



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103703375 B

(45)授权公告日 2018.04.10

(21)申请号 201280031730.7

(22)申请日 2012.06.27

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103703375 A

(43)申请公布日 2014.04.02

(30)优先权数据  
61/502,811 2011.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.12.26

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/AU2012/000756 2012.06.27

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/000021 EN 2013.01.03

(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·博伊尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 张静

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

审查员 苗君叶

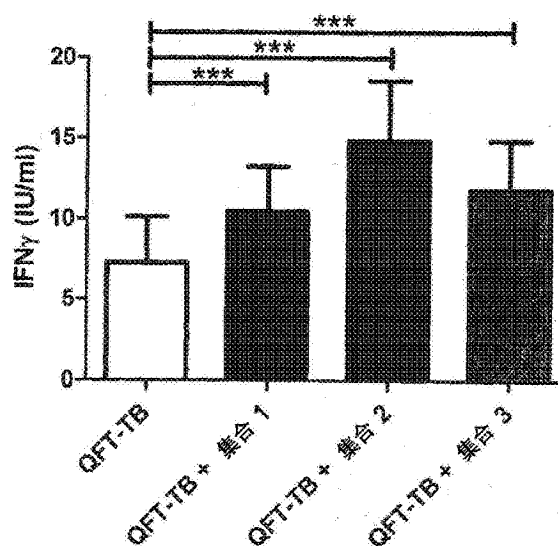
权利要求书1页 说明书27页 附图2页

(54)发明名称

具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答测定

(57)摘要

本公开一般涉及基于免疫学的诊断测定领域,所述基于免疫学的诊断测定包括检测细胞介导的免疫应答的测定。本发明教导了以具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答为基础的对象接触抗原的诊断。将来自对象的淋巴细胞与至少第一组和第二组肽接触,第一组包括至少一种7-14个氨基酸残基长度的肽且第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,检测免疫分子的出现或升高。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和促进临床护理管理。



1. 至少两组肽在生产试剂中的应用,所述试剂用于通过将所述至少两组肽与来自对象的淋巴细胞共同孵育并检测免疫效应分子的存在或水平升高的方法进行的细胞介导免疫应答的诊断测定,第一组由CD8<sup>+</sup>淋巴细胞识别且包含至少一种7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组由CD4<sup>+</sup>淋巴细胞识别包含至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包含蛋白抗原的全部或部分,待测定的所述细胞介导免疫应答的活性针对所述蛋白抗原。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象是人。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试验在未经稀释的全血上进行。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述全血在含有肝素的试管中。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述免疫效应分子是细胞因子。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述细胞因子是IFN- $\gamma$ 。

7. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂盒还包含对所述效应分子有特异性的抗体。

8. 权利要求7所述的应用,其特征在于,所述抗体包括用于ELISA/酶联免疫斑点法的抗体。

9. 权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象感染衍生自以下的病原体: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)。

10. 权利要求9所述的应用,其特征在于,所述对象感染结核分枝杆菌。

11. 如权利要求10所述的应用,其特征在于,所述蛋白抗原选自CFP10、ESAT-6、TB7.7和TB37.6。

12. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象患有乳糜泻。

13. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象患有自身免疫糖尿病。

14. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象患有癌症。

15. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述对象暴露于蛋白毒剂。

## 具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答测定

[0001] 申请数据

[0002] 本发明与2011年6月29号提交的题为“具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答测定”的美国临时专利申请号61/502,811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] 本公开一般涉及基于免疫学的诊断测定领域,所述基于免疫学的诊断测定包括检测细胞介导免疫应答的测定。本发明教导了以具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答为基础的对象接触抗原的诊断。本文预期的测定能够整合到标准病理学架构中以提供诊断报告系统和促进临床护理管理。

[0004] 发明背景

[0005] 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。

[0006] 在该说明书中参考任何现有技术不应作为或不应视作承认或任何提示形式表明该现有技术在任何国家中构成一般常识的一部分。

[0007] 基于免疫学的诊断测定是检测各种疾病状况的重要工具。这些测定类型的有效性取决于免疫系统内成分的特异性。尽管有这种特异性,基于免疫学的诊断对于检测低级感染或持续低水平感染的存在或在具有活性或潜伏感染疾病状态的对象中不总是足够灵敏。需要开发在细胞介导免疫应答方面具有增强灵敏度的诊断测定。

[0008] 基于免疫学的一种诊断方法形式涉及分离细胞培养或全血液培养中抗原或有丝分裂原的T细胞激活,然后是检测效应分子,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。这些测定用于检测疾病特异性T细胞反应。T细胞的一个例子是QuantIFERON(注册商标;塞尔雷斯蒂斯有限公司(CeIIlistis Limited))。另一种测定使用15聚体肽抗原以刺激T细胞。然而,这样长度的肽尽管能够被CD4<sup>+</sup>T细胞检测到,但是其太长以至于不能被CD8<sup>+</sup>T细胞检测到。

[0009] 快速评估细胞介导免疫的能力并且具有高度的灵敏度在临床上具有重要意义。尤其在免疫系统受损患者的情况中。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。

[0010] 但是,需要改进对象内细胞介导免疫应答测定的灵敏度。

[0011] 发明概述

[0012] 本文提供了用于检测对象中细胞介导免疫应答的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与衍生自蛋白抗原的肽孵育,所述肽包括一组每个有约7-14个氨基酸长度的肽与一组超过15个氨基酸长度的肽的组合,其包括全部或部分的所述蛋白抗原,并且然后筛选由活化淋巴细胞产生的效应分子水平。

[0013] “约7-14个氨基酸”表示7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸。这在本文视作第一组肽。“超过15个氨基酸”指从16个氨基酸至蛋白抗原的全长,包括16-50个氨基酸。这视作第二组肽。本方法不限于哪组肽称为第一组或第二组。每个组包括从至少一个肽到一系列重

叠的肽。

[0014] 衍生自蛋白抗原的7-14个氨基酸的肽和超过15个氨基酸的肽与淋巴细胞共同孵育得到更灵敏的测定,使得能够比其他情况更早检测淋巴细胞刺激成为可能。增加的灵敏度包括与用衍生自抗原的7-14个氨基酸范围内或>15个氨基酸范围内或全抗原自身的单个肽共孵育相比增加至少10%的效应分子检测。增加细胞介导免疫应答测定灵敏度的能力还能使检测效应分子的较低灵敏度方法可行。此外,在所公开测定中检测的细胞介导免疫应答的量级可能与疾病阶段、发展和/或严重性相关。因此,本公开指导对象内细胞介导免疫应答的测定。

[0015] 本发明不限于任意某个理论或作用模式,两组肽即7-14聚体肽和>15聚体肽能够被CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞同时检测。CD4<sup>+</sup>T细胞识别>15聚体肽而CD8<sup>+</sup>T细胞识别7-14聚体肽。这些肽可在本文称为“CD4<sup>+</sup>肽”( >15聚体肽)或“CD8<sup>+</sup>肽”(7-14聚体肽)。

[0016] 因此在本文中提供了一种用于测定对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括使来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括一种或多种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括一种或多种16个或更多氨基酸的肽,其全部或部分的包括抗原蛋白,并且测量来自免疫细胞的免疫效应分子的出现或水平升高,其中所述免疫效应分子的出现或水平指示对象对于抗原的细胞介导应答水平。

[0017] 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,所述样品是占待测样品体积约10%-100%的全血,或者占待测样品体积约50%-100%的全血,或者包含待测样品体积约80%-100%的全血。所述样品体积可以为微升量或毫升量,例如0.5μL-5mL。方便而言,将所述全血收集在含有肝素的试管中,且所述免疫效应分子是IFN-γ。一般,所述免疫效应分子采用特异性的抗体例如使用ELISA或ELISpot检测。

[0018] 所述对象可由选自以下的病原体导致的感染:分枝杆菌(*Mycobacterium*)属例如结核分枝杆菌(*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)的病原体感染或患有其导致的疾病。

[0019] 或者,所述对象患有选自以下的病症:乳糜泻、自身免疫性糖尿病、斑秃、关节强直性脊椎炎、抗磷脂综合症、自身免疫阿狄森氏病多发性硬化症、肾上腺自身免疫疾病、自身免疫溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身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、原发性混合型冷球蛋白血症、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、干燥综合症、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。

[0020] 或者,所述对象可患有选自以下的癌症:ABLI原癌基因、AIDS相关癌症、听神经瘤、急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、腺样囊性癌、肾上腺皮质癌、特发性骨髓外化生、脱发、腺泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生不良性贫血、星形细胞瘤、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、隆突性皮肤纤维肉瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室鼓膜瘤、食道癌、尤因肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼:黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范康尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠道类癌瘤、泌尿生殖系统癌症、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞病、胶质瘤、妇科癌、血液恶性肿瘤、毛细胞性白血病、头颈癌、肝细胞癌、遗传乳腺癌、组织细胞增多病、霍奇金病、人乳头瘤病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、平滑肌肉瘤、白血病、李-佛美尼综合症、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、莫克细胞癌、间皮瘤、转移性癌症、口癌症、多发性内分泌腺瘤病、蕈样肉芽肿病、脊髓发育不良综合症、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病、鼻癌、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合症、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、眼癌、食道癌、口腔(oral cavity)癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌(ostomy ovarian cancer)、胰腺癌、鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺肿瘤、阴茎癌、神经外胚层肿瘤、垂体癌、真性红细胞增多、前列腺癌、罕见癌症和相关病症、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、罗特穆德-汤姆逊综合症(Rothmund-Thomson syndrome)、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤、塞扎里综合症(Sezary syndrome)、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。

[0021] 或者,所述对象可暴露于蛋白毒剂。

[0022] 在上述方面中,所述抗原是衍生自病症或癌症相关病原剂的蛋白,或是毒剂。

[0023] 还提供一种使用户能够测定对象的细胞介导免疫应答状态的方法,所述方法包括:

[0024] (a) 接收免疫效应分子水平或浓度形式的数据,其通过通信网络相对于对照提供了与对象中细胞介导免疫应答状态的相关性,在使淋巴细胞暴露于至少两组肽之后测量免疫效应分子,第一组包括一种或多种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括一种或多种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,。

[0025] (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值;

[0026] (c) 与预定值相比,测定根据免疫应答值结果的对象状态;和

[0027] (d) 通过通信网络将对象状态指示转移到用户。

[0028] 在一个实施方式中,结核菌抗原是CFP10、ESAT-6、TB7.7或TB37.6。在一个实施方式中,所述对象感染HIV。在一个实施方式中,所述淋巴细胞与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>肽的组合接触。

## 附图说明

[0029] 图1是显示在所有可评价对象 (n=41) 中对于QFN-TB或QFN-TB加上三个集合之一的平均应答的柱状示意图。显示带有平均值标准误差的平均值。加入所有肽集合观察到应答的显著增加 ( $P < 0.001$ ) [有邓恩 (Dunn) 多重比较检验的弗里德曼 (Friedman) 检验]。QFN-TB测试包含 $CD4^+$ 肽和10聚体肽 ( $CD8^+$ 肽) 的集合。

[0030] 图2显示包括CMV pp65抗原的16聚体肽 ( $CD4^+$ 肽) 的QFT-CMV测试中的IFN- $\gamma$  应答, 使用不含抗原CMV的NiI管或仅使用16聚体 $CD4^+$ 肽; 以及组合的CMV  $CD4^+$ + $CD8^+$ 肽; 并且使用促分裂原作为对照。

[0031] 发明详述

[0032] 通篇说明书中, 除非上下文另外要求, 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。

[0033] 本说明书所用的单数形式“一个”、“一种”和“该(所述)”包括复数指代物, 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“抗原”包括单一抗原, 以及两种或更多种抗原; 提及“本公开包括本公开指导的单个或多个方面; 等等。本文教授的方面由术语“发明”涵盖。本发明的所有方面都在所述权利要求范围内。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T细胞。

[0034] 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, 多部分试验包可具有一系列的约7-14个氨基酸残基长度或超过15个氨基酸残基长度的重叠肽, 其包括全部或部分的蛋白抗原, 测量针对所述蛋白抗原的细胞介导免疫应答。因此, 本公开的这方面包括制剂, 所述制剂干燥且疏松或固定到试验包的分隔墙或固体支持物。

[0035] 本公开考虑了肽组。术语“组”可替换为其他术语如“集合”、“群”、“系列”、“集”等而不背离即时公开的方法。每组包括至少一种肽并且在一个实施方式中包括一系列的重叠肽。因此, 第一组可含有一系列的7-14个氨基酸残基长度的重叠肽。这些肽被 $CD4^+$ T细胞识别, ( $CD4^+$ 肽)。第二组可含有一系列的超过15个氨基酸残基长度的重叠肽。这些肽被 $CD8^+$ T细胞识别 ( $CD8^+$ 肽)。这两组肽都包括全长或部分的蛋白抗原。此外, 所述肽不必是重叠的或可重叠单个氨基酸或多个氨基酸。所述肽包括一小群涵盖80-100%蛋白抗原的肽。“80-100%”表示81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%。

[0036] 提及一系列约7-14个氨基酸残基长度的包括全部或部分蛋白抗原的重叠肽表示从约7个氨基酸残基长度至最大14个氨基酸残基的肽, 其总体从蛋白抗原N-末端到C-末端或其部分的每个氨基酸残基跨越到最高6个氨基酸残基。因此, 如果给定肽的长度是x个氨基酸残基长度, 其中x是约7-14, 那么两个连续肽的重叠程度是从x-1到x-6。在一个实施方式中, 每个连续肽的重叠是x-1。一系列的超过15个氨基酸残基长度的重叠肽也跨越全部或部分的蛋白抗原, 其中每个肽是至少16个氨基酸残基长度或最多全蛋白抗原的长度。在一个实施方式中, 超过15个氨基酸残基长度的肽是从16到50个氨基酸, 如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。如上所述,所述肽没有必要重叠,只要存在至少一组一个或多个7-14氨基酸肽和另一组至少一种>15聚体肽。

[0037] 本发明包括在该系列中每个肽长度相同(例如x)的情况。然而,所述肽系列可包括 $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_j$ ... $x_i$ 肽的混合物,其中每个 $x_i$ 肽是约7-14个氨基酸残基长度或超过15个氨基酸残基长度。

[0038] 本文提供了用于检测对象中细胞介导免疫应答的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽孵育,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,然后筛选由活化淋巴细胞产生的效应分子水平。

[0039] 淋巴细胞通过与至少两组肽共同孵育激活,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白。

[0040] 本公开教导了增强来自暴露于至少两组肽的淋巴细胞的效应分子生成,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,这些肽包括全部或部分的抗原蛋白。所述淋巴细胞是“活化的”或“经刺激的”淋巴细胞。所述增强通过将所述细胞暴露于至少两组肽发生,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白。应答的水平超过全抗原或衍生自所述抗原的肽存在的情况,其中所述肽小于7个氨基酸或超过14个氨基酸。这使测定更加灵敏以评估对象内细胞介导免疫应答。因此,本公开使测定能通过测量来自至少两组肽刺激的T细胞的效应分子的出现或水平来检测、评估或监测对象中的细胞介导应答,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白。所述测定还能更早检测细胞介导应答。在一个实施方式中,其所指导的测定增强细胞介导测定的灵敏度,该测定可使所用灵敏度较低的检测试验可行。此外,认为所述细胞介导免疫应答的程度或量级反映病症状态、发展和/或严重性或为其提供信息。例如,所述响应的量级可确定对象是否患有潜在或活性或急性感染或病症。

[0041] 便利地,CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>肽被划分为单独肽集合。

[0042] 本发明不限于任意某个理论或作用模式,至少两组肽能够使得CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>表位被激活。这些肽可在本文中称为“CD4<sup>+</sup>肽”( >15聚体肽)或“CD8<sup>+</sup>肽”(7-14聚体肽)。

[0043] 还可向孵育混合物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;含CpG的寡核苷酸;用作ToII-样受体(TLR)调控剂的寡核苷酸;和其他TLR调控剂。

[0044] 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。

[0045] “CpG分子”指包括CpG序列或基序的寡核苷酸。

[0046] 本发明提供一种测定对象内细胞介导免疫应答的方法,并进而指导测定病症或试剂是否诱导免疫抑制或与之相关联。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性,以及评价暴露于蛋白毒剂。该测定还能筛

选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。

[0047] 因此,本文教导的一个方面考虑了一种用于测定对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白,并且测量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对象的细胞介导免疫应答水平。

[0048] 本文考虑的另一方面是用于测量对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多的氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自免疫细胞的免疫效应分子的水平升高,其中免疫效应分子的水平指示对象的细胞介导应答水平,其中应答水平指示选自下表的疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段:病原体感染、自身免疫疾病、癌症、炎症和暴露于毒性蛋白试剂。

[0049] 本文另一方面提供用于测量对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自免疫细胞的免疫效应分子的水平升高,其中免疫效应分子的水平指示细胞介导应答的水平并且指示选自下表的疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段:病原体感染、自身免疫疾病、癌症、炎症和暴露于毒性蛋白试剂。

[0050] 本公开教导的另一个方面是检测对象中疾病或病症的存在、不存在、水平或阶段的测定,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白,并且测量来自免疫细胞的免疫效应分子的水平上升,其中所述免疫效应分子的水平指示疾病或病症。

[0051] 本公开还考虑了用于测定某一试剂是否在对象中诱导免疫抑制的方法,所述方法包括将对象在暴露于所述试剂之后的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自所述淋巴细胞的效应分子的存在与水平,其中所述效应分子的水平决定了由所述试剂诱导的免疫抑制的水平。

[0052] 根据此方面,所述试剂可以是药物或环境毒物。

[0053] 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,所述血样用至少两组肽共刺激,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白。

[0054] 也提供了至少两组肽在生产细胞介导免疫应答的诊断测定中的应用,第一组肽包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组肽包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,所述诊断测定是通过将淋巴细胞与有限量的激动剂孵育并且检测效应分子的出现或升高的方法。

[0055] 在另一个实施方式中,本文教导的是用于检测疾病病症是否在对象中诱导免疫抑制的方法,所述方法包括将来自具有疾病病症的对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸

残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自所述淋巴细胞的免疫效应分子的出现与水平,其中所述免疫效应分子的水平指示由所述疾病病症诱导或与之相关的免疫抑制程度。

[0056] 也提供了至少两组肽在生产细胞介导免疫应答的诊断测定中的应用,第一组肽包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组肽包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,。通常,所述方法包括将淋巴细胞与至少两组肽孵育,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白。

[0057] 此应用包括用于检测或监控疾病或病症的存在、不存在、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/或暴露于药剂或毒性蛋白试剂如环境毒剂。测量“免疫效应分子”包括测量一个或多个不同类型的分子。

[0058] 本公开还提供用于检测对象内细胞介导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) 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活化剂;并且另外将T细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自免疫细胞的免疫效应分子水平升高,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水平。

[0059] T调节功能的抑制剂或调节剂示例包括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CpG的一个或多个寡核苷酸也形成本公开内容的一部分。

[0060] 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CpG的寡核苷酸和TLR调节试剂。

[0061] 提及“对象”,包括人或非人物种,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。本主题具有人类医学适用性,也适用于家畜和兽医及野生动物应用,包括赛马、赛狗和赛骆驼行业。例如,本公开的试验通常可在强度劳作(如赛跑)之前和/或之后对马实施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。

[0062] 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。

[0063] 在另一个实施方式中,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,发展潜能或监控自身免疫病症、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。例如,后者可能由于包括多种化疗试剂的某些药物而发生。或者,暴露于环境蛋白毒剂和污染物。

[0064] 免疫效应分子可以是响应细胞活化或抗原刺激生成的一定范围分子中的任何一种。尽管干扰素 (IFN) 例如 IFN- $\gamma$  是特别有用的免疫效应分子,其它的免疫效应分子包括一些细胞因子,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 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )、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 $\alpha$  (CXCL1)、sICAM-1 (CD54)、IP-10 (CXCL10)、I-TAC (CXCL11)、MCP-1 (CCL2)、MIF (GIF)、MIP-1 $\alpha$  (CCL3)、MIP-1 $\beta$  (CCL4)、RANTES (CCL5) 或 MIG (CXCL9)。

[0065] 本公开还提供了一种用于测定对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约 7-14 个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种 16 个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白,并且测量来自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对象的细胞介导应答水平。

[0066] 本文教授的测定能检测对象中疾病或病症的存在或不存在或水平或阶段,所述疾病或病症例如病原体感染、自身免疫疾病、癌症、暴露于炎症病症、暴露于药物、暴露于毒性蛋白试剂以及免疫缺陷或免疫抑制,例如由疾病病症所诱导。

[0067] 在一个实施方式中,从对象收集的样品一般保存于血液收集管中。血液收集试管包括抽血管或其他类似容器。方便起见,当样品是全血时,肝素化血液收集管。或者,血液收集后向所述管加入肝素。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”,包括没有用例如组织培养、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% 体积全血的试验样品 (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,而没有背离包括“全血”的样品。

[0068] 血液体积可为约 0.5 $\mu$ L~200mL。示例包括 0.5 $\mu$ L、1.5 $\mu$ L、10 $\mu$ L、20 $\mu$ L、50 $\mu$ L、100 $\mu$ L、500 $\mu$ L、1mL、5mL、10mL 和 20mL。本公开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号 PCT/AU01/00420 和 Petkovic-Duran 等. (2009) Biotechniques 47: 827-834 中公开。

[0069] 因此,本文考虑了在容器中混合一种或多种淋巴细胞和至少两组肽的方法,第一组包括至少一种约 7-14 个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种 16 个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,所述方法包括在容器中提供约 0.5 $\mu$ l-150 $\mu$ l 的含所述组分的液体以建立声阻抗的不连续性并且采用声学信号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分别具有各自约 1Hz~约 20,000Hz 的频率,以交替方式在所述液体内实现混沌混合。

[0070] 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)。

[0071] 组合孵育步骤与收集管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。

[0072] 细胞介导免疫系统的细胞丧失在对象抽血后的延长期之后增加全血中免疫应答的能力,并且没有干扰的反应在抽血后24小时常常严重降低或缺失。劳动力的减少和对专门塑料制品的需求允许在护理地点用肽抗原进行细胞介导的刺激,例如医师诊所、诊所、门诊设施和兽医诊所或农场上。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,样品能在没有特殊条件或快速要求的情况下存储,或运输。

[0073] 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小时的时间段特别合适。

[0074] 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,增加自身免疫反应例如自身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情。因此,提及“测量对象的细胞介导免疫应答”,包括和涵盖传染病和自身免疫疾病的免疫诊断,免疫活性标记和炎症、癌症及毒性试剂的标记。重要的是,测定组合的先天和/或获得性免疫反应。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。本文所述试验使免疫应答的早期检测或更灵敏检测可行。

[0075] 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、癌症和炎性肠病的药物。

[0076] 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)以及其引起的疾病。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。

[0077] 在一个实施方式中,结核菌抗原是CFP10、ESAT-6、TB7.7或TB37.6。在一个实施方式中,所述对象感染HIV。

[0078] 本发明特别用于就暴露于结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)进行筛选。因此,本公开还教导了一种用于测定对象中细胞介导免疫应答活性的方法,所述方法包括将来自对象的淋巴细胞与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第

二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的抗原蛋白,其中所述抗原选自来自结核分枝杆菌的CFP10、ESAT-6、TB7.7和TB37.6并且测量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对象对于结核分枝杆菌的细胞介导免疫应答水平。

[0079] CFP10也称为ESAT-6-样蛋白eesxB和分泌抗原蛋白MTSA-10。ESAT-6是一种6kDa的结核分枝杆菌早期分泌抗原靶标。其他合适的结核分枝杆菌靶标蛋白抗原包括TB7.7和TB37.6。

[0080] 本文所述用于检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、肾上腺自身免疫疾病、自身免疫溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身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、克罗恩氏病、疱疹样皮炎、盘状红斑狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、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、干燥综合症、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。

[0081] 评价暴露于传染实体的对象的潜在或实际细胞介导反应通常是重要的。本公开的方法还能用于检测这些病症是否出现以及疾病过程的水平或阶段。

[0082] 能导致免疫抑制的其他病情包括炎症病情。

[0083] 本公开描述的炎症病情示例包括但不限于,导致以某些区域变红、肿胀、疼痛和发热感觉作为响应的疾病和紊乱,其用于保护受损伤或疾病影响的组织。能使用本公开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,本公开也检测马的EIPH和各种动物病症,例如袋獾面部肿瘤。

[0084] 癌症治疗部分取决于细胞介导免疫且肿瘤本身或用于治疗癌症的药物能导致免疫抑制。本文考虑的癌症包括:一组疾病和紊乱,表征为细胞生长失控(例如肿瘤形成)而这些细胞没有任何分化为专门和不同细胞。这种疾病和紊乱包括ABL1原癌基因、AIDS相关癌症、听神经瘤、急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、腺样囊性癌、肾上腺皮质癌、特发性骨髓外化生、脱发、腺泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生不良性贫血、星形细胞瘤、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、隆突性皮质纤维肉瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室鼓膜

瘤、食道癌、尤因肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼：黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范康尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠道类癌瘤、泌尿生殖系统癌症、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞病、胶质瘤、妇科癌、血液恶性肿瘤、毛细胞性白血病、头颈癌、肝细胞癌、遗传乳腺癌、组织细胞增多病、霍奇金病、人乳头瘤病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、平滑肌肉瘤、白血病、李-佛美尼综合症、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、莫克细胞癌、间皮瘤、转移性癌症、口癌症、多发性内分泌腺瘤病、蕈样肉芽肿病、脊髓发育不良综合症、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病、鼻癌、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合症、非黑素瘤皮肤癌、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、神经外胚层肿瘤、垂体癌、真性红细胞增多、前列腺癌、罕见癌症及相关疾病、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、罗特穆德-汤姆逊综合症、唾液腺癌、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。

[0085] 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。

[0086] 免疫效应分子的检测可以在蛋白或核酸水平测量。因此,提交免疫效应分子的“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。

[0087] 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。提及“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分子。

[0088] 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,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,这是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的免疫分析,但是它们通常因为产品的潜在异质性而不太受青睐。

[0089] 单克隆抗体在免疫分析中的应用中特别有用,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针对免疫原性制品敏化的淋巴细胞获得的用于单克隆抗体生产的杂交瘤细胞系制品可用本领域技术人员熟知的技术完成。

[0090] 因此,本文提供的另一方面是用于在包括来自对象淋巴细胞的样品中检测免疫效应分子的方法,所述方法包括将所述样品或一个等份样品与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-效应物络合物的条件下接触一段时间,并且然后检测所

述络合物,其中所述免疫效应分子在所述淋巴细胞与至少两组肽孵育后产生,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原。

[0091] “样品”包括全血或其含淋巴细胞的部分。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”还包括约0.5 $\mu$ 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,以及较大体积样品例如1ml-约200ml,例如1ml、2ml、5ml、10ml或20ml。

[0092] 多种免疫试验技术可参见美国专利号4,016,043、4,424,279和4,018,653。

[0093] 下面是一类试验的描述。将未标记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。经过一段合适的孵育期,时间足以形成抗体-免疫效应物分子复合物,然后加入标记有能产生检测信号的报告分子的效应分子特异性二抗并孵育,时间足以形成另一抗体-效应物-标记抗体复合物。洗去任何未反应的物质,通过观察报告分子产生的信号来测定效应分子的存在。结果可以通过简单观察可见信号来定量,或可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。

[0094] 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、聚丙烯酰胺、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、微孔板盘或任何其他适于进行免疫分析的表面。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条件下(例如约20 $^{\circ}$ C-约40 $^{\circ}$ C)下孵育足够时间(例如2-120分钟或更合适的时间,过夜)以能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。二抗连接报告分子,用于指示二抗与效应分子的结合。

[0095] 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的同步分析。另外,抗体与细胞因子的结合可以通过结合针对所提及一抗的经标记抗体来测定。

[0096] 本说明书所用的“报告分子”指某一分子,通过其化学性质提供可分析鉴定的信号,所述信号能检测结合抗原的抗体。检测可以是定性或定量的。这类试验中最常用的报告分子是酶,荧光团或含放射性核素的分子(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。在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,其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一抗-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溶液加入抗体-抗原-抗体复合物中。底物会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,本公开扩展至基本同步的分析。

[0097] 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,荧光物标记的抗体吸收光能,诱导分子激发性状态,然

后发射用光学显微镜可视化检测的特征性颜色的光。荧光标记抗体可结合一抗-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。

[0098] 可以使用一系列其它检测系统,包括胶体金和本公开涵盖的所有这类检测系统。

[0099] 本公开也包括遗传分析,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。

[0100] 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。使用荧光团在本公开的实践中特别有用。合适荧光团的示例可选自表1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。

[0101] 表1

[0102] 合适荧光团列表

[0103]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
<b>反应和偶联探针</b>		
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 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

[0104]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
别藻蓝蛋白 (APC)	650	660
TruRed	490, 675	695
Alexa Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617
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>		
赫斯特 33342	343	483
DAPI	345	455
赫斯特 33258	345	478
SYTOX 蓝	431	480
色霉素 A3	445	575

[0105]

探针	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
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
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>		

[0106]

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

[0107] <sup>1</sup>Ex: 激发峰波长 (nm)[0108] <sup>2</sup>Em: 发射峰波长 (nm)

[0109] 本文涵盖任何合适的分析荧光发射的方法。就此而言, 本文教授的技术包括但不限于: 2光子 and 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等, Biotechnology et elia 3: 1-18, 1997所公开。

[0110] 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。任何鉴定这种标记的光学方法能用于此方面。

[0111] 红外辐射可由合适红外染料产生。可用于本公开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 1V (有机固态材料的电学, 光学和磁学属性 1V)], 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。

[0112] 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。

[0113] 流式细胞术特定用于分析荧光团发射。

[0114] 如本领域已知, 流式细胞术是高通量技术, 涉及到快速分析粒子的物理和化学特性(例如, 经标记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以下所述算法来记录。

[0115] 现代流式细胞仪能完成这些任务达到每秒100000个细胞/粒子。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, 可采用各种荧光团靶向和检测例如, 一个样品内的不同免疫效应物或多个对象的免疫效应物。

[0116] 可用于本公开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)。

[0117] 表2

[0118] 可通过流式细胞仪测量的示例性光学参数

[0119]

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>

[0120] \*使用488nm激发激光

[0121] †带通滤波器宽度

[0122] #长通滤波器

[0123] 例如, Biggs等(1999), *Cytometry*36:36-45已使用三个激发激光构建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。能充分利用参数的选择, 这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量(Malemed等(1990), “Flow cytometry and sorting (《流式细胞术和分选》)”, 第二版, 纽约的威利-利斯Wiley-Liss)。应理解本公开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。

[0124] 本文提供的试验可以是自动或半自动, 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地控制自动操作。

[0125] 因此本公开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抑制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。因此也提供一种商业方法, 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应答, 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。

[0126] 因此, 基于知识的计算机软件和硬件也形成本公开的一部分。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免疫抑制或与之相关。

[0127] 本公开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, 试验结果通过通信网络(例如因特网)或电话联系传到处理系统, 所述系统中存储算法并用于产生预测后验概率值, 其转换成细胞介导免疫应答或免疫抑制指数, 再以诊断或预测报告形式送至终端用户。本报告也形成临床护理管理和个性化医疗的基础。

[0128] 因此, 所述测定可采用试剂盒或基于计算机的系统的形式, 其包括检测淋巴细胞暴露于至少两组肽之后的免疫效应分子浓度所必需的试剂, 第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽, 而第二组包括至少一种16个或更多个氨基酸残基的肽, 所述肽包括全部或部分的蛋白抗原, 以及计算机硬件和/或软件以辅助测定和将报告传送至临床医师。

[0129] 例如,本公开包括允许用户测定对象细胞介导免疫应答状态的方法,所述方法包括:

[0130] (a) 接收免疫效应分子水平或浓度形式的数据,其通过通信网络相对于对照提供了与对象中细胞介导免疫应答状态的相关性,在使淋巴细胞暴露于至少两组肽之后测量免疫效应分子,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原;

[0131] (b) 通过单变量或多变量分析处理对象数据以提供免疫应答值;

[0132] (c) 与预定值相比,测定根据免疫应答值结果的对象状态;和

[0133] (d) 通过通信网络将对象状态转移至用户。

[0134] 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。

[0135] 便利地,所述方法一般还包括:

[0136] (a) 使用户使用远程终端站测定数据;和

[0137] (b) 通过通信网络从终端站向基站转移数据。

[0138] 所述基站能包括第一和第二处理系统,其中所述方法可包括:

[0139] (a) 转移数据到第一处理系统;

[0140] (b) 转移数据到第二处理系统;和

[0141] (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应答值。

[0142] 所述方法还可包括:

[0143] (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

[0144] (b) 使第一处理系统测定对象状态。

[0145] 本情况中,所述方法也包括以下至少一个:

[0146] (a) 在通信网络和第一处理系统之间通过第一防火墙转移数据;和

[0147] (b) 在第一和第二处理系统之间通过第二防火墙转移数据。

[0148] 所述第二处理系统可以连接到适合存储预定数据和/或单变量或多变量解析函数的数据库,所述方法包括:

[0149] (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

[0150] (b) 对比所选预定数据和对象数据或产生细胞免疫应答或免疫抑制的预测可能性指数。

[0151] 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。

[0152] 所述方法还包括使基站:

[0153] (a) 测定支付信息,支付信息代表用户支付条款;和

[0154] (b) 响应测定支付信息进行对比。

[0155] 本公开还提供相对细胞介导免疫应答或免疫抑制测定对象状态的基站,所述基站包括:

[0156] (a) 存储方法;

[0157] (b) 处理系统,处理系统适合于:

[0158] (c) 通过通信网络从使用者接收对象的数据,所述数据包括免疫效应分子的水平,其中相对于对照的所述免疫效应分子水平提供了与细胞介导免疫应答的相关性,其中在使

淋巴细胞暴露于至少两组肽之后测定所述细胞效应分子,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽和/或第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原;

[0159] (d) 完成算法函数,包括对比数据与预定数据;

[0160] (e) 根据包括对比的算法函数结果测定对象状态;和

[0161] (c) 通过通信网络输出对象状态指示到用户。

[0162] 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。

[0163] 所述处理系统可以包括:

[0164] (a) 第一处理系统,适用于:

[0165] (i) 接受数据;和

[0166] (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;和

[0167] (b) 第二处理系统,适用于:

[0168] (i) 从处理系统接受数据;

[0169] (ii) 完成包括对比的单变量或多变量解析函数;和

[0170] (iii) 转移结果到第一处理系统;

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 测定免疫效应分子浓度或水平能基于相较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应答状态)中观察到的效应分子和疾病状态之间的关系来推断随后用于预测未知状态对象状态的关系。能用算法来提供对象有某一水平细胞介导免疫应答和/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。

[0174] 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或免疫抑制水平之间的关系来推断随后用于预测未知免疫状态患者状态的关系。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情况下使用。

[0175] 本公开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应答水平以产生算法,在输入包括未知免疫应答水平对象的相同免疫效应分子水平的第二数据知识库后,提供预测细胞介导免疫应答性质的可能性指数。

[0176] 术语“训练数据”包括相对于对照的免疫效应分子水平,其中在使淋巴细胞暴露于至少两组肽之后测定所述免疫效应分子,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原。“对照”包括对比有“正常”免疫应答的对象中免疫效应分子的水平,或可根据试验在统计上测定水平。

[0177] 因此,术语“训练数据”包括免疫效应分子水平。

[0178] 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,涉及细胞介导免疫应答。

算法输出或与对照对比是对象有某一水平免疫应答或免疫抑制的可能性或风险因子,本文称为“可能性指数”。

[0179] 从免疫效应分子水平得到的数据是输入数据。包括免疫效应物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。也能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(例如癌症治疗或病原性感染治疗期间)的风险。

[0180] 如上所述,诊断免疫应答或免疫抑制病症的方法在用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,这是通过免疫效应分子水平测定对象加强先天和/或获得性免疫反应程度。同时提供检测免疫应答的方法,包括测定对象样品中先天和/或获得性免疫系统刺激后免疫效应分子的出现和/或速度。“速度”指对象样品中效应分子浓度随着时间的改变。

[0181] 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。

[0182] 本公开的方法可用于诊断和疾病分期。本公开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、癌症治疗或其他或药物或暴露于毒剂后的免疫抑制。

[0183] 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:

[0184] (a) 提供来自对象的样品;

[0185] (b) 在由至少两组肽刺激之后测定免疫效应分子的水平,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原;

[0186] 其中,相对于对照的免疫效应物水平提供与细胞介导免疫应答状态的关联性,和使所述水平用于算法以提供对象有某一免疫应答水平的可能性指数。

[0187] (c) 在稍晚的时间点重复步骤(a)和(b),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。

[0188] 提及上述“算法”或“算法函数”包括执行单变量或多变量解析函数。一系列不同结构和平台可以用作上述内容的补充。应理解可以使用适于完成本公开的任何结构形式。然而,一个有益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,并确保如果一个基站堵塞或发生错误,其他终端站可以接管。这也允许负载共享等以确保可随时访问系统。

[0189] 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。

[0190] 还应理解在一个示例中,终端站可以是便携式设备,例如PDA,移动手机等,能通过通信网络例如因特网转移对象数据到基站,和接收报告。

[0191] 在上述方面,术语“数据”是指在由一系列约7-14个氨基酸残基长度的重叠肽刺激之后免疫效应物的水平或浓度,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原。所述“通信网络”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)。

[0192] 本公开的一个方面包括通过测量针对至少两组肽的应答来证明对象的细胞介导免疫应答的实验,其中第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至

少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原。在一个实施方式中,一个或多个样品例如外周血液样品、血液或支气管肺泡灌洗液的白细胞部分富集样品,可从有或怀疑发生特定疾病(例如自身免疫疾病,病原体感染或暴露于蛋白性毒剂)的对象获得,通过测定来自效应T细胞(如CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞)的效应分子检测免疫应答。

[0193] 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结合过程中形成的任何免疫复合物。因此,会在由至少两组肽刺激淋巴细胞之后得到疑似含有细胞因子的样品,其中第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且将样品与抗体接触然后检测或定量在特定条件下形成的免疫络合物的量。

[0194] 在有效情况下将所选生物样品与抗体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,即与任何存在的效应分子结合。此时间后,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的抗体种类,使得仅这种抗体在要检测的初级免疫复合物中特异性结合。

[0195] 在一个特定的实施方式中,本公开教导了用于检测人对象中疾病或病症的存在、不存在、水平或阶段的方法,所述方法包括将在反应混合物中占总体积至少10%的全血与至少两组肽接触,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且测量来自T细胞的免疫效应分子水平的出现或升高,其中免疫效应分子水平的出现或升高指示疾病或病症。

[0196] 在另一个实施方式中,本公开提供与上述方法联用的试剂盒。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,设想某一试剂盒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。在一个更具体的实施方式中,设想某一试剂盒用于分析来自有或怀疑发生疾病的对象的样品。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免疫应答。如果还使用抗原,试剂盒还能包括特定抗原。

[0197] 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。

[0198] 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。

[0199] 所述试剂盒还可包括适当等分的经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。

[0200] 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。

[0201] 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,其中可放置测试剂、抗体或抗原,且通常适当等分。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。本公开教授的试剂盒通常还包括用于在封闭限制件中包含所述抗体、衍生自抗原的肽和任意

其它试剂容器的市售用具。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。

[0202] 本文中考虑到用于检测对象中细胞介导免疫应答或其水平的经改善测定,所述测定包括将来自对象的淋巴细胞与抗原孵育并且检测效应分子的出现或升高,所述改善包括将所述淋巴细胞与至少两组肽孵育,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原。

[0203] 本公开还提供治疗患有病原感染、自身免疫疾病或癌症或具有发展所述病症或疾病倾向的对象的方法,所述方法包括使该对象的淋巴细胞来源接触至少两组肽,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽,而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽,所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,并且检测T细胞中免疫效应分子水平的出现或升高,其中,所述免疫效应分子的出现或升高指示该对象的细胞介导应答的水平,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。

[0204] 本文教授的方面还通过下列非限制性实施例进一步说明。

[0205] 实施例1

[0206] 试验开发

[0207] 肝素化血液样品收集到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。

[0208] 将等份的血样与至少两组肽孵育,第一组包括至少一种约7-14个氨基酸残基长度的肽(识别CD8<sup>+</sup>T细胞)而第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽(识别CD4<sup>+</sup>T细胞),所述肽包括全部或部分的蛋白抗原,其中所述抗原选自结核分枝杆菌CFP10、ESAT-6、TB7.7和TB37.6。

[0209] 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。

[0210] 使经刺激的血液样品孵育1-48小时,包括在抗原肽存在于37℃孵育16-24小时,之后从上述固定血细胞收集血清。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Cellestis有限公司(Cellestis Limited))根据生产商说明定量。样品IFN- $\gamma$ 通过更加敏感的Quantiferon-TB Gold(注册商标)ELISA(澳大利亚Cellestis有限公司)根据生产商说明定量。

[0211] 每个ELISA平板上所运行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存在的IFN- $\gamma$ 量转化成IU/mL值。

[0212] 实施例2

[0213] 通过向CD4<sup>+</sup>肽添加CD8<sup>+</sup>TB-特异性肽加强Quantiferon-TB管中的应答

[0214] 这些研究在一组临床上证明感染活性结核病的患者中进行。用现有的Quantiferon-TB In-Tube诊断测试来测试患者。Quantiferon-TB管含有对CD4<sup>+</sup>T细胞特异的肽集合(>15聚体肽)。也使用改良管测试患者,其中已经加入对CD8<sup>+</sup>T细胞特异性的集合(10聚体肽)。这些额外肽作为91个肽的完整集合和两个较小的集合进行测试。这些肽集合也加入到Quantiferon-Nil管中作为对照以评价单独对这些肽的背景反应。

[0215] 在有活性TB疾病的患者中,向Quantiferon-TB管中加入CD8<sup>+</sup>肽与现有Quantiferon-TB测试相比引起10%的灵敏度增加。

[0216] 实施例3

[0217] 使用CF10肽集合的TB诊断

[0218] 此实施例旨在测试设计成由CD8<sup>+</sup>T细胞识别的TB抗原(10聚体肽)是否能够诱导来自活性TB感染的患者血液中产生可检测IFN- $\gamma$ 水平。认为单独使用MHC 1类限制性肽(术语“CD8<sup>+</sup>肽”)或与现有肽联用会改善TB诊断的灵敏性。这特别与HIV感染的个体相关,所述个体具有减少的数量的CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0219] 覆盖了CFP10Mtb蛋白全长的总共91个肽一起收集到三个集合中,每个肽为10个氨基酸长度,。集合1含有全部91个肽,集合2含有覆盖CFP10蛋白前半部分的肽(肽1-45)而集合3含有覆盖CFP10蛋白后半部分的肽(肽46-91)。单独测试这些集合(加入到Ni1管)或与现有QFT-TB Gold抗原管联合。

[0220] 共募集63名患者。其中,50名患者在QuantiFERON-TB Gold In-tube测试中测试为阳性。募集的31名患者通过培养确认患有活性TB疾病(或一个病例通过临床症状确认)而19名募集的患者是疑似TB。

[0221] 患者信息:

[0222] TB疾病:31(一名未通过培养确认)

[0223] 疑似TB:19

[0224] HHC:13

[0225] 患者总数:63

[0226] 结果示于表3-7和图1中,并且显示了测试的肽集合与QFT-TB Gold抗原管联合的定量结果。

[0227] 表3

[0228] 患有TB疾病的患者(n=31):

[0229]

	QFT-TB Gold	集合 1	集合 2	集合 3
中间	0	0	0	0
阴性	3	0	1	0
阳性	28	31	30	31
灵敏度	90%	100%	97%	100%

[0230] 表4

[0231] 疑似TB(n=19):

[0232]

	QFT-TB Gold	集合 1	集合 2	集合 3
中间	0	0	0	0
阴性	9	7	6	7
阳性	10	12	13	12

[0233] 表5

[0234] HHC患者 (n=3) :

[0235]

	QFT-TB Gold	集合 1	集合 2	集合 3
中间	0	0	0	0
阴性	0	0	0	0
阳性	3	3	3	3

[0236] 实施定量分析以检测与单独QFT-TB Gold抗原管相比,向CD4<sup>+</sup>肽的现有管加入CD8<sup>+</sup>肽集合在加强IFN- $\gamma$ 反应方面的影响。IFN- $\gamma$ 反应的加强被定义为QFN TB结果增加>1.5倍。可评价的患者排除了有转化/回复反应的患者或不是所有血浆样品都可定量的情况。图1表示对于单独QFT-TB或与每个集合联合的平均IFN- $\gamma$ 应答。

[0237] 表6

[0238] 患有TB疾病的可评价患者 (n=24) :

[0239]

	集合1	集合2	集合3
加强 (>1.5x QFN TB结果)	17	20	19
无加强	6	4	5
%加强 (占可评价患者)	74%	83%	79%

[0240] 表7

[0241] 可评价的疑似TB (n=6) :

[0242]

	集合1	集合2	集合3
加强 (>1.5x QFN TB结果)	0	0	0
无加强	6	6	6
%加强 (占可评价患者)	0%	0%	0%

[0243] 这些数据表明向现有的QFT-TB Gold 1n Tube测定(其含有CD4<sup>+</sup>肽)加入CD8<sup>+</sup>肽使得测定灵敏度增加10%。此外,所述数据表明加入CD8肽引起的应答量增加(“加强”)超过1.5-倍只有在衍生自患有已确认活性TB疾病对象的患者样品中实施所述测定时明显。这些

数据表明向现有的QFT-TB Gold In Tube测定加入CD8肽可区分患有活性TB疾病和潜在TB疾病的对象。

[0244] 实施例4

[0245] CFP10CD8<sup>+</sup>肽对测定特异性的影响

[0246] 此实施例旨在研究向QFT-TB Gold管加入CFP10CD8<sup>+</sup>肽是否会造成测定特异性降低。因此,在从TB发生率低的国家(澳大利亚墨尔本)募集的健康对照供体群中,联用肽集合与QFT-TB Gold In Tube测定(其含有CD4<sup>+</sup>肽)。

[0247] 覆盖了CFP10Mtb蛋白全长的总共91个肽一起收集在三个集合中,每个肽为10个氨基酸长度。集合1含有覆盖CFP10蛋白前半部分的肽(肽1-45),集合2含有覆盖CFP10蛋白后半部分的肽(肽46-91)而集合3含有全部91个肽。

[0248] 共募集92个对象。其中,3个对象在QuantiFERON-TB Gold In Tube测试中检测为阳性。没有QFT-TB阴性对象显示对肽集合中任一个的反应。结果示于表8和9。

[0249] 表8

[0250]

	QFT-TB Gold	集合 1	集合 2	集合 3
中间	0	0	0	0
阴性	89	89	89	89
阳性	3	3	3	3

[0251] 在这3个QFT-TB阳性供体中,加入所述肽集合没有观察到IFN- $\gamma$ 反应的加强(QFN TB结果增加>1.5倍)。

[0252] 表9

[0253]

	集合1	集合2	集合3
加强(>1.5x QFN TB结果)	0	0	0
无加强	3	3	3
%加强(占可评价患者)	0%	0%	0%

[0254] 这些数据表明向现有QFT-TB Gold In Tube测定中加入CD8<sup>+</sup>肽不会对测定的特异性产生负面影响。

[0255] 实施例5

[0256] 在QFT-CMV测定中CMV16聚体CD4<sup>+</sup>与肽CD8<sup>+</sup>肽的组合

[0257] 此实施例研究了CD8<sup>+</sup>肽的加入是否增强QFT-CMV测定中的应答,所述测定使用来自CMV抗原pp65的16聚体肽。

[0258] 在QFT-CMV测定中使用来自三个具有阳性CMV血清结果的健康供体的血液,并加入1)含有1 $\mu$ g/ml(终浓度)16-聚体肽的Nil管,以及2)加入1 $\mu$ g/ml(终浓度)16-聚体肽的QFT-CMV管。按照生产商说明进行该实验。

[0259] 0/3供体对单独16-聚体肽响应。3/3供体对QFT-CMV测定中16聚体+CD8<sup>+</sup>-肽响应。

结果如下图1所示。

[0260] 在任意供体中没有观察到对16聚体肽的反应。在QFT-CMV测定中,所有供体显示了对16聚体肽与CD8<sup>+</sup>肽组合的阳性反应。

[0261] 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。本公开内容还包括本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。

[0262] 文献目录

[0263] Biggs等.(1999) Cytometry36:36-45Daneshvar等.(1999) J. Immunol. Methods226 (1-2):119-128

[0264] Durig等.(1993) J. Raman Spectrosc.24 (5):281-285

[0265] Eriksson等.(1993) Biophys. J.2:64

[0266] Fu等.(1999) Nature Biotechnology17:1109-1111

[0267] Lakowicz等.(1997) Biophys. J.72:567

[0268] Lewis等.(1999) Dyes Pigm.42 (2):197

[0269] Malemed等.(1990) "Flow cytometry and sorting (《流式细胞术和分选》)", 第二版, 纽约, 威利-利斯(Wiley-Liss)

[0270] Petkovic-Duran等.(2009) Biotechniques47:827-834

[0271] Rapaport等.(1999) Appl. Phys. Lett.74 (3):329-331

[0272] Rahman等.(1998) J. Org. Chem.63:6196

[0273] Tawa等. Mater. Res. Soc. Symp. Proc.488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials 1V (有机固态材料的电学, 光学和磁学属性1V)], 885-890

[0274] Youvan等.(1997) Biotechnology et alia3:1-18

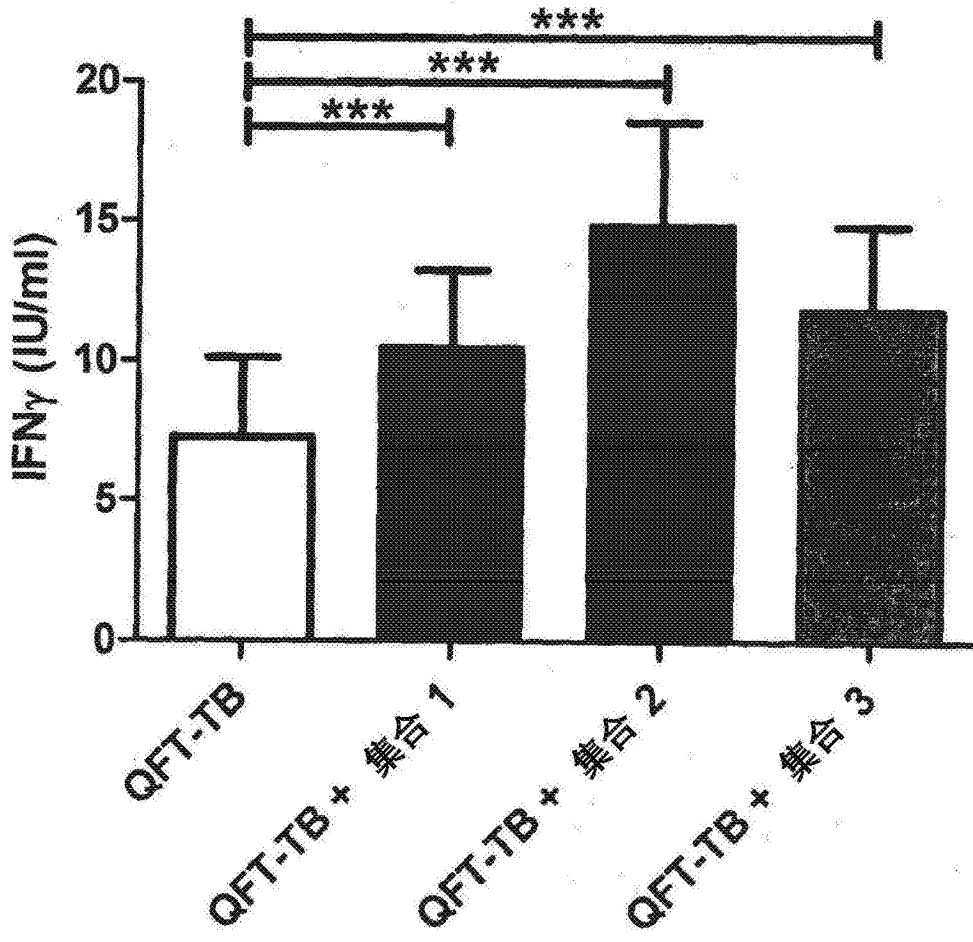


图1

CMV: 16-聚体 +/- CD8-肽

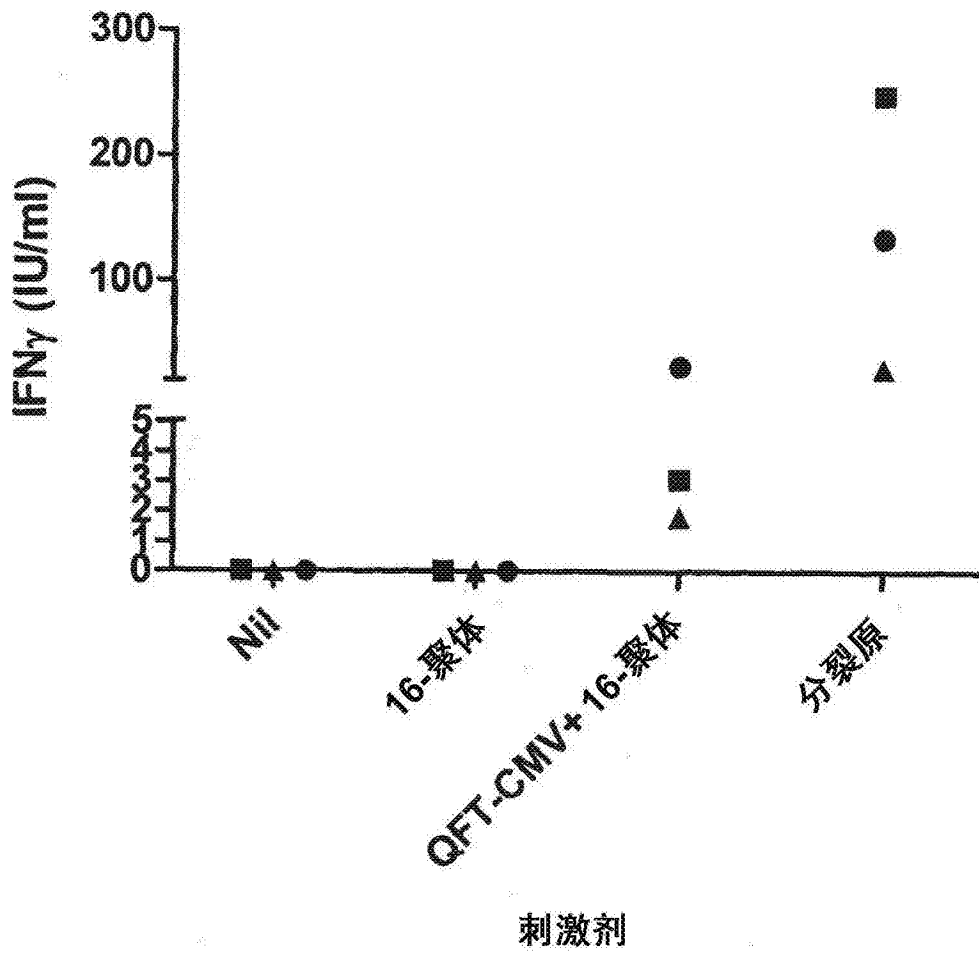


图2

专利名称(译)	具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN103703375B</a>	公开(公告)日	2018-04-10
申请号	CN201280031730.7	申请日	2012-06-27
[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·博伊尔		
发明人	J·博伊尔		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/68 G01N33/56966		
代理人(译)	张静		
优先权	61/502811 2011-06-29 US		
其他公开文献	CN103703375A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本公开一般涉及基于免疫学的诊断测定领域，所述基于免疫学的诊断测定包括检测细胞介导的免疫应答的测定。本发明教导了以具有增强灵敏度的细胞介导免疫应答为基础的对象接触抗原的诊断。将来自对象的淋巴细胞与至少第一组和第二组肽接触，第一组包括至少一种7-14个氨基酸残基长度的肽且第二组包括至少一种16个或更多氨基酸残基的肽，检测免疫分子的出现或升高。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和促进临床护理管理。

