



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101287988 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200680032034. 2

A61P 31/16(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 07. 03

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/696, 221 2005. 07. 01 US

60/726, 377 2005. 10. 13 US

60/765, 292 2006. 02. 02 US

60/792, 274 2006. 04. 14 US

OZAKI H. et al..Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses..《Veterinary Microbiology》. 2001, 第 82 卷 (第 2 期), 111-119.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 02. 29

TUMPEY T.M. et al..Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus..《Journal of Clinical Microbiology》. 2005, 第 43 卷 (第 2 期), 676-683.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/026155 2006. 07. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02007/018843 EN 2007. 02. 15

SHAW M.W. et al..Immunolgoical studies on the influenza A virus nonstructural protein NS..《Jorunal of experimental medicine》. 1982, 第 156 卷 243-254.

(73) 专利权人 阿波维塔公司

地址 美国加利福尼亚

NAKAJIMA K. et al..Evolution of the NS genes of the influenza A virus. II. Characteristics of the amino acid changes in the NS1 proteins of hte influenza A viruses..《Virus genes》. 1990, 第 4 卷 (第 1 期), 15-26.

(72) 发明人 彼得·S·卢

乔舒亚·D·拉比诺维茨

迈克尔·P·贝尔马雷什

SONGYANG Z. et al..Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains..《Science》. 1997, 第 5296 卷 (第 275 期), 73-77.

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

审查员 杨冀川

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

C07K 5/10(2006. 01)

C07K 7/06(2006. 01)

C07K 14/085(2006. 01)

C07K 16/10(2006. 01)

A61K 38/00(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书 6 页 说明书 104 页 附图 49 页

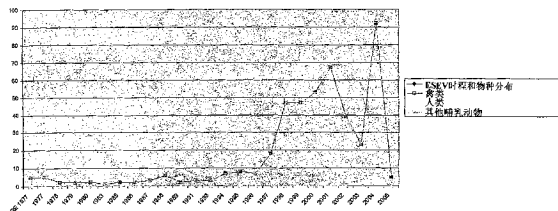
(54) 发明名称

用于流感诊断和治疗的方法和组合物

检测 PDZ 和 PL 之间是否发生结合相互作用。还提供鉴定抗病毒剂的分析, 以及利用组合物改变流感感染细胞中 PDZ 与 PL 结合的方法。

(57) 摘要

本发明提供用于检测样品中流感病毒的存在和量的方法和组合物, 包括高危流感 A 株。本发明还提供检测对象是否感染流感病毒以及检测流感病毒类型和株的方法。该方法包括将对象的样本与 PDZ 多肽 (PDZ) 和 / 或 PDZ 配体 (PL) 接触, 并



1. 一种用于检测 A 型流感病毒蛋白的存在和 / 或量和 / 或亚型的试剂盒,包括两种检测试剂,其中第一种检测试剂包含能特异结合 A 型流感病毒蛋白中的 PL 模体的 PDZ 多肽,并且第二种检测试剂包含能特异结合 A 型流感病毒蛋白的抗体,其中所述 A 型流感病毒蛋白包含 NS1。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,还包括喉拭子。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中第一和第二检测试剂结合同一 A 型流感病毒蛋白。

4. 如权利要求 3 所述的试剂盒,其中第一和第二检测试剂结合同一 A 型流感病毒蛋白的不同位点。

5. 如权利要求 3 所述的试剂盒,其中第一和第二检测试剂结合同一 A 型流感病毒蛋白的相同位点。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中第一或第二检测试剂包含多种 PDZ 多肽和 / 或抗体。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其中多种 PDZ 多肽和 / 或抗体对于多种 A 型流感病毒的多种病毒蛋白的多种 PL 模体具有特异性。

8. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其中多种 PDZ 多肽和 / 或抗体对于多种 A 型流感病毒的多种 NS1 蛋白的多种 PL 模体具有特异性。

9. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中 A 型流感病毒蛋白选自 :NP, HA, M1 和 NS1。

10. 如权利要求 9 所述的试剂盒,其中 PL 模体为 :S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸, 和 X 是任意氨基酸。

11. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中第一或第二检测试剂包含固定在固体支持物上的 PDZ 多肽和 / 或抗体。

12. 如权利要求 11 所述的试剂盒,其中所述固体支持物被配置用于毛细管流动分析装置。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其中毛细管流动分析被配置用于免疫分析。

14. 如权利要求 11 所述的试剂盒,其中固体支持物被配置用于侧向流分析。

15. 如权利要求 6 或 11 所述的试剂盒,其中试剂盒包括含有固定在阵列中的固体支持物上的多种 PDZ 多肽和 / 或抗体的检测试剂。

16. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中试剂盒包括含有对 A 型流感病毒 NS1 的所有亚型特异的抗体的检测试剂。

17. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中试剂盒包括含有至少一种选自如下的 PDZ 多肽的检测试剂:外膜, PSD95 PDZ#2 ;PSD95 PDZ#1,2,3 ;DLG1 PDZ#1 ;DLG1 PDZ#1,2 ;DLG1 PDZ#2 ;DLG2 PDZ#1 ;DLG2 PDZ#2 ;Magi3 PDZ#1 ;PTN3 PDZ#1 ;MAST2 PDZ#1 ;NeDLGPDZ#1,2 ;Shank1 d1 ;Shank2 d1 ;Shank3 d1 ;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1 ;Magi1 PDZ#1 ;Magi1 PDZ#4 ;Tip1 ;PTPL1 PDZ#1 ;Mint3 PDZ#1 ;Lym Mystique PDZ#1 ;DLG2 PDZ#3 ;MUPP1 PDZ#8 ;NeDLG PDZ#1 ;DLG5PDZ#1 ;PSD95PDZ#1 ;NumBP PDZ#3 ;LIMK1PDZ#1 ;KIAA0313 ;DLG1PDZ#2 ;Syntenin PDZ#2 ;Pick1 ;MAST2 ;PTN3PDZ#1 ;NOS 1PDZ#1,2,3 ;MINT1PDZ#2 ;ZO-I PDZ#2 ;NSP 和 RIM212。

18. 如权利要求 17 所述的试剂盒,其中试剂盒包括含有 PDZ 多肽的检测试剂,所述 PDZ 多肽包括 PSD95d2 的 PL 结合区 :SEQ ID NO :1 的第 80-100 氨基酸区域。

19. 如权利要求 17 所述的试剂盒,其中试剂盒包括含有 PDZ 多肽的检测试剂,所述 PDZ 多肽包括如下蛋白的 PL 结合区:PSD95 d1, PSD95 d2, PSD95 d3, INADL8d1, Magi1 d1, DLG1d2, DLG1d3, NeDLG1d1 或 NeDLG1d2。

20. 一种用于检测 A 型流感病毒 NS1 蛋白的存在和 / 或量和 / 或亚型的试剂盒,包括含有来自 PSD95 的 PL 结合区的第一 PDZ 多肽,以及含有来自 INADLd8 的 PL 结合区的第二 PDZ 多肽。

21. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中至少一种抗体或 PDZ 多肽识别选自下列的一种或者多种 PL 模体:ESEV(SEQ ID NO :2), ESEI(SEQ ID NO :3), ESKV(SEQ ID NO :4), TSEV(SEQ ID NO :5), GSEV(SEQ ID NO :6), RSEV(SEQ ID NO :7), RSKV(SEQ ID NO :8), GSEI(SEQ ID NO :9), GSKV(SEQ ID NO :10), NICI(SEQ ID NO :11), TICI(SEQ ID NO :12), RIC1(SEQ ID NO :13), DMAL(SEQ ID NO :14), DMTL(SEQ ID NO :15), DIAL(SEQ ID NO :16), DLDY(SEQ ID NO :17), SICL(SEQ ID NO :18), 和 SEV, SEI, SKV 和 SKI 的氨基酸序列。

22. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中第二检测试剂包含结合与第一检测试剂结合 A 型流感病毒蛋白不同的位点的检测抗体。

23. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其中所述检测抗体包括信号发生化合物。

24. 如权利要求 23 所述的试剂盒,其中所述检测抗体不抑制 PL 模体与 PDZ 的结合或者捕获抗体与 NS1 的结合。

25. 如权利要求 24 所述的试剂盒,其中所述检测抗体包括信号发生化合物。

26. 一种用于检测人 A 型流感病毒的存在和 / 或量和 / 或亚型的试剂盒,包括能特异结合 A 型流感病毒 NS1 蛋白中的 PL 模体的检测试剂,其中检测试剂包含至少一种 PDZ 多肽,并且该试剂盒还包括:

a) 作为对照的一种或者多种 A 型流感病毒,或者

b) 用于指导分析来使用所述的至少一种试剂检测生物样本中 A 型流感病毒 NS1 蛋白的存在和 / 或量和 / 或亚型的说明书。

27. 试剂盒,包括能特异结合 A 型流感病毒 NS1 蛋白中的 PL 模体的检测试剂,其中检测试剂包含至少一种抗体。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的试剂盒,还包括 A 型流感病毒蛋白的第二检测试剂,其中第二检测试剂包含 PDZ 多肽和 / 或抗体。

29. 一种用于患者样本中流感 A 病毒的鉴定和分型的试剂盒,包括,

与流感 A 病毒蛋白 NS1 的 PL 模体特异结合的试剂,其中所述试剂固定在固体支持物上。

30. 如权利要求 29 所述的试剂盒,其中所述试剂是抗体,PDZ 多肽,寡核苷酸适配体,或者其混合物。

31. 一种用于患者样本中流感 A 病毒鉴定和 / 或分型的试剂盒,包括,

与 A 型流感的病毒编码蛋白特异结合的试剂;和

与 NS1 蛋白的 PL 模体特异结合的试剂。

32. 如权利要求 31 所述的试剂盒,其中特异结合 NS1 蛋白的所述试剂与蛋白上的 PL 模体结合。

33. 如权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述试剂是抗体,PDZ 多肽,寡核苷酸适配体,或

者其混合物。

34. 如权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述 A 型流感的病毒编码蛋白是 NS1。

35. 一种用于患者样本中流感 A 病毒鉴定和 / 或分型的试剂盒,包括
与 NS1 在 PL 模体以外处特异结合的试剂 ;和
与 NS1 在 PL 模体处特异结合的试剂。

36. 一种包括多种 PDZ 多肽的试剂盒,所述 PDZ 多肽对多种 A 型流感病毒的多种 NS1 蛋白中的多个 PL 模体特异。

37. 一种分离的抗体,所述抗体与 A 型流感病毒 NS1 蛋白的羧基末端 PL 模体特异结合。

38. 如权利要求 37 所述的分离的抗体,其中所述羧基末端模体包括选自下列的 PL 模体 :ESEV (SEQ ID NO :2), ESEI (SEQ ID NO :3), ESKV (SEQ ID NO :4), TSEV (SEQ ID NO :5), GSEV (SEQ ID NO :6), RSEV (SEQ ID NO :7), RSKV (SEQ ID NO :8), GSEI (SEQ ID NO :9), GSKV (SEQ ID NO :10), NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RIC1 (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), 和 SEV, SEI, SKV 和 SKI 的氨基酸序列。

39. 如权利要求 37 所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体或者抗体片段。

40. 如权利要求 37 所述的抗体,其中所述 PL 模体是 ESEV/I/A (SEQ ID NO :19)。

41. 一种鉴定 A 型流感病毒的方法,包括 :

将样本与特异结合 A 型流感病毒蛋白 NS1 的 PL 模体的试剂接触 ;和
检测该试剂和 NS1 蛋白之间的特异结合,特异结合表明 A 型流感病毒的存在。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其中 NS1 蛋白 PL 具有模体 S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸, 和 X 是任意氨基酸。

43. 如权利要求 41 所述的方法,其中试剂是至少一种 PDZ 多肽。

44. 如权利要求 41 所述的方法,其中试剂是至少一种抗体。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中抗体对 NS1 蛋白的保守区特异。

46. 如权利要求 41 所述的方法,其中接触步骤包括,将样本与特异结合 A 型流感病毒蛋白 NS 1 不同表位的第一和第二试剂接触,第一试剂固定在支持物上,并且检测步骤检测其中第一和第二试剂与 NS1 蛋白特异结合的夹心,以表明病毒的存在。

47. 如权利要求 46 所述的方法,其中第一和第二试剂是第一和第二抗体。

48. 如权利要求 46 所述的方法,其中第一试剂是一种或者多种 PDZ 多肽,和第二试剂是一种或者多种抗体。

49. 如权利要求 46 所述的方法,其中第一试剂是一种或者多种 PDZ 多肽和一种或者多种抗体的混合物。

50. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述抗体是对 A 型流感病毒 NS1 的所有亚型特异的抗体。

51. 如权利要求 43 所述的方法,其中至少一种 PDZ 多肽选自 :外膜, PSD95 PDZ#2), PSD95 PDZ#1, 2, 3 ;DLG1 PDZ#1 ;DLG1 PDZ#1, 2 ;DLG1 PDZ#2 ;DLG2PDZ#1 ;DLG2 PDZ#2 ;Magi3 PDZ#1 ;PTN3 PDZ#1 ;MAST2 PDZ#1 ;NeDLG PDZ#1, 2 ;Shank1 d1 ;Shank2d1 ;Shank3 d1 ;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1 ;Magi1 PDZ#1 ;Magi1 PDZ#4 ;Tip1 ;PTPL1 PDZ#1 ;Mint3 PDZ#1 ;Lym Mystique PDZ#1 ;DLG2PDZ#3 ;MUPP1 PDZ#8 ;NeDLG PDZ#1 ;DLG5 PDZ#1 ;PSD95

PDZ#1 ;NumBP PDZ#3 ;LIMK1 PDZ#1 ;KIAA0313 ;DLG1 PDZ#2 ;Syntenin PDZ#2 ;Pick1 ;MAST2 ;PTN3 PDZ#1 ;NOS1 PDZ#1,2,3 ;MINT1PDZ#2 ;ZO-I PDZ#2 ;NSP 和 RIM212。

52. 如权利要求 43 所述的方法,其中所述 PDZ 多肽是包括 PSD95d2 的 PL 结合区 :SEQ ID NO :1 的第 80-100 氨基酸区域的蛋白。

53. 如权利要求 43 所述的方法,其中所述 PDZ 多肽是选自下列的蛋白 :PSD95 d1, PSD95 d2, PSD95 d3, INADL8d1, Magi1 d1, DLG1d2, DLG1d3, NeDLG1d1, 和 NeDLG1d2。

54. 一种用于 A 型流感感染分型的方法,包括鉴定亚型特异性 A 型流感病毒蛋白 NS1 PL 模体区的存在。

55. 如权利要求 54 所述的方法,其中 PL 模体包含模体 :S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸,和 X 是任意氨基酸。

56. 一种检测待测样本中包含 PL 模体的 A 型流感病毒蛋白的存在和量的方法,包括 :
在适于结合的条件下,将等份待测样本和至少一种 PDZ 肽和至少一种 PDZ 配体检测剂混合 ;和

测定 PDZ 肽和 PDZ 配体检测剂之间的结合,其中结合降低表明待测样本中存在 A 型流感病毒蛋白,任选地其中 PDZ 配体检测剂包括来自 A 型流感病毒蛋白 C 末端的 PL 模体,所述 A 型流感病毒蛋白选自 :NP, HA, M1 和 NS1。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其中 A 型流感病毒蛋白选自 :NP, HA, M1 和 NS1。

58. 如权利要求 56 所述的方法,其中 PDZ 配体检测剂包括来自 A 型流感病毒蛋白 C 末端的 PL 模体,所述 A 型流感病毒蛋白选自 :NP, HA, M1 和 NS1。

59. 如权利要求 58 所述的方法,其中 PL 模体是 :S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸,和 X 是任意氨基酸。

60. 一种检测待测样本中包含 PL 模体的 A 型流感病毒 NS1 蛋白的存在和量的方法,包括 :

将等份待测样本和至少一种 PDZ 肽混合 ;和

测定至少一种 PDZ 肽和 NS1 蛋白之间的结合,其中结合表明待测样本中存在 A 型流感病毒蛋白。

61. 一种确定患者是否感染流感 A 致病株的方法,包括

确定患者是否感染流感 A,

如果患者被感染 ;和

确定患者样本中带有 PL 模体的 NS1 蛋白的存在,存在表明患者感染 A 型流感病毒的致病株。

62. 一种鉴定患者样本中 A 型流感病毒的特异性亚型存在的方法,包括 :

将患者样本与至少一种 PDZ 多肽或者至少一种捕获抗体接触,所述捕获抗体与对流感病毒 A 亚型特异的 NS1 蛋白的 PL 模体特异结合 ;和

检测 PDZ 多肽或者捕获抗体是否与样本中的 PL 模体特异结合,特异结合表明亚型的存在。

63. 如权利要求 62 所述的方法,其中接触步骤包括将患者样本与多个 PDZ 多肽接触,所述 PDZ 多肽特异结合多个 NS1 蛋白中的多个 PL 模体,所述 PL 模体对流感病毒 A 的多个亚型特异 ;并且检测包括确定哪种 PDZ 多肽特异结合其 PL 模体,与一种或者多种 PDZ 多肽结

合从而表明亚型的存在。

64. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述捕获抗体识别 NS1 的羧基末端。

65. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述捕获抗体或者 PDZ 多肽识别选自下列的一种或者多种 PL 模体 :ESEV(SEQ ID NO :2),ESEI(SEQ ID NO :3),ESKV(SEQ ID NO :4),TSEV(SEQ ID NO :5),GSEV(SEQ ID NO :6),RSEV(SEQ ID NO :7),RSKV(SEQ ID NO :8),GSEI(SEQ ID NO :9),GSKV(SEQ ID NO :10),NICI(SEQ ID NO :11),TICI(SEQ ID NO :12),RICI(SEQ ID NO :13),DMAL(SEQ ID NO :14),DMTL(SEQ ID NO :15),DIAL(SEQ ID NO :16),DLDY(SEQ ID NO :17),SICL(SEQ ID NO :18),和 SEV, SEI, SKV 和 SKI 的氨基酸序列。

66. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述 PDZ 多肽选自 :外膜, PSD95 PDZ#2 ;PSD95 PDZ#1,2,3 ;DLG1 PDZ#1 ;DLG1 PDZ#1,2 ;DLG1 PDZ#2 ;DLG2PDZ#1 ;DLG2 PDZ#2 ;Magi3 PDZ#1 ;PTN3 PDZ#1 ;MAST2 PDZ#1 ;NeDLG PDZ#1,2 ;Shank1 d1 ;Shank2 d1 ;Shank3d1 ;Syntrophin α ;Syntrophin γ 1 ;Magi1 PDZ#1 ;Magi1 PDZ#4 ;Tip1 ;PTPL1 PDZ#1 ;Mint3 PDZ#1 ;Lym Mystique PDZ#1 ;DLG2 PDZ#3 ;MUPP1 PDZ#8 ;NeDLG PDZ#1 ;DLG5 PDZ#1 ;PSD95 PDZ#1 ;NumBP PDZ#3 ;LIMK1 PDZ#1 ;KIAA0313 ;DLG1 PDZ#2 ;SynteninPDZ#2 ;Pick1 ;MAST2 ;PTN3 PDZ#1 ;NOS 1PDZ#1,2,3 ;MINT1PDZ#2 ;ZO-1 PDZ#2 ;NSP 和 RIM2。

67. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述亚型是禽流感 A,所述 PL 模体是 PL 模体 ESEV/I/A(SEQ ID NO :19)。

68. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述亚型是 H3N2, PL 模体是 PL 模体 RSKV。

69. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述 PL 模体是 PL 模体 ESKV(SEQ ID NO :4)。

70. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述亚型是 H1N1, PL 模体是 PL 模体 RSEV。

71. 如权利要求 62 所述的方法,还包括将样本与检测抗体接触。

72. 如权利要求 71 所述的方法,其中所述检测抗体包括信号发生化合物。

73. 如权利要求 71 所述的方法,其中所述检测抗体不抑制 PL 模体与 PDZ 的结合或者捕获抗体与 NS1 的结合。

74. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述 PDZ 多肽或者所述抗体固定在固体支持物上。

75. 如权利要求 74 所述的方法,其中所述固体支持物是毛细管流动分析装置,所述接触步骤包括将小棒浸在所述患者样本中。

76. 如权利要求 75 所述的方法,其中毛细管流动分析是免疫分析。

77. 如权利要求 74 所述的方法,其中固体支持物是侧向流分析。

78. 一种鉴定能够特异结合流感病毒 NS1 蛋白 PL 模体的 PDZ 多肽的方法,包括 :

将包含流感病毒 NS1 蛋白 PL 模体的 PL 多肽与具有 PDZ 结构域的候选多肽在适于结合的条件下接触 ;和

检测 PL 多肽与候选多肽的特异结合 ;和确认 PL 多肽与 PDZ 结构域结合。

79. 试剂在制备用于治疗或者预防患有 A 型流感病毒感染或者处于 A 型流感病毒感染风险下的患者的药物中的应用,其中所述试剂抑制病毒含有 PL 模体的 NS1 蛋白与细胞 PDZ 蛋白的相互作用。

80. 如权利要求 79 所述的应用,其中所述试剂是特异结合 A 型流感病毒 NS1 蛋白 PL 模体的抗体。

81. 如权利要求 79 所述的应用,其中试剂选自 :反义寡核苷酸,小分子,siRNA 和锌指蛋

白,其中所述试剂抑制流感 A NS1 蛋白或者 PDZ 蛋白的表达。

82. 如权利要求 80 所述的应用,其中 NS 1 的 PL 模体选自 :ESEV(SEQ ID NO :2), ESEI(SEQ ID NO :3), ESKV(SEQ ID NO :4), TSEV(SEQ ID NO :5), GSEV(SEQ ID NO :6), RSEV(SEQ ID NO :7), RSKV(SEQ ID NO :8), GSEI(SEQ ID NO :9), GSKV(SEQ ID NO :10), NICI(SEQ ID NO :11), TICI(SEQ ID NO :12), RICI(SEQ ID NO :13), DMAL(SEQ ID NO :14), DMTL(SEQ ID NO :15), DIAL(SEQ ID NO :16), DLDY(SEQ ID NO :17), SICL(SEQ ID NO :18), 和 SEV, SEI, SKV 和 SKI 的氨基酸序列。

83. 如权利要求 80 所述的应用,其中试剂是 PDZ 多肽。

84. 如权利要求 83 所述的应用,其中 PDZ 多肽至少包括与 PL 模体相互作用的结合区, SEQ ID NO :1。

85. 如权利要求 83 所述的应用,其中所述 PDZ 多肽选自 :外膜, PSD95 PDZ#2 ;PSD95 PDZ#1,2,3 ;DLG1 PDZ#1 ;DLG1 PDZ#1,2 ;DLG1 PDZ#2 ;DLG2PDZ#1 ;DLG2 PDZ#2 ;Magi3 PDZ#1 ;PTN3 PDZ#1 ;MAST2 PDZ#1 ;NeDLG PDZ#1,2 ;Shank1 d1 ;Shank2 d1 ;Shank3d1 ;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1 ;Magi1 PDZ#1 ;Magi1 PDZ#4 ;Tip1 ;PTPL1 PDZ#1 ;Mint3 PDZ#1 ;Lym Mystique PDZ#1 ;DLG2 PDZ#3 ;MUPP1 PDZ#8 ;NeDLG PDZ#1 ;DLG5 PDZ#1 ;PSD95 PDZ#1 ;NumBP PDZ#3 ;LIMK1 PDZ#1 ;KIAA0313 ;DLG1 PDZ#2 ;Syntenin PDZ#2 ;Pick1 ;MAST2 ;PTN3 PDZ#1 ;NOS1 PDZ#1,2,3 ;MINT1PDZ#2 ;ZO-IPDZ#2 ;NSP 和 RIM2。

86. 一种筛选抗病毒剂的方法,包括 :

在待测化合物存在或者缺失的条件下,将 PDZ 多肽和包含流感病毒 NS1 蛋白 PL 模体的 PL 多肽接触 ;和

将待测化合物存在时 PDZ/PL 多肽结合的量与待测化合物缺失时相比较,其中所述抗病毒剂减少 PDZ/PL 多肽结合。

87. 如权利要求 86 所述的方法,还包括在体内或者胞内检测所述试剂以鉴定其是否干扰干扰素产生。

88. 与流感 A 致病株的 NS1 蛋白的 PL 模体结合的抗体在鉴定流感 A 中的用途。

89. PDZ 多肽在检测流感 A 致病株的 NS1 蛋白中的用途,其中的 NS1 蛋白包含 PL 模体。

90. 来自流感 A 致病株的 NS-1 蛋白和结合 NS-1 蛋白的 PL 模体的 PDZ 蛋白在筛选具有用于治疗流感 A 致病株活性的化合物中的用途。

用于流感诊断和治疗的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求美国临时申请 60/696, 221 (2005 年 7 月 1 日提交)、美国临时申请 60/726, 377 (2005 年 10 月 13 日提交)、60/765, 292 (2006 年 2 月 2 日提交) 和 60/792, 274 (2006 年 4 月 14 日提交) 的优先权, 上述各申请均在此完整引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 流行性病毒感染造成世界范围内严重的丧失生命并引起人类疾病, 范围从普通感冒到危及生命的流感、西尼罗河病毒 (West Nile) 和 HIV 感染。及时的检测、诊断和治疗是在流行性、广泛流行性和动物流行性背景中限制疾病传播的关键。快速筛查和诊断方法对减少患者患病和群体风险是特别有用。同样地, 快速抑制病毒组装和增殖的治疗剂特别适用于治疗方案。

[0005] 最近, 流感 A 已经显示成为对人群潜在的严重风险。禽类株已经交叉到人类, 越来越多的证据表明人和人之间的传播很快就可能发生 1。禽流感株对人群影响的实例是最近出现的超强毒禽流感株 H5N1 (鸟流感), 其中大约 50% 的感染个体 (42 人) 死亡, 在中国、印度尼西亚和越南由于屠宰上百万家禽导致食物短缺。跟踪流行的可能性, 世界卫生组织在 2005 年 7 月考虑将全球威胁水平提高到 4 或者 5 (共 6 个级别)。一位舆论领袖 (opinion leader) 最近在媒体上表示, 对禽流感的“检测、监督、预防和治疗”... (是)... “与时间的竞赛”。因为很少从人类分离出禽类株, 并且人类中的死亡率很高, 看来在全世界人群中实际上不存在免疫力。因此, 存在世界范围大流行的可能。对比来说, 在 1918 年全球流感流行造成大约 2-4 千万人死亡。今天随着人口密度的增加, 可能会有更高的死亡率。

[0006] 在病毒安全参考实验室中, 例如满足防护级别 4 (Containment Group 4) 病原体的要求, 用于流感 A 感染的检测和确认的病毒学试验方法是耗时耗力并且高风险的, 即, 包括在含胚鸡蛋中的病毒分离 4-7 天; 从死亡或者濒死胚胎中收集尿囊液; 在红细胞凝集和红细胞凝集抑制试验、免疫扩散试验中检测上述液体; 和, 利用专门制备的单一特异性抗血清, 在过夜免疫扩散分析中通过红细胞凝集素和神经氨酸苷酶, 对液体中的病毒进行最终分型。现有的分型包括鉴定 16 个不同的可能的病毒红细胞凝集素蛋白的每一种与 9 个不同的可能的病毒神经氨酸苷酶蛋白的组合。令人遗憾的是, 因为只有很少的流感 A 致病株在当时危及经济和健康, 这种耗时的工作很多可能是不需要的和浪费的。

[0007] 现有的流感抗原的快速免疫诊断检测, 像 “Binax NOW FluA and FluB™”, (Binax, Inc., Portland, ME), “Directigen Flu A+B™” (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), “Flu OIA™” (Biostar Inc., Boulder, CO), “Quick Vue™” (Quidel, San Diego, CA), “Influ AB Quick™” (Denka Seiken Co., Ltd., Japan) 和 “Xpect Flu A & B” (Remel Inc., Lenexa, KS), 据报道能够检测流感 A 或者区别流感 A 和 B, 但重要的是, 不能区别不同的流感 A 亚型或者流感 A 的致病和非致病株。该检测形式的复杂性可能要求专业训练。此外, 通常需要大量的病毒颗粒以获得阳性试验结果, 这限制了它们在病毒排放水平最高时的短暂窗口期的使用。分析敏感度也是可变的, 在某些分析中产生高达 20% 假阴性试验结果, 成为当前的重要关注³⁶ (例如, 参见 “WHO recommendations on

the use of rapid testing for influenza diagnosis (WHO 推荐使用流感诊断的快速检测)”, 2005 年 7 月)。最近引入基于逆转录 PCR 的诊断 (RT-PCR) 用于确认流感 A 病毒, 使检测能力产生重要进步³⁶, 但是费力, 且需要高度受训的人员, 使得当场 (on-site) 和野外检测 (field-testing) 困难。因为反转录酶的相对低效, 有效检测病毒 RNA 可能需要大量病毒 (例如, 10^4 病毒颗粒) 和多至 20 个引物。尽管存在这些显著的障碍, 但在美国、加拿大和香港的 12 个不同的参与检测实验室之间, 最近记载了参考实验室中高水平熟练的 RT-PCR 流感 A 检测³⁶。利用 RT-PCR 和 HA 引物, Lee 等人³⁷ 描述了 H5 和 H7 亚型病毒间的定量鉴别。Munch 等人³⁸ 报告了利用 NP 引物, 在 RT-PCR 中, 相似的可能差异特异性。令人遗憾的是, RT-PCR 不易于适合流行背景中对象的高通量筛查, 或者在农业或者医护点 (point-of-care) 背景中的现场使用。

[0008] 此外, 新流感株的复杂性、多样性和快速出现使高风险株的诊断困难, 因此快速反应在现在几乎是不可能的。对流行病学家来说, 高突变率和基因重配造成的多样性, 使得难以预期新品系在何处出现和及时做出反应引入新的 PCR 诊断引物。因而, (目前) 流感的多样性表明了多重 PCR 方法的必要性。

[0009] 禽流感病毒 (H5N1) 被认为是通过水生野禽中流感病毒的突变和部分重配进化的^{2,3}。“患病”鸟类中的高致病性疾病可以不同, 从疾病的明显病征很少的突然死亡到伴有呼吸症状、过度流泪、鼻窦炎、头部水肿、无羽表皮的发绀和腹泻的更具特征性疾病, 即, OIE 在其健康指导中采用的“患病”的诊断病征 (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (陆生动物诊断分析和疫苗手册), 第五版, 2004, World Organization for Animal Health (世界动物卫生组织))。在被感染的鸟类中, 流感 A 病毒仅在 2-3 天内就排放^{4,5}。考虑到人类中的高死亡率, 快速检测对隔离感染的禽类和人类对象和保护人群是必要的。在本领域, 禽流感 (bird flu) 的人类病例历史上发生于东南亚地区, 那里缺乏复杂的诊断分析设备、病毒安全参考 BL4 实验室和方法的顺畅通路。因此, 在个体患者水平评估群体风险现在是非常成问题的。在其他目标中, 本发明提供这些问题的解决方案。

[0010] 支持农业和公众健康所需的快速诊断分析, 被证明是挑战性的 - 即, 对于抗病毒宿主应答 (抗体) 的血清学检测或者样本中病毒蛋白 (抗原) 的鉴定。流感 A 亚型的检测也是复杂的, 因为: (i) 流行病学的范围和公众健康的需要, 即, 对于环境样本中和感染家畜, (例如猪流感), 家禽 (例如禽流感 (avian flu)) 和人类 (例如禽流感 (bird flu)) 中病毒检测的潜在需要; 和, (ii) 可能检验的样品范围广, 可能包括血清, 鼻咽、咽喉含漱、鼻或者喉部的样本 (人类); 和, 泄殖腔、粪便和气管的样本 (鸟类)。因为高危病毒倾向于快速传播, 速度极为重要。高亲合力的特异性结合试剂无疑是关键和必需的。在其他目标中, 本发明解决这些关键需求。

[0011] 通过红细胞凝集 - 抑制 (HI) 的经典流感血清试验 (用于抗体) 相对简单, 但在农业实践中这些试验对于免疫或者自然感染后检测禽抗体是相对不敏感的, 因为血清抗体在感染后倾向于快速下降。在最优条件下, 例如 Xu 等人³⁹ 最近描述了一种胶乳凝集试验, 即, 利用完全热灭活的疫苗病毒和来自免疫鸟类的血清。据报道后一 HI- 试验具有 88% 的灵敏度 (12% 假阴性) 和 98% 的特异性, 在这种情况下, 对这种危险病毒病原体的农业或者公共卫生检测来说假阴性率太高。同样地, 利用中国禽类场所的样品, 最近 Jin 等人⁴ 描述了重

组流感 NP 抗原在 ELISA 分析中的可能应用。这些研究者注意到病毒排放从第 2 天开始,但抗病毒抗体的滴度在 2 周时最高。遗憾的是,在检测被感染的动物之前后者的“滞后”在当前世界范围的危机中是无法接受的。展示进一步可能的复杂因素,后者研究中的数据显示低剂量的病毒只产生非常低滴度的抗体,即,说明隐性感染可能检测不到。

[0012] 流感即流感 B 常规诊断方法中的现有局限性在 Steininger 等人⁴¹发表的数据中有记录。在后来的研究中,使用不同的试验方法检测标准 A 型流感储存病毒制品;和,有下列发现:即,基于酶的快速分析比常规病毒分离法检测的灵敏度低大约 1000 倍;而常规病毒分离法又比 RT-PCR 的灵敏度低大约 1000 倍。尽管后者有灵敏度的总量限制,但 ELISA 仍然正确鉴别出 62% 的阳性样本和 88% 取自小于 5 岁的流感 B 患者的样本。作为差样本对分析性能影响的实例,对商业可用的流感试验分析其在检测实验性感染的志愿者的鼻咽样本中病毒抗原的灵敏度。报道的结果表明,分析灵敏度对于 Directigen 流感分析⁴³(Becton Dickinson)来说大约是 60%;和,对流感光学免疫测定 (FLU OIA; ThermoBioStar/Biota)⁴⁴来说在 48-100% 范围内。重要的是,(不管后来的分析的明显局限性),Sharma 等人⁴⁵报道了 A 型流感病毒感染的快速确认:(i) 减少不相关的实验室试验,例如尿分析和白细胞检验,以及,(ii) 抗生素在发烧婴儿和幼儿中的不恰当使用。因此,在临床实践中灵敏度相对较差的筛查分析仍然是有用的,因为该分析正确鉴别出那些需要额外随诊的患者。显而易见,为了非参考实验室的使用,需要对用户友善性、速度、分辨性和绝对定量灵敏度进行改进,即,即使用于常规流感检测。同样地,常规流感检测对于提示如何获得所需分析性能的方法没有特别的帮助,所述检测性能是检测患者样本中高危流感 A 株所需要的。

[0013] H5N1 和 H7 禽流感 A 病毒呈现的毒力因子和 H9N2 流感病毒动物流行病的传播和它们与哺乳动物宿主因子的相互作用已经被综述⁵。在流感恶性禽类株编码的蛋白中,NS1(非结构蛋白-1)早期在感染细胞中表达,但与 HA 和 NA 不同,它与病毒粒子无关,只表达为胞内蛋白。NS1 由基因组片段 8 编码,是增强病毒 mRNA 翻译的病毒调节因子;干扰宿主细胞 mRNA 的成熟和转运⁶;结合宿主 mRNA 的 poly(A) 尾;改变宿主细胞基因表达的内在小干扰 RNA (siRNA) 控制⁷;预防抗病毒蛋白激酶 R 的 ds-RNA 诱导;抑制干扰素 α/β (INF- α/β) 的抗病毒作用的诱导⁸和拮抗其抗病毒作用^{9,10};和,通过巨噬细胞¹¹和树突状细胞¹²刺激促炎性细胞因子的产生。INF- α/β 在先天性和获得性免疫应答以及发病机理中的作用已经被综述¹³。

[0014] 感染细胞中 NS1 蛋白的分布表明优选核定位,即,在细胞质、核糖体和多聚核糖体部分²²⁻²⁴的量较少。高毒力禽 H5N1 株的 NS1 蛋白在体外显著抑制人细胞的干扰素应答²⁵。一些机理研究表明,NS1 中羧基末端缺失可能减弱野生型 A/Swine/Texas/4199-2/98 (TX/98) 病毒²⁶以及马流感病毒²⁷的体内毒力。有趣地是,缺失 NS1 基因的流感 A 似乎在干扰素-缺陷型细胞系中复制得最好²⁸,向作者提示 INF- α/β 的 NS1 抑制可能是高效病毒增殖必需的。此外,据报道高毒力 H5N1-NS1 基因重重配到毒力较低的 H1N1-A 株中降低了杂交病毒的肺清除率,并还引起炎性细胞因子的水平升高²⁹。Tumpey 等人⁴⁰报道了检测抗 NS1 抗体可能可用于区别已接种的和已感染的家禽,即,因为 NS1 只在感染细胞中表达,而不在灭活的梯度纯化疫苗病毒中表达。令人遗憾的是,后来基于抗体的血清试验方法遇到上面和 HI 试验相同的普遍问题:即,低灵敏度和不能在病毒排放和感染潜在传播前检测到病毒。

[0015] 利用 H7N3 株, Cattoli 等人⁴² 报告评估了对来自实验和自然感染火鸡的气管样本中病毒检测的计时、特异性和敏感性, 即, 抗原-捕获 ELISA, RT-PCR 和实时 RT-PCR, (即, 后两个试验针对 M 基因)。在后来相对受控的实验室条件下, 早在感染后 3-5 天就可以特异性和高灵敏度良好地检测病毒。他们总结出只要有足够的检测灵敏度, 理论上应该可能在感染第 3-5 天检测到至少这种特定的禽类病毒和或许其他更高毒力的禽类株。

[0016] 因此, 在医学领域仍然明显需要能够检测具体致病病毒株的改进的、廉价的、快速的、精确的和有鉴别力的方法, 所述致病病毒最经常涉及引起医学上重大的疾病。还特别需要简单的分析方法, 其能够在不发达国家、市场、诊所、医生和兽医办公室、学校和食品加工厂由相对未受过训练的人员常规使用。考虑到新流感 A 变异体的传播在世界范围内造成的威胁, 临床领域需要新的和改进的抗病毒药剂。本发明满足了这些需求。

[0017] 发明简述

[0018] 在一方面, 本发明通过检测患者样本中是否存在 A 型流感病毒的 NS1 蛋白, 存在表明患者感染了 A 型流感病毒, 从而提供鉴定患者是否感染 A 型流感病毒的方法。检测步骤能包括将患者样本与特异结合 A 型流感病毒蛋白 NS1 的试剂接触; 并检测该试剂和 NS1 蛋白的特异结合, 特异结合表明 A 型流感病毒的存在。备选或者此外, 该检测可以包括检测编码 NS1 蛋白的 PDZ 配体模体 (PL) 的 mRNA 的存在, 并由 mRNA 的存在推断出 NS1 蛋白的存在。优选的 PL 具有以下模体: S/T-X-V/I/L, 其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸和 X 是任意氨基酸。优选, 该试剂是至少一种 PDZ 多肽。或者, 该试剂可以是至少一种抗体。对于泛-特异 (pan-specific) 性抗体, 抗体可以是对 NS1 蛋白的保守区域特异。优选, 接触步骤包括将患者样本与特异结合 A 型流感病毒蛋白 NS1 不同表位的第一和第二试剂接触, 第一试剂固定在支持物上, 检测步骤检测其中第一和第二试剂与 NS1 蛋白特异结合的夹心, 表明病毒的存在。第一和第二试剂可以是第一和第二抗体, 但优选第一试剂是一种或者多种 PDZ 多肽, 第二试剂是一种或者多种抗体。第一试剂可以是一种或者多种 PDZ 多肽和一种或者多种抗体的混合物。抗体可以是对 A 型流感病毒 NS1 的全部亚型特异的抗体。

[0019] 一种或者多种 PDZ 多肽可以是下列的一种或者多种: 外膜, PSD95 (PDZ #2), PSD95 (PDZ #1, 2, 3), DLG1 (PDZ #1), DLG1 (PDZ #1, 2), DLG1 (PDZ #2), DLG2 (PDZ #1), DLG2 (PDZ #2), Magi3 (PDZ #1), PTN3 (PDZ #1), MAST2 (PDZ #1), NeDLG (PDZ #1, 2), Shank1 d1, Shank2 d1, Shank3 d1, Syntrophin α , Syntrophin γ 1, Magi1 (PDZ #1), Magi1 (PDZ #4), Tip1; PTPL1 (PDZ #1), Mint3 (PDZ #1), Lym Mystique (PDZ #1), DLG2 (PDZ #3), MUPP1 (PDZ #8), NeDLG (PDZ #1), DLG5 (PDZ #1), PSD95 (PDZ #1), NumBP (PDZ #3), LIMK1 (PDZ #1), KIAA0313, DLG1 (PDZ #2), Syntenin (PDZ #2), Pick1, MAST2, PTN3 (PDZ #1), NOS1 (PDZ #1, 2, 3), MINT1 (PDZ #2), ZO-1 (PDZ #2), NSP 和 RIM212。

[0020] 患者样本可以是下列的任意一种: 血液, 组织, 鼻分泌物, 肺渗出液, 泄殖腔样本, 粪便样本, 喉拭子和唾液。优选, 患者是人, 鸟类, 猪, 马, 或者哺乳动物。PDZ 多肽优选包括 PL 结合区 (80-100 氨基酸区), 例如 PSD95 d2 的 PL 结合区于 SEQ ID NO: 1 提供。为了进行亚型特异测定, PDZ 多肽优选的是 PSD95 d1, PSD95 d2, PSD95 d3, INADL8d1, Magi1d1, DLG1d2, DLG1d3, NeDLG1d1, 或者 NeDLG1d2。

[0021] 在另一方面, 本发明提供了通过鉴定亚型特异性流感 A 型病毒蛋白 NS1 PDZ 配体

模体 (PL) 区的存在,对 A 型流感感染进行诊断和分型的方法。优选 PL 具有以下模体 :S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸和 X 是任意氨基酸。

[0022] 在一方面,本发明提供检测待测样本中包含 PL 区的 A 型流感病毒蛋白的存在和量的方法,该方法通过在适于结合的条件下,将等份的待测样本与至少一种 PDZ 肽和至少一种 PDZ 配体 (PL) 检测试剂混合 ;和测定 PDZ 肽和 PL 检测试剂之间的结合,结合的降低表明待测样本中 A 型流感病毒蛋白的存在。优选,A 型流感病毒蛋白是 NP, HA, M1 或者 NS1。优选,PL 检测试剂包括来自 A 型流感病毒蛋白 C 末端的 PL 模体,所述蛋白选自 :NP, HA, M1 和 NS1。优选 PL 模体是 :S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸和 X 是任意氨基酸。

[0023] 在另一方面,本发明提供鉴定患者是否感染 A 型流感病毒的方法,该方法通过检测患者的鼻分泌物、痰样本或者喉拭子中是否存在 A 型流感病毒的 NS1 蛋白,存在表明患者感染 A 型流感病毒。

[0024] 在一方面,本发明提供在待测样本中检测包含 PL 区的 A 型流感病毒蛋白的存在和量的方法,该方法通过混合等份的待测样本和至少一种 PDZ 肽 ;和检测 PDZ 肽和 PL A 型流感病毒蛋白之间的结合,结合表明待测样本中 A 型流感病毒蛋白的存在。

[0025] 在另一方面,本发明通过检测患者是否感染流感 A,提供检测患者是否感染流感 A 致病株的方法,如果患者被感染,检测患者样本中具有 PL 模体的非结构蛋白的存在,存在表明患者感染了 A 型流感病毒的致病株。

[0026] 在一方面,本发明提供鉴定患者样本中 A 型流感病毒特异性亚型存在的方法,该方法通过将患者样本与至少一种 PDZ 多肽或者至少一种捕获抗体接触,所述 PDZ 多肽或捕获抗体与对流感病毒 A 亚型特异的 NS1 蛋白的 PL 模体特异结合 ;并检测 PDZ 多肽或者捕获抗体是否与样本中的 PL 模体特异结合,特异结合表明该亚型的存在。优选,该接触步骤包括将患者样本与大量 PDZ 多肽接触,所述 PDZ 多肽特异结合多个 NS1 蛋白中的多个 PL 模体,所述 NS1 蛋白对流感病毒 A 的多个亚型特异 ;并且检测包括确定哪种 PDZ 多肽特异结合其 PL 模体,与一种或者多种 PDZ 多肽的结合从而表明亚型的存在。优选,捕获抗体识别 NS1 的羧基末端。优选,捕获抗体或者 PDZ 多肽识别一种或者多种 PDZ 配体模体 (PLs) :ESEV (SEQ ID NO :2), ESEI (SEQ ID NO :3), ESKV (SEQ ID NO :4), TSEV (SEQ ID NO :5), GSEV (SEQ ID NO :6), RSEV (SEQ ID NO :7), RSKV (SEQ ID NO :8), GSEI (SEQ ID NO :9), GSKV (SEQ ID NO :10), NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RICI (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV, 和 SKI。优选,PDZ 多肽至少是下列的一种 :外膜, PSD95 (PDZ #2), PSD95 (PDZ #1, 2, 3), DLG1 (PDZ #1), DLG1 (PDZ #1, 2), DLG1 (PDZ #2), DLG2 (PDZ #1), DLG2 (PDZ #2), Magi3 (PDZ #1), PTN3 (PDZ #1), MAST2 (PDZ #1), NeDLG (PDZ #1, 2), Shank1 d1, Shank2 d1, Shank3 d1, Syntrophin1 α , Syntrophin γ 1, Magi1 (PDZ #1), Magi1 (PDZ #4), Tip1 ; PTPL1 (PDZ #1), Mint3 (PDZ #1), Lym Mystique (PDZ #1), DLG2 (PDZ #3), MUPP1 (PDZ #8), NeDLG (PDZ #1), DLG5 (PDZ #1), PSD95 (PDZ #1), NumBP (PDZ #3), LIMK1 (PDZ #1), KIAA0313, DLG1 (PDZ #2), Syntenin (PDZ #2), Pick1, MAST2, PTN3 (PDZ #1), NOS1 (PDZ #1, 2, 3), MINT1 (PDZ #2), ZO-1 (PDZ #2), NSP 和 RIM2。患者样本可以是鼻分泌物,痰样本,喉拭子,

泄殖腔样本,粪便样本,肺渗出液,或者唾液。如果该方法用于鉴定亚型,则该亚型优选禽流感 A 并且 PL 是 PL 模体 ESEV/I/A(SEQ ID NO :19)。或者,亚型是 H3N2 和 PL 是 PL 模体 RSKV(SEQ ID NO :8)。或者,PL 是 PL 模体 ESKV(SEQ ID NO :4)。或者,亚型是 H1N1 和 PL 是 PL 模体 RSEV(SEQ ID NO :7)。该方法还能够包括将样本与检测抗体接触。优选,检测抗体包括信号发生化合物,并且不抑制 PL 与 PDZ 的结合或者捕获抗体与 NS1 的结合。

[0027] PDZ 多肽或者抗体可以固定在固相支持物上。如果固相支持物是毛细管流动分析装置,接触步骤包括将小棒浸在患者样本中。优选,毛细管流动测定是免疫测定法。优选,固相支持物是侧向流测定。

[0028] 在一方面,本发明提供用于患者样本中流感 A 病毒的鉴定和分亚型的试剂盒,所述试剂盒包括与固定在固相支持物上的流感 A 病毒 NS1 特异结合的试剂。优选,该试剂是抗体,PDZ 多肽,寡核苷酸适配体,或者混合物。

[0029] 在另一方面,本发明提供用于患者样本中流感 A 病毒鉴定和 / 或分亚型的试剂盒,包括与流感 A 病毒编码蛋白特异结合的试剂 ; 和与 NS1 蛋白特异结合的试剂。优选,特异结合 NS1 蛋白的试剂与蛋白上的 PL 区结合。优选,该试剂是抗体,PDZ 多肽,寡聚核苷酸适配体,或者混合物。优选,流感 A 病毒编码蛋白是 NS1。

[0030] 在一方面,本发明提供用于患者样本中流感 A 病毒鉴定和 / 或分亚型的试剂盒,包括与 NS1 在非 PL 模体处特异结合的试剂和与 NS1 在 PL 模体处特异结合的试剂。

[0031] 在一方面,本发明提供具有大量 PDZ 多肽的试剂盒,所述 PDZ 多肽对多个流感 A 病毒的多个 NS1 蛋白的多个 PL 模体特异。

[0032] 在一方面,本发明提供鉴定能够特异结合流感病毒 PDZ 配体 (PL) 的 PDZ 多肽的方法,通过将流感病毒非结构蛋白 PL 与具有 PDZ 结构域的候选多肽在适于结合的条件下接触 ; 检测 PL 与候选多肽的特异结合 ; 并确认 PL 结合到 PDZ 结合位点。

[0033] 在一方面,本发明提供分离的抗体,该抗体与 A 型流感病毒 NS1 蛋白中的羧基末端模体特异结合。优选,具有 PL 模体的羧基末端模体是 ESEV(SEQ ID NO :2), ESEI(SEQ ID NO :3), ESKV(SEQ ID NO :4), TSEV(SEQ ID NO :5), GSEV(SEQ ID NO :6), RSEV(SEQ ID NO :7), RSKV(SEQ ID NO :8), GSEI(SEQ ID NO :9), GSKV(SEQ ID NO :10), NICI(SEQ ID NO :11), TICI(SEQ ID NO :12), RICI(SEQ ID NO :13), DMAL(SEQ ID NO :14), DMTL(SEQ ID NO :15), DIAL(SEQ ID NO :16), DLDY(SEQ ID NO :17), SICL(SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV, 或者 SKI。优选,抗体是单克隆抗体或者抗体片段。优选 ; PL 模体是 ESEV/I/A(SEQ ID NO :19)。

[0034] 在一方面,本发明提供对感染 A 型流感病毒或者具有感染风险的患者进行治疗或者预防的方法,该方法通过对患者使用有效方案的药剂来实现,所述药剂抑制病毒的 NS1 蛋白与细胞的 PDZ 蛋白的相互作用,从而作用于感染的治疗或者预防。优选,该药剂是与 A 型流感病毒 NS1 蛋白的 PL 模体特异结合的抗体。优选,药剂是反义寡核苷酸,小分子, siRNA 或者锌指蛋白,并且该药剂抑制流感 A NS1 蛋白或者 PDZ 蛋白的表达。优选, NS1 的 PL 模体是 ESEV(SEQ ID NO :2), ESEI(SEQ ID NO :3), ESKV(SEQ ID NO :4), TSEV(SEQ ID NO :5), GSEV(SEQ ID NO :6), RSEV(SEQ ID NO :7), RSKV(SEQ ID NO :8), GSEI(SEQ ID NO :9), GSKV(SEQ ID NO :10), NICI(SEQ ID NO :11), TICI(SEQ ID NO :12), RICI(SEQ ID NO :13), DMAL(SEQ ID NO :14), DMTL(SEQ ID NO :15), DIAL(SEQ ID NO :16), DLDY(SEQ ID NO :17), SICL(SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV, 或者 SKI。优选,药剂是 PDZ 多肽并且它包括至少

与 PL SEQ ID NO :1 相互作用的结合区。优选, PDZ 多肽下面的至少一种 : 外膜, PSD95 (PDZ #2), PSD95 (PDZ #1, 2, 3), DLG1 (PDZ #1), DLG1 (PDZ #1, 2), DLG1 (PDZ #2), DLG2 (PDZ #1), DLG2 (PDZ #2), Magi3 (PDZ #1), PTN3 (PDZ #1), MAST2 (PDZ #1), NeDLG (PDZ #1, 2), Shank1 d1, Shank2 d1, Shank3 d1, Syntrophin1 α , Syntrophin γ 1, Magi1 (PDZ #1), Magi1 (PDZ #4), Tip1 ; PTPL1 (PDZ #1), Mint3 (PDZ #1), Lym Mystique (PDZ #1), DLG2 (PDZ #3), MUPP1 (PDZ #8), NeDLG (PDZ #1), DLG5 (PDZ #1), PSD95 (PDZ #1), NumBP (PDZ #3), LIMK1 (PDZ #1), KIAA0313, DLG1 (PDZ #2), Syntenin (PDZ #2), Pick1, MAST2, PTN3 (PDZ #1), NOS1 (PDZ #1, 2, 3), MINT1 (PDZ #2), ZO-1 (PDZ #2), NSP 和 RIM2。

[0035] 在另一方面, 本发明提供筛选抗病毒剂的方法, 该方法通过在待测化合物存在或者缺失的条件下, 将 PDZ 多肽和流感病毒 PDZ 配体 (PL) 接触 ; 和将待测化合物存在条件下较之缺失条件下的 PDZ/PL 结合量作比较, 优选抗病毒剂减少 PDZ/PL 结合, 并还可能包括在体内或者胞内检测试剂以鉴定其是否干扰干扰素的产生。

[0036] 在一方面, 本发明提供非天然的 PDZ 配体 (PL) 肽诊断试剂, 其具有选自流感 A 蛋白 C 端氨基酸序列内的氨基酸线性阵列, 因此 PL 能够结合哺乳动物 PDZ 多肽。优选, PL 具有以下模体 : S/T-X-V/I/L, 其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸和 X 是任意氨基酸。优选, 流感 A NS1 蛋白阵列包括以下至少一种 : ESEV (SEQ ID NO :2), ESEI (SEQ ID NO :3), ESKV (SEQ ID NO :4), TSEV (SEQ ID NO :5), GSEV (SEQ ID NO :6), RSEV (SEQ ID NO :7), RSKV (SEQ ID NO :8), GSEI (SEQ ID NO :9), GSKV (SEQ ID NO :10), NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RIC1 (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV 或者 SKI。还能包括诊断试剂, 例如阳性对照, 阴性对照, 分析标准品, 分析校准品 (calibrator), 竞争性分析配体, 标记的肽检测剂或者固相捕获剂。还能包括合成肽, 重组多肽, 基本上纯化的天然 PL 多肽, 基本上纯化的天然 PL 多肽的片段, 模拟 PL 的肽, 寡核苷酸适配体 PL 或者多肽适配体 PL。优选, PL 肽来自流感 A NS1 蛋白。

[0037] 在一方面, 本发明提供一种非天然的 PDZ 多肽诊断试剂, 用于检测生物样本中的流感 A PL, 所述生物样本包含能够结合流感 A NS1 蛋白的非天然 PDZ 多肽, 优选的 PDZ 结构域蛋白诊断试剂选自阳性对照、阴性对照、分析标准品、分析校准品、竞争性配体、标记的蛋白检测结合伴侣和捕获剂的诊断试剂, 优选外膜, PSD95 (PDZ #2), PSD95 (PDZ #1, 2, 3), DLG1 (PDZ #1), DLG1 (PDZ #1, 2), DLG1 (PDZ #2), DLG2 (PDZ #1), DLG2 (PDZ #2), Magi3 (PDZ #1), PTN3 (PDZ #1), MAST2 (PDZ #1), NeDLG (PDZ #1, 2), Shank1 d1, Shank2 d1, Shank3 d1, Syntrophin1 α , Syntrophin γ 1, Magi1 (PDZ #1), Magi1 (PDZ #4), Tip1 ; PTPL1 (PDZ #1), Mint3 (PDZ #1), Lym Mystique (PDZ #1), DLG2 (PDZ #3), MUPP1 (PDZ #8), NeDLG (PDZ #1), DLG5 (PDZ #1), PSD95 (PDZ #1), NumBP (PDZ #3), LIMK1 (PDZ #1), KIAA0313, DLG1 (PDZ #2), Syntenin (PDZ #2), Pick1, MAST2, PTN3 (PDZ #1), NOS1 (PDZ #1, 2, 3), MINT1 (PDZ #2), ZO-1 (PDZ #2), NSP 或者 RIM2。

[0038] 在另一方面, 本发明提供用于检测待测样本中流感 A 蛋白的信号发生结合剂, 所述待测样本包含非天然 PL 或者非天然 PDZ, 其中 PL 或者 PDZ 均是与信号发生化合物共价连接的肽或者多肽。

[0039] 在一方面, 本发明提供鉴定患者是否感染致病流感 A 的方法, 该方法通过检测患

者样本中是否存在 A 型流感病毒的 NS2 蛋白,该蛋白在 70 位具有丝氨酸,其存在表明患者感染流感 A 的致病株。优选的检测步骤是将患者样本与特异结合具有丝氨酸 70 的序列的试剂接触。优选试剂是抗体或者核酸。

[0040] 在一方面,提供鉴定患者是否感染致病 A 型禽流感病毒的方法,该方法包括,将患者样本与 PSD-95 PDZ 蛋白接触;和检测 PSD-95 PDZ 蛋白与样本之间的特异结合,特异结合表明 A 型流感病毒的存在,该存在表明患者感染致病 A 型禽流感病毒。优选,致病 A 型流感病毒是 H5N1。优选,PSD-95 PDZ 蛋白是 PSD-95 的结构域 2。优选,流感 NS1 蛋白 PL 具有以下模体:ESKV,ESEI (SEQ ID NO :3),或者 ESEV (SEQID NO :2)。在一方面,接触步骤包括将患者样本与 PSD-95 PDZ 蛋白和抗体接触,所述抗体与 A 型流感病毒蛋白 NS1 的不同抗原表位而不是 PSD-95 PDZ 蛋白特异结合,PSD-95 固定和支持物上,检测步骤检测 NS1 蛋白与抗体的特异结合。在另一方面,该方法包括将患者样本与第二 PDZ 蛋白接触的另外步骤,INADL d8 作为对照并检测特异结合,第一 PDZ-95 蛋白相对于第二 PDZ 蛋白特异结合更高表明患者感染了致病 A 型禽流感病毒。

[0041] 附图简述

[0042] 图 1 是显示禽类、人类和其他哺乳动物中 NS1 PL 序列 ESEV (SEQID NO :2) 出现的时程图。

[0043] 图 2 是显示禽类、人类和其他哺乳动物中 NS1 PL 序列 EPEV (SEQID NO :27) 出现的时程图。

[0044] 图 3 是显示禽类、人类和其他哺乳动物中 NS1 PL 序列 RSKV (SEQID NO :8) 出现的时程图。

[0045] 图 4 显示对检验 6 个人流感 A 阳性样本的鼻分泌物的结果。

[0046] 图 5 显示感染 A/PR/8/34 的 MDCK 细胞中的 NS1 表达。

[0047] 图 6 显示细胞中 PDZ 与 NS1 的相互作用。

[0048] 图 7 显示细胞中 INADL d8 与 H3N2 NS1 的相互作用。

[0049] 图 8 显示利用 PDZ 捕获剂和单克隆抗体检测剂 AU-4B2,用于 NS1 诊断的侧向流形式。

[0050] 图 9 显示利用单克隆抗体捕获剂和单克隆抗体检测剂 AU-4B2 的侧向流形式。

[0051] 图 10a-k 是 11 个示范性侧向流流感检测形式。

[0052] 定义

[0053] 除非另外定义,所有此处使用的技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解含义相同的。下列文献给技术人员提供了本发明使用的许多术语的一般定义:Singleton 等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (微生物和分子生物)(第二版,1994);THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (剑桥科技词典)(Walker 编著,1988);和 Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (HARPER COLLINS 生物词典)(1991)。尽管与此处描述的方法相似或者等同的任何方法和材料都可用于本发明的实践或者检测,但现在描述优选的方法和材料。按照逻辑(而不是字母)顺序提供定义以帮助读者实现本发明,即,如下:也就是,

[0054] “试剂”包括任何物质,分子,元素,化合物,实体,或者其组合,包括但不限于,例如,蛋白,多肽,小的有机分子,多糖-肽嵌合分子,核苷酸-肽嵌合分子等。试剂的典型实

例包括非天然状态的天然产物,合成肽化合物,化合物,以及两种或更多种天然或者非天然化合物。除非另作说明,术语“试剂”,“物质”,和“化合物”可以互换使用。

[0055] “禽流感 A”是指 A 亚型流感,其感染禽类对象并在禽类对象之间传染。禽流感血凝素 (hemmagglutinin) 亚型的典型实例包括 H5, H6, H7, H9 和 H10, 典型菌株包括 H5N1, H6N2, H7N3, H7N7, H9N2, H10N4 和 H10N5。

[0056] “禽类对象”是指适合进行检测或者治疗的对象,包括所有种类的鸟类,包括野生鸟类(例如野禽)和家养种类(例如家禽)。优选,要检测或者治疗的禽类对象选自鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸵鸟、鸚鵡和外来鸟类例如鸚鵡、美冠鸚鵡和鸡尾鸚鵡。更优选,要检测的禽类对象是鸡,火鸡,鹅或者鹌鹑。

[0057] “非天然”用来指在自然界不存在的组合物。非天然组合物的典型实例包括基本上纯化的组合物,以及,那些包含着在自然界的相同化学形式中不会出现的化合物的组合物,例如,化学和基因修饰蛋白、核酸等。

[0058] 此处使用的“调节”是指例如通过激动结合活性的上调(即,活化或者刺激),和例如通过拮抗结合活性的下调(即抑制或者遏制)二者。此处使用的术语“PDZ 配体结合调节剂”是指能够改变包含 PDZ 结构域的多肽与 PDZ 配体(即,“PL”)结合的试剂。调节剂包括,但不限于,活化剂例如激动剂和抑制剂例如拮抗剂二者。抑制剂可能引起部分或者完全的结合抑制。

[0059] 当用于区别不同的流感病毒株情况下,“流感 A 的致病株”是指根据 OIE 世界动物卫生组织、世界卫生组织或者它们指定的代表提出的指南的“须通报禽流感”(NAI) 病毒,例如,在 OIE “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, (陆生动物诊断分析和疫苗手册,第五版) 2004 (www.oie.int) 中提出的指南。此外,该致病株在毒力或者 H5 或者 H7 病毒的典型试验中具有“高致病性”,所述 H5 或者 H7 病毒具有流感 A 血凝素 (HA) 前体蛋白 HA0 切割位点的氨基酸序列,所述氨基酸序列与在毒性病毒中观察到的任何 HA0 切割位点氨基酸序列相似,即,如 OIE 或者代表性的相似国家或者国际组织或者行业协会所规定。流感 A 毒性 H5 和 H7 株中 HA0 切割位点氨基酸序列的典型实例包括病毒前体血凝素蛋白切割位点处的多个碱性氨基酸(精氨酸或者赖氨酸),例如,其中 H7 病毒的低毒株具有 -PEIPKGR*GLF-(SEQ ID NO:20) 或者 -PENPKGR*GLF-(SEQ ID NO:21), 高致病株具有 -PEIPKKKKR*GLF-(SEQ ID NO:22), -PETPKRKRKR*GLSF-(SEQ ID NO:23), -PEIPKICREKR*GLF-(SEQ ID NO:24) 或者 -PETPKRRRR*GLF-(SEQ ID NO:25)。现在典型的毒力试验包括用感染性病毒接种 4-8 周龄鸡,其中如果病毒株在 10 天内造成大于 75% 的死亡率,则该病毒株被认为是高致病性的;和/或,静脉内致病性指数 (IVPI) 大于 1.2 的任意病毒,其中静脉内接种的鸟类在 10 天期间每 24 小时检查;正常,记分为“0”;患病为“1”;严重患病为“2”;死亡为“3”;和,计算平均分作为 IVPI。后来的高致病性病毒株被 OIE 称为“高致病性 NAI 病毒”(HPNIA)。现有的 NAI 典型实例包括流感 A 的 H5 和 H7 株。现在 HPNIA 的典型实例包括 H5N1。

[0060] “流感 A 的低致病株”表示须通报的禽流感 A,即,NAI 分离物(上文),但其对鸡不具有致病性并且不具有 HA0 切割位点氨基酸序列,所述序列与在毒性病毒中观察到的任何 HA0 切割位点氨基酸序列相似,即,该病毒株被 OIE 称为“低致病性禽流感 (LPAI)”。

[0061] “PDZ 结构域”是指与脑突触蛋白 PSD-95、果蝇 (*Drosophila*) 分隔连接蛋白

Discs-Large (DLG) 和 / 或上皮细胞紧密连接蛋白 ZO1 (ZO1) 具有大约 90 个连续氨基酸同源的氨基酸序列 ; 优选大约 80-90 个 ; 更优选, 大约 70-80 个, 更优选大约 50-70 个氨基酸。PDZ 结构域的典型实例在本领域还已知有 Discs-Large 同源性重复 (“DHRs”) 和 “GLGF” 重复 (SEQ ID NO :26)。在各种膜相关蛋白中发现了 PDZ 结构域的实例, 包括鸟苷酸化激酶同系物的 MAGUK 家族的成员, 几种蛋白磷酸酯酶和激酶, 神经元一氧化氮合成酶 (neuronal nitric oxide synthase), 肿瘤抑制蛋白, 和几种抗肌萎缩蛋白相关蛋白, 总称为 syntrophins。该 PDZ 结构域包括天然和非天然的氨基酸序列。PDZ 结构域的典型实例包括 PDZ 蛋白的多态变体, 以及, 包含两个不同 PDZ 蛋白等部分的嵌合 PDZ 结构域。优选, 该 PDZ 结构域包含与下列公开的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列 : 美国专利申请号 10/485, 788 (2004 年 2 月 3 日提交), 国际专利申请 PCT/US03/285/28508 (2003 年 9 月 9 日提交), 国际专利申请 PCT/US01/44138 (2001 年 11 月 9 日提交), 在此完整引入作为参考。典型的非天然 PDZ 结构域包括那些氨基酸序列的对应遗传密码已经突变的 PDZ 结构域, 例如, 用于产生改变 (增强或者减弱) 与 PL 结合或者与 PL 结合特异性的氨基酸改变。任选 PDZ 结构域或者其变体与来自脑突触蛋白 PSD-95、果蝇分隔连接蛋白 Discs-Large (DLG) 和 / 或上皮细胞紧密连接蛋白 ZO1 (ZO1) 和动物同系物中至少一种的 PDZ 结构域具有至少 50、60、70、80 或者 90% 的序列一致性。任选天然 PDZ 结构域的变体与天然 PDZ 结构域具有至少 90% 的序列一致性。PDZ 结构域的序列一致性由 PDZ 结构域内的至少 70 个氨基酸确定, 优选 80 个氨基酸, 和更优选 80-90 或者 80-100 个氨基酸。当类似物和人序列进行最大限度比对时, 类似物的氨基酸指定为天然人序列中相应氨基酸的相同编号。类似物通常与天然存在的肽在一个、两个或者几个位置存在不同, 经常借助于保守置换。术语 “等位基因变体” 用于指相同种类中不同个体基因之间的变异和该基因编码的蛋白中相应的变异。PSD-95 d2 的示范性 PDZ 结构域如 SEQ ID NO :1 所示。

[0062] “PDZ 蛋白”, 与 “包含 PDZ 结构域的多肽” 和 “PDZ 多肽” 可以互换使用, 是指具有 PDZ 结构域 (上文) 的天然存在或者非天然存在的蛋白。以前 (上文) 已经公开了 PDZ 蛋白的典型实例, 包括 CASK, MPP1, DLG1, DLG2, PSD95, NeDLG, TIP-33, TIP-43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, AF6, GORASP1, INADL, KIAA0316, KIAA1284, MAGI1, MAST2, MINT1, NSP, NOS1, PAR3, PAR3L, PAR6 β , PICK1, Shank 1, Shank 2, Shank 3, SITAC-18, TIP1, 和 ZO-1。用于筛查分析的该非天然 PDZ 结构域多肽可以包含例如比天然 PDZ 结构域小的 PDZ 结构域。例如非天然 PDZ 结构域可任选包含 “GLGF” 模体, 即, 具有 GLGF 氨基酸序列 (SEQ ID NO :26) 的模体, 其通常位于 PDZ 结构域附近, 例如通常在 N 端大约 10-20 个氨基酸内。PDZ 结合活性通常需要 GLGF 模体 (SEQ ID NO :26) 和紧挨着 GLGF 模体 (SEQ ID NO :26) N 端的 3 个氨基酸。同样地, 非天然 PDZ 结构域可以构建为 PDZ 结构域 C- 末端缺失 β - 折叠, 即, 通常可以从天然 PDZ 结构域删除这一区域而不影响 PL 的结合。提供了一些示范性的 PDZ 蛋白, 括号内是 GI 或者检索号 (accession numbers) : PSMD9 (9184389), af6 (430993), AIPC (12751451), ALP (2773059), APXL-1 (13651263), MAGI2 (2947231), CARDI1 (1282772), CARDI4 (13129123), CASK (3087815), CNK1 (3930780), CBP (3192908), Densin 180 (16755892), DLG1 (475816), DLG2 (12736552), DLG5 (3650451), DLG6 剪接变体 (splice var)1 (14647140), DLG6 剪接变体 2 (AB053303), DVL1 (2291005), DVL2 (2291007), DVL3 (6806886),

ELFIN 1(2957144), ENIGMA(561636), ERBIN(8923908), EZRIN 结合蛋白 50(3220018), FLJ00011(10440342), FLJ11215(11436365), FLJ12428(BC012040), FLJ12615(10434209), FLJ20075 Semcap2(7019938), FLJ21687(10437836), FLJ31349(AK055911), FLJ32798(AK057360), GoRASP1(NM031899), GoRASP2(13994253), GRIP1(4539083), GTP 酶活化酶(2389008), 鸟嘌呤交换因子(6650765), HEMBA 1000505(10436367), HEMBA 1003117(7022001), HSPC227(7106843), HTRA3(AY040094), HTRA4(AL576444), INADL(2370148), KIAA0147 Vartul(1469875), KIAA0303 MAST4(2224546), KIAA0313(7657260), KIAA0316(6683123), KIAA0340(2224620), KIAA0380(2224700), KIAA0382(7662087), KIAA0440(2662160), KIAA0545(14762850), KIAA0559(3043641), KIAA0561 MAST3(3043645), KIAA0613(3327039), KIAA0751 RIM2(12734165), KIAA0807 MAST2(3882334), KIAA0858(4240204), KIAA0902(4240292), KIAA0967(4589577), KIAA0973 SEMCAP3(5889526), KIAA1202(6330421), KIAA1222(6330610), KIAA1284(6331369), KIAA1389(7243158), KIAA1415(7243210), KIAA1526(5817166), KIAA1620(10047316), KIAA1634 MAGI3(10047344), KIAA1719(1267982), LIM Mystique(12734250), LIM(3108092), LIMK1(4587498), LIMK2(1805593), LIM-RIL(1085021), LU-1(U52111), MAGI1(3370997), MGC5395(BC012477), MINT1(2625024), MINT3(3169808), MPP1(189785), MPP2(939884), MPP3(1022812), MUPP1(2104784), NeDLG(10853920), Neurabin II(AJ401189), NOS1(642525), 新 PDZ 基因(7228177), 新丝氨酸蛋白酶(1621243), Numb 结合蛋白(AK056823), 外膜蛋白(7023825), p53(12733367), PAR3(8037914), PAR3-样(AF428250), PAR6(2613011), PAR6 β (13537116), PAR6 γ (13537118), PDZ-73(5031978), PDZK1(2944188), PICK1(4678411), PIST(98394330), prIL16(1478492), PSAP(6409315), PSD95(3318652), PTN-3(179912), PTN-4(190747), PTPL1(515030), RGS12(3290015), RGS3(18644735), Rho-GAP10(NM020824), Rhophilin-样(14279408), 丝氨酸蛋白酶(2738914), Shank 2(6049185), Shank 3(AC000036), Sliroom(18652858), 与 GRASP65 相似(14286261), 与 Numb px2 的配体相似(BC036755), 与 PTP 同系物相似(21595065), SIP1(2047327), SITAC-18(8886071), SNPCIIA(20809633), Shank 1(7025450), Syntenin(2795862), Syntrophin 1 α (1145727), Syntrophin β 2(476700), Syntrophin γ 1(9507162), Syntrophin γ 2(9507164), TAX2-样蛋白(3253116), TIAM 1(4507500), TIAM 2(6912703), TIP1(2613001), TIP2(2613003), TIP33(2613007), TIP43(2613011), X-11 β (3005559), ZO-1(292937), ZO-2(12734763), ZO-3(10092690)。

[0063] “PDZ 配体”, 缩写为“PL”, 表示一种天然存在的蛋白, 该蛋白具有与 PDZ 结构域结合并与其形成分子间相互作用复合物的氨基酸序列。之前在现有的美国和国际专利申请(上文)中已经披露了 PL 的典型实例。流感 A PL 的其他实例在下面实施例部分中提供。

[0064] “PDZ 试剂”用来指一种化合物, 其与那些不包括 PDZ 试剂的对照相比, 在检测分析中干扰至少 20% 的 PDZ 配体多肽和包含 PDZ 结构域多肽之间发生的结合相互作用, 例如, 至少 30%, 至少 40%, 至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 至少 95%, 直到大约 99% 或者 100%。尽管不希望受限于任何具体的作用机理, 但该 PDZ 剂可能起干扰作用, 例如通过结合到否则将与流感 NS1 配体结合的 PDZ 结构域; 或者, 它可以直接结合 NS1 配体以阻止其结合 PDZ 蛋白。通常, 后来的 PDZ 试剂是那些在特定分析中表现出 IC₅₀

在大约 1mM 或者更低范围内的 PDZ 试剂。显示更低 IC₅₀ 的化合物,例如,通常其 IC₅₀ 为大约 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM 甚或更低。后来的 PDZ 试剂可用于治疗和预防药物组合物,给药以减轻、治疗或者预防由流感 A 病毒感染引起的一种或者多种疾病的症状。“PL 调节剂”在用于 PDZ 试剂(上文)背景时,是指结合流感 A NS1 蛋白并调节其与 PDZ 结构域结合的化合物。

[0065] “PDZ 调节剂”在用于 PDZ 试剂(上文)背景时,是指结合 PDZ 结构域并调节流感 NS1 蛋白在对象 PDZ 结构域位点结合的化合物。

[0066] 该 PDZ 调节剂和 PL 调节剂可以分别是设计成结合 PDZ 结构域或者 PL 的肽、模拟肽或者小分子模拟物。下面的实施例部分非常详细地描述了检测 PDZ 调节剂是否结合 PDZ 结构域的分析法。同样地,还阐明了用于检测 PL 调节剂是否结合 PDZ 结构域的分析法,例如,重组 PDZ 结构域融合蛋白与重组 NS1 融合蛋白结合。

[0067] “PDZ 介导的病症”是指流感 A 感染对象中的一种或者多种症状,由流感 A 病毒蛋白 PL 在宿主细胞 PDZ 结构域的结合引起。后来的症状起因于病毒感染,包括,但不限于发烧,咳嗽,喉咙痛,肌肉疼痛,结膜炎,呼吸问题,气道中过度粘液产生,对继发性细菌感染的易感性增加,肺炎,神经感染等。

[0068] “患病”用在此处是指禽类对象时,包括的体征和症状可以从几乎没有明显病征的猝死到具有呼吸征象、过度流泪、窦炎、头部水肿、无羽表皮发绀和腹泻的更具特征性疾病。OIE 在它们的卫生指南“Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 第五版,世界动物卫生组织”中披露了“患病”的典型诊断体征、样本和检验。

[0069] 此处使用的“类似物”是指结构上类似感兴趣的天然 PDZ 或者 PL 分子的分子,但其已经被修饰,例如,通过取代或者化学修饰一种或者多种所选的氨基酸取代基。与起始分子比较,类似物可能显示相同、相似或者改进的功用。合成和筛选类似物以鉴定具有改进特征的已知化合物的变异体在医药领域是公知的,例如,增强结合亲合力,改变与目标结合的选择性,减少与非目标分子的结合,改进体外和体内稳定性,和改进药理学性质。

[0070] “接触”具有其正常含义,是指结合两种或更多种试剂从而使成分合并,例如,待测样本中的 PL 与 PDZ 合并。接触可以在体外发生,例如,PDZ 蛋白与细胞裂解产物在试管或者其他容器中合并,或者,原位,例如,借助于细胞的天然生物合成活性,天然宿主细胞 PDZ 蛋白和天然病毒 PL 在流感感染的细胞中合并。或者,通过例如将 PDZ 结构域编码序列转染到流感 A 感染细胞中,而合并重组 PDZ 与病毒 PL。

[0071] “多聚体”用于指一种或者多种类型重复单元的连续阵列,而不管来源。多聚体可以在生物系统中发现,特别包括多肽和多核苷酸,以及,包含氨基酸、核苷酸或者其类似物的化合物。术语“多核苷酸”是指任意长度核苷酸或者其类似物的多聚体,包括长度范围从 10-100 个核苷酸的寡核苷酸和长度大于 100 个核苷酸的多核苷酸。术语“多肽”是指具有任意长度的氨基酸连续排列的多聚体,优选连续排列中从大约 12 个到大约 50 个氨基酸范围;和,最优选的大于大约 50 个氨基酸。

[0072] “多肽”和“蛋白”互换使用,包括氨基酸(其中天然肽键骨架被替换为非天然合成骨架)和多肽(其中一种或者多种天然氨基酸被替换为一种或者多种非天然存在或者合成的模拟氨基酸)的聚合连续阵列。

[0073] “融合蛋白”是指由来源于两种或更多种天然蛋白的氨基酸序列组成的多肽,其表

达为单个重组蛋白,即,在其天然状态不连接的两种或更多种氨基酸序列在重组蛋白中连接在一起,例如利用它们各自的氨基和羧基末端通过肽键,从而形成单一连续的氨基酸序列。融合蛋白可以是两个、三个或者甚至四个或者更多个不同的天然或者非天然蛋白的组合。典型融合蛋白包括那些具有两个或者更多个异源的,即,无关的,氨基酸序列;那些兼具异源和同源的,即,相关的,序列。融合蛋白还由下列氨基酸序列组成:有或者没有N端甲硫氨酸残基的氨基酸序列,那些标签用于抗原的抗原表位鉴定的氨基酸序列,以及,那些具有信号发生化合物作为融合伴侣的氨基酸序列,例如,具有荧光伴侣的融合蛋白;酶伴侣例如 β -半乳糖苷酶;化学发光伴侣例如荧光素酶;等。

[0074] “捕获试剂”,当用于诊断分析试剂或者方法的背景时,是指在结合相互作用和适用于诊断分析形式的时间段内,能够结合流感病毒分析物的试剂,所述相互作用具有足够的强度(例如测定为结合亲和力)和特异性,该特异性允许从不同病毒分析物的混合物中浓缩病毒分析物;所述适用于诊断分析形式的时间段,即,通常大约5分钟到大约90分钟;优选大约5分钟到大约60分钟;和,最优选的大约5分钟到大约30分钟。根据本发明的可选实施方式,该捕获试剂包含PDZ结构域或者PL。典型的捕获试剂在下面实施例部分说明。捕获试剂通常“特异结合”一种或者多种病毒分析物,例如,包含PL的蛋白,而排斥其他分析物,例如,不包含PL的蛋白。优选,该捕获试剂结合该病毒分析物的解离常数(KD)小于大约 10^{-6} M,优选,小于大约 10^{-7} M;和,最优选的,小于大约 10^{-8} M。

[0075] “特异结合”,当用于该天然和非天然PDZ结构域与PL试剂之间的结合相互作用时,用于指捕获或者检测试剂优先结合特定病毒分析物的能力,所述特定病毒分析物存在于不同病毒分析物的混合物中。在某些实施方式中,该特异结合相互作用能够辨别具有或者缺失PL的蛋白,即,在一些实施方式中鉴别能力大于大约10到约100倍;和,优选大于约1000到约10,000倍。

[0076] 术语“基本上一致”是指当最优比对时,例如利用缺省缺口权重(default gap weight)通过程序GAP或者BESTFIT,两个肽序列共有至少65%的序列一致性,优选至少80%或者90%的序列一致性,更优选至少95%的序列一致性或者更高(例如,99%的序列一致性或者更高)。优选,不同的残基位置区别在于保守氨基酸取代。

[0077] “结合干扰”用于涉及PDZ结构域与PL的第一结合相互作用,从而在诊断分析形式中形成复合物;其中,随后在必要的第二结合相互作用中检测该复合物,即,当第一结合相互作用抑制第二结合相互作用导致信号发生化合物产生的信号强度减弱时,产生干扰。本发明方法中该组合物发生的信号受到的结合干扰小于15%;优选,小于10%;和,最优选小于大约5%。

[0078] “捕获剂/分析物复合物”是由捕获试剂,例如PDZ结构域融合蛋白,和分析物,例如含有PL的流感病毒蛋白,特异结合产生的复合物。在“适于特异结合的条件下”,捕获试剂和分析物特异结合,即,一个与另一个,其中这种物理化学条件可以便利地根据例如盐浓度、pH、去污剂浓度、蛋白浓度、温度和时间表示。该条件适合于例如在溶液中使得结合发生;或者可选地,结合成员中的一种被固定到固相上。这种合适的典型条件在诊断领域是公知的,例如参见,Harlow和Lane,“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,ColdSpring Harbor,N.Y.(1989)。合适的条件优选导致结合相互作用的解离常数(K_D)小于大约 10^{-6} M;优选,小于大约 10^{-7} M;和,最优选小于大约 10^{-8} M。

[0079] “表面结合捕获试剂”与“固相捕获试剂”互换使用,用来指固定在固体基质表面的 PDZ 结构域或者 PL 捕获剂,所述固体基质例如,片层,珠子,或者其他结构,例如在下面更详细说明书的带孔板等。在某些实施方式中,此处使用的捕获剂的集合存在于相同支持物的表面上,例如,以其中表面上的特定位置对应于存在的特定表面结合捕获剂的阵列形式。

[0080] “分离的”或者“纯化的”通常指物质(化合物,多核苷酸,蛋白,多肽,多肽组合物)的分离,使得该物质在其存在的样本中占有显著的百分比(例如,大于 2%,大于 5%,大于 10%,大于 20%,大于 50%,或者更高,通常直到大约 90% -100%)。在某些实施方式中,基本上纯化的成份包括样本的至少 50%,80% -85%,或者 90-95%。用于纯化感兴趣的多核苷酸和多肽的技术在本领域是公知的,包括,例如,离子交换层析,亲和层析和密度沉降。通常,当相对于样本的其他成份,一种物质在该样本中存在的量是在自然界未发现的,则该物质被纯化。

[0081] “评价”,当用于该试验的背景时,是指评估试验结果和 / 或进行试验测定,以确定流感 A 病毒分析物是否存在于待测样本中。典型的评估包括“确定 (determining)”,“测定 (measuring)”,“评估 (evaluating)”和“分析 (assaying)”,它们可以互换使用,包括定量和 / 或定性测定。评价可以是相对的或者绝对的。“评价结合”包括检测结合相互作用的数量或者程度,以及,检测是否发生特定结合相互作用,即,结合是否存在。

[0082] “治疗”,是指将本发明的化合物对需要其的对象给药,目的是达到所需的药理和 / 或生理作用,例如,预防或者减轻一种或者多种疾病的症状(上文)。该治疗可以采用预防方式给药,即,预防一种或者多种疾病症状的发展;和 / 或,治疗以缓解或者消除疾病的症状。需要其治疗的对象包括人类和家养动物。

[0083] 此处使用的“受试者”,是指人类和家养动物,例如哺乳动物,鱼,鸟,爬行动物,两栖动物等等。

[0084] “信号发生化合物”,缩写为“SGC”,是指可以连接到 PL 或者 PDZ 的分子(例如利用下面披露的化学连接方法),并且能够在本公开的分析法中反应形成可检测的化学或者物理实体(即,反应产物)。反应产物的典型实例包括沉淀物、荧光信号、具有颜色的化合物,等等。典型 SGC 包括例如,生物发光化合物(例如,荧光素酶),荧光团(例如,如下文),生物发光和化学发光化合物,放射性同位素(例如, ^{131}I , ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{32}P ,等等),酶(例如,如下文),结合蛋白(例如,生物素,抗生物素蛋白,链霉亲和素等等),磁性颗粒,化学反应性化合物(例如,着色染料),标记的寡核苷酸;分子探针(例如,CY3,Research Organics, Inc.),等等。典型的荧光团包括异硫氰酸荧光素,琥珀酰荧光素,若丹明 B,丽丝胺(lissamine),9,10-二苯基蒽,二萘嵌苯,红荧烯,芘和其荧光衍生物例如异氰酸酯,异硫氰酸酯,酰氯或者磺酰氯,伞形酮,镧系元素例如铕(Eu)的稀土螯合物,等等。可用于信号发生结合物的典型 SGC 包括下列中的酶:1 类 IUB,尤其是 1.1.1 和 1.6(例如,乙醇脱氢酶,甘油脱氢酶,乳酸脱氢酶,苹果酸脱氢酶,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶等等);1.11.1 类 IUB(例如,过氧化氢酶,过氧化物酶,氨基酸氧化酶,半乳糖氧化酶,葡萄糖氧化酶,抗坏血酸氧化酶,心肌黄酶,尿素酶等等);2 类 IUB,尤其是 2.7 和 2.7.1(例如,己糖激酶等等);3 类 IUB,尤其是 3.2.1 和 3.1.3(例如, α 淀粉酶,纤维素酶, β -半乳糖透明质酸酶(galacturonidase),淀粉葡萄糖苷酶, β -葡糖醛酸酶,碱性磷酸酶,酸性磷酸酶等等);4 类 IUB(例如,裂解酶);5 类 IUB,尤其是 5.3 和 5.4(例如,磷酸葡萄糖异构酶,磷酸

丙糖酶异构酶 (trios phosphatase isomerase), 磷酸葡萄糖变位酶等等)。信号发生化合物还包括其产物可以通过荧光和化学发光波长检测的 SGC, 例如, 荧光素酶, 荧光发射金属例如 ^{152}Eu , 或者镧系的其他; 化合物例如鲁米诺, 异鲁米诺, 吡啶鎓盐, 等等; 生物发光化合物例如荧光素; 荧光蛋白; 等等。荧光蛋白包括, 但不限于下列: 即, (i) 绿色荧光蛋白 (GFP), 即, 包括但不限于, GFP 的“人源化”形式, 其中天然存在的核苷酸序列的密码子被改变成更密切匹配人密码子偏差; (ii) 源于维多利亚多管水母 (*Aequoria victoria*) 的 GFP 和其衍生物, 例如, “人源化”衍生物例如增强的 GFP, 它是商品化提供的, 例如, 来自 Clontech, Inc.; (iii) 来自其他种类例如海肾 (*Renilla reniformis*), *Renilla mulleri*, 或者 *Ptilosarcus guernyi* 的 GFP, 如 W099/49019 和 Peelle 等人 (2001) *J. Protein Chem.* 20:507-519 所描述; (iv) “人源化”重组 GFP (hrGFP) (Stratagene); 和, (v) 来自珊瑚虫 (Anthozoan) 种类的其他荧光和有色蛋白, 例如 Matz 等人 (1999) *Nature Biotechnol* 17:969-973 所描述那些; 等等。该信号发生化合物可以偶联到 PL 或者 PDZ 结构域多肽。可以通过金属螯合基团例如 EDTA 实现某些 SGC 与蛋白的连接。该 SGC 都具有允许检测和 / 或定量待测样本中流感 PL 分析物的共同特性。利用目视法可以检测该 SGC; 优选, 适于自动化的方法例如分光光度法, 荧光法, 化学发光法, 电纳米方法 (electrical nanometric method) 包括例如, 电导、阻抗、电阻等等的变化和磁场方法。

[0085] 此处使用的“固相”是指可以静电、疏水或者共价连接一种或者多种反应物的表面。典型的固相包括例如: 尼龙 6; 尼龙 66; 聚苯乙烯; 胶乳珠; 磁性珠; 玻璃珠; 聚乙烯; 聚丙烯; 聚丁烯; 丁二烯-苯乙烯共聚物; 硅橡胶; 聚酯; 聚酰胺; 纤维素和衍生物; 丙烯酸酯; 甲基丙烯酸酯; 聚乙烯; 氯乙烯; 聚氯乙烯; 聚氟乙烯; 聚苯乙烯共聚物; 硅凝胶; 硅片玻璃; 琼脂糖; 右旋糖苷; 脂质体; 不溶蛋白金属; 和, 硝化纤维素。典型的固相包括形成珠子、管、条带、圆盘、滤纸、板等等的那些。滤器可用于捕获分析物例如作为滤液, 或者通过截留起作用, 或者通过将 PL 或者 PDZ 共价结合到滤器上起作用 (例如, 参见下面的实施例部分)。根据本发明的某些实施方式, 配给用户的固相捕获试剂可以由包被“捕获试剂”(下文)的固相(上文)组成, 并进行包装 (例如, 在氮气气氛下) 以保存和 / 或最大化捕获试剂与生物样本中流感 PL 分析物的结合。

[0086] “捕获试剂”是指能够结合流感 PL 的固定 PDZ 多肽 (或者肽)。该捕获试剂可以由 PDZ 溶液; 或者修饰以促进其与固相结合 PDZ; 或者已经固定在固相表面上的 PDZ 组成, 所述固定在固相表面上的 PDZ 例如, 通过静电力、范德华力、疏水力、共价化学键等等 (如下面进一步披露) 将 PDZ 连接到固相 (上文) 来固定。PDZ 捕获试剂的典型实例在下面的实施例部分公开, 包括活动的固相 PDZ 捕获试剂, 例如固定在活动的胶乳珠上的 PDZ, 例如在胶乳珠浸染棒 (dipstick) 分析中。

[0087] “检测试剂”是指一种结合物, 包含连接到 PL 或者 PDZ 多肽或者肽的 SGC; 或者, 连接到能够特异结合 PL 或者 PDZ 的抗体的 SGC。该检测试剂的典型实例包括一种或者多种 PL 或者 PDZ 与一种或者多种 SGC 化合物的复合物, 即, 高分子复合物。有关检测试剂包括活动的固相检测试剂, 例如胶乳珠浸染棒分析中活动的胶乳珠。

[0088] “生物样本”是指从活的 (或者死的) 生物体, 例如, 哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物、有袋类动物等等获得的样本。生物样本包括组织液, 组织切片, 空气或者水中带有的生物材料, 并例如通过过滤、离心等等从中收集, 例如, 用于评价生物恐怖威胁等等。备选的生物样

本可以取自胎儿或者卵,卵黄和羊水。典型生物液体包括,例如尿液,血液,血浆,血清,脑脊液,精液,肺灌洗液,粪便,痰,粘液,含水生物材料等等。或者,生物样本包括鼻咽或者口咽拭子,鼻灌洗液,来自气管、肺、肺泡、肠、脾、肾、大脑、肝和心脏的组织,痰,粘液,含水生物材料,泄殖腔拭子,痰,鼻和口腔粘液,等等。典型的生物样本还包括食品,例如,肉、加工食品、家禽、猪等等的样本。生物样本还包括污染的溶液(例如,食品加工溶液等等),来自门诊场所、医院、诊所、食品加工场所(例如,饭店,屠宰场,冷藏库,超级市场包装等等)的拭样。生物样本还可以包括原位组织和体液(即,不是收集用于检验的样本),例如,该方法可用于检测眼睛中病毒感染的存在或者严重性,例如,利用滴眼剂,将测试条(test strips)直接用于结膜;或者,通过例如将指示剂胶囊置于检验对象的口或者鼻咽,检测肺感染的存在或者程度。或者,拭子或者测试条可以置于口中。生物样本可以来源于对象的任意组织,器官或者细胞群。在一些实施方式中,从对象获得刮片、活组织切片或者灌洗液。生物样本可以包括体液例如血液,尿液,痰液,和口腔液体;和样本例如鼻洗涤液、拭子或者抽吸物,气管抽吸物,下疳拭子,和大便样本。适于目标个体病原体检测的生物样本的收集方法是本领域技术人员已知的,例如鼻咽样本例如鼻拭子、洗涤液或者抽吸物,或者,在涉及呼吸系统疾病的高危流感A病毒情况下的气管抽吸物,口腔拭子等等。因此,本发明的实施方式提供可用于检测各种不同类型的生物样本中流感A污染或者感染的存在或者量的方法。任选,生物样本可以悬浮在包含抗生素例如青霉素、链霉素、庆大霉素和制霉菌素的等渗溶液中。

[0089] 此处使用的“配体”是指能够结合PDZ结合位点的PL化合物。配体的典型实例包括包含PL的复合病毒颗粒(上文),该颗粒发现于各种不同的流感A株中。该配体能够填满PDZ结构域结合位点处的三维空间,使得静电斥力被最小化,静电引力被最大化,疏水性和氢键键合力被最大化。配体以特异和可饱和的方式结合PDZ多肽,并且结合亲合力可以根据本领域技术人员已知的配体结合检测法测定,例如下面所公开的。

[0090] “特异性”,当用于本发明实施方式的分析背景时,是指根据本发明步骤进行的该分析,能够从一组生物样本(例如,100个样本的组)中正确鉴定出样本的“指示”百分比。该样本组全部包含一种或者多种胞壁质分析物(例如,细菌或者真菌污染的阳性对照样本)。优选该“指示”特异性大于85%,(例如,分析法能够指示100个样本中大于85个包含一种或者多种胞壁质分析物),并最优选,该分析法的指示特异性大于90%。任选,该分析法能够鉴别“真正的非流感A病例”,即,从生物样本组(例如,100个样本的组)中检测出阴性样本的“指示”百分比。优选,本发明的该步骤能够正确鉴定出“真正的非禽流感A病例”;和最优选,本发明的该步骤能够正确鉴定出“真正的低致病性禽流感A病例”。在不同的实施方式中,样本的阴性对照组或者不包含流感A PL分析物;或者,包含非禽流感A PL分析物;或者,包含非致病的流感PL。优选该特异性大于85%,(例如,分析法能够指出100个样本中超过85个),和最优选,该检测法的特异性大于90%。

[0091] “特异性”,当用于本发明实施方式的背景时,是指根据本发明步骤进行的该分析法能够从一组包含阳性对照(上文)和阴性对照(即,缺失PL分析物)的样本组中鉴定出“指示”百分比的包含流感PL分析物的那些样本。优选该“指示”的灵敏度大于85%和最优选大于90%。任选,该分析法能够从一组样本中以包含流感PL分析物的那些样本的“指示”百分比鉴定出“真正的流感A病例”。优选,本发明的该步骤能够正确的鉴定出“真正的

禽流感 A 病例”；和，最优选，本发明的该步骤能够正确的鉴定出“真正的致病性禽流感 A 病例”。在不同的实施方式中，样本的阳性对照组包含流感 A PL 分析物；或者，包含禽流感 APL 分析物；或者，包含高致病性的流感 A PL。优选该“指示”灵敏度大于大约 70% 和更优选大于大约 80%。甚至更优选，灵敏度大于大约 85% 和最优选大于对照灵敏度的大约 90%。或者，该灵敏度可以参照鉴定相同蛋白的 PCR 反应的灵敏度测定。

[0092] 就特异性和灵敏度而言，任选可以运用下列定义：

[0093] “阳性预测值”，缩写为 PPV，是指在本方法中检测为阳性并且是真正禽流感 A 病例的样本的百分比。优选，本方法的 PPV 大于约 65%，和最优选的大于约 80%。

[0094] “阴性预测值”，缩写为 NPV，是指检测为阴性并且是真正阴性流感 A 病例的样本的百分比。优选，本方法的 NPV 大于约 85%，和最优选大于约 90%。

[0095] 当涉及生物样本时，“真正阳性流感 A”是指两个或者更多个独立试验确认的包含流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚鸡卵中分离和培养，在商业化免疫测定法、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原来鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，在呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者流感 A 抗原的免疫荧光检测。

[0096] 当涉及生物样本时，“真正阳性禽流感 A”是指两个或者更多个独立试验确认的包含禽流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚鸡卵中分离和培养，在商业化免疫分析试验、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原来鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，在呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者禽流感 A 抗原的免疫荧光检测。

[0097] 当涉及生物样本时，“真正阳性高致病性禽流感 A”是指如上文定义并由两个或者更多个独立试验确认的包含高致病性禽流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚鸡卵中分离和培养，在商业化免疫分析试验、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原来鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，在呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者禽流感 A 抗原的免疫荧光检测。

[0098] 当涉及生物样本时，“阴性禽流感 A”是指两个或者更多个独立试验确认的不包含禽流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚鸡卵中分离和培养，在商业化免疫分析试验、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原来鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者流感 A 抗原的免疫荧光检测。

[0099] 当涉及生物样本时，“真正阴性禽禽流感 A”是指两个或者更多个独立试验确认的不包含禽流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚小鸡卵中分离和培养，在商业化免疫分析试验、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者流感 A 抗原的免疫荧光检测。在这种情况下，生物样本可能包含除了禽流感 A 病毒颗粒以外的流感 A 病毒颗粒，即，如上文定义。

[0100] 当涉及生物样本时，“真正阴性高致病性禽流感 A”是指如上定义并且由两个或者更多个独立试验确认的不包含高致病性禽流感 A 病毒颗粒的样本，所述试验例如，在含胚小鸡卵中分离和培养，在商业化免疫分析试验、免疫扩散、红细胞凝集和 / 或红细胞凝集抑制试验中鉴定病毒抗原来鉴别 HA 和 / 或 NA 亚型，呼吸器官标本的细胞中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测或者流感 A 抗原的免疫荧光检测。但是该样本可能包含上文定义的流感 A 病毒颗粒或

者较低致病性的禽流感 A 病毒颗粒。

[0101] 当用于本发明实施方式的试验法情况下时,“背景”是指试验结果中的不确定性,(有时表示为假阳性或者假阴性结果的百分比或者通过测定试验结果的置信度),是由试验中存在可能干扰分析的正确运行的物质时产生的。可能起干扰作用的物质,即,干扰物质、混淆(confounding)物质等的典型实例包括内源性 PDZ 结合多肽,信号发生化合物的抑制剂或者底物,例如,酶抑制剂,自由基反应性化合物,内源性过氧化物等等。

[0102] 此处使用的“基本上纯化的”是指包含非天然状态的天然 PDZ 或者 PL 多肽或者肽的制剂,例如其纯度高于自然界中的水平。典型的比天然样本中记载的更高水平的纯度包括 PDZ 和 PL 多肽和其片段,相对于存在于天然来源材料中的水平,它们被富集大于约 10 倍到约 25 倍,优选的大于约 26 倍到约 50 倍,和最优选大于约 100 倍。该制剂还优选包含小于约 10% 的杂质,和最优选小于约 5% 的可检测杂质,例如通过 SDS-PAGE 或者反相 HPLC。

[0103] 先前已经确定并在 NCBI 的 Genbank 数据库中电子储存的核酸和蛋白序列在此通过 Genbank 检索号(GI)引入作为参考。在那些 Genbank 项目中披露的序列集合为了一切目的在此完整引入作为参考。申请人明确保留以后修改说明书以具体列举一种或者多种这些序列、或者其任意标明部分的权利。

[0104] 此处涉及的各种生化和分子生物学方法都是本领域公知的,并且描述于,例如,Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y. 第二(1989)和第三(2000)版,和 *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, F. M. 等人编著) John Wiley & Sons, Inc., New York (1987-1999)。

[0105] 核酸可以是 DNA 或者 RNA, 和单链或者双链。寡核苷酸可以是天然存在或者合成的,但通常通过合成方法制备。优选的本发明的核酸包括 DNA 片段,或者它们的互补序列(complement),包括如表 12 所示的包含 Ser70 的 NS2 序列中的任意一个。该片段通常在 5 和 100 个连续碱基之间,并且范围经常在 5, 10, 12, 15, 20, 或者 25 个核苷酸到 10, 15, 30, 25, 20, 50 或者 100 个核苷酸之间。5-10, 5-20, 10-20, 12-30, 15-30, 10-50, 20-50 或者 20-100 个碱基之间的核酸是常见的。多态性位点可以存在于片段内的任意位置。该片段可以来自于表 12 所示的 NS2 的任意等位基因形式。为了在表中简便起见,符号 T 用于代表 DNA 中的胸腺嘧啶和 RNA 中的尿嘧啶。因此,在 RNA 寡核苷酸中,符号 T 应解释为表示尿嘧啶残基。

[0106] 杂交探针能够以碱基特异方式结合核酸的互补链。这种探针包括核酸,肽核酸,如 Nielsen 等人于 *Science* 254, 1497-1500 (1991) 的描述。

[0107] 术语引物是指一种单链寡核苷酸,它能够在合适条件(即,存在 4 种不同的核苷三磷酸和聚合剂,例如, DNA 或者 RNA 聚合酶或者逆转录酶)、合适缓冲液和合适温度下,作为模板指导的 DNA 合成起始点。引物的适合长度取决于引物的打算用途,但范围通常在 15 到 40 个核苷酸之间。短的引物分子通常需要较冷的温度以便与模板形成足够稳定的杂交复合物。引物无须反映模板的精确序列,但必须足够互补以便与模板杂交。术语引物位点是指与引物杂交的靶 DNA 区域。术语引物对是指包括 5' 上游引物和 3' 下游引物的引物组, 5' 上游引物与待扩增的 DNA 序列的 5' 端杂交, 3' 下游引物与待扩增的序列的 3' 端互补序列杂交。

[0108] 多态性是指病毒种群中两种或更多遗传确定的可变序列或者等位基因的存在。第一个鉴定的等位基因形式被随意命名为参照形式,而其他等位基因形式被命名为可变或者

变体等位基因。在这种情况下,多态性包括 70 位,其中甘氨酸被替换为丝氨酸。

[0109] 单核苷酸多态性发生在被单核苷酸占据的多态性位点,这是等位基因序列之间的变异位点。该位点通常在等位基因高度保守序列(例如,种群成员中变化小于 1/100 或者 1/1000 的序列)的前后。

[0110] 单核苷酸多态性通常由于多态性位点处一个核苷酸取代另一个而产生。转换(transition)是一种嘌呤被另一种嘌呤或者一种嘧啶被另一种嘧啶替换。颠换(transversion)是一种嘌呤被一种嘧啶替换,或者反之亦然。单核苷酸多态性还可以源于相对于参照等位基因的核苷酸的缺失或者核苷酸的插入。

[0111] 一组多态性是指至少 2 个,和有时 5 个,或者更多的如表 12 或者 13 和 / 或表 3a-e 所示的多态性。

[0112] 杂交通常在严谨条件下进行,该条件允许寡核苷酸和靶 DNA 之间的特异结合,靶 DNA 包含如表 12 或者 13 和 / 或表 3a-e 所示的多态性位点中的一种。严谨条件定义为任意合适的缓冲液浓度和温度以及任意去除寡核苷酸非特异性结合的洗涤条件,所述缓冲液浓度和温度允许寡核苷酸能够与高度同源的序列特异杂交,该序列跨越至少一个如表 12 或者 13 所示的多态性位点。例如,5×SSPE(750mM NaCl,50mM 磷酸钠,5mM EDTA,pH 7.4)和温度 25-30℃的条件适于等位基因特异探针的杂交。

[0113] 通常洗涤条件的范围从室温到 60℃。

[0114] 术语引物是指一种单链寡核苷酸,它能够在合适条件(即,存在 4 种不同的核苷三磷酸和聚合试剂,例如, DNA 或者 RNA 聚合酶或者逆转录酶)、合适缓冲液和合适温度下,作为模板指导的 DNA 合成起始点。引物的适合长度取决于引物的打算用途,但范围通常在 15 到 30 个核苷酸之间,尽管也可以使用更短或者更长的引物。短的引物分子通常需要较冷的温度以便与模板形成足够稳定的杂交复合物。引物无须反映模板的精确序列,但必须足够互补以便与模板杂交。术语“引物位点”是指与引物杂交的靶 DNA 区域。术语“引物对”是指包括 5' 上游引物和 3' 下游引物的引物组,5' 上游引物与待扩增的 DNA 序列的 5' 端杂交,3' 下游引物与待扩增 DNA 序列的 3' 端互补序列杂交。

[0115] 为将氨基酸取代分类为保守或者非保守,氨基酸分组如下:组 I(疏水性侧链):正亮氨酸,甲硫氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸;组 II(中性亲水性侧链):半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸;组 III(酸性侧链):天冬氨酸,谷氨酸;组 IV(碱性侧链):天门冬酰胺,谷氨酰胺,组氨酸,赖氨酸,精氨酸;组 V(影响链取向的残基):甘氨酸,脯氨酸;和组 VI(芳香族侧链):色氨酸,酪氨酸,苯丙氨酸。保守取代包括同类氨基酸之间的取代。非保守取代是由这些类型中一种的成员交换另一成员构成。

[0116] 此处叙述的方法可以按照所叙述事件的任意次序进行,即,达到这样的顺序逻辑上可行的程度。此外,当提供范围数值时,应当清楚,在所述范围上下限之间的每个居间值,以及落在该范围内的任意其他提及的或者居间的值都包括在本发明内。同时,预期所述的本发明改变的任何任选特征可以阐明并独立提出权利要求,或者与此处描述的任意一个或者多个特征结合。

[0117] 指示单个物品包括存在有多个相同物品的可能性。更具体地,如此处和所属权利要求中使用的,单数形式“一个”、“所述(said)”和“该(the)”包括复数指示,除非上下文明显另有规定。还应注意,可以起草权利要求以排除任何任选元素。因而,对于权利要求元

素的叙述相关的排它术语如“唯一”“只有”等的使用,或者“负性”限制的使用,本声明意在作为前提基础。

[0118] 发明详述

[0119] 本发明的前提部分基于注意到流感 NS1 蛋白具有 PL 区,该 PL 区与哺乳动物 PDZ 蛋白相互作用,并且不同的 PL 模体与不同的 PDZ 蛋白特异性相互作用。本发明的前提还部分地基于以下结果:在身体分泌物例如鼻分泌物中能够发现可检测水平的 NS1 PL 蛋白。流感 A 夺取正常宿主细胞的功能,并引起导致致病性的变化。已发现某些致病性流感株具有非结构 NS1 蛋白,该蛋白含有结合哺乳动物 PDZ 蛋白的配体模体。作为急性毒力因子,NS1 蛋白可能干扰或者转变宿主细胞高分子蛋白复合物的 PDZ 蛋白组装。因为 PDZ 蛋白还通常参与分子伴侣、内吞和分泌过程,此处公开的证据有力支持以下观点:毒性流感株破坏基于细胞 PDZ 的调节机制。本发明提供新的诊断组合物和方法,以及,治疗性抗病毒靶位和候选化合物。

[0120] 本结果显示特异 PDZ 蛋白与流感 NS1 的结合具有高亲合力和特异性。PDZ 蛋白与毒性而不是非毒性流感 A 株中的 C 端三-和四-肽 NS1 模体结合。为了说明该方法,利用重组 PDZ 蛋白和交叉反应的抗 NS1 单克隆抗体,构建嵌合分析以区别致病性和非致病性流感 A 株(又称为毒性的和非毒性的)。该分析方法包括将对象的待测样本与包含 PDZ 结构域的多肽接触,并检测样本中的致病性流感 A NS1 PDZ 配体是否结合 PDZ 配体多肽。包含 PDZ 的多肽和病毒 PDZ 配体之间的结合表明 NS1 来自于流感 A 的毒性株。当对患者样本进行试验时,该结果表明对象感染了流感 A 病毒的致病株。该分析特别适合于鉴定 H5 和 / 或 H7 致病株。更优选该分析鉴定至少一种致病株,包括 H5N1、H7N2、H7N7、H10N7,并最优选该分析鉴定 H5N1 株。更优选,该分析鉴定禽类株的致病株,例如当前造成禽流感的 H5N1,其具有 NS1 PL 模体 ESEV (SEQ ID NO :2)。

[0121] 不同的流感 A 株编码具有不同 PDZ 配体 (PL) 的蛋白。因此不同的流感 A 株可以根据它们的 PL 进行区分。因此,本发明还提供通过与特异 NS1 PL 类型的关系,确定流感病毒亚型的方法。还提供检测人类对象是否感染禽流感病毒 H5N1 株的方法。还提供鉴定抗病毒剂的分析法。因为该方法检测只在感染细胞内部产生的病毒 NS1 抗原,所以该方法可用于筛查,以检测当前被感染的对象。该方法是特别有利的,因为与其他方法不同,它可以区别已免疫和被感染的对象。被感染的对象具有病毒 NS1 抗原,而已免疫的则没有。最优选,该方法能够区别禽流感 A 病毒的不同亚型,以鉴定(即,具有阳性分析结果)一种或者多种高致病性禽流感 A 株,如果它们存在于生物样本中。优选,该分析方法包括例如,在商业化屠宰场、农场或者养殖场监控禽类对象感染高致病性禽流感 A 株例如 H5N1 或者 H7 的步骤。在其他实施方式中,本发明通过鉴定被感染的动物并除去和 / 或销毁和 / 或治疗它们以预防传染其他对象,而提供预防在大量对象中流行的流感 A 病毒传播的方法。优选,该方法包括区分感染了高致病性流感 A 株,例如禽类亚型如 H5N1,与那些感染了较低致病性株的禽类和人类对象。

[0122] 此外本发明提供检测对象是否感染流感病毒;和 / 或,受试者是否感染高危流感 A 病毒的禽类株的方法。该方法包括将来自对象的待测样本与特异识别 NS1 PL 的 PDZ 结构域多肽、抗体和 / 或适配体和 / 或其他试剂接触,并检测待测样本中的分析物与 PDZ 结构域多肽、抗体和 / 或适配体之间是否发生结合相互作用。评价和检测该结合相互作用可用于

确定待测样本包含流感病毒 PL ;从而确认受试者被感染。该方法还可以在流感 A 病毒株之间进行区分,例如评价对象是否感染高危禽流感病毒株(致病性)例如 H5N1,或者,感染较低危的 H1N1 株(无致病性)。还提供在鉴定药物抗病毒化合物,例如药物开发中有用的筛选分析法。因此,本发明发现了在各种诊断和治疗应用中的用途。

[0123] I. 流感病毒

[0124] 流感病毒属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae),并基于它们核蛋白(NP)和基质蛋白(M1)的抗原差异分为 A、B 和 C 组。进一步分型到株通常基于对存在于两个毒粒糖蛋白中的抗原类型,即,红细胞凝集素(HA ;H)和神经氨酸苷酶(NA ;N)进行评价。HA 和 NP 是毒性因子,介导病毒粒子与宿主细胞表面的连接。M1 蛋白被认为在病毒组装和出芽中起作用,而 NP 在 RNA 复制和转录中起作用。除这些毒粒蛋白之外,两个其他非结构(即非毒粒)蛋白在病毒感染细胞中表达,它们被称为非结构蛋白 1 和 2(NS1 ;NS2)。非结构病毒蛋白 NS1 具有多重功能,包括调节剪接和核输出细胞 mRNAs 和刺激翻译,以及抵抗宿主干扰素能力。在流感病毒中已经鉴定和测序了 NS1 蛋白,该序列可以在 NCBI 数据库中查到。其他流感病毒中的 NS1 蛋白,是指与在已知流感亚型中鉴定为 NS1 的蛋白之一具有最大序列相似性的蛋白,使用的序列例如,genbank 检索号, CY003340, CY003324, DQ266101, 等等。

[0125] 全部禽流感病毒分类为 A 型。已经从人,猪,马和海洋哺乳动物以及家养和野生鸟类中分离出 A 型病毒。禽流感病毒是发生人流感大流行的关键因素,因为 1957 年的亚洲流行性感冒和 1968 年的香港流感都是由据认为是禽类来源的病毒引起。近年来, H5N1 和 H7N7 亚型的纯种禽流感病毒已经在香港和荷兰直接造成致命的人类疾病(Horimoto, T. 和 Kawaoka, Y. (2001) Clin. Microbiol. Rev. 14 :129-149 ;Guan, Y. 等人 (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 :8156-8161)。

[0126] II. PL 区

[0127] 下面的实施例显示,流感病毒病原体包含具有 PDZ 配体的模体的病毒蛋白,所述 PDZ 配体结合 PDZ 蛋白。具有 PL 模体的病毒蛋白,包括红细胞凝集素(HA),核蛋白(NP),基质 1(M1)和非结构蛋白 1(NS1)蛋白。但是, II 型 PL 模体(全部,单除了 NS1 蛋白)显示与 PDZ 蛋白较弱的结合。通常在蛋白最后 3 或者 4 个 C 末端氨基酸处发现 PL 模体。在大多数流感 NS1 蛋白中发现的可鉴别模体是 S/T-X-V/I/L,其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸, X 是任意氨基酸。各特异性模体的频率在实施例 1 和表 3a-e 中显示。尽管 EPEV(SEQ ID NO :27)和 KMAD(SEQ ID NO :28)不对应于典型的 PL 模体,但它们在一定程度上结合 PDZ,并且也能用于鉴定。表 3a-e 和图 1-3 的结果显示了通过 H 和 N 抗原鉴别的亚型和相应 NS1 PL 模体之间的非随机关系。特异 NS1 PL 模体此处被称为 NS1PL 类。

[0128] III. PDZ 蛋白

[0129] 最近已经显示 PDZ 结构域是细胞质膜蛋白复合物的主要组织者。最初鉴定 PDZ 结构域为突触后密度蛋白 PSD95/SAP90、果蝇肿瘤抑制物 dig-A 和紧密连接蛋白 ZO-1 内的保守序列元件。尽管最初被称为 GLGF(SEQ ID NO :26)或者 DHR 模体,但现在它们已知为代表前 3 个包含 PDZ 的蛋白(PDZ :PSD95/DLG/ZO-1)的缩写。现在这些 80-90 个氨基酸的序列已在超过 75 种蛋白中得到了很好的鉴定,并在单个蛋白内特征性地多拷贝表达。PDZ 结构域被国家生物技术信息中心(theNational Center for Biotechnology Information)

(www.ncbi.gov) 识别为家族,例如在 Pfam 中。还发现它们存在于不同生物体的整个系统发育中,如多细胞动物、植物和细菌。这种广泛的物种分布好象是只有这种结构域特有的,但或许 PDZ 结构域最区别性特征在于观察到绝大多数包含它们的蛋白与胞质膜相关。尽管在许多不同结构中发现了 PDZ 结构域,但各 PDZ 蛋白通常局限于特定的亚细胞结构域,例如突触;细胞-细胞接触;或者顶端、底部或者侧部的细胞表面。这引出一种推测,即 PDZ 结构域进化早,在组织胞质膜结构域中发挥主要作用。PDZ 结构域最普遍的功能可能是将它们配体定位到合适的胞质膜结构域。在极化上皮细胞中,PDZ 蛋白清楚地定位在不同的顶端、底部-侧部和结合的膜结构域,并且在大部分情况下,与它们的跨膜和细胞溶质结合伴侣共定位。显然 PDZ 蛋白还具有一个基本作用,在特定亚细胞结构域内空间簇聚集和锚定跨膜蛋白。

[0130] PDZ 结构域包含约 80-90 个残基,它们折叠成具有 5-6 个 β 链和两个 α 螺旋的 β -夹心结构。肽配体结合在由 β 链 (bB)、 α 螺旋和结合肽的羰基的环组成的疏水性裂缝 (cleft) 中。肽以反平行模式与 bB 链结合,C 末端残基占据疏水性袋。PDZ 杂二聚体形成线性的头尾 (head-to-tail) 排列,参与伴侣蛋白之一上内部构件 (internal) 的识别。PDZ 结构域蛋白在本领域是已知的,通过蛋白测序和鉴定 PDZ 结构域的存在,新的蛋白能够被鉴定为具有 PDZ 结构域。2004 年 8 月 2 日提交的美国专利申请 10/485,788 详细解释了 PDZ 蛋白,并给出了大量实例。或者,怀疑是 PDZ 蛋白的蛋白可以检测与各种 PL 蛋白或者 NS1PL 类的结合。

[0131] IV. PDZ/PL 相互作用

[0132] 来自流感的包含 PL 模体的 NS1 蛋白与实施例中所示的 PDZ 蛋白结合。实施例 2 显示了用于鉴定结合的方法。2004 年 8 月 2 日提交的美国专利申请 10/485,788 和 2003 年 11 月 14 日提交的 10/714,537 详细描述了检测 PDZ 结构域多肽和候选 PDZ 配体多肽之间结合的两个互补分析 (A 和 G 分析)。在两个不同分析的每一种中,检测具有对应于预期结合一种或者多种 PDZ 结构域的蛋白的 C 末端的序列的肽 (即候选 PL 肽),和 PDZ 结构域多肽 (通常是包含 PDZ 结构域的融合蛋白) 之间的结合。

[0133] A. 检测 PDZ 结构域多肽和 NMDA 受体 PL 蛋白之间相互作用的分析

[0134] 建立了两个称为“A”和“G”的互补分析来检测 PDZ 结构域多肽和候选 PDZ 配体之间的结合。在两个不同分析的每一种中,检测具有对应于预期结合一种或者多种 PDZ 结构域的蛋白 C 末端的序列的肽 (即候选 PL 肽) 和 PDZ 结构域多肽 (通常是包含 PDZ 结构域的融合蛋白) 之间的结合。在“A”分析中,固定候选 PL 肽并检测可溶 PDZ 结构域多肽与固定肽的结合 (“A”分析的命名是因以下事实:在一个实施方式中用抗生物素蛋白表面 (avidin) 固定肽)。在“G”分析中,固定 PDZ 结构域多肽,并检测可溶 PL 肽的结合 (“G”分析的命名是因为用 GST-结合表面固定 PDZ 结构域多肽)。下面描述示范性的分析。

[0135] I. “A 分析”利用固定 PL 肽检测 PDZ 配体结合。

[0136] 分析包括下列步骤:

[0137] (1) 将生物素化的候选 PL 肽固定在抗生物素蛋白包被的表面上。然后测定 PDZ 结构域融合蛋白与该表面的结合。

[0138] (2) 抗生物素蛋白与表面,例如蛋白结合表面结合。任选,通过每孔添加 100 μ L 溶于不含钙和镁的磷酸盐缓冲盐水 pH 7.4 (“PBS”, GibcoBRL) 的 20 μ g/mL 的抗生物素

蛋白 (Pierce), 在 4°C 12 小时, 将抗生物素蛋白结合到聚苯乙烯 96 孔板 (例如, Nunc Polysorb(cat#475094))。然后通过每孔添加 200 μ LPBS, 在 4°C 2 小时, 对板进行处理以阻断非特异性的相互作用, 所述 PBS 每 100mL 含有 2g 无蛋白酶牛血清白蛋白 (“PBS/BSA”)。然后对板的每孔重复添加每孔 200 μ LPBS, 用 PBS 洗板 3 次, 然后将板的内含物倒入废液器中, 在干燥表面上轻叩板。

[0139] (3) 通过每孔添加 50 μ L 溶于 PBS/BSA 的 0.4 μ M 肽, 在 4°C 30 分钟, 将生物素化的 PL 肽 (或者候选 PL 肽) 固定在板的孔表面上。通常, 各个不同的肽添加到至少 8 个不同的孔, 因此能够做出多重测量 (例如, 双份重复, 并且还利用不同的 GST/PDZ 结构域融合蛋白和单独的 GST 阴性对照), 并且还准备其他的阴性对照孔, 其中没有肽被固定。在 PL 肽固定到表面上后, 用 PBS 洗板 3 次。

[0140] (4) 通过每孔添加 50 μ L 包含溶于 PBS/BSA 的 5 μ g/mL GST/PDZ 结构域融合蛋白的溶液, 在 4°C 2 小时, 使得 GST/PDZ 结构域融合蛋白与表面反应。作为阴性对照, 添加单独的 GST (即不是融合蛋白) 到指定孔, 通常每个固定肽至少 2 个孔 (即双份重复测量)。反应 2 小时后, 用 PBS 洗板 3 次以去除未结合的融合蛋白。

[0141] (5) 可以利用本领域已知的各种方法和检测器检测 GST/PDZ 结构域融合蛋白与抗生物素蛋白-生物素化肽表面的结合。在一个实施方式中, 板中每孔添加 50 μ L 溶于 PBS/BSA 的抗 GST 抗体 (例如 2.5 μ g/mL 多克隆山羊抗 GST 抗体, Pierce), 使其在 4°C 反应 20 分钟。用 PBS 洗板 3 次, 添加第二种可检测的标记抗体。在一个实施方式中, 板中每孔添加 50 μ L 2.5 μ g/mL 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的多克隆兔抗山羊免疫球蛋白抗体, 使其在 4°C 反应 20 分钟。用包含 0.2% Tween 20 的 50mM Tris pH 8.0 洗板 5 次, 通过每孔添加 100 μ L HRP 底物溶液 (TMB, Dako), 在室温 (RT) 20 分钟显色。通过每孔添加 100 μ L 1M 硫酸终止 HRP 和其底物的反应, 在 450nm 读出板上各孔的光密度 (O. D.)。

[0142] (6) 通过对来自 PL 肽和 PDZ 结构域多肽组合的孔中信号与背景信号进行比较, 检测 PL 肽和 PDZ 结构域多肽的特异结合。背景信号是阴性对照中发现的信号。典型的特异或者选择性反应至少两倍于背景信号, 更典型的超过 5 倍于背景信号, 和最典型的是 10 倍于或者更多倍于背景信号。此外, 统计上有显著意义的反应包括多次测量的信号和背景相差至少两个标准误差的反应, 更典型的是 4 个标准误差, 和最典型的是 6 个或者更多个标准误差。相应地, 比较信号的重复测定与背景的重复测定的统计检验 (例如 T- 检验) 将得出 p 值 < 0.05 , 更典型的是 p 值 < 0.01 , 和最典型的是 p 值 < 0.001 或者更低。如所述, 在 “A” 分析的实施方式中, 来自 GST/PDZ 结构域融合蛋白与未接触 (即未被覆盖) PL 肽的抗生物素蛋白表面相结合的信号是一个合适的阴性对照 (有时称为 “B”)。来自单独 GST 多肽 (即不是融合蛋白) 与已经接触 (即被覆盖) PL 肽的包被抗生物素蛋白的表面相结合的信号是第二种合适的阴性对照 (有时称为 “B2”)。因为所有的检测都进行多次 (即至少两次), 用几次检测的算术平均值 (或者, 相当于, 平均) 确定结合, 用平均值的标准误差确定结合检测中的概率误差。N 次检测的平均值的标准误差等于下列的平方根: 各检测值和平均值之间差值的平方和, 除以 (N) 和 (N-1) 的乘积。因此, 在一个实施方式中, 通过将特定 PL-PDZ 组合的平均信号 (“平均 S”) 和信号的标准误差 (“SE”) 与平均值 B1 和 / 或平均值 B2 进行比较, 确定 PDZ 蛋白与板结合 PL 肽的特异结合。

[0143] II. “G 分析”-利用固定 PDZ 结构域融合多肽的 PDZ 配体结合检测

[0144] 在一方面,本发明提供一种检测法,其中 GST/PDZ 融合蛋白被固定在表面上(“G”分析)。然后测量标记 PL 肽(例如图 3a-e 中所列那些中的一种)与该表面的结合。在一个优选的实施方式中,该分析法按下列步骤进行:

[0145] (1) 将 PDZ 结构域多肽结合到表面,例如蛋白结合表面。在一个优选的实施方式中,包含一个或多个 PDZ 结构域的 GST/PDZ 融合蛋白与聚苯乙烯 96 孔板结合。能够通过任意不同的标准方法将 GST/PDZ 融合蛋白结合到板上,尽管需要小心操作使融合蛋白结合到板的步骤不改变 PDZ 结构域的配体结合性质。在一个实施方式中, GST/PDZ 融合蛋白通过包被在 96 孔板上的抗 GST 抗体来结合。当按下列操作时可以实现与板的充分结合:

[0146] a. 聚苯乙烯 96 孔板(例如, Nunc Polysorb) 中每孔添加 100 μ L 溶于 PBS 的 5 μ g/mL 山羊抗 GST 多克隆抗体(Pierce), 在 4 $^{\circ}$ C 12 小时。

[0147] b. 每孔添加 200 μ L PBS/BSA, 在 4 $^{\circ}$ C 2 小时, 对板进行封闭。

[0148] c. 用 PBS 洗板 3 次。

[0149] d. 板上每孔添加 50 μ L 溶于 PBS/BSA 的 5 μ g/mL GST/PDZ 融合蛋白或者作为阴性对照的单独 GST 多肽(即不是融合蛋白), 在 4 $^{\circ}$ C 2 小时。

[0150] e. 再用 PBS 洗板 3 次。

[0151] (2) 通过每孔添加 50 μ L 溶于 PBS/BSA 的 20 μ M 生物素化的肽溶液, 使生物素化的 PL 肽与表面在 4 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟, 然后再在 25 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。用冰冷的 PBS 洗板 3 次。

[0152] (3) 可以利用本领域技术人员已知的各种方法和检测器检测生物素化的肽与 GST/PDZ 融合蛋白表面的结合。在一个示范性步骤中, 每孔添加 100 μ L 溶于 BSA/PBS 的 0.5 μ g/mL 链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP) 结合物, 在 4 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。然后用包含 0.2% Tween 20 的 50mM Tris pH8.0 洗板 5 次, 通过每孔添加 100 μ L HRP 底物溶液(TMB, Dako) 在室温(RT) 20 分钟显色。通过每孔添加 100 μ L 1M 硫酸终止 HRP 和其底物的反应, 在 450nm 处读出板上各孔的光密度(O. D.)。

[0153] (4) 通过对来自 PL 肽和 PDZ 结构域多肽组合的孔中的信号与背景信号进行比较, 确定 PL 肽和 PDZ 结构域多肽的特异结合。背景信号是阴性对照中发现的信号。典型的特异性或者选择性反应至少两倍于背景信号, 更典型的超过 5 倍于背景信号, 和最典型的是 10 倍于或者更多倍于背景信号。此外, 统计上有显著意义的反应包括多次测量得到信号和背景相差至少两个标准误差的反应, 更典型的是 4 个标准误差, 和最典型的是 6 个或者更多个标准误差。相应地, 比较信号的重复测定与背景的重复测定的统计检验(例如 T- 检验) 将得出 p 值 < 0.05 , 更典型的是 p 值 < 0.01 , 和最典型的是 p 值 < 0.001 或者更低。如所述, 在“G”分析的实施方式中, 来自给定 PL 肽与固定的(表面结合的) 单独 GST 多肽结合的信号是合适的阴性对照(有时称为“B1”)。因为所有的测定都进行多次(即至少两次), 用几次检测的算术平均值(或者, 相当于, 平均) 确定结合, 并用平均值的标准误差确定结合测定中的概率误差。N 次检测平均值的标准误差等于下列的平方根: 各检测值和平均值之间差值的平方和, 除以 (N) 和 (N-1) 的乘积。因此, 在一个实施方式中, 通过将特定 PL-PDZ 组合的平均信号(“平均 S”) 和信号的标准误差(“SE”) 与平均值 B1 进行比较, 确定 PDZ 蛋白与板结合肽的特异结合。

[0154] i) “G’ 分析” 和 “G” 分析”

[0155] 上文描述的“G 分析”特定条件的两种特定改变尤其有用。改变的分析法使用更少

量的标记 PL 肽,并且相对上文描述的特定分析条件,对 PDZ 配体结合的检测的生化要求略有不同。

[0156] 为了方便起见,本章节描述的分析条件称为“G' 分析”和“G”分析”,而在前面章节中描述的 G 分析特定条件称为“G⁰ 分析”。“G' 分析”与“G⁰ 分析”相同,除了步骤 (2) 中肽浓度是 10 μM 而不是 20 μM。这导致检测亲和力较低和 / 或离解速率较快的相互作用时灵敏度略低。相应地,它稍微增加了以下情况的确定性,即被检测的相互作用具有足够的亲和力和半衰期,从而具有生物学重要性并且是有用的治疗目标。

[0157] “G”分析”与“G⁰ 分析”相同,除了步骤 (2) 中肽浓度是 1 μM 而不是 20 μM,并且在 25°C 孵育 60 分钟 (而不是,例如,4°C 10 分钟然后是 25°C 20 分钟)。这导致对亲和力低、离解速率快、和 / 或亲和力在 25°C 比在 4°C 更低的相互作用的灵敏度较低。如果 (我们发现通常对 PDZ 配体结合来说是成立的) 反应熵是负的 (即产物的熵小于反应物的熵),则相互作用在 25°C 的亲和力比在 4°C 时低。相反,在“G”分析和“G⁰ 分析”中,对结合和离解速率慢的相互作用,PDZ-PL 结合信号可能是相似的,因为 PDZ-PL 复合物将在“G”分析的较长孵育期间积聚。因此“G”分析和“G⁰ 分析”结果的比较可用于估算不同 PDZ-PL 相互作用的相对熵、焓和动力学。(熵和焓通过等式 $\Delta G = RT \ln(Kd) = \Delta H - T \Delta S$ 与结合亲和力建立联系,其中 ΔG 、 H 和 S 分别是反应自由能、焓和熵, T 是凯氏度数的温度, R 是气体常数, Kd 是平衡解离常数)。特别是,只能在“G⁰ 分析”中检测到或者在“G⁰ 分析”中检测更强的相互作用通常在 25°C 具有快速的离解速率 ($t_{1/2} < 10$ 分钟) 和负反应熵,而在“G”分析中检测的同样强的相互作用通常在 25°C 具有较慢的离解速率 ($t_{1/2} > 10$ 分钟)。PDZ-PL 相互作用的热力学和动力学的大致估算 (可通过上文概述的“G⁰ 分析”相对“G”分析”结果的比较实现) 可用于设计相互作用的有效抑制剂。例如,基于从给定 PDZ 结构域缓慢解离 (通过与“G⁰ 分析”相似的“G”分析”中的结合证明) 的 PL 化学结构的小分子抑制剂可能自身解离缓慢,因此具有高亲和力。

[0158] 采用这样的方式,“G 分析”步骤 (2) 温度和持续时间的改变可用于了解 PDZ 配体结合反应的动力学和热力学,并了解该反应抑制剂的设计。

[0159] 本发明的可检测标记物可以是任意可检测的化合物或者组合物,它们可以直接或者间接与分子结合 (例如上面描述)。该标记物能够是本身可检测 (例如,放射性同位素标记或者荧光标记) 或者,对酶标记物来说,可以催化底物化合物或者组合物可检测的化学变化。优选的标记物是酶标记物,它催化非放射性显色试剂的变色。

[0160] 有时,标记物间接与抗体结合。技术人员知道用于间接结合的不同技术。例如,抗体可以与生物素结合,上述任意类型的标记物可以与抗生物素蛋白结合,或者反之亦然 (同样参见上面的“A”和“G”分析)。生物素选择性结合到抗生物素蛋白,因此,标记物可以用这种间接方式与抗体结合。参见, Ausubel, 上文,对涉及生物素-抗生物素蛋白结合和相似分析的技术的综述。或者,为实现标记物与抗体的间接结合,抗体与小半抗原 (例如地高辛) 结合,上述不同类型标记物中的一种与抗-半抗原抗体 (例如抗-地高辛抗体) 结合。因此,可以实现标记物与抗体的间接结合。

[0161] 分析变化可以包括不同的洗涤步骤。“洗涤”表示将固相暴露于水溶液 (通常是缓冲液或者细胞培养基),以这种方法使未结合的材料 (例如,未粘附细胞,未粘附捕获剂,未结合配体,受体,受体构建物,细胞裂解产物或者 HRP 抗体) 从中去除。为减少背景噪声,方

便的是在洗涤液中包括去污剂（例如，Triton X）。通常，洗涤后从分析板的孔中倒出水性洗涤液。利用自动化洗涤设备可以方便地实现洗涤。有时，可能需要几个洗涤步骤（例如，在大约 1 到 10 个洗涤步骤之间）。

[0162] PDZ-PL 检测分析中还可以使用不同的缓冲液。例如，不同的阻断缓冲液可用于降低分析背景。术语“阻断缓冲液”是指包含至少一种阻断化合物的水性 pH 缓冲溶液，其能够结合没有被包含 PL 或者 PDZ 的蛋白包被的基质的暴露表面。阻断化合物通常是蛋白例如牛血清白蛋白 (BSA)，明胶，酪蛋白或者奶粉，并且不与分析中的任何试剂交叉反应。阻断缓冲液的 pH 通常在大约 7 到 7.5 之间，合适的缓冲剂包括磷酸盐和 TRIS。

[0163] 在检测 PDZ-PL 相互作用中，可以使用不同的酶-底物组合。酶-底物组合的实例包括，例如：

[0164] (i) 辣根过氧化物酶 (HRPO) 与过氧化氢酶作为底物，其中过氧化氢酶氧化染料前体（例如邻苯二胺 [OPD] 或者 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺盐酸盐 [TMB]）（如上所述）。

[0165] (ii) 碱性磷酸酶 (AP) 与对-硝基苯磷酸作为生色底物。

[0166] (iii) β -D-半乳糖苷酶 (β -D-Gal) 与生色底物（例如对-硝基苯- β -D-半乳糖苷酶）或者荧光底物 4-甲基伞型酮- β -D-半乳糖苷酶。已有大量的其他酶-底物组合。对于这些组合的总体概述，可参见美国专利 4,275,149 和 4,318,980，这两篇均在此引入作为参考。

[0167] 下页的表 1 和 2，列出包含 PDZ 结构域的蛋白（“PDZ 蛋白”）和 PDZ 配体（“PL”），此处已经鉴定出它们彼此结合。每个 PL 蛋白具有结合至少一种 PDZ 蛋白的亲合力。表 1 的第 2 栏列出 PL 蛋白来源的流感 A 蛋白（例如，红细胞凝集素 (HA)，核蛋白 (NP)，基质 (M1) 和非结构蛋白 1 (NS1)）；第 3 栏列出 PL 模体氨基酸序列；第 4 栏提供与 PL 结合的 PDZ 结构域蛋白的 GenBank 识别号 (GI 号)（该数据库项目在此引入作为参考，包括其中描述的任意注释）。

[0168] 表 1-PDZ-PL 的相互作用 *

病原体	蛋白	C 端	PDZ 伴侣	
[0169]	流感 A	NS1	ESEV (SEQ ID NO:2)	外膜; PSD95 (PDZ # 2); PSD95 (PDZ #1,2,3); DLG1 (PDZ#1); DLG1 (PDZ #1,2); DLG1 (PDZ #2); DLG2(PDZ#1); DLG2 (PDZ #2); Magi3 (PDZ #1); PTN3 (PDZ#1); MAST2 (PDZ#1); NeDLG (PDZ #1,2); Shank1 d1; Shank2 d1; Shank3 d1; Syntrophin1 α ; Syntrophin γ 1; Magil (PDZ#1); Magil (PDZ #4); Tip1; PTPL1 (PDZ #1); Mint3 (PDZ #1); Lym Mystique (PDZ #1); DLG2 (PDZ #3); MUPP1 (PDZ #8); NeDLG (PDZ #1); DLG5 (PDZ #1); PSD95 (PDZ #1); NumBP (PDZ #3); LIMK1 (PDZ#1); KIAA0313; DLG1 (PDZ #2); Syntenin (PDZ #2); Pick1
		NS1	EPEV (SEQ ID NO:27)	PSD95 (PDZ # 2) PSD95 (PDZ #1,2,3)
[0170]		NS1	ESEI (SEQ ID NO:3)	外膜; PSD95 (PDZ #2); PSD95 (PDZ #1,2,3); NeDLG (PDZ #1,2); DLG2 (PDZ #2); MAST2; PTN3(PDZ#1)
		NS1	ESKV (SEQ ID NO:4)	PSD95 (PDZ #2); PSD95 (PDZ #1,2,3); MAST2; Magi3 (PDZ #1); NeDLG (PDZ #1,2); NumBP (PDZ #4)

[0171] * 实验证实的相互作用。

[0172] 表 2-PDZ-PL 相互作用

	流感 A	HA	8486126	RICI (SEQ ID NO:13), NICI(SEQ IDNO:11), TICI (SEQ ID NO:12)	NOS1 (PDZ#1,2, 3);MINT1 (PDZ#2);ZO-1 (PDZ #2); NSP; RIM2
		NS1	8486133	ESEV (SEQ ID NO:2), RSEV (SEQ ID NO:7), RSKV (SEQ ID NO:8)	NeDLG (PDZ#1, 2); LIM-RIL; Vartul(PDZ#1,2);MAGI2; DLG2(PDZ#1,2);MAST2; DLG1 (PDZ#1,2);PSD95 (PDZ# 1,2,3); MAGI1;TIP1; MAGI 3; 外膜蛋 白 ; MAST2; Syntrophin γ 1; MUPP1 (PDZ#13); PTPL1 (PDZ #2); Syntrophin 1 α ; ERBIN; KIAA1526; AIPC; LIM mystique; TIP43; TIP2
[0173]	流感 B	HA	8486153	SICL (SEQ ID NO:18)	NOS1 (PDZ #1,2, 3);MINT1 (PDZ#2);ZO-1 (PDZ #2); NSP; RIM2; 新型丝氨酸蛋白酶; PICK1
		NA	8486155	DMAL(SEQ ID NO:14), DMTL(SEQ IDNO:15), DIAL(SEQIDNO:16)	ZO-1 (PDZ #2); RIM2; 新型丝氨 酸蛋白酶; MINT1
		M1	8486158	RKYL(SEQ ID NO:29), KKYL (SEQ ID NO:30)	ZO-1 (PDZ #2) RIM2 d1
		核蛋白	8486160	DLDY (SEQ ID NO:17)	ZO-1 (PDZ #2) RIM2 d1; syntenin

[0174] PDZ 蛋白可以产生为融合蛋白,只要它们包含活性 PDZ 结构域。例如,已经产生了 PDZ 结构域克隆入载体 (PGEX-3X 载体) 用于产生 GST-PDZ 融合蛋白 (Pharmacia),并在现有的美国和国际专利申请中有教导,例如,美国专利申请 10/485,788(2004 年 2 月 3 日提交),国际专利申请 PCT/US03/285/28508(2003 年 9 月 9 日提交),国际专利申请 PCT/US01/44138(2001 年 11 月 9 日提交),在此完整引入作为参考。

[0175] V. 筛选 PDZ 蛋白

[0176] 筛选方法可以包括利用已知的用于序列分析和 / 或结构域分析的任意计算机程序,使用序列分析鉴定 PDZ 结构域。一旦鉴定出 PDZ 蛋白,可以筛选其与流感 PL 蛋白相互作用的能力。

[0177] PDZ 蛋白或者 PDZ 结构域多肽是包含 PDZ 结构域的任何蛋白。任意包含 PDZ 结构域的蛋白,无论是天然、重组、嵌合或者片段,都可筛选其结合流感 PL 结构域的能力。美国专利申请 10/485,788(2004 年 2 月 3 日提交),国际专利申请 PCT/US03/285/28508(2003 年 9 月 9 日提交),国际专利申请 PCT/US01/44138(2001 年 11 月 9 日提交)给出了 PDZ 结构域的鉴定方法,在此完整引入作为参考。

[0178] VI. 筛选其他 PL 结合剂

[0179] 适于在诊断分析中使用的 PL 结合剂包括特异结合一种或者多种 PL 模体的任意试剂。利用在筛选抗病毒剂方法中公开的相同方法能够鉴定这样的试剂。例如,利用包含 PL

模体的蛋白能够鉴定该试剂。利用任意类型的文库,例如包括表达文库和小分子文库,能够鉴定待测化合物。用于筛选治疗剂或者治疗先导物的待测化合物的优选来源是噬菌体展示文库。参见,例如,Devlin, W091/18980 ;Key, B. K., 等人编著, *Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA, 1996。噬菌体展示是一种强大的技术,使人能够从包含 10^8 - 10^9 个不同序列的文库中,使用噬菌体遗传学选择和扩增具有所需特征的肽或者蛋白。可以将文库设计为氨基酸序列在所需位置的选择性上色 (variegation),使得文库对所需特征偏好。设计文库使肽表达为与噬菌体表面呈现的蛋白融合。挑选具有所需特征的噬菌体展示肽,能够再生长进行扩增。因为肽是通过噬菌体的增殖扩增的,可以方便地测序所选噬菌体的 DNA,从而促进所选肽的快速分析。

[0180] 通过筛选特异结合 PDZ 结构域蛋白和 / 或 NS1 PL 的噬菌体,能够挑选出编码肽抑制剂的噬菌体。产生与蛋白融合的文库,例如表达在噬菌体表面的基因 II。文库可以由不同长度的、线性的或者通过包含两个 Cys 氨基酸进行限制的肽组成,与噬菌体蛋白融合或者还可以融合到其他作为支架的蛋白。还可以设计文库偏好此处公开的 PL 区或者偏好从初始文库筛选的结合噬菌体得到的肽序列,所述初始文库提供其他的分析抑制剂化合物。

[0181] VII. 用于诊断和治疗用途的抗体

[0182] 本发明的 NS1, NS1 PL, PDZ 和 PDZ PL 结合结构域多肽可用于产生在诊断和治疗中使用的抗体。抗体可以是多克隆抗体、不同的单克隆抗体或者具有不同表位特异性的集合单克隆抗体。采用依据抗体类型的标准方法,单克隆抗体由包含抗原的蛋白片段制备 (参见,例如, Kohler, 等人, *Nature*, 256 :495, (1975) ;和 Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (C. S. H. P., NY, 1988) Queen 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86 : 10029-10033 (1989) 和 WO 90/07861 ;Dower 等人, W091/17271 和 McCafferty 等人, W092/01047 (每项在此引入作为参考用于所有的目的)。噬菌体展示技术还可以用于诱变抗体的 CDR 区,所述抗体先前显示具有与本发明肽的亲合力。一些抗体与存在于 NS1 或者 PDZ 蛋白的一种形式而不是其他形式中的抗原表位结合。例如,一些抗体与 NS1 C 端 PL 位点内的抗原表位结合。那些结合特异性 NS1 PL 模体的抗体可被分为 NS1 PL 类 - 特异抗体。此外,一些抗体与 PDZ 蛋白的 PDZ 结构域内的抗原表位结合。一些抗体与例如表 1 中所示的 PDZ 多肽特异结合,而不与其他结合。可以纯化抗体,例如,通过与支持物结合和从其洗脱,所述支持物上结合有激发抗体的多肽或者肽。

[0183] 术语“抗体”或者“免疫球蛋白”用于包括完整的抗体和其结合片段。通常,片段与作为片段来源的完整抗体竞争与抗原片段的特异结合,所述抗原片段包括分开的重链,轻链 Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc 和 Fv。通过重组 DNA 技术或者通过酶或者化学分离完整的免疫球蛋白来产生片段。术语“抗体”还包括一种或者多种免疫球蛋白链,该免疫球蛋白链与其他蛋白化学结合,或者与其他蛋白表达为融合蛋白。术语“抗体”还包括双特异性 (bispecific) 抗体。双特异性或者双功能抗体是一种人工杂交抗体,具有两个不同的重 / 轻链对和两个不同的结合位点。可以通过各种方法包括杂交瘤融合或者 Fab' 片段连接产生双特异性抗体。参见,例如, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79 : 315-321 (1990) ;Kostelny 等人, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)。

[0184] 抗体可以用作流感 A 感染和其亚型,尤其是禽流感 A 感染的预测和诊断的试剂 (例如,在预包装的试剂盒中)。可以用各种方法预测和诊断流感 A 感染。

[0185] A. 泛反应性 (Pan-reactive) 抗体

[0186] 泛反应性或者泛特异性 (pan-specific) 抗体是单克隆或者多克隆抗体,它们与任意和所有的流感 A 病毒 NS1 蛋白结合,或者,与超过 3 种流感 NS1 蛋白结合,或者更优选的超过 5 种。优选,泛反应性或者泛特异性抗体识别至少下列 3 种流感 A 株: H5N1, H3N2 和 H1N1。泛反应性抗体可用于鉴定流感 A 病毒的存在但不能鉴定它是何种亚型。因此,泛反应性单克隆抗体可以特异识别 NS1 蛋白的保守区,或者可以识别两种或更多种 NS1 蛋白或者特异 NS1 PL 类的 PL 区。优选的 NS1 蛋白的保守区例如可以在 RNA 结合结构域中发现,在国家生物技术信息中心 (the National Center for Biotechnology Information) 的网址上显示为 NCBI IVNS1ABP。然而,已经显示的 PL 区在病毒亚型之间是不同的,有可能鉴定出结合 NS1 区超过一种 PL 的单克隆抗体。

[0187] 但是,泛反应性抗体的其他实施方式包括多克隆抗体和 / 或单克隆抗体的混合物,其作为一个整体来看能够鉴定全部或者很多流感 A 病毒。这些抗体能够识别 NS1 蛋白的保守或者非保守区。如果抗体识别 NS1 PL 区,抗体混合物优选识别还包含 PL 区的 NS1: ESEV (SEQ ID NO: 2), ESEI (SEQ ID NO: 3), ESKV (SEQ ID NO: 4), TSEV (SEQ ID NO: 5), GSEV (SEQ ID NO: 6), RSEV (SEQ ID NO: 7), RSKV (SEQ ID NO: 8), GSEI (SEQ ID NO: 9), GSKV (SEQ ID NO: 10), NICI (SEQ ID NO: 11), TICI (SEQ ID NO: 12), RIC1 (SEQ ID NO: 13), DMAL (SEQ ID NO: 14), DMTL (SEQ ID NO: 15), DIAL (SEQ ID NO: 16), DLDY (SEQ ID NO: 17), SICL (SEQ ID NO: 18), SEV, SEI, SKV 和 SKI。如果使用超过一种抗体和 / 或 PDZ 蛋白, PDZ 蛋白优选是至少一种选自表 1 或者 2 的蛋白,并且抗体优选模拟至少一种 PDZ 蛋白。

[0188] B. PDZ 蛋白的单克隆抗体替代品 (surrogates)

[0189] 如上面和实施例中所示,存在多种识别并结合 NS1 蛋白上 PL 模体的 PDZ 蛋白。识别相同模体的抗体也可以用作这些 PDZ 蛋白的替代品。优选, PDZ 蛋白是下列的一种: 外膜蛋白, PSD95 (PDZ #2); PSD95 (PDZ #1, 2, 3); DLG1 (PDZ #1); DLG1 (PDZ #1, 2); DLG1 (PDZ #2); DLG2 (PDZ #1); DLG2 (PDZ #2); Magi3 (PDZ #1); PTN3 (PDZ #1); MAST2 (PDZ #1); NeDLG (PDZ #1, 2); Shank1 d1; Shank2 d1; Shank3 d1; Syntrophin1 α ; Syntrophin γ 1; Magi1 (PDZ #1); Magi1 (PDZ #4); Tip1; PTPL1 (PDZ #1); Mint3 (PDZ #1); Lym Mystique (PDZ #1); DLG2 (PDZ #3); MUPP1 (PDZ #8); NeDLG (PDZ #1); DLG5 (PDZ #1); PSD95 (PDZ #1); NumBP (PDZ #3); LIMK1 (PDZ #1); KIAA0313; DLG1 (PDZ #2); Syntenin (PDZ #2); Pick1 或者类似物或者片段。更优选,抗体模拟特异识别 PL ESEV (SEQ ID NO: 2) 的任意 PDZ 蛋白。识别特异 NS1 PL 模体的抗体替代品可命名为 NS1 PL 类别 - 特异的。

[0190] C. 抗体和其他结合剂的混合物

[0191] 抗体和 PDZ 蛋白 (和 / 或适配体) 的混合物可用于任何分析。PDZ 蛋白和抗体可以用于 NS1 不同亚型的鉴定,流感 A 病毒的鉴定,鉴别出与较低致病形式比较的致病形式。在一些分析中,混合抗体和 PDZ 蛋白,共同施用于一个样本。在其他分析中,抗体和 PDZ 蛋白是分离的,以便结合不同的样本以鉴定两个不同的亚型或者对亚型的鉴定进行确认。

[0192] VIII. 适配体

[0193] 适配体是在体外从大量随机序列种群选择的 RNA 或者 DNA 分子,通过形成结合袋 (binding pockets) 识别特异的配体。变构核糖酶是 RNA 酶,其活性通过效应子分子与适配体结构域的结合而调节,所述适配体结构域位于活性位点外。这些 RNA 作为精确的分子

开关,受特异效应子存在或者缺失的控制。适配体能够结合核酸,蛋白,甚至完整的生物体。适配体不同于抗体,然而它们模拟抗体在各种诊断形式中的性质。因此,适配体可以用于替代抗体和 / 或 PDZ 蛋白,或者与抗体和 / 或 PDZ 蛋白联用,鉴定一般和特异 NS1 PL 区的存在。

[0194] IX. NS2 序列和致病性的相关性

[0195] 流感 A 的非结构蛋白 NS1 和 NS2 都是由相同基因利用不同的剪接产生的。发生的剪接类型导致 NS1 和 NS2 蛋白羧基末端的差异。就 NS1 来说,这导致羧基末端特殊的 PL,而 NS2 在 C 端没有 PL。因为 NS1 中 PL 区的特异序列能与致病性有关,对 NS2 蛋白的变化分析任意类型的相关性。分析致病株中由剪接产生的 NS2 序列,与那些不具有致病性比较进行分析。表 12 和 13 在蛋白水平和核苷酸水平对序列进行了分析。这些表显示 70 位的甘氨酸到丝氨酸的取代与病毒的致病性和 / 或毒性高度相关,特别是关于 1918 年大流行的 H1N1 株。利用 H5N1 株描述了示范性的 NS2 序列,如国家生物技术信息中心 (www. ncbi. gov) 所述,例如 AF 144307,并且当序列最大限度地比对时,并且对相应的其他 NS2 蛋白进行氨基酸和编码氨基酸密码子的编号。因为这种相关性,鉴定出一种方法,该方法利用 NS2 在 Ser70 处的多态性作为单独的试验来分析一种给定的流感 A 株是否是致病性的。该方法还可用于鉴定特异流感株。或者,NS2 多态性可以和此处公开的 NS1 试验联用,鉴定致病性或者确认以不同方法鉴定的致病性。

[0196] 筛选 NS2 蛋白中 Ser70 序列变化的方法包括鉴定蛋白水平或者核苷酸水平变化的方法。

[0197] 1. 基于蛋白的诊断试验

[0198] 本发明提供基于蛋白的诊断试验,以鉴定包括 Ser70 的 NS2 蛋白的存在,用于鉴定流感 A 病毒、流感 A 病毒株和致病性的流感 A 病毒株。利用 NS2 中 Ser70 多态性序列的诊断试验可以使用与 NS1 分析中相同的形式(参见章节 VIII 和其他相关的章节)。该试验鉴定位置 70 处丝氨酸的存在,如果丝氨酸存在,鉴定流感株为致病性的。如果丝氨酸不存在,则鉴定流感株为非致病性的。

[0199] 识别 NS2 蛋白中丝氨酸 70 变化的单克隆或者多克隆抗体可用于鉴定一种流感株为流感 A,能够鉴定特异流感 A 株,并且能够鉴定一种病毒是否是致病性的。可以产生 NS2 抗体以识别丝氨酸 70 的存在,并可用于鉴定致病性的株。例如,能够利用表 12 或者 13 中提供的肽产生抗体,所述抗体针对 70 位具有丝氨酸的 NS2 区。然后筛选丝氨酸 70 抗体以确定它们是否与 70 位具有甘氨酸或者其他氨基酸的肽发生交叉反应。或者,可以产生针对各病毒株识别包括丝氨酸 70 的特异序列的抗体,产生株-特异抗体(还可参见为 NS1 抗体提供的章节 VIII)。在一些试验中,抗体用于鉴定一种病毒株为致病性的。在一些试验中,NS2 抗体可代替 NS1 抗体。在一些试验中,NS2 抗体与 NS1 抗体在任何使用 NS1 蛋白的试验中联用。NS2 抗体可用于鉴定特异性流感 A 病毒,鉴定一种病毒为流感 A 病毒,或者鉴定一种病毒是致病性的。

[0200] 或者,其他结合剂可用于替代抗体,例如通过噬菌体展示文库技术选择的肽。

[0201] 2. 核酶诊断试验

[0202] 本发明还提供基于核酸的诊断试验,以鉴定编码包括 Ser70 的蛋白的 NS2 核酸的存在。这些试验可以用于鉴定流感 A 病毒,流感 A 病毒株,和致病性的流感 A 病毒株。该诊

断试验使用一种序列,该序列包括在各种形式的 NS2 中编码 Ser70 的密码子。例如,该诊断试验可以使用与编码 Ser70 序列互补的探针或者引物。优选,使用编码表 12 中鉴定的肽的序列。如果丝氨酸 70 被鉴定为存在,则鉴定流感病毒为致病性的。

[0203] 检测 NS2 中多态性的方法。能够通过几种方法确定样本中碱基的同一性,所述碱基占据 NS2 核酸的包括表 12 所示 Ser-70 的序列,所述方法依次进行描述。

[0204] A. 单碱基延伸方法

[0205] 例如,US 5,846,710,US 6,004,744,US 5,888,819 和 US 5,856,092 描述了单碱基延伸方法。简单来说,该方法通过与靶序列互补的引物杂交起作用,使得引物的 3' 端立即紧邻但不跨越靶序列的潜在变异位点。也就是说,该引物包括靶多核苷酸互补序列的子序列,所述子序列终止在紧邻多态性位点 5' 端的碱基。杂交在一种或者多种标记核苷酸存在的条件下进行,所述标记核苷酸与可能占据潜在变异位点的碱基互补。例如,对于编码 NS2 Ser70 多态性的序列,可以使用一种或者多种标记的核苷酸引物。针对各多态性的引物能够包括不同的标记以区分多态性。优选,引物重叠或者部分编码剪接位点。这表示剪接位点或者多态性区域的一些部分包含在引物中,优选 Ser70 位点。在一些方法中,尤其是使用多重差异标记的核苷酸的方法中,核苷酸是双脱氧核苷酸。如果存在与占据靶序列中变异位点的碱基互补的核苷酸,则在允许引物延伸的条件下进行杂交。延伸合并标记的核苷酸,从而产生标记的延伸引物。如果使用多重差异标记的核苷酸并且目标是杂合体,则可以获得多重差异标记的延伸引物。检测延伸的引物,提供指示哪些碱基占据目标多核苷酸中的变异位点。

[0206] B. 等位基因 - 特异性探针

[0207] 例如 Saiki 等人 (Nature 324,163-166(1986);Dattagupta, EP235,726, Saiki, WO 89/11548 描述了用于分析多态性的探针的设计和使用。利用该公开的内容,可以将探针设计为识别包括 Ser70 多态性的特定序列,所述特定序列与一种类型病毒或者病毒株的靶 DNA 片段杂交,而不与其他类型病毒或者病毒株的相应片段杂交,这是由于两种病毒中各自片段中存在的不同多态性形式造成的。杂交条件应该足够严谨,使 Ser70 区的等位基因之间的杂交强度存在显著差异,优选基本二元的反应 (binary response),其中探针只与一种等位基因杂交。一些探针设计为与靶 DNA 的片段杂交,使得 Ser70 的多态性位点对准探针的中心位置 (例如,15mer 中的第 7 位;16mer 中的第 8 或者 9 位)。这种探针设计实现了来自不同病毒和 / 或株的编码 NS2 蛋白的不同核酸之间杂交的良好区分。

[0208] 这些探针经常成对使用,对子中的一个成员表现出与靶序列的一种参照形式完全匹配,而另一成员表现出与变异体形式或者不同的参照形式完全匹配。然后将几对探针固定在相同的支持物上,用于相同靶序列内多重多态性的同时分析。还可以通过与核酸阵列杂交鉴别多态性,W095/11995 描述了其中的一些实例 (在此完整引入作为参考用于所有目的)。

[0209] C. 等位基因特异的扩增方法

[0210] 等位基因 - 特异性引物与靶 DNA 中重叠多态性的位点杂交,并且引物只扩增与引物表现出完全互补的等位基因形成。参见 Gibbs, Nucleic Acid Res. 17, 2427-2448 (1989)。这种引物与在远端位点杂交的第二引物联用。扩增起始于两个引物,产生可检测的产物,提示存在特异的等位基因形式。通常用第二对引物作为对照,其中一个在多态性位点显示单

个碱基错配,另一个显示与远端位点的完全互补。单碱基错配阻止扩增,没有形成可检测的产物。在一些方法中,错配包括在与多态性相关的寡核苷酸的 3' - 端位置,因为这个位置对于从引物延长是最不稳定的。参见,例如,WO 93/22456。在这种情况下,可以将等位基因特异引物设计为与 NS2 的剪接位点重叠,包括 Ser70 位置。

[0211] D. 直接测序

[0212] 本发明 NS2 多态性序列的直接分析可以利用双脱氧链终止法或者 Maxam-Gilbert 方法实现(参见 Sambrook 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第二版, CSHP, New York 1989); Zyskind 等人, *Recombinant DNA Laboratory Manual*, (Acad. Press, 1988))。)

[0213] E. 变性梯度凝胶电泳

[0214] 利用聚合酶链式反应产生的扩增产物可以利用变性梯度凝胶电泳进行分析。根据 DNA 在溶液中序列依赖性的不同熔解性质和电泳迁移,可以鉴定 NS2 Ser70 多态性的不同等位基因。Erlich 编著, *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*, (W. H. Freeman and Co, New York, 1992), Chapter 7。

[0215] F. 单链构象多态性分析

[0216] 靶序列的等位基因可以利用单链构象多态性分析进行区分,所述单链构象多态性分析通过单链 PCR 产物电泳迁移的变化鉴定碱基差异,如 Orita 等人描述, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, 2766-2770 (1989)。如上所述能够产生扩增的 PCR 产物,加热或者变性,形成单链扩增产物。单链核酸可以重新折叠或形成部分取决于碱基序列的二级结构。单链扩增产物不同的电泳迁移率可能与靶序列等位基因之间的碱基序列差异相关。

[0217] 3. NS2 治疗剂 - 此处公开的筛针对 NS1 和 PDZ 蛋白的抗病毒治疗剂和筛选抗病毒治疗剂的方法同样可以用于鉴定 NS2 的结合伴侣,鉴定阻断 NS2 和结合伴侣之间相互作用的治疗剂,和治疗病毒性流感 A 感染的患者。(参见章节 XI 药物组合物)。鉴定针对 NS2 的治疗剂的靶标包括,在包含 Ser70 的重叠区阻断结合伴侣和 NS2 相互作用的试剂,阻断 NS2 PL(内部位点)和 PDZ 结合伴侣之间相互作用的试剂,和磷酸化 Ser70 的丝氨酸激酶,导致抑制相互作用。

[0218] X. 诊断试验

[0219] 本发明的实施方式提供诊断捕获剂和检测剂,它们可用于在各种不同类型的生物样本中鉴定流感 A 病毒和其产物的检测法。可用于检测流感病毒的代表性试验形式包括酶联固相吸附试验,放射性标记结合试验, PDZ- 和 PL- 结合试验,时间分辨 PDZ 和 PL 荧光试验,以及,夹心和酶 - 级联试验形式。示例性的方法,可以从免疫测定领域用于该试验的方法修改,包括均相和多相试验形式;竞争性和非竞争性试验形式;酶连接固相试验形式,荧光试验形式,时间分辨荧光试验形式,生物发光试验形式,级联酶试验等等。

[0220] 在本发明的某些实施方式中,一种或者多种 PDZ 蛋白被用作捕获剂从生物样本分离一种或者多种 PL 分析物。在其它可选的实施方式中,一种或者多种 PDZ 蛋白与一种或者多种信号发生化合物结合,用作鉴定生物样本中一种或者多种 PL 分析物的存在或者量的检测剂。在其他实施方式中,PL 蛋白和 PL 肽与信号发生化合物 (PL-SGC) 结合,用于竞争性配体抑制试验,即,其中病毒 PL 的存在与一种或者多种 PL-SGC 竞争与 PDZ 的结合。优选, PDZ 蛋白是下列至少一种:外膜蛋白, PSD95 (PDZ #2); PSD95 (PDZ #1, 2, 3); DLG1 (PDZ #1);

DLG1(PDZ #1,2);DLG1(PDZ #2);DLG2(PDZ #1);DLG2(PDZ #2);Magi3(PDZ #1);PTN3(PDZ #1);MAST2(PDZ #1);NeDLG(PDZ #1,2);Shank1 d1;Shank2 d1;Shank3 d1;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1;Magi1(PDZ #1);Magi1(PDZ #4);Tip1;PTPL1(PDZ #1);Mint3(PDZ #1);LymMystique(PDZ #1);DLG2(PDZ #3);MUPP1(PDZ #8);NeDLG(PDZ#1);DLG5(PDZ #1);PSD95(PDZ #1);NumBP(PDZ #3);LIMK1(PDZ#1);KIAA0313;DLG1(PDZ #2);Syntenin(PDZ #2);Pick1 或者类似物或者片段。对那些常规鉴定流感 A 的试验,可以使用 PDZ 蛋白和抗体的混合物。对于这些试验,PDZ 蛋白可能包括将上述一种蛋白与识别其他病原体特异的或者流感 A 特异的 PL 模体的其他蛋白混合。

[0221] 本发明提供检测样本中病原体 PL 蛋白的方法,并发现其在诊断对象病毒感染中的用途。在许多实施方式中,从受试者处获得生物样本,检测样本中病原体 PL 蛋白的存在。样本中可检测量的病原体 PL 蛋白的存在表明个体感染了特定病毒。在其他实施方式中,检测生物样本中病原体 PL 蛋白的水平,与样本中的对照量进行比较。样本中病原体 PL 蛋白的相对量指示病原体感染的严重性。

[0222] 该方法通常包括对流感 A PL 蛋白特异的两种结合伴侣,其中一个是如上所述的 PDZ 结构域多肽。通常,该方法包括 a) 利用结合伴侣之一从样本分离病原体 PL,和 b) 用另一种结合伴侣检测病原体 PL 蛋白。

[0223] 对亚型特异性试验或者 NS1 PL 类别特异性试验,待鉴定的 PL 优选是下面一种:ESEV(SEQ ID NO:2),ESEI(SEQ ID NO:3),ESKV(SEQ ID NO:4),TSEV(SEQ ID NO:5),GSEV(SEQ ID NO:6),RSEV(SEQ IDNO:7),RSKV(SEQ ID NO:8),GSEI(SEQ ID NO:9),GSKV(SEQ IDNO:10),NICI(SEQ ID NO:11),TICI(SEQ ID NO:12),RICI(SEQ IDNO:13),DMAL(SEQ ID NO:14),DMTL(SEQ ID NO:15),DIAL(SEQ ID NO:16),DLDY(SEQ ID NO:17),SICL(SEQ ID NO:18),SEV,SEI,SKV 和 SKI。对亚型特异性试验,使用的 PDZ 蛋白优选是下面的至少一种:PSD95(PDZ #2);PSD95(PDZ #1,2,3);DLG1(PDZ #1);DLG1(PDZ #1,2);DLG1(PDZ #2);DLG2(PDZ #1);DLG2(PDZ #2);Magi3(PDZ #1);PTN3(PDZ #1);MAST2(PDZ #1);NeDLG(PDZ #1,2);Shank1 d1;Shank2 d1;Shank3 d1;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1;Magi1(PDZ #1);Magi1(PDZ #4);Tip1;PTPL1(PDZ #1);Mint3(PDZ #1);LymMystique(PDZ #1);DLG2(PDZ #3);MUPP1(PDZ #8);NeDLG(PDZ#1);DLG5(PDZ #1);PSD95(PDZ #1);NumBP(PDZ #3);LIMK1(PDZ#1);KIAA0313;DLG1(PDZ #2);Syntenin(PDZ #2);Pick1 或者类似物或者片段。NS1 PL 可以高度预测病毒的 H 和 A 抗原和亚型。

[0224] 对病原体特异性试验,待鉴定的 NS1 PL 优选是下面的至少一种:ESEV(SEQ ID NO:2),ESEI(SEQ ID NO:3),ESKV(SEQ ID NO:4),TSEV(SEQ ID NO:5),GSEV(SEQ ID NO:6),RSEV(SEQ ID NO:7),RSKV(SEQ ID NO:8),GSEI(SEQ ID NO:9),GSKV(SEQ ID NO:10),NICI(SEQ ID NO:11),TICI(SEQ ID NO:12),RICI(SEQ ID NO:13),DMAL(SEQ ID NO:14),DMTL(SEQ ID NO:15),DIAL(SEQ IDNO:16),DLDY(SEQ ID NO:17),SICL(SEQ ID NO:18),SEV,SEI,SKV 和 SKI。对病原体特异性试验,使用的 PDZ 蛋白优选是选自表 1 或者 2 中的至少一种或者类似物或者片段。

[0225] 对流感 A 特异性试验,待鉴定的 NS1 PL 优选是下面的至少一种:ESEV(SEQ ID NO:2),ESEI(SEQ ID NO:3),ESKV(SEQ ID NO:4),TSEV(SEQ ID NO:5),GSEV(SEQ ID NO:6),RSEV(SEQ ID NO:7),RSKV(SEQ ID NO:8),GSEI(SEQ ID NO:9),GSKV(SEQ ID NO:10),

NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RICI (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV 和 SKI。对病原体特异性试验,使用的 PDZ 蛋白优选是选自表 1 或者 2 中的至少一种或者类似物或者片段。

[0226] A. ELISA 夹心多相分析形式

[0227] 如下面实施例部分所述,利用该 PDZ 捕获和单克隆抗 NS1,构建检测生物样本中高危流感 A 株的夹心分析形式。当前分析的灵敏度范围在 1-1,000ng/ml 之间:即,对商业用于检测生物样本中流感 A 病毒类型或者量具有足够的灵敏度,注意下列告诫:即,

[0228] a) 免疫测定法能够区别流感 A H5N1, H1N1 和 H3N2 株的 NS1 蛋白;

[0229] b) 不同分析形式的交叉反应模式不同,并且还取决于待检测的特定流感 A 株,以及,包含细胞裂解产物的生物样本中的绝对灵敏度;和,

[0230] c) 在诊断设备领域中确定不同分析形式的检测限现在是相对常规的。

[0231] 尽管可以确定可能用于本方法的各种竞争性和非竞争性分析形式,但现在优选是夹心分析形式,因为已经证明这些分析具有性能特征和各种良好建立的 (well established) 信号放大策略。在当前优选的夹心免疫测定实施方式中,使用特异的高亲和力非天然 PDZ 蛋白捕获生物样本中的天然病毒 NS1 抗原;用抗 NS1 小鼠单克隆抗体检测结合的 NS1 抗原;和,利用信号发生化合物检测结合的抗 NS1 抗体的存在,例如用偶联酶的第二抗体(例如,偶联辣根过氧化物酶的抗体;HRP)或者生物素化的第二抗体和链霉亲和素-酶偶联物(例如,HRP)。

[0232] 通常,本发明的方法包括以下步骤:(i) 利用第一结合剂即捕获剂,从复杂生物样本中分离 (separating) (即,分离 (isolating)) 天然病毒 PL 蛋白分析物;和,(ii) 利用第二结合剂即检测剂,检测分离的 PL 分析物。分离和检测步骤可以利用结合伴侣实现,所述结合伴侣对 PL 分析物具有不同水平的特异性,例如,如果捕获剂是高特异性的,则可以要求检测剂是较低特异性的,反之亦然。在某些实施方式中,捕获剂优选是 PDZ 结构域多肽。更优选,捕获剂是表 1 和 / 或表 2 所列的一种。在其他实施方式中,第一结合伴侣是抗病原体 PL 蛋白抗体或者抗体的混合物,条件是在这些实施方式中检测剂的至少一种组分是 PDZ 多肽,例如,与捕获 / 分离的 PL 分析物结合并且然后利用偶联信号发生化合物的抗 PDZ 抗体检测复合物中 PL 分析物的存在的 PDZ 蛋白检测剂。在某些当前优选的实施方式中,直接的或者通过连接子,将 PDZ 捕获剂结合在固相上。例如,在一个非限制性实施例中,PDZ 结构域多肽结合磁珠。在后面的实施例中,当接触生物样本时,固定在磁珠上的 PDZ 捕获剂能够与样本中的流感病毒 PL 蛋白有效形成 PDZ-PL 相互作用复合物。然后,施加磁场,从样本分离包含结合的流感病毒 PL 的相互作用复合物。在另一个非限制性实施例中,将 PDZ 结构域多肽捕获剂固定在微量滴定板的表面上;将包含流感 PL 的生物样本与固定的捕获剂接触,导致 PL 与板表面的结合;用缓冲液洗板,从板上去除非 PL 病毒分析物;和,因此,固定的 PL 分析物从生物样本分离。各种分离 (separation) / 分离 (isolation) 方法都是已知的,例如,利用磁场、洗涤等等。采用的特定方法取决于特定的分析形式。例如,可以通过许多不同的方法进行分离,包括但不限于洗涤;磁性方法;离心;过滤;层析法,包括分子筛、离子交换和亲和层析;在电场中分离;毛细管作用例如在侧向流测试条中;免测沉淀法;和,下面公开的类似方法。

[0233] 在某些实施方式中,通过将等份的生物样本接触测试条的一端,然后让蛋白在测试条上迁移,例如通过毛细管作用例如侧向流,从生物样本中的其他病毒和细胞蛋白分离流感 PL 蛋白。该方法不同于先前的免疫测定法,因为在存在一种或者多种 PDZ 多肽试剂,抗体,和 / 或适配体的测定法中,例如,作为捕获和 / 或检测剂,这给予该测定法特异鉴定高危流感 A 病毒株的存在或者量的能力。该方法不同于先前的免疫测定法,在于以下事实:它们鉴定存在于患者样本中的病毒蛋白,而不是抗体。用于侧向流分离、检测和定量的方法和装置是本领域已知的,例如,美国专利号 6,942,981,5,569,608 ;6,297,020 ;和 6,403,383,在此完整引入作为参考。在一个非限制性实施例中,测试条包括用于上样的近端区域(上样区)和包含 PDZ 多肽捕获剂和缓冲试剂和添加剂的远端试验区,所述缓冲试剂和添加剂适于迁移生物样本中 PDZ 多肽和任意流感 PL 蛋白之间的结合相互作用。在其他实施方式中,测试条包括两个试验区域,该区域包含不同的 PDZ 结构域多肽,即,每个能够特异地与不同的流感 PL 蛋白分析物相互作用。

[0234] 根据上面公开的方法,从生物样本中的其他蛋白分离流感 PL 蛋白分析物,即,采用这种方法使样本中的分析物适合于检测和 / 或定量,利用 PDZ 多肽、偶联信号发生化合物的 PDZ 多肽、抗体、适配体等等,本发明的实施方式提供检测分离的流感 PL 蛋白的新方法。根据其他实施方式,利用对病原体 PL 蛋白特异的抗体,例如偶联信号发生化合物的抗体,检测与 PDZ 捕获剂、抗体和 / 或适配体结合的流感 PL 分析物。当然,各种检测方法是诊断领域已知的,并且本(非限制性)公开的目的不是为了阐明所有可选的公知方法。而是,本公开是为了满足阐明实施本发明最佳方式的要求,并作为可选方法的综合参考指导。

[0235] 在某些实施方式中,在均相分析形式中,即,无需分离步骤,用偶联了 SGC(信号发生化合物)的 PDZ 结构域检测样本中病原体 PL 蛋白分析物的存在。在该分析中,PL 与 PDZ 结构域的结合诱导 SGC 产生信号的变化,例如,荧光各向异性的变化。

[0236] 在其他实施方式中,多相固相检测模型(上文公开)可用于检测生物样本中的流感 PL 分析物。如上文背景部分所述,PDZ 蛋白与包含 PL 的细胞蛋白结合。同样地,在感染细胞中,包含 PL 的流感病毒蛋白与宿主细胞的 PDZ 蛋白结合。尽管通常预期这些相互作用将在诊断分析形式中竞争结合,但在此还提供以下指导,即出乎意料地,这些后来天然相互作用的亲合力和质量平衡是非常弱的,或者在去污剂提取的细胞裂解产物中是被充分破坏的,或在该诊断分析形式中流感 PL 分析物是可检测的。因此,在存在的去污剂例如 Tween-20 或者 TritonX100 小于约 0.5% 的条件下;优选,小于约 0.2%;和,最优选,于大约 0.1% 的条件下,可以制备和测定裂解产物。

[0237] 在某些实施方式中,样本中病毒 PL 蛋白的水平可以被定量和 / 或与对照进行比较。合适的阴性对照样本例如从已知是健康的个体获得,例如,已知没有流感病毒感染的个体。特异性对照可以从已知患有流感 B 感染的个体,或者感染较低毒性流感株,例如,H1N1、H3N2 等等的个体收集。对照样品可以来自与待测对象有遗传关系的个体,但还可以来自遗传无关的个体。合适的阴性对照样本还可能是来自个体在感染早期的收集的样本,即,时间点比取得待测样本的时间点早。本发明的实施方式还包括非感染性阳性对照,即,具有高危流感 A 病毒 PL 的氨基酸序列的重组蛋白。

[0238] 初始 Western 印迹,(参见下面的实施例部分),显示生物样本中 NS1 水平足以允许在各种不同的可行免疫分析形式中检测这些抗原。但是,应证明特定生物样本中的 NS1

水平对于在特定免疫分析形式中检测是有限的,然后,作为另一种选择性的实施方式,通过体外感染细胞来扩增生物样本中的活病毒,即,病毒扩增样本中的 NS1 蛋白应该在大约 6 小时到大约 12 小时内可以检测到。在其它的选择性实施方式中,用于提高生物样本和病毒扩增样本中 NS1 抗原收率的方法包括利用蛋白酶抑制剂和蛋白酶体抑制剂,例如 MG132。

[0239] B. 试剂的制备

[0240] PL 肽, PDZ 结构域多肽,和适配体可以通过本领域已知的合成(即,利用设备)或者利用重组方法制备。例如,用于重组蛋白表达的方法和条件是本领域公知的,例如,参见 Sambrook, 上文,和 Ausubel, 上文。Winnacker “From Genes to Clones, VCH Publishers, N. Y., N. Y., 1987”;和 Ausubel, 上文,综合讨论了利用哺乳动物组织细胞培养表达多肽的用途。

[0241] 2003 年 7 月 29 日提交的美国专利申请序列号 10/630,590 和公布为 US20040018487 和美国专利序列号 6,942,981 中也公开了结合分析的细节。

[0242] 基于细胞的分析通常包括利用重组表达系统,共同产生(即,在相同细胞内产生,不管它们产生的时间)该 PDZ 结构域多肽和流感 PL。用于在真核细胞中产生该多肽的合适细胞公开在下面的实施例部分。有可能适于表达该 PDZ 结构域多肽和流感 PL 的细胞类型包括下列:例如,猴肾细胞(COS 细胞),SV40 转化的猴肾 CVI 细胞(COS-7, ATCC CRL 165 1);人胚肾细胞(HEK-293, Graham 等人, J. Gen. Virol. 36 :59(1977));HEK-293T 细胞;幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞(CHO, Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77 :4216, (1980));小鼠塞尔托利细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 :243-251(1980));猴肾细胞(CVI ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(hep G2, HB8065);小鼠乳腺癌(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI 细胞(Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68(1982));NIH/3T3 细胞(ATCC CRL-1658);和小鼠 L 细胞(ATCC CCL-I)。其他的细胞系将是显而易见的。各种各样的细胞可得自美国典型微生物菌种保藏中心(merieanType Culture Collection),10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209。

[0243] C. 样本制备

[0244] 可以使用包含可检测浓度的流感蛋白并优选 NS1 的任意样本。可使用样本的实例是,例如,肺渗出液,细胞提取物(呼吸器官,鼻内上皮层),血液,粘液,和鼻拭子。此处显示,在猪和人的鼻拭子中能够发现非常高浓度的 NS1。这是令人惊奇的,因为 NS1 被认为是一种胞内蛋白。因此,优选的用于 NS1 鉴定的样本是鼻分泌物。

[0245] 实施例中显示了 PL 蛋白与 PDZ 蛋白和 / 或抗体的结合,该结合在高达 0.05% SDS 的存在下发生,包括 0.03% 和 0.01%。因此,当鼻或者其他身体分泌物不可能容易地用于侧向流形式时,它可以用 SDS 处理。优选,添加的 SDS 的量直到最终浓度为 0.01%,更优选为 0.03%,甚至更优选为 0.05%。可以使用其他不干扰 PDZ 蛋白、抗体或者适体或者其他试剂与 PL 蛋白结合的去污剂和类似物。可以使用不干扰蛋白 / 蛋白相互作用的其他样品处理方法,包括用缓冲液或者水稀释。

[0246] D. 单独或者联用常规流感 A 试验

[0247] 该试验鉴定样本中流感 A 的存在。因此,该试验可以使用利用抗体或者适配体等鉴定 NS1 保守区域存在的方法。优选,单一单克隆抗体或者单一适配体鉴定全部 NS1 的变异体。当利用识别 NS1 蛋白保守区域的抗体时,这是非常可能的。或者,可以使用超过一种抗体和 / 或适配体和 / 或 PDZ 蛋白或者其他结合剂来鉴定全部流感 A 亚型。该方法还可以根据 NS1 蛋白的存在,使用抗体和 PDZ 蛋白的混合物来鉴定全部流感 A。常规流感 A 试验可以与更特异的试验联用来分型病毒,这些试验可以顺序或者同时进行。如果在该试验中使用,还可以参见上面用于优选的 PL 区和 PDZ 蛋白的泛特异抗体的说明。

[0248] E. 致病性流感 A 试验

[0249] 该试验鉴定具有 NS1 蛋白 PL 模体的全部形式的病毒。此处确定了流感 A 的非致病株具有缺失禽类 PL 模体的 NS1 蛋白。因此,特异性鉴定致病性流感 A 病毒存在的方法可以鉴定包含禽类 PL 区的 NS1 的存在。一种或者多种 PDZ 蛋白和 / 或抗体可用于鉴定所有的各种 PL 区。例如,如果只使用 PDZ 蛋白,至少需要两种 PDZ 蛋白来鉴定所有的 NS1 PL 蛋白。或者,使用能够识别包含 PL 区的 NS1 蛋白的单个抗体。优选,待鉴定的 NS1 的 PL 区是下列至少一种 :ESEV (SEQ ID NO :2), ESEI (SEQ ID NO :3), ESKV (SEQ ID NO :4), TSEV (SEQ ID NO :5), GSEV (SEQ ID NO :6), RSEV (SEQ ID NO :7), RSKV (SEQ ID NO :8), GSEI (SEQ ID NO :9), GSKV (SEQ ID NO :10), NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RICI (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV 和 SKI。优选,待鉴定的 PL 区是包含禽类 PL 区的。优选,一种或者多种 PDZ 蛋白选自表 1 或者 2 中的至少一种或者类似物或者活性片段。

[0250] F. 致病性 A 型禽流感病毒试验

[0251] H5N1 禽流感的 NS1 蛋白具有结合多样化 PDZ 结构域的 C 端序列,所述 PDZ 结构域不能结合典型人流感例如 H3N2 的 NS1。77% 的禽流感 H5N1 分离物的 NS1 蛋白末端是 ESEV (SEQ ID NO :2),此外, ESEV (SEQ ID NO :2)、ESKV (SEQ ID NO :4) 和 ESEI (SEQ ID NO :3) 后两个最常见的 C 端 NS1 序列,占禽流感分离物的另外 17%,也与 PSD-95 以高亲和力结合 (即 :分别为 45nM 和 200nM)。H3N2 NS1 的末端是 RSKV (SEQ ID NO :8),该序列与 PSD-95 结合的亲和力即使有的话也非常低。因此 PSD-95 可以用作禽流感的检测剂,并从其他株例如 H3N2 区别禽流感。

[0252] 尽管可以使用 PSD-95 的任意部分,只要其具有 PDZ 结构域,但 PSD-95 结构域 -1、-2 和 -3 具有不同的结合特异性和亲和力。作为鉴定的一部分,其中 PDZ 蛋白与禽流感 H5N1 PLs 的亲和力最高 (参见实施例 2 和表 4a-e),发现 PSD-95 结构域 2PDZ 结合的亲和力最高。因此,分析中使用的 PSD-95 PDZ 蛋白只需要包括蛋白的一种 PDZ 结构域,和优选包括至少来自结构域 2 的 PDZ 或者足以进行特异结合的其片段。PSD-95 PDZ 蛋白与样本接触。如果该样本包含致病性流感病毒 A,PSD-95 PDZ 与致病性流感病毒 NS1 蛋白的 PL 特异结合。

[0253] 可以使用例如图 8 和 11 和实施例 6 所叙述的侧向流形式,利用 PDZ 捕获然后是单克隆抗体检测,检测禽类 NS1 PL 蛋白。或者,侧向流形式可以使用单克隆抗体捕获和 PDZ 检测。利用一种或者多种重组 PDZ 蛋白作为捕获剂,沿着膜在特定位置沉积在膜上,可以产生侧向流 (参见实施例 6)。侧向流结果的分析可以定性或者定量的。优选,使用来自鼻分

泌物的患者样本。可以预先处理样本,使其更容易在侧向流形式使用的膜上流动。患者样本最初可以与偶联信号分子的泛反应性抗 NS1 单克隆抗体接触。用于检测的单克隆抗体优选不与所使用 PDZ 蛋白相同的抗原表位结合,而是,代之以结合全部 NS1 蛋白共有的分离抗原表位。如果样本中的 NS1 蛋白结合捕获剂(沉积在膜上的 PDZ 蛋白),PDZ 蛋白在膜上沉积的位点出现条带。利用这种侧向流形式可以检测对禽流感株特异的 C 端 NS1 模体。这些包括 ESEV(SEQ ID NO :2),ESEI(SEQ ID NO :3) 和 ESKV(SEQ ID NO :4)。在一些情况下,可以使用 EPEV(SEQ ID NO :27)。或者可以使用其他捕获剂,包括只与 NS1 蛋白的一种 PL 模体特异结合的抗体。

[0254] 为了定性或者定量分析和为了质量控制,可以包括下列对照的任意一种或者全部。对照带由山羊抗小鼠抗体(GAM)组成。鉴通过将结合全部形式 NS1 蛋白的抗体沉积在膜上,来定是否存在任何流感 A 的泳道。可包括阴性对照,其包括具有除了 PDZ 结构域以外全部结构域的 PSD-95 蛋白。其他对照可以包括用于定量信号的对照,例如已知与膜上捕获剂结合较弱、中等、较强或者根本不结合的纯化形式的 PL 蛋白,优选的捕获剂是 PDZ 蛋白或者对一种或者多种 PL 特异的抗体。

[0255] 可以包括用于定量信号的对照,以便分析结合强度来区别与 PSD-95 结合较弱或者中等的 PL。例如,实施例 6 指出利用下列符号定量结合强度:(-)是指没有结合,(+)是指较弱的结合,(++)是指中等的结合和(+++)是指较强的结合。与特定 PDZ 蛋白结合的强度可用于区别具有 NS1 的 H1N1,所述 NS1 末端是与 PSD-95 以中等亲和力结合的 RSEV。用于强结合的阳性对照可以是来自 H5N1 的纯化 NS1,用于较弱结合的对照可以是来自 H3N2 的纯化 NS1,用于中等结合的对照可以是来自 H1N1 的纯化 NS1。

[0256] 或者,可以使用其他 PDZ 蛋白进一步区分结合 PSD-95 的株。例如,如实施例 6 所示,H5N1 和 H1N1 都结合 PSD-95。所以,使用 INADLD8 鉴定病毒株是否是 H1N1 或者 H5N1,因为只有 H1N1 结合。与 INADLD8 的结合可以使得不容置疑地鉴定 PL 作为 H5N1 与 PSD-95 结合。在表 4a-e 和实施例 2 中可以发现结合 H1N1 但不结合 H5N1 的其他 PDZ 蛋白。

[0257] G. 特定 NS1 PL 试验

[0258] 该试验通过特定 NS1 PL 鉴定 NS1 PL 类的特定类型。它还可以通过特定 NS1 PL 类来鉴定亚型。虽然通常 HA 和 NP 抗原的类型与 NS1 PL 区相关,但情况不总是这样。有可能,例如,由于重配或者病毒能经受的其他遗传过程,来自例如 H1N1 病毒的 NS1 PL 区可能转移到 H2N1 病毒中。但是,不受特定理论限制,NS1 PL 区的存在可能对患者样本中病毒的致病性更具有提示作用。这可能是因为 NS1 在感染中所起的生物学作用。优选的试验鉴定人的 PL ESEV(SEQ ID NO :2)。优选的试验鉴定禽流感 A NS1 PL,该 PLs 具有模体 ESEV(SEQ ID NO :2),ESEI(SEQ ID NO :3),和 ESKV(SEQ ID NO :4)。这鉴定病毒的高致病性株,并可以采取合适测定来治疗和隔离疾病。其他优选的试验包括,例如,能够使人特异鉴定 NS1 PL 亚型的阵列。这类阵列还可以包括流感 A 的常规试验。这类试验还可以包括确定 HA 和 NP 蛋白类型的试验。优选,待鉴定的 PL 是下列的一种:ESEV(SEQ ID NO :2),ESEI(SEQ ID NO :3),ESKV(SEQ ID NO :4),TSEV(SEQ ID NO :5),GSEV(SEQ ID NO :6),RSEV(SEQ ID NO :7),RSKV(SEQ ID NO :8),GSEI(SEQ ID NO :9),GSKV(SEQ ID NO :10),NICI(SEQ ID NO :11),TICI(SEQ ID NO :12),RICI(SEQ ID NO :13),DMAL(SEQ ID NO :14),DMTL(SEQ ID NO :15),DIAL(SEQ ID NO :16),DLDY(SEQ ID NO :17),SICL(SEQ ID NO :18),

SEV, SEI, SKV 和 SKI. 更优选,待鉴定的 NS1 PL 是 ESEV (SEQ IDNO :2)。优选,所使用的至少一种 PDZ 蛋白选自表 1 或者 2 中的至少一种、片段或者类似物。更优选,至少一种 PDZ 蛋白是下列的至少一种:外膜蛋白, PSD95 (PDZ #2); PSD95 (PDZ #1,2,3); DLG1 (PDZ #1); DLG1 (PDZ #1,2); DLG1 (PDZ #2); DLG2 (PDZ #1); DLG2 (PDZ #2); Magi3 (PDZ #1); PTN3 (PDZ #1); MAST2 (PDZ #1); NeDLG (PDZ #1,2); Shank1 d1; Shank2 d1; Shank3 d1; Syntrophin1 α ; Syntrophin γ 1; Magi1 (PDZ #1); Magi1 (PDZ #4); Tip1; PTPL1 (PDZ #1); Mint3 (PDZ #1); LymMystique (PDZ #1); DLG2 (PDZ #3); MUPP1 (PDZ #8); NeDLG (PDZ #1); DLG5 (PDZ #1); PSD95 (PDZ #1); NumBP (PDZ #3); LIMK1 (PDZ #1); KIAA0313; DLG1 (PDZ #2); Syntenin (PDZ #2); Pick1 或者类似物或者片段和 / 或模拟任何 PDZ 蛋白的抗体 (或者适配体)。

[0259] H. 血清抗体的试验

[0260] 可以在任何形式的诊断方法中使用鉴定血清抗体存在的试验,所述抗体结合特定的 NS1 PL 模体和 / 或在 70 位具有丝氨酸的 NS2 蛋白。可以在侧向流或者其他形式中使用特定的包括重叠区的 NS1 PL 肽作为捕获剂,所述重叠区包含 Ser70。

[0261] I. 流行环境中分析的用途

[0262] 分析灵敏度和特异性可以该变,以实现生物样本中流感 A NS1 检测的不同绝对水平,例如,通过在竞争性分析形式中降低竞争性配体的水平,改变夹心分析中捕获和检测剂的量等等。因此,本试验方法包括各种具有不同性能属性的分析,以满足不同用途中的不同要求,如下面实施例部分所述。例如,在禽类流行环境中,通常记录到最高的 PPV 和阳性试验结果更可能是真实的,即,最低的 NPV 和假阴性结果倾向于更可能。此外在监控禽类对象中流感 A 的流行性时,将全部样本提供给参考实验室用于检验是目前的惯例。通过在本筛选分析中鉴定真正阳性的样本,例如,在野外或者护理点,本试验分析发现了减少最终必须提交给参考实验室用于检验的样本数目的用途,即,在流行期间当试验负担高时具有特别的价值。因为目前都是实行宰杀所有动物,而不管它们是否被感染,相对高的假阳性率是可以接受的,但是它还必须还具有相对低的假阴性率。在某些实施方式中,本发明提供具有不同特异性、灵敏度、PPV 和 NPV 的试验试剂盒,在流行期间使用,此处称为“流行性试验方法”。优选适合当前需要,本流行性试验方法具有以下分析性能:即,特异性大于约 65%;灵敏度大于约 90%;PPV 大于约 85%;NPV 大于约 65%;假阳性值小于大约 25%和假阴性率小于约 5%。

[0263] 相反,在禽类对象流感 A 发病率低的时候,通常记录到最低的 PPV,假阳性试验结果更有可能,和最高的 NPV,阴性试验结果倾向于更有可能和真实。在这些低发病率的时候,筛查目标可以是快速鉴定可能被感染的动物并隔离它们,直到例如在参考实验室中完成验证试验。因此,在某些实施方式中,本发明提供具有增强的灵敏度和 NPV 的试验方法,在低流感 A 发病率的时候使用,这时监控是根本的,即,此处称为“监控试验方法”。优选,该监控试验方法具有以下分析性能:即,特异性大于约 65%;灵敏度大于约 90%;PPV 大于约 85%;NPV 大于约 65%;假阳性率小于约 20%和假阴性率小于约 5%。当该监控试验方法用于筛查超过 100 个成员的禽群时,作为一个整体的禽群的 PPV 显著高于任何特定分析中得到的预测值。因此,当在监控试验方法中得到阳性试验结果时,利用上文的流行性试验分析法重复检测禽群成员可能证明是有益的。

[0264] 在人类而不是禽类中,试验目的当然是不同的。流感 A 感染的及时证据可能具有

重要的病例管理意义,例如,尽早提示在儿童或者老年对象中施用抗病毒剂。通常对人的诊断产物要求高度的特异性和灵敏度,例如,大于 90% 的特异性和,和大于 90% PPV 的灵敏度。但是,在所定义的流行环境中,例如,游船感染,那里 PPV 高;假阳性的可能性低,假阴性的可能性高;和,当提交样本进行验证试验时,可能需要较低的特异性例如 65%,以便进一步降低假阴性试验结果的数目例如该值小于大约 5%。

[0265] J. 诊断和治疗试剂盒

[0266] 提供实施本方法的试剂盒。该试剂盒不同于免疫分析试剂盒,至少存在下列一种或者多种成分:(i)PDZ 结构域多肽和(ii)打印的说明书,用于指导利用 PDZ 结构域多肽来鉴定生物样本中高危流感 A 禽类病毒株的分析。该试剂盒允许鉴定患者样本中的病毒蛋白而不是抗体,使其对被感染的个体更特异。该试剂盒任选包含一种或者多种试剂、缓冲液或者添加剂组合物或者上文公开的试剂;和,在某些实施方式中,该试剂盒还可以包含对流感 A 病毒 PL,优选 NS1 特异的抗体。在其他实施方式中,该试剂盒还可以包括一种装置,例如设备或者系统,用于从生物样本的其他潜在干扰物质中去除流感病毒 PL。如果需要,该试剂盒还可以包括,一种或者多种对进行分析有用的不同组分:例如,一种或者多种分析容器;一种或者多种对照或者校准试剂;一种或者多种在其上进行分析的固相表面;或者,一种或者多种缓冲液、添加剂或者检测剂或者抗体;一种或者多种打印说明书,例如包装插入物和/或容器标签,标明用于进行分析的各组分的量,以及,用于评价分析结果的指导。该试剂盒能包含用于进行各种不同类型分析形式的组分,包括例如测试条,夹心 ELISA,Western 印迹分析,胶乳凝集等等。该试剂盒内的参照、对照和校准物可以包含,例如,一种或者多种天然和非天然的流感 PL 蛋白,重组 PL 多肽,合成 PL 肽,PDZ 结构域多肽,PDZ 结构域肽和/或用于评价本方法的性能和准确度的合适比色和酶标准品。

[0267] 用于实施本方法的说明书通常记录在合适的记录介质上,并包括在试剂盒中,例如,作为包装插入物。例如,说明书可以打印在基质例如纸或者塑料上。在其他实施方式中,说明书可以数字记录在电子计算机可读的存储介质上,例如 CD-ROM,磁盘等等。在其他实施方式中,用户能够从远程数字源,例如在因特网网点,以可下载的文档文件形式获得用于进行本方法的说明书。

[0268] 任选,该试剂盒可以包括用于进行流感 A 常规试验以及特异试验的试剂。例如侧向流试验可以包括鉴定普通流感 A 病毒存在的道和鉴定病毒是否是禽流感 A 的道。常规试验可以是鉴定流感 A 病毒存在的任何试验,包括针对 NS1 存在的试验。可以包括的其他类型的普通流感 A 可以鉴定任何流感 A 蛋白。或者根据患者血液中抗体的存在可以鉴定流感 A 的存在。最后,通常可以使用 PCR 试验鉴定流感 A 的存在。

[0269] K. 阵列

[0270] 在其他实施方式中,本发明提供 PDZ,抗体,和/或适配体阵列,所述阵列由固定在固相上可识别选定位置的不同 PDZ 多肽、抗体和/或适配体或者类似的结合剂组成。阵列中每个固定的 PDZ 多肽、抗体和/或适配体对 PL 配体都对 PL 配体具有明确的结合亲合力和特异性,即,包括已鉴定的与流感病毒蛋白中 PL 的结合相互作用。阵列的区分活性由下列因素确定:(i)各自不同 PDZ 多肽、抗体和/或适配体的结合亲合力;(II)各自不同 PDZ 多肽、抗体和/或适配体对 PL 的结合特异性;和,(iii)分析条件,例如,离子强度,时间,pH 等等。PDZ 结构域是高度特异的,例如,MAST205 中的 PDZ 结构域能够区别包含 TDV 和 SDV

的C端PL序列。同样地,相同PDZ蛋白内,不同的各自结构域可能具有不同的结合特异性和亲合力,即,PSD-95结构域-1、-2和-3具有不同的结合特异性和亲合力。申请人已经在先前的美国专利申请中克隆、表达和公开了超过255个不同的人PDZ结构域的序列,所述PDZ结构域包括了人类基因组中超过90%的全部PDZ结构域。对PDZ结构域融合蛋白与不同的PL肽的相互作用作图,构成选择本流感阵列特定成员的基础。出乎意料地,阵列的选择性基于以下发现:(i)不同流感A株中有区别的不同NS1 PL氨基酸序列模体,如下面实施例部分所述;和,联合(ii)不同流感病毒蛋白中不同的PL序列模体,即,HA, NP, MA1, NS1等等。

[0271] 本发明的实施方式提供区别待测样本中流感A病毒或者流感B的不同株的方法,根据是流感病毒蛋白中PL的组成结合性质,例如,HA, NP, MA1, NS1等等,其中流感A和B的不同株和/或亚型在阵列中产生独特的结合模式。该方法包括以下步骤:(a)在阵列不同预定位置接触等份待测样本;(b)在阵列的特定位置检测结合的存在或者缺失;(c)根据阵列中的结合模式确定(i)待测样本中存在流感PL和(ii)阵列中PL结合的模式构成流感A或者B病毒特定毒株的区别标记。根据阵列可区别的流感A病毒的代表性实例包括例如H1N1, H2N2, H2N3, H2N5, H3N2, H3N8, H4N6, H5N1, H6N1, H6N2, H7N2, H7N3和H7N7。优选,该阵列至少部分基于和NS1 PL的结合。更优选,PDZ、抗体和/或适配体阵列特异地鉴定至少一种NS1 PL的存在,包括:ESEV(SEQ ID NO:2),ESEI(SEQ ID NO:3),ESKV(SEQ ID NO:4),TSEV(SEQ ID NO:5),GSEV(SEQ ID NO:6),RSEV(SEQ ID NO:7),RSKV(SEQ ID NO:8),GSEI(SEQ ID NO:9),GSKV(SEQ ID NO:10),NICI(SEQ ID NO:11),TICI(SEQ ID NO:12),RICI(SEQ ID NO:13),DMAL(SEQ ID NO:14),DMTL(SEQ ID NO:15),DIAL(SEQ ID NO:16),DLDY(SEQ ID NO:17),SICL(SEQ ID NO:18),SEV,SEI,SKV和SKI。更优选,NS1 PL是ESEV(SEQ ID NO:2)。优选,PDZ蛋白是选自表1或者2中的至少一种、片段或者类似物。更优选,阵列包括至少一种PDZ蛋白,抗体或者模拟表1和2中所列任意PDZ蛋白的适体,类似物和活性片段。更优选的,阵列包括PDZ蛋白,抗体模拟物和/或适配体,包括外膜蛋白,PSD95(PDZ #2);PSD95(PDZ #1,2,3);DLG1(PDZ #1);DLG1(PDZ #1,2);DLG1(PDZ #2);DLG2(PDZ #1);DLG2(PDZ #2);Magi3(PDZ #1);PTN3(PDZ #1);MAST2(PDZ #1);NeDLG(PDZ #1,2);Shank1 d1;Shank2 d1;Shank3 d1;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1;Magi1(PDZ #1);Magi1(PDZ #4);Tip1;PTPL1(PDZ #1);Mint3(PDZ #1);Lym Mystique(PDZ #1);DLG2(PDZ #3);MUPP1(PDZ#8);NeDLG(PDZ #1);DLG5(PDZ #1);PSD95(PDZ #1);NumBP(PDZ#3);LIMK1(PDZ #1);KIAA0313;DLG1(PDZ #2);Syntenin(PDZ #2);Pick1或者类似物或者片段和/或模拟任何PDZ蛋白的抗体(或者适配体)。

[0272] L. 侧向流设计

[0273] 类似于家庭妊娠试验,侧向流装置通过将液体施加于测试条起作用,所述测试条已经经过特异生物制剂处理。通过携带液体样本,用相应生物制剂标记的荧光体流过测试条,当它们进入特异区时能被捕获。测试条上发现的荧光体信号的量与靶分析物的量成比例。

[0274] 采用一些方法将怀疑含有流感A的样本添加到侧向流装置中,令样本通过扩散移动,线或者有色的区带表明流感A的存在。侧向流通常包括固相支持物(例如硝酸纤维素膜),其包含3个特定区域:样本添加区,包含一种或者多种固定的PDZ蛋白和抗体的捕获区,和包含一个或者多个区带的读出区,各区带包含一种或者多种标记物。侧向流还可以包

括阳性和阴性对照。因此,例如侧向流装置在某些实施方式中将按照如下进行:通过将等份生物样本接触测试条的一端,然后让蛋白在测试条上迁移,例如通过毛细管作用例如侧流,从生物样本中的其他病毒和细胞蛋白分离流感 PL 蛋白。包括一种或者多种 PL 结合剂例如 PDZ 多肽试剂、抗体和 / 或适配体作为捕获和 / 或检测剂。用于侧向流分离、检测和定量的方法和装置是本领域已知的,例如,美国专利号 5,569,608 ;6,297,020 ;和 6,403,383,在此完整引入作为参考。在一个非限制性实施例中,测试条包括用于上样的近端区域(上样区)和包含 PDZ 多肽捕获剂和缓冲试剂和添加剂的远端试验区,所述缓冲试剂和添加剂适于建立迁移的生物样本中 PDZ 多肽和任何流感 PL 蛋白之间的结合相互作用。在其他实施方式中,测试条包括两个试验区域,该区域包含不同的 PDZ 结构域多肽,即,每个能够特异地与不同的流感 PL 蛋白分析物相互作用。

[0275] XI. 药物组合物

[0276] 上述筛查过程可以鉴定一种或者多种类型的化合物,所述化合物可以掺入药物组合物。这些化合物包括试剂,所述试剂是至少一种 NS1 蛋白或者至少一种 PDZ 蛋白的转录、翻译和翻译后处理的抑制剂。该试剂还可能抑制或者阻断 NS1 和 PDZ 蛋白或者其混合物的结合。这些化合物还包括试剂,所述试剂是一种或者多种 NS1 蛋白、一种或者多种 PDZ 蛋白或者 NS1 和 PDZ 蛋白之间相互作用的抑制剂,并且所述试剂具有固有的呼吸和 / 或消化或者上皮细胞 - 特异活性或者成像活性。该化合物还包括偶联物,其中药剂或者成像组分与抑制剂连接,所述抑制剂是 NS1、PDZ 蛋白或者 NS1 蛋白和 PDZ 蛋白之间相互作用的抑制剂。还提供偶联物,所述偶联物包括具有药物活性的试剂和相对单独试剂对 PDZ 蛋白具有降低的底物能力的偶联基团,是为了减少该试剂转运入未感染细胞,在那里试剂将产生不需要的副作用。优选,该化合物或者试剂抑制或者阻断至少一种下列 PL 与 PDZ 蛋白的结合 :ESEV (SEQ ID NO :2), ESEI (SEQ ID NO :3), ESKV (SEQ ID NO :4), TSEV (SEQ ID NO :5), GSEV (SEQ ID NO :6), RSEV (SEQ ID NO :7), RSKV (SEQ ID NO :8), GSEI (SEQ ID NO :9), GSKV (SEQ ID NO :10), NICI (SEQ ID NO :11), TICI (SEQ ID NO :12), RIC1 (SEQ ID NO :13), DMAL (SEQ ID NO :14), DMTL (SEQ ID NO :15), DIAL (SEQ ID NO :16), DLDY (SEQ ID NO :17), SICL (SEQ ID NO :18), SEV, SEI, SKV 和 SKI。更优选,被阻断或者抑制的 NS1 PL 是 ESEV。优选,该化合物或者试剂抑制与至少一种来自表 1 或者 2 的 PDZ 蛋白的结合。更优选,被抑制的 PDZ 蛋白或者相互作用是下列至少一种 :PSD95 (PDZ #2) ;PSD95 (PDZ #1,2,3) ;DLG1 (PDZ #1) ;DLG1 (PDZ #1,2) ;DLG1 (PDZ#2) ;DLG2 (PDZ #1) ;DLG2 (PDZ #2) ;Magi3 (PDZ #1) ;PTN3 (PDZ #1) ;MAST2 (PDZ #1) ;NeDLG (PDZ #1,2) ;Shank1 d1 ;Shank2 d1 ;Shank3 d1 ;Syntrophin α ;Syntrophin γ 1 ;Magi1 (PDZ #1) ;Magi1 (PDZ #4) ;Tip1 ;PTPL1 (PDZ #1) ;Mint3 (PDZ #1) ;Lym Mystique (PDZ #1) ;DLG2 (PDZ#3) ;MUPP1 (PDZ #8) ;NeDLG (PDZ #1) ;DLG5 (PDZ #1) ;PSD95 (PDZ#1) ;NumBP (PDZ #3) ;LIMK1 (PDZ #1) ;KIAA0313 ;DLG1 (PDZ #2) ;Syntenin (PDZ #2) ;Pick1 或者类似物或者片段和 / 或模拟任何 PDZ 蛋白的抗体 (或适配体)。

[0277] 一种或者多种上述实体可以与药物可接受的、无毒的载体或者稀释剂组合,所述载体或者稀释剂定义为通常用来配制用于动物或者人类给药的药物组合物的介质。选择稀释剂以便不影响组合的生物活性。这类稀释剂的实例是蒸馏水,缓冲水,生理盐水,磷酸盐缓冲液 (PBS), Ringer 氏溶液,右旋糖溶液和 Hank 氏溶液。此外,药物组合物或者制剂

还可以包括其他载体,佐剂,或者无毒的非治疗性非免疫性稳定剂、赋形剂等等。组合物还可以包括其他物质以接近生理条件,例如 pH 调节和缓冲剂,毒性调节剂,湿润剂,去污剂等等(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company Publishing Company, Philadelphia, PA, 第 17 版(1985);用于药物投放方法的简要综述可以参见, Langer, Science 249:1527-1533(1990);这些参考文件中的每一篇均在此完整引入作为参考)。

[0278] 用于口服给药的药物组合物可以是例如下列形式,片剂,丸剂,粉剂,锭剂,袋剂,囊剂(cachet),酏剂,悬浮液,乳剂,溶液,或者糖浆剂。合适赋形剂的一些实例包括乳糖,右旋糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,淀粉,阿拉伯树胶,磷酸钙,藻酸盐,黄芪胶,明胶,硅酸钙,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,纤维素,无菌水,糖浆,和甲基纤维素。还可以包括防腐剂例如甲基-和羟丙基苯甲酸盐(propylhydroxy-benzoates);甜味剂;和调味剂。根据剂型,在对患者给药后组合物可以提供快速的、持续的或者延迟的活性成分释放。聚合材料可以用于口服缓释投放(参见"Medical Applications of Controlled Release," Langer 和 Wise(编著),CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974);"Controlled Drug Bioavailability," Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball(编著), Wiley, New York(1984);Ranger 和 Peppas, 1983, J Macromol. Sci. Rev. Macromol Chem. 23:61;还可参见 Levy 等人, 1985, Science 228:190;During 等人, 1989, Ann. Neurol. 25:351;Howard 等人, 1989, J. Neurosurg. 71:105)。通过将偶联物包裹在胶囊内或者缓慢溶解的多聚体内,能够实现缓释。优选的多聚体包括羧甲基纤维素钠,羟丙纤维素,羟丙甲基纤维素和羟乙基纤维素(最优选,羟丙基甲基纤维素)。其他优选的纤维素醚已经被描述(Alderman, Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr., 1984, 5(3)1-9)。本领域已经描述了影响药物释放的因素(Bamba 等人, Int. J. Pharm., 1979, 2, 307)。为了通过吸入给药,根据此处公开的内容应用的化合物采用气溶胶喷雾制剂形式可以方便地投放,所述制剂来自增压包装或者喷雾器,借助于合适的喷射剂,例如,二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,二氧化碳或者其他合适的气体,或者来自无喷射剂的干粉吸入器。就增压气雾剂而言,剂量单位可以通过设置投放计量的阀来确定。例如在吸入器或者吹入器中使用的明胶的胶囊和药筒,可以制成包含化合物和合适的粉末基质例如乳糖或者淀粉的粉末混合物。

[0279] 根据几个良好确立的方案的任意一个,容易确定药物组合物的有效剂量和给药方式(给药的量和频度)。例如,通常利用动物研究(例如,小鼠,大鼠)确定生物活性试剂的每千克重量的最大耐受剂量。通常,至少一种被测的动物种类是哺乳动物。来自动物研究的结果可以推断确定在其他种类中使用的剂量,例如人类。

[0280] 可以向患者施用化合物用于预防性和/或治疗性处理。治疗量是指无论以任何方式,足以治疗疾病状态或者症状,或者其他预防、阻止、延缓、或者逆转疾病或者任何其他不良症状进程的量。在预防性应用中,向易感特定疾病或者感染或者处于该风险下的患者施用化合物。因此,"预防有效的"量是足以预防、阻止或者延缓疾病状态或者其症状的量。在任一种情况下,组合物中包含的化合物的准确量取决于患者的健康和体重情况。

[0281] 确定药物组合物的合适剂量,例如,通常利用动物研究(例如,小鼠,大鼠)确定生物活性试剂的每千克重量的最大耐受剂量。通常,至少一种被测的动物种类是哺乳动物。来自动物研究的结果可以推断确定在其他种类中使用的剂量,例如人类。

[0282] 药物组合物的组分优选是高纯度的,并且基本上不含潜在有害的污染物(例如至少国家食品(NF)级的,通常至少分析级的,和更常见至少药物级的)。

[0283] 为了给定化合物必须在使用前合成的程度,所得产物通常基本上不含任何潜在的毒剂,尤其是任何内毒素,内毒素可能在合成或者净化步骤期间存在。通常在GMP条件下制备组合物。用于肠胃外给药的组合物通常是无菌的和基本上等渗的。

[0284] A. 抗病毒剂

[0285] 适合本发明使用的药物组合物包括其中包含有效剂量活性剂的组合物。抗病毒剂包括NS1、PDZ和/或NS1/PDZ相互作用的抑制剂,所述抑制剂优选显示出对NS1或者PDZmRNA或者蛋白水平的至少30,50,75,95,或者99%的抑制。利用特异结合蛋白的抗体然后检测抗体和蛋白之间形成的复合物,可以通过建立免疫分析定量蛋白的表达。可以通过例如,点印迹分析,原位杂交,RT-PCR,定量逆转录PCR(即,称为“TaqMan”方法),Northern印迹和核酸探针阵列方法,定量mRNA水平。优选,用于鉴定抑制剂的NS1 PL是下列一种:ESEV(SEQ IDNO:2),ESEI(SEQ ID NO:3),ESKV(SEQ ID NO:4),TSEV(SEQ IDNO:5),GSEV(SEQ ID NO:6),RSEV(SEQ ID NO:7),RSKV(SEQ IDNO:8),GSEI(SEQ ID NO:9),GSKV(SEQ ID NO:10),NICI(SEQ IDNO:11),TICI(SEQ ID NO:12),RICI(SEQ ID NO:13),DMAL(SEQ IDNO:14),DRTL(SEQ ID NO:15),DIAL(SEQ ID NO:16),DLDY(SEQ ID NO:17),SICL(SEQ ID NO:18),SEV,SEI,SKV和SKI。更优选,用于鉴定抑制剂的NS1 PL是ESEV(SEQ ID NO:2)。优选,用于鉴定抑制剂的PDZ蛋白是选自表1或者2中的至少一种、片段或者类似物。更优选,用于鉴定抑制剂的PDZ蛋白是下列至少一种:外膜蛋白,PSD95(PDZ #2);PSD95(PDZ #1,2,3);DLG1(PDZ #1);DLG1(PDZ#1,2);DLG1(PDZ #2);DLG2(PDZ #1);DLG2(PDZ #2);Magi3(PDZ#1);PTN3(PDZ #1);MAST2(PDZ #1);NeDLG(PDZ #1,2);Shank1 d1;Shank2 d1;Shank3 d1;Syntrophin1 α ;Syntrophin γ 1;Magi1(PDZ #1);Magi1(PDZ #4);Tip1;PTPL1(PDZ #1);Mint3(PDZ #1);Lym Mystique(PDZ #1);DLG2(PDZ #3);MUPP1(PDZ #8);NeDLG(PDZ #1);DLG5(PDZ #1);PSD95(PDZ #1);NumBP(PDZ #3);LIMK1(PDZ #1);KIAA0313;DLG1(PDZ #2);Syntenin(PDZ #2);Pick1或者类似物或者片段和/或模拟任意PDZ蛋白的抗体(或者适配体)。

[0286] 抗病毒剂可以包括经鉴定与PDZ蛋白结合的PL肽治疗剂,所述PDZ蛋白与流感NS1或者其他PL蛋白相互作用。抗病毒剂包括基于PL模体或者PDZ结构域的肽。用于抑制流感病毒PL和与PL结合的PDZ结构域相互作用的一些示范性肽显示于表11(SEQ IDNOS:89-987)。其他有用的肽是SEQ ID NOS:2,48,53,996和997,如实施例所述。本发明的治疗剂包括肽本身,包括从C端开始的至少5、10、15或者20个连续残基的其截短型,和所有这些肽的保守取代变异体和模拟物,任选将它们掺入药物组合物中。保守取代,如果有的话,优选发生于所述肽的C端3-4个氨基酸外。阻断致病性流感PL与PDZ结合的肽可用于治疗致病性流感。优选,表11所示的肽,其截短型、保守取代的变异体或者模拟物与转运蛋白肽(蛋白转导结构域)在肽序列的N端连接。可以使用数个转运蛋白肽序列,包括Tat和触足蛋白(antennapedia)(参见实施例7)。抗病毒治疗剂还包括抑制病毒PL和PDZ之间相互作用的小分子,以及Cox2抑制剂(如此处表8中鉴定的)。已经在此处的表9和10中鉴定了一些小分子抑制剂。

[0287] B. 筛选抗病毒剂的方法

[0288] 此处公开了筛选与 NS1 PL 蛋白和 / 或 PDZ 蛋白结合的试剂的方法。最初筛选的是与 NS1 PL 或者 PDZ 蛋白的 PDZ 结构域结合的试剂。然后检测它们抑制 PDZ/PL 相互作用的能力。在下面的“B. 抗病毒剂分析”中也提供了这些方法。可以在体外利用天然或者合成的 PL 蛋白进行结合分析。或者, 包含天然或者合成的 PDZ 结构域的蛋白可用于鉴定能够结合特定 PDZ 蛋白的试剂。

[0289] 此处公开的筛选抗病毒剂的方法鉴定阻断或者抑制病毒 PL 和任何与其有相互作用的 PDZ 蛋白之间相互作用的试剂。筛选抑制剂和编码其的 DNA 的抑制 NS1 和 / 或 PDZ 表达的能力。进行初筛, 选择能够抑制或者终止 PDZ/PL 相互作用的试剂亚组。这样的分析可以在体外进行, 利用分离的 PDZ 蛋白和 PL 蛋白或者其能够彼此结合的片段。这样的筛选鉴定的试剂然后能够进行功能分析。还可以在表达 PL 蛋白的细胞中筛选试剂, 所述细胞或者天然表达 PDZ 蛋白, 或者经转化表达 PDZ 蛋白。

[0290] 除了以上公开和说明的诊断试验外, 实施方式提供鉴定能够调节一种或者多种结合相互作用的候选抗病毒剂的分析法, 所述结合相互作用发生在流感 A 感染的细胞中流感病毒 PL 和宿主细胞 PDZ 多肽之间。该方法包括在抗病毒剂存在下, 检测对照 PL 例如合成 PL 肽, 与 PDZ 结构域多肽例如重组 PDZ 融合蛋白的结合。候选抗病毒剂调节对照 PL 和 PDZ 结构域多肽之间的结合。申请人之前在美国和国际专利申请中, 例如在此完整引入作为参考的美国专利号 5, 569, 608 ;6, 297, 020 ;和 6, 403, 383 中, 已经公开了测定对照 PL 和 PDZ 结构域多肽之间结合相互作用的分析。

[0291] 特别有用的筛选分析使用既表达一种或者多种流感 NS1 PL 又表达一种或者多种 PDZ 结构域蛋白的细胞。这类细胞能够通过用编码蛋白的多核苷酸共转染细胞重组产生, 或者能够通过用第二种蛋白转染天然包含蛋白之一的细胞产生。在一个特定实施方式中, 这类细胞在多孔培养皿中生长, 与不同浓度的待测化合物接触预定的时间段, 所述时间段能够根据经验确定。分析全细胞裂解产物、培养基或者细胞膜对 PL/PDZ 相互作用的抑制。与对照相比显著抑制活性的待测化合物被认为是治疗剂候选物。

[0292] 分离的 PDZ 结构域蛋白或者其 PL 结合片段, 可以在任何的各种药物筛选技术中用于筛选治疗化合物。或者, 能够使用包含 PL 模体的分离 NS1 PL 蛋白或者片段。用于这类试验的蛋白可以是膜结合的, 在溶液中游离的, 固着在固相支持物上, 带在细胞表面的, 或者位于细胞内的。可以测定 PDZ 结构域或者 NS1 PL 和待测试剂之间结合复合物的形成。更具体地, 如果相互作用比无待测化合物存在时测量的相互作用显著更低, 则待测化合物被认为是 PDZ/PL 相互作用的抑制剂。在该背景下, 术语“显著更低”是指在待测化合物存在下, PDZ/PL 相互作用与无待测化合物存在条件下测量的相互作用相比时显著更低, 在分析法的置信限内。

[0293] 还可以筛选肽或者其他化合物的随机文库适合作为 PDZ/PL 结合的抑制剂, 或者单纯结合 PDZ 结构域蛋白或者 NS1 PL 蛋白。许多类型的化合物都可以产生组合文库, 其可以采用逐步方式合成。这类化合物包括多肽, β -转角模拟物, 多糖, 磷脂, 激素, 前列腺素, 类固醇, 芳香族化合物, 杂环化合物, 苯二氮平, 低聚 N-取代甘氨酸和低聚氨基甲酸酯 (oligocarbamates)。通过编码合成文库 (ESL) 方法可以构建化合物的大组合文库, 所述方法描述于 Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 和 Scripps, WO 95/30642 (各在此引入作为参考用

于所有目的)。

[0294] 用于筛选治疗剂或者治疗先导物的待测化合物的优选来源是噬菌体展示文库。参见,例如, Devlin, W091/18980 ;Key, B. K., 等人编著, Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996。噬菌体展示是一种强大的技术,能够令人从包含 10^8 - 10^9 个不同序列的文库中,使用噬菌体遗传学选择和扩增具有所需特征的肽或者蛋白。可以设计文库,用于氨基酸序列在所需位置的选择性上色 (variegation), 允许文库对所需特征的偏好。设计文库使肽表达为与噬菌体表面展示的蛋白融合。挑选具有所需特征的噬菌体展示肽,并能再生长进行扩增。因为肽是通过噬菌体的增殖扩增的,可以方便的测序所选噬菌体的 DNA, 从而促进所选肽的快速分析。

[0295] 通过选择特异结合 PDZ 结构域蛋白和 / 或 NS1 PL 的噬菌体,能够挑选出编码肽抑制剂的噬菌体。产生融合到蛋白的文库,例如表达在噬菌体表面上的基因 II。文库可以由不同长度的、线性的或者通过包含两个 Cys 氨基酸进行限制的肽组成,与噬菌体蛋白融合,或者还能够融合到其他作为支架的蛋白。还能够设计文库偏好此处公开的 PL 区或者偏好从初始文库选择的结合噬菌体得到的肽序列,所述初始文库提供其他的待测抑制剂化合物。

[0296] C. 抗病毒剂的类型

[0297] 下面阐明的任意试剂可以用作药物以及那些在筛选方法中鉴定者。抑制剂可以从任意类型的文库鉴定,包括 RNA 表达文库,噬菌体表达文库,小分子文库,肽文库。还可以利用核酸和 / 或多肽的已知序列产生抑制剂。化合物还包括几类已知调控基因表达的分子,例如锌指蛋白,核糖酶, siRNAs 和反义 RNAs。

[0298] (a) siRNA 抑制剂

[0299] siRNAs 是相对较短的、至少部分双链的 RNA 分子,其用于抑制互补 mRNA 转录体的表达。尽管实现本发明不需要理解机理,但是认为 siRNAs 通过诱导互补 mRNA 转录体的降解起作用。设计和使用 siRNAs 的原理通常描述于 WO 99/32619, Elbashir, EMBO J. 20, 6877-6888 (2001) 和 Nykanen 等人, Cell 107, 309-321 (2001) ;W001/29058。

[0300] 本发明的 siRNAs 由至少部分互补的 RNA 的两条链形成,每条链优选长度为 10-30, 15-25, 或者 17-23 或者 19-21 个核苷酸。所述链可以在全长彼此完全互补,或者在另外双链分子的一端或者两端具有单链 3' - 突出端。单链突出端,如果存在,通常是 1-6 个碱基,优选 1 或者 2 个碱基。选择 siRNA 的反义链与 NS1 或者 PDZ 转录体的片段基本上互补 (例如,至少 80, 90, 95% 和优选的 100%)。任何错配的碱基优选存在于 siRNA 链的末端或者在末端附近。末端错配的碱基能够是脱氧核糖核苷酸。siRNA 的有义链显示与 NS1 或者 PDZ 转录体片段的互补体相似的关系。特别合适的 siRNAs 具有两条链,每条具有 19 个碱基的完全互补性,并且在有义链的 3' 端具有两个不配对的碱基,在反义链的 3' 端具有一个不配对的碱基。

[0301] 如果就这样施用 siRNA,因为编码 siRNA 的 DNA 的形式不同,则 siRNA 的链可以包含一种或者多种核苷酸类似物。核苷酸类似物位于那些抑制剂活性基本上不受影响的位置,例如在 5' - 端和 / 或 3' 端区域,尤其是单链突出区。优选核苷酸类似物是糖 - 或者骨架 - 修饰的核糖核苷酸。核酸碱基 - 修饰的核糖核苷酸,即核糖核苷酸,包含非天然存在的核酸碱基而不是天然存在的核酸碱基,例如 5- 位修饰的尿苷或者胞苷,例如 5-(2- 氨

基) 丙基尿苷, 5- 溴尿苷; 8 位修饰的腺苷和鸟苷, 例如 8- 溴鸟苷; 去氮核苷酸, 例如 7- 去氮- 腺苷; 0- 和 N- 烷基化核苷酸, 例如 N6- 甲基腺苷也是合适的。在优选的糖修饰核糖核苷酸中, 2' OH- 基团被选自 H, OR, R, 卤素, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ 或者 CN 的基团取代, 其中 R 是 C1-C6 烷基, 烯基或者炔基, 卤素是 F, Cl, Br 或者 I。在优选的骨架- 修饰的核糖核苷酸中, 与相邻核糖核苷酸连接的磷酸酯基团被修饰的基团例如硫代磷酸酯基团取代。在 siRNA 5' 羟化残基上的磷酸基中引入其他优选的修饰。通过用 ATP 和 T4 激酶处理 siRNA, 可以引入这样的基团。还可以修饰天然 RNA 的磷酸二酯键, 以包括至少一种氮或者硫杂原子。可以使 RNA 结构中的修饰适合于特定的基因抑制, 同时避免一些生物体中由 dsRNA 引起的常见恐慌反应。同样地, 可以修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。

[0302] NS1 或者 PDZ 转录体内的许多片段是设计 siRNAs 的合适目标。当 NS1 PL 的选定片段用于选择性靶定亚型时, 该片段优选显示与转录体的其他 NS1 PL 区缺少完全的序列同一性。优选, NS1 或者 PDZ 蛋白的选定片段显示出与 NS1 PL 的相应片段 (如果有的话) 至少 1、2、3、4 或者更多个核苷酸差异。可以从 NS1 或者 PDZ 的编码区、5' UTR 和 3' UTR 选择靶位点, 在一些情况下, NS1 的 PL 位点是优选的。优选的靶位点是称为 NS1 PL 的 siRNA (参见实施例)。该位点在 C 端, 并对流感 A 病毒亚型特异。其他优选的位点包括 PDZ 蛋白的 PL 结合位点。

[0303] 通过在一对启动子之间插入编码 siRNA 的 DNA 片段, 能够重组合成 siRNA, 所述启动子定向驱动插入片段从反方向的转录。这类启动子的转录产生两个互补 RNA 链, 该互补 RNA 链随后能退火形成所需的 dsRNA。用于这类系统的示范性质粒包括质粒 (PCR 4.0 TOPO) (由 Invitrogen 提供)。另一个实例是载体 pGEM-T (Promega, Madison, WI), 其中反向定向的启动子是 T7 和 SP6; 还可以使用 T3 启动子。或者, 编码 siRNA 链的 DNA 片段被插入到单启动子的下游。在该系统中, 共转录 siRNA 的有义和反义链, 产生自身互补的单 RNA 链, 从而能够形成 dsRNA。编码 siRNAs 的载体可以在体外或者细胞培养物中转录, 或者可以导入转基因动物或者患者用于原位表达。合适的载体描述如下。用于重组表达的启动子和任意的其他调控序列的选择可以决定表达的组织特异性。例如, PDGF, 朊病毒, 神经烯醇酶, 或者 thy-1 启动子适合于在中枢神经系统表达。

[0304] 还能够通过有机化学合成和体外退火, 合成 siRNAs 的链。如果是化学合成或者通过体外酶促合成, RNA 在导入细胞前可以纯化。例如, 通过用溶剂或者树脂沉淀、电泳、层析、或者其组合来提取, 可以从混合物中纯化 RNA。RNA 可以被干燥用于储存, 或者溶于水溶液。溶液可包含促进退火和 / 或双链稳定的缓冲液或者盐。通过各种方法, 能够将 siRNAs 以 RNA 或者编码 RNA 的 DNA 形式导入细胞或者生物体, 如下面所述。

[0305] (b) 反义多核苷酸

[0306] 通过结合并干扰有义 mRNA 的翻译, 干扰转录, 干扰 RNA 前体的加工或者定位, 抑制 mRNA 的转录或者通过一些其它机理起作用, 反义多核苷酸能够造成抑制。反义分子通过何种特定机理减少表达不是最关键的。

[0307] 通常反义多核苷酸包括至少 7 至 10 到通常 20 或者更多个核苷酸的单链反义序列, 所述序列与来自基因 mRNA 的序列特异杂交。一些反义多核苷酸来自长度约 10 到大约 50 个的核苷酸, 或者长度大约 14 到大约 35 个的核苷酸。一些反义多核苷酸是小于大约 100 个核苷酸或者小于大约 200 个核苷酸的多核苷酸。通常, 如果需要, 反义多核苷酸应该足够

长以形成稳定的双链,但是还需足够短以便体内给药,这取决于给药方式。与靶序列特异杂交所需的多核苷酸最小长度取决于几个因素,尤其是,例如 G/C 含量,错配碱基(如果有的话)的位置,与靶多核苷酸群相比该序列的独特程度,和多核苷酸的化学性质(例如,甲基磷酸酯骨架,肽核酸,硫代磷酸酯)。

[0308] 为确保特异杂交,反义序列至少与编码它们的靶 mRNA 或者基因的片段基本上互补。一些反义序列与它们的目标靶序列完全互补。但是反义多核苷酸还能包括,核苷酸取代,添加,缺失,转换,转座,或者修饰,或者其他核酸序列或者非核酸部分,只要将与对应于 RNA 或者其基因的有关靶的序列特异结合保留作为该多核苷酸的功能性质。用于抑制 NS1 或者 PDZ 蛋白表达的反义多核苷酸被设计成显示出与特定 NS1 或者 PDZ 基因或者转录体的完全的或者相当程度的序列一致性,和与不同 PDZ 基因的不完全的和较低程度的序列一致性。

[0309] 一些反义序列与 mRNA 相对易接近的序列(例如,相对缺少二级结构)互补。这可以通过分析预测的 RNA 二级结构来确定,利用例如 MFOLD 程序(Genetics Computer Group, Madison WI)和本领域已知的体外或者体内检验。用于鉴定有效反义组合物的另一个有用的方法利用寡聚核苷酸的组合阵列(参见,例如, Milner 等,1997, Nature Biotechnology 15 :537)。

[0310] 可以利用任何合适的生产核酸的方法制备反义核酸(DNA, RNA, 修饰的,类似物,等等),例如此处公开的化学合成和重组方法。反义 RNA 可以就这样投放或者以编码反义 RNA 的 DNA 形式投放。编码反义 RNA 的 DNA 可以作为载体的成分或者非复制形式投放,例如下面所述。

[0311] (c) 锌指蛋白

[0312] 锌指蛋白还可以用于抑制 NS1 或者 PDZ 蛋白或者核酸或者特定 NS1 亚型的表达。锌指蛋白可以工程化或者选择结合靶基因内的任意需要的靶位点。在一些方法中,靶位点在启动子或者增强子内。在其他方法中,靶位点在结构基因内。在一些方法中,锌指蛋白与翻译阻遏剂连接,例如来自人类 KOX-1 蛋白的 KRAB 抑制结构域(Thiesen 等人, New Biologist 2, 363-374(1990); Margolin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 4509-4513(1994); Pengue 等人, Nucl. Acids Res. 22 :2908-2914(1994); Witzgall 等人, Proc. Natl Acad. Sci USA 91, 4514-4518(1994)。WO 00/00388 描述了选择适合被锌指蛋白靶定的靶位点的方法,和设计锌指蛋白结合选定的靶位点的方法。EP. 95908614.1 描述了利用噬菌体展示选择与靶结合的锌指蛋白的方法。用于设计锌指蛋白的靶位点通常是大约 9-19 个核苷酸。为了抑制 NS1 或者 PDZ 蛋白或者多核苷酸,在 NS1 或者 PDZ 蛋白或者多核苷酸内选择靶位点,所述位点显示与上面讨论的不同 PDZ 基因或者转录体是不完全的或者缺乏显著的序列一致性。WO 00/00409 描述了利用锌指蛋白调控内源基因的方法。锌指蛋白可以作为蛋白或者以编码锌指的核酸形式给药。在后一种情况下,核酸可以利用载体或者如下所述的不可复制形式投放。

[0313] (d) 核糖酶

[0314] 核糖酶是充当酶的 RNA 分子,并且能够被工程化在特定位点切割其他 RNA 分子。该过程中核糖酶自身不消耗,并且能够催化作用于切割 mRNA 靶分子的多个拷贝。Haseloff & Gerlach, (1988) Nature 334 :585-591 和 Uhlenbeck, (1987) Nature 328 :596-603 和 US

5, 496, 698 描述了设计反向切割靶 RNA 的核糖酶的一般规则。

[0315] 核糖酶通常包括两个侧翼片段和侧翼片段之间的催化区, 所述侧翼片段显示与转录体(靶亚位点)上的两个位点互补并与其结合。侧翼片段通常长 5-9 个核苷酸, 最佳长 6-8 个核苷酸。核糖酶催化区的长度通常是大约 22 个核苷酸。mRNA 靶在靶亚位点之间包含一致的 (consensus) 切割位点, 具有通式 NUN, 优选 GUC (Kashani-Sabet 和 Scanlon, (1995) *Cancer Gene Therapy* 2:213-223; Perriman, 等人, (1992) *Gene (Amst.)* 113:157-163; Ruffher, 等人, (1990) *Biochemistry* 29:10695-10702; Birikh, 等人, (1997) *Eur. J. Biochem.* 245:1-16; Perrealt, 等人, (1991) *Biochemistry* 30:4020-4025)。

[0316] 通过选择靶亚位点, 并从而选择与该亚位点互补的核糖酶侧翼片段, 可以控制核糖酶的特异性。对于 NS1 或者 PDZ 蛋白的抑制剂, 优先选择靶亚位点, 使在其他 PDZ 蛋白中不存在准确的相应亚位点, 并优选没有具有显著序列一致性的相应亚位点。核糖酶可以作为 RNA 分子, 或者以编码核糖酶的 DNA 作为可复制载体组分的形式, 或者采用如下所述的不可复制的形式, 进行投放。

[0317] (e). 抗体

[0318] 化合物包括抗体, 完整的和其结合片段二者都是, 例如 Fabs, Fvs, 它们与本发明基因编码的蛋白特异结合。通常抗体是单克隆抗体, 尽管多克隆抗体也能重组表达(参见, 例如, US6, 555, 310)。能够表达的抗体实例包括小鼠抗体, 嵌合抗体, 人源化抗体, 镶嵌 (veneered) 抗体和人类抗体。嵌合抗体是轻和重链基因已经构建的抗体, 通常通过遗传工程对属于不同种类的免疫球蛋白基因片段进行构建(参见, 例如, Boyce 等人, *Annals of Oncology* 14:520-535(2003))。例如, 小鼠单克隆抗体基因的可变 (V) 片段可以与人的恒定 (C) 片段连接。典型的嵌合抗体因此是一种杂合蛋白, 由小鼠抗体的 V 或者抗原结合结构域和人抗体的 C 或者效应器结构域组成。人源化抗体具有基本上来自人抗体的可变区骨架残基(称为受体抗体)和基本上来自小鼠抗体的互补决定区,(称为供体免疫球蛋白)。参见 Queen 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033(1989) 和 WO 90/07861, US 5, 693, 762, US 5, 693, 761, US 5, 585, 089, US 5, 530, 101 和 Winter, US 5, 225, 539。恒定区 (constant region), 如果存在, 也基本上或者全部来自人免疫球蛋白。特别是, 通过常规杂交瘤方法, 噬菌体展示(参见, 例如, Dower 等人, WO 91/17271 和 McCafferty 等人, WO 92/01047), 利用具有人免疫系统的转基因小鼠 (Lonberg 等人, WO93/12227(1993)), 可以获得抗体。编码免疫球蛋白链的核酸可以从产生抗体的杂交瘤或者细胞系获得, 或者基于已出版文献中的免疫球蛋白核酸或者氨基酸序列。

[0319] (f). 模拟化合物

[0320] 在特定实施方式中, 本筛选法化合物中鉴定的该候选抗病毒化合物是所述 PDZ 结构域多肽或者 PL 的模拟肽, 即, 与所述 PDZ 结构域或者 PL 具有基本上相同的结构和 / 或功能特点的合成化合物。所述模拟物可以完全由氨基酸的合成、非天然类似物组成, 或者, 是部分天然肽氨基酸和部分氨基酸非天然类似物的嵌合分子。模拟物还包括任意量的天然氨基酸保守取代, 只要这类取代也是基本上不改变模拟物的结构和 / 或抑制或者结合活性。至于是保守变异体的本发明多肽, 常规实验法确定模拟物是否在本发明的范围内, 即, 其结构和 / 或功能基本上不改变。因此, 如果模拟组合物能够抑制所述多肽之间的结合, 则该模拟组合物在本发明的范围内。

[0321] 模拟物可以包含非天然结构组分的任意组合,它们通常来自 3 个结构组:a)除了天然酰胺键(“肽键”)连接外的残基连接组;b)代替天然存在的氨基酸残基的非天然的残基;或者c)诱导二级结构模拟的残基,即,诱导或者稳定二级结构,例如, β 转角, γ 转角, β 折叠, α 螺旋构象,等等。

[0322] 当多肽残基的全部或者一些通过除了天然肽键外的化学方法连接时,多肽可以表征为模拟物。个体模拟肽残基可以通过肽键、其他化学键或者偶联方法连接,例如,戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯,双官能马来酰亚胺,N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)或者N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)。可以替代常规酰胺键(“肽键”)连接的连接基团包括,例如,酮亚甲基(例如,对于 $-C(=O)-NH-$ 的 $-C(=O)-CH_2-$),氨基亚甲基(CH_2-NH),乙烯,烯烃($CH=CH$),醚(CH_2-O),硫醚(CH_2-S),四唑(CN_4-),噁唑,逆酰胺(retroamide),硫代酰胺,或者酯(参见,例如,Spatola(1983)Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, A Peptide Backbone Modifications, Marcell Dekker, NY)。

[0323] 通过包含全部或者一些非天然残基取代天然存在的氨基酸残基,多肽也可以表征为模拟物。在科学和专利文献中详尽描述了非天然残基;下面描述了可用作天然氨基酸残基模拟物的一些示范性非天然组合和指导方针。

[0324] 芳香族胺基酸的模拟物能够通过用以下物质取代而产生,例如,D-或者L-萘基丙氨酸(naphylalanine);D-或者L-苯基甘氨酸;D-或者L-2-噁吩丙氨酸;D-或者L-1,2,3,或者4-芘基丙氨酸(pyrenylalanine);D-或者L-3-噁吩丙氨酸;D-或者L-(2-吡啶基)-丙氨酸;D-或者L-(3-吡啶基)-丙氨酸;D-或者L-(2-吡嗪基)-丙氨酸;D-或者L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基丙氨酸;D-对-氟苯丙氨酸;D-或者L-对-二苯基苯丙氨酸;K-或者L-对-甲氧基二苯基苯丙氨酸;D-或者L-2-咪唑(烷基)丙氨酸;和,D-或者L-烷基丙氨酸(alkylainines),其中烷基可以是取代的或者未取代的甲基,乙基,丙基,己基,丁基,戊基,异丙基,异丁基,sec-isotyl,异戊基,或者非酸性氨基酸。非天然氨基酸的芳环包括,例如,噁唑基,苯硫基,吡啶基,苯并咪唑基,萘基,呋喃基,吡咯基,和吡啶基芳环。

[0325] 通过用下列物质取代,例如,非羧酸盐氨基酸同时维持负电荷;(膦酰基)丙氨酸;硫酸苏氨酸,能够产生酸性氨基酸的模拟物。羧基侧基(例如,天冬氨酰或者谷氨酰基)还可以通过与碳二亚胺($R-N-C-N-R=$)反应进行选择修饰,所述碳二亚胺例如,L-环己基-3(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺或者L-乙基-3(4-氮鎓-4,4-二甲基苯基(dimethylpentyl))碳二亚胺。通过与铵离子反应,天冬氨酰或者谷氨酰还可以转变为天冬酰胺酰和谷氨酰胺酰残基。

[0326] 通过用下列物质取代,例如,(除赖氨酸和精氨酸外)氨基酸鸟氨酸,瓜氨酸,或者(胍基)-乙酸,或者(胍基)烷基乙酸,其中烷基按上面所定义,可以产生碱性氨基酸的模拟物。脒衍生物(例如,包含 $CN-$ 部分取代 $COOH$)可以被天门冬酰胺或者谷氨酰胺取代。天门冬酰胺酰和谷氨酰胺酰残基可以脱氨基,成为相应的天冬氨酰或者谷氨酰残基。

[0327] 通过精氨酰与下列物质反应,例如,一种或者多种常规试剂,包括,例如,苯基乙二醛,2,3-丁二酮,1,2-环己二酮,或者水合茚三酮,优选在碱性条件下反应,能够产生精氨酸残基模拟物。

[0328] 通过酪氨酰与例如芳香族重氮化合物或者四硝基甲烷反应,能够产生酪氨酸残基模拟物。N-乙酰基咪唑(acetylimidazol)和四硝基甲烷可分别用于生成O-乙酰酪氨酰类和3-硝基衍生物。

[0329] 通过半胱氨酰残基与下列物质反应,例如, α -卤代乙酸酯例如2-氯乙酸或者氯乙酰胺和相应的胺,得到羧甲基或者羧酰胺甲基衍生物,可以产生半胱氨酸残基模拟物。通过半胱氨酰残基与下列物质反应,例如,溴-三氟丙酮, α -溴- β -(5-咪唑酰基丙酸;磷酸氯乙酰, N-烷基马来酰亚胺,3-硝基-2-吡啶二硫化物;甲基2-吡啶二硫化物;对氯汞苯甲酸;2-氯汞基-4硝基苯酚;或者,氯-7-硝基苯并-氧-1,3-二唑,也能够产生半胱氨酸残基模拟物。

[0330] 通过赖氨酰与例如琥珀酸或者其他羧酸酐反应,能产生赖氨酸模拟物(和可以改变氨基末端残基)。通过与亚氨基酯反应,例如甲基皮考林亚氨基酯(picolinimidate),磷酸吡哆醛,吡哆醛,氯代硼氢化物,三硝基苯磺酸,0-甲基异脲,2,4-戊二酮,以及与乙醛酸的转酰胺基酶催化反应,也可以产生赖氨酸和其他包含 α -氨基的残基模拟物。

[0331] 通过与例如甲硫氨酸亚砷反应,可以产生甲硫氨酸的模拟物。脯氨酸的模拟物包括,例如,哌啶酸,噻唑烷羧酸,3-或者4-羟基脯氨酸,脱氢脯氨酸,3-或者4-甲基脯氨酸,或者3,3,-二甲基脯氨酸。通过组氨酰与例如二乙基焦碳酸酯或者对溴苯酰甲基溴反应,可以产生组氨酸残基模拟物。

[0332] 其他模拟物包括,例如,通过以下作用产生的那些:脯氨酸和赖氨酸的羟化作用;丝氨酰或者苏氨酰残基的羟基磷酸化作用;赖氨酸,精氨酸和组氨酸的 α -氨基甲基化;N端胺的乙酰化;主链酰胺残基的甲基化或者用N-甲基氨基酸取代;或者C端羧基的酰胺化。

[0333] 所述多肽的氨基酸还可以用相反手性的氨基酸(或者模拟肽残基)取代。因此,以L-构型天然存在的任意氨基酸(还可以称为R或者S,取决于化学实体的结构)可以用相同化学结构类型的氨基酸或者模拟肽取代,但它们具有相反的手性,通常称为D-氨基酸,但此外还可以称为R-或者S-形。

[0334] 本发明的模拟物还可以包括组合物,该组合物包含结构模拟残基,尤其是诱导或者模拟二级结构的残基,例如 β 转角, β 折叠, α 螺旋结构, γ 转角,等等。例如,在肽内用D-氨基酸;N- α -甲基氨基酸;C- α -甲基氨基酸;或者脱氢氨基酸取代天然氨基酸残基,可以诱导或者稳定 β 转角, γ 转角, β 折叠或者 α 螺旋构象。 β 转角模拟结构已得以描述,例如,Nagai(1985)Tet. Lett. 26 :647-650;Feigl(1986)J. Amer. Chem. Soc. 108 :181-182;Kahn(1988)J. Amer. Chem. Soc. 110 :1638-1639;Kemp(1988)Tet. Lett. 29 :5057-5060;Kahn(1988)J. Molec. Recognition1 :75-79。 β 折叠模拟结构已得以描述,例如,Smith(1992)J. Amer. Chem. Soc. 114 :10672-10674。例如,Beusen(1995)Biopolymers 36 :181-200,描述了顺式酰胺替代物,1,5-二取代四唑,诱导VI型 β 转角。Banerjee(1996)Biopolymers 39 :769-777,描述了掺入非手性 ω -氨基酸残基以产生聚亚甲基单位作为酰胺键的取代。通过例如强场 ^1H NMR或者 ^2D NMR光谱,可以分析多肽的二级结构,参见,例如,Higgins(1997)J. Pept. Res. 50 :421-435。还可以参见,Hruby(1997)Biopolymers43 :219-266,Balaji等人,美国专利号5,612,895。

[0335] D. 改进抗病毒剂

[0336] 为改进抗病毒剂在所选细胞中的接受和导入,存在许多已知的方法。例如,蛋白的 PEG 化可使它们更能抵抗免疫系统。或者,可以在蛋白和载体中添加胞内信号或者部分使它们更易进入所选细胞。可以添加使蛋白或者载体易被感染细胞特异摄取的部分,在这种情况下是对呼吸细胞表达的受体特异的配体。该部分可以对流感受体或者细胞类型特异的受体具有特异性。

[0337] 该治疗化合物还可以进一步修饰,以便该化合物更容易溶解或者促进其进入细胞。例如,化合物可以在任意位置 PEG 化,或者化合物可以偶联到膜易位 (translocating) 肽例如 tat、触足蛋白或者信号序列膜易位肽,如 U. Langel 所述, " Cell Penetrating Peptides", CRC Press, Boca Rotan, 2002, 即,在此完全引入作为参考。

[0338] 本领域已经描述了许多肽序列,它们能够促进与这些序列连接的肽通过胞质膜进入细胞 (Derossi 等人,1998, Trends in Cell Biol. 8 :84)。为了本发明的目的,这类肽统称为“跨膜转运蛋白肽”,这与“细胞穿透肽”互换使用。后者细胞穿透肽的实例包括,但不限于下列肽:即,源自 HIV 的 tat (Vives 等人,1997, J. Biol. Chem. 272 :16010 ;Nagahara 等人,1998, Nat. Med. 4 :1449), 来自果蝇 (*Drosophila*) 的触足蛋白 (Derossi 等人,1994, J. Biol. Chem. 261 :10444), 来自单纯疱疹病毒的 VP22 (Elliot 和 D' Hare,1997, Cell 88 :223-233), 抗 DNA 抗体的互补决定区 (CDR) 2 和 3 (Avrameas 等人,1998, Proc. Natl Acad. Sci U. S. A. ,95 :5601-5606), 70KDa 热休克蛋白 (Fujihara,1999,EMBOJ. 18 :411-419) 和转运蛋白 (transportan) (Pooga 等人,1998,FASEB J. 12 :67-77)。在某些实施方式中,可以使用截短的 HIV tat 肽。

[0339] E. 干扰素产生

[0340] 干扰素 α 和 β (IFN- α/β) 在抗病毒抵抗的固有细胞机制中起着重要作用,例如,抑制病毒序列的转录和翻译。IFN- α/β 受体信号复合物的组装需要给受体复合物募集因子,包括转录因子,例如 NF- κ B, STAT 和 INF- 诱导的转录因子 -3 ;和蛋白激酶。据认为 RACK1 可以作为支架蛋白,给复合物募集和 / 或结合 PKC 和 STAT ;可能结合网蛋白,即,半桥粒 (hemidesmasome) 组织者 (organizer)。最近来自其他实验室的数据表明腮腺炎和麻疹病毒可能破坏 INF- α/β 信号复合物,即,据报道腮腺炎 V- 蛋白结合 RACK1, 并诱导 STAT 从受体复合物解离;和,在麻疹病毒感染细胞中,据报道病毒 C 和 / 或 V 蛋白通过结合和“冻结” INF- α/β 受体复合物,来抑制信号激酶的磷酸化作用。

[0341] 干扰素 - α/β 信号抑制促 - 细胞凋亡应答,通过 STAT 和 NF κ B14 的核转移提高细胞存活率¹⁴。干扰素受体信号触发 PKC- δ ¹⁵ 的活化,其又能下调半胱天冬酶 3¹⁶, 以及,通过 STAT17 和,在气道中,通过 NF κ B^{18,19}, 下调促炎症信号。据报道 PKC- δ 活化还抑制 TNF α 诱导的凋亡^{20,21}。在这方面,IFN- α/β 信号的禽流感 NS1 抑制看来会促进细胞死亡和决定疾病的严重程度。因此,用于药物研发的候选药剂和新的分子靶标是干扰和 / 或阻断 NS1 对 IFN- α/β 信号作用的那些。这些试剂在感染流感 A 的对象中促进改善一种或者多种症状的所需治疗效果。

[0342] 流感 A 的高危 (也参见致病性) 禽类株在人类中造成爆发性感染,即,快速越过粘膜肺组织传播进入循环和 CNS。不受特定理论束缚,很有可能某些后来的效应源自受非结构流感 A 病毒蛋白介导 INB- α/β 信号的抑制。此外,很有可能病毒蛋白例如 NS1 和 NS2 抑制胞内 PDZ 结构域 -PL 的相互作用,而这种相互作用对于有效的 INB- α/β 信号信号和诱

导细胞抗病毒抵抗机理是必需的。

[0343] 此处鉴定了 INF- α / β 受体-1 中可能的 PDZ-配体 (PL) 序列 (检索号 16166194), C 端序列“QDFV”(SEQ ID NO :31), 即, 可能的 1-型 PL 序列。相似的, INF- α / β -受体-1 信号复合物的其他潜在成员还包括下列推断的 C 端 PL 序列模体: 即, MAP-1A (检索号 2119250) 包含“KSRV”(SEQ ID NO :32); MAP-1B (检索号 14165456/5174525) 包含“KIEL”(SEQ ID NO :33); MAP-1A/1B 轻链-3 (检索号 12383056/18551443) 包含 C 端“KLSV”(SEQ ID NO :34); 网蛋白-1 (检索号 4505877) 包含 C 端 PL 序列模体“SAVA”(SEQ ID NO :35); PKC- δ (检索号 509050) 包含“KVLL”(SEQ ID NO :36); INF-可诱导蛋白激酶 (检索号 13637584 和 4506103-e1f2 α) 包含 C 端序列模体“RHTC”(SEQ ID NO :37); 干扰素 α 应答转录因子-3 (检索号 5174475) 具有 C 端模体“LSLV”(SEQ ID NO :38); 和, 干扰素调节因子-2 (检索号 20141499/4504723) 包含“VKSC”(SEQ ID NO :39)。

[0344] 因此, 很有可能 PDZ 结构域-PL 相互作用在病毒发病机理中起着重要作用, 并从而成为开发药物化合物的靶标。

[0345] 能够抑制 NS1 与 IFN- α / β 受体复合物的胞内 PDZ 结构域相互作用的药物化合物包括 PL 肽, 和其模拟物, NS1PL/IFN- α / β 相互作用的肽抑制剂, NS1 表达的抑制剂, 细胞可渗透的非天然 PDZ 结构域多肽, 和其模拟物, 和能够抑制 NS1 PL 与人特异 PDZ 结构域结合的小分子抑制剂, 所述 PDZ 结构域参与 IFN- α / β 反应。

[0346] F. 5. 4 治疗方法

[0347] 此处公开的药物组合物用于流感 A 疾病预防或治疗方法。

[0348] 从上面公开的内容可知, 本发明具有多种应用。例如, NS1 蛋白、PDZ 蛋白或者 NS1 和 PDZ 蛋白之间相互作用的抑制剂, 可用于鉴定与转运蛋白相互作用并且能够进入感染细胞的试剂或者偶联物。NS1 蛋白、PDZ 蛋白或者 NS1 和 PDZ 蛋白之间相互作用的抑制剂还能通过鉴别结合感染细胞的偶联部分并将偶联部分与试剂连接, 用于增强试剂结合感染细胞的能力。

[0349] 在预防应用中, 给对流感 A 感染易感、或者处于患流感 A 感染发展风险的对象施用一定量的药物组合物或者药物, 所述的量足够预防、减弱或者阻止流感 A 感染的发展。在治疗应用中, 给被怀疑患有、或者已经患有流感的患者施用一定量的组合物或者药物, 所述的量足够逆转、阻止或者至少部分阻止, 流感 A 感染的症状。在预防和治疗方案中, 作为 NS1、PDZ 和 / 或 NS1-PDZ 相互作用抑制剂形式的本发明活性剂, 通常分几次剂量给药, 直到实现充分的应答。但是, 在预防和治疗方式中, 活性剂还可以单次剂量给药, 直到实现充分的应答。通常, 对治疗进行监控, 并可以给予重复剂量。此外, 对于那些治疗流感 A 感染治疗或者流感 A 感染发展的患者, 治疗方式可以使用相似的剂量; 给药途径和给药频率。

[0350] 根据治疗的疾病、哺乳动物种类和特定给药方式, 可以与载体组合产生单一剂型的 NS1 蛋白、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 相互作用和其他活性剂的抑制剂的量是不同的。对于任意特定患者, “有效剂量”, “药理可接受剂量” 或者 “药理可接受量” 可能取决于各种因素, 包括使用的特定化合物的活性, 接受治疗的患者的物种, 年龄, 体重, 健康状况、性别和饮食; 给药时间和途径; 代谢或者排泄速度; 同时或者先前给药的其他药物; 疾病的类型和严重程度; 副作用的严重程度, 患者是否是动物或者人类, 等等。通常患者是人类, 但还可以治疗非人类的哺乳动物, 包括转基因哺乳动物。可以施用有效剂量的全长活性剂或者其活性

片段。

[0351] 对于用于本发明方法的 NS1 蛋白、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 相互作用的任意抑制剂和其他活性剂,用于人类的有效量最初可以从非人类动物模型估算。临床医生利用本领域已知的参数可以确定有效量。通常,开始的给药剂量稍微低于最佳有效量。此后小量增加给药量直到达到有效剂量。(参见 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第 16 半, § 22, 1992, Berkow, Merck Research Laboratories, Rahway, New Jersey, 在此引入作为参考)。

[0352] 剂量需要逐步增高以最优化安全性和效果。可以通过实验动物的标准药理学步骤检测此处描述的化合物的毒性和治疗效果,例如通过测定 LD₅₀ (导致 50% 试验群体死亡的剂量) 和 ED₅₀ (在 50% 试验群体中治疗有效的剂量)。有毒和治疗效果之间的剂量比例是治疗指数,可以表达为 LD₅₀ 和 ED₅₀ 之间的比例。优选显示高治疗指数的化合物。从这些非人类动物研究获得的数据可用于配制对于人用无毒的剂量范围。这类化合物的剂量优选处于循环浓度范围内,该范围包括几乎没有或者没有毒性的 ED₅₀。个人医生根据患者情况可以选择正确的剂型、给药途径和剂量。(参见,例如,Finigl 等人 (1975) In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chapter 1, 在此引入作为参考)。

[0353] G. 给药方法

[0354] NS1 蛋白、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 相互作用的抑制剂和其他活性剂可以被单独投放或者施用于哺乳动物,例如,人类患者或者对象,以药物可接受的盐或者其可水解前体的形式,或者以药物组合物形式,其中有效剂量的化合物与合适的载体或者赋形剂混合。有效方案是指药物或者药物组合以足够的量和频率并且通过合适途径给药,以便至少可检测地预防、延缓、抑制或者逆转流感 A 感染至少一种症状的发展。“有效剂量”,“药理可接受剂量”,“药理可接受量”是指当以合适的方式给药时,存在足够量的 NS1 蛋白或者表达、PDZ 蛋白或者表达和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂、活性剂或者 NS1、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂与其他活性剂联合,以获得所需要的结果,例如,预防、延缓、抑制或者逆转流感 A 感染的症状或者流感 A 感染的进展。

[0355] 用于本发明方法的流感 A 的 NS1、一种或者多种 PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂和其他活性剂可以作为药物组合物给药,所述药物组合物包括 NS1、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂或者活性剂,和各种其他药学可接受的组分。药物组合物可以是以下形式:固体(例如粉剂,颗粒,糖衣丸,片剂或者丸剂),半固体(例如凝胶剂,浆剂,或者膏剂),液体,或者气体(例如气雾剂或者吸入剂)。

[0356] 本发明使用的合适剂型可以参考 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company 1985) Philadelphia, PA, 第 17 版) 和 Langer, Science (1990) 249: 1527-1533, 在此引入作为参考。此处描述的药物组合物可以采用常规方式制备,即,混合,溶解,粒化,制备糖衣丸,磨粉,乳化,包囊,捕获或者冻干步骤。

[0357] NS1/PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂和其他活性剂可以与常见的赋形剂、稀释剂或者载体一起配制,压成片剂,或者配制成酞剂或者方便口服给药的溶液。NS1、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂和其他活性剂还可以配制缓释剂型等等。

[0358] 可以多种方式实现化合物的给药,包括口服,含服,直肠,胃肠外,腹膜内,经皮,透

皮,气管内,静脉内,和肌内给药。该化合物可以在长效或者缓释的剂型中,局部而不是全身方式给药。此外,化合物可以在脂质体中给药。此外,化合物可以通过基因治疗方式给药。

[0359] 为了口腔给药,组合物可以采用按常规方式配制的片剂或者锭剂的形式。

[0360] 为了吸入给药,本发明应用的化合物以气溶胶喷物制剂形式可以方便地投放,所述制剂来自增压包装、喷雾器 (nebulizer) 或者注射喷雾器 (syringe sprayer),借助于合适的喷射剂,例如,二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,二氧化碳或者其他合适的气体,或者来自无喷射剂的干粉吸入器。就增压气雾剂而言,剂量单位可以通过设置投放计剂量的阀来确定。例如在吸入器或者吹入器中使用的明胶的胶囊和药筒,可以制成包含化合物和合适的粉末基质例如乳糖或者淀粉的粉末混合物。

[0361] 化合物可以配制成通过注射进行肠胃外给药,例如,通过弹丸注射 (bolus injection) 或者连续输注。用于注射的剂型可以存在于单位剂型,例如,在安瓿中或者多剂量容器中,含有添加的防腐剂。组合物可以采用以下形式:油基或水性介质中的悬浮液、溶液、或者乳液,并且可以包含配制剂 (formulator agents) 例如悬浮、稳定和 / 或分散剂。组合物配制成无菌、基本等渗的和完全符合美国食品和药物管理局 (the U.S. Food and Drug Administration) 的所有药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice, GMP)。

[0362] NS1、PDZ 蛋白和 / 或 NS1/PDZ 蛋白相互作用的抑制剂和其他活性剂还可以配制为直肠组合物,例如栓剂或者保留灌肠剂,例如,包含常用栓剂基质例如可可脂,碳蜡,聚乙二醇或者其他甘油酯,所有这些在体温下溶化,而在室温下凝固。

[0363] 除以上描述的剂型外,化合物还可以配制为长效制剂 (depot preparation)。这类长效剂型可以通过植入 (例如,皮下或者肌内) 或者通过肌肉注射给药。因此,例如,化合物可以用合适的聚合或者疏水性材料 (例如,作为可接受的油中的乳剂) 或者离子交换树脂配制,或者作为微溶的衍生物,例如,微溶的盐。(参见,例如, Urquhart 等人, (1984), *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24 :199 ;Lewis, ed., 1981, *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals*, Plenum Press, New York, N. Y., 美国专利号 3, 773, 919, 和 3, 270, 960, 在此引入作为参考)。

[0364] 或者,可以使用用于疏水性药物化合物的其他运送系统。脂质体和乳剂是疏水性的药物运送介质或者载体的公知实例。在一些方法中,可以使用循环时间长,即,隐形脂质体。Woodle 等人的美国专利号 5, 013, 556 一般性地描述了这类脂质体,其教导在此引入作为参考。本发明的化合物还可以通过控释工具和 / 或运送装置给药,所述工具和装置描述于美国专利号 3, 845, 770 ;3, 916, 899 ;3, 536, 809 ;3, 598, 123 ;和 4, 008, 719 ;其公开内容在此引入作为参考。

[0365] 为了通过基因治疗给药,目标遗传物质 (例如, DNA 或者 RNA) 被转移到宿主中以治疗或者预防流感 A 感染。在本发明中,目标遗传物质编码 NS1、PDZ 和 / 或 NS1/PDZ 相互作用的抑制剂、活性剂或者其片段。根据本发明的一个方面,遗传物质应该是有疗效的。许多这类蛋白、载体、DNA 本身是已知的。(参见 Culver, K. W., " Gene Therapy ", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N. Y., 在此完整引入作为参考)。只为了示例的目的,载体可以选自莫洛尼小鼠白血病病毒载体,带有组织特异启动子的腺病毒载体,单纯性疱疹载体,牛痘的载体,人工染色体,受体介导的基因运送,和上述载体的混合物。基因治疗载体是由不同的实验室商品化供应的,例如 Chiron, Inc., Emeryville, Calif. ;

Genetic Therapy, Inc., Gaithersburg, Md.; Genzyme, Cambridge, Mass.; Somtax, Alameda, Calif.; Targeted Genetics, Seattle, Wash.; Viagene 和 Vical, San Diego, Calif.

[0366] 腺病毒是遗传物质的有希望的基因治疗载体,所述遗传物质编码 NS1、PDZ 和 / 或 NS1/PDZ 相互作用的抑制剂、活性剂或者其片段。可以操纵腺病毒使其编码和表达所需基因产物(例如, NS1、PDZ 和 / 或 NS1/PDZ 相互作用的抑制剂或者其片段),并且同时其在正常裂解病毒生活周期中的复制能力被灭活。无需将病毒 DNA 整合入宿主细胞染色体就可以实现腺病毒表达,从而缓解了关于插入突变发生的担心。此外,腺病毒作为活的伤寒疫苗已经使用很多年,具有优异的安全特征(Schwartz, A. R. 等人(1974)Am. Rev. Respir. Dis. 109 :233-238)。最后,在许多例子中已经证明了腺病毒介导的基因转移,包括 α -1-抗胰蛋白酶和 CFTR 转移到棉鼠的肺中(Rosenfeld, M. A. 等人(1991)Science 252 :431-434; Rosenfeld 等人,(1992)Cell 68 :143-155)。此外,试图确认腺病毒为人类癌症致病剂的广泛研究一律是阴性的(Green, M. 等人(1979)PNAS USA 76 :6606)。

[0367] 药物组合物还能包括合适的固体或者胶体相载体或者赋形剂。这类载体或者赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙,磷酸钙,各种糖,淀粉,纤维素衍生物,明胶,和多聚体例如聚乙二醇。

[0368] 实施例

[0369] 实施例 1 :流感 A NS 1 蛋白具有 PDZ 结构域配体 (PL) 模体

[0370] NCBI 流感资源数据库的检查显示, NS1 蛋白序列具有符合结合 PDZ 结构域能力的特征。这类序列被命名为 PDZ 结构域配体或者 PL。经鉴定这些流感 NS1 蛋白的 PL 模体是 S/T-X-V/I/L, 其中 S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, V 是缬氨酸, I 是异亮氨酸, L 是亮氨酸, X 是任意氨基酸。NCBI 数据库 747 个全长人 NS1 序列中, 572 个具有该模体。NCBI 数据库 345 个全长鸡 NS1 序列中, 237 个具有该模体。该数据概述于表 3a-3e, 和图 1-3。该数据提供了特定 NS1 PL 模体在不同的动物和人类中出现的统计表述。统计分析可用于分析各种动物中发现了何种 PL 模体, 它们如何在物种之间穿梭, 以及在一些情况下, 通常发现何种 PL 具有特定 H 或者 N 蛋白。

[0371] 人 PL 分成 5 个序列组(参见表 3a) :RSKI (SEQ ID NO :40), ESEV (SEQ ID NO :2), KSEV (SEQ ID NO :41), RSEV (SEQ ID NO :7), 和 RSKV (SEQ ID NO :8)。亚型和特定 PL 模体间存在着强相关性 ;RSKI (SEQ ID NO :40) 和 H3N2 (93%), ESEV (SEQ ID NO :2) 和 H5N1 (100%), KSEV (SEQ ID NO :41) 和 H1N1 (100%, 尽管数量少), RSEV (SEQ ID NO :7) 和 H3N2 (98%), 以及 RSKV (SEQ ID NO :8) 和 H3N2 (95%)。

[0372] 鸡 PL 分成 5 个序列组(参见表 3b) :ESEI (SEQ ID NO :3), ESEV (SEQ ID NO :2), GSEV (SEQ ID NO :6), ESKV (SEQ ID NO :4) 和 GSKV (SEQ ID NO :10)。亚型或亚型组与特定 PL 模体间存在着强相关性 ;ESEI (SEQ ID NO :3) 和 H7N2 (90%), ESEV (SEQ ID NO :2) 和 H5N1 (64%), ESKV (SEQ ID NO :4) 和 H5N2 (84%) 以及 GSKV (SEQ ID NO :10) 和 H5N2 (100% - 但数量稍小)。如果汇总需通报的禽流感或者 H5 和 H7, ESEI (SEQ ID NO :3) 与 NAI 100% 相关, ESEV (SEQ ID NO :2) 与 NAI 83% 相关。

[0373] 鸭 PL 分成 3 个序列组(参见表 3c)。猪 PL 分成 7 个序列组(参见表 3d)。马 PL 分成 1 个序列组(参见表 3e)。

[0374] NS1 PL 序列与 HN 分亚型的非随机组合表明了通过 NS1 PL 分型鉴定 HN 亚型的方

法。PDZ 结合模式可用于区分不同的 PL 序列, 并作为流感分亚型的基础。

[0375] 表 3a-e

[0376] 表 3a : 人 NS1 PL 572 PL/747 分离物

[0377]

PL 模体	N (数量)	亚型 %	
RSKI	1	H1N2	7%
	13 (总计 14)	H3N2	93%
ESEV	11 (总计 11)	H5N1	100%
KSEV	1 (总计 1)	H1N1 (1918)	100%
RSEV	65 (总计 66)	H1N1	98%
	1	H3N2	2%
RSKV	24	H1N2	5%
	1	H2N2	0%
	455 (总计 480)	H3N2	95%

[0378] 表 3b : 鸡 NS1 PL 237 PL/345 分离物

[0379]

ESEI	3	H5N1	10%
	26 (总计 29)	H7N2	9% (H5/H7 100%)
ESEV	1	H10N7	1%
	96	H5N1	64%
	4	H5N2	3%
	1	H5N2	1%
	2	H6N1	1%
	15	H6N2	10%
	9	H7N2	6%
	14	H7N3	9%
	2	H7N7	1%
	6	H9N2	4%
	125 (总计 150)	H5/H7	83%
GSEV	1	H6N2	50%
	1 (总计 2)	H6N8	50%
ESKV	9	H5N1	16%
	46 (总计 55)	H5N2	84%
GSKV	1 (总计 1)	H5N2	100%

[0380] 表 3c : 鸭 NS1 PL 72 PL/110 分离物

[0381]

ESEI	1	H6N1	50%
	1 (总计 2)	H9N2	50%
ESEV	2	H11N8	3%
	2	H11N9	3%
	1	H2N2	1%
	3	H2N3	4%
	2	H3N8	3%
	1	H4N8	1%
	31	H5N1	46%
	8	H5N2	12%
	1	H5N8	1%
	1	H6N1	1%
	2	H6N2	3%
	2	H6N8	3%
		1	H7N7
	1	N7N8	1%
	2	H9N1	3%
	7	H9N2	10%
	1 (总计 68)	H9N8	1%
ESKV	2 (总计 2)	H5N1	100%

[0382] 表 3d :猪 NS1 PL 31 PL/109 分离物

[0383]

RSEA	1 (总计 1)	H1N1	100%
ESEI	1	H3N2	25%
	3 (总计 4)	H9N2	75%
ESEV	1	H4N6	33%
	2 (总计 3)	H5N1	67%
GSEV	1	H1N1	50%
	1 (总计 2)	H3N2	50%
RSEV	1 (总计 1)	H9N2	100%
TSEV	1 (总计 1)	H1N1	100%
RSKV	19 (总计 19)	H3N2	100%
	总计 31		

[0384] 表 3e :马 NS1 PL3 PL/21 分离物

[0385]

ESEV	2	H3N8	67%
	1 (总计 3)	H7N7	33%

[0386] 检查 3 个代表性的 PL 序列基团, ESEV (SEQ ID NO :2)、EPEV (SEQ ID NO :27) 和 RSKV (SEQ ID NO :8), 揭示了 PL 可能的起源。ESEV (SEQ ID NO :2) 首先出现在禽类分离物中, 直到 2003 年才进入人类和哺乳动物宿主 (参见图 1)。EPEV (SEQ ID NO :27) 首先出现在马分离物中, 在 1997 年进入人类、禽类和其他哺乳动物宿主 (参见图 2)。RSKV (SEQ ID NO :8) 首先出现在人类分离物中, 直到 1997 年才进入其他物种, 具体是猪 (参见图 3)。这类分析对评价流行性感动的物种起源可以是非常重要的。

[0387] 上述分析证明了一种检测流感病毒 NS1 多肽存在的新方法, 它利用了对流感 A 特异和特定亚型特异的 PL 模体。特定 PL 的鉴定是鉴定样本存在何种流感病毒株的方法。

[0388] 实施例 2 :PDZ 分析

[0389] 本实施例描述 PDZ 蛋白与不同流感 A PL 模体的结合。利用改良 ELISA 评定 PDZ 蛋白。简单来说, 产生 GST-PDZ 融合, 其包含 PDZ 蛋白的完整 PDZ 结构域。此外, 合成对应于不同流感 A 株 NS1 蛋白的 C 端 20 个氨基酸的生物素化的肽, 并利用 HPLC 纯化。这些实体之间的结合通过“G”分析检测, 这是一种比色分析, 利用抗生物素蛋白-HRP 结合生物素和过氧化物酶底物。来自特定流感株的 NS1 蛋白的序列如 SEQ ID NOS :42-47 所显示。

[0390] 检测 NS1 PL (或者就 H5N1 A 来说是 C 末端) 与人 PDZ 蛋白的结合, 利用 (i) 选择模拟流感 A H5N1、H1N1 和 H3N2 株中某些 NS1PL (或者 C 末端) 序列的生物素化的合成 20-mer 肽 ;和, (ii) 重组系统中合成基因编码的重组 NS1 蛋白, 即, 表达系统中合成 NS1 DNA 并与编码 MBP 免疫化学标签的序列融合 (麦芽糖结合蛋白 ;NEB ;根据厂商的说明书产生)。

[0391] 在人类基因组中所有不同 PDZ 结构域的几乎全套 (255) 组成的阵列形式中检测基质 graphPeptides 和蛋白。每个 PDZ 结构域多肽都可以在商品化的谷胱甘肽 S- 转移酶标签的表达系统中表达为重组 GST-PDZ 多肽。利用链霉亲和素-HRP 和 TMB 底物, 检测生物素化的 PL 肽与 PDZ 结构域多肽的特异结合。同样地, 利用生物素化的抗 MBP、链霉亲和素-HRP 和 TMB 底物, 可显示 NS1-MBP 融合蛋白与 PDZ 结构域多肽的特异结合。分析结合的相对强度, 显示每个 PL 的强和弱结合剂。当用于捕获或者鉴定 PL 蛋白时, 优选结合更强的 PDZ 蛋白。但是对于利用 PDZ 蛋白与不同 PL 蛋白差异结合的试验, 弱结合 PDZ 蛋白仍然可能是有用的。结果如下 :检测来自 A/Taiwan/1996Ac. #AAC14269 株的 MBP. NS1 H1N1 (RSEV) PL (SEQ ID NO : 42) 与多种 PDZ 蛋白的结合。发现下列 PDZ 蛋白结合强 :Rho-Gap 10, Syntrophin 1 α , 外膜, Magi2 d3, Magi1 d4, Tip43 d1, Magi1 d1, Tip 1, PSD95 d1, 2, 3, PTPL1 d2, PSD95 d2, INADL d8, DLG1 d1, 2, Vartul d2, PSD95 d1, Magi1 3 d1, DLG1 d2. Mast2 d1, NeDLG d1, 2, SNPC 11a, DLG2 d2。发现下列 PDZ 蛋白结合弱 :Magi3 d2, PTN3 d1, DLG2 d1。在利用直接结合夹心分析的滴定研究中, 发现 PSD95 d1, 2, 3 结合的 EC₅₀ 为 1.29 μ g/ml, 外膜蛋白结合的 EC₅₀ 为 1.25 μ g/ml。其他测定结果显示于 4a。

[0392] 表 4a :滴定 EC50 ;MBP. NS1 H1N1 (RSEV-SEQ ID NO :7)

MBP-H1N1	(μg/ml)	
Rec. ID	G 分析	直接结合分析
DLG1 d1,2	1	2.6
外膜	1.2	6
[0393] PSD95 d1,2,3	1.3	1.3
INADL d8	3.2	
Magi3 d1	3.1	
MAST2 d1	2	
NeDLG d1,2	1.1	

[0394] 检测来自 A/New York/31/2004 Ac. # AAX56415 株的 MBP. NS1H3N2 (RSKV) PL (SEQ ID NO :43) 与多种 PDZ 蛋白的结合。发现下列 PDZ 蛋白结合强 :外膜, PSD95 d1, 2, 3, INADL d8, DLG1 d1, 2, Grip 1 d4, Shank 1, GoRasp1 d1, Sim GoRasp65, Syntenin d2, NeDLG d3, FLJ12615, KIAA0967, PTN3 d1, DLG2 d1, NeDLG1, d1, 2, DLG2 d2, mast1 d1, Kiaal719d4, Kiaal415 d1, 和 Pick1 FL。发现下列结合弱 :Shank 2, NumbBP d3, psd95 d1, 2, 3, 和 Mast2d1。在利用直接结合夹心分析的滴定研究中, 发现 PSD95 d1, 2, 3 结合的 EC_{50} 为 $25.3 \mu\text{g/ml}$, 发现 INADL 结合的 EC_{50} 为 $0.869 \mu\text{g/ml}$ 。其它测定结果显示于表 4b。

[0395] 表 4b :滴定 EC_{50} :MBP. NS1 H3N2 (RSKV-SEQ ID NO :8)

MBP-h3n2	(μg/ml)	
Rec. ID	G 分析	直接结合分析
DLG1 d1,2	20.8	7.7
外膜	13	3
[0396] PSD95 d1,2,3	25	1.6
INADL d8	0.9	
Magi3 d1	3	
MAST2 d1	50<	
NeDLG d1,2	50<	

[0397] 检测来自 A/Hong Kong/97/1998 Ac. # AAK49317 株的 MBP. NS1H5N1A (EPEV) PL (SEQ ID NO :44) 与多种 PDZ 蛋白的结合。发现下列 PDZ 蛋白结合强 :ALP, PSD95 d1, 和 PICK FL。发现下列结合弱 :INADL d8, NeDLG d1, 2, 和 KIAA1719 d4。在利用直接结合夹心分析的滴定研究中, 发现外膜蛋白结合的 EC_{50} 为 $12.55 \mu\text{g/ml}$, 发现 PSD95d1, 2, 3 结合的 EC_{50} 为 $15.76 \mu\text{g/ml}$ 。其它测定结果显示于表 4c。

[0398] 表 4c :滴定 EC_{50} :MBP. NS1 H5N1 A (EPEV-SEQ ID NO :27)

MBP-H5N1A	(μg/ml)	
Rec. ID	G 分析	直接结合分析
[0399] DLG1 d1,2	23	100<
外膜	27	12.5
PSD95 d1,2,3	100<	15.7

[0400] 检测来自 A/Viet nam/1194/2004 Ac. # AAT73394 株的 MBP. NS1H5N1B (ESEV) PL (SEQ ID NO :45) 与不同 PDZ 蛋白的结合。发现下列 DZ 蛋白结合强 :DLG1 d1, 2, LIM mystique d1, DLG2 d3, Vartul d2, PSD95 d1, Magi3 d1, DLG1 d2, PTN-3 d1, DLG2 d1, NeDLG1 d1, 2, Magi2 d5, DLG2 d2, 和 PSD95 d3 CS Bound, Magi2 d1, DLG1 d1, RhoGap10, 外膜, Magi1 d4, Tip 43, Tip1 d1, PSD95 d1, 2, 3, Tip33 d1, PSD95 d2。发现下列结合弱 :SIP1 d2, Lim RiL, mint3 d2, ALP1, PSD95 d3, SEMCAP 3 d1, LIMK 1, Kiaa0613, Syntrophin γ 1, Magi2 d6, Mast2d1, Magi1 d5, INADL d3, Magi3 d2, syntrophin 1α , magi2 d3, par3L d2, Magi1 d1, Kiaal719 d5, Vartul d1, 和 PTPL1 d1。在利用直接结合夹心分析的滴定研究中, 发现 PSD95 d1, 2, 3 结合的 EC_{50} 为 $0.29 \mu\text{g/ml}$, 发现外膜蛋白结合的 EC_{50} 为 $0.18 \mu\text{g/ml}$ 。其它测量结果显示于表 4d (ND 表示未进行)。

[0401] 表 4d : 滴定 EC₅₀ : MBP. NS1 H5N1B (ESEV-SEQ ID NO : 2)

MBP-H5N1B	($\mu\text{g/ml}$)	
Rec. ID	G 分析	直接结合分析
DLG1 d1,2	0.2	0.4
外膜	0.2	0.8
PSD95 d1,2,3	0.3	0.3
INADL d8	1.8	6.1
Magi3 d1	0.9	5
MAST2 d1	0.9	ND
NeDLG d1,2	0.2	0.8

[0403] 检测来自 A/duck/ST/4003/2003 Ac. # AAF02349/6048830 株的肽 1958 H5N1A (EPEV) PL (SEQ ID NO : 46) 与不同 PDZ 蛋白的结合。发现下列 DZ 蛋白结合弱 : MAST2 d1, PSD95 d1, 2, 3, 和 PSD95 d2。在利用直接结合夹心分析的滴定研究中, 发现 PSD95 d2 结合的 EC₅₀ 为 3.8 $\mu\text{g/ml}$, 发现 PSD95 d1, 2, 3 结合的 EC₅₀ 为 4.1 $\mu\text{g/ml}$ 。其它测定结果显示于表 4e。

[0404] 表 4e 滴定 EC₅₀ : 1958 H5N1A 肽 (EPEV-SEQ ID NO : 27)

肽 1958	($\mu\text{g/ml}$)
Rec. ID	G 分析
MAST 2 d1	5.5
PSD95 d1,2,3	4.1
PSD95 d2	3.8

[0406] 检测来自 A/chicken/Hong Kong/915/1997 Ac. #AAT73457/50296374 株的肽 1959 H5N1B (ESEV) PL (SEQ ID NO : 47) 与不同 PDZ 蛋白的结合。

[0407] 符合碰撞分类 (hit classification) 特定标准的 PDZ 汇总于基质碰撞列表 (Matrix Hits List) 的表 4a-e, 显示相互作用的相对强度。为了按碰撞 (hit) 分类, NS1-PDZ 相互作用的 OD 必须大于平均背景的两倍, 并且它必须在至少两个样本中符合碰撞。分类为“弱”的碰撞具有小于 0.5 的 OD, 分类为“强”的碰撞具有大于 0.5 的 OD。

[0408] 利用如上所述的用于基质分析的相同检测系统进行肽和融合蛋白滴定。基质碰撞列表用于确定何种 PDZ 与 NS1 滴定来测定相互作用的强度。上面显示了每种检测的特定 PL 的滴定结果。列出了滴定 NS1-PDZ 相互作用计算出的 EC₅₀s。下面提供使用的特定分析和方法。

[0409] A. 肽纯化

[0410] 代表不同流感 A NS1 蛋白 C 端 20 个氨基酸的肽, 通过标准 Fmoc 化学方法合成, 如果不用作未标记的竞争性试剂, 则将其生物素化。利用大小为 10*25mm, 5 μm 的 Vydac 218TP C1 8 反相柱, 通过反相高效液相色谱法 (HPLC) 纯化肽。大约 40mg 的肽溶于 2.0mL 49.9% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的水溶液中。然后通过 25 微米注射过滤器 (Millipore) 将该溶液注入 HPLC 设备。用于获得好的分离的缓冲液是 (A) 含有 0.1% TFA 的蒸馏水和 (B) 含有乙腈的 0.1% TFA。分离是基于肽的性质发生的。总体上疏水性的肽比亲水性的肽更晚洗脱。收集包含“纯”肽的级份, 利用质谱仪 (MS) 核查。纯化的肽进行冻干以保持稳定和以后使用。

[0411] B. 鉴定肽和融合蛋白试剂和材料之间相互作用的“G”分析:

[0412] • Nunc Polysorp 96 孔酶标板 (Nunc cat#62409-005)

- [0413] (Maxisorp 板显示有较高的背景信号)
- [0414] • PBS pH 7.4(Gibco BRL cat#1 6777-148) 或者 (AVC 磷酸盐缓冲盐水, 8g NaCl, 0.29g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, 加 H₂O 到 1L 和 pH 7.4 ; 0.2 μ m 过滤)
- [0415] • 2% BSA/PBS (10g 牛血清白蛋白, 级份 V (ICN Biomedicals cat#IC15142983) 溶于 500ml PBS)
- [0416] • 山羊抗 -GST mAb 储存液 5mg/ml, 4 °C 保存, (Amersham Pharmacia cat#27-4577-01), PBS 1 : 1000 稀释, 终浓度 5 μ g/ml
- [0417] • HRP- 链霉亲和素, 2.5mg/2ml 储存液 4 °C 保存 (Zymed cat#43-4323), 2% BSA 1 : 2000 稀释, 终浓度 0.5 μ g/ml
- [0418] • 洗涤缓冲液, 0.2% Tween 20 溶于 50mM Tris pH 8.0
- [0419] • 即用 TMB (Dako cat#S 1600)
- [0420] • 1M H₂SO₄
- [0421] • 12w 多道移液器,
- [0422] • 50ml 试剂库,
- [0423] • 15ml 聚丙烯锥形管
- [0424] 方案
- [0425] 1) 用 100 μ l 5 μ g/ml 山羊抗 GST 包被板, 在 4 °C 0/N
- [0426] 2) 倒出包被抗体, 轻拍干
- [0427] 3) 封闭 - 每孔添加 200 μ l 2% BSA, 4 °C 2 小时
- [0428] 4) 在 2% BSA 中准备蛋白
- [0429] (每排或者每两列 2ml)
- [0430] 5) 用冷的 PBS 洗涤 3 次 (在整个实验中必须是冷的)
- [0431] (洗涤最后在孔中残留 PBS 直到立即添加下一步)
- [0432] 6) 在冰上每孔添加 50 μ l 蛋白 (4 °C 1-2 小时)
- [0433] 7) 在 2% BSA 中准备肽 (2ml/ 排或者 / 列)
- [0434] 8) 用冷的 PBS 洗涤 3 次
- [0435] 9) 在冰上每孔添加 50 μ l 肽 (开始时间 / 结束时间)
- [0436] a. 在添加最后一次肽后在冰上放置恰好 10 分钟
- [0437] b. 在室温放置恰好 20 分钟
- [0438] 10) 准备 12ml/ 板的 HRP- 链霉亲和素 (在 2% BSA 中 1 : 2000 稀释)
- [0439] 11) 用冷的 PBS 洗涤 3 次
- [0440] 12) 在冰上每孔添加 100 μ l HRP- 链霉亲和素, 4 °C 20 分钟
- [0441] 13) 打开读板器, 准备文件
- [0442] 14) 洗涤 5 次, 避免起泡
- [0443] 15) 用手套, 每孔添加 100 μ l TMB 底物。
- [0444] a. 在室温下暗处孵育
- [0445] b. 定期检查板 (5, 10 & 20 分钟)
- [0446] c. 如果需要, 在 650nm (蓝色) 读取早期读数
- [0447] d. 在 20 分钟时, 用 100 μ l 1M H₂SO₄ 终止反应

[0448] e. 在 450nm(黄色)读取最终读数

[0449] 实施例 3 :NS1 蛋白在人临床样本中的表达

[0450] 检查人鼻分泌物中流感 A NS1 的存在和量。收集人鼻抽吸物, -80℃ 保存于 M4 病毒转移培养基 (Remel, Inc, Lenexa, KS) 中。解冻保存的材料, 在 10% SDS-PAGE 上电泳。用 NS1, 3H3 和 1A10 的单克隆抗体 (Arbor Vita Corporation, Sunnyvale, Ca) 进行 Western 印迹分析。6 个样本的结果显示于图 4。该结果显示 NS1 在鼻分泌物中大量存在。

[0451] 为了研究感染流感 A 病毒的细胞产生和分泌 NS1 的时间线, MDCK 细胞在 0.1 的 MOI 下被人流感 A/PR/8 感染。收集上清液以及细胞, 在 1% Triton X-100 中裂解, 利用对 NS1 泛反应性的单克隆抗体 3H3 进行 SDS-PAGE 和 Western 分析。感染后 24 小时内在感染细胞中检测到 NS1, 48 小时内在感染细胞的上清中检测到 NS1 (参见图 5)。这表明基于 NS1 的诊断也许能在 48 小时内和可能 24 小时内检测流感 A 造成的感染。

[0452] 实施例 4 :细胞中 NS1 与 PDZ 的相互作用

[0453] 为验证细胞中 NS1 与 PDZ 蛋白的相互作用, 进行一系列 PDZ 牵出 (pull-down) 实验。用包含 HA-NS1-H5N1B 的质粒或者用 HA-NS1-H3N2 转染 293HEK 细胞。按照此处所述制备裂解产物。制备谷胱甘肽-琼脂糖凝胶-PDZ 珠 (10ugDLG1d1, 2, 10ug NeDLGd1, 2, 和 10ug PSD95d1, 2, 3), 用于牵出 (pulldown) 来自转染的 293ET 细胞的 150ug 裂解产物, 如图 6 和 7 所示。在 4℃ 过夜孵育并用 HNTG 缓冲液多次洗涤后, 用牵出物制备膜。该膜用 F63-3G1 上清 (1 : 5) 探测。全部 3 个检测的 PDZs 成功地从表达 HA-H5N1B 的细胞中牵出 NS1 (参见图 6)。

[0454] 类似地, 制备谷胱甘肽-琼脂糖凝胶-PDZ 珠 (40ug INADLd8), 用于牵出转染 H3N2 的 293ET 细胞的 150ug 裂解产物。在 4℃ 过夜孵育和用 PBS 多次洗涤后, 准备 Western 印迹, 用 a-HA (1 : 500) (Roche) 检测。INADL d8 成功地从细胞裂解产物中牵出 HA-H3N2 NS1 (图 7)。

[0455] 结论是如基质 (MATRIX) 分析所确定, NS1 PL 在细胞内是有功能的, 它可以与 PDZ 结构域相互作用。

[0456] 实施例 5 :NS1 的单克隆抗体

[0457] 制备与 NS1 蛋白亚型、NS1 PL 类特异结合和具有泛特异性的单克隆抗体。产生 NS1 单克隆抗体的策略如下, 结果显示于表 5、6 和 7 :

[0458] 1. 制备用于表 5 汇总的亚型的 NS1 的 GST 和 MBP 融合蛋白。克隆载体获自 Pharmacia (GST) 或者 New England Biolabs (MBP)。通过 DNA 2.0 (Menlo Park, Ca) 利用重叠寡核苷酸合成 NS1 编码区。

[0459] 2. 用 MBP-NS1 融合蛋白免疫小鼠, 剂量范围是每剂量 10-100ug, 开始在 CFA 中, 然后是在 IFA 和 PBS 中。

[0460] 3. 根据 Kohler 和 Milstein 所述 (Nature 1975), 在用相应 GST-NS1 融合蛋白最后一次加强免疫后 3 天, 收集脾细胞和淋巴细胞, 并与 FOXP-NY 骨髓瘤细胞融合。

[0461] 4. 首先在 ELISA (参见表 5-7 的直接 ELISA) 中用 MBP-NS1 筛选杂交瘤。克隆阳性孔, 用一组 MBP 和 GST NS1 再筛选, 并将其分为泛反应性的或者亚型活性的

[0462] 5. 利用 Western 印迹进一步筛选, 证实符合 NS1 的靶蛋白的分子量。

[0463] 6. 利用 S2 分析形式 (参见实施例 4) 进行另外的筛选, 用于与 PDZ 捕获的相容性

(参见表 5-7 的 S2 ELISA)。

[0464] 7. 用细胞裂解产物形式的真核表达 NS1 重复步骤 5 和 6。

[0465] 8. 检查抗体对实施例 6 所述侧向流形式的相容性。

[0466] 9. 最后, 检查抗体检测临床样本中 NS1 的能力。

[0467] 该工作流程对获得识别人临床样本的抗体是关键的。

[0468] 表 5

		利用MBP-NS1的直接ELISA				利用MBP-NS1的S2 ELISA			
		H1N1	H3N2	H5N1A	H5N1B	H1N1	H3N2*	H5N1A	H5N1B
F63	1C6	-	+	++++	-	-	-	N/A	-
	1F9	++	-	+++	+++	-	-	N/A	-
	2C3	-	-	+++	-	-	-	N/A	-
	3C1	-	-	+++	+	-	-	N/A	-
	3G1	++	+	+++	+++	-	-	N/A	-
	5E11	-	-	+++	-	-	-	N/A	-
F64	1A10	++++	++++	++++	++++	-	-	N/A	-
	1D6	+	++++	-	++	+	-	N/A	++++
	2H6	++	-	-	++	+++	-	N/A	++++
	2H9	++	-	-	++	+++	-	N/A	++++
	3H3	+++	++	++	++++	++++	+	N/A	++++
	4C4	+	-	+++	+++	++	-	N/A	++++
	5B4	+	+	-	++	+	-	N/A	+++
	5G12	++++	-	+++	++++	++++	-	N/A	++++
	5H10	++	-	+	+++	+++	-	N/A	++++
	6C1	-	-	-	+	+	-	N/A	+++
	6G12	+	++	+	+++	+++	++	N/A	++++
	7A8	++	-	-	++++	++++	-	N/A	++++
	7B1	-	-	-	+	-	+	N/A	+++
	7B5	+++	++++	+++	+++	+	-	N/A	+
	7D1	+++	-	+++	++++	+++	-	N/A	++++
	7H2	-	-	-	+	-	-	N/A	+
8B3	+	-	-	++	+	-	N/A	++++	
8C11	++	-	-	-	-	-	N/A	++++	
F68	1D10	++++	++++	++++	++++	+	+	N/A	+
	1E5	+++	-	-	-	+++	-	N/A	-
	2C3	-	-	++++	-	-	-	N/A	-
	3G5	+++	-	-	-	+	-	N/A	++++
	3H5	++	-	-	+++	++	-	N/A	++++
	4B2	++	+++	-	+	++++	++++	N/A	++++
	4C1	++++	-	-	-	++	-	N/A	-
	4H9	++	+++	-	++	+++	++++	N/A	++++

[0470] 表 5(续)

[0471]

		利用MBP-NS1的直接ELISA				利用MBP-NS1的S2 ELISA			
		H1N1	H3N2	H5N1A	H5N1B	H1N1	H3N2*	H5N1A	H5N1B
F68	5B5	++++	++++	+++	++++	-	-	N/A	-
	6A12	+++	+++	+++	+++	+	-	N/A	+
	6B7	++++	++++	++++	++++	+	+	N/A	+
	6C6	++	-	-	++	+++	+	N/A	++++
	6D6	++	+++	-	++	+++	+++	N/A	++++
	7B10	+++	+++	+++	+++	+	-	N/A	+
	9A6	++	-	-	-	-	-	N/A	-
F70	1A3	+++	++++	+++	+++	-	-	N/A	-
	1B2	-	+	-	-	-	+	N/A	-
	2C4	++++	++++	++++	++++	+	+	N/A	+
	2D12	-	++	-	+	+	++++	N/A	++++
	2G12	++	++++	+++	+	-	-	N/A	-
	2H1	+	+	-	+	++	++++	N/A	++++
	3A6	+	+++	-	+	-	-	N/A	-
	3C2	++	+++	++	+++	-	-	N/A	-
	3F6	++	+++	+	+	-	-	N/A	-
	3G7	-	+	-	+	+	+++	N/A	++++
	4G9	++	++	+	++	-	-	N/A	-
4H12	++	++	+	++	-	-	N/A	-	
F72	1B11	+++	+++	++	+++	+	+	N/A	++
	1C1	+++	+++	++	+++	-	-	N/A	-
	1G4	-	-	+++	+	-	-	N/A	-
	1H7	++	++	+	++	-	-	N/A	-
	2A8	++	+++	++	++	-	-	N/A	-
	3D7	+++	-	++	+++	+	-	N/A	+

[0472] 表 6

[0473]

		利用GST-NS1的Western				利用HA-NS1裂解产物的Western			
		H1N1	H3N2	H5N1A	H5N1B	H1N1	H3N2	H5N1A	H5N1B
F63	3G1	-	+	+++	+++	-	-	+++	+++
F64	1A10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1D6	+	+	-	+	+	-	-	-
	2H6	-	-	-	++	-	-	-	-
	3H3	+++	++	++	++	+++	-	+	+++
	4C4	+	-	-	+++	-	-	-	++
	5B4	+	-	-	+	-	-	-	-
	5H10	+	-	-	+++	-	-	-	++
	6C1	+	-	-	-	-	-	-	-
	6G12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7A8	-	++	-	+++	-	-	-	++
7B5	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	

[0474]

	7D1	+++	-	+++	+++	-	-	-	+++
	7H2	+	-		++				-
	8B3	++	-	-	+++	++	+	++	+++
F68	1D10	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	4B2	+++	+++	-	++	+++	-	-	++
	4H9	+++	++	+	+	+++	-	+	+
	5B5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6A12	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
	6B7	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	6D6	+++	++	+	+	+++	-	+	+
	7B10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
F70	1A3	+	+	+	+	+	+	+	+
	2C4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2D12	-	++	+	+	-	++	+	+
	2G12	++	++	++	+	+	++	++	+

[0475] 表 7

[0476]

		利用HA-NS1裂解产物的S2 ELISA			
		H1N1	H3N2*	H5N1A	H5N1B
F64	1D6	-	-	N/A	++
	3H3	++	-	N/A	++++
	5B4	-	-	N/A	+
	6C1	-	-	N/A	-
	6G12	-	+	N/A	++++
	7A8	-	-	N/A	++++
	7B5	-	-	N/A	-
	7D1	-	-	N/A	++++
	7H2	-		N/A	-
	8B3	-	-	N/A	++++
F68	1D10	-	-	N/A	-
	4B2	+	+	N/A	++++
	4H9	+	+	N/A	++++
	5B5	-	-	N/A	-
	6A12	-	-	N/A	-
	6B7	-	-	N/A	-
	6D6	+	-	N/A	++++
		7B10	-	-	N/A

[0477] 实施例 6 :侧向流

[0478] 图 8,9 和 11 提供用于 NS1 检测的侧向流形式的实施例。图 8 提供一种侧向流,利用 PDZ 捕获继之以单克隆抗体检测。对所有情况,利用提条器 (striper) 将重组 PDZ 结构域蛋白或者抗体沉积在 RF120Millipore 膜上。对图 8,PDZ 蛋白 PSD95D1-3,和 INADL D8 沉积浓度为 0.5mg/ml。还沉积对照条带,其由山羊抗小鼠抗体 (GAM) 组成,浓度也为 0.5mg/ml。NS1 蛋白与 100ul 体积溶于 TBS-T 缓冲液的金交联单克隆的抗 NS1 例如 4B2 结合。使用的 NS1 蛋白来自 H1N1, H3N2, H5N197, H5N1, 而对照道 (control lane) 不包含 NS1。在所有情况下,稀释人鼻抽吸物并保存于盐水或者 M4, 按指示。样本与如下所述量的金交联抗体直接混合。

[0479] 将 PDZ 条膜插入 NS1/ 抗 NS1 蛋白溶液,流动起始于毛细管作用和导湿垫。根据 PDZ 反应性模式对 NS1 进行分型 H1N1 与 PSD95 和 INADL d8 均结合;H3N2 只结合 INADL d8; H5N1 只结合 PSD95。利用与 PDZ 的反应性和用金交联的泛反应性抗 NS1 单克隆抗体,根据 NS1 侧向流的结果进行流感 A 分型。

[0480] 在图 9 中,13 种不同的单克隆抗体沉积在侧向流装置中。这 13 种使用的抗体是 F64-1 A0, F64-3H3, F64-6G12, F64-7A8, F64-7D1, F68-1D10, F68-4B2, F68-4H9, F68-6A12, F68-6B7, F68-6D6, F68-7B10。向包含 H1N1 流感病毒的样本中添加亚型特异的金交联泛 NS1 抗体。将样本加入侧向流装置,结果显示于图 9。该结果显示,泛特异抗体可以用于鉴定何种抗体与 H1N1 结合最好的试验和测定。利用下列符号定量结合强度:(-) 是指没有结合,(+) 是指弱结合,(++) 是指强结合和 (+++) 是指中等结合。

[0481] 在膜上沉积泛特异抗体,产生鉴定患者样本中致病性流感 A 的侧向流试验。患者样本与金标记抗体的混合物混合,所述抗体识别全部 NS1 PL。样本加入侧向流测试条,如果存在流感 A 的致病株,条上将形成一条线。

[0482] 利用下列方案和材料进行条测试检验:使用的材料包括:之前用山羊抗小鼠/PSD95 d1,2,3/INADL d8 涂条的测试条;TBST/2% BSA/0.25% Tween 20 缓冲液;NS1 蛋白 MBP-H1N1、MBP-H3N2、MBP-H5N1 A、和 MBP-H5N1B" 旧" (Jon' s) 快速金交联 F68-4B2 抗体的储存液;和 Maxisorp ELISA 板。按如下步骤进行:

[0483] 1.) NS1 蛋白储存液在 TBST/2% BSA/0.25% Tween 20 中稀释到 100ng/uL (利用不少于 5uL 蛋白进行稀释)

[0484] 2.) 通过向 10uL TBST/2% BSA/0.25% Tween 20 中添加 10uL 蛋白,将 100ng/uL 稀释液被稀释到 50ng/uL

[0485] 3.) 制备溶于 TBST/2% BSA/0.25% Tween 20 缓冲液的金交联抗体储存液。每 100uL 缓冲液中添加 4uL 抗体,准备足够 6 个 100uL 反应 (这提供了额外的死体积) 使用的缓冲液。

[0486] 4.) ELISA 板各孔中添加 98uL 抗体 / 缓冲液混合物

[0487] 5.) 向含有缓冲液的孔中添加 2uL NS1 稀释液 (每孔一种 NS1)

[0488] 6.) 一个孔中只有抗体和缓冲液作为阴性“无 NS1”对照

[0489] 7.) 轻敲 ELISA 板若干次以混合孔的内含物

[0490] 8.) 在孔中加入预涂条 (pre-stripped) 的测试条,在进展期间观察。在大约 15 分钟后 (当全部液体已经被吸收,但条还未干燥时),从孔中取出条,扫描进计算机。

[0491] 图 10a 和 10b 中提供的试验按如下方式制备:GST-PSD95 d1,2,3 蛋白以 3mg/mL

涂条在膜上用于禽类试验,或者可以使用两种单克隆抗体的混合物(1.1mg/mL F64-3H3和0.075mg/mL F68-4H9用于泛流感A试验)。1mg/mL多克隆山羊抗小鼠抗体的第二条线用于试验捕获线。下面阐明试验步骤。

- [0492] 1. 制备具有样本膜和接收垫(sink pad)的卡片。
- [0493] 2. 用PDZ蛋白和/或抗体对膜涂条(参见上面对浓缩的说明)
- [0494] 3. 膜在56度干燥过夜,然后将卡片切成4.26mm宽的条。
- [0495] 4. 将玻璃纤维样本垫与条的底部连接,将完整的条放置于盒内用于测试。
- [0496] 5. 解冻待测样本,添加80 μ l样本到20 μ l缓冲液中。上下抽吸若干次进行混合。
- [0497] 6. 在样本/缓冲溶液中掺入8 μ l金交联(Au-)检测体混合物。该检测体混合物是4 μ l Au-F68-4B2和4 μ l Au-F68-3D5。上下抽吸若干次进行混合。
- [0498] 7. 在盒的样本孔中添加100 μ l制备的样本。
- [0499] 8. 在样本添加后15分钟读取盒上的试验和对照线。对于任何读数可信的试验结果,对照线都是清晰可见的。流感A阳性样本标注为(+),流感A阴性样本标注为(-)。上箭头(top arrow)指向对照,下箭头(bottom arrow)指向测试。在两种情况下,顶部线是对照线(山羊抗小鼠mAb),下面第二条线是测试线(用于泛流感A试验的F64-3H3和F68-4H9 mAbs的混合物以及用于禽类试验的PSD95d1,2,3)。对禽类试验检测2ng H5N1蛋白。底部环状斑点是样本孔。在图10a中,两个试验都是阳性的。

[0500] 图10c显示用图10a和10b所示形式检测的20个人样本中的3个。所述样本显示各种结果,例如,样本1对流感A是阳性的,但对禽流感A是阴性的,样本14对两者都是阴性的。图10d显示对H1N1,H3N2,和H5N1重组蛋白相同的试验。泛FluA试验对这三个都是阳性的。禽流感试验只对H5N1是阳性的。在图10e中,金交联PDZ用作检测体,而单个或者多个mAb用于捕获。图10e具有以含有F68-4B2 mAb捕获剂的Au-PSD95 d1,2,3形式添加的液体金(liquid gold)。1.7ng NS1 H5N1蛋白检测阳性。这是禽流感特异性试验。

[0501] 在图10f中,使用干金(dried gold)方法。卡片的制备与液体金方案相同,除了在进行任何涂条前样本垫被固定到卡片上。当捕获剂被涂下条后,在卡片底部的样本垫上喷射金交联检测体混合物(其这时还包含偶联稀释剂)。卡片被干燥,切割,并像液体试验一样放入盒中。当制备人样本时,在100 μ l人样本在盒中进行反应时,它们只用缓冲溶液处理(不添加其他的金交联检测体混合物)。流感A阳性样本标注为(+),流感A阴性样本标注为(-)。这些盒的设计和读数与液体金盒一样。在图10f中,样本7和9对流感A和禽流感都是阳性的,样本12对流感A和禽流感都是阴性的。

[0502] 实施例7:PDZ/PDZ配体相互作用的抑制剂

[0503] 在该实施例中,选择化合物分析其作为PDZ/PDZ配体相互作用的抑制剂。对于挑选的PDZ/PL对,筛选了下列23种药物(1-17号是COX抑制剂)。1. 氟尼酸,2. 布洛芬,3. 奈普生钠,4. 双氯芬酸钠盐,5. 乙酰水杨酸,6. 水杨酸,7. 氟吡洛芬,8. 舒林酸硫醚,9. 舒林酸,10. 依托度酸,11. 吲哚美辛,12. 酮咯酸氨丁三醇盐,13. 酮基布洛芬,14. 甲芬那酸,15. 卡洛芬,16. 巴氯芬,17. 菲诺洛芬,18. 甲磺酰苯扎托品,19. 盐酸阿米替林,20. 色甘酸钠,21. 盐酸去甲丙咪嗪,22. 盐酸氯丙咪嗪,和23. 盐酸去甲替林。在下面的说明中,A部分提供利用COX抑制剂进行的实验,B部分提供利用小分子抑制剂进行的实验,C部分提供利用肽抑制剂进行的实验。表8提供A-C部分中用于鉴定抑制剂的PDZ/PL相互作用。使

用的 PL 序列是 SEQ ID NOS :54-59。结果显示于表 1-13。

[0504] 表 8 :用于药物筛选的 PDZ/PL 相互作用

PDZ	PL序列	序列号
Magi d1 (AVC 88)	GRWTGRSMSSWKPTRRETEV (AVC 1857)	SEQ ID NO: 54
TIP1(AVC 54)	QISPGGLEPPSEKHFRETEV (AVC AA56)	55
SHANK1 (AVC 235)	YGRKKRRQRRRYIPEAQTRL (AVC 1965)	56
PSD95 d1 (AVC 143)	YGRKKRRQRRRRISSIETDV (AVC 1912)	57
PSD95 d2 (AVC 265)	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (AVC AA348)	58
PSD95 d3 (AVC 466)	YGRKKRRQRRRTKNYKQTSV (AVC 1916)	59

[0506] A. 根据以下两个标准选择 COX 抑制剂 :1. 存在好在 PDZ 的零位发生相互作用的羧酸基团,和 2. 可以位于 PDZ 零位的羧酸基团附近的疏水性或者芳香族基团。疏水性或者芳香族基团不是绝对必需的,但是优选的。

[0507] 浓度为 250uM 药物浓度的 COX 分子在基质 / 阵列竞争性分析形式中接受筛选,即,该分析中在前面描述的小分子竞争物存在或者缺失的条件下,测定配体与融合蛋白中固相 PDZ 结构域的对接 (docking)。结果如下。舒林酸硫醚抑制 Magi1 d1/AVC1857。菲诺洛芬抑制 PSD95d1/AVC1912 相互作用。分析中没有任何药物显著抑制 PSD95d2/AVCAA345 相互作用。菲诺洛芬抑制 PSD95 d2/AVCAA348 相互作用。菲诺洛芬抑制 PSD95 d3/AVC1916 相互作用。菲诺洛芬抑制 SHANK1/AVC1965 相互作用。舒林酸硫醚抑制 TIP1/AVCAA56 相互作用。其他药物在该分析中未显示显著的抑制。两个主要小分子碰撞是舒林酸硫醚和苯氧苯丙酸。

[0508] 结果表明 COX 抑制剂可以用作 PDZ/PDZ 配体相互作用的抑制剂,这些抑制剂的衍生物可能是基于 PDZ 的靶标的有效治疗剂,那些被测的舒林酸硫醚和菲诺洛芬显示出最强的抑制作用。

[0509] B. 根据分子模型预测 PDZ/PDZ 配体相互作用的小分子抑制剂。利用 Accelrys software(Accelrys, San Diego, CA) 的 in silico 筛选构建模型,和用 4 种不同 PDZ 结构域模拟物对接 (dock) 650,000 分子文库 (ChemDiv, San Diego, CA ;Blanca Pharmaceuticals, Mountain View, CA)。该分子模型基于发现的化合物具有通过静电、氢键键合和疏水性相互作用与 PDZ 相互作用的能力。

[0510] 从 in silico 筛选得到的最佳碰撞用于在基质 / 阵列竞争性分析形式中接受筛选,即,该分析中在别处描述的小分子竞争物存在或者缺失的条件下,测定配体与融合蛋白中固相 PDZ 结构域的对接 (docking)。表 9 列出了筛选的抑制 PDZ/PDZ 配体相互作用的小分子。可以参考本领域技术人员任何已知的小分子公共数据库,获得待测小分子抑制剂的化学结构和化学式。小分子抑制剂的其他实施例可见于美国临时申请 ARBV :002USP1, 标题为“Small Molecule Inhibitors of PDZ Interactions”, _____ 提交,在此完整引入作为

参考。用于筛选的小分子浓度是~ 250uM。这些筛选的结果显示于表 10。

[0511] 表 9 250uM 小分子浓度下, 药物筛选中用于碰撞的碰撞相对强度

分子名	Magi1 d1 /1857	PSD95 d1 /1912	PSD95 d2 /AA348	PSD95 d3 /1916	Shank1 /1965
D008-0168		强	强	强	强
2357-3224	弱	强	强	强	强
E544-0129	中	中	强	强	强
0620-0057			强	强	
7291-0042	强				
3289-2331	强	强			
1193-0076		强	强		
3807-2058	中				
2817-0095		中	弱	强	
C450-0454		中	中	中	
3558-0042	弱				弱
6623-2002					中
8003-6598				强	
5786-0525	中				
2054-0616		中			
MC 319743	强				强
MC 272352	强	强	中	强	
3699-1081	弱				
K906-1419	弱				
3254-1829	中		中		
MC 310405		中		中	
3019-0348	弱				
8009-5039	弱				
4998-2792	弱				
8014-1258	弱				
MC 285172	强	中	中	中	中
MC 247808	中		中	中	中

[0512] 表 10

分子名	Magi1 d1 /1857	PSD95 d1 /1912	PSD95 d2 /AA348	PSD95 d3 /1916	Shank1 /1965	Tip1/ AA56	PDZ建模来自
D008-0168	>250	159	177	>250	212	>250	hDVL1
2357-3224	160	>250	>250	210	211	>250	hDVL1
E544-0129	61	2.5	5.0	3.5	9.1	>250	hDVL1
0620-0057	237	2.7	14.9	8.2	>250	>250	PSD95 d3
7291-0042	87	>250	>250	>250	>250	>250	PSD95 d2 (DPI)
3289-2331	130	>250	>250	>250	>250	>250	PSD95 d1
1193-0076	>250	>250	>250	>250	>250	>250	PSD95 d1
3807-2058	>250	>250	>250	>250	>250	>250	PSD95 d1
2817-0095	86	183	>250	99.9	>250	>250	hDVL1
C450-0454	>250	206	>250	>250	>250	>250	PSD95 d3
3558-0042	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
6623-2002	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
[0514] 8003-6598	>250	>250	>250	6.3	10.9	>250	hDVL1
5786-0525	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
2054-0616	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
MC 319743	113	>250	>250	>250	>250	>250	PSD95 d2 (1QLC)
MC 272352	233	213	223	181	161	>250	PSD95 d2 (1QLC)
3699-1081	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
K906-1419	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
3254-1829	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
MC 310405	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
3019-0348	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
8009-5039	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
4998-2792	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
8014-1258	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
MC 285172	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
MC 247808	>250	>250	220.8	>250	>250	>250	hDVL1

[0515] 参考总结结果的表 10 和 11, 根据分析的 OD (450) 读数, 小分子被认为是碰撞弱、中或者强: 弱碰撞: OD 相对于对照降低 > 40%, 中碰撞: OD 相对于对照降低 ~ 40-60%, 强碰撞: OD 降低 > 40%。

[0516] 在该后来分析中最好的碰撞然后进行滴定结合研究, 即在相同竞争性分析中滴定小分子进行估算, IC₅₀ 值和结果总结于表 10。

[0517] 根据 *in silico* 筛选, 鉴定出 PDZ/PL 相互作用的不同小分子抑制剂。这些分子可用于阻断治疗值的 PDZ/PL 相互作用, 包括流感 ANS1/PDZ 相互作用。

[0518] C. 鉴定和检测肽治疗抑制剂 (参见表 11)。每个包含 PL (H5N1, H3N2 和 H1N1) 的流感 A NS1 蛋白类型具有与若干种 PDZs 相互作用的潜力。这些 PDZ 的每一个本身可能就是抗有关流感 A 株的潜在治疗靶标, 这样的话, 用肽阻断 PDZ 可能具有治疗功用。为了鉴定潜在的治疗肽, 搜索 AVC 专利数据库寻找每个 PDZ 的 PDZ 配体。AVC 数据库包含 PL/PDZ 相互作用, 这是基于经先前描述的专利 ELISA 试验 (G 分析) 鉴定的。用于鉴定有希望的 PL 的标准基于下列 3 个标准: 1) OD (450nm) ≥ 0.5, 2) 测定的相对标准偏差 < 0.25, 3) 肽浓

度 = < 20 微摩尔。

[0519] 根据 PDZ/PL 结合相互作用、结构和结合数据的数据库, 鉴定 C 端序列最可能与根据 PSD95 d2 结构和结合数据的 PSD95 d2 结构 (SEQ ID NO :1, 例如) 结合。因此, 禽流感 A (H5N1) 优选的肽治疗抑制剂基于结合 PSD95 d2 的肽和, 与符合共有序列 :E/D/N/Q-S/T-D/E/Q/N-V/L (SEQ ID NO :48) 的 PSD95 d2 结合的最佳和优选的肽序列。

[0520] 利用这些共有序列, 以下是用作结合 PSD95 d2 结构域的肽抑制剂优选 C 端序列的实例 :

[0521] 1) ESDV (SEQ ID NO :49)

[0522] 2) ESEV (SEQ ID NO :2)

[0523] 3) ETDV (SEQ ID NO :50)

[0524] 4) ETEV (SEQ ID NO :51)

[0525] 5) DTDV (SEQ ID NO :52)

[0526] 6) DTEV (SEQ ID NO :53)

[0527] 7) DSDV (SEQ ID NO :996)

[0528] 8) DSEV (SEQ ID NO :997)

[0529] 针对各 PDZ 的潜在 PDZ 配体治疗肽汇总于表 11。表 11 在第一列显示 PL 肽标识符 (AVC ID), 第二列显示 PL 肽名称 (源自作为其来源的蛋白), 第三列显示肽序列, 最后一列显示序列识别号。表的每个部分包含一个题头, 表明 PLs 将结合的 PDZ 蛋白。表 11 所示的肽或者其保留 C 端 PL 的截短型是适于治疗流感的试剂。阻断致病性流感 PL 与 PDZ 结合的 PL 肽治疗剂可用于治疗致病性流感。例如, 通过将转运蛋白肽 (蛋白转导结构域) 连接到该肽序列的 N 端, 这些肽 (SEQ ID NOS :89-987) 中每个肽的 C 端序列 (长 3 到 20 个氨基酸) 可以转变成治疗剂。具有 C 端保守的 3 个氨基酸的至少长 5 个氨基酸的这些肽的亚片段被用作表 11 所列各 PDZ 的病毒 PL/PDZ 相互作用的治疗抑制剂, 优选, 至少 6 个氨基酸长, 7 个氨基酸长, 8 个氨基酸长, 9 个氨基酸长, 和 10 个氨基酸长。优选至少 C 端 4 个氨基酸是保守的, 更优选, C 端 5 个氨基酸是保守的, C 端 6 个氨基酸, 或者 C 端 7 个氨基酸。肽治疗剂还包括包含肽模拟物中氨基酸保守取代的肽。但是, 优选保守取代位于除了最后 3 或者 4 个氨基酸以外的区域中。使用若干种转运蛋白肽序列, 包括 Tat 和触足蛋白。利用实施例 2 描述的 A 或者 G PDZ 分析, 鉴定那些抑制 PDZ/PL 相互作用的肽, 对所述肽进行进一步分析。对那些被证明具有抑制作用的肽在体外和流感动物模型中进行进一步研究。

[0530] 实施例 8 : 与毒性相关的 NS2 模体

[0531] 在前面部分, NS1 PL 模体, ESEV (SEQ ID no :2), 与禽亚型 H5N1 中所见的高度毒性 / 致死表型有关。因为 NS1 的 PL 部分与 NS2 重叠, 分析了禽 PL 保守性对重叠区中 NS2 序列的影响。NS1 和 NS2 对重叠区使用不同的读码框, 这对可以使用的密码子的选择构成了限制。所述分析确认, 该区域的序列变化改变了 NS1 而不是 NS2 的蛋白序列 (参见表 12 和 13 一在表 12 中 STYPE 是指病毒的亚型)。具体地, 在 H5N1 中, PL 序列 ESEV (SEQ ID NO :2), EPEV (SEQ ID NO :27) 和 ESKV (SEQ ID NO :4) 不改变 NS2 的蛋白序列, 在 NS2 的 70 位保持丝氨酸 (S 或者 Ser)。相反, 良性亚型例如 H3N2 包含导致 70 位为甘氨酸的核苷酸序列。这种情况的唯一例外是导致 1918 年致命大流行病的 1918 株 H1N1, 其表达 PL, KSEV (SEQ ID NO :41), 这导致与 H5N1 株一样的 70 位丝氨酸。表 12 所示的 NS1 PL 序列是 ESEV (SEQ ID NO :

2), EPEV (SEQ ID NO :27), ESKV (SEQ ID NO :4), RSKV (SEQ ID NO :8), KSEV (SEQ ID NO :41), 和 RSEV (SEQ ID NO :7), 在表中鉴别 NS1C 端编码区域的 SEQ ID NO 与 NS2 区域的 SEQ ID NO 相同 s (参见表 12 和 13)。因此, 流感 A 病毒 NS2 蛋白中 70 位的丝氨酸与病毒的毒性相关。因而, 70 位丝氨酸可以用作高毒性的标记物, 而 NS2 中 70 位甘氨酸可以用作更良性的临床病程的标记物。下文中 NS270 位的变化被用作诊断标记物和治疗靶标。丝氨酸取代允许该序列被磷酸化, 可能被激酶调控。

[0532] 表 12/S70 与高毒性临床病程相关

病毒	STYP	NS1 C端编码区	SEQ ID NO.	NS1 PL	NS2	SEQ ID NO.
A/chicken/Viet Nam/DT-015/2004(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Chicken/HongKong/FY150/01(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Ck/YN/374/2004(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/ck/Nakhon Sawan/Thailand/CU-39/04(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Duck/Hong Kong/wv461/2000(H5N1)	H5N1	gttgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Duck/Hong/Kong/2986.1/2000(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Duck/Hong Kong/p46/97 (H5N1) EPEV	H5N1	attgagccagaagtttgaaga	989	EPEV	QLSQKFE	994
A/grebe/Novosibirsk/29/2005(H5N1) ESKV	H5N1	attgagtcaaaagtttgaaga	990	ESKV	QLSQKFE	994
A/Bar-headed Goose/Qinghai/60/05(H5N1)	H5N1	attgagtcaaaagtttgaaga	990	ESKV	QLSQKFE	994
A/Hong Kong/213/03(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/Hong Kong/481/97(H5N1) EPEV	H5N1	attgagccagaagtttgaaga	989	EPEV	QLSQKFE	994
A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/tiger/Suphanburi/Thailand/TI-1/04(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/leopard/Suphanburi/Thailand/Leo-1/04(H5N1)	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	ESEV	QLSQKFE	994
A/HongKong/97/98(H5N1) EPEV	H5N1	attgagccagaagtttgaaga	989	EPEV	QLSQKFE	994
A/Viet Nam/1203/2004(H5N1) del PL*	H5N1	attgagtcagaagtttgaaga	988	DEL PL	QLSQKFE	994
A/New York/393/2005(H3N2)	H3N2	gctaggtcaaaagtttgaaga	991	RSKV	QLGQKFE	995
A/Brevig Mission/1/1918(H1N1)	H1N1	attaaagtcagaagtttgaaga	992	KSEV	QLSQKFE	994
A/New York/227/2003(H1N1)	H1N1	attaggtcagaagtttgaaga	993	RSEV	QLGQKFE	995

[0533]

120

[0534] 用作诊断标记物

[0535] 从表现流感 A 症状的患者中提取粘液样本。该样本经过处理使其更具流动性以便用于侧向流形式。利用实施例 6 中提出的方案产生侧向流形式, 除了用一种核酸鉴定捕获剂来捕获样本中存在的任何包含 70 位丝氨酸的 NS2, 所述核酸与包括重叠区并包含来自表 12 的 NS2 蛋白中的丝氨酸 70 的序列互补。所述捕获剂包括与所有已知的毒性流感 A 株互补的核酸。阳性结果表明患者应该接受针对流感 A 病毒高毒性形式的治疗。

[0536] 表 13/S70 与高毒性临床病程相关

NS2				核苷酸序列				NS1				亚型				
G				ag		a		R	K			H3N2				
G				ag				R				H1N1				
L	S	Q	K	F	att	gag	tca	gaa	gtt	tga	I	E	S	E	V	H5N1
									a				I			H5N1
							a						K			H5N1
						c						P				H5N1
					a						K					H1N1 (1918)

[0537]

[0538] 基于单克隆抗体的试验是相似的, 除了一系列特异识别包括来自表 12 丝氨酸 70 的重叠区的抗体被用作捕获剂。

[0539] 用于治疗剂设计使用阻断 NS2 和靶标之间相互作用的治疗剂。具体地, 治疗剂阻断 NS2 蛋白在 70 位丝氨酸处的结合。给已经感染流感 A 的患者或者在感染前施用肽或者

小分子治疗剂,给药量足以阻断 NS2 和其靶标之间的相互作用。通过吸入给药,继续治疗直到患者症状消失和 / 或患者不再有感染疾病的危险。

[0540] 本说明书引用的全部出版物和专利在此引入作为参考,就如各个独立出版物或者专利是具体和单独地表明引入作为参考。通过 GID 或者检索号引用的 Genbank 记录,尤其是任何多肽序列、多核苷酸序列或者其注释在此引入作为参考。任何出版物的引用是因为其公开在提交日期前,不应被认为是承认因为先前的发明,本发明不享有居先于这类出版物的权利。

[0541] 尽管本发已经明参考其特定实施例进行了描述,但本领域技术人员应当了解,可以做出各种改变和等同替换,而不脱离本发明的真实精神和范围。此外,可以做出许多改进以使特定情况、材料、物质的组成、方法、工序或者步骤适应本发明的目标、精神和范围。所有这类改进认为是在此处所附权利要求的范围内。本说明书中提及的全部出版物和专利申请在此相同程度引入作为参考,就如各个独立出版物或者专利申请是具体和单独地指出用来引入作为参考。

[0542] 表 11 :结合 DLG2 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No
AA72.1	HPV E6 33(修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	60
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVWDQSSV	61
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	62
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	63
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	64
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	65
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	66
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	67
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	68
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	69
AA34.2	NMDA	LNSSCNRRRVYKKMPSIESDV	70
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRRVYKKMPSIESDV	71
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	72
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDSWV	73
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	74
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	75
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDVRGEVRQFTLRHWLKV	76
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	77
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	78
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	79
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	80
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	81
AA180	NMDA谷氨酸受体2C	TQGFPGPATWRRISSESEV	82
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	83
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	84
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	85
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	86
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	87
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	88

[0544] 表 11 续 :结合 GORASP d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqID.No.
1927	X=L-苯基甘氨酸		
1754	核衣壳,SARS	DFSRQLQNSMSGASADSTQA	89
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	90
1750	M蛋白, SARS	NYKLNTDHAGSNDNIALLVQ	91
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	92
1795	Tat-A2A肾上腺素能受体	YGRKKRRQRRRARGDRKRIV	93
1791	Tat-MUC1 Ile -2	YGRKKRRQRRRAVAATSINL	94
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	95
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	96
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	97
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	98
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	99
1789	Tat-ERC1b	YGRKKRRQRRRQDEEEGIWA	100
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	101
1752	E蛋白, SARS	YVYSRVKLNLSSEGVPDLLV	102

[0546] 表 11 续:结合 GRIP1 d4 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqID.No.
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	103
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	104
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLOHWLAI	105
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	106
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	107
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	108
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	109
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	110
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	111
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	112
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	113
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	114
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	115
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	116
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	117
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	118

[0548] 表 11 续:结合 INADL d8 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqIDNo.
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKQVWDQSSV	119
AA121	CD68	ALVLI AFCI IRRRPSAYQAL	120
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	121
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	122
AA245	α -2c肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	123
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEDQHTQITKV	124
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	125
AA218	CSFG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	126
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉病蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	127
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGPLPHSTTRV	128
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGSRPKTRV	129
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	130
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	131
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	132
AA177L	c-kit受体	INSVGSTASSSQPLLVDV	133
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	134
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	135
1820	TRPM7	KKQPGNSTKESESTNSVRLML	136
AA118	MINT-1	KTMPAAMYRLLTAQEQPVYI	137
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIQYA	138
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	139
AA34.2	NMDA	LNSSNRRVYKKMPESIDV	140
AA345	NMDA R2A	LNSSNRRVYKKMPESIDV	141
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	142
AA217	联蛋白-62	PYSELNYETSHYPASPDV	143
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	144
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	145

[0549]

[0550] 表 11 续:结合 INADL d8 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDN
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGKQVVPFSSSV	146
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	147
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	148
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	149
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	150
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	151
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLEPHSTTRV	152
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	153
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	154
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	155
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	156
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	157
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAACKKYVSYNNLVI	158
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	159
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	160
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	161
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	162
1966	Tat-H3N2	YGRKKRRQRRRMARTARSKV	163
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	164

[0551]

[0552] 表 11 续:结合 KIAA1284 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID
1927	X=L-苯基甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	165
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	166
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRO	167
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	168
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	169
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	170
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	171
[0553] AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	172
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	173
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	174
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	175
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	176
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	177
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	180
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	181
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	180
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	181

[0554] 表 11 续:结合 KIAA1284 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA05.1	CD4(修饰的)	LSEKKTQSPPHFRFQKTASPI	182
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	183
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	184
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	185
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	186
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	187
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	188
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	189
[0555] AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	190
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAKKKYVSYNNLVI	191
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	192
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	193
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	194
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	195
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	196
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	197
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	198
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPELLV	199

[0556] 表 11 续:结合 KIAA1415 d1 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	200
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	201
AA248	生长激素抑制素受体4	EALQPEPGRKRIPLTRTTTF	202
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	203
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	204
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	205
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	206
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	207
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	208
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	209
1820	TRPM7	KKQPGNSTKESESTNSVRLML	210
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	211
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	212
[0557] AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	213
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSLTGYV	214
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	215
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRAFRRLARPWTQTAW	216
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	217
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	218
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFVMSRAMYV	219
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	220
1759	EGFR	TAENAAYLRVAPQSSEFIGA	221
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	222
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAACKKYVSYNNLVI	223
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	224
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	225
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	226
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	227

[0558] 表 11 续 :结合 KIAA1719 d4 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	228
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTDKELEVLSSL	229
AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFERRAFKKILARGDRKRIV	230
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	231
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRRARQERLQRRRETQV	232
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	233
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	234
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	235
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	236
AA300	TRAF2	NSYVRDDAIFIKAIVDLTGL	237
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	238
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	239
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASFY	240
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	241
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	242
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	243
1940	Tat-CLCA-3 (鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	244
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	245
1912	生物素-Tat-NMDAR2 special1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	246
1917	1917	YGRKKRRQRRRRISSLETQV	247
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	248

[0559] 表11续:结合 Lim Mystique d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOQRRETAL	249
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	250
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILERRARRGRQ	251
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	252
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	253
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	254
AA346	NMDA R2R	ENGSSNGHVYEKLSSIESDV	255
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	256
AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	257
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	258
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	259
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	260
[0561] AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	261
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	262
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	263
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	264
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	265
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	266
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	267
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	268
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDSWV	269
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	270
AA56	JAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	271
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	272
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASFY	273
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	274
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	275

[0562] 表 11 续:结合 Lim Mystique d1 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPPSSGKDYV	276
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	277
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	278
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐受体)	VDPNSPAACKKYVSYNNLVI	279
AA125	紧密连合蛋白3(ZO-3)	VHDAESSDEEDGYDWGPATDL	280
[0563] AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	281
AA123	α -辅肌动蛋白2	VFGALDYAAFSSALYGESDL	282
1784	Tat-MUC1(Ala变体)	YGRKKRRQRRRAVAASANL	283
1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	284
1791	Tat-MUC1 Ile -2	YGRKKRRQRRRAVAATSINL	285
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	286
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	287
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	288

[0564] 表 11 续:结合 MAGI1 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqIDN
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	289
AA121	CD68	ALVLIAFCIIRRRPSAYQAL	290
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	291
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFDMDQLAFHQFYI	292
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	293
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGQGLHVTAL	294
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	295
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	296
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉病蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	297
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	298
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	299
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGGSGGGGGSGGHSTTRV	300
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGLPHSTTRV	301
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGSRRPKTRV	302
[0565] AA22.1	DNAM-1 (连接子10aa)	GGGGGSGGGGTFSRRPKTRV	303
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	304
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	305
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	306
1857	HPV E6 #35 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSMSSWKPTRRETEV	307
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLOHWLAI	308
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	309
AA02.1	Clasp-2	ISGTPPTSTMVHGMTSSSSVV	310
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	311
AA29.2	CDw128B	KDSRPSFVGSSSGHTSTTL	312
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	313
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	314
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	315
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRESEI	316
AA113	SSTR2(生长抑素受体2)	LNETTETQRTLLNGDLQTSI	317
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	318
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	319
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	MGRWTGRSSESWRPRPVTQV	320

[0566] 表 11 续:结合 MAGI1 d1 的 PL 序列 (续)

[0567]

1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	321
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	322
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	323
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	324
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	325
AA252	毒蕈碱性乙酰胆碱受体M4	QQYQORQSVIFHKRAPEQAL	326
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	327
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	328
AA74.1	HPV E6 52 (修饰的)	SEGGRPTRGPRLQGRRVTVQV	329
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	330
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	331
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELKGLSSP	332
AA214L	ErbB- 4 受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	333
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	334
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	335
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	336
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	337
AA223	密蛋白1	SYPTPRYPKPPAPSSGKDYV	338
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	339
AA69.1	HPV E6#16(修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	340
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	341
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	342
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	343
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	344
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	345
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	346
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	347
1862	HPV E6 #82	WTGQSANSRKPPRQRSETQV	348
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	349
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	350
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	351
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	352
1912	生物素-Tat-NMDAR2 special1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	353
AA25	FceR1b	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	354

[0568] 表 11 续 :结合 MAGI2 d5 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	SeqIDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	355
AA115	presenilin-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	356
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	357
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGQGLHVTAL	358
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	359
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	360
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEDQHTQITKV	361
AA218	CSFG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	362
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	363
1761	成纤维细胞生长因子受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	364
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	365
[0569] AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	366
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	367
AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFRAAFKKILARGDRKRIV	368
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	369
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	370
AA182L	柄蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	371
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	372
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	373
1820	TRPM7	KQPGNSTKESESTNSVRLML	374
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	375
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	376
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	377
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	378
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	379

[0570] 表 11 续:结合 MAGI2 d5 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	380
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	381
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	382
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	383
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDVW	384
AA07	CD34	QATSRNGHSARQHVVADTEL	385
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	386
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	387
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	388
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	389
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASFY	390
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	391
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	392
[0571] AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	393
AA66.1	HPV E6J66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	394
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	395
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	396
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	397
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	398
AA125	紧密连合蛋白3(ZO-3)	VHDAESSDEDGYDWGPATDL	399
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAACSLCRLYII	400
AA123	α -辅肌动蛋白2	VPGALDYAAFSSALYGESDL	401
1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	402
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	403
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	404
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	405
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	406
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	407

[0572] 表 11 续:结合 MAGI3 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	408
AA121	CD68	ALVLI AFCIIRRRPSAYQAL	409
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	410
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	411
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	412
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	413
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	414
AA19	CD148	ENLAPVTTFGKTINGYIA	415
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGLVTSV	416
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	417
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	418
AA220	claudin 10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	419
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	420
AA36.3	神经配蛋白(连接子14aa)	GGGGGSGGGGGSGGHSTTRV	421
AA36.2	神经配蛋白(连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSLPHSTTRV	422
[0573] AA22.2	DNAM-1(连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSGSRPKTRV	423
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	424
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	425
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	426
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	427
1857	HPV E6 #35 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSMSSWKPTRRETEV	428
AA67.1	HPV E6 #57 (cysteine-free)	HAMNAAPRAMENAPALRTSH	429
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	430
AA02.1	Clasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSVV	431
AA26	半乳凝素3	ISKLGISGDIDLTSASYTMI	432
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	433
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	434
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	435
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	436
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	437
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	438
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	439

[0574] 表 11 续:结合 MAGI3 d1 的 PL 序列(续)

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No.
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSESVDV	440
AA05.2	CD4 (修饰的) C->S	LSEKKTSPHRFQKTSSPI	441
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	GRWTGRSSESWRPRPVTQV	442
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	443
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	444
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	445
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDVWV	446
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	447
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	448
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDGRGEVRQFTLRHWLKV	449
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGCKQVVPFSSSV	450
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	451
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	452
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGKLSSP	453
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	454
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	455
[0575] AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	456
AA228	柄蛋白2	SPDSSYQGKGFVMSRAMYV	457
AA117	早老蛋白-2	STDNLVRPFMDTLASHQLYI	458
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPPAPSSGKDYV	459
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	460
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	461
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	462
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	463
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	464
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	465
AA33	KV1.3	TNNNPNSAVNIKKIFTDV	466
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	467
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELVIFPSVKIATLV	468
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLORLYII	469
1862	HPV E6 #82	VTGQSANSRKPPRQRSETQV	470
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	471
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	472
AA25	FceRib	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	473

[0576] 表 11 续:结合 MAGI3 d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	474
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	475
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	476
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEDQHTQITKV	477
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	478
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	479
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	480
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGSGGGGSGGGHSTTRV	481
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGSGGGGSGGLPHSTTRV	482
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	483
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	484
[0577] AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFERRAFKKILARGDRKRIV	485
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	486
AA216	NMDA R2C	HPTDITGLPNLSDPSVSTVV	487
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	488
AA02.1	Clasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSVV	489
AA152L	ActRIIA	IVTVVTMVTNVDFPPKESSL	490
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	491
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	492
1820	TRPM7	KQPGNSTKESESTNSVRLML	493
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTD	494
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	495
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPESIDV	496
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGIV	497

[0578] 表 11 :结合 MAGI3 d2 的 PL 序列 (续)

密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	497
KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	498
RA-GEF (ras/rap1A-assoc.-GEF)	PYQSQGFSTEEDEDEQVSAV	499
α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	500
TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	501
多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	502
BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	503
GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	504
ErbB-4 受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	505
CD6	SPQPDSTDNDDYDDISAA	506
Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	507
CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYGL	508
[0579] 密蛋白1	SYTPRPYPKPPSSGKDYV	509
神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTRV	510
HPV E6#35 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	511
NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	512
DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	513
KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	514
GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	515
AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	516
HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	517
1854	YGRKKRRQRRRARGRRETWV	518
TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	519
Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	520
Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	521

[0580] 表 11 续 :结合 NeDLG d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	522
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVDQSSV	523
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSSVNVSSNL	524
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	525
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	526
AA28.1	CDW125 (修饰的)	EVIGYIEKPGVETLEDVSVF	527
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	528
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	529
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	530
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	531
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	532
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	533
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	534
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	536
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	536
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	537
AA311	β -1联蛋白	LMDGLEPPGDSNQLAWFDL	538
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	539
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	540
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	541
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPSWV	542
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	543
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDVRGEVRQFTLRHWLKV	544
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDVRGEVRQFTLRHWLKV	545
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGKLSSP	546
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	547
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	548
1759	EGFR	TAENAAYLRVAPQSSEFIGA	549
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	550
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	551
AA33	KV1.3	TNNNNPNSAVNIKKIFTDV	552
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	553
AA251	v-AKT1	VDSERRPHFPQFSYSASGTA	554
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	555
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	556
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRRQRNRNDNIALLVQ	557

[0581] 表 11 续:结合 NeDLG d2 的 PL 序列

[0582]

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOGRRETAL	558
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVWDQSSV	559
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	560
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	561
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSEFKHILFRRARRGRFQ	562
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	563
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	564
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	565
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	566
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGSAAHFSSLESEV	567
AA80.1	HPV E6#_35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	568
[0583] AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	569
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	570
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	571
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	572
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	573
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	574
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	575
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	576
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	577
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	578
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	579
AA34.2	NMDA	LNCSNRRRVYKKMPESIEVD	580
AA345	NMDA R2A	LNSSNRRRVYKKMPESIEVD	581
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	582

[0584] 表 11 续:结合 NeDLG d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	583
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPSWV	584
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	585
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	586
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	587
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	588
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSV	589
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	590
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	591
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	592
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	593
[0585] AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGFVMSRAMYV	594
1759	EGFR	TAENAEYLRVAPQSSEFIGA	595
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	596
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	597
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	598
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	599
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	600
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	601
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVFPVVKIATLV	602
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAACSLCRLYII	603
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	604
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	605
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPELLV	606
AA25	FceR1b	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	607

[0586] 表 11 续 : 结合外膜蛋白的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOGRRETAL	608
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVWDQSSV	609
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRROTQV	610
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DERPSEFKHILFRRARRGFRQ	611
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	612
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	613
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	614
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	615
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGSAAHFSSESEV	616
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	617
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	618
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	619
[0587] AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	620
AA02.1	Clasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSV	621
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	622
AA58	PAG	KENDYESISDLQQGRDITRL	623
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	624
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	625
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	626
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	627
AA225	claudin 9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	628
AA106	Kir2.1(内向整流型K ⁺ 通道)	LHNQASVPLEPRELRRESEI	629
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSESVD	630
AA345	NMDA R2A	LNSSNRRVYKKMPSESVD	631
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	632
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPPTLTSPL	633
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVW	634

[0588] 表 11 续 :结合外膜蛋白的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA07	CD34	ATSRNGHSARQHVVADTEL	635
AA244	α -2B肾上腺素能受体	DFERRAFRRILARPWTQTAW	636
AA56	TAX	ISPGGLEPPSEKHFRETEV	637
AA112	GluR δ -2	PTPTLGLNLGNDFDRGTSI	638
AA240	多巴胺转运蛋白	ELVDRGEVRQFTLRHWLKV	639
AA240	多巴胺转运蛋白	ELVDRGEVRQFTLRHWLKV	640
AA207L	Nedasin (S-型)	NIEEVYVGGKQVVPFSSSV	641
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	SGATIPLVGQDIIDLQTEV	642
AA095	GluR5-2 (大鼠)	FTSILTCHQRRTQRKETVA	643
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	644
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	645
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	646
AA228	柄蛋白2	SPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	647
[0589] AA223	密蛋白1	YPTPRYPKPAOSSGKDYV	648
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	649
AA200L	HER2受体	EKGTPAENPEYLGLDVPV	650
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	651
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	GSALQAWRHTSRQATESTV	652
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	QGFPGPATWRRISSLESEV	653
AA22	DNAM-1	REDIYVNYPTFSRRPKTRV	654
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	655
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	DPNSPAAKKKYVSYNNLVI	656
AA82	AdenoE4 typ9	GTLLELRFVIFPSVKIATLV	657
AA125	紧密连合蛋白3(ZO-3)	HDAESSDEDGYDWGPATDL	658
AA77	HPV-E6 #63	HKVRNKFKA CSLCRLYII	659
AA123	α -辅肌动蛋白2	PGALDYAAFSSALYGESDL	660
AA348	TATNMDA2B9	GRKKRRQRRRKLSSIESDV	661
1777	Tat-M-蛋白-SARS	GRKKRRQRRRNDNIALLVQ	662
1776	Tat-E-蛋白-SARS	GRKKRRQRRRSEGVPLLIV	663

[0590] 表11续:结合Pick1 d1的PL序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
1927	X=L-苯基甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	664
AA121	CD68	ALVLIAFCCIIRRRPSAYQAL	665
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	666
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRO	667
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	668
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLOQFCRTPNPALKNGQYV	669
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	670
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	671
AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	672
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLOHWLAI	673
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	674
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	675
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	676
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	677
AA118	MINT-1	KTMPAAMYRLLTAQEOPVYI	678
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	679
[0591] AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVLWSIWQYA	680
AA05.2	CD4 (修饰的) C->S	LSEKKTSSQSPHRFQKTSSEPI	681
AA227	密蛋白2	PGQPPVKSEFNYSYSLTGYV	682
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	683
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVW	684
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	685
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVVRQFTLRHWLKV	686
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	687
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	688
AA228	柄蛋白2	BSPDSSYQKGFVMSRAMYV	689
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	690
AA33	KV1.3	TNNNNPNSAVNIKKIFTDV	691
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNLVI	692
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	693
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQLGLH	694
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	695
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	696
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	697

[0592] 表 11 续:结合 PSD95 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	698
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	699
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSEKHILFRRARRGFRO	700
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDIYV	701
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	702
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	703
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGSAAHFSSLESEV	704
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	705
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	706
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	707
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	708
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	709
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	710
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	711
[0593] AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	712
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	713
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	714
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	715
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	716
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	717
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	718
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDWV	719
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	720
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	721
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDGRGEVRQFTLRHWLKV	722
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	723
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	724
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	725
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFMVMSRAMYV	726
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPPAPSSGKDYV	727
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	728

[0594] 表 11 续:结合 PSD95 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRRISSLESEV	729
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	730
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIETDV	731
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	732
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELVIFPSVKIATLV	733
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	734
1915	生物素-Tat-NMDA-优化的	YGRKKRRQRRRALKSIETEV	735
1854	1854	YGRKKRRQRRRARGRRETWV	736
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	737
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	738
1853	1853	YGRKKRRQRRRGMTSSSSSVV	739
1914	生物素-Tat-NMDAR2_短	YGRKKRRQRRRIETEV	740
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	741
AA351	TAT-NR2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	742
1923	X=2-氨基-4,4,4-三氟丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	743
[0595] 1924	X=L-叔丁基-甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	744
1944	X=正缬氨酸NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	745
1963	X=4-氨基-苯丙氨酸Tat-NMDAR2B var	YGRKKRRQRRRKLSSIESXV	746
1953	NMDAR2B P-1 Y	YGRKKRRQRRRKLSSIESYV	747
1939	Tat-NMDAR2B S->T P-2	YGRKKRRQRRRKLSSIETDV	748
1945	X=正缬氨酸, S->T P-2 NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIETDX	749
1931	1931	YGRKKRRQRRRKLSSIEYDV	750
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	751
1855	1855	YGRKKRRQRRRQDERVETRV	752
1918	TAT-SLO2	YGRKKRRQRRRQDSREETQL	753
1912	生物素-Tat-NMDAR2special 1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	754
1913	生物素-Tat-NMDAR2special2	YGRKKRRQRRRRISSIQTDV	755
1797	Tat-NMDA 2C9	YGRKKRRQRRRRISSLESEV	756
1911	生物素-Tat-NMDAR2C S->T突变	YGRKKRRQRRRRISSLETEV	757
1917	1917	YGRKKRRQRRRRISSLETQV	758
1938	Tat-HPV33E6 (无半胱氨酸)	YGRKKRRQRRRSRRRETAL	759
1916	生物素-Tat-CRIPT	YGRKKRRQRRRTKNYKQTSV	760
AA25	FceR1b	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	761

[0596] 表 11 续:结合 PSD95 d1,2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	762
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSSVNVSSNL	763
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	764
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGRFQ	765
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	766
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	767
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	768
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	769
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	770
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	771
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	772
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	773
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	774
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	775
[0597] AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	776
AA216	NMDA R2C	HPTDITGLPNLSDPSVSTVV	777
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	778
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	779
AA02.1	Clasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSV	780
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	781
AA13P	磷酸化CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	782
AA13	CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	783
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	784
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	785
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	786
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	787
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	788
AA345	NMDA R2A	LNSSNRRVYKKMPSIESDV	789
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	MGRWTGRSSESWRPRPVTQV	790
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	791

[0598] 表 11 续:结合 PSD95 d1,2 的 PL 序列 (续)

AA217	联蛋白- $\delta 2$	PYSELNYETSHYPASPDSWV	793
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	794
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	795
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHHLKV	796
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	797
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	798
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	799
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGKLSSP	800
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	801
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	802
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	803
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	804
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	805
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGRRSSRTRRETQL	806
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	807
[0599] AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	808
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	809
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	810
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDENSEPAAKKKYVSYNNLVI	811
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	812
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	813
1862	HPV E6 #82	WTGQSANSRKPPRQRSETQV	814
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	815
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	816
1967	Tat-H1N1	YGRKKRRQRRRMAGTIRSEV	817
1961	H5N1 AAT73368/50296240	YGRKKRRQRRRMARTIESEI	818
1959	H5N1 AAT73457/50296374	YGRKKRRQRRRMARTIESEV	819
1958	H5N1 AAF02349/6048830	YGRKKRRQRRRMERTIEPEV	820
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	821

[0600] 表 11 续:结合 PSD95 d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	822
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRQTQV	823
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	824
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	825
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	826
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	827
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	828
AA13	CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	829
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	830
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	831
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	832
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	833
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	834
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	835
[0601] AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	836
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	837
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	838
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	839
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	840
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	841
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	842
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYI	843
1915	生物素-Tat-NMDA-优化的	YGRKKRRQRRRALKSIETEV	844
1854	1854	YGRKKRRQRRRARGRRETWV	845
1767	Tat-FGFR3 IIIc同工型1	YGRKKRRQRRRDKELEVELSL	846
AA356	bTAT-TAXAA	YGRKKRRQRRREKHFREAEA	847
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	848
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	849
1853	1853	YGRKKRRQRRRGMTSSSSVV	850
1914	生物素-Tat-NMDAR2 短	YGRKKRRQRRRIETEV	851

[0602] 表 11 续:结合 PSD95 d2 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo
1930	1930	YGRKKRRQRRRKLSSIESDL	852
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	853
AA351	TAT-NR2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	854
1923	X=2-氨基-4,4,4-三氟丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	855
1924	X=L-叔丁基-甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	856
1926	X=3-氟-DL-缬氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	857
1929	X=4,4,4-三氟-DL-缬氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	858
1944	X=正缬氨酸NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	859
1954	X=炔丙基甘氨酸P0 NMDAR2B	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	860
1963	X=4-氨基-PheTat-NMDAR2B变体	YGRKKRRQRRRKLSSIESXV	861
1953	NMDAR2B P-1 Y	YGRKKRRQRRRKLSSIESYV	862
1939	Tat-NMDAR2B S->T P-2	YGRKKRRQRRRKLSSIETDV	863
1945	X=正缬氨酸, S->T P-2 NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIETDX	864
[0603] 1946	X=L-2NH4-3ureidoproacidP-2TatNMD	YGRKKRRQRRRKLSSIEXDV	865
1931	1931	YGRKKRRQRRRKLSSIEYDV	866
1961	H5N1 AAT73368/50296240	YGRKKRRQRRRMARTIESEI	867
1959	H5N1 AAT73457/50296374	YGRKKRRQRRRMARTIESEV	868
1958	H5N1 AAF02349/6048830	YGRKKRRQRRRMERTIEPEV	869
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	870
1855	1855	YGRKKRRQRRRQDERVETRV	871
1918	TAT-SLO2	YGRKKRRQRRRQDSREETQL	872
1912	生物素- Tat-NMDAR2special1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	873
1913	生物素- Tat-NMDAR2special2	YGRKKRRQRRRRISSIQTDV	874
1797	Tat-NMDA 2C9	YGRKKRRQRRRRISSLESEV	875
1911	Biotin-Tat-NMDAR2C S->T mut	YGRKKRRQRRRRISSLETEV	876
1917	1917	YGRKKRRQRRRRISSLETQV	877
1938	Tat-HPV33E6 (无半胱氨酸)	YGRKKRRQRRRRSRRRETAL	878
1916	生物素- Tat-CRIPT	YGRKKRRQRRRTKQTSV	879

[0604] 表 11 续:结合 PTN-3 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo.
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	880
AA311	β -1联蛋白	IMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	881
[0605] 1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	882
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	883
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	884
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	885
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	886

[0606] 表 11 续:结合 SHANK1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	887
AA121	CD68	ALVLIAFCIIRRRPSAYQAL	888
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGQGLHVTAL	889
AA261	GABA转运蛋白3	DAKLKSDGTIAAITEKETHF	890
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	891
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	892
AA59	PTEN	DSDPENEFDEQHTQITKV	893
AA248	生长抑素受体4	EALQPEPGRKRIPLTRITTF	894
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTFNPALKNGQYVW	895
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	896
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGGSGGGGSGGGHSTTRV	897
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGGLPHSTTRV	898
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGSRRPKTRV	899
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	900
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	901
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	902
AA29.2	CDw128B	KDSRPSFVGSSSGHTSTTL	903
AA58	PAG	KENDYESISDLQQGRDITRL	904
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	905
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	906
AA148L	CFTCR (CysticF 跨膜传导调节蛋白)	KPQIAALKEETEEVQDTRL	907
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	908
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	909
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	910
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	911

[0607] 表 11 续:结合 SHANK1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	912
AA113	SSTR2(生长抑素受体2)	LNETTETQRTLLNGDLQTSI	913
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	914
AA329	VIPS_人	LQFHRGSRAQSFLQTETSVI	915
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	916
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPPLTSPL	917
AA147	Na ⁺ /Pi 协同转运蛋白2	PPATPSPRLALPAHHNATRL	918
AA45	BLR-1	PSWRRSSLSESENATSLTTF	919
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDVW	920
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	921
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	922
1895	TAMRA-粘性类别1(Val0)	RRASTSRETWV	923
[0609] AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	924
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	925
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGFVMSRAMYV	926
AA124	CXCR3	SSRRDSSWSETSEASYSGL	927
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	928
AA69.1	HPV E6 #16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	929
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	930
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSNNLVI	931
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	932
AA123	α -辅肌动蛋白2	VPGALDYAAFSSALYGESDL	933
1767	Tat-FGFR3 IIIc同工型1	YGRKKRRQRRRDKELEVLSL	934
1956	Tat-COX-2	YGRKKRRQRRRLKERSTEL	935
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	936
1950	Tat-TIAM 1	YGRKKRRQRRRPSRKLNTEI	937
1965	Tat-hGKAP	YGRKKRRQRRRYIPEAQTRL	938

[0610] 表 11 续 :结合 TIP43 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	939
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	940
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYKLSIESDV	941
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	942
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	943
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSTTVKTSY	944
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	945
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTD	946
[0611] AA345	NMDA R2A	LNSSNRRVYKKMPSIESDV	947
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	948
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	949
AA124	CXCR3	SSRRDSSWSETSEASYSGL	950
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	951
AA33	KV1.3	TNNNNPNSAVNIKKIFTDV	952
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	953
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	954
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	955
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRLSSIESDV	956
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	957

[0612] 表 11 续:结合 Vartul d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	958
AA206L	CITRON 蛋白	AGAVRTPLSQVNKVVWDQSSV	959
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	960
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	961
AA245	α -2C 肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	962
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	963
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	964
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	965
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	966
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	967
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	968
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	969
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	970
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	971
[0613] AA190L	肝配蛋白B1	PVYIVQEMPPQSPANIYKV	972
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPDWV	973
AA244	α -2B 肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	974
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	975
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	976
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELKGLSSP	977
AA23.3	Fas 配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	978
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPAPSSGKDYV	979
AA180	NMDA 谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	980
AA33	KV1.3	TTNNPNNSAVNIKKIFTDV	981
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAKKKYVSYNNLVI	982
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKA CSLCRLYII	983
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	984
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	985
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	986
AA25	FceR1b	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	987

[0614] 引文:

- [0615] 1. Fauci, 2005, Nature 435 (7041) :423-424.
- [0616] 2. Normile, 2005, Science 308 (5726) :1234-1235.
- [0617] 3. Guan, 2002, PNAS 99 (13) :8950-8955.
- [0618] 4. Jin, 2004, Avian Dis. 48 (4) :870-878.
- [0619] 5. Webster, 2004, Rev. Sci. Tech. 23 (2) :453-465.
- [0620] 6. Noah, 2003 Virology 307 (2) :386-395.
- [0621] 7. Chien, Biochemistry 43 (7) :1950-62.
- [0622] 8. Dauber, J. Fzro/. 78 (4) :1865-1872.
- [0623] 9. Quinlivan, 2005 J. Fifro/. 79 (13) :8431-8439.
- [0624] 10. Solorzano, 2005 J Viro. 79 (12) :7535-7543.
- [0625] 11. Stasakova, 2005, JGe/ ? Viro. 86 (Pt 1) :185-195.
- [0626] 12. Diebold, 2003, Nature 424 (6946) :324-328.
- [0627] 13. Theofilopoulos, 2005, Ann. Rev. Immunol. 23 :307-336.

- [0628] 14. Yang, 2005 J. Biol. Chem. 280(36) :31530-31536.
- [0629] 15. Uddin, 2002. J. Biol. Chem. 277(17) :14408-14416.
- [0630] 16. Voss, 2005 J Biol. Chem. 2m :17371-17379.
- [0631] 17. DeVries 2004 J Biol. Chem. 279(44) :45603-45612.
- [0632] 18. Page 2003 J. Immunol. 170(11) :5681-5689.
- [0633] 19. Farshori, 2003, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 85(2-5) :337-347.
- [0634] 20. Akca, 2003, Growth Factors 21(1) :31-39.
- [0635] 21. Mmami 2003, J. Biol. Chem. 278(9) :6976-6984.
- [0636] 22. Greenspan, 1988 J. Virol. 62 :3020-3026.
- [0637] 23. Compans, 1973, Virology 51 :56-70.
- [0638] 24. Krug, 1973, Virology 56 :334-348.
- [0639] 25. Seo 2004, Virus Res. 103(1-2) :107-13
- [0640] 26. Solorzano, 2005, J. Virol. 79(12) :7535-7543.
- [0641] 27. Quinlivan, 2005 J. Virol. 79(13) :8431-8439.
- [0642] 28. Garcia-Sastre, 1998, Virology 252 :324-330.
- [0643] 29. Lipatov, 2005, J. Gen. Virol. 86(4) :1121-1130.
- [0644] 30. Usacheva, 2001, J. Biol. Chem. 276(25) :22948-22953.
- [0645] 31. Usacheva, 2003 J. Immunol. 171(6) :2989-2994.
- [0646] 32. Osmanagic-Myers ;2004. Plectin-RACK1, J. Biol. Chem. 279(8) :18701-18710.
- [0647] 33. Litjens, 2005, J. Biol. Chem. 280(23) :22270-7.
- [0648] 34. Kubota, 2002, J. Virology 16(24) :12676-12682.
- [0649] 35. Yokota, 2003, Virology 306(1) :135-146.
- [0650] 36. Spackman, 2005, J. Vet.. Diagn.. Invest. 17(1) :76-80.
- [0651] 37. Lee, J. Virol. Methods 119(2) :151-158.
- [0652] 38. Munch, 2001, Arch. Virol. 146(1) :87-97.
- [0653] 39. Xu, 2005, J. Clin. Microbiol. 43(4) :1953-1955.
- [0654] 40. Tumpey, 2005, J. Clin. Microbiol. 43(2) :676-682.
- [0655] 41. Steininger, 2002, J. Clin. Microbiol. 40(6) :2051-2056.
- [0656] 42. Cattoli, 2004, Avian Pathol. 33(4) :432-437.
- [0657] 43. Kaiser, 1999. , J. Clin. Virol. 14(3) :191-197.
- [0658] 44. Tucker, 2001. Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 356(1416) : 1915-1924.
- [0659] 45. Sharma, 2002, Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 156(1) :41-43.
- [0660] 50. Brown, 1983, NSL. Virology 130(1) :134-143.
- [0661] 51. Seo, 2000, Nature Medicine 8(9) :950-954.
- [0662] 52. Govorkova, 2005 J. Virol. 19(4) :2191-2198.

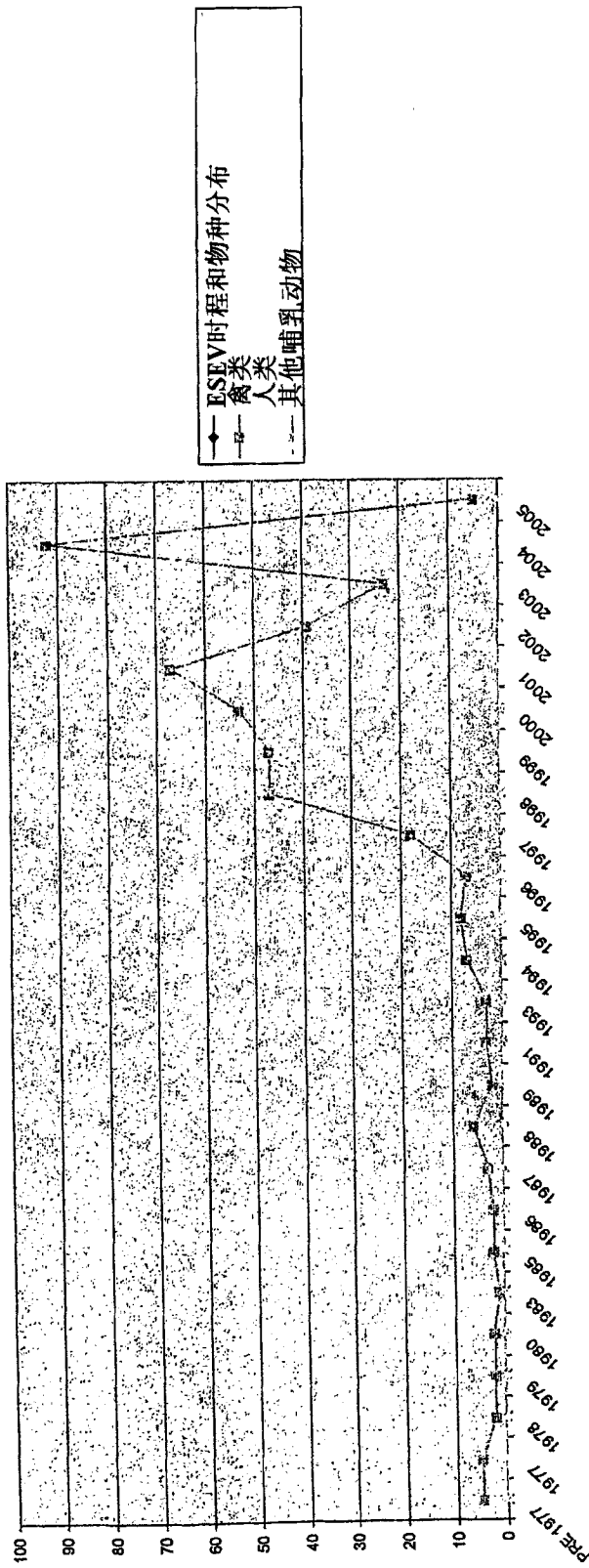


图1

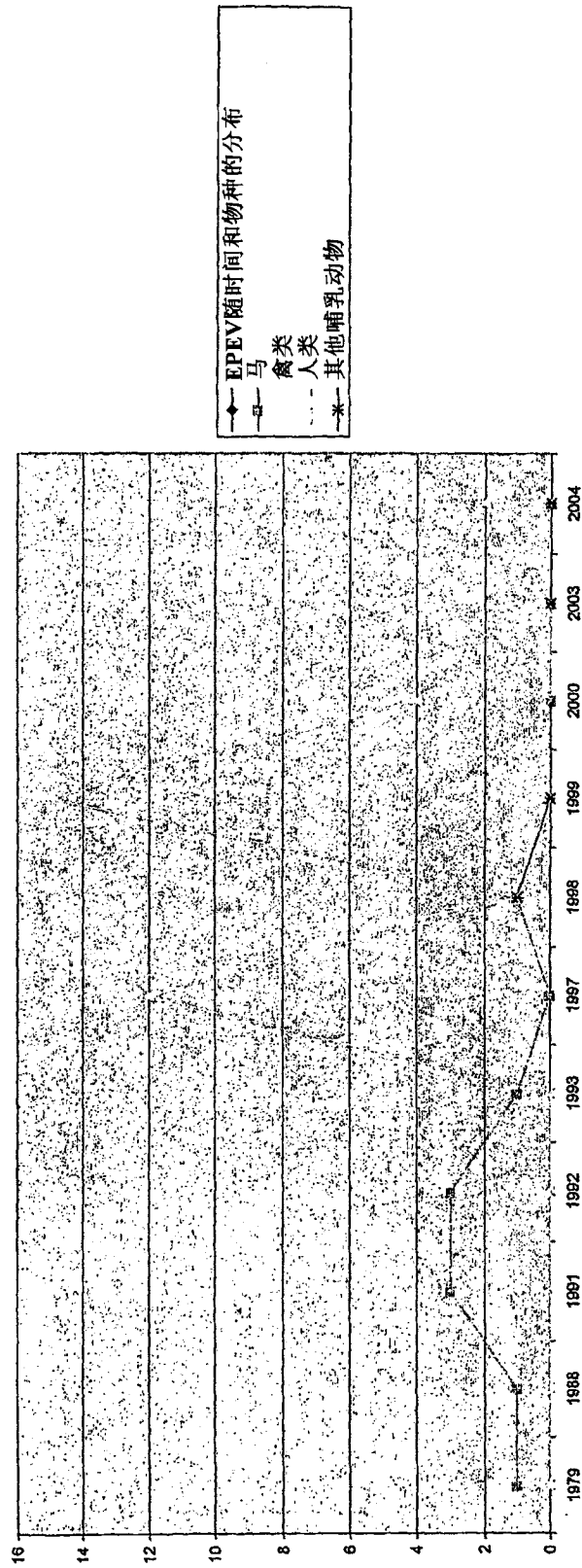
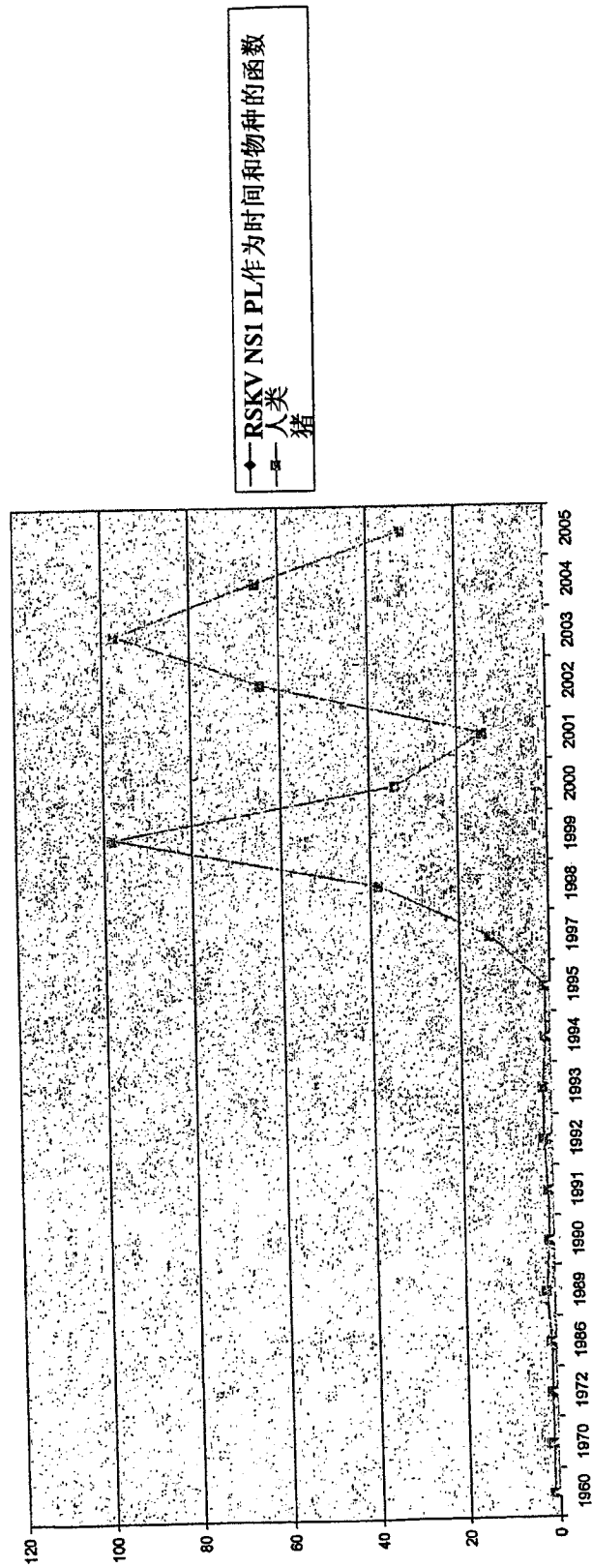
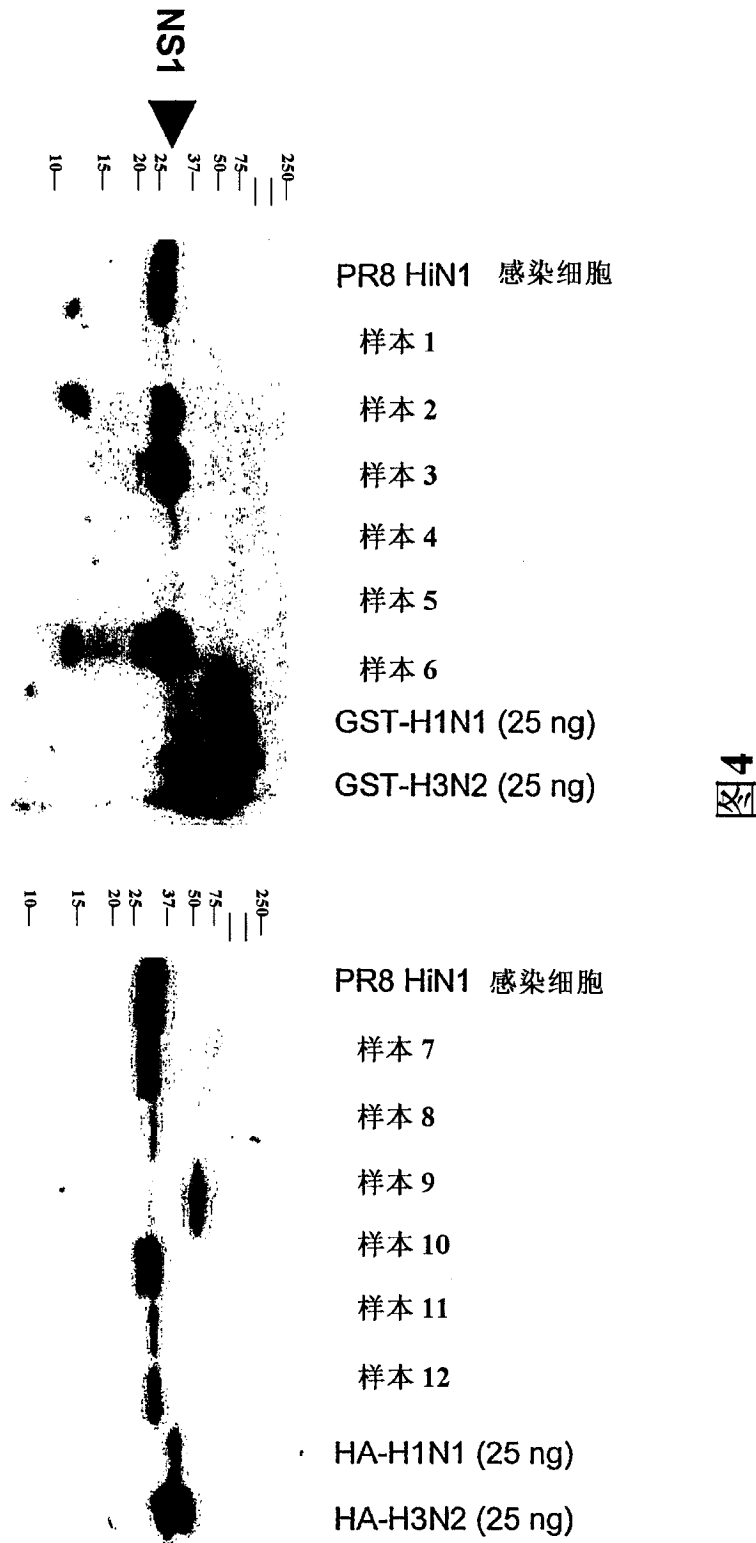


图2

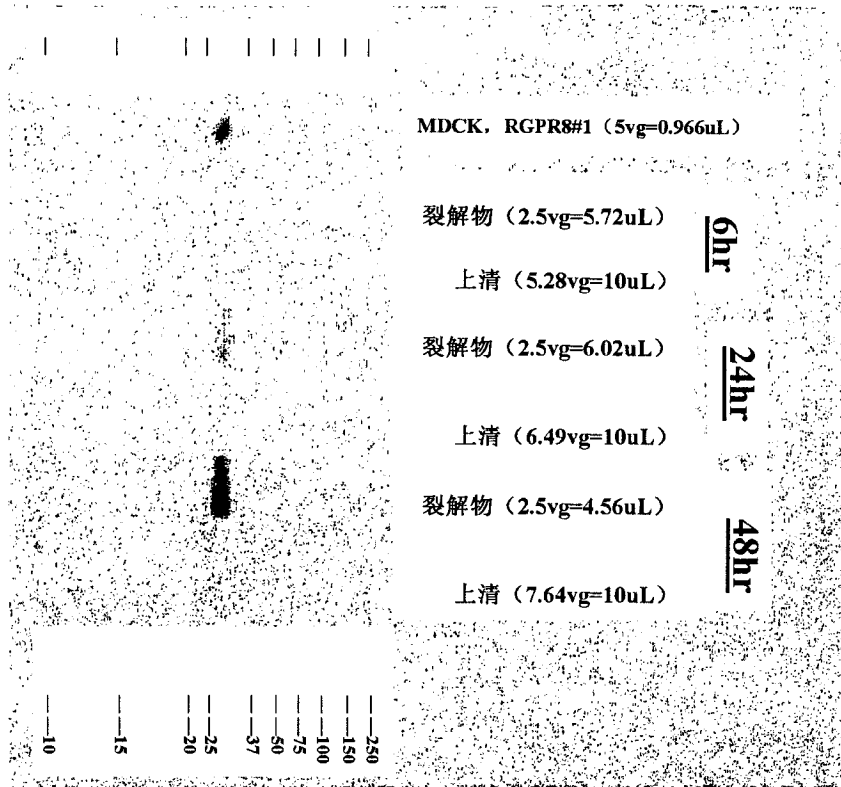


◆ RSKV NSI PL作为时间和物种的函数
— 人类
— 猫

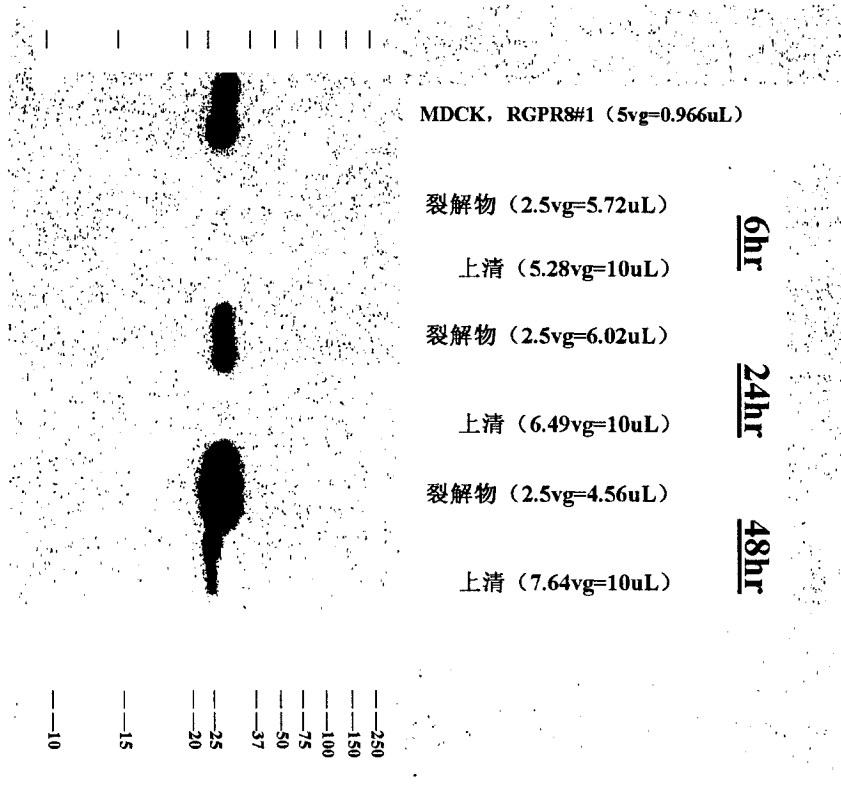
图3



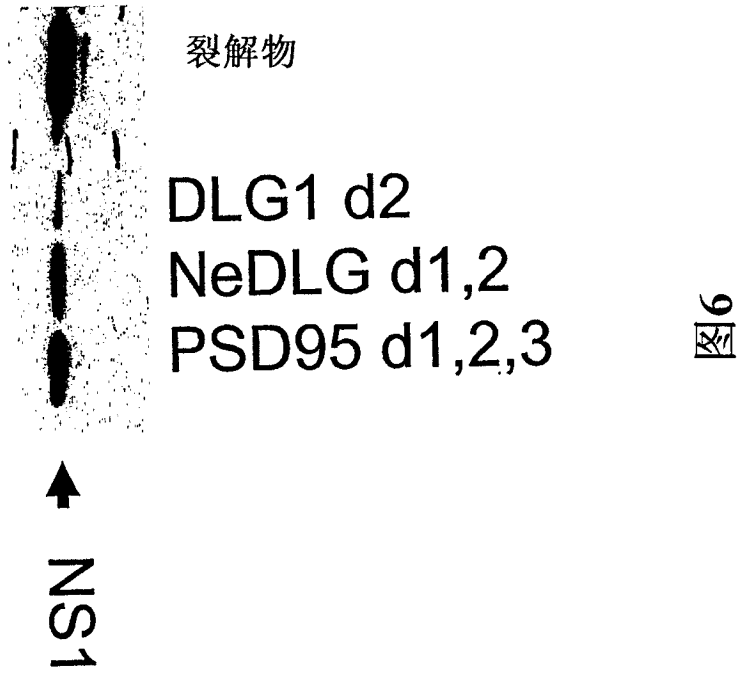
ECL+, 1sec

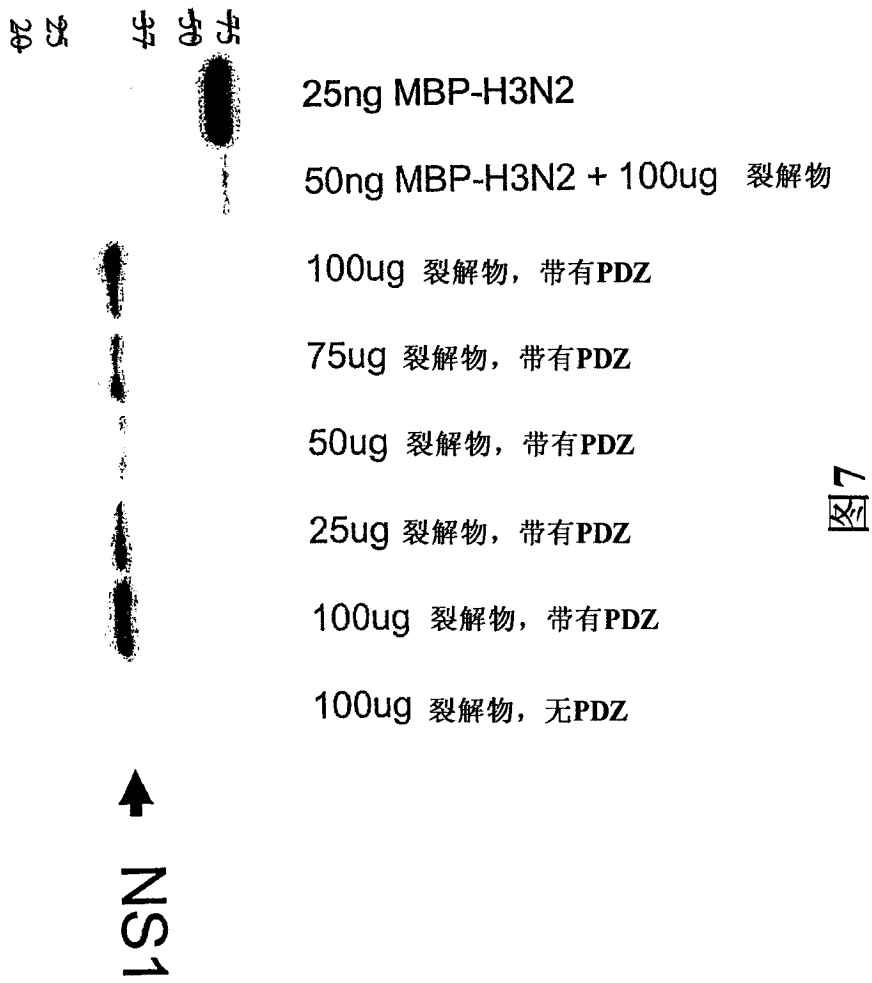


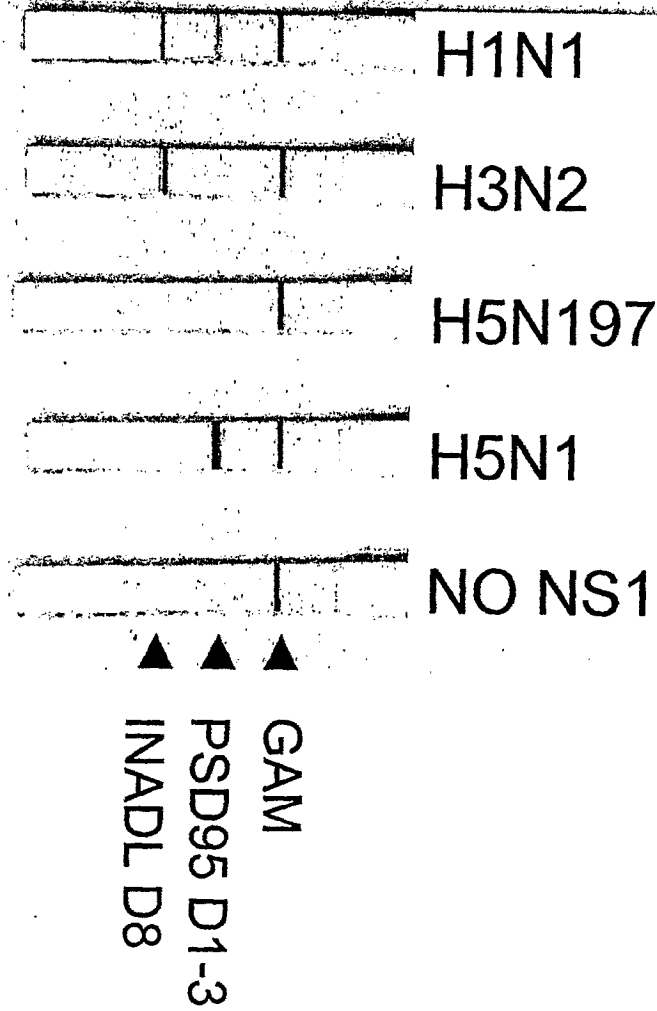
ECL+, 3min



5/49







8

F64-1A0	+
F64-3H3	+++
F64-6G12	++
F64-7A8	+++
F64-7D1	+++
F68-1D10	+++
F68-4B2	+++
F68-4H9	+++
F68-5B5	+
F68-6A12	++
F68-6B7	++
F68-6D6	+++
F68-7B10	+
(阳性对照) PSD95 d1,2,3	+
(阴性对照) PBS	-

图9

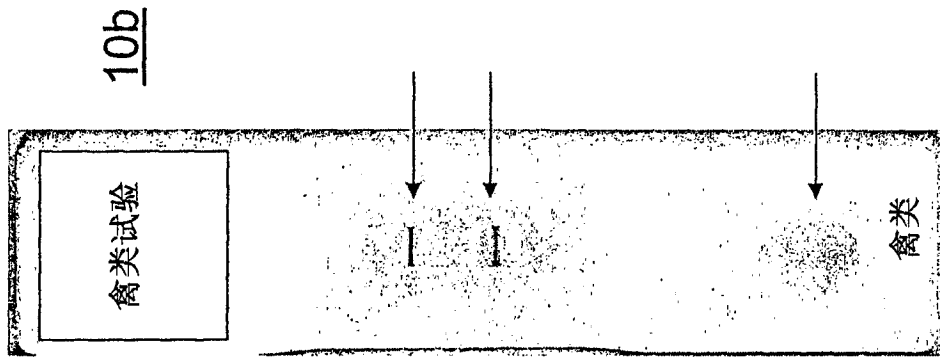


图10b

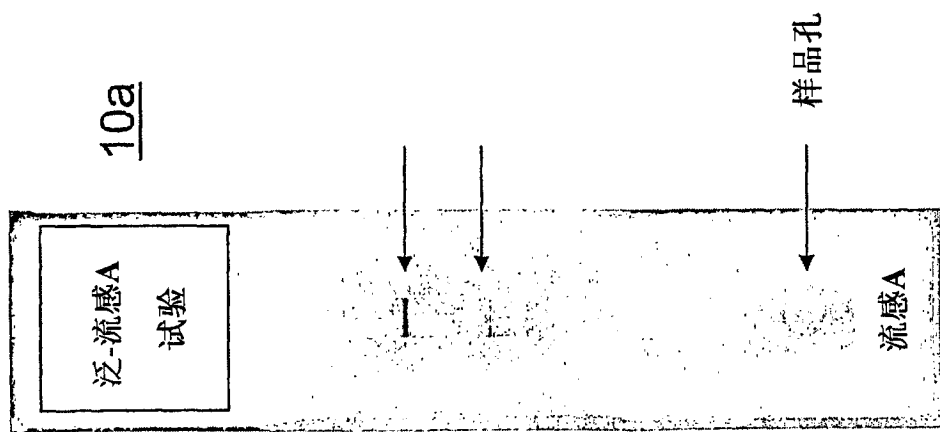


图10a

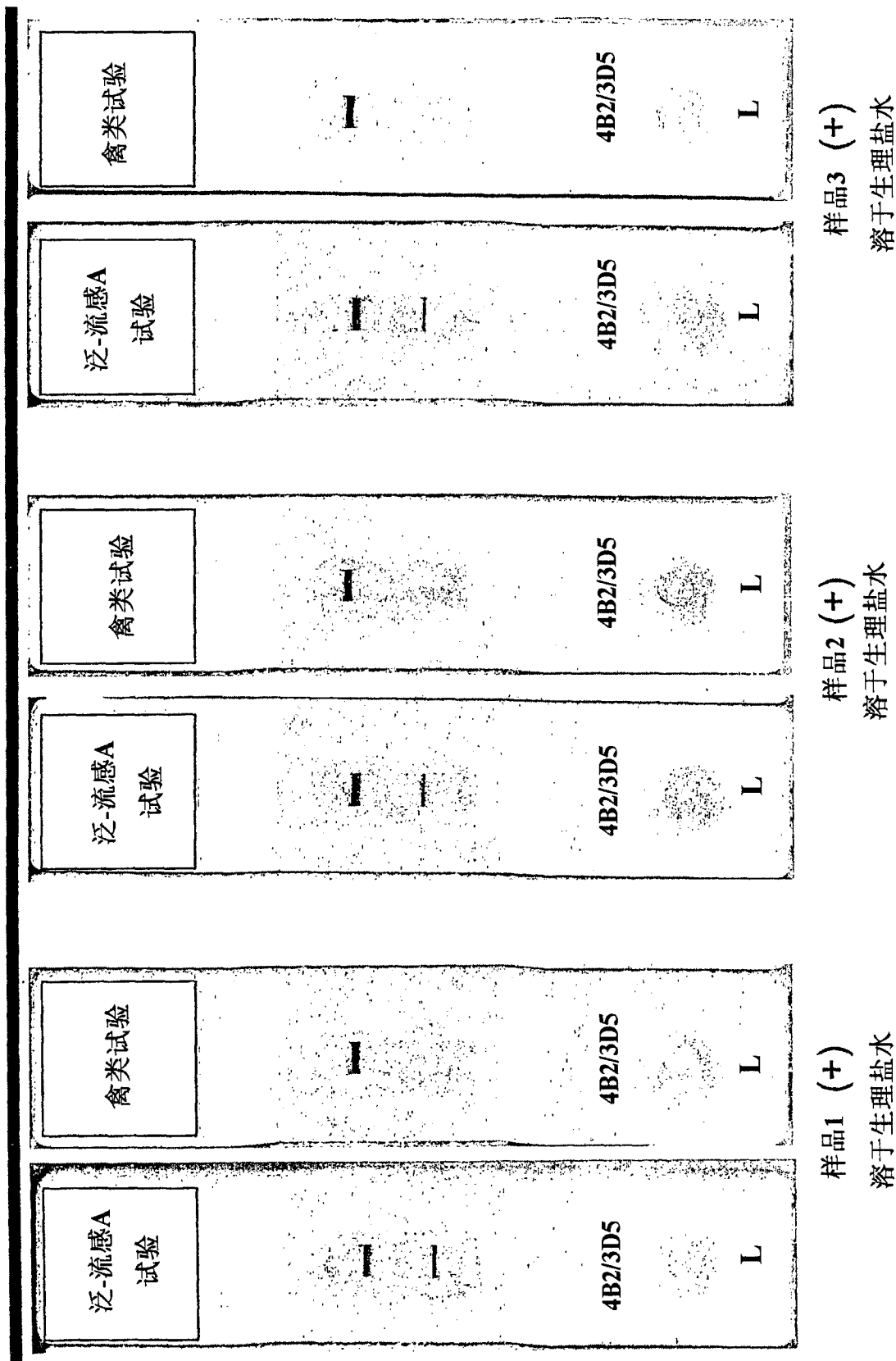
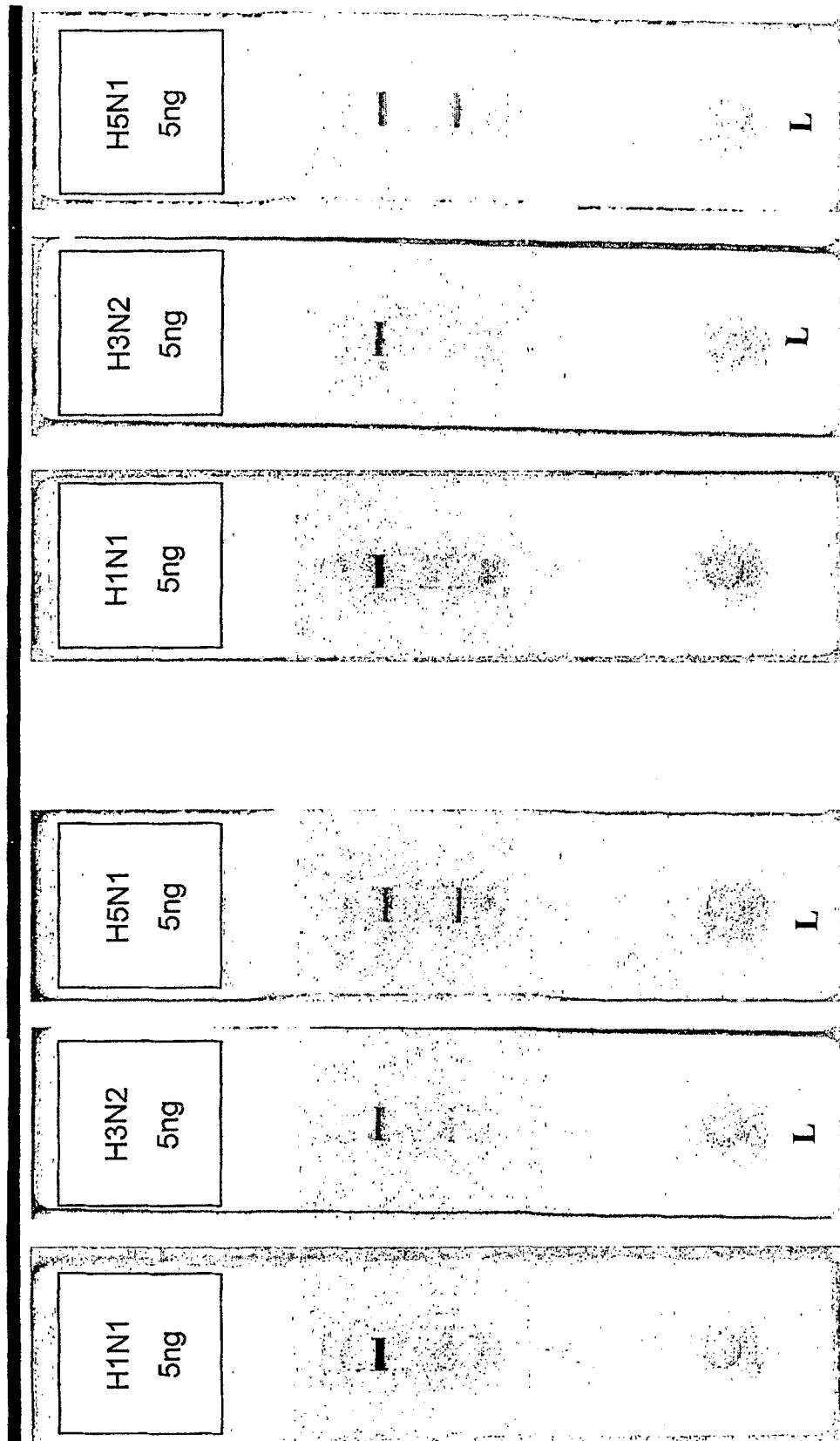


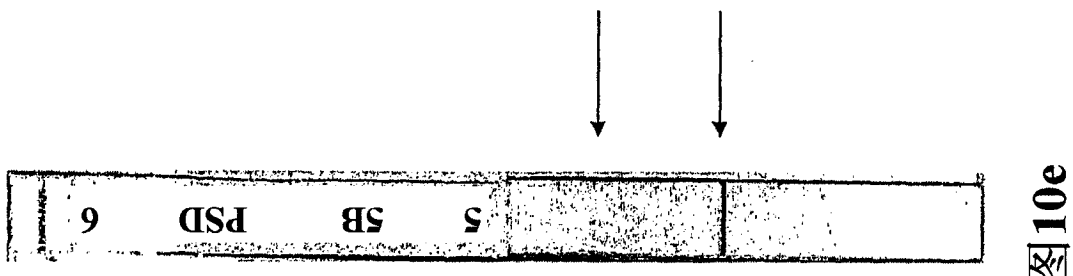
图10c



泛-流感A试验
溶于80% M4培养基, 20%缓冲液B3

禽类流感试验
溶于80%M4培养基, 20%缓冲液B3

图10d



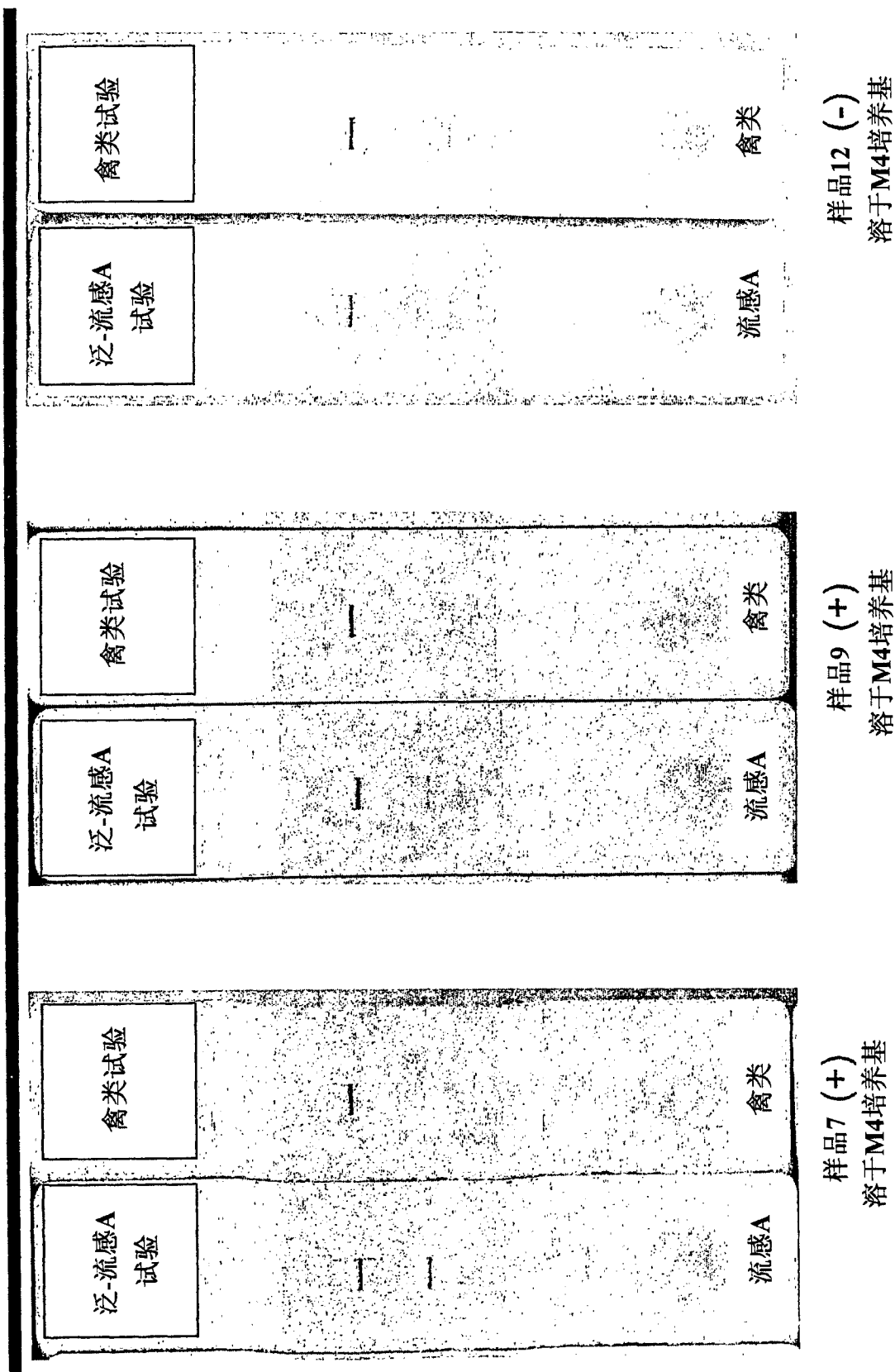


图10f

表 11: 结合 DLG2 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No
AA72.1	HPV E6 33(修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	80
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNVKVDQSSV	81
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	82
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	83
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	84
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	85
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	86
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	87
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	88
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMWLSIWQYA	89
AA34.2	NMDA	LNSSCNRRVYKKMPSIESDV	90
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	91
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	92
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDSWV	93
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRARFRILARPWTQTAW	94
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	95
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	96
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	97
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	98
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	99
AA223	密蛋白1	SYTPRPPYKPPSSGKDYV	100
AA86.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	101
AA180	NMDA谷氨酸受体2C	TQGFPGPATWRRISSESEV	102
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	103
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCLRYII	104
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	105
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRLSSIESDV	106
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRNRDNIALLVQ	107
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	108

表 11 续：结合 GORASP d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqID.No.
1927	X=L-苯基甘氨酸		
1754	核衣壳,SARS	DFSRQLQNSMSGASADSTQA	89
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	90
1750	M蛋白, SARS	NYKLNTDHAGSNDNIALLVQ	91
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	92
1795	Tat-A2A 肾上腺素能受体	YGRKKRRQRRRARGDRKRIV	93
1791	Tat-MUC1 lle -2	YGRKKRRQRRRAVAATSINL	94
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	95
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	96
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	97
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	98
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	99
1789	Tat-ERC1b	YGRKKRRQRRRQDEEEGIWA	100
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	101
1752	E蛋白, SARS	YVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	102

表 11 续: 结合 GRIP1 d4 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqID.No
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	103
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	104
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	105
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	106
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	107
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	108
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	109
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	110
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	111
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	112
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	113
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDENSPAAKKKYVSYNNLVI	114
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	115
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	116
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	117
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	118

表 11 续: 结合 INADL d8 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqIDNo.
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVDQSSV	119
AA121	CD68	ALVLIAFICIIRRRPSAYQAL	120
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	121
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRROTQV	122
AA245	α -2c肾上腺素能受体	DERPSFKHILFRRARRGFRO	123
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEQHTQITKV	124
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	125
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	126
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉病蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	127
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGLPHSTTRV	128
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGSRPKTRV	129
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	130
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	131
AA70	HPV-E8 #18	HSCCNRRARQERLQRRRETQV	132
AA177L	c-kit受体	INSVGSTASSSQPLLVDHV	133
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	134
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	135
1820	TRPM7	KKQPGNSTKESESTNSVRLML	136
AA118	MINT-1	KTMPAAMYRLLTAQEQPVI	137
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	138
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	139
AA34.2	NMDA	LNSSCNRRVYKMPSESVDV	140
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKMPSESVDV	141
AA140	KIAA 1481	EIPAGGCTFSGIFPILTSP	142
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVW	143
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	144
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	145

表 11 续: 结合 INADL d8 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. ID#
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	146
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	147
AA06	CD6	SEQPDSTDNDYDDISAA	148
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	149
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFVMSRAMYV	150
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	151
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	152
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	153
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	154
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	155
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	156
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	157
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAACKKYVSYNNLVI	158
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVPSVKIATLV	159
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	160
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	161
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	162
1966	Tat-H3N2	YGRKKRRQRRRMARTARSKV	163
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	164

表 11 续: 结合 KIAA1284 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID
1927	X=L-苯基甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	165
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQRRQTQV	166
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	167
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	168
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	169
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	170
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	171
AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFERRAFKKILARGDRKRIV	172
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	173
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRRARQERLQRRRETQV	174
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	175
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	176
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	177
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	180
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	181
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	180
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	181

表 11 续: 结合 KIAA1284 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA05.1	CD4(修饰的)	LSEKKT SQSPHRFQKTASPI	182
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	183
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	184
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	185
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	186
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	187
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGFVMSRAMYV	188
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	189
AA33	KV1.3	TNNNPNSAVNIKKIETDV	190
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	191
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	192
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	193
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	194
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	195
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	196
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	197
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	198
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	199

表 11 续: 结合 KIAA1415 d1 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA245	α -2C 肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	200
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHQYV	201
AA248	生长激素抑制素受体4	EALQPEPGRKRIPLTRTTTF	202
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	203
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	204
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	205
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	206
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	207
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	208
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	209
1820	TRPM7	KKQPGNSTKESESTNSVRLML	210
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	211
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	212
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	213
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYLTGYV	214
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	215
AA244	α -2B 肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	216
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	217
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFFGLYKL	218
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	219
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	220
1759	EGFR	TAENAEYLRVAPQSSEFIGA	221
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	222
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	223
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAACSLCRLYII	224
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	225
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	226
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	227

表 11 续: 结合 KIAA1719 d4 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPKHDYV	228
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLISL	229
AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	230
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	231
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRRARQERLQRRRETQV	232
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	233
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	234
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	235
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	236
AA300	TRAF2	NSYVRDDAIFIKAIVDLTGL	237
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	238
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	239
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASY	240
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	241
AA124	CXCR3	SSRRDSSWSETSEASYSGL	242
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	243
1940	Tat-CLCA-3 (鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	244
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	245
1912	生物素-Tat-NMDAR2 special1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	246
1917	1917	YGRKKRRQRRRRISSLETQV	247
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	248

表 11 续: 结合 Lim Mystique d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	249
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	250
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRO	251
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	252
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	253
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTDKELEVLSSL	254
AA346	NMDA R2R	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	255
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	256
AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	257
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	258
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	259
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	260
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	261
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	262
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	263
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	264
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	265
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	266
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	267
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	268
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDSWV	269
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	270
AA56	IAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	271
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	272
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASFY	273
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	274
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	275

表 11 续: 结合 Lim Mystique d1 的 PL 序列(续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAFSSGKDYV	276
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	277
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRRISSLESEV	278
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐受体)	VDNSPAAKKKYVSYNLVI	279
AA125	紧密连合蛋白3(ZO-3)	VHDAESSDEDGYDWGPATDL	280
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	281
AA123	α -辅肌动蛋白2	VFGALDYAAFSSALYGESDL	282
1784	Tat-MUC1(Ala变体)	YGRKKRRQRRRAVAASANL	283
1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	284
1791	Tat-MUC1 Ile -2	YGRKKRRQRRRAVAATSINL	285
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	286
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	287
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	288

表 11 续: 结合 MAG11 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	SeqID#
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	289
AA121	CD68	ALVLI AF CI IRRRPSAYQAL	290
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	291
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	292
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	293
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGQGLHVTAL	294
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSEFKHILFRARRGFRQ	295
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	296
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉病蛋白	ESSGTQSPKRRHSGSYLVTSV	297
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	298
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	299
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGGSGGGGGSGGHSTTRV	300
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSGLPHSTTRV	301
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSGRRPKTRV	302
AA22.1	DNAM-1 (连接子10aa)	GGGGGSGGGGTFSRRPKTRV	303
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	304
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	305
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRTQV	306
1857	HPV E6 #35 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSMSSWKPTRRETEV	307
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	308
AA70	HPV-E6 #18	HSCNRARQERLQRRRETQV	309
AA02.1	Clasp-2	ISGTFPTSTMVHGMTSSSSV	310
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	311
AA29.2	CDw128B	KDSRPSFVGSSSGHTSTTL	312
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	313
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	314
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	315
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRESEI	316
AA113	SSTR2(生长抑素受体2)	LNETTETQRTLLNGDLQTSI	317
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	318
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	319
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	MGRWTGRSSESWRPRPVTQV	320

表 11 续: 结合 MAGI1 d1 的 PL 序列(续)

1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	321
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNSYSLTGYV	322
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	323
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	324
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	325
AA252	毒蕈碱性乙酰胆碱受体M4	QQYQQRQSVIFHKRAPEQAL	326
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	327
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	328
AA74.1	HPV E6 52 (修饰的)	SEGGRPTRGPRQLQRRVTQV	329
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SETSILTCHQRRTORKETVA	330
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	331
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGLKSSP	332
AA214L	ErbB- 4 受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	333
AA06	CD6	SPQPDSTDNDDYDDISAA	334
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	335
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFVMSRAMYV	336
AA124	CXCR3	SSRRDSSWSETSEASYGL	337
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPPSSGKDYV	338
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	339
AA69.1	HPV E6#16(修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	340
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTRSQATESTV	341
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	342
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	343
AA33	KV1.3	TNNNPNSAVNIKKIETDV	344
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	345
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVFPVVKIATLV	346
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	347
1862	HPV E6 #82	WTGQSANSRKPPRQRSETQV	348
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	349
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	350
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	351
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	352
1912	生物素-Tat-NMDAR2 special1	YGRKKRRQRRRRISSIETDV	353
AA25	FceRb	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	354

表 11 续: 结合 MAGI2 d5 的 PL 序列(续)

AVC ID	肽	序列	SeqIDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOGRRETAL	355
AA115	presenilin-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	356
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	357
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGOGLHVTAL	358
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGRFQ	359
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	360
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEDQHTQITKV	361
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	362
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	363
1761	成纤维细胞生长因子受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSSL	364
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	365
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	366
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	367
AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	368
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	369
AA70	HPV-E6 #18	HSCNRARQERLQRRRETQV	370
AA182L	柄蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	371
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	372
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	373
1820	TRPM7	KQPGNSTKESESTNSVRLML	374
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	375
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTD	376
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	377
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	378
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	379

表 11 续: 结合 MAGI2 d5 的 PL 序列 (续)

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	380
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	381
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	382
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	383
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVSW	384
AA07	CD34	QATSRNGHSARQHVADTEL	385
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	386
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	387
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	388
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	389
AA328	GPR5	SPASIPHSPGAFAYEGASFY	390
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	391
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	392
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	393
AA86.1	HPV E6J66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	394
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFFGPATWRRISSLESEV	395
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	396
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDENSEPAAKKKYVSYNNLVI	397
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	398
AA125	紧密连合蛋白3(ZO-3)	VHDAESSDEDGYDNGPATDL	399
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLGRLYII	400
AA123	α -辅肌动蛋白2	VPGALDYAAFSSALYGESDL	401
1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	402
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	403
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	404
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	405
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	406
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVDPDLV	407

表 11 续: 结合 MAGI3 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	408
AA121	CD68	ALVLIAFCIIRRRPSAYQAL	409
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	410
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	411
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	412
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	413
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	414
AA19	CD148	ENLAPVITTFGKTNGYIA	415
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	416
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	417
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	418
AA220	claudin 10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	419
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	420
AA36.3	神经配蛋白(连接子14aa)	GGGGGSGGGGGSGGHSTTRV	421
AA36.2	神经配蛋白(连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSGPLHSTTRV	422
AA22.2	DNAM-1(连接子12aa)	GGGGGSGGGGGSGSRRPKTRV	423
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	424
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	425
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCSWCWKPTRRETEV	426
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	427
1857	HPV E6 #35 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSMSSWKPTRRETEV	428
AA67.1	HPV E6 #57 (cysteine-free)	HAMNAAPRAMENAPALRTSH	429
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	430
AA02.1	Clasp-2	ISGTPSTMTVHGMTSSSSVV	431
AA26	半乳凝素3	ISKLGISGDIDLTSASYTMI	432
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	433
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	434
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	435
AA40	DOCK2	LASKSAEEQKQIPDSLSTD	436
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	437
AA106	Kir2.1(内向整流型K ⁺ 通道)	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	438
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKMPSESIEVD	439

表 11 续: 结合 MAGI3 d1 的 PL 序列(续)

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No.
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	440
AA05.2	CD4 (修饰的) C->S	LSEKKTQSPPHRFQKTSSPI	441
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	GRWTGRSSESWRPRPVTVQV	442
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	443
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	444
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPLTSPL	445
AA217	朕蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPSWV	446
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	447
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	448
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVROFTLRHWLKV	449
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	450
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA	451
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	452
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGKLSSP	453
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	454
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	455
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	456
AA228	柄蛋白2	SPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	457
AA117	早老蛋白-2	STDNLVRPFMDTLASHQLYI	458
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	459
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	460
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	461
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	462
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTRSROATESTV	463
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	464
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYP TFSRRPKTRV	465
AA33	KV1.3	TNNNPNSAVNIKKIFTDV	466
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	467
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELVIFPSVKIATLV	468
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAACSLCRLYII	469
1862	HPV E6 #82	VTGQSANSRKPPRQRSETQV	470
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRLKSSIESDV	471
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRLNDNIALLVQ	472
AA25	FceRIb	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	473

表 11 续: 结合 MAGI3 d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	474
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRROTV	475
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	476
AA59	PTEN	DSDPENEPFDEDQHTQITKV	477
AA233L	5-羟色胺受体5HT-2B	DTLLLTENEGDKTEEQVSYV	478
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	479
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	480
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGGSGGGGSGGGHSTTRV	481
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGGLPHSTTRV	482
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	483
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	484
AA243	α -2A肾上腺素受体	HDFERRAFKKILARGDRKRIV	485
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFLOLQHWLAI	486
AA216	NMDA R2C	HPTDITGLPNLSDPSVSTVV	487
AA182L	肝配蛋白 B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	488
AA02.1	Clasp-2	ISGTPSTMVHGMTSSSSSVV	489
AA152L	ActRIIA	IVTVVTMVTNVDFPPKESL	490
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	491
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	492
1820	TRPM7	KQPGNSTKESESTNSVRLML	493
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTD	494
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	495
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	496
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	497

表 11 :结合 MAGI3 d2 的 PL 序列 (续)

密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	497
KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	498
RA-GEF (ras/rap1A-assoc.-GEF)	PYQSQGFSTEEDEDEQVSAV	499
α -2B肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	500
TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	501
多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	502
BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	503
GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTORKETVA	504
ErbB-4 受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	505
CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	506
Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	507
CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	508
密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	509
神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	510
HPV E6#35 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	511
NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	512
DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	513
KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	514
GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDENSPAACKKYVSYNNLVI	515
AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	516
HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	517
1854	YGRKKRRQRRRARGRETWV	518
TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	519
Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	520
Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	521

表 11 续: 结合 NeDLG d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	522
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKQVWDQSSV	523
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSVVNVSSNL	524
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	525
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	526
AA28.1	CDW125 (修饰的)	EVIGYIEKPGVETLEDSVF	527
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	528
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	529
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	530
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	531
AA70	HPV-E6 #18	HSCNRARQERLQRRRETQV	532
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	533
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	534
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	535
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	536
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	537
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	538
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	539
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	540
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFFTLTSP	541
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDSWV	542
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFRRFRRLARPWTQTAW	543
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	544
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	545
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELGLSSP	546
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	547
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFVMSRAMYV	548
1759	EGFR	TAENAEYLRVAPQSSEFIGA	549
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	550
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	551
AA33	KV1.3	TNNNNPNSAVNIKKIFTDV	552
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNLVI	553
AA251	v-AKT1	VDSERRPHEFPQFSYSASGTA	554
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRLVIFPSVKIATLV	556
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	556
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRNRNDNIALLVQ	557

表 11 续: 结合 NeDLG d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOGRRETAL	558
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVDQSSV	559
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	560
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRROTQV	561
AA245	α -2C肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	562
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	563
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	564
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	565
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	566
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	567
AA80.1	HPV E6# 35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	568
AA80	HPV-E6 #35	GRWTGRCMSCWKPTRRETEV	569
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	570
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	571
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	572
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	573
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	574
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	575
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	576
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	577
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	578
AA311	β -1联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDIDL	579
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	580
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	581
AA227	密蛋白2	PGQFPKVKSEFNYSYSLTGYV	582

表 11 续: 结合 NeDLG d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPPLTSPL	583
AA217	联蛋白- $\delta 2$	PYSELNYETSHYPASPSWV	584
AA244	α -2B肾上腺素受体	QDFRRAFRRILARFWQTAW	585
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	586
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	587
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	588
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	589
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	590
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	591
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	592
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	593
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	594
1759	EGFR	TAENAEYLRVAPQSSEFIGA	595
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	596
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	597
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSESEV	598
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	599
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	600
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAKKKYVSYNLVI	601
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	602
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	603
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	604
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	605
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	606
AA25	FceRIb	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	607

表 11 续: 结合外膜蛋白的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	608
AA206L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVNKVDQSSV	609
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	610
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	611
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	612
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPAKNGQYV	613
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	614
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	615
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGSAAHFSSLESEV	616
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	617
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	618
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	619
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	620
AA02.1	Ciasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSV	621
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	622
AA58	PAG	KENDYESISDLQQGRDITRL	623
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	624
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	625
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	626
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	627
AA225	claudin 9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	628
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	629
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	630
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	631
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	632
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	633
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVW	634

表 11 续: 结合外膜蛋白的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA07	CD34	ATSRNGHSARQHVVADTEL	635
AA244	α -2B肾上腺素能受体	DFRRAFRRILARPWTQTAW	636
AA56	TAX	ISPGGLEPPSEKHFRETEV	637
AA112	GluR δ -2	PTPTLGLNLGNDRGTSI	638
AA240	多巴胺转运蛋白	ELVDRGEVRQFTLRHWLKV	639
AA240	多巴胺转运蛋白	ELVDRGEVRQFTLRHWLKV	640
AA207L	Nedasin (S-型)	NIEEVYVGGKQVVPFSSV	641
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	SGATIFLVGQDIIDLQTEV	642
AA095	GluR5-2 (大鼠)	FTSILTCHQRRTQRKETVA	643
AA70.1	HPV E6 #18	SGGNRARQERLQRRRETQV	644
AA06	CD6	SPQPDSTDNDDYDDISAA	645
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	646
AA228	柄蛋白2	SPDSSYQGGKGFVMSRAMYV	647
AA223	密蛋白1	YPTPRPYPKPAPSSGKDYV	648
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	649
AA200L	HER2受体	EKGTPTAENPEYLGLDVPV	650
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	651
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	GSALQAWRHTSRQATESTV	652
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	QGFPGPATWRRISSESEV	653
AA22	DNAM-1	REDIYVNYPTFSRRPKTRV	654
AA33	KV1.3	TTNPNNSAVNIKKIFTDV	655
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	DPNSPAKKKYVSYNNLVI	656
AA82	AdenoE4 typ9	GTLLELRFVIFPSVKIATLV	657
AA125	紧密连接蛋白3(ZO-3)	HDAESSDEDGYDWGPATDL	658
AA77	HPV-E6 #63	HKVRNKFKAKCSLCRLYII	659
AA123	α -辅肌动蛋白2	PGALDYAAFSSALYGESDL	660
AA348	TATNMDA2B9	GRKKRRQRRRKLSSIESDV	661
1777	Tat-M-蛋白-SARS	GRKKRRQRRRNDNIALLVQ	662
1776	Tat-E-蛋白-SARS	GRKKRRQRRRSEGVPDLLV	663

表 11 续: 结合 Pick1 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
1927	X=L-苯基甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	664
AA121	CD68	ALVLI AFCI IRRRPSAYQAL	665
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	666
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	667
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKHDYV	668
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	669
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	670
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	671
AA243	α -2A肾上腺素能受体	HDFRRAFKKILARGDRKRIV	672
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	673
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	674
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	675
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	676
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	677
AA118	MINT-1	KTMPAAMYRLLTAQEQPVYI	678
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	679
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	680
AA05.2	CD4 (修饰的) C-> S	LSEKKT SQSPHRFQKTSSPI	681
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSILTYV	682
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	683
AA217	联蛋白- δ 2	PYSELNYETSHYPASPD SWV	684
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	685
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVD RGEVRQFTLRHWLKV	686
AA06	CD6	SPQPDSTDNDYDDISAA	687
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFEGLYKL	688
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQGKGFVMSRAMYV	689
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	690
AA33	KV1.3	TNNNNPNSAVNIKKIETDV	691
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	692
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKF KAKCSLCRLYII	693
1940	Tat-CLCA-3(鼠)	YGRKKRRQRRREMQVTLGLH	694
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	695
1947	Tat-hCLCA1	YGRKKRRQRRRIGELQLSIA	696
1922	X=L- α -氨基丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	697

表 11 续: 结合 PSD95 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLOQRRETAL	698
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQRRQTQV	699
AA245	α -2C 肾上腺素受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	700
AA222	密蛋白 18	DGGARTEDEVQSYPSKHQYV	701
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	702
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	703
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	704
AA220	密蛋白 10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	705
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	706
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	707
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFLOHWLAI	708
AA226	密蛋白 7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	709
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	710
1820	TRPM7	KKKKQPGNSTKESESTNSVRLML	711
AA229	密蛋白 5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	712
AA250	5-羟色胺受体 3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	713
AA225	密蛋白 9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	714
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	715
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	716
AA227	密蛋白 2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGIV	717
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSPL	718
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDVW	719
AA244	α -2B 肾上腺素受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	720
AA56	TAX	QISEGGLEPPSEKHERETEVE	721
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	722
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	723
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	724
AA23.3	Fas 配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	725
AA228	柄蛋白 2	SSPDSSYQKGFVMSRAMYV	726
AA223	密蛋白 1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	727
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	728

表 11 续: 结合 PSD95 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRRISSLESEV	729
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	730
AA33	KV1.3	ITNNNPNSAVNIKKIFTDV	731
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	732
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLELRFVIFPSVKIATLV	733
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	734
1915	生物素-Tat-NMDA-优化的	YGRKKRRQRRRALKSIEVEV	735
1854	1854	YGRKKRRQRRRARGRRETWV	736
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	737
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	738
1853	1853	YGRKKRRQRRRGMTSSSSV	739
1914	生物素-Tat-NMDAR2_短	YGRKKRRQRRRIEVEV	740
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	741
AA351	TAT-NR2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	742
1923	X=2-氨基-4,4,4-三氟丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	743
1924	X=L-叔丁基-甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	744
1944	X=正缬氨酸NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	745
1963	X=4-氨基-苯丙氨酸Tat-NMDAR2B var	YGRKKRRQRRRKLSSIESXV	746
1953	NMDAR2B P-1 Y	YGRKKRRQRRRKLSSIESYV	747
1939	Tat-NMDAR2B S->T P-2	YGRKKRRQRRRKLSSIETDV	748
1945	X=正缬氨酸, S->T P-2 NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIETDX	749
1931	1931	YGRKKRRQRRRKLSSIEYDV	750
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	751
1855	1855	YGRKKRRQRRRQDERVETRV	752
1918	TAT-SLO2	YGRKKRRQRRRQDSREETQL	753
1912	生物素-Tat-NMDAR2special 1	YGRKKRRQRRRRRISSIETDV	754
1913	生物素-Tat-NMDAR2special2	YGRKKRRQRRRRRISSIQTDV	755
1797	Tat-NMDA 2C9	YGRKKRRQRRRRRISSLESEV	756
1911	生物素-Tat-NMDAR2C S->T突变	YGRKKRRQRRRRRISSLETEV	757
1917	1917	YGRKKRRQRRRRRISSLETQV	758
1938	Tat-HPV33E6 (无半胱氨酸)	YGRKKRRQRRRRSRRRETAL	759
1916	生物素-Tat-CRIPT	YGRKKRRQRRRTKKNYKQTSV	760
AA25	FceRib	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	761

表 11 续: 结合 PSD95 d1,2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	762
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	763
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	764
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSEFKHILFRRARRGFRQ	765
AA178L	PDZ-结合激酶 (PBK)	EDPKDRPSAAHIVEALETDV	766
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYVW	767
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	768
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV	769
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	770
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	771
AA108.1	GLUR2(谷氨酸受体2-修饰的)	GGGGGSGGGGGSGIESVKI	772
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRRETAL	773
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	774
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRQTQV	775
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	776
AA216	NMDA R2C	HPTDITGLPNLSDPSVSTVV	777
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	778
AA182L	肝配蛋白B2	ILNSIQVMRAQMNQIQSVEV	779
AA02.1	Clasp-2	ISGTPTSTMVHGMTSSSSVW	780
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	781
AA13P	磷酸化CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	782
AA13	CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	783
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	784
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	785
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	786
AA106	Kir2.1(内向整流型K+通道)	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	787
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	788
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	789
1860	HPV E6 #52 (Cys->Ser)	MGRWTGRSSESWRPRPVITQV	790
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	791

表 11 续: 结合 PSD95 d1,2 的 PL 序列(续)

AA217	联蛋白-52	PYSELNYETSHYPASPDSWV	793
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	794
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	795
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDVRGEVRQFTLRHWLKV	798
AA207L	Nedasin (S-型)	RNIEEVYVGGKQVVPFSSSV	797
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	798
AA095	GluR5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	799
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELKGLSSP	800
AA214L	ErbB-4受体	SLKPGTVLPPPPYRHRNTVV	801
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	802
AA223	密蛋白1	SYPTPRPYPKPAPSSGKDYV	803
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	804
AA200L	HER2受体	TFKGTPTAENPEYLGLDVPV	805
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	806
AA66.1	HPV E6#66 (无半胱氨酸)	TGSALQAWRHTSRQATESTV	807
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	808
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	809
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	810
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸受体)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	811
AA82	AdenoE4 typ9	VGTLLEERVIFPSVKIATLV	812
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	813
1862	HPV E6 #82	WTGQSANSRKPPRQRSETQV	814
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	815
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	816
1967	Tat-H1N1	YGRKKRRQRRRMAGTIRSEV	817
1961	H5N1 AAT73368/50296240	YGRKKRRQRRRMARTIESEI	818
1959	H5N1 AAT73457/50296374	YGRKKRRQRRRMARTIESEV	819
1958	H5N1 AAF02349/6048830	YGRKKRRQRRRMERTIEPEV	820
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	821

表 11 续: 结合 PSD95 d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	822
AA75.1	HPV E6 58 (修饰的)	AVGGRPARGGRLQGRRTQV	823
AA346	NMDA R2B	FNGSSNGHVYEKLSIESDV	824
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	825
1859	HPV E6 #33 (Cys->Ser)	GRWAGRSAASWRSRRETAL	826
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	827
1858	HPV E6 #58 (mod Cys->Ser)	GRWTGRSAVSWRPRRRTQV	828
AA13	CD95	KDITSDSENSNFRNEIQSLV	829
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSTTVKTSY	830
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	831
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	832
AA345	NMDA R2A	LNSSNRRVYKKMPSIESDV	833
1861	HPV E6 #45 (Cys->Ser)	NTSSDQARQERLRRRRETQV	834
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	835
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	836
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIDLQTEV	837
AA06	CD6	SPQPDSTNDYDDISAA	838
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	839
AA69.1	HPV E6#16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	840
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	841
AA33	KV1.3	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV	842
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKCSLCRLYII	843
1915	生物素-Tat-NMDA-优化的	YGRKKRRQRRRALKSIETEV	844
1854	1854	YGRKKRRQRRRARGRRRETWV	845
1767	Tat-FGFR3 IIIc同工型1	YGRKKRRQRRRDKELEVLSL	846
AA356	bTAT-TAXAA	YGRKKRRQRRREKHFREAEA	847
AA353	bTAT-TAX	YGRKKRRQRRREKHFRETEV	848
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	849
1853	1853	YGRKKRRQRRRGMTSSSSVV	850
1914	生物素-Tat-NMDAR2 短	YGRKKRRQRRRIETEV	851

表 11 续: 结合 PSD95 d2 的 PL 序列(续)

AVC ID	肽	序列	Seq.IDNo
1930	1930	YGRKKRRQRRRKLSSIESDL	852
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	853
AA351	TAT-NR2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	854
1923	X=2-氨基-4,4,4-三氟丁酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	855
1924	X=L-叔丁基-甘氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	856
1926	X=3-氟-DL-缬氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	857
1929	X=4,4,4-三氟-DL-缬氨酸	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	858
1944	X=正缬氨酸NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	859
1954	X=炔丙基甘氨酸P0 NMDAR2B	YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	860
1963	X=4-氨基-PheTat-NMDAR2B变体	YGRKKRRQRRRKLSSIESXV	861
1953	NMDAR2B P-1 Y	YGRKKRRQRRRKLSSIESYV	862
1939	Tat-NMDAR2B S->T P-2	YGRKKRRQRRRKLSSIETDV	863
1945	X=正缬氨酸, S->T P-2 NMDAR2B类似物	YGRKKRRQRRRKLSSIETDX	864
1946	X=L-2NH4-3ureidoproacidP-2TatNMD	YGRKKRRQRRRKLSSIEXDV	865
1931	1931	YGRKKRRQRRRKLSSIEYDV	866
1961	H5N1 AAT73368/50296240	YGRKKRRQRRRMARTIESEI	867
1959	H5N1 AAT73457/50296374	YGRKKRRQRRRMARTIESEV	868
1958	H5N1 AAF02349/6048830	YGRKKRRQRRRMERTIEPEV	869
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	870
1855	1855	YGRKKRRQRRRQDERVETRV	871
1918	TAT-SLO2	YGRKKRRQRRRQDSREETQL	872
1912	生物素- Tat-NMDAR2special1	YGRKKRRQRRRRRISSIE TDV	873
1913	生物素- Tat-NMDAR2special2	YGRKKRRQRRRRRISSIQT DV	874
1797	Tat-NMDA 2C9	YGRKKRRQRRRRRISSLESEV	875
1911	Biotin-Tat-NMDAR2C S->T mut	YGRKKRRQRRRRRISSLETEV	876
1917	1917	YGRKKRRQRRRRRISSLETQV	877
1938	Tat-HPV33E6 (无半胱氨酸)	YGRKKRRQRRRRSRRETAL	878
1916	生物素- Tat-CRIPT	YGRKKRRQRRRTKNYKQTSV	879

表 11 续: 结合 PTN-3 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	880
AA311	β -1联蛋白	LM DGLPPGDSNQLAWFDTDL	881
1763	Tat-MUC1	YGRKKRRQRRRAVAATSANL	882
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	883
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	884
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	885
1776	Tat-E-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRSEGVPDLLV	886

表 11 续: 结合 SHANK1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	887
AA121	CD68	ALVLI AF CI IRRRPSAYQAL	888
AA30	LPAP	AWDDSARAAGGQGLHVTAL	889
AA261	GABA转运蛋白3	DAKLKSDGTIAAITEKETHF	890
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGRFQ	891
AA222	密蛋白18	DGGARTEDEVQSYPSKH DYV	892
AA59	PTEN	DSDPENEFEDEDQHTQITKV	893
AA248	生长抑素受体4	EALQPEPGRKRIPLTRTTTF	894
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPAKNGQYWV	895
AA220	密蛋白10	GGEDFKTTNPSKQFDKNAYV	896
AA36.3	神经配蛋白 (连接子14aa)	GGGGGSGGGGSGGGHSTTRV	897
AA36.2	神经配蛋白 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGGLPHSTTRV	898
AA22.2	DNAM-1 (连接子12aa)	GGGGGSGGGGSGSRRPKTRV	899
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFLQHLWLA I	900
AA70	HPV-E6 #18	HSCCNRARQERLQRRRETQV	901
AA226	密蛋白7	KAGYRAPRSYPKSNSSKEYV	902
AA29.2	CDw128B	KDSRPSFVGSSTGHTSTTL	903
AA58	PAG	KENDYESISDLQQGRDITRL	904
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	905
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	906
AA148L	CFTCR (CysticF 跨膜传导调节蛋白)	KPQIAALKEETEEVQDTRL	907
AA229	密蛋白5	KYSAPRRPTATGDYDKKNYV	908
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	909
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSIWQYA	910
AA225	密蛋白9	LGYSIPSRSGASGLDKRDYV	911

表 11 续: 结合 SHANK1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA311	β -1 联蛋白	LMDGLPPGDSNQLAWFDTDL	912
AA113	SSTR2(生长抑素受体2)	LNETTETQRTLLNGDLQTSI	913
AA34.2	NMDA	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV	914
AA329	VIPS 人	LQFHRGSRAQSFLOTETSVI	915
AA227	密蛋白2	PGQPPKVKSEFNYSYSLTGYV	916
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFPTLTSP	917
AA147	Na ⁺ /Pi 协同转运蛋白2	PPATFSPRLALPAHNNATRL	918
AA45	BLR-1	PSWRRSSLSESENATSLTTF	919
AA217	联蛋白-52	PYSELNYETSHYPASPDSWV	920
AA244	α -2B 肾上腺素能受体	QDFERRAFRRILARPWTQTAW	921
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDGRGEVRQFTLRHWLKV	922
1895	TAMRA-粘性类别1(Val0)	RRASTSRETWV	923
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	924
AA23.3	Fas配体	SSKKSSEESQTFGLYKL	925
AA228	柄蛋白2	SSPDSSYQKGFMVSRAMYV	926
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYGL	927
AA36	神经配蛋白	TFAAGFNSTGLPHSTTRV	928
AA69.1	HPV E6 #16 (修饰的)	TGRGMSGGRSSRTRRETQL	929
AA22	DNAM-1	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV	930
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	931
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAACSLCRLYII	932
AA123	α -辅肌动蛋白2	VPGALDYAAFSSALYGESDL	933
1767	Tat-FGFR3 IIIc同工型1	YGRKKRRQRRRDKELEVL	934
1956	Tat-COX-2	YGRKKRRQRRLLKERSTEL	935
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	936
1950	Tat-TIAM 1	YGRKKRRQRRRPSRKLNTEI	937
1965	Tat-hGKAP	YGRKKRRQRRRYIPEAQTRL	938

表 11 续: 结合 TIP43 d1 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. IDNo.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	939
1761	FGF受体3 IIIc同工型1	FHSKTAGANTTDKELEVLSL	940
AA348	NMDA R2B	ENGSSNGHVYEKLSSIESDV	941
AA347	NMDA R2D	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV	942
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	943
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	944
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	945
AA40	DOCK2	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL	946
AA345	NMDA R2A	LNSSSNRRVYKKMPSIESDV	947
AA181	BAI-1(脑特异性血管生成抑制剂1)	RSGATIPLVGQDIIDLQTEV	948
AA095	Glur5-2 (大鼠)	SFTSILTCHQRRTQRKETVA	949
AA124	CXCR3	SSSRDSSWSETSEASYSGL	950
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	951
AA33	KV1.3	TTNNPNNSAVNIKKIFTDV	952
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKA KCSLCRLYII	953
1764	Tat-HER2	YGRKKRRQRRREYLGLDVPV	954
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	955
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	956
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	957

表 11 续: 结合 Vartul d2 的 PL 序列

AVC ID	肽	序列	Seq. ID No.
AA72.1	HPV E6 33 (修饰的)	AAGGRSARGGRLQGRRETAL	958
AA208L	CITRON蛋白	AGAVRTPLSQVKNKVDQSSV	959
AA29.3	IL-8RA	ARHRVTSYTSSSVNVSSNL	960
AA115	早老蛋白-1	ATDYLVQPFMDQLAFHQFYI	961
AA245	α -2C肾上腺素能受体	DFRPSFKHILFRRARRGFRQ	962
AA218	CSPG4 (硫酸软骨素蛋白多糖4)	ELLQFCRTPNPALKNGQYWV	963
AA210L	APC-结肠腺瘤性息肉蛋白	ESSGTQSPKRHSGSYLVTSV	964
AA80.1	HPV E6#35 (无半胱氨酸)	GRWTGRAMSAWKPTRRETEV	965
AA258	去甲肾上腺素转运蛋白	HHLVAQRDIRQFQLQHWLAI	966
AA327	PAR-2	KHSRKSSSYSSSSTTVKTSY	967
1820	TRPM7	KKKQPGNSTKESESTNSVRLML	968
AA250	5-羟色胺受体3a	LAVLAYSITLVMLWSWQYA	969
AA34.2	NMDA	LNCSNRRVYKKMPSIESDV	970
AA140	KIAA 1481	PIPAGGCTFSGIFTLTSPL	971
AA190L	肝配蛋白B1	PVYIVQEMPPQSPANIYYKV	972
AA217	联蛋白-82	PYSELNYETSHYPASPDWV	973
AA244	α -2B肾上腺素能受体	QDFRRAFRRILARPWTQTAW	974
AA56	TAX	QISPGGLEPPSEKHFRETEV	975
AA240	多巴胺转运蛋白	RELVDRGEVRQFTLRHWLKV	976
AA253	Clasp-3	SLIGPVQKEYQRELKLSPP	977
AA23.3	Fas配体	SSKSKSSEESQTFGLYKL	978
AA223	密蛋白1	SYTPRPYPKPAPSSGKDYV	979
AA180	NMDA谷氨酸受体2C (无半胱氨酸)	TQGFPGPATWRRISSLESEV	980
AA33	KV1.3	TNNNPNSAVNIKKIFTDV	981
AA114	GLUR7 (代谢型谷氨酸盐R)	VDPNSPAAKKKYVSYNNLVI	982
AA77	HPV-E6 #63	VHKVRNKFKAKSLCRLYII	983
1775	Tat-N-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRGASADSTQA	984
AA348	TATNMDA2B9	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	985
1777	Tat-M-蛋白-SARS	YGRKKRRQRRRNDNIALLVQ	986
AA25	FceRib	YSATYSELEDPGEMSPPIDL	987