

[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 95190675.5

[51] Int. Cl.

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 100478352C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

[22] 申请日 1995.7.24 [21] 申请号 95190675.5

[30] 优先权

[32] 1994. 7. 25 [33] DE [31] P4426276.0

[32] 1994. 8. 31 [33] DE [31] P4430973.2

[86] 国际申请 PCT/EP1995/002921 1995. 7. 24

[87] 国际公布 WO1996/003423 德 1996. 2. 8

[85] 进入国家阶段日期 1996. 3. 25

[73] 专利权人 罗切诊断学有限公司

地址 德国曼海姆

[72] 发明人 E·豪斯 C·塞德尔

U-H·文胡斯 E·法茨

U·史密特

[56] 参考文献

WO9314404 1993.7.22

WO9318054 1993.9.16

北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社. 丁桂凤等, 主编. 医学免疫学纲要, 第 1 卷. 1992

审查员 邹 凯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 杜京英

权利要求书 5 页 说明书 39 页

[54] 发明名称

半抗原标记的肽

[57] 摘要

本发明涉及一种产生半抗原标记肽的方法, 其特征在于: (a) 在固相上, 由其反应性侧支基团被保护基团所阻断的氨基酸衍生物合成具有目标氨基酸序列的肽, 选择伯氨侧支基团上的保护基团使得需要时可被选择性地裂解掉, (b) 除去保护基团以形成至少一个游离伯氨基团, (c) 半抗原活性酯衍生物与肽上至少一个游离的伯氨基团相偶联和 (d) 如果需要, 除去仍保留的保护基团, 半抗原选自甾醇、胆酸、性激素、类皮质激素、强心甙、强心甙糖甙、蟾蜍二烯内酯、甾类皂角甙元和甾类生物碱。

1. 产生半抗原标记肽的方法，其中

(a) 在固相上由反应性侧支基团被保护基团阻断的氨基酸衍生物合成具有目标氨基酸序列的肽，其中氨基酸衍生物中的伯氨侧支基团上的保护基团可被选择性裂解，

(b) 除去保护基团以形成至少一个游离的伯氨基团，并且

(c) 将半抗原-活性酯与肽上至少一个游离的伯氨基团相偶联。

2. 根据权利要求1的方法，其还包括：

(d) 将仍保留的保护基团裂解掉，半抗原选自甾醇、胆酸、性激素、类皮质激素、强心甙、强心甙糖甙、蟾蜍二烯内酯、甾类皂角甙元和甾类生物碱。

3. 权利要求1的方法，其中半抗原选自强心甙和强心甙糖甙。

4. 权利要求1的方法，其中半抗原选自异羟洋地黄毒甙元、洋地黄毒甙元、芫毒甙元、毒毛旋花甙元、地高辛、洋地黄毒甙、地托辛和毒毛旋花甙K。

5. 权利要求4的方法，其中用异羟洋地黄毒甙元或地高辛为半抗原。

6. 权利要求1的方法，其中在步骤a)中合成具有目标氨基酸序列的肽包括：将带有在特定反应条件下可定量除去的第一氨基侧链保护基团的氨基酸衍生物用于半抗原将要偶联的肽位置上，带有第二氨基侧链保护基团的氨基酸用于半抗原不偶联的肽位置上，在第一保护基团可被裂解掉的反应条件下，第二保护基团自身不会被裂解。

7. 权利要求6的方法，其中使用酸不稳定性第一保护基团和酸稳定性第二保护基团。

8. 权利要求1的方法，其中用N-羟基琥珀酰亚胺酯作为半抗原-活性酯。

9. 权利要求1的方法，其中合成的肽含有一个免疫活性表位区和一个至少有一个半抗原标记物偶联的间隔区。

10. 权利要求 9 的方法，其中间隔区的长度为 1 到 10 个氨基酸。

11. 权利要求 9 或 10 的方法，其中间隔区位于肽的氨基或/和羧基末端。

12. 权利要求 9 的方法，其中间隔区含有带电荷或/和可形成氢键的氨基酸。

13. 权利要求 9 的方法，其中间隔区的氨基酸选自甘氨酸、 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸、 ϵ -氨基己酸、赖氨酸和具有 $\text{NH}_2-[(\text{CH}_2)_n-\text{O}]_x-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 结构的化合物，其中的 n 是 2 或 3， x 是 1 到 10。

14. 权利要求 1 的方法，其中合成的肽含有来自 HIV I、HIV II 或 HCV 氨基酸序列的表位区。

15. 权利要求 14 的方法，其中表位区选自下列 HIV I、或 HIV II 的氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸的部分序列：

NNTRKSISIG	PGRAFYT	(I)
NTTRSISIGP	GRAFYT	(II)
IDIQEERRMR	IGPGMAWYS	(III)
QARILAVERY	LKDOQLLGIW	GASG (IV)
LGIWGCSGKL	IGTTAVPWNA	SWS (V)
KDQQLLGIWG	SSGKL	(VI)
ALETLLQNQQ	LLSLW	(VII)
LSLWGCKGKL	VCYTS	(VIII)
WGIRQLRRL	LALETLLQN	(IX) 和
QAQLNSWGCA	FRQVCHTTP	WPNDSLT (X)。

16. 权利要求 14 的方法，其中表位区选自下列 HCV 的氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸的部分氨基酸序列：

SRRFAQALPV	WARPD	(XI)
PQDVKFPGGG	QIVGGV	(XII)
EEASQHLPYI	EQ	(XIII)
QKALGLLQT		(XIV)

SRGNHVSPTH YVPESDAA (XV)
 PQRKNKRNTN RRPQDVKFPG
 GGQIVGVV (XVI)
 AWYELTPAET TVRLRAYMNT PGLPV (XVII)。

17. 最大长度为 50 个氨基酸的、与至少一个半抗原活性酯通过伯氨基偶联的半抗原标记肽，其中半抗原选自甾醇、胆酸、性激素、类皮质激素、强心甙、强心甙糖甙、蟾蜍二烯内酯、甾类皂角甙元和甾类生物碱。

18. 权利要求 17 的肽，其中半抗原是异羟洋地黄毒甙元或地高辛。

19. 权利要求 17 或 18 的肽，其中该肽含有一个免疫活性表位区和一个携带至少一个半抗原标记物的间隔区。

20. 权利要求 19 的肽，其中间隔区位于肽的氨基或/和羧基末端。

21. 权利要求 19 的肽，其中表位区从 HIV I、HIV II 或 HCV 的氨基酸序列衍生而来。

22. 权利要求 21 中的肽，其中表位区选自下列 HIV I 或 HIV II 的氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸的部分氨基酸序列：

NNTRKSISIG	PGRAFYT	(I)
NTTRKSISIGP	GRAFYT	(II)
IDIQEERRMR	IGPGMAWYS	(III)
QARILAVERY	LKDQQLLGIW	GASG (IV)
LGIWGCSGKL	ICTTAVPWNA	SWS (V)
KDQQLLGIWG	SSGKL	(VI)
ALETLLQNQQ	LLSLW	(VII)
LSLWGCKGKL	VCYTS	(VIII)
WGIRQLRARL	LALETLLQN	(IX) 和
QAQLNSWGCA	FRQVCHTTVP	WPNDSLT (X)。

23. 权利要求 21 的肽，其中表位区选自下列的 HCV 氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸的部分序列：

SRRFAQALPV	WARPD	(XI)
PQDVKFPGGG	QIVGGV	(XII)
EEASQHLPLYI	EQ	(XIII)
QKALGLIQT		(XIV)
SRGNHVSPTH	YVPESDAA	(XV)
PQRKNKRNTN	RRPQDVKFPG	
GGQIVGVV		(XVI)
AWYELTPAET	TVRLRAYMNT	PGLPV (XVII)。

24. 按权利要求 1 的方法产生的半抗原标记肽或权利要求 17 中所述的肽在检测样品液中特异抗体的免疫学方法中用作抗原的用途。

25. 权利要求 24 的用途，其中免疫学方法是桥式检测方法。

26. 免疫测定样品液中特异抗体的方法，其中样品液与 (a) 和 (b) 一起孵育：

(a) 针对待测抗体的含有按权利要求 1 的方法产生的半抗原标记肽或权利要求 17 的肽的第一标记抗原，及

(b) 携带一个信号产生基团的半抗原受体，通过与肽的结合检测抗体。

27. 权利要求 26 的方法，其中用地高辛或异羟洋地黄毒贰元标记的肽作为第一抗原，抗异羟洋地黄毒贰元或/和地高辛的抗体用作受体。

28. 权利要求 26 或 27 的方法，其中在固相存在的情况下，样品液与第一抗原和针对待测抗体的第二抗原一起孵育，第二抗原 (a) 与固相结合或 (b) 以能与固相结合的形式存在，

通过测定固相或/和液相中的标记物来检测待测抗体。

29. 权利要求 28 的方法，其中用生物素标记的抗原作为第二抗原，并使用链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白包被的固相。

30. 权利要求 28 的方法，其中样品液与第一和第二抗原混合，然后加入第一抗原之半抗原的受体。

31. 免疫测定特异抗体的试剂，其中试剂包括至少一个与待测抗体反应的按权利要求 1 的方法产生的半抗原标记肽。

32. 权利要求 31 的试剂，其中试剂含有一个与待测抗体反应的权利要求 18 的半抗原标记肽。

33. 权利要求 31 的试剂，其中它包括：（a）与待测抗体反应的半抗原标记肽，（b）携带信号产生基团的半抗原受体和（c）另一个与待测抗体反应的固定于固相上或以能与固相结合的形式存在的抗原。

半抗原标记的肽

本发明涉及一种产生半抗原标记肽的方法，按此方法产生的半抗原标记肽及其在免疫检测方法中的应用。

体液中，特别是人类血清中免疫球蛋白的测定用于诊断微生物感染，特别是病毒感染，例如 HIV、肝炎病毒等。通常应用能与特异免疫球蛋白反应的一种或数种抗原与待检样品进行反应，以检测特异免疫球蛋白的存在。测定液体样品中特异免疫球蛋白的方法必须灵敏、可靠、简单易行且又快速。

近几年来，已经发展了越来越多的以非放射活性标记基团为基础的检测方法，在这些检测方法中，待测样品中的分析物，比如一种特异抗体，可在光学(例如发光的或荧光的)检测法、NMR-活性或金属沉淀检测方法的帮助下检测出来。

EP - A - 0 307 149 描述一种用两种重组多肽做为抗原的检测抗体的免疫学检测方法，其中一种多肽固定于固相上，另一种携带一个信号基团，两种多肽可在不同的菌内进行表达以提高检测的特异性。

EP - A - 0 366 673 中描述一种检测样品中抗体的方法。在此方法中，样品通过与纯化的标记抗原和同样纯化的与固相固定的抗原起反应来检测抗体。例如，公开了人类 IgG 做为一种抗原。

EP - A - 0 386 713 中叙述了一种应用两种固体支持物来检

测抗 HIV 抗体的方法。在这一方法中，将不同的 HIV 抗原固定在这两种固体支持物上，且每种支持物都与样品及一种标记的 HIV 抗原相接触，这样通过至少一个实验中的阳性反应检测出抗体的存在。公开了重组产生的多肽作为 HIV 抗原。

EP - A - 0 507 586 叙述了一种检测特异免疫球蛋白的免疫学检测方法，此方法中将能与免疫球蛋白结合的两抗原与样品相接触，第一种抗原携带一种适合与固相支持物相连接的基团，第二种抗原携带一种信号基团。信号基团可以是直接标记基团，比如一种酶、色原、金属颗粒，也可以是间接标记基团，即与抗原相连的标记基团可以与其受体相反应，而其受体携带一种产生信号的基团。提到荧光衍生物作为间接标记基团的例子，其受体是与一种酶相偶联的抗体。公开了如乙肝表面抗原一类的多肽作为抗原。通过衍生作用将 SH 基团导入这种抗原以与荧光剂相连。

EP - A - 0 507 587 描述了一种检测 IgM 抗体的特异方法。此方法中样品与可与待测抗体直接结合的标记抗原及可与待测抗体直接结合并能与固相相连的二抗一同孵育。

现有技术中测定抗体的免疫学方法中，通常所用的多肽抗原一般是用重组 DNA 的方法生产的。然而，使用此类多肽抗原时可能带来许多问题。这些重组多肽常常只能以融合多肽的形式产生，这样在检测中融合部分可导致假阳性结果。另外由重组表达产生的多肽在样品溶液中不很稳定并且易于凝聚。重组表达方法的另一个缺点是不能选择性地、可重复地将标记基团导入多肽。

此外，生产重组多肽抗原耗资高，免疫反应中大量不同的重组多肽抗原可发生大的变异。

因此，本发明的目的是提供一种产生免疫检测用抗原的简单有效的方法，本方法至少部分消除现有技术中已知抗原的缺点。另外，本方法还可选择性地、可重复地将标记基团导入抗原。

通过产生半抗原标记肽的方法达到本发明的目的，该方法具有以下特征：

(a) 在固相上由其侧支反应性基团被保护基团阻断的氨基酸衍生物合成含有目标氨基酸序列的肽，选择伯氨基侧支基团上的保护基团使得需要时可被选择性地裂解掉，

(b) 除去保护基团以形成最少一个游离的伯氨基团，

(c) 将半抗原-活性酯衍生物与肽上至少一个游离伯氨基团相偶连，并且

(d) 如果需要将仍保留的保护基团裂解掉，

半抗原选自甾醇、胆酸、性激素、类皮质激素、强心甙、强心甙糖甙、蟾蜍二烯内酯、甾类皂角甙元及甾类生物碱。

根据本发明的方法产生的肽，最大长度优选 50 个氨基酸，特别优选 30 个氨基酸，它们十分适合于免疫检测方法并特别适于特异免疫球蛋白的测定。令人惊异地发现，根据本发明的方法产生的肽尽管携带着庞大的半抗原标记基团，但其对待测免疫球蛋白具有很高的亲和力和特异性。

本发明的方法能够从结合位点和数量上有选择地导入半抗原标记基团。在本发明的肽合成中，通过在氨基酸衍生物的伯氨基团上应用特定的保护基团来特异性选择肽上选择性除去保护基团后可与半抗原反应的位点，这种方法是可行的。这样就可提高检测的可重复性和敏感性。

本发明的方法的另一个优点是使用肽抗原能够测定出象 IgM、IgG、IgE、IgA 的所有类别抗体。这一检测方法使用所限定的小而稳定且不易凝聚的抗原，还对干扰不敏感。

根据本发明的方法与肽相偶联的半抗原是一种选自甾醇、胆酸、性激素、类皮质激素、强心甙、强心甙糖甙、蟾蜍二烯内酯、甾类皂角甙元和甾类生物碱的含有甾类骨架的分子。这些半抗原能够与特异受体结合，例如，与对抗半抗原的抗体或抗体片断结合。特别优选从强心甙和强心甙糖甙中选择出的半抗原。这些半抗原的代表是：异羟洋地黄毒甙元、洋地黄毒甙元、芫毒甙元、毒毛旋花甙元，地高辛、洋地黄毒甙、地托辛（ditoxin）和毒毛旋花甙 K，优选异羟洋地黄毒甙元和地高辛。

本发明的方法中，半抗原活性酯衍生物和肽上的氨基末端和/或游离伯氨基侧支基团相连。本发明中“活性酯”这一术语包括不会与肽的其它反应性基团产生干扰性副反应且能与游离氨基基团反应的活化酯基团。优选使用 N-羟基-琥珀酰亚胺酯做为活性酯衍生物。半抗原活性酯衍生物的合适的代表为：地高辛-4''-戊二酸半酯-N-羟基-琥珀酰亚胺酯、异羟洋地黄毒甙元-3-羧甲基醚-N-羟基琥珀酰亚胺酯、异羟洋地黄毒甙元-3-O-甲基羧基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、异羟洋地黄毒甙元-3-琥珀酸半酯-N-羟基琥珀酰亚胺酯、洋地黄毒甙-4''-戊二酸半酯-N-羟基琥珀酰亚胺酯和洋地黄毒甙元-3-琥珀酸半酯-N-羟基琥珀酰亚胺酯。这些半抗原衍生物均由 Boehringer mannheim Company GmbH（Mannheim GER）销售。除了 N-羟基琥珀酰亚胺酯外，也可能使对硝基

苯酯、五氟苯酯、咪唑酯或 N - 羟基苯并三唑酯。

在本发明的方法中，含有所需氨基酸序列的肽是优选使用市售肽合成仪（例如、应用生物系统中的 A 431 或 A 433）在固相上合成的。根据已知的方法用氨基酸衍生物优选从肽的羧基末端开始合成肽。优选使用偶联所需的氨基末端被苄基甲氧羰基（Fmoc）衍生化的氨基酸衍生物。所用氨基酸的反应性侧基团含有肽合成完成后易于被除去的保护基团。这种保护基团的优选代表是：三苯甲基（Trt）、叔丁基醚（tBu）、叔丁基酯（O-tBu）、叔丁氧羰基（Boc）或 2, 2, 5, 7, 8 - 五甲基 - 苯并二氢吡喃 - 6 - 磺酰基（Pmc）。位于肽上准备后期与半抗原进行衍生化位置上的含有伯氨基分支基团的赖氨酸或其它氨基酸衍生物的氨基侧链，与在特定反应条件下（比如，在酸性条件下）能定量除去的第一种氨基保护基团相偶联。酸不稳定性保护基团的适宜代表是 BOC。含有伯氨基侧基团而不希望与半抗原偶联的赖氨酸或其他氨基酸残基的侧基团与在第一种氨基保护基团可被除去的条件下本身不被除去的第二种氨基保护基团相偶联。在肽与固相分离及所有其他保护基团从肽上裂解下来的条件下，优选第二种保护基团仍是稳定的。这种第二保护基团的代表是象苯乙酰的耐酸保护基团。除了 20 种天然氨基酸外，肽也可以含有人工合成的氨基酸，例如 β - 丙氨酸、 γ - 氨基丁酸、 ϵ - 氨基己酸、正亮氨酸或鸟氨酸。这些人工合成的氨基酸以类似于天然氨基酸的保护方式用于合成肽。

合成结束后，包括第一氨基保护基团在内的位于半抗原所要偶联位置上的保护基团，在任选地肽从固相上释放下来之后被除

去。然后这样得到的产品优选使用 HPLC 进行纯化。随后通过肽与所需的半抗原活性酯衍生物反应将半抗原标记物引入肽，半抗原活性酯衍生物与游离伯氨基团，即与肽的氨基末端基团或/和氨基侧支基团发生反应。每个游离的伯氨基团优选使用 1.5 至 2.5 当量的活性酯。然后产物经 HPLC 进行纯化。

如果肽仍然含有被第二保护基团如苯乙酰衍生的氨基基团，那么在合成的最后一步将这些保护基团除去。例如室温下，可在含有机溶剂的水溶液中用固定化或溶解的毒霉素 G 酰胺酶除去苯乙酰保护基团。

如果通过本发明的方法生产的肽含有分子内部的二硫键，那么在合成结束后在除去最后一个氨基酸 N - 末端的 Fmoc 保护基团之前，用（例如）六氟异丙醇/二氯甲烷中的碘（Kamber and Hiskey in Gross E. and Meienhofer J., *The Peptides*, Academic Press, New York, 1981, Pages 145 - 147）在固相上将这种肽序列氧化，然后再除去 N - 末端的 Fmoc 保护基团。

优选合成的肽含有一个免疫活性表位区，即抗体结合的肽序列，和一个间隔区。这样至少一个半抗原标记物优选与间隔区相偶联。标记物位于间隔区的肽在免疫检测中常具有较好的敏感性。

1 至 10 个氨基酸长度的间隔区由于含有电荷或/和可形成氢键，因而具有稳定化和加溶的双重作用。另外，它可以在空间上促进几种受体，比如高分子量受体结合到半抗原标记的肽上。间隔区的氨基酸优先选自甘氨酸、 β - 丙氨酸、 γ - 氨基丁酸、 ϵ - 氨基己酸、赖氨酸和具有 $\text{NH}_2 - [(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x - \text{CH}_2 -$

CH₂ - COOH 结构的化合物，其中 n 是 2 或 3，X 是 1 至 10。另外，间隔区优选含有至少一些人工合成的氨基酸衍生物。间隔区位于肽的氨基末端或/和羧基末端。

根据本发明方法合成的肽优选含有来自病原体，例如细菌、病毒和原生物，或来自自体免疫抗原的表位区。免疫活性表位区优选是从病毒抗原，比如 HIV I、HIV II、HIV O 亚型或丙型肝炎病毒（HCV）的氨基酸序列衍生而来。

HIV I、HIV II 或 HIV O 亚型的表位区优选自 gp32、gp41、及 gp120。HCV 表位优选自非结构蛋白区 HS₃、NS₄ 或 NS₅ 的核心/EnV。

HIV I、HIV II 或 HIV O 亚型表位区的氨基酸序列特别优先选自以下氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸，优选至少 8 个氨基酸的部分氨基酸序列：

NNTRKSISIG	PGRAFYT		(I)
NTTRSISIGP	GRAFYT		(II)
IDIQEERRMR	IGPGMAWYS		(III)
QARILAVERY	LKDQQLLGIW	GASG	(IV)
LGIWGCSGKL	ICTTAVPWNA	SWS	(V)
KDQQLLGIWG	SSGKL		(VI)
ALETLLQNQQ	LLSLW		(VII)
LSLWGCKGKL	VCYTS		(VIII)

WGIRQLRARL	LALETLLQN	(IX)	和
QAQLNSWGCA	FRQVCHTTVP WPNDSLT	(X)	

I 至 III 的氨基酸序列是从 HIV I 的 gp 120 区衍化而来, IV 至 IX 的氨基酸序列是从 HIV I 的 gp 41 区衍化而来, X 的氨基酸序列是从 HIV II 的 gp 32 区衍化而来。I 至 X 的氨基酸序列还显示在序列表 SEQ ID NO.1 至 SEQ ID NO.10 中。第 V、VIII 和 X 的氨基酸序列都含有两个以二硫键形式相连的半胱氨酸。这些序列优选含有一个如上文定义的 N - 末端或/和一个 C 末端间隔区, 该间隔区携带一个半抗原标记物, 优选异羟洋地黄毒甙元或地高辛标记物, 特选优选异羟洋地黄毒甙元 - 3 - 羧甲基醚标记物。位于表位区内的赖氨酸残基也可任选地以被标记的形式出现。

HCV 表位区的氨基酸序列优先选自以下的氨基酸序列或其长度至少为 6 个氨基酸、优选至少 8 个氨基酸的部分序列:

SRRFAQALPV	WARPD	(XI)
PQDVKFPGGG	QIVGGV	(XII)
EEASQHLPYI	EQ	(XIII)
QKALGLLQT		(XIV)
SRGNHVSPTH	YVPESDAA	(XV)
PQRKNKRNTN	RRPQDVKFPG	

GGQIVGVV	(XVI)	和
AWYELTPAET TVRLRAYMNT PGLPV	(XVII)	

XI 序列是从 HCV 的 NS₅ 区衍化而来, XII 和 XIV 序列是从 HCV 的核心区衍生而来, XIII、XIV 和 XV 序列从 NS₄ 区、XVII 是从 HCV 的 NS₃ 区衍化而来。氨基酸序列 XI 至 XVII 也显示在序列表 SEQ ID NO.11 至 SEQ ID NO.17 中。具有上述表位区的肽优选还含有一个携带半抗原标记物的间隔区。

本发明另外一个主题是一种最大长度为 50 个氨基酸、优选 30 个氨基酸的半抗原标记肽, 其氨基末端或/和氨基侧支基团至少与一个半抗原活性酯衍生物相偶联。半抗原优选为异羟洋地黄毒甙元或地高辛, 活性酯优选为 N-羟基琥珀酰亚胺酯。

本发明的肽优选含有一个能与来自如人类血清的抗体反应的免疫反应表位区和一个携带至少一个半抗原标记物的非免疫反应间隔区。间隔区位于肽的氨基末端, 其长度为 1 至 10 个氨基酸。表位区优选是从 HIV I、HIV II 或 HCV (包括其变型如亚型, 例如 HIV 的 O 亚型) 的氨基酸序列衍化而来, 是 I 至 XVII 氨基酸序列或其部分氨基酸序列之一。

本发明也涉及将半抗原标记肽作为抗原应用于样品液中特异抗体的测定。优选测定能指示微生物感染, 比如细菌、病毒或原

生动物感染的抗体。特别优选测定针对病毒的抗体，比如针对 HIV 或肝炎病毒的抗体。待测样品液优选血清，特别优选人类血清。另外，优选在桥式（bridge）检测模式的免疫方法中使用本发明的半抗原标记肽。

本发明也涉及一种测定样品液中特异抗体的免疫学方法，这一方法具有以下特征：样品液与（a）一种针对待测抗体且含有以上所定义的半抗原标记肽的第一标记抗原，（b）一种携带信号产生基团的半抗原受体共同孵育，通过与所述肽的结合来测定抗体。优选使用用地高辛或异羟洋地黄毒甙元标记的肽作为第一抗原，抗异羟洋地黄毒甙元或/和地高辛的抗体作为受体。本文中“抗体”这一术语也包含抗体片断，例如 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂ 片断，或者其他抗体片断，比如被遗传工程修饰过的片断。受体与一种信号产生基团相偶联，优选酶类，例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶或 Q-β-复制酶。但信号产生基团也可以是一种产色素的、放射活性或 NMR 活性基团或是金属颗粒（比如金颗粒）。信号产生基团优选为酶类。

本发明中的免疫测定方法实际上可根据任何已知的检测模式进行，例如具有单一反应相的同质免疫测定法或具有 1 个以上反应相的异质免疫测定法。优选使用异质检测方法，其中抗体的检测是在固相存在的条件下进行的。这种检测方式的一个实例是所谓的双抗原桥式检测设计。这样在固相存在的条件下，样品液与第一抗原及针对待测抗体的第二抗原共同孵育，第二抗原能够（a）固定于固相上，或（b）以能与固相结合的形式存在。通

过测定固相上或/和液相中的标记物来检测样品液中的待测抗体。第二抗原优选生物素标记，且能与被链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白包被的固相结合。优选被生物素标记的肽作为第二抗原。

优选检测步骤包括：将第一抗原和固相上的第二抗原与样品液相混合，以获得一种含有第一抗原、抗体和与固相结合的第二抗原的标记的固定化复合物。与其他测定抗体的检测方式相比，桥式检测方式提高了检测的敏感性和特异性，即可检测出 IgG、IgM、IgA 和 IgE 等所有类别的免疫球蛋白且使非特异性反应降低。如果检测步骤分为两步，双抗原桥式检测特异性和敏感性可进一步提高，第一步将第一和第二抗原与样品液混合，第二步加入携带信号产生基团的第一抗原的半抗原标记物的受体。

将固相结合的肽和半抗原标记的肽作为抗原的双抗原桥式检测方式的另一个优点是，作为 Hook 效应的结果，即通过提高每个肽上标记基团的数量，最好是 2 至 10 个标记基团，可降低含有高滴度待测抗体样品的假阴性评估结果。与携带直接可检测的标记基团的检测方法相比，增加每个肽上半抗原标记基团的数目通过受体的信号放大作用可提高 Hook 敏感性。

而本发明的另一主题是检测特异抗体的免疫检测方法中的试剂，它至少含有一个本发明的半抗原标记肽，与待测抗体相反应。如果这种试剂用于双抗原桥式检测，那么它优选包括（a）半抗原标记肽，（b）携带一个信号产生基团的半抗原受体，和（c）与固相结合或以能与固相结合的形式存在的可与待测抗体反应的

另一种抗原。半抗原优选为强心甾或强心甾糖甙，特别是地高辛或异羟洋地黄毒甙元，半抗原受体优选抗半抗原的抗体，信号产生基团优选酶类，另一种抗原优选为被生物素标记的且能与被链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白包被的固相结合。

通过以下的实施例和序列表进一步描述本发明。

SEQ ID NO.1：显示来自 HIV I gp 120 区表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.2：说明来自 HIV I gp 120 区另一个表位的氨基酸列；

SEQ ID NO.3：来自在 HIV I 和 HIV I O 亚型的 gp 120 区另一表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.4：来自 HIV I gp 41 区表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.5：来自 HIV I gp41 区另一个表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.6：来自 HIV I gp 41 区又一个表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.7：来自 HIV I O 亚型 gp41 区表位的氨基酸序列

SEQ ID NO.8：来自 HIV I O 亚型 gp 41 区另一个表位的氨基酸序列；

SEQ ID NO.9: 来自 HIV I O 亚型 gp 41 区又一个表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.10: 来自 HIV II gp 32 区表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.11: 来自 HCV NS₅ 区表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.12: 来自 HCV 核心区表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.13: 来自 HCV NS₄ 区表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.14: 来自 HCV NS₄ 区另一个表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.15: 来自 HCV NS₄ 区又一个表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.16: 来自 HCV 核心区另一个表位的氨基酸序列;

SEQ ID NO.17: 来自 HCV NS₃ 区表位的氨基酸序列。

实施例 1

半抗原标记肽的产生

在一批肽合成仪上, 例如来自应用生物系统的 A431 或 A433 合成仪上按苄基甲氧羰基 (Fmoc) 固相肽合成法合成半抗原标记肽。为产生半抗原标记肽, 使用 4 当量如表 1 所示的各种氨基酸衍生物:

表 1

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K1	Fmoc-Lys(苯乙酰)-OH
K2	Fmoc-Lys(Boc)-OH
K3	Fmoc-Lys(Fmoc)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
U	Fmoc-β-丙氨酸-OH
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Z	Fmoc-ε-氨基己酸-OH
Nle	Fmoc-ε-正亮氨酸-OH
Abu	Fmoc-γ-氨基丁酸-OH

赖氨酸衍生物 K1 用于不需导入半抗原标记物的位置。赖氨酸衍生物 K2 用于导入半抗原标记物的位置。赖氨酸衍生物 K3 用于连接 ϵ -氨基基团和肽的间隔区。

将氨基酸或氨基酸衍生物溶于 N-甲基吡咯烷酮。在 400~500mg 容量为 0.4~0.7mmol/g (JACS 95 (1973), 1328) 的 4-(2',4'-二甲氧苄基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基树脂上 (Tetrahedron Letters 28(1987),2107)合成肽。以二甲基甲酰胺作为反应溶剂与相对 Fmoc-氨基酸衍生物 4 当量的二环己基碳化二亚胺和 4 当量的 N-羟基苯并三唑进行偶联反应 20 分钟。每步合成反应后,用二甲基甲酰胺中 20% 的哌啶在 20 分钟内除去 Fmoc 基团。

如果肽序列中存在半胱氨酸残基,那么在合成结束后立即用六氟异丙醇/二氯甲烷中的碘在固相上进行氧化。

室温下,用 20ml 三氟醋酸、0.5ml 乙二硫醇、1ml 硫代茴香醚、1.5g 苯酚和 1ml 水处理合成树脂 40 分钟,将肽从合成树脂上释放出来并可除去苯乙酰保护基团以外的酸不稳定性保护基团。随后,反应液与 300ml 冷二异丙醚混合,0℃下保持 40 分钟以彻底沉淀多肽。过滤沉淀,用二异丙醚冲洗,然后溶解于少量的 50% 的醋酸,冻干。用制备性 HPLC 在大约 120 分钟处纯化粗制品,使用适当的梯度(洗脱液 A:水、0.1% 三氟醋酸,洗脱液 B:乙腈,0.1% 的三氟醋酸)在 delta-PAK Rp C18 材料(50×300mm 柱,100Å,15 μ)上进行纯化。用离子喷雾质谱法测定

洗脱物质。

用适当的活性酯衍生物和肽的游离氨基基团将半抗原标记物（比如异羟洋地黄毒甙元或地高辛标记物）导入溶液。将待衍化的肽溶于 DMSO 和 0.1M PH 为 8.5 的磷酸钾缓冲液的混合液中，随后在室温下滴加入溶于少量 DMSO 的活性酯并不断搅拌，每当量游离伯氨功能基团需加入 2 当量的活性酯。用分析型 HPLC 监控反应过程。用制备性 HPLC 纯化产品。

如果肽仍含有苯乙酰保护的赖氨酸，那么在最后一步反应中，用含有一定比例有机溶液的毒霉素 G 酰胺盐水溶液室温酶解除去保护基团。过滤分离出酶，用制备性 HPLC 纯化肽。用离子喷雾质谱法测定洗脱物质。

表 2 所示的从 HIV I 和 HIV II 的 gp120、gp 41 和 gp 32 区衍生而来的肽化合物是用异羟洋地黄毒甙元 - 3 - 羧甲基醚 - N - 羟基琥珀酰亚胺酯（Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, GER)制备的。

表 2

gp120	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZ-NNTRKSISIGPGRAFY 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-IDIQERRMRIGPGMAWYS
gp41/1	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-AVERYLKDQQLGIW 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-ZUZU-AVERYLKDQQLGIW 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZ-QARILAVERYLKDQQLGIWGASG 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-ZGGGG-QARILAVERYLKDQQLGIWGASG 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-WGIRQLRARLLAETLLQN
gp41/2	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-LGIWGC\$GKLICTTAV LGIWGC\$GK-(cme-3-异羟洋地黄毒甙元)-LICTTAV 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-LGIWGC\$GK-(cme-3- 异羟洋地黄毒甙元)-LICTTAV 异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-ZU-GC\$GKLICTTAVPWNASWS GC\$GK-(cme-3-异羟洋地黄毒甙元 -LICTTAVPWNASWS GC\$GKLICTTAVPWNASWSK (cme-3-异羟洋地黄毒甙元)G 异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UZU-LSLWGC\$GKLVCTYS
gp41/3	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-KDQQLGIWGSSGKL
gp41/4	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-UZU-AETLLQNQLLSLW
gp32	异羟洋地黄毒甙元 -3-cme-Z-NSWGC\$AFRQVCHTT

表 3 所示的肽是从 HCV 的 NS₅、NS₄ 和核心区合成的。

表 3

NS5/1	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UZU-SRRFAQALPVWARPD
核心 2	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-U-PQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/1	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UU-Nle-EEASQHLPYIEQ
NS4/2	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UU-QKALGLLQT
NS4/3	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UZU-SRGNHVSPTHYVPESDAA
核心 1	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UZU-KNKRNTNRR
核心 1+2	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-U-PQRKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGVV
NS3/1	异羟洋地黄毒甙元-3-cme-UZ-AWYELTPAETTVRLRAYM ¹ TPGLPV

生物素标记肽或者是在树脂上（生物素活性酯）通过衍生化从 N - 末端合成的或者通过在序列中使用生物素 - ϵ - 衍生的赖氨酸残基（Fmoc-LYS(生物素) - OH）合成的。

实施例 2

通过优选的检测步骤提高检测的特异性和敏感性。

用本发明的肽进行的双抗原桥式检测方法的特异性和敏感性，通过一定的检测步骤可一步提高。在这一检测步骤中，第一步混合样品、半抗原标记抗原和固相抗原；然后优选在 1~4 小时后，特别优选 1.5 至 2.5 小时后，加入抗半抗原的抗体。

将 HIV 的表位区 gp 41/1 和 gp 41/2(表 2)用作抗原。

优选的两步检测步骤的检测条件如下：

- 50mmol/L 的中性磷酸钾缓冲液，PH7.2，

0.2%牛血清白蛋白（BSA），0.2%月桂硫酸钠（SLS）去垢剂

- 孵育时间

- 半抗原标记抗原和固相抗原与血清孵育 120 分钟

- 与抗异羟洋地黄毒甙元的抗体和过氧化物酶的偶联物孵育（<Dig>-POD）60 分钟

- 孵育温度：25℃

- 所有孵育步骤之间的结合态/游离态的分离。

两步检测方法的另一检测条件如下：

- 50mmol/L PH 为 7.2 的中性磷酸钾缓冲液，0.2% BSA,0.2% SLS 去垢剂

- 孵育时间

- 固相抗原与血清孵育 90 分钟
- 与半抗原标记抗原和<Dig>-POD 孵育 90 分钟
- 与 ABST 孵育 60 分钟
- 孵育温度: 25 ℃
- 所有孵育步骤之间的结合态/游离态的分离。

一步检测法的检测条件如下:

- 50mmol/L PH 为 7.2 的中性磷酸钾缓冲液, 0.2%的 BSA, 0.2% 的 SLS 的去垢剂
- 孵育时间
 - 两种抗原与血清和<Dig>-POD 孵育 120 分钟
 - 与 ABTS 孵育 60 分钟
- 孵育温度: 25 ℃
- 所有孵育步骤之间的结合态/游离态的分离

检测结果如表 4 所示。可以看出, 在优选的检测方法中得到了非常高的信号区别, 即测定的阳性样品的信号与阴性样品信号之比大。

表 4

样品数目	一步检测法	优选 两步检测法	可替代的两步检测法
		1. 样品与两种特异抗原混合 2. 加入抗半抗原的抗体以进行检测反应	1. 样品与壁结合特异抗原混合 2. 加入特异检测抗原和抗半抗原抗体以进行检测反应
A) 阴性样品	信号 (m A)	信号 (m A)	信号 (m A)
1	19	7	7
2	21	12	9
3	17	6	5
4	19	5	7
5	18	4	8
6	28	7	16
7	20	10	9
8	21	7	11
9	18	10	7
10	19	11	8
11	17	8	9
12	19	12	7
13	22	7	7
14	20	5	17
15	24	40	8
16	19	10	7
17	20	4	8
18	23	6	8
19	20	8	7
20	16	11	7

B) 阳性样品	信号 (m A)	信号 (m A)	s 信号 (m A)
1	405	2401	3681
2	1080	4836	4931
3	158	1100	300
4	760	6210	2155
5	1094	3578	1835
6	452	2296	2954
7	163	1068	136
8	76	195	14
9	2405	7803	2671
10	293	3093	575
11	303	2430	42
12	37	132	11
13	19	9	9
14	63	218	11
15	74	297	15
16	60	253	16
17	86	509	17
18	106	1182	22
19	962	8782	338
20	815	7335	167

实施例 3

在双抗原桥式检测法中将本发明的肽抗原与重组多肽抗原进行比较。在本发明的一个实例中，异羟洋地黄毒甙元标记的肽抗原 gp 41/2（表 2）与具有相同序列的生物素标记肽抗原结合进行检测。在另一个对比实例中，异羟洋地黄毒甙元标记的多肽抗原 rec gp41(Chang 等., Science 228(1985),93-96)与具有相同序列的生物素标记多肽结合进行检测。

本检测的结果如表 5 所示。“NC”代表阴性对照，“PC”代表阳性对照。“截止”指数（cut-off index）是实验中阳性和阴性评价的界限。将其定义为 $2 \times \text{NC}$ 。从表 5 中可以很明显地看出，用重组多肽抗原时，阴性和阳性样品之间可能没有区别，而用肽抗原可看出很明显的区别。

表 5

样品 (稀释)	重组 gp41-Bi/Dig	肽 gp41-Bi/Dig	重组 gp41-Bi/Dig	肽 gp41-Bi/Dig
	吸收度	吸收度	截止指数	截止指数
NC	768	36	0.5	0.5
PC	3066	2094	2.0	29.1
PC 1:2	2587	1410	1.7	19.6
PC 1:4	1681	867	1.1	12.0
阳性 1	1466	9999	1.0	138.9
阳性 2	497	9999	0.3	138.9
阳性 3	801	9999	0.4	138.9
阳性 4	1213	9999	0.8	138.9
阳性 5	952	8039	0.6	111.7
阴性 1	738	50	0.5	0.7
阴性 2	769	39	0.5	0.6
阴性 3	747	40	0.5	0.5

序列表

(1) 一般信息

(I) 申请人:

(A) 姓名: **Boehringer Mannheim GmhH**

(B) 街道: **Sandhofer Str 116**

(C) 城市: **曼海姆**

(E) 国家: **德国**

(F) 邮政编码: **68305**

(ii) 申请题目: **半抗原标记的肽**

(iii) 序列数目: **17**

(iv) 电脑可读形式

(A) 资料载体: **软盘**

(B) 电脑: **IBM PC 兼容机**

(C) 操作系统:

PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: **PatentIn Release # 1.0 Version # 1.25(EPA)**

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii)假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A)染色体/片断: gp 120

(xi) 序列描述: SEQ ID NO 1:

Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr
1				5					10					15	

Thr

(2)SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii)分子类型: 肽

(iii)假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(Viii)在基因组中的位置:

(A)染色体/片断: gp 120

(Xi)序列描述: SEO ID NO 2:

Asn	Thr	Thr	Arg	Ser	Ile	Ser	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr
1				5				10					15		

(2)SEO ID NO:3 的信息:

(i)序列特征:

(A) 长度: 19 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii)分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(B) 菌株: O 亚型

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 120

(Xi) 序列描述: SEO ID NO: 3:

```
Ile Asp Ile Gln Glu Glu Arg Arg Met Arg Ile Gly Pro Gly Met Ala
1          5          10          15
Trp Tyr Ser
```

(2)SEO ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 41

(xi) 序列描述: SEO ID NO: 4:

```
Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
1           5           10           15

Leu Gly Ile Trp Gly Ala Ser Gly
20
```

(2) SEO ID NO: 5 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 23 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 41

(xi)序列描述: SEO ID NO: 5:

Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	Thr	Thr	Ala	Val
1				5				10						15	

Pro	Trp	Asn	Ala	Ser	Trp	Ser
				20		

(2) SEO ID NO: 6 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 41

(xi)序列描述: SEO ID NO: 6:

Lys	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Ser	Ser	Gly	Lys	Leu
1				5					10					15

(2)SEO ID NO: 7 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(B) 菌株: O 亚型

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 41

(xi)序列描述: SEO ID NO: 7:

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp
1				5					10					15

(2)SEO ID NO: 8 的信息:**(I) 序列特征:****(A) 长度: 15 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑: 线形****(ii) 分子类型: 肽****(iii) 假拟: 非****(vi)原始来源:****(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒****(B) 菌株: O 亚型****(viii)在基因组中的位置:****(A) 染色体/片断: gp 41****(xi)序列描述: SEO ID NO: 8:**

Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5					10					15

(2)SEO ID NO: 9 的信息:**(I) 序列特征:****(A) 长度: 19 个氨基酸**

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 1 型人类免疫缺陷病毒

(B) 菌株: O 亚型

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 41

(xi)序列描述: SEO ID NO: 9:

Trp	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu
1				5					10					15	

Leu Gln Asn

(2)SEO ID NO: 10 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度 : 27 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 2 型人类免疫缺陷病毒

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: gp 32

(xi) 序列描述: SEO ID NO: 10:

Gln	Ala	Gln	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Ala	Phe	Arg	Gln	Val	Cys	His
1				5				10						15	

Thr	Thr	Val	Pro	Trp	Pro	Asn	Asp	Ser	Leu	Thr
		20						25		

(2) SEO ID NO: 11 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: NS₅

(xi) 序列描述: SEO ID NO: 11:

Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	Pro	Asp
1				5					10					15

(2) SEO ID NO: 12 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 16 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: 核心区

(xi)序列描述: SEO ID NO: 12:

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val
1 5 10 15

(2)SEO ID NO: 13 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: NS₄

(xi)序列描述: SEO ID NO: 13:

Glu Glu Ala Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
1 5 10

SEO ID NO: 14 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度 : 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: NS₄

(xi)序列描述: SEO ID NO: 14:

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr
1 5

(2) SEO ID NO: 15 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度 : 18 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: NS₄

(xi)序列描述: SEO ID NO: 15:

Ser	Arg	Gly	Asn	His	Val	Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	Pro	Glu	Ser	Asp
1				5					10					15	

Ala Ala

(2)SEO ID NO: 16 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 28 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi) 原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii) 在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: 核心区

(xi) 序列描述: SEO ID NO: 16:

Pro	Gln	Arg	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val
1				5					10					15	

Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Val	Gly	Val	Val
			20				25				

(2) SEO ID NO: 17 的信息:

(I) 序列特征:

(A) 长度: 25 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(vi)原始来源:

(A) 生物体: 丙型肝炎病毒

(viii)在基因组中的位置:

(A) 染色体/片断: NS₃

(xi)序列描述: SEO ID NO: 17:

Ala	Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Val	Arg	Leu	Arg	Ala
1					5					10					15

Tyr	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val
			20				25	