



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101715558 A

(43) 申请公布日 2010.05.26

(21) 申请号 200880019293.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.06

G01N 33/80 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/543 (2006.01)

0755624 2007.06.08 FR

G01N 33/537 (2006.01)

60/929,052 2007.06.11 US

G01N 33/569 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/057128 2008.06.06

(87) PCT申请的公布数据

W02008/148890 EN 2008.12.11

(71) 申请人 博瑞巴斯德公司

地址 法国马恩-拉-科盖特

(72) 发明人 弗雷德里克·比菲埃 伊夫·瑞森

埃利亚内·里瓦兰 安帕鲁·圣胡安

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 9 页

(54) 发明名称

红细胞携带的抗原以及抗红细胞抗体的检测

(57) 摘要

本发明涉及用于检测红细胞携带的多种抗原性分子和 / 或多种抗红细胞抗体的方法, 所述由红细胞携带的抗原性分子包括不仅由红细胞携带、而且由至少一种其它细胞群携带的血型抗原分子之外的抗原性分子, 所述方法包括将样品与可辨别的珠子进行接触, 在可辨别珠子上连接有 a) 特异性针对所述抗原的抗体, 或 b) 红细胞或红细胞膜片段。

1. 用于鉴定个体的红细胞携带的多种抗原性分子,和 / 或用于鉴定生物样品中多个针对红细胞携带的抗原性分子的抗体的体外方法,

所述由红细胞携带的抗原性分子由红细胞和至少一种其它细胞群二者都携带的、血型分子以外的抗原性分子组成,

所述方法包括

a) 通过下列步骤鉴定个体的红细胞携带的多种抗原性分子

(i) 在允许红细胞与抗体结合并且不产生凝集的条件下,将所述含有红细胞的样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子带有给定的、特异性针对红细胞携带的抗原性分子的抗体,所述抗体在一组珠子与另一组珠子之间不同,所述红细胞在与所述的多组珠子进行接触之前或之后被标记,

(ii) 除去不与所述抗体结合的红细胞,以及

(iii) 鉴定与标记的红细胞结合的珠子组,从而鉴定由所检测的红细胞携带的抗原 ;
和 / 或

b) 通过下述步骤鉴定生物样品中针对红细胞携带的抗原性分子的多种抗体,

(iv) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与红细胞或红细胞膜片段结合,并且不产生凝集的条件下,将所述样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子携带有表型已知的 (1) 红细胞或 (2) 红细胞膜片段,所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,

(v) 除去不与所述红细胞或所述红细胞膜片段结合的抗体或活化的血清补体级份,

(vi) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

(vii) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的、针对红细胞携带的抗原性分子的抗体。

2. 权利要求 1 的方法,其中按照 (a) 鉴定抗原和按照 (b) 鉴定抗体同时并在同一个容器中进行。

3. 前述权利要求任一项的方法,其中混合物的分析通过流式细胞术来进行。

4. 前述权利要求任一项的方法,其中还包括血红蛋白的化学或酶法降解的步骤,例如溶血。

5. 前述权利要求任一项的方法,其中可辨别的珠子是超顺磁性、或磁性、或可磁化的珠子。

6. 前述权利要求任一项的方法,其中可辨别的珠子发射发光或荧光信号。

7. 前述权利要求任一项的方法,其中可检测地标记的红细胞用荧光化合物标记。

8. 前述权利要求任一项的方法,其中抗体 (根据 b) 是通过与带有荧光、发光或放射性标记物的抗人类球蛋白抗体相接触来标记的。

9. 前述权利要求任一项的方法,其中活化血清补体级份是通过与带有荧光、发光或放射性标记物的抗血清补体级份抗体相接触来标记的。

10. 前述权利要求任一项的方法,其中生物样品选自全血、血浆、血清、血细胞颗粒或任何其它血液制备物。

11. 前述权利要求任一项的方法,其中生物样品源自于具有体内被抗体致敏、或包被有血清补体级份的红细胞的个体。

12. 前述权利要求任一项的方法,还包括对鉴定到的抗体进行定量。

13. 前述权利要求任一项的方法,其中抗原性分子是 HLA 系统的分子、被个体吸收的化学产品或药物,或其降解产物。

14. 用于执行前述权利要求任一项的检测方法的反应物组,包含可辨别的珠子组,每个珠子带有至少一种可以被检测的具体物理参数,并且每个珠子属于至少两种不同的组,一组带有特异性针对红细胞携带的抗原性分子的捕获抗体,另一组携带 (1) 红细胞或 (2) 红细胞膜片段。

红细胞携带的抗原以及抗红细胞抗体的检测

[0001] 本发明利用了红细胞上抗原性分子的存在,来鉴定由红细胞和其它细胞群二者携带的抗原性分子。

[0002] 如今,输血是静脉内供给从供血者获得的血红细胞浓缩物(血细胞浓缩物)制剂。在输血时,主要的风险与抗体及其红细胞抗原在接受者(被输血的个体)体内再结合的可能性有关。事实上,在红细胞、也被称为血红细胞的表面,存在有能够被免疫系统识别并能够引发免疫应答、使血红细胞溶血的膜抗原,特别是血型(或系统)抗原。这种免疫反应的结果,其范围可以从没有临床征兆的无效输血,到轻微临床反应(焦虑、颤抖),严重临床反应(休克、血红蛋白尿(haemoglobinurea)、肾功能不全)或导致死亡的剧烈临床反应(休克、弥散性静脉内溶血)。

[0003] 如果接受者不具有任何针对供体红细胞抗原的循环系统抗体,则供体的血红细胞被称为是与接受者的血液相容的。

[0004] 除了血型抗原之外,在法国人群中,已经在15%的个体中检测到红细胞上存在的HLA抗原决定簇(de Villartay等, Tissue Antigens, 1985, 26(1):12-9)。尽管红细胞上HLA抗原决定簇的这种量与其它细胞类型相比较低,但就输血风险来说仍是重要的(Everett等, Transplantation, 1987, vol. 44, no. 1, pp. 123-129)。

[0005] 本发明人最初关注于输血风险,随后意识到,除了血型抗原分子之外,任何抗原性分子都可以利用它们在红细胞上的偶然出现,容易地被检测到。

发明内容

[0006] 本发明提供了用于鉴定个体的红细胞携带的多种抗原性分子,和/或用于鉴定生物样品中多个针对红细胞携带的抗原性分子的抗体的体外方法,所述由红细胞携带的抗原性分子由红细胞和至少一种其它细胞群二者都携带的、血型分子之外的抗原性分子组成,所述方法包括:

[0007] a) 通过下列步骤鉴定个体的红细胞携带的多种抗原性分子

[0008] (i) 在允许红细胞与抗体结合并且不产生凝集的条件下,将所述含有红细胞的样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子带有给定的、特异性针对红细胞携带的抗原性分子的抗体,抗体在一组珠子与另一组珠子之间不同,所述红细胞在与所述的多组珠子进行接触之前或之后被标记,

[0009] (ii) 除去不与所述抗体结合的红细胞,以及

[0010] (iii) 鉴定与标记的红细胞结合的珠子组,从而鉴定到由所检测的红细胞携带的抗原;

[0011] 和/或

[0012] b) 通过下述步骤鉴定生物样品中针对红细胞携带的抗原性分子的多种抗体,

[0013] (iv) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与红细胞或红细胞膜片段结合,并且不产生凝集的条件下,将所述样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子携带有表型已知的(1)红细胞或(2)红

细胞膜片段,所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,

[0014] (v) 除去不与所述红细胞或所述红细胞膜片段结合的抗体或活化的血清补体级份,

[0015] (vi) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

[0016] (vii) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的、针对红细胞携带的抗原性分子的抗体。

[0017] 本发明还提供了一组用于执行这种方法的反应物,包含可辨别的珠子组,每个珠子带有至少一种可以被检测的具体物理参数,并且珠子属于至少两种不同的组,一组带有特异性针对红细胞携带的抗原性分子的捕获抗体,另一组携带 (1) 红细胞或 (2) 红细胞膜片段。

[0018] 发明详述

[0019] 定义:

[0020] 在本说明书中,术语“红细胞 (erythrocyte)”或“血红细胞 (redblood cell)”没有差别,用于表示同样的血细胞。

[0021] 术语“多重”是指在单一容器中,使用单一信号读取系统,对单一样品的几种不同抗原-抗体类型的反应同时进行分析。

[0022] 术语“单式”是指抗原-抗体类型的反应在几个独立的容器中进行分析。但是,优选情况下,分析同时进行,并优选使用单一信号读取系统。

[0023] 表述“红细胞携带的抗原性分子”是指红细胞携带的任何抗原性分子,包括由红细胞和至少一种其它细胞群二者携带的抗原性分子。血型分子被排除在外。术语“血型抗原”是指下列系统的任何抗原:具有抗原 A、抗原 B 和同时表达的抗原 A 和 B 或抗原 H 的 ABO 系统,具有抗原 D、E、e 和 C 或 c 的 Rhesus 系统,具有抗原 K 或 k 的 Kell 系统,Duffy 系统 (Fya、Fyb), Kidd 系统 (Jka、Jkb),或其它在实践中不太经常研究但也存在的系统,例如 MNS、Lewis 系统等。

[0024] 携带目标抗原性分子的细胞群可以是血细胞 (淋巴细胞),血小板包括在内。

[0025] 红细胞和其它细胞群携带的目标抗原性分子的例子,包括 HLA 系统的分子,特别是 HLA B-27、CD55 和 / 或 CD29 (Terpos 等, Medical Science Monit. 2008, 14276-280)。其它目标抗原性分子的例子包括红细胞衰老标志物,例如磷脂酰丝氨酸 (PS)。

[0026] 包括了在生理或非生理条件下可以在红细胞表面上、以及其它细胞类型或细胞群的表面上发现的红细胞抗原。也包括了由红细胞抗原引起的免疫反应导致的出现在红细胞表面上的抗原。在这种情况下,表述“红细胞携带的抗原性分子”包括由体内致敏的红细胞携带的血清补体级份的抗体或元件。未在生理条件下发现的抗原性分子包括例如个体吸收的化学制品或药物,或其降解产物。

[0027] 还包括了吸附在红细胞上但源自于其它细胞群的抗原性分子。

[0028] 术语“红细胞携带的”是指膜表达、吸附或细胞间表达,通过处理或利用红细胞的生理过程 (例如在红细胞衰老过程中) 使抗原性分子变得可进入红细胞。

[0029] 表述“针对红细胞携带的抗原性分子的抗体”或“抗红细胞抗体”是指任何与红细胞和至少一种其它细胞群携带的抗原特异性结合的抗体。术语“结合的抗体和 / 或结合的血清补体级份的标记”被理解为是指对可逆结合于或直接嵌入到红细胞膜中的抗体或 (可

选地活化的)血清补体级份的标记。

[0030] 术语“个体”是指任何具有红细胞携带的多种抗原性分子的动物。对于动物来说,可以提到的有例如狗,到目前为止已经在其中鉴定到 8 种不同的血型,以及猫,有三种。当然,术语“个体”也指人类,包括胎儿阶段的人类。

[0031] 术语“生物样品”是指无论是生理性还是病理性地可能含有红细胞或抗红细胞抗体的体液或组织活体样品的任何级份。因此,对于生物样品来说,可以提到的是血液样品,特别是全血样品或血细胞颗粒样品(或血袋),或任何其它血液制剂,但是也包括含有血液的唾液、汗液、泪液、乳液或尿液。也可以使用血浆或血清样品用于抗体筛选。在用于检测抗原性分子的方式(a)中使用的样品,可以与用于检测抗体的样品相同或不同。当样品相同时,方式(a)和方式(b)可以在同一个容器中同时进行。生物样品可以不经预处理。

[0032] 术语“抗体”是指任何完整抗体或抗体的功能性片段,它含有或由至少一个抗原结合位点组成,使得所述抗体与抗原性化合物的至少一个抗原决定簇结合。抗体片段的例子,可以提到的是 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段,以及 scFv 链(单链可变片段)、dsFv 链(双链可变片段)等。这些功能性片段具体来说可以通过遗传工程获得。

[0033] 术语“捕获抗体”是指与固相连接的抗体或抗体的一部分,它能够通过亲和性结合留住生物样品中存在的抗原性化合物的至少一个抗原决定簇。

[0034] 用作检测工具的抗体可以是多克隆或单克隆抗体。可用于本发明的情况中的单克隆抗体或多克隆抗体的生产,是在常规技术下进行的。

[0035] 单克隆抗体可以按照 Köhler 和 Milstein 描述的淋巴细胞融合和杂交瘤培养的常规方法(Nature, 256, p. 495-497(1975))来获得。其它用于制备单克隆抗体的方法也是已知的(Harlow 等主编《抗体实验指南》,Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))。可以通过免疫哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔或甚至人类等)并通过使用产生杂交瘤的淋巴细胞融合技术(Köhler 和 Milstein, 1975, 同上),来制备单克隆抗体。

[0036] 还存在着这种常规技术的可替代技术。例如,可以通过表达从杂交瘤克隆的核酸来生产单克隆抗体。抗体也可以通过噬菌体展示技术,通过将抗体 cDNAs 导入载体、典型为丝状噬菌体(例如用于大肠杆菌的 fUSE5, Scott 等, (Science, 249, pp. 386-390(1990)))来生产。后者构成了文库,并在其表面上具有 scFv 片段。构建这些抗体文库的方案描述在 Marks 等(1991)(J. Mol. Biol., 222, pp. 581-597, (1991))中。

[0037] 多克隆抗体可以按照常用的方案,从用本性优选为肽的抗原免疫的动物的血清获得。

[0038] 一般来说,多肽、特别是重组多肽,或寡肽,可以用作例如免疫原。根据常规的方案,按照 Denoit 等描述的步骤 [PNAS USA, 79, pp. 917-921(1982)],将兔用相当于 1mg 的肽免疫原进行免疫。

[0039] 珠子:

[0040] 珠子通常由对生物样品的成分惰性的聚合物构成;它们是固态的,在样品中不溶解。使用的聚合物可以是聚酯、聚醚、聚烯烃、聚酰胺、多糖、聚氨基甲酸酯或纤维素。也可以使用粘合剂为颗粒提供完整性和结构。

[0041] 可以将功能基团与这些聚合物掺和在一起,以便允许连接或结合生物学重要的大

分子（蛋白、脂类、碳水化合物、核酸）。这些本技术领域的专业人员已知的功能基团，可以是酰胺（ $-\text{NH}_2$ ）或铵官能团（ $-\text{NH}_3^+$ 或 $-\text{NR}_3^+$ ）、醇官能团（ $-\text{OH}$ ）、羧酸官能团（ $-\text{COOH}$ ）或异氰酸酯官能团（ $-\text{NCO}$ ）。最常用于将 COOH 官能团导入聚烯烃的单体是丙烯酸或甲基丙烯酸。

[0042] 反应物与颗粒表面的连接可以通过静电吸引、亲和相互作用、疏水相互作用或共价结合来进行。共价结合是优选的。

[0043] 本发明中使用的珠子是形状大约为球形的颗粒，其尺寸可以在 $0.5\ \mu\text{m}$ 到 $40\ \mu\text{m}$ 之间，优选在 $4\ \mu\text{m}$ 到 $9\ \mu\text{m}$ 之间，更优选在 $5\ \mu\text{m}$ 到 $8\ \mu\text{m}$ 之间。

[0044] 这里使用的珠子是“可辨别的”，因为它们具有不同的标志物，使得可以通过适合的检测器将它们彼此区分开。因此，每组珠子具有不同的生理化学性质（尺寸、密度、粒度、粗糙度、吸光度、荧光、顺磁性成分），使得可以利用适合的检测器或工具，例如流式细胞仪将它们彼此区分开。

[0045] 对于用于将颗粒彼此区分开的差异性参数来说，具体来说可以通过选择不重叠的尺寸范围来使用颗粒的尺寸。

[0046] 在另一个优选实施方案中，可辨别的颗粒发射荧光信号。事实上，掺入了各种不同荧光标记物的珠子，可以通过它们的荧光光谱来区分。为此，珠子可以被一种或多种具有各种适合浓度的染料（例如荧光、发光染料等）浸渍，或者用放射性同位素、酶等类型的标记物浸渍 (Venkatasubbarao S., “微阵列——现状与展望”, 《Microarrays—Status and prospects》Trends in Biotechnology Dec 2004, 22(12):630–637; Morgan 等, “细胞测量珠阵列：适用于生物学各领域的多元化分析平台”, 《Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology》, Clin. Immunol. (2004) 100:252–266)。光的散射或发射，或其组合，也可用于区分颗粒。

[0047] 在优选实施方案中，可辨别的珠子发射发光或荧光信号。

[0048] 使用的珠子可以是超顺磁性、磁性或可磁化的。对于可用于本发明的珠子来说，可以具体提到的是在 US 6,872,578 中描述的珠子。根据特别优选的实施方案，使用的珠子是荧光和超顺磁性的。这些生理化学性质，可以使在与生物样品反应过程中将这些微粒捕获的级份与没有结合的级份分离开，成为可能。这种分离可以通过尤其是离心、过滤或磁化来进行。通过磁化进行分离是优选的，为此，可以使用含有顺磁性、铁磁性、亚铁磁性和变磁性成分的珠子。顺磁性成分是优选的，例如铁、钴、镍或金属氧化物例如 Mn_2O_3 、 Cr_2O 或 Fe_3O_4 。磁性成分的含量可以在 2% 到 50%（以重量计）之间，优选在 3% 到 25% 之间。

[0049] 可以通过任何适合的技术将抗体连接到珠子上。它们可以通过直接共价键，或者非共价地、特别是通过被动吸附或通过亲和进行连接。直接共价连接可以通过活化珠子表面上存在的羧基，包括经例如羟基琥珀酰亚胺或碳二亚胺键合来进行。在具体的实施方案中，首先通过共价键将抗免疫球蛋白抗体连接到珠子上，然后将珠子与待连接的抗体相接触。

[0050] 红细胞或红细胞膜片段可以通过聚 L-赖氨酸利用非共价键合、或利用任何类型的配体例如染料类型的聚阳离子进行连接。红细胞或红细胞膜片段也可以通过共价键合、特别是使用高碘酸钠连接到珠子上。

[0051] 令人吃惊地注意到，血红细胞或膜片段的连接，无论是共价的还是非共价的，都不损害珠子通过流式细胞术方法可以被辨别的性质。

[0052] 珠子可以通过检测器例如流式细胞仪进行测量,例如在 Luminex 的专利申请 WO 97/14028 中描述的流式细胞仪。因此,将珠子的带有反应物(抗体或红细胞或红细胞膜)的亚组暴露于生物样品,每个亚组具有一种或多种分类参数,使得能够将一个亚组的珠子与另一个亚组的珠子区分开。然后将这样的暴露于样品的珠子经过检测区(例如流式细胞仪),在那里收集与分类参数相关的数据(例如荧光发射强度),优选也收集与反应物和目标被分析物之间(即根据本发明的方法中的(a)为珠子与红细胞携带的抗原性分子之间,或根据(b)为珠子与抗体之间)形成的复合物的存在或不存在相关的数据。

[0053] 标记:

[0054] 被可检测地标记的红细胞可以通过本技术领域的专业人员已知的任何技术进行标记。它们可以用例如荧光化合物进行标记,例如插入到这些细胞的膜中的荧光团。它们也可以使用本身用荧光标记物官能化的配体进行标记,该配体能够识别红细胞表面上的结构。这些配体可以是例如抗体或动物或植物的凝集素。这些类型的标记可以在测试前进行,也可以不进行。

[0055] 在抗体鉴定的情况下,被标记的是抗体,或者可选地是(可选地活化的)血清补体级份。任何标记技术都是可能的。标记的类型也可以是混合的。

[0056] 根据具体实施方案,将抗体与带有荧光、发光或放射性标记物的抗人类免疫球蛋白抗体进行接触。

[0057] 根据另一个具体的、可选地累积的实施方案,将活化血清级份与特异性识别活化血清补体级份的抗体进行接触,所述抗体带有例如荧光、发光或放射性标记物。这样的抗体可以是单克隆的或多克隆的,对于本技术领域的专业人员来说是熟知的。

[0058] 未结合反应物的除去:

[0059] 在进行分析步骤之前,在与反应物进行接触和温育期间没有被结合的反应物,应该被除去。希望除去尽可能多的未结合的反应物,以便降低背景噪音,从而获得良好的测试特异性,但是太剧烈的条件可能降低所述测试的灵敏度。因此,残余存在的未结合反应物一般是可忍受的。用于在方法的灵敏度与特异性之间获得可接受的折衷的条件,可以由本技术领域的专业人员通过常规的实验容易地确定。

[0060] 除去未结合的反应物可以利用本技术领域的专业人员已知的任何技术来进行,例如利用重复的离心步骤进行洗涤,或利用珠子的超顺磁性性质和使用磁体。

[0061] 优选实施方案:

[0062] 正如上面定义的,本发明的方法使得鉴定抗原、或者也鉴定结合的抗体或活化血清补体级份,成为可能。也可以使用几种类型的鉴定的组合。因此,抗原的鉴定和抗体的鉴定,可以同时或分别进行。抗体的鉴定可以通过揭示抗体和活化血清补体级份二者来进行。

[0063] 容器可以是任何固体容器,例如试管、微孔板的孔或任何允许在自动化系统中进行反应的容器。离心容器不是必需的。

[0064] 反应物和目标被分析物的混合,在允许红细胞携带的抗原与抗体发生特异性结合、并且不凝集的条件(特别是pH、温度、离子强度等)下进行。具体来说,基本上不存在凝集,使得使用流式细胞仪成为可能。为了避免任何凝集反应,调整珠子的量和尺寸以及样品的浓度,是有利的。凝集反应满足数学定律,具体来说它们已经在 H. E. Hart, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 17-36, K. C. Chak, Bulletin of mathematical biology, vol

42, 37-56 和 C. DeLisi, Journal of Theoretical Biology, 1974, vol 45, 555-575 页中描述过了。这些定律涉及几个参数, 例如具体为反应物的尺寸以及它们的数量比率。因此, 本技术领域的专业人员可以通过使用与他们所用的反应物有关的数学定律来选择反应条件, 使得基本上不发生凝集。例如, 当使用红细胞和与红细胞的尺寸相似、即大约 $7 \mu\text{m}$ 的珠子时, 本技术领域的专业人员将选择红细胞数量与珠子数量的比率在 30 到 150 之间。

[0065] 有利情况下, 优选提供血红蛋白的化学或酶法降解步骤, 例如溶血作用, 该步骤优选在连接之后, 并在抗原或抗体鉴定之前。

[0066] 溶血可以以各种不同方式进行。例如, 可以将混合物在低克分子渗透压浓度介质中温育。术语“低克分子渗透压浓度介质”一般是指克分子渗透压浓度小于或等于 100mosmol/L 的介质。对于适合的低克分子渗透压浓度介质来说, 可以提到的是浓度为 40mM 或以下的氯化铵溶液, 或蒸馏水。溶血也可以通过超声来进行。

[0067] 应用:

[0068] 本方法使得以多重格式进行红细胞携带的抗原性分子的鉴定, 成为可能。

[0069] 此外, 方法使得例如通过分析荧光信号来定量确定样品中位于红细胞表面上的抗原的比例, 成为可能。

[0070] 本发明的方法也使对抗体进行量化成为可能。因此, 获得的结果可以是数字形式的, 可用于利用电子数据处理系统来帮助解释。

[0071] 有利的是, 方法使得在仅仅几分钟内获得完整的、可靠的结果成为可能。更具体来说, 有可能在少于 1 小时、或甚至少于 30 分钟内给出完整的结果。

[0072] 本发明的方法还使显著减少所取的测试样品体积成为可能。目前, 反应一般对于每次测试来说使用 $25 \mu\text{l}$ 测试样品来进行。为了执行本发明的方法, 例如仅仅 50 到 $100 \mu\text{l}$ 就已足够。

[0073] 下面的图和实施例对本发明进行了说明, 但不对其范围构成限制。

[0074] 图例说明

[0075] 图 1 是流程图, 显示了抗体在 Luminex[®] 珠子上的直接固定化。

[0076] 图 2 是流程图, 显示了通过亲和将抗体固定化在 Luminex[®] 珠子上。

[0077] 图 3 是流程图, 显示了用荧光膜内化合物标记各种不同表型的血细胞。

[0078] 图 4 是流程图, 显示了利用聚 L- 赖氨酸将血细胞固定化在 Luminex[®] 珠子上的步骤。

[0079] 图 5A 到 5D 显示了血细胞的多重表型定型。

[0080] 图 6 是流程图, 显示了来自“直接 Coombs 阳性”患者的血细胞的同时进行的鉴定和多重表型定型。

[0081] 实施例:

[0082] 实施例 1: 抗原鉴定

[0083] 本分析的目的是利用特异的单克隆抗体, 鉴定来自供体或患者的血细胞表面存在的抗原。使用荧光珠子来固定化抗血细胞抗体。因此抗原特异性不同的抗体可以结合到具有不同颜色的珠子的各种不同区域。

[0084] 对于红血球来说, 它们用与 Bio-Rad 公司以名称“Bioplex 200”销售的装置的报告激光波长相容的荧光化合物进行标记。

[0085] 在标记后,将血红细胞与致敏的珠子温育。因此有可能检测到与珠子连接的血红细胞,从而确定它们的抗原特异性。

[0086] 1.1- 材料与反应物

[0087] 珠子:

[0088] 使用的珠子由 Luminex 制造 (Luminex Corp., Austin Texas, United States)。它们是直径为 $8\ \mu\text{m}$ 的超顺磁性珠子,由聚苯乙烯和甲基丙烯酸 (COOH 官能团) 构成。

[0089] 在本实施例中,使用了具有各种不同的珠子区域 19、21、32、34 (内标珠子 (ISB))、71 和 98 (空白珠子 (BB)) 的荧光超顺磁性珠子。

[0090] 将具有珠子区域 34 的珠子 (ISB) 用罗丹明衍生物官能化,用作内部荧光对照。这些珠子将产生 5000 到 15000RFI 之间的荧光值。

[0091] 将区域 98 的 BB 珠子用牛血清白蛋白饱和。这些珠子既不能结合抗原,也不能结合抗体,因此被用于验证不存在非特异性结合。这些珠子应该产生低于 1000RFI 的荧光值。

[0092] - 抗人类免疫球蛋白单克隆 IgG 抗体,克隆 125A15 (Bio-Rad)。

[0093] - 抗人类 IgM(μ) 多克隆抗体 (Bio-Rad)。

[0094] - 抗 D IgG (克隆 H2D5D2F5), 抗 Fya IgG (克隆 5T72A13F5A93) 和抗 S IgM (克隆 MS94) 单克隆抗体 (Bio-Rad, Millipore)。

[0095] - PKH26 细胞标记试剂盒 (Sigma)。

[0096] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 和“Stabiliss”编号 86550 销售的稀释介质。

[0097] - 以名称“ScanGel Coombs”编号 86432 销售的用于非典型抗体筛选的凝胶卡 (Bio-Rad)。

[0098] - 以名称“ScanGel RhK”编号 86428 和“ScanGel Neutral”编号 86430 销售的凝胶卡 (Bio-Rad)。

[0099] - 以名称“ScanPanel”编号 86593 和“ScanCell”编号 86595 销售的,用于通过凝胶卡技术进行非典型抗体筛选的表型确定的血红细胞 (Bio-Rad)。

[0100] - 保存在 SAG-MAN 介质中的浓缩的表型确定的血红细胞颗粒 (EFS Nord de France)。

[0101] - 源自于患者样品的直接 Coombs 阳性和 / 或阴性的血红细胞。

[0102] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) proclin)。

[0103] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。

[0104] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。

[0105] 1.2- 流程

[0106] 1.2.1. 用血型抗体致敏珠子

[0107] 抗体在珠子表面的固定化可以根据两种不同的原理来进行。在第一种情况下,抗体通过共价键直接固定化在珠子上 (图 1)。第二种方法包括通过亲和非共价地进行抗血红细胞抗体的固定化。在这种情况下,连接利用了在第一步中通过共价键与珠子连接的抗免疫球蛋白抗体来进行 (图 2)。在显示的实施例中选择了这种方法。

[0108] 具有珠子区域 19、21 和 32 的珠子被用于抗人类免疫球蛋白抗体的共价固定化。具有珠子区域 71 的荧光珠子被用于抗人类 IgM 抗体的共价固定化。出现在珠子表面上的羧

基基团根据包括羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的技术进行活化。因此,蛋白可以通过它们的胺基被固定化。

[0109] 这样制备的珠子在 +4°C 下,以 3mg/ml 的浓度储存在含有 10% (w/v)BSA、0.5% (v/v)Tween 20 和 0.09% (w/v) 叠氮化钠的 pH7.4 的 PBS 中。

[0110] 带有固定化的抗人类免疫球蛋白的珠子可以用抗 D IgG 或抗 FyaIgG 血型抗体致敏。事实上,抗免疫球蛋白抗体允许 IgGs 通过它们的 Fc 片段结合。因此,血型抗体使用该原理非共价固定化在珠子上。每个珠子区域被具有不同特异性的抗体致敏。选择的抗免疫球蛋白对人类免疫球蛋白具有高度亲和性,从而允许这种结合随时间稳定。

[0111] 未纯化的抗 D 和抗 Fya 抗体分别以 30 和 10 μ g/ml 的终浓度与用 80 μ g/ml 抗 Fc 官能化的珠子一起使用。

[0112] 使用血型抗体致敏在 pH 7.4 的 PBS 中,在 37°C 下搅拌进行 1 小时。

[0113] 致敏后,将珠子洗涤几次,然后 +4°C 储存在 pH7.4 的 PBS 中。

[0114] 带有固定化的抗 mu 的珠子可以用抗 S IgM 致敏。事实上,抗 mu 允许结合 IgMs。该抗 mu 多克隆抗血清的亲和性足以确保结合随时间稳定。将未纯化的抗 S 固定化在用 40 μ g/ml 抗 mu 官能化的珠子上。致敏在 pH 7.4 的 PBS 中,在 37°C 下搅拌进行 1 小时。致敏后,将珠子洗涤几次,然后 +4°C 储存在 pH7.4 的 PBS 中。

[0115] 在与红细胞温育之前(自身测试),将用血型抗体致敏的珠子与对照的区域 34 珠子(1SB)和对照的区域 98 珠子(BB)进行混合。

[0116] 1.2.2. 红细胞的标记

[0117] 红细胞用荧光化合物的标记可以使用各种原理来进行。在本实施例中,红细胞使用 PKH26 进行标记,PKH26 是插入到红细胞膜中的荧光团。因此可以按照相同的步骤标记各种不同表型的红细胞(图 3)。

[0118] PKH26 是由 Sigma 公司销售的荧光探针。该探针在 551nm 处具有最大激发,在 567nm 处具有最大发射。

[0119] 试剂盒包含荧光探针,该探针具有长的脂族链,使其可以插入到细胞膜的脂质层中,试剂盒还包含不含盐、缓冲液或有机溶剂的等渗水性稀释剂。该稀释剂能够将细胞存活性、标记物溶解性和标记效率维持在高的水平。

[0120] 用 PKH26 标记红细胞使用制造商推荐的步骤来进行。将这样标记的红细胞在 Stabiliss 缓冲液中稀释,在 +4°C 下储存在暗处。

[0121] 通过按照凝胶技术进行表型定型分析,验证了标记的红细胞随时间的质量、存活性和稳定性。将标记的红细胞的抗原完整性与未标记的红细胞进行比较。通过使用来自 Bio-Rad 的“Bioplex 200”装置进行荧光测定,研究了荧光标记本身的质量和稳定性。

[0122] 1.2.3. 抗体-珠子与红细胞温育

[0123] 为了证实根据本发明的技术进行血型分型的可行性并验证其特异性,发明人以单一的方式进行了反应。在这种情况下,将用目标抗体官能化的珠子与各种不同表型的红细胞单独进行温育。

[0124] 在多重反应的情况下,将不同血液样品单独与具有不同的珠子区域并用不同特异性抗体致敏的珠子进行接触。这种类型的实验可以验证在同样的测试样品中检测几种抗原特异性的可能性。

[0125] 将致敏的珠子与血红细胞混合,以获得大约 50 到 150 的血红细胞 / 珠子比率。将混合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。

[0126] 温育后,将珠子 - 血红细胞复合物用蒸馏水洗涤几次。

[0127] 1. 2. 4. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”自动装置通过流式细胞术进行测量

[0128] 在最后一次洗涤后以及测量之前,将复合物用 185 μ l “包被液体”介质稀释。对于每个测试,将 25 μ l 悬浮液自动注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子来进行。

[0129] 对于每个分型 / 表型定型系列来说,进行了系统对照,以证实所研究的反应的特异性。

[0130] 1. 3. 单式 / 多重表型定型 / 分型实施例

[0131] 本系列测试的目的是证实在单一和 / 或多种方式中对血红细胞进行表型定型 / 分型的可行性。选择 D、Fya 和 S 抗原作为模型。用抗人类免疫球蛋白或抗 mu 链抗体致敏的珠子被用于固定化抗 D、抗 Fya 和抗 S 抗体。

[0132] 1. 3. 1. RH D 阳性血红细胞的单一表型定型

[0133] 将用抗 D 抗体致敏的珠子与用 PKH26 标记的 Rh D 阳性和 Rh D 阴性血红细胞进行温育,使用的血红细胞数 / 珠子数比率为 150。

[0134] 使用了两种 RH D 阳性血红细胞和两种 RH D 阴性血红细胞。将每种样品双份注射到装置中。

[0135] RH D 阳性血红细胞产生大约 21000 到 25000RFI 的强阳性信号,而 RH D 阴性血红细胞显示出 40 到 400RFI 之间的阴性信号。

[0136] ISB 34 对照珠子给出大约 6500RFI 的信号, BB 98 对照珠子给出低于 1000RFI 的信号,证实了结果的有效性。进行的各种不同的阴性对照显示出 15 到 400RFI 之间的信号,证实了反应的特异性。RH D 阳性和 RH D 阴性血红细胞事实上不与没有抗 D 抗体的珠子结合。

[0137] 这些结果证实了非常清楚地辨别 RH D 阳性和 RH D 阴性血红细胞、从而鉴定血红细胞表面上的 D 抗原的可能性。

[0138] Fya 和 S 血红细胞的单一表型定型可以根据同样的原理,使用同种型 G 特异性或同种型 M 特异性的抗体来进行。

[0139] 1. 3. 2. D、Fya 和 S 血红细胞的多重表型定型

[0140] 多重表型定型的原理概述在图 5A 到 5D 中。

[0141] 在这种情况下,将用抗 D 抗体致敏的区域 19 珠子,与用抗 Fya 抗体致敏的区域 21 珠子,也与用抗 S 抗体致敏的区域 71 珠子进行混合。

[0142] 将该珠子的混合物与具有不同的 D、Fya 和 S 表型的血红细胞温育 :D+Fya+S+ / D+Fya-S- / D-Fya+S- / D-Fya-S- / D-Fya-S+ / D-Fya+S+ / D+Fya-S+ / D+Fya+S-。使用的血红细胞数 / 珠子数比率是 50。

[0143] 当用给定抗体致敏的珠子与具有相应抗原特异性的血红细胞结合时,获得了 13000 到 29000RFI 之间的阳性信号。

[0144] 在测量到的荧光信号与用于执行测试的血红细胞的表型之间,观察到了极好的关

联性。

[0145] 当用抗体致敏的珠子与不带有相应抗原的血红细胞进行接触时,获得了低于 1000RFI 的信号。

[0146] 此外,用没有用抗体致敏的珠子进行的对照,产生了与所用的血红细胞无关的阴性信号。

[0147] 这些结果证明了测量到的信号是特异性的:珠子-血红细胞的结合只在包含了抗原-抗体对的情况下才发生。

[0148] 使用对照珠子 ISB 34(11000RFI) 和 BB 98(低于 1000RFI) 获得的结果证实了分析的有效性。

[0149] 测试内变异系数在 1%到 10%之间,证明了令人满意的测试内可重复性。

[0150] 这些结果证明了根据本发明的技术进行血红细胞的三参数多重表型定型的可行性。

[0151] 1.3.3. 直接 Coombs 阳性 (CD+) 血红细胞的多重表型定型

[0152] 根据图 6 中描述的原理,使用微珠的多重方法可以同时鉴定 CD+ 的本质并对血红细胞进行表型定型。

[0153] 将用抗 Fc 抗体致敏的区域 32 珠子与分别用抗 D、抗 Fya 和抗 S 抗体致敏的区域 19、21 和 71 珠子混合。在体内用抗体致敏的 CD+ 血红细胞,可以与区域 32 珠子携带的抗人类免疫球蛋白结合,从而可以鉴定 CD+ 的特征。此外,根据血红细胞膜上存在的特异性,这些血红细胞也能结合携带有特异性针对 D、Fya 和 S 抗原的抗体的区域 19、21 和 71 珠子。

[0154] 使用了大约 40 的血红细胞数/珠子数比率来验证本方法。

[0155] ISB 34 和 BB 98 对照珠子产生了预期的信号,即分别为大约 13000RFI 和低于 1000RFI,证实了结果的有效性。

[0156] 使用用抗人类免疫球蛋白抗体致敏的区域 32 珠子,两种 CD+ 血红细胞产生了高于 30000RFI 的阳性信号。使用该同样的珠子区域,两种 CD 阴性血红细胞就它们本身而言产生了低于 500RFI 的阴性信号。这些结果证明了使用事先结合到给定珠子区域的珠子上的抗球蛋白,利用其特异性结合鉴定 CD+ 血红细胞的可能性。

[0157] 此外,结果还证实了 CD+ 血红细胞的红细胞抗原的多重表型定型,可以与 CD+ 本性的鉴定同时进行。事实上,一种 CD+ 血红细胞的表型被定型为 D+Fya-S-,另一种为 D+Fya+S+。

[0158] 按照常规技术,使用 IgM 类型的抗 S 抗体,验证了这两个样品的 S 表型。获得的结果与根据新技术获得的结果完全匹配。

[0159] 另一方面,对于抗 Fya 表型来说,不能执行该同样的分析。事实上,没有 IgM 类型的用于血红细胞表型定型的反应物。

[0160] 但是,对于被分析的 CD+ 血红细胞的 Fya 表型,观察到了差异,这证实了结果的有效性,并使排除非特异性结合的现象成为可能。

[0161] 对于大多数样品来说,变异系数在 1%到 5%之间,显示出令人满意的测试内可重复性。

[0162] 实施例 2:检测磷酸酰丝氨酸,一种红细胞衰老的标志物

[0163] 红细胞衰老的标志物的证明,不仅在研究输血中的血红细胞群中(Cardo L J 等,

Transfus Apher Sci, 2008Apr ;38(2) :141-7), 而且在涉及某些血液病理学的现象例如地中海贫血的研究中 (Basu S 等, BrJHaematol, 2008Apr ;141(1) :92-9), 都具有价值。

[0164] 具体来说, 红细胞的衰老由红细胞表面上被称为磷脂酰丝氨酸 (PS) 的结构的出现所反映。

[0165] 本发明的测试可以容易地进行, 以检测血红细胞表面上的这种分子。

[0166] 为此, 使用荧光珠子, 通过聚 L- 赖氨酸 (PLL) 来固定化待测试的血红细胞。

[0167] 然后将这些珠子在温育阶段中与抗磷脂酰丝氨酸抗体进行接触。

[0168] 在洗涤步骤后, 通过将珠子 - 血红细胞复合物与用藻红蛋白 (PE) 标记的抗 Fc (IgG) 第二抗体进行温育, 来检测抗磷脂酰丝氨酸与血红细胞的结合。

[0169] 进行最后的洗涤步骤, 以除去未结合的抗 Fc (IgG) -PE。

[0170] 然后使用 BioPlex200 装置读取珠子 - 血红细胞复合物。

[0171] 使用了从血袋获得的不同年龄的血红细胞作为标准范围。

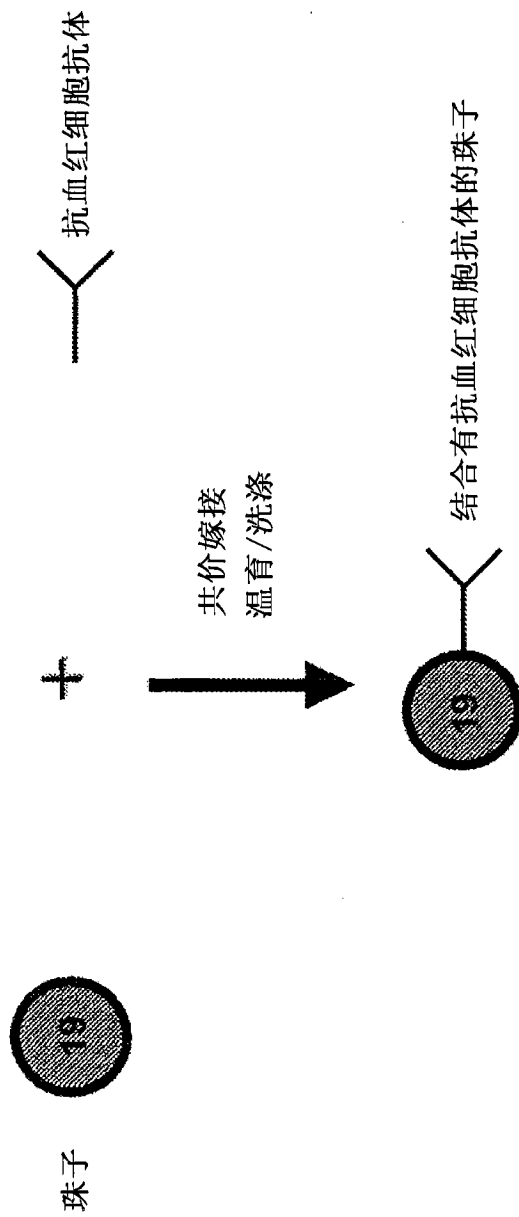


图 1

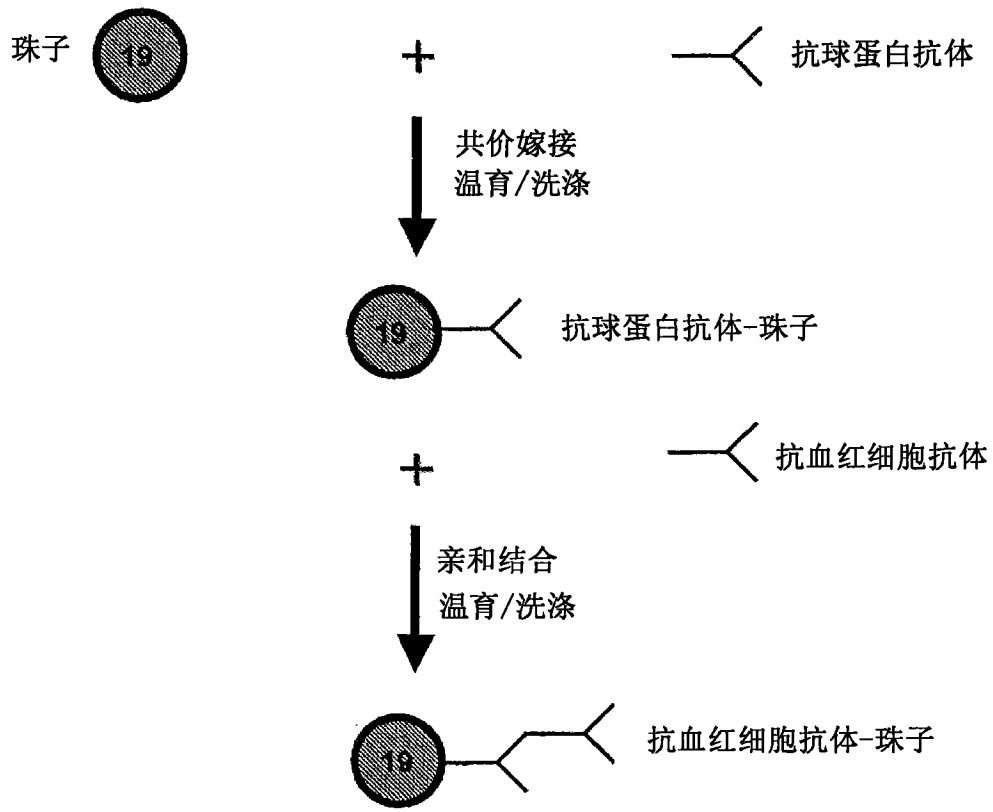


图 2

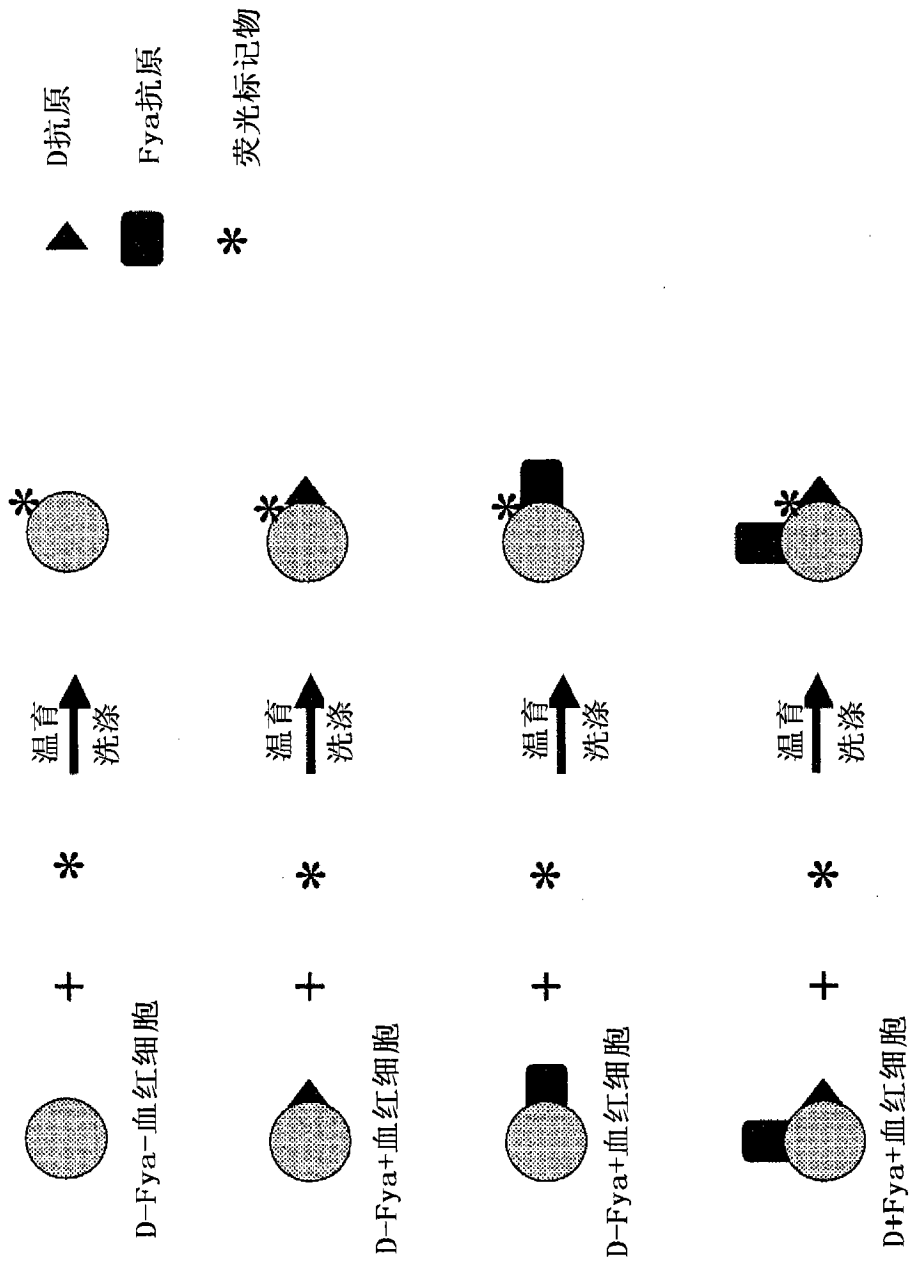


图 3

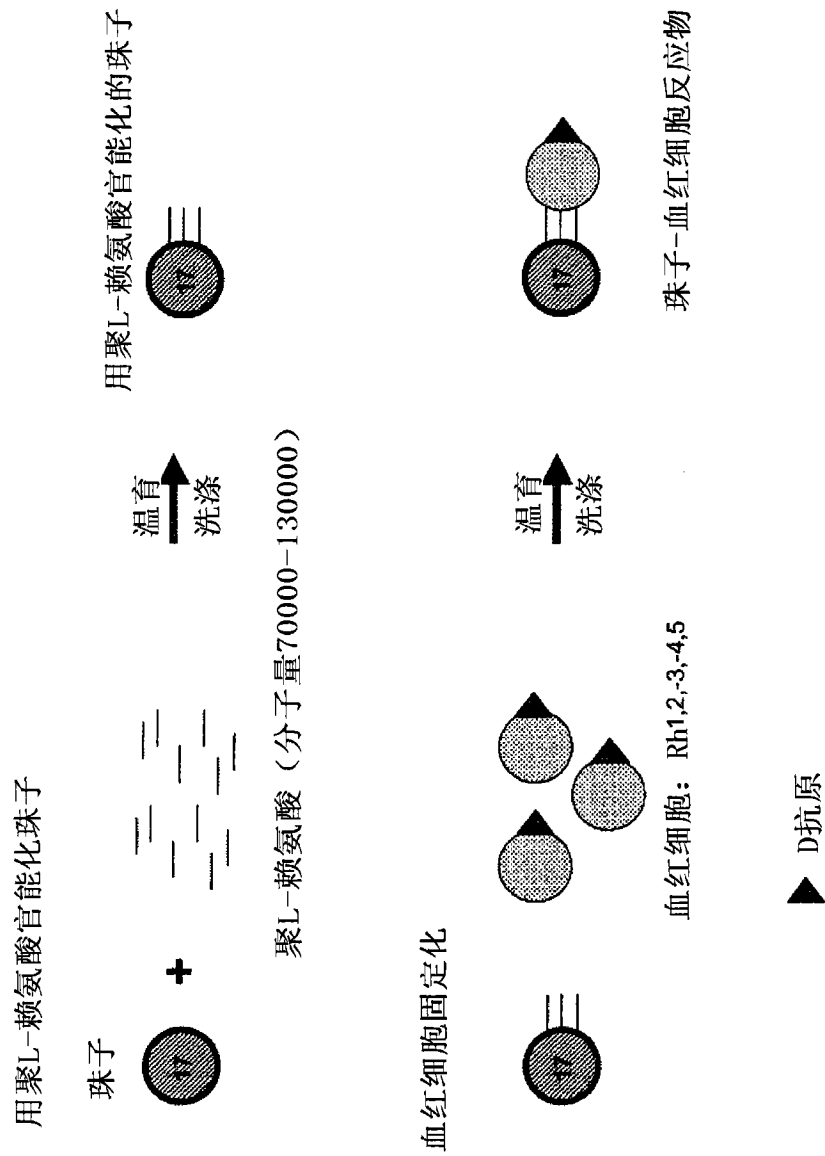


图 4

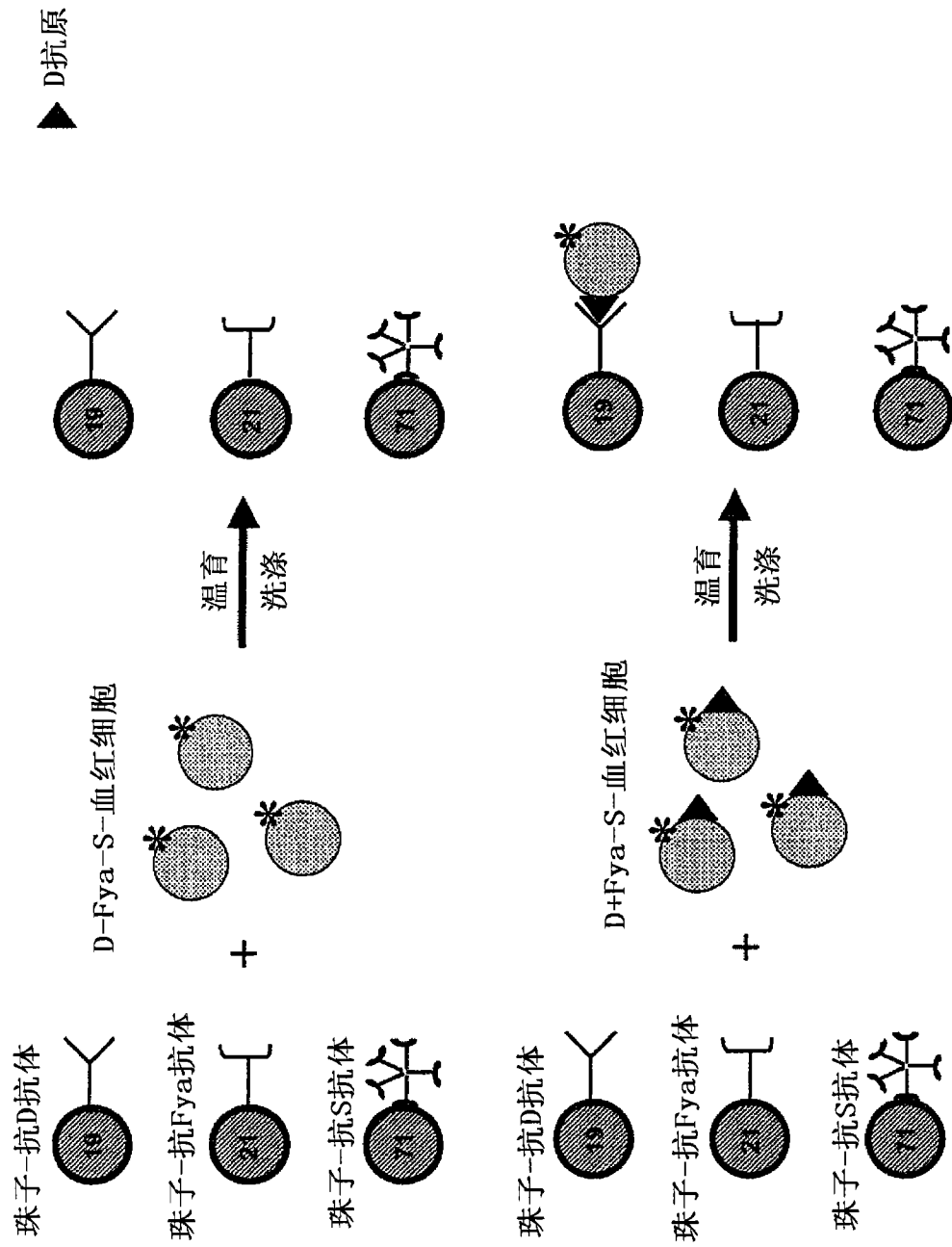


图 5a

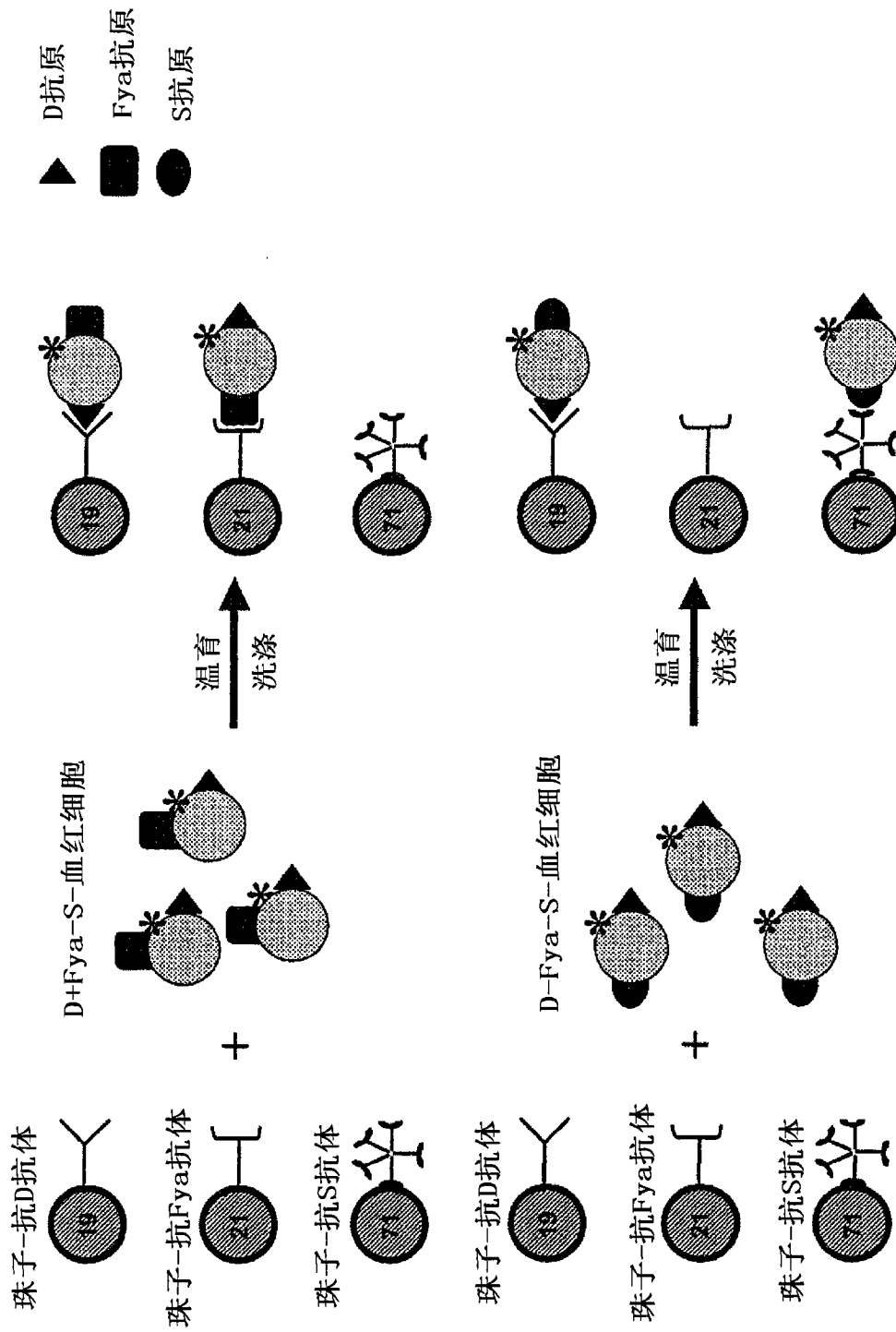


图 5b

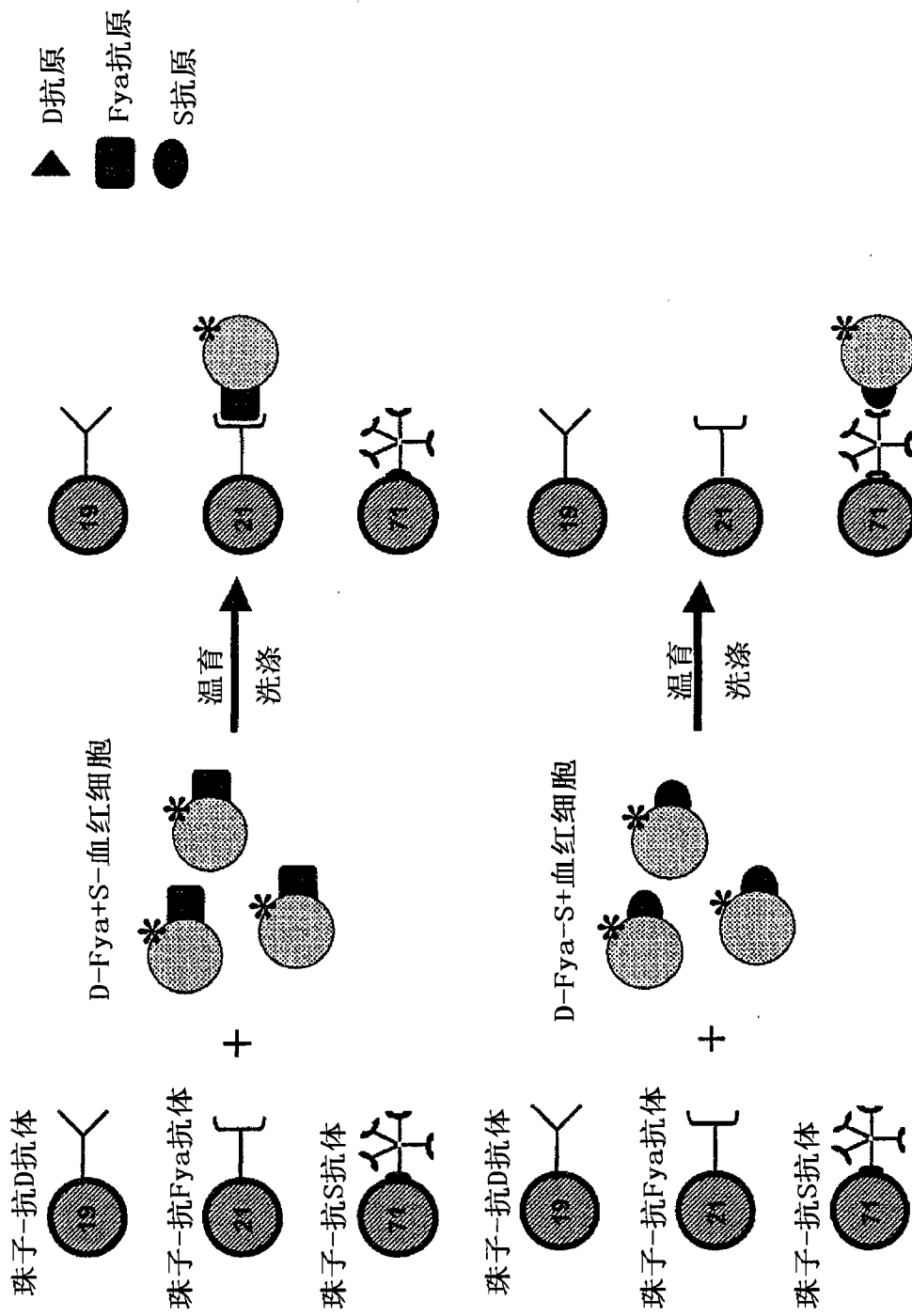


图 5c

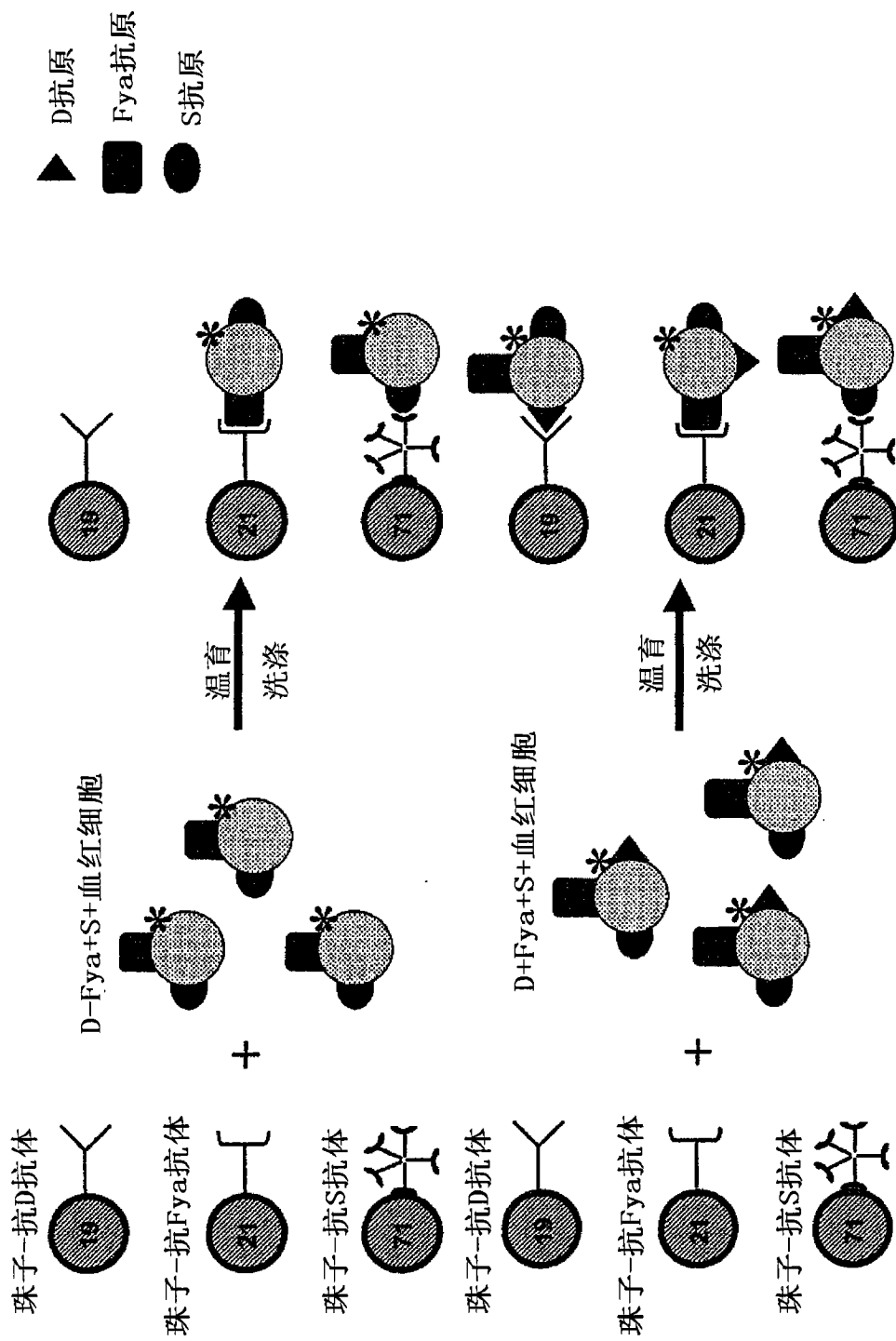


图 5d

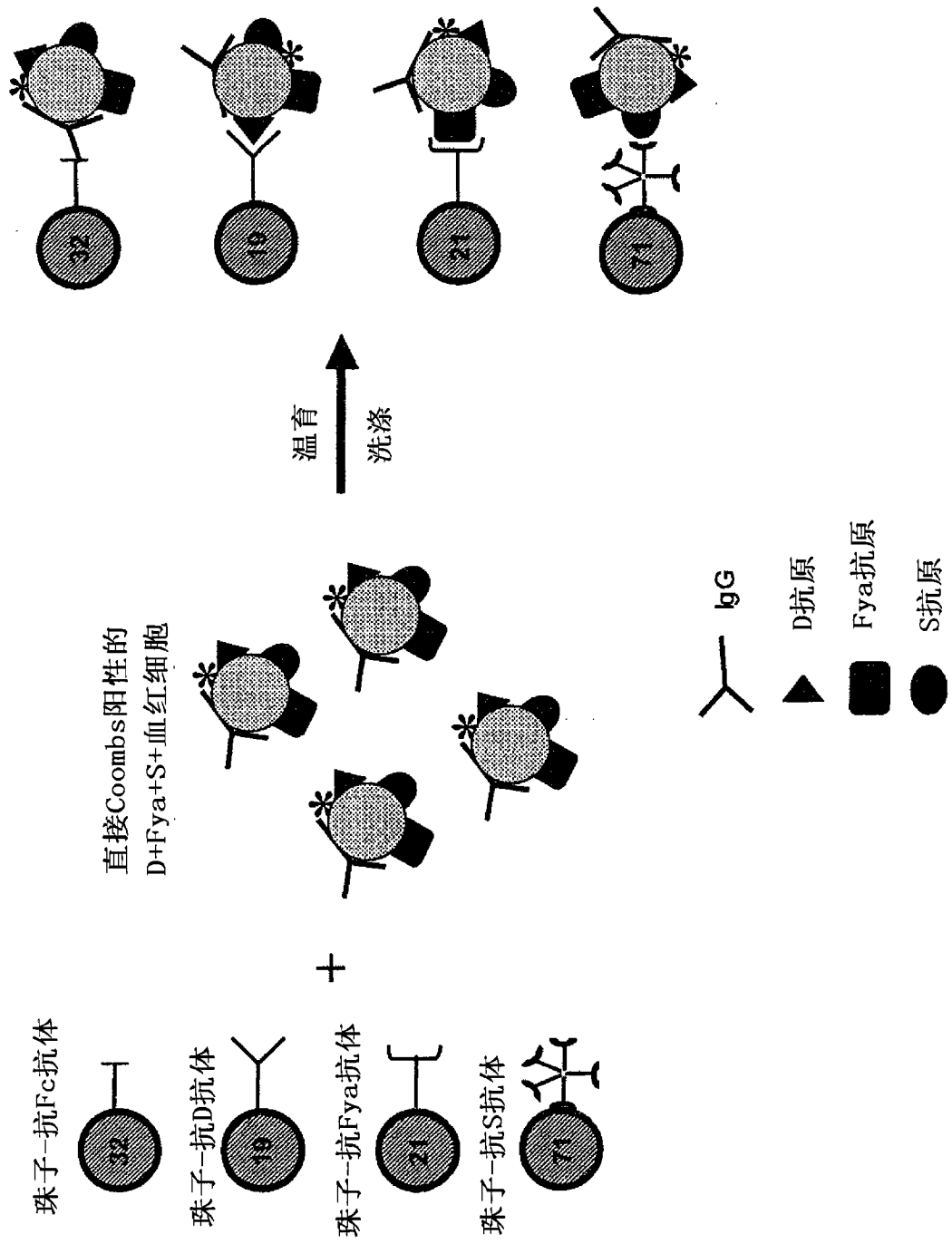


图 6

专利名称(译)	红细胞携带的抗原以及抗红细胞抗体的检测		
公开(公告)号	CN101715558A	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	CN200880019293.0	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
当前申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
[标]发明人	弗雷德里克比菲埃 伊夫瑞森 埃利亚内里瓦兰 安帕鲁圣胡安		
发明人	弗雷德里克·比菲埃 伊夫·瑞森 埃利亚内·里瓦兰 安帕鲁·圣胡安		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/543 G01N33/537 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/537 G01N33/80 G01N33/54333 Y10T436/101666 Y10T436/25125		
代理人(译)	张颖		
优先权	2007055624 2007-06-08 FR 60/929052 2007-06-11 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测红细胞携带的多种抗原性分子和/或多种抗红细胞抗体的方法，所述由红细胞携带的抗原性分子包括不仅由红细胞携带、而且由至少一种其它细胞群携带的血型抗原分子之外的抗原性分子，所述方法包括将样品与可辨别的珠子进行接触，在可辨别珠子上连接有a)特异性针对所述抗原的抗体，或b)红细胞或红细胞膜片段。

