



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113490684 A

(43) 申请公布日 2021. 10. 08

(21) 申请号 201980093160.6

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(22) 申请日 2019.12.27

代理人 傅宇昌

(30) 优先权数据

3871-2018 2018.12.28 CL

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.27

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CL2019/050155 2019.12.27

G01N 33/53 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/132772 ES 2020.07.02

(71) 申请人 智利天主教教皇大学

地址 智利圣地亚哥

(72) 发明人 A·M·卡莱伊斯帕拉

S·M·布埃纳拉米兹

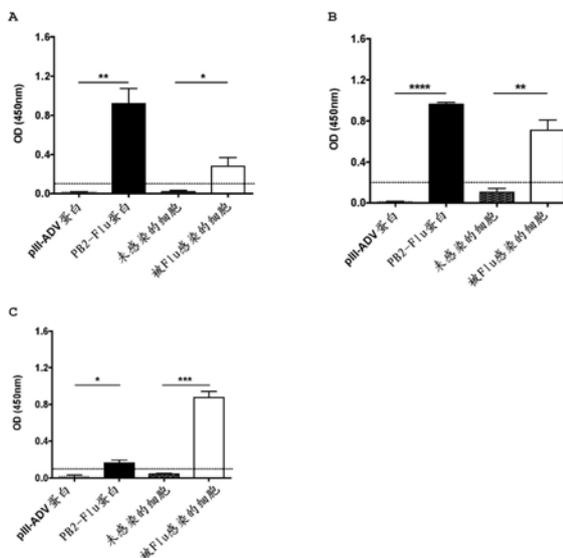
权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

特异于人流感病毒 (FLU) 的PB2抗原的单克隆抗体、核苷酸序列、诊断由FLU产生的感染的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明提出了识别人流感病毒 (Flu) 的PB2蛋白的单克隆抗体或其片段的产生,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区。此外,本发明提供了用于在鼻咽分泌物的生物学样品中检测Flu感染的诊断方法,其中使用以诊断试剂盒形式的单克隆抗体。



1. 与人流感病毒 (FLU) 的PB2蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分,其用于在检测所述蛋白的存在和/或定位中使用,其特征在于,所述抗体选自:

i) 包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1 (CDR_{LC1}) 按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2 (CDR_{LC2}) 由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3 (CDR_{LC3}) 相应于SEQ ID NO:3;和重链可变区,其中其CDR1 (CDR_{HC1}) 按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2 (CDR_{HC2}) 相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3 (CDR_{HC3}) 相应于SEQ ID NO:6;或者

ii) 包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1 (CDR_{LC1}) 按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2 (CDR_{LC2}) 由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3 (CDR_{LC3}) 相应于SEQ ID NO:9;和重链可变区,其中其CDR1 (CDR_{HC1}) 按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2 (CDR_{HC2}) 相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3 (CDR_{HC3}) 相应于SEQ ID NO:12,

其中所述抗体可以用作检测抗体或捕获抗体。

2. 用于检测生物学样品中的Flu病毒的方法,其特征在于,所述方法包括使所述生物学样品与根据权利要求1的与Flu的PB2蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分相接触,并且检测所述抗体与所述抗原的结合,由此检测所述样品中的Flu病毒。

3. 根据权利要求2的用于检测生物学样品中的Flu病毒的方法,其特征在于,所述生物学样品选自由下列各项组成的组:被Flu感染的体外细胞、鼻分泌物、鼻冲洗物、脑脊液、咽分泌物和/或支气管冲洗物或分泌物。

4. 根据权利要求2或3中任一项的根据权利要求2的用于检测生物学样品中的Flu病毒的方法,其特征在于,用于检测所述抗体与所述抗原的结合的测定法选自:ELISA、免疫荧光、免疫组织化学法、免疫色谱法、流式细胞术、细胞分选仪、免疫沉淀和/或Western印迹。

5. 根据权利要求2至4中任一项的用于检测生物学样品中的Flu病毒的方法,其特征在于,根据权利要求1的抗体或其抗原结合部分与允许其检测的标记物相缀合。

6. 根据权利要求5的用于检测生物学样品中的Flu病毒的方法,其特征在于,所述抗体结合至从由下列各项组成的组中选择的标记物:荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

7. 用于定性和/或定量检测Flu病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含:

-根据权利要求1的与PIV的L嵌合蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分,其作为捕获抗体或检测抗体起作用,其中所述检测抗体与用于其检测的标记物相缀合;

-所述抗体所附着至的固体支持物;和

-用于检测在所述检测抗体中所包括的标记物的试剂,所述标记物例如为荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

8. 根据权利要求7的用于定性和/或定量检测Flu病毒的试剂盒,其特征在于,所述固体支持物为由从由下列各项组成的组中选择的化合物之一形成的膜:硝化纤维素、纤维素、聚乙烯和尼龙。

9. 根据权利要求7和8中任一项的用于定性和/或定量检测Flu病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒相应于免疫色谱法测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫分析、Western印迹、点渍法、ELISA、免疫扩散或免疫沉淀,以用于检测PIV。

10. 根据权利要求1的与FLU的PB2蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分的用途,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分充当捕获抗体和/或检测抗体。

特异于人流感病毒(FLU)的PB2抗原的单克隆抗体、核苷酸序列、诊断由FLU产生的感染的方法和试剂盒

[0001] 说明书

[0002] 发明描述

[0003] 本发明提出了识别人流感病毒(FLU)的PB2蛋白的单克隆抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包括下述抗体:包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:3,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:6;或者包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:9,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:12,其中所述抗体可以用作检测抗体或捕获抗体。另外,本发明提供了诊断生物学样品中的Flu感染的方法,其使用以用于检测Flu的诊断试剂盒形式的单克隆抗体,其中所述试剂盒包含至少一种根据上面所描述的针对Flu的单克隆抗体。

发明领域

[0004] 本发明涉及识别人流感病毒的PB2蛋白的单克隆抗体或其片段,其对于开发诊断人中的流感感染的方法来说是有用的。

[0005] 发明背景

[0006] 流感是由人流感病毒引起的呼吸道感染性疾病。这种病毒对产生严重或轻微的呼吸道临床病情负有责任,主要影响鼻、咽喉、支气管和偶尔还有肺的部位。通常,流感的临床症状与季节性感冒的相似,然而症状可以是可变的,并且从无症状感染至可能引起死亡的严重肺炎变动(<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/faq/es/#doesit>)。该病毒很容易从人到入或者通过经由病人的咳嗽或喷嚏而排出的液滴或小颗粒进行传播,这使得其蔓延是快速的并且成为季节性疾病流行的一部分(http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=3154&Itemid=2498&lang=es)。

[0007] 流感病毒全年期间均可以检测到,但是其检测在秋冬季节增加,虽然时期和持续时间可以是可变的(<https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/season/flu-season.htm>)。根据流行病学统计,在美国,2016年,310,000人因具有与流感相关的并发症而住院。在同一国家,统计学表面,这种感染引起每年大约89,000例死亡。从经济成本观点来看,在美国由人流感病毒造成的损失据估计达到710亿至1500亿美元的年成本(https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/us_flu-related_deaths.htm)。

[0008] 用于检测Flu的最常见的诊断方法称为“快速流感诊断测试”(RIDT),这些测试基于在鼻咽拭子或抽吸物的样品中检测Flu抗原(免疫测定法)。这些测试可以在15至20分钟的时间段内给出结果,然而它们缺乏灵敏度并且仅给予定性结果(阳性或阴性),其由于它

的低特异性而可能可以是假阴性 (<https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>)。

[0009] 迄今为止,用于确认流感病毒感染的标准技术相应于逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)的分子分析。例如,由美国疾病控制与预防中心(CDC)开发的人流感病毒实时RT-PCR诊断小组(Human Influenza Virus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel)允许在体外检测在具有呼吸道感染征候和症状的人患者的呼吸道样品中的流感病毒。该方法通过针对编码高度保守的蛋白质(例如,基质蛋白(M蛋白)、核蛋白(NP蛋白)和非结构蛋白(NS蛋白))的基因的引物的反应来检测流感病毒A和B。该类型的技术就其成本和优化而言具有缺点,因为为了其施行和启动,需要获得高成本的专业化设备和试剂,以及训练有素的人员。

[0010] 另一种常见的用于该诊断的方法为在细胞培养物中病毒的分离。该类型的技术的问题是高度专业化的设备和人员。另一方面,它是一种缓慢的方法,其可以在其开始后5至14天内给出诊断结果。

[0011] 在临床诊断实践中,主要的困难或问题之一是样品本身,因为可能得到有限量的样品,此外其还具有低的抗原浓度并且这包括可能干扰检测反应的其他蛋白质和细胞组分的存在。

[0012] 以前已描述了用于检测人流感病毒的抗原的单克隆抗体。在文献 WO2012045001 (A2)中,例如公开了与表面蛋白质血凝素相结合的人单克隆抗体。在文献US9650434B2中,提供了可以与流感病毒H1亚型和H5亚型的血凝素这种蛋白的HA1结构域特异性地相结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。在这两篇文献中,所提出的解决方法都旨在检测与PB2蛋白不同的抗原,并且未证明在临床样品中抗原-抗体结合的功效、特异性和灵敏度。

[0013] 关于Flu的PB2蛋白的检测,文献JP2015189715 (A)提供了与RNA依赖性RNA聚合酶的PB2亚基相结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。在那里所描述的抗体的重链可变区和轻链可变区的序列实质上不同于作为本发明的一部分的单克隆抗体的序列。另一方面,在JP2015189715 (A)中,未进行人的临床样品中的抗原的检测测定法,也未测定在临床诊断的情景下所述抗体的特异性和灵敏度的特征。请记住,在临床诊断的条件下,借助于包含非常低浓度的抗原的生物学样品,这使得抗原-抗体反应的特异性和灵敏度变得困难。

[0014] 因而需要一种新的诊断人流感病毒的备选方案,其不同于为了其施行和维持而忍受较长应答时间和高成本的分子诊断和细胞培养测试,而允许快速地、灵敏地、特异性地和以较低成本检测各种各样的流感类型和亚型。此外,尽管迄今已提出了用于检测Flu的其他蛋白质(甚至针对PB2)的单克隆抗体,但是仅在鼠类模型中评价了这些抗体并且无论如何不相应于对于所提出的技术问题的解决方案。

[0015] 根据所提供的背景,提出了检测PB2蛋白的单克隆抗体,以用于在被Flu感染的患者中在快速、有效且准确的检测和诊断中使用,其中所述抗体特异性地检测在具有非常低浓度的特异抗原的临床样品中的该蛋白质(高灵敏度),甚至在甚至包括了其他呼吸道病毒的抗原的临床样品中区分出该特异病毒抗原。另外,所提供的抗体可以构成用于诊断Flu的诊断方法和试剂盒的一部分,其中每一种所述抗体可以既作为检测抗体也作为捕获抗体多面地进行使用。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明涉及针对人流感病毒的PB2蛋白或其片段的特异性单克隆抗体。特别地,本

发明相应于由被命名为1A3E2和2F11B1的杂交瘤细胞系所分泌的单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段识别人流感病毒(Flu)的PB2蛋白,其中所述单克隆抗体或其片段包括下述抗体:包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:3,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:6;或者包含下述部分的抗体:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:9,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:12,其中所述抗体可以用作检测抗体或捕获抗体。另外,本发明提供了诊断生物学样品中的Flu感染的方法,其使用以用于检测Flu的诊断试剂盒形式的单克隆抗体,其中所述试剂盒包含至少一种根据上面所描述的针对Flu的单克隆抗体。

[0018] 相对于其他已经存在的检测病毒抗原的抗体和方法而言,在本发明中所描述的抗体具有有利的和突出的重要技术特征。

[0019] 首先,每种病毒都具有特异性的表面蛋白质,因此基于用于其他类型的呼吸道病毒的单克隆抗体的其他诊断技术与所建议的本发明是不可比的。相对于针对其他病毒抗原(例如针对腺病毒的pIII蛋白)而言所述抗体针对Flu的PB2蛋白的检测特异性显示在图1A、1B和1C中所提供的结果之中。从这些结果可能得出结论:在本申请范围内所提供的抗体仅识别Flu的PB2蛋白,并且在用ADV病毒的抗原的ELISA测定法中未观察到检测信号。

[0020] 其次,作为本发明范围的一部分的抗体允许特异性地检测PB2蛋白或其片段,从而它们既不相互竞争抗原结合位点,也不对与其同时结合施加阻碍。

[0021] 第三,它们使得能够在包含少量的抗原的样品(例如鼻咽拭子样品)中以高灵敏度检测PB2蛋白或其片段。

[0022] 所建议的单克隆抗体能够检测PB2蛋白(一种高度保守的蛋白质)。检测保守的病毒蛋白质这一策略允许,作为本发明范围的一部分的抗体检测不同类型的人流感病毒,尤其是流感病毒A、B和C。

[0023] 当在本发明中提及CDR序列时,这些相应于在具有抗原检测功能的蛋白质的可变结构域中发现的短序列。本发明提出了关于由杂交瘤1A3E2和2F11B1所分泌的抗体的重链(CDR_{HC})和轻链(CDR_{LC})的CDR序列。

[0024] 所描述的单克隆抗体可以用于检测、诊断和/或测定Flu感染的测定法。可以同时使用这些抗体,以提高在其中存在数量和可用性低的抗原的临床样品中的检测灵敏度。在这方面,还提供了诊断生物学样品中的Flu感染的方法,所述方法包括使所述生物学样品与根据权利要求的针对Flu的PB2蛋白或其片段的单克隆抗体相接触,并且检测所述抗体与所述抗原的结合。所述生物学样品可以相应于(但不限于)被Flu感染的体外细胞、鼻分泌物、鼻冲洗物、脑脊液、咽分泌物和/或支气管冲洗物或分泌物。作为该方法的一部分,用于检测抗原-抗体结合的测定法选自:ELISA、Luminex、免疫荧光、免疫组织化学法、免疫色谱法、流式细胞术、细胞分选仪、免疫沉淀和/或Western印迹。

[0025] 本发明还包括用于检测人流感病毒的诊断试剂盒,其包含:针对Flu的PB2蛋白或其片段的单克隆抗体,其中所述抗体可以作为捕获抗体或检测抗体起作用,其中特别地所

述检测抗体与用于其检测的标记物相缀合；所述抗体所附着至的固体支持物；和用于检测在所述检测抗体中所包括的标记物的试剂，所述标记物例如为荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

[0026] 在本发明中，当提及捕获抗体时，这相应于与所述抗原特异性地结合的抗体。在检测抗体的情况下，这相应于在其上缀合有标记物以通过诸如下列的不同测试来进行检测的抗体：免疫色谱法测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫分析、Western印迹、点渍法、ELISA、Luminex、免疫扩散或免疫沉淀，以用于检测PIV。

[0027] 当与检测标记物相偶联时，作为本发明的一部分的抗体可以作为捕获抗体或作为检测抗体双重地起作用。所述检测标记物缀合至检测抗体，并且它可以相应于（但不限于）荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。优选地，所述检测抗体与基于辣根过氧化物酶（HRP）活性检测的报道系统相缀合。

[0028] 附图描述

[0029] 图1：通过间接ELISA测定法用由杂交瘤1A3E2和2F11B1所产生的单克隆抗体来检测Flu的PB2蛋白。用50ng的经纯化的重组Flu PB2蛋白、50ng的ADV pIII蛋白（作为特异性的对照）以及20 μ g 的未感染（用作特异性的对照）和被Flu感染的MDCK细胞来活化平板。包括没有抗原、具有一抗、具有与HRP相缀合的抗小鼠IgG（未活化）的对照孔，和没有抗原也没有一抗、仅具有抗小鼠IgG抗体（HRP）的孔，数据未在该图中显示。然后，将所述孔与以170ng 的量的来自杂交瘤1A3E2的抗-PB2抗体（A）、以170ng的量的来自杂交瘤2F11B1的抗-PB2抗体（B）和以170ng的量进行使用的目录号为GTX125926（GeneTex）的商业多克隆抗体即抗流感病毒A PB2 蛋白抗体（C）一起进行温育。在该图中所显示的数据表示在450nm 处检测的吸光度（以OD，光密度），其通过由在与由杂交瘤1A3E2、4D8C6和GeneTex的GTX125926所分泌的抗体特异性地结合的抗小鼠IgG二抗中所缀合的辣根过氧化物酶（HRP）所催化的底物四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出。所述值相应于在至少两个独立实验中由每个样品所发出的吸光度的平均值 \pm 标准偏差。其中，* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；和**** $P < 0.0001$ ，通过参数Student检验，其比较了pIII-ADV蛋白的结果与PB2-Flu的结果，和另一方面比较了未感染的细胞与被感染的细胞。

[0030] 图2：测定由杂交瘤1A3E2和2F11B1所产生的单克隆抗体在检测Flu的PB2蛋白中的灵敏度。用1:2系列稀释物（以50ng的PB2 蛋白开始和以0.04ng结束）来活化ELISA平板。然后，将所述孔与以170ng的量的来自杂交瘤1A3E2的抗-PB2抗体（A）和以170ng 的量的来自杂交瘤2F11B1的抗-PB2抗体（B）一起进行温育。包括未活化的孔作为阴性对照。在该图中所显示的数据表示在450nm处的吸光度，其通过由与以170ng的量的来自杂交瘤1A3E2和2F11B1 的抗-PB2抗体（A和B）相缀合的辣根过氧化物酶（HRP）所催化的底物四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出。所述值相应于在至少两个独立实验中由每个样品所发出的吸光度的平均值 \pm 标准偏差。* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ，通过参数Student检验，其比较了被命名为对照的孔的结果与PB2蛋白的每一个稀释物的结果。

[0031] 图3：由杂交瘤1A3E2和2F11B1所产生的抗-Flu PB2单克隆抗体的系列稀释测定法，其用于检测经纯化的Flu的抗原。用50ng的 Flu的重组PB2蛋白活化ELISA平板，并且用抗-PB2抗体1A3E2（A）或2F11B1（B）的11个1:2系列稀释物（从3.4 μ g/mL（170ng/孔）的浓度开始）来检测抗原。数据表示为在至少两个独立实验中以一式两份的每个样品在450nm处所

发出的吸光度值的平均值±标准偏差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和*** $P < 0.001$, 通过参数Student检验, 其比较了被命名为对照的孔的结果与PB2蛋白的每一个稀释物的结果。

[0032] 图4: 通过夹心式ELISA来检测在临床样品中的Flu, 其中由杂交瘤1A3E2和2F11B1所分泌的单克隆抗体的组合。用170ng的由杂交瘤1A3E2所分泌的抗体(抗-Flu)(其作为捕获抗体起作用)来活化ELISA平板。将用捕获抗体进行活化的孔与50 μ l的具有病毒性呼吸道病情的患者的鼻咽拭子(NPS)样品一起进行温育。作为阴性对照, 分析10个健康对照样品。使用12个对于Flu来说阳性的患者的样品, 并且作为特异性的对照, 包括3个对于副流感病毒来说阳性的患者的样品。作为阳性对照, 包括向其添加了经纯化的PB2-Flu重组蛋白的孔。为了检测被抗体1A3E2所捕获的蛋白, 以1:2000的稀释度(1.8ng/ μ l/孔)使用与辣根过氧化物酶相缀合的由杂交瘤2F11B1所产生的抗体。所显示的数据为每个样品的在450nm处发出的吸光度值的中值(** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.0001$; 通过非参数Student检验和Mann-Whitney后检验, 其比较了Flu阳性患者与健康对照, 和相对于作为特异性的对照进行使用的病毒)。

[0033] 图5: 通过间接ELISA测定法来检测PB2蛋白, 其中使用与生物素相缀合的由杂交瘤1A3E2和2F11B1所分泌的完整单克隆抗体或其片段。观察到与生物素相缀合的所述抗体的PB2蛋白的检测。分别以黑色和白色指明了由杂交瘤1A3E2和2F11B1所分泌的抗体的片段。而以灰色呈现了分别由杂交瘤1A3E2和2F11B1所分泌的抗体的完整片段的活性。在该图中所显示的数据表示出了通过由辣根过氧化物酶(HRP)所催化的底物四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出的在450nm处的吸光度。显示了每个样品的在450nm处发出的吸光度值的平均值(其中b等于相比于a而言 $p < 0.0001$; 通过两因素ANOVA检验, 其比较了没有样品的孔与具有蛋白质、具有所有抗体的孔)。

[0034] 允许展示本发明的单克隆抗体的不同应用的实施例

[0035] 实施例1: 测定编码由杂交瘤1A3E2所分泌的抗-Flu PB2抗体的可变区的轻链(VL)和重链(VH)的核苷酸序列

[0036] 使杂交瘤1A3E2在补充有3.7g/L碳酸氢钠和10%胎牛血清的DMEM-高葡萄糖培养基中在37 $^{\circ}$ C下在具有10%CO₂的情况下进行生长, 直至700,000个细胞/mL的细胞密度。通过用Trizol化合物(Invitrogen)进行处理, 获得 3.5×10^6 个细胞的总RNA。将0.5 μ g的RNA用于用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(其使用同种型特异性通用引物)通过逆转录反应来产生cDNA。按照GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)来扩增抗体的轻链和重链。将扩增出的抗体片段分开地克隆在标准克隆载体中。进行菌落PCR以鉴定具有有着正确大小的插入物的克隆。对于每个片段, 对至少五个具有有着正确大小的插入物的菌落进行测序。比对不同克隆的序列并且提供这些克隆的共有序列。鉴定出了由杂交瘤1A3E2所分泌的抗体的重链和轻链的核苷酸序列, 其中对于重链的情况, 标示为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3, 和对于轻链的情况, 标示为SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.4。

[0037] 实施例2: 测定编码由杂交瘤2F11B1所分泌的抗-Flu PB2抗体的可变区的轻链(VL)和重链(VH)的核苷酸序列

[0038] 使杂交瘤2F11B1在补充有3.7g/L碳酸氢钠和10%胎牛血清的DMEM-高葡萄糖培养基中在37 $^{\circ}$ C下在具有10%CO₂的情况下进行生长, 直至700,000个细胞/mL的细胞密度。通

过用Trizol化合物 (Invitrogen) 进行处理,获得 3.5×10^6 个细胞的总RNA。将0.5 μ g 的RNA用于用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(其使用同种型特异性通用引物)通过逆转录反应来产生cDNA。按照 GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP) 来扩增抗体的轻链和重链。将扩增出的抗体片段分开地克隆在标准克隆载体中。进行菌落PCR以鉴定具有有着正确大小的插入物的克隆。对于每个片段,对至少五个具有有着正确大小的插入物的菌落进行测序。比对不同克隆的序列并且提供这些克隆的共有序列。从这开始,测定由杂交瘤2F11B1所分泌的抗体的重链和轻链的核苷酸序列,标示为 SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3的序列相应于轻链,和标示为 SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3的序列相应于重链。

[0039] 实施例3:检测Flu抗原的测定法,通过间接ELISA测定法来测定Flu 的抗-PB2单克隆抗体对于经纯化的Flu抗原的特异性

[0040] 该测定法的目的是证明由杂交瘤1A3E2和2F11B1所产生的抗体对于Flu的PB2蛋白的特异性。抗原的检测通过间接ELISA技术来进行,其中在37°C下用50ng的经纯化的抗原活化ELISA平板1小时。以同样的方式,用20 μ g的未感染(作为阴性对照)和被Flu病毒血清型A感染的MDCK细胞的细胞裂解物来活化平板。所包括的另一阴性对照为在单独的孔中的50ng的ADV的pIII蛋白。然后,用1X 磷酸盐缓冲盐水(PBS)/0.05%Tween20洗涤平板两次。之后,用1X PBS/10%胎牛血清(FBS)在37°C下封闭平板2小时。然后,重复洗涤,并接着在37°C下温育在1X PBS/10%FBS中稀释的最终浓度为 3.4 μ g/mL(170ng/孔)的每种抗体(1A3E2和2F11B1)1小时(每种抗体在单独的平板中)。在相同条件下,在不同平板中,通过以3.4 μ g/mL的浓度使用识别Flu的PB2蛋白的商业单克隆抗体(抗流感病毒A PB2蛋白抗体,目录号 GTX125926, GeneTex)来进行对照测定法。在温育时间过后,重复洗涤,并且向每一个所述孔添加在1X PBS/10%FBS中的以1:2000稀释度(1.8ng/ μ l/孔)的标记有辣根过氧化物酶(HRP)的抗小鼠IgG二抗,在黑暗中在环境温度($\approx 25^\circ\text{C}$)下1小时。最后,进行洗涤,并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB, 3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1mg/mL, Becton Dickinson)进行显色。为了终止反应,添加50 μ L的2N H₂SO₄,并且在ELISA 阅读器上在450nm下读取结果。为了确定在识别一抗方面二抗的反应是特异性的并且所获得的信号不是由于二抗与病毒抗原的非特异性结合而引起的,设置其中仅使用二抗而没有一抗也没有样品的对照(未活化的孔)。用于确定一抗的反应特异于抗原的另一对照在于在未用抗原进行活化的ELISA平板(没有抗原)上使用所述抗体,或者在具有50ng的ADV的pIII蛋白或未感染的细胞的ELISA平板上使用所述抗体。结果显示,本发明的单克隆抗体能够特异性地识别50ng的经纯化的抗原,因为其不识别ADV的pIII蛋白,也不识别未感染的细胞的蛋白(图1A和1B)。另一方面,观察到,在该测定法中用作对照的商业抗体(图1C),尽管对于仅检测被感染的细胞来说是特异性的,但是在我们的实验室中在检测经纯化的重组Flu PB2蛋白方面并不是有效的。所有所使用的阴性对照都给出了所预期的结果(数据未在图中显示)。

[0041] 实施例4:用于测定所述单克隆抗体用于检测Flu的抗-PB2病毒抗原的灵敏度的测定法

[0042] 进行该测定法以测定来自杂交瘤1A3E2和2F11B1的Flu的抗 -PB2单克隆抗体能够通过间接ELISA进行检测的最大蛋白质稀释度。为此,采用与实施例3中所描述的相同的技术。用Flu的PB2蛋白的 11个1:2系列稀释物(从50ng的经纯化的抗原开始)来活化平板。以

3.4 μ g/mL (170ng/孔) 的浓度使用抗-PB2抗体1A3E2或2F11B1, 将其稀释在1X PBS/10%FBS中。然后, 添加以1:2,000的稀释度 (1.8 ng/ μ l/孔) 的抗小鼠IgG检测抗体, 并且在黑暗中在环境温度 (\approx 25 $^{\circ}$ C) 下温育1小时。最后, 进行洗涤, 并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/ 四甲基联苯胺 (TMB, 3-3' -5-5' -四甲基联苯胺, 1mg/mL, Becton Dickinson) 进行显色。为了终止反应, 添加50 μ L的2N H₂SO₄, 并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。结果显示, 抗-PB2抗体1A3E2能够识别直至780皮克 (pg) 的Flu的PB2蛋白 (图2A)。来自杂交瘤2F11B1的抗-PB2抗体显示出与抗-PB2抗体1A3E2相同的灵敏度 (图2B)。在所有测定法中都包括使得能够排除所述两种抗体的非特异性反应的对照, 其包含除了样品 (Flu PB2蛋白) 外的所述测定法的所有组分 (数据未在图中显示)。

[0043] 实施例5: 用于通过间接ELISA来测定所述单克隆抗体用于检测Flu 的病毒抗原的效能的测定法

[0044] 进行该测定法以测定允许检测病毒抗原的来自杂交瘤1A3E2和 2F11B1的Flu的抗-PB2单克隆抗体的最大稀释度。为此, 用50ng 的经纯化的抗原 (PB2蛋白) 活化平板, 之后用1X PBS/10%胎牛血清 (FBS) 在37 $^{\circ}$ C下封闭平板2小时。以1:2稀释 (从工作浓度 (170 ng) 开始直至1X PBS/10%FBS中的第11次稀释 (0.15ng)) 来使用抗-PB2抗体1A3E2和2F11B1。然后, 添加以1:2000的稀释度 (1.8 ng/ μ l/孔) 的抗小鼠IgG检测抗体, 并且在黑暗中在环境温度 (\approx 25 $^{\circ}$ C) 下温育1小时。最后, 进行洗涤, 并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/ 四甲基联苯胺 (TMB, 3-3' -5-5' -四甲基联苯胺, 1mg/mL, Becton Dickinson) 进行显色。为了终止反应, 添加50 μ L的2N H₂SO₄, 并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。在图3中观察到, 抗-PB2抗体1A3E2可以检测50ng的经纯化的抗原, 直至1.3ng/孔 (图3A)。另一方面, 抗-PB2克隆2F11B1比克隆1A3E2更有效, 因为用几乎所有所制得的稀释物其都识别50ng的经纯化的PB2 (图3B)。在该测定法中所包括的阴性对照相应于不包含样品 (PB2蛋白) 的孔, 用1X PBS/10%FBS进行封闭, 添加一抗 (抗-PB2抗体1A3E2或抗-PB2 抗体2F11B1), 并且还包含与HRP相缀合的抗小鼠IgG抗体。

[0045] 实施例6: 通过夹心式ELISA技术, 使用Flu的抗-PB2单克隆抗体来对被Flu感染的患者的样品进行临床诊断

[0046] 在鼻咽拭子的临床样品中病毒蛋白质的可用性和浓度通常是非常低的, 因此需要改进先前所进行的ELISA测定法。对于该测定法, 进行夹心式ELISA, 其中使用Flu的来自杂交瘤1A3E2的抗-PB2抗体作为捕获抗体和Flu的抗-PB2克隆2F11B1作为检测抗体。将Flu的抗-PB2检测抗体2F11B1与HRP相缀合。对于该测定法, 用3.4 μ g/mL (170ng/孔) 的在1X PBS中稀释的关于Flu的来自杂交瘤1A3E2的抗-PB2抗体活化ELISA平板的孔, 并且在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。用1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤, 然后用200 μ L的1X PBS/10% FBS在37 $^{\circ}$ C下封闭平板1小时。再次进行洗涤, 并且在37 $^{\circ}$ C下将每个孔与50 μ L的按照诊断方法“D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA” (常规地被称为“病毒小组 (panel viral)”) 对于Flu来说阳性的患者的鼻咽拭子 (预先处理的) 一起温育1小时, 并且其如后面所描述的那样进行处理。作为对照, 包括: 1) 特异性的对照: 使用50 μ L的通过关于抗-Flu抗体的病毒小组而诊断为具有PIV的患者的样品; 2) 阳性对照: 50ng的重组PB2-Flu蛋白; 3) 阴性对照: 相应于健康对照样品。然后, 用1X PBS-0.05% Tween20进行2次相应的洗涤, 并且将每个孔与50 μ L的与HRP相缀合的来自杂交瘤

2F11B1的抗-PB2抗体(1.8 ng/ μ l/孔的最终浓度)一起在环境温度下温育1小时。将检测抗体在环境温度($\approx 25^{\circ}\text{C}$)下在黑暗中温育1小时。接着,再洗涤平板2次,用50 μ L的TMB溶液进行显色,并且在黑暗中温育15分钟。用50 μ L的2N H_2SO_4 终止反应,并且在被认证可用于临床诊断的ELISA阅读器(Epoch型)上在450nm下进行平板的阅读。

[0047] 关于该测定法而获得的结果显示在图4A中,其中可以观察到,使用来自杂交瘤1A3E2的(抗-PB2)抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤2F11B1的抗体-HRP作为检测抗体的夹心式ELISA技术使得能够检测在被Flu感染的患者的样品中的抗原(图4A),所述患者先前通过使用病毒小组在经认证的临床实验室中通过直接免疫荧光而得到确认。图4A显示了用Flu的抗-PB2抗体获得的结果,其中使用12个被诊断为Flu阳性的患者的样品,并且作为特异性的对照,包括3个对于副流感病毒来说阳性的患者的样品。作为阳性对照,包括向其添加了经纯化的PB2-Flu重组蛋白的孔。作为阴性对照,使用10个健康对照。结果显示,所述抗体在仅检测出对于Flu来说阳性的患者,而未检测出健康对照或被其他病毒(PIV)感染的患者方面是特异性的。所有通过ELISA而被检测为阳性的样品为显示出高于0.15的光密度(OD)的那些。

[0048] 该测定法证明了Flu的来自杂交瘤1A3E2和2F11B1的抗-PB2抗体所具有的多面性,因为它们能够同时与所述抗原相结合而不竞争结合位点或相互干扰。上述这一点允许在患者样品中的PB2蛋白的捕获和随后检测。

[0049] 临床样品的处理。从包含在通用运输介质(UTM)中的鼻咽拭子开始来获得用于所述测定法的样品。在环境温度下以14,000rpm将样品离心4分钟。然后,将上清液(SN1)与粒状沉淀分开;将后者与100 μ L的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0,150mM NaCl,1% NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,和1X蛋白酶抑制剂混合物)一起在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育15分钟,其中每5分钟通过涡旋振荡进行摇动。接着在环境温度下以14,000rpm离心4分钟。在最后,取所获得的上清液(SN2)并且与SN1相混合,进行涡旋振荡。

[0050] 至关重要是,由于在样品中抗原的低可用性,使用这两种抗体来进行PB2蛋白的检测。通过使用夹心式ELISA提高了在诊断Flu中的特异性和灵敏度。进行这样的测定法,其中直接用鼻咽拭子的临床样品来活化平板,之后分开地温育抗-PB2抗体1A3E2和抗-PB2抗体2F11B1。之后温育与HRP相缀合的抗小鼠IgG二抗,并且评价通过将抗体加上样品的复合物与底物TMB一起进行温育而产生的吸光度,并且未观察到阳性诊断,因为所给出的信号非常低(数据未显示)。

[0051] 制备其中平板可以被活化和封闭的使用夹心式ELISA技术的诊断试剂盒将会减少进行诊断的时间和成本,因为该技术相比于标准技术(PCR)而言是易于实施和分析的。该试剂盒不需要训练有素的人员来实施和分析它。

[0052] 实施例7:通过夹心类型Luminex技术,使用FLU的抗-PB2单克隆抗体来对被FLU感染的患者的样品进行临床诊断

[0053] 与在ELISA技术中一样,在鼻咽拭子的临床样品中病毒蛋白质的可用性和浓度通常是非常低的,因此想要通过另一种更灵敏的技术来评价通过ELISA技术所获得的结果(图4A)。对于该测定法,进行夹心类型Luminex测定法,其中使用抗-PB2抗体1A3E2作为捕获抗体和抗-PB2抗体2F11B1作为检测抗体。将FLU的抗-PB2检测抗体2F11B1与生物素荧光团相缀合。用50个磁性微球(内部标记有不同强度的红色或近红外荧光团)/ μ L来活化Luminex平

板,所述磁性微球与作为捕获抗体起作用的由杂交瘤1A3E2所分泌的抗体(抗-FLU)相缀合(以2.5 μ M的最终浓度)。将经缀合的微球与50 μ L的具有病毒性呼吸道病情的患者的鼻咽拭子(NPS)样品一起在环境温度(\approx 23 $^{\circ}$ C)下、在以400rpm的摇动下并且在黑暗中(用铝箔覆盖)温育2小时。作为阴性对照,分析8个健康对照样品。使用19个按照诊断方法“D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds)USA”(常规地被称为“病毒小组”)对于FLU来说阳性的患者的样品,其以与上面所提及的相同方式进行处理;并且作为阳性对照,包括向其添加了经纯化的PB2-FLU蛋白(50ng)的孔。2小时后,使用手动磁力洗涤器,用100 μ L 1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤(持续30秒)。为了检测被抗体1A3E2所捕获的蛋白质,使用在1X PBS-1%BSA中稀释的、以4 μ g/mL的浓度的、与生物素荧光团相缀合的由杂交瘤2F11B1所产生的抗体,其中用50 μ L温育所述孔。所述温育在黑暗环境中在环境温度下进行1小时,其中以400rpm进行摇动。使用手动磁力洗涤器,用100 μ L 1X PBS-0.05%Tween20再次进行2次洗涤(持续30秒)。将由缀合有捕获抗体的微球加上抗原和检测抗体所形成的复合物与50 μ L的链霉抗生物素蛋白/藻红蛋白(以6 μ g/mL的最终浓度)一起进行温育。所述温育在黑暗环境中在环境温度下进行30分钟,其中以400rpm进行摇动。最后,再进行两个洗涤步骤,并且将所述孔与100 μ L的Sheat液体试剂(由Luminex设备所使用以便该设备读取样品的试剂)一起进行温育,在黑暗中以400rpm摇动5分钟。然后,在设备Luminex 200中读取平均荧光强度(MFI)的结果,该设备通过红色激光(621 nm)来检测微球的识别区域,和绿色激光(511nm)检测检测抗体与分析物的结合。

[0054] 关于该测定法所获得的结果显示在图4B中,其中可以观察到,使用来自杂交瘤1A3E2的(抗-PB2)抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤2F11B1的抗体-HRP作为检测抗体,与通过ELISA技术所获得的一样,Luminex技术使得能够以高强度检测在被FLU感染的患者的样品中的抗原(图4A),所述患者先前通过使用病毒小组在经认证的临床实验室中通过直接免疫荧光而得到确认。图4B显示了用FLU的抗-PB2抗体获得的结果,其中使用19个被诊断为FLU阳性的患者的样品和6个健康对照的样品。此外,还使用向其添加了经纯化的PB2-FLU蛋白的孔作为阳性对照。结果显示,所述抗-PB2抗体在仅检测出对于FLU来说阳性的患者,而未检测出对照受试者方面是特异性的。所有通过Luminex被检测为阳性的样品为显示出高于健康对照的MFI平均值两个标准偏差的MFI的那些。

[0055] 与在用患者样品的ELISA测定法中一样,该测定法证明了FLU的来自杂交瘤1A3E2和2F11B1的抗体所具有的多面性,因为它们能够同时与所述抗原相结合而不竞争结合位点或相互干扰,并且检测出在鼻咽拭子样品中所述抗原的低的可用性。

[0056] 实施例8:用于检测在从经历感染的患者获得的临床样品中的PB2-FLU抗原的盲研究,其中使用FLU的抗-PB2单克隆抗体,其构成呼吸道病毒的多重检测试剂盒的一部分

[0057] 事先进行夹心式ELISA测定法,其中已知待评价的样品的先前诊断。在这些测定法之后,进行盲研究,其中评价大约160个鼻咽拭子样品,不知道微生物学诊断。对于该盲研究的所有测定法,进行夹心式ELISA,其中使用抗-L抗体1A3E2作为捕获抗体和抗-L抗体2F11B1作为检测抗体(与HRP相缀合)。对于所有测定法,用3.4 μ g/mL(170ng/孔)的在1X PBS中稀释的FLU的来自杂交瘤1A3E2的抗-L抗体在37 $^{\circ}$ C下活化ELISA平板的孔30分钟。用1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤,然后用200 μ L的1X PBS/10%FBS在37 $^{\circ}$ C下封闭平板30分钟。再次进行洗涤,并且在37 $^{\circ}$ C下将每个孔与50 μ L的患者的鼻咽拭子一起温育1小时,

所述鼻咽拭子通过标准诊断方法 (PCR) (常规地被称为“病毒小组”) 平行地进行评价, 并且如前面在实施例6中所描述的那样进行处理。作为对照, 包括: 1) 特异性的对照: 使用50 μ L的BSA蛋白 (50ng); 2) 阳性对照: 50ng的重组PB2-FLU蛋白; 3) 阴性对照: 没有样品的孔和经封闭并用检测抗体进行温育的孔。然后, 用1X PBS-0.05% Tween20进行2次相应的洗涤, 并且将每个孔与50 μ L的与HRP相缀合的来自杂交瘤2F11B1 的抗-PB2抗体 (1.8ng/ μ L的最终浓度) 一起在环境温度 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$, 在黑暗中) 下温育30分钟。接着, 再洗涤平板2次, 用50 μ L的TMB溶液进行显色, 并且在黑暗中温育15分钟。用50 μ L的2N H_2SO_4 终止反应, 并且在被认证可用于临床诊断的ELISA阅读器 (Epoch型) 上在450nm下进行平板的阅读。

[0058] 结果显示在图4A中, 其中观察到所述抗体检测在临床样品中的 PB2蛋白的能力, 因为它们是从嵌合蛋白开始来设计的。从21名PIV 阳性患者中检测出18名, 并且从这些结果开始可以测定所述抗体的诊断准确性, 这显示在表1中。在该表中, 观察到定义诊断准确性的两个概念, 其中包括特异性, 即所述抗体将阴性样品诊断为阴性而不检测假阳性的能力, 和另一方面, 包括灵敏度, 即所述抗体将真正为阳性的那些样品诊断为阳性而不诊断假阴性的能力。在该表中所展示的结果显示了相对于标准技术 (PCR) 而言所述抗体的高的特异性百分比 (94%) 和灵敏度百分比 (86%)。

[0059] 表1. 抗-FLU PB2抗体的诊断准确性

PIV (N=160)	通过参考技术 (PCR) 的诊断		特异性	灵敏度
	真阳性	假阳性		
[0060] 诊断测试: ELISA	18	9	100%	86%
	假阴性 3	真阴性 130		

[0061] 实施例9: 通过间接ELISA测定法来检测PB2蛋白, 其中使用完整单克隆抗体及其片段

[0062] 在该应用实施例中显示, 针对PB2蛋白的特异性单克隆抗体都可以通过间接ELISA来进行检测。为此, 用50 μ L的50ng PB2蛋白和 BSA来活化ELISA平板。用在1X PBS中稀释的10%FBS来封闭非特异性位点。170ng (3.4 μ g/mL) 的由杂交瘤1A3E2 (抗-Flu) 和2F11B1 (抗-Flu) 所分泌的抗体的Fab片段, 两者都事先与生物素相缀合。温育缀合有HRP的生物素结合分子 (链霉抗生物素蛋白) (1:2000 稀释, 75ng/孔) (图5, 暗灰色条: 抗体1A3E2; 和浅灰色条: 抗体 2F11B1)。

[0063] 实施例10: 通过间接ELISA测定法来检测Flu的抗原的测定法, 其中使用Flu的抗-PB2单克隆抗体的F(ab')₂片段

[0064] 该测定法的目的是证明对于PB2蛋白来说由杂交瘤1A3E2和 2F11B1所产生的抗-Flu抗体的片段的检测能力。在间接ELISA测定法之前, 进行每种抗-Flu抗体的IgG分子的片段化。所述片段化通过使用试剂盒“Thermo Scientific™ Pierce™ F(ab')₂ Fragment Preparation Kits” (#10381214, Thermo Scientific) 来进行, 其通过使用消化Fc片段的胃蛋白酶来从目的抗体上分开F(ab')₂片段和Fc, 和然后进行纯化步骤以将F(ab')₂片段与经消化的Fc片段分开。在抗体片段化之后, 通过Western印迹技术来验证经纯化的F(ab')₂级分。使用快速缀合试剂盒Lightning-Link rapid biotin type A (#370-0010, Expedeon) 来将F(ab')₂级分与生物素分子相缀合。在具有所有所列试剂的情况下, 通过间接ELISA技

术来进行抗原的检测,其中用50ng 的经纯化的PB2抗原在37℃下活化ELISA平板1小时。包括两个阴性对照,一个没有样品,和另一个温育具有50ng的BSA蛋白的孔。然后,用1X磷酸盐缓冲液(PBS)/0.05%Tween20洗涤平板两次。之后,用1X PBS/10%胎牛血清(FBS)在37℃下封闭平板2小时。然后,重复洗涤,并接着在37℃下温育在1X PBS/10%FBS中稀释的最终浓度为3.4μg/mL (170ng/孔) 的与生物素相缀合的每种抗体(未分级和F(ab')₂级分)(1A3E2和2F11B1)1小时(每种抗体在单独的平板中)。在温育时间过后,重复洗涤,并且向每一个所述孔添加在1X PBS/10%FBS中的以1:2000稀释度(25ng/μL/孔)的标记有辣根过氧化物酶(HRP)的生物素结合蛋白(链霉抗生物素蛋白),在黑暗中在环境温度(≈25℃)下1小时。最后,进行洗涤,并且用50μL 的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB,3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1 mg/ml,Becton Dickinson)进行显色。为了终止反应,添加50μL的 2N H₂SO₄,并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。为了确定在识别一抗方面二抗的反应是特异性的并且所获得的信号不是由于二抗与抗原的非特异性结合而引起的,设置其中仅使用二抗而没有一抗也没有样品的对照(未活化的孔)。用于确定一抗的反应特异于抗原的另一对照在于在未用抗原进行活化的ELISA平板(没有样品)上使用所述抗体,或者在具有50ng的BSA蛋白的ELISA平板上使用所述抗体。

[0065] 结果显示,本发明的单克隆抗体能够特异性地识别50ng的经纯化的抗原,而不论是使用完整抗体还是其片段(图5,黑色条:抗体 1A3E2;和白色条:抗体2F11B1)。

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5

SEQ ID No 5.

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 合成的 - 杂交瘤1A3E2 - 抗 PB2 Flu CDRHC 2

<400> 5

Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val Lys

1 5 10 15

Gly

SEQ ID No 6.

<210> 6

<211> 13

<212> DNA

<213> 合成的 - 杂交瘤1A3E2 - 抗 PB2 Flu CDRHC 3

<400> 6

Asp Arg Asp Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Met Asp Tyr

1 5 10

SEQ ID No 7.

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> 合成的 - 杂交瘤2F11B1 - 抗 PB2 Flu CDRLC 1

<400> 7

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

SEQ ID No 8.

<210> 8

<211> 7

<212> DNA

<213> 合成的 - 杂交瘤2F11B1 - 抗 PB2 Flu CDRLC 2

<400> 8

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

SEQ ID No 9.

<210> 9

<211> 9

<212> DNA

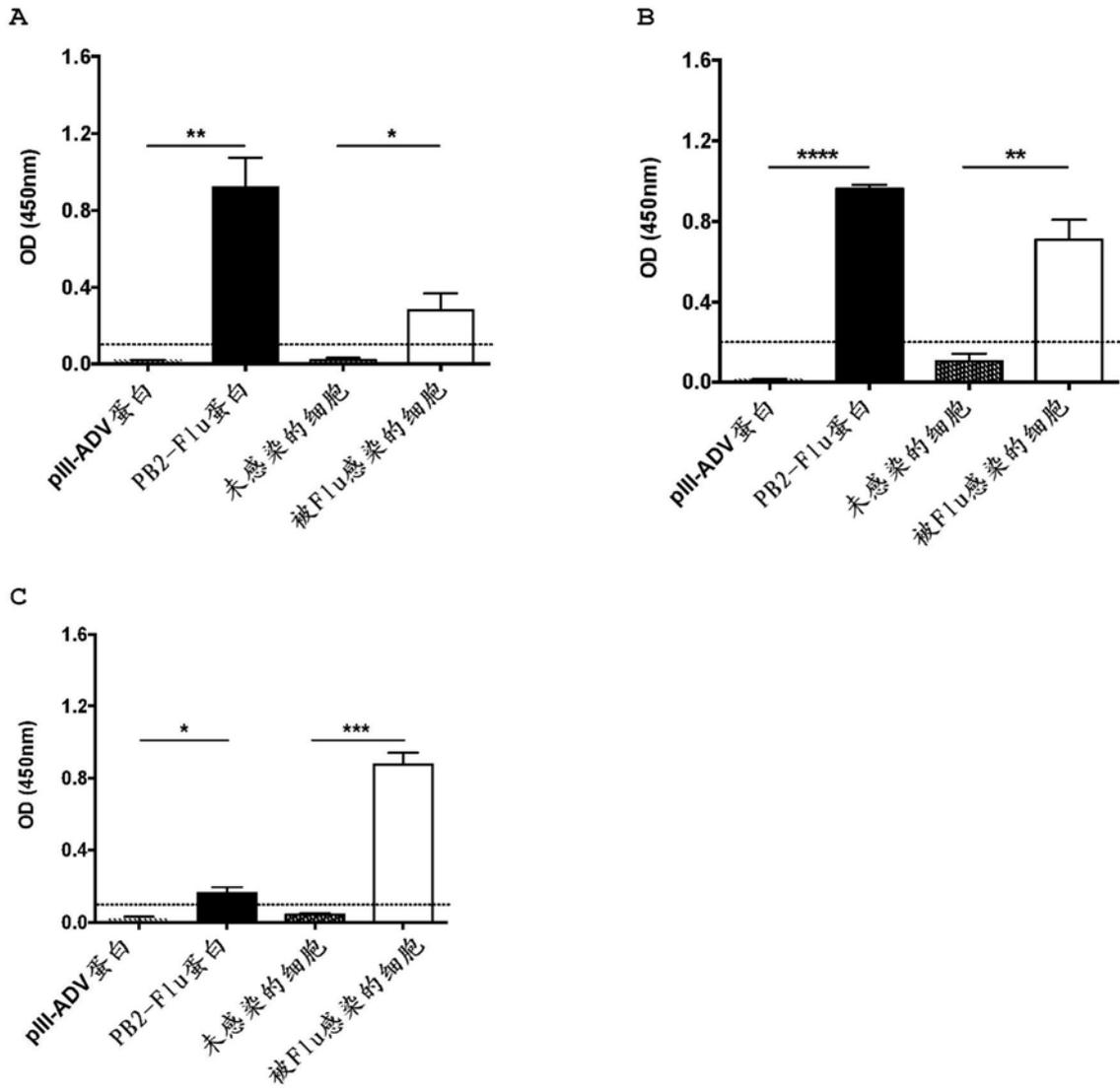


图1

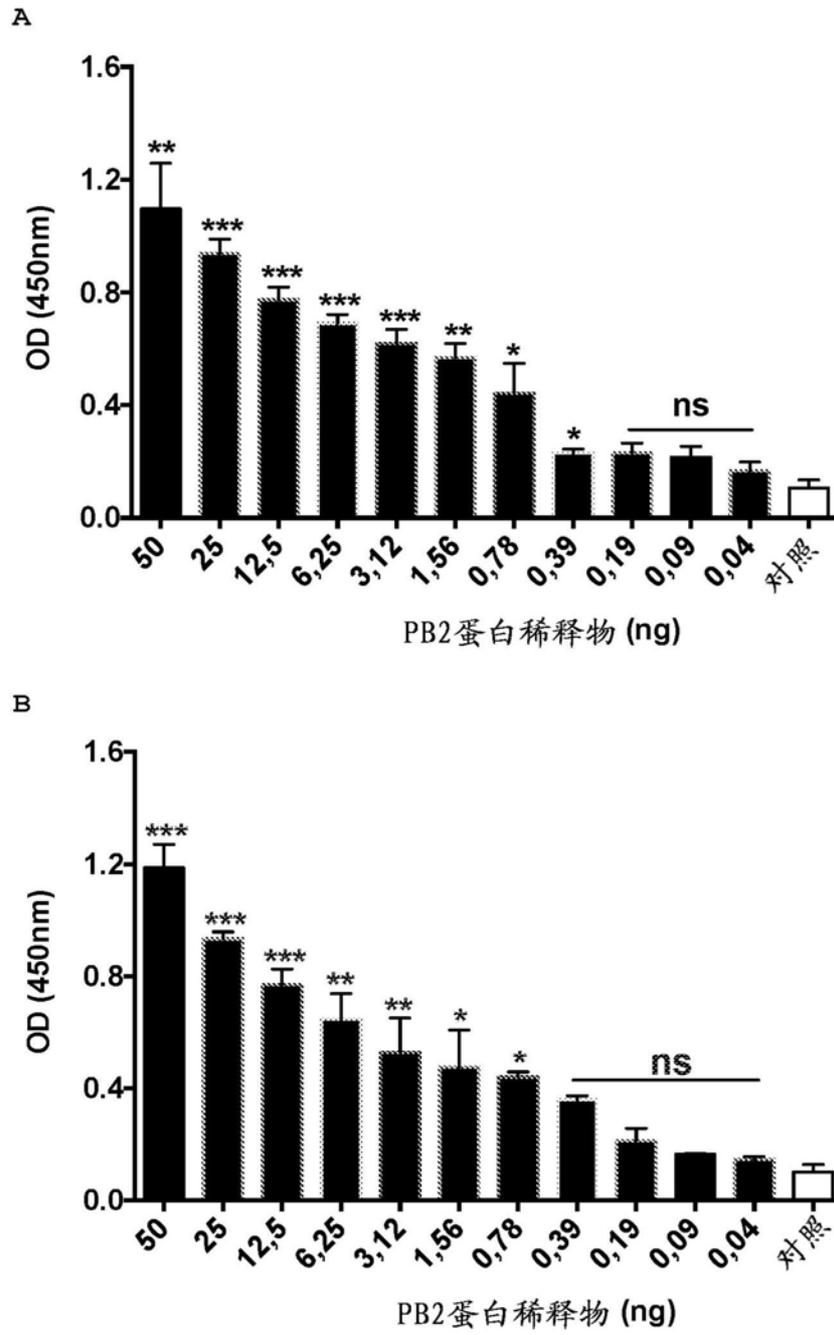


图2

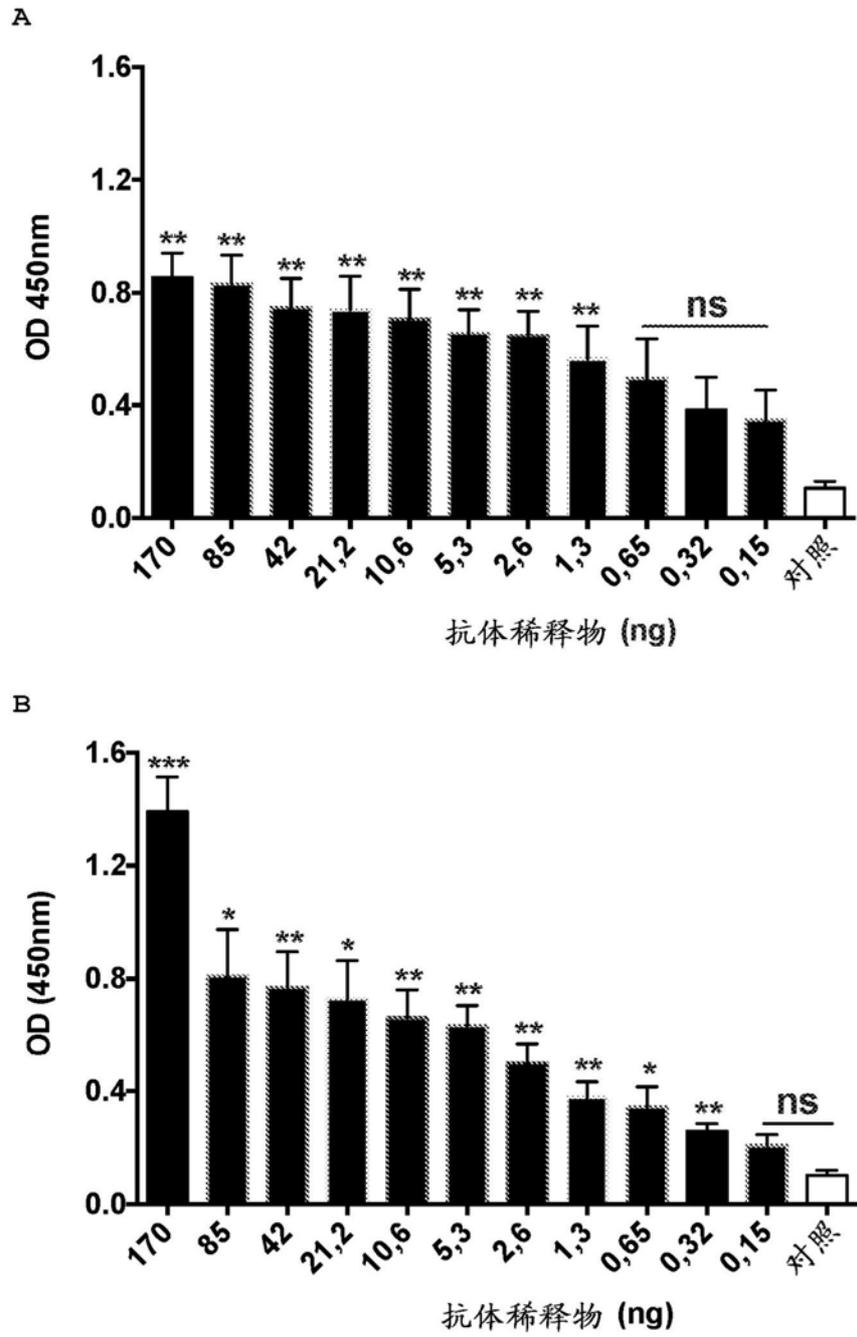


图3

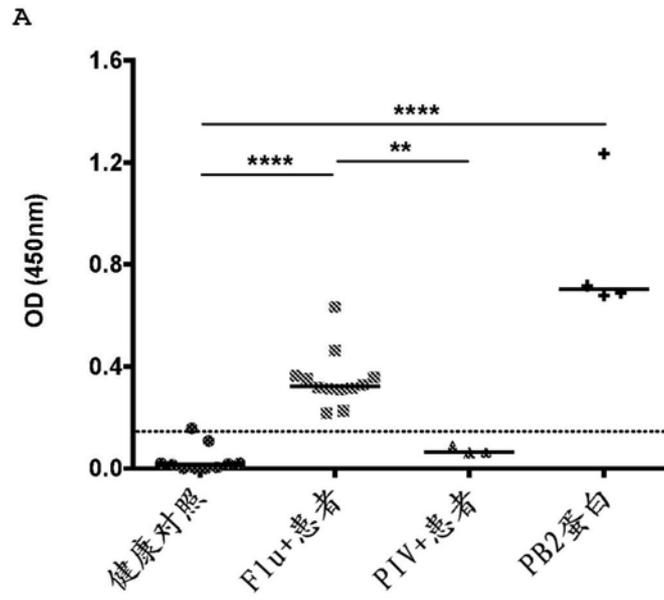


图4

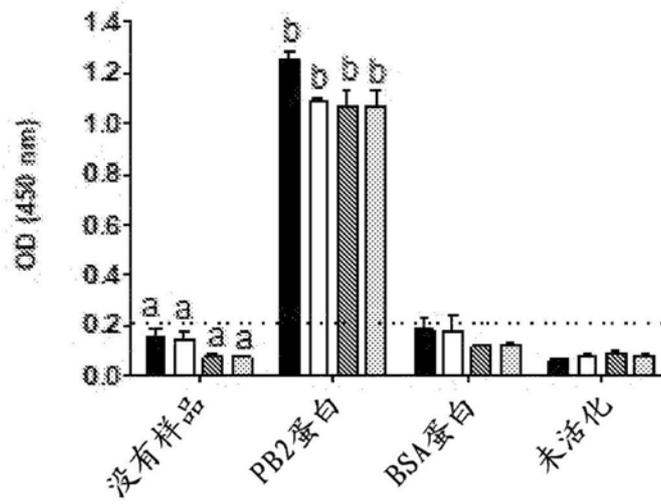


图5