

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/533



[12] 发 明 专 利 说 明 书

G01N 33/58 C07F 15/00

C07K 14/16 G01N 33/543

G01N 33/68 G01N 33/577

[21] ZL 专利号 95195022.3

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1148578C

[22] 申请日 1995.7.24 [21] 申请号 95195022.3

[30] 优先权

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

[32] 1994. 8. 31 [33] DE [31] P4430972.4

[86] 国际申请 PCT/EP1995/002919 1995.7.24

[87] 国际公布 WO96/003652 德 1996.2.8

[85] 进入国家阶段日期 1997.3.12

[71] 专利权人 罗切诊断学有限公司

地址 联邦德国曼海姆

[72] 发明人 U - H · 维恩赫斯

C · 克鲁斯 - 穆勒 E · 霍斯

E · 法特兹 B · 奥恩罗 - 哈恩勒

C · 瑟德尔 M · 维德曼

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 3 页

[54] 发明名称 免疫测定特异抗体的方法、所用试剂、抗原及其用途

[57] 摘要

本发明涉及免疫测定特异抗体的方法、所用试剂、抗原及其用途，在所述测定方法中，在一种固相载体的存在下，检液用针对待测定抗体的两个抗原温育，第一个抗原至少带有一个标识基，第二个抗原(a)结合在固相上、或(b)是可与固相结合的形式，通过测定固相上的或/和液相中的标识基，鉴别出待测定的抗体，其特征是，两个抗原中的至少一个含有可与待测定的抗体发生反应的多重抗原决定簇。

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

1. 免疫测定检液中特异抗体的方法，在固相载体的存在下，该检液用针对待测定抗体的两个抗原温育，第一个抗原至少带有一个标识基，第二个抗原 (a) 结合于固相上、或 (b) 是可与固相结合的形式，通过测定固相上的或/和液相中的标识基，鉴别出待测定的抗体，其特征是，两个抗原中的至少一个抗原含有可与待测定的抗体发生反应的多重抗原决定簇。

2. 权利要求 1 的方法，其特征是，两个抗原中的至少一个含有多个相同的抗原决定簇。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，第一个被标识的抗原含有多个抗原决定簇。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，第二个固定相上的抗原含有多个抗原决定簇。

5. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，第一个被标识的抗原和第二个固定相上的抗原含有多个抗原决定簇。

6. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，所用的抗原带有不与所测定的抗体发生反应的载体，多重抗原决定簇共价偶联于其上。

7. 权利要求 6 的方法，其特征是，所用的抗原具有如下的通式：



式中，T 为载体，P 为含有相同或不同的、有免疫活性的抗原决定簇的、并与载体共价偶联的肽或多肽链，L 为标识基或可与固相结合的基团，该基团共价偶联于载体或肽或多肽链上，n 为大于 1 直到 40 的一个整数，m 为 1 到 10 的一个整数。

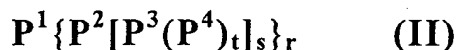
8. 权利要求 7 的方法，其特征是，P 为长度为 6 到 50 个氨基酸的合成肽链，它除含有抗原决定簇外，还任选含有免疫非活性

的间隔基。

9. 权利要求 7 的方法，其特征是，P 为长度直到 1000 个氨基酸的重组多肽。

10. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，所用的抗原含有多个直接地或经间隔基相互共价偶联的抗原决定簇。

11. 权利要求 10 的方法，其特征是，所用的抗原具有通式 (II) 的结构：



式中， P^1 、 P^2 、 P^3 和 P^4 为具有直到 50 个氨基酸的肽链，其上至少 2 个肽链含有相同或不同的、有免疫活性的抗原决定簇， r 为 1 或 2， s 为 0 到 4 的整数， t 为 0 到 8 的整数，抗原上至少含有 1 个分枝位置和至少 1 个标识基或 1 个可与固相结合基团。

12. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，所用抗原是含有多个抗原决定簇的重组融合多肽，其氨基酸序列含有多个有免疫活性的抗原决定簇，该抗原决定簇可经免疫非活性的间隔基相连接。

13. 用于免疫测定检液中特异抗体的试剂，其中含有一个有反应活性的固相，两个针对待测定抗体的抗原，其中的第一个抗原带有标识基，第二个抗原 (a) 与固相结合、或 (b) 为可与固相结合的形式，其特征是，两个抗原中至少一个抗原含有可与待测定的抗体发生反应的多重抗原决定簇。

14. 用于特异抗体的免疫测定方法中、作为鉴别试剂的多重抗原的用途，该抗原具有多个相同的、可与待测定的抗体发生免疫反应的有活性的抗原决定簇，并且带有至少一个标识基或可与固相结合基团。

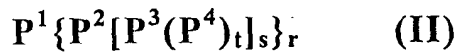
15. 如下通式的抗原：



式中，T 为载体，P 为含有相同或不同的、有免疫活性的抗原决定簇的、并与载体共价偶联的肽或多肽链，L 为标识基或可与固相结合基团。

相结合的基团，该基团共价偶联于载体或肽或多肽链上， n 为大于 1 直到 40 的一个整数， m 为 1 到 10 的一个整数。

16. 如下通式的抗原：



式中， P^1 、 P^2 、 P^3 和 P^4 为具有直到 50 个氨基酸的肽链，其上至少 2 个肽链含有相同或不同的、有免疫活性的抗原决定簇， r 为 1 或 2， s 为 0 到 4 的整数， t 为 0 到 8 的整数，抗原上至少含有 1 个分枝位置和至少 1 个标识基或 1 个可与固相结合的基团。

免疫测定特异抗体的方法、所用试剂、抗原及其用途

本发明涉及用含有多个抗原决定部分的抗原来测定特异的免疫球蛋白的方法。

检查体液中、尤其是人血清中的免疫球蛋白可用于诊断微生物感染，尤其是病毒例如 HIV、肝炎病毒等的感染。常规检查受检样品中存在的特异的免疫球蛋白的方法是通过使一个或多个抗原与该特异的免疫球蛋白发生反应，测定检液中特异免疫球蛋白的方法必须灵敏、可靠、简便和快捷。

近年来，日渐发展了基于非放射性标记基团的检查系统，此时检查中存在的特异的抗体可借助光学（例如发光或荧光）、NMR 或金属沉淀检测系统进行测定。

EP-A-0 307 149 公布了抗体的免疫测定方法，是用两个重组的多肽作为抗原，其中一个多肽固定在固相上，另一多肽则携带一标识基，两个重组的抗原取自不同的生物，以便提高鉴别的特异性。

EP-A-0 366 673 公布了测定样品中抗体的方法，是将抗体与一纯化的标识的抗原和纯化的与固相结合抗原进行反应。用作抗原的例如是人的 IgG。

EP-A-0 386 713 叙述了鉴别 HIV 抗体的方法，是用两个固体载体，固定在两个固体载体上的是不同的 HIV - 抗原，它与检样的等分液和被标识的 HIV - 抗体相接触，此时若有抗体存在时，至少有一个检样有阳性反应。重组方法制备的多肽作为 HIV - 抗原。

EP-A-0 507 586 叙述了免疫方法测定特异的免疫球蛋白的方法，即一个检样与两个能与免疫球蛋白结合的抗原相接触而反应，第一个抗原携带有结合在固体载体上的适宜的基团，第二个抗原携带有标识基团。标识基团可以是直接的标识基团，例如酶、发色团、金属粒子，也可以是间接的标识基团，后者携带有可产生信号的基团。间接识别基团的一

个实例可提及荧光素衍生物，它的受体是一个抗体，该抗体又与一酶偶联。多肽可作为抗原，例如乙肝表面抗原。该抗原可衍生化引入 SH - 基，再与荧光素偶联。

EP-A-0 507 587 公布了特异地鉴别 IgM 抗体的适宜方法，即将检样与被标识的、针对要检出的抗体的抗原和与第二个也针对要检出的抗体的、与固相连结的抗原共同温育。

根据桥连测定概念的已知免疫鉴别方法，是用标识的抗原和可结合在固相的抗原，它仍有明显的弱点。当被测定的抗体和抗原之间有较小的亲和力时，尤其是有较小的灵敏度。这特别是只有短时间的血清转化或感染的微生物出现新的亚型。迄今已知的桥连测定概念的另一缺点是由于 Hook 效应对于高滴度的检样有假阴性的危险。

基于这些问题，本发明提出了鉴别特异抗体的方法，其中现有技术方法的上述缺点至少部分地被克服了，尤其是对直到前不久才实现的血清转化和新的微生物亚型有足够的灵敏性。此外，本发明方法的 Hook 效应可达到最小。

解决这个问题所用的方法是，在检液中免疫测定特异的抗体，在固相载体的存在下，该检液用针对待测定抗体的两个抗原相温育，第一个抗原至少携带一个标识基，第二个抗原 (a) 结合于固相上、或 (b) 是可与固相结合的形式，通过测定固相上的或/和液相中的标识基，鉴别出待测定的抗体，其特征是，两个抗原中的至少一个抗原含有可与待测定的抗体发生反应的多重抗原决定簇。

令人意外的是，在用至少一个多重抗原进行桥连免疫测定时，即用有多重抗原决定部分的抗原时，对于血清中所用的抗原有较小亲和力的抗体的检测灵敏度可改善。此外，本发明方法还显著地减低了因 Hook 效应而使高滴度检样造成假阴性的危险。经提高桥连测定概念的抗原决定簇的密度而优化了抗原的表达，通常会改善多克隆血清中特异的免疫球蛋白的反应性，如使用检液血清那样。本发明方法的另一优点是，多重抗原比单抗原的稳定性明显地改善了。

根据桥连测定概念，对特异抗体进行免疫测定的方法需要有两个抗原。本发明的第一个优选的实施形式是用多重抗原作为标识抗原，而单

抗原作为固相的抗原。本发明的第二个实施形式是，用多重抗原作为固相抗原，单抗原作为标识的抗原。第三个优选的实施形式是，用多重抗原作为被标识的抗原和固相抗原。

多重抗原含有多个抗原决定部分，即具有免疫学上与特定的抗体反应的结构，优选为肽或多肽序列。该抗原决定部分优选经免疫非活性区段（例如间隔区域）相互连接。优选用的多重抗原包含有多个相同的抗原决定簇。

本发明的多重抗原优选含有多于1个到80个免疫活性的抗原决定区域，尤其优选为多于1个到40个抗原决定区域。该抗原决定区域可以用高分子载体偶联，或经间隔基间接与之相互偶联。

抗原决定区域优选是有免疫活性的合成肽，序列的长度为6 - 50个氨基酸，或是重组多肽，序列的长度优选直到1000个氨基酸。合成的肽抗原决定基除含特定的抗原决定簇外，最好有间隔基，该间隔基例如用于与其它抗原决定基或载体偶联，或者和与标识基或固相结合基偶联。

间隔基优选的免疫非活性的肽，序列长度为1 - 10个氨基酸。间隔基的氨基酸优选自：甘氨酸、 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸， ϵ -氨基己酸，赖氨酸，以及 $\text{H}_2\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 的化合物， n 为2或3， x 为1 - 10。间隔基最好是在抗原决定簇的氨基端或/和羧基端的氨基酸的连续序列。

按照桥连测定概念进行免疫测定时，用第一个标识的抗原。本发明方法可以用各种已知的标识基团，例如放射活性的和非放射活性的标识基。优选的非放射性标识基团可直接或/和间接地检出。直接可检测的标识基是定位在抗原上的可直接产生测定信号的基团。这些可直接产生信号的基团的实例是生色团（荧光或发光基团，染料），酶，NMR-活性基团或金属粒子，这些可用已知方法偶联到肽或多肽抗原上。优选的直接可测定的标识基团是通过荧光或电化学发光来检测的金属螯合物，尤其优选为钆、镱、铈或钕螯合物，特别是钆螯合物，例如钆-(二吡啶) $_3^{2+}$ -螯合物。其它适宜的金属螯合物-标识基例如叙述于EP-A-0 580 979，WO90/05301，WO90/11511和WO92/14138。本发明提及这些

文件并将相关内容并入本发明。

本发明的另一种标识基团是间接的可检查的标识基团，此时抗原与间接的可检出的基团偶联，例如生物素或半抗原基团，后者又与适宜的结合配对相反应（抗生物素蛋白链菌素、抗生物素蛋白或抗半抗原-抗体），后者又携带可产生信号的基团。优选的间接的标识基团作为半抗原时，用分子量为 100 ~ 2000 的有机分子，优选用分子量为 150 ~ 1000。

该半抗原是能够与特异受体结合的半抗原。受体的实例是抗体，抗体片断，后者可针对半抗原，或者是与半抗原作特异结合的物质，例如当半抗原是生物素时，为抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白。优选的半抗原可选自甾类，没食子酸，性激素，皮质素，强心甙元，强心甙，蟾蜍二烯木脂素，甾体-皂甙元，甾体生物碱，尤其优选的半抗原是强心甙元和强心甙，这类物质的代表是洋地黄甙，洋地黄毒甙，地高辛甙元，毒毛旋花子甙原，地高辛，洋地黄毒甙，地妥辛和毒毛旋花子甙，其中特别优选的是地高辛甙元和地高辛。另一个适宜的半抗原例如是荧光素或适宜的荧光素衍生物。

半抗原的受体与能产生信号的基团相偶联，优选为酶，如某些过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，脲酶或 Q- β -复制酶。产生信号的基团也可以是生色团、放射性基团或 NMR 活性基团或是金属粒子（如金）。半抗原与抗原偶联例如可以这样进行，将半抗原以活化酯衍生物的形式偶联到肽或多肽抗原的氨基末端或羧基末端。

本发明的“活化酯”的含义是活化的酯基，它在如下的条件下可与肽的游离氨基反应，而不与肽中其它活性基团发生干扰性的副反应。活化酯衍生物优选用 N-羟基琥珀酰亚胺酯，例如适宜的半抗原-活化酯衍生物有地高辛-4'''-戊二酸半酯，N-羟基琥珀酰亚胺酯，地高辛甙原-3-羧甲基醚-N-羟基琥珀酰亚胺酯，地高辛甙原-3-O-甲基醚- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯，地高辛甙原-3-丁二酸半酯-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-丁二酸半酯-N-羟基琥珀酰亚胺酯。这些半抗原衍生物可在 Boehringer Mannheim 公司（Mannheim, BRD）买到。除 N-羟基琥珀酰亚胺酯外，也可用 N-

羟基苯并三唑 - P - 硝基苯酯、- 五氟苯酯、或咪唑酯的类似物。

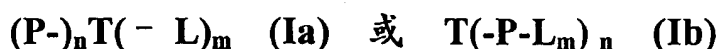
本发明方法除第一个标识抗原外，也可用第二个抗原，它与固相相连接，或是以能与固相结合的形式存在，也同样可以是多重抗原。与固相相连的抗原同固相的连结可以是共价键，或是吸附性结合，可以直接结合、或经化学键联，或是特异的相互作用，例如生物素 - 抗生物素蛋白链菌素/抗生物素蛋白，抗原 - 抗体，碳水化合物 - 植物凝血素。与固相连结的抗原是生物素化的抗原，固相是由抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白所覆盖。生物素与抗原偶联反应可用已知的方法，例如加入生物素活化酯衍生物，这类方法本领域技术人员是皆知的。

在多重抗原上的标识基团或固相结合基团的数目是可变的，即可存在一个或多个基团。本发明的一些实施形式优选是至少 3 个、尤其是 3 到 20 个标识基或固相结合基。用这样的方法可以得到异常高的灵敏度，并且显著地消除了 Hook 效应（强阳性检样得到假阴性）。

本发明是基于这样的认识：当于此检测中所用的两个抗原至少一个有多重抗原时，则在检液中测定特异抗体时，免疫试验法是有利的，该多重抗原、即多重抗原决定簇优选包含多重相同的抗原决定簇。本发明的“抗原决定簇”的含义是可与受试的抗体发生特异反应的结构，优选为肽或多肽序列。为了在多重抗原上安排多重抗原决定簇，原则上有多种可能性。其中一种实施方案是多重抗原偶联一个不与待试抗体反应的载体，经共价键与抗原决定簇偶联。适宜的载体有肽或多肽，或合成的载体如右旋糖酐，金粒子，树状物等。适宜的多肽有白蛋白，如牛血清白蛋白，非特异的免疫球蛋白，免疫球蛋白片段， β - 半乳糖苷酶，聚赖氨酸和具有对称结构的其它蛋白质。使用的载体不得与检样中的抗体发生交叉反应。

抗原决定簇优选经过双功能联结基与载体的有反应活性的基团偶联，例如与氨基或 SH - 基偶联。优选是经与载体的 NH_2 - 基偶联。

本发明的该实施方案优选通式如下的抗原：



式中 T 为载体，P 为肽或多肽，含有相同或不同的免疫活性的抗原决定簇，并共价键合于载体上，L 是标识基团或可结合于固相上的基团，它

共价偶连在载体或肽或多肽序列上。 n 是大于1至40的数， m 为1-10的数。 n 和 m 不能没有数值，因为只有这样，载体才能在反应中统计学上可被抗原决定基或标识基或固相结合基覆盖， n 优选等于或大于2。

在载体上偶联的肽与多肽序列最好含有合成的、肽链氨基酸长度为6-50个的氨基酸，重组的肽链的优选长度为直到1000个氨基酸。

合成的肽链除含有特异的抗原决定簇外，还可任选地含有上面定义的间隔基，例如安装在抗原决定簇和载体之间，或/和抗原决定簇与标识基或固相结合基之间。

肽或多肽抗原决定簇可偶联在载体的N-端、C-端或侧链的活性基团上。偶联的可能性在于：载体分子经与已知的连接物（如马来酰亚胺基己酸，马来酰亚胺基丙酸，马来酰亚胺苯甲酸）反应而使氨基活化，并将SH活化的肽衍生物共价偶联到载体上。标识基或固相连接基常规上以活化形式偶联于载体分子或/和）抗原决定簇上。但也可有其它的偶联方式，如经过双功能的光照连接。

为了合成其含有的抗原决定簇偶联于惰性载体上的多重抗原，制备相应的肽，它最好具有活泼的巯基例如可引入另一个半胱氨酸残基。这种肽可在N-端、C-端或在连接基的序列上加以修饰。为了在多重抗原上进行反应，例如可将含有伯氨基的载体首先与相应的标识基的活性酯衍生物结合，然后与马来酰亚胺基烷基反应。这样，载体上的赖氨酸残基的 ϵ -氨基部分地被标识基团（如地高辛甙元或二吡啶钌）或固相结合基团（如生物素）标记，并且另一部分转变成马来酰亚胺基。

下一步是肽或肽混合物经有反应活性的巯基与所需的抗原决定簇偶联到被马来酰亚胺修饰的载体上。当标识基团直接位于肽链上时，多重抗原的合成用类似的方法，只是现在用相应标识的SH-活化的肽与载体反应。

本发明另一个实施方案是，使用多重抗原，它包含有多个直接地或经间隔基而共价偶联的抗原决定簇。优选的方法是使抗原决定簇至少部分地经三功能的连接分子进行偶联，以致使抗原包含有至少一个最好是1个到7个分枝点。

该实施方案优选用的抗原为通式 II:

$$p^1\{p^2[p^3(p^4)_t]_s\}_r \quad (\text{II})$$

式中 P^1 , P^2 , P^3 和 P^4 为长度 1 - 50 个氨基酸残基的肽链, 其中至少 2 个肽链含有相同或不同的免疫活性的抗原决定簇, r 为 1 或 2, s 为 0 - 4, t 为 0 - 8, 该抗原至少有一个分枝和至少一个标识基团, 或能够与固相结合基团。

当 p^1 , p^2 , p^3 和 p^4 是线形肽链时, 式 II 的抗原形成了树状结构, 最多有 7 个分枝, 并最好含有 2 到 8 个相同或不同的免疫活性的抗原决定簇。间隔基优选为免疫非活性的肽链, 其长度如上所述的 1 - 10 个氨基酸。 p^1 , p^2 , p^3 和 p^4 肽链不仅必须含有抗原决定簇, 而且也可能是构成间隔基的结构, 使用三功能基的氨基酸如赖氨酸或鸟氨酸, 可在结构中建成分枝。

此外, 通式 II 要至少含有上面定义的标识基团或固相结合基。这些基团可以偶联在肽链的端基或/和有反应活性的侧链上。

多重抗原的另一实例形式还可是所谓的嵌蛋白, 即重组融合多肽, 其氨基酸链含有多重免疫活性的抗原决定簇, 并且任选地可偶联免疫非活性的间隔基。重组嵌蛋白的制备是, 制备用于所需蛋白编码的 DNA 序列, 并将它加到重组的主细胞中进行表达。该方法对于分子生物学领域的技术人员是熟知的, 并在标准教科书中有述 (例如: Sambrook 等: 分子克隆, 实验室手册, 第二版, 1989, 冷泉港实验室出版社)。用已知方法也可将标识基或固相结合基引入到重组蛋白中。

本发明优选的实施方案是, 所合成的肽链的抗原决定簇长度为 6 到最大为 50 个氨基酸, 优选为最多到 30 个氨基酸。这样的抗原决定簇, 既可根据其位置也可根据其数目引入标识基团或固相结合基。即在合成制备时, 通过使用活泼侧链上的保护基, 例如加入氨基酸的伯氨基进行保护, 以定向地选择其位置, 选择性地去保护基后, 得到引入的标识基团。

此外, 还合成了在固相上有所需氨基酸序列的肽, 优选市售的肽合成仪进行 (如 Applied Biosystems 出品的仪器 A432 或 A433)。合成按照已知的方法, 用氨基酸衍生物时, 优选始自肽的羧基端。加入的氨

氨基酸衍生物应是这些，其上为进行偶联而必需的末端氨基被苄氧羰基（Fmoc）衍生化。加入的氨基酸有反应活性的侧链要加以保护，待合成完毕后不必进一步裂解。优选的保护基实例里，三苯甲基（Trt），叔丁醚（tBu），叔丁酯（OtBu），叔丁氧羰基（Boc）或2,2,5,7,8-五甲基色烷-6-磺酰基（Pmc）。

赖氨酸残基上的或其侧链上有处于肽上的伯式侧氨基的氨基酸生物的氨基侧链，需用半抗原如地高辛或地高辛甙元衍生化时，要选择可以裂解的基团将第一个氨基保护，在固定的反应条件下定量地反应，例如在酸的存在下进行裂解。适宜的对酸敏感的保护基的实例是Boc。赖氨酸或其它的有伯氨基侧链的氨基酸的侧链若不与半抗原偶联时，要对第2个氨基保护，所选择的保护基应是在可裂解掉第一个保护基时，不对它裂解。第二个保护基最好在肽从固相上裂解时以及将所有的保护基裂解掉的条件下也是稳定的。该第二个保护基的实例是酸稳定的保护基，如苯乙酰基。除20个天然氨基酸外，肽中也可含非天然（合成的）氨基酸，例如有 β -丙氨酸， γ -氨基丁酸， ϵ -氨基己酸或正亮氨酸。非天然氨基酸与天然氨基酸类似，在合成中也要用保护形式。

合成结束后，可任选地将肽自固相上游离下来，将包括发生半抗原偶联的位置上存在的第一个氨基保护基裂解下来。然后优选用HPLC方法进行纯化，再将所需的半抗原-活化酯衍生物与肽反应，引入半抗原标识基，反应的位置是肽的末端或侧链上的游离的伯氨基。每个伯氨基优选加入1.5 - 2.5当量的活化酯。最后对反应产物纯化，优选用HPLC。

若肽中仍含被第二个保护基保护的氨基，例如用苯乙酰衍生化的保护基，则在最后一步除去保护基。用例如酶法除去苯乙酰保护基，用固定的或在水溶液中溶解的青霉素G-酰胺酶与有机溶剂在室温下水解。

用本发明方法制备的肽若含有分子内二硫化物桥键，则在合成结束后、但在最终氨基酸的N-端Fmoc保护基去保护之前，将在固相上的肽链用碘于六氟异丙醇-二氮甲烷中氧化（Cober等，肽，科学出版社（The Peptide, Academic Press），New York, 1981，145 - 147页），然后将N-端Fmoc保护基脱去。

活泼的SH基的引入例如可将半胱氨酸残基偶联到肽的氨基端上来

实现。

在合成的肽中引入金属螯合物 - 标识基可如下实现：（a）在合成了所需的肽链后、但最好在从固相上裂解掉肽之前和裂解掉为进行肽合成而应用的氨基酸衍生物的活泼侧链上的保护基之前，将活化的发光的金属螯合物、例如活化酯衍生物偶联到肽的 N - 端伯氨基上，或/和（b）在合成肽的过程中，引入与发光的金属螯合物标识基相共价偶合了的氨基酸衍生物，例如 ϵ -衍生化的赖氨酸。

分枝的多重抗原的合成可这样进行，使用由两个 Fmoc 基保护的二氨基酸如赖氨酸。肽被生物素衍生化例如可通过将生物素衍生物在肽仍与固相偶联时引入到 N - 端上来实现。

本发明方法优选的肽或多肽抗原决定簇来自病源体微生物，例如用细菌、病毒和原虫或由自家免疫的抗原。免疫活性抗原决定簇最好来自病毒抗原，例如 HIV - I，HIV - II，HIV - O 亚型或丙肝病毒（HCV）。

HIV - I、HIV - II - 或 HIV - O 亚型的抗原决定簇优选选自 gp32，gp41, gp120 和 gp24 区段。HCV 抗原决定簇优选自核心/封套区段或非结构蛋白区段 NS3，NS4 或 NS5。

HIV - I -、HIV - II - 或 HIV - O 亚型的抗原决定簇的氨基酸序列尤其优选自以下肽链；

NNTRKSIISIG	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)
WGIRQLRLRL	LALETLLQN	(IX)
QAQLNSWGCA	FRQVCHTTVP	WPNDSLT (X)

或它们的部分序列，其长度至少有 6 个氨基酸，优选至少有 8 个氨基酸。

氨基酸序列 I - III 来自 HIV - I 的 gp-120 区段, IV - IX 来自 HIV - I 的 gp - 41 区段, X 来自 HIV - II 的 gp - 32 区段。氨基酸序列 I - X 还可由控制序列的 SEQ ID NO.1 - SEQ ID NO. 10 制取。序列 V, VIII 和 X 各含有 2 个半胱氨酸残基, 优选以二硫化物桥键形式存在。

HCV - 氨基酸序列的抗原决定簇优选自如下序列

SRRFAQALPV	WARPD	(XI)
PQDVKFPGGG	QIVGGV	(XII)
EEASQHLPYF	EQ	(XIII)
QKALGLLQT		(XIV)
SRGNHVSPTH	YVPESDAA	(XV)
PQRKNKRNTN	RRPQDVKFPG	
GGQIVGGV		(XVI)
AWYELTPAET	TVRLRAYMNT	PGLPV (XVII)

或它们的部分序列, 其长度至少有 6 个氨基酸, 优选至少有 8 个氨基酸。序列 XI 源自 HCV 的 NS5 - 区段, XII 和 XVI 来自核心区段, 序列 XII 和 XVI 来自核心区段, 序列 XIII、XIV 和 XV 来自在 NS - 4 区段, 序列 XVII 来自 NS3 区段。氨基酸序列 XI 到 XVII 还可由控制序列的 SEQ ID NO.11 - SEQ ID NO.17 制取。

本发明的另一内容是用免疫测定检液中的特异抗体的试剂, 它含有有反应活性的固相, 两个针对待测定抗体的抗原, 其中第 1 个抗原携带有标识基团, 第 2 个抗原 (a) 连结在固相上, 或 (b) 为可与固相结合的形式。该试剂的特征是, 两个抗原中至少一个含有多重抗原决定簇, 后者可以同待测定的抗体发生反应。

本发明的一个实施形式中, 该试剂含有一个带多重抗原决定簇的第一个标识的抗原, 它至少携带一个半抗原 - 标识基团和一个该半抗原的受体, 并抗原还含有能产生信号的基团。此外, 该试剂还优选地含有具有多重抗原决定簇的、与固相结合的第 2 个抗原, 它至少携带一个生物素基团和被抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白复盖的活泼的固相。

本发明的另一内容是多重抗原的用途, 多重抗原包含有多个免疫活

性的抗原决定簇，用于免疫测定检液中的特异抗体。

优选被测定的抗体是由微生物如细菌、病毒或原虫引起的感染，尤其优选针对病毒的抗体，例如测定 HIV 或肝类病毒的抗体。检液优选为血清或血浆，尤其是人血清或血浆。此外，本发明的多重抗原作为免疫方法是以试剂盒形式应用的。

测定方法优选是将检液与第一抗原和在固相上的第二抗原混合，以得到被标识的、由第一抗原、抗体和与固相结合的第二抗原形成的、固定的复合物。本试剂盒与其它测定抗体的其它试剂盒不同，它既改善了灵敏性，即可检出所有的免疫球蛋白家族如 IgG，IgM，IgA 和 IgE，也改善了特异性，即减低了非特异的反应性。因而用本发明方法可成功地以改善了的灵敏性来广泛适用地鉴别特异免疫球蛋白。灵敏性的改善尤其涉及用与多重抗原的反应来识别低亲和力的免疫球蛋白。例如 IgM，反之用单抗原只能识别高亲和力的抗体。双抗原测定的特异性和灵敏性还可用两步测定方法得到改善，此时第一步，将检液与第一和第二抗原混合，然后最好在 1 - 4 小时、特别优选 1.5 - 2.5 小时后加入用于第一抗原的半抗原标识的受体，它携带有产生信号的基团。

最后，本发明还涉及上面定义的式 (Ia)，(Ib) 和 (II) 的新抗原。

此外，本发明可用下面的实施例、序列图示和图加以说明，即

SEQ ID NO. 1: 来自 HIV-I 的 gp120 区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 2: 来自 HIV-I 的 gp120 另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 3: 来自 HIV-I，O 亚型的 gp120 另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 4: 来自 HIV-I 的 gp41 区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 5: 来自 HIV-I 的 gp41 另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 6: 来自 HIV-I 的 gp41 再另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列；

SEQ ID NO. 7: 来自 HIV-I，O 亚型的 gp - 41 区段的、抗原决定簇的

氨基酸序列;

SEQ ID NO. 8: 来自 HIV-I, O 亚型的 gp - 41 另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 9: 来自 HIV-I, O 亚型的 gp - 41 再另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 10: 来自 HIV-II 的 gp32 区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 11: 来自 HCV 的 NS5 - 区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 12: 来自 HCV 核心区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 13: 来自 HCV NS4 - 区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 14: 来自 HCV NS4 另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 15: 来自 HCV NS - 4 再另一区段的、抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 16: 来自 HCV 核心区段的另一抗原决定簇的氨基酸序列;

SEQ ID NO. 17: 来自 HCV NS3 - 区段的一个抗原决定簇的氨基酸序列;

图 1: 重组 HIV P24 抗原的氨基酸序列;

图 2: 用单一的钆化了的 HIV - gp120 抗原和多重的钆化了的 HIV - gp120 抗原进行双抗原测定的测定信号的比较;

图 3: 用单一的生物素化了的 HIV - gp41 抗原和多重的生物素化了的 HIV - gp41 抗原进行双抗原测定的测定信号的比较。

实施例 1

肽 - 抗原决定簇的制备

肽 - 抗原决定簇是在批处理或肽合成仪 (如 Applied Biosystems A431, 或 A433) 上、用苄氧羰基 - (Fmoc) - 固相肽合成法制备的。表 1 中列出的氨基酸衍生物每次用 4.0 当量。

表 1:

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	Boc-Lys(Fmoc)-OH
K4	Fmoc-Lys(BPRu)-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- 正亮氨酸 -OH
Abu	Fmoc-γ- 氨基丁酸 -OH

肽链中存在有半胱氨酸残基时,在合成结束后,于固相上直接用于六氟异丙醇/二氯甲烷中的碘氧化。氨基酸或氨基酸衍生物溶解于N-甲基吡咯烷酮中。肽构建到400-500mg 4-(2',4'-二甲氧苄基-Fmoc-氨基)-苯氧树脂(四面体通讯(Tetrahedron Letters)28(1987),2107)上,载量为0.4-0.7mmol/g(JACS, 95(1973),1328)。以1当量Fmoc-氨基酸衍生物计,偶联反应用4当量二环己基碳二亚胺和4当量N-羟基苯并三唑于二甲基甲酰胺中作为反应介质,反应时间20分钟。每合成一步,用二甲基甲酰胺中的哌啶反应20分钟,将Fmoc基裂解掉。

肽自合成树脂上游离出来并将对酸敏感的保护基裂解掉(苯乙酰基保护基除外)的反应如下完成:在室温下与20ml三氟乙酸,0.5ml乙二硫醇,1ml硫代苯甲醚,1.5g苯酚和1ml水反应40分钟。然后在反应混合液中加入300ml冷二异丙醚,于0℃保持40分钟,使沉淀完全。滤集沉淀,用二异丙醚洗涤,溶解于少许50%乙酸中,冻干。得到的粗品用制备型HPLC纯化,柱子用Delta-PAK RP C18-填充,(柱身50×300mm, 100Å, 15μ),梯度法洗脱(洗脱剂A:水,0.1%三氟乙酸;洗脱剂B:乙腈,0.1%三氟乙酸)。纯化时间约120分钟。用离子喷雾质谱鉴定洗脱出的物质。

引入半抗原,例如地高辛甙元-或地高辛标识物,是将活化酯衍生物如地高辛甙元-3-羧甲基醚-N-羟基琥珀酰亚胺酯(Boehringer Mannheim公司, Mannheim, BRD)偶联在溶液中肽的游离氨基上。得到的衍生化的肽溶解于DMSO与0.1M磷酸钾(pH8.5)的混合液内。然后溶解在少许DMSO中,以伯胺滴加到2当量活化酯中进行偶联,室温搅拌。反应用分析型HPLC跟踪。产物用制备型HPLC纯化。

赖氨酸衍生物K1用于定位,不会于其上面发生半抗原标识。而用赖氨酸衍生物K2定位时,会发生半抗原标识。赖氨酸衍生物K3被用来在肽上偶联ε-氨基,为间隔基。

若肽链上还含有用苯乙酰基保护的赖氨酸,下一步则在水介质

中，加入有机溶剂，室温下用青霉素 - G 酰胺酶酶解。滤除酶，肽用制备型 HPLC 纯化，洗脱下的物质用离子喷雾质谱进行鉴定。

钌 - 标识基团的引入或是于 N - 端经钌(二吡啶)₃ - 羧酸衍生物 (BPRu - COOH)，例如 Ru (二吡啶)₃²⁺ - N - 羟基琥珀酰亚胺酯、或是于肽链上经 ϵ - 衍生化的赖氨酸残基 K4 (Fmoc-Lys(Bp Ru)OH) 进行。

生物素标记基的引入或是在 N - 端经在树脂上的衍生化 (生物素 - 活化酯) 进行，或在肽链内类似于引入钌 - 标记基那样，经过相应于用生物素体 ϵ 衍生化的赖氨酸进行。

合成分枝的多重肽类似于合成线型肽的方法。固相用低载量的树脂，如选用 0.2mmol/g 的载量。为进行分枝化，用二 - Fmoc - 保护的二氨基羧酸，例如 Fmoc - Lys (Fmoc) - OH。

表 2 和 3 中列出了所制备的肽。

表 2a - 2d 列出的肽化合物是由 HIV - I 或 HIV - II 的 gp120, gp41 和 gp32 区段制备的。

表 2a： SH - 活化的线型肽

gp41/1	CUZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	CUZU-LSLWGCKGKLVICYTS
gp41/4	CUZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp120	CUZU-IDIQEMRIGPMAWYS

表 2b： 地高辛贰元 - 标识的线型肽

gp120	地高辛贰元 -3-cme-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT 地高辛贰元 -3-cme-UZ-NTTRSISIGPGRIFY 地高辛贰元 -3-cme-UZU-IDIQEERRMRIGPMAWYS
gp41/1	地高辛贰元 -3-cme-UZU-AVERYLKDQQLLGIW 地高辛贰元 -3-cme-ZUZU-AVERYLKDQQLLGIW 地高辛贰元 -3-cme-UZ-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG 地高辛贰元 -3-cme-ZGGGG-QARILAVERYLKDQQLLGIWGASG 地高辛贰元 -3-cme-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN

gp41/2	地高辛贰元 -3-cme-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV LGIWGCSGK-(cme-3- 地高辛贰元)-LICTTAV 地高辛贰元 -3-cme-UZU-LGIWGCSGK-(cme-3- 地高辛贰元)-LICTTAV 地高辛贰元 -3-cme-ZU-GCSGKLICTTAVPWNASWS GCSGK-(cme-3- 地高辛贰元)-LICTTAVPWNASWS GCSGKLICTTAVPWNASWSK(cme-3- 地高辛贰元)G 地高辛贰元 -3-cme-UZU-LSLWGCKGKLV CYTS
gp41/3	地高辛贰元 -3-cme-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	地高辛贰元 -3-cme-UZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp32	地高辛贰元 -3-cme-Z-NSWGCAFRQVCHTT

表 2c: 钆化的线型肽

gp120	BPRu-UZU-NNTRKSISIGPGRAFYT BPRu-UZ-NTTRSISIGPGRAFY BPRu(乙二醇)-UZ-NTTRSISIGPGRAFY NNTRKSISIGPGRAFYT-K(BPRu) BPRu-UZU-IDIQEERRMRIGPGMAWYS
gp41/1	BPRu-UZU-AVERYLKDQQLLGIW BPRu-UGGG-QARILAVEYLKDQQLLGIWGASG BPRu-GGGG-QARILAVEYLKDQQLLGIWGASG BPRu-UZU-WGIRQLRARLLALETLLQN
gp41/2	BPRu-UZU-LGIWGCSGKLICTTAV BPRu-UGGG-GCSGKLICTTAVPWNASWS (GCSGKLICTTAVPWNASWS)K-(BPRu)
gp41/3	BPRu-UZU-KDQQLLGIWGSSGKL
gp41/4	BPRu-UZU-ALETLLQNQQLLSLW
gp32	BPRu-UZU-NSWGCAFRQVCHTT BPRu-GGG-QAQLNSWGCAFRQVCHTTVPWPNDSLT

表 2d：分枝肽

gp120	(NTTRSIGPGRAPHY-AbuZ AbuZ) ₂ -K-Z-AbuZ-K-(Bi) ((NTTRSIGPGRAPHY-ZU) ₂ -K-UU-K-(Bi) ((NNTRKSIIGPGRAPHYT-UZU-K) ₂ -UZU- NNTRKSIIGPGRAPHYT-UZU-K) ₂ -UZU-Bi
gp120	(NTTRSIGPGRAPHY-ZU) ₂ -K-UU-K-(BPRu)

表 3a - 3d 列出的肽是由 HCV 的 NS5 -、NS4 -、核心 - 和 NS3 - 区段合成的。

表 3a：SH - 活化的线型肽

NS4/3	C-UZ-SRGNHVSPTHYVPESDAA
-------	-------------------------

表 3b：半抗原标识的线型肽

NS5/1	地高辛贰元 -3-cme-UZU-SRRFAQALPVWARPD
Core2m	地高辛贰元 -3-cme-U-PQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/1	地高辛贰元 -3-cme-UU-Nle-EEASQHLPIYIEQ
NS4/2	地高辛贰元 -3-cme-UU-QKALGLLQT
NS4/3	地高辛贰元 -3-cme-UZU-SRGNHVSPTHYVPESDAA
Core1	地高辛贰元 -3-cme-UZU-KNKRNTNRR
Core1+2	地高辛贰元 -3-cme-U-PQRKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGVV
NS 3/1	地高辛贰元 -3-cme-UZ-AWYELTPAETTVRLRAYMNTPLPV

表 3c：钉化的线型肽

Core1	BPRu-GGGG-KNKRNTNRR
Core1+2	BPRu-UZU-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/1+2	BPRu-UZ-SQHLPIYIEQG-NleNle-LAEQFKQQALGLLQT
NS4/3m	BPRu-UZ-SRGNHVSPTHYVPESDAA
NS5/1	BPRu-UZ-SRRFAQALPVWARPD
Core1+2+3	BPRu-UZ-KNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVLLPRR
Core1m	BPRu-UZ-NPKPQKKNKRNTNRR

Core3m	BPRu-UZ-GQIVGGVYLLPRRGPRLG
Core2m	BPRu-UZ-PQDVKFPGGGQIVGGV
NS4/3m-I	BPRu-UZU-SRGNHVSPTHYVPESDAA
NS4/1	BPRu-UZU-SQHLPYIEQ

表 3d：分枝肽

NS4/3m	(SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₂ KUUK (BPRu) (SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₄ K ₂ KUUK (BPRu) (SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₈ K ₄ U ₄ K ₂ KUUK (BPRu) (SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₂ KUUK (Z-Bi) (SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₄ K ₂ KUUK (Z-Bi) (SRGNHVSPTHYVPESDAA-UU) ₈ K ₄ U ₄ K ₂ KUUK (Z-Bi)
--------	--

实施例 2

制备带有肽抗原决定簇的、与载体结合的多重抗原（多重半抗原）

相应的肽是用活泼的巯基例如加入半胱氨酸制备的（见表 2a 和 2b）。肽的修饰或于 N - 端、或于 C - 端、或任意在有所谓的连接基的序列上进行。肽的合成按实施例 1 所述进行。

为了进行多重半抗原的反应，首先将含有氨基的载体与标识基的相应活化酯结合。然后与马来酰亚胺烷基结合，优选马来酰亚胺己基 - （MHS）或马来酰亚胺丙基 - N - 羟基琥珀酰亚胺酯（MPS）。这样，将载体上的伯氨基部分地标记（例如赖氨酸残基的 ϵ - 氨基侧链），而将另一部分转化为马来酰亚胺基。

载体与活化酯的反应优选于 pH 为 7.0 - 8.5 的 0.1mol/l 的磷酸钾缓冲液中进行，浓度为 5 - 20mg/ml，于室温下反应 2 - 4 小时。低分子量组分可用透析法或用凝胶层析法（ACA 202 - 凝胶，洗脱剂 0.1mol/l 磷酸钾，pH7 - 8.5）进行分离。

然后进行的下一步是肽或肽混合物与载于 MHS 修饰的载体上的、有反应活性的巯基反应，在室温和 0.1mol/l 磷酸钾缓冲液（pH8.5）中进行 6 小时偶联反应。未发生反应的肽或用透析法或用凝胶层析法分离出来。

若标识基直接位于肽上，则该多重半抗原用类似的方法合成，

并加入相应的被标识的 SH - 活化的肽。

载体可用兔 IgG, 牛血清白蛋白, β - 半乳糖苷酶, 氨基右旋糖和牛 - Fab - 抗体片段, 载体与肽链的比值按分子比为 1:2 - 1:20。载体与标识基之比例按分子比为 1:1 - 1:20。

实施例 3

制备具有多重 - p24 - RSA - BPRu 的实施例的多重抗原决定簇的、与载体结合的多重抗原 (多重半抗原)

1. 原理

牛血清白蛋白 (RSA) 与钆 - (二吡啶) $_3^{2+}$ - N - 羟基琥珀酰亚胺酯 (BPRU) 和马来酰亚胺乙酰 - N - 羟基 - 琥珀酰亚胺 (MHS) 按上述的次序反应, 为分离出游离的、非结合性的、衍生化的试剂, 用透析方法。

由大肠杆菌重组的 p24 - 抗原 (Ghrayeb 和 Chang, DNA5(1986),93-99) 具有图 1 所列的氨基酸序列, 与 N - 琥珀酰亚胺基 - S - 乙酰硫代丙酸 (SATP) 反应, 经氨基引入硫代酯, 用透析法分离出游离的未结合的 SATP。

将活化的 p24 - 抗原的 SH - 基游离后, 偶联到 RSA - BPRU 的马来酰亚胺基上。过量的有功能基的偶联基被半胱氨酸和 N - 甲基马来酰亚胺捕获, 因而中止了反应。

用层析法 Sephacryl S200 将产物自反应混合物中分离出。

2.1 RSA (MH) - BPRU 的制备

将 5 倍过量的 BPRU 试剂于蛋白质浓度为 20mg/ml, 于 PBS 缓冲液 pH8.0 中的溶液 (0.4ml BPRU 溶液于 DMSO 中, 浓度为 47mg/ml) 加到 250mg RSA 中。

加毕, 于 25℃ 搅拌 75 分钟, 然后加入赖氨酸, 使终浓度为 10mmol/l, 再于 25℃ 搅拌 30 分钟。

加入碘乙酰胺, 使终浓度为 10mmol/l, 将 RSA 存在的 SH 基衍生化, 再于 pH8.0、25℃ 搅拌 45 分钟。

将游离的未结合的衍生化试剂透析 (20 小时, 4℃), 透析体积为 >500 倍的 PBS 缓冲液, pH7.5 (50mmol/l 磷酸钠,

150mmol/l, NaCl, pH7.5), 直至完全分开。

每摩尔 RSH 用 BPRU 47 摩尔, 产量为 220mg RSA - BPRU (89%)。

然后将 25 倍摩尔过量的 MHS 试剂于 pH7.1、蛋白质浓度为 20mg/ml 的 PBS 缓冲液中的溶液加到 220mg RSA - BPRU (0.5ml MHS 的 DMSO 溶液, 浓度为 50mg/ml) 中, 于 25℃ 搅拌 60 分钟。

反应液中加入赖氨酸使终浓度为 10mmol/l, 再于 25℃ 搅拌 30 分钟。

游离的未结合的 MHS 试剂于 >500 倍体积的 PBS 缓冲液 (pH7.5) 中进行透析 (20 小时, 4℃), 使分离完全。收率: 210mg RSA (MH) - BPRU (84%)。

2.2 制备 p24 - 抗原 (SATP)

将过量 3 倍摩尔量的 SATP 试剂于 0.1M 磷酸钠、0.1% (w/v) SDS, pH 为 7.1、浓度为 10mg/ml 的蛋白质溶液加到 100mg p24 抗原内 (SATP 于 DMSO 的溶液浓度为 35mg/ml), 于 25℃ 搅拌 60 分钟。

加入赖氨酸, 使终浓度为 10mmol/l, 再于 25℃ 搅拌 30 分钟。

游离的未结合的 SATP 试剂再与 >500 倍体积的 0.1mol/l 磷酸钠、0.1% (w/v) SDS、pH7.5 的缓冲液透析 (20 小时, 室温), 以使分离完全。收率: 95mg p24 抗原 (SATP) (95%)。

2.3 制备多重 - p24 - 抗原 - RSA - BPRU

将蛋白质浓度为 10mg/ml (于 0.1mol/l 磷酸钠、0.1% (w/v) SDS, pH7.5 的羟胺 (1mol/l, Merck)) 加到 95mg p24 抗原 (SATP) 中, 使终浓度为 30mmol/l, 再于 25℃ 搅拌 60 分钟。

加入 18mg RSA (MH) - BPRU, 加入蛋白质的浓度为 9mg/ml, 于 pH7.1, 25℃ 搅拌 60 分钟。加入半胱氨酸使终浓度为 2mmol/l, 以中止反应, 于 pH7.1 搅拌 30 分钟, 然后加入 N - 甲基马来酰亚胺 (Sigma), 使终浓度为 5mmol/l, 再于 25℃ pH7.1

下搅拌 30 分钟。

中止反应的物料于室温下对 >500 倍体积的 0.1mol/l 磷酸钠、0.1 % (w/v) SDS pH6.5 缓冲液透析，并经 Sephacryl S200 柱纯化，柱层析的最重要的条件是：柱体积 340ml，装载体积 12ml，流速 13.0cm/小时，洗脱缓冲液 0.1mol/l 磷酸钠，0.1 % (w/v) SDS，pH6.5，层析温度为室温。

洗脱过程用波长 280nm 的光谱对流出液作分光光度测定，按流份分成份（馏份量大约为柱体积的 0.5 % ）。

高分子量的洗脱组分按紫外吸收性合并，产品的浓度为 10mg/ml，在 Amicon 搅拌池 YM30 膜（Amicon）上进行浓集，- 80 °C 冻干。

加入量：每摩尔 p24 抗原 - RSA - BPRU 用 5 摩尔 p24 抗原，收量：19mg。

实施例 4

使用多重抗原改良试剂盒的灵敏度

a) 与载体结合的多重抗原（多重半抗原）

生物素化的多重半抗原于双抗原免疫测定中的不同方法是与单体的地高辛贰元化的半抗原合用，因而是等摩尔量的生物素化的或地高辛贰元化的半抗原。作为抗原决定簇，使用的是 HIV 的 gp120 区段的氨基酸序列 NNTRKSI SIGPGRAFYT。半抗原的制备方法按照实施例 1 和 2 所述进行。天然的抗 HIV 血清与各种生物素衍生的多重半抗原的相对反应活性用该血清与相应的生物素单抗原（反应活性=100 %）加以标准化。

表 4 列出了该试验的结果。

载体分子	每个载体分子的有效载量		相对于单抗原(100%) 的反应活性
	生物素	肽	
RSA (MW:69000) (约 627 Aa)	1	4.2	大约 173,0 %
	1	5.1	大约 185,0 %

β-Gal (MW:465000) (约 4227 Aa)	1	2.2	大约 123.5 %
	1	3.6	大约 151,8 %
	1	9.4	大约 125,0 %
牛 - Fab (MW:75000) (约 682 Aa)	1	5.9	大约 146,0 %

b) 多重分枝抗原

在试剂盒的双抗原免疫测定中,对生物素化的和钉化的单抗原决定簇抗原和多重分枝抗原决定簇抗原进行了比较。

HCV 的 NS4 区段的抗原决定簇(序列为 SRGNHVSPT HYVPESDAA)中,生物素化的单抗原与钉化的单抗原的组合与生物素化的多重分枝抗原(见表 3d 第二行)和钉化的单抗原的组合进行了试验比较。测定了信号差异,即阳性检品与阴性检品之间测定信号的比例。较高的信号差异表示有较好的灵敏性。用生物素化的多重抗原得到的信号差异为 386,而两个单抗原的组合得到的信号差异只为 208。

同样进行了 HIV 的 gp120 区段的抗原序列的双抗原试验。所用的抗原决定簇氨基酸序列为 NTTRISISIGPGRIFY。对生物素化的单抗原与钉化的单抗原的组合与生物素化的多重分枝抗原(见表 2d 第 2 行)和钉化的多重抗原(见表 2d,第 4 行)的组合进行了比较。用两个多重抗原的组合进行试验时,阳性检品与阴性检品之间的信号差异为 12。而两个单抗原的组合试验的信号差异只为 10。

实施例 5

使用多重的、与载体结合的抗原来改善试剂盒的灵敏度

生物素化的单抗原和钉化的单抗原的组合与由生物素化的单抗原和载体结合的多重钉化的抗原(载体分子;牛血清白蛋白;抗原决定簇; HIV - p24 - 抗原;按照实施例 3 制备)的组合,以及与载体结合的多重生物素化的抗原和钉化的单抗原的组合进行了试验比较。两个受试的阳性检品(HIV - 血清)用两个单抗原的组合进行试验的阳性/阴性信号差异为 2,而生物素化的单抗原

与钉化的多重抗原的组合进行试验的信号差异为 19 和 7，生物素化的多重抗原与钉化的单抗原的组合进行试验的信号差异为 4 和 3。

生物素化的单抗原和其它钉化的多重抗原（载体分子：兔免疫球蛋白）的组合对三个不同的阳性检品试验有较大的阳性/阴性信号差异，为 3.22 和 10，而用单抗原的组合的信号差异为 2.9 和 8。

使用其它的抗原决定簇（源自 HIV gp - 41 区段的蛋白质）也表明，用多重抗原优于单抗原。将生物素化的单抗原与地高辛甙元化的抗原组合进行试验，实际上在阳性和阴性检品之间没有区别，而多重聚半抗原的组合有非常良好的差别。

实施例 6

使用多重抗原改善试剂盒的灵敏度

面型单抗原与标识的多重抗原的组合试验对特异免疫球蛋白的较宽浓度范围内尤其可达到优良的灵敏度。优选加入量为 1 当量的面型抗原决定簇对 0.2-10、尤其是 0.2 - 8 当量的标识的抗原决定簇。

图 2 比较了生物素化的单抗原与钉化的单抗原以抗原决定簇比例为 1:1 的组合（曲线 1）同生物素化的单抗原与钉化的、与载体结合的多重抗原以抗原决定簇比值为 1:2（曲线 2）或 1:4（曲线 3）的组的对比试验结果。

在实施例 4a 中给出的序列是 HIV 的 gp120 区段的肽作为抗原决定簇。多重抗原的载体分子是 RSA。载体的载量以摩尔比与抗原决定簇为 5:1，与 BPRu - 基为 3:1。

图 2 明显地说明，使用多重抗原可以降低 Hook 效应，并且可提高灵敏度。

实施例 7

使用提高了标识基数目的多重抗原来改善试剂盒的灵敏度

另一个改善测定的灵敏度的方法，是增加标识基或固相结合基的数目，这在很大的程度上可以不在抗原决定簇进行标识，或通过抗高疏水性来提高非特异的背景值。

比较了地高辛贰元化的多重抗原，它含有偶联于牛 - Fab - 抗体片段载体上的 HIV gp120 区段（见实施例 4b）的抗原决定簇，载体对抗原决定簇肽的载量（以摩尔计）范围为 1:6 到 1:7。载体对地高辛贰元基的载量为 1:2 或 1:4。

这些试验结果列于表 5，可以看出，提高了标识基的数目可非线性地改善灵敏度，并且明显地降低了 Hook 效应。

表 5

检品	载体：地高辛化学计量比 1:4	载体：地高辛化学计量比 1:2
测定范围的动态 稀释步骤	mE	mE
1/16384	36	148
1/8192	48	159
1/4096	49	151
1/2048	82	158
1/1024	132	159
1/512	302	157
1/256	675	164
1/128	1503	190
1/64	3493	259
1/32	7436	480
1/16	9306	1066
1/8	9449	3036
1/4	9449	3378
1/2	9449	2694
未稀释	9474	2266

实施例 8

使用多重抗原改善稳定性

试验了单抗原与多重抗原的稳定性。于 35 ℃ 温育 3 天后，以开始的信号强度计，测定了信号的重现性。

对于 HIV 的 gp120 区段来源的钉化了的单抗原（序列见实施例 4），在与新鲜制备的生物素化了的单抗原组合时，两个检品的信号重现性分别为 3.0 % 和 4.0 %。使用与载体结合的多重钉化了的抗原（载体：家兔 - IgG，每个载体分子有 4 个标识基，3 个抗原决定簇）在同样测定条件下，信号的重现性为 73.1 % 和 73.6 %。

用相应的方式试验了具有相同抗原决定簇序列的、生物素化了的单抗原与同载体结合的、生物素化了的多重抗原（载体：家兔 - IgG，每个载体有 18 个生物素基，3 个抗原决定簇）与钉化的单抗原组合。生物素化的单抗原的信号重现性为 25.0 % 和 37.0 %；多重抗原的信号再现性为 120.3 % 和 79.9 %。

实施例 9

改善低亲和抗原反应灵敏度

多重抗原最好是用于具有低亲和性的特异性免疫球蛋白的鉴别，例如鉴别短时血清转化之前和新的病毒亚型。

a) 钉化了的多重抗原

用 HCV 的 NS4/3 - 区段的抗原决定簇的抗原，试验了阳性/阴性的信号差异，钉化了的单抗原与生物素化了的单抗原组合，对两个不同的阳性血清转化检品进行测定，阳性/阴性的信号差异为 3 和 1，即一个阳性检品未被作为阳性检出。使用多重的 IgG - 载体结合的生物素化的和钉化的抗原，信号差异为 21。用多重抗原可以正确地将阳性检品分类。

b) 生物素化的和地高辛贰元化的多重抗原

用 HIV gp41 区段的相同抗原决定簇肽（gp41/3）作为与载体

结合的多重抗原和作为单抗原进行了对照比较，各加入 50ng/ml 的生物素化的和地高辛贰元化的单抗原，为多重抗原时，加入 50ng/ml “肽等同物”，此时的肽量是经多重抗原的容载度计算的。该测定是在自动分析仪 ES700 上进行的。

该测定是用不同的血清转化板作为检品。图 3 表明，在用地高辛贰元化的多重半抗原进行测定时，血清转化板列为恰当的阳性检品，而用单抗原时，则为假阴性结果。

“切断” - 指数是实验中阴性和阳性评价的界限。其定义为阴性对照值的 2 倍。

(2)SEQ ID NO:2 的信息**(i)序列特征:****(A)长度:** 16 个氨基酸**(B)性质:** 氨基酸**(C)拓扑形状:** 线型**(ii)分子性质:** 肽**(iii)前提:** 无**(vi)来源:****(A)有机物:** 人免疫缺陷病毒 I 型**(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段:** gp120**(xi)序列表示:** SEQ ID NO:2

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

(2)SEQ ID NO:3 的信息**(i)序列特征:****(A)长度:** 19 个氨基酸**(B)性质:** 氨基酸**(C)拓扑形状:** 线型**(ii)分子性质:** 肽**(iii)前提:** 无**(vi)来源:****(A)有机物:** 人免疫缺陷病毒 I 型**(B)来源:** 亚型 O**(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段:** gp120**(xi)序列表示:** SEQ 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)SEQ ID NO:4 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 24 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: gp41

(xi)序列表示: SEQ 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)SEQ ID NO:5 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 23 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: gp41

(xi)序列表示: SEQ 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)SEQ ID NO:6 的信息**(i)序列特征:****(A)长度: 15 个氨基酸****(B)性质: 氨基酸****(C)拓扑形状: 线型****(ii)分子性质: 肽****(iii)前提: 无****(vi)来源:****(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型****(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段: gp41****(xi)序列表示: SEQ ID NO:6**

```

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

```

(2)SEQ ID NO:7 的信息**(i)序列特征:****(A)长度: 15 个氨基酸****(B)性质: 氨基酸****(C)拓扑形状: 线型****(ii)分子性质: 肽****(iii)前提: 无****(vi)来源:****(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型**

(B)来源：亚型 O

(viii)基因组位置：

(A)染色体/片段： gp41

(xi)序列表示： SEQ ID NO:7

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

(2)SEQ ID NO:8 的信息

(i)序列特征：

(A)长度： 15 个氨基酸

(B)性质： 氨基酸

(C)拓扑形状： 线型

(ii)分子性质： 肽

(iii)前提： 无

(vi)来源：

(A)有机物： 人免疫缺陷病毒 I 型

(B)来源： 亚型 O

(viii)基因组位置：

(A)染色体/片段： gp41

(xi)序列表示： SEQ ID NO:8

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

(2)SEQ ID NO:9 的信息

(i)序列特征：

(A)长度： 19 个氨基酸

(B)性质： 氨基酸

(C)拓扑形状： 线型

(ii)分子性质： 肽

(iii)前提： 无

(vi)来源:**(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型****(B)来源: 亚型 O****(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段: gp41**

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

Leu Gln Asn

(2)SEQ ID NO:10 的信息**(i)序列特征:****(A)长度: 27 个氨基酸****(B)性质: 氨基酸****(C)拓扑形状: 线型****(ii)分子性质: 肽****(iii)前提: 无****(vi)来源:****(A)有机物: 人免疫缺陷病毒 I 型****(B)来源: 亚型 O****(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段: gp32****(xi)序列表示: SEQ 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)SEQ ID NO:11 的信息**(i)序列特征:****(A)长度: 15 个氨基酸**

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: NS5

(xi)序列表示: SEQ ID NO:11

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

(2)SEQ ID NO:12 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 16 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: 核心

(xi)序列表示: SEQ ID NO:12

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

(2)SEQ ID NO:13 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 12 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: NS4

(xi)序列表示: SEQ ID NO:13

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

(2)SEQ ID NO:14 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 9 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: NS4

(xi)序列表示: SEQ ID NO:14

Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr
1 5

(2)SEQ ID NO:15 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: NS4

(xi)序列表示: SEQ 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)SEQ ID NO:16 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 28 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)拓扑形状: 线型

(ii)分子性质: 肽

(iii)前提: 无

(vi)来源:

(A)有机物: 肝炎 C 病毒

(viii)基因组位置:

(A)染色体/片段: 核心

(xi)序列表示: SEQ 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)SEQ ID NO:17 的信息

(i)序列特征:**(A)长度: 25 个氨基酸****(B)性质: 氨基酸****(C)拓扑形状: 线型****(ii)分子性质: 肽****(iii)前提: 无****(vi)来源:****(A)有机物: 肝炎 C 病毒****(viii)基因组位置:****(A)染色体/片段: NS3****(xi)序列表示: SEQ 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
```

图 1

重组序列 p24

1	MTMITPSLAA	GPDKGNSSQV	SONYPIVQNL	QGQMVHQALS	PRTLNAWVKV	IEEKAFSPEV
	pUC8 (12aa)	p17 (12aa)	--)	p24 (231aa)		
61	IPMFSALSEG	ATPQDLNTML	NTVGGHQAAM	QMLKETINEE	AAEWDVRVHPV	HAGPIAPGQM
121	REPRGSDIAG	TTSTLQEIQIG	WMTNNPPIPV	GEIYKRWIIL	GLNKIVRMYS	PVSILDIRQG
181	PKEPFRDYVD	RFYKTLRAEQ	ASQEVKNWMT	ETLLVQNANP	DCKTILKALG	PAATLEEMMT
241	ACQGVGGPGH	KARVLAEAMS	QVTNSATIMM	QRGNFRNQKK	TVKCFNCGKE	GHIAKNCRAP
		(--	p15 (72aa)			
301	RKKGCKWCKGK	EGHQMKDCTE	RQANFLGN			

连接物 (1aa)

图 2

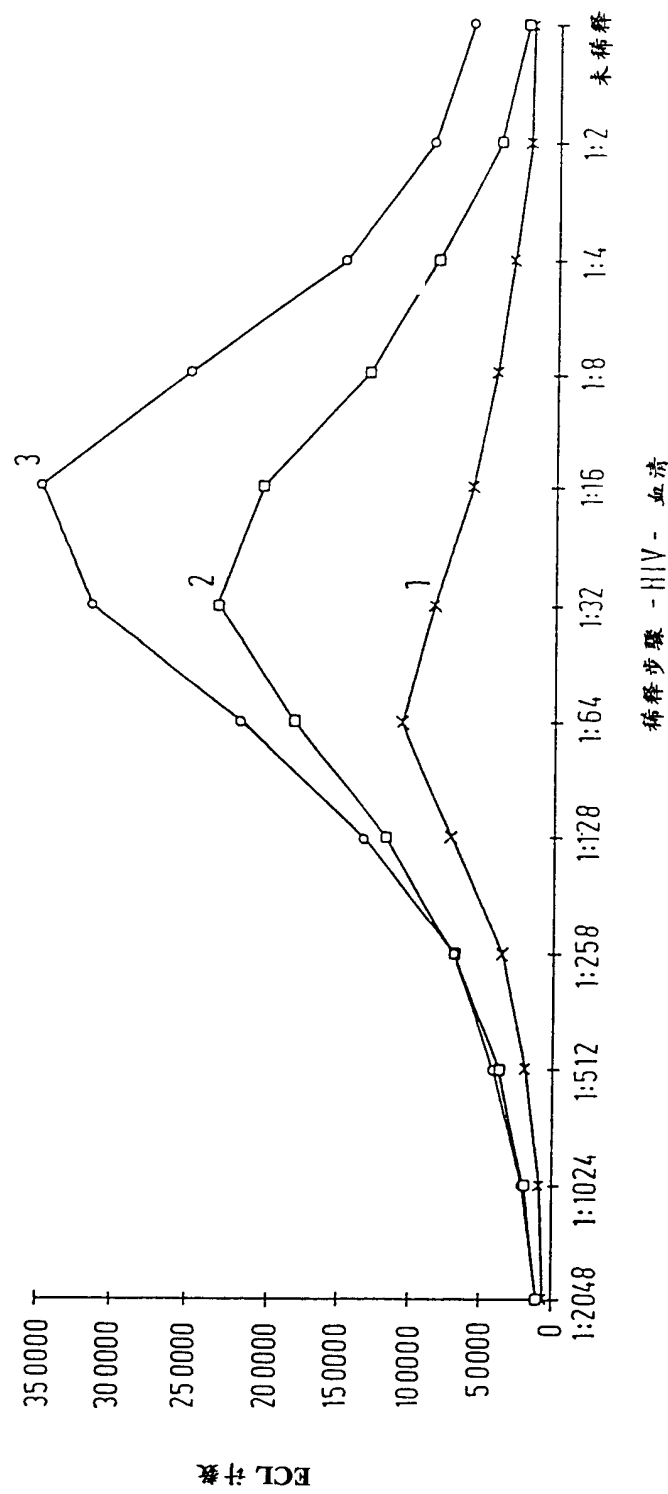


图 3

