



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101711360 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200880012007.8

G01N 33/49 (2006.01)

(22) 申请日 2008.03.14

G01N 33/50 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006.01)

2007901385 2007.03.16 AU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.10.14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2008/000377 2008.03.14

(87) PCT申请的公布数据

W02008/113119 EN 2008.09.25

(71) 申请人 赛乐思迪斯有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 A·J·雷德福 S·L·琼斯

J·L·霍华德

(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 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 2 页

(54) 发明名称

细胞介导的免疫应答检验及其试剂盒

(57) 摘要

本发明提供用于测定从受试者中收集的小体积未稀释的全血中的细胞介导的免疫 (CMI) 的方法和试剂盒。具体地,该方法用于测定在体积例如为 50 μ l 至 500 μ l 的未稀释的全血样品中的应答。这样,包括儿童、成人或老人人类受试者的受试者的毛细管取样和快速测试是便利地。

1. 用于在从受试者收集的全血样品中测定细胞介导的免疫 (CMI) 应答的方法, 其中所述全血样品包括被抗原刺激后能够产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞, 所述方法包括:

(i) 使来自外周毛细血管的全血样品或来自受试者动脉或静脉的低于 0.5mL 的全血在基本上无需稀释所述样品的条件下在孵育容器中与抗原一起孵育; 和

(ii) 检测或测定免疫效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在或水平升高, 所述效应子分子指示受试者建立细胞介导的应答的能力。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其包括:

(i) 将来自外周毛细血管的全血样品或来自受试者动脉或静脉的低于 0.5mL 的全血收集到容器。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其用于选择用于治疗具有以下症状的受试者的合适的治疗策略: 炎性疾病状况, 病原性感染, 自体免疫失调, 免疫缺陷, 过敏或癌症或发展此类疾病的倾向。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中该方法包括孵育和 / 或收集毛细血管血液样品。

5. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中该方法包括用毛细管取样装置从受试者收集样品。

6. 根据权利要求 2 或 3 或 4 所述的方法, 其中将来自受试者的全血收集到包含抗原和 / 或抗凝血剂的容器中, 或其中其后将抗原和 / 或抗凝血剂添加到血液中。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中抗凝血剂为肝素。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述孵育步骤在简单糖, 例如右旋糖的存在下进行。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的方法, 其中所述受试者为人类。

10. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的方法, 其中所述受试者为动物或鸟类。

11. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述人类为儿童、成人或老人受试者。

12. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的方法, 其中所述全血样品与抗原一起孵育约 4 小时至约 50 小时。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中 ii) 部分的所述免疫效应子分子为: 细胞因子、补体系统的成分、穿孔蛋白、防御素、组织蛋白酶抑制素、颗粒酶、Fas 配体、CD-40 配体、外毒素、细胞毒素、趋化因子或单核因子。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述细胞因子为 IFN- γ , TNF α 或 GM-CSF。

15. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述免疫细胞选自自然杀伤 (NK) 细胞、T-细胞、B 细胞、巨噬细胞或单核细胞。

16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述细胞为 T-细胞。

17. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述抗原选自自体抗原、来自病原性有机体的抗原、金属或无机抗原、或肿瘤抗原或其类似物。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述病原性有机体为细菌、病毒、真菌或寄生生物。

19. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述抗原来自分枝杆菌属 (Mycobacterium)。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述抗原为选自 ESAT-6,CFP-10 和 TB7 的分枝杆菌蛋白。

21. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述抗原为破伤风类毒素 (TT) 或来自结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 或鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 的纯化蛋白质衍生物 (PPD)。

22. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述容器中的样品具有至少约 4mm 至约 6mm,最大高度约 12mm 至 20mm 的高度。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述容器中的样品具有至少约 6mm 至最大约 12mm 的高度。

24. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品具有 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm, 12mm, 13mm, 14mm, 15mm, 16mm, 17mm, 18mm, 19mm 或 20mm 的高度或其间的高度。

25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述样品具有 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm 或 12mm 的样品高度或中间的高度。

26. 根据权利要求 1 至 25 任一项所述的方法,其中孵育的总样品体积低于 500 μ l, 低于 400 μ l, 低于 300 μ l, 低于 200 μ l, 低于 100 μ l, 或低于 50 μ l。

27. 根据权利要求 1 至 25 任一项所述的方法,其中所述样品为毛细血管血液,孵育的总体积为约 2000 μ l, 1500 μ l, 1400 μ l, 1300 μ l, 1200 μ l, 1100 μ l, 900 μ l, 800 μ l, 700 μ l, 600 μ l, 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l 或 40 μ l 的体积或中间的体积。

28. 根据权利要求 1 至 27 任一项所述的方法,其中所述样品为毛细血管血液样品。

29. 根据权利要求 2 所述的方法,其中将所述样品收集到约 3-4mm 直径的毛细管。

30. 根据权利要求 1 至 29 任一项所述的方法,其中所述孵育容器适于保持样品的最佳形状,并且其中所述形状具有选自以下的一种或两种或更多的尺寸:(i) 最大圆直径低于约 6mm;(ii) 高度至少约 4mm 至 6mm,最大高度约 12mm 至 20mm;或 (iii) 体积低于 0.5mL, 任选地低于 400 μ l。

31. 用于测定从受试者收集的全血样品中的细胞介导的免疫 (CMI) 应答的试剂盒,其中所述全血样品包括被抗原刺激后产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞,所述试剂盒以多组分形式包括:(i) 一个或多个收集和/或孵育容器,其适合容纳或孵育外周毛细血管全血样品或低于 0.5mL 的静脉或动脉全血;(ii) 一种或多种测试抗原,用于分析针对其的体外应答,以及任选的对照抗原;(iii) 反应试剂,用于测定免疫效应子分子的存在或水平的升高;(iv) 任选的一套包括本文所公开的方法中任一的说明书。

32. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中孵育容器适于形成样品的最佳形状,其中所述形状具有选自以下的一种或两种或更多的尺寸:(i) 最大圆直径低于约 6mm;(ii) 高度至少约 4mm 至 6mm,最大高度约 12mm 至 20mm;或 (iii) 体积低于 0.5mL, 任选地低于 400 μ l。

33. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述说明书包括以下说明:(i) 收集全血,并在收集/孵育容器中将血液混合;(ii) 将全血样品与抗原和与任选的对照抗原或有丝分裂原一起孵育;(iii) 将孵育容器离心和收集血浆;以及 (iv) 检测血浆中的免疫效应子分子。

34. 根据权利要求 31、32 或 33 所述的试剂盒,其进一步包括毛细管取样装置。

35. 根据权利要求 31、32 或 33 所述的试剂盒,其中所述受试者为人类。

36. 根据权利要求 31、32 或 33 所述的试剂盒,其中所述受试者为动物或鸟类。

37. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,其中所述人类为儿童、成人或老人受试者。

38. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其进一步包括孵育器,其中所述全血样品与抗原一起孵育约 4 小时至约 50 小时。

39. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中 (iii) 部分的所述免疫效应子分子为:细胞因子、补体系统的成分、穿孔蛋白、防御素、组织蛋白酶抑制素、颗粒酶、Fas 配体、CD-40 配体、外毒素、细胞毒素、趋化因子和单核因子。

40. 根据权利要求 39 所述的试剂盒,所述细胞因子为 IFN- γ , TNF α 或 GM-CSF。

41. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述免疫细胞选自自然杀伤 (NK) 细胞、T- 细胞、B 细胞、巨噬细胞或单核细胞。

42. 根据权利要求 41 所述的试剂盒,其中所述细胞为 T- 细胞。

43. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述抗原选自自体抗原、来自病原性有机体的抗原、金属或无机抗原、或肿瘤抗原或其类似物。

44. 根据权利要求 43 所述的试剂盒,其中所述抗原来自分枝杆菌属 (Mycobacterium)。

45. 根据权利要求 43 所述的试剂盒,其中所述抗原为选自 ESAT-6, CFP-10 和 TB7 的分枝杆菌蛋白。

46. 根据权利要求 43 所述的试剂盒,其中所述抗原为破伤风类毒素 (TT) 或来自结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 或鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 的纯化蛋白质衍生物 (PPD)。

47. 根据权利要求 31 或 32 所述的试剂盒,其中所述孵育容器形成至少约 4mm 至 6mm, 最大高度约 12mm 至 20mm 的样品高度。

48. 根据权利要求 47 所述的试剂盒,其中所述孵育容器形成至少约 6mm 至最大约 12mm 的样品高度。

49. 根据权利要求 31 或 32 所述的试剂盒,其中所述孵育容器形成 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm, 12mm, 13mm, 14mm, 15mm, 16mm, 17mm, 18mm, 19mm 或 20mm 的样品高度或其高度。

50. 根据权利要求 31 或 32 所述的试剂盒,其中所述孵育容器形成 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm 或 12mm 的样品高度或中间高度。

51. 根据权利要求 32 所述的试剂盒,其中所述孵育的样品具有低于 500 μ l, 低于 400 μ l, 低于 300 μ l, 低于 200 μ l, 低于 100 μ l, 或低于 50 μ l 的体积。

52. 根据权利要求 32 所述的试剂盒,其中所述样品为毛细血管血液,孵育的样品具有约 2000 μ l, 1500 μ l, 1400 μ l, 1300 μ l, 1200 μ l, 1100 μ l, 900 μ l, 800 μ l, 700 μ l, 600 μ l, 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l 或 40 μ l 的体积或中间体积。

53. 根据权利要求 31 至 52 任一项所述的试剂盒,其中所述样品为毛细血管血液样品。

54. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述反应试剂包括用于检测 IFN- γ 的抗体缀合物。

55. 根据权利要求 31 至 54 任一项所述的试剂盒,其包括约 3-4mm 直径的毛细管。

细胞介导的免疫应答检验及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明主要涉及用于诊断、监视或治疗的方法和试剂盒，其测量针对体外试剂（原文为“agent in vitro”，也可称为“体外因子”）的细胞应答性。具体地，本发明提供用于测量从受试者收集的小样品全血中的针对抗原的细胞介导的免疫（CMI）应答的系统。该方法和试剂盒将在全血样品分析中找到广阔应用，所述全血样品具有包括来自婴儿和儿童或其它受试者的一系列不同体积，其中所述样品体积是受限的或其中需要小样品体积。

背景技术

[0002] 本说明书中作者引用的出版物的参考书目集中在说明书的末尾。

[0003] 本说明书对任何之前出版物（或从其衍生的信息），或任何已知的事物的引用，不是并且也不应该看作是之前出版物（或从其衍生的信息），或公知常识的已知事物形成为本说明书涉及到努力方面的承认或供认或任何形式的暗示。

[0004] 免疫应答的功能在于消除入侵的病原体或毒素。在某些情况下免疫应答对有机体是非常破坏性的，并且存活依赖于免疫系统从非自体区分自体的能力。例如当免疫系统对自体过度应答时产生自体免疫疾病。某些免疫应答针对相对无害的非自体分子。例如哮喘和枯草热，涉及对非自体的免疫应答，其中所述免疫应答比病原因子（causative agent）更衰弱。通常，先天的免疫系统筛选出针对非病原性有机体的应答，并且有助于防止针对此类无害试剂的适应性免疫应答。

[0005] 适应性免疫应答由淋巴细胞例如执行抗体应答的 B 淋巴细胞或执行细胞介导的应答的 T 淋巴细胞来执行。B 淋巴细胞产生有助于使病原体和毒素失活的免疫球蛋白。T 细胞直接与呈递于宿主细胞表面上的非自体分子（抗原）反应，其与提供“自体”分子指令系统的主要组织相容性（MHC）分子有关。在两种情况下，产生对非自体分子的特定表位特异的细胞应答，并提供免疫应答网络和免疫效应子分子。

[0006] 因此，用于诊断或监视感染或评价受试者建立（mount）针对非自体的免疫应答的能力的一种方法为确定受试者是否已经建立了针对抗原刺激的免疫应答。由于 T 细胞应答包括产生效应子 T 细胞，所述效应子 T 细胞能够对抗原应答或能够被刺激来通过产生免疫效应子分子对抗原应答，可以在体外测定应答于特定抗原的这些分子的产生，作为细胞介导的免疫应答的测定。然而，由于非自体抗原性分子通过抗原呈递细胞呈递至 T 细胞，存在复杂的和必须在体外成功地发生的细胞与分子的相互作用以产生用于检测的充分的免疫效应子分子。

[0007] 用于检测细胞介导的免疫应答的大多数体外方法包括使用各种分离技术从全血中纯化外周血单核细胞。此类检验包括铬释放检验、细胞毒性检验、MHC I 类四聚体检验、用于 IFN- γ 或其它细胞因子的检验，其中 ELISPOT 提供良好的实例。ELISPOT 方法固定抗原呈递细胞，并且已经用于检测应答于抗原性刺激产生特定细胞因子的 T 细胞的数量。

[0008] 如果使用全血，通常将其稀释于培养基中以稀释红细胞，这被认为降低该检验的敏感性。使用未稀释全血的管内细胞介导的免疫应答检验描述于国际公开 No. WO

2004/042396,申请人为 Cellestis Limited,在此将其全文引入以作参考。国际公开 No. WO 2004/042396 公开了使用血液收集管以用于样品与抗原和简单糖一起孵育,并且使用该试管系统与其中将血液转移到 24-孔微量滴定板并在 24-孔微量滴定板中孵育的检验相比,显示增强的敏感性。

[0009] 对于人类和牲畜动物中的全血检验而言,至少从受试者中取 3 毫升血液,以提供充足的材料来进行细胞介导的免疫应答检验。通常通过静脉血取样、借助于经常在真空下的用针刺入收集血管来取该量。

[0010] 检测免疫效应子分子的各种方法,例如酶联免疫吸附检验 (ELISA)、放射免疫检验 (RIA)、或血细胞计数法可以使用小体积,然而,对于进行体外细胞介导的免疫应答检验的抗原性刺激阶段的改进系统,在本领域存在需要。具体地,需要允许以小体积血液进行的全血测试的方法,例如通过外周毛细血管取样获得的那些。筛选小样品血液的能力将极大地便利儿童或其它血液可能受到限制或难于获得的受试者的取样,并且允许无需静脉采血的血液取样,其通过使用毛细血管血例如通过拇指、足跟、耳垂或其它方便位点的点刺测试 (pricktest) 获得的那些,并且用于测试在单次小容量抽血中 (single blood draw of low volume) 的包括有丝分裂原和半抗原刺激物的多种或一系列抗原。

发明内容

[0011] 本发明部分基于以下令人惊奇的发现:可以在来自受试者的非常小体积的全血中产生和检测细胞免疫应答,并且其不必须为静脉或动脉血。这意味着收集血液用于进行细胞介导的免疫应答的检验可以使用,例如点刺取样外周毛细血管血液来实现,其通常产生约 1 毫升或更少的体积。此外,该非常小的全血样品可以就它们产生免疫效应子分子的能力来测试,便于从小样品中多次测试。

[0012] 在一个广泛的实施方式中,本发明提供用于在来自受试者的样品中测定细胞介导的免疫应答的方法,其中所述样品包括被试剂 (agent) 例如抗原刺激后分泌免疫效应子分子的细胞。在一个特定实施方式中,本发明提供用于在从受试者收集的全血样品中测定细胞介导的免疫 (CMI) 应答的方法,其中所述全血样品包括被抗原刺激后能够产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞,所述方法包括:(i) 使来自外周毛细血管的全血样品或来自受试者动脉或静脉的低于 0.5mL 全血在基本上无需稀释样品下在孵育容器中与抗原一起孵育;和 (ii) 检测或测定免疫效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在,所述效应子分子指示受试者建立细胞介导的应答的能力。

[0013] 在另一实施方式中,该方法包括:(i) 将来自外周毛细血管的全血样品或来自受试者动脉或静脉的低于 0.5mL 的全血收集到容器;(ii) 使全血与抗原和抗凝血剂一起孵育;和 (iii) 检测或测定免疫效应子分子或能够产生免疫效应子分子的核酸分子的存在,所述免疫效应子分子指示受试者建立细胞介导的应答的能力。

[0014] 该方法将在选择用于治疗患有例如以下疾病的受试者的合适的治疗策略中发现广泛应用:炎性疾病状况,病原性感染例如由细菌、病毒、寄生虫或真菌病原体引起的那些,自体免疫失调,免疫缺陷,过敏或癌症或发展此类疾病的倾向。

[0015] 在优选的实施方式中,该方法包括收集和 / 或孵育毛细血管血液样品,或用毛细血管取样装置从受试者收集样品。

[0016] 在某些实施方式中,该方法包括:在样品的形状包括已经被优化的尺寸(dimension)的条件下将样品与试剂一起孵育。在某些实施方式中,就特定受试者或受试者群优化所述尺寸。在其它实施方式中,就特定细胞样品优化所述尺寸。在某些实施方式中,尺寸为样品的高度。在另一实施方式中,优化体积。在进一步的实施方式中,还优化外周血单核细胞(PBMC)或其它免疫细胞的浓度。所述“优化”是指与其他测试的值或范围相比所选尺寸值或范围提供最佳的细胞应答。这样,在某些实施方式中,所述样品包括使用本文公开的方法已经预选择来提供最佳细胞应答的尺寸。

[0017] 如在实施例1中所列举,标准缀合物联免疫检验测定(standard conjugate-linked immunoassay testing)证明:在少至0.5mL,0.4mL,0.3mL,0.2mL和0.1mL的血液孵育总体积中产生IFN- γ 。描述于实施例2至4的进一步的实验显示:孵育少至20 μ l和/或具有4mm样品高度的血液样品能够产生充分的免疫效应子分子以用于诊断检验。最佳结果在约6mm至约12mm或约5mm至约18mm以及中间值的样品高度下获得,而不依赖于收集或孵育的样品体积。

[0018] 因此,在某些实施方式中,孵育容器适于保持样品的最佳形状,其中所述形状具有选自以下一种或两种或更多的尺寸:(i)最大圆直径低于约6mm;(ii)高度至少约4mm至6mm,最大高度约12mm至20mm;或(iii)体积低于0.5mL,任选地低于约400 μ l。

[0019] 在另一方面,本发明提供用于在来自受试者的全血样品中测定针对试剂(agent)的细胞介导的应答的试剂盒,所述试剂盒包括:与能够刺激免疫细胞分泌免疫效应子分子的试剂分开或一起容纳的收集容器,以及进一步任选地包括使用说明书。在某些实施方式中,将该样品从收集容器转移到一个或多个用于与抗原一起孵育的容器,并且所述试剂盒包括一个或多个收集容器和一个或多个孵育容器。方便起见,收集容器包括抗凝血剂。在其它实施方式中,孵育容器包括抗原和任选的简单糖例如右旋糖。

[0020] 因此,本发明提供用于测定从受试者收集的全血样品中的细胞介导的应答的试剂盒,所述试剂盒以多组分形式包括:(i)一个或多个收集和/或孵育容器,其适合容纳或孵育外周毛细血管全血样品或低于0.5mL的静脉或动脉血;(ii)一种或多种测试抗原,用于分析针对其的体外应答,以及任选的对照抗原;(iii)反应试剂(reagents),用于测定免疫效应子分子的存在或水平的升高;(iv)任选的一套包括本文所述方法之一的说明书。

[0021] 在某些实施方式中,孵育容器适于保持样品的最佳形状,其中所述形状具有选自以下一种或两种或更多的尺寸:(i)最大圆直径低于约6mm;(ii)高度至少约4mm至6mm,最大高度约12mm至20mm;或(iii)体积低于0.5mL,任选地低于约400 μ l。

[0022] 说明书,例如可以包括收集全血和将血液在收集/孵育容器中混合以将抗凝血剂与该血液混合的说明。在其它实施方式中,说明书包括将全血样品与抗原和与任选的对照抗原或有丝分裂原一起孵育的说明。在其它实施方式中,说明书包括将孵育容器离心和收集血浆的说明。在某些实施方式中,说明书包括检测血浆中的免疫效应子分子的说明。

[0023] 在某些实施方式中,标记收集容器以将样品高度确定为约12mm。在某些实施方式中,试剂盒包括多个标记的相同和/或不同尺寸的收集容器。在某些实施方式中,试剂盒包括毛细管取样装置。在另一实施方式中,试剂盒包括一种或多种用于诊断的测试抗原和任选的作为对照抗原的有丝分裂原,以用于分析针对其的体外应答。任选地,试剂盒进一步包括适于测定免疫效应子分子或其编码分子的存在或水平升高的反应试剂,包括阳性和阴

性对照。在某些实施方式中,试剂盒进一步包括适于进行用于免疫效应子检测的检验的反应试剂。在一种实施方式中,所述检验为用于 IFN- γ 、或下游效应子分子的检验。在优选的实施方式中,反应试剂包括用于检测 IFN- γ , TNF 或 GM-CSF 的抗体缀合物。在示例性的实施方式中所述抗体缀合物检测 IFN- γ 。此类检验包括例如基于 ELISA 或 ELISPOT 的检验或本领域已知的类似检验。在另一实施方式中,所述检验为用于编码免疫效应子分子,例如 IFN- γ 的 RNA 的逆转录-扩增检验。此类检验中本领域是已知的,并且描述于例如 Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001 和 Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002。

[0024] 在另一方面,本发明包括可以自动化或半自动化的方法、计算机程序、计算机产品、计算机以便于从受试者检验的结果的解释。

[0025] 上述简述不是并且不应以任何形式看作本发明所有实施方式的穷举列举。

附图说明

[0026] 图 1 为用于执行由存储介质编码的指令的系统的图解表示。

[0027] 图 2 为磁性存储介质的截面的图解表示。

[0028] 图 3 为光学可读数据存储系统的截面的图解表示。

具体实施方式

[0029] 除非另外指出,本文所用的所用科学技术术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解相同的含义。虽然与本文所述类似或等同的任何方法或材料可用于本发明实践和测试中,但还是描述优选的方法和材料。为了本发明的目的,以下术语如下定义。

[0030] 术语“约”规定前述术语数值中的一些变化或校正。其涉及数量 (quantity)、体积、水平、值、百分比、尺寸、大小或量 (amount), 其可以相对于列举的术语以多至 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 或 3% 变化。这样,术语“至少约 6mm”包括 4mm 或 5mm 以及 6mm 和大于 6mm 的高度,而“约 12mm”包括 13mm, 14mm, 15mm 或 16mm 或小于 12mm 的高度。此外,术语覆盖单位数值的分数部分,例如 6.5mm 或 6.9mm 等。在优选的实施方式中,变化是较小的,并且限制至数值中的 10% 或 15% 的变化。

[0031] 本文使用冠词“a”和“an”(对应于中文的“一个”、“一种”或未将其翻译)来指一个或多个(即至少一个)冠词的语法目标。举例而言,“一种抗原”或“一个抗原”或“抗原”是指一种抗原或多于一种抗原,“一种免疫效应子分子”或“一个免疫效应子分子”或“免疫效应子分子”是指一种或多种免疫效应子分子。

[0032] 本文所用术语“抗原”包括刺激免疫应答、特别是细胞免疫应答的任何分子或试剂,并且包括反义蛋白或肽、半抗原、有丝分裂原、过敏原或毒素或具有此活性的任何天然发生或合成的分子或其部分。在某些实施方式中,抗原包括一种或多种全长或部分长度的多肽。在其它实施方式中,抗原包括肽或一组肽,其来自一种或多种不同全长或部分长度的多肽。在某些实施方式中,使用在体外模拟呈递至免疫系统的抗原的一种或多种作用的抗原。通常,就给定群体或受试者中的最佳选择性和敏感性选择测试抗原。在一种示例性实施方式中,所述抗原为来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的抗原。在某

些实施方式中,所述抗原为结核 (TB) 特异性抗原。在其它实施方式中,所述抗原为衍生自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 或鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 的纯化蛋白。在某些实施方式中,所述抗原刺激分枝杆菌蛋白例如 ESAT-6 (Skjot et al., *Infection and Immunity*, 68(1) :214-20, 2000), CFP-10 和 TB7 (Brock et al., *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 5(5) :462-467, 2001)。有丝分裂原可以用作阳性对照,或来检测样品中细胞建立抗原非特异性免疫应答的能力。在其它实施方式中,所述试剂为有丝分裂原。在其它实施方式中,所述抗原选自自体抗原、来自病原性有机体的抗原、刺激免疫应答的金属或无机分子、或肿瘤抗原。在某些实施方式中,所述试剂(抗原)为磷脂、磷蛋白或磷脂蛋白。在另一示例性实施方式中,所述抗原来自巨细胞病毒 (CMV)。在某些实施方式中,来自病原性有机体的所述抗原为细菌、病毒、寄生虫或真菌抗原或其类似物。

[0033] 除非上下文需要,否则单词“包括 (comprise)”,以及变体例如“包括 (comprises)”和“包括 (comprising)”,将被理解为暗示包含指定的整体 (integer) 或步骤或整体或步骤的组,但是不排除任何其它整体或步骤或整体或步骤的组。

[0034] 除非另外指出,本文所述的每一实施方式加以必要的修正可用于每一个其它实施方式。

[0035] 优选地,“受试者”为人类。然而,本发明涉及灵长类、牲畜动物、伴侣动物和鸟类以及非哺乳动物例如爬行动物和两栖动物。因此,该检验应用于人类、牲畜、兽医和野生动物治疗、诊断和监测。在某些实施方式中,人类受试者选自展示特定属性或状况的组。在某些实施方式中,受试者为儿童、成人或老人受试者。在某些实施方式中,受试者具有或者已经具有病原性感染、自体免疫疾病、或癌症,或正在经受癌症治疗,或有发展此类疾病的倾向,免疫缺失或经受炎症反应。一旦受试者已经被评价包括使用本方法和/或试剂盒,则他们可以被治疗,因此,还特别涉及包括诊断和治疗的方法。

[0036] 因此,本发明提供本文公开的方法中的任一,其中受试者为人类,包括儿童、成人或老人受试者。在其它实施方式中,受试者为动物或鸟,例如牲畜、赛马、外来的 (exotic)、迁移的动物或鸟。

[0037] 如上所述,本发明的显著优点之一为便于使用未稀释的来自外周毛细血管的全血进行 CMI 检验。因此,在某些实施方式中,该方法包括使用毛细管取样装置从受试者中收集样品。该装置可以为适于毛细管取样任何外周毛细血管例如拇指、手指、足跟、脚趾、耳垂等的点刺装置。在某些实施方式中,该装置包括毛细管。毛细管或其它窄或锥形容器可用于形成具有非常小样品的最佳高度的样品形状,例如约 20 μ l 至 50 μ l 与约 200 μ l 至 250 μ l 之间。在某些实施方式中,孵育容器适于保持样品的最佳形状,其中所述形状具有选自以下一种或两种或更多的尺寸:(i) 最大圆直径低于约 6mm;(ii) 高度至少约 4mm 至 6mm,最大高度约 12mm 至 20mm;或 (iii) 体积低于 0.5mL,任选地低于约 400 μ l。在某些实施方式中,容器中的样品具有至少约 6mm 至最大约 12mm 的高度。在某些实施方式中,样品具有 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm, 12mm, 13mm, 14mm, 15mm, 16mm, 17mm, 18mm, 19mm 或 20mm 的高度或中间的高度。在其它实施方式中,样品具有 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm 或 12mm 的高度或中间的高度。关于样品的体积,在某些实施方式中,孵育的总样品体积为低于 500 μ l, 低于 400 μ l, 低于 300 μ l, 低于 200 μ l, 低于 100 μ l 或低于 50 μ l。其中所述样品为毛细血管血,孵育的总样品体积选自约 2000 μ l, 1500 μ l, 1400 μ l, 1300 μ l, 1200 μ l, 1100 μ l,

900 μ l, 800 μ l, 700 μ l, 600 μ l, 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l 或 40 μ l 或中间的体积。在某些实施方式中,将样品收集到约 3-4mm 直径的毛细管。

[0038] 关于“免疫细胞”包括例如淋巴细胞的细胞,其包括自然杀伤 (NK) 细胞、T- 细胞、(CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺ 细胞)、B 细胞、巨噬细胞和单核细胞;树突细胞或任何其它能够应答于直接或间接抗原刺激而产生效应子分子的细胞。方便起见,免疫细胞为淋巴细胞,更特别是 T- 淋巴细胞。

[0039] 因此,本发明涉及本文公开的方法,其中免疫细胞选自自然杀伤 (NK) 细胞、T- 细胞、B 细胞、巨噬细胞或单核细胞。在优选的实施方式中所述细胞为 T- 细胞。

[0040] 免疫效应子分子可以为应答于细胞被抗原激活或刺激而产生的一系列分子中的任何一个。虽然干扰素 (IFN) 例如 IFN- γ 为特别有用的免疫效应子分子,其它包括一系列的细胞因子例如白介素 (IL),例如 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 或 IL-12;肿瘤坏死因子 α (TNF- α , TNF- β),例如在补体途径中的补体或成分的许多其它中的集落刺激因子 (CSF) 例如粒细胞 (G)-CSF 或粒细胞巨噬细胞 (GM)-CSF,穿孔蛋白、防御素、组织蛋白酶抑制素 (cathelicidins)、颗粒酶 (granzymes)、Fas 配体、CD-40 配体、外毒素 (exotoxins)、细胞毒素、趋化因子和单核因子。

[0041] 因此,在某些实施方式中本发明提供其中免疫效应子分子为以下的方法:细胞因子、补体系统的成分、穿孔蛋白、防御素、组织蛋白酶抑制素、颗粒酶、Fas 配体、CD-40 配体、外毒素、细胞毒素、趋化因子或单核因子。在优选的实施方式中,细胞因子为 IFN- γ , TNF α 或 GM-CSF。

[0042] “全血”是指来自受试者的血液,其基本上尚未被稀释或分级 (fractionate),对于细胞保持血液的周围温度以接近于实际的天然血浆条件。这样,根据本发明小体积或干燥量的例如抗原、糖或抗凝血剂的添加不构成稀释,而超过血液体积的培养基的添加构成稀释。尽管未稀释的全血为优选和最方便的样品,本发明扩展到包含免疫细胞的其它样品,例如淋巴液、脑脊液、组织液(例如骨髓或胸腺液)和呼吸系统液体 (respiratory fluid) 包括鼻和肺液。这些样品的衍生物还可以通过处理获得。例如,血沉棕黄层细胞 (buffy coat cells) 或外周血单核细胞或抗原呈递细胞可以通过本领域已知的方法获得。全血还可以处理以通过本领域已知的方法除去例如红细胞和 / 或血小板的成分。通过添加超过约 40% 至 50% 初始体积的样品,将出现实质上的稀释。

[0043] 因此,在某些实施方式中,该方法包括检测效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在。在该实施方式中,效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在或水平的升高指示受试者建立细胞介导的应答的能力。

[0044] 在示例性的实施方式中,样品的形状包括已被优化的高度。在该实施方式的一个实施例中,细胞样品包括至少 6 毫米 (mm) 至最大约 12mm 的高度,或任何中间高度。本领域技术人员将理解,关于使用的样品体积或样品在其中孵育的容器的形状,对于样品的优选高度的目前公开的需要允许可观的变化或选择。这样,在某些实施方式中,大体积的样品,如 10 毫升 (mL) 血液在合适尺寸的容器中孵育,以确保孵育期间样品的高度不超过约 12mm。在另一标度上,可以例如在 3-4mm 直径的毛细管中孵育 50 微升 (μ l) 的样品,以提供至少约 6 毫米 (mm) 至最大约 12mm 的样品高度,或任何中间高度。本发明不必限于要孵育的样品的任何特定体积或包含样品的容器的任何特定尺寸或形状。然而,在优选的方面本发明

便于使用小体积的血液（包括毛细管取样体积），因此避免静脉血液取样的需要。此外，不需要要求额外处理步骤的稀释血液，将血液以任意状态保持以用于测定免疫应答。使用来自人类供体的全血已经确定上述最佳高度。其它受试者或受试者群或亚群或细胞样品类型具有不同的特征，并且在样品孵育的最佳高度上显示某些变化。在这些组中涉及通过优化在样品孵育的最小和最大高度方面一些其它次要的变化。一旦理解本发明，此类优化在接受人 (addressee) 的技能内。

[0045] 在某些实施方式中，其中共孵育样品和抗原的容器还为用于从受试者中收集样品的收集容器。可以使用很多不同可获得的容器中的任一个，条件是它们提供合适的样品尺寸。在实施例中描述了许多不同的管以旨在例示，但本发明绝不限于这些容器。在某些实施方式中，容器为包括真空以便于从受试者中收集血液的管。在其它实施方式中，容器为毛细管。在某些实施方式中，毛细管用于从皮肤表面通过毛细作用收集血液。在某些实施方式中，将样品从受试者收集到包含抗原的收集容器中，或随后向收集容器添加抗原。在某些实施方式中，使用毛细管取样装置例如针点刺装置取样血液，将血液收集到肝素化的收集容器，并随后转移到合适的容器以与试剂共孵育。

[0046] 在某些实施方式中，样品为血液样品。通常，血液在抗凝血剂例如肝素的存在下保持，当添加血液时其可以在容器中或随后添加。任选的，简单糖例如右旋糖包含于容器中，或添加到孵育混合物。在一些优选的实施方式中，血液样品为全血样品。在某些实施方式中，将来自受试者的全血收集到包含抗原和 / 或抗凝血剂的容器中，在其它实施方式中，其后将抗原和 / 或抗凝血剂添加到血液中。

[0047] 在一种实施方式中，该方法包括：使用毛细管取样装置从受试者收集血液样品，将血液导入合适的收集容器。在某些实施方式中，毛细管取样装置包括抗凝血剂和抗原。在其它实施方式中，收集容器或随后的容器 (subsequent vessel) 包括抗原。在其它实施方式中，收集容器包括简单糖例如右旋糖或其它保持样品细胞建立 CMI 应答的能力的试剂。无论通过哪种途径，该方法包括：使抗原与基本上未稀释样品的血液样品接触，在样品形状包括已对特定受试者或受试者群或样品类型优化过的高度的条件下使样品与抗原一起孵育。在另一实施方式中，该方法包括使样品与试剂一起孵育，检测效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在。在示例性的实施方式中，免疫效应子分子为细胞因子例如 IFN- γ 。

[0048] 在其它实施方式中，将血液通过标准方法收集到收集容器，并转移到预定尺寸的样品（测试）容器，以确保在样品形状包括已对特定受试者或受试者群或样品类型优化过的高度的条件下使规定体积的血液与抗原一起孵育。

[0049] 使用血液收集管作为收集容器和测试容器公开于国际公开 No. WO 2004/042396，申请人为 Cellestis Limited，在此将其全文引入以作参考。

[0050] 在某些实施方式中，与抗原一起孵育的血液样品包括低于约 1mL 血液或高于约 2mL 血液的体积。在其它实施方式中，孵育期间 1mL 血液样品或约 1mL 血液样品不包括 13mm 的宽度。

[0051] 在某些实施方式中，毛细管取样装置为点刺装置，例如但绝不限于美国专利 No. 4, 469, 110 所描述的那些。

[0052] 在另一实施方式中，该方法包括：评价在来自一个或多个受试者组中的血液样品

中的细胞介导的免疫应答,其中评价来自每一受试者组的样品以确定来自每一受试者组的主要评估的样品的最小体积。任选地,该方法包括:取样适合每一受试者或受试者组的血液的量,其中在与抗原一起孵育期间每一样品包括,包含已对特定受试者或受试者群或样品类型优化过的高度的形状。这样,例如,来自包括小样品体积(低于约1毫升)的受试者样品的分析结果可以容易地与来自包括例如几毫升血液的大样品的结果比较。这样,通过表征和控制细胞介导的应答检验中的变量,本发明增强来自检验的输出的值。

[0053] 本发明还部分基于以下观察:孵育期间由孵育容器的形状确定的样品的高度,可用于调控细胞介导的免疫应答检验的敏感性。在一种实施方式中,本发明提供测定在细胞样品中的细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括:在其中样品的形状包括至少6毫米(mm)至约12mm的高度的条件下使样品与抗原一起孵育。在该观测特别有用的应用中,本发明提供检验来自受试者的样品的方法,其中样品体积是受限的或其中需要低样品体积。根据使用血液样品实施的本发明的一种实施方式,使用少至约20 μ l至约200 μ l的血液样品,其中孵育期间样品的形状包括在其最高点至少约6毫米(mm)的高度,至在其最高点约12mm的最大高度。

[0054] 因此,一方面本发明提供在来自受试者的样品上进行细胞介导的免疫应答检验的方法,其中所述方法避免使用针(needles),该方法包括使用毛细管取样装置收集血液,以获取小体积的血液。在另一相关方面,本发明包括实施本文所述的检验,包括使用小体积的样品例如约20 μ l至低于但约1mL的样品的一种或多种。在其它实施方式中,使用针对细胞检验技术的标准血液取样,并使用较大的样品体积,典型的1mL至5mL,但包括大至约10至200mL或以上的体积。在优选的实施方式中,全血的总孵育体积在约50 μ l至低于约500 μ l的范围内。

[0055] 本发明提供用于测定受试者样品中细胞介导的免疫(CMI)应答的方法,包括在样品的形状包括已被优化的尺寸的条件下将样品与试剂一起孵育。在某些实施方式中,细胞样品与抗原一起孵育约4或5至约50小时。

[0056] 在某些实施方式中,该方法基于测定通过免疫系统的细胞应答于抗原性刺激的免疫效应子分子的产生。在其它实施方式中,免疫效应子分子为由效应子T细胞应答于抗原刺激产生的即时效应子分子(immediate effector molecules)。在其它实施方式中,测定下游效应子。例如,IFN- γ 或其它即时效应子分子引起测定其产生的其它效应子分子的产生。在另一实施方式中,免疫效应子的产生通过测定能够产生免疫效应子的核酸分子的水平或存在来测定。因此,在某些实施方式中,免疫效应子可以使用配体或结合分子例如对效应子特异的抗体或通过测定编码效应子的基因的表达水平来检测。因此,本发明提供确定受试者细胞应答性的方法,而且,提供用于诊断感染性疾病、病理条件、免疫状况、免疫活性水平和T细胞对内源性或外源性抗原的应答性的标记的方法。

[0057] 因此,在另一实施方式中,本发明涉及用于测定在受试者中的CMI应答的方法,所述方法包括:i)将来自受试者的流体样品收集到收集容器,其中所述样品包括被试剂刺激后产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞。在某些实施方式中,所述收集容器包括抗凝血剂,例如肝素。在其它实施方式中,所述收集容器包括试剂。在某些实施方式中,该方法进一步包括使试剂与收集容器中的样品接触。该方法进一步包括iii)在样品的形状包括已被优化的尺寸的条件下使所述样品与抗原一起孵育。在某些实施方式中,该方法任选的包

括 iv) 检测免疫效应子分子或能够产生这些中任一核酸分子的存在,其中效应子分子或能够产生效应子分子的核酸分子的存在或水平的升高指示受试者建立细胞介导的应答的能力。在其它实施方式中,免疫效应子为细胞因子、细胞毒素或趋化因子。在示例性的实施方式中,免疫效应子为 IFN- γ 。

[0058] 在某些实施方式中,通过测定在具有一系列尺寸的样品中效应子细胞功能以及选择与效应子细胞功能的最敏感测定相关的形状来优化样品的形状。在优选的实施方式中,样品的高度是变化的。在示例性的实施方式中,样品的高度从最大高度约 12mm,最小高度约 6mm 而变化。

[0059] 根据优选的实施方式,本发明提供用于测定人类受试者中的 CMI 应答的方法,所述方法包括:使用毛细管取样装置将来自所述人类受试者的样品收集到收集容器中。在某些实施方式中,所述样品包括被抗原、有丝分裂原或半抗原刺激后能够产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞。在某些实施方式中,该方法包括使所述样品与抗原一起孵育,然后测定免疫效应子分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应子分子的存在或水平指示所述人类受试者建立细胞介导的免疫应答的能力。

[0060] 因此,在另一优选的实施方式中,本发明提供用于测定受试者中 CMI 应答的方法,所述方法包括将来自所述受试者的样品收集到收集容器中,其中所述样品包括被抗原刺激后能够产生 IFN- γ 分子的免疫系统的细胞,将所述样品与抗原一起孵育,然后测定 IFN- γ 分子的存在或水平的升高,其中所述 IFN- γ 分子的存在或水平指示所述受试者建立细胞介导的免疫应答的能力。

[0061] 从受试者收集的样品通常保存在血液收集容器中。尽管未稀释的全血是优选和极方便的样品,本发明扩展到包含免疫细胞的其它样品,例如淋巴液、脑脊液、组织液和呼吸系统液体包括鼻和肺液。

[0062] 在从受试者抽血后延长一段时间 (extended periods) 后,CMI 系统的细胞丧失建立全血中 CMI 应答的能力,并且抽血后 24 小时未干预 (intervention) 的应答经常是严重地降低或缺失。在本发明中人工和对专门设备需要的降低允许使用抗原的 CMI 刺激在护理地点 (carelocation) 例如医生办公室、诊所、门诊设备和兽医诊所或在农场进行。一旦抗原刺激完成,对新鲜和活性细胞的不再存在。IFN- γ 和其他细胞因子或免疫效应子分子在血浆中是稳定的,这样,样品可以被储存或输送,而不需要与用于其它感染疾病或其他疾病诊断的标准血清样品类似的方式的特定的条件或快速时间要求。

[0063] 孵育步骤可以从约 4 或 5 小时至 50 小时,更优选约 5 小时至 40 小时,更优选约 8 至 24 或约 16 至 24 小时,或之间的时间阶段。在某些实施方式中,任选的起始混合步骤以将抗原分布到整个样品后,进行样品孵育而无需进一步混合。

[0064] 因此,本发明另一优选的实施方式涉及用于测定包括人类受试者的受试者中 CMI 应答的方法,所述方法包括:通过毛细管取样从所述受试者收集全血的样品,将所述全血样品与抗原一起孵育,然后测定免疫效应子分子例如 IFN- γ 的存在或水平的升高,其中所述免疫效应子分子的存在或水平指示所述受试者建立细胞介导的免疫应答的能力。

[0065] 测定 CMI 的能力对于评估受试者的以下能力是重要的:应答由病原性试剂例如微生物或病毒或寄生虫引起的感染、建立例如在糖尿病中的自体免疫应答以防止癌症或其它肿瘤条件或测试对环境抗原的敏感性 (过敏测试)。因此,提到“测定在受试者中的 CMI 应

答”包括和包含感染性和自体免疫疾病的免疫诊断、免疫活性的标记和对内源性和 / 或外源性抗原（包括测定疫苗的效力）的 T- 细胞应答的检测以及用于过敏、炎性疾病和癌症的标记。

[0066] 以小体积血液进行该测试的能力对于儿童和其它血液可能受限的样品而言是重要的。在纯化淋巴细胞方面任何处理步骤的不存在在小血液体积方面增加优点，这是因为来自小体积的淋巴细胞的纯化和计数有实际上的困难，如在无菌环境中添加温暖的无菌培养基和反应试剂。通过调整孵育容器或样品的相对比例（例如，形状、宽度和高度）以小体积获得最佳 CMI 应答的能力提供有价值的优点。术语容器 (vessel)、容器 (container)、隔室 (compartment) 可相互交换地使用，并且包括容纳任何体积的任何容器 (receptacle)，例如孔、液体采样器 (dip)、管、艾芬道夫 (eppendorf) 等。

[0067] 本文涉及的自体免疫疾病还特别包括斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自体免疫爱迪生疾病多发性硬化 (Autoimmune Addison' s Disease Multiple Sclerosis)、肾上腺的自体免疫疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、白塞氏病 (Behcet' s Disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎 (Celiac Sprue-Dermatitis)、慢性疲劳症候群 (CFIDS)、慢性炎症 (Chronic Inflammation)、脱髓鞘、慢性炎症 (Chronic Inflammation) 多神经病、变应性肉芽肿性血管炎 (Churg-Strauss Syndrome)、瘢痕性类天疱疮 (Cicatricial Pemphigoid)、肢端硬皮综合征 (CREST Syndrome)、冷凝集素病、克罗恩氏病、疱疹样皮炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛、肾小球肾炎、甲状腺机能亢进 (Grave' s Disease)、格林 - 巴利综合征 (Guillain-Barre)、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病胰岛素依赖型糖尿病 (IgA Nephropathy Insulin Dependent Diabetes) (I 型)、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃尔氏病、混合性结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、心肌炎、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多内分泌腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征 (Sjogren' s Syndrome)、全身肌强直综合征、全身性红斑狼疮、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎和白癜风。

[0068] 通常评估在这些个体中潜在或实际的 CMI 应答性是重要的。

[0069] 涉及的其它疾病状况包括炎性疾病状况。

[0070] 本发明涉及的炎性疾病的实例包括但不限于导致在特定区域发红 (redness)、肿胀、疼痛和感觉发热的那些疾病或失调，这意味着保护组织免受损伤或疾病的影响。可以使用本发明方法治疗的炎性疾病包括但不限于：痤疮、心绞痛 (angina)、关节炎、吸入性肺炎、疾病、积脓症、胃肠炎、炎症、肠道流行性感冒、NEC、坏死性小肠结肠炎、盆腔炎疾病、咽炎、PID、胸膜炎、嗓子发炎疼痛 (raw throat)、发红 (redness)、发红病 (rubor)、咽喉痛、胃流感和尿路感染、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy)。

[0071] 癌症治疗还某种程度上依赖于 CMI。本文涉及的癌症包括：特征在于不受控的细胞生长（例如形成肿瘤）而這些细胞没有任何分化成特异和不同的细胞的疾病和紊乱。此类疾病和紊乱包括 ABL1 原癌基因、AIDS 相关癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、囊性腺样癌、肾上腺皮质癌、特发性髓样化生 (Agnogenic myeloidmetaplasia)、脱发、腺泡状软组织肉瘤 (Alveolar soft-part sarcoma)、肛門癌、血管肉瘤、再生障碍性贫血、星形细胞瘤、共济失调毛细血管扩张、基底细胞癌（皮肤）、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑干胶质瘤、脑和 CNS 瘤、乳腺癌、CNS 肿瘤、类癌肿瘤、子宫颈癌、儿童脑瘤、儿童癌症、儿童白血病、儿童软组织肉瘤、软骨肉瘤、绒毛膜癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病、结直肠癌 (Colorectal Cancers)、皮肤 T 细胞淋巴瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤 (Dermatofibro sarcoma-provesselans)、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤文氏肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼黑素瘤、成视网膜细胞瘤、输卵管癌 (FallopianVessel cancer)、范可尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤、泌尿生殖器癌、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、妇科癌、血液恶性肿瘤、毛细胞白血病、头和颈癌、肝细胞癌、遗传性乳腺癌、组织细胞增多病、霍奇金病、人类乳头状病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、平滑肌肉瘤、白血病、利弗劳梅尼 (Li-Fraumeni) 综合征、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、新陈代谢癌、口腔癌、多发性内分泌瘤病、蕈样肉芽肿病、骨髓增生异常综合征、骨髓瘤、骨髓增生性疾病、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合征、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、眼癌 (Ocular Cancers)、食道癌、口腔癌 (Oral cavity Cancer)、口咽癌、骨肉瘤、造口卵巢癌 (Ostomy OvarianCancer)、胰腺癌、鼻窦癌、甲状旁腺癌、腮腺癌、阴茎癌、外周神经外胚层瘤、脑垂体癌、红细胞增多症、前列腺癌、稀少癌症及相关疾病 (Rare-cancers-and-associated-disorders)、肾细胞癌视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、先天性血管萎缩性皮肤异色症 (Rothmund-ThomsonSyndrome)、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤、塞扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌 (SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、鳞状细胞癌（皮肤）、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌（膀胱）、移行细胞癌（肾-骨盆-/-输尿管）、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌、膀胱上皮分化标志物 (Uroplakins)、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom's-Macroglobulinemia)、肾母细胞瘤 (Wilms' Tumour)。

[0072] 可以测试一系列抗原中的任一，例如对特定有机体、病毒、自体抗原或癌细胞特异的那些。作为选择，可以使用更常用的试剂来测试细胞介导的免疫应答的通用能力。后者的实例包括来自结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 的 PPD 和破伤风类毒素。任何肽、多肽或蛋白质，碳水化合物、糖蛋白、磷脂、磷蛋白或磷脂蛋白或非蛋白化学试剂可用于本检验系统。

[0073] 如上所述，免疫效应子分子的检测可以在蛋白或核酸水平上进行。因此，提到“所述免疫效应子分子的存在或水平”包括直接或间接数据。例如，高水平的 IFN- γ mRNA 为间接数据，显示增加的 IFN- γ 水平。用于评估 RNA 的本领域已知的检验描述于例如 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001 and Ausubel (Ed) *Current Protocols in Molecular Biology*, 5th Edition, John Wiley&Sons,

Inc, NY, 2002。

[0074] 免疫效应子的配体在检测和 / 或定量这些分子上特别有用。针对免疫效应子分子的抗体特别有用。本文涉及的用于检验的技术在本领域是已知的, 并且包括, 例如三明治检验、ELISA 和 ELISSPOT。还包括快速现场护理免疫层析装置 (Rapid point of care immunochromatographic devices)。提到“抗体”包括抗体的部分、哺乳动物源化 (例如人源化) 抗体、重组或合成抗体以及杂交和单链抗体。

[0075] 多克隆和单克隆抗体都能够通过用免疫效应子或其抗原性片段免疫获得, 任一类型可用于免疫检验。获得两种类型血清的方法在本领域是已知的。多克隆血清不太优选, 但通过以下相对容易制备: 用有效量的免疫效应子, 或其抗原性部分注射合适的实验室动物, 从该动物收集血清, 通过任何已知的免疫吸附技术分离特定血清。虽然通过该方法产生的抗体实际上可用于任何类型的免疫检验, 由于产品的潜在异质性它们通常不优选。

[0076] 在免疫检验中单克隆抗体的使用特别优选, 因为能够大量产生它们以及产品的均匀性。通过将永久细胞系和对免疫原性制剂敏感的淋巴细胞融合衍生的, 用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞系的制备可以通过本领域技术人员已知的技术来完成。

[0077] 因此, 本发明的另一方面涉及用于检测来自受试者的包含免疫细胞的样品中的免疫效应子的方法, 所述方法包括: 在足以形成抗体 - 效应子复合物的条件下, 将所述样品或所述样品的等分试样与对所述免疫效应子或其抗原性片段特异的抗体接触一段时间, 然后检测所述复合物。

[0078] 样品包括全血。该方法包括在平面或球形固体载体上的微阵列和巨阵列 (macro-arrays)。

[0079] 通过参考美国专利 4, 016, 043, 4, 424, 279 和 4, 018, 653 可以看出, 可以获得宽范围的免疫检验技术。

[0080] 以下为一种类型检验的描述。将未标记的抗体固定在固体基质上, 将要就免疫效应子 (例如抗原) 测试的样品与结合分子接触。孵育足以允许形成抗体 - 抗原复合物的合适的时间后, 然后将用能够产生可检测信号的报告分子标记的针对该抗原特异的二抗加入并孵育, 使经过足以形成抗体 - 抗原 - 标记的抗体的另一复合物的时间。冲洗掉任何未反应的材料, 通过观察由报告分子产生的信号确定抗原的存在。结果通过简单的观察可视信号可以是定性的, 或可以通过与包含已知量的抗原的对照样品比较来定量。该通用技术对于本领域技术人员是已知的, 为许多变体中的任何。

[0081] 在这些检验中, 对瞬时免疫效应子 (instant immune effector) 具有特异性的一抗共价地或主动地结合到固体表面。典型地固体表面为玻璃或聚合物, 最常用的聚合物为纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。固体载体可为以下形式: 容器、珠、球、微孔板 (microplate) 的盘 (discs)、或适于进行免疫检验的任何其它表面。结合方法在本领域是已知的, 通常由交联共价结合或物理吸附组成, 在用于测试样品的制剂中洗涤聚合物 - 抗体复合物。然后将要测试的样品的等分试样加入固相复合物, 并在合适的条件下 (例如约 20°C 至约 40°C) 孵育足够的时间 (例如 2-120 分钟或当更方便时, 过夜) 以允许结合存在于抗体中的任何亚单位。孵育时间后, 将抗体亚单位固相洗涤和干燥, 并与对抗原的部分的特异性二抗一起孵育。二抗与报告分子连接, 报告分子用于指示二抗与半抗原的结合。

[0082] 对于该检验有许多变体。一种特别有用的变体为所有或许多组分基本上同时地混合的同时检验 (simultaneous assay)。

[0083] 关于本说明书中所用的“报道分子”，是指通过其化学性质提供分析上可鉴定的信号的分子，其允许检测抗原结合的抗体。检测可以是定性或定量的。在该类型检验中最常用的报道分子为酶、荧光团或包含放射性核素的分子（即放射性同位素）和化学发光分子。合适荧光团的实例提供于表 2。在酶免疫检验的情况下，酶通常借助于戊二醛或高碘酸盐缀合到二抗。然而，为了更容易地识别，存在各种不同的缀合技术，其对于本领域技术人员容易获得。其中常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。当通过相应的酶水解时，与特定酶一起使用的底物通常就产生可检测的颜色变化而选择。合适酶的实例包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。还可以使用荧光底物，其产生荧光产物而不是上述的发色底物。在所有情况下，将酶标记的抗体加入一抗-抗原复合物，使其结合，然后洗涤掉过量的反应试剂。然后将包含合适底物的溶液加至抗体-抗原-抗体的复合物。底物将与连接到二抗的酶反应，给出定性可视的信号，其可通常分光光度地被进一步定量，以给出存在于样品中的抗原的量的指示。再一次，本发明扩展到基本上同时的检验。

[0084] 作为选择，荧光化合物，例如荧光素和罗丹明，可以化学地偶联到抗体上而不改变其结合能力。当通过用特定波长的光照射激活时，荧光染料-标记的抗体吸收光能，诱导分子中的可激发性状态，然后发射为用光显微镜能够可视检测的特征颜色的光。使荧光标记的抗体与一抗-抗原复合物结合。洗涤掉未结合的反应试剂之后，然后将残余的三元复合物暴露到合适波长的光下，观察到的荧光指示目的抗原的存在。免疫荧光和 EIA 技术在本领域非常良好的建立，对于本方法特别优选。然而，还可以使用其它报道分子，例如放射性同位素、化学发光或生物发光分子。

[0085] 存在可使用的一系列其它检测系统，包括胶体金，本发明包括所有此类检测系统。

[0086] 本发明还涉及基因检验，例如包括 RT-PCR 分析或其它基于本领域已知的策略的扩增来检测编码免疫效应子的基因序列的 RNA 表达产物。

[0087] 在一种实施方式中，PCR 使用引物对进行，其一种或两种通常用相同或不同的能够给出可区分信号的报道分子标记。荧光团的使用在本发明实施中尤其有用。合适荧光团的实例可以选自表 2 中给出的列表。其它标记包括发光 (luminescence) 和磷光以及红外染料。这些染料或荧光团还可用作用于抗体的报道分子。

[0088] 本发明包括分析荧光发射的任何合适方法。在这点上，本发明涉及包括但不限于以下技术：例如由 Lakowicz 等, *Biophys. J.*, 72 :567, 1997 公开的 2-光子和 3-光子时间分辨的荧光光谱 (2-photon and 3-photon time resolved fluorescence spectroscopy)，例如由 Eriksson 等, *Biophys. J.*, 2 :64, 1993 公开的荧光寿命成像以及例如由 Youvan et al., *Biotechnology*. 3 :1-18, 1997 公开的能量共振能量转移。

[0089] 发光 (Luminescence) 和磷光可分别由本领域已知的合适的发光或磷光标记产生。在这点上可使用鉴定此类标记的任何光学方法。

[0090] 红外辐射可由合适的红外染料产生。可用于本发明的示例性红外染料包括但不限于以下公开的那些：Lewis et al., *Dyes Pigm.*, 42(2) :197, 1999, Tawa et al., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890, Daneshvar et al., *J. Immunol. Methods*, 226(1-2) :

119-128,1999, Rapaport et al., Appl. Phys. Lett., 74(3):329-331,1999 and Duriget al., J. Raman Spectrosc., 24(5):281-285,1993。可以使用任何合适的红外光谱法来询问 (interrogate) 红外染料。比如,在该点上可使用例如由 Rahman et al., J. Org. Chem., 63: 6196,1998 描述的傅立叶变换红外光谱。

[0091] 合适地,电磁波散射可由入射电磁辐射包括光和 X 射线的衍射、反射、偏振或折射引起。此类散射可用于定量 mRNA 的水平或蛋白质的水平。

[0092] 在分析荧光团发射上流式细胞仪特别有用。

[0093] 如本领域已知,流式细胞仪为高通量技术,其包括当悬浮于流体流时随着它们通过一道或多道激光束的路径,快速分析颗粒(例如标记的 mRNA, DNA 或蛋白质)的物理和化学特性。由于每一颗粒拦截激光束,使用任何合适的例如下文描述的跟踪算法,由每一细胞或颗粒发射的散射光和荧光可以被检测和记录。

[0094] 现代流式细胞仪能够进行这些达 100,000 细胞/颗粒 s^{-1} 的任务。通过使用过滤器和二向色镜的光学阵列,不同波长的荧光可以被分离并同时检测。此外,可以使用许多具有不同激发波长的激光。因此,可以使用各种荧光团以靶向或检查例如样品内不同的免疫效应子或来自多个受试者的免疫效应子。

[0095] 可用于本发明方法的合适的流式细胞仪包括使用单激发激光 (single excitation laser),测定 5 至 9 个光学参数(参见表 3)的那些,所述单激发激光通常为氩离子风冷激光,运行在 15mW,其光谱线 488nm。更先进的流式细胞仪能够使用多个激发激光,除了氩离子激光(488 或 514nm)之外,例如 HeNe 激光(633nm)或 HeCd 激光(325nm)。

[0096] 例如, Biggs et al., Cytometry, 36:36-45,1999 已经使用三个激发激光构建了 11 个参数的流式细胞仪,并且已经证明除了正向和侧向散射测定外使用 9 个可区分的荧光团以旨在免疫表型分型(即分类)颗粒。目前商业上可获得的参数的最大数量为 17: 正向散射、侧向散射和三个激发激光,每个具有 5 个荧光检测器。所有参数是否都能够充分地利用极大地依赖于消光系数、量子产率和所有荧光团之间光谱重叠的量 (Malemed et al., "Flow cytometry and sorting", 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990)。然而,将理解本发明不限于任何特定的流式细胞仪或任何特定的参数组。在这点上,本发明还涉及使用例如 Fu et al., Nature Biotechnology, 17:1109-1111,1999 公开的微型流式细胞仪 (microfabricated flow cytometer) 代替传统的流式细胞仪。

[0097] 本发明的检验对于高通量筛选或对于就来自一个受试者的许多免疫效应子筛选而言可以是自动化或半自动化的。自动化通过计算机软件方便地控制。

[0098] 因此本发明涉及用于评估一种或多种免疫效应子存在或不存在的计算机程序产品,所述产品包括:

[0099] (1) 接收与标记的 mRNA 或抗体相关的报道分子的特性 (identity) 作为输入值的代码;

[0100] (2) 将所述输入值与参考值比较,以确定报道分子的水平和/或与报道分子连接的分子的特性的代码;和

[0101] (3) 储存代码的计算机可读介质

[0102] 在另一实施方式中,程序产品进一步包括接受关于在试管中的样品的高度作为输入信息的代码。在某些实施方式中,所述信息鉴定包含样品的测试容器,所述样品具有超出

一个或多个预定尺寸的形状。在某些实施方式中,信息可以为报告样品(或对应的测试容器)检测的信号的形式,其中样品的高度超过至少约 12mm 或对于不同的样品的其它校正的值。在另一实施方式中,信息可以为报告样品检测的信号形式,其中样品的高度低于约 6mm 或对于不同的样品的其它校正的值。

[0103] 本发明另一方面扩展到用于评估一种或多种免疫效应子存在或不存在的计算机,所述计算机包括:

[0104] (1) 机器可读数据存储介质,包括用机器可读数据编码的数据存储材料,其中所述机器可读数据包括鉴定与标记的 mRNA 或抗体相关的报道分子的输入值;

[0105] (2) 工作内存 (working memory),用于处理所述机器可读数据的指令;

[0106] (3) 中央处理单元,其耦合到所述工作内存和所述机器可读数据存储介质,用于处理所述机器可读数据以比较所述值来提供报道分子或它们连接的分子的特性或水平的评估;以及

[0107] (4) 输出硬件,耦合到所述中央处理单元,用于接收比较的结果。

[0108] 这些实施方式的方案之一在图 1 中显示,所述图 1 显示系统 10,包括包含中央处理单元("CPU")20 的计算机 11,工作内存 22,其可为例如 RAM(随机存取内存)或"磁芯"存储器("core" memory)、大容量存储器 24(例如一个或多个磁盘驱动器或 CD-ROM 驱动器)、一个或多个阴极射线管("CRT")显示终端 26、一个或多个键盘 28、一根或多根输入线 30、以及一根或多根输出线 40,所有都通过传统的双向系统总线 50 相互连接。

[0109] 输入硬件 36,通过输入线 30 耦合到计算机 11,可以以各种方式实现。例如,本发明的机器可读数据通过使用调制解调器或调制解调器 32 输入,所述调制解调器或调制解调器 32 通过电话线或专用数据线 34 连接。作为选择或此外,输入硬件 36 可以包括 CD。作为选择,ROM 驱动器或磁盘驱动器 24 与显示终端 26 连接,键盘 28 可用作输入装置。

[0110] 输出硬件 46,通过输出线 40 耦合到计算机 11,类似地可以通过传统的装置实现。举例而言,输出硬件 46 可以包括 CRT 显示终端 26 以用于显示如本文所述的合成多核苷酸序列或合成多肽序列。输出硬件还可以包括打印机 42,以便可以产生硬拷贝输出,或磁盘驱动器 24 以存储稍后使用的系统输出。

[0111] 运行时,CPU 20 协调使用各种输入和输出装置 36,46,协调来自大容量存储器 24 的数据存取以及向工作内存 22 存取或从工作内存 22 存取,并且确定数据处理步骤的顺序。许多程序可用于处理本发明的机器可读数据。示例性的程序可以使用例如以下步骤:

[0112] (1) 输入鉴定与标记的 mRNA 或抗体相关的报道分子的输入值;

[0113] (2) 评估,包括将所述输入值与参考值比较以确定报道分子的水平和/或与报道分子连接的分子的特性;和

[0114] (3) 输出评估结果。

[0115] 图 2 显示磁性数据存储介质 100 的截面图,其可以用机器可读数据或指令组编码,以用于评估免疫效应子的水平,其可由例如图 1 的系统 10 的系统执行。介质 100 可以为传统的软盘或硬盘,具有可以为传统的合适的基质 (substrate) 101,在一面或两面的可以为传统的合适的涂层 102,包含其极性或取向可以磁性地改变的磁畴 (magnetic domains) (不可见)。介质 100 还可以具有开口用于接收磁盘驱动器或其它数据存储装置 24 的主轴 (spindle)。将介质 100 的涂层 102 的磁畴极化或取向以便以可以为传统的方式编码用于

通过例如图 1 的系统 10 的系统执行的机器可读数据。

[0116] 图 3 显示光学可读数据存储介质 110 的截面图,其也可用此类机器可读数据或指令组编码,用于设计本发明的合成分子,其可由例如图 1 的系统 10 的系统执行。介质 110 可为传统的致密光盘只读存储器 (CD-ROM) 或可擦写介质 (rewritable medium) 例如磁光盘,其光学上可读并且磁-光学上可写。介质 100 优选具有可以为传统的合适的基质 111,和通常在基质 111 一侧的可以为传统的合适的涂层 112。

[0117] 已知,在 CD-ROM 的情况下,涂层 112 为反射性的,并且压有 (impressed with) 多个凹坑槽 (pits) 113 以编码机器可读数据。凹坑槽的排列通过将激光从涂层 112 的表面反射来读取。保护涂层 114,其优选基本上透明,设置在涂层 112 上部。

[0118] 本发明还涉及用于根据本文所述的方法,评估受试者建立细胞介导的应答的能力的试剂盒。方便起见该试剂盒为隔室形式 (compartmental form),具有一个或多个适于接收来自受试者的样品的隔室,所述样品例如优选通过毛细管取样,例如通过点刺装置收集的全血。这样在某些实施方式中,该试剂盒包括适于毛细管取样的装置,例如刺穿或穿孔皮肤以允许从外周毛细血管流血的装置。用于接收样品的容器可以具有相同的均一尺寸,或它们可以包括多个尺寸。在某些实施方式中,用于接收样品的容器被标记或否则安排成可以评估容器中的样品的高度。容器还可以适于包含抗凝血剂,其中样品为具有或不具有简单糖例如右旋糖的全血,以维持免疫细胞的有效功能能力。

[0119] 通常,试剂盒为封装有一套说明书用于销售的形式。说明书通常为用于测定受试者中 CMI 应答的方法的形式,所述方法包括:从所述受试者收集样品,其中所述样品包括被抗原刺激后能够产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞,在样品的形状包括已被优化的尺寸的情况下,将所述样品与抗原一起孵育,然后任选地测定免疫效应子分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应子分子的存在或水平指示所述受试者建立细胞介导的免疫应答的能力。

[0120] 方便起见,该试剂盒进一步包括毛细管取样装置和/或孵育器。在某些实施方式中,使用约 3-4mm 直径的毛细管收集血液。

[0121] 在某些实施方式中,样品源自其的受试者为人类受试者,例如儿童、成人或老人受试者。任何动物或鸟可为受试者。

[0122] 虽然示例性的免疫效应子分子为 IFN- γ ,其它细胞因子例如作为补体系统中容易检验的成分 TNF α 和 GM-CSF、穿孔蛋白、防御素、组织蛋白酶抑制素、颗粒酶、Fas 配体、CD-40 配体、外毒素、细胞毒素、趋化因子和单核因子。在某些实施方式中测试的免疫细胞选自自然杀伤 (NK) 细胞、T-细胞、B 细胞、巨噬细胞或单核细胞。

[0123] 在某些实施方式中,试剂盒包括选择以下的抗原:自体抗原、来自病原性有机体的抗原、金属或无机抗原、或肿瘤抗原或其类似物。在某些实施方式中,抗原来自分枝杆菌属,例如但绝不限于 ESAT-6, CFP-10 和 TB7。在其它实施方式中,测试的抗原为破伤风类毒素 (TT) 或来自结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 或鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 的纯化蛋白质衍生物 (PPD)。

[0124] 如关于本方法所述,选择容器以在孵育步骤期间提供最佳样品形状。在某些实施方式中,孵育容器形成至少约 4mm 至 6mm 至最大高度约 12mm 至 20mm 的样品高度。在其它实施方式中,优选至少约 6mm 至最大约 12mm 的样品高度。在某些实施方式中,孵育容器形成

4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm, 12mm, 13mm, 14mm, 15mm, 16mm, 17mm, 18mm, 19mm 或 20mm 的样品高度或其间高度。在其它实施方式中, 孵育容器形成 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm, 11mm 或 12mm 的样品高度或中间高度。相对于孵育容器中的样品体积, 在某些实施方式中, 孵育的样品具有低于 500 μ l, 低于 400 μ l, 低于 300 μ l, 低于 200 μ l, 低于 100 μ l, 或低于 50 μ l 的体积。在其它实施方式中, 样品为毛细血管血液, 孵育的样品具有约 2000 μ l, 1500 μ l, 1400 μ l, 1300 μ l, 1200 μ l, 1100 μ l, 900 μ l, 800 μ l, 700 μ l, 600 μ l, 500 μ l, 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l 或 40 μ l 的体积或中间体积。

[0125] 在某些实施方式中, 试剂盒包括用于检测 IFN- γ 的反应试剂, 这些包括用于检测 IFN- γ 的抗体缀合物。

[0126] 本发明进一步提供治疗具有病原性感染、自体免疫疾病或癌症或发展此类疾病的倾向的受试者的方法, 所述方法包括: 通过测定受试者中的 CMI 应答的方法评估所述受试者建立细胞介导的免疫应答的能力。所述方法包括任选地通过毛细管取样收集来自所述受试者的样品, 其中所述样品包括被抗原刺激后能够产生免疫效应子分子的免疫系统的细胞, 在样品的形状包括已被优化的尺寸的条件下, 在孵育容器中将所述样品与抗原一起孵育, 然后测定免疫效应子分子的存在或水平的升高, 其中所述免疫效应子分子的存在或水平指示所述受试者建立细胞介导的免疫应答的能力, 然后选择合适的治疗策略。在某些实施方式中, 样品为血液样品。在某些实施方式中, 样品的形状包括至少 6mm 至最大约 12mm 的高度。在其它实施方式中, 样品体积低于 1mL, 更优选低于 0.5mL, 包括 0.01mL 样品。在某些实施方式中, 受试者为牲畜动物或人类或鸟类受试者。在进一步的实施方式中, 孵育容器适于保持样品的最佳形状, 其中所述形状具有选自以下一种或两种或更多的尺寸: (i) 最大圆直径低于 6mm; (ii) 高度至少约 4mm 至 6mm, 最大高度约 12mm 至 20mm; 或 (iii) 体积低于 0.5mL, 任选地低于约 400 μ l。

[0127] 在另一方面, 本发明提供用于优化体外细胞免疫应答的方法, 所述方法包括: i) 在孵育容器中将多个具有一系列不同高度或其它尺寸的细胞样品与试剂在体外在以下条件下一起孵育一段时间, 其中所述细胞样品包括被抗原 (例如抗原、半抗原或有丝分裂原) 刺激后分泌免疫效应子分子的细胞, 所述时间和条件足以使细胞分泌免疫效应子分子, 和 ii) 测定来自各样品的免疫效应子分子的存在和水平; 以及 iii) 鉴定提供最佳细胞应答的样品尺寸。在某些实施方式中, 尺寸为孵育容器中样品的高度。在另一实施方式中, 尺寸为孵育容器中样品的体积。在其它实施方式中, 尺寸为孵育容器中样品的最大圆直径。

[0128] 本发明还进一步通过以下非限制性实施例描述。

[0129] 实施例 1

[0130] 在与抗原一起孵育的小体积样品中的免疫效应子分子的检测

[0131] 将来自健康供体 (4 个供体) 的全血收集到 9mL Vacuette 肝素锂 (Vacuette Li-heparin) 管, 其具有约 6.6mm 直径的圆柱形以及 U 形基底。在 Vacuette 微型收集管中刺激 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5mL 血液的等分试样 (无添加剂)。使用破伤风类毒素和植物血球凝集素-P (有丝分裂原) 刺激血液。添加到各管的抗原体积与血液体积成比例, 例如, 0.1mL 血液用 0.01mL 抗原刺激, 0.4mL 血液用 0.04mL 抗原刺激。

[0132] 将在小体积血液中产生的 IFN- γ 应答与使用 1mL 血液在 13/75 Vacuette 血液收集管 (对照) 中产生的应答比较。

[0133] 在除去血浆以用于 IFN- γ 检测 (QuantiFERON 结核金 ELISA (QuantiFERON-TB Gold ELISA)) 之前将血液与抗原在 37°C 下一起孵育 16 至 24 小时。由于未获得充分的样品, 仅就 0.1mL 样品检验 25 μ L 血浆。

[0134] ELISA 测试证明 IFN- γ 在少至 0.1mL 的血液体积中产生 (参见表 3)。对于应答于抗原的 0.3-0.4mL 血液在 6.6mm 直径容器内的结果与在 11mm 直径球形容器中各受试者的 1mL 对照类似。有丝分裂原结果较少地受体积影响, 并且从 0.1mL 至 0.5mL 类似, 指示较少需要随容器比例优化体积。

[0135] 根据本发明, 只要进行容器的预优化, 通过细胞因子生产或其它效应子机制测定的最佳细胞应答可以以小体积 (例如通过点刺取样可获得的那些) 实现, 一旦意识到可行, 所述优化可以由本领域技术人员实现。

[0136] 实施例 2

[0137] 在具有不同内部形状的容器中孵育的小体积全血中的免疫效应子分子的检测

[0138] 将肝素化的血液在聚丙烯管中分配成 3x5mL 等分试样。将抗原, 要么为人类巨细胞病毒 (CMV) 要么为破伤风类毒素 (Tetanus) 以合适的浓度添加到血液。每管充分地混合, 使血液 (50 μ L) 分配到其中血液体积采取不同高度的各种容器。具体地, PCR 管 (锥形, 高度 10mm, 最大直径 5mm, U 形基底), 微型收集器 (圆柱形, 直径 6.5mm, U 形基底)、96 孔板 (圆柱形, 直径 6.5mm, 平底)、48 孔板 (圆柱形, 直径 11mm, 平底)。在除去血浆 (20 μ L) 之前, 将容器在 37°C 下孵育 20 小时, 以用于通过 QFT-ELISA 的测试, 所述 QFT-ELISA 使用标记的抗体检测 IFN- γ 的产生。在对照试验中, 1mL 血液在圆柱形容器 (内径 10.5mm, 平底) 中孵育, 通过 QFT-ELISA 测试 20 μ L 血浆。结果示于表 4, 其中就无抗原 (Ni1)、破伤风类毒素 (TT) 和巨细胞病毒 (CMV) 显示以 IU/mL 为单位的 IFN- γ 。0.20 IU/mL 的应答和之上的 Ni1 是显著的。不同容器中血液体积的高度和最大圆直径也示于表 4。在具有 CMV 和 / 或 TT 的受试者 1, 3, 4 和 5 中对于 11.5mm 和 6mm 的样品高度检测出强信号。当高度降到低于 6mm 至 3mm, 然后 1.5mm 时, 对于 CMV 信号减弱。因此, 15 μ L 全血样品提供强信号, 条件是血液体积在合适的提供至少约 4mm 的样品高度的容器中孵育。

[0139] 实施例 3

[0140] 在外周毛细血管血液中的免疫效应子分子的检测

[0141] 通过手指点刺将 (150 μ L) 毛细血管血液收集到肝素锂微型收集管。将小体积 (50 μ L) 转移到三个 PCR 管。PCR 管为锥形, 具有圆柱形上部, 从 10mm 逐渐变细成锥形基底。为 CMV 或破伤风类毒素 (Tetanus) 的抗原或无抗原 (Ni1) 添加到管, 将其在 37°C 下孵育 20 小时。其后, 将血浆 (20 μ L) 除去并使用 QFT-ELISA 测试。如图 5 所示, 阳性 CMV 对照受试者 (TR) 样品与阴性对照相比产生显著的信号, 指示检测可以以少至 50 μ L 毛细血管血液的体积进行。

[0142] 实施例 4

[0143] 少至 6mm 高度, 多至 18mm 高度的免疫效应子分子的检测

[0144] 不同体积的肝素化的人类血液与抗原 (无抗原 (Ni1), 破伤风类毒素 (TT) 或巨细胞病毒 (CMV)) 在提供 11.5mm, 18mm 和 6mm 血液高度的三种类型容器中一起孵育。以 QFT-ELISA 测试血浆。结果 (参见表 6) 再次显示少至 6mm 的有效性。结果还显示使用 18mm 锥形管的阳性结果, 指示尽管最佳结果在 5 至 18mm 之间达成, 但免疫效应子分子在高于

18mm 的样品高度下也产生。

[0145] 示于图 3 的结果在也提供各种血液样品高度的图 8 中再次列表。这里可以看出，随着样品高度从 16mm 向上增加，产生降低的信号。表 3 中的有丝分裂原结果已经在表 8 中除去，因为 PHA-P 为非特异性刺激物，而破伤风类毒素需要细胞抗原加工和呈递。

[0146] 实施例 5

[0147] 少至 4mm 和 20 μ l 全血的免疫效应子分子的检测

[0148] 将不同体积 (50 μ l, 40 μ l, 30 μ l, 20 μ l 和 10 μ l) 的肝素化的人类血液在分别提供 6mm, 5.5mm, 5mm, 4mm 和 2.5mm 样品高度的小 PCR 管中测试。抗原为不同浓度的无抗原 (N)、破伤风类毒素 (TT) 或巨细胞病毒 (CMV)。血液在 37°C 下孵育 20 小时，除去血浆以通过 QFT-ELISA 用于测试。使用 1mL 培养物 (cultures) 的对照试验 (表 7 续) 使用小体积的血浆 (50 μ l, 40 μ l, 30 μ l, 20 μ l, 15 μ l, 10 μ l 和 5 μ l) 以通过 QFT-ELISA 测试。示于表 7 的结果显示高度为 4mm 的低至 20 μ l 血液的阳性信号，尽管最佳结果发现于 5.5 和 6mm。

[0149] 本领域技术人员将意识到本文所述的本发明除了特别描述的那些之外，容许变体和改进。可以理解本发明包括所有此类变体和改进。本发明还包括说明书中引用或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物，无论是单独的还是总的，以及任何两种或多种所述步骤或特征的任何和所有组合。

[0150] 表 1

[0151] 合适荧光团的列表

[0152]

| 探针 | Ex ¹ (nm) | Em ² (nm) |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| 反应和缀合的探针 | | |
| 羟基香豆素 | 325 | 386 |
| 氨基香豆素 | 350 | 455 |
| 甲氧基香豆素 | 360 | 410 |
| 级联蓝(Cascade Blue) | 375; 400 | 423 |
| 萤黄(Lucifer Yellow) | 425 | 528 |
| NBD | 466 | 539 |
| R-藻红蛋白(PE) | 480; 565 | 578 |
| PE-Cy5 缀合物 | 480; 565; 650 | 670 |
| PE-Cy7 缀合物 | 480; 565; 743 | 767 |
| APC-Cy7 缀合物 | 650; 755 | 767 |
| Red 613 | 480; 565 | 613 |
| 荧光素(Fluorescein) | 495 | 519 |
| FluorX | 494 | 520 |
| BODIPY-FL | 503 | 512 |
| TRITC | 547 | 574 |
| X-罗丹明 | 570 | 576 |
| 丽丝胺罗丹明 B | 570 | 590 |
| PerCP | 490 | 675 |
| 德克萨斯红 | 589 | 615 |
| 别藻蓝蛋白(APC) | 650 | 660 |
| TruRed | 490, 675 | 695 |
| Alexa Fluor 350 | 346 | 445 |
| Alexa Fluor 430 | 430 | 545 |
| Alexa Fluor 488 | 494 | 517 |
| Alexa Fluor 532 | 530 | 555 |
| Alexa Fluor 546 | 556 | 573 |
| Alexa Fluor 555 | 556 | 573 |
| Alexa Fluor 568 | 578 | 603 |
| Alexa Fluor 594 | 590 | 617 |

[0153]

| 探针 | Ex ¹ (nm) | Em ² (nm) |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Alexa Fluor 633 | 621 | 639 |
| Alexa Fluor 647 | 650 | 688 |
| Alexa Fluor 660 | 663 | 690 |
| Alexa Fluor 680 | 679 | 702 |
| Alexa Fluor 700 | 696 | 719 |
| Alexa Fluor 750 | 752 | 779 |
| Cy2 | 489 | 506 |
| Cy3 | (512); 550 | 570; (615) |
| Cy3,5 | 581 | 596; (640) |
| Cy5 | (625); 650 | 670 |
| Cy5,5 | 675 | 694 |
| Cy7 | 743 | 767 |
| 核酸 探针 | | |
| Hoeschst 33342 | 343 | 483 |
| DAPI | 345 | 455 |
| Hoechst 33258 | 345 | 478 |
| SYTOX Blue | 431 | 480 |
| 色霉素 A3 | 445 | 575 |
| 光神霉素 | 445 | 575 |
| YOYO-1 | 491 | 509 |
| SYTOX Green | 504 | 523 |
| SYTOX Orange | 547 | 570 |
| 溴化乙啶 | 493 | 620 |
| 7-AAD | 546 | 647 |
| 吖啶橙 | 503 | 530/640 |
| TOTO-1, TO-PRO-1 | 509 | 533 |
| 噻唑橙 | 510 | 530 |
| 碘化丙啶 (PI) | 536 | 617 |
| TOTO-3, TO-PRO-3 | 642 | 661 |
| LDS 751 | 543; 590 | 712; 607 |
| 荧光蛋白 | | |
| Y66F | 360 | 508 |
| Y66H | 360 | 442 |
| EBFP | 380 | 440 |
| 野生型 | 396, 475 | 50, 503 |
| GFPuv | 385 | 508 |
| ECFP | 434 | 477 |

[0154]

| 探针 | Ex ¹ (nm) | Em ² (nm) |
|------------------|----------------------|----------------------|
| Y66W | 436 | 485 |
| S65A | 471 | 504 |
| S65C | 479 | 507 |
| S65L | 484 | 510 |
| S65T | 488 | 511 |
| EGFP | 489 | 508 |
| EYFP | 514 | 527 |
| DsRed | 558 | 583 |
| 其它探针 | | |
| Monochlorobimane | 380 | 461 |
| 钙黄绿素 | 496 | 517 |

[0155] ¹Ex :峰值激发波长 (nm)

[0156] ²Em :峰值发射波长 (nm)

[0157] 表 2

[0158] 可以通过流式细胞仪测定的示例性光学参数

[0159]

| 参数 | 首字母缩写 | 入射激光束的检测角 | 波长 (nm) |
|---------|-------|-----------|----------------------|
| 正向散射光 | FS | 2-5° | 488 [*] |
| 测向散射光 | SS | 90° | 488 [*] |
| "绿色" 荧光 | FL1 | 90° | 510-540 [†] |
| "黄色" 荧光 | FL2 | 90° | 560-580 [†] |
| "红色" 荧光 | FL3 | 90° | >650 [#] |

[0160] ^{*} 使用 488nm 激发激光

[0161] [†] 带通滤波器的宽度

[0162] [#] 长波通滤波器

[0163]

表 3
用于血液刺激的小容器(6.6mm 内径)的优化

| 血液体积 (mL) | 受试者 1 | | | 受试者 2 | | | 受试者 3 | | | 受试者 4 | | |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | Nil | TT | Mit | Nil | TT | Mit | Nil | TT | Mit | Nil | TT | Mit |
| 0.1 | 0.11 [#] | 1.31 [#] | 2.44 [#] | 0.37 [#] | 4.2 [#] | 42.57 [#] | 0.21 [#] | 0.17 [#] | 13.93 [#] | 0.08 [#] | 0.99 [#] | 40.39 [#] |
| 0.2 | 0.16 | 4.88 | 3.82 | 0.06 | 24.03 | 42.57 [*] | 0.14 | 1.14 | 17.02 | 0.07 | 6.1 | 40.39 [*] |
| 0.3 | 0.16 | 10.13 | 2.72 | 0.07 | 42.57 [*] | 42.57 [*] | 0.15 | 1.72 | 8.74 | 0.08 | 14.37 | 40.39 [*] |
| 0.4 | 0.15 | 10.45 | 3.29 | 0.05 | 42.57 [*] | 42.57 [*] | 0.12 | 4.01 | 8.82 | 0.08 | 12.11 | 40.39 [*] |
| 0.5 | 0.19 | 3.29 | 3.11 | 0.18 | 42.57 [*] | 42.57 [*] | 0.11 | 3.15 | 12.21 | 0.08 | 6.36 | 40.39 [*] |
| 对照 | 0.32 | 11.51 | 4.91 | 1.51 | 42.57 [*] | 42.57 [*] | 0.24 | 4.37 | 19.93 | 0.09 | 9.01 | 40.39 [*] |

Nil = 仅PBS, TT = 破伤风类毒素, Mit = 有丝分裂原(PHA-P)

* = 不合尺寸(Off scale)的结果

= 仅可获得25µL 血浆用于测试(校正的结果2X显示)

[0164]

表 4

| 受试者 | 抗原 | PCR 管 (50 μ l 培养物 (culture), 在 EIA 中 20 μ l) | 微型收集器 (50 μ l 培养物, 在 EIA 中 20 μ l) | 96孔板 (50 μ l 培养物, 在 EIA 中 20 μ l) | 48孔板 (50 μ l 培养物, 在 EIA 中 20 μ l) | 对照 (1ml 培养物, 在 EIA 中 50 μ l) | 对照 (1ml 培养物, 在 EIA 中 20 μ l) |
|-----|-----|---|--|---|---|--|--|
| | | 锥形, 高度 10mm, 最大直径 5mm, U形基底 血液高度 = 6mm | 圆柱形, 直径 6.5mm, U形基底 血液高度 = 3mm | 圆柱形, 直径6.5mm, 平底 血液高度 = 1.5mm | 圆柱形, 直径 11mm, 平底 血液高度 = 0.5mm | 圆柱形, 直径10.5mm, 平底(凝胶) | |
| 1 | Nil | 0.13 | 0.03 | 0.87 | 0.06 | 0.02 | 0.02 |
| | TT | 5.82 | 4.26 | 0.39 | 0.39 | 12.16 | 12.16 |
| | CMV | 3.72 | 1.99 | 1.07 | 0.97 | 6.24 | 3.92 |
| 2 | Nil | 0.07 | 0.02 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.02 |
| | TT | 0.34 | 0.96 | 0.15 | 0.27 | 1.30 | 0.81 |
| | CMV | 0.05 | 0.02 | 0.05 | 0.05 | 0.02 | 0.02 |
| 3 | Nil | 0.09 | 0.02 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.02 |
| | TT | 12.16 | 12.16 | 12.16 | 12.16 | 12.16 | 12.16 |
| | CMV | 7.38 | 1.31 | 0.69 | 0.56 | 12.16 | 7.83 |
| 4 | Nil | 0.14 | 0.05 | 0.10 | 0.07 | 0.05 | 0.04 |
| | TT | 0.86 | 0.44 | 0.37 | 0.21 | 5.31 | 3.26 |
| | CMV | 0.07 | 0.05 | 0.12 | 0.06 | 0.05 | 0.04 |
| 5 | Nil | 0.08 | 0.07 | 5.50 | 0.11 | 0.03 | 0.04 |
| | TT | 2.34 | 0.58 | 0.18 | 0.15 | 7.87 | 5.00 |
| | CMV | 0.22 | 0.10 | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.11 |

使用 20 μ l 血浆与 1ml 比较
 应答于 Nil, CMV 抗原或破伤风类毒素的以 IU/mL 为单位的 IFN- γ 的结果显示

[0165] 表 5

[0166] 毛细血管血

[0167]

| | | | |
|-----|-----------------------|-------|---------|
| 受试者 | IFN- γ (IU/mL) | | |
| | Nil | CMV | Tetanus |
| TR | 0.22 | 27.07 | - |
| JH | 0.12 | - | 0.4 |

[0168] 表 6

[0169] 在 PCR 管中培养物的变化体积

[0170] 应答于 Nil, CMV 抗原或破伤风类毒素的以 IU/mL 为单位的 IFN- γ 的结果显示

[0171]

| 受试者 | 抗原 | 1mL 对照 | 300 μ l | 50 μ l |
|-----|-----|--------------------|------------------|-----------------|
| | | 圆柱形 11.5mm 血液高度 | 锥形* 18mm 血液高度 | 锥形* 6mm 血液高度 |
| 1 | N | 0.10 | 0.11 | 0.17 |
| | TT | 5.51 | 3.99 | 4.66 |
| | CMV | 2.68 | 2.98 | 1.84 |
| 2 | N | 0.11 | 0.12 | 0.06 |
| | TT | 0.35 | 0.49 | 0.70 |
| | CMV | 0.11 | 0.10 | 0.12 |
| 3 | N | 0.07 | 0.10 | 0.08 |
| | TT | 13.81 | 13.07 | 9.28 |
| | CMV | 3.00 | 3.93 | 1.79 |
| 4 | N | 0.05 | 0.10 | 0.08 |
| | TT | 1.09 | 1.16 | 0.60 |
| | CMV | 0.08 | 0.10 | 0.10 |
| 5 | N | 0.04 | 0.04 | 0.06 |
| | TT | 0.54 | 0.21 | 0.14 |
| | CMV | 0.07 | 0.06 | 0.07 |

[0172] 在每一情况下检验 20 μ l 血浆[0173] 显示低至 6mm 高度和 50 μ l 的有效性

[0174] *管逐渐变细到 10mm 高度, 然后圆柱形至 20mm 高度。管在圆柱形截面的直径为 5mm

[0175]

表 7

可变的低体积培养物

应答于 Nil, CMV 抗原或破伤风类毒素的以 IU/mL 为单位的 IFN- γ 的结果显示

| 受试者 | 抗原 | PCR管(锥形, 高度10mm, 最大直径5mm) | | | | |
|-----|-----|---|---|---|---|--|
| | | 50 μ l培养物 (在EIA中25 μ l 血浆) 血液高度 = 6mm | 40 μ l培养物 (在EIA中20 μ l 血浆) 血液高度 = 5.5mm | 30 μ l培养物 (在EIA中15 μ l 血浆) 血液高度 = 5mm | 20 μ l培养物(在 EIA中10 μ l血 浆) 血液高度 = 4mm | 10 μ l培养物(在 EIA中5 μ l血浆) 血液高度 = 2.5mm |
| 1 | N | 0.14 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.05 |
| | TT | 6.05 | 5.96 | 3.62 | 1.98 | 0.08 |
| | CMV | 3.37 | 3.59 | 1.79 | 1.22 | 1.11 |
| 2 | N | 0.04 | 0.05 | 0.12 | 0.05 | 0.13 |
| | TT | 1.82 | 0.25 | 0.30 | 0.23 | 0.13 |
| | CMV | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.05 | 0.07 |
| 3 | N | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.02 | 2.52 |
| | TT | 14.28 | 14.28 | 9.97 | 2.04 | 0.41 |
| | CMV | 2.39 | 2.75 | 0.39 | 0.74 | 0.26 |
| 4 | N | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.06 |
| | TT | 0.25 | 0.47 | 0.36 | 0.08 | 0.09 |
| | CMV | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.10 |
| 5 | N | 0.06 | 0.04 | 0.06 | 0.03 | 0.05 |
| | TT | 0.49 | 0.48 | 0.16 | 0.09 | 0.04 |
| | CMV | 0.04 | 0.06 | 0.04 | 0.02 | 0.04 |

[0176]

表 7 续

| 受试者 | 抗原 | 1mL 对照 (圆柱形, 直径 10.5mm) | | | | | | | | |
|-----|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|------|
| | | 1mL 培养物(在 EIA 中 50μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 40μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 30μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 25μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 20μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 15μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 10μl 血浆) | 1mL 培养物(在 EIA 中 5μl 血浆) | |
| | | 血液高度 = 11.5mm | | | | | | | | |
| 1 | N | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 |
| | TT | 13.48 | 13.48 | 13.48 | 13.48 | 13.48 | 8.05 | 6.04 | 3.40 | |
| | CMV | 8.04 | 7.40 | 6.59 | 5.72 | 4.64 | 4.19 | 2.82 | 1.99 | |
| 2 | N | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | |
| | TT | 0.95 | 0.80 | 0.67 | 0.58 | 0.52 | 0.45 | 0.35 | 0.33 | |
| | CMV | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | |
| 3 | N | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | |
| | TT | 14.28 | 14.28 | 14.28 | 14.28 | 14.28 | 14.28 | 14.28 | 14.28 | |
| | CMV | 9.16 | 6.97 | 6.36 | 6 | 5.3 | 4.84 | 3.77 | 2.13 | |
| 4 | N | 0.05 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | |
| | TT | 3.98 | 3.49 | 3.02 | 2.43 | 2.07 | 1.69 | 1.17 | 0.08 | |
| | CMV | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | |
| 5 | N | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | |
| | TT | 0.98 | 0.9 | 0.79 | 0.69 | 0.59 | 0.47 | 0.37 | 0.22 | |
| | CMV | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | |

[0177]

表 8
在微型收集(R)管(Greiner Bio-One)中培养物的可变体积

| 血液高度 受试者 | 抗原 | 4mm | | 8mm | | 12mm | | 16mm | | 20mm | | 1mL 对照(检验 50µl) |
|-------------|----|--------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--|--------------------|
| | | 100µl (检验 25µl) | 25µl | 200µl | 100µl | 300µl | 400µl | 500µl | | | | |
| 1 | N | 0.11 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.15 | 0.19 | 0.32 | | | |
| | TT | 1.31 | 4.88 | 10.13 | 10.45 | 10.13 | 10.45 | 3.29 | 11.51 | | | |
| 2 | N | 0.37 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.05 | 0.18 | 1.51 | | | |
| | TT | 4.20 | 24.03 | 42.57* | 42.57 | 42.57 | 42.57 | 42.57 | 42.57 | | | |
| 3 | N | 0.21 | 0.14 | 0.14 | 0.15 | 0.15 | 0.12 | 0.11 | 0.24 | | | |
| | TT | 0.17 | 1.14 | 1.72 | 1.72 | 1.72 | 4.01 | 3.15 | 4.37 | | | |
| 4 | N | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.11 | 0.05 | | | |
| | TT | 0.99 | 6.10 | 14.37 | 12.11 | 12.11 | 12.11 | 6.36 | 1.09 | | | |

* 指示用于该运行的最大值, 实际值为 >
指示用蛋白抗原获得的最大值(排除对照)
N= Nil, TT = 添加的破伤风类毒素

[0178] 参考书目

[0179] Altschul et al., Nucl. Acids Res., 25 :3389, 1997.

[0180] Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology John Wiley&Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

[0181] Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley&Sons, Inc, NY, 2002.

[0182] Biggs et al., Cytometry, 36 :36-45, 1999.

[0183] Bonner et al., Eur. J. Biochem., 46 :83, 1974.

[0184] Brock et al., Int. J. Tuberc. Lung. Dis, 5(5) :462-467, 2001.

- [0185] Daneshvar et al., *J. Immunol. Methods*, 226 (1-2) :119-128, 1999.
- [0186] Durig et al., *J. Raman Spectrosc.*, 24 (5) :281-285, 1993.
- [0187] Eriksson et al., *Biophys. J.*, 2 :64, 1993.
- [0188] Erickson et al., *Science*, 249 :527-533, 1990.
- [0189] Fu et al., *Nature Biotechnology*, 17 :1109-1111, 1999.
- [0190] Hodgson, *Bio/Technology*, 9 :19-21, 1991.
- [0191] Kurrek, *Eur. J. Biochem.*, 270 :1628-1644, 2003.
- [0192] Lakowicz et al., *Biophys. J.*, 72 :567, 1997.
- [0193] Lewis et al., *Dyes Pigm.*, 42 (2) :197, 1999.
- [0194] Malemed et al., "Flow cytometry and sorting", 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990.
- [0195] Marmur et al., *J. Mol. Biol.*, 5 :109, 1962.
- [0196] Rahman et al., *J. Org. Chem.*, 63 :6196, 1998.
- [0197] Rapaport et al., *Appl. Phys. Lett.*, 74 (3) :329-331, 1999.
- [0198] Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., 1990, Mack Publishing, Company, Easton, PA, U. S. A.
- [0199] Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001.
- [0200] Skjot et al., *Infection and Immunity*, 68 (1) :214-20, 2000.
- [0201] Summerton et al., *Antisense and nucleic acid Drug Development*, 7 : 187-195, 1997.
- [0202] Tawa et al., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890.
- [0203] Wells, *Methods Enzymol.*, 202 :2699-2705, 1991.
- [0204] Youvan et al., *Biotechnology*. 3 :1-18, 1997.

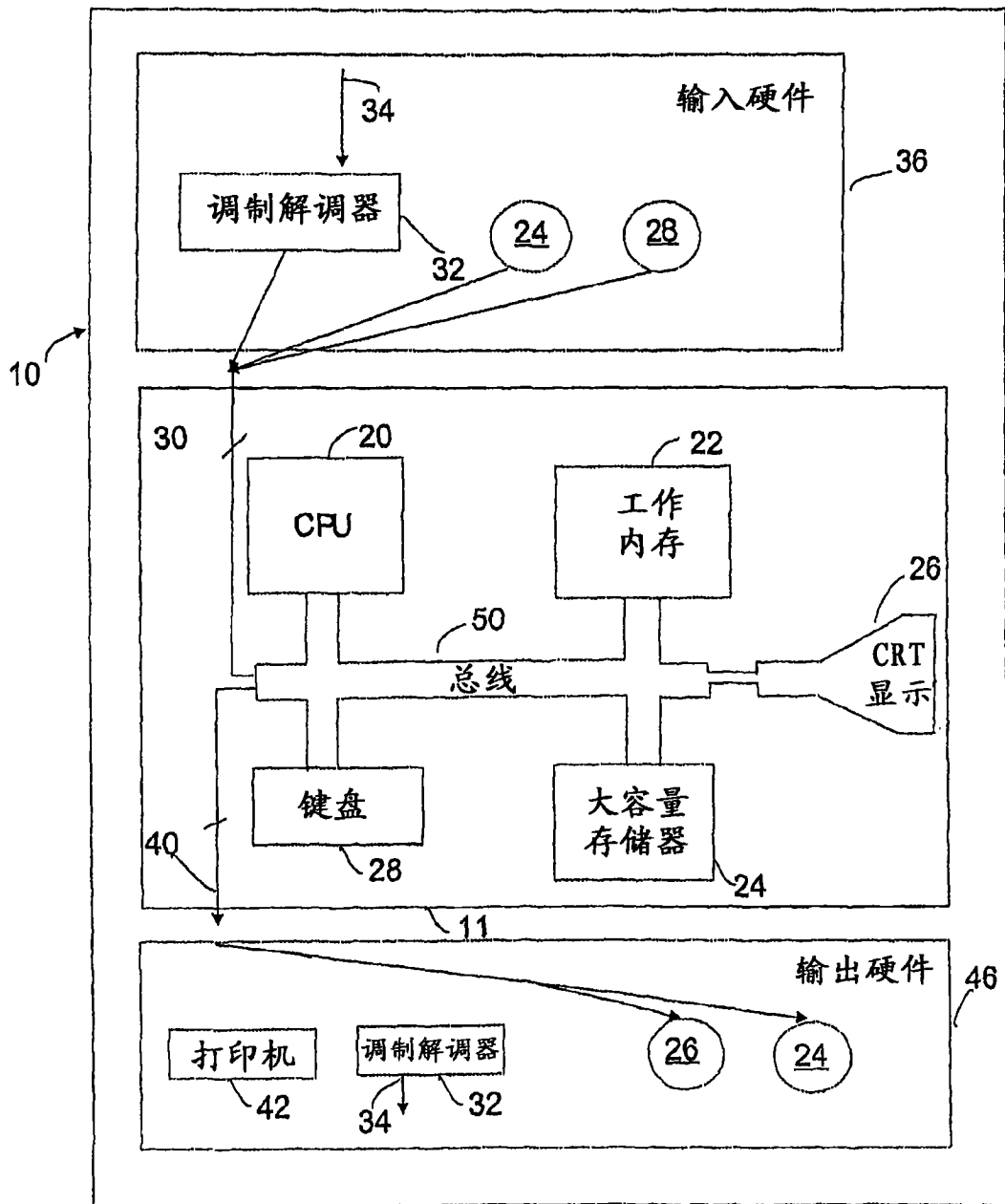


图 1

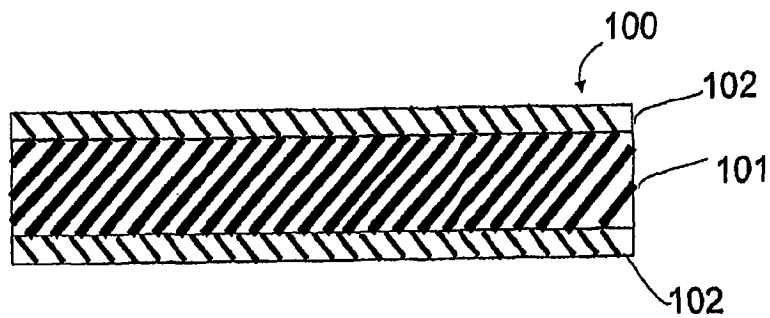


图 2

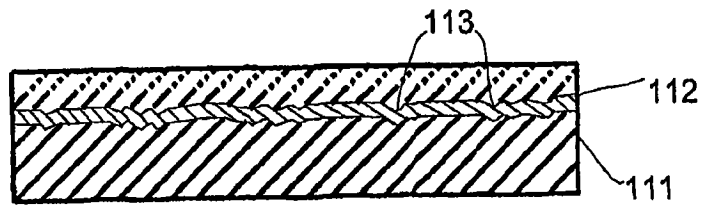


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 细胞介导的免疫应答检验及其试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN101711360A | 公开(公告)日 | 2010-05-19 |
| 申请号 | CN200880012007.8 | 申请日 | 2008-03-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 赛乐思迪斯有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 赛乐思迪斯有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 赛乐思迪斯有限公司 | | |
| [标]发明人 | AJ雷德福 SL琼斯 JL霍华德 | | |
| 发明人 | A·J·雷德福 S·L·琼斯 J·L·霍华德 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/49 G01N33/50 C12Q1/68 | | |
| CPC分类号 | G01N33/56972 G01N2333/35 G01N2333/57 G01N33/6863 | | |
| 优先权 | 2007901385 2007-03-16 AU | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供用于测定从受试者中收集的小体积未稀释的全血中的细胞介导的免疫(CMI)的方法和试剂盒。具体地,该方法用于测定在体积例如为50μl至500μl的未稀释的全血样品中的应答。这样,包括儿童、成人或老人人类受试者的受试者的毛细管取样和快速测试是便利地。

| 探针 | Ex ¹ (nm) | Em ² (nm) |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| | 反应和耦合的探针 | |
| 羟基香豆素 | 325 | 386 |
| 氨基香豆素 | 350 | 455 |
| 甲氧基香豆素 | 360 | 410 |
| 级联蓝(Cascade Blue) | 375; 400 | 423 |
| 萤黄(Lucifer Yellow) | 425 | 528 |
| NBD | 466 | 539 |
| R-藻红蛋白(PE) | 480; 565 | 578 |
| PE-Cy5 混合物 | 480; 565; 650 | 670 |
| PE-Cy7 混合物 | 480; 565; 743 | 767 |
| APC-Cy7 混合物 | 650; 755 | 767 |
| Red 613 | 480; 565 | 613 |
| 荧光素(Fluorescein) | 495 | 519 |
| FluorX | 494 | 520 |
| BODIPY-FL | 503 | 512 |
| TRITC | 547 | 574 |
| X-罗丹明 | 570 | 576 |
| 丽丝胺罗丹明 B | 570 | 590 |
| PerCP | 490 | 675 |
| 德克萨斯红 | 589 | 615 |
| 别藻蓝蛋白(APC) | 650 | 660 |
| TruRed | 490, 675 | 695 |
| Alexa Fluor 350 | 346 | 445 |
| Alexa Fluor 430 | 430 | 545 |
| Alexa Fluor 488 | 494 | 517 |
| Alexa Fluor 532 | 530 | 555 |
| Alexa Fluor 546 | 556 | 573 |
| Alexa Fluor 555 | 556 | 573 |
| Alexa Fluor 568 | 578 | 603 |
| Alexa Fluor 594 | 590 | 617 |