

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/576

C07K 7/08 C07K 14/18

C12N 15/10



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00820000.9

[43] 公开日 2003 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 1455866A

[22] 申请日 2000.11.3 [21] 申请号 00820000.9

[86] 国际申请 PCT/IT00/00442 2000.11.3

[87] 国际公布 WO02/37115 英 2002.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.29

[71] 申请人 肯顿有限公司

地址 意大利波梅齐亚

[72] 发明人 F·费利西 N·加尔加诺

O·米年科娃 P·莫纳西

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

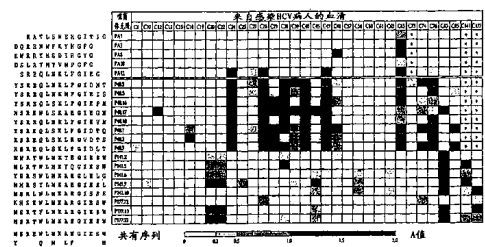
代理人 程 泳

权利要求书 7 页 说明书 24 页 序列表 27 页  
附图 7 页

[54] 发明名称 使用抗原模拟物的传染原的检测

[57] 摘要

用于对抗原作诊断的方法，其包括通过用抗原模拟物的抗体检测 (ADAM) 方法学鉴定血清中抗原的抗体分子的结合特异性，用抗原模拟物的抗体检测方法学包括用来自受到抗原感染的病人和非感染个体的血清筛选噬菌体文库，从而鉴定结合与该抗原特异相关的抗体 (配体) 的肽。通过体外成熟策略以及将配体连接到共同核心上 (例如 MAP) 可获得该方法的改进。特别地，该方法应用于 HCV。



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

1. 诊断抗原的方法，包括通过用抗原模拟物的抗体检测（ADAM）方法学鉴定血清中抗抗原的抗体分子的结合特异性，用抗原模拟物的抗体检测方法学包括用来自受到抗原感染的病人和非感染个体的血清筛选噬菌体文库，从而鉴定结合与该抗原特异相关的抗体（配体）的肽。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述配体通过体外成熟策略加以改进。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述配体为合成肽。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的方法，其中所述配体连接到共同核心上。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述共同核心和所述配体一起是 MAP。

6. 通过包含下列步骤的方法可获得的抗原特异性配体的集合：

a) 首先在  $n$  个阳性血清之上淘选噬菌体文库以产生第一套  $n$  个噬菌体库；

b) 制备  $n$  个含有  $n-1$  个库的噬菌体库混合物；

c) 对  $n$  个混合物中的每一个进行抗产生经排除的噬菌体库的血清的亲和力选择，从而得到第二套  $n$  个噬菌体库，可选地

d) 附加地，在由除了用于第一次淘选的之外所有  $n$  个原始血清所组成的混合物之上淘选第二套  $n$  个噬菌体库中的每一个；

e) 用所有  $n$  个原始血清的混合物对结果产生的第二套  $n$  个噬菌体库进行免疫筛选，从而得到阳性克隆；

f) 通过使用作为噬菌体分泌群体的所述克隆的整齐阵列测试所有阳性克隆与阳性和阴性血清组的个体反应性；

g) 产生所述噬菌体分泌群体的复制物；

h) 筛选每个复制物对阳性和阴性血清的反应性，从而显露出与阳性血清特异地反应的克隆；

i) 使用所述特异反应噬菌体中的每一个作为配基来从阳性血清中亲

和纯化出抗体;

j) 测试所述抗体以确定它们与先前鉴定的抗原特异性肽的反应性;

k) 挑选出检测血清抗体的克隆。

7. 诊断丙型肝炎的方法, 包括通过用抗原模拟物的抗体检测 (ADAM) 方法学鉴定血清中抗 HCV 的抗体分子的结合特异性, 用抗原模拟物的抗体检测方法学包括用来自 HCV 病人和非感染个体的血清筛选噬菌体文库, 从而鉴定结合与 HCV 感染特异相关的抗体 (配体) 的肽。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述配体通过体外成熟策略加以改进。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法, 其中所述配体为合成肽。

10. 根据权利要求 6 或 7 或 8 所述的方法, 其中所述配体连接到共同核心上。

11. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述共同核心和所述配体一起是 MAP。

12. 通过包含下列步骤的方法可获得的 HCV 特异性配体的集合:

a) 首先在  $n$  个阳性血清之上淘选噬菌体文库以产生第一套  $n$  个噬菌体库;

b) 制备  $n$  个含有  $n-1$  个库的噬菌体库混合物;

c) 对  $n$  个混合物中的每一个进行抗产生经排除的噬菌体库的血清的亲和力选择, 从而得到第二套  $n$  个噬菌体库, 可选地

d) 附加地, 在由除了用于第一次淘选的之外所有  $n$  个原始血清所组成的混合物之上淘选第二套  $n$  个噬菌体库中的每一个;

e) 用所有  $n$  个原始血清的混合物对结果产生的第二套  $n$  个噬菌体库进行免疫筛选, 从而得到阳性克隆;

f) 通过使用作为噬菌体分泌群体的所述克隆的整齐阵列测试所有阳性克隆与阳性和阴性血清组的个体反应性;

g) 产生所述噬菌体分泌群体的复制物;

h) 筛选每个复制物与阳性和阴性血清的反应性, 从而显露出与阳性血清特异地反应的克隆;

i) 使用所述特异反应噬菌体中的每一个作为配基来从阳性血清中亲和纯化出抗体;

j) 测试所述抗体以确定它们与先前鉴定的 HCV 肽的反应性;

k) 挑选出检测血清抗体的克隆。

13. 根据权利要求 12 所述的集合, 其中步骤 a) 的噬菌体文库为 pVIII-12aa.

14. 根据权利要求 12 和 13 所述的集合, 其中从权利要求 12 的步骤 k) 中挑选出的克隆的插入片段具有下列序列: SREQLNKLFGIEG; RATLSNEHGITIG; DQRENWFKYHGFG; EWRRYMSDIHGYG; DSLRYMYVMPGFG.

15. 根据权利要求 12 所述的集合, 其中产生了噬菌体文库, 在该噬菌体文库中最优反应性克隆经部分诱变以致克隆序列的每个氨基酸能够独立地被任何其他的氨基酸替换。

16. 根据权利要求 12 所述的集合, 其中产生了噬菌体文库, 在该噬菌体文库中反应性克隆经部分诱变以致克隆序列的每个氨基酸能够独立地被任何其他的氨基酸替换。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的集合, 其中所述克隆具有下列插入序列: SREQLNKLFGIEG.

18. 根据权利要求 12-17 中任何一项所述的集合, 其中在所述噬菌体文库中, 随机序列的两侧为两个半胱氨酸残基。

19. 根据权利要求 12-18 中任何一项所述的集合, 其中肽序列连接于共同核心上。

20. 根据权利要求 17 所述的集合, 其中所述共同核心和所述肽一起是 MAP.

21. 权利要求 12-20 中任何一项所述的集合在制备用于检测怀疑感染了所述 HCV 的对象中 HCV 的诊断试样之中的用途。

22. 用于诊断目的的试剂盒, 其含有权利要求 6 所述的集合。

23. 用于 HCV 诊断的试剂盒, 其含有权利要求 12-20 中任何一项所述的集合。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的试剂盒, 其含有所述集合固定于其

上的带。

25. 根据权利要求 24 所述的试剂盒，其中所述带进一步含有内部标准。

26. 选自下列的肽：

- i) SREQLNKLFGIEG;
- ii) RATLSNEHGITIG;
- iii) DQRENWFKYHGFG;
- iv) EWRRYMSDIHGYG;
- v) DSLRYMYVMPGFG;
- vi) YSREQLNKLFGIDMT;
- vii) YSREQLNKMFGEIS;
- viii) YSREQLSKLFGIEPM;
- ix) NSRWLSKAHGIEGM;
- x) YSREQLNKLFGIEVM;
- xi) YSREQLSKLFGIDTQ;
- xii) KSREQLSKLHGVDTS;
- xiii) RSREQLSKLFGIDLT;
- xiv) MWRTWLMKTHGIESW;
- xv) MLRTWLMKYQGIESW;
- xvi) YSRWLMKAHGLELG;
- xvii) MMRSYLMKAHGIESL;
- xviii) MSRLWLMKAHGISSE;
- xix) KHSEWLNKARGIESW;
- xx) MSRTFLMKAHGIESW;
- xxi) MSRTWLMKAHGIESW; ;
- xxii) AEGEKKLRRSTNWGDPAK;

- xxiii) AEGEFKTRRQTNYPQDPAK;
- xxiv) AEGEFKTLRNANRLDPAK;
- xxv) AEGEFKTLRNSNRLDPAK;
- xxvi) AEGEFKKFPGSSTPKDPAKAAFDSL;
- xxvii) AEGEFQDARFPGGGDPAKAAFDSL;
- xxviii) PQDARFPGGGDPAKAAFDSL;
- xxix) AEGEFKGAGGAQTVDWALLVDPAK;
- xxx) AEGEFMQKHFGGAQWIMGDPAK;
- xxxii) AEGEFSLKSGGGQLRALVDPAK;
- xxxiii) AEGEFYLLKRSSPPDPAKAAFDSL;
- xxxiv) AEGEFILVGPYLLPRRSREEAVDPAK;
- xxxv) AEGEFILVGPYLLPRRSREEAVDPAKGGK;
- xxxvi) AEGEFRLGVRAPRKALDPAK;
- xxxvii) AEGEFRLGVRALRKALDPAK;
- xxxviii) AEGEFRLGVRALRKAPDPAK;
- xxxix) RLGVRALRKAPDPAK;
- xl) AEGEFTQPRGHSYQDPAK;
- xli) AEGEFKERAEMSARKTLGADPAK;
- xlii) AEGEFFYQIPRRMETKYGDPAK;
- xliii) AEGEFSREQLNKLFIEGDPAK;
- xliv) AEGEFNSREWLSKAHGIEGMDPAK;
- xlv) AEGEFRSREQLSKLFGIDLTPAK;
- xlvi) AEGEFYSREQLNKLFIDMTDPAK;
- xlvii) AEGEFYSREQLNKMFIEGSDPAK;
- xlviii) AEGEFYSREQLNKLFIEVMDPAK;

- xlix) AEGEFKSREQLRKLHGFDTSDPAK;
- l) AEGEFKMRNYLNKAFGIEGMDPAK;
- li) AEGEFRSREQLSKLFGIELTDPAK;
- lii) AEGEFSRREYSNKAFGIETQDPAK;
- liii) AEGEFRRREYLNKAFGIEGGDPAK;
- liv) AEGEFSRREWLNKRFGIEYLDPAK;
- lv) AEGEFMSRTWLMKAHGIESWDPAK;
- lvi) AEGEFYSPWLNKARGIDRSDPAK;
- lvii) AEGEFKSREQLSKLHGVDTSDPAK;
- lviii) AEGEFYSSREQLNKMFIEISDPAK;
- lix) AEGEFYSSWLMKAHGLELGDPAK;
- lx) AEGEFMMRSYLMKAHGIESLDPAK;
- lxi) AEGEFMSRLWLMKAHGISEDPAK;
- lxii) AEGEFPQPQEVHVYREQLGLDPAKAAFDL;
- lxiii) AEGEFGEVLYRGFDEVGGDPAKAAFDL;
- lxiv) AGEFYVIERGMQDPAK;
- lxv) AEGEFTTASPRHFLVPLDPAKAAFDL;
- lxvi) AEGEFTTASPAHFLVPLDPAKAAFDL;
- lxvii) AEGEFTTASPSHFLVPLDPAKAAFDL;
- lxviii) AEGEFATAPPRHYSWDPAK;
- lxix) AEGEFATAPPAHYSWDPAK;
- lxx) AEGEFATAPPSHYSWDPAK;
- lxxi) AEGEFRFWKVPDYDPPAAGGDPAK;
- lxxii) AEGEFTESSVSSTLADLASKTFGSADPAK;
- lxxiii) AEGEFTLADLATMTFGSTDPAK;
- lxxiv) AEGEFGLADLATLTFGSPDPAK .

27. 权利要求 26 所述的肽在权利要求 7-11 所述的方法中的用途。
28. 根据权利要求 12-20 中任何一项所述的集合，其含有至少一种权利要求 26 所述的肽。
29. 用于感染检测的试剂盒，其含有权利要求 6 所述的集合。
30. 根据权利要求 29 所述的试剂盒，其含有所述集合固定于其上的带。
31. 根据权利要求 30 所述的试剂盒，其中所述带进一步含有内部标准。
32. 用于 HCV 感染检测的试剂盒，其含有权利要求 12-20 中任何一项所述的集合。
33. 用于 HCV 感染检测的试剂盒，其含有至少一种来自权利要求 25 所述的集合的肽。
34. 根据权利要求 32 或 33 所述的试剂盒，其含有所述集合固定于其上的带。
35. 根据权利要求 34 所述的试剂盒，其中所述带进一步含有内部标准。
36. 权利要求 6 所述的集合在疫苗制备中的用途。
37. 权利要求 12-20 中任何一项所述的集合或者至少一种权利要求 26 所述的肽在抗 HCV 疫苗制备中的用途。
38. 抗 HCV 的疫苗，其含有至少一种权利要求 12-20 中任何一项所述的集合或者至少一种权利要求 26 所述的肽。

## 使用抗原模拟物的传染原的检测

本发明涉及用于检测传染原，尤其是病毒原，更尤其是人丙型肝炎病毒（以下简称为 HCV）的诊断测定，和用于该测定的抗传染原抗体结合肽，还涉及用于制备该肽的方法，以及涉及用于进行该测定的试剂盒。本发明尤其涉及 HCV、用于诊断测定的抗 HCV 抗体结合肽、用于其制备的方法和进行该测定的试剂盒。

### 发明背景

丙型肝炎病毒（HCV）为非肠道传播的、非甲型、非乙型肝炎的主要病原。这种病毒非常经常地引起持续的感染并常常导致慢性肝炎和肝硬化的产生，其构成了慢性肝脏疾病的主要的世界性致病原因（Boyer N, Marcellin P, 丙型肝炎的发病机理、诊断和治疗（Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C.），J Hepatol 2000; 32:98-112）。

病毒感染通过检测血清中的抗 HCV 抗体或者用核酸扩增方法（Robbins DJ, Pasupuleti V, Cuan J, Chiang CS, 丙型肝炎病毒的逆转录酶 PCR 定量（Reverse transcriptase PCR quantitation of hepatitis C virus），Clin Lab Sci 2000 Winter; 13:23-30）显露出病毒 RNA 来诊断。后者的方法非常的灵敏，但是费用昂贵且易于造成技术或实验室误差。另外，PCR 技术的可靠性和专一性还未标准化（Gretch DR, 丙型肝炎的诊断测试（Diagnostic tests for hepatitis C），Hepatology 1997 Sep; 26(3 Suppl 1):43S-47S）。

本发明涉及通过检测产生出的抗传染原的抗体，尤其是抗 HCV 抗体来对于传染病，如病毒感染，尤其是 HCV 感染进行诊断。

就在近期，报道了一种用于 HCV 核心蛋白的灵敏检测的系统（Komatsu F, Takasaki K, Liver 1999 Oct; 19(5):375-80）。

大量的专利和非专利文献涉及对 HCV 检测的诊断方法和试剂盒。

授予 Sumitomo Chemical Company 的 US 5,985,542 提供了一种用于肝脏疾病如丙型肝炎和酒精性肝硬化的试剂盒,该试剂盒含有能够识别细胞色素 P450 的抗体。

授予 Baxter Aktiengesellschaft 的 US 5,972,347 提供了一种用于 HCV 感染的治疗并含有通过结合来中和人 HCV 抗体的灭活 HCV 的组合物,其中抗体至少抗一种选自 HCV 核心蛋白和 NS3 蛋白的蛋白质。

授予 Ambion 和 Cenetron 的 US 5,939,262、US 5,919,625 和 US 5,677,124 提供了一种非常广泛的用于确定样品中待测核酸序列的存在的方法,其中包括抗(核糖)核酸酶的(核糖)核酸片段的获得。

授予 Institut Pasteur 的 US 5,866,139 提供了一种用于确定 HCV E-1 特异性抗体的存在的试剂盒。也可见授予 Abbott 的 US 5,854,001。

授予 Tonen 的 US 5,800,982 揭示了能够和抗 HCV 类群 II 的抗体特异性地反应的抗原性肽。授予 Tonen 的 JP 10019897 提供了一种包含具有构成 HCV 非结构区域 4A (NS4A) 蛋白质的至少 5 个连续氨基酸的氨基酸序列的肽和具有构成 HCV 非结构区域 4B (NS4B) 蛋白质的至少 5 个连续氨基酸的氨基酸序列的肽的试剂盒。

对于本领域状况的描述,还可见 US 5,871,904、US 5,869,253、US 5,750,331、US 5,747,241、US 5,667,992、US 5,645,983、US 5,625,034、US 5,610,009、WO 9707400、WO 9637783、EP 593291、EP 593290、EP 586065、JP 4349885。

血清中抗 HCV 抗体的检测到目前为止仍然是被最广泛使用的用于评估 HCV 感染的测试。自 1987 年以来,当克隆了 HCV 基因组后,已经产生出了各种抗 HCV 诊断测定的改进形式。当前,可用的诊断试剂盒可显露出抗 4 种相当于 HCV 多肽的 HCV 核心部分、非结构 3、非结构 4 和非结构 5 区域的重组体抗原(Gretch DR, 丙型肝炎的诊断测试(Diagnostic tests for hepatitis C), Hepatology 1997 Sep;26(3 Suppl 1):43S-47S)混合物的血清抗体。然后,通过该 ELISA 筛选划为阳性的样品必须通过免疫印迹测定来确认,其中分别检测抗同样的 4 种抗原的抗体的存在。阳性诊断需要检测抗至少 2 种重组体抗原的抗体。

对于相应的带有抗 HCV 抗体的部分人群, 显示出对于只是一种抗原的反应, 如此是不可能确切地作出最后诊断的。另一个问题来自能够被 HCV 无关抗体识别从而产生假阳性诊断的重组体抗原的使用。然后需要对于病人的补充调查和长期监测以达到最后的诊断。

外来抗原和有机体的接触激活了特异的免疫反应。通过体液反应检测的抗原的图象由被宿主抗体所识别的表位来详细说明。假设抗体结合位点为表位的负图象, 那么特异地结合互补位的分子就应该代表了表位的正图象。这条想法暗示了就体液反应而言, 抗原能够由结合到抗原特异性抗体上的特异性配体来如实地描述。鉴定这些配体将提供一种检测抗抗原的特异性体液反应的方法, 其独立于该抗原是否为已知的和/或可获得的。

将这些概念应用于开发用作人类中与感染(包括 HCV 感染)相关抗体的检测的诊断测定。用 HCV 阳性血清筛选噬菌体文库鉴定出特异地结合抗 HCV 抗体的肽配体。这是通过采用特殊的选择策略来完成的, 因为来自受感染的病人的血清含有散布于大量其它具有不同结合特异性的抗体中的病毒特异性抗体。

用大量阴性血清筛选肽以排除那些在阴性样品中检测出抗体(假阳性)的配体, 从而导致选择出一套高度特异的肽。非特异性反应的发生率也通过短肽序列和脱离天然抗原背景的序列的使用来减少。这个技术揭示于 EP 0 698 091 B1, 发表于 28. 02. 1996. 还可见 J. Mol. Biol. (1991), 222, 301-310; Gene, 128 (1993), 51-57; Gene, 148 (1994), 7-13; The EMBO Journal, Vol. 13, no. 9, 2236-2243, 1994; Bacterial Protein Toxins, Zb. Bakt. Suppl 24, 415-425 (1994); The Journal of Immunology (1996) 4504-4513; Methods in Molecular Biology, vol. 87, Humana Press Inc. pp. 195-208; Combinatorial Libraries (R. Cortese ed.) Walter de Gruyter 1996, 第 8 章; Methods in Enzymology, (1996) vol. 267, 116-129; Biol. Chem. Vol. 378, 495-502, June 1997; The EMBO Journal, Vol. 17, No. 13, 3521-3533, 1998; Nature Biotechnology Volume 16, November 1998, 1068-1073, 以对于上面 EP 0 698 091 中

所揭示的模拟表位 (mimotope) 与噬菌体表位 (phagotope) 技术和实现这些技术的方法有一个综合的了解。

这些选择策略鉴定出那些最好地结合免疫显性抗 HCV 抗体的肽结构。另外, 配体的多价展示对于检测的灵敏性贡献出了显著的亲和效应。尽管这些考虑, 测试未用于筛选的血清组上的 ADAM-HCV (ADAM = 用抗原模拟物的抗体检测) 混合物, 结果导致低于 100% 的灵敏度, 虽然这已是相当高的灵敏度了。抗 HCV 体液反应的特定特征可以解释这一结果, 因为它不涉及主要免疫显性表位而是相反地导向许多不同的病毒决定簇。不同的病毒基因型的存在进一步使问题复杂化。

目前可用的诊断试剂盒可显露出抗 4 种相当于 HCV 多肽大区域的重组体抗原 (Gretch DR, 丙型肝炎的诊断测试 (Diagnostic tests for hepatitis C), *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):43S-47S) 的血清抗体。阳性诊断需要检测抗至少 2 种重组体抗原的血清抗体: 由于这个原因, 不可能确切地对于相应的带有抗 HCV 抗体的部分人群作出结论性的诊断, 因为只能显出与一种抗原的独特的反应性。ADAM-HCV EIA (酶免疫测定) 使用几个来自各种抗原的不同的免疫显性表位的模拟物, 从而可保证得到分析中更高的分辨力。作为直接的结果, 可以急剧地降低不确定样品的频率。

我们对于 ADAM-HCV 测定 (用基本上揭示于上面提到的 EP 0 698 091 中的策略) 的技术发展作出了重要的努力。将选自噬菌体文库的肽作为主要壳体蛋白 pVIII 的 N 末端融合蛋白进行展示。用噬菌体作为诊断试剂有许多优点: 它是非常灵活的试剂, 可以让其适用于不同类型的免疫测定 (Dente 等人, 1994; F. Felici, G. Galfrè, A. Luzzago, P. Monaci, A. Nicosia 和 R. Cortese, 作为人血清鉴别工具的噬菌体展示的肽 (Phage-displayed peptides as tools for the characterization of human sera), *Methods in Enzymology* 267, 116-129, 1996; Bartoli 等人, *Nature Biotechnology* Volume 16, November 1998, 1068-1073), 而且低规模的生产既容易又便宜。

尽管有这些优点, 但噬菌体微粒的大小限制了在测定中能够获得的

肽分子的浓度。抗噬菌体壳体蛋白的血清抗体的干扰需要在测定混合物中添加载体噬菌体来封闭抗噬菌体的抗体。最后，这种生物反应试剂的大规模生产要面对微生物污染、再现性、质量控制、纯化和生产成本的问题。

源自展示在噬菌体上的肽序列的简单线性合成肽在大多数情况下不能保留灵敏性或特异性以完成有效的抗体检测。

### 发明概述

现在已经发现一种用于对传染病，如病毒感染，尤其是丙型肝炎作诊断的方法（该方法也是本发明的一个目的），其包括通过用抗原模拟物的抗体检测（ADAM）方法学鉴定血清中抗抗原的抗体分子的结合特异性，用抗原模拟物的抗体检测方法学包括用来自受到抗原感染的病人和非感染个体的血清筛选噬菌体文库，鉴定能结合与该抗原特异相关的抗体的肽（配体）。

在特别优选的实施方案中，本发明涉及 HCV 感染。

### 发明详述

在第一个优选的实施例中，于根据本发明的方法之中，所述的配体通过体外成熟策略进行改进。

在第二个优选的实施例中，于根据本发明的方法之中，所述的配体为合成肽。

在第三个优选的实施例中，所述的配体连接于共同核心上。在特别优选的实施例中，根据以下给出的定义，所述共同核心和所述配体为 MAP。

本发明的另一个目的为通过含有下列步骤的方法可获得的 HCV 特异性配体的集合：

- a) 首先在  $n$  个阳性血清之上淘选噬菌体文库以产生第一套  $n$  个噬菌体库；
- b) 制备  $n$  个含有  $n-1$  个库的噬菌体库混合物；
- c) 对  $n$  个混合物中的每一个进行抗产生经排除的噬菌体库的血清的亲和力选择，从而得到第二套  $n$  个噬菌体库，可选地
- d) 附加地，在由除了用于第一次淘选的之外所有  $n$  个原始血清所

组成的混合物之上淘选第二套 n 个噬菌体库中的每一个；

e) 用所有 n 个原始血清的混合物对结果产生的第二套 n 个噬菌体库进行免疫筛选，从而得到阳性克隆；

f) 通过使用作为噬菌体分泌群体的所述克隆的整齐阵列用阳性和阴性血清组测试所有阳性克隆的个体反应性；

g) 产生所述噬菌体分泌群体的复制物；

h) 筛选每个复制物与阳性和阴性血清的反应性，从而显露出与阳性血清特异地反应的克隆；

i) 使用所述特异反应噬菌体中的每一个作为配基来从阳性血清中亲和纯化出抗体；

j) 测试所述抗体以确定它们与先前鉴定的 HCV 肽的反应性；

k) 挑选出能检测血清抗体的克隆。

这些来自上述方法的单个肽也是本发明的一个目的。

特别地，在应用于 HCV 的本发明的优选实施例中，下列肽为本发明的进一步目的：

- YSREQLNKLFGIDMT;
- YSREQLNKMFGIEIS;
- YSREQLSKLFGIEPM;
- NSRWLSKAHGIEGM;
- YSREQLNKLFGIEVM;
- YSREQLSKLFGIDTQ;
- KSREQLSKLHGVDTS;
- RSREQLSKLFGIDLT;
- MWRTWLMKTHGIESW;
- MLRTWLMKYQGIESW;
- YSRSWLMKAHGLELG;
- MMRSYLMKAHGIESL;
- MSRLWLMKAHGISSE;

- KHSEWLNKARGIESW;
- MSRTFLMKAHGIESW;
- MSRTWLMKAHGIESW; ;
- AEGEKKLRRSTNWGDPAK;
- AEGEFKTRRQTNYQDPAK;
- AEGEFKTLRNANRLDPAK;
- AEGEFKTLRNSNRLDPAK;
- AEGEFKKFPGSSSTPKDPAKAAFDSL;
- AEGEFQDARFPGGGDPAKAAFDSL;
- PQDARFPGGGDPAKAAFDSL;
- AEGEFKGAGGAQTVDWALLVDPAK;
- AEGEFMQKHFGGAQWIMGDPAK;
- AEGEFSLKSGGGQLRALVDPAK;
- AEGEFSLKSGGAQLRALVDPAK;
- AEGEFYLLKRSSPPDPAKAAFDSL;
- AEGEFPILVGPYLLPRRSREEAVDPAK;
- AEGEFPILVGPYLLPRRSREEAVDPAK GK;
- AEGEFRLGVRAPRKALDPAK;
- AEGEFRLGVRALRKALDPAK;
- AEGEFRLGVRALRKAPDPAK;
- RLGVRALRKAPDPAK;
- AEGEFTQPRGHSYQDPAK;
- AEGEFLKERAEMSARKTLGADPAK;
- AEGEFFYQIPRRMETKYGDPAK;

- 
- AEGEFNSREQLNKLFGIEGMDPAK;
  - AEGEFNSREWLKSKAHGIEGMDPAK;
  - AEGEFNSREQLSKLFGIDLTDPAK;
  - AEGEFYSREQLNKLFGIDMTDPAK;
  - AEGEFYSREQLNKMFGIETSDPAK;
  - AEGEFYSREQLNKLFGIEVMDPAK;
  - AEGEFKSREQLRKLHGFDTSKPAK;
  - AEGEFKMRNYLNKAFGIEGMDPAK;
  - AEGEFNSREQLSKLFGIELTDPAK;
  - AEGEFNSREYSNKAFGIETQDPAK;
  - AEGEFRRREYLNKAFGIEGGDPAK;
  - AEGEFNSREWLNKRFIEYLDPAK;
  - AEGEFMSRTWLMKAHGIESWDPAK;
  - AEGEFYSPEWLNKARGIDRSKPAK;
  - AEGEFKSREQLSKLHGVDTSKPAK;

- AEGEFYSREQLNKMFGIEISDPAK;
- AEGEFYSRSWLMKAHGLELGDPK;
- AEGEFMMRSYLMKAHGIESLDPAK;
- AEGEFMSRLWLMKAHGISEDPAK;
- AEGEFPPQPQEVHVYREQLGLDPAKAAFDL;
- AEGEFGEVLYRGFDEVGGDPKAAFDL;
- AGEFYVIERGMQDPK;
- AEGEFTTASPRHFLVPLDPKAAFDL;
- AEGEFTTASPAHFLVPLDPKAAFDL;
  
- AEGEFTTASPSHFLVPLDPKAAFDL;
- AEGEFATAPPRHYSWDPK;
- AEGEFATAPPAHYSWDPK;
- AEGEFATAPPSHYSWDPK;
- AEGEFRFWKVPDYDPPAAGGDPK;
- AEGEFTESSVSSTLADLASKTFGSADPAK;
- AEGEFTLADLATMTFGSTDPAK;
- AEGEFGLADLATLTFGSPDPK;

对于本发明的集合，步骤 a) 的优选的噬菌体文库为 pVIII-12aa.

对于本发明的集合，从步骤 k) 中挑选出的优选克隆的插入片段具有  
序列:

1. SREQLNKLFGIEG;
2. RATLSNEHGITIG;
3. DQRENWFKYHGFG;
4. EWRRYMSDIHGYG;
5. DSLRYMYVMPGFG.

在本发明的集合中，优选产生这样的噬菌体文库，该文库中的反应性克隆，更优选的为最优反应性克隆，经部分诱变以致克隆序列的每个氨基酸独立地被任何其他的氨基酸替换。

在本发明的集合中，所述克隆优选地含有优选的插入序列：  
SREQLNKLFGIEG。

在本发明的集合中，噬菌体文库中随机序列的两侧可能为两个半胱氨酸残基。这一方面可以应用于本发明的一般开发，并且不限于 HCV 的情况。

上述集合在制备用于检测怀疑感染了传染原（如病毒尤其是 HCV）的患者中该传染原（如病毒尤其是 HCV）的诊断试样之中的用途为本发明的一个目的。

用于诊断目的且含有上述集合的试剂盒为本发明的一个目的。

能够从在这里所揭示的方法中以集合的形式或作为单个肽而获得的免疫原性肽为本发明的一个目的。该肽可作为免疫原起作用，因此可用于疫苗（尤其是抗 HCV）的制备。便利地，肽可以上面提到的试剂盒的形式存在。

与基于抗原的系统相比较，我们所测试的诊断测定有利地具有内在的可升级的能力：特别的选择可以用那些未检测到反应的血清来进行。相似的方法学可用于鉴定能够区别不同的 HCV 基因型的肽组，从而可以用更便宜和更快捷的 EIA 代替既价格昂贵又劳力密集的 PCR 方法。

本发明还应通过实施例和图来作更详细的描述，其中在后者中：

图 1 代表源自筛选的克隆的鉴别。经选择的克隆的氨基酸序列以单个字母密码进行表示。顶部和较低的组分别显示了源自原始的或二级文库的序列。位于外源表位两侧的 pVIII 序列为 (NH<sub>2</sub>)AEGEF[外源表

位]DPAK。灰色的盒表明更常常地出现在来自原始文库的克隆中的任何指定位置上的残基。构成来自二级文库的肽的共有序列的残基用粗体字显示。所显示的数据为来自两次独立测定的平均值，其涉及于经指明的噬菌体所测量的吸光度 ( $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$ ) 和于 wt 噬菌体 pC89 (Felici 等人, 1991) 所测量的吸光度之间的差异。\*表示未经测试的血清。

图 2 代表模拟同样的抗原决定簇的噬菌体的鉴定。通过用阳性血清 C65 和克隆 PA1、PA3、PA8、PA12 或 PA18 (列于第一列) 进行亲和纯化得到的抗体在 ELISA 中测试它们抗同样的噬菌体 (列于第一行) 的反应。

所显示的数据为来自两次独立测定的平均值，其涉及于经指明的噬菌体所测量的吸光度 ( $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$ ) 和于 wt 噬菌体 pC89 (Felici 等人, 1991) 所测量的吸光度之间的差异。

图 3 代表源自文库 pVIIIA12 的选择的库的 ELISA 反应。源自在阳性血清 C76 上淘选文库 pVIIIA12 的文库的噬菌体库在 ELISA 中测试它和阳性血清 C12、C13、C29、C40、C47、C65、C73、C74、C76、C83 与 C85 的反应。白色、灰色和黑色条分别表示 wt 噬菌体、pVIIIA12 文库和库 p76<sup>II</sup> 的反应。ELISA 结果以  $A = A_{405\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$  表示。所显示的数据为来自两次独立测定的平均值。

图 4 的 A 代表 ADAM-HCV 混合物与血清的反应。截断值 ( $CO = 0.232$ ) 按  $CO = N + 5\sigma$  计算，其中  $N$  和  $\sigma$  分别为用阴性血清所获得的数据的平均和标准偏差。图 4 的 B 代表在从 Italian Red Cross 获得的血清上的 ADAM-HCV EIA。截断值 ( $CO = 0.252$ ) 按  $CO = N + 5\sigma$  计算，其中  $N$  和  $\sigma$  分别为从 5 个阴性对照血清所获得的数据的平均和标准偏差。ELISA 按照材料和方法中的描述检测肽和存在于人血清中的抗体的结合。收集来自两个独立实验的平均值。结果以测量信号与截断值的比率 ( $S/CO$ ) 表示。标明了对于每一组血清的测试血清的数量。

图 5 代表在不确定血清组上的 ADAM-HCV EIA。最左边的列标明了经测试的 HCV 肽的名称，并根据它们的结合特异性分组。接下来的 4 列显示了所列出的肽与阳性血清 (c25 和 r15) 和阴性对照血清 (r6 和 r13) 的反应。每个另外的列显示了所列出的肽和不确定血清的反应。抗体和

人血清中存在的 HCV 肽的结合通过 ELISA 按照材料和方法中的描述来检测。已经确定了来自两个独立实验的平均值。对于每个肽，截断值 (CO) 按  $CO = N + 5\sigma$  计算，其中 N 和  $\sigma$  分别为从 31 个阴性对照血清所获得的数据的平均和标准偏差。结果以测量信号与截断值的比率 (S/CO) 表示。

图 6 代表在阳性、阴性和不确定血清上的 ADAM-HCV/SIA。下面的 ADAM-HCV 肽根据它们的结合特异性进行分组，并固定到尼龙膜上，从而获得 10 队：m1909.2 和 m1913.2 (A)；m1901.31、m3322.3、m3362.3 (B)；m1977.1 (C)；m3551.3 (D)；m3566.3 (E)；m858、mF78 和 mH1 (F)；mA12.1、mA12.2 和 mA12.12 (G)；mB11.17 (H)；mG21.2 (I)；m1929A3.1、m1929C3.4 和 m1929.21 (J)。含有纯化的人 IgG 的附加线作为内部阳性对照而被包括在其中。抗体和人血清中存在的 HCV 肽的结合按照材料和方法中的描述来检测。

在本发明的最优选实施例中，合成了 8 个相同肽序列的 C 末端连接于共同核心上 (Tam, J.P.: 合成肽疫苗的设计：高密度多重抗原肽系统的合成和特性 (Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system), Proc. Natl. Acad. Sci. 85 (1988) 5409-5413) 的多重抗原肽 (MAP)，从而提供了能保持可与噬菌体产生的肽的特异性相比较的特异性水平的反应试剂。噬菌体支架的去除可得到更高的固定配体的肽浓度，从而导致更高的灵敏度。

优选地，根据本发明可获得的 HCV 特异性配体组包括模拟 HCV NS3 (一种免疫显性的 HCV 抗原) 的肽。在该优选的实施例的情况下，据我们所知，这是第一次描述了模拟免疫显性的 NS3 决定簇的短肽。NS3 蛋白质的肽扫描分析显露出很少与阳性血清反应的更长的序列 (Khudyakov, Y. 等人, 1995, Virology, 206:666-672)。

相反地，其他的方法 (Santini C, Brennan D, Mennuni C, Hoess RH, Nicosia A, Cortese R, Luzzago A, HCV cDNA 表达文库作为  $\lambda$  噬菌体壳体蛋白 D 的 C 末端融合蛋白的有效展示 (Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein

D of bacteriophage lambda), J Mol Biol 1998 Sep 11; 282(1):125-35; Pereboeva J. Med. Virol 1998 Oct;56(2):105-11) 已经分离了具有保持抗原特性的大蛋白质结构域。如此我们所开发的方法含有不依赖于 HCV 抗原的使用或信息的内在特性, 甚至可以应用于抗原未知的系统, 从而创造了一种导致抗原发现的方法。

噬菌体展示的随机肽文库(噬菌体文库)代表了用于鉴定被抗 HCV 血清抗体特异地识别的配体的有力工具。噬菌体产生的肽具有广阔的模拟潜能, 因为它们能够模拟线性的、具构象的和甚至非蛋白质的表位(综述可见 Felici F, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A, Sollazzo M, Traboni C, 丝状噬菌体表面的肽和蛋白质展示 (Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage), Biotechnol Annu Rev, 1995; 1:149-83; Zwick MB, Shen J, Scott JK, 噬菌体展示的肽文库 (Phage-displayed peptide libraries), Curr Opin Biotechnol, 1998 Aug; 9(4):427-36)。

在本发明中, 报告了有效的 HCV 特异性配体的更广泛集合的鉴定, 和用于血清中抗 HCV 抗体的检测的新类型诊断试剂盒的开发。

本发明提供的肽作为诊断试剂或者作为免疫原或疫苗是有用的。

含有根据本发明的免疫原和疫苗的药用组合物按常规以具有本领域一般经验的人员通常所了解的方法来制备。例如, 它们可按照 EP 0 698 091 中的描述来制备。

下面的实施例将进一步阐明本发明

#### 实施例

##### 具有新的结合特异性的 HCV 特异性配体的鉴定

将噬菌体文库 pVIII-12aa 在 8 个阳性血清 (C13、C14、C27、C29、C40、C47、C62 和 C65) 上进行淘选, 从而产生 8 个噬菌体库(分别以 p13<sup>I</sup>、p14<sup>I</sup>、p27<sup>I</sup>、p29<sup>I</sup>、p40<sup>I</sup>、p47<sup>I</sup>、p62<sup>I</sup>和 p65<sup>I</sup>表示)。制备 8 个混合物, 每个包含不同的来自这 8 个噬菌体库中 7 个的组合。每个混合物用产生经排除的噬菌体库的血清来进行亲和力选择: 例如, 由库 p13<sup>I</sup>、p14<sup>I</sup>、p27<sup>I</sup>、

p29<sup>I</sup>、p40<sup>I</sup>、p47<sup>I</sup>和 p62<sup>I</sup>所组成的混合物 mix $\Delta$ p65 在血清 C65 上进行淘选。结果产生的 8 个噬菌体库（以 p13<sup>II</sup>、p14<sup>II</sup> 等等表示）中的每一个单独地再次用由除了用于前次选择的之外所有原始血清所组成的混合物淘选。例如库 p13<sup>II</sup> 在血清 C14、C27、C29、C40、C47、C62 和 C65 的混合物上进行淘选。

用所有 8 个原始血清的混合物免疫筛选结果产生的 8 个噬菌体库，从而产生大量的阳性克隆。我们通过产生作为噬菌体分泌群体的该克隆的整齐阵列用阳性和阴性血清组测试所有这些克隆的个别反应。在它们生长之后，这一整套克隆用多孔（multipin）设备以整齐的阵列转印到硝酸纤维素滤膜上。重复同样的程序来产生许多复制物，然后对于这些复制物与阳性和阴性血清的反应进行单独和同时的筛选，从而显露出许多和阳性血清特异地反应的克隆。这些噬菌体中的每一个用于作为配基从阳性血清中亲和纯化出抗体。然后这些抗体在 ELISA 中测试它们和 4 组先前鉴定的 HCV 肽中任一组的反应（ref. Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, R., Galfre', C., Cortese, R., Nicosia, A. 和 Monaci, P., 1996. 1, Immunology, 156:4504-4513; Bartoli 等人, Nature Biotechnology Volume 16, November 1998, 1068-1073）。这一分析挑选出 12 个具有新的结合特异性的能检测血清的克隆，因此表明它们模拟了不同于已经鉴定的抗原决定簇的抗原决定簇。

序列分析表明有 5 种不同的序列。制备来自这 5 个克隆（PA1、PA3、PA8、PA12 和 PA18）中每一个的培养物上清液，并用 30 个不同的阳性和 24 个阴性血清测试它们的 ELISA 反应（图 1）。只有克隆 PA8 和 PA12 显示出统计上显著的与阳性血清的反应（ $p < 0.2$ ）。

然后噬菌体 PA1 用于从血清 C65 中免疫纯化出抗体。这些经纯化的抗体特异地与克隆 PA3、PA8、PA12、PA18 以及与克隆 PA1 本身反应，从而表明所有这些噬菌体能够分组成被同样特异性的抗体所识别的单一类别（图 2）。当使用野生型作为配基时，或者抗体是从阴性血清中亲和纯化出来的时，则检测不到与上述克隆中任何一个的反应。

当来自同一组的不同克隆用于免疫纯化血清抗体时，或者当使用不

同的阳性血清时，我们获得与图 1 中所显示的反应相一致的结果。例如，当噬菌体 PA3 用于从同样血清中免疫纯化出抗体时，这些抗体与克隆 PA8 和 PA12 反应，也与同样的克隆 PA3 反应。这些结果表明克隆 PA1、PA3、PA8、PA12 和 PA18 能够检测与同样的 B 细胞表位反应的抗体，正如这些肽序列之间的弱的相似性所暗示的（图 1）。

### HCV 肽的亲合力成熟

产生其中克隆 PA12 的序列经部分诱变的噬菌体文库。在命名为 pVIIIA12 的这“二级”文库中，寡核苷酸是合成的，以致 SREQLNKLFGIEG 序列的每个氨基酸能够独立地被任何其他的氨基酸替换：理论上，每个位置上的替换会以 20% 的频率发生。另外，在外源肽序列的两个位点上包含了随机残基。将 pVIIIA12 文库在 12 个阳性血清（C8、C10、C12、C13、C22、C58、C60、C76、C83、C85、C141 和 C177）上淘选两次。

当在 ELISA 中测试时，噬菌体库 p76<sup>II</sup>、p141<sup>II</sup> 和 p177<sup>II</sup>（分别源自用血清 C76、C141 和 C177 的选择）显示出与阳性血清组最高和最宽的反应性并进行进一步分析（图 3）。以该反应性为基础，噬菌体库 p76<sup>II</sup>、p141<sup>II</sup> 和 p177<sup>II</sup> 分别通过用血清 C40、C141 和 C177 进行免疫筛选。对于每个库，该分析挑选出几个克隆，这些克隆随后按照上面的详述通过膜复制方案对它们与许多不同的阳性和阴性血清的反应性进行单独测试。该最后的筛选挑选出 51 个特异地与阳性血清反应的克隆。

序列分析显示出 16 种不同的序列（分别源自库 p76<sup>II</sup>、p141<sup>II</sup> 和 p177<sup>II</sup> 的 8 种、5 种和 3 种）。制备来自这些克隆中每一个的培养物上清液，并用 33 个不同的阳性和 24 个阴性血清测试它们的 ELISA 反应性（图 1）。

克隆 P40.17 和 P40.7 与更多的测试阳性血清反应（每个 42%）。它们和克隆 P141.7 与 P177.22 的组合与阳性血清组中的 70% 反应。将这些经选择的肽进行序列比对，从而定义出一个共有序列：  
(M/Y)SRE(W/Q)L(M/N)K(A/L)(H/F)GIES(W/M)。

### 另外的 HCV 特异性配体的鉴定

以具有不同于先前所鉴定的新的结合特异性的配体的鉴定为目标实行相似的选择策略。筛选各种长度的噬菌体文库，在这些文库中随机序

列是完全随机的或者在其两侧具有两个制约展示肽构象的半胱氨酸残基。

使用各种血清和噬菌体库的组合来选择噬菌体文库。对于展现出感兴趣的对阳性血清反应特性的噬菌体库作进一步的分析。通过复制物筛选对于大量个别克隆的反应性进行评估，从而挑选出显示与阳性血清特异反应性的噬菌体。

我们将我们的注意力集中于具有感兴趣的反应性模式的克隆。

用从 HCV 肽中亲和纯化出的抗体探查这些克隆，从而排除那些模拟先前鉴定的肽的抗原决定簇的克隆。于这些选择步骤中幸存下来的克隆用大量的阳性和阴性血清在 ELISA 中进行测试，以便从统计上确定它们的 HCV 特异性。

这些经选择的克隆通过创造和筛选二级文库来进一步改进，在该二级文库中原始克隆或者克隆群体的序列经过部分诱变，然后再次进行筛选以挑选出具有改进的结合特性的变异体。该步骤采用已经描述的不同策略 (ref. paper Urbanelli, Zhu) 来进行。该广泛而重复的努力鉴定出新的 7 组以不同结合特异性特异地结合 HCV 特异性血清抗体的配体。

用血清筛选噬菌体展示的 HVR1 变异体的所有组成部分，从而分离出特异地与大量阳性血清反应的肽 (Puntoriero 等人; Nicosia 未发表的)。分析源自该筛选的一套 HVR1 噬菌体产生的肽以确定它们与我们的血清组的反应性。鉴定出 3 个具有与阳性血清最高和特异反应频率的肽 (mF78、mH1 和 m858)。

概括地说，鉴定出 12 组配体，其中包括先前鉴定的 4 组 (Bartoli 等人, Nature Biotechnology Volume 16, November 1998, 1068-1073; Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, R, Galfre', C., Cortese, R., Nicosia, A. 和 Monaci, P., 1996.1, Immunology, 156:4504-4513); 见图 5, A 至 L 组。

#### 从噬菌体产生的肽到合成的肽

以八分枝的多重抗原肽形式 (ADAM-HCV 肽) 来合成源自 12 组 HCV 配体的 22 个肽序列。在该分子中，8 个同样的肽序列通过赖氨酸叉连接

到一个共同核心上，从而形成与噬菌体壳体上 pVIII 融合肽的展示相似的多重展示。ADAM-HCV 肽的序列显示于下文中：

m858 ETYTTGGAAARTTSGLTSLFSPGPSQN  
m1901.31 AEGEFKKFPGSSTPKDPAKAAFDL  
m1901.34 AEGEFPEDTFPGSKLILSGDPAKAAFDL  
m1909.2 AEGEFKTRRNTNYQDPAK  
m1913.2 AEGEFKTLRNTNRLDPAK  
m1929.21 AEGEFATASPTHYTSELDP  
m1929A3.1 AEGEFTTASPTHFLVPLDPAK  
m1929C3.4 AEGEFATAPPSHYSWDP  
m1977.1 AEGEFPYLLPRRSREEAVDPAK  
m3322.3 AEGEFQDARFPGGGDPAK  
m3362.3 AEGEFSLKSGGGQLRALVDPAK  
m3551.3 AEGEFRLGVRALRKAPDPAK  
m3566.3 AEGEFKTSVRSVPRARPPINGDPAK  
mA12.1 AEGEFNSREWLSKAHGIEGMDPAK  
mA12.2 AEGEFRSREQLSKLFGIDLTPAK  
mA12.13 AEGEFMSRTWLMKAHGIESWDPAK  
mB11.17 AEGEFRELLYEAFDDMEGDPAK  
mF78 QTHTTGGQAGHQAHSLTGLFSPGAKQN  
mG21.2 AGEFYVIEQGMMDP  
mH1 QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQN  
mN15.3 AEGEFGLADLATLTFGSTDP  
mS48.5 AEGEFRFWKVPDYDPPAAGGDPAK

虽然关于它们分析结果的数据概括于表 1 中,但此处用图附加说明。

在许多情况下,位于外源表位两侧的 pVIII 序列 (NH<sub>2</sub>AEGEF 和/或 DPAK-COOH) 显示出与相应的肽的结合特异性有关。

含有这 22 个 ADAM-HCV 肽的混合物(ADAM-HCV 混合物)用于通过 EIA (ADAM/HCV EIA) 检测抗 HCV 抗体的存在。ADAM-HCV 肽混合物通过被动包被而固定于多孔 ELISA 平板的底部,然后用 1:40 稀释的血清样品孵育 40 分钟。结合到肽上的人抗体通过用抗人共轭物孵育 20 分钟来检测,并通过生色酶促反应来测量。

如图 4A 中所显示的,ADAM/HCV EIA 有效地区分出阳性和阴性血清。

#### ADAM-HCV/EIA

HCV 阳性和 HCV 阴性血清组通过 ADAM/HCV-EIA 来测试抗 HCV 抗体的存在(图 4B)。该测试鉴定出包括在该组中的所有阳性血清,并通过鉴定所有的阴性样品证实具有 100%的特异性。

#### 不确定样品

根据商用 HCV 证实测定诊断为不确定的血清的集合可从各种来源获得。23 个 ADAM-HCV 肽在 ELISA 中单独地测试它们与 31 个样品的反应性(图 5)。6 个样品不与测试的 MAP 中的任何一个反应,因而将其划归为阴性。8 个样品只识别一个抗原,因而确认为不确定分析。最后,17 个样品显示出两种或更多种抗不同肽组的反应,因而将其鉴定为阳性。

#### ADAM-HCV 带状免疫印迹测定 (ADAM-HCV/SIA)

将 ADAM-HCV 肽共价固定到活化的尼龙膜上,从而获得具有 10 队的带。如图 6 的详述,每条线包含具有相同结合特异性的不同的肽。还包括了一条作为内部阳性对照的含有纯化的人 IgG 的对照线。从不确定血清组中选择出的一些样品通过将血清样品与该带进行孵育来测试它们与固定抗原的反应性。由个别抗原捕获的抗 HCV 抗体通过将该带与抗人酶共轭物进行孵育并随后进行比色酶促反应来显现出来。样品与肽条带的反应性通过视觉上比较每个条带和内部阳性对照的亮度来确定。

ADAM-HCV/SIA 显露出所有 8 个阳性血清与 ADAM-HCV 肽所模拟的几个不同的病毒决定簇的反应。当测试 8 个阴性血清时,未检测到反应性(图

6)。

我们也通过 ADAM-SIA 分析了许多经选择的不确定样品。如图 6 中所显示的, 8 个不确定样品的分析证实了通过用个别的肽的 ADAM-HCV/EIA 所获得的结果, 从而表明这两个测定具有同等的灵敏度。

## 材料和方法

### 噬菌体文库

使用 4 种不同的噬菌体展示的随机肽文库作为配体的来源: pVIII9aa、pVIII9aa\_cys、pVIII12aa、pVIII15aa 和 pVIII12. pVIII9aa (Felici 等人, 1991)、pVIII12aa 和 pVIII15aa 分别为三个不同的由随机 9 聚体、12 聚体和 15 聚体所组成的文库, 其作为主要外壳蛋白 pVIII N 末端的融合蛋白展示在丝状噬菌体上。pVIII9aa\_cys 为其中两个半胱氨酸残基位于随机九肽两侧的文库 (Luzzago 等人, 1993)。在后者文库中, 半胱氨酸促进了在某种程度上限制所展示的肽的构象的二硫桥的形成。pVIII12 文库是通过合成编码氨基酸序列 SREQLNKLFGIEG 的寡核苷酸来构建的。通过采用树脂分解合成方法学 (Glaser 等人, 1992), 每个氨基酸位置能够以 20% 的频率被 NNS 三联体所替换。另外, 在外源肽序列的两个位点上包含了随机残基。所有的 5 个文库按所描述的那样产生出来 (Folgori 等人, 1998)。文库的复杂度按源自获得于细菌转化的个体克隆的数量计算对于这 5 个文库中的每一个为大约  $1 \times 10^8$ 。

### 人血清

本研究中所使用的人血清是随机地从来自输血中心和医院部门的废弃的献血者血液单元和来自健康自愿者的单元之中收集的。也就是说, 许多本研究中所使用的不确定样品是从 Laboratory of Virology, Istituto Superiore di Sanita, Roma (意大利) 和 Centro Nazionale Trasfusione Sangue della Croce Rossa Italiana, Roma (意大利) 获得的。血清用第二代 HCV ELISA 测试系统 (Ortho Diagnostic System, Bersee, Belgium) 进行测试以确定抗 HCV 抗体的存在, 并用第一代点印迹免疫测定 RIBA HCV 测试系统 (Chiron Co., Emeryville, CA) 进行确

认。血清还通过 AUSAB EIA 测试 (Abbott Labs, Chicago, IL) 和第三代 HIV-1/HIV-2 EIA 测试 (Abbott Labs, South Pasadena, CA) 进行测试以确定不存在抗 HBsAg 和抗 HIV-1/HIV-2 的抗体。对于抗 HCV 抗体的存在为阳性但对于抗 HBsAg 和抗 HIV 抗体为阴性的样品作为 HCV 阳性血清包括于本研究之中。对于抗所有三种抗原的抗体的存在为阴性的血清作为 HCV 阴性血清包括于本研究之中。

#### 亲和选择和免疫筛选

按照描述, HCV 阳性血清用于亲和选择噬菌体展示的随机肽文库 (Folgori 等人, 1998; Felici 等人, 1996; Prezzi 等人, 1996)。源自亲和选择的克隆用血清按描述进行免疫筛选 (Prezzi 等人, 1996; Minenkova 等人)。

#### 使用噬菌体克隆的 ELISA

使用噬菌体上清液和人血清的 ELISA 按下述进行。噬菌体上清液按先前的描述从 DH5 $\alpha$ -F' 受感染细胞中制备 (Felici 等人, 1991)。多孔平板 (Immunoplate Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) 用 200 $\mu$ l 在 pH9.6 的 50mM NaHCO<sub>3</sub> 中浓度为 1 $\mu$ g 抗体/毫升的抗 pIII 单克隆抗体 57D1 (Dente 等人, 1994) 于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。在丢弃包被溶液之后, 平板用 ELISA 封闭缓冲液 (PBS 中含 0.1% 酪蛋白和 1% Triton-X100) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。平板用 PBS/0.05% Tween-20 (洗涤缓冲液) 洗涤几次。将 ELISA 封闭缓冲液和澄清噬菌体上清液的 1:1 混合物加入每一个孔中, 并让其于 37 $^{\circ}$ C 结合 1 小时。将 1:40 稀释的人血清于室温孵育 30 分钟, 其孵育条件为在 ELISA 封闭缓冲液中具有  $5 \times 10^{10}$  蚀斑形成单位 (pfu)/毫升的噬菌体 f11.1 (Dente 等人, 1996)、25 $\mu$ l/ml 来自被噬菌体 f11.1 (Dente 等人) 侵染的 DH5-F' 细胞的蛋白质提取物和 25 $\mu$ l/ml 来自无关的鼠杂交瘤细胞的上清液。在丢弃了含有噬菌体上清液的混合物之后, 平板用洗涤缓冲液洗涤, 然后将预孵育的血清混合物加入到每个孔中并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。然后, 平板用洗涤缓冲液洗涤, 并将于二级抗体封闭缓冲液 (PBS 中含 1% Triton、1% 马血清和 50% 胎牛血清, 5 $\mu$ l/孔的单克隆抗体上清液) 中作 1:20,000 稀释的连接有 HRP 的山羊抗人 IgG 抗体 (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) 加入到每个孔中。在于 37℃ 孵育 30 分钟之后, 洗涤平板并通过与 200 $\mu$ l TMB 液体底物系统 (SIGMA, St. Louis, MO) 孵育来检测过氧化物酶活性。在经过 15 分钟孵育之后, 通过加入 25 $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 来终止反应。平板用自动 ELISA 阅读器 (Labsystems Multiskan Bichromatic, Helsinki, Finland) 进行阅读, 并将结果以  $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$  表示。于显示项目中所表明的 ELISA 数据为来自两次独立测定的平均值。如果它们大于 0.3 截断值并且它们与对于 wt 噬菌体所观察到的背景信号的差异大于  $3\sigma$  ( $\sigma = \{1/2[\sigma^2_p + \sigma^2_w]\}^{1/2}$ ), 那么则认为它们在统计上是显著的。

涉及克隆 PA8 和 PA12 的 p 值是所观察到的阳性和阴性血清反应性的频率分布根据  $\chi^2$  测试在统计上相同的概率。

#### 从血清中亲和纯化出噬菌体表位特异性抗体

60mm 直径的聚苯乙烯培养皿 (Becton Dickinson Labware, NJ) 用在 1 毫升 pH9.6 的 50mM NaHCO<sub>3</sub> 中含  $1 \times 10^{11}$  CsCl 纯化的噬菌体微粒的溶液于 4℃ 包被过夜。在用 PBS/Tween 洗涤之后, 培养皿用 ELISA 封闭缓冲液于 37℃ 孵育 60 分钟。将人血清 (在 ELISA 封闭缓冲液中以 1/100 稀释)、 $1 \times 10^{12}$  pfu/ml 的 f11.1 和 25 $\mu$ l/ml XL1-blue 细胞提取物的混合物于室温孵育 60 分钟。在丢弃封闭缓冲液之后, 向平板加入预孵育的混合物并于 4℃ 孵育过夜。丢弃血清稀释液, 然后用洗涤缓冲液洗涤培养皿。结合的抗体用添加了 10 $\mu$ g/ml BSA 的 pH2.7 的 0.1M 甘氨酸-HCl 来洗脱, 并进行中和。

#### 噬菌体克隆的鉴别

亲和纯化出的抗体在标准 ELISA 中测试它们抗噬菌体表位的反应性。一般地, 多孔平板用 100 $\mu$ l/孔的在 pH9.6 的 50mM NaHCO<sub>3</sub> 中含  $1 \times 10^{11}$  TU/ml CsCl 纯化的噬菌体的溶液于 4℃ 包被过夜。在用 PBS/Tween 洗涤之后, 平板用封闭缓冲液于 37℃ 孵育 60 分钟。然后, 向每个孔中加入 100 $\mu$ l 亲和纯化出的抗体, 并让其于 4℃ 结合过夜。然后用冷的 PBS/Tween 洗涤平板, 并以 100 $\mu$ l/孔加入于封闭缓冲液中作 1/5000 稀释的连接有碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG (Fc 特异性) 抗体 (Sigma, St. Louis, MO)。

在室温孵育 2 小时之后, 洗涤平板, 碱性磷酸酶就按上面的描述显露出结果来。

### 合成肽

我们已经使用了合成的八分枝的多重抗原肽 (MAPs): (Tam, 199X)。通过流动聚酰胺方法 (Pessi 等人, 1990) 来进行合成。肽溶解在二甲亚砜中。

### 使用合成肽的 ELISA

多孔平板 (Immuno plate Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) 用在 pH9.6 的 50mM NaHCO<sub>3</sub> 中浓度为 10 $\mu$ g/ml 的 MAP 溶液于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。在丢弃包被溶液之后, 平板用 ELISA 封闭缓冲液 (PBS 中含 0.1%酪蛋白和 1% Triton-X100) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。平板用 PBS/0.05% Tween-20 (洗涤缓冲液) 洗涤几次。向每个孔中加入 1:40 稀释的人血清, 并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。然后平板用洗涤缓冲液洗涤, 再将于 ELISA 封闭缓冲液中作 1:20,000 稀释的连接有 HRP 的山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) 加入到每个孔中。在于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟之后, 洗涤平板并通过与 TMB 液体底物 (SIGMA, St. Louis, MO) 孵育来检测过氧化物酶活性。经过 15 分钟孵育之后, 通过加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 来终止反应。平板用自动 ELISA 阅读器 (Labsystems Multiskan Bichromatic, Helsinki, Finland) 进行阅读, 并将结果以  $A = A_{450\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$  表示。于显示项目中所表明的 ELISA 数据为来自两次独立测定的平均值。

### 参考文献

Smith, C. P. 和 Petrenko, V. A. 1997. 噬菌体展示 (Phage display). Chem. Rev. 97:391-410.

Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfrè, G., Cortese, R., Monaci, P. 和 Nicosia, A. 1994. 只用随机肽文库和人血清鉴定病理学抗原的模拟表位的一般策略 (A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random

peptide libraries and human sera). *EMBO J.* 13:2236-43.

Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, R., Galfre', C., Cortese, R., Nicosia, A. 和 Monaci, P., 1996. *J. Immunology*. 156:4504-4513.

Alter, H. J. 1995. 为 C 或不为 C: 这些是值得思考的问题 (To C or not to C: these are the questions). *Blood*. 85:1681.

Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. 和 Cesareni, C. 1991. 来自表达于多价展示载体上的寡肽大文库的抗体配体的选择 (Selection of antibodies ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector). *J. Mol. Biol.* 222:301-310.

Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A. 和 Cortese, R. 1993. 通过噬菌体展示的肽来模拟不连续表位: I. 使用受约束肽的噬菌体文库的人 H 铁蛋白的表位制图 (Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides). *Cene.* 128:51-57.

Dente, L., Cesareni, G., Micheli, C., Felici, F., Folgori, A., Luzzago, A., Monaci, P., Nicosia, A. 和 Delmastro, P. 1994. 识别丝状噬菌体的单克隆抗体——噬菌体展示技术的有用工具 (Monoclonal antibodies that recognize filamentous phage. Useful tools for phage display technology). *Gene*. 148:7

Sambrook, J., Fritsch, T. 和 Maniatis, T. 1989. 分子克隆: 实验指南 (Molecular Cloning: a laboratory manual) (第二版).

Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onoshi, E., Andoh, T., Yoshida, I. 和 Okayama, H. 1991. 从人携带者中分离所得的丙型肝炎病毒基因组的结构和组织 (Structure and organization of the Hepatitis C virus genome isolated from human carriers). I. *Virology*. 65:1105-1113.

Smith. D. B. 1993. 谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白的纯化 (Purification of glutathione S-Transferase fusion proteins). *Methods in molecular and cellular biology*. 4:220-229.

Frangioni, f. V. 和 Neel, B. J. 1993. 具酶促活性的谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白 (pGex) 的溶解和纯化 (Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-Transferase (pGex) fusion proteins). *Analyt. Biochem.* 210:179-187.

Komatsu F, Takasaki K 1999. 采用用于抗 HCV 阳性病人中 HCV 病毒血症的定量评估的新方法来确定血清丙型肝炎病毒 (HCV) 核心蛋白 (Determination of serum hepatitis C virus (HCV) core protein using a novel approach for quantitative evaluation of HCV viraemia in anti-HCV-positive patients). *Liver* 19:375-80.



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 3

Asp Gln Arg Glu Asn Trp Phe Lys Tyr His Gly Phe Gly  
1                    5                    10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 4

Glu Trp Arg Arg Tyr Met Ser Asp Ile His Gly Tyr Gly  
1                    5                    10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 5

Asp Ser Leu Arg Tyr Met Tyr Val Met Pro Gly Phe Gly  
1                    5                    10

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 6

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile Asp Met Thr  
 1                    5                    10                    15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 7

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe Gly Ile Glu Ile Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 8

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Glu Pro Met  
 1                    5                    10                    15

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 9

Asn Ser Arg Trp Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Gly Met  
 1                    5                    10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 10

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile Glu Val Met  
 1                    5                    10                    15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 11

Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Asp Thr Gln  
 1                    5                    10                    15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 12

Lys Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu His Gly Val Asp Thr Ser



<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 16  
 Tyr Ser Arg Ser Trp Leu Met Lys Ala His Gly Leu Glu Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 17  
 Met Met Arg Ser Tyr Leu Met Lys Ala His Gly Ile Glu Ser Leu  
 1                    5                    10                    15

<210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 18  
 Met Ser Arg Leu Trp Leu Met Lys Ala His Gly Ile Ser Ser Glu  
 1                    5                    10                    15

<210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT



<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 22

Ala Glu Gly Glu Lys Lys Leu Arg Arg Ser Thr Asn Trp Gly Asp Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala Lys

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 23

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Arg Arg Gln Thr Asn Tyr Gln Asp Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala Lys

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 24

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Leu Arg Asn Ala Asn Arg Leu Asp Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala Lys

<210> 25  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 25  
 Ala Glu Gly Glu Phe Lys Thr Leu Arg Asn Ser Asn Arg Leu Asp Pro  
 1                   5                   10                   15

Ala Lys

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 26  
 Ala Glu Gly Glu Phe Lys Lys Phe Pro Gly Ser Ser Thr Pro Lys Asp  
 1                   5                   10                   15

Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
                   20                   25

<210> 27  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 27  
 Ala Glu Gly Glu Phe Pro Gln Asp Ala Arg Phe Pro Gly Gly Gly Asp

1                    5                    10                    15

Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
                         20                    25

<210> 28  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 28

Pro Gln Asp Ala Arg Phe Pro Gly Gly Gly Asp Pro Ala Lys Ala Ala  
1                    5                    10                    15

Phe Asp Ser Leu  
                         20

<210> 29  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 29

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Gly Ala Gly Gly Ala Gln Thr Val Asp Trp  
1                    5                    10                    15

Ala Leu Leu Val Asp Pro Ala Lys  
                         20

<210> 30  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 30

Ala Glu Gly Glu Phe Met Gln His Phe Gly Gly Ala Gln Trp Ile Met  
 1                    5                    10                    15

Gly Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 31

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu  
 1                    5                    10                    15

Arg Ala Leu Val Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 32

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gly Gly Ala Gln Leu  
 1                    5                    10                    15

Arg Ala Leu Val Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 33  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 33  
 Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Leu Leu Lys Arg Ser Ser Pro Pro Asp Pro  
 1                   5                   10                   15

Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
 20

<210> 34  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 34  
 Ala Glu Gly Glu Phe Pro Ile Leu Val Gly Pro Tyr Leu Leu Pro Arg  
 1                   5                   10                   15

Arg Ser Arg Glu Glu Ala Val Asp Pro Ala Lys  
 20                   25

<210> 35  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 35

Ala Glu Gly Glu Phe Pro Ile Leu Val Gly Pro Tyr Leu Leu Pro Arg  
 1 5 10 15

Arg Ser Arg Glu Glu Ala Val Asp Pro Ala Lys Gly Lys  
 20 25

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 36

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Pro Arg Lys Ala Leu  
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 37

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala Leu  
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 38

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala Pro  
 1                    5                    10                    15

Asp Pro Ala Lys  
                   20

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 39

Arg Leu Gly Val Arg Ala Leu Arg Lys Ala Pro Asp Pro Ala Lys  
 1                    5                    10                    15

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 40

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Gln Pro Arg Gly His Ser Tyr Gln Asp Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala Lys

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 41

Ala Glu Gly Glu Phe Leu Lys Glu Arg Ala Glu Met Ser Ala Arg Lys

1

5

10

15

Thr Leu Gly Ala Asp Pro Ala Lys

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 42

Ala Glu Gly Glu Phe Phe Tyr Gln Ile Pro Arg Arg Met Glu Thr Lys

1

5

10

15

Tyr Gly Asp Pro Ala Lys

20

<210> 43

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 43

Ala Glu Gly Glu Phe Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly Ile

1

5

10

15

Glu Gly Asp Pro Ala Lys

20

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 44

Ala Glu Gly Glu Phe Asn Ser Arg Glu Trp Leu Ser Lys Ala His Gly

1

5

10

15

Ile Glu Gly Met Asp Pro Ala Lys

20

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 45

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly

1

5

10

15

Ile Asp Leu Thr Asp Pro Ala Lys

20

<210> 46

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 46

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly  
1 5 10 15

Ile Asp Met Thr Asp Pro Ala Lys  
20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 47

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe Gly  
1 5 10 15

Ile Glu Thr Ser Asp Pro Ala Lys  
20

<210> 48

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 48

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Leu Phe Gly  
1 5 10 15

Ile Glu Val Met Asp Pro Ala Lys  
20

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 49

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Ser Arg Glu Gln Leu Arg Lys Leu His Gly  
 1                    5                    10                    15

Phe Asp Thr Ser Pro Ala Lys  
 20

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 50

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Met Arg Asn Tyr Leu Asn Lys Ala Phe Gly  
 1                    5                    10                    15

Ile Glu Gly Met Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 51

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 51

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu Phe Gly



<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 54

Ala Glu Gly Glu Phe Ser Arg Arg Glu Trp Leu Asn Lys Arg Phe Gly  
 1                    5                    10                    15

Ile Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 55

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 55

Ala Glu Gly Glu Phe Met Ser Arg Thr Trp Leu Met Lys Ala His Gly  
 1                    5                    10                    15

Ile Glu Ser Trp Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 56

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 56

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Pro Glu Trp Leu Asn Lys Ala Arg Gly  
 1                    5                    10                    15

Ile Asp Arg Ser Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 57

Ala Glu Gly Glu Phe Lys Ser Arg Glu Gln Leu Ser Lys Leu His Gly  
 1                    5                    10                    15

Val Asp Thr Ser Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 58

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 58

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Glu Gln Leu Asn Lys Met Phe Gly  
 1                    5                    10                    15

Ile Glu Ile Ser Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 59

Ala Glu Gly Glu Phe Tyr Ser Arg Ser Trp Leu Met Lys Ala His Gly  
 1 5 10 15

Leu Glu Leu Gly Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 60

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 60

Ala Glu Gly Glu Phe Met Met Arg Ser Tyr Leu Met Lys Ala His Gly  
 1 5 10 15

Ile Glu Ser Leu Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 61

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 61

Ala Glu Gly Glu Phe Met Ser Arg Leu Trp Leu Met Lys Ala His Gly  
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Glu Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 62

Ala Glu Gly Glu Phe Pro Gln Pro Gln Glu Val His Val Tyr Arg Glu  
1                   5                   10                   15

Gln Leu Gly Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
                  20                   25                   30

<210> 63

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 63

Ala Glu Gly Glu Phe Gly Glu Val Leu Tyr Arg Gly Phe Asp Glu Val  
1                   5                   10                   15

Gly Gly Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
                  20                   25

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 64

Ala Gly Glu Pro Tyr Val Ile Glu Arg Gly Met Gln Asp Pro Ala Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 65

<211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 65  
 Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Arg His Phe Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
 20 25

<210> 66  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 66  
 Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Ala His Phe Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
 20 25

<210> 67  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 67  
 Ala Glu Gly Glu Phe Thr Thr Ala Ser Pro Ser His Phe Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Leu Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu  
                   20                                  25

<210> 68  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 68  
 Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Arg His Tyr Ser Trp Asp  
   1                  5                                  10                                  15

Pro Ala Lys

<210> 69  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 69  
 Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Ala His Tyr Ser Trp Asp  
   1                  5                                  10                                  15

Pro Ala Lys

<210> 70  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 70

Ala Glu Gly Glu Phe Ala Thr Ala Pro Pro Ser His Tyr Ser Trp Asp  
 1                    5                    10                    15

Pro Ala Lys

<210> 71

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 71

Ala Glu Gly Glu Phe Arg Phe Trp Lys Val Pro Asp Tyr Asp Pro Pro  
 1                    5                    10                    15

Ala Ala Gly Gly Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 72

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 72

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Glu Ser Ser Val Ser Ser Thr Leu Ala Asp  
 1                    5                    10                    15

Leu Ala Ser Lys Thr Phe Gly Ser Ala Asp Pro Ala Lys  
 20                    25

<210> 73

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 73

Ala Glu Gly Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Ala Thr Met Thr Phe Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Thr Asp Pro Ala Lys  
 20

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：噬菌体文库克隆

<400> 74

Ala Glu Gly Glu Phe Gly Leu Ala Asp Leu Ala Thr Leu Thr Phe Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Pro Asp Ala Lys  
 20

表1

表1: ADAM-HCV肽的反应性

N, 测试血清的数量; S, 测得的信号; CO, 截断值 ( $CO = \text{neg} + 3b$ , 其中neg和b为来自阴性血清的数据的平均和标准偏差)

组	肽	阴性血清		阳性血清	
		N	N	% S/CO>1	平均值 S/CO>1
A	m1913.2	33	21	100	45.0
	m1909.2	33	21	100	50.3
B	m1901.31	39	38	61	3.2
	m1901.34	39	38	39	5.4
	m3322.3	30	18	78	10.1
	m3362.3	31	37	84	4.4
C	m1977.1	32	28	96	13.6
D	m3551.3	37	26	46	3.0
E	m3566.3	14	12	50	2.1
F	m858	40	41	73	8.9
	mH1	60	60	68	9.8
	mF78	64	51	80	5.8
G	mA12.1	37	45	64	8.4
	mA12.2	37	45	33	8.6
	mA12.13	38	45	31	4.4
H	mB11.17	35	24	46	2.7
I	mG21.2	34	34	26	4.0
J	m1929C3.4	35	33	27	7.1
	m1929A3.1	43	25	40	3.9
	m1929.21	13	18	72	9.7
K	mS48.5	29	9	67	7.0
L	mN15.3	36	21	10	15.2



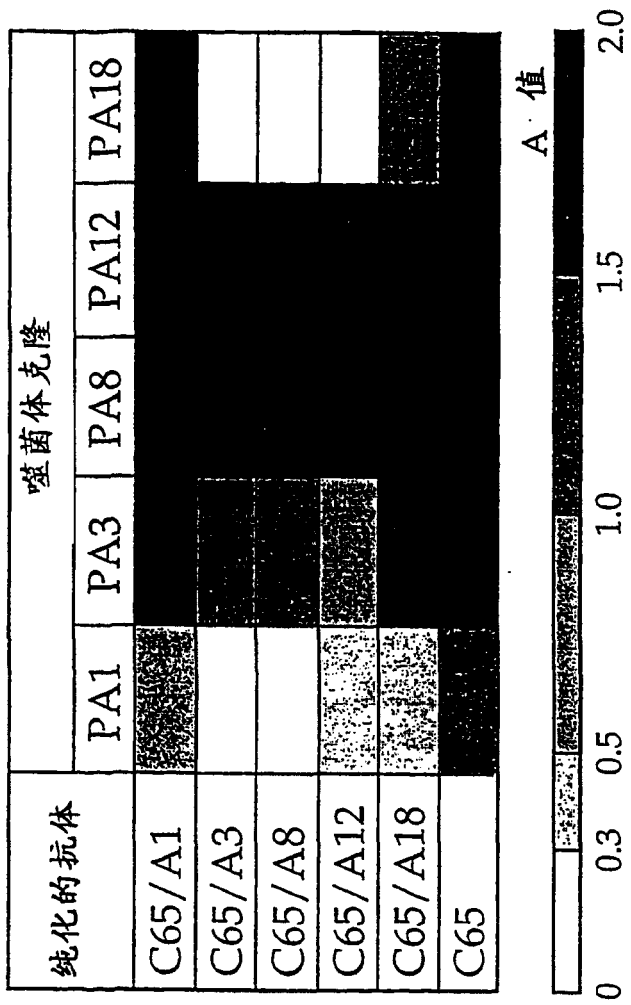


图2

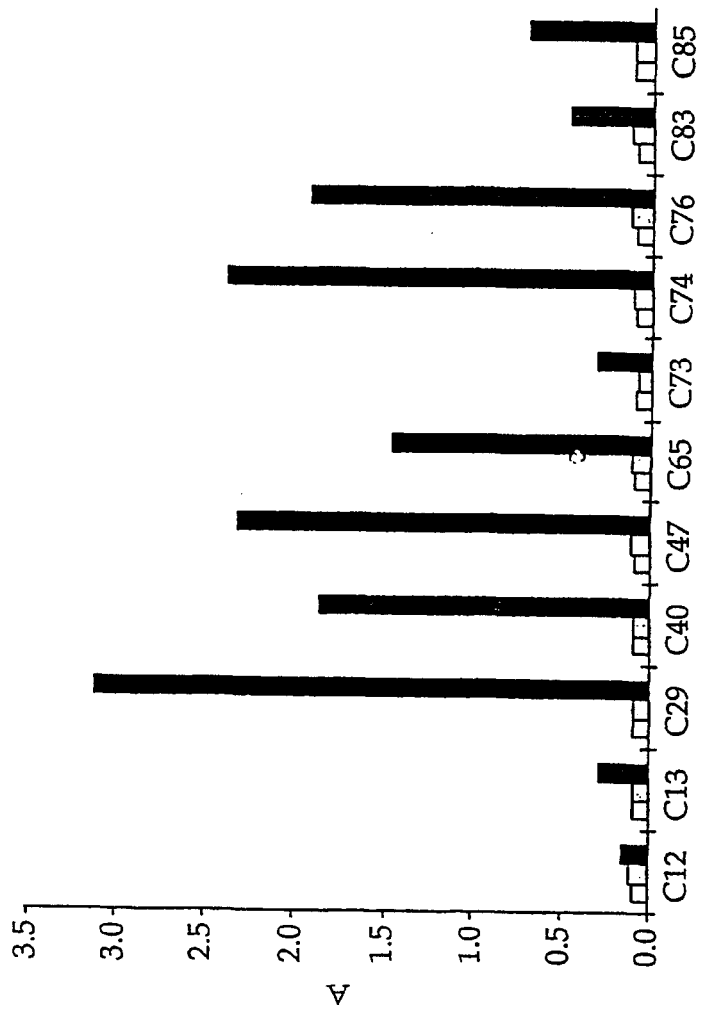
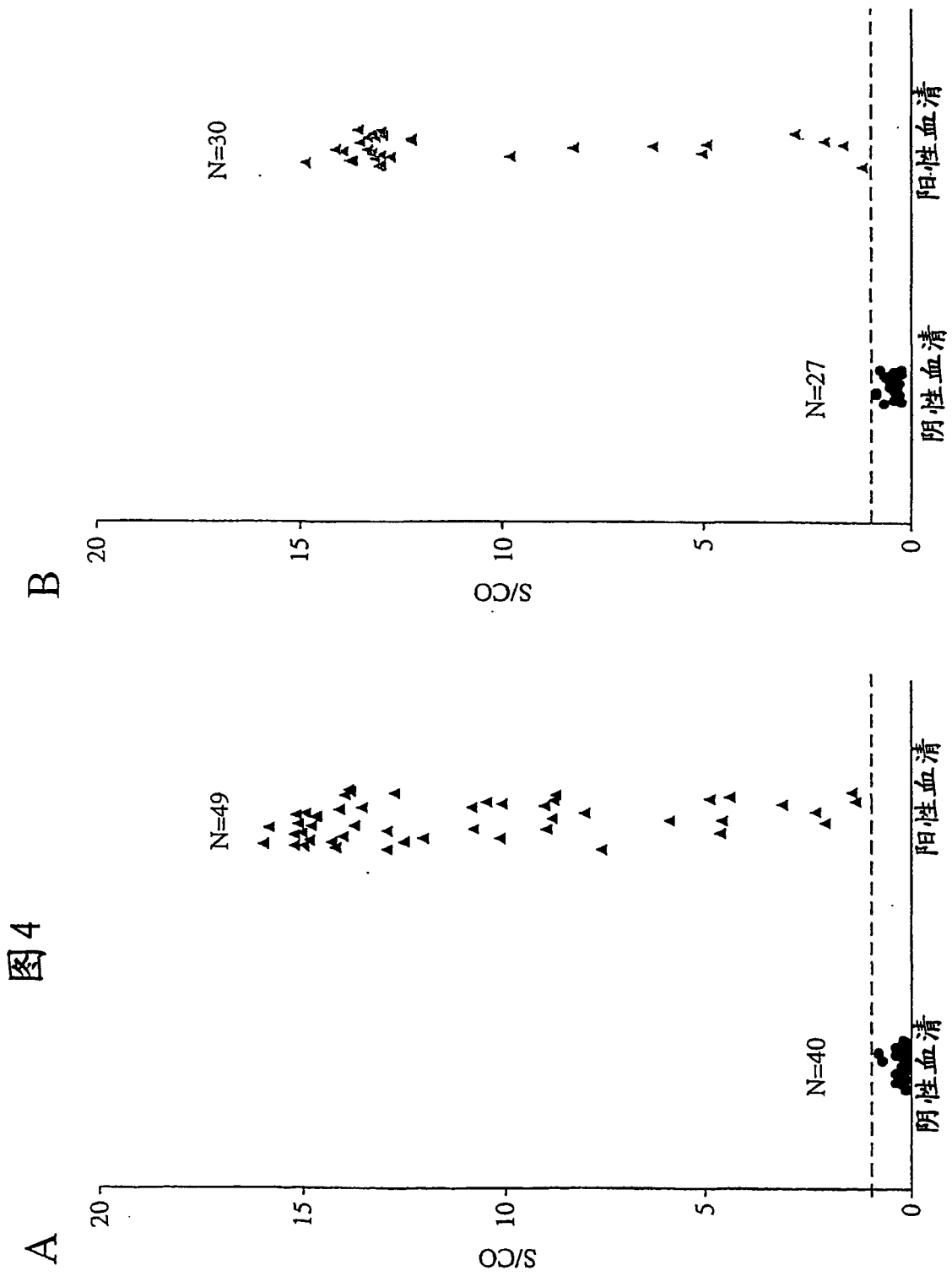


图 3



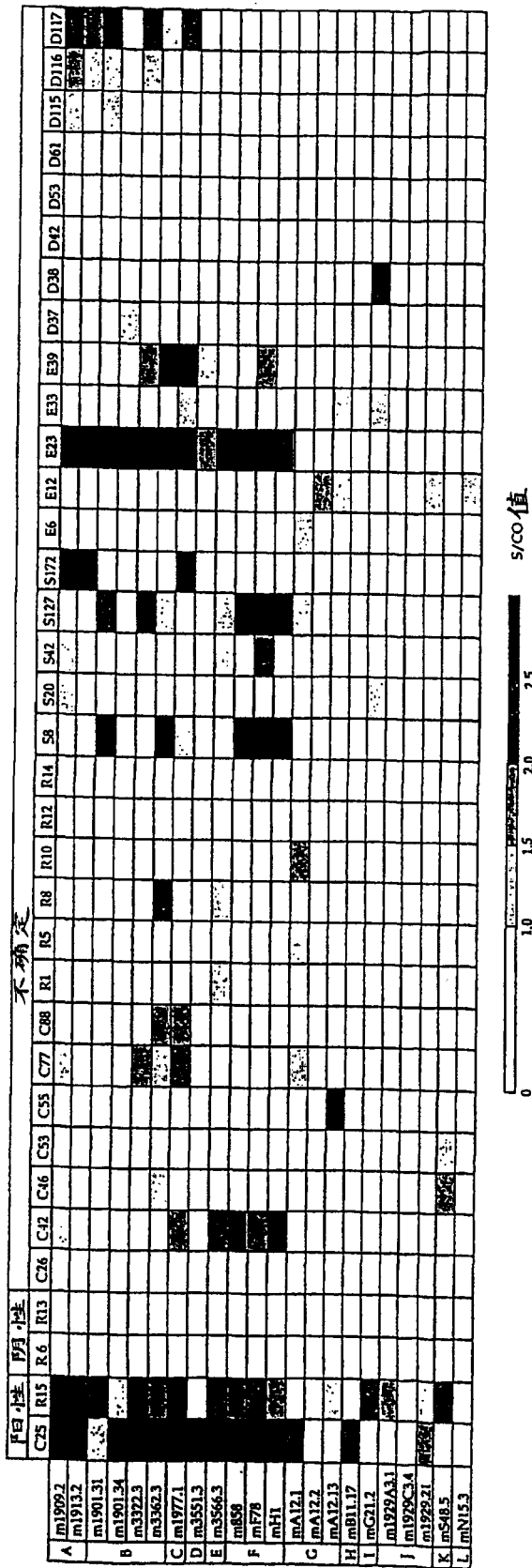
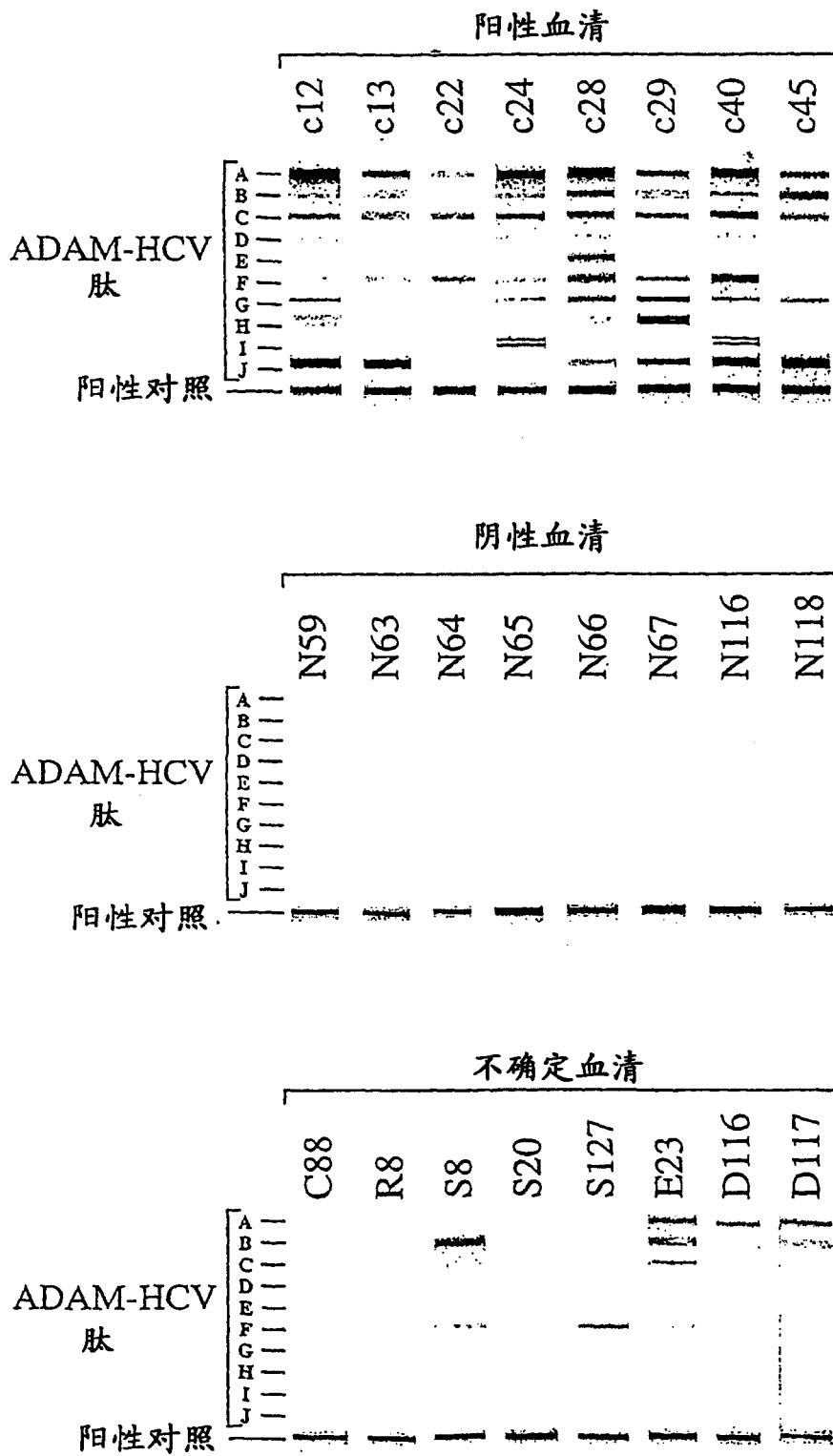


图5

图6



专利名称(译)	使用抗原模拟物的传染原的检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN1455866A</a>	公开(公告)日	2003-11-12
申请号	CN00820000.9	申请日	2000-11-03
[标]发明人	F·费利西 N·加尔加诺 O·米年科娃 P·莫纳西		
发明人	F·费利西 N·加尔加诺 O·米年科娃 P·莫纳西		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/29 C07K14/18 G01N33/576 C07K7/08 C12N15/10		
CPC分类号	G01N33/5767 C12N2770/24222 C12N2770/24022 A61K39/00 C07K14/005		
代理人(译)	程泳		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

用于对抗原作诊断的方法，其包括通过用抗原模拟物的抗体检测(ADAM)方法学鉴定血清中抗抗原的抗体分子的结合特异性，用抗原模拟物的抗体检测方法学包括用来自受到抗原感染的病人和非感染个体的血清筛选噬菌体文库，从而鉴定结合与该抗原特异相关的抗体(配体)的肽。通过体外成熟策略以及将配体连接到共同核心上(例如MAP)可获得该方法的改进。特别地，该方法应用于HCV。

