



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105308457 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201480026715. 2

代理人 韩威威

(22) 申请日 2014. 03. 13

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/782, 003 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/026406 2014. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/151763 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·B·迪安 G·陈

(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 11038

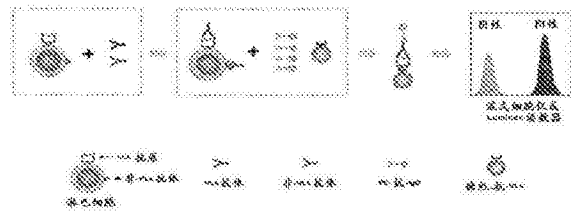
权利要求书4页 说明书17页 附图17页

(54) 发明名称

检测供体特异性抗体的方法和用于实施所述方法的系统

(57) 摘要

提供了用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。所述方法包括在足以使受体免疫抗体（如果存在的话）结合供体细胞表面抗原（Ag）的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本接触以形成免疫抗体-Ag复合物，将所述混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物（例如，Ag或免疫抗体）的抗体的珠粒接触，在裂解条件下添加特异性结合结合于珠粒的免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体，和检测结合于免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在以测定供体特异性抗体在受体的生物样本中的存在或不存在。还提供了用于实施主题方法的系统和试剂盒。



1. 一种方法,其用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在,所述方法包括:

通过在足以使受体免疫抗体(如果存在的话)结合供体细胞表面抗原(Ag)的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合来形成混合物以形成免疫抗体-Ag复合物;

将所述混合物与在其表面上包含特异性结合所述免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒接触;

在裂解条件下添加特异性结合结合于所述珠粒的所述免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体;和

检测结合于所述免疫抗体-Ag复合物的所述可检测地标记的抗体的存在或不存在,以测定供体特异性抗体在来自所述受体的生物样本中的存在或不存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测是半定量的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述免疫抗体是同种抗体。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述免疫抗体是自体抗体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述免疫抗体是补体固定抗体(CFab)。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述检测包括检测荧光发射。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述检测包括将所述复合物流过流式细胞仪。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述检测包括通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测所述复合物。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述可检测地标记的抗体包含附接于抗体或其抗原结合片段的可检测标记。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述可检测标记包含荧光染料、生色团、酶、接头分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述可检测标记包含选自由以下组成的组的荧光团:吖啶羧花青(C3)、吖啶羧花青(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红、太平洋蓝、俄勒冈绿488、Alexa fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、JOE、丽丝胺、罗丹明绿、BODIPY、异硫氰酸荧光素(FITC)、羧基荧光素(FAM)、别藻蓝蛋白(APC)、藻红蛋白(PE)、罗丹明、二氯罗丹明(dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、羧基-X-罗丹明(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen和RiboGreen。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述供体特异性抗体是实际供体特异性抗体。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述Ag选自由以下组成的组:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB2、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQ和HLA-DP。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述生物样本包括血清、血液、唾液

或血浆。

15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的方法,其包括从所述供体获得所述细胞样本。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的方法,其包括从所述受体获得所述生物样本。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包括有核细胞。

18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包含  $0.001 \times 10^6$  至  $2.0 \times 10^6$  个细胞。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包含少于  $0.2 \times 10^6$  个细胞。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包含少于  $0.1 \times 10^6$  个细胞。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包含少于  $0.5 \times 10^5$  个细胞。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法,其中来自所述供体的所述细胞样本包含约 25,000 至 200,000 个细胞。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述平均珠粒直径为 0.1 至 20 微米。

24. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述平均珠粒直径为 5 微米或更小。

25. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述平均珠粒直径为 2.5 至 5 微米之间。

26. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中所述珠粒是琼脂糖珠粒。

27. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中所述珠粒是胶乳珠粒。

28. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中所述珠粒是磁性珠粒。

29. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中所述珠粒是聚苯乙烯珠粒。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的方法,其中在 12 小时或更短的时间内完成所述方法。

31. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的方法,其中在 8 小时或更短的时间内完成所述方法。

32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的方法,其中所述裂解条件包括施用包含示踪剂、去垢剂和 DNA 酶的裂解缓冲液。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的方法,其包括生成指明供体特异性抗体是否存在于来自所述受体的所述生物样本中的报告。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中生成报告通过计算机来进行。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中所述报告被显示至所述计算机的远程输出设备。

36. 一种系统,其包括:

样本流体子系统,其包括:

处理器,和

可操作地连接于处理器的在其上具有存储的程序的计算机可读介质,当通过处理器执

行所述程序时,使所述处理器按程序使所述样本流体子系统:

在足以使受体免疫抗体(如果存在的话)结合供体细胞表面抗原(Ag)的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合以形成免疫抗体-Ag复合物;

将所述混合物与在其表面上包含特异性结合所述免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒接触;和

在裂解条件下添加特异性所述免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体;和

被构造来测定所述样本的结合于所述免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在,以测定供体特异性抗体的存在或不存在的流式细胞仪。

37. 根据权利要求 36 所述的系统,其中所述免疫抗体是同种抗体。

38. 根据权利要求 36 所述的系统,其中所述免疫抗体是自体抗体。

39. 根据权利要求 36-38 中任一项所述的系统,其中所述免疫抗体是补体固定抗体(CFab)。

40. 根据权利要求 36-39 中任一项所述的系统,其中所述可检测地标记的抗体包含附接于抗体或其抗原结合片段的可检测标记。

41. 根据权利要求 36-40 中任一项所述的系统,其中所述可检测标记包括选自由以下组成的组的荧光团:吖啶羧花青(C3)、吖啶羧花青(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红、太平洋蓝、俄勒冈绿 488、Alexa fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、JOE、丽丝胺、罗丹明绿、BODIPY、异硫氰酸荧光素(FITC)、羧基荧光素(FAM)、别藻蓝蛋白(APC)、藻红蛋白(PE)、罗丹明、二氯罗丹明(dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、羧基-X-罗丹明(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen 和 RiboGreen。

42. 根据权利要求 36-41 中任一项所述的方法,其中所述平均珠粒直径为 0.1 至 20 微米。

43. 根据权利要求 36-41 中任一项所述的系统,其中所述平均珠粒直径小于 5 微米。

44. 根据权利要求 36-41 中任一项所述的系统,其中所述平均珠粒直径为 2.5 至 5 微米之间。

45. 根据权利要求 36-44 中任一项所述的系统,其中所述珠粒为琼脂糖珠粒。

46. 根据权利要求 36-44 中任一项所述的系统,其中所述珠粒是胶乳珠粒。

47. 根据权利要求 36-44 中任一项所述的系统,其中所述珠粒是磁性珠粒。

48. 根据权利要求 36-44 中任一项所述的系统,其中所述珠粒是聚苯乙烯珠粒。

49. 根据权利要求 36-48 中任一项所述的系统,其中所述系统被构造来在 12 小时或更短的时间内检测供体特异性抗体的存在或不存在。

50. 根据权利要求 36-48 中任一项所述的系统,其中所述系统被构造来在 8 小时或更短的时间内检测供体特异性抗体的存在或不存在。

51. 一种试剂盒,其包含:

多种在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒;

特异性结合所述免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体;和

用于使用多种珠粒和可检测地标记的抗体测定来自供体的细胞样本和来自受体的生

物样本,以测定供体特异性抗体在所述生物样本中的存在或不存在的说明书。

52. 根据权利要求 51 所述的试剂盒,其中所述可检测地标记的抗体包含附接于抗体或其抗原结合片段的可检测标记。

53. 根据权利要求 51 或 52 所述的试剂盒,其中所述可检测标记包含选自由以下组成的组的荧光团:吖啶羧花青(C3)、吖啶羧花青(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红、太平洋蓝、俄勒冈绿 488、Alexa fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、JOE、丽丝胺、罗丹明绿、BODIPY、异硫氰酸荧光素(FITC)、羧基荧光素(FAM)、别藻蓝蛋白(APC)、藻红蛋白(PE)、罗丹明、二氯罗丹明(dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、羧基-X-罗丹明(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen 和 RiboGreen。

54. 根据权利要求 51-53 中任一项所述的试剂盒,其中所述平均珠粒直径小于 5 微米。

55. 根据权利要求 51-54 中任一项所述的试剂盒,其中所述平均珠粒直径为 2.5 至 5 微米之间。

56. 根据权利要求 51-55 中任一项所述的试剂盒,其中所述珠粒为琼脂糖珠粒。

57. 根据权利要求 51-55 中任一项所述的试剂盒,其中所述珠粒是胶乳珠粒。

58. 根据权利要求 51-55 中任一项所述的试剂盒,其中所述珠粒是磁性珠粒。

59. 根据权利要求 51-55 中任一项所述的试剂盒,其中所述珠粒是聚苯乙烯珠粒。

## 检测供体特异性抗体的方法和用于实施所述方法的系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求对 2013 年 3 月 14 提交的美国临时专利申请系列第 61/782,003 号（其公开内容通过引用整体并入本文）的提交日期的优先权。

[0003] 背景

[0004] 每年世界上进行 100,000 多例实体器官移植,包括每年在美国进行的数万例移植。尽管在免疫抑制和移植后护理方面取得了显著的改善,但长期的移植物功能不太理想。在美国,死亡和活供体的肾移植物的经调整的 10 年异体移植物存活率分别仅为约 40% 和 60%。继发于抗体介导的排斥 (AMR) 的早期和晚期移植失败是低移植物存活率的重要原因。

[0005] 针对人白细胞抗原 (HLA) 的抗体是存在于移植候选者或受体的血液中的循环抗体,其为较早致敏事件 (输血、先前的移植或妊娠) 的结果。移植前存在的供体特异性抗体 (DSA) 可引起超急性排斥和立即移植物失功,并且可通过移植前交叉配血来评估。在最近几年,监测针对供体特异性 HLA-I 类和 II 类错配的临床相关抗体的移植后发生的概念一直是移植界内关注的重要领域。无论在移植前还是移植后检测,当未进行临床治疗时,针对在供体器官上表达的抗原的抗体的存在都导致对移植器官的免疫攻击,并且增加移植物失功和/或排斥的风险。DSA 攻击,除其它以外,异体移植物的内皮,并且可导致随后活组织检查证实的 AMR 以及需要增强的免疫抑制的急性损伤。DSA 发展的进展和相应的临床事件一起损害异体移植物,从而随着时间的推移导致慢性改变,最终削弱移植物功能和存活。

[0006] 抗体介导的排斥可表现为因记忆应答或从头抗原体产生而导致的早期急性过程,或表现为因从头抗体产生而引起的晚期和慢性过程。在急性期中,通常预先形成导致早期急性排斥的抗体,但从头 DSA 也可在早期移植后期间发生,从而导致急性排斥。具有预先形成的 DSA 的患者处于显著更大的患有急性 AMR 的风险中,并且具有显著更低的移植物存活率。

[0007] 慢性排应是移植肾失功能 (death-censored graft loss) 的主要原因之一。同种抗体介导的损伤和修复的反复循环导致异体移植物的微血管系统的显著变化。具有预先形成的 DSA 的患者和从头发发生 DSA 的患者处于增加的患有慢性排斥的风险中。

[0008] 概述

[0009] 提供了用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。所述方法包括通过在足以使受体免疫抗体 (如果存在的话) 结合供体细胞表面抗原 (Ag) 的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合来形成混合物以形成免疫抗体-Ag 复合物,将所述混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag 复合物 (例如, Ag 或免疫抗原) 的珠粒混合,在裂解条件下添加特异性结合结合于珠粒的免疫抗体-Ag 复合物的可检测地标记的抗体,和检测结合于免疫抗体-Ag 复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在,以测定供体特异性抗体在来自受体的生物样本中的存在或不存在。还提供了用于实施主题方法的系统和试剂盒。

[0010] 附图简述

[0011] 当结合附图阅读时,可根据下列详细描述最好地理解本发明。包括在附图中的是下列图:

[0012] 图 1 示意性举例说明用于据本公开内容的一个实施方案测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。

[0013] 图 2 示意性举例说明用于根据本公开内容的第二实施方案测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。

[0014] 图 3 显示包括同时捕获和标记 DSA 的 DSA-FXM 实验的结果。使用区别在于每一个珠粒的内部荧光 ID 的 HLA-I 类和 II 类珠粒,通过 DSA-FXM 测试 4 个样本。因 HLA 特异性抗体而增强荧光(阳性信号)示于 X 轴上。图 3,图 A:HLA-I 类(C-I)和 II 类(C-II)供体特异性抗体(DSA)呈阴性(CI-/CII-);图 3,图 B:仅 C-II DSA 呈阳性(CI-/CII+);图 3,图 C:仅 C-I DSA 呈阳性(CI+/CII-);和图 3,图 D:CI 和 C-II DSA 都呈阳性(CI+/CII+)。

[0015] 图 4 显示包括相继捕获和标记 DSA 的 DSA-FXM 实验的结果。通过 DSA-FXM 测试阴性 AB 血清(样本 A)和三个阳性血清(样本 B、C 和 D)。样本 A:C-I 和 C-II DSA 呈阴性;样本 B:C-I 和 C-II DSA 呈阳性;样本 C:仅 C-I DSA 呈阳性并且 C-II DSA 呈阴性;样本 D:仅 C-II DSA 呈阳性并且 C-I DSA 呈阴性。

[0016] 图 5 提供 DSA-FXM 实验的结果。通过 FXM、DSA-FXM 和 LMX-IgG 针对不同细胞数目测试以不同稀释度存在的 HLA-Ab 阳性血清(PPS)的混合物。结果显示 DSA-FXM 是用于检测 DSA 的最灵敏的方法并且当与标准方法相比较时使用少得多的细胞(例如可用少至 25,000 个细胞来检测 DSA)。LMX-IgG 在使用单抗原珠粒的 Luminex 平台上确定了 PPS 血清中包含的 HLA 特异性并且显示的值是平均荧光强度(MFI)。大于或等于 1000MFI 的值被认为是阳性的;500-999MFI 的值被认为可能是阳性的(不明确的)。

[0017] 图 6 显示 DSA-FXM 实验的结果。通过 DSA-FXM,同时利用盲攻击和并行地利用定期流式细胞交叉配型(FXM)和在单抗原珠粒上进行的标准 Luminex 抗体筛选(LMX-IgG)来测试 23 个 CAP(美国病理学家学会)外部能力样本。鉴定 HLA-I 类(C-I)和/或 HLA-II(C-II)的供体特异性抗体(DSA),并通过 LMX-IgG 进一步确认大多数 DSA。一些具有低 MCS 的额外 DSA 只能用更灵敏的 DSA-FXM 方法检测到。外部能力样本是具有已知的特异性的血清和细胞。在从所有参与中心接收所有结果之前,血清的特异性对于参与者是未知的。

[0018] 图 7 提供 DSA-FXM 实验的结果。7 个 HLA-DQ DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定,并且已被 DSA-FXM 确认。历史上,一直不可能通过任何类型的牵涉细胞或细胞提取物的 DSA 测定将所有特异性 DSA 检测成 DQ。

[0019] 图 8 显示 DSA-FXM 实验的结果。6 个 HLA-DP DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定,并且已被 DSA-FXM 确认。

[0020] 图 9 提供 DSA-FXM 实验的结果。3 个 HLA-C DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定,并且已被 DSA-FXM 确认。

[0021] 图 10 显示来自 DSA-FXM 测试法的实验性结果。图 A:HLA-I 类(C-I)和 II 类(C-II)供体特异性抗体(DSA)呈阴性(CI-/CII-);图 B:仅 C-I DSA 呈阳性(CI+/CII-);图 C:仅 C-II DSA 呈阳性(CI-/CII+);和图 D:CI 和 C-II DSA 呈阳性(CI+/CII+)。

[0022] 图 11 提供 117 个利用已知的 I 类和 II 类 DSA 反应性或缺乏其的单独的 DSA-FXM 测试的结果,该结果显示与已知的 DSA 特征谱相关的反应性的互斥模型。

[0023] 图 12 显示针对 I 类特异性 DSA(B7) 的 FXM、DSA-FXM 和 LMX-IgG 单抗原珠粒测定的灵敏度比较,该比较显示即使当另两个测试是阴性时,DSA-FXM 亦可检测靶细胞上的特异性 HLA I 类 DSA。

[0024] 图 13 显示针对 II 类特异性 DSA(DR4) 的 FXM、DSA-FXM 和 LMX-IgG 单抗原珠粒测定的灵敏度比较,该比较显示即使当另两个测试是阴性时,DSA-FXM 亦可检测到靶细胞上的特异性 HLA II 类 DSA。

[0025] 图 14 的图 A 和 B 显示针对 95 个 I 类 DSA(图 A) 和 100 个 II 类 DSA(图 B) 的 FXM 比较的 DSA-FXM 与 LMX-IgG SAB 结果之间的皮尔逊相关。图 C 显示使用 IgG DSA 作为标准的针对 I 类和 II 类的灵敏度和特异度百分比。图 D 显示针对 7 个血清样本(6 个个体)的 LMX-IgG SAB、LMX-C1q SAB、FXM 和 DSA-FXM 的比较。与 LMX-SAB 的过度反应性相关的差异。结合图 15,结果显示 LMX-IgG SAB 给出假阳性反应(即,当 FXM 和 DSA-FXM 为阴性时 DSA 呈阳性)。这促成了图 15 中显示的较低的特异度。

[0026] 图 15 显示针对 15 个患者的 FXM 与 DSA-FXM 的比较,所述患者中有 12 个通过 FXM 测定具有未知特异度的针对抗原的自体抗体(下图)。这些患者中有 4 个(P12-P-15)具有针对 HLA 的自体抗体,如通过 DSA-FXM 测定的(上图)。

[0027] 图 16 显示 FXM 与 DSA-FXM 区分因 DSA 种类(I 和 / 或 II) 而引起的阳性反应的能力的比较。DSA-FXM 标题:CI 珠粒检测所有 I 类,CIIa 检测 DQ,CIIb 检测所有 DR 和 DP,但仅检测某些 DQ。显示了 4 个不同类型的结果。1 和 3 类都具有阳性 B 细胞 FXM,但案例 1 归因于 I 类同种抗体,然而案例 3 归因于 II 类同种抗体。案例 2 和 4 都具有阳性 T 和 B FXM,但案例 2 归因于自体抗体,然而案例 4 归因于 I 类同种抗体。

[0028] 图 17 的图 A 显示针对在缓冲液中 1:2 稀释的和在静脉注射免疫球蛋白(IVIG)中 1:2 稀释的血清中的 I 类 DSA 的 DSA-FXM 结果。IVIG 用于对 HLA 脱敏,降低抗体。常规 FXM 显示因第二步骤抗-IgG 试剂和 IVIG 与细胞表面上的未知靶的广泛反应性的存在而导致的 IVIG 处理的样本相较于缓冲液(数据未显示)的增加。DSA-FXM 显示 IVIG 的抑制,因为检测对于 HLA 是特异的。因此,DSA-FXM 显示处理的功效。图 B 显示针对在缓冲液中 1:2 稀释的和在静脉注射免疫球蛋白(IVIG)中 1:2 稀释的血清中的 II 类 DSA 的 DSA-FXM 结果。IVIG 用于对 HLA 脱敏,降低抗体。常规 FXM 显示因第二步骤抗-IgG 试剂和 IVIG 与细胞表面上的未知靶的广泛反应性的存在而导致的 IVIG 处理的样本相较于缓冲液(数据未显示)的增加。DSA-FXM 显示 IVIG 的抑制,因为检测对于 HLA 是特异的。因此,DSA-FXM 显示处理的功效。

[0029] 图 18 的图 A 显示掺有 5% IVIG 并在不同稀释度上通过 DSA-FXM 测试的阳性 DSA 血清的结果。结果显示 IVIG 对 HLA I 类 DSA 具有剂量依赖性抑制。图 B 显示掺有 5% IVIG 并且在不同稀释度上通过 DSA-FXM 测试的阳性 DSA 血清的结果。结果显示 IVIG 对两种 HLA II 类 DSA 具有剂量依赖性抑制。

[0030] 图 19 显示关于来自经历 IVIG 脱敏处理以前瞻性地降低 / 消除鉴定的潜在活供体的 DSA 的肾候选者的系列样本的 FXM 和 DSA-FXM 结果。FXM 结果显示因 IVIG 和 Rituxan(治疗性抗-CD20,B 细胞的标志物)而引起的增加的 MCS 值,而 DSA-FXM 结果在即使在治疗性抗体存在的情况下亦显示在对于移植是可接受的范围内的对 IVIG 和 MCS 值的抑制(功效)。

[0031] 定义

[0032] “供体特异性抗体”或“DSA”意指存在于受体中的特异性结合供体抗原（例如，供体细胞表面抗原）的抗体。DSA 可以是“预先形成的”（例如，在接受来自供体的移植物或输血之前存在于受体中）和 / 或从头产生的 DSA（其由受体响应已怀孕或接受来自一个或多个供体的移植物或输血而产生）。在一些情况下，DSA 可以是结合患者自己细胞的细胞表面组分的自体 DSA（自体抗体）。在某些方面，DSA 是补体结合抗体（CFAb）。在某些方面，DSA 是针对 HLA 抗原的。

[0033] 主题发明的“亲和试剂”具有对靶分析物具有高结合亲和力的分析物结合结构域、部分或组分。高亲和力意指至少约  $10^4\text{M}$ ，通常至少约  $10^6\text{M}$  或更高，例如  $10^9\text{M}$  或更高的结合亲和力。亲和试剂可以是多种不同种类的分子的任一种，只要其当以标记的亲体和配体形式存在时展现对于靶蛋白的必要结合亲和力即可。

[0034] 这样，亲和试剂可以是小分子或大分子配体。小分子配体意指大小范围在约 50 至约 10,000 道尔顿，通常地约 50 至约 5,000 道尔顿，更通常地约 100 至约 1000 道尔顿内的配体。大分子意指大小在分子量上为约 10,000 道尔顿或更大的配体。

[0035] 特别吸引人的是大分子亲和配体是抗体及其结合片段和模拟物。当抗体是亲和配体时，它们可来源于多克隆组合物，以使相异在于特异性的抗体的异源群体各自被相同标签标记。这样，亲和配体可以是单克隆、寡克隆和 / 或多克隆抗体。亲和配体可以是抗原结合片段或模拟物，其中这些片段和模拟物具有对于靶蛋白的必要结合亲和力。例如，抗体片段诸如 Fv、(Fab')<sub>2</sub> 和 Fab 可通过裂解（例如利用蛋白酶或化学裂解）完整抗体来制备。还吸引人的是重组产生的抗体片段，诸如单链抗体或 scFv，其中此类重组产生的抗体片段保持上述抗体的结合特征。此类重组产生的抗体片段通常包括主题抗体的至少 VH 和 VL 结构域，只要保持所述主题抗体的结合特征即可。主题发明的这些重组产生的抗体片段或模拟物可使用任何方便的方法，诸如美国专利第 5,851,829 和 5,965,371（所述美国专利的公开内容通过引用并入本文）中描述的方法来容易地制备。

[0036] 上述抗体或其片段和模拟物可获自商业来源和 / 或使用方法的技术来制备，其中产生多克隆抗体、寡克隆抗体、单克隆抗体、其片段和模拟物，包括其重组衍生物的方法对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0037] “表位”意指特定 B 细胞和 / 或 T 细胞对其作出应答的抗原上的部位。该术语还可与“抗原决定簇”或“抗原决定部位”互换使用。表位可在对于表位是独特的空间构象中包含 1 个或多个氨基酸，诸如 3 个或更多个氨基酸。表位可包含 1-10 个氨基酸，诸如 1-5 个氨基酸，例如 1、2、3、4 或 5 个氨基酸。测定氨基酸的空间构象的方法在本领域中是已知的，并且包括例如，X 射线衍射晶体分析法和二维核磁共振。此外，给定的蛋白质中的表位的鉴定可使用本领域中公知的方法来容易地实现。参见，例如，Geysen 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:3998-4002（快速合成肽以测定给定抗原中的免疫原性表位的益的一般方法）；美国专利第 4,708,871 号（用于鉴定和化合合成抗原的表位的方法）；和 Geysen 等，Molecular Immunology (1986) 23:709-715（用于鉴定具有对于给定抗体的高亲和力的肽的技术）。可在显示一种抗体阻断另一种抗体对靶抗原的结合的能力的简单免疫测定中鉴定识别相同表位的抗体。

[0038] “特异性地结合”或“特异性结合”意指抗体对特定抗原或表位的高亲合力和 / 或高亲和力结合。结合其特定抗原上的表位的抗体具有比相同抗体对不同表位（特别地可存

在于与相同样本结合的或相同样本中的分子（作为特定目标抗原）中的不同表位）的结合更大的亲合力和 / 或亲和力。然而，补体结合抗体可对不同目标抗原上的各种表位具有相同或相似的亲合力和 / 或亲和力。这样，“特异性地结合”或“特异性结合”无意将给定的补体固定抗体从对不止一种目标抗原的结合排除。特异性结合目标多肽的抗体能够以微弱但仍可检测的水平（例如，10%或更少的显示的对目标多肽的结合）结合其它多肽。此类微弱的结合或本底结合可以例如通过使用适当的对照来容易地与特异性抗体对目标多肽的结合区别。

[0039] “可检测地标记的”抗体意指具有附接的可检测标记的抗体，其中所述抗体能够特异性结合另一种分子，例如另一种抗体（诸如 IgG 抗体）。所述可检测地标记的抗体保持结合特异性。所述可检测标记可通过化学缀合来附接，或当标记是多肽时，其可通过基因工程技术来附接。用于产生可检测地标记的抗体的方法在本领域中是公知的。可检测标记可选自本领域中已知的多种此类标记，包括放射性同位素、发色团、荧光团、荧光染料、酶（例如，辣根过氧化物酶）、接头分子或其中或者发出可检测信号（例如，放射性、荧光、颜色）或在将标记曝光于其底物后发射可检测信号的其它部分或化合物。各种可检测标记 / 底物对（例如，辣根过氧化物酶 / 二氨基联苯胺、生物素 / 链霉抗生物素蛋白、荧光素酶 / 荧光素）、用于标记抗体的方法以及使用标记的二抗检测抗原的方法在本领域中是公知的。参见，例如，Harlow 和 Lane, 编辑 (Using Antibodies :A Laboratory Manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)。

[0040] “分离的”意指存在于与化合物天然存在于其中的环境不同的环境中的目标化合物。“分离的”意指包括存在于样本内的针对目标化合物充分富集的和 / 或其中目标化合物被部分或充分纯化的化合物。术语“分离的”包括其中化合物无至少一些其通常在其天然状态与之结合的材料伴随的情况。例如，关于多肽，术语“分离的”通常指完全或部分缺乏在自然界中通常与其结合的序列的氨基酸分子；或如其在自然中存在的一样，但具有与其连接的异源序列的序列。

[0041] 如本文中所示，“纯化的”意指引述的材料包含按重量计至少约 75% 的总蛋白，至少约 80% 是优选的，至少约 90% 是特别优选的。如本文中所示，术语“基本上纯的”是指从其天然环境取出的并且至少 60% 不含，优选 75% 不含，最优选 90% 不含在自然界中与其结合的其它组分的化合物。

[0042] 如本文中所示，“来自受体的生物样本”是指从受体分离的组织或液体的样本，所述样本在本发明的说明书中通常是指可含有供体特异性抗体的样本，在任选的处理后，可在体外测定中分析所述样本。目标样本包括，但不限于，血液、血浆、血清、血细胞、尿、唾液、活检组织和粘液。样本还包括体外细胞培养成分的样本，包括但不限于因细胞和组织在培养基中的生长而产生的条件培养基，例如，重组细胞和细胞组分。

[0043] “人白细胞抗原”或“HLA”意指主要组织相容性复合物 (MHC) 内的基因，其横跨染色体 6 的短臂上约 350 万个碱基对。MHC 被分成含有 I 类、II 类和 III 类基因的 3 个单独区域。在人中，I 类 HLA 复合物长度为约 2000kb 并且含有约 20 个基因座。在 I 类区域中，存在编码命名为 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 的良好表征的 I 类 MHC 分子的基因。另外，存在由 HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-H、HLA-J、HLA-X 和 MIC 基因座编码的非经典 I 类基因。II 类区域含有由 HLA-DRB1、3、4、5、HLA-DQA、HLA-DQB 和 HLA-DPA、HLA-DPB 基因座编码的 6 个基因

家族。这些基因编码命名为 HLA-DRB1、3、4、5、DQ 和 DP 的经典的 II 类 MHC 分子的  $\alpha$  和  $\beta$  链。在人中,已在 II 类中鉴定了由 DM、DN 和 DO 基因座编码的非经典基因。III 类区域含有超过 36 个与免疫应答相关的基因座的异源集合。

[0044] 术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”和“测定”可互换使用并且包括定量和定性测定。

[0045] 术语“固体基底”是指其中可将抗原和 / 或抗体固定在其上的固体支持物。示例性固体基底包括多孔板、膜,包括硝酸纤维素膜和聚乙烯膜、细胞和细胞膜、珠粒、微粒、微球体、微珠等。本发明的方法可利用微粒、微球体、微珠或任何材料例如二氧化硅、金、胶乳、聚合物诸如聚苯乙烯、聚砜、聚乙基或水凝胶的珠粒来进行。另外,微粒、微球体、珠粒或微珠可具有磁性。

[0046] 术语“补体固定抗体”是指特异性结合抗原或病原体并且起始免疫系统的补体级联的抗体,所述补体级联提供具有抗原的靶(例如,细胞)或病原体从生物体的清除。一般地,补体固定抗体是被补体因子补体因子 C1q、补体因子 C3 经由替代途径等识别和特异性结合的 IgM 或 IgG 抗体。

[0047] 进一步指出的是,权利要求可被撰写来排除可以是任选的任何元素。因此,该陈述意欲用作与权利要求要素的描述联合使用此类排他性术语如“唯一地”、“仅仅”等或使用“否定”限制的在先基础。

[0048] 详述

[0049] 提供了用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。所述方法包括通过在足以使受体免疫抗体(如果存在的话)结合供体细胞表面抗原(Ag)的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合来形成混合物以形成免疫抗体-Ag 复合物,将所述混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag 复合物(例如,Ag 或免疫抗原)的珠粒接触,在裂解条件下添加特异性结合结合于珠粒的免疫抗体-Ag 复合物的可检测地标记的抗体,和检测结合于免疫抗体-Ag 复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在,以测定供体特异性抗体在来自受体的生物样本中的存在或不存在。还提供了用于实施主题方法的系统和试剂盒。

[0050] 在更详细地描述本发明之前,应理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,因此当然可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅为了描述特定实施方案的目的,并且无意是限定性的,因为本发明的范围将仅由所附权利要求限制。

[0051] 当提供值的范围时,应理解,该范围的上限和下限之间的每一个居间数值(至下限单位的十分之一,除非本文另外清楚地规定)也被明确地公开。规定的范围内的任何规定的值或居间值与该规定的范围中的任何其它所述值或居间值之间的每一个较小的范围包括在本发明中。这些较小范围的上下限可独立地被包括在所述范围中或不包含在所述范围中,并且其中任一个限值、两个限值中没有一个限值或两个限值都包括在较小范围内的每一个范围也包含在本发明内,服从于所述范围内的任何特别排除的限值。在该规定的范围包括该限值的一者或两者的情况下,排除所包含的限制中的一个或两个的范围也包括在本发明内。

[0052] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与如由本发明所属的领域中的普通技术人员通常理解的含量义相同的含义。尽管在实施或测试本发明中能使用

与本文描述的那些方法和材料相似或相等的任何方法和材料，但是现在描述一些潜在的和示例性方法和材料。本文中提及的任何和所有出版物通过引用并入本文以公开和描述与出版物结合引用的方法和 / 或材料。应理解，本公开内容替代并入的出版物的任何公开内容，直至存在矛盾为止。

[0053] 必须指出的是，如本文中中和所附权利要求中所用，除非另外明确规定，否则单数形式“一个 (a)”、“一种 (an)”和“该 (the)”包括复数参照物。因此，例如，“电极”包括多种此类电极，并且“信号”包括参考一个或多个信号等。

[0054] 还要指出的是，权利要求可被撰定来排除可以是任选的任何元素。因此，该陈述意欲用作与权利要求要素的描述联合使用此类排他性术语如“唯一地”、“仅仅”等或使用“否定”限制的在先基础。

[0055] 本文中所述论的出版物仅针对它们在本申请提交日之前的公开内容而提供。此处的任何信息都不应解释为承认本发明不能因为是在先发明而先于这些出版物。另外，所提供的公开日可能不同于实际的公开日，这可能需要独立地进行确认。在这类出版物可能规定与本公开内容的明确或暗含的定义发生冲突的术语的定义的情况下，以本公开内容为准。

[0056] 如在阅读本公开内容后对于本领域普通技术人员是很显然的，本文中描述的和举例说明的单个实施方案的每一个具有可容易地与其它几个实施方案的任一个的特征分开或组合的分立的组分和特征而不背离本发明的范围或精神。可以以所引用事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行任何引用的方法。

#### [0057] 方法

[0058] 如上所概述的，本发明的方面包括用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。所述方法包括通过在足以使受体免疫抗体（如果存在的话）结合供体细胞表面抗原 (Ag) 的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合来形成混合物以形成免疫抗体 -Ag 复合物，将所述混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体 -Ag 复合物（例如，Ag 或免疫抗原）的珠粒接触，在裂解条件下添加特异性结合结合于珠粒的免疫抗体 -Ag 复合物的可检测地标记的抗体，和检测结合于免疫抗体 -Ag 复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在，以测定供体特异性抗体在来自受体的生物样本中的存在或不存在。所述方法的各个步骤和方面现将在下文中进行更详细描述。

[0059] “供体”意指细胞样本的来源（例如，人来源）。供体可与受体不同（例如，当 DSA 可以是同种抗体时），或供体与受体可以相同（例如，当 DSA 可以是自体抗体时）。在某些方面，供体可以是向有此需要的受体捐赠细胞（例如，血细胞）、组织（例如，角膜、皮肤、骨、心脏瓣膜、腱、股骨和 / 或隐静脉、淋巴结、脾等）、器官（例如，肾、心脏、肝、胰腺、肺、肠等）及其任意组合的候选者。目标供体包括人供体、非人灵长类动物供体、哺乳动物供体（例如，猪）、非哺乳动物供体和任何其它目标供体类型。

[0060] 如本文中所述，来自供体的“细胞样本”是获自供体的包括至少一个细胞的样本。所述至少一个细胞可以是有核细胞（例如，淋巴细胞或外周血单核细胞 (PBMC)）或缺乏细胞核的细胞（例如，红细胞或血小板）。在某些方面，所述细胞样本是获自供体的的样本，其包括选自淋巴细胞（例如，T 细胞和 / 或 B 细胞）、PBMC、红细胞、血小板及其任意组合的细胞。根据某些实施方案，来自供体的细胞样本来自供体的组织（例如，淋巴结、脾、角膜、皮

肤、骨、心脏瓣膜、腱、股骨和 / 或隐静脉等), 来自供体的器官 (例如, 肾、心脏、胰腺、肺、肝、肠、眼等), 或此类组织和 / 或器官的任意组合。可在用于本公开内容的方法之前将所述细胞样本经历纯化过程。例如, 所述细胞样本可以是基本上纯的淋巴细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、红细胞和 / 或血小板的样本, 所述样本不含可干扰主题方法的混合、接触和 / 或检测步骤的组分的。在某些方面, 所述方法包括从供体获得细胞样本。

[0061] 根据某些实施方案, 来自供体的细胞样本包括  $0.001 \times 10^6$  至  $2.0 \times 10^6$  个细胞。在某些方面, 来自供体的细胞样本包括  $1 \times 10^6$  个或更少的细胞, 诸如  $0.5 \times 10^6$  个或更少的细胞,  $0.4 \times 10^6$  个或更少的细胞,  $0.3 \times 10^6$  个或更少的细胞,  $0.2 \times 10^6$  个或更少的细胞,  $0.1 \times 10^6$  个或更少的细胞, 或  $0.5 \times 10^5$  个或更少的细胞。在某些方面, 来自供体的细胞样本包括 25,000 至 200,000 个细胞。

[0062] “受体”意指生物样本的来源。受试者可与供体不同 (例如, 在 DSA 可以是同种抗体的情况下), 或受体与供体可以相同 (例如, 在 DSA 可以是自体抗体的情况下)。在某些方面, 受体 (例如, 人受体) 可以是接受来自受体的细胞 (例如, 血细胞)、组织 (例如, 角膜、皮肤、骨、心脏瓣膜、腱、股骨和 / 或隐静脉等)、器官 (例如, 肾、心脏、胰腺、肺、肝、肠、眼等) 或其任意组合 (例如, 以改善医疗病况) 的候选者, 或可能已接受来自供体的细胞、组织或器官。目标受体包括人受体、非人灵长类动物受体、哺乳动物受体、非哺乳动物受体和任何其它目标受体类型。

[0063] 来自受体的“生物样本”可以是来自受体的包括或可包括供体特异性抗体 (DSA) 的任何生物样本。根据某些实施方案, 来自受体的生物样本选自血清、血浆、血液、唾液、组织及其任意组合。在某些方面, 所述生物样本是  $100 \mu\text{L}$  或更少的自血清、血浆、血液、唾液及其任意组合, 诸如  $90 \mu\text{L}$  或更少、 $80 \mu\text{L}$  或更少、 $70 \mu\text{L}$  或更少、 $60 \mu\text{L}$  或更少、 $50 \mu\text{L}$  或更少、 $40 \mu\text{L}$  或更少、 $30 \mu\text{L}$  或更少、 $20 \mu\text{L}$  或更少、或  $10 \mu\text{L}$  或更少的血清、血浆、血液、唾液及其任意组合。根据一个实施方案, 来自受体的生物样本是  $30 \mu\text{L}$  或更少的血清、血浆、血液、唾液及其任意组合。在某些方面, 主题方法包括从受体获得生物样本。

[0064] 通过将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本混合来形成混合物在足以使受体免疫抗体 (例如, DSA) (如果存在的话) 结合供体细胞表面抗原 (Ag) 以形成免疫抗体-Ag 复合物的条件下发生。根据某些实施方案, 所述受体免疫抗体是同种抗体。在其它方面, 所述受体免疫抗体是自体抗体。足以使受体免疫抗体 (例如, DSA) (如果存在的话) 结合供体细胞表面抗原 (Ag) 的条件可通过选择适当的缓冲液 (例如, PBS、TBS 等)、去垢剂 (例如, Tween)、蛋白质 (例如, BSA)、pH、温度、持续时间等来提供。用于允许抗体对它们的靶抗原的特异性结合的条件描述于例如 Coligan, 等, 编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY(1994-2013) 中。在某些方面, 将来自供体的细胞样本 (例如,  $0.2 \times 10^6$  个细胞) 和来自受体的生物样本 (例如,  $50 \mu\text{L}$  来自受体的血清) 在室温下在适当的缓冲液中孵育约 20 分钟, 以允许受体免疫抗体结合供体细胞表面抗原。在某些方面, 在室温下进行混合、接触和 / 或检测步骤。

[0065] 在某些方面, 所述供体特异性抗体是实际的供体特异性抗体。

[0066] 根据某些实施方案, 所述供体细胞表面抗原是 HLA 抗原, 以使所述供体特异性抗体是抗-HLA 抗体。在某些方面, 所述供体特异性抗体是抗-HLA I 类和 / 或抗-HLA II 类抗体。根据某些实施方案, 所述供体特异性抗体结合选自 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、

HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DPA 和 HLA-DPB 的供体细胞表面抗原。

[0067] 所述供体特异性抗体（如果存在的话）可以是补体结合抗体（CFAb）。在某些方面，本发明的方法不仅包括测定供体特异性抗体在生物样本中的存在和 / 或不存在，而且还包括确定 DSA 是 CFAb 还是非 -CFAb。可以例如使用特异性结合 CFAb（和 / 或非 -CFAb）的直接或间接标记的结合剂来将 DSA 鉴定为 CFAb。根据某些实施方案，所述结合剂是分离的补体成分 C1q。可用可与复合物中的任何其它荧光标记相区别的荧光标记来直接或间接标记 C1q。在某些方面，将分离的 C1q 缀合于生物素（“Bio-C1q”），并且可通过添加荧光标记的链霉抗生物素蛋白（例如，缀合有 R-藻红蛋白的链霉抗生物素蛋白（SA-PE））来检测所述 C1q。根据上述实施方案中，如果 DSA 是补体固定抗体，则 C1q 蛋白结合 Ag-Ab DSA，并且可在所述方法的下游检测步骤（例如，在流式细胞仪中）过程中在复合物（与结合于 DSA 的差别地可检测地标记的抗体一起）中检测到直接或间接标记的 C1q，这表明所述 DSA 是 CFAb。

[0068] 在形成混合物后，将所述混合物与包含特异性结合抗体 -Ag 复合物的供体细胞表面抗原（例如，HLA 抗原）的抗体的珠粒接触。取决于目标供体细胞表面抗原，此类珠粒可以是商购可得的。另外，可使用本领域中已知的缀合策略将期望类型的珠粒（例如，琼脂糖、胶乳、聚苯乙烯、磁性或其它类型的珠粒）缀合于结合目标抗原的抗体。参见，例如，G. T. Hermanson, “Bioconjugate Techniques” Academic Press, 第 2 版, 2008。此外，包括用于将目标抗体缀合于珠粒的试剂和说明书的试剂盒是商购可得的（例如，Dynabeads® 抗体偶联试剂盒（Life Technologies, Carlsbad, CA））。所述珠粒可以是具有 0.1 至 20 微米，诸如 0.5 至 10 微米，例如，5 微米或更小（例如，2.5 至 5 微米）的平均珠粒直径的微珠。通常在足以使珠粒上包含的抗体特异性结合已与受体免疫抗体（例如，DSA）结合的供体细胞表面抗原（例如，HLA 抗原）的条件下进行所述接触。提供此类条件可包括选择适当的缓冲剂（例如，PBS、TBS 等）、去后剂（例如，Tween）、蛋白质（例如，BSA）、pH、温度、持续时间等。用于允许抗体对它们的靶抗原特异性结合的条件描述于例如 Coligan, 等, 编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2013) 中。任选地，在混合与接触步骤之间洗涤所述混合物。

[0069] 所述接触步骤导致免疫抗体 -Ag 复合物，其包括被受体免疫抗体（例如，DSA）（例如存在的话）；和存在于珠粒上的抗体结合的供体细胞表面抗原。细胞样本的供体细胞也通过保留在供体细胞表面上的复合物的供体细胞表面抗原与该复合物结合。在接触步骤后，在裂解条件下添加特异性结合所述复合物（例如，复合物的受体免疫抗体（例如，DSA））的可检测地标记的抗体。任选地，在接触步骤与在裂解条件下添加可检测地标记的抗体之间进行一个或多个洗涤步骤。所述裂解条件足以裂解与复合物结合的细胞，从而将复合物从供体细胞释放，从而有助于复合物的下游分析（例如，通过流式细胞术）。在某些方面，所述裂解条件包括施用包含示踪剂、去垢剂、蛋白酶抑制剂和 BSA 的裂解缓冲液。

[0070] 所述可检测地标记的抗体和裂解条件可通过在接触步骤后向混合物中添加“裂解混合物”来提供，其中所述裂解混合物在裂解缓冲液中包含可检测地标记的抗体。可使用任何适当的裂解缓冲液，其可包括 Tris-HCl、EDTA、EGTA、SDS、脱氧胆酸盐、Triton X、NP-40 的一种或多种和 / 或任何其它所需的裂解缓冲液组分。所述裂解缓冲液使免疫抗体 -Ag 复

合物保持完整。根据本公开内容的某些方面裂解缓冲液是非变性的。所述免疫抗体-Ag 复合物现包括结合于供体细胞表面抗原的珠粒结合的抗体、结合于供体细胞表面抗原的受体免疫抗体（例如，DSA）（如果存在的话）和结合于受体免疫抗体（例如，DSA）（如果存在的话）的可检测地标记的抗体。可测量来自复合物的可检测地标记的抗体的可检测信号，所述信号与来自受体的生物样本中的受体免疫抗体（例如，DSA）的量成比例相关。

[0071] 如上所示，本公开内容的方法包括检测（例如，定量检测）结合于免疫抗体-Ag 复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在，以测定供体特异性抗体在来自受体的生物样本中的存在或不存在。所使用的检测策略可根据存在于可检测地标记的抗体上的可检测标记的类型而变化。用于实施主题方法的可检测标记包括，但不限于，荧光团、生色团、酶、接头分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

[0072] 根据某些实施方案，所述可检测地标记的抗体被荧光标记，并且包括选自吖啶羧花青 (C3)、吖啶羧花青 (C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红、太平洋蓝、俄勒冈绿 488、Alexa fluor-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、JOE、丽丝胺、罗丹明绿、BODIPY、异硫氰酸荧光素 (FITC)、羧基荧光素 (FAM)、别藻蓝蛋白 (APC)、藻红蛋白 (PE)、罗丹明、二氯罗丹明 (dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明 (TAMRA)、羧基-X-罗丹明 (ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen 和 RiboGreen 的荧光团。

[0073] 当可检测地标记的抗体被荧光标记时，所述检测可包括检测一个或多个荧光发射。荧光发射可以任何有用的形式来检测。在某些方面，所述检测包括将免疫抗体-Ag 复合物（其包括珠粒）流过流式细胞仪。

[0074] 当所述检测包括将受体免疫抗体-Ag 复合物流过流式细胞仪时，根据需要，将所述流式细胞仪构造来通过将复合物暴露于激发光，随后在一个或多个检测通道中测量每一个复合物的荧光来检测和独特地鉴定复合物。激发光可来自一个或多个光源，并且可以是窄频或宽频的。激发光源的实例包括激光、发光二极管和弧光灯。用于鉴定复合物的检测通道中发射的荧光可在利用单光源激发后测量，或可在用不同的光源激发后单独地测量。在某些方面，将混合物从其流过的流式细胞仪包括荧光激发和检测能力，以使可检测地标记的抗体的荧光标记和与复合物的其它组分结合的任何其它任选的荧光标记各自是可检测的，并且在通过流式细胞仪查询复合物后是可辨别的。

[0075] 流式细胞仪还包括数据获取、分析和记录工具，诸如计算机，其中多数据通道记录来自每一个检测器的由每一个复合物，当其通过传感区时，发射的光散射和荧光的数据。分析系统的目的是分类和计数复合物，其中每一个复合物本身表示为一组数据化参数值。可将流式细胞仪在所选择的参数上设置至触发值。“触发值”是指用于检测参数的预设阈值。其通常用作用于检测复合物通过激光束的工具。超过所选择的参数的阈值的事件的检测触发复合物的光散射和荧光数据的获得。未获得引起低于阈值的反应的被测定的复合物或介质中的其它组分的数据。触发参数可以是由复合物通过光束引起的前向光散射的检测。流式细胞仪随后检测和收集复合物的光散射和荧光数据。

[0076] 如上所述，复合物的流式细胞术分析产生关于复合物的定性和定量信息。当需要时，上述分析产生混合物中的目标复合物的计数。因此，流式细胞术分析提供了关于一个或

多个不同类型的复合物在混合物中的数量。

[0077] 可以任何方便的时间量同时进行混合、接触和检测步骤。根据某些实施方案,在 12 小时或更短,诸如 11 小时或更短,10 小时或更短,9 小时或更短,8 小时或更短,7 小时或更短,6 小时或更短,5 小时或更短,4 小时或更短,3 小时或更短,2 小时或更短的时间内进行本公开内容的方法。

[0078] 根据某些实施方案,本公开内容的方法包括生成表明供体特异性抗体是否存在于来自受体的生物样本中的报告。如果 DSA 存在,则所述报告可包括关于来自受体的生物样本中的 DSA 的量的信息。报告可通过计算机生成,在该情况下任选地将报导显示于计算机的远程输出设备。

[0079] 在某些实施方案中,本公开内容的方法用于检测结合存在于来自供体的细胞样本中的细胞上的供体 HLA 抗原(例如,HLA I 类和 / 或 HLA II 类抗原)的 DSA。根据一个实施方案中,通过将包括含有 HLA 抗原的供体细胞的细胞样本与来自受体的血清或血浆接触(以使能够特异性结合供体 HLA 的任何 DSA 可结合于供体 HLA)来形成混合物。可在接触步骤之前,洗涤所得的含有 DSA-HLA 复合物的混合物 1 次或多次(例如,3 次)。根据该实施方案中,接触步骤包括添加涂覆有抗-HLA 抗体的微珠,以使附接于珠粒的抗-HLA 抗体结合于供体细胞表面上的供体 HLA I 类和 / 或 II 类分子的恒定区。可洗涤现包括结合于供体 HLA 抗原的捕获珠粒的所得复合物 1 次或多次(例如,3 次),随后继续进行所述方法。根据该实施方案,在裂解条件下添加荧光标记的抗-IgG 抗体(例如,PE-抗-IgG 抗体),以使抗-IgG 抗体结合复合物的 DSA。供体细胞的裂解有利于复合物与存在于复合物中的其它材料分离。随后,可检测来自荧光标记的抗-IgG 抗体的荧光,任选地定量所述荧光,以测定 DSA 在结合供体 HLA 的受体血清或血浆中的存在(和任选地量 / 浓度)或不存在。在某些方面,所述方法用于查询受体血清 / 血浆的 DSA 的存在或不存在,所述 DSA 结合 HLA I 类和 / 或 II 类例如 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DPA 和 HLA-DPB。

[0080] 根据本公开内容的实施方案的方法在图 1 中进行了示意性举例说明。根据该实施方案,通过流式细胞仪或 Luminex 器检测免疫抗体-Ag 复合物。在反应中,将供体细胞与受体血清组合。供体特异性抗体(DSA)(如果存在的话)特异性结合供体细胞上的抗原(Ag)以形成 DSA-Ag 复合物。在裂解条件下,通过缀合有针对与 DSA-Ag 复合物中相同的 Ag 的抗体的珠粒特异性捕获 DSA-Ag 复合物。利用荧光标记的第二抗体,通过流式细胞仪或 Luminex 器检测捕获的 DSA-Ag。

[0081] 根据本公开内容的第二实施方案的方法在图 2 中进行了示意性举例说明。根据该实施方案,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来检测免疫抗体-Ag 复合物。在反应中,将供体细胞与受体血清组合。供体特异性抗体(DSA)(如果存在的话)特异性结合供体细胞上的抗原(Ag)以形成 DSA-Ag 复合物。在细胞裂解后,DSA-Ag 复合物通过针对与 DSA-Ag 复合物中相同的 Ag 的抗体被特异性捕获在基底上。连接有第二抗-IgG 抗体的酶结合 DSA,并且在酶与底物反应时 DSA 是可检测的。本公开内容还提供了该方法的变型(例如,发光测定)。

[0082] 系统

[0083] 还提供了用于进行本公开内容的方法的系统。本公开内容的系统包括样本流体系统,其包括处理器和可操作地连接于处理器的在其上具有存储的编制程序的计算机可读

介质。当通过处理器执行时,所述存储的编制程序使处理器按程序,通过在足以使受体免疫抗体(如果有的话)结合供体细胞表面抗原(Ag)的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本组合来形成混合物以形成免疫抗体-Ag复合物。当通过处理器执行时,所述存储的编制程序还使处理器按照程序,将混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒接触,和在裂解条件下添加特异性结合免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体。主题系统还包括被构造来测定样本的结合于免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在,以测定供体特异性抗体的存在或不存在。在某些方面,将流式细胞仪以流控方式偶联于样本流体子系统。

[0084] 处理器可以是用于报告存储的编制程序的任何适当的处理器。根据某些实施方案,处理器按程序在子系统将混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒接触之前,使样本流体子系统洗涤混合物。可选地,或另外地,处理器可按程序在子系统将混合物与包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒接触之后,但在流式细胞仪测定样本的结合于复合物的可检测的标记的存在或不存在之前,使样本流体子系统洗涤混合物。

[0085] 计算机可读介质可以是计算机可读信号介质或计算机可读存储介质。计算机可读存储介质可以是,例如,但不限于电子、磁性、光学、电磁、红外线或半导体系统、装置或设备,或上述的任何适当组合。计算机可读存储介质的更具体实例(非穷举列表)可包括下列实例:具有一个或多个导线电连接、便携式计算机磁盘、硬盘、随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、可擦除可编程只读存储器(EPRM或闪存)、光纤、便携式光盘只读存储器(CD-ROM)、光存储设备、磁存储设备或上述的任何适当的组合。计算机可读存储介质可以是任何有形介质,所述介质可含有或存储由本公开内容的系统的样本流体子系统使用的或与所述样本流体子系统结合使用的程序。

[0086] 来自供体的细胞样本、供体细胞表面抗原、来自受体的生物样本、受体免疫抗体(例如,抗-HLA DSA)、在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒、可检测地标记的抗体、缓冲液、结合和裂解条件以及流式细胞仪可以是如上文中针对本公开内容的方法所描述的。

[0087] 本公开内容的系统可被构造来在方便的时间量中检测 DSA 的存在或不存在。根据某些实施方案,主题系统被构造来在 12 小时或更短,诸如 11 小时或更短,10 小时或更短,9 小时或更短,8 小时或更短,7 小时或更短,6 小时或更短,5 小时或更短,4 小时或更短,3 小时或更短,2 小时或更短的时间内检测 DSA 在受体的生物样本中的存在或不存在。

#### [0088] 试剂盒

[0089] 还提供了包括用于进行本公开内容的方法的一种或多种试剂的试剂盒。根据一个实施方案,提供了试剂盒,其包括多种在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的抗体的珠粒、特异性地结合免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体,和使用多种珠粒和可检测地标记的抗体测定来自供体的细胞样本和来自受体的生物样本以测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的说明书。主题试剂盒还可包括其它有用的组分,诸如裂解缓冲液、对照血清或血浆、对照细胞样本等。在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物的珠粒和特异性结合免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体可以是如上文中针对本公开内容的方法所描述的。

[0090] 可在单独的管中提供包含在主题试剂盒中的试剂,或者可在单个管中提供两种或更多种试剂。根据一个实施方案,在单独的管中提供珠粒和可检测地标记的抗体。在某些方面,在裂解缓冲液中提供可检测地标记的抗体。

[0091] 根据一个实施方案,在计算机可读介质上提供包含在主题试剂盒中的指令,所述指令,当由处理器执行时,使处理器按程序测定来自供体的细胞样本和来自受体的生物样本以测定 DSA 在生物样本中的存在或不存在。

#### [0092] 效用

[0093] 主题方法、系统和试剂盒用于其中期望检测受体的生物样本中的供体特异性抗体的任何应用。目标受体包括,但不限于,有此需要的或已接受来自器官或组织供体的器官(例如,肾、肝、心脏等)或组织植物物的人受体。目标应用包括基于检测和/或定量受体的生物样本中的 DSA 的水平移植后风险评估和/或稀释后监测。

[0094] 本公开内容的方法区分与供体细胞反应的抗体和与供体细胞上的 HLA 分子反应的抗体。先前的流式交叉配型技术是有缺陷的,因为它们不能进行该重要的区分,其中阳性流式交叉配型结果可能与抗体与 HLA 的相互作用完全无关。

[0095] 主题方法提供可被广泛用于开发许多不同的 DSA 测定的平台。来自受体的任何类型的生物样本和任何目标靶细胞可用于确定 DSA 存在还是不存在。与现有方法相比较,所述主题方法允许受体抗体以它们的无任何修饰的天然构型和以高检测特异度和高通量结合供体抗原。此外,所述方法可在比现有 DSA 检测法更少的时间内完成,并且需要更少的供体细胞。由与目标靶抗原无关的抗体引起的本底信号通过包括结合于目标抗原的 DSA 的复合物的特异性抗体介导的固相捕获来消除。

## 实施例

[0096] 如可从上文提供的公开内容理解的,本公开内容具有广泛的应用。因此,提出下列实施例以为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明的完整公开内容和描述,所述实施例无意限定被当作本发明的内容的范围,也不旨在表示下文的实验是所执行的全部或唯一实验。然而,本领域普通技术人员将容易认识到可被改变或修改以产生基本上相似的结果的多个非关键参数。已经做出努力以确保关于数字(例如量、温度等)的正确性,但是应该占有一些错误和偏差。

#### [0097] 实施例 1 :DSA-FM 测试法

[0098] 下列方法可用于实施主题方法的一个实施方案(称为供体特异性抗体流式细胞交叉配型(“DSA-FXM”)。本示例性方法包括同时捕获和标记,并且可以 2 小时或更短时间内完成。

[0099] 首先,制备排列待测试的 FXM 样本的 96 孔布局格式。第二,按照板布局将  $0.2 \times 10^6$  (在体积上少于  $250 \mu\text{l}$ ) 供体细胞分配在 96 孔板中的所有预先选定的孔中。以  $2,000 \times g$  离心 3 分钟。轻叩板并在翻转板之前在叠纸塔上印迹 2 次。通过轻轻涡旋重悬浮细胞。按照板布局向预先选定的孔中添加  $50 \mu\text{l}$ /孔的每一种血清。轻轻涡旋板并在室温培养箱 ( $22^\circ\text{C}$ ) 中孵育 20 分钟。在孵育过程中制备裂解缓冲液(对于每一个孔,PE-抗-hIgG 和裂解缓冲液于  $23 \mu\text{l}$  的总体积中)。孵育后,向每一个孔中添加  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA,并如先前一样旋转板。轻叩板并在翻转板之前在叠纸塔上印迹 2 次。重复洗涤步骤另外 2 次,

每一次洗涤通过添加 250  $\mu$ l 的 3% HBSA 来进行。

[0100] 在最后一次洗涤（第 3 次洗涤）时向每一个孔添加 5  $\mu$ l 捕获珠粒混合物，如先前一样使用 250  $\mu$ l 的 3% HBSA 再次洗涤。向每一个孔添加 23  $\mu$ l 裂解混合物（细胞裂解缓冲液和荧光抗体）并轻轻涡旋板。用一张箔覆盖板，通过轻轻振荡在黑暗中孵育板 30 分钟。如下在孵育过程中制备 DSA-FXM 洗涤缓冲液：制备 10ml DSA-FXM 洗涤缓冲液，向 9.5ml 1X TBS 洗涤缓冲液添加 0.5ml 去垢剂，通过将管颠倒 5 次进行混合。

[0101] 通过向每一个孔添加 250  $\mu$ l DSA-FXM 洗涤缓冲液洗涤 2 次，如先前一样进行洗涤。添加 250  $\mu$ l DSA-FXM 洗涤缓冲液并如先前一样洗涤。将珠粒重悬浮于每一个具有 200  $\mu$ l 流动固定液的孔中，轻轻涡旋板。将板置于流式细胞柿饼上，并获取珠粒。实验结果示于图 3、图 5-9、图 11-14 和图 16 中。

[0102] 对于图 3 中显示的实验，通过 DSA-FXM（同时捕获和标记实施方案）测试 4 个样本，并且 HLA-I 类与 II 类珠粒的区别在于每一个珠粒上的荧光 ID。因 HLA 特异性抗体而产生的递增荧光（阳性信号）示于 X 轴（FL1 通道）上。图 3，图 A：HLA-I 类（C-I）和 II 类（C-II）供体特异性抗体（DSA）都呈阴性（CI-/CII-）；图 3，图 B：仅 C-II DSA 呈阳性（CI-/CII+）；图 3，图 C：仅 C-I DSA 呈阳性（CI+/CII-）；和图 3，图 D：CI 和 C-II DSA 都呈阳性（CI+/CII+）。

[0103] 如图 5 中所示，通过 FXM、DSA-FXM 和 LMX-IgG 针对不同的细胞数目测试不同稀释度的 HLA-Ab 阳性血清（PPS）的汇集物。结果显示 DSA-FXM 是用于检测 DSA 的最灵敏的方法，并且当与标准方法比较时，使用少得多的细胞（例如可用少至 25,000 个细胞检测 DSA）。LMX-IgG 使用单抗原珠粒在 Luminex 平台上确定了 PPS 血清中包含的 HLA 特异性，并且显示的值是平均荧光强度（MFI）。

[0104] 如图 6 中所示，通过 DSA-FXM，同时利用盲攻击和并行地利用定期流式细胞交叉配型（FXM）和在单抗原珠粒上进行的标准 Luminex 抗体筛选（LMX-IgG）来测试 23 个外部能力 CAP 样本（美国病理学家学会）。鉴定 HLA-I 类（C-I）和 / 或 HLA-II（C-II）的供体特异性抗体（DSA），并通过 LMX-IgG 进一步确认大多数 DSA。一些具有低 MCS 的额外 DSA 只能用更灵敏的 DSA-FXM 法检测到。外部能力样本是具有已知的特异性的血清和细胞。在从所有参与中心接收所有结果之前，血清的特异性对于参与者是未知的。图 7 中所示的数据表明 7 个 HLA-DQ DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定并且已被 DSA-FXM 确认。如图 8 中所示，6 个 HLA-DP DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定并且已被 DSA-FXM 确认。如图 9 中所示，3 个 HLA-C DSA 阳性样本已被 LMX-IgG 鉴定并且已被 DSA-FXM 确认。

[0105] 如图 11 中所示，测试从 LMX-IgG SAB 测试了解其 DSA 特异性的 117 个血清的集合（包括 HLA 分型试剂、阴性对照和临床样本）。获得唯一的阳性或阴性反应。当将 DSA-FXM 的结果与 FXM 和 LMX-IgG SAB 结果相比较时，DSA-FXM 对于 I 类（图 12）和 II 类（图 13）具有比另外的测试的任一种更优的灵敏度。图 14，图 A 和 B 分别给出 95 个 I 类和 100 个 II 类 DSA 的总体相关性。图 14，图 C 概述了相较于 LMX-IgG SAB 测定的 DSA-FXM 的灵敏度和特异度。如图 14 的图 D 中显示的，图 14 的图 C 比较中获得的降低的特异度归因于 LMX-IgG SAB 测定中的假阳性反应而非 DSA-FXM 测定中的假阴性反应。

[0106] 如图 15 中所，T 和 B 细胞 FXM 测定在自体抗体存在的情况下产生非特异性（即，不归因于 HLA，未知的靶）阳性结果，然而 DSA-FXM 明确地区分针对 HLA 的自体抗体和区分

自体抗体是针对 I 类还是 II 类的。

[0107] 如图 16 中所示, DSA-FXM 能够区分归因于 I 类和 / 或 II 类同种抗体以及归因于目前的 FXM 法一般不能区分的自体抗体的流式细胞术结果。对于 FXM 看到的相似结果 (例如, 案例 1 和 3 或 2 和 4) 当通过 DSA-FXM 测试时具有完全不同的解释。可将 DSA-FXM 与通过 LMX-IgG SAB 获得的特异性 I 类和 / 或 II DSA 特征谱发生关系, 以提供关于移植前或移植后排斥的风险的预后, 然而 FXM 结果不能。

[0108] 如图 17 中对于 I 类 (图 A) 和 II 类 (图 B) 所显示的, DSA-FXM 能够显示相较于缓冲液, IVIG 处理对种类特异性 DSA 的抑制。这与在 IVIG 输注之前和之后在体内看到的类似。

[0109] 如图 18 中对 I 类 (图 A) 和 II 类 (图 B) 所显示的, DSA 特异性血清显示也预测体内功效的由 IVIG 产生的剂量依赖性抑制。

[0110] 如图 1 中所示, 使用来自经历 IVIG 脱敏处理以前瞻性地降低 / 消除鉴定的潜在活供体的 DSA 的肾候选者的系列样本进行 FXM 和 DSA-FXM。FXM 结果显示因 IVIG 输注的人为行为而导致的增加的 MCS 值 (即, 变得更加阳性)。所述人为行为归因于用作测定的信号的第二步骤抗体 (抗 - 人 IgG)。因为所有 IVIG 产物是纯化的 IgG, 因此 FXM 结果显示归因于 IVIG 而非 DSA 的假阳性增加。Rituxan (治疗性抗 -CD20, B 细胞的标志物) 也因为 B 细胞表面上的 CD20 而在 B 细胞 FXM 中增加 MCS 值。尽管这不是人为的, 但 FXM 被设计来检测 HLA 抗体, 而非天然细胞特异性靶。DSA-FXM 结果, 相反地, 即使在治疗性 (抗 -CD20) 抗体存在的情况下亦显示在对于移植是可接受的范围内的对 IVIG 和 MCS 值的抑制 (功效)。

#### [0111] 结果计算

[0112] 使用 DSA-FXM 分析电子表格记录和进行计算。测定患者血清及阳性对照的中值信道偏移 (MCS)。关于 MCS 的计算:  $MCS = \text{患者血清 (或阳性对照) 的中位信道值 (MCV)} - \text{阴性对照的中位信道值 (MCV)}$ 。在电子表格和计算机上将结果记录为 MCS。根据 FXM 截断值生成报告以界定阴性或阳性 DSA-FXM。

#### [0113] 结果和解释

[0114] 通过来自针对 5 个不同来源的靶细胞 (新鲜 / 冷冻的 PBMC、冷冻的淋巴结和冷冻的脾细胞) 的预先测试的 AB 男性血清 (通常约 20 个) 的结果 (MCS) 测定 FXM 的截断值。通过从 AB 血清 MCV 扣除阴性对照 MCV 来计算每一个测试的 AB 血清的 MCS; 和从所有获得的 MSC (N = 138) 计算 DSA-FXM MCS 的平均值。如下设置 DSA-FXM 截断值的标准: MCS 值 < AB 阴性 MCS+3SD 被解释为“阴性的”; MCS 值  $\geq$  AB 阴性 MCS+3SD 被解释为“阳性的”。HLA-I DSA-FXM 阳性: MCS  $\geq$  61。HLA-II DSA-FXM 阳性: MCS  $\geq$  60。

#### [0115] 材料和方法

[0116] 对于 FXM 法, 将  $0.1 \times 10^6$  个 PBMC 细胞分配至 96 孔板的每一个孔中, 以  $1,300 \times g$  离心 3 分钟。轻叩板以除去上清液; 将细胞重悬浮于  $50 \mu l$  测试血清中, 并在室温培养箱 ( $22^\circ C$ ) 中孵育 20 分钟。在孵育后, 洗涤细胞 4 次, 每一次使用  $250 \mu l$  的 3% HBSA。添加  $100 \mu l$  含有  $0.5 \mu g$  的 FITC-抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA)、 $0.2 \mu g$  PerCP-CD3 和 PE-CD19 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 的检测剂混合物。在于室温下孵育另外 30 分钟后, 洗涤细胞 2 次, 每次使用  $250 \mu l$  的 3% HBSA, 随后将细胞重悬浮于  $200 \mu l$  0.2% 的 PBS 中的多聚甲醛中。在 BD FACSCanto II 流式细胞

仪 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 上获得细胞。利用 BD FACSDiva™ 软件分析获得的数据。

[0117] 对于 LMX-IgG 方法,按照制造商的说明书 (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) 进行实验。结果显示在不同浓度下通过 DSA-FXM 都检测到 HLA I 类和 II DSA (图 5)。

#### [0118] 实施例 2 :DSA-FXM 测试

[0119] 可选地将下列方法用于实施称为供体特异性抗体流式细胞交叉配型 (“DSA-FXM”) 的主题方法的一个实施方案。本示例性方法包括相继捕获和标记。

[0120] 首先,制备排列 FXM 设置的 96 孔布局格式。第二,按照所述板布局将  $0.2 \times 10^6$  个 (体积小于  $250 \mu\text{l}$ ) 供体细胞分配在 96 孔板中的所有预先选定的孔中。以  $2,000 \times g$  离心 3 分钟。轻叩板以除去上清液。轻轻涡旋板,按照所述板布局将  $50 \mu\text{l}$ / 孔的每一个血清添加至预先选定的孔。轻轻涡旋板并在室温培养箱 ( $22^\circ\text{C}$ ) 中孵育 20 分钟。孵育后,将  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA 添加至每一个孔,并如先前一样旋转。轻叩板,在翻转板之前将其在叠纸塔上印迹 2 次。重复洗涤步骤另外 2 次,每一次洗涤通过添加  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA 来进行。

[0121] 在最后一次洗涤 (第 3 次洗涤) 时向每一个孔添加  $5 \mu\text{l}$  含有 HLA-I 类和 II 类捕获珠粒的捕获珠粒混合物,如先前一样使用  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA 再次洗涤。向每一个孔添加  $23 \mu\text{l}$  裂解混合物并轻轻涡旋板。用一张箔盖板,通过轻轻振荡在黑暗中孵育板 30 分钟。如先前一样,洗涤珠粒 2 次,每一次使用  $250 \mu\text{l}$  DSA-FXM 洗涤缓冲液。用  $100 \mu\text{l}$  的洗涤缓冲液中的荧光抗-IgG 重悬浮珠粒,将在室温下将板再孵育另外 30 分钟。如先前一样洗涤珠粒 2 次,每一次使用  $250 \mu\text{l}$  的 DSA-FXM 洗涤缓冲液,将所述珠粒重悬浮于含有  $200 \mu\text{l}$  流动固定液的每一个孔中,并轻轻地涡旋板。将板置于流式细胞仪上并获得珠粒。如上所述进行 FXM 和 LMX-IgG 法。实验结果示于图 4 中。如图 4 中所示,通过 DSA-FXM (相继捕获和标记) 测试阴性 AB 血清 (样本 A) 和 3 个阳性血清 (样本 B、C 和 D)。样本 A :C-I 和 C-II DSA 呈阴性;样本 B :C-I 和 C-II DSA 呈阳性;样本 C :仅 C-I DSA 呈阳性,并且 C-II DSA 呈阴性;样本 D :仅 C-II DSA 呈性,并且 C-I DSA 呈阴性。

#### [0122] 实施例 3 :DSA-FXM 测试

[0123] 可选地将下列方法用于实施称为供体特异性抗体流式细胞交叉配型 (“DSA-FXM”) 的主题方法的一个实施方案。本示例性方法包括相继捕获和标记。

[0124] 首先,制备排列 FXM 设置的 96 孔布局格式。第二,按照所述板布局将  $0.2 \times 10^6$  个 (体积小于  $250 \mu\text{l}$ ) 供体细胞分配在 96 孔板中的所有预先选定的孔中。以  $2,000 \times g$  离心 3 分钟。轻叩板以除去上清液。轻轻涡旋板,按照所述板布局将  $50 \mu\text{l}$ / 孔的每一个血清添加至预先选定的孔。轻轻涡旋板并在室温培养箱 ( $22^\circ\text{C}$ ) 中孵育 20 分钟。孵育后,将  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA 添加至每一个孔,并如先前一样旋转。轻叩板,在翻转板之前将其在叠纸塔上印迹 2 次。重复洗涤步骤另外 2 次,每一次洗涤通过添加  $250 \mu\text{l}$  的 3% HBSA 来进行。

[0125] 添加  $100 \mu\text{l}$  的荧光抗-IgG 以重悬浮细胞,并用一张箔盖板;通过轻轻振荡在黑暗中孵育板 30 分钟。如先前一样洗涤细胞 2 次,每一次使用  $250 \mu\text{l}$  的 DSA-FXM 洗涤缓冲液。将细胞重悬浮于  $25 \mu\text{l}$  裂解缓冲液,向每一个孔中添加  $5 \mu\text{l}$  含有 HLA-I 类和 II 类捕获珠粒的捕获珠粒混合物。在室温下孵育板进行另外 30 分钟。如先前一样洗涤珠粒 2 次,每次使用  $250 \mu\text{l}$  的 DSA-FXM 洗涤缓冲液,并将珠粒重悬浮于含有  $200 \mu\text{l}$  流动固定液的每一个孔中,并轻轻地涡旋板。将板置于流式细胞仪上并获取珠粒。如上所述进行 FXM 和 LMX-IgG

方法。实验结果示于图 10 和图 11 中：图 10, 图 A :HLA-I 类 (C-I) 和 II 类 (C-II) 供体特异性抗体 (DSA) 呈阴性 (CI-/CII-) ;图 10, 图 B :仅 C-I DSA 呈阳性 (CI+/CII-) ;图 10, 图 C :仅 C-II DSA 呈阳性 (CI-/CII+) ;和图 10, 图 D :CI 和 C-II DSA 呈阳性 (CI+/CII+)。

[0126] 实施例 4 :自动 -DSA-FXM 测试

[0127] 通过 FXM, 同时利用实施例 1 中描述的 DSA-FXM 法针对受体自己的 PBMC 细胞测试来自 15 个受体的自体血清。实验结果示于图 15 中 :在 15 个自体交叉配型中, 通过 DSA-FXM 和 FXM 检测, 3 个呈阴性, 4 个呈阳性 ;通过 FXM 检测, 仅 8 个呈阳性, 并且证明通过 FXM 检测的 DSA 不是针对 HLA 抗原的 DSA。

[0128] 实施例 5 :静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 脱敏 DSA-FXM 测试

[0129] 通过实施例 1 中描述的 DSA-FXM 测试法评价 IVIG 对 HLA-DSA 的抑制作用。实验结果示于图 17-19 中。

[0130] 对于图 17 中显示的实验, 将 5% IVIG 掺入两份 HLA DSA 阳性血清并且通过 DSA-FXM 体外测试。IVIG 对 HLA I 类和 II 类 DSA 的抑制作用是可测量的。

[0131] 如图 18 中所示, 将 5% IVIG 掺入不同稀释度的阳性 DSA 血清并且通过 DSA-FXM 测试其。结果显示 IVIG 对 HLA I 类和 II 类 DSA 具有剂量依赖性抑制。

[0132] 通过 DSA-FXM 和 FXM 针对潜在的 (但不相容的) 活供体细胞测试来自在 IVIG 脱敏处理下的肾候选者的一系列样本。如图 19 中所示, IVIG 对 HLA-DSA 的抑制作用可通过 DSA-FXM 观察到, 但不能通过 FXM 观察到。Rituxan (治疗性抗 -CD20) 对通过 DSA-FXM 测试产生的测试结果没有干扰。

[0133] 虽然为了清楚地理解, 已通过举例说明和实例稍许详细地描述了上述发明, 但根据本发明的教导, 对于本领域技术人员来说很显然的是, 在不背离所附权利要求的精神和范围下可对本发明进行某些改变和更改。还应理解, 本文中使用的术语仅为了描述特定实施方案并且无意是限定的, 本发明的范围只受所附权利要求限定。

[0134] 因此, 前述仅仅示出了本发明的原则。应理解, 本领域普通技术人员将能够设计不同的安排, 其尽管未被本文明确地描述或显示, 但使本发明的原则具体化, 且包含在其精神和范围内。而且, 本文叙述的所有实施例和条件措辞都主要旨在帮助读者理解由发明者贡献的本发明的原则和概念以促进本领域发展, 并且不应理解为对这类具体叙述的实施例和条件的限制。而且, 叙述本发明的原则、方面和实施方案的本文的所有陈述和其具体实施例都旨在涵盖其结构和功能二者的等同形式。此外, 期望此类等同物包括目前已知的等同物和未来开发的等同物, 即无论结构如何, 进行相同功能的开发的任何元件。因而, 本发明的范围无意限定于本文中显示和描述的示例性实施方案。相反, 本发明的范围和精神由所附权利要求体现。

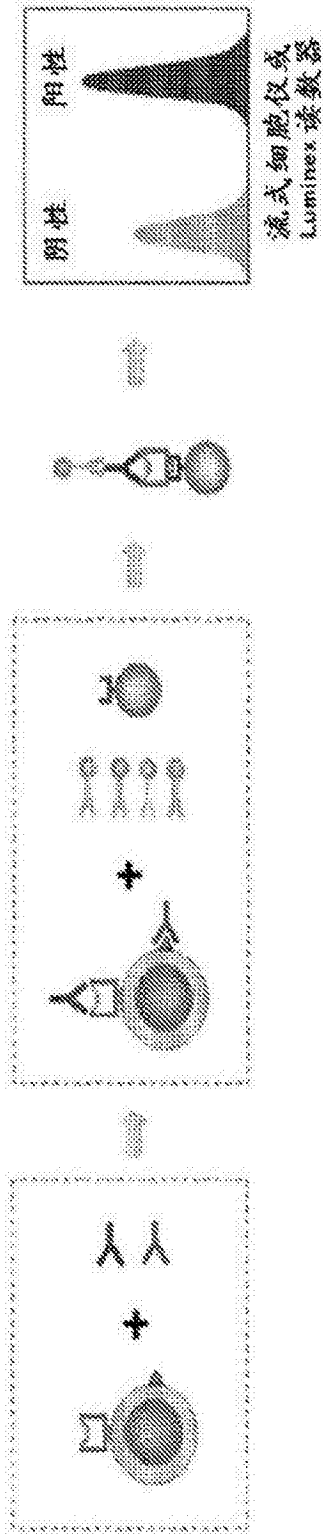


图 1

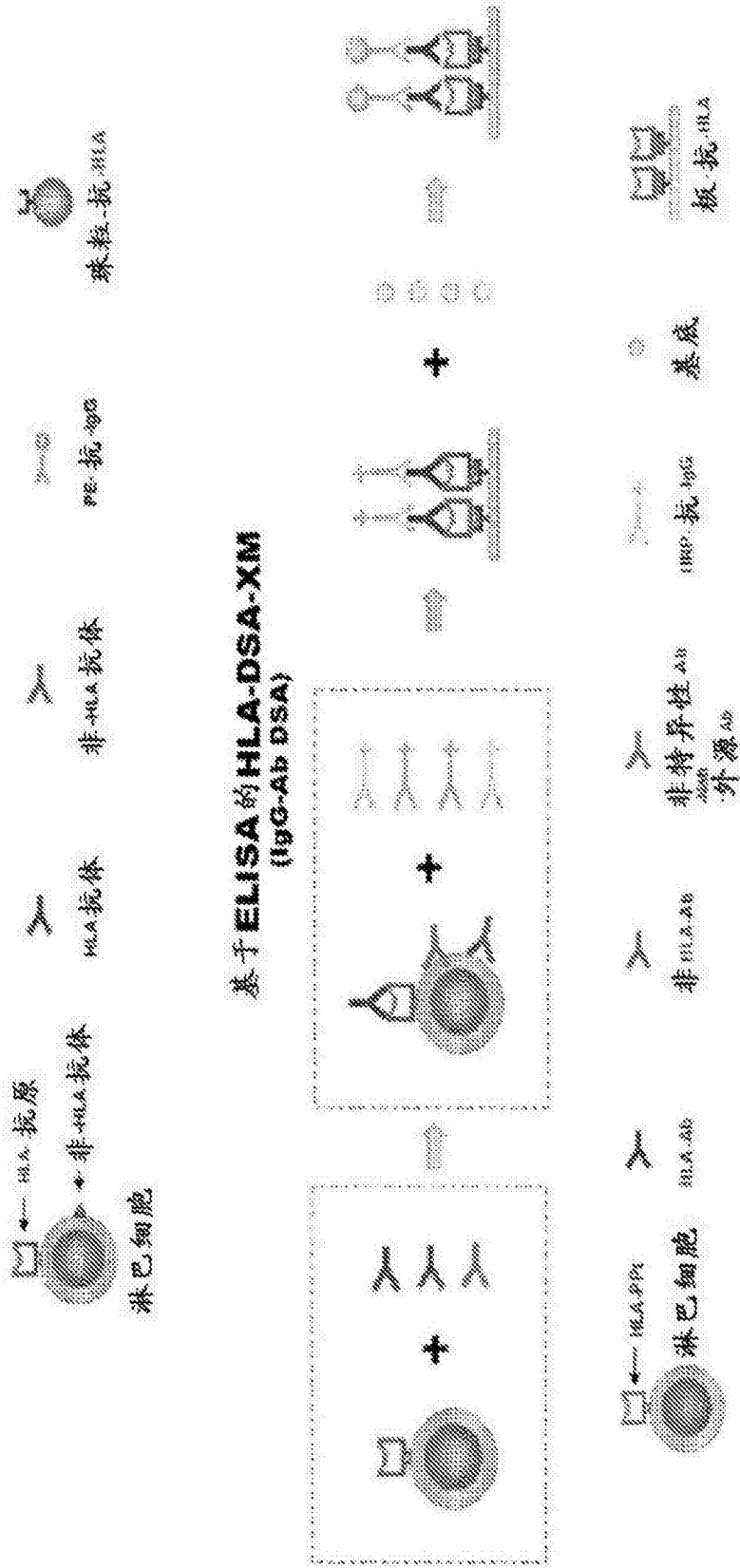


图 2

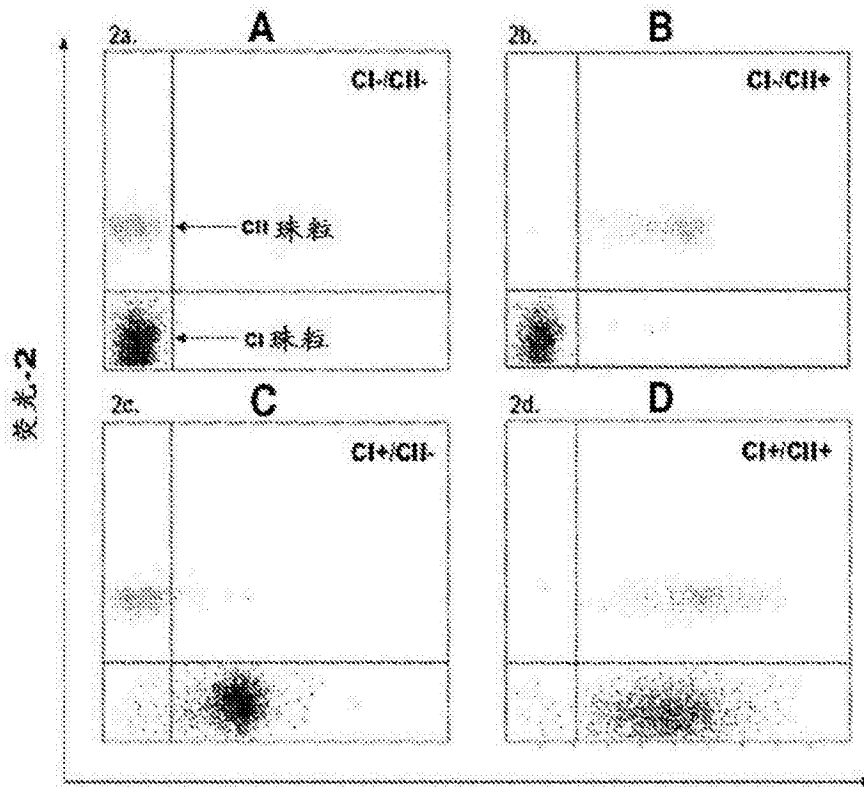


图 3

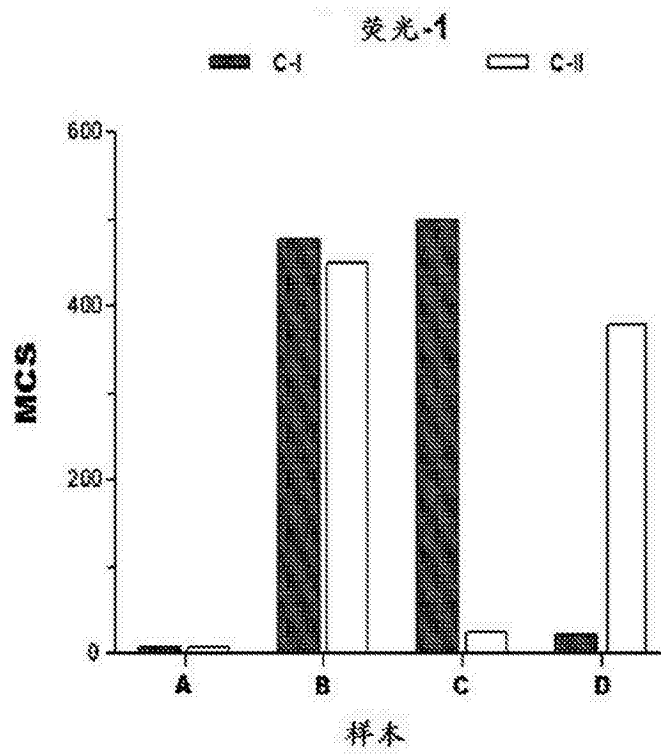


图 4



编号	细胞类型	血清	DSA-FXM (MCS)		LMX-IgG SSA
			HLA-CI	HLA-CII	(MFI)
1		血清1	81	88	27012
2	HLA-B*07:02	血清1	87	100	27012
3	HLA-B*08:01	血清1	80	8	27012
4		血清1	85	8	27012
5		血清1	80	37	27012
6	HLA-B*07:02	血清1	85	85	27012
7	HLA-B*08:01	血清1	80	5	27012
8		血清1	80	4	27012
9	HLA-B*07:02	血清1	80	72	27012
10		血清1	25	28	27012
11	HLA-B*07:02	血清1	80	80	27012
12	HLA-B*08:01	血清1	4	48	27012
13		血清1	80	75	27012
14	HLA-B*07:02	血清1	2	4	27012
15	HLA-B*08:01	血清1	85	80	27012
16		血清1	80	80	27012
17		血清1	80	20	27012
18	HLA-B*07:02	血清1	8	85	27012
19	HLA-B*08:01	血清1	85	80	27012
20		血清1	80	80	27012
21	HLA-B*07:02	血清1	85	80	27012
22	HLA-B*08:01	血清1	81	80	27012
23	HLA-B*07:02	血清1	75	20	27012
24	HLA-B*08:01	血清1	80	80	27012

截断值: LMX-IgG (MFI): HLA-CI/II > 1000  
 DSA-FXM (MCS): HLA-CI: 61 HLA-CII: 60

图 6







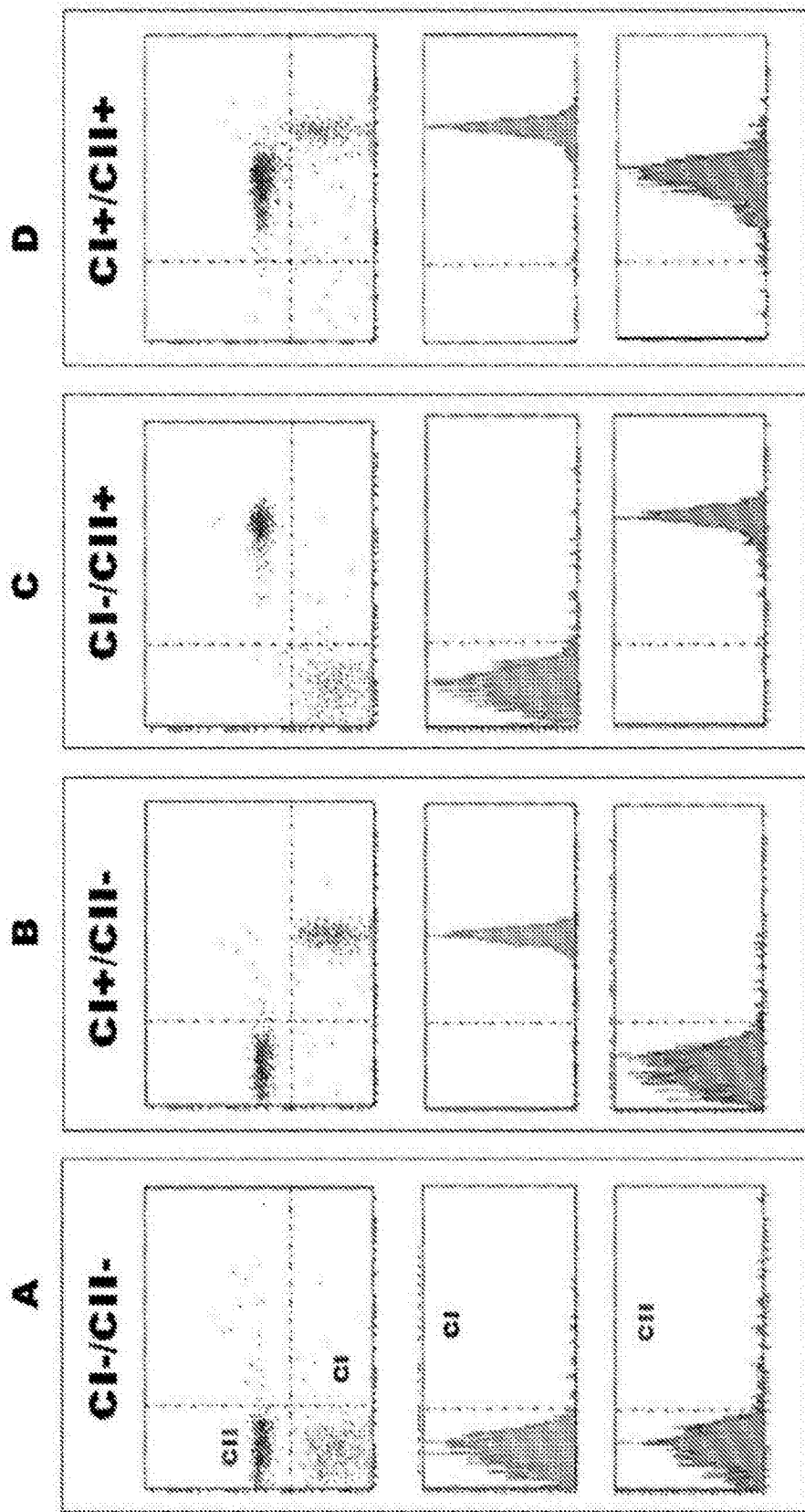


图 10

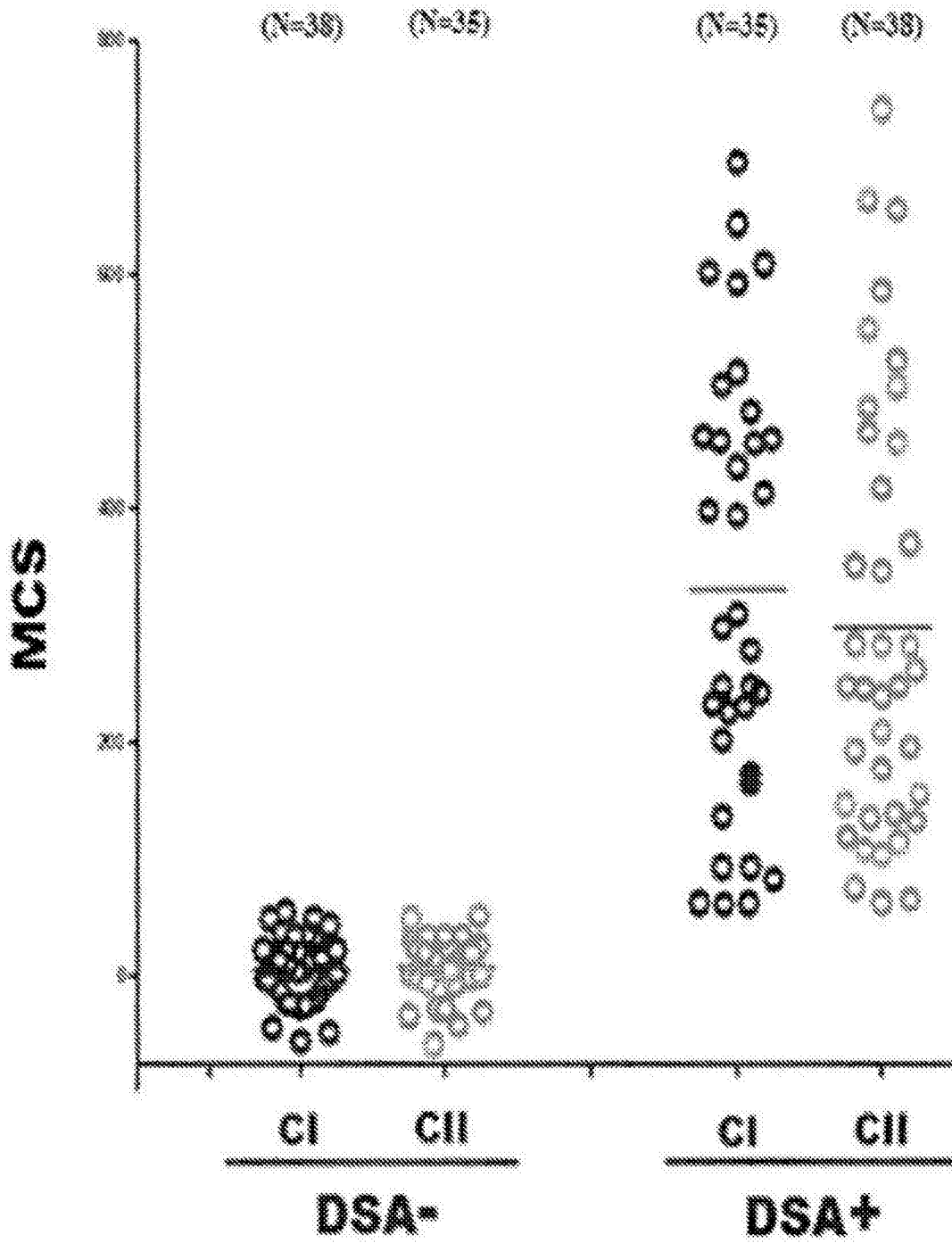


图 11

血清稀释物	FXM (MCS)			DSA-FXM (MCS)		LMX-DSA (MFI) (HLA-B7)
	Tc	Bc	CI	CI	CI	
纯	*404	*423	*081		17	*16455
1:10	*194	*229	*397		33	*3288
1:25	*112	*128	*208		9	*1338
1:50	64	55	*214		15	**688
1:100	33	9	*162		-10	358
1:500	0	-1	37		-6	82
1:1000	-3	1	12		5	23

细胞: A3.24, B7.1, Bw6, DR8, 15, DR51; DQ4, 6, GPG1, 6

\*阳性; \*\*可能阳性

图 12

血清稀释物	FXM (MCS)			DSA-FXM (MCS)		LMX-DSA (MFI) (HLA-DR4)
	Tc	Bc	CI	CI	CI	
纯	9	*286	*186		*741	*1388, *12473, *12188, *9559, *8646
1:100	6	*199	-10		*356	*1487, *1440, *1453, *1040, *847
1:500	4	42	-44		*188	263, 232, 227, 188, 114
1:1000	3	-3	-43		*94	15, 12, 12, 11, 10

细胞: A1, X, B36, S1, Bw4, Bw6, Cw\*06, \*15, DR\*04B\*03C, DR\*114; DR3\*037E, DR4\*01D\*01, DQ\*032, DQ\*03;

DRB1\*04:01, \*04:02, \*04:03, \*04:04, \*04:05

\*阳性; \*\*可能的阳性

图 13

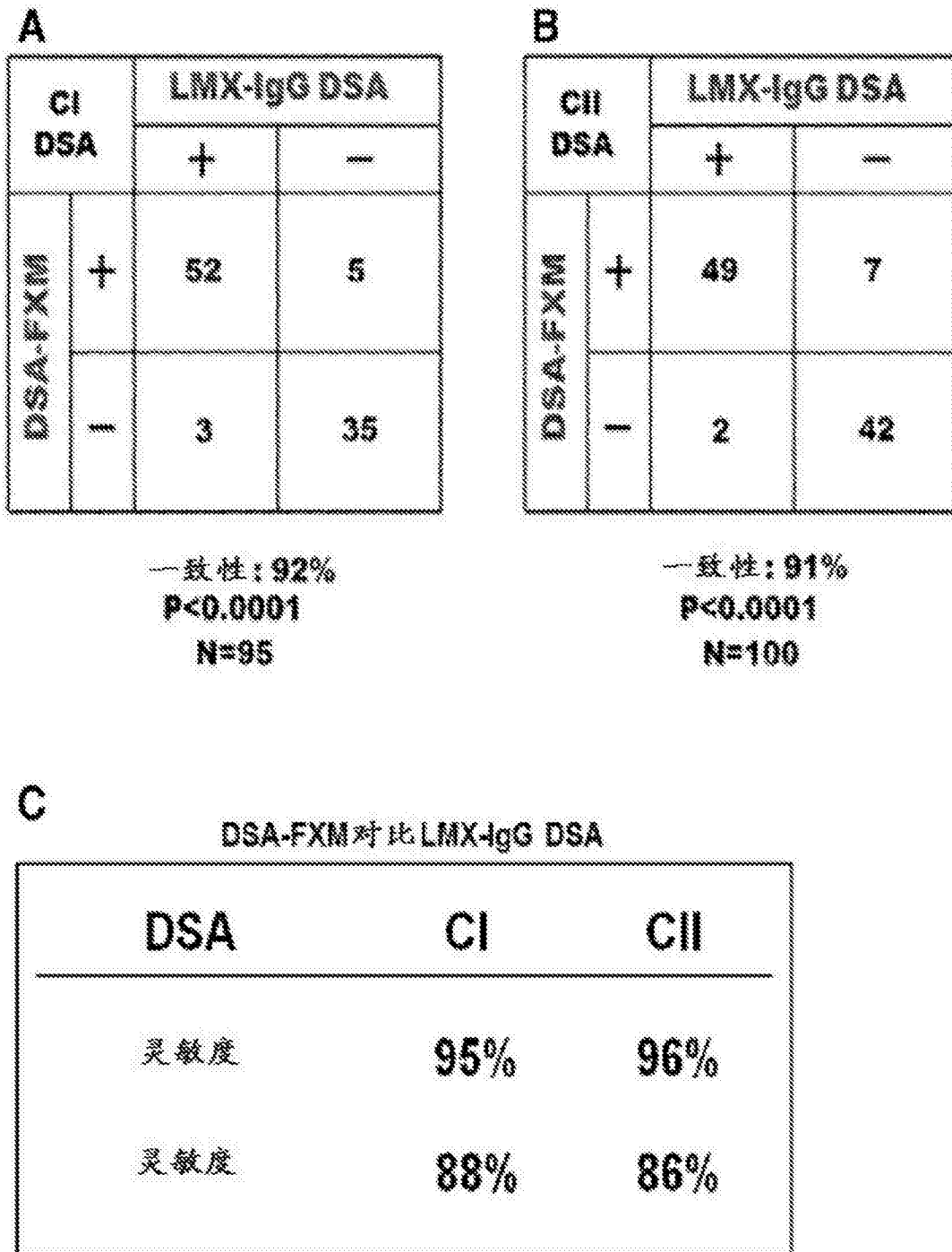


图 14



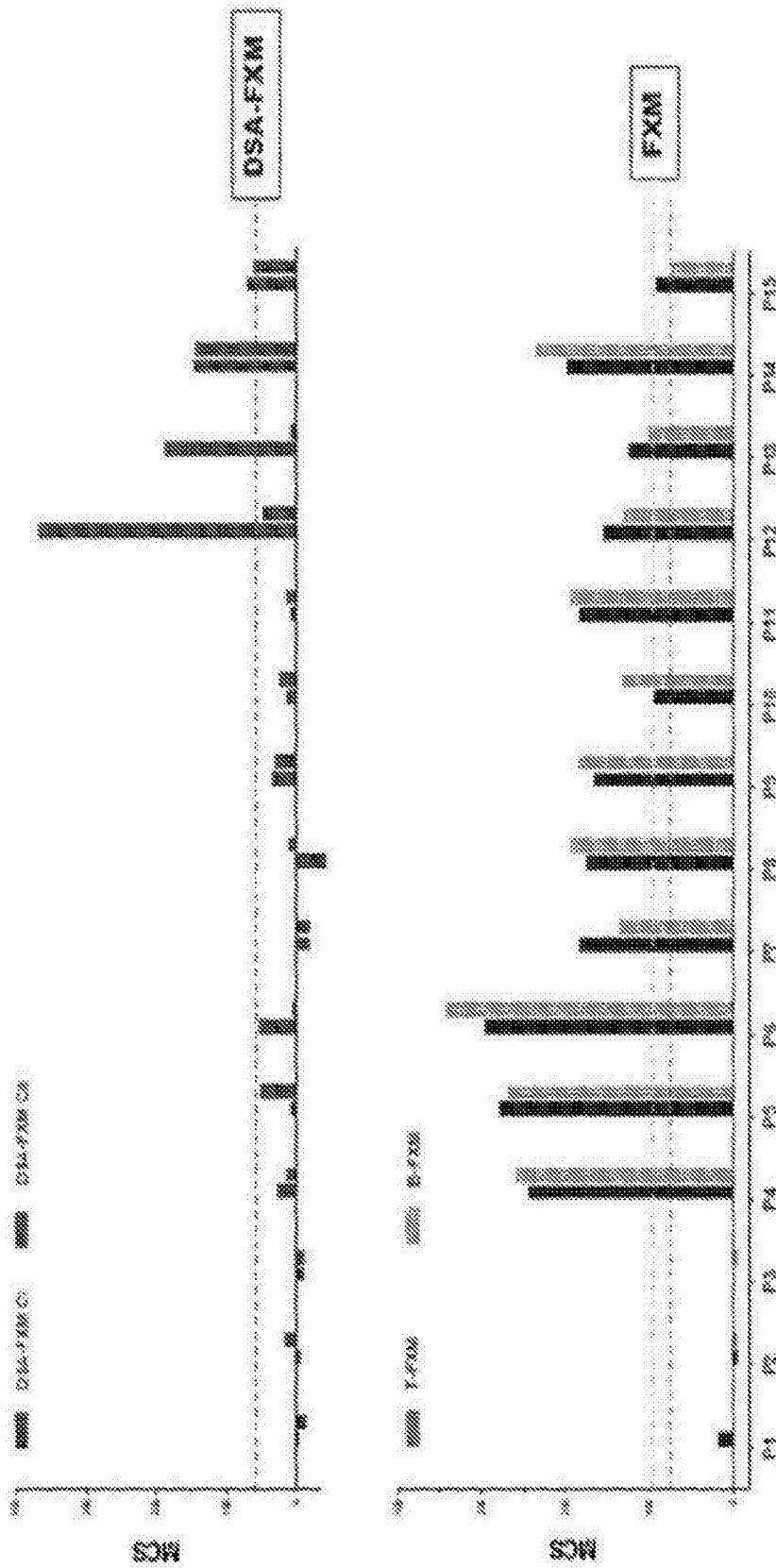


图 15

案例	LMX-IgG C5a (MFI)	细胞	血清及日期	9/9-9/9/2012			10/9-10/9/2012			
				TXM	EXM	测试日期	CI	CH3	CH2	测试日期
1	A2-880-789; 827-1128-1210; DR1-959-1163	91708	89695 6-23-12	65	162	2/5/2013	190	NA	14	2/7/2013
		91708	89695 1-29-13	66	122	2/5/2013	185	NA	12	2/7/2013
2	无效 LMX-IgG 结果	自动	92081 10-11-12	355	421	11/26/2012	278	179	191	5/9/2013
			92081 11-19-12	355	418	11/26/2012	267	160	181	5/9/2013
		92081 10-11-12	337	377	11/26/2012	297	173	151	5/9/2013	
		92081 11-19-12	328	378	11/26/2012	297	189	143	5/9/2013	
3	CW07:02-897; DRB1*04:03-940 CW07:02-428; DRB1*04:03-898	95532	94237 3-26-13	NA	NA	NA	-36	2	35	10/15/2013
		95532	94237 6-18-13	-8	140	6/25/2013	-41	-11	23	10/15/2013
4	CW8-3403	97968	97819 12-03-13	228	239	10/13/2012	无细胞可用			
		97968	97819 12-03-13	224	226	2012/20/13	218	-6	-39	2/10/2014

图 16

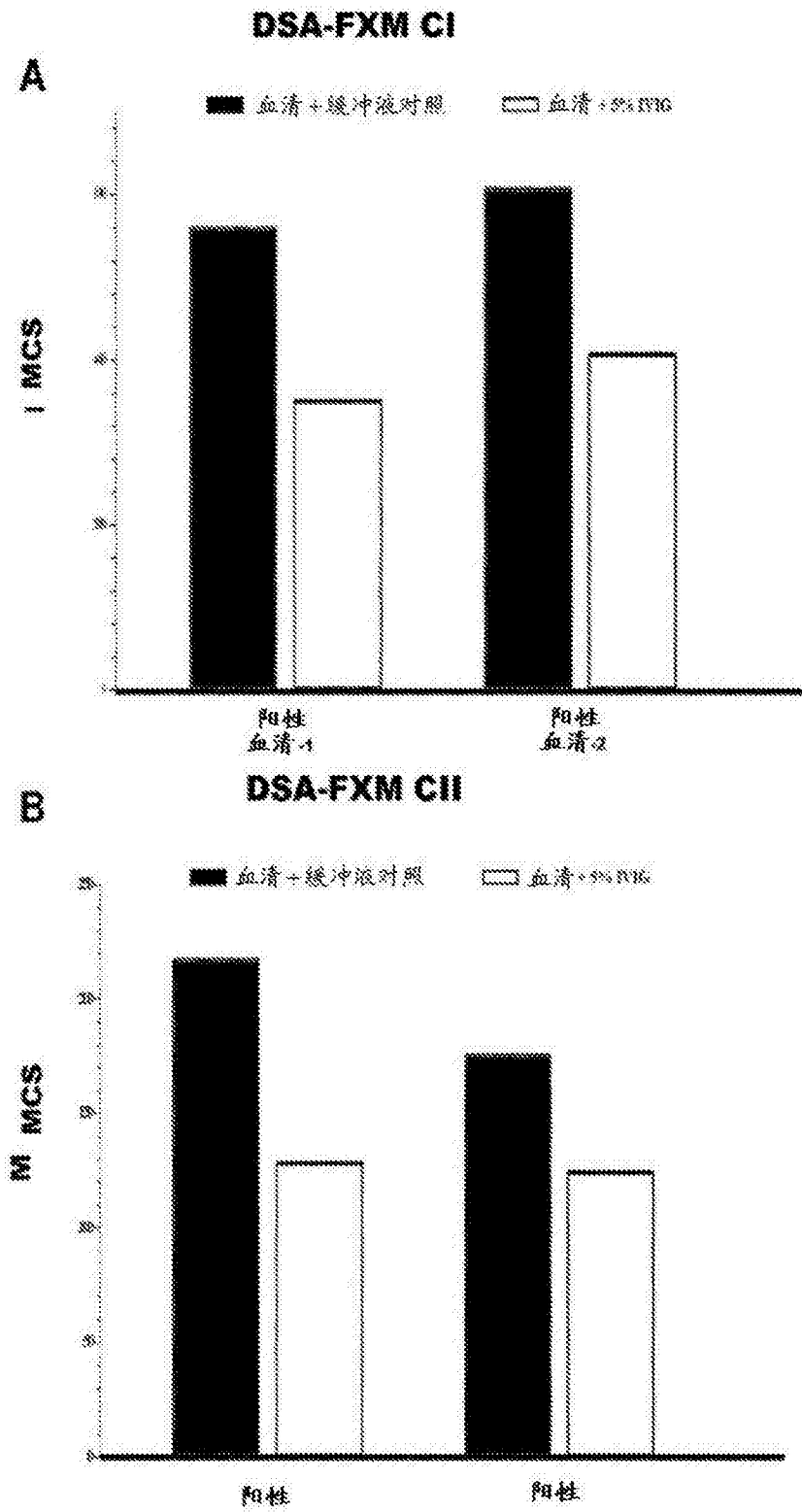


图 17

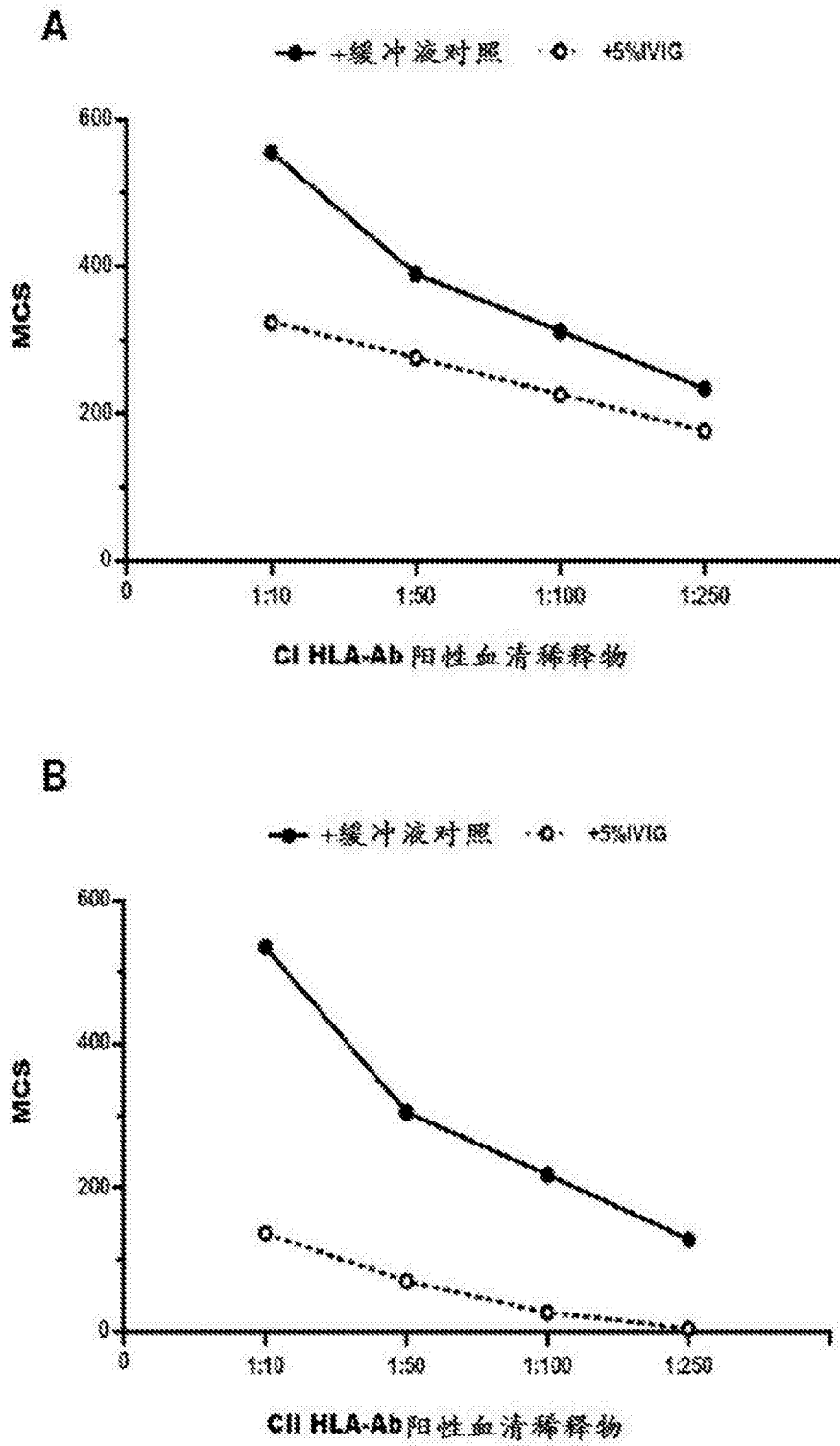


图 18

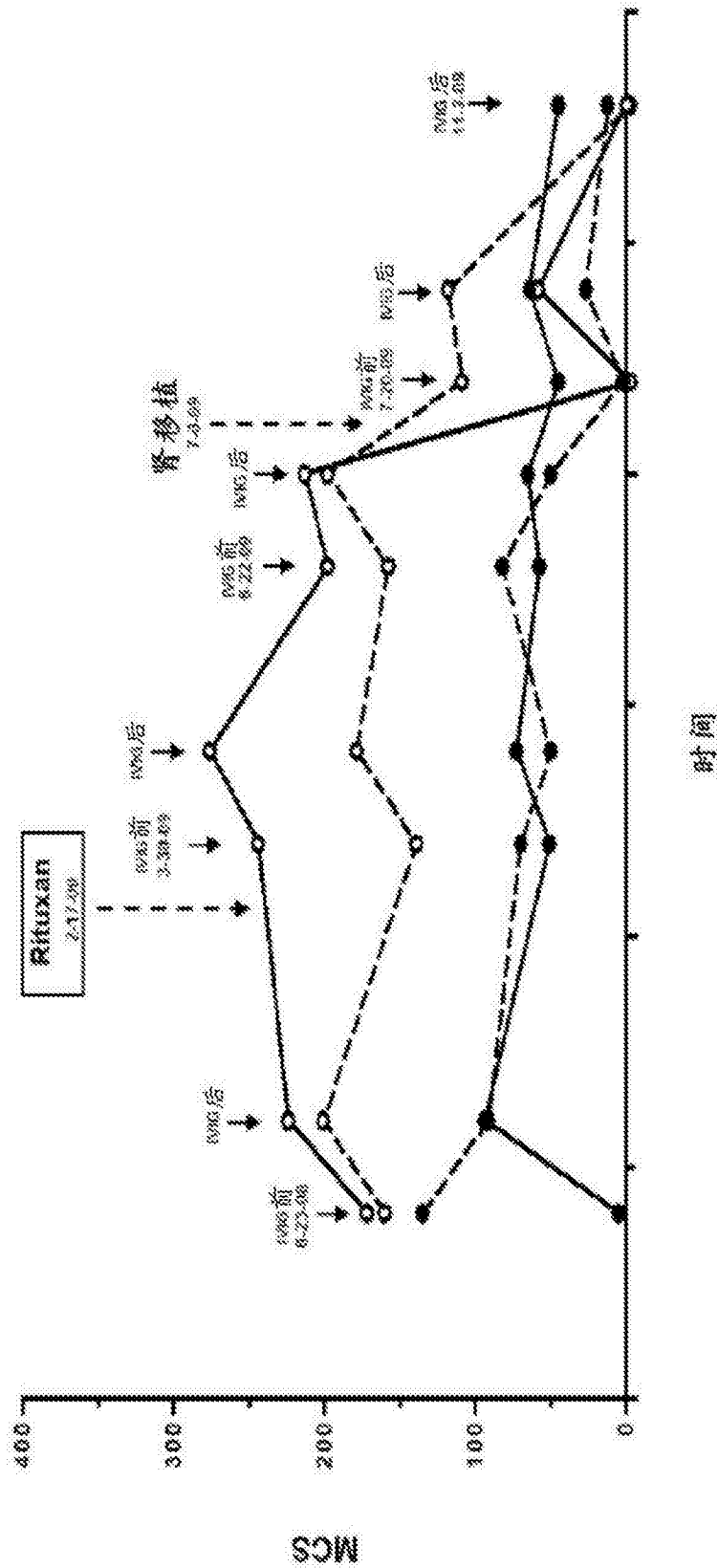


图 19

专利名称(译)	检测供体特异性抗体的方法和用于实施所述方法的系统		
公开(公告)号	<a href="#">CN105308457A</a>	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201480026715.2	申请日	2014-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	斯坦福大学托管董事会		
当前申请(专利权)人(译)	斯坦福大学托管董事会		
[标]发明人	DB迪安 G陈		
发明人	D·B·迪安 G·陈		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/686 G01N33/5091 G01N33/5094 G01N33/54313 G01N33/54333 G01N33/56977 G01N33/582 G01N33/6854 G01N2333/4716		
优先权	61/782003 2013-03-14 US		
其他公开文献	CN105308457B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供了用于测定供体特异性抗体在生物样本中的存在或不存在的方法。所述方法包括在足以使受体免疫抗体(如果存在的话)结合供体细胞表面抗原(Ag)的条件下将来自供体的细胞样本与来自受体的生物样本接触以形成免疫抗体-Ag复合物,将所述混合物与在其表面上包含特异性结合免疫抗体-Ag复合物(例如,Ag或免疫抗体)的抗体的珠粒接触,在裂解条件下添加特异性结合结合于珠粒的免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体,和检测结合于免疫抗体-Ag复合物的可检测地标记的抗体的存在或不存在以测定供体特异性抗体在受体的生物样本中的存在或不存在。还提供了用于实施主题方法的系统和试剂盒。

