

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 481**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2014 PCT/JP2014/072068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15025968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2014 E 14838384 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3037822**

54 Título: **Procedimiento y kit de detección inmunológica de *Mycoplasma pneumoniae***

30 Prioridad:

23.08.2013 JP 2013173991

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.06.2020

73 Titular/es:

**TAUNS CO., LTD. (100.0%)
761-1, Kamishima
Izunokuni-shi, Shizuoka 410-2325, JP**

72 Inventor/es:

SAITO, KENJI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 764 481 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y kit de detección inmunológica de *Mycoplasma pneumoniae*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae*, y a un procedimiento inmunológico y una tira de prueba para detectar *Mycoplasma pneumoniae*.

Técnica antecedente

La neumonía por micoplasma es una neumonía atípica causada por *Mycoplasma pneumoniae*. La neumonía por micoplasma, junto con la neumonía por clamidia, constituye 30% a 40% de los casos de neumonía atípica y también constituye un alto porcentaje de los casos de neumonía adquiridos en la comunidad.

10 La neumonía por micoplasma es común en los bebés, niños y adolescentes. El período de incubación es de 2 a 3 semanas. La excreción del patógeno en la mucosa respiratoria se observa 2 a 8 días antes del comienzo del síntoma inicial, alcanza su pico en el comienzo de los síntomas clínicos, continúa en un nivel alto durante aproximadamente una semana y después continúa durante 4 a 6 semanas o más. Los síntomas clínicos principales son fiebre, malestar general, cefalea, y otros síntomas similares a los del resfrío. La neumonía por micoplasma está caracterizada, por
15 ejemplo, por fiebre alta superior a 38°C y tos secaintensa. La tos continúa en forma adicional durante un tiempo prolongado, 3 a 4 semanas, después de la disminución de la fiebre. Sin embargo, no existe un hallazgo de examen característico para la neumonía por micoplasma, siendo típico el aspecto de vidrio esmerilado pálido en el análisis por rayos X del tórax.

20 El modo de infección con *Mycoplasma* es la infección por gotitas y la infección por contacto de un paciente infectado. *Mycoplasma pneumoniae* invade el tracto respiratorio y ataca el epitelio de los bronquios o bronquiolos para producir la infección.

La infección por *mycoplasma* está designada como una enfermedad notablemente infecciosa (Enfermedades infecciosas categoría V) basado en Infectious Diseases Control Law, y los profesionales de la salud designados tienen la obligación de informar la cantidad de pacientes.

25 El *mycoplasma* es un microorganismo mínimo que puede replicarse a sí mismo y difiere de otras bacterias dado que no tiene pared celular. Por consiguiente, los antibióticos β -lactámicos y los antibióticos cefem, que son antibióticos que tienen la función de inhibir la síntesis de la pared celular, no son eficaces, y se requiere para el tratamiento una administración de antibióticos macrólidos, antibióticos de tetraciclina y nuevos antibióticos de quinolona. La identificación inmediata del patógeno, por lo tanto, es necesaria para determinar el plan de tratamiento inicial.

30 En la actualidad, la infección por *Mycoplasma pneumoniae* está diagnosticada definitivamente por un procedimiento de cultivo por aislamiento y una prueba serológica.

35 El cultivo por aislamiento requiere de un medio de cultivo especializado (medio PPLO) para detectar el *Mycoplasma*. Además, su proliferación es lenta, en comparación con otras bacterias y toma al menos aproximadamente una semana obtener el resultado de la determinación. Por lo tanto, es difícil identificar rápidamente el patógeno mediante el medio de cultivo por aislamiento en los centros clínicos.

El *Mycoplasma* es sensible a la temperatura, y las muestras que contienen *Mycoplasma* no pueden mantenerse en almacenamiento a bajas temperaturas, a diferencia de las muestras que contienen bacterias comunes. Por consiguiente, el *Mycoplasma* contenido en una muestra puede extinguirse o disminuir durante el almacenamiento o el transporte de la muestra y puede no detectarse incluso mediante el procedimiento de cultivo por aislamiento.

40 Los ejemplos de la prueba serológica incluyen una prueba de hemaglutinación (IHA), un procedimiento de aglutinación de partículas (PA), y un inmunoensayo enzimático (EIA), que específicamente detectan el anticuerpo IgG o el anticuerpo IgM.

45 Además, un kit inmunocromatográfico (ImmunoCard Mycoplasma Antibody, disponible de TFB, Inc.) se encuentra disponible en el mercado como una prueba simple que detecta el anticuerpo IgM específico de *Mycoplasma pneumoniae* en el suero o plasma mediante EIA y se usa en los centros de salud.

50 En la prueba serológica, aunque el anticuerpo IgM en una muestra a detectar aumenta en la primera etapa de la infección, la muestra puede mostrar un falso negativo en el caso de baja respuesta a la producción de anticuerpos en los tiempos del ensayo. Además, dado que transcurre mucho tiempo hasta que el anticuerpo IgM desaparece en la sangre, no puede decirse que el resultado de la prueba serológica siempre indica de manera correcta el estado actual de la infección.

Por consiguiente, el diagnóstico definitivo por la prueba serológica requiere pruebas cuantitativas que usen sueros pareados de etapas agudas y convalecientes, y, por lo tanto, deben ser diagnósticos ex-post en muchos casos.

Se emplea también un procedimiento de detección de ácido nucleico para detectar el ADN de *Mycoplasma pneumoniae*. En el procedimiento de detección, sin embargo, el procedimiento de amplificación del ácido nucleico es complicado y requiere equipamiento especializado, y el ensayo lleva varias horas. Por lo tanto, el procedimiento no es unaprueba que se use generalmente.

- 5 Con el propósito de detectar de manera más rápida y simple la infección por *Mycoplasma pneumoniae*, se ha desarrollado el anticuerpo específico contra el antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*, y se ha informado un procedimiento de detección para distinguir si la infección por micoplasma está presente o no.

10 *Mycoplasma pneumoniae* se une a los cilios del epitelio respiratorio con su órgano adhesivo en forma de una protuberancia con forma de frasco, y después se mueve a la superficie celular mediante motilidad deslizante y se adhiere a esta para lograr la infección. Se han informado la producción de un anticuerpo específico para la proteína P1 (169 KDa), que se conoce como una proteína adhesiva que cumple una función central en esta adhesión o motilidad deslizante, y un procedimiento de detección que usa la proteína P1 como un marcador de detección (Documentos de Patente 1 y 2).

15 También es sabido que la proteína P1, el antígeno a detectar informado en los informes anteriores, tiene dos genotipos y que las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genotipos de la proteína P1 son diferentes entre sí. Por consiguiente, con el propósito de detectar ampliamente la *Mycoplasma pneumoniae*, es necesaria la producción de cada anticuerpo contra la proteína P1 de cada genotipo P1 o un anticuerpo que reconozca un sitio común de proteína P1 de los diferentes genotipos. Además, se ha informado una epidemia estacional de modo tal que se detecta un genotipo diferente del genotipo epidémico en la última estación, es decir, el genotipo cambia dependiendo de las estaciones epidémicas. Por lo tanto, es necesario hallar el genotipo en una etapa inicial de la epidemia y usar el anticuerpo específico para este.

20 También se ha informado un procedimiento de detección que usa la proteína DnaK, que es conocida por estar conservada entre las cepas aisladas de *Mycoplasma pneumoniae* en comparación con la proteína P1, como un marcador de detección (Bibliografía de Patente 3). Sin embargo, *Mycoplasma genitalium* que produce enfermedades infecciosas urinarias en humanos también tiene la proteína DnaK, y, por lo tanto, también muestra reactividad en el procedimiento de detección. Como consecuencia, *Mycoplasma pneumoniae* no puede detectarse de manera específica por el uso de la proteína anterior como un marcador de detección.

25 Si la neumonía por micoplasma no se trata de manera adecuada, los síntomas pueden extenderse o tornarse más severos o pueden incluso producir la extensión de la infección por infección secundaria. Por consiguiente, con el propósito de seleccionar el tratamiento y los antibióticos adecuados, se requiere la detección rápida y concluyente de *Mycoplasma pneumoniae*.

30 Además, aunque se ha contemplado la detección específica y rápida de *Mycoplasma pneumoniae*, se ha requerido un marcador de detección que además pueda detectarse de manera específica *Mycoplasma pneumoniae*, un anticuerpo específico contra el marcador, y también un inmunoensayo y un kit que contiene el anticuerpo.

35 Documentos técnicos convencionales

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Patente de Japón expuesta al público Núm. H5-304990

Documento de Patente 2: Patente de Japón expuesta al público Núm. 2013-72663

Documento de Patente 3: Publicación Internacional Núm. WO2011/068189

40 Documentos de no patente

Documento de No Patente 1: D. Nakane, *et al.*, "Isolation and Characterization of P1 Adhesin, a Leg Protein of the Gliding Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*", *Journal of Bacteriology*, Feb. 2011, pp. 715-722,

45 H.-Y. Chang *et al.*: "Domain Analysis of Protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* Cytadherence and Gliding Motility", *Journal of Bacteriology*, vol. 193, no. 7, 21 January 2011 (2011-01-21), pages 1726-1733, and DALLO S F *et al.*: "Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin", *INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US*, vol. 64, no. 7, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 2595-2601, estudiaron la relación entre la estructura y la función de la adhesina P30.

50 En A. K. Varshney *et al.*: "Cloning, Expression, and Immunological Characterization of the P30 Protein of *Mycoplasma pneumoniae*", *CLINICAL and VACCINE IMMUNOLOGY*, vol. 15, no. 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 215-220, la proteína de fusión P30 se hizo reaccionar con los anticuerpos anti-MBP presentes en el suero de los pacientes.

Sumario de la invención

Problema a resolver por la invención

La finalidad de la presente invención es detectar *Mycoplasma pneumoniae*, que es un patógeno de la neumonía por micoplasma, con una alta sensibilidad y también un procedimiento de detección inmunológica y una tira de prueba.

Medios para resolver el problema

5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un ensayo inmunocromatográfico para detectar *Mycoplasma pneumoniae*, que comprende:

proporcionar un portador de membrana que tiene una zona de captura que se forma mediante la inmovilización previa de un primer anticuerpo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en una posición predeterminada;

10 desarrollar cromatográficamente una mezcla líquida en el portador de membrana hacia la zona de captura, dicha mezcla líquida contiene un segundo anticuerpo contra la proteína P30 y una cantidad predeterminada de una muestra de prueba, por la que se captura un complejo de un antígeno contenido en la muestra de prueba y el segundo anticuerpo se captura por la zona de captura,

15 en el que los anticuerpos primero y segundo son, cada uno, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la proteína P30 presente en una región de la secuencia de la SEQ ID NÚM.: 2, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una tira de prueba inmunocromatográfica para detectar *Mycoplasma pneumoniae*, que al menos comprende anticuerpos primero y segundo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* y un portador de membrana, en la que el primer anticuerpo está previamente inmovilizado en una posición predeterminada para formar una zona de captura; y un segundo anticuerpo está marcado con una sustancia de marcado adecuada y se proporciona en una posición separada de la zona de captura de manera de desarrollarse cromatográficamente en el portador de membrana,

en el que los anticuerpos primero y segundo son, cada uno, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la proteína P30 presente en una región de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 2, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.

25 De acuerdo con aún otro aspecto, el anticuerpo monoclonal que se usa esencialmente en la presente invención reconoce un epítipo de la proteína P30 en una región que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 2 constituye una parte de la secuencia de aminoácidos completa de la proteína P30 establecida en la SEQ ID NÚM.: 1 y es una región que contiene un epítipo presente en la proteína P30.

30 Con el propósito de evitar la competencia entre los anticuerpos y obtener una mayor reactividad, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo preferentemente reconocen epítopos presentes en la proteína P30.

Incidentalmente, la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* a la que reacciona el anticuerpo para detectar *Mycoplasma pneumoniae* es una proteína necesaria para la adhesión de *Mycoplasma* a una célula huésped y es conocida como una de las proteínas accesorias que trabajan junto con una proteína P1 del factor de adhesión.

35 La proteína P30 tiene un peso molecular de 30 KDa y es una de las proteínas adhesivas involucradas en la adhesión y patogenicidad, como la proteína P1. En la célula de *Mycoplasma pneumoniae*, la proteína P30 está localizada en la superficie celular en un extremo del órgano adhesivo y es una proteína de transmembrana que tiene el extremo terminal N incrustado en la membrana celular y el extremo terminal C presente fuera de la membrana celular. La proteína P30 incluye una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina en el lado del extremo terminal C y tiene una estructura repetitiva de la secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina. En general, es sabido que una región que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene prolina forma una conformación tridimensional y es sabido que tiene una posibilidad de convertirse en un epítipo reactivo con un anticuerpo.

45 Por consiguiente, el anticuerpo usado en la presente invención probablemente sea un anticuerpo que reconoce un sitio que tiene la estructura repetitiva de la secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina en una región extracelular de la proteína P30. Además, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 2 se considera la secuencia de aminoácidos que constituye la región extracelular y es una región que incluye la región que tiene la estructura repetitiva de la secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina y que incluye un epítipo de la proteína P30.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el segundo anticuerpo está marcado con un metal coloidal o un látex.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el portador de membrana es una membrana de nitrocelulosa.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la muestra biológica es al menos una seleccionada del grupo que consiste en aspiración de la cavidad nasal, hisopado de la cavidad nasal, hisopado de la garganta, esputo, saliva

y desechos bronquiales.

Efecto de la invención

5 De acuerdo con la presente invención, la infección con *Mycoplasma pneumoniae* puede diagnosticarse de manera rápida y específica al realizar una detección inmunológica por el uso de la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* como un marcador de detección. El procedimiento de detección inmunológica y la tira de prueba de la presente invención permite que la detección de *Mycoplasma pneumoniae* y el diagnóstico de infección con la bacteria se hagan de manera más simple y rápida en el hospital u otra dependencia sin necesidad de un equipamiento o habilidad especializados.

Breve descripción de los dibujos

10 [Figura 1] La Figura 1 es una vista en planta de una tira de prueba inmunocromatográfica, y la Figura 1b es una vista en sección transversal vertical de la tira de prueba inmunocromatográfica que se muestra en la Figura 1 a.

Descripción de realizaciones

En la presente divulgación, cada etapa en la producción de un anticuerpo y un procedimiento de detección o ensayo que usa el anticuerpo se realiza en conformidad con cada procedimiento inmunológico conocido *per se*.

15 (Anticuerpo)

20 Un anticuerpo monoclonal específico para la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* puede prepararse, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal, tal como un ratón, con proteína P30 extraída y purificada de células *Mycoplasma pneumoniae* o proteína P30 expresada mediante ingeniería genética o un polipéptido como parte de la proteína P30 como se menciona con anterioridad, como un antígeno para inmunización; la fusión de las células del bazo del animal inmunizado y las células de mieloma; la selección de hibridomas en un medio que contiene HAT y el cultivo de los hibridomas; y la evaluación de las cepas cultivadas con proteína P30 preparada como se indica con anterioridad, por ejemplo, mediante un inmunoensayo enzimático para una cepa que produce un anticuerpo de la proteína anti-P30.

25 Los ejemplos del anticuerpo incluyen anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo y anticuerpos modificados sustancialmente equivalentes a los anticuerpos contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae*. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', y fragmentos scFv. Además, también se abarca un polipéptido que se une a la proteína P30 derivado del anticuerpo.

30 El ensayo inmunocromatográfico de la presente invención para detectar *Mycoplasma pneumoniae* en una muestra de prueba puede realizarse fácilmente de acuerdo con la estructura de una tira de prueba inmunocromatográfica conocida.

35 Generalmente, dicha tira de prueba inmunocromatográfica está constituida por al menos un primer anticuerpo que es capaz de someterse a reacción antígeno-anticuerpo en un primer determinante antigénico de un antígeno, un segundo anticuerpo que está marcado y es capaz de someterse a reacción antígeno-anticuerpo en un segundo determinante del antígeno, y un portador de membrana, en el que el primer anticuerpo está previamente inmovilizado en una posición predeterminada del portador de membrana para formar una zona de captura, y el segundo anticuerpo está colocado en una posición separada de la zona de captura, de manera de permitirle desarrollarse cromatográficamente en el portador de membrana. El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo generalmente se usan en combinación "hétéro". Es decir, los anticuerpos primero y segundo que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes en posición y conformación en un antígeno se usan en combinación. Sin embargo, el primer determinante antigénico y el segundo determinante antigénico pueden tener la misma conformación a condición de que sean diferentes en posición en el antígeno, y en tal caso, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden ser anticuerpos monoclonales en una combinación "homo", es decir, un mismo anticuerpo monoclonal puede usarse como el primer anticuerpo y como el segundo anticuerpo.

45 Como un ejemplo específico, puede hacerse mención de una tira de prueba como se muestra en la Fig. 1. En la Fig. 1, el numeral 1 indica una lámina adhesiva, 2 indica un miembro impregnado, 3 indica un portador de membrana, 31 indica una zona de captura, 32 indica una zona de captura de control, 4 indica un miembro absorbente, y 5 indica un miembro receptor de muestras.

En el ejemplo que se muestra en la figura, el portador de membrana 3 consiste en un filtro de membrana de nitrocelulosa con forma de tira alargada que tiene un ancho de 5 mm y una longitud de 36 mm.

50 En el portador de membrana 3, se inmoviliza un primer anticuerpo en una posición de 7,5 mm desde el extremo del lado inicial del desarrollo cromatográfico, para formar una zona de captura 31 de un analito. Además, el portador de membrana 3 se proporciona con una zona de captura de control 32 en una posición de 15 mm desde el extremo del lado inicial del desarrollo cromatográfico. Esta zona de captura de control 32 se proporciona para verificar si la reacción se realiza o no independientemente de la presencia o ausencia de un analito y puede formarse normalmente mediante

la inmovilización de un material (sin incluir el analito) específicamente uniendo inmunológicamente el segundo anticuerpo al portador de membrana 3. Por ejemplo, cuando un anticuerpo derivado de un ratón se usa como el segundo anticuerpo, puede usarse un anticuerpo contra el anticuerpo de ratón.

5 En el ejemplo que se muestra en la figura, se usa un filtro de membrana de nitrocelulosa como el portador de membrana 3. Sin embargo, puede usarse cualquier tipo de portador de membrana en la presente memoria, a condición de que sea capaz de desarrollar cromatográficamente un analito contenido en una muestra de prueba e inmovilizar un analito que forma la zona de captura 31. Por lo tanto, también pueden usarse otros tipos de membrana de celulosa, membranas de nylon, membranas de fibra de vidrio, o similares.

10 El miembro de impregnación 2 comprende un miembro impregnado con un segundo anticuerpo que se somete a reacción de antígeno-anticuerpo con el antígeno en un segundo determinante antigénico ubicado en un sitio diferente del primer determinante antigénico al que se une el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo está previamente marcado con una sustancia de marcado adecuada.

15 En el ejemplo que se muestra en la figura, se usa una tela no tejida de fibra de vidrio con forma de tira que tiene un tamaño de 5 mm x 15 mm como el miembro impregnado 2. Sin embargo, el miembro impregnado 2 no está limitado a esta, sino que incluye, por ejemplo, telas de celulosa (un papel de filtro, una membrana de nitrocelulosa, etc.), telas plásticas porosas tal como de polietileno y polipropileno, y otras.

20 Como una sustancia de marcado que marca el segundo anticuerpo, puede usarse cualquier sustancia, a condición de que pueda usarse en la presente memoria. Los ejemplos de dicha sustancia de marcado incluyen una sustancia de marcado con color, y una sustancia de marcado enzimático, y una sustancia de marcado por radiación. Entre estas, se usa preferentemente la sustancia de marcado con color dado que la observación de un cambio de color en la zona de captura 31 a simple vista permite la detección rápida y simple.

25 Los ejemplos de la sustancia de marcado con color incluyen metales coloidales, tal como oro coloidal y platino coloidal; complejos coloidales de estos metales; y látex, tal como látex sintéticos tal como látex de poliestireno coloreado con pigmentos tal como pigmento rojo y azul y látex de caucho natural. Entre estos, en particular se prefieren los metales coloidales, tal como el oro coloidal.

El miembro de impregnación 2 puede producirse, por ejemplo, mediante la impregnación de un miembro, tal como la tela no tejida de fibra de vidrio mencionada con anterioridad, con una suspensión de un segundo anticuerpo marcado y su secado.

30 Como se muestra en la Figura 1, la tira de prueba inmunocromatográfica de la presente invención puede producirse de la siguiente manera. Se fija un portador de membrana 3 a la mitad de la lámina adhesiva 1. En el extremo del lado inicial del desarrollo cromatográfico (es decir, el lado izquierdo en la Figura 1 que se denomina en adelante en la presente memoria "lado corriente arriba", mientras que el lado opuesto, es decir, el lado derecho en la Figura 1 se denomina en adelante en la presente memoria "lado corriente abajo") del portador de membrana 3, el lado corriente abajo del miembro impregnado 2 está dispuesto para su comunicación. La zona del lado corriente arriba del miembro impregnado 2 está fijada a la lámina adhesiva 1.

35 Más aún, si es necesario, la zona del lado corriente abajo de un miembro que recibe muestras 5 puede colocarse sobre la cara superior del miembro impregnado 2 mientras que la zona del lado corriente arriba del miembro que recibe muestras 5 también puede fijarse a la lámina adhesiva 1. Además, la zona del lado corriente arriba del miembro absorbente 4 puede colocarse sobre la cara superior de la zona del lado corriente abajo del portador de membrana 3 mientras que la zona del lado corriente abajo del miembro absorbente 4 puede fijarse a la lámina adhesiva 1.

40 El miembro absorbente 4 puede estar fabricado con cualquier material a condición de que sea capaz de absorber rápidamente y retener un líquido. Los ejemplos de un material tal incluyen telas de algodón, papel de filtro y telas no tejidas de plástico poroso fabricadas a partir de polietileno, polipropileno, etc. En particular, el papel de filtro es óptimo.

45 Como el miembro que recibe muestras 5, puede usarse, por ejemplo, una lámina o película de una resina sintética porosa tal como polietileno poroso o polipropileno poroso, o papel de celulosa o una tela tejida o no tejida tal como un papel de filtro y una tela de algodón.

50 De este modo, una muestra de prueba que contiene una muestra biológica o similares, si se requiere, se mezcla, con un disolvente de desarrollo adecuado para obtener una mezcla líquida que pueda desarrollarse cromatográficamente. Después, la mezcla líquida se inyecta en el miembro receptor de muestras 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica como se muestra en la Figura 1, para que pase a través del miembro receptor de muestras 5 y se mezcle con un segundo anticuerpo marcado en el miembro impregnado 2.

55 Además, la tira de prueba inmunocromatográfica que se muestra en Fig. 1 puede proporcionarse en un estado en que se coloca en una caja plástica adecuada que tiene una porción para inyección de muestra de prueba y una porción para determinación que están respectivamente abiertas sobre el miembro receptor de muestras 5 y la zona de captura 31. Con el propósito de prevenir la infección de un usuario, la tira de prueba inmunocromatográfica está

preferentemente provista en un estado en que se ubica en la caja plástica.

De este modo, una muestra de prueba que contiene una muestra biológica o similares, si se requiere, se mezcla con un disolvente de desarrollo adecuado para obtener una mezcla líquida que pueda desarrollarse cromatográficamente. Después, la mezcla líquida se inyecta en el miembro receptor de muestras 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica como se muestra en la Figura 1, para que pase a través del miembro receptor de muestras 5 y se mezcle con un segundo anticuerpo marcado en el miembro impregnado 2.

En este caso, si se observa un analito en la mezcla líquida mencionada con anterioridad, se forma un complejo del analito y el segundo anticuerpo se forma como un resultado de la reacción de antígeno-anticuerpo. Este complejo se desarrolla cromatográficamente en el portador de membrana 3, y después alcanza la zona de captura 31 y se captura por el primer anticuerpo inmovilizado allí como resultado de la reacción de antígeno-anticuerpo.

En este caso, si se usa como una sustancia de marcado una sustancia de marcado con color tal como oro coloidal, el analito puede determinarse inmediatamente de manera cualitativa o cuantitativa en base a la coloración causada por acumulación de la sustancia de marcado con color en la zona de captura 31. Además, la intensidad de la coloración puede digitalizarse y puede medirse cuantitativamente mediante la lectura óptica de la intensidad del color de la sustancia de marcado con color acumulada en la zona de captura 31 de la tira de prueba inmunocromatográfica con un lector de inmunocromatografía.

Además, cuando el desarrollo cromatográfico se realiza de manera normal, el segundo anticuerpo no involucrado en la reacción de antígeno-anticuerpo con el analito alcanza la zona de captura de control 32 y es capturado por un anticuerpo que está inmovilizado allí y que es reactivo al segundo anticuerpo. En esta ocasión, si se usa una sustancia de marcado con color como una sustancia de marcado, la zona de captura de control 32 se colorea por acumulación de la sustancia de marcado con color para confirmar que el desarrollo cromatográfico se ha realizado de manera normal. En contraste, si la zona de captura de control 32 no se colorea, indica que ocurre un problema tal como la falta de desarrollo del segundo anticuerpo.

En la tira de prueba inmunocromatográfica que se muestra en la figura, el segundo anticuerpo está impregnado en el miembro de impregnación 2 y está dispuesto sobre el portador de membrana 3. El segundo anticuerpo no está limitado a la configuración que se muestra en la figura y puede proporcionarse en una posición separada de la zona de captura 31 de manera de desarrollarse cromatográficamente en el portador de membrana 3. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede incluirse de antemano en un recipiente tal como un tubo provisto para el mezclado de una muestra de prueba con un disolvente de desarrollo y puede empacarse junto con una tira de prueba que incluye el portador de membrana 3 sobre el que se inmoviliza de antemano el primer anticuerpo.

Puede usarse cualquier muestra de prueba. Por ejemplo, puede usarse una muestra biológica en la que puede estar presente *Mycoplasma pneumoniae*, tal como aspiración de la cavidad nasal, hisopado de la cavidad nasal, hisopado de garganta, esputo, saliva, y lavados bronquiales. La muestra de prueba puede diluirse con un diluyente adecuado tal como un disolvente de desarrollo antes de aplicarse al portador de membrana. Además, después de la remoción de la sustancia viscosa o de los sólidos derivados de los componentes biológicos contenidos en una muestra de prueba por filtración con un filtro, la muestra de prueba puede aplicarse al portador de membrana.

Cuando una muestra de prueba contaminada con sangre se usa en un análisis, en particular, por el uso de un anticuerpo marcado con una sustancia de marcado con color tal como oro coloidal, el miembro de membrana que captura hematocitos se dispone preferentemente sobre el miembro receptor de muestras. El miembro de membrana que captura hematocitos está laminado preferentemente entre el miembro impregnado mencionado con anterioridad y el miembro receptor de muestras mencionado con anterioridad. Esto inhibe el desarrollo de eritrocitos en el portador de membrana y de este modo facilita la confirmación de acumulación de sustancias de marcado con color en la zona de captura del portador de membrana. Como tal miembro de membrana que captura hematocitos, se usa una membrana de carboximetilcelulosa. Específicamente, puede usarse un papel de filtro de intercambio de iones CM (marca comercial) disponible de Advantec Toyo K.K., un papel de celulosa de intercambio de iones disponible de Whatman Japan K.K., etc.

Ejemplos

La presente invención se describe más específicamente por medio de los siguientes ejemplos, pero no se limita a los mismos.

(Ejemplo 1: Expresión y purificación de la proteína P30 recombinante)

La secuencia de aminoácidos de la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* cepa M129 se obtuvo de la base de datos DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Una región extracelular que excluye el dominio de transmembrana, la secuencia de aminoácidos (AA74-274) establecida en la SEQ ID NÚM.: 2, se especificó a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína P30, y se sintetizó una secuencia génica correspondiente a la secuencia de aminoácidos. Un vector de expresión His-tag, pET302/NT-His, se escindió con una enzima de restricción, EcoRI, después se desfosforiló con el uso de una fosfatasa alcalina, y se mezcló con la secuencia génica, seguido de una reacción de ligación que usa DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara Bio Inc.). Un plásmido P30 recombinante que transporta el gen diana

se introdujo en un huésped que expresa la proteína recombinante, *E. coli* BL (DE3) pLysS (Novagen). Las bacterias huésped se cultivaron en un medio en placa de agar LB. Las colonias resultantes se cultivaron en un medio LB líquido. Después, se añadió IPTG 1 mM (Takara Bio Inc.) al medio para inducir la expresión de la proteína recombinante, y después se recolectó la *E. coli*. Las bacterias recolectadas se suspendieron nuevamente en un tampón de solubilización (Triron X-100 0,5% (Sigma), imidazol 10 mM, fosfato 20 mM, y NaCl 0,5 M (pH 7,4) (Amersham)) y se solubilizaron por ultrasonificación. Después se purificó la proteína P30 recombinante con His trap Kit (Amersham). Esta proteína purificada se dializó contra una solución salina con tampón de fosfato (en adelante denominado PBS) para obtener una proteína P30 recombinante diana.

(Ejemplo 2: Producción de anticuerpo monoclonal contra la proteína P30 recombinante)

La proteína P30 recombinante preparada en el Ejemplo 1 se usó como antígeno para inmunización para producir un anticuerpo monoclonal contra la proteína P30 recombinante (en adelante denominado anticuerpo anti-P30). El anticuerpo monoclonal se produjo de acuerdo con un procedimiento común. La proteína P30 recombinante (100 µg) se mezcló con una cantidad igual de Adyuvante Completo de Freund (Difco). Se inmunizó un ratón (BALB/c, 5 semanas de vida, Japan SLC, Inc.) con la mezcla tres veces, y se usaron las células del bazo del ratón en la fusión celular con el uso de células de mieloma de ratón Sp2/0-Ag14 (Shulman, *et al.*, 1978). Las células se cultivaron en una solución de cultivo preparada mediante la incorporación de L-glutamina (0,3 mg/ml), potasio de penicilina G (100 unidades/ml), sulfato de estreptomina (100 µg/ml), y Gentamicin (40 µg/ml) a Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) y también se añadió suero de feto de ternero (JRH) en una cantidad de 10%. La fusión celular se realizó mediante la mezcla de células de bazo del ratón inmunizado con células Sp2/0-Ag14 y la incorporación de solución de polietilenglicol (Sigma) a la mezcla. Las hibridomas se cultivaron en HAT-DMEM (DMEM con suero agregado que contenía hipoxantina de sodio 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM, y timidina 0,016 mM (Gibco)). La producción de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo se verificó mediante ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). Las células positivas para la producción de anticuerpos se cultivaron en HT-DMEM (DMEM con suero añadido que contiene hipoxantina de sodio 0,1 mM y timidina 0,16 mM) y se cultivaron, además, de manera continua en DMEM con suero añadido.

(Ejemplo 3: Preparación de anticuerpo monoclonal)

Un ratón (BALB/c, retirado, Japan SLC, Inc.), inoculado con 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Sigma) por anticipado, se inoculó por vía intraperitoneal con células clonadas, y se recolectó la ascitis. La ascitis se aplicó a una columna de proteína G para purificar un anticuerpo monoclonal. El isotipo del anticuerpo monoclonal producido se identificó mediante los Reactivos para Isotipado de Anticuerpos Monoclonales de Ratón (Sigma).

Finalmente, se obtuvieron cinco clones de células que producen anticuerpos monoclonales contra la proteína P30. Todos estos anticuerpos monoclonales eran del isotipo de inmunoglobulina IgG₁.

(Ejemplo de referencia 1: Producción de la solución bacteriana estándar para pruebas)

Se inocularon medios de PPLO con cepas estándar de *Mycoplasma pneumoniae* cepa M129 y cepa FH, seguido del cultivo en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C hasta que se obtuvo la concentración deseada. La solución de cultivo resultante se diluyó en serie 10 veces con un medio líquido de PPLO hasta dar una solución diluida 100.000 veces. La cantidad de colonias cultivadas en cada solución diluida en medio de agar de PPLO se contó bajo un estereomicroscopio para calcular la concentración bacteriana. Las soluciones de cultivo resultantes se usaron como soluciones bacterianas para las pruebas.

(Ejemplo comparativo 1: Purificación de la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae*)

Un medio líquido de PPLO se inoculó con cepa M129 de *Mycoplasma pneumoniae*, seguido de cultivo a 37°C. La solución de cultivo resultante se centrifugó para recolectar las células. La proteína P1 se purificó a partir de las células de acuerdo con el procedimiento de Nakane, *et al.* (Journal of Bacteriology, 2011).

Las células resultantes se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (en adelante denominada PBS) dos veces. Las células se suspendieron en PBS que contiene CHAPS al 1%, y la suspensión se centrifugó. Después, el sedimento resultante se disolvió en una PBS que contiene octilglucósido al 2%. La solución se centrifugó y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante resultante se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio, seguido de centrifugado. El sedimento resultante se disolvió en una PBS que contiene Triton X-100 al 0,3%, y la solución se purificó por cromatografía en columna por filtración de gel por el uso de Superdex 200. La fracción que contiene la proteína purificada se analizó por SDS-page para confirmar una banda individual a aproximadamente 170 kDa. De este modo, se obtuvo la proteína P1 diana.

De manera similar, la proteína P1 derivada de la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* se purificó de las células para obtener la proteína P1 diana.

(Ejemplo comparativo 2: Producción de anticuerpo monoclonal contra la proteína P1)

La proteína P1 purificada preparada en el Comparativo Ejemplo 1 se usó como antígeno para inmunización y se

produjo un anticuerpo monoclonal contra la proteína P1 recombinante (en adelante denominado anticuerpo anti-P30). El anticuerpo monoclonal se produjo en conformidad con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las células resultantes se seleccionaron para determinar la presencia de células productoras de anticuerpo anti-P1 mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (en adelante denominado ELISA) con el uso de la proteína P1 derivada de la cepa M129 y la proteína P1 derivada de la cepa FH preparadas en el Ejemplo Comparativo 1 como antígenos de fase sólida. Se seleccionaron las células productoras de anticuerpos que mostraron una absorbancia de 2,0 o más en el ELISA.

Un ratón (BALB/c, retirado, Japan SLC, Inc.), inoculado con 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Sigma) por anticipado, se inoculó por vía intraperitoneal con células productoras de anticuerpo anti-P1, y se recolectó la ascitis. La ascitis se aplicó a una columna de proteína G, y el anticuerpo obtenido se usó como anticuerpo anti-P1 purificado. Finalmente, se seleccionaron cinco clones de células que producen anticuerpos monoclonales contra la proteína P1 derivada de las cepas M129 y FH. Todos estos anticuerpos monoclonales eran del isotipo de inmunoglobulina IgG₁.

(Ejemplo 4: Examen comparativo de la reactividad del anticuerpo anti-P30 y el anticuerpo anti-P1)

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-P30 preparados en el Ejemplo 3 y los anticuerpos anti-P1 preparados en el Ejemplo Comparativo 2. Cada uno de los anticuerpos producidos en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo Comparativo 2 se aplicó a una microplaca a la que las soluciones bacterianas de la cepa M129 y la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* en el Ejemplo de Referencia 1 y *Mycoplasma genitalium* se extrajeron en fase sólida a las concentraciones indicadas, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la solución en cada pocillo se succionó y se retiró. Después del lavado, se añadió anticuerpo anti-ratón marcado con biotina para la reacción. Después de la incubación durante 1 hora, la solución en cada pocillo se succionó y se retiró. Después del lavado, se añadió peroxidasa de rábano picante marcada con avidina para la reacción. Después, se añadió una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMBZ) como sustrato cromogénico para la reacción. La reacción se interrumpió con ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia se midió con un lector de microplacas (Biorad) a una longitud de onda principal de 450 nm. Los resultados se muestran en las Tablas 1 a 3.

Tabla 1: Prueba de reactividad del anticuerpo anti-P30 (sensibilizado con proteína P30 derivada de la cepa M129)

	<i>M. pneumoniae</i>		<i>M. genitalium</i>
	Cepa M129	Cepa FH	
BLA-001	2,632	2,126	0,040
BLA-002	2,692	2,491	0,084
BLA-003	2,883	2,790	0,080
BLA-004	2,635	2,030	0,040
BLA-005	2,171	2,137	0,056

Tabla 2: Prueba de reactividad del anticuerpo anti-P1 (sensibilizado con proteína P1 derivada de la cepa M129)

	<i>M. pneumoniae</i>		<i>M. genitalium</i>
	Cepa M129	Cepa FH	
BLM-001	2,858	0,080	0,182
BLM-002	2,528	2,961	0,070
BLM-003	0,799	0,623	0,164
BLM-004	1,697	0,120	0,099
BLM-005	2,029	2,670	0,309

Tabla 3: Prueba de reactividad del anticuerpo anti-P1 (sensibilizado con proteína P1 derivada de la cepa FH)

	<i>M. pneumoniae</i>		<i>M. genitalium</i>
	Cepa M129	Cepa FH	
BLF-001	1,216	1,800	0,048
BLF-002	2,238	2,957	1,968
BLF-003	1,018	1,969	0,309
BLF-004	2,036	2,987	0,254
BLF-005	0,916	2,182	0,379

Como es evidente a partir de la Tabla 1, se confirmó que los anticuerpos anti-P30 producidos en el Ejemplo 2 mostraron altas reactividades tanto con la cepa M129 como con la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* y no mostraron reacción cruzada con el control negativo, *Mycoplasma genitalium*.

En contraste, como es evidente a partir de las Tablas 2 y 3, se reveló que las reactividades de los anticuerpos anti-P1 producidos en el Ejemplo Comparativo 2 tenían sesgo en cualquiera de la cepa M129 o la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae*. Es muy probable que el sesgo de reactividad tenga su causa en el genotipo P1, es decir, una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas P1 que tienen diferentes genotipos P1 se refleja en las reactividades de los anticuerpos monoclonales. Además, se reconoció una leve reactividad cruzada con el control negativo, *Mycoplasma genitalium*.

Por consiguiente, se demostró que la proteína P30 es comúnmente conservada en *Mycoplasma pneumoniae* y es una proteína específica y, además, se obtuvieron los anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la proteína P30.

(Ejemplo 5: Producción de la tira de prueba inmunocromatográfica por el uso del anticuerpo anti-P30)

(1) Preparación del anticuerpo anti-P30

Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con las hibridomas BLA-001 y BLA-002 preparados en el Ejemplo 3, y la ascitis obtenida de cada ratón se purificó con proteína G mediante un procedimiento habitual para obtener IgG, que se usó como un anticuerpo anti-P30.

(2) Preparación de solución de partículas coloidales de platino-oro

La totalidad de los utensilios a usar se lavaron con agua regia. Se hirvió agua ultra pura (390 ml) en un matraz, y una solución acuosa de ácido cloroáurico (30 ml, 1 L de la solución acuosa contiene 1 g de oro, fabricada por Katayama Chemical Industries Co., Ltd.) se añadió al agua en ebullición. Una solución acuosa de citrato de sodio al 1% en peso (60 ml) se añadió después al matraz, y después de 6 minutos y 45 segundos, se añadió una solución acuosa de ácido cloroplátinico (30 ml, 1 l de la solución acuosa contiene 1 g de platino, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). 5 minutos después de la adición de la solución acuosa de ácido cloroplátinico, se añadió una solución acuosa de citrato de sodio al 1% en peso (60 ml), seguido de reflujo durante 4 horas para obtener una suspensión coloidal de platino-oro.

Preparación de la solución de anticuerpo anti-P30 marcada con coloide platino-oro

El clon BLA-002 obtenido en la sección anterior (1) se usó como un anticuerpo anti-P30 que se marcará con el coloide de platino-oro, y el marcado con el coloide platino-oro se realizó mediante el siguiente procedimiento.

El anticuerpo anti-P30 (1 µg en términos del peso de proteína, en adelante, el peso de un anticuerpo en términos del peso de la proteína simplemente se muestra mediante un valor numérico del peso obtenido por análisis gravimétrico de la proteína purificada) y la solución coloidal de platino-oro (1 m) descrita en la sección anterior (2) se mezclaron, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir que todo el anticuerpo se una a las partículas coloidales de platino-oro. Una solución de albúmina de suero de bovino al 10% (en adelante denominada "BSA") se añadió posteriormente a una concentración final del 1% en la solución coloidal de platino-oro para bloquear la totalidad de las superficies residuales de las partículas coloidales de platino-oro con BSA. De este modo, se preparó una solución de anticuerpo anti-P30 marcado con platino-oro coloidal (en adelante denominada "anticuerpo marcado con platino-oro coloidal"). Esta solución se centrifugó (5600XG, durante 30 min) para precipitar el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal, y el sobrenadante se retiró para obtener un anticuerpo marcado de platino-oro coloidal. Este anticuerpo marcado con platino-oro coloidal se suspendió en solución con tampón de ácido clorhídrico tris 50 mM (pH 7,4) que contenía sacarosa al 10%, BSA al 1%, y Triton-X 100 al 0,5% para obtener una

solución de anticuerpo marcado con platino-oro coloidal.

(4) Producción de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae*

(4-1) Zona de captura del complejo de proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* y anticuerpo marcado con platino-oro coloidal

5 Una membrana con forma de tira alargada con un tamaño de 5 mm de ancho y 36 mm de longitud se proporcionó como portador de membrana 3 para desarrollo cromatográfico de un medio cromatográfico. Se aplicó 0,5 µl de una solución que contiene 1,0 mg/ml de anticuerpo anti-P30 en una forma lineal a una posición de 7,5 mm desde el extremo del lateral del punto de partida del desarrollo cromatográfico del portador de membrana para el desarrollo cromatográfico. Se secó a la temperatura ambiente, para formar una zona de captura 31 para capturar un complejo de la proteína P30 y el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal. El anticuerpo anti-P30 aplicado era el clon BLA-001 obtenido en la sección anterior (1).

(4-2) Miembro impregnado con anticuerpo marcado con platino-oro coloidal

15 Una tela no tejida de fibra de vidrio con forma de tira con un tamaño de 5 mm x 15 mm se impregnó con 37,5 µl de la solución del anticuerpo marcado con platino-oro coloidal, y después se secó a temperatura ambiente, para obtener un miembro impregnado con anticuerpo marcado con platino-oro coloidal 2.

(4-3) Preparación de la tira de prueba inmunocromatográfica

20 Además del portador de membrana 3 para el desarrollo cromatográfico y el miembro impregnado con anticuerpo marcado 2, se prepararon una tela de algodón como el miembro receptor de la muestra 5 y un papel de filtro como el miembro absorbente 4. Después, una tira de prueba cromatográfica que era igual que la Figura 1 se preparó con el uso de estos miembros.

(5) Pruebas

25 Las soluciones bacterianas de la cepa M129 y la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* preparadas en el Ejemplo de Referencia 1 se diluyeron con una solución para extracción de muestras en una concentración indicada para preparar cada muestra de prueba. La muestra de prueba (120 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestras 5 de la tira de prueba descrita en la sección anterior (4) para el desarrollo cromatográfico dejándose reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La cantidad capturada del complejo de la proteína P30 y el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista. La cantidad capturada se determinó mediante la evaluación del grado de ennegrecimiento, que es proporcional a la cantidad, a simple vista y se clasificó en las siguientes cinco etapas: - (sin ennegrecimiento), ± (ennegrecimiento leve), + (ennegrecimiento evidente), ++ (ennegrecimiento notable), y +++ (ennegrecimiento notable).

30 La Tabla 4 muestra los resultados. Como resulta evidente a partir de la Tabla 4, se reveló que la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* puede detectarse mediante el ensayo inmunocromatográfico con el uso de dos tipos de anticuerpo anti-P30. Además, no se observó ennegrecimiento no específico en el blanco.

Tabla 4: Reactividad con *Mycoplasma pneumoniae* cepa M129

		cepa M129M. <i>pneumoniae</i>
Concentración [UFC/ml]	Blanco	-
	1x10 ⁶	+
	1x10 ⁷	++

35

(Ejemplo comparativo 4: Preparación de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1)

40 Se preparó una tira de prueba inmunocromatográfica con el uso de los anticuerpos anti-P1 reactivos a la cepa M129 y la cepa FH entre los anticuerpos anti-P1 producidos en el Ejemplo Comparativo 2, es decir, con el uso de BLM-002 como anticuerpo para marcado y BLF-001 como anticuerpo para la zona de captura, de acuerdo con el procedimiento para producir la tira de prueba inmunocromatográfica descrito en el Ejemplo 3.

Se demostró que la tira de prueba inmunocromatográfica que utiliza el anticuerpo anti-P 1 puede detectar la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae*.

(Ejemplo 6: Análisis de reactividad comparativa de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 y la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1)

45 Las soluciones bacterianas de la cepa M129 y la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* preparadas en el Ejemplo de

Referencia 1 se diluyeron con una solución para extracción de muestras en una concentración indicada para preparar cada muestra de prueba. La muestra de prueba (120 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestras 5 de cada tira de prueba inmunocromatográfica para el desarrollo cromatográfico dejándose reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo del antígeno y el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista para determinar el resultado. La cantidad capturada se determinó mediante la evaluación del grado de ennegrecimiento, que es proporcional a la cantidad, a simple vista y se clasificó en las siguientes cinco etapas: - (sin ennegrecimiento), ± (ennegrecimiento leve), + (ennegrecimiento evidente), ++ (ennegrecimiento notable), y +++ (ennegrecimiento notable). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

10 Tabla 5: Análisis de reactividad comparativa de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 y la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1

		cepa M129M. pneumoniae		cepa FH M. pneumoniae	
		anticuerpo anti-P30	anticuerpo anti-P1	anticuerpo anti-P30	anticuerpo anti-P1
Concentración [UFC/ml]	Blanco	-	-	-	-
	1x10 ⁵	±	-	+	-
	1x10 ⁶	+	-	++	±
	1x10 ⁷	++	±	+++	+
	1x10 ⁸	+++	+	+++	++

15 Como resulta evidente a partir de la Tabla 5, la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 mostró ennegrecimiento notable para 1x10⁷ UFC/ml de la cepa M129 y 1x10⁶ UFC/ml de la cepa FH y mostró ennegrecimiento evidente para 1x10⁶ UFC/ml de la cepa M129 y 1x10⁵ UFC/ml de la cepa FH.

En contraste, la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1 mostró ennegrecimiento evidente de 1x10⁸ UFC/ml de la cepa M129 y 1x10⁷ UFC/ml de la cepa FH.

20 Como resulta evidente a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 5, los resultados de la comparación de las concentraciones bacterianas de las muestras para análisis a las que se mostró el mismo grado de ennegrecimiento demostraron que la sensibilidad de detección de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 era 100 veces más alta que la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1 en ambas reactividades con la cepa M129 y la cepa FH.

25 Los resultados descritos anteriormente demostraron que la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 con el uso del anticuerpo anti-P30 puede detectar *Mycoplasma pneumoniae* con alta sensibilidad y especificidad.

(Ejemplo 6: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* de hisopado de garganta)

30 Se recolectaron hisopados de garganta de los pacientes clínicamente sospechados de infección con *Mycoplasma pneumoniae* con hisopos de algodón esterilizados. Los hisopados de garganta se verificaron, cada uno, respecto de si había presencia de *Mycoplasma pneumoniae* en el hisopado de garganta o no, mediante el análisis genético desarrollado por el National Institute of Infectious Diseases, Japan. En base a los resultados, siete muestras en las que se detectó el gen de *Mycoplasma pneumoniae* y tres muestras en las que no se detectó el gen se seleccionaron de los hisopados de garganta recolectados. Los hisopados de garganta seleccionados se extrajeron con una solución para extracción de muestras para preparar muestras de prueba. Las muestras de prueba se sometieron a detección de *Mycoplasma pneumoniae* con el uso de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención.

35 La muestra de prueba (120 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestras 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica preparada en el Ejemplo 3 para el desarrollo cromatográfico dejándose reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo del antígeno y el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista para determinar el resultado.

40 La Tabla 6 muestra los resultados de la prueba.

Tabla 6: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* de hisopado de garganta

Muestra Nro.	Ensayo inmunocromatográfico	Análisis genético
1	+	+
2	+	+
3	-	-
4	-	-
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	-	-
9	+	+
10	+	+

5 Como resulta evidente a partir de la Tabla 6, los resultados de detección por la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención estuvieron todos de acuerdo con los resultados del análisis genético. De este modo, se demostró que *Mycoplasma pneumoniae* de los hisopados de garganta puede detectarse de manera rápida y simple mediante la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención.

(Ejemplo 7: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* de hisopado de garganta)

10 Ochenta y un hisopados de garganta se recolectaron de 81 pacientes clínicamente sospechados de infección con *Mycoplasma pneumoniae* mediante el raspado de la faringe de los pacientes con hisopos de algodón esterilizados. Los hisopos usados para recolectar los hisopados de garganta se sometieron, cada uno, a extracción con 0,7 ml de una solución para extracción de muestras para preparar las muestras de prueba. Las muestras de prueba se sometieron a detección de *Mycoplasma pneumoniae* con el uso de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención. Por separado, como control, se condujo un análisis de rendimiento comparativo con el uso de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1. Todas las muestras clínicas recolectadas se sometieron a un análisis de amplificación de ácido nucleico (procedimiento PCR) basado en el análisis genético desarrollado por el National Institute of Infectious Diseases, Japan para verificar la presencia de *Mycoplasma pneumoniae*.

20 La muestra de prueba (120 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestras 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica preparada en el Ejemplo 3 para el desarrollo cromatográfico dejándose reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo del antígeno y el anticuerpo marcado con platino-oro coloidal capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista para determinar el resultado. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

25 Además, como control, se realizó el mismo procedimiento con el uso de la tira de prueba inmunocromatográfica preparada en el Ejemplo Comparativo 4, y los resultados se determinaron después de la reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7: Análisis comparativo de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 y análisis de amplificación del ácido nucleico (procedimiento por PCR) para la muestra clínica

		Análisis de amplificación de ácido nucleico (procedimiento por PCR)		
		Positivo	Negativo	Total
Ejemplo 3: Tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30	Positivo	38	0	48
	Negativo	10	33	43
	Total	48	33	81

Cuando el análisis de amplificación del ácido nucleico se usó como estándar, la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención mostró un índice de coincidencia positivo (sensibilidad) de 79,2%, un índice de coincidencia negativo (especificidad) de 100,0% y un índice de coincidencia total de 87,7%.

5 Tabla 8: Análisis comparativo de la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1 y análisis de amplificación de ácido nucleico (procedimiento por PCR) para la muestra clínica

		Análisis de amplificación de ácido nucleico (procedimiento por PCR)		
		Positivo	Negativo	Total
Ejemplo comparativo 4: Tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1	Positivo	8	0	8
	Negativo	40	33	73
	Total	48	33	81

10 En contraste, la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1 como un Ejemplo Comparativo mostró un índice de coincidencia positivo (sensibilidad) de 16,7%, un índice de coincidencia negativo (especificidad) de 100,0% y un índice de coincidencia total de 50,6%.

15 Como resulta evidente a partir de las Tablas 7 y 8, se demostró que los resultados de detección por la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención se correlacionan bien con los resultados del análisis de amplificación de ácido nucleico (procedimiento por PCR). Además, la presente invención mostró una alta sensibilidad de detección en comparación con la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P1 de un Ejemplo Comparativo. Este resultado demostró que la tira de prueba inmunocromatográfica que detecta la proteína P30 de la presente invención puede detectar *Mycoplasma pneumoniae* con alta sensibilidad y especificidad en centros clínicos.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención proporciona un procedimiento inmunológico y una tira de prueba para detectar *Mycoplasma pneumoniae* que usa un anticuerpo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae*, y puede diagnosticar de manera rápida y específica la infección con *Mycoplasma pneumoniae* sin necesidad de ningún equipamiento ni habilidad especializados.

Descripción de los símbolos

- 1 Lámina adhesiva
- 25 2 Miembro impregnado
- 3 Portador de membrana
- 31 Zona de captura
- 32 Zona de captura de control
- 4 Miembro absorbente
- 30 5 Miembro receptor de muestras

Listado de secuencias

- <110> BL Co., Ltd.
- <120> Inmunoensayo de *Mycoplasma pneumoniae* kit
- <130> P-107
- 35 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1

ES 2 764 481 T3

<211> 274

<212> PRT

<213> *Mycoplasma pneumoniae*

<400> 1

```

Met Lys Leu Pro Pro Arg Arg Lys Leu Lys Leu Phe Leu Leu Ala Trp
 1          5          10          15

Met Leu Val Leu Phe Ser Ala Leu Ile Val Leu Ala Thr Leu Ile Leu
 20          25          30

Val Gln His Asn Asn Thr Glu Leu Thr Glu Val Lys Ser Glu Leu Ser
 35          40          45

Pro Leu Asn Val Val Leu His Ala Glu Glu Asp Thr Val Gln Ile Gln
 50          55          60

Gly Lys Pro Ile Thr Glu Gln Ala Trp Phe Ile Pro Thr Val Ala Gly
 65          70          75          80

Cys Phe Gly Phe Ser Ala Leu Ala Ile Ile Leu Gly Leu Ala Ile Gly
 85          90          95

Leu Pro Ile Val Lys Arg Lys Glu Lys Arg Leu Leu Glu Glu Lys Glu
 100         105         110

Arg Gln Glu Gln Leu Ala Glu Gln Leu Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln
 115         120         125

Glu Glu Gln Gln Ala Leu Glu Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala His Ala
 130         135         140

Glu Ala Glu Val Glu Pro Ala Pro Gln Pro Val Pro Val Pro Pro Gln
 145         150         155         160

Pro Gln Val Gln Ile Asn Phe Gly Pro Arg Thr Gly Phe Pro Pro Gln
 165         170         175

```

ES 2 764 481 T3

Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala
 180 185 190

Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly
 195 200 205

Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln
 210 215 220

Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala
 225 230 235 240

Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly
 245 250 255

Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Arg

<210> 2

<211> 201

<212> PRT

5 <213> *Mycoplasma pneumoniae*

<400> 2

Phe Ile Pro Thr Val Ala Gly Cys Phe Gly Phe Ser Ala Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Pro Ile Val Lys Arg Lys Glu Lys
 20 25 30

Arg Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln Leu Ala Glu Gln Leu
 35 40 45

Gln Arg Ile Ser Ala Gln Gln Glu Glu Gln Gln Ala Leu Glu Gln Gln
 50 55 60

Ala Ala Ala Glu Ala His Ala Glu Ala Glu Val Glu Pro Ala Pro Gln
 65 70 75 80

Pro Val Pro Val Pro Pro Gln Pro Gln Val Gln Ile Asn Phe Gly Pro
 85 90 95

Arg Thr Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met
 100 105 110

ES 2 764 481 T3

Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro
115 120 125

Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro
130 135 140

Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met
145 150 155 160

Pro Pro His Pro Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro
165 170 175

Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Gln Pro Pro Arg Pro Gly Met Pro
180 185 190

Pro Gln Pro Gly Phe Pro Pro Lys Arg
195 200

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo inmunocromatográfico para detectar *Mycoplasma pneumoniae*, que comprende:

5 proporcionar un portador de membrana que tiene una zona de captura que se forma mediante la inmovilización previa de un primer anticuerpo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en una posición predeterminada;

desarrollar cromatográficamente una mezcla líquida en el portador de membrana hacia la zona de captura, conteniendo dicha mezcla líquida un segundo anticuerpo contra la proteína P30 y una cantidad predeterminada de una muestra de prueba,

10 mediante lo cual se captura un complejo de un antígeno contenido en la muestra de prueba y el segundo anticuerpo por la zona de captura,

en el que los anticuerpos primero y segundo son, cada uno, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la proteína P30 presente en una región de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 2, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.
2. El ensayo inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal reconoce una región que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina.
3. El ensayo inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el segundo anticuerpo está marcado con un metal coloidal o un látex.
4. El ensayo inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el portador de membrana es una membrana de nitrocelulosa.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra biológica es al menos una seleccionada del grupo que consiste en aspiración de la cavidad nasal, hisopado de la cavidad nasal, hisopado de la garganta, esputo, saliva y lavados bronquiales.
6. Una tira de prueba inmunocromatográfica que detecta *Mycoplasma pneumoniae*, que comprende al menos anticuerpos primero y segundo contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* y un portador de membrana,

25 en la que el primer anticuerpo se inmoviliza previamente en una posición predeterminada del portador de membrana para formar una zona de captura; y

el segundo anticuerpo está marcado con una sustancia de marcado adecuada y se proporciona en una posición separada de la zona de captura de manera que se desarrolla cromatográficamente junto con una muestra de prueba en el portador de membrana, en la que los anticuerpos primero y segundo son cada uno un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la proteína P30 presente en una región de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 2, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.

30
7. La tira de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo monoclonal reconoce una región que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina.
8. La tira de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que el segundo anticuerpo está marcado con un metal coloidal o un látex.
- 35 9. La tira de prueba para inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el portador de membrana es una membrana de nitrocelulosa.
10. La tira de prueba para inmunocromatográfica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la muestra biológica es al menos una seleccionada del grupo que consiste en aspiración de la cavidad nasal, hisopado de la cavidad nasal, hisopado de la garganta, esputo, saliva y lavados bronquiales.

40

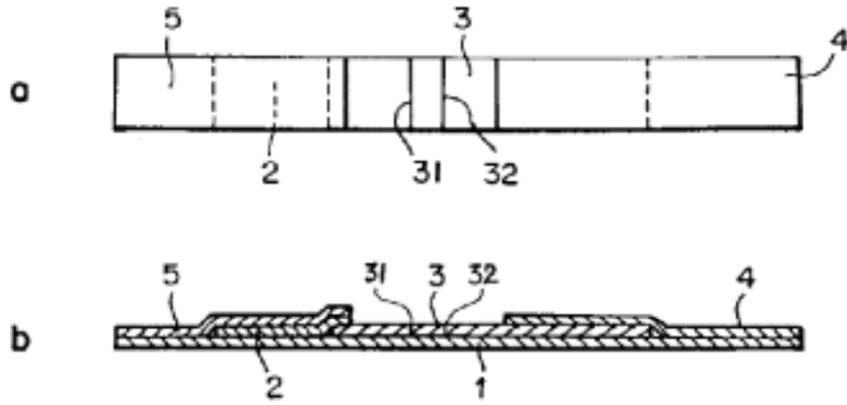


Fig. 1