

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580035920.6

[51] Int. Cl.

C07K 14/35 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 101044160A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.8.19

[21] 申请号 200580035920.6

[30] 优先权

[32] 2004.8.19 [33] US [31] 60/603,243

[86] 国际申请 PCT/AU2005/001254 2005.8.19

[87] 国际公布 WO2006/017912 英 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.19

[71] 申请人 蛋白质组系统知识产权有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 詹姆斯·A·麦金托什

罗伯特·艾伦·科尔

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 15 页 说明书 83 页 序列表 16 页

[54] 发明名称

结核分支杆菌感染的诊断和治疗方法及所用试剂

[57] 摘要

本发明提供了用于结核分支杆菌对动物对象如人的感染及与这类感染相关的症状如结核病的诊断、预后和治疗性试剂。更特别地,本发明提供了用于基于抗体的诊断应用的称为“BSX”的结核分支杆菌重组蛋白(SEQ ID NO: 1)及其例如包含 SEQ ID NO: 34、25 和 45 的免疫原性表位。本发明还提供了抗 BSX 及其免疫原性肽的抗体,这些抗体可用于基于抗原的诊断或预后测试及用于治疗和疫苗配制。

1、一种分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

2、权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白，其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或具有与 SEQ ID NO:1 至少约 95%相同的氨基酸序列。

3、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽是合成肽。

4、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:1 的序列的至少约 5 个连续氨基酸残基。

5、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:1 的序列的至少约 10 个连续氨基酸残基。

6、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:1 的序列的至少约 15 个连续氨基酸残基。

7、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含在 N-末端和/或 C-末端与约 1-5 个额外氨基酸残基融合的 SEQ ID NO:1 的序列的至少约 5 个连续氨基酸残基。

8、权利要求 7 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:2-53 中的任一氨基酸序列或任一所述序列的包含与其至少约 95%相同的氨基酸序列的免疫学交叉反应性变体。

9、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，

其中所述肽、片段或表位包含位于 SEQ ID NO:1 的约残基 65 至约残基 84 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

10、权利要求 9 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含位于 SEQ ID NO:1 的约残基 65 至约残基 75 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基。

11、权利要求 9 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含位于 SEQ ID NO:1 的约残基 67 至约残基 73 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基。

12、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:45 的序列的至少约 5 个连续残基。

13、权利要求 9 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，进一步包含长度多至约 5 个氨基酸残基的 N-末端延伸和/或长度多至约 5 个氨基酸残基的 C-末端延伸。

14、权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其包含 SEQ ID NO:24、25 或 45 的氨基酸序列或其包含与 SEQ ID NO:24、25 或 45 至少约 95%相同的氨基酸序列的免疫学交叉反应性变体。

15、权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述蛋白质、肽、片段或表位包含一或多种标记或可检测部分以便于检测或分离或固定化。

16、权利要求 15 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述标记是生物素、谷胱甘肽-S-转移酶 (BSXT)、FLAG 表位、六组氨酸或 β -半乳糖苷酶。

17、一种包含一或多种权利要求 1 的免疫原性 BSX 肽、片段或

表位的融合蛋白。

18、权利要求 17 的融合蛋白，其包含谷胱甘肽-S-转移酶(BSXT)、FLAG 表位、六组氨酸或 β -半乳糖苷酶。

19、一种分离的蛋白质聚集体，其包含一或多种权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或一或多种其免疫原性 BSX 肽、片段或表位。

20、权利要求 19 的分离的蛋白质聚集体，其包含免疫球蛋白。

21、权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在检测对象中的由结核分支杆菌引起的继往感染、活动感染或潜伏感染中的用途，其中所述感染通过得自所述对象的样品中的抗体与所述分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的结合而确定。

22、权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在引起结合结核分支杆菌谷氨酰胺合成酶的抗体生成中的用途。

23、权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在制备用于接种对象以抗结核分支杆菌感染的药物中的用途。

24、一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合权利要求 1-16 任一项的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

25、权利要求 24 的分离的抗体，其中所述抗体是多克隆抗体。

26、权利要求 24 的分离的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。

27、产生权利要求 26 的单克隆抗体的分离的抗体生成细胞或抗

体生成细胞群。

28、权利要求 24 的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段在检测对象中的由结核分支杆菌引起的继往感染、活动感染或潜伏感染中的用途，其中所述感染通过所述抗体或片段与得自所述对象的生物学样品中存在的结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的结合而确定。

29、权利要求 24 的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段在鉴别结核分支杆菌或由结核分支杆菌感染的细胞或者选择或计数所述细菌或所述细胞中的用途。

30、权利要求 24 的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段在药物中的用途。

31、一种组合物，其包含权利要求 24 的分离的或重组的抗体及药理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

32、一种诊断对象中的结核病或结核分支杆菌感染的方法，包括在来自所述对象的生物学样品中检测抗免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的抗体，其中所述抗体在样品中的存在是感染的指征。

33、权利要求 32 的方法，包括将衍生自对象的生物学样品与权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在足以形成抗原-抗体复合物的条件下接触一段足以形成抗原-抗体复合物的时间，然后检测抗原-抗体复合物的形成。

34、权利要求 33 的方法，其中检测抗原-抗体复合物的形成包括检测抗原-抗体复合物中的人免疫球蛋白。

35、权利要求 34 的方法，其中检测人免疫球蛋白包括将抗原-抗体复合物与包含抗人免疫球蛋白的第二抗体在足以使所述第二抗体结合复合物中的人免疫球蛋白的条件下接触一段足以使所述第二

抗体结合复合物中的人免疫球蛋白的时间,然后检测结合的抗人免疫球蛋白。

36、权利要求 35 的方法,其中第二抗体用可检测标记或报道分子标记。

37、权利要求 33 的方法,其中衍生自对象的生物学样品与分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白接触,所述蛋白包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

38、权利要求 33 的方法,其中衍生自对象的生物学样品与包含 SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽接触。

39、权利要求 33 的方法,其中衍生自对象的生物学样品与包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽接触。

40、权利要求 32 的方法,包括将衍生自对象的生物学样品与包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽以及与包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白在足以形成抗原-抗体复合物的条件下接触一段足以形成抗原-抗体复合物的时间,然后检测抗原-抗体复合物的形成。

40、权利要求 33 的方法,进一步包括将衍生自对象的生物学样品与结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽接触,所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白或肽不是分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

41、权利要求 40 的方法,其中所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽是谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

42、权利要求 41 的方法,其中所述免疫原性肽包含 SEQ ID NO:54 或 55 的氨基酸序列。

43、权利要求 32 的方法,其中所述对象是中国人或南非人。

44、权利要求 32 的方法,其中所述对象是无免疫应答的或免疫

缺陷的。

45、权利要求 32 的方法，其中所述对象是 HIV+。

46、权利要求 32 的方法，其中所述样品包含得自对象的血液或血清或免疫球蛋白级分。

47、一种诊断对象中的结核病或结核分支杆菌感染的方法，包括在来自所述对象的生物样品中检测免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其中所述蛋白质或免疫原性片段或表位在样品中的存在是疾病、疾病进程或感染的指征。

48、权利要求 47 的方法，其中所述方法包括将衍生自对象的生物样品与一或多种能结合 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。

49、权利要求 48 的方法，其中抗体是分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合权利要求 1-16 任一项的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

50、权利要求 49 的方法，其中抗体是多克隆抗体。

51、权利要求 49 的方法，其中抗体是单克隆抗体。

52、权利要求 47 的方法，其中所述对象是无免疫应答的或免疫缺陷的。

53、权利要求 47 的方法，其中所述对象是 HIV+。

54、权利要求 47 的方法，其中所述样品包含组织提取物，所述组织选自如下一组：脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨及其混合物。

55、权利要求 47 的方法，其中所述样品包含选自如下一组的体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

56、权利要求 47 的方法，其中所述样品衍生自选自如下一组的

体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

57、权利要求 47 的方法，包括将衍生自对象的生物学样品与结合包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽的抗体以及与结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白的抗体接触，接触的时间和条件为足以使抗原-抗体复合物形成的时间和条件，然后检测抗原-抗体复合物的形成。

58、权利要求 48 的方法，进一步包括将衍生自对象的生物学样品与结合结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽的抗体接触，所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽不是分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

59、权利要求 58 的方法，其中所述抗体结合谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

60、权利要求 59 的方法，其中所述抗体结合包含 SEQ ID NO:54 或 55 的氨基酸序列的谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

61、一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法，所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位，其中所述蛋白或片段或表位的水平相比于在正常或健康对象中可检测到的该蛋白或片段或表位的水平增加则表示该对象对所述治疗无应答或者未消除疾病或感染。

62、权利要求 61 的方法，其中所述方法包括将衍生自所述对象的生物学样品与一或多种能与 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位结合的抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。

63、权利要求 62 的方法，其中抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合根据权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，或特异性结合包含所述免疫

原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

64、权利要求 62 的方法，其中抗体是多克隆抗体。

65、权利要求 62 的方法，其中抗体是单克隆抗体。

66、权利要求 61 的方法，其中所述对象是无免疫应答的或免疫缺陷的。

67、权利要求 61 的方法，其中所述对象是 HIV+。

68、权利要求 61 的方法，其中所述样品包含组织提取物，所述组织选自如下一组：脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨及其混合物。

69、权利要求 61 的方法，其中所述样品包含选自如下一组的体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

70、权利要求 61 的方法，其中所述样品衍生自选自如下一组的体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

71、权利要求 61 的方法，包括将衍生自对象的生物学样品与结合包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽的抗体以及结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白的抗体接触，接触的时间和条件为足以使抗原-抗体复合物形成的时间和条件，然后检测抗原-抗体复合物的形成。

72、权利要求 62 的方法，进一步包括将衍生自对象的生物学样品与结合结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽的抗体接触，所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽不是分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

73、权利要求 72 的方法，其中所述抗体结合谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

74、权利要求 73 的方法，其中所述抗体结合包含 SEQ ID NO:54 或 55 的氨基酸序列的谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

75、一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所

述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法,所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位,其中所述蛋白或片段或表位的水平相比于在患有结核病或结核分支杆菌感染的对象中可检测到的该蛋白或片段或表位的水平降低则表示该对象对所述治疗有应答或者已经消除了疾病或感染。

76、权利要求 75 的方法,其中所述方法包括将衍生自所述对象的生物学样品与一或多种能与 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位结合的抗体接触,并检测抗原-抗体复合物的形成。

77、权利要求 76 的方法,其中抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段,其特异性结合根据权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

78、权利要求 76 的方法,其中抗体是多克隆抗体。

79、权利要求 76 的方法,其中抗体是单克隆抗体。

80、权利要求 75 的方法,其中所述对象是无免疫应答的或免疫缺陷的。

81、权利要求 75 的方法,其中所述对象是 HIV+。

82、权利要求 75 的方法,其中所述样品包含组织提取物,所述组织选自如下一组:脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨及其混合物。

83、权利要求 75 的方法,其中所述样品包含选自如下一组的体液:痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

84、权利要求 75 的方法,其中所述样品衍生自选自如下一组的体液:痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

85、权利要求 75 的方法,包括将衍生自对象的生物学样品与结合包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽的抗体以及与

结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白的抗体接触，接触的时间和条件为足以使抗原-抗体复合物形成的时间和条件，然后检测抗原-抗体复合物的形成。

86、权利要求 76 的方法，进一步包括将衍生自对象的生物学样品与结合结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽的抗体接触，所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽不是分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

87、权利要求 86 的方法，其中所述抗体结合谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

88、权利要求 87 的方法，其中所述抗体结合包含 SEQ ID NO:54 或 55 的氨基酸序列的谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

89、一种监测对象中的疾病进程、对治疗的应答性或结核分支杆菌感染状态的方法，包括在不同的时间确定来自所述对象的生物学样品中的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的水平，其中 BSX 蛋白、片段或表位水平的改变表示对象的疾病进程、对治疗的应答性或感染状态的改变。

90、权利要求 89 的方法，进一步包括当 BSX 蛋白、片段或表位水平随时间增高时给予用于治疗结核病或结核分支杆菌感染的化合物。

91、权利要求 89 的方法，其中所述方法包括将衍生自所述对象的生物学样品与一或多种能与 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位结合的抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。

92、权利要求 91 的方法，其中抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合根据权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

93、权利要求 91 的方法，其中抗体是多克隆抗体。

94、权利要求 91 的方法，其中抗体是单克隆抗体。

95、权利要求 89 的方法，其中所述对象是无免疫应答的或免疫缺陷的。

96、权利要求 89 的方法，其中所述对象是 HIV+。

97、权利要求 89 的方法，其中所述样品包含组织提取物，所述组织选自如下一组：脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨及其混合物。

98、权利要求 89 的方法，其中所述样品包含选自如下一组的体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

99、权利要求 89 的方法，其中所述样品衍生自选自如下一组的体液：痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物。

100、权利要求 89 的方法，包括将衍生自对象的生物样品与结合包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的免疫原性 BSX 肽的抗体以及结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白的抗体接触，接触的时间和条件为足以使抗原-抗体复合物形成的时间和条件，然后检测抗原-抗体复合物的形成。

101、权利要求 91 的方法，进一步包括将衍生自对象的生物样品与结合结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽的抗体接触，所述结核分支杆菌的免疫原性蛋白质或肽不是分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

102、权利要求 101 的方法，其中所述抗体结合谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

103、权利要求 102 的方法，其中所述抗体结合包含 SEQ ID NO:54 或 55 的氨基酸序列的谷氨酰胺合成酶蛋白或肽。

104、权利要求 47 的方法，其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物，所述循环免疫复合物包含与结核分支杆菌的 BSX

蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位结合的免疫球蛋白 (Ig), 并且其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物的免疫球蛋白部分接触, 接触的时间和条件足以形成复合物, 随后检测结合的抗 Ig 抗体。

105、权利要求 61 的方法, 其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物, 所述循环免疫复合物包含与结核分支杆菌的 BSX 蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位结合的免疫球蛋白 (Ig), 并且其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物的免疫球蛋白部分接触, 接触的时间和条件足以形成复合物, 随后检测结合的抗 Ig 抗体。

106、权利要求 75 的方法, 其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物, 所述循环免疫复合物包含与结核分支杆菌的 BSX 蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位结合的免疫球蛋白 (Ig), 并且其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物的免疫球蛋白部分接触, 接触的时间和条件足以形成复合物, 随后检测结合的抗 Ig 抗体。

107、权利要求 89 的方法, 其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物, 所述循环免疫复合物包含与结核分支杆菌的 BSX 蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位结合的免疫球蛋白 (Ig), 并且其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物的免疫球蛋白部分接触, 接触的时间和条件足以形成复合物, 随后检测结合的抗 Ig 抗体。

108、一种治疗结核病或结核分支杆菌感染的方法, 包括:

- (i) 进行权利要求 32 的方法, 由此检测在来自对象的生物学样品中结核分支杆菌感染的存在; 和
- (ii) 给予治疗有效量的药物组合物以降低对象的肺部、血液或淋巴系统中的病原性杆菌的数目。

109、一种治疗结核病或结核分支杆菌感染的方法，包括：

- (i) 进行权利要求 47 的方法，由此检测在来自正在用第一种药物组合物治疗的对象的生物样品中结核分支杆菌感染的存在；和
- (ii) 给予治疗有效量的第二种药物组合物以降低对象的肺部、血液或淋巴系统中的病原性杆菌的数目。

110、一种药物组合物，其包含权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位以及药理学可接受的稀释剂。

111、权利要求 110 的药物组合物，进一步包含佐剂。

112、编码权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的分离的核酸。

113、表达权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的细胞。

114、权利要求 113 的细胞，其中所述细胞是在其表面上表达权利要求 1 的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的抗原呈递细胞（APC）。

115、一种用于检测生物样品中的结核分支杆菌感染的试剂盒，所述试剂盒包含：

- (i) 一或多种特异性结合权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的、或者特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的分离的抗体或其免疫反应性片段；和
- (ii) 用于检测抗原-抗体复合物形成的手段，

任选地与使用说明一起包装。

116、一种用于检测生物学样品中的结核分支杆菌感染的试剂盒，所述试剂盒包含：

(i) 根据权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位；和

(ii) 用于检测抗原-抗体复合物形成的手段，

任选地与使用说明一起包装。

117、一种吸附有权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位或者包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的固体基质。

118、权利要求 117 的固体基质，包括膜。

119、权利要求 118 的固体基质，其中膜包括尼龙和硝酸纤维素。

120、权利要求 117 的固体基质，包括聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔板。

121、权利要求 117 的固体基质，包括 dipstick。

122、权利要求 117 的固体基质，包括玻璃支持体。

123、权利要求 117 的固体基质，包括层析树脂。

124、一种吸附有抗体的固体基质，所述抗体结合权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位或者结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。

125、权利要求 124 的固体基质，包括膜。

126、权利要求 125 的固体基质，其中膜包括尼龙和硝酸纤维素。

127、权利要求 124 的固体基质，包括聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔板。

-
- 128、权利要求 124 的固体基质，包括 dipstick。
 - 129、权利要求 124 的固体基质，包括玻璃支持体。
 - 130、权利要求 124 的固体基质，包括层析树脂。

结核分支杆菌感染的诊断和治疗方法及所用试剂

发明领域

本发明涉及新的诊断、预后和治疗被结核分支杆菌 (*M. tuberculosis*) 感染的动物个体如人以及与这类感染相关的症状如结核病的试剂。更特别地, 本发明首次以充分公开的形式提供了称为 BSX 的结核分支杆菌蛋白质 (SEQ ID NO:1) 及其适于制备免疫学试剂如抗原蛋白/肽和/或抗体的免疫原性表位在感染个体中的表达, 以用于感染的诊断、预后和治疗以及疫苗的开发。

发明背景

1. 总的信息

本文所用术语“衍生自”应被认为是表示一具体的整体 (integer) 可以获自一特定来源, 但是不是必须直接来自该来源。

除非上下文有需要或者特别指出相反教导, 否则本文中作为单数形式的整体、步骤或元件而叙述的本发明的整体、步骤或元件清楚地包括单数和复数形式的所叙述的整体、步骤或元件。

本文中针对任一单个的实施方案以及特别是针对任何蛋白质或其在结核分支杆菌的诊断、预后或治疗中的用途而描述的本发明的实施方案应被理解为加以必要的变更而适用于本文描述的本发明的任何其它实施方案。

本文描述的用于个体对象的诊断实施方案加以必要的变更后清楚地适用于种群 (population)、种族群体 (racial group) 或亚群 (sub-group) 的流行病学或具有特定 MHC 限制性的个体的诊断或预后。本领域技术人员基于本文描述的主题可以容易地获得本发明的所有这类变异。

在本说明书中，除非上下文有需要，否则术语“包含”应被理解为包括所描述的步骤或元件或整体或者步骤或元件或整体组，但不排除任何其它步骤或元件或整体或元件或整体组。

本领域技术人员应理解本文描述的本发明可以有与特异描述不同的变异和修改。应理解的是本发明包括所有这类变异和修改。本发明还包括本说明书中个别或统一引用的或指出的步骤、特征、组合物和化合物的全体以及所述步骤或特征的任何和全部的组合或者任何两个或多个。

本发明范围不限于本文描述的具体实施例。功能等价的产品、组合物和方法清楚地包括在本文所述的本发明范围内。

除非另有指明，否则使用分子生物学、微生物学、蛋白质组学、病毒学、重组 DNA 技术、溶液肽合成、固相肽合成和免疫学的常规技术无需过多实验即可实施本发明。这些程序例如在并入参考的下述文献中描述：

1. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), whole of Vols I, II, and III;

2. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N. Glover, ed. 1985), IRL Press, Oxford, whole of text;

3. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, whole of text, and particularly the papers therein by Gait, pp1-22; Atkinson et al, pp35-81; Sproat et al, pp 83-115; and Wu et al, pp 135-151;

4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, whole of text;

5. *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, whole of text;

6. Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984);
7. Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), whole of series;
8. J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany);
9. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. and Fenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342
10. Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154.
11. Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York.
12. Wünsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart.
13. Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg.
14. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg. 15. Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474.
16. Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).
17. Wilkins M. R., Williams K. L., Appel R. D. and Hochstrasser (Eds) 1997 Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics Springer, Berlin.

2. 相关技术描述

结核病是一种慢性传染病，通常由结核分支杆菌感染导致。它是

发展中国家的主要疾病并且在世界的发达区域也越来越成问题，每年有约 8 百万新增病例，3 百万人死亡。尽管在相当一段时间感染是无症状的，但是该病最常见的表现形式是急性肺部炎症，导致发热和咳嗽。如果不治疗，结核分支杆菌感染可行进超出肺部原发感染部位而到达身体任何器官，通常导致严重的并发症和死亡。

迅速增加的全球性结核病发病率和微生物抗性问题经常被医疗保健行业许多研究人员描述并且为本领域技术人员所熟知。特别是越来越认识到急需新的诊断剂、药物和疫苗。

结核分支杆菌在宿主内保持和增殖的免疫学机制尚不很清楚。其结果是结核病与宿主之间的免疫学关系的任何新信息都可以被清楚地以多种不同方式应用以改善该病的诊断、治疗。

结核病的发病在晚期 AIDS 病人中特别常见，他们大多数都受此痛苦。事实上，HIV 感染是在纯化蛋白衍生物（PPD）结核菌素对象中发生活动性结核病的最重要的风险因子，并且与未被 HIV 感染的个体相比在 HIV 感染的免疫抑制个体中发生结核病感染的风险可能显著增加。另外还可能的是 HIV-I 和结核分支杆菌的共感染介导了无 HIV 症状期的缩短以及对象存活时间缩短，这可能是通过引发增加的病毒复制和病毒负荷，导致 CD4⁺ T 细胞耗竭和免疫缺陷或免疫抑制所致（Corbett et al 2003; Ho, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91, 385-387, 1996）。

结核分支杆菌基因组的测序为鉴别理论上可能被该生物表达的潜在结核分支杆菌蛋白质的无数研究努力提供了便利。然而测序数据单独不足以总结出任一特定蛋白质在体内被该生物表达，更不用说在感染人和其它动物期间表达了。结核分支杆菌基因组中阅读框的阐明也不意味着所编码的或实际被该细菌表达的任何特定蛋白质包括制备诊断、预后和治疗性免疫学试剂所需的任何免疫显性 B 细胞表位或 T 细胞表位。例如，为了确定结核分支杆菌的一特定蛋白质或其衍

生片段具有作为免疫测定中的诊断试剂的功效或者适合用于疫苗制备物中,需要表明该蛋白质在细菌的感染周期中表达并且宿主生物对该蛋白质和/或包含 B 细胞表位或 T 细胞表位(例如, CD8⁺限制的 CTL 表位)的肽片段产生免疫应答。

在培养物中生长结核分支杆菌的能力为鉴别体外表达的结核蛋白提供了一种方便的模型。但是,培养环境与体内发现结核分支杆菌的人巨噬细胞、肺或肺外部位(extrapulmonary site)的环境显著不同。最近的证据表明胞内寄生物如结核分支杆菌的蛋白质表达谱根据环境信号而发生显著变化,从而该生物的体外表达谱可能不能准确反映该生物的原位表达谱。

用结核分支杆菌感染或再激活潜伏的感染诱导了宿主应答,包括单核细胞和巨噬细胞向感染部位的募集。随着更多免疫细胞的积累,形成了肉芽结节,其包括免疫细胞和已被巨噬细胞的细胞毒性产物破坏的宿主组织。随着疾病的进程,巨噬细胞酶导致蛋白质、脂质和核酸水解,由此周围组织液化并形成肉芽。最终,损害破裂,杆菌释放进周围肺、血液或淋巴系统。

在这一感染周期期间,杆菌暴露于四种不同的宿主环境,即肺泡巨噬细胞、干酪肉芽(caseous granuloma)、胞外肺和肺外部位如肾或腹膜腔、淋巴、骨或脊柱。

据认为杆菌可在所有这些环境中复制至不同程度,但是对每一部位的环境条件却所知甚少。所有四种宿主环境是不同的,提示结核分支杆菌在每一环境中的表达谱是不同的。

因此,对来自对数期培养物的结核分支杆菌蛋白质的鉴别不一定提示哪些蛋白质在每种体内环境中被表达或是高度免疫原性的。类似地,对在体外生长的巨噬细胞中的结核分支杆菌的鉴别不一定模拟了在干酪肉芽、高充气肺或具有低氧含量的肺外部位中的结核分支杆菌的蛋白质表达谱。

另外，宿主内的结核分支杆菌感染可见为一动态事件，其中宿主免疫系统持续试图通过感染的巨噬细胞的破坏而包囊化杆菌并消灭其。其结果是，结核分支杆菌经历胞内生长、破坏（其中胞内和分泌的细菌蛋白均被暴露和破坏）和快速细胞外繁殖的周期。宿主和病原体的相互作用是许多因素的结果，其不能在体外重现。

因此，直到本发明做出之前，尚不清楚哪些结核分支杆菌蛋白质在任一体内特定环境中是最高表达的和/或高免疫学活性的或免疫原性的结核分支杆菌蛋白质。

很明显，仍需要快速和廉价的诊断和预后试剂以确定结核分支杆菌感染和/或与其相关的疾病症状。

发明概述

在导致完成本发明的工作中，本发明人希望阐明在一系列体内环境中由结核分支杆菌表达的蛋白质范围，以便鉴别高表达的和/或高免疫原性的结核分支杆菌蛋白质。

本发明人使用蛋白质组学途径来鉴别一组患者体液包括痰、胸腔积液（pleural fluid）、血浆和血清中的结核分支杆菌蛋白质。在一组结核分支杆菌感染的患者的样品中鉴别了一种在体内高表达的结核分支杆菌蛋白质，它与预测由结核分支杆菌基因组编码的一个序列具有高氨基酸序列相同性。本发明人鉴别的蛋白质包括 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。在大规模筛选中，有 47% 的 TB 阳性对象显示出产生抗该蛋白质的抗体应答，而仅有 6% 的 TB 阴性对象显示出产生抗该蛋白质的抗体应答，提示该蛋白质的存在与 TB 诊断相关。

SEQ ID NO:1 的氨基酸序列命名为“BSX”。序列分析表明结核分支杆菌蛋白 BSX 的序列包括一在 XRE 家族样蛋白质（即与某些原核基因（例如 Cro, cl, HipB）上游区域中的 cw 作用异型生物物质（xenobiotic）应答元件结合的转录调节蛋白）中发现的螺旋-转角-

螺旋基序。

本发明人进一步产生了一 PEPSET, 其包括 43 个合成的重叠肽 (即 SEQ ID NO:2-44), 它们覆盖了 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 用以确定该鉴别的蛋白质是否跨地理和跨种族界限而存在, 并且鉴别用于后续单克隆和多克隆抗体产生的 B 细胞表位。筛选 TB 阴性血清和来自包括对于人免疫缺陷病毒 (HIV-1 和/或 HIV-2) 呈血清学阴性或血清学阳性的 TB 患者在内的 TB 阳性对象的血清, 确定其中是否存在对 PEPSET 中的每种肽的抗体。在 TB 阳性组中, 这些肽中有六种是免疫原性的。很高比例 (80%) 的 HIV⁺ ZTB⁺ 对象具有针对 8 种肽的抗体, 而仅有 25% 的 HIV⁺ VTB⁺ 对象有所述抗体。所有这些肽 (SEQ ID NO:14、20、21、22、24、25 和 36) 在对照组中均不出现, 提示它们可用作特别是 HIV 感染的个体中结核分支杆菌的潜伏和活动感染的诊断指示剂。

本发明人进一步示出抗 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或其 B 细胞表位的抗体在结核分支杆菌的肺外感染过程中存在于对象中, 至少在一个种群中。因此, 本发明人检查了对这些抗体的检测是否可以作为诊断结核病的合适的测定示值读数 (readout)。有关这一点, 本发明人确定包含 SEQ ID NO:1 所示序列的重组 BSX 蛋白和包含 SEQ ID NO:24-25 内的免疫显性 B 细胞表位的肽 (例如包含 SEQ ID NO:45 的序列的肽) 根据它们的高灵敏性和特异性可以用于基于抗体的结核病诊断测试中, 包括多分析物测试。衍生自 BSX 蛋白的全长序列的其它肽, 例如包含 SEQ ID NO:46 和 47 的序列的肽根据它们的高特异性可用于这些测试中, 例如在一多分析物测定形式中作为二级配体。

本发明人还制备了抗 BSX 衍生肽的抗体, 用于开发基于抗原的诊断和预后测定。产生表达抗选定的肽的抗体的血浆细胞瘤, 这些细胞瘤可用于例如产生杂交瘤, 所述杂交瘤表达单克隆抗体, 这些单克

隆抗体结合患者样品中的结核分支杆菌 BSX 蛋白的 B 细胞表位，由此检测细菌。为了选择能够检测患者血清中纳克/ml 或皮克/ml 以下水平的血清中结核分支杆菌 BSX 蛋白的高亲和性抗体，还获得了其它的抗体。

这些发现为产生用于检测对象中结核分支杆菌感染的新的诊断剂和用于感染或与其相关的疾病状态的进程的新的预后指示剂提供了措施。优选地，BSX 蛋白或其 B 细胞表位用于感染或疾病的早期诊断。本领域技术人员清楚本文所述的这类预后指示剂可与结核病或其相关感染的治疗疗法结合使用。

因此，本发明为产生用于检测对象中结核分支杆菌感染的新的诊断剂和用于感染或与其相关的疾病状态的进程的新的预后指示剂提供了措施，其可以单独检测 BSX，也可以作为多分析物检测的一部分。优选地，BSX 蛋白或其 B 细胞表位用于感染或疾病的早期诊断。本领域技术人员清楚本文所述的这类预后指示剂可与结核病或其相关感染的治疗疗法结合使用。

例如，本发明提供了分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

优选地，所述分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或具有与 SEQ ID NO:1 有至少约 95%相同性的氨基酸序列。

优选地，所述免疫原性 BSX 肽是一种合成肽。优选地，BSX 肽、片段或表位包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少约 5 个连续氨基酸残基，更优选地，包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少约 10 个连续氨基酸残基，还更优选地，包含 SEQ ID NO:1 所示序列的至少约 15 个连续氨基酸残基，还更优选地，包含在 N-末端和/或 C-末端融合有约 1-5 个额外氨基酸残基的 SEQ ID NO:1 所示序列的至少约 5 个连续氨基酸残基。

在一个特别优选的实施方案中，BSX 肽、肽或表位包含 SEQ ID NO:2-53 中的任一氨基酸序列，优选地，包含选自 SEQ ID NO:14、20、21、22、24、25、36、45、46 和 47 的序列，更优选地，包含选自 SEQ ID NO: 24、25、45、46 和 47 的序列，还更优选地，包含选自 SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:45 的序列，或任一所述序列的免疫学交叉反应变体，所述变体包含与所述序列有至少约 95%相同性的氨基酸序列。

从本发明公开可以清楚优选的免疫原性 BSX 肽、片段或表位包含位于 SEQ ID NO:1 的约残基 65 至约残基 84 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基的氨基酸序列，更优选地，位于 SEQ ID NO:1 的约残基 65 至约残基 75 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基的氨基酸序列。还更优选地，优选的免疫原性 BSX 肽、片段或表位包含位于 SEQ ID NO:1 的残基 67 至残基 73 之间的至少约 5 个连续氨基酸残基的氨基酸序列，相应于 SEQ ID NO:45 所示序列的至少 5 个连续残基。这包括任何包含 N-末端延伸至多约 5 个氨基酸残基长度和/或 C-末端延伸至多约 5 个氨基酸残基长度的肽。

本发明范围还清楚地包括包含用于例如促进检测或分离或固定化的一或多个标记或检测部分的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。优选的标记包括例如生物素、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、FLAG 表位、六组氨酸、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、链霉抗生物素蛋白或金。

本发明还提供了融合蛋白，其包含一或多个根据本文所述任一实施方案的免疫原性 BSX 肽、片段或表位。例如，BSX 蛋白的 N-末端和 C-末端部分可被融合，如 SEQ ID NO:46 所提供的，其中 7 个 N-末端残基和 7 个 C-末端通过一内部半胱氨酸残基而融合。本领域技术人员能认识到这种内部连接残基是任选的或优选的并且对于融合

蛋白的生产或每种用途不是必需的。但是,优选的融合蛋白可包括一接头,以将免疫原性 BSX 肽与一或两个其它肽部分分离,所述接头例如是一个单氨基酸残基(例如甘氨酸、半胱氨酸、赖氨酸)、肽接头(例如非免疫原性肽如聚赖氨酸或聚甘氨酸)、包含多至约 6 或 8 或 10 或 12 个碳残基的多碳接头、或一种化学接头。这些接头例如通过允许与脂质或半抗原连接或允许与配体交联或结合而可促进抗体产生或疫苗配制。蛋白质作为融合体表达也可增加其可溶性。

优选的融合蛋白包含与载体蛋白、可检测标记或报道分子融合的 BSX 蛋白、肽、片段或表位,所述载体蛋白、可检测标记或报道分子例如为谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、FLAG 表位、六组氨酸、 β -半乳糖苷酶、硫氧还蛋白(TRX)(La Vallie et al, Bio/Technology 11, 187-193, 1993)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、大肠杆菌 NusA 蛋白(Fayard, E.M.S., Thesis, University of Oklahoma, USA, 1999; Harrison, inNovations 11, 4-7, 2000)、大肠杆菌 BFR(Harrison, inNovations 11, 4-7, 2000)、大肠杆菌 GrpE(Harrison, inNovations 11, 4-7, 2000)。

本发明还提供了分离的蛋白质聚集体,其包含一或多个本文所述任一实施方案的免疫原性 BSX 肽、片段或表位。优选的蛋白质聚集体包含与一种免疫球蛋白例如 IgA、IgM 或 IgG 复合的所述蛋白质、肽、片段或表位,如循环免疫复合物(CIC)。示例性的蛋白质聚集体可以被衍生,例如衍生自对象的含有抗体的生物样品。

本发明还包括根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位用于检测对象中继往的或当前的结核分支杆菌感染或潜伏感染的用途,其中所述感染通过得自对象的样品中的抗体与所述分离的或重组的免疫原性 BSX 蛋白或免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的结合而确定。

本发明还包括根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免

疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位用于引起结合结核分支杆菌 BSX 的抗体产生的用途。

本发明还包括根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在制备用于免疫接种对象以抗结核分支杆菌感染的药物中的用途。

本发明还提供了药物组合物，其包含与药物学可接受的稀释剂例如佐剂组合的根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。

本发明还提供了分离的核酸，其编码根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，其用于制备基于核酸的疫苗或用于表达免疫原性多肽、蛋白质、肽、片段或表位。

本发明还提供了表达根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的细胞。所述细胞可优选地由例如在其表面表达所述分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的抗原呈递细胞（APC）组成。

本发明还提供了特异性结合根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的、或者特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段。优选的抗体包括例如单克隆或多克隆抗体制备物。这延及产生结合 BSX 蛋白或 BSX 蛋白的免疫原性片段或包含衍生自 BSX 蛋白序列的序列的其它免疫原性肽的抗体的任何分离的抗体产生细胞或抗体产生细胞群，例如杂交瘤或浆细胞

瘤。

本发明还提供了根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段的药物用途。

本发明还提供了本文所述任一实施方案的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段用于检测对象中继往的或当前的（活动性）结核分支杆菌感染或潜伏感染的用途，其中所述感染通过所述抗体或片段与得自对象的生物样品中存在的结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位的结合而确定。

本发明还提供了本文所述任一实施方案的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段用于鉴别结核分支杆菌或由结核分支杆菌感染的细胞或用于选择或计数所述细菌或所述细胞的用途。

所述分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段还可用于治疗性、诊断性和研究性应用，用于检测结核分支杆菌的继往的或当前的感染或潜伏的感染，这通过所述抗体与来自对象的生物样品中存在的结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位而确定（即基于抗原的免疫测定）。

本发明抗体的其它应用包括纯化和研究诊断性/预后性 **BSX** 蛋白、鉴别用结核分支杆菌感染的细胞或用于选择或计数所述细胞。

所述抗体及其片段还可用于治疗，包括预防、诊断或预后，以及这些抗体或片段在制备用于治疗结核分支杆菌感染的药物中的应用。例如，产生特异的人源化抗体或配体，它们特别是在体内结合并中和 **BSX** 蛋白或结核分支杆菌。所述人源化抗体或配体被用于制备用于治疗人类对象中 **TB** 特异性疾病或结核分支杆菌感染、如治疗活动性或慢性结核分支杆菌感染的药物。

本发明还提供了一种组合物，其包含本文所述任一实施方案的分离的或重组的抗体以及药物学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明还提供了诊断对象中的结核病或结核分支杆菌感染的方法。

法，包括检测来自所述对象的生物样品中的抗免疫原性 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位的抗体，所述样品中存在所述抗体是感染的指征。在一相关的实施方案中，所述样品中存在所述抗体是感染的指征。感染可以是继往的或活动的感染，或潜伏感染，但是这一测定形式特别用于检测活动感染和/或最近的感染。

例如，所述方法可以是一种免疫测定，例如包括将衍生自对象的生物样品与根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位（例如，如下的肽：其包含 SEQ ID NO:2-53 任一氨基酸序列、优选地选自 SEQ ID NO:14、20、21、22、24、25、36、45、46 和 47 的序列、更优选地选自 SEQ ID NO:24、25、45、46 和 47 的序列、还更优选地选自 SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:45 的序列、或者包含与上述任一所述序列有至少约 95%相同性的氨基酸序列的上述任一所述序列的免疫学交叉反应性变体）接触，接触的时间和条件为足以形成抗原-抗体复合物，然后检测抗原-抗体复合物的形成。样品是含抗体的样品，例如包含得自对象的血液或血清或免疫球蛋白级分的样品。样品可以含有与 **BSX** 抗原片段复合形式的循环抗体。通常，抗原-抗体复合物在使用能结合患者的免疫球蛋白的抗体例如抗人 Ig 抗体的测定形式中检测。

本发明范围包括这一测定形式的多分析物检测，其中使用多个抗原表位证实使用 **BSX** 肽获得的诊断。例如，患者样品可以与 **BSX** 或免疫原性 **BSX** 肽或片段或表位接触或者与结核分支杆菌谷氨酰胺合酶（GS）蛋白（例如 SwissProt Database 登录号 033342）或自其衍生的免疫原性肽例如衍生自 GS 蛋白的表面暴露区域的或包含序列 RGT DGS AVFAD SNGPHGMSSMFRSFC（SEQ ID NO: 54）或 WASGYRGLTPASDYNIDYAIC（SEQ ID NO: 55）的肽接触。用于检测结核病或结核分支杆菌感染的免疫原性结核分支杆菌 GS 和肽衍生物

也在本申请人的共同在审国际专利申请 PCT/AU2005/000930(申请日 2005 年 6 月 24 日) 中详细描述, 该申请全文引入本文作参考。用于二级分析物例如抗谷氨酰胺合酶的抗体的测定可以方便地与检测血清中的抗 BSX 的抗体相同的方式进行。这些测定可以同时或不同时进行, 使用相同或不同的患者样品。这些测定还可以在同一反应容器中进行, 只要是使用不同的检测系统来检测不同的抗体, 例如用不同的报道分子如不同颜色的染料、荧光团、放射性核苷酸 (radionucleotide) 或酶标记的抗人 Ig。

本文所用术语“感染”应理解为微生物、特别是细菌或病毒在对象的呼吸道中的入侵和/或建群和/或微生物的增殖。这种感染可以是不明显的或者导致局部细胞损伤。感染可以是局部的、亚临床的和暂时的, 或者可以通过蔓延而传播, 变为急性或慢性临床感染。感染也可以是继往感染 (past infection), 其中宿主中还保留有残余的 BSX 抗原或结合分离的 BSX 蛋白或肽的反应性宿主抗体。感染也可以是潜伏感染, 其中微生物存在于对象中, 但是对象不表现出与该微生物相关的疾病症状。优选地, 感染是结核分支杆菌肺部感染或肺外感染, 更优选地, 是肺外感染。“肺部”感染是指肺气道的感染, 如肺组织、支气管、细支气管、呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊或肺泡的感染。“肺外 (extra-pulmonary)”是指肺部之外, 包括例如肾、淋巴、尿道、骨、皮肤、脊髓液、小肠、腹膜、胸膜和心包腔。

本发明还提供了诊断对象中的结核病或结核分支杆菌感染的方法, 包括在来自所述对象的生物样品中检测免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位, 其中所述蛋白或免疫原性片段或表位在样品中的存在是疾病、疾病进程或感染的指征。在一相关的实施方案中, 所述蛋白或免疫原性片段或表位在样品中的存在是感染的指征。例如, 所述方法可以包括免疫测定, 例如将衍生自对象的生物样品与能够结合 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位

的一或多种抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。在一个特别优选的实施方案中，抗体是分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合根据本文所述的任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位，或特异性结合包含所述免疫原性 **BSX** 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。本发明的诊断测定特别用于检测无免疫应答的（immune compromised）或免疫缺陷的对象例如 HIV+对象中的 TB。用于进行这种测定的样品包括例如（i）选自如下一组的组织的提取物，所述的组由脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨骼及其混合物组成；（ii）选自如下一组的体液，所述的组由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成；（iii）衍生自体液的样品，所述体液选自由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成的一组。

本发明还提供了确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法，所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中的 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位，其中所述蛋白或片段或表位的水平相比于在正常或健康对象中可检测到的该蛋白或片段或表位的水平增加则表示该对象对所述治疗无应答或者未消除疾病或感染。例如，所述方法可包括一种免疫测定，例如，将衍生自所述对象的生物学样品与一或多种能与 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位结合的抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。在一个特别优选的实施方案中，抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合根据本文所述的任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位，或特异性结合包含所述免疫原性 **BSX** 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。本发明的诊断测定特别用于检测无免疫应答的或免疫缺陷的对

象例如 HIV+对象中的 TB。用于进行这种测定的样品包括例如 (i) 选自如下一组的组织的提取物, 所述的组由脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨骼及其混合物组成; (ii) 选自如下一组的体液, 所述的组由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成; (iii) 衍生自体液的样品, 所述体液选自由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成的一组。

本发明还提供了确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法, 所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位, 其中所述蛋白或片段或表位的水平相比于在患有结核病或结核分支杆菌感染的对象中可检测到的该蛋白或片段或表位的水平降低则表示该对象对所述治疗有应答或者已经消除了疾病或感染。例如, 所述方法可包括一种免疫测定, 例如, 将衍生自所述对象的生物学样品与一或多种能与 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位结合的抗体接触, 并检测抗原-抗体复合物的形成。在一个特别优选的实施方案中, 抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段, 其特异性结合根据本文所述的任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位, 或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。本发明的诊断测定特别用于检测无免疫应答的或免疫缺陷的对象例如 HIV+对象中的 TB。用于进行这种测定的样品包括例如 (i) 选自如下一组的组织的提取物, 所述的组由脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨骼及其混合物组成; (ii) 选自如下一组的体液, 所述的组由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成; (iii) 衍生自体液的样品, 所述体液选自由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成的一组。

本发明还提供了监测对象中的疾病进程、对治疗的应答性或结核分支杆菌感染状态的方法，包括在不同的时间确定来自所述对象的生物样品中的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的水平，其中 BSX 蛋白、片段或表位水平的改变表示对象的疾病进程、对治疗的应答性或感染状态的改变。在一个优选的实施方案中，所述方法进一步包括当 BSX 蛋白、片段或表位水平随时间增高时给予用于治疗结核病或结核分支杆菌感染的化合物。例如，所述方法可以包括一种免疫测定，例如，将衍生自所述对象的生物样品与一或多种能结合 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体接触，并检测抗原-抗体复合物的形成。在一个特别优选的实施方案中，抗体是一种分离的或重组的抗体或抗体的免疫反应性片段，其特异性结合根据本文所述的任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，或特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体。本发明的诊断测定特别用于检测无免疫应答的或免疫缺陷的对象例如 HIV + 对象中的 TB。用于进行这种测定的样品包括例如 (i) 选自如下一组的组织的提取物，所述的组由脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌肉、骨骼及其混合物组成；(ii) 选自如下一组的体液，所述的组由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成；(iii) 衍生自体液的样品，所述体液选自由痰、血清、血浆、全血、唾液、尿、胸膜腔积液及其混合物组成的一组。

在一个特别优选的实施方案中，在一种基于抗原的测定平台或基于抗体的测定平台中检测循环免疫复合物 (CIC)。对于基于抗原的测定平台，通过检测 CIC 的免疫球蛋白，CIC 的检测可以提供对循环中的分离的抗原检测的显著的信号放大。根据这一实施方案，除了在对象循环中的分离的抗原的捕获之外，还使用一种捕获试剂例如一种捕获抗体来捕获与对象的免疫球蛋白复合的 BSX 抗原 (BSX 多肽或

其免疫反应性片段或表位)。使用任选地与检测标记缀合的抗 Ig 抗体来特异性结合所捕获的 CIC, 由此检测 CIC 患者样品。在本发明范围内, 抗 Ig 抗体优先结合样品中的 IgM、IgA 或 IgG。在一个特别优选的实施方案中, 抗 Ig 抗体与人 Ig 例如人 IgA、人 IgG 或人 IgM 结合。抗 Ig 抗体可以与现有技术已知的任何标准可检测标记缀合。这一点对于检测病原体例如细菌或病毒的感染或者诊断与 CIC 相关的任何疾病或失调是特别有用的。因此, 本文任一实施方案所述的诊断方法适于进行修改, 其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物, 所述循环免疫复合物包含与结核分支杆菌的 BSX 蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位结合的免疫球蛋白 (Ig), 并且其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物的免疫球蛋白部分接触, 接触的时间和条件足以形成复合物, 随后检测结合的抗 Ig 抗体。

本发明范围还包括在一或多种前述基于抗原的测定形式中的多分析物检测, 其中使用不同特异性的多个抗体证实用抗 BSX 抗体获得的诊断, 由此增加特异性和/或选择性。例如, 患者样品可以与抗 BSX 或免疫原性 BSX 肽或片段或表位的抗体以及抗结核分支杆菌谷氨酰胺合酶 (GS) 蛋白 (例如 SwissProt Database 登录号 033342) 或其衍生的免疫原性肽的抗体例如抗衍生自 GS 蛋白的表面暴露区或包含序列 RGTDGS AVFADSNGPHGMSSMFRSFC (SEQ ID NO: 54) 或 WASGYRGLTPASDYNIDYAIC (SEQ ID NO: 55) 的肽而制备的抗体接触。抗免疫原性结核分支杆菌 GS 肽的抗体也在本申请人的共同未决国际专利申请 PCT/AU2005/000930 (申请日: 2005 年 6 月 24 日) 中详细描述, 该申请全文引入本文做参考。然后用能结合每一蛋白质分析物的抗体 (例如抗 BSX 和抗 GS 抗体) 检测所形成的抗原-抗体复合物, 或者在 CIC 检测情况下, 用能结合人免疫球蛋白的抗体进行检测。测定可以同时进行或者可以在不同时间进行, 使用相同或不

同患者样品。测定也可以在同一反应容器中进行，条件是使用不同的检测系统来检测不同的抗原或包含不同抗原的 CIC，例如用不同的报道分子如不同颜色的染料、荧光团、放射性核苷酸或酶标记的抗人 Ig；或差异标记的抗 BSX 和抗 GS 抗体。与本文描述的其它免疫测定一样，二级抗体任选地与合适的可检测标记如辣根过氧化物酶（HRP）或 β -糖苷酶、胶体金颗粒等缀合。在复合物的检测中采用这些标记的标准方法是本领域技术人员熟知的。

本发明还提供了一种治疗结核病或结核分支杆菌感染的方法，包括：

- (i) 实施根据本文所述任一实施方案的诊断方法，由此检测在来自对象的生物样品中结核分支杆菌感染的存在；和
- (ii) 给予治疗有效量的药物组合物以降低对象的肺部、血液或淋巴系统中的病原性杆菌的数目。

本发明还提供了一种治疗结核病或结核分支杆菌感染的方法，包括：

- (i) 实施根据本文所述任一实施方案的诊断方法，由此检测在来自正在用第一种药物组合物治疗的对象的生物样品中结核分支杆菌感染的存在；和
- (ii) 给予治疗有效量的第二种药物组合物以降低对象的肺部、血液或淋巴系统中的病原性杆菌的数目。

本发明还提供了治疗对象中的结核病的方法，包括实施本文所述的诊断方法或预后方法。在一个实施方案中，本发明提供了一种预防方法，包括：

- (i) 检测来自对象的生物样品中的结核分支杆菌感染的存在；和
- (ii) 给予治疗有效量的药物组合物以降低对象的肺部、血

液或淋巴系统中的病原性杆菌的数目。

更具体地，当被给予动物对象时，免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽、片段或表位诱导高效价抗体的特异性产生。

因此，本发明还提供了引起抗结核分支杆菌抗体产生的方法，包括给予所述对象免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位，给予的时间和条件为足以引起抗体如抗结核分支杆菌的中和抗体的产生。

本发明清楚地包括免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位在制备抗人类或其它动物对象中的结核分支杆菌感染的治疗性或预防性亚单位疫苗中的用途。

因此，本发明还提供了一种疫苗，其包含与药理学可接受的稀释剂组合的免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位。优选地，所述蛋白质或其肽或片段或表位用合适的佐剂配制。

或者，通过给予自体或异源抗原呈递细胞（APC）或已在体外处理而在其表面呈递肽的树突细胞，所述的肽或衍生物或变体可以配制为细胞疫苗。

本发明还包括如下的基于核酸的疫苗，其包含克隆到合适的载体（例如痘苗病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒或其它真核生物病毒载体）中的编码免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的核酸如 DNA 或 RNA。优选地，编码免疫原性 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的 DNA 被配制成 DNA 疫苗，例如组合已知的 Calmette-Guerin（BCG）或免疫佐剂如痘苗病毒、弗氏佐剂或另一种免疫刺激剂。

本发明还提供了免疫原性 BSX 蛋白或其一种或多种免疫原性 BSX 肽或一种或多种免疫原性 BSX 片段或一种或多种表位在制备用于预防或治疗性治疗或诊断对象、例如被 HIV-1 和/或 HIV-2 感染对象中的结

核病或结核分支杆菌感染、包括治疗性治疗人类对象中的潜伏结核分支杆菌感染的组合物中的用途。

在一个替代的实施方案中，本发明提供了免疫原性 BSX 蛋白或其一或多种免疫原性 BSX 肽或一或多种免疫原性 BSX 片段或一或多种表位在制备用于预防或治疗性治疗或诊断对象中的结核分枝杆菌感染的组合物中的用途，其中所述对象先前已进行了抗 HIV-1 和/或 HIV-2 的抗病毒治疗。

本发明还提供了用于检测生物学样品中的结核分支杆菌感染的试剂盒，所述试剂盒包含：

- (i) 一或多种特异性结合根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位的、或者特异性结合包含所述免疫原性 BSX 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的分离的或重组的抗体或其免疫反应性片段；和
- (ii) 用于检测抗原-抗体复合物形成的手段，
任选地与使用说明一起包装。

本发明还提供了用于检测生物学样品中的结核分支杆菌感染的试剂盒，所述试剂盒包含：

- (i) 根据权利要求 1-16 任一项所述的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 BSX 蛋白或其免疫原性 BSX 肽或免疫原性 BSX 片段或表位；和
- (ii) 用于检测抗原-抗体复合物形成的手段，
任选地与使用说明一起包装。

本文所述的测定适于任何测定形式，特别适于固相 ELISA、穿流（flow through）免疫测定形式、毛细管形式，并用于纯化或分离免疫原性蛋白质、肽、片段和表位以及 CIC。

因此,本发明还提供了吸附有根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的免疫原性结核分支杆菌 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位或者包含所述免疫原性 **BSX** 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的固相基质。例如,所述固相基质可以包含聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔板或其部件(例如微滴板的一或多个孔)、dipstick、玻璃支持体或层析树脂。

在一替代实施方案中,本发明还提供了吸附有结合根据本文所述任一实施方案的分离的或重组的 **BSX** 蛋白或其免疫原性 **BSX** 肽或免疫原性 **BSX** 片段或表位的、或者结合包含所述免疫原性 **BSX** 蛋白、肽、片段或表位的融合蛋白或蛋白质聚集体的抗体的固相基质。例如,所述固相基质可包括膜例如尼龙或硝酸纤维素。或者,所述固相基质可包括聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔板或其部件(例如微滴板的一或多个孔)、dipstick、玻璃支持体或层析树脂。

特别是用于采用多个抗原或多个抗体的多分析物检测的包括进行本文所述测定所需的额外的抗原和/或抗体的所述固相基质清楚地包括在本发明范围内。

优选实施方案的详细描述

*分离的或重组的 **BSX** 蛋白及其免疫原性片段和表位*

本发明的一个方面提供了分离的或重组的 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位。

本发明的这一方面包括任何衍生自本文所指的 **BSX** 蛋白的合成或重组的肽,包括全长 **BSX** 蛋白和/或 **BSX** 蛋白的衍生物或类似物或其免疫原性片段或表位。

本文所用术语“**BSX**”应被理解为指与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列有至少约 80%氨基酸序列相同性的任何肽、多肽或蛋白质。优选地,**BSX** 蛋白与 SEQ ID NO:1 的相同性百分比为至少约 85%、更优

选地至少约 90%、更优选地至少约 95%、更优选地至少约 99%。本发明不限于使用所列举的结核分支杆菌 BSX 蛋白，因为如本领域技术人员了解的，无需过多实验就可以定义与所列举的结核分支杆菌 BSX 蛋白的一个区域有序列相同性好免疫学等价性的片段。

在确定两个氨基酸序列是否落入上述限定的相同性百分比之内时，本领域技术人员能意识到可以进行氨基酸序列的并行比较。在这种比较或对比中，根据用于进行对比的算法，在不相同残基的定位中会产生差异。在本说明书中，两个或多个氨基酸序列之间的相同性和相似性百分比应被理解是指用本领域技术人员已知的任何标准算法确定的所述序列之间的相同或相似残基的数目。特别地，氨基酸相同性和相似性是用 Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Maddison, Wisconsin, United States of America 的软件计算的，例如使用 Devereaux et al, Nucl. Acids Res. 12, 387-395, 1984 的 GAP 程序，该程序利用 Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 48, 443-453, 1970 的算法。或者使用 Thompson et al, Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680, 1994 的 CLUSTAL W 算法获得多个序列的对比，其中需要或者希望的是最大化相同/相似残基的数目并且最小化对比中序列缺口 (gap) 的数目和/或长度。氨基酸序列对比也可以用各种其它可商购的序列分析程序如在可在 NCBI 获得的 BLAST 程序进行。

特别优选的片段包括那些包括表位、特别是 B 细胞表位或 T 细胞表位的片段。

B 细胞表位可方便地衍生自免疫原性 BSX 蛋白的氨基酸序列。本发明特别包括希望产生免疫应答的独特型和抗独特型 B 细胞表位，以及脂质修饰的 B 细胞表位或 B 群蛋白 (Group B protein)。优选的 B 细胞表位是当被给予哺乳动物时能引起抗体生成，所述抗体优选是抗结核分支杆菌的中和抗体，更优选地是高效价中和抗体。更短的 B 细胞表位是促进肽合成所优选的。优选地，B 细胞表位的长度不超过

约 30 个氨基酸。更优选地，B 细胞表位序列由约 25 个氨基酸残基或更少残基组成，更优选地少于 20 个氨基酸残基，更优选地为衍生自全长 B 群蛋白序列的长度约 5-20 个氨基酸残基。

CTL 表位也方便地衍生自 BSX 蛋白的全长氨基酸序列并且通常由所述 BSX 蛋白的至少约 9 个连续氨基酸组成并具有经确定以显著水平与 MHC I 类等位基因相互作用的氨基酸序列，所述相互作用用确定 MHC I 类结合表位的预测算法例如德国 Tuebingen 大学的 SYFPEITHI 算法或美国政府国立健康研究院的生物信息学和分子分析部 (BEVIAS) 的 HLA 肽结合预测程序的算法来确定。更优选地，CTL 表位具有结合和/或稳定抗原呈递细胞 (APC) 表面上的 MHC I 类分子的氨基酸序列。还更优选地，CTL 表位具有诱导记忆 CTL 应答或引起 T 细胞如 CD8⁺ T 细胞、细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表达 IFN- γ 的序列。还更优选地，CTL 具有在标准细胞毒性测定中刺激 CTL 活性的序列。特别优选的 BSX 蛋白的 CTL 表位能在人细胞或组织中例如通过识别和溶解被结核分支杆菌感染的人细胞而引起细胞免疫应答，由此提供或增强抗结核分支杆菌的细胞免疫。

合适的片段的长度至少为约 5 个、例如 10、12、15 或 20 个氨基酸。它们的长度也可以少于 200 个、100 个或 50 个氨基酸。

优选地，BSX 的免疫原性片段或表位包含 SEQ ID NO:2-53 任一氨基酸序列，优选地包含选自如下一组的氨基酸序列的免疫原性片段或表位：MRQLAERSGVSNPYL (SEQ ID NO: 14), ERGLRKPSADVLSQI (SEQ ID NO: 20), LRKPSADVLSQIAKA (SEQ ID NO: 21), PSADVLSQIAKALRV (SEQ ID NO: 22), SQIAKALRVSAEVLY (SEQ ID NO: 24), AKALRVSAEVLYVRA (SEQ ID NO: 25), VRAGILEPSETSQVR (SEQ ID No: 29), TAITERQKQILLDIY (SEQ ID NO; 36), SQIAKALRVSAEVLYVRAC (SEQ ID NO: 45), MSSEEKLC DPTPTDD (SEQ ID NO: 46) 和

VRAGILEPSETSQVRC (SEQ ID NO: 47)。

更优选地，结核分支杆菌 BSX 蛋白的免疫原性片段包含选自如下下一组的氨基酸序列：SQIAKALRVSAEVLY (SEQ ID NO: 24), AKALRVSAEVLYVRA (SEQ ID NO: 25), SQIAKALRVSAEVLYVRAC (SEQ ID NO: 45), MSSEEKLCDPTPTDD (SEQ ID NO: 46)和 VRAGILEPSETSQVRC (SEQ ID NO: 47), 更优选地，选自 SQIAKALRVSAEVLY (SEQ ID NO: 24), AKALRVSAEVLYVRA (SEQ ID NO: 25), 和 SQIAKALRVSAEVLYVRAC (SEQ ID NO: 45)的序列。

BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的氨基酸序列可以根据本领域技术人员熟知的方法为特定目的而修饰，但不负面影响其免疫功能。例如，特定的肽残基可以被衍生化或化学修饰以增强免疫应答或允许肽与其它物质特别是脂质的偶联。还可以改变肽中的特定氨基酸而不干扰肽的整体结构或抗原性。这种改变因此被称作“保守”改变并倾向于依赖残基的亲水性或极性。侧链的大小和/或电荷也是确定哪些取代是保守取代的相关因素。

本发明清楚地包括一个或多个免疫原性 BSX 肽之间的共价融合体，包括肽的同源二聚体、同源三聚体、同源四聚体或更高的同源多聚体，或包含两个或多个不同免疫原性肽的杂二聚体、杂三聚体、杂四聚体或更高的杂多聚体。

本发明还包括一个或多个免疫原性 BSX 肽之间的非共价聚集体，例如通过离子相互作用、流体净力学相互作用或现有技术已知的或本文描述的其它相互作用而聚集在一起。

本领域技术人员能够理解生物学功能等价蛋白的定义内固有的是这样的概念：可以在分子的限定部分内进行的并且仍产生具有可接受水平的等价生物学活性的分子的改变数目是有限度的。因此本文中定义的生物学功能等价蛋白是特异氨基酸被取代的那些蛋白质。特定

的实施方案包含在肽的氨基酸序列中有一个、二个、三个、四个、五个或更多个变异的变体。当然，具有不同取代的多个不同蛋白质/肽可以根据本发明而容易地制备和使用。

本领域技术人员熟知下列取代是可允许的保守取代：(i)涉及精氨酸、赖氨酸和组氨酸的取代；(ii)涉及丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的取代；和(iii)涉及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的取代。掺入这类保守取代的衍生物在本文中被定义为生物学或免疫学功能等价物。

水合(hydropathic)氨基酸指数在赋予蛋白质以相互作用性生物学功能中的重要性是本领域了解的(Kyte & Doolittle, J Mol. Biol. 157, 105-132, 1982)。已知某些氨基酸可以被取代为具有相似水合指数或值的其它氨基酸并仍保持相似的生物学活性。氨基酸的水合指数在确定产生功能等价分子的保守取代中也可被考虑。每个氨基酸基于其疏水性和电荷特征被赋予如下水合指数：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。在根据水合指数进行改变时，优选的是水合指数在 ± 0.2 之内的氨基酸取代。更优选地取代涉及水合指数在 ± 0.1 之内的氨基酸，更优选地在约 ± 0.05 之内。

本领域还理解相似氨基酸的取代可有效地基于亲水性(hydrophilicity)进行，特别是当由此产生的生物学功能等价蛋白或肽如在本案中要用于免疫学实施方案中时(例如美国专利 4,554,101)。事实上，由其相邻氨基酸的亲水性所控制的蛋白质的最大局部平均亲水性与其免疫原性和抗原性相关。如美国专利 4,554,101 所详细描述，氨基酸残基被赋予下述亲水性值：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；

天冬氨酸(+3.0 +/- 0.1); 谷氨酸 (+3.0 +/- 0.1); 丝氨酸 (+0.3); 天冬酰胺(+0.2); 谷氨酰胺(+0.2); 甘氨酸(0); 苏氨酸(-0.4); 脯氨酸(-0.5 +/- 0.1); 丙氨酸(-0.5); 组氨酸(-0.5); 半胱氨酸(-1.0); 甲硫氨酸(-1.3); 缬氨酸(-1.5); 亮氨酸(-1.8); 异亮氨酸(-1.8); 酪氨酸(-2.3); 苯丙氨酸(-2.5); 色氨酸(-3.4)。在基于相似的亲水性值进行改变时, 优选的是取代彼此的亲水性值在约+/-0.2 之内的氨基酸, 更优选地在约+/-0.1 之内, 更优选地在约+/-0.05 之内。

包含表位的 BSX 多肽或其肽片段可用标准技术容易地合成, 如 Merrifield 合成法(Merrifield, J Am Chem Soc, S5,:2149-2154, 1963)及该技术很多改进(参见例如 Synthetic Peptides: A User's Guide, Grant, ed. (1992) W.H. Freeman & Co., New York, pp. 382; Jones (1994) The Chemical Synthesis of Peptides, Clarendon Press, Oxford, pp. 230.); Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York; Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474.d/

如现有技术所知, 可以产生合成肽, 其在衍生自全长 BSX 蛋白的片段或 B 细胞表位的序列上添加额外的亲水性 N-末端和/或 C-末端氨基酸, 如促进合成或改善肽溶解性。甘氨酸和/或丝氨酸残基特别优选用于这一目的。如本文所例举, SEQ ID NO:2-24 所示的每种肽包括位于 BSX 片段侧翼的额外间隔序列, 所示间隔序列包含甘氨酸和丝氨酸的杂聚合物(三聚体或四聚体)。

本发明的肽可容易地被修饰以用于诊断目的, 例如通过添加天然

或合成半抗原、抗生素、激素、类固醇、核苷、核苷酸、核酸、酶、酶底物、酶抑制剂、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、聚乙二醇、肽性多肽部分（例如 tuftsin、聚赖氨酸）、荧光标记（例如 FITC、RITC、丹酰、鲁米诺或香豆素）、生物发光标记、spin 标记、生物碱、生物胺、维生素、毒素（例如地高辛、鬼笔环肽、鹅膏菌素、河豚毒素）或复合物形成剂。

在另一个实施方案中，BSX 作为重组蛋白产生。

为了用重组手段表达蛋白质，编码蛋白质的核苷酸序列以可操纵连接方式与启动子或能够在无细胞系统或细胞系统中调节表达的其它调节序列连接。在本发明的一个实施方案中，包含与合适的启动子序列可操纵地连接的编码 BSX 蛋白或其表位的序列的核酸在足以使表达发生的条件下在合适的细胞中表达一段足以使表达发生的时间。编码 BSX 蛋白的核酸可容易地衍生自公共可获得的氨基酸序列。

在另一实施方案中，BSX 蛋白以重组融合蛋白形式产生，以例如有助于提取和纯化。为了产生重组多肽，例如用 Ausubel 等人所述的标准克隆程序（Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, ISBN 047150338, 1992）将一些开放读框共价连接在同一读框中，并在启动子控制下表达。融合蛋白配偶体的例子包括谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、FLAG（Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys）、六组氨酸、GAL4（DNA 结合和/或转录激活结构域）和 β -半乳糖苷酶。在融合蛋白配偶体与感兴趣的蛋白质序列之间也可以方便地包括蛋白裂解位点以便于除去融合蛋白序列。优选地，融合蛋白不妨碍 BSX 蛋白的免疫功能。

本文所称“启动子”应取其最广的含义并包括经典基因组基因的转录调节序列，包括精确转录起始所需的 TATA 盒，有或没有 CCAAT 盒序列和应答发育和/或外部刺激或以组织特异性方式改变基因表达的额外的调节元件（即上游激活序列、增强子和沉默子）。在这一上

下文中，术语“启动子”也用于描述重组的、合成的或融合分子或衍生物，其赋予、激活或增强与其可操纵连接的并编码多肽或肽片段的核酸分子的表达。优选的启动子可以含有额外拷贝的一或多个特异性调节元件以进一步增强所述核酸分子的表达和/或改变空间表达和/或时间表达。

将核酸分子置于启动子序列的调节控制下，即“可操纵地连接”是指将所述分子定位成其表达由启动子序列控制。启动子通常位于它们所控制的编码序列的 5'（上游）。

在细菌如大肠杆菌中产生完整多肽和肽的前提条件是使用具有有效核糖体结合位点的强启动子。适于在细菌细胞如大肠杆菌中表达的典型启动子包括但不限于 *lacZ* 启动子、温度敏感型 X_L 或 λR 启动子、T7 启动子或 IPTG 诱导型 *tac* 启动子。用于在大肠杆菌中表达本发明的核酸分子的一些其它载体系统是本领域熟知的并例如在 Ausubel 等人 (In: Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, ISBN 047150338, 1987) 或 Sambrook et al (In: Molecular cloning, A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) 中描述。具有用于在细菌中表达的合适启动子序列和有效的核糖体结合位点的许多质粒已被描述，例如 pKC30 (λ_L : Shimatake and Rosenberg, Nature 292, 128, 1981); ρ KK173-3 (*tac*: Amann and Brosius, Gene 40, 183, 1985), pET-3 (T7: Studier and Moffat, J Mol Biol 189, 113, 1986); 含有阿拉伯糖诱导型启动子的 pBAD/TOPO 或 pBAD/Thio-TOPO 系列载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 后者设计用于产生与硫氧还蛋白的融合蛋白以增强表达的蛋白质的溶解性; pFLEX 系列表达载体 (Pfizer Inc., CT, USA); 或 pQE 系列表达载体 (Qiagen, CA), 等等。

用于在真核细胞病毒和真核细胞中表达的典型启动子包括 SV40 晚期启动子、SV40 早期启动子和巨细胞病毒 (CMV) 启动子、CMV

IE（巨细胞病毒立即早期）启动子等。用于在哺乳动物细胞（例如 293、COS、CHO、10T 细胞、293T 细胞）中表达的优选的启动子包括但不限于由 Invitrogen 提供的 pcDNA 载体系列，特别是包含 CMV 启动子并编码 C-末端 6xHis 和 MYC 标记的 pcDNA 3.1 myc-His-tag；逆转录病毒载体 pSR α tkneo (Muller et al, Mol Cell Biol, 11, 1785, 1991)。载体 pcDNA 3.1 myc-His (Invitrogen) 特别优选用于在 293T 细胞中表达分泌型 BSX 蛋白或其衍生物，其中表达的肽或蛋白质可以用标准亲和技术被纯化为不含同种蛋白质，所述标准亲和技术采用镍柱以经 His 标记结合蛋白质。

适于表达本发明的诊断蛋白质或其免疫学衍生物（例如表位或其它片段）的各种其它宿主/载体系统是公众可获得的，并且在例如 Sambrook et al (In: Molecular cloning, A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) 中描述。

将分离的核酸分子或包含其的基因构建体导入细胞用于表达的手段是本领域技术人员熟知的。用于给定生物体的技术取决于已知的成功技术。将重组 DNA 导入动物细胞的手段包括显微注射、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染如用脂转染胺试剂 (Gibco, MD, USA) 和/或 cellfectin (Gibco, MD, USA)、PEG 介导的 DNA 摄入、电穿孔和微粒轰击如用 DNA 包被的钨或金颗粒 (Agracetus Inc., WI, USA)，等等。

本发明的蛋白质可以以分离的形式产生，优选地基本上不含同种蛋白质。抗体和其它亲和配体特别优选用于产生分离的蛋白质。优选地，蛋白质呈一制剂，其中制剂中超过 90%（例如 95%、98%或 99%）的蛋白质是 BSX 蛋白或其表位。

结合 BSX 蛋白或其表位的抗体

本发明的第二方面提供了特异性结合 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体,如适于用在本文所述测定中的单克隆或多克隆抗体制备物。

本文所称抗体包括完整的多克隆和单克隆抗体及其部分,它们单独存在或缀合有其它部分。抗体部分包括 Fab 和 F(ab)₂ 片段和单链抗体。抗体可以在合适的实验动物体内制备,或者在工程抗体(单链抗体或 SCABS 等)情况下使用重组 DNA 技术体外制备。

根据本发明的这一方面,可以产生抗体用于给对象免疫接种,在这种情况下,高效价或结合 B 细胞表位的中和抗体是特别优选的。用于免疫接种的合适对象当然取决于免疫接种抗原或抗原性 B 细胞表位。应理解本发明广泛用于接种各种动物,如农场动物(例如马、牛、绵羊、猪、山羊、鸡、鸭、火鸡等)、实验室动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠、兔)、家养动物(猫、狗、鸟等)、野生或野生外来动物(例如负鼠、猫、猪、水牛、野狗等)和人类。

或者,抗体可用于商业或诊断目的,在这种情况下被给予 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的对象最可能是实验室或农场动物。可用各种动物物种产生抗血清。典型地,用于产生抗血清的动物是兔、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、山羊、绵羊、猪、狗、马或鸡。由于兔和绵羊相对较大的血液体积,它们是产生多克隆抗体的优先选择。但是,如本领域技术人员熟知的,与小型动物如小鼠相反,从大型动物获得高抗体需要更大量的免疫原。在这些情况下,希望的是从免疫接种的动物中分离抗体。

优选地,抗体是高效价抗体。“高效价”是指适于用在诊断或治疗应用中的足够高的效价。本领域已知的是,何种被认为是“高效价”可能会有一些差异。对于大多数应用,优选的是至少约 10^3 - 10^4 的效价。更优选地,抗体效价在约 10^4 到约 10^5 的范围,更优选地在约 10^5 到约 10^6 的范围。

更优选地，在来自病原体病毒或细菌的 B 细胞表位的情况下，抗体是中和抗体（即它能够中和衍生 B 细胞表位的生物物的感染性）。

为了产生抗体，以可注射组合物形式方便地给予任选地用任何合适或所希望的载体、佐剂、BRM 或药物学可接受赋形剂配制的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位。注射可以是鼻内、肌肉内、皮下、静脉内、真皮内、腹膜内或其它已知途径。对于静脉内注射，希望的是包括一或多种流体和营养补充剂。制备和鉴定抗体的手段是本领域熟知的（参见例如 ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988，引入本文作参考）。

用于产生多克隆或单克隆抗体的优选的免疫原性肽选自序列表所列出的组。在一个实施方案中，一种免疫原性肽例如包含 SEQ ID NO:24、25、45 或 46 所示氨基酸序列的免疫原性肽或其免疫原性片段与一种免疫原性载体蛋白如白喉类毒素（DT）、匙孔血蓝蛋白（KLH）、破伤风类毒素（TT）或流感病毒核蛋白（NP）使用本领域已知的几种缀合化学之一共价偶联。这增强了不然在动物例如小鼠、大鼠、鸡等中不是高免疫原性的肽的免疫原性。

制备用于这种偶联的载体蛋白的方法是本领域熟知的。例如，DT 优选地通过从白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）培养物中纯化毒素随后化学脱毒而产生，但是也可以通过纯化重组的或遗传学脱毒的该毒素类似物（例如 CRM197，或美国专利 4,709,017, 5,843,711, 5,601,827, 和 5,917,017 所述的其它突变体）而制备。优选地，类毒素用最多 6 个碳原子的桥作为间隔物而衍生化，如由白喉类毒素的己二酸酐衍生物（D-AH）而提供。

为了进行偶联，衍生自全长 BSX 蛋白的肽可以被化学合成或通过重组表达手段产生，用羟胺处理以形成游离巯基，并经所述游离巯基与马来酰亚胺修饰的白喉类毒素、破伤风类毒素或流感病毒 NP 蛋白或其它载体分子交联。一种最特异性的可靠的缀合化学使用肽中的

半胱氨酸残基和添加到载体蛋白中的马来酰亚胺基团，以形成稳定的硫醚键（Lee, A.C., et al, Mol. Immunol. 17, 749-756 1980）。例如，如果肽中不存在巯基，则 BSX 衍生的肽可以事先通过加入 C-末端半胱氨酸残基而修饰（例如 SEQ ID NO:45）或加入内部半胱氨酸残基而修饰（例如 SEQ ID NO:46）以便于这一程序。免疫原性 BSX 肽优选地在非变性条件下生产，用羟胺、硫醇还原剂或者酸或碱水解处理以产生游离巯基，含有所述游离巯基的肽通过游离巯基与一载体经化学键而缀合。这种缀合可以使用合适的双马来酰亚胺化合物。或者，HA 蛋白可以与马来酰亚胺修饰的载体蛋白如白喉类毒素、破伤风类毒素和流感病毒（NP）蛋白缀合或与碳水化合物如藻酸、葡聚糖或聚乙二醇缀合。这种马来酰亚胺修饰的载体分子可以通过将载体分子与马来酰亚胺-N-羟基琥珀酰亚胺酯型杂双官能交联剂反应而形成。这种双官能酯包括马来酰亚氨基-己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯（MCS）、马来酰亚氨基-苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯（MBS）、马来酰亚氨基-苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯（sulfo-MBS）、琥珀酰亚胺基-4-（N-马来酰亚氨基甲基）环己烷-1-羧基酯（SMCC）、琥珀酰亚胺基-4-（p-马来酰亚氨基苯基）丁酸酯（SMPP）、硫代琥珀酰亚胺基-4-（N-马来酰亚氨基甲基）环己烷-1-羧基酯（sulfo-SMCC）和硫代琥珀酰亚胺基-4-（p-马来酰亚氨基苯基）丁酸酯（sulfo-SMPP）。N-羟基琥珀酰亚胺酯部分与载体蛋白的胺基团反应，使得马来酰亚胺部分游离以便与抗原上的巯基反应而形成交联材料。

如此产生的缀合分子可以被纯化并在免疫原性组合物中使用而在给予宿主时引起针对 BSX 肽的免疫应答，这一免疫应答与单独 BSX 肽相比被增强。

白喉类毒素可以商业获得或者从在浸没式培养物中生长的白喉棒杆菌用标准方法制备。白喉类毒素的生产分为 5 个阶段，即种子的保持、白喉棒杆菌的生长、白喉毒素的收获、白喉毒素的脱毒和白喉

类毒素的浓缩。在制备物中用作载体的纯化的白喉类毒素（DT）优选地是通过用水溶性碳二亚胺缩合方法附着间隔分子如己二酸二酰肼（ADH）而修饰（衍生化）的商业类毒素。修饰的类毒素、典型地是己二酸酰肼衍生物 D-AH 然后被处理以去掉未反应的 ADH。

BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位在产生抗体中的功效如实施例所述通过用包含 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的配制品注射动物如小鼠、鸡、大鼠、兔、豚鼠、狗、马、奶牛、山羊或猪，然后监测对 B 细胞表位的免疫应答而确立。初次及再次免疫应答均被监测。用常规免疫测定如 ELISA 或放射免疫测定确定抗体效价。

多克隆抗体的产生可以通过在免疫接种后各时间点取被免疫动物的血液样品而监测。如果需要达到所希望的抗体效价，可以给予第二次加强注射。重复加强和滴定程序直至达到合适的效价。当获得希望水平的免疫原性时，给免疫的动物放血并分离和储存血清，和/或用该动物产生单克隆抗体（MAb）。

单克隆抗体是特别优选的。为了产生单克隆抗体（MAb），可以使用本领域熟知的任何技术，如美国专利 4,196,265 中的程序，该引入本文作参考。

例如，在足以刺激抗体生成细胞的条件下用有效量的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位接种合适的动物。啮齿类动物如兔、小鼠和大鼠是优选的动物，但是也可以使用绵羊或青蛙细胞。使用大鼠可提供一些优点，但是小鼠或兔是优选的，BALB/c 小鼠最优选作为最常用的动物并且通常给出更高百分比的稳定融合体。已知兔提供高亲和性单克隆抗体。

免疫接种后，选择具有生成抗体潜力的体细胞、特别是 B 淋巴细胞（B 细胞）以用于 MAb 产生方案。这些细胞可以得自脾、扁桃腺或淋巴结活检样品，或者得自外周血样品。脾细胞和外周血细胞是优选的，前者是因为它们是处于分裂浆母细胞阶段的抗体生成细胞的

丰富来源，后者是因为外周血很容易获得。通常，一组动物被免疫并取具有最高抗体效价的动物的脾。脾淋巴细胞通过用注射器匀浆脾而获得。典型地，来自免疫小鼠的脾含有约 5×10^7 至 2×10^8 个淋巴细胞。

来自免疫动物的 B 细胞然后与永生化骨髓瘤细胞的细胞融合，所述永生化骨髓瘤细胞通常衍生自与用 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位免疫的动物相同的物种。适于用在产生杂交瘤的融合程序中的骨髓瘤细胞系优选地是非抗体生成性的，具有高融合效率和酶缺陷，使它们不能在一些选择性培养基中生长，而这些选择性培养基仅支持所希望的融合细胞或杂交瘤的生长。可以使用一些骨髓瘤细胞中的任一种，它们是本领域技术人员已知的（例如小鼠 P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO₅NSO/U, MPC-II, MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0; 或者大鼠 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 和 4B210; 和 U-266, GM1500-GRG2, LICR-L0N-HMy2 和 UC729-6）。优选的小鼠骨髓瘤细胞是 NS-I 骨髓瘤细胞系（也称为 P3-NS-1-Ag4-1），其可得自 NIGMS 人类遗传突变细胞保藏机构，登录号为 GM3573。或者，使用 8-氮鸟嘌呤抗性的小鼠骨髓瘤 SP2/0 非生产细胞系。

为产生生成抗体的脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体，将体细胞以大约 20:1 至大约 1:1 的比例在存在促进细胞膜融合的试剂（化学或电子试剂）的条件下混和。使用仙台病毒的融合方法如 Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975; 及 Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511-519, 1976 所述。使用聚乙二醇(PEG)如 37% (v/v) PEG 的方法在 Gefter et al, Somatic Cell Genet. 3, 231-236, 1977 中描述。也可以应用电诱导的融合方法。

将杂交体通过在选择培养基中培养而扩增，所述培养基包含阻断核苷酸在组织培养基中重新合成的物质。优选的该物质例如是氨基蝶

呤、氨甲喋呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和氨甲喋呤阻断嘌呤和嘧啶的从头合成，而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤合成。当使用氨基蝶呤或氨甲喋呤时，培养基中补加次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸来源(HAT 培养基)。在使用重氮丝氨酸的情况中，培养基中补加次黄嘌呤。

优选的选择培养基是 HAT，因为只有能进行核苷酸补救途径的那些杂交瘤能在 HAT 培养基中存活，而骨髓瘤细胞缺少补救途径关键的酶(例如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶或 HPRT)而不能存活。B 细胞可以进行这种补救途径，但是它们的培养寿命有限，通常在大约 2 周内死亡。因此，能在选择培养基中存活的唯一的细胞是从骨髓瘤和 B 细胞形成的那些杂交体。

扩增的杂交瘤针对抗体特异性和/或效价进行功能选择，例如通过免疫测定(例如放射性免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性分析、噬斑分析、斑点免疫测定等)。

将选择的杂交瘤系列稀释并克隆进各个抗体生成细胞系中，然后这些克隆可以无限地繁殖以提供 MAbs。所述细胞系可以两种基本方式用于 MAbs 产生。杂交瘤样品被注射进用于提供体细胞和骨髓瘤细胞进行原始融合的类型组织相容的动物，通常是腹膜腔中。注射的动物产生肿瘤，分泌由融合的杂种细胞产生的特异性单克隆抗体。然后可以引流出动物的体液如血清或腹水以提供高浓度的 MAbs。所述各个细胞系也可以在体外培养，其中 mAb 自然地分泌进培养基中，从中可易于高浓度获得。通过任一方式产生的 mAb 如果需要的话可以进一步使用过滤、离心和各种层析方法如 HPLC 或亲和性层析方法进行纯化。

或者，使用 ABL-MYC 技术(NeoClone, Madison WI 53713, USA)产生分泌抗免疫原性 BSX 肽抗原的单克隆抗体(mAb)的细胞系。在这种方法中，将 BALB/cByJ 雌性小鼠用一定量的所述肽抗原免疫大约 2—3 个月。在此期间，以一定间隔取血样以在标准 ELISA 中评定抗

体应答。将具有至少大约 1,000 抗体效价的小鼠的脾用于随后的 ABL-MYC 感染中, 感染采用包含致癌基因 v-abl 和 c-myc 的无复制能力的逆转录病毒。将脾细胞移植到从未进行过试验的小鼠中, 然后该小鼠产生腹水, 腹水中含有产生抗 BSX 肽抗原的单克隆抗体(mAb)的细胞系。使用例如结合于固体基质的蛋白质 G 或蛋白质 A, 根据 mAb 的同种型而从腹水中纯化 mAb。由于没有杂交瘤融合, 因此 ABL-MYC 方法与常规的 mAb 产生方法相比的一个优点是更快、成本更低及产量更高。另外, 由这种方法产生的二倍体浆细胞瘤比多倍体杂交瘤显然更稳定, 因为 ABL-MYC 逆转录病毒仅感染已经用免疫抗原刺激的脾中的细胞。然后 ABL-MYC 将那些激活的 B 细胞转化成无限增殖的产生 mAb 的浆细胞, 称作浆细胞瘤。“浆细胞瘤”是一种无限增殖的浆细胞, 其能不受控地细胞分化。由于浆细胞瘤仅从一个细胞开始, 因此由其产生的所有浆细胞瘤均是相同的, 而且产生相同的希望的“单克隆”抗体。结果, 不需要淘选不希望的细胞系。ABL-MYC 技术在如下并入作参考的文献中详细描述:

1. Largaespada et al, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 166, 91-96, 1990;
2. Weissinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8735-8739, 1991;
3. Largaespada et al, Oncogene, 7, 811-819, 1992;
4. Weissinger et al, J. Immunol. Methods 168, 123-130, 1994;
5. Largaespada et al, J. Immunol. Methods. 197(1-2), 85-95, 1996;
6. Kumar et al, Immuno. Letters 65, 153-159, 1999。

本发明的单克隆抗体还包括通过本领域熟知方法产生的抗独特型抗体。本发明的单克隆抗体也可以是单克隆抗体异源缀合物(即两个或多个抗体分子的杂合体)。在另一个实施方案中, 本发明的单克隆抗体是嵌合的单克隆抗体。在一种方法中, 所述嵌合的单克隆抗体是

通过克隆含有启动子、前导序列和来自小鼠抗 PSA 生成细胞的可变区序列及来自人抗体基因的恒定区外显子的重组 DNA 而工程化。由这种重组基因编码的抗体是小鼠-人嵌合体。其抗体特异性通过衍生自小鼠序列的可变区而决定。由恒定区决定的其独特型衍生自人 DNA。

在另一个实施方案中,本发明的单克隆抗体是通过本领域众多熟知技术的任一种技术产生的“人源化的”单克隆抗体。即,将小鼠互补决定区(CDR)从小鼠 Ig 的重和轻 V 链移至人 V 结构域,随后在构架区中的一些人残基用相应的小鼠残基置换。本发明的“人源化的”单克隆抗体特别适用于体内诊断和治疗方法中。

如上所述,本发明的单克隆抗体及其片段根据本领域熟知的体外和体内方法增殖。体外增殖是在合适的培养基中进行,所述培养基如 Dulbecco's 修改的 Eagle 培养基或 RPMI 1640 培养基,任选补充哺乳动物血清如胎牛血清或微量元素及支持生长的补充剂,例如饲养细胞,如正常小鼠腹膜分泌物细胞、脾细胞、骨髓巨噬细胞等。体外生产方法提供了相对纯的抗体制品,并且可以按比例扩大规模以提供大量希望的抗体。在组织培养条件下的大规模杂交瘤培养技术为本领域所已知,包括同质悬浮培养(例如在气升式反应器或者持续搅拌反应器或固定或捕获细胞培养)。

大量的本发明单克隆抗体也可以通过在体内增殖杂交瘤细胞而获得。将细胞克隆注射进与亲代细胞组织相容的哺乳动物中(例如同种小鼠),以使得产生抗体的肿瘤生长。任选地,将所述动物在注射之前用烃、特别是油如 Pristane (四甲基十五烷)刺激。

根据本发明,本发明的单克隆抗体的片段通过用酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化和/或通过化学还原裂解二硫键等方法而得自如上所述产生的单克隆抗体。或者,本发明的单克隆抗体片段是使用自动肽合成仪合成的,或者可以使用本领域熟知的技术人工产生。

本发明的单克隆缀合物是通过本领域已知的方法制备的,例如通过将如上述制备的单克隆抗体与例如一种酶在存在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐的条件下反应。具有荧光素标记的缀合物在存在这些偶联剂的条件下制备,或者通过与异硫氰酸盐反应而制备。具有金属螯合物的缀合物类似地产生。可缀合于抗体的其它组分包括放射性核素例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 及 ^{152}Eu 。

本发明的放射性标记的单克隆抗体是根据本领域熟知的方法产生的。例如,将单克隆抗体通过与碘化钠或碘化钾及一种化学氧化剂如次氯酸钠或者一种酶促氧化剂如乳过氧化物酶接触而碘化。本发明的单克隆抗体可以通过配体交换方法用钨标记,例如通过用锡溶液还原高钨酸盐、将还原的钨螯合在 Sephadex 柱上、将所述抗体施加于该柱,或者通过直接标记技术(例如通过保温高钨酸盐、还原剂如 SnCl_2 、缓冲溶液如邻苯二甲酸钠钾溶液和抗体)进行标记。

任何免疫测定均可用于监测针对 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位产生的抗体。免疫测定最简单和最直接的含义是指结合测定。某些优选的免疫测定是本领域已知的各种类型酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射性免疫测定(RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测也特别有效。然而,应理解检测不限于这些技术,也可以应用 Western 印迹、斑点印迹、FACS 分析等。

最优选地,测定能产生量化结果。

例如在简单的竞争分析中测试抗体。将结合 B 细胞表位的已知抗体制品和测试抗体与抗原组合物一起保温,所述组合物包含优选地在天然抗原中的 B 细胞表位。如本文所用,“抗原组合物”是指含有一些可及形式(accessible form)的 B 细胞表位的任何组合物。特别优选 ELISA 平板的抗原包被的孔。在一个实施方案中,在施加抗原组合物之前,将已知抗体及不同量的测试抗体(例如 1:1、1:10 和 1:100)

预先混和一定时间。如果一种已知抗体是标记的，则可以直接检测与抗原结合的标记；对比未混和的样品测定将确定测试抗体的竞争及因此的交叉反应性。或者，使用特异于已知或测试抗体的二级抗体将能确定竞争。

结合所述抗原组合物的抗体能有效地竞争已知抗体的结合，并因此显著降低后者的结合。已知抗体在没有任何测试抗体存在下的反应性作为对照。在存在测试抗体时的反应性的显著降低表明测试抗体与B细胞表位结合(即其与已知抗体交叉反应)。

在一种举例性的ELISA中，将BSX蛋白或其免疫原性片段或B细胞表位固定在呈现蛋白质亲和性的选定表面上，所述表面如聚苯乙烯微滴定平板的孔。然后，向孔中加入含有包含B细胞表位的肽的组合物。在结合及洗涤以除去非特异性结合的免疫复合物之后，可以检测结合的表位。通常通过加入已知结合B细胞表位并与一种可检测的标记连接的第二种抗体进行检测。这种类型的ELISA是一种简单的“夹心ELISA”。也可以通过加入所述第二种抗体，随后加入与第二种抗体具有结合亲和性的第三种抗体进行检测，所述第三种抗体与一种可检测的标记连接。

在另一种既适用于流动相(flow through)ELISA也适用于固相ELISA的免疫测定形式中，将结合免疫原性BSX蛋白或免疫原性BSX片段或B细胞表位的抗体固定在呈现蛋白质亲和性的选定表面上，如聚苯乙烯微滴定平板的孔或柱中。在足以使得抗原-抗体复合物形成的条件下加入包含免疫原性BSX蛋白或免疫原性肽或含所述抗体结合的B细胞表位的免疫原性片段的样品一段足以使得抗原-抗体复合物形成的时间。在这种情况下，加入的BSX蛋白、肽或片段与人Ig复合。在患者血清的情况中，例如通过患者对结核分支杆菌BSX蛋白的应答，所述肽优选地与人Ig复合。在结合及洗涤以除去非特异性结合的免疫复合物之后，结合的表位通过加入已知结合所

述免疫复合物中的人 Ig 并与可检测的标记连接的第二种抗体而检测。这是一种经修改的“夹心 ELISA”。通过加入所述第二种抗体，随后加入与第二种抗体具有结合亲和性的第三种抗体而实现检测，所述第三种抗体与一种可检测的标记连接。

本发明显然涵盖了用于诊断结核分支杆菌感染的多分析物测试。例如检测抗结核分支杆菌 BSX 蛋白的抗体的测定可以与检测抗结核分支杆菌谷氨酰胺合成酶(GS)的抗体的测定组合。在这方面，本发明人也制备了浆细胞瘤，其产生的单克隆抗体与 GS 的免疫原性片段或肽或表位结合，所述 GS 的免疫原性片段或肽或表位包含位于全长 GS 的约第 265 位残基至约第 300 位残基、更优选地位于 GS 的约第 270 位至约第 295 位、更优选地位于 GS 的约第 271 位至约第 295 位残基的至少大约 5 个连续氨基酸残基的氨基酸序列，特别是氨基酸序列 RGTDGSAVFADSNGPHGMSSMFRSF (SEQ ID NO:54)中的至少 5 个连续氨基酸残基。因此，所述抗体结合进一步包含对基本肽的免疫原性无不利影响的 N 末端和 C 末端延伸的 SEQ ID NO:54 的 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个连续氨基酸残基。

本发明的抗体可以结合在固体支持物上和/或与合适的试剂、对照物、说明书等一起包装进在合适的容器中的试剂盒中。

检测结核病或结核分支杆菌感染的诊断/预后方法

1. 基于抗原的测定

本发明提供了一种诊断对象中结核病或结核分支杆菌感染的方法，所述方法包括检测所述对象生物学样品中 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位，其中样品中所述蛋白质或其免疫原性片段或表位的存在表明感染的存在。

与基于抗体的测定相反，检测结核分支杆菌抗原的一个优点是严

重无免疫应答的患者也许不产生可检测水平的抗体,并且任何患者中抗体的水平均不反映细菌负荷。另一方面,抗原水平应反映细菌负荷,并且作为细菌产物,抗原水平是检测其存在的直接方法。

在本发明诊断测定的一个实施方案中,提供了一种检测对象中结核分支杆菌感染的方法,所述方法包括将所述对象的生物学样品与能结合 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体接触,并检测抗原-抗体复合物的形成。

在另一个实施方案中,本发明的诊断测定可用于确定对象中结核病或结核分支杆菌感染的进展。根据本发明的这些预后应用,生物学样品中的 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位的水平与感染状态呈正相关。例如,所述 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段的水平低于在表现出结核病或感染症状的对象中检测到的 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段的水平,表明该对象从感染中恢复。相似地,如果所述对象生物学样品中所述蛋白质或片段的水平高于健康个体,则表明该对象未消除疾病或感染。

因此,本发明的另一个实施方案提供了一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法,所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位,其中所述蛋白质或其片段或表位的水平高于在正常或健康个体中检测到的该蛋白质或其片段或表位的水平,表明该对象对所述治疗无应答或者未消除疾病或感染。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物的治疗的应答的方法,所述方法包括检测来自所述对象的生物学样品中的 **BSX** 蛋白或其免疫原性片段或表位,其中所述蛋白质或其片段或表位的水平低于在患有结核病或结核分支杆菌感染的对象中检测到的所述蛋白质或其片段或表位的水平,表明所述对象应答所述治疗或

者已经消除疾病或感染。显然，如果 BSX 蛋白或其片段或表位的水平在对象中检测不到，则该对象已经应答所述治疗。

在另一个实施方案中，将患者生物样品中 BSX 蛋白的量与先前得自同一患者的生物样品中的相同蛋白质的量进行对比。如本领域技术人员所明了，这种方法可用于持续监测潜伏期感染患者或者已经发生结核病的患者。以这种方式，可以监测患者特别是 HIV⁺个体的感染或疾病的发作或进展，以在建立感染之前着手进行治疗。

或者或另外，可以将得自结核病对象的生物样品中检测到的蛋白质的量与参考样品对比，其中所述参考样品得自一或多个未经历感染或疾病的结核病患者或者一或多个最近接受成功的感染治疗的结核病患者和/或未患有结核病及未经历感染或疾病的一或多个对象。

在一个实施方案中，BSX 蛋白或其免疫原性片段在参考样品中检测不到，然而所述 BSX 蛋白或其免疫原性片段在患者样品中检测到，表明该患者患有结核病或者结核分支杆菌感染或者即将发生急性感染。

或者，患者样品中 BSX 蛋白或其免疫原性片段的量与在参考样品中检测的水平相比可能是增高的。同样，这表明从中分离所述生物样品的患者患有结核病或者结核分支杆菌感染或者即将发生急性感染。

在本文所述诊断/预后方法的一个实施方案中，所述生物样品预先得自对象。根据这个实施方案，所述预后或诊断方法是离体（*ex vivo*）进行的。

在另一个实施方案中，本发明的诊断/预后方法进一步包括处理对象样品以产生包含分析物的衍生物或提取物(例如胸膜腔积液或痰液)。

合适的样品包括如下组织的提取物：如脑、乳腺、卵巢、肺、结肠、胰腺、睾丸、肝、肌和骨组织，或者体液如痰、血清、血浆、全

血、血清或胸膜腔积液。

优选地，生物学样品是选自如下的体液或组织样品：唾液、血浆、血液、血清、痰、尿、及肺。不除外其它样品。

从本文描述中显而易见的是优选的样品可包含循环免疫复合物，所述循环免疫复合物包含与人免疫球蛋白复合的 BSX 蛋白或其片段。这种免疫复合物的检测显然在本发明的范围内。根据这个实施方案，捕获试剂例如捕获抗体除了捕获对象循环系统中分离的抗原之外，还用于捕获与对象的免疫球蛋白复合的 BSX 抗原(BSX 多肽或其免疫活性片段或表位)。抗 Ig 抗体，任选地与可检测的标记缀合，用于特异性结合捕获的 CIC，从而检测 CIC 患者样品。在本发明的范围内，抗 Ig 抗体优先结合样品中的 IgM、IgA 或 IgG。在特别优选的实施方案中，抗 Ig 抗体结合人 Ig，例如人 IgA、人 IgG 或者人 IgM。抗 Ig 抗体可以与本领域已知的任何标准可检测的标记缀合。这特别用于检测病原体例如细菌或病毒的感染，或者用于诊断与 CIC 相关的任何疾病或失调。因此，本发明任一实施方案所述的诊断方法可以进行修改，其中衍生自对象的样品包含一或多种循环免疫复合物，所述复合物包含与结核分支杆菌的 BSX 蛋白或者一或多种免疫原性 BSX 肽、其片段或表位结合的免疫球蛋白(Ig)，其中检测抗原-抗体复合物的形成包括将抗 Ig 抗体与循环免疫复合物接触，接触的条件和时间足以形成复合物的条件和时间，然后检测结合的抗 Ig 抗体。

2. 基于抗体的测定

本发明提供了一种诊断对象中结核病或结核分支杆菌感染的方法，所述方法包括在来自所述对象的生物学样品中检测抗 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体，其中所述样品中存在所述抗体表示存在感染。所述感染可以是继往的或当前的感染或者潜伏感染。

基于抗体的测定主要用于检测结核分支杆菌的活动性感染。优选地, 由于在结核分支杆菌最近的继往感染或慢性感染中持续的残余抗体水平而需要考虑对象的临床病史。

测定形式是廉价但高度敏感性的, 然而不如基于抗原的测定形式那样有效地检测无免疫应答的个体中的感染。然而, 基于抗体的测定显然可用于检测不是无免疫应答的 HIV⁻ 或 HIV⁺ 个体中的感染。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种检测对象中结核分支杆菌感染的方法, 所述方法包括将得自该对象的生物样品与 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位接触, 并检测抗原-抗体复合物的形成。

在另一个实施方案中, 本发明的诊断测定可用于确定对象中结核病或结核分支杆菌感染的进展。根据本发明的这些预后应用, 所述对象的血液或血清或免疫球蛋白组分中的抗 BSX 蛋白或其片段或表位的抗体的量与感染状态正相关。例如, 抗 BSX 抗体的水平低于在患有结核病症状或感染的对象中检测到的抗 BSX 抗体水平, 表明该对象正从感染中恢复。相似地, 所述对象样品中抗体水平高于健康个体抗体水平表明该对象未消除疾病或感染。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物治疗的应答的方法, 所述方法包括检测所述对象生物样品中抗 BSX 蛋白或其免疫原性片段的抗体, 其中抗体水平与在正常或健康对象中检测到的抗体水平相比增强, 表明该对象对所述治疗无应答或者未能消除疾病或感染。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种确定患有结核病或结核分支杆菌感染的对象对用针对所述结核病或感染的治疗性化合物治疗的应答的方法, 所述方法包括检测所述对象生物样品中的抗 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体, 其中抗体的水平低于在患有结核病或结核分支杆菌感染的对象中检测到的抗体水平, 表示该对象应

答所述治疗或者已经消除疾病或感染。

可以将在患有结核病的对象的生物学样品中检测到的抗 BSX 蛋白或片段的抗体的量与参考样品相对比,其中参考样品得自先前未感染过结核分支杆菌或者最近未感染过结核分支杆菌的健康对象。这种阴性对照对象具有较低的循环抗体效价,使其成为基于抗体的测定形式中的合适标准。例如,抗 BSX 蛋白或其免疫原性片段的抗体在参考样品中未检测到,仅在患者样品中检测到,表明该患者患有结核病或结核分支杆菌感染或者将发生急性感染。

在本文所述诊断/预后方法的一个实施方案中,所述生物学样品是预先得自对象。根据这个实施方案,所述预后或诊断方法离体进行。

在另一个实施方案中,所述诊断/预后方法进一步包括对对象样品进行处理以产生包含分析物的衍生物或提取物(例如血液、血清或者含有免疫球蛋白的任何样品)。

合适的样品包括例如含免疫球蛋白的组织的提取物,如血液、骨、或体液如血清、血浆、全血、含有免疫球蛋白的血清组分、含有免疫球蛋白的血浆组分、含有免疫球蛋白的血液组分。

3. 检测系统

本发明的优选检测系统包括检测分离自人对象的生物学样品中蛋白质或抗体的任何已知测定,例如 SDS/PAGE、等电位聚焦、包含 SDS/PAGE 和等电位聚焦的双向凝胶电泳、免疫测定、使用蛋白质的抗体或非抗体配体如小分子(例如蛋白质的化学化合物、激动剂、拮抗剂、变构调节剂、竞争性抑制剂、或者非竞争性抑制剂)的检测系统。根据这些实施方案,抗体或小分子可以用于适合检测蛋白质的任何标准固相或溶液相测定形式中。本发明显然也涵盖了光学或荧光检测,例如使用质谱分析、MALDI-TOF、生物传感器技术、倏逝光纤(evanescent fiber optics)或者荧光共振能量转移。本发明特别涵盖了

适用于高通量筛选大量样品的测定系统，特别是高通量质谱共振方法(例如 MALDI-TOF、电喷雾(electrospray) MS 或者纳升级电喷雾(nano-electrospray) MS)。

特别优选的免疫测定形式，例如选自免疫印迹、Western 印迹、斑点印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、酶免疫测定。也可以使用利用荧光共振能量转移(FRET)、同位素编码的亲性和标记(ICAT)、基质辅助激光解析/电离飞行时间 (MALDI-TOF)、电喷雾电离(ESI)、生物传感器技术、倏逝光纤技术或蛋白质芯片技术的改进的免疫测定。

优选地，所述测定是半定量测定或定量测定。

标准固相 ELISA 形式特别用于确定各种患者样品的蛋白质或抗体浓度。

在一种形式中，这种测定包括将包含抗 BSX 抗体或者 BSX 蛋白或其免疫原性片段的生物学样品固定在固相基质上，例如固定在聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔或者 dipstick、膜或玻璃支持物(例如玻片)上。

在基于抗原的测定中，将特异性结合 BSX 蛋白的固定化抗体与生物学样品直接接触，与所述样品中存在的任何其靶蛋白质形成直接键合。对于基于抗体的测定，将固定化的分离或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位与生物学样品接触。溶液中加入的抗体或蛋白质通常用可检测的报道分子标记，例如荧光标记(例如 FITC 或 Texas Red)，或酶(例如辣根过氧化物酶(HRP))、碱性磷酸酶(AP)或者 β -半乳糖苷酶。或者或另外，可以使用结合第一抗体或者结合分离/重组的 BSX 抗原的第二种标记抗体。在洗涤除去任何未结合的抗体或 BSX 抗原后，在荧光标记的情况中所述标记可以被直接检测或者通过加入底物如过氧化氢、TMB、或者甲苯胺或者 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-吡喃半乳糖苷(x-gal)检测。

这种基于 ELISA 的系统特别适于定量样品中的蛋白质或抗体的

量，例如根据已知标准量校准该检测系统。

在另一种形式中，ELISA 包括将特异性结合 BSX 蛋白的抗体固定在固体基质上，例如固定在膜、聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔、聚苯乙烯或聚碳酸酯 dipstick 或玻璃支持物上。然后将患者样品与所述抗体进行物理接触，样品中的抗原被结合或“捕获”。然后使用标记抗体检测结合的蛋白质。例如如果从人样品中捕获了所述蛋白质，则使用抗人抗体检测捕获的蛋白质。

在一个实施例中，本发明包括：

(i)将特异性结合本发明的免疫原性 BSX 肽的抗体固定在固体基质或支持物上(例如包含 SEQ ID NO:2—53 所示一或多个序列的肽)；

(ii)将结合的抗体与得自对象的样品、优选含有抗体的样品如血液、血清或其含有 Ig 的组分接触，接触的条件和时间为足以使得固定化抗体结合样品中的 GS 蛋白或其片段从而形成抗原—抗体复合物的条件和时间；

(iii)检测形成的抗原—抗体复合物，包括将所述复合物与识别人 Ig 的抗体接触，其中所述人 Ig 的存在表示患者样品中存在结核分支杆菌。

根据这个实施方案，固定化抗体的特异性保证只有分离的或免疫复合的 BSX 蛋白质或包含抗体识别的表位的片段发生实际结合，而抗人 Ig 的特异性保证只有免疫复合的 BSX 蛋白或片段被检测。文中术语“免疫复合的”是指患者样品中的 BSX 蛋白或其片段与人 Ig 如人 IgA 或人 IgM 或人 IgG 等复合。因此，这一实施方案可特别用于检测结核分支杆菌的存在或者在对象中已经产生免疫应答的结核分支杆菌感染。通过适当地选择检测抗体，例如抗人 IgA 或抗人 IgG 或者抗人 IgM，可以进一步检测对象的免疫应答同种型。这种人 IgA、IgM 和 IgG 的检测抗体在本领域是公众可获得的。

或者，或除了前述实施方案之外，可以使用与第二（检测）抗体

结合的第三标记抗体。

技术人员显然明白本发明所述测定形式适合高通量形式，例如自动化筛选方法，或者如 Mendoza et al, *Biotechniques* 27(4): 778-788, 1999 所述的微阵列形式。另外，本领域技术人员显然明白上述测定的变化形式，例如竞争性 ELISA。

或者，抗 BSX 抗体或者 BSX 蛋白或其免疫原性片段的存在使用放射性免疫测定(RIA)检测。该测定的基本原理是使用放射性标记的抗体或抗原以检测抗体-抗原相互作用。例如，可以将特异性结合 BSX 蛋白的抗体与一种固体支持物结合，及将生物学样品直接与所述抗体接触。为了检测结合的抗原，将放射性标记的分离和/或重组形式的抗原与所述抗体直接接触。在洗涤之后，检测结合的放射性的量。由于生物学样品中的任何抗原均抑制放射性标记的抗原的结合，因此检测到的放射性的量与样品中抗原的量成反比。这种测定可以通过增加已知浓度的分离的抗原而利用标准曲线量化。

如技术人员所显然明白，这种测定可以进行修改以使用任何报道分子，例如酶或荧光分子代替放射性标记。

Western 印迹也可用于检测 BSX 蛋白或其免疫原性片段。在这种测定中，来自生物学样品的蛋白质使用十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离，所述分离使用本领域熟知的技术及例如 Scopes (*Ini Protein Purification: Principles and Practice*, Third Edition, Springer Verlag, 1994)所述技术进行。然后使用本领域熟知的方法如电子转移方法将分离的蛋白质移至固体支持物，如一种膜或更具体地，PVDF 膜。然后将这个膜用特异性结合 BSX 蛋白的标记的抗体或配体封闭和探查。或者，可以使用标记的第二或者甚至第三抗体或配体检测特异性第一抗体的结合。

特别优选的是检测抗 BSX 抗体或者 BSX 蛋白或其免疫原性片段的存在的高通量方法。

在一个实施方案中,使用 MALDI-TOF 快速鉴别已经通过单向或双向凝胶电泳分离的蛋白质。因此,不需要使用特异性结合感兴趣蛋白质的抗体或配体检测感兴趣的蛋白质。优选使用本领域熟知的方法利用凝胶电泳分离来自生物样品蛋白质的蛋白质,及使用 MALDI-TOF 测定那些在大约正确分子量和/或等电点的蛋白质,以确定感兴趣蛋白质的存在与否。

或者,使用 MALDI 或 ESI 或者组合方法确定生物样品例如痰中特定蛋白质的浓度。这种蛋白质优选地被预先充分鉴定一些参数如分子量和等电点。

生物传感器装置通常采用一个电极表面组合电流或阻抗测定元件,它们与测定底物集成在一个装置中(如美国专利 No. 5,567,301 所述)。特异性结合感兴趣的蛋白质的抗体或配体优选被掺入生物传感器装置的表面上,分离自患者的生物样品(例如使用本文所述方法溶解的痰)与所述装置接触。通过生物传感器检测到电流或阻抗中的变化表示蛋白质与所述抗体或配体结合。本领域已知的一些形式的生物传感器也依赖于表面等离子体共振来检测蛋白质相互作用,从而表面等离子体共振表面反射中的变化表示蛋白质与配体或抗体结合(美国专利 No. 5,485,277 和 5,492,840)。

生物传感器由于其便于使系统适应微升(micro-)或纳升(nano-)规模而特别用于高通量分析中。另外,这类系统便于适应掺入一些检测试剂,可以在一个生物传感器单元中复用多个诊断试剂。这样可以在少量体液中同时检测多个表位。

倏逝生物传感器(Evanescent biosensor)也是优选的,因为它们不需要在检测感兴趣的蛋白质之前对生物样品进行预处理。倏逝生物传感器通常依赖于与荧光分子例如附着在探针表面附近的荧光抗体相互作用的预定波长的光在诊断蛋白质与抗体或配体结合时发出不同波长的荧光。

为了产生蛋白质芯片,将能特异性结合感兴趣抗体或蛋白质的蛋白质、肽、多肽、抗体或配体结合在固体支持物上,所述支持物例如是玻璃、聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚苯乙烯、氧化硅、金属或氮化硅。这种固定是直接(例如通过共价键如 Schiff's 碱形成,二硫键、或者酰胺或尿素键形成)或间接固定。产生蛋白质芯片的方法为本领域所已知,在例如美国专利申请 No.20020136821、20020192654、20020102617 及美国专利 No. 6,391,625 中描述。为了将蛋白质与固体支持物结合,通常需要处理所述固体支持物以在表面上产生化学反应基团,例如用含有醛的硅烷试剂处理。或者,抗体或配体可以被捕获在显微制造的 (microfabricated) 聚丙烯酰胺凝胶垫上及使用 Arenkov et al. Anal. Biochem. 278:123-131, 2000 所述微电泳方法加速进入凝胶中。

优选产生的蛋白质芯片上排列一些蛋白质、配体或抗体阵列。这种形式可以同时筛选样品中多种蛋白质的存在。

或者,蛋白质芯片可以仅包含一种蛋白质、配体或抗体,用于筛选一或多个患者样品中的一种感兴趣多肽的存在。这种芯片也可用于同时筛选一组患者样品的感兴趣多肽。

优选地,待使用蛋白质芯片分析的样品附着于报道分子如使用本领域熟知方法可检测的荧光分子、放射性分子、酶,或者抗体。因此,通过将蛋白质芯片与标记的样品接触,随后洗涤以除去任何未结合的蛋白质,使用本领域熟知的方法例如使用 DNA 微阵列读数器可以检测到结合的蛋白质的存在。

或者,使用生物分子相互作用分析—质谱分析(BIA-MS)快速检测和鉴定复杂的生物学样品中存在的低 fmol 至亚 fmol 水平的蛋白质(Nelson et al. Electrophoresis 21: 1155-1163, 2000)。一种可用于蛋白质芯片分析中的技术是表面增强的激光解吸/离子化—飞行时间—质谱分析(SELDI-TOF-MS)技术,其鉴定与蛋白质芯片结合的蛋白质。或者,使用如美国专利申请 20020139751 所述的 ESI 分析蛋白质芯片。

如技术人员所显然明白, 蛋白质芯片特别适合检测试剂的多元化。因此, 一些能特异性结合不同的肽或蛋白质的抗体或配体可以结合所述蛋白质芯片的不同区域。然后使用所述芯片进行的生物学样品分析可以检测多个感兴趣的蛋白质或者BSX蛋白的多个B细胞表位。本发明特别涵盖了诊断和预后标记的多元化。

在进一步的实施方案中, 使用ICAT、特别是如美国专利申请 No. 20020076739 所述的方法分析样品。这个系统依赖于用第一种试剂标记来自一个来源(即健康个体)的蛋白质样品及用第二种试剂标记来自另一个来源(即结核病患者)的蛋白质样品, 第二种试剂与第一种试剂在化学性质上相同, 但是由于同位素组成而在质量上不同。优选的是所述第一种和第二种试剂还包含生物素分子。然后混和等浓度的两种样品, 通过抗生物素蛋白亲和层析回收肽。然后使用质谱分析法分析样品。重与轻肽离子之间峰高度的任何差异与生物学样品中蛋白质丰度差异直接相关。然后使用本领域熟知的方法确定这种蛋白质的身份, 例如通过MALDI-TOF或ESI确定。

在一个特别优选的实施方案中, 将包含抗BSX抗体或者BSX蛋白或其免疫原性片段的生物学样品进行双向凝胶电泳。根据这个实施方案, 优选在电泳之前除去样品中某些微粒物质, 例如通过离心、过滤或者组合离心与过滤。然后分离生物学样品中的蛋白质。例如, 蛋白质可根据其电荷使用等电位聚焦和/或根据其分子量而分离。双向分离(two-dimensional separation)可以鉴别蛋白质的各种同种型, 因为具有相似分子量的蛋白质也通过其电荷而分离。使用质谱分析可以确定患者样品中是否存在感兴趣的蛋白质。

如本领域技术人员所显然明白, 本文描述的诊断或预后测定可以是多元测定。如本文所用术语“多元(multiplex)”不仅是指在单一样品中同时检测两或多种诊断或预后标记, 而且还涵盖相继检测单一样品中两或多种诊断或预后标记、同时检测不同但匹配的样品中两或

多种诊断或预后标记、及相继检测不同但匹配的样品中两或多种诊断或预后标记。如本文所用术语“匹配的样品”是指衍生自相同初始生物样品或生物样品的两或多种样品，或者在同一时间点分离的两或多种生物样品。

因此，多元测定可包括在同一反应中检测若干抗 BSX 抗体和/或 BSX 表位的测定，并且同时或替代地其可检测除了一或多种抗 BSX 抗体和/或 BSX 表位之外的其它一或多种抗原/抗体。

本发明清楚地涵盖了通过细胞表面上的一或多种受体和/或一或多种 HIV-1 和/或 HIV-2 抗原除了检测 CD4⁺ T 辅助细胞之外还检测 BSX 抗体和表位的多元测定。这种测定特别用于同时获得关于结核分支杆菌与 HIV-1 和/或 HIV-2 共同感染的信息，和/或用于确定具有结核分支杆菌的对象是否是无免疫应答的。显然，这种多元测定形式可用于监测 HIV⁺/TB⁺个体的健康状况。

正如技术人员所明了，如果这种测定是基于抗体或配体，则这些抗体必须在相同条件下起作用。

4. 生物样品和参考样品

优选地，要检测其中的 BSX 蛋白或抗 BSX 抗体的生物样品是选自如下的样品：肺、与肺相关的淋巴组织、鼻旁窦、支气管、细支气管、肺泡、呼吸道纤毛粘膜上皮、呼吸道粘膜上皮、支气管肺泡灌洗液(BAL)、肺泡内液、痰、粘液、唾液、血液、血清、血浆、尿、腹膜液、心包液、胸膜腔积液、呼吸道鳞状上皮细胞、肥大细胞、杯状细胞、肺泡上皮细胞 (pneumocyte) (1 型或 2 型)、上皮内 (intra epithelial) 树突细胞、PBMC、嗜中性粒细胞、单核细胞，或者任一或多种所述组织、体液或细胞的任何含有免疫球蛋白的组分。

在一个实施方案中，生物样品是预先从患者获得的。

在一个实施方案中，生物样品通过选自如下一组的方法得自

对象：手术或者其它切除方法、抽吸体液如高渗盐水或丙二醇、支气管肺泡（bronchoalveolar）灌洗、支气管镜检、用玻璃管收集唾液、salivette（Sarstedt AG, Sevelen, Switzerland）、Ora-sure（Epitope Technologies Pty Ltd, Melbourne, Victoria, Australia）、omni-sal（Saliva Diagnostic Systems, Brooklyn, NY, USA）及使用本领域熟知的任何方法例如使用注射器收集血液。

特别优选的是生物学样品是痰，使用例如 Gershman, N.H. et al, J Allergy CHn Immunol, 10(4): 322-328, 1999 所述方法分离自患者肺部。

在另一个优选的实施方案中，生物学样品是使用本领域熟知的方法分离自从患者收集的血液的血浆。

在一个实施方案中，生物学样品被处理以使其中的细胞溶解。这类方法包括使用去污剂、酶、重复冷冻与解冻所述细胞、超声或在存在玻璃珠的情况下涡旋所述细胞等等。

在另一个实施方案中，生物学样品被处理以使其中存在的蛋白质变性。变性蛋白质的方法包括加热样品，用 2-巯基乙醇、二硫苏糖醇（DTT）、去污剂或其它化合物如胍盐或尿素处理样品。例如优选使用 DTT 液化痰。在另一个实施方案中，处理生物学样品浓缩其中的蛋白质。浓缩蛋白质的方法包括沉淀、冻干、使用漏斗管凝胶（TerBush and Novick, Journal of Biomolecular Techniques, 10(3); 1999）、超滤或透析。

显然，本发明提供的诊断和预后方法需要一定程度的定量以确定诊断或预后感染或疾病的蛋白质的量。这种定量可以通过在本文所述的测定中包括进合适的参考样品而确定，其中所述参考样品衍生自健康或正常个体。

在一个实施方案中，所述参考样品包含例如来自先前或最近未受感染并且未处于感染或疾病中的健康对象的细胞、体液或组织。这种

参考样品来自不需要手术切除或介入而方便地获得的体液或组织。因此,优选体液及其衍生物。高度优选的参考样品包括痰、粘液、唾液、血液、血清、血浆、尿液、BAL液、腹膜液、心包液、胸膜腔积液、PBMC、嗜中性粒细胞、单核细胞,或者任一或多种所述组织、体液或细胞的含有免疫球蛋白的任何组分。

对参考样品和测试(或患者)样品进行处理、分析或测定,并比较针对参考样品和测试样品获得的数据。在一个实施方案中,在同一时间对参考样品和测试样品进行处理、分析和测定。在另一个实施方案中,在不同时间对参考样品和测试样品进行处理、分析和测定。

在另一个实施方案中,在测定中不包括参考样品。代之是参考样品可以衍生自预先产生的已建立的数据集。因此,在一个实施方案中,参考样品包含来自健康个体的样品群研究的数据,例如,对于健康范围的被测试的整数为统计学显著的数据。然后将得自测试样品的处理、分析或测定的数据与针对所述样品群获得的数据相比较。

从足够大量的参考样品中获得的作为群体代表的数据可以用于产生数据集以确定特定参数的平均水平。因此,可以针对任何个体群、衍生自所述个体的任何样品、针对测定样品确定的表达产物的水平的随后比较而确定诊断或预后感染或疾病的蛋白质的量。当依赖这种标准化数据集时,优选包含在所进行的每一测定中包括内部对照以控制差异。

诊断测定试剂盒

本发明提供了一种检测生物学样品中结核分支杆菌感染的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包含:

- (i) 一或多种结合 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的抗体; 和
- (ii) 检测抗原-抗体复合物形成的手段。

在另一个实施方案中,试剂盒包含:

- (i) 分离或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位；和
- (ii) 检测抗原-抗体复合物形成的手段。

本发明试剂盒的抗体、免疫原性 BSX 肽和检测手段优选地选自本文上述的抗体和免疫原性 BSX 肽，那些实施方案应并入作参考。技术人员通过本文教导可易于选择对任一测定形式适合的试剂盒成分。

在一特别优选的实施方案中，所述试剂盒包含：

- (i) 结合包含选自 SEQ ID NO:24、25 和 45 的氨基酸序列的分离或重组或合成的肽的抗体；和
- (ii) 抗人 Ig。

优选地，所述试剂盒进一步包含适量的一或多种肽或者任两或多种所述肽的融合体，所述每种肽包含选自 SEQ ID NO:2—23、26—44 和 46—55 的氨基酸序列。

任选地，所述试剂盒进一步包含检测抗体、其片段或配体与 BSX 蛋白结合的手段。这种手段包括报道分子例如酶(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、底物、辅因子、抑制剂、染料、放射性核素、发光基团、荧光基团、生物素，或者胶体颗粒如胶体金或硒。优选地这种报道分子与所述抗体或配体直接连接。

在另一个实施方案中，试剂盒可另外包含参考样品。这种参考样品可例如是衍生自从一或多个结核病对象分离的生物学样品的蛋白质样品。或者，参考样品可包含分离自一或多个健康个体的生物学样品。这种参考样品任选地包含在试剂盒中以进行诊断或预后分析。

在另一个实施方案中，参考样品包含通过抗体或配体检测的肽。优选地，所述肽的浓度已知。这种肽特别用作标准物。因此，使用本文所述预后或诊断测定可以检测各种已知浓度的这种肽。

在另一个实施方案中，试剂盒任选地包含样品制备的手段，例如细胞溶解的手段。优选地这种手段是溶解痰的手段，例如去污剂(例

如三丁基膦, C7BZO, 硫酸葡聚糖或者聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯)。

在另一个实施方案中, 试剂盒包含蛋白质分离的手段(Scopes (In: Protein Purification: Principles and Practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994)。

预防和治疗方法

BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位当被给予动物对象时可诱导高效价抗体的特异性产生。

因此, 本发明提供了一种引起抗结核分支杆菌抗体生成的方法, 所述方法包括将分离的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位给予所述对象, 给予的条件和时间为足以引起抗体例如抗结核分支杆菌的中和抗体生成的条件和时间。

优选地, 所述中和抗体是高效价中和抗体。

产生抗体的 BSX 蛋白或表位的有效量根据免疫原性 B 细胞表位的性质、给予途径、用于免疫的动物、抗体的性质而变化。所有这些变量通过本领域公认的方式凭经验而确定。

在一个优选的实施方案中, 本发明提供了一种诱导对象中针对结核分支杆菌的免疫的方法, 所述方法包括给予所述对象分离或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位, 给予的条件和时间为引起针对所述分离或重组的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的体液免疫应答的条件和时间。

所述免疫抗原可以如本文所述的任何常规配制品形式给予。

“体液免疫应答”是指针对免疫抗原产生的足以预防结核分支杆菌感染的二次免疫应答。

优选地, 产生的体液免疫包括引起对象中持续水平的针对免疫抗原中的 B 细胞表位的抗体。“持续水平的抗体”是指抗 B 细胞表位的

足以预防结核分支杆菌感染水平的循环抗体。

优选地，抗体水平持续至少大约 6 个月或 9 个月或 12 个月或 2 年。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种增强对象免疫系统的方法，所述方法包括给予免疫学活性 BSX 蛋白或表位或包含所述 BSX 蛋白或表位的疫苗组合物，给予的时间和条件是足以赋予或增强抗所述对象中结核分支杆菌的抗性的时间和条件。

“赋予或增强抗性”是指在所述对象中发生结核分支杆菌特异性免疫应答，所述应答选自如下一组：

(i) 在对象中产生抗结核分支杆菌的 BSX 蛋白或所述蛋白的表位的抗体；

(ii) 在所述对象中产生抗结核分支杆菌的中和抗体；

(iii) 所述对象中特异于结核分支杆菌的 BSX 蛋白的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和/或 CTL 前体被激活；

(iv) 所述对象具有对后来的结核分支杆菌感染或者潜伏的结核分支杆菌感染的再活动的增强的免疫。

本发明涵盖一种在未感染的人对象中提供或增强抗结核分支杆菌的免疫的方法，所述方法包括将免疫学活性的 BSX 蛋白或其表位或包含所述 BSX 蛋白或其表位的疫苗组合物给予所述对象，给予的时间和条件为足以提供对抗未来的结核分支杆菌感染的免疫记忆的时间和条件。

本发明提供了一种治疗对象的结核病的方法，包括进行本发明所述的诊断方法或预后方法。

在一个实施方案中，本发明提供了一种预防方法，所述方法包括：

(i) 检测对象的生物样品中感染的存在；和

(ii) 给予治疗有效量的药物组合物以降低对象肺、血液或淋巴系统中病原菌的数目。

优选地，将 BSX 蛋白或表位或疫苗给予具有潜伏的或活动的结核分支杆菌感染的对象。

不受任何理论或作用模式的限制，所述治疗方法以瞬时或持续方式增强 T 细胞识别并溶解携带结核分支杆菌的细胞的能力，或者增强 T 细胞识别结核分支杆菌抗原的 T 细胞表位的能力。相似地，T 细胞群的再激活可以在潜伏的结核分支杆菌感染活动之后或者在重新感染结核分支杆菌之后或者在用本发明的 BSX 蛋白或表位或疫苗组合物免疫先前感染的对象之后而发生。可以使用标准方法确定对象中 CTL 激活发生与否，例如使用细胞毒性分析、ELISPOT，或者确定对象的 PBMC 中 IFN- γ 的产生。

优选地，给予所述肽或衍生物或疫苗组合物，时间和条件为足以引起或增强 CD8⁺ T 细胞的扩增。更优选地，给予所述肽或衍生物或疫苗组合物，时间和条件为足以增强对象中结核分支杆菌特异性细胞介导的免疫(CMI)。

“结核分支杆菌特异性 CMI”是指激活的及克隆扩增的 CTL 是 MHC 限制性的并且特异于本发明的 CTL 表位。CTL 是基于抗原特异性和 MHC 限制进行分类(即非特异性 CTL 和抗原特异性的 MHC 限制性 CTL)。非特异性 CTL 由多种细胞类型组成，包括 NK 细胞和抗体依赖性细胞毒性，可以非常早地在免疫应答中起作用以降低病原体负荷，而此时抗原特异性应答仍在建立过程中。相反，MHC-限制的 CTL 比非特异性 CTL 较晚达到最佳活性，通常在抗体产生之前。抗原特异性 CTL 抑制或降低结核分支杆菌的传播，优选地终止感染。

CTL 激活、克隆扩增或者 CMI 可以全身性诱导或者分区定位(compartmentally localized)。在分区定位的情况中，优选利用适合给予该分区而配制的疫苗组合物。另一方面，对于在对象中全身性诱导 CTL 激活、扩增或 CMI 无这种严格要求。

单独给予或者于疫苗组合物中给予的以引起 CTL 激活、克隆扩

增或者 CMI 的 BSX 蛋白或其表位的有效量，基于免疫原性表位的性质、给予途径、免疫对象的体重、年龄、性别或者一般健康状况及 CTL 应答的性质而变化。所有这种变量通过本领域公认的手段凭经验确定。

BSX 蛋白或其表位任选地与任何合适的或希望的载体、佐剂、BRM 或药物可接受的赋形剂一起配制，以可注射的组合物形式常规给药。注射可以是鼻内、肌内、皮下、静脉内、皮内、腹膜内注射或者通过其它已知途径。对于静脉内注射，希望所述配制品包括一或多种液体和营养补充物。

给予的最佳剂量和优选的给予途径使用动物模型确定，例如，为小鼠、大鼠、兔、豚鼠、狗、马、牛、山羊或猪注射包含所述肽的配制品，然后使用常规测定监测对所述表位的 CTL 免疫应答。

过继转移技术也可用于赋予或增强抗结核分支杆菌感染的抗性，或者预防或降低再活动的潜伏感染的严重性。因此，在一个相关的实施方案中，本发明提供了一种增强或赋予未感染的人对象抗结核分支杆菌的免疫的方法，包括将得自人对象的 T 细胞与免疫学活性 BSX 蛋白或其表位或包含所述蛋白质或表位的疫苗离体接触，接触的时间和条件为足以赋予所述 T 细胞以结核分支杆菌活性。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种增强人对象的结核分支杆菌特异性细胞介导的免疫的方法，所述方法包括：

(i)将得自人对象的 T 细胞与免疫学活性 BSX 蛋白或其 CTL 表位或包含所述蛋白质或表位的疫苗组合物离体接触，接触的时间和条件为足以赋予所述 T 细胞结核分支杆菌活性；

(ii)将激活的 T 细胞导入对象自体中或者导入同种异体的另一人对象中。

所述 T 细胞可以是 CTL 或 CTL 前体细胞。

用于获得 T 细胞的人对象可以是与治疗对象相同或不同的对象。

治疗对象可以是携带潜伏或活动性结核分支杆菌感染或者处于结核分支杆菌感染或者结核分支杆菌感染再活动的危险中的任何人对象或者需要或者期望获得抗结核分支杆菌的免疫接种的人。

优选进行这种过继转移，及基本如 Einsele et al, Blood 99, 3916-3922, 2002 所述测定结核分支杆菌反应性，所述方法在此并入作参考。

“结核分支杆菌活性”是指如上所述使 T 细胞能被激活(即 T 细胞识别并溶解携带结核分支杆菌的细胞或者能瞬时或者持续识别结核分支杆菌抗原的 T 细胞表位)。因此，特别优选的是 T 细胞是 CTL 前体，通过本发明的方法使其能识别并溶解携带结核分支杆菌的细胞或者能瞬时或持续识别结核分支杆菌抗原的 T 细胞表位。

对于这种离体应用，T 细胞优选包含在得自人对象的生物学样品中，例如包含初级或中枢淋巴器官(例如骨髓或胸腺)或者次级或周围淋巴器官(例如血液、PBMC、或者衍生自其中淡黄色外层(buffy coat)级分)的活检组织样品。

优选地，T 细胞或者包含 T 细胞的样品预先从人对象中获得，例如由接诊医生将样品送至病理学实验室进行分析。

优选地，所述方法进一步包括获得包含对象 T 细胞的样品及更优选获得所述对象的所述样品。

配制品

本发明明确涉及 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位在制备抗人或其它动物对象中结核分支杆菌感染的治疗或预防性亚单位疫苗中的应用。

因此，本发明提供了一种药物组合物或疫苗，其包含组合药物可接受的稀释剂的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位。

BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位在药物学可接受的赋形剂或

稀释剂中常规配制，例如水性溶剂、非水性溶剂、无毒赋形剂如盐、防腐剂、缓冲剂等。非水性溶剂例如是丙二醇、植物油及可注射的有机酯如乙基油酸酯。水性溶剂包括水、醇性/水性溶液、盐水溶液、肠道外载体如氯化钠、Ringer's 葡萄糖等。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。药物组合物的各种成分的 pH 和精确浓度根据本领域常规技术调节。

在某些情况中，还希望的是将 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位与一种佐剂一起配制，以增强对 B 细胞表位的免疫应答。同样，这不是严格必需的。这种佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物，例如细胞因子、毒素或者合成的组合物。佐剂例如包括 IL-1、IL-2、BCG、氢氧化铝、N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺(thur-MDP)、N-乙酰基-正-胞壁酰基-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺(CGP 11637，称作 nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(r-2'-二棕榈酰-sn-丙三基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 1983 A，称作 MTP-PE)、脂质 A、MPL 和 RIBI，其含有从细菌中提取的三种成分、单磷酰脂质 A、海藻糖二霉菌酸酯及于 2%角鲨烯/Tween 80 乳液中的细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。

用于抗结核分支杆菌疫苗中的特别优选的佐剂例如 Elhay and Andersen Immunol. Cell Biol. 75, 595-603, 1997 或者 Lindblad et al, Infect. Immun. 65, 1997 所述。

希望的是共同给予生物应答修饰剂(BRM)和 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位，以负调节抑制物 T 细胞活性。BRM 例如包括但不限于 Cimetidine (CEVI; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA, USA); Indomethacin (IND; 150 mg/d) (Lederle, NJ, USA); 或者小剂量的环磷酰胺(CYP; 75、150 或者 300 mg/m.su.p.2) (Johnson/Mead, NJ, USA)。

给予 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的优选运载体包括脂质体。脂质体是由围绕水性区室的一或多个脂质双层组成的微型小泡

(Bakker-Woudenberg et al, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(Suppl. I), S61 (1993); 及 Kim, Drugs 46, 618 (1993))。脂质体在成分上与细胞膜相似, 因此脂质体通常可安全给予并且是可生物降解的。

本领域技术人员熟知制备脂质体及配制(例如包囊化)各种分子包括肽和寡核苷酸的技术。

根据制备方法, 脂质体可以是单层或多层的, 其直径大小可以在 0.02 μm 至超过 10 μm 范围内变化。许多物质在脂质体中包囊化。疏水性物质分隔成双层, 亲水性物质分隔在内部水性空间内 (Machy et al, LIPOSOMES IN CELL BIOLOGY AND PHARMACOLOGY (John Libbey 1987)及 Ostro et al, American J. Hosp. Pharm. 46, 1576 (1989))。

脂质体也可吸附于基本上任何类型的细胞, 然后释放包囊化的物质。或者, 脂质体与靶细胞融合, 从而脂质体的内容物注入靶细胞中。或者, 吸附的脂质体可以由吞噬性的细胞吞噬。胞吞后是脂质体脂质经溶酶体内降解及包囊化物质的释放(Scherphof et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 446, 368 (1985))。在本发明中, BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位可以定位于脂质体表面上, 以促进抗原呈递而不破坏脂质体或胞吞。然而, 不论机制或输送如何, 结果是相关的 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位在细胞内分布。

脂质体载体可以是阴离子或者阳离子载体。阴离子脂质体载体包括 pH 敏感性脂质体, 其在胞吞和内体(endosome)酸化后破坏内体膜或者与之融合。阳离子脂质体优选的是介导哺乳动物细胞体外转染或者一般输送核酸, 但是也可用于输送其它治疗剂如肽或脂肽。

阳离子脂质体制品是通过常规方法产生的(Feigner et al, Proc. Natl Acad. Sci USA 84, 7413 (1987); Schreier, Liposome Res. 2, 145 (1992))。可易于获得商业制品如 Lipofectin (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Md. USA)。给予的脂质体的量基于剂量应答曲线而优化(Feigner et al., 如前)。

本发明方法中使用的其它合适的脂质体包括多层脂质体 (multilamellar vesicle, MLV)、寡层脂质体 (oligolamellar vesicle, OLV)、单层脂质体(unilamellar vesicle, UV)、小单层脂质体(SUV)、中等大小的单层脂质体(MUV)、大单层脂质体(LUV)、巨大单层脂质体(GUV)、多泡脂质体(multivesicular vesicle, MW)、通过反相蒸发方法(REV)产生的单层或寡层脂质体、通过反相蒸发方法产生的多层脂质体(MLV-REV)、稳定的多层脂质体(stable plurilamellar vesicle, SPLV)、冷冻或解冻的 MLV (FATMLV)、通过挤出方法(VET)制备的脂质体、通过 French press 制备的脂质体(FPV)、通过融合制备的脂质体(FUV)、脱水-再水合脂质体(DRV)及泡沫体 (bubblesomes, BSV)。本领域技术人员意识到制备这些脂质体的技术为本领域所熟知(见 COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, vol. 66, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc. 1994)。

本发明还涵盖了其它形式的输送 BSX 蛋白或其免疫原性片段或表位的输送颗粒，例如微球体等。

制备合适的配制品和药理学有效运载体的指导见例如并入参考的 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 83—92 章, 第 1519—1714 页所述(Mack Publishing Company 1990) (Remington's)。

或者,通过给予自体同源或同种异源的抗原呈递细胞(APC) 或者已经在体外处理以将所述肽呈递在其表面上的树突细胞,将所述肽或其衍生物或变体制配为细胞疫苗。

本发明还涵盖了基于核酸的疫苗,所述疫苗包含例如编码免疫学活性 BSX 蛋白或表位的 DNA 或 RNA 的核酸,及克隆进合适载体中(例如痘苗病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒或其它真核病毒载体)。优选地,将编码 BSX 蛋白的 DNA 配制成 DNA 疫苗,例如组合现有的 Calmette-Guerin (BCG)或者免疫佐剂如痘苗病毒、Freund's 佐剂或者另一种免疫刺激剂。

参考如下非限制性实施例进一步描述本发明。

实施例 1：用于进行蛋白质组学分析的血清的制备

将 HIV⁺和结核分支杆菌培养呈阳性的血清及 HIV⁺ 结核分支杆菌培养呈阴性的血清独立地解冻及处理。加入 CHAPS 至终浓度为 0.5% (w/v)。然后将样品与 9 份的冷(-20℃)丙酮混和，在-20℃沉淀大约 1 小时。将该沉淀物在 4℃以 5000 g 离心沉淀 20 分钟，通过在 10 份的 7 M 尿素、2 M 硫脲、CHAPS 2%、5 mM Tris 中旋动而再悬浮。将此悬浮液用 5mM 三丁基膦在室温还原 1 小时，然后用 15 mM 碘乙酰胺 (碘乙酰胺新鲜制备成 300 mM 的溶液) 烷基化 1 小时。

实施例 2：分析方法

多通道电泳(Multi Compartmental Electrophoresis)

通过将 2.5μl TEMED 及 5μl 的 40% APS 与 immobiline 溶液组合，在这一溶液中浸泡微纤维玻璃滤纸并在 50℃干燥 1 小时，而在 pH 3、5.5、6.3 和 10.5 制备 MCE 膜。干燥后，将该膜在 7M 尿素中洗涤 4 次 30 分钟。

将还原和烷基化的样品加样于 MCE 的中心腔室 (central chamber) 中。与该中心腔室相邻的各腔室加样 7 M 尿素、2 M 硫脲和 CHAPS 2%。末端的酸性腔室加样 7 M 尿素、2 M 硫脲和正磷酸(最终浓度 0.28% v/v)。酸性腔室溶液的 pH 为大约 2.5，并用正磷酸调节使其比相邻腔室 pH 值低大约 0.5 pH 单位。将末端碱性腔室加样 7 M 尿素、2 M 硫脲和大约 7 mM 氢氧化钠(从 10 M 原液中稀释)。将碱性腔室溶液的 pH 调节为大约 11，高于相邻腔室 pH 值大约 0.5 pH 单位。每个腔室在实验期间均强力搅拌。

将样品在 600—800 伏特及恒定瓦特在 MCE 中聚焦 40—48 小时。从每个腔室中取样，用移液管分成 1ml 等份，在-80℃贮存。每个大

的 MCE 运行产生 3 个级分：酸(pH3—5.5)，白蛋白(5.5—6.3)和碱(6.3—10.5)。

第一向电泳 (first dimension electrophoresis)

根据实验目的，将样品用 7cm 或者 11cm LPG 条集中 (focus)。所述 7 cm 条在 45,000—50,000 Vh 集中；所述 11 cm 条在大约 110,000 Vh 集中。

第二向电泳

将所有条带均使用 Invitrogen NuPage Bis-Tris 4-12%、1.5 mm、2D mini 凝胶或者 Proteome Systems 11 cm Gel Chips 电泳。当在 Invitrogen NuPage Bis-Tris 凝胶中电泳 11 cm 条时，将 IPG 条切成两半。将每一半加样于单独的凝胶中。如 Invitrogen 所述，将 IPG 条包埋在制备于 1 × MOPS 凝胶电泳缓冲液中的 0.5% 琼脂糖中。所述凝胶电泳程序为以 5 mA/凝胶电泳 30 分钟，以 10 mA/凝胶电泳 30 分钟，及以 30 mA/凝胶电泳直至追踪染料距离凝胶底部大约 3mm。Proteome Systems Gel Chips 在 50 mM Tris、50 mM Tricine、1% SDS 中以 50mA/凝胶电泳 1.1—1.3 小时。凝胶用 G-250 胶体考马斯蓝或 SyproRuby 或银染色。用 SyproRuby 染色的凝胶在染色之前首先固定在 2 次变化的 7% 乙酸和 10% 甲醇中，在相同试剂中脱色过夜。

质谱分析

将双向(2D)凝胶用 AlphaInnotech 凝胶成像仪成像和/或使用 HP ScanJet 5200C 扫描成文件。切下 2D 凝胶中的蛋白质斑点，置于 150 μ l 50% v/v 乙腈(MeCN)中，用胶带密封，在 30℃ 保温 1 小时以除去考马斯蓝染色。除去 MeCN，将凝胶片在烤箱中干燥 20 分钟。将在 30 μ l 的 50 mM NH_4HCO_3 缓冲液中的 5 μ g/ml 胰蛋白酶加入凝胶片中，在 30℃ 消化过夜。在用胰蛋白酶消化过夜后，提取肽并使用 MAP π /8

自动加样于指定平板中。在这个步骤之后，剩余的蛋白质提取物贮存在 -20°C 以备进一步分析。注意如果材料是用于 LC MS-MS 分析而不是 MALDI 或 MALDI PSD 分析，则最后的 MAP $\pi/8$ 步骤可以省略。因此，根据实验目的，可以使用如下 MS 技术的任何组合用于 i) 鉴别或者 ii) 核实推定的鉴别：MALDI-MS-TOF、MALDI-MS-TOF-PSD 和 LC MS-MS，包括 nano-spray LC-MS-MS。对于 MALDI 分析，使用 Shimadzu Kratos Axima-CFR 或者 Bruker Biflex III 仪器。

生物信息学分析

在自动收集质谱峰之后，如下处理数据。首先检测所有质谱的肽质量正确校准。然后处理质谱以除去包括相应于胰蛋白酶峰和基质的质量在内的背景噪声。然后针对可公开获得的 SwissProt 和 TrEMBL 数据库，使用 Proteome Systems 搜索引擎 IonIQ v69 检索该数据。针对相同的数据库使用内部搜索引擎 FragmentastIQ 检索 PSD 数据。针对所述数据库使用 SEQUEST 搜索引擎软件检索 LC MS-MS 数据。

实施例 3：结核分支杆菌感染的诊断标记的鉴别

在 TB^+ZHIV^+ 样品(凝胶编号 P802，蛋白质斑点 17)中鉴别了等电点为大约 5.23 及分子量为大约 15356 道尔顿的蛋白质。有六种来自 MALDI-TOF 数据库中的肽(SEQ ID NO:48–53)匹配这种蛋白质，其中两种具有 1 个漏掉的 (missed) 裂解，四种没有漏掉的裂解。这六种肽(SEQ ID NO:48–53)覆盖 GenBank 登记号为 No. 053759 (SEQ ID NO:1) 的蛋白质的百分比为 32.1%，提示这些肽片段衍生自相同的蛋白质标记。有两种肽具有甲硫氨酸亚砷修饰。这些数据示于表 1，并且是从用于分析 PMF 数据的 IonIQ 数据库中提取的。

基于通常在 XRE 家族样蛋白质(即结合某些原核生物基因(例如 Cro、cl、HipB)的上游区域中的顺式作用 xenobiotic 应答元件的转录

调节蛋白)中发现的螺旋-转角-螺旋基序的存在, 将经鉴别具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的蛋白质称作 BSX,。

SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列相应于从结核分支杆菌基因组的开放读框的 *in silico* 翻译中鉴别的一种结核分支杆菌假设蛋白质。因此, 本文首次揭示了结核分支杆菌的 BSX 蛋白在人宿主的活动性结核病感染期间被表达。这些数据提示在 TBVHIV⁺血清中鉴别的结核分支杆菌 BSX 蛋白是制备结核病的诊断和治疗试剂的良好候选蛋白。

表 1: 结核分支杆菌感染的诊断标记的鉴别

肽 ID=肽身份编号
DB 质量=肽的理论质量
User 质量=肽的观察质量
PPM error=以百万分之份数表示的与肽质量相关的误差
MC=错误裂解
Pep Start=肽起始处的氨基酸编号
Pep End=肽末端的氨基酸编号
Mods=修饰
登录号: 053759 序列名称: 推定的调节蛋白 (转录调节物, PbsX 家族)
物种: 结核分支杆菌 分子量: 15356 等电点: 5.23
MSSEEKLAAK VSTKASDVAS DIGSFIRSQR ETAHVSMRQL AERSGVSNPY LSQVERGLRK PSADVLSQIA
KALRVSAEVL YVRAGILEPS ETSQVRDAITDAITERQK QILLDIYASF THQNEATREE CPSDPTPTDD (SEQ ID NO:1)

氨基酸覆盖: 45 覆盖百分比: 32.14%

肽 ID	DB 质量	User 质量	PPM 误差	MC	Pep Start	Pep End	Mods	序列
O53759.06.1.0.10000T	726.297980	726.225000	100.4923	0	1	6	MSO:1	MSSEEK(SEQ ID NO:48)
O53759.06.31.0.10000T	946.441620	946.506000	-68.0186	0	31	38	MSO:1	ETAHVSMR(SEQ ID NO:49)
O53759.06.15.0.00000T	1337.670080	1337.710000	-29.8420	0	15	27		ASDVASDIGSFIR(SEQ ID NO:50)
O53759.06.44.0.00000T	1435.718110	1435.700000	12.6141	0	44	56		SGVSNPYLSQVER(SEQ ID NO:51)
O53759.06.15.1.00000T	1708.861800	1708.850000	6.9052	1	15	30		ASDVASDIGSFIRSQR(SEQ ID NO:52)
O53759.06.39.1.00000T	2033.041560	2032.990000	25.3617	1	39	56		QLAERSGVSNPYLSQVER (SEQ ID NO:53)

实施例 4：结核分支杆菌的 BSX 蛋白的 B 细胞表位作图

1.合成肽

为了鉴别 BSX 蛋白的免疫原性表位，从 SEQ ID NO:1 所示的一级氨基酸序列中产生一系列合成肽(PEPSET)。所述合成肽包含 SEQ ID NO:2—44 所示的氨基酸序列，它们与 SEQ ID NO:1 中相应片段的序列相比加入了额外的 N 末端和/或 C 末端序列延伸。

特别地，产生了一种合成肽(表 2 中#1)，其由 SEQ ID NO:1 的 N 末端 15 个残基及 C 末端延伸 Gly-Ser-Gly 组成。这种肽的基本肽序列如 SEQ ID NO:2 所示。PEPSET 中其它合成肽(即表 2 中#2 至#43)含有在分别由 SEQ ID No:3—44 所示的 BSX 的基本肽序列中加入的 N 末端延伸 Ser-Gly-Ser-Gly。

所述肽的结构如表 2 所示。除了基本肽序列即包含衍生自 SEQ ID NO:1 的序列及 N 末端和/或 C 末端延伸序列之外，表 2 中所示结构包括加入在每种肽的 N 末端和/或 C 末端的标记(例如生物素，BioCytAm)，以便于它们在免疫测定例如 ELISA 中的应用。相反，SEQ ID No:2—44 所示序列仅示出基本肽序列，即衍生自 SEQ ID NO:1 的序列及 N 末端和/或 C 末端延伸序列，不包括修饰的残基。技术人员使用肽合成及蛋白质的免疫学检测的标准方法能加入这种修饰。

表2

编号	肽结构	Hydro	MbI Wt	SEQ ID NO: (基本肽)
5	#1 生物素- MSSEKLAAKVSTKAGSG-BiocytAm	0.24	2,360.82	2
	#2 生物素- SGSGEEKLAAKVSTKASDV-NH2	0.07	2,089.37	3
	#3 生物素- SGSGLAAKVSTKASDVASD-NH2	0.16	1,976.21	4
	#4 生物素- SGSGKVSTKASDVASDIGS-NH2	0.13	1,978.18	5
	#5 生物素- SGSGTKASDVASDIGSFIR-NH2	0.25	2,080.32	6
10	#6 生物素- SGSGSDVASDIGSFIRSQR-NH2	0.20	2,151.36	7
	#7 生物素- SGSGASDIGSFIRSQRETA-NH2	0.18	2,151.36	8
	#8 生物素- SGSGIGSFIRSQRETAHVS-NH2	0.27	2,201.47	9
	#9 生物素- SGSGFIRSQRETAHVSMRQ-NH2	0.18	2,359.69	10
	#10 生物素- SGSGSQRETAHVSMRQLAE-NH2	0.13	2,256.52	11
15	#11 生物素- SGSGETAHVSMRQLAERSG-NH2	0.14	2,185.44	12
	#12 生物素- SGSGHVSMRQLAERSGVSN-NH2	0.17	2,184.46	13
	#13 生物素- SGSGMRQLAERSGVSNPYL-NH2	0.27	2,234.56	14
	#14 生物素- SGSGLAERSGVSNPYLSQV-NH2	0.31	2,133.38	15
	#15 生物素- SGSGRSGVSNPYLSQVERG-NH2	0.17	2,162.39	16
20	#16 生物素- SGSGVSNPYLSQVERGLRK-NH2	0.20	2,259.59	17
	#17 生物素- SGSGPYLSQVERGLRKPSA-NH2	0.22	2,214.55	18
	#18 生物素- SGSGSQVERGLRKPSADVL-NH2	0.17	2,168.48	19
	#19 生物素- SGSGERGLRKPSADVLSQI-NH2	0.19	2,182.50	20
	#20 生物素- SGSGLRKPSADVLSQIAKA-NH2	0.25	2,110.48	21
25	#21 生物素- SGSGPSADVL SQIAKALRV-NH2	0.36	2,081.44	22
	#22 生物素- SGSGDVLSQIAKALRVSAE-NH2	0.29	2,113.44	23
	#23 生物素- SGSGSQIAKALRVSAEVLV-NH2	0.38	2,161.53	24
	#24 生物素- SGSGAKALRVSAEVL YVRA-NH2	0.33	2,159.56	25
	#25 生物素- SGSGLRVSAEVL YVRAGIL-NH2	0.51	2,172.60	26
30	#26 生物素- SGSGSAEVL YVRAGILEPS-NH2	0.42	2,117.43	27
	#27 生物素- SGSGVL YVRAGILEPSETS-NH2	0.42	2,147.45	28
	#28 生物素- SGSGVRAGILEPSETSQVR-NH2	0.24	2,155.43	29
	#29 生物素- SGSGGILEPSETSQVRDAI -NH2	0.27	2,128.36	30
	#30 生物素- SGSGEPSETSQVRDAIITD-NH2	0.17	2,174.34	31
35	#31 生物素- SGSGETSQVRDAIITDTAI -NH2	0.28	2,146.38	32
	#32 生物素- SGSGQVRDAIITDTAITER-NH2	0.23	2,215.49	33
	#33 生物素- SGSGDAIITDTAITERQKQ-NH2	0.17	2,216.47	34
	#34 生物素- SGSGITDTAI TERQKQILL-NH2	0.35	2,256.62	35
	#35 生物素- SGSGTAI TERQKQILLDIY-NH2	0.38	2,318.70	36
40	#36 生物素- SGSGTERQKQILLDIYASF-NH2	0.37	2,338.69	37
	#37 生物素- SGSGQKQILLDIYASFTHQ-NH2	0.44	2,318.66	38
	#38 生物素- SGSGILLDIYAS FTHQNEA-NH2	0.47	2,248.52	39
	#39 生物素- SGSGDIYASFTHQNEATRE-NH2	0.15	2,295.45	40
	#40 生物素- SGSGASFTHQNEATREECF-NH2	0.14	2,233.40	41
45	#41 生物素- SGSGTHQNEATREECPSDP-NH2	0.03	2,227.35	42
	#42 生物素- SGSGNEATREECPSDPTPT-NH2	0.08	2,160.30	43
	#43 生物素- SGSGATREECPSDPTPTDD-OH	0.06	2,148.24	44

2.血清样品

用 PEPSET 的肽筛选 30 个 TB 阳性样品和 52 个 TB 阴性样品。这些样品包括来自南非(S.A.)祖鲁族人 TB 阳性个体、南非祖鲁族人 TB 阴性个体、南非高加索人 TB 阴性个体、世界卫生组织(WHO)未知种族的 TB 阳性个体、WHO 未知种族 TB 阴性个体、及澳洲高加索人 TB 阴性对照个体的血清及来自中国人 TB 阳性个体和中国人 TB 阴性个体的血浆。

使用如下所述开发的 ELISA 系统筛选样品的抗体存在情况。

3. ELISA 分析

将 Nunc-Immuno module maxisorp 孔在室温或者 4℃用于 milli-Q 水中稀释的 5 μ g/ml 链霉抗生物素以 100 μ l/孔浓度包被过夜度过周末。将链霉抗生物素从孔中轻轻拂去, 并将每个孔用含有 1.0% (w/v) 酪蛋白、0.1% (v/v) Tween 20 和 0.1% (w/v) Azide (封闭剂)的 200 μ l 磷酸盐缓冲盐水(PBS)封闭。1 小时后, 除去封闭剂, 经搅拌平板将每个孔用 100 μ l 于封闭剂中的生物素酰化的肽包被 1 小时。随后, 将每个孔用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤 5 次, 在吸水纸上干燥, 用干燥剂在 4℃贮存或者立即使用。接着的是与在封闭剂中 1:50 稀释的 50 μ l 患者血清或血浆搅拌保温 1 小时。在保温后, 将所有孔均使用 PBS/0.1% Tween 20 经层流洗涤 5 次, 轻拍干燥。然后向每个孔中加入 100 μ l 绵羊抗人 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)缀合物。将此缀合物在 PBS/0.1% (w/v)酪蛋白/0.1% (v/v) Tween 20/0.1% (w/v) 水杨乙汞(thimerosal)中 1:10,000 (v/v)稀释, 搅拌保温 1 小时。然后将每个孔使用 PBS/0.1% (v/v) Tween 20 洗涤 4 次, 使用 PBS 洗涤 2 次。最后, 向每个孔中加入 100 μ l 液体的基于 TMB 底物的系统(Sigma), 将孔在室温黑暗下保温 20 分钟。通过加入 100 μ l 的 0.5M 硫酸而终止反应。一式两份分析每种肽, 如果一式两份不呈现重复性则再次重复进行。

与患者样品一起，也测试了如下 4 个对照样品：

1. 阴性对照：链霉抗生物素/肽 24/无血清或血浆/缀合物；
2. 肽对照：链霉抗生物素/无肽/患者血清或血浆/缀合物；
3. 阳性对照：链霉抗生物素/肽 24/南非血清 7/缀合物；
4. 血清背景：无链霉抗生物素/无肽/患者血清或血浆/缀合物。

南非血清 7 由于其在初步的 ELISA 实验中的持续可再现阳性结果而用作阳性对照。

4. 数据分析

免疫原性肽代表肽吸光率分布中的异常值，根据通过计算正常统计学分值而进行的对数变换标准化而检测，并且以平均值和通过稳健 M 估计（robust M-Estimator）而估计的标准偏差表示。

5. 结果

对 TB 阳性和 TB 阴性样品针对抗体 BSX 抗体的存在进行的大规模筛选表明 47% 的 TB 阳性样品含有抗 BSX 抗体(表 3)。对于任一 BSX 肽测试呈阳性的 TB 阴性患者包括 1 个中国人、1 个南非高加索人及 1 个澳洲高加索人。

表 3：具有抗 BSX 蛋白抗体的患者数概述

患者的 TB 状态	具有抗 BSX 抗体的样品数		
	总人群	HIV+	HIV-
TB 阳性 (TB+)	14/30 (47%)	13/17 (76%)	1/13 (8%)
TB 阴性 (TB-) *	3/52 (6%)	0/6 (0%)	3/46 (7%)

* BSX 测试为阳性的对照患者无一对 BSX 肽 24 测试呈阳性

总患者群包括 HIV 状态的区别说明 TB/HIV 相关性，其中 76%

的含有抗 BSX 抗体的 TB 阳性样品也是 HIV⁺(表 3)。这一点在南非组样品中进一步得到证实, 其中 80%被筛选的南非 TB 阳性/HIV⁺样品含有 BSX 抗体(表 4)。

表 4: 含有抗 BSX 抗体的南非 TB 患者(HIV⁺和 HIV⁻)的比例

患者的 TB 状态	HIV+状态	HIV-状态
TB 阳性 (TB+)	12/15 (80%)	1/4 (25%)
TB 阴性 (TB-)	0/5 (0%)	1/26 (4%) *

* 这里包括南非高加索人 1/10 (10%)

表 5 例证了在南非 TB 阳性/ HIV⁺患者群中发现的抗 BSX 抗体的特异性和再现性 (recurrence)。全部 8 个 BSX 肽对于筛选的南非 TB 阳性/HIV⁺血清样品是独特的。抗 BSX 24 抗体(包含 SEQ ID NO:25 所示基本肽)在 12 例中的 9 例中发现, 抗 BSX 23 抗体(包含 SEQ ID NO:24 所示基本肽)在 12 例中的 3 例中出现, 抗 BSX 20 (包含 SEQ ID NO:21 所示基本肽)及抗 BSX 35 (包含 SEQ ID NO:36 所示基本肽)在 12 例中的 2 例中发现, 抗 BSX 13 (包含 SEQ ID NO:14 所示基本肽)、抗 BSX 19 (包含 SEQ ID NO:20 所示基本肽)、抗 BSX 21 (包含 SEQ ID NO:22 所示基本肽)及抗 BSX 42 (包含 SEQ ID NO:43 所示基本肽)仅在 12 例中的 1 例中发现。

表 5: 含有抗 BSX 抗体的南非祖鲁人 HIV⁺血清中的再现的肽

免疫原性 BSX 肽编号 (SEQ ID NO)	出现率
BSX 24(SEQ ID NO:25)	9/12
BSX 23(SEQ ID NO:24)	3/12
BSX 20(SEQ ID NO:21), BSX 35(SEQ ID NO:36)	2/12
BSX 13(SEQ ID NO:14), BSX 19(SEQ ID NO:20) BSX 21(SEQ ID NO:22), BSX 42(SEQ ID NO:43)	1/12

相反，针对 BSX 筛选的所有中国人患者血清均为 HIV⁻，并根据其肺部诊断分类(表 6)。无一肺部外或肺部 TB 阳性血浆含有 BSX 的抗体，而仅一个所筛选的 TB 阴性血浆含有针对一种 BSX 肽的抗 BSX 抗体。

表 6：显示肺部状态的中国人患者中含有抗 BSX 抗体的血浆比例

患者的 TB 状态	总数	肺 TB	肺外
TB 阳性 (TB+)	0/9(0%)	0/4(0%)	0/5 (0%)
TB 阴性 (TB-)	1/9(11%)	-	-

最后针对抗 BSX 抗体筛选的 TB 阳性组是 4 个未知种族来源的 WHO 血清样品。样品中有两个是 TB 阳性/HTV⁻，其中一个经测试 BSX 抗体阳性，特别是针对包含 SEQ ID NO:25 所示基本肽的 BSX 24 的抗体阳性。

在 3 个 TB 阴性样品中鉴别到抗 BSX 抗体，然而无论种族如何无一含有对于 TB 独特的 8 个候选肽的抗体。这 8 个候选肽包 SEQ ID NO:14、20、21、22、24、25、29、36。

6.讨论

对 TB 阴性和 TB 阴性血清或血浆进行 ELISA 分析鉴别了含有结核分支杆菌的全长 BSX 蛋白的 B 细胞表位的许多免疫原性 BSX 肽。

在测试的任何对照 TB 阴性血清或对照血浆中均未发现肽 BSX 24 (SEQ ID NO:25)是免疫原性的。也未发现任何这 8 个独特的候选肽在 TB 阴性南非祖鲁人对象血清中是免疫原性的，因此增强了 BSX 和/或其任何肽作为诊断试剂及作为免疫原制备适用于针对结核分支杆菌感染的基于抗原的测定中的单克隆抗体的适宜性。

另外，HIV 状态与 TB 状态之间关于 BSX 肽 24 (SEQ ID NO:25)

血清学反应性的相关性具有许多治疗性优势，例如可以检测 TB 和 HIV 状态和/或监测 HIV⁺个体中 TB 状态。为了进一步强调 TB 与 HIV 之间的相关性，重要的是注意到所有所研究的中国人样品均是 HIV 阴性的。

中国人患者群的血浆中可检测的抗 BSX 抗体的不存在与限于肺部的肺部 TB 相关，而在南非患者中 HIV 状态通常与肺外疾病相关，其是更全身性的。或者，BSX 在中国 TB 患者中不象在南非 TB 患者中那样高度表达。

实施例 5：针对衍生自 BSX 蛋白(SEQ ID NO:1)的合成肽对 TB 和非 TB 血清的筛选

1. 合成肽

从转录调节因子 PbsX 家族的氨基酸序列(SwissProt 登记号 053759)中合成三个肽，并作为人免疫球蛋白 G 的捕获剂在 TB 阳性血清中进行评价。一种称作 BSX (23-24)(SEQ ID NO:45)的肽包含在前述实施例中确定的 SEQ ID NO:25 所示的高免疫原性的肽的序列，并且具有额外的在全长蛋白质(SEQ ID NO:1)中位于这一序列两侧的 N 末端和 C 末端序列，且 C 末端与一个半胱氨酸残基缀合。称作 N-C 末端 (N-C terminal) 的另一种肽(SEQ ID NO:46)包含 SEQ ID NO: 1 的 N 末端 7 个残基，其通过一个间插的半胱氨酸残基与 SEQ ID NO:1 的 C 末端 7 个残基融合。称作肽 28 的第三种肽(SEQ ID NO:47) 包含 SEQ ID NO:29 所示序列，其在 C 末端与一个半胱氨酸残基缀合。这三种另外的肽的序列示于下表 7。

表 7：另外的肽的序列

BSX(23-24)肽	SQIAKALRVSAEVLVVRAC(SEQ ID NO:45)
N-C 末端	MSSEKLCDPTPTDD(SEQ ID NO:46)
肽 28	VRAGILEPSETSQVRC(SEQ ID NO:47)

对于 ELISA 形式, SEQ ID NO:45–47 所示的肽另外包含与前述实施例的基本肽连接的 N 末端接头(Ser-Gly-Ser-Gly), 以促进所述肽与固体基质的结合。

C 末端和内部半胱氨酸残基被包括进来是为了促进所述肽的交联以用于随后的抗体产生。

2. 血清

每个实验中的血清是得自 41–44 个 TB 阳性患者(即 TB 阳性血清)及 51 个健康对照对象(即非 TB 血清)的一组血清。

3. ELISA 分析

以 3 $\mu\text{g/mL}$ 将包含 SEQ ID NO:45–47 的肽包被在 ELISA 平板上的 5 $\mu\text{g/mL}$ 链霉抗生物素基底上, 然后(封闭后)用非 TB 对照血清和已知的 TB 阳性血清探查。血清在使用之前 1/50 (v/v)稀释。人 IgG 的捕获用酶联绵羊抗 HuIgG/四甲基联苯胺 (TMB)底物追踪。

4. 统计学分析

通过取平均底物产物 OD 值(来自缀合的过氧化物酶/TMB 反应)并计算在超出平均两标准偏差(two standard deviations above the average)和超出平均三标准偏差(three standard deviations above the mean)(即分别在 95%和 99.7%显著性水平)的截断值而分析敏感性和特异性。对于对照血清, 一个样品通过 Dixon's 异常值检验(N=30)产生了异常值 OD 值。比较包括和排除这一异常值的分析。

如本文所用, 所用的与诊断/预后测定相关联的术语“敏感性”是指使用特定的测定方法诊断的 TB 阳性对象的比例(即“真”阳性)。因此, 具有增加的敏感性的测定与具有降低或较低的敏感性的测定相

比能检测更高比例的 TB 感染的对象。

如本文所用，所用的与诊断/预后测定相关联的术语“特异性”是指使用特定测定方法不转成阳性结果的非 TB 对象（即未被感染的对象）的比例（即“真”阴性）。因此，具有增加或增强的特异性的测定与具有降低的特异性的测定相比假阳性结果更少或者能更大程度地区分感染的和未感染的对象。

4. 结果

a) BSX (23-24)肽(SEQ ID NO:45)

BSX (23-24)肽序列示出与证实的 TB 阳性血清的明显结合。敏感性与特异性数据概括示于表 8。表 8 中针对每个对象提供的数据表明包含 SEQ ID NO:45 所示序列的肽选择性鉴别患者血清中的抗结核分支杆菌的抗体。数据还示出使用这些修订的标准的敏感性和特异性无论异常值忽略与否是相对不变的，然而在 3 个标准偏差水平敏感性有边际增加。

表 8：BSX (23-24)肽(SEQ ID NO:45)的敏感性和特异性数据

	包括对照血清异常值的 %测定值		忽略对照血清异常值的 %测定值	
	2σ	3σ	2σ	3σ
检测 TB 阳性 血清的测定敏 感性 (n=41)	46.3%	43.9%	48.8%	46.3%
不检测 TB 阴 性血清的测定 特异性 (n=51)	94.1%	98.0%	92.0%	98.0%

b) N-C 末端(SEQ ID NO:46)和肽 28 (SEQ ID NO:47)

这两种肽示出与一些证实的 TB 阳性血清仅微弱相互作用。如表 9 和 10 所示, 如果忽略假阳性检测结果, 使用这些肽的测定不是高度敏感性的但却是特异性的。

表 9: N-C 末端肽 (SEQ ID NO:46) 的敏感性和特异性数据

	包括对照血清异常值的 %测定值		忽略对照血清异常值的 %测定值	
	2 σ	3 σ	2 σ	3 σ
检测 TB 阳性 血清的测定敏 感性 (n=41)	13.3%	6.7%	17.8%	8.9%
不检测 TB 阴 性血清的测定 特异性 (n=51)	95.8%	95.8%	93.6%	95.7%

表 10: 肽 28 (SEQ ID NO:47) 的敏感性和特异性数据

	包括对照血清异常值的 %测定值		忽略对照血清异常值的 %测定值	
	2 σ	3 σ	2 σ	3 σ
检测 TB 阳性 血清的测定敏 感性 (n=41)	11.1%	4.4%	未进行	未进行
不检测 TB 阴 性血清的测定 特异性 (n=51)	94.1%	96.1%	未进行	未进行

表 8—10 示出的数据表明 BSX (23-24)肽(SEQ ID NO:45)可用于基于抗体的测定中, 以检测患者样品、特别是血清中的结核病。本实施例中测试的其它两种肽(SEQ ID NO:46 和/或 47)也可用于消除假阳性的检测中, 例如与 SEQ ID NO:45 一起作为多分析物测试的一部分。鉴于前述实施例中呈现的数据, 即证实肽 23 和 24 (即分别为 SEQ ID

No:24 和 25) 特别是包含在 SEQ ID NO:45 序列中的 SEQ ID NO:25 组成或包含全长 BSX 蛋白的免疫原性 B 细胞表位, 这个发现不特别令人惊奇。

实施例 6: 针对重组全长 BSX 蛋白(SEQ ID NO:1)对 TB 和非 TB 血清的筛选

1. 血清

血清来自 44 个 TB 阳性(涂片或培养物)中国和南非患者(即 TB 阳性血清)及 44 个健康对照对象(即非 TB 血清)。

2. ELISA 测定

以 5 μ g/mL 将重组 BSX 蛋白(SEQ ID NO:1)或者 BSX (23-24)肽(SEQ ID NO:45) 直接包被在 ELISA 平板上, 然后(封闭后)用在缓冲液中 1/100 (v/v)稀释的非 TB 对照血清和已知 TB 阳性血清探查。人 IgG 的捕获用酶联绵羊抗 HulgG/四甲基联苯胺(TMB)底物追踪。

3. 统计学分析

通过取平均底物产物 OD 值(来自缀合的过氧化物酶/TMB 反应)并计算超出平均两标准偏差和超出平均三标准偏差的显著性(即分别在 95%和 99.7%显著性水平)的截断值而分析敏感性和特异性。

4. 结果

如表 11 所示, 在这些条件下测定的重组 BSX 蛋白在检测 TB 阳性血清中是高度特异性的。所述测定在测试人群中的敏感性居于 SEQ ID NO:45 与 SEQ ID NO:46—47 之中间。

另一方面, 所述测定在南非人涂片或培养物 TB 阳性血清中的敏感性高于总体的敏感性(即在三个标准偏差截断值为 35%对 25%)。使

用中国人涂片或培养物 TB 血清，所述测定的敏感性低于总体敏感性 (即在三个标准偏差截断值为 11%对 25%)。在中国和南非人群中，所述测定的特异性是 100%，表明这个参数的鲁棒性 (robustness)。

表 11:

重组 BSX 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的敏感性和特异性数据

	包括对照血清异常值的%测定值		忽略对照血清异常值的%测定值	
	2σ	3σ	2σ	3σ
检测 TB 阳性血清的测定敏感性 (n=44)	29.5%	25.0%	未进行	未进行
不检测 TB 阴性血清的测定特异性 (n=44)	95.5%	100.0%	未进行	未进行

实施例 7: 根据 HIV 状态对 TB 和非 TB 血清的筛选

1.血清

血清是得自如下对象的一组血清:

- (i) 5 个涂片或培养物 TB-阳性和 HIV-阴性的南非患者(即 TB⁺ HIV⁻血清);
- (ii) 21 个涂片或培养物 TB-阳性和 HIV-阳性的南非患者(即 TB⁺ HIV⁺血清);
- (iii) 20 个涂片或培养物 TB-阴性和 HIV 阴性对象 (即健康对照血清)。

2. ELISA 测定

以 5μg/mL 将重组 BSX 蛋白(SEQ ID NO:1)或 BSX (23-24)肽(SEQ ID NO:45) 直接包被在 ELISA 平板上，然后 (封闭后) 用在缓冲液中 1/100 (v/v)稀释的非 TB 对照血清和已知 TB 阳性血清探查。或者，

如前述实施例所述使用 BSX(23-24)肽。人 IgG 的捕获用酶联绵羊抗 HulgG/四甲基联苯胺(TMB)底物追踪。

3. 统计学分析

通过取平均底物产物 OD 值(来自缀合的过氧化物酶/TMB 反应)并计算超出平均两标准偏差和超出平均三标准偏差的显著性(即分别在 95%和 99.7%显著性水平)的截断值而分析敏感性和特异性。

4. 结果

如表 12 所示,在这些条件下测定的重组 BSX 蛋白在检测 TB 阳性血清中是高度特异性的。所述测定对测试人群的敏感性对于 HIV⁺患者也非常高。使用 BSX(23-24)肽获得相似结果。因此,全长重组 BSX 蛋白和 BSX(23-24)肽独立地检测约 40—45%的 TB⁺HIV⁺ 对象,在多分析物测试形式中检测约 65%—70%的 TB⁺HIV⁺ 对象,仅大约 5%为假阳性。

另一方面,所述测定在南非人涂片或培养物 TB 阳性血清中的敏感性高于总体的敏感性(即在三个标准偏差截断值对比为 35%对 25%)。使用中国人涂片或培养物 TB 血清,所述测定的敏感性低于总体敏感性(即在三个标准偏差截断值为 11%对 25%)。在中国和南非人群中,所述测定的特异性是绝对的,即 100%,表明这个参数的鲁棒性。

表 12

重组 BSX 蛋白 (SEQ ID NO:1) 的敏感性和特异性

	重组 BSX (SEQ ID NO:1)	BSX(23-24)肽 (SEQ ID NO:45)	组合的 (蛋白质和肽)
检测 TB ⁺ HIV ⁻ 血清的测定敏感性 (n=5)	0%	0%	0%
检测 TB ⁺ HIV ⁺ 血清的测定敏感性 (n=21)	40%	43%	67%
对组合 TB ⁺ HIV ⁺ 和 TB ⁺ HIV ⁻ 血清的测定敏感性 (n=26)	31%	35%	54%
对健康对照血清的测定敏感性 (n=20)	0%	5%	5%
不检测 TB ⁺ 血清的测定特异性 (n=20)	100%	95%	95%

这些数据表明全长 BSX 蛋白，例如重组蛋白质，可与包含本发明鉴别的显性 B 细胞表位的合成肽例如肽 24 (SEQ ID NO:25)或 BSX(23-24) 肽(SEQ ID NO:45)组合使用，以诊断结核分支杆菌的活动性感染或近期继往感染的存在。

例如，重组全长 BSX (SEQ ID NO:1)和 BSX(23-24)肽均是生物素酰化的且固定在已经预先附着在微滴定平板的孔上的链霉抗生物素基底(5 μ g/ml)上。进行标准 ELISA 反应，其中(i)将在缓冲液中 1/100 (v/v)稀释的患者血清和对照血清加入单独的孔中，(ii) 固定化蛋白质和肽对血清中人 IgG 的捕获使用经四甲基联苯胺 (TMB)底物检测的酶联绵羊抗 HuIgG 追踪。

<110> 蛋白质组系统知识产权有限公司

<120> 结核分支杆菌感染的诊断和治疗方法及所用试剂

<130> 124450/MRO

<150> US 60/603243

<151> 2004-08-19

<160> 55

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> M. tuberculosis Bsx protein

<400> 1

Met Ser Ser Glu Glu Lys Leu Ala Ala Lys Val Ser Thr Lys Ala Ser
1 5 10 15

Asp Val Ala Ser Asp Ile Gly Ser Phe Ile Arg Ser Gln Arg Glu Thr
20 25 30

Ala His Val Ser Met Arg Gln Leu Ala Glu Arg Ser Gly Val Ser Asn
35 40 45

Pro Tyr Leu Ser Gln Val Glu Arg Gly Leu Arg Lys Pro Ser Ala Asp
50 55 60

Val Leu Ser Gln Ile Ala Lys Ala Leu Arg Val Ser Ala Glu Val Leu
65 70 75 80

Tyr Val Arg Ala Gly Ile Leu Glu Pro Ser Glu Thr Ser Gln Val Arg
85 90 95

Asp Ala Ile Ile Thr Asp Thr Ala Ile Thr Glu Arg Gln Lys Gln Ile
100 105 110

Leu Leu Asp Ile Tyr Ala Ser Phe Thr His Gln Asn Glu Ala Thr Arg
115 120 125

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Thr Pro Thr Asp Asp
130 135 140

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 2

Met Ser Ser Glu Glu Lys Leu Ala Ala Lys Val Ser Thr Lys Ala
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 3

Glu Glu Lys Leu Ala Ala Lys Val Ser Thr Lys Ala Ser Asp Val
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 4

Leu Ala Ala Lys Val Ser Thr Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Asp
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 5

Lys Val Ser Thr Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 6

Thr Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Asp Ile Gly Ser Phe Ile Arg
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 7

Ser Asp Val Ala Ser Asp Ile Gly Ser Phe Ile Arg Ser Gln Arg
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 8

Ala Ser Asp Ile Gly Ser Phe Ile Arg Ser Gln Arg Glu Thr Ala
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 9

Ile	Gly	Ser	Phe	Ile	Arg	Ser	Gln	Arg	Glu	Thr	Ala	His	Val	Ser
1				5					10					15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 10

Phe	Ile	Arg	Ser	Gln	Arg	Glu	Thr	Ala	His	Val	Ser	Met	Arg	Gln
1				5					10					15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 11

Ser	Gln	Arg	Glu	Thr	Ala	His	Val	Ser	Met	Arg	Gln	Leu	Ala	Glu
1				5					10					15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 12

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

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 13

His	Val	Ser	Met	Arg	Gln	Leu	Ala	Glu	Arg	Ser	Gly	Val	Ser	Asn
1				5					10					15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 14

Met	Arg	Gln	Leu	Ala	Glu	Arg	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Pro	Tyr	Leu
1				5					10					15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 15

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

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 16

Arg	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Pro	Tyr	Leu	Ser	Gln	Val	Glu	Arg	Gly
1				5					10					15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 17

Val	Ser	Asn	Pro	Tyr	Leu	Ser	Gln	Val	Glu	Arg	Gly	Leu	Arg	Lys
1				5					10					15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 18

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

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 19

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

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 20

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

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 21
Leu Arg Lys Pro Ser Ala Asp Val Leu Ser Gln Ile Ala Lys Ala
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 22
Pro Ser Ala Asp Val Leu Ser Gln Ile Ala Lys Ala Leu Arg Val
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 23
Asp Val Leu Ser Gln Ile Ala Lys Ala Leu Arg Val Ser Ala Glu
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 24

Ser Gln Ile Ala Lys Ala Leu Arg Val Ser Ala Glu Val Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 25

Ala Lys Ala Leu Arg Val Ser Ala Glu Val Leu Tyr Val Arg Ala
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 26

Leu Arg Val Ser Ala Glu Val Leu Tyr Val Arg Ala Gly Ile Leu
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 27

Ser Ala Glu Val Leu Tyr Val Arg Ala Gly Ile Leu Glu Pro Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 28

Val	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Gly	Ile	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Thr	Ser
1				5					10					15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 29

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

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 30

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

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 31

Glu	Pro	Ser	Glu	Thr	Ser	Gln	Val	Arg	Asp	Ala	Ile	Ile	Thr	Asp
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 32

Glu Thr Ser Gln Val Arg Asp Ala Ile Ile Thr Asp Thr Ala Ile
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 33

Gln Val Arg Asp Ala Ile Ile Thr Asp Thr Ala Ile Thr Glu Arg
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 34

Asp Ala Ile Ile Thr Asp Thr Ala Ile Thr Glu Arg Gln Lys Gln
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 35

Ile Thr Asp Thr Ala Ile Thr Glu Arg Gln Lys Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 36

Thr Ala Ile Thr Glu Arg Gln Lys Gln Ile Leu Leu Asp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 37

Thr Glu Arg Gln Lys Gln Ile Leu Leu Asp Ile Tyr Ala Ser Phe
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 38

Gln Lys Gln Ile Leu Leu Asp Ile Tyr Ala Ser Phe Thr His Gln
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 39

Ile Leu Leu Asp Ile Tyr Ala Ser Phe Thr His Gln Asn Glu Ala
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 40
Asp Ile Tyr Ala Ser Phe Thr His Gln Asn Glu Ala Thr Arg Glu
1 5 10 15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 41
Ala Ser Phe Thr His Gln Asn Glu Ala Thr Arg Glu Glu Cys Pro
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 42
Thr His Gln Asn Glu Ala Thr Arg Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence
<400> 43

Asn Glu Ala Thr Arg Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Thr Pro Thr
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence

<400> 44

Ala Thr Arg Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Thr Pro Thr Asp Asp
1 5 10 15

<210> 45

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence coupled to c
ysteine

<400> 45

Ser Gln Ile Ala Lys Ala Leu Arg Val Ser Ala Glu Val Leu Tyr Val
1 5 10 15

Arg Ala Cys

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic fusion peptide comprising N-terminal and C-terminal por
tions of SEQ ID NO: 1 coupled by internal cysteine residue

<400> 46

Met Ser Ser Glu Glu Lys Leu Cys Asp Pro Thr Pro Thr Asp Asp
1 5 10 15

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> synthetic peptide derived from SEQ ID NO: 1 sequence coupled to cysteine residue

<400> 47

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

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1

<400> 48

Met	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys
1				5	

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1

<400> 49

Glu	Thr	Ala	His	Val	Ser	Met	Arg
1				5			

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1

<400> 50

Ala	Ser	Asp	Val	Ala	Ser	Asp	Ile	Gly	Ser	Phe	Ile	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10
<210> 51 <211> 13 <212> PRT <213> artificial sequence <220> <223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1 <400> 51 Ser Gly Val Ser Asn Pro Tyr Leu Ser Gln Val Glu Arg 1 5 10		
<210> 52 <211> 16 <212> PRT <213> artificial sequence <220> <223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1 <400> 52 Ala Ser Asp Val Ala Ser Asp Ile Gly Ser Phe Ile Arg Ser Gln Arg 1 5 10 15		
<210> 53 <211> 18 <212> PRT <213> artificial sequence <220> <223> sequence of MALDI-TOF peptide fragment present in TB+/HIV+ sample also present in SEQ ID NO: 1 <400> 53 Gln Leu Ala Glu Arg Ser Gly Val Ser Asn Pro Tyr Leu Ser Gln Val 1 5 10 15 Glu Arg		
<210> 54 <211> 26 <212> PRT		

<213> artificial sequence

<220>

<223> immuogenic peptide derived from M. tuberculosis glutamine synthetase

<400> 54

Arg Gly Thr Asp Gly Ser Ala Val Phe Ala Asp Ser Asn Gly Pro His
1 5 10 15

Gly Met Ser Ser Met Phe Arg Ser Phe Cys
20 25

<210> 55

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> immuogenic peptide derived from M. tuberculosis glutamine synthetase

<400> 55

Trp Ala Ser Gly Tyr Arg Gly Leu Thr Pro Ala Ser Asp Tyr Asn Ile
1 5 10 15

Asp Tyr Ala Ile Cys
20