种抗体与一种或多种肽结合的条件下进行接触;以及
 - b. 检测包含所述集合中的所述一种或多种肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成指示所述样品中存在针对寨卡抗原表位的抗体。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述样品来自受试者。
41. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者为人类女性。
42. 如权利要求41所述的方法,其中所述受试者已怀孕或正试图怀孕。
43. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者是已经施用寨卡病毒疫苗或免疫调节剂的测试受试者。
44. 如权利要求40所述的方法,其中所述受试者对酶联免疫吸附测定(ELISA)具有血清阳性结果。
45. 如权利要求40所述的方法,其中所述样品选自由鼻咽吸出物、血液、脑脊髓液、唾液、血清、血浆、尿液、痰液、支气管灌洗液、心包液和腹膜液组成的组
46. 如权利要求45所述的方法,其中所述样品是血清、血浆或尿液。
47. 如权利要求39所述的方法,其中所述样品选自由用于开发药剂和治疗剂的细胞、细胞培养物、细胞培养基和组合物组成的组。
48. 如权利要求39所述的方法,其中所述肽的集合固定至固体支持物。
49. 如权利要求39所述的方法,其中所述检测步骤包括进行ELISA测定。
50. 一种试剂盒,其包括如权利要求1所述的分离的肽的集合。
51. 如权利要求50所述的试剂盒,其还包括一种或多种选自由下列组成的组的附加组分:稀释剂和缓冲剂、经标记的缀合物、用于检测特异性结合的抗原或抗体的其他试剂、其他信号产生试剂、包被试剂、捕获试剂、洗涤试剂,以及使用说明书。
52. 一种试剂盒,其包括如权利要求5所述的分离的肽的集合。
53. 如权利要求52所述的试剂盒,其还包括一种或多种选自由下列组成的组的附加组分:稀释剂和缓冲剂、标记的缀合物、用于检测特异性结合的抗原或抗体的其他试剂、其他信号产生试剂、包被试剂、捕获试剂、洗涤试剂,以及使用说明书。
54. 一种试剂盒,其包括如权利要求13所述的肽微阵列。
55. 如权利要求54所述的试剂盒,其还包括一种或多种选自由下列组成的组的附加组分:稀释剂和缓冲剂、标记的缀合物、用于检测特异性结合的抗原或抗体的其他试剂、其他信号产生试剂、包被试剂、捕获试剂、洗涤试剂,以及使用说明书。

寨卡病毒感染的血清学测定

[0001] 政府支持声明

[0002] 本发明是受政府支持在NIH批准号U19AI109761下完成的。因此,美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及使用高通量血清学检测向病毒的暴露,尤其是检测向寨卡病毒(ZIKV)的暴露的领域。

背景技术

[0004] 寨卡病毒(ZIKV)是一种新兴的蚊媒病毒,其影响包括非洲、亚洲和美洲在内的几个主要大陆,并已被世界卫生组织(WHO)视为全球性紧急情况。ZIKV感染会对孕妇带来高风险,因为它与严重的胎儿脑异常,诸如小头畸形、颅内钙化和胎儿脑破裂序列以及眼部异常有因果联系(Rasmussen等人2016)。此外,ZIKV感染可能会引发格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)的风险增加(Broutet等人2016)。

[0005] 在城市和郊区环境中,ZIKV在人-蚊-人传播循环中传播。除蚊传播外,还有证据表明ZIKV可以在怀孕期间从母亲传染给胎儿。另外,还报道了向伴侣的性传播。最后,尽管尚未报道通过输血传播ZIKV,但鉴于其他相关黄病毒的传播,很可能通过这种途径发生。

[0006] 寨卡病毒是一种与登革热病毒(DENV)密切相关的黄病毒。ZIKV诊断常常基于临床症状和流行病学联系。寨卡病毒和登革热病毒以及其他病毒,即西尼罗河病毒(West Nile virus)(黄病毒)和基孔肯雅病毒(chikungunya virus)(甲病毒)感染也呈现类似的临床症状,导致鉴别诊断困难。用于检测寨卡病毒基因产物的分子测定法可用于诊断活性感染,但无法提供对急性感染清除后可以影响子宫内后代发育的历史感染的了解。目前血清学测定法中ZIKV和DENV之间的交叉反应混淆了临床诊断和调查感染流行和与疾病的联系的工作。实际上,疾病控制和预防中心建议在噬斑减少中和试验(PRNT)中验证在当前ZIKVELISA中发现呈血清反应阳性的所有样品。PRNT昂贵、劳动强度大并且需要活病毒,因此,PRNT难以在临床微生物实验室中执行。

[0007] 另外,ZIKV疫苗处于研究的最前沿。随着这些疫苗的开发,需要快速可靠的用于测试此类疫苗功效的测定法。

[0008] 因此,需要灵敏、特异性且廉价的高通量血清学测定法来诊断ZIKV暴露。

发明内容

[0009] 本发明提供了用于检测向某些病毒的暴露和受某些病毒的感染的组合物、方法、装置和试剂盒。具体地,本发明允许对向病毒的暴露和受病毒的感染进行快速差异血清学检测。具体而言,本发明允许对向寨卡病毒(ZIKV)的暴露和受寨卡病毒(ZIKV)的感染进行快速血清学检测。

[0010] 用于检测向ZIKV的暴露和受ZIKV的感染的组合物、方法、装置和试剂盒包含分离

和未分离的特异性肽,所述分离和未分离的特异性肽与ZIKV具有强烈反应性并且对ZIKV具有特异性,即为ZIKV抗体的反应性和特异性表位。

[0011] 在ZIKV的NS2B区中鉴定出一种此类肽。在恢复期血清样品中,与ZIKV的特异性超过90%。这种肽具有以下氨基酸序列:

[0012] DITWEKDAEXTGNSPRLDVA,其中X为V或I (SEQ ID NO:1)。

[0013] 因此,本发明的一个实施方案是与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽,其包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA,其中X为V或I (SEQ ID NO:1)。

[0014] 在恢复期血清样品中,沿着与ZIKV抗体具有超过50%的特异性的ZIKV蛋白质组还鉴定了12种其他肽。

[0015] 因此,本发明的其他实施方案是选自表2中列出的12种与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽 (SEQ ID NO:2-13) 的肽。

[0016] 本发明的另一个实施方案是包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA (其中X为V或I) (SEQ ID NO:1) 的肽上移动了一个残基的氨基酸序列 (即,SEQ ID NO:14-22) 的肽的集合或套组。这些集合或套组可以包含下述肽或由下述肽组成,所述肽在长度上包含以下数量的氨基酸或由以下数量的氨基酸组成:6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸、11个氨基酸以及最多12个氨基酸。

[0017] 本发明的另一个实施方案是包含在选自表2中列出的12种与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽 (SEQ ID NO:2-13) 的一种或多种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组。这些集合或套组可以包含下述肽或由下述肽组成,所述肽在长度上包含以下数量的氨基酸或由以下数量的氨基酸组成:6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸、11个氨基酸以及最多12个氨基酸。

[0018] 在一个实施方案中,所述肽的集合或套组包括包含在与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的全部13种肽 (SEQ ID NO:1-13) 上移动了一个残基的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的所有肽。

[0019] 这些不同的肽集合或套组可以包含下述肽或由下述肽组成,所述肽在长度上包含以下数量的氨基酸或由以下数量的氨基酸组成:6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸、11个氨基酸以及最多12个氨基酸。

[0020] 用于本发明的肽的数量范围可以为2个肽到数千至数万至数十万的数量。

[0021] 另一方面,本发明提供了包含本发明的两种或更多种肽的组合物。

[0022] 另一方面,本发明提供了包含编码本发明肽的序列的核酸。另外,本发明提供了包含此类核酸的载体,以及包含此类载体的宿主细胞。在某些实施方案中,所述载体是穿梭载体。在其他实施方案中,所述载体是表达载体 (例如,细菌或真核表达载体)。在某些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在其他实施方案中,宿主细胞是真核细胞。

[0023] 在非限制性实例中,可以使用许多免疫检测技术来检测ZIKV的抗体,所述免疫检测技术包括但不限于蛋白质印迹 (Western blot)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、侧流测定、浸渍片类型的测定或SNAP试验、各种各样的多重抗体检测技术,或适于检测目标抗体的此类测定的任何修改形式。患者的ZIKV抗体可以是IgG或IgA,或其他免疫球蛋白类别或亚型。

[0024] 在一个实施方案中,免疫检测技术是可编程肽阵列的形式。

[0025] 在某些实施方案中,本发明的肽附接于或固定至固体支持物。在一个实施方案中,本发明的肽通过金属纳米层附接于固体支持物。在某些实施方案中,固体支持物是珠粒(例如,胶体颗粒、金属纳米颗粒或纳米壳,或乳胶珠粒)、侧流免疫测定装置(例如,多孔膜)中的流动路径、印迹(例如,蛋白质印迹、狭缝印迹或斑点印迹)、分析或离心转子中的流动路径,或管或孔(例如,在适于ELISA测定或微阵列的平板中)。在某些实施方案中,本发明的肽是分离的(例如,合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,本发明的肽与配体缀合。例如,在某些实施方案中,所述肽是生物素化的。在其他实施方案中,所述肽与链霉亲和素、亲和素或中性亲和素缀合。在其他实施方案中,所述肽与载体蛋白(例如,血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)或免疫球蛋白Fc结构域)缀合。

[0026] 本发明的一个特定实施方案是包含与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽的肽微阵列。在一些实施方案中,肽微阵列包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的一种或多种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合。

[0027] 另一方面,本发明提供了装置。在某些实施方案中,所述装置可用于进行免疫测定。例如,在某些实施方案中,所述装置是侧流免疫测定装置。在其他实施方案中,所述装置是分析或离心转子。在其他实施方案中,所述装置是管或孔,例如在适于ELISA测定或微阵列的平板中。在其他实施方案中,所述装置是电化学、光学或光电传感器。

[0028] 在某些实施方案中,所述装置包含至少一种本发明的肽。在其他实施方案中,所述装置包含如本文所述的本发明肽的集合或套组。在某些实施方案中,所述肽附接于或固定在所述装置上。

[0029] 另一方面,本发明提供了在样品中检测针对寨卡抗原表位的抗体的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使样品与本发明的一种或多种肽接触,以及检测包含所述肽的抗体-肽复合物的形成,其中所述复合物的形成指示所述样品中存在针对寨卡抗原表位的抗体。在某些实施方案中,所述方法包括使样品与本发明的不同肽的集合或套组接触。在某些实施方案中,所述方法包括使样品与本发明的所有肽的集合或套组接触。

[0030] 本发明的另一个实施方案是用于对向ZIKV的暴露和/或受ZIKV的感染进行血清学检测的方法,其包括使用与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的一种或多种肽,所述肽包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合。

[0031] 在本发明的其他实施方案中,用于对样品中的向ZIKV的暴露和/或受ZIKV的感染进行血清学检测的方法包括:使样品与与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的一种或多种肽接触,所述肽包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含

氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合;以及检测样品中的抗ZIKV抗体与所述一种或多种肽之间的结合。

[0032] 在某些实施方案中,所述集合或套组中的肽或每种肽是分离的(例如,合成的和/或纯化的)肽。在某些实施方案中,所述肽或肽的集合或套组附接于或固定至固体支持物。在一个实施方案中,所述肽或肽的集合或套组通过金属(例如,金)纳米层附接于固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物是一个珠粒或多个珠粒(例如,胶体颗粒、金属纳米颗粒或纳米壳,或乳胶珠粒)、侧流免疫测定装置(例如,多孔膜)中的流动路径、分析或离心转子中的流动路径、印迹(例如,蛋白质印迹、狭缝印迹或斑点印迹),或管或孔(例如,在适于ELISA测定或微阵列的平板中)。在某些实施方案中,固体支持物包括金属、玻璃、基于纤维素的材料(例如,硝化纤维素),或聚合物(例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、尼龙或聚砷)。

[0033] 本发明的另一个实施方案是用于对向ZIKV的暴露和/或受ZIKV的感染进行血清学检测的方法,其包括使用包含与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽的肽微阵列,所述肽微阵列包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合。

[0034] 在本发明的其他实施方案中,用于对样品中的向ZIKV的暴露和/或受ZIKV的感染进行血清学检测的方法包括:使样品与包含与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽的肽微阵列接触,所述肽微阵列包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合;以及检测样品中的抗ZIKV抗体与微阵列中的所述一种或多种肽之间的结合。

[0035] 在某些实施方案中,所述检测步骤包括进行ELISA测定。在其他实施方案中,所述检测步骤包括进行侧流免疫测定。在其他实施方案中,所述检测步骤包括进行凝集测定。在其他实施方案中,所述检测步骤包括在分析或离心转子中旋转样品。在其他实施方案中,所述检测步骤包括使用蛋白质印迹、狭缝印迹或斑点印迹分析样品。在其他实施方案中,所述检测步骤包括用电化学传感器、光学传感器或光电传感器分析样品。在某些实施方案中,所述检测步骤包括进行波长位移测定。

[0036] 在一些实施方案中,所述肽由氨基酸序列SEQ ID NO:1-13组成。

[0037] 在一些实施方案中,包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:14-22或由其组成的12聚肽。

[0038] 本发明还包括用于对向ZIKV的暴露和/或受ZIKV的感染进行血清学检测的系统和试剂盒。

附图说明

[0039] 出于说明本发明的目的,在附图中描绘了本发明的某些实施方案。然而,本发明不限于附图中描绘的实施方案的精确布置和手段。

[0040] 图1A是条形图,其显示免疫反应性肽(SEQ ID NO:1)是寨卡病毒在NS2B区中的特异性和鉴别性免疫反应表位并且在包含氨基酸序列DITWEKDAEVTGNSPRLDVA(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的肽的套组(SEQ ID NO:14-22)也对寨卡病毒具有特异性和鉴别性。每个样品的每个条形代表SEQ ID NO:14-22。

[0041] 图1B是条形图,其显示免疫反应性肽(SEQ ID NO:1)是寨卡病毒在NS2B区中的特异性和鉴别性免疫反应表位并且NS2b表位中缬氨酸到异亮氨酸的突变对反应性、特异性或鉴别性特征没有影响。在包含氨基酸序列DITWEKDAEVTGNSPRLDVA(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的肽的套组(SEQ ID NO:14-22)也对寨卡病毒具有特异性和鉴别性。每个样品的每个条形代表SEQ ID NO:14-22。

[0042] 图2是显示商业ELISA测定与使用本发明的肽(SEQ ID NO:1)的ELISA测定的比较结果的图。该图显示了通过商业ELISA(右侧条)与使用本发明的肽(SEQ ID NO:1)的ELISA测定(左侧条)检测的已知Zika阳性血清的百分比。

具体实施方式

[0043] 定义

[0044] 在本说明书中使用的术语在本发明的上下文中以及使用每个术语的特定上下文中通常具有其在本领域中的普通含义。在下面或说明书中的其他地方讨论了某些术语,以向从业者提供描述本发明的方法以及如何使用这些方法的额外指导。而且,应理解,可以以不止一种方式来陈述相同的内容。因此,替代性语言和同义词可以用于本文所讨论的任何一个或多个术语,并且对于术语是否在本文中详细阐述或讨论也没有任何特殊意义。提供了某些术语的同义词。对一个或多个同义词的叙述不排除使用其他同义词。在说明书中任何地方使用实例,包括本文所讨论的任何术语的实例,仅是说明性的,并且决非限制本发明的范围和含义或任何示例术语。同样,本发明不限于其优选实施方案。

[0045] 如本文所用,术语“样品”意指含有或假定含有抗体,尤其是ZIKV抗体的任何物质。样品可以是天然或合成来源的,并且可以通过本领域技术人员已知的任何方式获得。样品可以从受试者分离的组织或液体样品,包括但不限于血浆、血清、全血、脊髓液、精液、羊水、淋巴液、滑液、尿液、泪液、血细胞、器官和组织。样品可以是研究样品、临床样品或环境样品。样品也可以是用于输血或治疗的血液制品。样品也可以是合成的并且包括但不限于体外细胞培养成分,包括但不限于条件培养基、重组细胞和细胞组分。

[0046] 如本文所用,术语“受试者”意指任何生物,包括但不限于哺乳动物,如小鼠、大鼠、狗、豚鼠、雪貂、兔和灵长类动物。在优选的实施方案中,受试者是人类、宠物或家畜。

[0047] 如本申请中所用的术语“患者”意指人受试者。

[0048] 如本文所用的术语“检测”等意指发现某物的存在或出现。

[0049] 如本文所用的术语“鉴定”等意指识别来自受试者的样品中的向一种或多种特定病毒的暴露。

[0050] 术语“肽”包括两种或更多种氨基酸的任何序列。本文具体列举的肽序列以左侧为氨基末端而右侧为羧基末端进行书写。

[0051] 术语“氨基酸”包括D或L形式的天然氨基酸(例如Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Hyl、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val),以及非天然氨基酸(例如磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、马尿酸、八氢吡啶-2-羧酸、抑胃酶氨酸(statine)、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、青霉素、鸟氨酸、瓜氨酸、 α -甲基丙氨酸、对苯甲酰苯丙氨酸、苯基甘氨酸、炔丙基甘氨酸、肌氨酸和叔丁基甘氨酸)的残基。该术语还包括带有常规氨基保护基团(例如乙酰基或苄氧基羰基)的天然和非天然氨基酸,以及在羧基末端受保护的天然和非天然氨基酸(例如作为(C₁-C₆)烷基、苯基或苄基酯或酰胺)。

[0052] “抗原”(来自抗体产生)或“免疫原”是促使抗体产生并且可以引起免疫反应的物质。它们还可以用于诊断或患者选择或表征目的。

[0053] 抗体(也称为免疫球蛋白(Ig))是指在脊椎动物的血液或其他体液中发现的,并且被免疫系统用于鉴定和中和外来物,如细菌和病毒的球蛋白。它们通常由基本结构单元构成-每个基本结构单元具有两条大的重链和两条小的轻链-以形成例如具有一个单元的单体,具有两个单元的二聚体或具有五个单元的五聚体。抗体由B细胞产生。存在几种不同类型的抗体重链和几个不同类型的抗体,将抗体根据其所拥有的重链分为不同的同种型。在哺乳动物中已知五种不同的抗体同种型,其执行不同的作用,并且有助于针对它们所遇到的每种不同类型的外来物指导适当的免疫应答。

[0054] 尽管所有抗体的总体结构非常相似,但蛋白质尖端的小区变化极大,从而允许存在数百万具有略微不同的尖端结构的抗体。该区被称为高变区。这些变体中的每一种都可以结合不同的被称为抗原的靶标。这种巨大的抗体多样性允许免疫系统识别同样多样的抗原。抗体识别的抗原部分称为“表位”。这些表位与其抗体以高度特异性的相互作用结合,称为诱导契合(induced fit),这允许抗体仅鉴定和结合构成生物体的数百万种不同分子中的匹配抗原中的特定表位。抗体对抗原的识别将抗原标记为由免疫系统的其他部分攻击。抗体还可以通过例如结合引起感染所需要的病原体的一部分来直接中和靶标。产生抗体是体液免疫系统的主要功能。

[0055] 如本文所用,术语“分离的”等意指所提及的物质不含在通常发现该材料的自然环境中所发现的组分。具体而言,分离的生物物质不含细胞组分。分离的肽或蛋白可以与在细胞中与之缔合的其他蛋白或核酸或两者结合,或者如果是膜相关蛋白则可以与细胞膜缔合。分离的材料可以被纯化,但不需要是纯化的。

[0056] 如本文所用,术语“基本上纯化的”是指基本上不含细胞物质(蛋白、脂质、碳水化合物、核酸)、培养基、化学前体、用于肽合成的化学品或其组合的分子,如肽。基本上纯化的肽具有少于约40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%或更少的细胞物质、培养基、其他多肽、化学前体和/或用于肽合成的化学品。因此,基本上纯的分子,如肽,按干重计可以为至少约60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的目标分子。

[0057] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围

内,这将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的限制,即对于特定目的如药物制剂所需的精确度。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1个或多于1个标准偏差内。或者,“约”可以意指给定值的至多20%,优选至多10%,更优选至多5%,且更优选至多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程,该术语可以意指在值的一个数量级以内,优选在5倍以内,更优选在2倍以内。在本申请和权利要求书中描述了特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假定术语“约”意指在特定值的可接受误差范围内。

[0058] 本发明通过建立用于描绘受试者的病原体暴露史的新血清学测定平台而增强ZIKV的鉴别诊断和管理。

[0059] 与分子诊断相比,其中在过去20年聚合酶链反应和高通量筛选等技术的进展中显著提高了灵敏度、特异性和广度,血清学方法大致保持不变。鉴于血清学在确定感染的分布和频率,测试致病因子的发现与疾病之间的关联重要性以及致力于病原体发现方面的作用,这种滞后很重要。本文尤其描述了用于ZIKV诊断血清学的第一灵敏、无偏、高度复用平台。这种基于肽阵列的平台将为研究由感染引起的急性和慢性疾病的流行病学和发病机制以及监测对疫苗和免疫调节药物的体液反应提供新的策略。还可以用作快速选择可用于已建立的廉价、替代平台(包括侧流免疫测定)的关键信息肽的筛选工具。通过实现对感染性疾病的回顾性鉴别诊断(当致病因子的遗传轨迹可能不再存在时)以及在促进疫情调查和监察方面,此类应用将对临床医学和公共卫生具有实际效用。

[0060] 当患者不再具有急性感染的迹象,例如病毒核酸,但过去曾有ZIKV感染,这可能影响未出生的孩子或是另一种疾病,例如格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)的原因时,这在ZIKV的感染中特别有用。

[0061] 本发明是使用将病毒蛋白质组拼接在移动了一个残基(例如残基1-12、2-13、3-14)的12聚肽的滑动窗口中的策略而开发的测定法。目标是获得对寨卡病毒有特异性且敏感的肽。此类肽是从寨卡病毒的NS2B区获得的,其对于检测具有ZIKV感染记录历史的患者中的抗体具有特异性并且灵敏度为约85%。相同的拼接策略可用于合成对应于ZIKV蛋白质组其他区(包括NS1和包膜蛋白)的较短肽(长度为6、7、8、9或10个氨基酸)。

[0062] 对ZIKV抗体有特异性且敏感的分离的肽(ZIKV反应肽)

[0063] 本发明包括与患者样品中的ZIKV抗体具有强烈反应性并且对其敏感的分离的肽。这些肽可以用于现在已知或以后开发的任何类型的血清学测定或平台中,以筛选ZIKV抗体的存在并确定受试者是否已经感染ZIKV和/或暴露于ZIKV。这些肽还可用于测试和监测对疫苗和免疫调节药物的体液反应,因此可用于开发ZIKV的治剂疗和预防剂。

[0064] 本发明的一个实施方案是在登录号ZIKV_AY632535_AAV34151的1426-1434处,在ZIKV的NS2B区中鉴定的分离的肽,并且具有1426-DITWEKDAEVTGNSPRLDVA-1434的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。该肽是如实验实施例中所示鉴定的,并且对Zika恢复期血清样品具有超过90%的特异性。

[0065] 另外,少数寨卡病毒具有突变,其中氨基酸1439处的缬氨酸是异亮氨酸,即1426-DITWEKDAEITGNSPRLDVA-1434(SEQ ID NO:1)。如下所述测试具有该突变的肽,并且该突变不影响肽阵列或ELISA结果(参见图1)。因此,如本文所述鉴定的分离的肽可在位置10处具有缬氨酸或异亮氨酸,并且反应性和特异性保持相同。

[0066] 本发明的另一个实施方案包括肽的集合或套组,所述肽包含在包含氨基酸序列

DITWEKDAEXTGNSPRLDVA (其中X为V或I) (SEQ ID NO:1) 的肽上移动了一个残基的氨基酸序列。该集合可以含有长度为6个氨基酸、长度为7个氨基酸、长度为8个氨基酸、长度为9个氨基酸、长度为10个氨基酸、长度为11个氨基酸以及长度最多为12个氨基酸的肽。

[0067] 在一个实施方案中,所述套组或集合中的每个肽的长度均为12个氨基酸。肽的集合包括具有以下氨基酸序列的肽:

[0068] DITWEKDAEXTG,其中X为V或I (SEQ ID NO:14);

[0069] ITWEKDAEXTGN,其中X为V或I (SEQ ID NO:15);

[0070] TWEKDAEXTGNS,其中X为V或I (SEQ ID NO:16);

[0071] WEKDAEXTGNSP,其中X为V或I (SEQ ID NO:17);

[0072] EKDAEXTGNSPR,其中X为V或I (SEQ ID NO:18);

[0073] KDAEXTGNSPRL,其中X为V或I (SEQ ID NO:19);

[0074] DAEXTGNSPRLD,其中X为V或I (SEQ ID NO:20);

[0075] AEXTGNSPRLDV,其中X为V或I (SEQ ID NO:21);和

[0076] EXTGNSPRLDVA,其中X为V或I (SEQ ID NO:22)

[0077] 本发明还包括12种另外的分离的肽,其对寨卡恢复期血清样品具有超过50%的特异性。

[0078] 这些另外的分离的肽列于表2中并包含SEQ ID NO 2-13。

[0079] 本发明的其他实施方案包括分离的肽的集合或套组,所述分离的肽包含在这12种肽中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或全部十二个上移动了一个残基的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。该集合或套组可以包含分离的肽或由分离的肽组成,所述分离的肽在长度上包含以下数量的氨基酸或由以下数量的氨基酸组成:6个氨基酸,7个氨基酸,8个氨基酸,9个氨基酸,10个氨基酸,11个氨基酸以及最多12个氨基酸。

[0080] 基于显示抗体与长度范围为5至9个氨基酸的线性肽序列结合并且当靶标侧接另外的氨基酸时最有效结合的研究,优选12个氨基酸的肽 (Buus等人2012)。然而,可以使用在长度上包含小于12个氨基酸的肽和大于12个氨基酸的肽。可以使用长度为13个氨基酸、长度为14个氨基酸、长度为15个氨基酸、长度为16个氨基酸、长度为17个氨基酸、长度为18个氨基酸、长度为19个氨基酸、长度为20个氨基酸、长度为最多25个氨基酸、长度为最多30个氨基酸、长度为最多35个氨基酸、长度为最多40个氨基酸和长度为最多50个氨基酸的肽。

[0081] 在某些实施方案中,本发明的肽是通过合成化学产生的 (即,为“合成肽”)。在其他实施方案中,本发明的肽是生物产生的。本发明的分离的肽可以是在水、缓冲液中或呈待重构的干燥形式,例如,作为试剂盒的一部分。本发明的分离的肽可以是药学上可接受的盐的形式。能够与本发明的肽形成盐的合适的酸和碱 (包括无机和有机酸和碱) 是本领域技术人员熟知的。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的肽经修饰。本发明的肽可以通过多种技术修饰,例如通过加热和/或去污剂 (例如,SDS) 变性。或者,本发明的肽可以通过与一个或多个其他部分缔合来修饰。缔合可以是共价或非共价的,并且可以,例如,通过末端氨基酸接头 (如赖氨酸或半胱氨酸)、化学偶联剂或肽键。附加部分可以是,例如固定肽的配体、配体受体、融合配偶体、可检测标记、酶或底物。

[0083] 本发明的肽可以与配体,例如生物素(例如,通过半胱氨酸或赖氨酸残基)、脂质分子(例如,通过半胱氨酸残基)或载体蛋白(例如,血清白蛋白、免疫球蛋白Fc结构域、匙孔血蓝蛋白(KLH),通过例如半胱氨酸或赖氨酸残基)缀合。与配体(如生物素)的附接可用于将肽与配体受体,例如亲和素、链霉亲和素、聚合链霉亲和素或中性亲和素缔合。亲和素、链霉亲和素、聚合链霉亲和素或中性亲和素又可以与信号传导部分(例如,酶,如辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(ALP),或可以观察到的其他部分,如金属纳米颗粒或纳米壳(例如,胶体金)或荧光部分)),或固体基质(例如,硝酸纤维素膜)连接。或者,本发明的肽可以与配体受体,如亲和素、链霉亲和素、聚合链霉亲和素或中性亲和素融合或连接,从而促进肽与相应配体如生物素和任何部分(例如,信号传导部分)或与其附接的固体基质的缔合。其他配体-受体配对的实例是本领域熟知的并且可以类似地使用。

[0084] 本发明的肽可以与融合配偶体(例如,肽或其他部分)融合,融合配偶体可用于改善纯化,增强肽在宿主细胞中的表达,帮助检测和稳定所述肽。用于融合配偶体的合适化合物的实例包括载体蛋白(例如,血清白蛋白、免疫球蛋白Fc结构域、KLH)和酶(例如,辣根过氧化物酶(HRP)、 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、碱性磷酸酶)。融合可以通过肽键实现。例如,本发明的肽和融合配偶体可以是融合蛋白并且可以在框内直接融合或者可以包含肽接头。

[0085] 另外,可以修饰本发明的肽以包括多种已知的化学基团或分子中的任何一种。此类修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、与聚乙二醇共价附接(例如,聚乙二醇化)、黄素的共价附接、血红素部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、泛素化、经脂肪酸修饰及转运RNA介导的向蛋白添加氨基酸(如精氨酸化)。还包括氨基酸的类似物(包括非天然氨基酸)和具有取代连键的肽。由本文所讨论的任何序列组成的本发明的肽可以通过任何讨论的修饰进行修饰。此类肽仍然“包含”氨基酸或由氨基酸“组成”。

[0086] 如上所述的修饰是本领域技术人员熟知的,并且已在科学文献中进行了详细描述。

[0087] 包含编码ZIKV反应肽的序列的核酸

[0088] 另一方面,本发明提供了包含编码本发明肽的序列的核酸。本发明的核酸可以是单链或双链。核酸可以是RNA、DNA、cDNA、基因组DNA、化学合成的RNA或DNA,或其组合。核酸可以纯化而不含其他组分,如蛋白、脂质和其他多核苷酸。例如,核酸可以是50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯化的。本发明的核酸编码本文所述的肽。在某些实施方案中,所述核酸编码具有SEQ ID NO:1-24序列的肽。本发明的核酸可包含其他核苷酸序列,如编码接头的序列、信号序列、TMR终止转移序列、跨膜结构域或用于蛋白纯化的配体,如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌蛋白A。

[0089] 制备与表达控制序列可操作地连接的多核苷酸并在宿主细胞中表达所述多核苷酸的方法是本领域熟知的。参见,例如,美国专利号4,366,246。当本发明的核酸邻近或靠近一个或多个指导多核苷酸的转录和/或翻译的表达控制元件定位时,所述核酸被可操作地

连接。

[0090] 因此,例如,本发明的肽可以按照常规基因工程技术重组产生。为了产生本发明的重组肽,将编码所述肽的核酸插入合适的表达系统中。通常,构建重组分子或载体,其中编码所选肽的多核苷酸序列与容许肽表达的表达控制序列可操作地连接。本领域已知许多类型的适当表达载体,包括例如含有细菌、病毒、酵母、真菌、昆虫或哺乳动物表达系统的载体。获得和使用此类表达载体的方法是熟知的。对于这种和其他用于本发明组合物或方法的分子生物学技术的指导,参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,current edition,Cold Spring Harbor Laboratory,New York;Miller等人,Genetic Engineering,8:277-298(Plenum Press,current edition),Wu等人,Methods in Gene Biotechnology(CRC Press,New York,N.Y.,current edition),Recombinant Gene Expression Protocols,在Methods in Molecular Biology中,第62卷(Tuan编辑,Humana Press,Totowa,N.J.,现行版本)和Current Protocols in Molecular Biology,(Ausabel等人编辑)John Wiley&Sons,NY(现行版本),以及其中引用的参考文献。

[0091] 因此,本发明还提供了包含本发明核酸的载体,以及包含此类载体的宿主细胞。在某些实施方案中,所述载体是穿梭载体。在其他实施方案中,所述载体是表达载体(例如,细菌或真核表达载体)。在某些实施方案中,宿主细胞是细菌细胞。在其他实施方案中,宿主细胞是真核细胞。

[0092] 使用ZIKV反应肽的平台、测定和装置

[0093] 存在许多用于检测包含本发明的一种或多种肽的抗体-肽复合物的形成的不同的常规测定。例如,检测步骤可包括进行ELISA测定,进行免疫荧光测定,进行侧流免疫测定,进行凝集测定,进行波长位移测定,进行蛋白质印迹、狭缝印迹或斑点印迹,在分析或离心转子中分析样品,或用电化学、光学或光电传感器分析样品。这些不同的测定在本文中进行了描述和/或是本领域技术人员熟知的。

[0094] 因此,本发明的肽可用于任何用于抗体检测的测定、形式或平台,包括但不限于ELISA、Luminex、蛋白质印迹测定和点样肽阵列,以及以后开发的那些平台。

[0095] 在本发明的某些实施方案中,该测定包括:固定样品中的一种或多种抗体;添加本发明的肽;以及检测抗体与肽结合的程度,例如通过将肽进行标记或通过添加经标记物质,如经标记的结合配偶体(例如,链霉亲和素-HRP或链霉亲和素-胶体金复合物)或特异性识别所述肽的经标记抗体。

[0096] 在其他实施方案中,该测定包括:固定本发明的肽;添加含有抗体的样品;以及检测与肽结合的抗体的量,例如通过添加另一种与标记(例如,金属纳米颗粒或金属纳米壳、荧光标记物或酶(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶))直接或间接缀合的本发明肽或通过添加经标记物质,如特异性识别样品抗体的结合配偶体或经标记抗体(例如,抗人IgG抗体或抗人IgM抗体)。

[0097] 在其他实施方案中,该测定包括:固定本发明的肽;添加含有抗体的样品;以及检测与肽结合的抗体的量,例如通过添加特异性识别样品抗体(例如,抗人IgG抗体或抗人IgM抗体)的第一结合配偶体,并进一步添加第二结合配偶体,其中第二结合配偶体经标记并且识别所述第一结合配偶体。

[0098] 在其他实施方案中,该测定包括:使肽和含有抗体的样品反应而不固定任何反应

物,然后检测抗体和肽的复合物的量,例如通过将肽进行标记或通过添加经标记物质,如经标记的结合配偶体(例如,链霉亲和素-HRP或链霉亲和素-胶体金复合物)或特异性识别所述肽的经标记抗体。

[0099] 本发明的肽的固定可以是共价的或非共价的,并且非共价固定可以是非特异性的(例如,与微量滴定孔中的聚苯乙烯表面非特异性结合)。与固体或半固体载体、支持物或表面的特异性或半特异性结合可以通过具有下述部分与下述部分缔合的肽实现,所述部分实现其与固体或半固体载体、支持物或表面的共价或非共价结合。例如,所述部分可以与附接于载体、支持物或表面的组分具有亲和力。在这种情况下,所述部分可以是,例如,与肽的氨基酸基团结合的生物素或生物素基团或其类似物,然后所述组分是亲和素、链霉亲和素、中性亲和素或其类似物。

[0100] 合适的载体、支持物和表面包括但不限于金属纳米层、珠粒(例如,磁珠、胶体颗粒或金属纳米颗粒或纳米壳,如胶体金,或包含二氧化硅、乳胶、聚苯乙烯、聚碳酸酯或PDVF的颗粒或纳米颗粒),共聚物如苯乙烯-二乙烯基苯、羟甲基苯乙烯-二乙烯基苯、聚苯乙烯、羧化聚苯乙烯的乳胶,炭黑珠粒,非活化或聚苯乙烯或聚氯乙烯活化玻璃,环氧活化多孔磁性玻璃,明胶或多糖颗粒或其他蛋白颗粒,红细胞,单克隆或多克隆抗体或此类抗体的Fab片段。

[0101] 使用抗原检测特异性抗体的免疫测定方案是本领域熟知的。例如,可以使用常规夹心测定,或者可以使用常规竞争性测定形式。

[0102] 用于进行特异性结合测定,特别是免疫测定的装置是已知的,并且可以容易地适用于本发明的方法。固相测定装置包括微量滴定板、流通测定装置(例如,侧流免疫测定装置)、浸渍片(dipstick)和免疫毛细管或免疫色谱免疫测定装置。

[0103] 在本发明的实施方案中,固体或半固体表面或载体是微量滴定孔的底板或壁、过滤器表面或膜(例如,硝酸纤维素膜或PVDF(聚偏二氟乙烯)膜)、空心纤维、珠状色谱介质(例如,琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶)、磁珠、纤维状纤维素基质、HPLC基质、FPLC基质;具有这样大小的分子的物质,使得当溶解或分散在液相中时可以通过过滤器保留有肽与之结合的物质;能够形成胶束或参与胶束形成,允许液相在不夹带胶束的情况下进行更换或交换的物质;水-可溶性聚合物,或任何其他合适的载体、支持物或表面。

[0104] 在本发明的一些实施方案中,本发明的肽具有使检测成为可能的合适标记。可以使用常规标记,其能够单独或与其他组合物或化合物一起提供可检测的信号。合适的标记包括但不限于酶(例如,HRP、 β -半乳糖苷酶或碱性磷酸酶)、荧光标记、放射性标记、有色乳胶颗粒和金属缀合的标记(例如,金属纳米层、金属纳米颗粒或金属纳米壳缀合的标记)。合适的金属纳米颗粒或金属纳米壳标记包括但不限于金颗粒、银颗粒、铜颗粒、铂颗粒、镉颗粒、复合颗粒、金空心球、金包被的二氧化硅纳米壳和二氧化硅包被的金壳。适于可检测层的金属纳米层包括由镉、锌、汞和贵金属(如金、银、铜和铂)组成的纳米层。

[0105] 合适的检测方法包括但不限于以比色测定(例如,用于检测HRP或 β -半乳糖苷酶活性),使用光学显微镜术、免疫荧光显微镜术(包括共聚焦显微镜术)的目视检查,或通过流式细胞术(FACS)、放射自显影术(例如,用于检测放射性标记的致病因子)、电子显微镜术、免疫染色、亚细胞分级分离等检测直接或间接标记的致病因子。在一个实施方案中,将放射性元素(例如,放射性氨基酸)直接掺入肽链中。在另一个实施方案中,荧光标记通过生物

素/亲和素相互作用,与荧光素缀合的抗体的缔合等与肽缔合。在一个实施方案中,将抗体的可检测特异性结合配偶体添加到混合物中。例如,结合配偶体可以是可检测的二抗或结合第一抗体的其他结合剂(例如,蛋白A、蛋白G、蛋白L或其组合)。这种二抗或其他结合剂可以用例如放射性、酶促、荧光、发光、金属纳米颗粒或金属纳米壳(例如胶体金)或其他可检测标记(如亲和素/生物素系统)标记。在另一个实施方案中,结合配偶体是本发明的肽,其可以与酶,如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶或其他信号传导部分直接或间接缀合。在此类实施方案中,通过添加产生可检测信号的酶的底物(如发色、荧光或化学发光底物)而产生可检测信号。

[0106] 在本发明的一些实施方案中,检测程序包括目测检查抗体-肽复合物的颜色变化,或检查抗体-肽复合物的物理-化学变化。可随氧化反应或其他化学反应发生物理-化学变化。可以使用分光光度计等通过目视对其进行检测。

[0107] 一种测定形式是侧流免疫测定形式。可以用经过干燥并置于玻璃纤维垫(样品施加垫或缀合垫)上的信号发生物或报告物(例如,胶体金)标记人或动物免疫球蛋白的抗体。将诊断肽固定在膜,如硝酸纤维素或PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上。当样品被施加于样品施加垫(或流过缀合垫)时,其溶解经标记的报告物,然后经标记的报告物结合样品中的所有抗体。然后所得复合物通过毛细管作用转运到下一膜(含有诊断肽的PVDF或硝酸纤维素)中。如果存在针对诊断肽的抗体,则抗体结合膜上条纹化的诊断肽,从而产生信号(例如,可以看到或观察到的条带)。对标记的抗体或第二标记抗体具有特异性的附加抗体可用于产生控制信号。

[0108] 侧流免疫测定的另一种形式包括本发明的肽或组合物与配体(例如,生物素)缀合并与标记的配体受体(例如,链霉亲和素-胶体金)复合。标记的肽复合物可以置于样品施加垫或缀合垫上。将本发明的抗人IgG/IgM或抗动物IgG/IgM抗体固定在测试部位的膜,例如PVDF的硝酸纤维素膜上。将样品添加到样品施加垫中时,样品中的抗体与标记的肽复合物反应,使得与本发明的肽结合的抗体变得被间接标记。然后样品中的抗体通过毛细管作用转运到下一膜(含有诊断肽的PVDF或硝酸纤维素膜)中,并与固定的抗人IgG/IgM或抗动物IgG/IgM抗体结合。如果任何样品抗体与本发明的标记肽结合,则可以在测试部位看到或观察到与肽缔合的标记。

[0109] 用于筛选血液制品或其他生理或生物流体的另一种测定是酶联免疫吸附测定,即ELISA。通常在ELISA中,本发明的分离的肽或肽的集合或套组直接地或通过捕获基质(例如,抗体)吸附到微量滴定孔的表面。然后用适当的试剂,如牛血清白蛋白(BSA)、热灭活的正常山羊血清(NGS)或BLOTTO(一种脱脂乳粉的缓冲溶液,其还含有防腐剂、盐和消泡剂),阻断表面上残留的非特异性蛋白结合位点。然后将孔与怀疑含有特异性抗体的生物样品一起温育。样品可以纯净施加,或者更经常地可以稀释,通常稀释在含有少量(0.1-5.0重量%)蛋白(如BSA、NGS或BLOTTO)的缓冲溶液中。在温育足够长的时间以允许发生特异性结合后,对孔进行洗涤以去除未结合的蛋白,然后与最佳浓度的适当抗免疫球蛋白抗体一起温育,所述抗体通过标准程序与酶或其他标记缀合并溶于封闭缓冲液中。所述标记可以选自多种酶,包括辣根过氧化物酶(HRP)、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶(ALP)和葡萄糖氧化酶。允许足够的时间再次发生特异性结合,然后再次对孔进行洗涤以去除未结合的缀合物,并添加合适的酶底物。允许显色,并且通过视觉或仪器确定孔内容物的光密度(在适当波长

下测量)。进行ELISA测定的条件是本领域熟知的。

[0110] 在ELISA的另一个实施方案中,将本发明的肽或肽的集合或套组固定在表面,如96孔ELISA板上。然后添加样品并如上进行测定。

[0111] 在其他实施方案中,将本发明的肽或肽的集合或套组电印迹或斑点印迹到硝酸纤维素纸上。随后,将诸如生物流体(例如,血清或血浆)的样品与印迹抗原一起温育,并允许生物流体中的抗体与抗原结合。然后可以例如,通过标准免疫酶方法或通过使用与二抗或其他抗体结合剂或其组合偶联的金属纳米颗粒或纳米壳进行观察来检测结合的抗体。

[0112] 本领域技术人员应该理解,可以设计许多常规蛋白测定形式,特别是免疫测定形式,以利用本发明的分离的肽,以及本发明的肽的集合和套组,检测受试者中的寨卡抗体。因此本发明不受特定测定形式的选择限制,并且据信涵盖本领域技术人员已知的测定形式。迄今为止,大多数血清学已经使用单重ELISA、补体结合或中和测定进行。最近,已经采用基于Luminex的系统,其可以同时处理多达100个抗原靶标(即,100个单独的病原体,一种病原体的100个单独的抗原靶标,或其一些变异)(Anderson等人2011)。另外,建立了包含在体外大肠杆菌(*E. coli*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、杆状病毒或无细胞的偶联转录-翻译系统中表达的点样重组蛋白的测定(Vigil等人2010)。

[0113] 本发明的一个目的是使ZIKV抗体检测过程自动化并使其廉价、快速和准确以及检测暴露本身,而不是严格地表征对特定病原体的体液反应。

[0114] 满足这些要求的一种测定是可编程肽阵列。

[0115] 一种创建和验证可编程阵列的方法,其可以测量对ZIKV的体液免疫反应,从而能够检测向ZIKV(或其疫苗中的基因产物)的暴露,包括以下步骤:1)使用生物信息学方法选择病毒肽;2)使用来自已经暴露于ZIKV抗原的人和其他动物的血清来测试印在阵列上的那些肽的灵敏度和特异性;3)检查通常用于表位预测的算法的性能;4)利用测定结果开发较小且不太全面的肽库,其可以部署在较小且更易用的平台上;5)优化和验证测定方案;以及6)开发软件以使测定分析自动化。

[0116] 使用这些步骤,产生本发明的肽。

[0117] 可以利用肽阵列容量来为每张载玻片印上多个阵列(可以印制1、3或8或12个阵列的构造)。

[0118] 因此,本发明的一个实施方案是包含与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性的肽的肽微阵列。在一些实施方案中,肽微阵列包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的肽(即SEQ ID NO:14-22)的集合或套组;或在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的肽的集合或套组;或其组合。

[0119] 本发明的另一个实施方案是肽微阵列,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:14-2)的肽的集合或套组。

[0120] 在一些实施方案中,肽阵列包括肽的套组或集合,所述肽包含在包含SEQ ID NO:1-13的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1-13的氨基酸序列组成的所有肽上移动了一个残基的氨基酸序列。

[0121] 用于对向ZIKV的暴露进行血清学检测的方法和系统

[0122] 本发明包括用于利用本发明的各种分离和未分离的肽及肽微阵列来检测任何样品中的向ZIKV抗原的暴露即ZIKV抗体的方法和系统。

[0123] 合适的方法通常包括:接收或获得(例如,来自患者)可能含有抗体的体液或组织样品;在有效形成特异性肽-抗体复合物(例如,适于肽与抗体的特异性结合)的条件下,使待测定的样品与本发明的一种或多种肽接触(例如,温育或反应);以及测定已接触(反应)样品中抗体-肽反应的存在(例如,确定抗体-肽复合物的量)。存在较大量的抗体-肽复合物指示受试者暴露于寨卡病毒并受其感染。与针对寨卡抗原的抗体“特异性结合”的肽(包括其修饰形式)以一定量和足够时间与所述抗体相互作用,或与之形成或进行物理缔合,以允许检测抗体。

[0124] 使肽和抗体反应使其特异性反应的条件是本领域技术人员熟知的。参见,例如,Current Protocols in Immunology(Coligan等人编辑,John Wiley&Sons,Inc)。

[0125] 一旦容许本发明的一种或多种肽与样品抗体在合适的培养基中反应,就进行测定以确定抗体-肽反应存在与否。可以使用本文讨论的任何测定。

[0126] 本发明的方法和系统可用于在研究和临床环境中检测向ZIKV抗原的暴露。

[0127] 用于该方法的一种样品是生物样品。生物样品可以从受试者的组织或来自受试者的体液获得,包括但不限于鼻咽吸出物、血液、脑脊髓液、唾液、血清、血浆、尿液、痰液、支气管灌洗液、心包液或腹膜液,或粪便等固体。优选的生物样品是血清、血浆和尿液。受试者可以是任何动物,特别是脊椎动物,更特别是哺乳动物,包括但不限于牛、狗、人、猴、小鼠、猪或大鼠。在一个实施方案中,受试者是人。

[0128] 样品也可以是研究、临床或环境样品,如用作药剂和治疗剂或用于开发药剂和治疗剂的细胞、细胞培养物、细胞培养基以及组合物。

[0129] 其他应用包括但不限于检测血液制品的筛选(例如,筛选血液制品中的感染因子)、生物防御、食品安全、环境污染、法医学和遗传可比性研究。本发明还提供了用于检测用于开发药剂和治疗剂的细胞、细胞培养物、细胞培养基和其他组合物中的病毒抗体的方法和系统。

[0130] 受试者可以是已经暴露于ZIKV抗原的、被怀疑暴露于ZIKV抗原或据信没有暴露于ZIKV抗原。在一个实施方案中,受试者是女性,并且在另一个实施方案中,女性受试者可能已怀孕或正试图怀孕。在一个实施方案中,可以通过ZIKV ELISA发现受试者是血清阳性的。

[0131] 在一个实施方案中,受试者可以是已经施用ZIKV疫苗或免疫调节剂的试验受试者。

[0132] 本文描述的系统和方法支持检测和测量对ZIKV的体液免疫反应。

[0133] 本发明的一个实施方案提供了用于检测任何样品中的向ZIKV抗原的暴露,即ZIKV抗体的系统。该系统包括至少一个子系统,其中所述子系统包括本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组,其与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性,包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一

个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组；或其组合。该系统还可以包括用于以下目的的附加子系统：样品的制备；样品中任何ZIKV抗体与一种或多种肽的结合；洗涤未结合的样品；以及结合的一种或多种抗体的观察和/或量化。

[0134] 本发明的另一个实施方案提供了用于检测任何样品中的向ZIKV抗原的暴露，即ZIKV抗体的系统。该系统包括至少一个子系统，其中所述子系统包括包含本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组的肽微阵列，所述肽与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性，包括：包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽；或选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）中的肽；或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽上移动了一个残基的氨基酸序列（即SEQ ID NO:14-22）的肽的集合或套组；或包含在选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组；或其组合。该系统还可以包括用于以下目的的附加子系统：样品的制备；样品中任何ZIKV抗体与一种或多种肽的结合；洗涤未结合的样品；以及结合的一种或多种抗体的观察和/或量化。

[0135] 本发明提供了用于检测任何样品中的向ZIKV抗原的暴露，即ZIKV抗体的方法，其包括以下步骤：使样品与本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组在足以使样品中的任何ZIKV抗体和所述肽结合的条件下进行接触，所述肽与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性，包括：包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽；或选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）中的肽；或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽上移动了一个残基的氨基酸序列（即SEQ ID NO:14-22）的肽的集合或套组；或包含在选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组；或其组合；以及观察和/或量化与肽结合的任何一种或多种抗体。该方法可任选地包括洗涤任何未结合样品的步骤。

[0136] 本发明提供了用于检测任何样品中的向ZIKV抗原的暴露，即ZIKV抗体的方法，其包括以下步骤：使样品与包含本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组的肽微阵列在足以使样品中的任何ZIKV抗体和所述肽结合的条件下进行接触，所述肽与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性，包括：包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽；或选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）中的肽；或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA（其中X为V或I）（SEQ ID NO:1）的肽上移动了一个残基的氨基酸序列（即SEQ ID NO:14-22）的肽的集合或套组；或包含在选自表2中列出的12种肽（SEQ ID NO:2-13）的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组；或其组合；以及观察和/或量化与肽结合的任何一种或多种抗体。该方法可任选地包括洗涤任何未结合样品的步骤。

[0137] 本文讨论的或本领域已知的任何检测方法均可用于观察和/或量化结合的抗体。

[0138] 在本发明的一个实施方案中，用于所述系统和方法中的肽将包含肽的集合或套组，所述肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:14-22或由氨基酸序列SEQ ID NO:14-22组成。

[0139] 在本发明的一个实施方案中，用于所述系统和方法中的肽微阵列将包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:14-22或由氨基酸序列SEQ ID NO:14-22组成的肽的集合。

[0140] 试剂盒

[0141] 本发明还包括用于实践本发明方法的试剂和试剂盒。这些试剂和试剂盒可以不同。

[0142] 试剂盒的一种试剂将是本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组,所述肽与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性,包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列或(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合。

[0143] 在某些实施方案中,所述肽附接于或固定至固体支持物。在一些实施方案中,所述肽通过金属纳米层(例如,镉、锌、汞、金、银、铜或铂纳米层)附接于或固定至固体支持物。在某些实施方案中,固体支持物是珠粒(例如,胶体颗粒或金属纳米颗粒或纳米壳)、侧流免疫测定装置中的流动路径、分析或离心转子中的流动路径、管或孔(例如,在平板中),或传感器(例如,电化学、光学或光电传感器)。

[0144] 在本发明的试剂盒中也可以提供用于特定类型的测定的试剂。因此,试剂盒可包括珠粒群(例如,适于凝集测定或侧流测定),或平板(例如,适于ELISA测定的平板)。在其他实施方案中,试剂盒包括装置,如侧流免疫测定装置、分析或离心转子、蛋白质印迹、斑点印迹、狭缝印迹,或电化学、光学或光电传感器。

[0145] 在一个特定实施方案中,试剂盒将包括肽微阵列,所述肽微阵列包含本发明的一种或多种肽或肽的集合或套组,所述肽与ZIKV抗体具有反应性并且对ZIKV抗体具有特异性,包括:包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽;或选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)中的肽;或包含在包含氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为V或I)(SEQ ID NO:1)的肽上移动了一个残基的氨基酸序列(即SEQ ID NO:14-22)的肽的集合或套组;或包含在选自表2中列出的12种肽(SEQ ID NO:2-13)的至少一种肽上移动了一个残基的氨基酸序列的肽的集合或套组;或其组合。

[0146] 另外,试剂盒可包括各种稀释剂和缓冲剂、经标记的缀合物或用于检测特异性结合的抗原或抗体的其他试剂(例如标记试剂)和其他信号产生试剂,如酶底物、辅因子和色原。在一些实施方案中,试剂盒包含作为标记试剂的与可检测标记(例如,金属纳米颗粒、金属纳米壳、金属纳米层、荧光团、有色乳胶颗粒或酶)缀合的抗人IgG/IgM抗体。在其他实施方案中,试剂盒包含作为标记试剂的与可检测标记(例如,金属纳米颗粒、金属纳米壳、金属纳米层、荧光团、有色乳胶颗粒或酶)缀合的蛋白A、蛋白G、蛋白A/G融合蛋白、蛋白L或其组合。在其他实施方案中,试剂盒的标记试剂是与可检测标记(例如,金属纳米颗粒、金属纳米壳、金属纳米层、荧光团、有色乳胶颗粒或酶)缀合的本发明肽的第二集合或套组。所述肽的第二集合或套组可以与所述肽的集合或套组相同或不同,其可以任选地附接于或固定至固体支持物。

[0147] 试剂盒的其他组分可由本领域技术人员容易地确定。此类组分可包括包被试剂,对本发明的肽有特异性的多克隆或单克隆捕获抗体,或两种或更多种抗体的混合物,作为标准品的这些抗原的纯化或半纯化提取物,单克隆抗体检测抗体,与可检测标记缀合的抗小鼠、抗狗、抗猫、抗鸡或抗人抗体,用于比色比较的指示图,一次性手套,去污说明,涂抹棒

或容器,样品准备杯和缓冲剂或适于构成允许肽-抗体复合物形成的反应介质的其他试剂。

[0148] 此类试剂盒为临床实验室诊断寨卡病毒感染提供了方便、有效的方式。因此,在某些实施方案中,试剂盒还包含说明书。

[0149] 实施例

[0150] 通过参考以下非限制性实施例可以更好地理解本发明,给出这些实施例是为了更全面地说明本发明的优选实施方案。决不应将其解释为限制本发明的广泛范围。

[0151] 实施例1-由ZIKV和其他病毒产生12聚肽

[0152] 选择12聚肽代表寨卡(ZIKV)、基孔肯雅(CHIKV)、登革热1-4型(DENV 1-4)、西尼罗河(WNV)、黄热病(YFV)和奥罗普切(OROV)病毒的全蛋白质组(表1)。

[0153] 表1-选定的12聚肽

[0154]

	序列数	肽(偏移一个)	独特的肽
ZIKV	178	120,438	10,284
CHIKV	573	670,061	17,378
DENV (1-4)	1,161	796,173	74,108
WNV	1,438	3,620,608	34,247
YFV	218	230,915	13,440
OROV	390	121,835	16,041
			165,498

[0155] 使用12聚体反映了三个考虑因素:1)线性表位的抗体识别中的原理和情景决定因素,2)平台限制,和3)在点样肽阵列的实验中获得的初始数据。

[0156] 线性表位的抗体识别中的原理和情景决定因素:血清抗体结合5至9个氨基酸的线性肽序列(Buus等人2012)并且当靶标侧接附加氨基酸时最有效地结合。

[0157] 平台限制:当前生产版本的平台可容纳多达300万个5-18个氨基酸的肽。12聚体的合成保真度超过99%;超过这个长度,成本急剧增加且保真度显著下降。

[0158] 初始数据。用点样12聚肽进行的实验证实,最近接种流感、麻疹、腮腺炎和风疹疫苗的人具有可以在点样阵列上通过同源肽检测到的血清抗体(Robinson等人2002)。因此,12聚肽可以展示出由血清抗体识别的单个线性表位。

[0159] 从包括GenBank在内的公共数据库中提取ZIKV、CHIKV、DENV 1-4、WNV、YFV和OROV的基因组序列。使用编码序列设计12个氨基酸的肽的套件,其平铺各个病毒的蛋白质组,有1个氨基酸偏移和11个氨基酸重叠。

[0160] 用于焦磷酸测序的Roche NimbleGen (NG) 平台和DNA也可用于肽阵列平台。

[0161] 将NG平台肽用于肽的基本原理如下:1)NG阵列可以各种构造印制,范围为每张载玻片有1至24个独立阵列;因此,可以同时测试不同的样品或方案,从而以较低的成本提供受控数据;2)将NG阵列印制在75mm×25mm(3英寸×1英寸)的载玻片上;这允许使用标准扫描仪,并且将促进过渡到使用已经在病理学和微生物学实验室中使用的机器人的自动化临床应用;以及3)NG平台提供业内最高的特征密度。已经使印制过程适应于允许原位肽合成。激光和聚焦镜允许在小至1微米的表面区域中的核苷酸或氨基酸的光活化和精确沉积。

[0162] 使用制造商的说明将独特的肽序列(165,498+随机对照肽)印制在Roche-

NimbleGen阵列上。以每张载玻片12个子阵列来印制阵列,每个子阵列具有172,000个特征的容量。

[0163] 实施例2-鉴定对ZIKV抗体有特异性且敏感的肽

[0164] 从具有ZIKV、DENV 1-4和CHIKV自然感染史的人获得免疫血清,其来自以下三个来源:(1) 纽约市卫生和心理健康部(New York City Department of Health and Mental Hygiene);(2) 尼加拉瓜卫生部(Ministry of Health of Nicaragua);和(3) 奥斯瓦尔多克鲁兹基金会(Fundação Oswaldo Cruz)。

[0165] 将免疫血清与肽一起温育、洗涤,然后与荧光素化的二抗一起温育。在扫描信号后,将原始数据转换成含有相应肽信息(即,位置、序列)的热图。

[0166] 图1A显示了在单个虫媒病毒阵列上测试的七种人血清。样品1-4是来自尼加拉瓜的DENV病毒阳性血清,样品5来自健康对照,样品6和7是来自尼加拉瓜的ZIKV病毒阳性血清。在患者中检测出寨卡RNA后至少3周进行样品收集。具有强免疫反应性表位(SEQ ID NO: 1) (426-1434,NS2B-DITWEKDAEVTGNSPRLDVA,登录号ZIKV_AAV34151)的重叠和连续氨基酸序列(SEQ ID NO:14-22)的肽在图中用条表示(对于每个样品而言,每个肽一个条,SEQ ID NO:14-22),并且示于图1A的右侧。

[0167] 当用NS2b表位中具有异亮氨酸突变的肽进行测试时,未发现对反应性、特异性或鉴别性特征的影响。再次在单个虫媒病毒阵列上测试七种人血清。样品1-4是来自尼加拉瓜的DENV病毒阳性血清,样品5来自健康对照,样品6和7是来自尼加拉瓜的ZIKV病毒阳性血清。在患者中检测出寨卡RNA后至少3周进行样品收集。具有强免疫反应性表位(SEQ ID NO: 1) (1430-1438,NS2B-DITWEKDAEITGNSPRLDVA,登录号ZIKV_AMD61711)的重叠和连续氨基酸序列(SEQ ID NO:14-22)的肽在图中用条形表示(对于每个样品而言,每个肽一个条形,SEQ ID NO:14-22),并且示于图1B的右侧。

[0168] ZIKV的NS2B区中鉴定的具有氨基酸序列DITWEKDAEXTGNSPRLDVA(其中X为缬氨酸或异亮氨酸)(SEQ ID NO:1)的这种强烈反应性和特异性肽,在超过90%的寨卡恢复期血清样品中具有反应性(图1)。

[0169] 沿着寨卡病毒蛋白质组鉴定了另外十二个表位,在超过50%的寨卡恢复期血清样品中具有反应性(表2)。

[0170] 表2-ZIKV的其他反应性表位肽

鉴定	氨基酸序列
黄病毒_ZIKV_AF372422_AAK 91609; 31-42	31-SGMIVNDENRAKVEVTPNSPRAE-42(SEQ ID NO: 2)
黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 447-452	447-DEDRAKVEVTPNSPRAE-452(SEQ ID NO: 3)
黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 1499-1501	1499-SGALWDVPAPKEVK-1501 (SEQ ID NO: 4)

[0171]

	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 1668-1672	1668-REEETPVECFEPSMLK-1672 (SEQ ID NO: 5)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 1856-1871	1856-KTVWFVPSVRNGNEIAACLTKAG KRVI-1871(SEQ ID NO: 6)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 1955-1963	1955-RGRIGRNPKNKPGDEYMYGGG-19 63(SEQ ID NO: 7)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 2256-2269	2256-AVGLLGLITANELGWLERTKNDI AH-2269(SEQ ID NO: 8)
[0172]	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 2547-2549	2547-GITEVCREEARRAL-2549 (SEQ ID NO: 9)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 2761-2767	2761-DGPRRPVKYEEDVNLGSG-2767(S EQ ID NO: 10)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 2923-2940	2924-AALGAIFEEKEWKTAVEAVNDP RFWAL-2940(SEQ ID NO: 11)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 3347-3353	3347-PVTKWTDIPYLGKREDLW-3353(S EQ ID NO: 12)
	黄病毒_ZIKV_AY632535_AAV3 4151; 2923-2940	3368-LIGHRPRTTWAENIKDTVNMVRR IIGD-3383(SEQ ID NO: 13)

[0173] 实施例3-ZIKA NS2B肽ELISA

[0174] 基于用肽阵列对特异性肽的选择,所述特异性肽对ZIKV具有强烈反应性和特异性,创建了肽DITWEKDAEVTGNSPRLDVA (SEQ ID NO:1)的肽ELISA。

[0175] 材料和方法

[0176] 合成肽DITWEKDAEVTGNSPRLDVA (SEQ ID NO:1),其在N或C末端具有生物素或KLH,例如AGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALD {Lys (生物素/KLH)} (SEQ ID NO:23)。为了提高ELISA灵敏度,还产生了在N或C末端具有生物素化或KLH的DITWEKDAEVTGNSPRLDVA (SEQ ID NO:1)的2X串联体(contactamer),例如串联体肽序列为AGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDEAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALD {Lys (生物素)/KLH} (SEQ ID NO:24)。

[0177] 用于ELISA的肽(加下划线的氨基酸作为ELISA的接头或间隔子氨基酸被包括在内)–

[0178] 1. ZIKA C TERM LONG P3,

[0179] AGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALD {Lys (生物素)} (SEQ ID NO:23)

[0180] 2. ZIKA C TERM LONG 2XP3,

[0181] AGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDEAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALD{Lys(生物素)} (SEQ ID NO:24)

[0182] ZIKA NS2B肽ELISA方案:

[0183] 将预吸附的兔抗人IgG H&L(抗生物素)在密封条件下包被在96孔ELISA平板上,并在37°C下温育过夜。接下来,用PBS-Tween洗涤平板三次,在每个孔中添加200μl/孔的封闭溶液,并在室温下加盖温育1小时。然后用PBS-Tween再洗涤平板三次。在接下来的步骤中,将ZIKA C TERM LONG P3或2XP3稀释于封闭溶液中,并添加100u1/孔,并在在37°C下加盖温育90分钟。用PBS-Tween洗涤平板3次。将一抗(血清、血浆、CSF或尿液)稀释于封闭溶液中并添加200μL/孔,并且在适当情况下,连续稀释。将含有稀释的样本并用抗生物素捕获抗体和结合的寨卡肽包被的平板在37°C下温育90分钟。用PBS-Tween洗涤3次后,以1:5000稀释度(100μL/孔)使用山羊抗人IgG HRP缀合物,并在37°C下温育90分钟,然后用PBS-Tween洗涤3次。最后,加入发色底物(Ultra TMB)和终止溶液,并在酶标仪上在450nm下对平板进行读数。

[0184] 将通过尼加拉瓜、巴西、波多黎各、国立卫生研究院和纽约市卫生和心理健康部(NYCDOHMH)的合作者(返程旅行者)获得的来自具有ZIKV、DENV 1-4和CHIKV自然感染史的人的血清用于测定中。

[0185] 结果

[0186] 筛选肽阵列能够在ZIKA的NS2b中发现特异性肽序列(DITWEKDAEVTGNSPRLDVA (SEQ ID NO:1),其对来自具有ZIKV感染记录的个体的血清具有高于80%的灵敏度。生物信息学分析证实这种肽与登革病毒的NS2b没有显著同源性。其效用在基于合成氨基末端或羧基末端生物素化的可溶性肽的ELISA中得到证实,会促进与捕获抗体的基质附接。优化使得能够设计出对ZIKV具有95.3%的灵敏度和的94.5%的特异性的寨卡NS2b肽ELISA。

[0187] 另外,用来自寨卡患者的急性和恢复期血清比较了NS2b肽ELISA和商业ELISA(Euroimmun)的性能。对于两种血清,NS2b肽ELISA具有比商业NS1ELISA更高的灵敏度(图2)。

[0188] 参考文献

[0189] Anderson et al.J.Immunol.Methods 2011;366:79-88.

[0190] Broutet et al.N.Engl.J.Med.2016 Apr 21;374(16):1506-9.

[0191] Buus et al.Mol.Cell Proteomics 2012;11:1790-800.

[0192] Rasmussen et al.N.Engl.J.Med.2016 May 19;374(20):1981-7.

[0193] Robinson et al.Nat.Med.2002;8:295-301.

[0194] Vigil et al.Future Microbiol.2010;5:241-51.PMC2841399

序列表

- <110> 纽约哥伦比亚大学理事会
- <120> 寨卡病毒感染的血清学测定
- <130> 01001/005473-W00
- <140> 随附提交
- <141> 2017-12-01
- <150> 62/428,845
- <151> 2016-12-01
- <160> 24
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 寨卡抗原肽
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (10) .. (10)
- <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
- <400> 1

Asp Ile Thr Trp Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg

1 5 10 15

Leu Asp Val Ala

20

- <210> 2
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 寨卡抗原肽
- <400> 2

Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Val Thr

1 5 10 15

Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu

20

- <210> 3
- <211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 3

Asp Glu Asp Arg Ala Lys Val Glu Val Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala

1 5 10 15

Glu

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 4

Ser Gly Ala Leu Trp Asp Val Pro Ala Pro Lys Glu Val Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 5

Arg Glu Glu Glu Thr Pro Val Glu Cys Phe Glu Pro Ser Met Leu Lys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 6

Lys Thr Val Trp Phe Val Pro Ser Val Arg Asn Gly Asn Glu Ile Ala

1 5 10 15

Ala Cys Leu Thr Lys Ala Gly Lys Arg Val Ile

20 25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 7

Arg Gly Arg Ile Gly Arg Asn Pro Asn Lys Pro Gly Asp Glu Tyr Met
 1 5 10 15
 Tyr Gly Gly Gly
 20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 8

Ala Val Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Ala Asn Glu Leu Gly Trp Leu
 1 5 10 15
 Glu Arg Thr Lys Asn Asp Ile Ala His
 20 25

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 9

Gly Ile Thr Glu Val Cys Arg Glu Glu Ala Arg Arg Ala Leu
 1 5 10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨卡抗原肽

<400> 10

Asp Gly Pro Arg Arg Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asp Val Asn Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly

<210> 11
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <400> 11
 Ala Ala Leu Gly Ala Ile Phe Glu Glu Glu Lys Glu Trp Lys Thr Ala
 1 5 10 15
 Val Glu Ala Val Asn Asp Pro Arg Phe Trp Ala Leu
 20 25
 <210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <400> 12
 Pro Val Thr Lys Trp Thr Asp Ile Pro Tyr Leu Gly Lys Arg Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Trp
 <210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <400> 13
 Leu Ile Gly His Arg Pro Arg Thr Thr Trp Ala Glu Asn Ile Lys Asp
 1 5 10 15
 Thr Val Asn Met Val Arg Arg Ile Ile Gly Asp
 20 25
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (10) .. (10)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 14
 Asp Ile Thr Trp Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (9) .. (9)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 15
 Ile Thr Trp Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (8) .. (8)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 16
 Thr Trp Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>

- <221> 尚未归类的特征
 <222> (7) .. (7)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 17
 Trp Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (6) .. (6)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 18
 Glu Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (5) .. (5)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 19
 Lys Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg Leu
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (4) .. (4)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 20
 Asp Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg Leu Asp
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (3) .. (3)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 21
 Ala Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg Leu Asp Val
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2) .. (2)
 <223> X可为缬氨酸或异亮氨酸
 <400> 22
 Glu Xaa Thr Gly Asn Ser Pro Arg Leu Asp Val Ala
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 寨卡抗原肽
 <220>

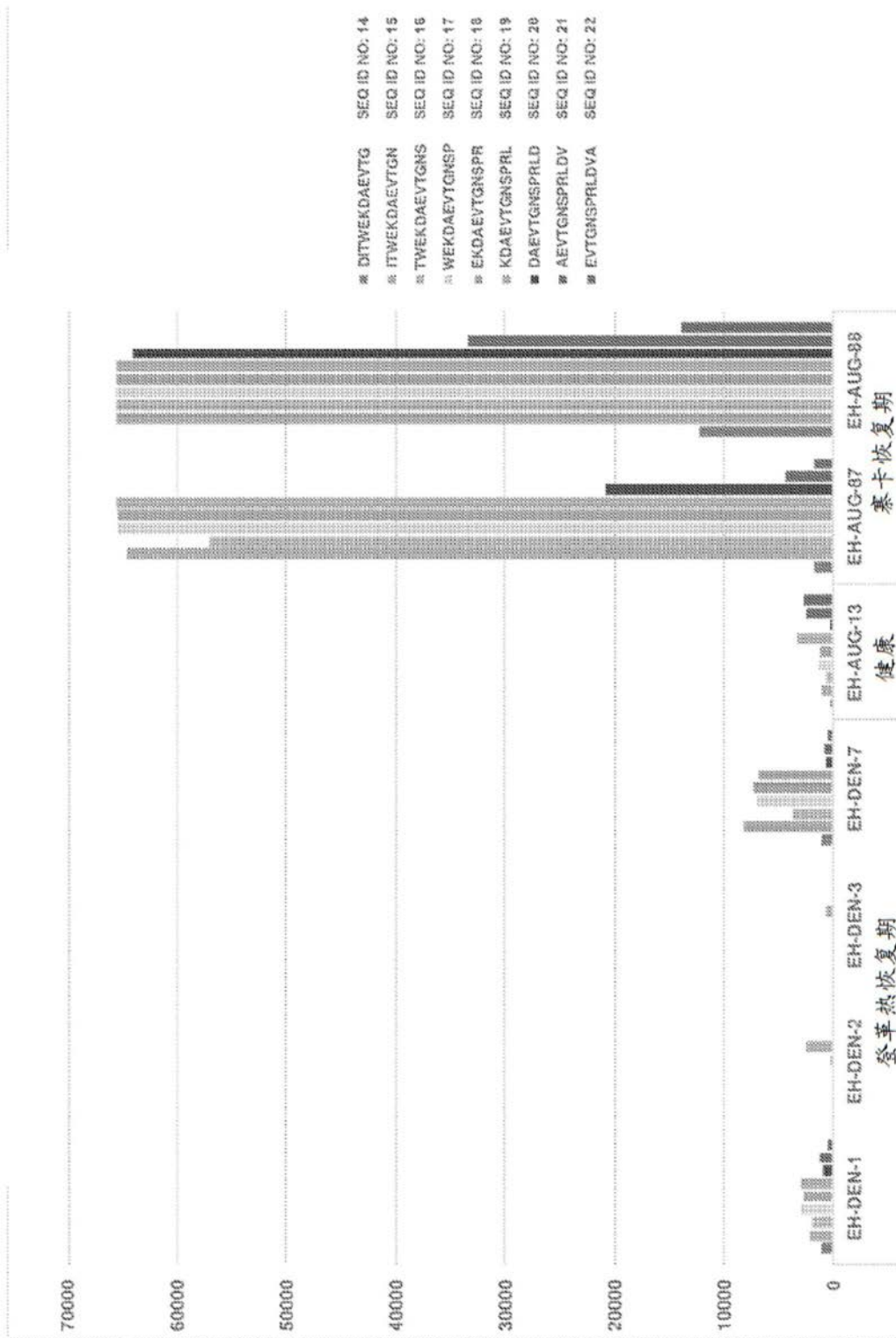


图1A

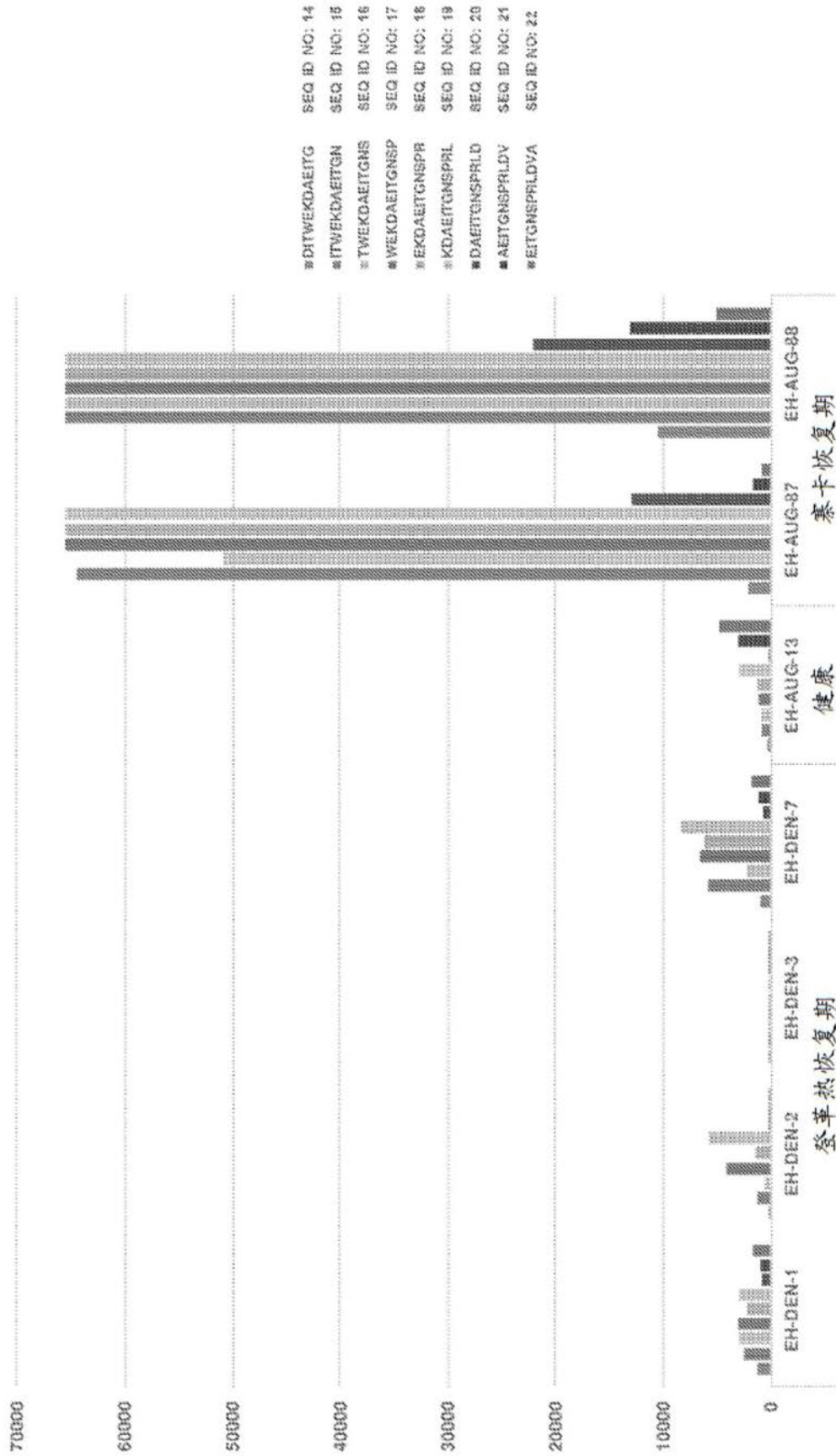


图1B

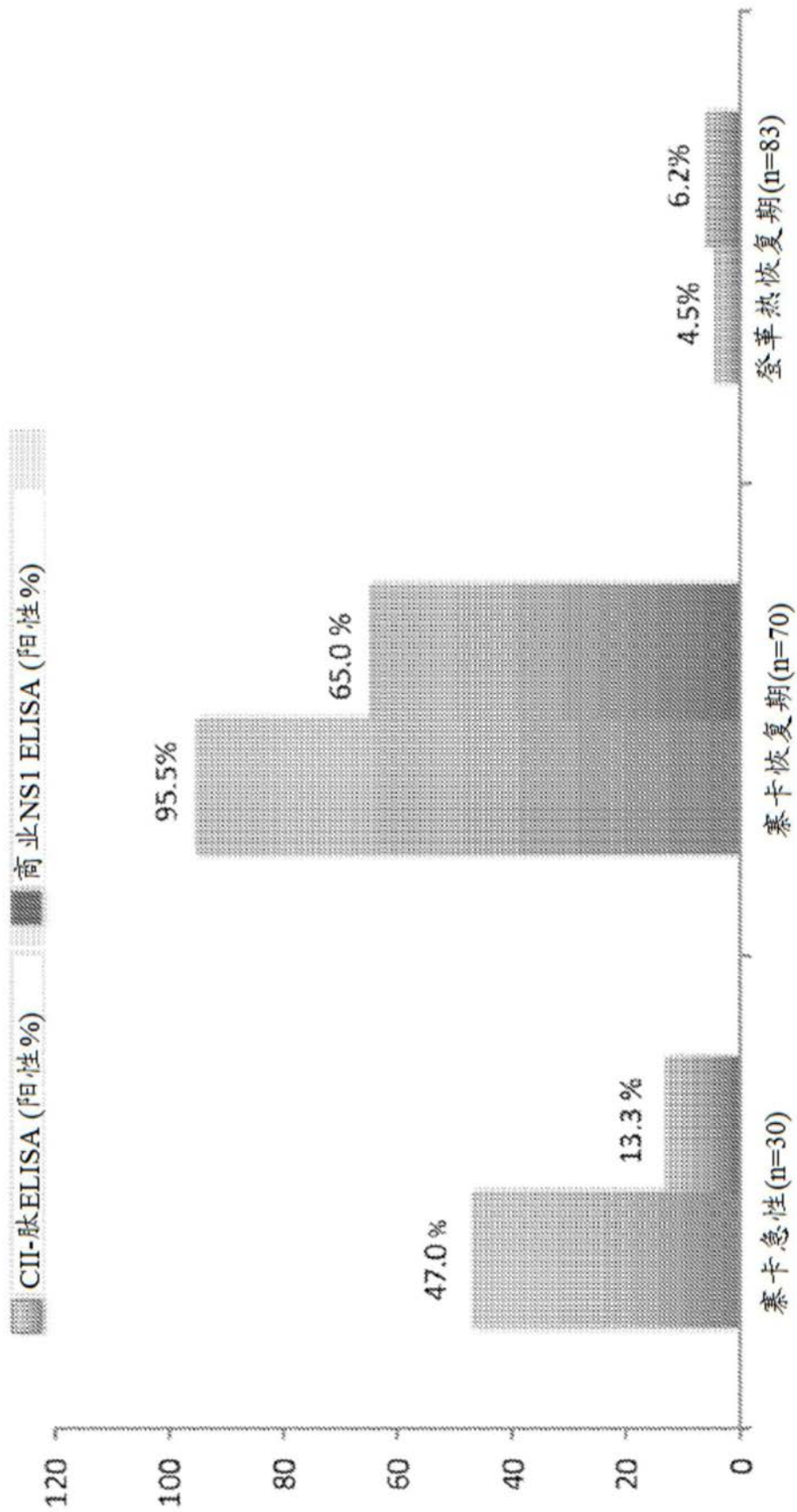


图2

专利名称(译)	寨卡病毒感染的血清学测定		
公开(公告)号	CN110178031A	公开(公告)日	2019-08-27
申请号	CN201780083444.8	申请日	2017-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
[标]发明人	W I 利普金 N米什拉 T 布里斯		
发明人	W·I·利普金 N·米什拉 T·布里斯 A·柯楚拉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/547 G01N33/569 G01N33/58 A61K39/12 C07K16/08 C07K16/10 C07K16/38 C07K14/08		
CPC分类号	A61K35/76 C07K14/005 C07K16/06 C07K16/1081 C07K2317/21 C07K2317/34 C12N2770/24122 G01N33/56983 G01N2333/185		
代理人(译)	刘文娜 郗名悦		
优先权	62/428845 2016-12-01 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测向某些病毒的暴露和受某些病毒的感染的组合物、方法和试剂盒。具体地，本发明允许对向病毒的暴露和受病毒的感染进行快速差异血清学检测。具体而言，本发明允许对向寨卡病毒(ZIKV)的暴露和受寨卡病毒(ZIKV)的感染进行快速血清学检测。

