



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051537 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201380065249. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 20

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/50(2006. 01)

13167355. 0 2013. 05. 10 EP

C12Q 1/68(2006. 01)

61/746, 965 2012. 12. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2013/001509 2013. 12. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/100853 EN 2014. 07. 03

(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 A·奈茨 C·穆尼安

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 余颖 陶家蓉

权利要求书3页 说明书27页 附图2页

(54) 发明名称

细胞介导的免疫应答试验

(57) 摘要

本公开内容一般涉及基于免疫学的诊断试验领域,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。本发明教导了基于细胞介导的免疫应答诊断对象对抗原的暴露,其具有增强的灵敏度,且通过在样品与抗原孵育期间添加非还原糖来实现。

1. 一种测量细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括:
 - (a) 通过使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖来提供孵育组合物,所述免疫细胞能够在由抗原进行刺激后产生免疫效应分子;以及
 - (b) 检测是否存在至少一种免疫效应分子或其水平。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述非还原糖是非还原二糖,优选选自海藻糖和蔗糖。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述孵育组合物中所述非还原糖的浓度是至少 1.5mg/ml,优选至少 2mg/ml。
4. 如权利要求 1-3 中一项或多项所述的方法,在步骤 (a) 中,所述样品接触包含所述抗原和所述非还原糖的组合物,且优选地,所述组合物包含在样品收集容器中。
5. 如权利要求 4 所述的方法,所述组合物还包含抗凝血剂,优选肝素,且所述样品是全血样品
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法,所述样品具有一种或多种以下特性:
 - i) 所述样品获自人对象;
 - ii) 所述样品获自免疫抑制或免疫缺陷的人对象;
 - iii) 所述样品包含免疫细胞,所述免疫细胞选自 NK 细胞、T 细胞、B 细胞、树突细胞、巨噬细胞和单核细胞;和 / 或
 - iv) 所述样品是全血。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法,所述抗原具有一种或多种以下特性:
 - i) 一种或多种肽被用作抗原,所述一种或多种肽的长度选自 5-100 个氨基酸或 7-50 个氨基酸;
 - ii) 所述抗原由一种或多种合成肽提供;
 - iii) 所述抗原由至少两组肽提供,第一组包含至少一种长度为约 7-14 个氨基酸残基的肽且第二组包含至少一种长度为 15 个氨基酸残基或更长的肽,所述肽包括全部或部分蛋白抗原;
 - iv) 所述抗原由被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的一种或多种肽提供;和 / 或
 - v) 所述抗原由被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的一种或多种肽提供且所述一种或多种肽的长度为小于 15 个氨基酸,优选长度选自 7-14 个氨基酸。
8. 如权利要求 1-7 中一项或多项所述的方法,其中,在步骤 (a) 中使用了两种或多种不同的抗原和 / 或在步骤 (b) 中检测了两种或多种不同的效应分子。
9. 如权利要求 1-8 中一项或多项所述的方法,所述抗原是疾病特异性抗原,特别是病原体特异性抗原。
10. 如权利要求 1-9 中一项或多项所述的方法,所述抗原具有一种或多种以下特性:
 - i) 所述抗原与疾病或病症相关或代表疾病或病症,其中针对所述疾病或病症测试细胞介导的免疫应答;
 - ii) 所述抗原来源于来自疾病病症相关病原体的抗原或与其具有交叉反应性,或者是与癌症相关的肿瘤相关抗原;
 - iii) 所述抗原是病原体特异性抗原且所述病原体是细菌、病毒、寄生虫、酵母或真菌;
 - iv) 所述抗原是病原体特异性抗原,即细菌特异性抗原,且所述细菌选自革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物,特别是分枝杆菌属如结核分枝杆菌,葡萄球菌属,链球菌属,大肠杆菌,

沙门氏菌属,梭状芽孢杆菌属,志贺菌属,变形杆菌属,芽孢杆菌属,嗜血杆菌属和伯疏氏螺旋体属;

v) 所述抗原是病原体特异性抗原,即病毒特异性抗原,且所述病毒选自肝炎病毒如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒、疱疹病毒、CMV 病毒和人免疫缺陷病毒 (HIV);和 / 或

vi) 所述抗原来自或特异性针对病毒,优选巨细胞病毒 (CMV),且由一种或多种肽提供,所述肽的长度为 7-14 个氨基酸残基、7-13 个氨基酸残基或 8-12 个氨基酸残基。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法,其用于监测或测定是否存在疾病或病症或其水平或阶段,所述疾病或病症选自致病物感染、自身免疫疾病、癌症、炎性病症、暴露于毒性试剂、对治疗剂应答、免疫缺陷和免疫抑制。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的方法,所述方法包括:

(a) 通过使获自人对象的全血样品接触包含至少一种肽抗原和至少一种优选海藻糖或蔗糖的非还原二糖的组合物来提供孵育组合物,并将所述孵育组合物孵育至少 2 小时;以及

(b) 测量是否存在因所述抗原刺激而释放的 IFN- γ 或其水平;

其中,存在经检测的 IFN- γ 或其量表示所述人对象中细胞介导的免疫应答的水平。

13. 如权利要求 1-12 中一项或多项所述的方法,所述非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖,且优选地,所述非还原糖是海藻糖。

14. 一种用于诱导细胞介导的免疫应答的组合物,所述组合物包含:

a) 至少一种抗原,所述抗原是疾病特异性抗原;

b) 至少一种非还原糖;以及

c) 可选的至少一种抗凝血剂。

15. 如权利要求 14 所述的组合物,所述组合物具有一种或多种以下特性:

i) 所述非还原糖是非还原二糖,优选选自海藻糖和蔗糖;

ii) 所述非还原糖不用作抗原的稳定剂;

iii) 所述非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖;

iv) 所述非还原糖是海藻糖;

v) 所述抗原具有权利要求 7-10 中一项或多项所定义的一种或多种特性;

vi) 所述抗原由一种或多种肽提供,优选合成肽,其长度小于 15 个氨基酸、优选长度选自 7-14 个氨基酸;

vii) 所述抗凝血剂是肝素;和 / 或

viii) 所述组合物是喷雾干燥的组合物。

16. 一种样品收集容器,其包含权利要求 14 或 15 所述的组合物。

17. 一种试剂盒,所述试剂盒用于测量对象中细胞介导的免疫应答活性,包含至少一种抗原、至少一种非还原糖、至少一种样品收集容器和至少一种针对至少一种免疫效应分子的检测手段。

18. 如权利要求 17 所述的试剂盒,所述样品收集容器具有权利要求 16 所述的样品收集容器的特性。

19. 非还原糖在测量细胞介导的应答活性的免疫试验中的应用,其中,所述样品与所述抗原孵育期间添加所述非还原糖增加了对所述试验中测试的所述抗原产生应答的免疫细

胞释放的免疫效应分子,且优选地,所述非还原糖具有一种或多种以下特性:

- i) 所述非还原糖是二糖;
- ii) 所述非还原糖选自海藻糖和蔗糖;
- iii) 所述非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖;
- iv) 所述非还原糖是海藻糖;
- v) 所述非还原糖以至少 1mg/ml、优选 2mg/ml 的浓度用于包含待测试样品和所述抗原的所述孵育组合物中;和 / 或
- vi) 所述非还原糖以组合物的形式提供,所述组合物还包含待测试抗原和可选的抗凝血剂。

细胞介导的免疫应答试验

技术领域

[0001] 本发明一般涉及基于免疫学的试验领域,并描述了用于测量细胞介导的免疫应答力的方法。本发明教导了用于测定细胞介导的免疫应答活性的方法、组合物和试剂盒,其具有增强的灵敏性和改善的储存稳定性。

[0002] 发明背景

[0003] 基于免疫学的诊断试验在医疗领域具有广泛应用。具体而言,其是辅助检测和监测多种疾病病症的重要工具。这些试验类型的效果部分在于免疫系统内组分(如T淋巴细胞)的特异性。尽管有这样的特异性,但对于在具有活性或潜伏感染疾病状态的对象或表现出免疫缺陷或任何形式的免疫抑制的对象中检测感染、检测是否存在低级感染(持续低水平感染)而言,基于免疫学的诊断不总是足够灵敏的。细胞介导的免疫应答试验的所需性能特征,尤其是对于检测抗原特异性T细胞应答而言,包括合适的灵敏性、特异性、可靠性和再现性,此外还应简单和快速地进行操作。

[0004] 一种已建立的基于免疫学的诊断试验形式涉及使用抗原刺激T细胞或免疫系统的其他细胞,随后检测应答抗原刺激而生成的免疫效应分子(如IFN- γ 或其他细胞因子)。使用熟知的技术检测免疫效应分子,如酶免疫试验、多元珠分析、ELISA、ELISpot和流式细胞术。还可基于RNA水平测定免疫效应分子是否存在或其水平的升高。这类试验可例如用于检测疾病特异性免疫应答,特别是病原体特异性免疫应答。各试验在商标QuantiFERON(注册商标,塞尔雷斯蒂斯有限公司(Cellectis Limited))下市售可得且可例如用于诊断病原体感染或监测针对疾病的细胞介导的免疫。

[0005] 各细胞介导的免疫应答试验的其他应用包括分析或监测针对疫苗或免疫治疗(如癌症免疫治疗)的细胞免疫应答。

[0006] 非常需要具有增强的灵敏性的各试验。先前,通过将样品(如全血样品)与抗原在单糖(如右旋糖)存在的情况下进行孵育来改善用于测量细胞介导的免疫应答的方法(参见例如WO 2004/042396 A1)。已发现,单糖(如右旋糖和葡萄糖)增加由免疫细胞产生的IFN- γ 并由此改善试验的灵敏性。对于允许细胞利用该能量源并因此受益于在与抗原孵育期间添加糖而言,单糖(如右旋糖和葡萄糖)的使用被认为是必要的。在除抗原外向样品中直接添加单糖时,观察到INF- γ 水平的显著升高。然而,为简化方法的实施,优选提供即用型试剂组合物并避免手动操作步骤。因此,需要提供包含抗原和单糖的单个组合物。所述组合物可在样品收集管中提供,其中样品以正确浓度直接接触抗原和单糖,从而避免操作误差。然而在本文中发现,当包含抗原和单糖的各样品收集管在室温下或升高的温度下储存时,试验活性随时间减少。这发现于使用某些抗原时。因此,这些试剂盒组分的储藏期有限,且在一段储存时间后,该试验仅提供低灵敏度或者甚至试验活性完全丧失。因此,各试剂盒/试验材料(其中在一个组合物中方便地提供抗原与单糖)不是储存稳定的,且因此具有试验灵敏度随时间降低或甚至丧失的风险。当样品收集管内未包含单糖与抗原,但单糖单独地添加至样品以与抗原孵育时,未观察到上述现象。

[0007] 本发明的目的是克服现有技术方法的至少一个缺陷。具体而言,本发明的目的是

提供灵敏且可靠的方法来测量细胞介导的免疫应答以及储存稳定的试剂盒和试剂盒组分。

发明内容

[0008] 发明人发现,在样品与抗原孵育期间添加非还原糖出乎意料地增加了应答水平并因此提高了该方法的灵敏度,其类似于在孵育期间添加单糖(如右旋糖和葡萄糖)所见的现象。这是预料之外的,因为先前认为仅可以使用单糖并因此使用代表还原糖的单糖来实现灵敏度的升高。此外,还出乎意料地发现,该方法即使在延长的试验材料储存期间也可维持其增加的灵敏度,即使在以单一组合物的形式提供非还原糖和抗原时也是如此。因此,发明人出乎意料地发现,使用非还原糖代替单糖显著增加了试验组分的储存稳定性,同时提高了应答水平并因此可改善试验灵敏度。不受理论的束缚,认为非还原糖在阳性细胞介导的免疫应答的情况下增加了释放的免疫效应分子的量,从而改善试验灵敏度。显然,免疫效应分子产生得到增强。因此,如本文所述使用非还原糖还可比其它可能的方法更早地监测到免疫细胞刺激。提高细胞介导的免疫应答试验的灵敏度的能力还可促使使用较低灵敏度的效应分子监测方法和/或使用较小的样本量。此外,这些有益效果还可在延长的试验材料储存后获得,从而改善试验的可靠性和再现性。

[0009] 根据第一方面,提供了用于测量细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括

[0010] (a) 通过使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖来提供孵育组合物,所述免疫细胞能够在由抗原进行刺激后产生免疫效应分子,以及

[0011] (b) 检测是否存在免疫效应分子或其水平。

[0012] 可使用所述方法例如以测量对象(如患者)中细胞介导的免疫应答活性。存在(或不存在)检测到的免疫效应分子或其水平表示对象针对测试的抗原产生细胞介导的免疫应答的水平或能力。

[0013] 根据第二方面,提供了用于诱导细胞介导的免疫应答的组合物,所述组合物包含

[0014] a) 至少一种抗原;

[0015] b) 至少一种非还原糖;以及

[0016] c) 可选的至少一种抗凝血剂。

[0017] 组合物可各自方便地用于本发明的第一方面所述的方法中以通过使包含免疫细胞的样品接触所述组合物来制备孵育组合物。

[0018] 根据第三方面,提供了一种样品收集容器,其包含本发明的第二方面所述的组合物。该样品收集容器可方便地用于本发明的第一方面所述的方法中。优选地,该样品收集容器是真空的血液收集管。

[0019] 根据第四方面,提供了用于测量对象中细胞介导的免疫应答活性的试剂盒,其包含至少一种抗原、至少一种非还原糖、至少一个样品收集容器(其优选是血液收集管)和至少一种针对至少一种免疫效应分子的检测手段。试剂盒可各自用于进行本发明的第一方面所述的方法。

[0020] 根据第五方面,本发明涉及非还原糖在用于测量细胞介导的应答活性的免疫试验中的应用,其中,非还原糖的添加增加了免疫细胞中至少一种免疫效应分子(优选 IFN- γ)的释放,所述免疫细胞对所述试验中测试的抗原产生应答。

[0021] 根据下述说明和所附权利要求,本发明的其它目的、特征、优点和方面对本领域技

术人员而言是显而易见的。然而,应理解,尽管下述说明、所附权利要求和特定实施例表示所述应用的优选实施方式,其也仅以说明方式给出。通过阅读下文,落在所述公开的发明的精神和范围内的不同变化和修改对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0022] 附图简要说明

[0023] 图 1 :QFN-CMV 试验中添加海藻糖对于 IFN- γ 应答的影响。

[0024] (**p<0.01 ;***p<0.001)

[0025] 图 2 :QFN-TB 试验中添加海藻糖对于 IFN- γ 应答的影响。

[0026] 图 3 :四种不同非还原糖增加定量 QFN CMV 结果。

[0027] 发明详述

[0028] 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。

[0029] 本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,和两个或更多 T 细胞;提及“抗原”包括单一抗原,和两种或更多抗原。同样,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。提及“公开”包括由本公开文件教导的单个或多个方面;等。本文教导的各方面由术语“发明”包括。本发明的所有方面都在本权利要求允许范围内。

[0030] 根据第一方面,提供了用于测量细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括

[0031] (a) 通过使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖来提供孵育组合物,所述免疫细胞能够在由抗原进行刺激后产生免疫效应分子,以及

[0032] (b) 检测是否存在免疫效应分子或其水平。

[0033] 本文描述了所述方法的有利实施方式和应用。根据第一方面的一个实施方式,提供了用于测量对象中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括

[0034] (a) 通过使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖来提供孵育组合物,所述免疫细胞能够在由获自对象的抗原进行刺激后产生免疫效应分子,以及

[0035] (b) 检测是否存在免疫效应分子或其水平的升高。

[0036] 存在(或不存在)免疫效应分子或其水平的升高表示该对象的细胞介导的免疫应答水平或能力。具体而言,所述方法允许测定所述对象之前是否接触过抗原或者测试的抗原所代表的抗原。由此,可以测定该对象是否能够引发针对所述抗原的细胞介导的免疫应答。在某些实施方式中,还可测定细胞介导的免疫应答的定量水平。在某些实施方式中,本文公开的试验中检测的细胞介导的免疫应答的量级可能与疾病状态、进展和/或严重性相关。因此,本发明提供了测定对象中细胞介导的免疫应答的方法。所述方法能够进行和/或支持(但不限于)疾病诊断,特别是感染性疾病、病理状况,允许测定免疫活性水平并允许评价对内源或异源试剂以及蛋白毒剂的免疫细胞应答。该试验还能筛选或监测先前暴露于特定抗原(例如与疾病、感染或污染物相关联的抗原)的对象。下文将描述所述方法的其他重要应用和用途。

[0037] 现在将详细解释本发明的第一方面所述方法的单个方法步骤和优选实施方式。

[0038] 步骤 (a)

[0039] 在步骤 (a) 中,使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖,所述免疫细胞能够在由抗原进行刺激后产生免疫效应分子。该免疫细胞和 / 或整个样品可获自例如其细胞介导的免疫应答待测定的对象。

[0040] 提及“对象”,包括例如人类或非人物种,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。本文公开的方法在研究、人类医学以及畜牧、兽医和野生应用中具有实用性。优选地,该对象是人且本文所述的细胞介导的免疫应答方法用于筛选对致病微生物、病毒和寄生虫的应答力、疾病病症、疾病发展潜力,或者监控自身免疫情况、监控对象对肿瘤攻击或免疫治疗的应答、监控针对疾病的细胞介导的免疫应答和用于测定是否存在任何免疫缺陷或免疫抑制。后者可由例如包括各种化疗试剂的某些药物引起。或者,可以使用本发明所述方法测定对环境蛋白毒剂和污染物的暴露。

[0041] 该样品包含能够在使用适当抗原刺激后产生免疫效应分子的免疫细胞。“免疫细胞”包括但不限于淋巴细胞(包括自然杀伤(NK)细胞、T细胞、B细胞、巨噬细胞和单核细胞)、树突细胞或者能够在对直接或间接抗原刺激的应答中产生一种或多种免疫效应分子的任何其他免疫细胞。优选地,该样品包含淋巴细胞,更优选地包含T淋巴细胞。术语“T细胞”和“T淋巴细胞”在本文中可互换使用。T细胞能够引发强免疫应答,前提是其识别提供的抗原。如果T细胞之前已接触测试的抗原或测试的抗原所代表的抗原,则出现具有该抗原特定记忆的T细胞的迅速再刺激。这些抗原特异性T细胞通过分泌免疫效应分子(例如,特别是干扰素 γ)来进行应答。随后,可以针对测试的抗原的免疫应答的特异性标记物的形式测量干扰素 γ 或针对释放的干扰素 γ 产生应答而释放的免疫效应分子。因此,根据一个实施方式,该样品包含T淋巴细胞,优选CD4⁺辅助T细胞和/或CD8⁺细胞毒性T细胞。优选地,该样品还包含相应刺激器细胞,特别是能够将测试的抗原呈递至T细胞的抗原呈递细胞。然而,还可单独地向孵育组合物中添加合适的抗原呈递细胞。分别添加的抗原呈递细胞(APC)包括天然以及人工的抗原呈递细胞或颗粒。例如,刺激器细胞(如经辐射的自体或HLA匹配的抗原呈递细胞)可任选地单独添加至孵育组合物中,所述孵育组合物随后将抗原呈递至T细胞。该实施方式是例如可行的,前提是样品不包含诱导T细胞应答所必需的各刺激器细胞。人工抗原呈递实施方式包括但不限于与重组MHC分子或肽和重组共刺激分子相关的颗粒或脂质囊泡。

[0042] 优选地,该样品可获自对象。根据一个实施方式,该样品是包含免疫细胞的体液或者是含有来源于各体液的部分的免疫细胞。根据优选的实施方式,该样品是全血。“全血”指基本未稀释或分级的来自对象的血液。根据一个实施方式,该全血样品是外周血。然而,对于测定细胞介导的免疫应答活性而言,全血是优选的和最方便的样品,也可使用其他含有免疫细胞的样品。示例包括但不限于淋巴液、脑脊液、组织液(如骨髓或胸腺液)和呼吸液(包括鼻液和肺液和支气管肺泡灌洗液)。上述样品的部分或衍生物(如消耗了非测量细胞介导的免疫应答所必需的细胞的样品)也可用作样品并可通过样品处理获得。例如,可通过本领域已知的方法处理全血以去除非CMI应答所必需的组分(如红细胞和/或血小板)或可处理全血以富集白细胞。还可通过本领域已知的方法获得暗黄层细胞或外周血单核细胞(PBMC)并可将其用作样品。根据一个实施方式,将培养的免疫细胞用作样品。此外,低温保存的细胞(如低温保存的PBMC细胞)也可用作对象的免疫细胞来源并因此用作

样品。例如,可使融化的 PBMC 细胞接触培养基以提供含有免疫细胞的样品,随后使其接触优选以单个组合物形式添加的抗原和非还原糖并与其孵育。根据一个实施方式,该样品包含介导细胞免疫应答所必需的所有免疫细胞。然而,如上文所述,单独添加刺激器细胞(特别是抗原呈递细胞)也包括在本发明的范围内。根据一个实施方式,该样品包含至少 T 细胞(T 淋巴细胞)和 NK 细胞(NK 淋巴细胞)。根据一个实施方式,在使样品接触抗原和/或非还原糖前,对样品的稀释不超过 50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或 3%。

[0043] 使待分析的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖以提供孵育组合物。

[0044] 本文所用术语“抗原”具体指能够刺激或再刺激免疫应答(且特别是能够刺激或再刺激细胞免疫应答)的任何分子或试剂。因此,可以在广义上使用术语“抗原”。该术语具体指可由主要组织相容性复合物(MHC)结合并可被呈递至 T 细胞受体或被抗体结合的任何分子或试剂。该术语还指可被非经典 MHC 蛋白(如 CD1d 或其他 CD1 家族成员)结合的任何分子或试剂。根据一个实施方式,该抗原是免疫原。根据一个实施方式,该抗原不是免疫原。抗原包括但不限于肽、蛋白、半抗原、变应原或毒素或任何天然产生或合成的分子或其部分。根据一个实施方式,该抗原是无活性病原体或其部分或裂解物。根据一个实施方式,该抗原选自肽、蛋白(包括糖蛋白)、碳水化合物、磷脂、磷蛋白、磷脂蛋白和前述物质的片段。除非上下文明确有不同的说明,本文所用术语“肽”还包括多肽和蛋白。术语“蛋白”还包括修饰的形式,如糖蛋白和磷蛋白。根据一个实施方式,该抗原包括一种或多种全长或部分长度的肽。根据一个实施方式,该抗原由肽提供。根据一个实施方式,用作抗原的一种或多种肽的长度选自 5-100 个氨基酸,优选 7-50 个氨基酸。根据一个实施方式,该抗原由来自一种或多种不同的全长或部分长度的肽组提供。肽组包含至少两种肽且在一个实施方式中包括一系列重叠或非重叠的肽。各肽组可覆盖天然产生的蛋白抗原的整个长度或一部分。然而,该肽不必是重叠的或者可通过单个氨基酸或多个氨基酸来重叠。根据一个实施方式,使用了一种肽组,其包括天然产生的肽或蛋白抗原的 80-100%。

[0045] 根据一个实施方式,该抗原由至少一种被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽提供。对于该实施方式,该抗原优选由至少一种长度小于 15 个氨基酸(优选 13 个氨基酸或更少、12 个氨基酸或更少、11 个氨基酸或更少或者 10 个氨基酸或更少)的肽提供。被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的各种肽的合适的大小范围包括 7-14 个氨基酸残基、7-13 个氨基酸残基、8-12 个氨基酸残基、8-11 个氨基酸残基和 8-10 个氨基酸残基。还可使用包含被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽或由其组成的肽组。所述肽可包括全部或部分蛋白抗原(如天然产生的蛋白抗原)。发现包含各短肽作为抗原的试验显示在单糖(如葡萄糖或右旋糖)存在的情况下储存期间试验活性的显著降低。使用非还原糖时未观察到该现象,如同本发明教导的那样。本文中,由于纳入了非还原糖,试验灵敏度维持增加,即使在延长的试验组分储存时间后也是如此。在使用包含被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽抗原和非还原糖(例如分别作为试剂盒化合物组分)的组合物时,这是重要的优势。

[0046] 根据一个实施方式,该抗原由至少两组肽提供,第一组包含至少一种长度为约 7-14 个氨基酸残基的肽且第二组包含至少一种长度为 15 个氨基酸残基或更长的肽,其包括全部或部分蛋白抗原。各组包含至少一种至一系列重叠或非重叠的肽。将来源于或对应于代表待测试疾病或病症的蛋白抗原的 7-14 个氨基酸肽和大于等于 15 个氨基酸肽与包含在样品内的免疫细胞共孵育产生较灵敏的试验,从而可比其它可能的方法更早地检测到

免疫细胞、特别是淋巴细胞刺激。提高细胞介导的免疫应答试验灵敏度的能力有利地降低检测限度和 / 或允许使用较不灵敏的方法来检测效应细胞。因此,将至少两组各种肽与非还原糖联用是有益的。不受理论或作用模式的限制,认为两组肽(7-14 聚体肽和大于等于 15 聚体肽)促使 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的检测。CD4⁺T 细胞识别大于 15 聚体肽且 CD8⁺T 细胞识别 7-14 聚体肽。这些肽在本文中称为“CD4⁺肽”(大于等于 15 聚体肽)或“CD8⁺肽”(7-14 聚体肽)。各组包含至少一种肽且在一个实施方式中包括一系列重叠的肽。因此,第一组可含有一系列长度为 7-14 个氨基酸残基的重叠的肽。这些肽被 CD8⁺T 细胞识别(CD8⁺肽)。第二组可含有一系列长度大于 15 个氨基酸残基的重叠的肽。这些肽被细胞毒性 CD4⁺T 细胞识别(CD4⁺肽)。两组肽都覆盖蛋白抗原的整个长度或一部分,例如代表待测试疾病或病症的天然产生的蛋白抗原。该肽不必是重叠的或者可通过单个氨基酸或多个氨基酸来重叠。该肽包括肽群(pods of peptides),其包括并因此覆盖蛋白抗原的 80-100%。“80-100%”指 80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%。提及根据一个实施方式包括全部或部分蛋白抗原的长度为约 7-14 个氨基酸残基的一系列重叠的肽时,指长度为约 7 个氨基酸残基至最多 14 个氨基酸残基的肽或其部分,所述肽从蛋白抗原的 N 末端至其 C 末端总共从蛋白抗原的各氨基酸残基跨越至最多 6 个氨基酸残基。因此,如果给定肽的长度为 x 个氨基酸残基,其中 x 为约 7-14,则两种连续肽之间重叠的长度为 x-1 至 x-6。在一个实施方式中,各连续肽的重叠为 x-1。长度大于等于 15 个氨基酸残基的一系列重叠的肽也跨越全部或部分蛋白抗原,其中各肽的长度为至少 15 个氨基酸残基或最多完整蛋白抗原的长度。在一个实施方式中,长度大于等于 15 个氨基酸残基的肽是约 15-50 个氨基酸,如 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 个氨基酸残基。

[0047] 本发明包括以下情况,即系列或肽组中的各肽是相同长度的(即 x)。然而,该肽系列或肽组可包含 x_1 、 x_2 、 x_j ... x_i 肽的混合物,其中根据一个实施方式各 x_i 肽的长度为约 7-14 个氨基酸残基或大于等于 15 个氨基酸残基。该 CD4⁺和 / 或 CD8⁺肽可分为单独的肽池。其可单独地添加至样品中或可包含在一个组合物内,优选连同非还原糖。随后可使该组合物接触样品以制备孵育组合物。

[0048] 在一些实施方式中,使用了一种或多种抗原,其模拟体内呈递至免疫系统的抗原的一种或多种作用。根据一个实施方式,该抗原选自自身抗原、来源于来自病原生物的抗原或与其具有交叉反应的抗原、金属或无机分子刺激的免疫应答或肿瘤相关抗原。根据一个实施方式,该抗原来源于来自与疾病病症相关的病原体的抗原并因此与其具有交叉反应,或者该抗原是与癌症相关的肿瘤相关抗原,或者该抗原是或来源于毒剂。根据一个实施方式,使用样品与特异性针对用于测试细胞介导的免疫应答的疾病或病症的抗原接触,例如与待评估疾病或病症相关或代表待评估疾病或病症的抗原。根据一个实施方式,该抗原是疾病特异性抗原,具体而言是病原体特异性抗原。在一些实施方式中,该病原体是细菌、病毒、寄生虫或真菌。在一个说明性实施方式中,该抗原是来自分枝杆菌(mycobacterium)的抗原,具体而言是来自结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的抗原。因此,在一些实施方式中,该抗原是结核(TB)特异性抗原。例如,该抗原可以是来自结核分枝杆菌或鸟分枝杆菌(M. avium)的纯化的蛋白衍生物。在一些实施方式中,该抗原刺激分枝杆菌蛋白,如 ESAT-6、CFP-10 和 TB7,分别地 TB7.7。在另一个说明性实施方式中,该抗原来自或特

异性针对病毒,如巨细胞病毒(CMV)。

[0049] 随后还描述了抗原、特别是疾病特异性抗原的其他示例。

[0050] 此外,样品在步骤 a) 中接触非还原糖。“非还原糖”具体指不与针对还原糖的检测试剂(如费林溶液(Fehling's solution)、本尼迪克特试剂(Benedict's reagent)或托伦试剂(Tollens' reagent))发生反应的糖。非还原糖不包含游离还原末端且因此不包含游离醛基或游离酮基。该非还原糖可具有任何长度并可以是直链或支链的。在某些实施方式中,该非还原糖包含至少两个单糖单元。根据一个实施方式,在非还原糖的任何和全部单糖单元中,与环结构中的氧原子相邻的碳原子不包含羟基且因此不包含异头羟基。根据一个实施方式,该非还原寡糖的单糖单元的环结构不包含半缩醛或半缩酮基团。根据一个实施方式,该非还原糖是寡糖,其包含10个单糖单元或更少、更有选8个单糖单元或更少、6个单糖单元或更少、5个单糖单元或更少、4个单糖单元或更少、3个单糖单元或更少或2个单糖单元。优选地,该非还原糖是二糖。根据一个实施方式,糖苷键形成于单糖单元之间,其连接一个单糖单元的还原末端与另一个单糖单元的还原末端。非还原糖的优选的示例是蔗糖和海藻糖。此外,如实施例所示,甘露醇和棉子糖也可用作非还原糖。因此,根据一个实施方式,该非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖。如实施例所示,这些示例性非还原糖提高了应答的量级。海藻糖是特别优选的,因为实验显示海藻糖提高应答的量级并因此提高试验灵敏度,此外包含海藻糖和抗原的组合物显示出出色的储存稳定性。如实施例所示,在测试的非还原糖中,使用海藻糖时应答提高作用最强。然而,该非还原糖还可以是单糖,其中,例如,还原末端与另一化学实体偶联并从而被其阻碍。因此,该非还原糖可以是衍生化的。糖衍生物的示例是氨基糖,其中一个或多个羟基被氨基或乙酰氨基取代。在优选的实施方式中,该非还原糖是未取代的且特别是未衍生化的。根据一个实施方式,该非还原糖不是多糖。在某些实施方式中,该非还原糖未结合至蛋白、肽或脂质或其他大分子。根据一个实施方式,该非还原糖未包含在细胞培养基或其他培养基中。根据一个实施方式,该非还原糖未包含在液体中。该非还原糖是可由样品中包含的免疫细胞代谢的。根据一个实施方式,当该非还原糖以适当浓度存在于包含样品和抗原的孵育组合物中时,其能够增加再刺激的T细胞所释放的干扰素 γ 。

[0051] 通过使样品接触抗原、非还原糖和可选的其他添加剂,提供了孵育组合物。优选地,所述孵育混合物在室温以上且因此在升高的温度下孵育。优选地,该孵育温度是高于30°C,优选高于35°C。合适的孵育温度范围包括30°C至40°C,优选35°C至40°C。便利地,将孵育组合物在37°C +/-1°C下孵育。优选地,将孵育组合物在这类升高的温度下孵育至少2小时以使抗原刺激免疫细胞并产生免疫效应分子。孵育步骤可以是2-50小时,例如2-40小时、5-30小时、8-24小时、16-24小时或以下数值之间的时间段: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。在一些实施方式中,在进行可选的初始混合步骤以将抗原、非还原糖和样品在整个孵育组合物中分布后,在不进一步混合的情况下进行孵育。

[0052] 在孵育组合物中,非还原糖以特定浓度存在,所述浓度使非还原糖有效地分别增强抗原对免疫系统的细胞的刺激和再刺激。因此,以特定浓度添加非还原糖,所述浓度使得在阳性样品(即对抗原具有免疫反应性的样品)中,与未添加非还原糖的情况相比,向孵育

组合物中添加非还原糖提高了产生的免疫效应分子（优选是干扰素 γ ）的水平。因此，以特定浓度添加非还原糖，所述浓度使得非还原糖增强了免疫效应分子应答量级，此时显示细胞介导的免疫应答的样品中产生了较多的免疫效应分子。优选地，以特定浓度使用非还原糖，所述浓度使得非还原糖将免疫效应分子应答增强了至少 1.1 倍，优选至少 1.2 倍，更优选至少 1.3 倍。根据一个实施方式，该非还原糖在延长的时间段内维持样品中包含的免疫细胞介导各应答的能力。根据一个实施方式，孵育组合物中非还原糖的浓度为至少 1mg/ml、至少 1.5mg/ml、优选至少 1.75mg/ml、更优选至少 2mg/ml。示例性范围包括但不限于 1mg/ml 至 20mg/ml、1.5mg/ml 至 17.5mg/ml、2mg/ml 至 15mg/ml、3mg/ml 至 15mg/ml、4mg/ml 至 12.5mg/ml 和 5mg/ml 至 10mg/ml。如实施例所示，这些范围例如适用于海藻糖。其也适用于其他非还原糖（如蔗糖、甘露醇和棉子糖），如实施例所示。根据一个实施方式，孵育组合物中非还原糖的浓度范围为 1.5mg/ml 至 10mg/ml，例如 1.75mg/ml 至 7.5mg/ml 或 2mg/ml 至 5mg/ml。还可由技术人员遵循本文所述教导来确定合适的浓度。

[0053] 一种或多种其他添加剂可以被添加并因此包含在孵育组合物中。例如，可以添加一种或多种对样品制备和 / 或样品保存必需或有利的添加剂，例如合适的抗凝血剂（如果样品是血液样品）。优选地，该抗凝血剂是肝素。添加剂不应以会干扰细胞介导的免疫应答的浓度包含。根据一个实施方式，除了非还原糖外，未向孵育组合物中添加其他单糖。根据一个实施方式，除了非还原糖外，未向孵育组合物中添加其他还原糖，特别是还原单糖。

[0054] 根据一个实施方式，使样品接触包含抗原和非还原糖的组合物。该实施方式是特别有利的，因为用户不必向孵育组合物中单独地添加非还原糖。提供这类即用型组合物避免了操作误差并节约了操作时间。任选地，将稀释剂或溶剂包含在含有抗原和非还原糖的组合物中。此外，所述组合物中可包含一种或多种添加剂，前提是其包含在孵育组合物中。该添加剂不应干扰细胞介导的应答。根据一个实施方式，该组合物还包含抗凝血剂，优选是肝素。根据一个实施方式，该组合物不包含单糖。根据一个实施方式，该组合物不包含还原糖，具体而言其不包含还原单糖。

[0055] 为制备孵育组合物，使包含抗原、非还原糖和任选地包含一种或多种其他添加剂（如在血液样品的情况下包含抗凝血剂）的组合物接触样品。可向组合物中添加样品，反之亦然。为制备孵育组合物，优选地混合样品、抗原、非还原糖和其他添加剂（如果存在）。

[0056] 合适的组合物形式的示例包括液体组合物、半液体组合物、凝胶状组合物和固体组合物，特别是干燥的组合物。根据一个实施方式，将包含抗原、非还原糖和可选的其他添加剂的组合物包含在样品收集容器内，优选样品收集管，如血液收集管。这是特别便利地，因为样品在收集后直接接触组合物。根据一个实施方式，将包含抗原、非还原糖和可选的其他添加剂的组合物喷雾干燥至样品收集容器的内侧。喷雾干燥方法是现有技术中熟知的，因此在本文中不需要任何详细描述。

[0057] 根据一个实施方式，该样品获自对象且在接触非还原糖和 / 或抗原前未被例如组织培养物、介质、赋形剂或其他液体试剂稀释。根据一个实施方式，该孵育组合物包含至少 10 体积% 样品。术语“至少 10 体积%”包括样品体积为总孵育组合物体积的 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 体积%。

[0058] 如实施例所示,在步骤 a) 中添加非还原糖出乎意料地增加了免疫效应分子的释放,例如特别是干扰素 γ ,从而提高了试验的灵敏度。该效果是非常令人惊讶的,因为迄今为止人们认为只可以通过单糖和因此通过还原单糖来达到该效果。此外,发现包含抗原和非还原糖的组合物即使在升高的温度下也显示改善的储存稳定性。使用还原糖所观察到的试验灵敏度和质量随时间减弱的效果在使用非还原糖时未观察到。因此,本发明通过提供灵敏的和储存稳定的试验对现有技术做出重要贡献,所述试验还在延长的储存期间内维持试验性能。本发明的教导便利地允许以储存稳定的组合物的形式提供抗原和非还原糖。在本发明中,该非还原糖不用作抗原的稳定剂。通过实验显示,抗原(特别是肽抗原)是非常储存稳定的。因此,如果在不存在糖的情况下储存抗体,不会观察到试验性能的下降。因此,该非还原糖用于增强试验灵敏度,特别是通过增强免疫效应分子(特别是细胞因子,如干扰素 γ)的产生和/或释放。

[0059] 步骤 (b)

[0060] 在步骤 (b) 中,检测是否存在免疫效应分子或其水平的升高。如上文所述,存在(包括不存在)免疫效应分子或其水平指示对象中针对测试的抗原的细胞介导的免疫应答的水平或能力。具体而言,所述方法允许确定所述对象先前是否接触过测试的抗原或者显示与测试的抗原(如待检测的病原体)具有交叉反应性的抗原。从而,可以确定对象是否能够引发分别针对所述抗原、测试的抗原所代表的抗原、病原体或疾病的细胞介导的免疫应答。

[0061] 免疫效应分子的检测可发生在肽或蛋白水平或者核酸水平,特别是免疫效应分子 mRNA 表达水平。因此,检测免疫效应分子“是否存在或其水平”包括直接和间接数据。例如,可使用适当检测方法(如 ELISA 或 ELISpot)直接测定免疫效应分子是否存在或其含量。然而,在一个实施方式中,基于 RNA 表达水平测量免疫效应分子是否存在或其水平。高水平的免疫效应分子 mRNA 是显示免疫效应分子水平升高的间接数据。用于测定目标基因 mRNA 表达水平的合适方法是现有技术中熟知的,因此无需任何详述。因此,在一些实施方式中,可使用配体或结合分子(如特异性针对效应分子的抗体)或通过测量编码免疫效应分子的基因的表达水平来检测免疫效应分子。

[0062] 待检测的免疫效应分子可以是应答细胞活化、抗原刺激或再刺激所产生的某一范围分子的任何一种。同样,可在步骤 (b) 中检测样品与测试的抗原接触后释放的一种以上免疫效应分子或免疫效应分子的模式。待测量的免疫效应分子可以由免疫细胞生产,特别是可以由淋巴细胞生产,所述淋巴细胞是例如 T 细胞,特别是 $CD4^+$ 辅助 T 细胞和/或 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞。因此,在一些实施方式中,该方法基于测量免疫系统的细胞(特别是 T 细胞)对抗原刺激应答而产生的一种或多种免疫效应分子。然而,非免疫细胞也会分别应答抗原对免疫细胞的刺激和再刺激而释放免疫效应分子,由于其受免疫细胞释放的免疫效应分子的刺激,特别是受再刺激的 T 细胞释放的免疫效应分子(如 $IFN-\gamma$)的刺激。这些免疫效应分子也可以是重要的信息源。因此,根据一个实施方式,待检测的免疫效应分子可以由效应 T 细胞应答抗原再刺激而产生的直接效应分子。在其他实施方式中,测量了下游免疫效应分子。例如,可在步骤 (b) 中测量由测试的抗原(再)刺激的免疫细胞(特别是 T 细胞)所生产的 $IFN-\gamma$ 或其他直接免疫效应分子。然而,如上文所述,这些分子通常诱导

或增强其他细胞产生其他免疫效应分子。也可在步骤 (b) 中测量这些其他 (下游) 免疫效应分子的产生。本发明还包括在步骤 (b) 中检测超过一种类型的免疫效应分子。根据一个实施方式,在步骤 (b) 中单独或与直接免疫效应分子 (如 IFN- γ) 一起检测免疫效应分子模式是否存在或其水平。各模式包括超过两种、优选超过三种不同的免疫效应分子。分析各模式可提供对象免疫状态的有价值信息。例如,特定的免疫效应分子或免疫效应分子的模式可以是特定疾病的特征。

[0063] 根据一个实施方式,步骤 (b) 中待测量的免疫效应分子是细胞因子,如淋巴因子、白介素或趋化因子。干扰素 (IFN) (如 IFN- γ) 特别适用作待测定的免疫效应分子。免疫效应分子的其他示例包括但不限于一定范围的细胞因子,例如白介素 (IL),如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-8 (CXCL8)、IL-10、IL-12、IL-13、IL-16 (LCF) 或 IL-17、IL-1 (IL-1F1)、IL-1 β (IL-1F2)、IL-1r α (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)、丝抑蛋白 E1 (PAI-1)、RANTES (CCL5) 或 MIG (CXCL9)。在一些实施方式中,本发明提供了方法,其中步骤 (b) 中待检测的免疫效应分子是细胞因子、补体系统的组分、穿孔蛋白、防御素、导管素 (cathelicidin)、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,在步骤 (b) 中检测的免疫效应分子是 IFN- γ 。因此,根据优选的实施方式,本发明提供了一种测量对象中细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括将来自所述对象的样品收集至收集容器中,所述样品包含能够在受抗原刺激后产生 IFN- γ 的免疫系统的细胞,将所述样品与抗原和非还原糖孵育,随后测量是否存在 IFN- γ 或其水平的升高,其中,存在 IFN- γ 或其水平表示所述对象建立细胞介导的免疫应答的能力。

[0064] 还可在步骤 (b) 中检测免疫效应分子的组合。因此,步骤 (b) 具体包括检测对抗原刺激做出应答而释放且是待分析的疾病或病症的特征的免疫效应分子 (特别是细胞因子) 或免疫效应分子的组合。此外,一种或多种免疫效应分子的水平可以单独或联合其他生物标记物或疾病指示物进行筛选。

[0065] 根据一个实施方式,通过使用特异性结合免疫效应分子的配体来检测免疫效应分子。免疫效应物的配体对检测和 / 或定量这些分子特别有用。可在检测免疫效应分子前除去孵育组合物中包含的细胞。可用于步骤 (b) 的用于检测试验的技术是本领域已知的,并包括,例如放射性免疫试验、夹心法试验,ELISA 和 ELISpot。免疫效应物的抗体特别适用作配体。提及“抗体”包括特异性结合免疫效应分子的抗体的部分 (如 Fab 片段),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。多克隆和单克隆抗体都可用免疫效应分子或其抗原片段免疫得到,且任一类型都可用于免疫试验。获取两种类型抗体的方法都是本领域熟知的。多克隆抗体较不优选,但相对易于制备,通过向合适的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,并用任何已知的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的免疫分析,但是它们通常因为产品的潜在异质性而不受青睐。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。可使用本领域技术人员熟知的技术通过融合永生细胞系和对免疫原性制品敏感的淋巴细胞来获得用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞

系制备物。针对特定免疫效应分子的抗体也是市售可得的。

[0066] 根据一个实施方式,步骤 (b) 包括使孵育组合物或其部分(如其消耗了细胞的部分)与特异性针对待检测免疫效应分子的抗体或其片段在足以形成抗体-效应物复合物的条件下接触一段时间,随后检测所述复合物。如上文所述,可在检测前通过离心除去孵育组合物中包含的细胞。例如,在使用血液作为样品时,检测前,可在孵育和免疫效应分子的生产 and 释放后将细胞从孵育组合物中分离,从而基本提供血浆样品。

[0067] 可使用多种免疫试验技术,参见美国专利号 4,016,043、4,424,279 和 4,018,653。可与本文所述细胞介导的免疫应答测试联用以检测产生的免疫效应分子的各项试验也描述于 W02004/042396、W02008/113119、W02010/009494 和 W02011/075773,其通过引用纳入本文。此外,Clay 等“Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer(监测对癌症的有效免疫治疗的细胞免疫应答的试验); *Clinical Cancer Research* 2001;7:1127-1135”描述了若干种用于监测细胞免疫应答的方法,从而也描述了用于检测在对抗原(再)刺激的应答中产生的免疫效应分子的合适试验。其中,描述了例如基于 ELISA 的试验、ELISpot 试验和基于核酸的试验,如通过实时定量 RT-PCR 测量细胞因子 mRNA 水平。任选地,在基于免疫效应分子的 RNA 表达水平测定免疫效应分子水平时,可将获得的数据标准化至对照基因(如 CD8)的表达。各方法还可与本发明联用以检测产生的免疫效应分子。根据一个实施方式,使用了用于检测免疫效应分子是否存在或其水平的基于核酸的试验。可使用现有技术中熟知的标准方法从孵育组合物或其细胞部分中分离核酸(特别是 RNA)。优选地,在该实施方式中使用基于扩增的试验(优选基于 PCR 的试验)来检测免疫效应分子是否存在或其表达的升高。可在扩增前首先使用特异性针对待检测免疫效应分子的引物和/或探针将分离的 RNA 逆转录为 cDNA。优选地,该检测是定量的。一种合适的方法是定量实时 RT(逆转录)PCR。

[0068] 优选地,步骤 (b) 中免疫效应分子的检测是定量检测。

[0069] 特定实施方式

[0070] 下文中描述了本发明所述方法的特定和优选的实施方式和其中使用的组分。

[0071] 如上文所述,步骤 (a) 中,一种或多种其他添加剂可包含在孵育组合物内。根据一个实施方式,可向孵育组合物中添加试剂以调控调节性 T 细胞(T-reg 细胞)的活性。后者包括抑制调节性 T 细胞的抑制功能。本文所涵盖的调节 T-reg 细胞的试剂包括但不限于 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、包含寡核苷酸的 CpG、用作 toll 样受体(TLR)调节剂的寡核苷酸和其他 TLR 调节剂。在特定实施方式中,T-reg 细胞是活性被调节剂抑制的免疫应答抑制细胞。“CpG 分子”指包括 CpG 序列或基序的寡核苷酸。T-reg 功能的抑制剂或调节剂的示例包括 CD25 配体,包括但不限于 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。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 W0 2005/118629。然而,合适试剂的其他示例包括刺激剂,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 调节剂的包含一个或多个寡核苷酸的 CpG 也形成本发明的一部分。可使用单一类型试剂或使用两个或更多类型

试剂来调控调节性 T 细胞。例如,该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,只使用一种类型的试剂。或者,可使用包含寡核苷酸和 TLR 调节剂的 CpG。各 T_{reg} 调节剂可单独添加至样品和 / 或孵育组合中,或这可包含在含有抗原和 / 或非还原糖的组合中。

[0072] 根据一个实施方式,本发明所述方法包括

[0073] (a) 通过使获自人对象的全血样品接触包含至少一种肽抗原和至少一种非还原二糖(优选海藻糖或蔗糖)的组合来制备孵育组合,并将该孵育组合在室温以上温度孵育至少 2 小时;以及

[0074] (b) 检测是否存在 IFN- γ 或其水平;

[0075] 其中,存在 IFN- γ 或其水平表示人对象中细胞介导的免疫应答的水平。

[0076] 优选地,该肽抗原是特异性针对疾病或病原体的抗原。本文描述了病原体的非限制性示例。根据一个实施方式,该病原体是病毒且该方法允许测定人对象是否有能力建立抗病毒细胞介导的免疫应答。

[0077] 根据一个实施方式,该方法还包括

[0078] (c) 比较检测的免疫效应分子水平或来源于其的数值与参考水平。

[0079] 步骤(c)包括比较测定的免疫效应分子水平或来源于其的数值与参考水平。该实施方式特别用于诊断抗原所代表的病原体感染。如果所述对象被病原体感染,测定的免疫效应分子水平或来源于其的数值高于参考水平,且如果所述对象未被病原体感染,测定的免疫效应分子水平或来源于其的数值低于参考水平。相同的原理适用于确定所述对象是否能够建立针对抗原所代表的病原体的细胞介导的免疫应答。

[0080] 根据一个实施方式,将样品分成至少两个组分且在步骤(a)中使样品的第一组分接触抗原和非还原糖以生成应答样品并使样品的第二组分接触无活性溶液以生成阴性对照(nil)样品。在该实施方式的步骤(b)中,在两种组分中测定是否存在免疫效应分子或其水平。在步骤(c)中,通过从应答样品中测定的免疫效应分子水平中扣除阴性对照样品中测定的免疫效应分子水平来测定样品的抗原依赖的免疫效应分子应答。随后将该抗原依赖的免疫效应分子应答或来源于其的数值与参考水平比较,从而帮助确定对象先前是否已接触抗原。从而,可以例如确定对象是否对抗原生成了免疫反应、是否有发生疾病的风险和 / 或是否可能被病原体感染。

[0081] 任选地,该方法还包括将样品分成至少三个组分并将样品的第三组分与 T 细胞激活剂(如促分裂原)孵育以生成阳性对照样品。本文中,将免疫细胞在例如三种单独群体中孵育:阴性对照样品(如盐水)、抗原刺激的应答样品和阳性对照样品(使用例如 T 细胞结合剂,如促分裂原,如植物血细胞凝集素)。因此,根据一个实施方式,将样品分成至少三个组分。在步骤(a)中,使样品的第一组分接触抗原和非还原糖以生成应答样品,使样品的第二组分接触无活性溶液以生成阴性对照样品并使样品的第三组分接触刺激溶液(包含例如促分裂原)以生成阳性对照样品。在该实施方式的步骤(b)中,在三种组分中测定是否存在免疫效应分子或其水平。在步骤(c)中,通过从应答样品中测定的免疫效应分子水平中扣除阴性对照样品中测定的免疫效应分子水平来测定应答样品的抗原依赖的免疫效应分子应答并将该抗原依赖的免疫效应分子应答或来源于其的数值与参考水平比较;通过从

阳性对照样品中测定的免疫效应分子水平中扣除阴性对照样品中测定的免疫效应分子水平来测定阳性对照样品的抗原依赖的免疫效应分子应答并将所得免疫效应应答与参考水平或来源于其的数值比较。从而,可以确定对象先前是否接触过测试的抗原或者显示与测试的抗原具有交叉反应性并从而对该抗原生成免疫反应的抗原。对于确定例如对象是否具有活性、近期或潜伏感染,或者对象是否对治疗产生应答、是否将要发生感染或疾病或者是否是免疫抑制的,这提供了有价值的帮助。例如,如果抗原依赖的免疫效应分子应答高于参考水平,则可将结果评估为阳性,即对象能够生成针对所述抗原的细胞介导的应答。如果抗原依赖的免疫效应分子应答低于参考水平且阳性对照依赖的免疫效应应答高于参考水平,则可将结果评估为阴性,即对象不能够生成针对所述抗原的细胞介导的应答。

[0082] 可在本发明中用作阳性对照的促分裂原包括本领域技术人员已知的所有促分裂原且包括但不限于植物血细胞凝集素 (PHA)、伴刀豆球蛋白 A (conA)、脂多糖 (LPS) 和商陆促分裂原 (PWM)。可用于提供阳性对照的除促分裂原以外的其他免疫刺激剂示例包括但不限于化学化合物 (如 R848)。

[0083] 如上文所述,在一些实施方式中,其中样品、抗原和非还原糖共孵育的容器也是用于收集来自对象的样品的收集容器。可以使用大量不同的可用容器中的任一种,前提是其提供合适的样品尺寸。在一些实施方式中,该容器是管,其包含真空以促进来自对象的样品 (如血液) 的收集。各真空血液收集管是现有技术中熟知的,因此在本文中不需要任何详细描述。在其他实施方式中,该容器是毛细管。在一些实施方式中,毛细管用于通过毛细作用从皮肤表面收集血液。在一些实施方式中,将样品从对象收集至含有至少一种抗原、至少一种非还原糖和至少一种抗凝血剂 (优选肝素) 的收集容器中,或者随后向其中添加抗原、非还原糖和抗凝血剂 (优选肝素)。在一些实施方式中,使用毛细取样装置 (如针刺装置) 对血液进行取样并将血液收集至肝素化的收集容器内并随后转移至适当容器以与抗原和非还原糖共孵育。优选地,以上文所述单个组合物的形式提供抗原、非还原糖和可选的抗凝血剂。在一些实施方式中,将来自对象的全血收集至含有抗原、非还原糖和可选的抗凝血剂的容器中。在其他实施方式中,在收集后向全血样品中添加抗原、非还原糖和 / 或抗凝血剂。

[0084] 本发明特别用于筛选对病原体的暴露,特别是分枝杆菌,如结核分枝杆菌。因此,本发明教导了一种测量对象中细胞介导的免疫应答活性的方法,该方法包括使包含能够在抗原刺激后产生免疫效应分子的免疫细胞的样品接触分枝杆菌特异性抗原和非还原性糖。用作抗原的肽包括全部或部分结核分枝杆菌蛋白抗原。孵育后,测定免疫细胞所产生的免疫效应分子 (优选干扰素 γ) 的水平,其中免疫效应分子的水平指示对象中针对结核分枝杆菌的细胞介导的免疫应答水平。

[0085] ESAT-6 是一种 6kDa 的结核分枝杆菌早期分泌抗原性靶标。ESAT-6 蛋白 (早期分泌抗原性靶标 6) 是已从结核分枝杆菌短期培养过滤物中纯化的主要分泌抗原。如本文所述,ESAT-6、CFP-10 (培养过滤物蛋白 10) 和 85B 可获自细胞裂解物和通过重组技术纯化或以合成的肽的形式生产。例如,ESAT6 可以重组蛋白的形式获自国家血清研究所 (SSI, 丹麦哥本哈根)。结核分枝杆菌的其他合适的目标蛋白抗原包括 TB7.7 和 TB37.6。CFP10 也称作 ESAT-6 样蛋白 eesxB 和分泌的抗原性蛋白 MTSA-10。

[0086] 结核菌素或 PPD (纯化的蛋白衍生物) 不同于 ESAT-6 蛋白 (早期分泌抗原性靶标 6)、CFP-10 (培养过滤物蛋白 10) 和 TB7.7, 其由仅位于结核分枝杆菌基因组内 (RD-I 区中)

的基因编码并不包含于 BCG(卡介苗)中。其不同于 PPD, 因为 PPD 还含有与例如 BCG 亚株和若干具有低致病性或无致病性的非结核分枝杆菌种共有的其他抗原。根据一个实施方式, PPD 被用作抗原。具体而言, 本文所用术语纯化的蛋白衍生物 (PPD 或结核菌素) 是一种非物种特异性分子的沉淀物。通过从结核分枝杆菌或其他分枝杆菌 (如鸟分枝杆菌) 的化合物中提取蛋白来获得 PPD 或结核菌素。PPD 通常用于测试是否存在针对 BCG 或针对结核分枝杆菌生成的细胞免疫或 Th1 应答。例如, 其可获自康诺特实验室有限公司 (Connaught Laboratories Limited) 的 TubersolB, 其制备自大母料 (Master Batch), 康诺特结核菌素 (CT68), 或者是获自国家血清研究所 (SSI, 丹麦哥本哈根) 的 RT23 形式。

[0087] 优选地, 该抗原选自来自结核分枝杆菌的 CFP10、ESAT-6、TB7.7 和 TB37.6。根据一个实施方式, 通过对应于这些蛋白抗原和 / 或显示对其交叉反应性的肽来提供抗原。

[0088] 在一个实施方式中, 使样品接触 CD4⁺ 和 CD8⁺ 肽的组合, 其在上文中详细描述。我们参考上文公开内容。

[0089] 在对象抽血后的延长期后, 免疫系统的细胞丧失了增加全血中细胞介导的免疫应答的能力, 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。劳动和对本发明中专门设备的需求的减少使得能在医疗点使用抗原进行细胞介导的免疫应答刺激, 所述医疗点是例如医师诊所、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 和其他由于抗原刺激而释放的细胞因子或免疫效应分子在无细胞或去除细胞的流体如血浆中稳定, 因此, 样品能以与用于其他感染性疾病或其他疾病诊断的标准血浆或血清样品类似的方式存储或运输而不需要特殊条件或快速时间要求。因此, 优选检测实际释放的免疫效应分子。然而, 包含在孵育组合物或全孵育组合物中的细胞可在孵育后与包含稳定 RNA 表达模式的核酸稳定组合物接触, 前提是基于免疫效应分子的 RNA 表达水平测定免疫效应分子是否存在或其水平。若干稳定组合物是市售可得的。例如, PAX 公司 (PreAnalytiX) 提供含有用于快速稳定血液中 RNA 基因表达概况的试剂的组合物。各组合物还可用于稳定孵育组合物中包含的细胞的 RNA 基因表达概况。各稳定组合物允许在室温下转运和储存而没有因基因诱导和转录降解导致 RNA 概况变化的风险 (参见例如 US 6, 617, 170, US 7, 270, 953, Kruhoffer 等, 2007)。各组合物以 PAXgene 血液 RNA 管 (PAXgene Blood RNA Tubes) 的名称售卖。

[0090] 应用、疾病和病症

[0091] 下文描述了非限制性应用, 包括用途、疾病和病症。显然, 本发明所述方法以及本文所述组合物和试剂盒可广泛地用于医疗和诊断领域且例如可用于适用于分析患者中细胞介导的应答的体外试验。此外, 本发明所述方法以及本文所述组合物和试剂盒是有价值的分析工具, 用于测试试剂 (如癌症免疫治疗剂) 刺激并因此增强细胞介导的免疫的能力。

[0092] 本文教导的方法能够例如检测对象中是否存在疾病或病症或其水平或阶段, 所述疾病或病症是例如致病物感染、自身免疫疾病、癌症、暴露于炎性试剂、暴露于药物、暴露于毒性蛋白性试剂和例如由疾病病症诱导或由药剂诱导的免疫缺陷或免疫抑制病症。可靠且灵敏地测量细胞介导免疫的能力对于例如评价对象能力而言是重要, 所述能力是对致病物 (如微生物、病毒或寄生虫) 感染的应答、建立自身免疫反应、对疫苗或免疫治疗剂应答、保护抵御癌症或其他肿瘤病症、检测炎性病症或检测对象对毒性试剂 (如铍或环境试剂) 的暴露或敏感性。本文所述试验使免疫应答力的早期检测和 / 或更敏感的检测可行。本文所

述试验还促使并有助于检测导致免疫抑制的疾病病症或检测由药物诱导的免疫抑制。因此,本文所教导的“测量对象中细胞介导的免疫应答”在医疗领域具有许多有用的应用,后文中将描述非限制性用途和应用。

[0093] 例如,本文所述方法可用于感染性或自身免疫疾病的免疫诊断,作为免疫活性的标记物,以及炎性疾病、变应原、癌症、免疫治疗剂的作用的标记物,和作为毒性试剂的标记物。此外,该方法通常用于检测针对内源性和 / 或外源性抗原的 T 细胞应答 (包括测量疫苗效率)。

[0094] 基于细胞的、功能性免疫应答试验还被接受作为影响免疫应答的疫苗、免疫治疗剂和生物制剂的开发中的高效替代标记物。该试验可用于学术环境、制药环境以及疫苗和生物制剂的研究和开发。免疫细胞功能能力的评估对于理解一些疾病病症和针对其的治疗策略效率而言至关重要。免疫细胞负责预防或治疗,例如在类似 HIV 的感染性疾病中,或者负责疾病病症本身,例如在自身免疫疾病病症中。可使用本发明所述方法在自身免疫疾病 (如多发性硬化) 患者中测量自身抗原特异性反应。本发明提供了用于这些目的的试验。

[0095] 目前在临床试验中测试了多种癌症免疫治疗策略。虽然临床效率是这些方法的最终测试,但这些项目漫长且复杂的开发途径需要评估作为最有可能成功的候选物的中间标记物的免疫应答。这强调了需要精确检测并定量 T 细胞介导、抗原特异性免疫应答的试验。对于各免疫治疗剂 (其例如不必然预期导致肿瘤消退,但仍对疾病具有有益效果),必须基于假定的活性模式选择生物标记物。对于免疫治疗,这类标记物是可由一种或多种免疫试验检测的肿瘤抗原特异性免疫应答的刺激。本文中,优选使用的试验评估 CD8⁺细胞毒性 T 细胞和导致细胞毒性 T 细胞生成的 CD4⁺辅助 T 细胞 (特别是 T 辅助 1 型应答) 的功能,所述 CD8⁺细胞毒性 T 细胞直接识别肿瘤细胞表面上 MHC 分子所呈递的触发直接细胞裂解的肿瘤肽。本发明提供了因为其灵敏性和可靠性而可用于该目的的试验。因此,本文所述方法、试剂盒和组合物可用于分析一种药剂 (如肿瘤治疗剂) 是否能够增强细胞介导的免疫。这可以使用可得的 (如标准化的) 免疫细胞 (示例如上文所述) 在例如总体水平上测试,或者也可在单个患者中测试,从而分析特定免疫治疗剂 (如癌症免疫治疗剂) 是否能够增强所述患者中的细胞介导的免疫。这类试验对于临床研发以及之后的治疗环境是有价值的,从而分析患者是否受益于使用免疫治疗剂的治疗。免疫治疗剂的示例包括但不限于生物制剂,如增强 T 细胞 (特别是细胞毒性 T 细胞) 活性的治疗性抗体。作用模式是不相关的,前提是其导致或可能导致细胞介导的免疫的刺激 / 增加。例如,可通过直接刺激免疫细胞或通过降低或关闭负调控所述 T 细胞活性的抑制机制来增强活性,从而间接地刺激 / 增加细胞介导的免疫。一个示例是癌症免疫治疗性抗体伊皮木单抗 (Ipilimumab)。

[0096] 此外,本发明所述方法可用于检测对象中是否存在疾病或病症或其水平或阶段,其中,使用本发明所述方法检测到存在免疫效应分子或其水平指示该疾病或病症。

[0097] 此外,本发明所述方法可用于测定试剂或疾病病症是否诱导对象中的免疫抑制或与其相关,其中,使用本发明所述方法检测到存在免疫效应分子或其水平指示由试剂诱导或由疾病病症诱导或与疾病病症相关的免疫抑制的程度。

[0098] 本发明的一个方面包括通过使用本发明所述方法测量针对特定抗原的应答来显示对象中细胞介导的免疫应答的方法。在一个实施方式中,样品 (如全血、富集的白细胞组分或支气管肺泡灌洗液) 可获自患有或可能发生特定疾病 (例如自身免疫疾病、致病物感

染或暴露于毒性试剂导致的疾病)的对象,并通过使用本发明的第一方面所述方法来测量免疫应答,例如通过检测对抗原刺激产生应答而从效应 T 细胞(如 CD4⁺T 细胞和 / 或 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞)中释放的免疫效应分子。

[0099] 本发明的方法特别用于检测和 / 或监测对象中疾病或病症(如致病物的感染、自身免疫疾病、癌症或炎性疾病),包括该疾病或病症的水平或阶段。其他病症包括暴露于毒性试剂(如铍)。本发明的试验还可用于监测治疗方案。

[0100] 在对测试的抗原应答中产生的免疫效应分子的存在或其水平指示对象中细胞介导的应答的水平。具体而言,应答的水平指示存在或不存在疾病或病症或其水平或阶段,所述疾病或病症选自致病物感染、自身免疫疾病、癌症、炎性病症和暴露于毒性试剂。具体而言,存在免疫效应分子或其水平指示存在或不存在测试的抗原所代表的疾病或病症或其水平或阶段。

[0101] 该方法还可用于监测对象中对疾病或病症的治疗方案的应答。存在产生的免疫效应分子或其水平或模式可指示治疗方案的功效。

[0102] 本发明方法也能称为“试验”。该方法是一种离体方法。本文所述试验用于评价对象的普通免疫应答或用于检测对特定疾病病症的免疫应答,所述疾病病症是例如自体免疫疾病、乳糜泻、癌症、致病生物或试剂的感染、暴露于毒性试剂或药物和免疫缺陷或免疫抑制病症(如由疾病病症或治疗剂诱导)。

[0103] 在一个实施方式中,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、发展潜力,或监控自身免疫病症、乳糜泻、监控对象对肿瘤攻击的应答和测定是否存在任何免疫缺陷或免疫抑制。后者可由例如包括各种化疗剂的某些药物引起。或者,可测试对环境毒剂和污染物的暴露。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。能导致免疫抑制的其他病症包括炎症病症。能导致免疫抑制的药物包括用于治疗风湿性关节炎、癌症和炎症性肠病的那些药物或与器官移植联用的那些药物。

[0104] 在一个实施方式中,本文所述方法可用于或辅助诊断或监测可能患有结核(例如活性、潜伏或近期的 TB 感染)的患者且特别是从潜伏发展至活性结核风险升高的患者,例如接受免疫抑制药物(即单克隆抗体治疗(抗 CD20 抗体(如 Rituximab[®])或 TNF- α 阻断治疗(如 Remicade[®]、Enbrel[®]、Humira[®])))或类固醇或癌症化疗的患者;或者,患有免疫抑制病症(例如 HIV 感染、癌症、IDDM 或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)、自身免疫疾病、营养不良、衰老、静脉内药物使用(IVDU)或遗传的免疫紊乱)的患者,以及最近被感染的个体。

[0105] 在一个实施方式中,本文所述方法可用于监测经诊断具有感染或其他疾病病症的对象。这可以例如有助于评估治疗终止期间或之后的治疗功效,例如通过监测和预测可能的感染复发。

[0106] 根据一个实施方式,该方法用于测定对象是否被感染和 / 或是否能够建立针对抗原所代表的病原体的细胞介导的免疫应答。

[0107] 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 CMV 病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和其导致的疾病。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。评价暴露于传染实体的对象中潜在或实际的细胞介导的应答通常是非常重要的。本发明的方法也可用于检测是否存在这些感染以及疾病过程的水平或阶段。

[0108] 该方法还可用于监测具有发生各疾病风险的人中针对某些疾病和 / 或感染剂的细胞介导的免疫的水平。一个示例是免疫抑制的患者 (如器官移植患者) 中的 CMV 感染。CMV 感染通常以免疫抑制并发症的形式出现, 特别是在移植后, 并显著导致移植接受者中的患病和死亡。目前用于防止移植器官排异的免疫抑制治疗对 T 淋巴细胞和细胞介导的免疫应答具有有害作用, 导致移植后病毒感染的可能性上升。CD8⁺CMV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 可保护免于发生病毒相关疾病的事实还突出了 T 细胞功能和抑制 CMV 复制的重要性。免疫抑制患者的另一个示例是 HIV 感染的患者。本发明的方法可用于在具有发生各疾病风险的人中依次监测疾病免疫 (如抗 CMV 免疫) 的水平, 因为该免疫功能的丧失可与疾病 (如 CMV 疾病) 发展相关。优选地, 在各测试中测定干扰素 γ 作为效应分子。移植受体的免疫状态可影响移植受体中的 CMV (再) 激活。例如, CMV 特异性抗原所诱导的强干扰素 γ 应答表示 CMV 疾病的风险降低, 因为患者具有强细胞介导的免疫应答且因此被保护免于病毒感染。最低的干扰素 γ 应答表示升高的 CMV 疾病风险, 因为不存在或存在非常低的细胞介导的免疫。数据显示, 抗病毒预防停止后, 与具有阴性测试的患者相比, 具有阳性 CMV 测试的患者显著较频繁地且较久地维持不具有 CMV 疾病。因此, 与不具有可检测免疫应答的那些患者相比, 在预防末期对 CMV 具有细胞免疫应答的患者具有显著较低的发生 CMV 疾病的风险。因此, 本发明所述方法可预测移植受体中迟发性 CMV 疾病的发展并因此对患者管理非常有用。

[0109] 或者, 该对象可患有以下疾病病症或可针对以下疾病病症进行测试: 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、白塞氏 (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、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。

[0110] 该对象可患有癌症或可针对癌症进行测试。癌症治疗部分取决于细胞介导免疫和肿瘤本身或用于治疗肿瘤的药物可导致免疫抑制。本文所述肿瘤包括一组疾病和紊乱，其特征为细胞生长失控（例如肿瘤形成）且这些细胞没有分化为任何专门且不同的细胞。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、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。

[0111] 或者，该对象可暴露于蛋白毒剂或可针对对蛋白毒剂的暴露进行测试。

[0112] 本文所述用于检测和 / 或监测的自身免疫疾病包括脱发斑秃，强直性脊柱炎，抗磷脂综合症，自身免疫阿狄森氏病，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,血管炎和白癜风。

[0113] 考虑的其他疾病病症包括炎症疾病病症,因为其可导致免疫抑制。本发明包括的炎症疾病病症的示例包括但不限于: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。能使用本发明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,本发明也检测马的EIPH和各种动物病症,例如袋獾面部肿瘤。

[0114] 在上述方面中,该抗原可获自致病物、与疾病病症或癌症相关或是毒剂。或者,感染、疾病病症、癌症或毒剂可抑制细胞介导的免疫,此时可使用对象先前已接触的任何抗原。

[0115] 下文中再次描述了根据第一方面的方法的说明书和权利要求书中描述的特别有利的实施方式。根据第一方面,本发明提供了一种用于测量细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括

[0116] (a) 通过使包含免疫细胞的样品接触至少一种抗原和至少一种非还原糖来提供孵育组合物,所述免疫细胞能够在由抗原进行刺激后产生免疫效应分子,以及

[0117] (b) 检测是否存在至少一种免疫效应分子或其水平。

[0118] 根据一个实施方式,该非还原糖是非还原二糖,优选选自海藻糖和蔗糖。根据一个实施方式,孵育组合物中非还原糖的浓度为至少 1.5mg/ml,优选至少 2mg/ml。上文中还描述了孵育组合物中非还原糖的合适浓度范围且参见上述公开内容。

[0119] 根据一个实施方式,该非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖。如实施例所示,这些非还原糖提高了应答水平。海藻糖是特别优选的,因为本文中观察到应答水平的最大增加。此外,储存期间可保留增强效果。

[0120] 根据一个实施方式,在步骤(a)中,使样品接触包含抗原和非还原糖的组合物。根据一个实施方式,其中样品是全血样品,该组合物还可包含抗凝血剂,优选肝素。根据一个实施方式,包含抗原、非还原糖和可选的抗凝血剂的组合物包含在样品收集容器内。如上文所述,这类样品收集容器可以例如是真空血液收集容器。根据一个实施方式,该组合物是喷雾干燥的组合物。本文描述了合适的实施方式。

[0121] 根据一个实施方式,该样品具有一种或多种以下特征:

[0122] i) 该样品获自人对象;

[0123] ii) 该样品获自免疫抑制或免疫缺陷的人对象;

[0124] iii) 该样品包含免疫细胞,所述免疫细胞选自NK细胞、T细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞和单核细胞;和/或

[0125] iv) 该样品是全血。

[0126] 根据一个实施方式,该抗原选自肽、蛋白(包括糖蛋白)、磷蛋白和磷脂蛋白、碳水化合物、磷脂和前述物质的片段,且优选由一种或多种肽提供。

[0127] 根据一个实施方式,在步骤(a)中使用两种或多种不同抗原和/或在步骤(b)中

检测两种或多种不同效应分子。

[0128] 根据一个实施方式,将一种或多种肽用作抗原,其长度选自 5-100 个氨基酸或 7-50 个氨基酸。根据一个有利的实施方式,该抗原由一种或多种被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽提供。优选地,在该实施方式中,该抗原由一种或多种长度小于 15 个氨基酸、优选长度选自 7-14 个氨基酸的肽提供。上文描述了各肽的细节且参见上述公开内容。

[0129] 根据一个实施方式,该抗原由至少两组肽提供,第一组包含至少一种长度为约 7-14 个氨基酸残基的肽且第二组包含至少一种长度为 15 个氨基酸残基或更长的肽,其包括全部或部分蛋白抗原。上文描述了各肽组的细节且参见上述公开内容。

[0130] 根据有利的实施方式,该抗原由一种或多种合成肽提供。上文描述了肽的细节且参见各公开内容。

[0131] 根据一个实施方式,使样品接触与疾病或病症相关或代表疾病或病症的抗原,其中测试针对所述疾病或病症测试细胞介导的免疫应答。根据一个有利的实施方式,该抗原为疾病特异性抗原,具体而言是病原体特异性抗原。例如,该抗原可来源于来自与疾病病症相关病原体的抗原或与其具有交叉反应性,或者是与癌症相关的肿瘤相关抗原。如上文所述,该病原体可以是细菌、病毒、寄生虫、酵母或真菌。下文中将描述非限制性实施例。例如,细菌可选自革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物,特别是分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) (如结核分枝杆菌),葡萄球菌属 (*Staphylococcus*),链球菌属 (*Streptococcus*),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*),嗜血杆菌属 (*Hemophilus*) 和伯疏氏螺旋体属 (*Borrelia*)。病毒可选自肝炎病毒(如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)、疱疹病毒、CMV 病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。寄生虫可选自疟原虫属 (*Plasmodium*),环癣和肝寄生虫。

[0132] 根据一个实施方式,该抗原来自或特异性针对病毒,优选巨细胞病毒 (CMV)。优选地,所述抗原由一种或多种肽提供,其长度为 7-14 个氨基酸残基、7-13 个氨基酸残基或 8-12 个氨基酸残基。如上文所述,该一种或多种肽可以是合成肽。

[0133] 根据一个实施方式,在步骤 (b) 中检测的免疫效应分子具有一种或多种以下特征:

[0134] i) 其是细胞因子;

[0135] ii) 其是趋化因子;

[0136] iii) 其对细胞激活、抗原的刺激或再刺激应答而产生;

[0137] iv) 其选自干扰素、白介素 (IL), 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)、丝抑蛋白 E1 (PAI-1)、RANTES (CCL5) 或 MIG (CXCL9); 和 / 或

[0138] v) 该免疫效应分子是 IFN- γ 。

[0139] 根据该方法的一个实施方式,免疫效应分子是否存在或其水平基于免疫效应分子测定或者基于免疫效应分子的 RNA 表达水平测定。上文中描述了合适的实施方式。

[0140] 根据一个实施方式,前述实施方式中任一项所述的方法是用于监测或测定是否存

在疾病或病症或其水平或阶段,所述疾病或病症选自致病物感染、自身免疫疾病、癌症、炎症病症、暴露于毒性试剂、对治疗剂应答、免疫缺陷和免疫抑制。优选地,细胞介导的免疫应答的量级与疾病病症的状态、进展和 / 或严重性相关。根据一个实施方式,前述实施方式中任一项所述的方法是用于检测或监测疾病、感染和 / 或对治疗的应答,特别是使用免疫抑制剂进行的免疫治疗或治疗。

[0141] 根据一个实施方式,前述实施方式中任一项所述的方法包括

[0142] (a) 通过使获自人对象的全血样品接触包含至少一种肽抗原和至少一种非还原二糖(优选海藻糖或蔗糖)的组合物来提供孵育组合物,并将该孵育组合物孵育至少 2 小时; 以及

[0143] (b) 测量是否存在因抗原刺激而释放的 IFN- γ 或其水平;

[0144] 其中,存在经检测的 IFN- γ 或其量表示人对象中细胞介导的免疫应答的水平。

[0145] 根据一个实施方式,前述实施方式中任一项所述的方法包括

[0146] (c) 将测定的免疫效应分子水平或来源于其的数值与参考水平比较。

[0147] 本发明还提供了一种治疗对象的方法,所述对象患有病原性感染、自身免疫疾病或癌症或者具有发生这类病症或疾病的倾向,该方法包括根据本发明的第一方面进行该方法以测量细胞介导的应答活性,其中,经测定存在免疫效应分子或其水平指示对象中细胞介导的应答水平,其指示是否存在病症或疾病或其水平或状态,随后治疗该病症或疾病。上文描述了第一方面所述方法的细节且参见上述公开内容。

[0148] 组合物、试剂盒和用途

[0149] 根据本发明的第二方面,提供了用于在样品中诱导细胞介导的免疫应答的组合物,其包含

[0150] a) 至少一种分离的抗原;

[0151] b) 至少一种非还原糖;

[0152] c) 可选的至少一种抗凝血剂。

[0153] 上文以及本发明所述方法中描述了涉及组合物、组合物形式、合适的抗原、非还原糖和抗凝血剂的细节且参见上述公开内容。这类组合物可用于例如第一方面所述的方法。上文中详细描述了合适的应用(包括用途 / 目的、可使用这类组合物分析的疾病和病症以及因此所述组合物的合适用途)且参见上述公开内容。第二方面所述的组合物特别适用于上文所述方法、应用和用途。根据一个实施方式,该组合物不包含单糖。根据一个实施方式,该组合物不包含还原糖。优选地,该组合物是半液体、凝胶状或固体组合物。优选地,其是干燥的组合物。根据一个实施方式,该组合物是喷雾干燥的组合物。

[0154] 非限制性、有利的实施方式再次如下描述:

[0155] 该非还原糖可具有上文以及第一方面的方法所述的特征且参见同样在本文中应用的各公开内容。如上文所述,该非还原糖不用作抗原的稳定剂但用于提高应答水平。如实施例中所示,非还原糖(如海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖)提高应答水平。根据一个实施方式,该非还原糖是非还原二糖。该非还原二糖可选自海藻糖和蔗糖。根据一个实施方式,第二方面所述组合物中非还原糖的浓度使得所述组合物与预期量的样品接触时,所得孵育组合物包含浓度为至少 1.5mg/ml、优选至少 2mg/ml 的非还原糖。上文以及第一方面所述的方法中还描述了孵育组合物中非还原糖的合适浓度范围且参见上述公开内容。上文以及第

一方面所述的方法中还描述了合适和优选的样品材料且参见上述公开内容。根据一个实施方式,该样品具有一种或多种以下特征:

[0156] i) 该样品获自人对象;

[0157] ii) 该样品获自免疫抑制或免疫缺陷的人对象;

[0158] iii) 该样品包含免疫细胞,所述免疫细胞选自 NK 细胞、T 细胞、B 细胞、树突细胞、巨噬细胞和单核细胞;和/或

[0159] iv) 该样品是全血。

[0160] 根据一个实施方式,组合物中包含的抗原选自肽、蛋白(包括糖蛋白)、磷蛋白和磷脂蛋白、碳水化合物、磷脂和前述物质的片段,且优选由一种或多种肽提供。

[0161] 根据一个实施方式,该组合物包含两种或多种不同的抗原。

[0162] 根据一个实施方式,该组合物包含一种或多种肽用作抗原,所述一种或多种肽的长度选自 5-100 个氨基酸或 7-50 个氨基酸。根据一个有利的实施方式,该组合物包含作为抗原的一种或多种被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽。优选地,在该实施方式中,该抗原由一种或多种长度小于 15 个氨基酸、优选长度选自 7-14 个氨基酸的肽提供。上文以及第一方面所述的方法中描述了合适的各肽且参见上述公开内容。

[0163] 根据一个实施方式,该组合物包含由至少两组肽提供的抗原,第一组包含至少一种长度为约 7-14 个氨基酸残基的肽且第二组包含至少一种长度为 15 个氨基酸残基或更长的肽,其包括全部或部分蛋白抗原。上文以及第一方面所述的方法中描述了合适的各肽组且参见上述公开内容。

[0164] 根据有利的实施方式,该组合物包含由一种或多种合成肽提供的肽。上文描述了肽的细节且参考各公开内容。

[0165] 根据一个实施方式,该组合物包含与疾病或病症相关或代表疾病或病症的抗原,其中测试针对所述疾病或病症细胞介导的免疫应答。

[0166] 根据有利的实施方式,包含在组合物内的抗原是疾病特异性抗原,具体而言是病原体特异性抗原。例如,该抗原可来源于来自与疾病病症相关病原体的抗原或与其具有交叉反应性,或者是与癌症相关的肿瘤相关抗原。如上文所述,该病原体可以是细菌、病毒、寄生虫、酵母或真菌。下文中将描述非限制性实施例。例如,该细菌可选自革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物,特别是分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) (如结核分枝杆菌),葡萄球菌属 (*Staphylococcus*),链球菌属 (*Streptococcus*),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*),嗜血杆菌属 (*Hemophilus*) 和伯疏氏螺旋体属 (*Borrelia*)。病毒可选自肝炎病毒(如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)、疱疹病毒、CMV 病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。寄生虫可选自疟原虫属 (*Plasmodium*)、环癣和肝寄生虫。

[0167] 根据一个实施方式,该组合物包含来自或特异性针对病毒(如巨细胞病毒 (CMV)) 的抗原。优选地,所述抗原由一种或多种肽提供,其长度为 7-14 个氨基酸残基、7-13 个氨基酸残基或 8-12 个氨基酸残基。如上文所述,该一种或多种肽可以是合成肽。

[0168] 该组合物可包含在样品收集容器内,本文中描述了这类容器(如真空血液收集容器)的合适和有利的实施方式且参见各公开内容。

[0169] 本发明还提供了一种孵育组合物,包含至少一种分离的肽、至少一种非还原糖、能

能够在抗原刺激后生产免疫效应分子的免疫细胞（优选 T 淋巴细胞）和可选的至少一种抗凝血剂。优选地，该孵育组合物从全血样品中制备并因此包含全血样品。根据一个实施方式，通过使第二方面所述组合物接触样品来制备孵育组合物。上文以及第一方面所述的方法中描述了合适和优选的样品材料且参见上述公开内容。根据一个实施方式，该样品具有一种或多种以下特征：

[0170] i) 该样品获自人对象；

[0171] ii) 该样品获自免疫抑制或免疫缺陷的人对象；

[0172] iii) 该样品包含免疫细胞，所述免疫细胞选自 NK 细胞、T 细胞、B 细胞、树突细胞、巨噬细胞和单核细胞；和 / 或

[0173] iv) 该样品是全血。

[0174] 优选地，通过使本发明第二方面所述的组合物接触获自对象（优选获自人）的全血样品来获得孵育组合物。上文以及本发明所述方法和第二方面所述组合物描述了关于第二方面所述组合物、孵育组合物、其制备、合适的抗原、非还原糖和抗凝血剂的细节且参见上述公开内容。该抗凝血剂优选是肝素。根据一个实施方式，该孵育组合物包含浓度为至少 1.5mg/ml、优选至少 2mg/ml 的非还原糖。上文以及第一方面所述的方法中也描述了孵育组合物中非还原糖的合适浓度范围且参见上述公开内容。根据一个实施方式，该非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖。如上文所述，根据有利的实施方式，该非还原糖是非还原二糖，优选选自海藻糖和蔗糖。

[0175] 还提供了一种样品收集容器，特别是样品收集管，其包含各组合物，所述组合物包含

[0176] a) 至少一种分离的抗原；

[0177] b) 至少一种非还原糖；

[0178] c) 可选的至少一种抗凝血剂。

[0179] 包含在样品收集容器中的组合物优选是第二方面所述的组合物。上文描述了关于组合物、合适的抗原、非还原糖和抗凝血剂的细节且参见上述公开内容。这类样品收集容器可用于例如第一方面所述的方法。上文中详细描述了合适的应用（包括用途 / 目的、可使用这类样品收集容器分析的疾病和病症）且参见上述公开内容。第三方面所述的样品收集容器特别适用于上文所述方法、应用和用途。优选地，将组合物喷涂至容器内侧，所述容器优选是真空血液收集管。通过在本发明的方法中使用这类即用型收集容器，可优化和标准化该方法的条件并简化操作。

[0180] 优选使用试剂盒进行本发明所述方法，该试剂盒提供了执行方法步骤所需的材料。这类试剂盒优选包含标准化的材料，其确保该方法在优化的条件下进行，从而确保获自不同样品或患者或者由不同工作人员获取的结果相互之间具有可比性。因此，在第四方面中，本发明还提供了一种测量对象中细胞介导的免疫应答活性的试剂盒，其包含至少一种抗原、至少一种非还原糖、至少一种样品收集容器和至少一种用于检测至少一种免疫效应分子的检测手段。优选地，该抗原和非还原糖以单个组合物的形式提供。为此，可以使用本发明第二方面所述的组合物且对于所述组合物的细节参见上述公开内容。上文以及本发明所述方法和组合物中描述了涉及组合物、抗原和非还原糖的细节且参见上述公开内容。根据一个实施方式，该试剂盒包含样品收集容器（如血液收集管），其包含含有抗原和非还原

糖的组合物。优选地,该组合物还包含抗凝血剂(如肝素)。如本文所述,包含在样品收集容器内的组合物可以是第二方面所述的组合物。优选地,该检测手段是免疫检测试剂,如标记的抗体。然而,对于基于检测 mRNA 表达水平的试验,该检测手段可由特异性针对待检测免疫效应分子的引物和 / 或探针提供。合适的试验和检测手段是本领域技术人员已知的且同样如上文所述。

[0181] 根据另一个方面,本发明涉及在用于测量细胞介导的应答活性的免疫试验中非还原糖的应用,其中,样品与抗原孵育期间非还原糖的添加增加了免疫细胞中免疫效应分子的释放,所述免疫细胞对所述试验中测试的抗原产生应答。

[0182] 上文以及本发明所述方法描述了涉及非还原糖、优选的浓度、医疗领域中的免疫试验及其应用、合适和优选的抗原、免疫效应分子和免疫细胞的细节且参见上述公开内容。该非还原糖可具有一种或多种下述特性:

[0183] i) 该非还原糖是二糖。

[0184] ii) 该非还原糖选自海藻糖和蔗糖;

[0185] iii) 该非还原糖以至少 1mg/ml、优选 2mg/ml 的浓度用于包含待测试样品和抗原的孵育组合物中;和 / 或

[0186] iv) 该非还原糖以组合物的形式提供,所述组合物还包含待测试抗原和可选的抗凝血剂。

[0187] 根据一个实施方式,该非还原糖选自海藻糖、甘露醇、蔗糖和棉子糖。

[0188] 上文所述非还原糖(如海藻糖)在用于测定或监测细胞介导的免疫的试验中的应用具有显著的优势。如上文所述,优选地,以与样品接触的单个组合物的形式提供非还原糖以及抗原。根据一个实施方式,添加非还原糖用于孵育和 / 或非还原糖包含在含有非还原糖和抗原的组合物中。如上文所述,该非还原糖不用作抗原的稳定剂。根据有利的实施方式,该抗原由一种或多种被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞识别的肽(优选合成肽)提供。优选地,在该实施方式中,该抗原由一种或多种长度小于 15 个氨基酸、优选长度选自 7-14 个氨基酸的肽(优选合成肽)提供。

[0189] 根据另一个方面,本发明涉及本发明第二方面所述组合物、本发明第三方面所述样品收集容器和 / 或本发明第四方面所述试剂盒在用于测量细胞介导的应答活性的试验中的应用。上述描述了涉及合适和优选的用途和应用的细节且参见上述公开内容。根据一个实施方式,该试验是用于监测或测定是否存在疾病或病症或其水平或阶段,所述疾病或病症选自致病物感染、自身免疫疾病、癌症、炎性病症、暴露于毒性试剂、对治疗剂应答、免疫缺陷和免疫抑制。根据一个实施方式,该试验是用于检测或监测疾病、感染和 / 或对治疗的应答,特别是使用免疫抑制剂进行的免疫治疗或治疗。根据一个实施方式,本发明第二方面所述组合物、本发明第三方面所述样品收集容器和 / 或本发明第四方面所述试剂盒用于上文详细描述且权利要求中描述的第一方面所述方法中。

[0190] 本发明不限于本文公开的示例性方法和材料。本文所述数值范围包括限定该范围的数值。本文提供的标题不是本发明的各种方面或实施方式的限制,可以参考说明书整体理解本发明的各种方面或实施方式。根据一个实施方式,本文所述包含某些步骤(对于方法而言)或包含某些成分(对于例如组合物、溶液和 / 或混合物而言)的主题指由各步骤或成分组成的主题。优选选择并组合本文所述优选实施方式且由各优选实施方式组合形成

的特定主题也属于本发明。

[0191] 下面通过非限制性实施例的方式进一步详细描述本发明。

实施例

[0192] 实施例 1 :海藻糖对于爱泼斯坦巴尔病毒 (Epstein-Barr virus) 试验灵敏度的影响

[0193] 进行使用 QuantiFERON 技术测量对来自爱泼斯坦巴尔病毒的模型抗原 EBNA-1 的应答的研究以评估向孵育混合物中添加非还原糖所诱导的试验灵敏度的增加。简言之,向血液收集管中添加 EBNA-1 肽,加 / 减海藻糖溶液的 3 个浓度 (0.5、1.0 或 2.0mg/ml 海藻糖)。根据生产商说明书进行测量抗 EBV 细胞免疫应答的 QuantiFERON 试验。根据海藻糖浓度测定和比较 IFN- γ 应答。使用增加的海藻糖浓度观察到 IFN- γ 应答的增加。该测试试验中 2mg/ml 海藻糖的浓度提供了最佳结果。

[0194] 这些研究显示,向全血试验中添加非还原糖 (如海藻糖) 导致细胞介导的免疫应答试验中 IFN- γ 应答的显著增加。由于添加非还原糖所诱导的 IFN- γ 应答的增加,增强了试验的灵敏度。

[0195] 实施例 2 :现有技术试验的储存稳定性

[0196] 在该实施例中,进行针对 CMV 的细胞介导的免疫应答测试并分析试验组分的储存稳定性。作为抗原,使用了长度为 8-12 个氨基酸的来自巨细胞病毒相关抗原的合成肽。在含有单糖 (葡萄糖) 的溶液中配制 CMV 相关合成肽并将其喷涂在血液收集管的内侧上并干燥。因此,抗原和单糖包含在一个组合物中。包含在血液收集管中的所述组合物的稳定性测试显示在室温下储存时试验活性随时间下降。此外,在将包含含有抗原和葡萄糖的喷涂干燥组合物的血液收集装置在 55°C 下储存超过 3 周 (21 天) 的时间后,CMV 装置的试验活性丧失。因此,各组合物和包含各组合物的收集管由于缺少储存稳定性而不适用于即用型试剂盒组分。从组合物中除去葡萄糖恢复了试验的稳定性和功能。因此,在组合物中包含单糖和抗原是不可行的。相反,为增加试验灵敏度,必须在制备孵育组合物期间向样品中单独添加单糖。

[0197] 相反地,本文所教导的包含抗原和非还原糖的组合物在延长的储存期间内也能维持增加的试验灵敏度。

[0198] 这些结果还由其他实验确认。将含有葡萄糖或不含葡萄糖的 CMV 管在 4°C、22°C、37°C 和 55°C 下储存三周并随后使用来自 4 个反应性供体和 1 个非反应性供体的血液样品进行测试。表 1 显示使用反应性供体获得的平均结果。在所示温度下,含有葡萄糖的 CMV 管的反应性低于 4°C 或 22°C 下储存的管且相对于用于制备 CMV 管的液体制剂 (参考标准) 显示显著的应答下降。相反地,缺少葡萄糖的管未显示各反应性丧失。

[0199] 表 1 :储存期间葡萄糖的影响。显示了对保留的倍数差异 (平均 IU/ml)

[0200]

	55°C	37°C	22°C	4°C
含有葡萄糖的 CMV 管	0.58	0.75	1.48	1.34

不含葡萄糖的 CMV 管	0.97	0.91	1.01	1.21
--------------	------	------	------	------

[0201] 实施例 3 :QFN-CMV 管中添加海藻糖对于 IFN- γ 应答的影响

[0202] QuantiFERON(QFN)CMV 是一种 CE 注册的试验,其监测针对来源于巨细胞病毒的抗原的 T 细胞免疫记忆。QFN-CMV 血液管含有肽,该肽被设计为特异性激活 CD8+T 细胞以产生干扰素 γ (IFN- γ)。这些管仅含有肽和肝素,不添加任何糖分子。

[0203] 该实验旨在研究向 QFN-CMV 管中添加非还原糖海藻糖时对于 IFN- γ 应答的影响。

[0204] 向 QFN-CMV 血液收集管中添加 0、1、5 或 10mg/ml 的海藻糖(水)溶液。随后向这四个管的每个中添加来自具有已知的抗 CMV T 细胞应答的 17 名健康供体的 1ml 血液,此外使用 Nil 管和促分裂原管作为对照。随后根据包装插页进行 QFN 试验。所有数值都扣除 Nil 值。针对各 QFN-CMV+0mg/ml 海藻糖(未处理对照)标准化以 IU/ml 为单位的 IFN- γ 水平以生成‘倍数变化’单位;从而控制应答量级的供体间差异。包括不具有可检测抗 CMV 免疫应答的健康供体以针对海藻糖诱导的非特异性 IFN- γ 进行控制。

[0205] 添加海藻糖导致 IFN- γ 平均水平的浓度依赖性增加(表示为 IFN- γ 对比匹配的未处理对照的倍数变化)。添加 5 和 10mg/ml 海藻糖时观察到效果的显著增加;使用 Friedman 检验和 Dunn 多重比较检验。结果见图 1 所示。未观察到 CMV 阴性对照供体中 IFN- γ 背景水平的显著增加(数据未显示)。

[0206] 向 QFN 试验中添加海藻糖显著提高了对血液收集管中含有的特异性抗原应答而产生的 IFN- γ 水平,而非非特异性地提高背景 IFN- γ 水平。

[0207] 实施例 4 :QFN-TB 管中添加海藻糖对于 IFN- γ 应答的影响

[0208] 为确认向评估肽特异性细胞免疫的试验(如 QuantiFERON(QFN)试验)中添加非还原糖海藻糖增强测试的定量结果的观察,制造添加有非还原糖的 QFN 管。制造 QFN 血液收集管以含有来自结核分枝杆菌(MTB)抗原 ESAT-6 和 CFP-10 的合成肽,其中不添加任何糖或添加非还原糖海藻糖。

[0209] 使用已建立的 QuantiFERON 平台技术测试来自使用 QuantiFERON Gold In Tube 试验确认具有 MTB 感染迹象的 20 名对象的全血,但使用上文所述经制造不具有糖(不含糖)或具有非还原糖(海藻糖)的修饰的 QFN TB 抗原管。根据是已建立试验的 QFT Gold 包装插页进行试验。在该成对临床分析中,在 TB 抗原管中包含非还原糖(海藻糖)显著增强了试验的定量应答($P = 0.0005$),如图 2 所示。来自管的数值(y 轴)以对数转换的 IFN- γ IU/ml 数值的形式显示(已扣除 nil 管数值)。进行成对单尾 t 检验以显示两组之间的统计显著性。结果清晰地显示,添加海藻糖增加了干扰素 γ 应答,如具有 TB 感染的对象中所示。

[0210] 实施例 5 :添加不同非还原糖增加定量 IFN- γ 应答

[0211] 使用其他非还原糖也显示观察到的增强效果。对于该实验,向 QFN CMV 抗原管和相应的 Nil 管中添加四种不同的非还原糖。为达到 2mg/ml 的最终血液浓度,向获自 5 名供体的全血中添加相应的蔗糖、海藻糖、甘露醇和棉子糖的 PBS 溶液。因此,对来自 5 名供体的血液进行 QFN 试验,其中使用不添加非还原糖(N/S)或添加非还原糖(蔗糖、海藻糖、甘露醇或棉子糖)的 QFN CMV 管。根据是已建立试验的 QFN 包装插页进行试验。结果见图 3 所示。x 轴(图 3)显示测试的条件。从相应 CMV 管中扣除背景(来自添加/不添加各糖的 Nil 管的数值)且在计算的非添加管(y 轴)上 IFN- γ 数值(IU/ml)的百分比增加。结果

显示,使用所有四种非还原糖都观察到了通过定量 IFN- γ (IU/ml) 测得的增加的 CMV 抗原应答。因此,所有测试的非还原糖都对 IFN- γ 应答具有有益效果。使用海藻糖时观察到最高的增加,之后是甘露醇、蔗糖和棉子糖。

海藻糖浓度对于IFN- γ 应答的影响（数值对CMV应答进行标准化） [n=17]

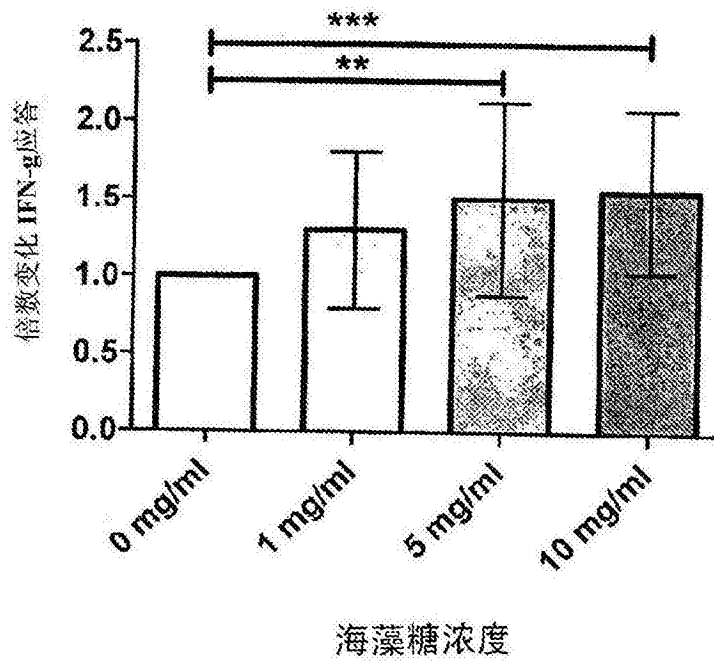


图 1

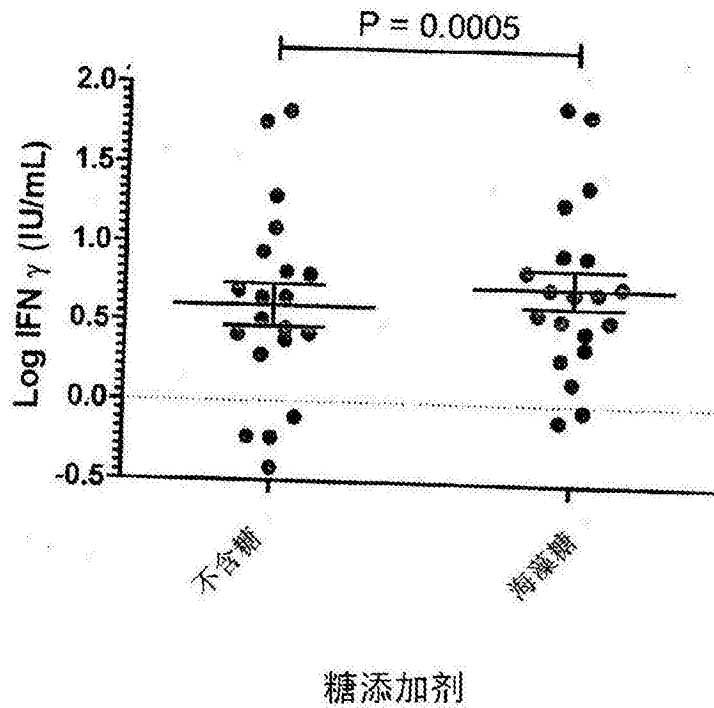


图 2

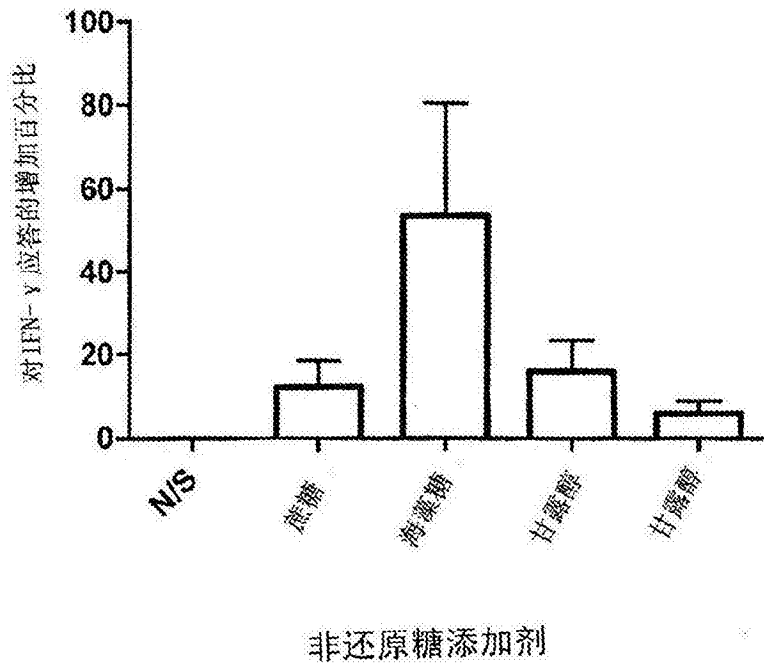


图 3

专利名称(译)	细胞介导的免疫应答试验		
公开(公告)号	CN105051537A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201380065249.4	申请日	2013-12-20
[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 A奈茨 C穆尼安		
发明人	J·伯勒 A·奈茨 C·穆尼安		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/5091 A61K39/12 A61K39/245 C12N2710/16122 C12N2710/16134 C12N2710/16222 G01N33/5047 C12N5/0634 C12N5/0638 C12N2500/34 G01N2333/57		
代理人(译)	余颖		
优先权	2013167355 2013-05-10 EP 61/746965 2012-12-28 US		
其他公开文献	CN105051537B		
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，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。本发明教导了基于细胞介导的免疫应答诊断对象对抗原的暴露，其具有增强的灵敏度，且通过在样品与抗原孵育期间添加非还原糖来实现。

海藻糖浓度对于qFN-CMV应答的影响（数值对CMV应答进行标准化）[n=17]

