

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 612**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C12N 15/02	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
C07K 16/12	(2006.01)
C07K 14/30	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/JP2016/052381**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16121831**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16743434 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3252471**

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

30 Prioridad:

29.01.2015 JP 2015015253

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

27.07.2020

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:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 775 612 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 de detección inmunológica y kit para *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 un kit para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* usando el anticuerpo.

Antecedentes de la técnica

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

10 La neumonía por micoplasma es común en infantes, 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 inicio del síntoma inicial, se convierte en la más alta al inicio de los síntomas clínicos, continúa a 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, dolor de cabeza y otros síntomas similares al resfriado. La neumonía por micoplasma se caracteriza por, por ejemplo, fiebre alta superior a 38 °C y tos seca intensa. La tos continúa aún más durante 15 mucho tiempo, de 3 a 4 semanas, después de la disminución de la fiebre. Sin embargo, no existe un examen que encuentre características de la neumonía por micoplasma, y es típica la apariencia de vidrio esmerilado pálido en el examen de rayos X de tórax.

20 La forma de infección con *Mycoplasma* es la infección por gotitas y la infección por contacto con un paciente infectado. *Mycoplasma pneumoniae* invade el tracto respiratorio y se adhiere a los bronquios o al epitelio de los bronquiolos para lograr la infección.

La infección por *Mycoplasma* se designa como una enfermedad infecciosa de declaración obligatoria (Enfermedades infecciosas Categoría V) en base a la Ley de Control de Enfermedades Infecciosas, y los proveedores de atención médica designados tienen la obligación de informar de inmediato el número de pacientes.

25 *Mycoplasma pneumoniae* es un microorganismo mínimo que puede replicarse a sí mismo, y se diferencia de otras bacterias en que no tiene una pared celular. En consecuencia, los antibióticos β -lactámicos y los antibióticos cefem, que son antibióticos que tienen la función de inhibir la síntesis de la pared celular, son ineficaces, y se administran para el tratamiento los antibióticos macrólidos, antibióticos de tetraciclina y nuevos antibióticos de quinolona. Por lo tanto, se desea la identificación inmediata de las bacterias causantes para determinar un plan de tratamiento.

30 Actualmente, la infección por *Mycoplasma pneumoniae* se diagnostica definitivamente mediante un procedimiento de cultivo de aislamiento y una prueba serológica.

El cultivo de aislamiento necesita un medio de cultivo especializado (medio PPLO) para detectar el *Mycoplasma*. Además, su proliferación es lenta, en comparación con otras bacterias, por lo que toma al menos aproximadamente una semana para obtener el resultado de la determinación. Por lo tanto, es difícil identificar rápidamente las bacterias causantes mediante el procedimiento de cultivo de aislamiento en las clínicas.

35 *Mycoplasma* es susceptible a la temperatura y las muestras que contienen *Mycoplasma* no pueden mantenerse en almacenamiento en frío, a diferencia de las muestras que contienen bacterias comunes. En consecuencia, el *Mycoplasma* contenido en una muestra puede extinguirse o disminuir durante el almacenamiento o transporte de la muestra y puede no detectarse incluso mediante el procedimiento de cultivo de aislamiento.

40 Los ejemplos de la prueba serológica incluyen una aglutinación en frío, una prueba de fijación del complemento (CF), una prueba de hemaglutinación indirecta (IHA), un procedimiento de aglutinación de partículas (PA) y un ensayo inmunoenzimático (EIA), que detecta específicamente el anticuerpo IgG o el anticuerpo IgM.

45 Además, un kit inmunocromatográfico (ImmunoCard Mycoplasma Antibody, disponible de TFB, Inc.) está disponible comercialmente como una prueba simple que detecta los anticuerpos IgM específicos para *Mycoplasma pneumoniae* en suero o plasma mediante EIA y se usa en clínicas.

En la prueba serológica, aunque el anticuerpo IgM en una muestra a detectar aumenta en la etapa temprana de la infección, la muestra puede mostrar un falso negativo en el caso de una baja respuesta de producción de anticuerpos o en función del momento del ensayo. Además, dado que toma mucho tiempo antes de que el anticuerpo IgM desaparezca en la sangre, no se puede decir que el resultado de la prueba serológica siempre 50 indique correctamente el estado actual de la infección.

En consecuencia, el diagnóstico definitivo mediante la prueba serológica necesita pruebas cuantitativas que usen sueros pareados de etapas agudas y convalecientes, y por lo tanto, tiene que ser un diagnóstico ex-post en muchos casos.

También se emplea un procedimiento de detección de ácidos nucleicos para la detección del ADN del *Mycoplasma pneumoniae*. Sin embargo, en el procedimiento de detección de ácidos nucleicos, el procedimiento de amplificación del ácido nucleico es complicado y necesita equipos especializados, y el ensayo tarda varias horas. Por lo tanto, el procedimiento no es una prueba que generalmente se usa.

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

10 *Mycoplasma pneumoniae* se adhiere a los cilios de las células epiteliales respiratorias con su órgano adhesivo en forma de una protuberancia en forma de frasco, y después se mueve a la superficie celular mediante motilidad deslizando y se adhiere a la misma para lograr la infección. Se ha informado de un anticuerpo específico para la proteína P1 (169 KDa), que se conoce como proteína adhesiva que desempeña un papel central en esta adhesión o motilidad deslizando, y de un procedimiento de detección que usa la proteína P1 como marcador de detección (Documento de patente 1 y 2).

15 También se sabe 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. En consecuencia, para detectar ampliamente *Mycoplasma pneumoniae*, es necesaria la producción de cada anticuerpo contra la proteína P1 de cada genotipo P1 o de un anticuerpo que reconozca un sitio común de la proteína P1 en los diferentes genotipos. Además, se ha informado una epidemia estacional de modo que se detecta un genotipo diferente del genotipo epidémico en la última temporada, es decir, el genotipo cambia según las estaciones epidémicas. Por lo tanto, es necesario descubrir el genotipo en una etapa temprana de la epidemia y usar un anticuerpo específico para la misma.

20 También se ha informado de un procedimiento de detección que usa la proteína DnaK, que se sabe que se conserva entre cepas aisladas de *Mycoplasma pneumoniae* en comparación con la proteína P1, como un marcador de detección (Documento de patente 3). *Mycoplasma genitalium* también contiene la proteína DnaK causando enfermedades infecciosas urinarias humanas, y por lo tanto también muestra reactividad cruzada. Por consiguiente, *Mycoplasma pneumoniae* no puede detectarse específicamente mediante el uso de la proteína anterior como marcador de detección.

25 Además, existe un informe de cepas mutantes relacionadas con la proteína P30 (30 kDa), que es una proteína de adhesión de *Mycoplasma pneumoniae* (Documento no patente 1). En este informe, se ha informado del procedimiento de detección SDS-PAGE utilizando unos antisueros de conejo contra la proteína P30. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal (102-181) y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos C-terminal (139-275) de la proteína P30 se expresan como una proteína de fusión con dihidrofolato reductasa murina modificada (DHFR) para producir antisueros de conejo contra la proteína de fusión. En este informe, solo se divulgan los antisueros de conejo que tiene reactividad contra la proteína P30, pero no se divulga ningún anticuerpo que reconozca un epitopo específico en la proteína P30. Además, se desconoce si el suero se puede usar para la detección inmunológica en la presente invención, y no está claro si tiene una alta especificidad y reactividad.

30 Si la neumonía por micoplasma no se trata adecuadamente, los síntomas pueden prolongarse o agravarse o causar la propagación de la infección debido a una infección secundaria. En consecuencia, para seleccionar el tratamiento y los antibióticos apropiados, se exige la detección rápida y concluyente de *Mycoplasma pneumoniae*.

35 Además, aunque se ha contemplado la detección rápida de *Mycoplasma pneumoniae*, se han exigido el uso de un anticuerpo que pueda detectar *Mycoplasma pneumoniae* con mayor especificidad y también un inmunoensayo y un kit que contenga un anticuerpo tal.

Documentos técnicos convencionales

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Documento de patente japonesa abierta a inspección pública núm. H5-304990

Documento de Patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública núm. 2013-72663

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

Documento de Patente 4: CN104198703A.

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: G. Layh-Schmitt y otros, "The adhesin related 30-kDa protein of *Mycoplasma pneumoniae* exhibits size and antigen variability.", FEMS Microbiology Letters, 152, 1997, p.101-108.

Sumario de la invención

Problema a resolver por la invención

La presente invención tiene como objetivo detectar específicamente la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras biológicas, lo que permita un diagnóstico mucho más preciso de la infección con *Mycoplasma pneumoniae* que antes.

5 **Los medios para resolver el problema.**

Los presentes inventores han logrado obtener un anticuerpo contra un epítipo específico de la proteína P30 mediante la inmunización de un ratón usando la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* como inmunógeno, y han descubierto que puede detectarse *Mycoplasma pneumoniae* con mayor especificidad con una sensibilidad más alta que antes mediante el uso del anticuerpo en un inmunoensayo de doble anticuerpo, y particularmente en un ensayo inmunocromatográfico. Por lo tanto, la presente invención ha sido completada se reivindica en la reivindicación 1.

Es decir, se proporciona un procedimiento, de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

De manera similar, se proporciona un kit de inmunoensayo tipo sándwich para detectar *Mycoplasma pneumoniae* como se reivindica en la reivindicación 7.

15 En particular, el inmunoensayo en el procedimiento de detección anterior y el kit de inmunoensayo es ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y un ensayo inmunocromatográfico.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar *Mycoplasma pneumoniae* que comprende un inmunoensayo de doble anticuerpo usando anticuerpos primario y secundario contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son los anticuerpos primario y secundario que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO 3 a 5, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.

25 De manera similar, se proporciona un kit de inmunoensayo tipo sándwich para *Mycoplasma pneumoniae* que comprende al menos los anticuerpos primario y secundario contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son los anticuerpos primario y secundario que reconoce los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de la proteína P30 localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento inmunocromatográfico para detectar al *Mycoplasma pneumoniae* que comprende:

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

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

de manera que un complejo de un antígeno contenido en la muestra de prueba y el anticuerpo secundario es capturado por la zona de captura,

40 en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son anticuerpos primario y secundario que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOS: 3 a 5, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.

45 De acuerdo con otro aspecto preferente de la presente invención, se proporciona una tira de prueba inmunocromatográfica que detecta *Mycoplasma pneumoniae* como se reivindica en la reivindicación 9.

Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 constituye parte de la secuencia de aminoácidos completa de la proteína P30 expuesta en la SEQ ID NO: 1 y son regiones que contienen un epítipo de la proteína P30.

50 Para evitar la competencia entre los anticuerpos usados en el presente documento y obtener una mayor reactividad, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario son anticuerpos contra diferentes epítopos de la proteína P30.

De paso, la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* con la que reacciona el anticuerpo para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* de acuerdo con la presente invención es una proteína necesaria para la adhesión del

Mycoplasma a una célula huésped y se conoce como una de las proteínas accesorias que funciona junto con una proteína P1 del factor de adhesión.

La proteína P30 tiene un peso molecular de 30 KDa y es una de las proteínas adhesivas implicadas en la adhesión y la patogenicidad, como la proteína P1. En la célula de *Mycoplasma pneumoniae*, la proteína P30 se localiza en la superficie celular en un extremo del órgano adhesivo y es una proteína transmembrana que tiene la región N-terminal incrustada en la membrana celular y la región C-terminal presente fuera de la membrana celular. La proteína P30 incluye una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina en la región C-terminal y tiene una estructura repetitiva de una secuencia tal. En general, se sabe que una región que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una gran cantidad de prolina forma una conformación tridimensional y tiene una alta posibilidad de convertirse en un epítipo reactivo con un anticuerpo.

El anticuerpo usado en la presente invención es un anticuerpo contra un epítipo localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 que están contenidas en la secuencia de aminoácidos completa de la proteína P30 que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Además, tales anticuerpos reaccionan solamente con *Mycoplasma pneumoniae*, pero no reaccionan con ninguna otra bacteria *Mycoplasma*, y por lo tanto son excelentes en especificidad. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 es una región que incluye un epítipo de la proteína P30. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpos usados en la presente invención pueden parafrasearse como un anticuerpo que puede causar una reacción antígeno-anticuerpo con un fragmento de proteína P30 que tiene de 12 a 15 residuos de aminoácidos contenidos en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo que reconoce un epítipo de proteína P30 localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, la infección con *Mycoplasma pneumoniae* puede diagnosticarse de manera rápida y específica al producir un anticuerpo específicamente reactivo a la proteína P30 del *Mycoplasma pneumoniae* y al realizar un ensayo inmunológico mediante el uso de la proteína P30 como marcador de detección. El ensayo inmunológico y el aparato de ensayo de la presente invención permiten que el diagnóstico de la infección con *Mycoplasma pneumoniae* se realice de manera más simple y rápida que antes, en un hospital u otra instalación sin necesidad de ningún equipo especializado o experiencia.

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo contra un epítipo localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 contenidas en la secuencia de aminoácidos completa de la proteína P30 mostrada en la SEQ ID NO: 1 se usan en el procedimiento de detección basado en un inmunoensayo y, por lo tanto, el diagnóstico de la infección con *Mycoplasma pneumoniae* puede realizarse con mayor precisión que antes, y la detección puede realizarse con mayor sensibilidad en una etapa anterior. En el documento EP 0 537 497 A2, la *M. pneumoniae* se detecta en una muestra biológica mediante el uso de un ensayo de doble anticuerpo y dos anticuerpos monoclonales específicos para diferentes epítopos de la proteína P1. Para proporcionar un procedimiento de detección alternativo, el experto encontraría DALLO S F y otros: Biofunctional domains of the Mycoplasma pneumoniae P30 adhesin", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, núm. 7, 1 de julio de 1996 (1996-07-01), páginas 2595-2601, XP009101720, ISSN: 0019-9567 que usa anticuerpos policlonales contra la proteína P30. Menciona que individualmente los anticuerpos muestran reacción cruzada con la queratina, miosina o fibrinógeno humano. Tampoco divulga los anticuerpos monoclonales y no hay indicios en el documento EP 0 537 497 A2 de modificar la diana. Por lo tanto, incluso si el experto combinara los dos documentos, no llegaría al tema de un procedimiento que use los dos anticuerpos monoclonales. El mismo argumento se aplicaría a partir del documento CN 104 198 703 A como la técnica anterior más cercana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a es una vista en plano de una tira de prueba inmunocromatográfica, y la Figura 1b es una vista en sección transversal vertical de la tira de prueba inmunocromatográfica mostrada en la Figura 1a.

Descripción de las realizaciones

En la presente invención, cada etapa en la producción de un anticuerpo y el procedimiento de detección o ensayo mediante el uso del anticuerpo se realiza de conformidad con cada procedimiento inmunológico conocido per se.

En la presente invención, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, por inmunización a un animal tal como un ratón con la proteína purificada anterior que se usa como antígeno, fusionando las células esplénicas del animal inmunizado con células de mieloma para la fusión celular, seleccionando las células así fusionadas en un medio que contiene HAT y dejándolas crecer, y después seleccionando las cepas cultivadas mediante el uso del polipéptido anterior de una secuencia de aminoácidos de las SEQ NO: 3 a 5 mediante un inmunoensayo marcado con enzima o similares.

Alternativamente, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse, por ejemplo, purificando la proteína P30 a partir de *Mycoplasma pneumoniae*, inmunizando un animal, tal como un ratón, con la proteína P30 que se usa como antígeno, fusionando las células esplénicas del animal inmunizado con células de mieloma para la fusión celular, seleccionando las células así fusionadas en un medio que contiene HAT y dejándolas crecer, y después seleccionando una cepa reactiva con un polipéptido de las SEQ ID NO: 3 a 5 de las cepas cultivadas.

Los ejemplos del anticuerpo usado en la presente invención incluyen no solo anticuerpos sino también fragmentos de anticuerpos y anticuerpos modificados sustancialmente equivalentes a los anticuerpos que tienen una reactividad contra un polipéptido de una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 contenida en la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae*. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab' y fragmentos scFv.

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

En general, una tira de prueba inmunocromatográfica está constituida por al menos un anticuerpo primario que es capaz de experimentar una reacción antígeno-anticuerpo en un primer determinante antigénico de un antígeno, un anticuerpo secundario que está marcado y es capaz de experimentar una reacción antígeno-anticuerpo en un segundo determinante antigénico del antígeno, y un portador de membrana, en la que el anticuerpo primario se inmoviliza previamente en una posición predeterminada del portador de membrana para formar una zona de captura, y el anticuerpo secundario se coloca en una posición separada de la zona de captura para permitir que se desarrolle cromatográficamente en el portador de membrana. El anticuerpo primario y el anticuerpo secundario se usan generalmente en una combinación "hetero". Es decir, los anticuerpos primarios y secundarios que reconocen los determinantes antigénicos respectivos diferentes en posición y conformación en un antígeno se usan en combinación.

Como ejemplo específico, se puede mencionar una tira de prueba como se muestra en la Figura 1. En la Figura 1, el número 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 muestra.

En el ejemplo mostrado en el dibujo, el portador de membrana 3 consiste en un filtro de membrana de nitrocelulosa en forma de tira alargada que tiene un ancho de 5 mm y una longitud de 36 mm.

En el portador de membrana 3, se inmoviliza un anticuerpo primario en una posición de 7,5 mm desde el extremo en el 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 en el 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, por lo general, puede formarse inmovilizando un material (excluyendo el analito) que se une inmunológicamente de manera específica al anticuerpo secundario, al portador de membrana 3. Por ejemplo, cuando se usa un anticuerpo derivado de un ratón como anticuerpo secundario, puede usarse un anticuerpo contra el anticuerpo de ratón.

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, siempre que sea capaz de desarrollar cromatográficamente un analito contenido en una muestra de prueba e inmovilizar un anticuerpo que forma la zona de captura 31. Por lo tanto, también pueden usarse otros tipos de membranas de celulosa, membranas de nylon, membranas de fibra de vidrio o similares.

El miembro de impregnación 2 comprende un miembro impregnado con un anticuerpo secundario que experimenta una reacción antígeno-anticuerpo con el antígeno en un segundo determinante antigénico localizado en un sitio diferente del primer determinante antigénico al que se une el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está marcado previamente con una sustancia de marcaje apropiada.

En el ejemplo que se muestra en la figura, se usa una tela no tejida de fibra de vidrio en 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 al mismo, sino que incluye, por ejemplo, telas de celulosa (un papel de filtro, una membrana de nitrocelulosa, etc.), telas de plástico porosas tales como de polietileno y polipropileno, y otras.

Como una sustancia de marcaje que marca el anticuerpo secundario, puede usarse cualquier sustancia, siempre que pueda usarse en la presente memoria. Los ejemplos de una sustancia de marcaje tal incluyen una sustancia de marcaje de color, una sustancia de marcaje enzimática, una sustancia de marcaje fluorescente y una sustancia de marcaje de radiación. De estos, una sustancia de marcaje de color se usa preferentemente porque la observación de un cambio de color en la zona de captura 31 a simple vista permite una determinación rápida y simple.

Los ejemplos de la sustancia de marcaje de color incluyen metales coloidales, tales como oro coloidal y platino coloidal; y látex, tales como los látex sintéticos tales como los látex de poliestireno coloreados con pigmentos tales como los pigmentos rojos y azules y los látex de caucho natural. Entre estos, los metales coloidales, tal como el oro coloidal, son particularmente preferentes.

5 El miembro de impregnación 2 puede producirse, por ejemplo, impregnando un miembro, tal como la tela no tejida de fibra de vidrio mencionada anteriormente, con una suspensión de un anticuerpo secundario marcado y secándola.

10 Como se muestra en la Figura 1, la tira de prueba inmunocromatográfica de la presente invención puede producirse como sigue. El portador de membrana 3 se fija en el medio de la lámina adhesiva 1. En el extremo sobre el lado inicial del desarrollo cromatográfico (es decir, el lado izquierdo en la Figura 1, que en lo sucesivo se denominará "lado ascendente", mientras que el lado opuesto, es decir, el lado derecho en la Figura 1 se denominará en adelante un "lado descendente") del portador de membrana 3, el extremo del lado descendente del miembro impregnado 2 se coloca para comunicarlos. La zona lateral ascendente del miembro impregnado 2 está fijada a la lámina adhesiva 1. Además, si es necesario, la zona lateral descendente de un miembro receptor de muestras 5 puede colocarse en la cara superior del miembro impregnado 2, mientras que la zona lateral ascendente del miembro receptor de muestras 5 también puede fijarse a la lámina adhesiva 1. Además, la zona lateral ascendente de un miembro absorbente 4 puede colocarse en la cara superior de la zona lateral descendente del portador de membrana 3 mientras que la zona lateral descendente del miembro absorbente 4 puede fijarse a la lámina adhesiva 1.

20 El miembro absorbente 4 puede estar hecho de cualquier material siempre que pueda absorber y retener rápidamente un líquido. Los ejemplos de un material incluyen telas de algodón, papel de filtro y telas no tejidas de plástico poroso hechas de polietileno, polipropileno, etc. En particular, el papel de filtro es óptimo. Además, puede usarse un papel de filtro hecho de un material compuesto que contiene un polímero absorbente de agua.

25 Como miembro receptor de la muestra 5, puede usarse, por ejemplo, una lámina o película de una resina sintética porosa tal como polietileno poroso y polipropileno poroso, o papel de celulosa o una tela tejida o no tejida tal como un papel de filtro y una tela de algodón.

30 Además, la tira de prueba inmunocromatográfica mostrada en la figura 1 puede proporcionarse en un estado que se acomoda en una caja de plástico apropiada que tiene una porción de inyección de muestra de prueba y una porción de determinación que se abren respectivamente sobre el miembro receptor de muestra 5 y la zona de captura 31. Con el objetivo de evitar la infección secundaria de un usuario, la tira de prueba inmunocromatográfica se proporciona preferentemente en un estado que se acomoda en la caja de plástico.

35 Después, una muestra de prueba constituida por una muestra biológica o similar se mezcla, si es necesario, con un disolvente de desarrollo adecuado para obtener una mezcla líquida que pueda desarrollarse cromatográficamente. Posteriormente, la mezcla líquida se inyecta en el miembro receptor de muestra 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica como se muestra en la Figura 1, de modo que pase a través del miembro receptor de muestra 5 y se mezcle con un anticuerpo secundario marcado en el miembro impregnado 2.

40 En este caso, si un analito existe en la mezcla líquida mencionada anteriormente, se forma un complejo del analito y el anticuerpo secundario como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo. Este complejo se desarrolla cromatográficamente en el soporte de membrana 3, y después alcanza la zona de captura 31 y es capturado por el anticuerpo primario inmovilizado en el mismo como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo.

45 En este caso, si se usa una sustancia de marcaje de color tal como el oro coloidal como una sustancia de marcaje, el analito puede determinarse inmediatamente cualitativa o cuantitativamente en base al color causado por la acumulación de la sustancia de marcaje de color en la zona de captura 31. Además, la intensidad de la coloración puede digitalizarse y medirse cuantitativamente leyendo ópticamente la intensidad de la coloración de la sustancia de marcaje de color acumulada en la zona de captura 31 de la tira de prueba inmunocromatográfica con un lector de inmunocromatografía.

50 Además, cuando el desarrollo cromatográfico se realiza normalmente, el anticuerpo secundario que no participa en la reacción antígeno-anticuerpo con el analito alcanza la zona de captura de control 32 y es capturado por un anticuerpo que está inmovilizado en el mismo y es reactivo al anticuerpo secundario. En esta ocasión, si se usa una sustancia de marcaje de color como sustancia de marcaje, se colorea la zona de captura de control 32 mediante la acumulación de la sustancia de marcaje de color para confirmar que el desarrollo cromatográfico se ha realizado normalmente. Por el contrario, si la zona de captura de control 32 no se colorea, indica que ocurre un problema tal como que no se desarrolla el anticuerpo secundario.

55 Puede usarse cualquier muestra biológica de prueba. Por ejemplo, puede ser una muestra biológica en la que el *Mycoplasma pneumoniae* puede estar presente, tales como aspirado de cavidad nasal, aspirado de nasofaringe, hisopo de cavidad nasal, hisopo de garganta, hisopo de nasofaringe, esputo, saliva y lavados bronquiales. La muestra de prueba puede diluirse con un diluyente apropiado tal como solución salina fisiológica y solvente de desarrollo antes de aplicarse al portador de membrana.

Cuando se usa en una prueba una muestra de prueba contaminada con sangre, en particular, usando un anticuerpo marcado con una sustancia de marcaje de color tal como oro coloidal, se coloca preferentemente un miembro de membrana de captura de hematocitos sobre el miembro receptor de muestra. El miembro de membrana de captura de hematocitos se lamina preferentemente entre el miembro impregnado mencionado anteriormente y el miembro receptor de muestra mencionado anteriormente. Esto inhibe el desarrollo de eritrocitos en el portador de membrana y, por lo tanto, facilita la confirmación de la acumulación de las sustancias marcadoras de color en la zona de captura del portador de membrana. Como tal miembro de membrana de captura de hematocitos, se usa una membrana de carboximetilcelulosa. Específicamente, puede usarse un papel de filtro de intercambio iónico CM (nombre comercial) disponible de Advantec Toyo KK, un papel de celulosa de intercambio iónico disponible de Whatman Japan K.K., etc.

Ejemplos

La presente invención se describirá más específicamente mediante los siguientes ejemplos, pero no se limita a los ejemplos.

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

La secuencia de aminoácidos de la proteína P30 de la cepa M129 de *Mycoplasma pneumoniae* se obtuvo de una base de datos del Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ). Una región extracelular que excluye un dominio transmembrana, la secuencia de aminoácidos (AA74-274) expuesta en la SEQ ID NO: 2, se especificó a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína P30, y se sintetizó una secuencia de genes correspondiente a la secuencia de aminoácidos. Un vector de expresión unido a His, pET302/NT-His, se escindió con una enzima de restricción, EcoRI, después se desfosforiló mediante el uso de una fosfatasa alcalina, y se mezcló con la secuencia del gen, seguido de una reacción de ligadura mediante el uso del kit DNA Ligation Ver. 2 (Takara Bio Inc.). El plásmido P30 recombinante que portaba el gen diana se introdujo en un huésped que expresaba proteínas recombinantes, E. coli BL (DE3) pLysS (Novagen). Las bacterias huésped se cultivaron en un medio de placa de agar LB. Las colonias resultantes se cultivaron en un medio líquido LB. Posteriormente, se añadió IPTG 1 mM (Takara Bio Inc.) al medio para inducir la expresión de la proteína P30 recombinante, y después se recogió E. coli. Las bacterias recogidas se resuspendieron en un tampón de solubilización (Tritón X-100 al 0,5 % (Sigma), imidazol 10 mM, fosfato 20 mM y NaCl 0,5 M (pH 7,4) (Amersham)) y se solubilizaron mediante ultrasonificación. La proteína P30 recombinante se purificó después con el kit His trap (Amersham). Esta proteína purificada se dializó contra una solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo, PBS) para obtener una proteína P30 recombinante diana.

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

La proteína P30 recombinante preparada en el Ejemplo 1 se usó como un antígeno para la inmunización para producir un anticuerpo monoclonal contra la proteína P30 recombinante (en lo sucesivo, denominado anticuerpo anti-P30). El anticuerpo monoclonal se produjo de acuerdo con un procedimiento habitual. 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 edad, Japan SLC, Inc.) con la mezcla tres veces, y las células del bazo del ratón se usaron en la fusión celular mediante el uso de células de mieloma de ratón Sp2/0-Ag14 (Shulman, y otros, 1978). Las células se cultivaron en una solución de cultivo preparada añadiendo L-glutamina (0,3 mg/ml), penicilina G potasio (100 unidades/ml), sulfato de estreptomina (100 µg/ml) y Gentamicina (40 µg/ml) al medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) y también añadiendo suero fetal de ternera (JRH) al mismo en una cantidad del 10 %. La fusión celular se realizó mezclando células del bazo del ratón inmunizado con células Sp2/0-Ag14 y añadiendo solución de polietilenglicol (Sigma) a la mezcla. Los hibridomas se cultivaron en HAT-DMEM (DMEM con suero añadido que contenía hipoxantina sódica 0,1 mM, aminopterin 0,4 µM y timidina 0,016 mM (Gibco)). La producción de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo se verificó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las células positivas para la producción de anticuerpos se cultivaron en HT-DMEM (DMEM con suero añadido que contenía hipoxantina sódica 0,1 mM y timidina 0,16 mM) y se cultivaron adicionalmente de forma continua en DMEM con suero añadido.

(Ejemplo 3: Preparación del anticuerpo monoclonal)

Un ratón (BALB/c, retirado, Japan SLC, Inc.), inoculado previamente con 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Sigma), se inoculó intraperitonealmente con las células clonadas, y se colectó 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 reactivos de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (Sigma).

Finalmente, se obtuvieron seis clones de células que producen anticuerpos monoclonales contra la proteína P30.

(Ejemplo de Referencia 1: Producción de la solución bacteriana estándar para prueba)

Los medios PPLO se inocularon con cepas estándares de *Mycoplasma pneumoniae* la cepa M129 y la cepa FH, seguido por el cultivo en una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C hasta que se obtuvo la concentración adecuada. La solución de cultivo resultante se diluyó en serie 10 veces con un medio líquido PPLO hasta dar una solución

diluida de 100.000 veces. El número de colonias crecidas en cada solución diluida en el medio de agar PPLO se contó bajo un microscopio estereoscópico 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*)

5 Se inoculó un medio líquido PPLO con una cepa M129 de *Mycoplasma pneumoniae*, seguido de su cultivo a 37 °C. La solución de cultivo resultante se centrifugó para recoger las células. La proteína P1 se purificó de las células de acuerdo con el procedimiento de Nakane y otros (Journal of Bacteriology, 2011).

10 Las células resultantes se lavaron con un PBS, pH 7,4, dos veces. Las células se suspendieron en un PBS que contenía CHAPS al 1 %, y la suspensión se centrifugó. El sedimento resultante se disolvió después en un PBS que contenía octilglucósido al 2 %. La solución se centrifugó y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante resultante se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio, seguido de centrifugación. El sedimento resultante se disolvió en un PBS que contenía Tritón X-100 al 0,3 %, y la solución se purificó por cromatografía en columna de filtración en gel usando Superdex 200. La fracción que contenía la proteína purificada se analizó mediante SDS-page para confirmar una sola banda a aproximadamente 170 kDa. Por lo tanto, se obtuvo la proteína P1 diana.

15 **(Ejemplo 4: Análisis del epítipo del anticuerpo anti-P30)**

20 Las secuencias de aminoácidos que están presentes en las regiones ricas en prolina en el extremo N-terminal pueden formar así epítopos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de la proteína P30 derivada del *Mycoplasma pneumoniae* de la SEQ ID NO: 1, y los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 fueron sintetizados. Los polipéptidos sintetizados tenían secuencias de GMAPRPGMPPHP (SEQ ID NO: 3) del Núm. 178 al Núm. 189, GMAPRPGFPPQP (SEQ ID NO: 4) del Núm. 190 al Núm. 201 y GMAPRPGMQPPRP (SEQ ID NO: 5) del Núm. 250 al Núm. 262 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Mientras tanto, la misma secuencia que la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 está presente entre el Núm. 202 y el Núm. 213 y entre el Núm. 226 al Núm. 237 a partir del N-terminal, y también la misma secuencia que la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 está presente entre el Núm. 214 y el Núm. 225 y entre el Núm. 238 y el Núm. 249 a partir del N-terminal. Es decir, una pluralidad de secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 y 4 existen en la proteína P30 para proporcionar estructuras repetitivas.

30 Los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5 se añadieron a una microplaca de 96 pocillos y se inmovilizaron. Como controles, las células purificadas de *M. pneumoniae*, la proteína P30 purificada preparada en el Ejemplo 1, los polipéptidos que tiene una secuencia de KRKEKRLLEEKERQEQLORIS (SEQ ID NO: 6) del Núm. 101 al Núm. 125 y de AQQEEQQALEQQAAAEAHAE (SEQ ID NO: 7) del Núm. 126 al Núm. 145, a partir del N-terminal de la proteína P30, y la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae* preparada en el Ejemplo de Referencia 1 fueron inmovilizados cada uno, y la reactividad contra los anticuerpos monoclonales producidos en el Ejemplo 3 se confirmó de la misma manera que anteriormente.

35 Los anticuerpos monoclonales producidos en el Ejemplo 3 se añadieron a la microplaca en la que se inmovilizaron los péptidos a las concentraciones prescritas, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, la solución en cada pocillo fue succionada y eliminada. Después del lavado, se añadió un anticuerpo anti-ratón marcado con biotina para la reacción. Después de la incubación durante 1 hora, la solución en cada pocillo fue succionada y eliminada. 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 detuvo con ácido sulfúrico 2N. La absorbancia se midió con un lector de microplacas (Biorad) a una longitud de onda principal de 450 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

45

Tabla 1

	Antígeno inmovilizado							Células purificadas de <i>M. pneumoniae</i>
	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	Proteína P30	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	Proteína P1	
BIMP001	0,894	1,021	1,863	1,813	0,062	0,051	0,012	2,124

	Antígeno inmovilizado							
	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	Proteína P30	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	Proteína P1	Células purificadas de <i>M. pneumoniae</i>
BIMP002	2,301	0,541	0,721	1,851	0,051	0,026	0,025	2,052
BIMP003	0,781	2,012	0,621	1,921	0,021	0,047	0,014	1,856
BIMP004	1,729	1,531	1,621	2,120	0,042	0,031	0,037	1,741
BIMP005	0,062	0,051	0,043	1,613	1,593	0,042	0,042	1,684
BIMP006	0,021	0,044	0,025	1,489	0,027	1,626	0,018	1,729

De los resultados anteriores, el anticuerpo monoclonal BLMP001 mostró la reacción más fuerte con el polipéptido que tiene la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5. Además, mostró una reacción con los polipéptidos que tienen secuencias similares, específicamente, el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo monoclonal BLMP002 mostró una fuerte reacción con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y el anticuerpo monoclonal BLMP003 mostró una fuerte reacción con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Ellos mostraron una reactividad con otros polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos similares, como lo hizo el anticuerpo monoclonal BLMP001.

El anticuerpo monoclonal BLMP004 mostró una fuerte reacción con todos los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. Se asume que es un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia común en las secuencias de aminoácidos respectivas.

Los anticuerpos monoclonales BLMP001, BLMP002 y BLMP003 mostraron una fuerte reacción con las células purificadas de *Mycoplasma pneumoniae* y de la proteína P30 purificada, pero no mostraron reacción con la proteína P1 purificada como control.

Por lo tanto, se confirmó que el anticuerpo monoclonal BLMP001 es un anticuerpo que reconoce un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 en la proteína P30, y el anticuerpo monoclonal BLMP002 es un anticuerpo que reconoce un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y el anticuerpo monoclonal BLMP003 es un anticuerpo que reconoce un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

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

(1) Preparación del anticuerpo anti-P30

Los ratones se inocularon intraperitonealmente con células productoras del anticuerpo monoclonal BLMP001 o con células productoras del anticuerpo monoclonal BLMP004 preparadas en el Ejemplo 3, y la ascitis obtenida de cada ratón se purificó con proteína G mediante un procedimiento ordinario para obtener IgG que se usó como un anticuerpo anti-P30.

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

La cristalería a usar se lavó con agua regia. Se hirvió agua ultrapura (390 ml) en un matraz, y se añadió una solución acuosa de ácido cloroáurico (30 ml, 1 litro de la solución acuosa contiene 1 g de oro, fabricado por Katayama Chemical Industries Co., Ltd.) al agua en ebullición. Después se añadió una solución acuosa de citrato de sodio al 1 % en peso (60 ml) al matraz, y después de 6 minutos y 45 segundos, una solución acuosa de ácido cloroplatínico (30 ml, 1 L de la solución acuosa contiene 1 g de platino, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se añadió a la misma. A los 5 minutos después de la adición de la solución acuosa de ácido cloroplatínico, 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.

(3) Preparación de la solución de anticuerpo anti-P30 marcado con coloide platino-oro

El anticuerpo monoclonal BLMP001 obtenido en la sección anterior (1) se usó como un anticuerpo anti-P30 para ser marcado con el coloide platino-oro, y el marcaje con el coloide platino-oro se realizó mediante el siguiente procedimiento.

5 El anticuerpo anti-P30 (1 µg en términos de peso de proteína, en adelante, el peso de un anticuerpo en términos de peso de proteína se muestra simplemente por un valor numérico de peso obtenido por análisis gravimétrico de la proteína purificada) y la solución coloidal platino-oro (1 ml) descrita en la sección anterior (2) se mezcló, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir que todo el anticuerpo se una a las superficies de las partículas coloidales de platino-oro. Después se añadió a la misma una solución acuosa de albúmina de suero bovino al 10 % (en lo adelante denominada "BSA") a una concentración final de 1 % en la
10 solución coloidal de platino-oro para bloquear todas 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 coloide de platino-oro (en lo adelante denominado "anticuerpo marcado con coloide de platino-oro"). Esta solución se centrifugó (5600xG, durante 30 minutos) para precipitar el anticuerpo marcado con coloide platino-oro, y el sobrenadante se eliminó para obtener un anticuerpo marcado con coloide platino-oro. Este anticuerpo marcado
15 con coloide de platino-oro se suspendió en una solución tampón de ácido clorhídrico tris 50 mM (pH 7,4) que contenía sacarosa al 10 %, BSA al 1 % y Tritón-X 100 al 0,5 % para obtener una solución de anticuerpo marcado con coloide de platino-oro.

(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 el anticuerpo marcado con oro coloidal

Se proporcionó una membrana alargada de nitrocelulosa en forma de tira con un tamaño de 5 mm de ancho y 36 mm de longitud como portador de membrana 3 para el desarrollo cromatográfico de un medio cromatográfico. Se aplicaron 0,5 µl de una solución que contenía 1,0 mg/ml de anticuerpo anti-P30 en forma recta a una posición de
25 7,5 mm desde el extremo en el lado del punto de partida del desarrollo cromatográfico del portador de membrana 3 para el desarrollo cromatográfico. Se secó a temperatura ambiente, para formar una zona de captura 31 para capturar un complejo de la proteína P30 y el anticuerpo marcado con coloide de platino-oro. El anticuerpo anti-P30 aplicado fue el anticuerpo monoclonal BLMP004 obtenido en la sección anterior (1).

(4-2) miembro impregnado de anticuerpo marcado con coloide de platino-oro

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

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

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

(5) Prueba

40 Las soluciones bacterianas cultivadas de la cepa M129 y la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* se diluyeron con una solución de extracción de muestra en una concentración prescrita para preparar cada muestra de prueba. La muestra de prueba (100 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestra 5 de la tira de prueba descrita en la sección anterior (4) para el desarrollo cromatográfico al dejarse reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La cantidad capturada del complejo de la proteína P30 y el anticuerpo marcado con coloides de platino-oro capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista. La cantidad capturada se determinó evaluando el grado de ennegrecimiento, que es proporcional a la cantidad, a simple vista y se clasificó
45 en las siguientes cinco etapas: - (sin ennegrecimiento), ± (ennegrecimiento leve), + (ennegrecimiento claro), ++ (ennegrecimiento notable) y +++ (ennegrecimiento extremadamente notable). La solución bacteriana cultivada de *M. genitalium* se usó como control negativo a una concentración predeterminada.

50 La Tabla 2 muestra los resultados. Como es obvio en la Tabla 2, se mostró una alta reactividad con las dos cepas de *Mycoplasma pneumoniae* y se mostró negatividad en todas las concentraciones probadas contra *M. genitalium* como el control negativo. Se reveló que el *Mycoplasma pneumoniae* puede detectarse con alta sensibilidad y alta precisión mediante el ensayo inmunocromatográfico mediante el uso de los dos tipos de anticuerpo anti-P30.

Tabla 2

		<i>Cepa M129 de M. pneumoniae</i>	<i>Cepa FH de M. pneumoniae</i>	<i>M. genitalium</i>
Concentración (CFU/ml)	En blanco	-	-	-
	1×10 ⁴	±	±	-
	1×10 ⁵	+	±~+	-
	1×10 ⁶	++	+	-
	1×10 ⁷	+++	++	-

(Ejemplo 6: Prueba de reactividad comparativa de la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P30 y la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P1)

5 Las soluciones bacterianas cultivadas de la cepa M129 y la cepa FH de *Mycoplasma pneumoniae* preparadas en el Ejemplo de Referencia 1 se diluyeron con una solución de extracción de muestra en una concentración prescrita para preparar cada muestra de prueba. La muestra de prueba (100 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestra 5 de cada tira de prueba inmunocromatográfica para el desarrollo cromatográfico, dejándola reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo del antígeno y el anticuerpo marcado con coloides de platino-oro capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista para determinar el resultado. La cantidad capturada se determinó evaluando el 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 claro), ++ (ennegrecimiento notable) y +++ (ennegrecimiento extremadamente notable). Como procedimiento convencional, se usó un reactivo disponible comercialmente para detectar la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae*. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

		<i>Cepa M129 de M. pneumoniae</i>		<i>Cepa FH de M. pneumoniae</i>		<i>M. genitalium</i>	
		Presente invención	Procedimiento convencional	Presente invención	Procedimiento convencional	Presente invención	Procedimiento convencional
Concentración (CFU/ml)	En blanco	-	-	-	-	-	-
	1×10 ⁴	+	-	±	-	-	-
	1×10 ⁵	±~+	-	+	-	-	-
	1×10 ⁶	++	±	++	+	-	±
	1×10 ⁷	+++	±~+	+++	+	-	±

20 Como es obvio de la Tabla 3, la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteína P30 preparada en el Ejemplo 5 de la presente invención mostró un oscurecimiento notable para 1×10⁷ CFU/ml de la cepa M129 y 1×10⁶ CFU/ml de la cepa FH y mostró un oscurecimiento claro para 1×10⁶ CFU/ml de la cepa M129 y 1×10⁵ CFU/ml de la cepa FH.

En contraste, el procedimiento convencional mostró un ennegrecimiento claro para 1×10⁷ CFU/ml o más de la cepa M129 y 1×10⁷ CFU/ml de la cepa FH.

25 Como es obvio a partir de los resultados mostrados en la Tabla 3, los resultados de la comparación de las concentraciones bacterianas de las muestras de prueba en las que se mostró el mismo grado de ennegrecimiento demostraron que la sensibilidad de detección de la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas

5 P30 preparada en el Ejemplo 5 de la presente invención fue aproximadamente 100 veces mayor para las cepas M129 y también 100 veces mayor para las cepas FH, en comparación con la sensibilidad de la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P1. Además, el procedimiento convencional mostró una ligera reactividad cruzada con el *Mycoplasma genitalium*, y se observó ennegrecimiento inespecífico. No se observó reactividad cruzada en la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P30 de la presente invención.

Los resultados descritos anteriormente demostraron que la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P30 que usa el anticuerpo anti-P30 de la presente invención puede detectar al *Mycoplasma pneumoniae* con alta sensibilidad y especificidad.

10 **(Ejemplo 7: Detección de *Mycoplasma pneumoniae* a partir del hisopo de garganta)**

15 Se colectaron hisopos de garganta de 20 pacientes con sospecha clínica de infección por *Mycoplasma pneumoniae* con hisopos de algodón esterilizados. Las muestras de garganta se verificaron si el *Mycoplasma pneumoniae* estuvo presente en el hisopo de la garganta o no por la prueba de amplificación de ácido nucleico reportada por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón. En base a los resultados, se seleccionaron dieciséis muestras (muestras positivas) en las que se confirmó la presencia del *Mycoplasma pneumoniae* y cuatro muestras (muestras negativas) en las que no se detectó el gen a partir de los hisopos de garganta colectados. Los hisopos de garganta seleccionados se prepararon como muestras de prueba. Las muestras de prueba fueron sometidas a detección de *Mycoplasma pneumoniae* mediante el uso de la tira de prueba inmunocromatográfica de detección de proteínas P30 de la presente invención. Un reactivo comercialmente disponible que detecta la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae* se usó como un procedimiento convencional.

20 La muestra de prueba (100 µl) se añadió gota a gota con una micropipeta al miembro receptor de muestra 5 de la tira de prueba inmunocromatográfica preparada en el Ejemplo 5 para el desarrollo cromatográfico al dejarse reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo del antígeno y el anticuerpo marcado con coloides de platino-oro capturado por la zona de captura 31 se observó a simple vista para determinar el resultado. La cantidad capturada se determinó evaluando el 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 claro), ++ (ennegrecimiento notable) y +++ (ennegrecimiento extremadamente notable). La Tabla 4 muestra los resultados de la prueba.

Tabla 4

Muestra Núm.	Presente invención	Procedimiento convencional	Prueba de amplificación de ácido nucleico (procedimiento de PCR)
1	++	+	+
2	++	+	+
3	+++	+	+
4	++	±	+
5	++	±	+
6	+	±	+
7	-	±	-
8	-	±	-
9	±	-	+
10	++	+	+
11	-	-	+
12	+	+	+

Muestra Núm.	Presente invención	Procedimiento convencional	Prueba de amplificación de ácido nucleico (procedimiento de PCR)
13	+	±	+
14	-	-	-
15	±	-	+
16	+	-	+
17	±	-	+
18	-	-	-
19	+	±	+
20	+	±	+

5 Como es obvio a partir de la Tabla 4, la comparación entre el procedimiento de detección de la presente invención y la prueba de amplificación del ácido nucleico muestra que el procedimiento de detección de la presente invención exhibió una alta tasa de concordancia, específicamente, una tasa de concordancia positiva del 93,8 %, una tasa de concordancia negativa del 100,0 % y una tasa de concordancia total del 95,0 %, confirmando que el procedimiento de detección de la presente invención puede realizar la detección con una precisión equivalente a la prueba de amplificación de ácido nucleico. También se muestra que el procedimiento de detección de la presente invención es un procedimiento de detección que tiene una alta sensibilidad y especificidad de detección, en comparación con el procedimiento convencional.

10 A partir de los resultados anteriores, se confirmó que la tira de prueba inmunocromatográfica de la presente invención puede detectar al *Mycoplasma pneumoniae* de hisopos de garganta con alta sensibilidad y alta precisión.

Aplicabilidad industrial

15 La presente invención proporciona un procedimiento y un kit para detectar al *Mycoplasma pneumoniae* comprendiendo un inmunoensayo que usa un anticuerpo que reconoce un epítipo específico de la proteína P30 del *Mycoplasma pneumoniae* y hace posible diagnosticar rápida y específicamente la infección con *Mycoplasma pneumoniae* sin necesidad de ningún equipo especializado o experiencia, en comparación con el procedimiento convencional.

Descripción de los símbolos

- 1 Hoja adhesiva
- 20 2 Miembro impregnado
- 3 Portador de membrana
- 31 Zona de captura
- 32 Zona de captura de control
- 4 Miembro absorbente
- 25 5 Miembro receptor de muestra

Listado de secuencias

<110> BL Co., Ltd.

30 <120> Inmudetección de Mycoplasma pneumoniae y kit

ES 2 775 612 T3

<130> IFP-1347

<160> 7

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 274

10

<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 Ser 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 2 775 612 T3

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

Pro Arg Ser 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

5 <212> PRT

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 2

Phe Ile Pro Thr Val Ala Val 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 2 775 612 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

<210> 3

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 3

10 Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Pro Pro His Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 4

20 Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Phe Pro Pro Gln Pro
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Mycoplasma pneumoniae

ES 2 775 612 T3

<400> 5

Gly Met Ala Pro Arg Pro Gly Met Gln Pro Pro Arg Pro
1 5 10

5 <210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Mycoplasma pneumoniae

10 <400> 6

Lys Arg Lys Glu Lys Arg Leu Leu Glu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln
1 5 10 15

Leu Ala Glu Gln Leu Gln Arg Ile Ser
20 25

<210> 7

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 7

20

Ala Gln Gln Glu Glu Gln Gln Ala Leu Glu Gln Gln Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Ala His Ala Glu
20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de *Mycoplasma pneumoniae* en una muestra de prueba, que comprende un inmunoensayo de doble anticuerpo utilizando anticuerpos primario y secundario contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son anticuerpos primario y secundario que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de proteína P30 localizado en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.
2. El procedimiento de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inmunoensayo tipo sándwich es un ELISA o ensayo inmunocromatográfico.
3. El procedimiento de detección de acuerdo con la reivindicación 1, en el que uno de los anticuerpos primario y secundario está inmovilizado en un portador.
4. Un procedimiento inmunocromatográfico para detectar al *Mycoplasma pneumoniae* que comprende:
 - proporcionar un portador de membrana que tiene una zona de captura que se forma inmovilizando previamente un anticuerpo primario 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, dicha mezcla líquida contiene un anticuerpo secundario contra la proteína P30 y una cantidad predeterminada de una muestra de prueba, a través de los cuales un complejo de un antígeno contenido en la muestra de prueba y el anticuerpo secundario es capturado por la zona de captura,
 - en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son los anticuerpos primario y secundario que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de proteína P30 localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5, y dicha muestra de prueba es una muestra biológica.
5. El procedimiento inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo secundario está marcado con uno cualquiera de un metal coloidal, un látex y una sustancia fluorescente.
6. El procedimiento inmunocromatográfico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el portador de membrana es una membrana de nitrocelulosa.
7. Un kit de inmunoensayo tipo sándwich para detectar al *Mycoplasma pneumoniae* que comprende al menos los anticuerpos primario y secundario contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* en el que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son los anticuerpos primario y secundario que reconocen a los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de la proteína P30 localizado en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5.
8. El kit de inmunoensayo tipo sándwich de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el inmunoensayo sándwich es un ELISA o ensayo inmunocromatográfico.
9. Una tira de prueba inmunocromatográfica que detecta al *Mycoplasma pneumoniae*, que comprende al menos los anticuerpos primario y secundario contra la proteína P30 de *Mycoplasma pneumoniae* y un portador de membrana,
 - en la que el anticuerpo primario es inmovilizado previamente en una posición predeterminada del portador de membrana para formar una zona de captura; y
 - el anticuerpo secundario es marcado con una sustancia de marcaje apropiada y es proporcionado en una posición separada de la zona de captura para que se desarrolle cromatográficamente en el portador de membrana,
 - en la que los anticuerpos primario y secundario en una combinación "hetero" son los anticuerpos primario y secundario que reconocen los respectivos determinantes antigénicos diferentes tanto en posición como en conformación sobre el antígeno y ambos son un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de proteína P30 localizado en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 5.
10. La tira de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el anticuerpo secundario está marcado con uno cualquiera de un metal coloidal, un látex y una sustancia fluorescente.
11. La tira de prueba inmunocromatográfica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el portador de membrana es una membrana de nitrocelulosa.

[Figura 1]

