

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410011660.6

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 2 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 100463922C

[22] 申请日 2001.6.14

[21] 申请号 200410011660.6

分案原申请号 01811246.3

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 15 [33] US [31] 60/212,082

[32] 2001. 4. 2 [33] US [31] 60/280,811

[32] 2001. 4. 2 [33] US [31] 60/280,867

[73] 专利权人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 D·Y·基恩 P·阿尔坎杰尔

L·坦德斯基 C·乔治-纳西门托

D·科伊特 A·梅迪纳-塞尔比

[56] 参考文献

US 5683864 A 1997.11.4

EP0870830A 1998.10.14

WO 9744469 A 1997.11.27

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 47 页 附图 20 页

[54] 发明名称

抗 HCV 抗体的免疫测定

[57] 摘要

本发明提供了一种 HCV 免疫测定方法，该方法包括 NS3/4a 构象表位和多表位融合抗原，本发明还提供了用于这种免疫测定的免疫测定固相支持物。

1. 一种多表位融合抗原，其特征在于，其包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或与该序列至少 90% 相同的、能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的氨基酸序列，其中该抗 HCV 抗体与 SEQ ID NO: 2 特异性反应。

2. 如权利要求 1 所述的多表位融合抗原，其特征在于，所述的多表位融合抗原包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或与该序列至少 98% 相同的、能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的多表位融合抗原，其特征在于，所述的多表位融合抗原由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列构成。

4. 一种多核苷酸，其特征在于，所述的核苷酸包含权利要求 1-3 任一所述的多表位融合抗原的编码序列。

5. 如权利要求 4 所述的多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 80% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列。

6. 如权利要求 4 所述的多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 90% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列。

7. 如权利要求 4 所述的多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 98% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列。

8. 一种重组载体，其特征在于，该载体包含：

(a) 权利要求 4-7 任一所述的多核苷酸；

(b) 以及可操作性连接于所述的多核苷酸的控制元件，由此在宿主细胞中转录和翻译该编码序列。

9. 由权利要求 8 所述的重组载体转化的宿主细胞。

10. 一种制备重组多表位融合抗原的方法，其特征在于，所述的方法包括：

(a) 提供权利要求 9 所述的宿主细胞群；和

(b)在表达所述的重组载体中存在的编码序列所编码的多重表位融合抗原的条件下培养所述的细胞群。

抗 HCV 抗体的免疫测定

本申请为申请号为 01811246.3、题为《抗 HCV 抗体的免疫测定》的中国专利申请的分案申请。

技术领域

本发明一般涉及病毒诊断。特别是涉及用多重 HCV 抗原进行的免疫测定以精确诊断丙肝病毒感染。

背景技术

丙肝病毒 (HCV) 是胃肠外非甲型非乙型肝炎 (NANBH) 的主要原因，它主要通过输血和体液交换传播。该病毒存在于 0.4-2.0% 的美国人口中。在约 50% 感染者中产生慢性肝炎，其中约 20% 被感染的个人产生肝硬化，有时导致肝细胞癌。因此，研究和控制该疾病在医学上是重要的。

Houghten 等首先鉴定并确定 HCV 是 NANBH 的原因。HCV 的病毒基因组序列是已知的，以及获得该序列的方法。参见，如国际出版物 No. W089/04669；W090/11089；和 W090/14436。HCV 具有 9.5kb 的正义单链 RNA 基因组，其是黄病毒家族的成员。基于系统发育分析，已鉴定出至少 6 个不同但相关的 HCV 基因型 (Simmonds 等, J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399)。该病毒编码一个具有 3000 个氨基酸残基的多蛋白。(Choo 等, Science (1989) 244:359-362; Choo 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451-2455; Han 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715)。多蛋白在翻译同时或之后加工成结构和非结构 (NS) 蛋白。

具体说，如图 1 所示，HCV 基因组编码几种蛋白质。HCV 多蛋白的切割产物的顺序和命名如下：NH₂-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-MS5a-NS5b-COOH。宿主蛋白酶催化最初切割多蛋白，释放三种结构蛋白：N-末端核衣壳蛋白 (称为“核心”) 和两种包膜糖蛋白“E1” (也称为 E) 和“E2” (也称为 E2/NS1)，

和含有病毒酶的非结构(NS)蛋白。NS区称为NS2、NS3、NS4、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b。NS2是具有蛋白水解活性的膜内在蛋白。NS2单独或与NS3组合,切开NS2-NS3 sissle键,从而产生NS3 N-末端并释放大多蛋白,其包含丝氨酸蛋白酶和RNA解旋酶活性。NS3蛋白酶加工剩余的多蛋白。多蛋白成熟的完成是由NS3-NS4a连接的自身催化切割引发的,这种自身催化切割是由NS3丝氨酸蛋白酶催化的。随后HCV多蛋白的NS3介导的切割似乎涉及另一种多肽的NS3分子识别多蛋白切割接头。在这些反应中,NS3释放NS3辅因子(NS4a)、NS4b和NS5a(NS4a具有磷酸化功能),和依赖RNA的RNA聚合酶(NS5b)。

已描述了许多用作HCV的免疫学和诊断试剂,衍生自HCV多蛋白的一般和特异性多肽。参见如Houghton等,欧洲出版物No.318,216和388,232;Choo等,Science(1989)244:359-362;Kuo等,Science(1989)244:362-364;Houghton等,Hepatology(1991)14:381-388;Chien等,Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015;Chien等,J.Gastroent. Hepatol.(1993)8:S33-39;Chien等,国际出版物No.WO 93/00365;Chien, D.Y., 国际出版物No.W094/01778。这些出版物对HCV、HCV多肽免疫学试剂的生产和使用提供了广泛的背景。

筛选和鉴定HCV载体和HCV污染的血液或血液制品的灵敏和专一的方法将对医学提供重要的进步。在约10%输血的病人中发生输血后肝炎(PTH),而HCV在这些病例种占90%。病人护理和预防及HCV通过血液或血产品,或通过密切的个人接触传播需要可靠的诊断和预后工具。因此,开发了几种测定方法用于HCV感染的血清诊断。参见如Choo等,Science(1989)244:359-362;Kuo等,Science(1989)244:362-364;Choo等,Br. Med. Bull.(1990)46:423-441;Ebeling等,Lancet(1990)335:982-983;van der Poel等,Lancet(1990)335:558-560;van der Poel等,Lancet(1991)337:317-319;Chien, D.Y., 国际出版物No.WO 94/01778;Valenzuela等,国际出版物No.W097/44469;和Kashiwakuma等,美国专利No.5,871,904。

一些基于血清的测定方法面临的显著问题是,在病毒感染和检测之间有明显的间隔,通常超过80天。这种测定间隔对输血受体可能产生很大的危险。为了克服该问题,开发了直接检测病毒RNA的基于核酸的测试(NAT),和检测病毒抗原而不是抗体反应的HCV核心抗原试验。参见如Kashiwakuma等,美

国专利 No. 5, 871, 904。

然而，仍然需要灵敏、准确的诊断和预后工具，以提供充分的病人护理并防止 HCV 通过血液和血制品，或密切的个人接触传播。

发明内容

本发明部分基于发现：用 NS3/4a 构象表位，与多重表位融合抗原结合，提供一种敏感且可靠的测试早期 HCV 血清转化的方法。本文所述的测定还可以测试由 6 种已知 HCV 的基因型中的任何一种导致的 HCV 感染。多重表位融合蛋白的使用还提供了如下优点：减少掩蔽问题；改善检测抗体的敏感型（通过在单位面积的底物上提供更大量的表位）和改善选择性。

因此，在本发明的一个实施例中，本发明涉及一种免疫测定固相支持物，它由其上结合的至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原构成，其中所述的 NS3/4a 表位和/或所述的多重表位融合抗原与 HCV 感染个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应。

所述的 NS3/4a 表位可包含图 3A-3D 所述的氨基酸序列，或具有与该序列至少 80% 相同的氨基酸序列，或与其 90% 相同的序列，或与其至少 98% 相同的序列，或其间任何整数，只要该序列具有蛋白酶活性。在某些实施例中，NS3/4a 构象表位由图 3A-3D 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中，多重表位融合抗原包含图 5A-5F 所示的氨基酸序列，或与其至少 80% 相同的序列，或与其至少 90% 相同的序列，或至少 98% 相同的序列，或其间任何整数，只要该序列与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性地反应。在某些实施例中，多重表位融合抗原由图 5A-5F 显示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中，本发明涉及一种免疫测定固相支持物，其基本上由其上结合的至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗体构成，其中所述的 NS3/4a 构象表位包含图 3A-3D 所示的氨基酸序列，或与该序列至少 80% 相同的氨基酸序列，该序列与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性地反应。在某些实施例中，NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原与图 3A-3D 和图 5A-5F 所示的氨基酸序列分别为至少 90%、98% 相同（或其间任何

整数), 只要 NS3/4a 序列具有蛋白酶活性, 且多重表位融合抗原与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体能特异性地反应。在某些实施例中, NS3/4a 构象表位由图 3A-3D 所示的氨基酸序列构成, 多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中, 本发明涉及免疫测定固相支持物, 其基本由其上结合的至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原构成, 其中所述的 NS3/4a 构象表位由图 3A-3D 所示的氨基酸序列构成, 且所述的多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中, 本发明涉及检测生物样品中丙肝病毒(HCV)感染的方法, 该方法包括:

(a) 提供如上所述的免疫测定固相支持物;

(b) 当生物样品中存在 HCV 抗体时, 在允许 HCV 抗体和所述的 NS3/4a 表位和/或所述的多重表位融合抗原结合形成第一种免疫复合物的条件下, 将生物样品与所述的固相支持物混合;

(c) 在复杂的形成条件下, 在步骤(b)的固相支持物中加入可检测的标记抗体, 其中所述的标记抗体与所述的免疫复合物反应;

(d) 如果有的话, 检测在可检测的标记抗体和第一种免疫复合物之间形成的第二种免疫复合物, 这表明生物样品中存在 HCV 感染。

在另一个实施例中, 本发明涉及检测生物样品中丙肝病毒(HCV)感染的方法, 所述的方法包括:

(a) 提供免疫测定固相支持物, 其基本由其上结合的至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原构成, 其中所述的 NS3/4a 构象表位由图 3A-3D 所示的氨基酸序列构成, 且所述的多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成;

(b) 当生物样品中存在 HCV 抗体时, 在允许 HCV 抗体和所述的 NS3/4a 表位和/或所述的多重表位融合抗原结合形成第一种免疫复合物的条件下, 将生物样品与所述的固相支持物混合;

(c) 在复杂的形成条件下, 在步骤(b)的固相支持物中加入可检测的标记抗体, 其中所述的标记抗体与所述的免疫复合物反应;

(d)如果有的话,检测在可检测的标记抗体和第一种免疫复合物之间形成的第二种免疫复合物,这表明生物样品中存在 HCV 感染。

在另一实施例中,本发明涉及免疫诊断测试的试剂盒,其包括如上所述的免疫测定固相支持物和进行免疫诊断测试的说明书。

在另一实施例中,本发明涉及制备免疫测定固相支持物的方法,该方法包括:

(a)提供固相支持物;和

(b)将至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原结合于固相支持物上,其中所述的 NS3/4a 表位和/或所述的多重表位融合抗原与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应。

在某些实施例中,构象表位包含图 3A-3D 所示的氨基酸序列,或与该序列至少 80%相同的氨基酸序列,或与其至少 90%相同的序列,或至少 98%相同的序列,或其间任何整数,只要该序列具有蛋白酶活性;和多重表位融合抗原包含图 5A-5F 所示的氨基酸序列,或与该序列至少 80%相同的氨基酸序列,或 90%相同的序列,或至少 98%相同的序列,或其间任何整数,只要该序列与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体能特异性地反应。

在另一实施例中,NS3/4a 构象表位由图 3A-3D 所示的氨基序列构成,且多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中,本发明涉及制备免疫测定固相支持物的方法,该方法包括:

(a)提供固相支持物;和

(b)将至少一种 HCV NS3/4a 构象表位和多重表位融合抗原结合于固相支持物上,其中所述的 NS3/4a 表位由图 3A-3D 所示的氨基酸构成,且所述的多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中,本发明涉及一种多重表位融合抗原,包含图 5A-5F 所示的氨基序列、或与其至少 80%相同的氨基酸序列、或 90%相同的序列、或至少 98%相同的序列、或其间任何整数,该序列与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应。

在某些实施例中,多重表位融合抗原由图 5A-5F 所示的氨基酸序列构成。

在另一实施例中，本发明涉及一种多核苷酸，其包括编码多重表位融合抗原的序列；包含多核苷酸和可操作地连接于所述多核苷酸的控制元件的重组载体，由此编码序列可在宿主细胞中转录和翻译；用重组载体转化宿主细胞；和制备重组多重表位融合抗原的方法，该方法包括提供如上所述的宿主细胞群，并在表达所述的重组载体中存在的编码序列编码的多重表位融合抗原的条件下培养所述的细胞群。

在一优选实施例中，本发明的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 80% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列；在另一优选实施例中，本发明的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 90% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列；在又一优选实施例中，本发明的多核苷酸包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列，或与该序列至少 98% 相同的、且编码能与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗 HCV 抗体特异性反应的多肽的核酸序列。

本发明的这些和其它方面在参考下列详述和附图后变得明显。

附图描述

图 1 是 HCV 基因组示图，描述了衍生出本测定试剂(蛋白质和抗体)的多蛋白的不同区域。

图 2 是本发明的典型免疫测定的示意图。

图 3A-3D 显示了用于本测定的典型 NS3/4a 构象抗原的 DNA 和相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。在图 3A-3D 中 403 和 404 位的氨基酸代表 HCV-1 的天然氨基酸序列中的 Pro 代替 Thr，和 Ile 代替 Ser。

图 4 是 MEFA 7.1 的示意图。

图 5A-5F 为 MEFA 7.1 的 DNA 及相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

图 6A-6C 显示了用于本发明免疫测定的典型 MEFA。图 6A 是 MEFA 3 的示意图。图 6B 是 MEFA 5 的示意图。图 6C 是 MEFA 6 的示意图。

图 7A-7D 是构建物 psMEFA 7 的示意图。

图 8 是构建物 psMEFA 7.1 的示意图。

图 9 是构建物 pd.HCV1a.ns3ns4aPI 的示意图。

发明详述

本发明的实施除非另外说明,将使用本领域技术人员已知的化学、生物化学、重组DNA技术和免疫学的常规方法。这些技术在文献中有完整的解释。参见,如《基础免疫学》(Fundamental Virology),第二版,第I和II卷(B.N.Fields和D.M.Knipe编);《实验免疫学手册》(Handbook of Experimental Immunology),第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编,Blackwell Scientific Publications);T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子特性》(Proteins: Structures and Molecular properties)(W.H. Freeman and Company, 1993);A.L. Lehninger,《生物化学》(Biochemistry)(Worth Publishers, Inc. 最新版);Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: a Laboratory Manual),第二版,1989;《酶学方法》(Methods in Engymology)(S.Colowick和N. Kaplan编,Academic Press, Inc.)。

必须注意的是,如本说明书中和权利要求中使用的,单数形式“一”、“一个”、“该”包括复数参考,除非内容明显说明。因此,“一抗原”的应用包括两个或多个抗原的混合物等。

文中使用了下列氨基酸缩写:

丙氨酸: Ala(A)	精氨酸: Arg(R)
天冬酰胺: Asn(N)	天冬氨酸: Asp(D)
半胱氨酸: Cys(C)	谷氨酰胺: Gln(Q)
谷氨酸: Glu(E)	甘氨酸: Gln(Q)
组氨酸: His(H)	异亮氨酸: Ile(I)
亮氨酸: Leu(L)	赖氨酸: Lys(K)
甲硫氨酸: Met(M)	苯丙氨酸: Phe(F)
脯氨酸: Pro(P)	丝氨酸: Ser(S)
苏氨酸: Thr(T)	色氨酸: Trp(W)
酪氨酸: Tyr(Y)	缬氨酸: Val(V)

I. 定义

在本发明的描述中,使用了下列术语,并如下定义。

术语“多肽”和“蛋白质”指氨基酸残基的聚合物,并不限于产物的最小长度。因此,肽、寡肽、二聚物、多聚物等都包括在该定义中。全长的蛋白质及其片段包括在该定义中。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。另外,为了本发明的目的,“多肽”指包括天然序列的修饰,例如缺失、添加和取代(通常性质保守),只要蛋白质维持所需活性。这些修饰可以通过定点诱变设计,或可以是偶然的,例如通过产生蛋白

质的宿主突变，或由于 PCR 扩增引起的错误。

HCV 多肽是一种如上所述的衍生自 HCV 多蛋白的多肽。该多肽不需要物理衍生自 HCV，但可以是合成或重组产生的。另外，该多肽可衍生自任何一种 HCV 株和分离物，如但不限于来自 HCV 株 1、2、3、4、5 或 6 的任一分离物。在这些病毒株之间有许多保守和可变的区域，一般当两条序列排列时，衍生自这些区域的表位的氨基酸序列将具有高程度的序列同源性，例如高于 30%，优选高于 40% 的氨基酸序列同源性。因此，例如术语“NS3/4a”多肽指任何一种 HCV 株的天然 NS3/4a 和 NS3/4a 类似物、突变蛋白和免疫原性的片段(如下进一步定义)。许多这些病毒株的完整基因型是已知的。参见如美国专利 No. 6, 150, 087 和 GenBank 登录号 AJ238800 和 AJ238799。

术语“类似物”和“突变蛋白”指参照分子的生物活性衍生物，或这些衍生物保留所需活性(如在本文所述的测定中的免疫反应性)的片段。通常，术语“类似物”指具有天然多肽序列和结构，以及相对于天然分子的一个或多个氨基酸添加、取代(通常性质保守)和/或缺失的化合物，只要修饰不破坏免疫原性的活性。术语“突变蛋白”指具有一种或多种肽模拟物(“类肽”)的肽，如国际出版物号 W091/04282 中所述的。优选类似物或突变蛋白至少具有与天然分子相同的免疫活性。制备多肽类似物和突变蛋白的方法是本领域已知的，如下进一步所述。

特别优选的类似物包括性质上保守的取代，即这些取代发生在与它们的侧链有关的一类氨基酸中。具体而言，氨基酸一般被分成四类：(1) 酸性--天冬氨酸和谷氨酸；(2) 碱性--赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3) 非极性--丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；(4) 无电荷的极性--甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。有时将苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸归为芳族氨基酸。例如，有理由预测：单独用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、用谷氨酸取代天冬氨酸、用丝氨酸取代苏氨酸，或者用结构上相关的氨基酸取代类似的保守的氨基酸，这样的取代将不会对生物活性有重要影响。例如，感兴趣的多肽可包括多达约 5-10 个保守的或不保守的氨基酸取代，甚至多达约 15-25 个保守的或不保守的氨基酸取代，或 2-25 之间任何整数，只要该分子的所需功能仍维持完整。本领域

的熟练技术人员可结合本领域熟知的 Hopp/Woods 和 Kyte-Doolittle 曲线图, 容易地测定感兴趣的分子中可耐受改变的区域。

术语“片段”指仅由完整的全长多肽序列和结构的一部分组成的多肽。该片段可包括该天然多肽的 C 末端缺失和/或 N 末端缺失。特定的 HCV 蛋白质的“免疫原性片段”一般至少包括该全长分子的约 5-10 个连续的氨基酸残基, 较佳至少含有该全长分子的约 15-25 个连续的氨基酸残基, 最佳至少含有该全长分子的约 20-50 个或以上的连续的氨基酸残基, 这些氨基酸残基限定了一个表位; 或者含有 5 个氨基酸和全长序列之间的任何整数, 只要所述的片段在测定中保留免疫活性。例如, 优选的免疫原性片段, 包括但不限于 HCV 核心的片段, 包含例如多蛋白的氨基酸 10-45、10-53、67-88 和 120-130, 表位 5-1-1(在病毒基因组的 NS4a/NS4b 区中)和图 1 所示衍生自多蛋白的任何区域的限定的表位, 例如但不限于 HCV 多蛋白的 E1、E2、(NS3 如来自 NS3 区的多肽 c33c)、NS4 (如来自 NS3/NS4 区的多肽 c100), NS3/4a 和 NS5 区, 和任何其它从 HCV 多蛋白中鉴定出的各种表位。见例如 Chien 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1992), 89: 10011-10015; Chien 等, *J. Gastroent. Hepatol.*, (1993), 8: S33-39; Chien 等, 国际出版物 WO 93/00365; Chien, D. Y., 国际出版物 WO 94/01778; 美国专利 No.6,150,087 和 6,121,020。

术语“表位”在文中指至少约有 3-5 个、较佳地约 5 到 10 或 15 个、但不超过约 1000 个氨基酸(或其中的任何整数)的序列; 它定义了一条自身或作为较大序列的一部分, 与在对其应答中产生的抗体结合的序列。该片段的长度没有严格的上限, 它几乎可含有蛋白质序列的全长, 乃至可包括含有 HCV 多蛋白的两个或多个表位的融合蛋白。用于本发明的表位并不限于具有其母体蛋白质的部分的确切序列的多肽。实际上, 病毒基因组处于不断变动的状态, 且含有几种在隔离种群间具有高度易变的可变的结构域。因而, 术语“表位”包括与天然序列相同的序列, 以及该天然序列的修饰物, 如缺失、添加和取代(通常性质保守)。

可使用任何数量的本领域周知的表位作图技术来鉴别包括表位在内的给定多肽的区域。参见, 如《分子生物学方法》(*Methods in Molecular Biology*)中的表位作图程序, 第 66 卷(Glenn E. Morris 编辑, 1996), Humana Press,

Totowa, New Jersey。例如, 通过如同时在固相支持物上合成大量的肽, 对应于蛋白质分子的部分的肽, 然后在这些肽仍连接于该支持物时使肽与抗体反应, 就可测定各线性表位。这些技术在本领域中是已知的, 并在美国专利 No.4, 708, 871; Geysen 等(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3998-4002; Geysen 等(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:178-182; Geysen 等(1986), *Molec. Immunol.*, 23: 709-715 中有所描述。用这些技术鉴定了许多 HCV 的表位。参见如 Chien 等, 《病毒性肝炎和肝病》(Viral Hepatitis and Liver Disease) (1994), 第 320-324 页和下文。类似地, 通过使用如 X-射线结晶学和二维核磁共振法测定氨基酸的空间构象容易地鉴定构象表位。参见如“表位作图流程”, 上述。还可使用标准抗原性曲线图和亲水性图, 如用从 Oxford Molecular Group 获得的 Omega 1.0 版软件程序, 也可鉴别蛋白质的抗原区域。此计算机程序采用 Hopp/Woods 方法(Hopp 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1981), 78: 3824-3828) 确定抗原性特性, 并用 Kyte-Doolittle 技术(Kyte 等, *J. Mol. Biol.*(1982), 157: 105-132)绘制亲水性图。

术语“构象表位”在文中指全长蛋白质的一部分, 或其类似物或突变蛋白, 它具有编码该全长天然蛋白质内的表位的氨基酸序列的结构特征。天然的结构特征包括但不限于糖基化和三维结构。限定序列的表位长度可广泛改变, 因为据信这些表位是通过抗原的三维形状形成的(例如折叠)。因此限定该表位的氨基酸可以数量相对少, 但在全长分子中广泛地分散很开, 通过折叠形成正确的表位构象。限定表位的残基之间的抗原部分对于表位的构象结构不是关键的。例如, 这些间插序列的缺失或取代可能不影响构象表位, 条件是保留对于表位构象关键的序列(例如涉及二硫键、糖基化位点的半胱氨酸等)。

可用上述方法容易鉴别 NS3/4a 区中存在的构象表位。另外, 在给定的多肽中构象表位的存在与否可通过用抗体(构象表位的多克隆血清或单克隆抗体)筛选感兴趣的抗原, 并将它的反应性与仅保留线性表位(如存在)的抗原的变性形式比较来确定。在用多克隆抗体的筛选中, 有利的是首先用变性的抗原吸附多克隆血清, 看其是否保留针对感兴趣的抗原的抗体。另外, 在 NS3/4a 的情况中, 保留天然构象的分子还可以具有蛋白酶活性, 和任选的解旋酶活性。

这些活性可用酶测定检测(如下所述)。

较佳地, 重组产生构象表位, 并使它在一种在保留其所需结构特征条件下(如表位没有变性)能被抽提出来的细胞中表达。这样的细胞包括细菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。HCV 多蛋白的重组构象表位的表达和分离在如国际出版物 WO 96/04301、WO 94/01778、WO 95/33053、WO 92/08734 中有所描述。另外, 可能表达抗原并在回收后恢复蛋白质性质。还理解化学合成也可提供构象抗原模拟表位(mimotopes), 它与“天然”抗原的构象表位交叉反应。

本文所用的术语“多表位融合抗原”或“MEFA”指一种多肽, 其中多个 HCV 抗原是一条单一、连续的氨基酸链的部分, 该链在天然中不存在。HCV 抗原可以直接通过肽键彼此连接, 或通过插入氨基酸序列分隔。融合抗原还可以含有 HCV 多蛋白外源的序列。另外, 存在的 HCV 序列可以来自多基因型和/或 HCV 的分离物。本免疫测定中所用的具体的 MEFA 的例子在例如国际出版物 WO97/44469 中详述, 并在下文中进一步描述。

“抗体”指通过化学或物理方法与感兴趣的多肽专一性结合的分子。因此, HCV 核心抗体是一种与 HCV 核心蛋白特异性结合的分子。本文所用的术语“抗体”包括从多克隆和单克隆制备物获得的抗体, 及以下: 杂交(嵌合)抗体分子(参见如 Winter 等(1991) *Nature* 349:293-299; 和美国专利 No.4,816,567); $F(ab')_2$ 和 $F(ab)$ 片段; F_v 分子(非共价异二聚体, 参见如 Inbar 等(1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2659-2662; 和 Ehrlich 等(1980) *Biochem* 19:4091-4096); 单链 F_v 分子(sFv)(参见如 Huston 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883); 二聚和三聚抗体片段构建物; 小抗体(参见如 Pack 等(1992) *Biochem* 31:1579-1584; Cumber 等(1992) *J Immunology* 149B: 120-126); 人源化抗体分子(参见如 Riechmann 等(1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyan 等(1988) *Science* 239: 1534-1536; 和英国专利申请 No.GB 2,276,169, 1994 年 9 月 21 日出版); 和从这些分子获得的任何功能性片段, 其中这些片段维持亲本抗体分子的免疫结合性质。

本文所用的术语“单克隆抗体”指具有同源抗体群的抗体组合物。术语不限于抗体种类或来源, 也不受其制备方式的限制。因此, 该术语包括从小

鼠杂交瘤获得的抗体，及用人而不是小鼠杂交瘤获得的人单克隆抗体。参见如 Cote 等，《单克隆抗体和癌症的治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)，Alan R. Liss, 1985, 第 77 页。

当涉及一种多肽时，“分离”意味着所述的分子从发现该分子天然存在的整个生物体中分离和分开，或基本不存在其它相同类型的生物大分子。术语“分离”对于多肽是：一种核酸分子，它完全或部分缺乏与其天然结合的序列；或一个序列，因为它天然存在，但具有与其结合的异源序列；或从染色体分离的分子。

“等效抗原决定簇”指来自 HCV 的不同亚种或株的抗原决定簇，例如 HCV 株 1、2 或 3。更特别地，表位是已知的，如 5-1-1，和病毒株 1、2 和 3 之间的表位有变化。因此，这三种不同病毒株的表位 5-1-1 是等效的抗原决定簇，即使“拷贝”，它们的序列不相同。等效抗原决定簇的氨基酸序列通常具有高度的序列同源性，例如当两个序列对比时，大于 30%的氨基酸序列同源性，较佳地大于 40%氨基酸序列同源性。

“同源性”指两条多核苷酸或两条多肽部分之间的相似性百分数。两条 DNA 或两条多肽序列在确定的分子长度内，当序列显示有至少约 50%，优选至少约为 75%、更佳至少约为 80-85%、尤其佳至少约为 90%、最佳至少约为 95-98%序列相似性时，彼此“基本上同源”。如本文所述，基本同源也指与特定的 DNA 或多肽序列完全相同的序列。

通常，“相同性”指两条多核苷酸或多肽序列上准确的核苷酸对核苷酸或者氨基酸对氨基酸对应。通过排列两个分子的序列直接比较它们的序列信息，计算两条排列的序列间匹配的准确数量，将其除以最短序列的长度，然后乘以 100，从而可得到相同性百分数。

在同源性和相同性分析中可辅助使用易于获得的计算机程序，如 ALIGH、Dayhoff、M.O.(*Atlas of Protein Sequence and Structure*、M.O.Dayhoff 编辑, 5 Suppl., 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC), 它适用于 Smith 和 Waterman 分析肽用的局部同源性算法(*Advances in Appl. Math.*, 2: 482-489, 1981)。可从 Wisconsin Sequence Analysis Package(第 8 版, 从 Genetics Computer Group, Madison, WI 获得)获得测定核苷酸序列同源性

的程序, 例如, BESTFIT、FASTA 和 GAP 程序, 这些程序也依赖于 Smith 和 Waterman 算法。使用制造者建议的和上述 Wisconsin Sequence Analysis Package 所述的默认参数可容易地使用这些程序。例如, 可使用 Smith 和 Waterman 的同源性算法的默认计分表和 6 个核苷酸位置的间隔罚分(gap penalty)测定的核苷酸序列与参比序列的同源性百分数。

本发明建立同源性百分数的另一方法是使用版权属于爱丁堡大学、由 John F. Collins 和 Shane S. Sturrock 开发、由 IntelliGenetics, Inc.(Mountain View, CA) 发行的 MPSRCH 程序包。Smith-Waterman 算法可在这套程序包中使用, 其中, 在计分表中使用默认参数(例如, 间隔开放罚分=12, 间隔延伸罚分=1, 间隔=6)。从这批数据产生的“匹配”值反映出“序列同源性”。计算序列间的相同性百分数或相似性百分数的其它合适的程序在本领域中一般都是已知的, 例如, 另一种排列程序是 BLAST, 使用默认参数。例如, 可使用下述默认参数的 BLASTN 和 BLASTP: 基因编码=标准; 过滤=无; 链=两; 截留=60; 期望值=10; 矩阵=BLOSUM62; 描述=50 个序列; 排序=HIGH SCORE; 数据库=无冗余, GenBank+ EMBL+ DDBJ+ PDB+ GenBank CDS 翻译 + Swiss 蛋白+ Spupdate+ PIR。在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> 网址上可查到这些程序的详细描述。

或者, 在同源区域之间形成稳定的双链的条件下进行多核苷酸杂交, 接着用单链特异性核酸酶消化, 然后测定消化的片段的大小, 从而测出同源性。在如(对具体的体系所定义的)严格条件下进行的 Southern 杂交试验中, 可鉴别基本同源的 DNA 序列。确定适当的杂交条件在本领域熟练技术人员所掌握的知识之内。例如, 参见 Sambrook 等, 同上; *DNA Cloning*, 同上; *Nucleic Acid Hybridization*, 同上。

“编码序列”或“编码”选定多肽的序列, 是指当处于适当的调节序列的控制下时, 一种核酸分子在体外或体内被转录(对于 DNA)和翻译(对于 mRNA)成一种多肽。该编码序列的界限可由 5'(氨基)末端的起始密码子和 3'(羧基)末端的翻译终止密码子来确定。转录终止序列可以位于该编码序列的 3'端。

“可操作性连接”指元件的排列, 其中所述成分被排成一定的形状, 以便执行它们所需的功能。因而, 可操作性连接于编码序列的给定的启动子,

在正确的转录因子等存在时，能使该编码序列有效表达。该启动子不需要与该编码序列邻接，只要它起到指导该序列表达的功能即可。因此，例如不参与翻译但转录的序列可存在于启动子序列和编码序列之间，与可转录的内含子一样；并且仍可认为该启动子序列“可操作性连接”于该编码序列。

本文的“重组”核酸分子指基因组、cDNA、病毒、半合成或合成的多核苷酸，由于其来源或操作与其天然相关的多核苷酸完全或部分不相关。术语“重组”蛋白质或多肽是由重组多核苷酸表达产生的多肽。通常，克隆感兴趣的基因，然后在转化的生物体中表达(如下所述)。宿主生物体表达外源基因，从而在表达条件下产生该蛋白。

“控制元件”指帮助与其连接的编码序列表达的多核苷酸序列。该术语包括启动子、转录终止序列、上游调节结构域、聚腺苷酸化信号、非翻译区域(包括 5'-UTR 和 3'-UTR)，适当时还有前导序列和增强子，这些序列共同为宿主细胞中的编码序列的转录和翻译创造条件。

“启动子”在本文中指能结合宿主细胞中的 RNA 聚合酶并启动与之操作性连接的下游(3'方向)编码序列的转录的 DNA 调节区域。用于本发明的启动子序列包括以高于背景值的可检测的水平启动感兴趣的基因的转录所需的最小数量的碱基或元件。在该启动子序列中有转录起始位点以及负责 RNA 聚合酶结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。真核细胞启动子常常(但不总是)含有“TATA”框和“CAT”框。

控制序列在 RNA 聚合酶结合启动子序列时“指导转录”细胞中的编码序列，并将该编码序列转录成 mRNA，之后该 mRNA 被翻译成由该编码序列编码的多肽。

“表达盒”或“表达构建物”指能指导感兴趣的序列或基因的表达的装配。该表达盒包括上述控制元件，如操作性连接于感兴趣的序列或基因(以指导其转录)的启动子，该表达盒还常常包括多腺苷酸化序列。在本发明的某些实施例中，在此所述的表达盒可被包含在质粒构建物中。除了该表达盒的组分外，该质粒构建物还含有一种或多种可选择的标记物、使该质粒构建物以单链 DNA(如 M13 复制源)存在的信号、至少一个多克隆位点和“哺乳动物”复制源(如 SV40 或腺病毒复制源)。

“转化”在本文中指将外源多核苷酸插入宿主细胞中，而不考虑插入的方法：例如，通过直接摄取、转染、感染等的转化。下文进一步描述具体的转染方法。该外源多核苷酸可维持为未整合的载体，例如附加体，或者可以被整合到宿主基因组中。

“宿主细胞”是已被转化的细胞，或者能被外源 DNA 序列转化的细胞。

本文所用的“生物样品”指从受试者中分离的组织或液体的样品，通常包含由该受试者产生的抗体。典型的样品包括本领域已知的那些抗体，包括(但不限于)血液、血浆、血清、粪便物、尿液、骨髓、胆汁、脊髓液、淋巴液、皮肤样品、皮肤分泌物、呼吸道分泌物、肠道分泌物和泌尿生殖道分泌物、泪液、唾液、乳液、血细胞、器官、活组织检查和体外细胞培养组分的样品，包括但不限于细胞和组织在培养基中生长获得的条件培养基，例如重组细胞和细胞成分。

“一般固相支持物”指一个单一固相基质，免疫测定所用的 HCV 多肽与其共价或通过非共价方式，例如疏水性吸附结合。

“免疫反应性”指所关心的抗原与 HCV 感染的个体的生物样品中存在的抗-HCV 抗体反应。

“免疫复合物”指当抗体和抗原上的表位结合时，形成的组合。

本文所用的术语“标记”和“可检测标记”指能检测的分子，包括但不限于反射性同位素、荧光素、化学发光物、生色团、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、生色团、染料、金属离子、金属溶胶、配体(例如生物素、亲和素、链霉亲和素和肝素)等。术语“荧光素”指能在可检测范围内显示荧光的物质或其部分。可在本发明中使用的特定标记的例子包括但不限于，辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素、FITC、罗丹明、丹磺酰、伞形酮、二甲基吡啶鎓酯(DMAE)、德克萨斯红、鲁米诺、NADPH 和 α - β -半乳糖苷酶。

II. 本发明的实施方式

在详细描述本发明之前，应理解本发明并非局限于特定的制剂或加工参数，显然它们是可以变化的。还应理解本文所用的术语仅用于说明本发明具体实施例的目的，而并非对其限定。

虽然大量与本文所述类似或相等的组合物和方法可用于本发明的实践中，但本文描述了优选的材料和方法。

如上所述，本发明的基础是发现了用于精确检测早期 HCV 感染的新型诊断方法。该方法依靠鉴定和使用 HCV 血清转化的早期阶段中存在的高免疫原性的 HCV 抗原，从而增加检测精确性并减少错误结果的发生。具体说，本文所述的免疫测定使用自 HCV 多蛋白的 NS3/4a 区域衍生的高免疫原性构象表位，和包含各种 HCV 多肽的多表位融合抗原，各来自相同或不同 HCV 基因型和分离物，如多优势免疫表位，例如 HCV 核心、E1、E2、NS3、5-1-1、c100-3 和 NS5 序列的主要线状表位。可以方便地以单次试验进行这些方法，使用如下所述的若干分析方式的任何一种，如(但并非限制于)：用结合有 HCV 抗原的固相支持物的分析方式。

已描述了 HCV 多蛋白的 NS3/4a 区域，且该蛋白的氨基酸序列和整体结构公开于：如 Yao 等，Structure(1999 年 11 月)7: 1353-1363; Sali 等，Biochem. (1998)37:3392-3401；和 Bartenschlager, R., J. Viral Hepat. (1999)6:165-181。同样，可参见 Dasmahapatra 等的美国专利 No. 5, 843, 752。所进行的免疫测定使用至少一种自 NS3/4a 区域衍生的构象表位，其以天然的 HCV 粒子或其传染性产物中所发现的构象存在，这可通过由 NS3/4a 基因产物正常表现的蛋白酶和任选地解旋酶活性的保存和/或抗原与受 HCV 感染的对象的生物样品中的抗体的免疫反应性以及抗原变性后表位的免疫反应性验证。例如，通过加热、pH 变化至极酸性或碱性或通过添加已知的有机变性剂(如二硫苏糖醇(DTT))或适当的去污剂破坏构象表位。参见如《蛋白质的纯化方法，实用方法》(Protein Purification Methods, a Practical approach)(E. L. Harris 和 S. Angal 编辑，IRL Press)，并将变性的产物与未进行上述处理的产物相比。

可用本领域已知的标准酶试验确定蛋白酶和解旋酶活性。例如，可用以下实例中所述的方法和本领域已知的方法确定蛋白酶活性。参见如 Takeshita 等，Anal. Biochem. (1997)247:242-246; Kakiuchi 等，J. Biochem. (1997) 122:749-755; Sali 等，Biochemistry(1998)37:3392-3401; Cho 等，J. Virol. Meth (1998)72:109-115; Cerretani 等，Anal. Biochem. (1999) 266:192-

197;Zhang 等, Anal.Biochem. (1999)270:268-275;Kakiuchi 等, J.Virol. Meth(1999) 80:77-84;Fowler 等, J.Biomol.Screen. (2000)5: 153-158;和 Kim 等, Anal. Biochem. (2000)284:42-48。类似地, 解旋酶活性分析是本领域熟知的, 且 NS3/4a 表位的解旋酶活性可用如下方法确定, 例如 ELISA 分析(如 Hsu 等, Biochem.Biophys, Res. Commun. (1998)253:594-599 中所述); 闪烁亲近测定系统(如 Kyono 等, Anal.Biochem. (1998)257:120-126 中所述); 高通量筛选测定法(如 Hicham 等, Antiviral Res. (2000) 46:181-193 和 Kwong 等, Methods Mol.Med. (2000)24:97-116 中所述); 以及本领域已知的其它测定法。例如, 参见 Khu 等, J.Virol. (2001)75:205 -214;Utama 等, Virology (2000)273:316-324; Paolini 等, J.Gen.Virol. (2000)81:1335-1345; Preugschat 等, Biochemistry (2000)39:5174-5183; Preugschat 等, Methods Mol.Med. (1998)19:353-364; 和 Hesson 等, Biochemistry(2000)39:2619-2625。

抗原的长度足以维持免疫反应性的构象表位。通常, 含有所用抗原的多肽几乎是全长的, 然而也可以截短该多肽, 例如用于增加溶解性或改善分泌。一般而言, 在细胞中以重组多肽形式表达 NS3/4a 的构象表位, 且多肽提供所需形式的表位(如下详述)。

图 3A-3D 显示了 NS3/4a 多肽的典型氨基酸序列。图上 2-686 位置所示的氨基酸序列相应于 HCV-1 的 1027-1711 位的氨基酸。在 1 位显示了编码 Met 的起始密码子(ATG)。另外, 在 HCV-1 的 1428 位通常出现的 Thr(图 3 的氨基酸 403 位)突变为 Pro, 在 HCV-1 的 1429 位通常出现的 Ser(图 3 的氨基酸 404 位)突变为 Ile。然而, 无论是天然序列(有或无 N-末端 Met)、所示的类似物(有或无 N-末端 Met)或其它类似物和片段都可用于试验, 只要使用保存或恢复其天然构象(如保留蛋白酶活性和任选地解旋酶活性)的方法制备该表位。Dasmahapatra 等, 美国专利 No.5,843,752 和 Zhang 等, 美国专利 No.5,990,276, 他们都描述了 NS3/4a 的类似物。

在约 1027-1207 位发现 NS3/4a 的 NS3 蛋白酶, 相对于 HCV-1(参见 Choo 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1991)88:245`-2455)编号, 图 3 上为 2-182 位。NS3 蛋白酶的结构和活性位点是已知的, 参见如 De Francesco 等, Antivir.

Ther. (1998)3:99-109; Koch 等, Biochemistry (2001)40:631-640。通常可以耐受的天然序列的变化将是分子活性位点以外的变化。具体说, 需要维持图 3 的氨基酸 1-或 2-155 (有少量或仅有保守性替代)。155 以外的氨基酸可以耐受更大的变化。另外, 如果使用图 3 中的 NS3/4a 序列的片段, 这些片段通常至少包括氨基酸 1-或 2-155, 较佳地包括氨基酸 1-或 2-175, 且最佳地包括氨基酸 1-或 2-182 (有或无 N-末端 Met)。发现解旋酶结构域约在 HCV-1 的 1193-1657 位 (图 3 的 207-632 位)。因此, 如果需要解旋酶活性, 就要维持分子的该部分有小量或仅有保守性变化。本领域技术人员根据 NS3/4a 的已知结构易确定耐受变化的其它区域。

本文所述的免疫测定还使用了多表位融合抗原 (称为 “MEFA”), 如国际出版物 No. W097/44469 所述。这些 MEFA 包括从 HCV 多蛋白的两种或多种不同的病毒区域衍生的多表位 (如图 1 和表 1 所示)。具体说, 如图 1 和表 1 所示, 切割后 HCV 多蛋白产生至少 10 种不同的产物, 其顺序为 NH₂-核心-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。其中核心多肽的位置为 1-191, 相对于 HCV-1 编号 (HCV-1 的基因组可参见, Choo 等, (1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455)。进一步加工该多肽产生约 1-173 个氨基酸的 HCV 多肽。包膜多肽 E1 和 E2 的位点分别为 192-383 和 384-746。发现 P7 结构域为约 747-809 位点。NS2 是具有蛋白酶活性的膜内在蛋白, 且在多蛋白的约 810-1026 位发现。NS2, 单独或与 NS3 结合 (在约 1027-1657 位发现), 切割 NS2-NS3 的 sissle 键, 从而产生 NS3 N-末端并释放大量的多蛋白 (具有丝氨酸蛋白酶和 RNA 解旋酶活性)。在约 1027-1207 位发现的 NS 蛋白酶在剩下的多蛋白加工中起作用。在约 1193-1657 位发现解旋酶活性。用在 NS3-NS4a 接头的自动催化 (用 NS3 丝氨酸蛋白酶催化) 切割引发多蛋白成熟的完成。随后的 NS3-介导的 HCV 多蛋白的切割似乎包括由另一种多肽的 NS3 分子识别多蛋白切割接头。在这些反应中, NS3 释放出 NS3 辅因子 (NS4a, 在约 1658-1711 位发现)、两种蛋白质 (在约 1712-1972 位发现的 NS4b, 在约 1973-2420 位发现的 NS5a) 和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (在约 2421-3011 位发现的 NS5b)。

表 1	
结构域	大约的边界*

C(核心)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

*相对于 HCV-1 编号。参见 Choo 等 (1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:2451-2455。

多重 HCV 抗原是氨基酸的单一、连续链(天然不存在的链)的一部分。因此,该表位的直线排列与其基因组中的直线排列不同。优先排列本文所用的 MEFA 序列的直线排列,使抗原性最佳。较佳地,这些表位来自多种 HCV 株,因此增加了在单次分析中检测多种 HCV 株的能力。所以,用于本文的 MEFA 可能包含自上述多蛋白衍生的不同的免疫原性区域。另外,可将由多蛋白核心区域中读框移位产生的蛋白质(如国际出版物 No. W099/63941 所述)用于 MEFA。如果需要,在融合蛋白中可能发生至少 2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 或更多的一种或多种衍生自 HCV 多蛋白的表位。

例如,在 MEFA 抗原中可以包含自如 E2 的高变区衍生的表位,如跨越氨基酸 384-410 或 390-410 的区域。特别有效的 E2 表位是包含自该区域衍生的共有序列的表位,如共有序列 Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn,其表现 1 型 HCV 基因组的氨基酸 390-10 的共有序列。本发明 MEFA 中存在的典型 E2 表位包含跨越氨基酸 390-444 的杂交表位。这种杂交 E2 表位可包含表现氨基酸 390-410 的共有序列,该序列融合于 HCV E2 的氨基酸 411-444 的天然氨基酸序列。

另外,可从各种 HCV 株衍生抗原。已知 HCV 的多种病毒株,且在融合蛋白中可用从任何这些株衍生的表位。已知任何特定品种的生物体的个体间互

不相同，而且特定生物体如病毒可以有大量不同的株。例如，如上所述，HCV 包括至少 6 种基因型。这些基因型各包括等效的抗原决定簇。更具体地说，各株包括大量抗原决定簇，它们存在于该病毒的所有株中，但各病毒株之间略有差异。例如，HCV 包括已知为 5-1-1 的抗原决定簇(参见图 1)。这种特定的抗原决定簇在 HCV 的三种不同的病毒株中有三种不同的形式。因此，在本发明的一个优选实施例中，用于免疫测定的多表位融合抗原上表现了三种形式的 5-1-1。类似地，也可能存在来自不同 HCV 株的核心区域的等效抗原决定簇。通常，等效抗原决定簇的氨基酸序列具有高度同源性，序列对比时其同源性程度通常为 30%或更高，较佳地为 40%或更高。本发明的多重拷贝表位还可包含同一表位的精确拷贝的多重拷贝。

图 4 和 6A-6C 显示用于本发明的、自 HCV 衍生的典型 MEFA。然而，应理解从 HCV 基因组衍生的其它表位也可用于本发明的分析。

图 5A 到 5F 显示了典型多表位融合抗原的 DNA 序列及相应的氨基酸序列。图 4 显示了 MEFA 7.1 的结构通式，其如下：hSOD-E1(1 型)-E2 HVR 共有序列(1a 型)-E2 HVR 共有序列(1 和 2 型)-解旋酶(1 型)-5-1-1(1 型)-5-1-1(3 型)-5-1-1(2 型)-c100(1 型)-NS5(1 型)-NS5(1 型)-核心(1+2 型)-核心(1+2 型)。这种多重拷贝表位包括以下氨基酸序列，相对于 HCV-1 编号(以下所述的氨基酸编号是按照 Choo 等(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:2451-2455 中提供的编号标志的，其中氨基酸#1 是由核心区域的编码序列编码的第一个甲硫氨酸)：超氧化物歧化酶的氨基酸 1-156(SOD，用于提高蛋白质的重组表达)；E1 区域多蛋白的氨基酸 303-320；多蛋白的氨基酸 390-410，表现 HCV-1a E2 高变区的共有序列；区域 E2 多蛋白的氨基酸 384-414，表现 HCV-1 和 HCV-2 的 E2 高变区的共有序列；HCV-1 多蛋白的氨基酸 193-1658，其确定解旋酶；5-1-1，氨基酸 1689-1735 的表位的三种拷贝，一种来自 HCV-1，一种来自 HCV-3，另一种来自 HCV-2，这些拷贝是 HCV 的三种不同病毒株的等效抗原决定簇；HCV-1 的多肽 C100，多蛋白的氨基酸 1901-1936；HCV-1 的 NS5 区域的表位的两种精确拷贝，各具有 HCV 多蛋白的氨基酸 2278-2313；和核心区域的表位的两种拷贝，一种来自 HCV-1 和一种来自 HCV-2，这两种拷贝是由 HCV-1 的氨基酸 9-32、39-42 和 64-88 以及 HCV-2 的氨基酸 67-84 表现的等效抗原

决定簇。

表 2 显示了参考本文图 5A-5F 的各种表位的氨基酸位置。

表 2 MEFA 7.1				
mefa aa#	5' 末端位点	表位	hcv aa#	菌株
1-156	<i>Nco</i> 1	hSOD		
159-176	<i>Eco</i> R1	E1	303-320	1
179-199	<i>Hind</i> 111	E2 HVR1a 共有序列	390-410	1
200-230		E2 HVR1+2 共有序列	384-414	1+2
231-696	<i>Sal</i> 1	解旋酶	1193-1658	1
699-745	<i>Sph</i> 1	5-1-1	1689-1735	1
748-794	<i>Nru</i> 1	5-1-1	1689-1735	3
797-843	<i>Cl</i> a1	5-1-1	1689-1735	2
846-881	<i>Ava</i> 1	C100	1901-1936	1
884-919	<i>Xba</i> 1	NS5	2278-2313	1
922-957	<i>Bgl</i> 11	NS5	2278-2313	1
958-1028	<i>Nco</i> 1	核心 表位	9-32, 39-42	1
			64-88	1
			67-84	2
1029-1099	<i>Bal</i> 1	核心 表位	9-32, 39-42,	1
			64-88	1
			67-84	2

在本发明的一个实施例中(图 2 所示), 用 NS3/4a 的构象表位和一种或多种多表位融合抗原如 MEFA 7.1, 进行快速捕捉配体免疫测定。将样品与如下所述可能存在于固相支持物上的抗原混合。如果用 HCV 感染样品, 存在于固相支持物上的那些表位的抗体将结合于固相支持物成分。检测是通过可检测标记(如图 2 所示的辣根过氧化物酶)与抗原/抗体复合物的成员结合进行的。这种结合可能是以共价形式, 或通过可检测标记的抗体的随后的结合(如在标准夹心测定中), 或通过反应产物可检测的酶反应。可检测的标记物包括(但并非限制于): 生色团、抗体、抗原、酶、酶反应化合物(其切割产物是可检测的)、罗丹明或罗丹明衍生物、生物素、亲和素、链霉亲和素、荧光化合物、

化学发光化合物(如二甲基吡啶鎓酯(DMAE, Ciba Corning Diagnostics Corp.)), 和这些标记物的衍生物和/或组合。可方便地使用能检测人 IgG 分子存在的一种可检测标记的抗人抗体。

为了进一步阐述本发明, 以下提供了对用于免疫测定的多肽制备以及进行免疫测定方法的更详尽的探讨。

制备用于 HCV 免疫测定的抗原

如上所述, 通常用重组方法制备本发明的分子。因此, 可以用标准分子生物学方法制备用于本发明的编码 HCV 抗原的多核苷酸。例如, 用重组方法可以获得编码上述分子的多核苷酸序列, 例如通过从表达该基因的细胞筛选 cDNA 和基因组文库, 或通过从已知的包括该基因的载体衍生该基因。另外, 用本领域所述的方法, 如 Houghton 等的美国专利 No. 5, 350, 671 所述的方法, 从病毒核酸分子直接分离出所需的基因。也可合成而非克隆制备感兴趣的基因。可用适当的特定序列的密码子消化该分子。然后将用标准方法制备的重叠的寡核苷酸装配完整的序列, 并装配入完整的编码序列中。参见如 Edge(1981)Nature 292:756; Nambair 等(1984)Science 223:1299;和 Jay 等(1984)J. Biol. Chem. 259:6311。

因此, 从携带所需序列的载体可获得具体的核苷酸序列, 或用本领域已知的各种寡核苷酸合成方法, 如定位诱变和聚合酶链式反应(PCR), 完全或部分合成。参见如 Sambrook, 上述。具体说, 获得编码所需序列的核苷酸序列的方法是用常规的自动多核苷酸合成仪制备的退火补集的重叠的合成的寡核苷酸, 然后用适当的 DNA 连接酶连接, 并用 PVR 扩增连接的核苷酸序列。参见如 Jayaraman 等(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088。另外, 在本发明中也可使用寡核苷酸定向的合成(Jones 等, (1986)Nature 54:75-82)、先有核苷酸区域的寡核苷酸定向诱变(Riechmann 等, (1988)Nature 332:323-327 和 Verhoeyen 等(1988)Science 239:1534-1536)和用 T₄DNA 聚合酶进行的酶促补平带缺口的寡核苷酸(Queen 等(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033), 以提供抗原结合能力变化或提高的和/或免疫原性降低的分子。

一旦制备或分离了编码序列，就可将这些序列克隆入任何合适的载体或复制子中。对本领域技术人员而言，各种克隆载体是已知的，且适当的克隆载体的筛选只是选择问题。合适的载体包括(但并非限制于)：质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体或当与适当的控制元件结合时能复制的病毒。

然后将克隆序列置于合适的控制元件的控制下，这取决于用于表达的系统。因此，可以将编码序列置于启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和任选地操纵子的控制下，从而由合适的转化体将感兴趣的 DNA 序列转录到 RNA 中。该编码序列可以包含或不包含信号肽或前导序列(随后可由宿主在翻译后加工除去)。参见如美国专利 No. 4, 431, 739; 4, 425, 437; 4, 338, 397。

除了控制序列外，可以添加调节序列，从而可以相对于宿主细胞的生长调节序列的表达。调节序列是本领域技术人员已知的，其实例包括那些能导致应答化学或物理刺激(包括调节化合物的存在)启动或关闭基因表达的调节序列。载体中还可存在其它类型的调节元件。例如，可以使用增强子元件以增加构建物的表达水平。实例包括 SV40 早期基因增强子(Dijkema 等(1985)EMBO J. 4:761)；从 Rous 肉瘤病毒的长末端重复序列(LTR)衍生的增强子/启动子(Gorman 等(1982)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:6777)；和从人 CMV 衍生的元件(Boshart 等, (1985)Cell 41:521)，如 CMV 内含子 A 序列中包括的元件(美国专利 No. 5, 688, 688)。表达盒中还可包括在合适的宿主细胞中自主复制的复制起点、一种或多种可选择的标记物、一个或多个限制酶切位点、高拷贝数量的势能和强启动子。

构建表达载体，使具体的编码序列位于该具有适合调节序列的载体中，与控制序列有关的编码序列的位置和取向使编码序列在控制序列的“控制”下转录(即，结合于控制序列中 DNA 分子的 RNA 聚合酶转录该编码序列)。可能需要对编码感兴趣分子的序列进行修饰来实现此目的。例如，在一些情况中可能需要修饰该序列，从而使其连接于适合取向的控制序列，即维持读框。在插入到载体之前，控制序列和其它调节序列可能连接于编码序列。或者，可以将编码序列直接克隆入已包含控制序列和合适的限制酶切位点的表达载体中。

如上所述，还可能需要制备感兴趣的抗原的突变体或类似物。尤其对

NS3/4a 而言。如此制备的方法在如下文献中有描述, 如 Dasmahapatra 等的美国专利 No. 5, 843, 752 和 Zhang 等的美国专利 No. 5, 990, 276。通过缺失一部分编码感兴趣的多肽的序列、插入序列、和/或替代该序列内的一个或多个核苷酸, 可以制备用于分析的这种和其它 HCV 蛋白的突变体或类似物。修饰核苷酸序列的方法, 如定向诱变等是本领域技术人员所熟知的。参见如 Sambrook 等, 上述; Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82 :448; Geisselsoder 等(1987) BioiTechniques 5:786; Zoller 和 Smith(1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland 等 (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79: 6409。

这种分子可以在各种系统中表达, 包括本领域熟知的昆虫、哺乳动物、细菌、病毒和酵母表达系统。

例如, 昆虫细胞表达系统如杆状病毒系统是本领域技术人员已知的, 描述于如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法都是可以试剂盒形式购得的, 尤其是 Invitrogen, San Diego CA(“MaxBac”试剂盒)。类似地, 细菌和哺乳动物细胞表达系统也是本领域熟知的, 其描述见如 Sambrook 等, 如上。酵母表达系统也是本领域熟知的, 其描述见如《酵母遗传工程》(Yeast Genetic Engineering) (Barr 等编辑, 1989) Butterworths, London。

许多用于上述系统的适合的宿主细胞也是已知的。例如, 哺乳动物细胞系是本领域已知的, 其包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的无限增殖化的细胞系, 如(但并非限制于)中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、Hela 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人胚肾细胞、人肝细胞癌细胞(如 Hep G2)、Madin-Darby 牛肾(“MDBK”)细胞等。类似地, 在本发明的表达构建物中也可使用细菌宿主, 如大肠杆菌、枯草杆菌和链球菌。在本发明中还可使用酵母宿主, 特别包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、季也蒙氏毕赤酵母(*Pichia guilliermondii*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces*

pombe)和 *yarrowia lipolytica*。可与杆状病毒表达系统一起使用的昆虫细胞特别包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、黑尾果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)。

用本领域熟知的各种基因送递的方法,可将包含感兴趣的核苷酸序列的核酸分子稳定地整合入宿主细胞基因组中或在合适的宿主细胞中的稳定的附加型元件上维持。参见如美国专利 No. 5, 399, 346。

根据所选用的表达系统和宿主,在表达蛋白质的条件下,培养用如上所述的表达载体转化的宿主细胞制备该分子。然后从宿主细胞分离出表达的蛋白质并纯化。如果表达系统将蛋白质分泌到培养基中,则直接从培养基纯化产物。如果不是分泌的,则从细胞裂解液分离。适合的培养条件和回收方法的选择都是本领域技术人员能力之内的。

已描述了各种 HCV 抗原的制备,包括用于如上所述的多重表位融合蛋白的抗原。参见如 Houghton 等,美国专利 No. 5, 350, 671 和 5, 683, 864; Chien 等, *J. Gastroent. Hepatol.* (1993)8:S33-39; Chien 等, 国际出版物 No. WO 93/00365; Chien, D. Y., 国际出版物 No. WO 94/01778; Chien 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992)89:10011-10015; Chien, D. Y., 国际出版物 No. WO 94/01778; 和共同拥有的美国专利申请 No. 08/403, 590 和 08/444, 818。

免疫诊断试验

一旦制备出 HCV 抗原,就可将其用于任何试验形式中,即用已知的抗原检测抗体。所有这些试验的共同特征是将该抗原与怀疑含有 HCV 抗体的躯体成分,在让抗原与成分中存在的任何抗体结合的条件下接触。这些条件通常是生理温度、pH 和离子强度(使用过量抗原)。将抗原与标本一起培养,然后检测由抗原构成的免疫复合物。

免疫测定被设计成可由多种变化,且许多形式都是本领域已知的。例如,这些可使用固体支持物或免疫沉淀。大部分试验包括使用标记的抗体或多肽,标记物可以是如酶、荧光、化学发光、放射性或染料分子(如上所述)。增强免疫复合物信号的试验也是已知的;其实例为使用生物素和亲和素的试验、

酶标记的和介导的免疫测定, 如 ELISA 测定。

免疫测定可以是(但并非限制于)异源或同源形式, 标准或竞争性类型。在异源形式中, 通常将多肽结合于固体基质或支持物, 以促进培养后从多肽分离样品。为了本发明的目的, 固相支持物可以是任何不溶基质材料, 且具有刚性或半刚性表面。示范性的固相支持物包括(但并非限制于)基质如硝化纤维素(如以膜或微量滴定孔形式); 聚氯乙烯(如板或微量滴定孔); 聚苯乙烯乳胶(如珠或微量滴定板); 聚偏氟乙烯; 重氮化纸; 尼龙膜; 活化的小珠、磁力感应小珠等。具体的支持物包括板、小球、圆盘、毛细管、中空纤维、针、钉、固体纤维、纤维素小珠、微孔玻璃小珠、硅胶、聚苯乙烯小珠(任选地与二乙烯苯交联)、嫁接的共聚小珠、聚丙烯酰胺小珠、乳胶小珠、二甲基丙烯酰胺小珠(任选地与 N-N'-二-丙烯酰乙烯二胺交联)和用疏水聚合物包膜的玻璃微粒。

如果需要, 易将待加到固相支持物上的分子功能化, 产生苯乙烯或丙烯酸部分, 能让该分子掺入聚苯乙烯、聚丙烯酸酯或其它聚合物如聚酰亚胺、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚乙炔、聚二乙炔、聚苯撑-乙烯撑、多肽、多糖、聚砜、聚吡咯、聚咪唑、聚噻吩、聚醚、环氧化物、石英玻璃、硅胶、硅氧烷、多磷酸盐、水凝胶、琼脂糖、纤维素等。

在一实例中, 首先在合适的结合条件下, 如让分子充分地固定于支持物上, 将固相支持物与 HCV 抗原反应。有时可以提高支持物的固定化, 通过首先将抗原和/或抗体与具有较好固相结合特性的蛋白质偶联。合适的偶联蛋白包括(但并非限制于)大分子如血清白蛋白, 包括: 牛血清白蛋白(BSA)、匙孔蛾血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白和本领域技术人员已知的其它蛋白质。可用于将分子结合于支持物的其它试剂包括多糖、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物等。将这些分子与抗原偶联的分子和方法是本领域技术人员所熟知的。参见如 Brinkley, M. A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:2-13; Hashida 等 (1984) *J. Appl. Biochem.* 6:56-63; 和 Anjaneyulu 和 Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30:117-124。

在固相支持物与固相成分反应后, 冲洗除去支持物上未固定化的固相成

分,然后在合适的结合条件下,将与支持物结合的成分与怀疑含有 HCV 抗体(本文将其总称为“配体分子”)的生物样品接触。如果样品中存在 HCV 抗体,它们会与 HCV 抗原形成复合物。冲洗除去未结合的配体分子后,加入可检测标记的抗异源(如抗人)的抗体,其识别抗 HCV 抗体上的表位。这些抗体结合是由于复合物形成的结果。

在同源的形式中,将测试样品与抗原的组合物在溶液中培养。例如,可在以沉淀任何形成的抗原-抗体复合物的条件下进行。同源分析用的标准和竞争性方式也是本领域已知的。

在标准形式中,直接监测形成抗体-抗原复合物的 HCV 抗体的量。这可以通过确定识别抗 HCV 抗体上表位的标记的抗异源(如抗人)抗体是否会因复合物形成而结合。在竞争性形式中,通过监测对复合物中已知量的标记的抗体(或其它竞争性配体)的结合的影响,推算样品中 HCV 抗体的量。

更具体地说,根据形式,用许多已知方法中的任何一种检测形成的含抗-HCV 抗体(或在竞争性试验中,竞争抗体的数量)的复合物。例如,可以用与标记物(如酶标记)复合的抗异源 Ig 的偶联物检测复合物中未标记的 HCV 抗体。在免疫沉淀法和凝集试验形式中, HCV 抗原和抗体间的反应形成从溶液或悬浮液的沉淀物的网络,并形成可见层或沉淀膜。如果在测试标本不存在抗 HCV 抗体,则不会形成可见的沉淀物。

如上所述的测定试剂,包括具有结合的抗体和抗原以及与捕捉样品反应的抗体和抗原的免疫测定固相支持物,可以试剂盒形式提供,并附有适合的说明书和其它必需的试剂,从而可以进行如上所述的免疫测定。通常在分开的容器中试剂盒包含抗原的组合(已结合于固体基质或与将它们结合于基质的试剂分开)、对照抗体制剂(阳性和/或阴性)、标记的抗体(当试验形式需要时)和产生信号的试剂(如酶底物)(如果标记不直接产生信号)。通常在试剂盒中附有进行该试验的说明书(如纸件、磁带、VCR、CD-ROM 等)。根据所用的具体免疫测定,这种试剂盒还可包括其它包装的试剂和材料(即冲洗缓冲液等)。还可用这些试剂盒进行标准免疫测定(如上所述)。

III. 实验

以下为进行本发明的具体实施例。提供以下实施例仅用于说明本发明的目的，对本发明的范围无任何限制

已努力确保所用数学的精确性(如数量、温度等)，但一些实验误差和偏差也是在允许范围内的。

实施例 1

MEFA 7 和 MEFA 7.1 的构建

以下实施例说明多重 HCV 表位的多蛋白盒的制备。这里将从多表位盒表达的多蛋白称为多表位融合抗原(MEFA)。较佳地，当一种表位重复时，额外的拷贝是以相同方向串联排列的。可以理解用作表位的病毒编码序列的区域略有不同，并依旧保留抗原性活性，且氨基酸的编号在菌株间各不相同。因此，由于菌株序列的不同和/或编号，在氨基酸序列中重复的表位相互不同。较佳地，MEFA 内的重复表位的氨基酸序列的氨基酸水平是至少 30%同源的，较佳地氨基酸水平是至少 40%同源的。

引入独特的限制性内切酶位点，以便在程序中连接表位，并且在嵌合抗原的设计中通过促进修饰提高本发明的可用性。重组 DNA 技术领域中的技术人员易确定限制性内切酶位点和克隆方法的选择。较佳地，表位接头(由于克隆表位间产生的氨基酸序列)不会产生非特异性表位。非特异性表位是，如 HCV 表位附近天然不存在的非 HCV 序列。非特异性表位可结合样品中的抗体，而导致错误的阳性分析结果。较佳地，测试多表位融合蛋白，以确定是否是由于这种在表位接头产生的序列导致的错误阳性结果。为了避免由于接头序列而导致的与 MEFA 的非特异性相互反应，可以例如突变编码该接头的 DNA 序列，从而减少与突变型氨基酸序列的非特异性相互反应，并且克隆该表位片段是可能的。

通过克隆含有串联排列中主要表位的编码核苷酸序列(如图 4 所示)，构建 HCV MEFA 7 和 7.1 表达盒。根据抗体与表位的反应频率和反应强度(滴定度)选择主表位(Chein, D. Y. 等(1994)“病毒性肝炎和肝病”，第 320-324 页)。用 PCR 扩增或合成的核苷酸构建编码 HCV 表位的各种 DNA 节段。上表 2 和图

5A-5F 列出和显示了各节段的氨基酸。由 Choo 等(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455 确定了完整的 HCV-1 氨基酸序列(3011 个氨基酸)。美国专利 No. 5,350,671 描述了能结合 HCV 的寡核苷酸。本发明表位中的氨基酸编号按照 Choo 等(上述)提供的编号方式,其中氨基酸 1 为核心区域的编码序列编码的第一个甲硫氨酸(除非特别指出)。例如,NS5 的一个表位节段由 HCV 多蛋白的氨基酸 2278-2313 表示。E1 区域的表位由相对于 HCV-1 多蛋白编号的氨基酸 303-320 表示。

MEFA 7 和 7.1 各包含 HCV-1、HCV-2 和 HCV-3 的表位,从而可以在一次分析中测定多种类型的病毒。确定 HCV 血清型的方法可以参见 WO 96/27153。例如,发现 5-1-1 区域的表位在 HCV 的血清型之间各不相同。本文所述的 MEFA 中存在各 HCV 型特异性 5-1-1 表位的拷贝,从而可以结合测试生物样品中存在的任何类型的 HCV。

用酵母表达载体 pBS24.1(包含酵母中自主复制的 2 μ 序列和酵母基因 leu2-d 和 URA3 作为标记物),基因工程改造 MEFA 7 和 7.1 构建物从而在酿酒酵母中表达。在该表达载体中还存在细菌中质粒复制所需的 β -内酰胺酶基因和复制的 ColE1 起点。首先构建用于 MEFA 7 的酵母表达载体(ps. MEFA 7)。随后,在编码 HCV 核心表位的区域修饰该质粒,产生质粒 ps. MEFA 7.1(编码 MEFA 7.1 抗原)。

具体说,如图 7A-7D 所示,如下构建用于 MEFA 7 的酵母表达质粒。首先,从 ps. MEFA6(编码 MEFA 6 的表达质粒,见国际出版物 No. W097/44469 所述)分离出 1896bp 的 BamHI/HindII 片段,其编码 ADH2/GAPDH 杂交启动子, hSOD(氨基酸 1-156),继之以 E1 表位(氨基酸 303-320, HCV1 株)。下一步制得 HindIII/SphI 合成的 DNA 片段 269bp,包含 E2 HCV R1 的编码序列,共有表位(氨基酸 390-410, HCV-1)、E2 HCV R1+2 共有表位(氨基酸 384-414, HCV1+2)和解旋酶结构域的 5' 末端(氨基酸 1193-1229, HCV-1)。从 pTac5/HeII 质粒 DNA 凝胶纯化 1264bp 的 SphI/EclXI 片段,其编码解旋酶结构域的残余(氨基酸 1230-1651, HCV-1)。将 HindIII/SphI 合成的 DNA 片段和 SphI/EclXI 1264bp 片段连接入载体 pSP72new.HindIII/EclXI 载体中,以制备 pSP72new.HindIII/EclXI/e2. 解旋酶。该载体是从 pSP72 和大肠杆菌载体衍

生的, 可从 Promega, Madison, WI 购得(参见 GenBank/EMBL 登录号 X65332)。具体说, 为了促进亚克隆几种 MEFA 7 表位, 通过合成的寡聚物, 在 pSP72 的 SphI 和 BglII 位点间引入新的多克隆位点(MCS)多接头。用 HindIII 和 EclXI(也称为 EagI)消化这种新的质粒(命名为 pSP72 new), 其在 MCS 中具有独特的位点。然后将其磷酸化和凝胶纯化。

用该质粒转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞, 铺在含有 100 微克/毫升氨苄青霉素的 Luria 琼脂平板上。用小量制备 DNA 分析鉴定出所需的克隆。鉴定序列后, 用 HindIII 和 EclXI(EagI)消化质粒 pSP72new.HindIII/EclXI/e2.解旋酶亚克隆#4, 产生 1534bp 的片段。凝胶纯化该 HindIII/EclXI 片段, 并用编码解旋酶结构域的最后氨基酸(氨基酸 1651-1658, HCV-1)的 EclXI/SphI 寡核苷酸连接入 pGEM7 HindIII/SphI 载体中。转化 HB101 感受态细胞, 并铺在 Luria-氨苄青霉素(100 μ g/ml)上。鉴定出所需的克隆并进行序列验证后, 用 HindIII 和 SphI 消化 pGEM7HindIII/SphI 亚克隆#9, 产生 1560bp 的片段, 并将其凝胶纯化(参见, 图 7A)。

为了装配 MEFA 7 的 3'末端部分, 进行如下步骤。从 ps.MEFA 6(编码 MEFA 6 的表达质粒, 参见国际出版物 No. WO 97/44469 所述, 作为 441bp 的 SphI/AvaI 片段)凝胶分离 HCV-1、HCV-3 和 HCV-2(依次)的 5-1-1 表位(氨基酸 1689-1735)。将该片段与合成的编码 c100 表位(氨基酸 1901-1936)的 AvaI/XbaI 寡核苷酸连接入 pSP72new.SphI/XbaI 载体中。HB101 转化、克隆鉴定和序列验证后, 用 XbaI 和 NotI 消化 pSP72new.SXi 亚克隆#6, 以制备 pSP72new.XbaI/NotI 载体。另外, 从 ps.MEFA6 分离 221bp 的 XbaI/NcoI 片段, 其编码 NS5 表位(氨基酸 2278-2313, HCV-1)的两个重复序列。将 Xba/NcoI 片段和 NcoI/NotI 寡核苷酸(后者编码 HCV-1 核心表位的第一部分氨基酸(氨基酸 9-17), 前者 9 位的 Lys 变成 Arg, 11 位的 Asn 变成 Thr)连接入 pSP72new.XbaI/NotI 载体(如上制备)中。分析 HB101 转化体, 并测定它们的质粒 DNA 序列。用 NotI/SalI 消化被命名为 pSP72new.SX/XNi#3 的亚克隆, 以制备用于随后亚克隆的载体(参见图 7B)。

为了完成 MEFA 7 的 3'末端的装配, 如下将编码核心表位(HCV-1 的氨基酸 9-53)序列的两个重复序列, 以及核心区域的两个基因型-特异性表位(氨基

酸 64-88, HCV-1; 和氨基酸 67-84, HCV-2)亚克隆到 NotI-SalI 消化的 pSP72new.SX/XNi 亚克隆#3 中。首先, 从 pd.Core.191RT 克隆#20 分离出编码核心表位氨基酸 18-51 的 92bp 的 NotI/XmnI 片段。通过将 1365bp BamHI-NcoI 片段(ADH2/GAPDH 启动子)和 615bp NcoI-SalI 片段(编码 HCV-1 核心的前 191 氨基酸, 其中氨基酸 9 从 Lys 突变为 Arg, 氨基酸 11 从 Asn 突变为 Thr)连接到 pBS24.1 BamHI-SalI 酵母表达载体中, 构建质粒 pd.core.191RT。615bp NcoI-SalI 片段是从大肠杆菌表达载体衍生的, 其中克隆了具有上述两种相同突变的核心序列(氨基酸 1-191)。

将 92bp NotI/XmnI 片段连接于 pSP72new.Not/Kpn 载体和 XmnI/KpnI 寡核苷酸(编码完整核心表位的 3'末端)。测定阳性克隆的序列后, 用 NotI 和 KpnI 消化 pSP72new.NKi 亚克隆#4, 并凝胶分离 224bp 片段。将该 NotI/KpnI 片段与 284bp 寡核苷酸(KpnI-SalI 末端)(编码如上所述的核心表位的完整重复序列)连接入如上所述的 pSP72new.SX/Xni NotI/SalI 载体中。转化 HB101、鉴定克隆和测序后, 用 SphI 和 SalI 消化 pSP72new.SX/XN/NSi 亚克隆#18, 并凝胶分离 1317bp 的片段(参见图 7)。

最后, 如上所述将以下片段连接入 pBS24.1BamHI/SalI 酵母表达载体中, 制备 ps.MEFA 7(参见图 7D):

1896bp 的 BamHI/HindIII 片段(图 7A)

1560bp 的 HindIII/SphI 片段(图 7A)

1317bp 的 SphI/SalI 片段(图 7C)

用 ps.MEFA7 转化酿酒酵母菌株 AD3, 核查培养基中的葡萄糖耗尽后单个转化体的表达。如考马斯蓝染色检测, 在酵母中高水平地表达了重组蛋白。具体说, 采用乙酸锂方法, 用 EMFA 表达质粒转化酵母细胞。将 Ura^r转化体划线成单个菌落, 并盖到 Leu⁻/8%葡萄糖板上, 以增加质粒拷贝数。30℃培养 Leu⁻起始培养物 24 小时, 然后以 1: 20 用 YEPD(酵母提取液细菌蛋白胨 2% 葡萄糖)培养基稀释。让细胞在 30℃生长 48 小时并收获。为了测试 MEFA 7 重组抗原的表达, 在裂解缓冲液(10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 10mM DTT)中用玻璃小珠裂解这些细胞。高速离心裂解液。在 SDS 蛋白凝胶上分析上清液和不溶的沉淀物。不溶沉淀物组分中高度富含 MEFA 7。

如下纯化 MEFA 7 抗原。如上所述收获表达 MEFA 7 的酿酒酵母细胞。将细胞悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH8.0)中, 并用玻璃珠在 Dyno-Mill(Wab Willy A. Bachofon, Basel, Switzerland)或相等装置中裂解。低速条件(3,000-5,000rpm, 15 分钟)离心裂解液, 并用尿素浓度递增(1M, 2M, 3M)的裂解缓冲液冲洗含有不溶蛋白质组分的沉淀物。在裂解缓冲液中, 用 0.1N NaOH、4M 尿素溶解离心沉淀物中的蛋白质。在 3,000-5,000rpm, 低速离心 15 分钟除去细胞碎片。用 6N HCl 将上清液的 pH 调节至 8.0, 从而沉淀在这些条件下不溶的蛋白质。

离心除去沉淀物, 将上清液调节至 2.3%SDS, 50mM DTT, pH 8.0, 并煮沸 3 分钟。通过在 Pharmacia Sephacryl S-400 上, 在含有 0.1%SDS、1mM EDTA 的磷酸盐缓冲盐水中, 通过凝胶过滤使混合物中的蛋白质分级并调节至 pH 7.4。收集含有 MEFA 7 的柱洗脱组分, 混合并在 Amicon YM-30 膜上浓缩。用相同的柱和条件重复凝胶过滤混合的组分。

在以试验性测定方式分析 MEFA 7 的期间, 发现用作检测偶联物的单克隆抗体与核心表位的特定序列(氨基酸 33-38)反应。因此, 将 ps.MEFA 7.1 设计为消除核心表位区域的氨基酸 33-38。

如下制备用于 MEFA 7.1 的酵母表达载体。首先, 修饰 ps.MEFA 7 的 3' 末端的核心表位的两个重复序列。为此, 将 NcoI/KpnI 合成的片段(206bp), 编码第一条核心表位重复序列(HCV-1 的氨基酸 9-32、39-42 和 64-88 和 HCV-2 的氨基酸 67-82)和 KpnI/SalI 合成的片段(233bp), 编码 HCV-2 的氨基酸 83 和 84, 其后为第二核心表位重复序列(氨基酸 9-32, 氨基酸 39-42 和氨基酸 64-88, HCV-1; 氨基酸 67-84, HCV2), 分别亚克隆入 pSP72new.NcoI/KpnI 载体和 pSP72new.KpnI/SalI 载体中。在 HB101 转化、克隆鉴定和测序后, 用 NcoI 和 KpnI 消化 pSP72new.NKi 克隆#21, 从而分离出 206bp 的 NcoI/KpnI 片段, 并用 KpnI 和 SalI 消化 pSP72new.KSi 克隆#32, 以分离出 233bp 的 KpnI/SalI 片段。

通过将如下片段连接入 pBS24.1Bam/SalI 酵母表达载体中, 装配质粒 ps.MEFA 7.1(参见图 8):

1896bp 的 BamHI/HindIII 片段, 如上针对 ps.MEFA 7 所述;

1560bp 的 HindIII/SphI 片段, 如上针对 ps. MEFA 7 所述;

从编码 5-1-1 表位、c100 表位和 NS5 表位的 ps. MEFA7 分离的 766bp 的 SphI/NcoI 片段;

206bp 的 NcoI/KpnI 片段;

233bp 的 KpnI/SalI 片段。

用 ps. MEFA 7.1 转化酿酒酵母菌株 AD3, 核查培养基中的葡萄糖耗尽后单个转化体的表达(如上所述)。如考马斯蓝染色检测, 在酵母中高水平地表达了重组蛋白。

如下纯化 MEFA 7.1 抗原。如上所述收获表达 MEFA 7.1 的酿酒酵母细胞。将这些细胞悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, pH8.0)中, 并用玻璃珠在 Dyno-Mill(Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)或相等装置中裂解。用 JA-10 离心机, 以 10,000rpm 离心裂解液 30 分钟, 并用尿素浓度递增(1M, 2M, 3M)的裂解缓冲液冲洗含有不溶蛋白质组分的沉淀物。在裂解缓冲液中, 用 0.1N NaOH、4M 尿素、50mM DTT 溶解离心沉淀物中的蛋白质。用 JA-14 离心机, 以 14,000rpm 离心 20 分钟除去细胞碎片。用 6N HCl 将上清液的 pH 调节至 8.0, 从而沉淀下在这些条件下不溶的蛋白质。

用 JA-14 离心机, 以 14,000rpm 离心 20 分钟除去沉淀物。将上清液调节至 2.3% SDS, 并在沸水中加热至 70-75℃, 然后冷却至室温。通过在 Pharmacia Sephacryl S-400 HR 上, 在含有 0.1% SDS、1mM EDTA 的磷酸盐缓冲盐水中, 通过凝胶过滤使混合物中的蛋白质分级并调节至 pH 7.4。收集含有 MEFA 7 的柱洗脱组分, 混合、并在 Amicon YM-30 膜上浓缩。将混合的凝胶过滤组分调节至 2.3% SDS, 50mM DTT, 并加热/冷却(如上所述)。在与第一次凝胶过滤步骤相同的条件下, 将该混合物在 Pharmacia Sephacryl S-300 HR 柱上进行第二次凝胶过滤。

实施例 2

NS3/4a 构象表位的重组制备

如下获得 NS3/4a 的构象表位。该表位具有图 3A-3D 所示的序列, 与 403 位(HCV-1 全长序列的氨基酸 1428)和 404 位(HCV-1 全长序列的氨基酸 1429)

的天然序列不同。具体说,在天然序列 1428 位上通常出现的 Thr 已突变成 Pro,且天然序列 1429 位上出现的 Ser 已突变为 Ile。

具体说,所用的酵母表达载体是 pBS24.1(如上所述)。如下制备质粒 pd.hcv1a.ns3ns4aPI,其编码用于本发明免疫测定的典型 NS3/4a 表位。使用两步流程。首先,将以下的 DNA 片段连接在一起:(a)合成的寡核苷酸,其提供 5'*Hind*III 克隆位点,随后接序列 ACAAACAAA,起始密码子 ATG,和 HCV1a 的密码子,从氨基酸 1027 开始继续到氨基酸 1046 的 *Bgl*II 位点;(b)来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 683bp *Bgl*II-*Cla*I 限制性片段(编码氨基酸 1046-1274);和 (c)*Hind*III 和 *Cla*I 消化,去磷酸化和凝胶纯化的 pSP72 载体(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL 登录号 X65332)。质粒 pAcHLTns3ns4aPI 衍生自 pAcHLT,一种可从 BD Pharmingen(San Diego, CA)购得的杆状病毒表达载体。特别是制备了 pAcHLT *Eco*RI-*Pst*I 载体和如下片段:*Eco*RI-*Alw*NI, 935bp, 对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1027-1036, *Alw*NI-*Sac*II, 247bp, 对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1336-1419; *Hin*fI-*Bgl*II, 175bp, 对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1449-1509; *Bgl*II-*Pst*I, 619bp, 对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1510-1711, 加上转录终止密码子。*Sac*II-*Hin*fI 合成产生的 91bp 片段(对应于 HCV-1 基因组的氨基酸 1420-1448, 含有 PI 突变(Thr-1428 突变成 Pro, Ser-1429 突变成 Ile))与上述的 175bp *Hin*fI-*Bgl*II 片段和 619bp *Bgl*II-*Pst*I 片段连接,并亚克隆入用 *Sac*II 和 *Pst*I 消化的 pGEM-5Zf(+)载体中。pGEM-5Zf(+)是市售的大肠杆菌载体(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL 登录号 X65308)。在转化感受态 HB101 细胞,单个克隆小筛选分析并证实序列后,凝胶纯化 pGEM5.PI 克隆 2 的 885bp *Sac*II-*Pst*I 片段。该片段与上述的 *Eco*RI-*Alw*NI 935bp 片段、*Alw*NI-*Sac*II 247bp 片段和 pAcHLT *Eco*RI-*Pst*I 载体连接。得到的构建物命名为 pAcHLTns3ns4aPI。

上述连接混合物转化入 HB101-感受态细胞中,并铺在含有 100 微克/毫升氨苄青霉素的 Luria 琼脂平板上。单个克隆的小制备物分析鉴定了推定的阳性,扩增了其中两个。用 Qiagen Maxiprep 试剂盒制备 pSP72 1aHC,克隆#1 和#2 的质粒 DNA 并测序

接着,连接下列片段:(a)来自 pSP721aHC#1 的 761bp *Hind*III-*Cla*I 片段(pSP72.1aHC 是通过连接下列片段产生的:用 *Hind*III 和 *Cla*I 消化的 pSP72,

提供 5'*Hind*III 克隆位点的合成寡核苷酸,接着是序列 ACAAACAAA,起始密码子 ATG 和 HCV1a 的密码子,从氨基酸 1027 开始,继续直到氨基酸 1046 处的 *Bgl*II 位点,和来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 683bp *Bgl*II-*Cla*I 限制性片段(编码氨基酸 1046-1274));(b)酵母杂交启动子 ADH2/GAPDH 的 1353bp *Bam*HI-*Hind*III 片段;(c)来自 pAcHLTns3ns4aPI 的 1320bp *Cla*I-*Sal*I 片段(编码 HCV1a 氨基酸 1046-1711,其中 Thr1428 突变成 Pro, Ser1429 突变成 Ile);和(d)用 *Bam*HI 和 *Sac*I 消化,去磷酸化和凝胶纯化的 pBS24.1 酵母表达载体。该连接混合物转化入感受态 HB101 细胞,并铺在含有 100 微克/毫升氨苄青霉素的 Luria 琼脂平板上。单个克隆的小制备物分析鉴定了具有预期的 3446bp *Bam*HI-*Sal*I 插入的克隆,该片段包括 ADH2/GAPDH 启动子,起始密码子 ATG 和氨基酸 1027-1711 的 HCV1a NS3/4a(如图 3A-3d 显示的氨基酸 1-686), Thr1428(图 3A-3D 的氨基酸位置 403)突变成 Pro, Ser1429 (图 3A-3D 的氨基酸位置 404)突变成 Ile。构建物命名为 pd.HCV1a.ns3ns4aPI(见图 9)。

用 pd.HCV1a.ns3ns4aPI 转化酿酒酵母株 AD3,在培养基中的葡萄糖耗尽后检查单个转化体的表达。在酵母中高水平地表达了重组蛋白质,如考马斯亮蓝染色检测到的,并用针对 NS3 的解旋酶结构域的多克隆抗体通过免疫印迹分析来证实。

实施例 3

NS3/4a 构象表位的纯化

如下纯化 NS3/4a 构象表位。如上所述收集表达 NS3/4a 表位的酿酒酵母细胞。将细胞悬浮在裂解缓冲液(50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.1μM 抑胃酶肽, 1μM 亮抑蛋白酶肽),并用玻璃珠在 Dyno-Mill(Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)中或相等装置中,以 1:1:1 细胞:缓冲液:0.5mm 玻璃珠的比例裂解。裂解液以 30100xg 4℃离心 30 分钟,并在洗涤缓冲液(6ml/g 起始细胞沉淀重量)中加入含有不溶性蛋白质组分的沉淀物,室温振摇 15 分钟。洗涤缓冲液含有 50mM NaPO₄ pH8.0、0.3M NaCl、5mM β-巯基乙醇、10%甘油、0.05%辛基葡糖苷、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μM 抑胃酶肽、1μM 亮抑蛋白酶肽。以 30100xg 4℃离心 30 分钟除去细胞

碎片。丢弃上清液并保留沉淀物。

如下从沉淀物中抽提蛋白质。加入 6ml/g 抽提缓冲液并在室温振摇 15 分钟。抽提缓冲液含有 50mM Tris pH8.0、1M NaCl、5mM β -巯基乙醇、10%甘油、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1 μ M 抑胃酶肽、1 μ M 亮抑蛋白酶肽。以 30100xg 4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟。保留上清液并用下列配方将硫酸铵加到 17.55：上清液的体积(ml)乘以 $x\% \text{硫酸铵} / (1-x\% \text{硫酸铵}) = \text{加到上清液中的 4.1M 饱和硫酸铵的毫升数}$ 。一边在冰上搅拌，一边滴加硫酸铵，溶液在冰上搅拌 10 分钟。以 17700xg 4 $^{\circ}$ C 离心溶液 30 分钟，保留沉淀物，储藏在 2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C 达 48 小时。

重新悬浮沉淀物，并在 4 $^{\circ}$ C 如下通过 Poly U 柱(Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia)。沉淀物重新悬浮在 6ml Poly U 平衡缓冲液/克沉淀物重量中。平衡缓冲液含有 25mM HEPES pH8.0、200mM NaCl、5mM DTT(新鲜加入)、10%甘油、1.2%辛基葡糖苷。4 $^{\circ}$ C 振摇溶液 15 分钟，以 31000xg 离心 30 分钟。

制备 Poly U 柱(1ml 树脂/克起始沉淀物重量)。线性流速为 60cm/hr，填充流速为 133% 60cm/hr。用平衡缓冲液平衡柱，并在平衡的柱上装入重悬浮的硫酸铵沉淀物的上清液。用平衡缓冲液将柱洗到基线，在一步洗脱中用下列 Poly U 洗脱缓冲液洗脱蛋白质：25mM HEPES pH8.0、1M NaCl、5mM DTT(新鲜加入)、10%甘油、1.2%辛基葡糖苷。柱洗脱物(考马斯染色的)在 SDS-PAGE 上通过，冷冻等份并储藏在 -80 $^{\circ}$ C。用 Western 印迹，使用针对 NS3 蛋白酶结构域的多克隆抗体和针对 5-1-1 表位(HCV 4a)的单克隆抗体证实了 NS3/4a 表位的存在。

另外，在纯化过程中如下监测蛋白酶活性。用 90 μ l 反应缓冲液(25mM Tris, pH7.5, 0.15M NaCl, 0.5mM EDTA, 10%甘油, 0.05 正十二烷基 B-D-麦芽糖苷, 5mM DTT)稀释 NS4A 肽(KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK)和含有 NS3/4a 构象表位的样品，并在室温下混合 30 分钟。将 90 μ l 该混合物加到微量滴定板(Costar, Inc., Corning, NY)中，加入 10 μ l HCV 底物(AnaSpec, Inc., San Jose CA)。混合平板并在 Fluostar 平板阅读仪上阅读。结果表示为相对荧光单位(RFU)/分钟。

用这些方法，1M NaCl 抽提的产物含有 3.7RFU/分钟的活性，硫酸铵沉淀

具有 7.5RFU/分钟的活性，Poly U 纯化的产物具有 18.5 RFU/分钟的活性。

实施例 4

用 HCV 抗原涂覆固相支持物

如下将 HCV NS3/4a 构象表位和 MEFA 7.1 抗原涂覆到平板上。用 0.22 μ 过滤装置过滤 HCV 涂覆缓冲液(50mM NaPO₄ pH 7.0, 2mM EDTA 和 0.1% 氯乙酰胺)。将以下试剂顺序添加到 HCV 涂覆缓冲液中，且每次添加后都要搅拌：来自 10mg/ml 溶液的 2 μ g/ml 巯基修饰的 BSA, (Bayer Corp, Pentex, Kankakee, Illinois); 来自 1M 溶液的 5mM DTT, (Sigma, St. Louis, MO); 0.45 μ g/ml NS3/4a(蛋白质浓度为 0.3mg/ml); 0.375 μ g/ml MEFA 7.1(蛋白质浓度为 1mg/ml)。室温搅拌最终溶液 15 分钟。

将 200 μ l 上述溶液加到 Costar 高度结合的平底板(Corning Inc., Corning, New York)上，并将平板在保湿室内培养过夜。然后用冲洗缓冲液(1 $\times$ PBS, 0.1% TWEEN-20)洗涤平板，轻敲干燥，并加入 285 μ l Ortho Post-涂覆缓冲液(1 $\times$ PBS, pH 7.4, 1% BSA, 3% 蔗糖)。培养平板至少 1 小时，轻敲并在 2-8 $^{\circ}$ C 干燥过夜。将平板装入有干燥剂的袋内备用。

实施例 5

早期血清转化研究

将 NS3/4a 和 MEFA7.1 在组合分析(HCV 4.0)中的表现与其它 HCV 分析相比，以测试血清转化的检测范围，并将这些范围与其它可购得的测定获得的范围相比。用可购得的人血液样品(受 HCV 感染的)试验平板。下表中显示的 PHV 试验平板是从 Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA(BBI)购得的。从 Bioclinical Partners, Franklin, MA(BCP)购得 6212 个试验平板。从 North American Biologics, Inc., Boca Raton, FL(NABI)购得 SC 试验平板。表中所示的天数为获得血样的时间。

如下进行 HCV 4.0 分析。在涂覆的平板中加入 200 μ l 样品稀释缓冲液(1g/l 酪蛋白, 100mg/l 重组人 SOD, 1g/l 氯乙酰胺, 10g/l BSA, 500mg/l 酵母提取物, 0.366g/l EDTA, 1.162g/l KPO₄, 5ml/l Tween-20, 29.22g/l NaCl, 1.627 g/l

NaPO₄,1% SDS)。然后加入 20μl 样品。将其在 37℃ 培养 1 小时。用冲洗缓冲液(1xPBS、pH 7.4, 0.1% Tween-20)洗涤平板。添加 200μl 偶联溶液(小鼠抗人 IgG-HRP, 如在 ORTHO HCV 3.0 ELISA 测试系统中用 Enhanced SAve 批量偶联稀释液(Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)以 1:22,000 稀释的小鼠抗人 IgG-HRP, 并在 37℃ 培养 60 分钟。如上所述冲洗, 并添加 200μl 底物溶液(1OPD 片剂/10ml)。OPD 片剂含有辣根过氧化物酶反应显色所需的邻苯二胺二盐酸和过氧化氢。将其避光室温培养 30 分钟。加入 50μl 4N H₂SO₄ 终止反应, 并在 492nm 阅读平板, 相对于 690nm 处的吸光度作为对照。

本研究中所用的其它分析如下:

Abbott PRISM 试验(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)是市售的, 并且是基于抗体的检测试验。用厂商的说明书进行试验。

ORTHO HCV 3.0 版 ELISA 测试系统(Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)是一种基于抗体的检测试验。用厂商的说明书进行试验。

Pasteur MONOLISA 抗 HCV Plus 2 版试验(Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France)是一种基于抗体的检测试验。用厂商的说明书进行试验。

将 HCV 4.0 分析的表现与 HCV 3.0、PRISM 和 Pasteur 测试相比较(参见表 3 和 4)。表 4 中列出了血实验组中存在的 HCV 抗体(抗-c33c 或抗-c22)。具体说, 用上述方法分析如上所述的三种商业来源的 17 个血清转化实验组。可以看出, 对 c33c 实验组而言, HCV 4.0 显示比 HCV 3.0 更早地检出(9 个 c33c 实验组中有 1-3 个出血), 比 PRISM 更早检出(9 个实验组中有 6 个), 而与 PRISM 相比则检测结果相当(9 个实验组中有 3 个)。对 c22 实验组而言, HCV 4.0 显示比 HCV 3.0 更早检出(8 个实验组中有 3 个), 而其它 5 个实验组的检测结果相当。HCV 4.0 显示 8 个实验组中有 2 个比 PRISM 更早地检出, 而剩下的 6 个则相当。观察到 HCV 3.0 和 PRISM 分析在 2-14 天的改善范围。

表 3

ID	出血天数	s	HCV4.0	Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0	0.031	0.05	0.01	0.12
PHV 904-2	2	0.024	0.04	0.01	0.08
PHV 904-3	7	1.391		0.33	0.51
PHV 904-4	9	2.513			
PHV 904-5	14	3.197			
PHV 904-6	21	3.176			
PHV 904-7	23	3.554			

PHV 905-1	0	0.015	0.02	0.02	0.06
PHV 905-2	4	0.019	0.03	0.01	0.07
PHV 905-3	7	0.079	0.12	0.02	0.14
PHV 905-4	11	0.950		0.42	0.70
PHV 905-5	14	1.586		0.30	
PHV 905-6	18	2.529			
PHV 905-7	21	3.177			
PHV 905-8	25	3.419			
PHV 905-9	28	3.408			

ID	出血天数	s	HCV4.0	Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 907-1	0	0.030	0.05	0.01	0.09
PHV 907-2	4	0.023	0.03	0.01	0.09
PHV 907-3	7	0.021	0.03	0.01	0.11
PHV 907-4	13	0.148	0.22	0.13	0.35
PHV 907-5	18	1.728		0.83	
PHV 907-6	21	2.785			
PHV 907-7	164	3.279			

PHV 908-1	0	0.029	0.04	0.01	0.07
PHV 908-2	3	0.079	0.12	0.01	0.08
PHV 908-3	5	0.399	0.81	0.01	0.13
PHV 908-4	11	1.780		0.50	
PHV 908-5	13	2.068		0.47	
PHV 908-6	19	2.793			
PHV 908-7	25	3.390			
PHV 908-8	27	3.299			
PHV 908-9	32	3.474			
PHV 908-10	35	3.707			
PHV 908-11	41	3.363			
PHV 908-12	45	3.372			
PHV 908-13	48	3.278			

ID	出血天数	s	HCV4.0	Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 913-1	0	0.060	0.09	0.01	0.08
PHV 913-2	2	0.242	0.37	0.02	0.10
PHV 913-3	7	0.893		0.43 -	0.5 -
PHV 913-4	9	1.141		0.54 -	0.59 -

PHV 914-1	0	0.033	0.05	0.00	0.06
PHV 914-2	5	0.024	0.04	0.01	0.06
PHV 914-3	9	0.135	0.21	0.01	0.06
PHV 914-4	12	2.653		0.04	0.09
PHV 914-5	16	3.020		0.33 -	0.47 -
PHV 914-6	19	2.302		0.52 -	0.9 -
PHV 914-7	24	2.697			
PHV 914-8	30	2.744			
PHV 914-9	33	2.991			

ID	出血天数	s	HCV4.0	Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co
6212-1	11/16/95	0.723		0.01	0.08
6212-2	11/28/95	2.716		0.85	
6212-3	11/30/95	3.117			
6212-4	12/09/95	3.278			
6212-5	12/12/95	3.527			
6212-6	12/18/95	3.292			
6212-7	12/23/95	3.096			
6212-8	01/08/96	3.241			
6212-9	01/10/96	3.306			

6213-1	01/16/96	0.035	0.05	0.01	0.09
6213-2	01/18/96	0.028	0.04	0.00	0.07
6213-3	01/24/96	0.037	0.06	0.01	0.08
6213-4	01/27/96	0.047	0.07	0.01	0.09
6213-5	01/31/96	0.034	0.05	0.01	0.07
6213-6	02/03/96	0.037	0.06	0.01	0.07
6213-7	02/13/96	0.056	0.09	0.01	0.07
6213-8	02/15/96	0.027	0.04	0.01	0.06
6213-9	02/20/96	0.098	0.15	0.01	0.11
6213-10	02/22/96	1.572		0.44 -	
6213-11	02/28/96	3.410			
6213-12	03/02/96	3.224			

ID	出血天数	s	HCV4.0	Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co
6214-1	01/13/96	0.042	0.06	0.01	0.09
6214-2	01/15/96	0.016	0.02	0.00	0.07
6214-3	01/21/96	0.035	0.05	0.00	0.07
6214-4	01/23/96	0.028	0.04	0.00	0.07
6214-5	01/29/96	0.031	0.05	0.00	0.08
6214-6	01/31/96	0.028	0.04	0.00	0.09
6214-7	02/05/96	0.364	0.55	0.01	0.59
6214-8	02/07/96	0.916		0.02 -	
6214-9	02/12/96	2.290		0.94 -	
6214-10	02/14/96	3.899			
6214-11	03/02/96	3.523			
6214-12	03/06/96	3.125			
6214-13	03/08/96	3.246			

6222-1	08/18/96	0.023	0.03	0.01	0.08
6222-2	08/20/96	0.151	0.23	0.00	0.06
6222-3	09/04/96	0.053	0.08	0.00	0.06
6222-4	09/06/96	0.016	0.02	0.00	0.06
6222-5	09/11/96	0.015	0.02	0.00	0.07
6222-6	09/13/96	0.009	0.01	0.00	0.06
6222-7	09/23/96	0.817		0.04	0.36
6222-8	09/27/96	2.862			

ID	出血天数	s	HCV4.0			Ortho HCV30.	Abbott prism
			s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
SC-0030-A	1	0.024	0.04	0.01	0.05		
SC-0030-B	40	1.658		0.94	0.54		
SC-0030-C	45	2.372					

SC-0040-A	1	0.773		0.02	0.09
SC-0040-B	3	1.491		0.12	0.54
SC-0040-C	8	2.400		0.77	
SC-0040-D	10	2.639			
SC-0040-E	15	3.423			

		出血天数早期检测				
		实验组	HCV 3.0	Abbott Prism	早期 c33c 实验组	早期 c22 实验组
#1	c33c	PHV 904	2	2	PHV 904	PHV 907
#2	c33c	PHV 905	7	3	PHV 905	PHV 909
#3	c22	PHV 907	3	0	PHV 908	PHV 910
#4	c33c	PHV 908	8	0	PHV 914	PHV 911
#5	c22	PHV 909	0	0	6212	PHV 912
#6	c22	PHV 910	0	0	6213	PHV 913
#7	c22	PHV 911	0	0	6214	SC-0010
#8	c22	PHV 912	0	0	6222	SC-0030
#9	c22	PHV 913	2	2	SC-0040	
#10	c33c	PHV 914	12	12		
#11	c33c	6212	14	12		
#12	c33c	6213	6	0		
#13	c33c	6214	7	0		
#14	c33c	6222	4	4		
#15	c22	SC-0010	0	0		
#16	c22	SC-0030	5	5		
#17	c33c	SC-0040	9	7		
改善范围			2-14 天	2-12 天		

实施例 6

HCV 4.0 基因型敏感性

将 HCV 4.0 测定的基因型敏感性与 HCV3.0 和 Pasteur 测定相比(如上所述)。具体说,如表中所示稀释(2 倍或 10 倍,取决于初始样品滴定度)表 5 中所示的 10 种不同的 HCV 基因型样品,并将它们用于这三种测定中(按照上述流程)。所有三种测试都是同时进行的。以信号或粗 O.D.显示数据。这些数据表明在检测稀释的基因型样品时 HCV 4.0 的原型更敏感。

表 5

HCV 4.0 和基因型稀释的敏感性

稀释	基因型	HCV4.0 原型 s	HCV3.0 Ortho s	Monolisa 2 版 Pasteur s	基因型	HCV4.0 原型 s	HCV3.0 Ortho s	Monolisa 2 版 Pasteur s
1:2500	1b	2.866	1.007	0.694	4b/c	2.478	0.701	0.551
1:5000		2.074	0.393	0.218		1.125	0.256	0.195
1:10000		1.099	0.159	0.084		0.609	0.087	0.076
1:20000		0.403	0.045	0.028		0.216	0.035	0.033
1:2500	2b	1.430	0.295	0.658	4a	2.831	0.632	0.462
1:5000		0.551	0.108	0.207		1.752	0.193	0.181
1:10000		0.225	0.032	0.061		0.717	0.069	0.076
1:20000		0.074	0.010	0.019		0.248	0.015	0.025
1:2500	2a/c	1.952	0.467	1.653	4c	1.751	0.457	1.147
1:5000		0.917	0.136	0.782		0.856	0.169	0.474
1:10000		0.395	0.049	0.286		0.384	0.055	0.178
1:20000		0.108	0.011	0.105		0.141	0.018	0.058
1:2500	3a	2.580	0.514	0.941	5a	2.682	1.496	2.271
1:5000		1.622	0.218	0.353		2.744	0.827	0.988
1:10000		0.873	0.067	0.164		1.587	0.316	0.395
1:20000		0.398	0.023	0.050		0.726	0.097	0.120
1:2500	3e	1.207	0.158	0.291	6	3.516	3.247	ND
1:5000		0.461	0.039	0.114		3.602	3.584	ND
1:10000		0.155	0.011	0.053		3.224	2.863	ND
1:20000		0.054	0.003	0.024		1.192	0.380	ND

实施例 7

竞争性研究

进行了下列竞争性研究，以评估 NS3/4a 构象表位检测的抗体是否与其它 HCV 抗原不同。具体说，将 NS3/4a 抗原与 c200 抗原如下比较。

如上所述产生的 0.5 μ g 和 1.0 μ g NS3/4a，或 c200(Hepatology (1992) 15:19-25，在 ORTHO HCV 3.0 版 ELISA 测试系统，Ortho-Clinical Diagnostics，Raritan，New Jersey 中可得)与 20 μ l 样品 PHV914-5(从感染个人血液获得的早期血清转化血液)以总体积 220 μ l(1x PBS)混合。混合物在微孔中 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时。然后将混合物转移到 NS3/4a-涂覆的平板中，并在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时。洗涤平板并如下测试。

在总体积为约 220 μ l 的 10 μ l 样品 PHV914-5 中加入 1 μ g c200 抗原。混合物在微孔中 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时，将 200 μ l 转移到 NS3/4a-涂覆的平板(100ng/试验)中，37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时。用 1x PBS、0.1% Tween-20、200 μ l 偶联溶液(如上所述)洗涤平板 5 次，培育平板并测试(如实施例 4 中 HCV 4.0 测定所述)。含有

PHV914-5 和 1x PBS(不含抗原)的对照如下处理。

结果如表 6 所示。栏 4 中所示的百分数抑制结果计算成栏 3 负(栏 2/栏 3 $\times 100$)。如所见, 数据显示 NS3/4a 被早期血清转化抗体中和, 而 c200 不是。当 PHV914-5 c33c 早期血清转化组成员中的抗体与平板涂覆的 NS34a 反应, 显示强信号。c200 抗原不被这些抗体中和。这显示于表 6 的顶部组。当 NS34a 与 PHV914-5 样品混合时被中和, 因此在样品中不存在与涂覆在微量滴定板上的 NS34a 反应的抗体。数据表明 NS34a 检测的抗体类型可能与 c200 检测的不同。

表 6

与 c200 抗原比较显示 NS34a 抗原在早期 c33c 血清转化组中, 检测不同
抗体的竞争性研究

	1	2	3	4
c200	+	PHV914-5	对照 1xPBS	%抑制
		s	s	
1 微克		1.450	1.645	12
1 微克		1.545	1.687	8
0.5 微克		1.557	1.913	19
0.5 微克		1.719	1.804	5
NS3/4a	+	PHV914-5		
		s	s	
1 微克		0.054	1.599	97
1 微克		0.037	1.677	98
0.5 微克		0.066	1.672	96
0.5 微克		NA	1.524	NA

实施例 8

NS3/4a 构象表位的稳定性研究

为了评估 NS3/4a 表位的稳定性对测试表现的影响, 进行了下列试验, 以测定随时间推移 NS3/4a 在室温下的免疫反应性。将小等份的 NS3/4a 原液静

置于室温，并在表 7 所示的间隔冷冻。所有小管同时涂覆并针对两个早期 NS3 血清转化组测试。如实施例 5 中 HCV 4.0 所述进行测定。

如表 7 所见，NS3/4a 原液不稳定，免疫反应性随时间下降。另外，维持 NS3/4a 构象是免疫反应性必需的。

如下进行了进一步的稳定性研究。用标准程序针对 NS3/4a 制备的两个构象单克隆抗体替换抗-HCV 早期血清转化组。NS3/4a 原液试管在时间间隔 3、6 和 24 小时储藏在室温。来自冷冻试管的 NS3/4a 以 90ng/ml 被涂覆，并用上述方法试验。结果提示两种单克隆实际是构象性的，其反应性对于在室温处理 NS3/4a 抗原是敏感的。阳性对照的单克隆抗体的反应性不变。

表 7

时间(hr)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	对照
	A	D	G	H	I	K	N	参照
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
PHV 904-4	3.7	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	4.4
PHV 904-5	4.8	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.3	5.5
PHV 904-6	5.4	2.8	1.1	1.0	0.6	0.5	0.6	5.8
PHV 904-7	5.1	3.4	1.5	1.0	1.1	0.5	0.7	5.4
PHV 914-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-4	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
PHV 914-5	2.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
PHV 914-6	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
PHV 914-7	2.8	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	4.9
PHV 914-8	2.9	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	4.9
酶								

RFU/分钟	8.74	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	
--------	------	------	------	------	------	------	------	--

实施例 9

NS3/4a 构象表位对变性 NS3/4a 的免疫反应性

如上所述产生的 NS3/4a 构象表位的免疫反应性，与在 NS3/4a 构象表位制备物中加入 SDS，达到最终浓度 2%变性的 NS3/4a 进行比较。变性的 NS3/4a 和构象 NS3/4a 涂覆到微量滴定板上(如上所述)。也将 c200 抗原(Hepatology (1992) 15:19-25，在 ORTHO HCv 3.0 版 ELISA 测试系统，Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey 中可得)涂覆到微量滴定板上。用 c200 作为比较，假定它是非构象的，由于在其配方中存在还原剂(DTT)和去污剂。

采用上述 ELISA 测定法针对两个早期 HCV 血清转化组，PHV904 和 PHV914(市售人血样，购自 Boston Biomeida, Inc., West Bridgewater, MA)测试了免疫反应性。结果如表 8 所示。数据提示 NS3/4a(和 c200)变性或线性化的形式不能像 NS3/4a 构象表位那么早检测到早期血清转化组。

表 8

NS3/4a 对变性的 NS3/4a								
*储存液 NS3/4a 掺入 2%SDS								
		NS3/4a	dNS3/4a	c200		NS3/4a	dNS3/4a	c200
		OD	OD	OD		s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0.012	0.012	0.009		0.02	0.02	0.01
血清转化	PHV 904-2	0.011	0.009	0.008		0.02	0.01	0.01
	PHV 904-3	1.124	0.071	0.045		1.80	0.11	0.07
	PHV 904-4	2.401	0.273	0.129		3.85	0.44	0.21
	PHV 904-5	3.022	0.793	0.347		4.85	1.28	0.57
	PHV 904-6	2.711	1.472	0.774		4.35	2.37	1.28
	PHV 904-7	3.294	1.860	0.943		5.28	2.99	1.55
	PHV 914-1	0.006	0.004	0.001		0.01	0.01	0.00
	PHV 914-2	0.005	0.004	0.002		0.01	0.01	0.00

	PHV 914-3	0.098	0.003	0.001		0.16	0.00	0.00
	PHV 914-4	1.118	0.006	0.004		1.79	0.01	0.01
	PHV 914-5	2.035	0.044	0.022		3.26	0.07	0.04
	PHV 914-6	2.092	0.074	0.025		3.35	0.12	0.04
	PHV 914-7	2.519	0.281	0.132		4.04	0.45	0.22
	PHV 914-8	2.746	0.907	0.500		4.40	1.46	0.82
	PHV 914-9	3.084	1.730	0.931		4.94	2.78	1.53
HCV 3.0	阴性对照	0.023	0.024	0.008				
对照	阴性对照	0.027	0.024	0.007				
	阴性对照	0.021	0.017	0.005				
	平均	0.024	0.022	0.007				
	截留	0.624	0.622	0.607				
	阳性对照	1.239	0.903	0.575		1.99	1.45	0.95
	阳性对照	1.445	0.916	0.614		2.32	1.47	1.01

还使用标准程序制备的针对 NS3/4a 的单克隆抗体测试了构象表位的免疫反应性。然后在针对 NS3/4a 和变性的 NS3/4a 和 c200 抗原的 ELISA 试验中测试这些单克隆抗体。数据显示抗-NS3/4a 单克隆抗体与 NS3/4a 和变性的 NS3/4a 以与表 9 显示的血清转化组相似的方式反应。该结果还提供了 NS3/4a 天然是构象表位的进一步证据，因为可制备反应性与早期 c33c 血清转化组相似的单克隆抗体。

表 9				
平板				
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
单克隆		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1.820	0.616	0.369
	1:1000	1.397	0.380	0.246
	1:10000	0.864	0.173	0.070

	1:20000	0.607	0.116	0.085
5B7/D7	1:100	2.885	0.898	0.436
	1:1000	2.866	0.541	0.267
	1:10000	1.672	0.215	0.086
	1:20000	1.053	0.124	0.059
1A8/H2	1:100	1.020	0.169	0.080
	1:1000	0.921	0.101	0.043
	1:10000	0.653	0.037	0.013
	1:20000	0.337	0.027	0.011

因此，公开了新颖的 HCV 检测试验。从上述可见，应理解虽然本文为了说明的目的描述了本发明的具体实施例，但是可作出许多改变，而不背离本文的精神和范围。

HCV基因组和重组蛋白

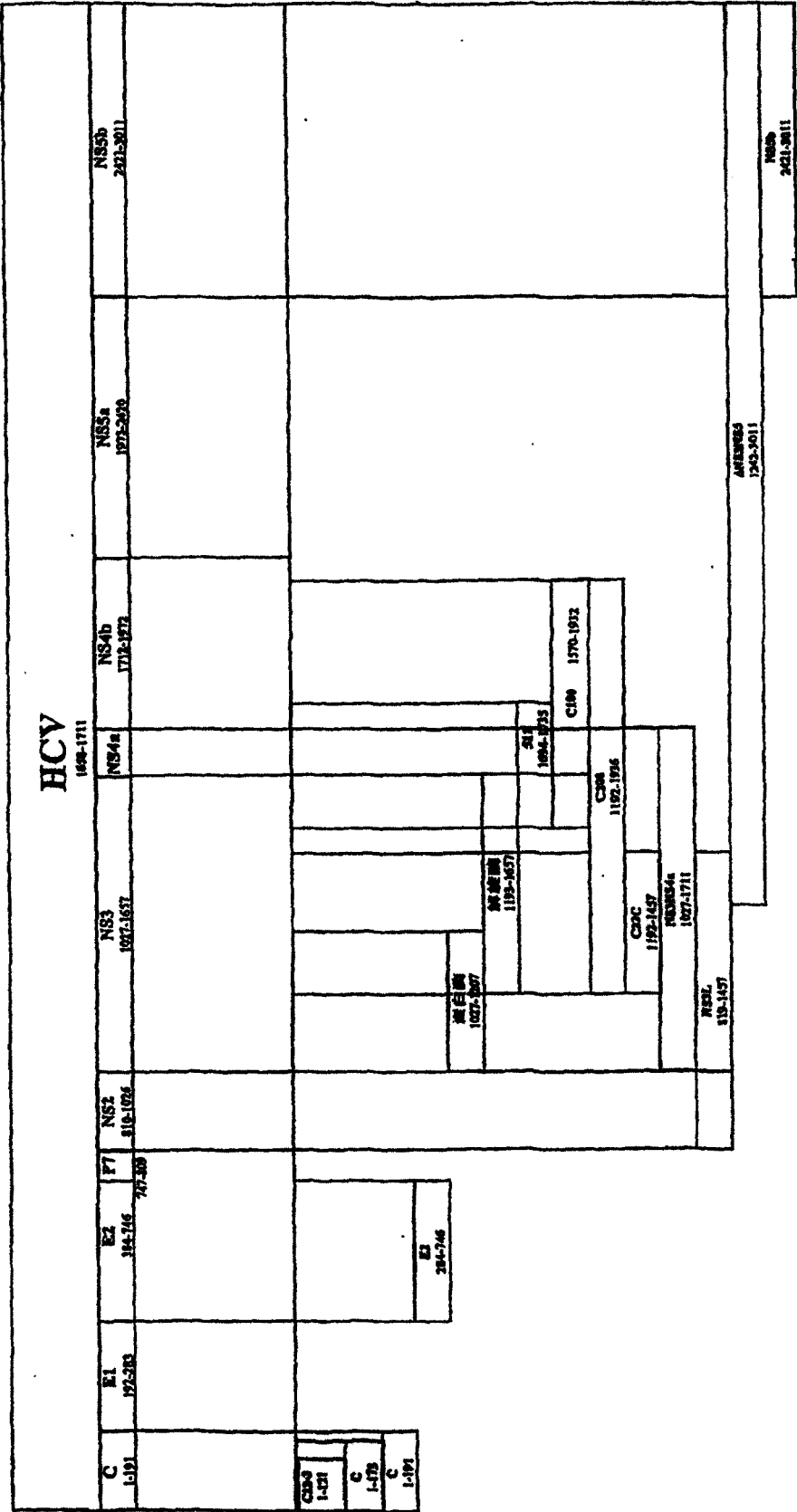


图 1

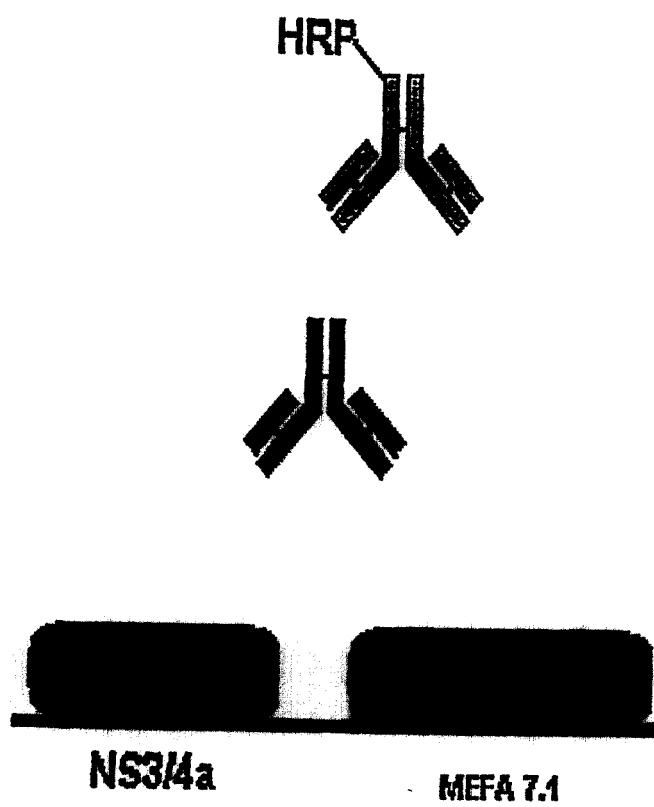


图 2

```

      1                               10
      M   A   P   I   T   A   Y   A   Q   Q
      ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

      20
      T   R   G   L   L   G   C   I   I   T   S   L   T   G   R
      ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

      30                               40
      D   K   N   Q   V   E   G   E   V   Q   I   V   S   T   A
      GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

      50
      A   Q   T   F   L   A   T   C   I   N   G   V   C   W   T
      GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                               70
      V   Y   H   G   A   G   T   R   T   I   A   S   P   K   G
      GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

      80
      P   V   I   Q   M   Y   T   N   V   D   Q   D   L   V   G
      CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

      90                               100
      W   P   A   P   Q   G   S   R   S   L   T   P   C   T   C
      TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

      110
      G   S   S   D   L   Y   L   V   T   R   H   A   D   V   I
      GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                               130
      P   V   R   R   R   G   D   S   R   G   S   L   L   S   P
      CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

      140
      R   P   I   S   Y   L   K   G   S   S   G   G   P   L   L
      CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

      150                               160
      C   P   A   G   H   A   V   G   I   F   R   A   A   V   C
      TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

      170
      T   R   G   V   A   K   A   V   D   F   I   P   V   E   N
      ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180                               190
      L   E   T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT

```

图 3A

```

P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

                210
P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

                230
A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

                240
T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

                260
P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

                270
I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

                290
S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

                300
T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

                320
A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

                330
P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

                350
A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

                360
P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

                380
S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

```

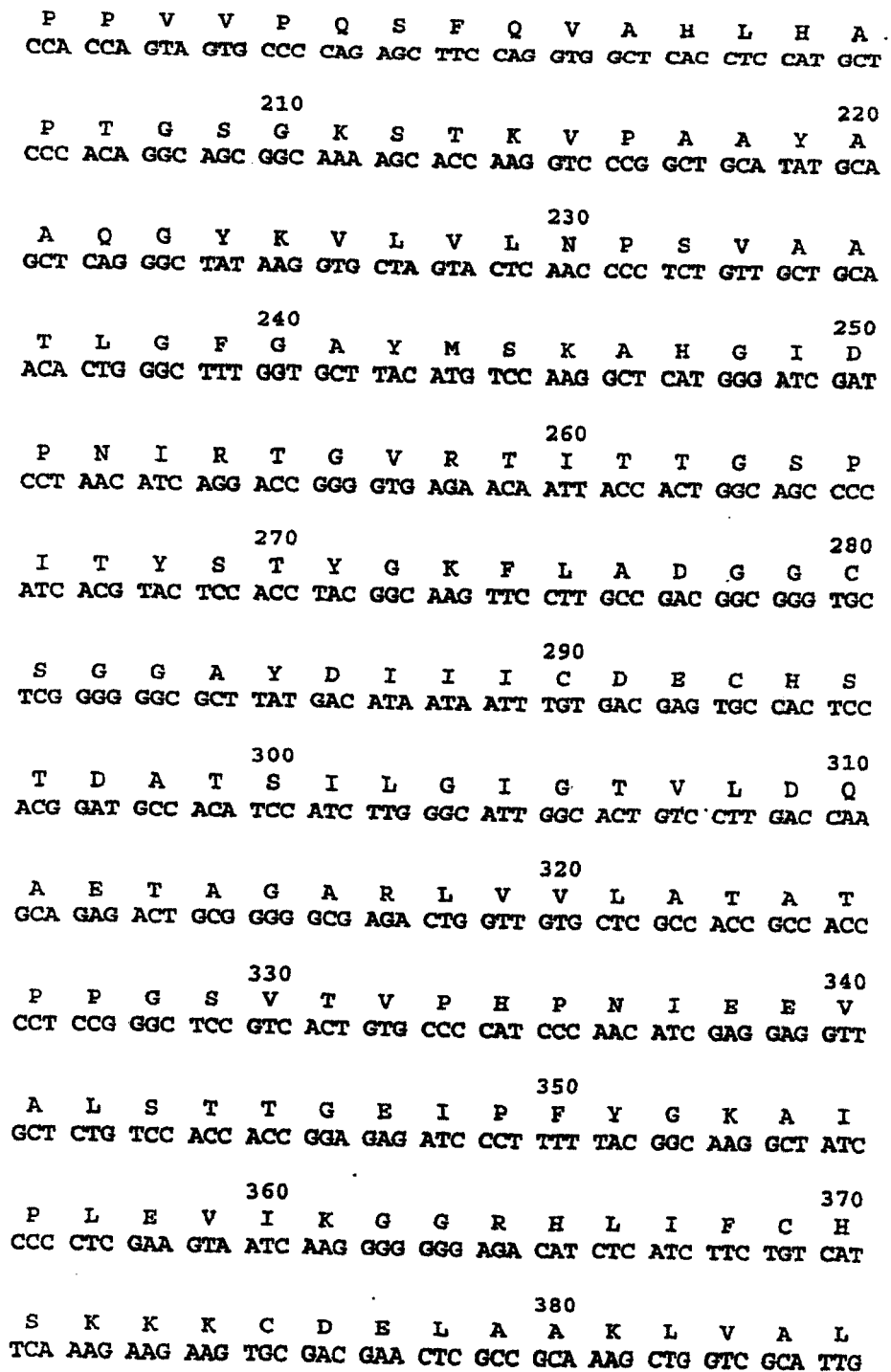


图 3B

```

      390
G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   400
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC

      410
I   P   P   I   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

      420
M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N   430
ATG ACC GGC TAT ACG GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

      440
T   C   V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F
ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

      450
T   I   E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T   460
ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

      470
Q   R   R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R
CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

      480
F   V   A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S   490
TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

      500
V   L   C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L
GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

      510
T   P   A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T   520
ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC

      530
P   G   L   P   V   C   Q   D   E   L   E   F   W   E   G
CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

      540
V   F   T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q   550
GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

      560
T   K   Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q
ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

      570
A   T   V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D   580
GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC

```

图 30

```

      590
Q   M   W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G
CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

      600
P   T   P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I
CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC

      610

      620
T   L   T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S
ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

      630
A   D   L   E   V   V   T   S   T   W   V   L   V   G   G
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

      640

      650
V   L   A   A   L   A   A   Y   C   L   S   T   G   C   V
GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

      660
V   I   V   G   R   V   V   L   S   G   K   P   A   I   I
GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

      670

      680
P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

      686
C
TGC

```

图 3D

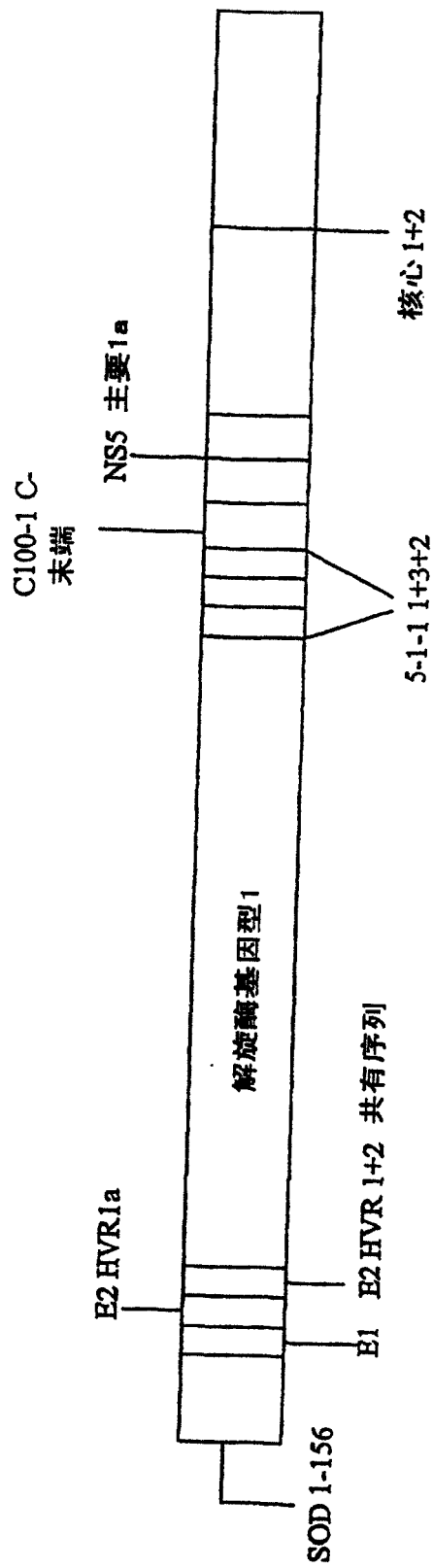


图 4

```

      1                                10
      M  A  T  K  A  V  C  V  L  K  G  D  G  P  V
      ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT

      20                                30
      Q  G  I  I  N  F  E  Q  K  E  S  N  G  P  V
      CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG

      40
      K  V  W  G  S  I  K  G  L  T  E  G  L  H  G
      AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA

      50                                60
      F  H  V  H  E  F  G  D  N  T  A  G  C  T  S
      TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT

      70
      A  G  P  H  F  N  P  L  S  R  K  H  G  G  P
      GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA

      80                                90
      K  D  E  E  R  H  V  G  D  L  G  N  V  T  A
      AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT

      100
      D  K  D  G  V  A  D  V  S  I  E  D  S  V  I
      GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC

      110                                120
      S  L  S  G  D  H  C  I  I  G  R  T  L  V  V
      TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC

      130
      H  E  K  A  D  D  L  G  K  G  G  N  E  E  S
      CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

      140                                150
      T  K  T  G  N  A  G  S  R  L  A  C  G  V  I
      ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT

      160
      G  I  A  Q  N  L  N  S  G  C  N  C  S  I  Y
      GGG ATC GCC CAG AAT TTG AAT TCT GGT TGC AAT TGC TCT ATC TAT

      170                                180
      P  G  H  I  T  G  H  R  M  A  W  K  L  G  S
      CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

      190
      A  A  R  T  T  S  G  F  V  S  L  F  A  P  G
      GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

```

图 5A

```

      200                                     210
A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A   A   A   R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

      220
T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G   A   S   Q
ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT GCC AGC CAA

      230                                     240
N   I   Q   L   I   V   D   F   I   P   V   E   N   L   E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

      250
T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S   P   P
ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA

      260                                     270
V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A   P   T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

      280
G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A   A   Q
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG

      290                                     300
G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A   T   L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

      310
G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D   P   N
GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC

      320                                     330
I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P   I   T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

      340
Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C   S   G
TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG

      350                                     360
G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S   T   D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

      370
A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q   A   E
GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG

      380                                     390
T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T   P   P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG

      400
G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V   A   L
GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG

      410                                     420

```

图 5B

```

S  T  T  G  E  I  P  F  Y  G  K  A  I  P  L
TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

E  V  I  K  G  G  R  H  L  I  F  C  H  S  K
GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

K  K  C  D  E  L  A  A  K  L  V  A  L  G  I
AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

N  A  V  A  Y  Y  R  G  L  D  V  S  V  I  P
AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

T  S  G  D  V  V  V  V  A  T  D  A  L  M  T
ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

G  Y  T  G  D  F  D  S  V  I  D  C  N  T  C
GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

V  T  Q  T  V  D  F  S  L  D  P  T  F  T  I
GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

E  T  I  T  L  P  Q  D  A  V  S  R  T  Q  R
GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

R  G  R  T  G  R  G  K  P  G  I  Y  R  F  V
CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

A  P  G  E  R  P  S  G  M  F  D  S  S  V  L
GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

C  E  C  Y  D  A  G  C  A  W  Y  E  L  T  P
TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC

A  E  T  T  V  R  L  R  A  Y  M  N  T  P  G
GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG

L  P  V  C  Q  D  H  L  E  F  W  E  G  V  F
CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

T  G  L  T  H  I  D  A  H  F  L  S  Q  T  K
ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

Q  S  G  E  N  L  P  Y  L  V  A  Y  Q  A  T

```



CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC
 640
 V C A R A Q A P P S W D Q M
 GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG
 650 660
 W K C L I R L K P T L H G P T
 TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA
 670
 P L L Y R L G A V Q N E I T L
 CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG
 680 690
 T H P V T K Y I M T C M S A D
 ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC
 700
 L E V V T S A C S G K P A I I
 CTG GAG GTC GTC ACG AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA
 710 720
 P D R E V L Y R E F D E M E E
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG
 730
 C S Q H L P Y I E Q G M M L A
 TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC
 740 750
 E Q F K Q K A L G L S R G G K
 GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG
 760
 P A I V P D K E V L Y Q Q Y D
 CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT
 770 780
 E M E E C S Q A A P Y I E Q A
 GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT
 790
 Q V I A H Q F K E K V L G L I
 CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC
 800 810
 D N D Q V V V T P D K E I L Y
 GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT
 820
 E A F D E M E E C A S K A A L
 GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC
 830 840
 I E E G Q R M A E M L K S K I
 ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

图 5D

```

      850
Q  G  L  L  G  I  L  R  R  H  V  G  P  G  E
CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG

      860
G  A  V  Q  W  M  N  R  L  I  A  F  A  S  R
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA

      870

      880
G  N  H  V  S  P  T  H  Y  V  P  S  R  S  R
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG

      890
R  F  A  Q  A  L  P  V  W  A  R  P  D  Y  N
AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC

      900

      910
P  P  L  V  E  T  W  K  K  P  D  Y  E  P  P
CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT

      920
V  V  H  G  R  S  S  R  R  F  A  Q  A  L  P
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC

      930

      940
V  W  A  R  P  D  Y  N  P  P  L  V  E  T  W
GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

      950
K  K  P  D  Y  E  P  P  V  V  H  G  R  K  T
AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC

      960

      970
K  R  N  T  N  R  R  P  Q  D  V  K  F  P  G
AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT

      980
G  G  Q  I  V  G  R  R  G  P  P  I  P  K  A
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT

      990

      1000
R  R  P  E  G  R  T  W  A  Q  P  G  Y  P  W
CGT CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG

      1010
P  L  Y  G  N  K  D  R  R  S  T  G  K  S  W
CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG

      1020

      1030
G  K  P  G  Y  P  W  P  R  K  T  K  R  N  T
GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC

      1040
N  R  R  P  Q  D  V  K  F  P  G  G  G  Q  I
AAC CGA CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

      1050

```

图 5E

1060
V G R R G P P I P K A R R P E
GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG

1070
G R T W A Q P G Y P W P L Y G
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC

1080

1090
N K D R R S T G K S W G K P G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG

1099
Y P W P
TAT CCT TGG CCC

图 5F

MEFA-3 抗原

hSOD-(1-154) 氨基酸	CORE	CORE	cd30	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2	C-100	C-100	NS5	NS5
	10 53	10 53	1192 1457	1694 1735	1694 1735	1694 1735	1901 1940	1901 1940	2278 2310	2278 2310

MEFA-5 抗原

hSOD-(1-154) 氨基酸	CORE	CORE	E1	E2	cd30	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2	C-100	NS5	NS5
	10 53	10 53	303 405	320 444	1192 1457	1689 1735	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	2278 2313

MEFA-6 抗原

hSOD-(1-154) 氨基酸	E1	E2	cd30	5-1-1 type 1	5-1-1 type 3	5-1-1 type 2	C-100	NS5	NS5	CORE	CORE
	303 320	405 444	1192 1457	1689 1735	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	2278 2313	10 53	10 53

图 6

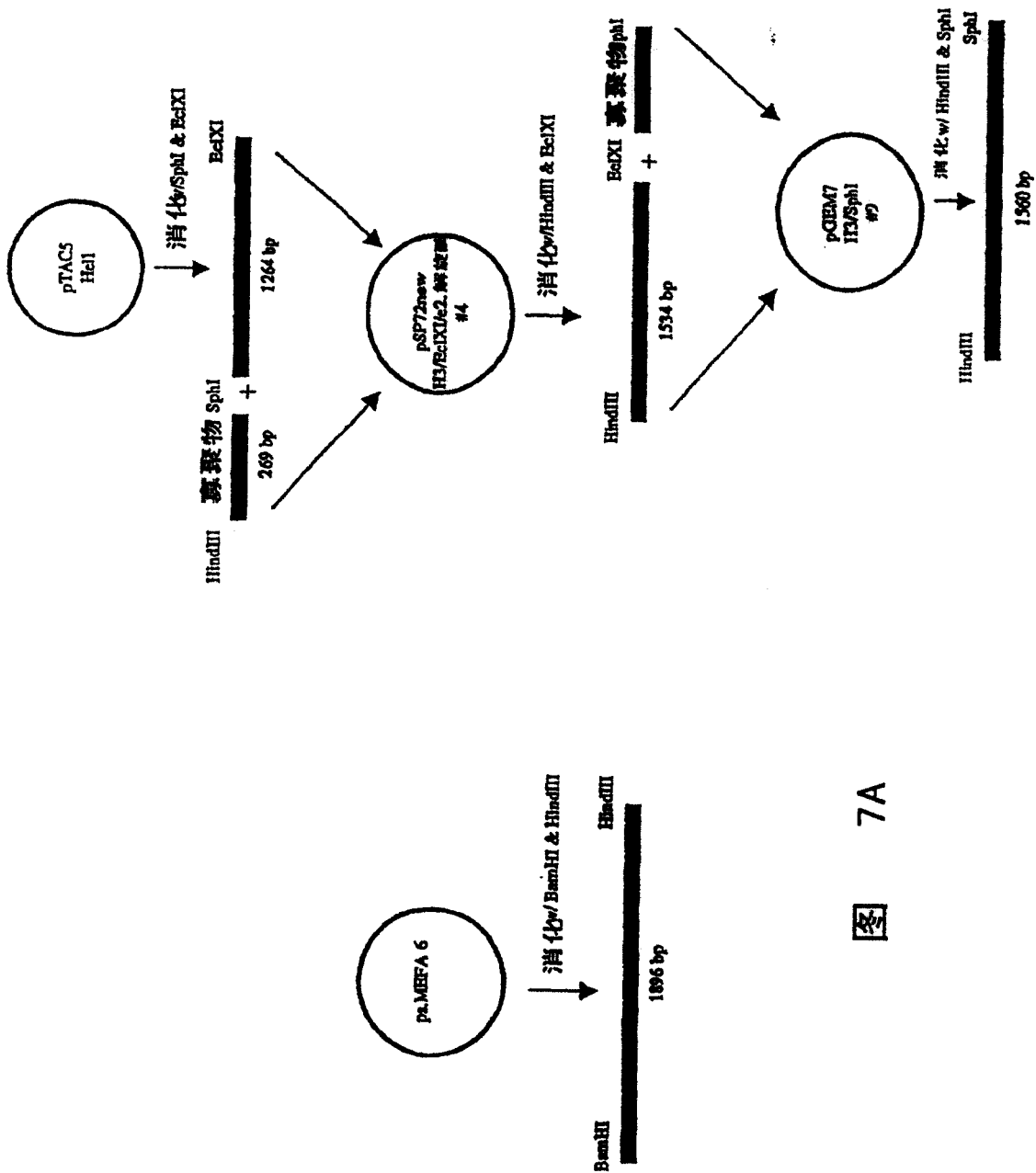
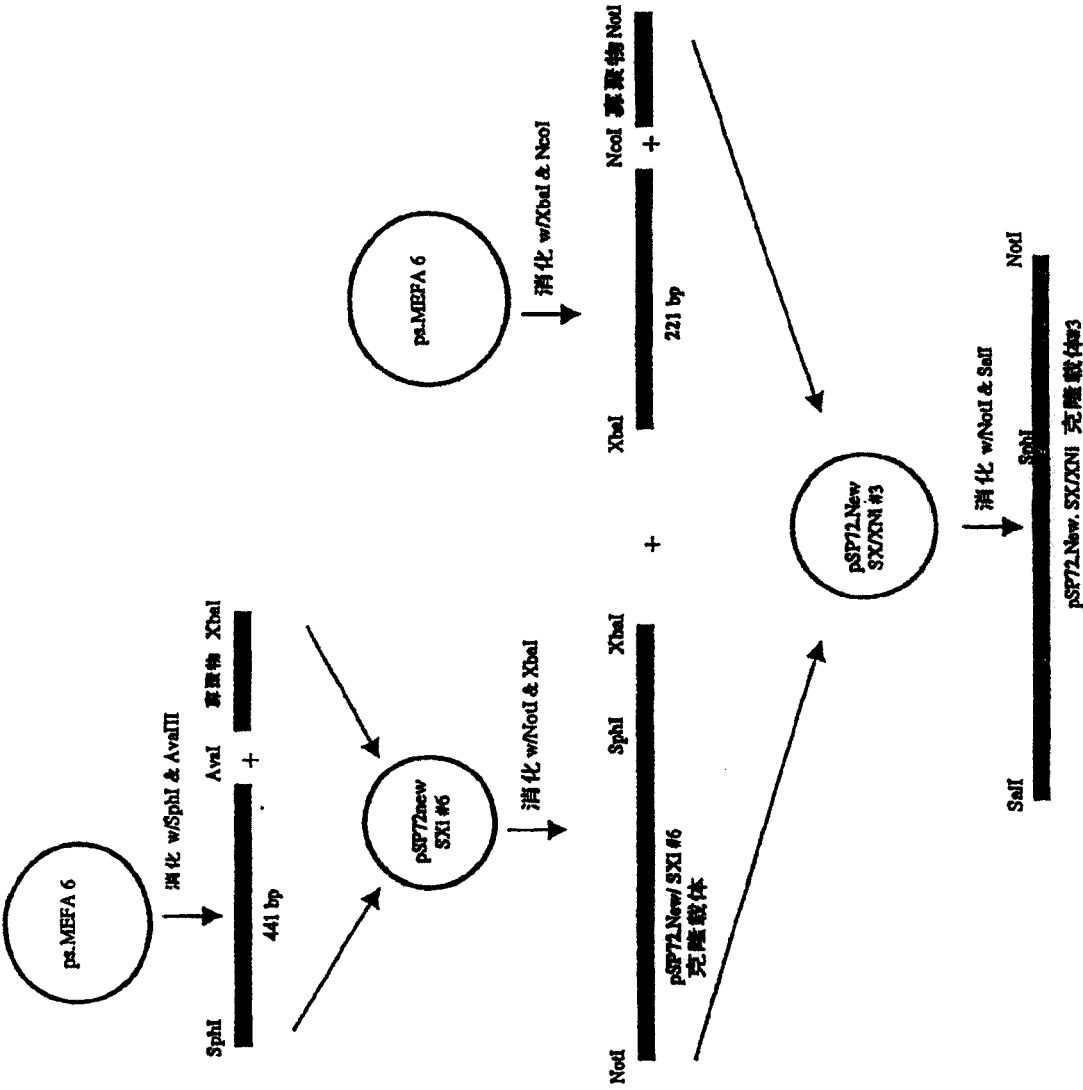


图 7A



图

7B

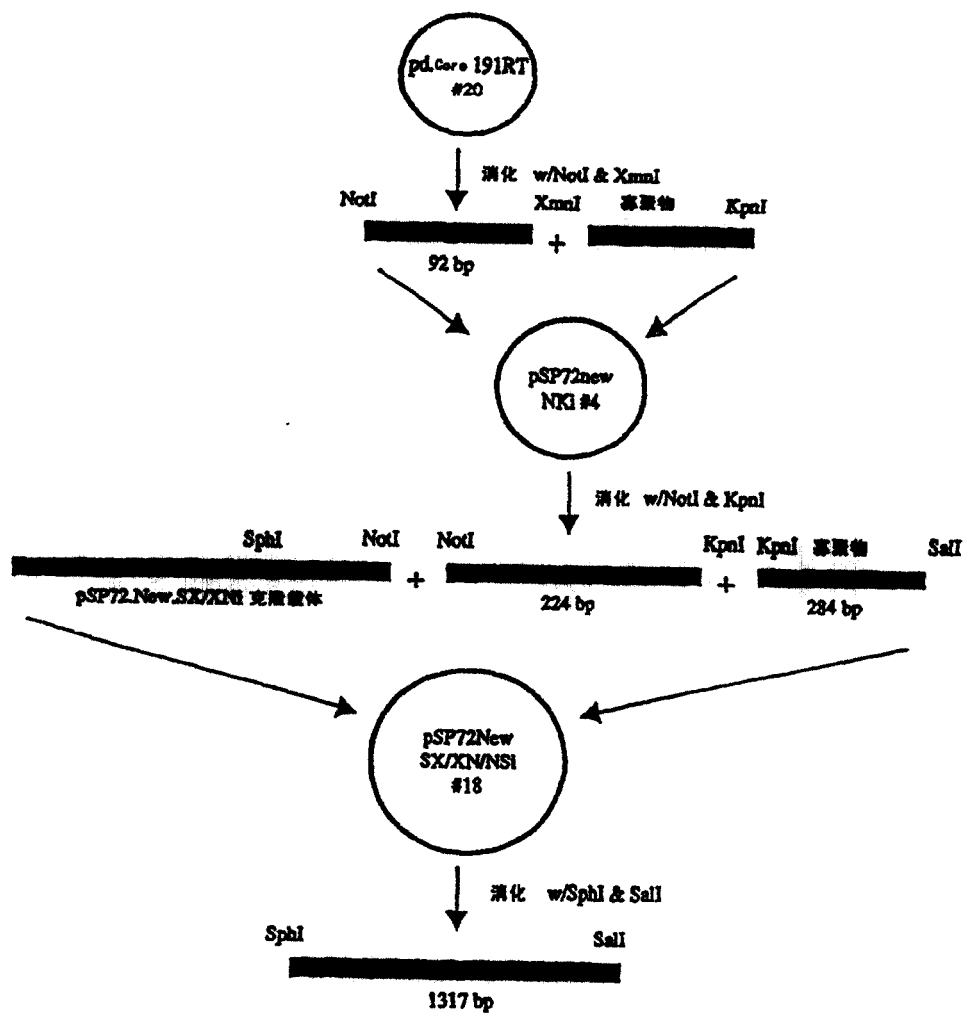


图 7C

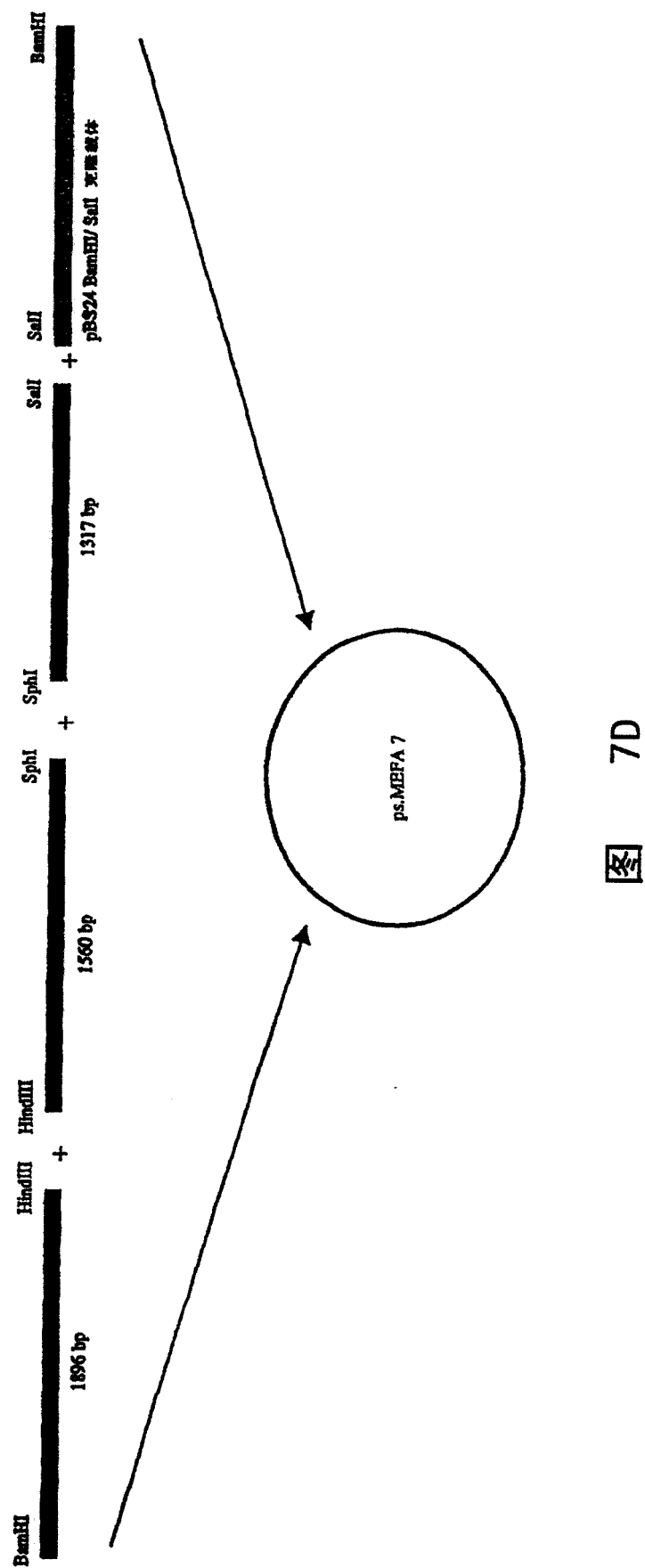
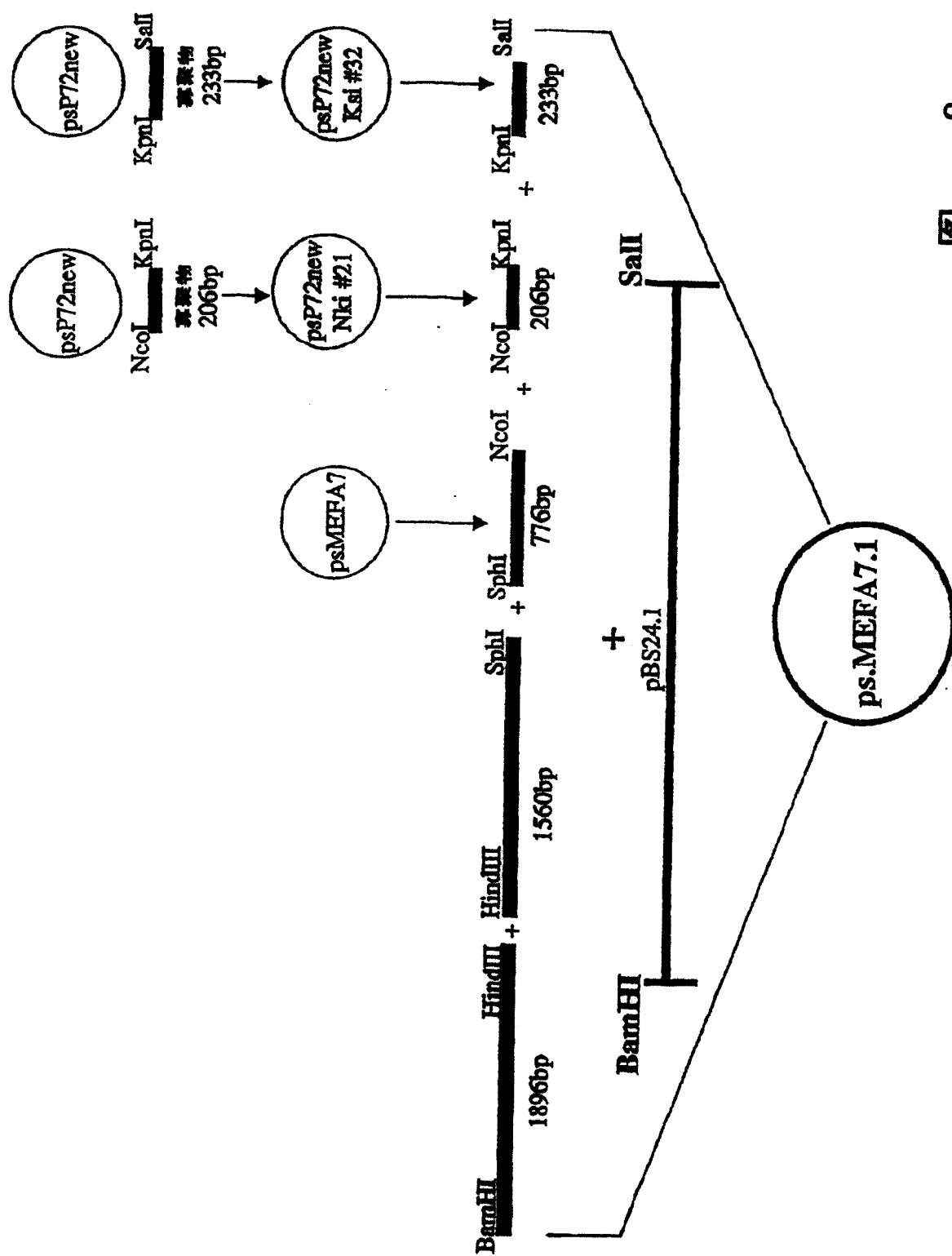


图 7D



图

8

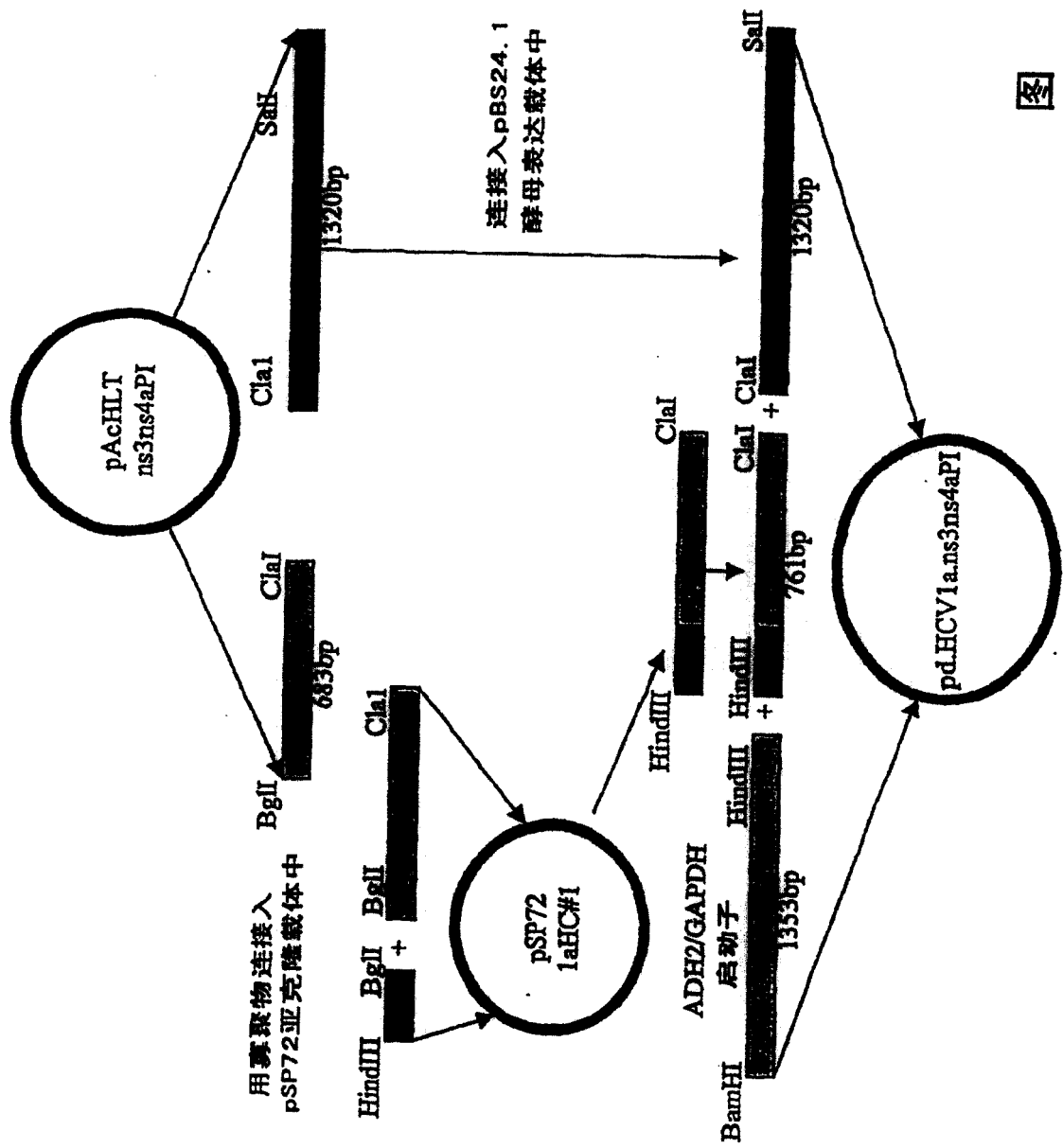


图 9

专利名称(译)	抗HCV抗体的免疫测定		
公开(公告)号	CN100463922C	公开(公告)日	2009-02-25
申请号	CN200410011660.6	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	希龙公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华疫苗和诊断公司		
[标]发明人	DY基恩 P阿尔坎杰尔 L坦德斯基 D科伊特 A梅迪纳 塞尔比		
发明人	D·Y·基恩 P·阿尔坎杰尔 L·坦德斯基 C·乔治-纳西门托 D·科伊特 A·梅迪纳-塞尔比		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/11 C12N15/63 C07K14/18 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	C07K2319/00 G01N2469/20 G01N2469/10 G01N2333/18 G01N33/5767 C12N2770/24222 C07K14/005		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	杨振宇		
优先权	60/212082 2000-06-15 US 60/280811 2001-04-02 US 60/280867 2001-04-02 US		
其他公开文献	CN1660913A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种HCV免疫测定方法，该方法包括NS3/4a构象表位和多表位融合抗原，本发明还提供了用于这种免疫测定的免疫测定固相支持物。

表 1

结构域	大约的边界*
-----	--------