

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531724

(P2004-531724A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/53 K

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/543 5 7 5

GO 1 N 33/543 5 8 1 D

GO 1 N 33/543 5 8 1 F

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願2002-588195 (P2002-588195)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月10日 (2002.5.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月7日 (2003.11.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/005140
 (87) 国際公開番号 W02002/090989
 (87) 国際公開日 平成14年11月14日 (2002.11.14)
 (31) 優先権主張番号 101 22 806.6
 (32) 優先日 平成13年5月10日 (2001.5.10)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 503291303
 ホルガー・キーゼヴェター
 ドイツ連邦共和国 1 3 4 6 5 ベルリン, ア
 ム・グリュエネンツィプフェル 1
 (71) 出願人 503291314
 アブデュルガーバー・サラマ
 ドイツ連邦共和国 1 3 4 6 7 ベルリン, ロ
 ートスヴェーク 6
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100080355
 弁理士 西村 公佑
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液細胞抗原および該抗原に対して指向される抗体の検出方法

(57) 【要約】

本発明は血液細胞抗原および該抗原に反応する抗体をサンプルで検出する方法に関する。
 本発明はまた上記方法の実施を容易にするキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトのサンプルで血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するインビトロの方法であって、

(i) ビーズを検出する特定の血液細胞抗原に対して指向される非ヒト抗体で被覆し ;
(ii) 付属の特定の選択された血液細胞抗原であって、適切な場合には、それ自体は従来技術で既に公知である標準化された血液細胞を可溶化することによって、また別には組換え方法またはタンパク質化学的方法を用いて得ることができる抗原を、(i) で得られた被覆されたビーズと混合し ;

(iii) 上記選択された抗原と(i) のビーズに結合された非ヒト抗体との結合の結果として抗原で被覆されている上記ビーズを、検査する患者の血清サンプルと混合し ; さらに
(iv) 特異的抗ヒト抗体テストを用いて、上記サンプルに由来し、さらに上記ビーズに結合した抗原と結合することができた患者の血液細胞抗原抗体を検出することを特徴とする上記の方法。 10

【請求項 2】

血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するインビトロの方法であって、

(i) ビーズを非抗ヒト種特異的抗体で被覆し ;
(ii) 標準細胞を可溶化するか、または組換えかもしくはタンパク質化学的方法を用いて得られた血液細胞抗原を溶液にし ;

(iii) (ii) の結果として生じる可溶化物、または組換えかもしくはタンパク質化学的方法を用いて得られた血液細胞抗原の溶液を、検出する抗原に対して指向され、かつ(i) で述べた種に由来する特異的抗体とインキュベートし ; さらに 20

(iv) (i) のビーズと一緒に(iii) で形成された複合体を遠心分離によって単離し ;
さらに

(v) 患者由来の抗体含有血清に対して、凝集テストで、直接検査するか、または後で検査することを特徴とする方法。

【請求項 3】

血液細胞抗原を検出するインビトロの方法であって、

(i) ビーズを検出する特定の血液細胞抗原に対して指向される抗体で被覆し ; 30
(ii) 検査する患者に由来する血液サンプルを、その中に含まれている血液細胞とともに、該血液細胞の膜に存在する抗原が可溶化される処理に付し、さらに適切な場合には抗原濃縮分画を調製し ;

(iii) (i) で得られた被覆ビーズを(ii) で得られたサンプルと混合し ;

(iv) 特異的抗体テストを用いて、上記サンプルに由来し、かつ上記ビーズに結合した抗体と結合することができる血液細胞抗原を検出することを特徴とする方法。

【請求項 4】

血液細胞抗原を検出するインビトロの方法であって、

(i) ビーズを非抗ヒト種特異的抗体で被覆し ; 40
(ii) 検査する患者に由来する血液細胞を可溶化し ;

(iii) (ii) で得られた可溶化物を、検出する抗原に対して指向され、かつ(i) で述べた種に由来する特異的抗体とインキュベートし ;

(iv) (i) のビーズと一緒に(iii) で形成された複合体を遠心分離によって単離し ;
さらに

(v) 凝集テストで上記サンプルを検査することを特徴とする方法。

【請求項 5】

患者の血清サンプルで血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するインビトロの方法であって、

(i) 検出する抗原に対して指向されるビオチン化非ヒト抗体を、対応する天然の血液細胞抗原を保有するヒトテスト細胞と接触させ；

(ii) (i) で生成された複合体を上記血液細胞が可溶化される条件に付し；

(iii) 抗原およびビオチン化抗体からなる上記複合体を、ストレプトアビジン被覆またはアビジン被覆微粒子を用いて上記サンプルから取り出し；

(iv) (iii) で生成された複合体を検査する患者由来の血清サンプルと接触させ；さらに

(v) 抗ヒト抗体テストを用いて、特異的抗体が上記血清サンプルに存在するときにビオチン化抗体、抗原および該血清中のヒト抗体から生成される複合体を、いったん該複合体をサンプルから分離して検出する

ことを特徴とする方法。

【請求項 6】

選択された血液細胞抗原を検出するインビトロの方法であって、

(i) 検出する抗原に対して指向されるビオチン化抗体を、対応する天然の血液細胞抗原を保有するヒトテスト細胞と接触させ；

(ii) (i) で生成された複合体を上記血液細胞が可溶化される条件に付し；

(iii) 抗原およびビオチン化抗体からなる上記複合体を、ストレプトアビジン被覆またはアビジン被覆微粒子を用いて上記サンプルから取り出し；

(iv) (iii) で生成された複合体を、上記抗原に対して指向される好ましくは標識された第二の抗体と接触させ；さらに

(v) 慣例の方法を用いて、ビオチン化抗体、抗原および第二の抗体から生成される複合体を、いったん該複合体をサンプルから分離して検出する

ことを特徴とする方法。

【請求項 7】

蛍光標識または酵素標識抗体が用いられる請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ビオチン化抗体がストレプトアビジン被覆および/またはアビジン被覆されたビーズを用いて結合される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ビーズが球状であり、かつ 0.01 から 10 μ m、好ましくは 2 から 4 μ m の直径を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも、請求項 9 に記載のビーズ、血液細胞抗原に対して指向される特異的抗体、および特異的抗ヒト抗体を含む、血液細胞抗原または血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するキット。

【請求項 11】

少なくとも、請求項 9 に記載のビーズ、第一の非抗ヒト種特異的抗体、およびまた検出する抗原に対して指向され、かつ第一の抗体が指向される種に由来する抗体を含む、血液細胞抗原または血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液細胞上の抗原を検出する方法または該抗原に対して指向される抗体をヒトの血中で検出する方法に関する。本方法は、患者から採取された血液を用いて *in vitro* で実施される。

【背景技術】

【0002】

今日では特定の疾患の診断は、赤血球および白血球並びに血小板に由来する選択された抗原を検出するか、また別にはこの抗原に対して指向される特異的抗体を患者の血中で検出することを必要とする。

10

20

30

40

50

【0003】

血液細胞抗原は、赤血球、血小板および白血球上の表面マーカー（特徴）である。それら抗原は通常は、糖タンパク質、糖脂質またはタンパク質である。この点に関する要旨は、例えば以下の成書で見出すことができる：Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt（編）、Springer-Verlag Berlin（1999）、pp.137-200。

【0004】

これら血液細胞抗原の臨床的な重要性は、それらの免疫原性、すなわち、例えば通常の環境下ではこれらの抗原を保有していない個体で輸血後に、特異的抗体の生成を刺激する能力によって確認される。

【0005】

血液細胞抗原に対して指向される上記抗体の生成はまた、例えば出生後に、血液型群同種凝集素の場合のように（抗Aおよび抗B）、または妊娠、器官移植もしくは骨髄移植の背景状況の中で選ばれる同種異系細胞によって、誘発され得る。対応する抗体の例は、赤血球に対して指向される抗D、抗K、抗Fyなど、血小板に対して指向される抗HPA-1および抗HPA-2、顆粒球に対して指向される抗INA-1および抗INA-2、またはHLAクラスIおよびHLAクラスIIに対して指向される抗体である。

【0006】

上記の他に、抗体はまた内因性抗原に対してもまた生成され得る（自己抗体）。これらの抗体は、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症または自己免疫性好中球減少症（顆粒球減少症）の事例のように自己由来細胞の成熟前の分解または崩壊をもたらし得る。

【0007】

胎児および新生児では、赤血球に対して指向されるアロ抗体、特に免疫抗体（例えば抗Dおよび抗C）は種々の重篤度をもつ溶血（新生児溶血症）を生じる。

【0008】

同種凝集素および臨床的に関連を有するアロ抗体は、赤血球を用いる輸血の前に考慮しなければならない。通例は、血清学的に認容できない赤血球はいずれも輸血することができない。例えば、（Rh陰性）レシピエントが抗D特異性を有するアロ抗体を保有するとき、Rh陽性赤血球は凝集する。このような理由で、輸血前に赤血球に対して指向される抗体を特定して輸血中にそれらを考慮する必要がある。さらにまた、輸血前には常に、輸血用に保存されている保存血サンプルの全てを用いて血清学的寛容検査（クロステスト）を実施する必要がある。

【0009】

今日まで、赤血球抗原に対して指向される抗体は、日常的には、血清サンプルを天然の選択されたテスト赤血球とインキュベートするか（抗体検索さらに適切な場合には抗体特定）、または輸血前にドナー赤血球とインキュベートする（クロステスト）ことによって検出されてきた。血清と赤血球間の不耐性は、検査時に赤血球の直接または間接凝集によって示される。例えば同種凝集素抗Aおよび抗Bは赤血球の直接凝集を誘発する。間接凝集は、例えば抗DをRh陽性テスト赤血球とインキュベートし、続いて抗ヒトグロブリン血清を添加することによって（間接クームス試験）誘発される。

【0010】

テスト赤血球を用いる欠点は、あるテスト赤血球の選別、希少性および入手可能性並びに前記細胞の保存時間が短いことから生じる。前記細胞を単離するためには、既知の抗原を保有する選択されたドナーを定期的に検索することが必要で、単離された細胞は短期間しか保存できない。

【0011】

これまでに記載されてきた実質的に全ての検査方法は前記のような細胞の使用に依存している（以下を参照されたい：Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt（編）、Springer-Verlag Berlin（1999）、pp.587-596およびNew diagnostic methods in oncology and hematology, Huhn（編）Springer Verlag, Berlin, 1998, pp. 197-212）。

10

20

30

40

50

【0012】

これらの方法に付随する欠点はしたがって以下のとおりである：

* 単離された（単一）特性を有する赤血球（例えば特徴的な“D”のみを保持する細胞）を得ることが可能でないので、特異的抗体を識別するために、いくつかの（通常は11を越える）テスト赤血球（テスト細胞）を各検査につき使用する必要がある。

【0013】

* 特定の抗体を認識する稀な特徴を有するテスト赤血球は通常は入手することができない。上記の理由のために患者の看護が常には保証できない。

【0014】

* 一般的に、通常存在する特徴を欠くテスト赤血球は、特異的抗体の認識のためには利用できない場合が多い。このためにまた患者の看護が常には保証できない。 10

【0015】

* 適切なテスト細胞を選択することは複雑で費用のかかる事柄である。

【0016】

* 上記材料はヒトから単離される生物学的材料であるので、該材料を取り扱う医療従事者および医師の感染の危険性を常に排除できない。

【0017】

* 上細胞は限定された期間しか保存できない。

【0018】

血小板抗原に対して指向される抗体の臨床的重要性は、自己免疫性血小板減少症（A I T P）、新生児アロ免疫性血小板減少症（N A I T）、輸血後紫斑病（P T P）および不適切な血小板輸血で示される。いずれの場合でも、抗体は止血の主要な混乱および患者の出血性素質をもたらし得る。 20

【0019】

これまでのところ血小板に対して指向される抗体を検出することは困難で、そのような検出は少数の専門検査室でのみ実施可能である。血小板の性質のために、これまでのところ赤血球の場合のような簡便で迅速な凝集テストの開発は可能ではなかった。もっとも頻繁に用いられるこれまでに報告された方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）および血小板吸着免疫蛍光検査（P I F T）、並びに、結合免疫グロブリンを特定するための免疫沈澱またはM A I P A（血小板抗原のモノクローナル抗体固定化）アッセイである 30（以下を参照されたい：Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt（編）、Springer-Verlag Berlin（1999）、pp.597-602；New diagnostic methods in oncology and hematology、Huhn（編）Springer Verlag, Berlin, 1998, pp. 213-228；McMillan, Transfusion Medicine Reviews, Vol.IV, No.2, pp136-143(1990)）。

【0020】

上記の方法は以下の多様な欠点を有する：

* 全ての検査方法は、標準化血小板が通常入手不能であるので労働集約型であり、さらにエキスパートのみがその検査を実施できる。

【0021】

* 例えばE L I S AまたはM A I P Aで、自己血小板、または血小板の数が少ない患者の場合、十分な数の自己血小板の単離および検査がしばしば不可能である。 40

【0022】

* 特異性（E L I S AおよびP I F T）および感度（M A I P A）は限定的であり、結果としてしばしば結果を解釈することができない。

【0023】

* 赤血球抗原の検出に関連して上記で述べた欠点の本質的に全てが本欠点にも適用される。

【0024】

好中球依存抗原に対して指向される抗体の臨床的重要性は、自己免疫性好中球減少症、新生児アロ免疫性好中球減少症およびT R A L I（輸血付随急性肺不全）によって特徴付け 50

られる。本抗体の検出は血小板抗体の検出よりもさらに困難である。これまでに知られている検査方法は、血小板に対して指向される抗体の検出方法を広範囲に応用している（以下を参照されたい：Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt (編), Springer-Verlag Berlin (1999), pp.603-609; New diagnostic methods in oncology and hematology, Huhn (編) Springer Verlag, Berlin, (1998), pp. 228-235; Minchinton and Waters, British Journal of Haematology, 56, pp.521-528, (1984), McCullough and William, Transfusion Medicine Reviews, Vol.1, No.3, pp150-160(1987))。

【0025】

さらにまた、リンパ球（特にTリンパ球）に対して指向される抗体は移植免疫学において極めて重要である。これらの抗体は移植体（骨髄、心臓、肺臓、腎臓および他の器官）の急性または遅延性拒絶を生じ得る。この理由のために、骨髄および腎臓移植を実施する前に、ドナー器官に対して指向されるリンパ球性抗体の存在を一切排除することが必要である。

10

【0026】

さらにまた、リンパ球抗原（HLA抗原）は、妊娠および輸血に関連してHLA特性に対して指向される特異的抗体の生成をもたらす得る。この理由から、その抗体の存在の可能性は、該当する場合には移植、並びに血小板および白血球の輸血に関連して考慮する必要がある。

【0027】

HLA抗体を検出する古典的な方法はこれまでのところリンパ球細胞毒性検査に限定されていた。しかしながら、この検査は補体活性化抗体の測定に用いることができるだけである。最近用いられているELISA法は極めて難しく、一部の専門検査室でのみ実施される（以下を参照されたい：Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt (編), Springer-Verlag Berlin (1999), pp.611-617; Zacharyら, Transplantation, Vol.60, No.12, pp.1600-1606 (1995); Lubenko および Rodi, Transfusion, Vol.38, pp.41-44 (1998))。

20

【0028】

要約すれば、血液細胞に対して指向される抗体を検出する全ての検査原理は、選択された生物学的な、さらに通常は天然のテスト細胞に基づく。この細胞は、選択された個体から得られ、続いて利用可能にされる。

30

【0029】

比較的迅速で単純な検査は、赤血球に対して指向される通常的抗体、例えば抗D抗体の検出についてのみ可能である。

【0030】

別の選択肢についての探索はこれまでのところ成功していない。

【0031】

ほとんどの血液型系（赤血球、血小板および白血球）の遺伝子がこれまでにクローニングされ、それらのいくつかは配列が決定されたが、組み換え抗原およびペプチドは、あっても抗体検出のために単離された事例でのみ用いられている（Bowditchら, Blood, Vol. 88 (12): 4579-4584 (1996); Petersonら, Blood, Vol. 92(6): 2053-2063 (1998); Yazdanbakhsh, Transfusion Medicine Reviews, Vol. 15(1):53-66 (2001))。

40

【0032】

上記で述べたMAIPA検査においてさえも（ここで抗体は間接ELISA試験を実施するためにマイクロタイタープレートに固定される）、操作に多くの実際的な問題がなお存在する。したがって、この検査は約7～8時間を要し、検査結果はしばしばあいまいである。さらに、被覆したマイクロタイタープレートを十分に長期にわたって保存することは不可能で、適切な溶液は全て検査室で実施に際して新しく調製しなければならない。

【0033】

Meyerら（THE LANCET, Vol. 354(9189):1525-1526 (1999)）は、抗原被覆ビーズに患者の血清サンプルを添加することによって、粒子凝集テストで血小板因子4およびヘパリンか

50

ら成る複合体に対して指向される抗体を検出することができる検査系を報告した。凝集サンプルは、ゲルカードテストによって検出された（例えば以下を参照されたい：Salama and Mueller-Eckhard in: Transfusionsmedizin [Transfusion medicine]、Mueller-Eckhardt (編)、Springer-Verlag Berlin (1999)、pp.587-617）。しかしながら、かれらの精力的な努力にもかかわらず、発明者らは、この比較的迅速で実施が容易なテストを他の血液細胞抗原またはこの抗原に対して指向される抗体の検出に用いることには成功しなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0034】

選択された血液細胞抗原に対して指向される抗体の検出に用いることが可能で、さらに上記に挙げた欠点を克服することができるテスト系に対する、上記に述べた事柄から必然的に生じる極めて強い必要性があるにもかかわらず、そのようなテスト系は本発明の前には利用可能ではなかった。

【0035】

米国特許第6203706号は、例えば血液細胞抗原または血液サンプル中の抗体の検出に用いられる方法を開示している。しかしながら、その該当する方法（抗原が直接ビーズに結合されている）は、稀な事例でのみ機能することが判明した。

【0036】

上述の先行技術から見れば、本発明はしたがって、選択された血液細胞抗原に対して指向される抗体を特異的に検出するために、または血液細胞抗原自体を検出するために用いることが可能な方法を利用できるようにするという目的をベースにしていた。本方法は、操作が簡単で迅速であり、その実施に信頼性があり経済的である。さらにまた、本方法は生きている生物から得ることができるサンプルでインビトロで実施することが可能であるはずである。

【0037】

本発明の目的および他の目的（明示的には述べられていないが、紹介することにより本明細書で考察されている関連事項から容易に推測または推論できる）は、特許請求の範囲1から4の全ての特徴を有する方法によって達成される。本発明の新規な方法の都合の良い改変は付随するサブクレームで保護される。

【課題を解決するための手段】

【0038】

変法1：

インビトロの方法で、以下の手段によって達成される：

(i) ビーズを検出されるべき特定の血液細胞抗原に対して指向される非ヒト抗体で被覆し；

(ii) 付属の特定の選択された血液細胞抗原であって、適切な場合には、それ自体は従来技術で既に公知である標準化された血液細胞を可溶化することによって、また別には組換え方法またはタンパク質化学による方法を用いて得ることができる抗原を、(i)で得られた被覆ビーズと混合し；

(iii) 上記選択された抗原と(i)のビーズに結合された非ヒト抗体との結合の結果として抗原で被覆されている該ビーズを、検査されるべき患者の血清サンプルと混合し；さらに

(iv) 特異的抗ヒト抗体テストを用いて、上記サンプルに由来し、さらに上記ビーズに結合した抗原と結合することができた患者の血液細胞抗原抗体を検出する。

【0039】

そしてこれは、容易には予測できない態様であって、血液細胞抗原に対して指向される抗体をサンプル中で検出する方法を利用可能にし、検出の容易な実施を可能にする。

【0040】

変法2：

10

20

30

40

50

ただ、以下の場合血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出する新規な方法のわずかな改変を示す：

- (i) ビーズを非抗ヒト種特異的抗体で被覆し；
- (ii) 標準細胞を可溶化するか、または組換えもしくはタンパク質化学的方法を用いて得られた血液細胞抗原を溶液にし；
- (iii) (ii) の結果として生じる、上記可溶化物、または組換えもしくはタンパク質化学的方法を用いて得られた血液細胞抗原の溶液を、検出されるべき抗原に対して指向され、かつ (i) で限定される種に由来する特異的抗体とインキュベートし；さらに
- (iv) (i) のビーズと一緒に (iii) で形成された複合体を遠心分離によって単離し；さらに
- (v) 患者由来の抗体含有血清に対して、凝集テストで直接検査するか、または後で検査する。

10

【 0 0 4 1 】

変法 3：

インビトロの方法はまた以下によって達成される：

- (i) ビーズを検出されるべき特定の血液細胞抗原に対して指向される抗体で被覆し；
- (ii) 検査されるべき患者に由来する血液サンプルを、その中に含まれている血液細胞とともに、該血液細胞の膜に存在する抗原が可溶化される処理に付し、さらに適切な場合には抗原濃縮分画を調製し；
- (iii) (i) で得られた被覆ビーズを (ii) で得られたサンプルと混合し；
- (iv) 特異的抗体テストを用いて、上記サンプルに由来し、かつ上記ビーズに結合した抗体と結合することができる血液細胞抗原を検出する。

20

【 0 0 4 2 】

変法 4：

さらにまた以下によってサンプル中の血液抗原を検出することができる：

- (i) ビーズを非抗ヒト種特異的抗体で被覆し；
- (ii) 検査されるべき患者に由来する血液細胞を可溶化し；
- (iii) (ii) で得られた可溶化物を、検出されるべき抗原に対して指向され、かつ (i) で限定される種に由来する特異的抗体とインキュベートし；
- (iv) (i) のビーズと一緒に (iii) で形成された複合体を遠心分離によって単離し；
- さらに
- (v) 凝集テストで上記サンプルを検査する。

30

【 0 0 4 3 】

新規な本方法は、特に操作が簡単で迅速であり、さらにその実施には信頼性があり経済的である。

【 0 0 4 4 】

一方、以前にはほとんど常に天然のテスト細胞を使用するか、または天然のテスト細胞を近い時点で調製することが、従来技術でこれまで述べてきた系を実行するために要求されたが、新規な本方法ではこの点が免除される。特に、本発明にしたがって用いることができる被覆済みのビーズは、天然のテスト細胞よりも実質的に高い保存性を提供する。さらにこれら被覆ビーズは、理論的には無制限の量で提供され、必要が生じた時のために保存することができ、これにより実質的な単純化が同様に得られる。

40

【 0 0 4 5 】

本発明にとって極めて重要なことは、血液細胞抗原、またはそれらに対して指向される抗体は、天然の抗原に対して指向されるモノクローナル抗体を用いてサンプルから探し出された該天然の抗原によって検出されるということである。本改変方法を用いたときのみ、上記の技術的目的は、極めて容易にさらに高い信頼性をもって、少ない投入エネルギーで首尾よく達成され、これは従来技術と比較したとき極めて重要である。

【 0 0 4 6 】

本発明にしたがって用いることができる被覆済みビーズは、変法 1 の工程 (ii) で得られ

50

るビーズ、変法2の工程(iv)で得られるビーズ、変法3の工程(i)で得られるビーズ、および変法4の工程(i)で得られるビーズである。

【0047】

これらのビーズは長期にわたって、すなわち天然のテスト細胞の場合よりも実質的に長く保存することができる。

【0048】

生物学的な出発材料は、上記目的のために特別に適合させた専門の検査室で調製することができるので、関与する職員が感染する危険性もまた減少する。

【0049】

本発明は、血液細胞抗原またはそれらに対して指向される抗体を検出することを含む。現時点では、700を超える赤血球抗原が報告されている。さらに多くの抗原が他の血液細胞で存在することが報告されている。これら全ての抗原が臨床的に関連を有するか、または有する可能性がある。したがって、本発明が基本的にこれらの抗原全てを迅速にさらに信頼性をもって検出するために用いることができることは当業者には明白である。

【0050】

これら血液細胞抗原の編集物は例えば以下で見出すことができる：Issitt, P. および Anstee, D. (編)：APPLIED BLOOD GROUP SEROLOGY, Montgomery Scientific Publications, Durham, North Carolina, USA。好ましくは本発明を用いて検出される特に重要な血液群抗原は以下のとおりである：ABO；C、C^w、C、D、E、e、K、k、Fy(a)、Fy(b)、Jk(a)、Jk(b)、S、s、M、N、P(1)、Le(a)、Le(b)。

【0051】

必要とされる極めて多くの抗体もまた既に利用可能である。これらの抗体の例は以下のとおりである：抗Jka(DiaClonから入手可能)、抗Jkb(DiaClon)、抗Lea(DiaClon)、抗Leb(DiaClon)Rhテスト血清(BIOLITH DIAGNOSTIKA, Hann. Meunden, Germany)、抗D、抗C、抗c、抗C^w、抗E、抗e、MNSs系のテスト血清(抗M、抗N、抗S)またはその他の血清(Dadeから供給される)(例えば抗K₁)。血液細胞抗原に対して指向される合計600を超える種々のモノクローナル抗体が世界中で市販されている。

【0052】

そのような抗体が入手できない場合には、それら抗体はポリクローナル抗体としてまたはモノクローナル抗体として調製できる。抗体の製造方法に関して当業者は周知している。

【0053】

従来技術で既に記載された方法でも用いられているプロトコルが、血液細胞または血液細胞抗原の可溶化に利用することができる。すでにどこかで説明したように、非常に重要な本発明の利点は、被覆ビーズの実質的により長期にわたる耐久性のために、これらのプロトコルが、該プロトコルに適合する検査室で大規模に実施できるということである。

【0054】

本発明にしたがって用いることができる被覆ビーズを調製するために、ビーズに特異的抗体を結合させなければならない。

【0055】

この結合は、好ましくはストレプトアビジンまたはアビジン/ビオチン複合体により仲介され、ビオチン化抗体がストレプトアビジンまたはアビジン被覆微小担体に結合される。前記に該当する方法は当業者には周知で、米国特許第6203706号に詳細に記載されている。

【0056】

特に好ましくは、ビオチン化された、検出されるべき抗原に対して指向される抗体を先ず初めに天然の細胞(テスト細胞)と反応させ、その後該細胞を可溶化し、生成された抗原およびビオチン化抗体の複合体をストレプトアビジンまたはアビジン被覆ビーズ(微小担体)を用いて反応混合物から分離する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

生成されたこの複合体を続いて以下の異なる2つの方法で用いることができる：

1) 抗原に対して指向される抗体の存在を患者の血清中で検出しようとする場合は、生成された複合体を続いて直接血清とインキュベートすることができる。存在し得るいずれの抗体もその抗原と反応し該複合体と結合する。検出されるこれらの抗体はヒト由来であるので、検出される抗体は、テスト混合物から分離された後抗ヒト抗体および周知の方法を用いて結合させることができる。

【 0 0 5 8 】

以下は使用可能な方法の例示リストである：標準的抗ヒトグロブリンテスト、カードテスト (Y. Lapierre ら, (1990) Transfusion 30(2):109-113)、E L I S A (マイクロタイタープレートで検出)、マイクロチップ、毛細管拡散、フローサイトメトリー、放射性免疫アッセイ (R I A ; 例えばビーズをヨード¹²⁵で標識) など。上記一連の方法が当業者には利用可能である。ゲルカード法 (カードテスト) およびフローサイトメトリーが特に適していることが証明された。

10

【 0 0 5 9 】

2) 抗原を直接検出しようとする場合は、同じ方法を用いて、抗原およびビオチン化抗体およびストレプトアビジン被覆またはアビジン被覆ビーズからなる上記の複合体と第二の抗体を直接結合させることができる。このために、第二の抗体を直接標識するか (例えばヨード¹²⁵、酵素標識)、または別には、種特異的抗体を手段として、および上記の方法を用いてもう一度検出される。このとき、この種特異的抗体は第二の抗体が由来する種に

20

【 0 0 6 0 】

血液細胞抗原、または該抗原に対して指向される抗体を血清サンプルで検出する新規な系の特に好ましい変型はしたがって以下を含む：

患者の血清サンプルで血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するインビトロの方法の場合：

(i) 検出されるべき抗原に対して指向されるビオチン化非ヒト抗体を、対応する天然の血液細胞抗原を保有するヒトテスト細胞と接触させ；

(ii) (i) で生成された複合体を上記血液細胞が可溶化される条件に付し；

(iii) 抗原およびビオチン化抗体からなる上記複合体を、ストレプトアビジン被覆またはアビジン被覆微粒子を用いて上記サンプルから取り出し；

30

(iv) (iii) で生成された複合体を検査されるべき患者由来の血清サンプルと接触させ；さらに

(v) 抗ヒト抗体テストを用いて、特異的抗体が上記血清サンプルに存在するときにビオチン化抗体、抗原および該血清中のヒト抗体から生成される複合体を、該複合体をいったんサンプルから分離して検出する。

【 0 0 6 1 】

さらにまた、選択された血液細胞抗原を検出するインビトロの方法の場合：

(i) 検出されるべき抗原に対して指向されるビオチン化抗体を、対応する天然の血液細胞抗原を保有するヒトテスト細胞と接触させ；

40

(ii) (i) で生成された複合体を上記血液細胞が可溶化される条件に付し；

(iii) 抗原およびビオチン化抗体からなる上記複合体を、ストレプトアビジン被覆またはアビジン被覆微粒子を用いて上記サンプルから取り出し；

(iv) (iii) で生成された複合体を、上記抗原に対して指向される好ましくは標識された第二の抗体と接触させ；さらに

(v) 慣例の方法を用いて、ビオチン化抗体、抗原および第二の抗体から生成される複合体を、該複合体をいったんサンプルから分離して検出する。

【 0 0 6 2 】

上記抗体を化学的にビーズに結合させることもできる。

【 0 0 6 3 】

50

本発明の目的のためには、ビーズは、種々の素材で構成された球状の微小担体であると通常考えられる。

【0064】

これに関して、強磁性体ストレプトアビジン粒子（例えばM280ストレプトアビジンダイナビーズ）を用いることが好ましい。

【0065】

これら粒子の物理的特性は以下のとおりである：

直径：2～4mm

密度：1.1～1.8g/cm³

磁気質量モーメント（magnetic mass moment）： $100 \pm 25 \times 10^{-6} \text{ m}^3 / \text{ kg}$

懸濁液は好ましくは10mg粒子/mL（ $6.7 \times 10^8 / \text{ mL}$ に該当）を含む。

10

【0066】

該粒子の結合特性は好ましくは以下のとおりである：

1mgのM280ストレプトアビジンダイナビーズは5～10gのビオチン化抗体と結合することができる（100%飽和の、ポリスチレンの表面と共有結合したストレプトアビジン）。

【0067】

これら粒子の利点は以下のとおりである：

その常磁性特性の結果として、これらの粒子はビオチン-抗体-抗原複合体を不均質混合物（例えば細胞溶解物）から単に磁石（磁性粒子濃縮装置）を用いることによって単離するために適切である。

20

【0068】

しかしながらこれら粒子は以下のような欠点を有する：

* 着色-蛍光粒子が存在しない；

* フローサイトメトリーによって分析することができない。

【0069】

したがって、周知であり市販もされている赤色-蛍光性高密度ストレプトアビジンポリスチレン粒子が本発明では特に好ましく用いられる。

【0070】

該粒子の物理的特性は以下のとおりである：

直径：2～4mm

密度：1.1～1.8g/cm³

30

【0071】

これら粒子の結合特性は好ましくは以下のとおりである：

ビオチン抗体結合に関するストレプトアビジンの密度及び性質はダイナビーズと同じである（上記参照）。

【0072】

これら粒子の利点は以下のとおりである：

* それらは赤色蛍光を発し、したがって読み取りを容易にする。

* 性能もまたフローサイトメトリーでモニターすることができる。

40

【0073】

総合すれば、該粒子は、好ましくはポリスチレンで構成され、直径は0.01から10μm、特に好ましくは2～4μmであるべきである。これらの微粒子はエポキシ、カルボキシおよび/またはアミノラジカル、またはトシル基をその表面に保有することが特に好ましい。

【0074】

しかしながら、本発明にしたがって用いることができる微粒子は多数の様々な材料で構成されてあってもよいことは当業者には明白であろう。微粒子技術分野に関して当業者は熟知しており、本発明にしたがって用いることが可能な多くの異なる市販の微粒子が存在する。この微粒子の好ましいサイズは上記に示されている。

50

【0075】

第二の抗体がビーズ - 第一の抗体 - 抗原複合体に結合した後、この第二の抗体を検出する。この目的のために、例えばその第二の抗体を蛍光標識するか、もしくは酵素標識するかのいずれか、また別にはこの第二の抗体に対して指向される第三の標識抗体を用いることも可能である。凝集テストを実施する場合は抗体を標識する必要はない。

【0076】

そのようなテストおよび検出方法は当業者にはよく知られている。凝集テストおよびフローサイトメトリーは、好ましくは本発明にしたがって用いることができる。

【0077】

新規な本検出方法の個々の構成が当業者に周知であることは本発明の特徴である。しかしながら、これら個々の工程の組み合わせが、上記のように極めて驚くべき有利な態様で、科学業界の非常に強い要請に対する単純な解決を提供する方法をもたらすとは全く予測不可能であった。 10

【0078】

特に、本発明にしたがって、血液細胞抗原または血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するキットを提供することができる。該キットは少なくとも以下を含む：直径が0.01から10 μ m、好ましくは2~4 μ mの球状ビーズ、血液細胞抗原に対して指向される特異的抗体および特異的抗ヒト抗体。

【0079】

別の好ましい実施態様では、血液細胞抗原または血液細胞抗原に対して指向される抗体を検出するキットは少なくとも以下を含む：直径が0.01から10 μ m、好ましくは2~4 μ mの球状ビーズ、第一の非抗ヒト種特異的抗体、および検出されるべき抗原に対して指向され、さらに該第一の抗体が指向される種に由来する抗体。 20

【0080】

本発明の方法に記載した本質的に必要な構成を含む他のキットもまた本出願の主題の一部を構成することは明白であろう。

【0081】

以下の実施例で本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は範囲を限定するものと解されるべきではない。

【実施例1】

【0082】

細胞の可溶化

可溶化緩衝液：1.21gのトリスを950mLのNaCl(pH7.4)に添加し、さらに5mLのTriton X-100を添加して1000mLとする。

テスト細胞(血小板)を卓上遠心機(Hettich製)で10000rpmで1分沈澱させる。上清を吸引除去し、細胞ペレットを100 μ Lの可溶化緩衝液に採取する。

【実施例2】

【0083】

特異的抗GPIIa - IIIb抗体(BioTest)をビオチン化し、ストレプトアビジン被覆ビーズを用いて溶液中で処理した。その抗体がビーズに結合したことが示された。これ 40

に関しては、1mMの亜鉛の存在が結合を促進することが判明した。続いて、上記ビーズを可溶化された血液細胞とインキュベートし、さらに第二の蛍光標識抗体を添加する。陽性テストアッセイの特徴はその二次抗体の上記複合体との結合の増加で、これは、続いて単離したビーズ - 第一の抗体 - 抗原 - 第二の抗体複合体の蛍光(これは上記結合によって付与された)によって測定することができる。

このようにして、極めて簡単な態様で血中のGPIIa - IIIb抗原を検出することができた。

【実施例3】

【0084】

凝集テスト(ゲルカードテスト(Diamed, Switzerland))を蛍光標識によるテストの代 50

わりに実施した。

このようにしてまた、極めて簡単な態様で血中のG P I I a - I I I b抗原を検出できた。

【実施例4】

【0085】

E L I S Aテストを用いる代わりに、第二の抗体により標識されたビーズをフローサイトメトリーで検出した。

このようにしてまた、極めて簡単な態様でG P I I a - I I I b抗原を検出できた。

【実施例5】

【0086】

Diamedによって供給されたストレプトアビジン粒子による本発明のテストの実施

患者/ドナーおよびサンプル物質：20 μ Lの血清（56 で30分不活化）

試薬および装置：赤色蛍光高密度ストレプトアビジンポリスチレン粒子（Diamed）

物理的特性：直径は2 ~ 4 μ m、

密度は1.1 ~ 1.8 g / cm³

懸濁液は0.075%（v/v）の粒子を含み、この理由でこれらビーズを50 μ Lの容積で用いた（ダイナビーズの場合には10 μ Lと比較）。

結合特性：ビオチン抗体との結合に対するストレプトアビジンの密度および性質はダイナビーズの場合と同じである。

利点：粒子は赤色の蛍光を發し、これは読み取りを容易にし、その性能はまたフローサイトメトリーの方法を用いてモニターすることができる（フローサイトメトリーは当業者には周知である）。

欠点：この粒子は持続的に高い吸収性を示すので、被覆後に粒子をP B S - B S Aでブロックすることが必要なようである。

【0087】

緩衝液

粒子緩衝液：

10 mM P B S 溶液（p H 7.4）、0.1% T w e e n 2 0

P B S - B S A（濃度2%）：

ダルベッコ（Dulbecco's）リン酸緩衝生理食塩水 × 10

蒸留水で1：10に希釈（p H 7.2）

2.2%（1：10）のウシアルブミンを添加

可溶化緩衝液：

1.21gのトリスを950 mLのN a C l（p H 7.4）に添加し、さらに5 mLのT r i t o n X - 1 0 0を添加して1000 mLとする。

【0088】

【表1】

10

20

30

使用抗体：

特異性	クローン	種	アイソタイプ	形態	ビオチン過剰率
GPIIb/IIIa(CD41)	P2	マウス	I g G 1 κ	精製	1 5
GPIa/IIa(CD49b)	Gi9	マウス	I g G 1 κ	精製	1 5
GPIb/IX(CD42a)	FMC-25	マウス	I g G 1 κ	精製	1 5
GPIV(CD36)	FA6-152	マウス	I g G	精製	1 5
CD9	ALB6	マウス	I g G 1 κ	精製	1 5
マウス IgG Fcγ フラグメント		ヤギ		精製	
ヒト IgG Fcγ フラグメント		ヤギ		ペルオキシダーゼ	

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

ビオチン：スルホ - N H S - L C - ビオチン、2 5 m g (Pierce, Perbio Science, Rockford, USA)。

ミリポアウルトラフリー M C 3 0 フィルターユニット (Millipore Corporation, Bedford, USA) でビオチン化後にろ過 (ろ過限界 3 0 k D a) 。

メンブレン：低結合再生セルロース

【 0 0 9 0 】

校正：

偶発的凝集をテストし陰性コントロールを含める。新しいバッチ毎にまたはカップリング毎に、フローサイトメトリー分析で定量的にチェックする。これに関連して、抗原被覆粒子をこの抗原に対して特異的に指向される蛍光標識抗体とインキュベートする。粒子表面の蛍光の強さ (フローサイトメトリーで容易に測定できる) は被覆の程度に比例する。

性能管理：陽性および陰性コントロール血清を含める。

【 0 0 9 1 】

手順：

ビオチン化モノクローナル抗体の調製

ビオチンは、カルボキシラーゼのための補助因子として機能するビタミン (2 4 4 ダルトン) である。サイズが小さいことの結果として、ビオチンは、結合後に原則として巨大分子の特性に対して影響を及ぼさない。ビオチンのための反応基はリジンおよびチロシンの - アミノ基で (N H S - ビオチン)、アミン結合が形成される。抗体はまた可変領域にリジンを含むことができるので、ビオチン化によって抗原の検出が失われる。この作用を排除または減少させるために、抗体結合の機能的領域が混乱されない最適ビオチン濃度 (ビオチン過剰) を各抗体について見つけなければならない (Ternyck and Avrameas, 1990)。N H S - L C - ビオチンの使用は巨大分子 (例えば糖タンパク質) にとって有利であることが判明した。この場合には、巨大分子の立体的妨害の可能性はいずれも、6 炭素分子を含むさらに別の鎖 (ヘキサノエートスペーサー、2 2 A) によって防止される。溶解されたビオチンは加水分解に非常に感受性が高いので、スルホ - N H S - L C - ビオチンを溶液にした後は迅速に処理することが推奨される。

【 0 0 9 2 】

手順：

1 m L の P B S にタンパク質を溶解し、以下を計算する：過剰ビオチン (率、1 0 ~ 1 5) の m m o l : タンパク質の m m o l × (1 2 または 2 0) = 添加されるビオチン試薬の m m o l : ピペットで添加されるビオチンの m m o l × 5 5 6 = 添加されるビオチン試薬の m g

(5 5 6 はスルホ - N H S - L C ビオチンの分子量) 計算：タンパク質の m g / タンパ

ク質の分子量 = タンパク質の mmol

例えば $1.3 / 150000 = 8.7 \times 10^{-6} \text{mmol}$ の IgG、

$8.7 \times 10^{-6} \times 20 = 1.73 \times 10^{-4} \text{mmol}$ のビオチン試薬、

$1.73 \times 10^{-4} \times 556 = 0.096373 \text{mg}$ (0.1mg) のビオチン。

【0093】

1. 開封の前にスルホ-NHS-LC-ビオチンを室温に戻す。

2. 1mg のスルホ-NHS-LC-ビオチンを $1000 \mu\text{L}$ の蒸留水 ($1 \mu\text{g} = 1 \mu\text{L}$) に溶解する。

3. 室温で30分インキュベートする(また別には氷上で2時間インキュベートする)。

4. ミリポアMC30フィルターを用いて未結合ビオチンをPBS中で遠心分離して除去する。 10

5. 遠心分離機の設定はタンパク質に応じて変動する。原則として、 10000rpm で10~15分で十分である。また別には 3500rpm で30分である。

6. ビオチン化抗体は 0.01% の酸化ナトリウム (sodium acid) 中で4で保存する。

【0094】

ビオチン化の程度の計算:

ビオチン化の程度は、HABA試薬(2-ヒドロキシアゾベンゼン-4-カルボン酸)を用いて測光法により決定される。このために、 500nm でのHABA試薬($360 \mu\text{L}$)の吸収を先ず初めにそれだけで測定し、続いてビオチン化サンプル($40 \mu\text{L}$)を添加する。添加後5分して吸収をもう一度 500nm で測定する。HABA分子中での競合結合の結果として、サンプルのビオチン含有量に応じて色の変化が出現する。すなわち、サンプルのビオチン化の程度は A に正比例する。 20

【0095】

1. $A500 = (0.9) \times (\text{HABA試薬の} A500) - (\text{ビオチン化タンパク質の} A500)$

2. ビオチン化タンパク質の $\text{mmol/mL} = \text{ビオチン化タンパク質の} \text{mg/mL}$ サンプル

3. ビオチンの $\mu\text{mol/mL}$ 反応混合物 = $A500$

HABA試薬テストの代替として、各使用タンパク質についてビオチン化校正曲線を構築することができる。この曲線を用いて、タンパク質毎およびバッチ毎に固有の最適ビオチン量(最適ビオチン量は各タンパク質について異なる)を決定することができる。 30

上記性質の校正曲線は図2に示されている。

【0096】

血清: 注意深くコントロール血清を -20 から融解させる。最初は4にし、遠心分離する(13000rpm で2分、エッペンドルフ遠心分離機)

【0097】

血小板の糖タンパク質の標識と可溶化

2×10^7 のテスト細胞(標準化細胞)をエッペンドルフチューブで 10000rpm で1分遠心分離し、上清を吸引し、細胞ペレットを $30 \mu\text{L}$ のPBS-2%BSAに再懸濁する。 40

【0098】

$10 \mu\text{L}$ の糖タンパク質特異的ビオチン化モノクローナル抗体を各アッセイに添加する。使用抗体の各々について最適な希釈は、ビオチン化の力価測定によって前もって決定しておかなければならない(偶発的凝集の除去の項を参照されたい)。CD41は1:60、CD42aおよびCD49bは1:10、HLA抗体は1:200。バッチにしたがって変動する。

37で30分インキュベートする。

【0099】

テスト血小板を $100 \mu\text{L}$ のPBSで3回洗浄する(10000rpm で1分遠心分離し、上清を吸引除去し、血小板ペレットを $100 \mu\text{L}$ のPBSに採取する)。 50

【0100】

最後の洗浄後、ペレットを各々100 μ Lの可溶化緩衝液で溶解し、個別にピペットで混合する。

【0101】

4 で30分インキュベートする。

【0102】

ストレプトアビジンポリマー粒子上の抗原の単離

溶解物を13000rpmで30分遠心分離する(4、細胞膜残渣を除去する)。

溶解物を遠心分離している間に、DiaMedストレプトアビジン粒子を1回粒子緩衝液中10000rpmで1分間洗浄する。10 μ Lの粒子(濃度0.5%)を70 μ Lの血小板溶解物に添加する。 10

37 で30分インキュベートする。

【0103】

粒子を100 μ Lの粒子緩衝液で1回10000rpmで1分間洗浄する。

上清を吸引除去する。

粒子を抗原で被覆し、粒子緩衝液に再懸濁し濃度を0.075%にした後、テスト系に導入することができる。

【0104】

抗原/抗体検出のための検査手順

20 μ Lの血清を粒子ペレットに添加し、ペレットをよく再懸濁する。 20

37 で30分インキュベートする。

100 μ Lの粒子緩衝液をピペットで粒子に添加する。

毎回100 μ Lの粒子緩衝液で粒子を2回洗浄する。

50 μ Lの粒子緩衝液にペレットを採取し、注意深くそれを混合する。

【0105】

粒子懸濁物を直接ヤギ抗ヒトカード(Diamed; Y. Lapierre et al., (1990) Transfusion 30(2): 109-113で説明される)にピペットで適用する。

さらにインキュベートすることなく、そのカードをカード遠心装置(DiaMed)において900rpmで10分遠心する。

【0106】

結果の判定(図1参照)

本テストの高い感度は明瞭である。 30

【0107】

これまでのところ、異なる反応性を有する34の血清を選択的に検査した。MAIPAとの比較によって、感度および特異性は比肩しえることが示される。

【0108】

N=8の血清で、抗Pla1の特異性を平行して検出することができた。

【0109】

N=2の血清で、以前の発見にもかかわらず、MAIPAでもカードテストでも抗Pla2は全く検出できなかった。 40

【0110】

N=4の血清で、抗Bra特異性を有する抗体を検出できた。

【0111】

N=4の血清で、様々な特異性を有する自己抗体を検出できた。

【0112】

N=8の血清はMAIPAおよびカードテストで陰性であった。

【0113】

N=8の血清は両テストで非特異的に反応した。

【0114】

テストの所要時間は30~45分であり(以前に被覆した粒子を使用)、投入された労力 50

および時間は最小限である。

【 0 1 1 5 】

結果の提示：

判定（図 1 参照）

陽性：凝集ビーズはゲル上に赤い線を形成するか、またはゲル内に配分される（++++ から+）。

陰性：IDカード内の窪みの底部に密に詰まった粒子が沈澱する。

【 図面の簡単な説明 】

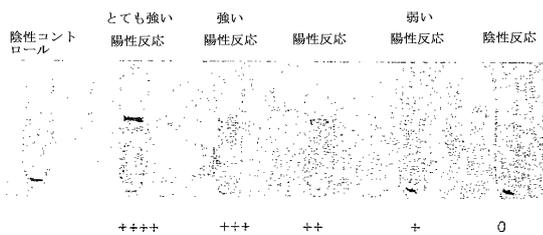
【 0 1 1 6 】

【 図 1 】 抗体検出のための検査結果を示す図である。

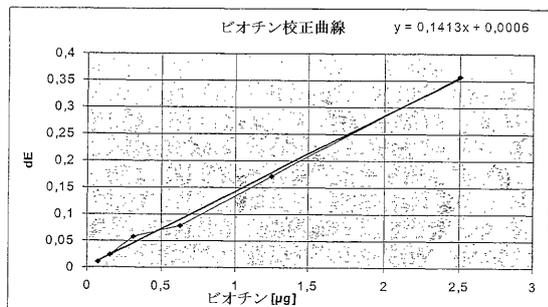
10

【 図 2 】 ビオチン校正曲線を示すグラフである。

【 図 1 】



【 図 2 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090989 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/543, 33/80 CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05140
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 2002 (10.05.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 22 806.6 10. Mai 2001 (10.05.2001) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

Erfinderverklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: KIESEWETTER, Holger [DE/DE]; Am Grünen Zipfel 1, 13465 Berlin (DE); SALAMA, Abdulgabar [IL/DE]; Lotosweg 6, 13467 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

- (74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt am Main (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/090989 A2

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BLOOD CELL ANTIGENS AND THE ANTIBODIES IN RESPONSE TO THE SAME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BLUTZELL-ANTIGENEN UND GEGEN DIESE GERICHTETE ANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting blood cell antigens and the antibodies in response to the same in a sample. The invention also relates to kits which facilitate the completion of said method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Blutzell-Antigenen und gegen diese gerichtete Antikörper in einer Probe. Weiterhin werden Kits zur Verfügung gestellt, die die Durchführung des Verfahrens erleichtern.

Verfahren zum Nachweis von Blutzell-Antigenen und gegen diese gerichtete
Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antigenen auf Blutzellen bzw. den Nachweis von gegen diese Antigene gerichteten Antikörpern im Blut von Menschen. Dieses Verfahren wird in-vitro mit Hilfe von dem Patienten entnommenem Blut durchgeführt.

In der heutigen Diagnostik bestimmter Erkrankungen müssen im Blut der Patienten ausgewählte Antigene von roten und weißen Blutzellen (Erythrozyten bzw. Leukozyten) und von Blutplättchen oder auch spezifische Antikörper gegen diese Antigene nachgewiesen werden.

Blutzellantigene sind Oberflächenmarker (Merkmale) von roten Blutkörperchen (Erythrozyten), Blutplättchen (Thrombozyten) und weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Meistens handelt es sich hierbei um Glykoproteine, Glykolipide oder Proteine. Eine Zusammenfassung hierzu findet sich z.B. in Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhardt (Hgb), Springer-Verlag Berlin (1999), S. 137-200.

Die klinische Bedeutung dieser Blutzellantigene ergibt sich durch ihre Immunogenität, d. h. ihre Fähigkeit, in einem Individuum, das diese Antigene unter natürlichen Umständen nicht aufweist, die Bildung spezifischer Antikörper z.B. nach einer Transfusion, zu stimulieren.

Die Bildung solcher gegen Blutzell-Antigene gerichteten Antikörper kann weiterhin beispielsweise postnatal, wie es bei den Blutgruppenisoagglutininen (Anti-A, Anti-B) der Fall ist, oder durch die Übertragung allogener Zellen im Rahmen einer Schwangerschaft, einer Organtransplantation oder einer Knochenmarkstransplantation induziert werden. Beispiele für entsprechende Antikörper sind Anti-D, Anti-K, anti-Fy usw. gegen Erythrozyten, Anti-HPA-1, Anti-HPA-2 gegen Thrombozyten, Anti-INA-1, Anti-INA-2 gegen Granulozyten oder Antikörper gegen HLA-Klasse I und Klasse II.

Darüber hinaus können Antikörper gegen eigene Antigene gebildet werden (Autoantikörper). Diese können zum vorzeitigen Abbau oder zur Zerstörung autologer Zellen führen, wie z. B. bei der autoimmunhämolytischen Anämie, der Autoimmunthrombozytopenie oder der Autoimmunneutropenie (Agranulozytose).

Alloantikörper gegen Erythrozyten können bei Feten und Neugeborenen unterschiedlich starke Hämolyse verursachen (Morbus haemolyticus neonatorum), vor allem Immunantikörper wie Anti-D und Anti-c.

Isoagglutinine und klinisch relevante Alloantikörper müssen vor jeder Bluttransfusion mit Erythrozyten berücksichtigt werden. Es dürfen in der Regel keine serologisch unverträglichen Erythrozyten transfundiert werden, z. B. rhesuspositive Erythrozytenkonzentrate, wenn bei dem Empfänger (rhesusnegativ) ein Alloantikörper der Spezifität Anti-D vorliegt. Daher müssen Antikörper gegen Erythrozyten vor Transfusionen identifiziert und bei einer Transfusion berücksichtigt werden. Ferner muss vor jeder Transfusion eine serologische Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) mit allen vorgesehenen Konserven zur Transfusion durchgeführt werden.

Die Erfassung von Antikörpern gegen erythrozytäre Antigene erfolgt bisher routinemäßig durch die Inkubation von Serumproben gegen native ausgewählte Testerythrozyten (Antikörpersuche und ggf. Antikörperidentifizierung) bzw. vor einer Transfusion gegen Spendererythrozyten (Kreuzprobe). Die Unverträglichkeit zwischen Serum und Erythrozyten zeigt sich durch eine direkte oder indirekte Verklumpung der untersuchten Erythrozyten. Eine direkte Verklumpung der Erythrozyten wird z. B. durch die Isoagglutinine Anti-A und Anti-B verursacht. Eine indirekte Verklumpung wird z. B. induziert durch die Inkubation von Anti-D mit rhesuspositiven Testerythrozyten und anschließend durch die Gabe von Antihumanglobulinserum (indirekter Coombstest).

Die Nachteile der Verwendung von Testerythrozyten sind durch die Selektion, Seltenheit und Verfügbarkeit bestimmter Testerythrozyten und kurze

Lagerungszeit der Zellen begründet. Es müssen regelmäßig ausgewählte Spender mit bekannten Antigenen zur Zellisolierung gesucht werden, und die isolierten Zellen sind nur für kurze Zeit haltbar.

Alle bisher beschriebenen Testmethoden beruhen praktisch auf der Verwendung solcher Zellen (siehe Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhardt (Hgb), Springer-Verlag Berlin (1999), S. 587-596, und *New diagnostic methods in oncology and hematology*, Huhn (Hgb) Springer Verlag, Berlin, 1998, S.197-212).

Damit verbundene Nachteile sind daher:

- Zur Erkennung spezifischer Antikörper müssen mehrere (in der Regel mehr als 11) Testerythrozyten (Testzellen) pro Testung verwendet werden, da Erythrozyten mit isolierten (einzelnen) Merkmalen nicht verfügbar sind (z. B. Zellen, die nur das Merkmal "D" tragen).
- In der Regel stehen Testerythrozyten mit seltenen Merkmalen zur Erkennung bestimmter Antikörper nicht zur Verfügung. Dadurch kann die Versorgung betroffener Patienten nicht immer gewährleistet werden.
- In der Regel stehen Testerythrozyten mit nicht vorhandenen Merkmalen, die normalerweise häufig vorkommen, zur Erkennung bestimmter Antikörper nicht zur Verfügung. Auch dadurch kann die Versorgung betroffener Patienten nicht immer gewährleistet werden.
- Die Selektion der entsprechenden Testzellen ist aufwendig.
- Da es sich um aus Menschen isoliertes biologisches Material handelt, ist ein Infektionsrisiko für das mit dem Material befasste klinische Personal, Ärzte etc. nicht immer ausgeschlossen.
- Die Zellen sind nur begrenzt lagerfähig.

Die klinische Bedeutung der **Antikörper gegen thrombozytäre Antigene** ist durch die Autoimmunthrombozytopenie (AITP), die neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT), die posttransfusionelle Purpura (PTP) und die Transfusion inkompatibler Thrombozyten reflektiert. In allen Fällen können die Antikörper eine primäre Hämostasestörung und eine Blutungsneigung bei den betroffenen Patienten verursachen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten ist bisher schwierig und kann nur in einzelnen Speziallabors durchgeführt werden. Ein einfacher und schneller Agglutinationsstest, wie z. B. bei Erythrozyten, ist durch die Beschaffenheit der Blutplättchen bisher nicht möglich. Von den bisher beschriebenen Methoden werden am häufigsten der Enzym-linked-Immuno-sorbent-assay (ELISA), der Plättchenadhäsions-Immunfluoreszenztest (PIFT) und zur Spezifizierung der gebundenen Immunglobuline die Immunpräzipitation oder MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens)-Assay verwendet (siehe Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhardt (Hgb), Springer-Verlag Berlin (1999), S. 597-602, New diagnostic methods in oncology and hematology, Huhn (Hgb) Springer Verlag, Berlin, (1998), S. 213-228, McMillan, Transfusion Medicine Reviews, Bd. IV, Nr. 2, pp 136-143 (1990)).

Die Nachteile dieser Methoden sind vielfältig:

- Alle Testmethoden sind arbeitsaufwendig, da typisierte Thrombozyten in der Regel nicht vorliegen, und die Tests nur von Experten durchgeführt werden können.
- Bei Patienten mit niedriger Thrombozytenzahl können häufig keine oder nicht genügend autologe Thrombozyten isoliert und untersucht werden, z. B. im ELISA oder MAIPA.
- Die Spezifität (ELISA und PIFT) und die Sensitivität (MAIPA) sind limitiert, und dadurch können die Ergebnisse häufig nicht interpretiert werden.

- Desweiteren treffen im wesentlichen alle Nachteile zu, die oben auch für den Nachweis erythrozytärer Antigene beschrieben wurden.

Die klinische Bedeutung der **Antikörper gegen Neutrophilen-abhängige Antigene** ist durch die Autoimmunneutropenie, neonatale Alloimmunneutropenie und TRALI (Transfusions-assoziierte akute Lungen-Insuffizienz) gekennzeichnet. Die Erfassung dieser Antikörper ist noch schwieriger als die Erfassung thrombozytärer Antikörper. Die bisher bekannten Testmethoden sind weitgehend an Nachweismethoden von Antikörpern gegen Thrombozyten adaptiert (siehe Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhardt (Hgb), Springer-Verlag Berlin (1999), S. 603-609, New diagnostic methods in oncology and hematology, Huhn (Hgb) Springer Verlag, Berlin, (1998), S. 228-235, Minchinton and Waters, British Journal of Haematology, 56, pp 521-528, (1984), McCullough and William, Transfusion Medicine Reviews, Bd. 1, Nr. 3, pp 150-160, (1987)).

Ferner sind Antikörper gegen Lymphozyten, vor allem T-Lymphozyten von größter Bedeutung in der Transplantationsimmunologie. Diese Antikörper können eine akute oder verzögerte Abstoßung der Transplantate (Knochenmark, Herz, Lunge, Niere und andere Organe) bewirken. Daher muss vor Durchführung von Knochenmarks- und Nierentransplantationen das Vorhandensein lymphozytärer Antikörper gegen Spenderorgane ausgeschlossen werden.

Weiterhin können Lymphozytenantigene (HLA-Antigene) im Falle von Schwangerschaften und Transfusionen zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen HLA-Merkmale führen. Das etwaige Vorhandensein solcher Antikörper muss deswegen bei Transplantationen und bei Transfusionen von Thrombozyten und ggf. Leukozyten berücksichtigt werden.

Die klassische Nachweismethode von HLA-Antikörpern ist bisher auf den lymphozytotoxischen Test beschränkt. Mit diesem Test können allerdings nur komplementaktivierende Antikörper bestimmt werden. Die neuerdings verwendete ELISA-Technik ist extrem schwierig und wird nur in einzelnen Speziallabors durchgeführt (siehe Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhardt (Hgb),

Springer-Verlag Berlin (1999), S. 611-617, Zachary et al. Transplantation, Bd. 60, Nr. 12, pp 1600-1606 (1995), Lubenko und Rodi, Transfusion, Bd. 38, pp 41-44 (1998))

Zusammenfassend beruhen alle Testprinzipien zur Erfassung von Antikörpern gegen Blutzellen auf der Verwendung von ausgewählten biologischen und meist nativen Testzellen, die von ausgewählten Individuen gewonnen und zur Verfügung gestellt werden.

Ein relativ schneller und einfacher Test ist nur für die Erkennung von gewöhnlichen Antikörpern gegen Erythrozyten möglich, z. B. der Nachweis eines Anti-D-Antikörpers.

Die Suche nach Alternativen blieb bisher ohne Erfolg.

Obwohl die Gene der meisten Blutgruppensysteme (Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten) inzwischen kloniert und zum Teil sequenziert wurden, gelingt der Nachweis von Antikörpern durch die Verwendung von rekombinanten Antigenen und Peptiden, wenn überhaupt, nur in Einzelfällen (Bowditch et al., Blood, Bd. 88, Nr. 12, pp 4579-4584 (1996), Peterson et al., Blood, Bd. 92, Nr. 6, pp 2053-2063 (1998), Yazdanbakhsh, Transfusion Medicine Reviews, Bd. 15, Nr. 1, pp 53-66, (2001)).

Auch der oben genannte MAIPA-Test, bei dem Antikörper auf Mikrotiterplatten zur Durchführung eines indirekten ELISA-Tests immobilisiert werden, bietet noch immer enorme praktische Handhabungsprobleme. So dauert dieser Test ca. 7-8 Stunden, und die Testergebnisse sind oft nicht eindeutig. Außerdem können die beschichteten Mikrotiterplatten nicht ausreichend lange aufbewahrt werden, so dass in der Praxis alle entsprechenden Lösungen im Labor frisch aufbereitet werden müssen.

Von Meyer et al., THE LANCET Bd. 354, Nr. 9189, pp 1525-1526 (1999) wurde ein Testsystem beschrieben, mit Hilfe dessen es gelang, Antikörper gegen den

Komplex aus Plättchenfaktor 4 und Heparin nachzuweisen, indem mit Antigenen beschichtete Beads in einem Teilchen-Agglutinationstest mit Serumproben von Patienten versetzt wurden. Agglutinierte Proben wurden durch einen Gelkartentest (siehe z.B. Salama und Mueller-Eckhard in: Transfusionsmedizin, Mueller-Eckhard (Hgb), Springer-Verlag Berlin (1999), Seite 587-617) nachgewiesen. Trotz angestrengtester Bemühungen gelang es den Erfindern jedoch nicht, mit Hilfe dieses relativ schnell und leicht durchzuführenden Tests andere Blutzell-Antigene oder auch gegen diese gerichtete Antikörper nachzuweisen.

Trotz des sich aus dem vorstehend Genannten zwangsläufig ergebenden extrem hohen Bedarfs nach einem Testsystem für den Nachweis von Antikörpern gegen ausgewählte Blutzell-Antigene, das die genannten Nachteile überwindet, konnte ein solches bis zu vorliegender Erfindung nicht zur Verfügung gestellt werden.

In der US 6,203,706 werden Verfahren aufgezeigt, mit deren Hilfe Blutzell-Antigene bzw. Antikörper in z.B. Blutproben nachgewiesen werden sollen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die entsprechenden Verfahren, bei denen Antigene direkt auf Beads gebunden werden, nur selten funktionieren.

Angesichts des genannten Stands der Technik lag der vorliegenden Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem Antikörper gegen ausgewählte Blutzell-Antigene oder Blutzell-Antigene selbst spezifisch nachgewiesen werden können. Dieses Verfahren soll einfach und schnell in der Handhabung und sicher und kostengünstig in der Durchführung sein. Weiterhin soll das Verfahren in vitro an Proben durchgeführt werden können, die aus lebenden Organismen gewonnen werden können.

Gelöst wird diese sowie weitere, nicht explizit genannte Aufgaben, die jedoch aus den hierin einleitend diskutierten Zusammenhängen ohne weiteres ableitbar oder erschließbar sind, durch ein Verfahren mit allen Merkmalen der Patentansprüche 1-4. Zweckmäßige Abwandlungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den rückbezogenen Unteransprüchen unter Schutz gestellt.

VARIANTE 1:

Dadurch dass man bei einem in vitro-Verfahren

- (i) ein Mikroktigelchen ("Bead") mit einem gegen das nachzuweisende spezifische Blutzellantigen gerichteten, nicht-humanen Antikörper beschichtet,
- (ii) zugehörige, spezifische, ausgewählte Blutzell-Antigene, die gegebenenfalls durch Solubilisierung von im Stande der Technik an sich schon bekannten standardisierten Blutzellen oder auch durch rekombinante oder proteinchemische Methoden erhalten werden können, mit den aus (i) erhaltenen beschichteten Beads mischt,
- (iii) die durch Bindung des ausgewählten Antigens an den in (i) an das Bead gebundenen, nicht humanen Antikörper mit Antigen beschichteten Beads mit einer Serumprobe eines zu untersuchenden Patienten mischt, und
- (iv) den gegebenenfalls an den am Bead gebundenen Antigen gebundenen, aus der Probe stammende Blutzell-Antigen-Antikörper des Patienten mit Hilfe eines spezifischen anti-human-Antikörpertests nachweist,

gelingt es auf nicht ohne weiteres vorhersehbare Weise ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Blutzell-Antigene in einer Probe zur Verfügung zu stellen, welches diesen Nachweis auf einfache Art und Weise ermöglicht. Dabei weist dieses Verfahren die oben genannten Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf.

VARIANTE 2:

Eine nur leichte Abwandlung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen Blutzell-Antigene bedeutet es, wenn man

- (i) Beads mit nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörpern beschichtet,
- (ii) Standardzellen solubilisiert bzw. gentechnisch oder proteinchemisch gewonnene Blutzell-Antigene in Lösung bringt,
- (iii) das aus (ii) erhaltene Solubilisat bzw. die Lösung von gentechnisch oder proteinchemisch gewonnenen Blutzell-Antigenen mit spezifischen, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten und aus der in (i) definierten Spezies stammenden Antikörpern inkubiert,

- (iv) die in (iii) gebildeten Komplexe mit den Beads aus (i) durch Zentrifugation isoliert, und
- (v) direkt oder später gegen aus Patienten stammendes Antikörper-haltiges Serum im Agglutinationstest untersucht.

VARIANTE 3:

Weiterhin gelingt es dadurch, dass man bei einem in vitro-Verfahren

- (i) ein Mikrokügelchen ("Bead") mit einem gegen das nachzuweisende spezifische Blutzellantigen gerichteten Antikörper beschichtet,
- (ii) Blutproben des zu untersuchenden Patienten mit den darin enthaltenen Blutzellen einer Behandlung unterwirft, durch die die in der Membran der Blutzellen enthaltenen Antigene solubilisiert werden, und gegebenenfalls eine Antigen-angereicherte Fraktion herstellt,
- (iii) die aus (i) erhaltenen beschichteten Beads mit der aus (ii) erhaltenen Probe mischt,
- (iv) das gegebenenfalls an den am Bead gebundenen Antikörper gebundene, aus der Probe stammende Blutzell-Antigen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpertests nachweist,

VARIANTE 4:

Weiterhin ist es möglich, Blutantigene in Proben nachzuweisen, indem man

- (i) Beads mit nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörpern beschichtet,
- (ii) Blutzellen aus zu untersuchenden Patienten solubilisiert,
- (iii) das aus (ii) erhaltene Solubilisat mit spezifischen, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten und aus der in (i) definierten Spezies stammenden Antikörpern inkubiert,
- (iv) die in (iii) gebildeten Komplexe mit den Beads aus (i) durch Zentrifugation isoliert, und
- (v) die Probe im Agglutinationstest untersucht.

Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Verfahren:

- einfach und schnell in der Handhabung und
- sicher und kostengünstig in der Durchführung,

Während zur Durchführung der bei den bisher im Stand der Technik beschriebenen Systeme bisher praktisch immer die Verwendung bzw. die zeitnahe Aufbereitung nativer Testzellen erforderlich war, kann das erfindungsgemäße Verfahren hierauf verzichten. Insbesondere bieten die fertig beschichteten, erfindungsgemäß verwendbaren Beads eine wesentlich höhere Lagerungsfähigkeit als native Testzellen. Außerdem können diese beschichteten Beads theoretisch in unbegrenztem Maße zur Verfügung gestellt und für den Bedarfsfall vorgehalten werden, so dass sich auch hieraus eine wesentliche Vereinfachung ergibt.

Essentiell für vorliegende Erfindung ist es, dass der Nachweis von Blutzell-Antigenen bzw. hier gegen gerichteten Antikörpern durchgeführt wird, in dem die nativen Antigene über die gegen sie gerichteten, monoklonalen Antikörper aus einer Probe gefischt werden. Nur mit dieser, gegenüber dem Stand der Technik wesentlichen Verfahrensabwandlung gelingt es, die oben genannte technische Aufgabe so leicht und sicher mit geringem Aufwand zu lösen.

Erfindungsgemäß verwendbare, fertig beschichtete Beads sind in Variante 1 die aus Stufe (ii) erhaltenen Beads, die in Variante 2 aus Stufe (iv) erhaltenen Beads, die in Variante 3 aus Stufe (i) erhaltenen Beads, sowie die in Variante 4 aus Stufe (i) erhaltenen Beads.

Diese Beads sind lange haltbar, wesentlich länger, als dies bei nativen Testzellen der Fall ist.

Da das biologische Ausgangsmaterial in extra darauf ausgerichteten Speziallabors aufbereitet werden kann, wird auch das biologische Infektionsrisiko für das befasste Personal verringert.

Erfindungsgemäß werden Blutzellantigene oder dagegen gerichtete Antikörper nachgewiesen. Zur Zeit sind mehr als 700 unterschiedliche erythrozytäre Antigene beschrieben. Von anderen Blutzellen sind noch weit mehr Antigene beschrieben. Alle diese Antigene besitzen oder können klinische Relevanz besitzen. Es ist

daher für den Fachmann klar, dass mit der vorliegenden Erfindung alle diese Antigene prinzipiell schnell und sicher nachgewiesen werden können.

Eine Zusammenstellung solcher Blutzell-Antigene findet sich beispielsweise in Issitt, P. und Anstee, D. (Hgb.): APPLIED BLOOD GROUP SEROLOGY, Montgomery Scientific Publications, Durham, North Carolina, USA. Besonders wichtige Blutgruppenantigene, die mit Hilfe der vorliegenden Erfindung bevorzugt nachgewiesen werden, sind: ABO; C, C^w, c, D, E, e, K, k, Fy (a), Fy (b), Jk (a), Jk (b), S, s, M, N, P (1), Le (a), Le (b).

Die ebenfalls benötigten Antikörper sind bereits in großem Maße verfügbar. Beispiele für solche Antikörper sind: Anti-Jka (Fa. DiaClon), Anti-Jkb (Fa. DiaClon), Anti-Lea (DiaClon), Anti-Leb (DiaClon), Rh-Testseren der Firma BIOLITH DIAGNOSTIKA, Hann. Münden, Deutschland (Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-C^w, Anti-E, Anti-e, Testseren des MNSs-Systems (Anti-M, Anti-N, Anti-S) oder auch die Seren der Fa. Dade (z.B. Anti-K₁). Insgesamt werden weltweit mehr als 600 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen Blutzell-Antigene kommerziell angeboten.

In Fällen, wo solche Antikörper nicht verfügbar sind, können diese entweder polyklonal oder monoklonal hergestellt werden. Methoden zur Herstellung von Antikörpern sind dem Fachmann gut bekannt.

Zur Durchführung der Solubilisierung der Blutzellen bzw. derer Antigene können die Protokolle angewendet werden, die auch in den im Stand der Technik bereits beschriebenen Verfahren verwendet werden. Wie an anderem Ort bereits ausgeführt, liegt ein ganz wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung darin, dass aufgrund der wesentlich erhöhten Haltbarkeit der beschichteten Beads diese Protokolle in dafür ausgerichteten Labors in großem Maßstab erfolgen können.

Zur Herstellung der erfindungsgemäß verwendbaren beschichteten Beads müssen die spezifischen Antikörper an die Beads gebunden werden.

Bevorzugt wird diese Bindung über den Streptavidin bzw. Avidin/Biotin Komplex vermittelt, indem biotinylierte Antikörper an mit Streptavidin bzw. Avidin beschichtete Mikrocarrier gebunden werden. Die entsprechenden Methoden sind dem Fachmann gut bekannt, und werden ausführlich in der US-Patentschrift 6,203,706 beschrieben.

Insbesondere ist es bevorzugt, wenn ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Antikörper, der biotinyliert ist, zunächst mit den nativen Zellen (Testzellen) reagiert, dann die Zellen solubilisiert werden, und der gebildete Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Beads (Microcarrier) aus dem Reaktionsansatz entfernt wird.

Dieser gebildete Komplex kann dann zweierlei verwendet werden:

1.) Soll das Vorhandensein eines gegen das Antigen gerichteten Antikörpers im Serum eines Patienten nachgewiesen werden, so kann der gebildete Komplex direkt mit dem Serum inkubiert werden. Eventuell vorhandene Antikörper reagieren dann mit dem Antigen und binden an den Komplex. Da diese nachzuweisenden Antikörper humanen Ursprungs sind, kann die Bindung der nachzuweisenden Antikörper nach Abtrennung des Komplexes aus dem Testansatz mittels eines anti-human Antikörpers unter Verwendung gut bekannter Methoden erfolgen.

Eine nicht erschöpfende Aufzählung möglicher Methoden folgt: Standard-Antihumanglobulintest, Kartentest (Y. Lapiere et al., (1990), Transfusion 30(2):109-113), ELISA (Nachweis auf Mikrotiterplatte), Mikrochip, Kapillardiffusion, Durchflussszytometrie, Radioimmunoassay (RIA; z.B. Iod¹²⁵ Markierung der Beads) usw. Es stehen dem Fachmann eine ganze Reihe von Methoden zur Verfügung. Als besonders gut geeignet haben sich die Gelkartenmethode (Kartentest) sowie die Durchflussszytometrie erwiesen.

2.) Soll der direkte Nachweis des Antigens erfolgen, so kann direkt die Bindung eines Zweitantikörpers an den oben genannten Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper und mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Beads mittels der gleichen Methoden erfolgen. Hierzu ist entweder der Zweitantikörper direkt markiert (z.B. Iod¹²⁵, enzymatische Markierung), oder er wird erneut über einen spezies-spezifischen Antikörper mithilfe der oben genannten Methoden nachgewiesen, wobei der spezies-spezifische Antikörper gegen die Spezies gerichtet sein muss, aus der der Zweitantikörper stammt.

Besonders bevorzugte Varianten des erfindungsgemäßen Nachweissystems für Blutzellantigene bzw. gegen diese gerichtete Antikörper aus Serenproben umfassen daher:

Ein in vitro-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Blutzell-Antigene in einer Serumprobe eines Patienten, bei dem man

- (i) biotinylierte, gegen das nachzuweisende Antigen gerichtete nicht-humane Antikörper in Kontakt bringt mit humanen Testzellen, die die entsprechenden, nativen Blutzell-Antigene tragen,
- (ii) den aus (i) gebildeten Komplex Bedingungen unterwirft, unter denen die Blutzellen solubilisieren,
- (iii) den Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper mit Hilfe von mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Mikropartikeln aus der Probe entfernt,
- (iv) den in (iii) gebildeten Komplex mit einer Serumprobe eines zu untersuchenden Patienten in Kontakt bringt, und
- (v) die im Falle des Vorhandenseins von spezifischen Antikörpern in der Serumprobe gebildeten Komplexe aus biotinyliertem Antikörper, Antigen und humanem Antikörper aus dem Serum nach Abtrennung des Komplexes aus der Probe mit einem anti-human Antikörper Test nachweist.

sowie

Ein in vitro-Verfahren zum Nachweis von ausgewählten Blutzell-Antigenen, bei dem man

- (i) biotinylierte, gegen das nachzuweisende Antigen gerichtete Antikörper in Kontakt bringt mit humanen Testzellen, die die entsprechenden, nativen Blutzell-Antigene tragen,
- (ii) den aus (i) gebildeten Komplex Bedingungen unterwirft, unter denen die Blutzellen solubilisieren,
- (iii) den Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper mit Hilfe von mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Mikropartikeln aus der Probe entfernt,
- (iv) den in (iii) gebildeten Komplex mit einem gegen das Antigen gerichteten, bevorzugt markierten Zweitantikörper in Kontakt bringt, und
- (v) die gebildeten Komplexe aus biotinyliertem Antikörper, Antigen und Zweitantikörper nach Abtrennung des Komplexes aus der Probe mit gängigen Methoden nachweist.

Auch eine chemische Bindung des Antikörpers an die Beads kommt in Frage.

Als Beads werden für die Zwecke der vorliegenden Erfindung meist kugelförmige Microcarrier aus unterschiedlichen Materialien verstanden.

Bevorzugt werden hierbei ferromagnetische Streptavidin-Partikel (z.B. Dynabeads M280 Streptavidin) eingesetzt.

Die physikalischen Eigenschaften dieser Partikel sind wie folgt:

Durchmesser: 2-4 µm

Dichte: 1,1-1,8 g/cm³

Oberfläche: 4-8 m²/g

Magnetisches Massenmoment: 100 ± 25x 10⁻⁶ m³/kg

Die Suspension enthält bevorzugt 10 mg/ml Partikel, entsprechend 6,7 x 10⁸ /ml

Die Bindungseigenschaften der Partikel sind bevorzugt wie folgt:

1 mg Dynabeads M280 Streptavidin können 5-10 mg eines biotinylierten Antikörpers binden (100 % Saturation des kovalent an der polystyrene Oberfläche gebundenen Streptavidin)

Vorteile dieser Partikel sind:

Durch die paramagnetischen Eigenschaften eignen sich diese Partikel zur Isolierung von Biotin-Antikörper-Antigen-Komplexen aus einem heterogenen Gemisch, wie z.B. Zellysat, durch einfache Anwendung eines Magneten (Magnetic Particle Concentrator).

Diese Partikel weisen aber folgende Nachteile auf:

- Es sind keine farbfluoreszenten Partikel vorhanden.
- Die Untersuchung in der Durchflußzytometrie ist ausgeschlossen.

Besonders bevorzugt erfindungsgemäß verwendbar sind daher Rot-fluoreszierende High-Density Streptavidin Polystyrene Partikel, die gut bekannt sind und kommerziell erhältlich sind.

Die physikalischen Eigenschaften dieser Partikel sind wie folgt:

Durchmesser: 2-4 µm

Dichte: 1,1-1,8 g/cm³

Die Bindungseigenschaften dieser Partikel sind bevorzugt wie folgt:

Streptavidin Dichte und Verhalten zur Biotin-Antikörper Bindung sind entsprechend Dynabeads (s.o.).

Vorteile dieser Partikel sind:

- sie sind rot fluoreszierend, dadurch ist die Ablesung erleichtert.
- die Kontrolle der Qualität kann auch in Durchflußzytometrie erfolgen.

Insgesamt sollten die Partikel bevorzugt aus Polystyrene bestehen und einen Durchmesser von 0,01 bis 10 µm aufweisen, besonders bevorzugt 2-4 µm. Es ist

besonders bevorzugt, wenn diese Mikropartikel auf der Oberfläche Epoxy-, Carboxyl-, und/oder Aminoreste oder Tosylgruppen tragen.

Es ist jedoch dem Fachmann klar, dass die erfindungsgemäß verwendbaren Mikropartikel aus einer großen Vielzahl unterschiedlicher Materialien aufgebaut sein können. Das Gebiet der Mikropartikel-Technologie ist dem Fachmann gut bekannt, und es gibt viele verschiedene kommerziell erhältliche Mikropartikel, die potentiell erfindungsgemäß verwendbar sind. Die bevorzugte Größe der Mikropartikel ist oben beschrieben.

Nach Bindung des Zweitantikörpers an den Bead-Erstantikörper-Antigen-Komplex wird dieser Zweitantikörper nachgewiesen. Hierzu kann entweder dieser Zweitantikörper beispielsweise Fluoreszenz- oder enzymatisch markiert sein, oder es kann auch ein markierter Drittantikörper gegen diesen Zweitantikörper eingesetzt werden. Wird ein Agglutinationstest durchgeführt, ist eine Markierung des Antikörpers nicht nötig.

Solche Tests und Nachweisverfahren sind dem Fachmann gut bekannt. Bevorzugt erfindungsgemäß verwendbar sind Agglutinationstests und die Durchflußzytometrie.

Es ist der vorliegenden Erfindung zu eigen, dass die einzelnen Bestandteile des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens dem Fachmann bekannt sind. Es war jedoch in keiner Weise vorherzusehen, dass eine Kombination dieser einzelnen Schritte zu einem Verfahren führt, dass in so überaus überraschend günstiger Weise für ein solchermaßen intensives Bedürfnis der Fachwelt eine einfache Lösung bietet.

Insbesondere können erfindungsgemäß auch Kits für den Nachweis von Blutzellantigenen bzw. von gegen Blutzellantigene gerichtete Antikörpern bereitgestellt werden, mindestens umfassend kugelförmige Beads mit einem Durchmesser von 0,01 bis 10 µm, bevorzugt 2-4 µm, einen spezifischen

Antikörper gegen ein Blutzellantigen, sowie einen spezifischen anti-human Antikörper.

Unter einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der Kit für den Nachweis von Blutzellantigenen bzw. von gegen Blutzellantigene gerichteten Antikörpern, mindestens kugelförmige Beads mit einem Durchmesser von 0,01 bis 10 μm , bevorzugt 2-4 μm , einen ersten nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörper sowie einen gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörper aus der Spezies, gegen die der erste Antikörper gerichtet ist.

Es ist klar, dass auch weitere Kits, die die in den erfindungsgemäßen Verfahren beschriebenen essentiell benötigten Bestandteile enthalten, Gegenstand der Anmeldung sind.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher. Sie sollen jedoch keineswegs limitierend verstanden werden.

BEISPIEL 1: Solubilisierung von Zellen

Solubilisierungspuffer: 1,21g Tris
ad 950 ml NaCl
pH 7,4
Zugabe von 5 ml Triton X-100
ad 1000 ml NaCl

Die Testzellen (Thrombozyten) werden 1 min in einer Tischzentrifuge (Hersteller: Hettich) bei 10000 U/min sedimentiert. Der Überstand wird abgesaugt, und das Zellpellet wird in 100 μl Solubilisierungspuffer aufgenommen.

BEISPIEL 2

Ein spezifischer anti-GPIIa-IIIb Antikörper (Fa. BioTest) wurde biotinyliert und in Lösung mit Streptavidin beschichteten Beads versetzt. Die Bindung des

Antikörpers an die Beads wurde gezeigt. Es hat sich hier gezeigt, dass die Anwesenheit von 1mM Zink die Bindung fördert.

Anschließend werden die Beads mit solubilierten Blutzellen inkubiert und ein Fluoreszenz-markierter Zweitantikörper hinzugegeben. Ein positiver Testansatz ist gekennzeichnet durch vermehrte Anlagerung des sekundären Antikörpers an den Komplex, was wiederum über die dadurch vermittelte Fluoreszenz des abgetrennten Bead-Erstantikörper-Antigen-Zweitantikörper-Komplexes gemessen werden konnte.

Im Blut konnte das GPIIa-IIIb -Antigen so auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

BEISPIEL 3

Statt eines auf Fluoreszenz-Markierung beruhenden Tests wurde ein Agglutinationstest (Gelkartentest, Fa. Diamed, Schweiz) durchgeführt.

Auch auf diese Weise konnte im Blut das GPIIa-IIIb -Antigen so auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

BEISPIEL 4

Statt eines Elisa-Tests wurden die mit Zweitantikörper markierten Beads mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen.

Auch auf diese Weise konnte das GPIIa-IIIb-Antigen auf erstaunlich einfache Weise nachgewiesen werden.

BEISPIEL 5

Durchführung eines erfindungsgemäßen Tests unter Verwendung von Streptavidin Partikeln der Firma Diamed.

Patienten/Spender und Probenmaterial

20 µl Serum (30 min bei 56°C inaktiviert)

Reagenzien und Geräte

**Rot-fluoreszierende High-Density Streptavidin Polystyrene Partikel
(Diamed)**

Physikalische Eigenschaften:

Durchmesser: 2-4 µm

Dichte: 1,1-1,8 g/cm³

Die Suspension enthält 0,075% Partikel (v/v), daher wurden diese Beads in einem Volumen von 50 µl eingesetzt (im Vergleich Dynabeads 10 µl).

Bindungseigenschaften:

Streptavidin Dichte und Verhalten zur Biotin-Antikörper Bindung sind entsprechend Dynabeads.

Vorteile: Die Partikel sind rot fluoreszierend, dadurch ist die Ablesung erleichtert und die Kontrolle der Qualität kann auch mittels der dem Fachmann gut bekannten Methode der Durchflußzytometrie erfolgen.

Nachteile: Blocken der Partikel nach Coating mit PBS-BSA erscheint notwendig, da eine hohe Absorptivität dieser Partikel besteht.

Puffer

Partikel Puffer 10 mM PBS-Lösung , pH 7,4, 0,1% Tween 20

PBS-BSA (2%ig): Dulbecco's Phosphate buffered saline x10

1:10 in aqua dest. verdünnen

pH 7,2

Zugabe von 22%igem (1:10)Rinderalbumin

Solubilisationspuffer: 1,21g Tris

ad 950 ml NaCl

pH 7,4

Zugabe von 5 ml Triton X-100

ad 1000 ml NaCl

verwendete Antikörper:

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Form	Biotin Überschuss Faktor
GP IIb/IIIa (CD41)	P2	Maus	IgG1 κ	purified	15
GP Ia/IIa (CD49b)	Gi9	Maus	IgG1 κ	purified	15
GP Ib/IX (CD 42a)	FMC-25	Maus	IgG1 κ	purified	15
GP IV (CD 36)	FA6-152	Maus	IgG	purified	15
CD 9	ALB 6	Maus	IgG1 κ	purified	15
Maus IgG Fcγ Frag.		Ziege		purified	
Human IgG Fcγ Frag.		Ziege		Peroxidase	

Biotin: Sulfo-NHS-LC-Biotin, 25 mg, Pierce, Perbio Science, Rockford, USA

Filtration nach Biotinylierung in Millipore Filtereinheiten Ultrafree-MC 30
(Millipore Corporation, Bedford, USA), Filtrationsgrenze 30 kDa

Membran: Low binding regenerated Cellulose

Kalibrierung:

Es werden Spontan-Agglutination getestet und Negativ-Kontrollen mitgeführt.
Jede neue Charge oder Kopplung wird quantitativ in einer
durchflußzytometrischen Untersuchung kontrolliert. Hierbei werden Antigen-
beschichtete Partikel mit einem Fluoreszenz markierten Antikörper, der spezifisch
gegen das Antigen gerichtet ist inkubiert. Die durchflußzytometrisch einfach zu
messenden Fluoreszenz-Intensität auf der Oberfläche der Partikel ist proportional
dem Beschichtungsgrad.

Qualitätskontrolle: Mitführen von positiven und negativen Kontrollseren

Vorgehensweise:

Vorbereitung

Biotinylierung der monoklonalen Antikörper

Biotin ist ein Vitamin (244 Dalton), das als Co-Faktor der Carboxylasen fungiert.

Durch seine geringe Größe beeinflusst Biotin die Eigenschaften eines Makromoleküls nach Bindung in der Regel nicht. Die reaktive Gruppe für Biotin sind ϵ -amino-Gruppen von Lysin und Tyrosin (NHS-Biotin) mit der Bildung einer Amin-Bindung. Da Antikörper auch im Bereich der variablen Regionen Lysin enthalten können, kann die Biotinylierung zu einem Verlust der Antigen-Detektion führen. Um diesen Effekt auszuschließen oder zu reduzieren muss für jeden Antikörper eine optimale Biotin-Konzentration (Biotin-Überschuß) gefunden werden, bei der funktionelle Bereiche der Antikörper-Bindung nicht gestört werden (Ternynck and Avrameas 1990). Die Anwendung des NHS-LC-Biotin hat sich für Makromoleküle wie z.B. Glykoproteine als vorteilhaft gezeigt. Hierbei wird durch eine zusätzliche Kette mit 6 Carbonmolekülen (Hexanoat-Spacer, 22 A), eine mögliche sterische Behinderungen der Makromoleküle verhindert. Nach dem Sulfo-NHS-LC-Biotin in Lösung gebracht wurde ist eine schnelle Verarbeitung zu empfehlen, da das gelöste Biotin sehr anfällig für Hydrolyse ist.

Vorgehensweise:

Das Protein in 1 ml PBS auflösen und mmols des Biotin-Überschusses (Faktor 10-

15) berechnen: mmols Protein \times (12 or 20) = mmols Biotinreagenz-Zugabe:

mmols Biotin zu pipettieren \times 556* = mg Biotinreagenz zu geben

(* 556 ist das MG des Sulfo-NHS-LC-Biotin) Berechnung: mg Protein/ MG

Protein = mmols Protein

z.B. $1,3/150\ 000 = 8,7 \times 10^{-6}$ mmol IgG

$8,7 \times 10^{-6} \times 20 = 1,73 \times 10^{-4}$ mmol Biotinreagenz

$1,73 \times 10^{-4} \times 556 = 0,096373$ mg Biotin (0,1 mg)

1. Das Sulfo-NHS-LC-Biotin vor dem Öffnen Raumtemperatur erreichen lassen.
2. 1 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin in 1000 µl dH₂O auflösen (1 µg = 1 µl).
3. Inkubation 30 Min Raumtemperatur (alternativ 2 Stunden Inkubation in Eis) .
4. Entfernen des nicht konjugierten Biotins durch Zentrifugation mit Millipore Filter MC 30 in PBS.
5. Zentrifugen-Einstellung variiert in Abhängigkeit vom Protein, in der Regel sind 10-15 Minuten bei 10000 U/min. ausreichend, alternativ 30 min bei 3500 U/min
6. Aufbewahren des biotinylierten Antikörper bei 4°C in 0,01%Natrium Acid.

Berechnung des Biotinylierungsgrades:

Die Bestimmung des Biotinylierungsgrades erfolgt photometrisch mit Hilfe des HABA Reagenz (2-Hydroxyazobenzene-4-Carboxyl-Säure).

Dazu wird zunächst die Absorption bei 500 nm des HABA Reagenz (360 µl) allein gemessen und notiert, um dann die biotinylierte Probe (40 µl) zuzugeben. 5 Minuten nach der Zugabe wird erneut die Absorption bei 500 nm bestimmt. In Abhängigkeit des Biotin-Gehaltes der Probe findet durch eine kompetitive Bindung im HABA Molekül ein Farbumschlag statt, d.h. je höher ΔA um so höher der Biotinylierungs-Grad der Probe.

1. $A_{500} = (0.9) \times (A_{500} \text{ HABA Reagenz}) - (A_{500} \text{ des biotinylierten Protein})$
2. $\text{mmol/ml des biotinylierten Protein} = \text{mg biotinylierten Protein/ml der Probe}$
3. $\mu\text{moles Biotin/ml Reaktionsmix} = A_{500}$

Alternativ zur HABA Reagenztest kann eine Eichkurve der Biotinylierung für jedes verwendete Protein erstellt werden. Nach dieser Kurve kann die optimale Biotin-Menge, die für jedes Protein anders ist, einmalig pro Protein und Charge ermittelt werden.

Eine solche Eichkurve ist in Abbildung 2 gezeigt.

Seren: Kontroll Seren aus -20°C vorsichtig zunächst bei 4°C auftauern,
abzentrifugieren (2 min 13.000 U/min; Eppendorffzentrifuge)

Markierung und Solubilisierung der Thrombozyten-Glykoproteine
 2×10^7 Test-Zellen (typisiert) 1 min bei 10000 U/min im Eppendorfftube
abzentrifugieren, Überstand absaugen, Zellpellet in $30 \mu\text{l}$ PBS-BSA 2%
resuspendieren

je Ansatz werden $10 \mu\text{l}$ glykoproteinspezifischer biotinylierter monoklonaler
Antikörper hinzugegeben, für jeden eingesetzten Antikörper muss vorher anhand
von Titration nach Biotinylierung eine optimale Verdünnung bestimmt werden
(siehe Ausschluss der Spontan-Agglutination) CD 41 1:60, CD 42a und CD49b
1:10, HLA Antikörper 1:200 ! Variationen sind chargenabhängig !

30 Minuten bei 37°C inkubieren

Testthrombozyten 3 mal mit $100 \mu\text{l}$ PBS waschen (1 min bei 10000 U/min
zentrifugieren, Überstand absaugen und Thrombozytenpellet in $100 \mu\text{l}$ PBS
aufnehmen.

nach dem letzten Waschvorgang die Pellets in je $100 \mu\text{l}$ Solubilisationspuffer
lysieren, einzeln mit der Pipette mischen

30 min bei 4°C inkubieren

Antigen-Isolierung an Streptavidin Polymer-Partikel

Lysate 30 min bei 13000 U/min abzentrifugieren (4°C , Zellmembranreste werden
entfernt)

während der Zentrifugation der Lysate die DiaMed Streptavidin Partikel 1 mal mit
Partikel-Puffer 1 min bei 10000 U/min waschen

$10 \mu\text{l}$ Partikel (Konzentration 0,5%) zu $70 \mu\text{l}$ des Thrombozyten-Lysates
zugegeben

Inkubation 30 min bei 37°C

waschen der Partikel 1 x mit $100 \mu\text{l}$ Partikel-Puffer, 1 min 10000 U/min
Überstand absaugen

Partikel sind mit Antigen beschichtet und können nach Resuspension in Partikel
Puffer zu einer Konzentration von 0,075% in das Testsystem eingebracht werden.

Testansatz zur Antigen/Antikörper Detektion

20 µl Serum zu dem Partikel-Pellet geben, Pellet gut resuspendieren
Inkubation 30 min bei 37 °C
100 µl Partikel-Puffer zu den Partikel pipettieren
2 mal mit je 100 µl Partikel-Puffer waschen
in 50 µl Partikel Puffer aufnehmen, Pellet vorsichtig mischen
Partikel Suspension direkt auf die Ziege anti-human Karte (Diamed; erläutert in
Y. Lapierre et al., (1990), Transfusion 30(2):109-113) pipettieren
Karte ohne weitere Inkubation in DiaMed Karten Zentrifuge bei 900 U/min und
10 min zentrifugieren

Befund-Beurteilung siehe Abbildung 1.

Man erkennt deutlich die hohe Sensitivität des Tests.

Bisher wurden 34 Seren verschiedener Reaktivität selektiv getestet. Der Vergleich
mit dem MAIPA zeigt eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität.

Bei N=8 Seren konnte die Spezifität anti- Pla 1 parallel detektiert werden

Bei N=2 Seren konnte trotz Vorbefund sowohl in MAIPA als auch im Kartentest
kein

anti-Pla 2 detektiert werden

Bei N=4 Seren konnten Antikörper der Spezifität anti Bra nachgewiesen werden

Bei N=4 Seren konnten Autoantikörper verschiedener Spezifität nachgewiesen
werden

N=8 Seren wurden negativ getestet in MAIPA und Kartentest

N=8 Seren waren in beiden Tests unspezifisch reagierend

Bei einer Testdauer von 30-45 Minuten (unter Nutzung vorher beschichteter
Partikel), ist der Arbeits- und Zeitaufwand minimal.

Ergebnisdarstellung:

Beurteilung (siehe Abbildung 1)

Positiv: Agglutinierte Beads bilden eine rote Linie auf dem Gel oder sind im Gel verteilt (+++ bis +)

Negativ: Kompaktes Partikelsediment am Boden der Kavität der ID-Karte

Patentansprüche:

1. In vitro-Verfahren zum Nachweis von gegen Blutzell-Antigene gerichtete Antikörper in Proben aus Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (i) ein Mikrokügelchen ("Bead") mit einem gegen das nachzuweisende spezifische Blutzellantigen gerichteten, nicht-humanen Antikörper beschichtet,
 - (ii) zugehörige, spezifische, ausgewählte Blutzell-Antigene, die gegebenenfalls durch Solubilisierung von im Stande der Technik an sich schon bekannten standardisierten Blutzellen oder auch durch rekombinante oder proteinchemische Methoden erhalten werden können, mit den aus (i) erhaltenen beschichteten Beads mischt,
 - (iii) die durch Bindung des ausgewählten Antigens an den in (i) an das Bead gebundenen, nicht humanen Antikörper mit Antigen beschichteten Beads mit einer Serumprobe eines zu untersuchenden Patienten mischt, und
 - (iv) gegebenenfalls an den am Bead gebundenen Antigen gebundenen, aus der Probe stammende Blutzell-Antigen-Antikörper des Patienten mit Hilfe eines spezifischen anti-human-Antikörpertests nachweist.

2. In vitro-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Blutzell-Antigene, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (i) Beads mit nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörpern beschichtet,
 - (ii) Standardzellen solubilisiert bzw. gentechnisch oder proteinchemisch gewonnene Blutzell-Antigene in Lösung bringt,
 - (iii) das aus (ii) erhaltene Solubilisat bzw. die Lösung von gentechnisch oder proteinchemisch gewonnenen Blutzell-Antigenen mit spezifischen, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten und aus der in (i) definierten Spezies stammenden Antikörpern inkubiert,
 - (iv) die in (iii) gebildeten Komplexe mit den Beads aus (i) durch Zentrifugation isoliert, und
 - (v) direkt oder später gegen aus Patienten stammendes Antikörper-haltiges Serum im Agglutinationstest untersucht.

3. In vitro-Verfahren zum Nachweis von Blutzell-Antigenen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- (i) ein Mikrokügelchen ("Bead") mit einem gegen das nachzuweisende spezifische Blutzellantigen gerichteten Antikörper beschichtet,
 - (ii) Blutproben aus einem zu untersuchenden Patienten mit den darin enthaltenen Blutzellen einer Behandlung unterwirft, durch die die in der Membran der Blutzellen enthaltenen Antigene solubilisiert werden, und gegebenenfalls eine Antigen-angereicherte Fraktion herstellt,
 - (iii) die aus (i) erhaltenen beschichteten Beads mit der aus (ii) erhaltenen Probe mischt, und
 - (iv) das gegebenenfalls an den am Bead gebundenen Antikörper gebundene, aus der Probe stammende Blutzell-Antigen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpertests nachweist.
4. In vitro-Verfahren zum Nachweis von Blutzell-Antigenen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- (i) Beads mit nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörpern beschichtet,
 - (ii) Blutzellen aus zu untersuchenden Patienten solubilisiert,
 - (iii) das aus (ii) erhaltene Solubilisat mit spezifischen, gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten und aus der in (i) definierten Spezies stammenden Antikörpern inkubiert,
 - (iv) die in (iii) gebildeten Komplexe mit den Beads aus (i) durch Zentrifugation isoliert, und
 - (v) die Probe im Agglutinationstest untersucht.
5. In vitro-Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Blutzell-Antigene in einer Serumprobe eines Patienten, dadurch gekennzeichnet, dass man
- (i) biotinylierte, gegen das nachzuweisende Antigen gerichtete nicht humane Antikörper in Kontakt bringt mit humanen Testzellen, die die entsprechenden, nativen Blutzell-Antigene tragen,
 - (ii) den aus (i) gebildeten Komplex Bedingungen unterwirft, unter denen die Blutzellen solubilisieren,

- (iii) den Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper mit Hilfe von mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Mikropartikeln aus der Probe entfernt,
 - (iv) den in (iii) gebildeten Komplex mit einer Serumprobe eines zu untersuchenden Patienten in Kontakt bringt, und
 - (v) die im Falle des Vorhandenseins von spezifischen Antikörpern in der Serumprobe gebildeten Komplexe aus biotinyliertem Antikörper, Antigen und humanem Antikörper aus dem Serum nach Abtrennung des Komplexes aus der Probe mit einem anti-human Antikörper Test nachweist.
6. In vitro-Verfahren zum Nachweis von ausgewählten Blutzell-Antigenen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- (i) biotinylierte, gegen das nachzuweisende Antigen gerichtete Antikörper in Kontakt bringt mit humanen Testzellen, die die entsprechenden, nativen Blutzell-Antigene tragen,
 - (ii) den aus (i) gebildeten Komplex Bedingungen unterwirft, unter denen die Blutzellen solubilisieren,
 - (iii) den Komplex aus Antigen und biotinyliertem Antikörper mit Hilfe von mit Streptavidin oder mit Avidin beschichteten Mikropartikeln aus der Probe entfernt,
 - (iv) den in (iii) gebildeten Komplex mit einem gegen das Antigen gerichteten, bevorzugt markierten Zweitantikörper in Kontakt bringt, und
 - (v) die gebildeten Komplexe aus biotinyliertem Antikörper, Antigen und Zweitantikörper nach Abtrennung des Komplexes aus der Probe mit gängigen Methoden nachweist.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem Fluoreszenzmarkierte oder enzymatisch markierte Antikörper verwendet werden.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem biotinylierte Antikörper über Streptavidin und/oder Avidin beschichtete Beads gebunden werden.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Beads kugelförmig sind und einen Durchmesser von 0,01 bis 10 μm , bevorzugt 2 bis 4 μm aufweisen.
10. Kit für den Nachweis von Blutzellantigenen bzw. von gegen Blutzellantigene gerichteten Antikörpern, umfassend mindestens Beads nach Anspruch 9, einen spezifischen Antikörper gegen ein Blutzellantigen, sowie einen spezifischen anti-human Antikörper.
11. Kit für den Nachweis von Blutzellantigenen bzw. von gegen Blutzellantigene gerichteten Antikörpern, umfassend mindestens Beads nach Anspruch 9, einen ersten nicht anti-humanen, Spezies-spezifischen Antikörper sowie einen gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörper aus der Spezies, gegen die der erste Antikörper gerichtet ist.

WO 02/090989

1/2

PCT/EP02/05140

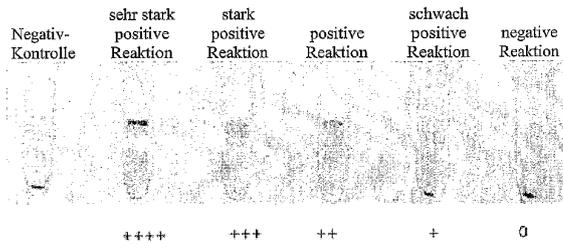


Abbildung 1

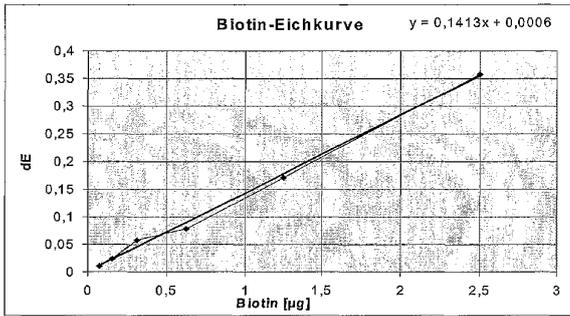


Abbildung 2

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090989 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/543, 33/80
 (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05140
 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 2002 (10.05.2002)
 (25) Einreichungssprache: Deutsch
 (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
 (30) Angaben zur Priorität: 101 22 806.6 10. Mai 2001 (10.05.2001) DE
- (71) Anmelder und
 (72) Erfinder: KIESEWETTER, Holger [DE/DE]; Am Grünen Zipfel 1, 13465 Berlin (DE). SALAMA, Abdulgabar [LL/DE]; Lotosweg 6, 13467 Berlin (DE).
 (74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt am Main (DE).
 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Erklärung gemäß Regel 4.17:
 — Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Veröffentlicht:
 — mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 12. Juni 2003
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/090989 A3

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BLOOD CELL ANTIGENS AND THE ANTIBODIES IN RESPONSE TO THE SAME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BLUTZELL-ANTIGENEN UND GEGEN DIESE GERICHTETE ANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting blood cell antigens and the antibodies in response to the same in a sample. The invention also relates to kits which facilitate the completion of said method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Blutzell-Antigenen und gegen diese gerichtete Antikörper in einer Probe. Weiterhin werden Kits zur Verfügung gestellt, die die Durchführung des Verfahrens erleichtern.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 02/05140
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 G01N33/80		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOELIGER C ET AL: "A RAPID AND SENSITIVE IMMUNOASSAY FOR ANTIBODIES AGAINST ALLOANTIGENS ON HUMAN PLATELET GLYCOPROTEINS (BIPA)" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 158, no. 2, 3 February 1992 (1992-02-03), pages 197-200, XP000371891 ISSN: 0022-1759	1-11
Y	abstract page 198 page 200	1,5,7-9
X	DE 42 28 395 A (LOELIGER CHRISTOPH CORNELIUS D) 3 March 1994 (1994-03-03)	1-11
Y	examples	1,5,7-9
	--- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 November 2002		25/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epic nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

Form PCT/ISA(210) (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/05140

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STOCKELBERG D ET AL: "DETECTION OF PLATELET ANTIBODIES IN CHRONIC IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA (ITP) A COMPARATIVE STUDY USING FLOW CYTOMETRY, A WHOLE PLATELET ELISA, AND AN ANTIGEN CAPTURE ELISA" EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 56, January 1996 (1996-01), pages 72-77, XP000983326 ISSN: 0902-4441 page 74, column 1	1,5,7-9
X	US 6 203 706 B1 (SCHWIND PETER ET AL) 20 March 2001 (2001-03-20) cited in the application column 12 -column 14	3,7-10
X	EP 0 325 723 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 2 August 1989 (1989-08-02) examples	3,7-10

*Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/05140

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
DE 4228395	A	03-03-1994	DE 4228395 A1	03-03-1994
US 6203706	B1	20-03-2001	EP 0849595 A1	24-06-1998
			AT 201100 T	15-05-2001
			AU 724475 B2	21-09-2000
			AU 4690797 A	25-06-1998
			BR 9705648 A	23-02-1999
			CN 1191312 A	26-08-1998
			DE 59606885 D1	13-06-2001
			DK 849595 T3	28-05-2001
			ES 2156610 T3	01-07-2001
			GR 3035882 T3	31-08-2001
			HK 1008244 A1	02-11-2001
			JP 10197534 A	31-07-1998
			NO 975937 A	19-06-1998
			PT 849595 T	31-10-2001
EP 0325723	A	02-08-1989	JP 1147367 A	09-06-1989
			EP 0325723 A2	02-08-1989

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/05140
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543 G01N33/80		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfgebiet (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfgebiet gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LOELIGER C ET AL: "A RAPID AND SENSITIVE IMMUNASSAY FOR ANTIBODIES AGAINST ALLANTOGENS ON HUMAN PLATELET GLYCOPROTEINS (G1PA)" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 158, Nr. 2, 3. Februar 1992 (1992-02-03), Seiten 197-200, XP000371891 ISSN: 0022-1759	1-11
Y	Zusammenfassung Seite 198 Seite 200	1,5,7-9
X	DE 42 28 395 A (LOELIGER CHRISTOPH CORNELIUS D) 3. März 1994 (1994-03-03)	1-11
Y	Beispiele ---	1,5,7-9
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhafte Erschließen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Demonstration, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht solidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung betrachtet wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahegelegt ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14. November 2002		25/11/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. Box 5010 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bevollmächtigter Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/05140

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	STOCKELBERG D ET AL: "DETECTION OF PLATELET ANTIBODIES IN CHRONIC IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA (ITP) A COMPARATIVE STUDY USING FLOW CYTOMETRY, A WHOLE PLATELET ELISA, AND AN ANTIGEN CAPTURE ELISA" EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, Bd. 56, Januar 1996 (1996-01), Seiten 72-77, XP000983326 ISSN: 0902-4441 Seite 74, Spalte 1	1,5,7-9
X	US 6 203 706 B1 (SCHWIND PETER ET AL) 20. März 2001 (2001-03-20) in der Anmeldung erwähnt Spalte 12 - Spalte 14	3,7-10
X	EP 0 325 723 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 2. August 1989 (1989-08-02) Beispiele	3,7-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/05140	
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören					
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4228395	A	03-03-1994	DE 4228395 A1		03-03-1994
US 6203706	B1	20-03-2001	EP 0849595 A1		24-06-1998
			AT 201100 T		15-05-2001
			AU 724475 B2		21-09-2000
			AU 4690797 A		25-06-1998
			BR 9705648 A		23-02-1999
			CN 1191312 A		26-08-1998
			DE 59606885 D1		13-06-2001
			DK 849595 T3		28-05-2001
			ES 2156610 T3		01-07-2001
			GR 3035882 T3		31-08-2001
			HK 1008244 A1		02-11-2001
			JP 10197534 A		31-07-1998
			NO 975937 A		19-06-1998
			PT 849595 T		31-10-2001
EP 0325723	A	02-08-1989	JP 1147367 A		09-06-1989
			EP 0325723 A2		02-08-1989

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100105290

弁理士 三輪 昭次

(72)発明者 ホルガー・キーゼヴェター

ドイツ連邦共和国13465ベルリン・アム・グリュエネンツィプフェル1

(72)発明者 アブデュルガーバー・サラマ

ドイツ連邦共和国13467ベルリン・ロートスヴェーク6