



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102084252 A

(43) 申请公布日 2011.06.01

(21) 申请号 200980125645.5 (51) Int. Cl.
G01N 33/53(2006.01)
(22) 申请日 2009.05.01 G01N 35/02(2006.01)
(30) 优先权数据
61/050039 2008.05.02 US
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010.12.31
(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2009/042565 2009.05.01
(87) PCT申请的公布数据
W02009/135152 EN 2009.11.05
(71) 申请人 罗切斯特大学
地址 美国纽约州
(72) 发明人 B·L·米勒 T·R·莫斯曼
D·托普汉 C·R·梅斯
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 权陆军 郭文洁

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 13 页

(54) 发明名称

用于流感免疫应答测量的阵列检测器系统

(57) 摘要

一种用于检测针对流感病毒的免疫应答的传感器芯片,所述传感器芯片包括具有表面的基板和与所述基板的表面上的离散位置结合的多个血细胞凝集素多肽,各血细胞凝集素多肽具有血细胞凝集素表位。本文还描述含有所述传感器芯片的检测装置和检测流感免疫应答的方法。

1. 一种用于检测针对流感病毒的免疫应答的传感器芯片,所述传感器芯片包括具有表面的基板和与所述基板的所述表面上的离散位置结合的多个血细胞凝集素多肽,各血细胞凝集素多肽包含血细胞凝集素表位。

2. 根据权利要求1所述的传感器芯片,其中所述血细胞凝集素多肽是全长血细胞凝集素蛋白。

3. 根据权利要求1所述的传感器芯片,其中所述血细胞凝集素多肽是全长血细胞凝集素蛋白的片段。

4. 根据权利要求3所述的传感器芯片,其中所述血细胞凝集素多肽片段包含免疫显性血细胞凝集素表位。

5. 根据权利要求1所述的传感器芯片,其中所述传感器芯片适用于阵列成像反射测量术(“AIR”)检测系统、表面等离子体共振(“SPR”)检测系统、Brewster角离散干涉测量术(“BASI”)检测系统或椭圆对称法。

6. 根据权利要求1所述的传感器芯片,其中所述血细胞凝集素多肽通过戊二醛接头结合所述基板。

7. 根据权利要求1所述的传感器芯片,其中各离散位置包含的血细胞凝集素多肽的浓度为约 $100\text{fg}/\text{mm}^2$ 至约 $100\text{ng}/\text{mm}^2$ 。

8. 根据权利要求1所述的传感器芯片,还包含与所述基板的所述表面上的离散位置结合的多个神经氨酸酶多肽,各神经氨酸酶多肽包含神经氨酸酶表位。

9. 根据权利要求8所述的传感器芯片,其中所述神经氨酸酶多肽是全长神经氨酸酶蛋白。

10. 根据权利要求8所述的传感器芯片,其中所述神经氨酸酶多肽是全长神经氨酸酶蛋白的片段。

11. 根据权利要求10所述的传感器芯片,其中所述神经氨酸酶多肽片段包含免疫显性神经氨酸酶表位。

12. 一种检测系统,包含:

根据权利要求1所述的传感器芯片;

被定位以照射所述芯片的光源;以及

检测器,所述检测器被定位以检测从所述芯片表面反射的光线,从而测定抗体是否结合所述血细胞凝集素多肽。

13. 一种检测系统,包含:

根据权利要求8所述的传感器芯片;

被定位以照射所述芯片的光源;以及

检测器,所述检测器被定位以检测从所述芯片表面反射的光线,从而测定抗体是否结合所述血细胞凝集素多肽或神经氨酸酶多肽。

14. 一种流通池,包括:

具有入口和出口的基底;

透光盖,所述透光盖以基本上流体密封的方式设置在所述基底上,并且和所述基底形成隔室,通过所述隔室流体可以从所述入口流到所述出口;和

根据权利要求1所述的传感器芯片;所述传感器芯片位于所述隔室中,并且通过所述

透光盖暴露于入射光,从而用于以合适的入射角照射所述芯片表面的入射光在不存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下实现几乎完全相消干扰的条件。

15. 一种检测系统,包含:

根据权利要求 14 所述的流通池;

和所述流通池的所述入口流体连通的流体样品源;

被定位以照射所述芯片的光源;以及

检测器,所述检测器被定位以检测从所述芯片表面反射的光线,其中所述照射光的所述入射角适于产生下列条件:在不存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下几乎完全相消干扰和在存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下光反射率的实质性改变。

16. 根据权利要求 15 所述的检测系统,其中 (i) 所述光源发射偏振光或 (ii) 所述系统还包含至少一个偏振器,所述偏振器位于所述光源和所述芯片之间并位于从所述光源发射的光程中。

17. 根据权利要求 16 所述的检测系统,其中所述光源使所述光线以非法线入射角导向覆层。

18. 根据权利要求 15 所述的检测系统,其中 (i) 所述光源发射偏振光或 (ii) 所述系统还包含至少一个偏振器,所述偏振器位于所述光源和所述芯片之间并位于从所述光源发射的光程中。

19. 根据权利要求 18 所述的检测系统,其中所述光源使所述光线以非法线入射角导向覆层。

20. 根据权利要求 15 所述的检测系统,其中所述检测器是捕获所述芯片表面的至少实质性部分的图像的成像阵列。

21. 根据权利要求 15 所述的检测系统,其中所述检测器是捕获所述芯片表面的至少实质性部分的图像的成像阵列。

22. 一种传感抗-流感抗体的方法,该方法包括:

提供根据权利要求 12 或权利要求 13 所述的检测系统;

在所述传感器芯片表面处导向光线;

在有效地允许样品中的抗-流感抗体特异性结合被所述抗体识别的血细胞凝集素多肽的条件下使所述传感器芯片和样品接触;以及

在有效地鉴定结合所述样品的抗体的血细胞凝集素多肽的条件下检测从所述芯片反射的光线。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述检测通过 AIR 检测系统、SPR 检测系统、BASI 检测系统或椭圆对称法来进行。

24. 一种传感抗-流感抗体的方法,该方法包括:

提供根据权利要求 15 所述的检测系统;

以有效地导致几乎完全相消干扰的条件的方式在所述传感器芯片处导向光线;

将流体样品加入所述流通池;

测量从所述芯片反射的光线;以及

基于所述测量的反射光,提供鉴定结合所述流体样品的抗体的血细胞凝集素多肽的输出。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述测量反射光还包括捕获所述芯片表面的至少实质性部分的图像。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述流体是水溶液。

27. 一种筛选流感疫苗的效力的方法,包括:

将流感疫苗施用至一个或多个个体;

从所述一个或多个个体获得血清样品;以及

进行权利要求 22 所述的方法,以测量由所述流感疫苗产生的抗-流感免疫应答。

28. 一种筛选流感疫苗的效力的方法,包括:

将流感疫苗施用至一个或多个个体;

从所述一个或多个个体获得血清样品;以及

进行权利要求 24 所述的方法,以测量由所述流感疫苗产生的抗-流感免疫应答。

29. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述样品得自选自人和非人灵长动物、家畜、驯化动物以及野生动物的个体。

30. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述样品得自选自人和非人灵长动物、家畜、驯化动物以及野生动物的个体。

31. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述样品得自选自人和非人灵长动物、家畜、驯化动物以及野生动物的个体。

32. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述样品得自选自人和非人灵长动物、家畜、驯化动物以及野生动物的个体。

用于流感免疫应答测量的阵列检测器系统

[0001] 该申请要求 2008 年 5 月 2 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/050,039 的权益,其通过引用的方式整体并入。

[0002] 该发明使用由国立卫生研究院授予的授权号 R24-AL054953 下的政府资助来进行。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及设计用于检测对于特定抗原的免疫应答的传感器芯片,其可用于检测个体之前暴露于具有抗原的病原体,以为了流行病学目的来监测在个体群中传染的程度,或测量疫苗针对所述病原体的效力。

背景技术

[0004] 流感病毒是膜包围的 (membrane-enclosed) RNA 病毒,其基因组由离散的阴性 - 正义 RNA 的链段构成,并且主要是禽类和人的传染剂 (Lamb et al., "The Gene Structure and Replication of Influenza Virus," *Annu Rev Biochem* 52:467-506 (1983))。负责停靠的流感蛋白,血细胞凝集素 (HA) 和出芽神经氨酸酶 (NA) 锚定于病毒脂质膜中,并且是预防和治疗传染的主要抗原关注点。有三种不同的流感病毒属 - 称为 A、B 和 C,并且通常区别在于结构蛋白 - 其引起不同严重程度的免疫学效果 (Cox et al., "The Molecular Epidemiology of Influenza Viruses," *Semin Virol* 6:359-370 (1995)), 例如和流感有关的典型症状 (Monto et al., "Clinical Signs and Symptoms Predicting Influenza Infection," *Arch Intern Med* 160:3243-3247 (2000))。流感 A 和 B 是最免疫相关的,因为它们的人群中具有共同循环传播的季节传染性 (Lin et al., "Recent Changes Among Human Influenza Viruses," *Virus Res* 103:47-52 (2004)), 并且流感 A 对于所有记录的大流行负责。流感 A 传染除了人的多种不同的动物种,包括鸭子、鸡、猪、鲸、马和海豹。流感 B 病毒通常只传染人。

[0005] 所有三种类型的流感病毒具有由 8 种不同 RNA 螺旋构成的基因组,所述螺旋编码单独基因,并且结合决定病毒类型 A、B 或 C 的核蛋白。实际上,流感基因组由 8 种单独的核酸片构成,当细胞受到多于一种病毒类型的共传染时,其可以一起形成具有新的病毒基因组合的病毒。这些 RNA 螺旋中的两种编码重要的病毒表面蛋白 - 血细胞凝集素和神经氨酸酶,它们嵌入成熟病毒颗粒的脂质双层中。

[0006] 病毒血细胞凝集素和神经氨酸酶的变化决定了病毒亚型。血细胞凝集素负责病毒进入宿主细胞,而神经氨酸酶在新形成的病毒从传染的细胞中释放中是重要的。血细胞凝集素的抗体可以中和病毒,并且是免疫性的主要决定簇。神经氨酸酶的抗体不中和病毒,但是可限制病毒复制和传染过程。特定类型的血细胞凝集素和神经氨酸酶的宿主抗体预防并通常改善相同病毒毒株的将来传染。然而,由于病毒毒株的基因构成是动态和不断变化的,因此在传染一年的过程中获得的通过成功耐受一种毒株而具有的免疫性可能在下一年在抵抗新的重组变异毒株中是无用的。

[0007] 在由于抗原性漂移的过程病毒毒株跟随时间而变化时,流感流行被认为产生。抗原性漂移(由主要病毒抗原基因的突变引起,特别是在血细胞凝集素或神经氨酸酶基因中的突变)导致表面抗原较小改变,并且随着时间基本上连续地发生。当这些改变在基因中的合适位置发生时,它们产生抗体不识别的新的抗原,所述抗体是在之前传染过程中针对其他流感病毒毒株而产生的。

[0008] 流感大流行(或世界范围流行)由于“抗原性转变”而发生。抗原性转变是流感 A 病毒中的突然、主要的改变,其源自在流感 A 毒株中出现的新的血细胞凝集素和/或新的血细胞凝集素和神经氨酸酶蛋白。这种转变通常被认为是在下列条件下产生的:产生病毒基因组 RNA 的新的联合时,可能在非人种中,并且新的联合传播给人。当发生这种抗原性转变时,大部分人对于病毒具有较小保护或没有保护,因此传染可以证明是致命的。

[0009] 周期性地,流感病毒的独特毒株可出现,并且病原体的抗原新颖性导致传染率、传播率和死亡率增加。历史显示这些流感大流行可以是极度致死的。例如,“西班牙流感”(Johnson et al.,“Updating the Accounts:Global mortality of the 1918-1920 “Spanish” Influenza Pandemic,”Bull Hist Med76:105-115(2002))(H1N1;1918-1920 超过 5 千万人死亡)、“亚洲流感”(Rajagopal et al.,“Pandemic(avian) Influenza,”Semin Respir Crit Care28:159-170(2007))(H2N2;1957-1958,1 百万人死亡),和“香港流感”(Shalala et al.,“Collaboration in the Fight Against Infectious Diseases,”Emerg Infect Dis 4:354-357(1998))(H3N2;1968-1969,700,000 死亡)证实病毒的效力和其快速世界范围内传播的能力,另外,传染性毒株可出现的快速性和我们对于它们先天的耐受性也明确地强调。为了抵抗这些大流行,在二十世纪四十年代中期开发了第一种单价和二价流感疫苗,其由灭活流感病毒构成(Henle et al.,“Demonstration of the Efficacy of Vaccination Against Influenza Type A by Experimental Infection of Human Beings,”J Immunol 46:163-175(1943),Francis et al.,“Protective Effect of Vaccination Against Induced Influenza A,”J Clin Invest 24:536-546(1945),Salk et al.,“Protective Effect of Vaccination Against Induced Influenza B,”J Clin Invest24:547-553(1945))。从那之后三价流感疫苗变得标准并且由三种灭活毒株构成(Halperin et al.,“Safety and Immunogenicity of a Trivalent, Inactivated, Mammalian Cell Culture-derived Influenza Vaccine in Healthy Adults, Seniors, and Children,”Vaccine 20:1240-1247(2002)),或由三种活的减毒毒株构成(Belshe et al.,“The Efficacy of Live Attenuated, Cold-adapted, Trivalent, Intranasal Influenzavirus Vaccine in Children,”New Engl J Med 338:1405-1412(1998))—两种流感 A 和一种流感 B—以提供针对共循环传播的季节性毒株的更广的预防措施。由于这些初期努力,已经进行了多种研究,所述研究基于重组技术针对开发改善的更多包膜疫苗以不仅针对当前病毒毒株产生免疫(Kilbourne et al.,“Future Influenza Vaccines and the Use of Genetic Recombinants,”Bull World Health Org 41:643-645(1969),Webby et al.,“Are We Ready for Pandemic Influenza?,”Science 302:1519-1522(2003),Treanor et al.,“Safety and Immunogenicity of a Baculovirus-Expressed Hemagglutinin Influenza Vaccine:A Randomized Controlled Trial,”J Am Med Assoc 297:1577-1582(2007)),还提供针对过去流行的毒株的保护。

[0010] 禽流感,命名为 H5N1,是目前国际上主要研究努力的对象。过去的流感大流行已经证明在缺乏合适的防护时,流感的新和高病原性毒株可以是极度致死的。随着全球人口的增加和国际旅游和贸易的进展,大流行的后果将变得严重。自从其初始在 1997 分离以来 (de Jong et al.,“A Pandemic Warning?”*Nature* 389 :554(1997)),已近报道 380 例 H5N1,导致 240 人死亡 (World Health Organization,“Epidemic and Pandemic Alert and Response :Avian Influenza,”accessed online from the WHO on April 16,2008)。这些报道的情况中的大多数都是从禽类传播至人,但也报道了人与人之间传播的分离的情况 (Ungchusak et al,“Probable Person-to-Person Transmission of Avian Influenza A(H5N1),”*N Engl J Med* 352 :333-340(2005))。

[0011] 近期报道了 A 型 H1N1,猪流感的毒株,其具有独特的基因性能并且能够在人与人之间传播。初始发作出现在墨西哥,但现在病例已经在美国和世界其他地区的大多数城市中心报道。截止 2009 年 4 月 30 日,世界卫生组织已经升至 5 期的警报水平。

[0012] 疫苗作为针对疾病的预防措施是必须的,但是传统药物基治疗法在疫苗供应受到限制或无法获得的情况下、高毒力流行病毒毒株 (例如禽类流感 H5N1) 特别严重的情况下也是需要的 (Kilpatrick et al.,“Predicting the Global Spread of H5N1 Avian Influenza,”*Proc Natl Acad Sci USA*103 :19368-19373(2006))。例如,神经氨酸酶,控制新包装的病毒从宿主细胞膜中释放的流感酶 (Wagner et al.,“Interdependence of Hemagglutinin Glycosylation Neuraminidase as Regulators of Influenza Virus Growth :A Study by Reverse Genetics,”*J Virol* 74 :6316-6323(2000)) 在流感生命周期中是吸引人的药物靶。奥塞米韦 (TAMIFLU™) (Kim et al.,“Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site :Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carboxylic Acid Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity,”*J Am Chem Soc* 119 :681-690(1997)) 是口服活性抗病毒剂,其起到神经氨酸酶的活性位点的转移状态模拟剂的作用。目前显示,世界中心地区开始囤积 TAMIFLU™ 供应 (和其他抗病毒剂,例如在突发流行的情况下 (Moscona et al.,“Neuraminidase Inhibitors for Influenza,”*New Engl J Med*353 :1363-1373(2005)) 扎那米韦 (Itzstein et al.,“Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication,”*Nature*363 :418-423(1993)))。尽管抗病毒剂能够起到治疗效果,预防而不是反应的措施将最终确保针对致死性流感病毒大流行的长期成功,因为很容易出现流感的耐药性形式 (de Jong et al.,“Oseltamivir Resistance During Treatment of Influenza A(H5N1) Infection,”*New Engl J Med* 353 :2667-2672(2005))。源自研究者的生产和扩增重组蛋白和来自编码它们的基因的能力的辅助开发是高通量微阵列。尽管高通量筛选的初始应用集中在基因组阵列 (Schena et al.,“Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns With a Complementary DNA Microarray,”*Science* 270 :467-470(1995), Lipshutz et al.,“High density Synthetic Oligonucleotide Arrays,”*Nat Genet* 21 :20-24(1999)),但是已经发现蛋白微阵列也具有多种显著的应用。例如,通过蛋白微阵列的蛋白组分布研究已经揭示了大量新的相互作用 (MacBeath et al.,“Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination,”*Science*

289 :1760-1763(2000), Michaud et al., "Analyzing Antibody Specificity With Whole Proteome Microarrays," Nat Biotech 21 :1509-1512(2003), Chan et al., "Protein Microarrays for Multiplexed Analysis of Signal Transduction Pathways," Nat Med 10 :1390-1396(2004)。蛋白微阵列已经用于开发抗原蛋白和监控对于它们的人免疫应答 (Davies et al., "Profiling the Humoral Immune Response to Infection by Using Proteome Microarrays :High-Throughput Vaccine and Diagnostic Antigen Discovery," Proc Natl Acad Sci USA 102 :547-552(2005), Li et al., "Protein Microarray for Profiling Antibody Responses to Yersinia pestis Live Vaccine," Infect Immun 73 :3734-3739(2005), Qiu et al., "Antibody Responses to Individual Proteins of SARS Coronavirus and Their Neutralization Activities," Microbes Infect 7 :882-889(2005)。该策略之前没有用于多种同种型流感抗原血细胞凝集素的固定。此外,在这种报道中的各种情况下,使用标记的试剂实现检测。

[0013] 将期望提供固定的抗原同种型阵列,其可用于在使用未标记的试剂的情况下筛选针对传染剂的抗体和包括多种类似特异性(例如在传染剂的不同毒株之间的区分,所述传染剂例如基于由这些传染剂或针对它们的疫苗所产生的免疫应答的流感)的疫苗。考虑到可能的流感大流行,还期望开发能够筛选推定疫苗治疗的针对各种流感毒株的效力和/或交叉保护。此外,在监控疾病的状态和传播时,能够快速筛选禽类流感或其他野生动物和家畜中的毒株存在的系统具有显著的实用性。

[0014] 本发明旨在克服本领域这些和其他缺陷。

发明内容

[0015] 本发明的第一方面涉及用于检测针对流感病毒的免疫应答的传感器芯片。传感器芯片包括具有表面的基板和与所述基板的所述表面上的离散位置结合的多个血细胞凝集素多肽,各血细胞凝集素多肽具有血细胞凝集素表位,优选其免疫显性表位。传感器芯片可以任选地包括与所述基板的所述表面上的离散位置结合的多个神经氨酸酶多肽,各神经氨酸酶多肽具有神经氨酸酶表位。

[0016] 在优选的实施方案中,传感器芯片适用于阵列成像反射测量术("AIR")检测系统、表面等离子体共振("SPR")检测系统、Brewster角离散干涉测量术(Brewster Angle Straddle Interferometry)("BASI")检测系统和椭圆对称检测系统。

[0017] 本发明的第二方面涉及检测系统,其包括根据本发明的第一方面的传感器芯片。检测系统优选包括被定位以照射所述芯片的光源;以及检测器,所述检测器被定位以检测从所述芯片表面反射的光线,从而测定抗体是否结合所述血细胞凝集素多肽。

[0018] 本发明的第三方面涉及用于检测样品中的抗-流感抗体的流通池。流通池包括:具有入口和出口的基底;透光盖,所述透光盖以基本上流体密封的方式设置在所述基底上,并且和所述基底形成隔室,通过所述隔室流体可以从所述入口流到所述出口;并且根据本发明的第一方面的传感器芯片;所述传感器芯片位于所述隔室中,并且通过所述透光盖暴露于入射光,从而用于以合适的入射角照射所述芯片表面的入射光在不存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下实现几乎完全相消干扰的条件,和在存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下实现光反射率的实质性改变的条件。

[0019] 本发明的第四方面涉及检测系统,包含:根据本发明的第三方面的流通池;和所述流通池的所述入口流体连通(fluid communicate)的流体样品源;被定位以照射所述芯片的光源;以及检测器,所述检测器被定位以检测从所述芯片表面反射的光线,其中所述照射光的所述入射角适于产生下列条件:在不存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下几乎完全相消干扰和在存在结合血细胞凝集素多肽的抗体的情况下光反射率的实质性改变。

[0020] 本发明的第五方面涉及传感样品中的抗-流感抗体的方法,该方法包括:提供根据本发明的第二或第四方面的检测系统;在所述传感器芯片表面处导向光线;在有效地允许样品中的抗-流感抗体特异性结合被所述抗体识别的血细胞凝集素多肽的条件下使所述传感器芯片和所述样品接触;以及在有效地鉴定结合所述样品的抗体的血细胞凝集素多肽的条件下检测从所述芯片反射的光线。

[0021] 在优选的实施方案中,检测使用 AIR 检测系统、SPR 检测系统、BASI 检测系统或椭圆对称检测系统来进行。

[0022] 本发明的第六方面涉及使用根本本发明的第四方面的检测系统来传感抗-流感抗体的方法,该方法包括下列步骤:以有效地导致几乎完全相消干扰的条件的方式在所述传感器芯片处导向光线;将流体样品加入所述流通池;测量从所述芯片反射的光线;以及基于所述测量的反射光,提供鉴定结合所述流体样品的抗体的血细胞凝集素多肽的输出。

[0023] 本发明的第七方面涉及筛选流感疫苗的效力的方法。该方法包括下列步骤:将流感疫苗施用至一个或更多个个体;从所述一个或更多个个体获得血清样品;以及进行根据本发明的第五或第六方面的方法,以测量由所述流感疫苗产生的抗-流感免疫应答。

[0024] 含有流感血细胞凝集素多肽阵列的本发明的传感器芯片已被证实在少于 30 分钟内使用无标记“无试剂”技术产生检测结果,并且所述结果显示为和那些通过比较 ELISA 测定衍生的结果一致,而比较 ELISA 测定采用更长的时间来进行并且根据样品和传感器芯片的反应需要加入另外的标记的试剂。因此,本发明提供用于测量疫苗效力和流感病毒毒株的交叉反应性的更快、可靠的检测系统。本文中的实施例证实通过使用 AIR 检测系统来实施,和 ELISA 相比可以在单独试验中筛选在更宽的动态范围的抗体滴度。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 示意性示出 AIR 检测系统。

[0027] 图 2 是本发明的流通池的剖视图,其包括适于在 AIR 检测系统中用于水性环境的传感器芯片。

[0028] 图 3 示意性示出椭圆对称检测系统。

[0029] 图 4A 示意性示出 SPR 检测系统。图 4B 示出 SPR 的输出。

[0030] 图 5A-B 是来自 Genbank 登录 ABW80979(毒株 A/新喀里多尼亚/20/1999, H1N1)(SEQ ID NO:1)、AY531033(毒株 A/怀俄明州/3/2003, H3N2)(SEQ ID NO:2)、EF541403(毒株 A/越南/1203/2004, H5N1)(SEQ ID NO:3)、AF250479(毒株 A/短颈野鸭/香港/W312/199, H6N1)(SEQ ID NO:4)和 NC_004908(毒株 A/香港/1073/1999, H9N2)(SEQ ID NO:5)的血细胞凝集素序列的比对,其均通过引用的方式整体并入。该比对使用 Multalin 版 5.4.1(Corpet, “Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering,” Nucl. Acids Res., 16(22):10881-10890(1988)来制备,其通过引用的方式整体并入。在共有序列(SEQ ID NO:6)中,符号“!”表示 I 或 V,符号“\$”表示 L 或 M,符号“%”表示 F 或 Y 和

符号“#”表示 N、D、Q、E、B 或 Z 中的一个。X 可以是任何氨基酸。共有序列中的大写字母表示绝对保守氨基酸残基 (100% 同一性), 而小写字母表示优势残基 (50-99% 同一性)。

[0031] 图 6 示出血细胞凝集素的三维结构, 不同颜色表示五种 HA 同种型: H1N1、H3N2、H5N1、H6N1 和 H9N2 的序列同源性。‘黑色’表示完全同一性, ‘暗灰色’表示序列类似和 ‘浅灰色’使各种序列符号化。左侧结构是 HA 病毒外结构域刺突的侧视图, 右侧结构是 HA 受体结合位点的俯视图。

[0032] 图 7 示意性示出手工制备本发明的血细胞凝集素阵列的关键。

[0033] 图 8A-B 分别是使用来自疫苗试验对象的未稀释的血清治疗前和后阵列化流感测试芯片的图像。基于选择的抗原斑的反射强度差异的结果图示于图 9 中。

[0034] 图 9 是示出在暴露于来自六个临床对象的血清时所有 HA 同种型的反射率变化量的图。参照图 7 中阵列关键中对于全抗原的描述, α -荧光素对照在图中表示为“抗-F”。

[0035] 图 10 是示出证实 ELISA 和 western 印迹结果的对象样品的 AIR 数据的比较分析的图。对象 1 是对象 056; 对象 2 是对象 080; 安慰剂对照是对象 079。H5 血细胞凝集素是 H5, 3(越南/1203/2004)。

[0036] 图 11 是示出 H5N9 禽类抗血清滴定结果的图。相对于 α -荧光素阴性对照斑中的改变, 将所有反射率变化归一化。重组 GFP 起到第二阴性对照和补充阳性加标对照的作用。IgY 抗体起到试验阳性对照的作用。暴露于单独缓冲液的第二组芯片是 0.0% 对照阵列。

[0037] 图 12 是 H7N3 抗血清试验的 HA 微阵列的 AIR 图像。所述芯片暴露于 10% H7N3 抗血清溶液。各探针类型以一系列印刷 8 次。从左至右, 探针分子是: H1、H3、H5、H6、空白、 α -IgY、 α -IgG 和 α -荧光素。注意 α -荧光素阴性对照不容易看到, α -IgY 在该浓度的抗血清下是几乎没有活性的。

[0038] 图 13 是示出以连续 \log_3 稀释的形式进行的 H7N3 禽类抗血清滴定结果的图。相对于 α -荧光素对照斑将所有变化归一化。将各浓度重复三次。

[0039] 图 14 是显示在 5% 稀释下筛选的对象抗血清的结果的图。“缓冲液”柱对应于来自六个试验的 MPBS-ET 对照芯片的平均值和标准偏差, HA 阵列应答根据对象数量和接受的 H5 剂量 (微克) 标记。

[0040] 图 15 是显示对于从 5% 至 0.04% 的 \log_5 抗血清稀释对象 06FR0033 的接种前和后的反射率变化的比较的图。

[0041] 图 16 是示对于从 5% 至 0.04% 的抗血清滴定对象 06FR0033 的结果的图。

[0042] 图 17A-B 示出人抗血清试验的自动印刷的 HA 微阵列。示出背景图像 (图 17A) 和暴露于 5% 抗血清的试验阵列的图像 (图 17B; 对象 071)。从左至右, 斑身份是 α -IgG、 α -IgM、 α -荧光素、HAS、空白、H1、H3、H5、H6 和 H9。

[0043] 图 18 示出用于安慰剂对象 064 的抗血清滴定。

[0044] 发明详述

[0045] 本发明的一个方面涉及用于检测针对流感病毒的免疫应答的传感器芯片。传感器芯片包括具有表面的基板和与所述基板的所述表面上的离散位置结合的多个血细胞凝集素多肽, 各血细胞凝集素多肽具有血细胞凝集素表位, 优选其免疫显性表位。

[0046] 传感器芯片的总体设计和构造可以根据其应用于的特定检测系统而改变。这些包括例如但不限于设计用于 AIR 检测系统、SPR 检测系统、BASI 检测系统和椭圆对称检测系统

的传感器以及任何其他无标记或荧光标记的阵列技术。

[0047] AIR 检测系统描述于美国专利 No. 7, 292, 349 (Miller et al), 其通过引用的方式整体并入, 该构造示于图 1。系统 10 包括光源 12、偏振器 14、受器 16 (即, 本发明的功能化传感器芯片) 和检测器 18。光源 12 产生和朝向受器的表面传输设定波长的光线 (L)。一个或更多个透镜和滤光器可用于优化所述系统。AIR 利用来自受器上的介质 / 覆层和覆层 / 基板界面的反射之间的干扰, 在使生物分子结合覆层时显示出反射率的变化。实际上, 使用具有氧化物覆层的硅晶片, 入射角和波长的明智选择可使用 s- 偏振光以在不存在靶的情况下 (在该情况下是抗血细胞凝集素抗体) 获得几乎完全相消干扰 (即反射率优选小于约 10^{-5} , 或在一些情况下甚至小于 10^{-6})。在靶结合后除去几乎完全 (或几乎完美) 相消干扰的条件。因此, 甚至更小量的抗 - 血细胞凝集素抗体的高灵敏度检测也是可能的。

[0048] 尽管使用 s- 偏振光的 AIR 已经证明具有高灵敏度, 但是定量检测多种生物分子分析物的简便分析方法, 在上述参考文献美国专利 No. 7, 292, 349 (Miller et al.) 中所述的系统, 更容易在干燥状态下操作, 即, 利用空气 / 氧化物界面而不是水 / 氧化物界面。在水环境中进行 AIR 的改善系统在共同待审美国专利申请 No. 12/261, 818 (Mace et al.) 和 PCT 国际申请 No. PCT/2008/081804 (Mace et al.) 中有所描述, 其通过引用的方式整体并入。基本上, 本文所述的流通池允许 s- 偏振光耦合到水性环境中以检测靶结合。使用该相同的流通池, 其含有功能化有多个血细胞凝集素多肽的传感器芯片, 也在本文的涵盖中。

[0049] 流通池示于图 2 中。流通池包括基底 112、90° 棱镜形式的透光盖 114、位于基底和盖之间的衬垫 116 和一个或更多个安装支架 118, 所述安装支架 118 用于以基本上流体密封的方式固定基底和盖。基底 112 包括形成在其一面中的孔 120 以及分别经过通道 126 和 128 和孔连通 (communicate) 的入口 122 和出口 124。入口 122 和出口 124 形成在基底的相对端上, 使得连通孔 120 的通道 126 和 128 确保当置于孔中时流体流过芯片 130。为了辅助就此而言的流体流过, 凹痕 131 形成在孔的各端出的孔 120 的侧壁中, 使得流体可以容易地从通道 126 流到孔中, 和通过通道 128 从孔中流出。通道 126 和 128 优选设置有配件 132, 其允许导管或其他形式管连接至流通池。例如, 流体样品源可以连接至入口 122, 出口 124 可连接至另外的流体分析仪或仅连接至废液储库。芯片 130 优选通过成角度的芯片支撑器 140 支撑在孔 120 中。

[0050] 在干式和湿式 AIR 系统中, 传感器芯片具有相同的功能构造, 具有基板、基板上的一个或更多个覆层, 然后探针分子 - 在该情况下血细胞凝集素多肽 - 结合覆层表面。在上述参考文献美国专利 No. 7, 292, 349 (Miller et al.), 美国专利申请 No. 12/261, 818 (Mace et al.) 和 PCT 国际专利申请 No. PCT/2008/081804 (Mace et al.) 中所述, 多种不同材料可被选择用于基板和一個或更多个覆层。任何合适基板和覆层的组合都涵盖于 AIR 检测系统中使用的传感器芯片中。

[0051] BASI 检测系统在美国专利公开 No. 20070076214 (Rothberg) 中有所描述, 其通过引用的方式整体并入。类似 AIR 系统, BASI 系统利用来自介质 / 覆层和覆层 / 基板界面的反射之间的干扰, 在使生物分子结合覆层时显示出反射率的变化。所述系统的基本设计类似于图 1 (AIR) 中所述, 但是传感器芯片的结构有区别。BASI 系统功能化有任何基板 / 覆层组合, 其中覆层非常薄 (例如硅上的天然氧化物膜), 并且当两个界面 (基板 / 覆层或覆层 / 介质) 中的一个上的入射角大于其 Brewster 角, 两个界面中的另一者上的入射角小于其

Brewster 角。不同于商业开发用于入射 s- 偏振光的 AIR 系统, BASI 系统依赖 p- 偏振光的检测。作为 Brewster 角离散和 p- 偏振光的结果, 其中覆层厚度 $\ll \lambda$, 反射偏振的相位翻转允许几乎完全相消干扰 (其中反射率优选小于约 10^{-4} , 或甚至在不存在靶结合的情况下小于 10^{-5})。对于 AIR 检测系统, 甚至更小量的抗 - 血细胞凝集素抗体的灵敏度检测也是可能的。

[0052] 椭圆对称检测系统测量反射光的偏振分量作为传感器芯片的表面上覆层厚度改变的度量。当电磁辐射被样品反射或透射时, 椭圆对称法灵敏地检测偏振态的改变。这种椭圆对称检测系统的典型实施方案示于图 3, 包括发射准直光束的光源, 所述准直光束通过由线性偏振器 (P) 和四分之一波长试板 (C) 形式的补偿器的组合提供的可变偏振控制器。偏振光束在已知斜角下入射到传感器表面 (S) 上, 从样品表面反射, 并且通过连接至合适的光检测器 (统称 A) 的第二线性偏振器来分析。在该椭圆对称器构造中, 测量可通过下列方式进行: 改变组件 P 和 A 的方位角, 同时 C 的光学轴保持为恒定方位角 (例如相对于入射面 45°), 直到光检测器接受最小强度。对于该“无效”条件的组件 P、C 和 A 的方位角可用于计算椭圆对称角 Delta 和 Psi, 它们对于在给定入射角和光线波长处的样品的光学参数是特异性的。使用合适的光学模型和数值回归, 量 Delta 和 Psi 可就其生长过程中的光学层的厚度或改变而言重新计算。使用椭圆对称法监控生物分子的结合反应追溯到 1942 (Rothen et al., “Serological Reactions of Protein Films and Denatured Proteins,” J. Exp. Med 76 :437 (1942), 其通过引用的方式整体并入), 其中在结合反应中在表面处吸附的生物材料的量可从量 Delta 和 Psi 来重新计算。

[0053] 成像椭圆对称法, 如美国专利 No. 5, 076, 696 (Cohn et al.) 中所述, 其通过引用的方式整体并入, 使用空间解析检测器和成像光学仪以允许椭圆对称数据的大规模平行测量, 例如以 Delta 和 / 或 Psi 图的形式。这些图可进而转化成层厚度、光学折射率、在阵列上的各斑的吸附的材料的化学组成或量的表面图。利用其内在平行检测方案的成像椭圆对称法可有利地用作这些所谓的生物芯片、微阵列或微板的检测技术 (Eing et al., Imaging Ellipsometry in Biotechnology, ISBN 3-9807279-6-3 (2002), 其通过引用的方式整体并入)。

[0054] 成像椭圆对称法已经证实利用用于测量照射到待测表面上的来自环境介质的光线。其他测量构造基于全内反射, 如美国专利 No. 6, 594, 011 (Kempen,) 中所述, 其通过引用的方式整体并入。此处, 来自光源的光线被导向通过内反射元件以将待检测的样本反射掉。

[0055] 检测信号的改善可使用 SPR 椭圆对称法获得, 如图 4A 中所示。在 SPR 椭圆对称法中使用的基板 232 使用薄金属层 234 以允许表面等离子体的激发和传播。尽管金属层 234 的一侧和透明支撑结构 236 接触, 但是通常连接棱镜 238 以允许光线在斜角下耦合进来, 所述层的另一侧暴露于环境介质 240。在环境中由于形成吸附层 (例如抗体 244 结合表面结合的血细胞凝集素多肽 242) 而导致的光线折射率的改变被监控为入射角的偏移 ($\Delta \theta$), 其产生表面等离子体共振, 从而引起反射光强度改变 (参见图 4B)。对于 SPR 基传感器, 已知金属膜和探测的表面之间的中间电介质层可起到进一步增加灵敏度的构件的作用。

[0056] 一种示例性 SPR 基板在美国专利 No. 7, 332, 329 (Wark et al.) 中有所描述, 其通过引用的方式整体并入。该 SPR 基板特别适用于血细胞凝集素多肽的生物分子阵列, 其中基板包括多个金属岛, 所述金属岛由疏水层或电介质材料包围, 并且血细胞凝集素多肽结

合所述金属岛。

[0057] 无论旨在施用基板的传感器芯片基板或检测系统如何,传感器芯片包括与所述传感器芯片的所述表面结合的多个血细胞凝集素多肽。结合至传感器芯片表面的各血细胞凝集素多肽可以是全长蛋白或其多肽片段。

[0058] 所有生物传感器固有的特点,无论标记状态或信号转导的方式,都是探针固定。二氧化硅表面的末端羟基的作用是在其可起到亲核试剂作用 (Bikiaris et al., “Compatibilisation effect of PP-g-MA copolymer on iPP/SiO₂ nanocomposites prepared by melt mixing,” Eur Polym J 41:1965-1978(2005); Tripp et al., “Chemical Attachment of Chlorosilanes to Silica: A Two-step Amine-promoted Reaction,” J Phys Chem 97:5693-5698(1993), 其均通过引用的方式整体并入) 或支持吸附时是高度挠性的。为此,二氧化硅容易通过多种化学方法来衍生化。这些化学反应导致羟基有效地转变为多种化学官能团中的任一种,包括但不限于胺 (Huang et al., “Directed Assembly of One-dimensional Nanostructures Into Functional Networks,” Science 291:630-633(2001), 其通过引用的方式整体并入) 或卤化物 (Hergenrother et al., “Small-molecule Microarrays: Covalent Attachment and Screening of Alcohol-containing Small Molecules on Glass Slides,” J Am Chem Soc 122:7849-7850(2001), 其通过引用的方式整体并入)。从各初始反应中,第二化学物可加入以进一步改变表面反应性,或探针可直接偶接。另外,多种官能化硅烷,在二氧化硅上偶联和自组装的分子 (Onclin et al., “Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-assembled Monolayers,” Angew Chemie Int Ed 44:2-24(2005), 其均通过引用的方式整体并入) 是市售的,并且可赋予基板表面多种化学前景 (landscape) (胺、环氧化物、链烯烃等)。多种这样的方案一般描述于美国专利 No. 7, 226, 733 (Chan et al.) 和美国专利 No. 7, 292, 349 (Miller et al.), 其均通过引用的方式整体并入。

[0059] 美国临时专利申请序列 No. 61/101, 831 (Mace et al.), 其通过引用的方式整体并入,教导在含有结合至阵列表面的探针分子的制剂中使用非亲核性添加剂。非亲核性添加剂的用量为有效地避免或减小由于反应剂在结合反应剂的阵列上的斑上非均匀分布而引起的表面形态性畸形的严重性。这些表面形态性畸形包括明亮中心斑和“咖啡渍”环(或孔环),其可以干扰在特定斑处靶分子结合的精确检测。换言之,使用有效量的非亲核性添加剂促进反应剂在定位探针的阵列上的各斑上基本上均匀分布。通过均匀分布,旨在使在斑表面上的反应剂浓度的变化最小化(相对于在不存在非亲核性添加剂的情况下制备的斑)。另一种方式表示为,优选在阵列斑上的像素变化小于约10%,更优选变化小于5%,最优选变化小于约3%,变化小于2%,或甚至变化小于约1%。

[0060] 可以使用任何有效量的非亲核性添加剂。典型地,这种有效量为约0.001至约3% v/v,更优选约0.01至约1% v/v。

[0061] 非亲核性添加剂的一个实施方案包括具有下式(I)结构的化合物:



[0063] 其中, n 是 0 至约 250 的整数; m 是 1 至 3 的整数, 优选 1 或 2; 并且 R¹ 和 R² 独立地选自 C1 至 C3 烷基或 R¹ 和 R² 一起形成 C1 至 C3 烷基, 在该情况下式 (I) 的化合物具有环状结构。R¹ 和 R² 优选为甲基或乙基或一起形成乙基。这些添加剂优选分子量为约 5000Da

或更小,更优选约 4000Da 或更小,或约 3000Da 或更小,最优选约 2000Da 或更小,或甚至约 1000Da 或更小。式 (I) 的示例性非亲核性添加剂包括但不限于冠醚 (18-冠-6, 15-冠-5, 12-冠-4 等)、双(2-甲氧基乙基)醚、二烷基醚和聚乙二醇。

[0064] 根据另一个实施方案,非亲核性添加剂是二甲基亚砜 (DMSO)。

[0065] 使用非亲核性添加剂(不参与反应剂(或探针前体)和官能化芯片基板的化学偶接)的益处是添加剂促进探针分子在阵列上的它们各离散位置上的更好的分散。因此该改善的分散使可降低检测系统的灵敏度的表面形态性畸形最小化或完全避免。结果,可以获得检测靶分子的改善的灵敏度。

[0066] 血细胞凝集素(222kDa 的跨膜同源三聚体)是负责通过唾液酸受体介导宿主细胞识别的流感抗原(Copeland et al., "Assembly of Influenza Hemagglutinin Trimers and Its Role in Intracellular Transport," *J Cell Biol* 103:1179-1191(1986), 其通过引用的方式整体并入)。目前,已经鉴定有 16 种主要 HA 同种型(Fouchier et al., "Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype(H16) Obtained from Black-headed Gulls," *J Virol* 79:2814-2822(2005), 其通过引用的方式整体并入),并且分离的病毒血清型和神经氨酸酶都基于它们的决定簇而被分类。当接触宿主时,细胞尝试内吞病毒。内涵体的更低的 pH 环境引起 HA 的显著结构重排(Skehel et al., "Changes in the conformation of Influenza Virus Hemagglutinin at the pH Optimum of Virus-mediated Membrane Fusion," *Proc Natl Acad Soc USA* 79:968-972(1982), 其通过引用的方式整体并入),这导致膜融合,并最终递送病毒有效负荷(Skehel et al., "Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: the Influenza Hemagglutinin," *Annu Rev Biochem* 69:531-569(2000), 其通过引用的方式整体并入)。

[0067] 编码 HA 的病毒 RNA 基因组的区域非常易于突变(Plotkin et al., "Codon Bias and Frequency-dependent Selection on the Hemagglutinin Epitopes of Influenza A Virus," *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7152-7157(2003), 其通过引用的方式整体并入),并且是流感病毒能够回避宿主防御的主要原因。这种类型的进化被分类为‘抗原性漂移’或‘抗原性转变’:‘抗原性漂移’是基因中编码抗原蛋白的突变的自然积累,其中产生抗原的免疫原性的改变(Jin et al., "Two Residues in the Hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like Influenza Viruses are Responsible for Antigenic Drift from A/Panama/2007/99," *Virology* 336:113-119(2005), 其通过引用的方式整体并入)。另一方面,‘抗原性转变’是在两个同时传染宿主细胞的病毒毒株之间产生的显著基因重组,并因此产生免疫学不同的抗原(Laver et al., "Studies on the Origin of Pandemic Influenza III. Evidence Implicating Duck and Equine Influenza Viruses as Possible Progenitors of the Hong Strain of Human Influenza," *Virology* 51:383-391(1973), 其通过引用的方式整体并入)。通过理解和期望两种进化途径,可以通过测序抗原决定簇在系统发育上追踪一种流感血清型至另一种的进程(Lindstrom et al., "Genetic Analysis of Human H2N2 and Early H3N2 Influenza Viruses, 1957-1972: Evidence for Genetic Divergence and Multiple Reassortment Events," *Virology* 328:101-119(2004), 其通过引用的方式整体并入)。例如,以这种方式绘制了人大流行

H2N2 病毒至大流行 H3N2 病毒的偏离的图 (Scholtissek, et al., "On the Origin of the Human Influenza Virus Subtypes H2N2 and H3N2," *Virology* 87:13-20(1978), 其通过引用的方式整体并入)。

[0068] 本发明的传感器芯片阵列旨在包括任何两种或更多种血细胞凝集素多肽, 但优选任何一种或更多种 H1 多肽 (例如来自 H1N1-H1N9 中的那些)、任何一种或更多种 H2 多肽 (例如来自 H2N1-H2N9 中的那些)、任何一种或更多种 H3 多肽 (例如来自 H3N1-H3N9 中的那些)、任何一种或更多种 H4 多肽 (例如来自 H4N1-H4N9 中的那些)、任何一种或更多种 H5 多肽 (例如来自 H5N1-H5N9 中的那些)、任何一种或更多种 H6 多肽 (例如来自 H6N1-H6N9 中的那些)、任何一种或更多种 H7 多肽 (例如来自 H7N1-H7N9 中的那些)、任何一种或更多种 H8 多肽 (例如来自 H8N1-H8N9 中的那些)、任何一种或更多种 H9 多肽 (例如来自 H9N1-H9N9 中的那些)、任何一种或更多种 H10 多肽 (例如来自 H10N1-H10N9 中的那些)、任何一种或更多种 H11 多肽 (例如来自 H11N1-H11N9 中的那些)、任何一种或更多种 H12 多肽 (例如来自 H12N1-H12N9 中的那些)、任何一种或更多种 H13 多肽 (例如来自 H13N1-H13N9 中的那些)、任何一种或更多种 H14 多肽 (例如来自 H14N1-H14N9 中的那些)、任何一种或更多种 H15 多肽 (例如来自 H15N1-H15N9 中的那些)、任何一种或更多种 H16 多肽 (例如来自 H16N1-H16N9 中的那些)、及其所有可能的组合。任何新发现的血细胞凝集素变体也可加入到本发明的传感器芯片上。

[0069] 除了血细胞凝集素多肽, 本发明的传感器芯片阵列还可以包括任意两种或更多种神经氨酸酶多肽。优选地, 传感器芯片阵列包括任意一种或更多种 N1 多肽 (例如来自 H1N1-H16N1 中的那些)、任意一种或更多种 N2 多肽 (例如来自 H1N2-H16N2 中的那些)、任意一种或更多种 N3 多肽 (例如来自 H1N3-H16N3 中的那些)、任意一种或更多种 N4 多肽 (例如来自 H1N4-H16N4 中的那些)、任意一种或更多种 N5 多肽 (例如来自 H1N5-H16N5 中的那些)、任意一种或更多种 N6 多肽 (例如来自 H1N6-H16N6 中的那些)、任意一种或更多种 N7 多肽 (例如来自 H1N7-H16N7 中的那些)、任意一种或更多种 N8 多肽 (例如来自 H1N8-H16N8 中的那些)、任意一种或更多种 N9 多肽 (例如来自 H1N9-H16N9 中的那些)、及其所有可能的组合。任何新发现的神经氨酸酶变体也可加入到本发明的传感器芯片阵列上。

[0070] 如本领域技术人员所意识到的, 抗原经历翻译后修饰, 这种糖基化可包括在阵列上。例如, 在哺乳动物细胞或 Baculovirus 细胞中血细胞凝集素或神经氨酸酶多肽 (待结合阵列表面) 的重组表达应该导致它们的糖基化。

[0071] 如本领域技术人员所意识到的, 基于发生检测的位置的表面积, 结合芯片上的各离散位置的血细胞凝集素或神经氨酸酶的量可被优化。通过例子的方式, 据信在血细胞凝集素或神经氨酸酶多肽 / 位置的浓度为约 100fg/mm² 至约 100ng/mm²、优选约 1pg/mm² 至约 10ng/mm² 时可以获得最佳结果。

[0072] 本发明中使用的试验 HA 阵列 (下述) 具有不同同种型和分离株。然而这不阻止特异产生的抗血清与表面固定的重组血细胞凝集素的交叉反应性。因此, 为了获得在抗原阵列中的血细胞凝集素之间的细微区别的分子理解, 对来自 H1N1、H3N2、H5N1、H6N1 和 H9N2 毒株 (得自 Genbank- 参见下文材料和方法) 的血细胞凝集素进行多个氨基酸序列比对。如图 5 中所示, 发现 5 种蛋白序列的 24.5% 的氨基酸具有完全同一性, 和另外 42.4% 序列类似性。这认为是高的序列保守百分比, 但这不保证在待被中和抗体识别的蛋白表面上可得

共同表位。

[0073] 因此,获得结构信息以补充序列分析。为此,将来自 1918 流感大流行的 H1N1 血细胞凝集素的已知结构 (Gamblin et al., “The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin,” *Science* 303 :1838-1842 (2004), 其通过引用的方式整体并入) 用作 HA 支架以三维表示序列同源性 (图 6)。HA 结构被染色以可视性表示同一性 (黑色), 类似性 (暗灰色) 和多样性 (浅灰色)。比对研究的结果 (图 5) 示出相当大程度的序列类似性依赖于血细胞凝集素作为可接近的潜在表位的表面。因此,对于抗血清可预计某些程度的同种型之间交叉反应性,特别是当对象 (人或其他) 接种重组病毒外结构域和非天然病毒锚定的血细胞凝集素时。另外,血细胞凝集素的活性位点的俯视图 (图 6) 揭示出在同种型之间蛋白的高度不类似区域。因此,一种同种型的受体结合位点的抗体或小分子抑制剂不太可能针对其他血细胞凝集素具有广泛的活性。

[0074] 血细胞凝集素和神经氨酸酶多肽可使用任何合适的偶接多肽的化学法而偶接至阵列表面。一些不同的结合化学方法描述于上述美国专利 No. 7, 292, 349 (Miller et al.), 其通过引用的方式整体并入。优选的方案,特别对于氧化物覆层,包括使用氨基烷基三烷氧基硅烷,然后使用戊二醛,这赋予能够结合血细胞凝集素或神经氨酸酶多肽的氨基反应性表面。

[0075] 血细胞凝集素或神经氨酸酶多肽结合各离散位置可以手工或使用自动系统来进行。对于手工阵列化,在从 2x 母液 (修饰的磷酸盐 - 缓冲盐水 (“MPBS”)) 至含有 10% 甘油和 0.01% Tween-20 的溶液以 1 : 1 稀释后,多肽溶液可在最终浓度 1-100 μ g/mL、优选 10-60 μ g/mL 下以 $\sim 1 \mu$ L 的体积进行阵列化。在周围环境中孵育 10 分钟后,芯片可浸入阻断缓冲溶液中 (在 HEPES 缓冲盐水 (“HBS”) 中的 1mg/mL 胎牛血清白蛋白 (“BSA”)) 45 分钟,然后用含有另外的 3mM EDTA 和 0.005% Tween-20 (“MPBS-ET”) 的 MPBS 缓冲液冲洗。对于自动阵列化,在从 2x 母液 (MPBS) 至含有 MPBS 中的 0.01-1% (v/v) 12-冠-4 醚的溶液以 1 : 1 稀释后,多肽溶液可在最终浓度 1-100 μ g/mL、优选 40-60 μ g/mL 下使用 Virtek ChipWriter Pro 或可相比装置通过自动印刷来进行阵列化。在微阵列室中在 70 °F、70% 相对湿度下孵育 60 分钟后,芯片可浸入阻断缓冲溶液中 (在 HBS 中的 300 μ g/mL BSA) 60 分钟,然后使用 MPBS-ET 冲洗。

[0076] 一旦制得阵列,传感器芯片可暴露于得自个体的血清样品 (或稀释的血清样品),然后存在 (或不) 一种或更多种特定流感毒株的抗体可以基于在将传感器芯片暴露于血清样品后,检测器输出的变化 (或缺乏变化) 的检测来测定。本领域中熟知的是,不存在可检测的信号并不必然表示抗体不存在而是它们低于检测限,因此不太可能展示出来。图像捕获可通过任何上述检测系统来获得,但优选通过捕获芯片表面的至少实质性部分的图像的图像阵列检测器来获得。对于数百到数十万探针的阵列,自动芯片读取器可被编程以基于捕获的图像来评价阵列上的各斑点的反射率的改变。

[0077] 如本文所使用,获得血清样品的个体可以是任何易于被流感传染的动物,包括人和非人灵长动物、家畜、驯化动物和野生动物 (特别是禽类)。筛选家畜是特别期望的,因为其有用于监控野生动物的流感的传播。血清样品可得自活的个体和死后的尸体。

[0078] 本发明的阵列特别有用于筛选流感疫苗的效力。基本上,阵列优选用于筛选得自个体 (其已经被施用疫苗) 的免疫前和后的血清。在足够时间以允许免疫应答后,获得免

疫后样品,然后针对本发明的阵列筛选。稀释血清样品,通常从约 1 : 20 至约 1 : 2500,可基于阵列的各离散位置上负载的血细胞凝集素或神经氨酸酶的量来优化。然而,在使样品暴露于阵列后,可以通过 AIR、SPR、BASI、椭圆对称法等使用用于读取传感器芯片表面的系统的检测系统来评价抗体-血细胞凝集素或抗体-神经氨酸酶反应性的检测。可以评价免疫反应性的定量测定。

[0079] 如果期望或需要,通过加入第二抗体,例如 IgG 的特异性抗体,可以进一步增强灵敏度。

[0080] 另外的分析可包括但不限于 ELISA、PCR、实时-PCR,质谱法和液相色谱--NMR 光谱法。此外,在使用芯片的过程中检测到存在抗体后,抗体本身可从在使用装置的过程中与之结合的血细胞凝集素或神经氨酸酶多肽中离解。离解可以通过多种方式的任一种来实现,包括但不限于在低 pH 下的甘氨酸溶液、低 pH 水溶液、高 pH 水溶液、洗涤剂溶液(低、中或高浓度)、低浓度变性剂溶液(例如脲)。在离解后抗体(现在没有芯片表面)可以回收,然后如果需要进行分析。取决于随后下游分析的方案,可以直接或在一个或更多个浓缩目标抗体的步骤后使用洗脱的样品。

[0081] 一旦传感器芯片清除之前的结合抗体,传感器芯片可重新使用以筛选其他血清样品是否存在抗-流感抗体。

实施例

[0082] 本发明可通过参照下列例子来进一步阐述。

[0083] 实施例 1-3 的材料和方法

[0084] 血细胞凝集素

[0085] 对于 HA 阵列,下列同种型用于手工和自动阵列(分离自人,除非另有说明):A/新喀里多尼亚/20/1999(H1N1),A/怀俄明州/3/2003(H3N2),A/香港/56/1997(H5N1),A/香港/213/2003(H5N1),A/越南/1203/2003(H5N1),A/短颈野鸭/香港/W312/1997(H6N1),A/香港/1073/1999(H9N2)。所有 HA 购自 Protein Sciences, Corp. (Meriden, CT) 和/或由 David Topham(University of Rochester, Rochester, NY) 的研究组提供。

[0086] 人、禽类和小鼠样品

[0087] 针对 H5 接种的人抗血清从 University of Rochester Retrovirology Lab and Vaccine Evaluation Unit 获得。标记 9 个研究对象:031、033(前和后)、036、037、038、064、067、069 和 071。血清的潜在病原性状态是未知的(即,关于 HIV 1/2 的测试的信息等是未知的),这样,当在 BSL-2 实验室中处理样品时要特别注意。针对禽类流感毒株 H5N9 和 H7N3 的鸡抗血清由 Cornell University 的 Whittaker lab of the College of Veterinary Medicine 惠赠。阴性对照小鼠血浆得自 University of Rochester Medical Center 的 Pearce Laboratory。在 IP 注射戊巴比妥和心脏右心室穿刺后,收集来自 5 只 4 个月大的雌性 129Sv/J 鼠(原始来源 Taconic,现在室内饲养)的全血样品。将血液在肝素上混合并离心除去红细胞。

[0088] 血细胞凝集素序列比对

[0089] 所有研究的血细胞凝集素的完全氨基酸序列通过 NCBI(Genbank)检索和从基因组核苷酸序列的转化(除了 H1N1,其作为肽序列进行保藏)而定位。各序列的 Genbank

登录号如下,其通过引用的方式整体并入:ABW80979(A/新喀里多尼亚/20/1999,H1N1)(Bragstad et al.,“The Evolution of Human Influenza A Viruses from 1999 to 2006—A Complete Genome Study,”*Virology* 5:40(2008),其通过引用的方式整体并入),AY531033(A/怀俄明州/3/2003,H3N2)(Bragstad et al.,“New Avian Influenza A Virus Subtype Combination H5N7 Identified in Danish Mallard Ducks,”*Virus Res.* 109:181-190(2005),其通过引用的方式整体并入),EF541403(A/越南/1203/2004,H5N1)(World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network,“Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia,”*Emerg. Infect. Dis.* 11:1515-1521(2005),其通过引用的方式整体并入),AF250479(A/短颈野鸭/香港/W312/1997,H6N1)(Hoffmann et al.,“Characterization of the Influenza A Virus Gene Pool in Avian Species in Southern China: Was H6N1 a Derivative or a Precursor of H5N1?,”*J. Virol.* 74:6309-6315(2000),其通过引用的方式整体并入)和 NC_004908(A/香港/1073/1999,H9N2)(Lin et al.,*Avian-to-Human Transmission of H9N2 Subtype Influenza A Viruses: Relationship Between H9N2 and H5N1 Human Isolates*,”*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9654-9658(2000),其通过引用的方式整体并入)。一级结构比对软件 Multalin(v5.4.1)(Corpet, F.,“Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering,”*Nucl Acids Res* 16:10881-10890(1988); Combet et al.,“NPS@: Network Protein Sequence Analysis,”*Trends Biochem Sci.* 25:147-150(2000),其通过引用的方式整体并入)用于比对约 560-570 个氨基酸的各 HA 序列。Multalin 参数被设定以使用同一性符号比较表和同一性评分方法。序列保守性的上限和下限分别设定为 100%和 50%。比对输出示于图 5。

[0090] 为了图示,经解析的血细胞凝集素结构 H1N1 的序列(Combet et al.,“NPS@: Network Protein Sequence Analysis,”*Trends Biochem Sci.* 25:147-150(2000),其通过引用的方式整体并入)(PDB ID:1RUZ)被用作支架,并且使用 MacPymol 提供(DeLano, W. L.,*The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA(2002),其通过引用的方式整体并入)。

[0091] 为了证实各保守的/类似的氨基酸残基的位置,将其序列加入 Multalin 比对算法中;在 MacPymol 中,100%保守的各残基被染色为‘黑色’50%-99%保守的各残基被染色为‘暗灰色’,并且 < 50%保守的各残基被染色为‘浅灰色’。然后血细胞凝集素同源性结构被射线追踪以显示‘刺突’(侧面)和‘活性位点’(俯视)取向(参见图 6)。

[0092] 手工血细胞凝集素阵列试验制备 AIR 基板以使初始 SiO₂ 厚度为 1381 Å,并且使用 PITC 总胺连接化学法(general amine attachment chemistry)进行官能化。用于手工阵列试验的 HA 是 H1N1、H3N2、所有三个 H5N1 和 H6N1。在从 2x 母液(MPBS)至含有 10%甘油和 0.01% Tween-20 的溶液以 1:1 稀释后,HA 在最终浓度 20 μg/mL 下以 1 μL 的体积进行手工阵列化。以相同的体积和缓冲液稀释在最终浓度 50 μg/mL 下将人 IgG(阳性对照)和荧光素抗体阵列化。探针溶液被允许在周围环境下孵育 10 分钟,之后将芯片立即浸入阻断缓冲剂溶液(在 HBS 中的 1mg/mL BSA)45 分钟。然后将芯片用 MPBS-ET 冲洗,并且将 150 μL 100%人血清样品滴在表面上(将发生一些可变的样品稀释)。在 45 分钟的孵育时间后,将芯片用 MPBS-ET 冲洗并加入 MPBS-ET 的振荡浴 5 分钟。然后将芯片用 ddH₂O 冲洗,

在氮气下干燥,并且在 G3 反射计上成像。将各斑的反射值和阴性对照芯片(只有 MPBS-ET)上的相应斑进行比较,并相对于 α -荧光素阴性对照进行归一化。

[0093] 微阵列化血细胞凝集素试验

[0094] 制备 AIR 基板以使初始 SiO_2 厚度为 1393 Å,并且使用戊二醛总胺连接化学法进行官能化。大和微阵列化 HA 测定所要求的氧化物厚度之间的差异推测是通过由于反射光低效地耦合至 G4 反射计检测器而引起的 AIR 反射最小值的轻微扩宽引起的。所有探针斑以 8 个重复印刷。用于手工阵列试验的 HA 是 H1N1、H3N2、H5N1(越南/1203/2003)、H6N1 和 H9N2(只有人抗血清试验)。在从 2x 母液(MPBS)至含有在 MPBS 中的 0.1% 12-冠-4 的溶液以 1:1 稀释后,HA 在最终浓度 40 $\mu\text{g/mL}$ (对于 H9N2 是 50 $\mu\text{g/mL}$)下使用 Virtek ChipWriter Pro 自动印刷。人 IgG 和人 IgM 抗体(阳性对照)在 100 $\mu\text{g/mL}$ 阵列化。人血清白蛋白(HSA)和 α -荧光素(阴性对照)分别在最终浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 在相同缓冲液稀释液中阵列化。使探针溶液在微阵列室中在 70 °F 和 70% 相对湿度下孵育 60 分钟。此后,芯片立即浸入阻断缓冲溶液中(在 HBS 中的 300 $\mu\text{g/mL}$ BSA)60 分钟。然后将芯片用 MPBS-ET 冲洗,并且将 50 μL 人血清样品滴在表面上(将发生一些可变的样品稀释)。在 60 分钟的孵育时间后,将芯片用 MPBS-ET 冲洗并加入 MPBS-ET 的振荡浴 5 分钟。然后将芯片用 ddH_2O 冲洗,在氮气下干燥,并且在 G4 反射计上成像。将各斑的反射值和阴性对照芯片(只有 MPBS-ET)上的相应斑进行比较,并相对于 HSA 阴性对照进行归一化。

[0095] 对于鸡 H5N9 和 H7N3 抗血清试验,所有方法保持相同,不同之处在于排除 H9N2 作为探针(缺乏可利用性),除去 HSA 作为阴性对照,除去 α -IgM 作为阳性对照,并且将 α -IgG 交换为 α -IgY 作为阳性对照。此外,重组绿色荧光蛋白(rGFP)在浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 下阵列化为第二对照。在鸡抗血清存在下,rGFP 起到另外的阴性对照的作用;在低抗血清稀释, α -rGFP 以浓度 5 $\mu\text{g/mL}$ 补充为阳性加标(spike)对照。

[0096] 实施例 1-手工制备的血细胞凝集素阵列

[0097] 进行利用高浓度的手工阵列化的血细胞凝集素的初始试验以研究这些蛋白的阵列能力和合适的初始芯片厚度。在 100 $\mu\text{g/mL}$ A/越南/1203/2004(H5N1),1360 Å 的氧化物被测得为理想膜厚度以给予合适的未结合的探针强度。尽管这些斑是可解析的,但是早期试验的关注在于总胺连接化学法:HA 是同源三聚体的,并且含有约 30 个溶剂可及胺/单体。因此,固定的分子的取向将是完全随机的。低聚状态可确保存在结合特异性抗体的溶剂可及面,但是导致有效的无活性传感器的取向也是可能的。

[0098] 在这些高 HA 浓度下尝试观察在加入对于 A/越南/1203/2004(H5N1)血细胞凝集素(eEnzyme 产品号 IA-005-01000)特异性的抗体后的信号改变失败,推测是因为阻碍大抗体的表位识别的表面处的空间拥挤。理想地,由于各 HA 同种型尺寸相同-序列只有细微差别-用于阵列的溶液浓度均还应该是相同的。A/新喀里多尼亚/20/1999(H1N1)同种型在最低母液浓度 66 $\mu\text{g/mL}$ 下供应,因此是该研究的限制探针;所有探针分子被稀释,使得它们可以补充足够量的由甘油和 Tween-20 构成的稳定溶液。因此,随后试验对于所有 HA 使用 20 $\mu\text{g/mL}$ 作为最终浓度来进行。在表面衍生化的过程中该低浓度和洗涤方案的细微改变使新的最佳芯片初始厚度增加为 1381 Å。试验阵列产生,并且由上述 H1N1 和 H5N1 试验血细胞凝集素探针斑、以及分别 α -IgG 和 α -荧光素的阳性和阴性对照斑构成。这些阵列针对特异性 A/新喀里多尼亚/20/1999(H1N1)抗体(Fitzgerald 产品号 M32210)以及 H5N1 抗

体而进行筛选。这些试验的有意思的结果是 H1N1 抗体似乎优选识别 H5N1 同种型,而 H5N1 抗体仅仅适度识别两种 HA。这并不完全是不可预见的,尽管由于抗血清交叉反应性由序列同源性预测。

[0099] 在用于小规模临床试验的制备中手工产生全 HA 阵列,其含有 6 个同种型与阳性和阴性对照 (图 7)。抗血清得自 6 个不同的对象:在两个分别就诊时 5 个接种各种量的 A/ 香港 /156/1997 (H5N1), 并且 1 个对象只给予安慰剂注射剂 (参见表 1)。所有试验进行盲测。

[0100] 表 1:来自接种变化量的抗原的各对象的传统接种效力试验的表格结果

对象 No.	量 (μg)	ELISA OD	Western 印迹	Neut. 滴度	HAI, 1 滴度	HAI, 3 滴度
056	90/90	1.748	阳性	453	2,560	20
068	90/10	0.652	阴性	14	320	10
[0101] 076	25/25	1.677	阴性	20	n/p	n/p
079	安慰剂	0.235	阴性	10	n/p	n/p
080	25/25	1.856	阳性	80	n/p	n/p
081	90/60	1.160	阴性	14	160	20

[0102] n/p = 试验未进行

[0103] 等份未稀释的血清通过使用下列文献中所述类型的检测系统的 AIR 用在全 HA 阵列上:美国专利申请序列 No. 10/282, 274 (Miller et al.), 2002 年 10 月 28 日提交,现在的美国专利 No. 7, 292, 349, 公布于 2007 年 11 月 6 日,其通过引用的方式整体并入。代表性暴露前和暴露后图像示于图 8A-B 中,而所有芯片的反射率变化的全定量示于图 9 中。

[0104] 重要的是知道:这些研究是进行盲测,事先不知道各对象接种的抗原量,由传统方式监控的抗血清应答的结果,或安慰剂样品的身份。在它们第二次免疫后 7 天对于从对象收集的血清进行传统测定 ELISA、针对抗血清的 western 印迹、病毒中和以及血细胞凝集素抑制 (HAI)。这些结果示于表 1 中。

[0105] 从临床抗血清数据中立即显示一些特征:证实研究具有纯化的抗体。首先,在对新喀里多尼亚 /20/1999 和越南 /1203/2004 血细胞凝集素的应答之间有高度的相关性。其次,与对象无关,来自香港 /156/1997 斑的应答有限。第三,特异性抗血清显示出引起比对其的更高的对一般 HA 表位的应答。然而,特别地,在香港 /156/1997 斑观察到非常少的应答,因为这是用于接种患者群的重组同种型。然而,尽管该同种型已经证实在 T- 细胞测定中的活性,但是不太可能以天然折叠构象存在。另外,产生的反射率变化相对于 HA 探针是特异性的,因为 α - 荧光素对照斑强度改变对于所有测定可忽略 (平均值 5.4 个单位)。考虑到试验使用的未稀释的抗血清,这是异常的结果。

[0106] 比较 AIR 结果和表 1 中示出的常规分析,观察到高度的类似性。来自对象 056 和 080 的样品显示出高的 AIR 反射率 (图 9 和 10)、ELISA OD、良好的中和滴度和阳性 western 印迹。对象 056 示出高的新喀里多尼亚 /20/1999 交叉反应性 (图 9)。对象 068 具有高的 HA 交叉反应性,如 AIR 和 HAI 滴度 (图 9) 所看到的。盲性研究的重要方面是确定是否安慰剂对象可以由 AIR 解析。基于 AIR 结果,安慰剂样品的三个候选物是对象 068、076 和 079。对象 068 由于低的应答而被鉴定,除了新喀里多尼亚 /20/1999 和越南 /1203/2004HA。对象 076 被鉴定因为该样品产生最低的两种总反应性中的一种。对象 079 也被鉴定,因为在所有

H5 血细胞凝集素斑上的低活性。实际上,安慰剂样品的身份稍后被传播为来自对象 079。

[0107] 对象 068 的低反应性可由较小的第二次接种剂量来解释,所述剂量可导致第二免疫应答降低,因此产生更少量的抗体。来自对象 076 的结果更难以解释。可能是 ELISA OD 是误导的,该对象对于接种具有非常弱的免疫应答,或者当香港 /156/1997 血细胞凝集素表面固定时,对于该对象免疫原性 HA 表位不可获得。然而,一种不类似的情况是对象 081。通过传统方法,对象 081 表现出是成功接种的较差候选物,因为它们抗血清中和滴度很低并且 western 印迹是阴性,但是通过 AIR 对象 081 在阵列上积累了一些最高的应答。然而,具有以下可能:通过将这些 HA 束缚到某些表位优选暴露或遮掩的基板表面。因此,对于基于溶液或基于基质的测定,观察的反射率值将失真。

[0108] 重要地,这些结果—使用无标记、“无试剂”技术在不到 30 分钟获得—和通过比较 ELISA 测定衍生的那些结果是完全一致的。

[0109] 实施例 2—禽群 (Avian Flock) 中的病毒监测

[0110] 禽类与人接触是 H5N1 流感病毒传播的主要途径 (Sandrock et al.,“Clinical Review:Update of Avian Influenza A Infections in Humans,”*Crit Care* 11:209 (2007),其通过引用的方式整体并入)。因此,监控全球家禽群的能力对于保护人的健康是关键。另外,监测也是农学和人类学的关注点:截止 2006 年底,超过 240 百万家禽已经被预防性杀死以制止禽流感病毒的传播 (World Organization for Animal Health,Avian influenza :Fact Sheet,accessed April 16,2008,其通过引用的方式整体并入)。

[0111] 鸡 H5N9 和 H7N3 抗血清的样品得自 Cornell University 的 the College of Veterinary Medicine 的 Whittaker lab。H5N9 抗血清将起到替换禽类 H5N1 的作用,而 H7N3 病毒也显示了传染人的可能性 (Tweed et al.,“Human Illness from Avian Influenza H7N3,British Columbia,”*Emerg. Infect. Dis.* 10 :2196–2199 (2004),其通过引用的方式整体并入)。另外,禽类抗血清试验将起到优异的模型系统的作用以同时利用 AIR 方法的改进进行研究。这些试验使用上述自动印刷阵列来进行。

[0112] 对于禽类抗血清试验,产生含有新喀里多尼亚 /20/1999 (H1N1)、怀俄明州 /3/2003 (H3N2)、越南 /1203/2004 (H5N1) 和短颈野鸭 / 香港 /W312/1997 (H6N1) 的阵列。对于这些阵列,加入 α -IgY 阳性对照和 α -荧光素以及重组绿色荧光蛋白 (rGFP) 阴性对照。rGFP 斑将同时起到稀释溶液的阳性加标对照的作用。不幸地,H5N9 抗血清以有限的体积供应,只可以获得最初滴度,示于图 11 中。对于 H3、H5 和 H6 在更高浓度的抗血清处观察到相当大的反射率增加。H3 表现出较低的特异性,因为其不像引入的稀释那样良好地进行滴定,而 H5 和 H6 良好地对应于浓度改变而改变。H1 血细胞凝集素示出对于所有筛选的浓度可忽略的反射率变化。IgY 抗体表现出比期望的、给定的大血清免疫球蛋白浓度更低的活性;例如,当阵列补充另外的 α -人 IgG 列时,人免疫球蛋白-特异性抗体展示出比对于鸡免疫球蛋白的抗体更高的灵敏度 (在 H7N3 抗血清试验的上下文中)。重组 GFP 示出针对鸡抗血清的小的、但是‘活性’非特异性吸附,因为通过将 α -GFP 加入稀释抗血清溶液中,其容易被识别。50% H5N9 抗血清稀释也在一套芯片上进行,但是对于表面的非特异性结合排除结合的可重复的定量。

[0113] 尽管 H5N9 抗血清迅速耗尽,但是至少其提供滴定窗,在其中有效地研究 H7N3 抗血清活性。对于这些试验,稀释窗集中为从 10% 至 0.37% (三个 \log_3 稀释)。处理更稀的

抗血清浓度允许保存和进行大量的重复试验。图 12 示出在暴露于 10% H7N3 抗血清后在 G4AIR 反射计上成像的血细胞凝集素微阵列图像。斑形态是各探针类型典型的。图像的右下角的较大亮点是由反射计成像系统上的颗粒引起的散射。这种反射异常在图像处理过程中容易规避。H7N3 抗血清滴定的结果非常不同于 H5N9 抗血清,如观察到的较大 H3 交叉反应性(图 13)。不幸地,重组 H7N3 血细胞凝集素不是市售的,因此不能在该阵列中实施。对于所有阵列化血细胞凝集素都观察到中度反射率增加,并且在减小的抗血清浓度下所有 HA 信号都滴定良好。AIR 的灵敏度由暴露于 10% 抗血清对 3.33% 抗血清的基板的统计上不同的反射率变化来明确证实。在平均观察到的信号改变中的标准偏差对于更稀的溶液较大,但是这可以由系统误差负责,所述系统误差源自加入靶溶液至湿芯片而引起的另外的样品稀释。

[0114] 如预计的,在 H5N9 和 H7N3 禽类抗血清之间观察到明显的差异。单独高抗血清稀释(如下述人抗血清所进行的)的比较建立在阵列化 HA 之间产生交叉反应性的趋势:H5N9 抗血清特异于 H5,并且在更少程度上特异于 H6,尽管对于 H1 或 H3 血细胞凝集素不展示出反应性;另一方面,H7N3 抗血清显示出在整个血细胞凝集素组的反应性,其中对于 H1 和 H3 具有轻微特异性。这些结果用于准备用于在将来进行的更深入的禽类监测研究,包括更大的 HA 阵列和更多样的家禽群。

[0115] 实施例 3- 较大血细胞凝集素阵列

[0116] 利用下列五种血细胞凝集素同种型使用自动微阵列印刷器来制备阵列:H1 = A/ 新喀里多尼亚 /20/1999 (H1N1); H3 = A/ 怀俄明州 /3/2003 (H3N2); H5 = A/ 越南 /1203/2004 (H5N1); H6 = A/ 短颈野鸭 / 香港 /W312/1997 (H6N1); 和 H9 = A/ 香港 /1073/1999 (H9N2)。一些对照也包括在阵列上,包括人血清白蛋白 (HSA) 作为“归一化”阴性对照,和抗-荧光素作为第二阴性对照元件。针对人 IgG 和人 IgM 的抗体起到阳性对照的作用。

[0117] 尽管最初人抗血清结果在提供下列方面中是成功的:AIR 数据可以提高传统接种测定的结果,但是存在两个不能由常规手工阵列化技术克服的主要限制:扩大阵列以包括增加的探针多余物和通过自动控制印刷阵列的体积和形态来除去“人的可变因素”。如前面章节禽类抗血清试验所证实的,使用自动微阵列仪以控制和可重复的方式来解决两种技术不足。另外,A/ 香港 /1073/1999 (H9N2) 血细胞凝集素补充到全阵列,同时还有两种或更多种对照探针:针对人 IgM 的抗体将起到第二阳性对照的作用 (Lacroix-Desmazes et al., “Analysis of Antibody Reactivities Toward Self Antigens of IgM of Patients with Waldenstrom’s Macroglobulinemia,” *Int Immunol* 9:1175-1183(1997), 其通过引用的方式整体并入), 和人血清白蛋白通过溶液-相位竞争效应,将是有效的另外阴性对照(图 14)。图 17B 示出在暴露于对象 071 的 5% 抗血清后在 G4AIR 反射计上成像的血细胞凝集素微阵列的代表性图像。

[0118] 由对来自随机选择的对象(来自临床群)的血清进行的测定,人抗血清试验的有效地试验滴定范围被测定为在 5% (1 : 20 稀释) 至 0.04% (1 : 2500 稀释) 之间。5% 抗血清被稀释至足以否定来自非特异性结合的信号,而保持大的非饱和反射率增加,并且事实上 0.04% (1 : 2,500 稀释) 被稀释至足以对于大多数样品滴定出至零的反射率变化。对于所有滴定的样品该稀释系列以 \log_5 步骤进行。然而,大部分抗血清只在 5% 稀释下研

究以定量在交叉反应性中的趋势和鉴定潜在的安慰剂对象。基于在上 5% 滴度的低 H5 反射率变化, 来自 06FR0037 和 06FR0069 的样品可能是安慰剂接受者 (图 14)。此外, 抗血清试验的缓冲液对照阵列 ($N = 6$) 被分析以定量阵列 - 至 - 阵列的再现性。对于 α -IgG 斑观察到在对照芯片之间最大的反射率变化 (3.05 ± 8.1), 而大部分可重复的斑是 α -荧光素 (2.66 ± 1.8)。然后测定的“噪音”约 3 个单位, 因此在该范围内的反射率变化被认为是可忽略的。

[0119] 一个对象也具有接种前血清, 其被等分以定量先天耐性和测得 H5 接种的实际保护效果。衍生自对象 06FR0033 的反射率变化指示针对 H3 血细胞凝集素的中等应答, 可能由于衍生自现有流感感染的记忆免疫性和针对 H1 和 H9 血细胞凝集素的细微交叉反应性 (图 15)。然而, 在接种前抗血清等份中只观察到 H5 和 H6 血细胞凝集素的基础识别, 由于这些相互反应在试验的浓度范围内不是可滴定的, 因此推测它们对于那些同种型不是特异性的。然而, 在接种 H5 后, 对象 06FR0033 获得针对阵列中的 H5 和所有 HA 的相当大特异性保护效果 (图 16)。此外, 由于这些相互作用在筛选浓度 -4 个 \log_5 系列稀释 (5%、1%、0.2% 和 0.04%) 内滴定良好, 因此它们确实是特异性免疫应答的结果。

[0120] 此外, 如所预期的, 在稀释过程中在信号中有剂量 - 依赖性改变。AIR 的灵敏度由暴露于小至 0.2% 抗血清的基板的统计上不同的反射率变化来明确证实。

[0121] 安慰剂样品鉴定为衍生自对象 064, 其在图 14 中展示的反射率数据中明确观察到。然后进行全抗血清滴定以监控针对 HA 的信号耗尽的速度。类似于使用对象 033 的接种前样品所观察到的, 在非接种群中存在非常微小地基础识别 H5 和 H6; 然而, 在正常人血清中存在针对 H1、H3 和 H9 血细胞凝集素的抗体。这示于图 18。对于所有通过 AIR 筛选的对象, 通过 National Institutes of Health, John Treanor (University of Rochester, Rochester, NY) 提供 H5 血细胞凝集素抑制数据 (表 2)。除了对象 036 和 067, 在用于接种对象的 H5 的量和它们产生抑制性抗血清能力 (通过 H5HAI 滴度观察) 之间表现出较小的相关性。感兴趣的是, 和在接种过程中检测到的情况相比, 在研究得出结论后 6 个月对象 031 和 036 具有更高的 HAI 滴度 (表 2 中的接种后就诊 1 和 2)。然而, AIR 结果很少有差别。在剂量、HAI 滴度 (接种后就诊 2) 和 AIR 反射率改变之间有明确的差异, 典型为源自衍生自对象 036、067 和 071 的样品。尽管期望由于针对血细胞凝集素 - 特异性表位产生的所有抗体具有引起反射率增加的潜力, 但是并不是抑制活性的那些。然而, 不可能断定通过 AIR 监控的 HA 阵列明确能够识别接种前和后的抗血清以及衍生自安慰剂和试验对象的样品。此外, 关于与 HAI 滴度和接种剂量的一致, 这些结果和从类似进行的 ELISA 和 western 印迹试验中预期的那些一致, 而大量增加可从单独对象衍生的样品获得的数据的量。

[0122] 表 2: 在各个临床研究阶段进行的 H5 血细胞凝集素抑制滴度的比较

[0123]

对象	剂量(μg)	HAI 接种后 1	HAI 接种后 2	HAI 6 个月	AIR 结果
064	0	5.0	5.0	5.0	7.11
037	7.5	5.0	5.0	5.0	42.78
031	7.5	5.0	5.0	10.0	56.94
033	7.5	5.0	7.1	5.0	61.57
071	7.5	5.0	5.0	5.0	77.87
069	15	5.0	5.0	5.0	38.81
038	45	5.0	5.0	5.0	65.83
036	90	28.3	28.3	56.6	59.28
067	90	5.0	160.0	5.0	103.75

[0124] AIR 数据在 5% 抗血清稀释下获得；通过 AIR 筛选的样品等同于在接种后就诊 2 的过程中用于 HAI 研究的样品（两结果加粗）。

[0126] 尽管前述试验使用 AIR 作为无标记传感器平台进行测定，但是本领域技术人员应该意识到 AIR 仅是优选的传感平台，因为其简便、灵敏和适于探针分子的大阵列（在该实施例中是血细胞凝集素同种型）。实际上，涵盖使用这样的阵列传感器，该阵列传感器适用于表面等离子体共振法（“SPR”）检测系统、Brewster 角离散干涉测量术（“BASI”）、椭圆对称法和任何其他无标记或荧光标记的阵列技术。在临床相关幼稚（naive）和产生的免疫状态之间的快速区分明显能够用于任何诊断测定，如果平台高度平行化和定量的情况更是如此。为此，使用抗原性阵列来测定高风险群的疫苗效力和病毒监测已经通过 AIR 证实。和大多数生物分子检测技术（包括 ELISA 和 SPR）一样，该简便直接的测定缺少在抑制性和广泛但仍特异性抗体-配体相互作用之间区分的能力；然而，AIR 的巨大灵敏度和选择性可被利用以探测络合物、对象衍生的样品的免疫学含量，并且增加从传统免疫测定中获得的数据。

[0127] 自动微阵列装置的加入允许阵列重复和高密度地印刷，以允许进行更多更复杂和提供更多信息的测定。此外，G4 反射计的开发允许微阵列明确地解析和成像。这证明是相对于 G3 反射计的主要技术改进，并且是针对这些抗原性阵列优化的明显改善。

[0128] 已经这样描述了本发明的基本概念，对于本领域技术人员而言明显的是上述详细公开旨在仅通过例子的方式提供而非限制性的。尽管本文并未明确表达，但是本领域技术人员将旨在进行各种改变、改善和修改。另外，加工元件或序列的引用顺序、或因此标号、字母或其他标识的使用不旨在将所要求的方法限制为任何顺序，除了可在权利要求中指明的。所述改变、改善和修改旨在暗示，并且在本发明的精神和范围内。因此，本发明只受到所附权利要求及其等同形式的限制。

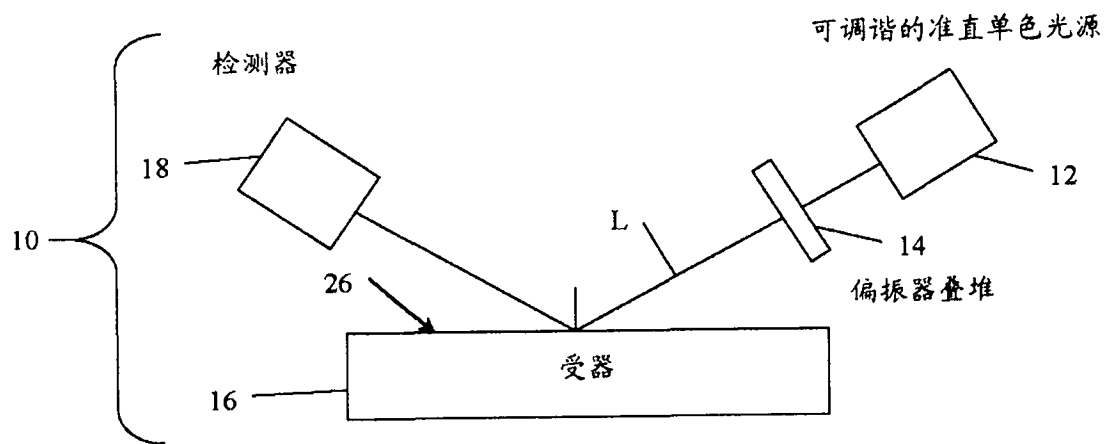


图 1

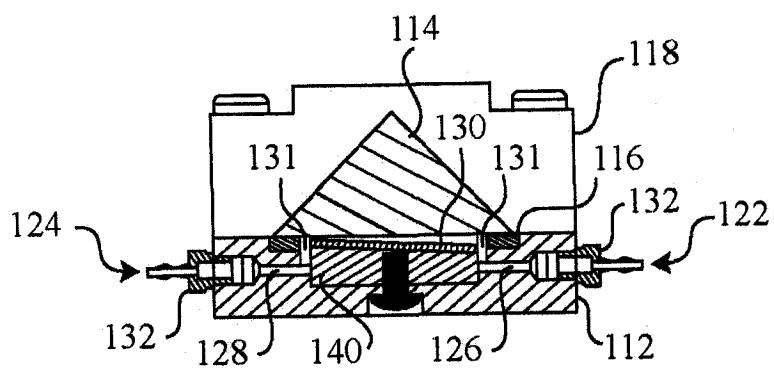


图 2

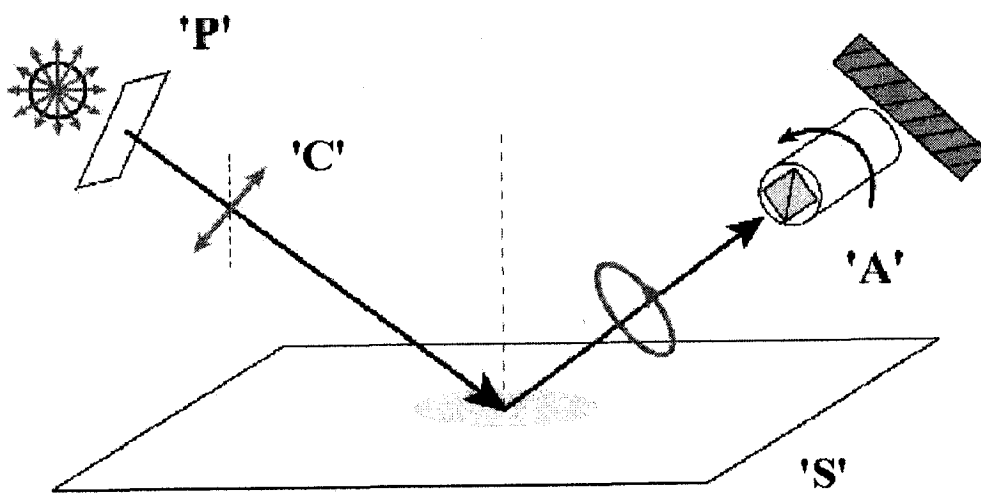


图 3

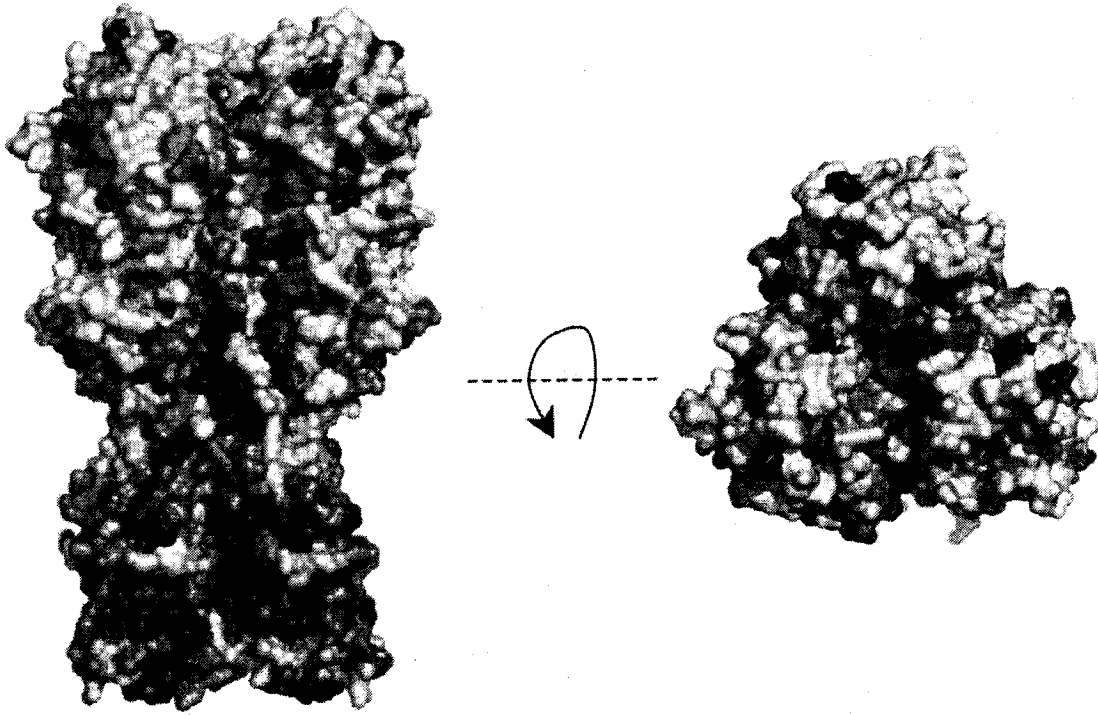


图 6

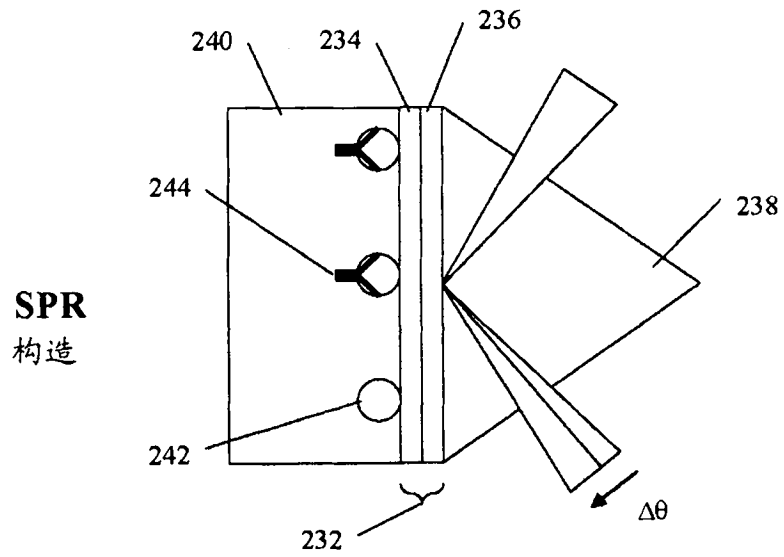


图 4A

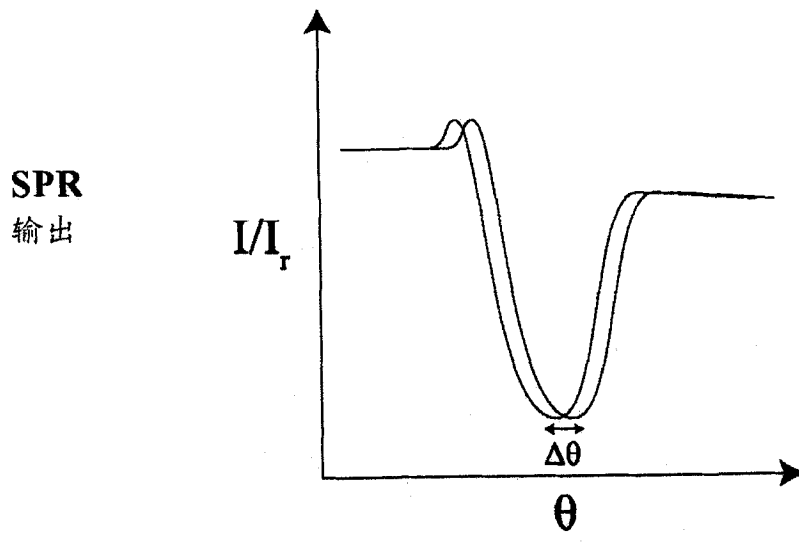


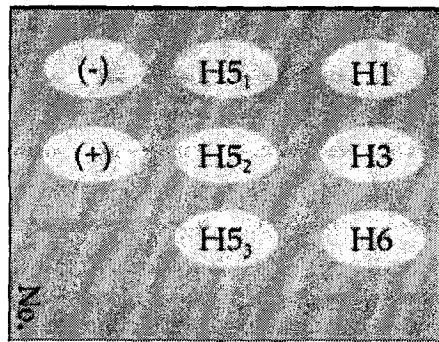
图 4B

	1				50
ABW80979M	KAKLLVLLCT	FTATYADTIC	IGYHANNSTD	TVDTVLEKNV
EF541403	MEKIVLLFAI	VSLVKSDQIC	IGYHANNSTE	QVDTIMEKNV
AF250479	MIAIIVIAIL	AAAGKSDKIC	IGYHANNSTT	QVDTILEKNV
NC_004908ME	TISLITILLV	VTASNADKIC	IGHQSTNSTE	TVDTLTETNV
AY531033		MKTIIALSXI	LCLVFSQKLP	GNDNSTATLC	LGHHAVPNGT
共有序列		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXX1X	XXaXXXdXiC	iGhhaXnstt
					XVdTit#X#!
	51				100
ABW80979		TVTHSVNLE	DSHNGKLCLL	KGIAPLQLGN	CSVAGWILGN
EF541403		TVTHAQDILE	KKHNGKLCDL	DGVKPLILRD	CSVAGWLLGN
AF250479		TVTHSIELLE	NQKEERFCKI	LNKAPLDLRE	CTIEGWILGN
NC_004908		PVTHAKELLH	TEHNGMLCAT	SLGHPLILD	CTIEGLVYGN
AY531033		EVTNATELVQ	SSSTGGICD.	SPHQILDGEN	CTLIDALLGD
共有序列		XVThaX#LlX	XXXXgXXCXX	sXXXpLdlXX	CtXXgXXlG#
					PqCDllXXXX
	101				150
ABW80979		SWSYIVETPN	PENGTCPYGY	FADYEELREQ	LSSVSSFERF
EF541403		EWSYIVEKAN	FVNDLCYPGD	FNDYEELKHL	LSRINHFEDI
AF250479		SWSYIVERPT	AQNGICYPGT	LNEVEELRAL	IGSGERVERF
NC_004908		EWSYIVERSS	AVNGTCYPGN	VENLEELRTL	FSSASSYQRI
AY531033		KWDLFVERSK	AYSN.CYPYD	VPDYASLRLS	VASSGT...L
共有序列		XWsyivErsX	aXngXCYPgX	vX#yeeLRXL	XXSXXXXXrX
					#XfpXsXwXX
	151				200
ABW80979		NHTVTGVSAS	CSHNGKSSFY	RNLLWLTG.K	NGLYPNLSKS
EF541403		HEASLGVSSA	CPYQKSSFF	RNVVWLK.K	NSTYPTIKRS
AF250479		VDTNSGTTRS	CPYSTGASFY	RNLLWIKTK	TAEYPVIKGI
NC_004908		NVTTYGTSSA	CS...GSFY	RSMRWLTQ.K	SGFYVQDAQ
AY531033		GVTQNGTSSA	CKRRSNKSF	SRLNWLTHLK	YK.YPALNVT
共有序列		XvTXXGtsXa	CXXXXXSF%	rX\$XWl tXXK	XXXYPXXXXX
					yXNnXXXXXL
	201				250
ABW80979		VLWGVHHPN	IGNQRALYHT	ENAYVSVVSS	HYSRRFTPEI
EF541403		VLWGIHHPND	AAEQTKLYQN	PTYISVGTG	TLNQRVLPRI
AF250479		YFWGVHHPN	TDEQDTLYGS	GDRYVRMGTE	SMNFAKSPEI
NC_004908		FVWGIHHPPT	YTEQTNLYIR	NDTTTSVTTE	DLNRTFKPVI
AY531033		YIWGVHHPVT	DSDQISLYAQ	ASGRITVSTK	RSQQTVI PNI
共有序列		yXWG!HHPpt	XX#QXXLYXX	XXXXXXvXTX	XX#XtXXPXI
					gXRPXVngXX
	251				300
ABW80979		GRINYWTLL	EPGDTIIFEA	NGNLIAPWYA	FALSRGFGSG
EF541403		GRMEFFWTIL	KPNDAINFES	NGNFIAPEYA	YKIVKKGDS
AF250479		GRIDYYWSVL	KPGETLNVES	NGNLIAPWYA	YKFVNTNSKG
NC_004908		GRIDYYWSVL	KPGQTLRVS	NGNLIAPWYG	H.VLSGGSHG
AY531033		SRISYWTIV	KPGDILLINS	TGNLIAPRGY	FKIRSGKSS.
共有序列		gRIXyYwt!l	KPG#t1XXXS	nGNLIAPwyX	XkXXsgXssg
					XlXrs#lpig

图 5A

	301				350
ABW80979	ECDAKCQTPQ	GAINSSLFPQ	NVHPVTIGEC	PKYVRSACLK	MVTGLRNIPS
EF541403	NCNTKCQTPM	GAINSSMPFH	NIHPLTIGEC	PKYVKSRLV	LATGLRNSPQ
AF250479	NCDATCQTIA	GVLRTNKTFQ	NVSPLWIGEC	PKYVKSESLR	LATGLRNVPQ
NC_004908	NCVVQCQTEK	GGLNSTLPPH	NISKYAFGTC	PKYVRVNSLK	LAVGLRNVPA
AY531033	KCNSECITPN	GSI PNDKPFQ	NVNRITYGAC	PRYVKQNTLK	LATGMRNVPE
共有序列	nCXXXCqTpX	GXiXXXkpFq	NiXXXtXGXC	PkYVkX#XLk	LAtG\$RNiPX
	351				400
ABW80979	IQ....SRGL	FGAIAGFIEG	GWIGMVDGWY	GYHHQNEQGS	GYAADQKSTQ
EF541403	RERRRKKRGL	FGAIAGFIEG	GWQGMVDGWY	GYHHSNEQGS	GYAADKESTQ
AF250479	IE....TRGL	FGAIAGFIEG	GWIGMIDGWY	GYHHENSQGS	GYAADRESTQ
NC_004908	RS....SRGL	FGAIAGFIEG	GWPGLVAGWY	GFQHSNDQGV	GMAADRSTQ
AY531033	KQ....TRGI	FGAIAGFIEN	GWEGMVDGWY	GFRHQNSEGT	GQAADLKSTQ
共有序列	XX....tRGL	FGAIAGFIEg	GWXG\$!dGWY	G&XH&Ns#GX	GXAADXXSTQ
	401				450
ABW80979	NAINGITNKV	NSVIEKMNTQ	FTAVGKEFNK	LERRMENLNK	KVDDGFLDIW
EF541403	KAIDGVTNKV	NSIIDKMNTQ	FEAVGREFNN	LERRIENLNK	KMEDGFLDVW
AF250479	KAVNRTNKV	NSIINKMNTQ	FEAVDHEFSN	LERRIDNLNK	RMQDGFLDVW
NC_004908	KAIDKITSKV	NNIVDKMNQ	YEIIDHEFSE	VETRLNMINN	KIDDQIQDWW
AY531033	AAINQINGKL	NRLIGKTNEK	FHQIEKEFSE	VEGRIQDLEK	YVEDTKIDLW
共有序列	kA!#Xi tXKv	NXi lXKmNXq	%eX!XXEFs#	vEXRi #Xl #k	XX#DXXXDvW
	451				500
ABW80979	TYNAELLVLL	ENERTLDFHD	SNVKNLYEKV	KSQlKNNAKE	IGNGCFEFYH
EF541403	TYNAELLVLM	ENERTLDFHD	SNVKNLYDKV	RLQLRDNAKE	LGNGCFEFYH
AF250479	TYNAELLVLL	ENERTLDMHD	ANVKNLHEKV	KSQLRDNATI	LGNGCFEFWH
NC_004908	AYNAELLVLL	ENQKTLDLHD	ANVNNLYNKV	KRALGSNAME	DGKGCFFELYH
AY531033	SYNAELLVAL	ENQHTIDLTD	SEMKNLFERT	KKQLRENAED	MGNNGCFKIYH
共有序列	XYNAELLVlL	EN#XTlDXhD	s#vnnLX#kv	KXqLrXNAXX	XGnGCFeXyH
	501				550
ABW80979	KCNNECMESV	KNGTYDYPKY	SEESKLNREK	IDGVKLESMG	VYQILAIYST
EF541403	KCDNECMESV	RNGTYDYPQY	SEEARLKREE	ISGVKLESIG	IYQILSIYST
AF250479	KCDNECIESV	KNGTYDYPKY	QTESKLNRLK	IESVKLENLG	VYQILAIYST
NC_004908	KCDDQCMETI	RNGTYNRRKY	REESRLERQK	IEGVKLESEG	TYKILTIYST
AY531033	KCDNACIESI	RNGTYDHDVY	RDEALNNRFQ	IKGVELKSGY	KDWILWI.SF
共有序列	KCD#XCiEs!	rNGTY#XXkY	rXEsXl #RXk	IXgVklEsXg	XyXilXiYst
	551				580
ABW80979	VASSLVLLVS	LGAI SFWMCS	NGSLQCRICI		
EF541403	VASSLALAIM	VAGLSLWMCS	NGSLQCRICI		
AF250479	VSSSLVLVGL	IMAMGLWMCS	NGSMQCRICI		
NC_004908	VASSLVLAMG	FAAFLEWAMS	NGSRCNICI		
AY531033	AISCFLLCVA	LLGFIMWACQ	KGNI RCNICI		
共有序列	vXSslvLXXX	XXafXXWacs	nGsXrCnICI		

图 5B



(-) 对照: α -荧光素
(+) 对照: α -IgG
H1: 新喀里多尼亚 /1999
H3: 怀俄明州 /2003
H6: 短颈野鸭 /香港 /1997
H5₁: 香港 /1997
H5₂: 香港 /2003
H5₃: 越南 /2004

图 7



图 8A



图 8B

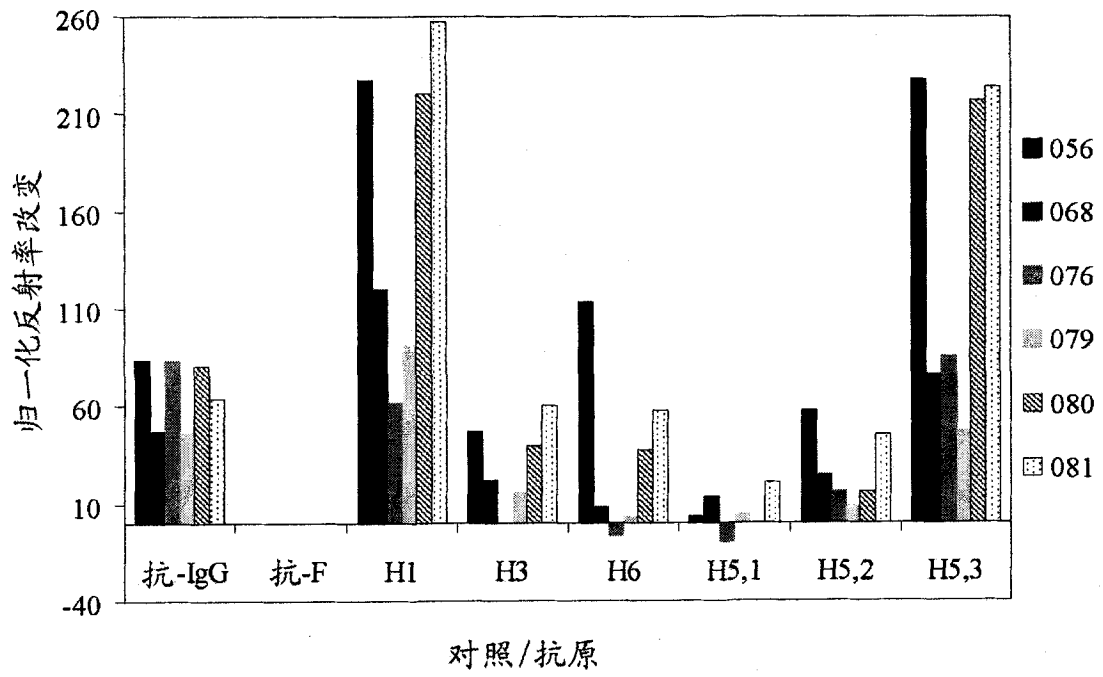


图 9

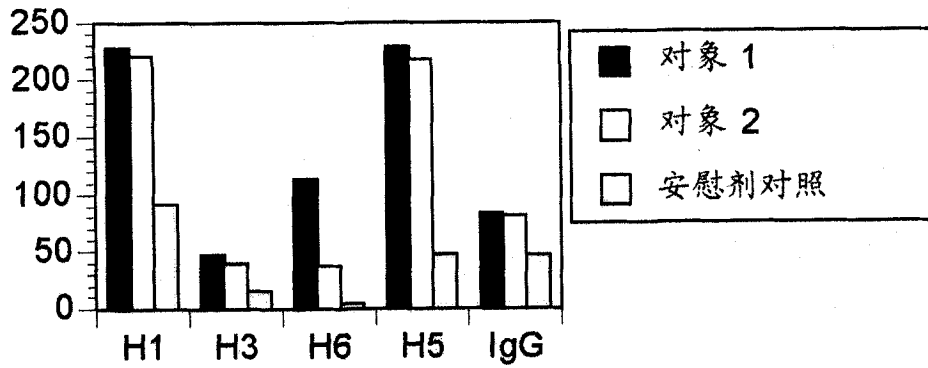


图 10

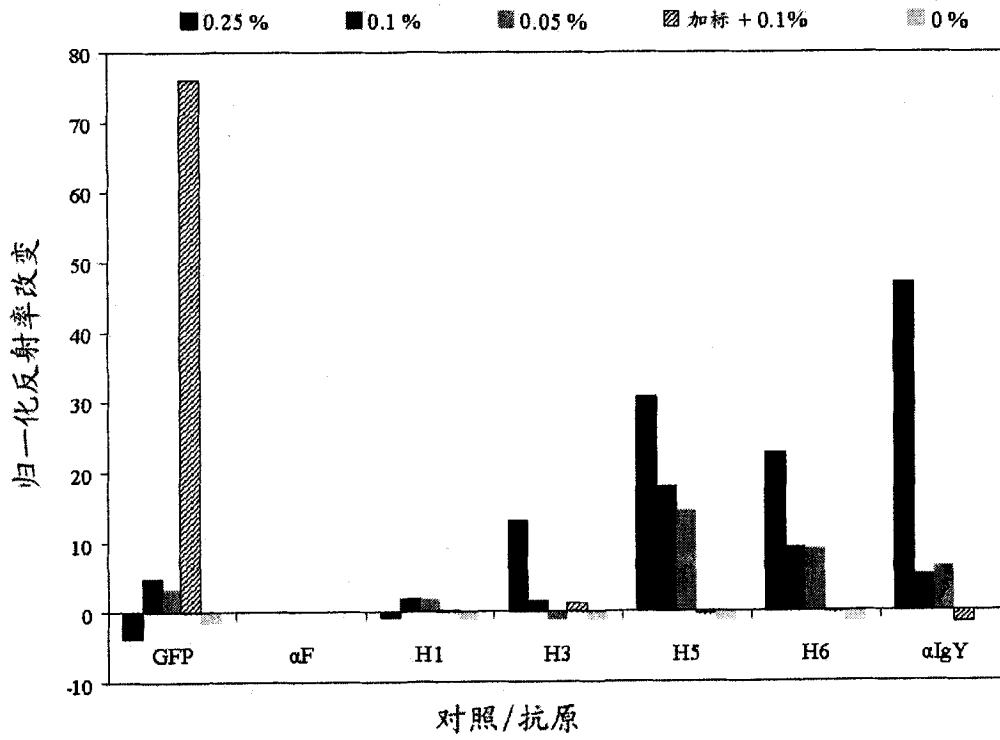


图 11

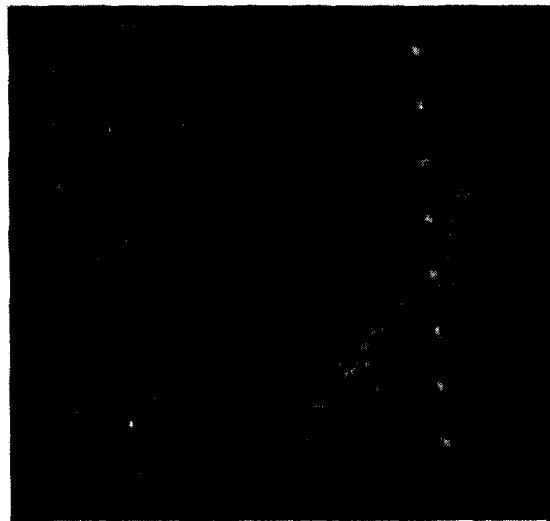


图 12

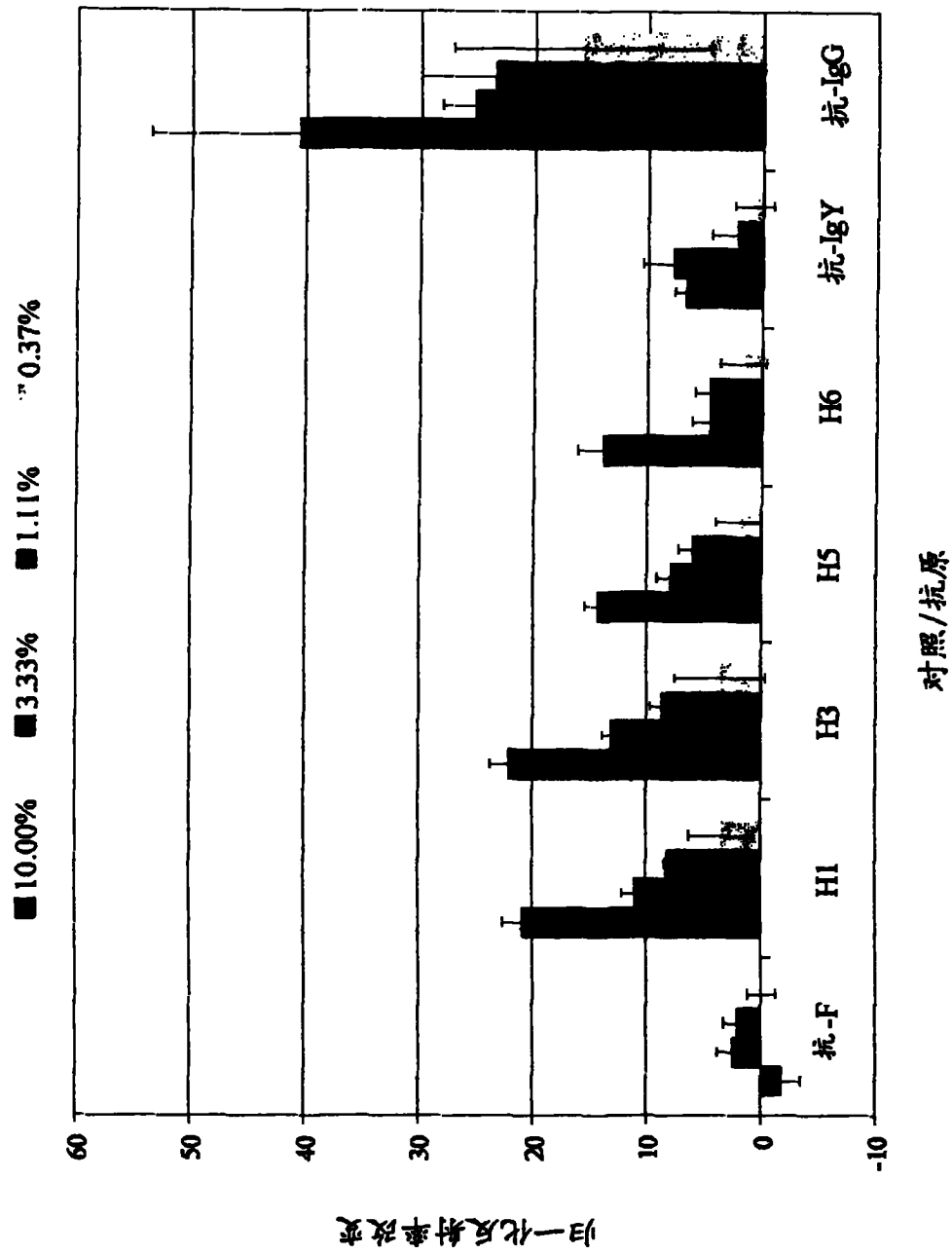


图 13

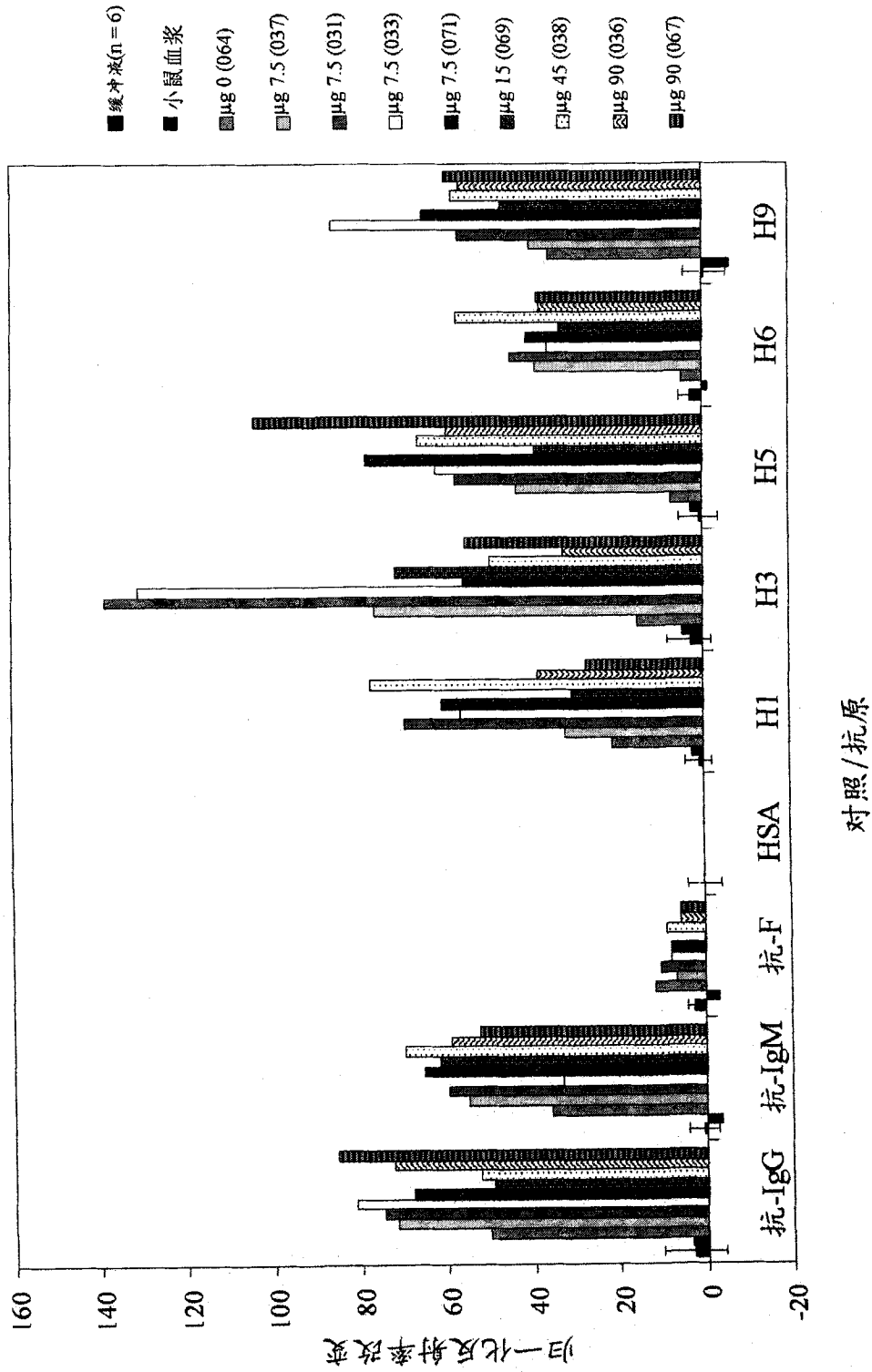


图 14

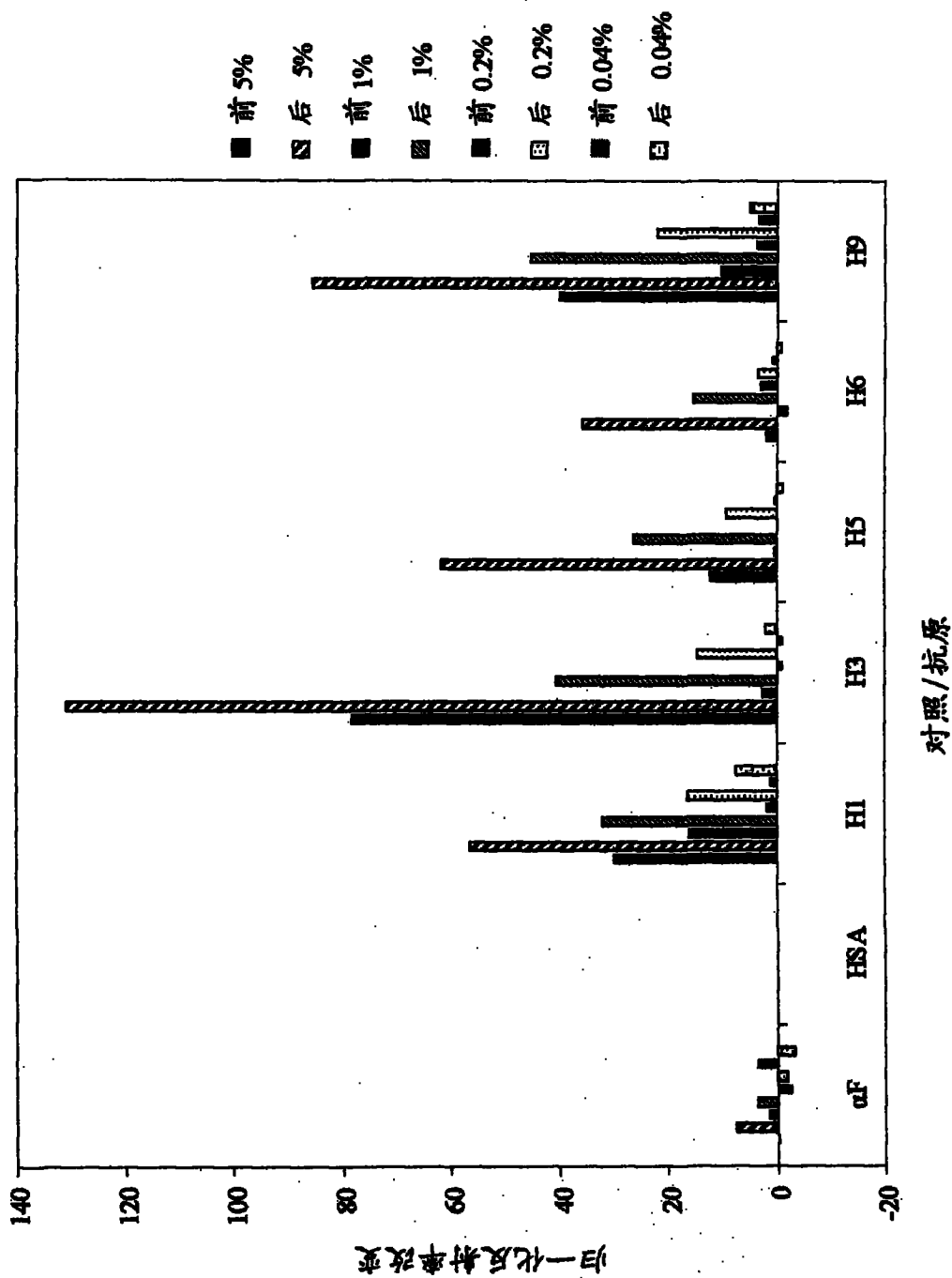


图 15

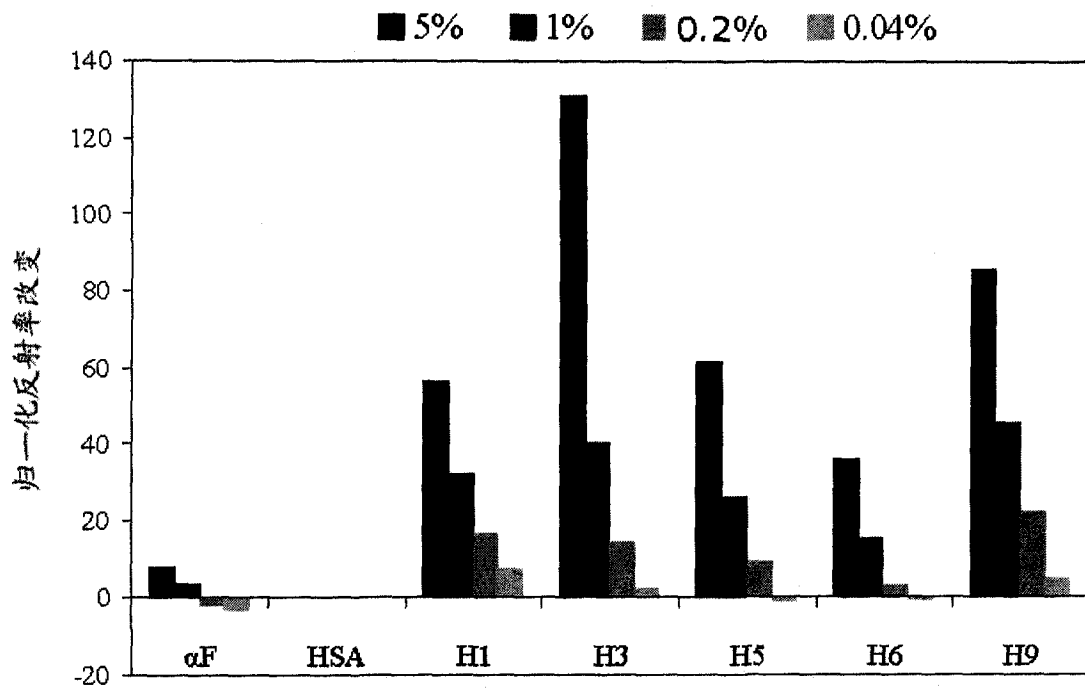


图 16

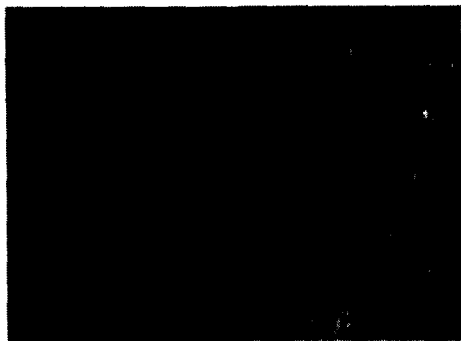


图 17A

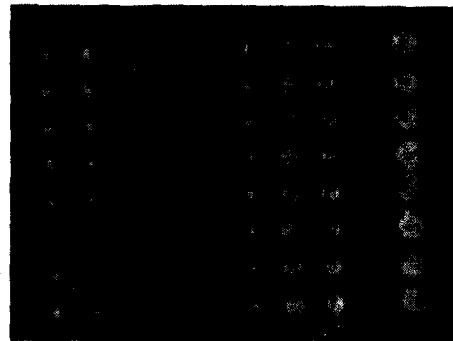


图 17B

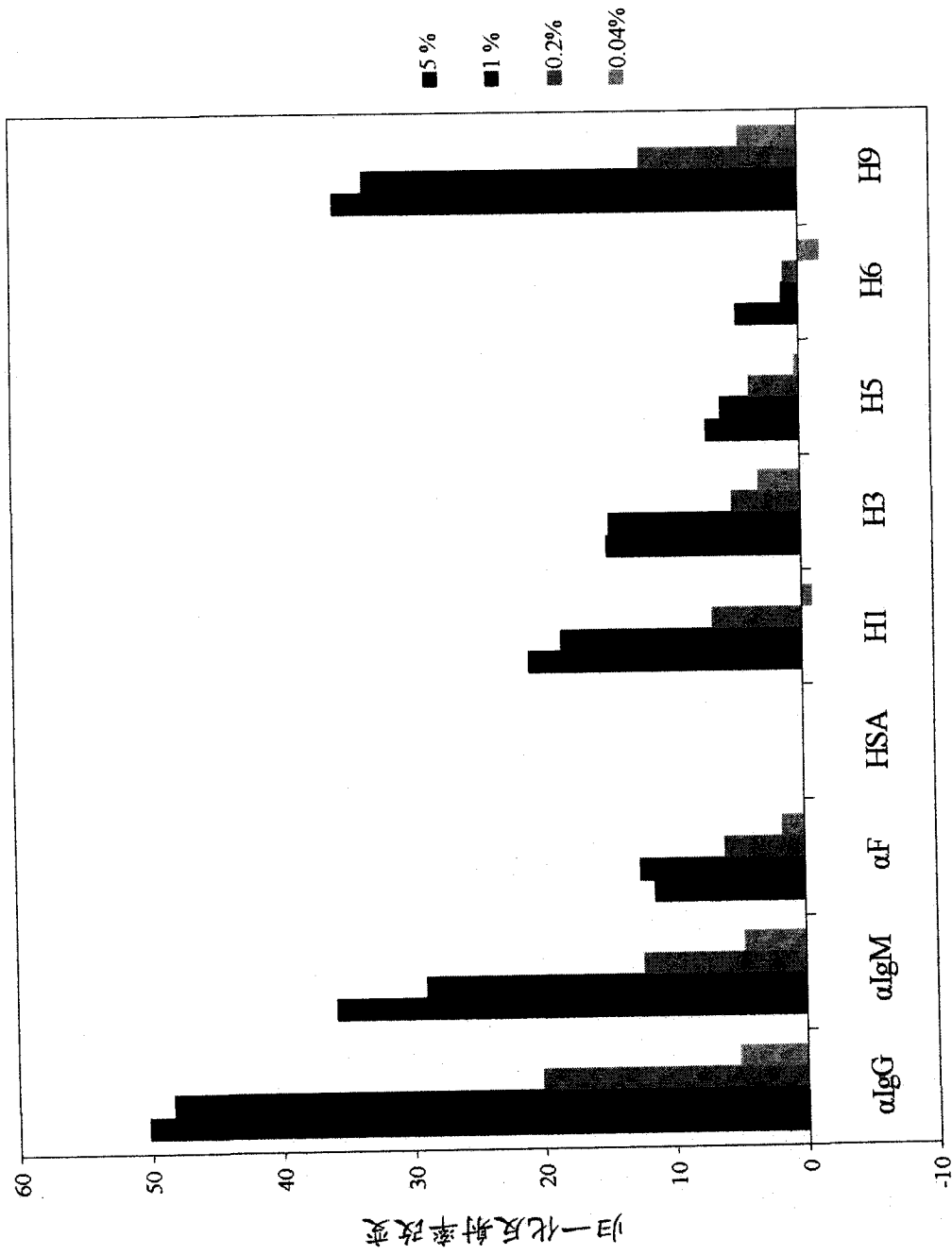


图 18

专利名称(译)	用于流感免疫应答测量的阵列检测器系统		
公开(公告)号	CN102084252A	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	CN200980125645.5	申请日	2009-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	罗彻斯特大学		
申请(专利权)人(译)	罗切斯特大学		
当前申请(专利权)人(译)	罗切斯特大学		
[标]发明人	BL米勒 TR莫斯曼 D托普汉 CR梅斯		
发明人	B·L·米勒 T·R·莫斯曼 D·托普汉 C·R·梅斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N35/02		
CPC分类号	G01N21/553 G01N21/05 G01N33/56983 G01N21/211 G01N2333/11 G01N33/54373 C12N2760/16011 G01N2021/1725 G01N2021/558 G01N2021/5957 G01N2800/52		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	61/050039 2008-05-02 US		
其他公开文献	CN102084252B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测针对流感病毒的免疫应答的传感器芯片，所述传感器芯片包括具有表面的基板和与所述基板的表面上的离散位置结合的多个血细胞凝集素多肽，各血细胞凝集素多肽具有血细胞凝集素表位。本文还描述含有所述传感器芯片的检测装置和检测流感免疫应答的方法。

对象 No.	量 (µg)	ELISA OD	Western 印迹	Neut. 滴度	HAI, 1 滴度	HAI, 3 滴度
056	90/90	1.748	阳性	453	2,560	20
068	90/10	0.652	阴性	14	320	10
076	25/25	1.677	阴性	20	n/p	n/p
079	安慰剂	0.235	阴性	10	n/p	n/p
080	25/25	1.856	阳性	80	n/p	n/p
081	90/60	1.160	阴性	14	160	20