



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105866426 B

(45)授权公告日 2018.11.23

(21)申请号 201610218019.2

(22)申请日 2009.11.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105866426 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(30)优先权数据

61/118,949 2008.12.01 US

(62)分案原申请数据

200980144639.4 2009.11.25

(73)专利权人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 D·B·蒂安 G·陈

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 杨昀

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/546(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

(56)对比文件

CN 1444044 A,2003.09.24,

CN 1423130 A,2003.06.11,

审查员 肖吉

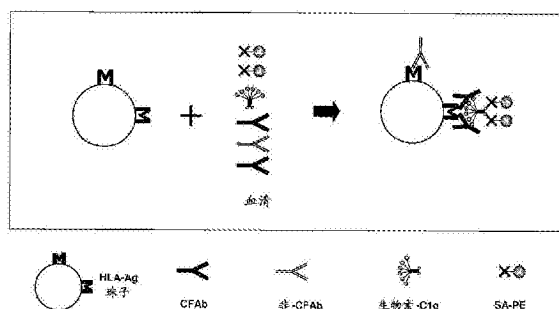
权利要求书1页 说明书27页 附图44页

(54)发明名称

用于检测补体结合性抗体的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供了用于使用补体因子C1q灵敏且特异性地检测生物样品中的补体结合性抗体的方法,所述补体因子C1q包括在生物样品中存在的自体补体因子C1q和结合自体补体因子C1q的可检测地标记的抗体、外源性人补体因子C1q和结合外源性人补体因子C1q的可检测地标记的抗体、可检测地标记的外源性人补体因子C1q、或自体补体因子C1q和外源性人补体因子C1q的组合。本发明也表征了用于本发明方法中的试剂盒、系统和装置。



1. 一种用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合人白细胞抗原 (HLA) 的补体结合性抗体的方法, 所述方法包括:

用不同亚类的微粒的集合和外源补体因子C1q温育来自受试者的生物样品, 其中每个微粒包被有不同的纯化的HLA亚型, 使得该集合模仿正常人群体中的HLA分布, 且其中所述温育的时间足以允许所述生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体结合所述HLA, 并允许所述外源补体因子C1q结合所述生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体;

在任何洗涤步骤之前, 用能特异性地结合外源补体因子C1q的至少一种可检测地标记的配体温育所述微粒, 所述外源补体因子C1q结合在与所述HLA结合的抗-HLA补体结合性抗体上; 并且

检测是否存在结合到所述外源补体因子C1q上的可检测地标记的配体, 以测定是否存在补体结合性抗体。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述微粒是乳胶珠。

3. 如权利要求1所述的方法, 其中所述生物样品是血液或血液制品。

4. 如权利要求1所述的方法, 其中所述可检测地标记的配体是可检测地标记的抗体或其结合片段。

5. 如权利要求1所述的方法, 其中可检测标记是染料。

6. 如权利要求1所述的方法, 其中可检测标记是荧光染料。

7. 如权利要求1所述的方法, 其中可检测标记是生色团、酶、电子供体、电子受体、金属或放射性核素。

8. 如权利要求1所述的方法, 其中所述检测是通过流式细胞术。

9. 如权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述样品和微粒在室温下孵育。

用于检测补体结合性抗体的方法和组合物

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/US2009/065984,国际申请日为2009年11月25日,进入中国国家阶段的申请号为200980144639.4,名称为“用于检测补体结合性抗体的方法和组合物”的发明专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 补体系统是血液中的一组复杂的蛋白,其与抗体和其它因子协同地作为免疫反应、变态反应、免疫化学反应和免疫病理学反应的介质起重要作用。补体系统的活化可以导致广范围的反应,诸如不同种类的细胞、细菌和原生动物的调理作用和裂解,病毒的失活,和炎性过程的直接介导。通过它的几种组分的激素-样活性,补体系统可以募集和支持其它体液和细胞效应系统的参与。这些又可以诱导白细胞的定向迁移,触发来自肥大细胞的组胺释放,并刺激溶酶体组分从吞噬细胞的释放。

[0003] 补体系统由至少20种不同的血浆蛋白组成,所述蛋白能彼此、与抗体和与细胞膜相互作用。当活化时,这些蛋白中的许多与其它蛋白相结合形成酶,以切割和活化系统中的其它蛋白。这些蛋白的相继活化(称作补体级联)遵循2个主要途径:经典途径和替代途径。两个途径都集中在C3,并使用共同的末端主干(terminal trunk),其导致细胞裂解、细菌调理作用和裂解、或病毒灭活。

[0004] 经典途径可以被抗原-抗体复合物、聚集的免疫球蛋白和非免疫学物质(诸如DNA和胰蛋白酶-样酶)活化。活化的经典途径连续地包含4种命名为C1、C4、C2和C3的组分。这些组分可以分成2个功能单位:C1或识别单位;和C4、C2和C3或活化单位。5个命名为C5、C6、C7、C8和C9的额外组分定义膜攻击复合物(MAC),形成两个途径共有的末端主干,后者导致细胞裂解。替代途径使用因子B,并绕过C1-C4-C2步骤,在C3处活化。

[0005] 经典途径从C1-复合物开始,所述C1-复合物由一个C1q分子和2个都具有C1r和C1s的分子组成。通过C1q对来自类别M和G的抗体(与抗原复合)的结合,或通过C1q对病原体表面的结合,触发C1-复合物的活化。C1r和C1s都是丝氨酸蛋白酶。C1q的结合导致C1q分子的构象变化,这又导致2个C1r分子的活化,随后是C1s分子的活化。为了防止该级联的自发活化,用C1-抑制剂(一种丝氨酸蛋白酶抑制剂)抑制C1r和C1s。一旦被活化,C1-复合物结合并切割C2和C4,生成C2a和C4b。C2a和C4b然后结合,以形成C4b2a复合物,称作C3-转变酶。C3-转变酶的生成导致C3被切割成C3a和C3b;后者连接C2a和C4b(C3转变酶),以生成C5转变酶,它是MAC的最初组分。

[0006] 补体途径的活化的研究和测量,可以提供许多可能的生物学障碍的指征。补体途径已经涉入发病机制或广谱的人疾病和病理学病症的症候学。这样的疾病包括几种类型的免疫复合物疾病、自身免疫病(尤其是系统性红斑狼疮)和感染性疾病(诸如发现涉及革兰阴性细菌、病毒、寄生物、真菌的感染的那些)和各种皮肤疾病、肾脏疾病和血液病。有些障碍可能是由于患者的补体不足。

[0007] 本领域需要用于以快速、灵敏且特异性的方式检测患者样品中的补体结合性抗体的方法,尤其在精确地且决定性地区分特定抗原的方面。

[0008] 本发明解决了这些需要。

[0009] 相关文献

[0010] 美国专利号6,514,714和6,150,122;Wahrman等人,J.Immunol.Methods.275(1-2):149-60(2003;和Smith等人,Am.J.Transplant.7(12):2809-15(2007)。

发明内容

[0011] 本发明提供了用于使用补体因子C1q灵敏且特异性地检测生物样品中的补体结合性抗体的方法,所述补体因子C1q包括在生物样品中存在的自体补体因子C1q和结合自体补体因子C1q的可检测地标记的抗体、外源性人补体因子C1q和结合外源性人补体因子C1q的可检测地标记的抗体、可检测地标记的外源性人补体因子C1q、或自体补体因子C1q和外源性人补体因子C1q的组合。本发明也表征了用于本发明方法中的试剂盒、系统和装置。

[0012] 在一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体的方法,所述方法通过下述进行:使其上面固定有目标抗原(AgI)的固体基质接触来自受试者的生物样品和补体因子C1q,其中所述接触的时间足以允许样品中的抗-AgI补体结合性抗体结合AgI,并允许补体因子C1q结合抗-AgI补体结合性抗体;使用能特异性地结合补体因子C1q的至少一种可检测地标记的配体温育固体基质,所述补体因子C1q结合在与AgI结合的抗-AgI补体结合性抗体上;并检测是否存在结合到补体因子C1q上的可检测地标记的配体,以测定生物样品中是否存在特异性地结合AgI的补体结合性抗体。

[0013] 在有些实施方案中,所述补体因子C1q是自体补体因子C1q。在其它实施方案中,所述补体因子C1q是外源性补体因子C1q。在其它实施方案中,所述补体因子C1q是自体补体因子C1q和外源性补体因子C1q的组合。

[0014] 在有些实施方案中,所述固体基质是多孔板。在其它实施方案中,所述固体基质是膜。在其它实施方案中,所述固体基质是微粒,如聚苯乙烯珠、乳胶珠或磁珠。在有些实施方案中,所述固体基质是细胞。在其它实施方案中,所述固体基质是细胞膜。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述可检测地标记的配体是可检测地标记的抗体或其结合片段。在有些实施方案中,所述可检测标记是荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体的方法,所述方法通过下述进行:使其上面固定有目标抗原(AgI)的固体基质接触来自受试者的生物样品和直接标记的外源性补体因子C1q,其中所述接触的时间足以允许样品中的抗-AgI补体结合性抗体结合AgI,并允许所述直接标记的外源性补体因子C1q结合抗-AgI补体结合性抗体;并检测是否存在结合到抗-AgI补体结合性抗体上的直接标记的外源性C1q,以测定生物样品中是否存在特异性地结合AgI的补体结合性抗体。

[0016] 在有些实施方案中,所述固体基质是多孔板。在其它实施方案中,所述固体基质是膜。在其它实施方案中,所述固体基质是微粒,如聚苯乙烯珠、乳胶珠或磁珠。在有些实施方案中,所述固体基质是细胞。在其它实施方案中,所述固体基质是细胞膜。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述直接标记的外源

性C1q被荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素标记。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合人白细胞抗原(HLA)的补体结合性抗体的方法,所述方法通过下述进行:用不同亚类的微粒的集合和补体因子C1q温育来自受试者的生物样品,其中每个微粒包被有不同的纯化的HLA亚型,所述HLA亚型源自呈递相同HLA的细胞群体,且其中所述温育的时间足以允许生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体结合HLA,并允许所述补体因子C1q结合生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体;用能特异性地结合补体因子C1q的至少一种可检测地标记的配体温育所述微粒,所述补体因子C1q结合在与HLA结合的抗-HLA补体结合性抗体上;并检测是否存在结合到补体因子C1q上的可检测地标记的配体,以测定是否存在补体结合性抗体。

[0018] 在有些实施方案中,所述补体因子C1q是自体补体因子C1q。在其它实施方案中,所述补体因子C1q是外源性补体因子C1q。在其它实施方案中,所述补体因子C1q是自体补体因子C1q和外源性补体因子C1q的组合。

[0019] 在有些实施方案中,所述微粒是琼脂糖珠。在其它实施方案中,所述微粒是乳胶珠。在其它实施方案中,所述微粒是磁珠。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述可检测地标记的配体是可检测地标记的抗体或其结合片段。在有些实施方案中,所述可检测地标记是荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。在有些实施方案中,所述检测是通过流式细胞术。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合人白细胞抗原(HLA)的补体结合性抗体的方法,所述方法通过下述进行:用不同亚类的微粒的集合和直接标记的外源性补体因子C1q温育来自受试者的生物样品,其中每个微粒包被有不同的纯化的HLA亚型,所述HLA亚型源自呈递相同HLA的细胞群体,且其中所述温育的时间足以允许生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体结合HLA,并允许所述补体因子C1q结合生物样品中的抗-HLA补体结合性抗体;并检测是否存在结合到抗-HLA补体结合性抗体上的直接标记的外源性补体因子C1q,以测定生物样品中是否存在特异性地结合HLA的补体结合性抗体。

[0021] 在有些实施方案中,所述微粒是琼脂糖珠。在其它实施方案中,所述微粒是乳胶珠。在其它实施方案中,所述微粒是磁珠。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述直接标记的外源性C1q被荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素标记。在有些实施方案中,所述检测是通过流式细胞术。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:其上面固定有目标抗原(AgI)的固体基质;能特异性地结合补体因子C1q的可检测地标记的配体;和用于测定来自受试者的生物样品中是否存在针对目标抗原的补体结合性抗体的说明书。

[0023] 在有些实施方案中,所述固体基质是多孔板。在其它实施方案中,所述固体基质是膜。在其它实施方案中,所述固体基质是微粒,诸如琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、乳胶珠或磁珠。在有些实施方案中,所述固体基质是细胞。在其它实施方案中,所述固体基质是细胞膜。在

有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述可检测地标记的配体是可检测地标记的抗体或其结合片段。在有些实施方案中,所述可检测标记是荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

[0024] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:其上面固定有目标抗原(AgI)的固体基质;能结合补体结合性抗体的直接标记的外源性C1q;和用于测定来自受试者的生物样品中是否存在针对目标抗原的补体结合性抗体的说明书。

[0025] 在有些实施方案中,所述固体基质是多孔板。在其它实施方案中,所述固体基质是膜或细胞。在其它实施方案中,所述固体基质是微粒,诸如琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、乳胶珠或磁珠。在其它实施方案中,所述固体基质是细胞膜。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述直接标记的外源性C1q被荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素分子、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素标记。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在针对人白细胞抗原(HLA)的补体结合性抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:微粒亚类的集合,其中每个微粒亚类包被有不同的纯化的HLA,以代表单个细胞系或多个细胞系的HLA抗原群体,使得该集合模仿正常人群体中的HLA分布;能特异性地结合补体因子C1q的可检测地标记的配体;和用于测定来自受试者的样品中是否存在针对HLA的补体结合性抗体的说明书。

[0027] 在有些实施方案中,所述微粒是琼脂糖珠、乳胶珠、磁珠或聚苯乙烯珠。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述可检测地标记的配体是可检测地标记的抗体或其结合片段。在有些实施方案中,所述可检测标记是荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了用于测定来自受试者的生物样品中是否存在针对人白细胞抗原(HLA)的补体结合性抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:微粒亚类的集合,其中每个微粒亚类包被有不同的纯化的HLA,以代表单个细胞系或多个细胞系的HLA抗原群体,使得该集合模仿正常人群体中的HLA分布;能结合补体结合性抗体的直接标记的外源性C1q;和用于测定来自受试者的样品中是否存在针对HLA的补体结合性抗体的说明书。

[0029] 在有些实施方案中,所述微粒是琼脂糖珠、乳胶珠、磁珠或聚苯乙烯珠。在有些实施方案中,所述生物样品是血清、血液、唾液、血浆或尿。在有些实施方案中,所述直接标记的外源性C1q被标记荧光染料、生色团、酶、连接分子、生物素、电子供体、电子受体、染料、金属或放射性核素。

[0030] 本领域技术人员在阅读下面更充分地描述的本发明的细节后,会明白本发明的这些和其它目的、优点和特征。

附图说明

[0031] 当结合附图阅读时,从下面的详细描述可以最好地理解本发明。应当强调,根据普通实践,附图的不同部件不是按规定比例。相反,为了清楚,不同部件的尺度被任意放大或缩小。附图中包括下述图。

[0032] 图1提供了本公开内容的一个实施方案的一般示意图。使其上面固定有抗原或单

个可辨别的目标抗原 (AgI) 的固体基质接触疑似含有抗-AgI 补体结合性抗体 (CFAb) 的生物样品。如图所示, 所述样品还可能包括非-补体结合性抗体 (非-CFAb) 以及特异性地结合相同样品中的补体结合性抗体的自体 and/或外源性 C1q。在温育后, 如果存在的话, 所述抗-AgI 补体结合性抗体特异性地结合固定化的 AgI, 且所述 C1q 特异性地结合结合的抗-AgI 补体结合性抗体。使所述固体基质接触特异性地结合人 C1q 的可检测地标记的抗-人 C1q (抗-hC1q) 抗体。然后使用本领域已知的方法, 测定所述可检测标记的存在。

[0033] 图2提供了本公开内容的另一个实施方案的一般示意图。在该实施方案中, 在使所述固体基质接触样品之前, 将可检测地标记的抗-C1q (抗-hC1q) 抗体直接加入到生物样品中。或者, 可以将抗-hC1q 抗体和生物样品同时引入固体基质中。

[0034] 图3提供了本公开内容的另一个实施方案的一般示意图。在该实施方案中, 在使所述固体基质接触样品之前, 将可检测地标记的外源性 C1q 直接加入到生物样品中。或者, 可以将可检测地标记的外源性 C1q 和生物样品同时引入固体基质中, 或可以在已经将生物样品引入基质中以后, 将可检测地标记的外源性 C1q 引入固体基质中。在该实施方案中, 象在其它实施方案中一样, 使用本领域已知的方法, 测定可检测地标记的外源性 C1q 的存在。

[0035] 图4提供了本公开内容的另一个实施方案的一般示意图。该实施方案类似于在图1中所述的实施方案, 且以类似的方式起作用。但是, 在该实施方案中, 其上面固定有抗原或单个可辨别的目标抗原 (AgI) 的固体基质是珠子、微珠、微球、微粒、细胞或膜。

[0036] 图5提供了本公开内容的另一个实施方案的示意图。该实施方案类似于在图2中所述的实施方案, 且以类似的方式起作用。但是, 在该实施方案中, 其上面固定有抗原或单个可辨别的目标抗原 (AgI) 的固体基质是珠子、微珠、微球、微粒、细胞或膜。

[0037] 图6提供了本公开内容的另一个实施方案的示意图。该实施方案类似于在图3中所述的实施方案, 且以类似的方式起作用。但是, 在该实施方案中, 其上面固定有抗原或单个可辨别的目标抗原 (AgI) 的固体基质是珠子、微珠、微球、微粒、细胞或膜。

[0038] 图7显示了一步法和两步法 C1q 的确定预期抗体的能力的对比。

[0039] 图8显示了使用常见的 LMX-IgG 试验不起作用的静脉内丙种球蛋白 (IVIG) 掺加 (spiking) 的结果。图表示测试在缓冲液中稀释的和在 IVIG 中稀释的阴性对照血清, 如在 IVIG 体外抑制试验中所进行的, 并使用抗-IgG 标记的第二个步骤 (当前的商业试验)。

[0040] 图9与图8相同, 只是掺加患者血清。结果表明, 如果将 IVIG 加入血清中, 并用抗-IgG 检测, 不可能检测出患者抗体的抑制 (在缓冲液中稀释的样品中可见)。

[0041] 图10显示了用于测定 IVIG 的抑制的补体-依赖性的细胞毒性 (CDC) 试验和 C1q 试验的对比。CDC 试验是以前可用于该测定的唯一试验。

[0042] 图11显示了在成年人心脏患者血清上的实际的 IVIG 体外抑制 C1q 试验, 表明如果治疗患者, 仅 A24 能被 IVIG 抑制。

[0043] 图12A-12B 显示了在监测成年人心脏患者血清 (具有每个后续治疗) 的 A24 抗体的变化中, LMX-C1q (图12A) 和 LMX-IgG (图12B) 试验的对比。(与图11相同的患者)。

[0044] 图13A-13B 显示了具有 IVIG 后续治疗的所有患者的抗体的监测, LMX-C1q (图12A) 和 LMX-IgG (图12B) 试验。注意到使用 LMX-IgG 试验, 难以观察抗体的抑制/消失。

[0045] 图14显示了体外 IVIG 抑制 C1q 试验的结果, 其类似于图11, 但是所述结果来自儿科肾患者, 表明 B57、B58 抗体会被 IVIG 有效地抑制。

[0046] 图15显示了体外和体内结果的并行对比。左图(与图14相同)显示了体外IVIG抑制,右图显示了相同血清日期的患者在IVIG输注之前和之后。

[0047] 图16A-N的表显示了C1q验证实验的结果。

[0048] 图17A-J的表显示了C1q-IVIG验证实验的结果。

[0049] 图18提供了直接标记的C1q试验的一般示意图。

[0050] 图19A-B提供了使用LMX-C1q试验的直接和间接标记C1q之间的对比。

[0051] 图20A-B提供了在体外LMX-C1q IVIG抑制试验中间接标记C1q(图20A)和在体外LMX-C1q IVIG抑制试验中直接标记C1q(图20B)之间的对比。

[0052] 定义

[0053] 术语“补体结合性抗体”是指这样的抗体,其特异性地结合病原体上的抗原,并启动免疫系统的补体级联,所述补体级联将携带抗原的靶物(例如,细胞)或病原体从生物体清除。一般而言,补体结合性抗体是被补体因子C1q识别和特异性地结合的IgM或IgG抗体。

[0054] C1q补体因子是活化血清补体系统的C1酶复合物的亚基。它由链A、B和C的9个二硫键连接的二聚体组成,所述链具有由N-端非螺旋区、三螺旋(胶原的)区和C-端球状头组成的共同结构(Smith等人Biochem. J. 1994. 301:249-256)。C1q参与宿主防御、炎症、细胞凋亡、自身免疫、细胞分化、器官发生、冬眠和胰岛素抗性的肥胖症。已经在C1q家族中鉴别出5个严格保守的残基(Kishore等人Trends in Immunology 2004. 25 (10):551-561)。每个C1q结构域表现出具有胶冻卷(jelly-roll)拓扑学的10链-夹心折叠,其由2个5链 β -折叠(A'、A、H、C、F)和(B'、B、G、D、E)组成,各自由反向平行链组成。一般而言,C1q补体因子存在于动物的血清中,且对补体结合性抗体具有结合特异性和结合亲和力,所述补体结合性抗体也存在于动物的血清中。C1q补体因子与补体结合性抗体的结合活化免疫系统的补体级联。

[0055] “自体的”是指源自相同患者样品,作为另一个组分。例如,提及的自体C1q是指,所述C1q存在于相同受试者样品中,作为补体结合性抗体。

[0056] “外源性的”是指不是天然地源自特定生物体的组分。例如,提及的外源性C1q是指,所述C1q源自不同于具有补体结合性抗体的受试者样品的生物体或系统。

[0057] 本发明的“亲和试剂”具有分析物结合域、部分或组分,其对靶分析物具有高结合亲和力。高结合亲和力是指至少约 10^{-4} M、通常至少约 10^{-6} M或更高、例如 10^{-9} M或更高的结合亲和力。亲和试剂可以是多种不同类型的分子中的任一种,只要它表现出对靶蛋白的必要的结合亲和力(当作为标记的亲和配体存在时)。

[0058] 这样,所述亲和试剂可以是小分子或大分子配体。小分子配体是指大小范围为从约50至约10,000道尔顿、通常从约50至约5,000道尔顿、更通常从约100至约1000道尔顿的配体。大分子配体是指分子量大小为约10,000道尔顿或更大的配体。

[0059] 特别感兴趣的大分子亲和配体是抗体及其结合片段和模仿物。在抗体是亲和配体的情况下,它们可以源自多克隆组合物(使得存在特异性差异的抗体的异质群体各自用相同的标记核酸标记)或单克隆组合物(其中对靶蛋白具有相同特异性的相同抗体的同质群体各自用相同标记(例如,荧光团)来标记)。这样,亲和配体可以是单克隆、寡克隆和/或多克隆抗体。在其它实施方案中,亲和配体是抗体结合片段或模仿物,其中这些片段和模仿物具有对靶蛋白的必要的结合亲和力。例如,通过切割完整的蛋白,例如通过蛋白酶或化学切割,可以制备诸如Fv、(Fab')₂和Fab等抗体片段。也感兴趣的是重组产生的抗体片段,诸如

单链抗体或scFv,其中这样的重组产生的抗体片段保留上述抗体的结合特征。这样的重组产生的抗体片段通常至少包括主题抗体的VH和VL结构域,从而保留主题抗体的结合特征。使用任意方便的方法,诸如在美国专利号5,851,829和5,965,371(它们的公开内容通过引用并入本文)中公开的方法,可以容易地制备本发明的这些重组产生的抗体片段或模仿物。

[0060] 上述的抗体、其片段和模仿物可以从商业来源得到,和/或使用任意方便的技术制备,其中产生多克隆抗体、寡克隆抗体、单克隆抗体、其片段和模仿物(包括其重组衍生物)的方法是本领域技术人员已知的。

[0061] “表位”是指特定B细胞和T细胞对其做出应答的抗原上的部位。该术语也与“抗原决定簇”或“抗原决定基”互换使用。一个表位可以在该表位独有的空间构象中包含1个或多个氨基酸,诸如3个或更多个氨基酸。通常,一个表位包括至少5个这样的氨基酸,且更常见地,由至少8-10个这样的氨基酸组成。测定氨基酸的空间构象的方法是本领域已知的,且包括例如X-射线晶体学和2-维核磁共振。此外,使用本领域众所周知的技术,可以容易地鉴别给定蛋白中的表位。参见,例如,Geysen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1984)81:3998-4002(general method of rapidly synthesizing peptides to determine the location of immunogenic epitopes in a given antigen);美国专利号4,708,871(procedures for identifying and chemically synthesizing epitopes of antigens);和Geysen等人,Molecular Immunology(1986)23:709-715(technique for identifying peptides with high affinity for a given antibody)。在证实一种抗体阻断另一种抗体对靶抗原的结合能力的简单免疫测定中,可以鉴别识别相同表位的抗体。

[0062] “特异性地结合”或“特异性的结合”是指抗体对特定抗原的高亲合力(avidity)和/或高亲合力(affinity)结合。抗体对在特定抗原上的它的表位的结合亲合力(avidity)和/或亲和力(affinity)大于相同抗体对不同表位(尤其是作为特定目标抗原的可能存在于结合的分子中或相同样品中的不同表位)的结合。但是,补体结合性抗体可以对不同目标抗原上的不同表位具有相同的或类似的亲合力(avidity)和/或亲和力(affinity)。这样,“特异性地结合”或“特异性的结合”无意从结合超过一种目标抗原中排除给定的补体结合性抗体。特异性地结合目标多肽的抗体可以能够在弱的、仍然可检测的水平(例如,对目标多肽表现出的结合的10%或更低)结合其它多肽。通过例如使用适当的对照,可以容易地将这种弱结合或背景结合与特定抗体对目标多肽的结合辨别开。

[0063] “可检测地标记的配体”或“可检测地标记的第二配体”是指具有连接的可检测标记的配体,其中所述配体能特异性地结合其它化合物。配体的实例包括、但不限于,保留结合特异性的抗体或抗体片段。通过化学缀合,可以连接可检测标记,但是在所述标记是多肽时,备选地通过基因工程技术来连接。用于产生可检测地标记的蛋白的方法是本领域众所周知的。可检测标记可以选自多种本领域已知的这样的标记,但是通常是放射性同位素、生色团、荧光团、荧光染料、酶(例如,辣根过氧化物酶)、接头分子、或发射出可检测信号(例如,放射性、荧光、颜色)或在所述标记暴露于它的底物后发射出可检测信号的其它部分或化合物。不同的可检测标记/底物对(例如,辣根过氧化物酶/二氨基联苯胺、抗生物素蛋白/抗生物素链菌素、萤光素酶/萤光素)、用于标记抗体的方法和使用标记的第二抗体来检测抗原的方法,是本领域众所周知的。[注:参见,例如,Harlow和Lane,编.(Antibodies:A Laboratory Manual(1988)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring

Harbor, N.Y.)]]。

[0064] “直接标记的C1q”是指具有连接的可检测标记的外源性C1q分子。通过化学缀合，可以连接可检测标记，但是在所述标记是多肽时，备选地通过基因工程技术来连接。用于产生可检测地标记的蛋白的方法是本领域众所周知的。可检测标记可以选自多种本领域已知的这样的标记，但是通常是放射性同位素、生色团、荧光团、酶（例如，辣根过氧化物酶）、接头分子、或发射出可检测信号（例如，放射性、荧光、颜色）或在所述标记暴露于它的底物后发射出可检测信号的其它部分或化合物。不同的可检测标记/底物对（例如，辣根过氧化物酶/二氨基联苯胺、抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素、萤光素酶/萤光素）、用于标记抗体的方法和使用标记的第二抗体来检测抗原的方法，是本领域众所周知的。[注：参见，例如，Harlow和Lane，编。（Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)]]。

[0065] 当用于分离的化合物的上下文中时，本文使用的术语“分离的”是指处于这样的环境中的目标化合物，所述环境不同于所述化合物天然存在的环境。“分离的”意在包括这样的化合物，其在大量富含目标化合物的样品中，和/或其中所述目标化合物部分地或基本上被纯化。术语“分离的”包括这样的情况，其中化合物不伴有至少一些在它的天然状态通常伴有的物质。例如，关于多肽，术语“分离的”通常是指这样的氨基酸分子，其缺少（全部或部分）它在自然界中通常伴有的序列；或指序列，如它在自然界中存在的，但是具有与它伴随的异源序列。

[0066] 本文使用的“纯化的”是指，所述物质包含至少约75%（按重量计算）的总蛋白，至少约80%是优选的，且至少约90%是特别优选的。本文使用的术语“基本上纯的”是指从它的天然环境取出的化合物，且至少60%、优选75%和最优选90%缺少天然伴随它的其它组分。

[0067] 本文使用的“生物样品”是指从受试者分离的组织或流体样品，其在本发明的背景下，通常是指疑似含有抗-AgI补体结合性抗体的样品，该样品在任选的加工后，可以在体外试验中分析。典型的目标样品包括、但不一定限于，血液、血浆、血清、血细胞、尿、唾液和粘液。样品也包括体外细胞培养组分的样品，包括但不限于在培养基中培养细胞和组织得到的条件培养基，例如，重组细胞和细胞组分。

[0068] 本文使用的术语“人白细胞抗原系统”或“HLA”是指主要组织相容性复合物，其跨染色体6的短臂上的大约350万个碱基对。它可分成3个单独的区域，它们包含I类、II类和III类基因。在人类中，I类HLA复合物的长度是约2000kb，且含有约20个基因。在I类区域中存在编码确定地表征的I类MHC分子的基因，命名为HLA-A、HLA-B和HLA-C。另外，存在非经典的I类基因，它们包括HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-H、HLA-J和HLA-X以及称作MIC的新家族。II类区域含有称作HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR基因座的3个基因。这些基因编码命名为HLA-DR、DP和DQ的经典II类MHC分子的 α 和 β 链。在人类中，还在II类中鉴别出命名为DM、DN和DO的非经典的基因。III类区域含有超过36个基因的异质集合。

[0069] 本文使用的“纯化的HLA亚型”是指在下面的表中所述的HLA亚型的基本上纯化的抗原。当关于用“不同的HLA亚型”包被的微珠使用时，是指每个微珠群体包被有不同的HLA抗原亚型。

[0070] 本文使用的“HLA抗原群体”是指在任意一个集合中发现的特定HLA抗原群体，其可

以是天然存在的或非天然存在的,诸如在一个特定的细胞或组织类型中。

[0071] 本文使用的“正常人群体中的HLA分布”是指在正常人群体中发现的特定HLA抗原群体,诸如在一个特定的细胞或组织类型或个体中。

[0072] 术语“评估”包括任意形式的测量,且包括测定元件是否存在。术语“测定”、“测量”、“评价”、“评估”和“试验”互换使用,且包括定量和定性测定。评估可以是相对的或绝对的。“评估……的存在”包括,测定存在的某物的量,和/或测定它是否存在。本文使用的术语“测定”、“测量”、“评估”和“试验”互换使用,且包括定量和定性测定。

[0073] 术语“固体基质”是指在其上面可以固定化抗原和/或抗体的固体支持物。示例性的固体基质包括多孔平板、膜(包括硝酸纤维素膜和聚乙烯膜)、细胞和细胞膜、珠子、微粒、微球和微珠。本发明的方法可以用任意材料的微粒、微球、微珠或珠子实现,例如硅石,金,乳胶,诸如聚苯乙烯、聚砜、聚乙烯或水凝胶等的聚合物。另外,微粒、微球、珠子或微珠可能是磁性的。

[0074] 进一步指出,可以撰写权利要求来排除任意的任选要素。这样,该陈述意在用作关于权利要求要素的陈述所使用的诸如“唯一”、“仅”等排它性术语或“阴性”限制的使用的前提基础。

具体实施方式

[0075] 本发明提供了用于使用补体因子C1q灵敏且特异性地检测生物样品中的补体结合性抗体的方法,所述补体因子C1q包括在生物样品中存在的自体补体因子C1q和结合自体补体因子C1q的可检测地标记的抗体、外源性人补体因子C1q和结合外源性人补体因子C1q的可检测地标记的抗体、可检测地标记的外源性人补体因子C1q、或自体补体因子C1q和外源性人补体因子C1q的组合。本发明也表征了用于本发明方法中的试剂盒、系统和装置。

[0076] 在描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所述的特定实施方案,因为它们当然可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅仅是用于描述特定实施方案的目的,无意进行限制,因为本发明的范围仅由所附的权利要求书限定。

[0077] 在提供值的范围的情况下,应当理解,也具体地公开了在该范围的上限和下限之间的每个插入值(在下限单位的十分之一内,除非上下文另有明确指示)。在任意所述值或在所述范围内的插入值与任意其它所述值或在所述范围内的插入值之间的每个更小的范围,也被包括在本发明内。在该范围中可以独立地包括或排除这些更小的范围的上限和下限,且在本发明内还包括这样的每个范围,其中两个、任一个、或没有边界值被包含在更小的范围内,这适用于所述范围中的任意特别排除的边界值。在所述范围包括边界值之一或二者时,在本发明内还包括这样的每个范围,其排除那些边界值之一或二者。

[0078] 除非另有定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文所述那些类似或等效的任意方法和材料可以用于实践或测试本发明,现在描述一些可能的和优选的方法和材料。本文提及的所有出版物都通过引用并入本文,以公开和描述所述出版物引用的方法和/或材料。应当理解,在存在矛盾的情况下,本公开内容替代并入的出版物的任意公开内容。

[0079] 必须指出,如在本文中和在所附的权利要求书中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确指示。因而,例如,提及的“细胞”包括多个

这样的细胞,提及的“该化合物”包括一种或多种化合物和本领域技术人员已知的其等效物,以此类推。

[0080] 本文讨论的出版物仅因为它们在本申请的提交日之前的公开而提供。本文中的任何内容都不应当解释为承认,本发明因为先前发明而在这些出版物之前没有获得资格。此外,提供的出版物的日期可能不同于实际的出版日,后者可能需要独立地确认。

[0081] 检测方法

[0082] 如上面所总结的,本发明提供了测定生物样品中是否存在补体结合性抗体的方法。本发明的方法使用补体因子C1q(例如自体的或外源性的)来鉴别在相同生物样品中存在的特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体。

[0083] 所述方法通常包括,使其上面固定有目标抗原(AgI)的固相支持物接触疑似含有特异性地结合目标抗原的补体结合性抗体的生物样品。如果存在,所述补体结合性抗体会特异性地结合固定化在固相支持物上的抗原,且C1q会结合所述补体结合性抗体。然后通过使固相支持物接触特异性地结合结合的C1q的可检测地标记的抗-C1q抗体,可以测定C1q结合。或者,可以在试验中使用直接标记的C1q,且可以直接地测量该直接标记的C1q的结合,无需使用可检测地标记的抗-C1q抗体。

[0084] 所述生物样品通常包括非-补体结合性抗体以及补体结合性抗体。本发明的一个优点是,它可以区分两种不同的抗体,无论是通过使用在相同样品中存在的C1q,还是通过使用外源性C1q。通过使用在相同样品中存在的C1q,所述试验提供有关的补体结合性抗体的灵敏且特异性的检测,这在使用异源的C1q(诸如源自兔血清的C1q)时不会发生。

[0085] 容易明白,本文所述的试验的设计可以进行大量变化,且许多形式是本领域已知的。下面的描述仅仅作为指导而提供,使用本领域众所周知的技术,本领域技术人员可以容易地改进所述方案。

[0086] 目标抗原(AgI)

[0087] 能引起抗体的抗原或抗原决定簇适用于本发明中。这样的抗原或抗原决定簇可以是,例如,源自正常人[例如,人白细胞抗原(HLA)]、细菌、病毒、寄生物或真菌来源、或者异常组织(诸如肿瘤抗原)的那些。抗原通常是可以针对它产生抗体的任意分子,包括需要佐剂的存在或与另一种分子缀合以诱导抗体形成的分子。抗原可以是肽或蛋白、碳水化合物、核酸或脂质。术语“抗原”也包括天然存在的分子的一部分,例如,蛋白的亚基、或含有功能结构域或生物学相关基序的蛋白片段。合适的抗原包括但不限于,细胞周期相关蛋白、组织特异性蛋白、肿瘤标志物、细胞因子、主要组织相容性复合蛋白、热休克蛋白和病原体相关蛋白(其中病原体可能是细菌、病毒、真菌、原生动物、多细胞寄生物或朊病毒)、以及与输血抗原和组织分型有关的碳水化合物残基、脂多糖、鞘脂类等。示例性的抗原是引发保护动物免于疾病的免疫应答的那些。这种抗原的实例包括但不限于原生动物寄生物抗原、蠕虫寄生物抗原、外寄生物抗原、真菌抗原、细菌抗原和病毒抗原。

[0088] 病毒抗原的实例包括源自下述的抗原,诸如乙型肝炎病毒(HBV),人免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒A型、埃巴病毒(EBV)、单纯疱疹病毒(HSV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人巨细胞病毒(HCMV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)和麻疹病毒。细菌抗原的实例包括、但不限于来自下述的抗原:放线菌属、杆菌属、拟杆菌属、博德特菌属(*Bordetella*)、巴尔通体属(*Bartonella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁杆菌属(*Brucella*)、弯曲杆菌属、二氧化碳噬

纤维菌属 (Capnocytophaga)、梭菌属、棒杆菌属、考克斯体属 (Coxiella)、嗜皮菌属、肠球菌属、埃里希体属、埃希氏菌属、弗朗西丝菌属、梭杆菌属、血巴尔通体属 (Haemobartonella)、螺杆菌属、克雷伯菌属、L型细菌、钩端螺旋体属、利斯特菌属、分枝杆菌属、支原体属、新立克次氏体属、诺卡尔菌属、巴斯德菌属、消化球菌属、消化链球菌属、变形杆菌属、假单胞菌属、立克次氏体属、罗克利马体菌属 (Rochalimaea)、沙门菌属、志贺菌属、葡萄球菌属、链球菌属和耶尔森菌属。真菌抗原的实例包括、但不限于来自下述的抗原：犁头霉属、支顶孢属、链格孢属、曲霉菌属、蛙粪霉菌属 (Basidiobolus)、双极霉属、芽生菌属、念珠菌属、衣原体属、球孢菌属、耳霉属、隐球菌属、弯孢属 (Curvularia)、表皮癣菌属、外小杯菌 (Exophiala)、地丝菌属、组织胞浆菌属、马杜拉分枝菌属、马拉色霉菌属 (Malassezia)、小孢子菌属、小丛梗孢属、被孢霉菌、毛霉菌属、拟青霉属、青霉菌属、单胞瓶霉菌、瓶霉菌、原壁菌属、假霉样真菌属 (Pseudallescheria)、假小托菌属、腐霉菌属、鼻孢子菌属、根霉菌属、线状担子菌属、孢子丝菌属、匍柄霉菌、发癣菌属、毛孢子菌属和木丝霉属。原生动物和蠕虫寄生物抗原的实例包括、但不限于来自下述的抗原：巴贝虫属、小袋虫属、贝诺孢子虫属 (Besnoitia)、隐孢子虫属、艾美球虫属、脑炎微孢子虫属、内阿米巴属、贾第虫属、哈蒙德虫属、肝簇虫属、等孢子球虫属、利什曼原虫属、微孢子属、新孢子虫属、微粒子虫属、五鞭毛滴虫属、疟原虫属、肺孢子虫属 (Pneumocystis)、肉孢子虫属、血吸虫属、泰勒虫属、弓形虫属和锥虫属、棘唇线虫属、猫圆线虫属、钩虫属、管圆线虫属、蛔虫属、布鲁丝虫属、仰口线虫 (Bunostomum)、毛细线虫属、夏柏特线虫属、古柏线虫属、环体线虫属、网尾线虫属、膨结线虫属、棘唇属、裂头属、复孔绦虫属、恶丝虫属、龙线虫属、蛲虫属、类丝虫属、血矛线虫属、兔唇蛔属、罗阿丝虫属、曼森线虫属、缪勒线虫属、侏形吸虫属、板口线虫属、细颈线虫属、结节线虫属、盘尾丝虫属、后睾吸虫属、胃线虫属、副丝虫属、并殖吸虫属、副蛔虫属、泡翼属线虫、原圆线虫属、腹腔丝虫属、旋尾线虫属、迭宫绦虫属、冠丝虫属、类圆线虫属 (Strongyloides)、圆线虫属、吸吮线虫属、弓蛔线虫属、弓蛔虫属、毛线虫属、毛圆线虫属、鞭虫属、钩虫属和吴策线虫属。外寄生物抗原的实例包括、但不限于来自下述的抗原 (包括保护性抗原以及变应原)：蚤；蜱，包括硬蜱和软蜱；蝇类，诸如蠓、蚊子、沙蝇、黑蝇、马蝇、角蝇、鹿蝇、采采蝇、厩蝇、蝇蛆病致病蝇和咬蚊；蚂蚁；蜘蛛、虱；螨；和真虫，诸如臭虫和接吻虫。

[0089] 示例性的抗原包括、但不限于：杯状病毒抗原、冠状病毒抗原、疱疹病毒抗原、免疫缺陷病毒抗原、传染性腹膜炎病毒抗原、白血病病毒抗原、猫泛白细胞减少症 (panleukopenia) 病毒抗原、细小病毒抗原、狂犬病病毒抗原、巴尔通体属抗原、耶尔森菌属抗原、恶丝虫属抗原、弓形虫属抗原、肿瘤抗原、蚤抗原、跳变应原、蠓抗原、蠓变应原、螨抗原和螨变应原。特别优选的抗原包括狂犬病毒糖蛋白G抗原；心丝虫PLA2、P39、P4、P22U、Gp29、虾红素、半胱氨酸蛋白酶、巨噬细胞迁移抑制因子、毒液变应原、TPX-1、TPX-2、转谷氨酰胺酶、锚蛋白和天冬酰胺酶抗原；蚤丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、氨肽酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂、羧酸酯酶、保幼激素酯酶和环氧化物水解酶抗原；蚤唾液抗原；耶尔森菌属F1和V抗原；和刚地弓形虫抗原。

[0090] 在本发明中使用的抗原可以是通过基因重组方法产生的抗原，或是基于通过基因重组测定的基因序列或肽序列而化学合成的抗原。因而，通过下述方式制备重组抗原：用酶等处理已知的基因组序列或通过使用基因重组技术从天然病毒或细胞的分子克隆得到的

DNA序列,或进行化学合成,并由微生物、动物、植物、昆虫等表达得到的DNA序列或修饰的DNA序列,以得到重组抗原;或通过下述方式制备肽或修饰的肽:称作液相方法的肽化学合成,或使用上述信息的固相方法。肽的固相合成方法通常以有利的方式通过自动化的肽合成仪器来实现。

[0091] 预吸附

[0092] 在有些实施方案中,任选地首先使生物样品接触交叉反应性抗原。一般而言,使生物样品接触交叉反应性抗原,会导致生物样品中交叉反应性抗体的清除,同时还未清除抗-AgI (目标抗原)特异性的补体结合性抗体,其如果存在,以可检测水平(例如,通过使用试验来检测本文所述的特定抗-AgI特异性的补体结合性抗体)保留在样品中。因此,用于接触生物样品的交叉反应性抗原通常不包含将要用于检测预吸附的生物样品中是否存在抗-AgI特异性的补体结合性抗体的AgI。

[0093] 接触可以如下完成,例如,使生物样品接触一种或多种本文所述的交叉反应性抗原。可以在连续的步骤中,使生物样品接触交叉反应性抗原,然后接触具有固定化的AgI的特定固体支持物。在有些实施方案中,在检测样品中的特定抗-AgI特异性的补体结合性抗体之前,使生物样品接触根据本发明的交叉反应性抗原,以从样品中“预吸附”非特异性的抗体。除非另有特别指出,本文使用的“预吸附”不一定表示,首先使生物样品接触交叉反应性抗原,然后使样品接触AgI,而是表示,直到样品已经暴露于交叉反应性抗原之后,才检测特定抗-AgI特异性的补体结合性抗体。

[0094] 样品制备

[0095] 在主题方法的实践中,测定来自受试者的样品中抗-AgI特异性的补体结合性抗体的存在。在有些实施方案中,测定的样品是这样的样品,它是或源自含有特异性地结合AgI的补体结合性抗体的任意最初来源。在其它实施方案中,所述样品是含有不足补体的任意最初来源或从其得到。这样的样品包括,其中已经通过热灭活来破坏补体或C1q的那些样品,和其中外源性地供给C1q的那些样品。因此,合适的样品来源源自这样的流体,已经向其中释放了特异性地结合AgI的补体结合性抗体。感兴趣的样品来源包括、但不限于:许多不同的体液,尤其是血液或血液制品,例如,血清、血浆和全血、血细胞和尿。样品体积可以是与特定测定形式相容的任意体积。在有些实施方案中,在测定特异性地结合AgI的补体结合性抗体是否存在之前,在合适的溶液中稀释样品。一般而言,适用于稀释生物样品的溶液包括缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS),且可以包括额外的物质,例如,非特异性的阻滞剂诸如牛血清白蛋白(BSA)、去污剂诸如Triton-X-100等。

[0096] 适用于试验的对照样品包括、但不限于:从不具有抗-AgI特异性的补体结合性抗体的人受试者收集的血液、血清、全血或尿(即,阴性对照),或含有已知的、预定量的抗-AgI特异性的补体结合性抗体的样品(即,阳性对照)。

[0097] 在许多实施方案中,人样品的合适的最初来源是血液样品。这样,在主题试验中采用的样品通常是血液衍生的样品。血液衍生的样品可以源自全血或其级分,例如,血清、血浆等,其中在某些实施方案中,样品源自允许凝结的血液,并分离和收集血清,以用于试验。

[0098] 在其中样品是血浆、血清或血清-衍生的样品的实施方案中,所述样品通常是流体样品。可以采用用于产生流体血清样品的任意方便的方法。在许多实施方案中,所述方法通过皮肤穿刺(例如,手指针刺、静脉穿刺术)将静脉血抽入凝固管或血清分离器管,允许血液

凝结,并从凝结的血液中离心出血清。然后收集和储存血清直到试验。类似地,可以如下从患者收集血浆样品:把静脉血抽入试管中,并离心血液,使血细胞聚集在试管底部。然后可以收集和储存样品的液体部分(它是血浆)直到试验。得到患者-衍生的样品后,对样品进行试验,以测定抗-AgI特异性的补体结合性抗体的存在。

[0099] 可以以多种方式处理受试者样品,从而增强抗-AgI特异性的补体结合性抗体的存在的检测。例如,在样品是血液的情况下,在试验之前,可以从样品去除红血细胞(例如,通过离心)。通过使用本领域众所周知的规程(例如酸沉淀、醇沉淀、盐沉淀、疏水沉淀、过滤(使用能保留大于30kD的分子的过滤器,例如Centrim 30™)、亲和纯化)来浓缩样品,也可以增强抗-AgI特异性的补体结合性抗体的存在的检测。

[0100] 试验形式

[0101] 固体支持物固定化的AgI在本文中用作诊断剂,以检测生物样品中是否存在反应性的抗-AgI特异性的补体结合性抗体。典型地,所述试验通常包含,将液相中未结合的抗体与抗原-补体结合性抗体复合物结合的固相支持物分离。该试验一般地描述在图1、图2和图3中(关于基本上平坦的固体支持物(例如,膜或微量滴定孔形式))和在图4、图5和图6中(关于微珠固体支持物)。可以用于实践本发明的固体支持物包括基质诸如硝酸纤维素(例如,以膜或微量滴定孔形式);聚氯乙烯(例如,片层或微量滴定孔);聚苯乙烯;乳胶(例如,珠子、微珠、微粒、微球或微孔滴定板);聚偏氟乙烯;重氮化的纸;尼龙膜;聚乙烯膜,活化的珠子,磁性反应珠子,细胞和细胞膜等。

[0102] 在有些实施方案中,在试验之前,在合适的溶液中稀释生物样品。一般而言,适用于稀释生物样品的溶液包括缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS),且可以包括额外的物质,例如,非特异性的阻滞剂诸如牛血清白蛋白(BSA)、去污剂诸如Triton-X-100等。

[0103] 一般而言,首先在合适的结合条件下,使固体支持物与液相组分(例如,一种或多种特定的目标抗原(AgI))反应,使得所述组分充分固定化在支持物上。任选地,通过首先将AgI偶联到具有更好结合性质的蛋白上,可以增强抗原向支持物上的固定化。合适的偶联蛋白包括、但不限于:大分子诸如包括牛血清白蛋白(BSA)在内的血清白蛋白、钥孔戚血蓝素、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白和本领域技术人员众所周知的其它蛋白。可以用于将抗原结合到支持物上的其它分子包括多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物等。这样的分子和将这些分子偶联到AgI上的方法,是本领域普通技术人员众所周知的。参见,例如,Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashida等人, *J. Appl. Biochem.* (1984) 6:56-63; 和Anjaneyulu和Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124。

[0104] 在使固体支持物接触AgI后,通过洗涤,从支持物去除任意未固定化的AgI。然后在合适的结合条件下,使支持物结合的AgI接触疑似含有抗-AgI补体结合性抗体的生物样品。如果存在,所述补体结合性抗体会特异性地结合固定化的AgI。在样品中存在的C1q(例如自体的或外源性的)会结合补体结合性抗体,所述补体结合性抗体结合在固定化在固相支持物上的AgI上。在样品中存在的C1q可以是来自生物样品自身的自体C1q,或可以是外源性C1q。在有些实施方案中,然后通过使固相支持物接触特异性地结合C1q的可检测地标记的抗-C1q抗体,来测定结合的C1q。然后可以使用本领域众所周知的技术,检测可检测地标记的抗-C1q抗体的存在。

[0105] 在有些实施方案中,以连续的方式进行测定,首先使固相支持物接触含有抗-AgI补体结合性抗体和C1q的生物样品,然后使固相支持物接触可检测地标记的抗-C1q抗体。该方案如图1所述。在其它实施方案中,使固相支持物同时接触生物样品和可检测地标记的抗-C1q抗体。该方案如图2所述。

[0106] 在有些实施方案中,在试验中使用可检测地标记的外源性C1q。在这样的实施方案中,使固相支持物同时接触目标样品和可检测地标记的外源性C1q。然后使用本领域众所周知的技术,检测结合的C1q。该方案如图3所述。

[0107] 更具体地,在有些实施方案中,可以使用ELISA方法,其中微孔滴定板的孔包被有特定AgI(例如,特定AgI被固定化在表面上)。然后将含有或疑似含有抗-AgI补体结合性抗体和C1q(例如自体的或外源性的)的样品加入包被的孔中。任选地,使用样品或其等分试样作为对照,可以平行地测定一系列含有已知浓度的抗-AgI补体结合性抗体的标准品。通常,约0.001至1ml样品(稀释的,或以其它方式得到)是足够的,通常约0.01ml会满足需要。此外,在某些实施方案中,将每个样品和标准品加入多个孔中,从而可以得到各自的平均值。将实验和对照样品各自与固体支持物一起温育足以发生抗体与抗原结合的时间。通常,约0.1至3小时是足够的,通常1小时会满足需要。

[0108] 在足以允许抗体结合固定化的AgI、和在样品中存在的C1q结合补体结合性抗体(其结合在固定化的AgI上)的温育时段后,可以任选地洗涤平板,以去除未结合的抗体。通常,在适当pH(通常7-8)的稀释的非离子型去污剂介质可以用作洗涤介质。在洗涤步骤中可以使用等渗缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水。在某些实施方案中,在试验过程中不进行洗涤。

[0109] 在一个替代实施方案中,首先使含有或疑似含有抗-AgI补体结合性抗体的生物样品接触溶液中的交叉反应性抗原,以提供预吸附的混合物。在足以允许抗体结合交叉反应性抗原的温育时段后,然后将含有“残余”抗体的预吸附的混合物加入到用特定AgI包被的微孔滴定板的孔中。在足以允许来自预吸附的混合物的“残余”抗-AgI补体结合性抗体结合固定化的AgI、和在样品中存在的C1q(例如自体的或外源性的)结合补体结合性抗体(其结合在固定化的AgI上)的温育时段后,可以任选地洗涤平板,以去除未结合的抗体。在某些实施方案中,不进行洗涤。加入可检测地标记的第二结合分子,其结合结合在补体结合性抗体上的C1q。允许第二结合分子与结合抗-AgI补体结合性抗体(例如,与固定化在表面上的特定AgI抗原结合的补体结合性抗体)的任意C1q(例如自体的或外源性的)反应,任选地洗涤平板,并使用本领域众所周知的方法检测第二结合分子的存在。

[0110] 因而,在一个具体实施方案中,使用包含针对自体C1q的抗体的第二结合物,可以容易地检测来自生物样品的结合的抗-AgI补体结合性抗体和自体C1q的存在。在另一个实施方案中,使用包含直接标记的外源性C1q的第二结合物,可以容易地检测来自生物样品的结合的抗-AgI补体结合性抗体的存在。许多抗-人C1q分子是本领域已知的(例如,可商业得到的山羊抗-人C1q、绵羊抗-人C1q等),它们可以容易地缀合到可检测标记上,以促进自体或外源性C1q的直接或间接检测。允许直接测量免疫复合物的标记的实例包括放射性标记,诸如³H或¹²⁵I、荧光团、染料、珠子、化学发光剂、胶体颗粒等。允许间接测量结合的标记的实例包括酶,其中底物可以提供有色的或荧光的产物。可以直接地(例如放射性同位素)或通过结合一种或多种额外的分子(例如结合到标记的抗体上的表位)检测标记。根据本发明可以使用的荧光化合物的非限制性实例包括荧光染料诸如荧光素(FITC)或Alexa 488、Cy 3

或Cy 5和绿荧光蛋白、以及藻红蛋白(PE) PE-Cy5、PerCP、ECD等。在有些实施方案中,所述抗体被共价结合的酶标记,在加入合适的底物后,所述酶能提供可检测的产物信号。适用于缀合物中的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等。当不可商业得到时,通过本领域技术人员已知的技术,可以容易地产生这样的抗体-酶缀合物。

[0111] 在这样的试验中,可检测地标记的抗-C1q抗体或直接标记的C1q的浓度通常是约0.1至500 $\mu\text{g/ml}$,诸如约150 $\mu\text{g/ml}$ 。含有可检测地标记的抗-C1q抗体的溶液通常被缓冲至约pH 6.5-9.5的范围。温育时间应当足以使可检测地标记的抗-C1q抗体结合可得到的自体或外源性C1q。通常,约0.1至3小时是足够的,通常40分钟会满足需要。在已经清除非特异性地结合的物质后,通过常规方式,检测由结合的可检测地标记的抗-C1q抗体生成的信号。例如,当所述可检测标记是荧光化合物时,使用流式细胞术或其它类似的技术,诸如Luminex xMap系统,可以检测标记的存在。当使用酶缀合物时,提供适当的酶底物,从而形成可检测的产物。更具体地,当过氧化物酶是选择的酶缀合物时,优选的底物组合是 H_2O_2 和O-苯二胺,其在适当的反应条件下产生有色的产物。适用于其它酶缀合物(诸如上面公开的那些)的底物是本领域技术人员已知的。合适的反应条件以及用于检测不同的有用缀合物或它们的产物的装置,也是本领域技术人员已知的。例如,对于底物O-苯二胺的产物,使用分光光度计方便地测量在490-495nm的吸光度。

[0112] 也可以在溶液中进行试验,使得在生物样品中存在的AgI和抗体在沉淀条件下形成复合物。在一个具体实施方案中,使用本领域已知的偶联技术,诸如通过直接化学偶联或间接偶联,可以将特定AgI固定化在固相颗粒(例如,琼脂糖珠、乳胶珠等)上。然后在合适的结合条件下,使AgI-包被的颗粒和游离的交叉反应性抗原(例如,未固定化在固相颗粒上)接触疑似含有抗-AgI补体结合性抗体的生物样品。结合的抗-AgI补体结合性抗体和C1q(例如,自体或外源性的)之间的交联,造成颗粒-抗原-抗体复合物聚集体的形成,使用洗涤和/或离心,可以将所述聚集体从样品中沉淀和分离出来。使用许多标准方法中的任一种,诸如上述的那些免疫诊断方法,包括使用可检测地标记的抗-C1q抗体,可以分析反应混合物,以测定抗体-抗原复合物是否存在。

[0113] 在另一个实施方案中,可以将特定AgI固定化在第一固相颗粒(例如,琼脂糖珠等)上,并可以将交叉反应性抗原固定化在第二固相颗粒(例如,磁珠)上,其中第一固相颗粒和第二固相颗粒是不同的。在这样的实施方案中,然后在合适的结合条件下,使交叉反应性抗原-包被的颗粒和特定AgI-包被的颗粒接触疑似含有抗-AgI补体结合性抗体的生物样品。然后可以从样品分离颗粒-交叉反应性抗原-抗体复合物。例如,在将交叉反应性抗原结合到第一颗粒(诸如磁性珠)上的情况下,使用许多标准方法中的任一种,可以从溶液分离颗粒-交叉反应性抗原-抗体复合物。然后可以使用上述方法,分析反应混合物,以测定是否存在补体结合性抗体-特定AgI抗原复合物。

[0114] 在另一个实施方案中,使用本发明诊断感染(例如,细菌或病毒)的方法包括,用于检测样品中是否存在抗-AgI补体结合性抗体的试验装置的应用,其通过下述进行:首先任选地使样品接触交叉反应性抗原,以去除会与特定AgI交叉反应的任意抗体,然后使样品接触特定AgI,以结合样品中的任意抗-AgI补体结合性抗体。在这样的实施方案中,所述试验装置至少包含样品施用区、预吸附区和检测区,且由能传导流体流动的膜(诸如硝酸纤维素膜条)组成。任选地,所述膜可以提供在刚性的或半刚性的支持表面上,该支持表面诸如聚

乙烯条。在代表性的实施方案中,所述预吸附区插入在样品施用区和检测区之间。所述区域的位置可以使得,流体沿着膜的侧向流造成样品的所有组分首先接触预吸附区,然后接触检测区。这样,通过跨膜的毛细管作用,促进沿着膜从样品施用区向预吸附区、然后向检测区的流体流动。示例性的侧向流试验装置和使用侧向流试验装置的检测方法提供在例如美国专利号6,146,589中,其公开内容通过引用并入本文。

[0115] 在代表性的实施方案中,将交叉反应性抗原固定化在预吸附区中,并将特定AgI固定化在检测区中。通过首先将样品加入样品施用区,并通过跨膜条的毛细管作用使样品迁移,检测抗-AgI补体结合性抗体是否存在。随着样品跨膜条迁移,样品首先接触预吸附区中的固定化的交叉反应性抗原,以提供预吸附的样品。预吸附的样品然后迁移至检测区,在这里接触固定化的特定AgI。如果存在,抗-AgI补体结合性抗体特异性地结合固定化的AgI,且C1q(例如,自体或外源性的)然后特异性地结合结合的抗-AgI补体结合性抗体。然后可以如上所述,使可检测地标记的抗-C1q抗体接触检测区,以检测C1q和抗-AgI补体结合性抗体复合物的存在。使可检测地标记的抗-C1q抗体分子与任意捕获的样品C1q反应,并使用上述的和本领域众所周知的方法,检测第二结合分子的存在。

[0116] 在任意上述实施方案中,可以采用1-6次洗涤,使用足够的体积,以彻底洗掉存在的任意非特异性地结合的蛋白或其它分子。

[0117] 试剂盒

[0118] 也提供了可用于实践上述主题方法的试剂盒。用于实践主题方法的试剂盒至少包括用于测定源自人受试者的样品中是否存在抗-AgI补体结合性抗体的试剂,其中这样的试剂盒可以包括:特定AgI和/或包含特定AgI的免疫测定装置、可检测地标记的抗-C1q抗体、直接标记的外源性C1q、以及信号产生系统的成员(诸如酶底物)等;用于实现主题检测试验的不同缓冲液;用于测定样品中是否存在抗-AgI补体结合性抗体的参比物;等。

[0119] 在有些实施方案中,所述组合物提供在适用于稀释生物样品的溶液中。一般而言,适用于稀释生物样品的溶液包括缓冲液诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS),且可以包括额外的物质,例如,非特异性的阻滞剂诸如牛血清白蛋白(BSA)、去污剂诸如Triton-X-100等。

[0120] 所述试剂盒可以另外包括一种或多种可以用于制备患者衍生出的样品的试剂,诸如肝素、聚蔗糖-泛影葡胺、裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂等。另外,主题试剂盒可以另外包括一种或多种用于样品分级的组分,诸如电泳介质或其前体,例如聚丙烯酰胺凝胶的干燥前体,一种或多种缓冲介质或其组分等。

[0121] 在某些实施方案中,所述试剂盒另外至少包括含有参照数据的信息储存和呈现介质,试验结果可以与所述参照数据对比,以便诊断感染,例如,与上述的特异性地结合源自细菌或病毒来源的目标抗原的抗-AgI补体结合性抗体的存在正相关或负相关的参照数据。所述信息储存和呈现介质可以是任意方便的形式,诸如在包装插页上的打印信息,存在于电子储存介质(例如磁盘、CD-ROM)上的电子文件,等。在其它实施方案中,所述试剂盒可以包括用于得到参照数据的替代方式,例如用于“在线”得到参照数据的网站。

[0122] 所述试剂盒可以另外包括用于得到患者样品的工具,例如注射器。主题试剂盒通常另外包括关于实现主题方法的说明书,其中这些说明书可以存在于包装插页上和/或试剂盒的包装上。最后,所述试剂盒可以另外包括一种或多种来自其它生化试验的试剂,所述其它生化试验用于检测抗-AgI补体结合性抗体的存在。

[0123] 所述试剂盒组分可以存在于单独的容器中,或一种或多种组分可以存在于相同的容器中,其中容器可以是储存容器和/或在试剂盒的预期试验中使用的容器。

[0124] 装置

[0125] 也提供了可用于实践上述主题方法的装置。用于实践主题方法的装置至少包括用于测定源自人受试者的样品中是否存在抗-AgI补体结合性抗体的试剂,其中这样的装置可以包括:固定化在固体支持物表面上的特定AgI和任选的交叉反应性抗原,该固体支持物诸如微孔滴定板或微珠,诸如琼脂糖或乳胶珠子。

[0126] 在某些实施方案中,给微孔滴定板提供独特的AgI,其固定化在平板的每个孔的表面上。在其它实施方案中,给微孔滴定板提供相同的AgI,其固定化在平板的一个或多个孔的表面上。在某些实施方案中,给微珠群体提供AgI,其固定化在微珠群体的表面上。在某些实施方案中,给微珠群体提供独特的AgI,其固定化在微珠的每个亚群体的表面上。例如,提供微珠群体,其包括10个亚群体,其中每个亚群体包括一种独特的固定化的AgI。例如,可以将30种I类HLA抗原(表1和表3)和30种II类HLA抗原(表2和表4)固定化在微珠(诸如乳胶珠)的表面上,它们是单个抗原形式(表1和2)或在亚群体中(表3和4),用于鉴别特异性地结合一种HLA亚型的补体结合性抗体。

[0127] 表1

珠子编号	HLA I 类抗原分型	珠子编号	HLA I 类抗原分型
1	A1	36	B47
2	A2	37	B48
3	A3	38	B49
4	A11	39	B50
5	A23	40	B51
6	A24	41	B52
7	A25	42	B53
8	A26	43	B54
9	A29	44	B55
10	A30	45	B56
11	A31	46	B57
12	A32	47	B58
[0128] 13	A33	48	B59
14	A34	49	B60
15	A36	50	B61
16	A43	51	B62
17	A66	52	B63
18	A68	53	B64
19	A69	54	B65
20	A74	55	B67
21	A80	56	B71
22	B7	57	B72
23	B8	58	B73
24	B13	59	B75
25	B18	60	B76
26	B27	61	B78
27	B35	62	B81
28	B37	63	B8201

[0129]	珠子编号	HLA I 类抗原分型	珠子编号	HLA I 类抗原分型
	29	B38	64	BW4
	30	B39	65	BW6
	31	B41		
	32	B42		
	33	B44		
	34	B45		
	35	B46		

[0130] 表2

[0131]	珠子编号	HLA II 类抗原分型
	1	DR1
	2	DR4
	3	DR7
	4	DR8
	5	DR10
	6	DR103
	7	DR11
	8	DR12
	9	DR13
	10	DR14
	11	DR15
	12	DR16
	13	DR17
	14	DR18
	15	DR51
	16	DR52
	17	DR53
	18	DR15, 17
	19	DQ2
	20	DQ4
	21	DQ5
	22	DQ6
	23	DQ7
	24	DQ8
	25	DQ9

[0132] 表3

[0133]	珠子编号	HLA I 类抗原分型
	1	A11 B27,48
	2	A2,29 B39,56
	3	A1,29 B8,45
	4	A2,24 B7,55
	5	A2,25 B18,64
	6	A26,24 B52,62
	7	A31,68 B53
	8	A2,11 B13,62

	珠子编号	HLA I 类抗原分型	
[0134]	9	A23,33	B45,63
	10	A23,34	B44
	11	A11,23	B49,52
	12	A11,24	B59,60
	13	A24,33	B44,51
	14	A23,26	B41,72
	15	A3,32	B50,56
	16	A2,24	B54,67
	17	A2	B52,73
	18	A26,66	B38,75
	19	A11,33	B51,54
	20	A30	B13,72
	21	A30,36	B35,71
	22	A69	B35,61
	23	A1,32	B60,64
	24	A2	B7,46
	25	A30	B42
	26	A2	B8,58
	27	A2,3	B58,65
	28	A1,36	B37,57
	29	A3,68	B7,65
	30	A33,36	B53,61

[0135] 表4

	珠子编号	HLA II 类抗原分型		
[0136]	1	DR15, 9	53, 51	DQ5, 9
	2	DR4, 15	53, 51	DQ6, 7
	3	DR16, 4	53, 51	DQ4, 5
	4	DR8, 14	52	DQ4, 5
	5	DR4, 7	53	DQ2, 8
	6	DR15, 18	51, 52	DQ6, 4
	7	DR11, 12	52	DQ5, 7
	8	DR103, 17	52	DQ5, 2
	9	DR1, 13	52	DQ5, 6
	10	DR9, 10	53	DQ5, 9
	11	DR15, 12	51, 52	DQ5, 7
	12	DR16, 14	51, 52	DQ5
	13	DR13, 8	52	DQ5, 6
	14	DR11, 13	52	DQ5, 6
	15	DR17, 7	52, 53	DQ2, 9
	16	DR15, 8	51	DQ6, 8
	17	DR15, 4	51, 53	DQ2, 6
	18	DR15, 17	51, 52	DQ6, 2
	19	DR15, 7	51, 53	DQ6, 2
	20	DR1, 7	53	DQ2, 5
	21	DR15, 11	52	DQ5, 6
	22	DR7, 13	52, 53	DQ6, 9

[0137]	23	DR15, 13	51, 52	DQ6, 2
	24	DR9, 14	52, 53	DQ5, 9
	25	DR8, 9	53	DQ2, 7
	26	DR17, 14	52	DQ2, 5
	27	DR1, 11	52	DQ5, 6
	28	DR17, 4	52, 53	DQ2
	29	DR11, 4	52, 53	DQ7, 8
	30	DR1, 14	52	DQ5

[0138] 许多这样的装置是本领域已知的。在一个非限制性实例中,所述装置包含AgI,其使用本领域已知的偶联技术(诸如通过直接化学偶联或间接偶联)固定化在固相颗粒(例如,琼脂糖珠、乳胶珠、磁珠等)上。然后可以将颗粒-AgI复合物用于上述试验中。在有些实施方案中,通过诸如多肽等连接部分,将AgI固定化在固相颗粒上。

[0139] 在要用所述装置实践的方法中可能存在需要或希望的其它物品,所述其它物品包括、但不限于:用于得到患者样品的装置,例如注射器;制备患者衍生出的样品必需的一种或多种试剂,诸如肝素、聚蔗糖-泛影葡胺、裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂等;关于使用主题装置实现主题方法的说明书;一种或多种来自其它生化试验的试剂,所述其它生化试验用于检测抗-AgI补体结合性抗体的存在。

[0140] 在有些实施方案中,还给所述装置提供适用于稀释生物样品的溶液。一般而言,适用于稀释生物样品的溶液包括缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS),且可以包括额外的物质,例如,非特异性的阻滞剂诸如牛血清白蛋白(BSA)、去污剂诸如Triton-X-100等。

[0141] 在另一个非限制性实例中,所述仪器通常采用合适的过滤器或膜(诸如硝酸纤维素膜)的连续流动路径,其具有至少3个区域:流体运输区、样品区和测量区。在接受样品之前,防止样品区与流动路径的其它部分发生流体转移接触。在样品区接受样品后,它与流体运输区建立流体转移关系(例如,样品区与流体运输区发生流体交流)。流体转移区可以任选地具有固定化的交叉反应性抗原,以便结合交叉反应性抗体。在流体运输区接受样品后,它与测量区建立流体转移关系(例如,流体运输区与测量区发生流体交流)。测量区上可能已经固定化了特定AgI,然后使可检测地标记的抗-C1q抗体与测试的样品相组合,并如上进行试验。

[0142] 在另一个非限制性实例中,所述装置是浸渍片(dipstick),其表面上结合有不同的区域:(1)特定AgI,和任选的(2)交叉反应性抗原亲和试剂。在这样的示例性装置中,在适合允许抗-AgI补体结合性抗体结合特定AgI、并使C1q(例如,自体或外源性的)随后结合结合的抗-AgI补体结合性抗体的条件下,将浸渍片直接插入源自人受试者的实验样品(例如,血液、血清或尿)中。然后从样品取出浸渍片,且在必要时,进行洗涤,以去除非特异性地结合的物质。接着,将浸渍片插入容器中,所述容器含有可检测地标记的抗-C1q抗体或其片段或模仿物,其特异性地结合人C1q。在温育足以使抗-C1q抗体结合人C1q和抗-AgI补体结合性抗体-AgI复合物的时间后,可以洗涤浸渍片,并通过标准方法检测抗-C1q抗体的结合。在需要检测第二抗体时,可以将浸渍片插入第二个容器中,该容器含有活化第二抗体上的可检测标记的试剂。或者,类似的实施方案可以使用直接标记的外源性C1q来替代抗-C1q抗体。在这样的实施方案中,在从样品取出浸渍片以后,可以洗涤浸渍片,并可以通过标准方法检测直接标记的外源性C1q的结合。

[0143] 实施例

[0144] 阐述下面的实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开内容和描述,且无意限制发明人做出的发明的范围,它们也无意表示,下面的实验是进行的全部或唯一实验。已经努力确保使用的数字(例如量、温度等)的准确度,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出,份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或接近大气压。

[0145] 实施例1

[0146] C1q HLA抗体试验

[0147] 方法和材料

[0148] 在下面的实施例中使用下面的方法和材料。

[0149] 材料

[0150] LABScreen单抗原和PRA试剂盒购自One Lambda (Canoga Park, CA)。绵羊抗-人C1q的PE-缀合物购自Meridian Life Science, Inc. (Saco, Maine 04072)。IVIG (Gamimmune-N); 10%在0.2M甘氨酸中;pH 4.4;由Bayer Corporation提供。

[0151] 方法

[0152] 1.细胞毒性的-依赖性的细胞毒性(CDC)

[0153] 10-S-150 细胞毒性交叉匹配-T细胞。

[0154] 10-S-151 细胞毒性交叉匹配-B细胞。

[0155] 2.CDC体外静脉内丙种球蛋白(IVIG)抑制

[0156] 10-S-150 细胞毒性交叉匹配-T细胞。

[0157] 10-S-151 细胞毒性交叉匹配-B细胞

[0158] 3.Luminex IgG(单抗原珠子和PRA珠子):

[0159] 10-S-127 LUMINEX IgG单抗原珠子试验。

[0160] 4.Luminex C1q(单抗原珠子和PRA珠子)实验规程

[0161] 下面的规程用于单抗原珠子和PRA珠子的Luminex C1q实验规程:

[0162] 4.1.在托盘振荡器上,用2.5 μ l HLA I和/或II类HLA-Ag包被的珠子(单抗原/混合抗原珠子)在室温温育20 μ l血清20分钟;

[0163] 4.2.没有洗涤;加入10 μ l PE缀合的抗-人C1q,并在托盘振荡器上继续温育另外20分钟;

[0164] 4.3.用200 μ l Luminex洗涤缓冲液洗涤珠子2次,并重新悬浮于60 μ l PBS中。

[0165] 4.4.在Luminex机器上获取样品和收集数据;

[0166] 4.5.使用LABScreen软件,进行数据分析。

[0167] 截止设置

[0168] 阳性的HLA-Ab特异性必须满足下述2个标准:

[0169] a.基于One Lambda提供的公式,评分应当>4;和

[0170] b.PE的粗荧光信号应当>100;

[0171] 5.用于IVIG体外抑制Luminex C1q实验的样品制备

[0172] 在体外IVIG抑制实验中,使用下面的3个样品:

[0173] a.纯血清(具有已知的抗-HLA特异性);

- [0174] b. 在[10%人白蛋白, 0.2M甘氨酸/PBS]缓冲液中1:2稀释的血清; pH7.4
- [0175] c. 在10% IVIG (在0.2M甘氨酸缓冲液载体中) 中1:2稀释的血清; pH~4.4。
- [0176] 如上制备的AB阴性的未致敏的男性血清作为IVIG抑制试验对照。
- [0177] 6. 用于体外抑制CDC实验的样品制备
- [0178] 除了用作稀释剂的0.2M甘氨酸/PBS缓冲液 (pH 7.4) 以外, 与上面的Luminex C1q样品制备相同的方式, 制备样品。上述的规程是一步规程。下面的规程是也可以使用的多步规程:
- [0179] a). 两步洗涤, 加入和不加入额外的人C1q
- [0180] b). 在进行试验之前, DTT处理血清, 加入和不加入额外的人C1q。
- [0181] c). 使用PE-抗-C3作为第二抗体。
- [0182] d). Luminex PRA珠子, 使用一步法。
- [0183] e). 热灭活血清, 加入和不加入C1q。
- [0184] 7. 验证实验设计
- [0185] 基于“盲试验”原理, 进行所有验证实验。通过AHG-CDC、Luminex IgG和Luminex C1q试验, 同时测试所有正式的验证样品。
- [0186] 8. 试验间/试验内QC样品
- [0187] 下面的预定义的QC样品用于QC监测方法:
- [0188] 用于试验间QC的阳性对照:
- [0189] ●PPS; 在3% HBSA (由Robert Bray博士友情提供) 中1:10稀释的广特异性的HLA抗体。
- [0190] 用于试验内QC的阳性对照:
- [0191] ●Harbury; 纯的; 具有已知的HLA抗体特异性 (自制分型血清)。
- [0192] 用于试验间QC的阴性对照:
- [0193] ●单个AB阴性男性供体, 没有输血或移植史。
- [0194] 预检验所有QC样品, 并分成小等分试样冷冻。每个等分试样仅用于单批试验。对于试验内QC, 在相同批试验中检验10份Harbury血清; 对于试验间QC, 在每批试验中检验PPS和单个AB QC血清。在3个不同荧光强度水平 (表示为相对数) 的这些组的数据用于变异系数 (CV%) 计算。每个组含有5个荧光强度数。
- [0195] 9. 样品资源
- [0196] 共91个盲样品用于Luminex-C1q验证研究中, 并与CDC和/或Luminex-IgG结果相对比。从下面来源得到所有验证样品:
- [0197] 1. 预定义的HLA分型血清 (N=16);
- [0198] 2. 随机的自制临床血清 (N=42);
- [0199] 3. 来自威斯康星的随机的临床血清 (N=11); 和
- [0200] 4. 随机的男性AB血清 (N=22)。
- [0201] 在30个样品 (体外样品) 上进行IVIG体外抑制实验, 还收集了11个IVIG前和IVIG后的血清 (体内), 并通过CDC、LMX-C1Q和LMX-IgG方法测试。
- [0202] 结果
- [0203] (Ab-Ag) 复合物的形成和补体C1q的结合, 是经典途径级联和CDC的早期事件。C1q

结合的量与细胞死亡(经典途径级联和CDC的最后一步)直接相关。作为在显微镜下视觉地估计细胞死亡百分比的替代,设计了Luminex-C1q来检测HLA-(Ab-Ag)复合物的C1q结合,其中使用高流通量Luminex技术。

[0204] 在反应中,用血清温育用单个HLA抗原单独包被的Luminex珠子,以允许HLA-Ab(如果存在)结合对应的Ag珠子和结合来自血清的补体C1q,随后加入荧光标记的抗-人C1q(PE-抗C1q)。另外温育后,洗涤珠子,并通过Luminex机器测量每个珠子表面上的PE-荧光强度。

[0205] 每个HLA单抗原珠子上的PE强度表示对应的HLA(Ab-Ag)复合物的补体结合能力;它与CDC效应成比例地相关。

[0206] Luminex-C1q方法设计和优化

[0207] 两步法与一步法的比较

[0208] 评价了一步法和两步法,其中加入/不加入额外的人C1q。数据证实,关于背景噪音、检测灵敏度和方法简单性,一步法远远好于两步法(图7)。

[0209] 样品稀释效应

[0210] 在一步Luminex-C1q中,评价了5种不同的稀释液:

[0211] a. 3% HBSA;

[0212] b. 0.2M甘氨酸缓冲液;pH 4.4;

[0213] c. 0.2M甘氨酸在PBS中;pH 7.2;

[0214] d. 10%人白蛋白在甘氨酸缓冲液中;pH 4.4;和

[0215] e. 10%人白蛋白在0.2M甘氨酸缓冲液/PBS中;pH 7.2。

[0216] 令人感兴趣地发现,当在每种上述稀释液中以1:2稀释血清时,仅含有甘氨酸的稀释液在Luminex-C1q试验中急剧增加预定义的阳性血清中的C1q结合(与纯血清结果相比,增加2-8倍)。甘氨酸缓冲液对C1q结合的增加,可能是由于:(a) C1q结合的直接增强,和/或(b)间接地增强CFAb结合,由此增加C1q结合。还在Luminex-IgG试验中评价了甘氨酸、3% HBSA和PBS对IgG结合的影响。没有增加IgG结合,所有稀释液成比例地降低IgG结合。因此,甘氨酸缓冲液通过未知的机理直接地增强C1q结合。

[0217] 基于所述结果和对检测灵敏度和方法稳定性的考虑,最终选择10%人白蛋白在0.2M甘氨酸缓冲液/PBS中(pH 7.2)作为用于Luminex-C1q IVIG抑制试验的最佳稀释液。

[0218] C3结合

[0219] 还在一步法和两步法中使用PE-缀合的抗-人C3 Ab,评价了补体C3对HLA-Ab(Ab-Ag)复合物的结合。在试验中不可检出C3结合。可能是因为,PE-抗-C3未被优化,或抗体自身具有不足的亲合力。如果必要,可以测试更多的C3抗体。

[0220] CDC和Luminex-C1q之间的关联

[0221] 通过CDC和Luminex-C1q测试了共78种血清,得到的结果彼此高度相关(N=76, 97%;参见附上的“LMX-C1q验证样品-常规样品(图16A-N)和LMX-C1q验证-IVIG样品(图17A-J)”)。使用LMX-IgG来测定血清中存在的所有结合Ab,存在22种这样的血清,其中LMX-C1Q比CDC更好地鉴别出CF Ab(N=22;28%)。在所有测试的样品中,被CDC挑出的HLA-IgG特异性也是Luminex-C1q阳性的。Luminex-C1q试验经常挑出通过CDC未看到的额外的CF HLA-Ab特异性的有限集合。通过Luminex-C1q检测出的所有“额外的”特异性,也在Luminex IgG试验中检测出,这证实了LMX-C1Q试验的更高的灵敏度。在具有广HLA-Ab特异性的血清的情

况下,CDC不会检出任何特异性;但是,Luminex-C1q能清楚地鉴别出特异性(#2、#21、#36、#37、#40、#42、#64;N=7;9%)。

[0222] 另外5种血清(#6、#9、#18、#67、#70;6.4%)被CDC检出“不清楚的或不确定的”HLA-Ab特异性,但是被Luminex-C1q和Luminex-IgG检出清楚的特异性。CDC在样品#7、#10、#11、#27和#28中检出错误鉴别的特异性(N=5;6.4%),这在任一种Luminex试验(C1q或IgG)中未发现。

[0223] 4种血清(样品#2、#3、#7和#10;N=4;5.1%)在CDC中鉴别出一些特异性,它们在Luminex-C1q中是阴性的。然后通过CDC重新测试盲样品,且在重复试验中是阴性的,证实了CDC的误检。存在一种这样的利妥昔单抗(Rituxan)治疗的患者血清,其中Luminex-C1q仍然能鉴别出I和II类特异性,但是通过CDC未测出特异性,因为所有B细胞都被血清中的细胞毒性利妥昔单抗杀死。

[0224] 应当指出,通过CDC在测试的DTT处理过的血清中检测出的任意IgM特异性(图16A-N中的#38、#41、#64、#67和#76,和图17A-J中的#7),也具有在Luminex-IgG中检测出的对应IgG(通过Luminex-C1q仅挑出#38、#41、#64和#67)。这提示,IgM和IgG同种抗体对相同Ag特异性的共存在体内可能是普通现象。

[0225] 通过CDC检出的IgM特异性在Luminex-C1q试验中是阴性的(图16A-N中的#76和图17A-J中的#7)。^[后续工作已经证实该发现]。C1q可能不能结合IgM(Ab-Ag)复合物,或抗-C1q抗体可能由于位阻不能接近复合物中的C1q。

[0226] 在验证中发现了另外2个表面上不相关的样品(N=2;2.6%)。样品#13具有通过CDC和Luminex-IgG可检测出的A23、B57和B58Ab,但是通过Luminex-C1q不可检出;样品#24具有通过CDC和LMX-IgG可检测出的B54、55、56、61、81,但是通过Luminex-C1q不可检出(注B61=CDC误检)。通过“掺加”外源性人C1Q,重复这2个有问题的样品,并观察到完全一致性。总之,27%(N=21)的CDC测试的样品被视作宽的或错误的,和/或具有不确定的特异性。通过Luminex-C1q,全部具有清楚的特异性。

[0227] 尽管与CDC相比,Luminex-C1q检测出额外的特异性(在LMX-IgG中也观察到),它的包含关联性(LMX-C1q包括通过CDC检出的所有特异性)是100%(78/78)。

[0228] Luminex-IgG和Luminex-C1q之间的关联

[0229] 来自验证过的样品的结果证实,被Luminex-C1q检出的所有HLA-Ab特异性也被Luminex-IgG发现。在我们测试的所有样品中,与CDC和/或Luminex-C1q的检测相比,Luminex-IgG总是给出更高的特异性。这是由于缺少非-CF Ab和IgM的检测,它们分别是通过CDC和LMX-C1Q不可检测的。Luminex-IgG可能在样品#1、#5、#29、#30、#38、#65、#71和#77(N=8;10%)中挑出非-CFAB。LMX-IgG也在正常的未致敏的AB阴性男性供体血清(#27、#28和#88)中检测出特异性,这些血清在理论上应该是测定阴性的。

[0230] CDC和Luminex-C1q是基于相同的原理,即检测补体结合性抗体,长期以来其被认为在临床上与免疫应答有关。但是,Luminex-IgG是基于IgG-结合的原理,仅不考虑该结合的下流效应。因此,方法灵敏度的对比(在能提供信息时)不是实验验证的基础,因为实验的原理是不同的。做出更好的试验系统的判断的标准,仍然是清楚地鉴别出那些临床上有关的同种抗体,它们会提供关于最好的供体-受体匹配、急性排斥预测和移植后监测的可靠信息。由于CDC已经被确定地证实它的临床重要性,我们在我们的Luminex-C1q验证研究中主

要聚焦于与CDC的对比;并使用Luminex-IgG作为进一步证实结果的参照。

[0231] 体外IVIG抑制试验和体内IVIG治疗的患者试验

[0232] 共11位患者血清样品已经用于IVIG抑制研究。同时进行Luminex-C1q、CDC和/或Luminex-IgG的平行实验。通过CDC和Luminex-C1q、但是不通过Luminex-IgG,进行IVIG抑制实验,因为后者不是适用于该目的的试验(参见IVIG掺加结果;图8-9)。

[0233] Luminex-C1q体外IVIG抑制实验的所有结果与在IVIG后样品中看到的体内IVIG效应完美匹配;甚至在其中IVIG造成某些特异性的差别抑制(而不造成其它特异性的差别抑制)的那些样品中(图10)。在用IVIG多次治疗的一位患者中,通过Luminex-C1q,测试了IVIG前和IVIG后血清的随访样品。体外IVIG抑制实验表现出有差别的抑制模式:A24被抑制,A2、68、69未被抑制。在患者接受IVIG治疗后,采取随访IVIG后样品用于Luminex-C1q试验,并证实了相同的抑制模式(图11-13B)。在大多数情况下,Luminex-C1q IVIG抑制结果也与CDC IVIG抑制实验结果相关联,或比后者更好。

[0234] 从IVIG研究组得到的验证数据清楚地证实了Luminex-C1q相对于CDC和Luminex-IgG的优点(图16A-N和图17A-J)。

[0235] 讨论

[0236] 正确鉴别出存在于(潜在的)移植受体的血清中的临床上有关的/有害的HLA同种抗体,是移植之前的关键步骤。细胞毒性同种抗体(CFAB)可以造成超急性排斥,这在移植领域通常很好地接受。

[0237] 基于它们的补体结合特征,将在受体血清中存在的HLA抗体(HLA-Ab)分成2大类,例如,CFAB和非-CFAB。已知仅CFAB是有害的和临床上有关的,但是非-CFAB的真实免疫学功能尚不清楚。流动交叉匹配研究提示,一些结合抗体是无关的,且有些是有害的。迄今为止,关于结合补体的能力,尚未做出在流动中的区别。有些非-CFAB实际上可能是有益的抗体,且在维持正常免疫体内稳态中起重要作用。我们的未公开的IVIG研究数据提示,有些IgG天然地存在于正常人血清中,它们可以特异性地结合HLA-Ag。作为激活CDC级联来杀死细胞的替代,它们发挥保护作用,并抑制由细胞毒性HLA同种抗体产生的CDC效应。该机理仍然在研究中。在移植实践中区分两类抗体是非常重要的。

[0238] 补体C1q是经典补体途径的关键组分,且起第一识别分子的作用,其与抗体-抗原复合物相互作用,以激活补体级联。C1与抗体的结合是通过C1q,且C1q必须交联至少2个抗体分子,然后才能被牢固地结合。包含3种不同蛋白C1q、C1r和C1s的补体1(C1)复合物是补体的经典途径的关键起始活化步骤,且在炎症过程的启动中起重要作用。补体C1q是非常稳定的蛋白分子,具有高血清浓度(150ug/ml)。在我们的研究中,测试的最老的血清是冷冻于1976年,且它仍然具有良好的C1q结合活性。在理论上,通过HLA同种抗体来检测C1q结合,优于使用经典途径级联中的其它更晚的下游补体组分。该方法允许获知,筛选供体可以将补体结合到特定抗体-抗原复合物上,给出关于活化移植后级联的连续步骤的风险估计。我们呈现的Luminex-C1q方法开发和验证数据,已经为该试验设计的原理提供了有力证据。

[0239] 在Luminex-C1q方法开发和优化过程中,评价了规程的几种不同的实验设计,包括一部法、两步法(加入和不加入额外的人C1q)、DTT血清处理和不同的稀释液。基于方法灵敏度、稳定性、准确度和简单性,确定了最终的优化的一步法,并用于验证研究中。对于Luminex C1q体外IVIG抑制试验,使用10%人白蛋白在0.2M甘氨酸/PBS缓冲液中(pH:7.4)

作为样品稀释液对照,以对照稀释效应。

[0240] 该新开发的Luminex-C1q完美地组合了来自CDC和Luminex-IgG的特征,且与此同时,消除了这两种试验中存在的主要缺点。一方面,不象LMX-IgG,但是象CDC,它通过无细胞的固相结合系统,直接地检测CFAb,以得到优于CDC的功能实验结果。因为它另外具有高灵敏度,Luminex-C1q能挑出被CDC错过的低水平细胞毒性的抗体。另一方面,象LMX-IgG,但是不象CDC,Luminex-C1q可以容易地在单个反应中同时鉴别出多达接近100种不同的HLA-Ab,这是由于使用Luminex高通量多路检测系统。

[0241] LMX-C1q实际上可以排除经常被Luminex-IgG检出的来自非-细胞毒性的Ab的假阳性结果。由于Luminex-C1q试验仅检测CFAb,且不具有来自IVIG的干扰(即,非CF IgG存在于来自IVIG治疗的患者的血清中),LMX-C1q可以可靠地用于体外IVIG抑制实验。已经证实了Luminex-C1q试验在预测和监测IVIG体内有效性方面的可靠性。(图17A-J和图10-15)。通过分析和对比所有3种方法的结果,发现了下面的模式,且与每个实验系统的理论原理相一致:

[0242] 1. 被CDC检出的任意特异性(1个除外,由于IgM)都包含在Luminex-C1q中;如果没有,则CDC被错误解释,和/或由于非-HLA抗体;

[0243] 2. 被Luminex-C1q检出的任意特异性也都包含在通过Luminex-IgG检测出的特异性中,但是不一定被CDC检出;且

[0244] 3. 如果Luminex-IgG是阴性的,则Luminex-C1q将是阴性的,且DTT处理过的血清在CDC中也将是阴性的。

[0245] 实施例2

[0246] 直接地标记的C1q HLA试验

[0247] 下面的提供了使用Luminex多路/单抗原珠子技术,筛选人血清来鉴别HLA补体结合性抗体(HLA-CFAb)的一个示例性方法。但是,这些方法可以使用任意的流式细胞术或ELISA系统来实现,以使用任意的多路或单抗原系统来鉴别任意种类的补体结合性抗体。

[0248] 使用HLA单抗原包被的Luminex (LMX) 珠子,诸如LABscreen I类和LABscreen II类单抗原珠子混合物(One Lambda, Canoga Park, CA) 和生物素标记的C1q,温育待测血清。通过补体依赖性的细胞毒性(CDC)和通过间接的C1q(抗-C1q)试验,已知血清A具有补体结合能力。它具有HLA抗体特异性的有限集合。血清B是阳性对照血清,通过CDC和间接的C1q(抗-C1q)试验,已知其具有补体结合能力。它具有非常宽的HLA抗体特异性集合。阴性对照是未输血的男性AB阴性(ABO/Rh血型类型)血清,已知其在任何试验中不结合补体。在试验之前,将所有血清热灭活,以“不补(decomplement)”它们。

[0249] 如图18所示,实验血清中的HLA抗体(1)结合在对应的珠子上的HLA抗原,和(2)结合的HLA-CFAb结合生物素标记的C1q(Bio-C1q),以(3)形成HLA-CFAb/Ag/Bio-hC1q的复合物。在反应物中存在的R-藻红蛋白-缀合的抗生蛋白链菌素(SA-PE)然后结合到该复合物的Bio-hC1q上。用LABscreen洗涤缓冲液洗涤后,在Luminex机器上获取珠子。每种HLA单抗原珠子上的PE强度代表对应的HLA-Ab/Ag复合物的补体结合能力,这与抗体的补体依赖性的细胞毒性(CDC)效应成比例地相关联。

[0250] 然后将实验血清的反应模式与抗原阵列工作单(与在试验中使用的抗原珠子混合物相结合)进行对比,伴随的分析程序提供数据,用于计算小组反应抗体(CPRA)和确定抗-

HLA补体结合性抗体特异性。

[0251] 将在LMX-C1q试验中使用直接标记的C1q的HLA检测的特异性与在早前的实施例中所使用间接标记的C1q(抗-C1q抗体)进行LMX-C1q试验的特异性进行了对比。如图19A所示,使用直接标记的C1q的检测导致真实阳性数目增加。图19B显示了血清B的亚集合,其仅包括通过直接标记的C1q检测出的阳性抗体,且该亚集合按照间接标记的C1q反应的强度排列。X轴在每种情况下代表单抗原珠子的特异性(即,每个条是不同于所有其它条的独特单抗原)。Y轴代表MFI(平均荧光强度),且是反应强度的指征。

[0252] 还使用该方法进行了体外IVIG抑制试验,以证实使用抗-C1q抗体(图20A)和直接标记的C1q(图20B)进行试验的关联性和再现性。如上所述进行IVIG试验。如图20B所示,在IVIG抑制试验中,直接标记的C1q与抗-C1q抗体的有效性类似。但是,用直接标记的C1q进行的试验比用抗-C1q方法进行的试验更灵敏。

[0253] 上面的结果成功地证实,该新开发的试验是简单的、可靠的、灵敏的、客观的、特异性的、高通量多路HLA同种抗体试验。它将代替经典的CDC试验。该试验的原理可能成为用于任意细胞毒性抗体检测的通用技术平台。

[0254] 前面仅仅解释了本发明的原理。应当明白,本领域技术人员能设计不同的方案,它们尽管没有在本文中予以明确描述或证实,但是会实现本发明的原理,且包括在本发明的精神和范围内。此外,本文阐述的所有实施例和条件语言原则上意在辅助读者理解本发明的原理和发明人提出的概念,以促进本领域,且应当解释为、但不限于这样的具体阐述的实施例和条件。此外,本文关于本发明的原理、方面和实施方案以及它们的具体实施例的所有阐述,意在包括它们的结构和功能等效物。另外,这样的等效物意在包括目前已知的等效物和将来开发的等效物,即开发的执行相同功能的任意元件,无论结构。因此,本发明的范围无意限于本文所示和所述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附的权利要求书来体现。

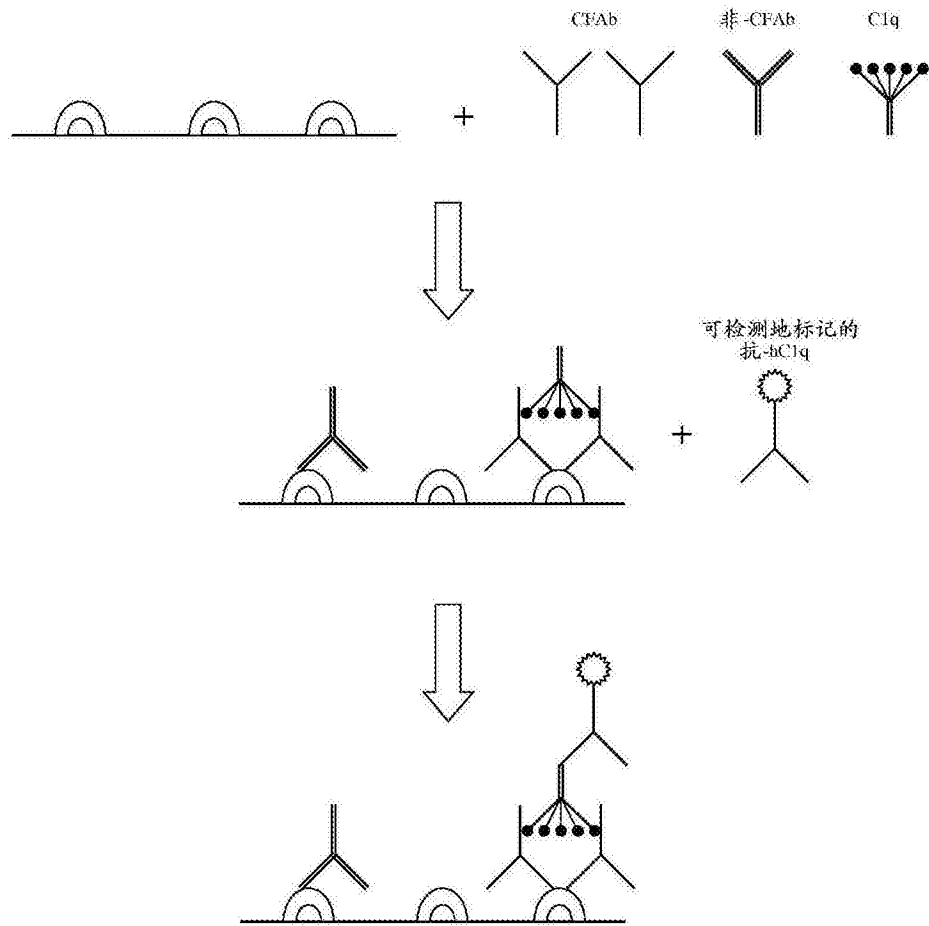
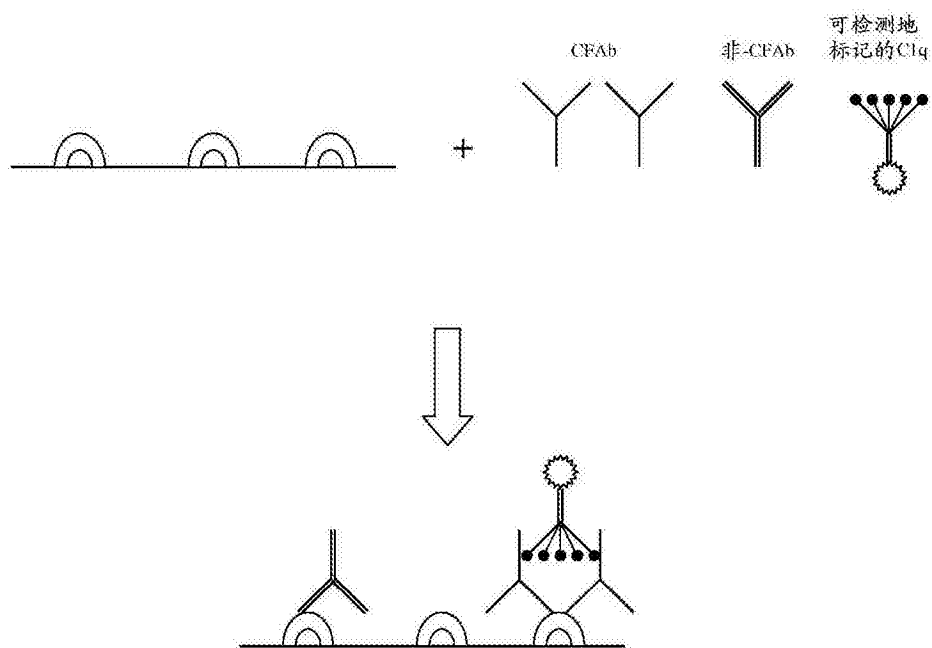
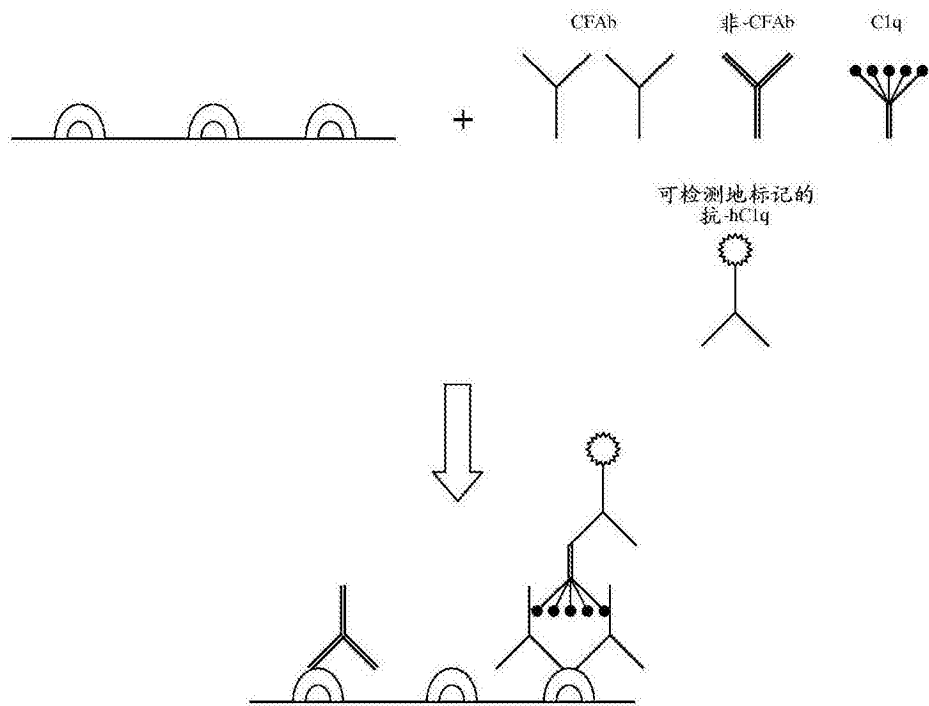


图1



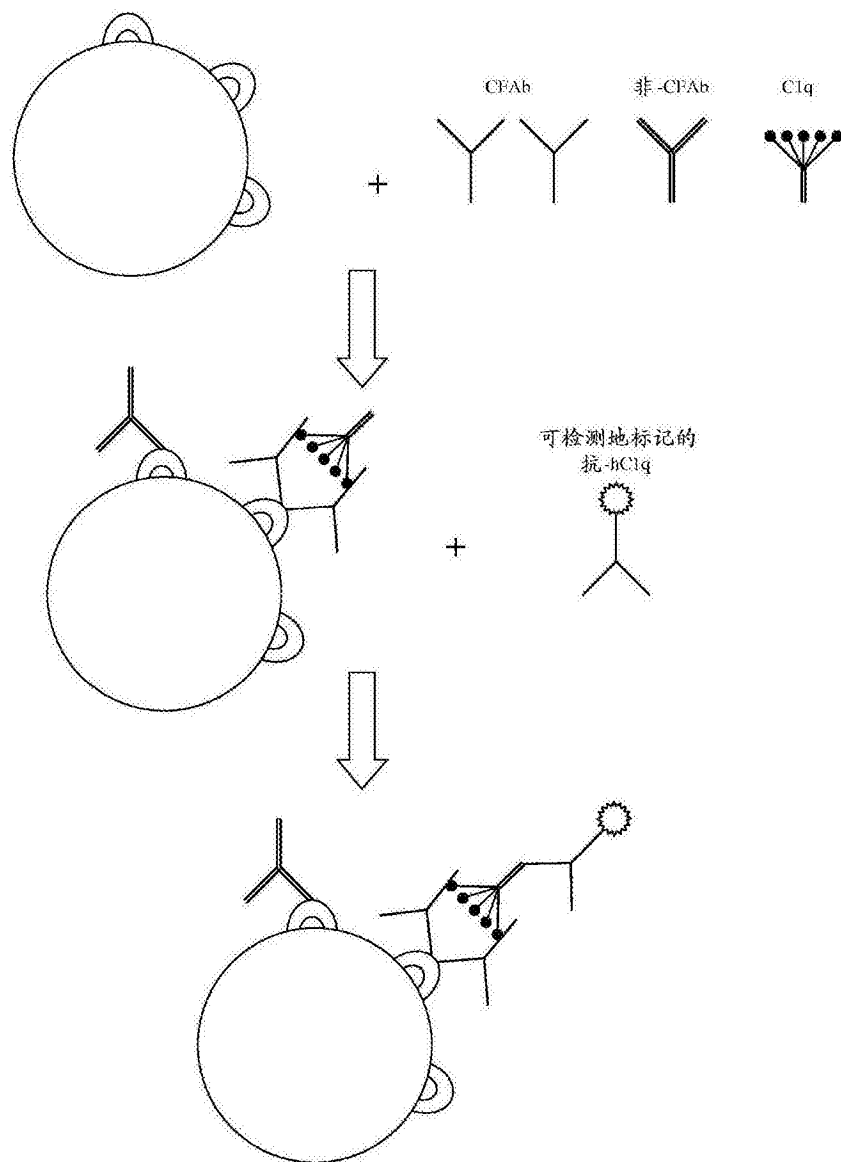


图4

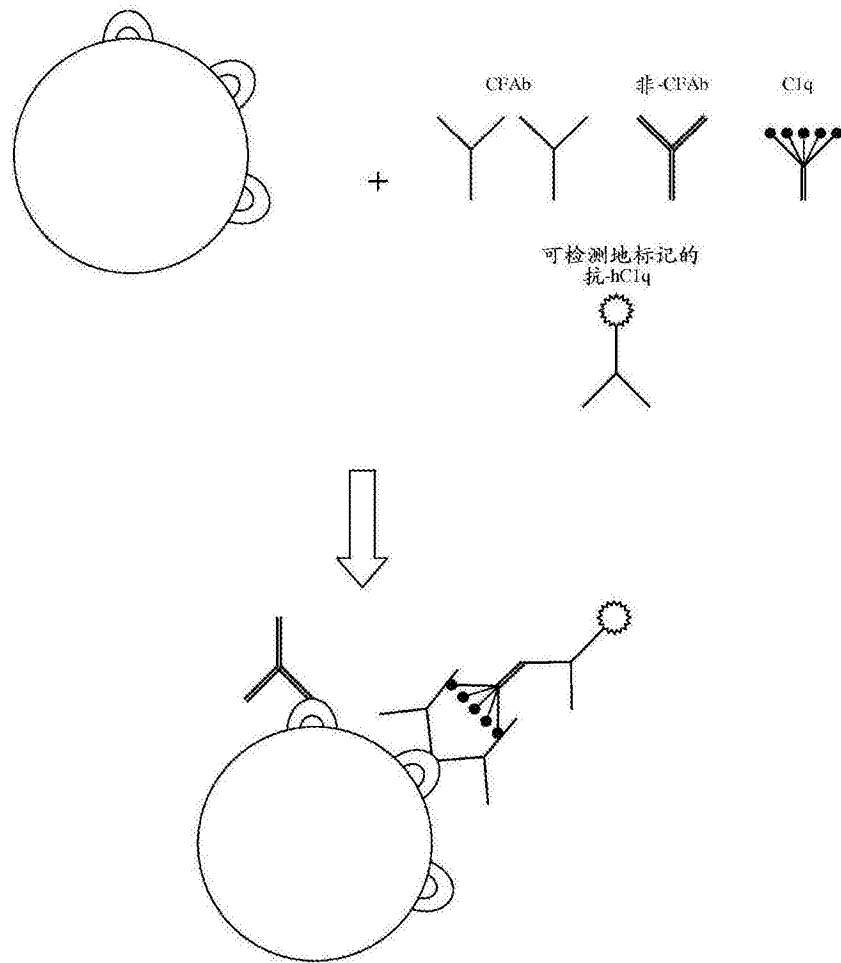


图5

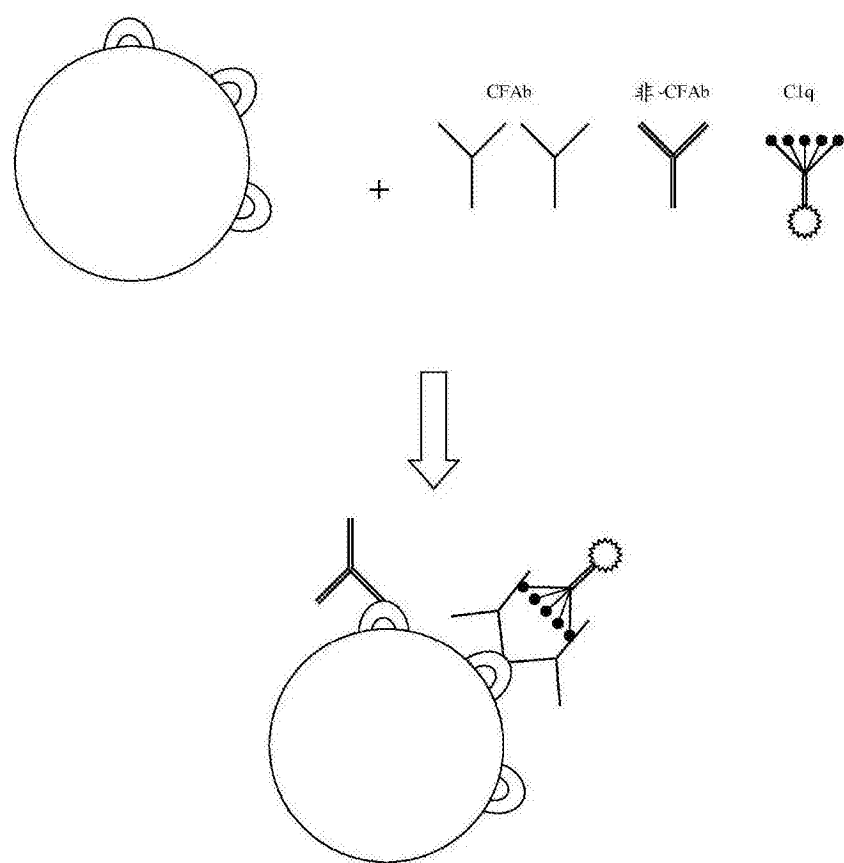


图6

观察到的/预期的一步和两步LUMINEX-Clq的对比

血清	检出的HLA-Ab	
	两步	一步
阳性	47/50	50/50
B8.59	0/2	2/2

图7

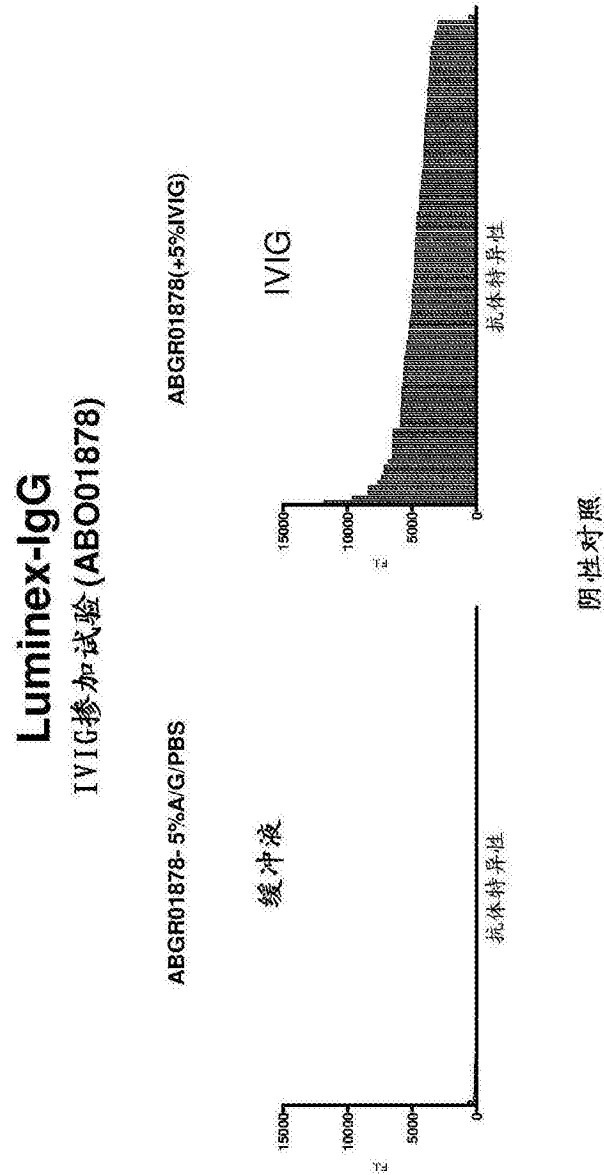


图8

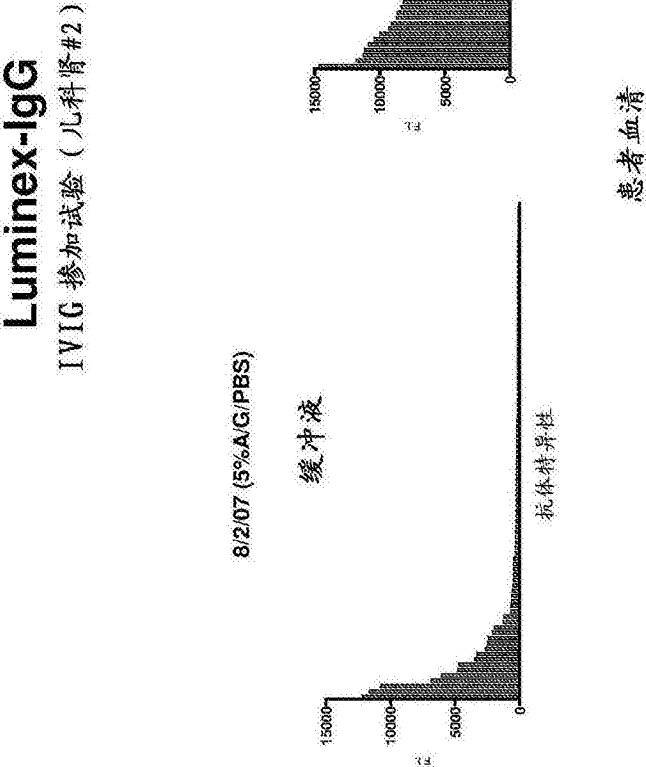


图9

CDC/LUMINEX-C1q IVIG 抑制试验的总结							
编号	样品	CDC		体外/体内 关联性	Luminex-C1q		体外/体内 关联性
		IVIG前 的预测	IVIG后		IVIG前 的预测	IVIG后	
1	有差别的抑制	不明	抑制	?	抑制	抑制	有
2		阴性	N/A	N/A	C-II 抑制	C-II 抑制	有
3		W/弱反应 C-II 系统	C-I 抑制	有	抑制	抑制	有
4		不明	C-I 抑制	N/A	抑制	抑制	有
5		阴性	N/A	N/A	阴性	N/A	有
6		D. 抑制	D. 抑制	有	D. 抑制	D. 抑制	有
7		阴性	N/A	N/A	抑制	抑制	有
8		* C-I 抑制 C-II 抑制	C-II 抑制?	有	抑制	抑制	有
9		IgM-Abs	N/A	N/A	抑制	抑制	有
10		不确定的 IgM-Abs	阴性	N/A	不抑制	不抑制	有
11		非特异性的 反应性	N/A	N/A	阴性	阴性	有
12		C-I 抑制 C-II 弱反应	N/A	N/A	抑制	抑制	有
13		N/A	N/A	N/A	抑制	抑制	有
14		强抑制	抑制	有	不抑制	不抑制	有

图10

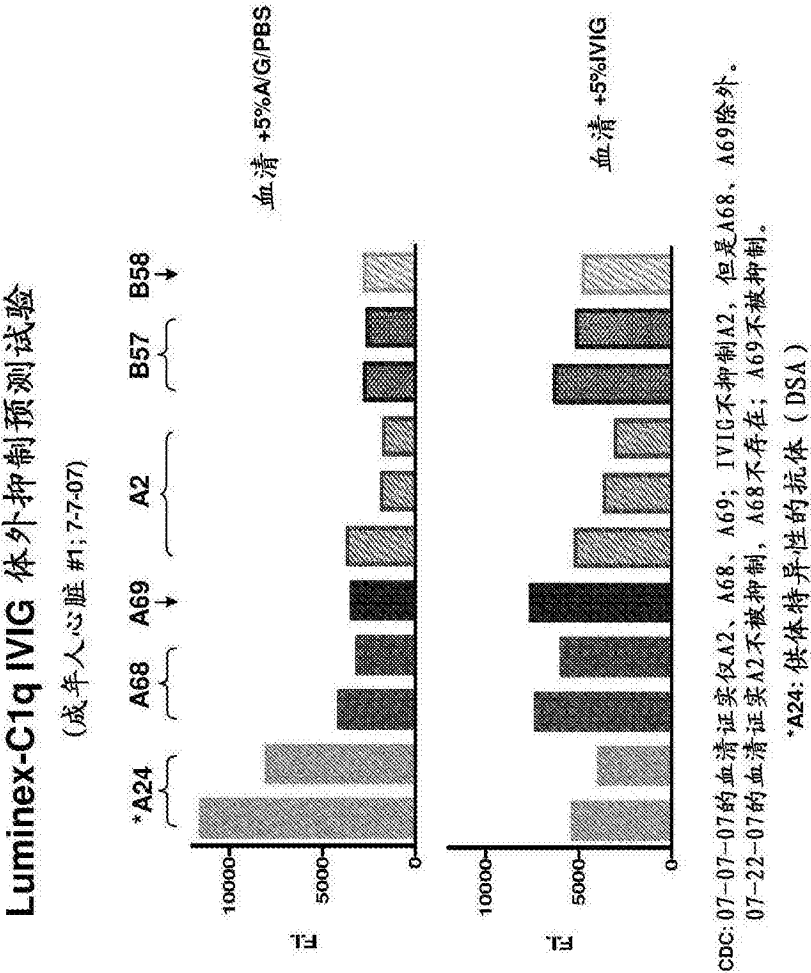


图11

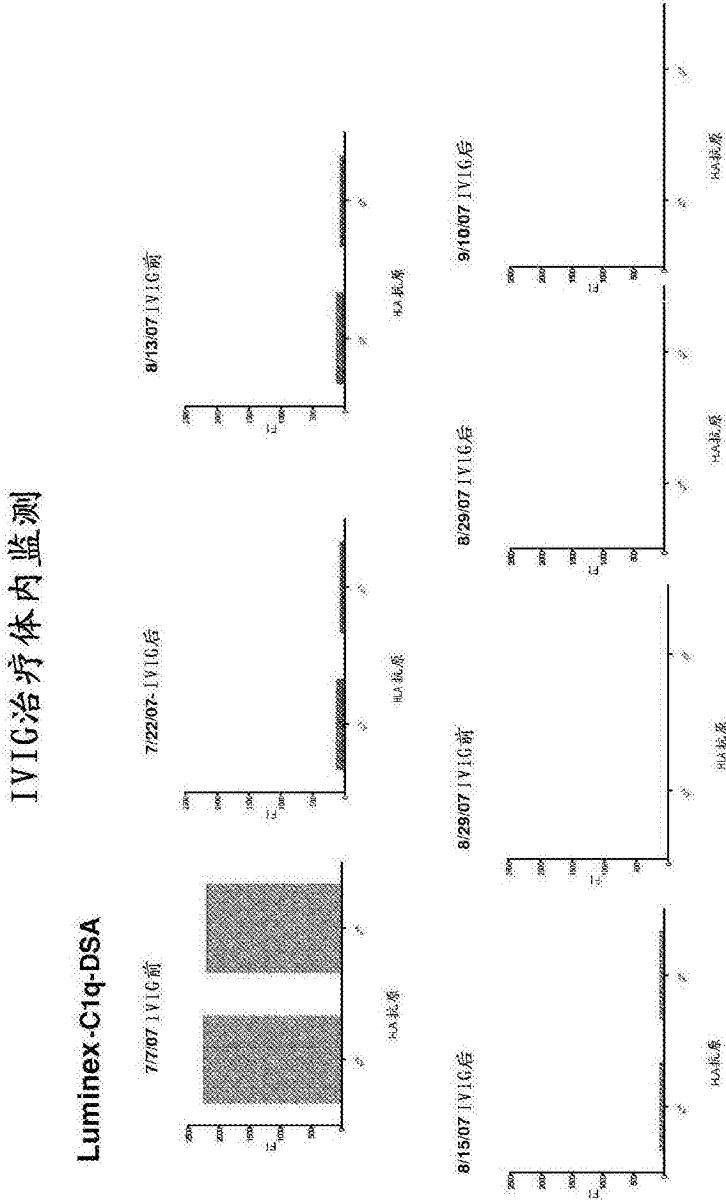


图12A

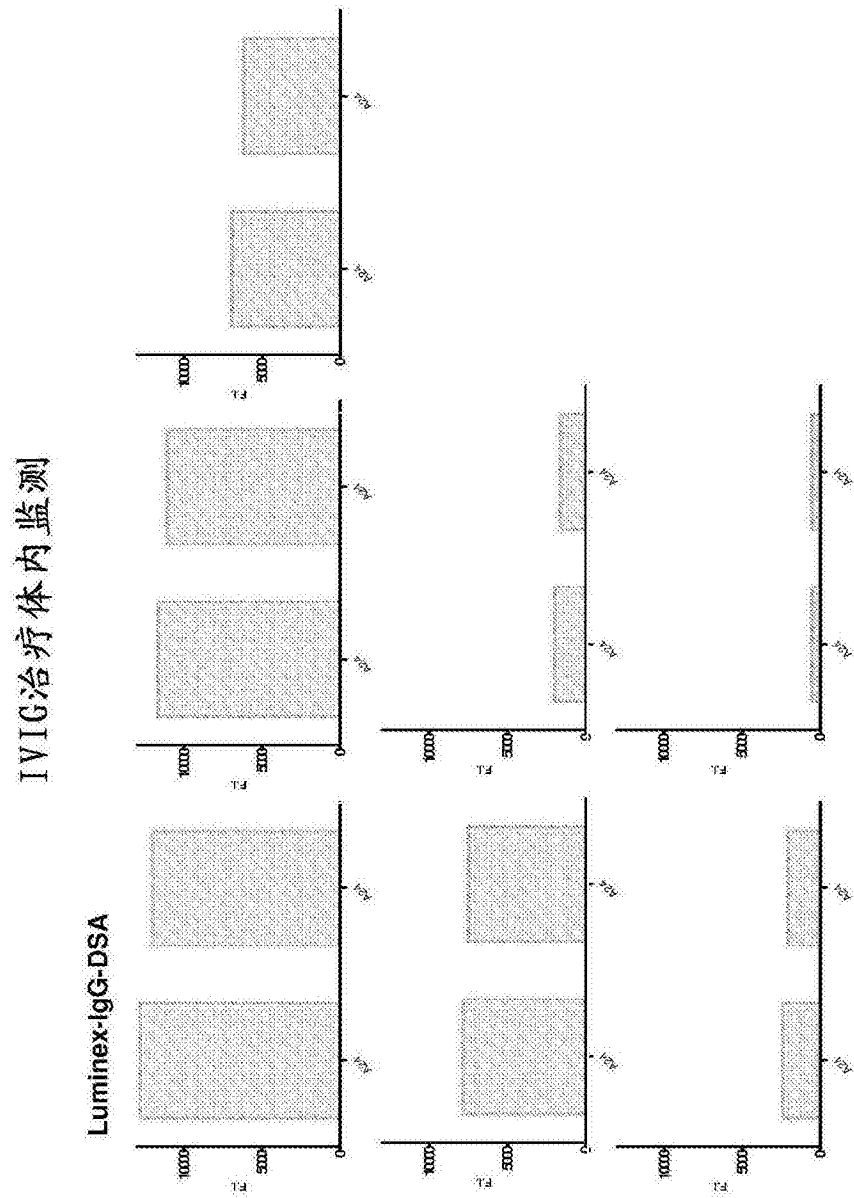


图12B

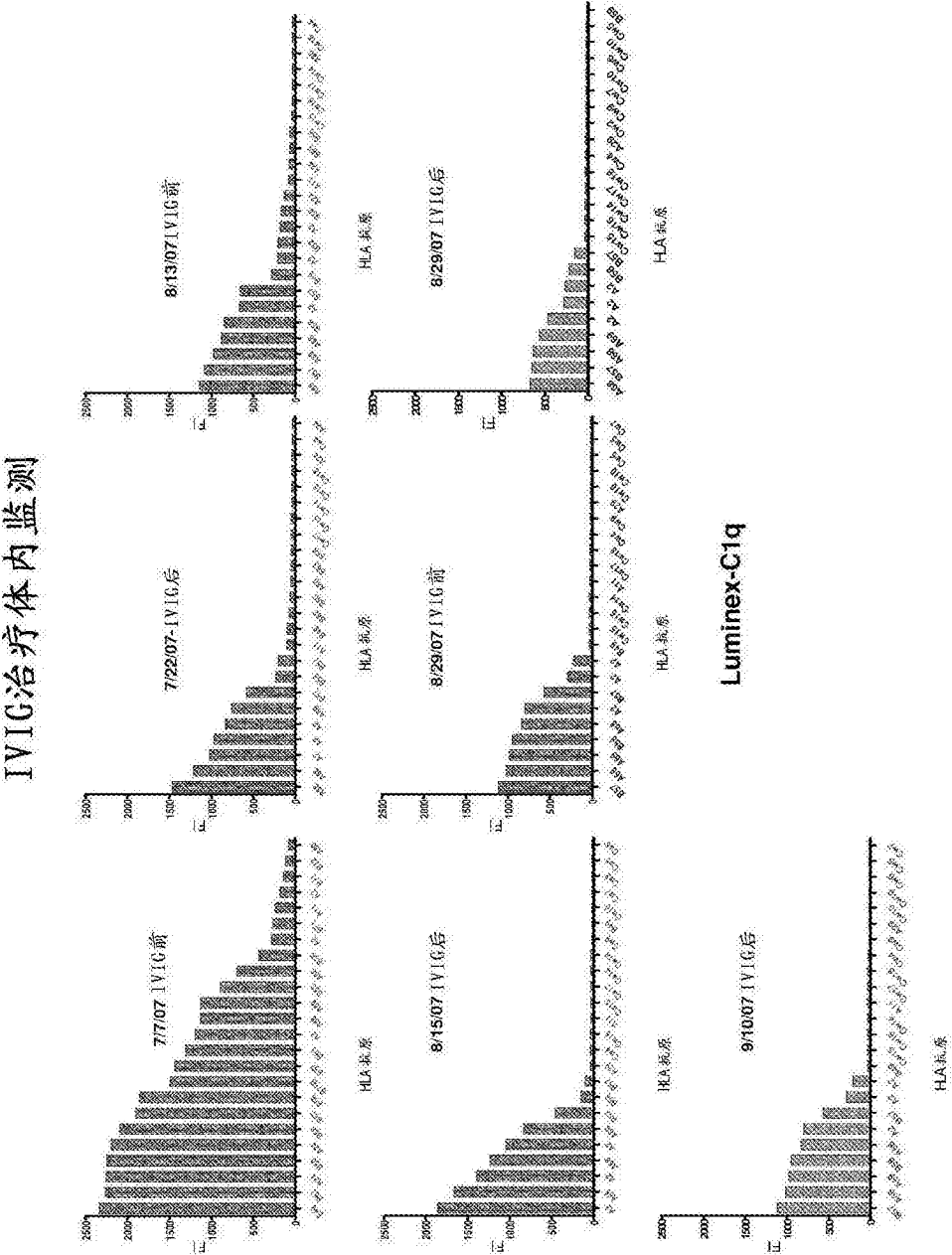


图13A

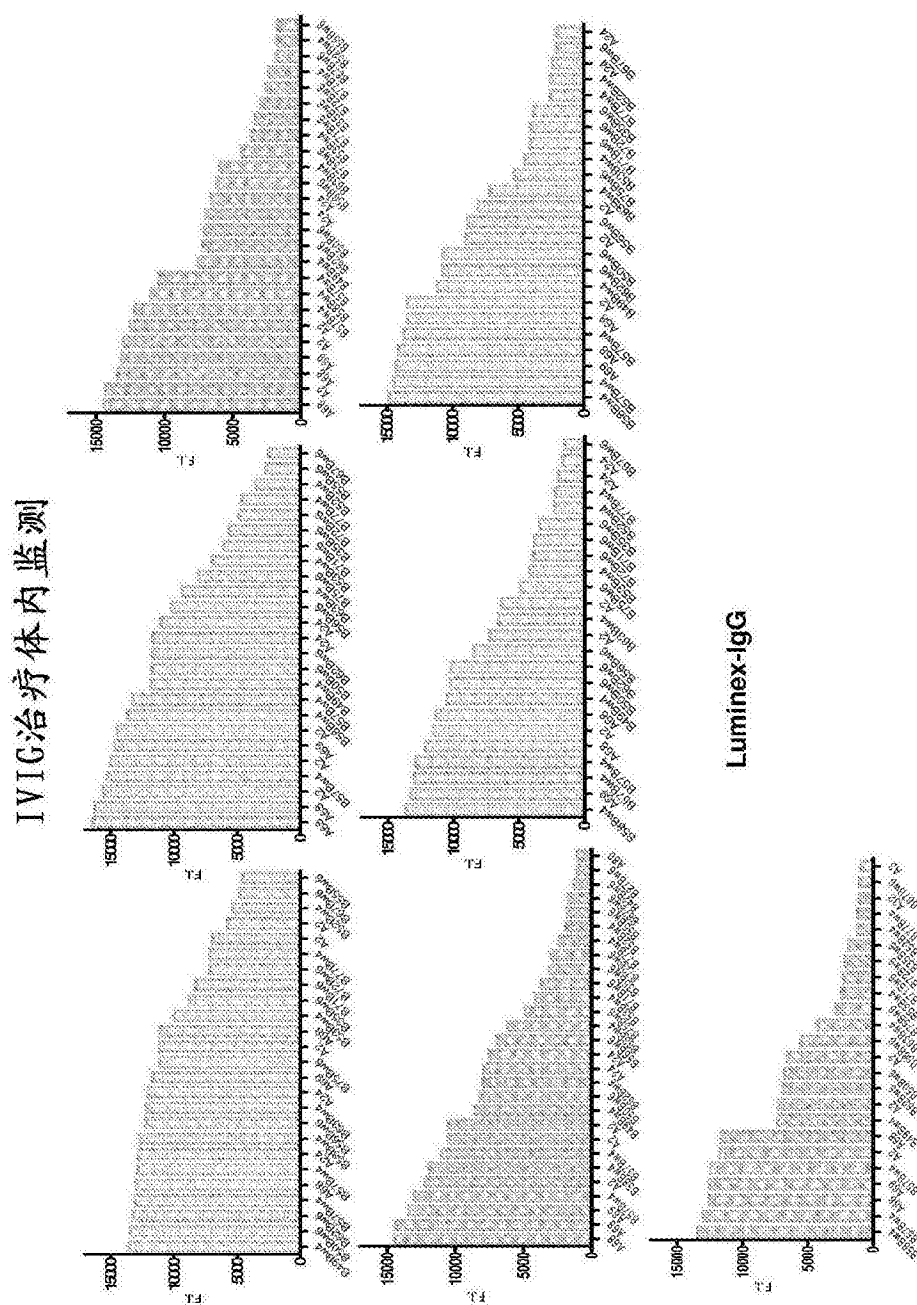
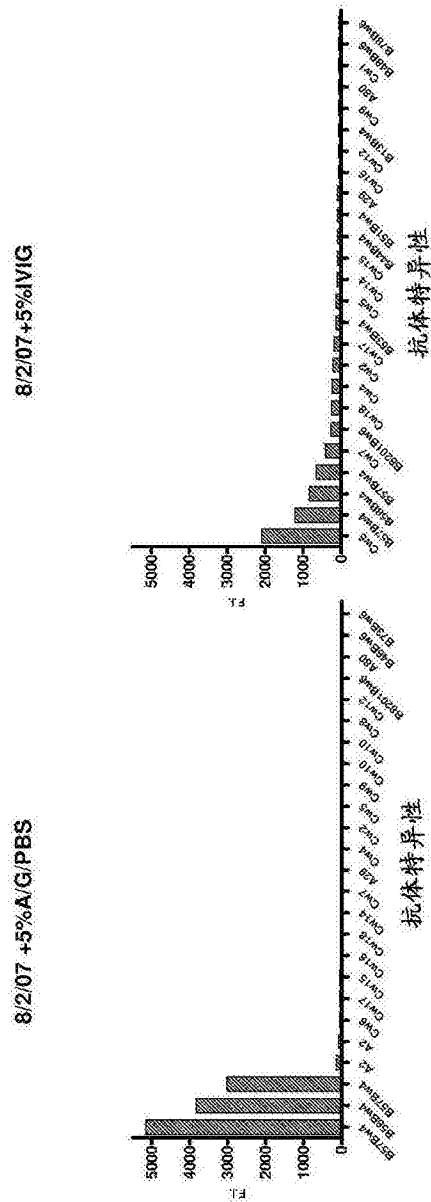


图13B

Luminex-C1q
IVIG 掺加试验 (儿科肾#2)



* 因为利妥昔单抗治疗，CDC不能检出特异性。

图14

Luminex-C1Q 验证实验结果

患者编号	PRA-CDC	PRA-IgG	CDC	LUMINEX-C1q		LUMINEX-IgG
				纯的	1:2	
1		CI-20 CII-45	NEG.	DQ7	相同	B53,63,51,32,78,48,54 DR51,16,DQ4,7.
2	CI-91	CI-89 CII-89	A1,9,10,11,32 BW4 RPT- 宽的	A24,32,23,25,11,66 BW4, B76,45,82 DR4,53, DQ7,8,9,DP	相同	A1,9,10,11,32,80 BW4,12,4005,56,76,82 宽的
3	CI-29 CII-0	CI-54 CII-0	B7,27,42,54 (实验日期?) RPT- 阴性的 10/25/07	阴性的	相同	B7,27,22,42,51,54,55, 56,67,73,75,78,81,82, A24,CW1,14.
4	CI-49 CII-81	CI-68 CII-96	A2 DR1,4,8,13,DQ7,8,9	A2, wk68 DR1,4,wk11,DQ7	相同	A2,68,69,B15,18,57,62,63 75,76,77, DR1,0103,2,4,8,9,10,11,12 13,14,15,16,51,DQ4,5,6,7, 8,9.
5	CI-0 CII-0	CI-58 CII-7	CI- 阴性的 杀死所有B细胞	阴性的	相同	B12,13,21,37,40,41,42, 44,45,47,48,49,50,52,60 61,62,72,75,76,77,DQ8.
6		CI-67 CII-59	不阳特异性	B57,58 DQ7,8,9.	相同	A1,2,36, B57,58 DQ7,8,9.
7	CI-49 CII-20	CI-55 CII-39	A2, DR7 RPT- 阴性的	阴性的	相同	A2,B57,58, DR1,7,9,10.
8	CI-62	CI-71 CII-14	B5,12,15,17,18,21, 35,70,78 RPT-B5,49.-10/25/07 CII- NEG.	A30, wk25 B5,15,17, 21,35,53,56. CII- NEG.	相同	A2,9,25,28,30,32, BW4 B50,73,62,56,75,35,71,72, 45,46,18,64,54,76,CW6,17, 10,18,9,2,16,14,1,4,5,15 DR7,12,9,53,DQ4,9.

图16A

9	CI-100	CI-100 CI-100	A29,66,B7,27,42,55, 60,61,73, CII-不能检测	A29,30,66,74,33,34,31, 32,23,43,26,B76,27,7, 12,47,60,61,73,81,82, 13,55,56,42,67, DR7,53,1,4,9,DQ2,7,8, DQ9	相同	变的
10	CI-30 CI-99	CI-31 CI-99	A25,26,30,31,32,68 RPT-阴性的	两次阳性 wk DO5,6	相同	A10,28,31,32,34,43,66 B46,63,75 DQ4,5,6,7,8,9
11	CI-0 CI-68	CI-1 CI-96	DR4,17,DQ7,8,9 Rpt-1/16/08MM DR4	CW17,18,5,15,2,5 DR4	相同	CW5,2,6,15,17,18 DR4,15,16,11,13,17 DQ7,8,9
12	CI-84	CI-78 CI-74	B5,15,18,35,53,70	B53,51,35,75,18,78	NT(不足)	A28,33, B5,14,18,35,53, 75,78, DR3,5,9
13	CI-56 CI-84 CI-71	CI-84 CI-71	A2,68,69,23,24 B57,58, CII-NT(没有剩下血清) A23, B57, B58 在8/9/07 但不是 在 8/10/07	A2,24,68,69 CII-NT	相同+B57,58	A2,23,24,68,69 B8,12,57,58,37,41,42,45 DR1,9,10,103,51 DQ4,5,6
14	CI-0 CI-63	CI-0 CI-63	DQ1,5,6	DQ1,5,6	相同	DR1,4,103 DQ1,5,6,2,8
15	CI-46 CI-43	CI-98 CI-79	A23,24, B44,57	A23,24,32,25, B45,76, 57,58,75,53,82,44,62 63 DR8,11,13,17 DQ2		A1,2,23,24,25,28,32,33 B8,14,18,35,39,45,67,62,73 75,76,78,82, BW4 DR3,5,6,7,8,9,11,12,13,14 17,18, DQ2
16	CI-21 CI-0	CI-76 CI-0	A23,24,25,32,Bw4	A23,24,25,32, Bw4	相同	A23,24,25,30,32, B50,62,BW4
17	CI-84	CI-88 CI-34	A2,28,B17,35,49,50, 53,62,63,71,72	A2,68,69,24,B49,56,63 B57,58,49,62,50,75,71	相同 + CW10,12,15	A2,9,11,28, B17,21,35,49 50,53,56,63,70,75,77,82

图16B

					72,77,35,53.		DR17,DQ2.
18		CI-48 CII-95	CI- 不明 DQ1,5,6.		CW7,B37,63,65,48,81, 73 DQ5,6,2.	相同	A23,24,B7,53,37,48,63,65, 73,81,CW7,81,10,12,15, 16,17,18 DR2,3,7,11,12,14,15,16,17 18,103,51,DQ2,5,6.
19	CI-32 CII-0	CI-84 CII-74	A11,26,29,32,34,36. 可能误检 CI- 阴性的		A30,11,25,26,66,43, 31,28,wk34 DQ5,6	相同 + A1 增强的 B57 加入	A1,3,10,11,19,28,43,66, 74,80,B8,18,84,73 DR15,16,DQ4,5,6,8,9, DP 可能
20	CI-23 CII-63	CI-23 CII-68	A1,36. DQ1,5,6; wk RPT- 阴性的		阴性的	相同	A1,36. DQ4,5,6.
21			宽的		仅B基因座是可能的	NT	宽的 AL & BL
22			B57,58		B57,58,53,49,27,63.	相同	A2,23,24,32,B57, 58,49,53,63,51,27, 77,44,38,52,59,37 13,44, DR17
23			A25,26,34,29,31,32, 33,74.		A25,32,33,68,74,28, 34,66,31,2,69,26,43 30 CI NEG.	相同	A32,34,29,68,74, 29,26,34,66,2,25, 31,33,66,69,43,30, CI NEG.
24			B7,27,42,48,60 61,81,54,55,56 RPT-B7,60,48,81,54, ?B56 DR4,53		B7,27,67,60,81,42,73 48 DR4,53.	相同	A25,66,26,30,34,43 31,29,11. B7,27,67,60,81,42,47,13,82, 54,55,56,51,64,78,73,48, 63,75. DR4,7,11,53,9,52DQ7,8,9 DF17,3,10,2,14,9.
25			A2		A2,69,B57,58 CI NEG	相同	A2,69,B57,58, DR1,7.

图16C

26				NEG	NT	NEG
27				A24,25,26,32,66,74	NT	A30
28				A1,2,3,11,29,32,68 734,774	NT	DR4
29				C1-NT (没有血清) C11-NEG	相同	A10,28,29,30,33, 34,43,66 B16,42, 55,67, DR1,4,10,103,DQ5
30				C1-NEG (没有血清) DR15	相同	B7,81 DR,15,16
31				B8	相同	B8,B18,B14,B37,B59, B46,B42,B54,A33,A34 ?DQ2
32				B51,52,59	相同+A24, B81, A25,32, B51,63,49,57,53,78,7, 56,67,52,38,77,18, 59,8201,42,13,39,56,8 DQ7,8,9	A25,A32,A9,A33,A30,A1, B51,B63,B17,549,578,B53, B5,16,77,67,59,16,8201,13, 42,14,35,7,8,22,75,81,40,73 46,80
33				BW4 XTRA RXNS	相同	A25,A9,A32,A10,A28,11,19,2 BW4,B73,B67,B39 CW7,CW17 DQ3,DR53,DR4,DR1,DR103 DQ5,2,4,DR10,11,7,51,9,6,8, DR2,DR17
34				弱 B57	相同+ 更高特异性, 因为更高	高 BG

图16D

图 16E

					Oil-NT	DR9, 12, 7, 10, 53, 52 DQ2, 5, 9, 5, 4.
41	CI-56	CI-99	A2, 68, 69, B7, 42, 55, 57, 58, 67, 81, 8201, IgM-B57, 58, CII-NT (没有血清)	NT		宽韵 C.I.
42	CI-95	CI-95	宽韵 IgG A1, 3, 11, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 43, 66, 74 B - 除了 46, 51, 57, 58, 59, 63, 65, DR11, DQ5, 4 DP2, 17, 3, 10, 9, 14, CII-NT	相同		A24, 1, 32, 11, 29, 31, 74, 36, 3, 30, 34, 33, 80, 66, 33, 26, 25, 43, 68, BW6, B44, 47, 27, 49, 13, 53, 77, 37, 51, 38, 52, 59, 63, DR11, 4, 1, 103, 13 DQ5, 6, 4, 8, 2 DP17, 3, 10, 2, 14, 9, 1, 5, 19, 13, 4, 11.
43	CI-63	CI-97	A1, 3, 11, 23, 24, 25, 36, B44 A1, 25, 36, 74, 80, B44, 45, 76, 8201, Rpt, A11 pos, 117/108 CII-NT	相同 + A29, 3 B57		A1, 2, 3, 11, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 74, 80, B44, 45, 49, 50, 52, 56, 57, 58, 63, 76, 8201, DP17, 19, 1, 5, 3, 10, 13, 14, 9, 11.
44	CI-20		B62, 75, 不确定 IVIg 抑制	相同		A34, 80, BW6, B57, 63, 77, 13, 49, CW2, 5, 9, 10, DR11, 7, 15, 16, 53 DQ5, 6, 4, DP19, 1, 4, 5, 2, 10, 13, 3, 11, 4.
45	CI-29	CI-99 CII-98	A1, 36, A1 无抑制 其它被抑制 A1 不抑制 在 CII-98 中其它被抑制	相同 + A30		A1, 11, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 43, 66, 68, 74, 80, B7, 18, 13, 18, 35, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 56, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 8201, Cw1, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 血清日期: 6/19/07
46	CI-50	CI-92 CII-99	A1, 3, 11, 36, 78, 51, A1, 3 ? 被抑制 A11, 36 可能不被抑制 其它被抑制	相同		A1, 3, 11, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 43, 66, 68, 74, 80, B18, 35, 37, 38, 39, 51, 52, 53, 64, 75, 76, 77, 78.
47			B57, 62	相同		A1, 3, 11, 23, 24, 25, 26, 29, 32.

图16F

					35, 76, 63, 53, 57, 78, 51, 71, 75, 72, 62, CW3, 10, 34, 36, 43, 66, B56, 58, 50, 35, 49, 78, 46, 71, 51, 53, 72, 77, 57, 76, 63, 52, 13, 45, 75, 62, 44, 67, 55, 42, 8201, 59, 38, 64, 18, 41, 39, 54, CW9, 10, 7, 18, 15, 2, 5, 6, DR1, 4, 52, DQ4, 5, 6, 8, 9, DP17, 19, 1, 5, 3, 10, 13, 14, 9, 11
48	A25, 26, 34				DQ4, 5, 6, DP17, 19, 3, 1, 5, 10, 9, 相同
49	A25, 26, 34				A25, 66, 26, 43, 34, 66, 68, 33, B45, 76, 8201, 相同, DR7, 11, 9, 53, DQ2, 9, 7, 4, DP10, 49, 62, DR7, 11, 9, 10, 12, 4, 17, 53, 52, DQ2, 4, 7, 8, 9
50	B7				A25, 66, 43, 25, 34, 68, 30, 11, 68, 29, 33, 23, 29, 69, 32, 24, BW4, 相同, DR4, 53, DQ7, 8, 9, 4, 9, 2, 4, A66, 66, 34, 25, 68, 43, 11, 23, 33, 69, 32, 30, 24, 66, 29, 2, 31, 74, BW4, B39, DR4, 1, 7, 9, 11, 103, 53, DQ7, 8, 9, 2, 4
51	A1				B67, 27, 81, 7, 42, 8201, 27, 56, 55, 60, 73, 61, 54, 48, 38, 57, 46, 8, 62, Cii- 阴性的, Cii- 阴性的, A1, 29, 36, 26, 80, 43, 24, B76, B76, 45, 44, 8201, 27, NT, 相同, DR1, 103
52	A2, 68, 59				A2, 24, 69, 68, 25, 34, 66, 33, 26, 29, 30, 23, 31, 30, Cii- 阴性的, Cii- 阴性的, A69, 2, 34, 68, 24, 25, 33, 34, 66, 26, 66, 29, 30, 33, 31, 43, 23, 32, 11, 74, 36, B56, 67, 46, 42, 63, Cii- 阴性的, Cii- 阴性的

图16G

53				A32 (POSS A25): B51, 52, 59, B51, B52, B18, B49, B63, B7 B77	A25, 32, 24, B53, 63, 49 51, 78, 57, 67, 58, 52, 38, 77, 18, 59, 82, 01, 42, 39 13, 56, 8, DQ7, 8, 9.	NT	A25, 32, 24, 29, 33, B51, 63, 57 49, 53, 78, 58, 52, 77, 18, 67, 59, 38, 82, 01, 13, 42, 35, 64, 7, 39, 8, 56, 65, 75, 81, 61, 55, 60, 46, 73 54, DR7, 15, 16, DQ7, 8, 9, 2, 4.
54				B57, 62.	B76, 57, 63, 75, 62, 77, 46 50, 49, 56, 13, 53, 35, CW9, 10, DR4, 53, DQ7, 8, 9.	相同	A23, 24, 68, 69, 2, B76, 57, 75, 63 62, 57, 77, 49, 50, 56, 46, 13, 35, 53, 7, 81, 82, 01, 71, 72, 27, 67, 58 78, 27, 42, 51, 55, 52, 73, 60, 45, CW9, 10, 8.
55				A26	A26, 66, 34, 11, 25, 43, 1, 36, 80, 30, 29, 66, DR7	相同	A26, 25, 11, 1, 43, 34, 56, 36, 30, 80, 29, 24, 66, 3, 33, 68, 23, 68, 69, 31, B76, 62, 75, 45, 82, 01, 44, 77, 46, 50, 63, 57, 49, 72, 53 35, 71, 56, 58, 78, 47, 13, DR7, 11, DQ2, 9, DP10, 2, 17.
56				B13	B13, 27, 81 CW18, 17, 2, 5, 15, 5, DR7.	NT	A66, 30, B13, 27, 81, 60, 7, 47, 61, 53, 73, 35, 75, 48, 49, 50, 77, CW18, 17, 5, 6, 2, 15, 4, DR7, 9, 53, 52, DQ2, 4, 9.
57				A1, B62	A1, 24, 3, 11, 30, 80, 36, 29, 34, 25, 29, 32, 23, B77, 46, 63, 50, 57, 49, 56 76, 53, 35, 75, 62, 58, 71, 78, 72, 45, 51, CII- 阴性的	相同	ALL, except A2, 68, 69, B7, 8 48, 41, 61, 60, 73, 81, 42, CW9, 10 DR8
58	CI-0 CII-0	CI-26 CII-9	阴性的	阴性的	阴性的	相同	A203, B7, 22, 42, 54, 55, 56, 67, 81, 82, 01 DO4
59	CI-0 CII-0	CI-71 CII-0	阴性的	阴性的	阴性的	相同	A25, 26, 34, 66, 2, 68, 69, 29, 32, 43, 74, B63

图16H

60	CI-0 CII-0	CI-0 CII-0	CI-II- 阴性的	CI-II- 阴性的	相同	CI-II- 阴性的
61	CI-0 CII-0	CI-0 CII-51	CI- 阴性的 CI-II- 弱反应性	CI- 阴性的 DR53	相同	CI- 阴性的 DR53
62	CI-48 CI-55	CI-95 CI-98	IgM 不确定 DQ2.6, 不确定	阴性的 DQ2.5.6	A2.25, 相同	A2.26,50.1,10.11,25.28,30.34, 43.66,68,69,B17.21,35,44,49, 53,56,57,58,62,63,75, DR7,DQ2.6,4.5,9
63	CI-34 CI-58	CI-98 CI-91	A24,58,59 体外抑制 DR15,51,DQ1.5,6	A24.2,68,69,11,3,34, 36,80, DR51, DQ5.6	相同	A1,2,3,11,24,29,31,33,34,36, 66,68,69,80,-Ser,D-3/5/07 DR1,2,9,10,15,16,103,51,53, DQ5,6,8,9
64	CI-17 CI-40	CI-99 CI-96	IgM、IgG对 CI和CII 具有显著的特异性 中等抑制	A30,31,34,649,50,45, 62,75,44,76,13,57,58, 47,60,63,61,53,64,41, 8,8201,27,65,56, DR13,11,17,14,13,12, 8,18,7,15,52 DQ5,6,4	相同 66,3,33,11, 67,7,71,59,35,81,5, 72,37, 相同	A1,11,26,28,30,31,32,33,34, 36,43,66,74,80, E7,8,12,13, 14,15,16,17,21,27,95,40,41, 42,47,48,52,53,55,56,59,67, 70,81,2708,4005,8201, DR7,8,11,12,13,14,15,17,18, 52,DQ1,4,5,6
65	CI-0 CII-0	CI-70 CII-67	阴性的	A30 CI-II- 阴性的	相同	A1,80, B7,8,22,35,42,50,53, 55,56,62,67,75,76,78,81, 2708,8201 DR8,11,12,13,14,17,18
66	CI-0 CII-0	CI-0 CII-999	阴性的	A11 CI-II- 阴性的	相同	
67	CI-73 CI-93	CI-99 CII-88	IgG, IgM- A1,3,11 CI-II- 不明 显著抑制	A24,1,3,36,80,34,23,11, 25,66,33,30,43,68 B7,81,27,56,67,42,76, 60,73,53,78,55,35,78, 8,62,51,48,75,13,47,61, DR17,11,13,8,14,18, DQ7,2,9,6,8,DQA1*ST456	相同	A24,1,3,36,80,34,23,11,26,69, 25,66,33,30,43,68,31,32, B7,81,27,56,67,42,76, 60,73,53,78,55,35,78, 8,62,51,48,75,13,47,61, DR17,11,13,8,14,18,7,9,12,52, DQ7,2,9,6,8, DQA1*ST456

图16I

68	CI-0 CII-0	CI-3 CII-0	阴性的	阴性的 CI-NT	相同	B58 CI-NT
69	CI-33 CII-75	CI-0 CII-0	全部细胞敏感裂解	B8 CI- 阴性的	相同	B8 CI- 阴性的
70	CI-9 CII-32	CI-99 CII-56	IgM、IgG 对CI和CII具有 不确定的特异性 但被抑制	B57.58 DQ2	相同+A1.11.24.	A24.11.2.3.25.1.32.80.36.68. 23.69.33.29.B57.58.49.53.77 63.51.27.38.52.59.47.37.44 13.76. DQ2.6.9.
71	CI-0 CII-0	CI-12 CII-63	非特异性的IgG 抗体	阴性的 可能含有DQ5	相同	A30.31 DQ5.6.4.
72	CI-0 CII-0	CI-25 CII-0	阴性的	阴性的	相同	A23.24.80.
73	CI-0 CII-0	CI-0 CII-70	阴性的 阴性的	CI- 阴性的 DR53	高背景 相同	CI- 阴性的 DR1.9.10.17.53 DQ8.9.
74	CI-64 CII-50	CI-99 CII-52	A3.23.24.11 显著抑制 CI-? 和抗原单抗	A24.11.3.80.1.36. 23.32.30.25.B82. 56.67.42.55.7.76 81.54. DR53.DQ7.8.9 ?DQA3	相同	A1.3.23.24.11.25.26. 29.30.31.32.33.34.36 66.68.69.74.80.B44. 7.8.12.14.17.18.22.27 35.37.42.45.51.53.59 63.67.76.78.81.8201. DR53.DQ7.8.9. ?DQA3
75	CI-0 CII-100	CI-0 CII-69	CI- 阴性的 CI-? 和抗原单抗	CI-NEG. DQ5	相同 DQ5.6.4	CI-NEG. DR15.DQ6.4.5.
76	CI-22 CII-85	CI-23 CII-96	长时间遇有的IgM-A11 DQ1.5.6. ARG的RPT阴性 RPT-DQ2.5.6.	阴性的 DR53.Rpt-DQ2.6	相同	A11.29.25.6601 DR15.51.53.DQ2.6.5.8. 血清日期-8/10/07

图16J

77	CI-0 CII-0	CI-81 CII-20	阴性的	阴性的	相同	A23,24,25,26,66,11,30,31,43 BW6 CII-NEG.
78	CI-0 CII-7	CI-13 CII-0	阴性的	阴性的	相同	B51,75,78 CII- 阴性的
79			NT	阴性的	NT	阴性的
80			NT	阴性的	NT	阴性的
81			NT	阴性的	NT	阴性的
82			NT	阴性的	NT	阴性的
83			NT	阴性的	NT	阴性的
84			NT	阴性的	NT	阴性的
85			NT	阴性的	NT	阴性的
86			NT	阴性的	NT	阴性的
87			NT	阴性的	NT	阴性的
88			NT	阴性的	NT	CI-B27
89			NT	阴性的	NT	阴性的
90			NT	阴性的	NT	阴性的
91			NT	阴性的	NT	阴性的
92			NT	阴性的	NT	阴性的
93			NT	阴性的	NT	阴性的

图16K

94				NT	阴性的	NT	阴性的
95				NT	阴性的	NT	阴性的
96				NT	阴性的	NT	阴性的
97				NT	阴性的	NT	阴性的
98	CI-12 CII-4	CI-33 CII-0	IGM? 特异性 抑制不能检出	阴性的	阴性的 CII-阴性的	CI-Wk B78	A24,2403,9,23B51,78
99			阴性的	A26,34,66,43,25 DR4			A26,34,66,43,25,68,33 DR4,7,9,53,52,DO4
100			B18,65	B18,64,66, DR1,17,103,9,51 DQ5,6,4,			A3,33 B18,64,65,8,78 51,54,35,56,8201,27, 53,67,7,81,42,37,55, DR1,103,9,17,8,12,15, 16,10,13,11,18,7,14,51 52, DO5,6,4,8
101			阴性的	A11,25,66,43,1 DR7,11			A11,25,66,1,43,26,34, 36,80,3,30,24,32,30, B73 DR7,11,9,DP10,17,2 3,14,9,4,1,19
102			阴性的	A25,32 B51,53,78,49,63 52,35,57,59,			A32,25,23,24 B51,78 53,49,63,52,35,51,18 57,59,75,58,77,67,37 8201,13,36,64, CII-阴性的
103	CI-0 CII-33	CI-31 CII-53	阴性的	阴性的	阴性的	相同	A28,33,34,28 B8 DR7,10,53,
104	CI-0 CII-29	CI-32 CII-56	CI-阴性的 DR11,13-IgM	阴性的	阴性的	相同	A23,24,25,32 DR11,13,14,17,18,
105	CI-100	CI-98	无的 CI, CII	A69,33,23,80,68,24,29,	相同	相同	A1,3,23,24,25,26,29,30,31,32,

图16L

	CII-100	CII-96		31,34,36,66,74,43,26,1, 32,3 B76,56,8201,47,55, 60,8,27,67,61,46,7,57,58, 81,42,13,73,54,63,48,41, CW9,10,8,18,14,16,1,7,5, DR11,17,7,13,52 DQ5,6, DR7,8,9,11,12,13,14,17,18, DQ5,6,DR52-可能	33,34,36,43,66,68,69,74,80, B7,8,13,27,37,41,42,44,45,46, 47,48,49,50,54,55,56,57,58, 60,61,62,63,64,67,73,75,76, 81,2708,8201,CW1,2,3,9,10,6, 14,16,17,18,6,7,8,12, DR7,8,9,11,12,13,14,17,18, DQ5,6,DR52-可能	
106	CI-0 CII-0	CI-21 CII-0	阴性的	阴性的	相同	A24 CII-阴性的
107		CI-92 CII-60	B44,45	A1 B76	相同+B8201,44, A1,23,24,25,29,32,36,80,2403, B7,13,27,37,41,42,44,45,47, 48,49,50,54,55,56,57,58,60, 61,62,63,67,75,76,77,81,2708, 8201,CW1,4,5,14,18, DR7,8,11,12,13,16,103	
108			A29, B44 B44-重新检查 误检/Tam1 Rpt1/15/08-No B44	A29,43 B7 CII-阴性的	相同	A3,11,23,25,26,29,30,31,32, 33,34,43,66,68,74,B7,8,13,27, 42,44,45,47,48,54,55,56,60,61, 67,73,76,81,2708,8201,CW2,3, 9,10,5,6,15,16,17,18,1 DR8, DQ4
109	CI-0 CII-0	CI-55 CII-64	CI-阴性的 DR3, DQ7,8	CI-阴性的 DQ8,7,9,4		A2 B52,57,58 DQ8,4,7,9
110	CI-98 CII-96		A1,36	A1,34,68,33,36,25,69,34, 66,26,33,30,3,11,29, BW6		
111	CI-21 CII-0	CI-1 CII-0	A3-IgM	CI-CII- 阴性的	相同	CI-CII- 阴性的
112	CI-0 CII-30		CI- 阴性的 IgM-不明	CI- 阴性的 Wk DR4	相同	DR4
113	CI-2		CI-阴性的	CI-阴性的	相同	CI- 阴性的

图16M

	CII-88	CII-DRS3, 宽的	DRS3 DQ7,8,9	DRS3 DQ7,8,9,2,4
114	CI-0 CII-0	CI-66 CII-71 CI- 阴性的 CII- 阴性的	CI- 阴性的 CII- 阴性的	相同 A2,203 B7,17,81 DR1,4,DQ3,7,8,9
115	CI-57 CII-38 CI-0 CII-0	CDCXM B-DTT NEG CDCXM B-POS CDCXM B-DTT NEG CDCXM B-POS	CI- 阴性的 CII- 阴性的 CI- 阴性的 CII- 阴性的	相同 相同 A2,203,210,68,69 B75 DR15,51 DQ6 CI,CII- 阴性的

共计: 991 株异性 共计: 1034 SPE
75 阳性样品

图16N

LUMINEX C1Q 验证总结-IVIG样品

编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果			LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS	5%IVIG	
1	8/2/2007	NT	wk A2: B57.58 CII-NT	相同	相同抑制	A1,2,36 B57.58, DQ7.8,9
	8/2/07PRE	不清楚的特异性 CII-和亚基单抗 减少	B57.58 DQ7.8,9	相同		A1,2,36 B57.58, DQ7.8,9
	8/2/07POST		仅B57 CII NEG	相同		
	8/2/07PRE	NT	B57.58 DQ7.8,9	相同		
	8/30/07POST	NT	仅B57 CII NEG	相同		A1,2,36 B57.58,63 CW2.5,6,15,17,18, DQ7.8,9
	8/30/07PRE	NT	B57.58	相同		A1,2,36 B57.58,63 CW2.5,6,15,17,18, DQ8.7,9 与上同相同
	8/30/07POST	NT	DQ7.8,9 仅B57 CII NEG	相同		
	8/30/07PRE	NT	B57.58	相同		与上同相同
	9/5/07POST	不清楚的特异性	DQ7.8,9 B57.58 DQ7	相同		与上同相同
	10/25/2007PRE	NT	B57.58	相同		A1,2,36 B57.58 CW2.5,6,15,17,18 DQ7.8,9 与上同相同
	10/25/07POST	NT	阴性的	相同		
	11/19/07PRE		阴性的	相同		A1,2,203 B57.58 CW6,17,18 DQ7.8,9

图17A

11/19/07POST		阴性的		相同		与上面相同
编号	血清 D ₁	CDC 结果	C1Q 结果		LUMINEX IgG	
			5%A/G/PBS	5%VIG		
2	1/15/2007 ALSO PRE	NT	纯的 阴性的	阴性的	Ci- 阴性的	
			DR53	DR53 部分抑制	DR1,9,10,17,53 DQ8,9,	
	8/21/07POST	NT	Ci- 阴性的 DR53	相同	Ci- 阴性的 DR1,9,10,17,53 DQ8,9,	
3	7/20/07PRE	A3,23,24,11	纯的 A24,11,3,80,1,36, 23,32,30,25,B82, 56,67,42,55,7,76 81,54,	相同	A1,3,23,24,11,25,26, 29,30,31,32,33,34,36 66,68,69,74,80, B44, 7,8,12,14,17,18,22,27 35,37,42,45,51,53,59 63,67,76,78,81,8201, DR53,DQ7,8,9, ?DQA3	
	8/10/07POST	Ci-? 利妥昔单抗 Ci-减少	DR53,DQ7,8,9 ?DQA3 A3,11,24	NT	A1,3,11,23,24,25,29, 30,32,34,36,68,80, B7,8,17,18,22,27,37, 42,63,64,67,76,81,82, DR53,DQ7,8,9,	
	11/6/2007PRE	Ci-? 利妥昔单抗	DR53,DQ8	NT		
	11/7/2007POST		A24,11,3,80,1,36 DR53 DQ7,8 A24,11,3, DR53 DQ8	相同		
	12/18/07PRE		A24,11,3,1,80,36	相同		

图17B

	12/18/07POST		B59.38,46,54, DR53 DQ7.8 12A24 12DR53	相同		
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果	5%A/G/PBS	5%IVIG	LUMINEX IgG
4	8/9/2007	A2,68,69,23,24, B57,58, 混淆CDC结果	纯的 A68,69,2 CII-NT	相同+A24, 明显的抑制	明显的抑制	A2,23,24,68,69,B8,12 17,37,41,42,45, DR1,9,10,103 DQ4,5,6, A2,23,24,68,69 B42,37,44,41,8,57,58 45, DR1,10,103,51 DQ5,6 A2,203,210,68,69,23 24,2403 DR1,10,103,51 DQ5,6.
	8/10/07PRE	A2,68,69 CII-NEG	A2,68,69,24,B57 DR1	NT	明显的 体内抑制	
	8/12/07POST	A2,69 A68 v.弱	A2,68,69 DR1	NT		
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果	5%A/G/PBS	5%IVIG	LUMINEX IgG
5	8/16/07PRE	等待CDC	纯的 阴性的	相同	B44,82,一些CW,DR 52加入,可能地FP, 在IVIG样品中	B51,75,78, CII-阴性的
	8/16/07POST	NT	阴性的	相同		
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果	5%A/G/PBS	5%IVIG	LUMINEX IgG
6	7/7/2007 ALSO PRE	A2,68,69-长时间温育	纯的 A24,2,68,69,11 B49,56,63,50,75, 62,57,58,53,35, 77,71,72.	相同-A11, B77,72	部分抑制 A24抑制	A2,11,23,24,68,69, B17,21,35,49,50,53, 56,62,63,70,71,72,75, 77

图17C

编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果			LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS	5%IVIG	
7	3/1/2007	NT	CII NEG. DQ5	相同 DQ3,6,4	相同抑制	DR15 DQ6,4,5. CI NEG.
	7/22/07POST	CII NEG. A2,69, A2 不抑制 A28 被抑制	CII NEG. A2,68,69B57,58	相同 +A11, B49,62		DR17 DQ2
	8/13/07PRE	A2,69	A2,68,69wk,24 B57,58wk21,62	NT		A2,24,68,69 B17,21, 35,42,52,53,55,56,62 63,70,71,72,75,77. CII NEG. 与上面相同, 仅B65不同
	8/15/07POST	A2	CII NEG. A2,68,69 B57,58 CII NEG.	NT		
	8/29/07PRE	NT	A2,68,69 B57,58	相同		A24,2,11,32,68,69, B17,21,35,52,53,55, 56,62,63,67,70,71,72, 75,77. CII NEG. 与上面相同
	8/29/07POST	NT	CII NEG. A2,68,69 B57,58 CII NEG.	相同		
	8/29/07PRE	NT	A2,68,69 B57,58 CII NEG.	相同		与上面相同
	9/10/07POST	NT	A2,68,69 B57,58 CII NEG.	相同		A2,68,69 B17,21,35, 52,53,55,62,63,70,71, 72,75,77. CII NEG.

图17D

8/29/07PRE	NT	CI NEG. DQ5.4	DQ5.6.4	A2 B49.17. DR15.8.11.13.17 DQ6.4.5.DQA1-ST456 A2 B49.17. DR15.8.11.13.17 DQ6.4.5
8/30/07POST	NT	CI NEG. DQ5.4	DQ5.6.4	
10/3/07PRE	IgM-A2 B57.58 CII-NT	CI NEG. DR11.13 DQ5.6.7	相同 相同+DQ2. 4.DR17	A2 B57.58.49 DR13.17.11.8.14.103. 15.12.18.52 DQ7.4 6.5..DQA1-ST456
10/5/074:00 POST	CI-NT (血清不够) DR15.DQ2.5.6	CI NEG. CII NEG.	相同 DR11.13 DQ5.6.7.	A2.25.69 B57.58.49. 63.27.7.51CW17.5.18.2 DR13.11.8.17.14.103. 15.12.18.16.7.52.51 DQ7.6.2.5.4.8.DQA1-ST456
10/5/0716:00 POST	CI-NT (血清不够) DR15.DQ5.6	CI NEG. DR11.13 DQ5.6.7	相同 相同+DQ2. DQ4	A2.25.69.32.24.68.34 B57.58.49.63.51.27.7 47.27.8201CW17.5.18.2 DR13.11.8.17.14.103. 15.12.18.16.7.52.51.1 DQ7.6.5.4.8.DQA1-ST456
10/5/074:00 PRE	NT	CI NEG. CII NEG.	相同 DR11.13 DQ5.6.7.	A2.25 B57.58.49.63 CW17. DR13.11.8.17.14.103. 15.12.18.16.7.52.51.1 DQ7.6.2.5.4.8.DQA1-ST456
10/13/07POST	NT	CI NEG. DR11.13DQ5.6.4	相同 +DQ2.7	A2.25 B57.58.49.63 CW17. DR13.11.8.17.14.103. 15.12.18.16.7.52.51.1 DQ7.6.5.4.8.DP19 DQA1-ST456

图17E

10/15/07POST	NT	CI NEG DR11,13 DQ5.6	A29 相同	A2,25,32 B59,57,58 63,51,53 CW17, DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51, DQ7,6,5,4,8, DQA1-ST456	
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果		LUMINEX IgG
			纯阳	5%A/G/PBS 5%IVIG	
8	9/4/2007	CI NEG DQ5.6-部分抑制	B37,63,65,48 CW7,17,8,1,10, DQ5.6,2	相同 +B81 CW12,15, 相同 被抑制,其它的为阴性 DQ部分抑制	A23,24 B7,53,37,48, 63,65,73,81, CW7,8 1,10,12,15,16,17,18, DR9,13,52,1,2,7,11,12 14,17,18,103,51, DQ2,5,6, B53,37,48,63,65,73,81 CW1,7,8,10,12,15,16 17 DR13 DQ2,5,6, 与上面相同 A23,24 B53,7,37,48,63 65,73,81 CW7,17,1,10 12,15,16,18,8 DR13,9,1,7,12,17,18,103 51 DQ2,6,5 与上面相同 CI- 与上面相同 CI- 相同 +DR10,11,14, 15,16, 与上面相同
	9/24/07PRE	NT	wk CW7	相同	
	9/24/07POST	NT	DQ5.6 CI NEG DQ5.6	相同 相同 相同	
	10/30/07PRE	NT	B63,37 CW7	相同	
	10/30/07POST	NT	阴性的 B63,37 CW7 DQ5.6,2	DQ5,6,2 相同	
	11/19/07PRE	NT	B63,37 CW7 DQ5.6	相同	
	11/19/07POST	NT	B63,37 CW7 DQ5.6	相同	

图17F

编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果		LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS 5%VIG	
9	8/17/2007	IgM-A11 DQ1.5.6. 双剂量-复检	纯的 阴性的 DR53	相同 DR53 抑制	A11,29,25,6601 DR15,51,53 DQ2,6,5,8. Serum date-8/10/07
	9/11/07PRE	NT	阴性的 DR53,DQ2,5,6.	相同	A11,29,25 CW7 DR15,51,53,1,10 DQ2,6,5,8,9.
	9/12/07POST	NT	阴性的 DR53,DQ2,5,6.	相同	A11,29,25 CW7,10,17 DR15,51. DQ2,6,5,8,9.
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果		LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS 5%VIG	
10	10/3/2007	IgM 不确定的	A2,25.	相同 A25 不抑制	A2,26,50,1,10,11,25, 28,30,3443,66,68,69 B17,21,35,44,49 53,56,57,58,62,63,75. DR7,DQ2,6,4,5,9.
	10/12/07PRE	DQ2,6. 不确定的 部分抑制	DQ2,5,6.	相同 DQ2,5,6.	A2,25,26,66 B57,58, 50,49. DQ2,5,6,4,9.
	10/12/07PRE	NT	阴性的	相同	A2,25,26,66 B57,58, 50,49,63,44,62. DR1,7,DQ2,5,6,4,9. DP19.
	10/13/2007	NT	DQ2,5,6 阴性的 DQ2,5,6	相同	
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果		LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS 5%VIG	
11	8/6/2007	非特异性 IgG	纯的 阴性的	相同 阴性的	A30,31

图 17G

	10/11/07PRE 10/12/07POST	抗体 NT NT	阴性的 阴性的	相同 相同		DQ5,6,4, A30,31 DQ5,6 A30,31 B76,63,8201, 45 CW7,17,10, DR12,4,1,53,52 DQ5,6 DP19
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果			LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS	5%IVIG	
12	9/19/2007 Post 3XPPs 9/27/07PRE 9/28/07POST	CI- 阴性的 CI- 弱反应性	CI- 阴性的 DR53	相同	DR53 被抑制	CI- 阴性的 DR53 CI- 阴性的 DR53 CI- 阴性的 DR53
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果			LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS	5%IVIG	
13	11/5/2007 11/5/2007PRE 11/5/07POST		CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9 CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9 CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9	相同 相同 相同	部分抑制 相同	CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9,2,4 CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9 CI- 阴性的 DR53 DQ7,8,9,2,4
编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果			LUMINEX IgG
			纯的	5%A/G/PBS	5%IVIG	
14	11/7/2007	A29 B44 B44 误检 A29 不抑制	A29,43,B7	相同	A29 无抑制	A29,30,29,43,32,33, 74,31,66,34,23,11,25 26,68,B7,81,27,76,45 27,60,44,61,42,47,82 48,13,67,73,56,55,8,54 CW2,10,16,17,9,18,5

图17H

编号	血清 D.	CDC 结果	C1Q 结果	LUMINEX IgG
15	7/31/2007	A23,24,32,B44	纯的 A23,24,32,25,B76, 45,57,58,75,53,8201, 44,63,62,49,51,77 DR8,11,13,17,DQ2	A1,2,9,25,28,32,33, B8,14,18,35,39,45,62,73,75 76,78,8201,BW4 DR7,8,9,11,12,13,14,17,18 DQ2
	8/30/2007 9/26/2007		Wk A24 阴性的 相同的	A9,25,32; B12,15,17,35,38,49,51,53,67,82,CW7 DR11,12,7,8,13,17 与上面相同
	11/1/07PRE	弱非特异的 Abs	CI- 阴性的 CI- 阴性的	
	11/2/07POST	阴性的	CI- 阴性的 CI- 阴性的	
	11/16/2007		CI- 阴性的 CI- 阴性的	A9,25,32,B12,15,17,35 38,49,51,53,67,78,8201 CW7 DR6,6,7,8,17,DQ2
	11/29/07PRE		CI- 阴性的 CI- 阴性的	A9,25,32,B17,35,38,49 51,53,63,75,76,77CW7 DR8,11,13 与上面相同
	11/30/07POST		CI- 阴性的 CI- 阴性的	

图171

16	12/5/2007		纯的 A2.66.69.3.878, 51.53 DR1	5%A/G/PBS 相同	5%WIG A2 本抑制 其它的抑制	A2.3.9.25.28.2403.B5, 14.18.36.53.71.75.77 78.8201 DR1,4,9,10,14,15,16 17,103.51.DQ5
----	-----------	--	---------------------------------------	-----------------	--------------------------	--

图17J

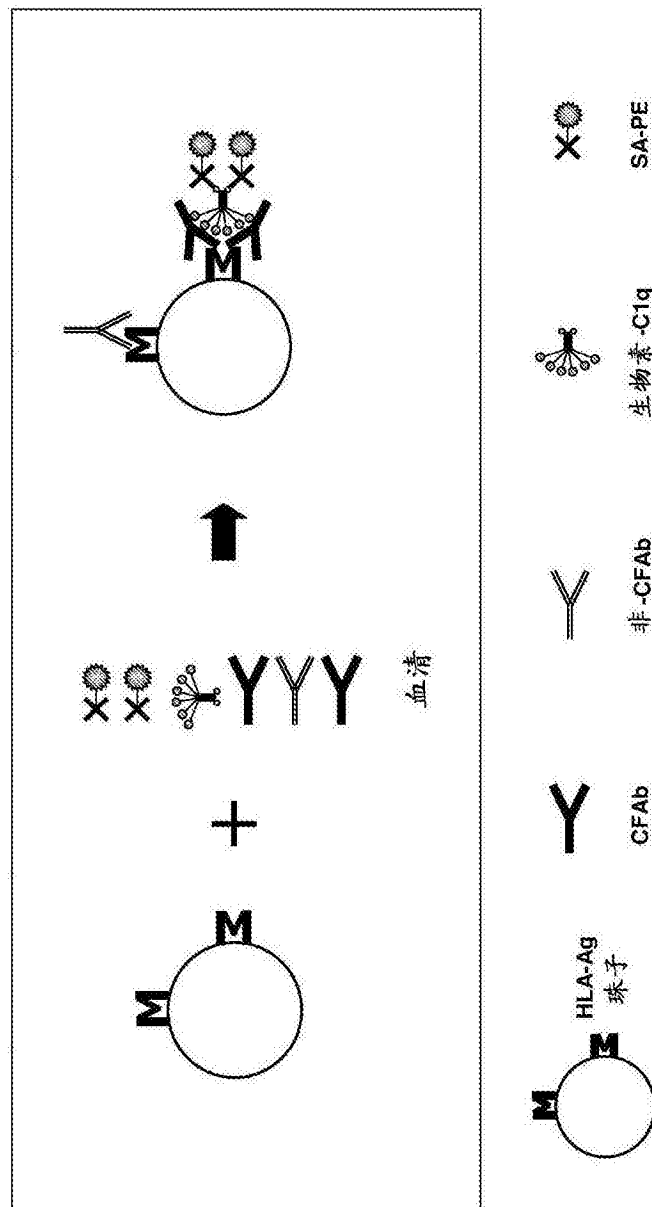


图18

直接和间接标记Clq在LMX-Clq试验中的对比

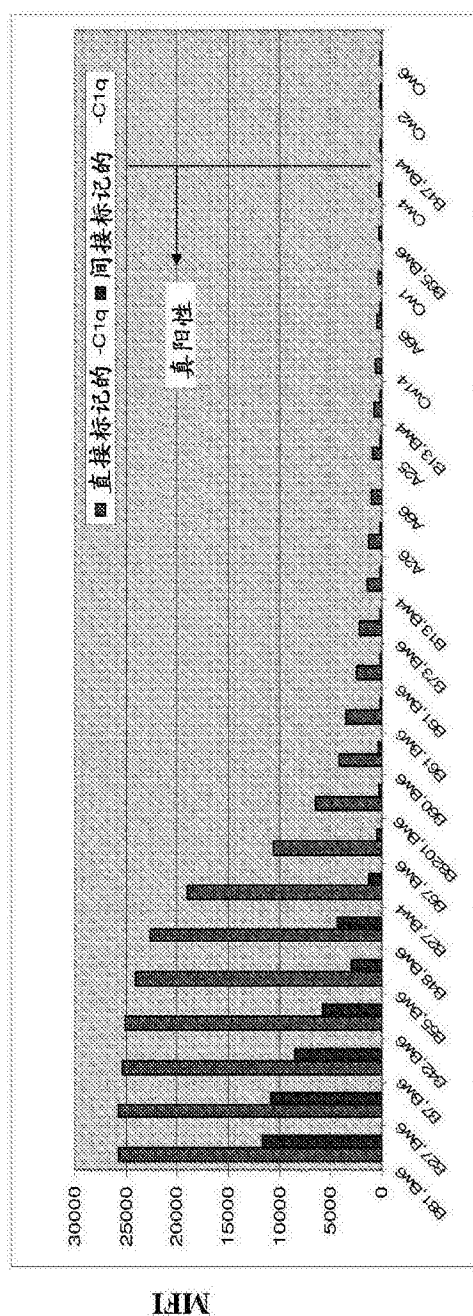
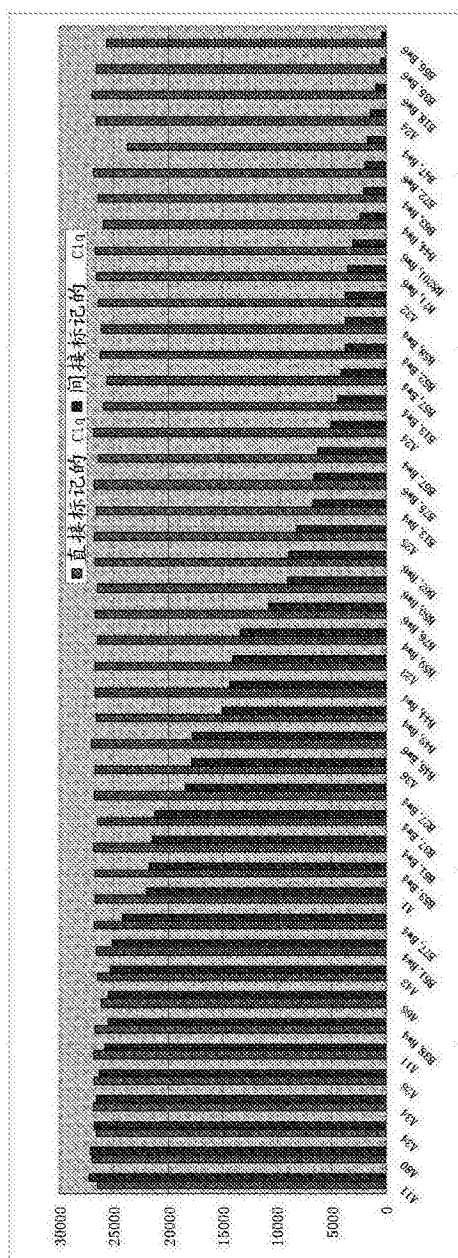


图 19A

HLA-特异性

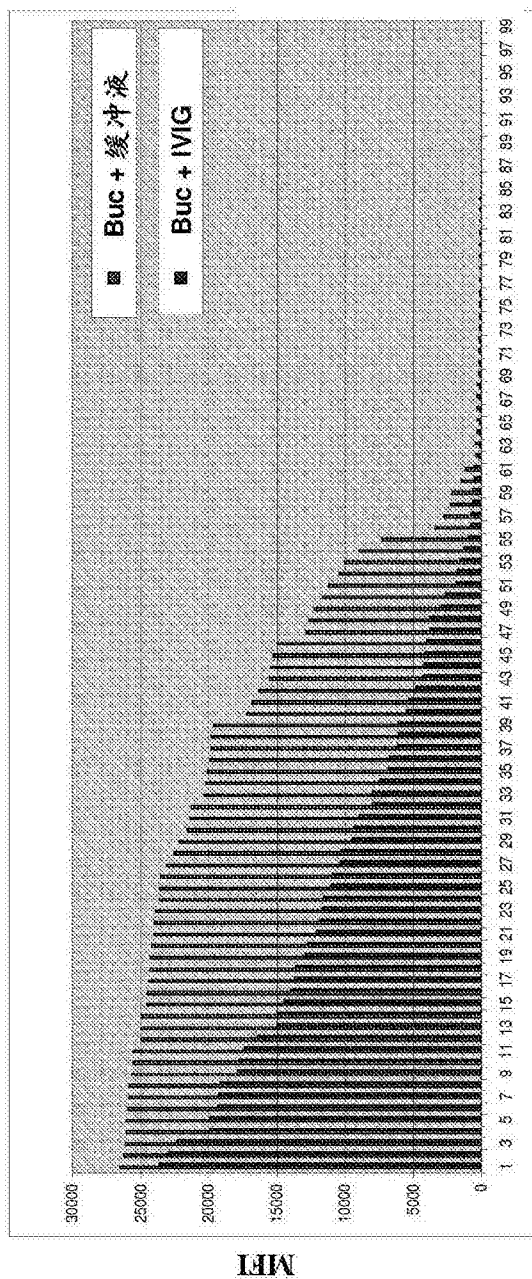
与使用抗-Clq抗体的间接检测相比,使用直接标记的Clq增加了灵敏度。血清A。



按照间接标记的Clq反应的强度排列，通过直接标记的Clq(来自载玻片2)检测出的仅阳性抗体的亚集合。血清B。

图19B

在体外 LMX-C1q IVIG 抑制试验中间接标记 C1q



HLA-A-特异性

IVIG 体外抑制试验证实使用抗-C1q 抗体的初始间接 C1q 方法的抑制

图20A

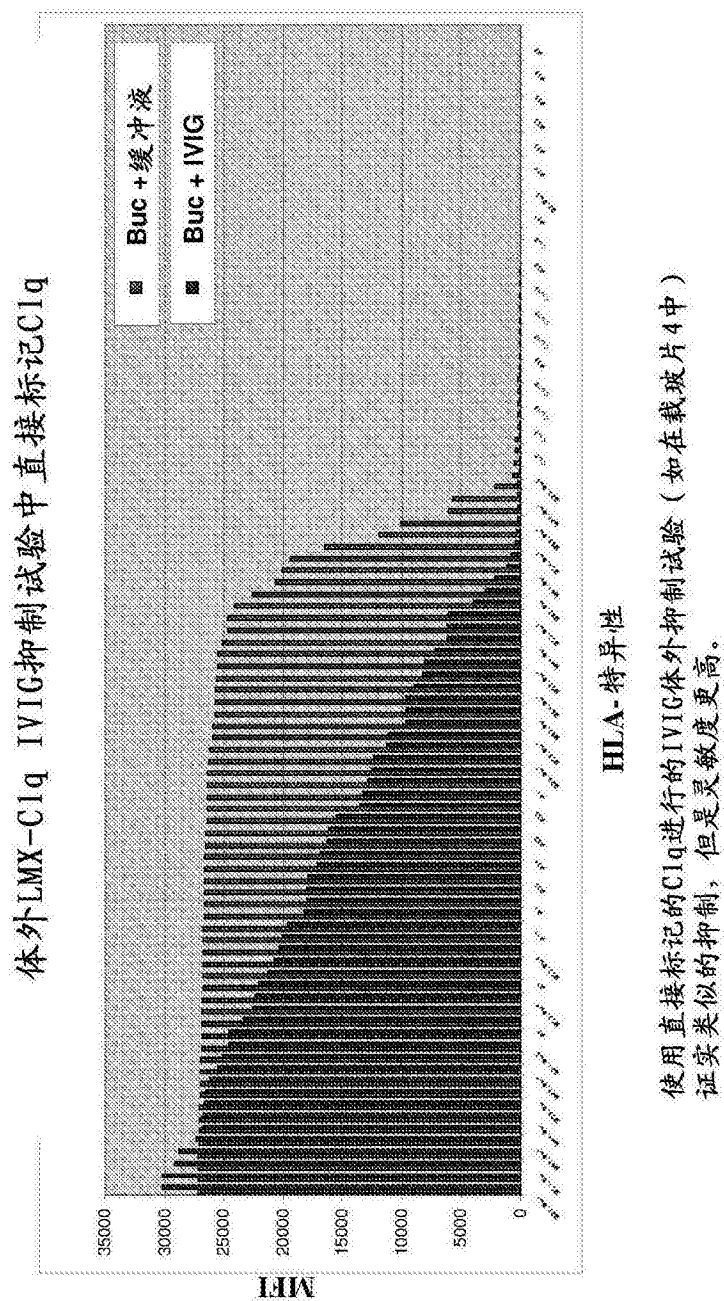


图20B