(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102084252 B
(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 200980125645.5

(22)申请日 2009.05.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102084252 A

(43)申请公布日 2011.06.01

(30)优先权数据
61/050039 2008.05.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.12.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/042565 2009.05.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/135152 EN 2009.11.05

(73)专利权人 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

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 35/02(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/076249 A1,2006.04.13,
US 2007/159325 A1,2007.07.12,
US 7255859 B1,2007.08.14,
US 7255859 B1,2007.08.14,
GJ Wegner.Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging.《Analytical chemistry》.2002,第74卷p5161-5168.
R Baggio.摘要,说明书第21-23段).《Journal of Biological》.2005,第280卷(第6期),p4188-4194.

审查员 吕健

权利要求书3页 说明书20页
序列表38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阵列成像反射测量术传感器芯片，所述传感器芯片包括具有表面的基板和来自不同的流感毒株或分离物的多个血细胞凝集素多肽，所述血细胞凝集素多肽各自包含血细胞凝集素表位并且与所述基板的所述表面上的离散位置结合，其中所述血细胞凝集素多肽保持能够与抗流感抗体结合的构象表位，并且其中所述表面在所述芯片上形成覆层使得在缺乏抗体结合下发生照射所述表面的偏振光的相消干扰并且抗体结合产生可检测的反射率变化。

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各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，其中所述血细胞凝集素多肽通过戊二醛接头结合所述基板。

6.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100fg/mm^{2}至100ng/mm^2。

7.根据权利要求1所述的传感器芯片，还包含来自不同的流感毒株或分离物的多个神经氨酸酶多肽，所述神经氨酸酶多肽各自包含神经氨酸酶表位并且与所述基板的所述表面上的离散位置结合，其中所述神经氨酸酶多肽保持能够与抗流感抗体结合的构象表位，并且其中所述表面在所述芯片上形成覆层使得在缺乏抗体结合下发生照射所述表面的偏振光的相消干扰并且抗体结合产生可检测的反射率变化。

8.根据权利要求7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。

9.根据权利要求7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。

10.根据权利要求9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。

11.一种检测系统，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，其中在缺乏抗体结合下发生照射所述表面的偏振光的相消干扰并且抗体结合产生可通过检测器检测的反射率变化。

12.一种检测系统，包含：

根据权利要求7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，其中在缺乏抗体结合下发生照射所述表面的偏振光的相消干扰并且抗体结合产生可通过检测器检测的反射率变化。

13.一种流通池,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。

14.一种检测系统,包含:

根据权利要求13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。

15.根据权利要求14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。

16.根据权利要求15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。

17.根据权利要求14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。

18.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。

19.一种应用阵列成像反射测量术检测抗-流感抗体的非诊断方法,该方法包括:

提供根据权利要求11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。

20.一种应用阵列成像反射测量术检测抗-流感抗体的非诊断方法,该方法包括:

提供根据权利要求14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。

21.根据权利要求20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。

22.根据权利要求20所述的方法，其中所述流体是水溶液。

23.一种筛选流感疫苗的效力的非诊断方法，包括：

提供来自已对其施用流感疫苗的一个或更多个个体的血清样品；以及

进行权利要求19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。

24.一种筛选流感疫苗的效力的非诊断方法，包括：

提供来自已对其施用流感疫苗的一个或更多个个体的血清样品；以及

进行权利要求20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。

25.根据权利要求19所述的方法，其中所述样品来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。

26.根据权利要求20所述的方法，其中所述样品来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。

27.根据权利要求23所述的方法，其中所述样品来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。

28.根据权利要求24所述的方法，其中所述样品来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 lnfluenza Virus,”Annu Rev Biochem52:467-506(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 lnfluenza 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 lnfluenza lnfection,”Arch lntern Med 160:3243-3247(2000))。流感A和B是最免疫相关的，因为它们在人群中具有共同循环传播的季节传染性(Lin et al.,“Recent Changes Among Human lnfluenza Viruses,”Virus Res103:47-52(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”lnfluenza 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)lnfluenza，”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 lnfectious Diseases，”Emerg lnfect 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 lnfluenza Type A by Experimental lnfection of Human Beings，”J lmmunol 46:163-175(1943),Francis et al.，“Protective Effect of Vaccination Against lnduced lnfluenza A，”J Clin lnvest 24:536-546(1945),Salk et al.，“Protective Effect of Vaccination Against lnduced lnfluenza B，”J Clin lnvest24:547-553(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 lmmunogenicity of a Trivalent,lnactivated,Mammalian Cell Culture-derived lnfluenza 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,lntranasal lnfluenzavirus 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 lnfluenza Vaccines and the Use of Genetic Recombinants，”Bull World Health Org 41:643-645(1969),Webby et al.，“Are We Ready for Pandemic lnfluenza?，”Science 302:1519-1522(2003),Treanor et al.，“Safety and lmmunogenicity of a Baculovirus-Expressed Hemagglutinin lnfluenza Vaccine:A Randomized Controlled Trial，”J Am MedAssoc 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 lnfluenza,”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 lnfluenza 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 lnfluenza,”Proc Natl Acad Sci USA103:19368-19373(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.,“lnterdependence of Hemagglutinin Glycosylation Neuraminidase as Regulators of lnfluenza Virus Growth:AStudy 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.,“lnfluenza Neuraminidase lnhibitors Possessing a Novel Hydrophobic lnteraction in the Enzyme Active Site:Design,Synthesis,and Structural Analysis of Carboxylic Acid Sialic Acid Analogues with Potent Anti-lnfluenza 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 etal.,“Neuraminidase lnhibitors for lnfluenza,”New Engl J Med353:1363-1373(2005))扎那米韦(ltzstein et al.,“Rational Design of Potent Sialidase-Based lnhibitors of lnfluenza Virus Replication,”Nature363:418-423(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 lnfluenza A(H5N1)lnfection,”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 lmmune Response to lnfection 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,”lnfect lmmun 73:3734-3739(2005),Qiu et al.,“Antibody Responses to lndividual Proteins of SARS Coronavirus and Their Neutralization Activities,”Microbes lnfect7:882-889(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(“AlR”)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 lnterferometry)(“BASl”)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A1R检测系统、SPR检测系统、BAS1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EL1SA测定衍生的结果一致，而比较EL1SA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A1R检测系统来实施，和EL1SA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A1R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A1R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 1D NO:1)、AY531033(毒株A/怀俄明州/3/2003，H3N2)(SEQ 1D NO:2)、EF541403(毒株A/越南/1203/2004，H5N1)(SEQ 1DNO:3)、AF250479(毒株A/短颈野鸭/香港/W312/199，H6N1)(SEQ 1D NO:4)和NC_004908(毒株A/香港/1073/1999，H9N2)(SEQ 1D 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 1D NO:6)中，符号“!”表示1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个或更多个覆层。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<<λ，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.，lmaging Ellipsometry in Biotechnology，lSBN 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(1)结构的化合物：

[0062] $R^1——O——[(CH_2)_mO]_n——R^2$　　　　(1)

[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R^1和R^2独立地选自C1至C3烷基或R^1和R^2一起形成C1至C3烷基，在该情况下式(1)的化合物具有环状结构。R^1和R^2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(1)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 lnfluenza Hemagglutinin Trimers and lts Role in lntracellular Transport,”J Cell Biol103:1179-1191(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 lnfluenza A Virus Hemagglutinin Subtype(H16) Obtained from Black-headed Gulls,”JVirol 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 confirmation of lnfluenza Virus Hemagglutinin at the pH Optimum of Virus-mediated Membrane Fusion,”Proc Natl Acad Soc USA79:968-972(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 lnfluenza 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 lnfluenza 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-likelnfluenza 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 lnfluenza lll.Evidence lmplicating Duck and Equine lnfluenza Viruses as Possible Progenitors of the Hong Strain of Human lnfluenza,”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 lnfluenza 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 lnfluenza 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/mm^{2}至约100ng/mm^2、优选约1pg/mm^{2}至约10ng/mm^{2}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 lnfluenza Hemagglutinin,”Science303:1838-1842(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1-100μg/mL、优选10-60μg/mL下以～1μL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1-100μg/mL、优选40-60μg/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℉、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300μg/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(或不存在)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(或缺少变化)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血球。

[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,"Virol J 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 Hierarchial 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SiO_2厚度为1381Å,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20μg/mL下以1μL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50μg/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150μL 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ddH_2O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1393Å,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40μg/mL(对于H9N2是50μg/mL)下使用Virtek ChipWriter Pro自动印刷。人IgG和人IgM抗体(阳性对照)在100μg/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200μg/mL和10μg/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℉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300μg/mL BSA)60分钟。然后将芯片用MPBS-ET冲洗,并且将50μL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$_2$O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50μg/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5μg/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100μg/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66μg/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20μg/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(FitzgeraId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

[0101]

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

[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(MiIler et aI.),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他的更高的对一般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的结果更难于解释。可能的是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,因为它们的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 FIock)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 aI.,"CIinicaI Review:Update of Avian InfIuenza 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的。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(WorId Organization for AnimaI HeaIth,Avian infIuenza:Fact Sheet,accessed ApriI 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CorneII University的the CoIIege of Veterinary Medicine的Whittaker Iab。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 aI.,"Human IIIness from Avian InfIuenza H7N3,British CoIumbia,"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萤光蛋白(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,所述系统误差源自由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 aI.,“AnaIysis of Antibody Reactivities Toward SeIf Antigens of IgM of Patients with WaIdenstrom's MacrogIobuIinemia,”Int ImmunoI 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

[0125] 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。

序列表

<110> 罗切斯特大学

<120> 用于流感免疫应答测量的阵列检测器系统

<130> 176/62372 (URMC 1639)

<150> US 61/050,039
<151> 2008-05-02

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 565
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 1

[0001]

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

[0002] Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asn Gln Arg Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala
260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
275 280 285

Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
340 345 350

[0003] Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
500 505 510

Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
515 520 525

[0004] Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 2
<211> 566
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 2

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Gly Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

[0005] Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Ala
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg Arg Ser Asn
145 150 155 160

Lys Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Tyr Lys
165 170 175

Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys
180 185 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Val Thr Asp Ser Asp Gln Ile
195 200 205

Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg
210 215 220

Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Tyr Arg Pro Arg Val Arg
225 230 235 240

Asp Ile Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
245 250 255

Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
260 265 270

[0006] Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
275 280 285

Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
290 295 300

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala
305 310 315 320

Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
325 330 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

[0007] Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 3
<211> 568
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 3

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
[0008] 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

[0009] Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

[0010] Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
[0011] 545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 4
<211> 566
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 4

Met Ile Ala Ile Ile Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ala Gly Lys Ser
1 5 10 15

Asp Lys Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Thr Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Ile Glu Leu

35 40 45

Leu Glu Asn Gln Lys Glu Glu Arg Phe Cys Lys Ile Leu Asn Lys Ala
50 55 60

Pro Leu Asp Leu Arg Glu Cys Thr Ile Glu Gly Trp Ile Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Gln Cys Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Ser Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Arg Pro Thr Ala Gln Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn
100 105 110

Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Leu Ile Gly Ser Gly Glu Arg Val Glu
115 120 125

[0012]

Arg Phe Glu Met Phe Pro Gln Ser Thr Trp Gln Gly Val Asp Thr Asn
130 135 140

Ser Gly Thr Thr Arg Ser Cys Pro Tyr Ser Thr Gly Ala Ser Phe Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Leu Leu Trp Ile Ile Lys Thr Lys Thr Ala Glu Tyr Pro Val
165 170 175

Ile Lys Gly Ile Tyr Asn Asn Thr Gly Thr Gln Pro Ile Leu Tyr Phe
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Thr Asp Glu Gln Asp Thr Leu Tyr
195 200 205

Gly Ser Gly Asp Arg Tyr Val Arg Met Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe

210 215 220

Ala Lys Ser Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Ala Val Asn Gly Gln Arg
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu
245 250 255

Asn Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys
260 265 270

Phe Val Asn Thr Asn Ser Lys Gly Ala Val Phe Arg Ser Asp Leu Pro
275 280 285

Ile Glu Asn Cys Asp Ala Thr Cys Gln Thr Ile Ala Gly Val Leu Arg
290 295 300

[0013]

Thr Asn Lys Thr Phe Gln Asn Val Ser Pro Leu Trp Ile Gly Glu Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Glu Ser Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Val Pro Gln Ile Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Glu Asn Ser Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Arg Glu Ser
370 375 380

Thr Gln Lys Ala Val Asn Arg Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile

385 390 395 400

Asn Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Asp His Glu Phe Ser Asn
405 410 415

Leu Glu Arg Arg Ile Asp Asn Leu Asn Lys Arg Met Gln Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Met His Asp Ala Asn Val Lys Asn Leu His Glu
450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asp Asn Ala Thr Ile Leu Gly Asn Gly
465 470 475 480

[0014]

Cys Phe Glu Phe Trp His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Ile Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Gln Thr Glu Ser Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Leu Lys Ile Glu Ser Val Lys Leu Glu Asn Leu Gly Val Tyr
515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ser Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Gly Leu Ile Met Ala Met Gly Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Met
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile

565

<210> 5
<211> 560
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 5

Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu
20 25 30

Thr Val Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr His Ala Lys
35 40 45

[0015]

Glu Leu Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala Thr Ser Leu
50 55 60

Gly His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Val Tyr
65 70 75 80

Gly Asn Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Arg Glu Trp Ser Tyr
85 90 95

Ile Val Glu Arg Ser Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asn
100 105 110

Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ser
115 120 125

Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Thr Trp Asn Val Thr Tyr
130 135 140

Thr Gly Thr Ser Arg Ala Cys Ser Gly Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg
145 150 155 160

Trp Leu Thr Gln Lys Ser Gly Phe Tyr Pro Val Gln Asp Ala Gln Tyr
165 170 175

Thr Asn Asn Arg Gly Lys Ser Ile Leu Phe Val Trp Gly Ile His His
180 185 190

Pro Pro Thr Tyr Thr Glu Gln Thr Asn Leu Tyr Ile Arg Asn Asp Thr
195 200 205

Thr Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Leu Asn Arg Thr Phe Lys Pro Val
210 215 220

[0016] Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Gln Gly Arg Ile Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn
245 250 255

Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser Gly Gly Ser
260 265 270

His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Lys Gly Gly Asn Cys Val Val
275 280 285

Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu Pro Phe His
290 295 300

Asn Ile Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Thr Cys Pro Lys Tyr Val Arg Val
305 310 315 320

Asn Ser Leu Lys Leu Ala Val Gly Leu Arg Asn Val Pro Ala Arg Ser
325 330 335

Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
340 345 350

Pro Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln
355 360 365

Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp
370 375 380

Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln
385 390 395 400

[0017] Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr Arg Leu Asn
405 410 415

Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Val Trp Ala Tyr
420 425 430

Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu
435 440 445

His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu
450 455 460

Gly Ser Asn Ala Met Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His
465 470 475 480

Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn
485 490 495

Arg Arg Lys Tyr Arg Glu Glu Ser Arg Leu Glu Arg Gln Lys Ile Glu
500 505 510

Gly Val Lys Leu Glu Ser Glu Gly Thr Tyr Lys Ile Leu Thr Ile Tyr
515 520 525

Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Ala Met Gly Phe Ala Ala Phe
530 535 540

Leu Phe Trp Ala Met Ser Asn Gly Ser Cys Arg Cys Asn Ile Cys Ile
545 550 555 560

<210> 6
<211> 576
<212> PRT
<213> 人工的

[0018]

<220>
<223> SEQ ID NO: 1-5 的 Multalin 共有序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(18)
<223> 位置 1-18 的 X 是任选的，并且可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(22)
<223> 位置 20-22 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(26)
<223> 位置 24-26 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)
<223> 位置 28 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> 位置 36 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> 位置 41 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> 位置 47 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> 位置 48 的 X 可以是任何氨基酸

[0019]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> 位置 49 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> 位置 50 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> 位置 51 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> 位置 56 的 X 可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> 位置 57 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(64)
<223> 位置 60-64 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(67)
<223> 位置 66-67 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(70)
<223> 位置 69-70 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0020] <222> (72)..(74)
<223> 位置 72-74 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(80)
<223> 位置 79-80 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (83)..(84)
<223> 位置 83-84 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(87)
<223> 位置 86-87 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> 位置 90 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(101)
<223> 位置 97-101 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (110)..(110)
<223> 位置 110 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
<223> 位置 112 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (115)..(115)
<223> 位置 115 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
[0021] <221> MISC_FEATURE
<222> (120)..(120)
<223> 位置 120 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (122)..(122)
<223> 位置 122 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (123)..(123)
<223> 位置 123 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (129)..(129)
<223> 位置 129 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (131)..(132)
<223> 位置 131-132 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (134)..(138)
<223> 位置 134-138 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (140)..(140)
<223> 位置 140 的的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (141)..(141)
<223> 位置 141 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (142)..(142)
<223> 位置 142 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
[0022] <221> MISC_FEATURE
<222> (145)..(145)
<223> 位置 145 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (147)..(147)
<223> 位置 147 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (149)..(151)
<223> 位置 149-151 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (154)..(155)
<223> 位置 154-155 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (159)..(159)

<223> 位置 159 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (162)..(167)
<223> 位置 162-167 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (170)..(170)
<223> 位置 170 的 X 可以是 Phe 或 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (172)..(172)
<223> 位置 172 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (173)..(173)
<223> 位置 173 的 X 可以是 Leu 或 Met

[0023]
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (174)..(174)
<223> 位置 174 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (178)..(179)
<223> 位置 178-179 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (181)..(183)
<223> 位置 181-183 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (186)..(190)
<223> 位置 186-190 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (192)..(192)
<223> 位置 192 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (195)..(199)
<223> 位置 195-199 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (202)..(202)
<223> 位置 202 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(205)
<223> 位置 205 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (211)..(212)
<223> 位置 211-212 的的 X 可以是任何氨基酸
[0024]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (213)..(213)
<223> 位置 213 的的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (215)..(216)
<223> 位置 215-216 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (219)..(226)
<223> 位置 219-226 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (228)..(228)
<223> 位置 228 的 X 可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (230)..(232)
<223> 位置 230-232 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (233)..(233)
<223> 位置 233 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (234)..(234)
<223> 位置 234 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (236)..(237)
<223> 位置 236-237 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0025] <222> (239)..(239)
<223> 位置 239 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (242)..(242)
<223> 位置 242 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (245)..(245)
<223> 位置 245 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (249)..(250)
<223> 位置 249-250 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (254)..(254)
<223> 位置 254 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (259)..(259)
<223> 位置 259 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (264)..(264)
<223> 位置 264 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (267)..(269)
<223> 位置 267-269 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (280)..(281)
<223> 位置 280-281 的 X 可以是任何氨基酸

[0026]
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (283)..(284)
<223> 位置 283-284 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (287)..(287)
<223> 位置 287 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (291)..(291)
<223> 位置 291 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (292)..(292)
<223> 位置 292 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (293)..(293)
<223> 位置 293 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (296)..(296)
<223> 位置 296 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (303)..(305)
<223> 位置 303-305 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (310)..(310)
<223> 位置 310 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (312)..(312)
<223> 位置 312 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
[0027] <221> MISC_FEATURE
<222> (314)..(316)
<223> 位置 314-316 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (322)..(322)
<223> 位置 322 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (323)..(325)
<223> 位置 323-325 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (327)..(327)
<223> 位置 327 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (329)..(329)

<223> 位置 329 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (336)..(336)
<223> 位置 336 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (337)..(337)
<223> 位置 337 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (338)..(338)
<223> 位置 338 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (345)..(345)
<223> 位置 345 的 X 可以是 Leu 或 Met

[0028]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (348)..(348)
<223> 位置 348 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (350)..(352)
<223> 位置 350-352 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (369)..(369)
<223> 位置 369 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (371)..(371)
<223> 位置 371 的 X 可以是 Leu 或 Met

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (372)..(372)
<223> X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (378)..(378)
<223> 位置 378 的 X 可以是 Phe 或 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (379)..(379)
<223> 位置 379 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (381)..(381)
<223> 位置 381 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (384)..(384)
<223> 位置 384 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

[0029]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (386)..(386)
<223> 位置 386 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (388)..(388)
<223> 位置 388 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (392)..(393)
<223> 位置 392-393 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (399)..(399)
<223> 位置 399 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (400)..(400)
<223> 位置 400 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (401)..(401)
<223> 位置 401 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (404)..(404)
<223> 位置 404 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (408)..(408)
<223> 位置 408 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0030] <222> (410)..(410)
<223> 位置 410 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (411)..(411)
<223> 位置 411 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (415)..(415)
<223> 位置 415 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (417)..(417)
<223> 位置 417 的 X 可以是 Phe 或 Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (419)..(419)
<223> 位置 419 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (420)..(420)
<223> 位置 420 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (421)..(422)
<223> 位置 421-422 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (426)..(426)
<223> 位置 426 的 X 可以是 Asn、 Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (429)..(429)
<223> 位置 429 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
[0031] <221> MISC_FEATURE
<222> (432)..(432)
<223> 位置 432 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (433)..(433)
<223> 位置 433 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (435)..(435)
<223> 位置 435 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (437)..(438)
<223> 位置 437-438 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (439)..(439)
<223> 位置 439 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (441)..(443)
<223> 位置441-443的X可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (447)..(447)
<223> 位置447的X可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (459)..(459)
<223> 位置459的X可以是Asn、Asp、Glu、Gln、Asx或Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (460)..(460)
<223> 位置460的X可以是任何氨基酸

<220>
[0032] <221> MISC_FEATURE
<222> (464)..(464)
<223> 位置464的X可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (468)..(468)
<223> 位置468的X可以是Asn、Asp、Glu、Gln、Asx或Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (473)..(473)
<223> 位置473的X可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (474)..(474)
<223> 位置474的X可以是Asn、Asp、Glu、Gln、Asx或Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (478)..(478)

<223> 位置 478 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (482)..(482)
<223> 位置 482 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (485)..(487)
<223> 位置 485-487 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (494)..(494)
<223> 位置 494 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (500)..(500)
<223> 位置 500 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

[0033]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (501)..(501)
<223> 位置 501 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (506)..(506)
<223> 位置 506 的 X 可以是 Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (512)..(512)
<223> 位置 512 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (513)..(514)
<223> 位置 513-514 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (518)..(518)
<223> 位置 518 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (521)..(521)
<223> 位置 521 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (523)..(523)
<223> 位置 523 的 X 可以是 Asn、Asp、Glu、Gln、Asx 或 Glx

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (525)..(525)
<223> 位置 525 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (528)..(528)
<223> 位置 528 的 X 可以是任何氨基酸

[0034]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (535)..(535)
<223> 位置 535 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (537)..(537)
<223> 位置 537 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (539)..(539)
<223> 位置 539 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (542)..(542)
<223> 位置 542 的 X 可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (548)..(548)
<223> 位置 548 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (554)..(558)
<223> 位置 554-558 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (561)..(562)
<223> 位置 561-562 的 X 可以是任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (570)..(570)
<223> 位置 570 的 X 可以是任何氨基酸

<400> 6

[0035]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ile Cys Ile Gly
20 25 30

His His Ala Xaa Asn Ser Thr Thr Xaa Val Asp Thr Ile Thr Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Val Thr His Ala Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Gly Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Pro Leu Asp Leu Xaa Xaa
65 70 75 80

Cys Thr Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Pro Gln Cys Asp Leu Leu
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Ser Xaa Ala Xaa
100 105 110

Asn Gly Xaa Cys Tyr Pro Gly Xaa Val Xaa Xaa Tyr Glu Glu Leu Arg
115 120 125

Xaa Leu Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Phe Pro
130 135 140

Xaa Ser Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Val Thr Xaa Xaa Gly Thr Ser Xaa Ala
145 150 155 160

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Phe Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Trp Leu
165 170 175

[0036] Thr Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Tyr Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa
180 185 190

Asn Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Xaa Trp Gly Xaa His His Pro
195 200 205

Pro Thr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Leu Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
210 215 220

Xaa Xaa Val Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Pro Xaa Ile
225 230 235 240

Gly Xaa Arg Pro Xaa Val Asn Gly Xaa Xaa Gly Arg Ile Xaa Tyr Tyr
245 250 255

Trp Thr Xaa Leu Lys Pro Gly Xaa Thr Leu Xaa Xaa Xaa Ser Asn Gly
260 265 270

Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ser Gly Xaa Ser
275 280 285

Ser Gly Xaa Xaa Xaa Arg Ser Xaa Leu Pro Ile Gly Asn Cys Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Cys Gln Thr Pro Xaa Gly Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Lys Pro Phe Gln
305 310 315 320

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Gly Xaa Cys Pro Lys Tyr Val Lys Xaa
325 330 335

Xaa Xaa Leu Lys Leu Ala Thr Gly Xaa Arg Asn Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
340 345 350

[0037] Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
355 360 365

Xaa Gly Xaa Xaa Asp Gly Trp Tyr Gly Xaa Xaa His Xaa Asn Ser Xaa
370 375 380

Gly Xaa Gly Xaa Ala Ala Asp Xaa Xaa Ser Thr Gln Lys Ala Xaa Xaa
385 390 395 400

Xaa Ile Thr Xaa Lys Val Asn Xaa Ile Xaa Xaa Lys Met Asn Xaa Gln
405 410 415

Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Phe Ser Xaa Val Glu Xaa Arg Ile Xaa
420 425 430

Xaa Leu Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Asp Val Trp Xaa Tyr
435 440 445

Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Xaa Xaa Thr Leu Asp Xaa
450 455 460

His Asp Ser Xaa Val Asn Asn Leu Xaa Xaa Lys Val Lys Xaa Gln Leu
465 470 475 480

Arg Xaa Asn Ala Xaa Xaa Xaa Gly Asn Gly Cys Phe Glu Xaa Tyr His
485 490 495

Lys Cys Asp Xaa Xaa Cys Ile Glu Ser Xaa Arg Asn Gly Thr Tyr Xaa
500 505 510

[0038]

Xaa Xaa Lys Tyr Arg Xaa Glu Ser Xaa Leu Xaa Arg Xaa Lys Ile Xaa
515 520 525

Gly Val Lys Leu Glu Ser Xaa Gly Xaa Tyr Xaa Ile Leu Xaa Ile Tyr
530 535 540

Ser Thr Val Xaa Ser Ser Leu Val Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Phe
545 550 555 560

Xaa Xaa Trp Ala Cys Ser Asn Gly Ser Xaa Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565 570 575

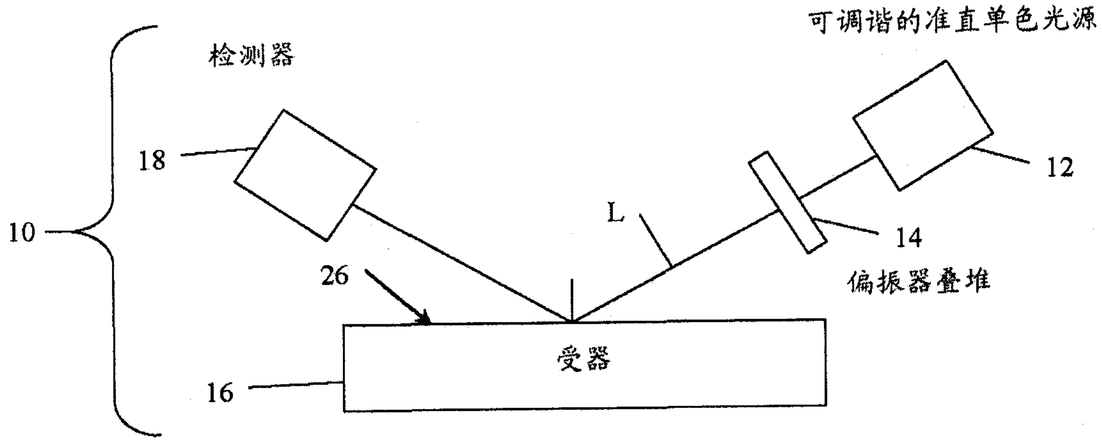

检测器
可调谐的准直单色光源
18
12
10
L
14
26
偏振器叠堆
受器
16

图1

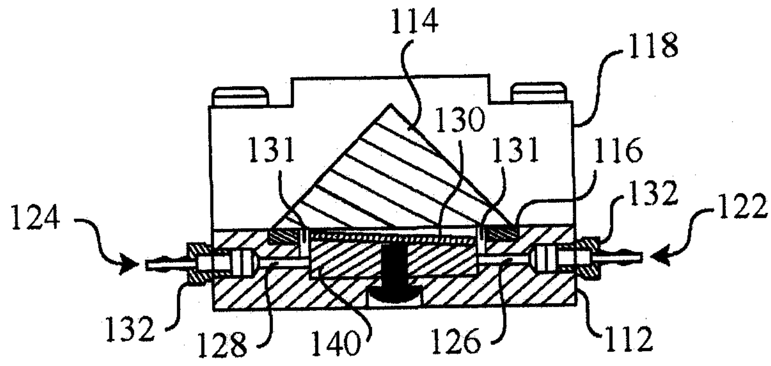

114
118
130
131
131
116
132
124
122
132
128
140
126
112

图2

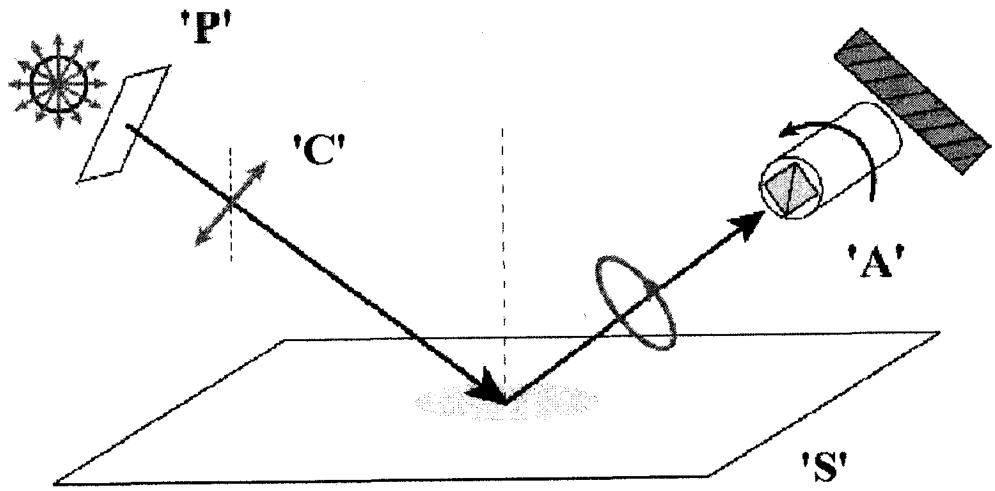

'P'
'C'
'A'
'S'

图3

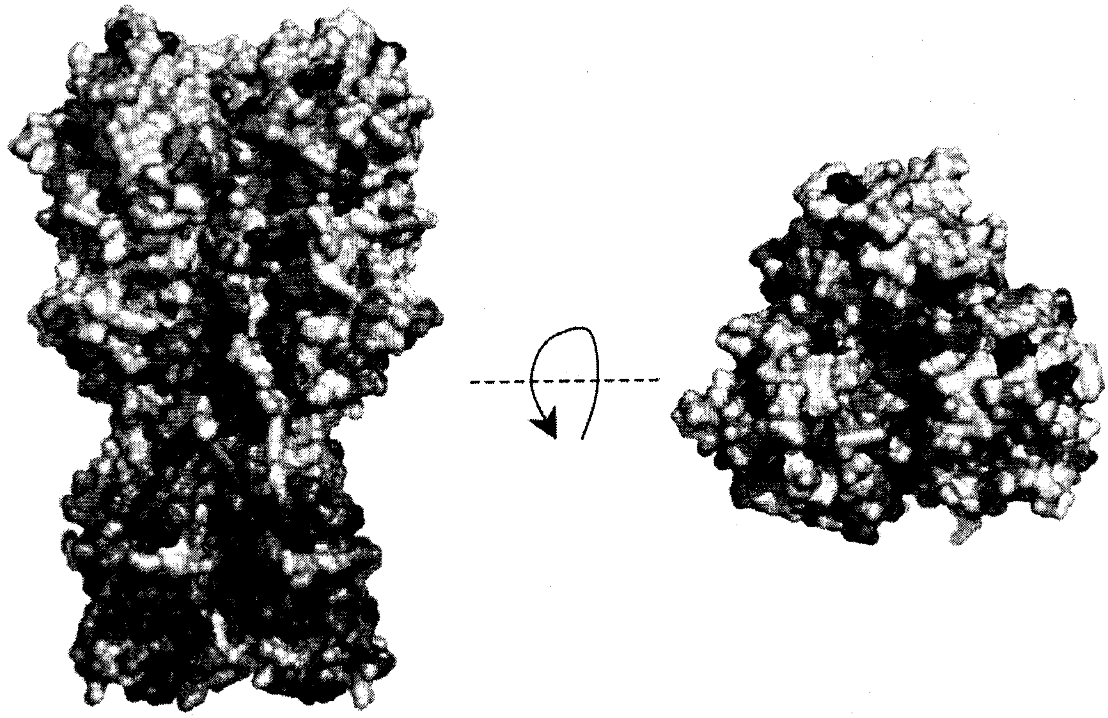


图6

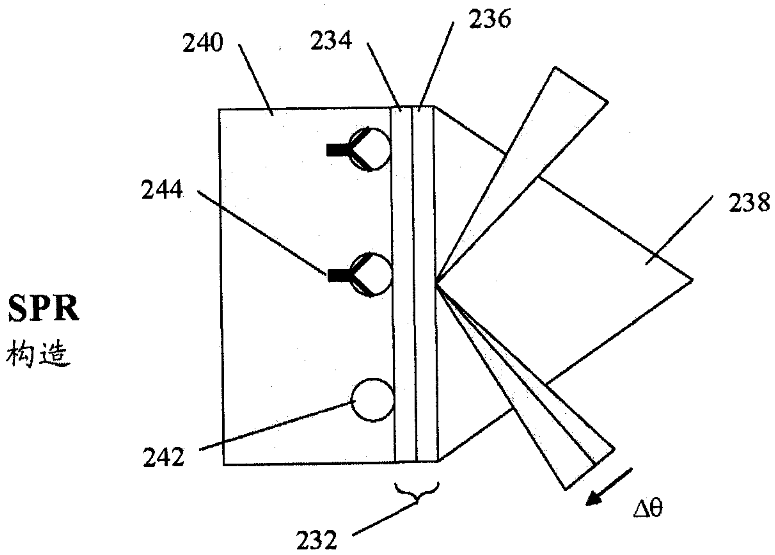


图4A

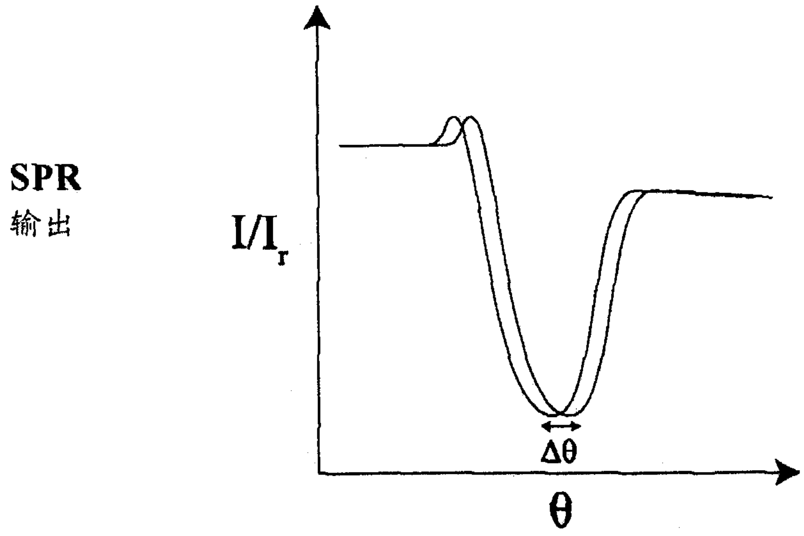


图4B

```
           1                                                     50
ABW80979   .........M KAKLLVLLCT FTATYADTIC IGYHANNSTD TVDTVLEKNV
EF541403   .......... MEKIVLLFAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV
AF250479   .......... MIAIIVIAIL AAAGKSDKIC IGYHANNSTT QVDTILEKNV
NC_004908  ........ME TISLITILLV VTASNADKIC IGHQSTNSTE TVDTLTETNV
AY531033   MKTIIALSYI LCLVFSQKLP GNDNSTATLC LGHHAVPNGT IVKTITNDQI
共有序列   XXXXXXXXXX XXXXXXXXlX XXaXXXdXiC iGhhaXnstt XVdTit#X#!

           51                                                   100
ABW80979   TVTHSVNLLE DSHNGKLCLL KGIAPLQLGN CSVAGWILGN PECELLISKE
EF541403   TVTHAQDILE KKHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP
AF250479   TVTHSIELLE NQKEERFCKI LNKAPLDLRE CTIEGWILGN PQCDLLLGDQ
NC_004908  PVTHAKELLH TEHNGMLCAT SLGHPLILDT CTIEGLVYGN PSCDLLLGGR
AY531033   EVTNATELVQ SSSTGGICD. SPHQILDGEN CTLIDALLGD PQCDGFQN.K
共有序列   XVThaX#LlX XXXXgXXCXX sXXXpLdlXX CtXXgXXlG# PqCDllXXXX

           101                                                  150
ABW80979   SWSYIVETPN PENGTCYPGY FADYEELREQ LSSVSSFERF EIFPKESSWP
EF541403   EWSYIVEKAN PVNDLCYPGD FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSS
AF250479   SWSYIVERPT AQNGICYPGT LNEVEELRAL IGSGERVERF EMFPQSTWQG
NC_004908  EWSYIVERSS AVNGTCYPGN VENLEELRTL FSSASSYQRI QIFPDTTW..
AY531033   KWDLFVERSK AYSN.CYPYD VPDYASLRSL VASSGT...L EFNNESFNWA
共有序列   XWsyiVErsX aXngXCYPgX vX#yeeLRXL XXSXXXXXrX #XfpXsXwXX

           151                                                  200
ABW80979   NHTVTGVSAS CSHNGKSSFY RNLLWLTG.K NGLYPNLSKS YVNNKEKEVL
EF541403   HEASLGVSSA CPYQGKSSFF RNVVWLIK.K NSTYPTIKRS YNNTNQEDLL
AF250479   VDTNSGTTRS CPYSTGASFY RNLLWIIKTK TAEYPVIKGI YNNTGTQPIL
NC_004908  NVTYTGTSRA CS....GSFY RSMRWLTQ.K SGFYPVQDAQ YTNNRGKSIL
AY531033   GVTQNGTSSA CKRRSNKSFF SRLNWLTHLK YK.YPALNVT MPNNEKFDKL
共有序列   XvTXXGtsXa CXXXXXXSF% rX$XWltXXK XXXYPXXXXX yXNnXXXXXL

           201                                                  250
ABW80979   VLWGVHHPPN IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE
EF541403   VLWGIHHPND AAEQTKLYQN PTTYISVGTS TLNQRLVPRI ATRSKVNGQS
AF250479   YFWGVHHPPN TDEQDTLYGS GDRYVRMGTE SMNFAKSPEI AARPAVNGQR
NC_004908  FVWGIHHPPT YTEQTNLYIR NDTTTSVTTE DLNRTFKPVI GPRPLVNGLQ
AY531033   YIWGVHHPVT DSDQISLYAQ ASGRITVSTK RSQQTVIPNI GYRPRVRDIS
共有序列   yXWG!HHPpt XX#QXXLYXX XXXXXXvXTX XX#XtXXPXI gXRPXVngXX

           251                                                  300
ABW80979   GRINYYWTLL EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRGFGSG .IITSNAPMD
EF541403   GRMEFFWTIL KPNDAINFES NGNFIAPEYA YKIVKKGDST .IMKSELEYG
AF250479   GRIDYYWSVL KPGETLNVES NGNLIAPWYA YKFVNTNSKG AVFRSDLPIE
NC_004908  GRIDYYWSVL KPGQTLRVRS NGNLIAPWYG H.VLSGGSHG RILKTDLKGG
AY531033   SRISIYWTIV KPGDILLINS TGNLIAPRGY FKIRSGKSS. .IMRSDAPIG
共有序列   gRIXyYWt!l KPG#tlXXXS nGNLIAPwyX XkXXsgXssg X!Xrs#lpig
```

图5A

	301				350
ABW80979	ECDAKCQTPQ	GAINSSLPFQ	NVHPVTIGEC	PKYVRSAKLR	MVTGLRNIPS
EF541403	NCNTKCQTPM	GAINSSMPFH	NIHPLTIGEC	PKYVKSNRLV	LATGLRNSPQ
AF250479	NCDATCQTIA	GVLRTNKTFQ	NVSPLWIGEC	PKYVKSESLR	LATGLRNVPQ
NC_004908	NCVVQCQTEK	GGLNSTLPFH	NISKYAFGTC	PKYVRVNSLK	LAVGLRNVPA
AY531033	KCNSECITPN	GSIPNDKPFQ	NVNRITYGAC	PRYVKQNTLK	LATGMRNVPE
共有序列	nCXXXCqTpX	GXiXXXkpFq	N!XXXtXGXC	PkYVkX#XLk	LAtG$RN!PX

	351				400
ABW80979	IQ....SRGL	FGAIAGFIEG	GWTGMVDGWY	GYHHQNEQGS	GYAADQKSTQ
EF541403	RERRRKKRGL	FGAIAGFIEG	GWQGMVDGWY	GYHHSNEQGS	GYAADKESTQ
AF250479	IE....TRGL	FGAIAGFIEG	GWTGMIDGWY	GYHHENSQGS	GYAADRESTQ
NC_004908	RS....SRGL	FGAIAGFIEG	GWPGLVAGWY	GFQHSNDQGV	GMAADRDSTQ
AY531033	KQ....TRGI	FGAIAGFIEN	GWEGMVDGWY	GFRHQNSEGT	GQAADLKSTQ
共有序列	XX....tRGl	FGAIAGFIEg	GWXG$!dGWY	G%XHXNs#GX	GXAADXXSTQ

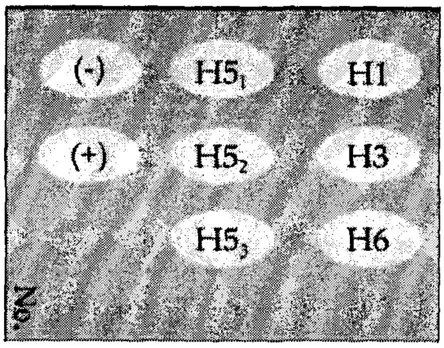
	401				450
ABW80979	NAINGITNKV	NSVIEKMNTQ	FTAVGKEFNK	LERRMENLNK	KVDDGFLDIW
EF541403	KAIDGVTNKV	NSIIDKMNTQ	FEAVGREFNN	LERRIENLNK	KMEDGFLDVW
AF250479	KAVNRITNKV	NSIINKMNTQ	FEAVDHEFSN	LERRIDNLNK	RMQDGFLDVW
NC_004908	KAIDKITSKV	NNIVDKMNKQ	YEIIDHEFSE	VETRLNMINN	KIDDQIQDVW
AY531033	AAINQINGKL	NRLIGKTNEK	FHQIEKEFSE	VEGRIQDLEK	YVEDTKIDLW
共有序列	kA!#XItXKv	NXi!XKmNXq	%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	ENQKTLDEHD	ANVNNLYNKV	KRALGSNAME	DGKGCFELYH
AY531033	SYNAELLVAL	ENQHTIDLTD	SEMNKLFERT	KKQLRENAED	MGNGCFKIYH
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	LGAISFWMCS	NGSLQCRICI
EF541403	VASSLALAIM	VAGLSLWMCS	NGSLQCRICI
AF250479	VSSSLVLVGL	IMAMGLWMCS	NGSMQCRICI
NC_004908	VASSLVLAMG	FAAFLFWAMS	NGSCRCNICI
AY531033	AISCFLLCVA	LLGFIMWACQ	KGNIRCNICI
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
$H5_1$: 香港/1997
$H5_2$: 香港/2003
$H5_3$: 越南/2004

图7

图8A

图8B

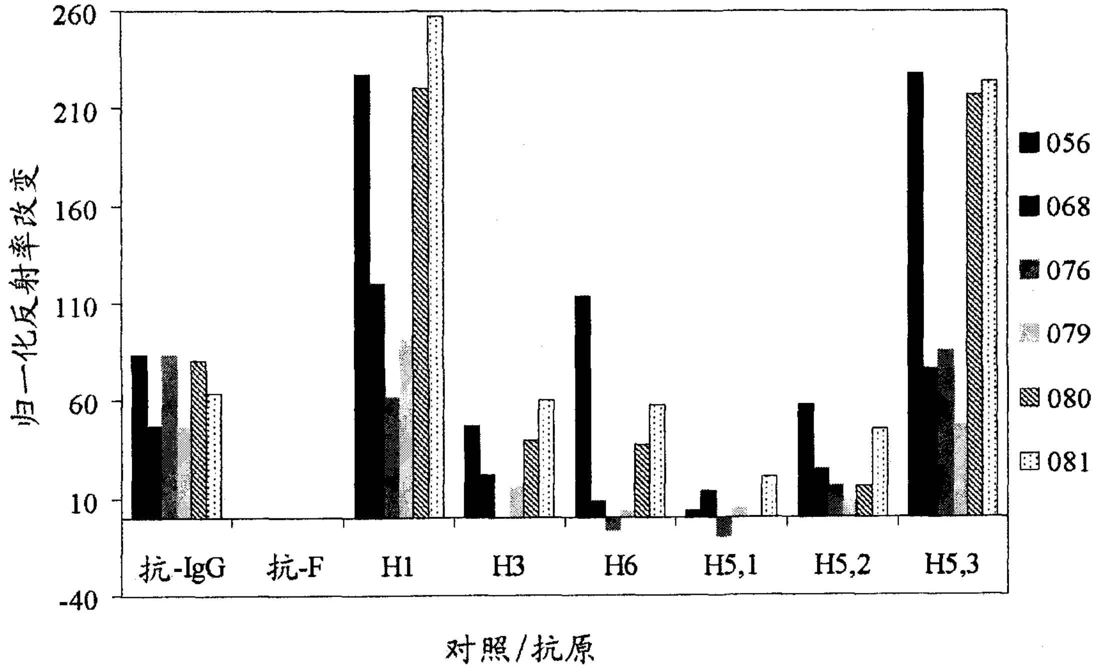

260
210
160
110
60
10
-40
归一化反射率改变
抗-IgG
抗-F
H1
H3
H6
H5,1
H5,2
H5,3
对照/抗原
056
068
076
079
080
081

图9

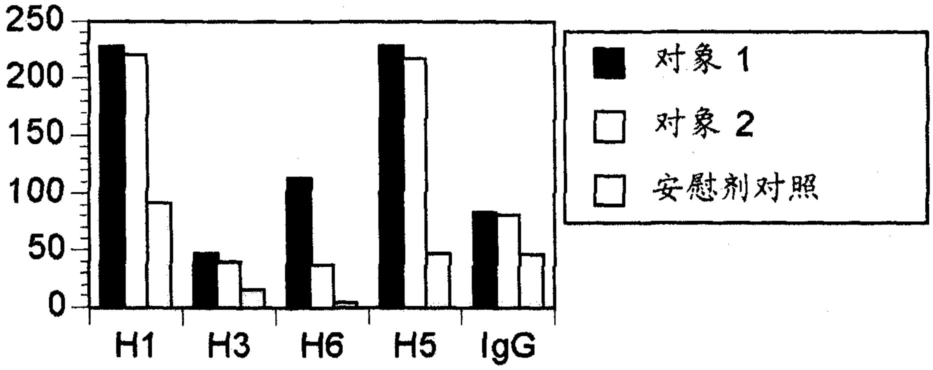

250
200
150
100
50
0
H1
H3
H6
H5
IgG
对象 1
对象 2
安慰剂对照

图10

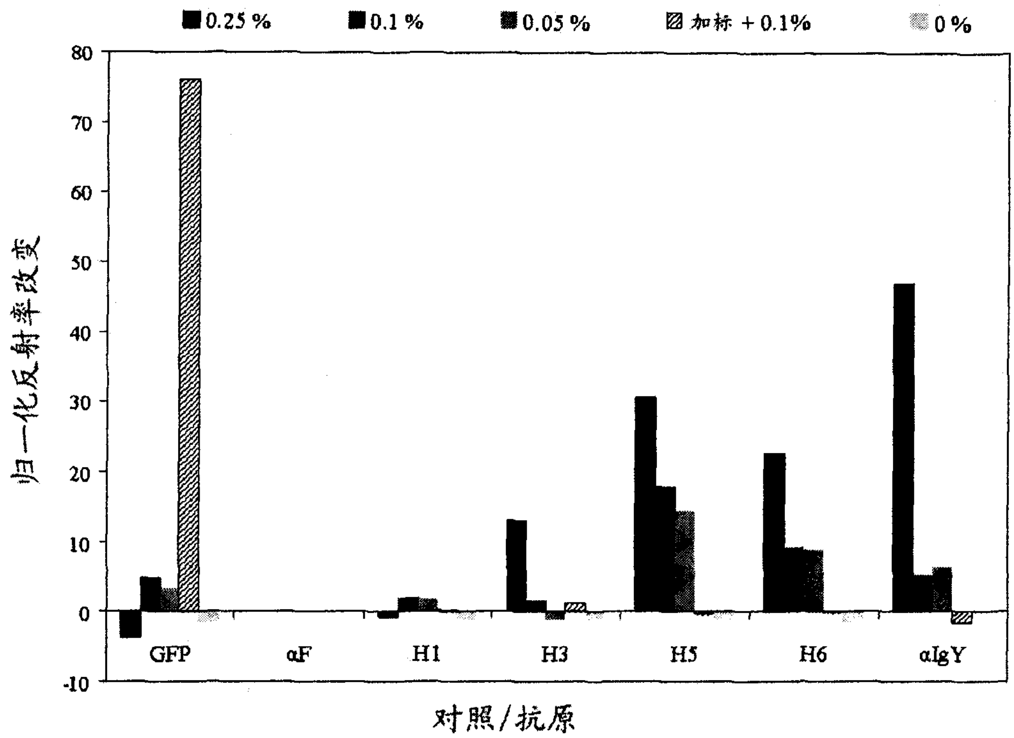

0.25 %
0.1 %
0.05 %
加标 + 0.1%
0 %
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
归一化反射率改变
GFP
αF
H1
H3
H5
H6
αIgY
对照/抗原

图11

图12

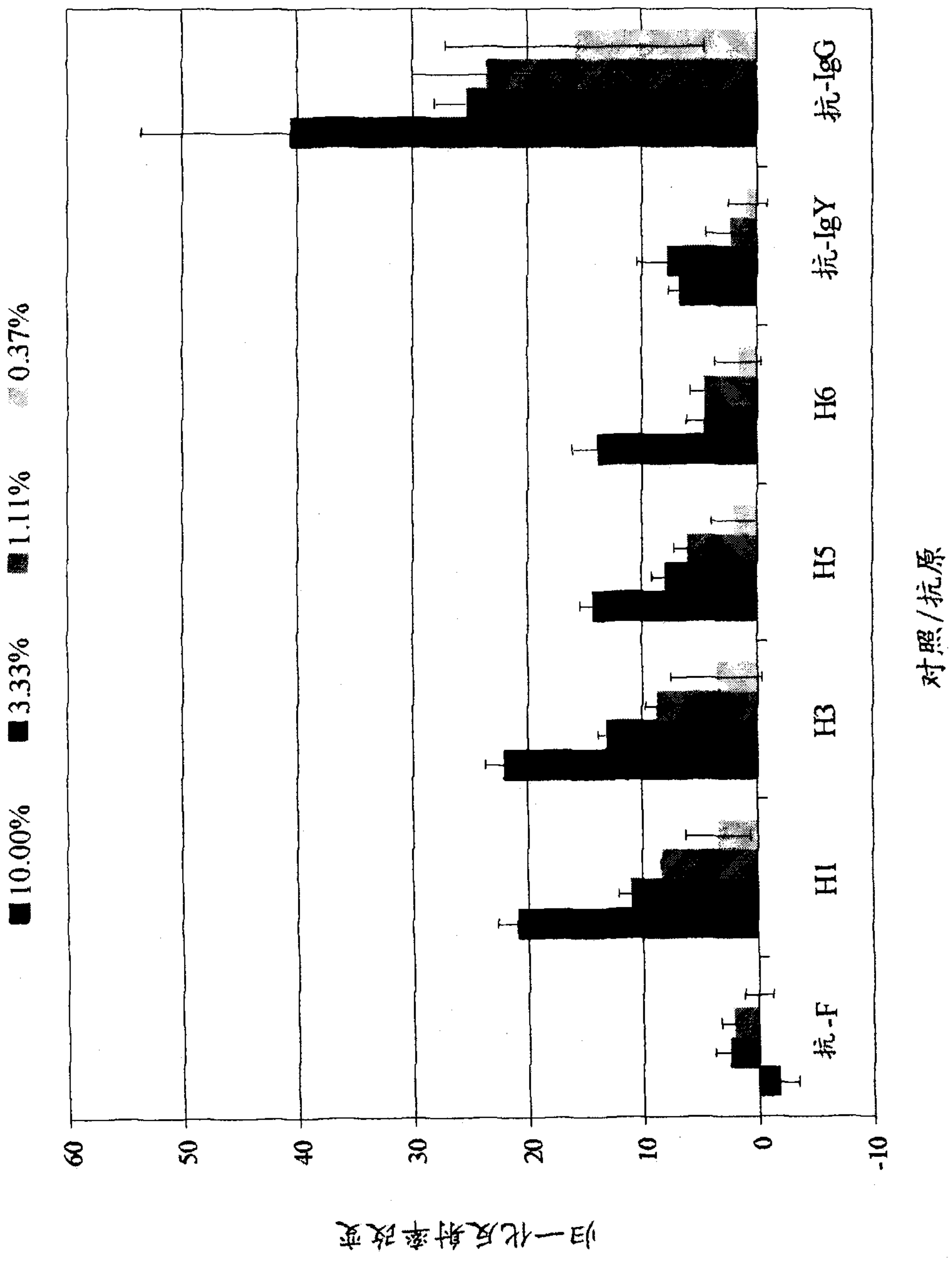
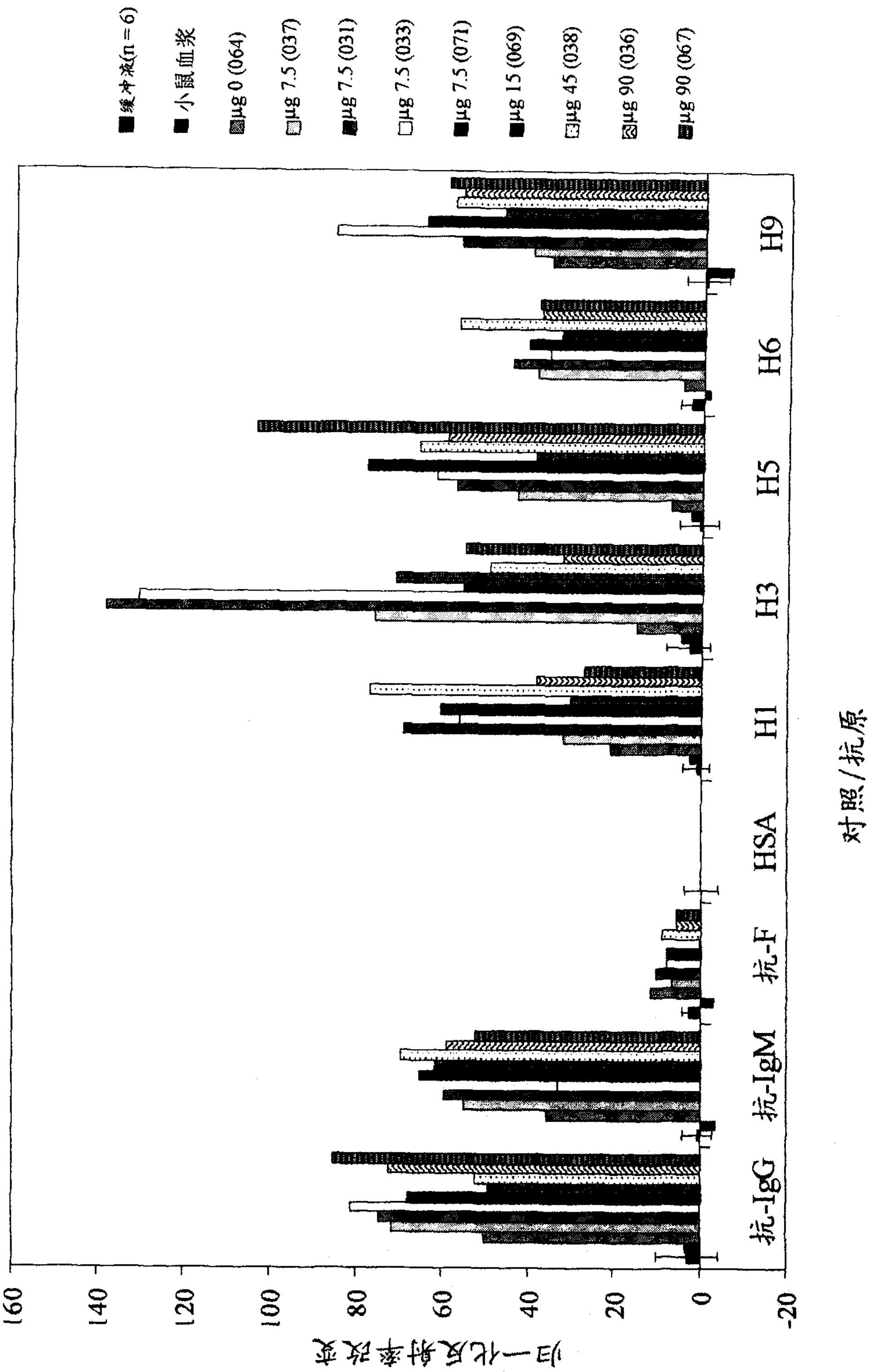
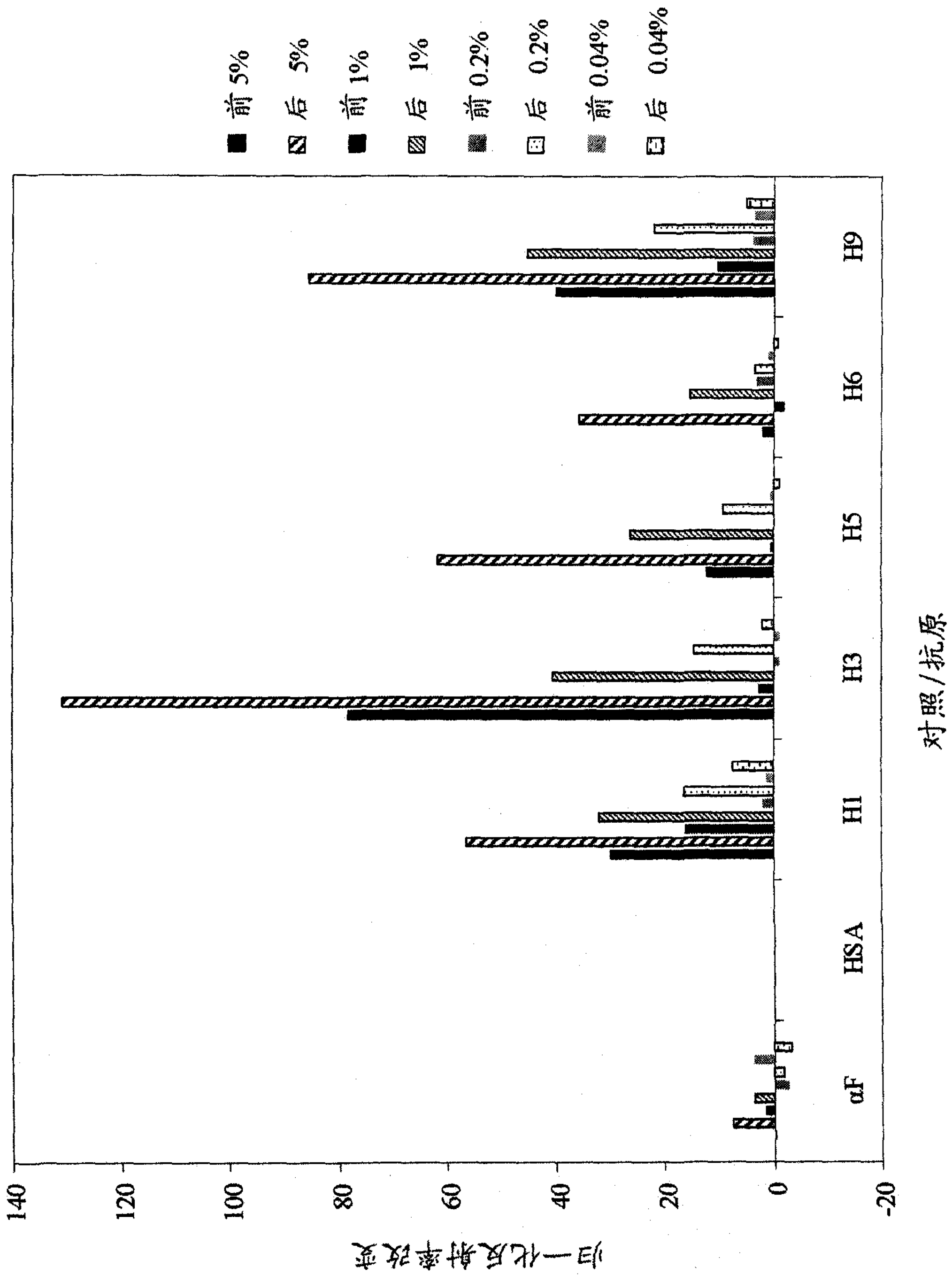

10.00%
3.33%
1.11%
0.37%
60
50
40
30
20
10
0
-10
归一化反射率改变
抗-F
H1
H3
H5
H6
抗-IgY
抗-IgG
对照/抗原

图13



缓冲液(n=6)
小鼠血浆
μg 0 (064)
μg 7.5 (037)
μg 7.5 (031)
μg 7.5 (033)
μg 7.5 (071)
μg 15 (069)
μg 45 (038)
μg 90 (036)
μg 90 (067)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
归一化反射率改变
抗-IgG
抗-IgM
抗-F
HSA
H1
H3
H5
H6
H9
对照/抗原

图14



前 5%
后 5%
前 1%
后 1%
前 0.2%
后 0.2%
前 0.04%
后 0.04%
αF
HSA
H1
H3
H5
H6
H9
对照/抗原
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
归一化反射率改变

图15

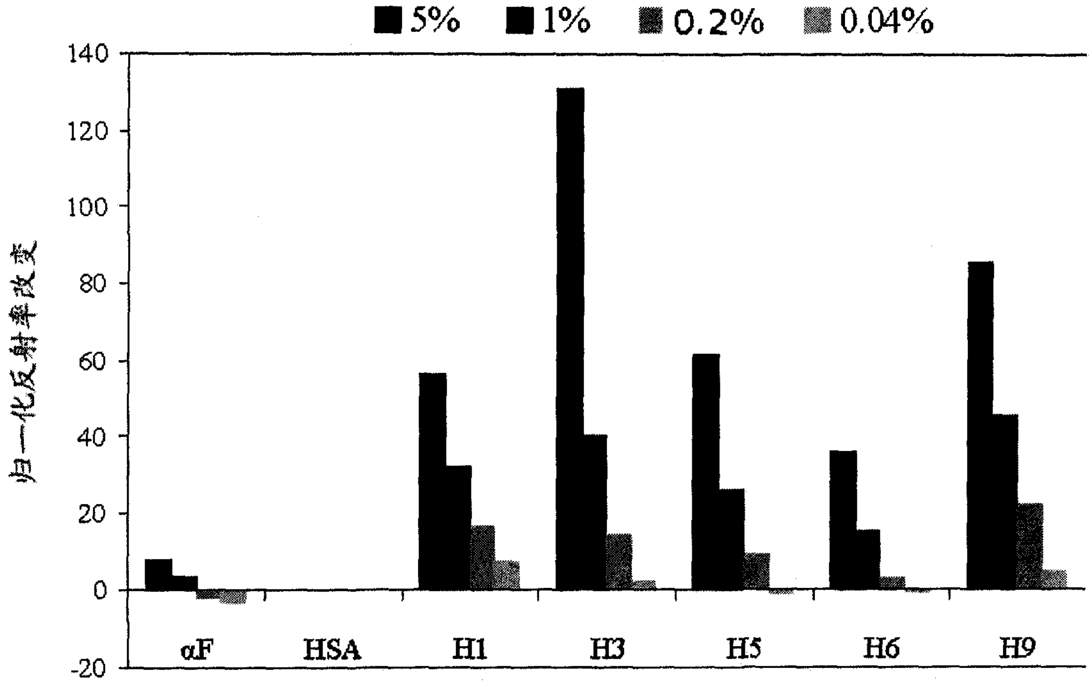


图16

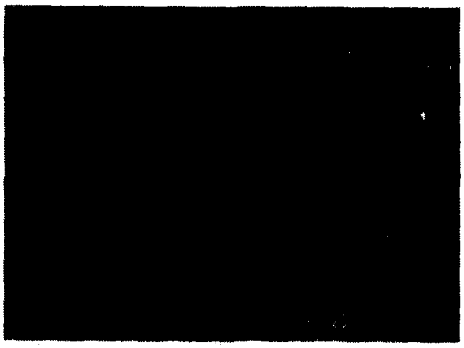


图17A

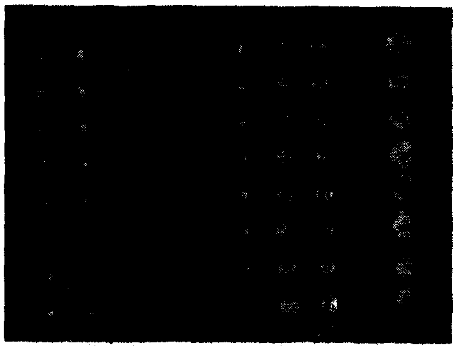


图17B

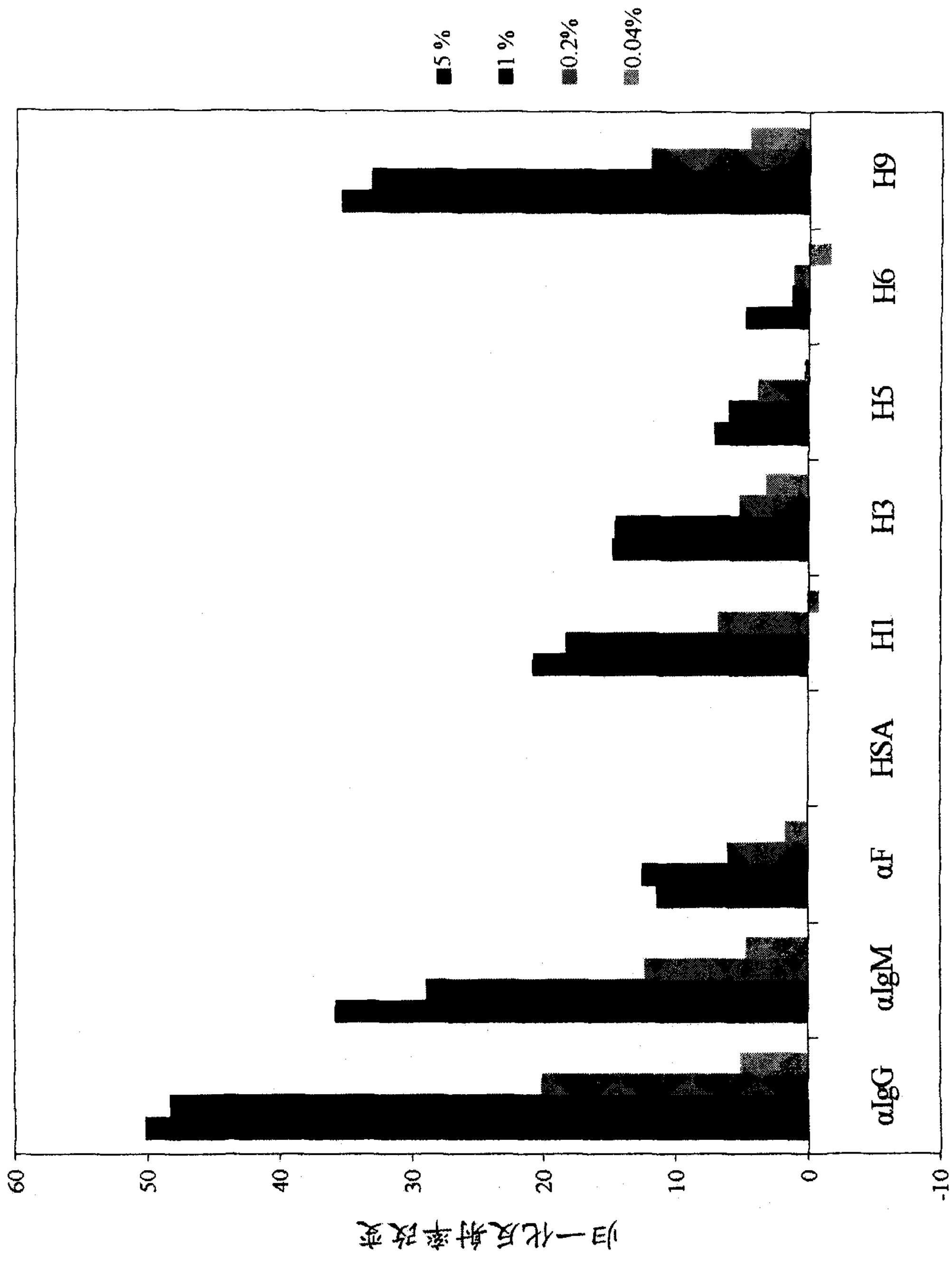

5 %
1 %
0.2%
0.04%
αIgG
αIgM
αF
HSA
H1
H3
H5
H6
H9
60
50
40
30
20
10
0
-10
归一化反射率改变

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	CN102084252B	公开(公告)日	2017-03-22
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	G01N33/56983 C12N2760/16011 G01N21/05 G01N21/211 G01N21/553 G01N33/54373 G01N2021/1725 G01N2021/558 G01N2021/5957 G01N2333/11 G01N2800/52		
代理人(译)	郭文洁		
审查员(译)	吕健		
优先权	61/050039 2008-05-02 US		
其他公开文献	CN102084252A		
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