



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109791148 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780059893.9

(22)申请日 2017.09.29

(30)优先权数据

62/402,014 2016.09.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/074812 2017.09.29

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/060447 EN 2018.04.05

(71)申请人 普洛米生科有限公司

地址 瑞典索尔纳

(72)发明人 贝斯顿·哈马苏尔

莱克·伊格纳托维茨

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 卓晓曦

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

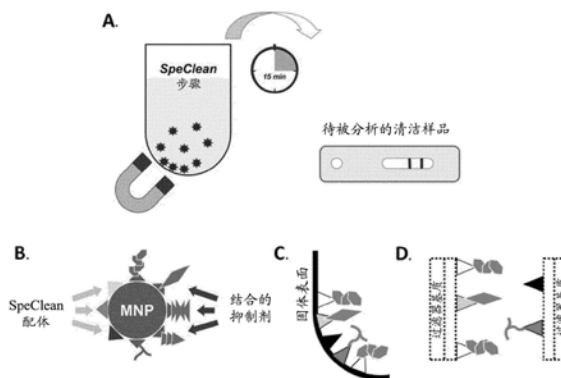
权利要求书4页 说明书14页  
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

用于去除抑制性组分的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在的体外方法,所述诊断样品包含选自自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体。该方法包括以下步骤:a)使所述样品与固相接触,所述固相具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的一种或更多种抑制性组分具有亲和力并且能够与其结合;b)允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述固相上存在的一种或更多种配体,从而减少所述样品中所述一种或更多种抑制性组分的量;以及其后c)检测所述诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在。所述一种或更多种抑制性组分的特征为能够与步骤c)中的检测结合并且干扰步骤c)中的检测。



1. 一种用于检测诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在的体外方法,所述诊断样品包含选自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体,所述方法包括以下步骤:

a) 使所述样品与固相接触,所述固相具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的一种或更多种抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的一种或更多种抑制性组分结合;

b) 允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述固相上存在的一种或更多种配体,从而减少所述样品中所述一种或更多种抑制性组分的量;以及其后

c) 检测所述诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在,

其中所述一种或更多种抑制性组分的特征为能够与步骤c)中的所述检测结合并且干扰步骤c)中的所述检测。

2. 如权利要求1所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分包括蛋白和碳水化合物的混合物。

3. 如权利要求2所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分具有5kDa-1000kDa的分子量。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分包括至少一种糖蛋白。

5. 如任一前述权利要求所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分选自由以下组成的组:Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

6. 如权利要求4所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分选自由以下组成的组:载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白。

7. 如前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中步骤b)还包括以下步骤:

b1) 将包含所述一种或更多种疾病相关组分的所述样品与所述一种或更多种抑制性组分已结合至其的所述固相分离。

8. 如前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述固相是一种或更多种颗粒的表面,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其至少一部分的一种或更多种所述配体。

9. 如权利要求7和8所述的体外方法,其中步骤b)还包括步骤b1)从所述生物样品中去除所述一种或更多种颗粒。

10. 根据权利要求6或7所述的体外方法,其中所述颗粒是纳米颗粒或微米颗粒。

11. 根据权利要求8-10中任一项所述的体外方法,其中所述颗粒是磁性颗粒或乳胶颗粒。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的体外方法,其中所述颗粒通过使用磁体从所述生物流体中被去除。

13. 根据权利要求9-11中任一项所述的体外方法,其中所述颗粒通过使用离心从所述生物流体中被去除。

14. 根据权利要求9-11中任一项所述的体外方法,其中所述颗粒通过使用过滤从所述生物流体中被去除。

15. 根据权利要求1-7中任一项所述的体外方法,其中所述固相是膜或固体表面。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中步骤c)包括:使所述样品与抗疾病相关组分抗体(检测抗体)接触,以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。

17. 如权利要求16所述的体外方法,其中步骤c)包括:将颗粒添加至所述诊断样品,所述颗粒在其表面的至少一部分上包被有抗疾病相关组分抗体;以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。

18. 如权利要求16或17所述的体外方法,其中所述检测通过添加化学试剂来进行。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述生物流体选自自由以下组成的组:尿液、痰液、唾液以及脑脊液。

20. 根据权利要求19所述的体外方法,其中所述生物流体选自自由以下组成的组:尿液、痰液以及唾液。

21. 根据权利要求20所述的体外方法,其中所述生物流体是尿液。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种疾病相关组分包括抗原。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种疾病相关组分包括整个细菌、细胞、病毒或其片段。

24. 如前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种疾病相关组分包括至少一种多糖。

25. 如前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种疾病相关组分包括至少一种病原体来源的组分。

26. 如权利要求25所述的体外方法,其中所述至少一种病原体来源的组分是多糖。

27. 根据权利要求26所述的体外方法,其中所述疾病相关组分是结核分枝杆菌(*Mycobacterium Tuberculosis*)抗原,例如LAM。

28. 根据权利要求25所述的体外方法,其中所述疾病相关组分选自磷酸肌醇甘露糖苷、脂甘露聚糖、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)C多糖以及人类内源性抗原PC(磷酸胆碱)。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述一种或更多种配体对蛋白具有亲和力。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述配体是生物分子,例如合成肽。

31. 根据权利要求30所述的体外方法,其中所述配体是生物分子,所述生物分子对以下组分中的一种或更多种具有亲和力:Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

32. 根据权利要求31所述的体外方法,其中所述配体是生物分子,所述生物分子对以下组分中的一种或更多种具有亲和力:载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白。

33. 根据权利要求1至29中任一项所述的体外方法,其中所述配体是化学分子。

34. 根据权利要求33所述的体外方法,其中所述配体选自自由以下组成的组:4-巯基苯硼酸、胺重氮苯化合物以及多粘菌素。

35. 如前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述固相包含对不同抑制性组分具有亲和力的不同配体。

36. 根据权利要求35所述的体外方法,其中所述固相包含对选自由以下组成的组的不同抑制性组分具有亲和力的不同配体: Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

37. 一种用于检测诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在的体外方法,所述诊断样品包含选自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体,所述方法包括以下步骤:

a) 减少所述生物流体中一种或更多种抑制性组分的量,以提供经清洁的诊断样品,其中所述一种或更多种抑制性组分包括至少一种蛋白;以及

b) 检测步骤a)的所述经清洁的诊断样品中所述一种或更多种疾病相关组分的存在。

38. 根据权利要求37所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分选自由以下组成的组: Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

39. 根据权利要求37或38所述的体外方法,其中所述一种或更多种抑制性组分是选自由以下组成的组的至少两种抑制性组分: 载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白。

40. 一种用于从诊断样品中去除一种或更多种抑制性组分的体外方法,所述诊断样品包含选自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体,所述方法包括以下步骤:

a) 将一种或更多种颗粒添加至所述样品,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其表面的至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合;

b) 允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述颗粒;以及

c) 从样品中去除所述颗粒,

其中所述抑制性组分的特征为当在随后的免疫测定中使用能够干扰所述诊断样品的组分。

41. 一种固相,所述固相用于在随后在免疫测定中使用诊断样品之前从所述诊断样品中去除抑制性组分中使用,所述固相具有缀合至其至少一部分的至少两种不同类型的配体,所述配体对不同抑制性组分具有亲和力并且能够与所述不同抑制性组分结合,其中所述抑制性组分的特征为能够干扰所述诊断免疫测定。

42. 根据权利要求41所述的固相,其中所述配体如权利要求29-35的任一项中所定义。

43. 根据权利要求41或2所述的固相,其中所述固相具有缀合至其至少一部分的不同配体,使得所述配体对选自由以下组成的组的至少两种抑制性组分具有亲和力: Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

44. 根据权利要求41-43中任一项所述的固相,其中所述固相是至少一种颗粒。

45. 根据权利要求44所述的固相,其中所述颗粒是纳米颗粒或微米颗粒。

46. 根据权利要求44或45所述的固相,其中所述颗粒是磁性颗粒或乳胶颗粒。

47. 根据权利要求44-46中任一项所述的固相,其中所述颗粒是表面活化的磁性颗粒。

48. 根据权利要求41至47中任一项所述的固相用于制备和/或清洁诊断样品的用途,所

述诊断样品用于在随后的免疫测定中使用。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中所述用途涉及在进行诊断免疫测定之前从所述诊断样品中去除一种或更多种抑制性组分或减少一种或更多种抑制性组分的量。

50. 一种部件试剂盒,所述部件试剂盒包含:

- a) 用于在免疫测定中捕获和检测一种或更多种疾病相关组分的装置,以及
- b) 用于减少生物流体中一种或更多种抑制性组分的量的装置,其中所述一种或更多种抑制性组分包括至少一种蛋白。

51. 根据权利要求50所述的部件试剂盒,其中用于减少生物流体中一种或更多种抑制性组分的量的所述装置包括一种或更多种根据权利要求39至45中任一项所述的固相。

52. 根据权利要求50或51所述的部件试剂盒,其中所述至少一种蛋白选自由以下组成的组: Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

53. 根据权利要求50-52中任一项所述的部件试剂盒,其中所述一种或更多种疾病相关组分是结核分枝杆菌抗原,例如LAM。

## 用于去除抑制性组分的方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及诊断免疫测定领域,并且更具体地,涉及诊断免疫测定灵敏度的改进。

[0002] 发明背景

[0003] 免疫测定被广泛地用作用于通过抗原与抗体的反应来测量溶液中分子的浓度或存在的生物化学测试。分析通过测量标记物活性例如辐射、荧光或酶活性来实现。

[0004] 一个重要的应用是疾病的诊断,其中免疫测定被用于检测生物流体中小浓度的疾病相关分子。作为实例,结核病(TB)是一种多层面的疾病,并且在工业化国家和发展中国家两者中均是有挑战性的公共健康问题,使全世界每年死亡300万人。根据世界卫生组织(the World Health Organisation),约三分之一的世界人口感染有结核分枝杆菌复合群(mycobacterium tuberculosis complex)的细菌,并且结核病占有可避免的成人死亡的26%,这使得它成为最常见的致命性传染性疾病。因此,TB的有效控制要求破坏传播链,这继而要求早期且精确的检测,随后是立即治疗。

[0005] 尽管诸如结核病、疟疾、HIV的传染性疾病的巨大的全球负担,但用于活动性疾病的诊断的目前测试是不充分的并且具有严重的限制。因此,对用于改进诊断测试的灵敏度和精确度的方法存在需求。

[0006] 发明概述

[0007] 以上呈现的问题现在通过提供一种新颖的方法、一种固相和一种试剂盒已经被克服或至少被缓解,所述固相和试剂盒包含缀合至所述固相的能够从体液中去掉抑制剂的一种或更多种配体。

[0008] 作为本发明的第一方面,提供了一种用于检测诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在的体外方法,所述诊断样品包含选自自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体,所述方法包括以下步骤:

[0009] a) 使所述样品与固相接触,所述固相具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合;

[0010] b) 允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述固相上存在的一种或更多种配体,从而减少所述样品中所述一种或更多种抑制性组分的量;以及其后

[0011] c) 检测所述诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在,

[0012] 其中所述一种或更多种抑制性组分的特征为能够与步骤c)中的检测结合并且干扰步骤c)中的检测。

[0013] 本发明基于以下认识:若干种体液包含可以在免疫测定中阻断可检测复合物的形成的抑制剂。因此,本发明人已经发现抑制性组分的存在负面地影响免疫测定的测试性能。因此,抑制剂的存在可能导致没有信号是可见的或被记录,并且因此即使样品包含靶抗原,样品也可能被认为是阴性的。为了克服此问题并逆转回损失的信号,本发明人已经发现减少此类抑制剂的浓度的方式,这可以在随后的免疫测定中导致更高的灵敏度。

[0014] 在本公开内容的上下文中,抑制性组分可以包括蛋白和碳水化合物的混合物。例

如,抑制性组分可以具有约5kDa-1000kDa的分子量。在本发明的所有方面中,抑制性组分可以包括至少一种蛋白,例如至少一种糖蛋白。

[0015] 在本公开内容的所有方面的上下文中,优选的抑制性组分的组是组1:Ig $\alpha$ 1链C区(Ig alpha-1chain C region)、凝血酶原、载脂蛋白D、尿调制蛋白(Uromodulin)、血型糖蛋白C(Glycophorin-C)、锌 $\alpha$ 2糖蛋白(Zinc-alpha-2-glycoprotein)、硫酸肝素蛋白聚糖(Heparin sulphate proteoglycan)、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0016] 在本公开内容的所有方面的上下文中,另外的优选的抑制性组分的组是组2:Ig $\alpha$ 1链C区、载脂蛋白D、尿调制蛋白、血型糖蛋白C、锌 $\alpha$ 2糖蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0017] 在本公开内容的所有方面的上下文中,另外的优选的抑制性组分的组是组3:载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白。本发明人已经发现这三种蛋白是非常有效且丰富的抑制剂。

[0018] 在本发明的第一方面的实施方案中,一种或更多种抑制性组分选自组1、组2或组3。作为实例,抑制性组分可以是组3中的所有抑制性组分或者包括组3中的所有抑制性组分。

[0019] 在本发明的第一方面的实施方案中,步骤b)还包括以下步骤:

[0020] b1) 将包含所述一种或更多种疾病相关组分的所述样品与所述一种或更多种抑制性组分已经结合至其的所述固相分离。

[0021] 因此,允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述固相上存在的一种或更多种配体的步骤之后可以是将样品和固相彼此分离的步骤。这可以有助于样品中疾病相关组分的任何将来的检测。

[0022] 步骤a)涉及允许诊断样品与配体已经被缀合至其上的固相接触。固相例如可以是基质(matrix)或平的表面,例如芯片的表面或试管的表面。因此,表面可以是塑料试管的内部的表面。因此,在本发明的第一方面的实施方案中,固相是膜或固体表面。因此,接触步骤可以涉及将样品添加至芯片、将样品注射到芯片被固定在其中的分析流动室(analysis flow chamber)中、使样品通过膜或将样品添加至试管。

[0023] 然而,固相可以是一种或更多种颗粒的表面,即接触步骤可以是将颗粒添加至样品。因此,在本发明的第一方面的实施方案中,固相是一种或更多种颗粒的表面,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其至少一部分的一种或更多种所述配体。因此,固相可以包含相同种类(即具有相同类型的缀合至颗粒的配体)的颗粒。然而,固相可以包含第一类型的颗粒,所述第一类型的颗粒具有缀合至其表面的第一类型的配体;第二类型的颗粒,所述第二类型的颗粒具有缀合至其表面的第二类型的配体;等等。

[0024] 因此,步骤a)可以包括将一种或更多种颗粒添加至所述样品,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其表面的至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合。

[0025] 另外,如果使用颗粒,则步骤b)还可以包括以下步骤:

[0026] b1) 从所述生物样品中去除所述一种或更多种颗粒。

[0027] 这在允许一种或更多种抑制性组分结合至颗粒表面上存在的一种或更多种配体

之后进行,并且因此可以减少所述样品中抑制性组分的量。

[0028] 颗粒可以是具有已经被活化并且配体已经被固定到其上的表面的颗粒。因此,颗粒可以是化学活化的颗粒。

[0029] 例如,颗粒可以是纳米颗粒 (nanoparticle) 或微米颗粒 (microparticle)。此外,或作为可选方案,颗粒可以是磁性颗粒或乳胶颗粒。

[0030] 颗粒例如可以通过使用磁体从所述生物流体中被去除。作为另一个实例,颗粒可以通过使用离心从所述生物流体中被去除。作为另外的实例,颗粒可以通过使用过滤从所述生物流体中被去除。

[0031] 此外,步骤c) 可以包括:使所述样品与抗疾病相关组分抗体(检测抗体)接触,以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。检测抗体可以以任何合适的方式来标记,并且例如可以通过电磁光谱学和/或通过光密度(OD)测量来检测。检测可以通过添加化学试剂来进行。

[0032] 检测抗体可以被缀合至表面。因此,步骤c) 例如可以包括添加颗粒,所述颗粒在其表面的至少一部分上包被有抗疾病相关组分抗体;以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。如果步骤a) 涉及使样品与颗粒接触,所述颗粒具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,则因此步骤c) 可以包括将颗粒添加至所述诊断样品,所述颗粒在其表面的至少一部分上包被有抗疾病相关组分抗体,以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。

[0033] 因此,如果步骤a) 包括将一种或更多种颗粒添加至所述样品,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其表面的至少一部分的一种或更多种配体,则步骤c) 可以包括将第二颗粒添加至所述诊断样品,所述颗粒在其表面的至少一部分上包被有抗疾病相关组分抗体;以及其后检测所述诊断样品中抗疾病相关组分的存在。

[0034] 在本公开内容的上下文中,生物流体可以选自由以下组成的组:尿液、痰液、唾液以及脑脊液。这些是良好地适于使用OD测量作为检测方法的将来的测定的生物流体。此外,生物流体可以选自由以下组成的组:尿液、痰液以及唾液。这些是易于取样、可以大量地获得的生物流体,并且与血液不同,它们是相对无菌的且非可传播的。因此,此类流体适于在其中从患者获得样品的可能性受限的环境中使用。作为实例,生物流体可以是尿液。

[0035] 疾病相关组分可以包括抗原,即能够诱导生物体中的免疫应答的分子,或其代谢物。例如,疾病相关组分可以包括外源性抗原,即借助于例如注射或吸入,已经从外部进入身体的抗原。然而,抗原可以是内源性抗原或肿瘤抗原。

[0036] 在本发明的第一方面的实施方案中,一种或更多种疾病相关组分包括至少一种多糖。

[0037] 一种或更多种疾病相关组分可以是人类起源的或病原体起源的。一种或更多种疾病相关组分可以包括整个细菌、细胞、病毒或者可以是其片段,例如细胞壁组分。另外,一种或更多种疾病相关组分可以包括蛋白、碳水化合物或者可以是来自蛋白或碳水化合物的降解产物。

[0038] 在第一方面的实施方案中,一种或更多种疾病相关组分包括至少一种病原体来源的组分。病原体来源的组分可以是多糖。病原体是传染性介质(infectious agent),例如病毒、细菌、原生动物、朊病毒、真菌或可以侵入宿主生物体的其他微生物。因此,病原体来源



的组分是源自或来源于这样的病原体的分子。病原体来源的组分还可以在包括血液的所有类型的生物样品中被检测到。因此,在本发明的可选的方面中,提供了一种用于检测包含生物流体的诊断样品中一种或更多种病原体来源的组分的存在的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0039] a) 使所述样品与固相接触,所述固相具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合;

[0040] b) 允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述固相上存在的一种或更多种配体,从而减少所述样品中所述一种或更多种抑制性组分的量;以及其后

[0041] c) 检测所述诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在,

[0042] 其中所述一种或更多种抑制性组分的特征为能够与步骤c)中的检测结合并且干扰步骤c)中的检测。

[0043] 生物流体可以选自由以下组成的组:血液、尿液、痰液、唾液以及脑脊液。

[0044] 作为实例,疾病相关组分可以是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*) 抗原,例如LAM,或其代谢物。LAM是主要的结核分枝杆菌表面抗原脂阿拉伯甘露聚糖 (lipoarabinomannan)。LAM的代谢物可以是LAM降解片段,例如脱脂的LAM。

[0045] 疾病相关组分的另外的实例包括磷酸肌醇甘露糖苷、脂甘露聚糖 (Lipomannan)、肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) C多糖以及人类内源性抗原PC (磷酸胆碱),一种磷脂酰胆碱的合成中的中间体。

[0046] 如以上所讨论的,在本发明的所有方面中,使用的配体可以对蛋白,例如糖蛋白具有亲和力。蛋白可以是以上的组1、组2或组3中列出的抑制性组分中的任一种。

[0047] 因此,配体可以对组1、组2或组3中的至少一种抑制性组分具有亲和力。因此,缀合至固相的配体可以对组1、组2或组3中任何数目的抑制性组分具有亲和力并且能够与组1、组2或组3中任何数目的抑制性组分结合。作为实例,缀合至固相的配体可以对组1、组2或组3中的所有抑制性组分具有亲和力并且能够与组1、组2或组3中的所有抑制性组分结合。

[0048] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组1或组2中的至少两种抑制性组分具有亲和力,例如对组1或组2中的至少三种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分具有亲和力。

[0049] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组3中的至少一种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中的至少两种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中所有的抑制性组分具有亲和力。

[0050] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组3中的至少一种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中的至少两种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中所有的抑制性组分具有亲和力,并且对选自由以下组成的组的至少一种抑制性组分,例如至少两种抑制性组分,例如至少三种抑制性组分,例如至少四种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分具有亲和力: Igα1链C区、凝血酶原、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0051] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组3中的所有抑制性组分具有亲和力,并且对选自由以下组成的组的至少一种抑制性组分,例如至少两种抑制性

组分,例如至少三种抑制性组分,例如至少四种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分具有亲和力:Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0052] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组3中的至少一种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中的至少两种抑制性组分具有亲和力,例如对组3中所有的抑制性组分具有亲和力,并且对选自以下组成的组的至少一种抑制性组分,例如至少两种抑制性组分,例如至少三种抑制性组分,例如至少四种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分具有亲和力:Ig $\alpha$ 1链C区、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0053] 在本发明的第一方面的实施方案中,缀合至固相的配体对组3中的所有抑制性组分具有亲和力,并且对选自以下组成的组的至少一种抑制性组分,例如至少两种抑制性组分,例如至少三种抑制性组分,例如至少四种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分具有亲和力:Ig $\alpha$ 1链C区、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0054] 因此,固相可以包含对不同抑制性组分具有亲和力的不同配体,所述不同抑制性组分例如以上组1、组2或组3中列出的抑制性组分。作为实例,至少两种,例如至少三种,例如至少五种不同类型的配体可以被缀合至固相,其中每种类型对不同抑制性组分具有亲和力。

[0055] 配体可以是生物分子,例如合成肽。作为实例,配体可以是对以上组1、组2或组3中列出的抑制性组分中的一种或更多种具有亲和力的生物分子。

[0056] 此外,生物分子可以是包含选自组4的氨基酸序列的肽:

[0057] CPRLSLH RPALEDLL (SEQ ID NO:1)

[0058] CSIPVCGQDQ VTV (SEQ ID NO:2)

[0059] CLAGLFGAAEG QAF (SEQ ID NO:3)

[0060] CWFMPSPYWI LA (SEQ ID NO:4)

[0061] CLTCVDLDECA IPG (SEQ ID NO:5)

[0062] CYYVYNLTAPP ECH (SEQ ID NO:6)

[0063] CALFQTPSYTQ PYQ (SEQ ID NO:7)

[0064] CLRYMYRHKGT YH (SEQ ID NO:8)

[0065] CEPVYVQRAKA YLE (SEQ ID NO:9)

[0066] C RNPDEDPRGP W (SEQ ID NO:10)

[0067] C AKQCPALEVTWP (SEQ ID NO:11)

[0068] C VLVDPEQVVQRH (SEQ ID NO:12)

[0069] 包含选自组4的氨基酸序列的肽可以对组1或组2中的至少一种抑制性组分,例如所有的抑制性组分具有亲和力。

[0070] 以上肽中的一种或若干种,例如以上肽中的至少两种,例如至少三种,例如至少五种,可以被缀合至固相。作为实例,以上所有不同类型的肽可以被缀合至固相,例如被缀合至表面或单个颗粒。作为实例,固相可以包括颗粒,所述颗粒具有被随机地缀合至颗粒的多于一种或所有肽,以在颗粒之间给出或多或少相同的肽分布。作为可选方案,固相可以包括

第一类型的颗粒以及第二类型的颗粒,所述第一类型的颗粒仅具有缀合至表面的一种或几种肽,所述第二类型的颗粒具有缀合至表面的其他类型的肽,等等。作为实例,固相可以包括许多不同类型的颗粒,每种类型的颗粒与其他类型的颗粒相比具有缀合至其表面的不同类型的配体。

[0071] 此外,配体可以是化学分子。作为实例,配体可以选自由以下组成的组:4-巯基苯硼酸、胺重氮苯化合物以及多粘菌素(Polymixin)。以上的组中的若干化学分子可以同时被用作配体。

[0072] 作为本发明第一方面的配置,提供了一种用于从包含生物流体的诊断样品中去除一种或更多种抑制性组分的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0073] a) 将一种或更多种颗粒添加至所述样品,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其表面的至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合;

[0074] b) 允许所述一种或更多种抑制性组分结合至所述颗粒;以及

[0075] c) 从样品中去除所述颗粒,

[0076] 其中所述抑制性组分的特征为当在随后的免疫测定中使用能够干扰所述诊断样品的组分。

[0077] 生物流体可以选自由以下组成的组:如本文以上讨论的分泌的体液、排泄的体液以及脑脊液。

[0078] 作为本发明第一方面的另外的配置,提供了一种用于制备和/或清洁诊断样品的体外方法,所述诊断样品包含生物流体,所述诊断样品用于随后的免疫测定,所述方法包括以下步骤:

[0079] a) 将一种或更多种颗粒添加至所述样品,所述一种或更多种颗粒具有缀合至其表面的至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对所述样品中存在的抑制性组分具有亲和力并且能够与所述样品中存在的抑制性组分结合;

[0080] b) 允许所述样品中存在的所述一种或更多种抑制性组分结合至所述颗粒上存在的所述一种或更多种配体;以及其后

[0081] c) 获得为免疫测定制备的经清洁的和/或制备的诊断样品,

[0082] 其中所述抑制性组分的特征为能够与测定组分结合并且还能够干扰诊断免疫测定。

[0083] 生物流体可以选自由以下组成的组:如本文以上讨论的分泌的体液、排泄的体液以及脑脊液。

[0084] 作为本发明的第二方面,提供了一种用于检测诊断样品中一种或更多种疾病相关组分的存在的体外方法,所述诊断样品包含选自由分泌的体液、排泄的体液和脑脊液组成的组的生物流体,所述方法包括以下步骤:

[0085] a) 减少所述生物流体中一种或更多种抑制性组分的量,以提供经清洁的诊断样品,其中所述一种或更多种抑制性组分包括至少一种蛋白;以及

[0086] b) 检测步骤a)的经清洁的诊断样品中所述一种或更多种疾病相关组分的存在。

[0087] 关于第二方面使用的术语和定义如以上针对第一方面所讨论。

[0088] 抑制性组分可以包括至少一种蛋白,例如至少一种糖蛋白。在本发明第二方面的

实施方案中,一种或更多种抑制性组分选自本文以上公开的组1、组2或组3的抑制性组分。

[0089] 因此,步骤a)可以涉及减少组1、组2或组3中任何数目的抑制性组分的量,例如减少组1、组2或组3中的所有抑制性组分。

[0090] 在本发明第二方面的实施方案中,步骤a)包括减少组1、组2或组3中的至少两种抑制性组分的量,例如减少组1或组2中的至少三种抑制性组分,例如至少五种抑制性组分的量。

[0091] 在本发明第二方面的实施方案中,步骤a)包括减少组3中的至少一种、例如至少两种、例如所有抑制性组分的量,并且减少选自由以下组成的组的至少一种、例如至少两种、例如至少三种、例如至少四种、例如至少五种抑制性组分的量: Ig $\alpha$ 1链C区、凝血酶原、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0092] 在本发明第二方面的实施方案中,步骤a)包括减少组3中的至少一种、例如至少两种、例如所有抑制性组分的量,并且减少选自由以下组成的组的至少一种、例如至少两种、例如至少三种、例如至少四种、例如至少五种抑制性组分的量: Ig $\alpha$ 1链C区、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0093] 作为本发明的第三方面,提供了一种固相,所述固相用于在随后在免疫测定中使用诊断样品之前从所述诊断样品中去除抑制性组分中使用,所述固相具有缀合至其至少一部分的一种或更多种配体,所述配体对抑制性组分具有亲和力并且能够与抑制性组分结合,其中所述抑制性组分的特征为能够干扰所述诊断免疫测定。

[0094] 关于第三方面使用的术语和定义如以上针对第一方面所讨论。作为实例,固相可以具有缀合至其至少一部分的至少两种配体。因此,第三方面可以提供一种固相,所述固相用于在随后在免疫测定中使用诊断样品之前从所述诊断样品中去除抑制性组分中使用,所述固相具有缀合至其至少一部分的至少两种不同类型的配体,所述配体对不同抑制性组分具有亲和力并且能够与不同抑制性组分结合,其中所述抑制性组分的特征为能够干扰所述诊断免疫测定。

[0095] 例如,一种或更多种配体可以如以上第一方面的任何实施方案中所定义。

[0096] 在本发明第三方面的实施方案中,固相具有缀合至其至少一部分的不同配体,使得所述配体对选自本文以上组1、组2或组3的至少两种抑制性组分具有亲和力。

[0097] 作为实例,固相可以是至少一种颗粒。另外,颗粒可以是纳米颗粒或微米颗粒。作为另外的实例,颗粒可以是磁性颗粒或乳胶颗粒。

[0098] 颗粒的表面还可以被活化,以便将配体结合至表面。因此,颗粒可以是表面活化的磁性颗粒。

[0099] 作为本发明的第四方面,提供了根据本发明第三方面的固相用于制备和/或清洁诊断样品的用途,所述诊断样品用于在随后的免疫测定中使用。关于第四方面使用的术语和定义如以上针对其他方面所讨论。用途可以涉及在进行诊断免疫测定前,从所述诊断样品中去除一种或更多种抑制性组分或减少一种或更多种抑制性组分的量。抑制性组分可以选自本文以上的组1、组2或组3。因此,该用途可以涉及减少组1、组2或组3中任何数目的抑制性组分的量,例如减少组1、组2或组3中的所有抑制性组分。

[0100] 此外,用途可以包括减少组1、组2或组3中的至少两种抑制性组分的量,例如减少

组1、组2或组3中的至少三种,例如至少五种抑制性组分的量。

[0101] 在本发明第四方面的实施方案中,用途包括减少组3中的至少一种、例如至少两种、例如所有抑制性组分的量,并且减少选自由以下组成的组的至少一种、例如至少两种、例如至少三种、例如至少四种、例如至少五种抑制性组分的量: Igα1链C区、凝血酶原、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0102] 在本发明第四方面的实施方案中,用途包括减少组3中的至少一种、例如至少两种、例如所有抑制性组分的量,并且减少选自由以下组成的组的至少一种、例如至少两种、例如至少三种、例如至少四种、例如至少五种抑制性组分的量: Igα1链C区、血型糖蛋白C、硫酸肝素蛋白聚糖、磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白以及白细胞介素18结合蛋白抑制性组分。

[0103] 作为本发明的第五方面,提供了一种部件试剂盒(kit of parts),所述部件试剂盒包含:

[0104] a) 用于在免疫测定中捕获和检测一种或更多种疾病相关组分的装置,以及

[0105] b) 用于减少生物流体中一种或更多种抑制性组分的量的装置,其中所述一种或更多种抑制性组分包括至少一种蛋白。

[0106] 在本发明第五方面的实施方案中,用于减少生物流体中一种或更多种抑制性组分的量的装置包括如根据以上第三方面的一种或更多种固相。因此,试剂盒可以包含针对如本文公开的抑制性组分的配体已经被缀合到其上的颗粒。然而,用于减少生物流体中一种或更多种抑制性组分的量的装置可以包括针对一种或更多种抑制性组分的配体已经被固定到其上的固相,例如膜、基质、芯片表面或试管的内表面。

[0107] 至少一种或更多种抑制性组分包括至少一种蛋白,例如至少一种糖蛋白。抑制性组分可以选自以上组1、组2或组3中列出的抑制性组分。

[0108] 另外,用于减少一种或更多种抑制性组分的量的装置可以包括用于减少至少两种不同抑制性组分、例如选自以上组1、组2或组3的至少两种抑制性组分的装置。

[0109] 用于在免疫测定中捕获和检测一种或更多种疾病相关组分的装置可以包括抗疾病相关组分抗体(检测抗体),例如缀合至除针对抑制性组分的配体已经被缀合至其上的颗粒之外的颗粒的抗疾病相关组分抗体。

[0110] 此外,在本发明第五方面的实施方案中,一种或更多种疾病相关组分是结核分枝杆菌抗原,例如LAM。

[0111] 附图简述

[0112] 图1示出了用于在免疫测定之前清洁样本的本公开内容的一般方法。(A) 在使用配体的情况下:在颗粒上(B)、在固体表面上(C)、在过滤器基质上(D)。

[0113] 图2示出了多种体液(100pg/ml)中LAM-Tb测定的SpeClean(样本清洁剂(Specimen Cleaner))改进。

[0114] 图3示出了SpeClean对掺有多种抗原(100pg/ml)的尿液样品的测定灵敏度的改进的效果。

[0115] 图4展示了当尿液样品用SpeClean预处理时,免疫测定(尿液中LAM的检测)的临床灵敏度的差异。未处理的灵敏度=47.6%,SpeClean处理的=80.9%,n=21,LOD 0,40D 620nm。

[0116] 详细描述

[0117] 本发明人已经发现了减少生物样品中的抑制性化合物的量的方式,使得随后的免疫测定的灵敏度增加。

[0118] 例如,如果将主要的结核分枝杆菌表面抗原脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)添加至来自健康个体或结核病(TB)患者的尿液,则当与PBS或合成尿液中的相同量的LAM相比时,LAM信号经常被减少,或者甚至被完全猝灭(quench)。此抑制效果在个体之间变化,并且还在于不同时间点从同一个体采取的样品之间变化。

[0119] 先前的蛋白组学研究已经从健康个体鉴定出多于2800种尿蛋白,然而它们在免疫测定中的影响未曾被探索。使用多种色谱方法联合质谱分析,本发明人例如现在已经能够从对LAM免疫测定具有潜在抑制效果的健康尿液中分离、纯化和表征若干丰富的蛋白。

[0120] 当在掺有LAM的磷酸盐缓冲盐水或合成尿液模拟物中重构时,这些蛋白单独地或组合地通过掩蔽LAM抗原或通过检测剂抗体的相互作用对测试产生抑制效果。降低患者尿液的抑制效果将明显地增加基于LAM的尿液测试的诊断灵敏度和精确度。

[0121] 本文提供了这些蛋白对免疫测定的抑制效果,对作用机制的理解以及还发现从体液中去除它们的方式,并且因此恢复测定的灵敏度。这为免疫测定的灵敏度提供很大的优点。在本文中,LAM测定被用作可以受益于诊断样品的预清洁的免疫测定的实例,但此方法还适用于其他免疫测定。

[0122] 尿液是用于诊断多种疾病的良好基质,因为它是无菌的、相比于血液或任何其他流体可以以较大体积获得,并且最重要地,不需要如在血液情况下的针头,并且因此避免另外的内部感染例如肝炎和HIV。

[0123] 为了该目的,使用构建用于从体液中去除抑制剂的样本清洁剂(SpeClean)的两种方法:

[0124] A) 通过噬菌体展示技术,鉴定对尿液抑制剂具有结合亲和力的肽。下文列出的充当针对抑制性蛋白的配体的十二种肽被鉴定出并且被缀合至磁性颗粒(MP),以通过磁体从体液中容易地去除抑制剂。

[0125] B) 我们对靶糖脂抗原(LAM)和抑制性蛋白的碳水化合物部分(主要由N-乙酰基葡萄糖胺组成)之间的结构差异的理解有助于鉴定对抑制剂具有结合能力的若干配体。然后,这些配体被用于构建许多配体-MP缀合物,以从体液中简单地去除抑制剂。

[0126] 因此,本文首次提供了一种用于从生物样品(体液)中去除抑制剂的方法,所述生物样品(体液)包括尿液或其他体液,例如血浆、痰液、唾液等,然后所述生物样品被用于随后的诊断测定例如免疫测定。为了去除所述抑制剂,本文可以使用颗粒,例如纳米颗粒或微米颗粒。所述颗粒例如可以是乳胶颗粒或磁性颗粒。一般方法在图1中被示出。A) 示出了配体已经被固定到其上的磁性颗粒在孵育之后(即在具有结合的抑制性组分后)如何使用磁力可以从样品中被去除,B) 示出了被固定到磁性颗粒(MNP)上并具有结合的抑制剂的配体(SpeClean配体),C) 示出了结合至固体表面的配体,以及D) 示出了结合至过滤器基质的配体。

[0127] 存在提供各种类型的颗粒的许多制造商,所述颗粒包括可以在当前上下文中使用的具有多样化表面、尺寸和功能的磁性颗粒。

[0128] 样本清洁剂(例如,如本文定义的包含缀合至其表面的至少一部分的配体(化学的

或生物的)的颗粒)是可以用于从任何生物流体中去除抑制剂的技术。该方法可以联合多种诊断方法使用,并且因此不限于LAM测定。配体与颗粒的缀合可以通过常规的手段来进行。

[0129] 抑制性蛋白和配体的实例

[0130] 以下是分离的蛋白(干扰诊断测定的抑制性蛋白)的列表,这形成用于鉴定与其结合的生物分子的基础,所述生物分子用于用作清洁和/或制备用于随后在免疫测定中使用的诊断样品中的配体。还提供了化学配体的列表,该列表呈现了用于用作如本文公开的方法中的配体的实例。

[0131] 在免疫测定中具有抑制效果的蛋白的实例(组1)

[0132] Ig $\alpha$ 1链C区

[0133] 凝血酶原

[0134] 载脂蛋白D

[0135] 尿调制蛋白

[0136] 血型糖蛋白C

[0137] 锌 $\alpha$ 2糖蛋白

[0138] 硫酸肝素蛋白聚糖

[0139] 磷酸肌醇-3-激酶相互作用蛋白

[0140] 白细胞介素18结合蛋白

[0141] 肽配体(组4)

[0142] CPRLSLH RPALEDLL (SEQ ID NO:1)

[0143] CSIPVCGQDQ VTV (SEQ ID NO:2)

[0144] CLAGLFGAAEG QAF (SEQ ID NO:3)

[0145] CWFMPSPAPYWI LA (SEQ ID NO:4)

[0146] CLTCVDLDECA IPG (SEQ ID NO:5)

[0147] CYYVYNLTAPP ECH (SEQ ID NO:6)

[0148] CALFQTPSYTQ PYQ (SEQ ID NO:7)

[0149] CLRYMYRHKGT YH (SEQ ID NO:8)

[0150] CEPVYVQRAKA YLE (SEQ ID NO:9)

[0151] C RNPDEDPRGP W (SEQ ID NO:10)

[0152] C AKQCPALEVTWP (SEQ ID NO:11)

[0153] C VLVDPEQVVQRH (SEQ ID NO:12)

[0154] 化学配体(实例)

[0155] 4-巯基苯硼酸

[0156] 胺重氮苯化合物

[0157] 多粘菌素

[0158] 实验部分

[0159] 实验部分例证了使用从诊断样品中去除任何抑制剂的清洁步骤对抗原例如(LAM)检测的积极效果。

[0160] 样本清洁剂(SpeClean)的制备

[0161] 肽(抗抑制剂(anti inhibitor))与各种基质的缀合

[0162] 磁性微米颗粒、硝酸纤维素膜、乳胶珠和玻璃料(frit) (全部用氨基基团官能化) 被用于肽配体的固定/缀合。相等量的组4中的所有肽被缀合至固相。首先,通过与溴乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的溴烷基化反应,将氨基基团转化成溴。接下来,将半胱氨酸化的肽逐滴地添加至活化的基质,同时保持pH。为了最大化缀合收率,将10mM的三丁基膦添加至反应混合物中以防止硫醇基团氧化并且因此允许与基质表面上的溴反应。

[0163] 产生的样本清洁剂被指示为SpeClean 1。这可以被添加至样品,并在孵育后被去除,以便减少抑制性化合物的量。例如,磁性颗粒可以通过磁体被去除。

[0164] 化学配体与基质表面的缀合

[0165] 4-巯基苯硼酸与基质表面的缀合如以上描述的进行。为了固定重氮苯化合物和多粘菌素,使用羧基(COOH)官能化的基质。简言之,基质首先用pH 6.0的2-(N-吗啉基)乙磺酸平衡,随后在室温用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)活化持续1小时。在洗涤后,添加含有胺的配体,并且允许缀合在室温进行持续2小时。

[0166] 产生的样本清洁剂被指示为SpeClean 2。

[0167] 一般测定描述(LAM测定,检测LAM抗原)

[0168] -将包被有捕获抗LAM抗体的磁性颗粒添加至尿液/其他体液并孵育。

[0169] -在洗涤后,添加生物素化的检测剂抗体并孵育。

[0170] -在洗涤后,添加亲和素-HRP酶缀合物并孵育。

[0171] -在洗涤四甲基联苯胺后,添加TMB底物,并且测量显色的强度(在450nm记录光密度)。

[0172] 因为体液可能包含阻断任何颜色形成的抑制剂,所以较低的信号/无信号将是可见的/被记录,并且因此即使样品包含靶抗原,样品也将被认为是阴性的。为了克服该问题并逆转回损失的信号,流体需要被清洁以去除抑制剂。为了该目的,在添加捕获颗粒之前,使用SpeClean 1或SpeClean 2施加本公开内容的样本清洁步骤用于清洁抑制剂。因此,在进行以上描述的测定/方法之前,引入清洁步骤。

[0173] 结果

[0174] 实施例.1

[0175] 在下文中,实施例1是LAM(抗原)测定,并且实施例2至实施例4包括在进行抗原(LAM)测定之前进行的另外的样品清洁剂步骤。数据示出,在抗原检测测试(在该上下文中,LAM)之前进行清洁步骤改进了测定的灵敏度,因为在与抗原(LAM)结合的捕获颗粒被添加至生物样品之前,样品中存在的并与抗原结合的任何抑制性分子被去除。

#### 在 450 nm 处的信号

	合成尿液	0.251
[0176]	合成尿液+ 100 pg/ml LAM	4.440
	尿液	0.28
	尿液+ 100 pg/ml LAM	0.31

[0177] 在掺有LAM的合成尿液中,由于其中不存在抑制性分子,LAM的信号更高。然而,LAM的信号在掺有LAM的尿液中是低的或者几乎不存在。



[0178] 实施例2

[0179] SpeClean对1名健康供体的掺有+/-100pg/ml LAM的尿液的效果

	<u>样品</u>	<u>SpeClean</u>	<u>OD 450 nm</u>
	尿液	-	0.14
	尿液+ 100 pg LAM/ml	-	0.17
	尿液+ 250 pg LAM/ml	-	0.51
[0180]	尿液+ 500 pg LAM/ml	-	0.93
	尿液	+	0.22
	尿液+ 100 pg LAM/ml	+	3.11
	尿液+ 250 pg LAM/ml	+	4.12
	尿液+ 500 pg LAM/ml	+	7.74

[0181] 这说明在进行测定之前的SpeClean步骤(即去除样品中的抑制剂)增加了抗原(LAM)检测测试的灵敏度。如果不进行清洁步骤,则获得低/无抗原(LAM)信号。

[0182] 实施例3

[0183] SpeClean对5名健康供体的具有不同抑制程度的尿液的效果。在此实验中,尿液样品掺有100pg/ml LAM。

	<u>样品</u>	<u>SpeClean</u>	<u>450 nm</u>
	D1	-	0.400
	D1	+	4.149
	D2	-	3.88
	D2	+	4.30
[0184]	D3	-	1.34
	D3	+	4.19
	D4	-	3.65
	D4	+	4.40
	D5	-	0.31
	D5	+	2.88
	合成尿液(无 LAM)		0.251
[0185]	合成尿液+ 100 pg/ml LAM		4.440

[0186] 此实验清楚地说明了个体尿液中在从低(D2、D4)、中(D3)和高(D1、D5)的范围内的

不同量的抑制剂的存在,其在用样本清洁剂处理后逆转回至正常信号(掺有LAM的合成尿液)。

[0187] 实施例4

[0188] 两种不同的SpeClean组合物,SpeClean 1和SpeClean 2(参见上文)对掺有LAM的健康尿液的效果。

	<u>样品</u>	<u>SpeClean</u>	<u>450 nm</u>
	1- 尿液	-	0.22
	2- 尿液+ 100 pg/ml	-	0.24
	3- 尿液	1	0.18
	4- 尿液+ 100 pg/ml	1	4.22
[0189]	5- 尿液+ 50 pg/ml	1	2.88
	6- 尿液+ 20 pg/ml	1	2.11
	7- 尿液	2	0.28
	8- 尿液+ 100 pg/ml	2	4.78
	9- 尿液+ 50 pg/ml	2	3.11
	10- 尿液+20 pg/ml	2	2.25

[0190] 此实验示出,基于生物配体的样本清洁剂(SpeClean 1)表现与基于化学的样本清洁剂(SpeClean 2)一样好。

[0191] 实施例5

[0192] 进行实验以观察不同体液中LAM-TB测定的SpeClean改进的效果。在如以上实施例1-实施例4中描述的测定中,测试添加SpeClean 1和不添加SpeClean 1的尿液、痰液、唾液和脑脊液。结果在图2中示出,其清楚地示出SpeClean 1组合物的添加清楚地增强所有生物样品的测定的OD。

[0193] 实施例6

[0194] 进行实验以观察当在添加以下各种抗原的尿液样品中进行测定时SpeClean改进的效果:磷酸肌醇甘露糖苷、脂甘露聚糖和肺炎链球菌C多糖。结果在图3中示出,并且明显的是,与未处理的样品相比,用SpeClean1处理的所有样品清楚地改进了在620nm处的OD,即对于所有测试的抗原,测定灵敏度增加。

[0195] 实施例7

[0196] 在从患有确诊的肺结核病的21名不同的TB患者中收集的尿液样品中,测试测定灵敏度的SpeClean改进的效果。

[0197] 图4展示了当尿液样品用SpeClean 1组合物预处理时免疫测定(尿液中的LAM的检测)的临床灵敏度的差异。用SpeClean 1预处理导致大多数样品中的增加的阳性信号,并且导致测定的临床灵敏度的整体改进,从正确地鉴定出31.8%的感染个体至80.9%的感染患

者。

[0198] 实施例8

[0199] 根据本文以上公开的缀合方案,将针对载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白的肽配体缀合至磁性微米颗粒,以给出表示为SpeClean 3的样本清洁剂。

[0200] 将SpeClean 3添加至尿液样品,并且同样在孵育后在根据以上一般测定描述进行抗原(LAM)测定之前去除。

[0201] 实施例9

[0202] 根据本文以上公开的缀合方案,将针对载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白的肽配体缀合至固体表面,以给出表示为SpeClean 4的样本清洁剂。

[0203] 使尿液样品与SpeClean 4表面接触,并进行孵育。然后并且在根据以上一般测定描述进行抗原(LAM)测定之前,将样品与表面分离。

[0204] 实施例10

[0205] 根据本文以上公开的缀合方案,将针对载脂蛋白D、尿调制蛋白和锌 $\alpha$ 2糖蛋白的肽配体缀合至试管的内表面,以给出表示为SpeClean 5的样本清洁剂。

[0206] 将尿液样品添加至试管并进行孵育,然后从试管去除。然后,根据以上一般测定描述进行样品的抗原(LAM)测定。



<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 非天然序列  
<400> 4  
Cys Trp Phe Met Pro Ser Ala Pro Tyr Trp Ile Leu Ala  
1                    5                    10  
<210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 非天然序列  
<400> 5  
Cys Leu Thr Cys Val Asp Leu Asp Glu Cys Ala Ile Pro Gly  
1                    5                    10  
<210> 6  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 非天然序列  
<400> 6  
Cys Tyr Tyr Val Tyr Asn Leu Thr Ala Pro Pro Glu Cys His  
1                    5                    10  
<210> 7  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 非天然序列  
<400> 7  
Cys Ala Leu Phe Gln Thr Pro Ser Tyr Thr Gln Pro Tyr Gln  
1                    5                    10  
<210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 非天然序列

<400> 8

Cys Leu Arg Tyr Met Tyr Arg His Lys Gly Thr Tyr His

1                    5                    10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 非天然序列

<400> 9

Cys Glu Pro Val Tyr Val Gln Arg Ala Lys Ala Tyr Leu Glu

1                    5                    10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 非天然序列

<400> 10

Cys Arg Asn Pro Asp Glu Asp Pro Arg Gly Pro Trp

1                    5                    10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 非天然序列

<400> 11

Cys Ala Lys Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro

1                    5                    10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 非天然序列

<400> 12

Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His

1                    5                    10

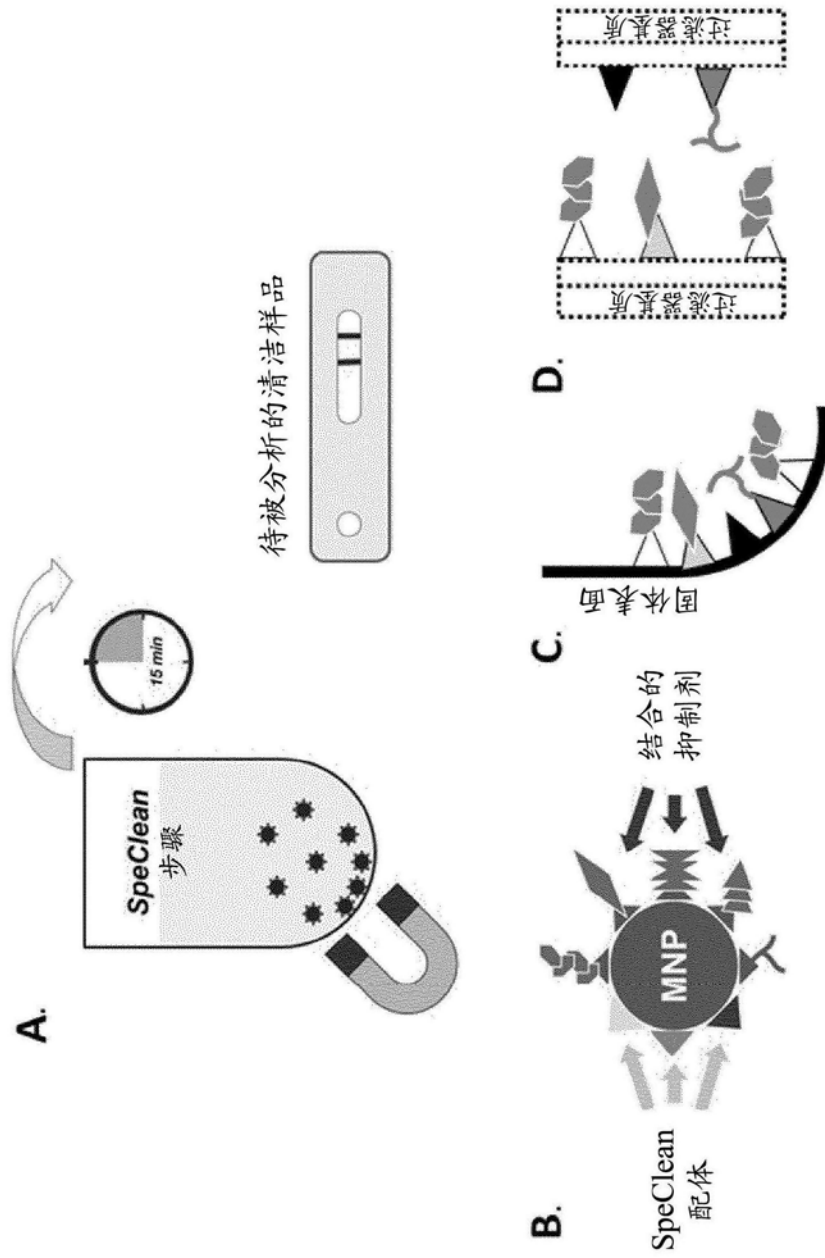


图1

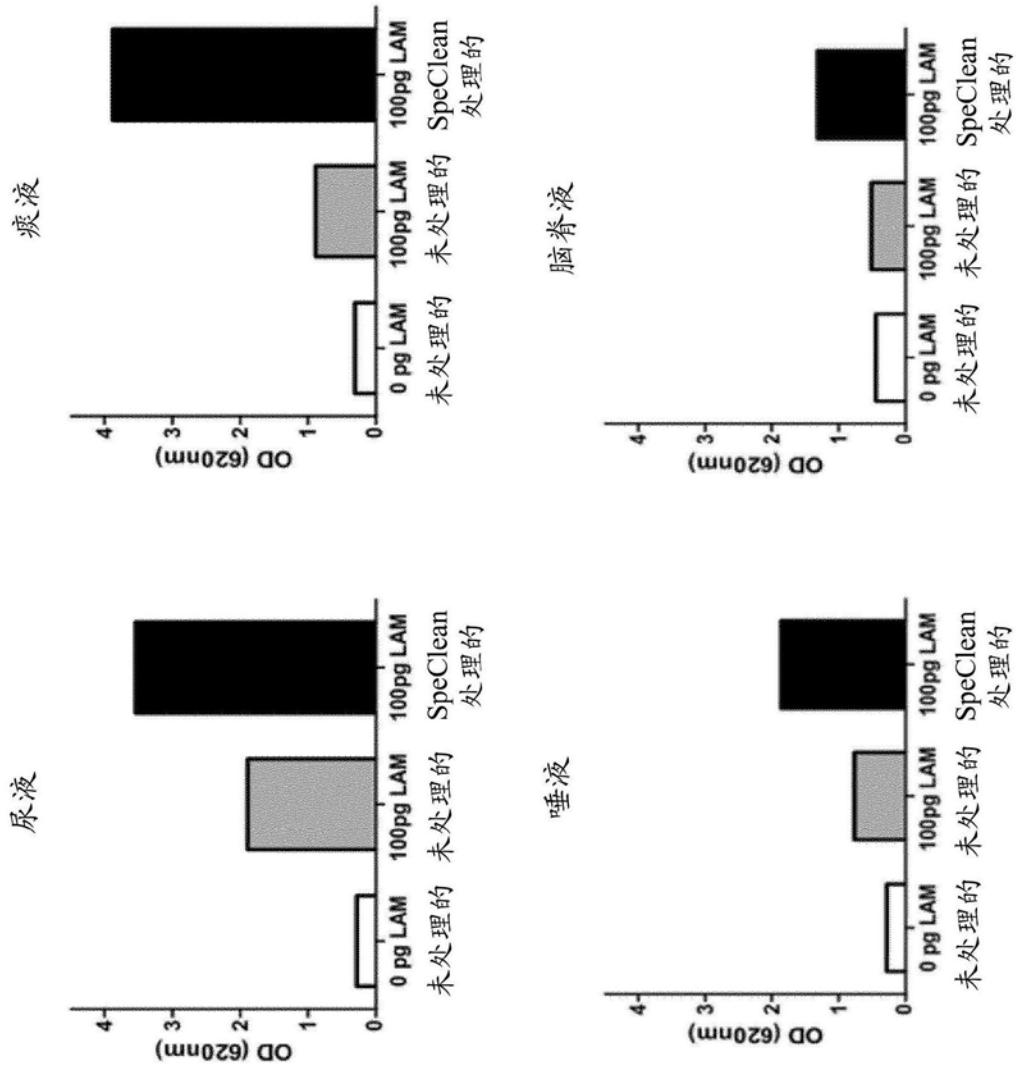


图2



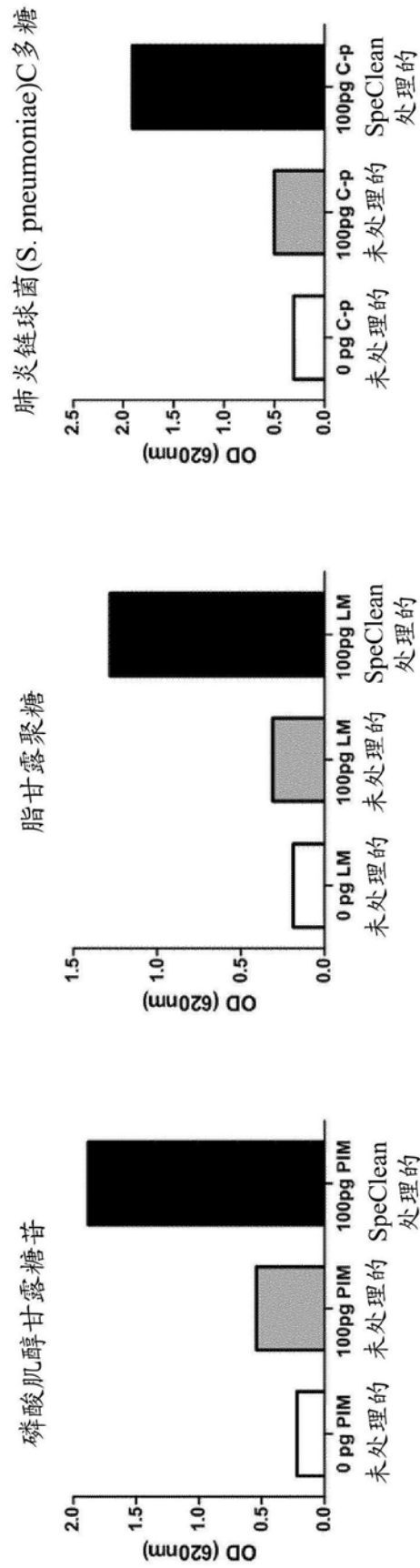


图3

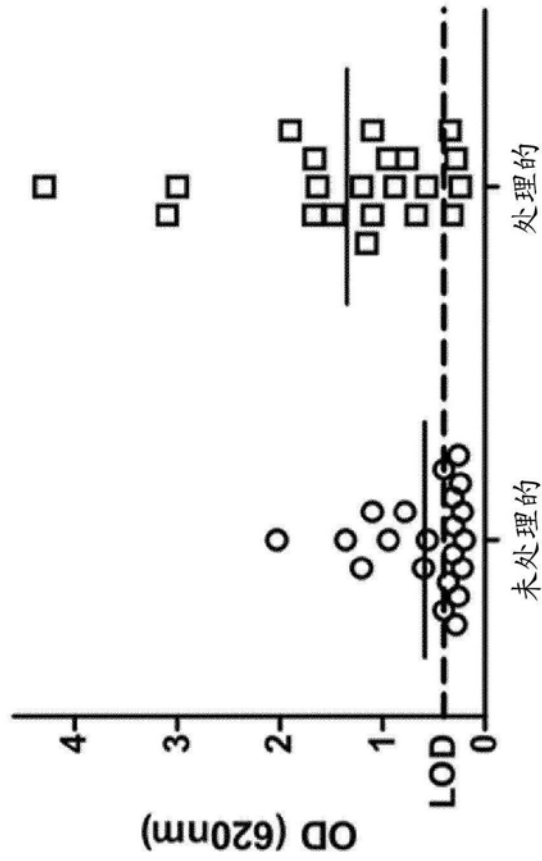


图4