

(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2010-529445

(P2010-529445A)

(43) 公表日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/545	A
	GO 1 N 33/543	5 9 7
	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-510827 (P2010-510827)	(71) 出願人	506215582
(86) (22) 出願日	平成20年6月6日 (2008.6.6)		バイオーラッド・パスツール
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月29日 (2010.1.29)		B I O - R A D P A S T E U R
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/057128		フランス国、エフ-92430 マルヌー
(87) 国際公開番号	W02008/148890		ラーコケット、ブルヴァール・レイモン
(87) 国際公開日	平成20年12月11日 (2008.12.11)		・ポアンカレ 3
(31) 優先権主張番号	0755624	(74) 代理人	100078662
(32) 優先日	平成19年6月8日 (2007.6.8)		弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100113653
(31) 優先権主張番号	60/929,052		弁理士 東田 幸四郎
(32) 優先日	平成19年6月11日 (2007.6.11)	(74) 代理人	100116919
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 齋藤 房幸
		(72) 発明者	ビュフィエール、フレデリック
			フランス国、エフ-33600 ペサック
			、リュ・デ・ラヴァンディエール 32
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球によって保有される抗原および抗赤血球抗体の検出

(57) 【要約】

本発明は、赤血球によって保有される複数の抗原性分子および/または複数の抗赤血球抗体を検出するための方法であって、赤血球によって保有される抗原性分子は、血液型抗原分子以外の、赤血球によってのみならず少なくとも1つの他の細胞集団によっても保有される抗原性分子からなり、方法は、試料を、a) 抗原に特異的な抗体、またはb) 赤血球もしくは赤血球膜フラグメントがその上に結合している区別可能なビーズと接触させることを含む、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的試料中の、個体の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定するための、および/または赤血球によって保有される抗原性分子に対する複数の抗体を同定するためのインビトロ方法であって、

赤血球によって保有される抗原性分子は、血液型分子以外の、赤血球、および少なくとも1つの他の細胞集団の両方によって保有される抗原性分子からなり、

方法は、

a)

(i) 赤血球を含む試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、赤血球が抗体に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な、所定の抗体を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること(ここで、赤血球はそれがビーズの群と接触させられる前または後に標識される)、

(ii) 抗体に結合していない赤血球を除去すること、および

(iii) 標識された赤血球に結合しているビーズの群を同定し、それにより、検出される赤血球によって保有される抗原の同定を可能にすること、

によって、個体の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定すること;および/または

b)

(iv) 試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、試料中に存在する抗体または活性化血清補体画分が赤血球または赤血球膜フラグメントに結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、既知の表現型の、(1)赤血球または(2)赤血球膜フラグメントを各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること、

(v) 赤血球または赤血球膜フラグメントに結合していない抗体または活性化血清補体画分を除去すること、

(vi) 結合している抗体および/または結合している活性化血清補体画分を標識すること、および

(vii) 標識された抗体または標識された活性化血清補体画分に結合しているビーズの群を同定し、それにより、存在する、赤血球によって保有される抗原性分子に対する抗体の同定を可能にすること、

によって、生物学的試料中の赤血球によって保有される抗原性分子に対する複数の抗体を同定すること、

を含む、方法。

【請求項 2】

(a)による抗原の同定および(b)による抗体の同定が同時にそして同じ容器中で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

混合物の分析がフローサイトメトリーによって行われる、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

溶血のような、ヘモグロビンの化学的または酵素的分解の工程をさらに含む、請求項1~3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

区別可能なビーズが超常磁性または磁性または磁化可能ビーズである、請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

区別可能なビーズが発光または蛍光シグナルを発する、請求項1~5のいずれか1項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

検出可能に標識された赤血球が蛍光化合物で標識される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

抗体 (b による) が、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗ヒトグロブリン抗体と接触させることによって標識される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

活性化血清補体画分が、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗血清補体画分抗体と接触させることによって標識される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

生物学的試料が、全血、血漿、血清、血液細胞ペレットまたは任意の他の血液調製物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

生物学的試料が、抗体によってインビボで感受性化されたか、または血清補体画分でコートされたかのいずれかの赤血球を有する個体起源である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

同定された抗体の定量をさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

抗原性分子が、HLA系の分子、個体によって吸収された化学産物もしくは医薬、またはその分解産物である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項記載の検出方法を実行するための一組の試薬であって、各々が、検出されることができる少なくとも 1 つの特定の物理的パラメーターを保有し、そして、群の 1 つは赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な捕獲抗体を保有し、そして他の群は (1) 赤血球または (2) 赤血球膜フラグメントを保有する、少なくとも 2 つの異なる群に属する、区別可能なビーズの群を含む、一組の試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、赤血球および他の細胞集団の両方によって保有される抗原性分子を同定するために、赤血球上の抗原性分子の存在を利用する。

【0002】

今日では、輸血は、血液ドナーから得られた赤血球濃縮物 (血液細胞濃縮物) の調製物を静脈内投与することにある。輸血が存在する場合、主な危険性は、抗体およびその赤血球抗原がレシピエント (輸血される個体) の身体中で再結合されることの可能性に関連付けられる。事実、赤血球 (erythrocyte) (赤血球 (red blood cell) と呼ばれる) の表面に、免疫系によって認識され、そして赤血球溶血を伴う免疫応答を引き起こすことができる膜抗原、特に血液型 (または式) 抗原が存在する。そのような免疫学的反応の結果は、臨床徴候を伴わない不十分な輸血から、軽微な臨床反応 (不安、悪寒)、重篤な臨床反応 (ショック、ヘモグロビン尿、腎不全)、または結果として死を生じる劇的な臨床反応 (ショック、播種性血管内溶血) までの範囲でありうる。

【0003】

ドナーの赤血球は、レシピエントが、ドナーの赤血球抗原に対するいかなる循環抗体も有しない場合に、レシピエントの血液と適合性であるといわれる。

【0004】

血液型抗原に加えて、赤血球上の HLA 抗原決定基の存在が、フランス人集団中の個体の 15% において検出されている (de Villartay et al., Tissue Antigens, 1985, 26(1):12-9)。赤血球上の HLA 抗原決定基のこの量は他の細胞型に比較して低い、それにもかかわらず、輸血の危険性の点から重大である (Everett et al., Transplantation, 1

10

20

30

40

50

987, vol. 44, no. 1, pp. 123-129)。

【 0 0 0 5 】

次いで、本発明者らは、最初に輸血の危険性に焦点を合わせ、血液型抗原分子に加えて、任意の抗原性分子を、赤血球上のその偶発的存在を利用することによって容易に検出できることを実現化した。

【 0 0 0 6 】

発明の概要

本発明は、生物学的試料中の、個体の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定するための、および/または赤血球によって保有される抗原性分子に対する複数の抗体を同定するためのインビトロ方法であって、赤血球によって保有される抗原性分子は、血液型分子以外の、赤血球、および少なくとも1つの他の細胞集団の両方によって保有される抗原性分子からなり、

方法は、

a)

(i) 赤血球を含む試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、赤血球が抗体に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な、所定の抗体を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること(ここで、赤血球はそれがビーズの群と接触させられる前または後に標識される)、

(i i) 抗体に結合していない赤血球を除去すること、および

(i i i) 標識された赤血球に結合しているビーズの群を同定し、それにより、検出される赤血球によって保有される抗原の同定を可能にすること、
によって、個体の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定すること；および/または

b)

(i v) 試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、試料中に存在する抗体または活性化血清補体画分が赤血球または赤血球膜フラグメントに結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、既知の表現型の、(1) 赤血球または(2) 赤血球膜フラグメントを各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること、

(v) 赤血球または赤血球膜フラグメントに結合していない抗体または活性化血清補体画分を除去すること、

(v i) 結合している抗体および/または結合している活性化血清補体画分を標識すること、および

(v i i) 標識された抗体または標識された活性化血清補体画分に結合しているビーズの群を同定し、それにより、存在する、赤血球によって保有される抗原性分子に対する抗体の同定を可能にすること、

によって、生物学的試料中の赤血球によって保有される抗原性分子に対する複数の抗体を同定すること、

を含む、方法を提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明はまた、この方法を実行するための一組の試薬であって、各々が、検出されることができると少なくとも1つの特定の物理的パラメーターを保有し、そして、群の1つは赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な捕獲抗体を保有し、そして他の群は(1) 赤血球または(2) 赤血球膜フラグメントを保有する、少なくとも2つの異なる群に属する、区別可能なビーズの群を含む、一組の試薬を提供する。

【 0 0 0 8 】

発明の詳細な説明

定義：

本明細書において、「赤血球(erythrocyte)」または「赤血球(red blood cell)」

という用語は同じ血液細胞を示すために区別なく使用される。

【0009】

「多重 (multiplex)」という用語は、同時に単一の試料について単一の容器中でそして単一のシグナル読み取りシステムを使用して、いくつかの異なる抗原 - 抗体型反応が分析されることを意味する。

【0010】

「単純 (simplex)」という用語は、いくつかの分離した容器中で、抗原 - 抗体型反応が分析されることを意味する。好ましくは、分析は、それにもかかわらず、同時に、そして好ましくは単一のシグナル読み取りシステムを使用して行われる。

【0011】

「赤血球によって保有される抗原性分子」という表現は、赤血球および少なくとも1つの他の細胞集団の両方によって保有される抗原性分子からなる、赤血球によって保有される任意の抗原性分子を示す。ここで血液型分子は除外される。「血液型抗原」という用語は、A 抗原、B 抗原、同時に発現される A および B 抗原もしくは H 抗原を用いる A B O 式、D、E、e および C もしくは c 抗原を用いる R h e s u s 式、K もしくは k 抗原を用いる K e l l 式、D u f f y 式 (F y a、F y b)、K i d d 式 (J k a、J k b)、または実際にはそれほど一般的には研究されていないが、それもまた存在する他の方式 (例えば M N S、L e w i s など) の任意の抗原を意味することが意図される。

【0012】

目的の抗原性分子を保有する細胞集団は血液細胞 (リンパ球) であってもよく、血小板が含まれる。

【0013】

赤血球および他の細胞集団によって保有される目的の抗原性分子の例は、H L A 系の分子、特に H L A B - 2 7、C D 5 5 および / または C D 2 9 を含む (Terpos et al., Medical Science Monit. 2008, 14 276-280)。目的の抗原性分子の他の例は、赤血球老化マーカー、例えばホスファチジルセリン (P S) を含む。

【0014】

生理学的にまたは赤血球の表面ではなく、そして他の細胞型または集団の表面で見出される赤血球抗原が含まれる。赤血球抗原に起因する免疫学的反応から生じる赤血球の表面に存在する抗原も含まれる。この場合、「赤血球によって保有される抗原性分子」という表現は、インビボで感受性化された赤血球によって保有される抗体または血清補体画分の要素を含む。生理学的に見出されない抗原性分子は、例えば、個体によって吸収される化学産物もしくは医薬、またはその分解産物を含む。

【0015】

赤血球上に吸着しているが他の細胞集団起源である抗原性分子も含まれる。

【0016】

「赤血球によって保有される」という用語は、処理によるかまたは赤血球の生理学的プロセスによって (例えば赤血球の老化の間に) 抗原性分子が接近可能になる、膜発現、吸着または細胞間発現を指す。

【0017】

「赤血球によって保有される抗原性分子に対する抗体」または「抗赤血球抗体」という表現は、赤血球、および少なくとも1つの他の細胞集団によって保有される抗原に特異的に結合する任意の抗体を示す。「結合している抗体および / または結合している血清補体画分の標識」という用語は、赤血球膜に可逆的に結合しているかまたは直接的に包埋されている抗体または (場合により活性化された) 血清補体画分の標識を意味すると理解される。

【0018】

「個体」という用語は、赤血球によって保有される複数の抗原性分子を有する任意の動物を意味することが意図される。動物として、例えば、イヌ (今日までに8個の異なる血液型が同定されている)、およびネコ (3個を有する) に言及しうる。もちろん、「個体

10

20

30

40

50

」という用語は、ヒト（胎児期を含む）にも関する。

【0019】

「生物学的試料」という用語は、生理学的であろうと病理学的であろうと、赤血球または抗赤血球抗体を含みうる体液または組織バイオプシーの任意の画分を意味することが意図される。生物学的試料として、それゆえ、血液試料、特に全血試料または血液細胞ペレット試料（もしくは血液バッグ）、または任意の他の血液調製物に言及しうるが、それが血液を含むときには、唾液、汗、涙、乳汁または尿にも言及しうる。抗体スクリーニングのために血漿または血清試料を使用することも可能である。抗原性分子を検出するために様式（a）において使用される試料は、抗体を検出するために使用される試料と同一であってもよくまたは異なってもよい。試料が同一であるときに、様式（a）および（b）を同じ容器中で同時に行うことができる。生物学的試料は前処理を経なくてもよい。

10

【0020】

「抗体」という用語は、抗原性化合物の少なくとも1つの抗原決定基に抗体が結合することを可能にする、少なくとも1つの抗原結合部位を含むかまたはそれからなる任意の抗体全体または抗体の機能性フラグメントを指す。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントに、そしてまたscFv鎖（単鎖可変フラグメント）、dsFv鎖（二重鎖可変フラグメント）などに言及しうる。これらの機能性フラグメントを、特に遺伝子工学によって得てもよい。

【0021】

「捕獲抗体」という用語は、親和性結合によって、生物学的試料中に存在する抗原性化合物の少なくとも1つの抗原決定基を保持することができる、固相に結合された抗体または抗体の部分の意味することが意図される。

20

【0022】

検出ツールとして使用される抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体でありうる。本発明に関して使用することができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生は、従来技術の部類に入る。

【0023】

モノクローナル抗体を、Kohler and Milstein (Nature, 256, p. 495-497(1975)) によって記載される従来リンパ球融合およびハイブリドーマ培養方法に従って得てもよい。モノクローナル抗体を調製するための他の方法も公知である (Harlow et al. editors, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。モノクローナル抗体を、哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギまたはヒトさえ等）を免疫し、そしてリンパ球融合物産生ハイブリドーマの技術を使用することによって調製してもよい (Kohler and Milstein, 1975、上記)。

30

【0024】

この習慣的技術に対する代替技術が存在する。例えば、モノクローナル抗体を、ハイブリドーマからクローン化された核酸の発現によって産生することができる。抗体を、典型的には繊維状ファージであるベクター（例えばE. coli用のfUSE5、Scott et al. (Science, 249, pp. 386-390 (1990))）中に抗体cDNAを導入することによって、ファージディスプレイ技術によって産生することもできる。後者は、ライブラリーを構成し、そしてその表面にscFvフラグメントを有する。この抗体ライブラリーを構築するためのプロトコルは、Marks et al. (J. Mol. Biol., 222, pp. 581-597, (1991)) に記載されている。

40

【0025】

ポリクローナル抗体を、通常の手順に従って、抗原（好ましくはペプチド性質の）に対して免疫された動物の血清から得ることができる。

【0026】

一般に、ポリペプチド（特に組換えポリペプチド）またはオリゴペプチドを、例えば免疫原として、使用することができる。従来プロトコルによれば、Benoit et al. [PNAS

50

USA, 79, pp. 917-921 (1982)] によって記載される手順に従って、ペプチド免疫原 1 mg の等価物でウサギを免疫する。

【 0 0 2 7 】

ビーズ：

ビーズは、一般に、生物学的試料の構成要素に関して不活性であるポリマーからなり；それは固体であり、そして試料に不溶性である。使用されるポリマーは、ポリエステル、ポリエーテル、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリサッカリド、ポリウレタンまたはセルロースでありうる。粒子に完全性および構造を与えるために結合剤を使用してもよい。

【 0 0 2 8 】

生物学的な目的の高分子（タンパク質、脂質、炭水化物、核酸）の結合またはカップリングを可能にするように、これらのポリマーに官能基を組み入れてもよい。当業者に公知であるこれらの官能基は、アミン（ $-NH_2$ ）またはアンモニウム（ $-NH_3^+$ または $-NR_3^+$ ）官能基、アルコール官能基（ $-OH$ ）、カルボキシル官能基（ $-COOH$ ）またはイソシアネート官能基（ $-NCO$ ）でありうる。COOH官能基をポリオレフィン中に導入するために最も一般的に使用されているモノマーはアクリル酸またはメタクリル酸である。

【 0 0 2 9 】

ビーズの表面への試薬の結合を、静電誘引、親和性相互作用、疎水性相互作用または共有結合によって行うことができる。共有結合が好ましい。

【 0 0 3 0 】

本発明において使用されるビーズは、形状がほぼ球状であり、 $0.5 \sim 40 \mu m$ 、好ましくは $4 \sim 9$ 、より特定すると $5 \sim 8 \mu m$ でありうるサイズの粒子である。

【 0 0 3 1 】

ここで使用されるビーズは、適切な検出器によってそれらを互いに区別することを可能にする差示的なマーカーをそれらが有するという点で、「区別可能」である。それゆえ、各々のビーズの群は、適切な検出器またはツール（例えばフローサイトメーター）によってそれらを互いに識別することを可能にする、異なる物理化学的特性（サイズ、密度、粒子サイズ、粗さ、吸光度、蛍光、常磁性成分）を有する。

【 0 0 3 2 】

粒子を互いに区別するための差示的なパラメーターとして、特に、非重複サイズ範囲を選択することによって、粒子のサイズを利用しうる。別の好ましい実施態様において、区別可能な粒子は蛍光シグナルを発する。種々の蛍光標識を組み入れるビーズを、事実、その蛍光スペクトルによって区別することができる。このために、ビーズに1つ以上の色素（例えば蛍光、発光など）（適切であれば種々の濃度の）、または放射性同位元素型、酵素型などの標識を浸透させることができる（Venkatasubbarao S. << Microarrays-Status and prospects >> Trends in Biotechnology Dec 2004, 22(12):630-637 ; Morgan et al, << Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology >>, Clin. Immunol. (2004) 100:252-266)。光の散乱もしくは発光、またはその組み合わせを、粒子間の区別のために使用することもできる。

【 0 0 3 3 】

好ましい実施態様において、区別可能なビーズは発光または蛍光シグナルを発する。

【 0 0 3 4 】

使用されるビーズは、超常磁性、磁性または磁化可能でありうる。本発明に従って使用することができるビーズとして、特にUS 6,872,578に記載のものに言及しうる。特に好ましい実施態様によれば、使用されるビーズは、蛍光性でありそして超常磁性である。これらの物理化学的特性は、生物学的試料との反応の間に、これらの微粒子によって捕獲された画分を結合していないものから分離することを可能にしうる。この分離を、とりわけ、遠心分離、ろ過または磁化によって行うことができる。磁化による分離が好ましく、そしてこのために、常磁性、強磁性、フェリ磁性およびメタ磁性成分を含むビーズを使用しうる。常磁性成分が好ましい（例えば、鉄、コバルト、ニッケルまたは金属酸化

10

20

30

40

50

物、例えば Mn_2O_3 、 Cr_2O もしくは Fe_3O_4)。磁性成分の量は 2% ~ 50% (重量)、好ましくは 3% ~ 25% でありうる。

【0035】

抗体を、任意の適切な技術によってビーズに結合させうる。それらは、直接的共有結合によって、または非共有結合で、特に受動的吸着もしくは親和性によって結合されうる。直接的共有結合を、例えば、ヒドロキシスクシンイミドまたはカルボジイミドを介する結合を含む、ビーズの表面に存在するカルボキシル基の活性化によって行いうる。特定の実施態様において、抗免疫グロブリン抗体をまずビーズに結合させ(共有結合によって)、次いでビーズを結合させようとする抗体と接触させる。

【0036】

赤血球または赤血球膜フラグメントを、ポリ-L-リジンを経る非共有結合によってか、または色素型のポリカチオンのような任意の型のリガンドによって、ビーズに結合させることができる。赤血球または赤血球膜フラグメントを、共有結合によって、特に過ヨウ素酸ナトリウムを使用して、ビーズに結合させることもできる。

【0037】

驚くべきことに、赤血球または膜フラグメントの結合が、共有結合であろうと非共有結合であろうと、フローサイトメトリープロセスに従って区別可能であるというビーズの有する特性を損なわないことが示された。

【0038】

ビーズは、例えば *Luminesx* の特許出願 WO 97/14028 に記載されるような、フローサイトメーターのような検出器による測定に供される。従って、反応物(抗体または赤血球または赤血球膜)を保有するビーズのサブグループが生物学的試料に曝露され、各々のサブグループは、1つのサブグループのビーズを別のサブグループのものから区別することを可能にする1つ以上の分類パラメーターを有している。次いで、このようにして試料に曝露されたビーズは、検査ゾーン(例えばフローサイトメーター)を通過し、ここで分類パラメーターに関連するデータ(例えば蛍光発光強度)が収集され、そして好ましくは反応物と目的の分析物との間(すなわち、ビーズと、本発明の方法における(a)による赤血球によって保有される抗原性分子または(b)による抗体との間)に形成された複合体の有無に関連するデータも収集される。

【0039】

標識：

検出可能に標識された赤血球を、当業者に公知の任意の技術によって標識することができる。例えば、それを、蛍光化合物、例えば細胞の膜中に挿入されるフルオロフォアで標識してもよい。それを、それ自体が蛍光標識で官能性付与されている、赤血球の表面の構造を認識することができるリガンドを使用して標識してもよい。これらのリガンドは、例えば、抗体または動物または植物レクチンでありうる。これらの型の標識を、試験の前に行ってもよく、または行わなくてもよい。

【0040】

抗体同定の場合、標識されるのは抗体であるか、あるいは、(場合により活性化された)血清補体画分である。任意の標識技術が可能である。標識の型を混合することもできる。

【0041】

特定の実施態様によれば、抗体は、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗ヒト免疫グロブリン抗体と接触させられる。

【0042】

別の特定の、場合により累積的な、実施態様によれば、活性化血清画分を、活性化血清補体画分を特異的に認識する、例えば、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗体と接触させる。そのような抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、そして当業者に周知である。

【0043】

10

20

30

40

50

非結合試薬の除去：

分析工程を行う前に、接触および試薬のインキュベーションの間に結合していない試薬を除去すべきである。バックグラウンドノイズを低下させ、それゆえ試験の良好な特異性を得るために、できるだけ多くの非結合試薬を除去することが望ましいが、徹底的過ぎる条件は前記試験の感度を低下させうる。それゆえ、非結合試薬の残存する存在は一般に容認できる。方法の感度と特異性との間の許容されうる妥協を得るための条件は、日常的な実験により当業者によって容易に決定されうる。

【0044】

非結合試薬の除去を、反復した遠心分離工程、またはビーズの超常磁性性質の使用および磁石の使用による洗浄のような、当業者に公知の任意の技術によって行うことができる。

10

【0045】

好ましい実施態様：

上記で規定するように、本発明による方法は、抗原を同定することを可能にし、または結合している抗体または血清補体画分を同定することも可能にする。それはまた、いくつかの型の同定の組み合わせを使用することを可能にする。従って、抗原の同定および抗体の同定を、同時にまたは別々に行うことができる。抗体の同定を、抗体および血清補体画分の両方を明らかにすることによって行うことができる。

【0046】

容器は任意の固体容器、例えば試験管、マクロプレートウェル、または自動化システムにおける反応を可能にする任意の容器でありうる。容器を遠心分離する必要はない。

20

【0047】

反応物の混合および目的の分析物の混合を、凝集なしに、赤血球によって保有される抗原の抗体への特異的結合を可能にする条件（特にpH、温度、イオン強度などの）下で行う。凝集の実質的な非存在は、特にフローサイトメーターを使用することを可能にする。いかなる凝集反応をも回避するために、ビーズの量およびサイズを、そしてまた試料の濃度を調整することが有利である。凝集反応は、特にH.E. Hart, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 17-36、K.C. Chak, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 37-56およびC. DeLisi, Journal of Theoretical Biology, 1974, vol 45, pages 555-575によって記載されている数学的法則を満たす。これらの法則は、特に、試薬のサイズそしてまたその数での比率のようないくつかのパラメーターを含む。それゆえ、当業者は、実質的な凝集が生じないように、使用する試薬に応じてこれらの数学的法則を適用することによって、反応条件を選択する。例えば、赤血球および赤血球のサイズと類似するサイズ（すなわち7 μmのオーダー）のビーズを使用する場合、当業者は30～150の範囲のビーズ数に対する赤血球数の比率を選択する。

30

【0048】

有利には、溶血のようなヘモグロビンの化学的または酵素的分解の工程を、好ましくは結合の後、抗原または抗体の同定の前に提供することが好ましい。

【0049】

溶血を種々の方法で行うことができる。例えば、混合物を低浸透圧モル濃度の媒質中でインキュベートすることができる。「低浸透圧モル濃度の媒質」という用語は、一般に、100 mosmol/L以下の浸透圧モル濃度を有する媒質を意味することが意図される。低浸透圧モル濃度の適切な媒質として、40 mM以下の濃度を有する塩化アンモニウム溶液、または蒸留水に言及しうる。溶血を超音波処理によって行ってもよい。

40

【0050】

適用：

方法は、多重フォーマットで、赤血球によって保有される抗原性分子の同定を行うことを可能にする。

【0051】

さらに、方法は、例えば蛍光シグナルの分析を通して、試料中の赤血球の表面の抗原の

50

割合を定量的に決定することを可能にする。

【0052】

本発明の方法は抗体の定量化も可能にする。従って、得られる結果は数値的形態にあり得、そして電子データ処理システムによる促進された解釈のために利用可能でありうる。

【0053】

有利には、方法は、完全な信頼できる結果を数分のみのうちに得ることを可能にする。より詳細には、1時間未満のうちに、または30分未満のうちにさえ完全な結果を与えることが可能である。

【0054】

本発明の方法はまた、取る試験試料の容積をかなり低下させることを可能にする。今日、反応は、一般に、各々の試験について25 μ lの試験試料を用いて行われる。本発明の方法を行うためには、例えば50~100 μ lのみで十分である。

10

【0055】

以下の図面および実施例は本発明をその範囲を限定することなしに例証する。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】Luminex（登録商標）ビーズ上の抗体の直接的固定化を示すスキームである。

【図2】Luminex（登録商標）ビーズ上の、親和性による、ビーズ上の抗体の固定化を示すスキームである。

20

【図3】蛍光膜内化合物での種々の表現型の赤血球の標識を示すスキームである。

【図4】ポリ-L-リジンによりLuminex（登録商標）ビーズ上に赤血球を固定化するための手順を示すスキームである。

【図5a】赤血球の多重化表現型決定（multiplexed phenotyping）を示す。

【図5b】赤血球の多重化表現型決定を示す。

【図5c】赤血球の多重化表現型決定を示す。

【図5d】赤血球の多重化表現型決定を示す。

【図6】「直接クームス陽性」患者由来の赤血球の同時同定および多重化表現型決定を示すスキームである。

30

【0057】

実施例：

実施例1：抗原同定

この分析の目的は、ドナーまたは患者由来の赤血球の表面に存在する抗原を、特異的モノクローナル抗体によって、同定することである。

【0058】

蛍光ビーズを使用して、抗赤血球抗体を固定化する。このようにして、異なる抗原特異性の抗体を、異なる色を有するビーズの種々の領域に結合させることができる。

【0059】

赤血球については、それを、企業Bio-Radによって「Bioplex 200」の名称の下に販売されている装置のレポーターレーザーの波長に適合する蛍光化合物で標識する。

40

【0060】

標識後、赤血球を、感受性化したビーズとともにインキュベートする。このようにして、ビーズに結合した赤血球を検出し、従ってその抗原特異性を決定することが可能である。

【0061】

1.1 - 材料および試薬

ビーズ：

使用するビーズはLuminex（Luminex Corp., Austin Texas, United States）によって製造されている。それは、ポリスチレンおよびメタクリル酸（COOH官能基）か

50

ら構成される、直径 8 μm の超常磁性ビーズである。

この実施例において、種々のビーズ領域 19、21、32、34（内部標準ビーズ（ISSB））、71 および 98（ブランクビーズ（BB））を有する蛍光超常磁性ビーズを使用する。

ビーズ領域 34 を有するビーズ（ISSB）にローダミン誘導体で官能性付与し、そしてそれを内部蛍光対照として使用する。このビーズは 5000 ~ 15000 RFI の蛍光値を生じるはずである。

領域 98 BB ビーズをウシアルブミンを用いて飽和させる。このビーズは、抗原も抗体も結合せず、それゆえ非特異的結合の非存在を確認するために使用される。このビーズは 1000 RFI 未満の蛍光値を生じるはずである。

- 抗ヒト免疫グロブリンモノクローナル IgG 抗体、クローン 125A15（Bio-Rad）。

- 抗ヒト IgM (μ) ポリクローナル抗体（Bio-Rad）。

- 抗 D IgG（クローン H2D5D2F5）、抗 Fya IgG（クローン 5T72A13F5A93）および抗 S IgM（クローン MS94）モノクローナル抗体（Bio-Rad, Millipore）。

- PKH26 細胞標識キット（Sigma）。

- 企業 Bio-Rad によって「ScanLiss」コード 86442 および「Stabiliss」コード 86550 の名称の下に販売されている希釈媒質。

- 非定型抗体スクリーニング用に「ScanGel Coombs」コード 86432 の名称の下に販売されているゲルカード（Bio-Rad）。

- 「ScanGel RhK」コード 86428 および「ScanGel Neutral」コード 86430 の名称の下に販売されているゲルカード（Bio-Rad）。

- ゲルカード技術による非定型抗体スクリーニング用に「ScanPanel」コード 86593 および「ScanCell」コード 86595 の名称の下に販売されている表現型決定された赤血球（Bio-Rad）。

- SAG-MAN 培地中に保存された濃縮され表現型決定された血液細胞ペレット（EFS Nord de France）。

- 患者試料起源の直接クームス陽性および / または陰性赤血球。

- コーティング液または緩衝液（10 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.1% (v/v) プロクリン）。

- ウシ血清アルブミン（BSA）（Millipore）。

- PBS 緩衝液、pH 7.4（7 mM リン酸ナトリウム、2.7 mM KCl、136 mM NaCl）。

【0062】

1.2 - プロトコル

1.2.1. 血液型抗体でのビーズの感受性化

ビーズの表面での抗体の固定化を 2 つの異なる原理に従って行うことができる。第 1 の場合、抗体をビーズ上に直接的に共有結合によって固定化する（図 1）。第 2 のアプローチは、親和性によって、非共有結合的に抗赤血球抗体の固定化を行うことにある。この場合、結合は、第 1 工程においてビーズに共有結合により結合された抗免疫グロブリン抗体により行われる（図 2）。このアプローチを、示す実施例において選択した。

【0063】

ビーズ領域 19、21 および 32 を有するビーズを、抗ヒト免疫グロブリンの共有結合固定化のために使用した。ビーズ領域 71 を有する蛍光ビーズを、抗ヒト IgM の共有結合固定化のために使用した。ビーズの表面に存在するカルボキシル基を、ヒドロキシスクシンイミドおよびカルボジイミドを含む技術に従って活性化した。このようにして、タンパク質をそのアミン基を介して固定化することができた。

【0064】

このようにして調製したビーズを、+4 で、10% (w/v) の BSA、0.5% (

10

20

30

40

50

v / v) の T w e e n 2 0 および 0 . 0 9 % (w / v) の アジ化ナトリウムを含む P B S 、 p H 7 . 4 中 3 m g / m l の濃度で貯蔵する。

【 0 0 6 5 】

固定化抗ヒト免疫グロブリンを保有するビーズを、抗 D I g G または抗 F y a I g G 血液型抗体で感受性化することができる。抗免疫グロブリンは、事実、I g G がその F c フラグメントを介して結合することを可能にする。それゆえ、血液型抗体を、この原理を使用してビーズ上に非共有結合的に固定化する。各々のビーズ領域を、異なる特異性の抗体で感受性化する。選択される抗免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンに対する高親和性を有し、従ってこの結合を長時間安定にする。

【 0 0 6 6 】

非精製抗 D および抗 F y a を、それぞれ最終濃度 3 0 および 1 0 μ g / m l で、8 0 μ g / m g の抗 F c で官能性付与されたビーズとともに使用する。

【 0 0 6 7 】

血液型抗体での感受性化を、P B S 、 p H 7 . 4 中攪拌しながら 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間行う。

【 0 0 6 8 】

感受性化後、ビーズを数回すすぎ、次いで + 4 $^{\circ}$ C で P B S 、 p H 7 . 4 中で貯蔵する。

【 0 0 6 9 】

固定化抗 μ を保有するビーズを抗 S I g M で感受性化することができる。抗 μ は、事実、I g M の結合を可能にする。この抗 μ ポリクローナル血清の親和性は、長時間安定な結合を確実にするために十分である。非精製抗 S を 4 0 μ g / m g の抗 μ で官能性付与されたビーズ上に固定化する。感受性化を、P B S 、 p H 7 . 4 中攪拌しながら 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間行う。感受性化後、ビーズを数回すすぎ、次いで + 4 $^{\circ}$ C で P B S 、 p H 7 . 4 中で貯蔵する。

【 0 0 7 0 】

赤血球とのインキュベーション (試験自体) の前に、血液型抗体で感受性化したビーズを、対照領域 3 4 ビーズ (I S B) および対照領域 9 8 ビーズ (B B) と混合する。

【 0 0 7 1 】

1 . 2 . 2 . 赤血球の標識

蛍光化合物での赤血球の標識を、種々の原理を使用して行うことができる。示す実施例において、赤血球を P K H 2 6 (これは赤血球膜中に挿入されるフルオロフォアである) を使用して標識する。このようにして、種々の表現型の赤血球を、同一のプロトコルに従って標識することができる (図 3) 。

【 0 0 7 2 】

P K H 2 6 は企業 Sigma によって販売されている蛍光プローブである。このプローブは、5 5 1 n m に最大励起を、そして 5 6 7 n m に最大発光を有する。

【 0 0 7 3 】

キットは、蛍光標識 (これは長い脂肪族鎖を有し、それが細胞膜の脂質層中に組み込まれることを可能にする) を含み、そして塩、緩衝液または有機溶媒を含まない等張水性希釈剤も含む。この希釈剤は、細胞生存率、標識溶解性および標識効率を高レベルに維持することを可能にする。P K H 2 6 での赤血球の標識を、製造業者によって推奨されるプロトコルを使用して行う。このようにして標識した赤血球を、S t a b i l i s s 緩衝液中で希釈し、そして暗所で + 4 $^{\circ}$ C で貯蔵する。

【 0 0 7 4 】

標識赤血球の品質、生存率および安定性を、ゲル技術に従って表現型決定アッセイを行うことによって経時的に確認する。標識赤血球の抗原性完全性を、非標識赤血球のものと比較する。蛍光標識の品質および安定性は、それらに関する限り、Bio-Rad からの「 B i o p l e x 2 0 0 」装置を使用して蛍光測定を行うことによって研究される。

【 0 0 7 5 】

1 . 2 . 3 . 抗体 - ビーズおよび赤血球のインキュベーション

本発明による技術に従う型決定 (grouping) の実行可能性を実証し、そしてその特異性

10

20

30

40

50

を確認するために、本発明者らは単体 (unitary) 様式で反応を行った。この場合、目的の抗体で官能性付与されたビーズを、種々の表現型の赤血球とともに個別にインキュベートする。

【0076】

多重化反応の場合、異なる血液試料を異なるビーズ領域を有するビーズと個別に接触させ、そして異なる特異性の抗体で感受性化する。この型の実験は、同じ試験試料中でいくつかの抗原特異性を検出することの可能性を確認することを可能にした。

【0077】

感受性化したビーズを、赤血球と、約50～150の赤血球/ビーズ比率が得られるように混合する。混合物を、15分間攪拌しながら37℃でインキュベートする。

10

【0078】

インキュベーション後、ビーズ-赤血球複合体を数回蒸留水で洗浄する。

【0079】

1.2.4. 企業Bio-Radからの「Bioplex 200」自動化デバイスを使用したフローサイトメトリーによる測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を185μlの「コーティング液」媒質で希釈する。各々の試験について、25μlの懸濁液を自動的に装置中に注入する。領域当たり250ビーズの捕獲によって測定を行う。

【0080】

各々の型決定/表現型決定シリーズについて、研究する反応の特異性を確認するために、系統的な対照を行う。

20

【0081】

1.3. 単純/多重表現型決定/型決定実施例

この一連の試験の目的は、単体および/または多重化様式での赤血球の表現型決定/型決定の実行可能性を実証することである。D、FyaおよびS抗原をモデルとして選択する。抗ヒト免疫グロブリンまたは抗μ鎖抗体で感受性化したビーズを使用して、抗D、抗Fyaおよび抗S抗体を固定化する。

【0082】

1.3.1. RH D陽性赤血球の単体表現型決定

抗D抗体で感受性化したビーズを、PKH26で標識したRh D陽性およびRh D陰性赤血球とともに、150の赤血球数/ビーズ数比率を使用してインキュベートした。

30

【0083】

2つのRH D陽性赤血球および2つのRH D陰性赤血球を使用した。各々の試料を装置中に二連で注入した。

【0084】

RH D陽性赤血球は21000～25000RFIのオーダーの強く陽性のシグナルを生じ、一方、RH D陰性赤血球は40～400RFIの陰性シグナルを示す。

【0085】

6500RFIのオーダーのシグナルを与えるISB34対照ビーズおよび1000RFI未満を与えるBB98対照ビーズにより結果を検証する。行う種々の陰性対照は、15～400RFIのシグナルを示し、反応の特異性を確認する。RH D陽性およびRH D陰性赤血球は、事実、抗D抗体の非存在下でビーズに結合しない。

40

【0086】

これらの結果は、RH D陽性およびRH D陰性赤血球を非常に明らかに区別すること、それゆえ赤血球の表面のD抗原を同定することの可能性を実証する。

【0087】

FyaおよびS赤血球の単体表現型決定を、同じ原理に従って、アイソタイプG特異的またはアイソタイプM型特異的抗体を使用して行うことができる。

【0088】

1.3.2. D、FyaおよびS赤血球の多重表現型決定

50

多重化表現型決定の原理を図5A～5Dにまとめる。

【0089】

この場合、抗D抗体で感受性化した領域19ピーズを、抗Fya抗体で感受性化した領域21ピーズと、そしてまた抗S抗体で感受性化した領域71ピーズと混合した。

【0090】

このピーズの混合物を、異なるD、FyaおよびS表現型を有する赤血球とともにインキュベートした：D + Fya + S + / D + Fya - S - / D - Fya + S - / D - Fya - S - / D - Fya - S + / D - Fya + S + / D + Fya - S + / D + Fya + S - 。50の赤血球数/ピーズ数比率を使用した。

【0091】

所定の抗体で感受性化したピーズが対応する抗原特異性を有する赤血球に結合したときに、13000～29000RFIの陽性シグナルが得られる。

【0092】

完全な相関が、測定される蛍光シグナルと、試験を行うために使用される赤血球の表現型との間に観察される。

【0093】

抗体で感受性化したピーズを、対応する抗原を保有しない赤血球と接触させたときに、1000RFI未満のシグナルが得られる。

【0094】

さらに、抗体感受性化していないピーズを用いて行う対照は、使用する赤血球にかかわらず、陰性シグナルを生じる。

【0095】

これらの結果は、測定されるシグナルが特異的であること：抗原-抗体対が関与するときのみピーズ-赤血球結合が起こることを実証する。

【0096】

対照ピーズISB34(11000RFI)およびBB98(1000RFI未満)を用いて得られた結果は、分析を検証する。

【0097】

試験間変動係数は1%～10%であり、これは満足な試験間再現性を実証する。

【0098】

これらの結果は、本発明による技術に従う赤血球の3パラメーター多重化表現型決定の実行可能性を実証する。

【0099】

1.3.3.直接クームス陽性(CD+)赤血球の多重化表現型決定

マイクロピーズを用いる多重化アプローチの使用は、図6に記載の原理に従って同時にCD+性質を同定し、そして赤血球を表現型決定することを可能にする。

【0100】

抗Fc抗体で感受性化した領域32ピーズを、それぞれ抗D、抗Fyaおよび抗S抗体で感受性化した領域19、21および71ピーズと混合する。抗体でインビボで感受性化したCD+赤血球は、領域32ピーズによって保有される抗ヒト免疫グロブリンに結合することができ、それによりCD+特徴を同定することを可能にする。さらに、これらの赤血球はまた、赤血球膜上に存在する特異性に従って、D、FyaおよびS抗原に特異的な抗体を保有する領域19、21および71ピーズに結合することができる。

【0101】

このアプローチを、40のオーダーの赤血球数/ピーズ数比率を使用して実証した。

【0102】

ISB34およびBB98対照ピーズは、予想される、すなわちそれぞれ13000RFIおよび1000RFI未満のオーダーのシグナルを生じ、そして結果を検証する。

【0103】

2つのCD+赤血球は、抗ヒト免疫グロブリン抗体で感受性化した領域32ピーズを用

10

20

30

40

50

いて3000RFIより高い陽性シグナルを生じる。2つのCD陰性赤血球は、それらに関する限り、この同じビーズ領域を用いて500RFI未満の陰性シグナルを生じる。これらの結果は、所定のビーズ領域のビーズに予め結合された抗グロブリンを使用してその特異的結合によりCD+赤血球を同定することの可能性を実証する。

【0104】

さらに、結果はまた、CD+赤血球の赤血球抗原の多重化表現型決定を、CD+性質の同定と同時に進めることができることを実証する。事実、CD+赤血球の一方はD+Fya-S-と、そして他方はD+Fya+S+と表現型決定される。

【0105】

これら2つの試料のS表現型を、従来技術に従って、IgM型の抗S抗体を使用して確認した。得られた結果は、新たな技術に従って得られたものと完全に相関する。

10

【0106】

他方、抗Fya表現型に関しては、この同じ分析を行うことができなかった。事実、赤血球を表現型決定するためのIgM型の試薬は存在しない。

【0107】

しかし、分析したCD+赤血球に従ってFya表現型について差異が観察され、これは結果を検証し、そして非特異的結合の現象を排除することを可能にする。

【0108】

変動係数は大部分の試料について1%~5%であり、これは満足な試験間再現性を示す。

20

【0109】

実施例2：赤血球老化のマーカーであるホスファチジルセリンの検出

赤血球老化のマーカーの実証は、輸血における赤血球集団の研究において(Cardo L J et al Transfus Apher Sci, 2008 Apr; 38(2): 141-7)、またサラセミアのような特定の血液病態に關与する現象の研究において(Basu S et al Br J Haematol, 2008 Apr; 141(1): 92-9)価値がある。

【0110】

赤血球老化は、特に、赤血球の表面でのホスファチジルセリン(PS)と呼ばれる構造の出現によって反映される。

【0111】

本発明の試験を、赤血球の表面でこの分子を検出するために容易に実行することができる。

30

【0112】

このために、蛍光ビーズを使用して、試験しようとする赤血球を、ポリ-L-リジン(PLL)を介して固定化する。

【0113】

次いで、このビーズをインキュベーション相で抗ホスファチジルセリン抗体と接触させる。

【0114】

洗浄工程の後、抗ホスファチジルセリンの赤血球への結合を、フィコエリトリン(PE)で標識された抗Fc(IgG)二次抗体とのビーズ-赤血球複合体のインキュベーションによって検出する。

40

【0115】

非結合抗Fc(IgG)-PEを除去することを意図した最終洗浄工程を行う。

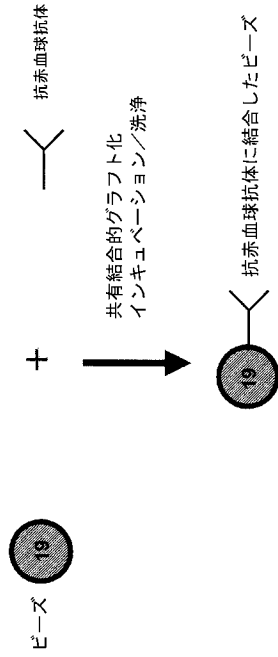
【0116】

次いで、ビーズ-赤血球複合体を、BioPlex 200装置を使用して読み取る。

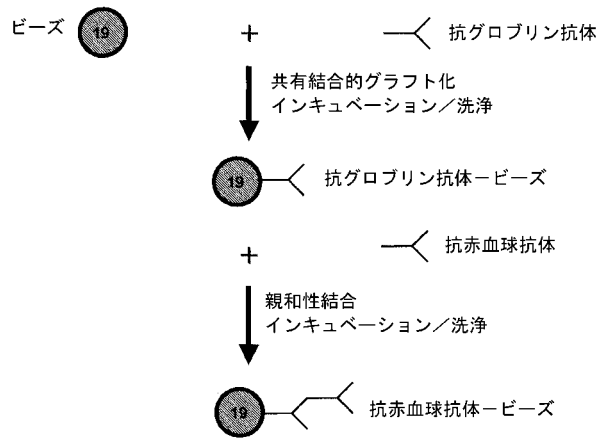
【0117】

血液バッグから得られる様々な時期の赤血球を標準範囲として使用する。

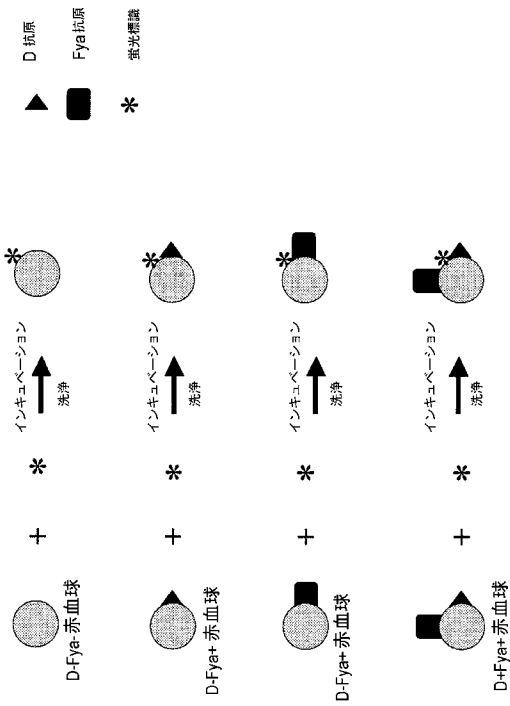
【 図 1 】



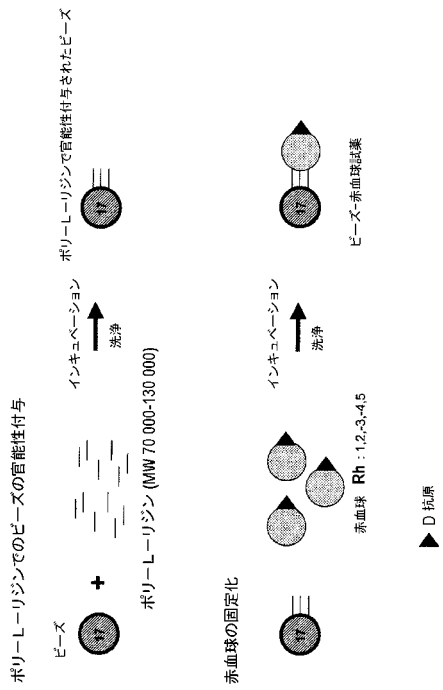
【 図 2 】



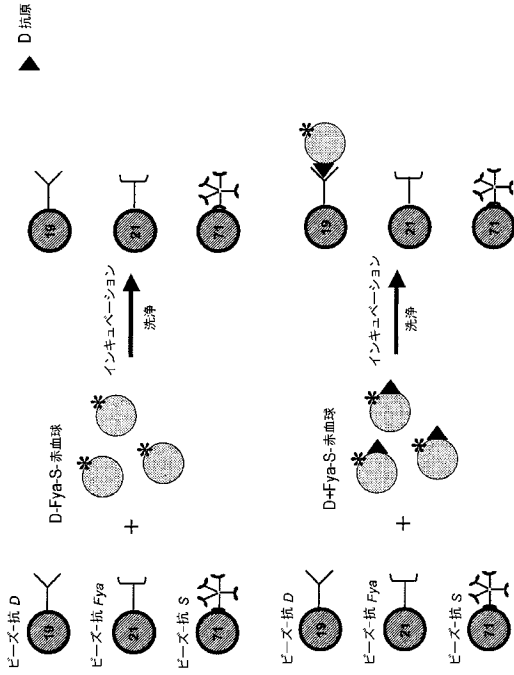
【 図 3 】



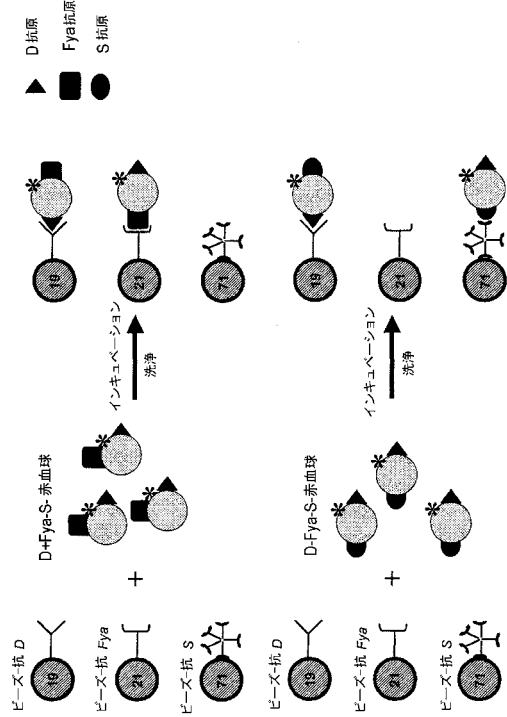
【 図 4 】



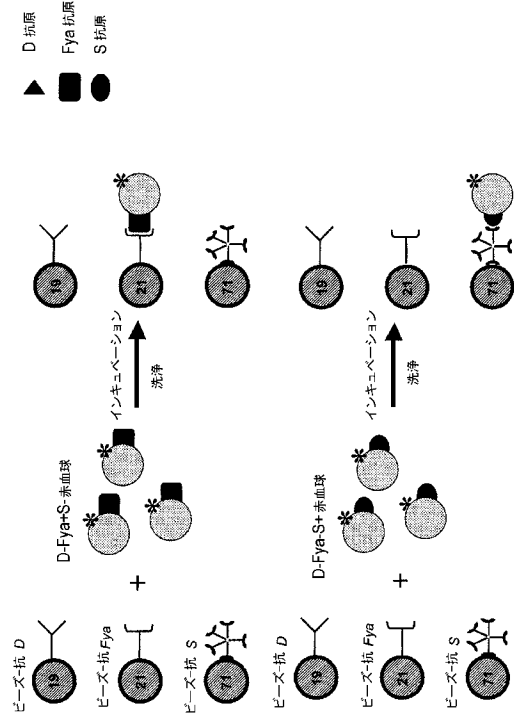
【 図 5 a 】



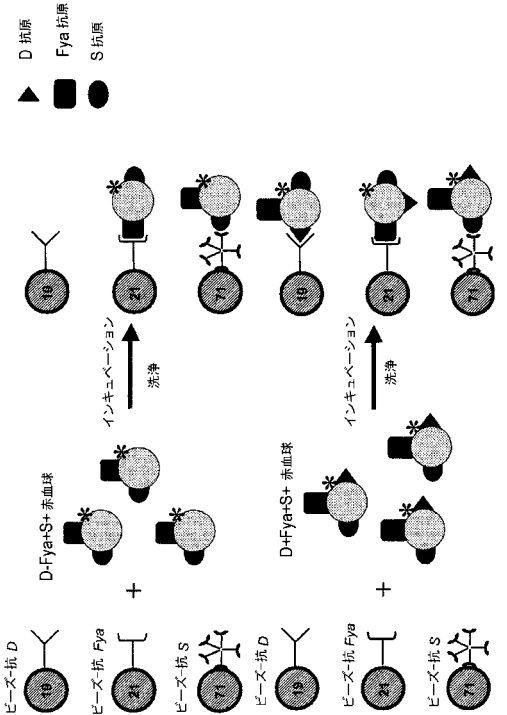
【 図 5 b 】



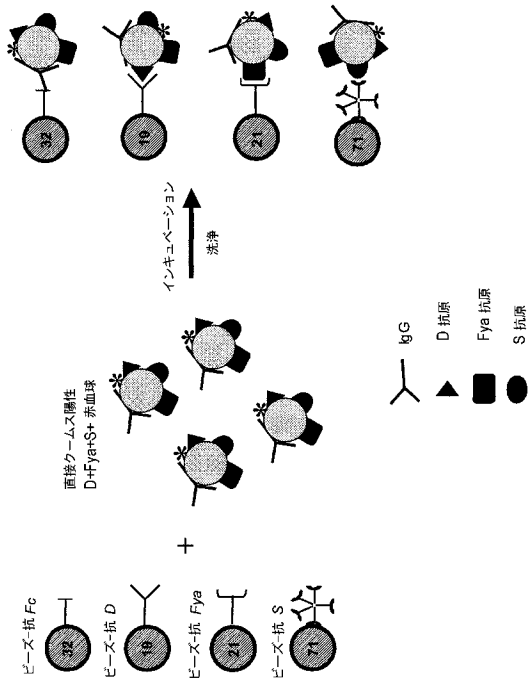
【 図 5 c 】



【 図 5 d 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/057128
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/80 G01N33/543 G01N33/537 G01N33/569		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 948 627 A (JAR-HOW L. [US] ET AL.) 7 September 1999 (1999-09-07)	1, 3, 6, 8-14
Y	abstract column 2, line 30 - column 3, line 42 claims 1-15	2, 4, 5, 7
Y	WO 98/21593 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US]) 22 May 1998 (1998-05-22) abstract page 8, line 30 - page 9, line 20 page 10, lines 1-13 page 10, line 24 - page 14, line 12 claims 1-10	2, 4, 7
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 document 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 12 August 2008		Date of mailing of the international search report 04/09/2008
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giry, Murielle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/057128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WD 85/01354 A (IMMUCOR, INC. [US]) 28 March 1985 (1985-03-28) abstract page 3, line 31 - page 4, line 11 claims 1-30</p>	4
Y	<p>US 2001/054580 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC. [US]) 27 December 2001 (2001-12-27) cited in the application abstract paragraphs [0010], [0013] - [0015], [0021], [0024], [0034] - [0039] claims 1-49</p>	5
A	<p>GARRATTY G. ET AL.: "Applications of flow cytometry to transfusion science." TRANSFUSION, vol. 35, no. 2, January 1995 (1995-01), pages 157-178, XP000983723 abstract page 159, column 1, paragraph 2 - page 160, column 1, paragraph 1 page 161, column 2, paragraphs 2,3 page 165, column 2, last paragraph - page 166, column 2, paragraph 1 page 167, column 2, paragraph 1 page 170, column 1, last paragraph - page 171, column 2, paragraph 1 page 172, column 2, last paragraph - page 173, column 2, paragraph 2</p>	1-14
A	<p>FREEDMAN J. ET AL.: "Applications of flow cytometry in transfusion medicine" TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS, vol. 9, no. 2, April 1995 (1995-04), pages 87-109, XP005441355 abstract page 93, column 1, paragraph 2 - page 102, column 1, paragraph 2</p>	1-14
A	<p>US 4 810 632 A (MCMILLAN R. [US]) 7 March 1989 (1989-03-07) abstract column 1, line 55 - column 3, line 57 claims 1-12</p>	1-14
A	<p>WOOD B.L. ET AL.: "Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations" BLOOD, vol. 88, no. 5, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 1873-1880, XP002491960 abstract page 1879, column 2, last paragraph</p>	1-14

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/057128

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5948627	A	07-09-1999	US 6150122 A 21-11-2000
WO 9821593	A	22-05-1998	AU 7181298 A 03-06-1998 US 5776711 A 07-07-1998
WO 8501354	A	28-03-1985	AU 3394684 A 11-04-1985 CA 1246442 A1 13-12-1988 EP 0157797 A1 16-10-1985 IT 1179427 B 16-09-1987
US 2001054580	A1	27-12-2001	NONE
US 4810632	A	07-03-1989	WO 8804432 A1 16-06-1988

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
	G 0 1 N 33/543	5 7 5

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 レザン, イヴ

フランス国、エフ - 9 5 1 2 0 エルモン、リュ・デ・ブルート 9

(72) 発明者 リヴァリン, エリアンヌ

フランス国、エフ - 7 8 2 4 0 エーグルモン、リュ・ドゥ・フシュロール 1 7 エー

(72) 発明者 サンジュアン, アンパード

フランス国、エフ - 9 2 1 3 0 イッシー - レ - ムリノー、リュ・クロード・マトラ 7

专利名称(译)	检测红细胞所具有的抗原和抗红细胞抗体		
公开(公告)号	JP2010529445A	公开(公告)日	2010-08-26
申请号	JP2010510827	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	Bio-Rad公司巴斯德 BIO RAD巴斯德		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
[标]发明人	ビュフィエールフレデリック レザンイヴ リヴァリンエリアンヌ サンジュアンアンパーロ		
发明人	ビュフィエール,フレデリック レザン,イヴ リヴァリン,エリアンヌ サンジュアン,アンパーロ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/545 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/80 G01N33/537 G01N33/54333 Y10T436/101666 Y10T436/25125		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.N G01N33/545.A G01N33/543.597 G01N33/543.541.A G01N33/543.541.B G01N33/543.575		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
优先权	2007055624 2007-06-08 FR 60/929052 2007-06-11 US		
其他公开文献	JP5587179B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种检测由红细胞和/或多种抗红细胞抗体携带的多种抗原分子的方法，所述红细胞携带的抗原分子不仅由红细胞携带，而且至少由红细胞携带。除了血型抗原分子之外的另一种细胞群，所述方法包括使样品与可区分的珠子接触，其上附着有a) 对所述抗原特异的抗体，或b) 红细胞或红细胞膜片段。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(公開番号)	(11) 特許出願公開番号 特表2010-5294 (P2010-52944)
		(43) 公表日 平成22年8月26日(2010.8.26)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 K	
GO1N 33/545 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/545 A	
	GO1N 33/543 597	
	GO1N 33/543 541A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全22頁) 最終頁に続	
(21) 出願番号 特願2010-510827(P2010-510827)	(71) 出願人 506215582	
(86) (22) 出願日 平成20年6月6日(2008.6.6)	バイオラッド・パストール	
(85) 翻訳文提出日 平成22年1月29日(2010.1.29)	BIO-RAD PASTEUR	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2008/057128	フランス国、エフ-92430 マルヌ	
(87) 国際公開番号 W02008/148890	ラーコケット、ブルヴァール・レイモ	
(87) 国際公開日 平成20年12月11日(2008.12.11)	・ポアンカレ 3	
(31) 優先権主張番号 0755624	(74) 代理人 100078682	
(32) 優先日 平成19年6月8日(2007.6.8)	弁理士 津国 肇	
(33) 優先権主張国 フランス(FR)	(74) 代理人 100113653	
(31) 優先権主張番号 60/929,052	弁理士 栗田 幸四郎	
(32) 優先日 平成19年6月11日(2007.6.11)	(74) 代理人 100116919	
(33) 優先権主張国 米国(US)	弁理士 齋藤 房等	
	(72) 発明者	
	ビュフィエール,フレデリック	
	フランス国、エフ-33600 パサッ	
	、リュ・ヂ・ラヴァングアイエール 32	
	最終頁に続く	