

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-515215

(P2016-515215A)

(43) 公表日 平成28年5月26日 (2016.5.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-502124 (P2016-502124)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014.3.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月9日 (2015.11.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/026406
 (87) 国際公開番号 W02014/151763
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 (31) 優先権主張番号 61/782,003
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515158308
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ レランド スタンフォード ジュニア
 ユニバーシティー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
 305-2038, スタンフォード, メイ
 ン クワッド ビー. オー. ボックス 2
 0386, オフィス オブ ザ ゼネラル
 カウンセル ビルディング 170, サ
 ード フロア
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人

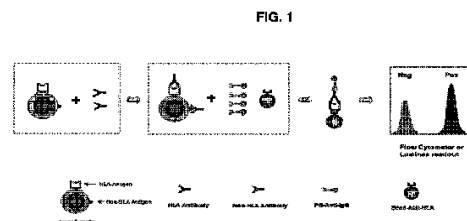
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドナー特異的抗体を検出する方法及び該方法を実施するためのシステム

(57) 【要約】

生体試料中のドナー特異的抗体の存在、または、不存在を判定する方法が提供される。当該方法は、レシピエント免疫抗体が存在する場合、これがドナー細胞表面抗原 (A g) と結合して免疫抗体 - A g 複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合すること、混合物を免疫抗体 - A g 複合体 (例えば A g または免疫抗体) と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させること、ビーズと結合した免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加すること、および免疫抗体 - A g 複合体に結合した検出可能標識抗体の存在または不存在を検出してレシピエントからの生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含む。目的の方法を実施するためのシステムおよびキットも提供される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定する方法であって、前記方法が

レシピエント免疫抗体が存在する場合、これがドナー細胞表面抗原 (A g) と結合して免疫抗体 - A g 複合体を形成するのに十分な条件下でドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合することによって混合物を形成すること、

前記混合物を前記免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させること、

前記ビーズと結合した前記免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加すること、および

前記免疫抗体 - A g 複合体と結合した前記検出可能標識抗体の存在または不存在を検出して前記レシピエントからの前記生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含む前記方法。

【請求項 2】

前記検知することが半定量的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫抗体が同種抗体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫抗体が自己抗体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫抗体が補体結合抗体 (C F A b) である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記検知することが蛍光発光を検出することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記検知することがフローサイトメーター中に前記複合体を流すことを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記の検出することが酵素結合免疫吸着検査法 (E L I S A) によって前記複合体を検出することを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出可能標識抗体が抗体に結合した検出可能な標識またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出可能な標識が蛍光色素、発色団、酵素、リンカー分子、ビオチン分子、電子供与体、電子受容体、染料、金属、または放射性核種を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が：インドカルボシアニン (C 3) 、インドジカルボシアニン (C 5) 、 C y 3 、 C y 3 . 5 、 C y 5 、 C y 5 . 5 、 C y 7 、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレングリーン 4 8 8 、アレクサフルオロ 3 5 5 、アレクサフルオロ 4 8 8 、アレクサフルオロ 5 3 2 、アレクサフルオロ 5 4 6 、アレクサフルオロ 5 5 5 、アレクサフルオロ 5 6 8 、アレクサフルオロ 5 9 4 、アレクサフルオロ 6 4 7 、アレクサフルオロ 6 6 0 、アレクサフルオロ 6 8 0 、アレクサフルオロ 7 0 0 、 J O E 、リサミン、ローダミングリーン、 B O D I P Y 、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 、カルボキシ - フルオレセイン (F A M) 、アロフィコシアニン (A P C) 、フィコエリトリン (P E) 、ローダミン、ジクロロローダミン (d R h o d a m i n e) 、カルボキシテトラメチルローダミン (T A M R A) 、カルボキシ - X - ローダミン (R O X) 、 L I Z 、 V

10

20

30

40

50

IC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、およびRiboGreenから成る群から選択される蛍光団を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記ドナー特異的抗体が実際のドナー特異的抗体である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記AgがHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB2、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQ、およびHLA-DPから成る群から選択される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記生体試料が血清、血液、唾液、または血漿を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記ドナーからの細胞試料を得ることを含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記レシピエントから生体試料を得ることを含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記ドナーからの前記細胞試料が有核細胞を含む、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記ドナーからの細胞試料が $0.001 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の細胞を含む、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記ドナーからの細胞試料が 0.2×10^6 個未満の細胞を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記ドナーからの細胞試料が 0.1×10^6 個未満の細胞を含む、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記ドナーからの前記細胞試料が 0.5×10^5 個未満の細胞を含む、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記ドナーからの細胞試料が約25,000~200,000個の細胞を含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

平均ビーズ直径が $0.1 \sim 20$ ミクロンである、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記平均ビーズ直径が5ミクロン以下である、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記平均ビーズ直径が $2.5 \sim 5$ ミクロンである、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記ビーズがアガロースビーズである、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記ビーズがラテックスビーズである、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記ビーズがラテックスビーズである、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

前記ビーズが磁気ビーズである、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記ビーズがポリスチレンビーズである、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記方法が 1 2 時間以下で実施される、請求項 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記方法が 8 時間以下で実施される、請求項 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記溶解条件がトレーサ、洗浄剤、および DNアーゼを含む溶解緩衝液を与えることを含む、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 3】

ドナー特異的抗体が前記レシピエントからの前記生体試料に存在するか示す報告を作成することを含む、請求項 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

報告を作成することがコンピューターによって実施される、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記報告がコンピューターから遠隔の場所で出力装置に表示される、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

プロセッサ、および

プログラムが保存され前記プロセッサと操作可能に接続したコンピューター可読媒体であって、前記プロセッサによって実行されるとき、試料液サブシステムに：

レシピエント免疫抗体が存在する場合、それがドナー細胞表面抗原 (A g) と結合して免疫抗体 - A g 複合体を形成するのに十分な条件下でドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合させ；

前記混合物を前記免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させ；かつ

前記免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加させるよう前記プロセッサをプログラムする前記コンピューター可読媒体を含む前記試料液サブシステム；および

前記免疫抗体 - A g 複合体と結合した前記検出可能標識抗体の存在または不存在のための前記試料を分析し、ドナー特異的抗体の存在または不存在を判定するよう構成されたフローサイトメーターを含むシステム。

30

【請求項 3 7】

前記免疫抗体が同種抗体である、請求項 3 6 に記載のシステム。

【請求項 3 8】

前記免疫抗体が自己抗体である、請求項 3 6 に記載のシステム。

【請求項 3 9】

前記免疫抗体が補体結合抗体 (C F A b) である、請求項 3 6 から 3 8 のいずれか一項に記載のシステム。

40

【請求項 4 0】

前記検出可能標識抗体が抗体と結合した検出可能な標識またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 4 1】

前記検出可能な標識がインドカルボシアニン (C 3)、インドジカルボシアニン (C 5)、Cy 3、Cy 3 . 5、Cy 5、Cy 5 . 5、Cy 7、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレングリーン 4 8 8、アレクサフルオロ 3 5 5、アレクサフルオロ 4 8 8、アレクサフルオロ 5 3 2、アレクサフルオロ 5 4 6、アレクサフルオロ 5 5 5、アレクサフルオロ 5 6 8、アレクサフルオロ 5 9 4、アレクサフルオロ 6 4 7、アレクサフルオロ 6

50

60、アレクサフルオロ680、アレクサフルオロ700、JOE、リサミン、ローダミンググリーン、BODIPY、フルオレseinイソチオシアネート(FITC)、カルボキシ-フルオレsein(FAM)、アロフィコシアニン(APC)、フィコエリトリン(PE)、ローダミン、ジクロロローダミン(dRhodamine)、カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、およびRiboGreenから成る群から選択される蛍光団を含む、請求項36から40のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項42】

前記平均ビーズ直径が0.1~20ミクロンである、請求項36から41のいずれか一項に記載のシステム(method)。

10

【請求項43】

前記平均ビーズ直径が5ミクロン未満である、請求項36から41のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項44】

前記平均ビーズ直径が2.5~5ミクロンである、請求項36から41のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項45】

前記ビーズがアガロースビーズである、請求項36から44のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項46】

前記ビーズがラテックスビーズである、請求項36から44のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項47】

前記ビーズが磁気ビーズである、請求項36から44のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項48】

前記ビーズがポリスチレンビーズである、請求項36から44のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項49】

前記システムが12時間以下でドナー特異的抗体の存在または不存在を検出するように構成される、請求項36から48のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項50】

前記システムが8時間以下でドナー特異的抗体の存在または不存在を検出するように構成される、請求項36から48のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項51】

表面で特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する抗体を含む複数のビーズ；
前記免疫抗体-Ag複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体；および
前記複数のビーズおよび前記検出可能標識抗体を用いてドナーからの細胞試料およびレシピエントからの生体試料を分析して前記生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定するための指示書を含むキット。

40

【請求項52】

前記検出可能標識抗体が抗体と結合した検出可能な標識またはその抗原結合フラグメントを含む請求項51に記載のキット。

【請求項53】

前記検出可能な標識がインドカルボシアニン(C3)、インドジカルボシアニン(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレゴングリーン488、アレクサフルオロ355、アレクサフルオロ488、アレクサフルオロ532、アレクサフルオロ546、アレクサフルオロ555、アレクサフルオロ568、アレクサフルオロ594、アレクサフルオロ647、アレクサフルオロ660、アレクサフルオロ680、アレクサフルオロ700、JOE、リサミン、ローダミ

50

ングリーン、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、カルボキシ-フルオレセイン(FAM)、アロフィコシアニン(APC)、フィコエリトリン(PE)、ローダミン、ジクロロローダミン(dRhodamine)、カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、およびRiboGreenから成る群から選択される蛍光団を含む、請求項51または52に記載のキット。

【請求項54】

前記平均ビーズ直径が5ミクロン未満である、請求項51から53のいずれか一項に記載のキット。

【請求項55】

前記平均ビーズ直径が2.5~5ミクロンである、請求項51から54のいずれか一項に記載のキット。

【請求項56】

前記ビーズがアガロースビーズである、請求項51から55のいずれか一項に記載のキット。

【請求項57】

前記ビーズがラテックスビーズである、請求項51から55のいずれか一項に記載のキット。

【請求項58】

前記ビーズが磁気ビーズである、請求項51から55のいずれか一項に記載のキット。

【請求項59】

前記ビーズがポリスチレンビーズである、請求項51から55のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年3月14日に出願された米国特許仮出願第61/782,003号の出願日に対する優先権を主張するものであり、本出願の開示は参照として本明細書に全体が組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

米国で実施される年間数万件を含め、世界中で年間100,000件を越える固形臓器移植が実施される。免疫抑制および移植後ケアは有意に改善したが、移植片の長期的な機能は最適とは言えない。米国では、献腎移植および生体腎移植の調整10年同種移植片生存率は各々わずかに約40%および60%である。抗体関連型拒絶反応(AMR)に続発する初期および末期移植片不全は、移植片生存不良の重大な原因である。

【0003】

ヒト白血球型抗原(HLA)に対する抗体は、移植前の感作事象(輸血、過去の移植、または妊娠)の結果発生する、移植候補者またはレシピエントの血液に存在する血流抗体である。移植前に存在するドナー特異的抗体(DSA)が超急性拒絶反応および即時移植片損失を引き起こす可能性があるため、移植前適合試験により評価する。さらに近年では、ドナー特異的HLAクラスIおよびクラスII不適合に対する臨床的に意味のある抗体の移植後発生を監視するという概念が、移植コミュニティ内で重大な関心領域となっている。ドナー臓器に発生した抗原に対する抗体の存在は、検出されたのが移植前であろうと移植後であろうと、臨床的に治療しない場合には移植した臓器への免疫攻撃を起し、移植片損失および/または拒絶反応のリスクを増大させる。とりわけDSAは同種移植片の内皮を攻撃し、その後生検で立証されるAMRおよび急性障害を引き起こし、免疫抑制の増強が必要となる可能性がある。DSA発現の進行および対応する臨床事象が複合して同種移植片を損傷し、経時的な慢性的変化を引き起こして最終的に移植片機能および生存を損なう。

10

20

30

40

50

【0004】

抗体媒介型拒絶反応は、既往性応答または新生抗体産生により起きる早期急性反応、または新生抗体産生による遅発性および慢性反応として現れる可能性がある。急性期では、それは早期拒絶反応を惹き起こす事前に形成された抗体であることが多いが、移植後早期にも新生DSAが発現して急性拒絶反応を起こすことがある。事前に形成されたDSAを有する患者は急性AMRとなるリスクが有意に高く、また移植片生存率が有意に低い。

【0005】

慢性拒絶反応は、生着失敗による移植片損失の主な原因の1つである。同種抗体媒介障害および修復の反復循環によって同種移植片の微小血管構造に特異的变化を起こす。DSAが事前に形成されている患者および新生DSAを発現する患者は慢性拒絶反応を起こすリスクが増大している。

10

【発明の概要】

【0006】

生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定する方法が提供される。当該方法は、レシピエント免疫抗体が存在する場合に、これがドナー細胞表面抗原(Ag)と結合して免疫抗体-Ag複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合することによって混合物を形成すること、混合物を免疫抗体-Ag複合体(例えば、Agまたは免疫抗体)と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させること、ビーズと結合した免疫抗体-Ag複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加すること、および免疫抗体-Ag複合体に結合した検出可能標識抗体の有無を検出してレシピエントからの生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含む。目的の方法を実施するためのシステムおよびキットも提供される。

20

【0007】

本発明は、添付の図面と関連づけて以下の詳細な説明を読むとき最もよく理解されるであろう。図面には以下の図が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本開示の1つの実施形態に従って生体試料にドナー特異的抗体の存在または不存在を判定する方法を模式的に例示する。

30

【図2】本開示の第2の実施形態に従って生体試料ドナー特異的抗体の存在または不存在を判定する方法を模式的に例示する。

【図3】DSAの同時的捕捉および標識化を包含するDSA-FXM実験の結果を示す。各ビーズの内部蛍光IDにより識別されるHLA-クラスIおよびクラスIIビーズを用いてDSA-FXMによって4つの試料を試験した。HLA特異的抗体によって増大した蛍光(陽性シグナル)をX軸に示す。図3パネルA:HLA-クラスI(C-I)およびクラスII(C-II)ドナー特異的抗体(DSA)はともに陰性であった(CI-/CII-);図3パネルB:C-II DSAだけが陽性であった(CI-/CII+);図3パネルC:C-I DSAだけが陽性であった(CI+/CII-);および図3パネルD:C-IおよびC-II DSAはともに陽性であった(CI+/CII+)。

40

【図4】DSAの逐次的捕捉および標識化を包含するDSA-FXM実験の結果を示す。DSA-FXMによって陰性AB血清(試料A)1件および陽性血清3件(試料B、CおよびD)を試験した。試料A:C-IおよびC-II DSAともに陰性;試料B:C-IおよびC-IIDSAともに陽性;試料C:C-I DSAだけが陽性かつC-IIDSAは陰性;試料D:C-II DSAだけが陽性およびC-IDSAは陰性。

【図5】DSA-FXM実験の結果を提供する。FXM、DSA-FXM、およびLMX-IgGによってさまざまな細胞数に対して希釈度の異なるHLA-Ab陽性血清(PPS)をプールして試験した。結果は、DSA-FXMはDSAを検出するための最も感度の高い方法であり、かつ標準的な方法と比較してはるかに少ない細胞(例えば、わずか25,000細胞でDSAを検出することができる)を用いることを示す。LMX-IgG

50

は単一抗原ビーズを用いる Lumine x プラットフォーム上の PPS 血清に含有される HLA 特異性を定義し、示される値は平均蛍光強度 (MFI) である。1000 MFI より大きいかまたはこれと同等の値が陽性と考えられ; 500 ~ 999 MFI の値は陽性の可能性あり (あいまい) と考えられる。

【図 6】DSA - FXM 実験の結果を示す。盲検誘発試験と同時に、かつ単一抗原ビーズ (LMX - IgG) 上で通常のプロサイトメトリッククロスマッチ (FXM) および標準的な抗体スクリーニングと平行して、DSA - FXM により CAP (米国病理学会) 外部精度管理 (proficiency) 試料 23 件を試験した。HLA - クラス I (C - I) および / または HLA - II (C - II) のドナー特異的抗体 (DSA) を同定し、大半の DSA は LMX - IgG によってさらに確認した。一部の MCS が低い DSA のみ、特別により感度の高い DSA - FXM 方法で検出した。外部精度管理試料は、特異性が既知である血清および細胞である。全参加施設から全ての結果を受け取るまで血清の特異性は参加者に対して盲検化される。

10

【図 7】DSA - FXM 実験の結果を提供する。LMX - IgG によって HLA - DQ DSA 陽性試料 7 件を同定し、DSA - FXM によって確認した。歴史的に、細胞または細胞抽出物を包含するいかなる種類の DSA 分析法によっても DQ に対して特異的な DSA をすべて検出することは不可能となっている。

【図 8】DSA - FXM 実験の結果を示す。LMX - IgG によって 6 つの HLA - DP DSA 陽性試料を同定し、DSA - FXM によって確認した。

【図 9】DSA - FXM 実験の結果を提供する。LMX - IgG によって 3 つの HLA - C DSA 陽性試料を同定し、DSA - FXM によって確認した。

20

【図 10】DSA - FXM 試験手順による実験結果を示す。パネル A : HLA - クラス I (C - I) およびクラス II (C - II) ドナー特異的抗体 (DSA) はともに陰性であった (CI - / CII -); パネル B : C - I DSA だけが陽性であった (CI + / CII -); パネル C : C - II DSA だけが陽性であった (CI - / CII +); およびパネル D : CI および C - II DSA ともに陽性であった (CI + / CII +) 。

【図 11】既知のクラス I およびクラス II DSA 反応性を有する、またはこれらを欠いた、分離 DSA - FXM 試験 117 件の結果を提供し、既知の DSA 特性と相関する反応性の相互排反パターンを示す。

【図 12】クラス I 特異的 DSA (B7) の FXM、DSA - FXM、および LMX - IgG 単一抗原ビーズ検出法の感度比較を示し、DSA - FXM が、他の 2 つの試験が陰性であっても、標的細胞上で特異的 HLA クラス I DSA を検出することができることを示す。

30

【図 13】クラス II 特異的 DSA (DR4) の FXM、DSA - FXM、および LMX - IgG 単一抗原ビーズ検出法の感度比較を示し、DSA - FXM が、他の 2 つの試験が陰性であっても、標的細胞上で特異的 HLA クラス II DSA を検出することができることを示す。

【図 14 A】図 14 のパネル A および B は、クラス I DSA (パネル A) 95 件およびクラス II DSA (パネル B) 100 件の FXM 比較について DSA - FXM および LMX - IgG SAB 結果の間のピアソン相関を示す。パネル C は、標準として IgG DSA を用いたクラス I および II についての感度および特異性百分率を示す。

40

【図 14 B】図 14 のパネル D は、7 つの血清試料 (6 名) 上での LMX - IgG SAB、LMX - C1q SAB、FXM、および DSA - FXM の比較を示す。LMX - SAB の過剰 - 反応性に関連する不一致。図 15 と関連づけて、結果は、LMX - IgG SAB が偽陽性反応をもたらす (すなわち、FXM および DSA - FXM がともに陰性である場合、DSA 陽性) ことを示す。これは図 15 に示した特異性の低下に寄与する。

【図 15】患者 15 例の FXM および DSA - FXM の比較を示し、うち 12 例は FXM による特異性不明抗原に対する自己抗体を持っていた (下部パネル)。これらの患者のうち 4 例 (P12 ~ P15) は、DSA - FXM で判定されたように、HLA に対する自己抗体を持っていた (上部パネル) 。

50

【図16】FXMとDSA-FXMがDSAクラス(Iおよび/またはII)による陽性反応を識別する能力の比較を示す。DSA-FXMヘッダー：CIピーズはクラスIをすべて検出し、CIIaはDQを検出し、CIIbはすべてのDRおよびDPを検出するもののDQは一部のみを検出する。4つの異なる型の結果を示す。ケース1および3ともに陽性B細胞FXMを有するが、ケース1はクラスI同種抗体によるものである一方、ケース3はクラスII同種抗体によるものである。ケース2および4ともに陽性TおよびBFXMを有するが、ケース2は自己抗体によるものである一方、ケース4はクラスI同種抗体によるものである。

【図17】図17パネルAは、緩衝液で1:2に希釈および静脈注射用免疫グロブリン(IVIg)で1:2に希釈した血清上でのクラスI DSAのDSA-FXM結果を示す。IVIgはHLAに対する脱感受性のために用いられ、抗体を低下させる。通常のFXMは、第2ステップ抗IgG試薬の存在および細胞表面上にある未知の標的とのIVIgの広い反応性のために、緩衝液(データは示さず)と比較してIVIg処理した試料で増加を示す。検出がHLAに対して特異的であるため、DSA-FXMはIVIgの阻害を示す。したがって、DSA-FXMは治療の有効性を明らかにする。パネルBは、緩衝液で1:2に希釈したおよび静脈注射用免疫グロブリン(IVIg)で1:2希釈した血清上でクラスII DSAのDSA-FXM結果を示す。IVIgはHLAに対する脱感受性のために用いられ、抗体を低下させる。通常のFXMは、第2段階抗IgG試薬の存在および未知の細胞表面上標的に対するIVIgの幅広い反応性のために、緩衝液(データは示さず)と比較してIVIg処理した試料で増加を示す。DSA-FXMは、検出がHLAに対して特異的であるため、IVIgの阻害を示す。したがって、DSA-FXMは治療の有効性を明らかにする。

【図18】図18のパネルAは、5%IVIgを加え、DSA-FXMによって異なる希釈度で試験した陽性DSA血清の結果を示す。結果は、IVIgにHLAクラスI DSAとともに用量依存的阻害があったことを示した。パネルBは、5%IVIgを加え、DSA-FXMによって異なる希釈度で試験した陽性DSA血清の結果を示す。結果は、IVIgは両HLAクラスI DSAを用量依存的に阻害することを示した。

【図19】特定されている候補生体ドナーに対するDSAを前もって低下/抑制するために、IVIg脱感受性治療を受けている腎移植候補者からの連続試料に関するFXMおよびDSA-FXMの結果を示す。FXM結果は、IVIgおよびRituxan(治療的抗CD20、B細胞のマーカー)によるMCS値の増加を示す一方、DSA-FXM結果は、治療的抗体が存在しても移植に許容できる範囲でIVIgおよびMCS値の阻害(有効性)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

(定義)

「ドナー特異的抗体」または「DSA」とは、レシピエントに存在し、特異的にドナー抗原(例えばドナー細胞表面抗原)に結合する抗体を意味する。DSAは、「事前形成」(例えばドナーから移植または輸血を受ける前からレシピエントに存在する)および/または妊娠していること、または1人以上のドナーから移植または輸血を受けることに反応してレシピエントによって産生される新生DSAである可能性がある。DSAは、一部の例では、レシピエント自身の細胞の細胞表面成分に結合する自己由来DSA(自己抗体)でありうる。特定の態様では、DSAは補体結合抗体(CFab)である。特定の態様では、DSAはHLA抗原に対するものである。

【0010】

対象発明の「親和性試薬」は、標的分析対象物質に対して結合親和性が高い分析対象物質結合ドメイン、部分、または成分を有する。結合親和性が高いとは、結合親和性が少なくとも約 10^{-4} M、通常少なくとも約 10^{-6} M以上、例えば、 10^{-9} M以上であることを意味する。親和性試薬は、標識親和性リガンドとして存在する場合に標的タンパク質に対して必須な結合親和性を示すかぎり、さまざまな異なる型の分子のいずれかとする

ことができる。

【0011】

従って、親和性試薬は、小分子または大分子リガンドとすることができる。小分子リガンドとは、サイズの範囲が約50～約10,000ダルトン、通常約50～約5,000ダルトンおよびさらに通常約100～約1000ダルトンであるリガンドを意味する。大分子とは、分子量が約10,000ダルトン以上のサイズのリガンドを意味する。

【0012】

大分子親和性リガンドとして特に興味深いものは、抗体、ならびに結合フラグメントおよびこれらの模倣物である。抗体が親和性リガンドである場合、ポリクローナル組成物から誘導することができるので、特異性の異なる抗体の不均一な集団がそれぞれ同じ標識で標識される。こうして、親和性リガンドは、モノクローナル、オリゴクローナル、および/またはポリクローナル抗体とすることができる。親和性リガンドは、フラグメントおよび模倣物が必須の標的タンパク質結合親和性を有する場合、抗体結合フラグメントまたは模倣物とすることができる。例えば、Fv、(Fab')₂、およびFabなどの抗体フラグメントは、未修飾タンパク質の例えばプロテアーゼまたは化学的開裂などの開裂によって調製することができる。一本鎖抗体またはscFvsなどの組換え産生抗体フラグメントも興味深く、このような組換え産生抗体フラグメントは、上記の抗体の結合特性を保持する。このような組換え産生抗体フラグメントは、一般的に、対象抗体の結合特性を保持するよう、対象抗体の少なくともVHおよびVLドメインを含む。対象発明のこれらの組換え産生抗体フラグメントまたは模倣物は、米国特許第5,851,829号および5,965,371号に開示された方法(この開示は参照として本明細書に組み入れられる)などの都合のよい方法を用いて容易に調製することができる。

【0013】

上記の抗体、フラグメントおよびその模倣物は、市販の供給源から入手、および/または任意の簡便な技術を用いて調製することができる、ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体、モノクローナル抗体、フラグメントおよびその模倣物(これらの組換え誘導体を含む)を生成する方法は、当業者に既知である。

【0014】

「エピトープ」とは、特異的B細胞および/またはT細胞が応答する抗原の部位を意味する。当該用語はこのほか、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と互換的に用いられる。エピトープは、そのエピトープに特有の立体配座で、1個以上のアミノ酸、例えば、3個以上のアミノ酸を含むことができる。エピトープは、1～10個のアミノ酸、例えば、1～5個のアミノ酸、例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含むことができる。アミノ酸の立体配座を決定する方法は技術上既知であり、例えばX線結晶解析および2次元核磁気共鳴を含む。さらに、所与のタンパク質中のエピトープの同定は、技術上周知の技術を用いて容易に実施される。Geysen他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:3998-4002(ペプチドを迅速に合成して所与の抗原中の免疫原性エピトープの位置を決定する一般的な方法)、米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定および化学合成する手順)、およびGeysen他, Molecular Immunology (1986) 23:709-715(所与の抗体に対して親和性が高いペプチドを同定する技術)などを参照されたい。1つの抗体が他の抗体の標的抗原との結合を遮断する能力を示すという単純な免疫測定法で、同一のエピトープを識別する抗体を同定することができる。

【0015】

「結合する特異的に(bind specifically)」または「特異的に結合する(specifically binds)」とは、特異的抗原またはエピトープに対する抗体の高い結合力および/または高親和性結合を意味する。特異的抗原上のそのエピトープとの抗体結合は、同じ抗体と別のエピトープ、特に同じ試料とともに、または同じ試料中で目的の特異抗原として分子内に存在することができる別のエピトープとの結合より結合力および/または親和性が大きい。しかし、補体結合抗体は、異なる対象抗原

10

20

30

40

50

のさまざまなエピトープに対して同一のまたはほぼ同じ結合力および/または親和性を有することができる。このように、「特異的に結合する (binds specifically)」または「特異的に結合する (specifically binds)」とは、所与の補体結合抗体が1つ以上の目的の抗原に結合することを妨げることを意味しない。目的のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、弱い結合、検出可能なレベル(例えば目的のポリペプチドに示した10%以下の結合)で他のポリペプチドを結合することができる。このような弱い結合、またはバックグラウンド結合は、例えば、しかるべきコントロールを用いて目的のポリペプチドとの特異的抗体結合と容易に識別することができる。

【0016】

「検出可能に標識された」抗体とは、検出可能な標識を付けた抗体を意味し、当該抗体は特異的にもう1つの分子、例えば、もう1つの抗体(例えばIgG抗体)に結合することができる。検出可能標識抗体は、結合特異性を保持する。検出可能標識は化学的結合により結合することができるか、または標識がポリペプチドである場合は遺伝子組み換え技術により結合することができる。検出可能標識抗体を産生する方法は技術上周知である。検出可能なシグナル(例えば、放射能、蛍光、色)を発するか、または標識をその基質に曝露した後検出可能なシグナルを発する放射線同位体、発色団、蛍光団、蛍光色素、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、リンカー分子または他の部分または化合物を含む、当技術分野で周知であるさまざまなこのような標識から検出可能標識を選択することができる。さまざまな検出可能標識/基質対(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンチジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/シフェリン)、抗体に標識をつける方法、および抗原を検出するために標識二次抗体を用いる方法が技術上周知である。例えば、Harlow and Lane編(Using Antibodies: A Laboratory Manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)を参照されたい。

【0017】

「単離された」とは、当該化合物が天然に生じる環境とは異なる環境にある目的の化合物を意味する。「単離された」とは、目的の化合物が相当程度濃縮され、かつ/またはその中で目的の化合物が部分的にまたは実質的に精製されている試料内にある化合物を含むことを意味する。用語「単離された」は、化合物が、通常その天然状態に関係する物質のうち少なくとも一部を伴わない場合を包含する。例えば用語「単離された」は、一般にポリペプチドについて、通常天然にポリペプチドと関係する配列の一部を欠くアミノ酸分子;または天然に存在するものと同じであるがこれと関係する異種配列を有する配列を意味する。

【0018】

本明細書に用いられる「精製した」は、列挙した物質が総タンパク質の少なくとも約75重量%、好ましくは少なくとも約80重量%、および特に好ましくは少なくとも約90重量%を含むことを意味する。用語「実質的に純粋(substantially pure)」は、本明細書に用いられる場合、化合物がその天然環境から取り出されている、および天然に付随する他の成分が少なくとも60%含まれない、好ましくは75%含まれない、およびさらに好ましくは90%含まれない化合物を意味する。

【0019】

本明細書に用いられる「レシピエントからの生体試料」は、レシピエントから単離した組織または体液の試料を意味し、本発明の文脈では一般的にドナー特異的抗体を含有することができる試料(任意の工程後、インビトロ検査でこの試料を分析することができる)を意味する。目的の試料は、血液、血漿、血清、血液細胞、尿、唾液、生検組織、および粘膜を含むが、これらに限定されない。試料はたとえば組換え細胞といった細胞および組織の培地内での増殖から得られる調整培地、例えば、および細胞成分を含むがこれらに限定されないインビトロ細胞培養成分の試料も含む。

【0020】

10

20

30

40

50

「ヒト白血球抗原」または「HLA」とは、第6染色体の短腕内で約350万塩基対に及び、主要組織適合性複合体(MHC)内の遺伝子を意味する。MHCはクラスI、クラスIIおよびクラスIII遺伝子を含む3つの独立した領域に分けられる。ヒトでは、クラスI HLA複合体は約2000kb長であり、また約20遺伝子座を含む。クラスI領域内には、十分に特性解析され、HLA-A、HLA-BおよびHLA-Cと命名されたクラスI MHC分子をコードする遺伝子が存在する。また、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-H、HLA-J、HLA-XおよびMIC遺伝子座によりコードされた非古典クラスI遺伝子がある。クラスII領域は、HLA-DRB1、3、4、5、HLA-DQA、HLA-DQB、およびHLA-DPA、HLA-DPB遺伝子座によりコードされた6つの遺伝子ファミリーを含む。これらの遺伝子は、HLA-DRB1、3、4、5、DQおよびDPと命名された古典クラスII MHC分子の鎖をコードする。ヒトではDM、DNおよびDO遺伝子座によりコードされた非古典遺伝子もクラスII内で同定されている。クラスIII領域は、免疫反応と関係する36を越える遺伝子座の不均一な集積を含む。

10

【0021】

用語「判定する」、「測定する」、「評価する」、「判断する」および「分析する」は、互換的に用いられ、量的および質的な判定を含む。

【0022】

用語「固形基材」は、それらの上に抗原および/または抗体を固定することができる固形支持体を意味する。例示的な固形基材は、マルチウエルプレート、ニトロセルロース膜およびポリエチレン膜を含む膜、細胞および細胞膜、ビーズ、マイクロ粒子、マイクロスフェア、マイクロビーズなどを含む。マイクロ粒子、マイクロスフェア、マイクロビーズ、または任意の材質(例えば、シリカ、金、ラテックス)のビーズ、ポリマー(例えば、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエチル、またはハイドロゲル)によって本発明の方法を実施することができる。また、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ビーズまたはマイクロビーズは、磁性物質とすることができる。

20

【0023】

用語「補体結合抗体」は、特異的に抗原または病原体に結合する抗体、および生体から抗原保持標的(例えば、細胞)または病原体を除去する免疫系の補体カスケードを開始する抗体を意味する。一般的に、補体結合抗体はIgMまたはIgG抗体である。補体第二経路などを介して補体因子C1q、補体因子C3により認識され、および特異的に結合される。

30

【0024】

請求項は、いかなる任意の要素も除外するように記載されうることを更に記す。従って、この記述は、請求項の要素の列挙または「否定的な」限定の使用と関連して、「単独で」、「唯一の」等のような除外的用語を用いるための先行詞を提示することを意図している。

【0025】

(詳細な説明)

生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定する方法が提供される。当該方法は、レシピエント免疫抗体が存在する場合に、これがドナー細胞表面抗原(Ag)と結合して免疫抗体-Ag複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合することによって混合物を形成すること、混合物を免疫抗体-Ag複合体(例えば、Agまたは免疫抗体)と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させること、ビーズと結合した免疫抗体-Ag複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加すること、および免疫抗体-Ag複合体に結合した検出可能標識抗体の存在または不存在を検出してレシピエントからの生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含む。目的の方法を実施するためのシステムおよびキットも提供される。

40

【0026】

50

本発明の詳細をさらに記載する前に、本発明は記載した特定の実施形態に限定されず、従って、当然ながら変更できるものであることを理解すべきである。本発明の範囲は添付の請求項によってのみ限定されるため、本明細書に用いる専門用語は、具体的な実施形態記載することのみを目的とし、限定することを意図しないことも理解すべきである。

【0027】

数値の範囲が提供される場合、文脈によって明示されない限り、中間の各値は、下限の単位の10分の1まで、その範囲の上限と下限の間で具体的に開示されていると理解される。任意の記載した値の間のそれぞれのさらに小さな範囲、または記載した範囲の間の値、およびその記載した範囲内の任意の他の記載したまたは間の値が本発明に包含される。これらのさらに小さな範囲の上限および下限は、個別に範囲に含むことも除外することもでき、より小さな範囲に上限および下限のいずれかを含む、いずれも含まない、または両者とも含む各範囲も、本発明に包含され、記載した範囲で任意の具体的に除外された限度の対象となる。記載した範囲が上限および下限の一方または両者を含む場合、その含まれる上限および下限のいずれかまたは両者を除外する範囲も本発明に含まれる。

10

【0028】

特に定義しない限り、本明細書に用いられるすべての技術および科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験に本明細書に記載したものとほぼ同じまたは等しい任意の方法および材料を用いることができるが、ここで、いくつかの可能性のあるおよび例示的な方法および材料を記載することができる。本明細書に記載した任意のおよびすべての出版物は、出版物が引用されているところに関係して、方法および/または材料を開示および記載するために参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾がある限り組み込まれる出版物の任意の開示に優先すると理解される。

20

【0029】

文脈が明らかに別段の指示をしない限り、本明細書および添付された請求項に用いられる単数形「a」、「an」および「the」は複数の指示物を含むことを明記しなければならない。したがって、例えば、「電極 (an electrode)」という文言は複数のその電極を含み、「そのシグナル (the signal)」という文言は1又はそれ以上のシグナルへの言及を含む等である。

30

【0030】

請求項は、いかなる任意の要素も除外するように記載されうることを更に記す。従って、この記述は、請求項の要素の列挙または「否定的な」限定の使用と関連して、「単独で」、「唯一の」等のような除外的用語を用いるための先行詞を提示することを意図している。

【0031】

本明細書に示した出版物は、本出願の出願日の前に開示されたものだけが提供される。本明細書中の何物も、先行発明によって本発明にこのような出版物に先行する権利がなくなることの容認として解釈すべきではない。さらに、提供された出版物の日付は、別途確認を要することもある実際の出版の日付と異なることもある。このような出版物が本開示に明示的または暗示的に示された定義と対立する用語の定義を説明する場合は、本開示の定義が優先する。

40

【0032】

本開示を読むとき当業者に明らかとなるように、本明細書に記載および例示した個々の実施形態の各々は、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、容易に任意の他のいくつかの実施形態の特徴から分離するかまたはこれと組み合わせることができる別の要素および特徴を有する。列挙した事象の順にまたは論理的に可能である任意の他の順にいずれの列挙した方法も実施することができる。

【0033】

(方法)

上記に概要を示したように、本発明の態様は、生体試料中のドナー特異的抗体の存在ま

50

たは不存在を判定する方法を含む。当該方法は、レシピエント免疫抗体が存在する場合に、これがドナー細胞表面抗原（A g）と結合して免疫抗体 - A g 複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合することによって混合物を形成すること、混合物を免疫抗体 - A g 複合体（例えば、A g または免疫抗体）と特異的に結合する抗体を含むビーズとその表面で接触させること、ビーズと結合した免疫抗体 - A g 複合体と特異的に結合する検出可能標識抗体を溶解条件下で添加すること、および免疫抗体 - A g 複合体に結合した検出可能標識抗体の有無を検出してレシピエントからの生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含む。ここで以下にさらに詳細に方法のさまざまなステップおよび態様を記載する。

【0034】

「ドナー」とは、細胞試料の採取源（例えばヒト採取源）を意味する。ドナーがレシピエントと異なっても（例えば D S A が同種抗体となりうる場合）、またはドナーとレシピエントが同じであってもよい（例えば D S A が自己抗体となりうる場合）。特定の態様では、ドナーは細胞（例えば血液細胞）、組織（例えば角膜、皮膚、骨、心臓弁、腱、大腿静脈および/または伏在静脈、リンパ節、脾臓など）、臓器（例えば腎臓、心臓、肝臓、すい臓、肺、腸管、眼球など）、および任意のこれらの組み合わせをこれらが必要なレシピエントに提供する候補者としてすることができる。目的のドナーは、ヒトドナー、非ヒト霊長類ドナー、哺乳類ドナー（例えばブタ）、非哺乳類ドナー、および任意の他の目的ドナー型を含む。

【0035】

本明細書に用いられるドナーからの「細胞試料」は、少なくとも1つの細胞を含むドナーから得た試料である。この少なくとも1つの細胞は有核細胞（例えばリンパ球または末梢血単核細胞（P B M C））、または核のない細胞（例えば、赤血球または血小板）とすることができる。特定の態様では、細胞試料は、細胞から選択されるリンパ球（例えばT細胞および/またはB細胞）、P B M C、赤血球、血小板、および任意のこれらの組み合わせから選択される細胞を含むドナーから得た試料である。特定の実施形態に従うと、ドナーからの細胞試料は、ドナーの組織（例えばリンパ節、脾臓、角膜、皮膚、骨、心臓弁、腱、大腿静脈および/または伏在静脈など）、ドナーの臓器（例えば腎臓、心臓、すい臓、肺、肝臓、腸管、眼球など）、またはこのような組織および/または臓器の任意の組み合わせに由来する。細胞試料は、本開示の方法に用いる前に精製手順に付してもよい。例えば、細胞試料はリンパ球、末梢血単核細胞（P B M C）、赤血球、および/または血小板の実質的に純粋な試料としてもよく、当該試料は対象方法の混合する、接触させるおよび/または検出するステップに干渉する可能性がある成分を含まない。特定の態様では、目的の方法はドナーからの細胞試料を得ることを含む。

【0036】

特定の実施形態に従うと、ドナーからの細胞試料は $0.001 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の細胞を含む。特定の態様では、ドナーからの細胞試料は、 1×10^6 個以下の細胞、例えば、 0.5×10^6 個以下の細胞、 0.4×10^6 個以下の細胞、 0.3×10^6 個以下の細胞、 0.2×10^6 個以下の細胞、 0.1×10^6 個以下の細胞、または 0.5×10^5 個以下の細胞を含む。特定の態様では、ドナーからの細胞試料は 25,000 ~ 200,000 細胞を含む。

【0037】

「レシピエント」とは生体試料の採取源を意味する。レシピエントがドナーと異なっても（例えば、D S A が同種抗体となりうる場合）、またはレシピエントとドナーが同じであってもよい（例えば、D S A が自己抗体となりうる場合）。特定の態様では、レシピエント（例えばヒトレシピエント）は、（例えば病状を緩和するために）ドナーに由来する細胞（例えば血液細胞）、組織（例えば角膜、皮膚、骨、心臓弁、腱、大腿静脈および/または伏在静脈など）、臓器（例えば腎臓、心臓、すい臓、肺、肝臓、腸管、眼球など）、および任意のこれらの組み合わせを受ける候補者であるか、またはドナーから細胞、組織、または臓器をすでに受けた者でありうる。目的のレシピエントは、ヒトレシピエ

10

20

30

40

50

ント、非ヒト霊長類レシピエント、哺乳類レシピエント、非哺乳類レシピエント、および任意の他の目的レシピエント型を含む。

【0038】

レシピエントからの「生体試料」は、ドナー特異的抗体(DSA)を含むかまたは含む可能性がある任意のレシピエント由来生体試料とすることができる。特定の実施形態に従うと、レシピエントからの生体試料は血清、血漿、血液、唾液、組織、および任意のこれらの組み合わせから選択される。特定の態様では、生体試料は100 μ L以下の血清、血漿、血液、唾液、または任意のこれらの組み合わせ、例えば、90 μ L以下、80 μ L以下、70 μ L以下、60 μ L以下、50 μ L以下、40 μ L以下、30 μ L以下、20 μ L以下、または10 μ L以下の血清、血漿、血液、唾液、または任意のこれらの組み合わせである。1つの実施形態に従うと、レシピエント由来の生体試料は30 μ L以下の血清、血漿、血液、唾液、または任意のこれらの組み合わせである。特定の態様では、目的の方法はレシピエントからの生体試料を得ることを含む。

10

【0039】

レシピエント免疫抗体(例えばDSA)が存在する場合、これがドナー細胞表面抗原(Ag)と結合して免疫抗体-Ag複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料をレシピエントからの生体試料と混合することによって混合物を形成する。特定の実施形態に従うと、レシピエント免疫抗体は同種抗体である。他の態様では、レシピエント免疫抗体は自己抗体である。レシピエント免疫抗体(例えばDSA)が存在する場合、これがドナー細胞表面抗原(Ag)と結合するのに十分な条件は、適切な緩衝液(例えばPBS、TBS、など)、界面活性剤(例えばTween)、タンパク質(例えばBSA)、pH、温度、持続時間等の選択によって提供することができる。抗体のその標的抗原への特異的結合を可能にするのに有用な条件は、例えば、Coligan他編、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY(1994-2013)に記載されている。特定の態様では、レシピエント免疫抗体がドナー細胞表面抗原に結合できるよう、適切な緩衝液中でドナー由来の細胞試料(例えば 0.2×10^6 の細胞)およびレシピエント由来の生体試料(例えば50 μ Lのレシピエント由来血清)を室温で約20分間インキュベートする。特定の態様では、室温で混合する、接触させる、および/または検出するステップを実施する。

20

【0040】

特定の態様では、ドナー特異的抗体は、実際のドナー特異的抗体である。

30

【0041】

特定の実施形態に従うと、ドナー細胞表面抗原はHLA抗原であるのでドナー特異的抗体は抗-HLA抗体である。特定の態様では、ドナー特異的抗体は抗-HLAクラスIおよび/または抗-HLAクラスII抗体である。特定の実施形態に従うと、ドナー特異的抗体は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DPA、およびHLA-DPBから選択されるドナー細胞表面抗原に結合する。

【0042】

ドナー特異的抗体が存在する場合、これは補体結合抗体(CFAb)でありうる。特定の態様では、本発明の方法は生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定することを含むだけでなく、DSAがCFAbまたは非CFAbであるかどうか判定することを含む。例えば、特異的にCFAb(および/または非CFAb)に結合する直接または間接標識結合剤を用いてDSAをCFAbと同定することができる。特定の実施形態に従うと、結合剤は単離した補体成分C1qである。C1qは、複合体中の任意の他の蛍光標識と識別することができる蛍光標識を有する直接的または間接的に標識することができる。特定の態様では、単離したC1qはビオチンコンジュゲート化され(「Bio-C1q」)、かつ蛍光標識ストレプトアビジン(例えば、R-フィコエリトリンコンジュゲート化ストレプトアビジン(SA-PE))の添加により検出することができる。上記の実施形態に従うと、C1qタンパク質は、DSAが補体結合抗体である場合、Ag-Ab

40

50

D S A に結合し、さらに本方法の下流検出ステップの間に（例えば、フローサイトメーターで）、複合体中の直接または間接標識 C 1 q を検出することができ（D S A に結合した識別検出可能標識抗体とともに）、D S A が C F A b であることを示す。

【0043】

混合物を形成したのちに、抗体 - A g 複合体のドナー細胞表面抗原（例えば、H L A 抗原）と特異的に結合する抗体を含むビーズと混合物を接触させる。目的のドナー細胞表面抗原によっては、このようなビーズは市販されていることがある。そうでない場合は、技術上既知のコンジュゲート化戦略を用いて、目的の抗原を結合する抗体で所望の種類のビーズ（例えばアガロース、ラテックス、ポリスチレン、磁気、または他の種類のビーズ）をコンジュゲート化することができる。例えば、G . T . H e r m a n s o n , 「B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s 」 A c a d e m i c P r e s s , 2 n d E d . , 2 0 0 8 を参照されたい。さらに、目的の抗体をビーズとコンジュゲート化するための試薬および指示書を含むキットが市販されている（例えば、D y n a b e a d s （登録商標）A n t i b o d y C o u p l i n g キット（L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A ））。ビーズは、平均ビーズ直径が 0 . 1 ~ 2 0 ミクロン、例えば 0 . 5 ~ 1 0 ミクロン、例えば 5 ミクロン以下（例えば 2 . 5 ~ 5 ミクロン）であるマイクロビーズとすることができる。接触させることは、典型的には、レシピエント免疫抗体（例えば D S A ）とすでに結合しているドナー細胞表面抗原（例えば H L A 抗原）とビーズ上に含まれる抗体が特異的に結合するのに十分な条件下で実施される。このような条件を提供することは、適切な緩衝液（例えば P B S 、 T B S など）、洗浄剤（例えば T w e e n ）、タンパク質（例えば B S A ）、p H 、温度、持続時間等の選択を含むことがある。抗体のその標的抗原への特異的結合を可能にするのに有用な条件は、例えば、C o l i g a n , 他編 , C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , I n c . , N Y (1 9 9 4 - 2 0 1 3) に記載されている。任意に、混合するステップと接触させるステップの間に混合物を洗浄する。

10

20

【0044】

接触させるステップはドナー細胞表面抗原を含む免疫抗体 - A g 複合体をもたらし、それは、存在する場合はレシピエント免疫抗体（例えば、D S A ）；およびビーズ上に存在する抗体が結合している。細胞試料のドナー細胞も、ドナー細胞の表面に残っている複合体のドナー細胞表面抗原によってこの複合体と関係している。接触させるステップの後、溶解条件下で特異的に複合体（例えば、複合体のレシピエント免疫抗体（例えば、D S A ））と結合する検出可能標識抗体を添加する。任意に、接触させるステップおよび溶解条件下での検出可能標識抗体添加の間に 1 回以上の洗浄ステップを実施する。溶解条件は複合体と関係がある細胞を溶解させるのに十分であり、これによりドナー細胞から複合体を遊離させ、複合体の下流分析（例えば、フローサイトメトリーによる）を可能にする。特定の態様では、溶解条件はトレーサ、界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤、および B S A を含む溶解緩衝液を投与することを含む。

30

【0045】

検出可能標識抗体および溶解条件は、接触させるステップの後に「溶解混合物」（溶解混合物は溶解緩衝液中に検出可能標識抗体を含む）を混合物に添加することによって提供することができる。任意の適切な溶解緩衝液を用いてもよく、かつ溶解緩衝液は T r i s - H C l 、 E D T A 、 E G T A 、 S D S 、 デオキシコレート、T r i t o n X 、 N P - 4 0 、 および / または任意の他の望ましい溶解緩衝液成分のうち 1 つ以上を含むことができる。溶解緩衝液は、このような免疫抗体 - A g 複合体が未変化のままであるような緩衝液である。溶解緩衝液は、本開示の特定の態様によれば非変性である。免疫抗体 - A g 複合体は、ここでドナー細胞表面抗原に結合したビーズ随伴抗体、ドナー細胞表面抗原に結合したレシピエント免疫抗体（例えば D S A ）（存在する場合）、およびレシピエント免疫抗体（例えば D S A ）に結合した検出可能標識抗体（存在する場合）を含む。複合体の検出可能標識抗体から検出可能なシグナルは測定し、さらにレシピエント由来の生体試料

40

50

中のレシピエント免疫抗体（例えば D S A ）の量と比例的に相関させることができる。

【 0 0 4 6 】

上記に記載したように、本開示の方法は、レシピエントからの生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定するために、免疫抗体 - A g 複合体に結合した検出可能標識抗体の有無を検出すること（例えば定量的に検出すること）を含む。採用する検出戦略は、検出可能標識抗体に存在する検出可能標識（単数または複数）の種類に従って変えることができる。標題の方法を実施する際の用途が確認されている検出可能標識は、蛍光団、発色団、酵素、リンカー分子、ビオチン分子、電子供与体、電子受容体、色素、金属、または放射性核種が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 7 】

特定の実施形態に従うと、検出可能標識抗体は蛍光標識され、インドカルボシアニン（C 3）、インドジカルボシアニン（C 5）、Cy 3、Cy 3 . 5、Cy 5、Cy 5 . 5、Cy 7、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレゴングリーン 4 8 8、アレクサフルオロ - 3 5 5、アレクサフルオロ 4 8 8、アレクサフルオロ 5 3 2、アレクサフルオロ 5 4 6、アレクサフルオロ - 5 5 5、アレクサフルオロ 5 6 8、アレクサフルオロ 5 9 4、アレクサフルオロ 6 4 7、アレクサフルオロ 6 6 0、アレクサフルオロ 6 8 0、アレクサフルオロ 7 0 0、J O E、リサミン、ローダミングリーン、B O D I P Y、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、カルボキシ - フルオレセイン（F A M）、アロフィコシアニン（A P C）、フィコエリトリン（P E）、ローダミン、ジクロロローダミン（d R h o d a m i n e）、カルボキシテトラメチルローダミン（T A M R A）、カルボキシ - X - ローダミン（R O X）、L I Z、V I C、N E D、P E T、S Y B R、P i c o G r e e n、および R i b o G r e e n から選択される蛍光団を含む。

【 0 0 4 8 】

検出可能標識抗体が蛍光標識されている場合、検出することは 1 つの以上の蛍光発光を検出することを含むことがある。蛍光発光（単数または複数）は任意の有用なフォーマットで検出することができる。特定の態様では、検出することは免疫抗体 - A g 複合体（ビーズを含む）をフローサイトメーター内に流すことを含む。

【 0 0 4 9 】

検出することがフローサイトメーター内にレシピエント免疫抗体 - A g 複合体を流すことを含む場合、フローサイトメーターは、複合体を励起光に曝露することおよび 1 つの以上の検出チャンネルで各複合体の蛍光を所望の通り測定することによって複合体を検出し、一意に同定するよう構成される。励起光は、1 つ以上の光源に由来してもよく、かつ狭帯域または広帯域のいずれかであってもよい。励起光源の例はレーザー、発光ダイオード、およびアーク灯を含む。複合体を同定するために用いられる検出チャンネルで発した蛍光は、単一光源で励起した後測定しても、または異なる光源による励起ののち別に測定してもよい。特定の態様では、その中に混合物を流すフローサイトメーターは、蛍光励起および検出能力を含むので、フローサイトメーターにより複合体を照合した時、検出可能標識抗体の蛍光標識と、複合体の他の成分と関連する他の任意の蛍光標識は、それぞれ検出可能かつ識別可能である。

【 0 0 5 0 】

フローサイトメーターは、データ取得、分析、および、各複合体が検知領域を通ると同時に、マルチデータチャンネルが各複合体の発する光散乱および蛍光について、各検出器からのデータを記録するコンピューターなどの記録手段をさらに含む。分析システムの目的は、複合体を分類し、計数することであり、このとき各複合体はそれ自体を一組のデジタル化パラメーター値として示す。フローサイトメーターは、バックグラウンドおよび雑音から目的の複合体を識別するために、選択したパラメーターでトリガーするよう設定することができる。「トリガー」とは、パラメーターの検出のための事前設定閾値を意味する。典型的には、レーザービームを通して複合体の通過を検出する手段として用いられる。選択したパラメーターに対する閾値を越える事象の検出は、複合体についての光散乱および蛍光データの取得をトリガーする。閾値以下の応答を引き起こす分析されている培地

10

20

30

40

50

中の複合体または他の成分については、データを取得しない。トリガーパラメーターは、光ビームを経た複合体の通過によって発生する前方散乱光の検出とすることができる。フローサイトメーターはその後複合体についての光散乱および蛍光データを検出および収集する。

【0051】

複合体のフローサイトメトリー分析は、上述のように、複合体についての定性的および定量的な情報をもたらす。所望場合、前記分析は、混合物中の目的の複合体の計数をもたらす。このように、フローサイトメトリー分析は混合物中の1つ以上の異なる型の複合体の数に関するデータを提供する。

【0052】

混合する、接触させるおよび検出するステップは、任意の都合のよい時間の長さで一括して実施することができる。特定の実施形態に従うと、本開示の方法は、12時間以下、例えば、11時間以下、10時間以下、9時間以下、8時間以下、7時間以下、6時間以下、5時間以下、4時間以下、3時間以下、または2時間以下で実施される。

【0053】

特定の実施形態に従うと、本開示の方法は、ドナー特異的抗体がレシピエントからの生体試料に存在するかを示す報告を作成することを含む。DSAが存在する場合、報告にはレシピエントからの生体試料中のDSAの量に関する情報を含めることができる。報告はコンピューターによって作成することができ、この場合任意ではコンピューターから遠隔の場所の出力装置に報告を表示する。

【0054】

特定の実施形態では、本開示の方法は、ドナー由来の細胞試料中の細胞に存在するドナーHLA抗原（例えば、HLAクラスIおよび/またはHLAクラスII抗原）に結合するDSAを検出するために用いられる。1つの実施形態に従うと、HLA抗原含有ドナー細胞を含む細胞試料とレシピエント由来の血清または血漿を混合することによって混合物を形成することで、ドナーHLAに特異的に結合することができる任意のDSAがドナーHLAに結合することができる。接触させるステップの前に得られたDSA-HLA複合体含有混合物を1回以上（例えば、3回）洗浄することができる。本実施形態に従うと、接触させるステップは、抗HLA抗体被覆マイクロビーズを添加することにより、ビーズに結合した抗-HLA抗体がドナー細胞の表面でドナーHLAクラスIおよび/またはクラスII分子の定常領域に結合することを含む。本方法を進める前にここでドナーHLA抗原に結合した捕捉ビーズを含む得られた複合体を1回以上（例えば、3回）洗浄することができる。本実施形態に従うと、溶解条件下で蛍光標識抗IgG抗体（例えば、PE抗IgG抗体）を添加した結果、抗IgG抗体は複合体のDSAと結合する。ドナー細胞の溶解が混合物に存在する他の物質から複合体の分離を促進する。次に、蛍光標識抗IgG抗体からの蛍光を検出、および任意に定量して、レシピエントの血清または血漿中の、ドナーHLAと結合するDSAの存在または不存在（および任意に量/濃度）を判定することができる。特定の態様では、本方法は、HLAクラスIおよび/またはクラスII、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA、HLA-DQB、HLA-DPA、およびHLA-DPBに結合するDSAの存在または不存在についてレシピエントの血清または血漿を調べるために用いられる。

【0055】

本開示の1つの実施形態に従った方法を図1に模式的に例示する。本実施形態に従って、フローサイトメーターまたはLuminox機器によって免疫抗体-Ag複合体を検出する。反応では、ドナー細胞がレシピエント血清と混合される。ドナー特異的抗体（DSA）は、存在する場合ドナー細胞の抗原（Ag）と特異的に結合し、DSA-Ag複合体を形成する。溶解条件下で、DSA-Ag複合体は、DSA-Ag複合体中と同じAgに対する抗体でコンジュゲート化したビーズによって特異的に捕捉される。フローサイトメーターまたはLuminox機器を通じて蛍光標識二次抗体によって捕捉されたDSA-

10

20

30

40

50

A gを検出する。

【0056】

本開示の第2の実施形態に従った方法を図2に模式的に例示する。本実施形態に従って、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)によって免疫抗体-Ag複合体を検出する。反応では、ドナー細胞がレシピエント血清と混合される。ドナー特異的抗体(DSA)は、存在する場合、ドナー細胞の抗原(Ag)と特異的に結合し、DSA-Ag複合体を形成する。細胞溶解後、DSA-Ag複合体はDSA-Ag複合体中のものと同じAgに対する抗体を介して基質上で特異的に捕捉される。酵素結合二次抗IgG抗体がDSAに結合し、さらにDSAは酵素と基質の反応で検出可能である。本開示によって本方法の変法(例えば、発光分析)も提供される。

10

【0057】

(システム)

本開示の方法を実施するシステムも提供される。本開示のシステムは、プロセッサと、そこにプログラミングを記憶させ、プロセッサと操作可能に接続したコンピューター可読媒体を含む試料液サブシステムを含む。記憶されたプログラミングは、プロセッサによって実行されると、レシピエント免疫抗体が存在する場合、これがドナー細胞表面抗原(Ag)と結合して免疫抗体-Ag複合体を形成するのに十分な条件下で、ドナーからの細胞試料とレシピエントからの生体試料を混合することによって混合物を形成するよう、プロセッサをプログラムする。また記憶されたプログラミングは、プロセッサによって実行されると、その表面で免疫抗体-Ag複合体と特異的に結合する抗体を含むビーズと混合物を接触させ、かつ溶解条件下で特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する検出可能標識抗体を添加するようプロセッサをプログラムする。目的のシステムは、免疫抗体-Ag複合体に結合した検出可能標識抗体の有無について試料を分析し、ドナー特異的抗体の存在または不存在を判定するように構成されたフローサイトメーターも含む。特定の態様では、フローサイトメーターの流路は試料液サブシステムに接続される。

20

【0058】

プロセッサは、記憶されたプログラミングを実行するのに適した任意のプロセッサとすることができる。特定の実施形態に従うと、プロセッサは、サブシステムがその表面で特異的に免疫抗体-Ag複合体を結合する抗体を含むビーズと混合物を接触させる前に、試料液サブシステムが混合物を洗浄するようプログラムされる。その代わりに、または追加的に、プロセッサは、サブシステムが特異的に免疫抗体-Ag複合体を結合する抗体を含むビーズと混合物を接触させた後であるが、フローサイトメーターが複合体に結合した検出可能標識の有無について試料を分析する前に、試料液サブシステムが混合物を洗浄するようプログラムされてもよい。

30

【0059】

コンピューター可読媒体は、コンピューター可読シグナル媒体またはコンピューター可読記憶媒体とすることができる。コンピューター可読記憶媒体は、これらに限定されないが、例えば、電子、磁気、光学、電磁気、赤外線、または半導体システム、器具、またはデバイス、または前記の任意の適切な組み合わせとすることができる。コンピューター可読記憶媒体のより具体的な例(非網羅的リスト)は、以下: 1つ以上の電線を有する電氣的接続、ポータブルコンピューターディスク、ハードディスク、ランダムアクセスメモリ(RAM)、リードオンリーメモリ(ROM)、消去可能プログラマブルリードオンリーメモリ(EPROMまたはフラッシュメモリ)、光ファイバー、ポータブルコンパクトディスクリードオンリーメモリ(CD-ROM)、光学記憶装置、磁気記憶装置、または前記の任意の好適な組み合わせを含むであろう。コンピューター可読記憶媒体は、本開示のシステムの試料液サブシステムによりまたはこれと関連付けて用いるプログラムを収容または記憶することができる任意の有形的媒体とすることができる。

40

【0060】

ドナーからの細胞試料、ドナー細胞表面抗原、レシピエントからの生体試料、レシピエント免疫抗体(例えば抗HLA DSA)、その表面で免疫抗体-Ag複合体と特異的に結

50

合する抗体を含むビーズ、検出可能標識抗体、緩衝液、結合および溶解条件、およびフローサイトメーターは、本開示の方法に関して上に記載したとおりとすることができる。

【0061】

本開示のシステムは、都合の良い時間の長さでDSAの有無を検出するように構成することができる。特定の実施形態に従うと、目的のシステムは、12時間以下、例えば、11時間以下、10時間以下、9時間以下、8時間以下、7時間以下、6時間以下、5時間以下、4時間以下、3時間以下、または2時間以下でレシピエントの生体試料にDSAの有無を検出するように構成される。

【0062】

(キット)

本開示の方法を実施するのに有用な1つ以上の試薬を含むキットも提供される。1つの実施形態に従って、その表面で特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する抗体を含む複数のビーズ、特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する検出可能標識抗体、およびドナーからの細胞試料およびレシピエントからの生体試料を分析し、生体試料中のドナー特異的抗体の存在または不存在を判定するために複数のビーズおよび検出可能標識抗体を用いるための指示書を含むキットが提供される。対象キットは、さらに他の有用な構成要素、例えば、溶解緩衝液、対照血清または血漿、対照細胞試料などを含むことができる。その表面で特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する抗体、および特異的に免疫抗体-Ag複合体と結合する検出可能標識抗体を含むビーズは、本開示の方法に関して上に記載したとおりとすることができる。

10

20

【0063】

対象キットに含まれる試薬を個別のチューブで提供することも、または2つ以上の試薬を単一のチューブで提供することもできる。1つの実施形態では、ビーズおよび検出可能標識抗体は分離チューブで提供される。特定の態様では、検出可能標識抗体は溶解緩衝液に入れて提供される。

【0064】

1つの実施形態では、対象キットに含まれる指示書がコンピューター可読媒体で提供され、プロセッサによって実行される時、ドナーからの細胞試料およびレシピエントからの生体試料を分析して生体試料中のDSAの存在または不存在を判定するようプロセッサをプログラムする。

30

【0065】

(有用性)

対象方法、システムおよびキットは、レシピエントの生体試料中にドナー特異的抗体を検出することが望ましい任意の用途に用いられている。目的のレシピエントは、臓器または組織ドナーからの臓器(例えば腎臓、肝臓、心臓等)または組織移植が必要である、またはこれをすでに受けたヒトレシピエントを含むが、これらに限定されない。目的の用途は、レシピエントの生体試料中のDSAの濃度を検出および/または定量することに基づく移植前リスクアセスメントおよび/または移植後モニタリングを含む。

【0066】

本開示の方法は、ドナー細胞に反応性の抗体とドナー細胞上のHLA分子に反応性の抗体の間の識別を可能にする。過去のフロークロスマッチ技術は、この重要な識別を行うことができず、フロークロスマッチが陽性であるという結果が、HLAとの抗体相互作用と完全に無関係かもしれないという点で不完全であった。

40

【0067】

対象方法は、多くの異なるDSA検査法を開発するために広く用いることができるプラットフォームを提供する。DSAが存在するか存在しないか判定するために、任意の型のレシピエントからの生体試料および任意の目的の標的細胞を用いることができる。既存の方法と比較して、対象方法は、いかなる修飾もなくかつ高検出特異性および高スループットで、レシピエント抗体がその未変性立体配置でドナー抗原に結合することを可能にする。さらに、本方法は既存のDSA検出方法よりも短時間で完了することができ、必要なド

50

ナー細胞が少ない。対象標的抗原と無関係な抗体によって生じたバックグラウンドシグナルは、対象抗原に結合したD S Aを含む複合体の特異的抗体媒介固相捕捉によって除去される。

【実施例】

【0068】

上に提供した開示から理解することができるように、本開示には幅広い用途がある。したがって、以下の実施例は、当業者に本発明の実施方法および使用方法の完全な開示および記述を提供するために記載され、発明者らがその発明と考えるものの範囲を制限することを意図せず、以下の実験が実施された全実験または唯一の実験であることを示すことも意図しない。当業者は、さまざまな重要でないパラメーターを変化させ、または修正しても本質的にはほぼ同じ結果を与えることができると容易に認識するであろう。用いられる数値（例えば量、温度等）に関して正確さを確保するために努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差および逸脱を考慮しなければならない。

10

【0069】

(実施例1)

(D S A - F M 試験手順)

以下の手順を用いてドナー特異的抗体フローサイトメトリークロスマッチ（「D S A - F X M」）と呼ばれる対象方法の1つの実施形態を実施することができる。本実施例の手順は、同時捕捉および標識化を含み、2時間以下で完了することができる。

20

【0070】

第1に、試験するF X M試料を配置するための96ウェルレイアウトフォーマットを準備する。第2に、プレートレイアウトに従って96ウェルプレートの事前に選択した全てのウェルに 0.2×10^6 ($250 \mu\text{L}$ 未満の容量)ドナー細胞を分注する。2、000 $\times g$ で3分間遠心分離する。積み重ねたペーパータワーの上でプレートおよびプロットを2回指ではじいた後プレートを裏返す。穏やかにボルテックスして細胞を再懸濁させる。プレートレイアウトに従って事前に選択したウェルに各血清を $50 \mu\text{L}$ /ウェル添加する。プレートを穏やかにボルテックスし、RTインキュベーター(22)で20分間インキュベートする。インキュベート中に溶解混合物(各ウェルに総体積 $23 \mu\text{L}$ のPE-抗h I g Gおよび溶解緩衝液)を調製する。インキュベート後、各ウェルに3% H B S A 250 μL を添加し、前と同じようにプレートを回転する。積み重ねたペーパータワーの上でプレートおよびプロットを2回指ではじいた後、プレートを裏返す。各洗浄につき3% H B S A 250 μL を添加することによってさらに2回洗浄ステップを繰り返す。

30

【0071】

最後の洗浄の際(3回目の洗浄)、各ウェルに捕捉ビーズ混合物 $5 \mu\text{L}$ を添加し、3% H B S A 250 μL を用いる前までの洗浄手順を再度実施する。各ウェルに $23 \mu\text{L}$ の溶解混合物(細胞溶解緩衝液および蛍光抗体)を添加し、プレートを穏やかにボルテックスする。1枚のホイルでプレートを覆い、穏やかに振り混ぜながら30分間暗所でプレートをインキュベートする。インキュベート中にD S A - F X M洗浄緩衝液を以下の通りに調製する: D S A - F X M洗浄緩衝液を 10 mL 生成するために、 $1 \times \text{T B S}$ 洗浄緩衝液 9.5 mL に界面活性剤 0.5 mL を添加し、試験管を5回倒置させて混合する。

40

【0072】

各ウェルにD S A - F X M洗浄緩衝液を $250 \mu\text{L}$ 添加し、前と同じように洗浄することによって2回洗浄する。D S A - F X M洗浄緩衝液を $250 \mu\text{L}$ 添加し、前と同じように洗浄する。 $200 \mu\text{L}$ のFlow F i x a t i v eで各ウェルのビーズを再懸濁させ、プレートを穏やかにボルテックスする。フローサイトメーターの上にプレートを置き、ビーズを得る。図3、図5~9、図11~14、および図16に実験結果を示す。

【0073】

図3に示した実験では、D S A - F X M(同時捕捉および標識化実施形態)によって4つの試料を試験し、各ビーズ上の蛍光IDによってH L A - クラスIおよびクラスIIビーズを識別した。H L A特異的抗体による増大蛍光(陽性シグナル)をX軸に示す(F L

50

1チャンネル)。図3パネルA：HLA - クラスI (C - I) およびクラスII (C - II) ドナー特異的抗体 (DSA) はともに陰性であった (CI - / CII -) ; 図3パネルB：C - II DSAだけが陽性であった (CI - / CII +) ; 図3パネルC：C - I DSAだけが陽性であった (CI + / CII -) ; および図3パネルD：CIおよびC - IIDSAはともに陽性であった (CI + / CII +) 。

【0074】

図5に示したとおり、FXM、DSA - FXM、およびLMX - IgGによってさまざまな細胞数に対して異なる希釈度のHLA - Ab陽性血清 (PPS) のプールを試験した。結果は、DSA - FXMがDSAを検出する最も感度の高い方法であり、また標準的な方法と比較してきわめて少ない細胞 (例えば、わずか25,000細胞でDSAを検出することができる) を用いることを示す。LMX - IgGは単一抗原ビーズを用いるLuminoxプラットフォーム上でPPS血清に含有されるHLA特異性を定義し、示した数値は平均蛍光強度 (MFI) である。

10

【0075】

図6に示したとおり、盲検化誘発試験と同時に、かつ単一抗原ビーズ (LMX - IgG) 上での通常のフローサイトメトリッククロスマッチ (FXM) および標準的なLuminox抗体スクリーニングと平行して、DSA - FXMによって外部精度管理CAP (米国病理学会) 試料23件を試験した。HLA - クラスI (C - I) および/またはHLA - II (C - II) のドナー特異的抗体 (DSA) を同定し、また大半のDSAはLMX - IgGによって確認した。一部のMCSが低いDSAのみ、特別により感度の高いDSA - FXM方法で検出した。外部精度管理試料は、特異性が既知である血清および細胞である。全参加施設から全ての結果を受け取るまで血清の特異性は参加者に対して盲検化されている。図7に示したデータは、LMX - IgGによって7つのHLA - DQ DSA陽性試料を同定し、DSA - FXMによって確認したことを示す。図8に示したとおり、LMX - IgGによって6つのHLA - DP DSA陽性試料を同定し、DSA - FXMによって確認した。図9に示したとおり、LMX - IgGによって3つのHLA - C DSA陽性試料を同定し、DSA - FXMによって確認した。

20

【0076】

図11に示したとおり、HLA型試薬を含む117件の血清、ネガティブコントロール、および臨床的な試料の集合を試験し、そのDSA特異性はLMX - IgG SAB試験によって判明した。排反する陽性または陰性反応を得た。DSA - FXMの結果をFXMおよびLMX - IgG SAB結果と比較する時、DSA - FXMのクラスI (図12) およびクラスII (図13) の感度は他の試験のいずれかより優れていた。図14のパネルAおよびBは、それぞれ95件のクラスI DSAおよび100件のクラスII DSAとの全体的相関を示す。図14のパネルCは、LMX - IgG SAB分析法と比較したDSA - FXMの感度および特異性を要約する。図14のパネルDに示したとおり、図14のパネルC比較で得た特異性の減少は、LMX - IgG SAB分析法の偽陽性反応によるものであり、DSA - FXM分析法の偽陰性反応によるものではない。

30

【0077】

図15に示したとおり、TおよびB細胞FXM分析法は、自己抗体の存在について非特異的 (すなわちHLAによるものではなく、標的は不明) 陽性結果を示す一方で、DSA - FXMは明白にHLAに対する自己抗体を識別し、かつ自己抗体が抗クラスIに対するものであるかまたはクラスIIに対するものであるか判別する。

40

【0078】

図16に示したとおり、DSA - FXMは、フローサイトメトリーの結果がクラスIおよび/またはクラスII同種抗体によるものか、さらには現在一般的に用いられるFXM法では識別できない自己抗体によるものか識別することができる。DSA - FXMによって試験した場合には、FXMでみられるほぼ同じ結果 (例えば例1および3、または2および4) は説明および解釈が完全に異なる。DSA - FXMは、LMX - IgG SABによって得た特異的クラスIおよび/またはII DSAプロフィールと相関させて移植

50

前または移植後に拒絶反応のリスクについて予後判定することができるが、一方F X M結果ではこれができない。

【0079】

クラスI (パネルA) およびクラスII (パネルB) について図17に示したとおり、D S A - F X Mは、緩衝液処理と比較したI V I G処理によるクラス特異的D S Aの阻害を示すことができる。これは、I V I G点滴前後にインビボでみられるものに対応している。

【0080】

クラスI (パネルA) およびクラスII (パネルB) について図18に示したとおり、D S A 特異的血清はI V I Gによる用量依存的阻害を示し、これによりインビボでの有効性も予測される。

10

【0081】

図1に示したとおり、特定されている候補生体ドナーに対するD S Aを前もって低下/抑制するために、I V I G脱感受性治療を受けている腎臓移植候補者からの連続試料を用いて、F X MおよびD S A - F X Mを実施した。F X Mの結果は、I V I G点滴のアーチファクトによるM C S値の増加(すなわち、より陽性となった)を示す。アーチファクトは、測定法においてシグナルとして用いられる第2ステップの抗体(抗ヒトI g G)によるものである。I V I G生成物はすべて精製I g Gであるため、F X Mの結果は、D S AではなくI V I Gによる偽陽性の増大を示す。B細胞表面上にC D 2 0があるため、R i t u x a n(治療的抗C D 2 0、B細胞マーカー)もB細胞F X MのM C S値を増大させる。これはアーチファクトではないが、F X Mは天然細胞特異的標的ではなく、H L A抗体を検出するように設計されている。D S A - F X M結果は、それに反して、治療的(抗C D 2 0)抗体が存在しても移植について許容できる範囲でI V I GおよびM C S値の阻害(有効性)を示す。

20

【0082】

(結果の計算)

計算を記録および実行するためにD S A - F X M分析ワークシートを用いる。患者の血清およびポジティブコントロールについてのM e d i a n C h a n n e l S h i f t (M C S)を決定する。M C Sの計算： $M C S = \text{患者血清(またはPosコントロール)のM e d i a n C h a n n e l値(M C V)} - \text{NegコントロールのM e d i a n C h a n n e l値(M C V)}$ 。ワークシートおよびコンピューターにM C Sとして結果を記録する。ネガティブまたはポジティブD S A - F X Mを定義するF X Mカットオフに従って報告する。

30

【0083】

(結果および解釈)

異なる5つの標的細胞(新鮮/凍結P B M C、凍結リンパ節、および凍結脾臓細胞)採取源に対して事前に試験したA B男性血清(通常約20)からの結果(M C S)によってF X Mのカットオフを判定した。A B血清M C Vから陰性コントロールM C Vを引くことによって、試験した各A B血清のM C Sを計算し、得られた全M C SからD S A - F X M M C Sの平均値を計算した(N = 138)。以下のとおりD S A - F X Mカットオフの評価基準を設定した。M C S値 < A B n e g M C S + 3 S Dを「陰性」と解釈した。; M C S値 > = A B n e g M C S + 3 S Dを「陽性」と解釈した。H L A - I D S A - F X M陽性：M C S > = 61。H L A - I I D S A - F X M陽性：M C S > = 60。

40

【0084】

(材料および方法)

F X M手順では、96ウェルプレートの各ウェルに 0.1×10^6 個のP B M C細胞を分注し、 $1,300 \times g$ で3分間遠心分離する。上清を除去するためにプレートを指ではじく; $50 \mu L$ の試験血清に細胞を再懸濁させ、R Tインキュベーター(22)で20分間インキュベートする。インキュベート後、3%H B S A $250 \mu L$ ずつ用いて4回細胞を洗浄する。F I T C - 抗ヒトI g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c

50

h Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA) を $0.5 \mu\text{g}$ 、PerCP-CD3 および PE-CD19 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を $0.2 \mu\text{g}$ 含有する検出試薬混合物 $100 \mu\text{L}$ を添加する。さらに 30 分間室温でインキュベートした後、3% HBSA を $250 \mu\text{L}$ ずつ用いて細胞を 2 回洗浄し、さらに 0.2% パラホルムアルデヒド PBS 溶液 $200 \mu\text{L}$ に再懸濁させる。BD FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 上で細胞を取得する。取得したデータは BD FACSDiva (商標) ソフトウェアによって分析する。

【0085】

LMX-IgG 手順では、製造者の指示書 (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) に従って実験を実施した。結果より、さまざまな条件で DSA-FXM によって HLA クラス I および II DSA とともに検出されることが示される (図 5)。

【0086】

(実施例 2)

(DSA-FXM 試験)

代替的に、以下の手順を用いてドナー特異的抗体フローサイトメトリークロスマッチ (「DSA-FXM」) と呼ばれる対象方法の 1 つの実施形態を実施することができる。本実施例の手順は、逐次捕捉および標識化を包含する。

【0087】

第 1 に、FXM 設定を配置するために 96 ウェルレイアウトフォーマットを準備する。第 2 に、プレートレイアウトに従って 96 ウェルプレートの事前に選択した全ウェルにドナー細胞 0.2×10^6 個 (体積 $250 \mu\text{L}$ 未満) を分注する。3 分間 $2,000 \times g$ で遠心分離する。上清を除去するためにプレートを指ではじく。プレートを穏やかにボルテックスし、プレートレイアウトに従って事前に選択したウェルに各血清を $50 \mu\text{L}$ / ウェル添加する。プレートを穏やかにボルテックスし、さらに RT インキュベーター (22) で 20 分間インキュベートする。インキュベート後、各ウェルに 3% HBSA を $250 \mu\text{L}$ 添加し、前と同じようにプレートを回転させる。積み重ねたペーパータワーの上で 2 回プレートおよびプロットを指ではじいた後プレートを裏返す。各洗浄につき 3% HBSA を $250 \mu\text{L}$ 添加してさらに 2 回洗浄ステップを繰り返す。

【0088】

最後の洗浄 (第 3 の洗浄) で各ウェルに $5 \mu\text{L}$ の HLA-クラス I および II 捕捉ビーズを含んだ捕捉ビーズ混合物を添加し、再度 3% HBSA $250 \mu\text{L}$ を用いる前と同じように洗浄する。各ウェルに細胞溶解緩衝液 $23 \mu\text{L}$ を添加し、プレートを穏やかにボルテックスする。1 枚のホイルでプレートを覆い、穏やかに振り混ぜながら 30 分間暗所でプレートをインキュベートする。前と同じように DSA-FXM 洗浄緩衝液を $250 \mu\text{L}$ ずつ用いて 2 回ビーズを洗浄する。蛍光抗 IgG 洗浄緩衝液溶液 $100 \mu\text{L}$ にビーズを再懸濁し、さらに 30 分間室温でプレートをインキュベートする。前と同じように DSA-FXM 洗浄緩衝液を $250 \mu\text{L}$ ずつ用いて 2 回ビーズを洗浄し、各ウェルで Flow-Fixative $200 \mu\text{L}$ にビーズを再懸濁させ、プレートを穏やかにボルテックスする。フローサイトメーターの上にプレートを置き、ビーズを得る。上記の方法で FXM および LMX-IgG 手順を実施した。図 4 に実験結果を示す。図 4 に示したとおり、DSA-FXM (逐次捕捉および標識化) によって、陰性 AB 血清 (試料 A) および 3 つの陽性血清 (試料 B、C および D) を試験した。試料 A: C-I および C-II DSA とともに陰性; 試料 B: C-I および C-II DSA とともに陽性; 試料 C: C-I DSA だけが陽性および C-II DSA は陰性; 試料 D: C-II DSA だけが陽性および C-I DSA は陰性。

【0089】

(実施例 3)

(DSA-FXM 試験)

代替的に、以下の手順を用いてドナー特異的抗体フローサイトメトリークロスマッチ（「D S A - F X M」）と呼ばれる目的の方法の1つの実施形態を実施することができる。本実施例の手順は、逐次捕捉および標識化を包含する。

【0090】

第1に、F X M設定を配置するために96ウェルレイアウトフォーマットを準備する。第2に、プレートレイアウトに従って96ウェルプレートの事前に選択した全ウェルにドナー細胞 0.2×10^6 個（体積250 μ L未満）を分注する。3分間2,000 \times gで遠心分離する。上清を除去するためにプレート指ではじく。プレートを穏やかにボルテックスし、プレートレイアウトに従って事前に選択したウェルに各血清を50 μ L/ウェル添加する。プレートを穏やかにボルテックスし、さらにRTインキュベーター（22 $^{\circ}$ C）で20分間インキュベートする。インキュベート後、各ウェルに3% H B S Aを250 μ L添加し、前と同じようにプレートを回転させる。積み重ねたペーパータワーの上で2回プレートおよびプロット指ではじいた後プレートを裏返す。各洗浄につき3% H B S Aを250 μ L添加してさらに2回洗浄ステップを繰り返す。

10

【0091】

蛍光抗I g Gを100 μ L添加して細胞を再懸濁し、1枚のホイルでプレートを覆い；さらに穏やかに振り混ぜながら30分間暗所でプレートをインキュベートする。前と同じようにD S A - F X M洗浄緩衝液を250 μ Lずつ用いて2回細胞を洗浄する。25 μ Lの溶解緩衝液に細胞を再懸濁させ、さらに各ウェルにH L A - クラスIおよびII捕捉ビーズを含有する捕捉ビーズ混合物5 μ Lを添加する。さらに30分間プレートを室温でインキュベートする。前と同じようにD S A - F X M洗浄緩衝液を250 μ Lずつ用いて2回ビーズを洗浄し、各ウェルでのF l o w - F i x a t i v e 200 μ Lにビーズを再懸濁させ、プレートを穏やかにボルテックスする。フローサイトメーターの上にプレートを置き、ビーズを得る。上記の方法でF X MおよびL M X - I g G手順を実施した。図10および図11に実験結果を示す：図10パネルA：H L A - クラスI（C - I）およびクラスII（C - II）ドナー特異的抗体（D S A）はともに陰性であった（C I - / C I I -）；図10パネルB：C - I D S Aだけが陽性であった（C I + / C I I -）；図10パネルC：C - II D S Aだけが陽性であった（C I - / C I I +）；および図10パネルD：C IおよびC - II D S Aともに陽性であった（C I + / C I I +）。

20

【0092】

30

（実施例4）

（自己 - D S A - F X M試験）

実施例1に記載したD S A - F X M手順と平行して、F X Mによりレシピエント15例由来の自己由来血清をレシピエント自身のP B M C細胞に対して試験した。図15に実験結果を示す：自己クロスマッチ15例中、D S A - F X MとF X Mとともに陰性が3例、またともに陽性が4例であり；F X Mのみ陽性は8例であり、またF X Mによって検出されたD S AはH L A抗原に対するD S Aでないこと立証された。

【0093】

（実施例5）

（静脈内免疫グロブリン（I V I G）脱感受性D S A - F X M試験）

40

実施例1に記載したD S A - F X M試験手順によってH L A - D S Aに対するI V I Gの阻害効果を評価した。図17～19に実験結果を示す。

【0094】

図17に示した実験では、2つのH L A D S A陽性血清にI V I Gを5%加え、D S A - F X Mによってインピトロで試験した。H L AクラスIおよびII D S Aの両者に対するI V I Gの阻害効果を測定することができた。

【0095】

図18に示したとおり、異なる希釈度の陽性D S A血清にI V I Gを5%加え、D S A - F X Mによって試験した。結果より、I V I GはH L AクラスIおよびII D S Aのいずれに対しても用量依存的阻害があったことが示された。

50

【 0 0 9 6 】

D S A - F X M および F X M の両者によって、I V I G 脱感受性治療を受けている腎移植候補者に由来する連続試料を、候補である（しかし不適合である）生体ドナーの細胞に対して試験した。図 1 9 に示したとおり、D S A - F X M によって I V I G の H L A - D S A に対する阻害効果が確認されたが、F X M ではみることができなかった。R i t u x a n（治療的抗 - C D 2 0）は D S A - F X M 試験による試験結果に干渉しなかった。

【 0 0 9 7 】

前記の発明は理解を明確にするために図および実施例によっていくつかの詳細について記載されたが、付属の請求項の趣旨または範囲から逸脱することなく、これに一定の変更および修正を行うことができることが、本発明の教示を踏まえると当業者に容易に明らかになる。本発明の範囲は添付した請求項だけによって限定されるため、本明細書に用いる専門用語は、特定の実施形態だけを記載する目的のためにあり、限定することを意図しないものとする。

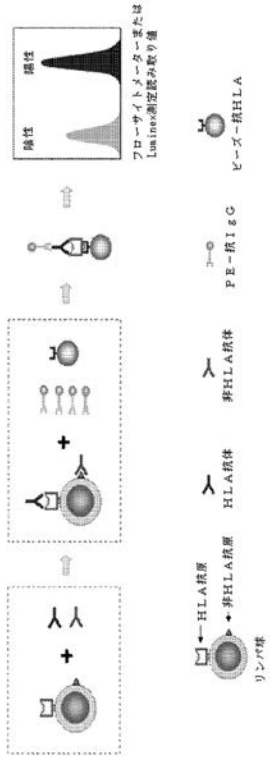
10

【 0 0 9 8 】

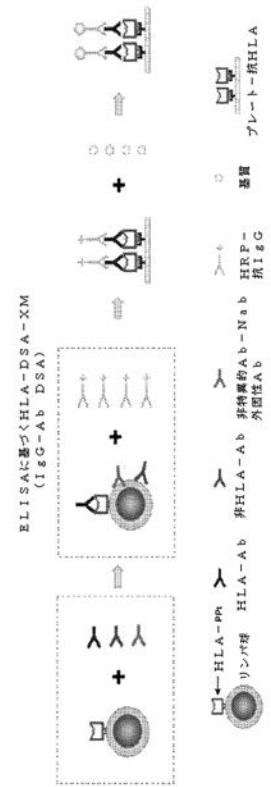
したがって、前記は単に本発明の原理を例示する。本明細書に明確に記載または示されなくとも、当業者は、本発明の原理を具体化するとともにその趣旨および範囲内に含まれるさまざまな仕組みを考案することができることと認識されるであろう。さらに、本明細書に列挙した全実施例および条件付き文言は、読者が本発明の原理および当技術分野を促進するために発明者によって与えられた概念を理解するのを助けること、およびこのような具体的に列挙した実施例および条件を制限することはないと解釈すべきであることを主に意図している。さらに、本発明の原理、態様、および実施形態ならびにその具体的実施例を列挙する本明細書のすべての記載は、その構造的および機能的等価物を包含することを意図している。さらに、このような等価物が現在既知である等価物および将来開発される等価物の両者、すなわち、構造と無関係に同一の機能を実施する任意の開発された要素を含むことを意図している。したがって、本発明の範囲は、本明細書に示しかつ記載する例示的な実施形態を制限されることを意図していない。むしろ本発明の範囲および趣旨は添付の請求項によって具体化される。

20

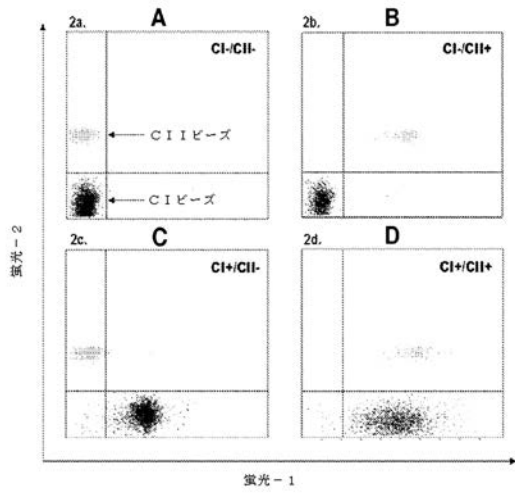
【 図 1 】



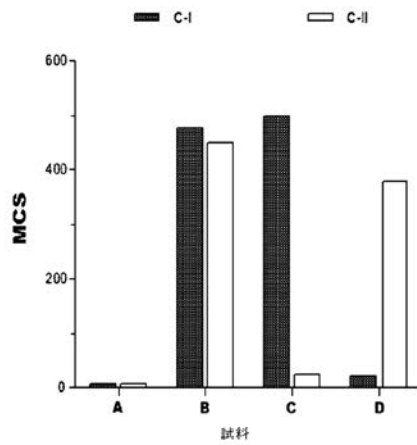
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



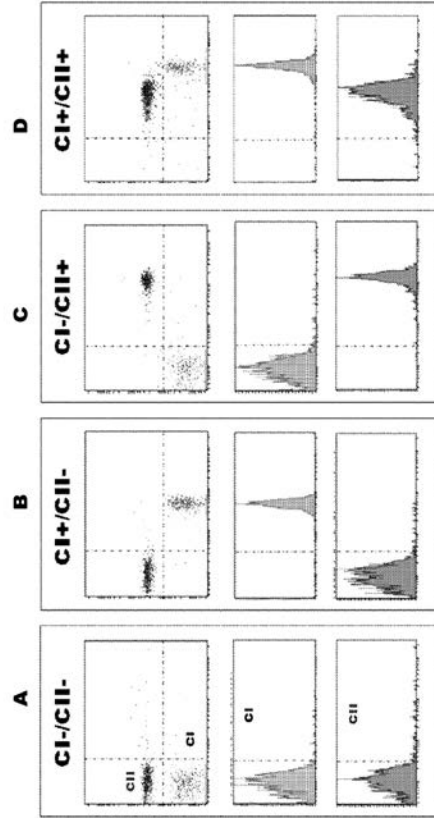
【 図 9 】

DSA-FXMの結果 (DSA: HLA-Cw)

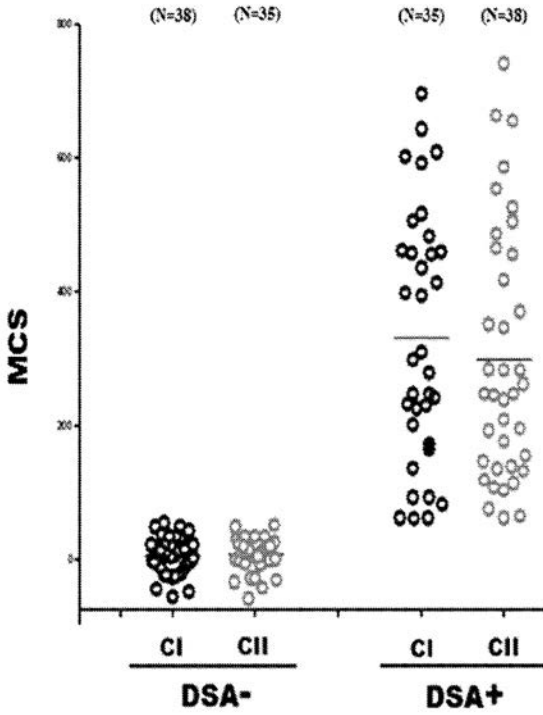
NO	LMX-IgG DSA (MFI)	血液	移植HLA型	DSA-FXM (MCS)		
				HLA-CI	HLA-CII	
1	Cw*01:245, DRB1*04:01, DRB1*07:01, DRB1*07:02, DRB1*07:03, DRB1*07:04, DRB1*07:05, DRB1*07:06, DRB1*07:07, DRB1*07:08, DRB1*07:09, DRB1*07:10, DRB1*07:11, DRB1*07:12	PG	A*02:01, B*07:02, C*01:02, C*01:03, C*01:04, C*01:05, C*01:06, C*01:07, C*01:08, C*01:09, C*01:10, C*01:11, C*01:12, C*01:13, C*01:14, C*01:15, C*01:16, C*01:17, C*01:18, C*01:19, C*01:20, C*01:21, C*01:22, C*01:23, C*01:24, C*01:25, C*01:26, C*01:27, C*01:28, C*01:29, C*01:30, C*01:31, C*01:32, C*01:33, C*01:34, C*01:35, C*01:36, C*01:37, C*01:38, C*01:39, C*01:40, C*01:41, C*01:42, C*01:43, C*01:44, C*01:45, C*01:46, C*01:47, C*01:48, C*01:49, C*01:50, C*01:51, C*01:52, C*01:53, C*01:54, C*01:55, C*01:56, C*01:57, C*01:58, C*01:59, C*01:60, C*01:61, C*01:62, C*01:63, C*01:64, C*01:65, C*01:66, C*01:67, C*01:68, C*01:69, C*01:70, C*01:71, C*01:72, C*01:73, C*01:74, C*01:75, C*01:76, C*01:77, C*01:78, C*01:79, C*01:80, C*01:81, C*01:82, C*01:83, C*01:84, C*01:85, C*01:86, C*01:87, C*01:88, C*01:89, C*01:90, C*01:91, C*01:92, C*01:93, C*01:94, C*01:95, C*01:96, C*01:97, C*01:98, C*01:99, C*01:100	VV	249	346
2	Cw*01:279, DRB1*01:01, DRB1*01:02, DRB1*01:03, DRB1*01:04, DRB1*01:05, DRB1*01:06, DRB1*01:07, DRB1*01:08, DRB1*01:09, DRB1*01:10, DRB1*01:11, DRB1*01:12, DRB1*01:13, DRB1*01:14, DRB1*01:15, DRB1*01:16, DRB1*01:17, DRB1*01:18, DRB1*01:19, DRB1*01:20, DRB1*01:21, DRB1*01:22, DRB1*01:23, DRB1*01:24, DRB1*01:25, DRB1*01:26, DRB1*01:27, DRB1*01:28, DRB1*01:29, DRB1*01:30, DRB1*01:31, DRB1*01:32, DRB1*01:33, DRB1*01:34, DRB1*01:35, DRB1*01:36, DRB1*01:37, DRB1*01:38, DRB1*01:39, DRB1*01:40, DRB1*01:41, DRB1*01:42, DRB1*01:43, DRB1*01:44, DRB1*01:45, DRB1*01:46, DRB1*01:47, DRB1*01:48, DRB1*01:49, DRB1*01:50, DRB1*01:51, DRB1*01:52, DRB1*01:53, DRB1*01:54, DRB1*01:55, DRB1*01:56, DRB1*01:57, DRB1*01:58, DRB1*01:59, DRB1*01:60, DRB1*01:61, DRB1*01:62, DRB1*01:63, DRB1*01:64, DRB1*01:65, DRB1*01:66, DRB1*01:67, DRB1*01:68, DRB1*01:69, DRB1*01:70, DRB1*01:71, DRB1*01:72, DRB1*01:73, DRB1*01:74, DRB1*01:75, DRB1*01:76, DRB1*01:77, DRB1*01:78, DRB1*01:79, DRB1*01:80, DRB1*01:81, DRB1*01:82, DRB1*01:83, DRB1*01:84, DRB1*01:85, DRB1*01:86, DRB1*01:87, DRB1*01:88, DRB1*01:89, DRB1*01:90, DRB1*01:91, DRB1*01:92, DRB1*01:93, DRB1*01:94, DRB1*01:95, DRB1*01:96, DRB1*01:97, DRB1*01:98, DRB1*01:99, DRB1*01:100	HT	292	149		
3	Cw*01:02, 01:03, 01:04, 01:05, 01:06, 01:07, 01:08, 01:09, 01:10, 01:11, 01:12, 01:13, 01:14, 01:15, 01:16, 01:17, 01:18, 01:19, 01:20, 01:21, 01:22, 01:23, 01:24, 01:25, 01:26, 01:27, 01:28, 01:29, 01:30, 01:31, 01:32, 01:33, 01:34, 01:35, 01:36, 01:37, 01:38, 01:39, 01:40, 01:41, 01:42, 01:43, 01:44, 01:45, 01:46, 01:47, 01:48, 01:49, 01:50, 01:51, 01:52, 01:53, 01:54, 01:55, 01:56, 01:57, 01:58, 01:59, 01:60, 01:61, 01:62, 01:63, 01:64, 01:65, 01:66, 01:67, 01:68, 01:69, 01:70, 01:71, 01:72, 01:73, 01:74, 01:75, 01:76, 01:77, 01:78, 01:79, 01:80, 01:81, 01:82, 01:83, 01:84, 01:85, 01:86, 01:87, 01:88, 01:89, 01:90, 01:91, 01:92, 01:93, 01:94, 01:95, 01:96, 01:97, 01:98, 01:99, 01:100	IK	249	36		

カプトオプ: LMX-IgG (MFI): HLA-CI-CII: 1000
 DSA-FXM (MCS): HLA-CI: 50; HLA-CII: 60

【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】

血液検査	FXM (MCS)		DSA-FXM (MCS)		LMX-DSA (MFI) (HLA-B7)
	Tc	Hc	CI	CII	
Neat	*404	*423	*081	17	**10455
1:10	*104	*229	*397	33	*3288
1:25	*112	*128	*288	9	*1338
1:50	64	55	*214	15	**888
1:100	33	9	*162	-10	359
1:500	0	-1	37	-6	82
1:1000	-3	1	12	5	23

血液: A1,24; B7,X; Bw6; DR8, 15; DR51; DQA, 6; DPB1, 6
 * 顕性, ** 顕性の可能性あり

【 図 1 3 】

血清希釈率	FXM (MCS)		DSA-FXM (MCS)		LMX-DSA (MFI) (HLA-DR4)	
	Tc	Bc	CI	CII		
NEAT	9	*346	*166	*741	*1,3369, *12473, *12188, *9559, *8646	
1:100	6	*199	-10	*356	*1,447, *1480, *1413, *1,040, *847	
1:500	4	42	-44	*158	253, 232, 227, 186, 114	
1:1000	3	-3	-43	*94	15, 12, 12, 11, 10	

細胞 : A1, X: B36.51; Bw4, Bw6; Cw*06, *16; DR*04BXR.C, DR*1114, DR*3107Y; DR*01DWH; DO *0302, DO *03.
 DRB1*04:01, *04:02, *04:03, *04:04, *04:05
 * 陽性, ** 陽性の可能性あり

【 図 1 4 A 】

DSA-FXM	CI DSA	LMX-IgG DSA	
		+	-
+		52	5
-		3	35

DSA-FXM	CII DSA	LMX-IgG DSA	
		+	-
+		49	7
-		2	42

一致率 : 92%
P<0.0001
N=95

一致率 : 91%
P<0.0001
N=100

C

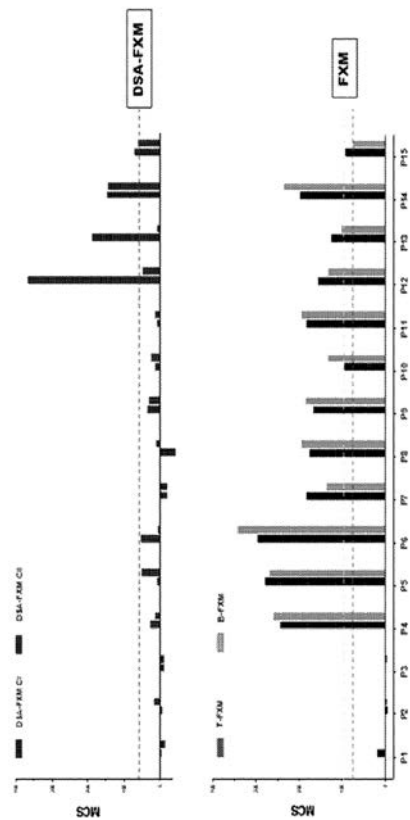
DSA-FXM vs. LMX-IgG DSA

DSA	CI	CII
感度	95%	96%
特異性	88%	86%

【 図 1 4 B 】

NO	LMX-IgG DSA (MFI)	LMX-C14 DSA (MFI)	細胞HLA型	FXM (CS)		DSA-FXM (CS)	
				Tc	Bc	I	II
1	47001, 1992	陰性	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	40	1	20	14
2	87091, 1426	陰性	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	19	35	3	0
3		陰性	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	10	4	23	24
4	427011, 1991	A*23:01, 2009	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	17	-3	23	-7
5	Cw*05:01, 9050	Cw*05:01, 1730	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	-1	4	14	16
6	DRB1*03:01, 8468	陰性	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	61	-7	44	20
7	DRB1*03:01, 8468	陰性	A*02:01, B*07:02, C*01:01, DR*01:01, DR*03:01, DR*04:01, DR*07:01, DR*08:01, DR*09:01, DR*10:01, DR*11:01, DR*12:01, DR*13:01, DR*14:01, DR*15:01, DR*16:01, DR*17:01, DR*18:01, DR*19:01, DR*20:01, DR*21:01, DR*22:01, DR*23:01, DR*24:01, DR*25:01, DR*26:01, DR*27:01, DR*28:01, DR*29:01, DR*30:01, DR*31:01, DR*32:01, DR*33:01, DR*34:01, DR*35:01, DR*36:01, DR*37:01, DR*38:01, DR*39:01, DR*40:01, DR*41:01, DR*42:01, DR*43:01, DR*44:01, DR*45:01, DR*46:01, DR*47:01, DR*48:01, DR*49:01, DR*50:01, DR*51:01, DR*52:01, DR*53:01, DR*54:01, DR*55:01, DR*56:01, DR*57:01, DR*58:01, DR*59:01, DR*60:01, DR*61:01, DR*62:01, DR*63:01, DR*64:01, DR*65:01, DR*66:01, DR*67:01, DR*68:01, DR*69:01, DR*70:01, DR*71:01, DR*72:01, DR*73:01, DR*74:01, DR*75:01, DR*76:01, DR*77:01, DR*78:01, DR*79:01, DR*80:01, DR*81:01, DR*82:01, DR*83:01, DR*84:01, DR*85:01, DR*86:01, DR*87:01, DR*88:01, DR*89:01, DR*90:01, DR*91:01, DR*92:01, DR*93:01, DR*94:01, DR*95:01, DR*96:01, DR*97:01, DR*98:01, DR*99:01, DR*100:01	48	7	34	16

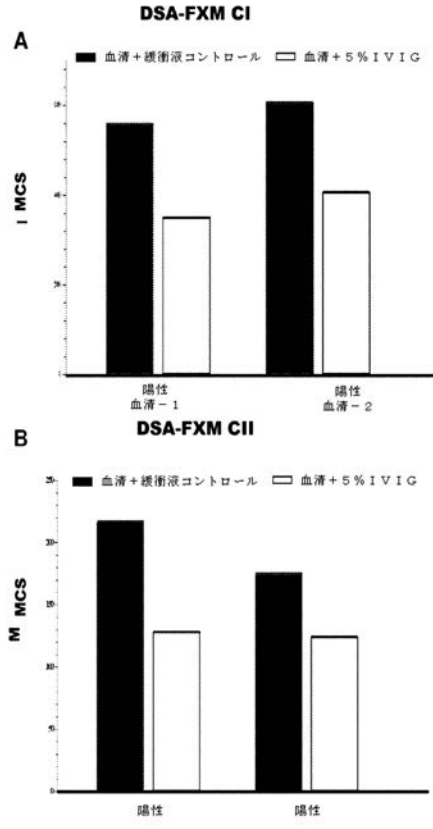
【 図 1 5 】



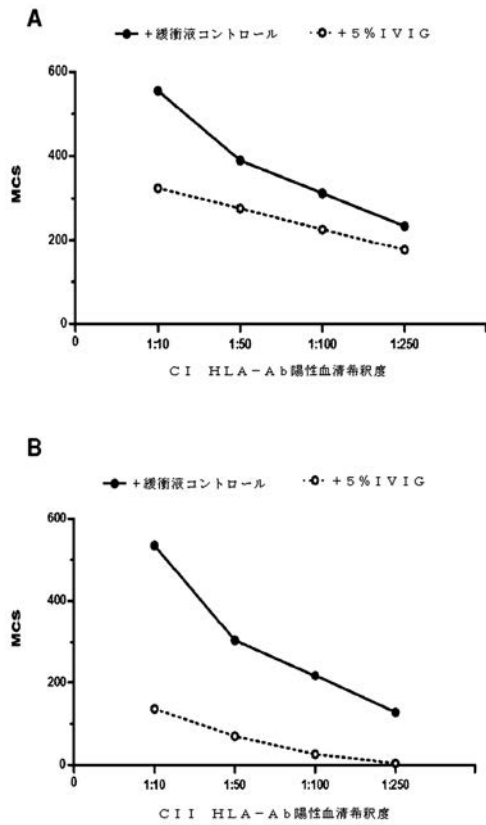
【 図 1 6 】

ケース	LMX-IgG DSA (MFI)	細胞	血清の日付	90-FXM (MCS)		DSA-FXM (MCS)	
				IXM	BXM	CI	CIa/CIb
1	A2-680-789-B27-1129-1210; DR1-959-1153	91708 91708	89595 6-23-12 89595 1-29-13	65	162	190	NA
				66	122	185	NA
2	無効なLMX-I & Gの結果	自己	92081 10-11-12 92081 11-19-12 92081 10-11-12 92081 11-19-12	355	421	278	179
				355	418	267	181
				337	377	297	151
				328	378	297	143
3	CW*07:02-887;DRB1*04:03-940 CW*07:02-428;DRB1*04:03-898	95532	94237 3-26-13 94237 6-18-13	NA	NA	-36	3
				-8	140	6/26/2013	-41
4	Cw8-3403	自己 97958	97819 12-03-13 97819 12-03-13	228	239		
				224	228	20/12/2013	218

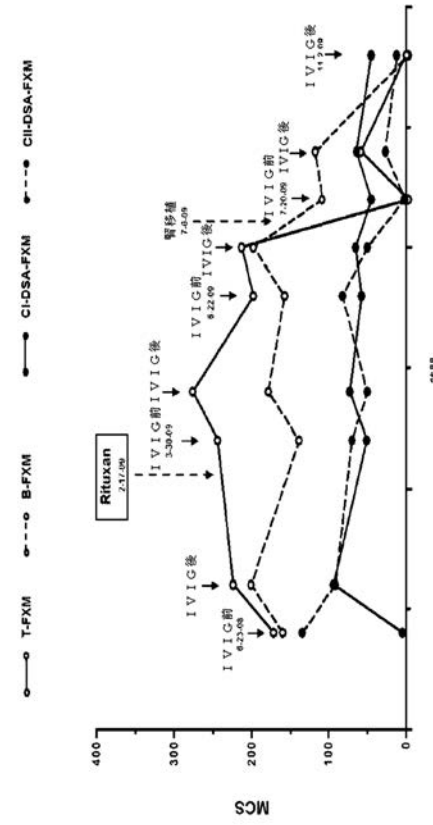
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/026406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53 (2014.01) USPC - 435/971 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12M 1/34; C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/68, 33/543, 33/564, 33/567, 33/569 (2014.01) USPC - 435/4, 7.1, 7.2, 7.23, 7.24, 7.92, 7.94, 173.4, 287.2, 288.3, 372.2, 372.3, 971; 436/44, 436/503, 438/507, 436/518, 436/523, 436/524, 436/528, 436/548 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - G01N 33/564, 33/5432, 33/6854, 33/56972; Y10S 435/971 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2005/0059095 A1 (YANG et al) 17 March 2005 (17.03.2005) entire document	1-4 37, 38
X — Y	WO 2010/138456 A2 (SEYFERT et al) 02 December 2010 (02.12.2010) entire document	36 37-39
X — Y	US 2012/0070834 A1 (GREINACHER et al) 22 March 2012 (22.03.2012) entire document	51-53
Y	US 2011/0261757 A1 (TYAN et al) 17 November 2011 (17.11.2011) entire document	39
A	WO 2013/029181 A1 (LOWARY et al) 07 March 2013 (07.03.2013) entire document	1-4, 36-39, 51-53
P, X	CHEN et al. "C1q Assay for the Detection of Complement Fixing Antibody to HLA Antigens," Transplantation Immunology: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, 01 July 2013 (01.07.2013), Vol. 1034, Pgs. 305-311. entire document	1-4, 51-53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2014		Date of mailing of the international search report 27 JUN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 671-272-4300 PCT QSP: 671-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

147020700.27.00.2014
International application No.

PCT/US2014/026406

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 5-35, 40-50, 54-59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 タイアン, ドリー, ピー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 6 2, パロマー パーク, ハーモース ロード 1 5

(72) 発明者 チェン, ガー
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 3 4, ロサンゼルス, キャタローガス アベニュー
9 4 0 8

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QR90 QS33 QS35 QX02
4B065 AA90X AC20 BA30 CA44

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016515215A5	公开(公告)日	2017-04-13
申请号	JP2016502124	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)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	タイアンドリービー チェンガー		
发明人	タイアン, ドリー, ビー チェン, ガー		
IPC分类号	G01N33/564 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543 C12N5/071		
CPC分类号	G01N33/686 G01N33/5091 G01N33/5094 G01N33/54313 G01N33/54333 G01N33/56977 G01N33/582 G01N33/6854 G01N2333/4716		
FI分类号	G01N33/564.Z C12Q1/02 G01N33/53.N G01N33/543.575 G01N33/543.501.A C12N5/071		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QR90 4B063/QS33 4B063/QS35 4B063/QX02 4B065 /AA90X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/CA44		
代理人(译)	内田直人		
优先权	61/782003 2013-03-14 US		
其他公开文献	JP6548631B2 JP2016515215A		

摘要(译)

提供了一种用于确定生物样品中供体特异性抗体的存在或不存在的方
法。该方法包括在足以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, 使来自供体的细胞样品与受体免疫的抗体接触, ,
将混合物与免疫抗体-Ag复合物混合 (例如, Ag与表面其它接触珠包含特
异性结合的免疫抗体的抗体) 加入可检测的标记的抗体将特异性结合在
裂解条件下结合至珠的免疫抗体-Ag复杂它, 可检测的标记的抗体结合于
免疫抗体-Ag复合物的存在或不存在检测和确定来自受体的生物样品中供
体特异性抗体的存在或不存在。还提供了用于执行感兴趣的方法的系统
和试剂盒。