



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103460043 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 18

(21) 申请号 201280005699. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 01. 04

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/429, 892 2011. 01. 05 US

61/524, 630 2011. 08. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 07. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2012/020234 2012. 01. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02012/094427 EN 2012. 07. 12

(71) 申请人 宙斯科技公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 马克·科普尼斯基

(74) 专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有限公司 44223

代理人 江耀纯

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

诊断方法

(57) 摘要

本发明提供了一种新颖的方法,所述方法将很大程度上是传统的 FANA 玻片检测的相关特征与很大程度上是传统的多重阵列分析的特征结合到实质上同时进行的单个分析中,其中对每个分析的修改都是最小的,以向医生以及所述方法的其他用户提供先前未知的优势,例如,容易使用以及分析速度提高,所述优势对例如自身免疫疾病的诊断和评估是有用的。

1. 一种对生物样品进行诊断分析的方法,所述方法包括将 FANA 玻片检测分析与多重阵列分析结合起来以形成单个分析系统。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析包括自身抗体免疫分析。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析包括靠近固定到载玻片或者其他固体相上的细胞的抗原斑点的阵列。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗原斑点是通过印刷涂覆的。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析实质上是同时进行的。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析系统包括用于形成加样孔的玻片以及柔性载网。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述加样孔各含有两个区域,一个具有细胞,而另一个具有经界定的抗原阵列。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在所述分析系统中使用了至少 10 个高度纯化的自身抗原。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析系统可用于对选自以下项所组成的组中的病征进行诊断和评估:自身免疫疾病、传染病或癌症诊断,或者可用于细胞学研究。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品选自以下项所组成的组中:血清、血液、尿液、脑脊液或者血浆,以及其他生物流体。

诊断方法

[0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案为非临时申请案,其以引用的方式将第 61/429,892 号美国临时申请案以及第 61/524,630 号美国临时申请案并入本文中,并且要求它们的优先权。

技术领域

[0003] 大体上,本发明涉及诊断分析系统的领域,具体而言可用于自身免疫疾病的诊断和评估,确切地说,本发明涉及用于进行自身抗体诊断分析的新颖方法。

背景技术

[0004] 抗体是身体响应于入侵或者感染性物质而生成的蛋白质。它们是身体保护其自身免于生病的多种方法中的一种。在正常的情况下,身体可以区分出“外来物”与“自身”组织,因此只针对是身体的“外来物”的那些物质生成抗体。

[0005] 当身体开始为其自身的组织生成抗体时就形成了自身免疫性。存在多种类型的自身免疫疾病;一些是系统性的,而其他的是器官特异性的。引起这些疾病的确切的机制还没有被完全地理解。一些疾病可容易治好并且仅带给病人最小的影响,而其他的疾病可能相当严重并且甚至是致命的。

[0006] 与自身免疫疾病的发作相关联的症状可以是多种多样的。并且,任何早期的症状都可能会伪装成许多其他疾病的症状。通常,如果病人因为自身免疫疾病的疑似症状而去看医生的话,那么医生通常会建议进行抗核抗体(ANA)检测。ANA 检测是良好的“第一轮”筛选检测,以观察某人是否具有自身组织的抗体。ANA 筛选检测存在许多种不同的版本。方法学可以包括从蛋白质印迹到复杂的微颗粒阵列;然而,最受欢迎的方法大概是荧光抗核抗体分析(FANA)。

[0007] 目前,市场上最受欢迎的 FANA 检测是所谓的 HEp-2 FANA 的检测。HEp-2 是一种连续的人类上皮细胞系,该细胞系可以快速地生长并且容易附接到固体表面,例如,组织培养瓶以及载玻片。HEp-2 细胞还具有较大的轮廓明显的细胞核。HEp-2 FANA 检测是通过在载玻片上培养 HEp-2 细胞并且将所述细胞永久地固定在所述载玻片的表面上来进行。分析则通过使病人的血清样品与所述细胞反应来进行。如果存在抗核抗体的话,那么它们将结合到所述细胞上。对载玻片进行冲洗并且用标记有荧光标记的抗人免疫球蛋白(Ig)来标记抗体。在使用适当配备的显微镜来观察时,可以观察到与特定的自身免疫疾病相关联的特定的反应图案。这些图案的实例示于附图的图 1 中。

[0008] 在 ANA 检测中使用的自身抗原代表了大多数,但并非全部的在 HEp-2 细胞上表达的已知的自身抗原。在 HEp-2 细胞上发现的一些自身抗原并没有出现在多重的悬浊液中。因此,多重微珠方法(multiplex bead method),例如, AtheNA Multi-Lyte ANA 检测系统(可从美国新泽西州布里奇沃特的宙斯科学公司(Zeus Scientific, Inc.)购得),含有建立在 Luminex xMAP®平台(可从美国德克萨斯州奥斯汀的卢米奈科斯公司(Luminex Corporation)购得)上的微珠混合物,方法是仅使用结合到单独的微球上的高度纯化的自

身抗原混合物并且进行多重分析。该系统具有大多数但并非全部的在 HEp-2 细胞上发现的自身抗原。因此,所期望的是包括实际上的 HEp-2 细胞以及多重微珠混合物,以确保可以基本上同时地针对所有潜在的自身抗原(所有已知的以及还未知的自身抗原)对病人的样品进行检测。然而,虽然这些类型的复杂 ANA 检测与使用 HEp-2 细胞的传统 FANA 相比通常更加具有针对性,但是它们可能被认为是不够敏感的,这是因为它们并入了受到限制的且数目有限的抗原。总之,这些自身抗原代表了在 HEp-2 细胞中表达的绝大多数已知的自身抗原,然而,理论上,天然的 HEp-2 细胞供应的是可能存在于体内的任何以及所有的自身抗原。

[0009] 虽然 HEp-2 FANA 方法是参考方法,但是上述 AtheNA Multi-Lyte ANA 检测系统提供了基本上等效的结果,并且一些观点认为在 ANA 的筛选中 ANA 多重阵列是足够的,并且还有一些观点认为只有 HEp2 细胞才是足够的。然而,通常认可的是,按照可以接受的筛选方法,从多重阵列中提供特定的数据会是非常有价值的。

发明内容

[0010] 不同于先前已知的传统方法,本发明的目标在于提供一种新颖的方法,所述方法将很大程度上是传统的 FANA 玻片检测的相关特征与很大程度上是传统的多重阵列分析的特征结合到实质上同时进行的单个分析中,其中对每个分析的修改都是最小的,以向医生以及所述方法的其他用户提供先前未知的优势,例如,容易使用以及分析速度提高,所述优势对例如针对自身免疫疾病的诊断和评估是有用的。此外本发明还提供了优于在已公开的第 PCT/US2009/056307 号国际申请案中描述且要求的方法的新颖的且出乎意料的优势,该申请案与本文是共同转让的并且该申请案的揭示内容以引用方式全文并入本文中。不同于在上文所参考的国际申请案中揭示的且要求的发明,已发现本发明能够实现基本上类似的目标和结果而无需使用参考文献中描述的多重微珠或仪器,方法是采用,例如,通过印刷,靠近固定在载玻片或者其他固体相上的细胞的抗原斑点的阵列,因此本发明的出乎意料的优势在于它不需要涉及多重微珠阵列或仪器,例如,在所述申请案中提及的 Luninex 仪器。

[0011] 因此,本发明的一个目标在于改进在上文所参考的领域中揭示的技术以及在上文所参考的 PCT 申请案中揭示的发明,方法是以新颖的方式将前述的传统 FANA 玻片检测与多重阵列结合到单个分析中,其中对每个分析的修改都是最小的。目前已知的是,还未曾试图将这两种非常不同的免疫分析结合到单个免疫分析中。

[0012] 根据本发明,这些优势是从基本上同时进行的这两种类型的免疫分析的组合中出乎意料地获得的。

附图说明

[0013] 图 1 示出了阳性 ANA 反应的实例,使用 HEp-2 FANA 示出了特定的反应图案(使用传统的玻片方法来执行)。

[0014] 图 2 示出了利用本发明的方法的细胞的双点染玻片阵列。

[0015] 图 3 示出了为了执行本发明的方法的用于形成加样孔的玻片以及柔性载网。

[0016] 图 4 示出了可用于执行本发明的方法的在玻片上的加样孔的排布,使得每个加样孔包含两个区域,一个区域具有细胞,而另一区域具有经界定的抗原阵列。

具体实施方式

[0017] 如上文所述,与自身免疫疾病的发作相关联的症状可以是多种多样的。并且,任何早期的症状都可能会伪装成许多其他疾病的症状。ANA 筛选检测被公认为是良好的“第一轮”筛选检测,以观察病人是否具有自身组织的抗体,目前最受欢迎的是荧光抗核抗体分析(FANA),而目前最受欢迎的FANA检测是HEp-2 FANA。该分析是通过使病人的血清与细胞进行反应来进行。如果存在抗核抗体的话,那么它们将结合到所述细胞上。随后用标记有荧光部分的抗人Ig来标记病人的抗体。在使用适当配备的显微镜来观察时,可以观察到特定的反应图案(如果存在的话),并且一些反应图案与特定的自身免疫疾病高度关联。一些阳性反应的实例示于附图的图1中。

[0018] 相应地,在本发明的优选实施例中,提供了新颖的方法,用于在某个对象的单个样品中进行自身抗原的基本上同时的分析,方法是将已知的FANA玻片检测与多重阵列结合到单个分析中,其中对每个分析的修改都是最小的。HEp-2 FANA检测包括使用HEp-2细胞的玻片检测,所述细胞已被允许在载玻片表面的TC培养基上生长。随后对玻片进行润洗,并且用传统的有机溶剂固定所述细胞,从而对细胞膜进行渗透并且使细胞附着在载玻片上。这种分析,例如,可以在显微镜玻片的小的加样孔中执行。

[0019] 定义

[0020] 1. 多重阵列平台:如本文中所示,多重阵列平台是可以同时对多个分析物进行检测的任何平台。常见的阵列系统涉及在玻璃或塑料等固体支撑物上的精确的位置中点染(spot)目标分子。广泛使用的多重阵列平台的一个受欢迎的实例是基于Luminex® xMAP®技术(美国德克萨斯州奥斯汀的卢米奈科斯公司)开发和销售的系统。已知其他的阵列也可以由位点、加样孔、柱、微珠、悬臂、金属线、电极或者光纤来制造(参见临床化学(Clinical Chemistry):56:12(2010))。

[0021] 2. 报告分子:如本文中所示意味着报告分子是在分析中被结合到检测分子上的荧光的、可见光的或者化学发光的标记。在设计用于测量人类抗体的免疫分析的情况下,检测分子可以是标记有藻红蛋白(例如)的羊抗人IgG(例如)。

[0022] 3. 细胞基质:如本文中所示意味着基本上附着在固体支撑物(玻璃或者塑料的显微镜玻片)上的任何细胞材料或者组织基质,并且该细胞材料或者组织基质随后被用作生化分析的一部分,以对抗体或抗原等生物分子进行分析。

[0023] 因此,本发明所提供的组合分析可无需使用某些仪器来执行,例如,无需使用传统的Luminex xMAP仪器,所述仪器本质上是流式细胞分析仪,所述流式细胞分析仪已经过改良用于多重微珠分析中的Luminex聚苯乙烯微球。因此,本发明与所属领域中用于执行类似分析的已知的方法相比,在简便性以及无需使用昂贵的仪器方面具有较大的优势,这些优势与其他优势一起都是所属领域的技术人员所显而易见的。

[0024] 在一项优选实施例中,本发明的分析包括一系列纯化的抗原,所述抗原已被点染到靠近细胞基质的载玻片上,所述细胞基质含有将要进行分析的细胞。根据将要进行的分析的性质,所述分析可以按照需要为简单的或者复杂的。对于ANA实例,目前优选的是使用最少为10个的高度纯化的自身抗原,以及优选地最多为20至25个的高度纯化的自身抗原。

[0025] 例如,本发明的方法的实践通常开始于载玻片。优选地,使用的是每个“加样孔”有两个“区域”的载玻片(参见附图中的图2)。涂覆所感兴趣的细胞,从而形成细胞基质并且将其固定到图2中所示的图像中的圆形的加样孔中。随后,将纯化的抗原点染到靠近基质处,所述抗原形成了图2中所示的正方形加样孔中的阵列。其后,将该玻片封装并且提供给分析系统的用户,以根据用户的需要对病人的标本进行进一步的分析。为了进行分析,可以按照用户的需要对玻片进行修饰,从而针对每个病人标本形成加样孔。所述加样孔可以经配置,例如,使得每个加样孔都含有一个圆形(HEp2细胞)和一个正方形(纯化的抗原阵列)。附图中的图3和图4描绘了这些加样孔的排布。该玻片随后可以用于针对细胞和抗原阵列的组反应性的来评估病人标本(例如,血清、尿液、血浆等),所述评估基本上都是同时进行的,使用的是所属领域的技术人员所熟知的适当的报告分子,从而提供了一种新颖的方法,用于收集在固定的细胞或组织内的天然形成的生物分子以及高度专一的、高度纯化的生物分子的阵列的反应性的组合。

[0026] 在本发明的一项优选实施例中,HEp-2 FANA 检测包括使用 HEp-2 细胞的玻片检测,所述细胞已被允许在载玻片表面的 TC 培养基上生长。随后润洗玻片并且用一些有机溶剂来固定,所述溶剂对细胞膜进行渗透并且使它们附着在载玻片上。这种分析传统上是在显微镜玻片的微小的加样孔中进行的。然而,所述阵列(在根据本发明的情况中)是一系列已经被点染于载玻片上的纯化抗原,以用于基本上同时进行的细胞与抗原阵列的组反应性。

[0027] 此外应理解,虽然上述实例关注的是可能患有自身免疫疾病的病人的自身抗体的测量,但是本发明也可以应用到大量的其他实例中,包括自身免疫、传染病、癌症诊断、细胞学研究,仅举几例。其他实例对于所属领域的技术人员而言是显而易见的。

[0028] 还应了解,除了上文所述的血清样品的分析之外,本发明的方法和教导也可以应用到可以从某个对象获得的任何生物流体的分析中,例如,血液、尿液、脑脊液和血浆,以及所属领域的技术人员所熟知的其他生物流体,所述方法和教导均可以适用于获得样品,在所述样品上可以执行根据本发明的分析方法。

[0029] 此外,应理解,通过阅读本文所揭示的内容,许多额外的修改以及变体对于所属领域的技术人员而言是显而易见的并且是可以理解的,所述改变和变体是可以如本文所述根据本发明的具体实施例而作出的,并且所有的此类修改都完全在本发明的范围之内,所述修改仅受所附的权利要求书的限制。

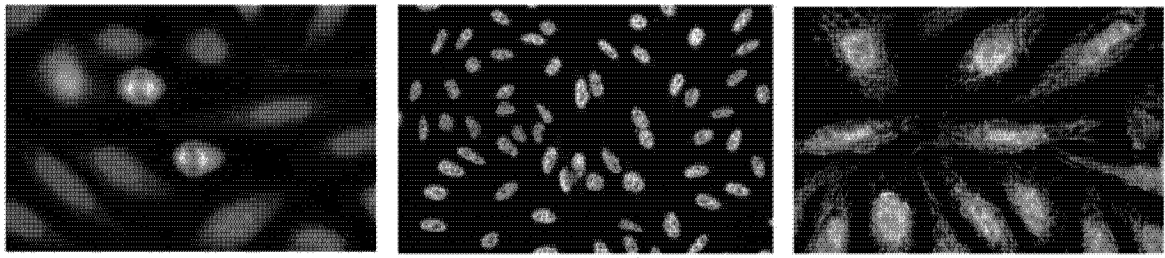


图 1

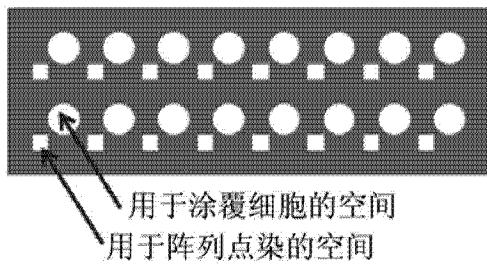


图 2

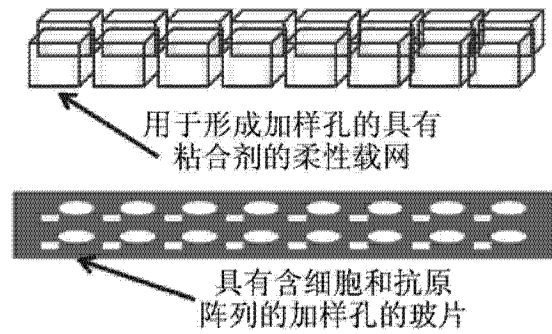


图 3

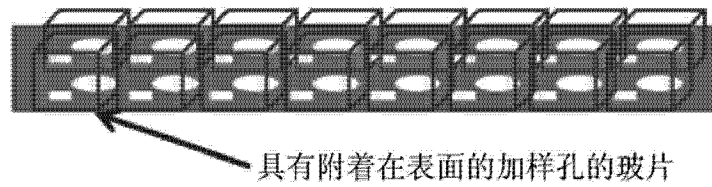


图 4

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	CN103460043A	公开(公告)日	2013-12-18
申请号	CN201280005699.X	申请日	2012-01-04
[标]发明人	马克科普尼斯基		
发明人	马克·科普尼斯基		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/5091 G01N33/5306 G01N33/564 G01N33/569 G01N33/574		
优先权	61/429892 2011-01-05 US 61/524630 2011-08-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种新颖的方法，所述方法将很大程度上是传统的FANA玻片检测的相关特征与很大程度上是传统的多重阵列分析的特征结合到实质上同时进行的单个分析中，其中对每个分析的修改都是最小的，以向医生以及所述方法的其他用户提供先前未知的优势，例如，容易使用以及分析速度提高，所述优势对例如自身免疫疾病的诊断和评估是有用的。

