



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105074464 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201380073397. 0

G01N 33/68(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 23

(30) 优先权数据

1223256. 7 2012. 12. 21 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/053416 2013. 12. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/096871 EN 2014. 06. 26

(71) 申请人 微测试矩阵有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 G·马佐莱尼 F·巴尔德拉琦尼

M·马卡里 H·A·C·格荣劳德

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 郭广迅 李渤

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

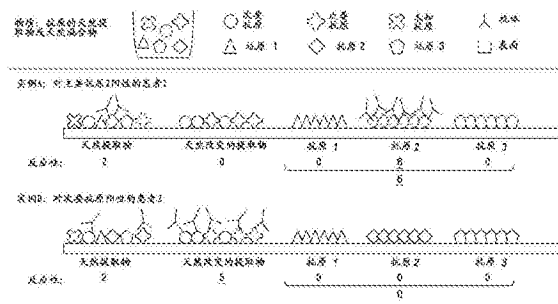
权利要求书1页 说明书16页 附图6页

(54) 发明名称

免疫检测

(57) 摘要

本发明涉及改进的免疫检测,其提高来自样品的物质特异性免疫球蛋白的检测灵敏度。本发明的方法涉及提供物质的多种形式,其中至少一种形式包括该物质的天然提取物。存在的其他形式可以是该物质的重组体或天然抗原成分。



1. 一种用于检测样品中物质特异性免疫球蛋白的存在或不存在的方法,所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质基本上同时接触,并测定是否形成免疫复合物,其中至少一种形式是天然提取物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法进一步包括定量物质特异性免疫球蛋白的水平步骤。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中针对每种物质形式测定所述物质特异性免疫球蛋白的水平。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其中所述物质特异性免疫球蛋白的水平作为分类得分或免疫球蛋白浓度提供。

5. 根据权利要求 2 至 4 中任一项所述的方法,其中所述物质特异性免疫球蛋白的水平针对物质的 2 种或多种形式组合。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法允许测定个体的物质特异性免疫球蛋白状态。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括诊断个体中对物质的过敏反应的步骤,并且具有一种或多种形式的免疫复合物的存在表明对该物质敏化。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述天然提取物是改性的天然提取物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述天然提取物通过去除一种或多种成分改性。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中通过成分特异性亲和贫化选择性地去除来自天然提取物的一种或多种成分来制备所述改性的天然提取物。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法,其中一种或多种去除的成分是抗原性的。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述抗原成分是交叉反应性成分。

13. 根据权利要求 9 至 12 中任一项所述的方法,其中所述一种或多种去除的成分单独地作为物质的一种或多种形式存在。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中针对改性的天然提取物和一种或多种去除的成分测定所述物质特异性免疫球蛋白的水平,然后组合。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中至少一种形式的所述物质是抗原成分或抗原成分的组合。

16. 一种阵列,其包括设在离散位置处的物质的多种形式,其中至少一种形式是天然提取物,并且至少一种形式是抗原成分或抗原成分的组合。

17. 一种试剂盒,其包括根据权利要求 16 所述的阵列,以及一种或多种检测分子。

18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒,其中所述检测分子是抗体或其衍生物。

19. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的方法,其中所述免疫球蛋白是免疫球蛋白 E 或免疫球蛋白 G。

免疫检测

[0001] 本发明涉及检测和 / 或定量抗原特异性免疫球蛋白的免疫检测领域,更具体地涉及用于过敏病症或疾病的诊断的免疫检测。

[0002] 发明背景

[0003] 过敏疾病在过去的数十年内流行增加,在世界的较发达地区流行增加最显著。过敏反应是对在环境中通常无害的物质的免疫应答。机体识别物质作为威胁并针对其产生不适当的放大的反应。引起反应的物质称为过敏原,并且这些可以包括如花粉、尘螨、动物皮屑、霉菌孢子、胶乳、药物、昆虫毒液,和食物如坚果和蛋的物质。

[0004] 过敏反应是重要的健康问题,并导致重大经济损失,因此,关键是正确的诊断和治疗。

[0005] 患有过敏反应的个体呈现各种疾病的临床症状。这些包括:呼吸症状(如打喷嚏、气喘和急性支气管痉挛)、心血管症状(如低血压)、皮肤症状(如肿胀和荨麻疹)、胃肠道症状(例如,呕吐和腹泻)或全身症状(包括全身性过敏反应)。常见的过敏紊乱包括哮喘、湿疹和枯草热。一旦在初级保健情况中的患者呈现涉及刺激和炎症的症状,则临床医生通常进行另外的测试以确定哪种过敏原引起过敏反应。结合临床症状和针对一种或多种过敏原的免疫球蛋白的出现得到过敏反应的诊断。

[0006] 为了对过敏反应作出诊断,临床医生可以使用皮肤点刺测试(skin-prick test)。使用微量的疑似过敏原点刺皮肤以观察是否有反应。如果有,围绕点刺的皮肤将肿胀并变红和发痒,这是针对该过敏原的免疫应答的典型标志。然而,由于皮肤点刺测试最明显的是可令人不适,并且全面测试涉及大面积皮肤,因此,皮肤点刺测试不总是理想的。此外,如果个体具有对任意过敏原的危及生命的反应,那么不建议进行这些测试。如果个体服用了抗组胺药或三环类抗抑郁药,那么皮肤点刺测试可能是不可靠的。

[0007] 给定物质的抗原性可以源自该物质内的许多单一抗原。抗原成分(“成分”)可以是蛋白质、多糖或能够刺激免疫应答的含有表位的任何其他实体。例如,如果物质是尘螨(屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*)),则其含有维持有机体生命的所有分子,但其还含有由抗原成分如 Der p 1 和 Der p 2 组成的过敏原部分。特别地,Der p 1 和 Der p 2 是天然尘螨提取物的主要过敏原成分。一般地,在给定提取物中的过敏原分子的部分越少,基于提取物的检测的灵敏度就越低。

[0008] 免疫球蛋白 E(IgE) 是在过敏疾病中起到主要作用的一类抗体。IgE 结合到过敏原并触发可以导致炎症的来自肥大细胞的物质的释放。在易感人群中,B 细胞在应答初次暴露于过敏原时产生过敏原特异性 IgE。该 IgE 随后在血液中循环;结合到肥大细胞,并且在随后暴露于相同过敏原时,可以开始级联的过敏反应。因此,特定的 IgE 成为已确定的针对过敏疾病的标志物。

[0009] 免疫检测可用于检测对特定过敏原具有特异性的 IgE 水平。这些是评价在敏化受试者中的各种过敏原特异性 IgE 抗体的存在以及可能对其定量的最重要的血液试验。

[0010] 免疫检测是用于检测在给定样品中的抗原或特定的抗原特异性抗体的存在的方法。通过在特定抗原上孵育样品可以实现对结合于抗原特异性抗体的抗原(即,免疫复合

物)的检测。随后,抗原特异性抗体的存在可以使用各种技术可视化。一般地,免疫检测需要将抗原固定在固体支持物上。免疫检测的类型包括 ELISA(酶联免疫吸附检测)和 RAST(放射过敏原吸附检测,包括来自 Phadia AB 的基于荧光的 ImmunoCAP™检测形式)。

[0011] 由于体外过敏反应诊断免疫检测仅需要提供血液样品,其对于个体而言更方便,因此其用作皮肤试验的供选择的方案。然而,已在报导(Bernstein 等人, Allergy Diagnostic testing:an updated practice parameter.Part 2. Ann Allergy Asthma Immunol 2008Mar ;100(3suppl)S66-S121)中发现,血液试验的灵敏度比皮肤试验低高达 25-30%。

[0012] 目前的针对具有可能的过敏反应的个体的血液试验的临床实践是针对样品,如血液中的结合于物质的免疫球蛋白的存在进行广泛测试。所述物质是过敏原或抗原物质,如花生、狗皮屑或桦树花粉。其可以作为物质的天然提取物,或从天然提取物中分离的成分出现在免疫检测中,但两者绝不平行出现。这样的检测有助于临床医生做出“对花生过敏”或“对桦树花粉过敏”的决定,但没有另外的信息。此外,每例过敏患者具有独特的过敏原特异性 IgE 谱(profile)。如果仅使用单个成分,当特定抗原成分可能被遗漏或尚未确定时,过敏反应会被遗漏。由于大多数物质含有至少一种抗原成分,因此过敏反应是复杂的。事实上,已知抗原成分之间的一些交叉反应性。例如,已知来自桦树花粉的过敏原 Bet v 1 和来自花生的过敏原 Ara h 8 是可交叉反应的,并且对这些之一具有特异性的免疫球蛋白也可以结合于另一个。

[0013] 仅在有限的情况下使个体经受第二次血液试验,该第二次血液试验试图分析个体具有的免疫球蛋白所针对的物质的成分。这可能是关键的,由于某些成分特异性免疫球蛋白的存在可以表明对物质的潜在的过敏反应,而其他不能。例如,吃花生(含有 Ara h 8)的具有针对 Bet v 1 的 IgE 抗体的桦树花粉过敏患者可以由于交叉反应抗体的存在而不是过敏反应而经历口腔发痒(口腔症状)。

[0014] 本发明试图改善针对过敏反应的免疫检测的灵敏度和质量,实际上是针对任何物质的免疫检测。其提供用于在试验样品中定量具体免疫球蛋白水平的更灵敏的免疫检测。在改善免疫检测的灵敏度和质量时,在试验样品中的具体免疫球蛋白的检测限也得到改善。此外,个体可以接受更特异性的诊断,其实现对临床症状的精确管理。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的目的是提供一种改进的免疫检测,其具有提高的灵敏度和质量。具体地,本发明是一种检测和/或定量物质特异性免疫球蛋白水平的方法。本发明还涉及能够实现这样的检测和定量的系统。该方法可以用于诊断在个体中对过敏原或过敏反应的敏化,特别是当考虑到患者的症状时。

[0017] 更具体地,本发明的目的是提供改进的免疫检测,其提供更灵敏的诊断工具并且其可以甚至有利地直接用于初级保健情况中。

[0018] 这些目的是通过新颖地提供每种关注的物质的多种形式来实现的。例如,关注的物质可以源自花生。如果需要,可以包括一种以上物质,从而以多种形式提供每种测试的物质。例如,物质作为天然提取物提供,并且一种或多种抗原成分源自该物质。作为实例,这可以是作为一种形式的花生的天然提取物和抗原成分 Ara h 1、Ara h 2 和 Ara h 5。如果使用固体支持物,则这些离散的物质形式分别地固定在固体支持物上。因此,在免疫测定中

分别评估每种形式,并由每种形式获得不同的结果。因此,对于每种测试的物质,多种形式产生多种结果。在有关花生的实例中,将获得4种各自的结果,针对天然提取物有一种和针对每种成分各有一种。当分析结果时,可以组合一种或多种物质形式,例如,可以总结两种或多种抗原成分的结果。由这些结果可以定量样品中的物质特异性免疫球蛋白的水平。如果个体具有结合于测试的物质的特异性免疫球蛋白,则这些结果的分析系统使得临床医生更精确地评估。对于存在于方法中的单个抗原成分(或多个抗原成分),结果将显示抗原成分特异性免疫球蛋白的存在和/或水平。

[0019] 重要的是要注意,只有当足量的物质特异性免疫球蛋白和所述物质两者均存在于检测中时,才可以确定体外诊断试验的阳性。具体地,如果检测中存在物质的不足或低质量,则物质特异性免疫球蛋白将不能充分结合于所述物质,这导致差的检测性能(例如,低灵敏度)。

[0020] 因此,在第一个方面,本发明提供了:

[0021] 一种用于检测样品中物质特异性免疫球蛋白的存在或不存在的方法,所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质基本上同时接触,并测定是否形成免疫复合物,其中至少一种形式是天然提取物。

[0022] 优选的是,至少一种形式是抗原成分或抗原成分的组合。

[0023] 优选的是,所述方法可以用于定量样品中物质特异性免疫球蛋白的水平。进一步优选的是,所述方法可以供选择地或另外地用于定量抗原成分特异性免疫球蛋白的水平。因此,本发明的方法可以包括定量物质和/或抗原成分特异性免疫球蛋白的水平的一个或多个步骤。

[0024] 在本发明的另一个优选的方面,所述方法可以用于实现个体中过敏反应的诊断。个体提供用于该方法中的样品。因此,本发明的方法可以包括测定个体的敏化状态的一个或多个步骤。供选择地或另外地,该方法可以用于测定个体的物质特异性或抗原成分特异性免疫球蛋白的状态。

[0025] 如本文所使用,敏化是指患者之前已经暴露于物质,并且免疫球蛋白已经针对该物质升高。进一步暴露可以导致如先前所讨论的过敏症状。

[0026] 在第二个方面,提供了用于定量样品中物质特异性免疫球蛋白水平的方法,所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质接触,并测定所述免疫球蛋白对所述物质形式的反应性水平,其中至少一种形式是天然提取物。

[0027] 在第三个方面,提供了用于提高物质的结合能力的方法,其包括选择性去除一种或多种成分。优选的是,将所述物质制备成天然提取物。结合能力涉及物质特异性结合元件如免疫球蛋白结合于物质的能力。所述物质(本文描述为改性的或贫化的物质)可以用于本发明的任何方法、阵列或试剂盒中。

[0028] 在第四个方面,提供了阵列,其包括设在离散位置处的多种形式的物质,其中至少一种形式是所述物质的天然提取物。所述阵列可以用于本发明的任何方法或试剂盒中。

[0029] 优选的是,至少一种抗原成分或抗原成分的组合作为所述物质的形式提供。因此,1种或多种形式可以是抗原成分或抗原成分混合物。

[0030] 在第五个方面,提供了试剂盒,其包括:阵列,其包括上述的在离散位置处提供的多种形式的物质;和一种或多种检测结合剂。

[0031] 在第六个方面,提供了测定个体的物质特异性免疫球蛋白状态的方法,其包括使来自所述个体的样品与多种形式的所述物质基本上同时接触,其中至少一种形式是天然提取物,并测定是否形成免疫复合物。

[0032] 在第七个方面,提供了用于诊断个体中对物质的过敏反应的方法,所述方法包括使来自所述个体的样品与多种形式的物质基本上同时接触,其中至少一种形式是天然提取物,并且具有一种或多种形式的免疫复合物的存在表明存在对该物质的敏化和/或过敏反应。

[0033] 附图简述

[0034] 图1:图1显示来自实施例1的结果。其为显示过敏原特异性免疫球蛋白(IgE)浓度(分类得分中的反应性)对尘螨提取物(天然提取物)、Der p 1和Der p 2(两种成分)的平均荧光信号的条形图。

[0035] 图2是显示来自实施例1的结果的另外的条形图,并且其与图1相似,除了显示的是阴性或低反应性样品(过敏原特异性免疫球蛋白浓度<0.35kU/L)。条形图显示如何可以通过使用源自单一抗原/过敏原(例如,天然提取物)或其组合(例如,天然改变提取物和/或单一抗原)的荧光信号改善灵敏度(即,更高的反应性)和特异性(即,阴性样品保持阴性)两者。

[0036] 图3:显示来自实施例1的结果,所述结果绘制在IgE浓度对平均荧光信号的图上。为了帮助理解绘图,将每个条件的趋势线叠加在数据上(例如,更高的斜率值表示更高的检测灵敏度)。

[0037] 图4:用图画显示本发明的核心,其将多种形式的物质提供给样品,包括天然提取物。天然提取物显示为抗原(抗原成分)的天然混合物。描绘了两种次要抗原、未知抗原、主要抗原、抗体和阵列表面。实施例A显示了用于对主要抗原2阳性的患者1的阵列。实施例B显示了用于对次要抗原阳性的患者2的阵列。实施例C显示对主要和次要/未知抗原两者均阳性的患者3,以及实施例D描绘了对未知抗原阳性的患者4。

[0038] 图5:显示了来自实施例1的选择数据,其突出了本发明的实用性。提供了5种样品,其中如果已经分别使用天然提取物或单个成分,则不能检测对尘螨的敏感度。数据显示为样品对荧光信号的条形图。

[0039] 发明详述

[0040] 发明人已经发现,可以通过提供包括至少一种物质的天然提取物的多种离散形式的物质改善免疫检测的灵敏度和质量。物质的形式还可以包括单独的或与一种或多种抗原成分组合的物质的抗原成分(如已知的过敏原)。随后分析来自这些离散的物质形式的反应性数据以提供关于个体(采集样品的个体)是否具有物质特异性免疫球蛋白的信息。如果使用固体支持物,则将物质形式分别固定在固体支持物上。由于在检测中,单一成分一般地将一种类型的抗原或过敏原提供给样品,因此本发明的方法还实现抗原成分特异性免疫球蛋白的检测和定量,并且还可以读取或测定这些单一结果。

[0041] 至始至终将理解的是,当讨论抗原成分时,该成分可以是过敏原或抗原。

[0042] 本发明可以以阵列或其他适合的形式使用,其中仅测试一种物质,或测试多种(2种或更多种)物质。当测试多种物质时,一种或多种这些物质可以以多种形式存在。因此,可能的是,所有测试的物质以多种形式存在,或一些(10、20、30、40、50、60、70、80或90%)

物质以多种形式存在。本发明的目的是，在免疫检测中在多种物质的情况下，这些物质中的至少一种以多种形式存在，这些形式中的至少一种为该物质的天然提取物。如果测试多种物质，可以在一次免疫检测中测试 2 至 10,000 之间的任意数量，更具体地为 2 至 1000 种物质，分别使用更具体地为 2 至 500 种，甚至更具体地为 2 至 250 种物质。

[0043] 优选的是，例如，本发明的方法在单一阵列格式上进行，其中所有物质形式位于单一芯片或板上。

[0044] 因此，提供了用于检测样品中物质特异性免疫球蛋白存在或不存在的方法，所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质基本上同时接触，并测定是否形成免疫复合物，其中至少一种形式是天然提取物。

[0045] 优选的是，所述方法能够定量样品中物质特异性免疫球蛋白的水平。定量涉及物质特异性免疫球蛋白的含量或水平的测定或表达。优选的是针对每种物质形式定量物质特异性免疫球蛋白的水平。根据使用的检测方法测量物质特异性免疫球蛋白的水平或含量。

[0046] 优选的是，一种或多种物质形式是所述物质的抗原成分。如果抗原成分用于本发明的方法中，则该方法能够检测和定量样品中的抗原成分特异性免疫球蛋白。

[0047] 在第二个方面，提供了用于定量样品中物质特异性免疫球蛋白的水平的方法，所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质接触，并测定所述免疫球蛋白对所述物质形式的反应性水平，其中一种形式是天然提取物。

[0048] 本发明的方法需要存在物质的多种形式，其中至少一种是天然提取物。如本文所使用，物质是实体、物理物质或材料。优选的是物质的来源是天然的，但是可以以改性的形式（即，乳胶）提供或是完全合成的（即，香料）。出于本发明的目的，物质是抗原性的，其能够与免疫系统相互作用并且可以刺激免疫应答。物质的抗原性可以来自该物质内的许多单一抗原。不受限制，以下是可以用于本发明的物质的实例：

[0049] 蛋，贝类，鱼，花生，木本坚果，大豆，芹菜，芥菜，芝麻，牛奶，羽扇豆，大蒜，燕麦，小麦，树花粉（例如，橡树、白蜡树、桦树、榆树、赤杨、雪松、榛树、柳树、橄榄树、角树），草花粉（例如，黑麦草和梯牧草），杂草花粉（豚草、荨麻、艾蒿、酢浆草和藜），羽毛，猫狗皮屑，蟑螂，尘螨，昆虫毒液，如蜂毒，啮齿动物（特别是啮齿动物的尿），霉菌孢子，细菌，病毒，寄生虫，乳胶，香料和自身蛋白如髓磷脂。

[0050] 本发明人认识到，向着当测试如过敏反应的病症时仅测试来自物质的单一成分的发展趋势在大多数情况下在过敏反应的检测中导致灵敏度降低。这是由于没有针对尚未确定或以低量存在于提取物中的抗原成分进行测试。此外，如果物质作为“掺入”已知抗原成分的天然提取物提供，情况也是如此，这是由于在该情况下剩余的抗原可以在过程中被稀释或掩盖。该灵敏度的降低可以导致个体的假阴性结果，特别是当其对物质中的未表征的抗原过敏时。本发明试图改善物质特异性免疫球蛋白（或多种物质特异性免疫球蛋白）的灵敏度（例如，更好的检测限）。

[0051] 优选的是，出于本发明的目的，将物质形式结合于适合的支持物，如固体表面。每种形式单独地在已知的位置结合。这些位置可以是紧邻的或间隔一定距离。下文进一步讨论固体表面或支持物的提供。

[0052] 当进行本发明的方法时，优选的是每种物质形式与样品基本上同时接触。这意味着每种形式与样品基本上同时接触，或平行接触。

[0053] 如本文所使用,样品是取自个体的标本。样品优选为身体流体,包括但不限于,血液、血浆、血清、淋巴液、尿液或唾液。

[0054] 个体表示受试者,不论其是否可能具有针对测试的物质(或多种物质)的免疫球蛋白,例如,不论其是否具有过敏疾病。出于本发明的目的,个体优选为人类,但是可以为动物,优选为哺乳动物。

[0055] 免疫球蛋白是存在于血清、淋巴和免疫系统的细胞中的一类 γ 球蛋白,其起到抗体的作用。主要类型的抗体(IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)包括在该定义内。这些蛋白响应抗原性物质的存在而产生,并且对该物质具有特异性。如本文所使用,免疫检测是检测物质特异性免疫球蛋白。

[0056] 针对特异性过敏原的免疫球蛋白 E(IgE) 通常在来自个体的样品中检测不到,并且仅当个体变得对该过敏原敏化时才产生。针对特定过敏原并且将仅与该过敏原反应的 IgE 通常称为特异性 IgE(sIgE)。个体可以具有针对一种以上过敏原的特异性 IgE。该原则也适用于其它抗体和抗原,产生的抗体对该抗原具有特异性。

[0057] 免疫复合物由免疫球蛋白如抗体对抗原的完整结合而形成。

[0058] 反应性用来指特定抗体及其配体之间结合以形成免疫复合物的水平。在本发明的上下文中,免疫球蛋白(或多种免疫球蛋白)是特异性抗体,并且配体是特异性抗原。在过敏疾病的情况下,通常特异性 IgE 将结合于特异性过敏原。反应性水平可以以 IU/ml 定义,或供选择地以可以为指定分类得分值的范围定义。例如,0 类为小于 0.35IU/ml ;1 类为 0.35 至 0.71IU/ml ;2 类为 0.71 至 3.51IU/ml ;3 类为 3.51 至 17.51IU/ml ;4 类为 17.51 至 50IU/ml 以及 5 类为 50.01 至 100IU/ml。

[0059] 供选择地,针对特定抗原的抗体反应性可以认为是阳性 / 存在的或阴性 / 不存在的,例如在阈值以下反应被视为阴性 / 不存在的,并且在阈值以上反应被视为阳性 / 存在的。一般地,水平为 $> (大于) 0.35IU/mL$ 表明阳性结果,换言之,特异性抗体已经结合于其配体。作为样品中的特异性抗体及其配体,在该情况下其配体是抗原之间的相互作用的结果而形成的抗体-抗原(免疫)复合物,其使用适合的检测来测量。

[0060] 抗原是能够引起免疫应答的实体。一般地,抗原对身体而言是外来的实体,但是抗原偶尔可以是个体本身具有的,这样一来,免疫应答是自身免疫应答。表位是免疫系统识别的抗原的一部分。表位的长度可以仅是几个残基,并且这些残基的排列可以是连续的或立体的。更大的抗原可以含有多于一个的表位。如本文所使用,物质可以含有 1 种或多种抗原,在本文中称为抗原成分。

[0061] 在本发明的上下文中,术语过敏原是指特定类型的抗原,所述抗原能够触发由 IgE 抗体介导的过敏应答。

[0062] 本发明的方法和制备涉及“物质的形式”或“物质形式”。这表示物质以天然制备物或提取物(例如,尘螨提取物)以及从天然制备物或提取物中分离的抗原成分(按照相同的实施例,成分 Der p 1 和 Der p 2)的“形式”存在。本领域技术人员将理解,抗原成分“形式”可以从天然来源中分离,或使用重组基因技术制备。本发明的优选方面是,在方法中测试的物质以天然提取物形式和一种或多种抗原成分形式存在。因此,物质的多种形式可以是天然提取物和一种或多种抗原成分。如果希望,可以提供多于一种的天然提取物。可以提供任意数量的物质形式,优选地 2 种或更多种,但是也可以提供 3 种、4 种、5 种、6 种、7

种、8 种、9 种、10 种或更多种物质形式。每种形式是不同的,但是应理解的是大多数方法至少一式两份地进行以验证所获得的结果。来自样品的物质特异性免疫球蛋白能够结合于任何包含表位的形式,所述形式针对所述表位具有特异性。

[0063] 本发明包括物质的多种形式,其每种是不同的。这些形式中的至少一种是天然提取物,如下文所述,其可以是改性的天然提取物。因此,在本发明中,物质的两种形式可以是物质的天然提取物。在该实施方案中,天然提取物将不是相同的;可能的是,至少一种可以是改性的天然提取物。

[0064] 在另外的实施方案中,物质的至少一种形式是该物质的抗原成分。抗原成分在下文进一步描述,但是可以从物质中分离或重组制备。因此,1 种、2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种或更多种形式可以是抗原成分。抗原成分可以单独提供(每种抗原成分为物质形式),或与 1 种或更多种(1 种、2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种或更多种)其它抗原成分组合作为单一物质形式提供。例如,一种物质形式可以是 2 种抗原成分,如 Der p 1 和 Der p 2 的组合。这两种抗原成分为已知的过敏原。该组合将作为物质的一种形式提供,并且可以包括 2 种或更多种抗原成分。

[0065] 将理解的是,如果在本发明的方法中利用成分,则来自样品的成分特异性免疫球蛋白将能够结合。单个或组合的抗原成分的存在实现过敏谱的更高的分辨率。优选的是,成分是抗原性的或过敏原性的。

[0066] 在一个方面,本发明是用于检测样品中的物质特异性免疫球蛋白存在或不存在的方法,所述方法包括使所述样品与多种形式的所述物质基本上同时接触,并测定是否形成免疫复合物,其中一种形式是天然提取物,并且至少一种形式是所述物质的抗原成分。

[0067] 本发明的方法可以基于样品中物质特异性免疫球蛋白的存在和/或水平,用于帮助诊断在个体中对物质的过敏反应。诊断通常是结合个体的病史做出的,所述病史如症状,其包括例如打喷嚏;气喘;呼吸困难;窦痛;流鼻涕;咳嗽;风疹(荨麻疹);肿胀;发痒或眼、耳、唇、喉和/或颚刺激;和/或疾病、呕吐和/或腹泻。

[0068] 应注意的是,在本发明的方法和阵列中作为物质的一种形式使用的抗原成分也可以以天然提取物形式存在。该存在是天然提取物的正常组成的部分;其绝对未加入或掺入在天然提取物中。本发明不涉及已掺入抗原成分的天然提取物。

[0069] 天然提取物是物质的制备物。例如,其可以是尘螨、花生或动物皮屑的制备物。其来自抗原的天然来源,所述天然来源包括合成化合物,如果这些合成化合物能够产生免疫应答。天然提取物可以根据任何适合的方法制备,包括由天然来源获得的物质的水性提取物。理想的制备方法旨在与物质与个体接触时所暴露的生理条件相容。这将产生物质的未改性的天然提取物。

[0070] 根据本发明另外的方面,可以处理天然提取物以去除一种或多种选择的成分,产生改性的或改变天然提取物。如本文使用的术语天然提取物还扩大到经处理以去除一种或多种选择的成分的天然提取物,从而包括改性的或改变天然提取物。本发明的优选的方面是处理天然提取物以去除还在免疫检测/方法中存在的抗原成分。由于成分被去除,因此这样的改性的天然物质还可以指“贫化的(depleted)”天然提取物。因此,如果检测中的一种物质形式是抗原成分 A,则可以处理天然提取物形式以去除抗原成分 A,完整地留下剩余的成分。由于天然提取物中的次要成分未被主要抗原成分的存在而稀释,因此这有

助于实现更高的灵敏度。例如,为了测定个体是否对尘螨过敏,以下形式可以用于免疫检测中:

[0071] 去掉 Der p 1 和 Der p 2 的天然尘螨提取物

[0072] Der p 1(抗原成分)

[0073] Der p 2(抗原成分)

[0074] 由于个体将可能具有不结合于分离的成分但结合于天然提取物形式的次要成分的抗原特异性抗体,因此从天然提取物中分离出已知的抗原成分形式实现更好的检测灵敏度。成分分辨率以及灵敏度提高。供选择地或另外地,可以处理天然提取物以去除交叉反应性的抗原成分。若干已知的过敏原共享共同的多肽或多糖序列,或肽或糖结构,针对所述序列或结构产生抗体。例如,Ara h 8(花生)和主要过敏原 Bet v 1(桦树花粉)共享共同序列。因此,可能的是针对一种过敏原形成结合于其它过敏原的免疫球蛋白。为了提供临床上更相关的结果,可以处理天然提取物以去除或降低交叉反应性的抗原成分。如果这样的交叉反应性的抗原成分去除或降低,则优选的是,这些的抗原成分单独地在方法或免疫检测中提供。将理解的是,方法中提供的抗原成分未必是从天然提取物中物理去除的那些,而是可以单独地制备。

[0075] 交叉反应在某些类型的花粉和食物之间是常见的。作为一个实例,患有桦树花粉过敏的患者当食用花生或含有结构类似的抗原的其他食物来源时,可以发生口腔症状的反应—这样的症状包括口腔粘膜发痒、肿胀和变红(通常称为“口腔过敏综合征”)。然而,目前的理解是,这将不会导致致命的或威胁生命的对花生的过敏反应。因此,不加辨别地平行使用贫化的天然提取物和抗原成分,将更难分辨对花生的口腔过敏综合征(由于对桦树花粉的过敏反应引起的)与真正的对花生的过敏反应。

[0076] 已知的交叉反应性抗原成分的实例包括:

[0077] 螨过敏原:Der p 1 和 Der p 2, 食物和花粉过敏原:(P 10 蛋白)Bet v 1, Cor a 1, Aln g 1, Mal d 1, Gly m 4, Api g 1 和类甜蛋白:Pru p 3(桃),Zea m 14(玉米)(抑制蛋白)Bet v 2 和 Phl p 12 以及 Sola t 8(马铃薯)和 Api g 4(芹菜),有毛动物:(脂质运载蛋白)Can f 6, Equ c 1, Fel d 4, (白蛋白)Can f 3(犬),Equ c 2(马),Fel d 2(猫)。

[0078] 本发明的另一个优选的方面是,供选择地或另外地处理天然提取物以去除其它或另外的成分。这也将产生改性的或贫化的天然提取物。例如,犬和猫皮屑可以含有 50-80% 的白蛋白,其体积较大。如果去除该成分,则保留了剩余的天然提取物,并且这样针对剩余的成分留下了更高的结合能力,其中一些可以包括表位并且是抗原性的。此外,这增加了成分分辨率和灵敏度。

[0079] 在一个优选的方面,天然提取物是改性的天然提取物,所述改性的天然提取物经处理以去除已知的抗原成分,包括交叉反应性抗原成分和/或另外的成分。在一个优选的实施方案中,至少一种去除的抗原成分在本发明的方法或阵列中作为物质形式存在。如之前所解释的,单独提供的抗原成分可以重组地制备或从天然提取物中分离。

[0080] 成分可以通过任何适合的手段从天然提取物或制备物中去除。例如,提取物可以过滤或可以使用其它物理分离技术(例如,亲和色谱),供选择地,可以使用生物分离手段(结合于特异性成分的单克隆抗体、抗原或适体),并且如果剩余的成分不受影响,甚至去

除成分的化学手段也是适合的。此外,这些技术还可以用于将成分从物质中分离。分离的成分可以用作物质形式。

[0081] 本发明的优点在于,已知的抗原成分可以从天然提取物中去除。这实现了关于在该天然提取物中的“次要”成分的抗原性的数据的收集,而不必首先对其进行鉴定。

[0082] 一种或多种天然提取物可以用于本发明的免疫检测、方法、阵列或试剂盒中。设想的是,可以使用多种天然提取物。例如,简单地从物质中分离的未改性的天然提取物可以与去除了一种或多种成分的一种或多种改性的天然提取物一起使用。不同的改性的天然提取物可以去除不同的成分,以通过“富集”次要成分来提高灵敏度。去除的成分可以包括已知的抗原成分或大体积成分。该选择性去除提高了检测的灵敏度。

[0083] 物质的抗原成分可以通过本领域已知的方法从物质本身中分离(如关于改性天然提取物的制备所讨论的),或可以重组制备。天然或重组抗原成分可以用于本发明的方法、阵列和试剂盒中。如之前所提到的,抗原成分可以单独使用,或可以根据需要组合以形成混合的单一物质形式。优选的是单独使用抗原成分,其能够收集更多的数据。

[0084] 抗原成分优选为已知的过敏原。本文所述的所有过敏原(抗原成分)已经根据 WHO/IUIS 过敏原命名分委员会(WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee)(<http://www.allergen.org/>)制定的标准命名。

[0085] 图 4 描述了本发明的一个方面的基本原则,并证明了在一个测定格式中的多种物质形式的使用。如果物质为其天然形式,可以通过选择性地去除一种或多种其成分(例如,抗原 1、抗原 2 和抗原 3)以富集所述物质的一些或所有剩余的抗原成分(例如,未知或次要抗原)的含量来改变组成。未改性的天然提取物和/或改性的或贫化的版本与所述物质的单一或组合的抗原成分固定在一起以提高免疫检测或方法的结合能力。结合能力的提高随后转化为更高的检测灵敏度。数据可以通过算法解译。事实上,算法可以寻找最强的荧光信号,所述荧光信号可以源自单一物质形式(例如,天然提取物或单一/组合的抗原成分)或其组合(例如,来自天然提取物(或多种天然提取物)和/或单一/组合的抗原成分的组合数据)。提供的方案证明了如果个体具有对主要、次要和/或未知抗原具有特异性的免疫球蛋白会发生什么。由于如果仅在检测中使用单一成分或天然提取物,那么若干这些个体将被遗漏,因此是使用多种物质形式提高了试验的灵敏度。

[0086] 在第三个方面,本发明涉及用于提高物质的结合能力的方法,其包括从物质中选择性去除一种或多种成分。结合能力涉及物质特异性免疫球蛋白或其它特异性结合分子结合于物质的能力。

[0087] 在本发明的该方面,物质通常是如本文所制备的天然提取物。选择用于去除的成分可以是已知的抗原成分,包括交叉反应性抗原成分或常见或大体积成分。本文针对能够实现成分的选择性去除的方法讨论方法。

[0088] 改性的天然提取物可以用于本发明。

[0089] 当本发明描述抗原的用途时,这可以被术语过敏原替代。优选的方面是所述物质是过敏原性的。

[0090] 如本文使用的术语“多种”定义为两种或多于两种。

[0091] 在第四个方面,提供了阵列,其包括设在离散位置处的多种物质形式,其中至少一种形式是天然提取物。在一个优选的实施方案中,该阵列还包括设在离散位置处的物质的

一种或多种抗原成分。

[0092] 在第五个方面,提供了包括阵列和一种或多种结合元件的试剂盒,所述阵列包括设在离散位置处的多种物质形式,其中至少一种形式是天然提取物。阵列可以如前所述。结合元件可以是检测抗体。

[0093] 优选的是,该阵列是微阵列。阵列可以采用适合用作免疫检测的任何形式。阵列基本上是结合于固体表面的物质形式的排列,以使每种形式的位置是已知的。阵列可以包括多种不同的物质,以使多个检测步骤平行地进行。因此,最优选的阵列的形式是多重检测。

[0094] 根据本发明的若干方面,检测到物质形式和物质特异性免疫球蛋白之间的免疫复合物的形成。该检测可以通过本领域技术人员已知的任意适合的手段,或如本文所讨论。

[0095] 免疫复合物的形成表明免疫球蛋白与物质发生了反应。因此,免疫复合物形成的水平表明物质特异性免疫球蛋白的反应性水平,并且可以用于定量该反应性。

[0096] 因此,通过使样品(其可以包括特异性免疫球蛋白)与多种抗原形式基本上平行(或基本上同时)接触,并测定结合于每种物质形式的来自样品的每种特异性免疫球蛋白的量,来测定免疫球蛋白反应性的水平。

[0097] 优选地,使用抗免疫球蛋白抗体(检测抗体),借助免疫检测测量对物质形式的免疫球蛋白反应性水平(或免疫复合物的形成水平)。一般地,用于免疫检测中的检测抗体(或其片段及部分)对特定的免疫球蛋白同种型具有特异性。例如,可能仅检测 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE。由于每种同种型可以具有不同的临床意义,因此这是有用的。

[0098] 当免疫检测涉及过敏反应的诊断时,仅检测 IgE 免疫球蛋白是有用的,因为其介导过敏反应。抗 IgE 抗体与人类免疫球蛋白的 IgE 同种型反应。因此,在某些实施方案中,使用抗 IgE 抗体测定或定量结合到每种抗原的 IgE 的存在或量。

[0099] 检测抗体可以是多克隆、单克隆、双特异性、人源化或嵌合抗体,但是一般地可以优选亲和纯化的抗体和更具体地是单克隆抗体。这样的检测抗体可以是常规抗体或重组抗体,并且可以由单链组成,但优选地由至少轻链或重链组成。然而,将理解的是需要至少一个互补决定区(CD)以结合靶标如抗原,抗体对所述抗原具有结合特异性。

[0100] 制备结合于免疫球蛋白的同种型的检测抗体的方法在本领域是已知的。例如,如果需要多克隆抗体,那么选择的哺乳动物,如人类、小鼠、兔、猪、绵羊、骆驼、山羊或马可以使用选择的抗原免疫,所述抗原如异源性 IgE、IgA 或 IgG。然后收集并处理来自免疫的动物的血清以获得抗体,例如通过免疫亲和色谱。

[0101] 单克隆检测抗体可以通过本领域已知的方法制备。熟知的是使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的一般方法(参见,例如, Kohler, G. and Milstein, C, Nature 256:495-497(1975); Kozbor 等人, Immunology Today 4:72(1983); Cole 等人, 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985))。

[0102] 如本文所提及的检测抗体应由表位结合区域如 CDR 组成。抗体可以是任意适合的类别,包括 IgE、IgM、IgD、IgA,特别是 IgG。也考虑了这些抗体的各种小类。在具体实施方案中,可以使用检测抗体的片段或源自保留检测抗体的结合特异性的这样的抗体的多肽。这样的片段包括但不限于,抗体片段,如 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv,其所有均能够结合于表位。

[0103] 术语“检测抗体”还延伸到任意各种天然和人工抗体及可得的抗体衍生的蛋白,

以及其衍生物,例如,包括但不限于,多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单域抗体、全抗体、抗体片段如 F(ab')₂ 和 F(ab) 片段、Fv 片段(非共价异二聚体)、单链抗体如单链 Fv 分子(scFv)、微抗体、寡聚抗体、二聚或三聚抗体片段或构建体、亲和体或其他形式的结合分子等。术语“检测抗体”不意指任何特定的来源,并且包括通过非常规方法,如噬菌体展示获得的抗体。本发明的抗体可以为任何同种型(例如,IgA、IgG、IgM)并且可以具有 κ (kappa) 或 λ (lambda) 轻链。

[0104] 虽然优选的是,免疫球蛋白的结合元件是抗体或其衍生物,但还设想的是,可以使用任意适合的结合元件。因此,结合元件可以是适体或诸如此类。适体是寡核酸(如 DNA 或 RNA)或结合于具体靶分子的肽分子。适合的结合元件在本领域是熟知的。因此,结合元件可以是能够结合于免疫球蛋白的任意适合的分子。

[0105] 因此,本发明延伸到对免疫球蛋白同种型具有结合特异性的结合元件或分子、检测抗体和结合片段用于本发明的用途。

[0106] 优选的是,所述检测抗体是抗 IgE 抗体。

[0107] 术语“特异性结合”或“结合特异性”是指结合元件、抗体或其片段以比其结合于非靶表位更高的亲和力结合于靶标的能力。例如,抗体与靶表位的结合可产生的结合亲和力为比针对非靶表位的结合亲和力高至少 10、50、100、250、500 或 1000 倍。在某些实施方案中,由亲和 ELISA 检测来测定结合亲和力。在供选择的实施方案中,亲和力是由 BIAcore 检测来测定的。供选择地,结合亲和力可以由动力学方法测定。

[0108] 在具体的实施方案中,检测抗体是标记的抗体,或结合元件是标记的。借助非限定性实例,标记可以通过缀合于酶如过氧化物酶,或化学发光或荧光化合物如 Alexa Fluor 555 或质量标签实现。本发明人构想任何适合的标记。

[0109] 在其他实施方案中,检测抗体是未标记的,并且使用另外的抗体检测,所述另外的抗体通常称为二级抗体,如描述的对其进行标记。这也适用于结合元件,其中第二结合元件可以用于检测第一个。

[0110] 在一个优选的实施方案中,检测抗体是针对免疫球蛋白如 IgE 的未标记的小鼠单克隆抗体,并且其使用标记的二级抗体,如抗小鼠 IgG 来检测。在某些实施方案中,一种或多种发光或荧光部分可以结合于亲和素/链霉亲和素,其转而可以结合于化学缀合到抗体的生物素。在某些另外的实施方案中,凝集素(蛋白 A/G/L)可以连接到发光或荧光分子,所述发光或荧光分子还可以连接到抗体或其他蛋白缀合物。在优选的实施方案中,利用酪胺信号放大系统,其使用辣根过氧化物酶(HP)的催化活性来产生高密度标记的抗体。适合的标记和标记方法在本领域是已知的,并且对技术人员是显而易见的。

[0111] 在具体的实施方案中,标记的抗体包括荧光标记。

[0112] 适合的荧光标记在本领域是众所周知的,并且借助非限定性实例,可以包括 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、R-藻红蛋白、Aqua、Texas-Red、FITC、罗丹明、罗丹明衍生物、荧光素、荧光素衍生物、瀑布蓝、Cy5 或 Cy3。

[0113] 检测方法可以通过本领域已知的任意适合的方法,如通过光学检测,包括荧光测量、色度测量、流式细胞术、化学发光等进行。其他方法包括电化学、放射、压电法等。再其他的结合检测方法可以通过表面等离子体共振(SPR)、表面等离子体显微镜(SPM)、表面等离子体荧光光谱或 SELDI 质谱等进行。技术人员将理解,检测可以使用检测方法的组合

进行。

[0114] 具体地, 结合的检测通过测量 / 检测发光信号, 例如, 由化学发光化合物产生的化学发光的光。

[0115] 固体支持物可以是本领域已知的任何材料, 例如, 玻璃载体、合成载体、硅片或膜。适合的材料包括塑料、玻璃、硅、陶瓷或有机聚合物, 所述有机聚合物包括聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯、纤维素和硝酸纤维素。表面本身可以是载玻片、片、微孔板或微量滴定板、托盘、膜、纤维、孔、颗粒 (pellet)、棒、棍、管、珠等的形式或其部分。

[0116] 术语“结合”的使用旨在是指物质在分子水平上 (即, 通过共价或非共价键或相互作用) 保留、固定或基本上连接到表面。使用的固定方法应是可重现的, 适用于具有不同特性 (尺寸、亲水性、疏水性) 的抗原, 便于高通量和自动化, 并保持抗原与抗体形成复合物的能力。通过非限定性实例的方式, 本领域已知的适合的方法包括被动吸附、基于亲和力的结合、共价偶联到化学活化的表面、光化学交叉偶联等。

[0117] 术语“定址 (address)”用来指固体支持物或固体支持物上的限定的位置的不同特征, 其使得特异性抗原被识别, 以实现针对该特异性抗原的免疫球蛋白反应性水平的测定。

[0118] 在一个实施方案中, 固体支持物是多个珠, 其各自借助定址是单独可识别的。适合的定址包括 RFID 标签、质量标签、荧光标签、光学编码、数字磁性标签、光谱编码等。

[0119] 在其他实施方案中, 固体支持物是微阵列。如本文所使用的术语“微阵列”是指用于结合免疫球蛋白而提供的点的有序阵列。本发明的微阵列包括至少两个、至少九个、至少五十个、至少一百个、至少五百个或至少一千个点。在一些实施方案中, 微阵列可以包括至少 10,000、40,000、100,000 或 1,000,000 个不同的和独特的点。点的密度可以为约 100/cm²至约 1000/cm²或更高。

[0120] “点”是指沉积在阵列表面上的具体定址, 在该情况下为物理位置的试剂或多种试剂, 在该情况下为具体物质形式。通常地, 点的特征在于存在一种或多种特异性分子 (例如, 特定蛋白质、过敏原提取物、抗原等)。点的直径可以为 10 至 2000 μm , 50–500 μm 或 200–400 μm 。物质形式可以以约 0.001 至 10mg/ml, 优选地 0.008mg/ml 至 3mg/ml 的点样浓度施加到固体支持物的表面, 以形成阵列。

[0121] 适用于测量或读取来自微阵列的荧光信号的系统是已知的。一般地, 通过在激光光斑下, 在两个方向上扫描载玻片来构建图像。可以在约一分钟内获取图像, 但在图像分析过程方面分析是复杂的。这些方法可以是复杂的, 因为需要大量产生的数据和分析算法两者来进行对来自每个点或微点的综合信号的明确测量。

[0122] 在其之前的公开的专利申请 W02003/091712 中, 发明人认识到可通过使阵列上的每个点的整体发光并在单次测量中进行全部点的荧光测量, 而不是扫描每个点的一部分和使其发光若干次来读取荧光, 以逐像素地建立每个点的图像。该方法能够实现将 LED 用作发光光源, 其为低成本光源。每个荧光分子接收相同的光能量, 正如相干光源用作发光光源时那样。然而, 检测器产生不需要进一步的信号分析的单一读数 (而不是需要复杂的图像处理以计算整体测量值的每点 400 像素的图像)。在一些情况下使用相干光源可能是不利的, 因为由于干涉效应产生的另外的噪音被引入信号中。

[0123] 在其他实施方案中, 构想了微悬臂的使用, 如国际专利公开 W02006/138161 中所公开的。再在其他的实施方案中, 检测使用一种或多种微流控芯片进行。

[0124] 在本发明中,使样品与物质的多种形式接触,包括天然提取物(或改性的或贫化的天然提取物)。针对每种形式检测免疫复合物的形成(或实际上其缺乏)。从而测定免疫球蛋白对每种形式的反应性。

[0125] 为了测定含有物质特异性免疫球蛋白的样品是否存在于样品中,针对每种物质形式检查物质特异性免疫球蛋白的水平。物质特异性免疫球蛋白的水平可以由来自标记的信号表示,如图1所描绘的。在一个实施方案中,每种形式的免疫球蛋白水平针对具体物质组合,并且取累积结果。这不需要针对存在的物质的所有形式,但可以针对选择的子集(例如,2、3、4、5、6、7、8或9种物质形式)。例如,可以仅针对抗原成分的水平组合。在供选择的实施方案中,采用具有最高水平的物质特异性免疫球蛋白的形式表示样品是否含有物质特异性免疫球蛋白。在另外的供选择的实施方案中,使用所有针对物质形式的数据进行统计分析。适合的算法在下文进一步讨论。

[0126] 物质特异性免疫球蛋白的水平(数据、信号或结果水平)可以作为数值,如分类得分(例如,从0到6)或抗体浓度(kU/L)提供。在该情况下,能够进行统计分析。供选择地,如果信号超出预定的阈值,可以简单地将数据分析为存在或不存在免疫复合物。免疫球蛋白反应性或免疫复合物形成的任何测量可以作为来自免疫测定的数据或结果提供。

[0127] 一旦收集并分析来自所有形式的结果,就可以确定样品是否含有物质特异性免疫球蛋白。这对于涉及确定免疫复合物的存在和/或诊断的方法的本发明的方面是特别相关的。

[0128] 虽然可以测定样品中的免疫球蛋白对每种物质形式的反应性,但是结果的分析可以是不同的。可以读取针对每种物质形式的数据。供选择地,当比较所有物质形式时,可以针对每种物质获得最高的结果,如分类得分或抗体/免疫球蛋白浓度。可以采用该最高的结果以表明物质特异性免疫球蛋白的存在。供选择地,来自选择的物质形式的数据可以组合。例如,来自贫化的天然提取物和一种或多种去除的抗原成分的数据可以组合。

[0129] 供选择地,来自一种或多种形式的数据可以组合或合计以确定物质特异性免疫球蛋白的存在。还可以进行另外的分析。例如,如果提供了超过一种已知的交叉反应性抗原成分,则针对该成分的数据可以组合以提供关于交叉反应性状态的信息。供选择地,来自超过一种主要抗原成分的数据可以组合以得到严重程度的指示。

[0130] 构想的是,使用算法自动分析来自每种物质形式的数据。可以使用任意适合的算法。目的是算法分析数据并提供单一读出以说明物质特异性免疫球蛋白是否存在于样品中。因此,希望是阳性或阴性结果。这样的形式使其成为希望的现场(point-of-care)方法,但本发明没有如此受限,并且可以在相对个体远程的位置进行。

[0131] 整个方法可以是自动化的,并且针对其的适合的仪器是来自本申请人的微测试仪器(www.microtestdx.com)。可以包括适合的软件以分析多种结果并提供单一的阳性或阴性结果。

[0132] 然而,将理解的是,该方法还提供关于详细的抗原特异性免疫球蛋白的信息,并且如果希望了解涉及了哪种抗原成分,该数据还可以单独提取。

[0133] 本发明的一个实施方案涉及测试个体的物质特异性免疫球蛋白状态,其作为针对过敏反应或自身免疫疾病的诊断。

[0134] 免疫检测在取自这样的个体的样品上进行,所述个体疑似具有针对一种或多种特

异性物质的一种或多种免疫球蛋白。例如,个体可以具有过敏症状,其表明存在针对过敏原的免疫球蛋白。供选择地,个体可以具有针对自身物质的免疫球蛋白(也称为自身抗体)并且这些可以使用本发明的方法检测。此外,个体可以具有针对其产生免疫球蛋白的病毒、细菌、寄生虫或真菌感染(当前或过去),并且本免疫检测可以用于确定这些免疫球蛋白的状态,并且从而确定个体的接种和/或感染史,或该感染的原因。

[0135] 在第六个方面,提供了测定个体的物质特异性免疫球蛋白的状态的方法,其包括使来自所述个体的样品基本上同时与多种形式的所述物质接触,其中至少一种形式是天然提取物,并确定是否形成免疫复合物。

[0136] 在一个优选的实施方案中,还确定了抗原成分特异性免疫球蛋白的状态。

[0137] 在本发明的任何方法或检测中提及的免疫球蛋白可以是任何适合的免疫球蛋白,但优选的是,该免疫球蛋白是免疫球蛋白 E。优选的是,物质是过敏原性的。

[0138] 在第七个方面,提供了用于诊断个体中对物质的过敏反应的方法,所述方法包括使来自所述个体的样品基本上同时与物质的多种形式接触,其中至少一种形式是天然提取物,并且具有一种或多形式的免疫复合物的存在表明存在针对该物质的过敏反应。

[0139] 对于本发明的任何方面,检测了本发明的具有每种形式的免疫复合物。一种或多种免疫复合物的存在可以足以进行诊断或确定物质特异性免疫球蛋白的存在。然而,来自这些数据还可以如前所述进行分析。因此,为了进行确定或诊断,可以将最强信号作为阳性结果的指示,或供选择地,可以采用针对所有形式的平均读数。针对每种形式的读数将针对个体给出关于具体过敏反应谱的信息,样品取自所述个体。

[0140] 现将参照实施例更加详细地描述本发明:

[0141] 实施例 1:

[0142] 40 种血浆样品获得自个体。

[0143] 将这些样品暴露于多种形式的尘螨过敏原。这些形式为:天然提取物(D01)和尘螨主要成分:Der p 1 和 Der p 2。

[0144] 将每种形式以有序矩阵固定到预处理的微阵列载玻片上。

[0145] 通过专有的荧光酶免疫检测来确定尘螨特异性 IgE 的存在/不存在,所述荧光酶免疫检测设计用于确定对一系列特异性过敏原的 IgE 应答,如下文所述。材料得自微测试诊断(Microtest Diagnostics)(www.microtestdx.com)。

[0146] 检测的第一步是通过微测试生物芯片(Microtest Biochip)的试剂端口,将样品加入到芯片上。流体流动到腔室中,并且每个多种形式的过敏原(例如,尘螨)与样品中包含的抗原特异性 IgE 发生反应。孵育 60 分钟后,微测试机器将样品冲走并加入二级抗体(抗人 IgE),所述二级抗体与过敏原-IgE 复合物结合。然后,在孵育 45 分钟后,微测试机器将二级抗体冲走并加入三级抗体,所述三级抗体是酶标记的抗体,其检测过敏原-抗体复合物。孵育 45 分钟后,微测试机器将未结合的三级抗体冲走并加入放大缓冲液(amplification buffer),其用于使荧光显影。最后,孵育 20 分钟后,微测试机器将放大缓冲液冲走。然后,使用新型且廉价的溶液捕获并加工荧光信号,机器通过读取过敏原-IgE 免疫复合物的荧光分析微型化阵列。

[0147] 结果(图 1、2 和 3,以及表 1 和 2)显示本发明改进了系统的灵敏度。由 Der p 1 和 Der p 2 的荧光总和或天然提取物反应性获得的最高读数等于或高于由天然提取物获

得的单一荧光信号或单一成分读数（即，标准现有技术的方法）。事实上，在荧光分析过程中，内部算法将寻找最佳结果（最强荧光信号），其可以来自单一抗原 / 过敏原（例如，天然提取物，D01）或其组合（例如，尘螨成分：Der p 1+Der p 2）。

[0148] 图 3 绘制的一些具有高特异性 IgE 水平（例如 ~ 50 和 ~ 100kU/L）的样品的低荧光反应性可以由屋尘螨抗原的不存在来解释，所述屋尘螨抗原与 Der p 1 和 Der p 2 一起是尘螨的主要过敏原成分。

[0149] 表 1：显示用于建立图 1 中的条形图的数值：

[0150]

分类得分	D01-提取物	Der p 1	Der p 2	Dp1 + Dp2	最大值 (D01 或 Dp1 + Dp2)
0-1	115	508	96	605	605
2	1685	2369	101	2469	3766
3	844	10260	9824	20084	20084
4	975	19244	11965	31209	31209
5	13705	26602	24816	51419	55962

[0151] 表 2：显示过敏原特异性免疫球蛋白浓度和分类得分之间的相关性

[0152]

特异性IgE测试说明	
kU/L	分类得分
< 0.35	0
0.35 - 0.70	1
0.71 - 3.50	2
3.51 - 17.5	3
17.6 - 50.0	4
50.1 - 100	5
> 100	6

[0153] 图 5 描绘了来自分析的 40 个样品中的 5 个选择的样品。样品 A 显示了与天然提取物 D01 的最高免疫复合物形成。样品 B 显示了与 Der p 1 的最高免疫复合物形成，而样品 C 显示了采用 Der p 2 的最高水平。样品 D 显示来自 Der p 1 和 Der p 2 的结果的组合得到了最高的结果，并且样品 E 显示了天然提取物中的次要 / 未知抗原导致最高水平的免疫复合物形成。仅独立使用 1 种或多种单一成分或天然提取物不能产生针对这些样品的准确结果。针对该图的特异性数据呈现在表 3 中。

[0154] 表 3：

[0155]

样品 ID_kU/L	D01- 提取物	Der p1	Der p2	Dp1+Dp2

样品 A_1.62	6568	641	0	641
样品 B_4.76	136	15920	581	16501
样品 C_12.25	280	774	23914	24688
样品 D_20.50	975	19244	11965	31209
样品 E_100.00	51347	9444	1014	10458

[0156] 实施例 2

[0157] 花生的贫化的天然提取物的制备

[0158] 如下制备天然花生提取物:收集生花生,将其共混成糊状物,然后使用标准技术使其溶解成液体形式,如 Hefle 等人, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 95, Issue 4, Pages 837-842, April 1995 中所描述的那些技术。这样形成花生的天然提取物。

[0159] 针对 Ara h 8 的兔多克隆抗体可以通过标准技术(如 Wen 等人, AnalBioanal Chem. 2005Jul ;382(5):1217-26 中关于针对 Ara h 1 的兔多克隆抗体所描述的那些)产生。这些抗体共价连接/偶联到用于色谱柱的基质。

[0160] 将该天然花生提取物装载到含有针对抗原成分 Ara h 8 的抗体的色谱柱上。当天然花生提取物通过色谱柱时,抗体选择性地结合于存在于提取物中的 Ara h 8。剩余的提取物未受影响并流经色谱柱,并且被收集。

[0161] 适合的方法描述于 Sen 等人, The Journal of Immunology July 15, 2002vol. 169no. 2 882-887,然而,在该情况下,由于目的是观察从天然提取物中去除的蛋白,因此在天然提物流经色谱柱后,将其丢弃。

[0162] 由色谱柱收集的所产生的液体提取物是 Ara h 8 贫化的花生的天然提取物。

[0163] 应注意的是,一旦天然提取物已洗脱并收集,将盐梯度施加到色谱柱上将实现 Ara h 8 的收集,其可以在免疫检测中用作花生的不同形式。

[0164] Ara h 8 是已知的交叉反应性抗原成分。

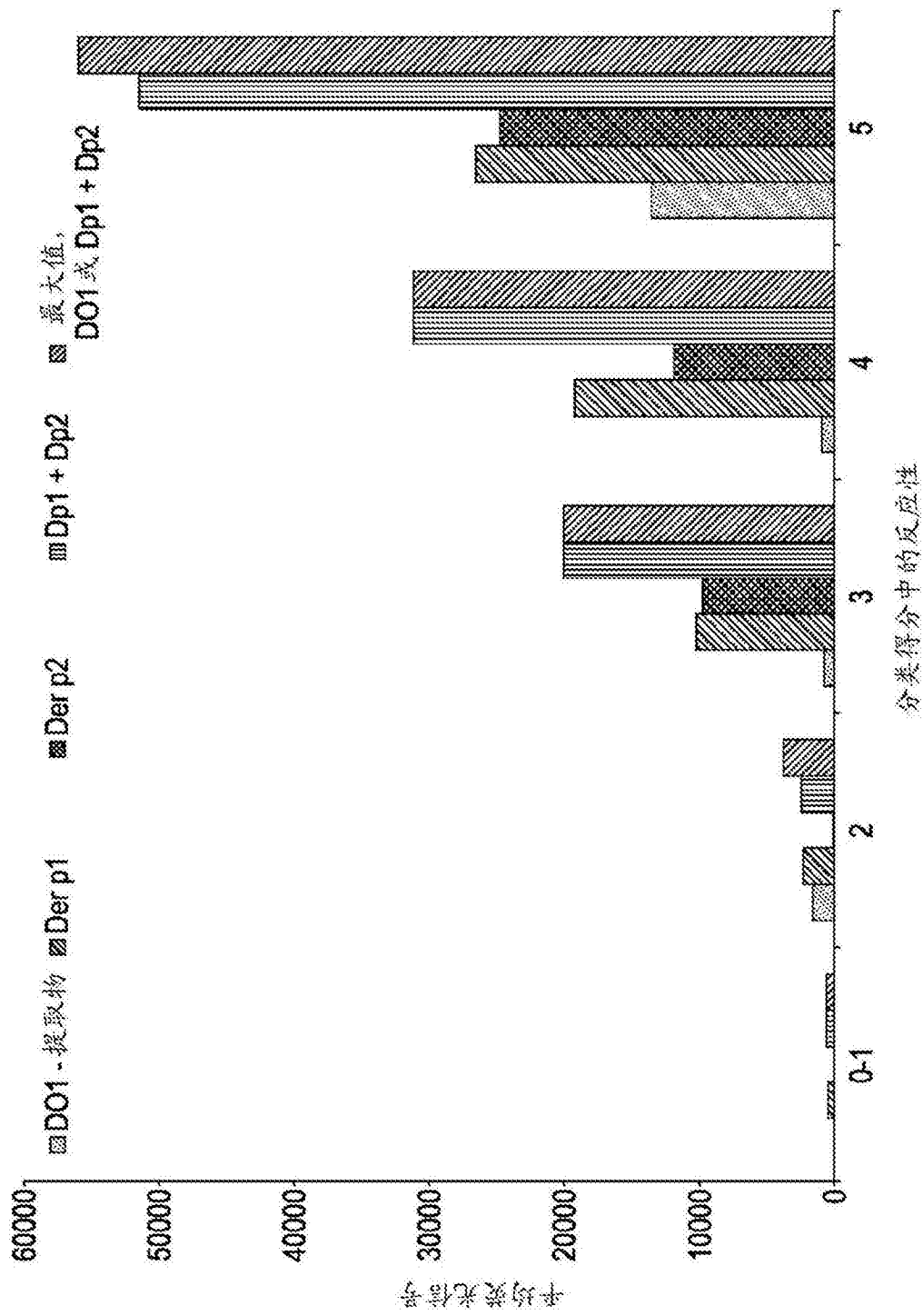


图 1

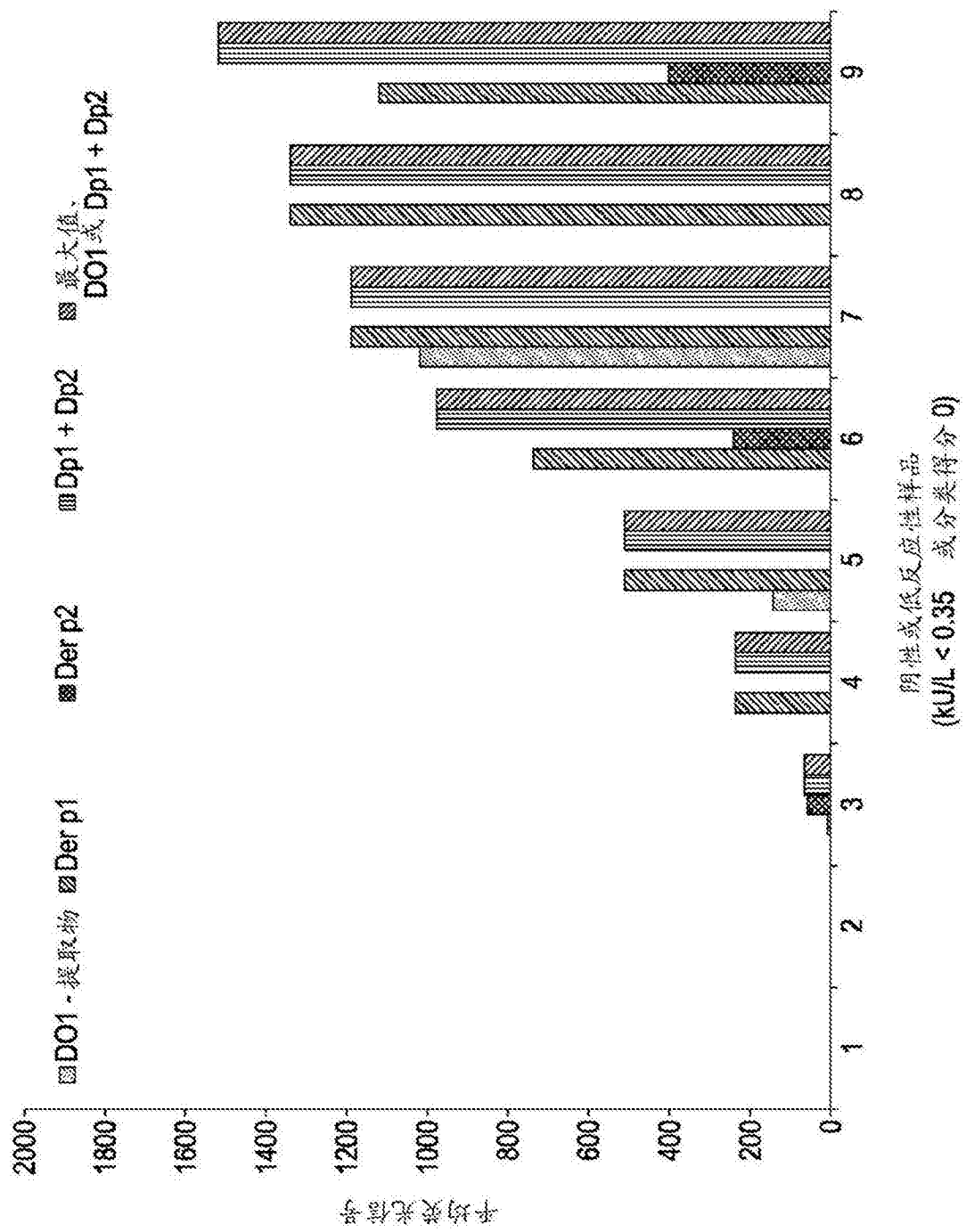


图 2

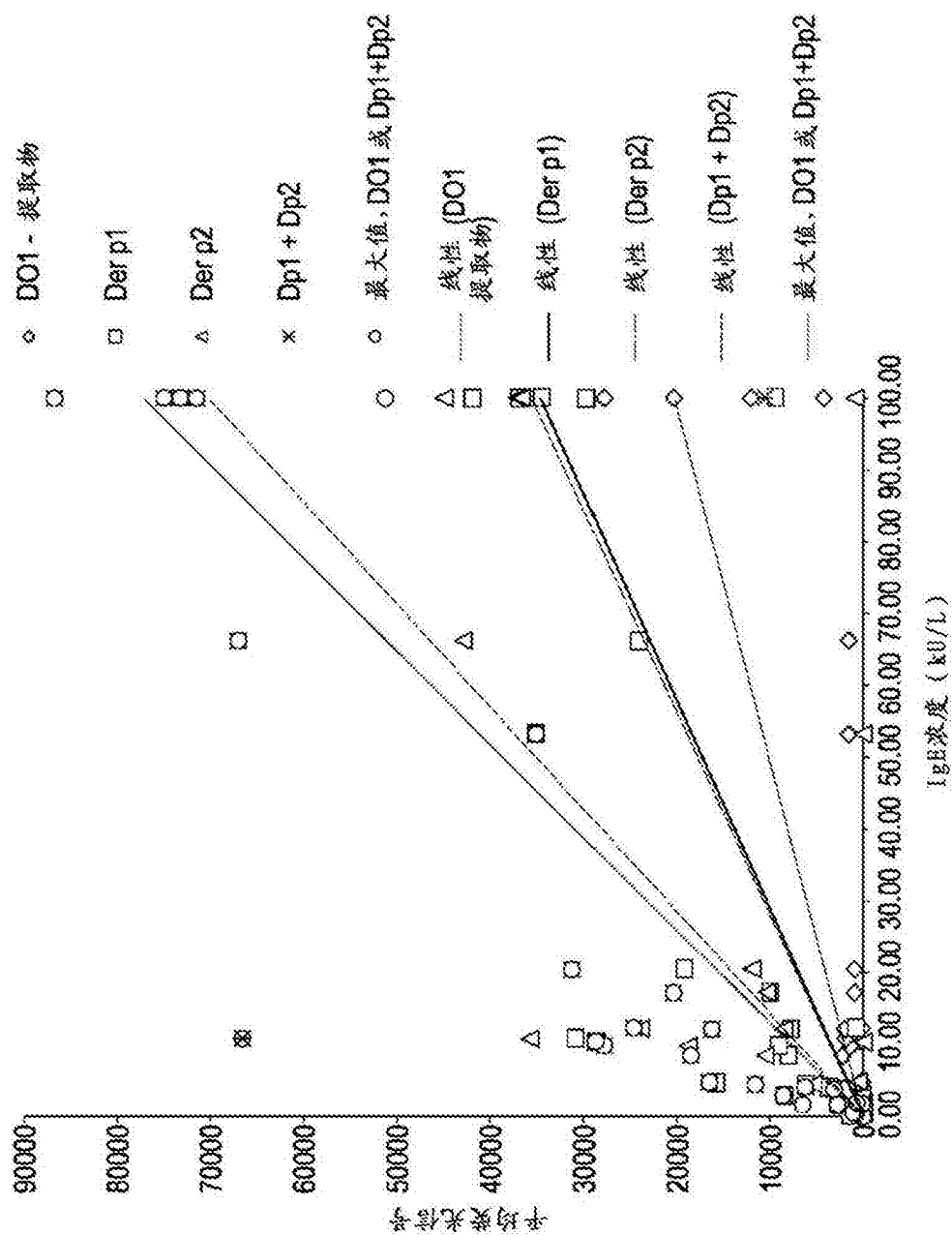


图 3

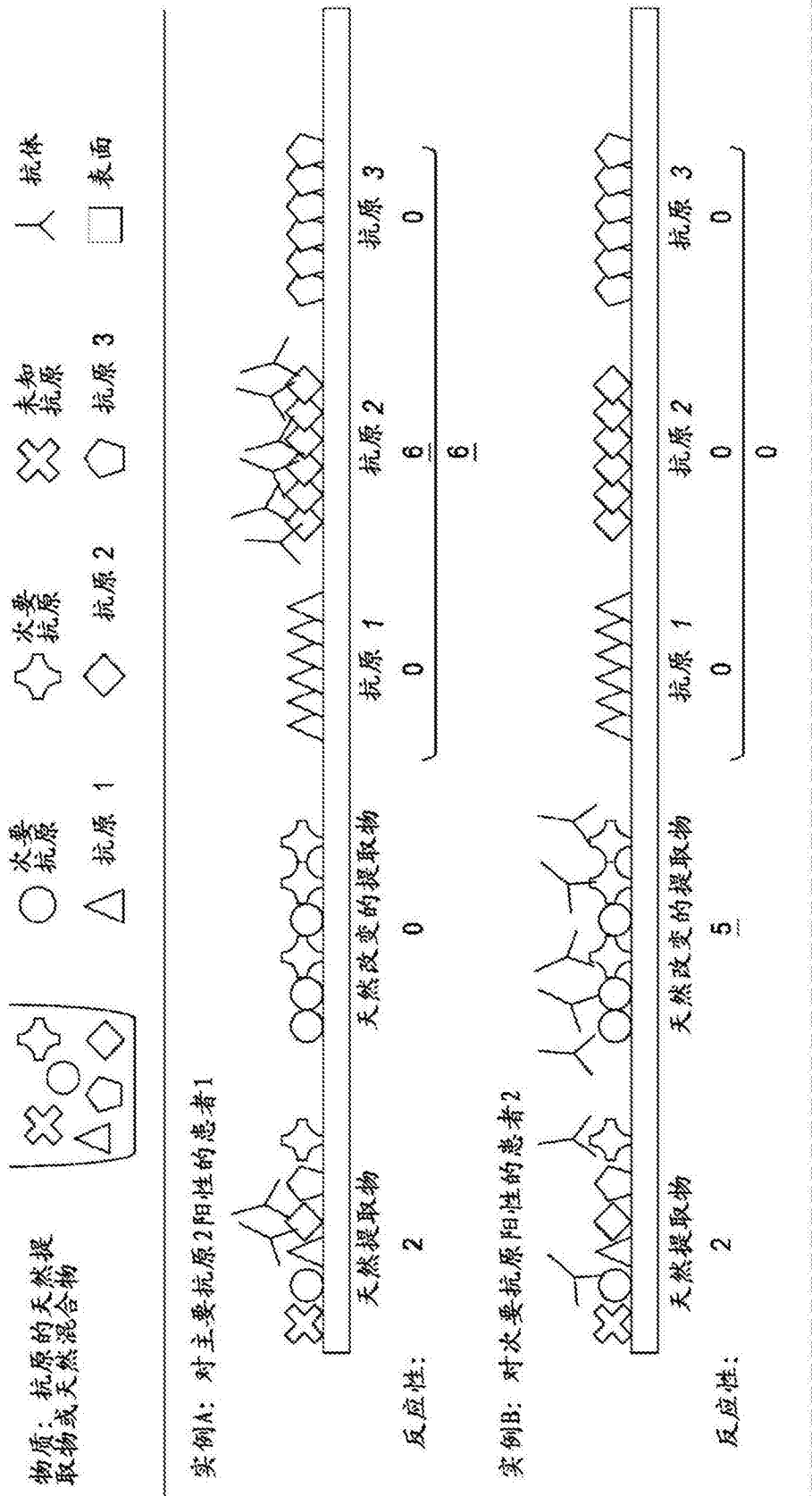
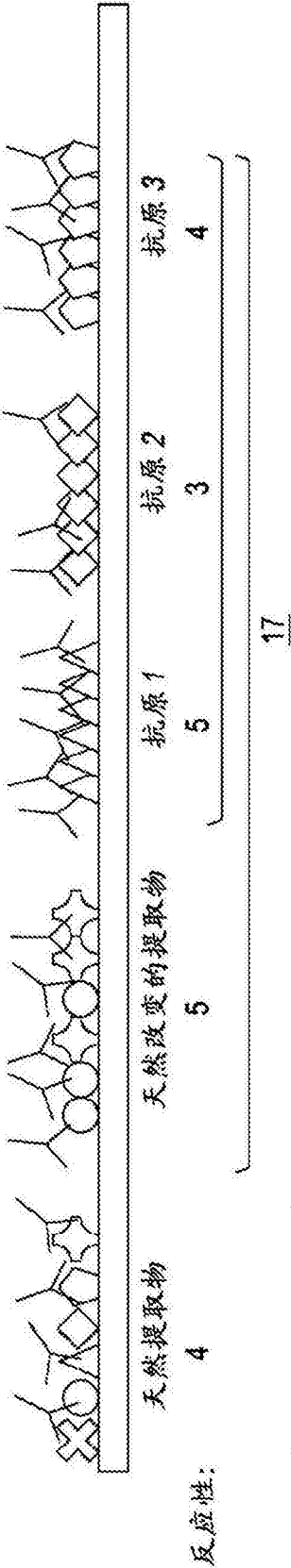


图 4

实例C: 对主要和次要/未知抗原两者阳性的患者3



实例D: 对未知抗原阳性的患者4

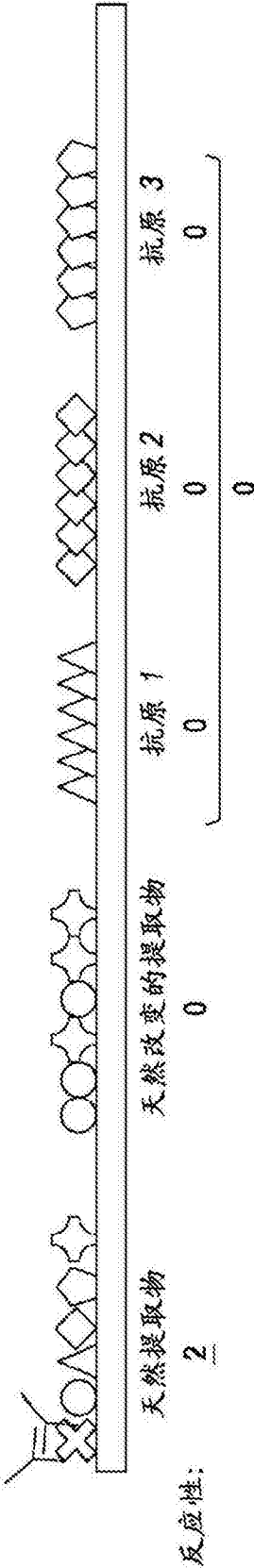


图4(续)

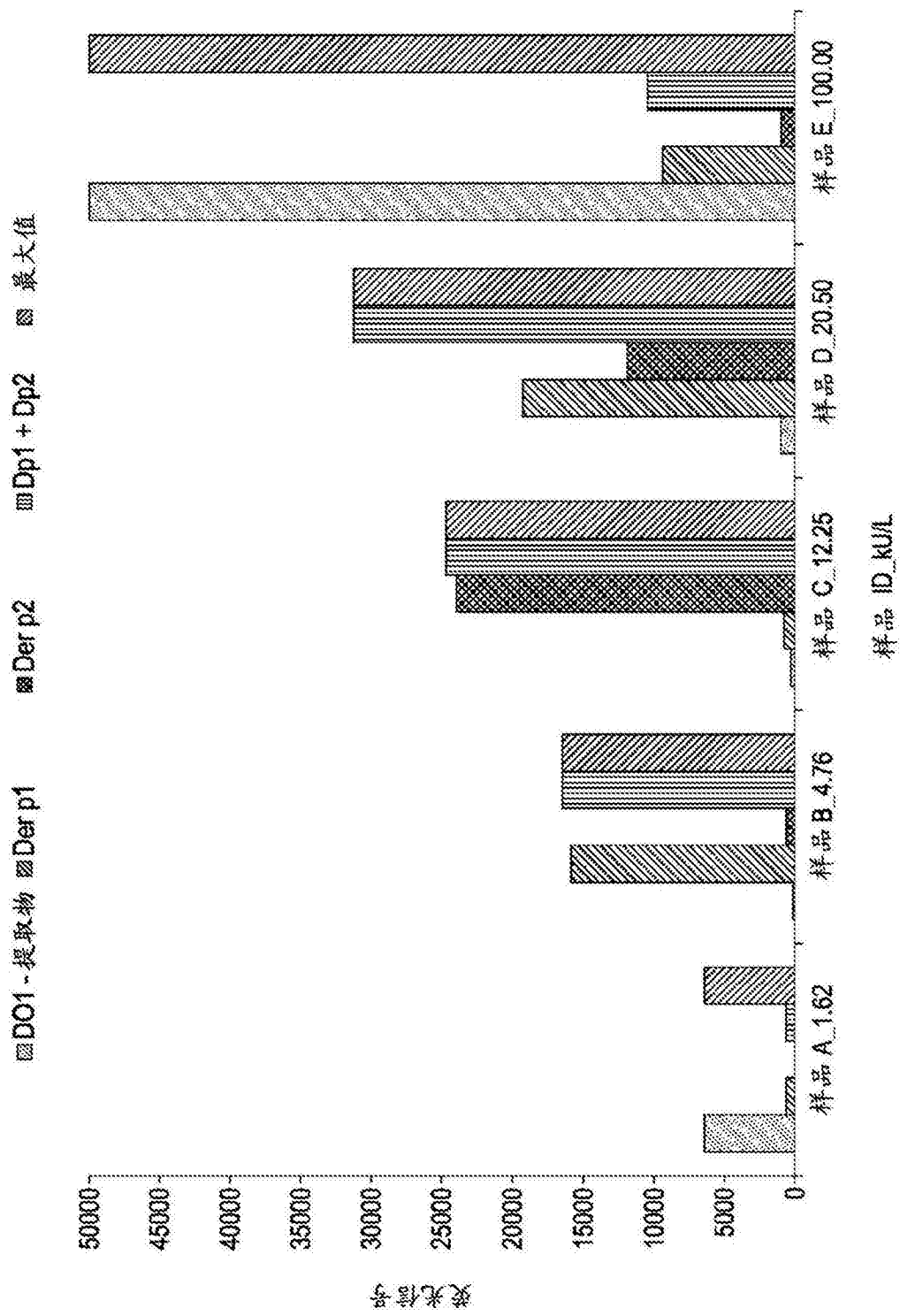


图 5

专利名称(译)	免疫检测		
公开(公告)号	CN105074464A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201380073397.0	申请日	2013-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
[标]发明人	G马佐莱尼 F巴尔德拉琦尼 M马卡里 HAC格荣劳德		
发明人	G·马佐莱尼 F·巴尔德拉琦尼 M·马卡里 H·A·C·格荣劳德		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/6854		
代理人(译)	李渤		
优先权	2012023256 2012-12-21 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及改进的免疫检测，其提高来自样品的物质特异性免疫球蛋白的检测灵敏度。本发明的方法涉及提供物质的多种形式，其中至少一种形式包括该物质的天然提取物。存在的其他形式可以是该物质的重组体或天然抗原成分。

