

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710111026.3

[43] 公开日 2008年1月9日

[11] 公开号 CN 101101293A

[22] 申请日 2007.6.13

[21] 申请号 200710111026.3

[30] 优先权

[32] 2006.6.22 [33] ES [31] 200601682

[71] 申请人 基立福有限公司

地址 西班牙巴塞罗纳

[72] 发明人 丹尼尔·马托瑞尔·皮纳

迈蒂尔·卡门·特拉弗斯·波罗

朱迪·法雷·利昂

约瑟芬娜·卡斯特尔·帕雷拉

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 牛利民

权利要求书2页 说明书11页

[54] 发明名称

红细胞的悬浮介质

[57] 摘要

红细胞的悬浮介质包含任何一组的氨基酸的组合, 以及磷酸盐缓冲液、氯化钠、葡萄糖、腺嘌呤、防腐剂、EDTA 以及甘氨酸, 还包含肌苷、柠檬酸盐、柠檬酸以及碳酸氢盐。氨基酸的浓度高于那些需要降低离子强度的浓度。

1. 用于需要红细胞的分析技术中的试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有任何一组的氨基酸的组合。
2. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其含有磷酸盐缓冲液、氯化钠、葡萄糖、腺嘌呤、防腐剂、EDTA以及甘氨酸。
3. 权利要求1和2的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质还含有肌苷、柠檬酸盐、柠檬酸以及碳酸氢盐。
4. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，氨基酸的浓度高于降低离子强度所需的浓度。
5. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸。
6. 权利要求5的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸：甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸和L-异亮氨酸的组合。
7. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸和含硫氨基酸的组合。
8. 权利要求7的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸和以下氨基酸：L-苯基丙氨酸，L-酪氨酸，L-色氨酸，L-蛋氨酸和L-半胱氨酸的组合。
9. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有以下氨基酸：L-缬氨酸、L-蛋氨酸，L-亮氨酸和L-异亮氨酸的组合。
10. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有疏水和亲水氨基酸的组合。
11. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸、不带电荷、带正电荷和带负电荷的极性氨基酸的组合。

12. 权利要求11的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸和以下氨基酸：L-丝氨酸，L-苏氨酸，L-半胱氨酸，L-蛋氨酸，L-天冬酰胺酸，L-谷氨酰胺，L-赖氨酸，L-]精氨酸，L-组氨酸，L-天冬氨酸和L-谷氨酸的组合。

13. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有脂肪族氨基酸、极性、中性或带电荷（正电和/或负电）的氨基酸，以及芳香族氨基酸的组合。

14. 权利要求1的用于试剂红细胞的悬浮介质，其特征在于，该悬浮介质含有非极性和极性氨基酸的组合。

15. 权利要求1-14的用于试剂红细胞的悬浮介质在凝胶或微管柱中进行的免疫血液学分析技术中的应用。

16. 权利要求1-14的用于试剂红细胞的悬浮介质在需要有试剂红细胞的免疫血液学技术中的应用。

17. 权利要求1-14的用于试剂红细胞的悬浮介质在需要有试剂红细胞的分析技术中的应用。

红细胞的悬浮介质

技术领域

本发明涉及新的红细胞的悬浮介质，用于在医院和血液输血中心进行需要红血球的主要免疫血液学凝集测试。血清型的确定、非常规抗体的探测和辨认、正负对照的制备，和用于反常结果研究的样品保存需求均需要红细胞，以及在溶液介质中再悬浮以维持它们的功能。

背景技术

输血提供的临床进展带来了免疫血液学的发展。如果没有免疫血液学的发展，目前在意外伤害、手术中或在白血病治疗以及癌症和其他疾病中不可能进行若干数量的输血。在西班牙，2004年中共有160万献血者（1），在美国，每年捐赠约为1500万袋血（2），世界卫生组织根据178个国家的数据，估计每年捐赠的总血单位约为8100万个（3）。如果没有事先进行免疫血液学的确定，这些捐赠则没有意义。待确定的主要血型为ABO系和RH系，特别是RH系中的抗原D（RH1）。

在紧急情况下，所有的人都可以接受O型的红细胞或红血球，AB型的人可接受任何ABO型的红细胞或红血球。因此，O型血的人被称为万能献血者，而AB型血的人被称为万能受血者。是否能够接受对来自具有特定血型的人的红细胞或红血球，取决于接受者血浆中的抗体。因此，O型个体中存在对抗原A和B的抗体，A型个体中存在对抗原B的抗体，反之，B型个体中存在对抗原A的抗体，而AB型个体中不存在那些抗体。因此，可以捐献给所有血型的不是红细胞，而是AB型个体的血浆。

免疫血液学分析的基础是确定ABO型和RH型。ABO系是通过抗原和抗体（常规抗体）来确定，而RH系和它的血系只有在怀孕和输血后才会

产生抗体（非常规抗体）。然而，尽管它们在人群中的发生频率较低，但对非常规抗体的确定是最为重要的。为避免危险的发生以及确保输血安全，非常规抗体的确定都需要在所有的医院和输血中心进行。另外，为了诊断新生儿溶血病的可能性，以及预防出现母亲为Rh-（缺少抗原D），而小孩为Rh+（存在抗原D）的情况，均需要新生儿非常规抗体的确定。

在免疫血液学中，用于红细胞类型鉴定、相容性测试以及常规和非常规抗体的检测的新技术的引进代表了本领域最为重大的进展。这些进展涉及促进特异性凝集的成分（例如，Coombs溶液、LISS溶液（低离子强度溶液），具有清蛋白的溶液，具有蛋白水解酶的溶液，或其他抗原-抗体联合物的增效剂），活性抗体的改进（例如，单克隆抗体），以及用于展示凝集的全新的或基本上不同的技术（例如，微片和凝胶技术）。微管柱技术、也被称为凝胶或卡技术的出现，奠定了现代免疫血液学的基础。微管柱技术(4)自1986年出现以来，不断得到引入瞩目的发展。由于其易于实现自动化，该技术将取代其他的技术，而成为唯一的表型确定技术。与流行的基因型技术相结合，它们将形成免疫学分析的基础。目前，用于基因型确定的主要方法还处于初级阶段，仅限于研究类实验室。

凝胶技术借助由凝胶小球（EP 194212, EP 305337）、玻璃小球或其他球型材料的小球（EP 485228, EP 725276, EP 755719）形成的过滤基质，通过离心而将那些凝集的细胞与未凝集的细胞进行分离。将样品分散于在微管的上部，位于凝胶柱之上的反应室。在含有凝胶或过滤基质的柱中，根据分析所使用的缓冲液可含有特异性抗体（例如，抗-A，抗-B，抗-D）或人抗球蛋白（人抗-IgG或人抗-IgM抗体），这被称为Coombs溶液。过滤基质由置于缓冲水溶液中的球状颗粒构成。为了展现免疫血液学凝集，进行离心使细胞（红细胞）通过过滤基质。颗粒之间的空间足够大，使那些未凝集的细胞，即个体细胞通过。尽管在此过程中发生凝集，但凝集的细胞会被保留在小球间。严格地讲，尽管这是一个定性技术，但细胞通过过滤基质使得对不同程度的凝集进行区分成为可能。

例如，在阳性样品中，非常强的凝集的细胞将被保留在凝胶的上半部分，而弱的凝集的细胞可以在基质中通过一段距离而被保留在中间位置。没有发生凝集意味着所有的细胞将会到达微管的底部（阴性反应）。如在常规的免疫血液学中所出现的，由于红细胞具有明显的红色，因此该技术对抗原（红细胞）- 抗体联合体不需要使用任何标记或放大试剂。

凝胶技术使得将阳性产物从阴性产物中进行物理分离成为可能，如阳性产物（高强度凝集）位于凝胶的上部分，柱中部分（中度或弱凝集），以及阴性产物（未凝集的红细胞）位于凝胶的下部分。

在免疫血液测试中，使用试剂红细胞测试血浆或血清中的常规和非常规抗体。在溶液中制备所述的红细胞从而维持这些细胞的功能性和完整性一段时间，通常在1到4周。在血库实验室或那些负责输血的机构中，通常选择具有特异性抗原的红细胞从而使其能够在每个免疫血液测试中充当试剂红细胞。为制备筛选细胞需进行一定的组合，如将2, 3 或4个具有具体抗原特异性的红细胞组合可探测抗体，将11或更多个红细胞组合可鉴别所探测到的抗体的特异性，但这种组合并不容易制得并且在中级机构这种操作也很难进行。本领域内的技术人员都熟知得到所述的筛选细胞或细胞群的难度以及需要频繁地制备这些试剂红细胞，同时还需制备用于这些红细胞的悬浮溶液或稀释液。此外，为了加强特异性血型的反应性还需要使用酶处理（如木瓜蛋白酶作用）来制备筛选细胞或细胞群。通过这种处理加强的血系也为本领域技术人员所熟知。

当前使用的溶液是将Alsever溶液进行适当的改进所得到。这些溶液通常含有抗凝血剂（如柠檬酸盐）、磷酸盐缓冲液、能量源（如葡萄糖）、嘌呤和核苷（如腺嘌呤和肌苷）、氯化钠以及防腐剂（抗生素）。然而，使用这些常规的溶液制备的试剂红细胞在凝胶技术的使用中可能会存在问题。因为一些没有凝集的红细胞通常会残留在柱中，所以在使用的凝胶技术可对物理分离产生影响。因为这些非特异性的存留物与中等或弱凝集物混乱，所以会产生假阳性结果。

用于试剂红细胞的悬浮液应能够使得没有发生凝集的红细胞维持其功能特征和它们通过凝胶柱从而到达凝胶柱底部的能力。根据上面所述的在免疫血液学实验室中制备红细胞所存在的困难，所以应维持这些特征尽可能长的时间。其中pH、摩尔渗透压浓度以及离子强度这些参数在这段时间内应维持恒定。同样，提供葡萄糖和腺嘌呤以维持红细胞的保活性也是必要的。这些物质的组成和浓度会增加离子强度，而离子强度会被加入的甘氨酸所降低。因为红细胞已经失去了遗传核以及任何生物合成的能力，因此加入这种氨基酸不会对蛋白合成有影响。

发明内容

为了减少试剂红细胞中所观察到的特异性的丢失，发明者们在研究中意外发现加入稀释溶液的浓度在高于为降低离子浓度所需的浓度时，可使试剂红细胞与氨基酸结合而与甘氨酸分离，从而可降低试剂红细胞中观察的特异性的丢失，即很大程度上降低了没有凝集的红细胞在凝胶柱中的非特异性保留。

由于此原因，在本专利用于试剂红细胞的稀释溶液组合物的申请中，将进行描述，其中稀释溶液组合物能够使得试剂红细胞在延长的时间内，如8个星期内维持其完整性和功能性。在这段时间内，红细胞维持其通过凝胶或其它狭窄空间的能力以及不会发生非特异性的凝集，保持其形变能力、完整性以及抗原性，从而其可被用作免疫血液学的试剂用在确定血清型、探测常规抗体测试以及非常规抗体的研究和识别中。

根据本发明，在用于红细胞的稀释液或悬浮液中加入氨基酸组合物能够维持红细胞的完整性和功能特征，其中这些特征使得红细胞能够使用在凝胶技术中。在新鲜的红细胞（初始制备悬浮液的时间）和那些保存8周的红细胞通过凝胶基质时，它们在保留性上并没有表现出差别。即是说，将氨基酸加入稀释液中使得红细胞维持其新鲜红细胞的初始物理特征成为可能。制备红细胞的时间越长，出现假阳性结果的可能性越

大。试剂红细胞是活细胞，因此本领域的技术人员都知道其在相对短时间内会发生退化。

凝胶技术使得不同大小的凝集能够直接通过视觉量化。凝集结果使用常用的评分等级来表示，如表1。如上所述，应出现在柱底的没有发生凝集的红细胞可能会出现类似+/- 和 1+的结果，从而出现不正确的诊断以及不正确的阳性解释。

表 1.

注释	等级	得分	描述
阴性:	-	0	在柱底存在红细胞带，柱子的其它部分没有明显的凝集物
阳性:	+/-	3	在柱子的下半部存在少量的小尺寸凝集物，红细胞位于柱子的底部
	1+	5	在柱子的底部存在一些小尺寸凝集物
	2+	8	延柱子存在小尺寸或中等尺寸的凝集物
	3+	10	中等尺寸的靠上的凝集带出现在柱子的上半部分
	4+	12	红细胞凝集带出现在柱子的上半部分

根据本发明，如本领域技术人员所熟知的、含有常用成分的液体中加入氨基酸组合物能够在很大程度上降低试剂红细胞发生非特异性保留。这些氨基酸组合物是磷酸盐缓冲液、氯化钠、葡萄糖、腺嘌呤、防腐剂（如氯霉素和新霉素）、EDTA以及甘氨酸。

组成本发明氨基酸组合物的每种氨基酸浓度可以根据它们在水溶液中的溶解性而不同，因此用于红细胞的稀释液的整体溶质度范围在100-700毫摩尔渗透压浓度/kg。

将对本发明中用于红细胞悬浮液中的氨基酸组合物的实施例进行描述。例如，向不含氨基酸的标准液体（液体1）中加入氨基酸得到液体（液体2），使用用于非常规抗体的Coombs技术的双细胞筛选，在超过10个星期的50次单次测定中，所得到的假阳性结果总数从13次降低到0次。需要提及的是从制备试剂红细胞到测试的10个星期这段时间已经超过了保存试剂红细胞的常规限制。另外一种量化这些液体的差别的方法就是对比所有单个测试的平均得分。对超过10周的10瓶液体1和液体2进行50次测定，平均得分分别为2.44和1.52。使用木瓜蛋白酶化的红细胞的双细胞筛选技术，在不含氨基酸的液体（液体No.1）和含有氨基酸的液体（液体No.2）之间假阳性结果的数目从40次降低到7次。7次假阳性结果是在10个星期后测得，而液体No.1的假阳性结果是从制备悬浮液后更短的时间内测得。对比使用木瓜蛋白酶化的红细胞的双细胞筛选技术所得到的平均得分，清楚地表明液体间的差别，液体No.1和液体No.2进行50次测定的平均得分分别为5.92和1.84。

液体 No. 1

成分	浓度 (g/l)
KH ₂ PO ₄ (无水磷酸二氢钾)	1.36
Na ₂ HPO ₄ (磷酸一氢钠)	1.42
氯霉素	0.17
新霉素	0.10
NaCl	1.0
葡萄糖 (无水D-葡萄糖)	3.5
腺嘌呤	0.02

EDTA (二水合二钠)	2.80
甘氨酸	14.70

液体 No. 2

成分	浓度 (g/l)
KH_2PO_4 (无水磷酸二氢钾)	1.36
Na_2HPO_4 (磷酸一氢钠)	1.42
氯霉素	0.17
新霉素	0.10
NaCl	1.0
葡萄糖 (无水D-葡萄糖)	3.5
腺嘌呤	0.02
EDTA (二水合二钠)	2.80
甘氨酸	14.70
L-缬氨酸	3.20
L-蛋氨酸	2.52
L-亮氨酸	2.60
L-异亮氨酸	6.48

如果在标准液体 (如液体No. 1) 中加入上面所描述的除氨基酸外的其它成分到红细胞溶液中, 如肌昔、柠檬酸盐、柠檬酸以及碳酸氢盐 (如液体No. 3), 氨基酸的效果可更明显。使用用于非常规抗体的Coombs技术的双细胞筛选, 在超过10个星期的50次单次测定中, 没有得到假阳性结果并且平均得分为0.96。或是在木瓜蛋白酶化的双细胞筛选中也没有得到假阳性结果并且平均得分为0.80。

液体 No. 3

成分	浓度 (g/l)
KH_2PO_4 (无水磷酸二氢钾)	0.30
Na_2HPO_4 (磷酸一氢钠)	0.28
氯霉素	0.17
新霉素	0.10
NaCl	1.00
葡萄糖 (无水D-葡萄糖)	3.50
腺嘌呤	0.02
EDTA (二水合二钠)	2.80
肌苷	0.02
NaHCO_3	0.80
Na_3 二水合柠檬酸盐	2.00
一水合柠檬酸	0.18
甘氨酸	6.00
L-缬氨酸	3.20
L-蛋氨酸	2.52
L-亮氨酸	2.60
L-异亮氨酸	6.48

如(5)所述,悬浮液中的红细胞在低离子强度的溶液中血型中特异性的抗原 (M , $P1$, Fy^a , Fy^b , S 和 s) 的抗原性可能消失或降低。氨基酸的加入并不会改变所述抗原的表达,这可以从制备的悬浮液放置10个星期后,即在产品的有效寿命内,观察到相同的反应性和抗原潜能。

在加入氨基酸的液体中观察到红血球溶解程度要低于没有加入氨基酸的液体或仅加入甘氨酸的液体中红血球溶解程度。这表明加入这些物质不会对细胞的渗透脆性产生负面影响。

在用于确定血清型的试剂红细胞试验中，即常规抗体的测定中，加入氨基酸的红细胞的悬浮液功能表现正常。

在使用没有氨基酸的标准液体，即液体1的血清型技术中，使用超过10个星期的4组血清型细胞（A₁，A₂，B和O）进行的240次测定中，得到187次假阳性结果，而对于加入氨基酸的液体2和液体3，假阳性结果的数目降低到0次。液体1的假阳性结果是从红细胞悬浮液制备后的2周和4周后测得，而对于加入氨基酸的液体，在悬浮液生产10周后，还没有观察到假阳性结果。对液体1、液体2和液体3在超过10个星期、使用4组血清型细胞、每组血清10瓶的条件下进行240次测定，液体1、液体2和液体3的平均得分分别为4.06，1.37和0.94。

加入除缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸外的氨基酸也会降低非特异性保留，其中上述4种氨基酸前3种为非极性脂肪族氨基酸，最后一种为含硫的氨基酸。例如，使用含有非极性脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、亲水氨基酸以及带正、负或中性电荷的极性氨基酸的液体4，同样能够降低红细胞在凝胶柱上的非特异性保留。

液体No. 4

成分	浓度 (g/l)
KH ₂ PO ₄ (无水磷酸二氢钾)	0.30
Na ₂ HPO ₄ (磷酸一氢钠)	0.28
氯霉素	0.17
新霉素	0.10
NaCl	1.00
葡萄糖 (无水D-葡萄糖)	3.50
腺嘌呤	0.02
EDTA (二水合二钠)	2.80
肌苷	0.02

NaHCO ₃	0.80
Na ₃ 二水合柠檬酸盐	2.00
一水合柠檬酸	0.18
甘氨酸	6.00
L-缬氨酸	1.60
L-蛋氨酸	1.26
L-亮氨酸	1.30
L-异亮氨酸	3.24
L-苯基丙氨酸	2.00
L-赖氨酸	1.22
L-组氨酸	0.50
L-色氨酸	0.50
L-精氨酸	1.60
L-苏氨酸	1.10

通过本发明中的方法，有可能明显地提高存储红细胞悬浮液的有效寿命以供进行分析，如进行的测试所表现的周期可从常规的为4个星期到最少的为8个星期。

参考文献

- (1) Federaciòn Espanola de donantes de sangre (Spanish Blood Donor Federation). www.donantesdesangre.net. July 2005.
- (2) *Facts about blood*. American Association of Blood Banks (2004).
- (3) *Global Database on Blood Safety : Report 2001-2002*.

Blood Transfusion Safety, Essential Health Technologies, World Health Organization. Geneva, Switzerland.

(4) *The gel test: A new way to detect cell antigen-antibody reactions.* Y. Lapierre *et al.* Transfusion 33:639-643 (1990).

(5) *The preservation of red cell antigens at low ionic strength.* J.C.Allan *et al.* Transfusion 30:423-426 (1990).

尽管用优选的实施方式对本发明进行了描述，不应认为这些实施方式对发明构成任何限制，而应由下面的权利要求的最宽的解释来限定本发明的范围。

专利名称(译)	红细胞的悬浮介质		
公开(公告)号	CN101101293A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200710111026.3	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	基立福有限公司		
申请(专利权)人(译)	基立福有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基立福有限公司		
[标]发明人	迈蒂尔·卡门·特拉弗斯·波罗 朱迪·法雷·利昂 约瑟芬娜·卡斯特尔·帕雷拉		
发明人	丹尼尔·马托瑞尔·皮纳 迈蒂尔·卡门·特拉弗斯·波罗 朱迪·法雷·利昂 约瑟芬娜·卡斯特尔·帕雷拉		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/96 A01N1/02 C12Q1/00 G01N33/80 A01N1/0226 Y10T436/108331		
代理人(译)	牛利民		
优先权	2006001682 2006-06-22 ES		
其他公开文献	CN101101293B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

红细胞的悬浮介质包含任何一组的氨基酸的组合，以及磷酸盐缓冲液、氯化钠、葡萄糖、腺嘌呤、防腐剂、EDTA以及甘氨酸，还包含肌苷、柠檬酸盐、柠檬酸以及碳酸氢盐。氨基酸的浓度高于那些需要降低离子强度的浓度。

注释	等级	得分	描述
阴性:	-	0	在柱底存在红细胞带，柱子的其它部分没有明显的凝集物
	+/-	3	在柱子的下半部存在少量的小尺寸凝集物，红细胞位于柱子的底部
阳性:	1+	5	在柱子的底部存在一些小尺寸凝集物
	2+	8	在柱子存在小尺寸或中等尺寸的凝集物
	3+	10	中等尺寸的靠上的凝集带出现在柱子的上半部分
	4+	12	红细胞凝集带出现在柱子的上半部分