

(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2017-508961
(P2017-508961A)

(43) 公表日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(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 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2016-553606 (P2016-553606)	(71) 出願人	516238625 キュービーディー (キューエスアイピー)) リミテッド イギリス ジャージー島 ジェイイー4 2キュービー セント ヘリア キャッス ル ストリート 9 エリザベス ハウス ビーオー ボックス 1 0 7 5
(86) (22) 出願日	平成27年2月20日 (2015. 2. 20)	(74) 代理人	100086771 弁理士 西島 孝喜
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月22日 (2016. 8. 22)	(74) 代理人	100088694 弁理士 弟子丸 健
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/050502	(74) 代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(87) 国際公開番号	W02015/124947	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開日	平成27年8月27日 (2015. 8. 27)		
(31) 優先権主張番号	1403115. 7		
(32) 優先日	平成26年2月21日 (2014. 2. 21)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球検出

(57) 【要約】

本発明は、赤血球抗原が、赤血球／エリスロサイトを検出するための手段として活用され得るという知見に基づく。具体的には、実質的に全ての赤血球型によって発現される赤血球抗原を特定することによって、赤血球の信頼性のある検出を達成する方法を提供することが可能である。

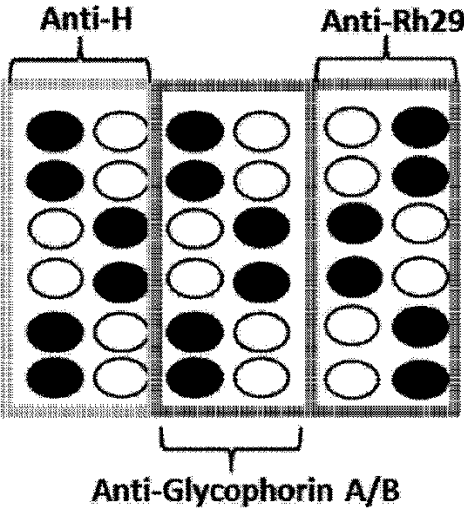


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中で赤血球を検出する方法であって、サンプルを、

- (i) E n ^a ;
- (i i) G e : 2 ;
- (i i i) G e : 3 ;
- (i v) G P A ;
- (v) G P B ;
- (v i) H ;
- (v i i) R h 2 9 ; および
- (v i i i) W r ^b

10

からなる群から選択される 1 つまたは複数の抗原を発現する赤血球についてプローブする工程を含む方法。

【請求項 2】

サンプル中の赤血球を検出する方法であって、サンプルを、

- (i) E n ^a ;
- (i i) G e : 2 ;
- (i i i) G e : 3 ;
- (i v) G P A ;
- (v) G P B ;
- (v i) H ;
- (v i i) R h 2 9 ; および
- (v i i i) W r ^b

20

からなる群から選択される 1 つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる 1 つまたは複数の結合因子と接触させる工程を含み、
結合因子に結合している赤血球の検出は、サンプルが赤血球を含んでいることを示す、方法。

【請求項 3】

赤血球を検出する方法における使用のための、および／またはアッセイもしくはアッセイ系における使用のための、

30

- (i) E n ^a ;
- (i i) G e : 2 ;
- (i i i) G e : 3 ;
- (i v) G P A ;
- (v) G P B ;
- (v i) H ;
- (v i i) R h 2 9 ; および
- (v i i i) W r ^b

からなる群から選択される 1 つまたは複数の抗原に結合することができる 1 つまたは複数の結合因子。

40

【請求項 4】

赤血球を検出する方法における、および／またはアッセイもしくはアッセイ系における使用のための、

- (i) E n ^a ;
- (i i) G e : 2 ;
- (i i i) G e : 3 ;
- (i v) G P A ;
- (v) G P B ;
- (v i) H ;
- (v i i) R h 2 9 ; および

50

(v i i i) W r^b

からなる群から選択される1つまたは複数の抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子の使用。

【請求項5】

方法、アッセイまたはアッセイ系が、サンプルまたはプロセスにおける赤血球の存在を確認するための対照試験である、請求項3に記載の1つまたは複数の結合因子、または請求項4に記載の使用。

【請求項6】

サンプルが、全血のサンプル、またはそれから調製された成体、胎児、新生児および／または出生前の血漿、血清もしくは赤血球のサンプルである、請求項1または2のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項7】

サンプルが、(i) 赤血球を含むか、潜在的に含むか、または含むと疑われる、任意の体積または量の液体または物質である、請求項1または2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

アッセイの対照試験である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項9】

(i) E n^a ;

(i i) G e : 2 ;

(i i i) G e : 3 ;

20

(i v) G P A ;

(v) G P B ;

(v i) H ;

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r^b

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子を含む、アッセイのための対照試験。

【請求項10】

プロセス、デバイス、装置、アッセイおよび／またはアッセイ系への赤血球の添加を確認するための陽性対照試験として使用される、請求項9に記載の対照試験。

30

【請求項11】

赤血球抗原のうちの1つまたは複数の結合することができる結合因子が、

(i) H ;

(i i) G P A ; および

(i i i) R h 2 9、

からなる群から選択される抗原のうちの1つまたは複数の結合することができる、請求項2～10のいずれか1項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項12】

赤血球抗原のうちの1つまたは複数の結合することができる結合因子が、抗H結合因子、抗グリコフォリンA、B結合因子および／または抗R h 2 9結合因子である、請求項2～11のいずれか1項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

40

【請求項13】

結合因子が、

(i) 抗体またはその抗原結合フラグメント、

(i i) アプタマー、

(i i i) 低分子抗体模倣物、

(i v) 核酸リガンド、および

(v) 赤血球抗原に結合することができる細胞由来の受容体

からなる群から選択される、請求項2～12のいずれか1項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

50

【請求項 14】

結合因子が、抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 2～13 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 15】

結合因子が、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、またはいずれかの抗原結合フラグメントである、請求項 14 に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 16】

結合因子が、任意の適切な基板上に固定、結合または吸着している、請求項 2～15 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 17】

結合因子が、基板の全てまたは一部に固定、結合または吸着している、請求項 2～16 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 18】

結合因子が、基板上の 1 つまたは複数の別個の所定の位置に固定、結合または吸着している、請求項 2～17 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 19】

結合因子が、複数／一連の別のおよび／または別個のスポットとして固定されている、請求項 18 に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 20】

基板上の各々の別個のまたは所定の位置またはスポットが独立して、1 つまたは複数の固定されている結合因子を含む、請求項 18 または 19 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 21】

結合因子が、アレイまたはマイクロアレイとして、基板に固定、結合および／または吸着している、請求項 20 に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 22】

結合因子が、既存のアッセイ系の基板に固定されている、請求項 2～21 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 23】

既存のアッセイ系が、交差適合、または血液型判定アッセイ系である、請求項 2～22 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 24】

基板が、

(i) グリシドキシプロピルトリエトキシシラン；

(ii) ポリ－１－リジン；

(iii) アミノプロピルシラン；

(iv) カルボキシシラン；

(v) ヒドロゲルおよびポリマーブラシ；

(vi) 自己組織化単分子層；および

(vii) シランベースのコーティング

からなる群から選択される 1 つまたは複数の官能性ポリマーで官能化されている、請求項 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法、結合因子、使用または対照試験。

【請求項 25】

赤血球が、自己蛍光によって検出される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 26】

赤血球の検出のためのアッセイまたはデバイスであって、

(i) En^a ；

(ii) $Ge:2$ ；

(iii) $Ge:3$ ；

(iv) GPA ；

10

20

30

40

50

(v) G P B ;
 (v i) H ;
 (v i i) R h 2 9 ; および
 (v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子が固定されている基板を含む、アッセイまたはデバイス。

【請求項27】

血液交差適合性アッセイにおける使用のための基板であって、抗体に結合することができる1つまたは複数の結合因子、ならびに

(i) E n ^a ;
 (i i) G e : 2 ;
 (i i i) G e : 3 ;
 (i v) G P A ;
 (v) G P B ;
 (v i) H ;
 (v i i) R h 2 9 ; および
 (v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子が固定されている基板。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、赤血球を検出するための方法を提供する。本発明の方法は、アッセイのための対照試験の基礎として使用することもできる。したがって、本発明はさらに、本発明の方法を活用するアッセイを提供する。

【背景技術】

【0002】

どんな種類のアッセイでも、全体としてのアッセイ系の正確な機能化だけでなく、種々の試薬、サンプルおよび／または機器の正確／適切な添加および／または機能化を、オペレーターが用いて確認し得る対照を含むことが標準的な習慣である。免疫学的アッセイを含むアッセイに使用される対照は、その機能によって、陽性対照または陰性対照と呼ばれ得る。

いくつかのアッセイにおいて、赤血球の添加が必要であり、これらのアッセイとしては、例えば、献血試験センターおよび輸血実験室で、世界中で慣用的に行われている赤血球サンプルの血液型判定のためのアッセイが挙げられる。この種類の試験としてはA B OおよびR h Dの分類が挙げられ、包括的な血液型試験としては（限定するものではないが）、R h、K e l l、D u f f y、M N Sおよび／またはK i d d抗原の検出が挙げられ得る。

【0003】

血液型判定試験は、試験管中での凝集試験として実施することもできる。さらに近年では、この種の試験は、固相マイクロプレートおよびカラム凝集技術を使用して実施されている（a k a G e l、C A T）。現況技術としては、市販のシステム、例えば、B e c k m a n C o u l t e r P K 7 3 0 0、I m m u c o r C a p t u r e - R、およびB i o R a d I D - S y s t e mおよびO r t h o C l i n i c a l D i a g n o s t i c s B i o V u eおよびI D - M T Sシステムが挙げられ、多くの他のバリエーションが現在利用可能であるが、それらは、上記のシステムに原則的に極めて類似している。

上記のようなアッセイは、赤血球の添加の成功に依存する。ほとんどの場合、消耗品／サンプルの体積および量は十分大きいので、サンプルおよび試薬（例えば、血液／赤血球）の添加の成功は簡単な観察によって記録され得る。アッセイに赤血球を添加する場合、

その形状、型、密度および色によって、それらは容易に検出可能になる。いくつかのシステムは、読み取りの終点として赤血球凝集（例えば、写真技術およびソフトウェアによって解釈される）を使用することができ、赤血球の添加は、特に、消耗品（サンプルなど）の体積および量が赤血球の容易な視覚的検出を可能にするのに十分大きいという理由だけでなく、赤血球凝集プロセスそれ自体が赤血球添加の証拠となるという理由で、決定することが容易である。

【0004】

しかし、アッセイの小型化には、視覚的特定に（単に）依存しない、赤血球を検出する方法の必要性が示される。しかし、どの方法でも、赤血球によって発現される抗原の多様性を配慮しなければならない。ヒトでは、異なる遺伝的背景を有するヒト由来、および／または異なる地理的場所由来の赤血球は、異なる抗原プロファイルを表し得る。したがって、赤血球を検出し、および／または対照試験として機能して、赤血球の添加を確認する手段として活用されるなんらかの方法で、いかなる種類の赤血球も確実に検出しなければならない。

赤血球の表面上の抗原（血液型抗原を含む）の存在によって、例えば、非凝集タンパク質マイクロアレイを用い得る血液型判定アッセイを含む、多くの免疫学的試験の基礎が形成され、ここでは固定された抗体は、赤血球の表面上の抗原に結合し、そのように固定された赤血球の存在が検出される（J S Robb et al 2006）。抗体マイクロアレイ技術も用いて、細胞表面上の抗原の複雑な混合物を検出することによって赤血球を表現型決定してもよい（C. J. Campbell et al 2006）。赤血球によって発現される抗原は、両方とも、十分提示され、容易に接近可能となる傾向である糖抗原、および膜貫通または膜連結タンパク質のエピトープであり、したがって、細胞表面に埋められて、より密接して保持され、これらは、抗体の正確な選択を用いて区別することに成功した、タンパク質ペプチド抗原である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

マイクロアレイ、表面プラズモン共鳴、および任意の他の形態のアッセイ／方法および／またはシステム（赤血球の使用または添加を必要とする）などの新規な小型化技術の出現とともに、全種類の赤血球を確実に、繰り返し、かつ一貫して検出できる試験または手段を提供することが望ましい。具体的には、赤血球を検出するために視覚検出法を用いない（または用いることができない）方法およびアッセイ／システムでの使用に適切な赤血球検出方法を提供することが望ましい。さらに、アッセイまたはアッセイ系への赤血球の添加を確実に、一貫して、かつ繰り返し報告できる対照試験を提供することが有利である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、赤血球抗原が、赤血球（エリスロサイトとも呼ばれ、本発明における「赤血球」という言及はエリスロサイトを包含する）を検出するための手段として活用され得るという知見に基づく。具体的には、実質的に全ての赤血球型によって発現される赤血球抗原を特定することによって、赤血球の信頼性のある検出を達成する方法を得ることが可能である。

【0007】

したがって、本発明は、サンプル中で赤血球を検出する方法であって、サンプルを、

- (i) $E n^a$;
- (ii) $G e : 2$;
- (iii) $G e : 3$;
- (iv) $G P A$;
- (v) $G P B$;
- (vi) H ;

10

20

30

40

50

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の抗原を発現する赤血球についてプローブする工程を含む方法を提供する。

本発明はさらに、サンプル中の赤血球を検出する方法であって、サンプルを、

(i) E n ^a ;

(i i) G e : 2 ;

(i i i) G e : 3 ;

(i v) G P A ;

(v) G P B ;

(v i) H ;

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子と接触させる工程を含み、結合因子に結合している赤血球の検出は、サンプルが赤血球を含んでいることを示す、方法を提供する。

【0008】

さらに、さらなる態様では、本発明は、赤血球を検出する方法における使用のための、および／またはアッセイ（免疫学的アッセイを含む）もしくは（免疫学的）アッセイ系における使用のための、

(i) E n ^a ;

(i i) G e : 2 ;

(i i i) G e : 3 ;

(i v) G P A ;

(v) G P B ;

(v i) H ;

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子を提供する。

【0009】

本発明はさらに、赤血球を検出する方法における、および／またはアッセイ（免疫学的アッセイを含む）もしくは（免疫学的）アッセイ系における使用のための、

(i) E n ^a ;

(i i) G e : 2 ;

(i i i) G e : 3 ;

(i v) G P A ;

(v) G P B ;

(v i) H ;

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r ^b

からなる群から選択される1つまたは複数の抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子の使用を提供する。

【0010】

本発明は、G P A および G P B 抗原の両方に結合することができる結合因子を活用し得るということに留意されたい。

【0011】

例えば、

(i) E n ^a ;

10

20

30

40

50

(i i) G e : 2 ;
 (i i i) G e : 3 ;
 (i v) G P A ;
 (v) G P B ;
 (v i) H ;
 (v i i) R h 2 9 ; および
 (v i i i) W r ^b

からなる群から選択される 1 つまたは複数の抗原に結合することができる 1 つまたは複数の結合因子は、

アッセイ（例えば、免疫学的アッセイ）または（免疫学的）アッセイ系への赤血球の添加を確認するための対照試験または方法において適用し得る。 10

便宜上、(i) ~ (v i i i) として上記で列挙した赤血球抗原は、以降「抗原 (i) ~ (v i i i) 」と呼ぶものとする。

【 0 0 1 2 】

本発明の方法における使用のためのサンプルは、赤血球抗原に結合することができる 1 つまたは複数の因子と、サンプル中に存在する結合因子と任意の赤血球との間の結合を可能にする条件下で接触させることができる。このような条件は、所定のインキュベーション時間（例えば、1 秒 ~ 約 1 時間、例えば、約 1 分、1 0 分、1 5 分、2 0 分または 3 0 分）および／または所定のインキュベーション温度（例えば、3 0 ~ 4 0 °C、例えば、約 3 5 °C、3 6 °C または約 3 7 °C）などの 1 つまたは複数の所定のパラメーターを含んでもよい。 20

【 0 0 1 3 】

赤血球（エリスロサイト）は、多数の抗原を発現し、その一部は、赤血球を検出するための方法で活用され得る。しかし、赤血球抗原プロファイルは、遺伝的背景によって変化し、1 つの集団または地理的場所に由来する赤血球は、世界の他の集団または異なる地域由来の赤血球のものとは異なる抗原プロファイルを発現し得る。異なる抗原プロファイルを有する赤血球は、「赤血球型」と呼ばれることもある。ヒトでは、世界中に多くの異なる赤血球の型がある。

【 0 0 1 4 】

大部分の赤血球上に存在することが既知のいくつかの「高頻度抗原」がある。しかし、これらの抗原はほとんどの赤血球上に存在するが、それらは、全て（または 1 0 0 %）の赤血球に存在するわけではない。したがって、単一の高頻度赤血球抗原に結合することができる単一の抗原を用いて、有意なパーセンテージの赤血球型を検出することも可能であり得るが、この種の方法は、結合因子が特異的である抗原を欠いている赤血球を検出することはできないであろう。結合因子が、赤血球型の 9 9 . 9 % によって発現される抗原に特異的である場合でさえ、この方法は、1 , 0 0 0 個のサンプルのうち 1 個では失敗するであろう。 30

したがって、親和性（または結合能力）高頻度抗原を示す結合因子の使用にのみ基づく方法は、全て、または実質的に全ての赤血球型の検出は達成し得ない。

【 0 0 1 5 】

本発明は、ほとんどの赤血球型に存在する抗原の特定に基づく。これらの抗原に基づく検出方法は、先行技術の方法および／または他の抗原に基づく方法と比較して、より多くのパーセンテージの赤血球型の検出を達成する。 40

本発明に記載の方法の基礎を形成する抗原は、全ての赤血球型のうち約 9 9 % ~ 約 9 9 . 9 % で発現される抗原である。例えば、本発明の方法において活用される抗原は、約 9 9 . 1 %、約 9 9 . 2 %、約 9 9 . 3 %、約 9 9 . 4 %、約 9 9 . 5 %、約 9 9 . 6 %、約 9 9 . 7 % または約 9 9 . 8 % まで発現され得る。

疑いを除くために、本発明によって提供される方法は、抗原 (i) ~ (v i i i) のうちのいずれか 1 つ、および／またはこれに結合することができる任意の因子を活用し得る。さらに、本発明は、抗原および／またはこの抗原に結合することができる因子の組合せ 50

(例えば、2つ以上、おそらく、例えば、3、4、5、6、7または8つ全て)を活用する方法に関し得る。

【0016】

「サンプル」という用語は、赤血球を含む任意のサンプルであり得る。例えば、サンプルは、全血のサンプルであっても、またはそれから調製された成体、胎児、新生児および／もしくは出生前の血漿、血清もしくは赤血球のサンプルであってもよい。「サンプル」とは、赤血球を含むか、潜在的に含むか、または含むと疑われる任意の体積または量の液体または物質であってもよい。このサンプルは、生物学および／または非生物学的な、天然または由来であってもよい。例えば、「サンプル」は、任意の生物学的物質または液体を含んでもよく、かつこの用語は、唾液、汗、精液、糞便、組織分泌物、剥離物、生検などのサンプルを含んでもよい。非生物学的サンプルは、例えば、土壌、水などのサンプルを含んでもよい。「サンプル」は、法医学的サンプルであってもよい。

さらに、本発明は主にヒト赤血球の特定に関連する。しかし、当業者は、赤血球の他の(動物)供給源は、赤血球が抗原(i)～(v i i i)のうちの1つまたは複数を発現する場合、本発明から利益を得る場合があるということを理解する。

本発明は、アッセイの対照試験を提供し得る。例えば、本発明は、あるアッセイまたは他のシステムへの赤血球の添加または適用を確認するための対照として用いられ得る技術を提供する。本発明はまた、陰性対照試験(それによって、サンプル中に赤血球がないことを確認する)でも活用され得る。

【0017】

免疫学的アッセイを含む多くのアッセイが、赤血球のサンプルの添加を必要とする。例えば、交差適合アッセイまたは血液型判定アッセイは全てが、赤血球の添加を必要とし得る。この種のアッセイでは、赤血球の予測される(または必要な)添加が行われていることを示す試験を含むことが望ましい。これは、体積が小さく、かつ特定の成分および／または試薬の添加が単純な視覚的確認では容易に決定できないマイクロアレイ型のアッセイには特に重要である。アッセイのサンプル、試薬および／または成分の添加を確認するように機能する任意の試験は、「陽性対照」と呼んでもよい。赤血球の添加を要するアッセイの場合、赤血球の添加を確認するために、陽性対照を用いてもよい。陽性対照試験の結果、赤血球の添加が確認されない場合、このアッセイは、繰り返される必要があり、および／または全体的な結果が無効にされるべきである。

【0018】

したがって、本発明は、

(i) E n^a ;

(i i) G e : 2 ;

(i i i) G e : 3 ;

(i v) G P A ;

(v) G P B ;

(v i) H ;

(v i i) R h 2 9 ; および

(v i i i) W r^b

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子を含む、アッセイのための対照試験を提供する。

上記の種類(および赤血球抗原(i)～(v i i i)のうちの1つまたは複数の結合因子に基づく)対照試験は、プロセス、デバイス、装置、アッセイおよび／またはアッセイ系への赤血球の添加を確認するための陽性対照試験として使用されてもよい。

【0019】

本発明の種々の試験、方法、アッセイおよび生成物は、本明細書に記載される結合因子のうちの1つまたは複数の特定の選択を活用し得る。例えば、本発明は、

(i) H ;

(i i) G P A ; および

(i i i) R h 2 9

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子を活用するか、または含むか、それからなるか、またはそれらから本質的になる、試験、方法、アッセイおよび生成物に関連し得る。

例えば、本発明の種々の態様および実施形態は、抗H結合因子、抗グリコフォリンA、B結合因子および／または抗Rh29結合因子を活用し得る。他のいずれかに述べるとおり、結合因子は、(ポリクローナルおよび／またはモノクローナル)抗体またはその抗原結合フラグメントであってもよい。

【0020】

供給源または赤血球型にかかわらず、本発明の対照試験は、あるプロセス、デバイス、装置、アッセイおよび／またはアッセイ系への赤血球の添加を、使用者に対してさらに確実に報告し得る。理論によって束縛されることは望まないが、本発明の利点は、本発明の基礎をなす抗原が、ほとんどの赤血球型によって発現されるという事実から生じ得る。本発明の対照試験の改善された信頼性は、本発明において活用されるものとは異なる抗原についての特異性を示す結合因子に基づいて、先行技術の対照試験および／または対照試験に対して評価され得る。したがって、本発明の対照試験は、他の結合因子ベースの対照試験を上回る改善を示し得る。

【0021】

本発明における使用のための結合因子は、赤血球抗原についての特異性を呈する。赤血球抗原に特異的である結合因子は、1つまたは複数の赤血球抗原に結合する能力を示す。典型的に、単一の結合因子は、単一の赤血球抗原に結合することができる。したがって、本発明の方法は、赤血球の信頼性のある検出(または捕捉)を達成するための1つまたは複数の結合因子であって、各々の結合因子が、赤血球抗原(i)～(viii)のうちの1つに特異的である結合因子を使用することもできる。

本発明における使用のための結合因子は、赤血球抗原(その抗原は、大部分の赤血球に共通の要因であり得る)に結合する特異性、親和性および／または能力を示す、抗体またはその抗原結合フラグメントであってもよい。それに加えて、またはその代わりに、その結合因子は、他の特異的に反応性の結合因子を含んでもよく、例えば、赤血球抗原に結合することができる、アプタマー、低分子抗体模倣物、核酸リガンド、または他の細胞由来の受容体などを使用することもできる。例えば、レクチンを使用することもできる。簡単にするために、本明細書において以降、結合因子および「抗体」と述べるが、これは、限定と解釈されるべきではない。

【0022】

結合因子は、ポリクローナル抗体および／またはモノクローナル抗体を含んでもよい。ポリクローナル抗体とは、ある抗原、またはその抗原性／機能性誘導体で免疫された動物／ヒトの血清由来の抗体分子の異種集団である。ポリクローナル抗体の生成のために、宿主動物、例えば、ウサギ、ヒツジ、ブタなどを、特定の抗原を注射することによって免疫してもよい。この注射はさらに、アジュバントを含む(またはアジュバントが補充される)。

特定の抗原に対する抗体の同種集団であるモノクローナル抗体は、培養物中の連続細胞株によって抗体分子の生成を提供する任意の技術によって得ることができる。これらとしては、限定するものではないが、Kohler and Milstein (1975), Nature 256:495-497、および米国特許第4,376,110号)のハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72、Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030)、ならびにEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, Monoclonal Anti-bodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)が挙げられる。

【0023】

本発明における使用のためのモノクローナル抗体は、任意の免疫グロブリン分類、例と

10

20

30

40

50

しては、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらの任意のサブクラスであってもよい。本発明のmAbを生成するハイブリドーマ細胞は、インビトロで培養されても、インビボで培養されてもよい。インビボにおける高濃度のmAbの生成によって、これは現在好ましい生成方法となる。

本発明における結合因子として、キメラの一本鎖ヒト化抗体を使用することもできる。キメラ抗体の産生のための技術（Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855、Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608、Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454、米国特許第4, 816, 567号）は、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子に由来する遺伝子をスプライシングすることを含み、一緒に、適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子に由来する遺伝子が用いられ得る。キメラ抗体とは、マウスmAb由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

【0024】

一本鎖抗体の生成について記載される技術は、米国特許第4, 946, 778号：Bird, 1988, Science 242:423-426、Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883、およびWard et al., 1989, Nature 334:544-546に見出され得る。ヒト化モノクローナル抗体を作製するための技術は、米国特許第5, 225, 539号（参照により本明細書にその全体が援用される）に記載される。

【0025】

本発明における使用のための抗体フラグメント（このフラグメントは、エピトープに結合する能力を示す）は、公知の技術によって生成され得る。例えば、このようなフラグメントは、限定するものではないが、抗体分子のペプシン消化によって生成され得るF(a b')₂フラグメント、およびF(a b')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFabフラグメントを含む。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して（Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281）、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な特定を可能にしてもよい。

本発明はさらに、本発明に記載される赤血球抗原、具体的には、抗原(i)～(viii)のうちの1つまたは複数に結合する能力を有するアプタマー（低分子、例えば、オリゴヌクレオチド／ペプチド分子）を活用してもよい。

【0026】

本発明における使用に適切な全ての形態の抗体、例としては、上記の抗体、およびその抗原結合フラグメントは、総称して「抗体」と呼ぶものとする。

本発明における使用のための結合因子は、任意の適切な基板上に固定、結合、または吸着していてもよい。結合因子は、基板の全てまたは一部に固定、結合、または吸着していてもよい。例えば、結合因子は、基板上の1つまたは複数の別個の所定の位置に固定、結合、または吸着していてもよい。例えば、結合因子は、複数／一連の別のおよび／または別個のスポットとして固定されていてもよい。例えば、この結合因子は、アレイ、例えば、マイクロアレイとして基板上に固定、結合、および／または吸着していてもよい。当業者は、アレイまたはマイクロアレイが、固定、結合、および／または吸着している結合因子の複数の別個のスポットを含んでもよいことを理解する。

【0027】

固定された結合因子の各々の「スポット」は、同じ結合因子を含んでも、または異なる結合因子を含んでもよい。例えば、任意の所定のスポットは、単一の種類の結合因子（例えば、単一の赤血球抗原に結合することができる結合因子）を含んでもよい。あるいは、任意の所定のスポットは、2つ以上の結合因子を含んでもよく、この各々の結合因子が、特定の赤血球抗原に結合することができる。

本発明の方法は、固定された結合因子の選択、例えば、固定された抗体の選択を活用し得、結合因子および／または抗体が、抗原(i)～(viii)のうちの1つまたは複数に結合する特異性および／または能力を示す。

この結合因子は、任意の従来基板に固定、結合、または吸着していてもよい（この「

10

20

30

40

50

固定されている」という用語は、「結合」および／または「吸着」している結合因子を包含し得ることに留意されたい）。使用のための結合因子または抗体は、既存のアッセイ系（例えば、交差適合性または血液型判定のアッセイ系）の基板に固定されていてもよい。

結合因子または抗体が固定され得る基板としては、例えば、天然に剛体または半剛体である基板が挙げられる。例えば、適切な基板としては、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハー、ファイバー、磁性または非磁性のビーズ、ゲル、配管、プレート、ポリマー、微小粒子、および／または毛細管が挙げられる。この基板は、結合因子および／または抗体が固定／結合される、種々の表面の形態、例えば、ウェル、トレンチ、ピン、チャネルおよび細孔を有してもよい。下にさらに詳細に記載されるとおり、基板表面の構造は、蛍光ベースの検出方法を改善するかまたは容易にするために形成されて適合され得る。この種の基板は、W O O 2 / 0 5 9 5 8 3 および W O O 3 / 0 2 3 3 7 7 に記載される。したがって、使用のための基板は、光学的に透明であってもよい。

【0028】

本発明における使用のための結合因子および／または抗体は、基板上にまたは基板に対して固定されてもよく、この基板は、例えば、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、金属および金属酸化物を含み、これらは、むき出しであるか、または例えば、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、ポリー１ーリジン、アミノプロピルシラン、カルボキシシラン、ヒドロゲルおよびポリマーブラシ、例えば、官能化されたアルキルチオール自己組織化単分子層などの官能的なポリマーで（少なくとも部分的に）官能化されている。使用のための基板は、シラン系のコーティング、例えば、疎水性連結、および目的の生物学的分子に結合する能力を有する官能基を有するシラン化合物を含んでもよい。

【0029】

上記のとおり、本発明における使用のための結合因子および／または抗体は、アレイ中の基板に対して結合または固定されていてもよい。本明細書において用いる場合、「アレイ」という用語は、ガラスのような基板上に固定、結合、または吸着しているプローブ（例えば、結合因子および／または抗体）の一般的に順序付けされた配置を指す。

典型的に、このアレイは、結合因子または抗体が結合している、一連の規則的に間隔の空いた区切られた、別のおよび／または別個の領域の形態にあってもよい。基板結合抗体アレイは一般に「抗体チップ」と記載される。

【0030】

この抗体は、本明細書において「チップ」と呼ばれる、例えば、平坦または球状の基板上に配置されてもよい。本発明の方法は、単一の種類の結合因子、または抗体、または複数の異なる抗体を活用し得る。したがって、少なくとも１つであるが、おそらく少なくとも２、３または４つの異なる抗体を、基板の表面上に結合していてもよい。さらに、各々の特定の抗体は、何回か希釈して提供されてもよく、および／または何回か（例えば、３～１０回）繰り返されてもよい。

本発明における使用のための「抗体チップ」を調製するために用いられる基板は、小型の平坦な基板を含んでもよい。適切な平面の基板は、任意の適切なサイズであってもよい。例えば、本発明における使用のための平面の基板は、長さが約５mm～約１００mm、および幅が約５mm～約５０mmのいずれであってもよい。例えば、適切な平面の基板は、約７６mm×約２６mmまたは約１２．５mm×約７．９mmの大きさであってもよい。

【0031】

結合因子または抗体は、スポッティングまたはプリンティングによって基板上に適用されてもよい。適切な公知の技術としては、Michael J. Heller, Annual Review of Biomedical Engineering, 2002 Vol. 4: 129-153に記載の技術が挙げられる。DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications and Angenendt, P; Glokler, J.; Murphy, D.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Anal. Biochem., 2002, 309, 252-260 Angend, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Chromatogr. A, 2003 100, 997-104.

10

20

30

40

50

結合因子／抗体のスポットまたはプリントされたスポットは、直径が1 mm未満、例えば、直径が500 μmもしくは100 μm未満、または直径が約50 μm～約1000 μmであってもよい。この方式では、10秒～1000秒の個々のおよび別個の結合因子／抗体スポットが、任意の所定の基板の表面上に提供され得る。

疑いを避けるために、本発明の基板上の任意の1つの位置またはスポット／プリントされたスポットは、単一の結合因子／抗体型を含んでもよく、または2つ以上の結合因子／抗体の種類を含んでもよい。

【0032】

本明細書に記載される種々の方法、試験、アッセイおよび／または生成物の各々の結合因子は、単一または複数の異なる濃度で提供されてもよい。例えば、マイクロアレイの試験またはアッセイの場合、各々の位置またはスポット／プリントされたスポットは、1つまたは複数の結合因子を、1つまたは複数の量もしくは濃度で、またはその中で含んでもよい。例えば、マイクロアレイ上の任意の所定のスポットまたは位置は、結合因子を特定の濃度でまたはその中で含んでもよい。同じアレイ上の別のスポットもしくは位置は、同じ結合因子を同じ量もしくは異なる濃度でまたはその中で含んでもよい。任意の所定のスポットは、2つ以上の結合因子を含んでもよく、この各々の結合因子は、同じ量もしくは異なる濃度でまたはその中で、あるいは異なる量もしくは濃度でまたはその中で、提供する。

【0033】

述べたとおり、本発明における使用のための結合因子は、基板上にプリントされてもよい。種々の結合因子が、必要な濃度でプリントされてもよい。例えば、H抗原（例えば、抗H抗体）に特異的な結合因子は、約1～20 μg/mL（またはその間のほぼ任意の特異的な量）、約5～15 μg/mLまたは約6、7、8、9、10、11、12、13もしくは14 μg/mLでプリントされてもよい。

グリコフォリンA、B（例えば、抗-GPA/GPB抗体）に特異的な結合因子は、約1～50 μg/mL（またはその間のほぼ任意の特異的な量）、約10～40 μg/mL、約20～40 μg/mLまたは約25～35 μg/mLの濃度でプリントされてもよい。

Rh29に特異的な結合因子（例えば、抗Rh29抗体）は、約1～100 μg/mL（またはその間のほぼ任意の特異的な量）、約10～90 μg/mL、約20～80 μg/mL、約30～60 μg/mLの濃度でプリントされてもよい。例えば、抗Rh29結合因子（抗体）は、約50、51、52、53、54または55 μg/mLの濃度でプリントされてもよい。

【0034】

さらに、他のアレイおよび／またはマイクロアレイを含む、他のアッセイ系は、上記の1つまたは複数の結合因子（これは、各々が、赤血球抗原（i）～（viii）のうちの1つまたは複数に特異的である）で補充されてもよいことが理解されるべきである。例えば、アレイおよびマイクロアレイを含む、アッセイまたはアッセイ系は、本発明の1つまたは複数の結合因子をそれ自体が含む対照試験を含んでもよい。

基板の表面に対する、本明細書に記載の種類の結合因子および／または抗体を固定するためには、種々の手順が当該分野で周知である。例えば、抗体を固定するために、静電結合が用いられてもよい。表面に結合因子または抗体を固定または結合するために用いられ得る他の方法としては、疎水性／親水性の相互作用、化学的相互作用、およびアミンカップリングが挙げられる。結合因子および抗体は、硫黄含有アミノ酸（システイン、メチオニン）を介して、または金含有基板上に以前に結合された結合因子と相互作用する官能基を含むアルカンチオールを介する結合を通じて、金含有基板上に直接吸着されてもよい。

【0035】

結合因子を提供されず、かつ非特異的な結合部位を提供し得る基板表面の領域は、サンプル中に存在する赤血球以外の成分の任意の非特異的な結合を防ぐために、ブロッキング剤で処理することが望ましい。例えば、抗体、タンパク質、ペプチド、補体因子などは、

基板のブロックされていない領域に全てが非特異的に結合することができる。適切なブロッキング剤は、当該分野で周知であり、これは、アルブミンまたは血清（望ましくない抗体、例えば、血液型の抗体、抗 I g G 抗体または任意の試験プローブ相互作用を邪魔し得る抗体を含まない）、脱脂乳タンパク質、カゼイン、ウシ血清アルブミン（BSA）などを含んでもよい。ブロッキング剤は、適切な緩衝液との使用のために処方されても、または調製されてもよい。

例えば、適切なブロッキング剤は、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（0.15 M の塩化ナトリウム、2.632 M のリン酸緩衝液ストック溶液（Quotient, Scotland）、pH 7.0）中に、1（w/v）% のウシ血清アルブミン（BSA）（PPA, Austria）を含んでもよい。

使用のために調製されたコーティングされた基板は、乾燥された基板として保管されてもよい。それに加えて、またはその代わりに、その基板は、環境温度で、または冷蔵／冷凍条件下で保管されてもよい。

【0036】

本発明の方法は、マイクロアレイフォーマットで行ってもよい。さらに、本発明によって提供される1つまたは複数の結合因子は、例えば、対照試験の一部としてマイクロアレイシステムに組み込まれてもよい。マイクロアレイフォーマットで本発明の方法を提供する能力は、マイクロアレイ型のアッセイが、従来の大きいフォーマットのアッセイに対して効率的かつ効果的な代用法であるおかげで有利である。本発明のマイクロアレイ法／アッセイは、血液処理に重要な他の試験（例えば、他のマイクロアレイ試験）（例えば、赤血球の表面上の多数の抗原について血液型表現型判定試験を含む）に容易に組み込まれ得る。

【0037】

当業者は、赤血球の添加を要するマイクロアレイアッセイが、赤血球の添加を確認する標準的な対照試験を活用し得ないことを理解する。マイクロアレイアッセイに添加されたサンプルおよび他の成分の体積／量は小さく、かつ赤血球の添加を確認するための視覚手段を用いることは困難であるか、および／または不可能である。抗体のような結合因子を活用することによって、本明細書に記載される方法は、赤血球を検出するか、および／またはマイクロアレイ型のアッセイにおいて赤血球の添加を確認する、有効、迅速かつ鋭敏な手段である。

本発明の（固定された）結合因子または抗体に結合した赤血球の存在は、蛍光、化学発光複合体化抗体を活用し得る、例えば、二次標識検出のような、当該分野で公知の種々の技術によって検出され得る。

【0038】

蛍光は、当該分野で公知の任意の適切な光検出器、例えば、分光光度計またはデジタル画像化デバイス、例えば、CCD画像センサー（CCDカメラの形態で）またはCMOSセンサーなどによって検出され得る。便宜上、解釈のための視覚的アウトプット、または解釈およびデータ処理の目的のための数値を考慮すると、スキャナーによって検出される赤血球（エリスロサイト）結合およびその強度を用いる単純なフラットベッドスキャナーを用いてもよい。

好都合なことに、結合した赤血球は、C J Campbell et al., 2006に記載されるようにRBCの自己蛍光によって検出され得る。自己蛍光による検出は、なんらかの標識の使用の必要性を回避し、かつ特に簡易型の処理を提供するという特別な利点を有する。より詳細には、RBCは、約420 nm、488 nm、543 nmまたは580 nmの波長の光を照射されるか、またはその光で励起されてもよく、そして蛍光発光は、488 nmで励起される場合、530 nm、または543 nmで励起される場合、570～585 nmなどのより長い波長で検出される。

【0039】

したがって、この方法では、結合された赤血球（エリスロサイト）は、蛍光シグナルによって検出しても、または例えば、フラットベッドスキャナーを用いて、スキャン後の画

10

20

30

40

50

像生成によって検出してもよい。

基板上の本発明の結合因子／抗体の各々の位置／場所を知ることによって、（a）赤血球がサンプル中に存在するか否かを決定するか、または（b）アッセイもしくはアッセイ系への赤血球の添加を確認することが可能であることが理解される。

当業者は、適切な電子機器およびソフトウェアを用いて、任意のデバイスが、基板の表面上に、またはそれに固定された特定のスポット、結合因子および／または抗体の同一性および位置を知り、かつこれを生じたシグナルと相関させるようにプログラムされ、その結果、特定の結合が、試験者に決定されて特定され得ることを理解する。さらに、基板上に提供された結合因子／抗体の種々の反復および／または希釈からの結果を組み合わせ、編成するように統計学的なソフトウェアが含まれてもよい。この方式では、特定の抗体スポットの多様性から得られるシグナルが、一緒に織り込まれて、統計学的に有意な結果が、試験者に示され得る。

10

【0040】

さらなる態様では、本発明は、

（i）En^a；

（ii）Ge：2；

（iii）Ge：3；

（iv）GPA；

（v）GPB；

（vi）H；

（vii）Rh29；および

（viii）Wr^b

20

からなる群から選択される1つまたは複数の赤血球抗原に結合することができる1つまたは複数の結合因子が固定されている基板を含む、アッセイまたはデバイスを提供する。

【0041】

本発明は、血液サンプルを交差適合する方法であって、本明細書に記載の対照試験を含む方法を提供する。述べたとおり、交差適合アッセイにおける使用に適切な対照試験は、本明細書に記載される結合因子であって、赤血球抗原（i）～（viii）のうちの1つまたは複数に特異的である結合因子のうちの1つまたは複数を含んでもよい。

30

血液サンプルを交差適合させる方法は、

第1の血液サンプル由来の血漿または血清を用意する工程と；

血漿サンプルと、第2の血液サンプル由来の赤血球とを接触させて、血漿／赤血球混合物を得る工程と；

血漿／赤血球混合物を、赤血球の感作を可能にする条件下でインキュベートする工程と；

赤血球を液相から分離する工程と；

赤血球と、抗体に結合することができる因子とを接触させる工程とを含んでもよく、

液相からの赤血球の分離が、遠心分離なしで生じ、かつ抗体に結合することができる因子に結合した感作された赤血球の検出は、ドナーの血液が、意図したレシピエントの血液と不適合であることを示す。

40

【0042】

この種の方法では、本明細書に記載されるこの種の対照試験を用いて、この方法の各段階への赤血球の添加を決定、確認またはモニターしてもよい。例えば、本発明の対照試験は、（i）血漿サンプルへの赤血球の添加、および／または（ii）抗体に結合することができる因子への赤血球の添加を確認するために用いてもよい。例えば、分離された赤血球のサンプルが抗体に結合することができる因子に添加されるので、分離された赤血球のさらなるサンプルが、1つまたは複数の抗原（i）～（viii）に結合することができる1つまたは複数の結合因子に（同時にまたは一緒に）添加されてもよい。

【0043】

50

交差適合性アッセイは、抗体（例えば、抗ヒト免疫グロブリン抗体のスポット）に結合することができる因子のスポットが、固定されている（おそらく、マイクロアレイの形態で）基板を活用し得る。この基板はさらに、本発明によって提供される1つまたは複数の抗原に対して特異性を有する結合因子または抗体を含む1つまたは複数の（追加の）スポットを含んでもよい。これらの追加の「スポット」は、対照試験の基礎を構成し得、この対照試験を用いて、基板に対する赤血球（そのうちのある程度は、以前のインキュベーション工程を通じて感作されていてもよい）の添加を確認し得る。

【0044】

したがって、本発明は、血液交差適合性アッセイにおける使用のための基板であって、抗体に結合することができる1つまたは複数の結合因子と、赤血球抗原(i)～(v i i i)のうちの1つまたは複数に結合することができる1つまたは複数の結合因子とが固定されている基板を提供する。この基板は、本明細書に記載の任意の基板であってもよく、種々の結合因子は、利用可能な任意の標準的な技術（上記の技術を含む）によって、またはそれを用いてそれに固定されてもよい。その結合因子は、アレイまたはマイクロアレイとして別個の、予め決定された領域の位置またはスポットに固定されてもよい。各々の位置またはスポットは、一種の結合因子（例えば、単一の抗原または抗体に対する特異性を有する結合因子）を含んでもよく、または多数の異なる種類の結合因子（1つまたは複数の抗原または抗体について集団的に特異性を有する）を含んでもよい。さらに、各々のスポットは単に、抗体に結合することができる結合因子（交差適合における使用のため）を含んでもよく、または赤血球抗原（例えば、抗原(i)～(v i i i)：対照試験としての使用のため）に結合することができる結合因子を含んでもよい。

本発明の対照試験で補充され得る例示的な交差適合性アッセイは、2014年7月2日出願の英国特許第1402174、5号および2015年2月6日出願のPCT/GB2015/050338に特定されている。便宜上、これらの出願の全内容は、「交差適合性方法」の見出しで下に再掲している。

詳細な説明

本発明はここで、以下の図面を参照して詳細に記載している。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】単一のアレイ（6×6グリッドのスポット）の図表示であって、プリントされた3つの抗体を示している。抗Hは、11 μg/mLで、抗グリコフォリンA、Bは、35 μg/mLで、および抗Rh29は、54 μg/mLでプリントした。16のアレイを、各々のスライド上に2×8のフォーマットでプリントした。黒いスポットは、陽性の細胞結合応答を示しており、かつ白のスポットは、どの細胞にも結合すべきでない陰性のスポットとしてプリントされた50%グリセロール/PBSを示している。

【図2】試験した合計56のサンプルの割合を示す、16のサンプルについての抗H、抗グリコフォリンA、Bおよび抗Rh29からの応答のマイクロアレイ画像化。

【図3】単一のアレイ（12×12グリッドのスポット）の図表示であって、プリントされた抗体を示す。16のアレイを、2×8のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、（三連で）プリントされた抗体を示し、白いスポットは、陰性スポットとしてプリントされた50%グリセロール/PBSを示す。

【図4】単一のアレイ（12×12グリッドのスポット）の図表示であって、プリントされた2つの抗体を示す。α-hIgMは、518 μg/mLでプリントし、α-hIgGは、301 μg/mLでプリントした。16のアレイを、2×8のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、陽性細胞結合反応を示し、白いスポットは、どの細胞にも結合しないはずである、陰性スポットとしてプリントされた50%グリセロール/PBSを示す。

【図5】スライドCM50、CM51およびCM52の画像であって、それぞれ、試験管、ガラススライドまたはプレート技術を用いて、30分間、抗D血漿で感作されたOr r、OR₁ r、OR₁ R₁およびOR₂ R₂細胞についての結果を示している。陽性対照細胞に

ついでの結果もまた示される (Z 4 4 1, I g G S e n s i t i s e d C e l l s)。

【図 6】スライド C M 6 0 および C M 6 1 の画像であって、それぞれ、試験管またはガラススライド技術を用いて、30 分間、抗 D 血漿で感作された O R₁ r、O R₁ R₁、O R₂ R₂ および O r r 細胞についての結果を示している。陽性対照細胞についての結果 (Z 4 4 1, I g G S e n s i t i s e d C e l l s) および A H G (A H G 結果 = 基準技術) を用いる間接的な凝集試験からの凝集の等級付けの結果もまた示される。

【図 7】図 6 に示される画像から生成したデータであって、アレイ中でプリントされた α h I g G に対して試験された細胞についての中央シグナル強度を示している。試験管またはガラススライド技術の結果を、プロットされた中央シグナル強度の標準偏差とともに示す。

10

【図 8 a】スライド C M 6 2 および C M 6 3 の画像であって、それぞれ、試験管またはガラススライド技術を用いて、A₁ または B 細胞で試験した抗 A および抗 B 血漿についての結果を示している。試験管中で A H G を用いる間接的試験の結果もまた示され、図の左側の下には凝集の等級付け結果を伴う。この試験は、手動で行われ、したがって、ある程度の混乱が生じる場合があり、これは、自動化された方法を使用した場合には、減るか／排除される。

【図 8 b】スライド C M 6 2 および C M 6 3 の画像であって、それぞれ、試験管またはガラススライド技術を用いて、A₁ または B 細胞で試験した抗 A および抗 B 血漿についての結果を示している。試験管中で A H G を用いる間接的試験の結果もまた示され、図の左側の下には凝集の等級付け結果を伴う。この試験は、手動で行われ、したがって、ある程度の混乱が生じる場合があり、これは、自動化された方法を使用した場合には、減るか／排除される。

20

【図 9】単一のアレイの図表示であって、プリントされた抗体を示す。抗ヒト I g M は、518 μ g/mL でプリントし、 α -h I g G は、301 μ g/mL でプリントした。16 のアレイを、2 × 8 のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、陽性細胞結合反応を示し、白いスポットは、どの細胞にも結合しないはずである、陰性スポットとしてプリントされた 50% グリセロール / P B S を示す。

【図 10】スライド 1 および 2 の画像であって、試験管またはガラススライド技術を用いて、30 分間、モノクローナル抗 F y^a 血漿で感作された F y (a + b +)、F y (a + b -) および F y (a - b +) 細胞の結果を示す。陽性対照細胞についての結果もまた示される (I g G S e n s i t i s e d C e l l s, Z 4 4 1)。

30

【図 11】図 11 に示される画像から作成したデータであって、スライド上で試験した陽性対照の細胞 (Z 4 4 1) について、中央シグナル強度に対して正規化したシグナル応答を示す。試験管およびスライド技術についての結果は、別のスライド上で行ったので、これによって、異なるスライド上でのアレイにわたるシグナルのいずれの相違も説明される。試験管またはガラススライド技術の結果を示す。I g G 感作細胞 (Z 4 4 1) によって、対照のシグナルが示される。モノクローナル抗 F y^a を用いる場合、良好な結合が両方の技術によって示される。F y (a - b +) 細胞によって、予想どおり、低い反応性または陰性の反応性が示される。この方法で、本発明者らは、抗 F y^a を含むサンプルが F y (a +) 細胞と不適合性であり、F y (a -) 陰性であることが判明し、これによって交差適合の原理が示される。

40

【発明を実施するための形態】

【0046】

高頻度抗原－赤血球添加対照における使用のため
確率計算

強調された (太字／下線) の抗原は、本明細書に記載される方法 (対照試験を含む) における使用のための、結合因子／抗体のための例示的な標的に相当する。それにもかかわらず、下で特定される任意の抗原は、有用な結合因子／抗体のための可能性のある標的に相当することが理解されるべきである。

50

計算のためのシナリオの要約

- ・理想的には、結合因子／抗体は、異なる血液型系から選択される
- ・7つの抗体特異性が特定されているが、ただし6つの血液型系からである
- ・抗体の能力に100%の信頼と仮定すること
- ・計算の前提：各々の抗体（6つの血液型に由来する）は、ヒト集団の全体にわたって

独立して分布すると仮定される。実際、これは、例えば、抗体が連鎖不均衡にある場合は、当てはまらない場合がある（これらをコードする遺伝子は染色体的に近い）。

・独立性の仮定が受け入れられる場合、完全に陰性のサンプル、すなわち、研究中の個体が、挙げられた抗原のいずれも有さない場合の頻度を算出するための式は単に、独立してそれらの各々を保持しないことについてその個体の機会の積である。したがって：その個体が、シナリオ1にあるように抗原1および抗原2を有さない場合、このような遺伝子構造の頻度は全体的な集団では、 $(1 \sim 99.9\%) * (1 \sim 99.9\%) = 0.001 * 0.001 = 100$ 万に1である。同様に、シナリオ2に関しては、これは、 $(1 \sim 99.9\%) * (1 \sim 99.9\%) * (1 \sim 99.9\%) = 10$ 億に1、などなどである。以下の表には、数値（この数値は、パネルの5および／または6の抗体に関してはほぼ正確である）をまとめてある。

【0047】

【表 1】

抗体の 組合せ	ブレンド中の抗体の数						陰性サンプルの頻度: (省略形)	陰性サンプルの頻度
	1	2	3	4	5	6		
シナリオ 1	99.9%	99.9%	-	-	-	-	1,000,000 に 1	1e+06 に 1
シナリオ 2	99.9%	99.9%	99.9%	-	-	-	1,000,000,000 に 1	1e+09 に 1
シナリオ 3	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	-	-	1,000,000,000,000 に 1	1e+12 に 1
シナリオ 4	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	-	999,999,999,999,996 に 1	9999999999999996 に 1
シナリオ 5	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	999,999,999,999,994,752 に 1	9999999999999994752 に 1
シナリオ 6	99.0%	99.9%	-	-	-	-	100,000 に 1	1e+05 に 1
シナリオ 7	99.0%	99.9%	99.9%	-	-	-	100,000,000 に 1	1e+08 に 1
シナリオ 8	99.0%	99.9%	99.9%	99.9%	-	-	100,000,000,000 に 1	1e+11 に 1
シナリオ 9	99.0%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	-	100,000,000,000,000 に 1	1e+14 に 1
シナリオ 10	99.0%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	99,999,999,999,999,472 に 1	999999999999999472 に 1

【 0 0 4 8 】

10

20

30

40

【表 2】

抗原	標的/抗原の頻度				頻度についての言及	抗体利用可能性に対するコメント
	‘世界的な’ 頻度%	特異的な頻度の 特徴	計算に用い る頻度% (陽性)	抗原陰性 ドナーの数 100あたり		
AnWj	100	3つの陰性が見られ、2例はイヌラエルの女性で、1例は、アラブ-イスラエルの家族	99.9	<1	901 シリーズの高頻度抗原。 Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 684. Blood group antigens & antibodies(2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 12.	不明
At ^a	100	>99% 黒人	99.0	<1	901 シリーズの高頻度抗原。 Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 682.	不明
Cr ^a	100	99% ネイティブ アメリカン	99.0	全集団:なし 黒人<1	‘Other useful facts’. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 699. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 28.	不明

10

20

30

40

50

Di ^b	100	100% 全集団 96% アメリカイ ンディアン 99% ヒスパニッ ク	99.9	<1	Diego. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 390. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas- Francis, C.SBB Books. Page 36.	抗 Band 3 が 利用可能でな い限り。現在 のところ抗 Di ^b の良い供 給源はない。
DISK	100	アイランズで 1 例のみ陰性が 報告された	99.9	<1	Diego. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 414.	不明
Dr ^a	100	ブララ出身のユ ダヤ人および日 本人でのみ陰性 が見出される	100	0	Cromer. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas- Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 534. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas- Francis, C.SBB Books. Page 39.	不明
Emm	N/A (該当せず)	陰性の例は 6 つ だけ発見/既知	99.9	<1	901 シリーズの高頻度抗原. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 683.	不明
En ^a (GPA を欠く)	100	GPA/Ena を 欠いてる RBC は、シアル酸の レベルが低下し ている	99.9	0	MNS. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 109. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas- Francis, C.SBB Books. Page 42.	モノクローサ ルが利用可能

10

20

30

40

50

<u>Es^a</u>	100	ランダム<99% Es(a-) 発端者 3 既知 メキシコ人/南ア メリカ人/黒人 99%	99.0	<1	Cromer. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 535. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 43.	不明
<u>Ge:2</u>	>99.9	全ての Gerbich 陰性の個体から 抗原欠失	99.9	<1	'Other useful facts'. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 699. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 49.	抗 Ge:2 利用 可能
<u>Ge:3</u>	>99.9	N/A(該当せず)	99.9	<1	'Other useful facts'. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 699. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 50.	抗 Ge:3 利用 可能
<u>GPA</u>	En ^a を 参照のこと	En ^a を 参照のこと	En ^a を 参照のこと	En ^a を 参照のこと	MNS. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 109.	抗 GPA モノ クローナル利 用可能
<u>GPB</u>	99	U 陰性と同じ。 白色人種では 99.9、黒人では 99%	99	<1	MNS. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 72.	抗 GPB モノ クローナル利 用可能

10

20

30

40

50

GUT1	100	陰性は 2 例のみ が報告された	99.9	0	Cromer. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 542.	不明
Gy ^a	100	N/A(該当せず)	N/A (該当せず)	0	Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 52.	不明
H	99.9	H 欠損: 1/8000 台湾人、 1/150,000 日本人、 1/10,000 インド、 1/1,000,000 ヨーロッパ人	99.9	<1	Hh. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 497. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 53.	モノクローナル抗体利用可能
hr ^B	98	全集団: R ₂ R ₂ は hr ^B を欠く 黒人: 97%	97.0	2	Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 57.	不明
Hr ^B	99	N/A(該当せず)	99.0	<1	Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 58.	不明
hr ^S	98	全集団: 98% なら R ₂ R ₂ は hr ^S を欠く 黒人: 97%	98.0	2	Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 59.	不明

10

20

30

40

50

Hy	100	>99% 黒人	99.0	0	Dombrock. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 449. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 60.	不明
I	>99 成人	N/A(該当せず)	99.0	<1	I. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 607. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 61.	1 様モノクロール利用可能
IFC (Cr _{null})	>99	N/A(該当せず)	99.0	<1	Cromer. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page xxx. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 63.	不明
In ^b	100%	インド人では 96%(南アジア)	N/A (該当せず)	0	Indian. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 572. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 66.	不明

10

20

30

40

50

Jo ^a	100	>99% 黒人	99.0	0	Dombrock. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 450. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 72.	不明
MAM	N/A (該当せず)	陰性は 4 例のみ が報告	N/A (該当せず)	N/A (該当せず)	901 シリーズの高頻度抗原. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 689.	不明
PEL	N/A (該当せず)	2 家族でのみ PEL 陰性を発見	N/A (該当せず)	N/A (該当せず)	901 シリーズの高頻度抗原. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 688.	不明
<u>Rh29</u>	100	Rh _{null} 表現型は Rh29 に関して 陰性	99.9	0	Rh. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 228.	モノクローナル抗体利用可能
<u>Wr^b</u>	100%	N/A(該当せず)	99.9	<1	Diego. Blood group antigen factsbook (2012). Reid, M.E., Lomas-Francis, C. and Olsson, M. Third Edition. Academic Press. Page 392. Blood group antigens & antibodies (2007). Reid, M.E. and Lomas-Francis, C.SBB Books. Page 144.	モノクローナル抗体利用可能

タンパク質マイクロアレイの調製

Schottから入手したコーティングしたスライドを基板として用いた。スポットする抗体プローブサンプルを、50%のグリセロール/50%のPBS中で調製した。このスライドを、12のサンプルJet spyderを備えるArrayjet Sprint Arrayer (Arrayjet)を用いてプリントした。各々の抗体の複製を、50%のグリセロール/PBSの陰性対照スポットによって隔てられる各々のスライド上にプリントした(図1を参照のこと)。全てのスライドを、40~60%の相対湿度内で、かつ環境温度(20~23℃)でプリントした。プリントしたプローブを、30分間湿潤雰囲気中で固定させた後に、暗所で少なくとも24時間2~8℃のボックスの中に保管した。

10

マイクロアレイアッセイにおける使用のための赤血球の調製

全部で56のEDTAサンプルを、広範な特異性について血清学的な試験管技術によって試験した後に、確証された社内プロトコールにしたがって凍結させた。必要なサンプルを解凍して、試験管技術によって再試験して、サンプルの特異性を確認した。細胞の回収は、各々のサンプルについて赤血球懸濁物の必要な体積を調製するために十分であった。

【0050】

全ての細胞種をPBSに懸濁するか、またはLISS(低イオン強度生理食塩水(low ionic strength saline))中に洗浄した。他の希釈液を用いてもよく、これには、例えば、改変オルシーバー(Alsever)およびそのバリエーションが挙げられる。さらに、細胞は、洗浄しなくてもよい。むしろ小体積の細胞は、直接PBS緩衝液中にドナーサンプル(おそらく遠心分離されている)から取り出してもよい。洗浄を用いる場合、細胞を、Thermo Centra CL2遠心分離を用いて2分間3000rpmで3回遠心分離し、ここでは各回で上清を取り除いて、約4mLのPBSで置き換える。最終の遠心分離後、PBS中で1回洗浄を行った後、その細胞をPBS中で2%HCTに再懸濁した。その細胞をさらに、希釈液中で1%HCTに希釈した。

20

抗原型判定(antigen typing:AT)アッセイのプロトコール

プリントされたアレイスライドを、2~8℃の保管から取り出して、Grace-Bioの16ウェルのマニフォールドにはめ込み、各々のウェルにおけるアレイの中央および直線の両方の配列を確認し、メタルチップを用いて固定して、Proplateトレイ(3つのスライド種類)にはめ込んだ。スライドは、使用の直前まで2~8℃の保管に戻した。ブロッキング溶液(2%のBSA/PBS)を、約37℃まで温めた。スライドを、各々のウェルに160μLのブロッキング溶液を添加することによってブロックし、15分間、Grant Bio PHMPサーモシェーカー(Thermoshaker)で、350rpmで振盪しながら37℃でインキュベートした(プラスチックカバーして)。

30

【0051】

ブロッキング後、その溶液を取り出して、希釈物中の160μLの1%HCT細胞(例2由来)を、各々の適切なウェルの左側にゆっくりピペッティングした。スライドを37℃で15分間(プラスチックカバーして)静置してインキュベートした。インキュベーション後、スライドを含むProplateトレイ全体を、PBSのタブ中に浸漬した。吸引を用いて、ウェル中のPBSおよび任意の他の液を取り出してもよい。

40

スライドを、Grace-Bioマニフォールドから注意深く取り出して、スライドホルダーに移して、新鮮なPBS中に浸した。スライドは、2~8℃で10分間、0.1%グルタルアルデヒド/PBS中に浸漬することによって固定してもよく、またはさらに便宜上、PBSを、吸引によって取り出して、フラットベッドスキャナーを用いて分析を直接行う。この後に、水中で最終洗浄を続け、その後、遠心分離して乾燥させた。スライドは、スキャンするまで、ごみのない暗所に保管した。

【0052】

抗Hは、試験した全てのサンプルに反応することが示された。図2によって、全てのサ

50

ンプルが陽性の反応を示したことが示されるが、A B型の血液サンプル（サンプル23および38）について観察される反応は弱かった。これらの細胞の抗原プロファイルは、おそらくA₁B型であるが、Hが少ないことは、A₁またはB抗原へのH抗原の効率的な変換が生じることに起因する。

【0053】

抗グリコフォリンA、Bに対する反応は、試験した全てのサンプルに陽性であった。

Rh型OR₂R₂（サンプル4および28）を有する細胞について観察された抗Rh29についての反応によって示される反応は、試験した他の全ての細胞種よりも弱い。ブレンド中の、または2つ以上の組合せとしてのこれらの抗体のプリンティングは、全ての抗体が最適濃度で混合された対照試験において適用を見出し得る。これらの3つの別々の抗原プロファイルについて陰性の対照サンプルが珍しいために、この技術を用いる試験はしなかった。

10

【0054】

引用文献

Robb, J.S., Roy, D.J., Ghazal, P., Allan, J. and Petrik, J. (2006). “Development of non-agglutination microarray blood grouping” *Transfusion Medicine*. 16, 119-129.

Campbell, C.J., O'Looney, N., Chong Kwan, M., Robb, J.S., Ross, A.J., Beattie, J.S., Petrik, J. and Ghazal, P. (2006). “Cell Interaction Microarray for Blood Phenotyping” *Analytical Chemistry*. 78, 1930-1938.

20

UK Blood Transfusion Services. (2013). *Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom*. 8th Edition. The Stationary Office, Norwich.

British Committee for Standards in Haematology; Milkins, C., et al. (2013). *Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories*. *Transfusion Medicine* 23, 3-35.

【0055】

交差適合性法

本開示は、抗体（具体的には、血液型抗体）の検出のための新規な方法を提供する。この方法は、ドナー単位（ドナー赤血球（エリスロサイト）を含む）とレシピエントとの間の不適合性を検出するための、輸血前の血液適合性試験に適用してもよい。

30

赤血球は、宿主免疫系に対して、それらの赤血球が、その宿主の赤血球上で見出されない抗原を発現する場合、それらの宿主免疫系に対して「外来」のように見える場合がある。この理由のせいで、血液は、輸血される前に注意深く交差適合されなければならない。例えば、ある程度の赤血球は、A型抗原を発現し、赤血球がA型血液抗原を発現する血液は、血液型「A」と呼ばれる。他の血液型としては「B」（ここでエリスロサイトは、「B」血液型抗原を発現する）、「AB」（ここでエリスロサイトは、AおよびBの両方の血液型抗原を発現する）および「O」（ここでエリスロサイトは、「A」血液型抗原も「B」血液型抗原も発現しない）が挙げられる。下にさらに詳細に説明されるとおり、ドナー赤血球（エリスロサイト）とレシピエントとの間の不適合性は、赤血球上に存在する抗原に結合するレシピエントの血漿中の抗体の存在に依存する。不適合性の試験は、「交差適合性（cross matching）」と呼ばれてもよい。

40

【0056】

完全な交差適合は、血漿中の抗Aまたは抗B抗体の有無に依存するだけでなく、赤血球／エリスロサイト（限定するものではないが、Rh、Kellなどを含む）によって発現される他の抗原について親和性を有する他の抗体にも依存する。

不適合性のドナー血液が輸血される場合、レシピエントの免疫系（特に「外来の」輸血された血液に存在する抗原に親和性を有する循環中の抗体）は、不適合な血液を「攻撃し」、輸血は失敗する場合がある。さらに、ドナー血液の大量破壊は、不適切なおよび／または肥大した免疫応答、ならびに凝固系のカスケードを誘発し得る。不適切な輸血後には、ショック、腎不全および死亡さえ生じ得る。

50

【0057】

レシピエント血漿のサンプルを、赤血球の不適切な供給源とともにインキュベートするとき、「外来の」赤血球抗原に特異性を有する血漿中の抗体は、それらの抗原に結合して、赤血球を「コーティングする」。このプロセスは、感作として知られており、表面抗原に結合した抗体を有する赤血球は、「感作されたエリスロサイト」または「感作された赤血球」と呼ばれる。

抗体（タンパク質）で感作された赤血球（エリスロサイト）は、免疫学的アッセイを履行することが必要な処理工程を持ちこたえ得る。実際、免疫学的アッセイおよび他の処理手順に供された、感作された赤血球（エリスロサイト）は、種々のインキュベーションおよび洗浄工程を通じて抗体で「感作された」（コーティングされた）ままである場合がある。上記を考慮して、感作のプロセスは、免疫学的交差適合性試験の基礎として活用され得る。

【0058】

第1の態様では、この開示は、交差適合性血液サンプルの方法であって、

第1の血液サンプル由来の血漿または血清を用意する工程と；

血漿サンプルと、第2の血液由来の赤血球とを接触させて、血漿／赤血球混合物を得る工程と；

血漿／赤血球混合物を赤血球の感作を可能にする条件下でインキュベートする工程と；

液相から赤血球（そのある程度または全てが、感作されても、感作されなくてもよい）を分離する工程と；

感作された赤血球と、抗体に結合することができる因子とを接触させる工程と；

を含み、

液相からの感作された赤血球の分離は、遠心分離なしで生じ、かつ抗体に結合することができる因子に結合した感作された赤血球の検出によって、ドナー血液が意図されるレシピエントの血液と不適合であることが示される、方法を提供する。

【0059】

上記で説明されたとおり、本明細書に開示の交差適合性方法はさらに、抗原（i）～（v i i i）のうちの1つまたは複数に結合する結合因子を含む対照試験を含んでもよい。

赤血球の感作は、血漿中に存在する（例えば、抗血液型抗原）抗体と、赤血球の抗原（例えば、血液型抗原）との間の結合を通じて生じることが理解されるべきである。

【0060】

使用のための血漿または血清は、任意の適切なまたは標準的な調製のプロトコールを用いて全血から調製してもよい。この方法が血液を交差適合する方法である場合、血漿および／または血清は、輸血をうける患者によって提供されてもよく、またはその患者に由来してもよい。使用のための血漿を調製するために、全血を抗凝結処理試験管内に収集してもよい。赤血球および血小板を、遠心分離によって取り除くかまたは分離して、得られた上清を血漿と命名する。使用のための血漿サンプルは、例えば、約10 μ L～約1 mLの体積を含んでもよい。例えば、約100 μ L、150 μ L、160 μ L、200 μ L、250 μ Lまたは300 μ Lの血漿を用いてもよい。使用のための血清を調製するために、全血を収集して、一定期間凝固させてもよい。再度、赤血球および血小板を遠心分離によって取り除き、得られた上清を血清と命名する。本明細書に開示の方法における使用のための血漿および／または血清は、使用前に適切な緩衝液または希釈液で希釈してもよい。血漿および／または血清は、使用のために、1：1、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9または1：10希釈として調製してもよい。適切な希釈液としては、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）および／または低イオン強度溶液（low ionic strength solution）（LISS）を挙げてもよい。

使用のための赤血球は、全血の任意の適切な供給源由来であり得る。ここでこの方法が輸血用の血液の交差適合のための方法である場合、赤血球は、使用を意図するドナー血液の供給源から得てもよい。ドナー血液を収集して、可塑性のプラスチックバッグに保管し

10

20

30

40

50

てもよい。このバッグは、血液の凝血を防ぎ、かつ保管を容易にする化合物および化学物質（例えば、クエン酸ナトリウム、リン酸塩、デキストロース、および時にはアデニン）を含んでもよい。貯蔵バッグ内に血液が通過する配管は、小体積の血液を含む「ピグテール」部分を得るために収集後に分割してもよい。ドナー血液のこれらの小さい「ピグテール」体積は、本明細書に開示されるアッセイを含む交差適合性アッセイにおける使用に適切である。小体積の全血は、アッセイ中の使用のための赤血球の供給源として提供されてもよい。例えば、約 1 u l ～約 500 u l の赤血球を用いてもよい。交差適合性アッセイは、約 $10\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $30\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $40\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $50\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $60\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $70\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $80\text{ }\mu\text{ L}$ 、 $90\text{ }\mu\text{ L}$ または $100\text{ }\mu\text{ L}$ の全血を用いてもよい。使用前に、赤血球は、任意の適切な希釈または緩衝液で希釈してもよい。

10

【0061】

血漿および／または血清および赤血球を混合して、血漿／赤血球混合物を得てもよい。便宜上、血漿／血清および赤血球混合物は、「細胞混合物」と呼ばれる。この細胞混合物は、適切な緩衝液または媒体を用いてさらに希釈してもよい。例えば、細胞混合物は、低イオン強度溶液（L I S S）を用いて希釈してもよい。細胞混合物の適切な希釈としては、例えば、緩衝液（例えば、L I S S）での $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:4$ ； $1:5$ または $1:6$ 希釈を挙げてもよい。

【0062】

（希釈されてもよい）細胞混合物を、血漿または血清に存在する抗体（例えば、抗血液型抗原抗体）が、赤血球の表面上に存在する抗原と相互作用し、かつその抗原と結合することを可能にする条件下でインキュベートしてもよい。上記で言及されるとおり、抗体、例えば、抗血液型抗原抗体が結合している赤血球は、「感作された」赤血球と呼ばれる。したがって、細胞混合物のインキュベーションは、感作された赤血球の形成を許すかまたは可能にするのに適切な条件下で行われ得る。さらに、その条件は、所定の時間および／または所定の温度を含み得る。例えば、細胞混合物は、約 $30\sim40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、例えば、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で、および／または約 10 秒 ～数時間インキュベートしてもよい。この細胞混合物は、約 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で約 5 分間 、約 10 分間 、約 15 分間 、約 20 分間 、約 25 分間 または約 30 分間 インキュベートしてもよい。

20

【0063】

細胞混合物は、任意の適切な基板、容器、試験管、プレート（マルチウェルプレートを含む）および／またはスライド中で、またはその上で調製されても、および／またはインキュベートされてもよい。この細胞混合物は、ガラスおよび／またはプラスチックの基板、容器、試験管、プレートおよび／またはスライド上で、または中で調製されても、および／またはインキュベートされてもよい。基板、容器、試験管、プレートおよび／またはスライド（ガラス、プラスチックまたはいくつかの他の材料を含むか否か）は、血漿／血清および／または全血成分と、基板、容器、試験管、プレートまたはスライドの材料との間の非特異的な結合を予防または低減するためにコーティングされてもよく、および／またはブロックされてもよい。

30

【0064】

上記で概説される理由のために、交差適合性アッセイは、鋭敏かつ特異的の両方でなければならない。具体的には、偽陽性および／もしくは偽陰性の結果の事例が、特定の許容範囲内におさまるか、または許容されるとみなされるようなものは高い頻度では生じないことが重要である。当業者は、交差適合性アッセイの場合、偽陰性の結果によって、ドナー血液は、実際ドナー血液が不適合であり得る場合に、適合であることが示唆されると理解する。この開示の方法では、感作された赤血球を検出するために用いられるプロセスがブロックされるか、中和されるか、そうでなければ阻害されるならば、偽陰性の結果が生じる場合がある。感作された赤血球を検出するために用いられるプロセスには、抗体に親和性を有する結合因子（例えば、抗体）を必要とする。この種の結合因子は、血漿および／または血清に存在する抗体によって、感作された赤血球と相互作用することからブロック、中和および／または防止され得る。

40

50

【0065】

したがって、細胞混合物中に存在する赤血球（エリスロサイト）抗原に特異性を有する未結合の血漿／血清抗体の存在は、本明細書に開示の方法の残りから（実質的に）除去されなければならない。

典型的には、免疫学的（交差適合性を含む）アッセイにおける偽陰性の結果の出現は、頻繁な洗浄および／または遠心分離の工程によって防がれる。これによって、血漿／血清サンプルと、赤血球（感作された赤血球を生成するため）の供給源との間のインキュベーションの任意の最初の期間の後、血漿／血清に存在する任意の未結合の抗体であって、それらの抗体が、感作された赤血球を検出するために用いられる結合因子（例えば抗体）を中和し得る抗体は、アッセイの最終段階には持ち込まれないことが確実になる。洗浄工程によって、アッセイから未結合の抗体を除去することが容易になるが、遠心分離は、液相中の未結合の抗体の、それらの標的に結合するものからの分離に影響する。

10

【0066】

洗浄および／または遠心分離の工程は、本明細書に記載される種類のアッセイを含む免疫学的アッセイにおいて、偽陰性および／または偽陽性の結果の事例を減らす有効な手段であるが、それらは時間がかかり、かつアッセイを完全にするのに必要な末端の機器の量を増やす。

本開示は、血液を交差適合するための鋭敏、特異的、正確かつ迅速なアッセイを提供するので、改善に相当し、このアッセイは、偽陽性および／または偽陰性の結果の率またはレベルを、先行技術の交差適合性アッセイおよび試験と同程度にさせるが、洗浄および／または遠心分離の工程の使用は減少している。

20

【0067】

これは、部分的には、細胞混合物の液相からの細胞混合物の赤血球成分の分離を可能にする条件下で細胞混合物インキュベーション工程を行うことによって達成される。例えば、インキュベーションは、例えば、ペレットを形成する細胞（そのうちある程度、全てが感作されてもよく、または全く感作されなくてもよい）の沈降を容易にする条件下で行われてもよい。細胞の沈降および／またはペレットの形成によって、赤血球抗原および他の血漿または血清成分に結合していない抗体を含む液相または上清が残る場合がある。赤血球のペレットの形成によって、液相（または上清）からの赤血球（またはそのサンプル）の容易な分離が可能になり、その結果、アッセイの残りは、赤血球成分上で、および血漿または血清成分の非存在下で行われ得、これによって、上記のとおり、偽陰性および／または偽陽性の結果がもたらされる場合がある。

30

本開示の方法、および具体的には細胞混合物インキュベーション工程では、細胞ペレットを形成するか、または赤血球（そのうちある程度が、全てが感作されてもよく、または全く感作されなくてもよい）を、細胞混合物の液相およびなんらかの未結合の抗体から分離するための遠心分離の使用を回避する。そうではなく、赤血球は、経時的におよび／または重力のもとで、液相から分離して、沈降することが可能である。これによって、天然の赤血球ペレットまたはクランプの形成が生じ得る。一旦、赤血球のペレットが形成されて沈降すれば、使用者は、以下の作用のいずれかまたは両方を行ってもよい。上清を取り除いて、赤血球のみを残してもよく、そのうちのある程度は、細胞混合物インキュベーション工程の間、抗血液型抗原抗体によって感作されていてもよい。それに加えて、またはその代わりに、沈降したかまたはペレットにされた赤血球またはそのサンプルを除去してもよい。次いで、アッセイの残りは、上清の除去後に残っている赤血球、または赤血球混合物から取り除かれた赤血球で行われる。

40

【0068】

本発明者らは驚くべきことに、一旦、赤血球がペレットになるか、および／または沈降されれば、例えば、ピペッティングもしくはデカンテーションによる、液相／上清の除去、または、例えば、吸引による、沈降されるか／ペレットにされた赤血球（もしくはそのサンプル）の除去は、本開示の方法が、先行技術のアッセイにおいて観察される（またはそれを用いて観察される）偽陽性および／または偽陰性の結果の同様、匹敵する（または

50

おそらくさらに優れた)出現またはレベルを示すことを保証するのに十分である(結合剤への適用のために緩衝液中に細胞が再懸濁される前に追加の洗浄は必要がない)ということを見出した。したがって、理論によって束縛されることは望まないが、上清もしくは液相の除去、または沈降/ペレット化された赤血球(またはそのサンプル)の除去は、感作された赤血球の検出に用いられる結合因子が中和されないような程度まで、アッセイから未結合の血漿/血清抗体を除去するのに十分であることが示唆される。

【0069】

本開示の方法の残りにおける使用のための赤血球は、抗体に結合することができる因子と接触させられる前に、適切な緩衝液中で再懸濁されてもよい。適切な赤血球再懸濁緩衝液は、例えば、ウシ血清アルブミンおよび/またはL I S Sを含んでもよい。

再懸濁されてもよい赤血球(そのうちある程度は感作されていてもよい)を、抗体と結合することができる因子と接触する。例えば、この方法がヒトのサンプル(ヒトの血漿およびヒトのドナー血液)を用いて行われる場合、抗体に結合することができる結合因子は、ヒト抗体に結合できるはずである。使用のための結合因子は、抗体またはその抗原結合フラグメント(1つまたは複数の抗体アイソタイプに特異性を有する)であってもよい。例えば、単一の抗体アイソタイプ(例えば、免疫グロブリンG、M、A、EまたはD)に特異的な単一の抗体種または複数の異なる抗体(各々が異なる抗体アイソタイプに特異性を有する)。

【0070】

感作された赤血球に結合することができる因子はそれ自体が、抗体またはその抗原結合フラグメントであってもよく、これは赤血球をコーティングする(感作する)1つまたは複数の他の抗体について特異性および/または親和性を示す。それに加えて、またはその代わりに、他の特異的に反応性の結合因子、例えば、感作された赤血球に結合することができる、低分子抗体模倣物、核酸リガンド、または他の細胞由来の受容体を用いてもよい。レクチンもまた使用されてもよい。簡単にするために、本明細書において以降では、結合因子および「抗体」と述べているが、これは、限定と解釈されるべきではない。

用いられる結合因子(例えば抗体)の選択は、赤血球をコーティングする(感作する)抗体の性質に依存することが理解される。例えば、結合因子は、血漿/血清抗体に結合することができる任意の因子であっても、または赤血球を感作(結合)し得る血漿もしくは血清中に存在する任意の他の成分であってもよい。例えば、この結合因子は、免疫グロブリンおよび/または補体因子に結合することができる因子を含んでもよい。一般には、用いられる結合因子は、従来のD A TまたはI A G T試験で用いられる結合因子、すなわち、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかの供給源の少なくとも抗I g G₁、抗I g G₃、および抗補体(C3)または広いスペクトルの抗ヒトI g Gに相当する。有利なことに、抗I g G₂およびI g G₄抗体が用いられてもよい。望ましい場合、他の抗体、例えば、抗軽鎖λ抗体、または抗軽鎖κ抗体などもまた含まれてもよい。

【0071】

この方法は、ポリクローナル抗体を用いても、および/またはモノクローナル抗体を用いてもよい。ポリクローナル抗体とは、抗原、またはその抗原性機能の誘導体で免疫された動物の血清に由来する異種集団の抗体分子である。ポリクローナル抗体の生成のためには、宿主動物、例えば、ウサギ、ヒツジ、ブタなどを、アジュバントで補充されてもよい特定の抗原を用いて注射によって免疫してもよい。

【0072】

特定の抗原に対する同種集団の抗体であるモノクローナル抗体は、培養物中の連続細胞株による抗体分子の生成を提供する任意の技術によって得ることができる。これらとしては、限定するものではないが、Kohler and Milstein (1975), Nature 256:495-497; および米国特許第4, 376, 110号)のハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72, Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030)、ならびにE B Vハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, Monoclonal Anti-bodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96

10

20

30

40

50

）が挙げられる。

【0073】

使用のためのモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらの任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであってもよい。mAbを生成するハイブリドーマは、インビトロで培養されても、またはインビボで培養されてもよい。インビボでの高力価のmAbの生成によって、これは、精製の現在の好ましい方法となる。

キメラ、一本鎖およびヒト化抗体はまた、結合因子として用いられてもよい。キメラ抗体の生成のための技術 (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454; 米国特許第4, 816, 567号) は、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングする工程を含み、それとともに適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子を用いてもよい。キメラ抗体とは、マウスmAb由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。

【0074】

一本鎖抗体の生成に記載される技術は、米国特許第4, 946, 778号: Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; およびWard et al., 1989, Nature 334:544-546に見出され得る。ヒト化モノクローナル抗体を作製する技術は、米国特許第5, 225, 539号 (参照により本明細書にその全体が援用される) に記載される。

使用のための抗体フラグメント (このフラグメントは、特定のエピトープを認識する) は、公知の技術によって生成され得る。例えば、このようなフラグメントは、限定するものではないが、抗体分子のペプシン消化によって生成され得るF(ab')₂フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFabフラグメントを含む。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して (Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281)、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な特定を可能にしてもよい。

【0075】

この方法は、モノクローナル抗IgG、モノクローナル抗IgG₁、モノクローナル抗IgG₃、およびモノクローナル抗C3を活用し得る。抗IgGが含まれる場合、(ポリクローナルまたはモノクローナル) 抗IgGが好都合である。これらのプローブのブレンドをまた用いて、結合した抗体の種類を区別することなく同じ結果を得る場合もある。

使用に適切な全ての型の抗体 (上記のものを含む) を、総称して、「抗体」と呼ぶものとする。

用いられる任意の抗体を含む結合因子は、基板にまたは基板上に、結合されてもまたは固定されてもよい。任意の従来の基板は、交差適合性方法で用いられてもよい。適切な基板としては、天然に剛体または半剛体である基板が挙げられる。例えば、適切な基板としては、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハー、ファイバー、磁性ビーズまたは非磁性ビーズ、ゲル、配管、プレート、ポリマー、微小粒子および/または毛細管が挙げられる。この基板は、種々の表面型、例えば、ウェル、トレンチ、ピン、チャネルおよび細孔 (ここに結合因子および/または抗体が固定/結合されている) を有してもよい。下にさらに詳細に記載されるとおり、そして結合した感作された赤血球 (エリスロサイト) の検出に影響するために用いられる方法次第で、基板の表面構造は、蛍光ベースの検出方法を改善または容易にするために形成されて、適合されてもよい。この種類の基板は、WO 02/059583およびWO 03/023377に記載される。したがって、使用のための基板は、光学的に透明であってもよい。

【0076】

適切な基板としては、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、金属および金属酸化物を含む基板が挙げられ、これは、むき出しであるか、または例えば、グリシドキシプロピルトリエト

10

20

30

40

50

キシシラン、ポリー１ーリジン、アミノプロピルシラン、カルボキシシラン、ヒドロゲルおよびポリマーブラシ、例えば、官能化されたアルキルチオール自己組織化単分子層などの官能的なポリマーで官能化されている。適切な基板は、シラン系のコーティング、例えば、疎水性連結、および目的の生物学的分子に結合する能力を有する官能基を有するシラン化合物を含んでもよい。

【0077】

使用のための結合因子および／または抗体は、アレイにおける基板に結合されても、または固定されてもよい。本明細書において用いる場合、「アレイ」という用語は、結合したプローブ（例えば、結合因子および／または抗体）の一般的に順序付けされた配置であって、ガラスのような基板上の感作された赤血球（またはそうではなく、赤血球をコーティング／感作する抗体）に特異的に結合する配置を指す。

通常は、このアレイは、結合因子または抗体が結合される区切られた領域から規則的に間隔を空けられた一連の形態であってもよい。このような基板結合抗体アレイは、通常、「抗体チップ」と記載されてもよい。

【0078】

この抗体は、本明細書において「チップ」と呼ばれる、例えば、平坦または球状の基板上に配置されてもよい。この方法は、単一型の結合因子もしくは抗体または複数の異なる抗体を活用し得る。したがって、少なくとも１つだが、おそらく少なくとも２、３または４つの異なる抗体が、その基板の表面に結合されてもよい。さらに、各々の特定の抗体は、いくつかの希釈液中に提供されてもよく、および／または、検出の方法を行う場合、生じ得る、任意の偽陽性または偽陰性の反応をさらに小さくするように、何回も（例えば、３～１０回）繰り返されてもよい。

使用のための「抗体チップ」を調製するために用いられる基板は、小さい平面の基板を含んでもよい。適切な平面の基板は任意の適切な大きさであってもよい。例えば、使用のための平面の基板は、長さが約５mm～約１００mm、および幅が約５mm～約５０mmのいずれであってもよい。例えば、適切な平面の基板は、約７６mm×約２６mmまたは約１２．５mm×約７．９mmの大きさであってもよい。

【0079】

結合因子または抗体は、スポッティングまたはプリンティングによって基板上に適用されてもよい。適切な公知の技術としては、Michael J. Heller, Annual Review of Biomedical Engineering, 2002 Vol.4: 129-153. DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications and Angenendt, P.; Glokler, J.; Murpy, D.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Anal. Biochem., 2002, 309, 252-260 Angendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Chromatogr.A, 2003 100, 997-104に記載の技術が挙げられる。

結合因子／抗体のスポットまたはプリントされたスポットは、直径が１mm未満、例えば、直径５００μmもしくは１００μm未満、または直径約５０μm～約１０００μmであり得る。この方式では、１０秒～１０００秒の個々のおよび別個の結合因子／抗体スポットが、任意の所定の基板の表面上に提供され得る。

【0080】

疑いを避けるために、基板上的任意の１つの位置またはスポット／プリントされたスポットは、単一の結合因子／抗体の種、または２つ以上の結合因子／抗体種を含んでもよい。

基板の表面に、本明細書に記載の種類の結合因子および／または抗体を固定するためには当該分野では種々の手順が周知である。例えば、静電気結合が、抗体を固定するために用いられてもよい。表面に結合因子または抗体を固定または結合するために用いられ得る他の方法としては、疎水性／親水性の相互作用、化学的相互作用、およびアミンカップリングが挙げられる。結合因子および抗体は、硫黄含有アミノ酸（システイン、メチオニン）を介して、または金含有基板上に以前に結合された結合因子と相互作用する官能基を含むアルカンチオールを介する結合を通じて、金含有基板上に直接吸着されてもよい。

【0081】

結合因子を提供されず、かつ非特異的な結合部位を提供し得る基板表面の領域は、抗体、補体因子（および他の血漿由来の成分）、赤血球または感作されたRBCのなんらかの非特異的な結合を防ぐために、ブロッキング剤で処理することが望ましい。適切なブロッキング剤は、当該分野で周知であり、これは、アルブミンまたは血清（望ましくない抗体、例えば、血液型の抗体、抗IgG抗体または任意の試験プローブ相互作用を邪魔し得る抗体を同じマイクロアレイ上に含まない）、脱脂乳タンパク質、カゼイン、ウシ血清アルブミン（BSA）などを含んでもよい。ブロッキング剤は、適切な緩衝液との使用のために処方されても、または調製されもよい。

例えば、適切なブロッキング剤は、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（0.15Mの塩化ナトリウム、2.632Mのリン酸緩衝液ストック溶液（Quotient, Scotland）、pH7.0）中に、1（w/v）%のウシ血清アルブミン（BSA）（ID Bio, France）を含んでもよい。

【0082】

使用のために調製されたコーティングされた基板は、乾燥された基板として使用のために保管されてもよい。それに加えて、またはその代わりに、その基板は、環境温度で、または冷蔵／冷凍条件下で保管されてもよい。

上記の観点で、交差適合性の方法は、マイクロアレイフォーマットで行ってもよい。マイクロアレイ交差適合性のアッセイは、従来の交差適合性の試験に対する効率的かつ効果的な代用法である。さらにマイクロアレイ交差適合性アッセイは、血液処理に重要な他の試験（例えば、他のマイクロアレイ試験）（例えば、赤血球（エリスロサイト）の表面上の多数の抗原について血液型表現型判定試験を含む）に容易に組み込まれ得る。

【0083】

感作された赤血球と固定された結合因子および／または抗体との間の結合を可能にする条件下でのインキュベーション後、未結合の赤血球を、例えば、洗浄によって除去してもよい。

捕捉された（結合している）感作された赤血球（エリスロサイト）の存在は、蛍光、化学発光複合体化抗体を活用し得る、例えば、二次標識検出のような、当該分野で公知の種々の技術によって検出され得る。

蛍光は、当該分野で公知の任意の適切な光検出器、例えば、分光光度計またはデジタル画像化デバイス、例えば、CCD画像センサー（CCDカメラの形態で）またはCMOSセンサーなどによって検出され得る。便宜上、解釈のための視覚的アウトプット、または解釈およびデータ処理の目的のための数値を考慮すると、スキャナーによって検出される赤血球（エリスロサイト）結合およびその強度を用いる単純なフラットベッドスキャナーを用いてもよい。

好都合なことに、結合した感作された赤血球は、C J Campbell et al., 2006に記載されるようにRBCの自己蛍光によって検出され得る。自己蛍光による検出は、なんらかの標識の使用の必要性を回避し、特に簡易型の処理を提供するという特別な利点を有する。より詳細には、RBCは、約420nm、488nm、543nmまたは580nmの波長の光を照射されるか、またはその光で励起されてもよく、蛍光発光は、488nmで励起される場合、530nm、または543nmで励起される場合、570～585nmなどのより長い波長で検出される。

したがって、この開示では、結合された感作された赤血球（エリスロサイト）は、蛍光シグナルによって検出しても、または例えば、フラットベッドスキャナーを用いて、スキャン後の画像生成によって検出してもよい。

【0084】

基板上の各々の特定の抗体の各々の位置を知ることによって、ドナー赤血球エリスロサイトが、患者の血漿サンプル中に存在する抗体によって感作されているか否かを決定することが可能であることが理解される。疑いを除くために、適合性のドナーユニットは陰性の結果（感作なし、したがって細胞結合なし）を生じるが、不適合性のドナーユニットは

10

20

30

40

50

、陽性の結果（感作、したがって、結合した感作された赤血球の陽性の検出）を生じる。当業者は、適切な電子機器およびソフトウェアを用いて、任意のデバイスが、基板の表面上の特定の抗体の同一性および位置を知り、かつこれを生じたシグナルと関連させるためにプログラムされ、その結果、特定の結合が、試験者に決定されて特定され得ることを理解する。さらに、基板上に提供された抗体の種々の反復および／または希釈からの結果を組み合わせて、編成するように統計学的なソフトウェアが含まれてもよい。この方式では、特定の抗体スポットの多様性から得られるシグナルが、一緒に織り込まれて、統計学的に有意な結果が、試験者に示され得る。

【0085】

この方法は1つまたは複数の対照を含んでもよい。例えば、陽性対照は、赤血球の添加を確認するために用いられ得る。陽性対照は、抗エリスロサイト抗体を含んでもよい。抗エリスロサイト抗体は、上記でさらに詳細に記載されるような基板上に固定されてもよく、および／またはスポット／プリントされてもよい。

【0086】

本明細書に記載される方法、具体的には、遠心分離および／または洗浄工程の使用なしで（感作された）赤血球および液相への細胞混合物の処理は、いくつかの異なる免疫学的アッセイで活用され得ることが理解されるべきである。例えば、抗体の供給源、および赤血球（エリスロサイト）のインキュベーション、ならびにその後の、感作された赤血球（エリスロサイト：抗体の供給源と赤血球との間でインキュベーションの間に形成される）の検出を必要とする任意のアッセイが、本明細書に記載の手順から有益であり得る。したがって、本開示は、赤血球および赤血球を感作することができる組成物（例えば、抗体および／または補体成分、例えば、血漿もしくは血清を含む組成物）を、赤血球の感作および赤血球成分の重力下での沈降を容易にする条件下でインキュベートする工程；ならびに液相（または上清）を除去し、および／または赤血球の少なくとも1つのサンプルを除去する工程を含む、感作された赤血球を検出する方法における使用のための赤血球を提供する手段を提供することもできる。

本開示のさらに好ましい特徴および利点は、例示によって示される以下の詳細な例からわかる。

詳細な説明

図3：単一のアレイ（12×12グリッドのスポット）の図表示であって、プリントされた抗体を示す。16のアレイを、2×8のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、（三連で）プリントされた抗体を示し、白いスポットは、陰性スポットとしてプリントされた50%グリセロール／PBSを示す。

【0087】

図4：単一のアレイ（12×12グリッドのスポット）の図表示であって、プリントされた2つの抗体を示す。α-hIgMは、518 μg/mLでプリントし、α-hIgGは、301 μg/mLでプリントした。16のアレイを、2×8のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、陽性細胞結合反応を示し、白いスポットは、どの細胞にも結合しないはずである、陰性スポットとしてプリントされた50%グリセロール／PBSを示す。

図5：スライドCM50、CM51およびCM52の画像であって、それぞれ、試験管、ガラススライドまたはプレート技術を用いて、30分間、抗D血漿で感作されたOr r、OR₁r、OR₁R₁およびOR₂R₂細胞についての結果を示している。陽性対照細胞についての結果もまた示される（Z441, IgG Sensitised Cells）。

【0088】

図6：スライドCM60およびCM61の画像であって、それぞれ、試験管またはガラススライド技術を用いて、30分間、抗D血漿で感作されたOR₁r、OR₁R₁、OR₂R₂およびOr r細胞についての結果を示している。陽性対照細胞についての結果（Z441, IgG Sensitised Cells）およびAHG（AHG結果＝基準技術

10

20

30

40

50

）を用いる間接的な凝集試験からの凝集の等級付けの結果もまた示される。

図7：図6に示される画像から生成したデータであって、アレイ中でプリントされた α h I g G に対して試験された細胞についての中央シグナル強度を示している。試験管またはガラススライド技術の結果を、プロットされた中央シグナル強度の標準偏差とともに示す。

図8 a および図8 b：スライド C M 6 2 および C M 6 3 の画像であって、それぞれ、試験管またはガラススライド技術を用いて、 A_1 または B 細胞で試験した抗 A および抗 B 血漿についての結果を示している。試験管中で A H G を用いる間接的試験の結果もまた示され、図の左側の下には凝集の等級付け結果を伴う。この試験は、手動で行われ、したがって、ある程度の混乱が生じる場合があり、これは、自動化された方法を使用した場合には、減るか／排除される。

【0089】

図9：単一のアレイの図表示であって、プリントされた抗体を示す。抗ヒト I g M は、 $518 \mu\text{g}/\text{mL}$ でプリントし、 α -h I g G は、 $301 \mu\text{g}/\text{mL}$ でプリントした。16のアレイを、 2×8 のフォーマットで各々のスライド上にプリントした。黒いスポットは、陽性細胞結合反応を示し、白いスポットは、どの細胞にも結合しないはずである、陰性スポットとしてプリントされた50%グリセロール／PBSを示す。

図10：スライド1および2の画像であって、試験管またはガラススライド技術を用いて、30分間、モノクローナル抗 F y^a 血漿で感作された F y (a+b+)、F y (a+b-) および F y (a-b+) 細胞の結果を示す。陽性対照細胞についての結果もまた示される (I g G S e n s i t i s e d C e l l s, Z 4 4 1)。

【0090】

図11：図11に示される画像から作成したデータであって、スライド上で試験した陽性対照の細胞 (Z 4 4 1) について、中央シグナル強度に対して正規化したシグナル応答を示す。試験管およびスライド技術についての結果は、別のスライド上で行ったので、これによって、異なるスライド上でのアレイにわたるシグナルのいずれの相違も説明される。試験管またはガラススライド技術の結果を示す。I g G 感作細胞 (Z 4 4 1) によって、対照のシグナルが示される。モノクローナル抗 F y^a を用いる場合、良好な結合が両方の技術によって示される。F y (a-b+) 細胞によって、予想どおり、低い反応性または陰性の反応性が示される。この方法で、本発明者らは、抗 F y^a を含むサンプルが F y (a+) 細胞と不適合性であり、F y (a-) 陰性であることが判明し、これによって交差適合の原理が示される。

【実施例】

【0091】

(例1)

タンパク質マイクロアレイの調製

S c h o t t から入手したコーティングされたスライドを基板として用いた。スポットする結合因子抗体プローブサンプルは、50%グリセロール／50%PBS中で調製した。

このスライドを、12のサンプル J e t s p y d e r を備える A r r a y j e t S p r i n t A r r a y e r (A r r a y j e t) を用いてプリントした。各々のサンプルの複製を、50%のグリセロール／PBSの陰性対照スポットによって隔てられる各々のスライド上にプリントした (図3を参照のこと)。全てのスライドを、40~60%の相対湿度内で、かつ環境温度 (20~23℃) でプリントした。プリントしたプローブを、30分間湿潤雰囲気中で固定させた後に、暗野で少なくとも24時間2~8℃のボックスの中に保管した。さらなるアレイを、図4に示される、抗 A および抗 B 血漿の試験のためにプリントした。

【0092】

(例2)

実験における使用の前の細胞の洗浄

10

20

30

40

50

全ての細胞種をL I S Sに懸濁するか、またはL I S S（低イオン強度生理食塩水（l o w i o n i c s t r e n g t h s a l i n e））中に洗浄した（他の希釈液を用いてもよく、これには、例えば、P B S、改変オルシーバー（A l s e v e r）およびそれらのバリエーションが挙げられる）。さらに、細胞は、洗浄しなくてもよい（むしろ小体積の細胞は、直接L I S S緩衝液中にドナーサンプル（おそらく遠心分離されている）から取り出してもよい）。洗浄を用いる場合、細胞を、T h e r m o C e n t r a C L 2遠心分離を用いて2分間3 0 0 0 r p mで3回遠心分離する（ここでは上清を各回で取り除いて、約4 m LのP B Sで置き換える）。最終の遠心分離後、L I S S中で1回洗浄を行った後、その細胞をL I S S中で2 % H C Tに再懸濁した。

異なるヘマトクリットの細胞を試験したいいくつかの実験に関しては、細胞を8 %のH C Tで調製した（1 6 0 μ Lの得られた細胞ペレットを、1 0 0 0 μ LのL I S Sに添加した）。次いで8 %のH C T細胞をL I S S中にさらに希釈して、必要なパーセンテージのヘマトクリットを達成した。

【0093】

（例3）

感作された細胞の間接的な凝集試験（従来の方法、基準技術）

細胞懸濁物の体積（4 0 μ Lまたは8 0 μ L）を、試験管中で8 0 μ Lのニートまたは希釈した血漿とともにインキュベートした。得られた混合物を、3 7 $^{\circ}$ Cの水浴中でインキュベートした。この例では、この混合物を3 0分または4 5分間インキュベートしたが、より短時間または長時間用いてもよい。これらの条件下では、赤血球が感作される。血漿が希釈された場合、希釈液は、赤血球懸濁液に用いられるものと同じであってもよい（他の適切な希釈液を用いてもよい）。

インキュベーション期間の後、細胞を、D i a C e n t 2 0 0 0 C e l lウォッシャー（P B Sを用いて $\times$ 4洗浄し、次いで1 0 0 0 gで遠心分離）でn Wプログラムを用いて洗浄した。2滴のA H Gを添加して、その試験管を最終的に遠心分離し（1 0 0 0 g、1 0秒）、細胞の凝集をライトボックスの上で読み取った。

【0094】

（例4）

細胞を感作する試験管技術

細胞懸濁液の体積（2 4 0 μ L — または血漿の体積と適合）を、4 8 0 μ Lのニートまたは希釈した血漿とともにインキュベートした。血漿は、P B SまたはL I S Sのいずれかで希釈した。試験管は、3 7 $^{\circ}$ Cでインキュベートした（3 0分間または4 5分間 — より長時間または短時間を用いてもよい）。インキュベーション期間の後、細胞を、D i a C e n t 2 0 0 0 C e l lウォッシャー（P B Sを用いて $\times$ 4洗浄し、最終的に遠心分離）を用いて洗浄した。次いで、細胞を2 4 0 μ Lの2 %のB S A / L I S S中に再懸濁した後に、例7に記載のアレイに添加した。

【0095】

（例5）

細胞を感作するためのガラススライド技術（血漿／上清を除去することおよび再懸濁による未結合の抗体の除去）

ブランクのスライド（S c h o t t , G l a s s B）を、G r a c e - B i o 1 6 - w e l l マニフォールドにはめ込んだ。ブロッキング溶液（2 %のB S A / P B S）を、約3 7 $^{\circ}$ Cに温め、スライドを、各々のウェルへの1 6 0 μ Lのブロッキング溶液の添加によってブロックして、1 5分間G r a n t B i o T h e r m o s h a k e r上で振盪（3 5 0 r p m）しながら3 7 $^{\circ}$ Cでインキュベートした（プラスチックカバーをして）。ブロッキングの後、溶液を取り出して、8 0 μ Lの（洗浄してもよい）細胞を、1 6 0 μ Lの血漿とともにインキュベートした。スライドを、3 7 $^{\circ}$ Cで3 0分または4 5分間静止してインキュベートした。インキュベーション時間は、行われる実験に依存した。

【0096】

インキュベーションの後、液体（または液相）の（実質的に）全体積を、各々のウェル

10

20

30

40

50

の上の右側の角から迅速に除去した。

残りの細胞を、 $240\text{ }\mu\text{L}$ の2%のBSA/LISS中に再懸濁した後に、例7に記載のアレイに添加した。

【0097】

(例6)

細胞を感作するためのプレート技術(血漿/上清からの感作されたエリスロサイトの除去、次いで再懸濁)

体積($40\text{ }\mu\text{L}$)の洗浄された細胞を、Grant Bio Thermoshakerを用いて 37°C で30分間または45分間、U底の96ウェルプレート中で、 $80\text{ }\mu\text{L}$ の血漿と静止してインキュベートした。総体積における変化を検討するために、 $80\text{ }\mu\text{L}$ の細胞を $160\text{ }\mu\text{L}$ の血漿とともにインキュベートした。インキュベーション時間は、行われる実験に依存した。インキュベーション時間の後、ウェルの底から $4\text{ }\mu\text{L}$ の細胞ペレットを、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の2%BSA/LISSを含むセパレートのウェルに取り出した。その細胞を再懸濁した後、例7に記載のとおりアレイに添加した。

【0098】

(例7)

アレイの処理

プリントされたアレイスライドを、 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ の保管から取り出して、Grace-Bioの16ウェルのマニフォールドにはめ込み、各々のウェル中のアレイの中央および直線配列の両方を確実にして、金属クリップを用いて固定し、Proplateトレイ(3スライド型)にはめ込んだ。スライドを、使用の直前まで $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ の保管に戻した。ブロッキング溶液(2%のBSA/PBS)を、約 37°C まで温めた。スライドを、 $160\text{ }\mu\text{L}$ のブロッキング溶液を各々のウェルに添加することによってブロックして、 37°C で、 350 rpm で、振盪しながらGrant Bio PHMP Thermoshakerで(プラスチックカバーをして)15分間インキュベートした。

ブロッキング後、溶液を取り出して、 $120\text{ }\mu\text{L}$ の感作された細胞(例4~6由来)を、各々の適切なウェルの左側にゆっくりピペティングした。

スライドを、 37°C で15分間(プラスチックカバーをして)静置してインキュベートした。インキュベーション後、スライドを含むProplateトレイ全体を、PBSのタブに浸漬した。吸引を行って、ウェルのPBSおよび他の液体を除去してもよい。

スライドを、Grace-Bioマニフォールドから注意深く取り出して、スライドホルダーに移し、新鮮なPBSに浸した。スライドは、 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で10分間0.1%グルタルアルデヒド/PBS中への浸漬によって固定してもよく、またはさらに都合よくは、PBSは、吸引によって取り出して、分析は、フラットベッドスキャナーを用いて直接行う。この後に、水中での最終洗浄を続け、その後に、乾燥するまで遠心分離した。スライドを、スキャンするまでごみのない暗い場所で保管した。

【0099】

(例8)

データの抽出および解析

スライドを、フラットベッドスキャナーを用いてスキャンして、高解像度の画像を捕えて、16ビットのTIFFファイルとして保存した。

赤血球が抗体に結合したとき、黒いスポットが明らかになる。

数値データを、シグナル強度を定量し得る社内で作成したアルゴリズムを用いて、マイクロアレイから抽出した。

【0100】

テキスト入力ファイルを、マイクロアレイカラムおよび列の位置を用いて自己作成して、各々のプローブの同一性および位置を決定した。これを用いて、マイクロアレイグリッド設定が一旦設定されれば、負荷されたアレイリストを作成した。一旦、グリッドおよびアレイのリストが作成されれば、データをテキストファイルに抽出した。このプロセスで、各々のスポットの中心から中央蛍光強度値、およびスライドの全体のバックグラウンド

領域から中央バックグラウンド値を得た。この情報は、エクセルのワークシートに収集した。

【0101】

各々のスポットに関して、バックグラウンド値は、スポット強度値から差引きした。各々のスライドについて、各々の異なるスキャン設定からのシグナル強度値を、1つのワークシートに並べた。

一旦、最高のデータスキャンを、選択した場合、これは以下のとおり処理した。望ましくないデータをワークシートから取り除いて、マイクロアレイ上でスポットに1つの値のみを残した（各々のスポットについて、スポット強度値マイナスバックグラウンド値）。陰性対照の値を用いて、「ノイズ」値、平均に加えて陰性の2標準偏差（平均+2sd）を算出する。この値は、非特異的な結合（NSB）に相当する。各々のスポットの値を、陰性対照の平均+2sdで割って、シグナル対ノイズ比（S/N）を得る。1を超える値は、有意とみなすことができる。S/Nの中央値を、各々のサンプルの複製のスポットについて算出した。

10

【0102】

マイクロソフトエクセルを用いて、処理したデータを必要に応じて解析した。データを分析するために、全体にわたって棒グラフを用いた。棒グラフ上のY軸は、サンプルについてのS/N中央値に相当する。

エラーバーが含まれる場合、各々のサンプルの標準誤差は以下のとおり算出された。各々のサンプルの複製の標準偏差を算出した（これは、S/N比または実際の値で行った）。標準偏差は、サンプルの複製の数の平方根で割って、標準誤差を得た。

20

【0103】

補充データ

タンパク質マイクロアレイは、上記の例1のとおり調製した。細胞を上記の例2のとおり実験前に洗浄した。感作された細胞の間接的な凝集試験（従来の方法：基準の技術）は、上記の例3のとおり行った。感作された細胞を調製するための「試験管技術」は、上記の例4のとおり行った。細胞を感作するための「ガラススライド技術」（血漿／上清の除去および再懸濁による未結合の抗体の除去（遠心分離／洗浄なし））は、上記の例5のとおり行った。アッセイは、上記の例7のとおり処理した。

データ抽出および解析

棒グラフ上のY軸が、陽性の対照（Z441）の結果に対して正規化され、パーセンテージとして算出されたサンプルについてのS/N中央値に相当することを除いて、もとの特許の例8のとおり。

30

【0104】

エラーバーが含まれる場合、各々のサンプルについての値と関連する変異係数%は以下のとおり算出した。各々のサンプルの複製のCV%を算出した（これは、S/N比または実際の値で行った）。平均値は、標準偏差であり、次いで100を掛けて、CV%を得た。

引用文献

- Robb, J.S., Roy, D.J., Ghazal, P., Allan, J. and Petrik, J. (2006). "Development of non-agglutination microarray blood grouping" *Transfusion Medicine*. 16, 119-129.
- Campbell, C.J., O'Looney, N., Chong Kwan, M., Robb, J.S., Ross, A.J., Beattie, J.S., Petrik, J. and Ghazal, P. (2006). "Cell Interaction Microarray for Blood Phenotyping" *Analytical Chemistry*. 78, 1930-1938.
- British Committee for Standards in Haematology; Milkins, C., et al. (2013). Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfusion Medicine* 23, 3-35.
- Issit, P.D. and Anstee, D.J. (1998) *Applied Blood Group Serology*. Fourth Edition. Montgomery Scientific Publications.

40

50

【図 1】

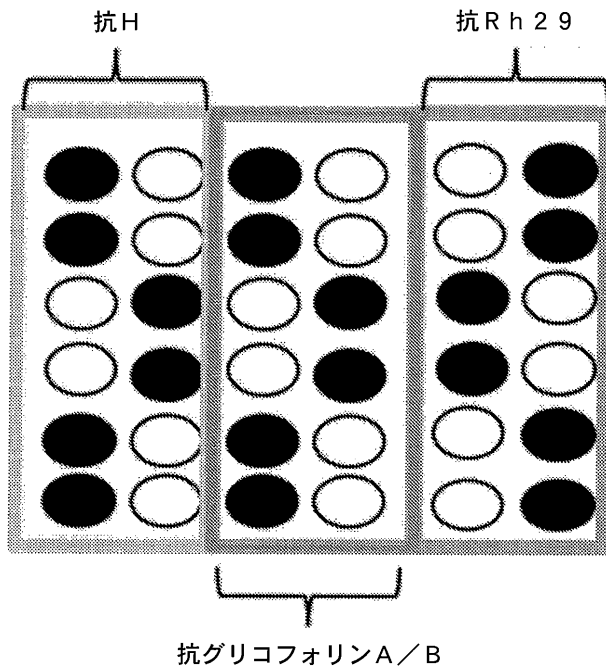


Figure 1

【図 3】

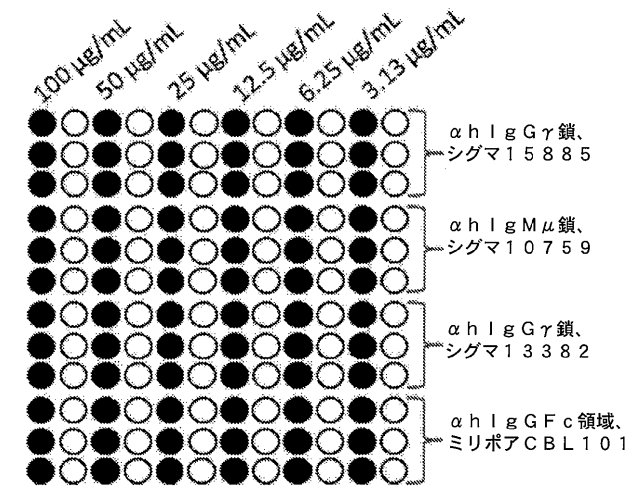


Figure 3

【図 4】

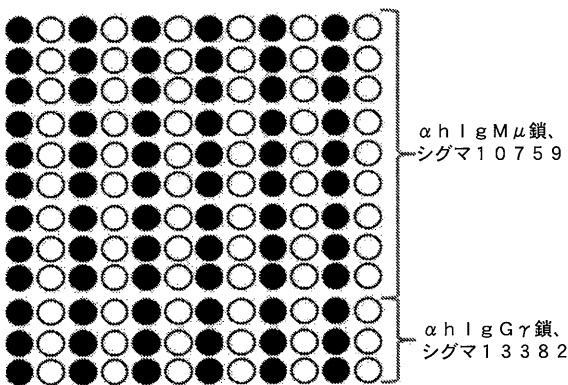


Figure 4

【図 7】

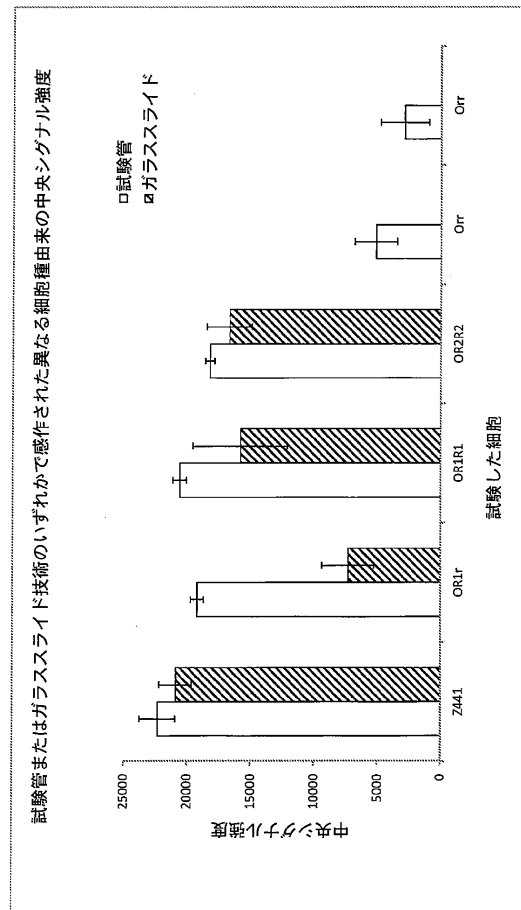


Figure 7

【図 8 b】

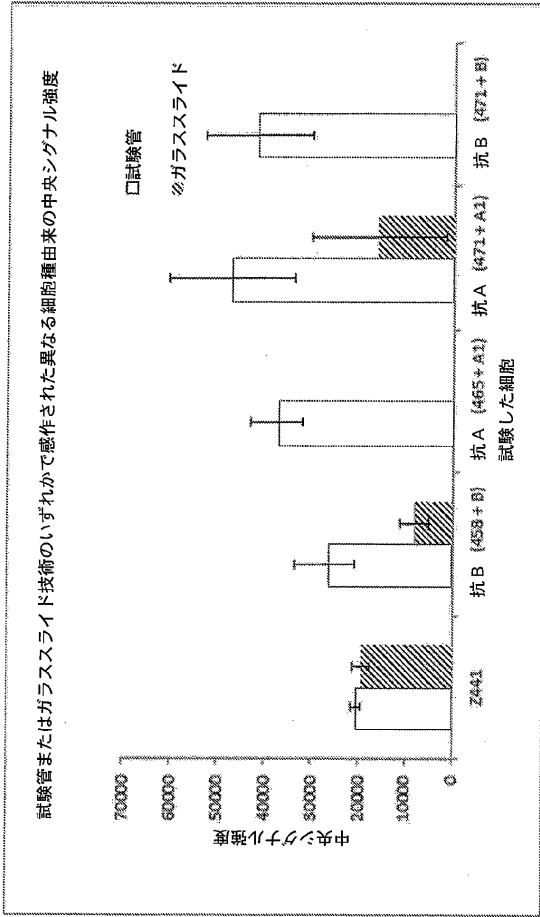


Figure 8b

【図 1 1】

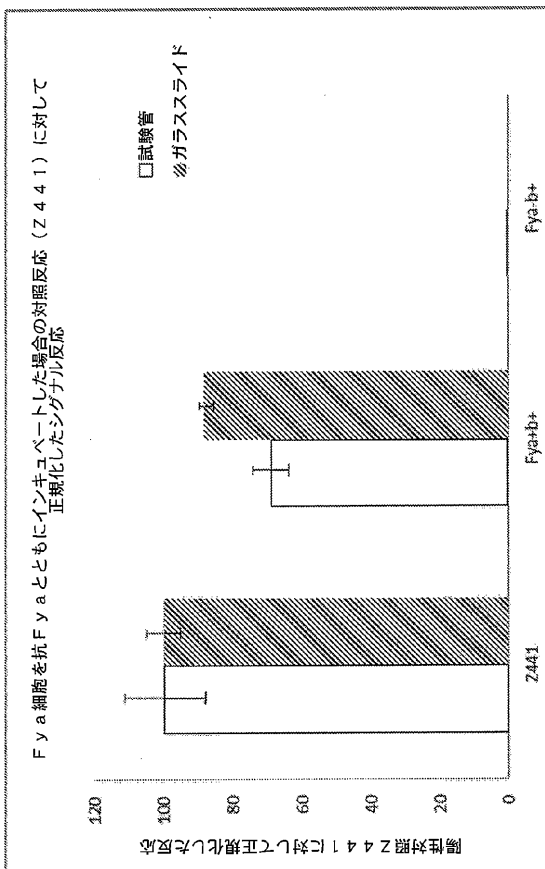


Figure 11

【図 9】

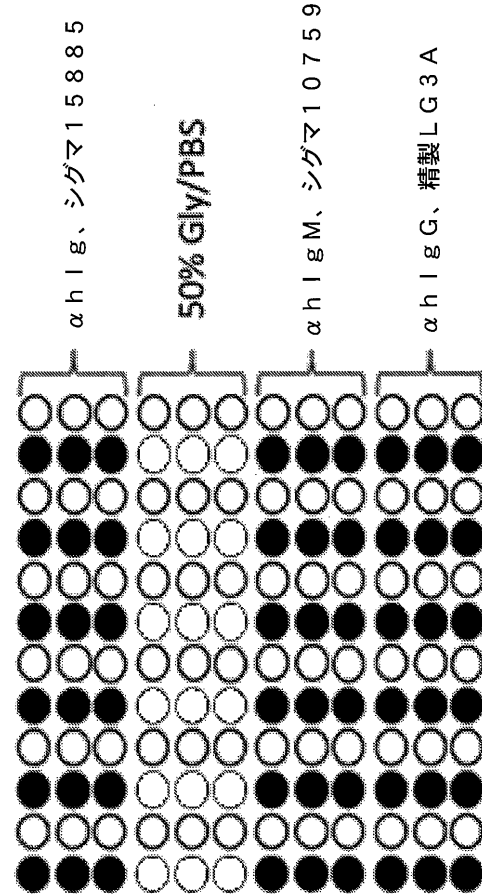


Figure 9

【図 2 - 1】

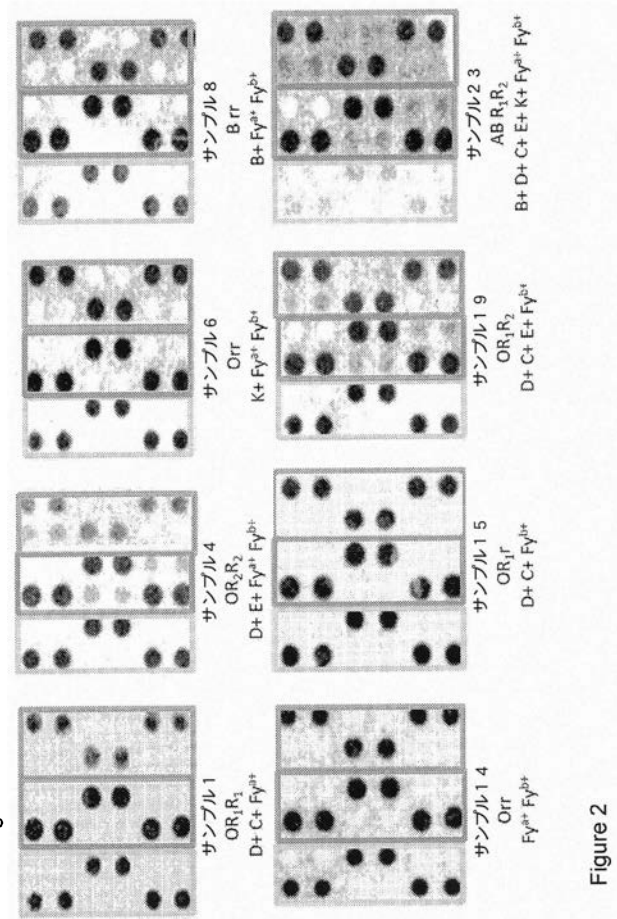
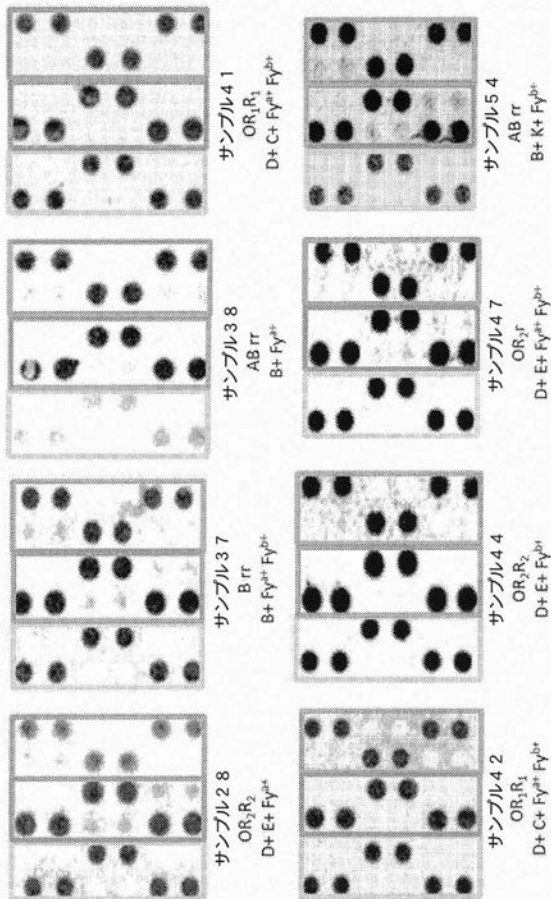


Figure 2

【図 2 - 2】



【図 5】

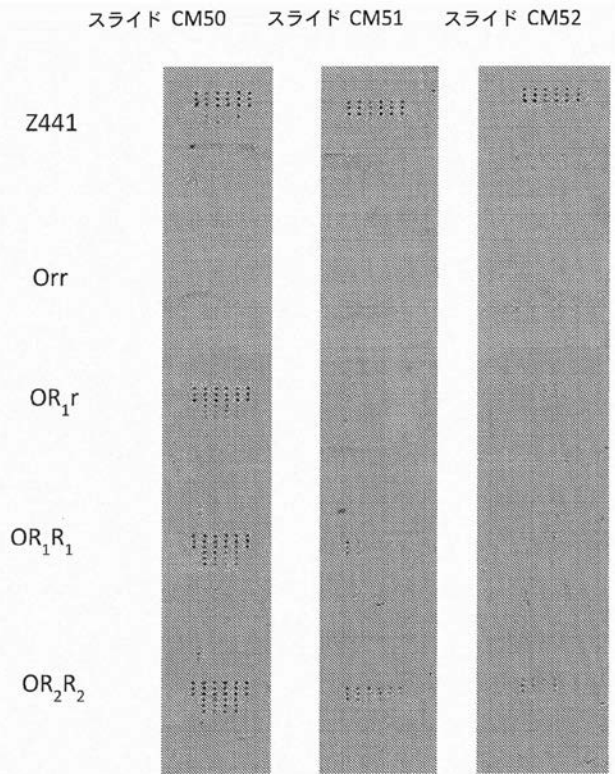


Figure 2 続き

Figure 5

【図 6】

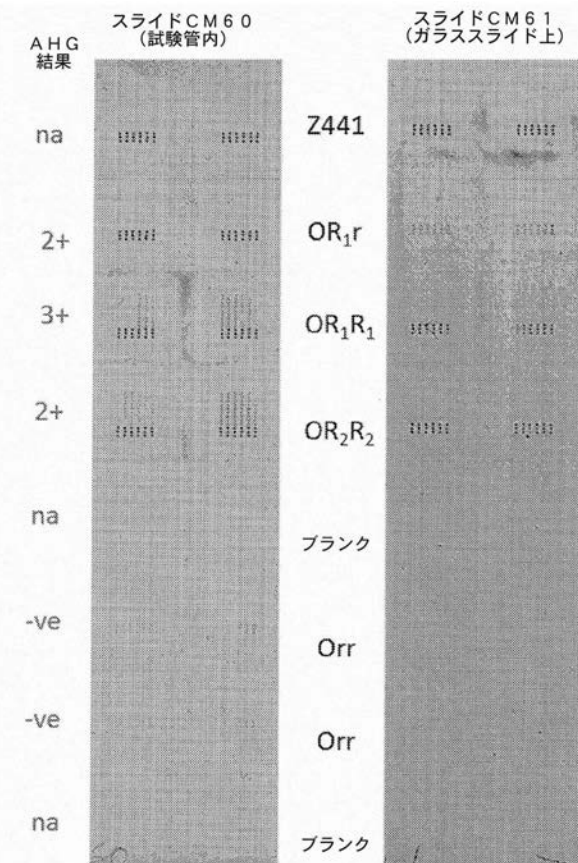


Figure 6

【図 8 a】

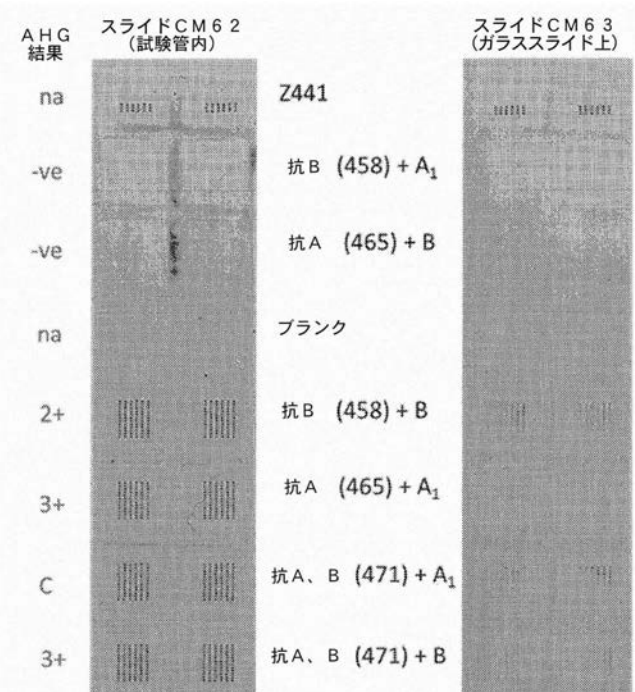
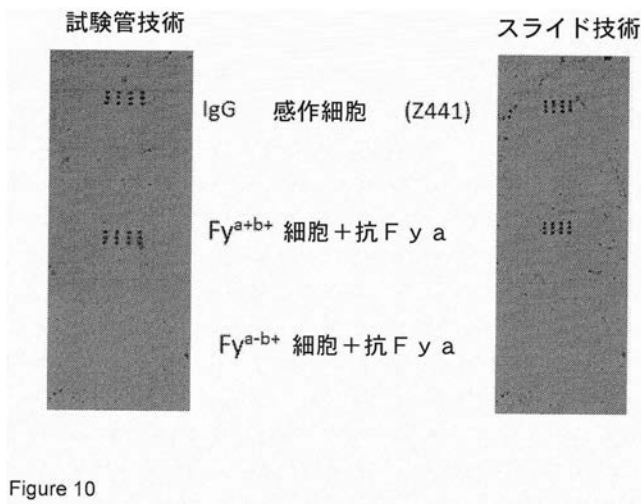


Figure 8a

【図 10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/050502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/555 G01N33/80 ADD.		
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 practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIANCHI D W ET AL: "ERYTHROID-SPECIFIC ANTIBODIES ENHANCE DETECTION OF FETAL NUCLEATED ERYTHROCYTES IN MATERNAL BLOOD", PRENATAL DIAGNOSIS, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 13, no. 4, 1 April 1993 (1993-04-01), pages 293-300, XP000197526, ISSN: 0197-3851 abstract; fig. 1, 2; p. 295; whole document ----- -/--	1-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ 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 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		Date of mailing of the international search report
15 April 2015		23/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Schindler-Bauer, P

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/050502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TELEN M J ET AL: "RELATIONSHIP OF THE HUMAN ERYTHROCYTE WRB ANTIGEN TO AN INTERACTION BETWEEN GLYCOPHORIN A AN BAND 3", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 76, no. 4, 15 August 1990 (1990-08-15), pages 842-848, XP000576661, ISSN: 0006-4971 the whole document	1-27
X	----- WO 2012/010666 A1 (DIAGAST [FR]; FAUCONNIER LAURENCE [FR]; BARBREAU YVES [FR]; BOULET ARN) 26 January 2012 (2012-01-26) claims 1, 51, 52; examples 1-14; fig. 1-18; whole document	1-27
X	----- WO 90/00614 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]) 25 January 1990 (1990-01-25) claims 1,6,7,16	1-27
Y	----- WO 2006/100477 A1 (UNIV EDINBURGH [GB]; COMMON SERVICES AGENCY [GB]; CAMPBELL COLIN [GB];) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document	1-27
Y	----- NICHOLA O'LOONEY ET AL: "Evaluation of a Protein Microarray Method for Immuno-Typing Erythrocytes in Whole Blood", JOURNAL OF IMMUNOASSAY AND IMMUNOCHEMISTRY, vol. 29, no. 2, 18 March 2008 (2008-03-18) , pages 197-209, XP55182681, ISSN: 1532-1819, DOI: 10.1080/15321810801888530 the whole document	1-27
Y	----- US 2012/202225 A1 (KNUTSON CHRISTOPHER R [US] ET AL) 9 August 2012 (2012-08-09) claims 17-52; table 1	1-27
Y	----- WO 03/021275 A1 (IQ CORP B V [NL]; VAN WEEGHEL ROBERT PAUL [NL]; SUK ROELF JOHAN [NL]) 13 March 2003 (2003-03-13) page 3; claims 1-19; figures 1-5 ----- -/--	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/050502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLANCHER ET AL: "Cross-reactivity of antibodies to human and primate red cell antigens", TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS, GRUNE AND STRATTON, ORLANDO, FL, US, vol. 14, no. 2, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 161-179, XP005451692, ISSN: 0887-7963, DOI: 10.1016/S0887-7963(00)80006-1 the whole document -----	1-27
A	GL DANIELS: "Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens Finnish", VOX SANGUINIS, vol. 87, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 304-306, XP55182832, the whole document -----	1-27
A	CAMPBELL C J ET AL: "Cell interaction microarray for blood phenotyping", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 78, no. 6, 7 February 2006 (2006-02-07), pages 1930-1938, XP002379179, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC051651M the whole document -----	1-27
A	WO 2008/035047 A1 (COMMON SERVICES AGENCY [GB]; ROBB JANINE S [GB]; KNOWLES LINDA K [GB];) 27 March 2008 (2008-03-27) the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/050502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012010666 A1	26-01-2012	AR 082317 A1 EP 2596370 A1 FR 2963108 A1 JP 2013531259 A TW 201217784 A US 2013130280 A1 WO 2012010666 A1	28-11-2012 29-05-2013 27-01-2012 01-08-2013 01-05-2012 23-05-2013 26-01-2012
WO 9000614 A1	25-01-1990	NONE	
WO 2006100477 A1	28-09-2006	AT 489632 T AU 2006226120 A1 CA 2602114 A1 EP 1861719 A1 ES 2357405 T3 JP 4834075 B2 JP 2008537105 A US 2008318798 A1 WO 2006100477 A1	15-12-2010 28-09-2006 28-09-2006 05-12-2007 26-04-2011 07-12-2011 11-09-2008 25-12-2008 28-09-2006
US 2012202225 A1	09-08-2012	EP 2670534 A1 EP 2670840 A2 US 2012202225 A1 US 2012202673 A1 WO 2012106442 A1 WO 2012106478 A2	11-12-2013 11-12-2013 09-08-2012 09-08-2012 09-08-2012 09-08-2012
WO 03021275 A1	13-03-2003	AT 360213 T CA 2458704 A1 DE 60219642 T2 EP 1423706 A1 ES 2284911 T3 US 2005124009 A1 WO 03021275 A1	15-05-2007 13-03-2003 17-01-2008 02-06-2004 16-11-2007 09-06-2005 13-03-2003
WO 2008035047 A1	27-03-2008	AT 553386 T AU 2007298839 A1 CA 2664055 A1 EP 2062055 A1 ES 2388147 T3 JP 5050058 B2 JP 2010504513 A US 2010041565 A1 WO 2008035047 A1	15-04-2012 27-03-2008 27-03-2008 27-05-2009 09-10-2012 17-10-2012 12-02-2010 18-02-2010 27-03-2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, 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

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100154988

弁理士 小林 真知

(72)発明者 ロブ ジャニーヌ スコット

イギリス イーエイチ 28 8ジェイティー ミッドロージアン ニューブリッジ ラーズ ノース プラット クレセント 4

(72)発明者 ロブ アンドリュー ゴードン

イギリス イーエイチ 19 3アールエス ミッドロージアン ボニーリッグ ピーコック アヴェニュー 1

(72)発明者 ロブソン デイヴィッド クーパー

イギリス イーエイチ 25 9エスアール ミッドロージアン ロスリン ビルストン キャッスルロー クレセント 78

专利名称(译)	红细胞检测		
公开(公告)号	JP2017508961A	公开(公告)日	2017-03-30
申请号	JP2016553606	申请日	2015-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	キュービーディーキューエスアイピーリミテッド		
申请(专利权)人(译)	丘比迪 (队列s -アイピー) 有限公司		
[标]发明人	ロブジャニーヌスコット ロブアンドリュウゴードン ロブソンデイヴィッドクーパー		
发明人	ロブ ジャニーヌ スコット ロブ アンドリュウ ゴードン ロブソン デイヴィッド クーパー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/555 G01N33/80		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.525.W G01N33/543.525.U		
代理人(译)	西岛隆义 田中真一郎 山崎 一夫 服部博信		
优先权	2014003115 2014-02-21 GB		
其他公开文献	JP2017508961A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于以下发现：红细胞抗原可以用作检测红细胞/红细胞的手段。具体地，可以提供一种通过鉴定由基本上所有红细胞类型表达的红细胞抗原来实现对红细胞的可靠检测的方法。

