



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101558309 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 26

(21) 申请号 200780041426. X

页第 13-17 行 .

(22) 申请日 2007. 09. 28

WO 2006/098724 A1, 2006. 09. 21, 第

【0094】、【0184】段 .

(30) 优先权数据

WO 2006/098724 A1, 2006. 09. 21, 第

2006905393 2006. 09. 28 AU

【0094】、【0184】段 .

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 93/23559 A1, 1993. 11. 25, 说明书第 14

2009. 05. 07

页第 13-17 行 .

(86) PCT国际申请的申请数据

US 5292636 A, 1994. 03. 08, 全文 .

PCT/AU2007/001449 2007. 09. 28

US 2005/0202521 A1, 2005. 09. 15, 全文 .

(87) PCT国际申请的公布数据

PAXTON H. ET AL. Comparison of CD4

W02008/037026 EN 2008. 04. 03

Cell Count by a Simple Enzyme-Linked

(73) 专利权人 麦克法兰布奈特医疗研究与公共

Immunsorbent Assay Using the TRAx CD4 Test

健康研究所有限公司

Kit and by Flow Cytometry and Hematology.

地址 澳大利亚维多利亚

《CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY

(72) 发明人 D·A·安德森 R·E·劳埃德

CARELLA A. V. ET AL. A Manual Bead

S·M·克罗 M·L·加西亚

Assay for the Determination of Absolute

A·L·蓝黛

CD4+ and CD8+ Lymphocyte Counts in

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

Human Immunodeficiency Virus-Infected

利商标事务所 11038

Individuals. 《CLINICAL AND DIAGNOSTIC

代理人 罗菊华

LABORATORY IMMUNOLOGY》. 1995, 第 2 卷 (第 5

期), 623 - 625.

(51) Int. Cl.

审查员 王慧

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

权利要求书3页 说明书26页

WO 93/23559 A1, 1993. 11. 25, 说明书第 14

序列表5页 附图32页

(54) 发明名称

一种诊断方法和用于此的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供用于检测或监测样品中细胞的数目的试剂盒和方法。所述细胞包含含有细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的细胞表面结合蛋白(CSAP)。所述试剂盒包括:(i)层析装置;(ii)CSAP结合试剂。所述方法包括:(i)任选地,将样品与能够裂解或透化具有CSAP的细胞的试剂接触;(ii)将样品与CSAP结合试剂接触,所述的CSAP结合试剂与CSAP的细胞质结构域结合;和(iii)直接或间接地评估样品中结合的CSAP的水平或存在。

1. 与 CD4 的细胞质结构域特异性结合的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于评估来自受试者的血液样品中具有 CD4 的 T 细胞的数目,所述评估包括:

(i) 将样品与能够裂解或透化具有 CD4 的细胞的试剂接触;

(ii) 将样品与 CD4 结合抗体或其抗原结合片段接触,所述的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段与 CD4 的细胞质结构域结合,并形成 CD4- 抗体复合物;和

(iii) 直接或间接地检测和评估步骤 (ii) 中形成的 CD4- 抗体复合物的水平或存在;并且

其中步骤 (ii) 中形成的 CD4- 抗体复合物的水平或存在指示受试者中具有 CD4 的细胞的数目,其中所述抗体或其抗原结合片段在步骤 (ii) 中不检测缺失细胞质结构域的可溶的 CD4,并且由此区别包含细胞质结构域的细胞结合的 CD4 和缺失细胞质结构域的可溶的 CD4。

2. 权利要求 1 的用途,其中步骤 (iii) 包括将 CD4- 抗体复合物与第二抗体或其抗原结合片段接触,所述的第二抗体或其抗原结合片段与 CD4 结合,包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三结合伴侣结合,并且检测所述检测标记。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述评估为酶联免疫吸附测定 (ELISA) 类型,流式细胞术或层析法。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述评估为 ELISA 类型或层析法,并且与 CD4 的细胞质结构域特异性结合的抗体或其抗原结合片段固定于固体支持物上。

5. 权利要求 1 的用途,其中在步骤 (ii) 中,通过下述将样品与所述 CD4 结合抗体或其抗原结合片段接触:将样品用于免疫层析装置的样品部分,其中所述样品部分可操作地与所述装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向并流经捕获部分,所述的捕获部分包含与 CD4 的细胞质结构域特异性结合的抗体或其抗原结合片段,以便只有包含细胞质结构域的 CD4,而非不包含细胞质结构域的可溶的 CD4,与所述抗体或其片段结合从而形成 CD4- 抗体复合物;并且其中在步骤 (iii) 中,通过下述来评估 CD4- 抗体复合物的水平或存在:将所述装置的捕获部分与第二结合抗体或其抗原结合片段接触,所述的第二结合抗体或其抗原结合片段与 CD4 结合,包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合。

6. 权利要求 1 或 5 的用途,其中将 CD4- 抗体复合物的水平或存在与预先确定的对照进行比较,其中所述预先确定的对照为预先确定量的对照,当与可视检测标记结合时,其足以产生信号,提供与由预先确定数目的 CD4 细胞产生的信号等价的可视内标。

7. 权利要求 6 的用途,其中对照为至少包含细胞质结构域的 CD4 多肽。

8. 权利要求 1 的用途,其中血液为全血或经稀释的全血或血液衍生物。

9. 权利要求 1 的用途,其中通过将样品与结合至固体支持物的单核细胞特异性试剂接触来除尽血液样品中的单核细胞。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述单核细胞特异性试剂为抗 CD14 抗体。

11. 权利要求 1 的用途,其进一步包括通过将样品与结合至固体支持物的红细胞捕获试剂接触来除尽样品中的红细胞。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述红细胞捕获试剂为抗血型糖蛋白抗体。

13. 一种用于检测或监测来自受试者的血液样品中具有 CD4 的 T 细胞的数目的试剂盒,其中该试剂盒包括:

(i) 层析装置,其包括与样品部分可操作地连接的多孔膜,测试部分,缀合部分,吸取部分,任选地对照部分和任选地裂解部分;

(ii) 与 CD4 的细胞质结构域结合的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段固定于一个或多个测试部分和 / 或包含于缀合部分内;

(iii) 对照部分,所述的对照部分包含预先确定量的对照,当与可视检测标记结合时,其足以产生信号,提供与由预先确定数目的细胞产生的信号等价的内标;

(iv) 使用所述装置以检测或监测样品或受试者中具有 CD4 的细胞的水平或存在的说明书。

14. 用于检测或监测来自受试者的血液样品中具有 CD4 的 T 细胞的数目的试剂盒,其中该试剂盒包括:

(i) 层析装置,其包括与样品部分可操作地连接的多孔膜,测试部分,缀合部分,吸取部分,任选地对照部分和任选地裂解部分;

(ii) 与 CD4 的细胞质结构域结合的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段固定于一个或多个测试部分和 / 或包含于缀合部分内;

(iii) 对照部分,所述的对照部分包含预先确定量的至少含有细胞质结构域的对照 CD4 多肽并且当与可视检测标记结合时,其足以产生信号,提供预先确定数目的 CD4 细胞的可视标准;

(iv) 使用所述装置以检测或监测样品或受试者中 CD4 细胞的水平或存在的说明书。

15. 权利要求 13 或 14 的试剂盒,其中所述试剂盒使用反向或侧向流动免疫层析。

16. 权利要求 13 或 14 的试剂盒,其中缀合部分包含可视检测标记。

17. 权利要求 14 的试剂盒,其中所述 CD4 多肽为缺失跨膜结构域的重组 CD4。

18. 权利要求 13 或 14 的试剂盒,其中样品垫包含红细胞捕获试剂。

19. 权利要求 18 的试剂盒,其中所述红细胞捕获试剂是抗血型糖蛋白 A 抗体。

20. 权利要求 13 或 14 的试剂盒,其中样品垫包含单核细胞特异性试剂。

21. 权利要求 20 的试剂盒,其中所述单核细胞特异性试剂为抗 CD14 磁珠。

22. 权利要求 13 或 14 的试剂盒,其进一步包括磁体。

23. 权利要求 22 的试剂盒,其中磁体连接到样品垫或能够与样品垫接触的免疫层析装置的部分。

24. 缺失跨膜结构域的重组 CD4 在制备用于定量来自受试者的样品中的 CD4T 细胞的数目的固体支持物或试剂盒中的用途。

25. 一种用于评估来自受试者的血液样品中 CD4T 细胞的水平或存在的非诊断目的的方法,该方法包括:

(i) 将样品与能够裂解或透化具有 CD4 的细胞的试剂接触;

(ii) 将样品与 CD4 结合抗体或其抗原结合片段接触,所述的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段与 CD4 的细胞质结构域特异性结合,并形成 CD4- 抗体复合物;和

(iii) 直接或间接地检测和评估步骤 (ii) 中形成的 CD4- 抗体复合物的水平或存在;

其中步骤 (ii) 中形成的包含 CD4 细胞质结构域的 CD4- 抗体复合物的水平或存在指示受试者中具有 CD4 的细胞的数目, 其中所述抗体或其抗原结合片段在步骤 (ii) 中不检测缺失细胞质结构域的可溶的 CD4, 并且由此区别包含细胞质结构域的细胞结合的 CD4 和缺失细胞质结构域的可溶的 CD4。

26. 权利要求 25 的方法, 其中步骤 (iii) 包括将 CD4- 抗体复合物与第二抗体或其抗原结合片段接触, 所述的第二抗体或其抗原结合片段与 CD4 结合, 包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三结合伴侣结合, 并且检测所述检测标记。

27. 权利要求 25 或 26 的方法, 其中所述方法为酶联免疫吸附测定 (ELISA) 类型, 流式细胞术或层析法。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述方法为 ELISA 或层析法, 并且与 CD4 的细胞质结构域特异性结合的 CD4 结合抗体或其抗原结合片段固定于固体支持物上。

29. 一种用于评估来自受试者的血液样品中 CD4T 细胞的水平或存在的非诊断目的的方法, 该方法包括: a) 将测试样品用于免疫层析装置的样品部分, 其中所述样品部分可操作地与所述装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向并流经捕获部分, 所述的捕获部分包含与 CD4 的细胞质结构域特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 以便只有包含细胞质结构域的 CD4, 而非不包含细胞质结构域的可溶的 CD4, 与所述抗体或其片段结合从而形成 CD4- 抗体复合物; b) 通过下述来评估 CD4- 抗体复合物的水平或存在: 将所述装置的捕获部分与第二结合抗体或其抗原结合片段接触, 所述的第二结合抗体或其抗原结合片段与 CD4 结合, 包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合; 评估所述检测标记的存在, 其中至少包含细胞质结构域的结合的 CD4 的水平或存在指示受试者中具有 CD4 的细胞的数目, 其中所述方法不检测缺失细胞质结构域的可溶的 CD4, 并且由此区别包含细胞质结构域的细胞结合的 CD4 和缺失细胞质结构域的可溶的 CD4。

30. 权利要求 29 的方法, 其中将 CD4- 抗体复合物的水平或存在与预先确定的对照进行比较, 其中所述预先确定的对照为预先确定量的对照, 当与可视检测标记结合时, 其足以产生信号, 提供与由预先确定数目的 CD4 细胞产生的信号等价的可视内标。

31. 权利要求 30 的方法, 其中对照为至少包含细胞质结构域的 CD4 多肽。

32. 权利要求 25 或 29 的方法, 其中血液为全血或经稀释的全血或血液衍生物。

33. 权利要求 25 或 29 的方法, 其还包括通过将样品与结合至固体支持物的单核细胞特异性试剂接触来除尽样品中的单核细胞。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述单核细胞特异性试剂为抗 CD14 抗体。

35. 权利要求 25 或 29 的方法, 其还包括通过将样品与结合至固体支持物的红细胞捕获试剂接触来除尽样品中的红细胞。

36. 权利要求 35 的方法, 其中所述红细胞捕获试剂为抗血型糖蛋白抗体。

一种诊断方法和用于此的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明主要涉及诊断领域并且提供用于精确评估来自受试者的样品中特定细胞类型,其细胞结合蛋白或其可溶(细胞外)形式的存在或数量的方法和试剂。在一些实施方案中,本发明涉及快速的,自足的诊断,所述诊断可以在大部分环境中使用,例如诊所,实验室,在野外,在家和在资源贫乏的地区。在一个实施方案中,提供用于评估来自受试者的样品中的 CD4T 细胞数目的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 主题说明书中的参考文献的著书目录的详细资料还列于说明书结尾。

[0003] 在本说明书中对任何现有技术的引用不被认为,也不应被认为是这样的承认或任何形式的暗示,即该现有技术在任何国家中构成公知常识的部分。

[0004] 不同领域的技术用于研究,分析,开发并且临床上用于检测目的细胞。手动或自动技术可用于对特别设计的小室中的细胞进行计数,其允许评估样品中的细胞数目。可以用特殊的染色剂对细胞进行染色以区别细胞类型。组织化学技术可以用于进一步区分样品中的细胞。还可以诊断细胞通过增殖或产生细胞因子响应特定抗原,结合其他细胞,吞噬(engulf)其他细胞或通过趋化作用进行移动的能力。细胞表面标记对于区分细胞类型和评估样品中特定细胞的数目来说特别有用。很多技术使用抗体以检测标记的存在。

[0005] 原核和真核生物体的细胞在其所有不同的形式下包含细胞膜,其将细胞内容与细胞外环境分隔开。细胞膜是选择性屏障,其决定进出细胞的物质并且其还与其他细胞和细胞的环境中的分子一起承担复杂的信号传导活动。细胞膜包含磷脂双层并且大多数跨双层膜或与双层膜相互作用的分子在插入双层膜中的蛋白的帮助下实现跨双层膜或与双层膜相互作用,所述的蛋白具有细胞质和细胞外部分。

[0006] 通常,细胞与其环境的最初的相互作用经由在质膜上表达的受体或细胞表面结合分子而产生。不管是通过结合内源性配体(例如细胞因子或激素)还是外源性配体(例如抗原),这些受体的活化引发从细胞膜经细胞质到细胞核的生化级联。已知大量受体或细胞表面结合蛋白质分子介导细胞-细胞相互作用和细胞-分子相互作用。这些包括,例如,MHC 蛋白,细胞因子,激素或神经递质受体,束缚配体,G 蛋白偶联受体,受体蛋白酪氨酸激酶,受体蛋白酪氨酸磷酸酶,蛋白-丝氨酸/苏氨酸激酶和受体鸟苷酸环化酶。

[0007] 在免疫系统中介导细胞-细胞识别或抗原识别的大多数蛋白包含 Ig 或 Ig 样结构域,暗示它们具有共同的进化历史。这些蛋白包括抗体,T 细胞受体,分化簇(CD)抗原例如 CD4,CD8 和 CD28 蛋白,B 和 T 细胞受体以及与淋巴细胞和其他白细胞上的 Fc 受体结合的恒定多肽链。已表征在白细胞表面上的蛋白约一半属于这一超家族。因此,免疫系统的细胞表达一系列细胞表面蛋白,所述细胞表面蛋白的同一性可以用于评估样品中不同细胞的数目和状态。

[0008] 例如,可以用抗 B 和 T 细胞抗原受体的恒定区的抗体鉴别 B 和 T 淋巴细胞。可分别基于共受体蛋白 CD4 和 CD8 的表达的基础上鉴别 T 辅助细胞和细胞毒性 T 细胞。

[0009] 流式细胞术是用于细胞鉴别和细胞计数的有力的工具。流式细胞术检测并计数经过激光束的流中的单独的细胞。通过检查大量细胞,流式细胞术可以对具有不同分子(例如表征 B 细胞的表面免疫球蛋白,称为 CD3 的 T 细胞受体相关分子,和区别主要 T 细胞亚群(subset)的 CD4 和 CD8 共受体蛋白)的细胞的百分数提供定量数据。用经荧光染料标记的特异性抗体对混合群内的单独的细胞加标签,或例如,通过特异性抗体接着通过经标记的抗免疫球蛋白抗体对混合群内的单独的细胞加标签。然后经标记的细胞的悬浮混合物被迫经过孔,产生每隔一段距离被逐一隔开的包含细胞的细的液体流。当各个细胞经过激光束,细胞散射激光,并且结合到细胞上的任何染料分子将被激发并且发出荧光。灵敏型光电倍增管检测散射光(提供细胞的大小和粒度的信息)和荧光发射(提供经标记的抗体的结合信息从而提供各个细胞的细胞表面蛋白的表达的信息)。如果使用两个或更多抗体,各个抗体与不同荧光染料偶联,则数据可以以二维散点图的形式或作为等值线图展示,其中对比第二个染料标记的抗体的荧光对第一个染料标记的抗体的荧光作图,从而用一个抗体标记的细胞群体可以基于其与第二个抗体的反应性进一步细分。

[0010] 免疫测定是另一种特别有用的测定形式,其利用抗体-抗原反应的特异性,强度和差异来分析样品并且检测其中的特异性组分。大量的免疫测定技术是可获得的,例如在 Wild D. "The Immunoassay Handbook" Nature Publishing Group, 2001 中描述的那些技术。

[0011] 用于检测抗特定抗原的抗体的大量方法也是已知的。例如,在实验室常规使用酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。还使用阵列和高通量筛选方法。这些方法通常需要在实验室技术上具有高水平的技术人员。

[0012] 还开发了多种方法,其不太要求技能并且快速完成,因此,其适用于在即席检验时(at the point of care)检测抗特定抗原的抗体,和/或检测特定抗原。特别地,已经开发侧向流动(lateral flow),测验片(dipstick)和毛细管试剂盒以测定许多感染,包括病毒感染。

[0013] 患有免疫缺陷性疾病例如 AIDS 的受试者中,表达 CD4 的 T 细胞的水平是何时开始抗逆转录病毒药物治疗的指标。病毒感染这些 T 细胞并且最终破坏它们。低 CD4⁺T 细胞水平还是临床进展风险和机会性感染的易感性的指标。

[0014] 在一种检测 CD4 细胞的方法中,用抗 CD4 抗体包被的免疫磁珠(dynabeads)用于结合 CD4⁺T 淋巴细胞。用经抗 CD4 抗体包被的珠粒将表达 CD4 和 CD4 的单核细胞从新鲜血液样品中除去。之后,分离的 CD4⁺T 淋巴细胞被裂解,用吖啶橙进行染色并且经染色的细胞核通过荧光显微法计数。"TRAx CD4"检测试剂盒在 Paxton 等人, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2(1):104-114, 1995 中描述。该试剂盒为基于 ELISA 的方法,用于测量全血样品中的总 CD4。所用的抗体不区别细胞结合的和可溶的 CD4(参见 Lyamuya 等人, J. Imm. Methods., 195:103-112, 1996)。国际公开号 W0 2006/115866 描述用于测量 CD4 抗原的免疫层析装置。然而,在该文献中仍没有公开能够在来自受试者的样品中区别细胞结合的 CD4 和缺失细胞质结构域的可溶的 CD4 的捕获试剂。此外,在 W0 2006/115866 中描述的装置依赖于样品流经一系列有限的捕获区域以通过渗透试纸条上的连续的捕获区域来捕获 CD4,从而提供样品中的 CD4 细胞的浓度的可视化指标。

[0015] 需要测量特定细胞类型或它们的细胞结合蛋白的改进的方法,特别是可以用于即

席检验 (point of care) 和提供快速而精确的结果的方法。

[0016] 发明概述

[0017] 贯穿整个说明书和接着的权利要求书,除非上下文另外要求,词语“包含”和其变体例如“含有”和“包括”应理解为表示包括所述的整体或步骤或整体或步骤的组,但不排除任何其他整体或步骤或整体或步骤的组。“由……组成”表示包括并且仅限于短语“由……组成”所陈述的任何事物。因此,短语“由……组成”指列出的要素是必需的或者必要的,并且不可以存在其他要素。“基本由……组成”表示包括该短语所陈述的任何要素,并且限于不干扰或不促成公开内容中指定的列出的要素的活性或作用的其他要素。因此短语“基本由……组成”指列出的要素是必需的或必要的,但有没有其他的要素是任选的并且依赖于它们是否影响所列出的要素的活性或作用,其他的要素可以存在或不可以存在。

[0018] 应注意的是,如在主题说明书中所用的,单数形式“一个”,“一种”,“这个”,“这种”,“该”包括复数方面,除非上下文明确另外指出。例如,“样品垫”包括一个样品垫或一个以上的样品垫。

[0019] 在本说明书中的各个实施方案通过作适当的修改可用于每个其他实施方案,除非特别另外说明。

[0020] 核苷酸和氨基酸序列通过序列标识编号 (SEQ ID NO:) 指明。SEQ ID NO: 数字上对应于序列标识符 <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2) 等。序列标识符的总结在表 1 中提供。序列表在权利要求书之后提供。

[0021] 在概括性的实施方案中,本说明书描述用于评估来自受试者的样品中包含细胞质 (胞质) 和细胞外 (胞外) 结构域的细胞表面结合蛋白 (CSAP) 的水平或存在或具有 CSAP 的细胞的水平或存在的方法,该方法包括:(i) 任选地将样品与能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的试剂接触;(ii) 将样品与和 CSAP 的细胞质结构域结合的 CSAP 结合试剂接触;和 (iii) 直接地或间接地评估样品中结合的 CSAP 的水平或存在。在一些实施方案中,至少包含细胞质结构域的结合的 CSAP 的水平或存在指示受试者中具有 CSAP 的细胞的数目。

[0022] 在另一个实施方案中,本说明书描述了用于评估来自受试者的样品中包含细胞质 (胞质) 和细胞外 (胞外) 结构域的细胞表面结合蛋白 (CSAP) 的水平或具有 CSAP 的细胞的水平的方法,该方法包括:a) 将测试样品用于免疫层析装置的样品部分,其中样品部分可操作地与装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向和流经捕获部分,所述的捕获部分包含与 CSAP 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,以便只有包含细胞质结构域的 CSAP (而非不包含细胞质结构域的可溶的 CSAP) 与抗体或其片段结合从而形成被捕获的 CSAP;b) 将捕获部分与第二结合试剂接触,所述的第二结合试剂与 CSAP 结合,包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合;c) 任选地将第二结合试剂与包含检测标记的第三或随后的结合试剂接触;评估检测标记的存在。

[0023] 在举例说明性的实施方案中,该方法用于评估来自受试者的血液样品中包含细胞质 (胞质) 和细胞外 (胞外) 结构域的 T 细胞结合 CD4 的水平或 CD4 T 细胞的水平,该方法包括:(i) 任选地,将样品与能够裂解或透化 CD4 T 细胞的试剂接触;(ii) 将样品与和 CD4 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段接触;和 (iii) 直接地或间接地评估样品中

结合的 CD4 的水平或存在。

[0024] 在该方面的另一个实施方案中,该方法用于评估来自受试者的包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的 T 细胞结合 CD4 的水平或 CD4T 细胞的水平并且包括:a) 将测试样品用于免疫层析装置的样品部分,其中样品部分可操作地与装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向和流经包含与 CD4 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段的捕获部分,以便只有包含细胞质结构域的 CD4(而非不包含细胞质结构域的可溶的 CD4)与抗体或其片段结合从而形成捕获的 CD4;b) 将捕获部分与第二结合试剂接触,所述的第二结合试剂与 CD4 结合,包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合;和 c) 任选地,将第二结合试剂与包含检测标记的第三或随后的结合试剂接触;评估检测标记的存在。

[0025] 与 CSAP 或 sCSAP 的细胞质结构域结合的试剂可以是与 CSAP 特异性结合的任何形式的分子。CSAP 结合试剂,例如配体,适体或抗体,是特别预期的。对 CSAP 的部分具有高特异性的抗体或其抗原结合片段可方便地制备。另外,抗体可以方便地缀合到可检测标记或与可检测标记一起产生或与缀合至可检测标记的第二或随后的抗体结合。其功能为直接或间接地检测试剂-CSAP 复合物的任一形式的抗体可以称为检测抗体。

[0026] 在另一个概括性的实施方案中,该方法包括:(i) 任选地,将样品与能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的试剂接触,(ii) 将待测试的样品与和 CSAP 的细胞外结构域结合的试剂接触,以便通过试剂结合全长(CSAP)和可溶形式(sCSAP)的 CSAP 并且形成包含试剂-CSAP 和/或试剂-sCSAP 的复合物(iii) 任选地,如果试剂不是已经与固体或半固体支持物的区域结合或关联,则将样品与固体或半固体支持物接触,以便试剂和任何试剂-CSAP 复合物和/或试剂-sCSAP 复合物与固体支持物结合(iii) 将样品或支持物的适当区域与和 CSAP 的细胞质结构域特异性结合的第二试剂接触和(iv) 直接或间接地确定结合的第二试剂的存在或水平。

[0027] 在另一个概括性的实施方案中,本说明书提供用于检测来自受试者的样品中 a) 包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的在细胞表面表达的蛋白(CSAP)或具有 CSAP 的细胞的水平或存在和 b) 在待测试的样品中可溶的非细胞膜结合的细胞外形式的 CSAP(sCSAP)的存在水平的方法。该方法包括(i) 任选地,将待测试的样品与能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的试剂接触,(ii) 将样品与和 CSAP 的细胞质结构域结合的试剂以及和缺失细胞质结构域的可溶形式的 CSAP 结合的第二试剂接触,(iii) 直接或间接地评估样品中的结合的 CSAP 和结合的 sCSAP 的水平。在其中还测量 sCSAP 的水平或存在的实施方案中,评估步骤(iii) 区别试剂-CSAP 复合物和试剂-sCSAP 复合物。在这个实施方案中,可以确定来自受试者的样品中细胞结合的和可溶的 sCSAP 的相对存在或数量。

[0028] 在另一个方面中,主题说明书描述了用于检测或监测来自受试者的样品中的细胞数目的试剂盒,其中所述细胞的特征在于包含含有细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的细胞表面结合蛋白(CSAP)。在概括性的实施方案中,试剂盒包括:(i) 包括与样品部分可操作连接的多孔膜,测试(捕获)部分,缀合部分,吸取部分,任选的对照部分和任选的裂解部分的层析装置;(ii) CSAP 结合试剂,例如与 CSAP 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,其中试剂或抗体固定(结合)于一个或多个测试部分和/或包含在缀合部分内;和(iii) 使用装置以检测或监测样品或受试者中具有 CSAP 的细胞的水平或存在的说明书。

[0029] 在举例说明性的实施方案中,提供用于检测或监测来自受试者的血液样品中的 CD4T 细胞的数目的试剂盒。在概括性的实施方案中,试剂盒包括:(i) 包括可操作地与样品部分连接的多孔膜,测试(捕获)部分,缀合部分,吸取部分,任选地对照部分和任选地裂解部分的层析装置;(ii) CD4 结合试剂,例如与 CD4 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,其中试剂或抗体固定(结合)于一个或多个测试部分和/或包含在缀合部分内;和(iii) 使用装置以检测或监测样品或受试者中的 CD4 细胞的水平或存在的说明书。如免疫层析装置领域的技术人员所理解的,主题试剂盒可以设计为任何适当的形式,包括反向或侧向流动免疫层析形式。

[0030] 以上的概述不以任何方式视为也不应以任何方式视为是本发明的所有实施方案的穷举。

附图简介

[0031] 图 1(A) 是与 T 淋巴细胞细胞表面膜结合的人 CD4 的图示。展示了包含氨基酸 1-395 的细胞外结构域,该结构域与其二硫键区域一起排列为四个免疫球蛋白样结构域。展示了包含氨基酸 396-420 的跨膜结构域,其跨 T 淋巴细胞细胞表面膜。还展示了包含氨基酸 421-458 的细胞质(胞质)结构域。图 1(B) 表示包含细胞质和细胞外结构域并且缺失跨膜结构域加上细胞质结构域的前两个氨基酸的 TM⁺CD4 的结构,这样该 TM⁺CD4 蛋白表示与氨基酸 423-458 融合的氨基酸 1-395。

[0032] 图 2 为人 CD4 细胞质结构域的图示和为了产生抗细胞质结构域的抗体而合成的亚序列肽的序列。肽 1 包含来自氨基酸 436 至 454 的缺失了氨基酸 446 至 447(QC) 的 17 个氨基酸(SEQ ID NO:1)。肽 2 包含来自人 CD4 的氨基酸 422 至 441 的 20 个氨基酸(SEQ ID NO:2)。氨基酸的编号如实施例 1 中所描述的。

[0033] 图 3 为测量抗 CD4 细胞质肽的绵羊多克隆抗体的特异性和滴度的 ELISA 测定的结果的图示。图 3A 和 3B 表示分别来自绵羊 G-6 和绵羊 G-7 的结果。血液为预取血(PB),两次测试中取血(TB1 和 TB2)和终取血(FB)的样品。

[0034] 图 4 为测量抗肽 1 和肽 2 的 CD4 多克隆抗体特异性的 ELISA 测定的结果的图示。如其中所示,绵羊通过 ELISA 对两个肽具有相似的反应性。TB2 是来自 G-7 或 G-6 绵羊免疫后的第二次测试取血的血液。

[0035] 图 5 为比较抗 CD4_{cyto} 肽 2 的抗 CD4_{cyto} 单克隆抗体(MAb)反应性的 ELISA 测定的结果的图示。如其中所示,三个单克隆抗体显示与肽 2 结合。

[0036] 图 6 为评估抗 CD4_{cyto} 单克隆抗体 ID2 和 4B4 与新鲜的(非固定化/透化)CD4⁺T 细胞(A, B, C 和 D)结合的能力的流式细胞术分析的结果的图示。抗体不能结合新鲜的细胞。

[0037] 图 7 为评估抗 CD4_{cyto} 单克隆抗体 ID2 和 4B4 与固定化/透化的 CD4⁺T 细胞(A, B, C, D)结合的能力的流式细胞术分析的结果的图示。抗体与固定化/透化的细胞结合并且 92% 的 CD4⁺ 细胞被选择。

[0038] 图 8 为适合于实施本发明的两种免疫测定形式的图示。

[0039] 图 9 为测量抗 CD4 的细胞质结构域的单克隆抗体包括商业可获得的抗 CD4_{cyto} 单克隆抗体(chemicon)的反应性的 ELISA 的结果的图示。

[0040] 图 10 为测量抗 CD4 的细胞质结构域的单克隆抗体 ID2 的特异性和其从 JC53 细胞

裂解物捕获 CD4 的能力的捕获 ELISA 的结果的图示和用抗 CD4 胞外结构域的单克隆抗体 (RPAT4) 检测的结果的图示。1D2 从 JC53 细胞裂解物捕获用 RPAT4 可检测的 CD4, 但是可溶 CD4 没有被捕获。

[0041] 图 11 为测量抗 CD4 细胞质结构域的单克隆抗体 1D2 的特异性和其从 JC53 细胞裂解物捕获 CD4 的能力的捕获 ELISA 的结果的图示和用抗 CD4 胞外结构域的多克隆抗体检测的结果的图示。1D2 从 JC53 细胞裂解物捕获用抗 CD4 胞外结构域的多克隆抗体可检测的 CD4, 但是可溶 CD4 没有被捕获。

[0042] 图 12 为来自供体的外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞 CD4 的捕获 ELISA 的结果的图示。A 表示来自供体 1 至 6 的通过单克隆抗体 4B4 捕获的 PBMC 裂解物的滴度, 所述的供体在总 PBMC 群中具有不同比例的 CD4⁺T 细胞。B 表示富含细胞 CD4 的淋巴细胞的捕获。

[0043] 图 13 为来自供体的外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞 CD4 的捕获 ELISA 的结果的图示。展示了来自三个供体的结果以及 OD450-620 与每微升的 CD4⁺T 细胞的数目之间的关联。

[0044] 图 14 为来自供体的外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞 CD4 的捕获 ELISA 的结果的图示。展示了来自 5 个不同 HIV 感染患者的结果并且证明 OD450-620 与每微升全血的 CD4⁺T 细胞的数目之间的紧密的关联。

[0045] 图 15 为用于检测全长的细胞结合 CD4 并且由此评估 CD4⁺ 细胞数目的免疫层析装置的图示。

[0046] 图 16 为编码一种形式的 TM⁺CD4 的核酸序列的图。下划线文本 (text) 为 His 标签。加框文本为肠激酶识别位点。粗体文本为 CD4 的胞外结构域以及斜体字文本为 CD4 的胞质尾部。

[0047] 图 17 为一种形式的 TM⁺CD4 的氨基酸序列的图。下划线文本为 His 标签。加框文本为肠激酶识别位点。粗体文本为 CD4 的胞外结构域以及斜体字文本为 CD4 的胞质尾部。

[0048] 图 18 为展示示通过 ELISA (A) 和通过 Western 免疫印迹 (B) 检测重组 TM⁺CD4 的数据的图表和照片示意。(A) 全长 (FL) CD4 或 TM⁺CD4 通过各自的 pcDNA4/HisMax 构建体的转染或模拟转染在 293T 细胞中表达。用所述的方法通过 CD4 ELISA 测试细胞裂解物和细胞上清液。结果显示, 全长 CD4 在细胞中有效表达但不被释放到上清液中, 而 TM⁺CD4 在细胞中有效表达并且大部分重组蛋白释放到上清液中, 从而允许简单纯化 (如果需要)。(B) 通过 Western 免疫印迹用抗 CD4 胞质结构域的定制 (custom) 的 MAbs 4B4 (3 μg/ml) 检测培养上清液中的 TM⁺CD4。

[0049] 图 19 为展示通过 ELISA 和免疫层析的快速的, 即席检验测定检测 TM⁺CD4 的数据的图表和照片示意。连续稀释来自用 TM⁺CD4 的质粒稳定转染的 HEK293 细胞的上清液 (以 1 : 5 开始稀释), 用于 ELISA 测定 (A), 在 ELISA 中显示出线性反应, 证明 TM⁺CD4 可作为对照试剂在 CD4 ELISA 测定中用于评估总的 CD4⁺T 细胞数目。在该图中, 在相同的测定中测试四个不同的全血样品 (样品 IDS72, 51, 40, 49), 与标准相比较的 CD4 的相对数量可以用所示的回归曲线或其他方法来评估。为了能够将 CD4 的数量转换为每微升的 CD4⁺T 细胞的数目, 通过流式细胞术和 ELISA 多次测试全血参比样品并与 TM⁺CD4 标准比较, 从而允许确定正确的转换因子 (数据未显示)。(B) 通过快速即席检验测定检测来自两个不同的稳定 HEK293-TM⁺CD4 细胞系克隆 (H5 和 F5) 的上清液, 表明在此类测定中 TM⁺CD4 可以用作对照

试剂或标准。

[0050] 图 20 为展示通过流式细胞术和 ELISA 计算的 CD4 细胞数目之间的良好关联的图示。使用重组可溶形式的 CD4 作为 CD4 ELISA 的内在测定对照,并且使用基于通过流式细胞术和 ELISA 平行测定参比样品而确定的转换因子,对于评估的 CD4 T 细胞数目来说,用 CD4 ELISA 与用 CD4 流式细胞术相比获得非常紧密的关联。特别地,注意到当大于或少于每微升 250 个 T 细胞时,所有样品都被正确鉴别,如在加框区域中所示的。在该测定中,在通过 ELISA 测定全血的 CD4 T 细胞前,用 CD14 磁珠从全血中除去单核细胞。

[0051] 图 21 为快速免疫层析形式中的结果的图示,其展示 TM^{CD4} (作为包含细胞质结构域的 CD4 的替代物) 的不同的数量和信号强度之间良好关联。这证明 TM^{CD4} 可作为对照试剂用于 CD4 测定的 ELISA 和快速的即席检验形式的制备,测试和质量控制。该图还证明 Chemicon 3706 抗细胞质结构域 Mab,和定制的 4B4 抗细胞质结构域 Mab 可以独立地或作为混合物用于在测定的快速形式中捕获 CD4。此外,这证明在快速形式中信号强度与样品中的 CD4 的数量是成比例的,允许快速即席检验形式用于 CD4 T 细胞数目的定量或半定量评估。

[0052] 图 22 为快速免疫成像 (immunographic) 装置中的结果的照片示意。(A) 提供快速即席检验测定形式的测试结果,以所示的每微升的细胞数使用纯化的 T 细胞 (在测试线反应)。(B):通过用与抗生物素金缀合物 (gold conjugate) 直接反应的生物素化的单克隆抗体划条带,制备与 500 个 T 细胞 / 微升和 250 个 T 细胞 / 微升等价的对照线。

[0053] 图 23 (A) 为根据本发明的全血 CD4 快速即席检验测定的图示。(B) 在如 A 中所示的全血测定中测试包含高 CD4T 细胞水平 (通过流式细胞术测定为 1452/ μ l) 的全血样品,如通常在裂解垫中具有去污剂 (“+TX”),或从裂解垫除去去污剂 (“-TX”)。在该实施例中,当存在去污剂以裂解垫中的 T 细胞时,仅在快速测试中见到 CD4 信号。(C) 在 CD4 快速即席检验测定中测定的代表性全血样品的实例。展示通过流式细胞术确定的各个样品的 CD4 数量,并且在该全血形式中可见高 CD4T 细胞数给出较强的信号而低 CD4T 细胞数给出弱的信号。

[0054] 图 24 为展示样品中的单核细胞的减少的数据的示意。在 ELISA 形式的测定中,可以如上述通过在本领域公知的方法中使用为此目的而设计的抗 CD14 磁珠和强磁体,在测定之前从全血中除去单核细胞。该方法还可以用于即席检验测定之前的全血的预处理,但是为了即席检验测试要求优选避免样品处理和加工。还没有描述过通过使用与快速的即席检验测定中的内容相容的方法除尽特定白细胞类型或其他细胞类型的方法。本发明人设计了如实施例 12 中所述的用于有效除去快速即席检验测试的样品垫中的单核细胞的方法。

[0055] 在图中,纯化的单核细胞和纯化的外周血淋巴细胞 (PBL, 除尽单核细胞) 分别用红外荧光染料标记 - 单核细胞用绿色 (Mini CellVueNIR815, PTI Research, Inc), PBL 用红色 (Mini CellVue Burgundy, PTI Research Inc.)。图像展示了在 Licor Odyssey 红外荧光扫描仪上经不同的滤光器观察到的相同的样品垫:(A) = 组合滤光器,(B) = Em800,(C) = Em700。磁体使其中使用它的样品垫的扫描变暗。将 1.5×10^4 个单核细胞 (结合到磁珠) 和除尽单核细胞的 2×10^4 个 PBL 组合并点样到无磁体 (左) 或有磁体 (右) 的抗血型糖蛋白 A 包被的样品垫上。用 60 μ l PBS 冲洗样品以允许样品流入吸收垫 (此处用于代替实际的裂解垫和硝酸纤维素试纸条,用于举例说明性目的)。在存在磁体的情况下在图

(A) 和 (B) 中可以看到保留 > 80% 的单核细胞 (绿色), 而没有绿色细胞进入吸收垫, 同时存在或不存磁体的 (A) 和 (C) 中证明除尽了单核细胞的 PBL 流入吸收垫。(D) 展示如 (A)-(C) 中所示的测试的示意图。

[0056] 表格简介

[0057] 表 1 提供本文提供的 SEQ ID NO 的描述。

[0058] 表 2 提供氨基酸亚分类。

[0059] 表 3 提供示例性的氨基酸取代。

[0060] 优选的实施方案的详述

[0061] 在准备本发明的工作中, 发明人已开发了用于精确计数来自受试者的细胞样品中的特定细胞类型的策略。本发明部分以这样的认识为基础, 即用于检测特定细胞类型的蛋白标记的现有技术方法使用与细胞标记的细胞外部分结合的试剂。因为很多细胞表面结合分子以细胞结合的和可溶的形式存在, 这些试剂检测可溶形式的标记, 导致假阳性或特定细胞类型的数目的过高估计。在一些实施方案中, 该方法不检测缺失细胞质结构域的可溶 CSAP (其可能存在于样品中)。在其他实施方案中, 该方法区别包含细胞质结构域的细胞结合的 CSAP 和缺失细胞质结构域的可溶的 CSAP。

[0062] 在一些实施方案中, 本发明提供测定, 例如免疫测定, 其包含区别可溶和全长形式的细胞表面标记的试剂。在本发明的特别有用的实施方案中, 提供不需要样品加工, 显微术, 使用其他仪器或科学的专门技能的快速即席检验 (RPOC) 方法和试剂盒。

[0063] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供用于评估来自受试者的样品中包含细胞质 (胞质) 和细胞外 (胞外) 结构域的细胞表面结合蛋白 (CSAP) 或具有 CSAP 的细胞的水平或存在的方法, 该方法包括 (i) 任选地, 将样品与能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的试剂接触, (ii) 将样品与和 CSAP 的细胞质结构域结合的试剂接触 (iii) 直接或间接地评估样品中结合的 CSAP 的水平。根据本发明的这一方面, 该方法允许在也包含可溶 CSAP 的样品中检测或测量细胞结合的 CSAP。试剂-CSAP 复合物的水平可以用于证明样品中特定细胞结合的 CSAP 的存在或定量样品中特定细胞结合的 CSAP 分子的数量。通过使用关于平均多少 CSAP 分子存在于特定细胞类型的表面上的信息, 可以评估样品中存在的具有 CSAP 的细胞的数目。

[0064] 与 CSAP 的细胞质结构域或可溶形式的 CSAP 结合的试剂可以是任何 CSAP 结合试剂, 例如配体, 适体或抗体, 然而方便地制备特异性抗体或其抗原结合片段。特别地, 抗体可以方便地与可检测标记缀合或与可检测标记一起产生或与缀合至可检测标记的第二或随后的抗体结合。

[0065] 可以以本领域已知的任何方便的形式进行免疫测定。其包括 Western 印迹, 免疫组织化学测定和 ELISA 测定。由于大量产生单克隆抗体的能力和产物的同质性, 免疫测定中特别优选使用单克隆抗体。然而, 如本文所示, 也可以使用多克隆抗体。用于产生单克隆抗体的杂交瘤细胞系的制备通过将永生细胞系和敏化的抗目的抗原的淋巴细胞融合而得到 (在非限制性实例中, 在 CD4 多肽的情况下, 抗体为肽 1 或 2 或其同源物, 衍生物, 变体) 或可以通过本领域技术人员公知的技术进行 (参见, 例如 Douillard 和 Hoffman, Basic Facts about Hybridomas, Compendium of Immunology 第 II 卷, 由 Schwartz 编辑, 1981; Kohler 和 Milstein, Nature 256:495-499, 1975; European Journal of Immunology 6:

511-519, 1976 或更新的参考文献 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001)。

[0066] 本发明的另一个方面关注用于检测来自受试者的生物样品中的 CSAP 的方法, 所述的方法包括在足以使抗体-CSAP 复合物形成的条件下, 将所述生物样品与对 CSAP 的细胞质结构域特异的抗体接触一段时间, 然后检测所述复合物。

[0067] 可以用很多方式, 例如通过 Western 印迹和 ELISA 方法评估 CSAP 的存在。可使用大量的免疫测定技术, 如可以参见美国专利 4, 016, 043, 4, 424, 279 和 4, 018, 653。这些包括非竞争型的单个位点和两个位点或“夹心”测定, 以及传统的竞争结合测定。

[0068] 夹心测定为最有用的和普遍使用的测定之一并且适合用于本发明。存在很多夹心测定技术的变形, 并且本发明意欲包括所有变形。简单来说, 在通常的正向测定中, 将抗体固定于固体或半固体基底上并且使待测试的样品与结合的分子接触。在温育合适的时间(一段足以允许抗体-抗原复合物形成的时间)后, 然后添加用能够产生可检测信号的报告分子标记的对抗原特异的第二抗体并温育, 进行足以形成另一个抗体-抗原-经标记的抗体的复合物的时间。清洗掉任何未反应的物质, 并且通过观察由可检测的标记(报告分子)产生的信号确定 CSAP 的存在。通过简单观察可视信号, 结果可以是定性的或定量的, 或可以通过与包含已知数量的 CSAP 的对照样品比较, 定量结果。正向测定的变形包括同时测定, 其中同时添加样品和经标记的抗体至结合的抗体。这些技术对本领域技术人员来说是公知的, 其包括任何小的明显的变化。根据本发明, 样品为可能包含 CSAP 的样品, 例如细胞提取物或活组织检查样品。因此, 样品通常为包含生物体液的生物样品。

[0069] 在通常的正向夹心测试中, 针对 CSAP 的细胞质结构域具有特异性的第一抗体共价或被动地与固体或半固体支持物结合。支持物通常为玻璃或聚合物, 最常用的聚合物为硝酸纤维素, 纤维素, 聚丙烯酰胺, 尼龙, 聚苯乙烯, 聚氯乙烯, 聚丙烯或这些物质的混合物或衍生物。固体支持物可以为管, 珠, 盘或微孔板的形式, 或任何其他适合于进行免疫测定的表面。结合过程是本领域公知的并且通常由交联共价结合或物理吸附聚合物-抗体复合物到固体表面组成, 所述表面然后在测试样品的制备中进行清洗。然后, 将待测试的样品的等分试样添加到固相复合物并且在合适的条件(例如从室温至约 37°C 包括 25°C)下温育一段足够的时间(例如 2-40 分钟或如果适宜, 过夜)以允许存在于抗体中的任何亚基的结合。温育后, 清洗抗体亚基固相并且与对抗原的部分特异的第二抗体一起温育。第二抗体连接到用于指示第二抗体与抗原的结合的可检测的标记。

[0070] 可选的方法包括固定生物样品中的靶分子然后将固定化的靶暴露于特异性抗体, 所述的抗体可以用或者可以不用可检测标记进行标记。取决于靶的数量和可检测标记的信号强度, 可以通过直接用抗体标记检测结合的靶。可选地, 将对第一抗体特异的经标记的第二抗体暴露于靶-第一抗体复合物以形成靶-第一抗体-第二抗体三联(tertiary)复合物。通过由报告分子发出的信号检测复合物。基于珠粒的方法的显著改进包括用独特的识别标签(例如寡核苷酸或电泳标签)标记各个珠粒, 以便促进各个文库成员的氨基酸序列的鉴别。这些改进的基于珠粒的方法在国际公开号 WO 93/06121 中描述。

[0071] 在其他实施方案中, 该方法为液相方法。在液相免疫测定的一个实例中(参见例如美国专利 6, 632, 603), 将样品与能够结合 CSAP 的细胞质部分的试剂和包含视觉可检测的试剂(例如标记的胶体金或银)的检测子试剂接触。通过流到不溶多孔支持膜的指定区

域上来应用测试样品,所述的不溶多孔支持膜具有不能使 CSAP(如果存在)与结合物和检测子物质形成的复合物通过,但可以使结合物和检测子物质(当不存在期望的 CSAP 时保持未复合)通过的孔径。如果在测试样品中存在 CSAP,检测子物质与 CSAP 和结合物结合以在多孔支持膜表面形成视觉可检出的复合物。在将测试样品应用到多孔支持物后,直观检查多孔支持物的表面的颜色以确定测定的 CSAP 的存在和数量或不存在。

[0072] 在另一个测定中,与 CSAP 标记结合的磁性抗体用于标记 CSAP 并且使用高 T_c 超导量子干涉仪以测量游离和结合的抗体的数量并且因此测量 CSAP 的存在或水平。例如,脂质体免疫迁移,液相竞争试纸条免疫测定在 Glorio-Paulet 等人 J Agric Food Chem 48(5): 1678-1682, 2000 中描述。

[0073] 用于进行不同形式的 ELISA 的通用的形式和方案已在本领域中公开并且对诊断学领域的技术人员来说是已知的。例如,可以参考 Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002 的第 11 章。

[0074] 在进一步优选的实施方案中,与 CSAP 的细胞质结构域结合的试剂用于将 CSAP 连接到固体或半固体支持物。这允许将样品中的任何可溶 CSAP 从 CSAP 物理分离,然后 CSAP 可以用与 CSAP 的细胞外结构域结合的试剂检测。

[0075] 在另一个实施方案中,该方法包括 (i) 任选地,将样品与能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的试剂接触, (ii) 将待测试的样品与和 CSAP 的细胞外结构域结合的试剂接触,从而 CSAP 和 CSAP 的可溶形式与试剂结合并且形成包含试剂-CSAP 和 / 或试剂-sCSAP 的复合物 (iii) 任选地,如果试剂不是已经结合至或另外与固体或半固体支持物的区域相关联,则将样品与固体或半固体支持物接触以便试剂和任何试剂-CSAP 复合物和 / 或试剂-sCSAP 复合物与固体支持物结合 (iii) 将样品与特异性和 CSAP 的细胞质结构域结合的第二试剂接触和 (iv) 直接或间接地确定结合的第二试剂的存在或水平。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明提供用于确定来自受试者的样品中 a) 包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的在细胞表面上表达的蛋白(CSAP)或具有 CSAP 的细胞的水平或存在和 b) 样品中 CSAP 的可溶的非膜结合的细胞外形式的存在水平的方法。在该实施方案中,将样品进一步与结合可溶形式的 CSAP 的试剂接触。在其中还测量可溶 CSAP 的水平或存在的实施方案中,评估步骤 (iii) 区别试剂-CSAP 复合物和试剂-sCSAP 复合物。在该实施方案中,可以确定来自受试者的样品中细胞结合的 CSAP 和可溶 CSAP 的相对存在或数量。

[0077] 在一些实施方案中,该方法包括 (i) 将来自受试者的样品用于具有特异性与 CSAP 的细胞质结构域结合的抗体的层析或免疫成像装置的部分,以便基本上只有包含细胞质部分的细胞结合的 CSAP 被捕获到测试部分上。在其中需要检测可溶 CSAP 的存在或水平的一些实施方案中,层析装置的另一个部分具有结合可溶 CSAP 的抗体,以便任何可溶 CSAP 被捕获到层析装置的另外的测试部分。当然,与可溶 CSAP 细胞外结构域结合的抗体也能够与 CSAP 的细胞外结构域结合。然而,如果存在于样品中的所有 CSAP 经由抗细胞质结构域的抗体与装置的其他部分结合,则抗可溶 CSAP 的抗体将只结合 CSAP 的可溶形式。

[0078] 在一些实施方案中,待测试的样品包含得自身体(例如脊髓液,骨或组织样品,血清,血浆,唾液,泪液和乳液)的细胞。在一些实施方案中,测试样品为全血或稀释的全血为全血衍生物。在一些实施方案中,可以在抗凝血剂(例如肝素,柠檬酸钠或乙二胺四乙酸

(EDTA)) 存在的条件下保存血液。

[0079] 在一种或多种上述方法中,检测步骤包括将结合的 CSAP 与和 CSAP 结合且包含检测标记或能够与包含检测标记的第三结合试剂结合的第二结合试剂接触,和检测检测标记。在一些特别的实施方案中,CSAP 结合试剂为抗体或其抗原结合片段。类似地,在一些实施方案中第二结合试剂为与 CSAP 结合(包括与 CSAP 的细胞质或细胞外结构域结合)的抗体或其抗原结合片段。

[0080] 如上所述,该方法的特别的实施方案包括评估样品中具有 CSAP 的细胞的数目。在一些实施方案中,这通过将结合的 CSAP 的水平或存在,或结合的检测标记的水平或存在与预先确定的对照比较而实现。在一些实施方案中,预先确定的对照为预先确定量的对照多肽,当与可视的检测标记结合时,其足以产生信号,提供与由预先确定数目的 CSAP 细胞产生的信号等价的可视的内标。

[0081] 用于评估细胞的方法取决于所用的方法的形式并且 ELISA 类型,流式细胞术或层析法都是预期的。在其中所述方法为 ELISA 或层析方法的一些实施方案中,与 CSAP 的细胞质结构域结合的 CSAP 结合试剂固定在固体或半固体支持物上。在其他实施方案中,所述方法为 ELISA 或层析法并且与 CSAP 结合包括与 CSAP 的细胞质或细胞外结构域结合的第二结合试剂固定于固体或半固体支持物上。

[0082] 所述方法适合在免疫层析装置中使用。在这方面的一些实施方案中,提供了用于评估来自受试者的样品中包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的细胞表面结合蛋白(CSAP)的水平或具有 CSAP 的细胞的水平的方法。在一些实施方案中,该方法包括:a) 将测试样品用于免疫层析装置的样品部分,其中的样品部分可操作地与装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向并通过捕获部分,所述的捕获部分包含与 CSAP 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,以便只有包含细胞质结构域的 CSAP(而非不包含细胞质结构域的可溶 CSAP)与抗体或其片段结合从而形成捕获的 CSAP;b) 将捕获部分与和 CSAP 结合(包括与细胞质或细胞外结构域结合)且包含检测标记或能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合的第二结合试剂接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括 c) 任选地,将第二结合试剂与包含检测标记的第三结合试剂接触;评估检测标记的存在。当然,如果需要,可以使用进一步的结合伴侣。

[0083] 在举例说明性的实施方案中,本说明书提供用于评估来自受试者的血液样品中包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的 T 细胞结合 CD4 的水平或 CD4T 细胞的水平的方法,该方法包括:(i) 任选地,将样品与能够裂解或透化 CD4 T 细胞的试剂接触;(ii) 将样品与和 CD4 细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段接触;和(iii) 直接地或间接地评估样品中结合的 CD4 的水平或存在。

[0084] 在一些实施方案中,步骤(iii)包括将 CD4- 抗体复合物与第二抗体或其抗原结合片段接触,所述的第二抗体或其抗原结合片段与 CD4 结合,包括与细胞质或细胞外结构域结合并且其包含检测标记或其能够与包括检测标记的第三结合伴侣结合,和检测检测标记。在一些实施方案中,该方法包括通过将结合的 CD4 或结合的检测标记的水平或存在与预先确定的对照进行比较来确定样品中具有 CD4 的细胞的数目。在一些实施方案中,预先确定的对照为预先确定量的对照多肽,当与可视的检测标记结合时,其足以产生信号,提供与由预先确定数目的 CD4 细胞产生的信号等价的可视内标。然而如上所述,在一些实施方

案中,该方法为 ELISA,流式细胞术或层析法。

[0085] 在一些实施方案中,所述方法为 ELISA 或层析法并且能够与 CD4 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段(抗-cytoCD4 抗体)固定于固体或半固体支持物上。

[0086] 关于层析装置,可以使用很多不同的形式。然而,在一个实施方案中,提供用于评估来自受试者的血液样品中包含细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的 T 细胞结合 CD4 的水平或 CD4 T 细胞的水平的方法。在一些实施方案中,该方法包括:a) 将测试样品用于免疫层析装置的样品部分,其中样品部分可操作地与装置的捕获部分连接并且其中测试样品的组分从样品部分流向并且通过捕获部分,所述的捕获部分包含与 CD4 细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,以便只有包含细胞质结构域的 CD4(而非不包含细胞质结构域的可溶 CD4)与抗体或其片段结合从而形成捕获的 CD4;b) 将捕获部分与这样的第二结合试剂接触,所述的第二结合试剂与 CD4 结合(包括与细胞质或细胞外结构域结合)并且其包含检测标记或其能够与包含检测标记的第三或随后的结合伴侣结合;c) 任选地,将第二结合试剂与包含检测标记的第三或随后的结合试剂接触;评估检测标记的存在。

[0087] 对于对照多肽来说,在一些实施方案中,对照多肽为至少包含细胞质结构域的 CD4 多肽。关于 CD4 细胞的数目,在一些实施方案中,其为小于 200,小于 250,大于 250,250 至 350,350 至 500,250 至 500 和大于 500 个细胞/ μ l 血液中的一种或多种。在其他实施方案中,CD4T 细胞的数目为少于 200,少于 500,500 至 1000,1000 至 2000,和大于 2000 个细胞/ μ l 血液中的一种或多种。

[0088] 如果需要,可以用多种方法从血细胞中除尽单核细胞或红细胞。在一些实施方案中,通过将样品与结合到固体或半固体支持物的抗 CD14 抗体接触来除尽样品中的单核细胞。在另一个实施方案中,通过将样品与结合到固体或半固体支持物的抗血型糖蛋白抗体接触来除尽样品中的红细胞。

[0089] 在另一个方面中,本发明提供了适合于实施主题方法的装置或试剂盒。

[0090] 在一些实施方案中,提供了层析装置,其包括具有这样的孔径的材料,所述的孔径允许或促进该方法的组分的毛细流动。在一些实施方案中,该装置包括这样的部分,所述部分包含不同孔径的材料,或非多孔材料,紧邻第一材料并且设计用于回收样品或回收或储存该方法的组分的材料。在一些实施方案中,层析装置的部分为分离的,紧邻的或重叠的或设计成在使用中集合。

[0091] 在一些实施方案中,样品垫层析法地与装置的测试部分连接,所述测试部分包含抗体或其抗体结合片段。在举例说明性的实施方案中,受试者为哺乳动物并且测试部分包含抗体,所述抗体在适宜的条件下识别并结合 CSAP 多肽的细胞质结构域。

[0092] 在一些实施方案中,样品垫层析法地与装置的测试部分连接,所述测试部分包含抗体或其抗体结合片段。在举例说明性的实施方案中,受试者为哺乳动物并且测试部分包含抗体,所述抗体在适宜的条件下识别并结合包含 Ig 或 Ig 样结构域的蛋白质的细胞质结构域。

[0093] 在其他实施方案中,CSAP 为受体,例如但不限于细胞因子,激素或神经递质受体,束缚配体,G 蛋白偶联受体,受体蛋白酪氨酸激酶,受体蛋白酪氨酸磷酸酶,蛋白-丝氨酸/苏氨酸激酶和受体鸟苷酸环化酶。

[0094] 在一些实施方案中,当待测试的样品的层析活性部分从样品垫移向并通过测试部

分时,包含细胞质结构域的 CSAP 被捕获到装置的测试或对照部分并且来自样品垫的样品的剩余部分不被捕获。这种安排确保在该实施方案中基本上只有待检测的非可溶 CSAP 允许与检测抗体相互作用,因此,其可以关注于可溶或非可溶 CSAP。在优选的实施方案中,用与 CSAP 的细胞外结构域结合的抗体检测 CSAP 以避免与和 CSAP 的细胞质结构域结合的抗体所用的位点结合。在一些实施方案中,测试样品的未捕获的组分层析法地收集到吸收垫中,所述的吸收垫位于所涉及的测试部分的任意方向。可以通过例如选择合适的网眼或孔径的垫和 / 或通过包含特定试剂例如抗体或凝集素以结合和保留这些组分来将受试者样品的组分,例如红细胞或特定的白细胞保留在样品垫中。例如可以用抗 CD14 抗体保留单核细胞。抗血型糖蛋白抗体可以用于保留 / 除去红细胞。

[0095] 在一些实施方案中,一旦免疫层析装置的测试部分暴露于受试者样品中的 CSAP,通过允许检测标记和测试部分接触,该方法开始进行。在一些实施方案中,检测标记储存在分离的检测标记垫中。

[0096] 在一些实施方案中,检测标记包括视觉可检测报告分子并且在免疫层析装置的测试和 / 或对照部分中,阳性结果基本上可以立即被观察到。在其他实施方案中,可以使用另外的检测方案和装置(例如本领域普通技术人员公知的那些)检测检测标记。例如,除胶体金以外,如本文所示例的,方便地使用其他胶体金属或金属氧化物颗粒或胶体非金属颗粒或染料或有色乳胶。

[0097] 在举例说明性实施方案中,本说明书描述了用于检测或监测来自受试者的样品中的细胞数目的试剂盒,其中所述细胞的特征在于包含含有细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的细胞表面结合蛋白(CSAP)。在一些实施方案中,所述试剂盒包括:(i)层析装置,其包括与样品部分可操作连接的多孔膜,测试(捕获)部分,缀合部分,吸取部分,任选地对照部分和任选地裂解部分;(ii)CSAP结合试剂,例如与CSAP的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述试剂或抗体固定(结合)于一个或多个测试部分和 / 或包含在缀合部分内;和(iii)使用装置以检测或监测样品或受试者中具有CSAP的细胞的水平或存在的说明书。

[0098] 在另外的非限制性的举例说明性实施方案中,所述试剂盒包括:(i)层析装置,其包括与样品部分可操作地连接的多孔膜,测试(捕获)部分,缀合部分,吸取部分,任选地对照部分和任选地裂解部分;(ii)CD4结合试剂,例如与CD4细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述试剂或抗体固定(结合)于一个或多个测试部分和 / 或包含于缀合部分内;和(iii)使用装置以检测或监测样品或受试者中CD4细胞的水平或存在的说明书。当然,此类试剂盒可以以任何合适的形式存在,例如反向或侧向流动的免疫层析形式。在优选的实施方案中,缀合部分包含可视的检测标记。在其他实施方案中,对照部分包含预先确定数量的对照多肽,当与可视的检测标记结合时,其足以产生信号,提供与由预先确定数目的细胞产生的信号等价的内标。在一些实施方案中,对照部分包含预先确定量的至少包含细胞质结构域的对照CD4多肽,当与可视检测标记结合时,其足以产生信号,提供预先确定数目的CD4细胞的可视标准。在一些实施方案中,CD4多肽是缺失跨膜结构域的重组CD4。

[0099] 对于CD4 T细胞的评估,在一些实施方案中,该试剂盒有利地提供一种或多种以下的预先确定的数目:小于200,小于250,大于250,250至350,350至500,250至500和大于500个细胞/ μ l血液。可选地,预先确定的数目为小于200,小于500,500至1000,1000

至 2000, 和大于 2000 个细胞 / μ l 血液中的一种或多种。在一些实施方案中除去红细胞和 / 或单核细胞并且试剂盒使用试剂以实现红细胞和 / 或单核细胞的除尽。在一些实施方案中, 样品垫包含红细胞捕获试剂 (例如血型糖蛋白 A) 和 / 或抗 CD14 磁珠, 其他单核细胞特异性试剂。

[0100] 根据本发明, 已经确定廉价的或一次性磁体在本免疫层析试纸条中有效地实现细胞分离。在一些实施方案中, 所用的磁体具有小于约 5mm 的通过样品的磁场强度范围。在一些实施方案中, 磁体包括在试剂盒中。在一些实施方案中, 磁性材料连接或可连接到样品垫或免疫层析装置的能够接触到样品垫的部分。

[0101] 在另一个实施方案中, 在试剂盒中评估具有 CSAP 的细胞的数目, 其通过: (i) 在一定条件下, 将来自受试者的测试样品用于样品部分, 在所述条件中, 具有 CSAP 的细胞流过捕获部分流向吸取部分; (ii) 使用可视检测标记直接或间接地检测捕获部分中捕获的 CSAP 的存在; 和 (iii) 将 (ii) 中检测标记的信号强度与对照部分的信号强度进行比较, 所述的对照部分包含对照多肽, 提供与由预先确定数目的具有 CSAP 的细胞产生的信号等价的内标。

[0102] 在一些实施方案中, 测试样品与裂解缓冲液接触或通过能够裂解或透化具有 CSAP 的细胞的裂解部分。

[0103] 缺失跨膜结构域的重组 CD4 用作或适于用作所述方法或试剂盒中的对照以确定 CD4 T 细胞的数目。因此, 本发明预期缺失跨膜结构域的重组 CD4 在制备用于定量来自受试者的样品中 CD4 T 细胞的数目的固体或半固体支持物或试剂盒中的用途。

[0104] 在一些实施方案中, 主题方法和 / 或试剂盒用于评估 AIDS 或其他免疫缺陷疾病患者。

[0105] 在一些实施方案中, 受试者为人。然而, 本发明扩展到灵长类, 家畜动物, 实验室试验动物, 伴侣动物和鸟类还有非哺乳动物, 例如爬行类动物。因此, 该方法用于人, 家畜, 兽医和野生动物治疗和诊断。

[0106] 本发明进一步以分割为若干部分的形式提供试剂盒, 其包括进行主题方法所需的试剂和层析装置。通常, 所述试剂盒还包含一套说明书。

[0107] 因此, 在另一个方面, 本发明提供用于评估来自受试者的样品中包含细胞质 (胞质) 和细胞外 (胞外) 结构域的细胞表面结合蛋白 (CSAP) 的水平或存在或具有 CSAP 的细胞的水平或存在的试剂盒, 其以分割为若干部分的形式包含免疫层析装置, 所述的免疫层析装置包含回收样品的部分, 回收或包含检测标记的部分, 及包含试剂 (例如与在细胞表面上表达的蛋白 (CSAP) 的细胞质结构域结合的抗体或其抗原结合片段) 的装置的测试和对照部分。在一些实施方案中, 所述装置的部分是分离的, 紧邻的或重叠的。在一些实施方案中, 试剂盒使用反向流动免疫层析。在其他实施方案中, 试剂盒使用侧向流动免疫层析。在一些实施方案中, CSAP 为特定细胞类型的标记, 例如包含 Ig 或 Ig 样结构域的蛋白。在一个实施方案中, 细胞标记选自分化簇 (CD) 抗原。在示例性的实施方案中, CSAP 为 CD4。在本发明的这一方面中, CD4 或具有 CD4 的细胞的水平是受试者需要抗逆转录病毒治疗的指标。特别地, 在患有 HIV 感染的受试者的情况下, 小于约 200 个细胞 / μ l 血液或小于 250 个细胞 / μ l 血液的水平表示需要抗逆转录病毒治疗。根据本发明的这一方面, 提供了这样的免疫层析装置, 其允许在临床有用的范围中, 例如小于 250, 大于 250, 250 至 350, 350 至

500,250 至 500 和大于 500 个细胞/ μ l 血液,定量评估 CD4 T 细胞。在一些实施方案中,这些范围或其修改版本 (amended versions) 用于监测 HIV 患者。在另一个实施方案中,适合于监测儿科 HIV 患者的装置允许定量评估少于 500,500 至 1000,1000 至 2000,和大于 2000 个细胞/ μ l 血液的 CD4T 细胞。

[0108] 在另一个实施方案中,CSAP 为受体,例如细胞因子,激素或神经递质的受体。在一个优选的实施方案中,受体为 TNF 受体。

[0109] 本文涉及的术语“造血细胞”包括未分化的造血干细胞 (HSC) 和任意一种或多种源自 HSC 的血细胞类型。该术语涉及多潜能细胞和最终产生完全分化的成熟血细胞的各种不同形式的髓性或淋巴性多能细胞 (myeloid-or lymphoid-restricted cell)。在成人中,HSC 存在于骨髓,外周血,肺,肝,脾和其他器官中。HSC 为祖细胞等级 (hierarchy) 的第一级。它们能够长期自我更新 (长期 (LT)-HSC)。LT-HSC 分化为短期多潜能 HSC (ST-HSC),其保留产生所有血细胞类型的能力但是只增殖相对短的时间。其次,产生淋巴祖细胞 (其最终产生免疫细胞),以及产生骨髓祖细胞 (其最终主要产生红细胞和血小板及一些先天性免疫细胞)。这些祖细胞具有不同的增殖和分化能力并且从这些细胞最终产生终末分化细胞。因此,涉及的 HSC 和造血祖细胞包括所有上述祖细胞并且涉及的造血或血细胞包括它们的任何终末分化后代 (descendant)。这些包括但不限于:HSC,造血干细胞;CLP,淋巴共同前体细胞 (common lymphoid precursor);CMP,髓共同前体细胞 (common myeloid precursor);GMP,粒细胞巨噬细胞前体 (granulocyte-macrophage precursor);MEP,巨核细胞-类红细胞前体 (megakaryocyte-erythroid precursor);CFU-GM,粒细胞/巨噬细胞集落生成单位 (colony forming unit-granulocytic/macrophage);CFU-G,粒细胞集落生成单位 (colony forming unit-granulocytic);CFU-M,巨噬细胞集落生成单位 (colony forming unit-macrophage);CFU-Mk,巨核细胞集落生成单位 (colony forming unit-megakaryocytic);BFU-e,类红细胞爆发集落形成单位 (Burst-forming unit erythroid);和 CFU-E,类红细胞集落生成单位 (colony forming unit-erythroid cells),和它们的后代。

[0110] 本文涉及的“CD”蛋白或多肽包括一种或多种选自以下的 CD 抗原:CD1a, b, c, d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, b, c, d, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79 α , β , CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD97, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CDw128, CD129, CD130, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153,

CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD157, CD158, CD158a, CD158b, CD159a, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD183, CD184, CD195, CDw197, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CDw210, CD212, CD213a1, CD213a2, CDw217, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246 和 CD247。此类分子和在其上发现此类分子的细胞在 Janeway 等人, Appendix II. CD Antigens, Immunology, Garland Publishing, New York, 5th edition, 2001 中描述, 其以其全文通过引用并入本文。

[0111] 本文涉及的“层析装置”包括本领域已知的用于促进或支持层析流动或分离的任何固体, 半固体, 基质或凝胶材料的装置。如本文所用的, 样品的组分(包括抗体), 和检测标记-抗原复合物和其组分, 通过毛细流动或经由层析材料的扩散相对于彼此移动。可以官能化或包被材料以允许例如试剂的交联。用于将抗体固定到固体支持物的方法是本领域公知的并且例如在美国专利 4, 168, 146, Cautrecases J. Biol. Chem. 245 :3059, 1970 中描述。预期用于本文的材料包括无机材料, 例如二氧化硅, 玻璃, 聚合材料例如纤维素, 淀粉, 右旋糖, 琼脂糖, 特殊的纤维纸(过滤/层析纸), 硝酸纤维素, 醋酸纤维素, PVC, 聚丙烯酰胺, 多糖, 聚丙烯酸酯, 聚乙烯基磺酸酯(polyethylensulphonate), 聚乙烯等。

[0112] “层析活性”组分简单地指能够流经免疫层析装置的全部或部分的组分。

[0113] 本文涉及的“得自”、“源自”表示样品获得自特定来源但并非必须直接来自该来源。

[0114] “抗体”包括与抗原相互作用的免疫球蛋白基因产物, 即抗原结合试剂, 其片段和得自非免疫球蛋白基因的能够用作抗原结合试剂的蛋白分子。因此, 术语抗体包括多克隆和单克隆抗体和其部分, 包括 Fab 部分和抗原结合决定簇。免疫球蛋白基因包括 κ , λ , α , γ , (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄,) δ , ϵ , 和 μ 恒定区和多种可变区基因。

[0115] 通常, 免疫球蛋白包含两对相同的免疫球蛋白链, 每对包含具有抗原结合区的轻链(V_L)和重链(V_H)可变部分。每对还包含提供种属(generic)抗体功能的恒定区。免疫球蛋白的其他形式为 F_v, scF_v, Fab, Fab¹, 和 (Fab¹)₂ 形式。涉及的抗体的“类(class)”包括涉及的任何类例如 IgM, IgG, IgA 等。

[0116] 快速而精确地确定 CD4⁺ 细胞水平的能力对于评估受试者响应抗病毒剂或发起免疫反应的能力是重要的。

[0117] 如本文所用的, 涉及的“检测”, “评估”, “计数”指它们的最广泛的意思以包括这样的测定, 其在 sCSAP 存在下对 CSAP 的存在或水平和由此的 CSAP 阳性细胞的数目进行定性或定量地或半定量地测试, 或其通过使用能够区别 CSAP 和 sCSAP 的试剂定性或定量测试 CSAP 和 sCSAP 的存在或水平。

[0118] 层析测定特别成熟并且可以使用很多不同的形式, 其经裁制适合于任何特别的研究中所需要的特别的试剂和仪器和结果。使用层析原理的“快速”测定经裁制适合于精确, 快速和容易地使用。特别优选免疫测定或基于酶(layer析测定并且这些在 Wild D" The Immunoassay Handbook", Nature Publishing Group, 2001 中描述并且可参考并入本文的美国专利 4, 016, 043 ; 4, 590, 159 ; 5, 266, 497 ; 4, 962, 023 ; 5, 714, 389 ; 5, 877, 028,

5, 922, 537, 6, 168, 956 和 6, 548, 309, 6, 180, 417, 和 5, 266, 497 以及其中引用的文献所公开的信息。免疫层析方法的各种改进在公开的美国专利申请 20010006821, 20040087036 和 20040214347 中描述, 其以其全文通过引用并入本文。用于多分析物分析的免疫金渗滤法在并入本文的公开的美国专利申请 20030165970 中描述。

[0119] “检测标记”或“报告分子”指这样的分子或颗粒, 所述分子或颗粒通过其化学性质提供允许检测抗原结合的抗体的经分析可鉴别的信号。如所公认的, 可以使用大量不同的报告系统并且允许快速的可视检测的那些报告系统显然在即席检验诊断的环境中是最有用的。

[0120] 在一些实施方案中, 检测标记为胶体颗粒或微粒。胶体金属和类金属颗粒包括包含金, 银, 铂, 铁, 铜, 硒的那些颗粒; 金属复合物 (例如三羰基环戊二烯锰 (I) (cyclopentadienylmanganese (I) tricarbonyl), 金簇 (gold cluster)); 和微粒 (例如乳胶和染色的乳胶颗粒)。

[0121] 本发明扩展到在该类型的免疫测定中使用任何常用的报告分子, 例如酶, 荧光团或包含放射性核素的分子和化学发光分子进行定性或定量检测。在酶免疫测定的情况下, 酶通常通过戊二醛或高碘酸与第二抗体缀合。常用的酶包括辣根过氧化物酶, 葡萄糖氧化酶, β 半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。与特异性酶一起使用的底物通常就可检测的颜色变化的产生 (基于由相应的酶进行的水解) 进行选择。合适的酶的实例包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。还可以使用荧光底物, 其产生荧光产物而非上述生色底物。在所有情况下, 将酶标记的抗体添加到第一抗体抗原复合物, 允许它们结合, 并且清洗掉过量的试剂。然后, 将包含合适的底物的溶液添加到抗体-抗原抗体复合物。底物将与连接至第二抗体的酶反应, 产生定性的可视信号, 其可以进一步定量 (通常利用分光光度法定量) 以提供存在于样品中的抗原的数量的指示。可选地, 将荧光化合物, 例如荧光素和罗丹明化学偶联至抗体而不改变它们的结合能力。当通过照射特定波长的光进行激活时, 荧光染料标记的抗体吸收光能诱导分子的可激发的状态, 接着发出用显微镜视觉可检测的具有特征性波长的光。

[0122] 涉及的“抗体”包括人源化的, 重组的, 合成的, 杂合的和单链抗体。抗体可以方便地进行制备和使用, 如例如在 Harlow 和 Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 中所述。单克隆抗体可以方便地以纯化形式大量制备。用于生产单克隆抗体的杂交瘤细胞系通过融合敏化的淋巴细胞和永生细胞系并且选择特异性抗体产生细胞来制备, 该制备如 Harlow 和 Lane (同上); 以及 Kohler 和 Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519, 1976 中所述, 其在该领域中是常规的。

[0123] 用于构建噬菌体抗体展示文库和 λ 噬菌体表达文库的方法是本领域公知的 (Kang 等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88:4363, 1991; Clackson 等人, *Nature*, 352:624, 1991; Lowman 等人, *Biochemistry*, 30:10832, 1991; Burton 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88:10134, 1991; Hoogenboom 等人, *Nucleic Acids Res.*, 19:4133, 1991, 以其全文通过引用并入本文)。一个特别有利的方法使用 scFv 噬菌体文库 (Huston 等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:5879-5883, 1988; Chaudhary 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:1066-1070, 1990; Clackson 等人, 1991, (同上))。展示在噬菌体外壳蛋白上的 scFv 文库的各种实施方案已经被描述。其他的噬菌体展示方法也是已知的, 例如, 如国

际公开号 WO 96/06213 和 WO 92/01047 (Medical Research Council 等人) 和国际公开号 W097/08320 (Morphosys) 中所述, 其通过引用并入本文。

[0124] 可以克隆并在例如酵母的表面上表达抗体单链 Fv 片段。通过筛选和分选来选择高亲和力的 scFv。使用链替换策略开发高亲和力抗体, 即通过用来自未免疫供体的全套 (repertoire) v- 基因顺序取代重链和轻链可变 (v) 区基因。可以使用来自任何物种的包含 csFv 的抗体。

[0125] 展示系统特别有用, 其使得能够将核酸连接至它表达的多肽。用于从大文库分离期望的成员的方案是本领域已知的, 如由噬菌体展示技术所代表的。此类系统 (其中不同的肽序列展示在丝状噬菌体的表面上) 用于产生抗体片段 (和编码它们的核苷酸序列) 的文库, 所述文库用于体外选择和扩增与靶抗原结合的特异性抗体片段。编码 V_H 和 V_L 区的核苷酸序列与这样的基因片段连接, 所述的基因片段编码将它们导向大肠杆菌 (E. coli) 的周质空间的前导信号从而所得的抗体片段展示在噬菌体的表面上 (通常与噬菌体外壳蛋白 (例如 pIII 或 pVIII) 融合)。可选地, 抗体片段外向地展示在 λ 噬菌体衣壳 (噬菌体) 上。基于噬菌体的展示系统的优点在于所选择的文库成员可以通过在细菌细胞中培养包含所选择的文库成员的噬菌体容易地进行扩增。此外, 由于编码多肽文库成员的核苷酸序列包含在噬菌体或噬菌粒载体上, 因此, 测序, 表达和后续的遗传操作相对容易。

[0126] 本发明进一步通过下列非限制性实施例进行描述。

[0127] 实施例 1

[0128] 抗 CD4 的细胞质或细胞外结构域的多克隆和单克隆抗体

[0129] 在绵羊中产生抗两种人 CD4 胞外结构域亚序列 P1 和 P2 (SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2) 的抗 CD4 多克隆抗体。肽序列和肽在细胞质 CD4 序列中的位置在图 2 中展示。使用标准方法, 用 P1 和 P2 注射两只绵羊, G-6 和 G-7。使用固定的生物素化的肽通过 ELISA 确定并使用与辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素检测抗 CD4_{cyto} 的多克隆抗体的特异性和滴度。结果在图 3(A) 绵羊 G-6 和 (B) 绵羊 G-7 中进行图示。来自任一绵羊的血清同等良好地识别肽 1 和肽 2 (见图 4)。还产生抗肽 2 的单克隆抗体并且通过 ELISA 测试其抗 CD4_{cyto} 的肽 2 (见图 5)。

[0130] 在免疫荧光测定中, 在 HeLa 细胞和 JC53 T 细胞上测试单克隆抗体 1D2 和 4B4 的反应性。两种单克隆抗体 (10 微克每微升) 都没有表现出对 HeLa 细胞的反应性。然而, 抗体识别固定的 T 细胞上的细胞内组分。识别 CD4 的胞外结构域的 SIM2 单克隆抗体不识别 HeLa 细胞但在 10 微克每微升的浓度下表现出与 JC53 细胞的表面结合。如所预期的, 单克隆抗体 1D2 和 4B4 不能结合新鲜的 CD4 阳性 T 细胞 (图 6)。相反, 单克隆抗体 1D2 和 4B4 都检测透化的 (permeabilised) 细胞 (见图 7C 和 D)。

[0131] 可以从不同物种产生抗 CD4 分子的抗体或抗原结合片段。在举例说明性的实例中来自小鼠, 兔, 鸡, 绵羊的细胞质结构域的序列提供如下。

[0132] 人 CD4 :₄₂₁rchrhrrrqae rmsqikrlls ekktcqcphr fqkctspi₄₅₈

[0133] 小鼠 CD4 :₄₂₀rcrh qq rqa a rmsqikrlls ekktcqcphr m qk shnl i₄₅₇

[0134] 兔 CD4 :₄₂₂k crhrr h qaq rmsqik k lls ekktcqcphr l qkt ynll ₄₅₉

[0135] 鸡 CD4 :₄₅₅r **wqr** rr **kr** ar rm **a** q **a** k **qy** l **l** ekktcqc **qr** r **my** k₄₈₇

[0136] 绵羊 CD4 :₄₁₈ **k** c **w** hrrrrqae rmsqikrlls ekktcqcphr **l** qkt **h** s **lt** ₄₅₅

[0137] 加框的残基突出人 CD4 和其他物种 CD4 之间的区别。

[0138] Key :人 & 小鼠 (~ 79% 的保守序列 30/38)

[0139] 人 & 兔 (~ 76% 的保守序列 29/38)

[0140] 人 & 鸡 (~ 55% 的保守序列 18/33)

[0141] 人 & 绵羊 (~ 84% 的保守序列 32/38)

[0142] NB.

[0143] 序列“ekktcqc”为推定的 p56^{lck} 结合位点,在所有物种中保守。

[0144] 实施例 2

[0145] CD4 ELISA

[0146] 开发 CD4 捕获 ELISA 以允许定量细胞结合 CD4 而不受缺失细胞质结构域的可溶 CD4 的干扰。抗 CD4 细胞质结构域的抗体用作“捕获”抗体,其与作为“检测”抗体的抗 CD4 细胞外结构域的抗体结合使用。只测量细胞结合 CD4 而排除缺失细胞质结构域的可溶 CD4 或被抗 CD4_{cyto} 的抗体识别的表位。CD4 捕获 ELISA 表现出与流式细胞术紧密关联并且适于提供如本文所示的快速即席检验诊断测试。

[0147] 图 9 展示测量抗 CD4 细胞质结构域的单克隆抗体,包括商业可获得的抗 CD4 单克隆抗体 (Chemicon) 的反应性的 ELISA 的结果。产生抗如图 2 中所示的肽 1 (SEQ ID NO :1) 和肽 2 (SEQ ID NO :2) 抗体。

[0148] 图 10 展示测量抗 CD4 细胞质结构域的单克隆抗体 1D2 的特异性和从 JC53 细胞裂解物捕获 CD4 的能力的捕获 ELISA 的结果和用抗 CD4 胞外结构域的单克隆抗体 (PRAT4) 检测的结果。

[0149] 图 11 展示测量抗 CD4 的细胞质结构域的单克隆抗体 1D2 的特异性和从 JC53 细胞裂解物捕获 CD4 的能力的捕获 ELISA 的结果和用抗 CD4 的胞外结构域的多克隆抗体检测的结果。

[0150] 图 12 展示来自供体外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞 CD4 的捕获 ELISA 的结果。A) 展示由单克隆抗体 4B4 从供体 1 至 6 捕获的 PBMC 裂解物的滴定。B) 展示富含细胞 CD4 的淋巴细胞的捕获。

[0151] 在举例说明性实施方案 (ELISA 方案) 中,标准量的包含细胞质和细胞外结构域的 CD4 在 PBS+0.5% Tween20 中稀释用作对照。将全血或稀释的血液添加到等体积的包含 10% Triton-X100 裂解缓冲液的裂解缓冲液中并且分配到用抗 CD4cyto 抗体包被的标准 ELISA 板的指定孔中。密封 ELISA 板并且在室温 (18 至 23°C) 下温育 60 分钟。抗 CD4 胞外结构域的生物素化的抗 CD4 单克隆抗体在 0.05% Tween20 中进行稀释以得到 0.25 微克每微升的终浓度。用标准 ELISA 清洗缓冲液清洗 ELISA 板并且排干然后往各个孔添加稀释的抗 CD4 生物素化单克隆抗体 100 微升。密封平板并且在室温下温育 60 分钟。之后,用 ELISA 清洗缓冲液清洗平板 (6 次) 并且排干。链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物以 1 : 1000 稀释于 PBS 0.05% Tween20 中并且往各个孔添加 100 微升。密封 ELISA 板并且在室温下温育 60 分钟。之后,在根据厂商说明书添加稀释于底物缓冲液中的酶生色 (chromogene) 底物四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine) (TMB) 之前,清洗平板并且排干。允许酶反应

在黑暗中在室温下进行大约 15 分钟并且在底物温育结束时,向各个孔添加 100 微升原液 (stock solution),之后使用具有 450 毫米滤光器和 620 毫米滤光器的双 λ ELISA 酶标仪 (ELISA reader) 读取平板的光密度作为参考。计算平均标准偏差和 % CV 并且使用散点图产生平均 OD 读数 (reading)。

[0152] 实施例 3

[0153] 捕获 ELISA 测定展示 OD 和 CD4⁺T 细胞的数目之间的关联

[0154] 进行来自供体外周血单核细胞 (PBMC) 的细胞 CD4 的 ELISA 并且结果示于图 13 和图 14 中。来自三个供体的结果示于图 13 上并且展示 OD₄₅₀₋₆₂₀ 和每微升 CD4⁺T 细胞数目之间的关联。来自 5 个单独的 HIV 感染患者的临床样品的结果示于图 14 中并且证明 OD₄₅₀₋₆₂₀ 和每微升全血的 CD4⁺T 细胞的数目之间的正关联。

[0155] 实施例 4

[0156] 根据本发明的使用抗 CSAP 的细胞质结构域的抗体的免疫层析装置

[0157] 免疫层析或免疫成像装置提供了在由全世界很多不同公司生产的大量的快速的即席检验诊断测试中使用的有力的技术。其在生产能力上过剩并且在目标国家中使该技术容易被接受。已经使用免疫层析装置作为测试平台以测量作为 CD4T 细胞数目的关联物的细胞结合 CD4。在这些测定中可溶 CD4 (包含细胞外结构域而不包含细胞质结构域 (存在于血液中)) 被排除。另外,在一些实施方案中,在主题测定中排除在单核细胞上表达的 CD4。在一些实施方案中,通过与各个试纸条中的标准进行视觉比较,免疫层析装置提供了 CD4 T 细胞数目的定量评估 (小于 250, 大于 250, 250 至 350, 350 至 500, 250 至 500 和大于 500 个细胞每微升)。这满足了目前用于成年患者开始使用抗逆转录病毒药物的标准。具有检测适当的细胞数目的适当的方法的其他的测试用相同的方法进行制备,其用于监测儿科 HIV 患者,所述的儿科 HIV 患者具有平均较高的 CD4 T 细胞数 (即小于 500, 500 至 1000 和 1000 至 2000 个细胞每微升)。

[0158] 因此,在图 15 中示意性描述用于检测全长细胞结合 CD4 和评估 CD4⁺ 细胞数目的免疫层析装置。通过划出由抗人 CD4 的细胞质结构域的单克隆抗体组成的测试线,由抗小鼠 IgG 组成的对照线 (或其他对照),和在测定进行期间提供指导的惰性限制线 (inert limit line) 来制备多孔膜 (例如硝酸纤维素)。将硝酸纤维素与下列装配在一起:在一端的“样品垫” (样品部分),所述的样品垫由多孔材料组成,对其应用指定量的血液并且可以对其添加试剂以捕捉样品中的红细胞或单核细胞和其他外来物质,包含裂解缓冲液的第二样品垫 (裂解部分),和在另一端的“缀合垫” (缀合部分),其由多孔材料组成,对其应用由与抗 CD4 抗体缀合的检测试剂组成的缀合物 (检测标记),和吸收材料 (吸取部分)。

[0159] 在一些实施方案中,裂解步骤在某些情况下是任选的,例如当使用能够穿透细胞的抗体或其它试剂时或当受试者患病并且无论如何,大部分特定细胞类型允许抗 CSAP 的试剂渗透通过时。

[0160] 实施例 5

[0161] 全长 CD4 和缺失跨膜结构域的重组可溶全长 CD4 (TM⁻CD4) 的克隆和表达

[0162] 要求 CD4 的 ELISA 和快速即席检验测试定量或半定量测量存在于样品中的细胞结合的和 / 或可溶 / 细胞外 CD4 的总量,提供 CD4T 细胞的数目的评估。为此,具有明确来源的 CD4 是有用的,其可以用于质量控制并且用作测定标准。人 T 细胞或用全长人 CD4 转化的

细胞可以用作 CD4 的来源,但是其产量可能不一致并且需要大量纯化膜结合 CD4 分子。本发明人推断,以可溶形式从细胞中释放同时保留对于 CD4 捕获 ELISA 中的反应性来说是必需的细胞质结构域的重组形式的 CD4 将更适用于该目的。本领域已知蛋白质跨膜结构域的缺失可以导致融合的细胞外结构域-细胞质结构域蛋白的分泌。因此,制备缺失跨膜结构域的 CD4 变体,将其称为 TM⁺CD4。该蛋白的示意性结构示于图 1 中。

[0163] CD4 序列获得自 T4pmV7 质粒,该质粒获得自 NIH AIDS research and reference program Cat No 158。为了制备 CD4 的可溶 TM⁺CD4 形式,设计引物以便它们产生两个单独的 PCR 产物。第一产物使用引物 RL1 和 RL3,产生 1.2kb 的条带,其在细胞外结构域的 5' 末端具有 EcoR 1 限制性位点并且在 3' 末端具有相应于细胞质尾的一些重叠序列。第二 PCR 产物使用引物 RL2 和 RL4,产生 120bp 的条带,其在细胞质尾的 5' 末端具有一些重叠的细胞外结构域序列并且在 3' 末端具有 Xba1 限制性位点。为了制备最终的 PCR 产物,将两种 PCR 产物用作第三次 PCR 反应的模板并且使用 RL1 和 RL2 引物。使用引物 RL1 和 RL2 与质粒 T4pmV7 一起在标准 PCR 反应中产生全长 CD4 构建体。

[0164] 引物:

[0165] RL1 5' CGG GAA TTC ACA ATG AAC CGG GGA GTC CC(有义)SEQ ID NO :3

[0166] RL2 5' GGC TCT AGA TCA AAT GGG GCT ACA TGT CTT C(反义) SEQ

[0167] ID NO :4

[0168] RL3 5' G CCT TCG GTG CCG GCA CCT CTG CAC CGG GGT GGA CC(反义)

[0169] SEQ ID NO :5

[0170] RL4 5' GG TCC ACC CCG GTG CAG AGG TGC CGG CAC CGA AGG C(有义)

[0171] SEQ ID NO :6

[0172] 引物 RL1 中的限制性位点 EcoR1 和引物 RL2 中的限制性位点 Xba1 为以粗体和下划线突出。在引物 RL3 和 RL4 中的细胞外区域以粗体和斜体突出并且细胞质尾为正常字体。

[0173] 将全长 CD4 构建体 (FLCD4) 和具有细胞质结构域而不具有 TM 区域的可溶 CD4 构建体 (CD4⁺TM) 克隆到 pcDNA4/HisMax version C (Invitrogen) 的 EcoR1 和 Xba1 限制性位点之间。

[0174] 通过限制性消化和测序鉴别克隆。TM⁺CD4 的插入物和编码的蛋白的完整的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于图 16 (SEQ ID NO :7) 和图 17 中 (SEQ ID NO :8)。所详述的序列的变体是预期的,例如得自不同的天然存在的序列或得自 1 个或多达 20 个核苷酸修饰或氨基酸修饰的那些变体。在一些实施方案中优选导致保守氨基酸改变的修饰并且这些如在表 2 和 3 中所列出。

[0175] 实施例 6

[0176] TM⁺CD4 在 CD4 捕获 ELISA 和 Western 免疫印迹中的检测

[0177] 通过 ELISA 和 Western 免疫印迹检测重组 TM⁺CD4 (参见图 18)。通过各自的 pcDNA4/HisMax 构建体的转染或模拟转染在 293 T 细胞中表达全长 CD4 或 TM⁺CD4,并且使用所描述的方法,通过 CD4 ELISA 测试细胞裂解物和细胞上清液。结果 (参见图 18A) 表明全长 CD4 在细胞中有效表达但是没有释放到上清液中,而 TM⁺CD4 在细胞中有效表达并且大部分重组蛋白释放到上清液中,允许容易地纯化 (如果需要)。用抗 CD4 的细胞质结构域的定制的 MAbs 4B4 (3 μg/ml) 通过 Western 免疫印迹检测培养上清液中的 TM⁺CD4 (参见图

18B)。

[0178] 实施例 7

[0179] 在 ELISA 和快速即席检验测定中作为对照试剂的 TM^{CD4}

[0180] 连续稀释来自用 TM^{CD4} 质粒稳定转染的 HEK293 细胞的上清液 (以 1 : 5 开始稀释) 以用于 ELISA 测定 (A) (参见图 19), 在 ELISA 中显示出线性反应, 证明 TM^{CD4} 可作为对照试剂用于在 CD4 ELISA 测定中评估总的 CD4 T 细胞数目。例如, 在相同的测定中测试四个不同的全血样品 (样品 IDS72, 51, 40, 49), 并且使用所示的回归曲线 (红色) 或其他方法可以评估与标准相比较的 CD4 的相对量。为了能够将 CD4 的量转换为每微升的 CD4 T 细胞的数目, 通过流式细胞术和 ELISA 多次测试全血的参比样品, 并与 TM^{CD4} 标准相比较, 从而允许确定正确的转换因子 (数据未显示)。如图 19B 中所示, 通过免疫层析快速即席检验测定, 检测来自两个不同的稳定的 HEK293-TM^{CD4} 细胞系克隆 (H5 和 F5) 的上清液, 表明 TM^{CD4} 还可以在此类测定中用作阳性对照试剂或标准。在一些实施方案中, TM^{CD4} 用作抗原用于制备 Ab。

[0181] 实施例 8

[0182] 在 CD4T 细胞数的评估中使用 TM^{CD4} 作为标准的 CD4 捕获 ELISA 和流式细胞术之间的强关联

[0183] 使用重组 TM^{CD4} 作为 CD4 ELISA 的内在测定对照, 并且使用基于通过流式细胞术和 ELISA 平行测定参比样品而确定的转换因子, 对于评估的 CD4 T 细胞数目来说, 使用 CD4 ELISA 与使用 CD4 流式细胞术相比获得非常紧密的关联。如图 20 中所示, 当大于或小于 250 个 T 细胞每微升时, 如加框区域中所示, 所有的样品都被正确鉴别。在该测定中, 在通过 ELISA 测定全血的 CD4 T 细胞之前, 用 CD14 磁珠 (Dynabeads CD14 (Dynal Biotech Cat No 111. 49)) 除去全血中的单核细胞。不除去单核细胞通常也可以获得精确的数目。

[0184] 实施例 9

[0185] 在快速即席检验测定中 CD4 (TM^{CD4}) 的量和信号强度之间的关联

[0186] 使用重组 TM^{CD4}, 与测定中的 TM^{CD4} 的量相比, 在快速形式中, 针对信号强度可以看到明显的剂量 - 反应曲线 (参见图 21)。这证明 TM^{CD4} 可作为对照试剂用于 CD4 测定的 ELISA 和快速即席检验形式的制备, 测试和质量控制。本实施例还证明在测试的快速形式中, Chemicon 3706 抗细胞质结构域 Mab 和定制的 4B4 抗细胞质结构域 Mab 可以独立地或作为混合物用于捕获 cyto CD4。此外, 这证明快速形式中信号强度与样品中的细胞结合 CD4 的量成比例, 允许快速即席检验形式用于 CD4 T 细胞数目的定量或半定量评估。

[0187] 实施例 10

[0188] 在快速即席检验测定中 CD4T 细胞的数目和信号强度之间的关联

[0189] 实际测试快速即席检验测试形式的结果, 以所示的每微升的细胞数目使用纯化的 T 细胞 (在测试线反应) (见图 22A)。通过用与抗生物素金缀合物直接反应的生物素化的单克隆抗体划条带, 制备与 500 个 T 细胞 / 微升和 250 个 T 细胞 / 微升等价的对照线。可观察到 (参见图 22B) 视觉区别允许样品中的 CD4T 细胞的水平被正确地鉴别为大于或小于 250 个细胞每微升或大于或小于 500 个细胞每微升。在 Millipore HFP90 硝酸纤维素膜上用 Chemicon MAb 3706 (测试线捕获) 以 0.5mg/ml 划条带进行测试; 样品: 1% Tx100/PBS 中的 50 μL CD4+ve T 细胞; 检测: 13B8. 2- 生物素 / 抗生物素金。显然, 任何反应性蛋白可

以用作对照线,例如但不限于 TM⁺CD4 蛋白,或生物素化的蛋白或抗体或与选择的检测系统反应的其他分子。还显然的是,可以调整对照线和其他测定参数以允许检测任何期望的每微升的细胞水平,例如可用于监测儿科样品的较高的水平(大约 2000 个细胞每微升或者甚至更高)。

[0190] 实施例 11

[0191] 全血中 CD4⁺ T 细胞的快速即席检验测定检测

[0192] 图 23A 提供全血 CD4 快速即席检验测定的一个实施方案的图示。使用本领域公知的方法通过 RBC 保留垫中的抗血型糖蛋白 A(Epiclonanti-N with 0.1% azard Cat No 00992311(HM1)Commonwealth SerumLaboratories(CSL)) 捕获红细胞,而血浆和白细胞(包括 CD4⁺T 细胞)流入去污剂浸渍的裂解垫,其中细胞被裂解并释放 CD4,其然后流入试纸条以与抗 CD4⁺Cyto Mab 反应,随后用生物素抗 CD4⁺胞外 Mab 和抗生物素胶体金检测(见图 23)。(B) 在如 A 中所示的全血测定中测试包含高 CD4⁺ T 细胞水平(通过流式细胞术确定为 1452/ μ l)的全血的样品,如通常在裂解垫中具有去污剂(“+TX”),或从裂解垫除去去污剂(“-TX”)。在一些实施方案中,当存在去污剂例如 Triton-X100 以裂解垫中的 T 细胞时,仅在快速测试中见到 CD4 信号(参见图 23)。这取决于抗 CD4 结合试剂的性质并且可以透过细胞膜的试剂与可以透过细胞膜的检验试剂一起不需要细胞裂解。(C) 在 CD4 快速即席检验测定中测定的代表性全血样品的实例。展示通过流式细胞术确定的各个样品的 CD4 的数量,并且在这一全血形式中可见高 CD4⁺T 细胞数给出较强的信号而低 CD4⁺T 细胞数给出弱的信号。

[0193] 实施例 12

[0194] 除去特定细胞群(单核细胞)以防止在快速即席检验测定中检测它们

[0195] 单核细胞也包含 CD4,在 CD4⁺ T 细胞中发现其为大约 10%的量,并且在基于 CD4 蛋白的测定中单核细胞的存在在一些情况下由于单核细胞 CD4 的影响可导致对 CD4⁺ T 细胞的错误评估。在 ELISA 形式的测定中,可如上所述在测定前通过在本领域公知的方法中使用为此目的而设计的抗 CD14 磁珠和强磁体,从全血中除去单核细胞。该方法还可以用于即席检验测定前的全血的预处理,但是为了即席检验测试,要求优选避免样品的加工和处理。还没有被描述过这样的方法,该方法使用与快速即席检验测定中的内容相容的方法除尽特定白细胞类型或其他细胞类型。本发明人已设计出用于有效除去快速即席检验测试的样品垫中的单核细胞的方法。

[0196] 该方法利用令人惊讶的观察结果,即通过在薄样品垫中进行磁性分离(通过在样品垫上或下放置磁体),使用弱得多的磁场(廉价的“冰箱磁体(fridge magnet)”)足以使已经与磁珠反应的细胞保留,而无须使用昂贵的强磁体(当在样品管中进行保留时,其在本领域广泛使用)。这将允许,例如在用于各个单独的测定的廉价的,一次性使用的装置中,或在用于进行多次测定的廉价的多次使用的装置或壳(housing)中包含合适的磁体。在一些实施方案中,磁体具有小于约 5mm 的磁场以便磁场扩展通过免疫层析装置的样品垫但是不通过,例如在 1cm 或更大直径的试管或容器中的所有细胞悬浮液。合适的磁体的一个实例为铁磁体,其在不存在磁场时保持磁化。在图 24 中,分别用红外荧光染料标记纯化的单核细胞和纯化的外周血淋巴细胞(PBL,除尽单核细胞)-单核细胞用绿色(Mini CellVue NIR815,PTI Research, Inc),PBL 用红色(Mini CellVue Burgundy,PTI Research Inc.)。图

像展示在 Licor Odyssey 红外荧光扫描仪上经不同滤光器观察到的相同样品垫：(A) = 组合滤光器，(B) = Em800，(C) = Em700。磁体使其中使用它的样品垫的扫描变暗。将 1.5×10^4 个单核细胞（与磁珠结合）和 2×10^4 个除尽单核细胞的 PBL 组合并点样到不具有（左）或具有（右）磁体的抗血型糖蛋白 A 包被的样品垫上。用 60u1 PBS 冲洗样品以允许样品流入吸收垫（此处用于代替实际的裂解垫和硝酸纤维素试纸条，用于举例说明性目的）。在存在磁体的情况下在图 (A) 和 (B) 中可以看到保留 $> 80\%$ 的单核细胞（绿色），而没有绿色细胞进入吸收垫，同时在存在或不存在磁体的 (A) 和 (C) 中证明除尽了单核细胞的 PBL 流入吸收垫。(D) 展示如 (A)-(C) 中所示的测试的示意图。对本领域技术人员明显的是，在裂解或测定期望的细胞之前，类似的方法可用于在滤器或样品垫形式中选择性保留或富集任何细胞群。

[0197] 本领域技术人员将认识到本文描述的发明容许除了那些特别描述的变化和改进以外的变化和改进。应理解本发明包括所有此类变化和改进。本发明还包括在本说明书中单独地或共同地涉及或指出的所有步骤，特征，组合物和化合物，以及任意两个或多个所述的步骤或特征的任意的和所有的组合。

[0198] 表 1

[0199] 序列标识符的总结

[0200]

SEQUENCE ID NO :	描述
1	人 CD4 细胞质结构域的肽 1
2	人 CD4 细胞质结构域的肽 2
3	用于产生编码 TM ⁺ CD4 的构建体的引物 1
4	用于产生编码 TM ⁺ CD4 的构建体的引物 2
5	用于产生编码 TM ⁺ CD4 的构建体的引物 3
6	用于产生编码 TM ⁺ CD4 的构建体的引物 4
7	编码 TM ⁺ CD4 的核苷酸序列
8	TM ⁺ CD4 的氨基酸序列

[0201] 表 2

[0202] 氨基酸的亚分类

[0203]

亚类	氨基酸
酸性	天冬氨酸, 谷氨酸
碱性	无环的: 精氨酸, 赖氨酸; 环状的: 组氨酸
带电荷的	天冬氨酸, 谷氨酸, 精氨酸, 赖氨酸, 组氨酸
小的	甘氨酸, 丝氨酸, 丙氨酸, 苏氨酸, 脯氨酸
极性的 / 中性的	天冬酰胺, 组氨酸, 谷氨酰胺, 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸
极性的 / 大的	天冬酰胺, 谷氨酰胺
疏水的	酪氨酸, 缬氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 甲硫氨酸
芳香族的	酸, 苯丙氨酸, 色氨酸
影响链取向的残基	色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸 甘氨酸和脯氨酸

[0204] 表 3

[0205] 示例性的和优选的氨基酸取代

[0206]

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

[0207] 参考文献

[0208] Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002.

- [0209] Bishop et al., *J. Virol. Methods*, 47 :203-116, 1994.
- [0210] Burton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88 :10134, 1991.
- [0211] Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87 :1066-1070, 1990.
- [0212] Clackson et al., *Nature*, 352 :624, 1991.
- [0213] Douillard and Hoffman, *Basic Facts about Hybridomas*, in *Compendium of Immunology* Vol. II, ed. by Schwartz, 1981.
- [0214] Glorio-Paulet et al *J Agric Food Chem* 48(5) :1678-1682, 2000.
- [0215] Janeway et al., *Appendix II. CD Antigens*, Immunology, Garland Publishing, New York, 5th edition, 2001.
- [0216] Harlow and Lane, " *Antibodies :A Laboratory Manual*" Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- [0217] Hoogenboom et al., *Nucleic Acids Res.*, 19 :4133, 1991.
- [0218] Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85 :5879-5883, 1988.
- [0219] Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88 :4363, 1991 ;
- [0220] Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6 :511-519, 1976.
- [0221] Lowman et al., *Biochemistry*, 30 :10832, 1991.
- [0222] Lyamuya et al., *J. Imm. Methods.*, 195 :103-112, 1996.
- [0223] MacGregor et al., *J Clin. Microbiol.*, 18(5) :1237-1243, 1983 ;
- [0224] Sambrook, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001.
- [0225] Paxton et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2(1) :104-114, 1995.
- [0226] Wild D. " *The Immunoassay Handbook*" Nature Publishing Group, 2001.

[0001]

序列表

<110> The Macfarlane Burnet Institute for Medical Research and
Public Health Limited
ANDERSON, David (US only)
LLOYD, Robyn (US only)
CROWE, Suzanne (US only)
LANDAY, Alan (US only)
GARCIA, Mary (US only)

<120> 一种诊断方法和用于此的试剂盒

<130> 30335717 JEH

<150> AU 2006905393

<151> 2006-09-28

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapien)

<400> 1

Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Pro His Arg Phe Gln Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu
20

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cggaattca caatgaaccg gggagtccc

29

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<400> 4 ggctctagat caaatggggc tacatgtctt c	31
<210> 5 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
<400> 5 gccttcgggtg ccggcacctc tgcaccgggg tggacc	36
<210> 6 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
<400> 6 ggtccacccc ggtgcagagg tgccggcacc gaaggg	36
<210> 7 <211> 1425 <212> DNA <213> 人工序列	
<400> 7 atgggggggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa	60
atgggtcggg atcigtacga cgatgacgat aaggtaccag gatccagtgt ggtggaatte	120
acaatgaacc ggggagtcce ttttaggcac ttgctctctg tcttgcact ggcgctccctc	180
ccagcagcca ctccaggaaa gaaagtgggt ctgggcaaaa aaggggatac agtggaaactg	240
accigtacag ctccccagaa gaagagcala caattccact ggaaaaacte caaccagata	300
agattctctg gaaatcaggg ctctctctta actaaaggtc catccaaget gaatgatcgc	360
gctgactcaa gaagaagcct ttgggaccaa ggaaacttcc ccttgatcat caagaatctt	420
aagalagaag actcagatac ttacatctgt gaagtggagg accagaagga ggaggtgcaa	480
tigtctagtgt tggaitgac tgccaactct gacaccacc tcttccaggg gcagagcctg	540
acctgacct tggagagccc ccttggtagt agccccccag tgcaatgtag gagtccaagg	600
ggtaaaaaaca tacagggggg gaagaccctc tccgtgtctc agctggagct ccaggatagt	660
ggcaacctgga catgcaactgt ctgacagaac cagaagaagg tggagtcca aatagacatc	720
gtggtgctag ctctccagaa ggcctccagc atagtctata agaaagagg ggaacagggtg	780
gagttctct tcccactcgc ctttacagtt gaaaagctga cgggcagtgg cgagctgttg	840
tggcaggcgg agagggcttc ctctcccaag tcttggatca ccttggacct gaagaacaag	900
gaagigtctg taaaacgggt taccaggac cctaagctcc agatgggcaa gaagctcccc	960
ctccacctca cctgcccaca ggccttgcct cagtatgtct gctctggaaa cctcaccctg	1020
gccttgaag cgaaaacagg aaagttgcat caggaagtga acctgggtgt gatgagagcc	1080
actcagctcc agaaaaattt gacctgtgag gtgtggggac ccacctccc taagctgaig	1140

[0003]

ctgagtttga aactggagaa caaggaggca aaggtctcga agcgggagaa ggcgggtgtgg 1200
 gtgctgaacc ctgaggcggg gatgtggcag tgtctgctga gtgactcggg acaggtcctg 1260
 ctggaatcca acatcaaggt tctgccaca tggtcaccc cgggtgcagag gtgccggcac 1320
 cgaaggcgcc aagcagagcg gatgtctcag atcaagagac tcctcagtga gaagaagacc 1380
 tgccagtgtc ctcaccgggt tcagaagaca tgtagcccca ttgga 1425

<210> 8
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 8

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Val
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Val Glu Phe Thr Met Asn Arg Gly Val Pro Phe
 35 40 45

Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr
 50 55 60

Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn
 85 90 95

Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys
 100 105 110

Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
 115 120 125

Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp
 130 135 140

Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln
 145 150 155 160

Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln
 165 170 175

Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro
 180 185 190

[0004]

Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys
 195 200 205

Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr
 210 215 220

Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile
 225 230 235 240

Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys
 260 265 270

Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser
 275 280 285

Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val
 290 295 300

Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro
 305 310 315 320

Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly
 325 330 335

Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu
 340 345 350

Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr
 355 360 365

Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys
 370 375 380

Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp
 385 390 395 400

Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser
 405 410 415

Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser
 420 425 430

Thr Pro Val Gln Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln
 435 440 445

[0005]

Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg
450 455 460

Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
465 470

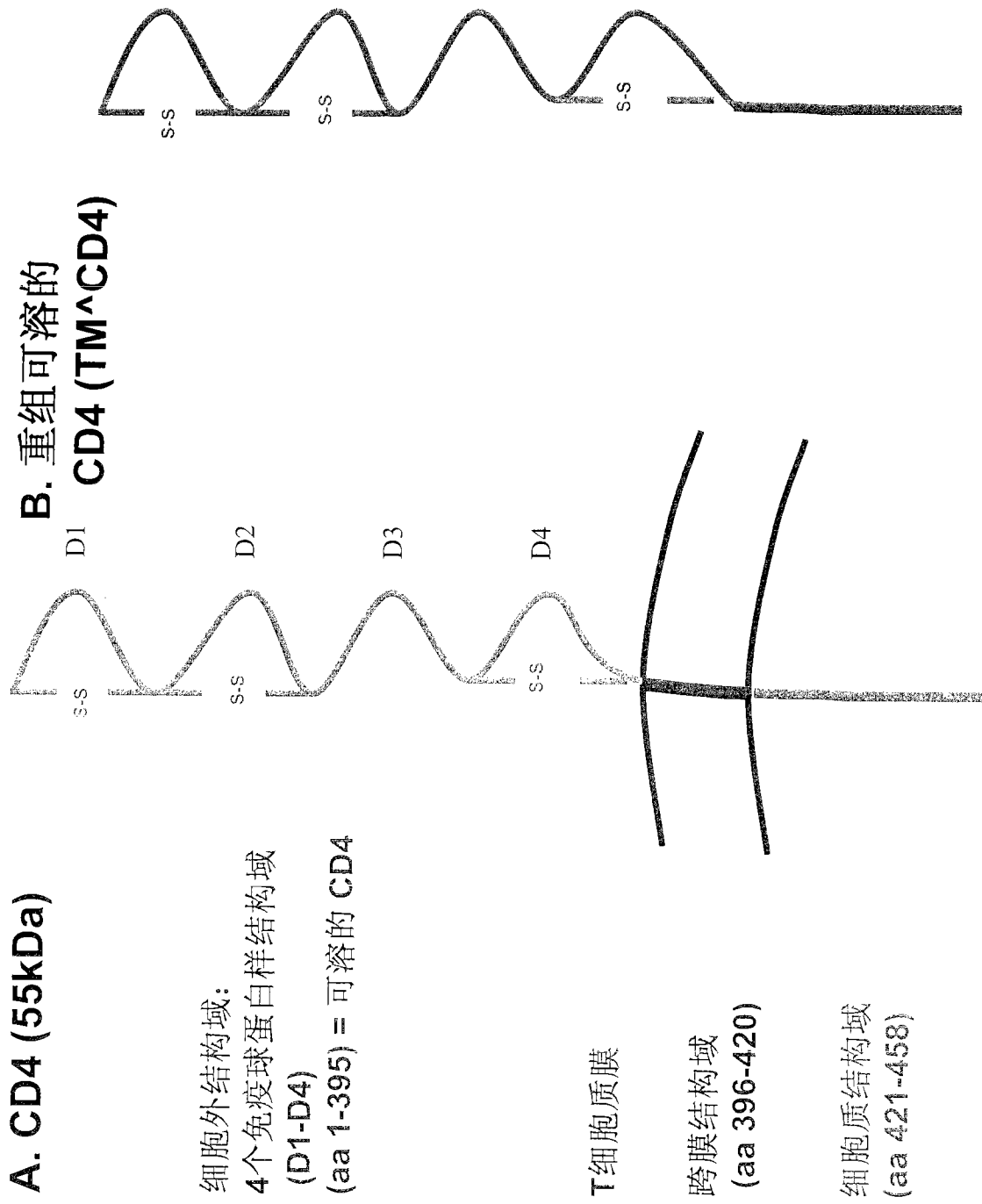


图1

合成基于人 CD4cyto 的两条肽:

- 肽 1 (17 个氨基酸):

• H-KRLLSEKKTCPHRFQKT-NH2

(⁴⁴⁶QC₄₄₇ & ⁴⁵⁵CSP₄₅₈ 缺失*)

- 肽 2 (20 个氨基酸):

• H-CRHRRQAERM^SQIKRLLSE-NH2

(⁴²¹R₄₂₁ 缺失*)

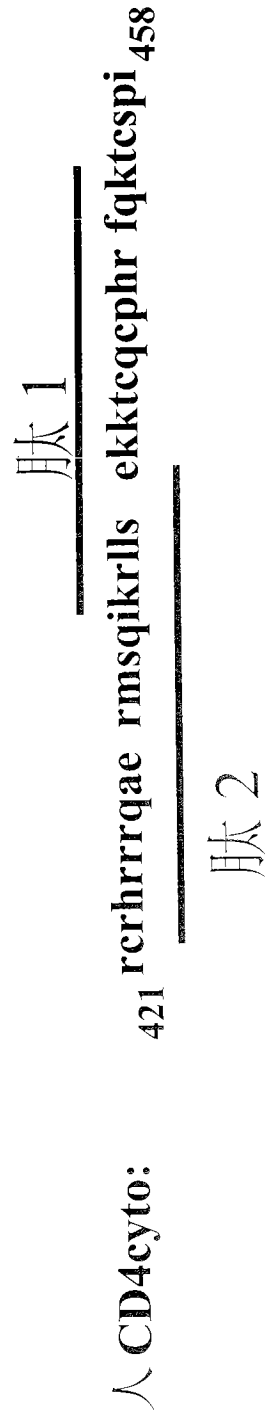
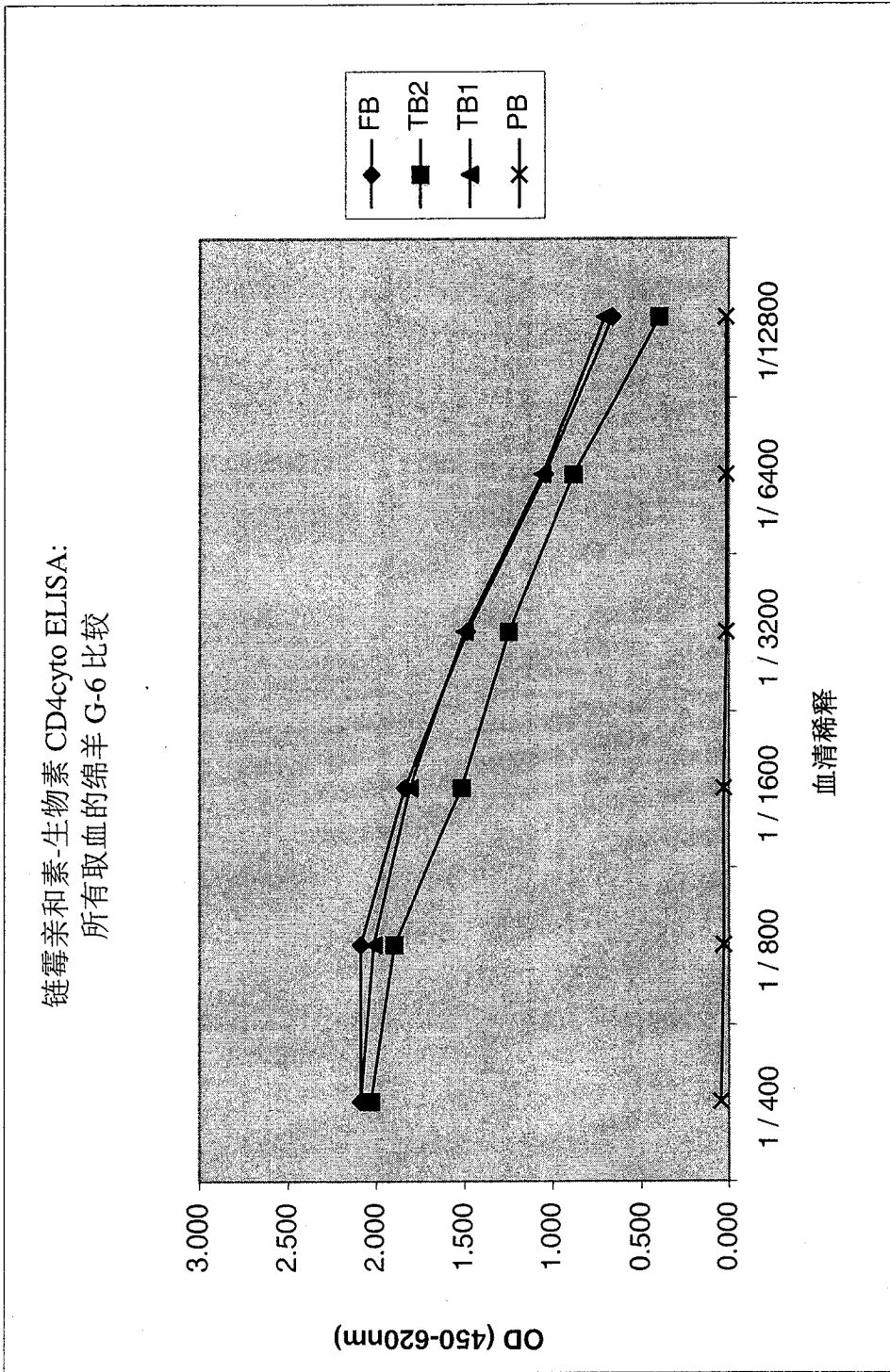
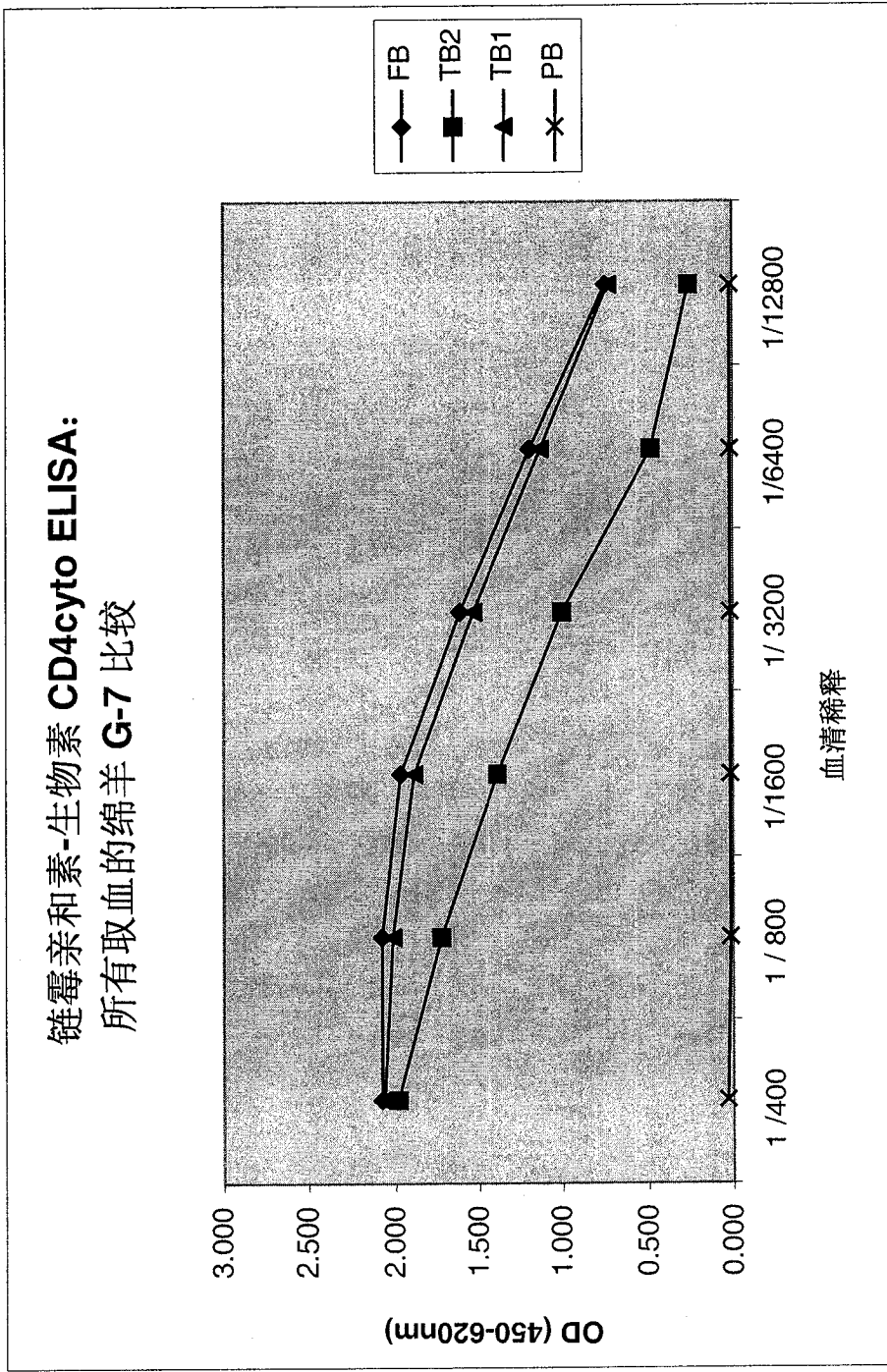


图 2



A

图 3



B

图 3 续

链霉亲和素-生物素 CD4cyto 分离肽 1& 2:
绵羊 Grey-6 & Grey-7 测试取血 2 的比较

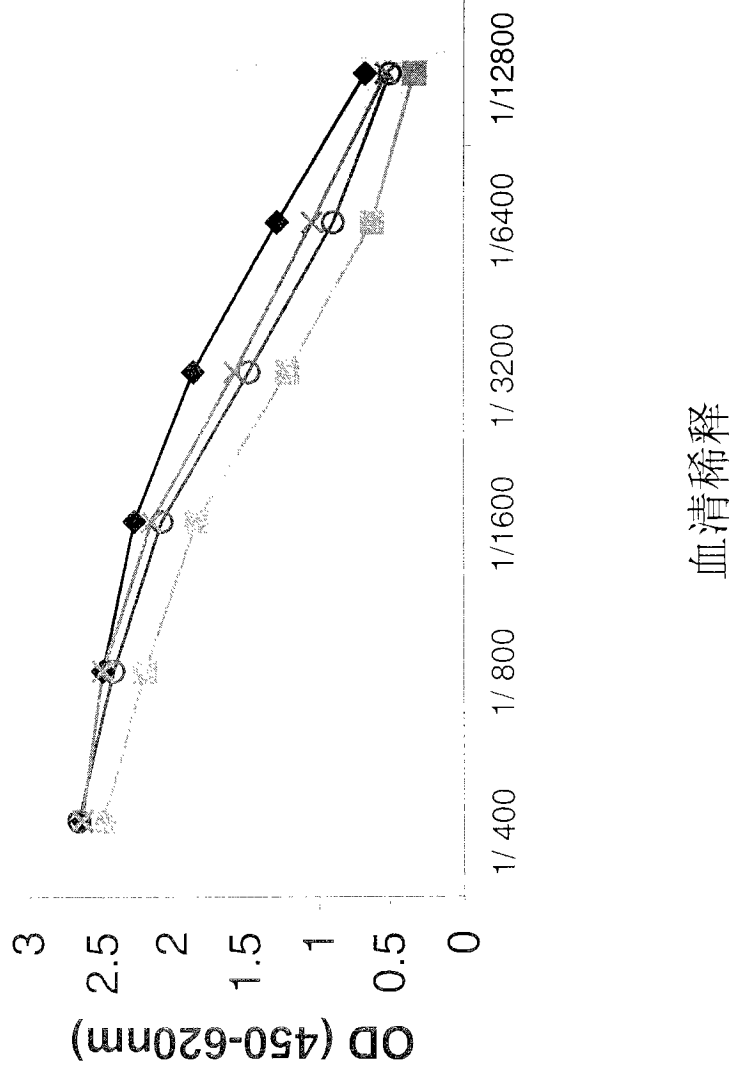


图 4

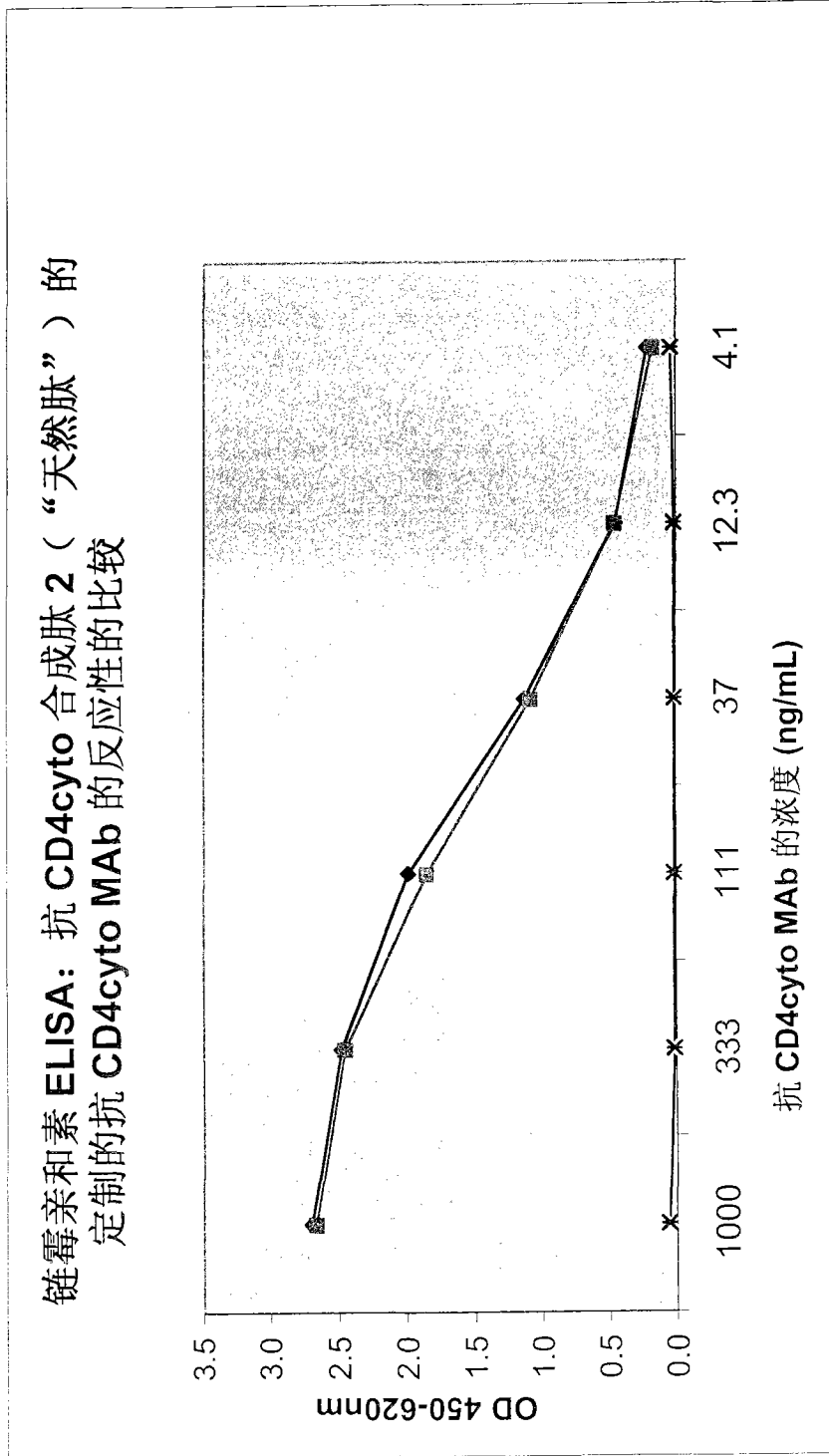


图 5

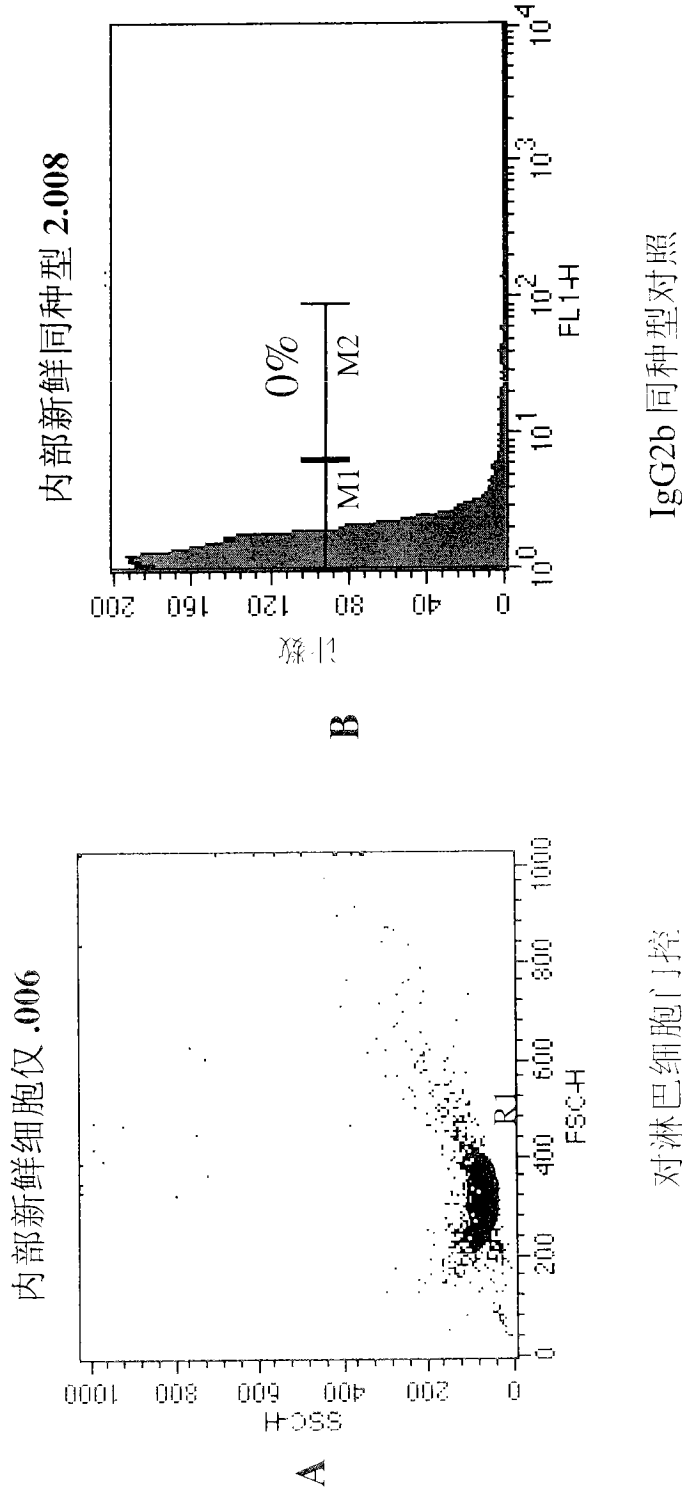


图6

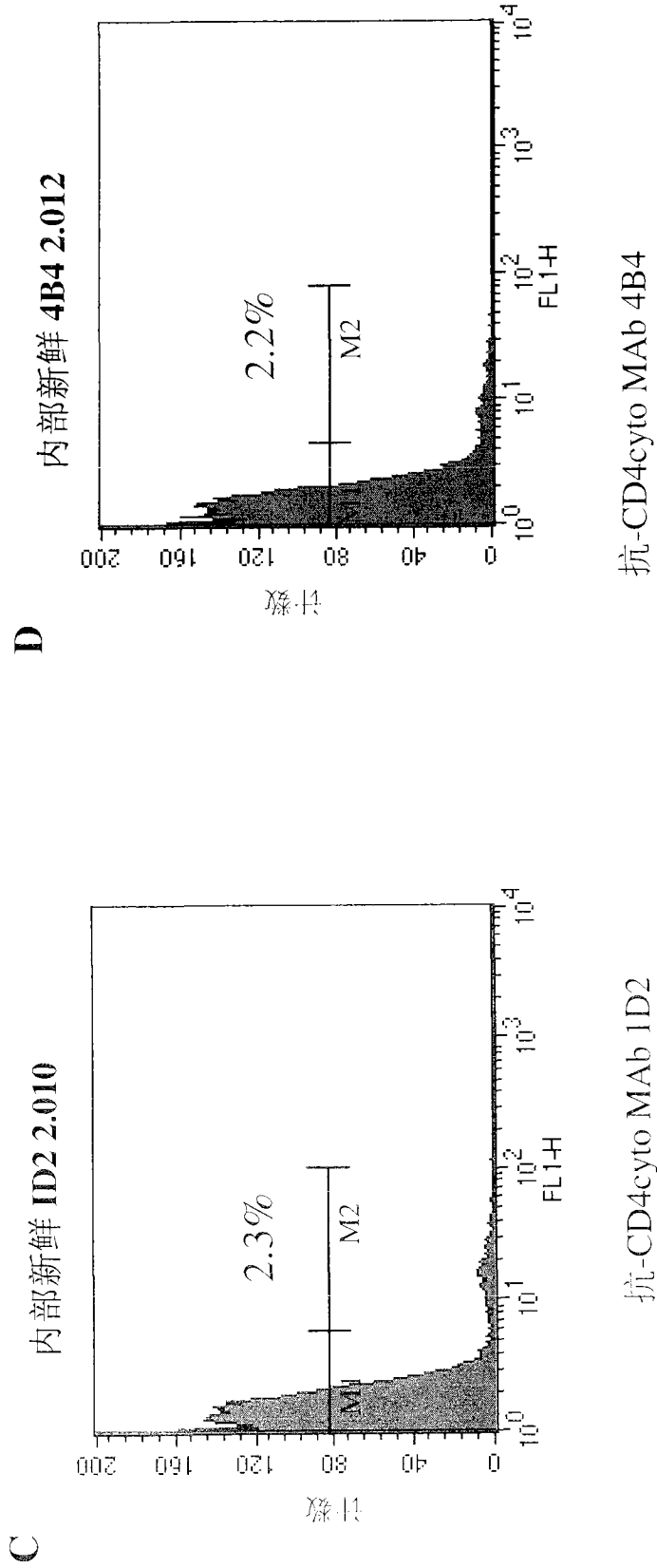
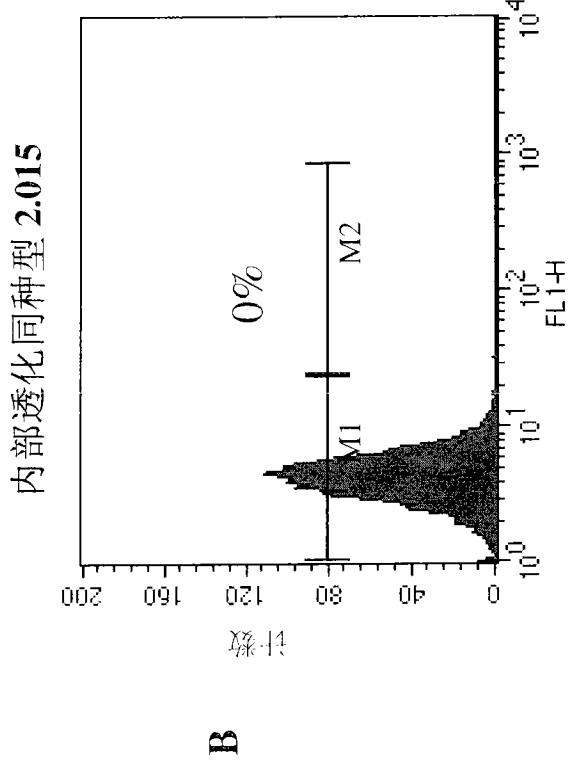


图6续



IgG2b 同种型对照

对淋巴细胞门控

图7

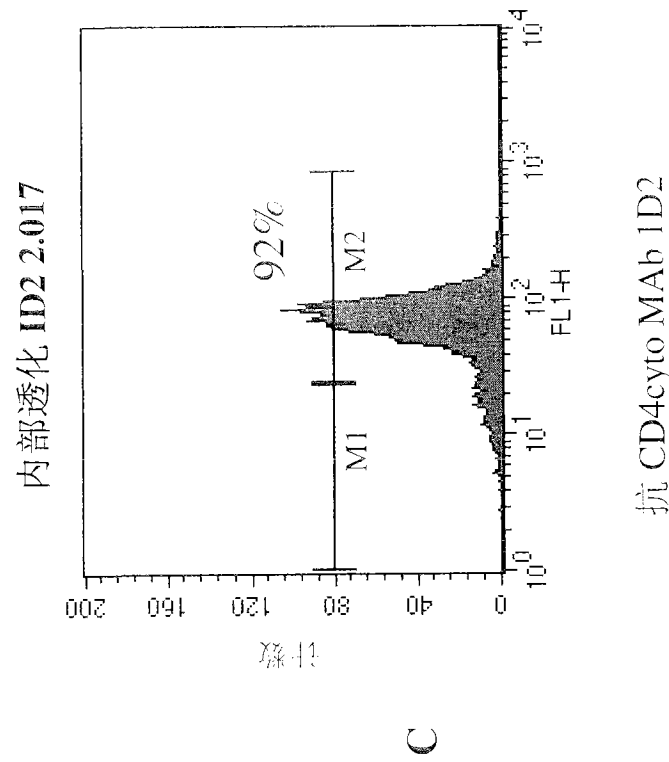
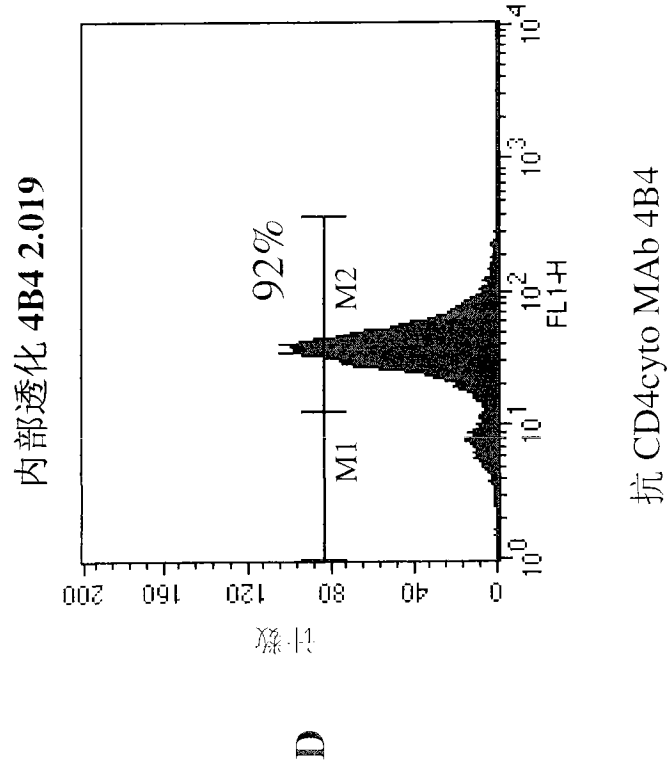


图7续

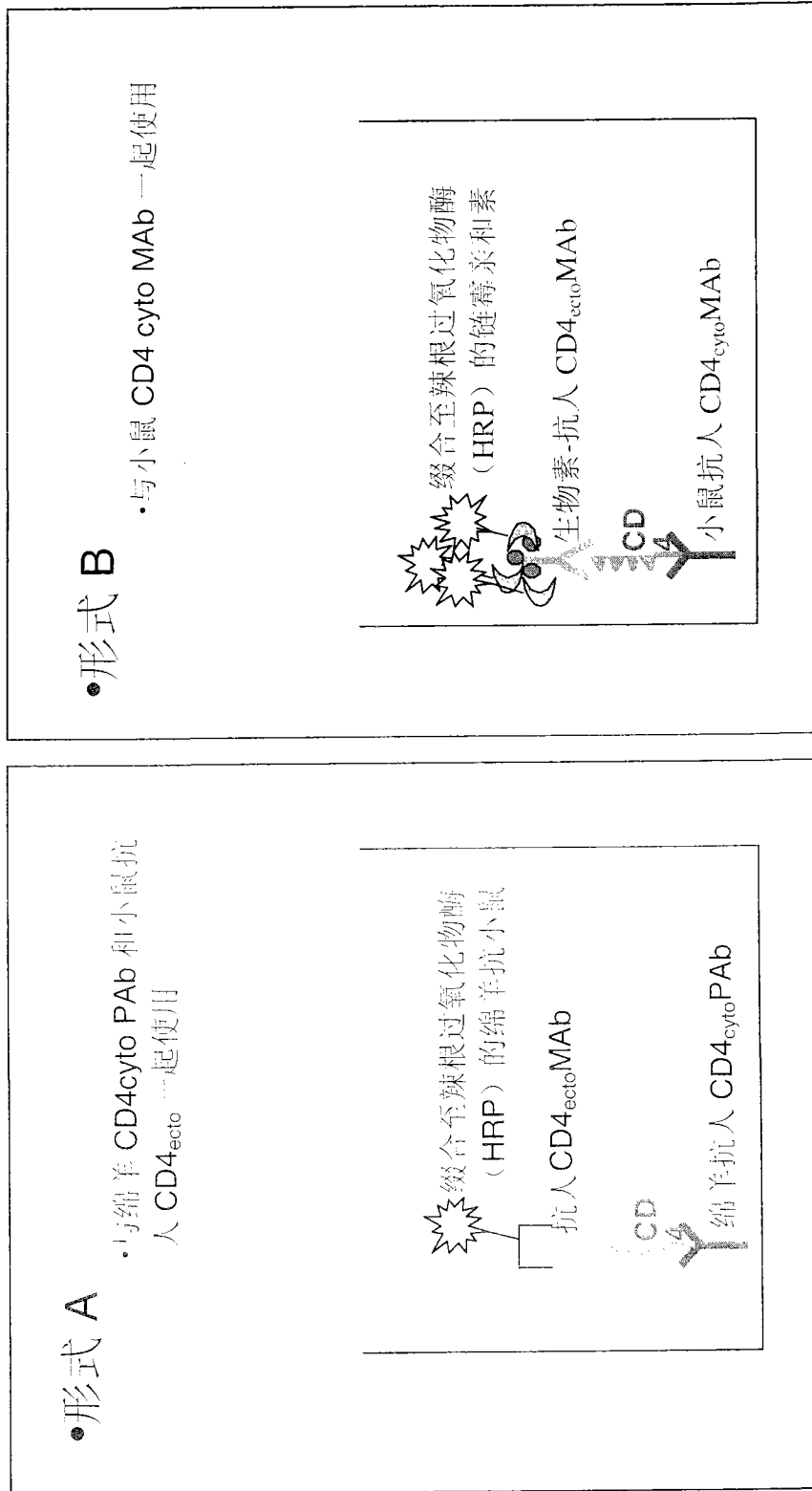


图 8

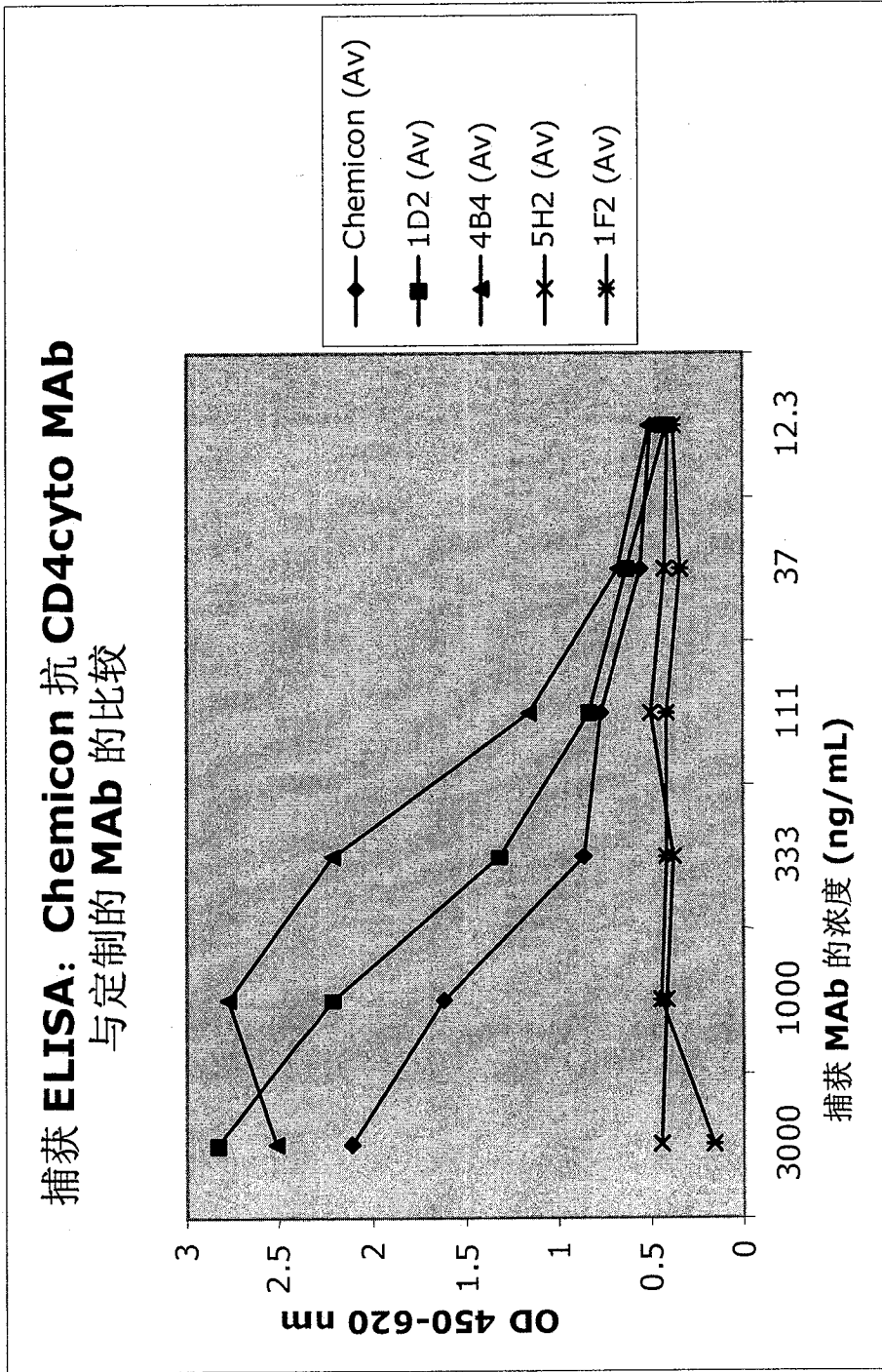


图 9

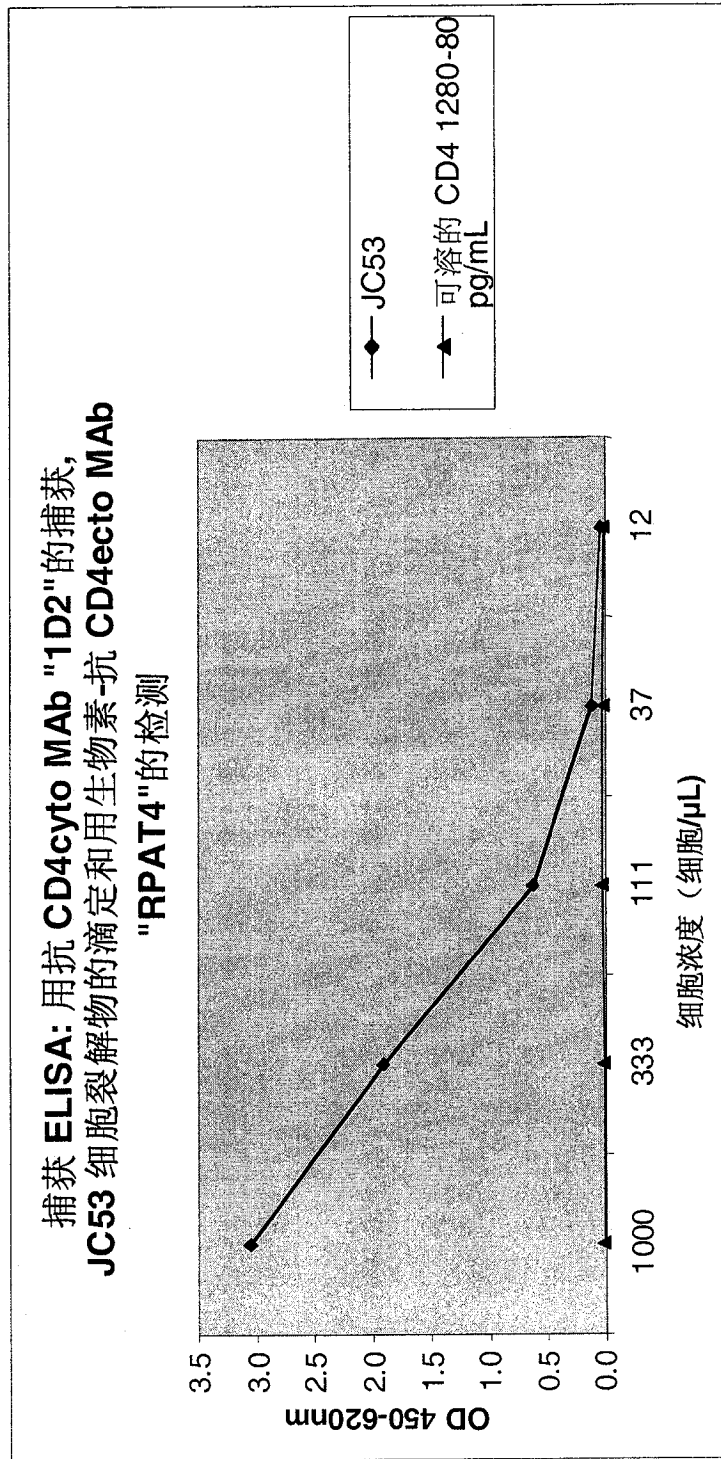


图 10

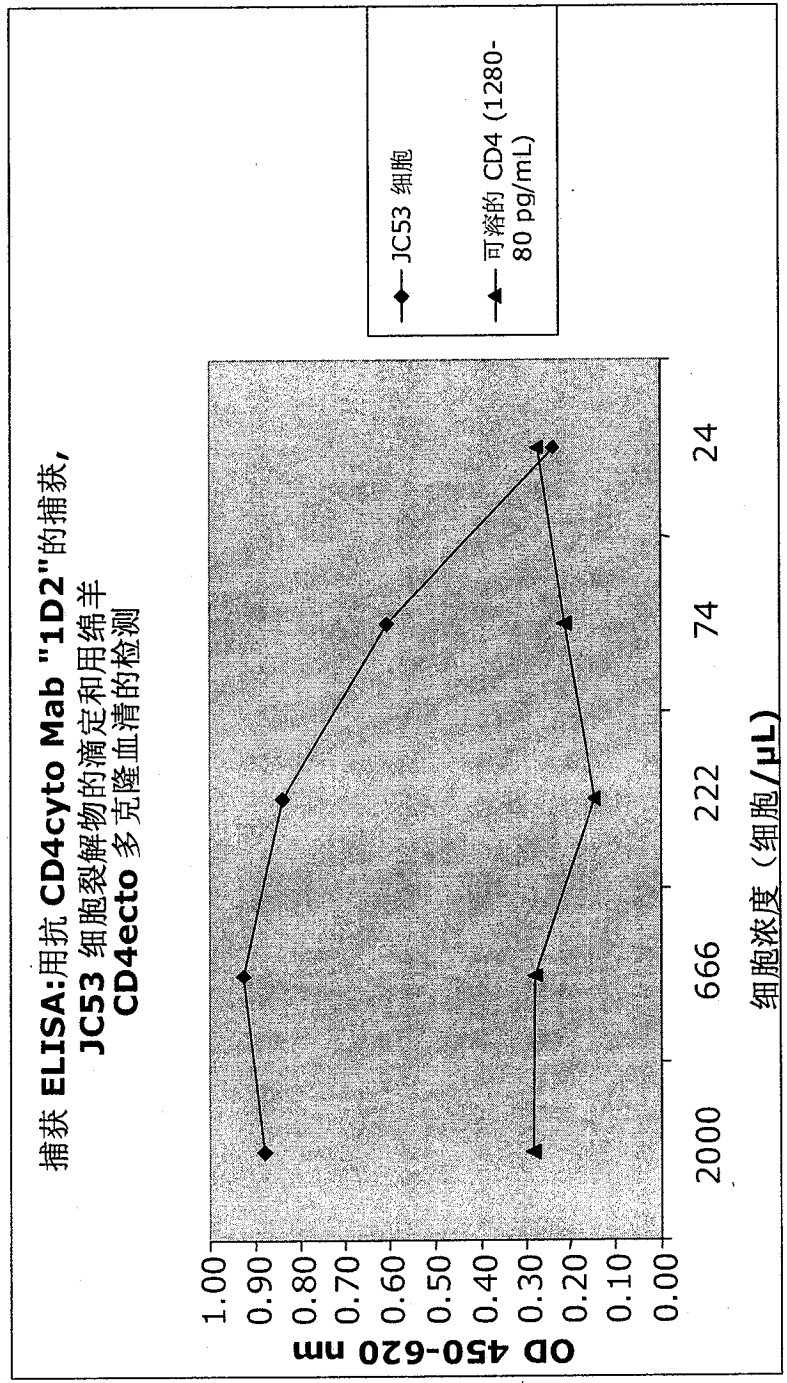


图 11

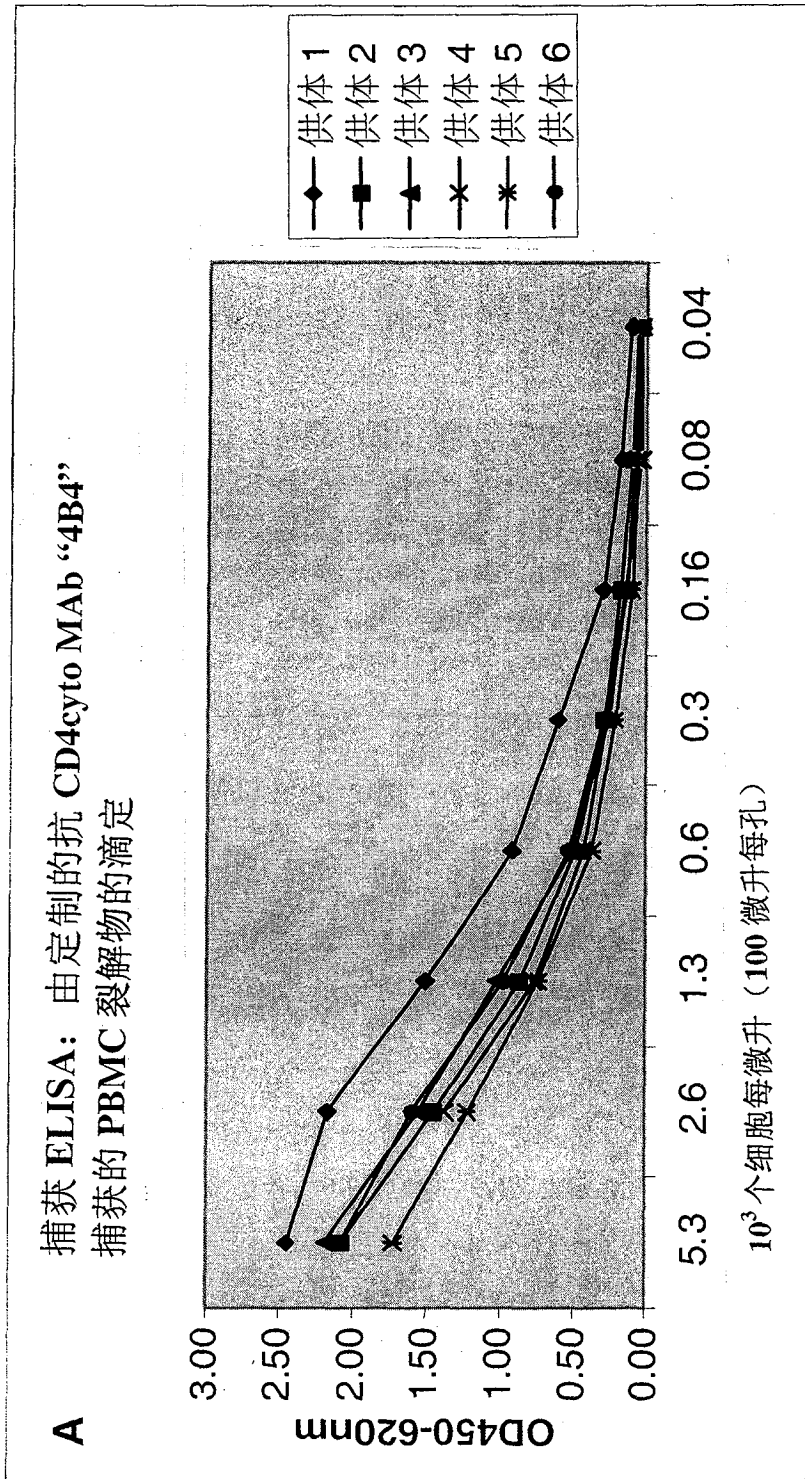


图 12

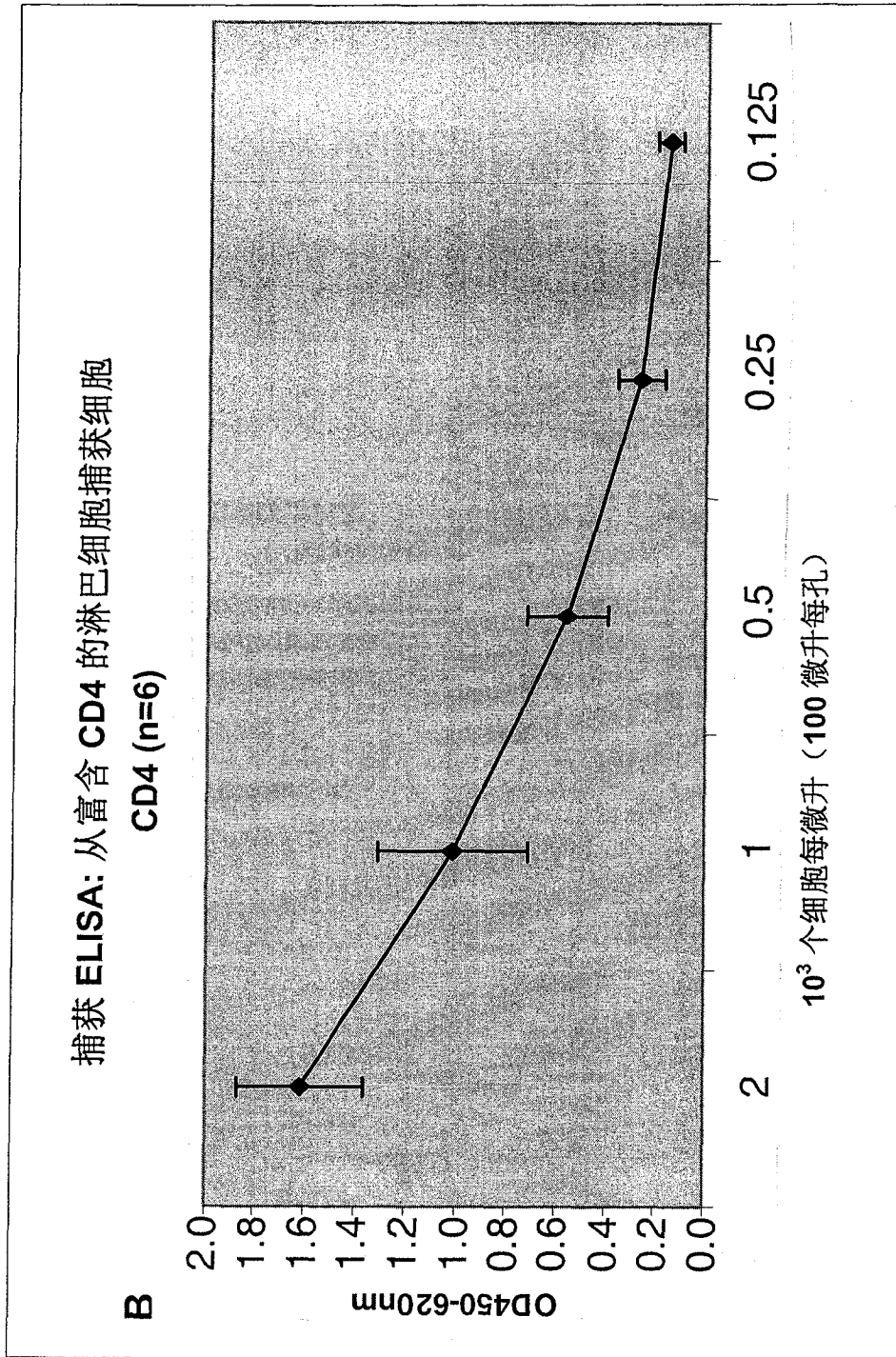


图 12 续

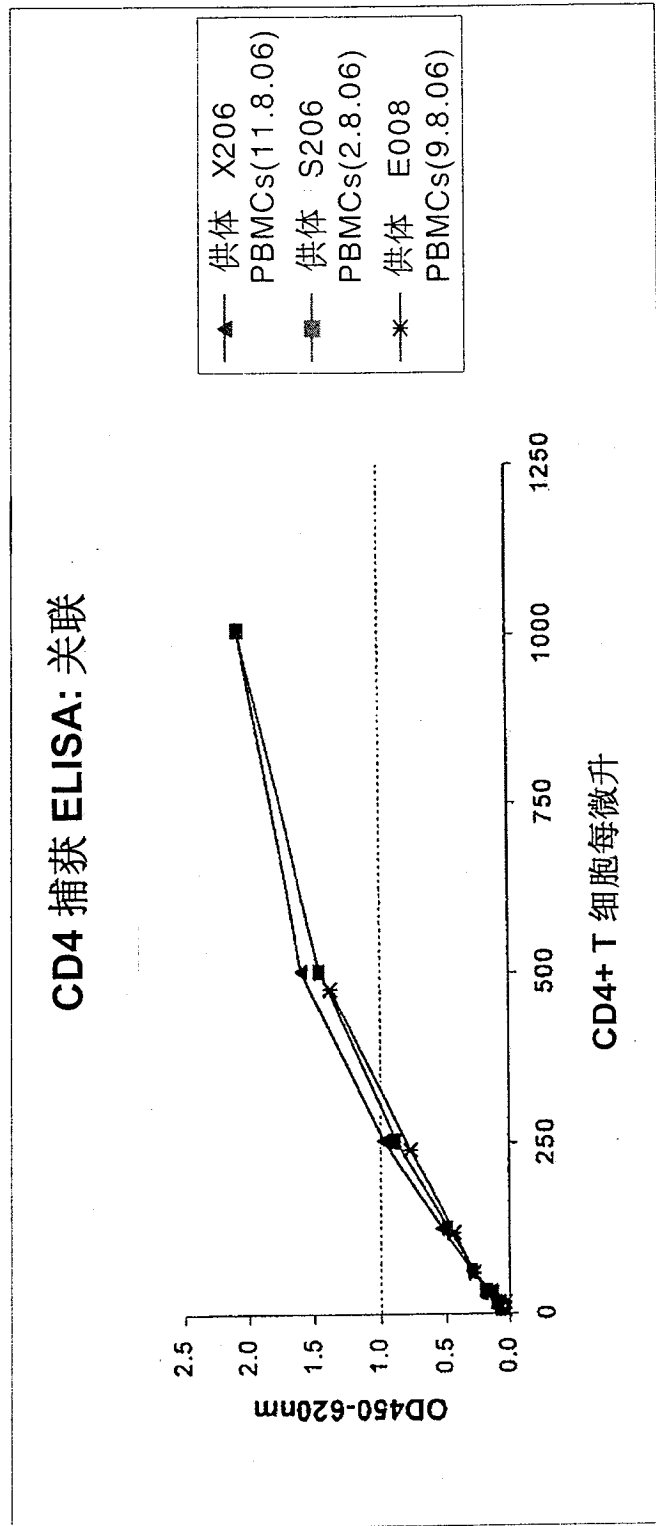


图 13

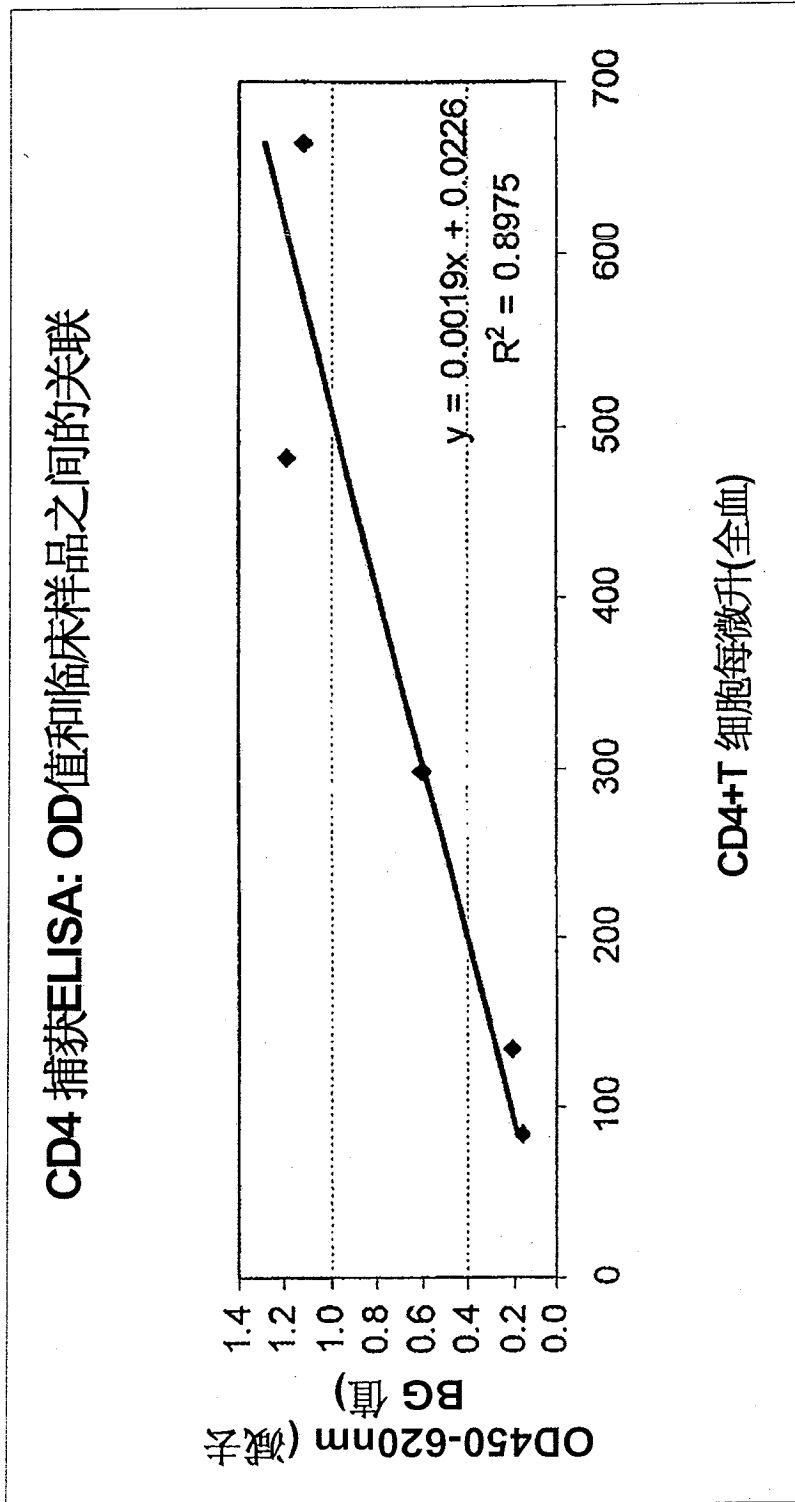


图 14

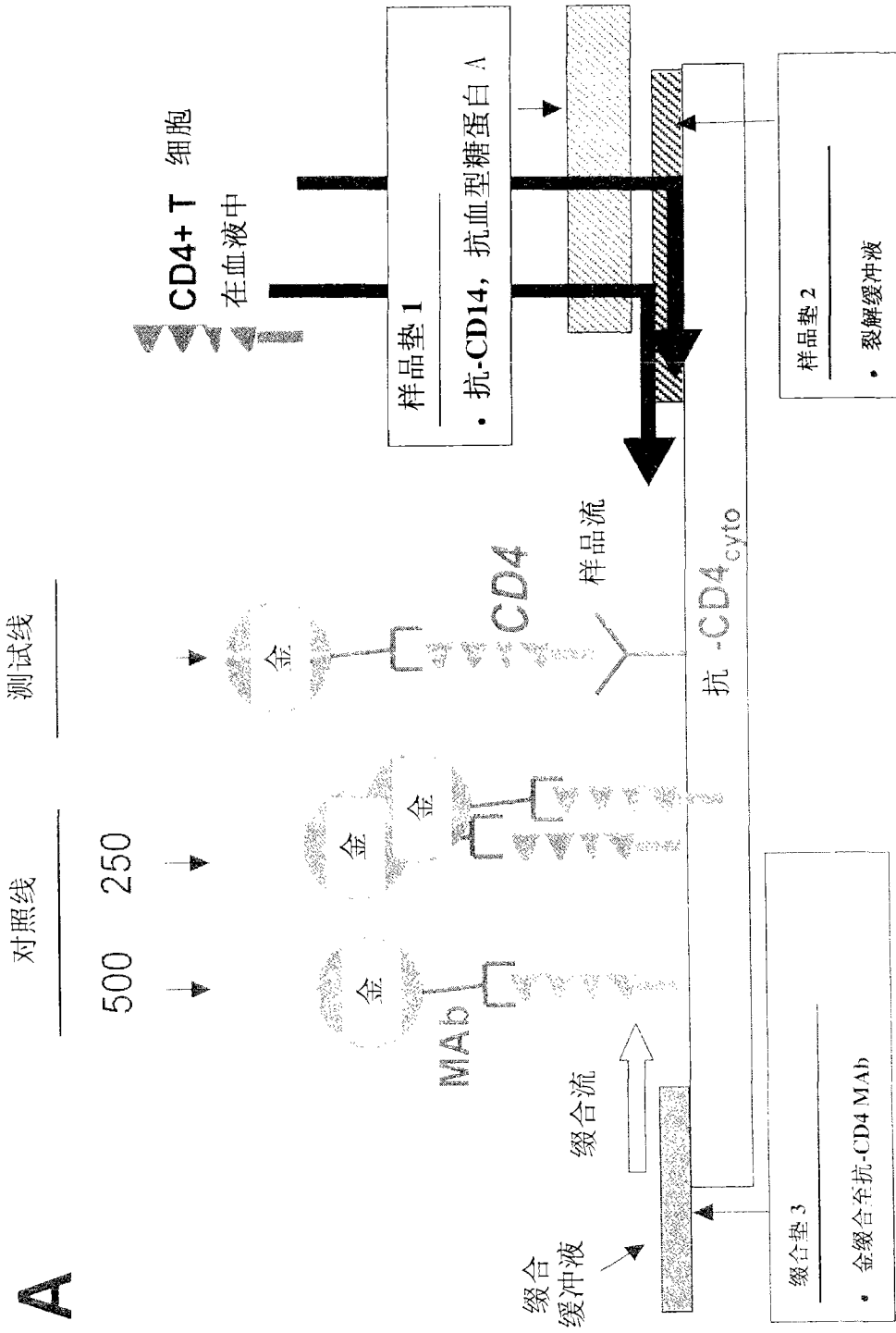


图15

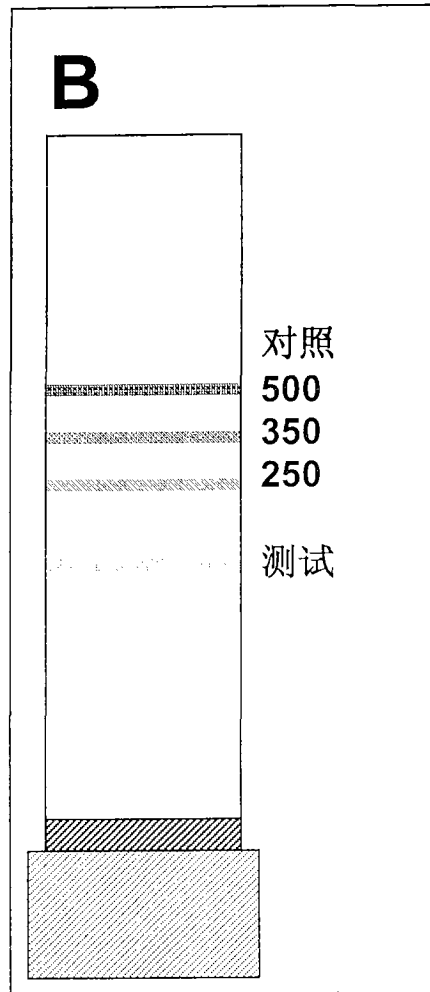


图 15 续

TM[^]CD4 核苷酸序列

```

atg ggg ggt tct CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT ggt atg gct agc
atg act ggt gga cag caa atg ggt cgt cgt cgt cgt gaa ttc aca ATG
GAC GAT AAG CCT TTT AGG CAC TTT CTT CTG CTG CTG CAA
AAC CGG GGA GTC CCA GCA GCC ACT CAG GAA AAG AAA GTG GTG
CTG GCG CTC CTC CCA GGG GAT ACA GTG GAA CTG ACC TGT ACA GCT
CTG GGC AAA AAA AAG AAG AGC ATA CAA TTC CAC TGG AAA AAC TCC AAC
TCC CAG AAG AAG ATT CTG GGA AAT CAG GGC TCC TTC TTA ACT AAA
CAG ATA AAG AAG CTG AAT GAT CGC GCT GAC TCA AGA AGA AGC
GGT CCA TCC AAG CAA GGA AAC TTT CCC CTG ATC ATC AAG AAT CTT
CTT TGG GAC CAA GAA TCA GAT ACT TAC ATC TGT GAA GTG GAG GAC
AAG ATA GAA GAC GAG GTG CAA TTG CTA GTG TTC GGA TTG ACT GCC
CAG AAG GAG GAG ACC CAC CTG CTT CAG GGG CAG AGC CTG ACC CTG
AAC TCT GAC ACC CAC CCC CCT GGT GGT ATA CAG GAG ACC CTC
ACC TTG GAG AGC CCA AGG GGT AAA AAC AAT CAG GAT AGT GGC ACC TGG ACA
AGG AGT CCA AGG CAG CTG GAG CTC CAG AAG AAG AAG GTG GAG TTC AAA ATA
TCC GTG TCT CAG TTG CAG AAC CAG AAG AAG AAG GCC TCC AGC ATA GTC
TGC ACT GTC TTG CAG AAT CAG AAT CAG AAG AAG AAG GAG TTC CCA CTC
GAC ATC GTG GTG CTA GCT TTC CAG AAG AAG AAG GCC TCC AGC ATA GTC
TAT AAG AAA GAG GGG GAA CAG GTG GAG TTC TCC TCC CCA CTC

```

图 16

GCC TTT ACA GTT GAA AAG CTG ACG GGC AGT GGC GAG CTG TGG TGG
 TGG CAG GCG GAG AGG GCT TCC TCC TCC AAG TCT TGG ATC ACC
 TTT GAC CTG AAG AAC AAG GAA GTG TCT GTA AAA CGG GTT ACC
 CAG GAC CCT AAG CTC CAG ATG GGC AAG AAG CTC CCG CTC CAC
 CTC ACC CTG CCC CAG GCC TTG CCT CAG TAT GCT GGC TCT
 GGA AAC CTC ACC CTG GCC CTT GAA GCG AAA ACA GGA AAG TTG
 CAT CAG GAA GTG AAC CTG GTG ATG ATG AGA GCC ACT CAG CTC
 CAG AAA AAT TTG ACC TGT GAG GTG TGG GGA CCC ACC TCC CCT
 AAG CTG ATG ATG CTG AGT TTG AAA CTG GAG AAC AAG GAG GCA AAG
 GTC TCG AAG CCG GAG AAG GCG GTG TGG GTG CTG AAC CCT GAG
 GCG GGG ATG TGG CAG TGT CTG CTG AGT GAC TCG GGA CAG GTC
 CTG CTG GAA TCC AAC ATC AAG GTT CTG CCC ACA TGG TCC ACC
 CCG GTG CAG AGG TGC CCG CAC CGA AGG CGC CAA GCA GAG CGG
 ATG TCT CAG ATC AAG AGA CTC CTC AGT GAG AAG ACC TGC
 CAG TGT CCT CAC CCG TTT CAG AAG ACA TGT AGC CCC ATT TGA

图16续

TM[^]CD4 氨基酸序列

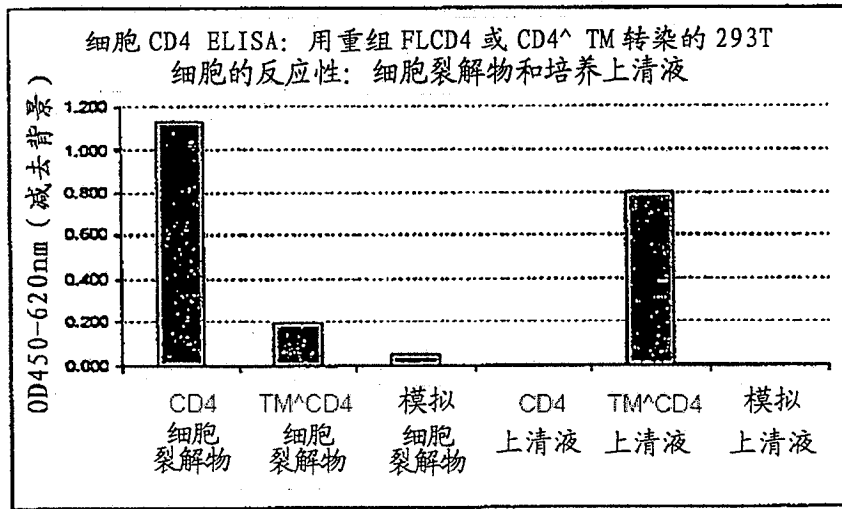
Met	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Met	Ala	Ser
Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Met	Gly	Arg	Val	Asp	Leu	Tyr	Asp	Asp
Asp	Asp	Lys	Val	Pro	Gly	Ser	Val	Val	Glu	Phe	Thr	Met	
Asn	Arg	Gly	Val	Pro	Phe	Arg	His	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Gln
Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Thr	Gln	Gly	Lys	Lys	Val	Val
Leu	Gly	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala
Ser	Gln	Lys	Lys	Ser	Ile	Gln	Phe	His	Trp	Lys	Asn	Ser	Asn
Gln	Ile	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Gln	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr	Lys
Gly	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Ala	Asp	Ser	Arg	Arg	Ser
Leu	Trp	Asp	Gln	Gly	Asn	Phe	Pro	Leu	Ile	Ile	Lys	Asn	Leu
Lys	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ile	Cys	Glu	Val	Glu	Asp
Gln	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	Thr	Ala
Asn	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu
Thr	Leu	Glu	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Gln	Cys
Arg	Ser	Pro	Arg	Gly	Lys	Asn	Ile	Gln	Gly	Gly	Lys	Thr	Leu
Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr
Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Gln	Lys	Lys	Val	Glu	Phe	Lys	Ile
Asp	Ile	Val	Val	Leu	Ala	Phe	Gln	Lys	Ala	Ser	Ser	Ile	Val
Tyr	Lys	Lys	Glu	Gly	Glu	Gln	Val	Glu	Phe	Ser	Phe	Pro	Leu

图 17

Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp
 Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr
 Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr
 Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Leu Pro Leu His
 Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Tyr Ala Gly Ser Gly
 Asn Leu Thr Ala Leu Lys Thr Gly Lys Leu His
 Gln Glu Val Asn Leu Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln
 Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys
 Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Trp Glu Ala Lys Val
 Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala
 Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu
 Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro
 Val Gln Arg His Arg Arg Glu Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln
 Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro
 His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile ***

图17续

A



B

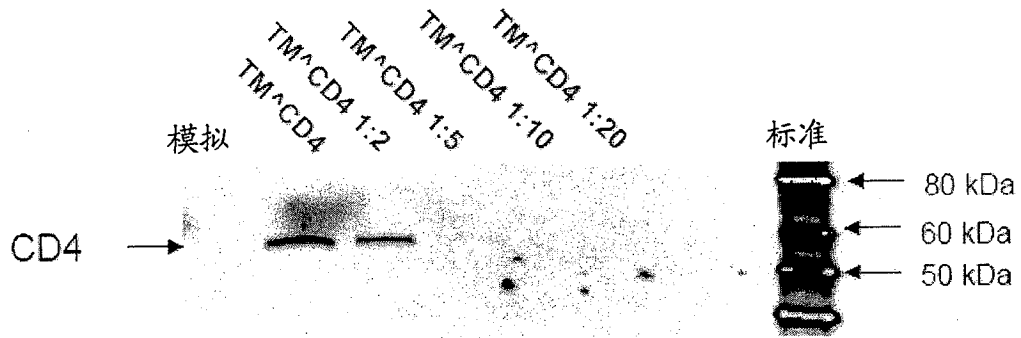
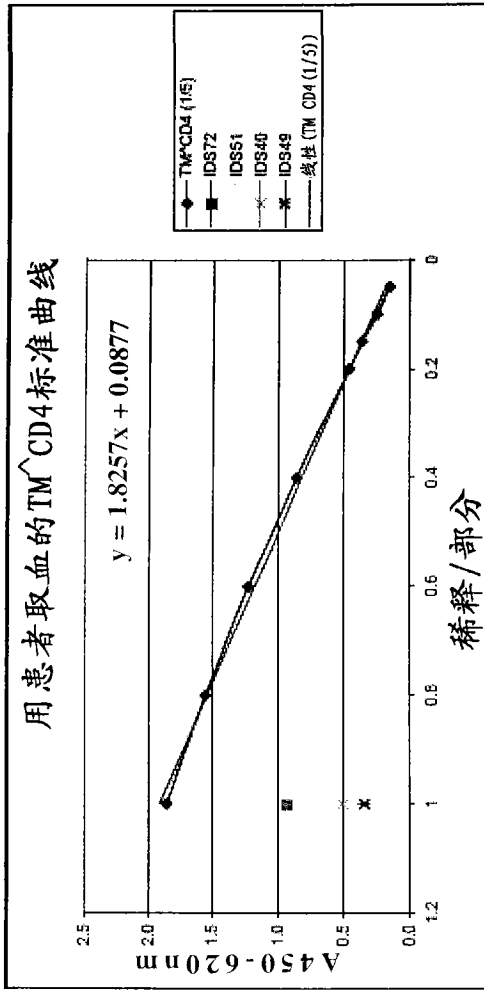


图 18

A.



B.

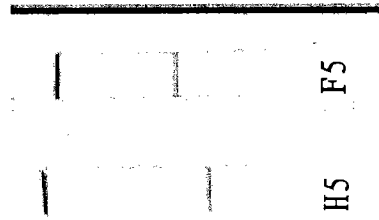


图19

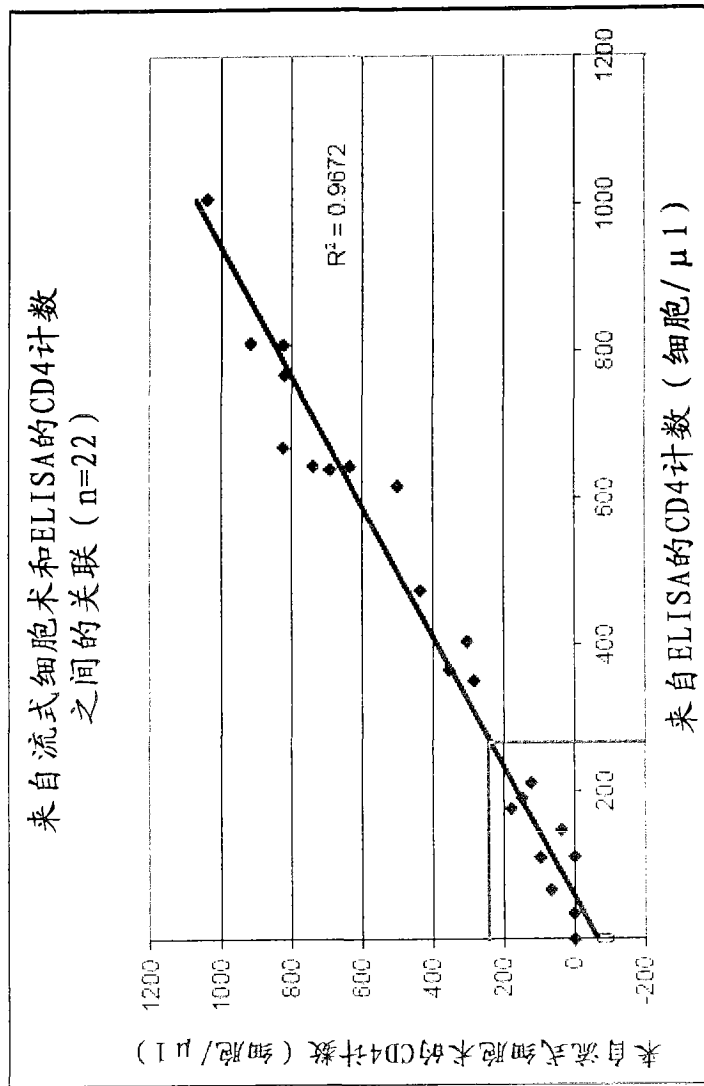


图20

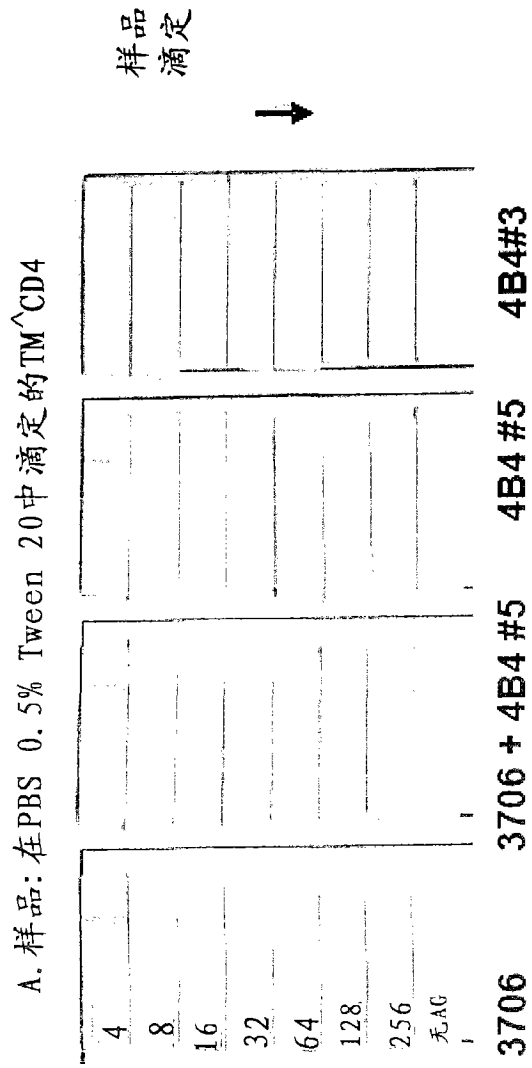


图 21

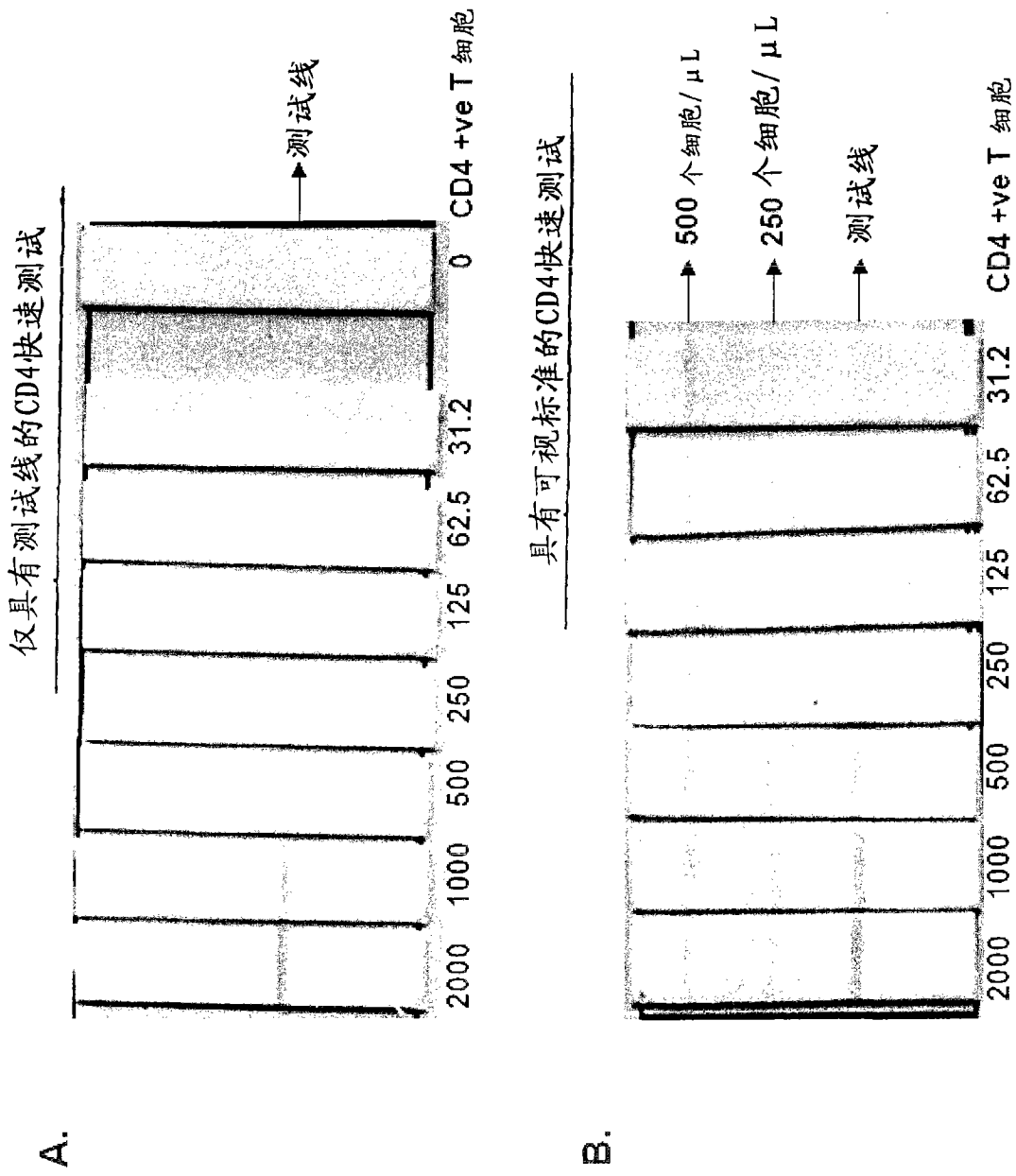


图 22

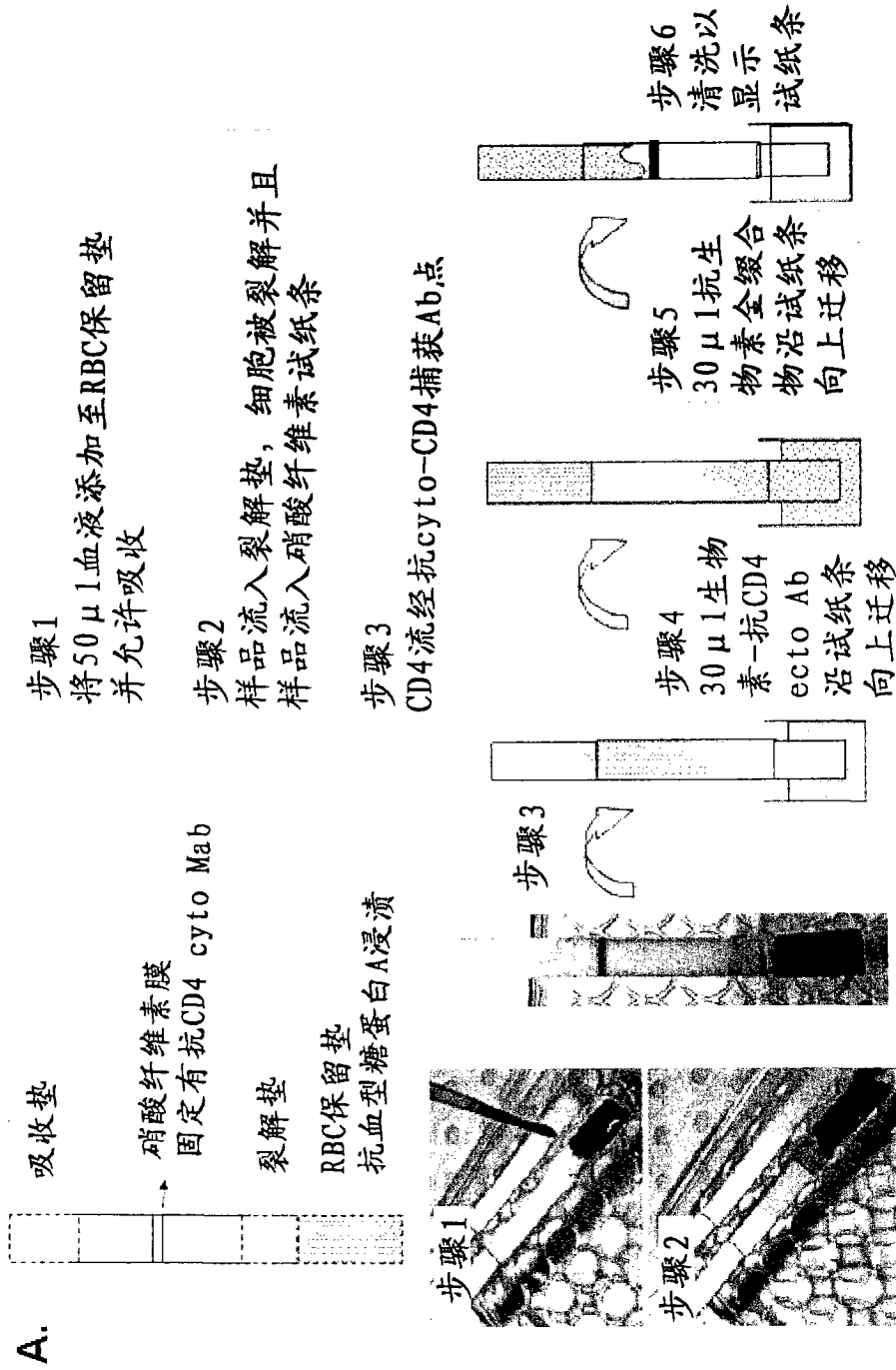


图23

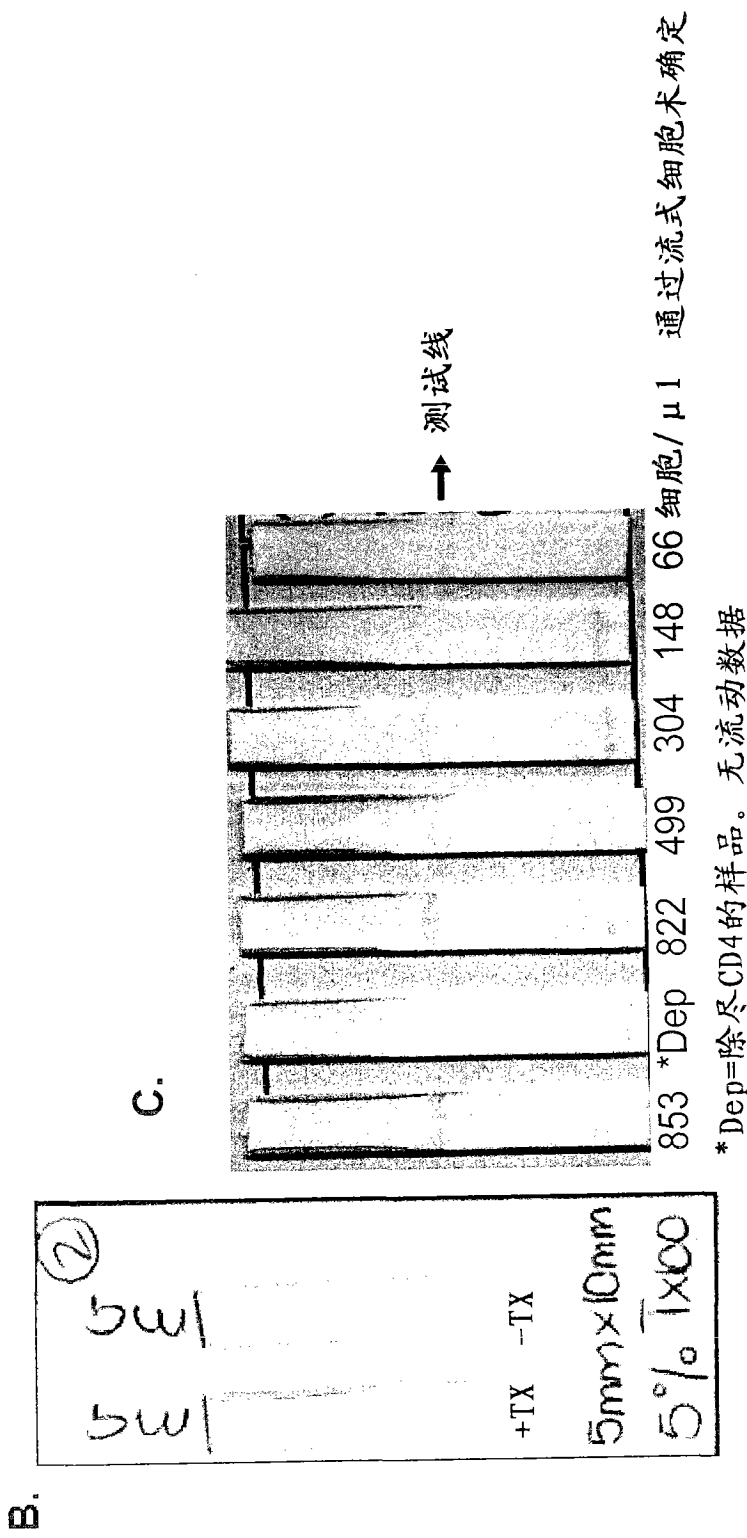


图23续

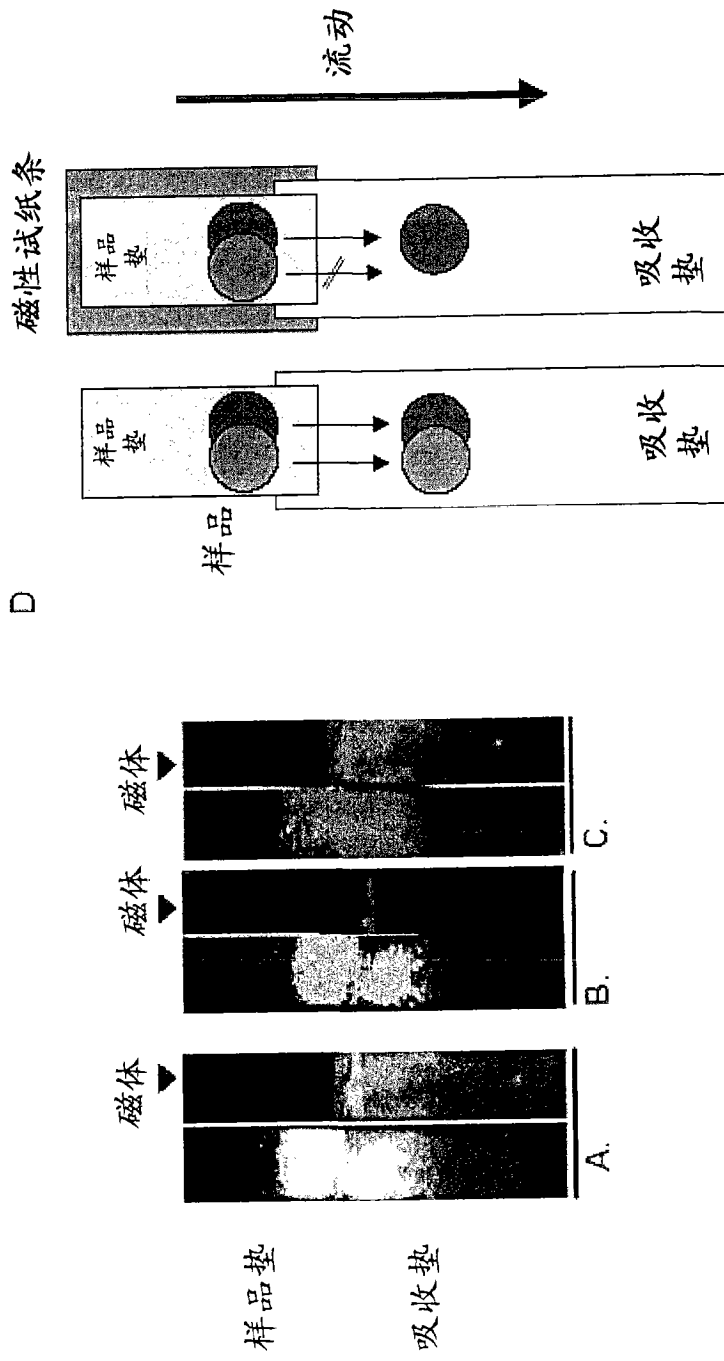


图24

专利名称(译)	一种诊断方法和用于此的试剂盒		
公开(公告)号	CN101558309B	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	CN200780041426.X	申请日	2007-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	麥克法蘭博尼特醫學健康研究公司		
申请(专利权)人(译)	麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究所有限公司		
[标]发明人	DA安德森 RE劳埃德 SM克罗 ML加西亚 AL蓝黛		
发明人	D·A·安德森 R·E·劳埃德 S·M·克罗 M·L·加西亚 A·L·蓝黛		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2333/70514 C07K14/70514 Y10T436/101666 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
审查员(译)	王慧		
优先权	2006905393 2006-09-28 AU		
其他公开文献	CN101558309A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于检测或监测样品中细胞的数目的试剂盒和方法。所述细胞包含含有细胞质(胞质)和细胞外(胞外)结构域的细胞表面结合蛋白(CSAP)。所述试剂盒包括：(i)层析装置；(ii)CSAP结合试剂。所述方法包括：(i)任选地，将样品与能够裂解或透化具有CSAP的细胞的试剂接触；(ii)将样品与CSAP结合试剂接触，所述的CSAP结合试剂与CSAP的细胞质结构域结合；和(iii)直接或间接地评估样品中结合的CSAP的水平或存在。

and CD4⁺ Lymphocyte Counts in
1 Immunodeficiency Virus-Infected
viduals. 《CLINICAL AND DIAGNOSTIC
RATORY IMMUNOLOGY》. 1995, 第 2 卷 (第 5
623 - 625.

审查员 王慧

权利要求书3页 说明书26页
序列表5页 附图32页