

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6708558号
(P6708558)

(45) 発行日 令和2年6月10日 (2020.6.10)

(24) 登録日 令和2年5月25日 (2020.5.25)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 K

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/53 N

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

GO 1 N 33/543 5 2 5 W

GO 1 N 37/00 1 0 2

請求項の数 15 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-568143 (P2016-568143)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月6日 (2015.2.6)
 (65) 公表番号 特表2017-505450 (P2017-505450A)
 (43) 公表日 平成29年2月16日 (2017.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/050338
 (87) 国際公開番号 W02015/118347
 (87) 国際公開日 平成27年8月13日 (2015.8.13)
 審査請求日 平成30年2月6日 (2018.2.6)
 (31) 優先権主張番号 1402174.5
 (32) 優先日 平成26年2月7日 (2014.2.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 516238625
 キュービーディー (キューエスアイビー
) 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
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液サンプルの交差適合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液サンプルを交差適合させる方法であって、

第 1 の血液サンプル由来の血漿および／または血清を用意する工程と；

前記血漿および／または血清と、第 2 の血液サンプル由来の赤血球とを接触させて、血漿および／または血清／赤血球の混合物を得る工程と；

前記血漿および／または血清／赤血球の混合物を、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；

前記インキュベートされた赤血球を液相から分離する工程と；

前記分離された赤血球と、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、液相からの赤血球の分離が、遠心分離なしに重力のもとで生じ、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、第 2 の血液サンプルが、第 1 の血液サンプルと不適合であることを示す、方法。

【請求項 2】

前記血漿および／または血清が、輸血を受ける患者から得られるか、その患者によって提供されるか、またはその患者由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記赤血球が、ドナー血液から得られるか、ドナー血液によって提供されるか、またはドナー血液由来である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

前記血漿および／または血清／赤血球の混合物が、(i) 約 30～40℃で、約 10 秒～数時間の間インキュベートされる、および／または(ii) 約 37℃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される、および／または(iii) 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インキュベートされる、および／または(iv) 赤血球の沈降を容易にしてペレットを形成する条件下でインキュベートされる、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

液相からの赤血球の分離の工程が、上清を除去して、赤血球のみを残す工程、および／またはペレットにした赤血球のサンプルを取り出す工程をさらに含む、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

上清が、ピペッティング、デカント、および／またはアスピレーションによって除去される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

抗体に結合することができる因子が、

(i) 1 つまたは複数の抗体アイソタイプに特異性を有する、抗体またはその抗原結合フラグメント；

(ii) 低分子抗体模倣物；

(iii) アプタマー；

(iv) 核酸リガンド；

(v) 他の細胞由来の受容体；および

(vi) レクチン

20

からなる群から選択される、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

抗体に結合することができる因子が、基板に対してまたは基板上に結合しているか、または固定されており、

基板が、官能化および／またはコーティングされた基板であってもよい、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

基板が、

(i) 官能化ポリマー；

(ii) グリシドキシプロピルトリエトキシシラン；

(iii) ポリ－１－リジン；

(iv) アミノプロピルシラン；

(v) カルボキシシラン；

(vi) ヒドロゲル；

(vii) ポリマー－ブラシ、官能化アルキルチオール自己組織化単分子層；

(viii) シランベースのコーティング；および

40

(ix) 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

からなる群から選択される 1 つまたは複数の化合物で官能化および／またはコーティングされている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗体に結合することができる因子が、アレイとして基板に結合または固定されている、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

抗体に結合することができる因子が、スポットティングまたはプリンティングによって基板に適用される、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

マイクロアレイフォーマットで行われ、および／または、1つまたは複数の他の試験および／またはマイクロアレイ試験と組み合わせられ、

前記1つまたは複数の他の試験および／またはマイクロアレイ試験が、血液型の表現型判定試験および／または血液感染性の疾患の試験からなる群から選択されてもよい、請求項1から11までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 3】

感作された赤血球と、抗体に結合する因子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、未結合の赤血球が洗浄によって除去される、請求項1から12までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 4】

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が、二次的な標識検出技術、および／または、蛍光化学発光複合体化抗体および／または赤血球自己蛍光、および／または、蛍光シグナルおよび／または、画像生成の使用を含む、請求項1から13までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 5】

1つまたは複数の対照の使用をさらに含み、

対照が、赤血球の添加を確認するための陽性対照を含んでもよい、請求項1から14までのいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、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。本発明の方法は、ドナー赤血球（エリスロサイト）とレシピエント血漿との間の不適合性の検出のための輸血前血液適合性試験に適用してもよい。

【背景技術】**【0002】**

交差適合試験は、輸血検査室で行う輸血前適合性手順の一部である：この試験は、A B OおよびR h D分類、抗体スクリーニング、抗体特定、直接または間接的な交差適合性を含む。

全患者に対してA B OおよびR h D血液型判定、うらA B O式判定および不規則抗体スクリーニングを行うことは、輸血業務の検査室には慣用的である。これは、A B OおよびR h D適合性であり、かつ患者が抗体を有する血液型抗原を欠いている血液を提供するために行う；これによって患者によって破壊される輸血されたドナーのエリスロサイトの危険性を防ぐかまたは低減する。陽性の抗体スクリーニングの事象では、抗体を特定する検査を行って、存在する抗体（その存在は、既知の抗原刺激なしで、環境要因に起因して形成される、抗Aまたは抗Bのような規則的血液型抗体と異なって、予想されないので、不規則血液型抗体と呼ばれる場合が多い）を特定する。抗体のスクリーニングまたは特定には、不規則血液型抗体が関連する臨床的に重要な血液型抗原を保持する、特異的に選択したエリスロサイトサンプルのパネルに対して試験した患者の血漿／血清の使用を含む。

【0003】

抗体スクリーニングが、陰性の結果に戻る場合、コンピューター適合性を用いて、患者に対する輸血のために適切なユニットを選択してもよい。これは、ガイドラインに対する適切なバリデーションおよび順守によって検査に対して、そうするような権威を与える場合にのみ行うことができる。しかし、抗体スクリーニングが陽性であって、抗体が存在するならば、さらなる適合性試験を行わなければならない。これには、完全抗体特定検査および交差適合を含む。適合性試験（本明細書では交差適合と呼ぶ）には、潜在的なドナーエリスロサイトユニットに対する患者の血漿／血清の試験を含む。

ドナーエリスロサイトユニットは、患者と同じA B OおよびR h型として、かつ患者が抗体を有する血液型抗原については陰性であるように選択すべきである。これは、問題の

10

20

30

40

50

抗原について陰性であるものを見出すためにドナーエリスロサイトユニットの血液型判定を包含することが多いが、輸血業務の慣用的な試験レジーム次第で、この試験は、ドナーユニット試験の時点で行っていてもよい。

【0004】

慣習的に、適合性試験は、試験管での凝集試験として行ってきた。さらに近年では、この試験はまた、固相マイクロプレートおよびカラム凝集技術を用いて行われてきた（a k a、G e l、C A T）。しかし、この試験は、依然としていくらか面倒であり、洗浄工程および遠心分離を何度も要する。この試験は、間接的な抗グロブリン試験（I A T、I A G T）の原理に従い；エリスロサイト懸濁物は、血漿／血清／血液型試薬または対照のサンプルとともにインキュベートされる。この第1の工程の間、抗体が存在し、これが特異的である抗原もエリスロサイト上に存在する場合、抗原に対する抗体の結合が生じる（この工程は、感作と呼ばれる）。感作後、感作されたエリスロサイトから、溶液中の未結合の抗体を分離するために洗浄工程が必要である。この洗浄工程後、抗ヒトグロブリン試薬を添加する；これは、抗ヒト I g G 抗体および多くの場合抗 C 3 を含む。抗体がエリスロサイトを感作している場合、抗ヒト I g G は、エリスロサイト上の I g G 抗体に結合して、赤血球凝集を生じる。従来の試験では、I g M 不適合性は、感作の前工程なしで、直接の赤血球凝集を通じて特定される。赤血球凝集は、感作反応の検出について用いられる終点である。未結合の I g G を除去することが失敗すれば、抗ヒトグロブリン試薬に存在する抗ヒト I g G の中和がもたらされ、かつ潜在的に、偽陰性の結果がもたらされ得る。これは、通常は、全ての陰性の I A T 試験に対する I g G 感作細胞の添加によって制御され、陽性の結果によって、抗ヒト I g G が利用可能であり、かつ中和されておらず、したがって、未結合の抗体の十分な洗浄／除去が生じていることが示される。試験が陰性である場合、抗ヒト I g G の結合領域がブロックされており、ほとんど「中和されている」可能性が高いことが実証され得、かつこの試験は不十分である洗浄または未結合の抗体除去のせいで無効であると結論され得る。

【0005】

現況技術としては、市販のシステム、例えば、Immucor Capture-R、および BioRad ID-System および Ortho Clinical Diagnostics BioVue および ID-MTS 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。固相系、例えば、Immucor Capture-R Select は、マイクロプレートウェルへのドナーエリスロサイトの結合、続いて、患者の血漿／血清とのインキュベーション、洗浄工程、次いで指標細胞の最終添加（抗 D をコーティングされた細胞および抗 I g G のレベル）を含み、そのため抗体が結合したドナーエリスロサイトを感作している場合、指標細胞上の抗 I g G は、ドナーエリスロサイトに結合したドナー抗体にも結合する。この例では、未結合の抗体を除去するには洗浄工程が必要である。カラム凝集技術は、抗ヒト I g G（および／または抗 C 3）を含むマイクロチューブを用い、マイクロチューブ上のウェルを用いて、抗ヒト I g G を含むカラムを通じた遠心分離の前に、患者の血漿／血清によるドナー細胞のインキュベーション／感作を可能にする。この場合、遠心分離を用いて、未結合の抗体を分離する。なぜなら、遠心分離力は細胞を下に押し付けるのに適切であるが、未結合の抗体を抗 I g G カラムへ抗体を通すのに十分ではないので、エリスロサイトは、遠心分離によってマイクロチューブを通じて強制されて、マイクロチューブ上のウェル中に未結合の抗体を残すからである。

【0006】

上記のような現在の系は、未結合の抗体から感作されたエリスロサイトを分離するために、遠心分離および／または洗浄工程のいずれかを用いる。このような手順は、時間と試薬を浪費し、したがって、先行技術のプロセスは、迅速なハイスループットスクリーニングにとって適切でないものとなる。

エリスロサイトの表面上の抗原（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る血液型判定アッセイを含む、多くの免疫学的試験の基

10

20

30

40

50

礎が形成され、ここでは固定された抗体は、エリスロサイトの表面上の抗原に結合し、そのように固定されたエリスロサイト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エリスロサイトを表現型決定してもよい (C J Campbell et al 2006)。エリスロサイト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】

【課題を解決するための手段】

10

【0007】

本発明は、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。本発明のこの方法は、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。

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。

20

【0008】

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。

30

【0009】

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。

40

本発明者らは、抗体（タンパク質）で感作された赤血球（エリスロサイト）が、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ことに注目した。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。

【0010】

第1の態様では、本発明は、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

50

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。

【0011】

10

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。

本発明における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ルを用いて全血から調製してもよい。本発明の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、輸血を受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または分離して、得られた上清を血漿と命名する。本発明における使用のための血漿サンプルは、例えば、約10 μ L～約1mL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、一定期間凝血させてもよい。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。本発明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。

20

【0012】

本発明における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、本発明の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、本発明の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 μ L～約500 μ Lの赤血球を用いてもよい。本発明の交差適合性アッセイは、約10 μ L、20 μ L、30 μ L、40 μ L、50 μ L、60 μ L、70 μ L、80 μ L、90 μ Lまたは100 μ 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。

30

40

【0013】

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（LISS）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、LISS）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。

【0014】

50

(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30~40℃、例えば、37℃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℃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。

10

【0015】

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。

20

【0016】

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より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。本発明の方法では、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)を必要とし得る。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。

30

【0017】

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、本発明の方法の残りから(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。

40

【0018】

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。

本発明は、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

50

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。

【0019】

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（重力のもとで）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、（おそらく感作された）赤血球成分上で、および血漿または血清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をもたらされる場合がある。

本発明の方法、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クランプ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のいずれかで行われる。

【0020】

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トによる、液相／上清の除去、または、例えば、吸引（アスピレーション）による、沈降されるか／ペレットにされた赤血球（またはそのサンプル）の除去は、本発明の方法が、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。

【0021】

本発明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、本発明の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。本発明におけ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）。

【0022】

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、アダプター、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。

【0023】

本発明の方法において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、本発明における使用のためのこの結合因子は、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DATまたはIAGT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IgG₁、抗IgG₃、および抗補体（C3）または広いスペクトルの抗ヒトIgGに相当する。有利なことに、抗IgG₂およびIgG₄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。

【0024】

本発明のこの方法は、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。

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。

【0025】

本発明における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。本発明の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、本発明において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。

【0026】

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。

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、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。

10

【0027】

本発明は、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。

本発明におけ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。

【0028】

20

本発明において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、本発明において用いられてもよい。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。この基板は、天然に平坦であってもよく、上部平坦表面を有しており、その上に本発明の方法の成分が、固定されても、および/または結合されてもよい。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 2005/059583およびWO 2003/023377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。

30

【0029】

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キシシラン、ポリ-1-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。本発明における使用のための適切な基板は、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。

40

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、結合因子および/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。

50

【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。

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、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. 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。

【0032】

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。

【0033】

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。

【0034】

本発明における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、本発明の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。

【0035】

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。

10

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。

20

【0036】

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、本発明では、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。

30

【0037】

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、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「知る」または認識する、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、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。

40

本発明のこの方法は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。

【0038】

50

本発明は、交差適合性アッセイを参照して記載してきたが、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、本発明は、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。

10

本発明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。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】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。

20

【図2】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 μ g/mLでプリントし、 α -hIgG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／PBSを示す。

【図3】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）。

30

【図4】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）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5】図4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 -hIgG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。

40

【図6a】スライドCM62およびCM63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AHG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6b】スライドCM62およびCM63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AHGを用いる間接的試験の結果もまた示され、図の左側

50

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7】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IgMは、 $518\mu\text{g}/\text{mL}$ でプリントし、 $\alpha\text{-hIgG}$ 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8】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Fy^a血漿で感作されたFy(a+b+)、Fy(a+b-)およびFy(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(IgG Sensitised Cells, Z441)。

【図9】図2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(Z441)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。IgG感作細胞(Z441)によって、対照のシグナルが示される。モノクローナル抗Fy^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。Fy(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Fy^aを含むサンプルがFy(a+)細胞と不適合性であり、Fy(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。

【発明を実施するための形態】

【0040】

[実施例]

(例1)

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Jet spyderを備えるArrayjet Sprint Arrayer(Arrayjet)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2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。

【0041】

(例2)

実験における使用の前の細胞の洗浄

全ての細胞種をLISS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、PBS、改変オルシーバー(Alsever)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LISS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回遠心分離する(ここでは上清を各回で取り除いて、約4mLのPBSで置き換える)。最終の遠心分離後、LISS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検出した実験に関しては、細胞を8 %のH C Tで調製した(160 μ Lの得られた細胞ペレットを、1000 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。

【0042】

(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(40 μ Lまたは80 μ L)を、試験管中で80 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、37℃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30分または45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)。

10

インキュベーション期間の後、細胞を、D i a C e n t 2000 C e l lウォッシャー(P B Sを用いて×4洗浄し、次いで1000 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(1000 g、10秒)、細胞の凝集をライトボックスの上で読み取った。

【0043】

(例4)

細胞を感作する試験管技術

細胞懸濁液の体積(240 μ L — または血漿の体積と適合)を、480 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、37℃でインキュベートした(30分間または45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 2000 C e l lウォッシャー(P B Sを用いて×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240 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。

20

【0044】

(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 16 - 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37℃に温め、スライドを、各々のウェルへの160 μ Lのブロッキング溶液の添加によってブロックして、15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(350 r p m)しながら37℃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、80 μ Lの(洗浄してもよい)細胞を、160 μ Lの血漿とともにインキュベートした。スライドを、37℃で30分または45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。

30

40

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、各々のウェルの上の右側の角から迅速に除去した。

残りの細胞を、240 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。

【0045】

(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 μ L)の洗浄された細胞を、G r a n t B i o T h e r m o s h a k e rを用いて37℃で30分間または45分間、U底の96ウェルプレート中で、80 μ L

50

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、 $80\mu\text{L}$ の細胞を $160\mu\text{L}$ 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 $4\mu\text{L}$ の細胞ペレットを、 $100\mu\text{L}$ の2%BSA/LISSを含むセパレー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。

【0046】

(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、 $160\mu\text{L}$ 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、 350rpm 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、 $120\mu\text{L}$ 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。

【0047】

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。

【0048】

(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。

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。

【0049】

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+2 s d）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+2 s d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。

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。

10

【0050】

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

20

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。

【0051】

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。

【0052】

引用文献

30

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.

Issitt, P.D. and Anstee, D.J. (1998) Applied Blood Group Serology. Fourth Edition . Montgomery Scientific Publications.

40

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕血液サンプルを交差適合させる方法であって、

第1の血液サンプル由来の血漿および／または血清を用意する工程と；

血漿および／または血清と、第2の血液サンプル由来の赤血球とを接触させて、血漿および／または血清／赤血球の混合物を得る工程と；

血漿および／または血清／赤血球の混合物を、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

50

を含み、

液相からの赤血球の分離が、遠心分離なしに生じ、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、方法。

〔2〕血漿および／または血清が、全血から調製される、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕血漿および／または血清が、輸血を受ける患者から得られるか、その患者によって提供されるか、またはその患者由来である、前記〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕赤血球が、ドナー血液から得られるか、ドナー血液によって提供されるか、またはドナー血液由来である、前記〔1〕から〔3〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔5〕赤血球の感作が、血漿および／または血清に存在する抗体と赤血球の抗原との間の結合を通じて生じる、前記〔1〕から〔4〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔6〕抗原が、血液型抗原である、前記〔5〕に記載の方法。

〔7〕血漿および／または血清／赤血球の混合物が、約30～40℃で、約10秒～数時間の間インキュベートされる、前記〔1〕から〔6〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔8〕血漿および／または血清／赤血球の混合物が、約37℃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される、前記〔1〕から〔7〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔9〕血漿および／または血清／赤血球の混合物が、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インキュベートされる、前記〔1〕から〔8〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔10〕血漿および／または血清／赤血球の混合物が、赤血球の沈降を容易にしてペレットを形成する条件下でインキュベートされる、前記〔1〕から〔9〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔11〕液相からの赤血球の分離の工程が、遠心分離の使用を必要としない、前記〔1〕から〔10〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔12〕液相からの赤血球の分離の工程が、上清を除去して、赤血球のみを残す工程、および／またはペレットにした赤血球のサンプルを取り出す工程をさらに含む、前記〔1〕から〔11〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔13〕上清が、ピペッティング、デカント、および／またはアスピレーションによって除去される、前記〔12〕に記載の方法。

〔14〕抗体に結合することができる因子と接触させる前に、赤血球を適切な緩衝液中で再懸濁する、前記〔1〕から〔13〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔15〕抗体に結合することができる因子が、

(i) 1つまたは複数の抗体アイソタイプに特異性を有する、抗体またはその抗原結合フラグメント；

(ii) 低分子抗体模倣物；

(iii) アプタマー；

(iv) 核酸リガンド；

(v) 他の細胞由来の受容体；および

(vi) 使用されてもよいレクチン

からなる群から選択される、前記〔1〕から〔14〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔16〕抗体に結合することができる因子が、基板に対してまたは基板上に結合しているか、または固定されている、前記〔1〕から〔15〕までのいずれか1項に記載の方法。

〔17〕基板が、官能化および／またはコーティングされた基板である、前記〔16〕に記載の方法。

〔18〕基板が、

(i) 官能化ポリマー；

(ii) グリシドキシプロピルトリエトキシシラン；

(iii) ポリ-1-リジン；

(iv) アミノプロピルシラン；

10

20

30

40

50

- (v) カルボキシシラン；
(vi) ヒドロゲル；
(vii) ポリマーブラシ、官能化アルキルチオール自己組織化単分子層；
(viii) シランベースのコーティング；および
(ix) 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
からなる群から選択される1つまたは複数の化合物で官能化および／またはコーティングされている、前記〔16〕または〔17〕に記載の方法。
- 〔19〕抗体に結合することができる因子が、アレイとして基板に結合または固定されている、前記〔1〕から〔18〕までのいずれか1項に記載の方法。 10
- 〔20〕抗体に結合することができる因子が、スポットティングまたはプリンティングによって基板に適用される、前記〔19〕に記載の方法。
- 〔21〕基板を、抗体に結合することができる因子を備えていない基板の領域が非特異的結合部位として作用することを防ぐためのブロックングプロトコールに供する、前記〔16〕から〔20〕までのいずれか1項に記載の方法。
- 〔22〕官能化および／またはコーティングされた基板が、乾燥された基板としての使用のために保管される、前記〔17〕または〔18〕に記載の方法。
- 〔23〕マイクロアレイフォーマットで行われる、前記〔1〕から〔22〕までのいずれか1項に記載の方法。
- 〔24〕1つまたは複数の他の試験および／またはマイクロアレイ試験と組み合わせられる、前記〔1〕から〔23〕までのいずれか1項に記載の方法。 20
- 〔25〕1つまたは複数の他の試験および／またはマイクロアレイ試験が、血液型の表現型判定試験および／または血液感染性の疾患の試験からなる群から選択される、前記〔24〕に記載の方法。
- 〔26〕感作された赤血球と、抗体に結合する因子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、未結合の赤血球が洗浄によって除去される、前記〔1〕から〔25〕までのいずれか1項に記載の方法。
- 〔27〕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が、二次的な標識検出技術、ならびに／または蛍光、化学発光複合体化抗体および／もしくは赤血球自己蛍光の使用を含む、前記〔1〕から〔26〕までのいずれか1項に記載の方法。 30
- 〔28〕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が、蛍光シグナルおよび／または画像生成の使用を含む、前記〔1〕から〔27〕までのいずれか1項に記載の方法。
- 〔29〕1つまたは複数の対照の使用をさらに含む、前記〔1〕から〔28〕までのいずれか1項に記載の方法。
- 〔30〕対照が、赤血球の添加を確認するための陽性対照を含む、前記〔29〕に記載の方法。

【図 1】

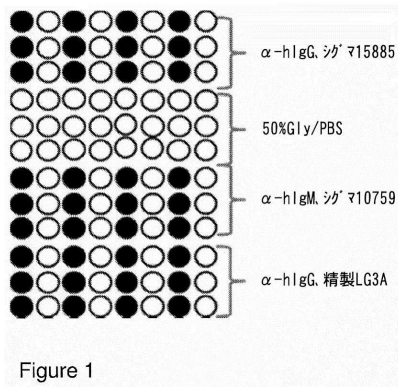


Figure 1

【図 2】

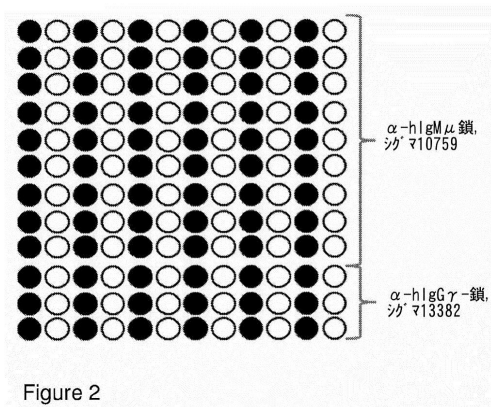


Figure 2

【図 3】

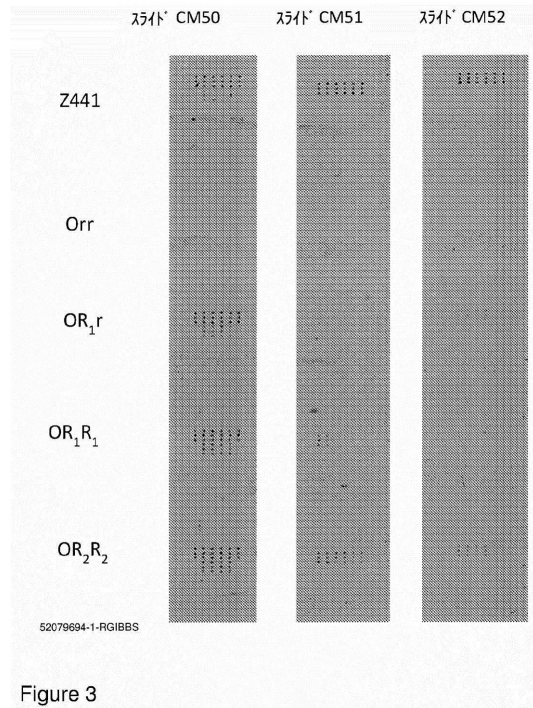


Figure 3

【図 4】

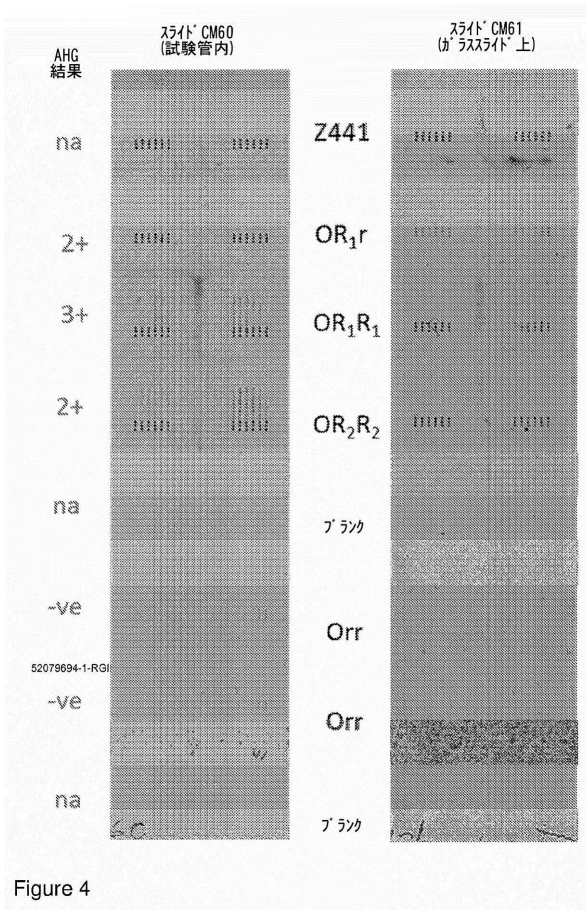


Figure 4

【図 5】

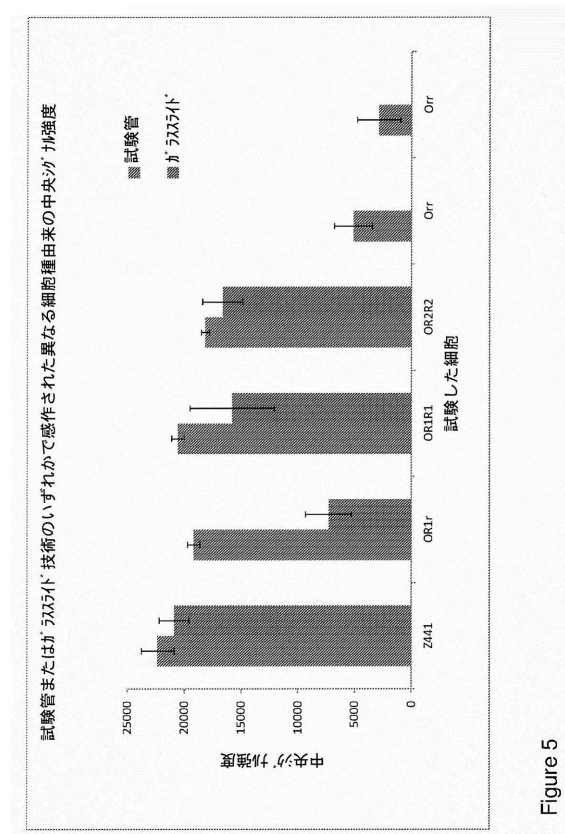


Figure 5

【図 6 a】

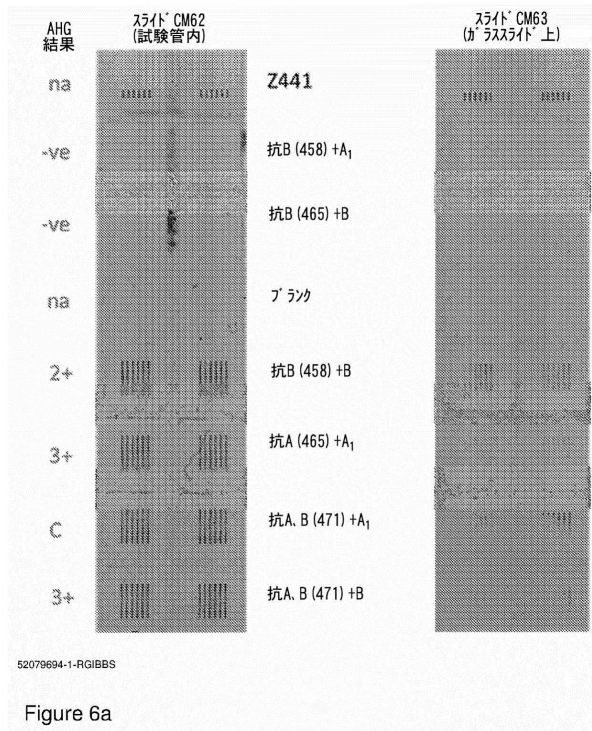


Figure 6a

【図 6 b】

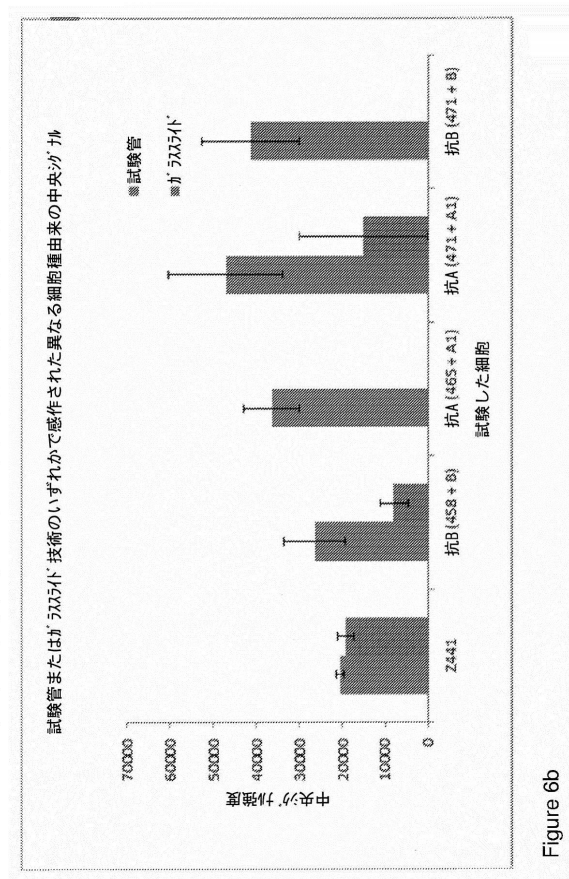


Figure 6b

【図 7】

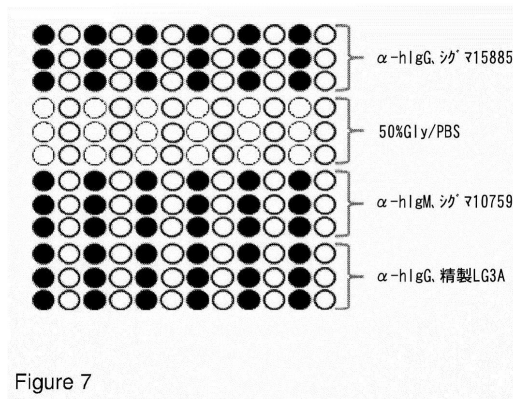


Figure 7

【図 8】

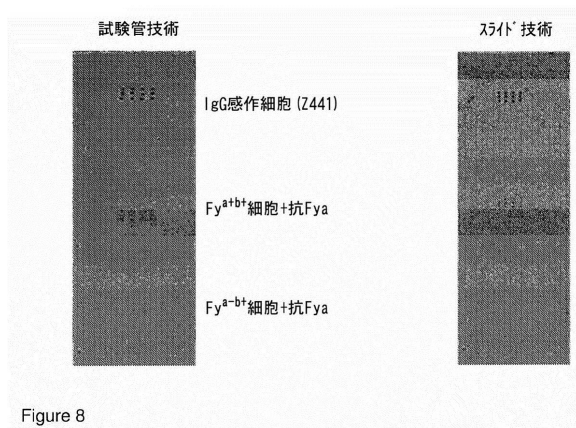


Figure 8

【図 9】

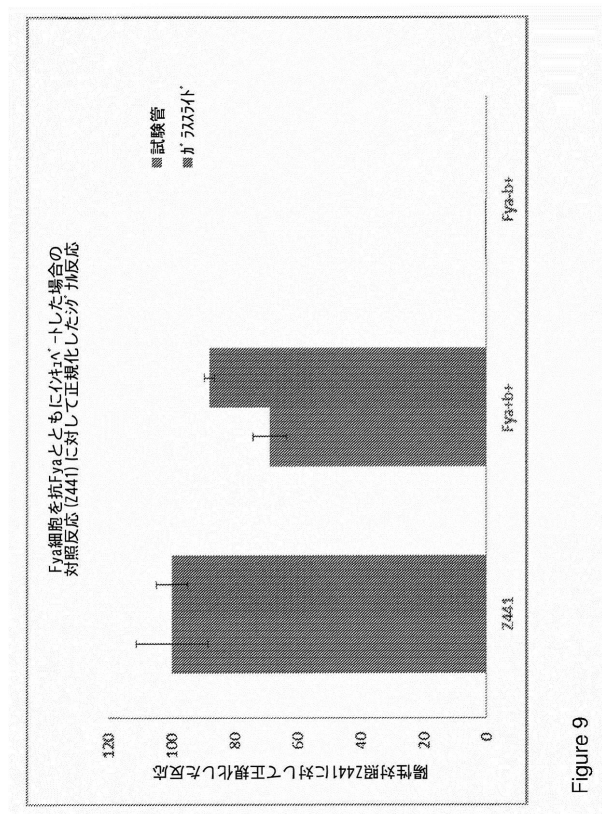


Figure 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/543 5 7 5

(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 ジャニース スコット

イギリス イーエイチ 2 8 8 ジェイティアー ミッドロージアン ニューブリッジ ラーゾ ノー
ス プラット クレセント 4

(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 2 5 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 7 8

(72)発明者 ルノー ニール ケヴィン

イギリス イーエイチ 2 5 9 エルアール ミッドロージアン ロスリン ステーション ロード
4 ビー

(72)発明者 クラクストン クリストファー ロバート ジェームズ

イギリス イーエイチ 2 0 9 ビーユー ミッドロージアン ローンヘッド ボルトン ロード
2 1

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 3 0 9 0 4 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 7 2 8 9 9 (US, A 1)

特表 2 0 1 0 - 5 0 4 5 1 3 (JP, A)

米国特許第 0 5 5 8 3 0 0 4 (US, A)

特表 2 0 1 3 - 5 3 1 2 5 9 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	血液样本的交叉匹配		
公开(公告)号	JP6708558B2	公开(公告)日	2020-06-10
申请号	JP2016568143	申请日	2015-02-06
[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		
当前申请(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 ロブソンデイヴィッドクーパー ルノーニールケヴィン クラクストンクリストファーロバートジェームズ		
发明人	ロブ ジャニーヌ スコット ロブソン デイヴィッド クーパー ルノー ニール ケヴィン クラクストン クリストファー ロバート ジェームズ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/80 G01N33/555 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.N G01N33/543.525.U G01N33/543.525.W G01N37/00.102 G01N33/543.575		
代理人(译)	西岛隆义 田中真一郎 山崎 一夫 服部博信		
优先权	2014002174 2014-02-07 GB		
其他公开文献	JP2017505450A JP2017505450A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测抗体,特别是血型抗体的新颖方法。 本发明的方法可以用于输血前血液相容性测试,以检测供体单位(包括供体红细胞(红细胞))与受体之间的不相容性。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特 許 公 報(B2)	(11) 特許番号 特許第6708558号 (P6708558)
(45) 発行日 令和2年6月10日(2020. 6. 10)	(24) 登録日 令和2年5月25日(2020. 5. 25)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)	F I G01N 33/53 K G01N 33/53 N G01N 33/543 525U G01N 33/543 525W G01N 37/00 102	請求項の数 15 (全 22 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特許2016-568143 (P2016-568143) (36) (22) 出願日 平成27年2月6日(2015. 2. 6) (35) 公表番号 特表2017-505450 (P2017-505450A) (43) 公表日 平成29年2月16日(2017. 2. 16) (38) 国際出願番号 PCT/GB2015/050338 (37) 国際公開番号 WO2015/118347 (31) 優先権主張番号 1402174. 5 (32) 優先日 平成26年2月7日(2014. 2. 7) (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国(GB)	(73) 特許権者 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 1075 (74) 代理人 100086771 弁理士 西島 孝喜 (74) 代理人 100086894 弁理士 弟子丸 健 (74) 代理人 100094569 弁理士 田中 伸一郎 (74) 代理人 100084663 弁理士 稲田 篤	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 血液サンプルの交差適合		