



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112424602 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 201980044587.7

(22) 申请日 2019.07.26

(30) 优先权数据

2018-141178 2018.07.27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/029353 2019.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/022467 JA 2020.01.30

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 砂村荣一郎 与谷卓也

(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 宋明 张莹

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54) 发明名称

生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的免疫分析方法、(1→3)-β-D-葡聚糖分析试剂盒以及(1→3)-β-D-葡聚糖免疫分析方法中使用的生物样品碱性预处理溶液

(57) 摘要

本文要解决的问题是进行生物样品中的BG的免疫分析方法,该方法操作简单且灵敏度与鲎试剂相当。该问题可以通过将碱性溶液预处理生物样品结合使用与BG特异性反应的抗BG单克隆抗体来解决。

1. 一种生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的免疫分析方法,包括以下步骤:
用碱性溶液预处理生物样品;和
使用抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体分析生物样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖。
2. 根据权利要求1所述的免疫分析方法,其中,所述生物样品是血液、血浆或血清。
3. 根据权利要求1或2所述的免疫分析方法,其中,所述碱性溶液的pH为11以上。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫分析方法,其中使用ELISA。
5. 生物样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,包括以下(a)和(b):
(a) 固定有第一抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体的固相;和
(b) 生物样品的碱性预处理溶液。
6. 根据权利要求5所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,其中,所述生物样品是血液、血浆或血清。
7. 根据权利要求5或6所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,其中,(b)所述生物样品的碱性预处理溶液的pH为11以上。
8. 根据权利要求5至7中任一项所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,进一步包括(c)用于中和所述生物样品的碱性预处理溶液的溶液。
9. 根据权利要求5至8中任一项所述的生物样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,进一步包含(d)用标记物质标记的第二抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体。
10. 生物样品的碱性预处理溶液,其在使用抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体的生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的免疫分析方法中使用。
11. 根据权利要求10所述的生物样品的碱预处理溶液,其中,pH为11以上。

生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的免疫分析方法、(1→3)-β-D-葡聚糖分析试剂盒以及(1→3)-β-D-葡聚糖免疫分析方法中使用的生物样品碱性预处理溶液

技术领域

[0001] 本发明涉及生物样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖(以下有时简称为BG)的免疫分析方法。本发明还涉及用于生物样品中BG免疫分析的试剂盒和生物样品中BG免疫分析方法中使用的生物样品碱性预处理溶液。

背景技术

[0002] β-D-葡聚糖是其中多个葡萄糖分子通过β键结合的葡萄糖聚合物。葡萄糖的1位碳原子可与另一个葡萄糖的5个碳原子中的每一个结合,即1位碳原子、2位碳原子、3位碳原子、4位碳原子和6位碳原子。据报道,1位和3位(1→3)、1位和4位(1→4)或1位和6位(1→6)的结合组合经常出现在天然β-D-葡聚糖中。

[0003] β-D-葡聚糖是真菌的细胞壁组成成分,是其他微生物(如细菌)中找不到的特征性物质。由于此特征,β-D-葡聚糖分析法已用于深部真菌病的检测。深部真菌病是一种机会性感染,患者由于抵抗力减弱而导致免疫功能失调,患者陷入极为危急的状态。深部真菌病的典型致病真菌的实例包括念珠菌属(*Candida*)和曲霉属(*Aspergillus*)。由于存在BG是这些致病生物的细胞壁所共有的,因此测量体液中的BG已用于深部真菌病感染的辅助诊断。

[0004] 目前,利用鲎(horseshoe crab)对BG的保护反应的鲎(*Limulus*)试剂用于检测深部真菌病(专利文献1和2)。该鲎试剂被批准用作体外诊断。但是,使用这种鲎试剂的方法需要天然资源鲎的血液,因此除了引起资源枯竭的问题之外,维持特定品质的成本也很高。该方法的另一个缺点是由于该技术需要多个步骤,因此易于发生分散。

[0005] 近年来,为了消除鲎试剂的缺点并更快速、更容易地测量BG,试图通过使用识别BG的抗体来测量BG(专利文献3和4,非专利文献1至3)。然而,就BG测量灵敏度而言,这些方法中使用的抗体远不如鲎试剂。因此,尚不存在临床上可用于测量任何实际含有源自真菌的BG的样品(例如血浆)的BG的免疫分析方法。

[0006] 引文列表

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本专利第5089375号

[0009] 专利文献2:日本专利第3553656号

[0010] 专利文献3:日本特开平4-346791号

[0011] 专利文献4:日本专利第5054426号

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Use of beta-1,3-glucan-specific antibody to study the cyst wall of *Pneumocystis carinii* and effects of pneumocandin B0 analog L-733,560. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994Oct;38(10):2258-2265.

[0014] 非专利文献2:Plasma(1→3)-β-D-glucan assay and immunohistochemical

staining of (1→3)-β-D-glucan in the fungal cell walls using a novel horseshoe crab protein (T-GBP) that specifically binds to (1→3)-β-D-glucan. Journal of Clinical Laboratory Analysis 1997 Volume 11, Issue 2, 104-109.

[0015] 非专利文献3: A novel monoclonal antibody recognizing beta (1-3) glucans in intact cells of Candida and Cryptococcus. APMS 2008 Oct; 116 (10): 867-876.

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 如上所述,就BG测量的灵敏度而言,使用识别BG的抗体测量BG的常规技术不如鲎试剂。因此,期望使用抗体的具有与鲎试剂相当的BG检测灵敏度且易于操作的BG分析方法。

[0018] 解决方案

[0019] 为了解决该问题,本发明人进行了深入研究,并制备了特异性识别BG的抗体。此外,本发明人发现,可以通过用碱性溶液预处理生物样品来进行具有与鲎试剂相当的灵敏度的BG免疫分析方法,从而完成了本发明。特别地,使用抗体的BG常规免疫分析方法具有较低的灵敏度,其不具有在临床上可使用的水平。在本发明中,通过将生物样品用碱性溶液预处理结合使用与BG特异性反应的抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体(以下有时称为抗-BG单克隆抗体),可以高灵敏度地分析生物样品中的BG。特别地,尽管常规使用抗体的BG免疫分析方法可以检测在1mL生物样品中以纳克存在的BG,但是本发明的免疫分析方法可以检测在1mL生物样品中以皮克存在的BG。

[0020] 具体地,本发明如下:

[0021] <1>一种生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的免疫分析方法,包括以下步骤:

[0022] 用碱性溶液预处理生物样品;和

[0023] 通过使用抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体分析生物样品中的(1→3)-β-D-葡聚糖。

[0024] <2>根据<1>所述的免疫分析方法,其中所述生物样品是血液、血浆或血清。

[0025] <3>根据<1>或<2>所述的免疫分析方法,其中所述碱性溶液的pH为11以上。

[0026] <4>根据<1>至<3>中任一项所述的免疫分析方法,其中使用ELISA。

[0027] <5>一种生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,包括以下(a)和(b):

[0028] (a) 固定有第一抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体的固相;和

[0029] (b) 用于生物样品的碱性预处理溶液。

[0030] <6>根据<5>所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,其中所述生物样品是血液、血浆或血清。

[0031] <7>根据<5>或<6>所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,其中(b)用于生物样品的碱性预处理溶液的pH为11以上。

[0032] <8>根据<5>至<7>中任一项所述的(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,进一步包括(c)用于中和所述生物样品的碱性预处理溶液的溶液。

[0033] <9>根据<5>至<8>中任一项所述的生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的分析试剂盒,进一步包含(d)用标记物质标记的第二抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体。

[0034] <10>生物样品的碱性预处理溶液,其用于使用抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体

的生物样品中的(1→3)- β -D-葡聚糖免疫分析方法中。

[0035] <11>根据<10>所述的生物样品的碱性预处理溶液,其中pH为11以上。

[0036] 发明的效果

[0037] 根据本发明,可以进行灵敏度与鲎试剂相当的生物样品中的BG免疫分析方法。本发明可以提供灵敏度与鲎试剂相当的生物样品中的BG的免疫分析试剂盒。

附图说明

[0038] [图1]图1是示出与通过酸性溶液预处理或通过加热预处理相比,通过碱性溶液预处理的本发明效果的图。

[0039] [图2]图2是示出与通过酸性溶液预处理或通过加热预处理相比,通过碱性溶液预处理的本发明效果的图。

[0040] [图3]图3是示出不同pH值对本发明效果的影响的图。

[0041] [图4]图4是示出通过碱性溶液预处理的时间的研究结果图。

[0042] [图5]图5是示出在通过碱性溶液预处理期间对温度条件的研究结果图。

[0043] [图6]图6是示出本发明的BG免疫分析方法的检测下限的研究结果的图。

[0044] [图7]图7是示出本发明的BG免疫分析方法与市售的鲎试剂之间的相关性的图。

具体实施方式

[0045] [1]生物样品中(1→3)- β -D-葡聚糖的免疫分析方法

[0046] (生物样品)

[0047] 本发明中“生物样品”的实例包括源自活体(生物)的实体组织和体液,并且优选使用体液。本发明中的生物样品更优选为血液、血清、血浆、尿液、唾液、痰、泪液、耳漏或前列腺液,更优选为血液、血清或血浆,进一步优选为怀疑患有深部真菌病的受试者的血液、血清或血浆,最优选怀疑患有由念珠菌属和/或曲霉属致病真菌引起的深部真菌病的受试者的血液、血清或血浆。活体或受试者的实例包括人或动物(例如,猴子、狗、猫、小鼠、豚鼠、大鼠、仓鼠、马、牛、猪、鸟和鱼),并且优选为人。

[0048] (预处理)

[0049] 本发明的免疫分析方法包括用碱性溶液预处理生物样品的步骤。进行预处理的时间没有特别限制,例如为30秒以内、1分钟以内、3分钟以内或5分钟以内。预处理可以进行5分钟以上。只要能够获得本发明的效果,还可以在用碱性溶液进行预处理之前或之后进行加热处理等。“用碱性溶液预处理生物样品”是指使碱性溶液和生物样品彼此接触。

[0050] (碱性溶液)

[0051] 对本发明的预处理步骤中使用的碱性溶液没有特别限制,只要能够获得本发明的效果即可,例如可以使用碱金属氢氧化物。特别优选氢氧化钠(NaOH)、氢氧化钾(KOH)或氢氧化锂(LiOH)。

[0052] 碱性溶液的pH为8以上,优选为9以上,更优选为10以上,进一步优选为11以上,最优选为12以上。碱性溶液的摩尔浓度没有限定,只要能够得到本发明的效果,例如在使用KOH的情况下,摩尔浓度为1mM以上,优选为4.5mM以上,更优选为9mM以上,进一步优选18mM以上,进一步优选35mM以上,最优选50mM以上。

[0053] (碱性溶液的温度)

[0054] 对本发明的预处理步骤中使用的碱性溶液的温度没有特别限制,只要能够获得本发明的效果即可。具体而言,例如,下限可以为0℃以上、4℃以上、10℃以上或者20℃以上,上限可以为70℃以下、60℃以下、50℃以下、40℃以下或37℃以下。具体范围优选为0℃至70℃,更优选为4℃至60℃,进一步优选为4℃至50℃,并且最优选为4℃至40℃。

[0055] 在本发明的预处理步骤中使用的碱性溶液优选为pH 9以上,温度为4℃至70℃,更优选为pH 10以上,温度为4℃至60℃,更优选为pH 11以上,温度为4℃至50℃,并且最优选pH为12以上,温度为4℃至40℃。

[0056] (碱性溶液的中和)

[0057] 在用碱性溶液处理生物样品之后,优选将碱性溶液中和。用于中和碱性溶液的溶液没有限制,只要能够获得本发明的效果即可,其实例包括Tris/HCl等。中和后的pH可以根据所使用的抗体和生物样品适当调节,并且可以调节至例如pH 6至9、pH 6.5至8.5或pH 7至8。

[0058] ((1→3)-β-D-葡聚糖)

[0059] 在本说明书中,“(1→3)-β-D-葡聚糖”和“BG”是指其中葡萄糖的1位碳和其他葡萄糖的3位碳以β型结合形式结合的葡聚糖。BG具有称为三重螺旋结构的独特结构。在本说明书中,“(1→3)-β-D-葡聚糖”和“BG”可包括其中葡萄糖以(1→6)形式结合到三重螺旋结构的外侧链上的(1→3)(1→6)-β-D-葡聚糖,例如海带多糖和香菇多糖。在本说明书中,“(1→3)-β-D-葡聚糖”和“BG”包括(1→3)(1→4)-β-D-葡聚糖,例如衍生自大麦的β-葡聚糖和地衣多糖,除了(1→3)结合形式外,还包括(1→4)结合形式。

[0060] 本发明中的“(1→3)-β-D-葡聚糖”或“BG”的实例包括海带多糖(laminarin)、香菇多糖(lentinan)、茯苓聚糖(pachyman)、凝胶多糖(curdlan)、海带多糖四糖(laminaritetraose)、裸藻淀粉(paramylon)、羧甲基茯苓聚糖(carboxymethylpachyman)、羧甲基凝胶多糖(carboxymethylcurdlan)和存在于引起深部真菌病的真菌细胞壁上的BG(例如,曲霉属真菌细胞壁上存在的BG、念珠菌属真菌细胞壁上存在的BG)。

[0061] 如本文所用,“深部真菌病”是指真菌进入身体的深部例如肺、肝脏、肾脏或脑部引起感染的病状。深部真菌病主要发生在接受器官移植并接受免疫抑制药物的患者中。深部真菌病的致病真菌的实例包括曲霉属真菌和念珠菌属真菌,并且本发明的免疫分析方法可以有效地分析存在于这些真菌细胞壁上的BG。

[0062] (抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体)

[0063] 本发明中使用的抗(1→3)-β-D-葡聚糖单克隆抗体和“抗BG单克隆抗体”与BG特异性反应。“与BG特异性反应”是指抗体与BG反应并且基本上不与具有相似结构的物质反应。“基本上不反应”的含义参见下文描述。用于本发明的抗BG单克隆抗体的具体实例包括单克隆抗体86202R、86207和86208。

[0064] 尽管在本说明书中同义地使用与BG“反应”、“识别”BG和“结合”BG,但是它们必须在最广义上解释而限于这些示例。抗体是否与抗原(化合物)例如BG“反应”,可以通过固定抗原的ELISA方法、竞争性ELISA方法、夹心ELISA方法等,以及使用表面等离子共振(SPR)原理进行确认。可以通过使用以Biacore(注册商标)的名称可商购的设备、传感器和试剂来执行SPR方法。

[0065] 陈述本发明中使用的抗体与某种化合物“不反应”是指本发明中使用的抗体与某种化合物基本上不反应,而陈述“基本不反应”是指例如当使用Biacore (注册商标) T100或T200基于SPR方法固定和测量本发明的抗体时,不能识别本发明中使用的抗体的增强的反应性。具体而言,这意味着抗体与化合物之间的反应性与对照(未添加化合物)的反应性没有显著差异。显然,除SPR方法外,还可以通过本领域技术人员熟知的方法或手段确认抗体与化合物“基本上不反应”。

[0066] 本发明的免疫分析方法中使用的抗BG单克隆抗体包括具有单克隆抗体功能的片段,只要能够获得本发明的效果。片段的实例包括含有通过酶消化抗BG单克隆抗体获得的单克隆抗体的Fab部分的功能片段、含有通过基因重组制备的单克隆抗体的Fab部分的功能片段,以及含有通过噬菌体展示法等制备的scFv的功能片段。

[0067] 本发明的免疫分析方法中使用的抗体,可以通过将BG例如海带多糖庚糖作为抗原(免疫原)溶解在溶剂例如磷酸盐缓冲盐水中,然后将该溶液施加至动物进行免疫。在根据需要向溶液中添加适当的佐剂后,可以使用乳剂进行免疫。佐剂可以是广泛使用的佐剂,例如油包水乳剂、水包油包水乳剂、水包油乳剂、脂质体或氢氧化铝凝胶,以及来源于生物成分的蛋白质或肽类物质。例如,可以优选使用弗氏不完全佐剂或完全佐剂。虽然没有特别限制,但期望的是,适当地选择佐剂的施用途径、施用剂量和施用时间,使得所期望的免疫应答可在通过抗原进行免疫的动物中增强。

[0068] 尽管没有特别限制,但用于免疫的动物的类型优选是哺乳动物,并且可以是小鼠、大鼠、牛、兔、山羊、绵羊和羊驼,并且更优选小鼠或大鼠。可以根据常规技术对动物进行免疫,例如,可以通过将抗原溶液,优选与佐剂的混合物皮下、皮内、静脉内或腹膜内注射给动物来实现免疫。由于免疫反应通常根据待免疫动物的类型和品系而不同,因此期望根据所用动物适当地设定免疫时间表。优选在初次免疫后重复几次抗原施用。

[0069] 尽管连续进行以下操作以获得单克隆抗体,但是该操作不限于此,并且产生单克隆抗体本身的方法在本领域中是众所周知的并且被广泛使用,因此用于本发明的免疫分析方法的抗体可以通过使用上述抗原容易地产生(参见,例如,抗体,实验室手册(冷泉港实验室出版社,(1988),第6章)。

[0070] 最终免疫后,可通过从被免疫的动物中提取作为抗体产生细胞的脾脏细胞或淋巴结细胞,并将其与具有高增殖能力的骨髓瘤来源的细胞系融合来产生杂交瘤。优选将具有高抗体产生能力(定量和定性)的细胞用于细胞融合,并且骨髓瘤来源的细胞系优选与待融合的产生抗体的细胞的动物相容。可以根据本领域已知的方法进行细胞融合,并且可以采用聚乙二醇方法、使用仙台病毒的方法或利用电流的方法。可以根据已知方法增殖获得的杂交瘤,并且可以在确认所产生的抗体的性质的同时选择期望的杂交瘤。杂交瘤可以通过有限稀释或软琼脂法等众所周知的方法克隆。

[0071] 考虑到所产生的抗体实际用于测量的条件,可以在选择阶段有效地选择杂交瘤。例如,在希望确认交叉反应性的化合物的存在下,使动物免疫后得到的抗体与固定在固相上的BG反应,可以与不存在希望确认交叉反应性的化合物的情况下进行比较,以便更有效地选择产生所需抗体的杂交瘤。或者,在存在生物样品来源的成分的情况下,使通过对动物进行免疫而得到的抗体与固定在固相上的BG反应,并且可以将反应性与不存在生物样品来源的成分的情况下进行比较,以更有效地选择产生所需抗体的杂交瘤。

[0072] 在克隆步骤之后,可以通过使用例如ELISA法、RIA法和荧光抗体法的方法来分析所产生的抗体与BG的结合能力,从而确认所选择的杂交瘤是否产生具有所需特性的单克隆抗体。

[0073] 具有所需性质的单克隆抗体可以通过如上选择的杂交瘤的大规模培养来产生。尽管不特别限制大规模培养的方法,但是其实例可以包括通过在适当的培养基中培养杂交瘤而在培养基中产生单克隆抗体的方法,以及通过将杂交瘤注射入哺乳动物的腹腔内进行增殖而在腹部水肿中产生抗体的方法。单克隆抗体可以通过适当地组合上述从抗血清中纯化抗体的方法来纯化,例如DEAE阴离子交换层析、亲和层析、硫酸铵分馏法、PEG分馏法和乙醇分馏法。

[0074] 用于本发明的免疫分析方法的抗体可以是完整的抗体分子以及具有抗原-抗体反应活性的抗体的片段,并且可以通过如上所述的动物免疫步骤或通过基因重组技术或嵌合抗体获得的抗体。抗体的片段优选是功能片段;优选地,其实例包括 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 $scFv$ 等;并且可以通过用蛋白水解酶(例如,胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)处理如上所述获得的抗体,或通过克隆抗体的DNA并在培养系统中使用大肠杆菌或酵母表达来产生这些片段。

[0075] 本发明的免疫分析方法中使用的抗体可以作为固定在不溶性载体上的固定的(固相)抗体使用,也可以作为后面描述的用本领域技术人员公知的标记物质标记的标记抗体使用。例如,可以通过使不溶性载体物理吸附或化学结合单克隆抗体(在它们之间可以存在合适的间隔子)来产生固定的抗体。不溶性载体可以由基于聚合物的材料例如聚苯乙烯树脂,基于无机物的材料例如玻璃以及基于多糖的材料例如纤维素和琼脂糖制成,其形状不受特别限制并且可以选自任何形状,例如板状(例如,微孔板和膜)、珠子或颗粒形状(例如,乳胶颗粒和胶体磁性颗粒)和管状(例如测试管)。

[0076] 通过使用可以与本发明的免疫分析方法中使用的抗体结合的标记抗体(第二抗体),可以分析与BG结合的抗体的量,从而可以检测生物样品中的BG。用于产生标记抗体的标记物质的实例包括酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、亲和素、放射性同位素、胶体金颗粒或有色乳胶。结合标记物质和抗体的方法可以是本领域技术人员可以使用的方法,例如戊二醛方法、马来酰亚胺方法、吡啶基二硫化物方法或高碘酸方法,固定抗体和标记的抗体的类型以及制备抗体的方法不限于这些实例。例如,当使用酶例如辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(ALP)作为标记物质时,可以通过使用该酶的特异性底物(例如,当酶是HRP时为0-苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB);当酶是ALP时为对硝基苯基磷酸酯);当将生物素用作标记物质时,至少亲和素或酶修饰的亲和素通常与之反应。在本发明的免疫分析方法中,优选将生物素或HRP用作标记物质。

[0077] 在本说明书中,“不溶性载体”可以表示为“固相”,并且用不溶性载体物理或化学地支持抗原或抗体,或者支持状态可以表示为“固定化”、“固定的”或“固相”。术语“分析”、“检测”或“测量”必须从最广泛的意义上解释,包括BG的存在性证明和/或定量,并且在任何意义上都不得以受限的方式解释。

[0078] (免疫分析法)

[0079] 本发明的免疫分析方法的实例包括但不限于ELISA、酶免疫分析、免疫组织化学染色法、表面等离子共振法、胶乳凝集免疫分析、化学发光免疫分析、电化学发光免疫分析、荧光抗体方法、放射免疫分析、免疫沉淀法、Western Blot法、免疫层析法、高效液相层析法

(HPLC)等。优选将ELISA用作本发明的免疫分析方法。在ELISA中,优选使用固定在固相上的第一抗BG单克隆抗体和标记的第二抗BG单克隆抗体的夹心ELISA。在这种情况下,可以将86207抗体用作第一抗BG单克隆抗体,并将86202R抗体用作第二抗BG单克隆抗体。相同的抗体可以用作第一抗BG单克隆抗体和第二抗BG单克隆抗体。固定在固相上的抗体或标记的抗体可以是多种抗体的混合物。生物素或HRP优选用作标记抗体的标记物质。

[0080] (诊断、诊断辅助和治疗深部真菌病)

[0081] 基于本发明的免疫分析方法的分析结果,可以诊断出受试者是否患有深部真菌病,或者可以辅助诊断。使用抗体的常规免疫分析方法的灵敏度不足,并且患有深部真菌病疾病早期的患者可能具有阴性结果。早期检测和早期治疗对深部真菌病很重要。通过使用本发明的高度灵敏的免疫分析方法,可以实现对深部真菌病的早期检测和早期治疗。

[0082] 在执行本发明的免疫分析方法之后,如果必要,基于分析生物样品中BG的步骤的结果,可以对患者实施另一种分析深部真菌病的方法,和/或可以对患者施用治疗深部真菌病的药物。

[0083] 本发明的免疫分析方法可包括检测生物样品中包含的6pg/mL或更多的BG的步骤,和/或将与所收集的生物样品相对应的受试者根据检测步骤的结果诊断为患有或怀疑患有深部真菌病的诊断步骤或辅助诊断步骤。可以根据生物样品的类型或免疫分析方法的类型来适当地设置截止值。例如,本发明的免疫分析方法可以包括检测生物样品中所含的BG为7pg/mL以上、8pg/mL以上、9pg/mL以上、10pg/mL以上、11pg/mL以上、20pg/mL以上、50pg/mL以上、80pg/mL以上,或100pg/mL以上的步骤,和/或将与所收集的生物样品相对应的受试者根据检测步骤的结果诊断为患有或怀疑患有深部真菌病的诊断步骤或辅助诊断步骤。与所收集的生物样品相对应的受试者可以是被给予抗癌剂或免疫抑制剂的受试者。

[0084] [2]生物样品中(1→3)-β-D-葡聚糖的检测试剂盒

[0085] 本发明提供的试剂盒包含(a)固相例如平板,其上固定有第一抗BG抗体,和(b)用于生物样品的碱性预处理溶液,并且优选包括(d)用标记物质标记的第二抗-BG单克隆抗体。固定有第一抗BG单克隆抗体的固相捕获生物样品中的BG,形成BG-抗体复合物。用标记物质标记的第二抗BG单克隆抗体与该BG-抗体复合物反应形成夹心状。样品中的BG可以通过用与标记物质相对应的方法测量标记物质的量来测量。对于构建试剂盒的特定方法,例如将第一抗BG单克隆抗体固定在固相上的方法和用标记物质标记第二抗-BG单克隆抗体的方法,本说明书中所述的方法以及本领域技术人员众所周知的方法可以不受限制地使用。

[0086] 对第一抗-BG单克隆抗体和第二抗-BG单克隆抗体没有特别限制,只要该抗体是与BG特异性反应的抗-BG单克隆抗体即可。例如,可以将86207抗体用作第一抗-BG单克隆抗体,并将86202R抗体用作第二抗-BG单克隆抗体。

[0087] 对于标记物质,例如,可以使用本领域技术人员已知的标记物质,例如荧光物质、化学发光物质、生物素和亲和素。根据待使用的标记物质和抗体,可以从已知的结合方法中适当地选择结合标记物质和抗体的方法,例如,一种方法,例如戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法或高碘酸法。优选将生物素或HRP用作标记物质。

[0088] 本发明的试剂盒也可以包含使用手册等。试剂盒可以包含任何组成元素,例如缓冲液、稳定剂、反应容器等。(b)用于生物样品的碱性预处理溶液的实例包括:碱性试样提取液和碱性试样稀释剂。

[0089] 本发明的试剂盒可以检测生物样品中包含的6pg/mL或更多的BG,并且基于该结果,可以将与所收集的生物样品相对应的受试者诊断为患有或怀疑患有深部真菌病。可以根据生物样品的类型等适当设定截止值。例如,本发明的试剂盒可以检测生物样品中所含的BG为7pg/mL以上、8pg/mL以上、9pg/mL以上、10pg/mL或以上、11pg/mL或以上、20pg/mL或以上、50pg/mL或以上、80pg/mL或以上或100pg/mL或以上,以及基于该结果,可以将与所收集的生物样品相对应的受试者诊断为患有或怀疑患有深部真菌病。

[0090] 在下文中将通过实施例具体描述本发明。然而,这些实施例不限制本发明的范围。

[0091] 实施例

[0092] [试验实施例1]本发明中使用的单克隆抗体的制备方法

[0093] 1. 免疫抗原的制备

[0094] 海带多糖庚糖(由Seikagaku Biobusiness Corporation制造)是具有以线性形状聚合的7个葡萄糖的结构BG,并且被用作免疫抗原。通过与非专利文献1中描述的相同的制备方法来制备海带多糖庚糖-转铁蛋白缀合物,并将其用作免疫抗原。

[0095] 2. 杂交瘤的产生和抗体的收集

[0096] 将由100 μ l制备的海带多糖庚糖-转铁蛋白缀合物溶液(1mg/mL)、0.25mL 0.1M PBS (pH 7.2)和0.25mL弗氏佐剂(完全佐剂或不完全佐剂)组成的悬液总量皮下施用至每个BALB/c小鼠(雌性)和F344/Jc1大鼠(雌性)的背部,或腹膜内施用至每个BALB/c小鼠(雌性)和F344/Jc1大鼠(雌性),总共3至6次。给药间隔为2周,并且第一次给药使用弗氏完全佐剂,而后四次给药使用弗氏不完全佐剂。第五次给药后一周,打开小鼠和大鼠的腹腔以去除它们的脾脏,并通过移液获得单细胞。

[0097] 将这些脾细胞用不添加血清的RPMI1640培养基洗涤两次,并与分别培养和洗涤的小鼠骨髓瘤细胞(X-63-Ag8-6.5.3)混合,比例为 1×10^7 骨髓瘤细胞: 5×10^7 脾细胞。离心混合物以除去上清液。充分溶解沉淀物,在37°C下缓慢加入用作融合促进剂的聚乙二醇1540(1mL)1分钟,并将混合物进一步搅拌1分钟以融合。将这些融合的细胞(杂交瘤)悬浮在补充有胎牛血清的10mL RPMI1640培养基中并离心后,将残留物接种在单个96孔培养板上,并在5%CO₂恒温箱中于37°C培养1周。在HAT培养基中于37°C下培养1周后,仅选择性收集杂交瘤。收集其培养物上清液以使用作为BG的一种的海带多糖作为抗原进行ELISA,并且选择克隆了三种高反应性杂交瘤(大鼠来源:86202R,小鼠来源:86207和86208)。从腹膜内注射了每种杂交瘤细胞的小鼠收集腹水,并在-80°C下冷冻保存。通过使用蛋白A或蛋白G柱从冷冻保存的腹水中纯化每种抗体。

[0098] [实施例1:确认不同预处理(碱、酸或加热)对样品中BG测量灵敏度的影响]

[0099] 在实施例1中,通过使用人血浆样品进行夹心ELISA,以检测碱预处理、酸预处理或加热预处理对BG测量灵敏度的影响。

[0100] 86207抗体用作固相抗体,生物素标记的86202R抗体用作液相抗体。

[0101] 1-1. 碱预处理

[0102] 向44 μ L人血浆样品中,添加77.4 μ L碱性预处理溶液(150mM KOH:氢氧化钾),并在37°C下孵育15分钟。随后,将98.6 μ L 1M Tris/HCl (pH7.5)添加到碱性预处理溶液中和碱性预处理溶液(总计220 μ L;样品稀释5倍;中和后的pH值小于7.9)。将其用作碱预处理的样品。

[0103] 向77.4 μ L的碱性预处理溶液中添加98.6 μ L的1M Tris/HCl (pH 7.5)以中和溶液。

随后,添加44 μ L的人血浆样品,以获得具有相同溶液组成并且未进行碱预处理的样品。

[0104] 1-2. 用酸(高氯酸)进行预处理

[0105] 向80 μ L人体血浆样品中加入80 μ L 2.5%高氯酸,在37 $^{\circ}$ C下孵育15分钟(生成白色沉淀物)。随后,将孵育的样品离心(14000rpm,15分钟,4 $^{\circ}$ C)以收集88 μ L上清液,并添加138 μ L的1M Tris/Cl (pH 7.5)以中和高氯酸(总共220 μ L;样品稀释5倍;中和后的pH值小于7.4)。使样品回到室温,然后用作酸预处理的样品。

[0106] 向44 μ L的2.5%高氯酸中加入138 μ L的1M Tris/Cl (pH 7.5),以提前中和。随后,添加44 μ L人血浆样品以获得具有相同溶液组成并且未用高氯酸预处理的样品。

[0107] 1-3. 加热预处理

[0108] 向44 μ L人血浆样品中,添加176 μ L PBS(总共220 μ L;样品稀释5倍),并在75 $^{\circ}$ C下孵育15分钟。将孵育的样品恢复到室温,然后用作加热预处理的样品。

[0109] 将稀释的人血浆样品在室温(20 $^{\circ}$ C至25 $^{\circ}$ C)下孵育15分钟,以获得具有相同溶液组成并且未经加热处理的样品。

[0110] 1-4. 样品量

[0111] 对于每个样品,准备两次测量的样品量(220 μ L;一次测量使用100 μ L),并将其用于夹心ELISA。

[0112] 1-5. 抗体的生物素标记

[0113] 将86202R抗体调节至2mg/mL(13.7 μ M,用PBS稀释),并与20倍量(274 μ M)的EZ-Link磺基-NHS-LC-生物素(Thermo Fisher Scientific制造)反应。该反应在冰上进行2小时。

[0114] 通过用PBS透析,除去未反应的EZ-Link磺基-NHS-LC-生物素。透析在4 $^{\circ}$ C下以100倍的量进行两次(使用Slide-A-Lyzer Diarysis Cassettes10k(由Thermo Fisher Scientific制造))。

[0115] 透析后,通过使用分光光度计从吸光度确定抗体浓度以获得生物素标记的86202R抗体。

[0116] 1-6. 夹心ELISA

[0117] 将用于固相的86207抗体(5 μ g/mL,100 μ L,用PBS稀释)分配到96孔板(Nunc免疫板,商品编号442404,由Thermo Fisher Scientific生产)的每个孔中,在4 $^{\circ}$ C下静置过夜。

[0118] 从每个孔中除去液体后,通过使用8通道移液器(总共400 μ L)将200 μ L PBST两次分配到每个板孔中。除去添加的PBST,并将这些操作限定为一次洗涤操作。进行3次该操作(用400 μ L PBST洗涤3次;在以下操作中进行相同的洗涤步骤)。

[0119] 洗涤后,将200 μ L封闭溶液分配到每个孔中,并使其在室温下静置1小时或更长时间。丢弃封闭溶液后,将100 μ L的每个预处理样品添加到每个孔中,并反应2小时。

[0120] 反应后,除去各孔中的液体,然后用400 μ L PBST洗涤3次。

[0121] 将在1-5中制备的生物素标记的86202R抗体(1 μ g/mL,100 μ L,用封闭溶液稀释)分配到每个孔中,并反应2小时。

[0122] 反应后,除去各孔中的液体,然后用400 μ L PBST洗涤3次。

[0123] 向每个孔中分配用封闭溶液稀释至0.5 μ g/mL的100 μ L的链霉亲和素蛋白HRP缀合物(商品编号21126,由Thermo Fisher Scientific生产),并静置1小时。

[0124] 向每个孔中分配100 μ L的着色溶液,并在室温下反应10分钟。

[0125] 向每个孔中添加100 μ L反应终止溶液。

[0126] 用酶标仪(使用Bio-Rad制造的iMark)测量490nm处的吸光度。

[0127] 1-7.结果

[0128] 图1示出了含有35.0pg/mL的BG的样品测量结果(通过 β -葡聚糖测试Wako测量:通过Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造的鲎试剂测量)。图2示出了含有178.4pg/mL BG的样品测量结果(通过 β -葡聚糖测试Wako测量)。

[0129] 在含有35.0pg/mL或178.4pg/mL BG的样品中,与样品进行其他两种类型的预处理(酸和加热)相比,经过碱预处理的样品的测量灵敏度均得到了显著提高。

[0130] [实施例2:确定预处理溶液的不同pH值对样品中BG测量灵敏度的影响]

[0131] 在实施例2中,用具有各种pH的碱性溶液预处理人血清样品。通过使用向不含源自真菌的BG的阴性血清中添加CM-茯苓聚糖(羧甲基茯苓聚糖:BG的一种,由Megazyme制造)得到的样品,研究了pH值对人血清样品中BG测量灵敏度的影响。当使用鲎试剂(β -葡聚糖测试Wako:Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)时,通过添加CM-茯苓聚糖获得的样品显示出与含有源自真菌的BG的实际样品接近的反应性。通过添加6ng/mL CM-茯苓聚糖获得的样品的吸光度对应于含有174pg/mL源自真菌的BG的实际样品的吸光度。用碱性溶液进行预处理的方案、所用的固相和液相抗体、抗体的生物素标记和夹心ELISA与实施例1相同。用于预处理的KOH溶液的浓度、预处理期间的pH、中和后的pH以及测得的吸光度值(减去空白值后的吸光度)如下表1所示。处理期间pH值与吸光度之间的关系如图3所示。

[0132] [表1]

KOH 浓度 (mM)	处理期间的 pH	中和后的 pH	6 ng/mL CM-茯苓聚糖 (相 当于实际样品中的 BG 为 174 pg/mL)
0.0	8.56	7.50	0.058
4.7	9.53	7.53	0.059
9.4	10.40	7.60	0.129
18.8	10.78	7.67	0.170
37.5	11.68	7.66	0.364
75.0	12.21	7.74	0.557
150.0	12.90	7.88	0.554

[0133] 当pH超过10时,灵敏度增加,而当pH为12.2以上时,灵敏度的增加达到峰值。

[0134] [实施例3:确定碱预处理时间对样品中BG测量灵敏度的影响]

[0135] 在实施例3中,研究了用碱性溶液预处理样品的时间对BG测量的灵敏度的影响。预处理方案与实施例1中的碱预处理相同,不同之处在于将预处理时间改变为不同的时间,并

使用通过添加CM-茯苓聚糖获得的人血清样品。抗体的生物素标记和夹心ELISA的方案与实施例1相同。结果示于表2和图4。测得的吸光度值代表减去空白值后的吸光度。

[0137] [表2]

处理时间 (分钟)	6 ng/mL CM-茯苓聚糖(相当于实际样品中 174 pg/mL)
0	0.230
5	0.720
10	0.670
15	0.682
30	0.649
60	0.698

[0140] 发现即使将处理时间改变为5分钟、10分钟、15分钟、30分钟和60分钟,样品中BG的测量灵敏度也几乎不受影响。

[0141] [实施例4:确定碱预处理温度对样品中BG测量灵敏度的影响]

[0142] 在实施例4中,研究了碱预处理期间的温度对BG测量灵敏度的影响。预处理方案与实施例1中的碱预处理相同,不同之处在于将预处理期间的温度改变为各种温度,并使用通过添加CM-茯苓聚糖获得的人血清样品。抗体的生物素标记和夹心ELISA的方案与实施例1相同。结果示于表3和图5中。

[0143] [表3]

处理温度 (°C)	6 ng/mL CM-茯苓聚糖 (相当于实际样品中 174 pg/mL)
4	0.667
25	0.741
37	0.724
50	0.665
60	0.523
70	0.484

[0145] 发现当温度为4°C至37°C时灵敏度最佳。

[0146] [实施例5:实际样品中BG的检测下限的检测]

[0147] 在实施例5中,通过使用实际样品检测夹心ELISA的检测下限。86207抗体用作固相抗体,生物素标记的86202R抗体用作液相抗体。

[0148] 5-1. 碱预处理

[0149] 使用混合了12个BG阴性样品的混合稀释血浆,将实际样品(含有421.2pg/mL源自真菌的BG的人血浆,通过β-葡聚糖检测Wako测量)进行分步稀释,以制备一系列稀释液。向1020μL的样品中加入168μL的碱性处理溶液(800mM KOH:氢氧化钾)并在37°C下孵育15分钟。随后,分别加入168μL 800mM HCl和168μL 100mM MOPS(pH 7.5)来中和碱性处理溶液(总共1356μL,样品的3/4倍稀释,用于12次测量)。这些样品用作碱预处理的样品。

[0150] 5-2. 抗体的生物素标记

[0151] 用与实施例1相同的方法用生物素标记抗体。

[0152] 5-3. 夹心ELISA

[0153] 夹心ELISA以与实施例1相同的方案进行。然而,生物素标记的抗体的浓度为4μg/mL。测量每个样品,n=12。

[0154] 5-4. 结果

[0155] 结果示于表4和图6中。表4中的吸光度代表n=12时的测量平均值,SD代表标准偏差。

[0156] [表4]

实际密度 (pg/mL)	吸光度 (平均值 n=12)	SD	2.6SD	平均值±2.6 SD
0.0	0.187	0.0103	0.027	0.214
3.0	0.223	0.0047	0.012	0.211
5.5	0.269	0.0057	0.015	0.254
10.4	0.351	0.0079	0.021	0.330
15.9	0.417	0.0054	0.014	0.403
20.6	0.518	0.0057	0.015	0.503

[0157] [0158] 在实际密度为0.0pg/mL的样品的吸光度平均值上加上样品的2.6SD所得到的值(0.214)小于从样品的平均吸光度减去5.5pg/mL样品的2.6SD所获得的值(0.254),因此发现,即使实际样品中源自真菌的BG为5.5pg/mL(鲎试剂的测量值),也可以在作为本发明的免疫分析方法一种实施方式的ELISA中检测到BG。Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 制造的鲎试剂的截止值为11pg/mL,该结果表明作为本发明的免疫分析方法的实施方式的ELISA具有与鲎试剂相当的灵敏度。

[0159] [实施例6:与市售鲎试剂的相关性检测]

[0160] 在实施例6中,通过使用人血浆样品(n=39)来检测夹心ELISA的测量值与鲎试剂的测量值之间的相关性。86207抗体用作固相抗体,HRP标记的86202R抗体用作液相抗体。

[0161] 6-1. 碱预处理

[0162] 除了使用人血浆以外,其他步骤与实施例1相同。

[0163] 6-2. HRP抗体标记

[0164] 通过使用HRP标记试剂盒(过氧化物酶标记试剂盒-SH, LK09, 由Dojindo Laboratories制造)来进行86202R抗体的HRP标记。

[0165] 标记后的蛋白质定量通过BCA法(试剂盒名称:Micro BCA蛋白质分析试剂盒, Thermo Scientific制造,商品编号:23235)进行。

[0166] 6-3. 夹心ELISA

[0167] 将用于固相的86207抗体(5μg/mL, 100μL, 用PBS稀释)分配到96孔板(Nunc免疫板, 商品编号442404, 由Thermo Fisher Scientific制造)的每个孔中,在4℃下静置过夜。

[0168] 从每个孔中除去液体后,通过使用8通道移液器(总共400μL)将200μL PBST两次分配到每个板孔中。除去添加的PBST,并将这些操作限定为一次洗涤操作。进行3次该操作(用400μL PBST洗涤3次;在以下操作中进行相同的洗涤方案)。

[0169] 洗涤后,将200μL封闭溶液分配到每个孔中,并使其在室温下静置1小时或更长时间。

[0170] 丢弃封闭溶液后,将100μL的每个预处理样品添加到每个孔中,并反应90分钟。

[0171] 反应后,除去各孔中的液体,然后用400μL PBST洗涤3次。

[0172] 将以6-2制备的HRP标记的86202R抗体(0.5μg/mL, 100μL, 用封闭溶液稀释)分配到每个孔中,并反应30分钟。

- [0173] 反应后,除去各孔中的液体,然后用400 μ L PBST洗涤3次。
- [0174] 向每个孔中分配100 μ L的着色溶液,并在室温下反应10分钟。
- [0175] 向每个孔中添加100 μ L反应终止溶液。
- [0176] 用酶标仪 (Multiskan FC,由Thermo Fisher Scientific制造) 测量492nm处的吸光度。
- [0177] 6-4. 鲎试剂
- [0178] BG是根据鲎试剂(商品名: β -葡聚糖测试Wako,和Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)的包装说明书中记载的方案进行分析的。
- [0179] 6-5. 结果
- [0180] 图7示出了鲎试剂的测量值与根据ELISA的吸光度之间的相关性。根据本发明的免疫分析方法的一种实施方式的夹心ELISA的吸光度测量值显示与鲎试剂的测量值相关。
- [0181] 工业适用性
- [0182] 本发明提供能够以与鲎试剂相当的灵敏度对生物样品中的BG进行免疫分析的方法。本发明可以提供生物样品中BG分析试剂盒,其灵敏度与鲎试剂相当,并且易于操作。

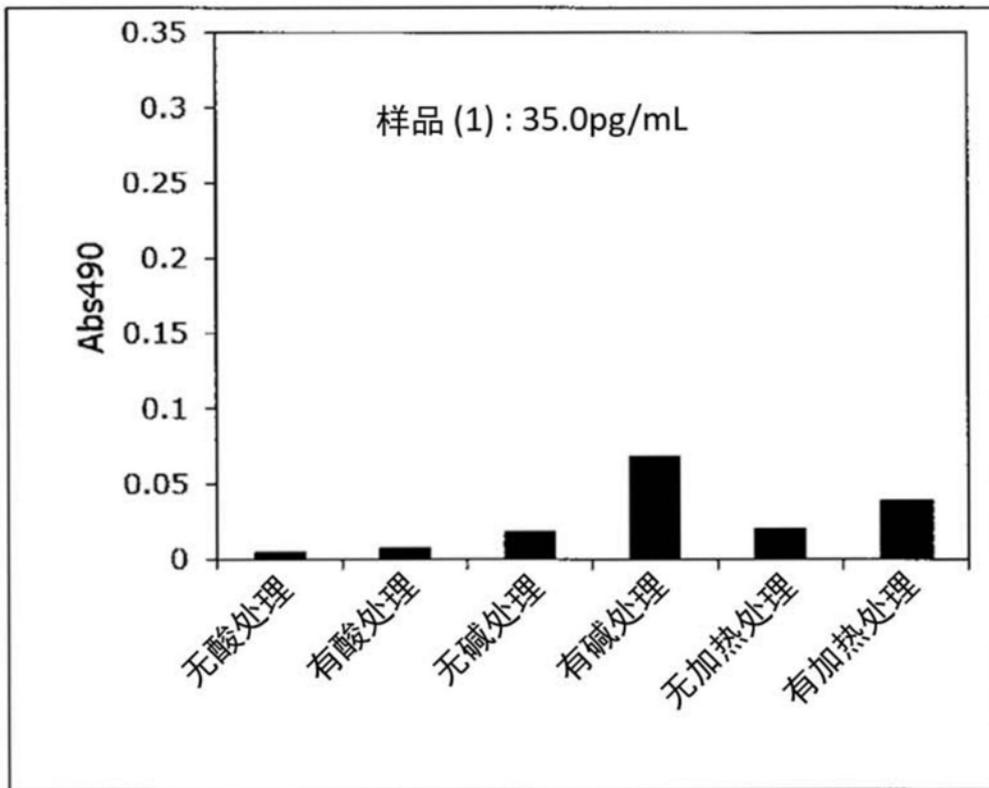


图1

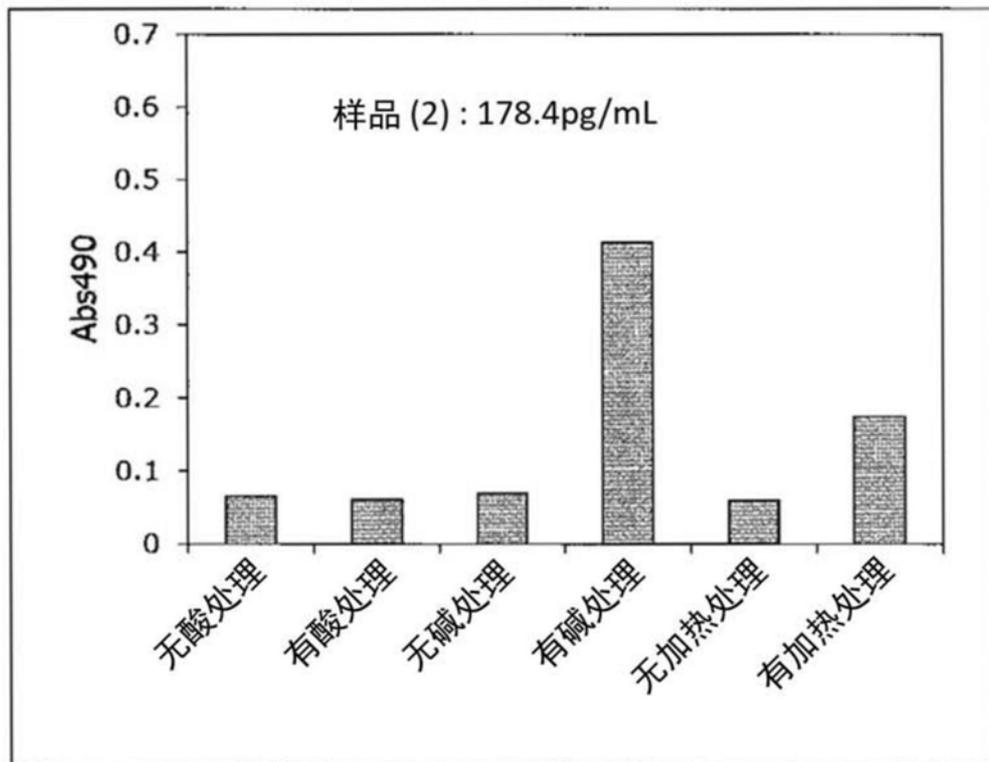


图2

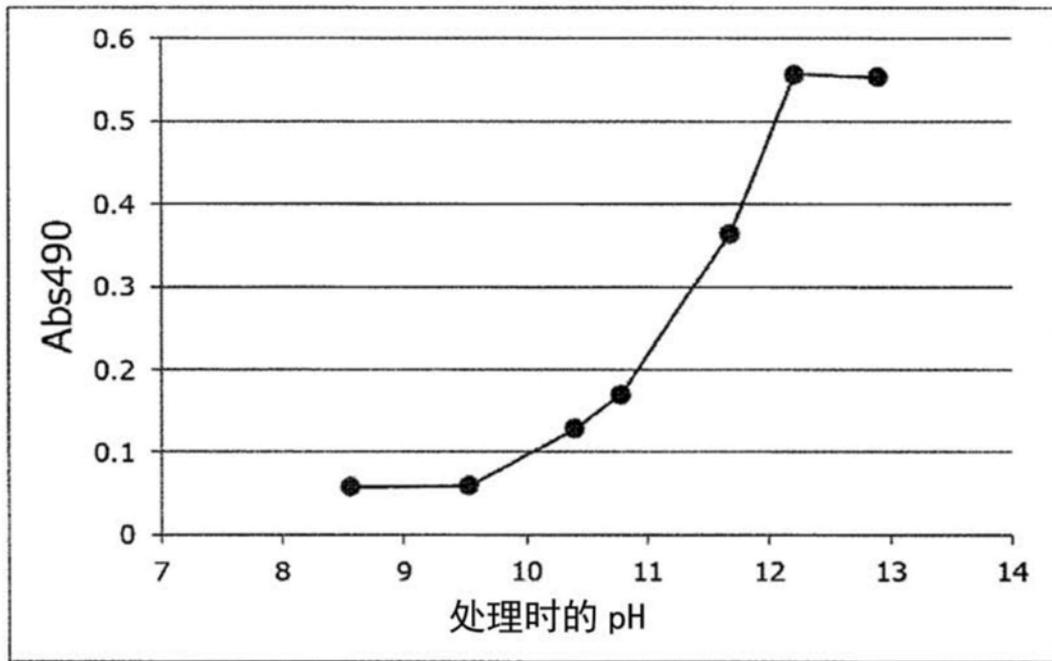


图3

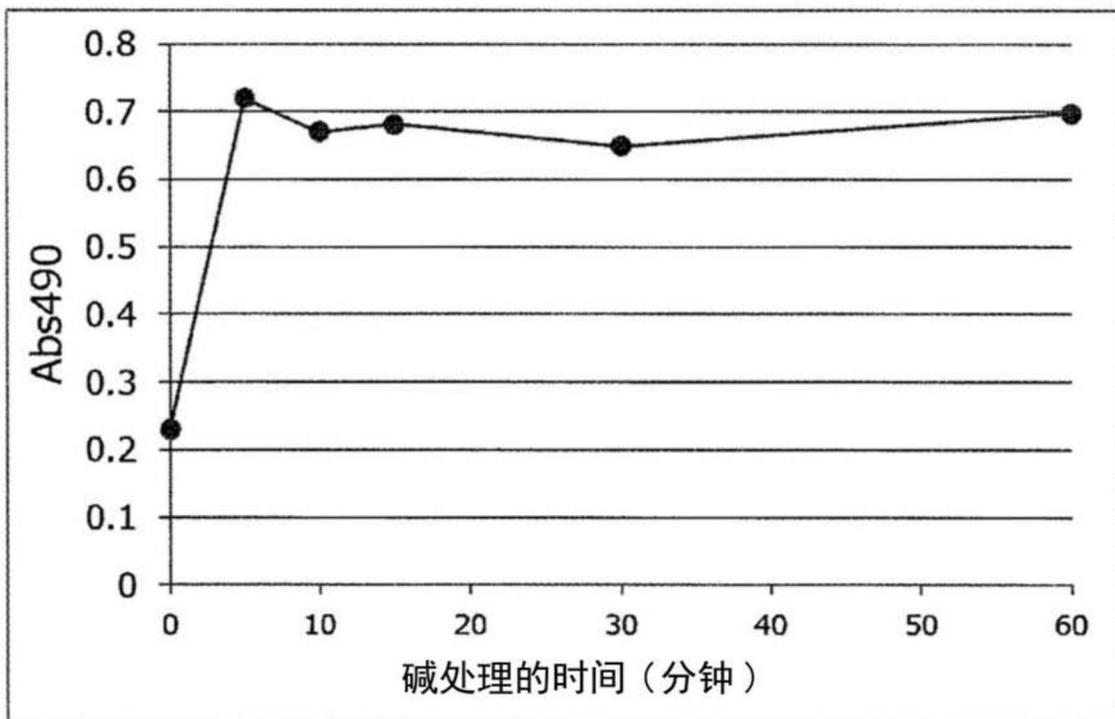


图4

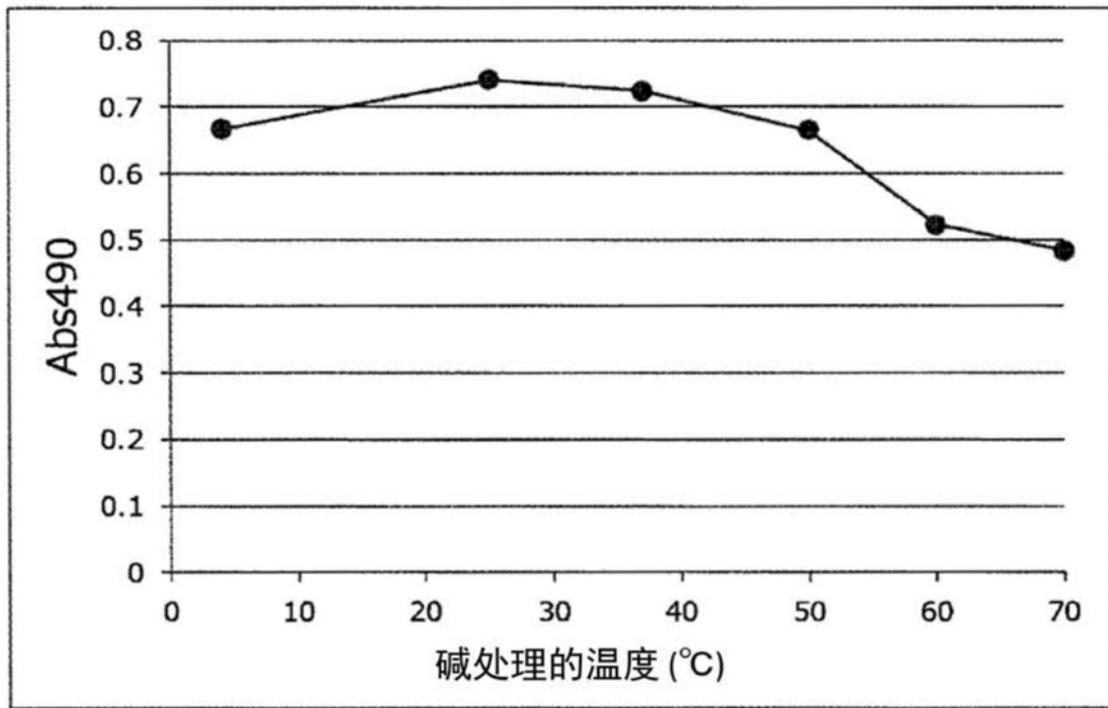


图5

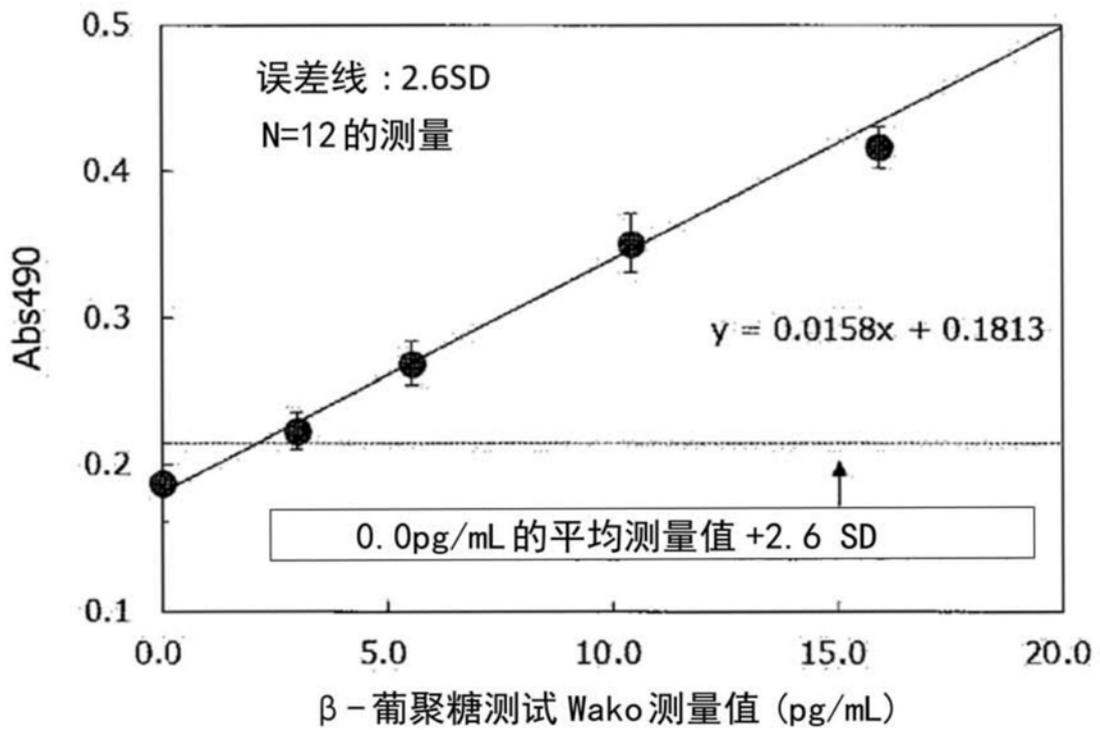


图6

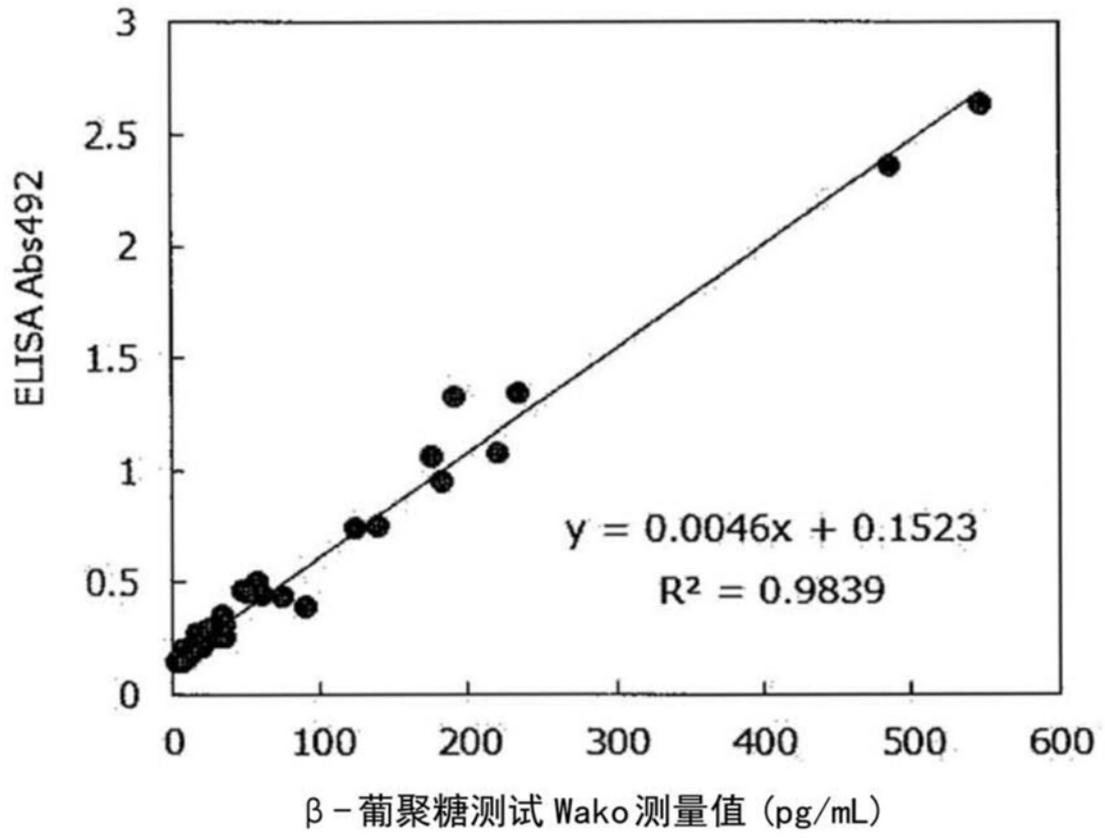


图7