



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102713619 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201080058756.1

(22)申请日 2010.12.21

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 102713619 A

(43)申请公布日 2012.10.03

(30)优先权数据  
61/289,880 2009.12.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2012.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/AU2010/001717 2010.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02011/075773 EN 2011.06.30

(73)专利权人 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 R·达拉斯海拉斯

(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

(51)Int.Cl.  
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101261276 A, 2008.09.10,  
DEETZ第.Gamma Interferon Scretion by Human Vγ2Vδ2 T Cells after Stimulation with Antibody against the T-Cell Receptor plus the Toll-Like Receptor 2 Agonist Pam3Cys.《Infection and Immunity》.2006,第74卷(第8期),第4505-4511页.

Jonathan B. Angel et al..Improvement in Cell-Mediated Immune Function during potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Therapy with Ritonavir plus Saquinavir.《The Journal of Infectious Diseases》.1998,第177卷第898-904页.

审查员 许珊萍

权利要求书4页 说明书26页 附图11页

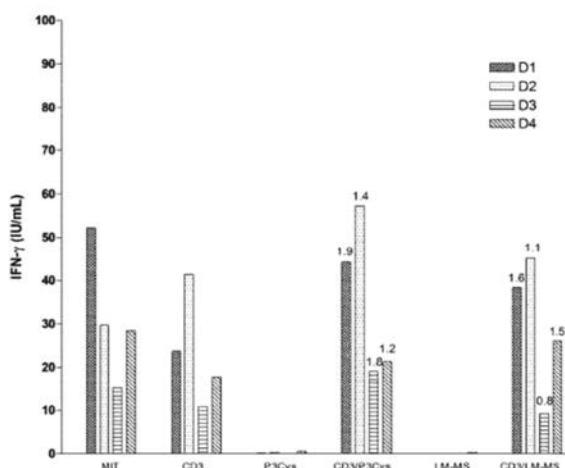
(54)发明名称

测量细胞介导免疫反应的试验

(57)摘要

本发明一般涉及基于免疫学的诊断试验领域。更特定地,本发明描述检测细胞介导免疫反应的方法。本发明还能测定病情,治疗试剂和环境污染物的免疫抑制作用。本发明的试验也能整合到病理学架构中以提供诊断报告系统和促进临床护理管理。

CD3 (UCHT1) /TLR-2 (1ug/mL) 共刺激



1. 增强获得性和先天免疫系统的多种试剂在制备检测产品中的用途,所述检测产品用于检测对象中细胞介导免疫反应活性,其中增强获得性免疫系统的试剂是选自抗CD3抗体的T细胞受体激动剂,而增强先天免疫系统的试剂是选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的To11样受体 (TLR) 激动剂;所述检测产品的使用方法包括将对象淋巴细胞的全血样品来源与所述多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的出现或增加,其中免疫效应分子的出现或水平指示对象的细胞介导免疫反应。

2. 刺激获得性和先天免疫反应的多种增强剂在制备检测产品中的用途,所述检测产品用于测定试剂是否诱导对象免疫抑制,其中刺激获得性免疫反应的增强剂是选自抗CD3抗体的T细胞受体激动剂,而刺激先天免疫反应的增强剂是选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的To11样受体 (TLR) 激动剂;所述检测产品的使用方法包括将接触待测定试剂后的对象淋巴细胞的全血样品来源与所述多种增强剂接触,并且检测来自淋巴细胞的免疫效应分子的出现和水平,其中免疫效应分子的水平确定试剂诱导的免疫抑制的水平。

3. 增强获得性和先天免疫系统的多种试剂在制备检测产品中的用途,所述检测产品用于检测对象病情是否诱导免疫抑制,其中增强获得性免疫系统的试剂是选自抗CD3抗体的T细胞受体激动剂,而增强先天免疫系统的试剂是选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的To11样受体 (TLR) 激动剂;所述检测产品的使用方法包括将有病情的对象淋巴细胞的全血样品来源与所述多种试剂接触,并测量来自淋巴细胞的免疫效应分子的出现和水平,其中免疫效应分子的水平指示病情诱导或与之相关的免疫抑制程度。

4. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象是人。

5. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述样品是未稀释的全血。

6. 如权利要求1或2或3所述的用途,其特征在于,所述样品包含构成待分析样品体积10%-100%的全血。

7. 如权利要求6所述的用途,其特征在于,所述全血构成待分析样品体积的50%-100%。

8. 如权利要求7所述的用途,其特征在于,所述全血构成待分析样品体积的80%-100%。

9. 如权利要求1或2或6中任一项所述的用途,其特征在于,所述样品是1 $\mu$ l-1000 $\mu$ l的小体积血液。

10. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述全血还用抗原孵育。

11. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述全血收集在包含肝素的试管中。

12. 如权利要求1或2或3所述的用途,其特征在于,所述TLR激动剂通过TLR-7/8,TLR-4或TLR-2刺激。

13. 如权利要求12所述的用途,其特征在于,所述激动剂是R848。

14. 如权利要求1或3所述的用途,其特征在于,所述增强获得性免疫系统的试剂通过T细胞受体依赖性方式刺激。

15. 如权利要求2所述的用途,其特征在于,所述刺激获得性免疫反应的增强剂通过T细胞受体依赖性方式刺激。

16. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述免疫效应分子是细胞

因子。

17. 如权利要求16所述的用途,其特征在于,所述细胞因子是IFN- $\gamma$ 。

18. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述免疫效应分子用其特异性抗体检测。

19. 如权利要求18中所述的用途,其特征在于,所述免疫效应分子使用ELISA检测。

20. 如权利要求18所述的用途,其特征在于,所述免疫效应分子使用酶联免疫斑点法检测。

21. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述对象具有由选自分枝杆菌属,葡萄球菌属,链球菌属,伯疏氏螺旋体属,大肠杆菌,沙门氏菌,梭状芽孢杆菌属,志贺菌属,变形杆菌属,芽孢杆菌属,疱疹病毒,乙型或丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)的病原体引起的感染或由其产生的疾病。

22. 如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述对象具有由选自分枝杆菌属,葡萄球菌属,链球菌属,伯疏氏螺旋体属,大肠杆菌,沙门氏菌,梭状芽孢杆菌属,志贺菌属,变形杆菌属,芽孢杆菌属,疱疹病毒,乙型或丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)的病原体引起的感染或由其产生的疾病。

23. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述病情是结核分枝杆菌感染或结核病(TB)。

24. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述病情是肝炎病毒或HIV感染。

25. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:脱发斑秃,强直性脊柱炎,抗磷脂综合征,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,大疱性类天疱疮,心肌病,口炎性腹泻皮炎(celiac sprue-dermatitis),慢性疲劳综合征(CFIDS),慢性炎症脱髓鞘,慢性炎症多神经病,瘢痕性类天疱疮,疱疹样皮炎,纤维组织肌痛,肾小球肾炎,格雷弗氏病,急性多发性神经根炎,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,多腺体综合征,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,干燥综合征,全身肌强直综合征,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。

26. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:盘状红斑狼疮,系统性红斑狼疮,变应性肉芽肿性血管炎。

27. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:脱发斑秃,强直性脊柱炎,抗磷脂综合征,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,大疱性类天疱疮,心肌病,口炎性腹泻皮炎(celiac sprue-dermatitis),慢性疲劳综合征(CFIDS),慢性炎症脱髓鞘,慢性炎症多神经病,瘢痕性类天疱疮,疱疹样皮炎,纤维组织肌痛,肾小球肾炎,格雷弗氏病,急性多发性神经根炎,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,多腺体综合征,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,干燥综合征,全身肌强直综合征,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。

28. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:自体免疫阿狄森氏病,冷凝集素病,白塞氏病,基本混合冷球蛋白血症,CREST综合征和克隆氏病。

29. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:自体免疫阿狄森氏病,冷凝集素病,白塞氏病,基本混合冷球蛋白血症,CREST综合征和克隆氏病。

30. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下述的病情:盘状红斑狼疮,系统性红斑狼疮,变应性肉芽肿性血管炎。

31. 如权利要求25-30中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象患有乳糜泻。

32. 如权利要求25-30中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象患有自体免疫糖尿病。

33. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:AIDS相关癌症,听神经瘤,腺样囊腺癌,特发性髓样化生,秃头症,肛门癌,再生障碍性贫血,共济失调毛细血管扩张症,基底细胞癌,骨瘤,脑和中枢神经系统肿瘤,乳腺癌,儿童癌症,绒毛膜癌,促纤维组织增生性小细胞癌,导管癌,内分泌癌,肝外胆道癌,视网膜母细胞瘤,胆膀胱癌,胃癌,胃肠道癌,泌尿生殖系统的癌症,妇科癌症,恶性血液肿瘤,头颈癌,组织细胞增生症,人类乳头状瘤,水囊状胎块,高钙血症,下咽癌,胰岛细胞癌,肾癌,喉头癌,李-佛美尼综合症,唇癌,肝癌,肺癌,淋巴性水肿,淋巴瘤,黑色素瘤,间皮瘤,转移癌,蕈样肉芽肿,鼻腔癌,鼻咽癌,神经纤维瘤病,奈梅亨破损综合症,眼癌,食道癌,口腔癌,口咽癌,胰腺癌,鼻窦癌,副甲状腺癌,腮腺肿瘤,垂体肿瘤,先天性皮肤异色症,肉瘤,神经鞘瘤,皮肤癌,脊髓肿瘤,鳞状细胞癌,胸腺癌,甲状腺癌,移行细胞癌和滋养细胞癌。

34. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:肾上腺皮质癌,肾恶性横纹肌肿瘤,肾胚细胞瘤,前列腺癌,肾母细胞瘤,范科尼贫血,肠瘤,白血病,郎格罕细胞组织细胞增多病,默克尔细胞癌和沃尔登斯特伦氏巨球蛋白血症。

35. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:结直肠癌,塞扎里(Sezary)综合征和膜板块蛋白异常癌。

36. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:儿童脑肿瘤,儿童白血病,中枢神经系统肿瘤,生殖细胞瘤,妊娠滋养细胞疾病肿瘤,造口术卵巢癌,阴茎癌,睾丸癌,眼内黑色素瘤,多发性内分泌肿瘤,输卵管癌,子宫肉瘤,子宫癌,阴道癌,外阴癌,遗传乳腺癌,男性乳腺癌,急性淋巴细胞性白血病,急性髓细胞白血病,慢性淋巴细胞性白血病,慢性粒细胞白血病,毛细胞白血病,骨髓瘤,骨髓增生性疾病,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,肝细胞癌,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,骨肉瘤,软组织肉瘤,皮肤基底细胞癌,非黑色素瘤皮肤癌,非小细胞肺癌(NSCLC),小细胞肺癌(SCLC),小肠肿瘤,泌尿系统的癌症,类癌瘤,周边神经外胚层肿瘤,唾液腺肿瘤,皮肤鳞状细胞癌。

37. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有神经胶质瘤。

38. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有脑干胶质瘤。

39. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:星形胶质细胞瘤,髓母细胞瘤和神经母细胞瘤。

40. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有选自下列的癌症:室管膜瘤,子宫颈癌,子宫内膜癌,儿童软组织肉瘤,肺泡软组织肉瘤,纤维肉瘤,卡波西肉瘤,平滑肌肉瘤,脂肪肉瘤,横纹肌肉瘤,滑膜肉瘤,皮肤T细胞淋巴瘤,骨髓增生异常综合征,真性红细胞增多症,膀胱癌,膀胱移行细胞癌,肾-肾盂-/-输尿管移行细胞癌,尿道癌,胃肠道类癌肿瘤。

41. 如权利要求1或2或3中任一项所述的用途,其特征在于,所述对象有隆凸性皮肤纤维肉瘤。

42. 选自抗CD3抗体的T细胞受体激动剂和选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的Toll样受体激动剂在制备检测产品中的用途,所述检测产品用于检测对象中细胞介导免疫反应活性,所述检测产品的使用方法包括将对象淋巴细胞的全血样品来源与所述T细胞受体激动剂和所述Toll样受体激动剂接触,和检测来自T细胞的免疫效应分子水平的出现或增加,其中免疫效应分子的出现或水平指示对象的细胞介导免疫反应水平,其中反应水平指示选自以下的疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段:病原体感染,自体免疫疾病,癌症,炎性病症和接触毒性试剂。

43. 增强获得性和先天免疫系统的试剂在生产细胞介导免疫反应诊断试剂盒中的应用,所述诊断试剂盒的使用方法包括:将增强获得性和先天免疫系统的试剂与包括T细胞和NK细胞的全血样品来源孵育,并且检测效应分子的出现或提高,其中增强获得性免疫系统的试剂是选自抗CD3抗体的TCR激动剂,增强先天免疫系统的试剂是选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的TLR激动剂。

44. 一种诊断报告系统,所述系统允许用户测定对象细胞介导免疫反应状态,所述诊断报告系统包括:

(a) 通过通讯网络接收来自用户的数据的处理系统,所述数据的形式是参比对照能关联到细胞介导免疫反应状态的免疫效应分子水平,在全血样品中的淋巴细胞接触能增强获得性和先天免疫反应的试剂之后测量免疫效应分子,其中增强获得性免疫反应的试剂是选自抗CD3抗体的T细胞受体激动剂,而增强先天免疫系统的试剂是选自Pam3CSK4、脂多糖、咪唑喹啉化合物的Toll样受体(TLR)激动剂;

(b) 通过单变量或多变量分析处理对象数据得出免疫反应状态值的处理系统;

(c) 根据免疫反应状态值与预定值的比较结果测定对象状态的处理系统;和

(d) 通过通讯网络将对象状态指标发送用户的处理系统。

45. 如权利要求44所述的诊断报告系统,其中所述免疫效应分子水平是免疫效应分子浓度。

## 测量细胞介导免疫反应的试验

[0001] 申请数据

[0002] 本发明与2009年12月23号提交的题为“An Assay(试验)”的美国临时专利申请号61/289,880相关并要求优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明一般涉及基于免疫学诊断试验的领域。更特别地,本发明考虑检测细胞介导免疫反应的方法。本发明还能测定病情、治疗剂和环境污染物的免疫抑制作用。本发明的试验也能整合到病理学架构中以提供诊断报告系统和促进临床护理管理。

### 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] 基于免疫学的诊断提供检测各种病情的重要工具。考虑到免疫系统内组分的特异性,更是如此。尽管有此特异性,基于免疫学的诊断并不总是必须有足够敏感性以检测低水平的适应性和/或先天免疫活性,例如响应低度感染或出现持续低水平感染或显示免疫缺陷或任何免疫抑制形式的对象。因为适应性和先天免疫潜能,需要发展与细胞介导免疫反应相关的敏感性增强的诊断方法。在对已接触或正在显示诱导或关联免疫抑制的病情和试剂的对象尤其如此。

[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,然后是检测效应分子,例如活化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细胞反应。

[0008] 评价对象的细胞介导免疫反应的能力在控制免疫缺陷和免疫抑制中特别重要。免疫缺陷的表征是有效增加免疫反应的能力下降。这种反应的受损或缺失可能来自原发性或获得性(继发性)免疫缺陷。

[0009] 原发性免疫缺陷(PID)可基因遗传,且表征为获得性或先天免疫系统的独特成分缺失(Hu和Gatti,Curr Opin Allergy Clin Immunol.8(6):540-546,2008)。然而,大部分免疫缺陷是获得性(继发性),并能由病原试剂诱导,如随着HIV感染发生;由药物诱导,如器官移植后免疫抑制治疗;由病情诱导,如在癌症(如白血病,淋巴瘤)中发生;或由环境污染物和污染物质诱导。

[0010] 免疫缺陷的分子基础多样化,然而,细胞介导免疫在调节很多观察到的临床表现中有重要作用。目前,免疫缺陷综合征以依赖于病原的特定方式诊断和管理。

[0011] 例如,HIV感染的主要特点是CD4<sup>+</sup>T细胞逐渐丧失和整体免疫功能受损,包括对病原例如巨细胞病毒(CMV)和乙型肝炎病毒(HBV)的抗原特异性获得性免疫反应受损(Douek等,Annu.Rev.Med.60:471-84,2009和Chang等,J. Virol.83:7649-58,2009)。因此,CD4<sup>+</sup>T

计数和病毒载量是HIV感染的重要替代标记,并已经广泛作为免疫功能障碍和预防治疗后渐进感染及免疫重建的有效预测(Hengel和Kovacs, *J. Infect. Dis.* 188(12):1791-3, 2003)。然而,当机会性感染在正常CD4<sup>+</sup>T细胞计数和低病毒载量存在情况下出现时,很多情况中临床疾病不与这些替代标记特定预测的免疫功能水平相关(Solomon等, *J. Infect. Dis.* 187:1915-23, 2003)。

[0012] 相似地,还以特定方式监控患者的细胞免疫缺陷状态,所述患者进行实体器官移植(SOT)并接受抑制免疫系统药物(免疫抑制剂)作为抗排异测量的患者。通常,监控患者免疫抑制剂药物水平,以及监控常规血液计数和移植、医院或社区获得性感染的发生(Schrem等, *Dtsch Arztebl Int.* 106(9):148-156, 2009)。

[0013] 与很多当前用于监控和定义疾病状态相关免疫缺陷的标记关联的根本问题是细胞介导免疫的缺失。已开发了一些T细胞功能试验来检测对有丝分裂原,例如植物血细胞凝集素(PHA)、商陆促分裂原和伴刀豆球蛋白(ConA)的淋巴增殖反应然而,这些只检测T细胞功能能力;所述细胞是参与细胞介导免疫的细胞子集。重要的是,先天免疫机理对宿主防御贡献重大变得日益明显,其通过单独作用或增加特异性T细胞反应(Cooper等, *Hematology*: 314-30, 2003)因此,先天(自然杀伤(NK)细胞)和获得性(T细胞)免疫细胞的功能反应一起形成细胞介导免疫的更广泛分析。

[0014] 评价细胞介导免疫的能力临床上重要。例如,超过三千三百万成人和儿童被HIV感染(2008年全球艾滋病疫情报告(2008Report on the Global AIDS Epidemic),UNAIDS; ISBN 9789291737116)并且目前每年全球进行约100,000例实体器官移植(Matesanz等, *Transplant Proc.* 41(6):2297-301, 2009)。

[0015] 先天免疫功能障碍已经涉及到HIV感染中,所述全血IFN- $\gamma$ 分析用于监控对TLR-7/8激动剂化合物(咪唑喹啉,R848)的先天免疫反应(Nowroozalizadeh等, *Cytokine* 46: 325-31, 2009)。另外,检测功能T细胞反应(Cyflex ImmuKnow(注册商标),如US 2003/0199006A1所述)的诊断设备检测来自PHA刺激CD4<sup>+</sup>细胞的ATP生成(Kowalski等, *J Immunotoxicol.* 4(3):225-32, 2007)。特定地,Cyflex分析已经显示在SOT设置的临床应用,从而包括感染和排异在内的不良事件能得到有效控制。

[0016] 需要开发一种能评价对象中先天和获得性细胞介导免疫反应的组合功能状态的试验,并测定能诱导免疫抑制的病情和试剂。

## 发明内容

[0017] 本发明提供评价对象中细胞介导免疫的状态和潜能的方法。本文所述方法能在获得性和先天免疫反应的共同刺激下部分预测。这提供目标对象中包括任何免疫抑制程度的细胞介导免疫潜能的预测检测。在一个实施方式中,全血或其部分的细胞与刺激淋巴细胞获得性和先天免疫反应的一种或多种试剂接触。细胞介导免疫反应的水平通过测量免疫细胞生成的效应分子的出现或水平来确定。在特定实施方式中,全血或其部分包括T细胞和NK细胞。一种或多种试剂刺激或加强通过T细胞的获得性免疫反应和通过NK细胞的先天免疫反应。因此,所述试验检测获得性和先天细胞介导免疫的组合潜能。

[0018] 与单独测量获得性或先天免疫活性相比,组合免疫反应提供细胞介导免疫反应性更好的检测。另外,所述试验能用小血液体积例如1 $\mu$ l-1000 $\mu$ l进行,并因此该试验适合手指

点刺和基于毛细管取样。本文也考虑大体积试验,例如1.5ml-200ml,包括5ml,10ml和20ml。

[0019] 评价组合的获得性和先天免疫的能力很重要,例如,用于鉴定病情和治疗及环境试剂,所述试剂诱导可造成更大继发性感染风险的免疫抑制。

[0020] 因此,本发明的一方面描述检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测免疫细胞生成的免疫效应分子水平,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平。

[0021] 本发明的另一方面提供检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平,其中免疫反应的水平指示选自以下列表的疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段:病原体感染,自体免疫疾病,癌症,炎症病症,接触毒性试剂,接触治疗试剂和免疫缺陷。

[0022] 本发明的另一方面描述检测对象中疾病或病症的出现、缺失、水平或阶段的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示疾病或病症。

[0023] 甚至本发明的另一方面提供监控对象响应疾病或病症的治疗方案的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与用于治疗方案的试剂接触,和在能加强获得性和先天免疫的一种或多种分子存在情况下,检测来自免疫细胞的免疫效应分子的出现或水平增加,其中免疫效应分子的水平指示治疗方案的功效。

[0024] 本发明还描述测定试剂是否诱导对象免疫抑制的方法,所述方法包括将接触试剂后的对象淋巴细胞来源与刺激获得性和先天免疫的一种或多种增强剂接触,并且检测来自淋巴细胞的效应分子的出现和水平,其中效应分子的水平确定所述试剂诱导的免疫抑制的水平。

[0025] 在一个实施方式中,血液样品用TLR激动剂和TLR激动剂共刺激。

[0026] 根据此方面,所述试剂可以是药物或环境毒药。

[0027] 本发明方法也能称为“试验”。本文的试验用于评价对象的普通免疫反应或检测对特定病情的免疫反应,所述病情例如自体免疫疾病,乳糜泻,癌症,致病生物或试剂的感染,接触毒性试剂或药物和免疫缺陷或免疫抑制病症,如由某一病情诱导。淋巴细胞来源是便捷的全血,但是本发明描述任何淋巴细胞来源的应用,包括含淋巴细胞的分离样品以及经历细胞分离和/或清除的样品。血液的微样品例如衍生自针刺和毛细管方法,也形成本发明的一部分。样品包括至少T细胞(T淋巴细胞)和NK细胞(NK淋巴细胞)。提及“免疫细胞”包括T细胞。

[0028] 可选地,单糖例如右旋糖或葡萄糖加入到反应混合物中。提及“全血”包括没有稀释的全血,和以约10%-约100%总样品分析体积(即反应混合物)的体积用于试验的全血,包括约50%-约100%和80%-约100%。分析体积范围可以为1 $\mu$ l-大于1000 $\mu$ l,包括1.5ml-200ml,例如5ml-20ml。

[0029] 一类试剂可用于增强获得性和先天免疫或者两种或更多试剂可共同使用。示例包括用TCR激动剂和TLR激动剂共刺激。淋巴细胞也可接触特定抗原,以检测对象的抗原诱导

获得性和先天免疫反应的组合能力。

[0030] 所述对象可以是人或非人动物。因此,本发明有人体医学,兽医和畜牧业应用。人在本发明实践中是特别有用的对象。

[0031] 另一个实施方式中,本发明描述检测病情是否诱导对象免疫抑制的方法,所述方法包括将有病情的对象淋巴细胞来源与加强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,并测量来自淋巴细胞的免疫效应分子的出现或水平,其中免疫效应分子的水平指示诱导病情或与之相关的免疫抑制程度。

[0032] 试剂盒和皮肤试验也形成本发明的一部分。

[0033] 一个实施方式中,样品是全血,从包含试剂或孵育中加入试剂的收集管内收集。一般,血液在肝素存在下维持。当加入或后续加入血液时,肝素可在试管中。血液收集管的应用与标准自动化实验室系统相容,这些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接触全血和血浆,因而降低实验室人员接触病原体的风险,所述病原体例如人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)。另外,使用收集管进行孵育使所述试验的灵敏度高于先前所用24孔培养板。

[0034] 因此本发明提供增强的细胞介导免疫试验,所述试验包括在一个实施方式中使用收集管,可选单糖例如右旋糖和用加强获得性和先天免疫的一种或多种试剂的孵育步骤。培养步骤一般5-50小时,例如24小时。可选地加入抗原。

[0035] 免疫效应分子一般是细胞因子,例如但不限于IFN- $\gamma$ ,白细胞介素(例如IL-2,IL-4,IL-6,IL-10,IL-12或IL-13),转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )或粒细胞或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(分别是G-CSF和GM-CSF)。其他效应分子在表6中列出。免疫效应分子的出现或水平可根据分子自身水平或编码该分子基因表达的程度测定。

[0036] 本发明试验也能用于治疗方案管理的个性化医疗方法和/或作为病理学架构平台部分。此平台可以基于或不基于网络。因此也提供商业方法,其中在运输管中收集血液,然后在定义位点分析细胞介导免疫反应,随后结果通过合适结构以电子报告形式送达临床护理提供者。

[0037] 另外,可以小体积血液进行试验的能力对儿童,老年和体弱人群有用。

[0038] 附图简要说明

[0039] 一些图片包括彩色表现或实体。彩色照片可向专利权所有人要求或从合适的专利局获得。如从专利局获得,可能需要交费。

[0040] 图1A-C是图形表述,显示来自全血培养物的单独刺激物IFN- $\gamma$ 反应。正常健康供体群散布,使用TCR刺激物有丝分裂原(A)和抗CD3抗体(B)或TLR刺激物R848(C)。

[0041] 图2A-C是图形表述,显示抗CD3抗体(TCR激动剂)和不同TLR激动剂的协同。(A) TLR-2; Pam3CSK4和脂甘露聚糖, (B) TLR-4; LPS(脂多糖)和(C) TLR-7/8; R848(咪唑喹啉)化合物。图片上的数字显示相比抗CD3抗体单独刺激培养物,用TLR/抗CD3抗体共刺激培养物的IFN- $\gamma$ 反应增加倍数。

[0042] 图3是图形表述,显示使用TCR/TLR共刺激的协同以在正常健康个体中设定界限(临界值)IFN- $\gamma$ 反应。这可设定健康人群参考范围,从而能观察免疫缺陷个体的IFN- $\gamma$ 反应下降。因此,若反应落在健康人群临界值(界限)内时,可推断来自药物治疗或疾病的免疫抑制测量。

[0043] 图4是图形表述,显示在来自治疗(TCR+TLR激动剂)和未治疗(NIL)全血的人血浆中检测多个分析物。通过用抗CD3抗体(TCR激动剂)和TLR-7/8激动剂;R848(咪唑喹啉)的组合刺激来治疗人全血。数个趋化因子,细胞因子和胞外信号分子只在用TCR和TLR激动剂同时刺激的全血的血浆中发现(蓝色条;TCR+TLR)。与未治疗全血相比,数个其他分子上调(红色条;NIL)。

[0044] 图5的图形显示与HIV感染和正常健康组中用全血和单独TCR激动剂或TLR激动剂刺激相比,全血培养物的双重刺激物(TCR+TLR) IFN- $\gamma$  反应间观察到的协同。研究人群包括(i)未处理HIV阳性(源自南非);和(ii)正常健康供体(源自澳大利亚)。人群中值见表7。

[0045] 图6的图形显示HIV感染组的组合激动剂(TCR+TLR)刺激的全血中,观察到的IFN- $\gamma$  反应水平和CD4T细胞计数间的关联性。

[0046] 图7是图形表述,显示在给定供体中能测定免疫抑制剂抑制浓度的TCR和TLR激动剂组合刺激全血。

[0047] 发明详述

[0048] 整篇说明书中,除非上下文需要另外说明,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者元件或整数组而不排除任何其他元件或整数或者元件或整数组。

[0049] 本对象说明书所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”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“试剂”包括单一试剂,和两种或更多试剂;提及“发明”包括发明的单个或多个方面;等等。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T细胞和先天免疫系统细胞,例如NK细胞。

[0050] 提及“制剂”,“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,例如单独提供制剂或单独使用或分散或分散前一起混合的两部分组合物。例如,多部分试验包可以有分别加强获得性和先天免疫维持的两种或更多制剂。在一个实施方式中,两种制剂是TCR激动剂和TLR激动剂。因此,本发明的此方面包括制剂,所述制剂干燥和疏松或固定到试验包的分隔墙或固体支持物。“组合”也包括含获得性免疫刺激物和先天免疫刺激物的融合或嵌合分子。获得性免疫刺激物可以通过T细胞受体依赖性或非依赖性方式调节获得性免疫。TCR激动剂的示例是抗CD3抗体。TLR激动剂包括TLR-7/8激动剂,例如R848(咪唑喹啉)。

[0051] 本发明部分通过来自接触获得性和先天免疫增强的淋巴细胞的效应分子生成增加来预测。这使得试验更灵敏以评价对象中细胞介导免疫反应。因此,本发明提供检测、评价或另外监控对象中细胞介导反应的试验,这是通过测量由获得性和先天免疫增效剂刺激的T细胞效应分子的出现或水平。淋巴细胞与增强获得性和先天免疫的试剂接触。一般使用至少两种试剂,其中至少一种增强获得性免疫(通过T细胞)且至少一种增强先天免疫(通过NK细胞)。或者,使用包括获得性免疫刺激物和先天免疫刺激物的嵌合分子。获得性免疫刺激物可以通过T细胞受体依赖性或非依赖性方式。因此,本发明提供检测对象中细胞介导反应的方法,并进而提供检测病情或试剂是否诱导免疫抑制或与之相关的方法。所述方法也能诊断传染病,病理状况,测定免疫活性水平和评价对内源或异源试剂的获得性和先天免疫细胞反应,以及评价接触毒性试剂例如铍或其他毒剂。

[0052] 因此,本发明的方面描述检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测免疫细胞生成的免疫效应分子水平,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平。

[0053] 本发明的另一方面提供检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平,其中免疫反应的水平指示选自以下列表的疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段:病原体,自体免疫疾病,癌症,炎性病症和接触毒性试剂。

[0054] 而本发明的另一方面提供检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示细胞介导免疫反应水平并指示选自以下列表的疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段:病原体,自体免疫疾病,癌症,炎性病症和接触毒性试剂。

[0055] 本发明的另一方面描述检测对象中疾病或病症的出现、缺失、水平或阶段的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示疾病或病症。

[0056] 本发明还描述测定试剂是否诱导对象中免疫抑制的方法,所述方法包括将接触试剂后的对象淋巴细胞来源与刺激获得性和先天免疫的一种或多种增强剂接触,并且检测来自淋巴细胞的效应分子的出现和水平,其中效应分子的水平确定所述试剂诱导的免疫抑制的水平。

[0057] 根据此方面,所述试剂可以是药物或环境毒药。

[0058] 在一个实施方式中,血液样品用TCR激动剂(如抗CD3抗体)和TLR激动剂(如TLR-7/8激动剂,咪唑啉(R848))共刺激。

[0059] 因此,本发明描述检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与提高获得性和先天免疫的TCR激动剂和TLR激动剂接触,和检测从免疫细胞生成的免疫效应分子水平,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平。

[0060] 本发明的另一方面提供检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞样品来源与增强获得性和先天免疫的TCR激动剂和TLR激动剂接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平的增加,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应水平,其中反应水平指示选自以下列表的疾病或病症的存在或缺失或水平或阶段:病原体感染,自体免疫疾病,癌症,炎性病症和接触毒性试剂。

[0061] 也提供增强获得性和先天免疫的TCR激动剂和TLR激动剂在细胞介导免疫反应的诊断试验生产中的应用,所述方法通过用增强获得性和先天免疫系统的一种或多种分子孵育淋巴细胞和检测效应分子的出现或提高。

[0062] 另一个实施方式中,本发明描述检测对象病情是否诱导免疫抑制的方法,所述方法包括将有病情的对象淋巴细胞来源与加强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,并测量来自淋巴细胞的免疫效应分子的出现或水平,其中免疫效应分子的水平指示诱导病情或与之相关的免疫抑制程度。

[0063] 也提供增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂在细胞介导免疫反应的诊断试验生产中的应用,所述方法通过用增强获得性和先天免疫的一种或多种分子孵育淋巴细胞和检测效应分子的出现或提高。

[0064] 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、炎性病症和/或接触药剂或毒性试剂如铍或其他环境毒剂。测量“免疫效应分子”包括检测一种或多种不同类型的分子。

[0065] 提及获得性和先天免疫潜能,包括刺激T细胞受体依赖性和/或非依赖性免疫和To11样受体(TLR)依赖性免疫,例如由NK细胞介导。“免疫细胞”指包括“T细胞”。也可加入额外试剂以调控调节T细胞(T调节细胞)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。

[0066] 在特定实施方式中,T调节细胞是活性被抑制的免疫反应抑制细胞。

[0067] 因此,本发明还针对检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象的调节T细胞来源与试剂接触,所述试剂选自(i)调节T细胞抑制子的抑制剂;和(ii)免疫增强细胞或其亚群的激活剂;并将T细胞与增强获得性和先天免疫的一种或多种试剂接触,和测量来自免疫细胞的免疫效应分子水平的提高,其中免疫效应分子水平指示对象的细胞介导反应的水平。

[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WO 2005/118629。然而,合适试剂的其他示例包括刺激试剂,例如通过To11样受体(TLR)和/或其他机理作用的CpG分子。因此,作为TLR调节试剂的包含一种或多种寡核苷酸的CpG也形成本发明的一部分。

[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调节试剂进行。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] 根据本发明的不同方面,淋巴细胞/免疫细胞也可接触抗原以测量抗原诱导的获得性和先天免疫反应。

[0071] 提及“对象”,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。因此本发明可用于人体医学,以及畜牧和兽医和野生应用,包括马、狗和骆驼比赛行业。例如,本发明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。

[0072] 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特定组和群体。

[0073] 另一个实施方式中,对象是人且细胞介导的免疫反应试验用于筛选对致病微生物、病毒和寄生虫的响应,发展潜能或监控免疫情况,乳糜泻,监控对象响应肿瘤攻击和测定任何免疫缺陷或免疫抑制的出现。后者可出现,例如由包括多种化疗试剂的某些药物引起。或者,接触环境毒剂或污染物。

[0074] 免疫效应分子可以是响应细胞活化或抗原刺激生成的某一范围分子的任何一种。尽管干扰素(IFN)例如IFN- $\gamma$ 是特别有用的免疫效应分子,其他包括细胞因子,例如白介素(IL)如IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12或IL-13,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ ),集落刺激因子(CSF)例如粒细胞(G)-CSF或粒细胞巨噬细胞(GM)-CSF,以及许多其他分子如补体通路中的补体或组分。可概括的其他效应分子包括表6所列的那些。

[0075] T细胞受体激动剂的示例包括PHA,葡萄球菌肠毒素B(SEB),CpG寡核苷酸,T细胞受体复合物的抗体和抗CD3抗体。不依赖T细胞受体的获得性免疫刺激物示例包括PMA和ConA。TLR激动剂包括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),咪唑喹啉化合物,例如R848(TLR-7/8配体)和CpG寡脱氧核苷酸(TLR-9配体)。至于选择TLR激动剂,激动剂按降序选自TLR-7/8>TLR-4>TLR-3>TLR-2。

[0076] “CpG分子”指包括CpG序列或基序的寡核苷酸。本发明延伸至Toll样受体(TLR)功能或免疫系统其他方面的任何调节剂。

[0077] 本发明也提供检测对象中细胞介导免疫反应活性的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与TLR激动剂和获得性免疫刺激物接触,和检测来自免疫细胞的免疫效应分子水平,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导免疫反应。

[0078] 本发明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,接触炎性病症,接触药物,接触毒性试剂例如铍或其他毒剂或污染物以及免疫缺陷或免疫抑制例如由病情诱导。

[0079] 获得性和先天免疫试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。试剂可用于干燥形式,在使用前或期间重建。相似地,如果包括抗原,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。

[0080] 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,本发明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”,包括没有被例如用组织培养,培养基,试剂,赋形剂等稀释的全血。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,而没有离开包括“全血”的样品。

[0081] 也可使用小体积血液,例如 $1\mu\text{l}$ - $1000\mu\text{l}$ 。示例包括 $5\mu\text{l}$ , $10\mu\text{l}$ , $20\mu\text{l}$ , $50\mu\text{l}$ , $100\mu\text{l}$ 和 $500\mu\text{l}$ 和其间的部分。因此,样品体积包括约 $1\mu\text{l}$ -约 $200\mu\text{l}$ ,包括 $1\text{ml}$ , $5\text{ml}$ , $10\text{ml}$ 和 $20\text{ml}$ 。

[0082] 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接触全血和血浆,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)。

[0083] 孵育步骤与收集管的组合特别有效并增强试验的灵敏度,如在单糖例如右旋糖或葡萄糖存在下孵育细胞的可选特性。

[0084] 细胞介导免疫系统的细胞丧失在对象抽血后的延长期增加全血中免疫反应的能力,并且没有干扰的反应在抽血后约24小时常常严重降低或缺失。人工减少和对专门塑料制品的需求允许在护理地点用抗原进行细胞介导的刺激,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- $\gamma$  和其他细胞因子或免疫效应分子在血浆中稳定,因此,样品能在不需要特殊条件或快速要求情况下存储,或运输。

[0085] 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小时时间段特别合适。

[0086] 检测细胞介导免疫的能力对评价对象能力重要,所述能力包括对病原体例如微生物或病毒或寄生虫感染的响应,增加自体免疫反应例如自体免疫糖尿病或保护抵御癌症或其他肿瘤情况或检测炎症病症或检测对象对毒性试剂例如铍的接触或敏感性。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情。因此,提及“检测对象的细胞介导免疫反应”,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,测定组合的获得性和先天免疫反应。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。

[0087] 在一个实施方式中,造成免疫抑制的病情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。

[0088] 病原体或感染原包括细菌,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。

[0089] 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,抗磷脂综合征,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),慢性疲劳综合征(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综合征,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,急

性多发性神经根炎,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,多腺体综合征(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,干燥综合征,全身肌强直综合征,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。

[0090] 通常评价接触传染实体的对象的潜在或实际细胞介导反应非常重要。本发明方法也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。

[0091] 能导致免疫抑制的其他病情包括炎症病情。

[0092] 本发明描述的炎症病情示例包括但不限于,导致某些区域变红、肿胀、疼痛和发热感觉响应的疾病和紊乱,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。

[0093] 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,腺样囊腺瘤,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,骨瘤,肠瘤,脑干胶质瘤,脑和中枢神经系统肿瘤,乳腺癌,中枢神经系统肿瘤,类癌瘤,子宫颈瘤,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,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,骨髓增生异常综合征,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,塞扎里综合征,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。

[0094] 如上所示,淋巴细胞免疫细胞还可接触抗原以测量抗原诱导的获得性和先天组合免疫。

[0095] 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。

[0096] 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,例如放射性免疫测定、夹心法,ELISA和酶联免疫斑点法。“抗体”包括抗体部分,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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 因此,另一方面本发明描述检测对象含淋巴细胞的样品中免疫效应分子的方法,所述方法包括将样品或等分样品与对免疫效应分子或其抗原片段特异的抗体在足以形成抗体-效应物复合体情况下接触一段时间,并且然后检测复合体,其中在淋巴细胞与增强获得性和先天免疫系统的一种或多种试剂孵育后产生免疫效应分子。

[0100] “样品”包括全血或其包括淋巴细胞的部分。此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”也包括约1 $\mu$ l-1000 $\mu$ l的小体积样品,包括5 $\mu$ l,10 $\mu$ l,20 $\mu$ l,50 $\mu$ l和100 $\mu$ l。

[0101] 广泛的免疫试验技术可参见美国专利号4,016,043,4,424,279和4,018,653。

[0102] 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体,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,或通过对比包括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。

[0103] 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。待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)以使结合抗体中存在的任何亚基。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。二抗连接报道分子,用于指示二抗与效应分子的结合。

[0104] 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所提及一抗的经标记抗体的结合来测定。

[0105] 通过本说明书所用的“报道分子”,指通过分子其化学性质提供可分析鉴定的信号,能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道分子是酶,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。酶免疫测定的情况中,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, $\beta$ -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为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,本方面延伸至基本同时的分析。

[0106] 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。

[0107] 可以使用一系列其他检测系统,包括胶体金和本发明涵盖的所有这种检测系统。

[0108] 本发明也包括遗传分析,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。

[0109] 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。使用荧光团在本发明实践中特别有用。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。

[0110] 表1

[0111] 合适荧光团列表

[0112]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (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 Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573

[0113]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617
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
<b>核酸探针</b>		
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 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
噻唑橙	510	530
碘化丙啶 (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661

[0114]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
LDS 751	543; 590	712; 607
<b>荧光蛋白</b>		
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
<b>其他探针</b>		
单氯二胺	380	461
钙黄绿素	496	517

[0115] <sup>1</sup>Ex: 激发峰波长 (nm)[0116] <sup>2</sup>Em: 发射峰波长 (nm)

[0117] 本发明包括分析荧光发射的任何合适方法。在这方面, 本发明所述技术包括但不限于: 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 elia* 3:1-18, 1997所公开。

[0118] 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。

[0119] 红外辐射可由合适红外染料产生。可用于本发明的红外染料示例包括但不限于, 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. Methods* 226 (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所公开染料。任何合适红外光谱法可以用于检测红外染料。例如, 傅里叶变换红外光谱如Rahman等, *J.*

Org.Chem.63:6196,1998所述,可用于本方面。

[0120] 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水平或蛋白水平。

[0121] 分析荧光团发射时流式细胞仪特别有用。

[0122] 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种或多种激光束路径。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以下所述算法来记录。

[0123] 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。

[0124] 可用于本发明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514nm)以外的HeNe激光(633nm)或HeCd激光(325nm)。

[0125] 表2

[0126] 可通过流式细胞仪测量的示例性光学参数

[0127]

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 <sup>*</sup>
侧向散射光	SS	90°	488 <sup>*</sup>
“绿色”荧光	FL1	90°	510-540 <sup>†</sup>
“黄色”荧光	FL2	90°	560-580 <sup>†</sup>
“红色”荧光	FL3	90°	>650 <sup>#</sup>

[0128] \*使用488nm激发激光

[0129] †带通滤波器宽度

[0130] #长通滤波器

[0131] 例如,Biggs等,Cytometry 36:36-45,1999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,“Flow cytometry and sorting(《流式细胞术和分选》)”,第二版,纽约的约翰威立(Wiley-Liss),1990)。应理解本发明不限于任何特定流式细胞仪或任何特定参数组。在这发面,发明也包括使用微型流式细胞仪代替传统流式细胞仪,例如Fu等,Nature Biotechnology 17:1109-1111,1999所公开。

[0132] 本发明的试验可以自动或半自动,以从一个对象中高通量筛选或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。

[0133] 因此本发明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反应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。因此也提供商业方法,其中在运输管中收集血液,然后在定义位点分析细胞介导免疫反应,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。

[0134] 因此,基于知识的计算机软件和硬件也形成本发明的部分。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情是否诱导或与免疫抑制相关。

[0135] 特定地,本发明的试验可以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反应或免疫抑制指数,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。

[0136] 因此,所述试验可采用试剂盒或基于计算机系统形式,包括在接触淋巴细胞于一种或多种能强化获得性和先天免疫的试剂之后,检测免疫效应分子浓度所需试剂,和计算机硬件和/或软件以协助临床医生确定和传输报告。

[0137] 例如,本发明包括允许用户测定对象细胞介导免疫反应状态的方法,所述方法包括:

[0138] (a)以相对对照的免疫效应分子水平或浓度形式接受数据,通过通讯网络提供用户的细胞介导免疫反应状态相关性,在淋巴细胞接触一种或多种能强化获得性和先天免疫反应的试剂之后,测量免疫效应分子;

[0139] (b)通过单变量或多变量分析处理对象数据以提供免疫反应值;

[0140] (c)与预定值相比,测定根据免疫反应值结果的对象状态;并

[0141] (d)通过通讯网络转化对象状态指示到用户。

[0142] 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。

[0143] 便利地,所述方法一般还包括:

[0144] (a)使用户使用远程终端站测定数据;和

[0145] (b)通过通讯网络从终端站向基站转移数据。

[0146] 基站能包括第一和第二处理系统,其中所述方法包括:

[0147] (a)转移数据到第一处理系统;

[0148] (b)转移数据到第二处理系统;和

[0149] (c)使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反应值。

[0150] 所述方法也可包括:

[0151] (a)转移单变量或多变量解析函数的结果到第一处理系统;和

[0152] (b)使第一处理系统测定对象状态。

[0153] 本情况中,所述方法也包括至少一个:

[0154] (a)通讯网络和第一处理系统之间通过第一防火墙转移数据;和

[0155] (b)在第一和第二处理系统之间通过第二防火墙转移数据。

[0156] 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:

- [0157] (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
- [0158] (b) 对比所选预定数据和对象数据或产生细胞免疫反应或免疫抑制的预测可能性指数。
- [0159] 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。
- [0160] 所述方法还可包括使用户通过安全阵列测定数据,安全元素阵列能测定免疫效应分子水平和具有位于各编码上不同位置的多个特征。此情况中,所述方法一般包括使基站:
- [0161] (a) 从数据中测定编码;
- [0162] (b) 测定布局,指示阵列上每一个特性的位点;和
- [0163] (c) 测定根据所测布局的参数值,和数据。
- [0164] 所述方法也包括使基站:
- [0165] (a) 测定支付信息,支付信息代表用户支付条款;和
- [0166] (b) 响应测定支付信息进行对比。
- [0167] 本方法也提供相对细胞介导免疫反应或免疫抑制测定对象状态的基站,基站包括:
- [0168] (a) 存储方法;
- [0169] (b) 处理系统,处理系统适合于:
- [0170] (c) 从用户通过通讯网络接受对象数据,数据包括免疫效应分子水平,其中相对对照的免疫效应分子水平提供细胞介导免疫反应状态的相关性,其中在淋巴细胞接触强化获得性和先天免疫系统的一种或多种分子后测定免疫效应分子;
- [0171] (d) 完成算法函数,包括对比数据与预定数据;
- [0172] (e) 根据包括对比的算法函数结果测定对象状态;和
- [0173] (c) 通过通讯网络输出对象状态指示到用户。
- [0174] 处理系统能适应从适于测定数据的远程终端站接受数据。
- [0175] 处理系统可以包括:
- [0176] (a) 第一处理系统,适用于:
- [0177] (i) 接受数据;和
- [0178] (ii) 根据包括对比数据的单变量或多变量解析函数测定对象状态;
- [0179] 和
- [0180] (b) 第二处理系统,适用于:
- [0181] (i) 从处理系统接受数据;
- [0182] (ii) 完成包括对比的单变量或多变量解析函数;和
- [0183] (iii) 转移结果到第一处理系统;
- [0184] 一般基站包括:
- [0185] (a) 连接第一处理系统与通讯网络的第一防火墙;和
- [0186] (b) 连接第一与第二系统的第二防火墙。
- [0187] 处理系统能连接到数据库,处理系统适合在数据库中存储数据。
- [0188] 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”水平指免疫效应分子浓度的增加或提高或下降或降低。

[0189] 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免疫反应状态)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免疫反应和/或疾病情况的可能性指数。算法执行单变量或多变量解析函数。

[0190] 因此,本发明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反应或免疫抑制之间水平的关系来推断关系,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发明情况下使用。

[0191] 本发明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免疫反应水平以产生算法,在输入未知免疫反应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,预测细胞介导免疫反应的性质。

[0192] 术语“训练数据”包括关于相对于对照的免疫效应分子水平的知识,其中在淋巴细胞接触加强获得性和先天免疫系统的一种或多种试剂后测定免疫效应分子。“对照”包括对象免疫效应分子水平与“正常”免疫反应的对比,或可根据试验统计上测定水平。

[0193] 因此,术语“训练数据”包括免疫效应分子水平。

[0194] 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,涉及细胞介导免疫反应。算法输出或与对照对比是对象有某一水平的免疫反应或免疫抑制的可能性或风险因子,本文称为“可能性指数”。

[0195] 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,或输入到提供例如对象有免疫抑制病症的可能性风险值的算法。治疗方案也能监控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。

[0196] 如上所述,诊断免疫反应或免疫抑制病症的方法,通过免疫效应分子水平测定对象加强获得性和先天免疫反应程度,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。同时提供检测免疫反应方法,包括测定对象样品获得性和先天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。

[0197] 如上所述,本文所术语“样品”指在刺激获得性和先天免疫过程之后包括效应分子的任何样品,包括但不限于,生物液体(包括全血,血浆,血清,腹水),组织提取物,新鲜收获的细胞,和已在细胞培养物中孵育的细胞裂解液。

[0198] 本发明方法可用于诊断和分级疾病。本发明也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接触毒剂后的免疫抑制。

[0199] 在一个实施方式中,所述发明包括监控对象免疫抑制的方法,包括:

[0200] (a) 提供来自对象的样品;

[0201] (b) 测定刺激获得性和先天免疫过程后免疫效应分子水平;

[0202] 其中,相对对照的免疫效应物水平提供细胞介导免疫反应状态的关联性,和使所述水平用于算法以提供有对象某一免疫反应水平的可能性指数。

[0203] (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)结果,其中可能性指数的差异指示对象病症的进展。

[0204] 上述“算法”或“算法函数”包括执行单变量或多变量解析函数。一些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发明的任何结构形式。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。

[0205] 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。

[0206] 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。

[0207] 上面方面中,术语“数据”指在加强获得性和先天免疫过程后,免疫效应物的水平或浓度。“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)。

[0208] 本发明的一个方面包括通过测量对特定先天和获得性免疫刺激物的反应,显示对象细胞介导免疫反应的实验。在一个实施方式中,一种或多种样品,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,病原体感染或接触铍)的对象获得,通过测定效应T细胞(如CD4<sup>+</sup>T细胞)效应分子检测免疫反应。在加强获得性和先天免疫反应的一种或多种试剂出现时进行试验。

[0209] 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,在获得性和先天免疫过程共刺激之后,可以得到怀疑包括细胞因子的样品,将样品和抗体接触,然后检测或定量特定情况下形成免疫复合物的量。

[0210] 将所选生物样品与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形成免疫复合物,即与任何现有抗原结合。这次过后,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,一般会清洗去除任何非特异性结合抗体种类,使只有这种抗体特异性结合在要检测的初级免疫复合物中。

[0211] 在一个特定实施方式中,本发明包括检测人对象疾病或病症存在、缺失、水平或阶段的方法,所述方法包括将全血(包括反应混合物中至少10%总体积)接触加强获得性和先天免疫的一种或多种试剂,和从T细胞中检测免疫效应分子水平的出现或提高,其中免疫效应分子的出现或水平指示疾病或病症。

[0212] 在其他实施方式中,本发明考虑用于上述方法的试剂盒。在一个实施方式中,包括免疫检测试剂盒。在另一个实施方式中,包括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。在一个更特定实施方式中,包括分析来自有或怀疑发生疾病的对象的样品的试剂盒。在一个更特定实施方式中,在已经发生疾病状态之前或之后,或对象给药之前或之后或接触给毒剂或污染物的对象,检测细胞介导免疫反应的试剂盒。如果也使用抗原,试剂盒也能包括特定抗原。

[0213] 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。

[0214] 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。

[0215] 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。

[0216] 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。

[0217] 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,或优选适当等分装。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。本发明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。

[0218] 本发明还包括检测对象细胞介导免疫反应或其水平的改善方法,所述方法包括孵育对象淋巴细胞来源和检测效应分子出现或提高,改进还包括淋巴细胞与加强获得性和先天免疫系统的一种或多种试剂孵育。

[0219] 本发明还提供治疗有病原感染,自体免疫疾病或癌症或发生所述情况或疾病倾向的对象的方法,所述方法包括将对象淋巴细胞来源与加强获得性和先天免疫系统的一种或多种试剂接触,并且检测来自T细胞的免疫效应分子水平出现或提高,其中免疫效应分子水平的出现或提高指示细胞介导反应水平,其指示病症或疾病的存在、缺失、水平或阶段的对象的,然后治疗该病症或疾病。

[0220] 下列非限制性实施例进一步说明了本发明。

[0221] 实施例1

[0222] 试验开发

[0223] 肝素化血液样品收集到Li-Hep Vacuette(注册商标)管中(德国葛莱娜第一生化有限公司(Greiner Bio-one))。

[0224] 等分血液样品用不同浓度T细胞受体激动剂孵育:植物血细胞凝集素(澳大利亚Cellistis有限公司(Cellistis Limited))抗人CD3 $\epsilon$ 抗体(小鼠IgG<sub>1</sub>单独UCHT1;圣地亚哥eBioscience)和T细胞受体复合物抗体;和Toll样受体激动剂:脂甘露聚糖TLR-2配体(圣地亚哥InvivoGen),Pam3CSK4TLR-2配体(圣地亚哥InvivoGen),Poly(I:C)TLR-3配体(圣地亚哥InvivoGen),脂多糖TLR-4配体(圣地亚哥西格玛(Sigma)),咪唑喹啉化合物-TLR-7/8配体,R848(圣地亚哥InvivoGen)和CpG寡脱氧核苷酸TLR-9配体(荷兰HBT公司(Hycult Biotechnology))或人Quantiferon(注册商标)测试(澳大利亚Cellistis有限公司)生产商推荐的一些不同大小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 $\mu$ l-1000 $\mu$ l,或大体积,例如1.5ml-200ml。

[0225] 在一些实验中,孵育开始前将不同浓度葡萄糖加入血。在另一些实验中,由至少一

个TCP刺激物和一个TLR刺激物组成的两个或多个刺激物共同联合加入血液中。

[0226] 经刺激血液样品在37°C孵育1-48小时,之后从上面固定血细胞中收集血浆。然后,每个血浆样品中存在的IFN- $\gamma$ 量用Quantiferon-TB(注册商标)ELISA(澳大利亚Cellistis有限公司)根据生产商说明定量。或者,样品IFN- $\gamma$ 通过更加敏感的Quantiferon-TB Gold(注册商标)ELISA(澳大利亚Cellistis有限公司)根据生产商说明定量。

[0227] 每个ELISA平板上IFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ 量转化成IU/mL值。

[0228] 实施例2

[0229] T细胞受体(TCR)依赖性激动剂和To11样受体(TLR)激动剂的组合

[0230] 用于实施例1试验的TCR和TLR激动剂的潜在组合示于表3。

[0231] 表3

[0232] 试验所用TCR和TLR激动剂的组合

[0233]

TCR 激动剂	TLR 激动剂					
	Pam 3CSK4 TLR-2	脂甘露 聚糖 (TLR-2)	Poly (I:C)- (TLR-3)	脂多糖 (TLR-4)	咪唑啉 (R848) (TLR-7/8)	CpG 寡 脱氧核苷 酸 (TLR-9)
PHA(植物血 细胞凝集素)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
抗 CD3 $\epsilon$ 抗体	✓	✓	✓	✓	✓	✓
葡萄球菌肠 毒素 B(SEB)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
T 细胞受体 复合物抗体	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[0234] 实施例3

[0235] T细胞受体(TCR)非依赖性激动剂和To11样受体(TLR)激动剂的组合

[0236] 用于实施例1试验的TCR非依赖性激动剂和TLR激动剂的潜在组合示于表4。

[0237] 表4

[0238] 试验所用TCR和TLR激动剂的组合

[0239]

TCR 非依赖性激动剂	TLR 激动剂					
	Pam 3CSK4 TLR-2	脂甘露聚糖 (TLR-2)	Poly (I:C)- (TLR-3)	脂多糖 (TLR-4)	咪唑喹啉 (R848) (TLR-7/8)	CpG 寡脱氧核苷酸 (TLR-9)
ConA <sup>1</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PMA <sup>2</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
商陆促分裂原	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[0240] <sup>1</sup>刀豆球蛋白A[0241] <sup>2</sup>乙酸肉豆蔻佛波醇

[0242] 实施例4

[0243] 试验评价

[0244] 所述试验涉及T细胞受体 (TCR) 和To11样受体 (TLR) 共刺激以评价个体的先天和获得性免疫组合功能。体外用针对分离TCR或TLR的单个刺激物刺激全血在健康供体中产生不同反应,从极高IFN- $\gamma$  水平到某些健康个体中无法检测的水平(图1)。为了设定健康参考范围和观察到免疫缺陷引起的功能下降,发现协同在组合的先天和获得性免疫反应后发生(图2)。双重刺激物加强增加正常健康群体方法的反应,可测定截止水平(图3)。提高正常健康群体方法也能观察免疫缺陷个体中IFN- $\gamma$  反应的下降。因此,当反应落在健康群体临界值(界限)内时,可推断由于药物治疗或疾病引起的免疫抑制测量。

[0245] 实施例5

[0246] 使用T细胞受体激动剂

[0247] 本实施例提供使用to11样受体 (TLR) 激动剂(咪唑喹啉化合物,对NK细胞特异的R848)和T细胞受体 (TCR) 激动剂共刺激免疫细胞,体外评价组合的先天和获得性免疫的方法。此体外诊断可用于全血,外周血单核细胞 (PBMC) 和饲养层纯化细胞群。然而,也包括对不同免疫系统细胞类型特异的其他TLR激动剂。

[0248] QFN试管内技术 (Cellestis) 提供用特异性激活不同免疫细胞的刺激物组合刺激全血后检测细胞介导免疫 (CMI) 的方法。刺激在封闭容器中无加湿下37°C孵育24小时完成。从全血中收集血浆,并使用一步ELISA检测IFN- $\gamma$ ,提供目标细胞功能的测量。特别地,试验通过评价组合的先天 (NK细胞) 和获得性 (T细胞) 免疫反应来检测个体功能免疫状态。为体外诊断和预后应用,采用所述测试监控个体总体免疫状态。

[0249] 所述设备检测对同时提供的两个刺激物组合响应生成的总IFN- $\gamma$  产量。所得“值”指个体在给定时间点的净功能免疫状态。这允许纵向和横向对比免疫状态。

[0250] 数据显示下列顺序,TLR-7/8>TLR-4>TLR-3>TLR-2,表明当与抗CD3抗体 (TCR激动

剂)联用以开发有临床用途的诊断试验时,施加协同反应的TLR类激动剂的有效性下降。因此,在本实施例中,采用TLR-7/8激动剂例如咪唑喹啉化合物(R848)以获得最大协同反应。然而,不同应用要求使用次最大协同或确实使用TLR类与TCR激动剂例如抗CD3抗体或促分裂原(植物血细胞凝集素;PHA)的两个或更多的组合。显示在诊断试验中,促分裂原通过位于T细胞上的TCR发挥作用。这通过联用两个刺激物时,抗CD3抗体能消除促分裂原反应来证实。

[0251] 实施例6

[0252] 测定给药对象的免疫抑制

[0253] 本试验用于接触药物的对象,所述药物例如化疗剂或用于治疗风湿性关节炎、癌症或炎症性肠病的试剂。鉴定免疫抑制的对象,实施护理以避免继发感染。例如,可提供抗生素或免疫刺激物。

[0254] 实施例7

[0255] 用TCR激动剂和TLR激动剂刺激全血

[0256] 全血用抗CD3抗体(TCR激动剂)和TLR-7/8激动剂;R848(咪唑喹啉)的组合刺激。观察到的由 $\gamma$ 干扰素(MIG;CXCL9)和IFN- $\gamma$ 诱导的单核因子水平示于图5。所示值减去相应的背景对照(NIL)。数据显示MIG和IFN- $\gamma$ 对应作为刺激指示剂。

[0257] 表5

[0258]

对象	MIG (CXCL9) pg/mL	IFN- $\gamma$ pg/mL
1	>2000	34280
2	1567	20040
3	1494	20000
4	>2000	31680
5	>2000	35320
6	>2000	73760
7	1744	25400
8	>2000	24840

[0259] 全血用或不用抗CD3抗体(TCR激动剂)和TLR-7/8激动剂;R848(咪唑喹啉)的组合刺激。所得血浆用于概述已知细胞因子,趋化因子和胞外信号分子。检测目标可用单独使用或与其他作为报道分子的效应物联用。这对多元化特别有用。检测目标显示于表6。

[0260] 表6

[0261]

目标
补体成分5a (C5a)
Gro $\alpha$ (CXCL1)
sICAM-1 (CD54)
IFN- $\gamma$ (II型IFN)
IL-1 $\alpha$ (IL-1F1)
IL-1 $\beta$ (IL-1F2)

IL-1ra (IL-1F3)
IL-6
IL-8 (CXCL8)
IL-10
IL-16 (LCF)
IL-17
IP-10 (CXCL10)
I-TAC (CXCL11)
MCP-1 (CCL2)
MIF (GIF)
MIP-1 $\alpha$ (CCL3)
MIP-1 $\beta$ (CCL4)
丝氨酸蛋白酶抑制剂E1 (PAI-1)
RANTES (CCL5)
TNF- $\alpha$ (TNFSF2)
MIG (CXCL9)

[0262] 表7

[0263]

	HIV+ve 未处理 (TCR)	HIV+ve 未处理 (TLR)	HIV+ve 未处理 (TCR+ TLR)	健康对 照 (TCR)	健康对 照 (TLR)	健康对照 (TCR+T LR)
值的编号	24	24	24	50	49	50
最小值	0.935	0	2.65	0.67	7.78	34.17
25%百分 位	26.63	1.601	54.35	7.068	24.74	232.1
中值	77.45	6.675	91.28	21.76	52.43	554
75%百分 位	108.6	22.41	291.5	42.39	87.33	882.5
最大值	331	122	1349	154.4	439.1	1989

[0264] 细胞因子,趋化因子和胞外信号分子的所得分布在图4中用图形表示。数个细胞因子,趋化因子和胞外信号分子只在用TCR和TLR激动剂同时刺激的全血的血浆中发现(蓝色条;TCR+TLR)。跟未治疗全血相比,数个其他分子相较未处理全血上调(红色条;NIL)。

- [0265] 与全血用TCR激动剂或TLR激动剂单独刺激相比,全血培养物中TCR和TLR激动剂双重刺激IFN- $\gamma$ 反应观察到的协同作用示于图5。
- [0266] 测试到的群体是HIV感染组和正常健康组。研究群包括(i)未处理HIV阳性(源自南非);和(ii)正常健康供体(源自澳大利亚)。群体中值见表7。
- [0267] TCR+TLR共刺激之后的IFN- $\gamma$ 反应水平和CD4T细胞计数的相关性示于图6。刺激HIV感染组的全血。
- [0268] 用TCR和TLR激动剂的组合刺激全血也能检测给定供体中的免疫抑制剂抑制浓度。
- [0269] 本领域技术人员能理解本文所述发明易进行特定描述以外的变化和修改,并且一些试剂影响T细胞受体依赖性和非依赖性加强和Toll样受体加强或两者的组合。应理解本发明包含所有这些试剂。本发明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。
- [0270] 文献目录
- [0271] Biggs等,Cytometry 36:36-45,1999
- [0272] Chang等,J. Virol.83:7649-58,2009
- [0273] Cooper等,Hematology:314-30,2003
- [0274] Daneshvar等,J. Immunol.Methods226(1-2):119-128,1999
- [0275] Douek等,Annu.Rev.Med.60:471-84,2009
- [0276] Durig等,J. Raman Spectrosc.24(6):281-285,1993
- [0277] Eriksson等,Biophys.J. 2:64,1993
- [0278] Fu等,Nature Biotechnology 17:1109-1111,1999
- [0279] Hengel和Kovacs,J. Infect.Dis.188(12):1791-3,2003
- [0280] Hu和Gatti,Curr Opin Allergy Clin Immunol.8(6):540-546,2008
- [0281] Kowalski等,J Immunotoxicol.4(3):225-32,2007
- [0282] Lakowicz等,Biophys.J. 72:567,1997
- [0283] Lewis等,Dyes Pigm.42(2):197,1999
- [0284] Malemed等,“Flow cytometry and sorting(《流式细胞术和分选》)”,第2版,纽约的约翰威立(Wiley-Liss),1990
- [0285] Matesanz等,Transplant Proc.41(6):2297-301,2009
- [0286] Nowroozalizadeh等,Cytokine 46:325-31,2009
- [0287] Rahman等,J. Org.Chem.63:6196,1998
- [0288] Rapaport等,Appl.Phys.Lett.74(3):329-331,1999
- [0289] Schrem等,Dtsch Arztebl Int.106(9):148-156,2009
- [0290] Solomon等,J.Infect.Dis.187:1915-23,2003
- [0291] 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
- [0292] Youvan等,Biotechnology et alia 3:1-18,1997

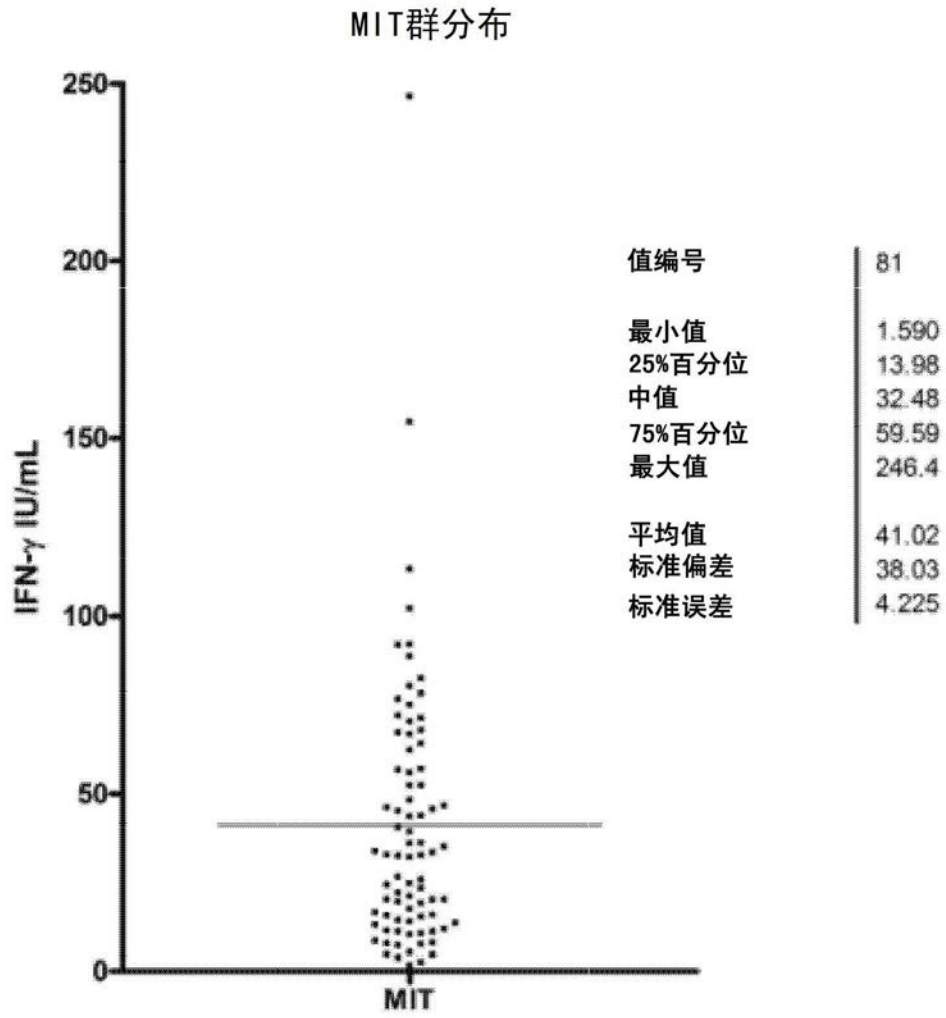


图1A

CD3 (UCHT1) 群分布

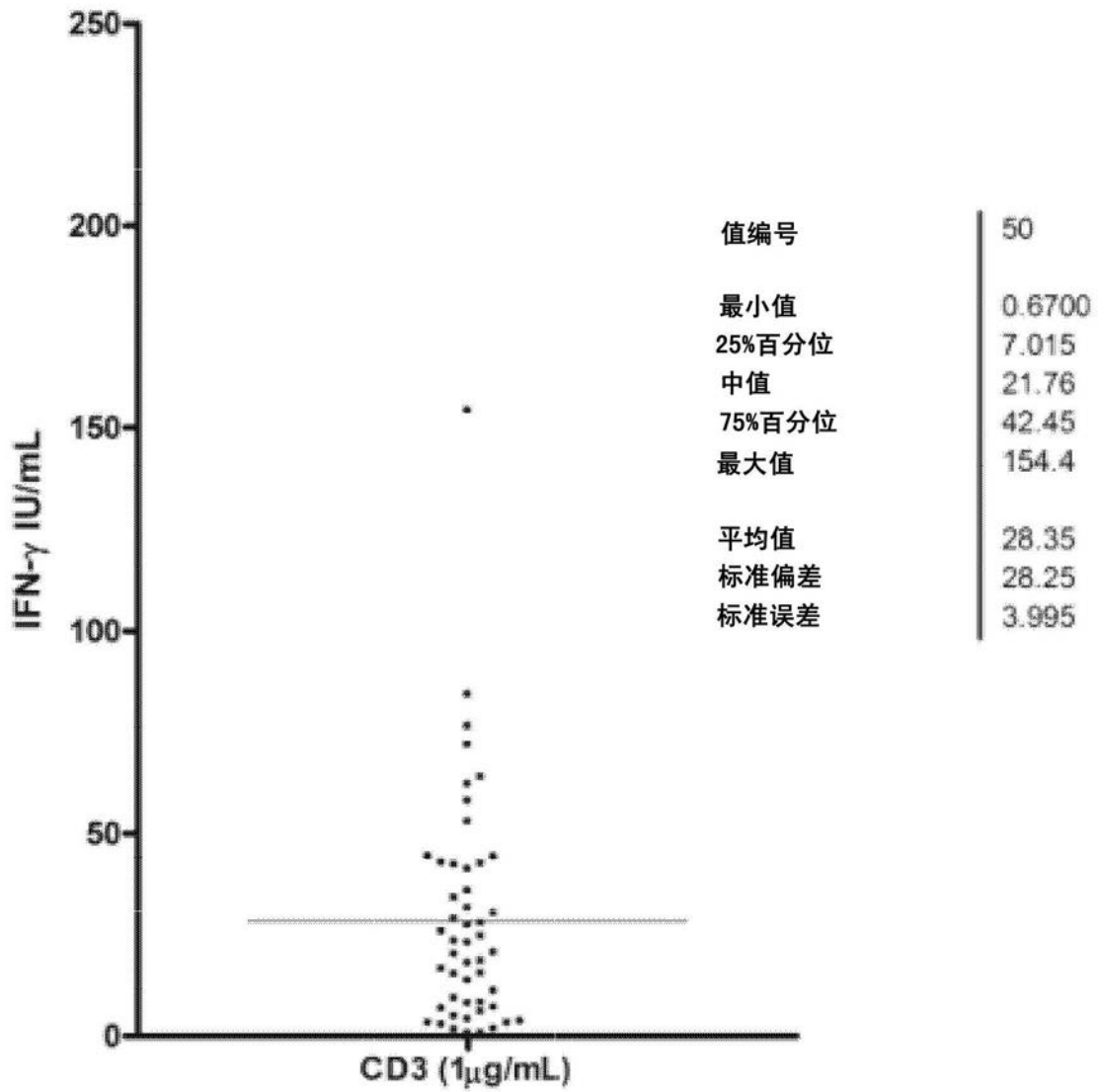


图1B

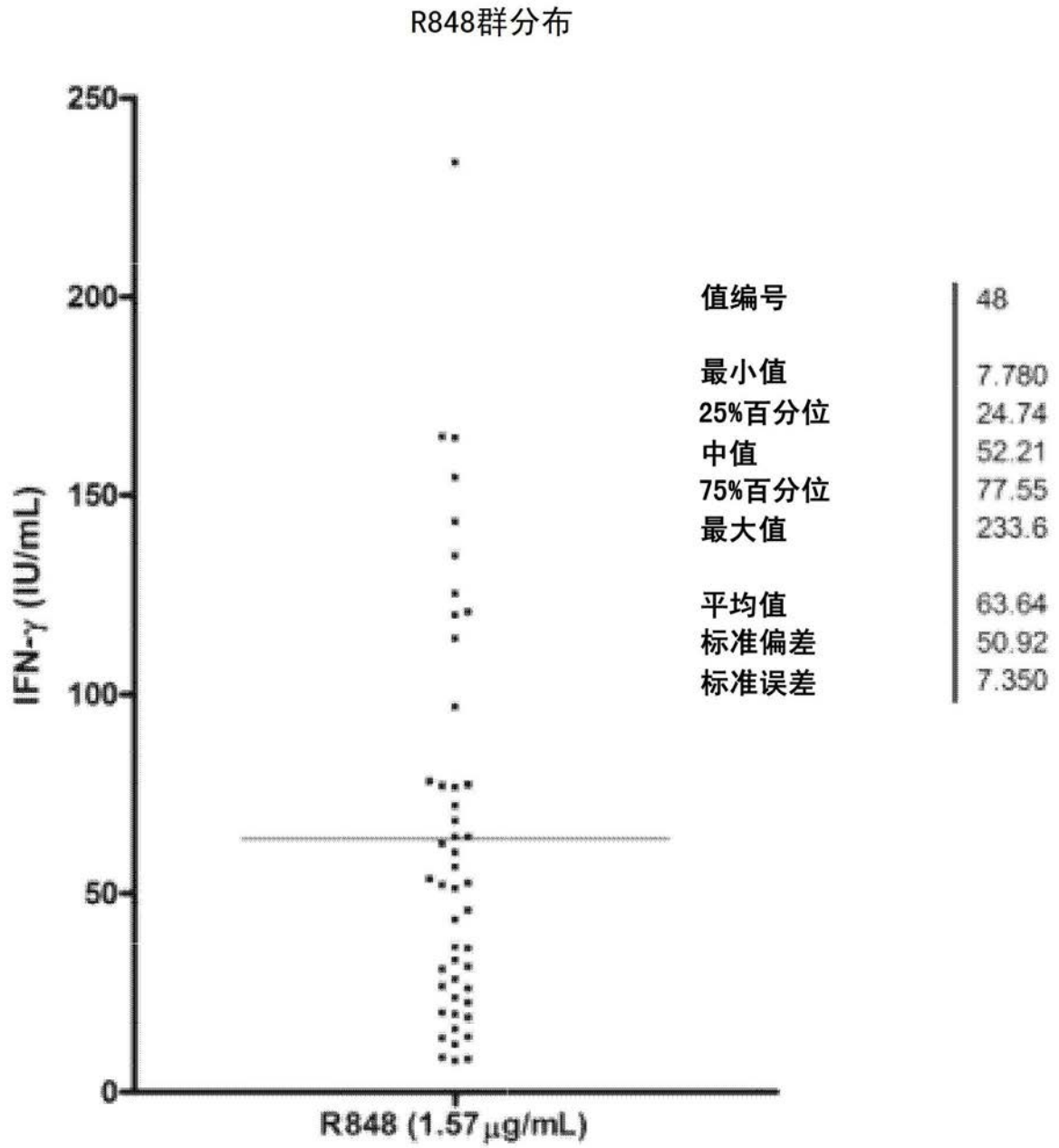


图1C

CD3 (UCHT1) /TLR-2 (1ug/mL) 共刺激

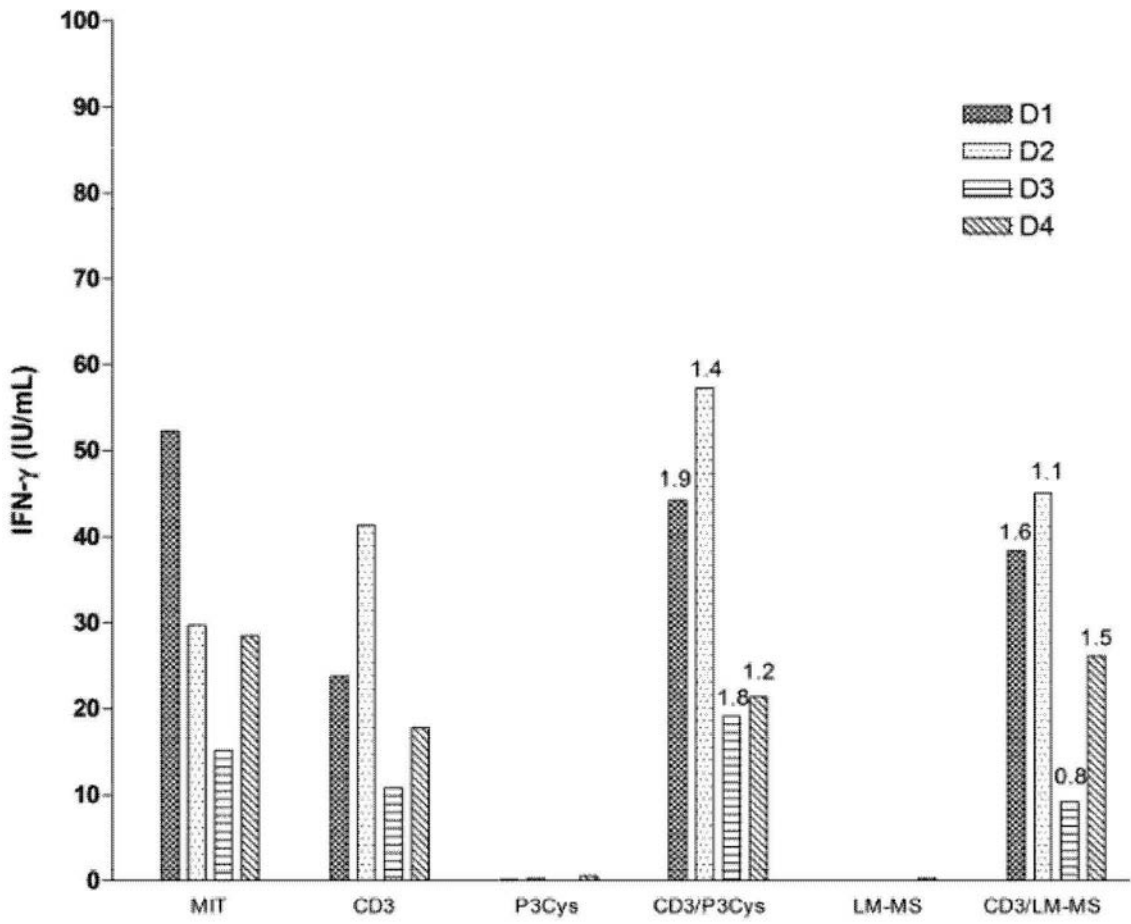


图2A

CD3 (UCHT1) /TLR-4 (1ug/mL) 共刺激

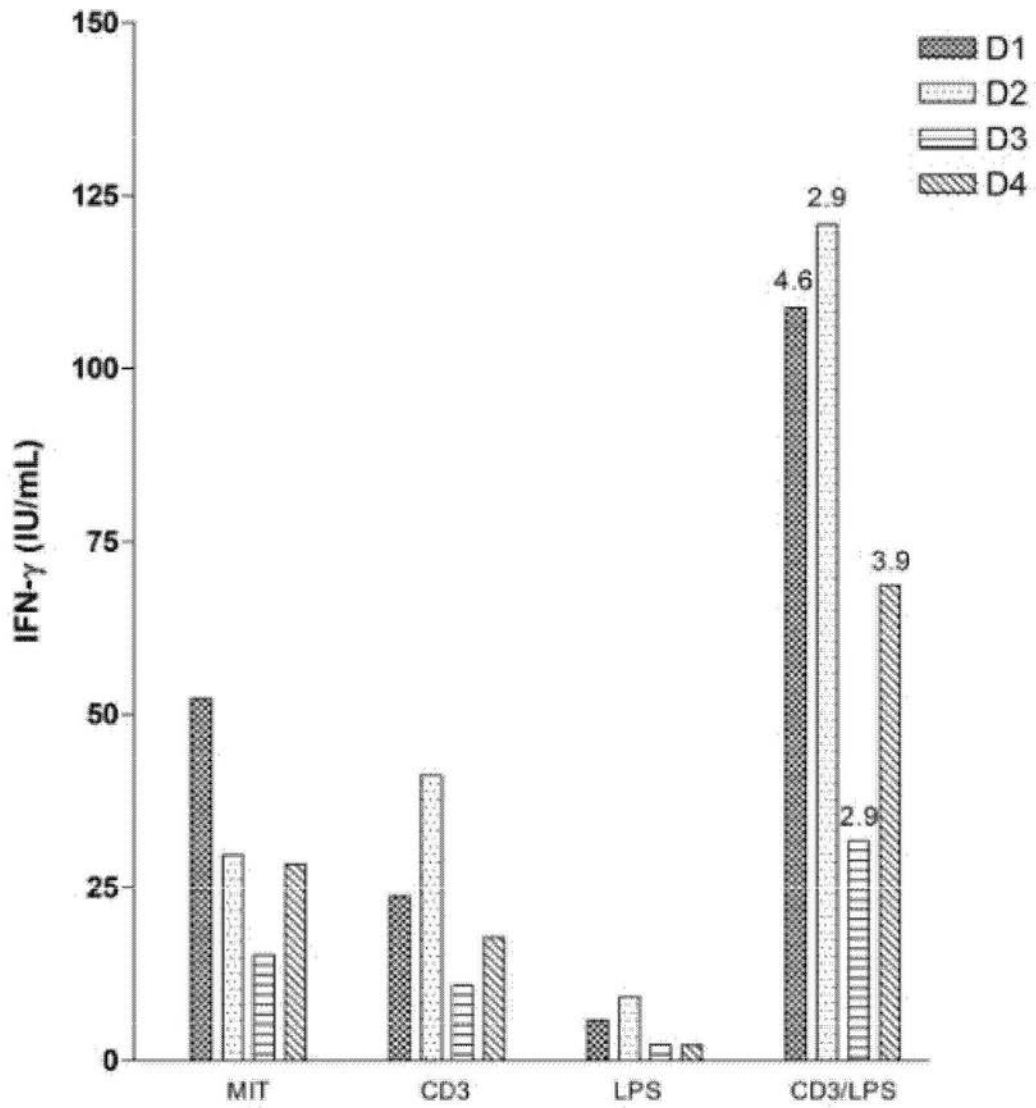


图2B

CD3 (UCHT1) /TLR-7/8 (1ug/mL) 共刺激

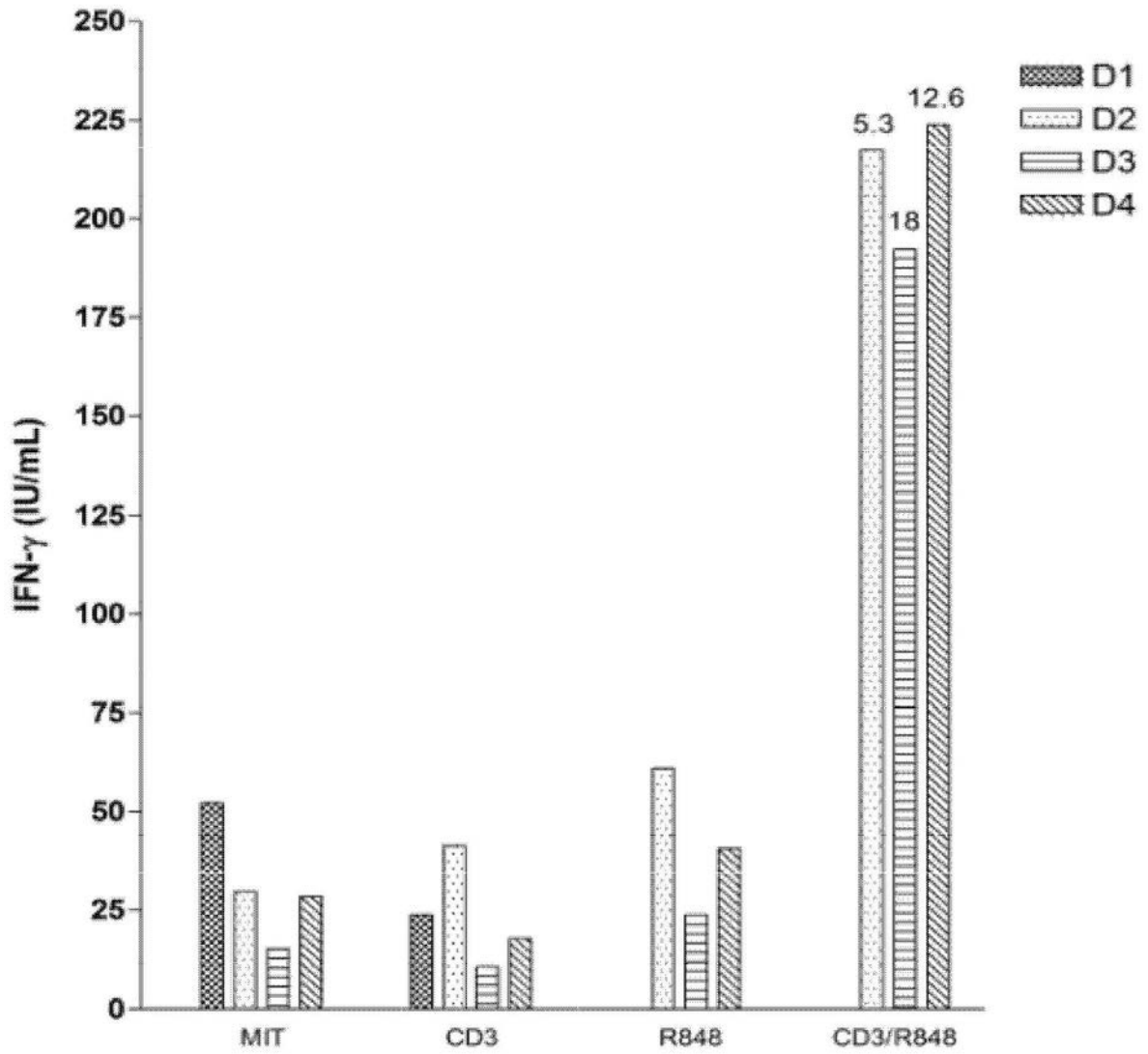


图2C

代表性示例

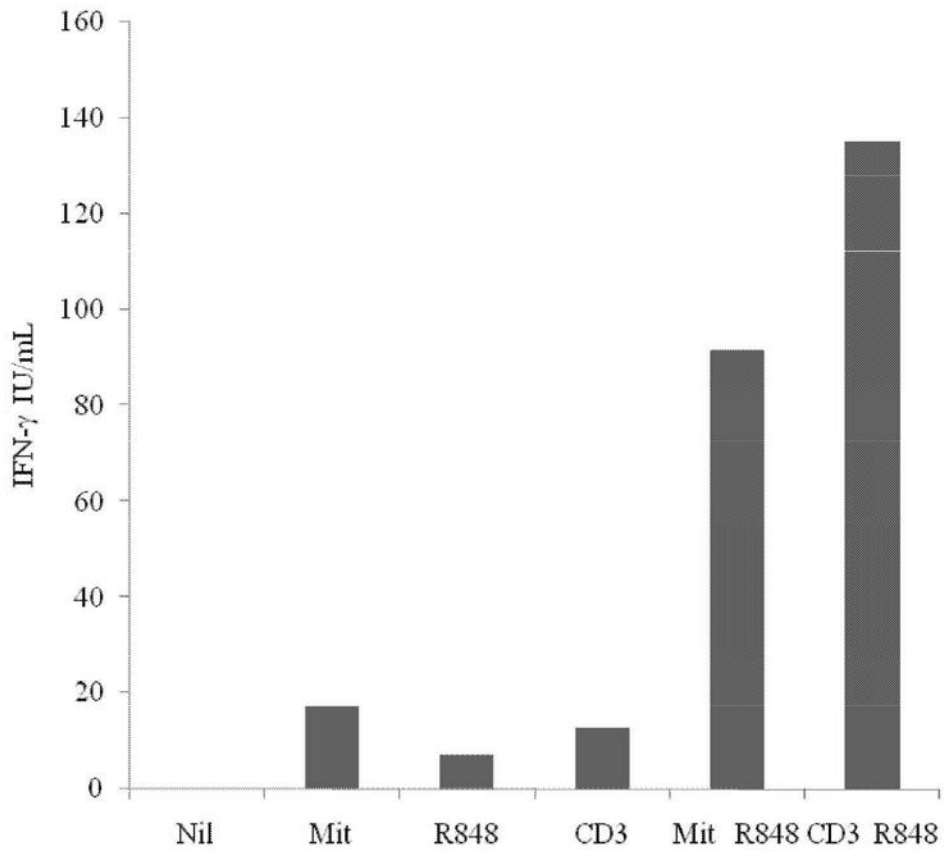
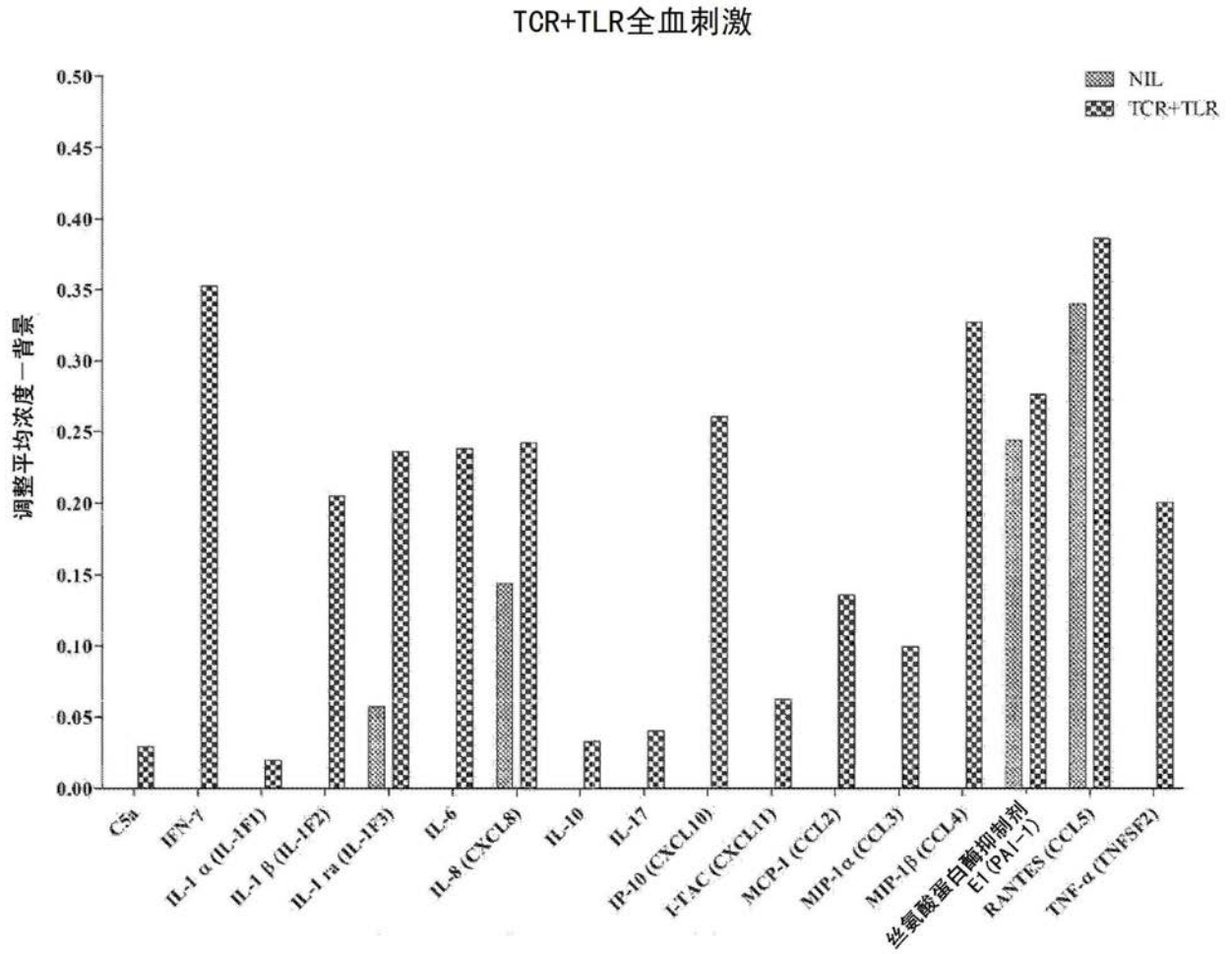


图3



蛋白质组概况阵列—人细胞因子阵列板A

图4

HIV感染群中TCR+TLR全血刺激

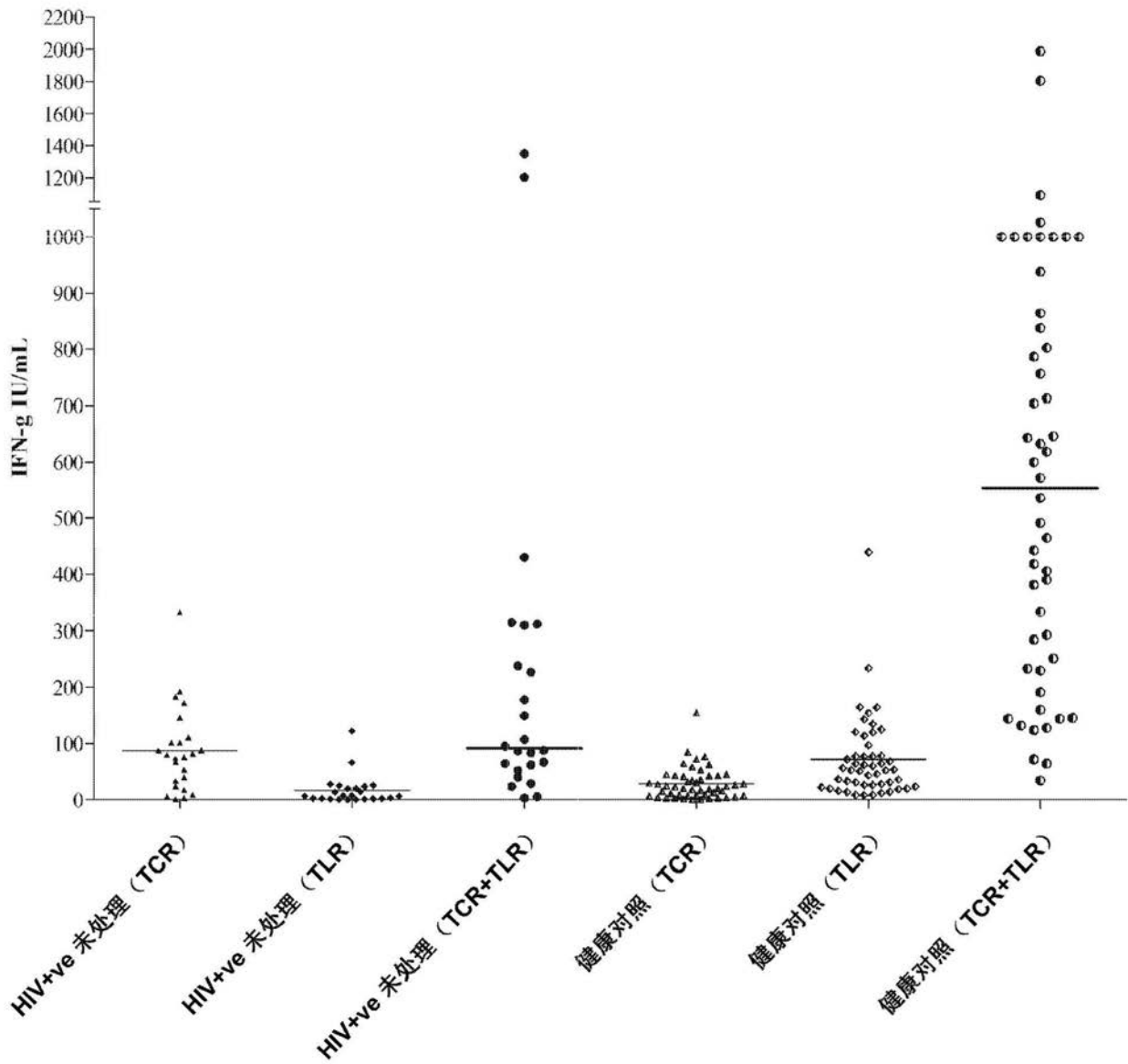


图5

HIV感染群中TCR+TLR刺激IFN-g与CD4计数的相关性

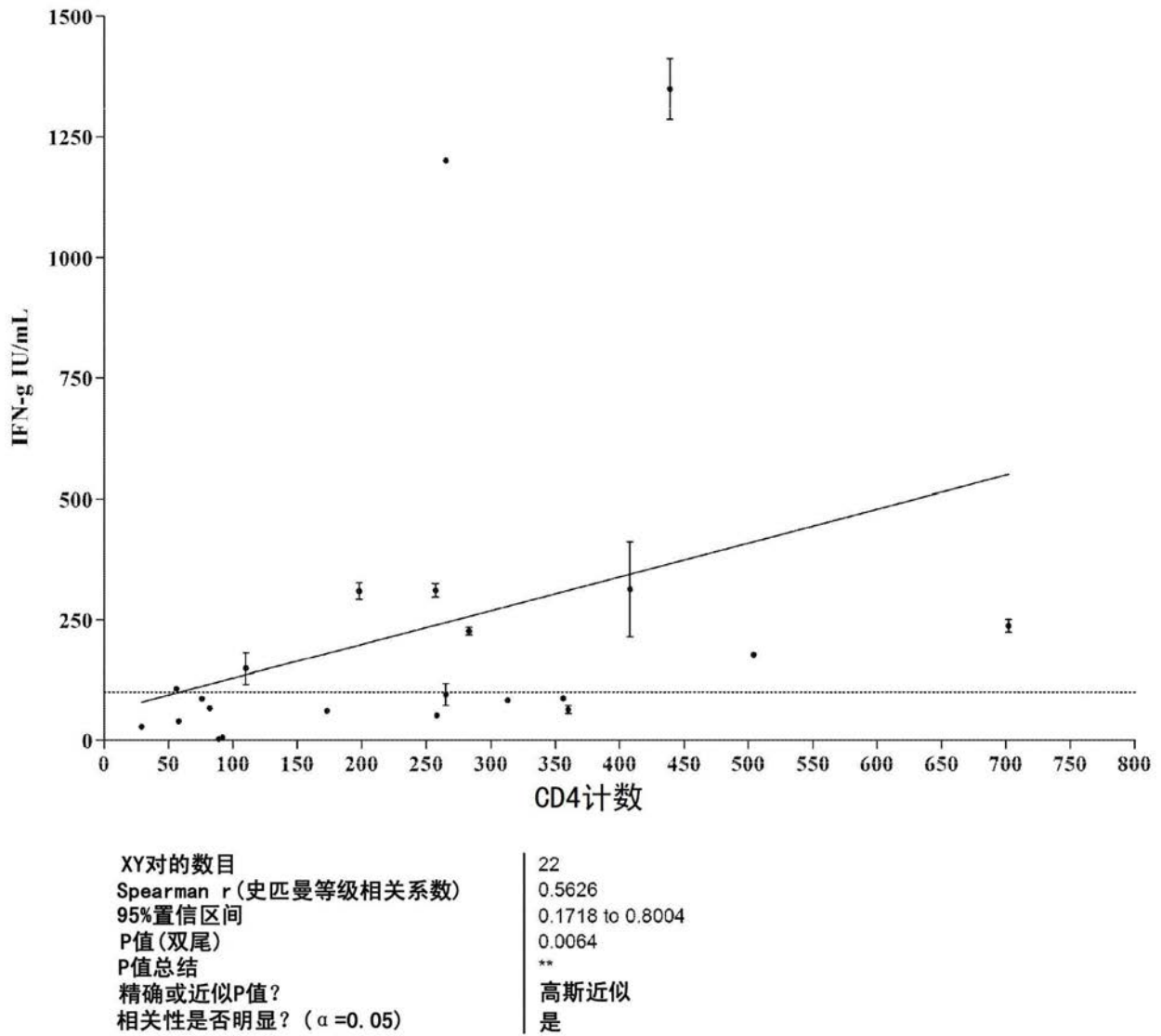


图6

免疫抑制剂（FK-506+雷帕霉素）处理的全血  
TCR+TLR激动剂刺激

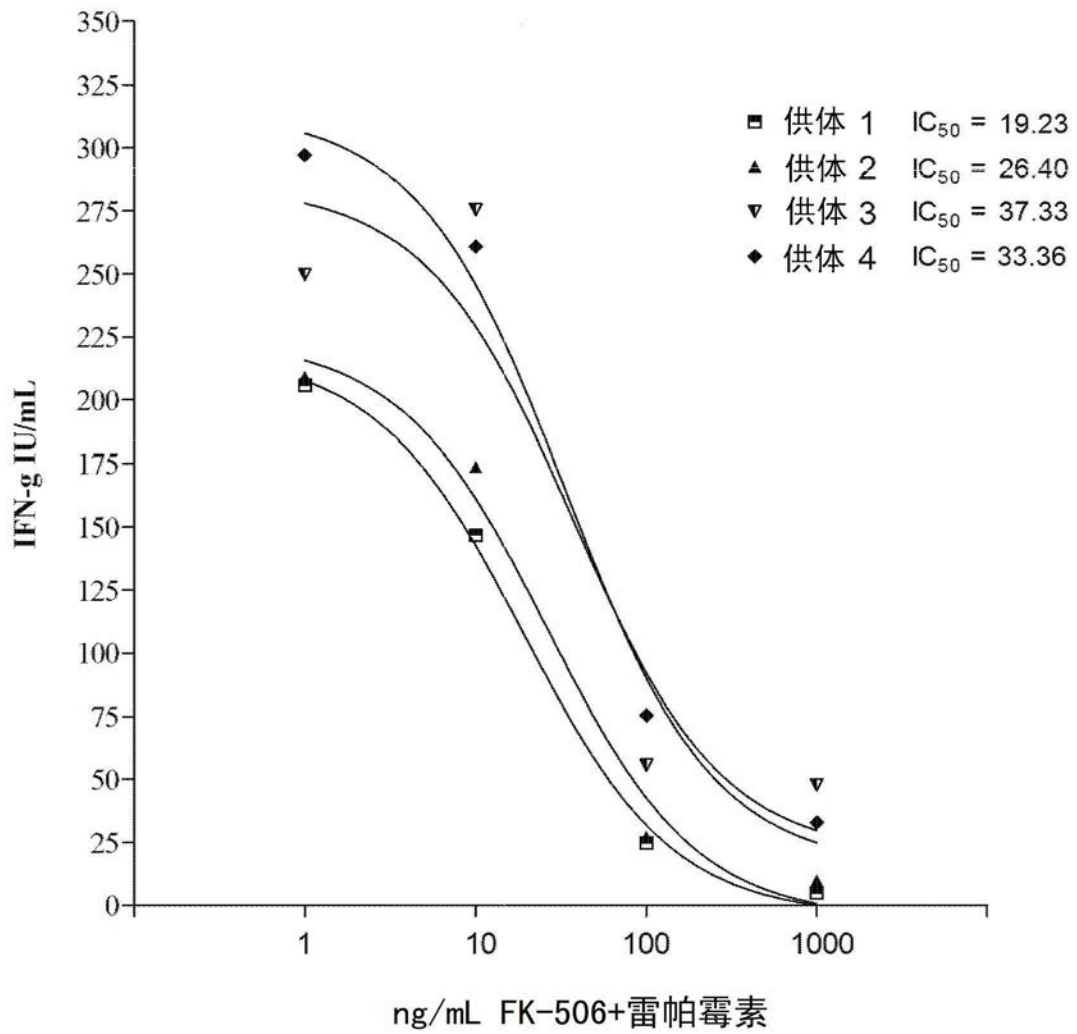


图7

专利名称(译)	测量细胞介导免疫反应的试验		
公开(公告)号	<a href="#">CN102713619B</a>	公开(公告)日	2018-08-10
申请号	CN201080058756.1	申请日	2010-12-21
[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 R 达拉斯海拉斯		
发明人	J·伯勒 R·达拉斯海拉斯		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N33/56972 Y02A90/22 Y02A90/24 Y02A90/26 G01N33/53		
代理人(译)	余颖		
优先权	61/289880 2009-12-23 US		
其他公开文献	CN102713619A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明一般涉及基于免疫学的诊断试验领域。更特定地，本发明描述检测细胞介导免疫反应的方法。本发明还能测定病情，治疗试剂和环境污染物的免疫抑制作用。本发明的试验也能整合到病理学架构中以提供诊断报告系统和促进临床护理管理。

CD3 (UCHT1) /TLR-2 (1ug/mL) 共刺激

