

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510055012.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年9月20日

[11] 公开号 CN 1834647A

[22] 申请日 2005.3.14

[21] 申请号 200510055012.5

[71] 申请人 斯马特生物技术有限公司

地址 以色列哈尔阿达

[72] 发明人 T·杰胡达 - 科亨

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 陈轶兰

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

用于改进对抗人类免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV)的抗体的检测以及用于在血清阴性个体中进行早期检测的方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及用于检测全血中针对人类免疫缺陷病毒(HIV), 和/或丙型肝炎(HCV)的抗体的改进方法和试剂盒, 所述全血是从通过常规测定技术确定为 HIV - 血清阴性的个体获得的。从这些个体分离全血, 并且直接用活化剂培养, 以刺激产生对 HIV 或 HCV 特异性的免疫球蛋白的 B - 淋巴细胞增殖。该方法提供了用于对大量血液样品进行 HIV 感染筛选的快速、简单和廉价的手段, 比使用未处理过的血液具有更好的结果。

1. 一种用于检测样品中针对HIV和/或HCV的抗体的方法，包括以下步骤：

a) 获得全血样品；

b) 在存在含有活化剂的培养基的条件下培养所述全血样品，以诱导外周血单核细胞的特异性和/或多克隆激活，以及HIV和/或HCV特异性抗体的表达；

c) 让步骤b) 所得到的培养物与HIV和/或HCV抗原接触，从而使抗原-抗体免疫复合物形成；和

d) 检测步骤c) 的抗原-抗体免疫复合物；从而检测HIV和/或HCV特异性抗体的存在。

2. 如权利要求1的方法，其中，步骤b) 的培养产生上清液，并且让所述上清液接触HIV和/或HCV抗原，从而使抗原-抗体免疫复合物形成。

3. 如权利要求1的方法，其中，所述活化剂包括促分裂原，凝集素，细菌内毒素，病毒，脂质A，细胞因子或淋巴因子。

4. 一种用于检测来自对象的针对HIV和/或HCV的抗体的试剂盒，包括：用于采集全血样品的容器，其中，所述容器装有含有活化剂的培养基，它能有效诱导外周血单核细胞的特异性和/或多克隆激活，以及全血样品的HIV和/或HCV特异性抗体的表达。

5. 如权利要求4的试剂盒，其中，所述试剂盒还包括用于检测HIV和/或HCV特异性抗体的测定。

6. 如权利要求5的试剂盒，其中，所述测定是酶联免疫吸附测定，western印迹，快速试验，生物芯片，或免疫荧光测定。

7. 如权利要求4的试剂盒，其中，所述容器是由塑料，玻璃或金属材料制成的。

8. 如权利要求4的试剂盒，其中，所述容器是试管或烧瓶。

9. 如权利要求4的试剂盒，其中，所述容器具有真空，如真空容器。

用于改进对抗人类免疫缺陷病毒（HIV）和丙型肝炎病毒（HCV）的抗体的检测以及用于在血清阴性个体中进行早期检测的方法和试剂盒

### 技术领域

本发明总体上涉及用于检测通过常规测定技术检测为血清阴性的个体的全血中的抗体，并且用于促进HIV和/或HCV抗体产生的改进的方法和试剂盒。更具体地讲，本发明涉及用于检测可能的逆转录病毒感染，如HIV病毒感染的测定方法，该方法将活化剂用于全血中，以便刺激外周血单核细胞的抗体产生。本发明还涉及改进的测定试剂盒，在用活化剂培养之前，它不需要从全血中分离外周血单核细胞。

### 发明背景

在本文中，活化剂表示任何能够活化B-细胞和/或T-细胞和/或其它白细胞的物质。术语“全血”表示用肝素，EDTA，或任何其它防止凝结和凝固的物质采集的血液。本文所使用的术语全血，还包括用肝素，EDTA，或任何其它防止凝结和凝固的物质从动物或人体内采集的血液。“全血”还可以表示这样的血液：其中红细胞业已裂解，同时保持了剩余的白细胞的活力。

抗多种感染性疾病因子的抗体的血清学检测，被认为是接触所述因子和/或被所述因子主动感染的证据。酶联免疫吸附测定（ELISA）商业试剂盒通常被用作抗体血清学检测的筛选试验。业已开发出了“快速试验”形式的其它试验，利用多种技术检测特异性抗体-抗原复合物的形成。一般，要对阳性样品进行两次再检测，并且只有在随后这两次试验中至少有一次也能起反应的时候，才被视为“阳性的”。在某些国家，Western印迹技术被用于验证ELISA-反应性血清样品。Western印迹技术被认为特异性比ELISA技术更高，但是，它的灵敏度通常较差。

不过，现有血清学技术无法识别受到感染，但是缺乏可检测水平的反应性抗体的个体。缺乏可检测水平的反应性抗体的情况的例子包括自身免疫性疾病，其中，抗体可能只在一部分时间内存在，并且在其余时间被抑制，或者，其中抗体与抗原结合形成了免疫复合物，并因此可能不能在血清中检测到；某些形式的癌，其中，针对肿瘤的抗体产生可能被癌发展中的某些特殊过程抑制；器官和组织移植，其中，受体不产生抗潜在供体的抗体，但是会产生快速的移植排斥，因为由于供体抗原与受体以前接触过的抗原的交叉反应而产生对免疫系统的回忆刺激（recall stimulation）；巨细胞病毒，它导致了抗体产生的减弱；以及，其它感染的宿主，其中，抗体产生随后被抑制。多种病毒同样会干扰免疫功能。被诱导的抑制作用可能特异性地与针对所述病毒的免疫反应相关，或可能是非特异性的，并且影响所述宿主的总体免疫系统的很多组成部分。

在世界范围内，血清学筛选技术被用于检测所有类型的HIV（HIV-1，HIV-2，HIV-0）。抗诸如HIV的慢性感染的抗体的存在，被视为感染的强指示。目前，在大部分医院和筛选实验室中，ELISA测定被用在血清样品上，以便进行这种测定。类似的抗体测定方法被用于检测丙型肝炎（HCV）的存在。如果血清样品是阳性的，就通过Western印迹测定试剂盒对该样品的一个等份样品进行筛选以便验证，或者进行重复试验。抗所述病毒的两个主要蛋白条带的抗体的存在，或相同样品的重复试验呈阳性，被认为有效验证和确定了所述血清样品供体是受感染的。

试验结果表明，目前使用的ELISA测定方法不能检测所有HIV和HCV感染的个体。这是因为某些HIV感染的个体不具有可检测水平的抗所述病毒的血清抗体，并且现有技术不能识别缺乏可检测水平的HIV抗体的个体。研究表明，在HIV感染和血清阳转之间可能存在较大的时间滞后。另外，某些受到HIV感染的、但是血清阴性的个体可能从来不发生血清阳转，但是在他们的整个生命中都保持感染。因此，报导了大量的假阴性。通过利用聚合酶链式反应（PCR）技术，病毒分离技术和原

位杂交，业已证实了HIV感染的但是血清阴性的个体的存在。确定受感染的但是血清阴性的个体的最可悲的方式是通过他们业已传播给其它人的感染。由于其高度可传染性，确定受感染的但是血清阴性的个体对于控制疾病的传播来说是重要的。另外，来自所述测定方法的数据对于受感染个体的临床管理，随访和治疗，以及保持与受感染个体接触的卫生保健工作人员的安全来说都具有重要意义。在HCV中，“窗口期”——即尽管受到感染，但是血清阴性的状态——可能比HIV长得多。

**Tamar Jehuda-Cohen**博士开发了用于检测血清阴性个体中的HIV感染的方法。在该方法中，从血液中分离外周血单核细胞（PBMC）然后接触活化剂，或使用不同的培养基配方，培养全血样品。结果发现，对于受到HIV感染但是呈血清阴性的患者来说，在存在活化剂的条件下培养分离的PBMC或全血，导致了淋巴细胞分泌对HIV特异性的抗体。因此，这种检测方法提供了确定大部分业已受到HIV感染，但是呈血清阴性的患者的可能性。为了早期单独或与HIV一起检测HCV，业已进行了类似研究。

在使用分离的PBMC制剂，并且在临床上试验时，存在某些严重问题。首先，必须采集来自业已接触过HIV的患者的血液，然后进行部分分离，以便分离外周血单核细胞。然后，可能需要除去某些抑制细胞。随后，必须将这些细胞悬浮在含有活化剂的生长培养基中，并且培养适当的时间。所述过程必须在无菌条件下进行。然后检测上清中HIV特异性抗体的存在。尽管这种措施在研究实验室中是可以接受的，然而在每周要处理数百份，并且在某些场合下甚至要处理数千份血液样品的临床实验室中，就不是这样了。

本领域需要能够在血清阳转之前检测诸如HIV和/或HCV病毒的特定抗原感染的测定方法。所述测定方法应当包括技术人员对血液的最少接触，与此同时，提供对大量血液样品进行病毒感染筛选的安全、方便和廉价的方法。

## 发明概述

本发明涉及用于检测通过常规测定技术检测为血清阴性的受感染个体的全血中的抗体的改进的测定方法，因此有助于诊断可能的逆转录病毒感染。更具体地讲，本发明涉及改进的测定方法和试剂盒，它将活化剂用在全血中，以便刺激以前不可检测的抗体的产生。

根据本发明，将血液样品抽取到装有有效浓度的活化剂溶液的试管如真空管中，或转移到装有合适溶液的组织培养试管中。在存在所述活化培养基的情况下，体外培养要检测的血液样品。人B细胞和其它淋巴细胞亚型的任何活化剂，都可用于获得提高抗体产生水平并且克服免疫抑制作用的相同功能，因此导致了抗体水平的提高和/或在血清阴性的个体中检测到感染。在培养之后，从液体的顶部取出等份样品，然后，通过标准ELISA方法和/或Western印迹分析，和/或任何其它用于检测抗体的测定方法，测定目的抗体的存在。如果所述样品要在较迟的日期进行测定的话，可以对所述血液进行离心，并且收集上清液体，冷冻并且保藏。可以通过重复试验验证结果。采用聚合酶链式反应(PCR)技术，通常能够证实所述病毒的存在。

或者，可以从要检测的血液样品中分离PBMC's，并且与活化剂一起在培养基中培养。可以单独将PBMC用于检测抗感染因子、癌表位的“隐藏”抗体或用于匹配移植的供体。

因此，本发明的一个目的是提供用于检测患者的逆转录病毒感染的简单和灵敏的测定方法，所述患者受到感染，但是对所述病毒是血清阴性的。

本发明的另一个目的是提供用于提高抗体水平，并且改善抗体诊断测定的灵敏度和/或特异性的简单和灵敏的测定方法。

本发明的另一个目的是提供用于预测由于回忆刺激移植受体中的抗体产生而产生器官或组织排斥的可能性的简单和灵敏的测定方法。

本发明的另一个目的是提供用于早期检测某些形式的癌症的方法和试剂盒。

本发明的另一个目的是提供用于诊断HIV感染的方法。

本发明的另一个目的是提供测定试剂盒，该试剂盒是独立完备的，

并且不需要在测定之前分离外周血单核细胞。

本发明的另一个目的是提供用于诊断逆转录病毒感染的测定方法和测定试剂盒，通过简化测定程序，减少对供体样品的操作，降低了卫生保健工作者的风险，并因此降低了感染的风险。

本发明的另一个目的是提供用于在血液中的抗体水平低于通过常规测定系统目前可检测的水平时检测抗体的方法。

通过阅读下面的对所披露的实施方案的详细说明和所附权利要求书，可以了解本发明的上述以及其它目的，特征和优点。

### 本发明的详细说明

本发明包括用于检测通过常规测定技术检测呈血清阴性的个体的全血中“隐藏的”抗体的方法和试剂盒。另外，本发明包括用于检测业已感染了HIV，但是对常规测定技术表现出血清阴性的个体全血中的HIV抗体的方法。该方法包括在存在活化剂的情况下培养血清阴性个体的全血。所述活化剂能导致对外周血单核细胞的刺激以及抗体的产生。然后，可以通过使用任何常规测定技术，如上文所列举的技术测定特异性抗体的存在。

在本发明中，任何活化剂都可用于刺激所述细胞。所述活化剂可以是T-细胞依赖性或非T-细胞依赖性的。可用于实施本发明的活化剂包括但不限于：凝集素（如伴刀豆球蛋白A和美洲商陆），细菌内毒素；细菌衍生的脂质A；多种病毒；以及诸如淋巴因子的生物活性剂，包括但不限于白介素，细胞因子或抗-免疫球蛋白试剂。

培养基表示可用于实施本发明的任何培养基，优选补充了合适的抗生素，谷氨酰胺和其它生长支持成分。可用于实施本发明的培养基包括但不限于，Eagles, Dulbecco's, RPMI, McCoy's, Media 199 和 Waymouth's培养基。

55

本发明还包括试剂盒，它包括其中装有有效浓度的活化剂的采血容器。所述容器可选择性地装有培养基。优选的容器是试管。所述采血容器可以是塑料，玻璃，或适合培养血液的任何其它材料。

可以理解的是,本发明还包括除了血液采集试管以外的血液容纳装置,包括但不限于微量滴定平板,它包括可以在其中培养血液的孔,组织培养管或瓶,玻璃烧瓶如锥形瓶,以及可以在它里面培养血液的任何其它容器。

本发明的方法包括任选从血液的液体部分分离血细胞,以便可以确定抗体的存在。从血液的液体部分分离血细胞可以通过本领域普通技术人员所熟知的若干方法中的任意一种实施,包括离心或过滤。应当理解的是,没有必要从液体中物理分离血细胞,尽管在培养和测定之前可以从血液中分离PBMC's。在用所述活化剂培养全血(或来自它的细胞)之后,可以从所述血液的顶部方便地吸取液体,并且检测抗体。任选地,可以通过温和的渗透压休克或用温和的洗涤剂裂解红细胞。通过这种方法,白细胞保持活力。

在本发明的一种实施方案中,采集全血(具有抗凝剂),并且将样品转移到装有培养基和活化剂的试管中。然后,在37℃下,在含有5% CO<sub>2</sub> 的潮湿的气氛中培养所述血液样品3-5天。然后对所述血液进行离心,并且收集上清液,并且在大约24小时之内,通过ELISA 和/或任何其它抗体检测技术测定反应性抗体。或者,可以直接从所述样品中取出一份液体。每一份样品都应首先通过ELISA(或快速试验)筛选抗体,然后可对被认为是阳性的样品进行重复确证试验,或进行Western印迹分析。

应当理解的是,本发明可用于在多种情况下检测抗体,包括但不限于针对器官和组织移植中涉及的外来抗原的抗体。可以按照本发明的方法制备并且处理来自潜在受体的血液的上清液,然后保藏,以便在发现潜在供体之时,将来自供体的PBMC与来自受体的上清液混合。可以通过多种不同的方法测定与供体细胞结合的抗体的存在和水平,这些方法包括但不限于通过补体裂解或通过鉴别染色和FACS分析。这些检测抗体的方法为本领域普通技术人员所熟知。

可将本发明用于确定在微生物感染之后或期间是否存在“隐藏的”抗体,所述微生物包括但不限于酵母,细菌,病毒,原生动物,以及

其它类别的微生物。

将通过以下实施例对本发明作进一步说明，这些实施例不被视为以任何方式构成对本发明范围的限定。相反，显而易见的是，在阅读本发明的说明书之后，在不偏离本发明的构思和/或所附权利要求书的范围的前提下，本领域技术人员可以提出并采取各种其它实施方案，改进，以及它们的等同方案。

### 实施例1

分析了来自超过20位不同患者（HIV高危的怀孕女性）的血液中HIV特异性抗体的存在。在本实施例中，从患者体内采集血液，并且从血液中分离PBMC。对每一位患者，在含有活化剂的培养基中培养全血和PBMC。对于全血来说，将1 ml全血与2 ml含有活化剂的培养基混合。对于PBMC来说，所述细胞以每毫升 $2 \times 10^6$  细胞的浓度在活化剂的不同制剂中培养。另外，分析了来自每一位患者的血清中HIV抗体的存在。全血和PBMC的培养在无菌试管中进行一式三份，并且在37℃下，在含有5%CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中培养4天。然后对所述培养物进行离心，采集上清液，并且在24小时之内，通过ELISA和Western印迹试验，测定HIV-反应性抗体。所使用的ELISA测试是从Sanofi Diagnostic Pasturer购买的。结果如下：

- 8位患者是血清阳性的，在培养之后，所有8位患者仍然是阳性的→ 没有阳性例丢失
- 在血清阴性的患者中，有5位患者在培养之后是阳性的。→ 提高了灵敏度
- 在这5位患者中，有3位在随后的3-4个月内发生了血清阳转，有1位在6个月之后发生了血清阳转。→ 早期检测
- 在本研究期间，在培养之后检测呈阴性的患者无一发生血清阳性→ 良好的特异性。

### 实施例2

一名卫生保健工作者被装有来自HIV患者的血液的注射器针头刺伤。

通过常规的血清学和通过在合适活化剂中培养血液(以及一些分离的PBMC),检测HIV状态。与所述抗体检测平行,还通过PCR进行了病毒核酸序列存在的检测。

受伤后时间	血清中的HIV抗体	培养的全血中的HIV抗体	培养的PBMC中的HIV抗体	HIV核酸序列(PCR)
1周	阴性	阴性	阴性	未检测
2周	阴性	阳性	阳性	阴性
4周	阴性	阳性	阳性	不确定
2月	阴性	阳性	阳性	阳性
3月	阴性	阳性	阳性	阳性
5月	阴性	阳性	阳性	阴性

从以上数据中可以看出,在PBMC和全血之间存在极好的相关性。这两种方法都能够对所述感染进行非常早期的检测,所述感染的“窗口期”超过五个月。

当然,应当理解的是,上面所涉及到的只是本发明的一种实施方案,并且,在不超出所附权利要求书提出的本发明的构思和范围的前提下,可以对它进行多种改进或改变。

专利名称(译)	用于改进对抗人类免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV) 的抗体的检测以及用于在血清阴性个体中进行早期检测的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1834647A</a>	公开(公告)日	2006-09-20
申请号	CN200510055012.5	申请日	2005-03-14
[标]发明人	T杰胡达 科亨		
发明人	T·杰胡达 - 科亨		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于检测全血中针对人类免疫缺陷病毒(HIV)，和/或丙型肝炎(HCV)的抗体的改进方法和试剂盒，所述全血是从通过常规测定技术确定为HIV - 血清阴性的个体获得的。从这些个体分离全血，并且直接用活化剂培养，以刺激产生对HIV或HCV特异性的免疫球蛋白的B - 淋巴细胞增殖。该方法提供了用于对大量血液样品进行HIV感染筛选的快速、简单和廉价的手段，比使用未处理过的血液具有更好的结果。

受伤后时间	血清中的HIV抗体	培养的全血中的HIV抗体	培养的PBMC中的HIV抗体	HIV 核酸序列 (PCR)
1 周	阴性	阴性	阴性	未检测
2 周	阴性	阳性	阳性	阴性
4 周	阴性	阳性	阳性	不确定
2 月	阴性	阳性	阳性	阳性
3 月	阴性	阳性	阳性	阳性
5 月	阴性	阳性	阳性	阴性