



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104144944 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201380011658.6

C12N 15/02(2006.01)

(22) 申请日 2013.02.28

C12N 15/09(2006.01)

(30) 优先权数据

C12P 21/08(2006.01)

2012-044796 2012.02.29 JP

C12Q 1/02(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53(2006.01)

2014.08.29

G01N 33/543(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/569(2006.01)

PCT/JP2013/055591 2013.02.28

G01N 33/577(2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02013/129634 JA 2013.09.06

CN 101661044 A, 2010.03.03,

WO 2005035756 A1, 2005.04.21,

(73) 专利权人 大塚制药株式会社

地址 日本国东京都

Aharona Glatman-Freedman et al..

(72) 发明人 葛城肃典 富樫将高 织田哲弥

伊藤隆太 川口知惠 西条容子

古贺大辅 松本真 藤原守

小野贤司

Monoclonal antibodies to surface antigens of Mycobacterium tuberculosis and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of Mycobacteria. 《Journal of clinical microbiology》. 1996, 第 34 卷 (第 11 期), 第 2795-2802 页.

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
11021

代理人 张国梁

李永刚等. 分支杆菌脂阿拉伯甘露聚糖抗原研究进展. 《中华结核和呼吸杂志》. 2002, 第 25 卷 (第 4 期), 第 232-235 页.

审查员 王奇

(51) Int. Cl.

C07K 16/12(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

权利要求书2页 说明书47页

序列表14页 附图11页

(54) 发明名称

抗-脂阿拉伯甘露聚糖抗体和使用该抗体对抗酸杆菌感染的免疫测定

序列组成的轻链 CDR1, (e) 由 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR2, 和 (f) 由 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR3。本发明还提供所述抗体的应用。

(57) 摘要

本发明提供一种单克隆抗体,其特异性结合抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖,特别是结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖,所述抗体描述如下:(A) 单克隆抗体,其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含下述 (a)-(c) 所示的重链 CDR1-CDR3,并且所述轻链可变区包含下述 (d)-(f) 所示的轻链 CDR1-CDR3;(a) 由 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR1, (b) 由 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR2, (c) 由 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR3, (d) 由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸

1. 能够结合抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的单克隆抗体, 所述抗体为下述(A)所述的抗体:

(A) 单克隆抗体, 其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含下述(a)-(c)所示的重链CDR1-CDR3, 并且所述轻链包含下述(d)-(f)所示的CDR1-CDR3;

(a) 由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1,

(b) 由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2,

(c) 由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3,

(d) 由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1,

(e) 由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2, 和

(f) 由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体, 其中(A)的单克隆抗体由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1或2所述的单克隆抗体, 其是单价或二价抗体。

4. 权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体在制备用于检测分枝杆菌(*mycobacterium*)的诊断剂中的应用, 其中权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体用于与受试者的生物样品接触; 并且

所述单克隆抗体与抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖之间的结合反应用作测定所述样品中的分枝杆菌的指标。

5. 根据权利要求4所述的应用, 其中抗酸杆菌中的结核杆菌(*tubercle bacillus*)通过使用权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体来特异性检测。

6. 抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖检测试剂, 其包含权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体。

7. 抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖检测试剂盒, 其包含权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体作为抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖检测试剂。

8. 结核病诊断试剂, 其包含权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

9. 结核病诊断试剂盒, 其包含权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体作为结核病检测试剂。

10. 权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体在制备用于测量测试样品中的抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的试剂中的应用, 其中权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体用于与可能含有分枝杆菌的测试样品接触; 并且所述单克隆抗体与抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖之间的结合反应用作测定所述测试样品中的抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的指标。

11. 根据权利要求10所述的应用, 其中抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖被定性, 或被定量。

12. 根据权利要求10或11所述的应用, 其所述权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体用作单克隆抗体来特异性测量抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖中的结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖。

13. 权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体在制备用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的试剂中的应用, 其中所述权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体用于与施用所述抗结核病药物之前和之后的测试样品接触;

所述单克隆抗体与结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖之间的结合反应用作测定在施用所述

抗结核病药物之前和之后所述测试样品中的结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的指标;并且其中当在施用所述抗结核病药物之前在所述测试样品中检测到结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖,并且在施用所述抗结核病药物之后在所述测试样品中没有检测到结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖时,确定所述抗结核病药物具有结核病治疗效果。

14. 权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体在制备用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的试剂中的应用,其中所述权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体用于与施用所述抗结核病药物之前和之后的测试样品接触;

其中所述单克隆抗体与结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖之间的结合反应用作定量在施用所述抗结核病药物之前和之后所述测试样品中的结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的指标以比较施用所述抗结核病药物之后所述测试样品中的结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的量(给药后测量)与施用所述抗结核病药物之前所述测试样品中的结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖的量(给药前测量);并且当给药后测量低于给药前测量时,所述抗结核病药物被确定为具有结核病治疗效果,并且当给药后测量不低于给药前测量时,所述抗结核病药物被确定为不具有结核病治疗效果。

15. 用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

16. 分枝杆菌检测工具,所述检测工具包含由能够通过毛细作用转移测试样品的材料形成的溶液吸收片,所述溶液吸收片包含:

(1) 样品收集部,其用于吸收和收集所述测试样品;

(2) 标记的抗体部,其负载有与抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖特异性反应的标记的权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体;

(3) 确定部,其包括测试结果显示部(a),在所述测试结果显示部(a)上固定有与抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖特异性反应的未标记的权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体;和

(4) 溶液吸收部,其用于吸收已经移动通过所述样品收集部、标记的抗体部和确定部的测试样品的残余溶液。

17. 根据权利要求16所述的分枝杆菌检测工具,其中所述确定部(3)还包括对照显示部(b),在所述对照显示部(b)上固定有与标记的权利要求1-3中任一项所述的单克隆抗体反应的未标记的抗体,所述对照显示部与所述测试结果显示部(a)分开放置。

18. 根据权利要求16或17所述的分枝杆菌检测工具,其用于检测作为抗酸杆菌的结核杆菌,所述工具包含权利要求1-3中任一项所述的(A)的单克隆抗体作为单克隆抗体。

抗-脂阿拉伯甘露聚糖抗体和使用该抗体对抗酸杆菌感染的免疫测定

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合抗酸杆菌(如结核杆菌)的脂阿拉伯甘露聚糖,并且特别涉及单链抗体(scFv)及其多价抗体。

[0002] 本发明还涉及使用所述抗体检测抗酸杆菌的方法,特别涉及用于诊断结核病(tuberculosis)的方法或结核病诊断方法;并且涉及抗酸杆菌检测试剂(例如,结核病诊断试剂)和抗酸杆菌检测试剂盒(例如,结核病诊断试剂盒),其用于上述方法中。

[0003] 本发明还涉及使用所述抗体确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法;以及用于上述方法的用于确定抗结核病药物的治疗效果试剂盒。

背景技术

[0004] 结核病是一种数千年来一直困扰人类的传染病,并且估计十九世纪欧洲1/4的成年人口死于结核病。由于二十世纪生活标准的改善以及抗生素的发现,到二十世纪五十年代,工业化国家已经几乎根除了结核病。然而,作为复发的传染病,结核病仍然是猖獗的。在当下,估计在世界人口中三个人中有一个感染结核杆菌(*tubercle bacillus*)(潜伏的结核病)。据说世界上新发作的结核病患者的总数有九百四十万,并且估计其中有两百万名患者死于该病。目前,大约95%的活动性结核病(active tuberculosis)患者生活在发展中国家,99%的死于结核病的人集中在发展中国家。

[0005] 在二十世纪九十年代,人们再次认识到结核病病例的数量仍然持续上升,成为集中在发展中国家的最主要的传染病,并且已经开始采取全面的措施。在全球协作下已经制定了针对结核病的对策,诸如最主要由世界卫生组织(World Health Organization,WHO)采用的直接观察的短期治疗(Directly Observed Treatment, Short-Course, DOTS),在直接涉及的国家、提供援助的国家和援助组织的协作下建立用于推进措施的“终止结核病伙伴(Stop Tuberculosis partnership)”,以及“世界抗击艾滋、结核病和疟疾基金(The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria)”作为提供经济支持的系统的资助。现有的用作结核病对策的多种技术已经使用了几十年而没有改善。因此,在发展中国家亟需开发有效的新技术。

[0006] 对于结核病的诊断,最重要的是在早期阶段发现结核杆菌感染以开始治疗。特别地,由于处于细菌释放状态的患者具有向周围人群传播传染病的极高危险,因此,需要在不与周围人群有任何接触的隔离的环境中治疗那些患者。作为用于此的检测,存在“结核病的细菌学诊断(Bacteriological diagnosis of tuberculosis)”,并且最普遍使用其中所述的痰液涂片检查。

[0007] 痰液涂片检查是一种在显微镜下直接观察和检查痰液涂片样品的方法(痰液涂片样品直接显微镜检),并且由Robert Koch远在一个世纪之前建立。通过染色结核病的病原体而鉴定临床测试样品中的分枝杆菌(*Mycobacteria*)。现在所用的结核病诊断方法是通过在实践中使用Koch所用的技术而建立的。在发展中国家中,结核杆菌涂片检查是标准的结

核病诊断方法,并且还用作参比来评价新检测方法的表现。

[0008] 已经确定基因扩增方法是具有比痰液涂片检查更高的灵敏性的方法。基因扩增方法是一种使用DNA聚合酶以链式反应方式扩增特定的DNA片段的方法。这一方法的原理是使用要扩增的DNA,与该DNA两端的序列互补的一对DNA引物,和耐热性DNA聚合酶,并且制定重复的温度变化,来扩增要用于检测的DNA。尽管基因扩增方法在灵敏性方面是令人满意的,但是,由于可操作性、设备和成本原因,在发展中国家很难使用这种方法。

[0009] 作为最近的全球趋势,由于多药耐药性结核病的传播,兴趣转向培养物检测和核酸扩增检测的必要性。然而,在现有的多种细菌学诊断方法中,痰液涂片检查(直接的痰液显微镜检)仍然被视为结核病对策策略的中枢核心。特别地,在结核病传播的资源匮乏的发展中国家,痰液涂片检查不仅是有效的诊断方法,而且作为确定治疗效果的方式起着重要的作用。

[0010] 如上文所述,尽管痰液涂片检查是结核病控制基本策略的中枢核心,但是,在许多发展中国家中进行细菌学检验的工人人数完全不足,并且据说这样的工人的技能是有问题的。由于这一检测的有效性取决于实验室技术人员的技能,日常培训和质量控制是必需的,并且引起综合费用的过度增加。另外,发展中国家在改善实验室环境、检测设备、检测技术等所需要的社会基础设施方面存在许多问题。这些因素以复杂的方式纠结在一起,并且结果以不小的程度不利地影响检测的质量。

[0011] 此外,由于痰液涂片检查是用于检测和鉴定抗酸杆菌的检测,而不是用于检测结核杆菌的方法,因此,不可能利用该检测来鉴定结核杆菌。

[0012] 关于在发达国家的结核病治疗,在鉴定结核杆菌后开始使用化学药剂的治疗;而在发展中国家进行的DOTS计划中,在痰液涂片检查中检测到抗酸杆菌而不是鉴定结核杆菌时,开始使用化学药剂的治疗。此处,尽管用于结核杆菌感染和非结核性抗酸杆菌感染的化学药剂是不同的,但是,由于尚未开发用于非结核性抗酸杆菌的高疗效的药物,基本上使用用于结核杆菌的化学药剂进行用于非结核性抗酸杆菌的治疗。因此,患者必须忍受化学药剂的副作用的危险。已经指出的危险的代表性实例包括严重的副作用,注入肝功能下降和视力丧失,以及耐药性非结核性抗酸杆菌的扩散。

[0013] 如上文所述,尽管在当前所知的结核病诊断及其治疗中存在多种问题,但是,Koch于1882年开发的痰液涂片检查方法目前仍然用于结核病的诊断,没有任何大的改善。为了解决发展中国家和最近新兴国家中关于实验室环境所需要的社会基础设施、检测设备、检测技术等的问题的目的,考虑两种措施,即,“建立完全使用电源和设施的允许高通量处理在局限区域采集的样品的高灵敏性和低成本的检测方法”或“建立高灵敏性的、快速的、容易的和低成本的并且无需使用需要电源的设备进行的护理点检测(Point Of Care Testing,POCT)”。

[0014] 如果其实位于非常局限的地区,则电源和设备在发展中国家和最近新兴的国家中也是就位的。另外,在此类地区已经存在进行相对先进的检测的检测中心,并且一些富有的患者可以使用这些服务。通过使用此类检测中心,可以解决诸如实验室环境、检测设备、检测技术和人力资源的问题。在这样的情形中,需要将患者或痰液样品由医学检查现场转移至检测中心。在转运用于核酸扩增检测或培养物检测的痰液样品过程中存在一些主要的限制。为了防止污染和不需要的微生物的生长,在要进行转运的痰液收集后,样品必须立即冷

冻。此外,由于将细菌保持在生长状态对于培养物检测是重要的,所以,当与遗传检测相比较时,需要更多的注意。此外,由于在对样品进行灭菌操作,诸如热处理时,不能进行这两种检测,因此,样品必须以严格可控的状态转运。由于在发展中国家和最近新兴的国家中没有建立可以处理样品转运所涉及的此类限制的系统,因此,建立甚至能够在对其实施灭菌操作的样品中进行检测的测定是重要的。

[0015] 在进行POCT时,允许在短时间期间在临床现场进行测定,而无需使用专门的设施和设备,是重要的。关于POCT通常所用的技术是免疫层析检测(ICT)。通常,认为ICT在灵敏性方面劣于免疫测定方法,如ELISA。因此,如果要用POCT来解决问题,建立能够高灵敏性检测的测定系统是重要的。此外,在使用POCT的情形中,由于对于检测工人难以通过使用检测中心等所用的安全橱等来采取感染预防措施,因此,为减少被样品感染的危险进行灭菌处理是必需的。

[0016] 因此,需要建立能够在灭菌的样品中进行高灵敏性检测的测定,以“建立完全使用电源和设施的允许高通量处理在局限区域采集的样品的高灵敏性和低成本的检测方法”和“建立高灵敏性的、快速的、容易的和低成本的并且无需使用需要电源的设备进行的护理点检测(POCT)”。为了做到这些,靶抗原的选择是重要的。作为对结核杆菌特异性的抗原,报道了蛋白抗原,如Ag85。然而,由于蛋白抗原在体内迅速降解并且被消化,使用其几乎不能获得精细的灵敏性。

[0017] 抗酸杆菌中主要的抗原包括糖脂,其实细胞膜和细胞壁的主要组成成分。由于其在体内是高度稳定的,因此,认为糖脂抗原时一种有希望的靶抗原类型。在这些之中,LAM占细菌细胞成分的15%,并且其为在其数量方面也引起注意的一种抗原。有多份关于产生用于检测活样品中的抗酸杆菌的LAM的目的的PoAb和MoAb的报道(参见非专利文献1-4(NPL 1-4))。与这些报道相应地,使用ELISA来检测痰液或尿液脂阿拉伯甘露聚糖(Lipoarabinomannan,以下,还称为“LAM”)。然而,抗酸杆菌中的LAMs的基本结构除了在甘露糖封端观察到的微小的不同之外几乎是相同的。特别地,在鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)(其为仅次于结核杆菌以第二最大频率引起抗酸杆菌感染的细节)中,甘露糖封端结构与结核杆菌的甘露糖封端结构几乎是相同的(参见,非专利文献5(NPL 5))。因此,需要能够特异性检测抗酸杆菌中的结核杆菌的LAM的单克隆抗体。

[0018] 引用列表

[0019] 非专利文献

[0020] NPL 1:Aharona Glatman-Freedman等,“Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for detection of *Mycobacteria*(结核分枝杆菌表面抗原的单克隆抗体及其在用于检测分枝杆菌的改良的酶联免疫吸附印记测定中的应用),”*Journal of Clinical Microbiology*(临床微生物学杂志),1996年11月,pp.2795-2802

[0021] NPL 2:Lenka M.Pereira Arias-Bouda等,“Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples(开发使用痰液样品用于结核病诊断的抗原检测测定),”*Journal of Clinical Microbiology*(临床微生物学杂志),2000年6月,pp.2278-2283

[0022] NPL 3:Beston Hamasir等,“Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of acid-fast bacillary lipoarabinomannan in urine(通过检测尿液中的抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖快速诊断结核病),”Journal of Microbiological Methods(微生物学方法杂志),45,2001,pp.41-52

[0023] NPL 4:C.Boehme等,“Detection of acid-fast bacillary lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis(使用抗原-捕获ELISA检测疑似结核病坦桑尼亚患者的未处理的尿液中的抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖),”Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,99,2005,pp.893-900

[0024] NPL 5:Lipoarabinomannans:from structure to biosynthesis(脂阿拉伯甘露聚糖:从结构到生物合成).Jerôme Nigou,Martine Gilleron,Germain Puzo,Biochimie 85(2003)153-166

[0025] NPL 6:Winter等,Annu.Rev.Immunol.(年度免疫学综述),12:433,1994

[0026] NPL 7:K.Zuberbühler,Protein Engineering,Design&Selection(蛋白质工程、设计和选择),22,169(2009)

[0027] 发明概述

[0028] 技术问题

[0029] 本发明的目的是提供特异性结合抗酸杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(以下,有时称为“LAM”)的单克隆抗体,特别是其单链抗体(scFv)和多价抗体。

[0030] 本发明的另一个目的是提供一种使用所述抗体来检测抗酸杆菌的方法,或结核病诊断方法,和抗酸杆菌检测试剂(例如,结核病诊断试剂)和使用所述方法的抗酸杆菌检测试剂盒(例如,结核病诊断试剂盒)。

[0031] 本发明的另一个目的是提供一种使用所述抗体确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法,和用于确定抗结核病药物的治疗效果的试剂盒,所述试剂盒用于上述方法。

[0032] 问题的解决方案

[0033] 通过开发产生或选择适当的免疫动物、免疫原和MoAb的技术,本发明人成功地开发了可以区分抗酸杆菌LAM与其他细菌的LAM或同其结构相似的膜抗原并且以与基因扩增检测方法的灵敏性相当的高灵敏性特异性检测抗酸杆菌LAM的抗体和测定方法。此外,本发明人成功地开发了可以区分结核杆菌LAM与非结核性抗酸杆菌的LAM并且特异性检测结核杆菌LAM的抗体。

[0034] 因此,本发明包括下述实施方案:

[0035] (I)特异性结合抗酸杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的单克隆抗体(I-1)

[0036] (I-1)能够结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体,所述抗体如下述(A)-(C)所述:

[0037] (A)单克隆抗体,其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含下述(a)-(c)所示的重链CDR1-CDR3,并且所述轻链包含下述(d)-(f)所示的CDR1-CDR3;

[0038] (a)由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1,

[0039] (b)由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2,

[0040] (c)由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3,

- [0041] (d)由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1，
- [0042] (e)由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2，和
- [0043] (f)由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3；
- [0044] (B)单克隆抗体，其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含下述(g)-(i)所示的重链CDR1-CDR3，并且所述轻链包含下述(j)-(l)所示的CDR1-CDR3；
- [0045] (g)由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链CDR1，
- [0046] (h)由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成的重链CDR2，
- [0047] (i)由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的重链CDR3，
- [0048] (j)由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1，
- [0049] (k)由SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2，和
- [0050] (l)由SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3；和
- [0051] (C)单克隆抗体，其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含下述(m)-(o)所示的重链CDR1-CDR3，并且所述轻链包含下述(p)-(r)所示的CDR1-CDR3；
- [0052] (m)由SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列组成的重链CDR1，
- [0053] (n)由SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列组成的重链CDR2，
- [0054] (o)由SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列组成的重链CDR3，
- [0055] (p)由SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1，
- [0056] (q)由SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2，和
- [0057] (r)由SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。
- [0058] (I-2)根据(I-1)所述的单克隆抗体，其中(A)的单克隆抗体的重链可变区由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成。
- [0059] (I-3)根据(I-1)或(I-2)所述的单克隆抗体，其中(A)的单克隆抗体的轻链可变区由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成。
- [0060] (I-4)根据(I-1)至(I-3)中任一项所述的单克隆抗体，其中(A)的单克隆抗体的接头具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。
- [0061] (I-5)根据(I-1)至(I-4)中任一项所述的单克隆抗体，其中(A)的单克隆抗体由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。
- [0062] (I-6)根据(I-1)至(I-5)中任一项所述的单克隆抗体，其中(A)的单克隆抗体能够特异性结合结核杆菌LAM，特别是人结核杆菌(结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*))的LAM。
- [0063] (I-7)根据(I-1)所述的单克隆抗体，其中(B)的单克隆抗体的重链可变区由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列组成。
- [0064] (I-8)根据(I-1)或(I-7)所述的单克隆抗体，其中(B)的单克隆抗体的轻链可变区由SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列组成。
- [0065] (I-9)根据(I-1)，(I-7)和(I-8)中任一项所述的单克隆抗体，其中(B)的单克隆抗体的接头具有SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列。
- [0066] (I-10)根据(I-1)和(I-7)至(I-9)中任一项所述的单克隆抗体，其中(B)的单克隆抗体由SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列组成。

[0067] (I-11)根据(I-1)所述的单克隆抗体,其中(C)的单克隆抗体的重链可变区由SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列组成。

[0068] (I-12)根据(I-1)或(I-11)所述的单克隆抗体,其中(C)的单克隆抗体的轻链可变区由SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列组成。

[0069] (I-13)根据(I-1),(I-11)和(I-12)任一项中所述的单克隆抗体,其中(C)的单克隆抗体的接头具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

[0070] (I-14)根据(I-1)和(I-11)-(I-13)中任一项所述的单克隆抗体,其中(C)的单克隆抗体由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成。

[0071] (I-15)根据(I-1)和(I-7)-(I-14)所述的单克隆抗体,其中(B)或(C)的单克隆抗体能够特异性结合非结核性抗酸杆菌。

[0072] (I-16)根据(I-1)-(I-15)中任一项所述的单克隆抗体,其中(A)-(C)中任一项的单克隆抗体是单价或二价抗体。

[0073] (II)用于免疫非人动物产生特异性结合抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的单克隆抗体的方法和用于产生所述单克隆抗体的方法

[0074] (II-1)用于免疫非人动物产生特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体的方法,所述方法包括向所述非人动物施用作为免疫原的BCG来诱导针对BCG的体液免疫应答。

[0075] (II-2)根据(II-1)所述的方法,其中所述非人动物是兔或鸡。

[0076] (II-3)根据(II-1)或(II-2)所述的方法,其中所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0077] (II-4)用于产生特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:

[0078] 向所述非人动物施用作为免疫原的BCG来诱导针对BCG的体液免疫应答,并且产生结合抗酸杆菌LAM的抗体;和

[0079] 从所述非人动物收集产生所述抗体的细胞。

[0080] (II-5)用于产生特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:

[0081] 向非人动物施用作为免疫原的BCG来诱导针对BCG的体液免疫应答;

[0082] 制备来自编码所述非人动物的结合抗酸杆菌LAM的抗体的mRNA;

[0083] 使用所述mRNA作为模板制备cDNA;并且

[0084] 使用所述cDNA通过噬菌体展示方法收集特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体。

[0085] (II-6)根据(II-4)或(II-5)所述的方法,其中所述非人动物是兔或鸡。

[0086] (II-7)根据(II-4)-(II-6)中任一项所述的方法,其中所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0087] (II-8)根据(II-4)-(II-7)中任一项所述的方法,其中所述特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体是(I-1)-(I-12)中任一项所述的单克隆抗体。

[0088] (II-9)根据(II-4)-(II-8)中任一项所述的方法,其中特异性结合分枝杆菌LAM、优选结合人结核杆菌(结核分枝杆菌)LAM的单克隆抗体是(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

[0089] (II-10)用于产生特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体的方法,所述方法包括下

述步骤:

[0090] 向非人动物施用LAM与(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体的复合物作为免疫原,以诱导针对所述复合物的体液免疫应答,并且产生结合抗酸杆菌LAM的抗体;和

[0091] 从所述非人动物收集产生所述抗体的细胞。

[0092] (II-11)用于产生特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:

[0093] 向非人动物施用LAM与(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体的复合物作为免疫原,以诱导针对所述复合物的体液免疫应答;

[0094] 制备编码来自所述非人动物的结合抗酸杆菌LAM的抗体的mRNA;

[0095] 使用所述mRNA作为模板制备cDNA;并且

[0096] 使用所述cDNA通过噬菌体展示方法收集特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体。

[0097] (II-12)根据(II-10)或(II-11)所述的方法,其中所述特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体是(I-1)和(I-7)-(I-12)中任一项所述的(B)的单克隆抗体。

[0098] (III)用于检测抗酸杆菌、优选结核杆菌的方法

[0099] (III-1)用于检测抗酸杆菌、优选结核杆菌的方法,所述方法包括下述步骤:

[0100] (1)使(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体与受试者的生物样品接触;并且

[0101] (2)使用所述单克隆抗体与抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的结合反应作为指标测定在所述样品中存在的抗酸杆菌、优选结核杆菌。

[0102] (III-2)根据(III-1)所述的方法,其中用于检测结核杆菌的方法使用(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

[0103] 在上述检测方法中,结核杆菌检测方法可以解释为用于诊断患者中的结核病的方法(结核病诊断方法)。

[0104] (IV)结核病诊断试剂和结核病诊断试剂盒

[0105] (IV-1)结核病诊断试剂,其包含(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

[0106] (IV-2)结核病诊断试剂盒,其包含(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体作为结核病检测试剂。

[0107] (V)用于测量抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的方法

[0108] (V-1)用于测量测试样品中的抗酸杆菌LAM的方法,所述方法包括下述步骤:

[0109] (1)使(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体与可能含有抗酸杆菌的测试样品接触;并且

[0110] (2)利用所述单克隆抗体与抗酸杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定测试样品中的抗酸杆菌LAM。

[0111] (V-2)根据(V-1)所述的方法,其是包括检测抗酸杆菌LAM作为步骤(2)的抗酸杆菌LAM定性方法,或者是包括定量抗酸杆菌LAM作为步骤(2)的抗酸杆菌LAM定量方法。

[0112] (V-3)(V-1)或(V-2)所述的方法,其中所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0113] (V-4)根据(V-3)所述的方法,其中所述单克隆抗体是(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

[0114] (VI)抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)检测试剂或检测试剂盒

- [0115] (VI-1)抗酸杆菌LAM检测试剂,其包含(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体。
- [0116] (VI-2)抗酸杆菌LAM检测试剂,其包含(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。
- [0117] (VI-3)根据(VI-2)所述的试剂,其中所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。
- [0118] (VI-4)抗酸杆菌LAM检测试剂盒,其包含(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体的作为抗酸杆菌LAM检测试剂。
- [0119] (VI-5)根据(VI-4)所述的抗酸杆菌LAM检测试剂盒,其中所述单克隆抗体是(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。
- [0120] (VI-6)根据(VI-5)所述的抗酸杆菌LAM检测试剂盒,其中所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。
- [0121] (vII)使用灭菌样品的测定
- [0122] (VII-1)一种用于确定测试样品中存在或不存在抗酸杆菌感染的方法,所述方法包括下述步骤:
- [0123] (1)通过煮沸、优选通过高压灭菌而将测试样品灭菌;
- [0124] (2)使(I-1)-(I-16)任一项所述的单克隆抗体、优选(I-1)-(I-6)和(I-7)-(I-10)中任一项的(A)或(B)的单克隆抗体与所述灭菌的样品接触;
- [0125] (3)使用单克隆抗体与抗酸杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定所述测试样品中的抗酸杆菌LAM;和
- [0126] (4)当在所述测试样品中检测到抗酸杆菌LAM时,确定所述测试样品感染了抗酸杆菌。
- [0127] (VII-2)根据(VII-1)所述的方法,其中所述单克隆抗体是(I-1)-(I-6)和(I-7)-(I-10)中任一项所述的(A)或(B)的单克隆抗体,并且所述抗酸杆菌是结核杆菌。
- [0128] (VIII)用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法
- [0129] (VIII-1)用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法,所述方法包括下述步骤:
- [0130] (1)使(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体与施用所述抗结核病药物之前和之后的测试样品接触;
- [0131] (2)使用所述单克隆抗体与结核杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定在施用抗结核病药物之前和之后的测试样品中的结核杆菌LAM;和
- [0132] (3)当在施用所述抗结核病药物之前的所述测试样品中检测到结核杆菌LAM,并且在施用所述抗结核病药物之后的所述测试样品中没有检测到结核杆菌LAM时,确定所述抗结核病药物具有结核病治疗效果。
- [0133] (VIII-2)用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法,所述方法包括下述步骤:
- [0134] (1)使(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体与施用所述抗结核病药物之前和之后的测试样品接触;
- [0135] (2)使用所述单克隆抗体与结核杆菌LAM之间的结合反应作为指标定量在施用所述抗结核病药物之前和之后的所述测试样品中的结核杆菌LAM;和

[0136] (3)比较施用所述抗结核病药物之后的所述测试样品中的结核杆菌LAM的量(给药后测量)与施用所述抗结核病药物之前所述测试样品中的结核杆菌LAM的量(给药前测量);并且当给药后测量低于给药前测量时,确定所述抗结核病药物具有结核病治疗效果,并且当给药后测量不低于给药前测量时,确定所述抗结核病药物不具有结核病治疗效果。

[0137] (IX)用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的试剂盒

[0138] (IX)用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的试剂盒,所述试剂盒包含(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体。

[0139] (X)抗酸杆菌(结核杆菌)检测工具

[0140] (X-1)抗酸杆菌、优选结核杆菌检测工具,其包含由能够通过毛细作用转移测试样品的材料形成的溶液吸收片,所述溶液吸收片包含:

[0141] (1)样品收集部,其用于吸收和收集测试样品;

[0142] (2)标记的抗体部,其负载有与抗酸杆菌LAM特异性反应的标记的(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体;

[0143] (3)确定部,其包括测试结果显示部(a),在所述测试结果显示部(a)上固定有与抗酸杆菌LAM特异性反应的未标记的(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体;和

[0144] (4)溶液吸收部,其用于吸收已经移动通过所述样品收集部、标记的抗体部和确定部的所述测试样品的残余的溶液。

[0145] (X-2)(X-1)所述的抗酸杆菌、优选结核杆菌检测工具,其中所述确定部(3)还包括对照显示部(b),在所述对照显示部(b)上固定有与标记的(I-1)-(I-16)中任一项所述的单克隆抗体反应的未标记的抗体,所述对照显示部与所述测试结果显示部(a)分开放置。

[0146] (X-3)(X-1)或(X-2)所述的抗酸杆菌检测工具,其中所述单克隆抗体是(I-1)-(I-6)中任一项所述的(A)的单克隆抗体,并且所述抗酸杆菌是结核杆菌,优选人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0147] 发明的有利效果

[0148] 按照本发明,能够将在受试者的生物样品(痰液、唾液、血液、肺洗出液、胃液、尿液、粪便、皮肤或胰液)中存在的抗酸杆菌与其他细菌区分开来,并且能够对其进行特异性检测。本发明所述的用于检测抗酸杆菌的方法具有与基因扩增检测方法的灵敏性和特异性相当的灵敏性和特异性。由于本发明所述的用于检测抗酸杆菌的方法可以确定活体中抗酸杆菌的量,因此,可以监测针对抗酸杆菌特别是结核病的治疗效果。此外,本发明所述的用于检测抗酸杆菌的方法甚至能够可靠地且准确地检测来自灭菌后至少一周的灭菌的靶标样品的抗酸杆菌。因此,即使在没有用于防止感染的专门的样品转运系统的地区,可以通过通用的转运系统(诸如通过邮寄)转运灭菌的样品。

[0149] 按照本发明的优选的实施方案,在结核病患者生物样品中存在的结核杆菌能够与非结核性抗酸杆菌区分开来,并且对其进行特异性检测。因此,本发明能够以高准确性诊断结核杆菌感染。此外,能够以高准确性确定抗结核病药物在结核病患者中的治疗作用。

[0150] 附图简述

[0151] [图1]在图1中,(A)和(B)均为显示本发明的结核杆菌检测工具(结核杆菌LAM检测工具)的模式示意图(侧视图)。示意图(A)显示其中确定部(3)仅具有测试结果显示部(a)的模式,示意图(B)显示其中确定部(3)具有测试结果显示部(a)和对照显示部(b)二者的模

式。该附图中的附图标记表示下述：10：支持体，21：片材形成的样品收集部(1)，22：片材形成的标记的抗体部(2)，23：片材形成的确定部(3)，24：片材形成的溶液吸收部(4)，(a)：测试结果显示部，(b)：对照显示部，(1)：样品收集部，(2)：标记的抗体部，(3)：确定部，(4)：溶液吸收部，P：箭头显示测试样品的流动方向。(同样适用于图2)。

[0152] [图2]图2显示本发明的结核杆菌检测工具(结核杆菌LAM检测工具)的一种模式(透视图)。

[0153] [图3]图3显示使用其上固定有结核分枝杆菌的LAM(-■-)和鸟分枝杆菌的LAM(-●-)的抗原平板通过ELISA法测量分别用BCG疫苗或杀死的H37Ra细菌细胞皮下免疫的兔的血液中的抗体滴度的测量结果(参比实施例1(2))。(A)显示来自用BCG疫苗免疫的兔的结果，(B)显示来自用杀死的H37Ra细菌细胞免疫的兔的结果。

[0154] [图4]图4显示具有LAM反应性的scFv的氨基酸序列。更具体地，产生在上下行之间的比较，上一行显示由用杀死的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞产生的scFv(Myc-scFv)的氨基酸序列(SEQ ID NO:30)，下一行显示由用BCG疫苗免疫的兔的脾细胞产生的scFv(TB-scFv)的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)，以及重链可变区中CDR1-CDR3区域、接头和轻链可变区中CDR1-CDR3区域的相应的位置之间的比较。应该注意到，关于具有结合在其N端的四个丝氨酸残基的接头序列，N端一侧的氨基酸区域表示VH区，并且C端一侧的区域表示VL区。

[0155] [图5]图5显示TB-scFv LAM反应性评估的结果。使用其上固定有结核分枝杆菌的LAM和鸟分枝杆菌的LAM的平板，使用ELISA评估由用BCG疫苗免疫的兔产生的TB-scFv的LAM反应性。在图5中，“■”表示针对结核分枝杆菌的LAM的反应性，“●”表示针对鸟分枝杆菌的反应性。

[0156] [图6]图6显示抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA的评估结果。使用纯化的结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM在抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA中评估针对LAM的反应性。在图6中，“●”表示在抗酸杆菌LAM检测ELISA中针对结核分枝杆菌的LAM的反应性，“■”表示在抗酸杆菌LAM检测ELISA中针对鸟分枝杆菌的LAM的反应性，“○”表示在结核杆菌LAM检测ELISA中针对结核分枝杆菌的LAM的反应性，并且“□”表示在结核杆菌LAM检测ELISA中针对鸟分枝杆菌的LAM的反应性。

[0157] [图7]图7显示抗体组合的评估结果。抗体组合的评估使用抗酸杆菌临床分离株通过抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA进行。针对每种菌株的反应性用色彩密度表示。在图7中，myco表示抗酸杆菌LAM检测ELISA的结果，TB表示结核杆菌LAM检测ELISA的结果。

[0158] [图8]图8显示抗酸杆菌LAM检测免疫层析测试和结核杆菌LAM检测免疫层析测试的评估结果。使用纯化的结核分枝杆菌LAM(A和B)和鸟分枝杆菌的LAM(C和D)在抗酸杆菌LAM检测免疫层析和结核杆菌LAM检测免疫层析中评估针对LAM的反应性。在每幅图中，“myco”表示抗酸杆菌LAM检测免疫层析测试的结果，“TB”表示结核杆菌LAM检测免疫层析测试的结果。

[0159] [图9]图9显示鸡抗血清针对LAM的抗体滴度(实施例5)。在图9中，“-●-”表示针对纯化的结核杆菌(结核分枝杆菌)的青山B菌株(Aoyama B strain)的LAM的反应性，“-■-”表示针对纯化的鸟分枝杆菌的LAM的反应性。

[0160] [图10]图10显示由鸡scFv文库分离的单链抗体G3-scFv的氨基酸序列,以及重链可变区中CDR1、CDR2和CDR3区、GS接头区和轻链可变区中CDR1、CDR2和CDR3区的位置。

[0161] [图11]图11显示使用二价抗体的LAM检测ELISA的反应性(实施例7)。在图11中,“●-”表示在结核杆菌LAM检测ELISA中针对BCG的反应性,“-■-”表示在抗酸杆菌LAM检测ELISA中针对BCG的反应性。

[0162] [图12]图12显示使用二价抗体的抗酸杆菌LAM检测ELISA的检测灵敏性(实施例8)。在该图中,表格是核酸扩增检测(NAAT)与抗酸杆菌LAM检测ELISA之间的检测灵敏性的比较。

[0163] [图13]图13显示抗酸杆菌LAM检测ELISA关于口腔细菌的交叉反应性检测的结果(实施例9)。在该图中,“Na”意指星形诺卡菌(*N. asteroides*)的细菌细胞,“Nf”意指皮疽诺卡菌(*N. farcinica*)的细菌细胞,“Sg”意指链霉菌属(*Streptomyces*)的细菌细胞,“Ca”意指白色念珠菌(*C. albicans*)的细菌细胞,“Ai”意指放线菌属(*Actinomyces*)的细菌细胞,“Tp”意指少变家村菌(*T. paurometabolum*)的细菌细胞。此处显示的是使用由每种这些培养的细菌细胞和培养的BCG细菌细胞提取的LAM进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA的结果。

[0164] [图14]图14显示在使用二价抗体的LAM检测ELISA中针对抗酸杆菌临床分离株的反应性(实施例10)。在该图中,“A”表示38个结核杆菌临床分离株的测定结果,“B”表示29个非结核性抗酸杆菌菌株(23个鸟分枝杆菌菌株、6个胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*))的测定结果。该图中的A和B中,黑色柱表示抗酸杆菌LAM检测ELISA的测定结果,白色柱表示结核杆菌LAM检测ELISA的测定结果。在B中的29个非结核性抗酸杆菌菌株中,Nos. 1-23是23个鸟分枝杆菌菌株的结果,Nos. 24-29是6个胞内分枝杆菌菌株的结果。

[0165] [图15]图15显示抗酸杆菌LAM检测ELISA与结核杆菌LAM检测ELISA中的反应性的比率(抗酸杆菌LAM检测ELISA的值/结核杆菌LAM检测ELISA的值)。

[0166] [图16]图16显示使用二价抗体在结核杆菌LAM检测ELISA(左图)和在抗酸杆菌LAM检测ELISA(右图)中针对临床痰液样品的反应性(实施例11)。在该图中,“I”表示在涂片检查(直接涂片检查)中为阴性的且在核酸扩增检测中为阴性的样品组的结果,“II”表示在涂片检查中为“不足的(*scanty*)”且在核酸扩增检测中为阴性的样品的结果,“III”表示在涂片检查中为阴性的且在核酸扩增检测中为阳性的样品组的结果,“IV”表示在涂片检查中为“不足的”且在核酸扩增检测中为阳性的样品组的结果,“V”表示在涂片检查中评分1+的样品组的结果,“VI”表示在涂片检查中评分2+的样品组的结果,“VII”表示在涂片检查中评分3+的样品组的结果。应该注意,在涂片检查中评分等于或高于1+的样品在核酸扩增检测中都是阳性的。此外,虚线表示暂定的截点值。

[0167] [图17]图17显示在LAM检测ELISA中检测的细菌细胞数与LAM浓度之间的相关性(实施例11)。在该图中,“I”表示在涂片检查中为阴性的且在核酸扩增检测中为阴性的样品组的结果,“II”表示在涂片检查中为阴性的且在核酸扩增检测中为阳性的样品的结果,“III”表示在涂片检查中为“不足的”且在核酸扩增检测中为阳性的样品组的结果,“IV”表示在涂片检查中评分1+的样品组的结果,“V”表示在涂片检查中评分2+的样品组的结果,“VI”表示在涂片检查中评分3+的样品组的结果。应该注意,在涂片检查中评分等于或高于1+的样品在核酸扩增检测中都是阳性的。此外,每个样品组中的线表示平均LAM浓度值。

[0168] [图18]图18显示抗酸杆菌LAM针对灭菌处理的稳定性。白色柱表示未灭菌的细菌

细胞的测定结果,黑色柱表示已经在100℃煮沸30分钟的细菌细胞的测定结果,灰色柱表示已经在高压蒸汽中灭菌(在121℃高压灭菌15分钟)的细菌细胞的测定结果(实施例12)。

[0169] [图19]图19显示高压蒸汽灭菌处理(高压灭菌)后LAM的储存稳定性。白色柱表示紧接在高压蒸汽灭菌处理后的细菌细胞的测定结果,黑色柱表示在高压蒸汽灭菌处理后已在25℃放置7天的细菌细胞的测定结果(实施例12)。

[0170] 实施方案描述

[0171] (I)特异性结合抗酸杆菌LAM的单克隆抗体

[0172] 结核杆菌属于分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)的分枝杆菌属(Mycobacterium),并且是一种与其他属于分枝杆菌的细菌一起称作抗酸杆菌的细菌组类型。然而,结核杆菌通过其能够在37℃生长而不能在28℃生长的事实和通过其具有耐热性过氧化氢酶的事实而与其他抗酸杆菌(非结核性抗酸杆菌)区分开来。已知四种类型的结核杆菌,即,结核杆菌(结核分枝杆菌,人结核杆菌),牛结核杆菌(牛分枝杆菌(M. bovis),牛结核杆菌,牛杆菌),非洲分枝杆菌(Mycobacterium africanum)(M. africanum)和田鼠结核杆菌(田鼠分枝杆菌(M. microti))。在这些中,人结核杆菌(结核分枝杆菌)作为引起结核病的细菌对人是致病性的,牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌(M. africanum)极少感染人。田鼠分枝杆菌对人没有致病性。此外,BCG通过经由连续长期的传代培养使牛分枝杆菌减毒而获得,并且用作用于结核病预防的疫苗(减毒活细菌疫苗)。

[0173] 作为本发明的主题的单克隆抗体(以下,还称为“MoAb”)是这样的抗体,即,其区分抗酸杆菌与体内存在的其他细菌并且特异性识别抗酸杆菌。更具体地,其是一种区分抗酸杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)与其他细菌的LAM-样抗原,并且特异性结合抗酸杆菌的LAM。此处所述的LAM是一种形成包括结核杆菌的分枝杆菌属(抗酸杆菌)细菌的细胞膜和细胞壁的主要脂聚糖。通常,LAM包括甘露糖基磷脂酰肌醇锚定(MPI)、包括D-甘露聚糖核心和D-阿拉伯聚糖结构域的糖骨架和封端基序。然而,取决于细菌类型,在分子内包括的多个糖残基(例如,甘露糖)的数量、糖链的分支结构、酰基基团的数目和形成酰基基团的脂肪酸类型中存在差别。

[0174] 具体地,本发明的MoAb包括具有下述结构的抗体:其中包括下述(a)-(c)的重链CDR1-CDR3的重链可变区与包括下述(d)-(f)的轻链CDR1-CDR3的轻链可变区通过接头连接在一起。为了便利,这种MoAb还称为“MoAb1”。

[0175] (a)由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1。

[0176] (b)由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2。

[0177] (c)由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3。

[0178] (d)由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1。

[0179] (e)由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2。

[0180] (f)由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

[0181] 此外,具体地,本发明的MoAb包括具有下述结构的抗体:其中包括下述(g)-(i)的重链CDR1-CDR3的重链可变区与包括下述(j)-(l)的轻链CDR1-CDR3的轻链可变区通过接头连接在一起。为了便利,这种MoAb还称为“MoAb2”。

[0182] (g)由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链CDR1。

[0183] (h)由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成的重链CDR2。

[0184] (i)由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的重链CDR3。

[0185] (j)由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1。

[0186] (k)由SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2。

[0187] (l)由SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

[0188] 此外,具体地,本发明的MoAb包括具有下述结构的抗体:其中包括下述(m)-(o)的重链CDR1-CDR3的重链可变区与包括下述(p)-(r)的轻链CDR1-CDR3的轻链可变区通过接头连接在一起。为了便利,这种MoAb还称为“MoAb3”。

[0189] (m)由SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列组成的重链CDR1。

[0190] (n)由SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列组成的重链CDR2。

[0191] (o)由SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列组成的重链CDR3。

[0192] (p)由SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1。

[0193] (q)由SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2。

[0194] (r)由SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

[0195] 此处,“CDR”是还称为互补性决定区的“Complementarity Determining Region (互补性决定区)”的缩写。CDRs是存在于免疫球蛋白可变区中的区域,并且是深入参与抗体与抗原的特异性结合的区域。在这些中,“重链CDR”是指存在于免疫球蛋白的重链的可变区的CDR,“轻链CDR”是指存在于免疫球蛋白的轻链的可变区的CDR。

[0196] 重链可变区是包括重链CDR1-CDR3的区域,轻链可变区是包括轻链CDR1-CDR3的区域。尽管对这些CDR1-CDR3的排列顺序(优选地,在重链可变区和轻链可变区二者中)没有特别的限制,但是,CDR1、CDR2和CDR3按照这一顺序在从N端一侧到C端一侧的方向连续的或通过其他氨基酸序列排列。

[0197] 本发明的MoAb的重链可变区和/或轻链可变区,在上述CDR1-CDR3之外的上述可变区中的区域中可以具有作为其他氨基酸序列的称为构架区(以下,简称为“FR”)的氨基酸序列。FR的氨基酸序列可以是来源于免疫球蛋白的重链可变区或轻链可变区的构架区(FR)的氨基酸序列、其变体或其通过在来源于FR的氨基酸序列的一部分中引入限制性酶识别位点而获得的部分修饰。

[0198] 在免疫球蛋白的重链可变区中,例如,重链可变区的N端与上述CDR1之间的区域定义为“FR1”,CDR1与CDR2之间的区域定义为“FR2”,CDR2与CDR3之间的区域定义为“FR3”,并且CDR3与重链可变区的C端之间的区域定义为“FR4”。类似地,在免疫球蛋白的轻链可变区中,例如,轻链可变区的N端与CDR1之间的区域定义为“FR1”,CDR1与CDR2之间的区域定义为“FR2”,CDR2与CDR3之间的区域定义为“FR3”,并且CDR3与可变区的C端之间的区域定义为“FR4”。

[0199] 这些FRs具有作为连接上述CDR1、CDR2和CDR3(作为抗原识别序列是重要的)中的每一个的接头的功能,并且是有助于形成可变区的三维构象的区域。

[0200] 在本发明的MoAb1中,重链可变区优选地具有SEQ ID NO:7所示的119个氨基酸残基的氨基酸序列,轻链可变区优选地具有SEQ ID NO:8所示的112个氨基酸残基的氨基酸序列。在显示重链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:7中,从N端至第30个氨基酸的区域对应于重链可变区的“FR1”,从第31个氨基酸至第35个氨基酸的氨基酸区域对应于重链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:1),从第36个氨基酸至第49个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR2”,从

第50个氨基酸至第65个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2”(SEQ ID NO:2),从第66个氨基酸至第96个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”,从第97个氨基酸至第106个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:3),并且从第107个氨基酸至第119个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0201] 此外,在显示本发明的MoAb1的轻链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:8中,从N端至第23个氨基酸的区域对应于轻链可变区的“FR1”,从第24个氨基酸至第36个氨基酸的氨基酸区域对应于轻链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:4),从第37个氨基酸至第51个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR2”,从第52个氨基酸至第58个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2”(SEQ ID NO:5),从第59个氨基酸至第89个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”,从第90个氨基酸至第102个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:6),从第103个氨基酸至第112个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0202] 在本发明的MoAb2中,重链可变区优选地具有SEQ ID NO:37所示的130个氨基酸残基的氨基酸序列,轻链可变区优选地具有SEQ ID NO:38所示的116个氨基酸残基的氨基酸序列。在显示重链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:37中,从N端至第35个氨基酸的区域对应于重链可变区的“FR1”,从第36个氨基酸至第40个氨基酸的氨基酸区域对应于重链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:31),从第41个氨基酸至第54个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR2”,从第55个氨基酸至第74个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2”(SEQ ID NO:32),从第75个氨基酸至第106个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”,从第107个氨基酸至第119个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:33),以及从第120个氨基酸至第130个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0203] 此外,在显示本发明的MoAb2的轻链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:38中,从N端至第20个氨基酸的区域对应于轻链可变区的“FR1”,从第21个氨基酸至第28个氨基酸的氨基酸区域对应于轻链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:34),从第29个氨基酸至第44个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR2”,从第45个氨基酸至第51个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2”(SEQ ID NO:35),从第52个氨基酸至第83个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”,从第84个氨基酸至第95个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:36),以及从第96个氨基酸至第116个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0204] 在本发明的MoAb3中,重链可变区优选地具有SEQ ID NO:53所示的121个氨基酸残基的氨基酸序列,轻链可变区优选地具有SEQ ID NO:54所示的110个氨基酸残基的氨基酸序列。在显示重链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:53中,从N端至第30个氨基酸的区域对应于重链可变区的“FR1”,从第31个氨基酸至第35个氨基酸的氨基酸区域对应于重链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:47),从第36个氨基酸至第49个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR2”,从第50个氨基酸至第65个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2”(SEQ ID NO:48),从第66个氨基酸至第96个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”,从第97个氨基酸至第108个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:49),以及从第109个氨基酸至第121个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0205] 此外,在显示本发明的MoAb3的轻链可变区的氨基酸序列的SEQ ID NO:54中,从N端至第23个氨基酸的区域对应于轻链可变区的“FR1”,从第24个氨基酸至第34个氨基酸的氨基酸区域对应于轻链可变区的“CDR1”(SEQ ID NO:50),从第35个氨基酸至第49个氨基酸

的氨基酸区域对应于“FR2”，从第50个氨基酸至第56个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR2” (SEQ ID NO:51)，从第57个氨基酸至第87个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR3”，从第88个氨基酸至第100个氨基酸的氨基酸区域对应于“CDR3”(SEQ ID NO:52)，以及从第101个氨基酸至第110个氨基酸的氨基酸区域对应于“FR4”。

[0206] 只要不损害本发明的MoAb1和MoAb2的有利作用，可以在对应于SEQ ID NOS:7,37和53所示的重链可变区的FR1-FR4的氨基酸序列和对应于SEQ ID NOS:8,38和54所示的轻链可变区的FR1-FR4的氨基酸序列的任一种中引入突变。此处，除非特别另外指明，否则，“本发明的MoAb1、MoAb2和MoAb3的有利作用”意指与抗酸杆菌LAM的结合，优选地意指与抗酸杆菌LAM的特异性结合。具体地，“本发明的MoAb1的有利作用”意指与结核杆菌LAM的结合，优选地意指与结核杆菌LAM的特异性结合。尽管对可以引入的突变的数目也没有特别的限制，但是，可以设定引入的突变的数目，以使与突变前的氨基酸序列的氨基酸序列同一性为85%以上，优选90%以上，更优选95%以上，并且特别优选地98%以上。应该注意，此处所述的引入突变可以包括氨基酸置换、缺失和插入。此外，可以向重链可变区的FR1和/或轻链/重链可变区的FR4中引入限制性酶识别位点。

[0207] 此外，在MoAb1和MoAb3中所示的重链可变区的FR1-FR4与轻链可变区的FR1-FR4均为来源于兔的氨基酸序列，而MoAb2中所示的重链可变区的FR1-FR4与轻链可变区的FR1-FR4均为来源于鸡的氨基酸序列。然而，只要不损害本发明的MoAb的有利效果，可以使用来源于任何动物物种的构架区。所述动物物种的实例可以包括，但不特别限于，人，兔，鸡，马，牛，山羊，绵羊，狗，小鼠，仓鼠和大鼠。氨基酸序列优选地来源于兔、鸡或人，并且更优选地来源于人。应该注意，人源的FR1-FR4的氨基酸序列在本领域中是已知的(Kabat,等,US Department of Health AND human Services(美国卫生与人类服务部),NIH(1991),USA)，并且，例如，记述在NCBI的网站上。

[0208] 本发明的MoAb具有下述结构：其中具有上述构型的重链可变区和轻链可变区通过接头连接在一起。关于此处的“接头”，没有特别的限制，只要本发明的MoAb的有利效果不被损害，并且其实例可以包括具有由通常为约8-30个、优选约8-20个、更优选约8-15个氨基酸残基数目的氨基酸序列形成的接头序列的肽。优选的接头序列的实例包括，但不限于，GS接头序列[(GIy-GIy-GIy-Ser:SEQ ID NO:9)_n,(GIy-GIy-GIy-GIy-Ser:SEQ ID NO:10)_n;n为重复的数目]等。优选地，具有1-3个(n为1-3的整数)所述GS接头序列的重复的序列的肽用作接头。在下文所述的实施例中，具有三个GS接头序列重复的序列(GGGGSGGGSGGGGS:SEQ ID NO:11)的肽(实施例1)和具有另一种序列(GGGGSGGDGSGGGGS:SEQ ID NO:40)的肽(实施例6)用作接头。

[0209] 本发明的MoAb1的优选的模式可以是由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成的单链抗体。此外，MoAb2的优选的模式可以是由SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列组成的单链抗体。此外，MoAb3的优选的模式可以是由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的单链抗体。

[0210] 本发明所述的单克隆抗体包括从非结核性抗酸杆菌区分并特异性识别结核杆菌的抗体。更具体地，其包括区分结核杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)与非结核性抗酸杆菌的LAMs并且特异性结合结核杆菌LAM的抗体。单克隆抗体的实例可以包括上文所述的MoAb1。与非结核杆菌抗酸杆菌区分并且由本发明的MoAb特异性识别的结核杆菌优选是人结核杆菌(结核分枝杆菌)和牛结核杆菌(牛分枝杆菌)，更优选是人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0211] 当通过竞争方法比较针对结核杆菌LAM的反应时,当非结核性抗酸杆菌LAM需要的量是结核杆菌LAM的量的10倍以上时,可以认为是关于结核杆菌LAM的特异性结合。此外,当通过使用固定的抗体和检测抗体的夹心法检测到LAM时,如果针对非结核性抗酸杆菌LAM的反应性已经减小为针对结核杆菌LAM的反应性的1/100,则可以确定本发明的MoAb具有更优先的针对结核杆菌LAM的结合特异性。

[0212] 抗体的亲和力可以容易地使用目前已知的技术来测量,例如,测量¹²⁵I标记的IgG或其片段的饱和结合等温线的技术,或通过Motiisky在Analyzing Data with GraphPad Prism(1999),GraphPad Software Inc.,San Diego,CA中所述的使用未标记的IgG同源置换¹²⁵IgG的非线性回归分析来测量。本领域已知的其他方法可以用于所述测量,并且,所述方法可以是,例如,Scatchard等,Ann.NYAcad.Sci.,51,660(1949)中所述的方法。

[0213] 本发明的MoAb可以按照但不限于噬菌体展示法(G Smith,Science(科学),228,1315(1985))使用结核杆菌作为抗原来产生。此处,结核杆菌的实例可以包括上述结核杆菌(结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis),人结核杆菌),牛结核杆菌(牛分枝杆菌,牛结核杆菌,牛杆菌),非洲分枝杆菌,和田鼠结核杆菌。优选结核杆菌(结核分枝杆菌,人结核杆菌),牛结核杆菌(牛分枝杆菌,牛结核杆菌,牛杆菌)和非洲分枝杆菌,并且更优选牛结核杆菌。如上文所述,通过连续长期传代培养使牛结核杆菌(牛分枝杆菌)减毒获得BCG。

[0214] 使用BCG作为抗原利用噬菌体展示产生本发明的MoAb的方法记述在实施例中。如上文所述,本发明的MoAb的特征是区分抗酸杆菌与其他细菌诸如口腔细菌并且特异性识别抗酸杆菌,更具体地,区分抗酸杆菌LAM与其他细菌的LAM-样抗原,并且特异性结合抗酸杆菌LAM。所述特征是优选区分结核杆菌与非结核性抗酸杆菌并且特异性识别结核杆菌,并且更具体地,区分结核杆菌LAM与非结核性抗酸杆菌LAM并且特异性结合结核杆菌LAM。可以使用BCG作为免疫原产生所述MoAb。

[0215] 应该注意,如上文所述,BCG是由牛结核杆菌(牛分枝杆菌)产生的减毒菌株,并且是指具有抗原性但是没有或减少的对人的毒性的细菌。然而,在本发明中,不仅此,而且使用该细菌产生的BCG疫苗也称为“BCG”。

[0216] 此外,本发明的单克隆抗体包括是上文所述的单链抗体的多价抗体。尽管多价抗体包括二价抗体、三价抗体和四价抗体,但是优选二价抗体。这些多价抗体可以按照目前已知的方法产生(非专利文献7:K.Zuberbuhler,Protein Engineering,Design&Selection(蛋白质工程、设计和选择),22,169(2009))。具体地,多价抗体可以这样产生,例如,在使用二价抗体的情形中,使用恒定区的基因连接单链抗体的重链和轻链的基因,将所连接的基因克隆到能够在哺乳动物细胞中表达的载体中,用包含所述基因的载体转化哺乳动物细胞,并且培养所述细胞。

[0217] (II)用于免疫非人动物以产生特异性结合抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的单克隆抗体的方法和用于产生所述单克隆抗体的方法

[0218] 本发明还涉及用于免疫非人动物以产生特异性结合抗酸杆菌LAM的MoAb的方法,和使用该免疫方法产生MoAb的方法。更具体地,本发明涉及用于免疫非人动物以产生特异性结合结核杆菌LAM的方法,和使用该免疫方法产生MoAb的方法。

[0219] (II-1)免疫方法

[0220] 除了在甘露糖封端结构中观察到的微小的差别之外,抗酸杆菌LAMs的基础结构几

乎是相同的。当产生针对所述抗酸杆菌LAM的抗体时,通常使用人结核杆菌的标准菌株如H37Rv作为免疫原免疫非人动物。通过这样做,可以产生广泛与抗酸杆菌LAM反应的抗体。

[0221] 另一方面,当使用BCG(即,由牛结核杆菌(牛分枝杆菌)产生的减毒菌株)或由其产生的疫苗作为免疫原免疫非人动物时,可以获得高特异性抗体,所述高特异性抗体通过区分结核杆菌LAM与非结核性抗酸杆菌的LAMs而特异性结合结核杆菌LAM,优选人结核杆菌的LAM。作为优选的模式,本发明提供使用BCG作为免疫原(免疫用抗原)免疫非人动物的方法,作为产生特异性结合人结核杆菌的LAM的MoAb的免疫方法。

[0222] 此处,非人动物可以是除人之外的动物,其实例包括哺乳动物,如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猴子、狗、山羊、绵羊、猪、马和牛,以及鸟类,如鸡、鸭、火鸡和鹌鹑。优选哺乳动物(小动物),诸如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠和兔,并且更优选兔。

[0223] 本发明产生特异性结合结核杆菌LAM的MoAb的免疫方法特征在于,使用BCG作为免疫原(免疫用抗原)免疫非人动物;并且用于免疫的技术没有特别的限制,并且可以适当地选择使用本领域已知的方法。

[0224] 其实例包括通过皮下、静脉内或腹内注射BCG以及必要时连同佐剂一起的施用方法。优选皮下施用。所述佐剂的实例可以包括,但不限于,完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂。应该注意,施用BCG优选在第一次施用(第一次免疫)后以约2周的时间间隔进行约2-5次。

[0225] 以所述方式免疫的非人动物的脾细胞可用于作用于产生对结核杆菌LAM、优选人结核杆菌的LAM高度特异性的抗体的细胞。在第一次Bcg免疫后十个单数日至数周从免疫的非人动物取出脾,并且用来产生和获得对结核杆菌LAM、优选人结核杆菌的LAM高度特异性的抗体。

[0226] 具体地,例如,由从免疫的非人动物取出的脾制备的细胞(抗体产生细胞)与骨髓瘤细胞按照目前已知的方法使用聚乙二醇法或电刺激融合,并且在HAT选择培养基中培养所述细胞,从而获得杂交瘤。然后,通过从所述杂交瘤筛选,可以获得产生结合结核杆菌LAM的抗体(使用目前已知的方法,诸如限制性稀释分析)的杂交瘤,对结核杆菌LAM高特异性的MoAb的杂交瘤。通过使用目前已知的方法的培养,杂交瘤以这样的方式克隆,可能制备并获得对需要的结核杆菌的LAM、优选人结核杆菌的LAM高特异性的MoAb。

[0227] 不管是结核杆菌还是非结核性抗酸杆菌,用于制备并获得与宽范围的抗酸杆菌的LAMs选择性结合的MoAb的方法的实例可以包括使用LAM与上述获得的对结核杆菌LAM、优选人结核杆菌的LAM高度特异性的抗体的复合物选择抗体的方法。在这一情形中,用于免疫的技术没有特别限制,并且可以适当地选择使用本领域已知的方法。应该注意,本文所述的“复合物”是指形成LAM与对结核杆菌LAM高特异性的抗体的抗原-抗体复合物,并且所述复合物的产生可以通过使用ELISA进行分析来确定。

[0228] (II-2)用于产生特异性结合抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的MoAb的方法

[0229] 特异性结合抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的MoAb可以使用已经用上述免疫方法免疫的非人动物(免疫的非人动物)来产生。

[0230] 所述方法的实例包括从上述免疫的非人动物中取出脾,由取出的脾制备细胞(抗体生成细胞),按照目前已知的方法使用聚乙二醇或电刺激将所述细胞与骨髓瘤细胞融合以获得杂交瘤,从所获得的杂交瘤中选择产生特异性结合抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的MoAb,并且培养所述杂交瘤。以这种方式,可以制备并获得对抗酸杆菌、优选结核杆菌的

LAM、更优选人结核杆菌的LAM高度特异性的MoAb。此处，培养杂交瘤可以在非人动物(如小鼠或兔)的腹内进行，或者可以使用培养皿等在体外进行。在前一种方法中，即，在非人动物的腹内培养杂交瘤，在培养后收集非人动物的腹水，并且从所述腹水分离并纯化需要的MoAb。在后一种方法中，即，在体外培养杂交瘤，从在培养后获得的培养物液体培养基中分离并纯化需要的MoAb。抗所述抗体的亚类为IgG时，用于纯化单克隆抗体的方法的实例可以包括使用蛋白质A的亲和层析法。

[0231] 此外，特异性结合抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的MoAb也可以使用近年来开发的噬菌体展示法产生(非专利文献6:Winter等,Annu.Rev.Immunol.(免疫学年度综述),12:433,1994)。具体地，从通过上述方法免疫的非人动物取出脾，由该取出的脾制备总RNA或mRNA，使用所述RNA作为模板制备cDNA，并且制备编码抗体的可变区的单链抗体(scFv:可变区的单链片段)的基因。此处，关于抗体的可变区，只要它们中的每一个包括两个区，即，重链可变区(VH区)和轻链可变区(LH区)，在所述VH区与LH区之前可以包括任何肽接头。例如，如(1)所述，肽接头可以是具有由约8-30个氨基酸残基的氨基酸序列形成的接头序列的肽，并且所述接头序列的实例包括GS接头序列。

[0232] 将所述基因克隆到噬菌粒载体中，并且引入到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中，然后将其转染噬菌体以允许scFv抗体在噬菌体荚膜上的表达(制备scFv展示噬菌体文库)。

[0233] 当使用BCG作为非人动物的免疫法中的免疫原(免疫用抗原)时，可以获得并产生特异性结合结核杆菌LAM、优选人结核杆菌的LAM的单克隆抗体(scFv抗体)，这通过下述进行:使用已经用作免疫用抗原的BCG，用表达scFv抗体的scFv展示噬菌体文库进行生物淘选(bio-panning)，并且随后使用具有固相的结核杆菌LAM、优选人结核杆菌的LAM的抗原平板进行生物淘选。

[0234] 此外，作为选择对分枝杆菌的LAM高度特异性的MoAb(单链抗体)的方法，可以获得并产生选择性结合宽泛范围的抗酸杆菌的LAMs的单链抗体(scFv抗体)，而不管其是结核杆菌还是非结核性抗酸杆菌，这通过下述进行:使用其中LAM被具有抗-LAM抗体的载体作为固相捕获的抗体-抗原复合物，用表达scFv抗体的scFv展示噬菌体文库进行生物淘选。

[0235] 应该注意，关于总RNA或mRNA的制备，cDNA的制备，亚克隆到噬菌粒中，引入到大肠杆菌中，用噬菌体感染，和筛选(生物淘选)特异性结合抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM、更优选人结核杆菌的LAM的单克隆抗体(scFv抗体)的方法;可以使用本领域已知的方法，并且更具体地，上述步骤可以使用下述实施例作为参比进行。

[0236] (III)用于检测抗酸杆菌、特别是结核杆菌的方法以及其中使用的抗酸杆菌(特别是结核杆菌)检测工具

[0237] 上文所述的本发明的MoAb可以用于检测抗酸杆菌，优选结核杆菌。换言之，使用本发明的MoAb，可以确定受试者是否携带抗酸杆菌，特别是结核杆菌。也就是说，可以诊断/检测受试者是否感染抗酸杆菌，特别是结核杆菌。

[0238] 本发明的抗酸杆菌、特别是结核杆菌的检测(诊断/测试)可以通过下述(1)和(2)的步骤进行:

[0239] (1)使本发明的MoAb与受试者的生物样品(测试样品)接触的步骤，并且

[0240] (2)使用本发明的MoAb与抗酸杆菌LAM、特别是结核杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定所述测试样品中存在的结核杆菌的步骤。

[0241] 在步骤(1)中与本发明的MoAb接触的受试者的生物样品(测试样品)可以是其中存在抗酸杆菌、特别是结核杆菌的生物样品,并且所述生物样品的实例可以包括痰液、唾液、血液(血清、血浆)、肺洗出液、胃液、尿液、粪便、皮肤和胰液等。所述生物样品优选是痰液、唾液或血液,并且更优选是痰液或唾液。

[0242] 此处,进行测定的受试者优选是人,然而,除人之外的动物,诸如马、牛、山羊、绵羊、狗、鸡、小鼠、仓鼠和大鼠也可以用作受试者。

[0243] 本发明的MoAb与所述生物样品彼此接触的条件没有特别限制,只要是不损害本发明的MoAb与抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM之间的结合反应的条件即可,并且使用免疫反应的一般条件。其方法的实例可以包括使得本发明的MoAb与含有抗酸杆菌、优选结核杆菌的生物样品在通常45℃以下、优选约4-40℃、更优选约25-40℃的温度条件下共存;并且放置或温育该混合物约0.5-40小时,并且优选约1-20小时。此外,对于结合反应中所用的溶剂及其pH没有特别的限制,只要对该反应没有不利作用即可;并且,按照或遵照目前已知的方法,可以使用缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、tris缓冲液、乙酸盐缓冲液等),以使pH为约5-9。

[0244] 步骤(1)可以在本发明的MoAb被固定(固相的)状态下(其中MoAb结合在固体载体上的状态)进行。所述固定包括两种情形:本发明的MoAb以可解离的方式和以不可解离的方式结合在固体载体上。

[0245] 作为用于固定MoAb的固体载体,可以使用本领域常用的多种载体,并且其实例可以包括宽泛范围的制品,诸如由各种材料形成的棒(sticks)、珠子、平板(包括微量平板)、试管等,所述各种材料如玻璃、纤维素粉、Sephadex、琼脂糖、聚苯乙烯、滤纸、羧甲基纤维素、硝基纤维素、离子交换树脂、葡聚糖、塑料膜、塑料管、尼龙、玻璃珠、丝织品、聚胺-甲基乙烯醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物等。

[0246] 对固定方法没有特别的限制,并且取决于不同的固体载体,可以使用物理粘附和化学键合。其实例可以包括:化学反应,如作为共价结合法重氮基法,肽法(酸-酰胺衍生物法、羧基氯化物树脂法、碳二亚胺树脂法、马来酸酐衍生物法、异氰酸酯衍生物法、溴化氰活化的多糖法、碳酸纤维素酯衍生物法和使用缩聚试剂的方法),烷基化法,使用交联剂的载体结合法(例如,使用戊二醛、六亚甲基异氰酸酯(hexamethylene isocyanate)等作为交联剂),和使用Ugi反应的载体结合法;使用诸如离子交换树脂的载体的离子键法;以及使用多孔玻璃如玻璃珠作为载体的物理吸附法。

[0247] 在步骤(2)中,本发明的MoAb可以以使用任何标记物质的标记状态使用。此处,标记物质的实例可以包括:酶,诸如辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶;荧光物质,如荧光异氰酸酯和罗丹明;放射性物质,如³²P和¹²⁵I;着色物质(染色物质),如用胶体金属(如胶体金)和白色胶体或红、蓝等色素染色的胶乳,包括天然胶乳和合成胶乳,诸如聚苯乙烯胶乳;以及化学发光物质。取决于不同的标记物质,用这些标记物质标记MoAb可以按照目前已知的方法进行。

[0248] 步骤(2)是通过本发明的MoAb与抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM之间的结合反应检测/测定所获得的免疫复合物(抗原-抗体结合的物质)的步骤。此处,检测/测定免疫复合物(抗原-抗体结合的物质)和用于其的条件没有特别限制,并且可以使用与常规免疫测定法相同或相符的方法和条件。具体地,取决于用于标记MoAb的标记物质的类型,可以使用通常

用于免疫化学测定的多种方法,诸如例如,放射性同位素免疫测定(RIA法),ELISA法,荧光抗体法,斑块法,印迹法,凝集法,Ouchterlony法等(例如,参见R&D pLanning K.K.于1982年3月5日出版的“Hybridoma method and monoclonal antibody(杂交瘤法和单克隆抗体)”的第30-53页)。从灵敏性和简单性观点来看,步骤(2)优选按照ELISA法进行,更优选按照夹心法进行。

[0249] 例如,当使用固相夹心法时,例如,可以以下述方式测定测试样品中作为抗酸杆菌、优选结核杆菌的测定靶标。

[0250] 首先,将生物样品(例如,痰液、唾液或血液等),作为包含是抗酸杆菌、优选结核杆菌的测定靶标的测试样品,添加到通过固定(通过可解离的固定)引起与测定靶标抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的特异性抗原-抗体反应的抗体而获得的固相抗体中,以允许抗原-抗体反应发生。接着,例如,通过洗涤去除未结合的物质;添加引起与测定靶标抗酸杆菌、优选结核杆菌的特异性抗原-抗体反应的抗体,以允许与上述产生的抗原-抗体结合物质中的测定靶标细菌反应;检测(定性测量)在所述反应中产生的抗原-抗体结合的物质(“抗体-抗酸杆菌-抗体”复合物,并且优选的是“抗体-结核杆菌-抗体”复合物)或者测量其量(定量测量)。对于这一方法,在本发明中,本发明的MoAb,优选MoAb1用作引起与抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的特异性抗原-抗体反应的抗体。

[0251] 抗原-抗体结合的物质(“抗体-抗酸杆菌-抗体”复合物,并且优选的是“抗体-结核杆菌-抗体”复合物)的测定可以通过使用用上述任一种标记物质标记的抗体(标记的抗体)作为用来进行与抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM的抗原-抗体反应的抗体中的一种(本发明的MoAb,优选MoAb1)而容易地进行。为了允许测定更容易地进行,例如,可以使用用着色胶乳颗粒等(如胶体金等)标记的抗体进行的免疫层析法。本领域技术人员应该充分知晓关于这些测定技术及其改进的多种方式的选择,并且本发明可以使用所述技术中的任一种来实现(参见“Clinical Test Method Manual(临床检测方法手册)”Kanehara Shuppan,1995,等)。

[0252] 例如,所述方法可以使用具有下述结构的抗酸杆菌检测工具、优选结核杆菌检测工具(以下,还称为“检测工具”进行)。所述检测工具是用于确定人或动物的体液(包括痰液、唾液和尿液)中存在抗酸杆菌、优选结核杆菌的工具,即,确定抗酸杆菌、优选结核杆菌感染的存在或不存在;并且包括由能够通过毛细作用转运测试样品的材料形成的溶液吸收片。

[0253] 所述溶液吸收片包括:

[0254] (i)样品收集部,其用于吸收和收集测试样品;

[0255] (ii)标记的抗体部,其负载有标记的与所述测试样品中的抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM特异性反应的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb);

[0256] (iii)确定部,其包括下文所述的检测结果显示部,

[0257] (a)所述检测结果显示部在其上固定有未标记的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb),所述抗体与抗酸杆菌、优选结核杆菌的LAM特异性反应;并且

[0258] (iv)溶液吸收部,其用于吸收已经通过所述样品收集部、标记的抗体部和确定部的测试样品的残余的溶液。

[0259] 应该注意,除了(a)检测结果显示部之外,(iii)确定部包括还包括下文所述的与

检测结果显示部分开放置的对照显示部：

[0260] (b)所述对照显示部其上固定有未标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(本发明的MoAb),优选未标记的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1),所述抗体与标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(本发明的MoAb)、优选标记的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1)反应。

[0261] 使用所述检测工具,可以通过存在或不存在(a)检测结果显示部的显色而确定测试样品中抗酸杆菌、优选结核杆菌的存在。

[0262] 本发明的检测工具包括由能够通过毛细作用或层析作用(在本发明中,这些总体上称为“毛细作用”)转运测试样品的材料形成的溶液吸收片。所述溶液吸收片可以是薄片样的片(以下,称为“薄片样片”),并且所述薄片样片可以由单个薄片形成,或可以由堆叠或彼此连接的多层薄片形成。备选地,所述溶液吸收片可以采用能够通过毛细作用吸收并转运液体的各种形式,诸如长的和薄的棒型片等。应该注意,本发明的检测工具还可以包括用于负载所述溶液吸收片的支持体。

[0263] 用于溶液吸收片的材料没有特别限制,只要:所述材料具有允许溶剂(水、血清、尿液和其他生物样品)、检测成分(抗酸杆菌,如结核杆菌)和包括所述检测成分的复合物(例如,标记的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1)和结核杆菌的复合物[标记的抗体-结核杆菌],或所述复合物与未标记的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1)的复合物[标记的抗体-结核杆菌-抗体])渗透的多孔结构或毛细结构;并且,当将含有所述检测成分的样品应用(收集、滴加、添加)到(1)所述样品收集部时,所述材料允许所述测试样品在多孔结构或毛细结构内转运(扩散),甚至在转运过程中当所述测试样品在其中获得抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1)和所述复合物(标记的抗体-结核杆菌)时。其实例可以包括上述固体载体。上述这些中,优选有机多孔体。应该注意,有机多孔体的实例可以包括天然纤维,诸如纤维素,纤维素衍生物,如硝基纤维素,和半合成的纤维素,如乙酸纤维素,由合成的纤维形成的纤维聚集物,如聚乙烯,聚丙烯,尼龙和聚酯,多孔聚丙烯,多孔聚苯乙烯,多孔聚甲基丙烯酸甲酯,多孔尼龙,多孔聚砜,多孔氟树脂,和多孔合成树脂,如在其中引入亲水基团的聚偏二氟乙烯。优选天然纤维,如纤维素,和纤维素衍生物,如硝基纤维素,和半合成的纤维,如乙酸纤维素。

[0264] 对所述溶液吸收片的尺寸没有特别的限制;并且其优选的尺寸是宽(短边的长度)约2-20mm,优选在约4-10mm的范围内,长(长边的长度)为20-200mm,优选在30-150mm的范围内。

[0265] 下文中,将参照附图描述本发明一个实施方案的检测工具。

[0266] 图1中(A)和(B)显示本发明的检测工具的一种模式。图1中(A)和(B)是从本发明的检测工具的侧面观察的示意图。在所述检测工具中,溶液吸收片包括用于收集(加入)测试样品的样品收集部(1),标记的抗体部(2),具有检测结果显示部(a)的确定部(3),和用于吸收已经通过所述样品收集部、标记的抗体部和确定部的测试样品的残余的溶液的溶液吸收部(4)。图1的(B)显示所述检测工具在确定部(3)除检测结果显示部(a)外还包括对照显示部(b)。

[0267] 尽管在图1所示的实例中,溶液吸收片是由多片薄片形成的薄片样片,但是所述薄片样片可以由均一材料的单个薄片形成,或可以由多片相同或不同材料的薄片整体上形成成为单个薄片。应该注意,整个薄片可以由多个薄片形成,或者可以具有部分由多个薄片形成

的部分。

[0268] 在图1所示的实例中,薄片样片粘合在支持体10上。在长边方向上从一个末端边到另一个末端边,所述薄片样片依次包括形成样品收集部(1)的薄片21,形成标记的抗体部(2)的薄片22,形成确定部(3)的薄片23,和形成溶液吸收部(4)的薄片24。此外,如图2所示,其可以具有这样的构型,其中薄片21的末端部分与薄片22的末端部分重合,薄片22的末端部分与薄片23的末端部分重合,薄片23的末端部分与薄片24的末端部分重合。通过具有这样的构型,溶液的移动可以顺利进行。

[0269] 样品收集部(1)是用于吸收和收集作为测试靶标的测试样品的部分(测试样品供给部)。测试样品的实例可以包括作为本发明的测定靶标的受试者的生物样品。

[0270] 如图1和图2所示,样品收集部(1)可以放置在薄片样片的末端部分(始端部)。

[0271] 形成标记的抗体部(2),其与上述样品收集部(1)的末端端接触(图1),或其与与样品收集部(1)部分重合的状态形成(图2)。标记的抗体部(2)以可解离的方式包括与测试样品中包含的抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM特异性反应的抗体。具体地,本发明的检测工具在形成标记的抗体部(2)的薄片22上以可解离的方式包括抗-抗酸杆菌LAM抗体(本发明的MoAb),优选抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1),所述抗体通过抗原-抗体反应特异性结合抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM。此处,本发明的MoAb以被上述标记物质中的任一种标记的状态使用,即,作为标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb),并且MoAb1作为标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)使用。

[0272] 在所述薄片样片中采用的材料中,标记的抗体部(2)优选由亲水性和吸水材料形成,所述材料以可解离的方式包括标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb),优选标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1),所述抗体与已经通过样品收集部(1)的测试样品中的检测成分(抗酸杆菌,优选结核杆菌)反应,形成抗原-抗体复合物(抗酸杆菌LAM与标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)的复合物,优选结核杆菌LAM与标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的复合物)。所述材料具有允许复合物以图1中箭头P所示的方向移动的特性,所述移动与测试样品向确定部(3)的移动相关联。

[0273] 应该注意,对于使标记的抗体部(2)以可解离的方式负载标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的方法没有限制;并且其实例包括将标记的抗体部(2)用包含标记的本发明的MoAb、优选标记的本发明的MoAb1的溶液浸渍的方法,和将所述溶液黏附到标记的抗体部(2)上的方法。此外,为了允许测试样品中所包含的检测成分(抗酸杆菌,优选结核杆菌)与标记的抗体部(2)完全结合的目的,优选地使标记的抗体部(2)负载过量的标记的本发明的MoAb,优选标记的本发明的MoAb1。

[0274] 确定部(3)是用于将从样品收集部(1)经过标记的抗体部(2)移动的测试样品进一步转运到溶液吸收部(4)的部分。确定部(3)在其转运区域包括用于捕获已转运的测试样品中包含的特定成分(标记的本发明的MoAb)的复合物,优选结核杆菌LAM与标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的复合物)并且显示捕获的结果的部分(检测结果显示部(a))。由于可以基于检测结果显示部(a)上显示的结果来确定测试样品中分枝杆菌的存在或不存在,因此,包括显示部(a)的区域称为“确定部(3)”。

[0275] 除了检测结果显示部(a)之外,本发明的检测工具可以在确定部(3)包括对照显示

部(b)。应该注意,检测结果显示部(a)和对照显示部(b)之间以一定的间隔设置依次排列。

[0276] 以过量的量固定在检测结果显示部(a)上的是未标记的与抗酸杆菌LAM特异性反应的抗体(未标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体),优选未标记的与抗酸杆菌LAM特异性反应的抗体(未标记的抗-结核杆菌LAM抗体)。因此,通过在标记的抗体部(2)的抗原-抗体反应已经与标记的本发明的MoAb结合的抗酸杆菌,优选已经与标记的本发明的MoAb1结合的结核杆菌,在检测结果显示部(a)以与本发明的MoAb、优选标记的本发明的MoAb1的复合物的形态被捕获;并且归因于所述标记物质的显色以依赖于所捕获的量的强度显现。

[0277] 应该注意,特异性结合抗酸杆菌的LAM的本发明的MoAb(本发明的MoAb)可以类似地用作形成未标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体的抗-抗酸杆菌LAM抗体。此外,特异性结合结核杆菌LAM的本发明的MoAb1(本发明的MoAb1)可以类似地用作形成未标记的抗-结核杆菌LAM抗体的抗-结核杆菌LAM抗体。

[0278] 以确定的量固定在对照显示部(b)上的是未标记的与标记的抗体部(2)中包含的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)反应的未标记的抗体(第二抗体)。对照显示部(b)可以在测试样品移动方向(图1中p的方向)上以检测结果显示部(a)-对照显示部(b)的顺序与检测结果显示部(a)间隔放置。以过量的量固定在对照显示部(b)上的是未标记的与已经由前面的薄片移动过来的测试样品中所含有的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)反应的抗体(第二抗体)。

[0279] 因此,在对照显示部(b),捕获已经从标记的抗体部(2)解离并且释放到测试样品中的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb),优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1),并且归因于标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的标记物质的显色以依赖于固定在对照显示部(b)上的第二抗体的量的强度显现。

[0280] 此处,如果其是与标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)结合的抗体,则所述未标记的抗体(第二抗体)是足量的。尽管所述未标记的抗体(第二抗体)没有限制,例如,可以使用抗酸杆菌的LAM结合蛋白、阴离子颗粒等。

[0281] 使用本发明的检测工具的结核杆菌测定使用在确定部(3)的检测结果显示部(a)的显色的存在或不存在作为指标进行。这时,如果需要,可以使用在确定部(3)的对照显示部(b)的显色的存在或不存在进行确定。甚至当在检测结果显示部(a)的显色不可识别时,如果显色在对照显示部(b)能够被识别,则测定已经适当地进行,并且测定结果可以确定为阴性的。然而,当显色在对照显示部(b)不可识别时,这表示测定没有适当地进行,并且检测结果显示部(a)的结果不能用来确定为阴性的。

[0282] 在薄片样片所采用的材料中,确定部(3)优选由亲水性和吸水材料形成,所述材料能够通过毛细作用使包含多种成分的测试样品移动至溶液吸收部(4),并且具有将未标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)稳定地固定在检测结果显示部(a)上、或将未标记的抗体(第二抗体)稳定地固定在对照显示部(b)上的特性。

[0283] 溶液吸收部(4)是用于吸收已经沿箭头P的方向从样品收集部(1)经过标记的抗体

部(2)和确定部(3)(检测结果显示部(a),或检测结果显示部(a)和对照显示部(b))移动的测试样品的残余的溶液的部分。因此,在所述薄片样片所采用的材料中,溶液吸收部(4)优选地由亲水性和吸附性材料形成,并且更优选的由具有不排斥吸收的溶液的特性的材料或弹性材料形成。具体地,所述材料的实例包括无纺布物,如滤纸和亲水性纤维,并且,还可以使用滤纸和无纺布物的层压体。

[0284] 尽管本发明的检测工具基本上包括具有上述构型的薄片样片,但是,除薄片样片之外,其还可以包括支持体10。对支持体10没有特别的限制,只要其具有能够保持所述薄片样片的构型和材料即可。例如,其可以是层压在要用的薄片样片的后表面(底层表面)上的薄片样支持体,或用于支撑(housing)所述薄片样片的框架型支持体。

[0285] 薄片样支持体的实例可以包括由各种塑料(塑料薄片)、硬纸制成的薄片,由金属(包括合金)(如铝)制成的薄片,例如,通过将多个不同类的或相同质量的纸裱糊在一起(粘附在一起)得到的多层纸,通过将塑料薄片和纸裱糊在一起(粘附在一起)得到的制品,通过将纸和金属薄片裱糊在一起(粘附在一起)得到的制品,通过将塑料薄片、纸和金属薄片裱糊在一起(粘附在一起)得到的制品,和在其上提供有涂层(如防水涂层)的纸,等等。优选地,支持体具有防水功能。

[0286] 框架型支持体优选是湿气不能透过的材料,诸如聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、丙烯酸聚合物等;但是,如果在其上进行防水处理,也可以使用由纸制成的制品。所述框架优选在其上至少形成与在框架中支撑的薄片样片的样品收集部(1)相对应的“溶液收集窗”,与确定部(3)的检测结果显示部(a)相对应的“确定显示窗”和与对照显示部(b)相对应的“对照显示窗”。应该注意,“确定显示窗”和“对照显示窗”可以单独形成,或者可以形成一个窗口。

[0287] 为了使用包括上述薄片样片的本发明的检测工具,首先,将样品收集部(1)充满测试样品。通过这样做,样品收集部(1)吸收的测试样品通过毛细作用渗透所述薄片样片,并且首先到达以可解离的方式负载标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的标记的抗体部(2)。在此处,通过抗原-抗体反应,测试样品中的检测成分(结核杆菌)与所述标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)特异性结合。接着,测试样品到达确定部(3)的检测结果显示部(a),同时伴随着“抗酸杆菌与标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)的复合物”(“结核杆菌与标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)的复合物”)和“未与结核杆菌结合的过量的标记的结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)”(“未与结核杆菌结合的过量的标记的结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)”)。由于未标记的特异性结合抗酸杆菌的抗-抗酸杆菌LAM抗体(本发明的MoAb),优选未标记的特异性结合结核杆菌的抗-结核杆菌LAM抗体(本发明的MoAb1)稳定地固定在检测结果显示部(a)上,测试样品中“已与抗酸杆菌特异性结合的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)”、优选“已与结核杆菌特异性结合的标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)”被捕获并且积聚。结果,基于在所捕获的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)中、优选在所捕获的标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)中的标记物质,检测结果显示部(a)显现出强度依赖于测试样品中所含有的抗酸杆菌、优选结核杆菌的量的显色。利用此,可以检测测试样品中存在或不存在抗酸杆菌、

优选结核杆菌,及其数量比率。

[0288] 然后,测试样品到达确定部(3)的对照显示部(b),同时伴随着“过量的未与抗酸杆菌结合的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)”,优选“过量的未与结核杆菌结合的标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)”。由于与标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)结合的第二抗体(未标记的抗体),优选与标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)结合的第二抗体(未标记的抗体)以特定的量稳定地固定在对照显示部(b)上,因此,捕获并积聚过量包含在测试样品中的标记的抗-抗酸杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb)、优选标记的抗-结核杆菌LAM抗体(标记的本发明的MoAb1)。结果,对照显示部(b)显现出强度依赖于固定在对照显示部(b)的第二抗体的量(或已与第二抗体结合的标记的抗体的量)的显色。

[0289] 除了上述这些之外,在不背离本发明的范围的前提下,可以对本发明的检测工具进行各种改进。对本发明的检测工具,可以附上记载怎样使用所述检测工具和确定方法的说明文件,由此本发明提供确定试剂盒,其是包括所述说明文件和所述检测工具的套件(set)。

[0290] (IV)结核菌诊断试剂或诊断试剂盒

[0291] 上述抗酸杆菌检测方法和抗酸杆菌检测工具用于检测受试者的生物样品中抗酸杆菌的存在。具体地,当本发明的MoAb1用作单克隆抗体时,可以举例结核杆菌作为抗酸杆菌的优选的实例。因此,上述抗酸杆菌检测方法和抗酸杆菌检测工具用于诊断抗酸杆菌、特别是结核杆菌感染的存在或不存在。

[0292] 因此,上述本发明的MoAb、优选MoAb1可用作结核菌诊断试剂,并且本发明提供包含本发明的MoAb、优选MoAb1的结核菌诊断试剂。本发明的MoAb可以可解离地或不可解离地固定在固体载体上,或者可以用任意标记物质标记。

[0293] 此外,当进行本发明的用于检测抗酸杆菌、特别是结核杆菌的方法时,所述方法可以通过使用结核菌诊断试剂盒容易地进行,所述试剂盒包括本发明的MoAb、优选MoAb1作为结核杆菌检测试剂。因此,本发明提供用于进行结核菌检测方法的结核菌诊断试剂盒。所述结核菌诊断试剂盒是利用抗原-抗体反应检测测定测试样品中存在的结核杆菌的试剂盒。当所述试剂盒包含本发明的MoAb、优选MoAb1时,其是充分的;并且所述试剂盒可以包括上述结核杆菌检测工具,与本发明的MoAb、优选MoAb1反应的第二抗体,抗体检测试剂等。此外,为了进行测定的便利,所述诊断试剂盒还可以包括适当的反应溶液、稀释溶液、润洗溶液、反应终止溶液、标记活性测量试剂等。

[0294] (V)用于抗酸杆菌LAM(特别是结核杆菌LAM)的测定,和抗酸杆菌LAM(特别是结核杆菌LAM)检测试剂或检测试剂盒

[0295] 本发明的MoAb是特异性识别并且结合抗酸杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的抗体。因此,上述本发明的抗酸杆菌检测方法也可以用于测定抗酸杆菌LAM。

[0296] 具体地,本发明的用于抗酸杆菌LAM的测定可以通过下述步骤进行:

[0297] (1)使本发明的MoAb与可能包含抗酸杆菌的测试样品接触的步骤;和

[0298] (2)使用在本发明的MoAb与抗酸杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定在测试样品中存在的抗酸杆菌LAM的步骤。

[0299] 步骤(1)和(2)是分别对应于上述“(III)用于检测抗酸杆菌、特别是结核杆菌的方

法以及其中使用的抗酸杆菌(特别是结核杆菌)检测工具”中描述的步骤(1)和(2)的步骤,并且上文在(III)中提供的描述在此也可以用作参考。另外,所述用于抗酸杆菌LAM的测定可以使用上述(III)中所述的抗酸杆菌检测工具类似地进行(应该注意,在该情形中,可以将其改述为“抗酸杆菌LAM检测工具”)。

[0300] 应该注意,关于本发明的MoAb,由于MoAb1是特异性识别并结合结核杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)的抗体,上述本发明的抗酸杆菌检测方法也可以用作结核杆菌检测方法用于测定结核杆菌LAM。

[0301] 此处,用于抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的测定包括检测抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的定性测量和测量抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的量的定量测量。定量测量的实例可以包括,但不限于,预先由本发明的MoAb与已知量的抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM反应产生标准曲线并且由所述标准曲线计算在测试样品中包含的抗酸杆菌LAM、优选结核杆菌LAM的未确定的量的方法。

[0302] 在这样的测定中,本发明的MoAb可用作抗酸杆菌LAM检测试剂,并且本发明提供抗酸杆菌LAM检测试剂,其包含本发明的MoAb作为抗酸杆菌LAM检测试剂。具体地,本发明的MoAb1可用作结核杆菌LAM检测试剂,并且本发明提供结核杆菌LAM检测试剂,其包含本发明的MoAb1作为结核杆菌LAM检测试剂。本发明的这些MoAbs可以可解离地或不可解离地固定在任意的固体载体上,或者可以用任意标记物质标记。

[0303] 当要进行本发明的抗酸杆菌LAM测定时,所述测定可以通过使用包含本发明的MoAb作为抗酸杆菌LAM检测试剂的抗酸杆菌LAM检测试剂盒容易地进行。此外,当要进行本发明的结核杆菌LAM测定时,所述测定可以通过使用结核杆菌LAM检测试剂盒容易地进行,所述试剂盒包含本发明的MoAbs中的MoAb1作为结核杆菌LAM检测试剂。

[0304] 因此,本发明提供用于进行抗酸杆菌LAM测定的抗酸杆菌LAM检测试剂盒,特别是用于进行结核杆菌LAM测定的结核杆菌LAM检测试剂盒。所述抗酸杆菌LAM检测试剂盒,特别是所述结核杆菌LAM检测试剂盒,是利用抗原-抗体反应检测测定测试样品中存在的抗酸杆菌、特别是结核杆菌的LAM的试剂的试剂盒。所述抗酸杆菌LAM检测试剂盒包括本发明的MoAb。当所述结核杆菌LAM检测试剂盒包括本发明的MoAb1时,其是充分的,并且所述试剂盒可以包括抗酸杆菌LAM检测工具(或结核杆菌LAM检测工具)、与本发明的MoAb(或MoAb1)反应的第二抗体、抗体检测试剂等。此外,为了进行测定的便利,诊断试剂盒还可以包括适当的反应溶液、稀释溶液、洗涤溶液、反应终止溶液、标记活性测量试剂等。

[0305] (VI)灭菌的样品的测定

[0306] 上述(III)中所述的本发明的用于检测抗酸杆菌或结核杆菌的方法可以作为无生物公害的测定应用。具体地,本发明的无生物公害的测定可以通过下述步骤进行:

[0307] (1)将样品样品煮沸灭菌,优选高压蒸汽灭菌,

[0308] (2)使本发明的MoAb、优选MoAb1与所述灭菌的测试样品接触的步骤;

[0309] (3)使用本发明的MoAb、优选MoAb1与结核杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定所述测试样品中的结核杆菌的步骤;和

[0310] (4)当在所述测试样品中检测到结核杆菌LAM时,确定所述测试样品感染了结核杆菌的步骤。

[0311] (VII)确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法

[0312] 上述(III)所述的本发明用于检测抗酸杆菌、特别是结核杆菌的方法可以用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果。

[0313] 具体地,本发明用于确定抗结核病药物的结核病治疗效果的方法可以通过下述步骤进行:

[0314] (1)使本发明的MoAb、优选MoAb1与施用所述抗结核病药物之前和之后的测试样品接触的步骤;

[0315] (2)使用在本发明的MoAb、优选MoAb1与结核杆菌LAM之间的结合反应作为指标测定在施用所述抗结核病药物之前和之后所述测试样品中的结核杆菌LAM的步骤;和

[0316] (3)当在施用所述抗结核病药物之前的所述测试样品中检测到结核杆菌LAM,并且在施用所述抗结核病药物之后的所述测试样品中没有检测到结核杆菌LAM时,确定所述抗结核病药物具有结核病治疗效果。

[0317] 这些步骤(1)和(2)分别对应于在上述“(III)用于检测分枝杆菌、特别是结核杆菌的方法”中记载的步骤(1)和(2),并且,除了测试样品是具有感染的结核病(感染有结核杆菌)的结核病患者的测试样品,并且进行所述方法的测试样品是在施用抗结核病药物之前的测试样品(在结核病治疗前)和在施用所述抗结核病药物之后的测试样品(在结核病治疗后)之外,在上述(III)中所述的方法可以相似地进行。另外,在(2)中进行的结核杆菌LAM的测定可以使用在上述“(III)用于检测抗酸杆菌、特别是结核杆菌的方法”中记载的结核杆菌检测工具类似地进行(应该注意,在这一情形中,可以将其改述为“结核杆菌LAM检测工具”)。

[0318] 作为此处所述的抗结核病药物,可以使用本领域目前已知的那些,诸如利福平(rifampicin),异烟肼(isoniazid)(异烟酸肼),吡嗪酰胺(pyrazinamide),链霉素(streptomycin)及其盐,以及乙胺丁醇(ethambutol)及其盐。然而,所述抗结核病药物不限于此,并且包括展现出针对结核杆菌的杀菌作用(抗结核病活性)的核准的或未核准的药物。

[0319] 作为上述步骤(2)的结果,当在施用抗结核病药物之前的测试样品中检测到结核杆菌LAM(换言之,检测到结核杆菌),并且当在施用抗结核病药物之后的测试样品中没有检测到结核杆菌LAM(结核杆菌)时,由于所述抗结核病药物对主题结核病患者具有结核病治疗效果,因此,可以确定所述抗结核病药物的效用。

[0320] 另一方面,作为上述步骤(2)的结果,当在施用抗结核病药物之前的测试样品中检测到结核杆菌LAM(换言之,检测到结核杆菌),并且当在施用抗结核病药物之后的测试样品中也检测到结核杆菌LAM(结核杆菌)时,可以比较在施用所述抗结核病药物之前和之后检测到的结核杆菌的量。此处,当观察到施用所述抗结核病药物之前和之后的结核杆菌的量的减少时,提示所述抗结核病药物对主题结核病患者可能有结核病治疗效果,并且可以对医学工作者提供继续使用所述抗结核病药物的治疗选择。另一方面,当没有观察到施用所述抗结核病药物之前和之后的结核杆菌的量减少时,这表明所述抗结核病药物对主题结核病患者没有结核病治疗效果。因此,可以向医学工作者提供停止使用所述抗结核病药物并且转用另一种疗法的治疗选择。

[0321] 在上述方法中,本发明的MoAb、特别是MoAb1可用作抗结核病药物的结核病治疗效果确定试剂,并且本发明提供结核病治疗效果确定试剂,其包含本发明的MoAb、特别是

MoAb1作为结核病治疗效果确定试剂。本发明的MoAb、特别是MoAb1可以可解离地或不可解离地固定在任何固体载体上,或者可以用任意标记物质标记。

[0322] 此外,当进行上述本发明的确定方法时,所述方法可以通过使用结核病治疗效果确定试剂盒容易地进行,所述结核病治疗效果确定试剂盒包括本发明的MoAb、优选MoAb1作为结核病治疗效果确定试剂。因此,本发明提供用于进行抗结核病药物的结核病治疗效果确定方法的结核病治疗效果确定试剂盒。所述结核病治疗效果确定试剂盒是用于通过使用抗原-抗体反应检测测定在治疗之前和之后的测试样品中存在的结核杆菌LAM而确定抗结核病药剂对结核病患者的治疗效果的试剂的试剂盒。当所述试剂盒包括本发明的MoAb、优选MoAb1时,其是充分的;并且所述试剂盒可以包括上述结核杆菌LAM检测工具,与本发明的MoAb反应的第二抗体,抗体检测试剂等。此外,为了进行所述测定的便利,诊断试剂盒还可以包括适当的反应溶液、稀释溶液、润洗溶液、反应终止溶液、标记活性测量试剂等。

[0323] 用于活动性结核病的治疗通常通过施用四种以上类型的治疗剂持续六个月而进行。当怀疑患有结核病感染时,首先,进行使用Ziehl-Neelsen染色或荧光染色的涂片检测。如果在1mL痰液样本中存在数目为10,000个以上的细菌,则认为其是“涂片阳性的”。作为传染源。痰液-涂片-阳性患者在临床上和对于公众健康是特别重要的。因此,涂片阳性患者需要在结核病病房住院治疗。转为门诊治疗的一个指标是连续三天具有阴性的涂片检查结果。本发明的结核杆菌LAM检测方法可以定量生物样品(如痰液、唾液和血液)中的LAM浓度。因此,通过测定诸如痰液、唾液和血液的生物样品中的LAM,可以监测治疗剂的效用,并且本发明还适用于确定对于细菌释放状态是感染阴性的。

实施例

[0324] 本发明及其效果在下文参照实施例进行描述。然而,本发明的范围不限于这些实施例。

[0325] 实施例1-4

[0326] 1.材料准备

[0327] (1-1)制备寡聚-LAM和制备免疫原

[0328] 将人结核杆菌结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*)的LAM(3mg)(来源于青山B菌株(strain Aoyama B),Nacalai Tesque)针对50mM乙酸盐缓冲液(pH 4.5)透析,并且调节至浓度为1mg/mL。随后,向其中加入150 μ L 200mM高碘酸水溶液,并且将混合物在4 $^{\circ}$ C避光搅拌7分钟。搅拌后,向其中加入35 μ L乙二醇,并且将混合物使用小柱PD-10(由GE Company制备)进行凝胶过滤(0.1M碳酸氢钠,pH 8.3),并且分成各个1mL的部分。通过苯酚-硫酸法检测分成的样品的糖;并且将检测到糖的级分针对纯水透析,然后冷冻干燥。

[0329] 将冷冻干燥的寡聚-LAM(3mg)溶解在0.5mL纯水中。向其中加入12 μ L溶解在乙腈中的100mg/mL 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐并将混合物搅拌约1分钟后,向其中加入12 μ L 0.2M三乙胺,并且将混合物搅拌2分钟。然后,向其中加入0.53mL溶解在0.5M碳酸氢钠缓冲液(pH 8.5)中的0.6M脂肪酸二酰肼(adipic acid dihydrazide),并将混合物在4 $^{\circ}$ C搅拌10小时,然后针对纯水透析约1小时。

[0330] 向透析后得到的溶液中,加入300 μ g钥孔藤血蓝蛋白(KLH)、30 μ L 200mM磷酸盐缓冲液(pH 5.0)和45 μ L 100mM N-羟基琥珀酰亚胺钠(N-hydroxysulfosuccinimide)。然

后,再向其中加入65 μ L 1M二氯乙烷,并且将混合物在4 $^{\circ}$ C搅拌3小时以上。最后,将得到的混合物针对磷酸盐缓冲液透析,以获得寡聚-LAM-KLH用于免疫原。将所述寡聚-LAM-KLH与佐剂(完全或不完全弗氏佐剂,由Difco制备)以1:1的比率(寡聚-LAM-KLH:佐剂(重量比))混合,并且用作免疫原。

[0331] (1-2)制备BCG疫苗和免疫原

[0332] 作为BCG疫苗,使用由日本BCG实验室制备的冷冻干燥的BCG疫苗(授权号:20300AMZ00767000)。对于免疫,使用100mg(湿重)冷冻干燥的BCG疫苗与1mI生理盐水的混合物。

[0333] (1-3)制备杀灭的H37Ra细菌细胞和免疫原

[0334] 作为杀灭的H37Ra细菌细胞,使用Difco制备的结核分枝杆菌H37Ra(冷冻干燥的产品)。对于免疫,使用100mg(湿重)冷冻干燥的杀灭的H37Ra细菌细胞与1mI生理盐水的混合物。

[0335] (1-4)制备用于产生scFv片段的引物

[0336] 表1显示制备单链抗体(scFvs)所用的引物的名称、碱基序列和用途。合成下述引物:四条有义引物和一条反义引物用作VH区扩增的引物,四条有义引物和四条反义引物用作VL区扩增的引物,一条有义引物和一条反义引物用作连接重链可变区片段和轻链可变区片段的接头(GS接头)的扩增的引物,两条引物用于限制性酶(SfiI,NotI)识别区的扩增。序列表的SEQ ID NOs:13-29所示的氨基酸序列对应于表1从上到下的顺序列出的引物的氨基酸序列。

[0337]

名称	序列	用途	SEQ ID NO.
RabVH-F1	5'-gccggcccccagtcggtaggagtgccRgg-3'	VH 区有义引物	SEQ ID NO: 13
RabVH-F2	5'-gccggcccccagtcggtaggagtgccgag-3'	VH 区有义引物	SEQ ID NO: 14
RabVH-F3	5'-gccggcccccagtcgYtggaggagtcggg-3'	VH 区有义引物	SEQ ID NO: 15
RabVH-F4	5'-gcccggcccccagSagcagctgRtggagtccgg-3'	VH 区有义引物	SEQ ID NO: 16
RabVH-R	5'-cctccaccctgaggatgaRgagaYggtgaccagggtgcc-3'	VH 区反义引物	SEQ ID NO: 17
RabVk-F1	5'-gcccagtcggagctcgtMtgaccagactcca-3'	VL 区有义引物	SEQ ID NO: 18
RabVk-F2	5'-gcccagtcggagctcgtMtgaccagactcca-3'	VL 区有义引物	SEQ ID NO: 19
RabVk-F3	5'-gcccagtcggagctcgtgatgaccagactgae-3'	VL 区有义引物	SEQ ID NO: 20
RabVk-R1	5'-acctgcccggctfaggatctccagctcgggtccc-3'	VL 区反义引物	SEQ ID NO: 21
RabVk-R2	5'-acctgcccggcttttgattccacattggtgcc-3'	VL 区反义引物	SEQ ID NO: 22
RabVk-R3	5'-acctgcccggcttttgacSaccacctcgggtccc-3'	VL 区反义引物	SEQ ID NO: 23
RabVλ-F	5'-gcccagtcggagctcgtcgcgactcagtcgcccfc-3'	VL 区有义引物	SEQ ID NO: 24
RabVλ-R	5'-acctgcccggccctgtgacggctcagctgggtccc-3'	VL 区反义引物	SEQ ID NO: 25
RS1	5'-tcatctcaggtggaggcgggttcaggcggagggtggctctggcgggtggcggatcggagctcg-3'	GS 接头有义引物	SEQ ID NO: 26
RS2	5'-cgagctccgatccgcccaccgcccagagccacctccgctgaaccgctccacctgaggatga-3'	GS 接头反义引物	SEQ ID NO: 27
RS-Sfi	5'-agcggcccag cggccgccc ag-3'	Sfi-I 位点引物	SEQ ID NO: 28
RS-Not	5'-acctgcccggc-3'	Not-I 位点引物	SEQ ID NO: 29

表 1

[0338]

(1-5)制备scFv噬菌体文库

[0339]

使用BCG疫苗或杀灭的H37Ra细菌细胞作为免疫原免疫兔(参见上述(1-2)和(1-

3),以及参比实施例1(2))。在免疫结束后,收集兔的脾,并将组织溶解在RPMI(不含血清)中,提取总RNA,由得到的总RNA合成cDNA。使用RNA提取试剂盒(Qiagen)按照操作手册提取总RNA。使用cDNA合成试剂盒(Invitrogen)按照操作手册由从总RNA合成cDNA。

[0340] 将合成的cDNA用作模板,使用上述表1所述的特定的引物进行VH基因片段扩增和VL基因片段扩增。具体地,VH基因片段扩增使用四个引物组进行:RabVH-F1与RabVH-R,RabVH-F2与RabVH-R,RabVH-F3与RabVH-R,和RabVH-F4与RabVH-R。VL基因片段扩增使用10个引物组进行:RabVκ-F1与RabVκ-R1,RabVκ-F1与RabVκ-R2,RabVκ-F1与RabVκ-R3,RabVκ-F2与RabVκ-R1,RabVκ-F2与RabVκ-R2,RabVκ-F2与RabVκ-R3,RabVκ-F3与RabVκ-R1,RabVκ-F3与RabVκ-R2,RabVκ-F3与RabVκ-R3,和RabVλ-F与RabVλ-R。得到的基因扩增产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳分离。从凝胶提取需要的分子量的基因扩增产物,并且纯化。

[0341] 将纯化的VH基因扩增产物和VL基因扩增产物使用GS接头(GGGGSGGGGSGGGGS:SEQ ID NO:11)连接。将具有与VH基因扩增产物的3'端同源的序列的RS1与VH基因混合并且进行5个PCR循环,以将GS接头添加到VH基因扩增产物的3'端。同样地,将具有与VL基因扩增产物的5'端同源的序列的RS2与VL基因混合,并且进行5个PCR循环,以将GS接头添加到VL基因扩增产物的5'端。将添加GS接头的VH基因扩增产物与添加接头的VL基因扩增产物混合,并且进行10个PCR循环,以产生scFv基因(VH基因/GS接头/VL基因),其中VH基因和VL基因通过GS接头连接。将这样制备的scFv基因用作模板,通过使用其中加入限制酶序列的引物(参见表1中的“RS-Sfi”和“RS-Not”)进行30个PCR循环,最后用限制酶Sfi I和Not I切割。

[0342] 然后,将用限制酶处理的scFv基因插入到抗体展示噬菌粒载体pCANTAB5E(由GE制备)的Sfi I和Not I位点,并且通过电穿孔转化到大肠杆菌JM109中。然后,将转化体在LB-Amp/Glu琼脂培养基(含有150μg/mL氨苄青霉素、1%葡萄糖和1.5%琼脂的LB培养基)中在37°C培养过夜,并且收集得到的菌落。

[0343] 将转化的大肠杆菌在LB培养基中调节至在600nm波长处具有0.2的吸光度(OD₆₀₀)后,将转化体与辅助噬菌体M13K07(由Invitrogen制备)(10¹²cfu)混合,然后在37°C静置培养30分钟;并且在1L LB-Amp/Kan液体培养基(含有150μg/mL氨苄青霉素和100μg/mL卡那霉素的LB培养基)中在37°C进一步培养过夜,以产生scFv展示噬菌体文库。

[0344] 最后,将scFv展示噬菌体文库浓缩在PEG/NaCl溶液中,并且用PBS调节至约1x10¹²cfu/mL的浓度,并且将得到的文库用于生物淘选。

[0345] (1-6)制备可溶性scFv(单链抗体)

[0346] 使用大肠杆菌表达载体pET22b(+)(由Novagen制备)制备可溶性scFv。使用有义和反义引物扩增靶scFv基因,由此向5'末端添加Not I限制酶序列并向3'末端添加Nco I限制酶序列。

[0347] 将用Not I和Nco I处理的scFv基因插入到大肠杆菌表达载体pET22b(+),然后转化到宿主大肠杆菌Rosetta(Novagen)中。将转化的大肠杆菌在LB-Amp/Glu琼脂培养基中在37°C培养过夜,并且将菌落在2mL LB-Amp液体培养基中在25°C培养8小时。将培养物(2mL)添加到200mL LB-Amp液体培养基中,并且在30°C培养16小时以在培养物上清中分泌可溶性scFv(单链抗体)。

[0348] 使用填充Ni Sepharose的柱(Ni柱)(由GE制造)通过亲和纯化进行从培养物上清纯化可溶性scFv。将三倍量的100mM磷酸盐缓冲液添加到培养物上清中,并将混合物加入到

Ni柱中,以允许可溶性scFv结合到柱上。用含有10mM咪唑的100mM磷酸盐缓冲液洗涤柱,然后用含有500mM咪唑的100mM磷酸盐缓冲液洗脱可溶性scFv。

[0349] 然后将洗脱液针对磷酸盐缓冲液透析过夜,以去除咪唑,并且得到可溶性scFv(单链抗体)。

[0350] (1-7)抗体的生物素标记

[0351] 使用Pierce SuIfo-NHS-LC-Biotin标记试剂盒按照推荐的试剂盒操作程序进行多克隆抗体(PoAb)和上文制备的单链抗体(scFv)的生物素标记。

[0352] 2.测定

[0353] (2-1)测量血液中的抗体滴度(ELISA)

[0354] 使用由用每种抗原免疫的兔和小鼠收集的血清,按下述通过ELISA确定血液中的抗体滴度。

[0355] 将人结核杆菌结核分枝杆菌的纯化的LAM(来源于青山B菌株,NacaIai Tesque)和非结核性抗酸杆菌鸟分枝杆菌的纯化的LAM(来源于血清型B菌株,NacaIai Tesque)分别用PBS调节至100 μ I/mI的浓度。将每份LAM溶液以100 μ L/孔的量加入到单独的96孔微量平板的每个孔中,并且允许在4 $^{\circ}$ C反应过夜,然后在含有1%脱脂乳的磷酸盐缓冲液中进行封闭,以制备抗原平板。

[0356] 通过向上述抗原平板的每个孔中加入100 μ L用反应缓冲液(含有1%BSA(胎牛白蛋白)、1%脱脂乳、0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液,pH 7.8)稀释的兔或小鼠血清进行一级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。然后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向上述一级反应溶液中加入100 μ L用反应缓冲液稀释5,000-倍的HRP-标记的抗-兔IgG(由Epitomics制备)或HRP标记的抗-小鼠IgG(由Zymed制备)进行二级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。然后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。

[0357] 通过向二级反应产物中加入100 μ L TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺),并且将混合物在室温下静置10分钟,进行显色反应。在显色后,通过加入100 μ L 1N硫酸溶液而终止反应。通过测量450-650nm波长的吸光度(OD_{450-650nm})进行检测。

[0358] (2-2)生物淘洗

[0359] 生物淘选以由步骤1-4组成的四个步骤进行。

[0360] 在步骤1-3中,浓缩与免疫原(BCG疫苗或杀灭的H37Ra细菌细胞)结合的噬菌体克隆。将用反应缓冲液(含有1%BSA、1%脱脂乳、0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液,pH 7.8)调节至1x10¹¹cfu/500 μ L的浓度的scFv展示噬菌体文库(参见“1.材料准备”的(1-5))与1mg BCG疫苗或杀灭的H37Ra细菌细胞混合,并且允许在25 $^{\circ}$ C反应2小时。反应后,通过离心(10,000rpm,10分钟)收集细胞,并且去除培养物上清。向收集的细胞中加入PBS并且混合后,通过离心再次收集细胞以洗涤所述细胞。进行洗涤操作5次。用500 μ L洗脱液(含有0.1%BSA的0.1N HCl溶液,并且用1M甘氨酸溶液调节至pH 2.2)洗脱与所述细胞结合的噬菌体,并且通过加入500 μ L中和液(1M Tris缓冲液,pH 9.1)进行中和。将中和的噬菌体汇集物用大肠杆菌JM109感染,并在LB-Amp/GIu琼脂培养基中在37 $^{\circ}$ C培养过夜;并且收集菌落。在LB培养基中调节至具有OD_{600nm}=0.2的转化的大肠杆菌与辅助噬菌体M13K07(由Invitrogen制备)(10¹²cfu)在37 $^{\circ}$ C静置培养30分钟后,加入100mL LB-Amp/Kan液体培养基,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C培养过夜。将噬菌体培养物在PEG/NaCl溶液中浓缩,并且用磷酸盐缓冲液调节至约

1×10^{12} cfu/mL的浓度。对所述细胞进行生物淘选3次。

[0361] 在步骤4中,使用在其上固定有纯化的结核分枝杆菌LAM或纯化的鸟分枝杆菌LAM的抗原平板(纯化的LAM固定的微量滴定平板)进行生物淘选。具体地,将在步骤3中获得的与细胞结合的噬菌体汇集物添加到纯化的LAM固定的微量滴定平板中,并且允许反应在25℃进行2小时。随后,通过用反应缓冲液洗涤10次,去除未反应的噬菌体。用100μL洗脱液洗脱与LAM结合的噬菌体,然后通过加入100μL中和液(1M Tris缓冲液,pH 9.1)进行中和。用大肠杆菌JM109感染中和的噬菌体汇集物,然后在LB-Amp/Glu琼脂培养基中在37℃培养过夜。

[0362] 参比实施例1制备针对LAM的抗血清

[0363] (1)为了制备针对LAM的多克隆抗体(PoAb),用寡聚-LAM免疫兔。具体地,作为寡聚-LAM,使用通过在前述“1.材料准备”的(1-1)中所述的方法制备的寡聚-LAM-KLH作为免疫原。将寡聚-LAM-KLH与佐剂(不完全弗氏佐剂)以1:1的比率(寡聚-LAM-KLH:佐剂(重量比率))混合,并且将100μg混合物皮下施用给兔(两只兔:Rab-1和2)。然后,以14天的时间间隔免疫4次。在第五次免疫结束后,采集血液,并且按照前述“2.测定”的(2-1)中所述的ELISA方法测量血清中针对人结核杆菌(结核分枝杆菌)的LAM和非结核性抗酸杆菌(鸟分枝杆菌)的LAM的抗体滴度。

[0364] 作为使用在其上固定有结核分枝杆菌LAM的抗原平板的评估结果,在两只皮下免疫的兔(Rab-1和2)的384,000-倍稀释的血清中验证抗体滴度的充分增加。这些兔(Rab-1和2)的抗血清还表现出针对在其上固定有鸟分枝杆菌LAM的抗原平板的结合反应,因此,证实兔(Rab-1和2)的抗血清表现出相似的针对结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM的反应性。具体地,使用寡聚-LAM(寡聚-LAM-KLH)作为免疫原制备的兔抗血清(多克隆抗体)具有针对一般抗酸杆菌LAM的反应性,并且没有观察到针对结核杆菌LAM的特异性。

[0365] (2)接着,使用BCG疫苗作为免疫原免疫兔,并且使用杀灭的H37Ra细菌细胞作为免疫原免疫兔。以与上述相同的方式以14天的时间间隔皮下免疫每只兔4次。具体地,每次免疫,每只兔总共用1mL含有100mg BCG疫苗或通过在前述“1.材料准备”的(1-2)或(1-3)中所述的方法制备的杀灭的H37Ra细菌细胞皮下免疫。

[0366] 以与上述相同的方式通过在前述“2.测定”的(2-1)中所述的ELISA法测量第二次免疫后每只兔的血清中的抗体滴度。具体地,使用在其上固定有纯化的结核分枝杆菌LAM的抗原平板和在其上固定有鸟分枝杆菌LAM的抗原平板评估由用BCG疫苗免疫的兔和用杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔制备的血清的抗体滴度。图3(A)显示使用BCG疫苗作为免疫原时的结果,并且图3(B)显示使用杀灭的H37Ra细菌细胞时的结果。在所述附图中,“-■-”表示针对结核分枝杆菌LAM的反应性,并且“-●-”表示针对鸟分枝杆菌LAM的反应性。

[0367] 如图3所示,在使用BCG疫苗的情形和使用杀灭的H37Ra细菌细胞的情形中,都证实针对LAMs的抗体滴度以浓度依赖性方式显著增加。此外,针对结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM二者表现出相似的反应性。

[0368] 如上述,当分别使用寡聚-LAM、BCG疫苗和杀灭的H37Ra细菌细胞作为免疫原时,所有针对这些抗原的抗血清(多克隆抗体)具有针对一般抗酸杆菌LAM的反应性,没有观察到针对结核杆菌LAM的特异性。

[0369] 实施例1制备针对LAM的单链抗体(scFvs)

[0370] (1)制备针对LAM的scFvs

[0371] 从在参比实施例1中用寡聚-LAM、BCG疫苗和杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞分离单链抗体。

[0372] 具体地,按照“1.材料准备”的(1-5)中所述的方法,由每只兔的脾制备总RNA,并且使用由所述总RNA合成的cDNA作为模版并使用表1所述的多个引物进行PCR,以制备VH和VL基因的扩增产物。

[0373] 然后,制备分别具有通过GS接头(GGGGSGGGGSGGGGS;SEQ ID NO:11)连接的VH基因和VL基因的scFV基因(VH基因/GS接头/VL基因),然后按照“1.材料准备”的(1-5)中所述的方法由其制备scFv噬菌体展示文库。每个文库的滴度为约 10^6 cfu,因此,推定每个文库具有 10^6 的多样性。

[0374] 对于由用BCG疫苗免疫的兔的脾细胞制备的scFv展示噬菌体文库,使用Bcg疫苗作为抗原进行生物淘选(参见“2.测定”的(2-2))3次,然后使用其上固定有结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)LAM的微量平板进行第四次生物淘选。

[0375] 类似地,对于由用杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞制备的scFv展示噬菌体文库,使用杀灭的H37Ra细菌细胞作为抗原进行生物淘选3次,然后使用其上固定有结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)LAM的微量平板进行第四次生物淘选。

[0376] 最后,从每次获得的淘选汇集物随机选择200个克隆,并且筛选LAM反应性克隆。结果,从每个文库中获得约10个LAM反应性克隆。

[0377] 作为碱基序列分析的结果,证实从每个文库获得的克隆的碱基序列几乎是相同的。

[0378] 通过上文提及的操作,从由用BCG疫苗免疫的兔的脾细胞制备的scFv展示噬菌体文库和由用杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞制备的scFv展示噬菌体文库中的每一个成功分离单个scFv(单链抗体)克隆。

[0379] 图4显示由用杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞制备的单链抗体scFv(Myco-scFv)的氨基酸序列(SEQ ID NO:30)和由用BCG疫苗免疫的兔的脾细胞制备的单链抗体scFv(TB-scFv)的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)以及重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区;GS接头;和轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区的位置。

[0380] (2)scFv的LAM反应性

[0381] 在由用BCG疫苗免疫的兔的脾细胞制备的scFv展示噬菌体文库获得的单链抗体scFv(TB-scFv)和由用杀灭的H37Ra细菌细胞免疫的兔的脾细胞制备scFv展示噬菌体文库获得的单链抗体scFv(Myco-scFv)中评估针对LAM的反应性。

[0382] 具体地,将每种单链抗体scFvs(TB-scFv和Myco-scFv)按照“1.材料准备”的(1-6)中所述的方法溶解,制备可溶性scFv。然后,将可溶性scFv按照其中(1-7)所述的方法进行生物素标记;并且通过“2.测定”的(2-1)中所述的ELISA法评估针对抗原平板(纯化的LAM固定的微量滴定平板)的反应性,所述抗原平板即为其上固定有纯化的结核分枝杆菌LAM的平板和其上固定有纯化的鸟分枝杆菌LAM的平板。

[0383] 图5显示单链抗体TB-scFv针对结核分枝杆菌LAM(-■-)和针对鸟分枝杆菌LAM(-●-)的反应性。如图5所示,通过使浓度为1000ng/ml,500ng/ml,250ng/ml,125ng/ml,62.5ng/ml,31.25ng/ml,15.625ng/ml和7.8125ng/ml的TB-scFv与LAM固定的抗原平板中的

结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM反应得到的结果证实TB-scFv针对结核分枝杆菌LAM(■-)的反应性在浓度为250ng/ml时达到最大值,OD值(450nm)大于3,而TB-scFv针对鸟分枝杆菌LAM(-●-)的反应性甚至在浓度为1000ng/ml时也没有达到最大值,OD值(450nm)约为2。尽管结果未显示,但是Myco-scFv表现出几乎相同的针对结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM的反应性。

[0384] 从上述结果,证实了通过使用BCG疫苗作为免疫原制备的单链抗体TB-scFv是特异性抗体,其针对人结核杆菌结核分枝杆菌LAM的反应性比针对非结核性抗酸杆菌鸟分枝杆菌LAM的反应性强。

[0385] 实施例2

[0386] 构建LAM检测ELISA

[0387] 表2总结了在参比实施例1和实施例1中制备的三种类型的抗体的特征(寡聚-LAM-免疫的兔多克隆抗体(以下称为“Myco-PoIy”)(参比实施例1),以及H37Ra杀灭的细菌细胞免疫的兔单克隆抗体(Myco-scFv)和BCG疫苗免疫的兔单克隆抗体(TB-scFv)(实施例1))。

[0388] 表2

[0389]

名称	免疫原	注释
Myco-scFv	杀灭的 H37Ra 细菌细胞	·兔单克隆抗体 (scFv) ·与一般抗酸杆菌 LAM 反应
Myco-Poly	寡聚-LAM (KLH)	·兔多克隆抗体 ·与一般抗酸杆菌 LAM 反应
TB-scFv	BCG 疫苗	·兔单克隆抗体 (scFv) ·针对结核杆菌 LAM 的高亲和力

[0390] 基于这些抗体的反应特异性,组合所述抗体构建两种类型的ELISA:抗酸杆菌LAM检测ELISA,和结核杆菌LAM检测ELISA。

[0391] (1)准备抗酸杆菌LAM检测ELISA

[0392] 对于抗酸杆菌LAM检测ELISA的构建,将Myco-PoIy固定在平板上作为捕获抗体,并且将Myco-scFv进行生物素标记并用作检测抗体。

[0393] 用磷酸盐缓冲液将Myco-PoIy调节至10μg/ml的浓度。将Myco-PoIy以100μL/孔的量加入到96孔微量平板中,并且允许在4℃反应过夜;然后,在含有1%脱脂乳的磷酸盐缓冲液汇中进行封闭,以制备抗体平板。

[0394] 按下述进行一级反应。使用可能包含抗酸杆菌的测试样品,并且向上述抗体平板的每个孔中加入用反应缓冲液(含有1%BSA、1%脱脂乳、0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液,pH 7.8)稀释的100μL测试样品。允许反应在25℃进行1小时,然后洗涤平板3次。通过向所述抗体平板的每个孔中加入100μL用反应缓冲液稀释5,000-倍的生物素标记的抗Myco-scFv进行二级反应,允许反应在25℃进行1小时,并且通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向其中加入100μL用反应缓冲液稀释10,000-倍的抗生物素蛋白标记的HRP(由Millipore制备)进行三级反应,允许反应在25℃进行1小时,然后通过洗涤3次去除未反应的抗生物素蛋白标记的HRP。

[0395] 通过向每个孔中加入100 μ L TMB溶液进行显色反应,并且将混合物在室温下静置10分钟。显色后,通过加入100 μ L 1N硫酸溶液终止反应。通过测量450-650nm波长的吸光度检测显色的强度。

[0396] (2)准备结核杆菌LAM检测ELISA

[0397] 使用TB-scFv作为捕获抗体和检测抗体进行结核杆菌LAM检测ELISA。与上述(1)相同的方式准备结核杆菌LAM检测ELISA,不同之处在于使用TB-scFv作为捕获抗体和检测抗体。

[0398] (3)评价每种LAM检测ELISA

[0399] 使用纯化的人结核杆菌(结核分枝杆菌)的LAM和纯化的抗酸杆菌(鸟分枝杆菌)的LAM,分别评价(1)和(2)中准备的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA针对LAM的反应性。

[0400] 图6显示结果。在该图中,●表示在抗酸杆菌LAM检测ELISA中针对结核分枝杆菌的反应性,■表示在抗酸杆菌LAM检测ELISA中针对鸟分枝杆菌的反应性,○表示在结核杆菌LAM检测ELISA中针对结核分枝杆菌的反应性,并且□表示在结核杆菌LAM检测ELISA中针对鸟分枝杆菌的反应性。

[0401] 从图6清楚可见,在抗酸杆菌LAM检测ELISA可以同等地检测结核分枝杆菌LAM(-■-)和鸟分枝杆菌LAM(-●-)。另一方面,在结核杆菌LAM检测ELISA中,证实针对结核杆菌结核分枝杆菌LAM的反应性在浓度为100ng/ml达到最大值,OD值(450nm)为3以上,而甚至在浓度为100ng/ml时,也几乎没有展现出针对抗酸杆菌鸟分枝杆菌LAM的反应性。

[0402] 实施例3

[0403] 在抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA中(使用抗酸杆菌临床分离株)评价针对抗酸杆菌LAM和结核杆菌LAM的反应性

[0404] 使用在实施例2中进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA,并且使用图7所示的多种抗酸杆菌临床分离株评价针对抗酸杆菌LAM和结核杆菌LAM的抗体反应性。

[0405] 具体地,作为抗酸杆菌临床分离株,使用38个结核分枝杆菌菌株的培养物(见图7的表A和B),23个鸟分枝杆菌菌株的培养物和6个胞内分枝杆菌菌株的培养物(见图7的表C和D)。鸟分枝杆菌菌株和胞内分枝杆菌菌株是MAC疾病的致病性细菌。将每种抗酸杆菌临床分离株在液体培养基(BD生产的7H9肉汤,其含有10%由BD生产的ADC富集物)中在37 $^{\circ}$ C培养至汇合,并且将培养物在-80 $^{\circ}$ C冷冻保存。

[0406] 将冷淡保存的培养物解冻,然后与等量的Y-PER(由Thermo生产的蛋白提取试剂)混合,随后将所述混合物在95 $^{\circ}$ C加热10分钟。通过离心(10,000rpm,10分钟)收集细胞后,收集上清。为了收集上清,加入4倍量的反应缓冲液(含有1%脱脂乳、0.5%BSA,0.05%吐温20和0.1%XL-II的磷酸盐缓冲液),取100 μ L的混合物进行实施例2中进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA,测量针对LAM的抗体反应性。

[0407] 通过与针对用作标准物的纯化的结核分枝杆菌LAM的抗体反应性比较,评价通过每种ELISA获得的测量结果。图7显示所述结果。

[0408] 如图7所示,在抗酸杆菌LAM检测ELISA中(见图7每个表格中的“myco”列),显示出针对所有38个结核分枝杆菌菌株、23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株的反应性。

另一方面,在结核杆菌LAM检测ELISA中(见图7每个表格中的“TB”列),显示出高比率的针对38个结核分枝杆菌菌株中的34个菌株的反应性,但是没有显示出针对23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株的反应性。

[0409] 如上文所示,揭示了实施例2中进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA具有高的针对抗酸杆菌LAM的反应性,并且能够广泛地检测抗酸杆菌LAM。另一方面,在实施例2中进行的结核杆菌LAM检测ELISA中,在所述菌株的反应性上存在差异,并且与抗酸杆菌LAM检测ELISA相比,反应是特异性的。具体地,在实施例2中进行的结核杆菌LAM检测ELISA特异性检测结核杆菌LAM,并且表现出良好的结果,灵敏度为90%,特异性为100%。

[0410] 由上述结果,证实了在实施例2中进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA(捕获抗体:Myco-PoIy和检测抗体:Myco-scFv)能够广泛地检测抗酸杆菌LAM,并且在实施例2中进行的结核杆菌LAM检测ELISA(捕获抗体:TB-scFv和检测抗体:TB-scFv)能够特异性检测结核杆菌LAM,与非结核性抗酸杆菌LAM相区分。

[0411] 实施例4构建LAM检测免疫层析法

[0412] 使用通过ELISA评价的抗体对进行针对抗酸杆菌LAM检测和针对结核杆菌LAM检测的免疫层析检验。

[0413] (1)用于检测抗酸杆菌LAM的免疫层析法

[0414] 为了进行针对抗酸杆菌LAM检测的免疫层析检验,将固定在硝基纤维素膜上的Myco-PoIy用作捕获抗体,用胶体金标记的Myco-scFv用作检测抗体。

[0415] 将Myco-PoIy(捕获抗体)应用至硝基纤维素膜(由Millipore生产,毛细管流时间:240)上至浓度为3.0mg/mL(磷酸盐缓冲液),并且在50°C干燥20小时。准备包含硝基纤维素基底并且在其上粘附有吸附垫的免疫层析条。在其上连接层压密封条,并且将得到的条切成4mm宽的条,用于一次检验。

[0416] 为了制备胶体金标记的Myco-scFv,使用尺寸为40nm的胶体金。将Myco-scFv添加至胶体金中(OD=1)至浓度为2.0 μ g/mL,并且允许在室温反应20分钟。使用2mM TES(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸)(pH 7.5)作为抗体结合的缓冲液。在胶体金标记后,通过允许反应在含有2mM Borax(四硼酸钠十水合物)和1.5%BSA(pH 9.0)的缓冲液中在室温以300rpm进行5分钟而进行封闭。封闭后,在4°C以4620xg进行离心20分钟,并且去除培养物上清。将得到的沉淀物悬浮在胶体金标记的抗体稀释液(10mM Borax,5%蔗糖和1%BSA(pH 9.0))中,然后通过0.1- μ m滤器过滤。

[0417] 测定以下述方式进行。将可能含有抗酸杆菌的测试样品用提取缓冲液(72mM磷酸二氢钠二水合物,4.5%牛血清白蛋白,0.9%酪蛋白,0.09%Triton X-305,0.1%叠氮化钠,10.0%Y-PER,适量的氢氧化钠,和适量的盐酸,pH 7.0)稀释后,加入适量的胶体金标记的抗体溶液。将上文制备的条浸没在该液体中以显色所述测试样品。在显色开始后七分钟,移出条并且用含有表面活性剂(0.1%吐温20)的磷酸盐缓冲液洗涤8分钟,之后用肉眼进行评估,以确定所述样品是阳性的还是阴性的。

[0418] (2)用于检测结核杆菌LAM的免疫层析法

[0419] 以如上述(1)中所述的构建方法和测定方法相同的方式进行针对杆菌LAM检测的免疫层析检验,不同之处在于使用TB-scFv作为捕获抗体和检测抗体。

[0420] (3)评价用于检测LAM的每种免疫层析法

[0421] 使用纯化的结核分枝杆菌LAM和鸟分枝杆菌LAM来评价(1)和(2)中进行的针对抗酸杆菌LAM检测和针对结核杆菌LAM检测的免疫层析检验针对LAM的方应性。

[0422] 图8显示该结果。

[0423] 通过针对检测抗酸杆菌LAM和针对检测结核杆菌LAM的免疫层析法测量结核分枝杆菌LAM。在两种免疫层析检验(myco:用于抗酸杆菌LAM检测;并且,TB:用于结核杆菌LAM检测)(图8A和8B)中用肉眼证实线(Line)。类似地,使用两种测定系统测量鸟分枝杆菌LAM。如图8C和8D所示,在针对抗酸杆菌LAM检测的免疫层析检验中,用肉眼证实与在结核分枝杆菌LAM的测定中观察到的线相当的线。与此相反,在针对结核杆菌LAM检测(TB)的免疫层析检验中,甚至在浓度高至1000ng/ml时,也没有检测到线(图8D)。

[0424] 上述结果表明使用BCG疫苗作为免疫原制备的单链抗体TB-scFv在免疫层析检验中能够特异性检测人结核杆菌(结核分枝杆菌)。

[0425] 如实施例1-4中所示,本发明人已经成功地分离了与结核杆菌LAM特异性反应的单链抗体(scFv(TB-scFv)),并且建立的可以通过用TB-scFv测量LAM特异性检测结核杆菌LAM的免疫测定系统。所述使用TB-scFv的测定系统适用于ELISA和免疫层析检验,并且允许快速且容易的诊断结核病感染。

[0426] [实施例5-12]

[0427] 3.材料准备

[0428] (3-1)制备BCG疫苗和免疫原

[0429] 使用由日本BCG实验室制备的冷冻干燥的BCG疫苗(授权号:20300AMZ00767000)作为BCG疫苗。对于免疫,使用100mg(湿重)冷冻干燥的BCG疫苗与1ml生理盐水的混合物。

[0430] (3-2)制备鸡scFv噬体文库

[0431] 用BCG疫苗作为免疫原免疫鸡(见上述(3-1)和实施例6)。在免疫结束后,从鸡中切下脾,将组织溶解在RPMI(不含血清)培养基中。使用RNA提取试剂盒(由Qiagen制造)按照操作手册提取总RNA。使用cDNA合成试剂盒(由Invitrogen制造)按照操作手册由总RNA合成cDNA。

[0432] 将合成的cDNA用作模板,使用表3列出的引物扩增VH和VL基因片段。具体地,使用Sfi1-CkVH F和GSL-CkVH R引物对扩增VH基因片段,而使用GSL-CkVL F和Not1-CkVL R引物对扩增VL基因片段。

[0433]

表 3

名称	序列	用途	SEQ ID NO.
Sfi1-CkVH F	5'-ctatgcgcccagccggcccgacgttgacgagag-3'	具有 Sfi I 位点(下划线的)的 VH 区有义引物	SEQ ID NO: 41
GSL-CkVH R	5'-cctccaccggaggagacgatgactcgggtcc-3'	VH 区反义引物	SEQ ID NO: 42
GSL-CkVL F	5'-gggatcggccctgactcagccgtcctcgggtgc-3'	VL 区有义引物	SEQ ID NO: 43
NotI-CkVL R	5'-acctgcggccctagaggacgggtcagg-3'	具有 Not I 位点(下划线的)的 VL 区反义引物	SEQ ID NO: 44
CkVH-GSL-VL F	5'-tcctccggtagagcgggttcaggcggagatggctctggcggatggccctg-3'	GS 接头有义引物	SEQ ID NO: 45
CkVL-GSL-VH R	5'-cagggccgatccgccaccgccagagccatctccgctgaaccgctccaccggagg-3'	GS 接头反义引物	SEQ ID NO: 46

[0434] 得到的基因扩增产物通过1.5%琼脂糖凝胶电泳分离。从凝胶提取需要的分子量的基因扩增产物,并且纯化。

[0435] 将纯化的VH基因扩增产物和VL基因扩增产物使用GS接头(SEQ ID NO:40)连接。将具有与VH基因扩增产物的3'端同源的序列的C_kVL-GSL-VH R(SEQ ID NO:46)与VH基因混合并且进行5个PCR循环,以将GS接头添加到VH基因扩增产物的3'端。同样地,将具有与VL基因扩增产物的5'端同源的序列的C_kVH-GSL-VL F(SEQ ID NO:45)与VL基因混合,并且进行5个PCR循环,以将GS接头添加到VL基因扩增产物的5'端。将添加GS接头的VH基因扩增产物与添加接头的VL基因扩增产物混合,并且进行10个PCR循环,以产生具有连接在一起的VH基因、GS接头基因和VL基因的scFv基因(鸡scFv基因)。最后,用限制酶Sfi I和Not I切割所述scFv基因。

[0436] 然后,将用限制酶处理的scFv基因插入到抗体展示噬菌粒载体pCANTAB5E的Sfi I和Not I位点,并且通过电穿孔转化到大肠杆菌JM109中。将转化体在LB-Amp/Glu琼脂培养基(含有150μg/mL氨苄青霉素、1%葡萄糖和1.5%琼脂的LB培养基)中在37℃培养过夜,并且收集所有产生的菌落。

[0437] 将转化的大肠杆菌在LB培养基中制备至在600nm处具有0.2的吸光度(OD₆₀₀)后,将转化体与辅助噬菌体M13K07(10¹²cfu)混合,然后在37℃静置培养30分钟,并且在1L LB-Amp/Kan液体培养基(含有150μg/mL氨苄青霉素和100μg/mL卡那霉素的LB培养基)中在37℃进一步培养过夜,以产生鸡scFv展示噬菌体文库。

[0438] 最后,将scFv展示噬菌体文库浓缩在PEG/NaCl溶液中,并且用PBS调节至约1x10¹²cfu/mL的浓度,并且将得到的文库用于生物淘选。

[0439] (3-3)使用鸡scFv文库进行抗原生物淘选

[0440] 生物淘选以由步骤1-4组成的四个步骤进行。

[0441] 在步骤1-3中,浓缩与免疫原(BCG疫苗)结合的噬菌体克隆。将用反应缓冲液(含有1%BSA、1%脱脂乳、0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液,pH 7.8)调节至1x10¹¹cfu/500μL的浓度的鸡scFv展示噬菌体文库(参见“3.材料准备”的(3-2))与1mg BCG疫苗混合,并且允许在25℃反应2小时。反应后,通过离心(10,000rpm,10分钟)收集细胞,并且去除培养物上清。向收集的细胞中加入PBS并且混合后,通过离心再次收集细胞以洗涤所述细胞。进行洗涤操作5次。用500μL洗脱液(含有0.1%BSA的0.1N HCl溶液,并且用1M甘氨酸溶液调节至pH 2.2)洗脱与所述细胞结合的噬菌体,并且通过加入500μL中和液(1M Tris缓冲液,pH 9.1)进行中和。将中和的噬菌体汇集物用大肠杆菌JM109感染,并在LB-Amp/Glu琼脂培养基中在37℃培养过夜;并且收集菌落。在LB培养基中调节至具有OD_{600nm}=0.2的转化的大肠杆菌与辅助噬菌体M13K07(10¹²cfu)静置培养30分钟后,加入100mLLB-Amp/Kan液体培养基,并且将细胞在37℃培养过夜。将噬菌体培养物在PEG/NaCl溶液中浓缩,并且用磷酸盐缓冲液调节至约1x10¹²cfu/mL的浓度。对所述细胞进行生物淘选3次。

[0442] 在步骤4中,使纯化的结核分枝杆菌LAM与TB-scFv-固定的平板反应,并且使用TB-scFv与LAM的复合物进行生物淘选。具体地,向其上固定有浓度为5μg/mI的TB-scFv的微量平板中加入10μg纯化的结核分枝杆菌LAM,并且允许反应在25℃进行1小时。洗涤后,加入在步骤3中得到的与细胞结合的噬菌体汇集物,并且允许反应在25℃进行2小时。随后,通过用反应缓冲液洗涤10次去除未反应的噬菌体。用100μL洗脱液洗脱同TB-scFv与LAM的复合物结合的噬菌体,然后通过加入100μL中和液(1M Tris缓冲液,pH 9.1)进行中和。用大肠杆菌JM109感染中和的噬菌体汇集物,然后在LB-Amp/Glu琼脂培养基中在37℃培养过夜。

[0443] (3-4)选择LAM-结合鸡scFv克隆

[0444] 对于LAM-结合scFv,通过噬菌体ELISA选择与LAM特异性反应的噬菌体克隆。将在上述(3-3)中解释的使用鸡scFv文库进行的抗原生物淘选的步骤4中获得的噬菌体汇集物作为单菌落培养,并且将得到的单菌落在50 μ L LB-Amp培养基中在37 $^{\circ}$ C培养8小时。将细胞用50 μ L辅助噬菌体M13K07(10^{12} cfu/mL)溶液感染后,加入400 μ L LB-Amp/Kan液体培养基,在37 $^{\circ}$ C培养过夜,从而制备单噬菌体克隆的培养物。

[0445] 通过向其上固定有浓度为5 μ g/mL的TB-scFv的微量平板中加入10 μ g纯化的结核分枝杆菌LAM进行噬菌体ELISA,允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时,以制备TB-scFv与LAM的复合物,并且筛选能够与所述复合物反应的克隆。通过向LAM-固定的平板中加入90 μ L反应缓冲液(含有1%BSA,1%脱脂乳和0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液)和10 μ L scFv展示噬菌体培养物进行一级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。随后,通过洗涤3次去除未反应的噬菌体。通过向一级反应溶液中加入100 μ L用于上述相同的反应缓冲液稀释5,000-倍的HRP-标记的抗-M13噬菌体p8蛋白抗体,进行二级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。然后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向二级反应溶液中加入100 μ L TMB溶液进行显色反应,并且允许反应在室温进行10分钟。显色后,向其中加入100 μ L 1N硫酸溶液,终止反应。通过测量在450-650nm波长处的吸光度($OD_{450-650nm}$)进行检测。

[0446] 将与LAM反应的克隆进行PCR,以扩增scFv基因,并且通过直接测序法确定基因序列。

[0447] (3-5)用于评价使用二价抗体的ELISA的样品

[0448] 使用抗酸杆菌临床分离株(38个结核分枝杆菌菌株,23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株),BCG,六个类型的口腔细菌(星形诺卡菌(*N.asteroides*),皮疽诺卡菌(*N.farcinica*),球孢链霉菌(*S.globisporus*),白色念珠菌(*C.albicans*),衣氏放线菌(*A.israelii*)和少变家村菌(*T.paurometabolum*))和痰液样品(54份样品),评价使用二价抗体的用于抗酸杆菌LAM检测的ELISA和用于结核杆菌LAM检测的ELISA。从培养的细菌细胞中提取LAM和从痰液样品中提取LAM都在相同的条件下进行。向每份样品中加入NaOH至终浓度为0.4M并且混合后,将混合物煮沸30分钟。煮沸后,通过加入磷酸盐缓冲液中和所述混合物。

[0449] 4. 测定

[0450] (4-1)制备二价抗体

[0451] 通过通用方法将单链抗体scFvA修饰为二价抗体。将来自Myco-scFv(SEQ ID NO:30),TB-scFv(SEQ ID NO:12)和G3-scFv(SEQ ID NO:39)的VH和VL区基因克隆到具有兔恒定区的哺乳动物细胞表达载体(商品名:pFUSEss-CHIg-rG*03和pFUSE2ss-CLIg-rk1,由InvivoGen制备)中,以制备VH和VL表达载体。将VH和VL表达载体混合,并且转染到CHO细胞中。在培养所述载体转染的细胞4天后,使用蛋白质A(由Bio-Rad制备)从上清中分离并纯化二价抗体(二价Myco-scFv,二价TB-scFv和二价G3-scFv)。

[0452] (4-2)二价抗体的生物素标记

[0453] 使用购自Pierce的SuIflo-NHS-LC-Biotin标记试剂盒按照试剂盒所附的操作手册进行每种二价抗体的生物素标记。使用所述生物素标记的抗体来构建ELISA系统。

[0454] (4-3)使用二价抗体构建用于抗酸杆菌LAM检测的ELISA

[0455] 使用二价TB-scFv、二价G3-scFv和二价Myco-scFv(见(4-1)“制备二价抗体”)来构建使用二价抗体的用于抗酸杆菌LAM检测的ELISA。

[0456] 将二价TB-scFv与二价G3-scFv等量混合,并且用磷酸盐缓冲液调节至浓度为5 μ g/ml。将得到的混合物以100 μ L/孔的比例加入到96-孔微量平板中,并且允许反应在4 $^{\circ}$ C进行过夜,之后在含有1%脱脂乳的磷酸盐缓冲液中进行封闭,由此产生在其上固定有二价抗体的抗体平板。

[0457] 通过向前述抗体平板的孔中加入100 μ L用反应缓冲液(含有1%BSA,1%脱脂乳,0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液)稀释的样品进行一级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时30分钟。然后,洗涤平板3次。通过向一级反应溶液中加入100 μ L用与上述相同的反应缓冲液稀释5,000-倍的生物素标记的二价Myco-scFv进行二级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时30分钟。随后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向二级反应溶液中加入100 μ L用与上述相同的反应缓冲液10,000-倍稀释的抗生物素蛋白标记的HR进行三级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时30分钟。然后,通过洗涤3次去除未反应的抗生物素蛋白标记的HRP。通过向三级反应溶液中加入100 μ L TMB溶液进行显色反应,并且允许反应在室温进行10分钟。显色后,向其中加入100 μ L 1N硫酸溶液,终止反应。通过测量在450-650nm波长处的吸光度(OD_{450-650nm})进行检测。

[0458] (4-4)使用二价抗体构建用于结核杆菌LAM检测的ELISA

[0459] 以与上述(4-3)中所述的用于抗酸杆菌LAM检测的ELISA相同的方式构架使用二价抗体的用于结核杆菌LAM检测的ELISA,不同之处在于使用二价抗体TB-scFv作为捕获抗体,使用生物素标记的二价Myco-scFv作为检测抗体。

[0460] 实施例5免疫鸡以及针对LAM的鸡抗血清的抗体滴度评价

[0461] 通过皮下免疫完全量的通过“3.材料准备”的(3-1)中所述的方法制备BCG疫苗(100mg湿重/1ml生理盐水)进行鸡的免疫。免疫以14天的时间间隔进行4次,并且通过ELISA评价鸡血液中的抗体滴度。

[0462] 用PBS将纯化的人结核杆菌结核分枝杆菌LAM(来源于青山B菌株,NacaIai Tesque)或纯化的鸟分枝杆菌LAM(来源于血清型B菌株,NacaIai Tesque)调节至100 μ I/ml的浓度。将其以100 μ L/孔的量加入到96孔微量平板中,并且允许在4 $^{\circ}$ C反应过夜,在含有1%脱脂乳的磷酸盐缓冲液中进行封闭,以制备抗原平板。

[0463] 通过向所述抗原平板的每个孔中加入100 μ L用反应缓冲液(含有1%BSA、1%脱脂乳、0.14M NaCl和0.1%吐温20的Tris缓冲液,pH 7.8)稀释的鸡血清进行一级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。然后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向一级反应溶液中加入100 μ L用相同的反应缓冲液稀释5,000-倍的HR标记的抗-鸡IgY进行二级反应,并且允许反应在25 $^{\circ}$ C进行1小时。随后,通过洗涤3次去除未反应的抗体。通过向其中加入100 μ L TMB溶液进行显色反应,并且允许反应在室温进行10分钟。显色后,通过加入100 μ L 1N硫酸溶液终止反应。通过测量450-650nm波长的吸光度(OD_{450-650nm})进行检测。

[0464] 结果显示在图9中。在该图中,“-■-”表示鸡抗血清针对纯化的结核分枝杆菌LAM的反应性,“-●-”表示鸡抗血清针对纯化的鸟分枝杆菌LAM的反应性。如图9所示,证实用BCG疫苗免疫鸡具有充分增加的针对LAM的抗体滴度。另外,观察到相似的针对结核杆菌LAM和抗酸杆菌LAM二者反应性。

[0465] 实施例6制备针对LAM的鸡scFv(单链抗体)

[0466] (1)制备针对LAM的鸡scFv(单链抗体)

[0467] 由用BCG疫苗免疫的鸡的脾细胞分离单链抗体scFv。具体地,按照“3.材料准备”的(3-2)中所述的方法,从鸡的脾制备总RNA,使用由其合成的cDNA作为模板和表3所述的各种引物进行PCR,从而制备VH基因扩增产物和VL基因扩增产物。接着,制备分别具有通过GS接头(SEQ ID NO:40)连接的VH基因和VL基因的鸡单链抗体(VH基因/GS接头/VL基因),并且由此制备scFv展示噬菌体文库。由于每个文库的滴度为约 10^6 cfu,因此,推定每个文库具有 10^6 的多样性。

[0468] 通过使用所制备的scFv展示噬菌体文库,用BCG疫苗进行生物淘选3次。为了分离识别与TB-scFv不同的表位的单链抗体scFv,对于第四次淘选,使用通过结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)LAM(来源于青山B菌株)与固定在微量平板上的TB-scFv的反应形成的复合物。允许结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)的LAM溶液在其上固定有TB-scFv的微量平板上反应,洗涤微量平板3次。向其中加入BCG淘选噬菌体汇集物,并且允许反应在25℃进行2小时。反应后,洗涤微量平板3次,并且洗脱LAM结合的噬菌体。最后,从每个淘选汇集物中随机选择200个克隆,并且使用TB-scFv与LAM的复合物筛选LAM反应性克隆。从每个文库获得约10个LAM反应性克隆。作为碱基序列分析的结果,证实从每个文库得到的克隆的序列几乎是相同的。

[0469] 结果,从由用BCG疫苗免疫的鸡的脾制备的scFv展示噬菌体文库成功分离了单链抗体scFv(G3-scFv)的单克隆。图10显示从鸡脾文库分离的单链抗体G3-scFv的氨基酸序列(SEQ ID NO:39),以及重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区,GS接头,和轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3区的位置。

[0470] (2)鸡scFv(单链抗体)的LAM反应性

[0471] 使用其上固定有纯化的结核分枝杆菌的LAM的平板和其上固定有纯化的鸟分枝杆菌的LAM的平板评价上述产生的G3-scFv的反应性。具体地,按照“1.材料准备”的(1-6)中所述的方法溶解G3-scFv,制备溶解的G3-scFv。接着,按照上述(1-7)中所述的方法进行生物素标记,并且通过用ELISA法的测定评价针对抗原平板(纯化的LAM固定的微量滴定平板)的反应性,即,其上固定有纯化的结核分枝杆菌LAM的平板,和其上固定有纯化的鸟分枝杆菌LAM的平板。

[0472] 结果,G3-scFv表现出相似的针对结核杆菌LAM和抗酸杆菌LAM的反应性。从这一结果,认为鸡的单链抗体G3-scFv是具有针对一般抗酸杆菌LAM(包括结核杆菌LAM)的反应性的抗体。

[0473] 实施例7使用二价抗体构建LAM检测ELISA

[0474] 欲将本发明付诸实践应用,按照“制备二价抗体”的(4-1)中所述的方法,将在实施例1和6中制备的三种类型的单链抗体scFvs(Myco-scFv,TB-scFv和G3-scFv)修饰为二价抗体,并且,基于所述二价抗体的反应特异性进行两种类型的ELISA,即,抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA。具体地,对于抗酸杆菌LAM检测ELISA,将二价TB-scFv与二价G3-scFv混合并且固定在平板上作为捕获抗体,并且使用已经用生物素标记的二价Myco-scFv作为检测抗体。对于结核杆菌LAM检测ELISA,将二价TB-scFv固定在平板上作为捕获抗体,将已经进行生物素标记的二价Myco-scFv用作检测抗体。其详细内容如“4.测定”的(4-

3)和(4-4)所述。

[0475] 通过测定由培养的BCG细菌细胞提取的LAM进行所构建的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA的评价(图11)。结果,如图11所示,在抗酸杆菌LAM检测ELISA(-■-)和结核杆菌LAM检测ELISA(-●-)中,可以以同等的灵敏性检测到BCG的LAM。

[0476] 实施例8使用二价抗体的LAM检测ELISA的检测灵敏性评价

[0477] 为了进行使用二价抗体的ELISA的灵敏性评价,将培养的BCG细菌细胞从 10^6 cfu/ml连续稀释至 61 cfu/ml,并且每份稀释溶液的一部分用来提取基因组DNA,以进行核酸扩增检测(NAAT),并且其另一部分用来提取LAM以进行抗酸杆菌LAM检测ELISA。

[0478] 抗酸杆菌LAM检测ELISA的结果显示在图12中。如图12中的表格所示,核酸扩增检测(NAAT)的检测灵敏性为约 500 cfu/ml,而抗酸杆菌LAM检测ELISA的检测灵敏性为约 250 cfu/ml。取决于细菌菌株,作为核酸扩增靶标的重复序列在重复数方面是不同的,并且据说检测灵敏性可能因不同的细菌菌株而不同。尽管由于BCG中的重复序列小,遗传检测的灵敏性低,但是,据说,具有大重复序列的细菌菌株通常导致 100 cfu/ml的检测灵敏性。

[0479] 利用上述结果,已经证明本发明使用二价抗体的抗酸杆菌LAM检测ELISA是非常高度灵敏性的免疫测定法,其检测灵敏性等于或高于核酸扩增检测的灵敏性。

[0480] 实施例9使用二价抗体的LAM检测ELISA的交叉反应性检验

[0481] 在口腔细胞中,存在具有结构与LAM的成分相似的膜抗原的物种。当要检测痰液样品中的抗酸杆菌LAM与结核杆菌LAM时,与这些口腔细菌的交叉反应性是非常有问题的,并且这是使用痰液建立抗酸杆菌和结核杆菌的检测性免疫测定的障碍之一。

[0482] 此处,为了检验LAM检测ELISA中针对口腔细菌的交叉反应性,由星形诺卡菌(*N.asteroides*)(简称为“Na”),皮疽诺卡菌(*N.farcinica*)(简称为“Nf”),球孢链霉菌(*S.globisporus*)(简称为“Sg”),白色念珠菌(*C.albicans*)(简称为“Ca”),衣氏放线菌(*A.israelii*)(简称为“Ai”)和少变家村菌(*T.paurometabolium*)(简称为“Tp”)中的每一种制备液体培养物。将液体培养物调节至 10^6 cfu/ml和 10^8 cfu/ml(仅对于Ca为 10^7 cfu/ml),并且,与在要在LAM检测ELISA中测定的培养的BCG细菌细胞中一样从中提取LAMs。图13显示了抗酸杆菌LAM检测ELISA的结果。

[0483] 由图13可以理解,尽管用作对照的BCG的反应性在浓度为 10^5 cfu/ml时达到最大值,但是所述口腔细菌中的每一种在细菌细胞为 10^8 cfu/ml的高浓度水平完全没有表现出反应性。使用结核杆菌LAM检测ELISA观察到完全相同的结果。

[0484] 上述结果已经证明了我们已经获得的单链抗体scFvs(Myco-scFv, TB-scFv和G3-scFv)具有针对抗酸杆菌LAM和结核杆菌LAM的高亲和性,并且可以通过将这些抗体组合为二价抗体以与核酸扩增检测同样高的灵敏性检测抗酸杆菌(包括结核杆菌),并且提供了非常选择性和特异性的测定和抗体,其与口腔细菌完全没有交叉反应性。

[0485] 实施例10用临床分离株评价使用二价抗体的LAM检测ELISA

[0486] 使用抗酸杆菌临床分离株,来评价使用二价抗体的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA。

[0487] 作为临床分离株,使用38个结核分枝杆菌菌株,23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株。鸟分枝杆菌菌株和胞内分枝杆菌菌株是MAC疾病的致病性细菌。从这些培养的细菌细胞提取LAMs,并且进行使用二价抗体的抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测

ELISA。结果显示在图14中。

[0488] 在图14中，“A”表示在38个结核杆菌临床分离株(结核分枝杆菌)菌株上进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA(黑色柱)和结核杆菌LAM检测ELISA(白色柱)的结果。“B”表示在29个非结核性抗酸杆菌(23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株)上进行的抗酸杆菌LAM检测ELISA(黑色柱)和结核杆菌LAM检测ELISA(白色柱)的结果。

[0489] 在抗酸杆菌LAM检测ELISA与结核杆菌LAM检测ELISA二者中,在所有38个结核分枝杆菌菌株、23个鸟分枝杆菌菌株和6个胞内分枝杆菌菌株中都观察到反应性。尽管抗酸杆菌LAM检测ELISA表现出同等的针对结核杆菌和非结核性抗酸杆菌的反应性,但是结核杆菌LAM检测ELISA表现出比非结核性抗酸杆菌低的反应性。

[0490] 为了仅从LAM检测ELISA的结果区分结核杆菌与非结核性抗酸杆菌的目的,计算来自抗酸杆菌LAM检测ELISA的值与来自结核杆菌LAM检测ELISA的值的比率(来自抗酸杆菌LAM检测ELISA的值/来自结核杆菌LAM检测ELISA的值)(图15)。结果,使用结核杆菌,所述38个菌株中仅有1个菌株具有超过3倍的两种测量值的比率。另一方面,使用非结核性抗酸杆菌,所述29个菌株中有23个菌株具有3倍以上的比率。

[0491] 上述结果表明LAM检测ELISA可以检测LAM,几乎不受菌株之间的差异的影响。另外,通过计算两种测定系统给的比率(来自抗酸杆菌LAM检测ELISA的值/来自结核杆菌LAM检测ELISA的值),已经证明了可以区分(区别)结核杆菌与非结核性抗酸杆菌,具有97%灵敏性和80%特异性的极佳的评分,并且本发明的方法是世界上首个作为“能够检测一般的抗酸杆菌,并且还区分结核杆菌与非结核性抗酸杆菌”的LAM检测ELISA的免疫测定系统。

[0492] 实施例11使用临床痰液样品评价使用二价抗体的LAM检测ELISA

[0493] 为了评价实施例7中进行的使用二价抗体的LAM检测ELISA的能力,使用来自54个病例的临床痰液样品进行评价。评价提供过直接的涂片检查(涂片)和核酸扩增检测(NAAT)进行。直接涂片检查和核酸扩增检测的结果总结在表4中。

[0494] 表4

	涂片	NAAT	样品数量
	3+	+	11
	2+	+	4
[0495]	1+	+	18
	极少的	+	9
	极少的	-----	1
	-----	+	3
	-----	-----	8

[0496] 从直接的涂片检查,有43个阳性病例(3+,2+,1+,极少的);从核酸扩增检测,有45个阳性病例(+).在这些中,有42个病例在两种检测中都是阳性的,有8个病例在两种检测中都是阴性的,有3个病例仅在核酸扩增检测中是阳性的。

[0497] 从临床痰液样品提取LAMs,并且用抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测

ELISA进行测定,这些的结果显示在表5和图16中。表5显示来自抗酸杆菌LAM检测ELISA和结核杆菌LAM检测ELISA二者的检测率。

[0498] 表5

NAAT	涂片	样品数	LAM-ELISA (n)	
			抗酸性杆菌	结核杆菌
+	3+	11	100% (11/11)	100% (11/11)
+	2+	4	100% (4/4)	100% (4/4)
[0499] +	1+	18	100% (18/18)	100% (18/18)
+	极少的	9	100% (9/9)	89% (8/9)
+	—	3	100% (3/3)	100% (3/3)
—	极少的	1	0% (0/1)	0% (0/1)
—	—	8	0% (0/8)	0% (0/8)

[0500] 如表5所示,来自抗酸杆菌LAM检测ELISA与结核杆菌LAM检测ELISA的结果几乎是相同的。在涂片检查中关于细菌细胞数方面证实评分为1+以上的组中,ELISA中的反应性在大部分样品中达到最大值。甚至其中细菌细胞数少的“极少的”,ELISA中的反应性也在50%的样品中达到最大值。此外,甚至在具有非常少的细菌细胞数并且仅在核酸扩增检测中确定为阳性的3个病例中,在所述这些中得到的值也高于在核酸扩增检测中确定为阴性的样品的值。使用抗酸杆菌LAM检测ELISA,尽管从在核酸扩增检测中确定为阳性的所有样品中检测到LAM,但是,甚至在一个病例中,由在核酸扩增检测中确定为阴性的样品不能检测到LAM。因此,与核酸扩增检测相比,抗酸杆菌LAM检测ELISA的灵敏性和特异性100%匹配。除了一个在核酸扩增检测中确定为阳性的并且在涂片检查中确定为“极少的”病例不与核酸扩增检测的结果相匹配之外,在结核杆菌LAM检测ELISA中,所有病例也与核酸扩增检测的相匹配。此外,所述不匹配的一个病例仅略低于截点值。

[0501] 上述结果表明,本发明的LAM检测ELISA是能够以与核酸扩增检测相等的灵敏性和特异性筛查和选择抗酸杆菌感染的患者的检测。

[0502] 然后,为了证实在LAM检测ELISA的值与细菌的量之间存在相关性,进行稀释测量。

[0503] 将来做痰液样品的提取溶液稀释5倍、25倍和125倍,测定稀释的溶液,连同用作标准制剂的纯化的LAM,并且计算其中的LAM的浓度。结果显示在图17中。

[0504] 使用核酸扩增检测和基于涂片检查的量,将样品分组(I:在核酸扩增检测和涂片检查中都是阴性的,II:在核酸扩增检测中是阳性的,在涂片检查中是阴性的,III:在核酸扩增检测中是阳性的,在涂片检查中是“极少的”,IV:在涂片检查中为1+,V:在涂片检查中为2+,VI:在涂片检查中为3+),并且与LAM浓度(pg/ml)比较。结果,如图17所示,由于LAM浓度的平均值由具有少量细菌的组向具有大量细菌的组增加(I至VI),这表明在细菌的量与LAM浓度之间存在正相关性。从上述结果,表明细菌的量可以通过定量LAM浓度进行预测。

[0505] 这些结果已经表明,本发明的方法具有与核酸扩增检测同等的灵敏性和特异性,

并且是能够另外确定细菌的量的检测,并且所述方法已被证明适用于结核病的治疗监测等。

[0506] 实施例12LAM稳定性评估

[0507] 当转运痰液样品时,由于传染问题,需要在严苛控制下转运该样品。在这样的情形中,成本变高,可用的地区变得有限。如果痰液样品在收集后灭菌,则可能对其进行普通的转运。为了完全灭菌抗酸杆菌,需要诸如煮沸30分钟以上和加压蒸气灭菌(高压灭菌等)的处理。当进行所述处理时,可以预测LAM的结构被改变。我们检验了上述构建的LAM检测ELISA是否耐受严酷的灭菌处理以及能够正确地检测LAM。

[0508] 从通过高压灭菌(121°C,20分钟)的培养的BCG细菌细胞获得的细菌细胞(高压灭菌的细菌)、在100°C煮沸30分钟的细菌细胞(煮沸处理的细菌)和未处理的细菌中分别提取LAMs,并使用抗酸杆菌LAM检测ELISA对其进行测定。结果显示在图18中。当比较未处理的细菌(白色柱)、煮沸处理的细菌(黑色柱)和高压灭菌的细菌(灰色柱)时,在所有这些中的值是完全相同的,这表明也可以与未处理的细菌类似地测定经过严苛处理(如煮沸和高压灭菌)的细菌细胞中的LAM。

[0509] 另外,使用进行高压灭菌(121°C,20分钟)的细菌细胞进行储存稳定性的评价,高压灭菌是最严苛的处理。将高压灭菌的BCG细菌细胞在25°C放置7天后,对从中提取的LAM进行抗酸杆菌LAM检测ELISA。图19显示该结果(黑色柱)和对在高压灭菌后立即从BCG细菌细胞中提取的LAM进行抗酸杆菌LAM检测ELISA的结果(白色柱)。从图19可以理解,在二者之间几乎没有差别,并且由高压灭菌后放置7天的细菌细胞获得与处理后立即从细菌细胞获得的结果相似的结果。这表明所述测定可以在灭菌处理后至少一周使用。

[0510] 从上述结果,证实了,使用本发明的测定系统,甚至当靶标是对其进行了严苛的处理(如加压蒸汽灭菌(高压灭菌))的细菌细胞时,测定也是可行的,并且测定可以在处理后至少一周稳定进行。

[0511] 因此,甚至在没有专门的样品转运系统付诸实施的地区,使用一般的转运系统(如邮寄等)进行样品运输也是可行的。此外,在时间上,由于存在约一周的宽限期,能够想到样品转运过程中的延误将不再是问题。

[0512] 自由正文

[0513] SEQ ID NOs:9和10显示GS接头序列的单位氨基酸序列,SEQ ID NOs:11和40显示用于本发明的接头序列的氨基酸序列。SEQ ID NOs:13-16显示抗体重链可变区有义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:17显示抗体重链可变区反义引物的氨基酸序列;SEQ ID NOs:18-20和24显示抗体轻链可变区有义引物的氨基酸序列;SEQ ID NOs:21-23和25显示抗体轻链可变区反义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:26显示GS接头有义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:27显示GS接头反义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:28显示限制酶(SfiI)位点引物的氨基酸序列;并且SEQ ID NO:29显示限制酶(NotI)位点引物的氨基酸序列(见表1)。

[0514] SEQ ID NO:41显示抗体重链可变区有义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:42显示抗体重链可变区反义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:43显示抗体轻链可变区有义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:44显示抗体轻链可变区反义引物的氨基酸序列;SEQ ID NO:45显示GS接头有义引物的氨基酸序列;并且SEQ ID NO:46显示GS接头反义引物的氨基酸序列(见表3)。

序列表

<110> 大塚制药株式会社
 <120> 抗-脂阿拉伯甘露聚糖抗体和使用该抗体对抗酸杆菌感染的免疫测定
 <130> P12-189
 <150> JP 2012-044796
 <151> 2012-02-29
 <160> 54
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 兔科 (Leporidae)
 <400> 1
 Thr Tyr Tyr Met Thr
 1 5

 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 兔科
 <400> 2
 Thr Ile Asp Ser Tyr Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

 [0001]
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 兔科
 <400> 3
 Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asn Asp Asn Ile
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 兔科
 <400> 4
 Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Gly Asn Asn Gln Leu Ala
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 兔科
 <400> 5
 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 兔科

<400> 6

Cys Gly Gly Tyr Lys Gly Ser Thr Thr Asp Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 兔科

<400> 7

Ala Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Thr Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Ser Tyr Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Gln Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
65 70 75 80

Met Thr Gly Leu Thr Ala Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg
85 90 95

[0002]

Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asn Asp Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ser Ser
115

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 兔科

<400> 8

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Gly Asn
20 25 30

Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
65 70 75 80

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Lys Gly Ser
85 90 95

Thr Thr Asp Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400> 9

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

[0003]

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 兔科

<400> 12

Ala Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Thr Ile Asp Ser Tyr Gly Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Gln Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 65 70 75 80

Met Thr Gly Leu Thr Ala Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Arg
 85 90 95
 Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asn Asp Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Val Pro Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Tyr Gly Asn Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 165 170 175
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Gln Phe Thr
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 210 215 220

[0004]

Gly Gly Tyr Lys Gly Ser Thr Thr Asp Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Val Val Lys
 245

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> VH区有义引物
 <400> 13
 gccggcggcc cagtcgggtgg aggagtcerg g 31

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> VH区有义引物
 <400> 14
 gccggcggcc cagtcgggtga aggagtcgga g 31

<210> 15
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> VH区有义引物

	<400> 15 gceggccgcc cagtcgytgg aggagtcgg g	31
	<210> 16 <211> 33 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VH区有义引物	
	<400> 16 gceggccgcc cagsagcage tgrtggagtc cgg	33
	<210> 17 <211> 38 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VH区反义引物	
	<400> 17 ctccacctg aggatgarga gayggtgacc aggtgccc	38
	<210> 18 <211> 32 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VL区有义引物	
[0005]	<400> 18 geggatcgga gctcgtgmtg acccagaetc ea	32
	<210> 19 <211> 32 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VL区有义引物	
	<400> 19 geggatcgga gctcgtatmg acccagaetc ca	32
	<210> 20 <211> 32 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VL区有义引物	
	<400> 20 geggatcgga gctcgtgatg acccagaetc aa	32
	<210> 21 <211> 34 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> VL区反义引物	
	<400> 21 acctgcggcc gcttaggatc tccagctcgg tccc	34

	<210> 22	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> VL区反义引物	
	<400> 22	
	acctggcgcc gcttttgatt tccacattgg tgcc	34
	<210> 23	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> VL区反义引物	
	<400> 23	
	acctggcgcc gcttttgacc accacetcgg tccc	34
	<210> 24	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> VL区有义引物	
	<400> 24	
	gcgatcggga gctcgtcctg actcagtcgc cctc	34
[0006]	<210> 25	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> VL区反义引物	
	<400> 25	
	acctggcgcc gcgcctgtga cggtcagctg ggtccc	36
	<210> 26	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> GS 接头有义引物	
	<400> 26	
	tcctcctcag gtggaggcgg ttcaggcggg ggtgctctg gcggtggcgg atcggagctc	60
	g	61
	<210> 27	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> GS 接头反义引物	
	<400> 27	
	cgagctcaga tccgccaccg ccagagccac ctccgctga accgcctcca cctgaggatg	60

<p>a</p> <p><210> 28 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的</p> <p><220> <223> Sfi-I位点引物</p> <p><400> 28 agcggcccag ccggccgcc ag</p> <p><210> 29 <211> 12 <212> DNA <213> 人工的</p> <p><220> <223> Not-I位点引物</p> <p><400> 29 accgcccgc gc</p> <p><210> 30 <211> 246 <212> PRT <213> 兔科</p> <p><400> 30</p> <p>Ala Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr 1 5 10 15</p> <p>Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asn Tyr 20 25 30</p> <p>Pro Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45</p> <p>Gly Cys Ile Glu Asp Ser Gly Arg Ile Lys Asp Ala Ser Trp Ala Lys 50 55 60</p> <p>Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys 65 70 75 80</p> <p>Leu Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg 85 90 95</p> <p>Asp Ala Gly Trp Ser Trp Trp Thr Gln Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly 100 105 110</p> <p>Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 115 120 125</p> <p>Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro 130 135 140</p> <p>Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln 145 150 155 160</p> <p>Ala Asn Glu Asn Ile Gly Arg Phe Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro</p>	<p>61</p> <p>22</p> <p>12</p>
---	-------------------------------

[0007]

<213> 家鸡

<400> 35

Ser Asn Asp Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> 家鸡

<400> 36

Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Val
1 5 10

<210> 37

<211> 130

<212> PRT

<213> 家鸡

<400> 37

Met Ala Leu Pro Ala Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu
1 5 10 15

Glu Thr Pro Gly Gly Val Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe
20 25 30

Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

[0009]

Gly Leu Gln Trp Val Ala Gly Ile Ser Gly Asp Asp Ser Arg Tyr Thr
50 55 60

Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala
85 90 95

Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Phe Ser Asp Gly Ser
100 105 110

Gly Ala Asp His Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val
115 120 125

Ser Ser

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> 家鸡

<400> 38

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Ser Asn Asp Lys
 35 40 45
 Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Glu Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Val Phe
 85 90 95
 Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His
 100 105 110
 His His His His
 115
 <210> 39
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 家鸡
 <400> 39
 Met Ala Leu Pro Ala Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 [0010] Gln Thr Pro Gly Gly Val Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe
 20 25 30
 Thr Phe Ser Ser Phe Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Gly Asp Asp Ser Arg Tyr Thr
 50 55 60
 Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala
 85 90 95
 Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Phe Ser Asp Gly Ser
 100 105 110
 Gly Ala Asp His Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val
 115 120 125
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr
 145 150 155 160
 Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Trp Tyr Glu
 165 170 175

Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Ser Asn Asp
180 185 190

Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly
195 200 205

Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Glu Asp Glu Ala
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gly Thr Tyr Asp Ser Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Val
225 230 235 240

Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Leu Glu His
245 250 255

His His His His His
260

<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 接头

<400> 40

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

[0011]

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 具有Sfi I位点的VH 区有义引物

<400> 41
ctatgggcc cagcggcgc cgtgacgtt ggacgag 37

<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> VH区反义引物

<400> 42
cctccaccgg aggagacgat gacttcggtc c 31

<210> 43
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> VL区有义引物

<400> 43
geggatggc cctgactcag ccgtcctcgg tgtc 34

	<210> 44	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 具有Not 1位点的VL区反义引物	
	<400> 44	
	acctggcgcc gctaggacgg tcagg	25
	<210> 45	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 6S 接头有义引物	
	<400> 45	
	tctccgggtg gagcggttc aggcggagat ggcctctggcg gtggcggate ggccttg	57
	<210> 46	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 6S 接头反义引物	
	<400> 46	
	caggcgcat ccgccaccgc cagagccatc tccgctgaa ccgcctccac cggagg	56
[0012]	<210> 47	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> 兔科	
	<400> 47	
	Asn Tyr Pro Met Cys	
	1 5	
	<210> 48	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> 兔科	
	<400> 48	
	Cys Ile Glu Asp Ser Gly Arg Ile Lys Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly	
	1 5 10 15	
	<210> 49	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 兔科	
	<400> 49	
	Asp Ala Gly Trp Ser Trp Trp Thr Gln Leu Asp Leu	
	1 5 10	
	<210> 50	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 兔科	
	<400> 50	

Gln Ala Asn Glu Asn Ile Gly Arg Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 兔科

<400> 51

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> 兔科

<400> 52

Cys Leu Gly Gly Pro Asn Asn Val Val Asp Gly Ala Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> 兔科

<400> 53

Ala Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr
1 5 10 15

[0013]

Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Pro Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Cys Ile Glu Asp Ser Gly Arg Ile Lys Asp Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
65 70 75 80

Leu Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg
85 90 95

Asp Ala Gly Trp Ser Trp Trp Thr Gln Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 110
<212> PRT
<213> 兔科

<400> 54

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Asn Glu Asn Ile Gly Arg Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0014]

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val His Cys
 65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Ser Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Pro Asn Asn Val Val
 85 90 95

Asp Gly Ala Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

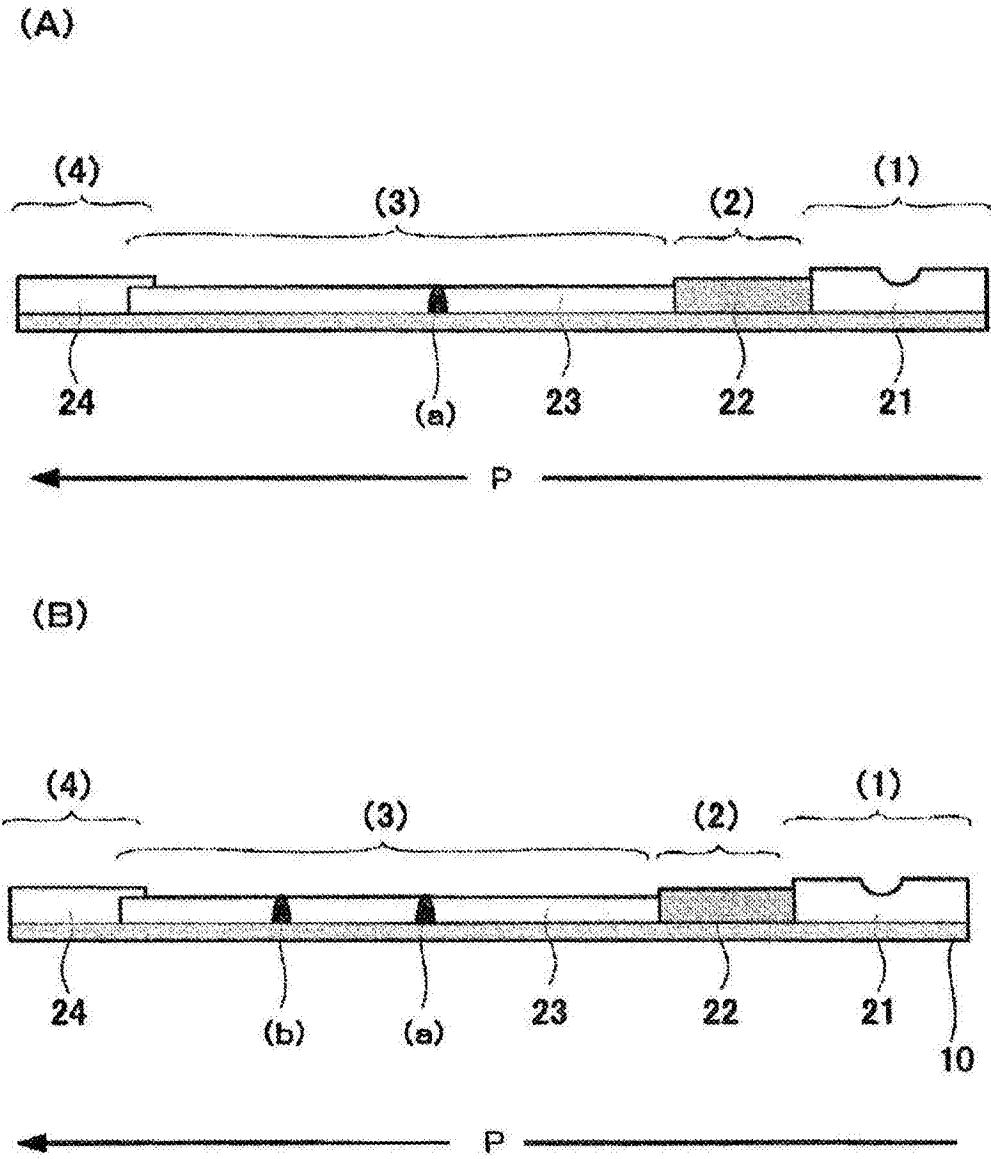


图1

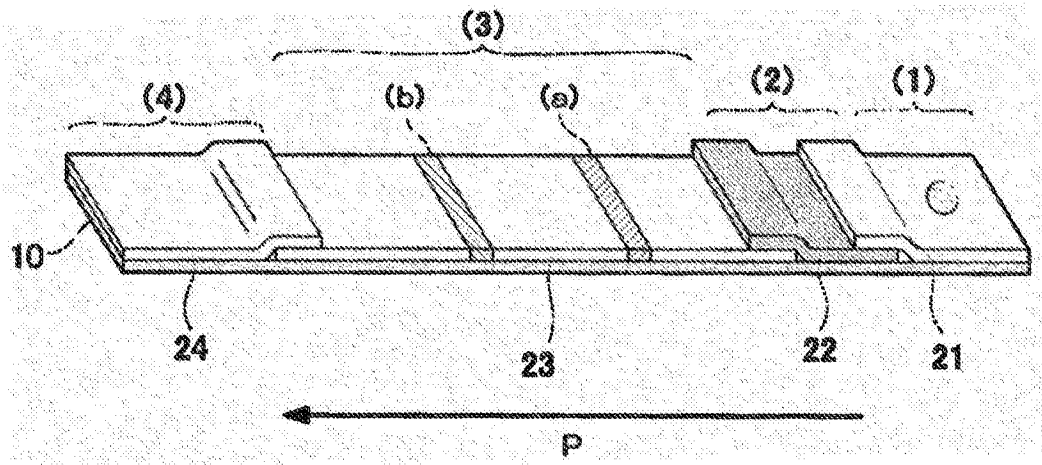


图2

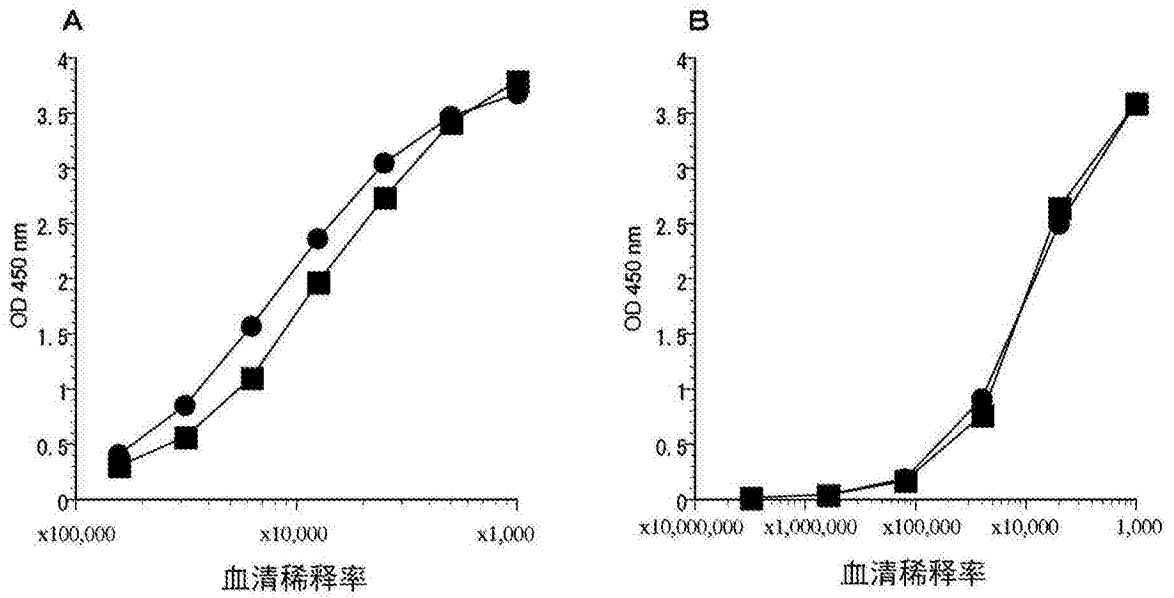


图3

	10	20	30	40	50
Myco-scFv	AQSVKESGGR	LVTPGTPLTL	TCTASGFTIT	NYPMCWVRQA	PGEGLIEWIGC
TB-scFv	AQSVKESGGR	LVTPGGSLTL	TCTVSGIDLT	TYMTWIRQA	PGKGLEWIGT
			CDR1=====		CDR2=
	60	70	80	90	100
Myco-scFv	IEDSGRIKDA	SWAKGRFTMS	KTSSTVDLK	LTSPTTEDTA	TYFCVRDAGW
TB-scFv	IDSYGNRYYA	SWAKGGFTIS	KTSSTVDLK	MTGLTASDTA	TYFCTRDDLG
	=====				CDR3=====
	110	120	130	140	150
Myco-scFv	SWWTQLDLWG	QGTLVTSSS	SGGGGSGGDG	SGGGGSELVM	TQTPSSVSAA
TB-scFv	WNNDNI--WG	PGTLVTVSSS	SGGGGSGGGG	SGGGGSELVM	TQTPSSKSVP
	=====		linker-----		
	160	170	180	190	200
Myco-scFv	VGDTVTIKCG	ANENI--GRF	LAWFQQKPGQ	RPKLLIYSAS	SLASGVSSRF
TB-scFv	VGDTV TINCG	ASESVYGNNG	LAWYQQKPGQ	PPKLLIYKAS	TLASGVPSRF
		CDR1=====		CDR2=====	
	210	220	230	240	
Myco-scFv	SGSGYGTDFE	LTISGVHCDD	AASYCLGGP	NNVVDGASFG	GGTEVVVK
TB-scFv	KSGYGTQFT	LTISDVVCDD	AATYYCGGYK	GSTTDGAAFG	GGTEVVVK
			CDR3=====		

图4

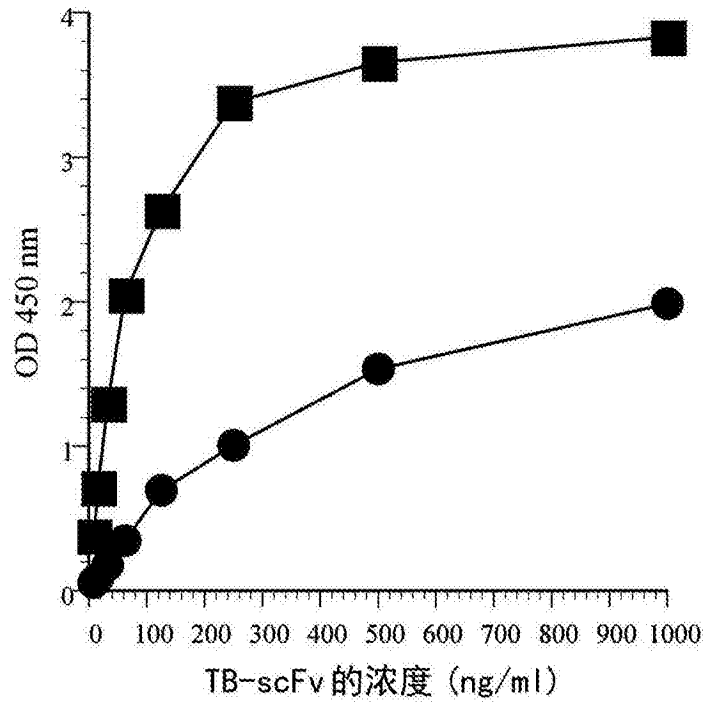


图5

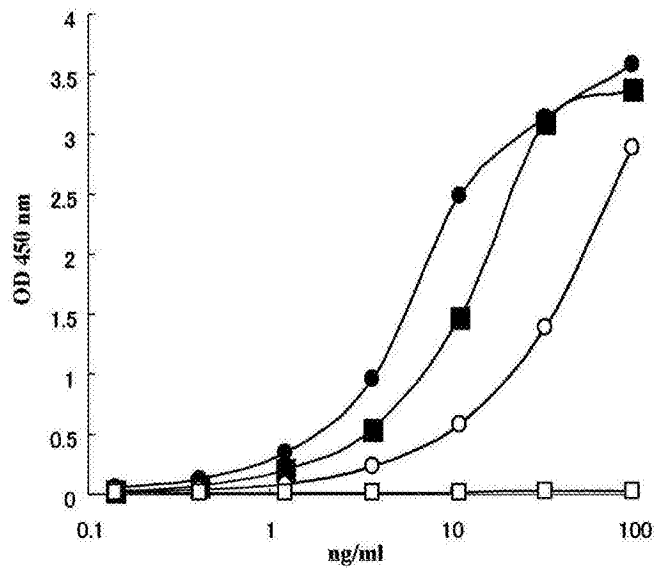


图6

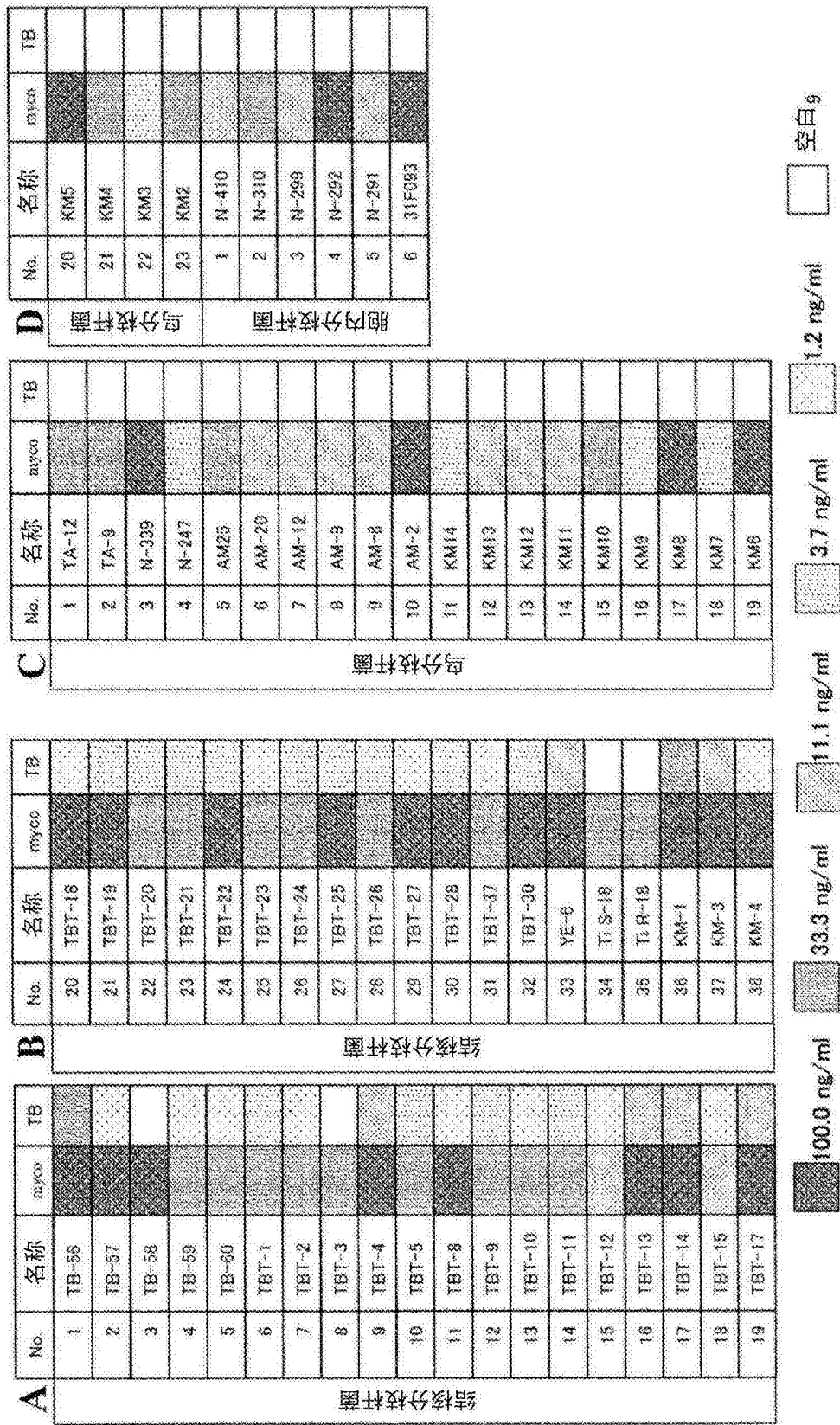


图7

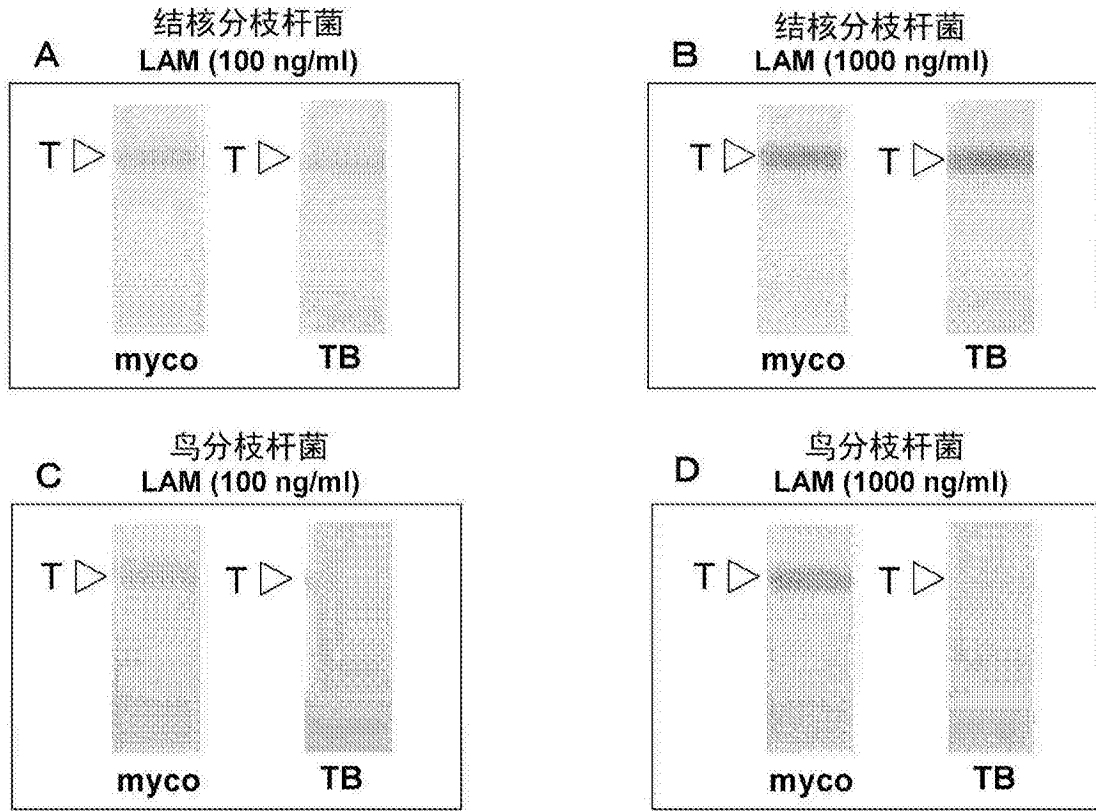


图8

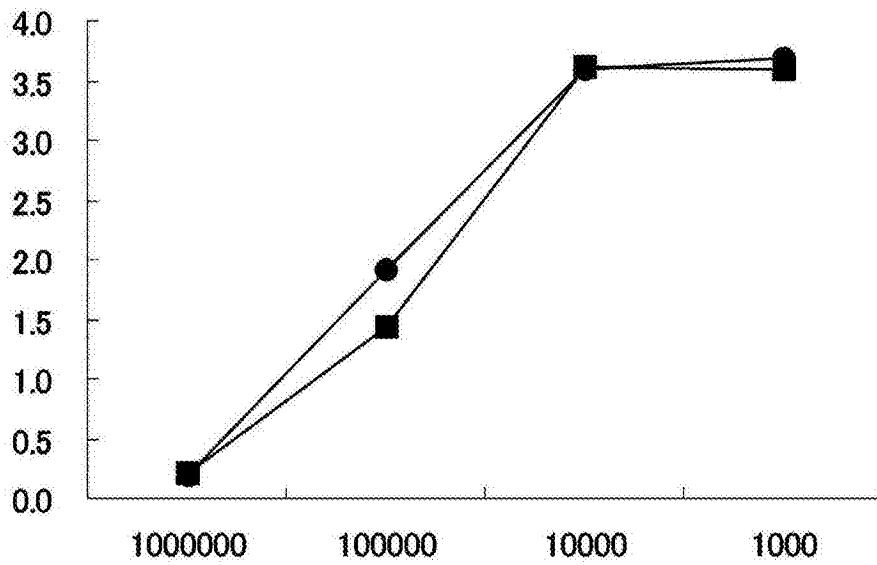


图9

```

      10      20      30      40      50
MALPAAVTLD ESGGGLQTPG GVLSLVCKAS GFTFSSFNMH WVRQAPGKGL
                        CDR1=====

      60      70      80      90      100
EWVAGISGDD SRYTYTNYAP AVKGRATISR DNGQSTVRLQ LNNLRAEDTG
GDR2===== =====

      110     120     130     140     150
TYYCAKDFSD GSGADHIDAW GHGTEVIVSS GGGGSGGDGS GGGGSALTQP
      CDR3===== linker- -----

      160     170     180     190     200
SSVSANPGET VKITCSGSSS WYGWYQKSP GSAPVTLIYS NDKRPSNIPS
                        CDR1===== CDR2= =====

      210     220     230     240     250
RFSGLSGST NTLTITGVQV EDEAVYFCGT YDSSDRYIGI FGAGTTLTVL
                        CDR3== =====

      260
AAALEHHHHH H

```

图10

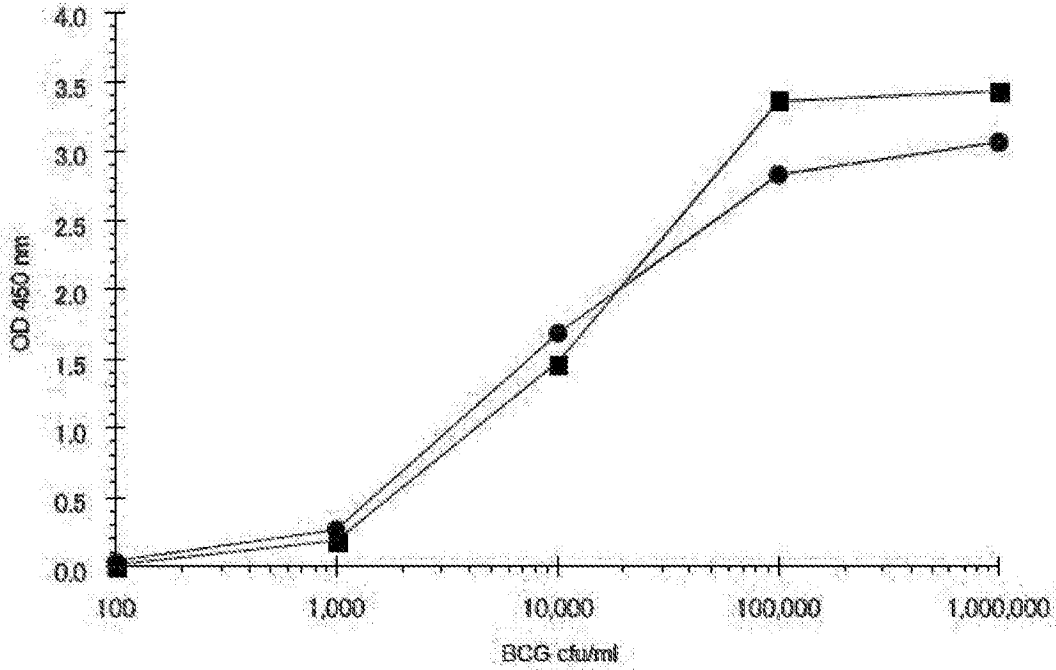


图11

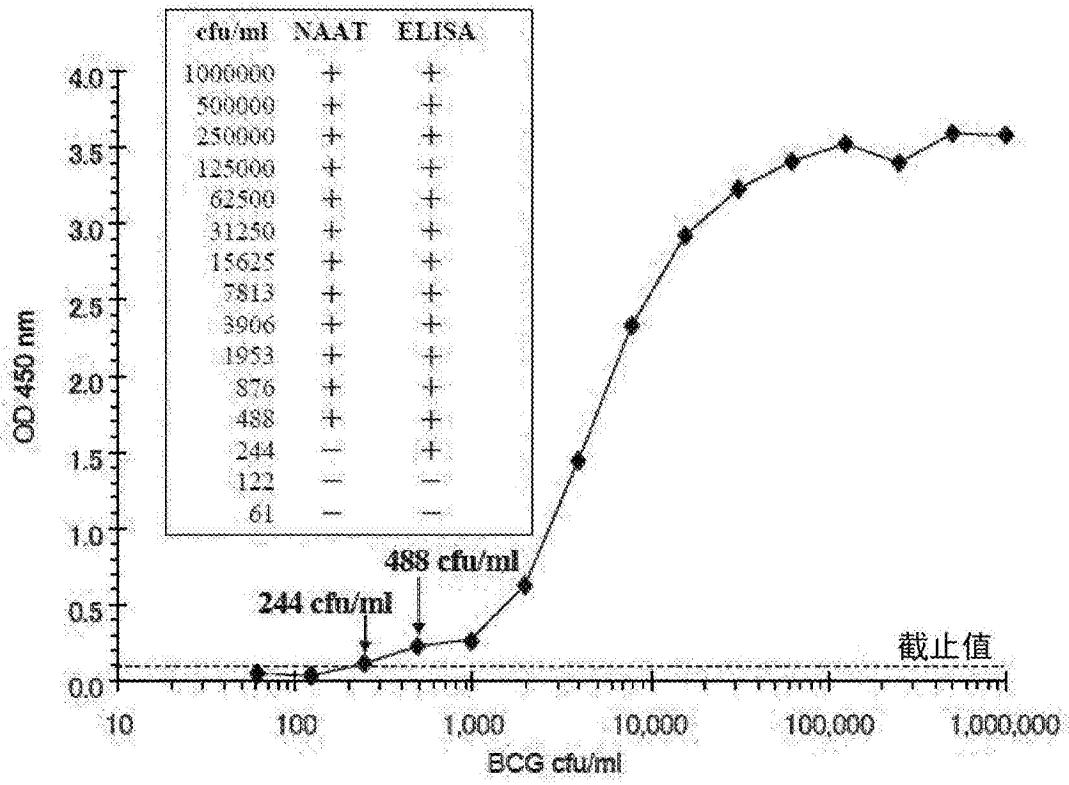


图12

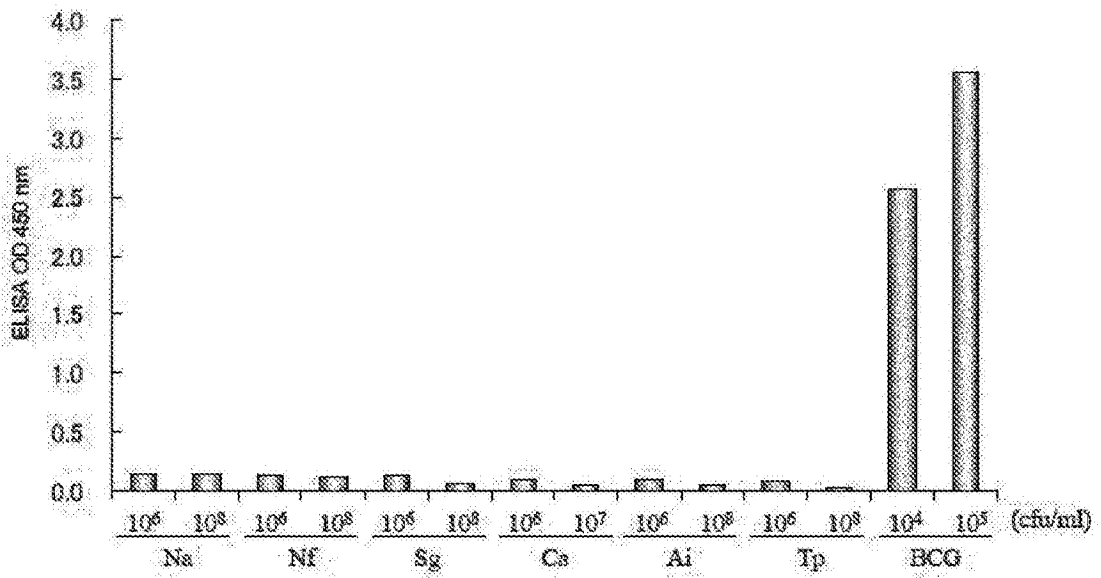


图13

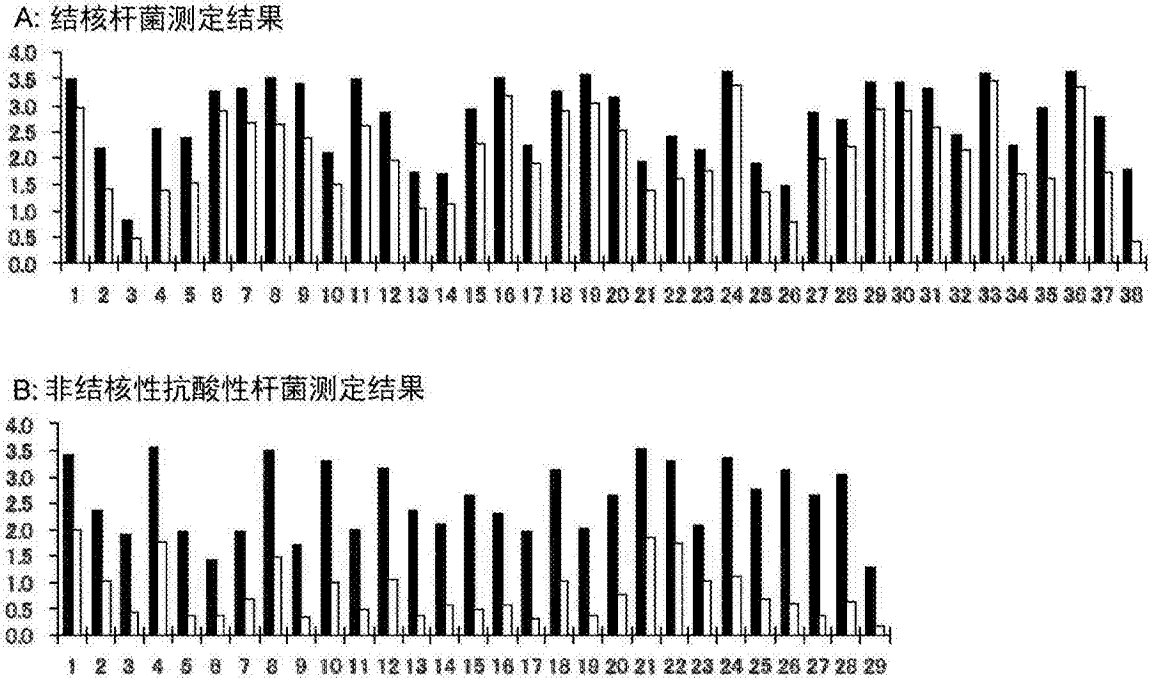


图14

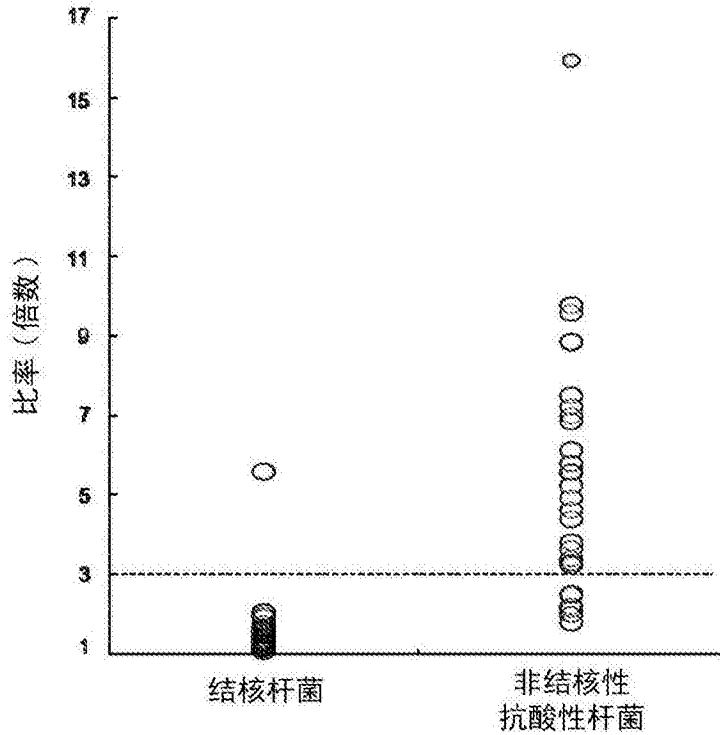


图15

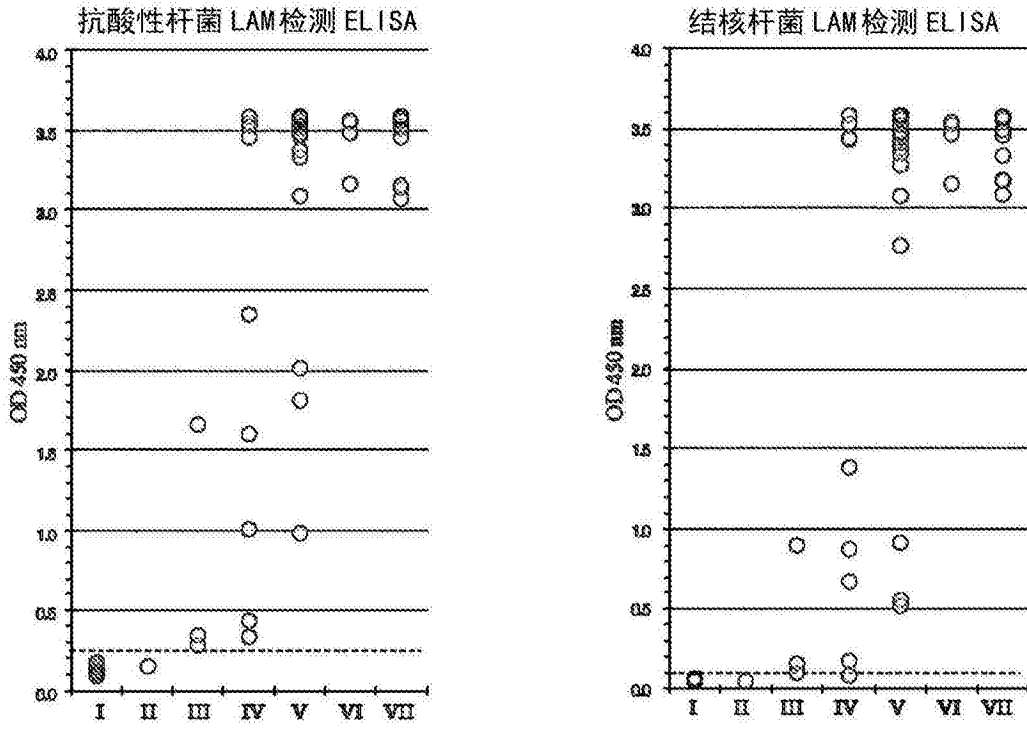


图16

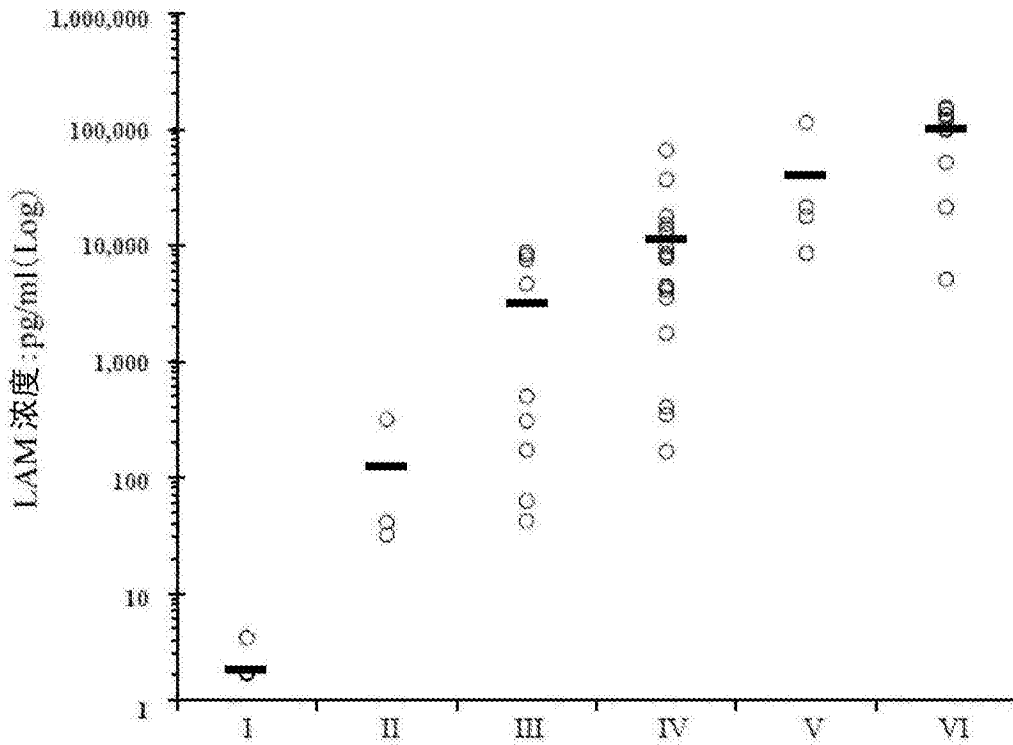


图17

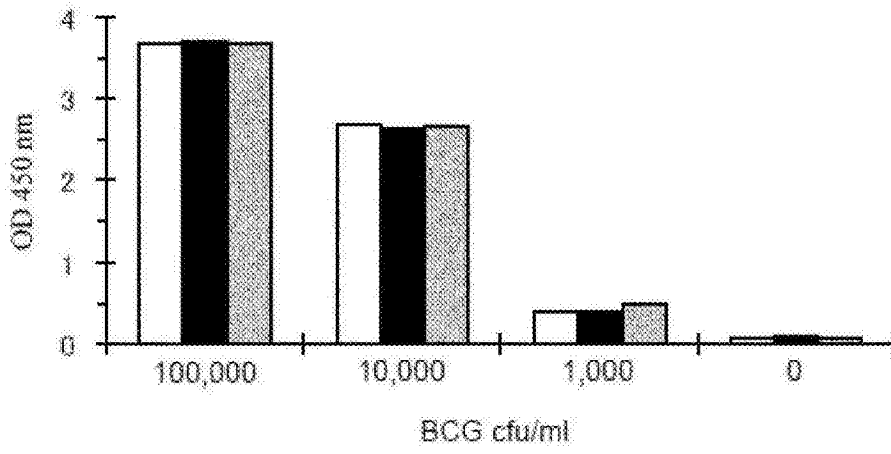


图18

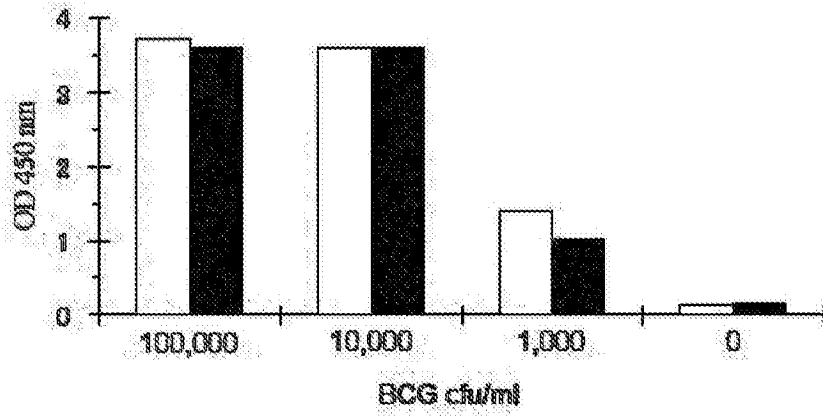


图19

专利名称(译)	抗-脂阿拉伯甘露聚糖抗体和使用该抗体对抗酸杆菌感染的免疫测定		
公开(公告)号	CN104144944B	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201380011658.6	申请日	2013-02-28
申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社		
[标]发明人	葛城肃典 富樫将高 织田哲弥 伊藤隆太 川口知惠 西条容子 古贺大辅 松本真 藤原守 小野贤司		
发明人	葛城肃典 富樫将高 织田哲弥 伊藤隆太 川口知惠 西条容子 古贺大辅 松本真 藤原守 小野贤司		
IPC分类号	C07K16/12 C12M1/34 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/1289 C07K2317/35 G01N33/5695 C07K16/1203 G01N33/53 C07K16/005 C07K16/1285 C07K2317/622 G01N2333/35 G01N2400/50		
代理人(译)	张国梁		
审查员(译)	王奇		
优先权	2012044796 2012-02-29 JP		
其他公开文献	CN104144944A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种单克隆抗体，其特异性结合抗酸杆菌脂阿拉伯甘露聚糖，特别是结核杆菌脂阿拉伯甘露聚糖，所述抗体描述如下：
 (A)单克隆抗体，其包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含下述(a)-(c)所示的重链CDR1-CDR3，并且所述轻链可变区包含下述(d)-(f)所示的轻链CDR1-CDR3；(a)由SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列组成的重链CDR1，(b)由SEQ ID NO：2所示的氨基酸序列组成的重链CDR2，(c)由SEQ ID NO：3所示的氨基酸序列组成的重链CDR3，(d)由SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列组成的轻链CDR1，(e)由SEQ ID NO：5所示的氨基酸序列组成的轻链CDR2，和(f)由SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列组成的轻链CDR3。本发明还提供所述抗体的应用。

