



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103620051 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201280030886. 3

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 04. 20

(30) 优先权数据

61/480, 913 2011. 04. 29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2012/000413 2012. 04. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/145786 EN 2012. 11. 01

(71) 申请人 塞尔雷斯蒂斯有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 J·伯勒 E·曼科特罗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

(51) Int. Cl.

G12Q 1/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书27页 附图4页

(54) 发明名称

细胞介导的免疫应答力试验

(57) 摘要

本公开内容一般涉及基于免疫学的诊断试验领域,包括检测细胞介导的免疫应答力的试验。本公开内容指导基于对象的细胞介导的免疫应答力来测定病症的阶段、发展和/或严重性。本文预期的试验能够整合到标准病理学架构中以提供诊断报告系统并方便医疗点临床管理。

1. 一种用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括使来自所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 Toll 样受体 (TLR) 激动剂,并检测来自免疫细胞的免疫效应分子的存在或水平升高,其中,所述免疫效应分子的存在或水平指示所述对象的细胞介导的应答力的水平。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 TLR 激动剂选自:R848(咪唑啉)、脂甘露聚糖和聚(I:C)。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述 TLR 激动剂是 R848。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述对象是人。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述样品是未经稀释的全血。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述全血收集在含有肝素的管中。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫效应分子是干扰素- γ (IFN- γ)。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述免疫效应分子用其特异性抗体检测。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述对象患有由致病体所致的感染,所述致病体选自下列:分枝杆菌属 (Mycobacterium)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、链球菌属 (Streptococcus)、包柔氏螺旋体菌属 (Borrelia)、大肠杆菌 (Escherichia coli)、沙门氏菌属 (Salmonella)、梭状芽孢杆菌属 (Clostridium)、志贺菌属 (Shigella)、变形杆菌属 (Proteus)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、疱疹病毒、乙型或丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述对象患有由结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis) 所致的感染。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述对象患有选自下列的病症:脱发斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合症、自体免疫阿狄森氏病多发性硬化症、肾上腺自体免疫疾病、自体免疫溶血性贫血、自体免疫肝炎、自体免疫卵巢炎和睾丸炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻皮炎、慢性疲劳综合症 (CFIDS)、慢性炎症脱髓鞘、慢性炎症多神经病、变应性肉芽肿性血管炎、瘢痕性类天疱疮、CREST 综合症、冷凝集素病、克隆氏病、疱疹样皮炎、盘状红斑狼疮、基本混合冷球蛋白血症、纤维组织肌痛、肾小球肾炎、格雷弗氏病、格林-巴利症、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 (I 型)、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、心肌炎、寻常性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合症、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、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、赖特尔综合症、风湿热、类风湿关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合症、全身肌强直综合症、系统性红斑狼疮、多发性大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和炎症性肠病。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述疾病是乳糜泻。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述对象患有选自以下的癌症:ABL1 原癌基因、AIDS 相关癌症、听神经瘤,急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、腺样囊腺癌、肾上腺皮质癌、特发性髓样化生、秃头症、泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生障碍性贫血、星形胶质细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌 (皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑干胶质瘤、脑和 CNS 肿瘤、乳腺癌、CNS 肿瘤、类癌瘤、子宫颈癌、儿童脑肿瘤、儿童癌症、

儿童白血病、儿童软组织肉瘤、软骨肉瘤、绒毛膜癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结直肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、隆凸性皮肤纤维肉瘤、促纤维组织增生性小细胞癌、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆道癌、眼癌、眼；黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范科尼贫血、纤维肉瘤、胆膀胱癌、胃癌、胃肠道癌、胃肠道类癌肿瘤、泌尿生殖系统的癌症、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、妇科癌症、恶性血液肿瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、遗传乳腺癌、组织细胞增生症、霍奇金氏病、人类乳头状瘤病毒、水囊状胎块、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、郎格罕细胞组织细胞增多病、喉头癌、平滑肌肉瘤、白血病、李 - 佛美尼综合症、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴性水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌肿瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、转移癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合症、骨髓瘤、骨髓增生性疾病、鼻腔癌、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨破损综合症、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、眼癌、食道癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺肿瘤、阴茎癌、周边神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、真性红细胞增多症、前列腺癌、罕见癌症和相关疾病、肾细胞癌、成视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、先天性皮肤异色症、唾液腺肿瘤、肉瘤、神经鞘瘤、塞扎里综合症、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 - 肾盂 -/- 输尿管)、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌症、膜板蛋白、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、沃尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和肾母细胞瘤。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,使所述对象暴露于毒剂。

15. 限制量的 TLR 激动剂在生产诊断试验中的应用,所述诊断试验通过孵育限制量的所述激动剂和淋巴细胞并检测效应分子的存在或升高的方法来检测细胞介导的免疫应答力。

16. 一种使用户能够测定对象的细胞介导的免疫应答力状态的方法,所述方法包括:

(a) 通过通讯网络从所述用户接收免疫效应分子的水平或浓度形式的数据,其中所述数据相对于对照与细胞介导的免疫应答力状态相关联,其中在将淋巴细胞暴露于抗原和限制量的 TLR 激动剂之后检测所述免疫效应分子;

(b) 通过单变量或多变量分析处理所述对象数据以提供免疫应答力值;

(c) 根据与预定值相比较的所述免疫应答力值的结果确定所述对象的状态;和

(d) 通过所述通讯网络将所述对象的状态指标传送到所述用户。

细胞介导的免疫应答力试验

[0001] 申请数据

[0002] 本申请联系并要求 2011 年 4 月 29 日提交的题为“细胞介导的免疫应答力试验”的美国临时专利申请 61/480,913 号的优先权,其全文内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容一般涉及基于免疫学的诊断试验领域,所述基于免疫学的诊断试验包括检测细胞介导的免疫应答力试验。本公开内容指导基于对象的细胞介导的免疫应答力测定病症的阶段、发展和 / 或严重性。本文预期的试验能够整合到标准病理学架构中以提供诊断报告系统并方便医疗点临床管理。

背景技术

[0004] 关于本说明书中作者的发表物详细书目在说明书的结尾按字母顺序集中。

[0005] 在该说明书中参考的任何现有技术不应认为或不应作为承认或任何形式暗示表明该现有技术在任何国家中构成一般常识的一部分。

[0006] 基于免疫学的诊断试验是检测各种病症的重要手段。这些试验类型的效果部分在于免疫系统内成分的特异性。尽管有此特异性,基于免疫学的诊断并不必总是足够灵敏以检测低水平的获得性和 / 或先天免疫应答活性,例如响应低度感染或出现持续低水平感染或者具有活性或潜在疾病状态的对象。需要开发在细胞介导的免疫应答力方面灵敏度提高的诊断试验。

[0007] 基于免疫学的一种诊断方法形式涉及在分离细胞培养或全血液培养中用抗原或有丝分裂原激活 T 细胞,然后检测效应分子,例如经刺激的 T 细胞(也称为效应 T 细胞)生成的细胞因子。效应分子一般用诸如酶免疫分析、多元珠分析、酶联免疫斑点法(ELISpot)和流式细胞仪等技术检测。这些试验用于检测疾病特异性 T 细胞应答。T 细胞试验的一个示例是 QuantiFERON(注册商标;Cellestis 有限公司)。这在后文被称为“QFT”,并且是基于干扰素- γ (IFN- γ)释放实验(IGRA)的测试。另一种试验使用抗 CD3 抗体(T 细胞受体激动剂)和 T_H1 样受体(TLR)激动剂(R848)直接刺激高度纯化的人 T 细胞。然而,并非所有效应分子都被检测到并且该试验不适用于全血。

[0008] 快速评估细胞介导免疫性的能力和具有高度的灵敏度是具有临床重要性的。临床医师需要对疾病状态的发展及其对宿主免疫系统的影响做出正确评价。

[0009] 但是,需要改进对象内细胞介导的免疫应答力试验的灵敏度。

发明内容

[0010] 本文提供用于检测对象内细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括使用以下物质孵育所述对象的淋巴细胞:

[0011] (i) 抗原 ;和

[0012] (ii) 限制量的 T_H1 样受体(TLR)激动剂 ;

[0013] 然后筛选由活化的淋巴细胞产生的效应分子的水平。

[0014] 所述 TLR 激动剂的“限量”指如下描述的一种试剂的量：

[0015] (i) 当该试剂与淋巴细胞在抗原不存在下孵育时诱导最小背景应答；和 / 或

[0016] (ii) 以试剂对抗原比例为 1:50 ~ 1:1.5 存在；和 / 或

[0017] (iii) 具有低于抗原量的浓度；和 / 或

[0018] (iv) 是最佳的试剂量，所述试剂量为其它情况下在 QFT-Ni1 抗原管中产生应答所需。

[0019] 抗原和所述限制量的 TLR 激动剂和淋巴细胞的共孵育导致更灵敏的试验，使对淋巴细胞刺激的检测比其它可能的检测更早。所述增加的灵敏度包括：相较于非限制量的 TLR 激动剂的共孵育，对效应分子的检测增加至少 10%。增加细胞介导的免疫应答试验灵敏度的能力还能使检测效应分子的较低敏感方法可行。此外，在本文公开的试验中的细胞介导的免疫应答的检测的量级可能与疾病阶段、发展和 / 或严重性相关。因此，本公开内容指导对象内细胞介导的免疫应答力的试验。

[0020] 因此，本文提供用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法，所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂并检测免疫细胞的免疫效应分子的存在或水平升高，其中，所述免疫效应分子的存在或水平指示所述对象的细胞介导的应答力水平。

[0021] TLR 激动剂包括 TLR-7/8、TLR-4、TLR-3 或 TLR-2 激动剂。示例包括咪唑喹啉，R848，脂甘露聚糖和聚 (I:C)。在一个实施方式中，所述 TLR 激动剂是 TLR7/8 激动剂 R848。

[0022] 有用的是，所述对象是人且所述样品是未经稀释的全血。或者，所述样品是包含约 10% ~ 100% 的待测样品体积，或者包含约 50% ~ 100% 的待测样品体积，或者包含约 80% ~ 100% 的待测样品体积的全血。所述样品体积可以为微升量或毫升量，例如 0.5 μ L ~ 5mL。方便而言，将所述全血收集在含有肝素的管中，且所述免疫效应分子是 IFN- γ 。一般而言，所述免疫效应子采用其特异性抗体例如使用 ELISA 或 ELISpot 检测。

[0023] 所述对象可受选自分枝杆菌 (Mycobacterium) 属例如结合分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis) 或结核 (TB)、葡萄球菌 (Staphylococcus) 属、链球菌 (Streptococcus) 属、包柔氏螺旋体菌 (Borrelia) 属、大肠杆菌 (Escherichia coli)、沙门氏菌 (Salmonella) 属、梭状芽孢杆菌 (Clostridium) 属、志贺菌 (Shigella) 属、变形杆菌 (Proteus) 属、芽孢杆菌 (Bacillus) 属、疱疹病毒、乙型或丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的病原剂感染或患有其导致的疾病。

[0024] 或者，所述对象患有选自以下的病症：乳糜泻、自体免疫性糖尿病、斑秃、关节强直性脊椎炎、抗磷脂综合症、自体免疫阿狄森氏病多发性硬化症、肾上腺自体免疫疾病、自体免疫溶血性贫血、自体免疫肝炎、自体免疫卵巢炎和睾丸炎、白赛氏 (Behcet's) 病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻皮炎 (celiac sprue-dermatitis)、慢性疲劳综合症 (CFIDS)、慢性炎症脱髓鞘、慢性炎症多神经病、丘 - 施二氏综合症、瘢痕性类天疱疮、CREST 综合症、冷凝集素病、克罗恩氏病、疱疹样皮炎、盘状红斑狼疮、基本混合冷球蛋白血症、纤维组织肌痛、肾小球肾炎、格雷弗氏病、格林 - 巴利症、乔本氏甲状腺炎、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 (I 型)、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃氏病、混合型结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、心肌炎、寻常性天疱疮、恶性贫

血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合症、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮炎、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、赖特尔综合症、风湿热、类风湿关节炎、肉状瘤症、硬皮病、舍格伦综合症、僵人综合症、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白斑和炎性肠病。

[0025] 或者,所述对象可患有选自以下的癌症: ABL1 原癌基因、AIDS 相关癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、腺样囊腺癌、肾上腺皮质癌、特发性髓样化生、秃头症、泡软组织肉瘤、肛门癌、再生障碍性贫血、星形胶质细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌(皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑干胶质瘤、脑和 CNS 肿瘤、乳腺癌、CNS 肿瘤、类癌瘤、子宫颈癌、儿童脑肿瘤、儿童癌症、儿童白血病、儿童软组织肉瘤、软骨肉瘤、绒毛膜癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、结直肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、隆凸性皮肤纤维肉瘤、促纤维组织增生性小细胞癌、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆道癌、眼癌(eye cancer)、眼:黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范科尼贫血、纤维肉瘤、胆膀胱癌、胃癌、胃肠道癌、胃肠道类癌肿瘤、泌尿生殖系统的癌症、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞疾病肿瘤、神经胶质瘤、妇科癌症、恶性血液肿瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、遗传乳腺癌、组织细胞增生症、何杰金氏病、人类乳头状瘤病毒、水囊状胎块、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、郎格罕细胞组织细胞增多病、喉头癌、平滑肌肉瘤、白血病、李-佛美尼综合症、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴性水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌肿瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、转移癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合症、骨髓瘤、骨髓增生性疾病、鼻腔癌、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨破损综合症、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、眼癌(ocular cancer)、食道癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺肿瘤、阴茎癌、周边神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、真性红细胞增多症、前列腺癌、罕见癌症和相关疾病、肾细胞癌、成视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、先天性皮肤异色症(Rothmund-Thomson syndrome)、唾液腺肿瘤、肉瘤、神经鞘瘤、塞扎里(Sezary)综合症、皮肤癌、小细胞肺癌(SCLC)、小肠肿瘤、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-肾盂-输尿管)、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌症、膜板块蛋白(uroplakin)、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、沃尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和肾母细胞瘤。

[0026] 或者,所述对象可暴露于毒剂。

[0027] 在上述方面中,所述抗原可获自所述病原剂,与所述病症或癌症相关或是所述毒剂。或者,所述感染、病症、癌症或毒剂可抑制细胞介导的免疫,在该情况中,可以使用所述对象之前接触过的任何抗原。

[0028] 本文指导的另一个方面是:限制量的 TLR 激动剂在细胞介导的免疫应答力的诊断试验制造中的应用,该应用通过将所述对象的淋巴细胞与限制量的所述激动剂孵育然后检测效应分子的存在或升高的方法进行。还提供一种使用户能够测定对象的细胞介导的免疫应答力状态的方法,所述方法包括:

[0029] (a) 通过通讯网络接收免疫效应分子的水平或浓度形式的数据,所述数据相校对照与细胞介导的免疫应答力状态相关联,其中在淋巴细胞暴露于抗原和限制量的 TLR 激动

剂之后检测所述免疫效应分子；

[0030] (b) 通过单变量或多变量分析处理所述数据以提供免疫应答力值；

[0031] (c) 根据与预定值相比较的所述免疫应答力值的结果确定所述对象的状态；和

[0032] (d) 通过所述通讯网络将所述对象的状态指标传送到所述用户。

附图说明

[0033] 图 1 以图示显示暴露于不同浓度的 TLR 激动剂 R848 (0.01 μ g/mL ~ 0.1 μ g/mL) 的全血培养物的 IFN- γ 应答。所述实验在无抗原 (Nil 抗原) 的包含 R848 和所述血样的管中实施。所述管是 QFT-Nil 抗原管。

[0034] 图 2 以图示显示暴露于 0.5 μ g/mL EB 病毒 (EBV) 和不同浓度的 R848 (0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL) 的全血培养物的 IFN- γ 应答。

[0035] 图 3 以图示显示暴露于 0.5 μ g/mL 巨细胞病毒 (CMV) 和不同浓度的 R848 (0.05 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL) 的全血培养物的 IFN- γ 应答。

[0036] 图 4 以图示显示疑似患有结核的患者或与其有接触的家属的全血培养物的使用 QFT 在 0.05 μ g/mL 或 0.1 μ g/mL R848 存在下的 IFN- γ 应答。各数据点表示所述应答减去相应的背景 (分别为 Nil ; Nil+0.05 μ g/mL R848 ; 和 N+0.1 μ g/mL R848)。数据经 log 转换并由带有邦弗朗尼事后检验 (Bonferroni post test) 的重复测量 ANOVA 分析。短线表示含 SEM 的平均值。

[0037] 发明详述

[0038] 通篇说明书中,除非内容需要另外说明,否则,术语“包括”或其变体如“包含”或“含有”应理解为指示包括所述元件或整数或方法步骤或者元件或整数或方法步骤的组而不排除任何其它元件或整数或方法步骤或者元件或整数或方法步骤的组。本对象说明书所用的单数形式“一个”、“一种”和“该(所述)”包括复数事物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“T 细胞”包括单个 T 细胞,以及两个或更多 T 细胞;提及“试剂”包括单一试剂,以及两种或更多试剂;提及“本公开内容”包括本公开内容指导的单个或多个方面;等等。所述方面由术语“发明”涵盖。所有方面都在本权利要求允许范围内。术语“T 细胞”和“T 淋巴细胞在本文中可互换使用。”“免疫细胞”包括淋巴细胞,例如 NK 细胞。

[0039] 提及“剂”,“试剂”,“分子”和“化合物”包括单个实体和两个或多个这类实体的组合。“组合”也包括多个部分如两部分组合物,其中所述试剂单独提供或单独使用或单独分散或分散前一起混合。例如,多部分试验包可具有待检测细胞介导的免疫应答所针对的抗原和 TLR 激动剂。因此,本公开内容的这方面包括试剂,所述试剂干燥并疏松或固定到试验包的分隔墙或固体支持物。

[0040] 本文提供用于检测对象内细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括使用以下物质孵育所述对象的淋巴细胞:

[0041] (i) 抗原;和

[0042] (ii) 限制量的 TLR 激动剂;

[0043] 然后筛选由活化的淋巴细胞产生的效应分子的水平。

[0044] 淋巴细胞通过与抗原共孵育来活化。所述限制量的 TLR 激动剂增强效应分子的早期检测。

[0045] 术语“TLR 激动剂”是加强先天免疫系统的试剂的示例。其它合适的术语包括所述先天免疫系统的增效剂、刺激剂、活化剂和诱导剂。

[0046] 先天免疫刺激剂包括 TLR 激动剂。TLR 激动剂包括咪唑喹啉化合物，例如 R848 (TLR-7/8 配体)、Pam3CSK4 (TLR-2 配体)、脂甘露聚糖 (TLR-2 配体)、聚 (I:C)-[TLR-3 配体]、脂多糖 (TLR-4 配体) 和 CpG 寡脱氧核苷酸 (TLR-9 配体)。就选择 TLR 激动剂而言，激动剂按降序选自 TLR-7/8>TLR-4>TLR-3>TLR-2。

[0047] R848 被 Nowroozalizadeh 等. (2009) Cytokine 46:325-31, Hemmi 等. (2002) Nature Immunology 3:196-200 和 Peel 等. (1985) J Med Chem 28:298-302 公开。提及“咪唑喹啉”或“R848”包括咪唑喹啉衍生物。本公开内容指导暴露于抗原的淋巴细胞的效应分子的生成量增高。所述淋巴细胞是“活化的”或“经刺激的”淋巴细胞。所述增高通过使所述细胞暴露于限制量的 TLR 激动剂而出现。在所述抗原和限制量的 TLR 激动剂的存在下的所述应答的水平比在抗原或限制量的 TLR 激动剂单独存在下各应答之和或所述 TLR 激动剂不受限制时的应答要高。这使试验更加灵敏以评估对象内细胞介导的免疫应答力。因此，本公开内容使试验能够通过检测限制量内的 TLR 激动剂存在下受抗原刺激的 T 细胞的效应分子的存在或水平来检测、评估或另外监测对象内细胞介导的应答。所述试验还使更早检测细胞介导应答力可行。在一个实施方式中，其所指导的试验增强了细胞介导试验的灵敏度，该试验可使灵敏度较低的检测实验可行。此外，建议所述细胞介导的免疫应答的程度或量反映或提供病症状态、发展和 / 或严重性的信息。例如，所述应答的量可确定对象是否患有潜在或活性或急性感染或病症。

[0048] 还可添加额外试剂以调控调节 T 细胞 (T- 调节细胞) 的活性。后者包括抑制 T 调节细胞的抑制功能。本文所涵盖的调节 T 调节细胞的试剂包括 CD25 配体；编码 JAK1 或 TYK2 遗传物质的正义或反义寡核苷酸；中和抗体；包括寡核苷酸的 CpG；用作 TLR 调控剂的寡核苷酸；和其他 TLR 调控剂。

[0049] 在特定实施方式中，T 调节细胞是活性被抑制的免疫应答抑制细胞。

[0050] “CpG 分子”指包括 CpG 序列或基序的寡核苷酸。

[0051] 关于所述 TLR 激动剂的“限制量”包括一定量的试剂，所述量的试剂在使用 QFT-Ni1 抗原管时自己不诱导或诱导最小背景应答；试剂和抗原的比例为 1:1.5 ~ 1:500 包括 1:1.5、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:46、1:47、1:48、1:49、1:50、1:51、1:52、1:53、1:54、1:55、1:56、1:57、1:58、1:59、1:60、1:61、1:62、1:63、1:64、1:65、1:66、1:67、1:68、1:69、1:70、1:71、1:72、1:73、1:74、1:75、1:76、1:77、1:78、1:79、1:80、1:81、1:82、1:83、1:84、1:85、1:86、1:87、1:88、1:89、1:90、1:91、1:92、1:93、1:94、1:95、1:96、1:97、1:98、1:99、1:100、1:101、1:102、1:103、1:104、1:105、1:106、1:107、1:110、1:111、1:112、1:113、1:114、1:115、1:116、1:117、1:118、1:119、1:120、1:121、1:122、1:123、1:124、1:125、1:126、1:127、1:128、1:129、1:130、1:131、1:132、1:133、1:134、1:135、1:136、1:137、1:138、1:139、1:140、1:141、1:142、1:143、1:144、1:145、1:146、1:147、1:148、1:149、1:150、1:151、1:152、1:153、1:154、1:155、1:156、1:157、1:158、1:159、1:159、1:160、1:161、1:162、1:163、1:164、1:165、1:166、

1:167、1:168、1:169、1:170、1:171、1:172、1:173、1:174、1:175、1:176、1:177、1:178、1:179、1:180、1:181、1:182、1:183、1:184、1:185、1:186、1:187、1:188、1:189、1:190、1:191、1:192、1:193、1:194、1:195、1:196、1:197、1:198、1:199、1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450 或 1:500 或之间的量；少于抗原的试剂的量；和 / 或其它情况下在 QFT-Ni1 抗原管内产生应答所需的试剂次佳量。本文所述的试验在检测效应分子的灵敏度方面产生至少 10% 的改进。”至少 10%”包括约 10% ~ 约 50%。

[0052] 所述试验中所用的 TLR 激动剂的量将视所述激动剂和所述试验的条件以及抗原和其它成分的浓度而不同。对于 R848, 该 TLR 激动剂的限制量包括 0.01 μ g/mL ~ 约 10 μ g/mL 试验液。这包含 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 μ g/mL。在一个实施方式中, 使用约 0.05 μ g/mL ~ 约 1.0 μ g/mL R848。

[0053] 本发明提供一种测定对象内细胞介导的免疫应答力的方法, 并进而指导测定病症或试剂是否诱导免疫抑制或与免疫抑制相关联。所述方法还能诊断传染病, 病理状况, 测定免疫活性水平和评价对内源或异源试剂的免疫细胞应答力, 以及评价暴露于毒性试剂例如铍或其他毒剂。该试验还能筛选先前暴露于特定抗原 (例如与疾病、感染或毒物相关联的抗原) 的对象。

[0054] 因此, 本文指导的一方面考虑用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂, 并检测由免疫细胞产生的免疫效应分子的水平, 其中, 所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导的免疫应答力的水平。

[0055] 本文考虑的另一方面是用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂, 并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平, 其中所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导应答力的水平, 其中, 所述应答力的水平指示了选自病原剂感染、自体免疫疾病、癌症、炎性病症和暴露于毒剂的疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段。

[0056] 本文提供的另一方面是用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂, 并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平, 其中, 所述免疫效应分子的水平指示细胞介导应答力的水平, 并指示选自病原剂感染、自体免疫疾病、癌症、炎性病症和暴露于毒剂的疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段。

[0057] 本公开内容指导的另一个方面是检测对象内疾病或病症的存在、不存在、水平或阶段的试验, 所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂, 并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平, 其中, 所述免疫效应分子的水平指示所述疾病或病症。

[0058] 本公开内容还涵盖一种用于测定试剂是否诱导对象内免疫抑制的方法, 所述方法包括使所述对象的淋巴细胞在暴露于所述试剂后接触抗原和限制量的 TLR 激动剂, 并检测所述淋巴细胞的效应分子的存在和水平, 其中, 所述效应分子的水平确定由所述试剂诱导的免疫抑制的水平。

[0059] 根据此方面, 所述试剂可以是药物或环境毒药。

[0060] 在一个实施方式中,所述淋巴细胞包含在血样内。在一个实施方式中,用抗原和限制量的 R848 或其它咪唑啉共刺激所述血样。

[0061] 因此,本公开内容指导用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 R848 或其功能等同物,并检测由免疫细胞产生的免疫效应分子的水平,其中,所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导的免疫应答力的水平。

[0062] 本公开指导的另一方面考虑用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 R848 或其功能等同物,并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平升高,其中所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导应答力的水平,其中,所述应答力的水平指示了选自病原剂感染、自体免疫疾病、癌症、炎症病症和暴露于毒剂的疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段。

[0063] 还提供限制量的 TLR 激动剂在制备细胞介导的免疫应答力的诊断试验中的应用,该试验通过将淋巴细胞和限制量的所述激动剂孵育并检测效应分子的存在或水平的方法进行。

[0064] 在另一个实施方式中,本文指导用于检测病症是否诱导对象内免疫抑制的方法,所述方法包括使具有病症的对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂,检测所述淋巴细胞的免疫效应分子的存在或水平,其中,所述免疫效应分子的水平指示经诱导的或与该病症相关的免疫抑制的程度。

[0065] 还提供抗原和限制量的 TLR 激动剂在细胞介导的免疫应答力的诊断试验制造中的应用,该应用通过将淋巴细胞和所述激动剂孵育并检测效应分子的存在或升高的方法进行。

[0066] 此应用包括检测或监控疾病或病症的存在、缺失、水平或阶段,所述疾病或病症例如病原体感染、自身免疫疾病、癌症、炎症病症和 / 或暴露于药剂或毒性试剂如铍或其他环境毒剂。测量“免疫效应分子”包括检测一个或多个不同类型的分子。

[0067] 本公开内容还提供用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括使所述对象的调节 T 细胞接触选自以下的试剂:(i) 抑制型调节 T 细胞的抑制剂;和(ii) 免疫增强细胞或其亚群的活化剂;并进一步使 T 细胞接触抗原与限制量的 TLR 激动剂,并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平升高,其中,所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导应答力的水平。

[0068] T 调节功能的抑制剂或调节剂的示例包括 CD25 配体,例如但不限于 CD25 的多克隆或单克隆抗体或其抗原结合片段,CD25 的人源化或去免疫多克隆或单克隆抗体或者多克隆或单克隆抗体的重组或合成形式。试剂的其他示例包括正义或反义核酸 (nucleic) 和分子,其针对编码 Janus 酪氨酸激酶 1 (JAK1) 或酪氨酸激酶 2 (TYK2) 或者 JAK1 或 TYK2 蛋白的小分子抑制剂的 mRNA 或 DNA (即遗传物质)。提及“小分子”包括免疫球蛋白新抗原受体 (IgNAR),如描述于国际专利公开号 W02005/118629。然而,合适试剂的其他示例包括刺激试剂,例如通过 Toll 样受体 (TLR) 和 / 或其他机理作用的 CpG 分子。因此,作为 TLR 调节试剂的包含一个或多个寡核苷酸的 CpG 也形成本公开内容的一部分。

[0069] 可使用单一类型试剂或使用两个或更多类型试剂来调节 T 调节细胞。例如,所述试验可用下述试剂进行:CD25 配体和 JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸;CD25 配体和 TLR 调

节试剂；JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸和 TLR 调节试剂；或 CD25 配体，JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸和 TLR 调节试剂。或者，只用一种类型试剂。或者，可使用包括寡核苷酸和 TLR 调节试剂的 CpG。

[0070] 提及对象撰，包括人类或非人物种，包括灵长类，家畜动物（如绵羊，牛，猪，马，驴，山羊），实验室试验动物（如小鼠，大鼠，兔，豚鼠，猪，仓鼠），伴侣动物（如狗，猫），鸟类物种（如家禽鸟，飞鸟），爬行动物和两栖动物。本发明所述对象具有人体医学适用性，也适用于畜牧和兽医和野生应用，包括马、狗和骆驼比赛行业。例如，本公开内容的试验通常可用于马的强度劳作（如赛跑）之前和 / 或之后以筛选运动诱发肺出血 (EIPH) 的证据。所有马在运动中显示一定程度的一些 EIPH 形式。然而，EIPH 的亚临床形式难以检测。

[0071] 提及“人”，包括特定人群，例如儿童、老年和体弱人群以及特定种族的人的特定组和群体。

[0072] 另一个实施方式中，对象是人且细胞介导的免疫应答试验用于筛选对致病微生物、病毒和寄生虫的应答力，发展可能，或监控免疫情况，乳糜泻，监控对象应答肿瘤攻击和测定任何免疫缺陷或免疫抑制的存在。后者可由例如包括各种化疗试剂的某些药物引起。或者，暴露于环境毒剂或污染物。

[0073] 免疫效应分子可以是应答细胞活化或抗原刺激所产生的某一范围分子的任何一种。尽管干扰素 (IFN) 例如 IFN- γ 是特别有用的免疫效应分子，其它的免疫效应分子包括一定范围的细胞因子，例如，白细胞介素 (IL)，如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-6 (CXCL8)、IL-10、IL-12、IL-13、IL-16 (LCF) 或 IL-17、IL-1 (IL-1F1)、IL-1 (IL-1F2)、IL-1r (IL-1F3)，肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、集落刺激因子 (CSF)，如粒细胞 (G)-CSF 或粒细胞巨噬细胞 (GM)-CSF、补体组分 5a (C5a)、Gro α (CXCL1)、sICAM-1 (CD54)、IP-10 (CXCL10)、I-TAC (CXCL11)、MCP-1 (CCL2)、MIF (GIF)、MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4)、RANTES (CCL5) 或 MIG (CXCL9)。

[0074] 本公开内容还提供用于检测对象内细胞介导的免疫应答活性的方法，所述方法包括使所述对象的淋巴细胞接触抗原和限制量的 TLR 激动剂，并检测免疫细胞的免疫效应分子的水平，其中，所述免疫效应分子的水平指示所述对象的细胞介导的应答力水平。

[0075] 本文指导的试验能检测对象中疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段，所述疾病或病症例如病原体感染、自身免疫疾病、癌症、暴露于炎性病症、暴露于药物、暴露于毒性试剂例如铍或其他毒剂或污染物以及例如由病症诱导的免疫缺陷或免疫抑制。

[0076] 所述 TLR 激动剂可以在反应容器中游离或固定于固体支持物，例如珠或反应容器的边或底部。所述激动剂还可以干燥形式使用，在使用之前或期间重建。相似地，所述抗原可以游离或固定于反应容器，例如容器本身或珠或其他固体支持物。

[0077] 在一个实施方式中，从对象收集的样品一般存于血液收集管中。血液收集试管包括抽血管或其他类似容器。便利地，当样品是全血时，肝素化血液收集管。或者，血液收集后向试管加入肝素。尽管全血特别加以考虑且是最方便的样品，本公开内容也延伸到含有免疫细胞的其他样品，例如淋巴液，脑液，组织液和包括鼻腔和肺液在内的呼吸液以及经历细胞清除的样品。提及“全血”，包括没有被稀释（例如用组织培养，培养基，试剂，赋形剂等）的全血。在一个实施方式中，术语“全血”包括至少 10% 全血体积的试验样品（即反应混合物）。术语至少“10% 体积”包括血液体积为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和 100% 的反应混合物总试验体积。可加入额外试剂,例如培养基,酶,赋形剂、抗原等,而不离开包括“全血”的样品。

[0078] 血液体积可为约 $0.5 \mu\text{L} \sim 200\text{mL}$ 。示例包括 $0.5 \mu\text{L}$ 、 $1.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L}$ 、 $50 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $500 \mu\text{L}$ 、 1mL 、 5mL 、 10mL 和 20mL 。本公开内容还允许声微流的应用以改善所述试验中的成分混合。声微流在国际专利申请 PCT/AU01/00420 号和 Petkovic-Duran 等. (2009) *Biotechniques*47:827-834 中公开。

[0079] 因此,本文考虑在容器中混合一种或多种淋巴细胞与抗原和限制量的 TLR 激动剂的方法,所述方法包括提供约 $0.5 \mu\text{L} \sim 150 \mu\text{L}$ 的液体,所述液体包含所述容器中的成分以建立声阻抗中的不连续并施加声信号以引起所述液体内的混合。还可施加第二声信号,所述第一和第二信号各自分别具有选自约 $1\text{Hz} \sim$ 约 $20,000\text{Hz}$ 的频率,以间歇方式在所述液体内起混乱混合作用。血液收集管的应用与标准自动化实验室系统相容,这些可适合大量和随机存取抽样的分析。血液收集管也使处理成本最小化并减少实验室暴露于全血和血浆,因而降低实验室人员接触病原体的风险,例如 HIV,乙型肝炎病毒 (HBV) 或丙型肝炎病毒 (HCV)。

[0080] 孵育步骤和收集管的组合特别有效并提高试验的灵敏度,还提高了在单糖例如右旋糖或葡萄糖存在下孵育细胞的可选特性。

[0081] 在对象抽血后的延长期后,细胞介导免疫系统的细胞丧失了增加全血中免疫应答的能力,并且无干扰的应答在抽血后约 24 小时常常严重降低或缺失。劳动力的减轻和对专门塑料制品的需求允许在医疗点用抗原进行细胞介导的刺激,所述医疗点例如医师诊所、诊所、门诊设施和兽医检验或农场上。一旦抗原刺激完成,不再需要新鲜和活性细胞。IFN- γ 和其他细胞因子或免疫效应分子在血浆中稳定,因此,样品能存储或运输而不需要特殊条件或快速时间要求。

[0082] 孵育步骤可以为 1-50 小时,例如 1-40 小时或 8-24 小时或以下之间的时间段:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 小时。24 小时时间段特别便利。

[0083] 检测细胞介导免疫的能力对评价对象的下述能力重要:对病原体例如微生物或病毒或寄生虫感染的应答,增加自体免疫应答例如自体免疫糖尿病或保护抵御癌症或其他肿瘤病症或检测炎性病症或检测对象对毒性试剂例如铍的暴露或敏感性。本文所述试验也能检测导致免疫抑制或药物诱导免疫抑制的病症。因此,提及“检测对象的细胞介导的免疫应答”,包括和涵盖传染和自体免疫疾病的免疫诊断,免疫活性标记和炎症、癌症和毒性试剂的标记。重要的是,组合的先天和/或获得性免疫应答力得到测定。另外,使用小体积血液的能力使得试验在例如儿童、老年和体弱人群中简单易行。本文所述的试验使免疫应答力的早期检测或更敏感的检测可行。

[0084] 在一个实施方式中,造成免疫抑制的病症包括慢性感染和癌症。能导致免疫抑制的药物包括那些用于治疗风湿性关节炎,癌症和炎症性肠病的药物。

[0085] 病原体或感染剂包括细菌, 寄生虫和病毒。细菌的示例包括革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物, 例如分枝杆菌属 (*Mycobacterium*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 链球菌属 (*Streptococcus*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 沙门氏菌 (*Salmonella*), 梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*), 志贺菌属 (*Shigella*), 变形杆菌属 (*Proteus*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 嗜血杆菌属 (*Hemophilus*), 伯疏氏螺旋体属 (*Borrelia*) 等。结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 以及结核分枝杆菌感染产生的病症例如结核病 (TB) 是特别有用的靶标。病毒示例包括肝炎病毒 (乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒), 疱疹病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和其产生的疾病。寄生虫包括疟原虫属 (*Plasmodium*), 环癣, 肝寄生虫等等。其他病原体包括真核细胞, 例如酵母和真菌。

[0086] 本文所述用于检测的自体免疫疾病包括脱发斑秃, 强直性脊柱炎, 抗磷脂综合症, 自体免疫阿狄森氏病, 多发性硬化症, 肾上腺自体免疫疾病, 自体免疫溶血性贫血, 自体免疫性肝炎, 自体免疫卵巢炎和睾丸炎, 白塞氏病, 大疱性类天疱疮, 心肌病, 口炎性腹泻皮炎 (celiac sprue-dermatitis), 慢性疲劳综合症 (CFIDS), 慢性炎症脱髓鞘, 慢性炎症多神经病, 变应性肉芽肿性血管炎, 瘢痕性类天疱疮, CREST 综合症, 冷凝集素病, 克隆氏病, 疱疹样皮炎, 盘状红斑狼疮, 基本混合冷球蛋白血症, 纤维组织肌痛, 肾小球肾炎, 格雷弗氏病, 格林-巴利症, 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 (I 型), 扁平苔藓, 红斑狼疮, 梅尼埃病, 混合性结缔组织病, 多发性硬化症, 重症肌无力, 心肌炎, 寻常性天疱疮, 恶性贫血, 结节性多动脉炎, 多软骨炎, 多腺体综合症 (polyglandular syndromes), 风湿性多肌痛, 多发性肌炎和皮炎, 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, 赖特尔综合症, 风湿热, 类风湿关节炎, 结节病, 硬皮病, 舍格伦综合症, 全身肌强直综合症, 系统性红斑狼疮, 多发性大动脉炎, 颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎, 溃疡性结肠炎, 葡萄膜炎, 血管炎和白癜风。

[0087] 评价暴露于传染实体的对象的潜在或实际细胞介导的应答力通常非常重要。本公开内容的方法还能用于检测这些情况是否出现以及疾病过程的水平和阶段。

[0088] 能导致免疫抑制的其他病症包括炎症病症。

[0089] 本公开内容描述的炎症病症示例包括但不限于, 导致某些区域变红、肿胀、疼痛和发热感觉应答的疾病和紊乱, 其用于保护受损伤或疾病影响的组织。能使用本公开内容的方法治疗的炎症疾病包括但不限于, 痤疮, 心绞痛, 关节炎, 吸入性肺炎, 疾病, 积脓症, 肠胃炎, 炎症, 肠流感, NEC, 坏死性肠炎, 盆腔炎, 咽炎, PID, 胸膜炎, 喉咙发炎, 红肿, 发红, 喉咙痛, 肠胃感冒和尿路感染, 慢性炎症脱髓鞘多神经病, 慢性炎症脱髓鞘多神经根神经病, 慢性炎症脱髓鞘多神经病, 慢性炎症脱髓鞘多神经根神经病。关于非人类应用, 本公开内容也检测马的 EIPH 和各种动物病症, 例如袋獾面部肿瘤。

[0090] 癌症治疗部分取决于细胞介导免疫和肿瘤本身或能导致免疫抑制的肿瘤治疗药物。本文所述肿瘤包括一组疾病和紊乱, 特征为细胞生长失控 (例如肿瘤形成) 而这些细胞没有任何分化为专门且不同细胞。这些疾病和紊乱包括: ABL1 原癌基因、AIDS 相关癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、腺样囊腺癌、肾上腺皮质癌、特发性髓样化生、秃头症、泡软组织肉瘤、肛门癌、再生障碍性贫血、星形胶质细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌 (皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑干胶质瘤、脑和 CNS 肿瘤、乳腺癌、CNS 肿瘤、类癌瘤、子宫颈癌、儿童脑肿瘤、儿童癌症、儿童白血病、儿童软组织肉瘤、

软骨肉瘤、绒毛膜癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、结直肠癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、隆凸性皮肤纤维肉瘤、促纤维组织增生性小细胞癌、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆道癌、眼癌 (eye cancer)、眼：黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范科尼贫血、纤维肉瘤、胆膀胱癌、胃癌、胃肠道癌、胃肠道类癌肿瘤、泌尿生殖系统的癌症、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞疾病肿瘤、神经胶质瘤、妇科癌症、恶性血液肿瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、遗传乳腺癌、组织细胞增生症、何杰金氏病、人类乳头状瘤病毒、水囊状胎块、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、郎格罕细胞组织细胞增多病、喉头癌、平滑肌肉瘤、白血病、李-佛美尼综合症、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴性水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌肿瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、转移癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合症、骨髓瘤、骨髓增生性疾病、鼻腔癌、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨破损综合症、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、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺肿瘤、阴茎癌、周边神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、真性红细胞增多症、前列腺癌、罕见癌症和相关疾病、肾细胞癌、成视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、先天性皮肤异色症、唾液腺肿瘤、肉瘤、神经鞘瘤、塞扎里综合症、皮肤癌、小细胞肺癌 (SCLC)、小肠肿瘤、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-肾盂-输尿管)、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统的癌症、膜蛋白、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、沃尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和肾母细胞瘤。

[0091] 在上述方面中,所述抗原可获自所述病原剂,与所述病症或癌症相关或是所述毒剂。或者,所述感染、病症、癌症或毒剂可抑制细胞介导的免疫,在该情况中,可以使用所述对象之前接触过的任何抗原。

[0092] 本文指导的另一个方面是:限制量的 TLR 激动剂在细胞介导的免疫应答力的诊断试验制造中的应用,该应用通过将所述对象的淋巴细胞与限制量的所述激动剂孵育然后检测效应分子的存在或升高的方法进行。

[0093] 免疫效应分子的检测可以在蛋白或核酸水平测量。因此,免疫效应分子的“出现或水平”包括直接和间接数据。例如,细胞因子 mRNA 的高水平是显示细胞因子水平增加的间接数据。

[0094] 免疫效应物的配体对检测和/或定量这些分子特别有用。免疫效应物的抗体特别有用。本文所述试验的技术为本领域已知,并包括,例如放射性免疫试验、夹心法试验,ELISA 和酶联免疫斑点法。提及“抗体”包括抗体的部分,哺乳动物化(例如人源化)抗体,去免疫抗体,重组或合成抗体以及杂交和单链抗体。对于人皮肤实验,本文特定描述人源化或去免疫抗体用于检测效应物分子。

[0095] 多克隆和单克隆抗体都可用免疫效应物分子或其抗原片段免疫得到,并任一种类都可用于免疫分析。获取两种血清的方法为本领域熟知。多克隆血清不太优选,但相对易于制备,通过向合适实验室动物注射有效剂量的免疫效应物或其抗原部分,从动物收集血清,并用任何已知免疫吸附剂技术分离特定血清。尽管此种方法生产的抗体可用于几乎任何类型免疫分析,但是它们通常因为产品的潜在异质性而不受青睐。

[0096] 免疫分析中应用单克隆抗体特别有用,因为其能大量生产且产品具有同质性。通过融合永生细胞系和对免疫原性制品敏感的淋巴细胞获得用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞系制备可用本领域技术人员熟知的技术完成。

[0097] 因此,本文所述的另一方面提供用于检测含对象淋巴细胞的样品中的免疫效应分子的方法,所述方法包括使所述样品或所述样品的等分和所述免疫效应分子或其抗原片段的特异性抗体在足以形成抗体-效应物复合物的条件下接触一段时间,然后检测所述复合物,其中,所述免疫效应分子在将所述淋巴细胞与一种抗原和限量量的 TLR 激动剂孵育后生成。

[0098] “样品”包括全血或其包括淋巴细胞的部分。方法包括平板或球形固体支持物上的微阵列,宏阵列和纳米阵列。可用微或宏阵列。“样品”还包括约 $0.5 \mu\text{l} \sim 1000 \mu\text{l}$, 包括 $5 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{l}$ 、 $50 \mu\text{l}$ 和 $100 \mu\text{l}$ 的小体积样品,以及较大体积例如 $1\text{ml} \sim$ 约 200ml , 例如 1ml 、 2ml 、 5ml 、 10ml 或 20ml 样品。

[0099] 大量免疫试验技术可参见美国专利号 4, 016, 043、4, 424, 279 和 4, 018, 653。

[0100] 下面是一类试验的描述。没有标记的抗体固定于固体底物,待检测免疫效应分子(如细胞因子)的样品与结合分子接触。经过一段合适时间的孵育,时间足以形成抗体-免疫效应物分子复合物,然后加入对效应物分子特异的二抗、标记有能产生检测信号的报告分子,孵育且时间足以形成另一抗体-效应物-标记抗体复合物。洗去任何没有反应的物质,通过观察报告分子产生的信号来测定效应物分子的存在。结果可以通过简单观察可见信号来定量,或通过对比含已知抗原量的对照样品来定量。此广义技术为本领域技术人员熟知,可以是多种变化中的任一种。

[0101] 在这些试验中,对即时免疫效应物特异的一抗可共价或被动结合到固体表面。通常固体表面是玻璃或聚合物,最常用聚合物是纤维素,聚丙烯,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。固体支持物可以是试管,珠,球,微孔板盘,或其他适合作免疫分析的合适表面。结合过程为本领域熟知,并通常由共价交联结合或物理吸附组成,洗涤聚合物-抗体复合物以制备检测样品。检测的等份样品随后加入固相复合物并在合适情况下(例如约 20°C - 约 40°C) 孵育足够时间(例如 2-120 分钟或更合适的时间,过夜)以使抗体中存在的任何亚基结合。孵育期后,洗涤抗体亚基固相并干燥,用对部分效应分子特异的二抗孵育。二抗连接报告分子,用于指示二抗与效应分子的结合。

[0102] 此试验存在很多变化。一个特别有用的变化是所有或很多成分基本同时混合时同时分析。另外,抗体与细胞因子的结合可以通过与针对首先提及抗体的经标记抗体的结合来测定。

[0103] 本说明书所用的“报告分子”,指通过分子其化学性质提供可分析鉴定的信号,从而检测结合抗原的抗体。检测可以是定性或定量。这类试验中最常用的报告分子是酶,荧光团或含分子的放射性核素(即放射性同位元素)和化学发光分子。合适荧光团的示例在表 1 中提供。酶免疫试验的情况下,酶一般通过戊二醛或过碘酸盐与二抗偶联。然而,如已公知,存在本领域技术人员可用的广泛不同偶联技术。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等。与特定酶一起使用的底物通常选择在相应酶水解后产生可检测的颜色变化。合适酶的示例包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。也可以使用荧光底物,产生荧光产物而不是上面提及的发色底物。所有情况中,将酶标记的抗体加入第

一抗体-抗原复合物中,使之结合,然后洗去多余试剂。然后将包括合适底物的试剂加入抗体-抗原-抗体复合物中。底物与连接二抗的酶反应,产生定性可见信号,通常可用分光光度分析进一步定量,指示样品中存在的抗原量。再者,本公开内容延伸至基本同时的分析。

[0104] 或者,荧光化合物例如荧光素和若丹明,可以化学偶联于抗体上而不改变其结合能力。当用特定波长光照射激活时,荧光物标记抗体吸收光能,诱导分子激发性状态,然后发射用光学显微镜视觉可检测的特征性颜色的光。荧光标记抗体可结合第一抗体-抗原复合物。洗去未结合试剂后,剩余三元复合物随后暴露在合适波长光下,观察到的荧光指示感兴趣抗原的存在。免疫荧光和酶免疫分析技术在本领域都已完善,并特别优选用于本方法。然而,也可使用其他报道分子,例如放射性同位素,化学发光或生物发光分子。

[0105] 可以使用一系列其它检测系统,包括胶体金和本公开内容涵盖的所有这种检测系统。

[0106] 本公开内容也包括遗传分析,例如涉及 PCR 分析以检测编码免疫效应物的遗传序列的 RNA 表达产物。

[0107] 在一个实施方式中,使用引物对完成 PCR,引物之一或两者一般用相同报道分子或能给出可区分信号的不同报道分子标记。使用荧光团在本公开内容的实践中特别有用。合适荧光团的示例可选自表 1 中给出的列表。其他标记包括发光和磷光以及红外染料。这些染料或荧光团也可用作抗体的报道分子。

[0108] 表 1

[0109] 合适荧光团列表

[0110]

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
反应和偶联探针		
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	375; 400	423
萤黄	425	528
NBD	466	539
R-藻红蛋白(PE)	480; 565	578
PE-Cy5偶联物	480; 565; 650	670
PE-Cy7偶联物	480; 565; 743	767
APC-Cy7偶联物	650; 755	767
红色613	480; 565	613
荧光素	495	519
FluorX	494	520
氟硼二吡咯(BODIPY)-FL	503	512
TRITC	547	574
X-若丹明	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沸石350	346	445
Alexa沸石430	430	545
Alexa沸石488	494	517
Alexa沸石532	530	555
Alexa沸石546	556	573

[0111]

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
Alexa沸石555	556	573
Alexa沸石568	578	603
Alexa沸石594	590	617
Alexa沸石633	621	639
Alexa沸石647	650	688
Alexa沸石660	663	690
Alexa沸石680	679	702
Alexa沸石700	696	719
Alexa沸石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蓝	431	480
色霉素A3	445	575
光神霉素	445	575
YOYO-1	491	509
SYTOX绿	504	523
SYTOX橙	547	570
溴化乙锭	493	620
7-AAD	546	647
吖啶橙	503	530/640
TOTO-1、TO-PRO-1	509	533

[0112]

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
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
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		
单氯二胺	380	461
钙黄绿素	496	517

[0113] ¹Ex :激发峰波长 (nm)

[0114] ²Em :发射峰波长 (nm)

[0115] 本文涵盖任何合适的分析荧光发射的方法。就此而言,本文指导的技术包括但不限于:2光子和3光子时间分辨荧光光谱,如Lakowicz等,Biophys. J. 72:567,1997所公开,荧光寿命成像,如Eriksson等,Biophys. J. 2:64,1993所公开,和荧光共振能量转移,如Youvan,Biotechnology et elia3:1-18,1997所公开。

[0116] 发光和磷光可以分别由本领域已知合适的发光或磷光标记产生。任何可以鉴定这种标记的光学方法能用于此方面。

[0117] 红外辐射可由合适红外染料产生。可用于本公开内容的红外染料示例包括但不限于下述文件公开的染料:Lewis 等, Dyes Pigm. 42(2):197,1999, Tawa 等, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 488[Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV(有机固态材料的电学,光学和磁学属性 IV)],885-890, Daneshvar 等, J. Immunol. Methods226(1-2):119-128,1999, Rapaport 等, Appl. Phys. Lett. 74(3):329-331,1999 和 Durig 等, J. Raman Spectrosc. 24(5):281-285,1993。任何合适红外光谱法可以用于检测红外染料。例如,为此可使用傅里叶变换红外光谱,如 Rahman 等, J. Org. Chem. 63:6196,1998 所述。

[0118] 合适地,电磁散射可由包括光和 X 射线在内的入射电磁辐射的衍射,反射,偏振或折射产生。这种散射可用于定量 mRNA 水平或蛋白质水平。

[0119] 分析荧光团发射时流式细胞仪特别有用。

[0120] 如本领域已知,流式细胞仪是高通量技术,涉及到快速分析粒子的物理和化学特性(例如,标记 mRNA, DNA 或蛋白),因为其悬浮于液体流时通过一个或多个激光束路径。因为每个粒子截断激光束,可检测每个细胞或粒子发射的散射光和荧光并通过任何合适追踪算法例如下述算法来记录。

[0121] 现代流式细胞仪能完成这些任务达到每秒每个粒子 100,000 个细胞。通过使用滤镜和二向色镜的光学阵列,能分开不同波长荧光并同时检测。另外,可使用有许多不同激发波长的激光。因此,可采用各种荧光定位和检测例如,一个样品内的不同免疫效应物或多个对象的免疫效应物。

[0122] 可用于本公开内容的方法的合适流式细胞仪包括使用单个激发激光测量 5-9 个光学参数(见表 2),通常在 15mW 以其 488nm 光谱线操作氩离子冷却式激光器。更先进的流式细胞仪能使用多个激发激光,例如氩离子激光(488 或 514

[0123] nm) 以外的 HeNe 激光(633nm) 或 HeCd 激光(325nm)。

[0124] 表 2

[0125] 可通过流式细胞仪测量的示例性光学参数

[0126]

参数	首字母缩写	入射激光束的检测角度	波长 (nm)
正向散射光	FS	2-5°	488*
侧向散射光	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 [#]

[0127] * 使用 488nm 激发激光

[0128] [†]带通滤波器宽度

[0129] [#]长通滤波器

[0130] 例如, Biggs 等(1999), Cytometry36:36-45 使用三个激发激光已经构建 11 个参数的流式细胞仪,并显示使用正向和侧向散射检测以外的九个可区分荧光团,以免疫分型

(即分类) 粒子。参数的选择能充分使用, 主要根据所有荧光团之间的消光系数, 量子产率和光谱重叠数量 (Malemed 等 (1990), “Flow cytometry and sorting(《流式细胞术和分选》)”, 第二版, 纽约的约翰威立 (Wiley-Liss))。应理解本公开内容不限于任何特定流式细胞仪或任何特定参数组。就此而言, 本公开内容还包括使用微型流式细胞仪代替传统流式细胞仪, 例如 Fu 等 (1999), Nature Biotechnology 17:1109-1111 所公开。

[0131] 本文提供的试验可以自动或半自动, 用于从一个对象中高通量筛选或用于筛选许多免疫效应物。通过计算机软件可方便控制自动操作。

[0132] 因此本公开内容还包括基于网络和非基于网络的系统, 其中对象的细胞介导免疫应答力数据通过客户服务器或其他结构平台提供到中央处理器, 其分析和对比对照且任选考虑其他信息例如患者年龄, 性别, 体重, 和其他医学条件, 然后提供报告, 例如, 疾病严重性或进展或状态或疾病发展可能性指数的风险因子。因此, 还提供商业方法, 其中在运输管中收集血液, 然后在定义位点分析细胞介导的免疫应答力, 然后所述结果通过客户服务器或其他结构平台以电子报告形式送达临床护理提供者。

[0133] 因此, 基于知识的计算机软件和硬件也形成本公开内容的部分。这有助于临床护理确定包括感染、炎症癌症或药物或毒剂的病症是否诱导或与免疫抑制相关。

[0134] 在一个实施方式中, 本公开内容提供的试验可用于现有或新开发的与病理学行业相关的基于知识的结构或平台。例如, 试验结果通过通讯网络 (例如因特网) 或电话联系传到处理系统, 其中算法被存储并用于产生预测后验概率值, 其转换成细胞介导免疫应答力或免疫抑制指数, 再以诊断或预测报告形式转入终端使用。本报告也形成临床护理管理和个性化医疗的基础。

[0135] 因此, 所述试验可采用试剂盒或基于计算机系统的形式, 包括在淋巴细胞暴露于抗原和限制量的 TLR 激动剂之后检测所述免疫效应分子的浓度的所需试剂, 和用以协助确定并传送报告至临床医师的计算机硬件和 / 或软件。

[0136] 例如, 本公开内容指导使用户能够测定对象细胞介导免疫应答力状态的方法, 所述方法包括:

[0137] (a) 通过通讯网络接收免疫效应分子的水平或浓度形式的数据, 其中所述数据相校对照与细胞介导的免疫应答力状态相关联, 其中在淋巴细胞暴露于抗原和限制量的 TLR 激动剂之后检测所述免疫效应分子;

[0138] (b) 通过单变量或多变量分析处理所述对象数据以提供免疫应答力值;

[0139] (c) 根据与预定值相比较的所述免疫应答力值的结果确定所述对象的状态; 和

[0140] (d) 通过所述通讯网络将所述对象的状态指标传送到所述用户。

[0141] 提及“单变量”或“多变量”分析, 包括执行单变量或多变量解析函数的算法。

[0142] 便利地, 所述方法一般还包括:

[0143] (a) 使用户使用远程终端站测定数据; 和 (b) 通过通讯网络从该终

[0144] 端站向基站传送数据。

[0145] 所述基站能包括第一和第二处理系统, 其中所述方法包括:

[0146] (a) 传送数据到第一处理系统;

[0147] (b) 传送数据到第二处理系统; 和

[0148] (c) 使所述第一处理系统执行单变量或多变量解析函数以产生细胞介导免疫应答

力值。

[0149] 所述方法还可包括：

[0150] (a) 传送单变量或多变量解析函数的结果到所述第一处理系统；和

[0151] (b) 使所述第一处理系统测定对象状态。本情况中，所述方法也包括至少一个：

[0152] (a) 所述通讯网络和所述第一处理系统之间通过第一防火墙传送数据；和

[0153] (b) 在所述第一和第二处理系统之间通过第二防火墙传送数据。

[0154] 所述第二处理系统可以连接到适应存储预定数据和 / 或单变量或多变量解析函数的数据库，所述方法包括：

[0155] (a) 查询数据库以得到至少所选预定数据或访问数据库中单变量或多变量解析函数；和

[0156] (b) 比较所选预定数据和对象数据或产生细胞免疫应答力或免疫抑制的预测可能性指数。

[0157] 所述第二处理系统能连接到数据库，所述方法包括在数据库中存储数据。所述方法还包括使基站：

[0158] (a) 测定支付信息，支付信息代表用户支付条款；和

[0159] (b) 响应测定支付信息进行对比。

[0160] 本公开内容还提供相对细胞介导的免疫应答力或免疫抑制测定对象状态的基站，所述基站包括：

[0161] (a) 存储方法；

[0162] (b) 处理系统，所述处理系统适合于：

[0163] (c) 通过通讯网络从所述用户接收对象数据，所述数据包括免疫效应分子的水平，其中，所述免疫效应分子的水平相较对照与细胞介导的免疫应答力状态相关联，其中，在淋巴细胞暴露于抗原和限制量的 TLR 激动剂之后测定所述免疫效应分子；

[0164] (d) 执行算法函数，包括将所述数据和预定数据作比较；

[0165] (e) 根据包括所述比较的所述算法函数的结果确定所述对象的状态；和

[0166] 态；和

[0167] (c) 通过所述通讯网络向所述用户输出所述对象状态的指标。所述处理系统能适应从适于测定数据的远程终端站接受数据。所述处理系统可以包括：

[0168] (a) 第一处理系统，其适用于：

[0169] (i) 接收数据；和

[0170] (ii) 根据包括数据比较的单变量或多变量分析函数的结果确定所述对象的状态；和

[0171] (b) 第二处理系统，其适用于：

[0172] (i) 从所述处理系统接收数据；

[0173] (ii) 执行包括所述比较的单变量或多变量分析函数；和

[0174] (iii) 向所述第一处理系统传送所述结果。

[0175] 所述处理系统能连接到数据库，所述处理系统适合在数据库中存储数据。

[0176] 根据此实施方式，免疫效应分子水平可以单独筛选或联合其他生物标记或疾病指示物。“改变”的水平指免疫效应分子浓度的增加或提高或下降或降低。

[0177] 免疫效应分子浓度或水平的测定能基于相对对照的浓度建立诊断方法。或者,诊断规则是基于统计和机器学习算法的应用。这种算法使用训练数据(有已知疾病或细胞介导的免疫应答力状态)中观察到的效应分子和疾病状态之间的关系来推断关系,然后用于预测未知状态对象的状态。能用算法来提供对象有某一水平细胞介导的免疫应答力和/或病症的可能性指数。算法执行单变量或多变量解析函数。

[0178] 因此,本公开内容提供基于统计和机器学习算法的应用的诊断规则。这种算法使用训练数据(有已知免疫状态)中观察到的效应分子和细胞介导免疫应答力或免疫抑制之间的关系来推断关系,然后用于预测未知免疫状态患者的状态。本数据分析领域从业者认识到,训练数据中推断关系的很多不同形式能在没有实质性改变本公开内容情况下使用。

[0179] 本公开内容还包括使用训练数据的知识库,对比对象免疫效应分子水平和已知细胞介导的免疫应答力水平以产生算法,在输入未知免疫应答力水平对象中包括相同免疫效应分子水平的第二数据知识库后,提供可能性参数,预测细胞介导的免疫应答力的性质。

[0180] 术语“训练数据”包括相对于对照的免疫效应分子水平的知识,其中在淋巴细胞暴露于抗原和限制量的一种或多种适应性试剂后测定免疫效应分子,所述试剂增强先天和/或获得性免疫系统。“对照”包括对象免疫效应分子水平与“正常”免疫应答力的对比,或可根据试验统计上测定水平。

[0181] 因此,术语“训练数据”包括免疫效应分子水平。

[0182] 免疫效应分子的水平或浓度提供输入测试数据,本文称为“第二数据知识库”。第二数据知识库视作相对于对照或输入包括已知免疫状态的对象免疫效应物水平信息的“第一数据知识库”产生的算法。第二数据知识库来自未知状态对象,涉及细胞介导的免疫应答力。算法输出或与对照对比是对象有某一水平的免疫应答力或免疫抑制的可能性或风险因子,本文称为“可能性指数”。

[0183] 从免疫效应分子水平得到的数据是输入数据。包括免疫效应水平的输入数据与对照作比较,或输入到算法中,所述算法提供对象有例如免疫抑制病症的可能性风险值。也可监控治疗方案以确定任何免疫抑制的出现。免疫抑制水平可以增加对象继发感染或复发(例如肿瘤治疗或病原性感染治疗期间)的风险。

[0184] 如上所述,诊断免疫应答力或免疫抑制病证的方法,通过免疫效应分子水平测定对象加强先天和/或获得性免疫应答程度,由已知免疫状态对象的第一数据知识库或相同效应分子水平产生的算法中,提供第二数据知识库。同时提供检测免疫应答力方法,包括测定对象样品先天和/或获得性免疫系统刺激后免疫效应分子出现和/或速度。“速度”指对象样品中效应分子浓度随着时间而改变。

[0185] 如上所述,本文所用的术语“样品”指包含一种或多种淋巴细胞的任何样品,包括但不限于:全血、全血部分、组织提取物和新鲜收获的细胞。

[0186] 本公开内容的方法可用于诊断和疾病分级。本公开内容还可用于监控病症进展和监控特定治疗是否有效。特别地,所述方法能用于监控手术,肿瘤治疗或其他或药物或暴露于毒剂后的免疫抑制。

[0187] 在一个实施方式中,本公开考虑监控对象免疫抑制的方法,包括:

[0188] (a) 从对象提供样品;

[0189] (b) 在通过抗原和限制量的 TLR 激动剂刺激之后测定免疫效应分子的水平;

[0190] 其中,免疫效应物水平相较于对照与细胞介导的免疫应答力状态相关联,并使所述水平用于算法以提供对象具有某一免疫应答力水平的可能性指数。

[0191] (c) 重复步骤 (a) 和 (b),在稍晚的时间点,对比步骤 (b) 结果与步骤 (c)

[0192] 结果,其中可能性指数的差异指示对象病症的进展。

[0193] 上述“算法”或“算法函数”包括执行单变量或多变量解析函数。不同结构和平台可以用作上面描述的补充。应理解可以使用适于完成本公开内容的任何结构形式。然而,一个有利技术是使用分布式结构。特别地,许多终端站可以在不同地理位置提供。这能通过降低数据带宽成本和需求来增加系统效率,和保证如果一个基站堵塞或发生错误,其他站点可以接管。这也允许负载共享或其他以确保可随时访问系统。

[0194] 此情况中,需要确保基站包括相同信息和签名,从而能使用不同终端站。

[0195] 还应理解在一个实施例中,终端站可以是便携式设备,例如 PDA,移动手机等,能通过通讯网络例如因特网转移对象数据到基站,和接受报告。

[0196] 在上述方面中,术语“数据”指在限制量的 TLR 激动剂存在下抗原刺激之后的所述免疫效应物的水平或浓度。所述“通讯网络”包括因特网和移动电话网络和电话线。当使用服务器时,一般是客户服务器或更特定是简单对象应用协议 (SOAP)。

[0197] 本公开内容的一方面包括通过检测在限制量的 TLR 激动剂存在下对抗原的应答力确定对象的细胞介导的免疫应答力的试验。在一个实施方式中,一个或多个样品,例如外周血液样品,血液组分或支气管肺泡灌洗液的白细胞富集样品,可从有或怀疑发生特定疾病(例如自体免疫疾病,病原体感染或暴露于铍)的对象获得,通过测定来自效应 T 细胞(如 CD4+T 细胞)的效应分子检测免疫应答力。所述试验在抗原和限制量的 TLR 激动剂存在下实施。

[0198] 所述免疫结合方法包括检测或定量样品中反应成分含量的方法,所述方法需要检测或定量在结合过程中形成的任何免疫复合物。此处,获得在限制量的 TLR 激动剂存在下由抗原刺激淋巴细胞之后疑似含有细胞因子的样品,并使该样品接触抗体,然后检测或定量在该特异性条件下形成的免疫复合物的量。

[0199] 所选的生物样品和抗体在有效情况下接触充分的时间段以形成免疫复合物(初级免疫复合物)一般是向样品中加入组合物和孵育混合物一段足够长的时间以使抗体与任何存在的效应分子形成(即与之结合)免疫复合物。之后,样品-抗体组合物例如组织切片,ELISA 平板,酶联免疫斑点,斑点印迹或 Western 印迹,一般会经清洗以去除任何非特异性结合抗体物质,使仅特异性结合在所述初级免疫复合物中的抗体被检测。

[0200] 在一个具体的实施方式中,本公开内容指导用于检测人对象内疾病或病症的存在、不存在、水平或阶段的方法,所述方法包括使含有至少 10% 反应混合物总体积的全血接触抗原和限制量的 TLR 激动剂,并检测 T 细胞的免疫效应分子水平的存在或升高,其中,所述免疫效应分子的存在或水平指示所述疾病或病症。

[0201] 在另一个实施方式中,本公开内容提供伴随上述方法使用的试剂盒。在一个实施方式中,考虑免疫检测试剂盒。在另一个实施方式中,考虑用于分析来自有或怀疑发生金属或化学诱导疾病的对象的样品的试剂盒。在一个更具体的实施方式中,考虑用于分析来自有或怀疑发生疾病的对象的样品的试剂盒。在一个实施方式中,试剂盒用于在疾病状态已经发展之前或之后或在对象接受药物或暴露于毒剂或污染物之前或之后评估对象的细胞

介导的免疫应答力。如果还使用抗原,试剂盒还可包括特定抗原。

[0202] 试剂盒的免疫检测试剂可以用各种形式中的任何一种,包括与给定抗体或抗原相关或连接的检测标记,与第二结合配体相关或连接的检测标记。示例性第二配体是有第一抗体或抗原结合亲和性的第二抗体,和有人体抗体结合亲和性的第二抗体。

[0203] 适用于本发明试剂盒的其它合适免疫检测试剂包括含二抗与三抗的双组分试剂,所述二抗对一抗或抗原有结合亲和性,所述三抗对二抗有结合亲和性,所述三抗连接有可检测标记。

[0204] 所述试剂盒还可包括适当等分的标记或未标记抗原或效应分子组合物,可用作制备检测试验的标准曲线。

[0205] 所述试剂盒可包含抗体-标记偶联物,其可为全偶联形式、中间体形式或待试剂盒用户偶联的单独部分。所述试剂盒的组分可包装在水性介质中或以冻干形式包装。

[0206] 任何试剂盒的容器用具通常包括至少一种小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器用具,其中可放置测试试剂,抗体或抗原,且通常适当等分装。当提供第二或第三结合配体或额外组分时,试剂盒通常也包括第二,第三或其他额外容器,其中可放置此配体或组分。本公开内容指导的试剂盒通常还可包括用于在封闭限制件中容纳所述抗体、抗原和任意其它试剂容器用于市售的用具。此类容器可包括注塑或吹塑的塑料容器,其中保留所需小管。

[0207] 本文还考虑的是一种检测对象内细胞介导的免疫应答或其水平的改进试验,所述试验包括将所述对象的淋巴细胞和抗原孵育,并检测效应分子的存在或升高,所述改进包括进一步使所述淋巴细胞与限制量的 TLR 激动剂孵育。

[0208] 本公开内容还提供治疗患有病原感染、自体免疫疾病或癌症或具有发展所述病症或疾病的倾向的对象的方法,所述方法包括使该对象的淋巴细胞来源接触抗原和限制量的 TLR 激动剂,并检测 T 细胞的免疫效应分子水平的存在或升高,其中,所述免疫效应分子的存在或升高指示该对象的细胞介导应答力的水平,其指示所述病症或疾病的存在、不存在、水平或阶段,然后治疗所述病症或疾病。

[0209] 本文提及“TLR 激动剂”包括 TLR-7/8 激动剂,例如 R848。

[0210] 本文指导的方面还通过下面的非限制性实施例进一步说明。

[0211] 实施例 1

[0212] 试验开发

[0213] 将肝素化血液样品收集到真空管 (Li-Hep Vacuette [注册商标] 管 (德国葛莱娜第一生化有限公司 (Greiner Bio-one))) 中。

[0214] 血液样品的等分用不同浓度的以下 Toll 样受体激动剂孵育:咪唑啉化合物-TLR-7/8 配体、R848 (GL 合成公司 (GL Synthesis, Inc.))、脂甘露聚糖 TLR-2 配体 (圣地亚哥的英韦沃基公司 (InvivoGen))、Pam3CSK4TLR-2 配体 (圣地亚哥的英韦沃基公司 (InvivoGen))、聚 (I:C)TLR-3 配体 (圣地亚哥的英韦沃基公司 (InvivoGen))、脂多糖 TLR-4 配体 (澳大利亚的西格玛公司 (Sigma)) 和 CpG 寡脱氧核苷酸 TLR-9 配体 (荷兰 HBT 公司 (Hycult Biotechnology));或 T 细胞受体激动剂:植物血细胞凝集素 (澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellistis Limited)) 抗人 CD3 ϵ 抗体 (小鼠 IgG1 克隆 UCHT1; 圣地亚哥的 EB 公司 (eBioscience)) 和针对 T 细胞受体复合物的抗体;或按所述人 QFT 测

试（澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellistis Limited)）建议的多个不同尺寸的血液收集管中的盐水对照。不依赖 T 细胞受体的刺激物包括乙酸肉豆蔻佛波醇 (PMA)，刀豆球蛋白 A (ConA) 和商陆促分裂原 (pokeweed mitogen)。等分样品可以是小体积，例如 $1\ \mu\text{l}$ - $1000\ \mu\text{l}$ ，或大体积，例如 0.5ml-200ml。

[0215] 在一些实验中，在孵育开始之前向所述血液添加不同浓度的葡萄糖。

[0216] 使经刺激的血液样品孵育 1 ~ 48 小时，包括在抗原和限制量的 TLR 激动剂存在下于 37°C 孵育 16 ~ 24 小时，这之后从上述固定血液细胞获取血清。然后，使用所述 QFT ELISA（澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellestis Limited)）按照生产商的指示对各血浆样品中存在的 IFN- γ 定量。或者，使用更敏感的 QFT-TB 金 ELISA（澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellestis Limited)）按照生产商的指示对样品 IFN- γ 定量。

[0217] 每个 ELISA 平板上 IFN- γ 标准的 ELISA 光密度值用于构建标准曲线，其中将每个检测血浆样品中的 IFN- γ 量转化成 IU/mL 值。

[0218] 在一个实施方式中，使 1mL 所述血样等分与不同浓度的 R848 (GL 合成公司 (GL Synthesis Inc.)) 在 QFT-Nil 管（澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellestis Ltd)）中孵育，对所述 QFT-Nil 管补给或掺入附有 EB (Epstein-Barr) 病毒 (EBV) EBNA1 蛋白 (JPT 肽技术公司 (JPT Peptide Technologies)) 的肽组或在 CMV 管 (QFT-CMV, 澳大利亚的塞尔雷斯蒂斯有限公司 (Cellesits Ltd)）中的肽组。

[0219] 实施例 2

[0220] QFT-Nil 管中对 R848 的背景应答

[0221] 向 QFT-Nil 管内的 1mL 全血添加不同浓度的 R848。使血液在 37°C 孵育 16 ~ 24 小时，然后将所述管离心，并通过 ELISA 测定血浆的 IFN γ 浓度 (IU/ml)。图 1 和表 3 显示对不同浓度的 R848 的背景应答，针对各浓度采用平均和 SEM 值作图。

[0222] 表 3

[0223] R848 浓度

[0224]

	0.01 μ g/ml	0.02 μ g/ml	0.025 μ g/ml	0.03 μ g/ml	0.04 μ g/ml	0.05 μ g/ml	0.1 μ g/ml
值的数量	31	16	5	16	16	44	15
平均值	-0.009677	0.0100	0.0330	0.0925	0.5144	1.084	21.58
标准偏差	0.03060	0.05680	0.04894	0.2248	1.275	1.908	37.57
标准误差	0.005497	0.01420	0.02189	0.05621	0.3188	0.2877	9.701

[0225] 该实施例显示, 低于 0.05 μ g/ml R848, QFT-Ni1 管中对 R848 的背景应答不显著。当向 QFT-Ni1 管添加 0.1 μ g/ml R848 时, 在许多供者中显示显著背景应答。

[0226] 实施例 3

[0227] 向 QFT 管添加 R848 后对抗原的加强应答

[0228] 向含有 0.5 μ g/ml EBV EBNA1 肽混物 (pepMix) 的 QFT-Ni1 管或 QFT-CMV 管中的 1mL 全血添加不同浓度的 R848。使血液在 37°C 孵育 16 ~ 24 小时,然后将所述管离心,并通过 ELISA 测定血浆的 IFN γ 浓度 (以 IU/ml 显示)。图 2 和表 4 (EBV+R848) 和图 3 (CMV+R848) 和表 5 分别显示各供者的值,就各供者而言,以对抗原 +R848 的组合的应答计,减去对同一 R848 浓度的背景应答。因此,这些图描述添加 R848 之后显示的抗原应答的加强。标出各供者的数据点以及各浓度数据集的平均值和平均值的标准误差。

[0229] 表 4

[0230] EBV+R848

[0231]

	EBV	EBV+0.01 g/ml R848	EBV+0.05 g/ml R848	EBV+0.1 g/ml R848
值的数量	15	7	15	15
平均值	1.080	2.857	18.32	29.57
标准偏差	1.132	3.621	31.05	37.03
标准误差	0.2923	1.369	8.017	9.562

[0232] 表 5

[0233] CMV+R848

	CMV	CMV+0.05 g/ml R848	CMV+0.1 g/ml R848
值的数量	11	11	8
平均值	9.496	15.96	79.53
标准偏差	18.34	29.91	92.84
标准误差	5.530	9.018	32.82

[0235] 这些试验显示,对 EBV EBNA1 肽池和 QFT-CMV 肽的应答在 R848 存在下都有所加强。就 EBV 应答而言,当添加 0.05 μ g/ml R848 时有显著加强。在 QFT-CMV 管中,添加 0.05 μ g/ml R848 时的应答加强不如 EBV 显示的幅度大。然而,添加 0.1 μ g/ml R848 时的加强幅度大很多。

[0236] 总之,对所述抗原 +R848 结合刺激的应答大于分别单独对抗原和 R848 显示的应答之和。

[0237] 实施例 4

[0238] 使用 R848 增加 TB 疑似患者和 TB 患者内 QFT-TB 应答的临床研究

[0239] 将 R848 作为刺激物在 QFT-TB 管中测试,作为临床研究的一部分。招募患有活性 TB 疾病的患者 (通过培养确认)、疑似患有 TB 的患者及其接触家属 (HHC) 来进行该研究。除在管中进行所述标准 QFT-TB 金以外,还通过添加两个不同浓度的 R848 (0.05 μ g/ml 和

0.01 μ g/ml) 实行两个额外的测试,两者在 QFT-Ni1 管中单独添加并在现 QFT-TB 管中联合添加。

[0240] 患者数据示于表 6。

[0241] 表 6

[0242] 患者信息

[0243]

对象	数量
确认 TB	14
疑似 TB	8
HHC	11
QFN 阳性	30
QFN 阴性	3
总计	33
总升高	26*

[0244] (*6 名患者不具有完整数据集并从该分析排除)

[0245] 添加 0.05 μ g/ml 和 0.1 μ g/ml 的 R848 显著增强对象内 QFT-TB 应答证明单独对 QFT-TB 测试的阳性应答(分别为 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$) [图 4]。

[0246] 所述患者中用现有 QFT-TB 管测试为阴性的两人在向所述管添加 R848(以两种测试浓度)时变为阳性。这两位患者都是 TB 疑似患者。

[0247] 本领域技术人员应理解所述主题内容的方面。应理解本公开内容涵盖所有这些变化和修改。本公开内容还包括说明书中单独或共同提到或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征中任意两种或更多种的任意和全部组合。

[0248] 文献目录

[0249] Biggs 等 (1999) Cytometry 36:36-45

[0250] Daneshvar 等. (1999) J. Immunol. Methods 226 (1-2):119-128

[0251] Durig 等. (1993) J. Raman Spectrosc. 24 (5):281-285

[0252] Eriksson 等. (1993) Biophys. J. 2:64

[0253] Fu 等. (1999) Nature Biotechnology 17:1109-1111

[0254] Hemmi 等. (2002) Nature Immunology 3:196-200

[0255] Lakowicz 等. (1997) Biophys. J. 72:567

[0256] Lewis 等. (1999) Dyes Pigm. 42 (2):197

[0257] Malemed 等. (1990) "Flow cytometry and sorting" (《流式细胞术和分选》), 第二版, 纽约威利斯 (Wiley-Liss)

[0258] Nowroozalizadeh 等. (2009) Cytokine 46:325-31

- [0259] Peel 等 . (1985) J Med Chem 28:298-302
- [0260] Petkovic-Duran 等 . (2009) Biotechniques 47:827-834
- [0261] Rahman 等 . (1998) J. Org. Chem. 63:6196
- [0262] Rapaport 等 . (1999) Appl. Phys. Lett. 74(3):329-331
- [0263] Tawa 等 , Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV (“有机固态材料 IV 的电、光和磁性质”)], 885-890
- [0264] Youvan 等 . (1997) Biotechnology et alia 3:1-18

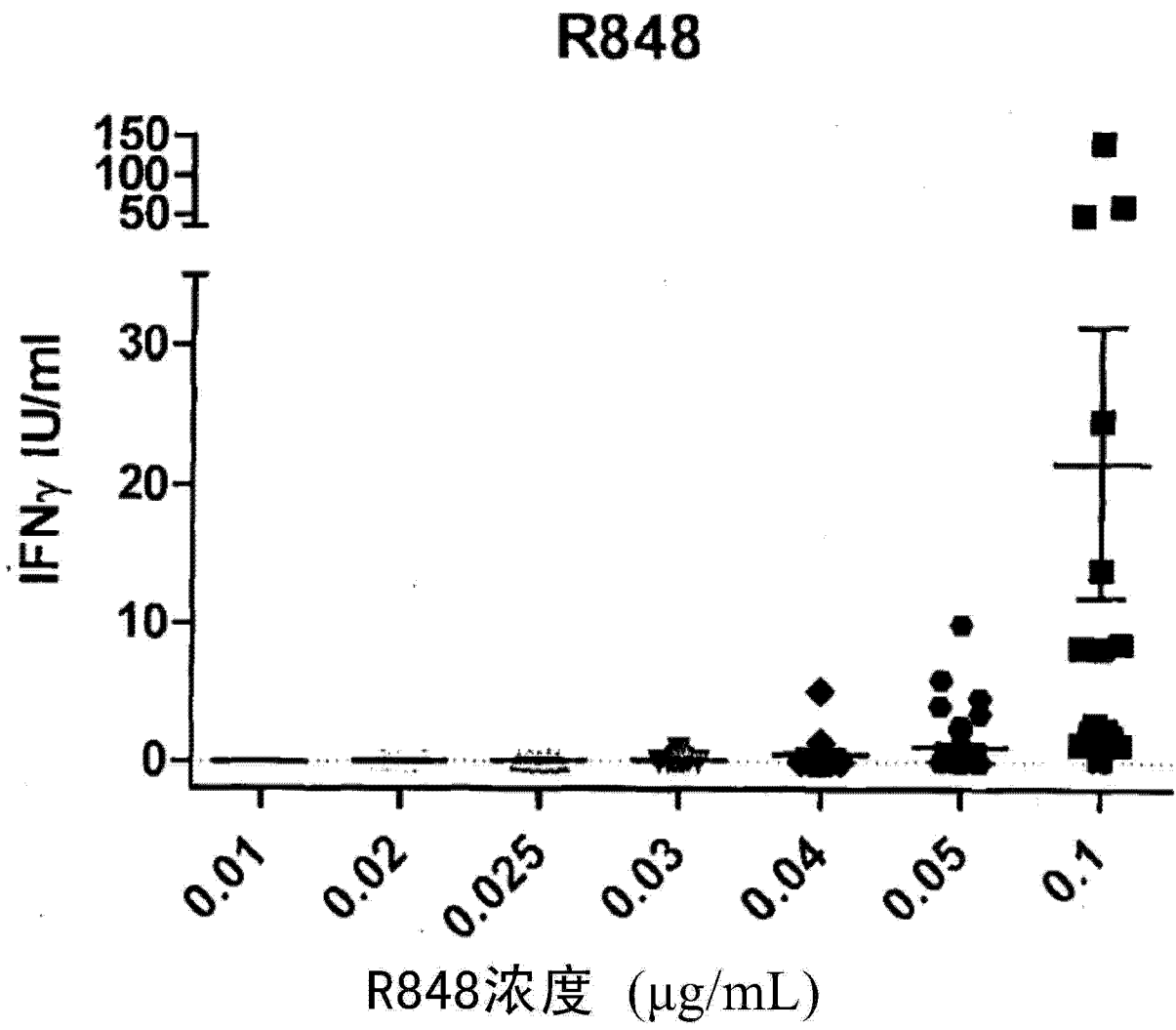


图 1

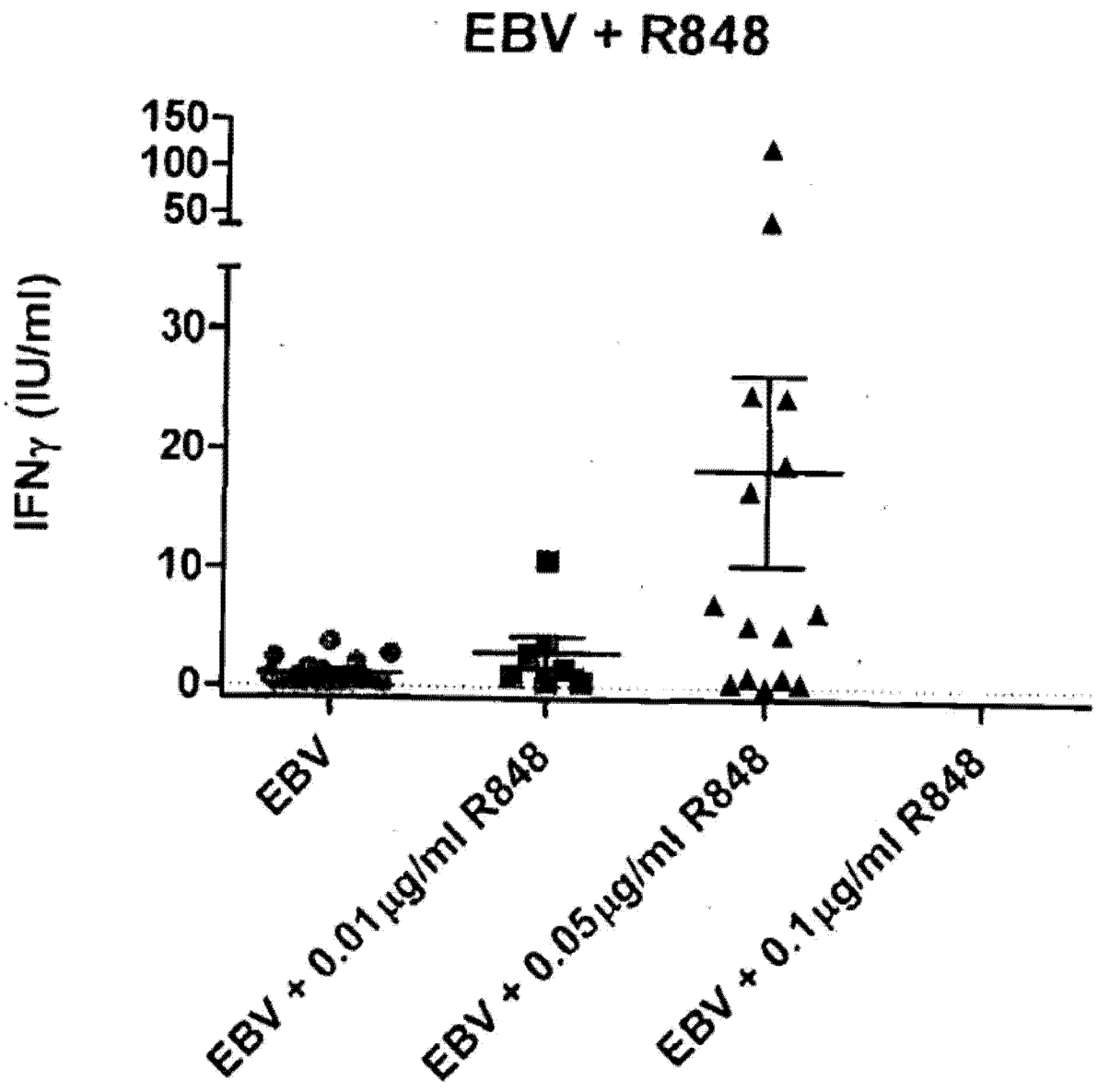


图 2

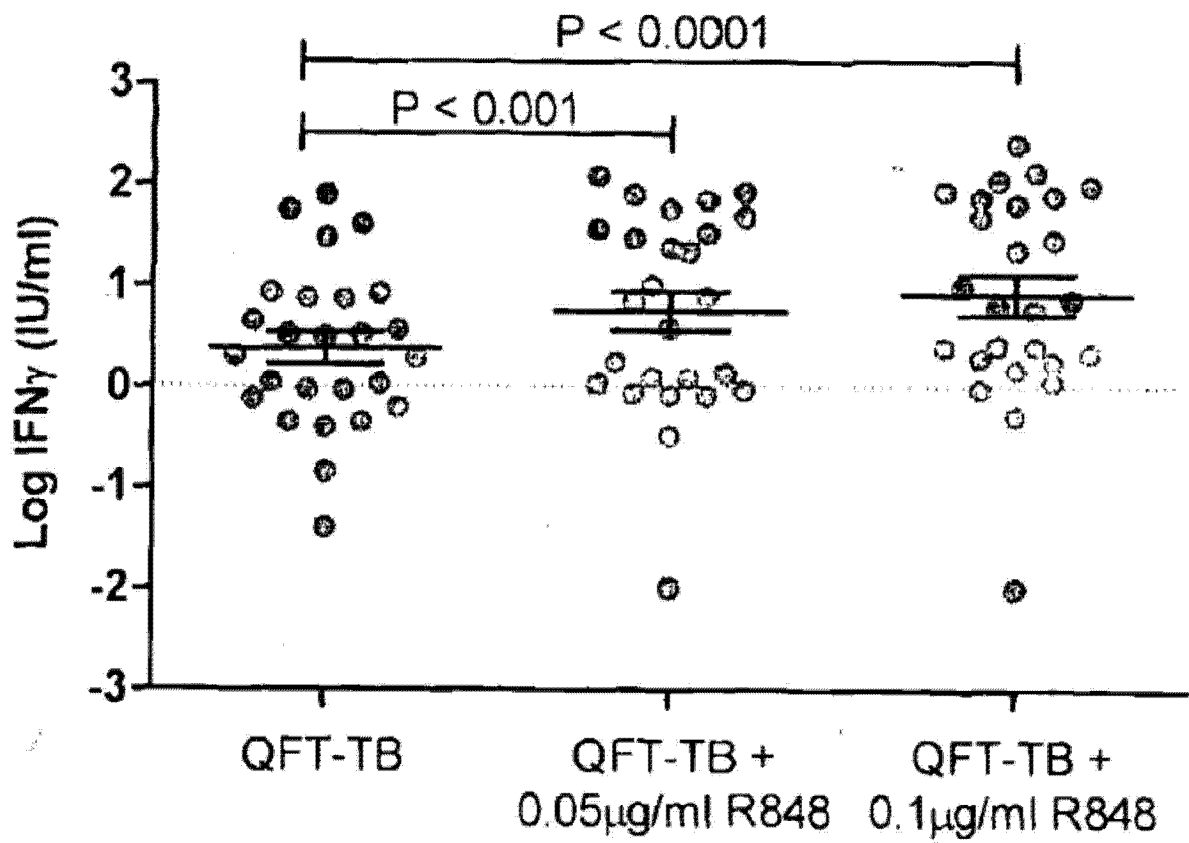


图 4

专利名称(译)	细胞介导的免疫应答力试验		
公开(公告)号	CN103620051A	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	CN201280030886.3	申请日	2012-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	塞尔雷斯蒂斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	塞尔雷斯蒂斯有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	塞尔雷斯蒂斯有限公司		
[标]发明人	J伯勒 E曼科特罗		
发明人	J·伯勒 E·曼科特罗		
IPC分类号	C12Q1/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2800/24 G01N33/5047		
代理人(译)	杨昀		
优先权	61/480913 2011-04-29 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开内容一般涉及基于免疫学的诊断试验领域，包括检测细胞介导的免疫应答力的试验。本公开内容指导基于对象的细胞介导的免疫应答力来测定病症的阶段、发展和/或严重性。本文预期的试验能够整合到标准病理学架构中以提供诊断报告系统并方便医疗点临床管理。

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
反应和偶联探针		
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	375; 400	423
萤黄	425	528
NBD	466	539
R-藻红蛋白(PE)	480; 565	578
PE-Cy5偶联物	480; 565; 650	670
PE-Cy7偶联物	480; 565; 743	767
APC-Cy7偶联物	650; 755	767
红色613	480; 565	613
荧光素	495	519
FluorX	494	520
氟硼二吡咯(BODIPY)-FL	503	512
TRITC	547	574
X-若丹明	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沸石350	346	445
Alexa沸石430	430	545
Alexa沸石488	494	517
Alexa沸石532	530	555
Alexa沸石546	556	573