

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/564

C07K 14/47

C07K 16/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03808667.0

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646916A

[22] 申请日 2003. 4. 16 [21] 申请号 03808667. 0

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 18 [33] US [31] 60/373,754

[32] 2002. 6. 12 [33] US [31] 10/170,317

[86] 国际申请 PCT/EP2003/004038 2003. 4. 16

[87] 国际公布 WO2003/087838 英 2003. 10. 23

[85] 进入国家阶段日期 2004. 10. 18

[71] 申请人 安蒂博迪肖普股份有限公司

地址 丹麦根托夫特

[72] 发明人 拉尔斯·奥托·乌特恩塔尔

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 22 页

[54] 发明名称 用于对结合甘露聚糖的凝集素 (MBL) 进行免疫化学测定的组分、方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了多种抗体，它们对与甘露聚糖或抗 MBL 抗体结合、结构上正常或异常的 MBL 具有不同的结合特性。此外还提供了筛选针对 MBL、具有不同结合特性的抗体的方法，以及利用这些抗体测量能够与甘露聚糖结合的 MBL 或测量样品中正常寡聚化的 MBL 和异常的低寡聚化的 MBL 的方法和试剂盒。这些方法和试剂盒在对传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化的诊断中是有用的。

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

5 1. 一种筛选针对 MBL 的单克隆抗体的方法，包括评估针对 MBL 的抗体结合或不结合与甘露聚糖结合的结构正常的 MBL 的能力，或其结合或不结合尽其所能与甘露聚糖结合的结构异常的 MBL 的能力。

10 2. 一种筛选针对 MBL 的单克隆抗体的方法，包括评估针对 MBL 的抗体结合或不结合与该抗体或不同的针对 MBL 的单克隆抗体结合的结构正常的 MBL 的能力，或其结合或不结合与该抗体或不同的针对 MBL 的单克隆抗体结合的结构异常的 MBL 的能力。

15 3. 一种针对 MBL 的抗体，该抗体选自具有下列能力的抗体：
(a) 与结合了甘露聚糖的结构正常的 MBL 结合或不结合；
(b) 与结合了甘露聚糖的结构异常的 MBL 结合或不结合；
(c) 与结合了该抗体或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的结构正常的 MBL 结合或不结合；或
(d) 与结合了该抗体或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的结构异常的 MBL 结合或不结合。

20 4. 利用权利要求 3 的抗体测量能够与甘露聚糖结合的 MBL 的免疫分析技术。

25 5. 权利要求 4 的免疫分析技术，其中能够结合甘露聚糖的 MBL 通过捕获分子被固定化在固相上，该捕获分子能够在用抗体检测前捕获与甘露聚糖结合的 MBL。

6. 权利要求 5 中的免疫分析技术，其中用于其它分析物的一种或多种捕获分子被包被到固相上，以便检测样品中其它的分析物。

30 7. 利用权利要求 3 的抗体能够测量样品中总的免疫反应性 MBL

的免疫分析技术。

5 8. 权利要求 7 的免疫分析技术，其中结构正常和异常的 MBL 均通过捕获分子被固定化在固相上，该捕获分子能够在用抗体检测前捕获总的免疫反应性 MBL。

9. 权利要求 8 的免疫分析技术，其中用于其它分析物的一种或多种捕获分子被包被到固相上，以便检测样品中其它的分析物。

10 10. 一种测量体液中能够与甘露聚糖结合的 MBL 的浓度的试剂盒，其含有权利要求 3 的抗体。

11. 一种测量体液中结构正常和异常的 MBL，一起称为总免疫反应性 MBL 的浓度的试剂盒，其含有权利要求 3 的不同抗体。

15 12. 一种用于比较体液中能够与甘露聚糖结合的 MBL 的浓度和总免疫反应性 MBL 的浓度的试剂盒，该试剂盒含有权利要求 3 的不同抗体。

20 13. 一种诊断传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化的方法，包括使用权利要求 3 的抗体测量人血浆或血清样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL。

25 14. 一种诊断传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化的方法，包括既测量人血浆或血清样品中正常寡聚化的 MBL 又测量异常的低寡聚化的 MBL。

30 15. 一种阐明人血浆或血清样品中 MBL 的结构状态的方法，包括使用权利要求 3 的抗体测量人血浆或血清样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL 和既测量人血浆或血清样品中正常寡聚化的 MBL 又测量异常的低寡聚化的 MBL。

用于对结合甘露聚糖的凝集素（MBL）进行免疫化学测定的组分、方法和试剂盒

5

发明领域

结合甘露聚糖的凝集素（MBL）在不同的个体中可以以不同的量和不同的遗传决定的变异形式存在，从而影响这些个体对传染病的易感性和自身免疫疾病的严重性。本发明提供了一系列针对人的结合甘露聚糖的凝集素（MBL）的单克隆抗体，这些单克隆抗体可用于对该蛋白特别是在生物体液，例如人的血清或血浆中的浓度进行定量分析，还可以用来提供关于该蛋白的结构和功能信息。在本发明的一个实施方案中，提供了用于测量能够与甘露聚糖结合的寡聚化的 MBL 的组分、方法和试剂盒。在另一个实施方案中，提供了测量总的免疫反应性的 MBL 亚基的组分、方法和试剂盒，不论这些亚基是否聚合成表征具有完全生物活性的 MBL 的四聚体、五聚体或六聚体。本发明的组分、方法和试剂盒可用于生化和医学领域。

10

15

发明背景

结合甘露聚糖的凝集素（MBL）是先天的免疫系统的一个重要组成部分。它是在肝脏中合成的多聚体蛋白，为一种 C 型凝集素，对微生物表面上的某些碳水化合物（多糖）结构表现出钙依赖的结合。甘露聚糖用作这类多糖的模型，而 MBL 对单糖成分，例如 N-乙酰葡萄糖胺和 D-甘露糖表现出亲和性。与微生物的多糖结合后，MBL 通过结合的称为 MASP-1、MASP-2 和 MASP-3 的丝氨酸蛋白酶来激活补体，然后通过裂解膜攻击复合物，利用其调理效应产生的噬菌作用，并通过与细胞表面受体的直接相互作用促进杀死微生物。

20

25

30

MBL 分子是由最多 6 组同源三聚体组成的寡聚复合物，每个单体为 228 个氨基酸残基的单链。每条链的组成为 20 个氨基酸的富含

半胱氨酸的 N-端结构域，其后是由 18-20 个甘氨酸-Xxx-Yyy 重复序列组成的类似胶原蛋白的结构域， α -螺旋卷曲的颈结构域，最后是碳水化合物识别结构域（CRD）。三条这样的链形成一个结构单元或“头”，其中胶原蛋白结构域在各带一个 CRD 的三个颈部区中形成一个三螺旋尾部。N-端结构域通过链间二硫键相连。然后最多 6 个这样的同源三聚体头通过它们的 N-端区域相连，形成正常的 MBL 分子结构，这可以比做一束具有三个花瓣的花。这种结构通过在相连的同源三聚体的各个链之间形成二硫键来维持。通过这种方式，MBL 能够与丝氨酸蛋白酶 MASP-1、MASP-2 和 MASP-3（以及一种相关的非酶类的肽 MAp19）结合，形成的复合物当 MBL 结合碳水化合物时能够激活补体。

人类的 MBL 基因（*mb12*）有许多等位基因变体。有些发生在启动子区，两个最重要的发生在-550 位（H 或 L）和-221 位（Y 或 X）；另一个变体发生在 5'-非翻译区，在+4 位（P 或 Q）；和有三个发生在外显子 1，在+223 位（A 或 D, Arg52Cys）、+230 位（A 或 B, Gly54Asp）和+239 位（A 或 C, Gly57Glu）。启动子单倍型 HY、LY 和 LX 分别与高、中和低 MBL 血浆水平有关，而外显子 1 单倍型影响蛋白链的结构和结合。连锁不平衡性决定了某些理论上可能的 MBL 单倍型是极端稀少的，并且尚未发现过；在 100 个丹麦献血者中，只检测到了下列单倍型（括弧中为频率）：HYPA（0.285）、LYQA（0.235）、LXPA（0.195）、LYPB（0.135）、HYPD（0.085）、LYPA（0.045）、LYQC（0.020）。在 A/A 基因型（即具有正常的胶原区）中，只有 LXP/LXP 基因型表现出低的水浆 MBL 水平。A/B、A/C 和 A/D 基因型（即正常和异常的胶原区是杂合的）在用所述的旧方法测定时显示出降低的水浆 MBL 水平；当它们与 LX 单倍型结合时，甚至记录到了更低的水平。B/B、C/D 和 D/D 基因型（即所有的胶原区都异常的），在用旧方法测定时显示出非常低的 MBL 水平，即使这些受试者都不表现出 LX 单倍型。在丹麦献血者中外显子 1 单倍型 A、B、C 和 D 的频率分别是 0.76、0.135、0.020 和 0.085。这意谓着 A/A、B/B、C/C 和 D/D 基因型的频

率将是它们的平方，即分别影响 58.76%、1.82%、0.04%和 0.72%的人群（数据来自 Steffenson R.等，(2000) J Immunol Meth 241: 33-42）。

5 来自 B/B、C/C 和 D/D 基因型的人 MBL 的可能结构已经通过分析在中国仓鼠卵巢细胞中表达的相应的重组蛋白而确定了。这三种基因型的结果相似，并且以造成最常见的 MBL 的严重结构异常的 B/B 基因型为参照进行了描述。从这种基因型（称为 MBL B）中分析未减少的 MBL，表明两条链可能形成二聚体，三个这样的二聚体可能连接起来形成一个对应于来自 A/A 基因型（称为 MBL A）的正常 MBL 的
10 两个三联体“头”的结构。更高的寡聚体不能形成，并且 MBL B，不论是重组的还是从人类供体制备的，与 MASPs 的结合强度都降低了，以至于在体外试验中不能激活补体。

A/B 杂合子据信含有 MBL A 和 B 单链的混合物，它们以各种方式相结合。因为正常的 MBL 在六个三聚体头中含有最多 18 条单链，
15 因此在 A/B 杂合子中这样的分子完全由正常的 MBL A 链组成的比率是非常低的。因此掺入理论上 50% MBL B 链的影响将破坏远多于一半的 MBL 寡聚体的结构，以至于根据 MBL 表现型来看 B 性状是显性的，即大部分 MBL 采取与 MBL B 相似的结构。同样的考虑也适用于
20 A/C 和 A/D 杂合子，尽管似乎 D 链的破坏效力可能比 B 链的稍低些。

现有的测量人 MBL 的方法依赖于在不同的免疫分析设计中使用针对 MBL 的多克隆和/或单克隆抗体。在许多情况下，并不清楚哪种 MBL 的分子形式更倾向于被这些方法测定。一种常用的方式依赖于在
25 三明治 ELISA（酶联免疫吸附分析）中使用针对纯化的人 MBL 的小鼠单克隆抗体 HYB 131-01 同时作为捕获抗体和检测抗体。在该方法中，HYB 131-01 被包被在微滴定板的孔中，以便能够与人血清或血浆样品中的 MBL 结合。结合的 MBL 的量是样品中 MBL 浓度的函数。然后通过加入标记的 HYB 131-01 作为检测抗体对结合的 MBL 进行定量分析。标记可以是酶，例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶，它们在
30

与适当的底物保温时能够产生定量的颜色反应，标记也可以是生物素，它能够与复合有适当的酶的亲和素或链亲和素结合，标记也可以是铕，它允许通过时间分辨荧光进行检测。

5 这些方法也依赖于两个同样的抗体分子（一个用于捕获，而另一个用于检测）与单一 MBL 分子的两个相同但分开的位点（表位）的结合。实际上，这只有在 MBL 分子是三聚体亚基的寡聚体时才会发生，因此只有 MBL 寡聚体才能被这些分析方法测量。单一或低寡聚化的 MBL 三聚体亚基不允许同时与捕获抗体和检测抗体结合。结果，
10 这些方法不足以测量低寡聚化的 MBL，也不能直接确定测量的 MBL 寡聚体是否真正能够结合甘露聚糖，而这是功能性 MBL 的一个限定特征。但是，与甘露聚糖的结合与 MBL 的寡聚状态具有非常强的相关性，因为还没有发现可影响 CRD 区的结构的基因变体。现有的测定血清或血浆 MBL 浓度的分析方法也不能确定记录到的低浓度 MBL
15 是由于象在 LXPA/LXPA 基因型中那样的低浓度的正常 MBL A 造成的，还是由于象在 A/B、A/C、A/D、B/B、C/D 和 D/D 基因型中那样的在分析中不充分反应的异常结构的 MBL 造成的。

 希望能够区分血浆中 MBL A 的低浓度和事实上由于在杂合子中
20 存在显著浓度的 MBL B、C 和 D 变体或其杂交形式造成的低的记录浓度。例如，已经报道 MBL B 与 MBL A 具有同样的细胞介导的细胞毒性、调理和促噬菌作用活性。因此，现有的分析方法不能检测 MBL B，就不能反映出该 MBL 的这些功能。此外，使用现有免疫分析方法测量到的低的 MBL 血浆浓度，以及与这样的低浓度相关的启动子或外
25 显子 1 等位基因形式，已经与儿童和免疫能力受损的病人中感染危险的增加相关联。它们也已经与慢性肉芽肿和囊性纤维变性中的疾病发展，以及自身免疫疾病，例如系统性红斑狼疮和风湿性关节炎的更严重的病程相关联。由于现有的分析方法只能够给出病人 MBL 状态的部分情况，因此人们预计，对该状态进行更差异化的分析可获得更精确
30 的相关性。例如，尚不知道由于结构异常造成的低的 MBL 测量水

平与由于 LXPA/LXPA 基因型造成的低的正常 MBL 水平是否具有不同的临床相关性。

发明概述

5 本发明的一个目的是提供筛选针对 MBL 的单克隆抗体的方法，依据是它们与 MBL 的正常或异常形式结合或不结合的能力，而该 MBL 只要其结构允许就与甘露聚糖结合。

10 本发明的另一个目的是提供筛选针对 MBL 的单克隆抗体的方法，依据是它们与 MBL 的正常或异常形式结合或不结合的能力，而该 MBL 与同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体结合。

本发明的另一个目的是提供针对 MBL 的抗体，该抗体具有下列能力：

- 15 (a) 与结合了甘露聚糖的 MBL A 结合或不结合；
(b) 与结合了甘露聚糖的结构异常的 MBL 结合或不结合；
(c) 与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的 MBL A 结合或不结合；或
(d) 与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的结构异常
20 的 MBL 结合或不结合。

本发明的另一目的是提供体外方法和试剂盒，用于在样品中测定能够与甘露聚糖结合的 MBL。

25 本发明的另一目的是提供体外方法和试剂盒，用于在样品中既测定正常寡聚化的 MBL 也测定异常的低寡聚化的 MBL。

30 本发明的另一个目的是提供体外方法和试剂盒，用于在样品中同时测定能够与甘露聚糖结合的 MBL 以及正常寡聚化的 MBL 和异常的低寡聚化的 MBL 的总量。

通过测量人血浆或血清样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL，或者通过既能测量正常寡聚化的 MBL 又能测量异常的低寡聚化的 MBL 的方法测量人血浆或血清样品中的 MBL，本发明的方法、试剂盒和抗体可用于诊断对传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化。使用这些方法也将使采用旧方法发现的 MBL 缺陷被分类成是由于结构正常的 MBL 的缺陷还是由于结构异常的 MBL 的存在。

发明详述

本发明提供了抗体、筛选抗体的方法以及在体外方法中使用抗体测量样品中结合甘露聚糖的凝集素 (MBL) 浓度的方法和试剂盒。使用本发明的抗体、方法和试剂盒，变体形式的 MBL 的存在可以与低浓度的正常 MBL 的存在区分开来。此外，可以独立于 MBL 的寡聚状态测量 MBL 的总量，并将其与能够结合甘露聚糖的寡聚化的 MBL 进行比较。

本发明的抗体、方法和试剂盒对于定量分析和表征样品中的 MBL 尤其有用，所述样品包括生物体液，特别是人血清和血浆。当使用这种分析方法来分析血浆样品中 MBL 与甘露聚糖结合的能力时，血液样品最好用肝素进行抗凝结化，而不是使用钙的螯合剂，例如柠檬酸或 EDTA，这是因为 MBL 与甘露聚糖的结合依赖于游离的离子化的钙的存在。如果手边只有血浆抗凝结的钙螯合剂可用，就必须加入过量的钙盐以饱和螯合剂，从而在存在螯合剂的情况下确保生理浓度的游离的离子化的钙。

本发明的一个方面涉及筛选针对具有不同结合能力的 MBL 的单克隆抗体的方法。在该方法的一个实施方案中，针对 MBL 的单克隆抗体的筛选是基于单克隆抗体与结合了甘露聚糖的结构正常的 MBL 或 MBL A 结合或不结合的能力。在该实施方案中，单克隆抗体的筛选也可以基于它们与尽其所能与甘露聚糖结合的结构异常的 MBL 结

合或不结合的能力。在该方法的另一个实施方案中，针对 MBL 的单克隆抗体的筛选是基于它们与结合了同样或不同的针对 MBL 的抗体的 MBL A 结合或不结合的能力。在该实施方案中，抗体的筛选也可以基于它们与结合了同样或不同的针对 MBL 的抗体的结构异常的 MBL 结合或不结合的能力。使用这些筛选方法，针对 MBL 的抗体被鉴定，它们具有下列能力：1) 与结合了甘露聚糖的 MBL A 结合或不结合；2) 与结合了甘露聚糖的结构异常的 MBL 结合或不结合；3) 与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的 MBL A 结合或不结合；或 4) 与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的结构异常的 MBL 结合或不结合。一种示例的结构异常的 MBL 是 MBL B。结构正常和异常的 MBL 共同组成了总的免疫反应性 MBL。

因此，本发明的另一个方面涉及针对 MBL 的抗体，它们具有下列能力：与结合了甘露聚糖的结构正常的 MBL 或 MBL A 结合或不结合；与结合了甘露聚糖的结构异常的 MBL 结合或不结合；与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的 MBL A 结合或不结合；或与结合了同样或不同的针对 MBL 的单克隆抗体的结构异常的 MBL 结合或不结合。

本发明的抗体如下所述进行制备和表征。

用作免疫原的人 MBL 从献血者的血浆中纯化。在纯化之前，根据 HbsAg，抗 HIV 1 和 2 及 HCV 抗体对血液的每个部分进行筛选。MBL 通过亲和层析在碳水化合物柱 (Sephrose) 上分离。使用生理 pH 下含有氯化钙的结合缓冲液冲洗柱子后，使用含有 EDTA 的无钙缓冲液洗脱 MBL。用无钙的螯合钙的缓冲液在生理 pH 下进行洗脱是重要的，当用其它方法洗脱，例如使用非生理 pH 或修饰蛋白或水的结构的盐、溶质和溶剂时，也会洗脱能够与碳水化合物柱结合的抗体，例如 IgM。洗脱物在 Sepharose 柱上进行分子大小层析，收集在空体积附近出现的蛋白峰。这个步骤除去了较低分子量的血清淀粉样蛋白 A，

其也表现出钙依赖性的与碳水化合物的结合。获得的产物通过超滤进行浓缩，通过还原和非还原状态的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）进行分析。

5 纯化的 MBL 被吸附到氢氧化铝凝胶上，并以 25mg 吸附蛋白的剂量通过腹膜内注射到 BALB/c x CF2 雌性小鼠中。用于监测免疫反应和制备单克隆抗体的技术按照本领域专业技术人员所熟知的技术进行，它们被描述在标准的参考书中，例如 Harlow, E.和 Lane, D. (1988; 抗体：实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual)。冷泉港实验室，
10 纽约)。

 在用纯化的人 MBL 包被的微孔中进行 ELISA 以筛选杂交瘤上清液。该筛选的结果是筛选到了由 HYB 131-01b、HYB 131-10 和 HYB 131-11 编码的新的杂交瘤，分别带有同样编码的相应的小鼠单克隆抗体被进一步表征。
15

 表征本发明的抗体包括与在以前描述的分析方法中使用的单克隆抗体 HYB 131-01 进行比较。比较表明，四种抗体 HYB 131-01、HYB 131-01b、HYB 131-10 和 HYB 131-11，每一个都结合到 MBL 分子上各自不同的非重叠表位上。因此，这些抗体中的一种与 MBL 的结合不会阻止其它三种抗体同时与同一个 MBL 结合。对这四种表位与 MBL 单体的碳水化合物结合位点之间的关系研究表明 HYB 131-01 的结合靠近该位点，干扰了 MBL 与甘露聚糖的结合。因此，与过量 HYB 131-01 抗体复合的 MBL 不能与甘露聚糖包被的微孔结合。相反，与过量的
20 HYB 131-01b、HYB 131-10 或 HYB 131-11 复合的 MBL 仍然能与甘露聚糖包被的微孔结合。因此从这些实验中可以得出结论：HYB 131-01b、HYB 131-10 或 HYB 131-11 抗体的表位不与碳水化合物结合位点重叠。但是，这些抗体与已经用胶原蛋白酶消化去除了胶原结构域和 N-端结构域的 MBL 进行免疫杂交的反应，表明这些抗体象 HYB
25 131-01 一样，结合的表位位于分子剩余的颈-加-CRD 部分。
30

单克隆抗体针对基因型为 A/A 和 B/B 的献血者血清中的 MBL A 和 MBL B 的反应性分别被测试。在这些实验中，MBL B 用作结构异常

5 的 MBL 的例子。当 MBL A 和 MBL B 在用甘露聚糖以每毫升 0.3 微克的包被浓度包被的 ELISA 微孔中保温 1 小时时，与辣根过氧化物酶偶联的抗体 HYB 131-01、HYB-01b、HYB-10 和 HYB-11 与 MBL A 表现出大约相等的反应，但是与 MBL B 不表现出明显的反应。通过用每毫升 5 微克的甘露聚糖包被增加甘露聚糖包被物的密度，增加了每个抗体与 MBL A 结合产生的信号，表明更多的 MBL A 被结合到包

10 被物上。此外，在不同的抗体与来自单一的 A/A 基因型献血者的 MBL A 和从健康的献血者的血清库中纯化的 MBL 的相对结合反应中产生了轻微的变化，表明后一种 MBL 是异源的，含有与不同密度的甘露聚糖包被物和/或不同抗体结合有轻微不同的形式。从来没有检测到抗体与 MBL B 结合。

15

因此推论，当 MBL 结合到甘露聚糖包被物上时，蛋白与其甘露聚糖结合的 CRDs 被保留，其方向使得没有被测试的抗体能够接近它们在结合的 CRDs 上的表位。只有带有足够数量的头以确保某些头结合到包被物上而其它的头在液相中自由摆动的寡聚化的 MBL A，才能够通过它的自由头与抗体结合。四种测试的抗体与这些假定的自由头的反应性有少许区别。MBL B 具有最多两个头或异常的单个头，其与甘露聚糖包被物结合的方式不允许任何抗体结合到 CRDs 上，因为在液相中没有可用的未结合的 CRDs。MBL B 与甘露聚糖包被的表面的结合也比 MBL A 的弱，而其它的实验表明为了获得有效的结合需要

20 延长保温时间。这归结于下列事实：MBL A 与甘露聚糖包被的表面的结合被同样寡聚体的多个头与表面结合的协同作用所稳定，而 MBL B 的结合不受同样程度的结合协同作用影响。因此，极有可能随后分析程序中的清洗步骤实际上除去了任何与包被物结合的 MBL B，使得这个分析程序对正常寡聚化的 MBL 高度特异。

25
30

5 四种抗体与 MBL A 和 MBL B 的反应性也以两两比较的方式进行测试。在这些分析中，每个纯化的抗体被用来包被微滴定孔。然后加入含有 MBL A 或 MBL B 的人血清稀释液，并测量其它三种抗体中每一种的纯化的标记的形式与结合的 MBL 的结合。在 A/A 基因型的单个献血者的血清中 MBL A 的浓度，根据以前描述的分析方法使用 HYB 131-01 作为包被抗体和检测抗体，以收集的献血者血浆纯化的 MBL 作为重量测定的标准，测定为 760 ng/ml。所有这些分析都使用不含有钙的常规稀释缓冲液和清洗缓冲液进行。表 1 显示了用每种抗体组合获得的 MBL A 血清和 MBL B 血清的 MBL 浓度，以同样的标准进行比较。

10

表 1、以 ng/ml 表示的 MBL 浓度，通过酶联免疫吸附分析 (ELISA)，使用不同组合的包被抗体和检测抗体，在含有 MBL A 和 MBL B 的血清中分别测量。SD：标准偏差；CV：变异系数。

检测抗体 包被抗体	HYB 131-01		HYB 131-01b		HYB 131-10		HYB 131-11		平均值 SD CV
	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	
HYB 131-01	760		980		900		870		878 91 10%
		0		130		140		70	85 65 76%
HYB 131-01b	820		840		990		870		880 76 9%
		50		90		100		210	113 68 61%
HYB 131-10	790		910		920		1040		915 102 11%
		160		170		190		530	263 178 68%
HYB 131-11	1050		1100		960		790		975 136 14%
		140		80		180		0	100 78 78%
平均值	855	88	958	118	943	153	893	203	
SD	132	75	111	41	40	41	105	235	
CV	15%	86%	12%	35%	4%	27%	12%	116%	

在下文中，包被/检测抗体的组合是指以这种次序，对每个抗体只使用参考号的最后部分；例如 01/01b 是指 HYB 131-01 用作包被抗体，而 HYB 131-01b 用作检测抗体。

5

获得的 MBL A 的表观浓度值的变化从 01/01 的 760ng/ml（使用以前描述的分析方法）到 11/01b 的 1100ng/ml。因此，使用不同的抗体组合，与收集的纯化的 MBL 标准相比，从该献血者中能够检测到比使用以前描述的分析方法测量到的多出高达 45% 的 MBL A。在单个献血者的血浆和标准血浆中的 MBL 都不是同源的，因此在单个献血者的血浆中记录到的数值增加可能部分是由于该抗体组合与收集的标准相比反应性降低了。使用不同的检测抗体与同样的包被抗体组合和使用同样的包被抗体与不同的检测抗体组合获得的 MBL A 浓度的变异系数，表明 HYB 131-01b 作为包被抗体与 MBL 结合的方式使得用不同的抗体进行检测可以获得最小的偏差，而使用 HYB 131-10 作为检测抗体在检测与不同包被物结合的 MBL 中显示出最小的偏差。

10

HYB 131-10 作为检测抗体对 MBL 被不同的包被物呈递的方式显示出很小的敏感性，其可靠性由在用不同浓度的甘露聚糖包被的微孔中测试来自不同基因型献血者的大量血清所证实。在四种检测抗体中，HYB 131-10 对于与不同的甘露聚糖包被物结合的同种血清的 MBL 给出了最一致的结果。

20

MBL A 浓度的最高平均值是使用 HYB 131-11 和 HYB 131-10 作为包被抗体，将用四种检测抗体获得的结果平均而获得的。这表明与 HYB 131-01b 和 HYB 131-01 相比，HYB 131-11 和 HYB 131-10 对 MBL 有较高的亲和性。

25

当与同样的包被抗体结合的 MBL A 用不同的检测抗体测量时，记录到的 MBL A 的浓度表现出差别，这表明某些包被/检测抗体对以

30

比其它抗体对更高的效率同时与 MBL A 结合。据推测，对于 MBL A 来说，这依赖于多种因素的组合。不同抗体保持其结合的 MBL 头的角度依赖于它们的表位在 CRD 上的位置，这影响了其它表位对它们相应的抗体的可接近程度。同时，单独抗体的亲和性可能影响结果。

5

检测抗体的联合在很大部分上依赖于它与摆向液相中未结合的 MBL 头的联合，结合包被物的头的表位由于结合了包被抗体而被封闭。但是，由于每个头有三个以径向对称排列的 CRD 区域，某些检测抗体与结合了包被物的头的结合仍然是可能的，只要正被讨论的表位的位置使得三联体的头通过这些相同表位中的一个或两个进行结合的角度允许检测抗体进入同一个头上的剩余的两个或一个表位。这种情况可能发生的程度由使用同样的抗体测量 MBL B 的浓度时所获得的结果显示，这时只有很少或没有头能够在液相中自由摆动。如表 1 所示，01/01 组合和 11/11 组合都不能测量 MBL B。因此，这些相同抗体的组合只能测量在液相中有未结合的头暴露给检测抗体的寡聚化的 MBL。

10
15

01b/01b 抗体组合对 MBL A 给出的总读数是 840ng/ml。这可以分析如下：从与液相中自由头的结合预期的读数是 760ng/ml (01/01 获得的读数，它不能与结合了包被物的头结合)；从与结合了包被物的头的结合预期的读数是 90ng/ml (对 MBL B 使用 01b/01b 获得的读数)；总的预期读数是 850ng/ml。预期读数 (850ng/ml) 与实际发现的读数 (840ng/ml) 之间的一致性相当好。

20

10/10 抗体组合对 MBL A 给出的总读数是 920ng/ml。这可以分析如下：从与液相中自由头的结合预期的读数是 760ng/ml (01/01 获得的读数，它不能与结合了包被物的头结合)；从与结合了包被物的头的结合预期的读数是 190ng/ml (对 MBL B 使用 10/10 获得的读数)；总的预期读数是 950ng/ml。预期读数 (950ng/ml) 与实际发现的读数 (920ng/ml) 之间的一致性也相当好。

25

30

在两种情况下计算是粗略的，因为它们是基于这样的假设，即 MBL B 血清中 MBL B 的量与 MBL A 样品中结合了包被物的 MBL A 头的量具有可比性。但是，MBL B 浓度的最高估算（这可能最接近于实际）是 530ng/ml，530/760 的比例可能距离 MBL A 样品中结合了包被物的头与总头的比例不远。如果有什么不同的话，它可能比这个比例稍高些。

假定不同的包被和检测抗体的组合对 MBL A 给出的读数是它们与非包被物结合的头的反应加上与结合了包被物的头的反应的函数，后一种反应依赖于检测抗体对它在这些头上的表位的可接近性。这将依赖于包被抗体的表位和检测抗体的表位的相对位置，它们之间角度的控制，以及径向对称的三联体头一旦通过包被抗体的一个或两个表位向下结合到包被物上时所述三联体头上检测抗体的表位的暴露情况。几何学上的因素决定了颠倒使用一对抗体将不会给出同样的结果，即 11/01b 给出的 MBL A 的读数为 1100ng/ml，而 01b/11 给出的读数为 870ng/ml。在这个方面另一个因素是，如果使用较高亲和性的抗体作为包被物，一般会获得较高的读数，因为在分析步骤中包被物以及它结合的 MBL 将比检测抗体经受更多的洗涤。

获得的 MBL B 的表观浓度值的变化从用 01/01 和以前描述的分析方法及 11/11 获得的 0 到用 10/11 获得的 530ng/ml。MBL B 具有正常的颈和 CR 结构域，因而对四种抗体表现出与 MBL A 同样的表位。但是，MBL B 由单个 MBL 链的二聚体和六聚体组成，所述六聚体可组织成两个三联体头，这是在 MBL B 分子中发现的头的最大数量。据信 MBL B 被结合到包被抗体上时，所有的二联体和三联体 CRD 头都与包被物通过包被抗体的两个或三个同样表位中的至少一个表位保持接触。MBL 头结合的角度依赖于 CRD 上正被讨论的表位的位置，这影响了其它表位对它们相应的检测抗体的可接近性，不论检测抗体与包被抗体相同还是不同。

因此在这个系统中 MBL B 的测量几乎完全依赖于包被和检测抗体表位的相对位置以及与包被物的结合对检测抗体表位暴露的影响。

01/01 和 11/11 的组合都不能测量 MBL B。这表明 HYB 131-01 和 HYB 131-11 抗体的表位在 CRD 上安置，以便二联体或三联体头与包被物中的抗体通过单一表位的结合将头保持在这样一种位置上，使得同一个抗体的另一个或两个表位被维持在不能接触到液相的位置上。由此推论，当二联体或三联体头中的 CRDs 以径向对称排列时，它们在 CRD 上的位置使得它们指向同样的方向。

01b/01b 和 10/10 组合能够测量某些 MBL B。这表明当 CDRs 在二联体或三联体头中排列时，这些抗体的表位在 CRD 上的位置安置使得它们指向不同的方向。01b/01b 给出的读数为 90ng/ml，而 10/10 给出的读数为 190ng/ml，这个事实可能是由于 HYB 131-10 抗体具有较高的亲和性，和/或由于表位位置的影响，从而使得非包被物结合的 HYB 131-10 的表位更好地暴露到液相中。

不同抗体作为包被和检测抗体的组合都能够测量某些 MBL B。据信这是由于下列事实：四种不同的抗体都结合到 CRD 上的不重叠的表位上。因此，它们之间一定有一些角度，不同表位的相对位置和角度形成显示出是影响获得的读数的主要因素。几何学上的因素决定了颠倒使用一对抗体将不会给出同样的结果，即 11/01b 给出的 MBL B 的读数为 80ng/ml，而 01b/11 给出的读数为 210ng/ml。MBL B 的最高读数（530ng/ml）是用 10/11 获得的，表明 MBL B 一旦结合到 HYB 131-10 包被物上，HYB 131-11 的表位就很好地暴露到该检测抗体前。在理论上，推测从一系列抗体对获得的 MBL B 浓度的最高读数将接近于重量测定的浓度，如果后者的测定是可能的话。

因此，10/11 抗体的组合是测量 MBL B 的最适的抗体组合，类似地也是测量 MBL C 和 D 以及测量来自 A/B、A/C 和 A/D 杂合子的 MBL

的最适的抗体组合。这个组合对 MBL A 也给出了高的读数 1040ng/ml, 以至于它适合于用来测量病人样品中的总免疫反应性 MBL。另一个可以用来测量总免疫反应性 MBL 浓度的组合是 11/01。使用这个组合记录的不同 MBL 基因型献血者血浆的 MBL 浓度被显示在表 2 中, 其中还将它们与 01/01 组合使用以前描述的分析方法获得的结果以及 11/11 组合获得的结果进行了比较。

表 2 显示出从 11/01、01/01 和 11/11 获得的读数对于所有的 A/A 基因型来说相当一致, 不论这些基因型是否与启动子缺陷有关。对于 A/B、A/D、B/B 和 B/D 基因型来说, 11/01 比其它两种抗体组合测量到更多的 MBL, 而 11/11 组合给出了中间值, 除了 B/B 基因型以外。应该注意到 A/D 基因型通常显示出只适度减少一些的 MBL 值, 即使是使用以前描述的方法, 这证实了以前的研究 (Steffensen, R.等, 同上)。尽管重组的 MBL D 与重组的 MBL B 相似, 但 D 链表现出比 B 链更好地与 A 链结合形成一定比例的正常或接近正常结构的 MBL 的能力。

表 2、不同 MBL 基因型献血者血浆的 MBL 浓度 (ng/ml), 用不同的抗体组合测定。PD: 启动子缺陷 (基因型) LX/LX 或 LX/LY。

抗体组合		11/01	01/01 (旧分析方法)	11/11
供体编号	基因型			
1	A/A	1460	1460	1440
2	A/A	1840	2530	2330
3	A/A	1520	1800	1690
4	A/A	2950	3990	4110
5	A/A PD	510	570	580
6	A/A PD	360	340	460
7	A/B	1170	350	790
8	A/B	2100	320	880
9	A/D	2140	1030	1460
10	B/B	570	50	0
11	B/D	660	20	220
12	B/D	530	20	290

钙的影响也被研究。上述使用不同抗体对的分析都是在稀释和清洗缓冲液中不存在钙的情况下进行的。糖与 MBL 的结合是钙依赖性的，钙本身结合到 MBL 的 CRD 上，改变了它的构象并参与糖结合的机制。因此对于依赖 MBL 与甘露聚糖包被物结合的 MBL 分析方法来说，使用含有钙的稀释和清洗缓冲液是必需的。在只依赖抗体与 MBL 的结合的 MBL 分析方法中钙是不需要的。但是，如果在依赖抗体与 CRD 结合的 MBL 分析方法中使用含有钙的缓冲液，由钙诱导的 CRD 中的构象变化可能修饰获得的结果。这可能以两种方式发生：特定的单克隆抗体对它的表位的亲和性可能因为该表位中的构象变化而被改变，和/或 CRD 中的构象变化可能改变不同的单克隆抗体的表位之间的角度。这意谓着为测量结构异常的 MBL 而对最适的抗体对进行的选择将受到稀释和清洗缓冲液中钙的存在的影响。因此，在含有 4mM 氯化钙（这超过了钙离子的生理水平）的缓冲液中重复了不同抗体对的试验。从大量的结果获得的总的结论是，在存在钙的情况下，测量结构异常的 MBL 的最适抗体对是 11/01，而不存在钙时的最适抗体对是 10/11。

本发明的另一个方面涉及用于测量在样品中能够结合甘露聚糖的 MBL 或测量样品中所有正常的寡聚化的 MBL 和异常的低寡聚化的 MBL 的体外方法和试剂盒。这些方法可用于诊断对传染病和自身免疫疾病的易感性增加及这些疾病病情的恶化。

任何一种众所周知的免疫分析技术都可以用于本发明的方法。对于本发明的免疫分析来说，最好将样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL 或总的免疫反应性 MBL 通过捕获分子，例如甘露聚糖或本发明的抗体，分别固定在固相上。然后可以将样品中能够与甘露聚糖结合的固定化的 MBL 或总的免疫反应性 MBL 通过本发明的带有可检测的标记的第二抗体进行检测。

30

在一个优选实施方案中，方法包括一个酶联免疫吸附分析 (ELISA)，由 ELISA 分析试剂盒组成，所述试剂盒含有预先用甘露聚糖或选定的针对 MBL 的单克隆抗体包被的微滴定板孔，选定的针对 MBL 的单克隆抗体的溶液，该抗体带有可检测的标记，例如生物素或可检测的酶，例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，或铈，以便通过时间分辨的荧光发射检测，作为标准和对照的人 MBL 溶液，以及对所用的酶生色底物的溶液。在用生物素标记抗体的情况下，还提供与上述的酶偶联的链亲和素的溶液。此外还提供稀释和清洗缓冲液。

用于 ELISA 以及本领域专业技术人员所熟知的可检测的酶的例子包括但不限于，乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、甘油磷酸酶、天冬酰胺酶、 β -半乳糖苷酶、 β -V 类固醇异构酶、过氧化氢酶、葡糖淀粉酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、辣根过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、核糖核酸酶、葡萄球菌核酸酶、磷酸丙糖异构酶、脲酶和酵母醇脱氢酶。

ELISA 可以被用来测量结合甘露聚糖的 MBL。为了测量结合甘露聚糖的 MBL，ELISA 板或孔条的微滴定孔预先用甘露聚糖作为捕获分子进行包被。在优选情况下，甘露聚糖从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 制备，其以浓度范围为 0.1 μ g/ml 到 5 μ g/ml，更优选为 3 μ g/ml，在适当的包被缓冲液中使用，并且遵循本领域专业技术人员所熟知的步骤。在用含有常规组分的清洗缓冲液，例如含有非离子去污剂作为封闭剂和以可溶性钙盐的形式存在，浓度在 0.5mM 到 5mM 之间，但优选为 4mM 的离子钙的清洗缓冲液洗涤孔后，待分析的血清或用肝素抗凝结的血浆样品以及标准和对照，被加入到其对应的孔中，它们都用含有前述浓度范围内，但优选为 4mM 的离子钙的稀释缓冲液进行稀释（因为 MBL 与甘露聚糖的结合是钙依赖性的）。孔在室温保温一段时间，不超过 1 小时，然后洗涤。将已被可检测标记，例如生物素，标记的选定的本发明的单克隆抗体，例如 HYB 131-10 的稀释液加到每个孔中，保温不超过 1 小时。该抗体的合适的稀释度

由经验确定，它的浓度可以在 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 到 2 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内。洗涤孔，使用众所周知的技术检测结合的抗体。例如，对于生物素标记的抗体来说，在每个孔中加入与辣根过氧化物酶偶联的链亲和素的溶液，保温不超过 1 小时。洗涤孔，向每个孔中加入生色底物的溶液，保温不超过 30 分钟。通过向每个孔中加入强酸抑制颜色生成，形成的颜色的光密度在读板机上读取。每个孔中与甘露聚糖结合的 MBL 的量通过将该孔的光密度与标准曲线进行比较而计算，标准曲线是根据含有标准品的孔的光密度读数绘制的，标准品来自纯化的 MBL 按重量制备。替代的检测方法包括但绝不限于，将抗体直接与酶或钼偶联，然后再采用上述的方案，正如本领域的专业技术人员所熟知的那样。

ELISA 也可以用来测量总的免疫反应性 MBL。为了测量总的免疫反应性 MBL，ELISA 板或孔条的微滴定孔预先用针对 MBL 的选定的单克隆抗体，例如 HYB 131-10 或类似的选定抗体作为捕获分子进行包被，其以浓度范围优选在 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 到 5 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内，更优选为 3 $\mu\text{g/ml}$ ，按照本领域专业技术人员所熟知的步骤在适当的包被缓冲液中使用。在用常规组成为本领域专业技术人员所熟知的并含有非离子去污剂作为封闭剂的清洗缓冲液洗涤孔后，待分析的血清或血浆样品以及标准和对照被加入到其对应的孔中，它们都稀释在常规组分的稀释缓冲液中。孔在室温保温一段时间，不超过 1 小时，然后洗涤。将已被可检测地标记，例如用生物素，标记的不同的单克隆抗体的稀释液加到每个孔中，保温不超过 1 小时，该抗体可以是 HYB 131-11 或按照类似的标准选择的其它抗体。该抗体的合适的稀释度由经验确定，它的浓度可以在 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 到 2 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内。洗涤孔，检测结合的抗体。对于生物素酰化的抗体来说，检测使用与过氧化物酶偶联的链亲和素的溶液，将其加入到每个孔中，保温不超过 1 小时。洗涤孔，向每个孔中加入生色底物的溶液，保温不超过 30 分钟。通过在每个孔中加入强酸抑制颜色生成，形成的颜色的光密度在读板机上读取。每个孔中能够同时与包被抗体和检测抗体结合的 MBL 的量通过将该孔的光密度与标准曲线进行比较而计算，标准曲线是根据含有标

准品的孔的光密度读数绘制的，标准品来自纯化的 MBL 按照重量制备。此外，抗体可以直接与酶或铈偶联，并采用上述的方案按照其它众所周知的技术进行检测。

- 5 一种特别有用和方便的 ELISA 方法是将使用甘露聚糖作为捕获分子与甘露聚糖结合的 MBL 的分析方法同使用 HYB 131-11 作为捕获抗体的总免疫反应性 MBL 的分析方法相结合。在该方法中，一组 ELISA 孔用甘露聚糖如前所述预先进行包被，第二组用浓度在 1 μ g/ml 到 5 μ g/ml 之间的 HYB 131-11 按照本领域专业技术人员所熟知的步骤预先进行包被。然后在两组孔中平行地分析同样的血清或血浆样品稀释液，使用同样的稀释和清洗缓冲液和同样的试剂。这同时测量了同样的血清或血浆样品中正常的寡聚化的与甘露聚糖结合的 MBL 和总的 MBL 的免疫反应性。稀释缓冲液和清洗缓冲液都含有离子化的钙，浓度在 0.5mM 到 5mM 之间，但优选为 4mM，缓冲液其它成分的选择使得不与钙形成沉淀或不干扰钙。在用含有非离子去污剂作为封闭剂的清洗缓冲液洗涤孔后，待分析的血清或血浆样品以及标准和对照被加入到其在三组中每一组的对应的孔中，它们稀释在含有钙的稀释缓冲液中。孔在室温保温一段时间，不超过 1 小时，然后洗涤。将已被可检测地标记，例如生物素，标记的单克隆抗体 HYB 131-01，或按照前面描述的标准选择的另一抗体的稀释液加到每个孔中，保温不超过 1 小时。该抗体的合适的稀释度由经验确定，它的浓度可以在 0.1 μ g/ml 到 2 μ g/ml 的范围内。洗涤孔，检测结合的抗体。对于生物素酰化的抗体来说，检测使用与辣根过氧化物酶偶联的链亲和素的溶液，将其加入到每个孔中，保温不超过 1 小时。洗涤孔，向每个孔中加入生色底物的溶液，保温不超过 30 分钟。通过在每个孔中加入强酸抑制颜色生成，形成的颜色的光密度在读板机上读取。每个孔中最初加入的 MBL 的量通过将该孔的光密度与标准曲线进行比较而计算，标准曲线是根据同组中（用同样的捕获分子包被）含有标准品的孔的光密度读数绘制的，标准品来自纯化的 MBL 按照重量制备。此外，检测抗体可以直接与酶或铈偶联，并采用上述的方案按照其它众所周知的技术进行
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

检测。该方法也可以与旧方法结合进行，使用另一组用 HYB 131-01 抗体包被的孔。将 MBL 的甘露聚糖结合和总免疫反应性分析相结合，不论是否与使用 HYB 131-01 的旧方法相结合，都提供了许多优点。

5 具体来说，MBL 的甘露聚糖结合方法对于正常寡聚化的 MBL 具有高的选择性，给出的结果一般与旧方法相似。

10 此外，MBL 的甘露聚糖结合方法不象旧方法，不容易受到可能在样品中存在的任何类风湿因子的干扰。在旧方法中，与免疫球蛋白结合的类风湿因子可以将包被抗体与检测抗体相交联，因此给出了假的高阳性读数，从而被解释成是由于 MBL 的存在。因为类风湿因子不结合甘露聚糖，这种情况不会在甘露聚糖结合分析方法中发生，因而更适合于测定患有自身免疫疾病，例如与类风湿因子的发展有关的类风湿关节炎的病人中正常寡聚化的 MBL 的水平。在保温培养基中
15 加入免疫球蛋白或热处理的免疫球蛋白可以吸附掉一些类风湿因子，减少它们对基于捕获和检测抗体的分析方法的干扰。尽管这样的干扰可以由这种步骤减少，但是它不可能完全消除。为此，优选使用非免疫球蛋白的捕获分子。

20 此外，将 MBL 的甘露聚糖结合分析方法和/或旧方法的结果与 MBL 总免疫反应性分析方法的结果进行比较，显示出遗传缺陷的本质是用旧方法记录到的低血清或血浆 MBL 水平的主要原因。这种类型的比较图解在表 2 的第三（11/01）和第四（01/01，旧分析方法）列，该表将总免疫反应性分析方法的结果与旧分析方法的结果进行了比较。
25 例如，用旧分析方法或甘露聚糖结合分析方法记录的高的水平（例如超过 1100ng/ml）与总免疫反应性分析方法中同样的高水平相联系。这些受试者（表 2 中的供体 1-4）具有结构正常的 MBL A（A/A 基因型），没有启动子缺陷。具有用旧分析方法或甘露聚糖结合分析方法记录的较低的水平（例如低于 1100ng/ml）的受试者在总免疫反应性
30 分析方法中可能显示同样的低水平，或者高得多的水平。在总免疫反

应性分析方法中同样的低水平（表 2 中的供体 5 和 6）表明结构正常的 MBL 的浓度降低，即存在启动子缺陷的 A/A 基因型，它可以是 LX/LX 或 LX/LY。在总免疫反应性分析方法中比在旧方法或甘露聚糖结合分析方法中的水平高得多，表明存在显著水平的结构异常的 MBL。A/B 杂合基因型（表 2 中的供体 7 和 8），其中 B 链的正常结构被高度破坏，一般来说与用旧方法或甘露聚糖结合分析方法记录时 MBL 水平大大低于 1000ng/ml 相关联。用总免疫反应性分析方法记录的值可能是 3 到 7 倍高。A/B 杂合基因型（表 2 中的供体 9），其中据信 D 链的正常结构比 B 或 C 链破坏得少，通常与用旧方法或甘露聚糖结合分析方法记录时 MBL 水平低于 1500ng/ml 相关联。用总免疫反应性分析方法记录的值可能是 2 倍高。B/B、D/D 和 C/C 纯合子和 B/D、B/C 和 D/C 杂合子只有结构异常的链，在表 2 中的例子是供体 10-12。这些基因型在用旧方法记录时一般与 MBL 水平低于 100ng/ml 相关，但是用总免疫反应性分析方法记录的值可以是 10 到 30 倍高，但仍然低于 1000ng/ml。

举例的 ELISA 分析方法的检测极限，在原始血浆或血清样品中，如果使用 10 倍的稀释倍数，是在 0.5ng/ml 的数量级，而通过适当增加样品的稀释倍数，工作范围的上限可以扩展到任何可能存在的浓度。

本领域的专业技术人员在阅读本发明内容后将会理解，用在上述 ELISA 方法中的原理可以按照众所周知的步骤进行常规的修饰，以用于其它的固相免疫分析方法。例如，在一个实施方案中，捕获分子或是甘露聚糖或是针对 MBL 的单克隆抗体，被包被在聚苯乙烯微球或微粒或磁性或顺磁性珠子上。在另一个实施方案中，捕获分子被包被在聚苯乙烯载玻片上。然后将样品加到包被的微粒、珠子或载玻片上，并使用本发明的抗体测量样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL 或正常寡聚化的 MBL 和异常的低寡聚化的 MBL。

30

此外，本领域的专业技术人员在阅读本发明内容后将会理解，用于其他目的分析物的其它捕获分子也可以包被在平板、微粒、珠子或载玻片上以自动化分析多种分析物。这样的分析物包括但不限于，先天免疫系统的其它成分，例如表面活性剂蛋白 A 和 D，ficolin H、L 和 M，补体成分和因子，以及适应性免疫系统的成分，凝结和溶血系统的成分，以及实际上任何分析目的的血清或血浆成分。

其它使用本发明的抗体和本领域专业技术人员熟知的免疫分析技术包括但不限于，放射免疫分析、例如用铷标记抗体的磁分离和电化学发光测量、免疫沉淀、Western 杂交分析（免疫印迹）、以及荧光激活的细胞分类（FACS）。免疫沉淀是本技术领域的标准方法，可以在例如 Ausubel F.M.等《分子生物学现代方法（Current Protocols in Molecular Biology）》第二卷，第 10.16.1-10.16.11 页中发现，John Wiley & Sons 出版公司 1998 年出版。Western 杂交（免疫印迹）分析也是本技术领域的标准方法，可以在例如 Ausubel F.M.等《分子生物学现代方法》第二卷，第 10.8.1-10.8.21 页中发现，John Wiley & Sons 出版公司 1997 年出版。MBL 的水平已经与传染病和自身免疫紊乱和疾病的易感性增加和病情恶化相关联。因此，本发明的方法、试剂盒和抗体，可以用来测量人血浆或血清样品中能够与甘露聚糖结合的 MBL 或正常寡聚化和异常的低寡聚化的 MBL，在诊断对传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化中是有用的。

专利名称(译)	用于对结合甘露聚糖的凝集素(MBL)进行免疫化学测定的组分、方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1646916A	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN03808667.0	申请日	2003-04-16
[标]发明人	拉尔斯奥托乌特恩塔尔		
发明人	拉尔斯·奥托·乌特恩塔尔		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/564 C07K14/47		
CPC分类号	Y10S435/81 Y10S435/975 G01N33/68 C07K16/18 Y10S435/96		
代理人(译)	杨青		
优先权	60/373754 2002-04-18 US 10/170317 2002-06-12 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了多种抗体，它们对与甘露聚糖或抗MBL抗体结合、结构上正常或异常的MBL具有不同的结合特性。此外还提供了筛选针对MBL、具有不同结合特性的抗体的方法，以及利用这些抗体测量能够与甘露聚糖结合的MBL或测量样品中正常寡聚化的MBL和异常的低寡聚化的MBL的方法和试剂盒。这些方法和试剂盒在对传染病和自身免疫疾病的易感性增加和病情恶化的诊断中是有用的。

检测抗体 包被抗体	HYB 131-01		HYB 131-01b		HYB 131-10		HYB 131-11		平均值 SD CV
	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	MBL A	MBL B	
HYB 131-01	760		980		900		870		878 91 10%
		0		130		140		70	85 65 76%
HYB 131-01b	820		840		990		870		880 76 9%
		50		90		100		210	113 68 61%
HYB 131-10	790		910		920		1040		915 102 11%
		160		170		190		530	263 178 68%
HYB 131-11	1050		1100		960		790		975 136 14%
		140		80		180		0	100 78 78%
平均值	855	88	958	118	943	153	893	203	
SD	132	75	111	41	40	41	105	235	
CV	15%	86%	12%	35%	4%	27%	12%	116%	