

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/543
G01N 33/574
G01N 33/576
G01N 33/569



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99816171.3

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 14 日 [11] 授权公告号 CN 1231761C

[22] 申请日 1999. 12. 23 [21] 申请号 99816171. 3 [30] 优先权 [32] 1998. 12. 23 [33] AU [31] PP7916 [32] 1999. 5. 18 [33] AU [31] PQ0425 [86] 国际申请 PCT/AU1999/001156 1999. 12. 23 [87] 国际公布 WO2000/039580 英 2000. 7. 6 [85] 进入国家阶段日期 2001. 8. 13 [71] 专利权人 梅德塞克股份有限公司 地址 澳大利亚新南威尔士 [72] 发明人 R · I · 克瑞斯托菲尔森 C · G · 多斯瑞米迪斯 审查员 刘 铭	[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利 商标事务所 代理人 周中琦
权利要求书 3 页 说明书 58 页 附图 24 页	

[54] 发明名称 一种检测装置及鉴定分子的方法
[57] 摘要

本发明涉及用于检查结合配偶体的检测。结合配偶体的存在与否可用于显示动物、鸟类或植物物种的正常状态、疾病状态或为此的发展倾向，也可用于显示样品中特定化学实体的存在。在一种实施方案中，本发明提供一阵列在生物样品中具有结合配偶体的分子，其中结合配偶体与阵列中各分子的结合模式显示动物、鸟类或植物的正常状态、疾病状态或向此发展的倾向或特定细胞类型或微生物、病毒、寄生物及其它病原因素的存在。在另一种实施方案中，结合配偶体存在于化学、环境或噬菌体展示文库样品中，结合模式显示特定结合配偶体或结合配偶体家族的存在、类型和/或浓度。本发明的检测尤其适用于癌、瘤和非瘤病变的检查。本检测还适用于检查在化学、环境和噬菌体展示样品中的细胞类型、微生物、病毒、寄生物或其他病原因素以及化学实体。

1. 一种检测装置，其含有固定于该装置的离散区域中的免疫球蛋白分子阵列或其衍生物的阵列，其中每个离散区域含有特异于不同细胞抗原的免疫球蛋白或其衍生物，并且除了阴性对照外每种免疫球蛋白分子或其衍生物能够与生物样品中的抗原相互作用，所述免疫球蛋白分子或其衍生物与该免疫球蛋白分子或其衍生物所特异的细胞抗原之间的相互作用同时确立了抗原表达的原位差别图像。

2. 权利要求 1 的检测装置，其中所述阵列包括通式：

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_{\text{e}}^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_{\text{f}}^{m_2} & \dots & \left[q_{o_k} \right]_{\text{g}}^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对细胞抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物；

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表结合相同抗原不同部分的相同免疫球蛋白组的成员；

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同细胞抗原的特异性所定义的不同组免疫球蛋白；

e, f 和 g 分别代表每组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量，且其中 e, f 和 g 可以相同或不同，且每个从 0 到 100，条件是 e, f 和 g 中至少有一个不是 0；

y 是该检测装置上免疫球蛋白组的总数，且从 7 到 2000。

3. 权利要求 1 或 2 的检测装置，其中所述细胞抗原与固定的免疫球蛋白之间的相互作用是通过使用标记的抗体确定的，所述标记的抗体特异于所述细胞抗原。

4. 权利要求 1 或 2 的检测装置，其中所述免疫球蛋白或其衍生物共价结合于所述阵列上，或者，其中所述免疫球蛋白或其衍生物结合于首先包被于固体支持体上的蛋白 A 或蛋白 G。

5. 检测一系列配体的检测装置，所述装置包含固定于所述装置的

离散区域中的并且针对所述配体的结合配偶体的阵列，所述阵列由下式定义：

$$\left[\begin{matrix} \left[P_{X_1} \right]_{b_1}^{n_1} & \left[P_{X_2} \right]_{c_2}^{n_2} & \dots & \left[P_{X_j} \right]_{d_j}^{n_j} \end{matrix} \right]_z$$

其中

P 是特异于配体的结合配偶体；

$n_1 n_2 \dots n_i$ 代表结合同一配体的不同部分的结合配偶体；

$x_1 x_2 \dots x_j$ 代表由对不同配体的特异性所定义的不同结合配偶体；

b, c 和 d 分别代表不同配偶体 $x_1 x_2 \dots x_j$ 的数量，且其中 b, c 和 d 可以相同或不同，且每个从 0 到 100，条件是 b, c 或 d 中至少有一个不是 0；

z 是该阵列上分子组的总数量，且从 7 到 2000；

其中所述结合配偶体和其各自配体之间的相互作用同时确立了所述配体系列存在的原位差别图像。

6. 体外鉴定同时出现的分子的特性的方法，所述方法包括：

从受试者中获取生物样品，所述生物样品包含存在于白细胞类型的细胞表面的抗原；

使所述生物样品与其上结合有免疫球蛋白的权利要求 1 的阵列接触，其中所述免疫球蛋白分子特异于所述抗原，并且所述抗原中的至少七种选自

CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD33, CD34, CD36, CD37, CD38, CD41, CD42, CD42a, CD45, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD57, CD60, CD61, CD71, CD79a, CD95, CD103, CD117, CD122, CD154, 血型糖蛋白 A, HLA-DR, KOR-SA3544, 和 FMC7; 和

确定何种抗原已结合于何种固定的免疫球蛋白分子上，借此同时确

立了抗原表达的原位差别图像。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述免疫球蛋白分子是单克隆抗体或其抗原结合型衍生物。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述免疫球蛋白分子是多克隆抗体。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述生物样品选自细胞、细胞碎片、细胞提取物、组织液、血清、血浆、血液、脑脊液、尿液、淋巴液、精液、抽吸物、骨髓抽吸物和粘液。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述生物样品是血液。

一种检测装置及鉴定分子的方法

发明领域

本发明一般涉及用于检查结合配偶体的检测。是否存在结合配偶体可用于显示动物、鸟类或植物的正常状态、疾病状态或障碍或发展疾病或障碍的倾向，或特定细胞类型或微生物、病毒、寄生物或其它病原因素的存在，或显示如在化学文库、生物标本、环境样品或噬菌体展示文库中特定化学实体的存在。在一种实施方案中，本发明提供一阵列具有存在于源于或衍生于上述动物、鸟类或植物的生物样品中的结合配偶体的分子，其中结合配偶体与阵列中各个分子的结合模式，包括没有结合及配偶体相互作用的密度，显示正常状态或疾病状态或障碍或发生疾病或障碍的倾向，或特定细胞类型或微生物、病毒、寄生物或其它病原因素的存在。在另一种实施方案中，结合配偶体存在于化学、环境或噬菌体展示文库样品中，结合模式，包括没有结合或配偶体相互作用的密度，显示特定的结合配偶体或结合配偶体家族的存在、类型和/或浓度。本发明检测尤其适用于检查包括人在内的动物、以及鸟类和植物的癌和瘤以及非瘤病变。该检测还适用于检测化学、环境和噬菌体展示样品中的细胞类型，微生物、病毒、寄生物或其它病原因素以及化学实体。在优选的实施方案中，阵列中的分子包括能与特定可溶的、可结合细胞或合成的抗原相互作用的免疫球蛋白。该阵列中的结合模式，包括是否与相应抗原结合或其结合量，显示在细胞上或由细胞表达的抗原，从而显示动物，鸟类或植物的正常状态或疾病状态如癌。结合模式还显示抗原在化学文库、环境样本或噬菌体文库中的存在和/或浓度。在另一种实施方案中，阵列中的分子是遗传分子，用于分析在特定细胞中相应的遗传物质。

发明背景

本专利说明中作者们提到的公开的文献目录在本说明书的末尾一同列出。

日益完善化的免疫学技术极大促进了医学、兽医学、园艺学和环境学领域的研究和发展。其基本重要性在于抗体-抗原间相互作用的特异性。通过这种相互作用才能确定编码某特定抗原的基因的表达。

发生于鸟类、植物和尤其是动物如人的许多疾病具有遗传基础，而且其特征在于各种基团的表达模式和/或水平变化。例如，一些癌症与致癌基因和抑癌基因表达的改变有关。而且，疾病状态或障碍与细胞周期的改变有关，病变的发展可归因于某特定基团在转录调节上的改变。

尽管现有几种遗传学检测可以评估突变，但某些遗传学改变的鉴定不总能直接指示疾病状态或障碍。

一些遗传学改变表达为细胞表面抗原的变化。然而，以鉴定单个抗原为依据对复杂疾病状态或障碍如癌进行诊断检测的努力尚未普遍成功。

白血病和淋巴瘤在人类可引起严重的病死率和发病率。这两种癌症是细胞连续不断地增生的结果，在由正常分化的各个阶段向特定细胞类型转化过程中，这些细胞连续不断的增生会被以其它方式阻断。白血病是骨髓中的血形成细胞前体在各分化谱系中发生突变的结果（见图 1）。淋巴瘤由淋巴组织中的淋巴细胞或巨噬细胞发展而来。

外周血中的淋巴细胞在其外质膜表面表达大量不同的抗原，其中许多抗原是生长因子、细胞与细胞间相互作用和免疫球蛋白的受体；细胞黏附或补体刺激分子；酶和离子通道。已开发一个独立的系统命名法对称为分化群抗原的单克隆抗体进行分类（CD）（Kishimoto 等，1997）。有关 CD 抗原的详细资料可在如下网址上找到：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prov/cd/index_molecules.htm。这些细胞表面抗原的表达能区分周围循环中发现的成熟血细胞的不同类型。外周血中的细胞在骨髓中产生，其从表达 CD34 表面抗原的前体髓样或淋巴样干细胞沿特定谱系增生和分化而来（见图 2）。

目前白血病的诊断是以形态学、特异性 CD 的表达、淋巴样 (LY) 和髓细胞样 (MY) 抗原、酶活性以及细胞发生异常如染色体易位为依据。如急性髓样白血病 (AML) 的诊断即用上述四条标准进行。目前, 应用针对特定 CD 抗原的荧光抗体标记并结合流式细胞仪分析确定了白血病细胞上的多达三种 CD 抗原的表达。所以, 应用这种费力繁杂的技术从患者中筛选共表达 166 种 CD 抗原的白血病细胞并不可行。最近, de Matos 和 Vale (1996) 对流式细胞术的操作步骤加以改进, 使之能在一次检测中同时定量分析人淋巴细胞及其亚群的主要类型。在该过程中, 应用针对 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD56 抗原的单克隆抗体孵育混合的人淋巴细胞群, 这些抗体用结合有三种不同的荧光染料。用流式细胞仪检测这三种荧光发射就能定量分析人淋巴细胞的主要类型, T 和 B 淋巴细胞和天然杀伤 (NK) 细胞。由于大多数流式细胞仪只可能同时使用三种不同激光进行细胞分析, 上述方法是目前对该项技术最大程度上的应用。

Chang (1983) 制备了在玻璃盖玻片上的不能特异性的抗体的矩阵样排列, 用作在其表面表达相应抗原的细胞的精密吸附剂。这种方法是基于以前的这样一个发现: 对于对细胞表面抗原有特异性的抗体, 细胞能够与被所述抗体包被的表面结合 (Mage 等, 1977; Wysocki 和 Sato, 1978)。Chang (1983) 证明了外周血单核细胞可与吸附于玻璃盖片的小鼠抗人 HLA-A2 抗体发生特异性结合, 小鼠胸腺细胞可与固定的抗 Lyt2.1 和抗 Lyt2.2 抗体发生特异性结合。

在研究本发明的工作中, 本发明者认为检查某些结合配偶体可用于诊断疾病状态和障碍如癌和非瘤病变, 以及正常状态的存在。该检测系统还可用于确定一阵列抗原的存在与否, 并能量化其相对浓度。这在化学文库、环境样本和噬菌体展示文库中尤其重要。

发明概述

本发明一方面提供一种包括一阵列 (assay) 分子的检测装置 (assay device), 其中在该阵列中, 除阴性对照以外, 各个分子均能与各自结合配偶体相互作用, 所述结合配偶体被认为存在于来自动物、鸟类或植物

的生物样品中。其中分子与结合配偶体的相互作用模式显示正常状态或疾病状态或障碍或发生疾病状态或障碍的倾向。

在一相关实施方案中，本发明提供一种包括一阵列分子的检测装置，其中在该阵列中，除阴性对照以外，每个分子均能与各自结合配偶体相互作用，其中所述结合配偶体被认为存在于化学或噬菌体展示文库或环境样品中，其中分子与结合配偶体的相互作用模式显示该样品中特定结合配偶体的存在、类型和/或数量。

本发明另一方面研究一种用于诊断动物如人的正常状态或癌症或发生癌症的倾向，该检测装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，阵列中的每个分子能与各自的结合配偶体相互作用，前提是所述配体存在于该动物的生物样品中，其中固定化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

本发明的相关方面提供用于诊断动物如人的非瘤病变或发生非瘤病变倾向的检测装置，该检测装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，阵列中的每个分子能与各自的结合配偶体相互作用，只要配体存在于该动物的生物样品中，其中固定化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示非瘤病变的存在或发生非瘤病变的倾向。

在一相关实施方案中，本发明提供一种用于检查细胞类型或微生物、病毒或寄生物因素或病原体的检测装置。该检测装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，阵列中的每个分子能与各自的结合配偶体相互作用，如果所述配体存在于所述细胞类型、微生物、病毒或寄生物因素或病原体上，其中固定化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示该细胞类型、微生物、病毒或寄生物因素或病原体的存在。

本发明的其他方面涉及一阵列固定于固相支持物上的分子，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} [Px_1]_{b_1}^{n_1} & [Px_2]_{c_2}^{n_2} & \dots & [Px_j]_{d_j}^{n_j} \end{matrix} \right]_z$$

其中

P 是能与结合配偶体相互作用的结合组成员；

$n_1 n_2 \dots n_i$ 代表结合组中的不同成员；

$x_1 x_2 \dots x_j$ 代表不同的结合组；

b, c 和 d 分别代表结合组 $x_1 x_2 \dots x_j$ 中不同成员的数量，其中 b, c 和 d 可以相同或不同，每个大约从 0 到大约 100，条件是 b, c 或 d 中至少有一个不是 0；

z 是该阵列分子组的数量，从大约 1 到大约 2000；

其中固相化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示正常状态或疾病状态或障碍或发生该疾病状态或障碍的倾向，或结合配偶体的存在、类型和/或数量。

本发明另一方面研究一种用于癌症的检测装置，该装置包括一阵列固定于固相支持物上分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分散区域对不同抗原有特异性，且其中所述抗原在正常细胞或癌细胞表面表达或由正常细胞或癌细胞释放；其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向或正常状态的存在。

本发明一个有关方面提供用于非瘤病变的检测装置，该装置包括一阵列固定于固相支持物上分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分散区域对不同抗原有特异性，且其中所述抗原在非瘤细胞表面表达或由非瘤细胞释放；这些固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式显示非瘤病变的存在或发生非瘤病变的倾向。

在其它相关实施方案中，本发明提供用于检查微生物、病毒、寄生物或其它病原因素的检测装置，该装置包括一阵列固定于固相支持物上分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分

散区域对不同抗原有特异性，且其中所述抗原在该微生物、病毒、寄生物因素或病原体表面表达或由其释放；抗原与固相免疫球蛋白的结合模式显示该微生物、病毒、寄生物或病原体的存在与否。

本发明的其它实施方案涉及用于检查存在于化学文库、环境样品或噬菌体展示文库的结合配偶体的检测装置，该装置包括一阵列固定于固相支持物上分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分散区域对不同抗原有特异性，且其中固相免疫球蛋白与抗原的结合模式显示该抗原的存在、类型和/或数量。

本发明另一方面涉及一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白、衍生物或化学等同物，所述抗原表达于正常或癌细胞表面或由正常或癌细胞释放或表达于微生物、病毒、寄生物、病原体上，或该抗原被认为存在于化学文库、环境样品中，其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_e^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_f^{m_2} & \dots & \left[q_{o_k} \right]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白，该抗原表达于正常细胞或癌细胞表面或由正常细胞或癌细胞释放或表达于微生物、病毒、寄生物、病原体上或被认为存在于化学文库、环境样品或噬菌体展示文库中；

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表可结合相同抗原不同部分的相同免疫球蛋白组的成员；

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性所定义的不同免疫球蛋白组；

e, f 和 g 分别代表每组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量，且其中 e, f 和 g 可以相同或不同，且每个从 0 到 100，条件是 e, f 和 g 中至少有一个不是 0；

y 是该阵列上免疫球蛋白组的数量，从大约 1 到大约 2000；

其中固相免疫球蛋白分子与其各自抗原的相互作用模式显示正常状态或癌症的发生或发生癌症的倾向或微生物、病毒、寄生物或病原体的存在，或化学或环境样品、噬菌体展示文库中结合配偶体的存在、类型和/或数量。

本发明的有关方面提供一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物，该抗原表达于非瘤细胞表面或由非瘤细胞释放，其中对每种抗原或其部分有特异性的各免疫球蛋白组位于固体支持物的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{array}{c} \left[q_{o_1} \right]_{e}^{m_1} \left[q_{o_2} \right]_{f}^{m_2} \cdots \left[q_{o_k} \right]_{g}^{m_i} \end{array} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白；

$m_1 m_2 \cdots m_i$ 代表可结合相同抗原不同部分的相同免疫球蛋白组的成员；

$o_1 o_2 \cdots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性所定义的不同免疫球蛋白组；

e, f 和 g 分别代表每组 $o_1 o_2 \cdots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量，且其中 e, f 和 g 可以相同或不同，且每个从 0 到 100，条件是 e, f 和 g 中至少有一个不是 0；

y 是该阵列免疫球蛋白组的数量，且从大约 1 到大约 2000；

其中固相免疫球蛋白分子与其各自抗原的相互作用模式显示非瘤病变的发生或发生非瘤病变的倾向或特定微生物、寄生物、病毒或病原体的存在。

另一方面本发明还研究一种用于癌症的检测装置，该装置包括一阵列固定于固体支持物分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分散区域对表达于白血病细胞上的不同分化群抗原和/

或髓细胞样和/或淋巴样抗原具有特异性，其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

另一方面本发明提供一种包括一阵列分子的诊断检测装置，其中阵列中的每个分子除阴性对照以外均能与各自的结合配偶体相互作用，该配体被认为存在于来自动物、鸟类或植物的生物样品中，其中阵列中的分子以一种方式阵列，这样当这些分子与结合配偶体相互作用时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示疾病状态或障碍或发生疾病或障碍的倾向。

其它方面本发明考虑诊断动物如人的癌症或发生癌症的倾向的检测装置，该检测装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，阵列中的每个分子能与各自的结合配偶体相互作用，只要配体存在于该动物的生物样品中，其中所说阵列中的分子以一种方式阵列，这样当固相化分子与其各自结合配偶体相互作用时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

另一方面，本发明还涉及一阵列固定于固体支持物上的分子，该阵列以下述通式定义：

$$\left[\begin{array}{cccc} \left[\text{Px}_1 \right]_b^{n_1} & \left[\text{Px}_2 \right]_c^{n_2} & \dots & \left[\text{Px}_j \right]_d^{n_j} \end{array} \right]_z$$

其中

p 是能与结合配偶体相互作用的结合组 (binding group) 成员；

$n_1 \ n_2 \ \dots \ n_j$ 代表结合组中的不同成员；

$x_1 \ x_2 \ \dots \ x_j$ 代表不同的结合组；

b, c 和 d 分别代表结合组 $x_1, x_2 \ \dots \ x_j$ 中不同成员的数量；其中 b, c 和 d 可以相同或不同，且每个从大约 0 到大约 100，条件是 b, c 和 d 中至少有 1 个不为 0；

z 是该阵列上分子的总组数，且从大约 1 到大约 2000；

其中该阵列中的分子以一种方式阵列，这样当固相化分子与各自结合配偶体相互作用时，结合基中示差密度模式提供可辨别信号，显示疾病状态或障碍或发生该疾病或障碍的倾向。

本发明另一方面研究用于癌症的检测装置，该装置包括一阵列固定于固体支持物上分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同的分散区域对不同抗原有特异性，且其中抗原表达于正常细胞或癌细胞表面或由正常细胞或癌细胞释放，其中该阵列中的结合免疫球蛋白以一种方式阵列，这样固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式提供有差别的密度模式，其以可辨别信号形式且显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

本发明的另一方面涉及一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物，该抗原表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放，其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} [q_{o_1}]_e^{m_1} & [q_{o_2}]_f^{m_2} & \dots & [q_{o_k}]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放的抗原有特异性的免疫球蛋白；

$m_1 \ m_2 \ \dots \ m_i$ 代表与同种抗原的不同部位结合的同一种免疫球蛋白组(group)的成员；

$o_1 \ o_2 \ \dots \ o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同组免疫球蛋白；

e , f 和 g 分别代表各组 $o_1 \ o_2 \ \dots \ o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量，且其中 e , f 和 g 可以相同或不相同，且每个从 0 到 100，条件是 e , f 和 g 中至少有一个不为 0；

y 是该阵列免疫球蛋白的总组数，从大约 1 到大约 2000；

其中，该阵列中分子以一种方式阵列，这样当固相免疫球蛋白与其各自抗原相互作用时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示癌症的发生或发生癌症的倾向。

本发明另一方面研究用于癌症的检测装置，该装置包括固定于固体支持物上分散区域的一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，使得不同分散区域对表达于白细胞上的不同分化群(CD)抗原和/或髓细胞样(MY)抗原和/或淋巴样(LY)抗原有特异性，其中该阵列中分子以一种方式阵列，这样当固相免疫球蛋白与其各自抗原相结合时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

本发明另一方面研究一种方法，确定在动物、鸟类或植物中的疾病状态或障碍或发生疾病或障碍的倾向的存在，其中所述的疾病或障碍例如(但不限于)癌症，该方法包括从所说动物、鸟类或植物获取生物样品，该样品中含有游离的结合配偶体或与细胞表面结合的结合配偶体，该结合配偶体直接或间接与上述疾病或障碍相联系，将所述生物样品与包含一阵列可与该配体结合的分子的固体支持物接触，其中上述阵列中的分子以一种方式阵列，这样当其与结合配偶体相互作用时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示疾病状态或障碍或发生该疾病或障碍的倾向。

本发明另一方面研究用于检测人及非人动物中的癌症及发生癌症倾向的方法，该方法包括从人或非人动物获取生物样品，将该生物样品与对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物接触，所述抗原表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放，其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_e^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_f^{m_2} & \cdots & \left[q_{o_k} \right]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放的抗原有特异性的免疫球蛋白；

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表与相同抗原的不同部分结合的不同免疫球蛋白组的成员;

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同组免疫球蛋白;

e, f 和 g 分别代表各组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量, 且其中 e, f 和 g 可以相同或不相同, 且每个从 0 到 100, 条件是 e, f 和 g 中至少有一个不为 0;

y 是该阵列上免疫球蛋白的总组数, 从大约 1 到大约 2000;
其中, 该阵列中分子以一种方式阵列, 这样当固相免疫球蛋白与其各自抗原相互作用时, 有差别的密度模式提供可辨别信号, 显示癌症的发生或发生癌症的倾向。

本发明另一方面研究一种测定动物、鸟类或植物的疾病状态或障碍或者疾病或障碍的发生倾向的存在的方法, 其中所述疾病或障碍例如(但不限于)癌症, 该方法包括从动物、鸟类或植物中获取生物样品, 该样品中含有游离的结合配偶体或与细胞表面结合的结合配偶体, 该结合配偶体直接或间接与上述疾病或障碍相联系, 并将该生物样品与包含一阵列可与该结合配偶体相结合的分子的固体支持物接触, 其中与结合配偶体的结合模式显示疾病状态或障碍或发生该疾病或障碍的倾向。

本发明的其它方面研究一种检测人及非人动物癌症或发生癌症的倾向的方法, 该方法包括从人或非人动物中获取生物样品, 将该生物样品与一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物接触, 该抗原表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放, 其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域, 该阵列由下述通式定义:

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_e^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_f^{m_2} & \dots & \left[q_{o_k} \right]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放的抗原具有特异性的免疫球蛋白;

$m_1, m_2, \dots, m_i$ 代表与相同抗原的不同部位结合的同一种免疫球蛋白组的成员;

$o_1, o_2, \dots, o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同免疫球蛋白组;

e, f 和 g 分别代表各组 $o_1, o_2, \dots, o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量, 且其中 e, f 和 g 可以相同或不相同, 且每个从 0 到 100, 条件是 e, f 和 g 中至少有一个不为 0;

y 是该阵列上免疫球蛋白的总组数, 从大约 2 到大约 2000;

其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的相互作用模式显示癌症的发生或发生癌症的倾向。

另一方面本发明涉及一阵列能与被认为存在于生物样品中的相应结合配偶体相互作用的分子的应用, 用于测定疾病状态或障碍或发生疾病状态或障碍的倾向。

另一方面本发明还研究一种治疗人及非人动物癌症的方法, 该方法包括: 从人及非人动物获取生物样品, 将所述样品与固定于固体支持物上离散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物接触, 使得不同分散区域对不同抗原具有特异性, 其中抗原表达于正常细胞或癌细胞表面或由正常细胞或癌细胞释放, 确定固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式, 并进行诸如但不限于人源化单克隆抗体的免疫治疗, 这种抗体对应于实质上表达于癌细胞上的抗原。

附图简述

图 1 显示的是血细胞分化谱系图表, 各种类型的白血病由前体细胞类型产生。测定全部抗原的表达能对白血病做出准确诊断 (参看图 2)。CML, 慢性髓细胞白血病; AMML, 急性髓单核细胞白血病; ALL, 急性淋巴细胞白血病; AEL, 急性红细胞白血病; Ameg1, 急性巨核细胞白血

病; Amol, 急性单核细胞白血病; AML, 急性髓细胞白血病; CLL, 慢性淋巴细胞白血病; NHL, 非何杰金氏淋巴瘤; APL, 急性早幼粒细胞白血病。改编自 Cooper (1993)。

图 2 显示的是骨髓中血细胞分化谱系图表, 图中标明一些表达于前体细胞和成熟血细胞上的抗原。改编自 Van Dongen 等 (1988)。

图 3 是包含一排列分散的抗体斑点的免疫检测装置示意图, (a) 顶视图和 (b) 透视图。

图 4 显示的是抗体阵列操作示意图。

图 5 显示结合到抗体 (Coulter Beckman) 阵列中一些斑点的人 CCRF-CEM 白血病与 Raji 淋巴细胞的 Nomaski 显微照片, 所述抗体排列吸附于玻璃显微载片上的硝酸纤维膜 (Molecular Probes)。所使用的操作除抗体滴加体积为 $0.4\mu\text{L}$ 外, 在实施例 1 和实施例 2 中作描述, A, CCRF-CEM 细胞; B, Raji 细胞。

图 6 是被 CD4 抗体斑点结合并由结合了 CD45 抗体的 Alexa-488 标记的 CCRF-CEM 细胞照片。

图 7 是用细胞系检测的抗体阵列示意图。

(a) 阵列中的抗体斑点位置一览表; (b) CCRF-CEM T 细胞白血病; (c) Raji B 细胞淋巴瘤; (d) NB4 髓样细胞。细胞在 PBS 中混悬。mIgG1, mIgG2a, bmIgM 是同型对照抗体, 数字代表相关 CD 分子的抗体 (如: 2 代表抗-CD2)。GPA 是抗血型糖蛋白 A 抗体, 它是人血红细胞上的标志; HLA-DR 是抗 HLA-DR II 类; KOR 是针对粒细胞 KOR-SA3544 抗原的抗体; FMC7 是针对区分不同 B 细胞白血病标志的抗体。

图 8 是用外周血纯化的白细胞检测的抗体阵列照片, 显示 (a) 阵列中抗体斑点位置一览表; (b) 正常 PBL RIC2; (c) CLL 患者 KB (白细胞数 10×10^9 细胞/mL); (d) CLL 患者 EH2 (白细胞数 30×10^9 细胞/mL);

(e) HCL 患者 RD; (f) AML 患者; (g) B 细胞淋巴瘤 (BCL) 患者 KR。细胞在含 EDTA 和 10%v/v 人 AB 血清的 PBS 中与排列结合。所有结果来自冷冻细胞样品。

图 9 是显示 Raji 细胞密度与结合抗体细胞斑点的细胞数的关系图表。

图 10 是显示抗体浓度与被抗体斑点结合的 Raji 细胞数的关系图表。

优选实施方案详述

本发明提供一种检测装置，该装置包括一阵列能与被测样品中潜在结合配偶体相互作用的分子。在一种实施方案中，检测分子与结合配偶体的相互作用的存在与否或检测分子与结合配偶体的相对相互作用，为动物、鸟类或植物样品提供正常状态或疾病状态或障碍的显示。本发明检测装置还用于检查非肿瘤细胞群的变化，如淋巴细胞群的变化，其显示例如免疫系统非瘤病变。因此，这后一方面包括使用该检测装置直接或间接检查细胞类型和包括寄生物、病毒和微生物在内的病原体。另一实施方案中，该样品为化学文库、环境样品或噬菌体展示文库。其结合模式则提供一特定结合配偶体的存在，类型和/或数量的显示。这尤其适用于筛选环境的污染物或筛选天然产物或有特殊亲和力的因子的化学文库，对筛选有特殊亲和力或结合特性的肽的噬菌体展示文库也是很重要的。这些分子的鉴定在肽模拟物的形成中是有用的。

因此，本发明的一个方面提供一种检测装置，包括一阵列分子，其中除阴性对照以外，在该阵列中的每一种分子能与各自的结合配偶体相互作用，所述结合配偶体被认为存在于动物、鸟类或植物的生物样品中，其中分子与结合配偶体的相互作用模式显示正常状态或疾病状态或障碍或发生疾病状态或障碍的倾向。

疾病状态或障碍优选发生在动物，如人，灵长类，实验室试验动物（如小鼠，兔子，豚鼠，仓鼠），宠物（如狗，猫）或捕获的野生动物。

优选动物是人。

然而，本发明还扩展至对鸟类和植物的疾病状态或障碍的检测。鸟类的例子包括家禽鸟类（如鸡，鸭，火鸡，鹅），狩猎野禽（如雉鸡，

野鸭，孔雀）和不能飞的鸟（如鸱鸒，鸵鸟）。植物的例子包括单子叶植物和双子叶植物，包括农作物，果树，装饰性植物和栽培树木。这里所提及到的“植物”包括有关的植物部位，如叶，花，茎和根。

依据本发明要检测疾病或障碍类型之一是发生于动物如人的癌症。名词“癌症”用作最广泛意义，且包括良性和恶性白血病，肉瘤和癌以及其它瘤。瘤可以是恶性的或是良性的。由本发明研究的癌和瘤可以是单一的（单克隆的，即由一种瘤细胞组成），混合的（多克隆的，即由一种以上的瘤细胞组成），或杂合的（即由一种以上的瘤细胞组成并源于一种以上的胚层）。本发明所包括简单癌的例子包括间质来源的肿瘤（如：结缔组织、内皮组织、血细胞、肌细胞肿瘤）和上皮来源的肿瘤。本发明所研究的特定癌症包括但不限于纤维肉瘤，粘液肉瘤，尤因肉瘤，粒细胞白血病，基底细胞肉瘤，结肠癌，胃癌和各种皮肤癌。更特定地说，本发明还研究的癌包括但不限于 CML，慢性髓样细胞样白血病；AMML，急性髓单核细胞白血病；ALL，急性淋巴细胞白血病；AEL，急性红细胞白血病；Ameg1，急性巨核细胞白血病；AMoL，急性单核细胞白血病；AML，急性髓细胞样白血病；CLL，慢性淋巴细胞白血病；NHL，非何杰金氏淋巴瘤；APL，急性早幼粒细胞白血病和 HCL，毛细胞白血病。

所述“正常”状态包括特定细胞类型或抗原的存在和/或数量，包括例如受体，离子通道，细胞与细胞间相互作用分子，信号传导分子，其基于统计学分析被认为最可能存在于基本上健康的对象群中。在这方面本发明可用于如监测化学治疗或免疫治疗后的患者，或用于筛选在危险个体或由个体组成的危险组或危险人群中的健康状态。所以有关“正常”状态的确定包括对“异常”状态的检查。

在一有关实施方案中，本发明涉及一种包括一阵列分子的检测装置，其中除阴性对照以外，在该阵列中的每种分子能与其各自的结合配偶体相互作用，该结合配偶体被认为存在于化学或噬菌体展示文库中或

环境样品中，其中分子与结合配偶体的相互作用模式显示该样品中特定配体的存在，类型和/或数量。

“化学样品”包括化学文库如合成分子文库、生物分子文库或用组合方法生产的分子文库。化学文库还可能是应用大头针技术合成的（如 Chiron）。有关化学文库包括用于天然产物筛选的天然产物分子文库。

“环境样品”包括从水，或空气或陆地环境以及从植物，微生物或珊瑚中得到的样品。因此，环境样品包括用于筛选所用天然产物的样品，例如药物或诊断因子，它还包括可能含有污染物的样品如土壤，水和空气。

“噬菌体展示文库”在其最广泛意义上使用，包括噬菌体外壳上有一种或多种异源肽、多肽或蛋白的 2 种或多种噬菌体颗粒，然而，一般情况下，每种噬菌体产生一种融合于外壳蛋白或其功能部分的特殊肽、多肽或蛋白。把噬菌体颗粒与该固相化分子接触。当噬菌体颗粒外壳上包含能结合于固相化分子的肽，多肽或蛋白时，噬菌体就被固定了，然后洗脱被固定的噬菌体，分离和克隆编码肽、多肽或蛋白的遗传物质。这是一种用于分离肽、多肽或蛋白模拟物特别有效的方法。例如，可以根据类似的结合特性分离模拟物。

在一特定例子中，如果固相化分子是一针对 CD40 配体的抗体，噬菌体或其它表达文库中的肽、多肽或蛋白与该抗体结合，于是这种肽，多肽或蛋白就成为充当 B 淋巴细胞活化剂或拮抗剂的候选分子。类似地，固相化分子可以是针对 CD154 的抗体，该抗体在患狼疮的患者中浓度升高。一种能结合 CD154 抗体或 CD154 配体的分子 identity wheel 将成为用于治疗狼疮的 CD154 的候选拮抗剂，在狼疮治疗中 useful。类似的基本理论适用于所有其它文库，诸如化学或天然产物文库。

另一方面本发明研究一种检测装置，用于诊断动物如人的正常状态或癌症或发生癌症的倾向，该检测装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，该阵列中的每一种分子能与其各自的结合配偶体相互作用，如果这些配体存在于源自上述动物的生物样品中的

话，其中固相化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

根据本发明，研究检测的另一种情况或障碍包括非瘤病变。非瘤病变在这里认为包括不以失控的细胞增长为特征的任何障碍或疾病，并包括免疫系统的非瘤病变。这些障碍包括自身免疫性疾病，包括 1 型糖尿病，多发性硬化，银屑病，类风湿性关节炎，硬皮病和系统性红斑狼疮。这些病变由表达 CD4 的 T 细胞亚群引起和/或由表达 CD19 的 B 细胞亚群针对自身抗原产生自身抗体所引起。例如，淋巴细胞群的异常诸如 CD4⁺ CD45⁺ T 淋巴细胞的下降和 CD8⁺ CD57⁺ T 淋巴细胞的升高在系统性红斑狼疮患者中是很典型的。

其它非瘤病变包括儿童先天性免疫缺陷导致的反复感染。流式细胞术测得的免疫表型分型可用于检查淋巴细胞亚群的缺陷。严重联合免疫缺陷综合征（SCIDS）由腺苷脱氨酶这种酶的缺陷引起，表现为极低水平的外周血淋巴细胞诸如 T（CD3）和 B（CD19）和天然杀伤（CD16）细胞。嘌呤核苷磷酸化酶缺陷可导致 B 细胞缺陷。本发明中的抗体阵列在有缺陷的淋巴细胞亚群方面提供了明确的资料。这有助于上述病情的诊断。

本发明抗体阵列还用于筛选由病原体因素引起的感染，其中的病原体如病毒、细菌和包括疟原虫等寄生物。例如，人免疫缺陷病毒（HIV）因 HIV 上的 gp120 蛋白与 CD4 结合而主要感染 CD4⁺ T 淋巴细胞。在 AIDS 发病过程中有 CD4⁺ T 淋巴细胞缺乏。然而，还有被 HIV 感染的其它许多种类细胞包括巨噬细胞、B 淋巴细胞和小神经胶质细胞。目前 HIV 患者的 CD4 淋巴细胞群已得到监测，但是疾病控制中心（CDC，美国亚特兰大）推荐进行更广泛的免疫表型检查监测。目前流式细胞术可完成下述双标记试验：阴性对照，CD45/CD14，CD3/CD4，CD3/CD8，CD3/CD19，CD3/CD16，CD3/CD56 和 CD4/CD8。根据本发明，这个费力繁琐的操作可以通过应用含有针对这些 CD 抗原和能进一步确定感染的淋巴细胞的亚群其它抗原的抗体的阵列进行一步操作来取代。当患者被 HIV 感染时，CD4⁺淋巴细胞在大约 6 周迅速下降至最低值，然后其水平至 12 周有部分

恢复。在更长时期内，CD4+ T 淋巴细胞渐进性下降导致大约 11 年后死亡（Shinton, 1998）。用叠氮胸苷（AZT）治疗可诱导 CD4+ T 淋巴细胞短暂升高；本发明提出使用抗体阵列来确定对各种 T 淋巴细胞亚群的化学治疗效果，以监测 HIV 患者的临床发展。

免疫分型还可用于骨髓和器官移植以确定免疫抑制的程度和排斥、感染等合并症。流式细胞术用于移植前用单克隆抗体检查 HLA 抗原的组织类型测定，或交叉配血检查。对移植组织的耐受通过对患者给予环孢素来诱导。在实施移植手术期间外周血淋巴细胞水平被降至几乎为 0。T 细胞从血中消失由用于 3D3+细胞的流式细胞术来监测。移植后，CD8+细胞升高是可能发生排斥反应的信号，CD8+和 CD16+，CD56+和/或 CD57+细胞升高可显示病毒感染。建议使用本发明中的抗体阵列对移植患者的这种免疫监视状态进行更迅速、广泛的检查。

一些癌症患者接受高剂量化疗后需要骨髓移植以重建其缺失的免疫系统。移植的骨髓可诱导造血重建，但有时会出现异常淋巴细胞亚群如 CD5+ T 细胞。患者可发生机会感染和移植物抗宿主疾病，这两者均有 CD8+细胞升高和天然杀伤细胞升高。用针对 CD 抗原的抗体阵列替代流式细胞术简化了对患者的监测，并提供更广泛的资料。

检查 CD 抗原的抗体阵列还用于监测在对昆虫或蜘蛛毒的脱敏治疗期间出现的淋巴细胞亚群改变，例如，CD4+ CD45RA+淋巴细胞数升高，以及 CD4+ CD45RO+淋巴细胞数由高水平下降。

慢性疲劳综合征的患者可与病毒感染者有一致的免疫学异常，有 CD8+淋巴细胞活化。对淋巴细胞亚群的详细分析能对该病建立扩充的诊断标准，并能对该病提供广泛的资料。

因此，另一方面本发明提供一种检测装置，用于诊断动物如人非瘤病变或发生非瘤病变的倾向，该检测装置包括一阵列固定在固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，该阵列的每种分子能与各自的结合配偶体相互作用，条件是这些配体存在于源自上述动物的生物样品中，其中固相化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示非瘤病变的存在或发生非瘤病变的倾向。

在以有关实施方案中，提供一种检查细胞类型或微生物或病毒因素或病原体的检测装置，该装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，该阵列中的每种分子能与各自结合配偶体相互作用，条件是这些配体存在于上述细胞类型，微生物、病毒或寄生物因素或病原体中，其中固相化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示该细胞类型，微生物、病毒或寄生物因素或病原体的存在。

在另一实施方案中，被筛选的样品是化学文库、噬菌体展示文库和环境样品。相互作用模式提供结合配偶体的存在、类型和/或数量。本发明在这方面尤其适用于筛选环境污染物，或筛选分子的化学或生物文库中的具有特殊亲和力、结合性质、免疫学性质和/或浓度的分子。化学或生物学文库包括噬菌体展示文库或其它形式的文库。化学文库可以是合成的或天然产生的。

术语“相互作用模式”在最广泛的意义上使用，包括：相对于背景相互作用的相互作用的存在与否；相互作用的相对密度诸如相对于背景的阵列上分散斑点结合的细胞相对密度；与阵列上分散斑点结合的细胞的形态学模式；裂解在阵列上分散斑点上的细胞内部分子的存在与否；阵列上细胞或抗原的相对数目；特定抗原的示差表达以及每个细胞上的抗原数。任何或所有上述标准可用于评估固相化分子与其结合配偶体的相互作用。表达模式还可进行量化。

典型的固体支持物是玻璃或聚合物，诸如纤维素、陶瓷材料、硝酸纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯及其衍生物、聚偏二氟乙烯（PVDF）、甲基丙烯酸酯及其衍生物、聚氯乙烯或聚丙烯，但不限于此。依据本发明，硝酸纤维素非常适用并为优选。固体支持物还可以是杂合物如被玻璃或聚合物基质支持的硝酸纤维素膜。关于“杂合物”包括上述列出的两种或多种玻璃或聚合物平面的分层排列。固体支持物可以采用膜或管、珠、圆片或微盘的形式，或其它适于进行检测的表面。固定分子的结合方法在本领域中已众所周知，一般由共价结合（例如交叉连接）或物理吸附分子于固体底物上组成。

本发明提及的固定于固体支持物上的分子在这里用“P”表示。分子P一般从命名为“x”的结合组(binding group)中选择。从每个结合组中选择一定量, n个分子P或从每个结合组中选择1个分子P。分子P可以以任何几何形式阵列于固体支持物诸如斑点(spot)、圆点(dot)、或圆点或斑点组, 或扩散或分层的形式。一般优选斑点或圆点形式。选择结合组依据需诊断的正常状态或疾病状态或障碍或要检查、量化的结合配偶体。在癌症病例中, 例如, 一般情况下可以依据某细胞表面配体(及更特定的抗原)或释放的可溶性配体(如可溶性抗原)来确定特定的癌症或癌症的形成。然后选择分子P作为细胞表面或可溶性配体的结合配偶体。分子P和其各自结合配偶体间的相互作用模式显示癌症或其它疾病状态或障碍的发生或发病倾向。在检查微生物、病毒或寄生物因素或病原体的情况中, 一般选分子P作为细胞表面分子的结合配偶体, 其中所述的细胞表面分子诸如糖、蛋白、脂蛋白、鞭毛、pilli、受体或细胞壁成分。在化学文库、噬菌体展示文库或环境样品的检查中, 一般但并不必需依据样品中推测的结构或亲和性来选择P分子。在噬菌体展示文库的情况下, 例如, 检测寻找与固相化分子结合的噬菌体上的肽、多肽或蛋白, 因而成为亲和性模拟物。这些分子成为潜在蛋白模拟物的进一步类似物的候选者。

阵列还可以包括有助于保持检查过程中质量控制的阳性和/或阴性对照。例如, 阳性对照可以是能与结合配偶体相互作用的分子, 该配体已知存在于生物或化学样品中。

另一方面本发明涉及一阵列固定于固相支持物的分子, 该阵列由下述通式定义:

$$\left[\begin{matrix} [P_{x_1}]_{b_1}^{n_1} & [P_{x_2}]_{c_2}^{n_2} & \dots & [P_{x_i}]_{d_i}^{n_i} \end{matrix} \right]_z$$

其中

P是能与结合配偶体相互作用的结合组成员;

$n_1 n_2 \dots n_i$ 代表结合组中的不同成员;

$x_1 x_2 \dots x_j$ 代表不同的结合组;

b, c 和 d 分别代表结合组 $x_1 x_2 \dots x_j$ 中不同的成员数量, 且其中 b, c 和 d 可以相同或不同, 且从大约 0 到大约 1 0 0, 只要 e, f 和 g 中至少有一个不为 0;

z 是阵列中分子的总组数, 从大约 2 到大约 2 0 0 0;

其中, 固相化分子与其各自结合配偶体的相互作用模式显示正常状态或疾病状态或障碍或发生该疾病状态或障碍的倾向或结合配偶体的存在、类型和/或数量。

优选地, 所述疾病状态或障碍为癌症。

阵列中的分子被优选设置于分散的斑点(discrete spots)中。 z 是不同类型分子的分散斑点数。合适地, 斑点按双倍设置, 所以阵列中的斑点总数为 $2z$ 。

符号“.....”的意思是组内可任选的其它成员, 例如在 $[P x_2]_c^{n2}$ 与 $[P x_j]_d^{n1}$ 之间。由通式表达的阵列并不限制该阵列的形状或顺序。

在特别优选的方案中, 分子 P 是免疫球蛋白, 其结合配偶体是抗原。然而, 本发明扩展至其它种类的分子 P , 诸如受体、受体的配体、T 细胞来源的抗原结合分子(TABM)或其它对某配体有亲和力的分子如凝集素、核酸结合蛋白等, 但不限于此。最优选的是, 分子 P 为能与抗原相互作用的免疫球蛋白, 例如, 位于正常细胞或癌细胞表面的抗原, 或由正常细胞或癌细胞释放的可溶性抗原, 或存在于化学文库, 噬菌体展示文库或环境样品中的抗原。

在特别优选的实施方案中, P 分子且更特定地说免疫球蛋白分子的排列是基于抗原来进行选择的, 所述抗原可能表达于疾病状态或障碍中如癌症, 或一般存在于正常细胞上, 或存在于微生物、病毒或寄生物因素或病原体上。该“抗原”还可以是化学文库、噬菌体文库部分或在环境样品中。“抗原”一词在其最广泛意义上使用, 包括有细胞外结构域的质膜有关的蛋白, 与离子通道有关的蛋白以及受体和碳水化合物部分等。免疫球蛋白分子与靶抗原的结合模式有助于诊断疾病状态或确定正常状态。最优选的是, 阵列还包括内部阳性和阴性对照。

因此，另一方面本发明研究一种用于癌症的检测装置，该装置包括一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，它们固定于固体支持物上的分散区域，使得不同分散区域对不同抗原具有特异性，且其中抗原表达于正常细胞或癌细胞表面，或由正常细胞或癌细胞释放，其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向或正常状态的存在。

在一有关实施方案中，本发明提供一种用于非瘤病变的检测装置，该装置包括一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，它们固定于固体支持物上的分散区域，使得不同分散区域对不同抗原具有特异性，其中抗原表达于非瘤细胞表面或由非瘤细胞释放，其中固相免疫球蛋白的分子与其各自抗原的结合模式显示非瘤病变的存在或发生非瘤病变的倾向。

在另一有关实施方案中，本发明提供一种用于微生物、病毒、寄生物或其它病原体因素的检测装置，该装置包括一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，它们固定在固体支持物的分散区域，使得不同的分散区域对不同抗原具有特异性，其中抗原表达于该微生物、病毒或寄生物因素或病原体上或由其释放，抗原与固相免疫球蛋白的结合模式显示该微生物、病毒、寄生物或病原体的存在与否。

本发明的另一实施方案涉及用于在化学文库、噬菌体展示文库或环境样品中的结合配偶体的检测装置，该装置包括一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，它们固定于固体支持物上的分散区域，使得不同的分散区域对不同抗原具有特异性，其中抗原与固相免疫球蛋白的结合模式显示该结合配偶体的存在类型和/或数量。

一般情况下，免疫球蛋白的范围是基于以下因素来进行选择的：表达于正常细胞、癌细胞、潜在癌细胞、微生物、病毒、寄生物或其它病原体，被病原体感染或侵袭的细胞上的抗原，或在化学文库、噬菌体展示文库或环境样品中找到的抗原。对不同抗原具有特异性的每组免疫球蛋白定义为 $x_1 x_2 \dots x_j$ 。在一种实施方案中，样品应包括一个混合细胞群，阵列中的免疫球蛋白分子被设计为有选择地结合特定细胞类型上的

抗原。在另一种实施方案中，样品是一化学分子混合物，包括合成化合物（如链烷、链烯、芳香剂、聚合物、环状分子），寡糖，蛋白、脂质、脂蛋白和碳水化合物。免疫球蛋白还可以针对在同一抗原上的不同表型。分散的抗体斑点可包括有单一表位特异性的免疫球蛋白或该免疫蛋白可以是针对一个抗原上的多个表位的异质组。一个分散的抗体斑点也可含有针对不同抗原的多种抗体，但所有这些抗原表达于例如某一特定细胞上。如果该细胞的捕获对随后的分析很重要，那么这是很有用的。

在每组 $x_1 x_2 \dots x_j$ 内，可以存在的对相同抗原不同部位有特异性的许多免疫球蛋白亚组，抗原被定义为组 $x_1 x_2 \dots x_j$ 。这些亚组被定义为 $n_1 n_2 \dots n_i$ 。

因此，另一方面本发明涉及一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物，其中的抗原表达于正常细胞或癌细胞或由正常细胞或癌细胞释放，或表达于微生物、病毒、寄生物或病原体上，或被认为存在于化学文库、噬菌体展示文库或环境样品中，其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于所述固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_{e_1}^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_{f_2}^{m_2} & \dots & \left[q_{o_k} \right]_{g_k}^{m_k} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白，该抗原表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放或表达于微生物、病毒、寄生物或病原体表面，或抗原被认为存在于化学文库、噬菌体展示文库或环境样品中；

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表结合相同抗原不同部位的同一免疫球蛋白组成员；

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同免疫球蛋白组；

e, f 和 g 分别代表每组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同的免疫球蛋白的数量，其中 e, f 和 g 可以相同或不同，每个从 0 到 1 0 0；

y 是该阵列中免疫球蛋白组的总数，从大约 2 到大约 2 0 0 0；

其中固相免疫球蛋白分子与其各自抗原的相互作用模式显示正常状态或癌症的发生或发生癌症的倾向或在化学、环境样品中微生物、病毒、寄生物和/或病原体的存在，或结合配偶体的存在、类型和/或数量。

如上所述，阵列还可包括阳性和/或阴性对照。一般情况下，免疫球蛋白设置于分散的斑点内，y 是不同类型免疫球蛋白的分散斑点的总数。优选情况下，斑点按双倍设置。符号“.....”按上文定义。

在特别优选的实施方案中，免疫球蛋白与表达于白血病细胞上的分化簇或命名簇(cluster designation) (CD) 抗原或髓细胞样(myeloid) (MY) 或淋巴细胞样(lymphoid) (LY) 抗原相互作用。通过携带特定抗原的细胞群体或比例上升来检查癌症或发生癌症的倾向。

因此，另一方面本发明研究一种用于癌症的检测装置，该装置包括一阵列免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物，它们固定于固体支持物的分散区域，使得不同的分散区域对表达在白血病细胞上的不同命名簇抗原和/或髓细胞样和/或淋巴细胞样抗原有特异性，其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

优选情况下，免疫球蛋白是单克隆抗体，但本发明扩展至多克隆抗体或抗原结合部分(如 Fab 片段)，其衍生物，同系物或类似物以及融合或杂交抗体，合成抗体或重组抗体。

另一方面，本发明还提供一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物，该抗原表达于非瘤细胞上或由非瘤细胞释放或表达于微生物或寄生物细胞或病原体上或病毒上，其中对每一种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{matrix} \left[q_{o_1} \right]_e^{m_1} & \left[q_{o_2} \right]_f^{m_2} & \cdots & \left[q_{o_k} \right]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白;

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表结合相同抗原的不同部分的同一免疫球蛋白组的成员;

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同组免疫球蛋白;

e, f 和 g 分别代表各组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量, 其中 e, f 和 g 可以相同或不同, 每个从 0 到 1 0 0, 只要 e, f 和 g 中至少有一个不为 0;

y 是该阵列中免疫球蛋白组的数量, 从大约 1 到 2 0 0 0;

其中固相免疫球蛋白与其各自抗原的相互作用模式显示非瘤病变的发生或发生非瘤病变的倾向或特定微生物、寄生物、病原体或病毒的存在。

检查抗原 - 免疫球蛋白的结合可用任意的许多方法来完成。例如, 抗原若为细胞表面抗原, 该阵列可以设计成允许细胞与固相免疫球蛋白结合。然后被捕获的细胞可以用各种染色、生物化学方法或免疫学方法在显微镜下分析。

可替代的方案是, 作为捕获分子的固相免疫球蛋白用标记抗体 (如荧光或放射标记抗体) 或其它方便的方法来确定, 捕获分子针对的是特定细胞类型和正常或癌细胞上表达的其它抗原。优选情况是, 抗体位于游离溶液中。捕获分子还可以针对可溶性抗原或从实体瘤上分离的细胞。关于后一种情况, 合适地, 由实体瘤活检制成细胞悬液, 然后使该细胞悬液与免疫球蛋白阵列接触。

如果固相免疫球蛋白阵列被设计成结合到游离物质 (即可溶性抗原), 可用免疫学或其它方法检查捕获抗原。

本发明检测装置优选是具有扁平、平坦表面的固体支持物, 合适的固体支持物例子包括膜、塑料盖片、玻璃载玻片或微量滴定盘上的孔。尤其优选硝酸纤维素。固体支持物包括一阵列免疫球蛋白包被区域, 优选斑点形式或其它几何图形。斑点是分散的, 被不含任何免疫球蛋白分子的区域包围。特定区域或斑点内的免疫球蛋白一般由共价键或非共价键固定。优选免疫球蛋白是单克隆抗体。

优选方案是，阵列的斑点按顺序设置，诸如矩形、三角形或球形矩阵，此免疫球蛋白区域由基于例如由行和列的坐标来进行定义。免疫球蛋白阵列可以覆盖任何合适的区域，诸如从大约 0.1mm^2 到大约 100mm^2 ，优选大约 0.5mm^2 到大约 15mm^2 。一般情况下，每个区域或斑点由具有单个不同特异性的免疫球蛋白组成。上下文中的特异性是就不同抗原或一种抗原的不同区域而言的。优选的免疫球蛋白斑点数量是从大约 7 到大约 1000，更优选的是从大约 10 到大约 1000。最优选的是，免疫球蛋白被多重设置诸如 2 重、3 重或更多。

然后固相免疫球蛋白阵列与生物样品接触，所述生物样品包括细胞、细胞碎片、细胞提取物、组织液、血清、血液、脑脊液、尿、淋巴液、吸出物、骨髓抽出物、黏液或其它组织或体液。可替代的其它样品是化学样品或环境样品诸如化学文库、水样品或土壤样品。优选情况是样品包括混合细胞群。在一定条件下接触一段时间，这样足以使细胞所携带的特定抗原被固相免疫球蛋白捕获或游离抗原被固相免疫球蛋白捕获。然后被捕获的细胞和抗原可以用任何方便的方法诸如生物化学、组织化学、免疫学方法或显微镜检查。免疫学检查尤其方便。例如可加入用报告分子标记的对被捕获抗原或细胞有特异性的第二种免疫球蛋白。鉴定报告分子能显示抗原已被捕获。可替代的另一种方法是，加第二种球蛋白以后，抗体与被捕获抗原形成复合物，再加用报告分子标记的抗免疫球蛋白的免疫球蛋白，然后确定来自报告分子的信号的存在。

在本发明说明书中使用的“报告分子”就其化学性质方面是指提供分析上可辨别信号的分子，以便能进行免疫球蛋白结合抗原的检查。检查可以是定性的或定量的。这种检测中使用的最普遍的报告分子是含有酶、荧光基团或放射性核素的分子（即放射性同位素）。在酶标免疫检查中，一般用戊二醛或高碘酸的方法将酶与第二种或第三种免疫球蛋白结合。然而，现有很多种不同的结合技术供本领域技术人员使用。一般所用的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等等。所用的底物一般选择被相应的酶水解后能产生易发现颜色改变的特异性酶。还可以使用能产生荧光产物的荧光底物。

可替代地，荧光化合物诸如荧光素和罗丹明可以在不改变其结合性能的情况下与免疫球蛋白化学结合。当被一特定波长的光激发时，荧光染料标记的免疫球蛋白分子吸收光能，在分子中诱导活化状态，然后发射有特殊颜色的光，这种颜色很容易用显微镜或使用其它影像系统如共聚焦显微镜或二维激光扫描仪（如 FluorImager or Typhoon, Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, USA）观察到。

癌症的存在或发生癌症的倾向或非癌症疾病状态的存在可以由携带特定抗原的特定细胞数量或细胞数比例的改变来显示。例如，某种细胞类型的增加显示特定状态。

另一方面，本发明研究一种用于确定人、鸟类或植物中疾病状态或障碍的存在或发生疾病状态或障碍的倾向的方法，其中所述疾病或障碍包括但不限于癌症，该方法包括：从动物、鸟类或植物获取生物样品，该生物样品含有游离的结合配偶体或与细胞表面结合的结合配偶体，该结合部分直接或间接与该疾病状态或障碍有关，然后将该生物样品与含有能结合所述配体的一阵列分子的固体支持物接触，其中与结合配偶体的相互作用模式显示疾病状态或障碍或发生该疾病状态或障碍的倾向。

优选情况是，结合配偶体包含两种或更多种与疾病状态或障碍相关的抗原，分子阵列为一阵列对不同组抗原有特异性的免疫球蛋白。

相互作用模式可以用任何合适的方法确定，诸如免疫检测、显微镜检查或组织学或生物化学技术。相互作用模式还可用电脉冲、电子发射物和/或放射性发射物确定。

在特别优选的方案中，本发明研究一种在人或非人动物中检查癌症或发生癌症倾向的方法，该方法包括从人或非人动物中获取生物样品，将该生物样品与一阵列免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物接触，它们对表达于正常细胞或癌细胞表面或由正常细胞或癌细胞释放的抗原有特异性，其中对每种抗原或其部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物上的分散区域，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{array}{c} \left[q_{o_1} \right]_{e}^{m_1} \left[q_{o_2} \right]_{f}^{m_2} \cdots \left[q_{o_k} \right]_{g}^{m_i} \end{array} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白，该抗原表达于正常细胞或癌细胞上或抗原由正常细胞或癌细胞释放；

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表结合相同抗原不同部分的同一免疫球蛋白组的成员；

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特异性定义的不同组的免疫球蛋白；

e , f 和 g 分别代表各组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量，其中 e , f 和 g 可以相同或不相同，每个从 0 到 100，条件是 e , f 和 g 中至少有一个不为 0；

y 是该阵列免疫球蛋白组的总数，从大约 2 到大约 2000；

其中固相免疫球蛋白分子与其各自抗原的相互作用模式显示癌症的发生或发生癌症的倾向。

另一方面本发明还涉及一阵列能与被认为存在于生物样品中的各自结合配偶体相互作用的分子的应用，用于确定疾病状态或障碍的存在或发生疾病状态或障碍的倾向。

优选地，所述分子为免疫球蛋白。

免疫球蛋白优选对所有结合抗原或可溶性抗原有特异性，诸如癌细胞上或由癌细胞脱落的抗原。

在特别优选的实施方案中，定性或定量检测相互作用模式为结合阵列中分子的细胞的或结合阵列中分子的无细胞抗原的密度模式。例如，该密度模式可以用肉眼观察或显微镜观察确定，也可以利用人工智能诸如使用计算机引导的密度计。另外，本发明包括结合模式的量化。抗体阵列的计算方面包括例如细胞数、抗原或细胞结合模式，每个斑点的细胞结合数的密度或每个细胞的抗原数。

因此，另一方面本发明提供一种包括一阵列分子的检测装置，其中除阴性对照以外，该阵列中的每一种分子均能与其各自的结合配偶体相互作用，所述配体被认为存在于动物、鸟类或植物的生物样品中，其中该阵列中的分子以一种方式阵列，这样当分子与结合配偶体相互作用时，不同的密度模式提供可辨别信号，显示疾病状态或障碍或发生该疾病状态或障碍的倾向。

更特定而言，本发明研究一种用于诊断动物如人的癌症或发生癌症倾向的检测装置，该装置包括一阵列固定于固体支持物上的分子，其中除阴性对照以外，该阵列中的每个分子能与各自结合配偶体相互作用，如果该结合配偶体存在于所述动物的生物样品中的话，其中该阵列中的分子以一种方式阵列，这样当固相化分子与其各自结合配偶体相互作用时，有差别的密度模式提供可辨别信号，显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

优选情况是，固相化分子为免疫球蛋白，结合配偶体是细胞结合性抗原、细胞内部抗原或可溶性（即游离的）抗原。

在特别优选的实施方案中，阵列上的免疫球蛋白以一种方式阵列，这样如果被筛选的癌症存在，相互作用模式提供有差别的密度，显示出可辨认并易于检测的形状诸如字母、数字或几何图形。

例如，可以安排在急性髓细胞样白血病（AML）期间可能表达的抗原，使得字母“A”相对于背景能被以更浓密的圆点优先显示出来。字母“A”只是用于举例，可以使用任何几何形状或设计。

另一方面本发明涉及一阵列固定于固体支持物上的分子，该阵列由下述通式定义：

$$\left[\begin{array}{cccc} \left[P_{x_1} \right]_{b}^{n_1} & \left[P_{x_2} \right]_{c}^{n_2} & \cdots & \left[P_{x_j} \right]_{d}^{n_i} \end{array} \right]_z$$

其中

P 是能与结合配偶体相互作用的结合组的成员；

$n_1 n_2 \dots n_i$ 代表结合组的不同成员;

$x_1 x_2 \dots x_j$ 代表不同的结合组;

b, c 和 d 分别代表结合组 $x_1 x_2 \dots x_j$ 中不同的成员数量, 其中 b, c 和 d 可以相同或不同, 从大约 0 到大约 100, 只要 b, c 和 d 中至少有一个不为 0;

z 是阵列上的分子组的总数, 从大约 1 到大约 2000;

其中该阵列分子以一种方式阵列, 这样当固相化分子与其各自结合配偶体相互作用时, 一个结合组中有差别的结合模式提供可视信号, 显示疾病状态或障碍或发生该疾病或障碍的倾向。

其它方面本发明研究一种癌症检测装置, 该装置包括一阵列固定于固体支持物不同分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物, 使得不同的分散区域对不同的抗原有特异性, 其中的抗原表达于正常细胞或癌细胞表面或由正常细胞或癌细胞释放, 其中该阵列中的结合免疫球蛋白被以一种方式阵列, 这样固相免疫球蛋白对其各自抗原的模式以可辨别信号的形式提供示差的密度模式, 显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

另一方面本发明是指一阵列对抗原有特异性的免疫球蛋白或其衍生物或化学等同物, 所述抗原表达于正常细胞或癌细胞上或由正常细胞或癌细胞释放, 其中对每个抗原或部分有特异性的每组免疫球蛋白位于固体支持物的分散区域, 该阵列由下述通式定义:

$$\left[\begin{matrix} [q_{o_1}]_e^{m_1} & [q_{o_2}]_f^{m_2} & \dots & [q_{o_k}]_g^{m_i} \end{matrix} \right]_y$$

其中

q 是对抗原有特异性的免疫球蛋白, 该抗原表达于正常细胞或癌细胞上或抗原由正常细胞或癌细胞释放;

$m_1 m_2 \dots m_i$ 代表结合相同抗原不同部分的同一免疫球蛋白组的成员;

$o_1 o_2 \dots o_k$ 代表由对不同抗原的特定性定义的不同组免疫球蛋白;

e , f 和 g 分别代表各组 $o_1 o_2 \dots o_k$ 中不同免疫球蛋白的数量, 其中 e , f 和 g 可以相同或不相同, 每个从 0 到 100, 条件是 e , f 和 g 中至少有一个不为 0;

y 是该阵列上免疫球蛋白组的总数, 从大约 1 到大约 2000;

其中该阵列分子以一种方式阵列, 这样当固相化分子与其各自结合配偶体相互作用时, 有差别的密度模式提供可辨别信号, 显示癌症的发生和发生癌症的倾向。

另一方面本发明还研究一种用于癌症的检测装置, 该装置包括一阵列固定于固体支持物上的分散区域的免疫球蛋白分子或其功能性衍生物或等同物, 使得不同的分散区域对表达于白血病细胞上不同的分化簇 (CD) 抗原和/或淋巴细胞样 (LY) 和/或髓细胞样 (MY) 抗原有特异性, 其中该阵列分子被以一种方式阵列, 这样基于固相免疫球蛋白结合各自抗原, 有差别的密度模式提供可辨别信号, 显示癌症的存在或发生癌症的倾向。

另一方面, 本发明研究一种用于确定动物、鸟类或植物中疾病状态或障碍的存在或发生疾病状态或障碍倾向的方法, 其中所述疾病或障碍包括但不限于癌症, 该方法包括: 从动物、鸟类或植物获取生物样品, 该生物样品包括游离的结合配偶体或与细胞表面结合的结合配偶体, 该结合配偶体直接或间接与该疾病状态或障碍有关, 然后将该生物样品与含有能结合该结合配偶体的一阵列分子的固体支持物接触, 其中该阵列分子以一种方式阵列, 这样当其与结合配偶体相互作用时, 有差别的密度模式提供可辨别信号, 显示疾病状态或障碍或发生该疾病状态或障碍的倾向。

另一方面, 本发明研究一种治疗人或非人动物癌症的方法, 该方法包括从人或非人动物中获取生物样品, 将该样品与一阵列固定于固体支持物上分散区域使得不同的分散区域对不同的抗原有特异性的免疫球蛋白或其功能性衍生物或等同物接触, 其中抗原表达于正常细胞或癌细胞

表面或由正常细胞或癌细胞释放，并确定固相免疫球蛋白与其各自抗原的结合模式，然后使用针对所表达抗原的抗体进行免疫治疗。这些抗体优选人源化单克隆抗体。相似方法还可用于治疗非瘤病变。

本发明的检测装置和实施本发明检测的检测方法很容易适应自动化。例如，机器人系统可以用于把合适数量包括毫微升体积的免疫球蛋白等递送至固体支持物上，如硝酸纤维素膜或微量滴定盘。经合适处理后，固相免疫球蛋白可在任何检测中使用。这也可以自动进行或用机器人进行。

本发明还研究此处所描述的抗体阵列在制备检测装置中的应用，其中所述装置用于检查疾病状态或发生疾病的倾向，或检查微生物、病毒、寄生物或病原体或筛选化学文库、噬菌体展示文库或环境样品。

本发明中的阵列还可以适用在微型芯片上使用。微型芯片技术允许生产数千种适用于一定范围的状况的抗体模式，还允许自动化和/或计算机分析。一个“微型芯片”包括一矩阵支持物(matric support)，它包含一阵列衔接分子、配体或潜在的结合配偶体。

本发明还研究一种治疗方法，包括使用抗体阵列鉴定抗原，该抗体阵列对患病细胞有特异性或对疾病状态有特异性或充当蛋白模拟物，制备针对该抗原的抗体或对该抗原有特异性的细胞毒因子，然后在足以实现该治疗的情况下用该抗体或细胞毒因子给药一段时间。

在一种实施方案中，抗体是一种非人源的人源化抗体。另一种实施方案中，人的或人源化抗原结合于细胞毒分子。本发明扩展至含有抗体、细胞毒因子或蛋白模拟物的药物组合物。这种组合物还可包括一种或多种可药用载体和/或稀释剂。

以仅仅举例的方式，本发明现在通过一特定实施方案即使用一阵列检查 CD 抗原来描述。下列描述并不是将本发明只局限于一个特定实施方案。

本发明的抗体阵列方面能快速和同步检查从血中分离的白细胞表面 CD 抗原的表达。在诊断白血病（血型糖蛋白 A，HLA-DR，KOR-SA3544，FMC7，免疫球蛋白， κ 和 λ ）中很重要的针对 51 种 CD 抗原的抗体，4 种

小鼠同型对照抗体 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM) 和 7 种针对其它表面标记的抗体以 5nL 圆点的形式加在硝酸纤维素膜或显微载玻片上。只有表达特定 CD 抗原的白细胞结合相应的抗体斑点。表达 CD 抗原特定亚群的特定白细胞类型由细胞结合 CD 抗体阵列的斑点模式来鉴定。不同类型的白细胞和白血病通过 CD 抗原表达模式进行鉴定, 并有高度确定性, 不同的白细胞亚群表达该阵列中所代表的大约 12~20 种抗原的不同组合 (图 1 和 2)。这种多因子分析形式是依据对不同白细胞或白血病的模式识别。本发明允许使用大量的抗体, 使该鉴定作用十分强大, 可允许不同样本间或个体间的表达变异。

成熟白细胞由骨髓中的干细胞沿特定谱系分化而来, 形成髓细胞样细胞和 T 和 B 淋巴细胞。CD 抗原的表达随着由于干细胞分化的前体细胞沿不同谱系发育成成熟的白细胞亚群而变化, 该成熟的白细胞亚型表达特定亚群的 CD 抗原。或者, 表达于白血病细胞上的 CD 抗原亚群可能与某特定谱系中的前体细胞上的抗原相似。另一方面, 用突变方法阻断某特定谱系可导致前体细胞分化成表达 CD 抗原异常组合的细胞。

以确定正常外周血白细胞 (PBLs) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞上 CD 抗原的表达为例说明该主题抗体阵列的应用。CLL 细胞以均匀的强度结合抗体斑点。而且, CLL 细胞较正常 PBLs 结合的抗体斑点少。检查晚期 CLL 患者 (其白细胞 (WBC) 计数 $30-86 \times 10^9$ 细胞/L) 的血样, 并检查 WBC 计数达正常 PBLs 密度 (10×10^9 细胞/L) 的患者血样。此低水平 CLL 的抗体阵列模式与正常 PBLs 仍可区别出来 (看 CLL 患者 KB 结果, 在图 8c 中显示)。

总之, 使用含 62 个抗体的原型阵列 (图 7 和 8 分别显示 54 和 60 点阵列) 能迅速并可重现地确定正常 PBLs 和 CLL 细胞上的 CD 抗原亚群。该阵列能基于 CD 抗原表达来诊断不同类型的白血病和淋巴瘤。确定白血病和淋巴瘤中的异常 CD 抗原为应用针对该抗原的人源化单克隆抗体治疗患者提供了一个靶点。例如, Rituximab 是抗-CD20 抗体, 用于治疗 B 细胞淋巴瘤, 诸如非何杰金氏淋巴瘤 (NHL)。Campath-1H 是抗-CD52 抗体, 用于治疗慢性 T 和 B 细胞白血病, 诸如 T-PLL 和 B-CLL。此类 CD 抗

体阵列还用于诊断和治疗与白细胞有关的非瘤病变，诸如自身免疫和免疫缺陷疾病，HIV 和单核细胞增多症。另外，该方法可用于分析脐带血和骨髓吸出物中的白细胞。

下述描述提供制备抗体阵列的最优选方法。该抗体组一般与 Cartesian Technologies PixSys™3200 抽吸物及分配系统一起建立抗体阵列。选择这些抗体用于特定诊断或检查方案。每种抗体一般使用量为每个斑点从大约 1 到大约 10 毫微升，间隔大约 0.5 到 1.5mm，以便在硝酸纤维素上形成一合适的阵列，一般硝酸纤维素膜置于固体支持物上诸如但不限于显微载片上。点样以后，支持物在光亮盒子中评定，阵列的拐角用例如铅笔轻轻标记。然后将抗体阵列浸入封闭因子中，所述封闭因子诸如但不限于脱脂乳、爱尔兰藓提取物或其它来源的角叉菜胶或明胶。脱脂乳粉末溶于 PBS 中浓度从大约 2% 到大约 15% w/v 4°C 过夜或 37°C 大约 60~120 分钟尤其适用。应用封闭因子以后，用纯化水轻轻洗涤固体支持物，室温干燥大约 60~120 分钟。然后将固体支持物在 4°C 下闭光贮存于密闭袋中。

用于在抗体阵列中检测的细胞要新鲜收集或从液氮贮存中复苏。在 PBS 中洗涤细胞，然后将其以大约 1×10^5 细胞/L 到 1×10^9 细胞/L 的密度混悬。然后准备固体支持物，使其温度平衡至室温并用 PBS 湿润。然后将硝酸纤维素沿标记的边缘擦干，将其置于潮湿环境诸如阵列有湿润薄纸的佩特里培养皿中。将大约 100 到大约 500 μ L 细胞悬液加至载片上阵列被擦干的边缘内。然后将该阵列与细胞在潮湿密闭的佩特里培养皿中室温孵育大约 30 分钟。这步的孵育时间和温度可以依检测人员的方便适应特定条件而有所改变。

在与细胞一起孵育后，小心将固体支持物淹入或浸入 PBS 中，然后放入有 PBS 的佩特里培养皿中，轻轻振荡以洗掉未与阵列特异性结合的细胞。如果用显微镜检查观察到有明显的背景吸附发生，应重复洗涤步骤。

然后用显微镜观察阵列，例如用 Olympus Bx60 荧光显微镜 (Olympus Optical Company, 日本)，物镜用 UPLan4x，聚光器置于 1

相位置，绿色滤光器滤过光源。使用 SenSys 数字冷却 CCD 照相机（1317×1035 Pixels, Photometrics）、PCI 抓取支架和 Windows 图像加工和分析软件（Digital Optical）拍照并分析图像。使用 Adobe Photoshop 3.0 版软件进行图像显示加工，细胞与每个斑点的特异性结合强度还可使用相对级别+/-，+，++，+++来记录。

当结果记录成计算机文件后，将载片浸在 FACS 固定液（0.94% v/v 福尔马林，2% D-葡萄糖，0.03% NaN₃，PBS（pH7.3））固定结合了细胞的抗体阵列，作用 30 分钟。在 PBS 中漂洗后，用苏木精复染剂（Immunotech, Marseille, 法国）对结合的细胞染色 5 分钟，苏木精能将细胞核染成蓝色。然后在 PBS 中漂洗固体支持物，干燥并在室温下贮存。随后用 PBS 湿润固体支持物并再次用显微镜观察。

尽管如上所述本发明以关于使用该检测检查癌症为特定实例来说明，本检测还可用于检查或定量测定在化学样品如化学文库或噬菌体文库或环境样品中的特定分子或分子种类或分子家族。本检测还可用于检查或定量测定特定微生物、病毒、寄生物或其它病原体。本发明扩展至所有这些方面。

而且，本发明扩展至使用遗传学方法进行检测。在这种情况下，分子 P 为低聚核苷酸。结合配偶体为能与 P 分子杂交的 DNA 或 RNA（如 mRNA）序列。在一特别优选实施方案中，结合配偶体是诸如用 RT-PCR 由逆转录酶产生的 DNA。

在一特定实例中，该阵列可以用于检查表达在白细胞、白血病或淋巴瘤上的 CD 抗原。该阵列包括对应于所有 CD 抗原（166 种或特定亚群）的微阵列低聚核苷酸。这种显微阵列由共价连接于固体支持物的互补低聚核苷酸（~20 核苷酸[nt]）微（pL）点组成。mRNA 从 5000~10000 个白细胞中提取，并由 RT-PCR 用生物素或 ³²P 末端标记的所得的 DNA 转录产物扩增。然后被标记的 DNAs 与低聚核苷酸阵列杂交，未结合的 DNA 通过洗涤除去。mRNAs 的 DNA 转录产物用高分辨荧光或放射扫描仪检测，产生表达 CD mRNAs 的点模式。该点模式相当于用抗体阵列用结合的细胞所获得的模式。

这种检查 CD 抗原表达的可替代方法较使用完整细胞的方法更加灵敏, 但需要更复杂精密的设备。这种操作对检查缓解期患者的最低量残留病变非常有用。本发明扩展至这种遗传检测。

本发明由下列非限制性实施例进一步加以描述。

实施例 1

抗体阵列的制备

抗体可与合适的膜如 Immobilon P 膜 (PVDF; Millipore Corporation) 共价结合, 然后优选用过量的蛋白溶液例如脱脂乳制剂进行封闭。设计封闭因子用于去除结合在表面的非特异性吸附。其它适当的封闭因子为爱尔兰藓天提取物或其它来源的角叉菜胶或明胶。抗体还可吸附于玻璃显微载片上的硝酸纤维素膜 (Schleicher and Schuell, NH, USA), 未被结合的硝酸纤维素用脱脂乳封闭。抗体可吸附于尼龙膜上。为了提高抗 CD 抗体与细胞上抗原的亲合力, 阵列所在的固体支持物首先用链球菌属蛋白 G 片断的重组物包被, 该重组物保留了对 IgG Fc 段和膜结合区的亲合力, 但缺少白蛋白和 Fab 段结合位点 (Goward et al., 1990)。抗体被加在这层蛋白 G 上, 通过其 Fc 结构域结合, 留下 Fab 结构域游离与细胞相互作用。Fab 结构域还进一步从固体相支持物上给细胞膜上的 CD 抗原提供与抗体结合的更大亲合力。

抗体阵列也可建立在膜或盖片上。这种情况下, 抗体在二维矩阵中以双斑点形式与膜共价结合。阵列斑点诸如但不限于 15×15 矩阵。抗体为单克隆并对白血病细胞上表达的分化簇 (命名簇) 抗原 (CD 抗原) 和髓细胞样 (MY) 抗原有特异性。还可包括对 LY 抗原有特异性的抗体。CD 抗原的详细资料可在 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd/index_molecule.htm 中得到。斑点为显微镜可见的尺寸, 用一滴 (~10 毫微升) 抗体溶液 (如 10 μg 蛋白/mL) 滴在膜或玻璃如盖片表面的指定位置而成, 其中的膜或玻璃首先用非特异性蛋白吸附剂诸如 30% w/v 脱脂乳 (Dutch Jug, Bonlac Foods Ltd, Melbourne, 澳大利亚) 洗涤, 然后漂洗。也可用其它蛋白溶液或其它品牌的脱脂乳。抗体可通过诸如赖氨

酸残基的氨基、天门冬氨酸或谷氨酸残基的羧基或半胱氨酸的巯基共价连接于固体支持物。抗体阵列有选择地结合表达各种抗原的体液细胞，也可结合游离抗原。包括阳性和/或阴性对照诸如对已知存在于样品中的表面分子或可溶分子的抗体。图 3 显示一种检测装置的实例。固体支持物方便地具有相似大小，制成显微载片的形状，可由玻璃或其它聚合材料组成。图中显示，有 40 个双份，分散的斑点，总共 80 个斑点。显微载片周围的壁可另加或与载片铸在一起，这有助于保留液体物质。本发明扩展至任何其它能实现本发明方法的装置。

实施例 2

样品的制备

抗凝处理后的血样用作抗原或细胞表面表达抗原的一种来源。外周血淋巴细胞可通过离心分离或更特定地讲用 Ficoll-Hypaque 密度介质分离来产生一血沉棕黄色层。淋巴细胞或其它细胞亚群还可以用动力磁珠分离，它是共价连接了特异性抗体的磁珠。一般来说，细胞用 Hank's 液以 2×10^6 浓度重新混悬，以均匀的 200 μ L 悬液加于抗体阵列。Hank's 液是等渗的并含有葡萄糖，能在该结合步骤中维持细胞的活力和完整性。细胞悬液与抗体阵列在 37 $^{\circ}$ C 潮湿空气中孵育 30~60 分钟（如 30 分钟）后，未结合的细胞用磷酸盐缓冲盐水（PBS；20 μ L 两份）从阵列上洗掉，然后将液体倾出。可替代的方法是，轻轻振荡以混悬未结合的细胞，然后用预温的 Hank's 液（3 $\times$ 1mL）洗涤。

实施例 3

制备样品的改良方法

用 Cartesian Technologies PixSys TM 3200 抽吸和分配系统把一组抗体（如 51 个抗体斑点）制成抗体阵列。选择单克隆抗体用于诊断普通类型的白血病。图 7A 和 8A 显示载片上的抗体阵列模板。在显微载片的硝酸纤维素膜上，每种抗体（5nL）以 0.8mm 的间隔点样，形成

0.65cm×0.45cm 阵列。点样后，载片置于一明亮小盒中，阵列的拐角处用铅笔轻轻标记。

然后将抗体阵列浸入溶于 PBS 的 5% w/v 封闭因子中，诸如脱脂乳、牛血清白蛋白（BSA）、胎牛血清、爱尔兰藓提取物或其它来源的角叉聚胶或明胶中，在 4℃ 下过夜；37℃ 下封闭 90 分钟可取得相同的效果。封闭以后，用纯净水轻轻洗涤载片，室温完全干燥 90 分钟。然后将载片包裹于 GladWrap（商标）中，密闭于密封袋中，在 4℃ 下闭光贮存。

在抗体阵列上检测的细胞要新鲜收集或从液氮贮存中复苏。细胞在 PBS 中洗涤，并以 1×10^7 细胞/mL 的浓度重新混悬。打开要检测的载片，恢复至室温并用 PBS 湿润。沿被标记阵列的边缘擦干硝酸纤维素，并将其放于阵列了湿润薄纸的佩特里培养皿中。在载片上阵列被擦干的边缘之内小心加细胞悬液（300 μ L）。阵列与细胞在潮湿封闭的佩特里培养皿中室温孵育 30 分钟。

在与细胞一起孵育以后，小心在载片上滴加一管 50mL PBS，然后将其放在有 PBS 的佩特里培养皿中，轻轻旋转洗掉没有与阵列特异结合的细胞。用显微镜检查载片，如果仍可观察到明显的背景吸附，可重复本步骤直至结合模式清晰。

实施例 4

检测

应用细胞或抗原样品于抗体-膜阵列上，孵育使之能最大程度的结合，非结合物质可被适当的洗液去掉。通常来说，被结合的细胞通过化学交叉连接固定在抗体上。应用显微镜观察被阵列中抗体结合的细胞以确定其形态。在需要的情况下，固定细胞于阵列上并染色，用酶处理和/或检查酶和/或受体的表达。

被固定的细胞还可与标记了报告分子（如荧光染料）的第二抗相互作用。可替代的是，用一系列“第二”抗体，其中每种抗体均带有一种不同的荧光染料。细胞上多种抗体的表达就可用荧光共聚焦显微镜检查确定。

被固定的细胞还可染色或用荧光标记来量化原始体液样品中的细胞浓度。使用可调整的扫描仪记录阵列中每个抗体斑点内的细胞密度，从而进行定量测定。例如，一种在二维空间（分辨率 $50\text{ }\mu\text{m}$ ）扫描的激光密度计（Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA, USA）尤其适用。抗体斑点的染色程度与每种抗体结合的细胞数成比例。对于荧光检查来说，可使用 FluorImager 或 Typhoon (Molecular Dynamics, Inc) (分辨率 $50\text{ }\mu\text{m}$)。

例如针对 CD 和 MY 抗原的抗体阵列能提供抗原的表达模式，这可与不同的白血病（如急性髓细胞样白血病 [AML]）的固定抗原表达模式相匹配。例如，AML (M4) 表达下述抗原：MY4 (CD14)，MY7，MY9 和 MO1 (CD11b)。

实施例 5

人 T 和 B 细胞系的检测

把 CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、和 CD56 (Coulter Beckman) 的抗体溶液 ($10\mu\text{g/mL}$) 样品 ($0.4\mu\text{L}$) 加于玻璃显微载片 (Molecular Probes) 上的硝酸纤维素膜上，置于 Petrie 培养皿并保持在湿润空气中。应用人 CCRF-CEM 白血病和 Raji B 淋巴瘤细胞 (10^7 细胞/ mL) 悬液于阵列上，按实施例 2 中所述孵育，用 PBS 洗涤。CCRF-CEM 白血病细胞与抗 CD4 和抗 CD8 抗体强烈结合，与抗 CD3 抗体部分结合，与抗 CD19 抗体不结合。Raji 细胞只结合抗 CD19 抗体。这些结果显示 CCRF-CEM 细胞，例如，表达高水平的 CD4，中等水平的 CD8，更低水平的 CD3 和可忽略水平的 CD19、CD14 和 CD56。相反，Raji 细胞表达 CD19，但不表达 CD3、CD4、CD8、CD14 和 CD56。使用 CD 抗原的抗体阵列测得的这些结果被流式细胞仪 (Becton Dickinson Facscalibur) 用荧光基团 FITC 标记的抗体证实。CD 抗原的表达水平与所报道 T 和 B 细胞抗原表达一致 (Bene 和 Martini, 1997)。这些实验结果显示于图 5A 和 5B。

实施例 6

检测的改良方法

应用 Olympus BX60 荧光显微镜 (Olympus Optical Company, Japan) 观察该阵列, 使用 UPLan 4× 物镜, 聚光器置于相 1 位置, 使用绿色滤光片滤过光源。使用 SenSys 数字冷却 CCD 照相机 (1317×1035 Pixels, Photometrics)、PCI 抓取支架和 Windows 图像加工和分析软件 (Digital Optics) 拍照和分析图像, 图像 (每张图片 6 个抗体斑点) 加工使用 Adobe Photoshop 3.0 版软件。细胞与每个抗体斑点特异性结合的强度还可用相对等级+/-, +, ++, +++来记录。

在把结果记录为计算机文件后, 将载片浸于 FACS 固定剂 (0.94%v/v 福尔马林, 2% D-葡萄糖, 0.03% v/v NaN_3 , PBS (pH 7.3)) 中固定结合了细胞的抗体阵列。在 PBS 中漂洗以后, 被结合的细胞用苏木精复染剂 (Immunotech, Marseille, 法国) 染色 5 分钟, 将细胞核染成蓝色。在 PBS 中漂洗载片, 凉干并室温贮存。以后干燥的载片用 PBS 湿润并重新用显微镜观察。

实施例 7

结合到抗体阵列的细胞的目测观察与量化

有若干可选择的方法用于检查血样中结合于抗体阵列的整个细胞或抗原。

(i) 将细胞或抗原与那些能将荧光基团共价连接于样品中所有蛋白的氨基或巯基的试剂发生反应。可以得到的作为蛋白标记装置的荧光团 (分子探针, <http://www.probes.com>) 是 Alexa 488 和 3-(4-羧基苯甲酰)-喹啉-2-甲醛 (CBQCA), 可用氩激光在 488nm 处激活。另一种替代方法是, 被阵列结合的细胞用 5-氯甲基荧光素二乙酸盐 (CMFDA) 标记, 它是一种膜渗透性探针, 由细胞内酯酶去乙酰后形成荧光的 5-氯甲基荧光素。该产物经历了谷胱甘肽 S-转移酶介导的反应, 产生膜渗透性谷胱甘肽荧光染料加合物, 然后该加合物与蛋白和肽上的巯基反应而形成结合物。被抗体阵列结合的荧光标记细胞用扫描荧光计 (如 FluorImager 或 Typhoon, Molecular Dynamics, Inc) 或共聚焦显微镜量化。优选使

用温和的反应条件以不影响大多数抗原结合位点。用不同数量的荧光团将不同细胞标记到不同程度。在与荧光团反应之前洗涤细胞。

(ii) 被阵列结合的未标记细胞与可溶的、荧光标记的抗体反应，后者可结合细胞上不同的 CD 抗原，从而能量化被结合的细胞。

(iii) 对一些样品来说，细胞 CD 抗原的水平可能超过特定斑点中可得抗体数量。从初筛中发现要表达的 CD 抗原可以在随后使用一排特定抗体的稀释液来进行量化。当该阵列上斑点中抗体数量超过所用样品细胞上 CD 抗原的数量时，荧光不再增加。荧光与抗体数量之关系图表明血浆样品中表达该 CD 抗原的细胞密度。由上述资料可计算出每个细胞特定 CD 抗原的数量。本定量检测中被结合细胞水平的测定可应用上面 (i) 或 (ii) 中的方法。

实施例 8

被固定的细胞的检查

抗体-膜阵列上的被结合细胞是用显微镜观察以确定其形态学。细胞被固定在阵列上并染色，用放射性或荧光标记的低聚合核苷酸探针杂交，用酶处理或检查酶活性，从而确定其形态学。被固定的细胞还可与第二标记的可溶性抗体（例如用荧光染料连接的）反应，或者真正地与一些不同的可溶性二抗反应，每种二抗带一种不同荧光染料。阵列上的膜结合性癌细胞（如淋巴瘤）所表达的多种抗原可用荧光显微镜诸如共聚焦显微镜确定。

在另一替代方法中，裂解被固定的细胞或用其它方法处理细胞以暴露细胞内部抗原，然后将其与对细胞内抗原有特异性的第二标记的可溶性抗体（例如用荧光染料连接的）反应，或者真正地与数种不同的可溶性二抗反应，每种二抗带不同荧光染料。然后用荧光共聚焦显微镜确定被结合的膜结合性癌细胞（如淋巴瘤）所表达的多种细胞内抗原。

为了能量化最初体液样品中的细胞密度，固定细胞要被染色或荧光标记。可用能程序化的扫描仪使这种量化进行自动化，它可记录该阵列中不同抗体（如 CD, MY 和/或 LY）的每个抗体斑点中的细胞密度。对于

包括未知比例细胞亚型的细胞混合物，表达特定表面抗原的细胞密度的量化采用如下方法：将细胞结合于一阵列一致大小的抗体斑点，其中同种抗体密度不同，差别系数为 10 倍。用密度计或荧光计扫描结合于这些阵列稀释抗体斑点上被固定和染色的细胞，确定何时某特定斑点的抗体密度超过细胞悬液样品中的细胞密度，以此确定特定细胞亚群的密度。第二种分析形式是使细胞悬液在一沿膜连接的特定抗体条带上扩散，固定和染色被结合细胞，然后测定相对于总抗体条带长度的被结合细胞条带的长度。然后从条带中已知的抗体结合能力计算出表达特定抗原的细胞密度。对于阵列稀释的抗体斑点或抗体条带，应做一针对与癌细胞无关的正常细胞所表达抗原的内部标准。

用一阵列单克隆抗体（如针对 CD、MY 或 LY 抗原），通过此阵列确定的特定抗原表达模式可与不同白血病（如 M4 AML（急性髓细胞样白血病））的抗原表达固定模式相比较：MY4（CD14）、MY7、MY9、MO1（CD11b）。细胞形态学提供第二诊断标准。用荧光计或分光光度计扫描该阵列实现诊断自动化，通过对特定癌症抗原表达模式的计算机化识别确定哪个抗体斑点结合细胞。这种方法可以自动化诊断多种白血病、淋巴瘤和其它转移癌。使用针对 CD、MY 或 LY 抗原的完整抗体阵列可发现新型白血病和淋巴瘤。

癌细胞上特定抗原的鉴定提供了必要的信息用于下一步应用人源化单克隆抗体或应用毒素或药物共价连接于抗体的免疫毒素对患者进行免疫治疗。由化疗或放疗引起的进行性缓解及后来因抗药细胞的生长而致的复发可通过患者的定期血样进行检测。

对于那些患有大的原发瘤并有转移危险性的患者，可以把对转移性结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤或其它癌症所表达抗原有特异性的抗体阵列用于检查体液（如血液或脑脊液）中极低水平的转移癌细胞。这种监视对迅速发展的癌症如黑色素瘤非常重要。

还可以用抗体阵列制作“使用者友好界面”，例如，以字母形式设计与急性髓细胞样白血病（AML）相应的抗体，“M”代表白血病。相同的抗体阵列可具有用于针对急性淋巴细胞白血病（ALL）设计成“L”的

抗体。应用这种方法，依据不同癌症表面抗原的已知表达模式，单个阵列就能作出直接诊断。抗体斑点和斑点阵列的体积能给同一样品做出几种不同的检测，而不显著增加检测成本。对 1-5 毫微升大小只花不到 1 美分的抗体斑点来讲尤其是这样。

许多免疫系统的许多非瘤病变可导致异常的循环淋巴细胞群。自身免疫性疾病如 1 型糖尿病，多发性硬化，重症肌无力，恶性贫血，银屑病，类风湿性关节炎，硬皮病和系统性红斑狼疮由表达 CD4 的 T 细胞亚群引起以及由表达 CD19 的 B 细胞亚群引起针对其自身抗原产生抗体引起。例如，已观察到系统性红斑狼疮患者的淋巴细胞群数量上的异常（↓CD4⁺，CD45⁺ T 淋巴细胞；↑CD8⁺，CD57⁺ T 淋巴细胞）。抗体阵列能检查针对自身抗原的扩增的 T 和 B 细胞克隆。

患反复感染的儿童可能有先天性免疫缺陷。用流式细胞仪免疫分型可用于检查淋巴细胞亚群缺陷。严重的联合免疫缺陷综合征（SCIDS）由腺苷脱氨酶这种酶缺陷引起，表现为极低水平的外周血淋巴细胞，诸如 T（CD3）和 B（CD19）和天然杀伤（CD16）细胞。嘌呤核苷磷酸化酶缺陷可导致 B 细胞缺陷。多种免疫缺陷病变可用免疫分型来诊断，但目前要明确诊断还需作酶检查和核型分型。本发明的抗体阵列在有缺陷的淋巴细胞亚群方面提供明确的信息，同时不需要其它标准。

人免疫缺陷病毒（HIV）因其 gp120 蛋白结合 CD4 而主要感染 CD4⁺ 淋巴细胞。在 AIDS 的发展过程中，有不可逆的 CD4⁺ 淋巴细胞缺失。然而许多其它细胞类型包括巨噬细胞、B 淋巴细胞和小神经胶质细胞也被 HIV 感染。目前，HIV 患者要检测 CD4 淋巴细胞群，疾病控制中心（CDC，美国亚特兰大）推荐更广泛地开展免疫表型分型。下列双标记检查由流式细胞仪完成：阴性对照，CD45/CD14，CD3/CD4，CD3/CD8，CD3/CD19，CD3/CD16，CD3/CD56 和 CD4/CD8。这种费力繁索的操作可以被包含针对这些 CD 抗原和其它抗原的抗体阵列进行单个步骤来取代，其还可进一步明确受影响的淋巴细胞亚群。当患者被 HIV 感染时，CD4⁺ 淋巴细胞在大约 6 周降至最低值，随后到 12 周其水平有部分恢复。在更长时期内，CD4⁺ 淋巴细胞进行性下降导致大约 11 年后死亡（Shinton, 1998），用

叠氮胸苷 (AZT) 进行治疗可诱导 CD4+淋巴细胞短暂升高; 用抗体阵列监测对各种淋巴细胞亚群化疗的疗效, 以便跟踪 HIV 患者的临床发展。

免疫表型分型还用于骨髓或器官移植以确定免疫抑制的程度和诸如排斥或感染等合并症 (Bene 和 Martini, 1997)。流式细胞术用于移植手术前, 目的在于使用单克隆抗体检查 HLA 特异性的组织分型或交叉配血。对被移植组织的耐受通过给患者服用环孢素 A 诱导。移植期间的治疗使外周血淋巴细胞降至几乎为 0。T 细胞从血中消失通过流式细胞术检查 CD3+细胞来监测。移植术后, CD8+细胞升高的信号预示可能发生排斥, CD8+和 CD16+、CD56+和/或 CD57+细胞升高可显示病毒感染。用抗体阵列能更快更广泛地完成这种对移植者免疫状态的监督。

一些癌症患者接受高剂量化疗后需要骨髓移植以重建其缺失的免疫系统。移植的骨髓可诱导造血重建, 但有时会出现异常淋巴细胞亚群如 CD5+ T 细胞。患者可发生机会感染和移植物抗宿主疾病, 这两者均有 CD8+细胞升高和天然杀伤细胞升高。用针对 CD 抗原的抗体阵列替代流式细胞术简化了对患者的监测, 并提供更广泛的信息。

CD 抗原的抗体阵列还可用于监测在对昆虫或蜘蛛毒的脱敏治疗期间出现的淋巴细胞亚群改变, 其中, CD4+ CD45RA+淋巴细胞数升高, 及 CD4+ CD45RO+淋巴细胞数由高水平下降。慢性疲劳综合征的患者可与病毒感染者有一致的免疫学异常, 表现为 CD8+淋巴细胞活化。本发明中的抗体阵列可提供详细的淋巴细胞亚群分析, 从而为该病建立新的诊断标准并提供基本资料。

实施例 9

诊断白血病的抗体阵列

使用结合在显微载玻片上的针对 CD3, 4, 8, 14, 19 和 56 的抗体阵列可区分 CCRF—CEM T 细胞白血病与 Raji B 细胞淋巴瘤。有区别的阵列显示如下 (其中 “+” 表示结合水平):

	CEM	Raji
CD3	+	-
CD4	+++++	-
CD8	++	-
CD14	-	-
CD19	-	++++
CD56	-	-

该阵列是用全血和外周血淋巴细胞检测的。所有斑点均结合细胞，其中一些斑点结合不同的细胞亚群。细胞亚群用针对下述 CD 抗原的抗体来检测：

CD2, 7, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11b, 11c, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 33, 34, 36, 37, 38, 41, 42, 45, 56, 57, 95, 122.

用这些抗体建立起来的大的阵列，用于研究患者白血病细胞的结合性能。特别集中于 AML, CLL 和 ALL 患者，但本发明适用于任何癌症。通过使用这种方法，依据这种一步检测提供的关于抗原表达的详细信息，该抗体阵列能确定新的白血病亚群。

实施实施例 10

以硝酸纤维素为基础的抗体阵列

准备检测的操作在图 4 中以流程图表举例说明。用 Biodot 抽吸和分配系统 (Cartesian Technologies) 建立抗体阵列，在玻璃显微载片的硝酸纤维素膜上滴加 5ul 斑点 (Schleicher and Schuell, Cat. NO. 10484182) 纯化的单克隆抗体 (Beckman Coulter, Becton Dickinson or Biosource International) 推荐使用流式细胞仪分析使用的浓度，并使用由生产者提供的相同缓冲液。然后在 37°C 下用 5%w/v 脱脂乳 (Dutch Jug) 孵育 1.5 小时，封闭硝酸纤维素，要选择可降低背景吸附的封闭条件。

干燥阵列可在 4°C 下储存 3 个月以上而不丢失与人 CCRF-CEM T 细胞白血病和 Raji B 细胞淋巴瘤细胞系结合的能力 (表 1 和 2)。比较干燥

阵列干燥储存于 4℃, 室温 (22℃) 或 37℃ 一个月显示, 在用正常 PBLs 检测时, 结合活力在 4℃ 下没有衰减或几乎没有衰减, 室温下少量衰减, 37℃ 下只有部分丢失 (表 3)。深色的抗体即使在 37℃ 储存 1 个月以后仍显示强烈的结合活力。向阵列添加蛋白稳定剂可进一步提高阵列的稳定性 (如购自 Surmodics, MN, 美国) 的聚乙二醇或稳定剂产品)。

正常白细胞或白血病细胞用 Histopaque 离心制备, 洗涤并在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中重新混悬成 10^7 细胞/L。使用 PBS 可使细胞无代谢, 并导致降低与封闭抗体阵列的非特意性背景吸附。滴加细胞悬液于该阵列上, 室温下孵育 30 分钟, 用葡萄糖/多聚甲醛/PBS 溶液固定, 然后用 PBS 洗涤。被阵列结合的细胞拍照下来, 数字图像与正常 PBLs 或白血病的一致图案相匹配。由于一些样品显示背景与硝酸纤维素吸附, 应采取步骤以减轻背景。在细胞悬液的 PBS 中加入 1 mM EDTA 螯合剂可明显降低背景吸附而不影响特异性抗体的结合, 发现 AML 样本与同型对照抗体具有强烈结合, 这意味 Fc 受体结合, 这可通过使用 10%v/v 加热失活的人 AB 血清预孵育来克服。为了进一步减轻背景结合问题, 下述化合物通过抑制蛋白合成和/或封闭表达于许多活化白细胞上的 Mac—1 黏附分子来降低白细胞结合能力: 肝素, 高分子量激肽原, 摩雪霉素, 己酮可可碱, 芊达明 (Tantum), 利多卡因和桂萘甲胺。

湿润的载片用显微镜在暗视野 400x 放大下观察。斑点以 6 个为一组拍照, 用 Adobe Photoshop 软件制成组合图片。每个抗体斑点的细胞密度由计算机软件或光密度计或荧光计扫描记录的数字图像定量测定, 被阵列结合的白细胞用结合了抗 CD45 抗体 (白细胞共同抗原) 的 Alexa 488 染色并用荧光显微镜观察 (图 6)。所以要用三色共聚焦显微镜进一步识别和鉴定被单个抗体斑点结合的细胞。组织化学染色剂 (如辣根过氧化物酶) 用于被阵列结合的细胞以证实一些白血病亚型的识别 (如 AML)。

起初, 在一阵列 54 个 10uL 抗体斑点上检测 3 个细胞系 (图 7a-d)。抗体位置表显示于图 7a。用 CCRF—CEM T 细胞白血病 (图 7b)、

Raji B 细胞淋巴瘤 (图 7c) 和 NB4 髓样细胞系检查不同的斑点模式, 这些结果总结于表 4。

正常 PBLs, 慢性淋巴细胞白血病 (CLL), 毛细胞白血病 (HCL), 急性髓细胞样白血病 (AML) 和 B 淋巴细胞淋巴瘤 (BCL) 的典型斑点模式显示于图 8a—g, 抗体位置表显示于图 8a。PBLs 的 CD 抗原表达模式总结于表 5, 其中颜色深的 CD 抗原显示常见表达模式, 新鲜分离的 PBLs (RIC) 与在液氮中冻存然后融解的 PBLs 结果相似 (显示于表 8)。该观察证明能使用冻存的白细胞和白血病细胞进行抗体阵列分析。表 6 总结了来自 9 名白血病患者的 CLL 细胞 CD 抗原表达模式。当 CLL 样品被冷冻然后再检测时, 所获得的模式具有高度可重复性。所有被检测的 CLL 强烈表达 CD5, 11c, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 37, 38, 45, 52 和 HLA-DR, 这些是 B 细胞型 CLLs 的特征细胞表面标志。

表 7 显示正常 PBL, 2 个 CLLs, PLL (前淋巴细胞白血病) 样品, HCL, BCL 和 AML 患者之间的比较。CLL 样品 KB 来自 WBC 密度在正常个体范围 (10×10^9 细胞/L) 之内被早期诊断的患者, 而 EH2 样品来自较晚期患者, 其 WBC 计数升高达 30×10^9 细胞/L。颜色深浅表明这些不同白血病表达的重要抗原的相同与不同之处。

用抗体阵列和流式细胞术对 PBLs 和 CLLs 进行了严格的比较 (表 8)。除 CD2, CD11b, 14, 15, 16, 56, 57, 95, 103, 154, KOR 及 FMC7 以外, 来自两种分析的结果有强烈的相关性。大多数情况下, 流式细胞术显示阳性, 而抗体阵列显示阴性。而且流式细胞术检测出的阳性细胞百分率很低, 或染色很微弱。流式细胞术使用可溶性抗体而阵列使用固定于固体支持物上的抗体。游离溶液中的抗体与细胞上 CD 抗原的接触较阵列上抗体与抗原的接触更多, 后者可发生空间阻碍。而且需要更高的结合亲和力保持细胞与固相结合。4°C 下贮存抗体于溶液中导致其在后来的抗体阵列中结合活性的逐渐丢失。多数情况下, 新鲜抗体的结合活性可以恢复。其他情况下, 则需要更高浓度的抗体。在一种情况 (CD2) 中, 来自不同杂交瘤克隆的抗体结合细胞。这些改变能明显提高固相与 FACS 分析之间的相关性。

CD 表达由流式细胞术检测为阴性，而由抗体阵列检测显示为阳性（即 RIC PBL 的 CD103 和 KOR7），该差别可通过在抗体阵列检测前在 RIC PBLs 中添加人 AB 血清来消除；CD103 和 KOR 则是均呈阴性（见图 8b）。添加包括免疫球蛋白的人 AB 血清还能阻断 B 细胞 CLLs 细胞表面免疫球蛋白（Ig）的检测。人血清还可能包括含其它细胞表面标志的可溶形式，它们能阻断这些结合细胞表达的这些标志（如 CD154，CD95）。推荐首先在不添加人 AB 血清的 EDTA/PBS 中检测样品。只有那些在初次检测中显示强烈的 Fc 受体结合的样本才用人 AB 血清重新检测。

对于一些应用来说，结合抗体斑点的细胞通过与一内部标准品比较进行量化。图 9 显示针对 3 种不同表面标志的抗体斑点孵育的细胞结合与 Raji 细胞密度之间的关系。对于 CD38 和 HLA-DR 来说，在细胞浓度大 10×10^6 细胞/L 条件下，细胞密度与被斑点结合的细胞数量之间有直接相关性。对于 HLA-DR 来说，从 $1-10 \times 10^6$ 细胞/mL 为线性关系。对 CD10 来说，在大约 5×10^6 细胞/mL 时升高达到稳定的平台期，显示抗体结合斑点的饱和。图 10 显示抗体浓度在 0.16—1.25ug/mL 之间时，细胞结合与 CD10 抗体浓度为线性相关性。这些结果证明只要最优化每种抗体的条件，细胞结合的量化是可能的。

本领域技术人员将会认识到：除本文详述的外，容易对此处描述的发明进行变化和修改。还应理解的是：本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括所有在本说明书中提及的或指明的步骤，特征，组合物和化合物，单独地或集体地，以及任何及所有任两项或多项该步骤或特征的组合。

本发明检测被称为“LD 阵列”并献给一位患急性髓细胞样白血病（AML，M4）的患者，Lee Dixon 女士。

表格说明

表 1: 结合 CCRF—CEM 细胞的抗体阵列的稳定性。

抗体阵列在室温下干燥，封闭，在水中洗涤，干燥后储存于 4°C，捆紧置于密闭塑料袋中。结果记录为-（无结合），+/-（有一些细胞结合），+（弱阳性），++（强阳性），+++（细胞全部覆盖抗体斑点），++++（厚厚覆盖抗体斑点）。

表 2：结合 Raji 细胞的抗体阵列的稳定性。

实验操作同表 1。（细胞与硝酸纤维素的背景结合使 b/g 结果模糊不清）

表 3：PBLs 在储存于 4°C，22°C 和 37°C 的阵列上的结合模式。

按所规定的操作将储存于液氮中的 PBL（RIC2）重建，并在含 EDTA 和人 AB 血清的 PBS 中与阵列结合，阴影的 CD 标志显示在所有 3 个温度下储存 1 个月后强烈结合。

表 4：抗体阵列上细胞系的结合模式

重新悬浮于 PBS 中的培养细胞结合于与表 3 相同的阵列上，阴影的 CD 标志显示强烈结合。

表 5：抗体阵列上 PBLs 的结合模式

来自 2 个对象（RIC 和 LB）和 3 个 Red Cross Blood Bank 中的血沉棕黄色层（PBL1, 2, 3）的 PBLs 与表 3 相同的阵列结合。所有操作与表 3 相同。

表 6：来自 9 名患者的慢性淋巴细胞白血病样品的结合模式

所有操作与表 3 相同，但样本在 PBS 中检测，除 EH2，KB，和 NH 添加 EDTA 和人 AB 血清以外，阴影的 CD 标志显示所有患者样品的一致结合。

表 7：PBL，CLL，PLL，HCL，BCL，和 AML 样品的结合模式

所有操作与表 3 相同，阴影的 CD 标志显示强烈结合。

表 8：对新鲜和冷冻 PBLs 及 2 个不同 CLL 样品的 FACS 分析与抗体阵列结果的比较。

除不加入人血清或 EDTA 外，抗体阵列操作与表 3 相同。用 10%人 AB 血清，按照常规进行 FACS 分析，阴影的区域突出两种方法间的不同之处。

表 1: 结合 CCRF-CEM 细胞的抗体阵列的稳定性

CD 标志	开始	3 天	1 周	2 周	7 周	3 个月
2	+/-	+/-	+/-	-	+	+/-
3	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	+	+++	+++	+++	+++	+++
8	-	++	+	+/-	+	++
95	+++	+++	+++	+++	+++	+++
103	-	-	-	-	-	-
HLA-DR	-	-	-	-	-	-

表 2: 结合 Raji 细胞的抗体阵列的稳定性

CD 标志	开始	3 天	1 周	2 周	7 周	3 个月
10	++	++	++	+++	+++	+++
19	+++	+++	++	+++	+++	+++
20	b/g	+	+/-	+	+++	++
21	b/g	+++	+++	+++	+++	+++
22	+++	+++	+++	+++	+++	+++
23	++	++	++	++	++	+++
25	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
37	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45	++	++	+/-	++	++	++
95	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HLA-DR	+++	+++	++	+++	+++	+++

表 3: 4℃, 22℃和 37℃下干燥储存的阵列上的 PBL 结合模式

CD 标志	1 天	贮存一个月后		
	4°C	4°C	22°C	37°C
mIgG1	-	-	-	-
2	++	++	++	++
3	++	++	++	+/-
4	++	++	++	++
5	+	+	++	+/-
7	++	++	++	+
8	+	+	+	+/-
9	+	+	+	-
10	-	-	-	-
11b	+/-	+/-	+/-	-
11c	++	++	++	++
13	+	+	+/-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	+	+/-	-	-
19	+/-	+	+	+/-
20	+	+	+/-	+/-
21	+/-	+	+	+/-
22	+	+	+	+/-
23	+/-	+/-	+/-	+/-
24	+/-	+	+	+/-
25	++	+	+	+/-
33	++	+/-	++	++
34	-	-	-	-
36	+++	+++	+++	+++
37	+	+	+	+
38	++	++	++	++
41	+/-	+/-	+/-	+/-
42a	+	+/-	+/-	+/-
45	+	+	-	+/-
45RA	+	+	+/-	+/-
45RO	++	++	+	+
52	++	++	+	++
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	+/-	+/-	+/-	+/-
71	+/-	+/-	+/-	+/-
79a	-	+	-	-
95	+/-	+	+/-	-
103	-	-	-	-
117	-	-	-	-
122	+/-	+	+/-	+/-
154	-	-	-	-
GPA	-	-	-	-
HLA-DR	++	++	++	++
KOR	-	-	-	-
FMC7	+/-	+	-	-

表 4: 细胞系在抗体阵列上的结合模式

抗体	CEM	Raji	NB4
mlgG1	-	-	-
mlgG2a	-	-	-
mlgG2b	-	-	-
mlgM	-	-	-
2	+/-	-	-
3	+/-	-	-
4	++++	-	+++
5	++++	-	-
7	++++	-	+
8	+++	-	-
9	-	-	+
10	-	+++	+/-
11b	-	-	+/-
11c	-	-	++
13	-	-	+++
14	-	-	-
15	+	-	++
16	-	-	-
19	-	+++	-
20	-	++++	-
21	-	+++	-
22	-	++++	-
23	-	++++	-
24	-	-	-
25	-	-	+
33	-	-	++
34	-	-	-
36	-	-	+/-
37	+/-	++++	-
38	++++	+++	+++
41	-	-	+/-
42a	-	-	+
45	++	++	++
45RA	-	+++	-
45RO	++	-	+++
52	-	-	-
56	-	-	+/-
57	-	-	+/-
60	-	-	-
61	-	-	-
71	++++	++	+++
79a	-	-	-
95	+	++	+/-
103	-	-	+
117	-	-	-
122	-	-	-
154	-	-	-
GPA	-	-	-
HLA-DR	-	++++	-
KOR	-	-	+
FMC7	-	-	-

表 5: PBL 在抗体阵列上的结合模式

标志	正常 PBL				
	RIC	PBL1	PBL2	PBL3	LB
mIgG1	-	-	-	-	-
2	+++	-	+/-	+	-
3	+++	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++	++++
5	+++	+++	+++	+++	++++
7	++	++	++	++	+++
8	+	+	++	-	+++
9	++	-	+	+++	++
10	-	-	+	+	-
11b	-	-	-	-	-
11c	++	++	++	++	+++
13	+	++	+	+	-
14	-	-	+/-	+/-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	+/-	+/-	-
19	+	+	+	+/-	+
20	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+
22	++	+++	++	++	-
23	+/-	+	+	+/-	+
24	+/-	+	+/-	+/-	+
25	++	++	+++	+++	++
33	++	++	+++	+++	+++
34	-	-	-	-	-
36	++	++	+++	+++	++++
37	+	-	++	+	+
38	++	+++	+++	+++	++++
41	++	+	+++	+	+/-
42a	++	++	+	++	+
45	++	+++	+++	+	++++
45RA	++	+	+++	+/-	+
45RO	++	++	++	+++	++++
52	+++	-	++	-	-
56	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-
61	+	-	-	-	+
71	-	+/-	+/-	+/-	+/-
79a	-	+/-	+/-	-	-
95	+	+/-	+/-	-	++
103	++	++	++	+	-
117	-	-	-	-	-
122	+	+	-	-	+/-
154	-	+/-	+	-	-
GPA	-	+/-	+/-	-	-
HLA-DR	+++	nd	nd	nd	+
KOR	+++	++	+	++	+/-
FMC7	-	-	-	-	-
抗-hlg	nd	nd	nd	nd	-

nd 未做

表 6: 来自 9 名患者的慢性淋巴细胞白血病样品的结合模式

标志	CLL								
	AW	YI	FS	PN	PL	DD	EH2	KB	NH
mIgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	++	++	++
3	-	-	-	-	-	-	+	+	++
4	-	-	-	-	-	-	+	+	++
5	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
7	nd	nd	nd	-	-	-	+	+	++
8	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++
9	+++	-	+++	-	+/-	++	++++	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11b	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
11c	nd	nd	nd	+++	+++	++++	++++	+++	++
13	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	+++	-	++	+++
19	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++
21	+++	++	+++	+++	++	++++	++	+++	++
22	+++	+++	+++	+++	++	++++	++++	+++	+
23	+++	+++	+++	++	++++	++++	++++	++	+++
24	nd	nd	nd	++	++	+++	++++	+++	++
25	++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	+
33	-	-	-	-	-	-	-	+	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-
37	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
38	nd	nd	nd	++	++	++++	++++	+	+
41	++	+/-	++	-	-	-	++	-	-
42a	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-
45	++	++	+	++	+++	++++	++++	+++	++
45RA	nd	nd	nd	+++	-	++++	+++	+++	+
45RO	nd	nd	nd	-	+++	++	+/-	+	++
52	nd	nd	nd	+++	++++	++++	++++	+++	+++
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	nd	nd	nd	-	+	-	-	-	-
60	nd	nd	nd	-	+++	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	-	+	++	+++	+++	++++	++	++
79a	nd	nd	nd	+	+++	++	-	++	-
95	++	+++	+/-	-	-	+/-	+/-	+	-
103	+	-	-	+	-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
122	nd	nd	nd	-	-	-	-	+	-
154	nd	nd	nd	-	-	-	+/-	+/-	-
GPA	nd	nd	nd	++++	-	-	-	-	-
HLA-DR	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
KOR	nd	nd	nd	-	-	+++	-	++	++
FMC7	nd	nd	nd	++	++	+++	+/-	+++	+
抗-hlg	nd	nd	nd	+++	++	-	-	++	-

nd 未做

表 7: PBL, CLL, PLL, HCL, BCL 和 AML 的结合模式

标志	PBL	CLL		PLL	HCL	BCL	AML
	RIC2	KB	EH2	AR	RD	KR	GT
mIgG1	-	-	-	-	-	-	-
2	+++	++	++	+	+/-	+/-	+++
3	++++	+	+	+	-	+/-	+/-
4	++++	+	+	+	-	+/-	+++
5	++++	+++	++++	+	+	++++	+/-
7	+++	+	+	-	-	+/-	+/-
8	+++	+/-	+/-	-	-	-	-
9	++	-	++++	-	+++	+++	+/-
10	-	+	-	-	-	-	-
11b	-	+/-	-	-	-	-	++
11c	+++	+++	++++	++	++++	+++	++++
13	-	+++	-	-	+/-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	+
16	-	++	-	-	-	-	+/-
19	+	+++	++++	++++	+++	+++	-
20	+	+++	++++	++++	+++	+	+/-
21	+	+++	++	++	-	+++	-
22	-	+++	++++	+++	+++	+++	-
23	+	++	++++	++	+/-	++	-
24	+	+++	++++	+++	-	+++	-
25	++	+++	+++	++	+++	-	-
33	+++	+	-	-	-	-	++++
34	-	-	-	-	+/-	-	-
36	++++	+/-	+/-	-	-	-	++++
37	+	+++	++++	+++	+++	++++	++
38	++++	+	++++	+	+/-	+++	+++
41	+/-	-	++	+	++	-	-
42a	+	-	-	-	-	-	-
45	++++	+++	++++	++	+++	++++	++
45RA	+	+++	+++	++	+++	+++	+++
45RO	++++	+	+/-	+/-	-	-	+
52	-	+++	++++	+++	+++	++++	+/-
56	-	-	-	-	-	-	+/-
57	-	-	-	-	-	-	+/-
60	-	-	-	-	-	-	+/-
61	+	-	-	-	-	-	-
71	+/-	++	++++	+	+	+++	-
79a	-	++	-	++	+/-	++	+/-
95	++	+	+/-	+	+/-	+	++
103	-	-	-	+	+++	+	-
117	-	-	+/-	-	-	-	-
122	+/-	+	-	+	++	+	-
154	-	+/-	+/-	-	++	-	-
GPA	-	-	-	++++	+	-	-
HLA-DR	+	+++	++++	+++	+++	++++	+++
KOR	+/-	++	-	-	-	-	+/-
FMC7	-	+++	+/-	+	+/-	+	+/-
抗-hlg	-	++	-	-	nd	-	-

nd 未做

表 8: FACS 分析和抗体阵列结果的比较

CD	RIC PBL	RIC PBL	RIC PBL fr	RIC PBL fr	PL CLL	PL CLL	AD CLL	AD CLL
标志	FACS	斑点阵列	FACS	斑点阵列	FACS	斑点阵列	FACS	斑点阵列
	% 阳性		% 阳性		% 阳性		% 阳性	
mlgG1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	78	-	73	nd	16	+/-	14	-
3	47	+++	65	+++	17	+/-	6	-
4	52	+++	48	+++	-	+/-	-	-
5	48	+++	61	+++	97	+++	93	+++
7	47	++	60	+++	9	+/-	-	-
8	16	+	22	++	7	-	-	-
9	64	++	36	++	18 dim	+	>34	++
10	-	-	-	+/-	-	-	8	-
11b	52	-	27	-	8 dim	-	7	-
11c	46	++	15	+	71	+++	29	++
13	35	+	10	+	11	-	-	-
14	30	+/-	12	-	16	-	12 dim	-
15	27	-	5	-	-	+/-	-	-
16	8	-	12	-	-	-	-	-
19	23	+	12	+	95	+++	96	+++
20	44	+	12	+	95	+++	93	+++
21	12	+/-	10	+	70	++	86	++
22	14	++	11	++	64	++	?	+++
23	11	+/-	-	+/-	94	+++	80	+++
24	15	+/-	16	+	83	++	48	++
25	5	++	20 dim	+	11	+++	85	+++
33	35	++	7	-	7	+/-	-	+/-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
36	30	++	7	++	-	-	8	+/-
37	40 (11 br)	+	40 (17 br)	+	99	+++	97	+++
38	45	++	22	++	-	+/-	15	+
41	46	++	14	++	-	+/-	11	+/-
42a	42	++	11	+	-	-	6	+/-
45	97	++	86	nd	100	++	98	++
45RA	29	++	42	+	36	+	74	+++
45RO	70	++	58	++	96	+++	78	++
52	96	+++	82	nd	100	++++	96	nd
56	16	-	19	-	-	-	11	-
57	-	-	10	-	11	-	7	-
61	43	+	12	+	-	-	13 dim	-
71	-	-	-	-	81	+++	29	++
95	34	+	49	+	12 dim	-	17 dim	-
103	-	++	-	+/-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	-	-	-
122	-	+/-	61(9 br)	+	9	+/-	-	-
154	19 dim	-	36 dim	-	-	-	13 dim	-
GPA	-	-	-	+	-	-	12 dim	-
HLA-DR	45	+++	21	nd	97	++++	94	+++
KOR	-	+++	-	++	-	-	-	-
FMC7	13	-	9	-	52	++	28	-

fr 新鲜血

nd 未做

br 明亮

参考文献

Bene, M.-C. 和 Martini, E. (1997). *Immunophenotyping of Blood and Bone Marrow Leukocytes*, Harwood Academic Publishers, 澳大利亚.

Chang, T.-W. (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 217-223.

Cooper, G.M. (1993). *The Cancer Book*, p158, Jones and Bartlett Publishers.

de Matos, O. 和 Vale, C.E. (1996). 美国专利 5,538,855.

Goward CR, Murphy JP, Atkinson T, Barstow DA (1990). *Biochem. J.* 267,171-177

Kishimoto, T 等, (1997). *Leukocyte typing VI. White cell differentiation antigens*. 第 6 届国际国际专题讨论会会议录 (Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference), 日本 Kobe, 1996 年 11 月 10-14 日, 美国纽约 Garland Publishing Inc.

Mage, M.G., McHugh, L.L. 和 Rothstein, T.L. (1997). *J. Immunol. Methods* 15, 47-56. Shinton, N.K. (1998) *CRC Desk Reference for Hematology* CRC Press, Boca Raton.

van Dongen, J.J.M. 等. *Neth. J. Med.* (1988).33:298-314

Wysocki, L.J. 和 Sato, V.L. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2844-2848

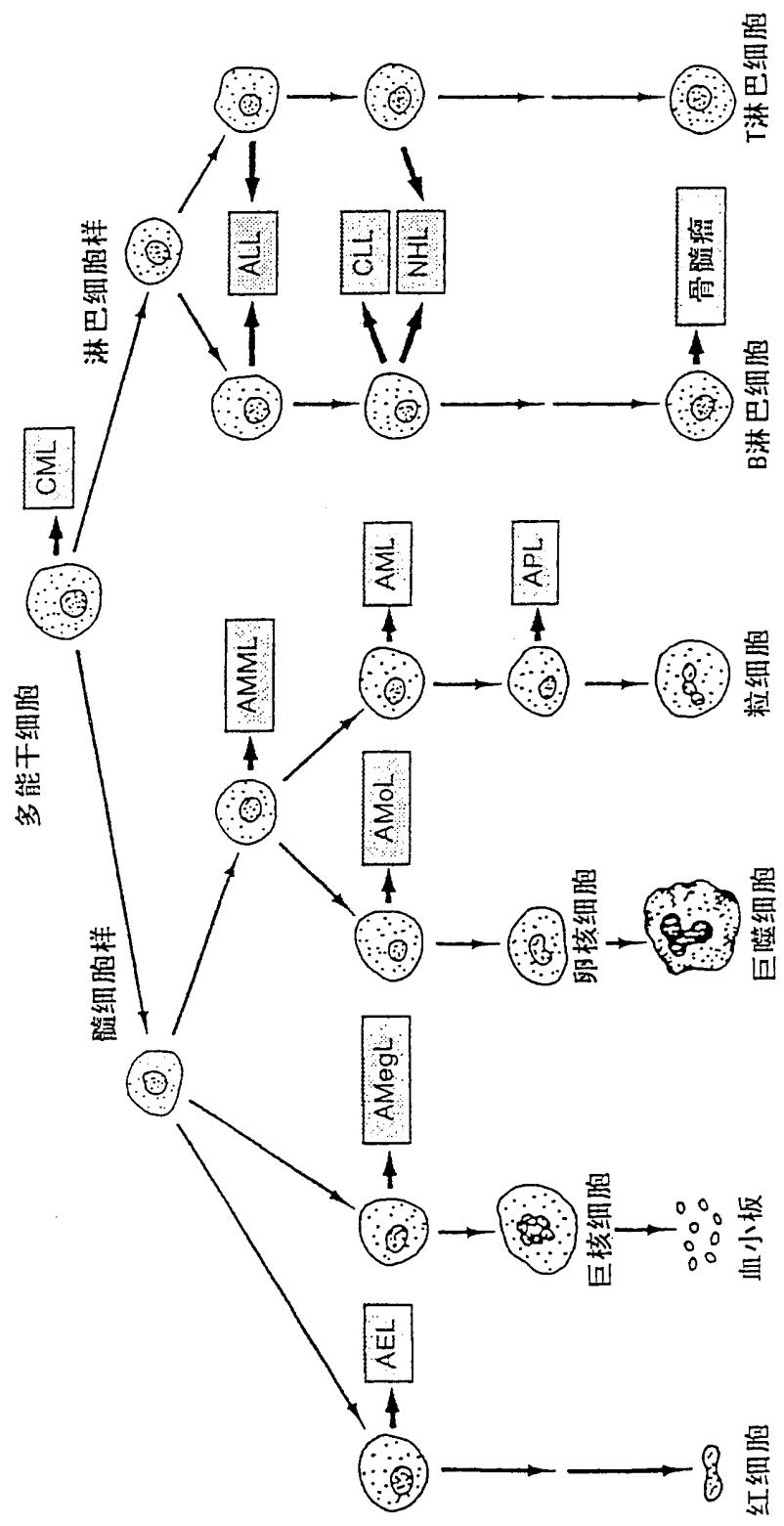


图 1

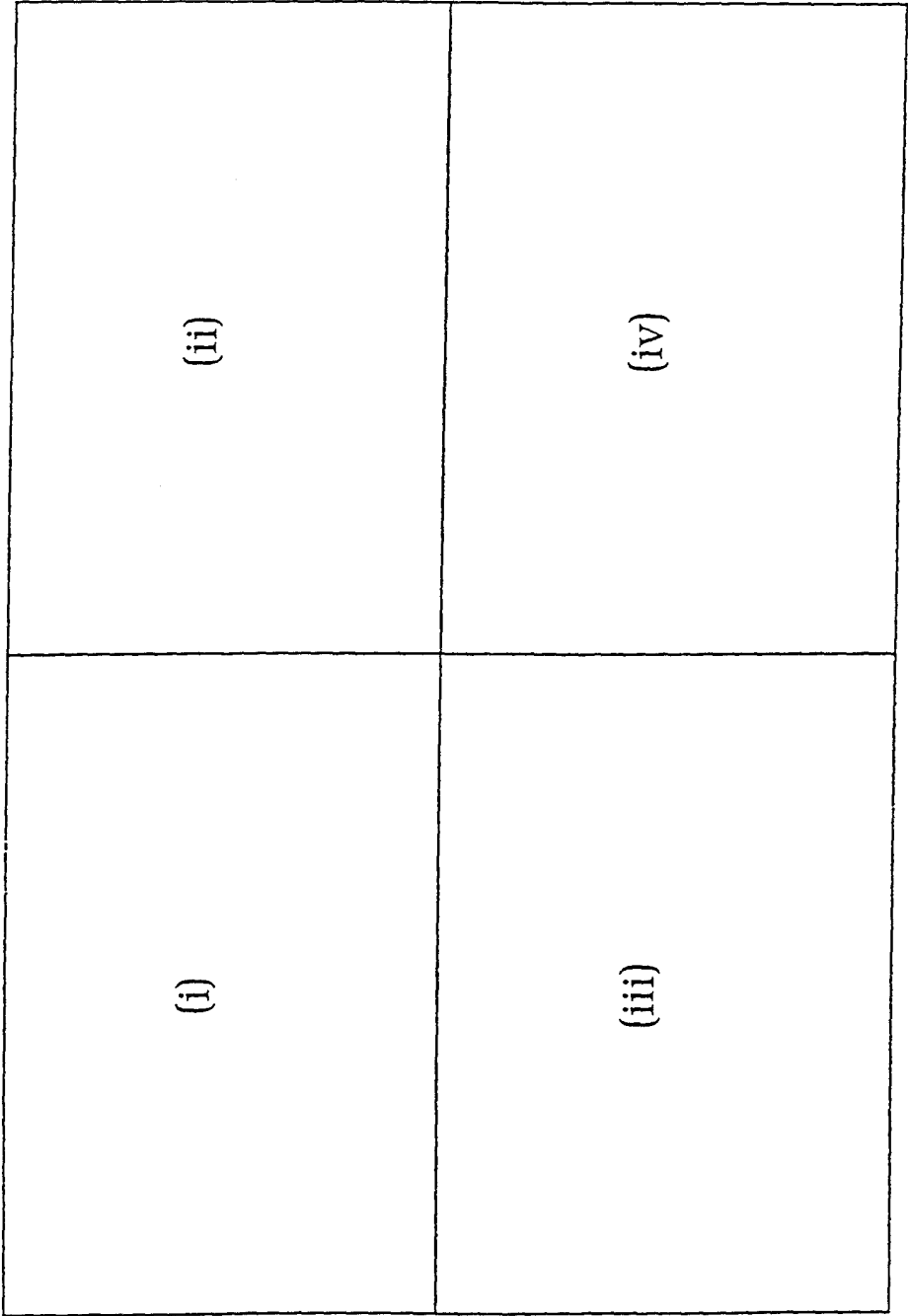


图 2

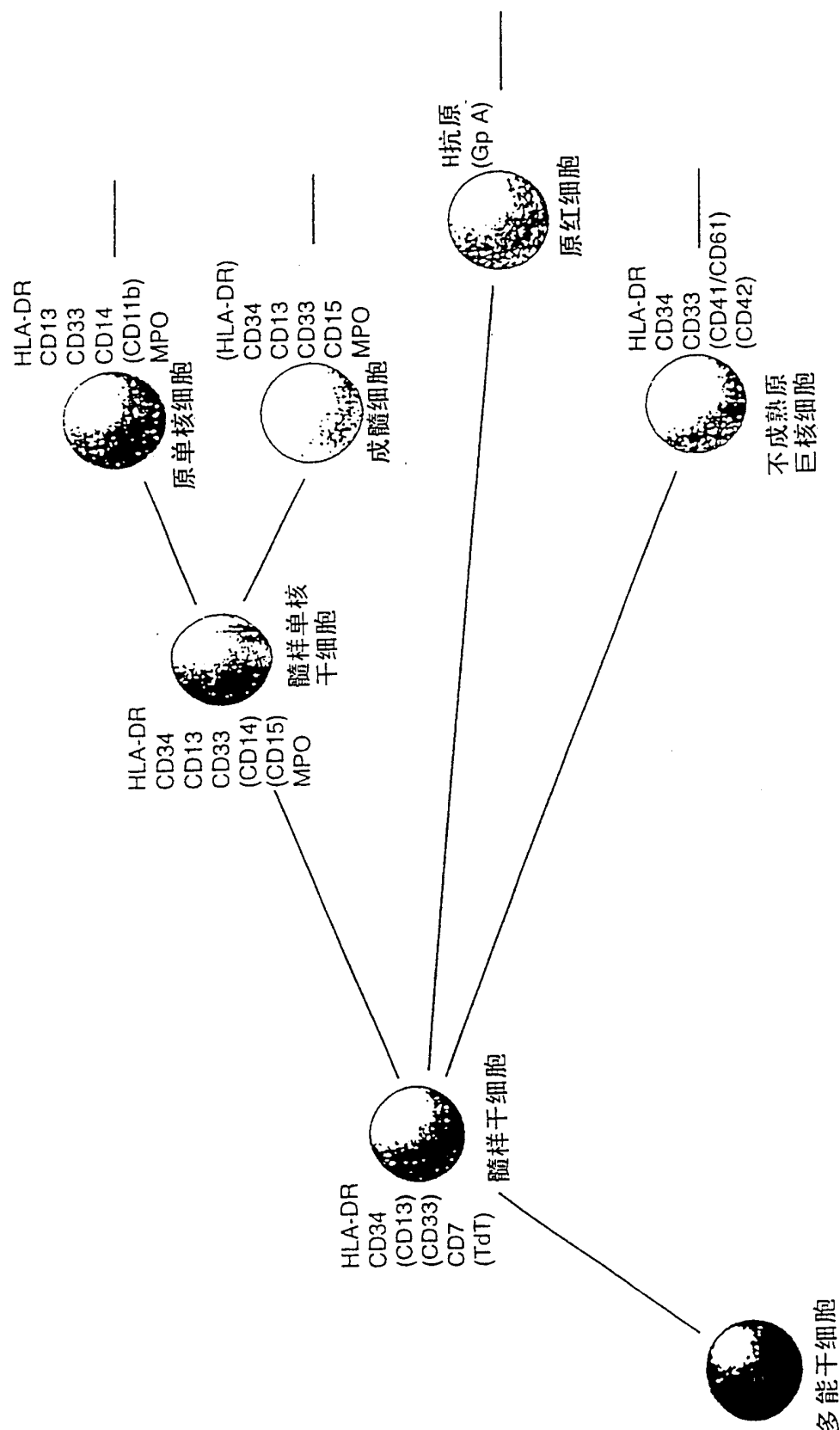


图 2(i)

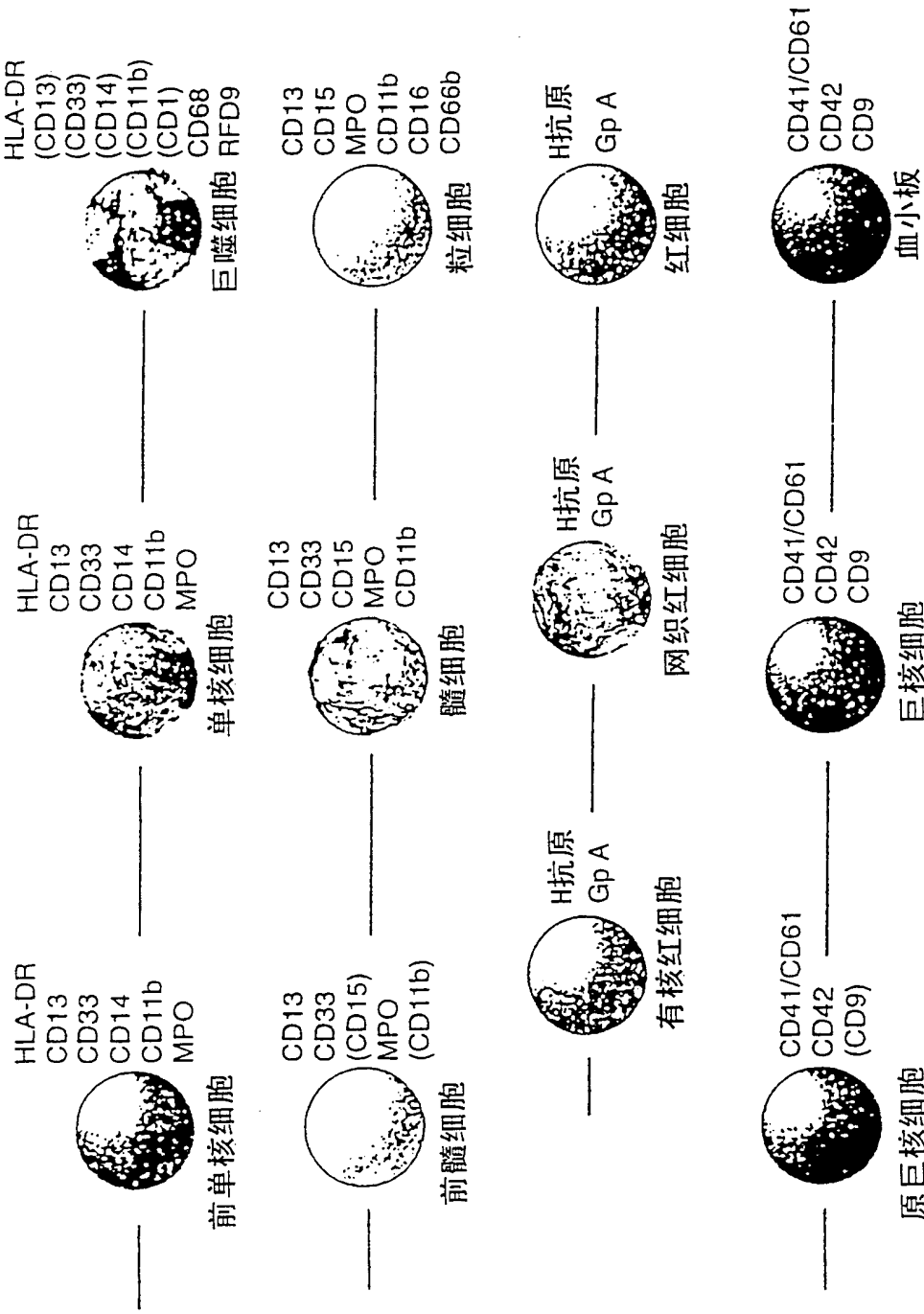


图 2(ii)

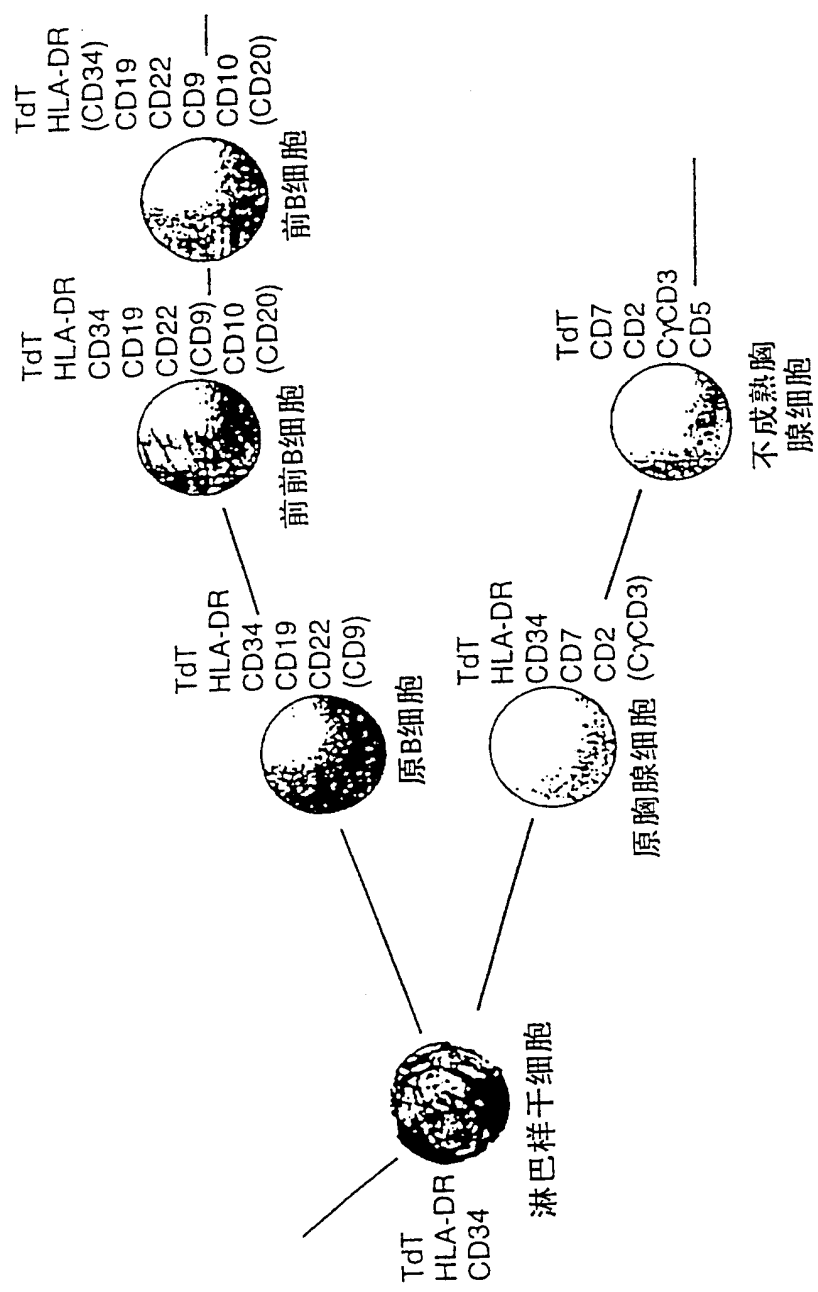


图 2(iii)

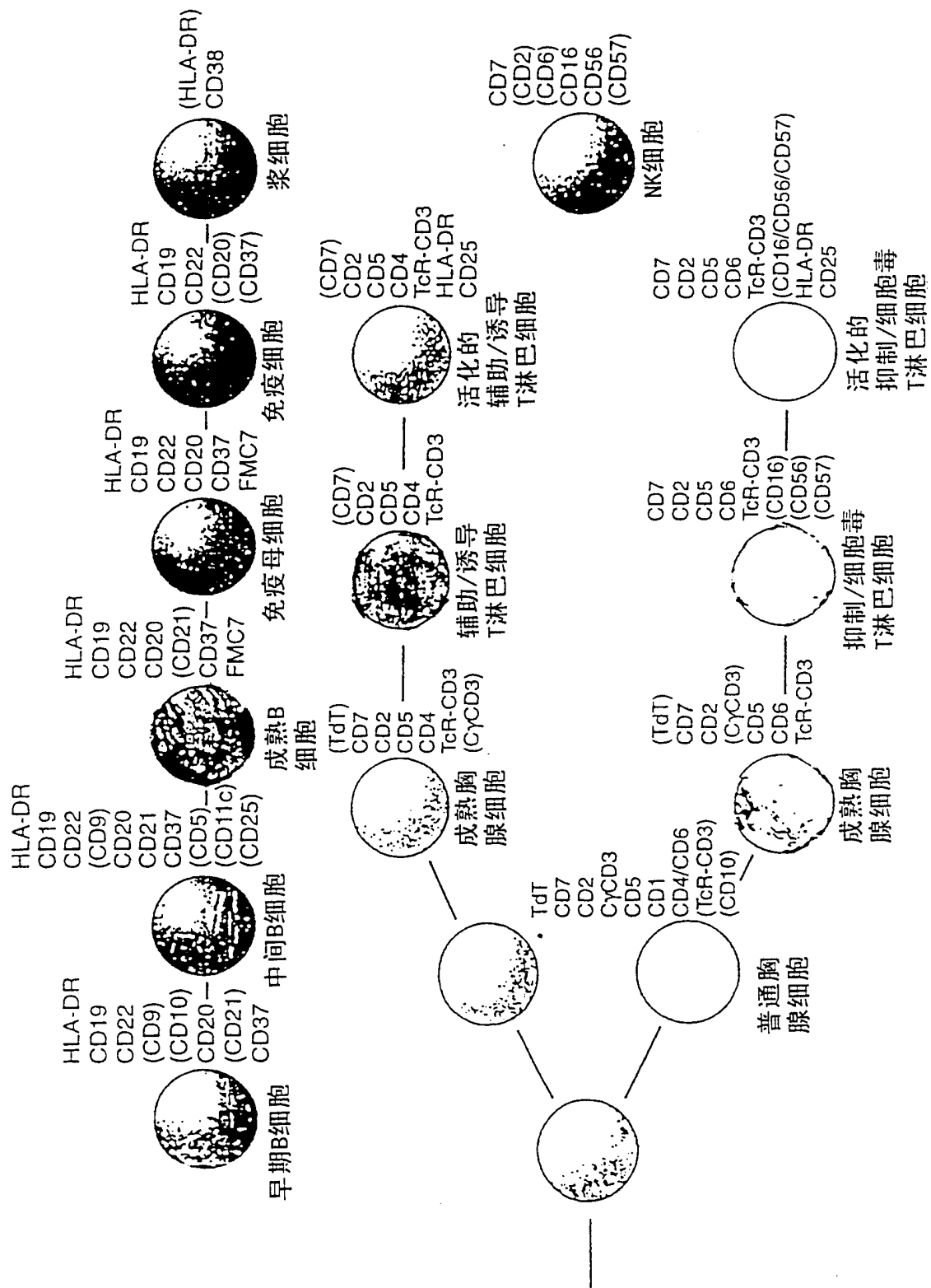


图 2(iv)

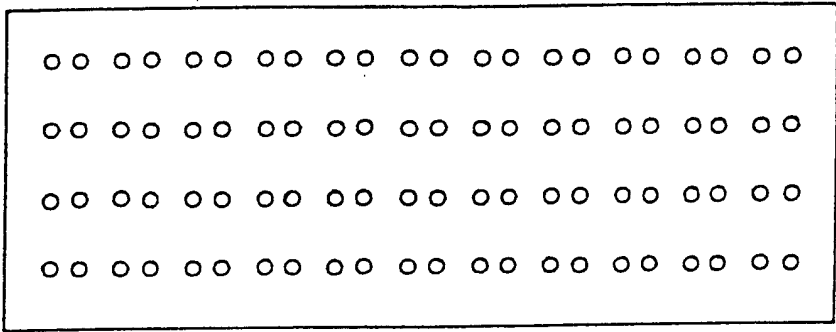


图 3a

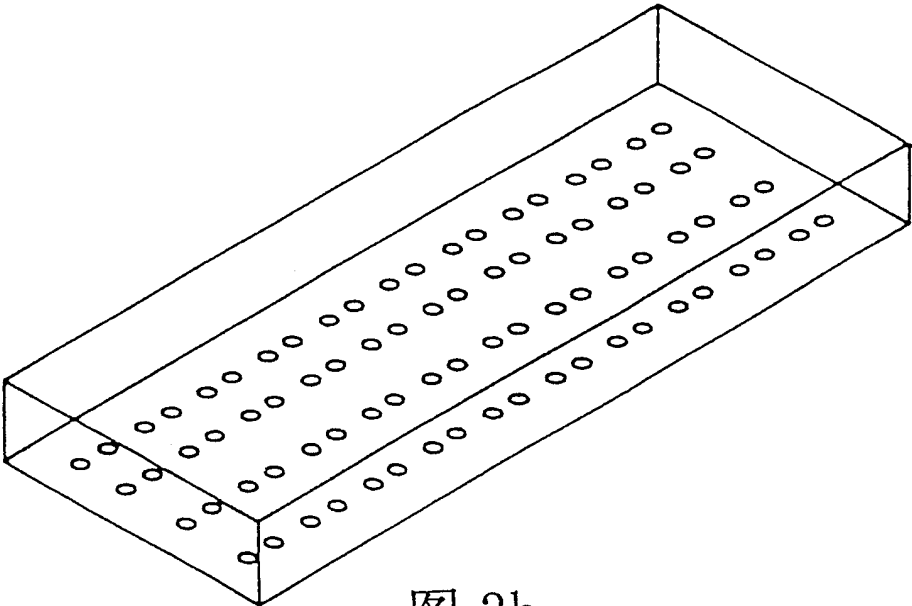
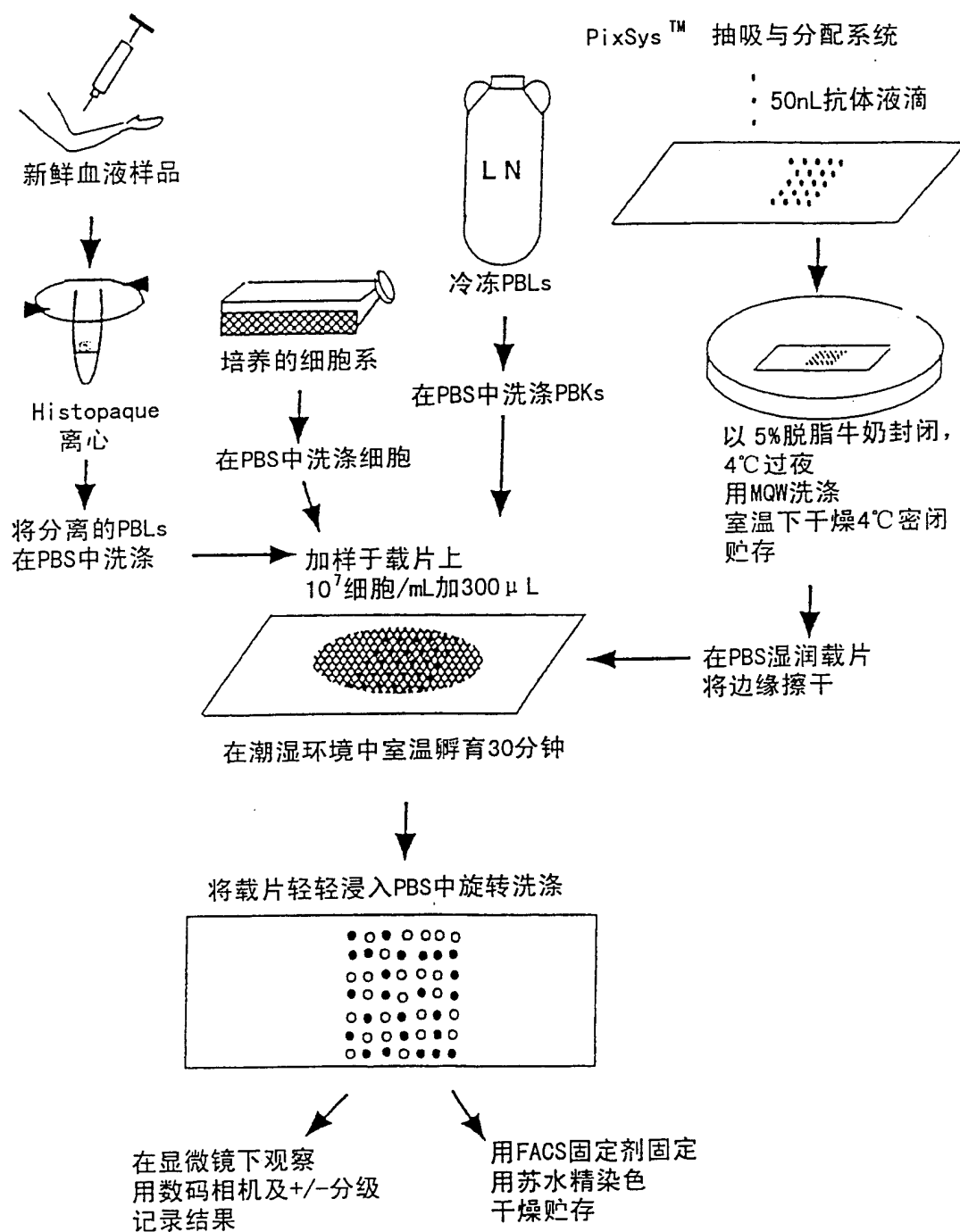


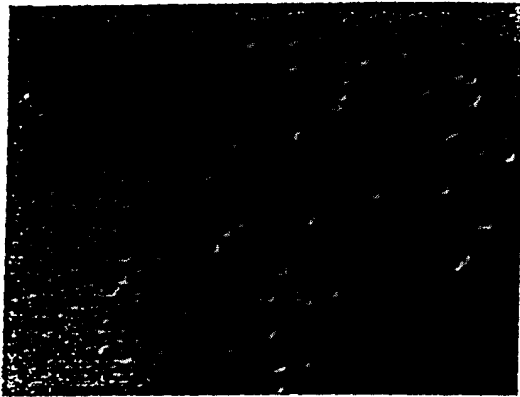
图 3b



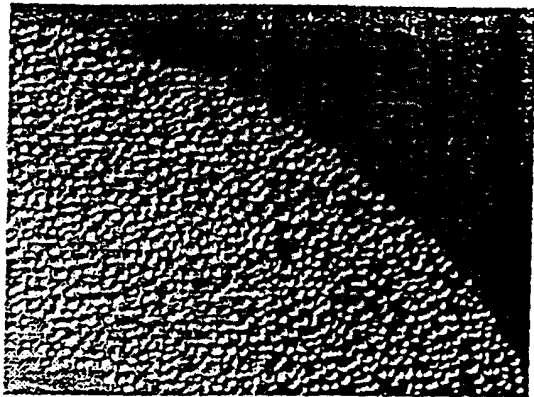
抗体阵列操作流程

图 4

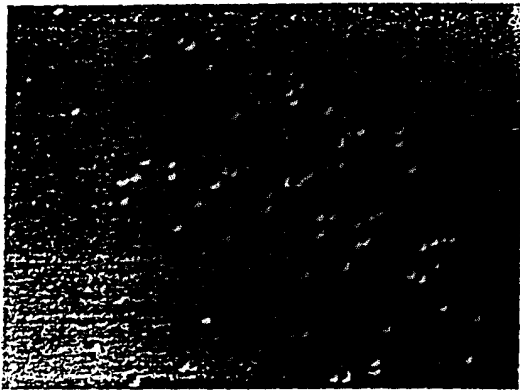
GEM 细胞阵列: T 细胞 ALL
Nomarski 照片



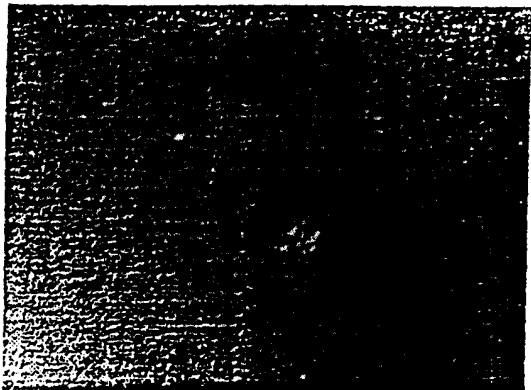
结合少量CD3+细胞的CD3抗体斑点



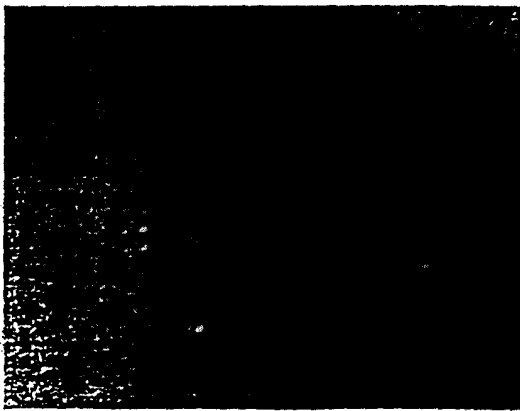
结合CD4+细胞的CD4抗体斑点的清晰边界



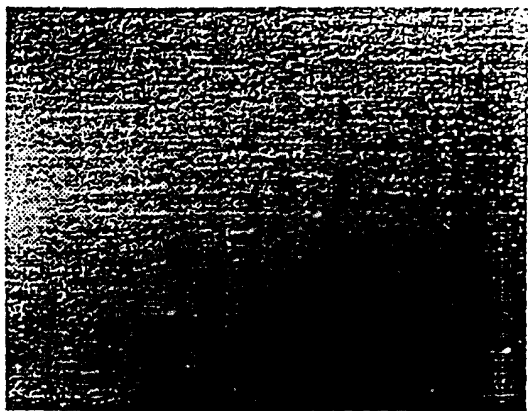
结合少量CD8+细胞的CD8抗体斑点



CD14抗体斑点显示阴性



CD19抗体斑点显示阴性



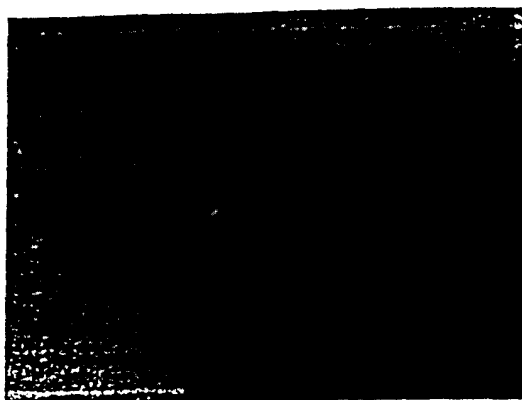
CD56抗体斑点显示阴性

放大X20

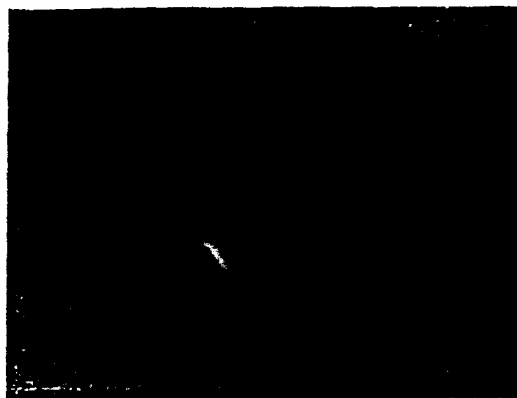
图 5a

RAJI 细胞阵列: B 细胞伯基特氏淋巴瘤

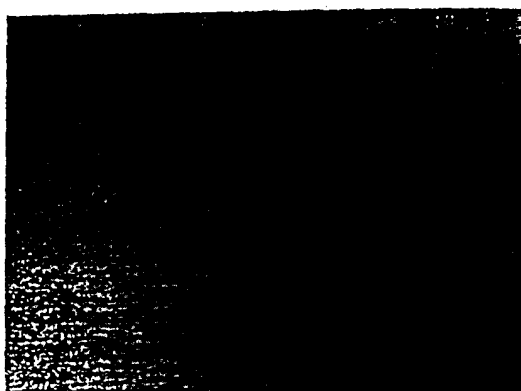
Nomarski 照片



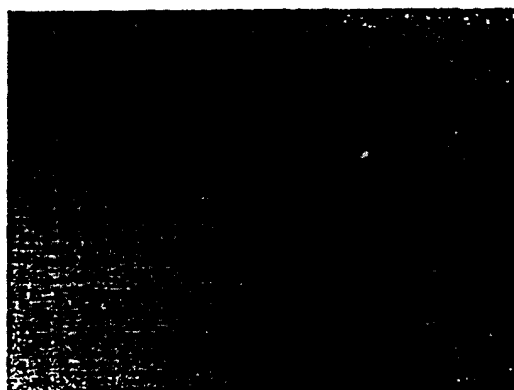
CD3抗体斑点显示阴性



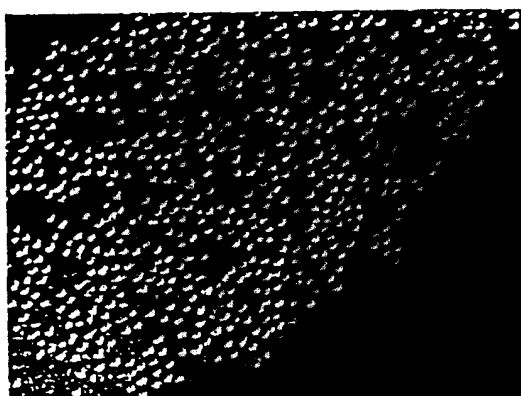
CD4抗体斑点显示阴性



CD8抗体斑点显示阴性



CD14抗体斑点显示阴性



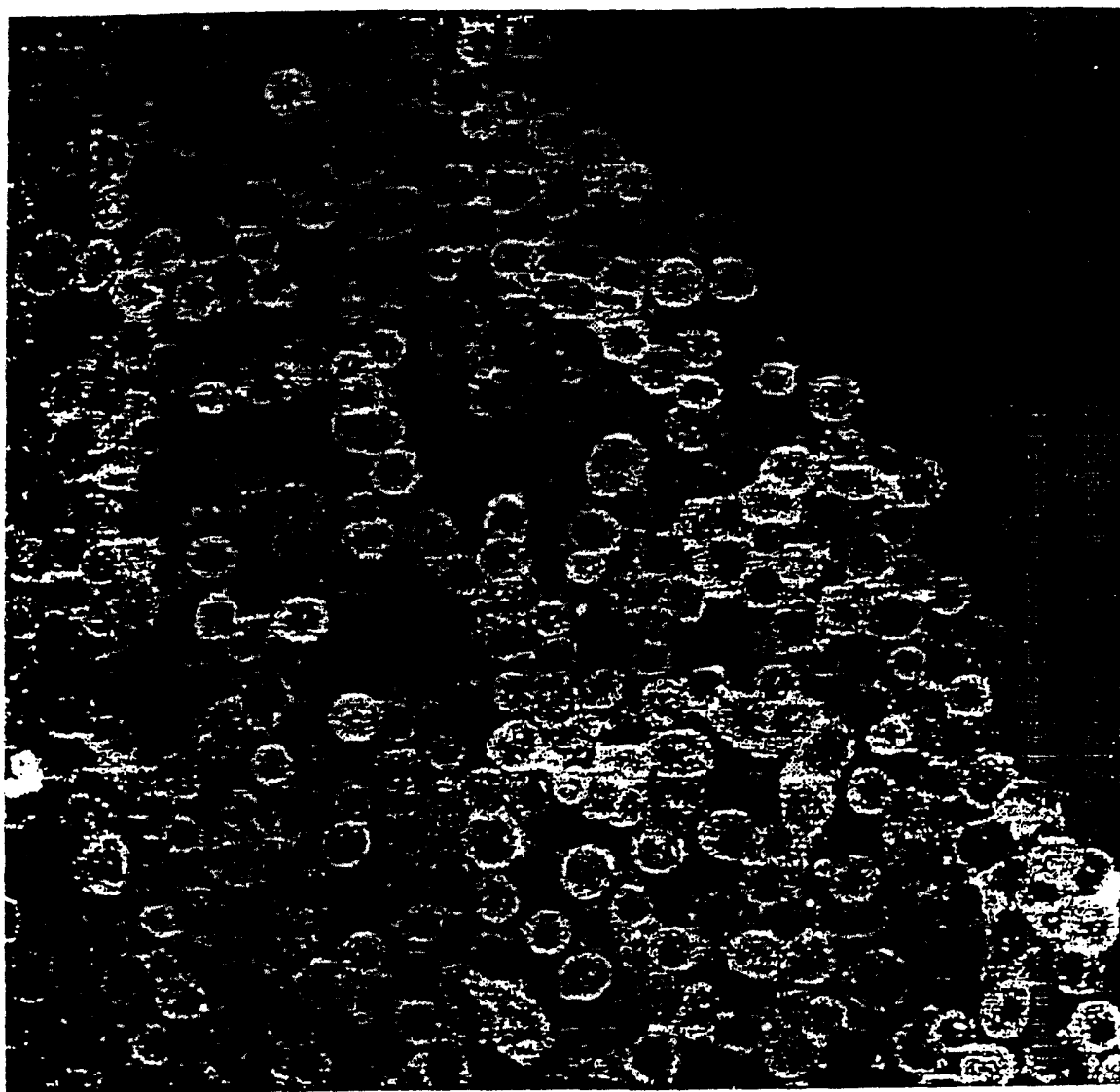
结合 CD19+细胞的 CD19 抗体斑点



CD56抗体斑点显示阴性

放大X20

图 5b



被CD4抗体斑点结合并由结合了CD45抗体的Alexa-488nm标记的CCRF-CEM细胞

图 6

mIgG1	2	3	4	5	7
8	9	10	11b	11c	13
14	15	16	19	20	21
22	23	24	25	33	34
36	37	38	41	42a	44
44 v3-10	44 v6	45	45 RA	45 RO	52
56	57	60	61	71	79a
95	103	117	122	154	GPA
HLA	KOR	FMC7	mIgG2a	mIg2b	mIgM

图 7a

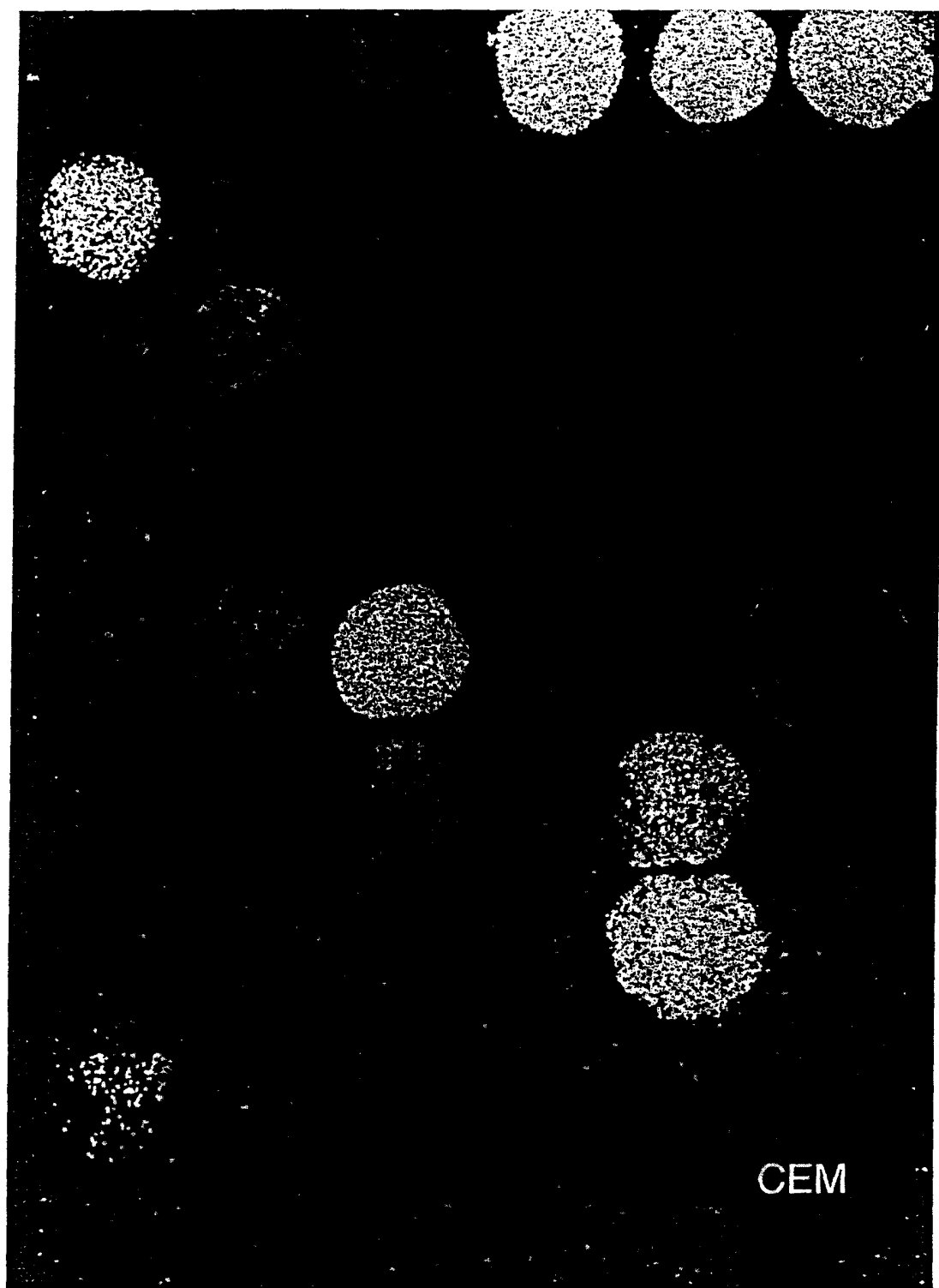


图 7b

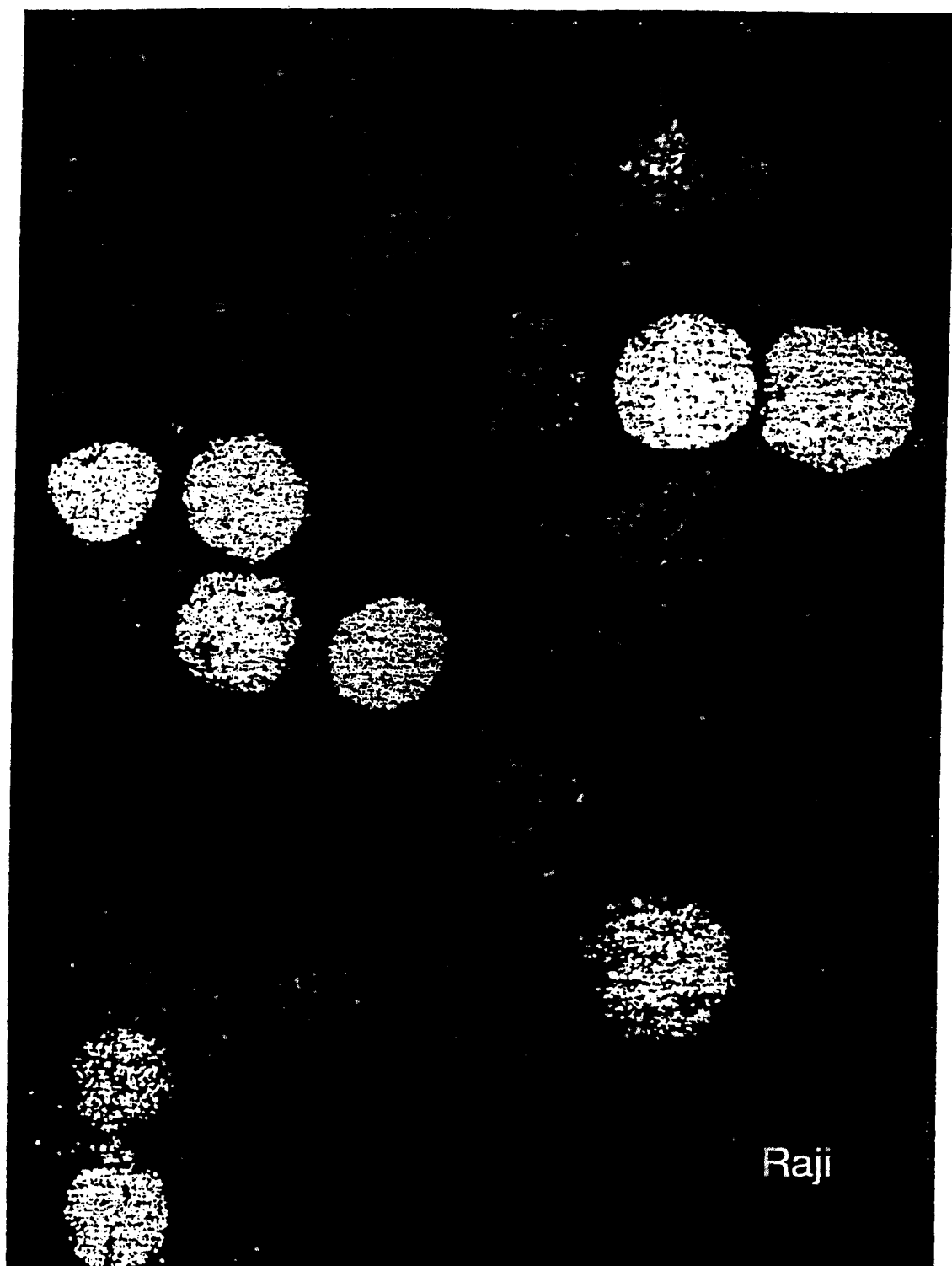


图 7c

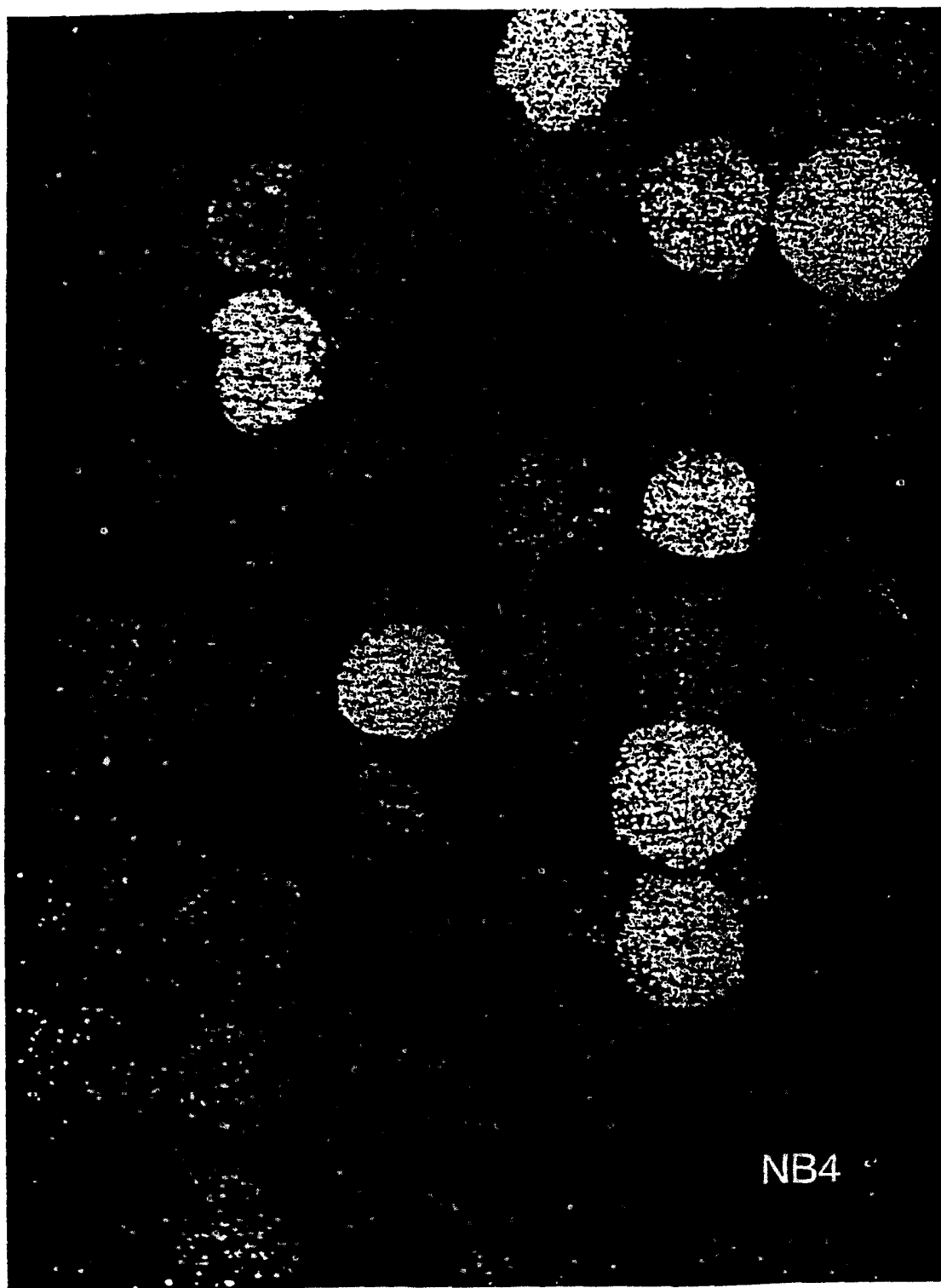


图 7d

mIgG1	2	3	4	5	7
8	9	10	11b	11c	13
14	15	16	19	20	21
22	23	24	25	33	34
36	37	38	41	42a	44
44 v3-10	44 v6	45	45 RA	45 RO	52
56	57	60	61	64	71
79a	79b	80	95	103	117
122	134	138	154	Kappa	Lambda
GPA	HLA	KOR	FMC7	Anti-Ig	IgG2a

图 8a

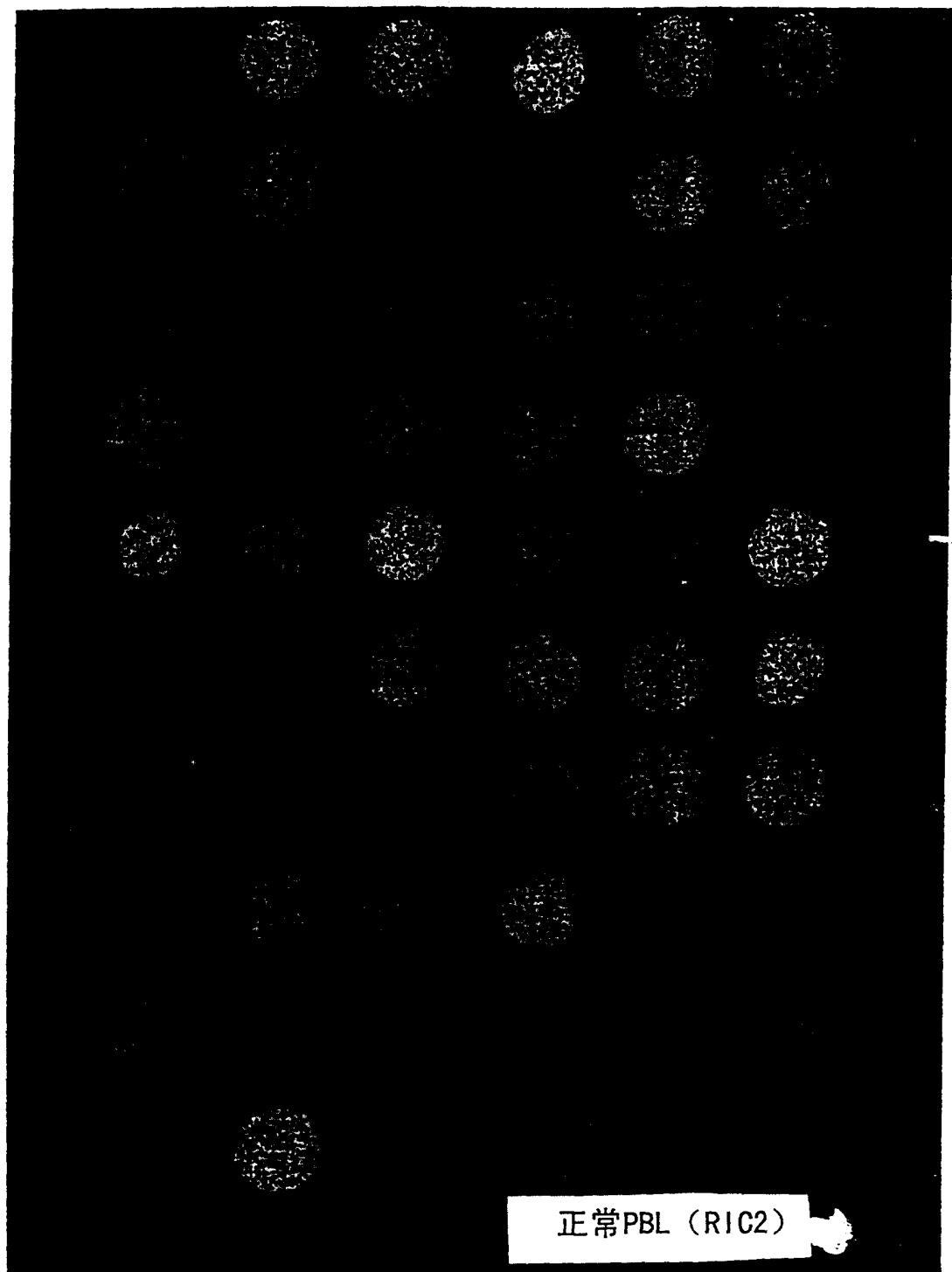


图 8b

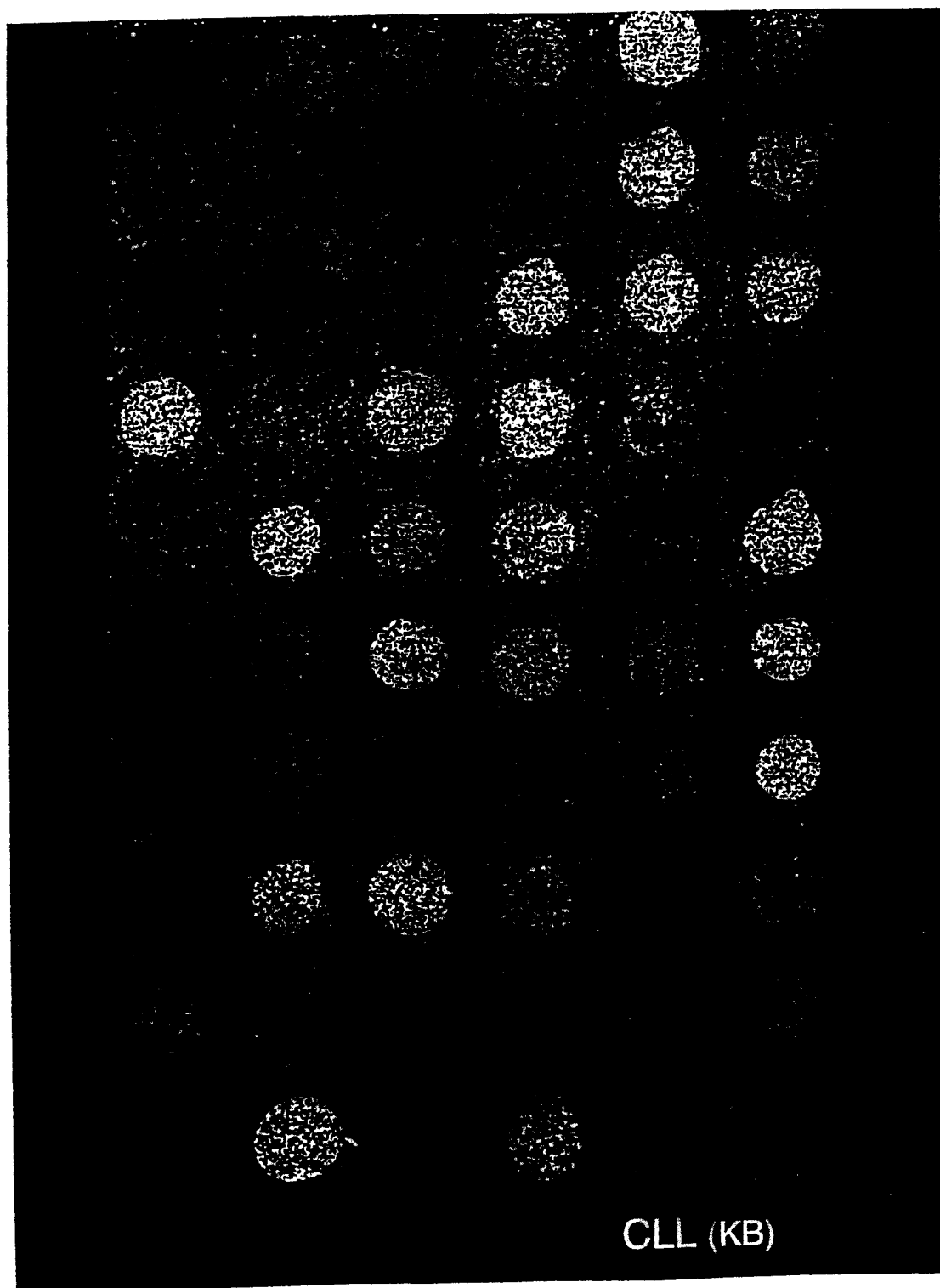


图 8c

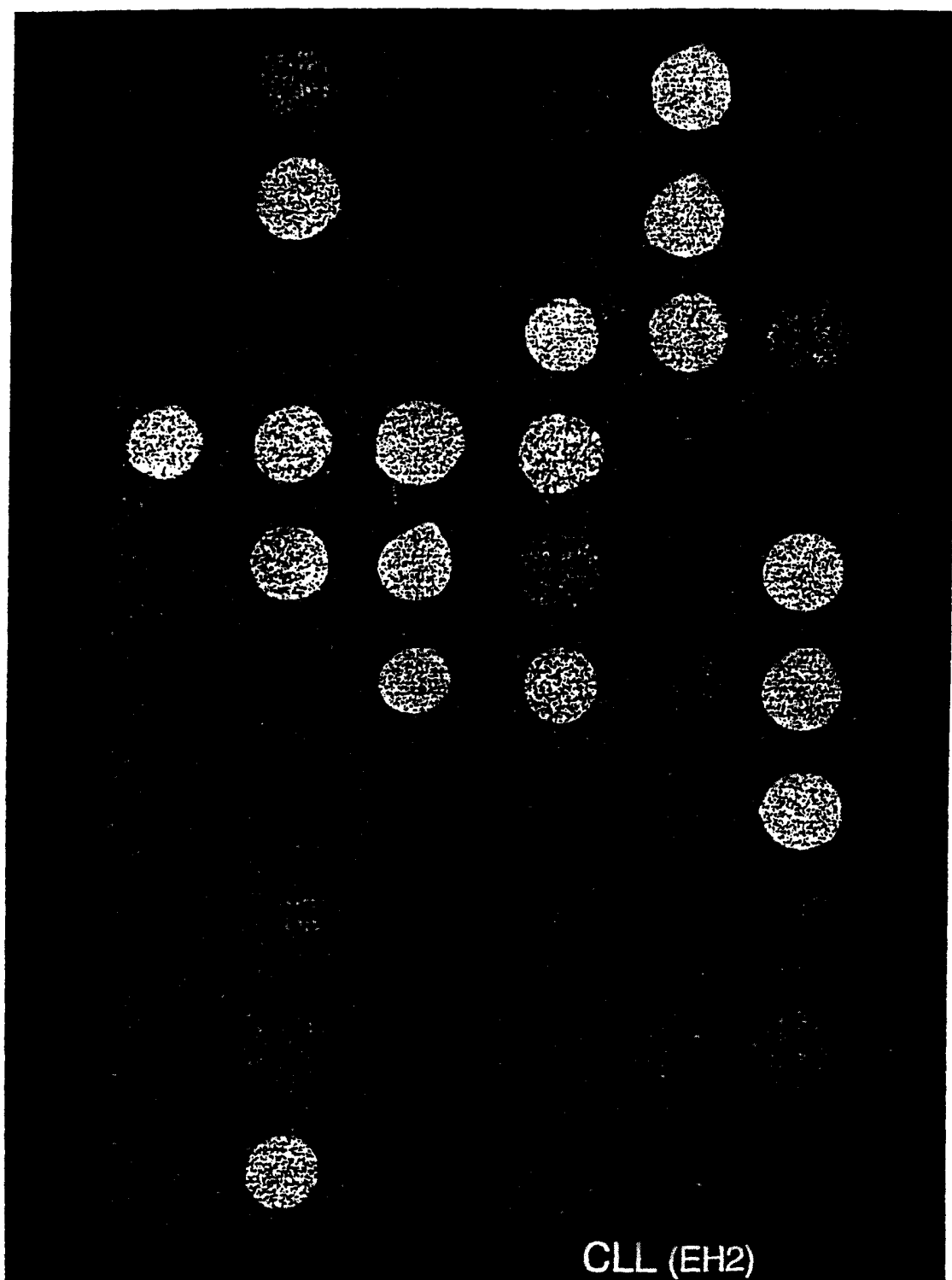


图 8d

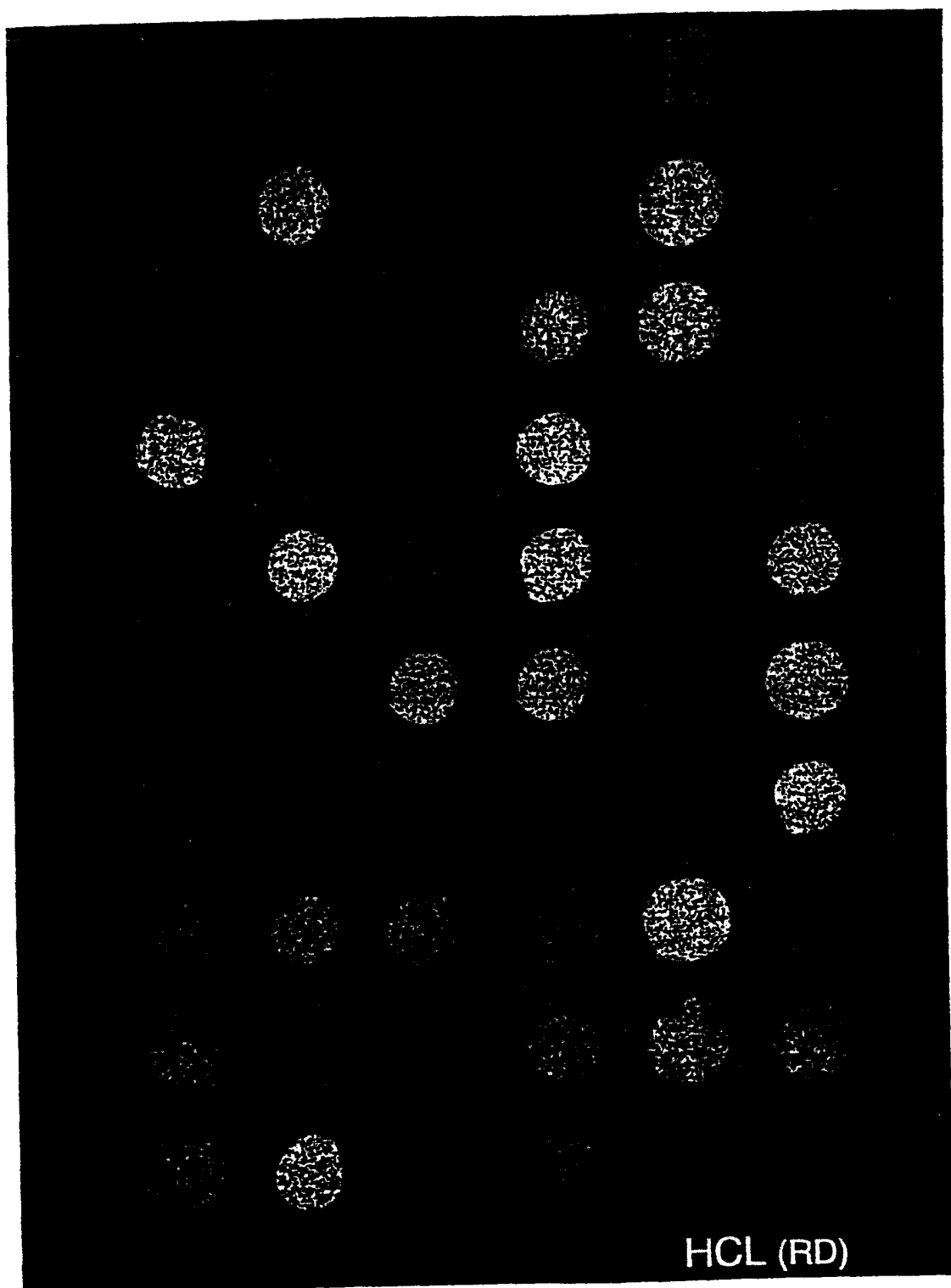


图 8e

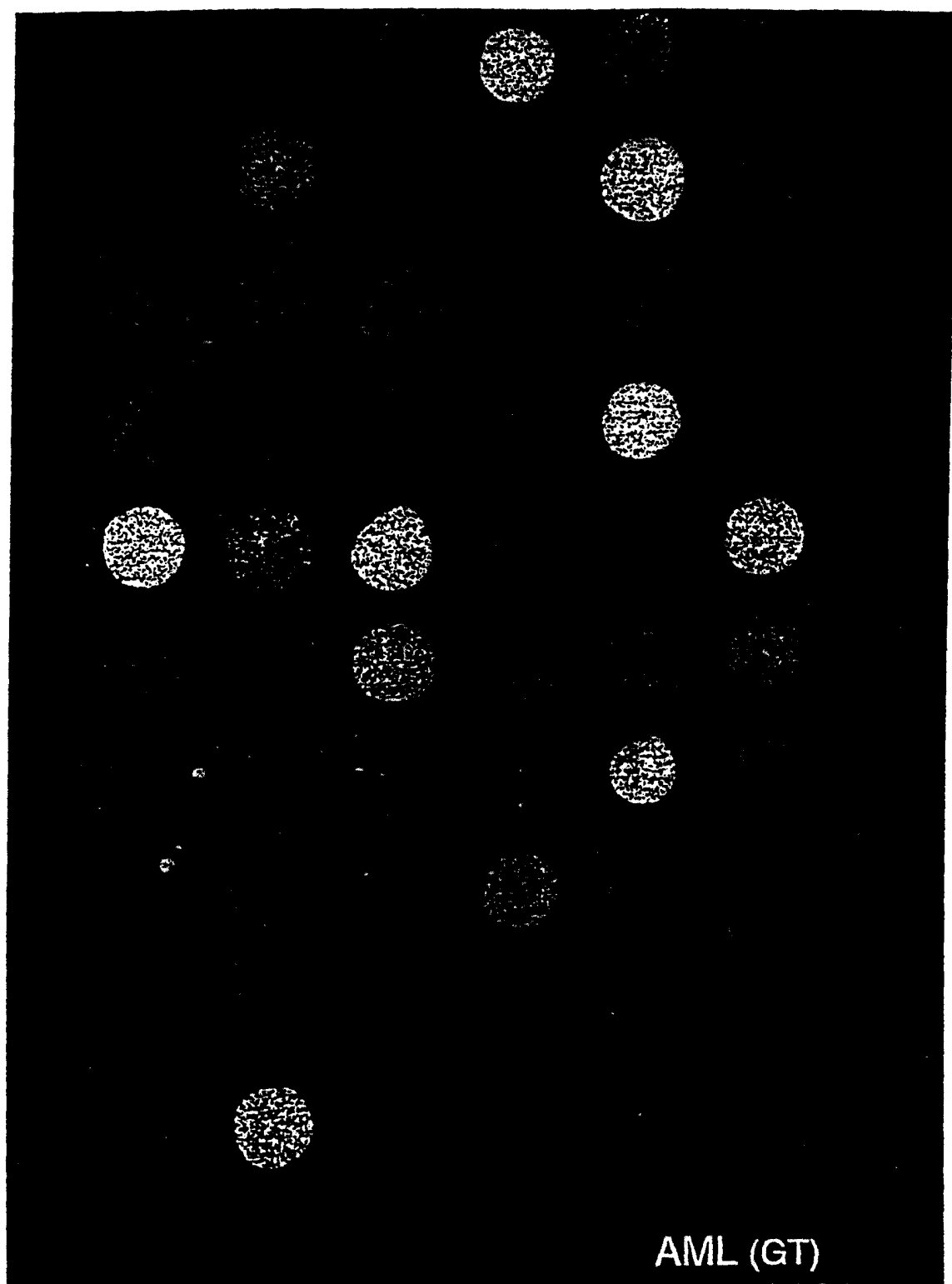


图 8f

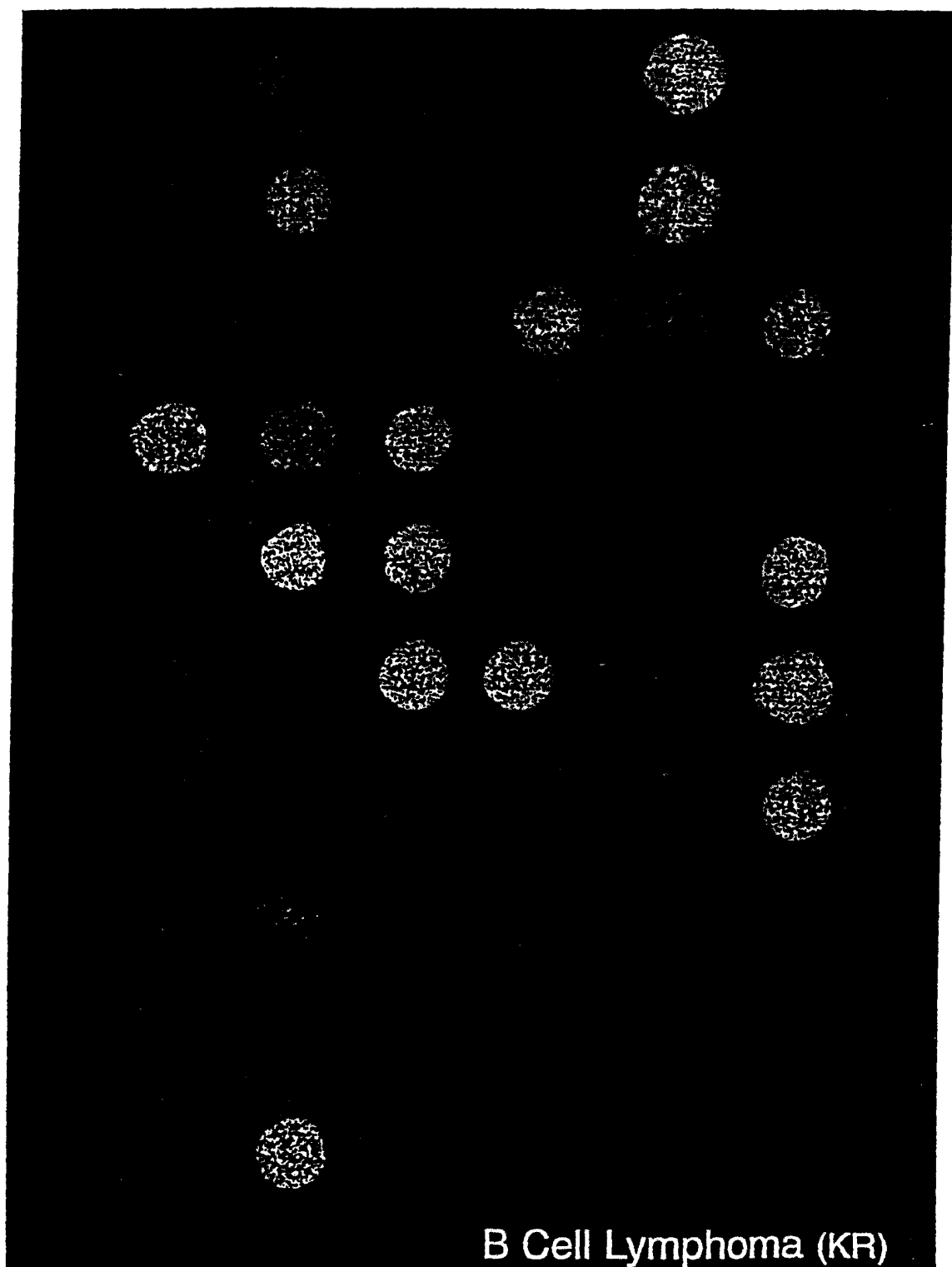


图 8g

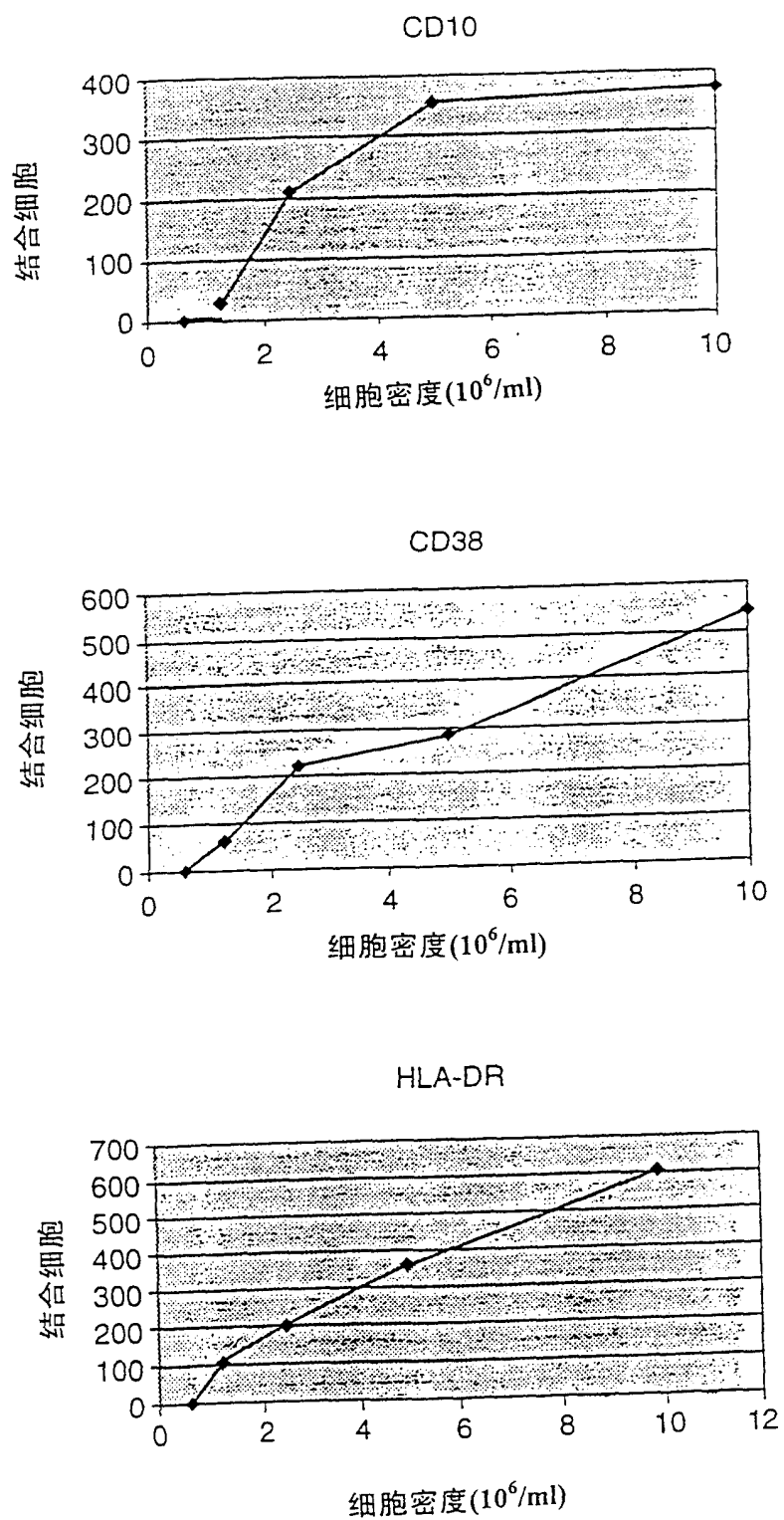


图 9

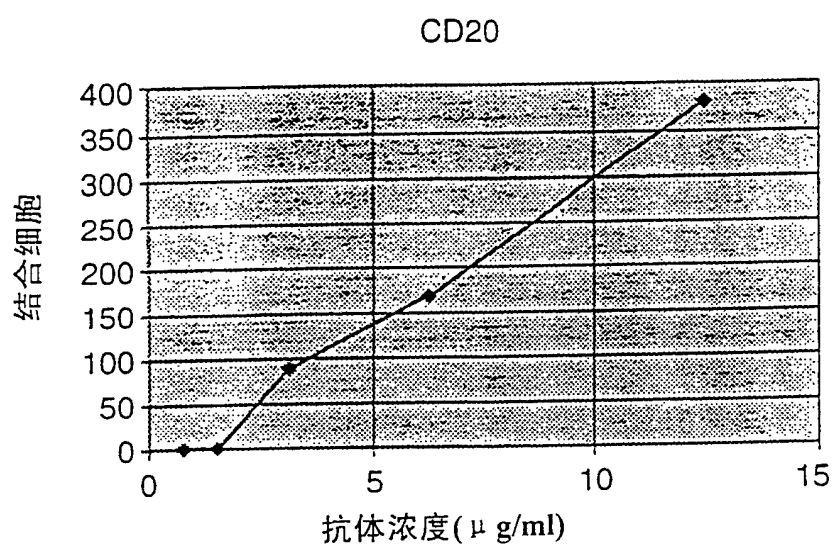


图 10