



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102105786 A

(43) 申请公布日 2011.06.22

(21) 申请号 200980128871.9

G01N 33/50 (2006.01)

(22) 申请日 2009.07.14

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006.01)

61/083,872 2008.07.25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2009/000899 2009.07.14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/009494 EN 2010.01.28

(71) 申请人 赛乐思迪斯有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 J·L·霍华德 A·J·雷德福

J·S·罗斯尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/49 (2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 22 页

(54) 发明名称

诊断方法

(57) 摘要

本发明大体上涉及基于免疫学的诊断测定领域。更具体地,本发明涉及测定细胞介导的免疫应答反应活性的方法。本发明还涉及用于检测或监视疾病或病况的细胞介导的基于免疫应答的测定。

1. 用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述受试者是人。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述样品是未经稀释的全血。

4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述样品是全血,其构成待测样品体积的大约 10% 至 100%。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述全血构成待测样品体积的大约 50% 至 100%。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述全血构成待测样品体积的大约 80% 至 100%。

7. 权利要求 3-6 任一项的方法,其中所述全血收集在含有抗原的管中。

8. 权利要求 3-7 任一项的方法,其中所述全血收集在含有肝素的管中。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述试剂抑制 T- 调节细胞的功能或活性。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述试剂选自以下一种或多种:CD25 配体;针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的正义或反义寡核苷酸;包含 CpG 的寡核苷酸;作为 TLR 调节剂的寡核苷酸;和 TLR 调节剂。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述 CD25 配体是抗 -CD25 抗体。

12. 权利要求 10 的方法,其中所述寡核苷酸是硫代磷酸酯化的。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述免疫效应分子是细胞因子。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述细胞因子是 IFN- γ 。

15. 权利要求 1 的方法,其中通过针对所述免疫效应分子的特异性抗体来检测所述免疫效应分子。

16. 权利要求 15 的方法,其中使用 ELISA 来检测所述免疫效应分子。

17. 权利要求 16 的方法,其中使用 ELISpot 来检测所述免疫效应分子。

18. 权利要求 1-17 任一项的方法,其中所述免疫响应性是受试者中疾病或病况的指征。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述疾病或病况选自:致病试剂引起的感染、自身免疫病、炎性病况和暴露于毒性试剂。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述疾病或病况是由选自分支杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、包柔氏螺旋体菌属、大肠杆菌、沙门氏菌属、梭菌属、志贺氏菌属、变形菌属、杆菌属、疱疹病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的致病试剂引起的感染,以及由其产生的疾病。

21. 权利要求 19 的方法,其中所述疾病或病况是结核分枝杆菌感染或肺结核 (TB)。

22. 权利要求 19 的方法,其中所述疾病或病况是肝炎病毒感染。

23. 权利要求 19 的方法,其中所述疾病或病况是选自下列的自身免疫病:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森氏病、多发性硬化、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌症、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘、慢性炎症性多发性神经病、Churg-Strauss 综合征、瘢痕性类天疱疮、crest 综合征、冷凝集素病、克罗恩病、疱疹性皮炎、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛、肾小球性肾炎、格雷氏症、

格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病、胰岛素依赖性糖尿病 (I 型)、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、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、多发性肌炎与皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、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、脉管炎和白癜风。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述自身免疫病是乳糜泻。

25. 权利要求 23 的方法,其中所述自身免疫病是自身免疫性糖尿病。

26. 权利要求 19 的方法,其中所述疾病或病况是选自下列的癌症: ABL1 原癌基因、AIDS 相关的癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、腺样囊性癌、肾上腺皮质癌、原因不明性骨髓化生、脱发、肺泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生障碍性贫血、星形细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌 (皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、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、类癌肿瘤、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、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、促纤维增生性小圆形细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼睛: 黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范可尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤、泌尿生殖系统癌症、生殖细胞瘤、妊娠-滋养细胞疾病、神经胶质瘤、妇科癌症、血液系统恶性肿瘤、毛细胞白血病、头颈部癌、肝细胞癌、遗传性乳腺癌、组织细胞增生症、何杰金氏病、人乳头状瘤病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西氏肉瘤、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、Li-Fraumeni 综合征、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、merkel 细胞癌、间皮瘤、转移性癌、口癌、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、鼻癌、鼻咽癌、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合征、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、眼癌、食道癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、副鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺癌、阴茎癌、外周性神经外胚层肿瘤、垂体癌、真性红细胞增多症、前列腺癌、稀少癌症和相关病症、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、罗特穆德-汤姆逊综合征、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤、Sezary 综合征、皮肤癌、小细胞肺癌 (SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、鳞状细胞癌 (皮肤)、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌 (膀胱)、移行细胞癌 (肾-骨盆-输尿管)、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌、uroplakins、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症和 Wilms 瘤。

27. 用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征,其中所述响应性水平是选自下列的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的指征: 致病试剂

引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况和暴露于毒性试剂。

28. 用于检测受试者中疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的测定法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述受试者是人。

30. 权利要求 28 或 29 的方法,其中所述样品是未经稀释的全血。

31. 权利要求 28 或 29 的方法,其中所述样品是全血,其构成待测样品体积的大约 10% 至 100%。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述全血构成待测样品体积的大约 50% 至 100%。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述全血构成待测样品体积的大约 80% 至 100%。

34. 权利要求 30-33 任一项的方法,其中所述全血收集在含有抗原的管中。

35. 权利要求 30 或 34 任一项的方法,其中所述全血收集在含有肝素的管中。

36. 权利要求 28 的方法,其中所述试剂抑制 T- 调节细胞的功能或活性。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述试剂选自以下一种或多种:CD25 配体;针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的正义或反义寡核苷酸;包含 CpG 的寡核苷酸;和 TLR 调节剂。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述 CD25 配体是抗 -CD25 抗体。

39. 权利要求 37 的方法,其中所述寡核苷酸是硫代磷酸酯化的。

40. 权利要求 28 的方法,其中所述免疫效应分子是细胞因子。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述细胞因子是 IFN- γ 。

42. 权利要求 28 的方法,其中通过针对所述免疫效应分子的特异性抗体来检测所述免疫效应分子。

43. 权利要求 42 的方法,其中使用 ELISA 来检测所述免疫效应分子。

44. 权利要求 43 的方法,其中使用 ELISpot 来检测所述免疫效应分子。

45. 权利要求 28 至 44 任一项的方法,其中所述疾病或病况选自:致病试剂引起的感染、自身免疫病、炎性病况和暴露于毒性试剂。

46. 权利要求 45 的方法,其中所述疾病或病况是由选自分支杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、大肠杆菌、沙门氏菌属、梭菌属、志贺氏菌属、变形菌属、杆菌属、嗜血杆菌属、肝炎病毒、疱疹病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV) 的致病试剂引起的感染,以及由其产生的疾病。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病或病况是结核分枝杆菌感染或肺结核(TB)。

48. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病或病况是肝炎病毒感染。

49. 权利要求 45 的方法,其中所述疾病或病况是选自下列的自身免疫病:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森氏病、多发性硬化、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌症、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘、慢性炎症性多发性神经病、Churg-Strauss 综合征、瘢痕性类天疱疮、crest 综合征、冷凝集素病、克罗恩病、疱疹样皮炎、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛、肾小球性肾炎、格雷氏症、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA 肾病、胰岛素依赖性糖尿病(I 型)、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发

性硬化、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、多发性肌炎与皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、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、脉管炎和白癜风。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述自身免疫病是乳糜泻。

51. 权利要求 49 的方法,其中所述自身免疫病是自身免疫性糖尿病。

52. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病或病况是选自下列的癌症: ABL1 原癌基因、AIDS 相关的癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、腺样囊性癌、肾上腺皮质癌、原因不明性骨髓化生、脱发、肺泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生障碍性贫血、星形细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌(皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、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、类癌肿瘤、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、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、促纤维增生性小圆形细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼睛:黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范可尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤、泌尿生殖系统癌症、生殖细胞瘤、妊娠-滋养细胞疾病、神经胶质瘤、妇科癌症、血液系统恶性肿瘤、毛细胞白血病、头颈部癌、肝细胞癌、遗传性乳腺癌、组织细胞增生症、何杰金氏病、人乳头状瘤病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西氏肉瘤、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、Li-Fraumeni 综合征、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、merkel 细胞癌、间皮瘤、转移性癌、口癌、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、鼻癌、鼻咽癌、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合征、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、眼癌、食道癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、副鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺癌、阴茎癌、外周性神经外胚层肿瘤、垂体癌、真性红细胞增多症、前列腺癌、稀少癌症和相关病症、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、罗特穆德-汤姆逊综合征、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤、Sezary 综合征、皮肤癌、小细胞肺癌(SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、鳞状细胞癌(皮肤)、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌(膀胱)、移行细胞癌(肾-骨盆-输尿管)、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌、uroplakins、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症和 Wilms 瘤。

53. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病或病况是对铍的敏感性或暴露于铍。

54. 用于检测人类受试者中疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的方法,所述方法包括,将构成反应混合物总体积的至少 10% 的全血与抑制调节性 T- 细胞功能的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

55. 治疗患有致病性感染、自身免疫病症或癌症或具有患上所述病况或病症的倾向的

受试者的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征,细胞介导的响应性水平是所述病况或病症的存在、不存在、水平或状态的指征;然后治疗所述病况或病症。

56. 用于测定受试者中细胞介导的免疫应答的试剂盒,所述试剂盒是多成分的形式,其中第一成分包含多个血液收集管,第二成分包含用于免疫效应分子的基于抗体的检测工具,第三成分包含一套说明书,所述说明书包含权利要求 1 或 28 的步骤。

57. 调节 T- 细胞或 T- 细胞子集的功能或活性的试剂用于制备诊断测定的用途,所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

58. 选自 (i) 阻抑性调节性 T- 细胞的抑制剂;和 (ii) 增强免疫系统的细胞或其子集的激活剂的试剂用于制备诊断测定的用途,所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

59. 选自 CD25 配体、针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的正义或反义核酸分子、包含 CpG 的寡核苷酸和 TLR 调节剂的试剂用于制备诊断测定的用途,所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

诊断方法

[0001] 申请信息

[0002] 本申请与 2008 年 7 月 25 日提交的美国临时专利申请号 61/083,872 相关并要求该申请的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及基于免疫学的诊断测定的领域。更具体地,本发明涉及测定细胞介导的免疫应答反应活性的方法。本发明还涉及用于检测或监视疾病或病况的细胞介导的基于免疫应答的测定。

背景技术

[0004] 在本说明书中作者提及的公开物的著录项目按照字母顺序排列于说明书末尾。

[0005] 本说明书中对任何现有技术的提及不是且不应该被认为是承认或以任何形式提议该现有技术在任何国家构成公知常识的一部分。

[0006] 基于免疫学的诊断提供了用于检测多种疾病状况的重要工具。鉴于免疫系统内的成分的特异性,所以情况尤其如此。虽然有此特异性,但是基于免疫学的诊断的灵敏性并不总是足以检测低水平的免疫活性,例如响应于低度感染,或者在存在持续低水平感染时。需要开发具有更高的灵敏性的诊断测定。

[0007] 一种形式的基于免疫学的诊断测定包括,在分离的细胞培养物或全血培养物中以抗原或有丝分裂原刺激 T- 细胞,然后检测效应分子,例如由激活的 T- 细胞(也称为效应 T- 细胞)产生的细胞因子。一般使用诸如酶免疫测定、多重珠子分析、ELISpot 和流式细胞术等技术检测效应分子。此类测定对于检测疾病特异性的 T- 细胞应答是有用的。

[0008] 在一种形式的测定中,使用全血在相对短的时间段内(通常少于 24 小时)测定 T- 细胞应答。此类测定在诊断肺结核感染中是有用的。但是,这些类型的测定的一个障碍在于调节性 T- 细胞(T-reg 细胞)(其抑制效应 T- 细胞应答)的影响。已经开发了需要选择性除掉 T-reg 细胞的方法,但是这是耗时的,降低了定量分析的能力并降低了灵敏性。另外,这些方法没有考虑到扩大免疫应答的 T- 细胞。

[0009] 需要一种改进的基于免疫细胞介导的测定。此类测定可用于检测或监视受试者中的多种疾病和病况,并用于监测治疗程序。

发明内容

[0010] 本发明提供了通过增强的效应分子的产生来检测细胞介导的免疫应答活性的方法。虽然也可能进行细胞分离和消除步骤,但是本发明的测定可以使用全血进行,无需费力的细胞分离或消除步骤。本发明的测定显示出增强的灵敏性。在一个实施方式中,效应 T- 细胞和与待测疾病或病况相关的抗原接触,然后或同时,与调节 T- 细胞、尤其是 T-reg 细胞活性或功能的试剂接触。本发明的方法在检测或监视受试者的疾病或病况,包括疾病或病况的水平或阶段中是特别有用的,所述疾病或病况是例如致病试剂引起的感染、自身免

疫病、癌症和炎性病况。其它病况包括暴露于毒性试剂,例如铍。本发明的测定还可用于监测治疗程序。

[0011] 因此,本发明的一个方面涉及测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0012] 本发明的另一个方面提供了用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征,其中所述响应性水平是选自下列的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的指征:致病试剂引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况和暴露于毒性试剂。

[0013] 本发明的另一个方面涉及检测受试者中疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的测定法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

[0014] 本发明的另一个方面提供了用于监视对于受试者的疾病或病况的治疗程序产生的响应的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与用于该治疗程序的试剂接触,并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述治疗程序的功效的指征。

[0015] 本发明的方法也可以称为“测定”。本文中的测定尤其可用于评估受试者的一般免疫响应性,或用于检测针对特定疾病状况例如自身免疫病、乳糜泻、癌症,或由致病生物体或试剂引起的感染的响应性。T- 细胞的来源方便地是全血,但是本发明涉及使用任何 T- 细胞来源,包括含有 T- 细胞的分级的样品,以及已经经过细胞分离和 / 或消除的样品。任选地,向反应混合物中加入单糖,例如右旋糖或葡萄糖。提及“全血”包括未经稀释的全血,以及以总样品测定体积(即反应混合物)的大约 10% 至大约 100% 的体积在测定中使用的全血。

[0016] 在具体的实施方式中,通过试剂靶向 T- 细胞样品中的 T-reg 细胞以进行功能或活性修饰。修饰可以是抑制具有免疫阻抑功能的 T-reg 细胞,或者是增加具有免疫刺激功能的特定细胞。所述试剂的例子包括 CD25 配体、针对编码诸如 Janus 激酶 1 (JAK1) 或酪氨酸激酶 2 (TYK2) 的分子的特定基因或 mRNA 的正义或反义寡核苷酸,以及刺激试剂,例如包含 CpG 的寡核苷酸,其通过 toll- 样受体 (TLR) 和 / 或通过其它机制发挥作用。因此,本发明提供了 CD25 配体、与编码 JAK1 或 TYK2 分子的遗传材料 (RNA 或 DNA) 互补或同源的寡核苷酸的用途,其用于扩大或增强免疫细胞介导的测定的灵敏性。本文涉及的寡核苷酸可以具有修饰的骨架或者具有化学修饰的核苷酸或核苷,例如硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸。

[0017] 可以使用一种类型的试剂,或者可以一起使用两种或所有三种类型的试剂。

[0018] 受试者可以是人或非人动物。因此,本发明具有人类医药、兽医药和家畜上的应

用。人类代表实施本发明的特别有用的受试者。

[0019] 因此,在具体的实施方式中,本发明涉及用于检测人类受试者的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的方法,所述方法包括,将构成反应混合物总体积的至少 10% 的全血与抑制调节性 T- 细胞功能的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

[0020] 试剂盒和皮肤测试也构成本发明的部分内容。

[0021] 在一个实施方式中,样品是全血,其被收集在含有抗原或向其中加入了抗原的收集管中以进行温育。一般而言,血液保持在存在肝素的情况下。肝素可以在加入血液的时候存在于管中,或者随后加入肝素。血液收集管的使用与标准的自动化实验室系统是相容的,这些易于进行大规模分析和随机获得取样。血液收集管还会使操作损失最小化并减少实验室向全血和血浆的暴露,因此,降低了实验室人员接触致病试剂例如人类免疫缺陷病毒 (HIV)、乙肝病毒 (HBV) 或丙肝病毒 (HCV) 的风险。此外,相对于以前使用的 24 孔培养板而言,使用收集管进行温育赋予了测定更高的灵敏性。

[0022] 本发明提供了加强的细胞介导的免疫测定,因此,在一个实施方式中,包括使用收集管,任选地包括单糖例如右旋糖和与抗原及调节 T- 细胞功能或活性的试剂一起温育的步骤。所述温育步骤通常是大约 5 至大约 50 小时。

[0023] 免疫效应分子一般是细胞因子,例如但不限于 IFN- γ 或白细胞介素(例如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 或 IL13,或转化生长因子 β [TGF β],或粒细胞集落刺激因子 [G-CSF] 或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 [GM-CSF])。可以在分子自身的水平上或者编码该分子的基因表达的程度测定免疫效应分子的存在或水平。

[0024] 详细描述

[0025] 在本说明书全文中,除非上下文另有需要,否则词语“包含 (comprise)”或其变体例如“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”应理解为暗示包括指明的元素或整体或元件或整体的集合,但不排除任何其它的元素或整体或元件或整体的集合。

[0026] 除非另有指明,否则本发明不限于特定的测定成分、生物材料或反应试剂等,因为它们是可变的。还应该理解,本文使用的术语仅仅是为了描述具体实施方式,不是为了限制。

[0027] 必须注意,本说明书中使用的单数形式“一个 (a)”、“一个 (an)”和“该 (the)”包括复数形式,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,还包括两个或更多个 T- 细胞;提及“效应分子”包括单个效应分子,还包括两个或更多个效应分子;提及“本发明”包括本发明的单个或多个方面;等等。

[0028] 本文使用的术语例如“试剂”、“反应试剂”、“化合物”和“细胞”是指化学或生物实体,其参与检测细胞介导的应答或此类应答的水平的测定中。

[0029] 提及“试剂”、“反应试剂”、“化合物”和“细胞”还包括两个或更多个此类实体的组合。“组合”还包括多部分的例如两部分的组合物,其中分开地提供试剂并分开地使用或分散,或者在分散前混合在一起。例如,多部分的测定包 (multi-part assay pack) 可以具有分开保持的两个或更多个试剂。因此,本发明的这个方面包括这样的抗原和 T- 细胞调节剂,它们是干燥的并且松散的,或者固定于测定包中的腔室壁或固体载体上。

[0030] 本发明部分基于增加从刺激的 T- 细胞产生效应分子。这能够得到评估受试者的细胞介导的免疫响应性的更灵敏的测定。因此,本发明提供了通过测定从目标抗原刺激的效应 T- 细胞产生的效应分子的存在或水平来检测、评估或监视受试者中的细胞介导的应答的测定,所述抗原是例如与疾病或病况相关的抗原。T- 细胞或 T- 细胞的子集与调节 T- 细胞功能或活性的试剂、尤其是调节 T-reg 细胞功能或活性的试剂接触。一般而言,所述试剂抑制 T-reg 细胞的阻抑功能。因此,本发明提供了测定受试者中细胞介导的免疫活性的响应性的方法,进而提供了用于诊断感染性疾病、致病性状况、免疫能力水平和针对内源性或外源性抗原的 T- 细胞响应性的标志物以及评估暴露于毒性试剂例如铍的方法。

[0031] 因此,本发明的一个方面涉及用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0032] 本发明的另一个方面提供了用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征,其中所述响应性水平是选自下列的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的指征:致病试剂引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况和暴露于毒性试剂。

[0033] 本发明的另一个方面涉及检测受试者中疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的测定法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

[0034] 还提供了调节 T- 细胞或 T- 细胞子集的功能或活性的试剂用于制备诊断测定的用途,所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并且检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

[0035] 这种用途包括用于检测或监视以下疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段:致病试剂引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况和 / 或暴露于毒性试剂,例如铍。

[0036] 提及 T- 细胞功能或活性的调节包括对调节性 T- 细胞 (T-reg 细胞) 的调节。更具体地,其包括抑制 T-reg 细胞的阻抑功能。此外,测定“免疫效应分子”包括测定一种或多种不同类型的分子。调节 T-reg 细胞的试剂也包括在本文中,例如 CD25 配体;针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的正义或反义寡核苷酸;包含 CpG 的寡核苷酸;作为 TLR 调节剂的寡核苷酸;以及其它 TLR 调节剂。

[0037] 本发明的另一个方面提供了测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节调节性 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0038] 本发明的另一个方面提供了用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节调节性 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征,其中所述响应性水平是选自下列的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的指征:致病试剂引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况和暴露于毒性试剂。

[0039] 本发明的另一个方面涉及检测受试者中疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的测定法,所述方法包括,将来自受试者的 T- 细胞来源与调节调节性 T- 细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

[0040] 在具体的实施方式中, T-reg 细胞是活性被抑制的免疫应答抑制细胞。

[0041] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及用于测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的调节性 T- 细胞来源与选自下列的试剂接触:(i) 抑制性调节性 T- 细胞的抑制剂;和(ii) 免疫增强细胞或其子集的激活剂;然后将所述 T- 细胞与抗原接触,针对该抗原的细胞介导的应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0042] 另一个实施方式提供了测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法,所述方法包括,将来自受试者的调节性 T- 细胞来源与选自下列的试剂接触:(i) 抑制性调节性 T- 细胞的抑制剂;和(ii) 免疫增强细胞或其子集的激活剂;然后将所述 T- 细胞与抗原接触,针对该抗原的细胞介导的应答是待测的;并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的指征。

[0043] 在相关的实施方式中,提供了选自(i) 抑制性调节性 T- 细胞的抑制剂;和(ii) 增强免疫系统的细胞或其子集的激活剂的试剂用于制备诊断测定的用途,所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

[0044] 提及“受试者”包括人类或非人类物种,包括灵长类、家畜动物(例如绵羊、牛、猪、马、驴、山羊)、实验室试验动物(例如小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、仓鼠)、宠物(例如狗、猫)、鸟类(例如家禽、观赏鸟类)、爬行动物和两栖动物。因此,本发明具有人类医药上的应用,以及家畜和兽医和野生动物上的应用。但是,最优选地,受试者是人类并且细胞介导的免疫应答测定具有以下应用:筛选针对致病微生物、病毒和原生动物的响应性、产生自身免疫病、乳糜泻的潜在可能,或监视自身免疫病、乳糜泻,以及用于监视受试者对肿瘤挑战的响应。

[0045] 免疫效应分子可以是响应于细胞激活或抗原刺激所产生的多种分子中的任意种。虽然干扰素(IFN)例如 IFN- γ 是特别有用的免疫效应分子,但其它的还包括多种细胞因子,例如白细胞介素(IL),例如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 或 IL13,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),例如粒细胞集落刺激因子

(G-CSF) 或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 另外还有许多其它的, 例如补体或补体途径中的成分。

[0046] T-reg 功能的抑制剂或调节剂的例子包括 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 的人源化的或去免疫化的多克隆或单克隆抗体, 或重组或合成形式的多克隆或单克隆抗体。所述试剂的其它例子包括针对编码 Janus 酪氨酸激酶 1 (JAK1) 或酪氨酸激酶 2 (TYK2) 的 mRNA 或 DNA (即遗传材料) 的正义或反义核酸分子, 或 JAK1 或 TYK2 蛋白的小分子抑制剂。提及“小分子”包括如国际专利公开号 WO 2005/118629 中描述的免疫球蛋白新抗原受体 (IgNAR)。合适的试剂的其它例子有, 刺激试剂, 例如 CpG 分子, 其通过 Toll-样受体 (TLR) 和 / 或其它机制发挥作用。因此, 包含 CpG 的寡核苷酸和作为 TLR 调节剂的寡核苷酸也构成本发明的一部分。

[0047] 可以使用单一类型的试剂, 或者可以应用两种或更多种类型的试剂。例如, 可以使用 CD25 配体和 JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸; CD25 配体和 TLR 调节剂; JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸和 TLR 调节剂; 或 CD25 配体、JAK1/TYK2 正义或反义寡核苷酸和 TLR 调节剂进行测定。或者, 仅应用一种类型的试剂。在另一个替代性实施方式中, 使用包含 CpG 的寡核苷酸和 TLR 调节剂。

[0048] 可以对寡核苷酸进行修饰, 例如具有化学修饰的骨架, 例如含磷骨架和 / 或化学修饰的核苷或核苷酸。

[0049] 因此, 本发明的另一个方面提供了测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括, 将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的 CD25 配体以及抗原接触, 针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的; 并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高, 其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0050] 本发明的另一个方面提供了测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括, 将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的针对 JAK1 和 / 或 TYK2 遗传材料的正义或反义寡核苷酸以及抗原接触, 针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的; 并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高, 其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0051] 本发明的另一个方面提供了测定受试者中细胞介导的免疫应答活性的方法, 所述方法包括, 将来自受试者的 T- 细胞来源与调节 T- 细胞或其子集的功能或活性的 CpG 分子以及抗原接触, 针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的; 并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高, 其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征。

[0052] “CpG 分子”意思是包含 CpG 序列或基序的寡核苷酸。本发明延伸至 Toll-样受体 (TLR) 功能或免疫系统的其它方面的任何调节剂。

[0053] 因此, 本发明延伸至选自 CD25 配体、针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的正义或反义核酸分子、和免疫刺激试剂 (例如包含 CpG 的寡核苷酸, 其通过 TLR 和 / 或其它机制发挥作用) 的试剂用于制备诊断测定的用途, 所述诊断测定通过将抗原或有丝分裂原与包含 T- 细胞的材料一起温育并检测效应分子的存在或升高来测定细胞介导的免疫响应性。

[0054] 这些方面包括使用上述的特定试剂用于检测受试者的疾病或病况的存在、不存

在、水平或阶段,所述疾病或病况是例如致病试剂引起的感染、自身免疫病、癌症、炎性病况、或暴露于毒性试剂,例如铍。

[0055] 试剂,例如 CD25 配体、反义分子和 CpG 分子可以自由地存在于反应管中,或者固定于固体载体,例如珠子或反应管的侧壁或底部。试剂还可以是干燥的形式,其在使用前或使用过程中复原。类似地,抗原可以自由地存在于或者固定于反应管中,例如固定于反应管本身或珠子或其它固体载体上。

[0056] 在一个实施方式中,从受试者收集的样品一般置于血液收集管中。血液收集管包括采血管或其它类似的管。方便地,当样品是全血时,所述血液收集管是肝素化的。或者,在采集血液之后向管中加入肝素。虽然特别考虑到全血作为最方便的样品,但本发明延伸至其它包含免疫细胞的样品,例如淋巴液、脑液、组织液和呼吸液,包括鼻和肺液,以及经过细胞消除的样品。提及“全血”包括未经稀释的全血,例如使用组织培养基、介质、试剂、赋形剂等稀释。在一个实施方式中,术语“全血”包括这样的测试样品(即反应混合物),其包含至少 10% 体积的全血。术语“至少 10% 体积”包括反应混合物总测定体积的 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% 体积的血液体积。不脱离包含“全血”的样品,可以加入另外的试剂,例如培养基、酶、赋形剂、抗原等。

[0057] 血液收集管的使用与标准的自动化实验室系统是相容的,这些易于进行大规模分析和随机获得取样。血液收集管还会使操作损失最小化并减少实验室向全血和血浆的暴露,因此,降低了实验室人员接触致病试剂,例如 HIV、乙肝病毒 (HBV) 或丙肝病毒 (HCV) 的风险。

[0058] 将温育步骤与收集管组合在一起是特别有效的,并且增强了测定的灵敏性,如存在样品糖例如右旋糖或葡萄糖的情况下温育细胞的可选特征一样。

[0059] 在从受试者中采血之后延长的时间段后,细胞介导的免疫系统的细胞丧失引发全血中的免疫应答的能力,并且在采血后 24 小时,不受破坏的应答经常被严重减弱或者不存在。人力和特定塑料器皿需求的减少允许在护理地点(例如医生办公室、诊所、门诊机构和兽医诊所或农场)进行以抗原刺激细胞介导的免疫。一旦完成抗原刺激,则不再存在对新鲜和活性细胞的需求。IFN- γ 和其它细胞因子或免疫效应分子在血浆中是稳定的,因此,可以储存或运输样品,无需类似于那些用于其它感染性疾病或其它疾病诊断中的标准血清样品的特定条件或迅速的时间要求。

[0060] 温育步骤可以是 5 至 50 小时,例如 5 至 40 小时或 8 至 24 小时,或之间的时间段,包括 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。

[0061] 能测定细胞介导的免疫力对于评估受试者针对致病试剂(例如微生物或病毒或原生动植物)引起的感染作出响应、引发自身免疫应答(例如自身免疫性糖尿病中的)或提供抵抗癌症或其它肿瘤病况的保护的能力,或检测炎性病况,或检测受试者对于毒性试剂例如铍的暴露或对其的敏感性具有重要意义。相应地,提及“测定受试者中细胞介导的免疫应答”包括感染性和自身免疫病的免疫诊断、免疫能力标志物和针对内源性或外源性抗

原的 T- 细胞应答的检测（包括测定疫苗功效），以及炎性疾病、癌症的标志物和毒性试剂。重要的是，通过抑制抑制性 T-reg 细胞或者刺激增强免疫系统的细胞，会增大所述测定的灵敏性。因此，现在可以检测例如低水平的感染。

[0062] 致病性或感染性试剂包括细菌、原生动动物和病毒。细菌的例子包括革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物，例如分支杆菌属 (*Mycobacterium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、梭菌属 (*Clostridium*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、变形菌属 (*Proteus*)、杆菌属 (*Bacillus*)、嗜血杆菌属 (*Hemophilus*)、包柔氏螺旋体菌属 (*Borrelia*) 等。结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 是特别有用的试剂，以及由于结核分支杆菌感染引起的病况，例如肺结核 (TB)。病毒的例子包括肝炎病毒（乙肝病毒和丙肝病毒）、疱疹病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 以及由其引起的疾病。原生动动物包括疟原虫属 (*Plasmodium*)、癣菌 (*Ringworm*)、肝脏原生动动物等。其它致病性试剂包括真核细胞，例如酵母和真菌。

[0063] 本文涉及的要检测的自身免疫病尤其包括：斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森氏病、多发性硬化、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌症、口炎性腹泻 - 皮炎、慢性疲劳综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘、慢性炎症性多发性神经病、Churg-Strauss 综合征、瘢痕性类天疱疮、crest 综合征、冷凝集素病、克罗恩病、疱疹样皮炎、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛、肾小球性肾炎、格雷氏症、格林 - 巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病、胰岛素依赖性糖尿病 (I 型)、扁平苔藓、狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、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、多发性肌炎与皮肌炎、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、赖特综合征、风湿热、风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、干燥综合征、僵人综合征、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、脉管炎和白癜风。

[0064] 一般而言，在这些个体中评估潜在的或真实的细胞介导的响应性具有重要意义。本发明的方法还可用于检测这些病况的存在或不存在以及疾病进展的水平或阶段。

[0065] 涉及的其它疾病病况包括炎性疾病病况。

[0066] 本发明涉及的炎性疾病病况的例子包括但不限于导致产生发红、肿胀、疼痛，以及某些区域的热感的疾病和病症，其是为了保护受损伤或疾病影响的组织。可以使用本发明的方法治疗的炎性疾病包括但不限于，痤疮、心绞痛、关节炎、吸入性肺炎疾病、积脓症、肠胃炎，炎症、肠炎、NEC、坏死性小肠结肠炎、盆腔炎、咽炎、PID、胸膜炎、喉咙发炎、发红 (redness)、发红 (rubor)、喉咙痛、胃炎和尿道感染、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经根性神经病，慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病，慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经根性神经病。

[0067] 癌症治疗在一定意义上也依赖于细胞介导的免疫力。本文涉及的癌症包括：特征在于失控的细胞生长（即形成肿瘤）（那些细胞不进行分化成特化和不同细胞的任何分化）的一组疾病和病症。此类疾病和病症包括 ABL1 原癌基因、AIDS 相关的癌症、听神经瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、腺样囊性癌、肾上腺皮质癌、原因不明性骨髓化生

(agnogenic myeloid metaplasia)、脱发、肺泡软组织肉瘤、肛门癌、血管肉瘤、再生障碍性贫血、星形细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症、基底细胞癌（皮肤）、膀胱癌、骨癌、肠癌、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、类癌肿瘤、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、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、促纤维增生性小圆形细胞肿瘤、导管癌、内分泌癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤文氏肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼睛：黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、范可尼贫血、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤、泌尿生殖系统癌症、生殖细胞瘤、妊娠 - 滋养细胞疾病、神经胶质瘤、妇科癌症、血液系统恶性肿瘤、毛细胞白血病、头颈部癌、肝细胞癌、遗传性乳腺癌、组织细胞增生症、何杰金氏病、人乳头状瘤病毒、葡萄胎、高钙血症、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西氏肉瘤、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、Li-Fraumeni 综合征、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、merkel 细胞癌、间皮瘤、转移性癌、口癌、多发性内分泌肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生性疾病、鼻癌、鼻咽癌、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、奈梅亨断裂综合征、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、眼癌、食道癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造口术卵巢癌、胰腺癌、副鼻窦癌、副甲状腺癌、腮腺癌、阴茎癌、外周性神经外胚层肿瘤、垂体癌、真性红细胞增多症、前列腺癌、稀少癌症和相关病症、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、罗特穆德 - 汤姆逊综合征、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤、Sezary 综合征、皮肤癌、小细胞肺癌 (SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、鳞状细胞癌（皮肤）、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌（膀胱）、移行细胞癌（肾 - 骨盆 - 输尿管）、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌、uropakins、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症和 Wilms 瘤。

[0068] 多种抗原中的任意个可用于测定中，例如那些对特定生物、病毒、自身抗原或癌细胞特异性的。或者，更加一般性的试剂可用于测试细胞介导的免疫应答的一般能力，此类试剂包括有丝分裂原。后者的例子包括来自结核分支杆菌的纯化的蛋白衍生物 (PPD) 和破伤风类毒素。但是，一般而言，任意的肽、多肽或蛋白、碳水化合物、糖蛋白、磷脂、磷蛋白或磷脂蛋白或非蛋白类化学试剂可以用于测定系统中作为抗原或有丝分裂原。

[0069] 如上所述，免疫效应分子的检测可以在蛋白或磷酸水平进行。因此，提及免疫效应分子的“存在或水平”包括直接的和间接的数据。例如，高水平的细胞因子 mRNA 是显示细胞因子水平升高的间接数据。

[0070] 免疫效应分子的配体在检测和 / 或定量这些分子中是特别有用的。针对免疫效应分子的抗体是特别有用的。本文涉及的测定的技术是本领域已知的，并且包括，例如，放射免疫测定、夹心式测定、ELISA 和 ELISpot。提及“抗体”包括抗体的部分、哺乳动物源化（例如人源化）抗体、去免疫化抗体、重组或合成的抗体，以及混杂和单链抗体。对于人类中的皮试而言，本文中特别考虑到人源化或去免疫化抗体用于检测效应分子。

[0071] 多克隆和单克隆抗体都可通过使用免疫效应分子或其抗原性片段进行免疫来获得，每种均可用于免疫测定。获得这两种类型的血清的方法是本领域熟知的。多克隆血清优选性较低，但是可以通过使用有效量的免疫效应分子或其抗原性部分注射合适的实验动

物、从该动物收集血清并通过任意已知的免疫吸附技术分离特异性血清来相对容易地制备。虽然通过该方法制备的抗体实质上可用于任意类型的免疫测定,但是它们一般不是优选的,因为产品具有潜在的异质性。

[0072] 单克隆抗体用于免疫测定是特别有用的,因为能够大量地生产它们,并且产品具有同质性。可以通过本领域技术人员熟知的技术来制备用于生产单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其衍生自无限增殖细胞系与针对免疫原性制剂致敏的淋巴细胞的融合。

[0073] 因此,本发明的另一个方面涉及用于检测来自受试者的包含 T- 细胞的样品中的免疫效应分子的方法,所述方法包括,将样品或样品的等分试样与对于免疫效应分子或其抗原性片段特异性的抗体在足以形成抗体 - 效应分子复合物的条件下接触一段时间,然后检测该复合物,其中在抗原与 T- 细胞和调节调节性 T- 细胞功能的试剂一起温育之后产生所述免疫效应分子。

[0074] “样品”包括全血或其组分。该方法包括在平坦的或球形的固体载体上的微阵列和巨阵列。微阵列或巨阵列是有用的。

[0075] 多种免疫测定技术是可获得的,可以参见美国专利号 4,016,043、4,424,279 和 4,018,653。

[0076] 以下描述了一种类型的测定。将未经标记的抗体固定于固体基质上,将样品(其免疫效应分子(例如细胞因子)是待测的)与结合分子接触。温育适当的时间段后(足以允许形成抗体 - 免疫效应分子复合物的时间段),加入对效应分子特异性的第二抗体并且温育,所述第二抗体上标记了能够产生可检测信号的报告分子,温育时间为允许形成抗体 - 效应分子 - 标记抗体的另一种复合物。洗掉任何未反应的材料,通过观察报告分子产生的信号来测定效应分子的存在。结果可以是定性的——仅仅通过简单观察可视信号;也可以是定量的——通过与含有已知数量抗原的对照样品进行比较。这种一般化的技术对于本领域技术人员是熟知的,其可以是多个变体中的任意项。

[0077] 在这些测定中,将对于免疫效应分子具有特异性的第一抗体共价地或被动地结合至固体表面。所述固体表面通常是玻璃或聚合物,最常使用的聚合物是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。固体载体可以是管、珠子、球、微平板圆盘的形式,或任何其它适合于进行免疫测定的表面。结合方法是本领域熟知的,一般由下列组成:交联、共价结合或物理吸附,洗涤聚合物 - 抗体复合物以准备用于测试样品。然后向固相复合物中加入待测样品的等分试样,并在适当的条件下(例如,在大约 20°C 至大约 40°C)温育足够长的时间段(例如,2-120 分钟,或更方便的是过夜温育)以允许抗体中存在的任何亚基的结合。温育结束之后,洗涤并干燥抗体亚基固相,并与对于效应分子的一部分具有特异性的第二抗体一起温育。所述第二抗体连接至报告分子,所述报告分子用于指示所述第二抗体与所述效应分子的结合。

[0078] 这种测定具有很多变体。一种特别有用的变体是同时测定,其中将所有的成分或很多的成分基本上同时混合。此外,可以通过针对所述第一抗体的标记抗体的结合来测定抗体与细胞因子的结合。

[0079] 本说明书中使用的“报告分子”意思是通过其化学性质提供分析型可鉴定信号的分子,所述信号允许检测与抗原结合的抗体。检测可以是定性的或定量的。这种类型的测定中最常使用的报告分子是酶、荧光团或包含放射性核的分子(例如放射性同位素)和化学

发光分子。表 1 中提供了合适的荧光团的例子。在酶免疫测定的情形中，一般通过戊二醛或高碘酸盐将酶缀合至第二抗体。但是，可以容易地认识到，存在多种不同的缀合技术，技术人员可以轻易获得这些技术。通常使用的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。与特异性酶一起使用的底物一般选择为，经过相应的酶水解之后，产生可检测的颜色变化。合适的酶的例子包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。除了如上所述的发色底物，还可以使用产生荧光的底物，其产生荧光产物。在所有的情况中，向第一抗体-抗原复合物中加入酶标记的抗体，使其结合，然后洗掉过量的试剂。然后向抗体-抗原-抗体复合物中加入含有合适底物的溶液。底物将与连接至第二抗体的酶反应，产生定性的可视信号，通常通过分光光度法可进一步定量测定所述信号，以给出存在于样品中的抗原数量的指征。本发明同样延伸至基本上同时的测定。

[0080] 或者，可以将荧光化合物（例如荧光素和若丹明）化学地偶联至抗体，但不改变抗体的结合能力。当使用特定波长的光照射使其激活时，荧光色素标记的抗体吸收光能，使分子的状态诱导为可激发性，然后发射可以使用光学显微镜可视检测的特征性颜色的光。使荧光标记的抗体与第一抗体-抗原复合物结合。洗掉未结合的试剂后，将剩余的三元复合物暴露于合适波长的光，观察到的荧光指示目标抗原的存在。免疫荧光和酶免疫测定技术在本领域都是非常完善的，对于本发明的方法是特别优选的。但是，也可以使用其它报告分子，例如放射性同位素、化学发光或生物发光分子。

[0081] 存在多种可以利用的其它检测系统，包括胶体金，所有这样的检测系统都包含在本发明中。

[0082] 本发明还涉及遗传测定，例如涉及 PCR 分析，以检测编码免疫效应分子的遗传序列的 RNA 表达产物。

[0083] 在一个实施方式中，使用引物对进行 PCR，一般使用能够产生可区分的信号的相同或不同报告分子来标记所述引物对中的一个引物或两个引物。使用荧光团对于本发明的实施是特别有用的。合适的荧光团的例子可以选自表 1 的列表。其它标记物包括发光和磷光以及红外染料。这些染料或荧光团还可用作抗体的报告分子。

[0084] 表 1. 合适的荧光团的列表

[0085]

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
活性的和缀合的探针		
羟基香豆素	325	386
氨基香豆素	350	455
甲氧基香豆素	360	410
Cascade Blue	375; 400	423
荧光黄	425	528
NBD	466	539
R-藻红蛋白(PE)	480; 565	578
PE-Cy5 缀合物	480; 565; 650	670
PE-Cy7 缀合物	480; 565; 743	767
APC-Cy7 缀合物	650; 755	767
Red 613	480; 565	613
荧光素	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-若丹明	570	576
丽丝胺若丹明 B	570	590
PerCP	490	675
Texas Red	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

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (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
核酸探针		
Hoeschst 33342	343	483
DAPI	345	455
Hoechst 33258	345	478
SYTOX 蓝	431	480
色霉素 A3	445	575
光神霉素	445	575
YOYO-1	491	509
SYTOX 绿	504	523
SYTOX 橙	547	570
溴化乙啶	493	620
7-AAD	546	647
吖啶橙	503	530/640

[0086]

[0087]

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
噻唑橙	510	530
碘化丙啶(PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543; 590	712; 607
荧光蛋白		
Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
野生型	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
DsRed	558	583
其它探针		
Monochlorobimane	380	461
钙黄绿素	496	517

[0088] 1. Ex :激发波长峰值 (nm)

[0089] 2. Em :发射波长峰值 (nm)

[0090] 本发明包括任何合适的分析荧光发射的方法。在这个意义上,本发明涉及的技术包括但不限于,例如在 Lakowicz 等人, Biophys. J. 72 :567,1997 中公开的 2- 光子和 3- 光子时间分辨荧光光谱法,例如在 Eriksson 等人, Biophys. J. 2 :64,1993 中公开的荧光寿命成像,和例如在 Youvan 等人, Biotechnology et elia 3 :1-18,1997 中公开的荧光共振能

量转移。

[0091] 发光和磷光可以分别产生于本领域已知的合适的发光或磷光标记物。在这个意义上可以使用鉴定此类标记物的任何光学方法。

[0092] 红外辐射可以产生于合适的红外染料。可用于本发明的示例性的红外染料包括但不限于以下文献中描述的那些：Lewis 等人, Dyes Pigm. 42(2) :197, 1999, Tawa 等人, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890, Daneshvar 等人, J. Immunol. Methods 226(1-2) :119-128, 1999, Rapaport 等人, Appl. Phys. Lett. 74(3) :329-331, 1999 和 Durig 等人, J. Raman Spectrosc. 24(5) :281-285, 1993。可以应用任何合适的红外光谱方法来检测红外染料。例如由例如 Rahman 等人, J. Org. Chem. 63 :6196, 1998 描述的傅立叶转换红外光谱法可用于这个方面。

[0093] 适宜地, 电磁散射可以产生于入射电磁射线 (包括光和 X 射线) 的衍射、反射、极化或折射。此类散射可用于定量 mRNA 水平或蛋白水平。

[0094] 流式细胞术在分析荧光团发射中是特别有用的。

[0095] 如本领域所知, 流式细胞术是高通量技术, 其涉及, 分散于液体流中的颗粒 (例如标记的 mRNA、DNA 或蛋白质) 通过一个或多个激光束的途径时, 迅速分析所述颗粒的物理和化学特性。随着每个颗粒拦截激光束, 使用任意合适的追踪算法 (如下文所描述的) 来检测并记录每个细胞或颗粒发射的散射光和荧光。

[0096] 现代的流式细胞仪能够以多达 100,000 个细胞 / 颗粒 s^{-1} 来执行这些任务。通过使用滤波器和二向色镜的光学阵列, 可以将荧光的不同波长分开并同时检测它们。此外, 可以使用多个具有不同激发波长的激光器。因此, 可以使用多个荧光团来靶向并检测例如样品内的免疫效应分子或来自多个受试者的免疫效应分子。

[0097] 可用于本发明的方法的合适的流式细胞仪包括：使用单一激发激光器测定 5 至 9 个光学参数 (见表 2) 的流式细胞仪, 所述激光器通常是在 15mW 在其 488nm 光谱线运行的氩离子气体冷却的激光器。更加先进的流式细胞仪能够使用氩离子激光器 (488 或 514nm) 以外的多个激发激光器, 例如 HeNe 激光器 (633nm) 或 HeCd 激光器 (325nm)。

[0098] 表 2

[0099] 流式细胞仪可以测定的示例性的光学参数

[0100]

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

[0101] *使用 488nm 的激发激光器

[0102] †带通滤波器的宽度

[0103] # 长通滤波器

[0104] 例如, Biggs 等人, *Cytometry* 36 :36-45, 1999 使用 3 个激发激光器构建了 11 个参数的流式细胞仪, 并证明了使用除了正向和侧向散射测定值之外的 9 个可区分的荧光团以用于对颗粒进行免疫分型(即分类)的目的。目前商业渠道可获得的最大数目的参数是 17 个: 正向散射、侧向散射和 3 个激发激光器, 每个激光器具有 5 个荧光团检测器。所有这些参数是否可以被充分地使用很大程度上取决于消光系数、量子产额和所有荧光团之间光谱重叠的量 (Malemed 等人, "Flow cytometry and sorting", 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990)。但是, 应该理解, 本发明不限于任何特定的流式细胞仪或参数的任何特定组合。在这个意义上, 本发明还涉及使用在例如 Fu 等人, *Nature Biotechnology* 17 :1109-1111, 1999 中公开的微制造的流式细胞仪以代替常规的流式细胞仪。

[0105] 本发明的测定可以自动化或半自动化地用于高通量筛选或用于筛选来自一个受试者的多个免疫效应分子。自动化方便地由计算机软件控制。

[0106] 因此, 本发明涉及用于评估一种或多种免疫效应分子的存在或不存在或水平的计算机程序产品, 所述产品包含:

[0107] (1) 接收与标记的 mRNA 或抗体结合的报告分子的特性以作为输入值的代码;

[0108] (2) 将所述输入值与参考值进行比较以确定报告分子的水平 and / 或与报告分子相连的分子的特性的代码; 和

[0109] (3) 储存代码的计算机可读介质。

[0110] 本发明的另一个方面延伸至用于评估一种或多种免疫效应分子的存在或不存在或水平的计算机, 所述计算机包含:

[0111] (1) 机器可读数据的存储介质, 其包含以机器可读数据编码的数据存储物质, 其中所述机器可读数据包含输入值, 所述输入值鉴定与标记的 mRNA 或抗体结合的报告分子;

[0112] (2) 用于储存处理所述机器可读数据的指令的工作内存;

[0113] (3) 与所述工作内存和与所述机器可读数据的存储介质偶联的中央处理器, 用于处理所述机器可读数据以比较所述数值, 从而提供关于报告分子或与报告分子相连的分子的特性或水平的评估; 和

[0114] (4) 与所述中央处理器偶联的输出硬件, 用于接收比较的结果。

[0115] 本发明的一个方面包括, 通过测定针对特定抗原或有丝分裂原的响应性来确定受试者的细胞介导的免疫响应性的实验。在一个实施方式中, 可以从患有或怀疑患有特定疾病(例如自身免疫病、感染致病试剂或暴露于铍)的受试者获取一种或多种富含血液的白细胞成分的样品(例如外周血样品)或支气管肺泡灌洗液样品, 并通过测定来自效应 T- 细胞(例如 CD4⁺T- 细胞)的效应分子来测定免疫响应性。该测定在存在调节 T- 细胞功能(例如调节性 T- 细胞功能)的试剂的情况下进行。

[0116] 免疫结合方法包括用于检测或定量样品中活性成分数量的方法, 该方法需要检测或定量结合过程中形成的任何免疫复合物。其中, 将会获得怀疑含有细胞因子的样品并将该样品与抗体接触, 然后检测或定量在特定条件下形成的免疫复合物的量。

[0117] 将所选的生物样品与抗体在有效条件下温育允许形成免疫复合物(初级免疫复

合物)的足够时间段通常是指,向样品中加入成分,并将混合物温育足以使抗体与存在的任意抗原形成免疫复合物(即与之结合)的足够长的时间。然后,一般将会洗涤样品-抗体组合物(例如组织切片、ELISA 平板、ELISpot、点印迹或 Western 印迹)以除掉任何非特异性结合的抗体物质,允许仅检测初级免疫复合物内那些特异性结合的抗体。

[0118] 在具体的实施方式中,本发明涉及用于检测人类受试者的疾病或病况的存在、不存在、水平或阶段的方法,所述方法包括,将构成反应混合物总体积的至少 10%的全血与抑制调节性 T-细胞功能的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测的;并测定来自所述 T-细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高,其中所述免疫效应分子的存在或水平是所述疾病或病况的指征。

[0119] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于上文描述的方法的试剂盒。在一个实施方式中涉及免疫检测试剂盒。在另一个实施方式中涉及用于分析来自患有或怀疑患有金属或化学诱导的疾病的受试者的样品的试剂盒。在更具体的实施方式中,涉及分析来自患有或怀疑患有疾病的受试者的样品的试剂盒。在更具体的实施方式中,开发了用于评估在疾病状态前和疾病状态后受试者的细胞介导的免疫响应性的试剂盒。

[0120] 试剂盒的免疫检测试剂可以采取多种形式中的任一种,包括那些与给定抗体或抗原结合或连接的可检测标记物,和与第二结合配体结合或连接的可检测标记物。示例性的第二配体是那些对于第一抗体或抗原具有结合亲和性的第二抗体,和对于人类抗体具有结合亲和性的第二抗体。

[0121] 用于本发明试剂盒的其它的合适的免疫检测试剂包括双成分(two-component)试剂,其包含对第一抗体或抗原具有结合亲和性的第二抗体,以及对第二抗体具有结合亲和性的第三抗体,所述第三抗体与可检测的标记物连接。

[0122] 试剂盒还可以包含标记的或未标记的抗原或效应分子的适当等分的成分,用于制备进行检测测定的标准曲线。

[0123] 试剂盒还可以包含抗体-标记物缀合物,可以是完全缀合的形式,中间体的形式,或作为单独的部分由试剂盒的使用者进行缀合。试剂盒的成分可以包装于水性介质中或是冻干的形式。

[0124] 任意试剂盒的容器一般将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器,可以向其中放入测试试剂、抗体或抗原,优选为适当等分的。当提供第二或第三结合配体或另外的成分时,试剂盒一般还可以包括第二个、第三个或其它另外的容器,以便向其中放入所述配体或成分。本发明的试剂盒通常还将包括用于将抗体、抗原和任何其它试剂容器紧密包括在一起的工具,以进行商业售卖。此类容器可以包括注射或吹塑容器,其中放持想要的小瓶。

[0125] 本发明还涉及改进的测定,用于检测受试者中细胞介导的免疫应答或其水平,所述测定包括,将抗原与来自受试者的 T-细胞来源一起温育,并检测效应分子的存在或升高,改进包括将 T-细胞进一步与抑制阻抑性 T-reg 细胞的试剂或刺激增强免疫系统的细胞的试剂一起温育。

[0126] 本发明还提供了治疗患有致病性感染、自身免疫病症或癌症或具有患上所述病况或病症的倾向的受试者的方法,所述方法包括,将来自受试者的 T-细胞来源与调节 T-细胞或其子集的功能或活性的试剂以及抗原接触,针对该抗原的细胞介导的免疫应答是待测

的；并测定来自所述 T- 细胞的免疫效应分子的存在或水平的升高，其中所述免疫效应分子的存在或水平是受试者的细胞介导的响应性水平的指征，细胞介导的响应性水平是所述病况或病症的存在、不存在、水平或状态的指征；然后治疗所述病况或病症。

[0127] 通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0128] 实施例 1. 测定的开发

[0129] 从知情同意的志愿者或供体采集肝素化的血液样品。将血液样品收集进入 Vacuette[注册商标] 管 (Greiner Bio-one, Germany) 中。

[0130] 将血液样品的等分试样与结核分枝杆菌纯化的蛋白衍生物 (PPD, Cellestis Limited, Australia)、破伤风类毒素 (CSL Limited, Australia)、植物血球凝集素 (Cellestis Limited, Australia) 或盐水对照在多个不同尺寸的血液收集管以及标准的 24- 孔组织培养板 (由牛全血 IFN- γ 测试 (Bovigam[注册商标], CSL Ltd.) 或人 Quantiferon[注册商标] 测试 (Cellestis Limited, Australia) 的生产商推荐) 中温育。

[0131] 在一些实验中，在温育起始之前向血液中加入不同浓度的右旋糖。

[0132] 将抗原刺激的血液样品在 37°C 温育 16 至 24 小时，然后从上述沉淀的血液细胞中收集血浆。然后按照生产商的说明书，使用 Quantiferon-TB[注册商标] ELISA (Cellestis Limited, Australia) 定量测定每个血浆样品中存在的 IFN- γ 的量。另外按照生产商的说明书，使用更加灵敏的 ELISA (Quantiferon-CMI ; Cellestis Limited, Australia) 测定使用破伤风类毒素抗原和盐水对照刺激的样品中的 IFN- γ 。

[0133] 使用在每个 ELISA 平板上进行的 IFN- γ 标准品获得的 ELISA 光密度数值构建标准曲线，从中将每个测试血浆样品中存在的 IFN- γ 的量转化成 IU/mL 数值。

[0134] 另外使用 CD25 配体、针对编码 JAK1 或 TYK2 的遗传材料的寡核苷酸或 CpG 寡核苷酸温育样品。所述寡核苷酸可以是硫代磷酸酯化的。

[0135] 实施例 2. CD25 抗体的效应

[0136] 将抗 -CD25 抗体包被的珠子与全血混合。事先不进行白细胞或外周血淋巴细胞的纯化。与全血混合之后，将血液培养物直接进行温育，以产生 IFN- γ ，不进行任何其它的分离或除去血液的调节性 T- 细胞的处理。不需要通过磁性分离或通过任何其它分离技术特异性除去调节性 T- 细胞。将珠子留在全血培养物中，不进行任何将调节性 T- 细胞与其余的白细胞或血浆分离的具体尝试。随着红细胞在血液温育过程中沉淀，珠子有可能通过自然重力作用沉入红细胞层，但是不进行任何将调节性 T- 细胞与其余的温育的和培养的细胞物理分离的干涉。有可能的是，珠子与调节性 T- 细胞的结合即完全足以阻抑 T- 细胞的功能。

[0137] 表 3 显示了当用于全血培养物时，抗 -CD25 抗体包被的珠子对于针对各种蛋白抗原的 IFN- γ 应答的影响。可以清楚地看出，向全血培养物中加入的珠子 (以可滴定的方式使用) 显著增加了针对抗原的特异性应答。这是没有对珠子和全血培养物进行任何通常的分离时的情况。可以通过常规经验测试来确定增强信号而不造成显著背景影响的最佳的珠子浓度。

[0138] 表 3. 加入和不加入抗 -CD25 磁性珠子时全血针对抗原的 IFN- γ 应答 (IU/mL)

		处理			
		对照	抗-CD25 珠子 20 μ L	抗-CD25 珠子 5 μ L	抗-CD25 珠子 1 μ L
[0139] 受试者 1	不加	0.26	0.67	0.14	0.12
	TB 抗原	0.83	4.52	2.33	0.97
受试者 2	不加	0.06	0.07	0.06	0.06
	麸朮 10 μ g/mL	0.17	3.11	0.74	0.2

[0140] 实施例 3. 针对激酶遗传材料的反义物的影响

[0141] 细胞表面受体的信号通过一系列修饰和扩大分子（包括蛋白激酶分子）传递至细胞内的效应分子。这些分子中的几种分子在传导衍生自调节性 T- 细胞的信号分子（包括白细胞介素 10, IL-10）中具有重要意义。可以通过加入正常的寡核苷酸来抑制这些激酶在纯细胞培养物中的功能。虽然寡核苷酸在全血培养物中是无效的，但是可以在全血培养物中使用硫代磷酸酯形式，并可与诊断性蛋白抗原一起使用。当以合适的浓度使用时，这些修饰的寡核苷酸实质上增强全血培养物中产生的 IFN- γ 信号。激活的 T- 细胞产生的其它细胞因子分子的量也会增多，包括但不限于以下分子，例如白细胞介素 2 (IL-2)、干扰素可诱导的蛋白 10 (IP10)、CCX 和其它细胞因子和趋化因子。

[0142] 表 4 显示了添加针对编码 JAK1 和 TYK2 激酶的遗传材料的反义寡核苷酸的效应。它们是不同的硫代磷酸酯寡核苷酸，其比天然形式的寡核苷酸更加有效。在这种情况下，添加的寡核苷酸也增加针对所用抗原的特异性应答，但不产生任何背景应答。还在全血中进行了这些实验，寡核苷酸在复杂的混合物（即全血）中的功效是高的。

[0143] 表 4. 加入和不加入寡核苷酸 (JAK1 和 TYK2) 时全血针对抗原的 IFN- γ 应答 (IU/mL)

[0144]

		处理		
		对照	JAK1 & TYK2 1 μ M	JAK1 & TYK2 10 μ M
受试者 1	不加	0.26	0.11	0.39
	TB 抗原 1 μ g/MI	0.83	0.91	9.79
受试者 2	不加	0.06	0.06	0.09
	麸朮 10 μ g/MI	0.17	0.21	0.94

[0145] 实施例 4. 寡核苷酸分子

[0146] 在存在抑制性调节性分子的情况下刺激 T- 细胞活性的替代性方法是通过另外的刺激机制来增强 T- 细胞应答，所述另外的刺激机制本身不能单独引发诊断性应答。

[0147] 表 5 显示了添加具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸的效应，也加入到全血中，但是

在这种情况下寡核苷酸含有具有 CpG 基序的序列。这些寡核苷酸也增强了针对抗原的特异性应答,但不以任何显著性方式影响背景应答。这些化合物辅助增强细胞因子信号的能力可用于诊断学目的,这种能力是新的。另外推测在全血中的用途和功效也是新的和令人惊奇的,如同反义寡核苷酸和抗 -CD25 抗体包被的珠子一样。

[0148] 表 5. 加入和不加入寡核苷酸 (CpG) 时全血针对抗原的 IFN- γ 应答 (IU/mL)

		处理		
		对照	CpG 1 μ M	CpG 10 μ M
[0149] 受试者 1	不加	0.26	0.14	0.48
	TB 抗原	0.83	0.81	8.21
受试者 2	不加	0.06	0.05	0.17
	麸朮 10 μ g/mL	0.17	0.13	1.14

[0150] 表 6 和 7 诠释了所有这些方法组合在一起的用途

[0151] 表 6. 加入和不加入单一的反义寡核苷酸及其组合时全血针对抗原的 IFN- γ 应答 (IU/mL)

[0152]

抗原	对照	JAK1 10 μ M	TYK2 10 μ M	JAK1+TYK2 各 10 μ M	CPG 10 μ M	JAK+TYK+CPG 各 10 μ M
不加	0.085	0.080	0.090	0.110	0.170	0.160
TB 抗原 1 μ g/mL	0.275	0.440	0.500	0.470	0.800	0.720

[0153] 表 7. 加入和不加入反义寡核苷酸和抗 -CD25 磁性珠子时全血针对抗原的 IFN- γ 应答 (IU/mL)。该情况中受试者 1 至 5 不具有已知的肺结核感染。

[0154]

受试者	抗原	对照	JAK1+TYK2 10 μ M	CPG 10 μ M	珠子 20 μ L	JAK1 + TYK2 + CPG 各 10 μ M+珠子 20 μ L
1	不加	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05
	麸朊	0.04	0.05	0.04	0.07	0.14
	TB	0.04	0.05	0.06	0.03	0.05
2	不加	0.03	0.06	0.08	0.04	0.12
	麸朊	0.05	0.05	0.10	0.13	0.17
	TB	0.04	0.05	0.05	0.04	0.09
3	不加	0.04	0.05	0.12	0.12	0.28
	麸朊	0.11	0.19	0.41	0.62	0.86
	TB	0.07	0.08	0.24	0.15	0.21
4	不加	0.05	0.05	0.09	0.64	0.98
	麸朊	0.14	0.30	0.36	3.34	4.63
	TB	0.04	0.06	0.12	1.20	0.30
5	不加	0.04	0.04	0.09	0.04	0.20
	麸朊	0.17	0.09	0.18	1.34	0.76
	TB	0.04	0.07	0.12	0.07	0.30

[0155] 本领域技术人员将认识到本文描述的发明易于进行除了那些特异性描述之外的改变和修饰,不同序列和类型的寡核苷酸可以影响 toll 样受体 (TLR) 途径,可以单独通过 TLR 信号传导或单独通过反义效应或二者的组合来引起所述影响,应理解,本发明包括所有此类变体和修饰。本发明还包括本说明书中单独地或联合地提及的或指明的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及任意两种或更多种所述步骤或特征的任意和所有组合。

[0156] 参考文献

[0157] Biggs 等人, Cytometry 36 :36-45,1999

[0158] Daneshvar 等人, J. Immunol. Methods 226(1-2) :119-128,1999

[0159] Durig 等人, J. Raman Spectrosc. 24(5) :281-285,1993

[0160] Eriksson 等人, Biophys. J. 2 :64,1993

[0161] Fu 等人, Nature Biotechnology 17 :1109-1111,1999

- [0162] Lakowicz 等人, Biophys. J. 72 :567, 1997
- [0163] Lewis 等人, Dyes Pigm. 42(2) :197, 1999
- [0164] Malemed 等人, " Flow cytometry and sorting " , 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990
- [0165] Rahman 等人, J. Org. Chem. 63 :6196, 1998
- [0166] Rapaport 等人, Appl. Phys. Lett. 74(3) :329-331, 1999
- [0167] Tawa 等人, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890
- [0168] Youvan 等人, Biotechnology et alia 3 :1-18, 1997

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	CN102105786A	公开(公告)日	2011-06-22
申请号	CN200980128871.9	申请日	2009-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	赛乐思迪斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛乐思迪斯有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛乐思迪斯有限公司		
[标]发明人	JL霍华德 AJ雷德福 JS罗斯尔		
发明人	J·L·霍华德 A·J·雷德福 J·S·罗斯尔		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2866 G01N33/56972 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00		
优先权	61/083872 2008-07-25 US		
其他公开文献	CN102105786B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明大体上涉及基于免疫学的诊断测定领域。更具体地，本发明涉及测定细胞介导的免疫应答反应活性的方法。本发明还涉及用于检测或监视疾病或病况的细胞介导的基于免疫应答的测定。

探针	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
活性的和组合的探针		
羟基香豆素	325	386
氨基香豆素	350	455
甲氧基香豆素	360	410
Cascade Blue	375; 400	423
荧光黄	425	528
NBD	466	539
R-藻红蛋白(PE)	480; 565	578
PE-Cy5 混合物	480; 565; 650	670
PE-Cy7 混合物	480; 565; 743	767
APC-Cy7 混合物	650; 755	767
Red 613	480; 565	613
荧光素	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-若丹明	570	576
丽丝胺若丹明 B	570	590
PerCP	490	675
Texas Red	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