



(10) 申请公布号 CN 114729402 A

(43) 申请公布日 2022.07.08

(21) 申请号 202080069734.9

(22) 申请日 2020.09.30

(30) 优先权数据

19217548.7 2019.12.18 EP

FR1910884 2019.10.01 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2020/051715 2020.09.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/064327 FR 2021.04.08

(71) 申请人 生物梅里埃公司

地址 法国马西伊特莱尔

申请人 里昂国民医疗中心 里昂第一大学

(72) 发明人 苏菲·阿桑特 弗朗索瓦·马莱

弗朗索瓦·巴尔托洛

克洛伊·阿尔伯特·维加

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6883 (2006.01)

权利要求书3页 说明书38页 附图3页

(54) 发明名称

用于确定个体对刺激物作出反应的能力的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于确定个体对刺激物作出反应的能力的体外或离体方法,以及允许实施该方法的工具和这些工具的用途,所述方法基于对选自三个生物标志物列表中的不同列表的至少两种不同生物标志物的表达的测量,所述生物标志物来自所述个体的血液样本,所述血液样本与所述刺激物一起培养。

1. 一种用于确定个体对刺激物作出反应的能力的体外或离体方法,其包括:

a) 将所述个体的血样与所述刺激物一起培养的步骤,以及

b) 从步骤a)产生的被刺激的血样中,测量分别选自以下列表的至少两个不同列表的至少两种不同生物标志物的表达的步骤:

- 列表S1:BST2、CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD3D、CD44、CD74、CD83、CLEC7A、CXCL10、CXCL2、CXCL9、DYRK2、FAM89A、HLA-DMB、HLA-DPB1、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、RARRES3、DDX58、SLAMF7、SRC、STAT2、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

- 列表S2:ADGRE3、ARL14EP、BST2、C3、CCL2、CCL20、CCL8、CCNB1IP1、IL7R、CD209、CD3D、CD44、CD74、CD83、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、CXCL10、CXCL2、CXCL9、DYRK2、FAM89A、HLA-DMB、HLA-DPB1、HLA-DRA、IFITM1、IRAK2、SLAMF7、TGFB1;

- 列表S3:121601901-HERV0116、BST2、C3、CCL20、CCL4、CCL8、CCR1、IL7R、CD209、CD44、CD74、CD83、CLEC7A、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DRA、IL1A、IL2、RARRES3、SLAMF7、STAT2。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两个不同的列表:

- 列表S1-1:BST2、CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD3D、CD44、CD83、CXCL2、DYRK2、HLA-DMB、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、RARRES3、DDX58、SRC、STAT2、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

- 列表S2-1:ADGRE3、ARL14EP、C3、CCL2、CCNB1IP1、IL7R、CD3D、CD44、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、CXCL2、DYRK2、HLA-DMB、HLA-DRA、IFITM1、IRAK2、TGFB1;

- 列表S3-1:121601901-HERV0116、C3、CCR1、IL7R、CD44、CD74、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DRA、IL1A、IL2、RARRES3、SLAMF7、STAT2。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两个不同的列表:

- 列表S1-2:CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD44、CD83、CXCL2、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、DDX58、SRC、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

- 列表S2-2:ADGRE3、ARL14EP、CCL2、CCNB1IP1、IL7R、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、DYRK2、IFITM1、TGFB1;

- 列表S3-2:121601901-HERV0116、C3、CCR1、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、IL2、SLAMF7。

4. 根据权利要求1至3的任一项所述的方法,其特征在于,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两个不同的列表:

- 列表S1-3:IFNG、PTGS2、DDX58、SRC、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

- 列表S2-3:ADGRE3、ARL14EP、CCL2、CCNB1IP1、CDKN1A、CX3CR1、IFITM1、TGFB1;

- 列表S3-3:121601901-HERV0116、CCR1、EIF2AK4、HLA-DPA1、IL2。

5. 根据权利要求1至4的任一项所述的方法,其特征在于,在步骤b)中,测量至少三种不同生物标志物的表达,所述生物标志物分别选自权利要求1至4中任一项所述的三个列表中的每一个。

6. 根据权利要求1至5的任一项所述的方法,其特征在于,所述个体是患者,优选地是医院的患者,更优选地是急诊部门、复苏室、重症监护室或连续护理室的患者,更优选地是患

有外伤、烧伤、接受过手术或处于脓毒症状态的患者,并且更优选地是脓毒性休克的患者。

7. 根据权利要求1至6的任一项所述的方法,其特征在于,所述血样是全血样本。

8. 根据权利要求1至7的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物包含能够结合至少一种类型的抗原呈递细胞(APC)和至少一种类型的适应性免疫细胞的分子,优选超抗原类型的分子或类似于超抗原的分子。

9. 根据权利要求1至8的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物包含超抗原类型的分子,所述超抗原类型的分子选自葡萄球菌物种产生的超抗原和链球菌物种产生的超抗原。

10. 根据权利要求1至9的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物包含选自SEB(葡萄球菌肠毒素B)和SEA(葡萄球菌肠毒素A)的分子。

11. 根据权利要求1至8的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物包含类似于超抗原的分子,所述类似于超抗原的分子是双特异性抗体。

12. 根据权利要求1至7的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物允许T淋巴细胞的直接激活。

13. 根据权利要求1至7和12的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物选自识别和激活T淋巴细胞表面上的受体的抗体。

14. 根据权利要求1至7和12至13的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物是抗CD3抗体,其优选与一种或多种抗体物理和/或化学结合,更优选这些一种或多种抗体选自以下组成的列表:抗CD28抗体、抗CD2抗体和/或抗CD137抗体。

15. 根据权利要求1至7的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物是咪唑啉类型,优选TLR受体激动剂,更优选TLR7和/或TLR8受体激动剂。

16. 根据权利要求1至7和15的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物是雷西莫特(R848)。

17. 根据权利要求1至7的任一项所述的方法,其特征在于,所述刺激物包含用于治疗目的分子,优选具有免疫调节作用的分子。

18. 根据权利要求1至17的任一项所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的表达在信使RNA(mRNA)水平上测量。

19. 根据权利要求1至18的任一项所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的表达通过RT-PCR测量,优选通过RT-qPCR测量。

20. 根据权利要求1至18的任一项所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的表达通过测序测量。

21. 根据权利要求1至18的任一项所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的表达通过杂交测量。

22. 根据权利要求1至21的任一项所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的表达相对于一种或多种管家基因的表达进行归一化。

23. 根据权利要求1至22的任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括从没有刺激的对照血样中测量与从受刺激的血样中测量的相同的生物标志物的表达的步骤。

24. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,所述方法包括计算受刺激的血液样本中每种生物标志物的表达,优选归一化的表达,相对于对照血液样本中相同生物标志物的表

达,优选归一化的表达的比率的步骤。

25. 一种试剂盒,其包含用于扩增和/或检测至少两种不同生物标志物的工具(优选引物和/或探针),所述生物标志物分别选自权利要求1至4中任一项所述的列表中的至少两个不同列表,优选地,用于扩增和/或检测至少三种不同生物标志物的工具,所述生物标志物分别选自权利要求1至4中任一项所述的三个列表中的每一个,所述试剂盒的特征在于,所述试剂盒的用于扩增和/或检测的所有工具总共允许检测和/或扩增最多100种生物标志物。

26. 根据权利要求25所述的试剂盒,其包括用于扩增和/或检测一种或多种管家基因的工具。

27. 根据权利要求25或26所述的试剂盒,其包括允许评估RNA提取质量、任何扩增和/或杂交方法的质量的阳性对照工具。

28. - 用于扩增和/或检测至少两种不同生物标志物的工具(优选引物和/或探针),所述生物标志物分别选自权利要求1至4中任一项所述的列表中的至少两个不同列表,优选地,用于扩增和/或检测至少三种不同生物标志物的工具,所述生物标志物分别选自权利要求1至4中任一项所述的三个列表中的每一个,或

- 包含此类扩增和/或检测工具的试剂盒,优选地,所述试剂盒的所有扩增和/或检测工具允许检测和/或扩增总共最多100种生物标志物,并且任选地,所述试剂盒包含用于扩增和/或检测一种或多种管家基因的工具和/或允许评估RNA提取质量、任何扩增和/或杂交方法的质量的阳性对照工具,

用于确定个体对刺激物作出反应的能力,优选个体免疫系统对刺激物作出反应的能力的用途。

用于确定个体对刺激物作出反应的能力的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于确定个体对刺激物作出反应的能力的体外或离体方法,以及允许实施该方法的工具和这些工具的用途,所述方法基于对选自三个生物标志物列表中的不同列表的至少两种不同生物标志物表达的测量,所述生物标志物来自与所述刺激物一起培养的所述个体的血液样本。

背景技术

[0002] 免疫系统是针对被认为是非自我的东西(例如病原体)的身体防御系统。免疫反应需要非常精细的调节并且有时可以被改变,特别是在炎症、过敏或自身免疫性疾病(其中免疫系统比正常时更活跃)或以免疫抑制为特征的疾病(其中免疫系统不如正常时活跃)的情况下。所述免疫抑制可具有不同来源,采取多种形式,并影响先天免疫和/或适应性免疫。

[0003] 特别地,脓毒症在2017年被世界卫生组织确认为卫生重点事项,并在发病率、死亡率和成本方面代表了一个全球性问题。据估计,全世界每年有3150万人患脓毒症,其中600万人会死于该病,并且300万人会患有可导致再次入院的病症。在脓症患者(也称为脓毒性状态)中,感染后免疫应答失调,导致多发性和危及生命的器官衰竭和功能障碍。这种免疫反应是复杂的,并且会随着时间而发展,伴有伴随性的过度的促炎和抗炎现象。所有这些免疫系统疾病都会导致器官衰竭、免疫系统麻痹和继发感染。“脓毒性休克是脓毒症的一种亚型,其中尽管有足够的血管充盈,但低血压持续存在。在脓毒症的初始阶段,炎症甚至过度炎症反应(包括细胞因子休克)似乎占主导地位,这是组织损伤和器官衰竭的原因,尤其是在肾脏水平。这就是为什么脓毒症领域的临床试验长期以来都集中在抗炎治疗上,却没有定论的结果。最近关于脓毒症病理生理学的研究表明,脓症患者会发生抗炎或免疫抑制反应,其与初始炎症同时发生或随后发生,以试图抵消过度炎症反应。然后,根据促炎和抗炎反应各自的程度,患者可能发现自己处于(可能是严重的)免疫抑制状态。这些免疫功能低下的患者发生院内感染(或HAI,医院获得性感染或卫生护理相关感染)和容易发生病毒再激活的风险很高,并且可以有利地受益于免疫刺激剂治疗。然而,对脓毒性休克患者的早期研究表明这种治疗没有益处。这可能是由于脓毒症病理生理学的复杂性(包括免疫反应的个体间变异性),也可能是由于宿主反应的动力学。

[0004] 因此,根据患者的免疫学特征对患者进行分层(stratification)似乎对他们的有效管理至关重要。一种能够精确识别免疫系统功能和免疫状态的诊断工具至关重要,以便能够适应和个性化治疗管理。然而,患有免疫系统病症的人并没有表现出特定的临床症状;特别地,对脓毒症患者的宿主反应的解释仍然是一个挑战。已提出可溶性或膜生物标志物,例如在单核细胞(mHLA-DR)表面上的HLA-DR(人类白细胞抗原-D相关的)的表达或中性粒细胞中CD88的表达,以及计数淋巴细胞或血小板,但它们各自都仅限于单个细胞群体,这可能低估了整体免疫贡献。

[0005] 在某些临床情况下(例如潜伏性结核病),功能测试或免疫功能测试(IFA,免疫功能测定)使显著改善患者护理成为可能。功能测试在体外直接测量一个或多个细胞群对与

细胞接触的刺激物作出反应的能力,例如已用于研究单核细胞的能量,最常见的方法是在用脂多糖(LPS)离体刺激后在蛋白质水平测量TNF α ,以及在临床上,在结核病的情况下,通过用结核分枝杆菌抗原刺激后在蛋白质水平测量干扰素 γ 。功能测试也被用作旨在确定应对不同的感染挑战的正常免疫反应(即在“健康”的背景下)的限度的研究的一部分(Urrutia et al(2016),Cell Reports 16:2777-2791)。

[0006] 然而,令人惊讶的是,已经发现,基于测量某些特定生物标志物的表达的功能测试,(所述生物标志物分类为三个列表,来自与刺激物一起培养的个体血液样本),可以确定该个体(可以是健康个体,也可以是患病个体,例如患有脓毒症的患者)对该刺激物作出反应的能力。特别地,这些功能测试,就先天和/或适应性免疫反应的功能障碍而言,可以动态地突出免疫反应的患者间异质性,并因此捕捉每个患者的反应能力的奇异性(singularity),从而推断出关于患者的诊断、预后和/或治疗管理的有用信息。根据本发明的功能测试可以特别地突出三类个体:表现出未改变或轻微改变的免疫特征的个体(簇S1)、表现出强烈改变的免疫特征的个体(簇S2)以及具有中等免疫特征的个体(簇S3)。簇S2中的个体,其免疫力似乎发生了很大变化并呈现出更大的死亡概率,可以有利地受益于更“积极的”和/或更早的治疗干预,而对于免疫力轻微改变的簇S1的个体,标准护理就足够了;在免疫力似乎是可恢复的簇S3的个体中,可以有利地测试个性化治疗(例如IL-7、干扰素 γ)。

发明内容

[0007] 因此,本发明涉及用于确定个体对刺激物作出反应的能力,优选确定个体免疫系统对刺激物作出反应的能力的体外或离体方法,所述方法包括:

[0008] a) 将所述个体的血样与所述刺激物一起培养的步骤,以及

[0009] b) 从步骤a)产生的被刺激的血样中,测量分别选自以下列表的至少两个不同列表的至少两种不同生物标志物表达的步骤:

[0010] -列表S1:BST2、CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD3D、CD44、CD74、CD83、CLEC7A、CXCL10、CXCL2、CXCL9、DYRK2、FAM89A、HLA-DMB、HLA-DPB1、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、RARRES3、DDX58、SLAMF7、SRC、STAT2、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

[0011] -列表S2:ADGRE3、ARL14EP、BST2、C3、CCL2、CCL20、CCL8、CCNB1IP1、IL7R、CD209、CD3D、CD44、CD74、CD83、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、CXCL10、CXCL2、CXCL9、DYRK2、FAM89A、HLA-DMB、HLA-DPB1、HLA-DRA、IFITM1、IRAK2、SLAMF7、TGFB1;

[0012] -列表S3:121601901-HERV0116、BST2、C3、CCL20、CCL4、CCL8、CCR1、IL7R、CD209、CD44、CD74、CD83、CLEC7A、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DRA、IL1A、IL2、RARRES3、SLAMF7、STAT2。

[0013]

靶标志物	染色体定位 (GRCh38/hg38)
ADGRE3	chr19:14,619,117-14,690,027
ARL14EP	chr11:30,323,099-30,338,458
BST2	chr19:17,402,939-17,405,648
C3	chr19:6,677,704-6,730,562
CCL2	chr17:34,255,218-34,257,203
CCL20	chr2:227,805,739-227,817,564
CCL4	chr17:36,103,827-36,105,621
CCL8	chr17:34,319,047-34,321,402
CCNB1IP1	chr14:20,311,368-20,333,312
CCR1	chr3:46,201,709-46,208,341
CD209	chr19:7,739,988-7,747,605
CD3D	chr11:118,338,954-118,342,744
CD44	chr11:35,138,870-35,232,402
CD74	chr5:150,400,041-150,412,936
CD83	chr6:14,117,256-14,136,918
CDKN1A	chr6:36,676,460-36,687,339
CLEC7A	chr12:10,116,777-10,130,273
CX3CR1	chr3:39,263,494-39,281,735
CXCL10	chr4:76,021,116-76,023,536
CXCL2	chr4:74,097,035-74,099,280
CXCL9	chr4:76,001,275-76,007,523
DDX58	chr9:32,455,302-32,526,324

	DYRK2	chr12:67,648,338-67,665,406
	EIF2AK4	chr15:39,934,115-40,035,596
	FAM89A	chr1:231,018,958-231,040,254
	HLA-DMB	chr6:32,934,629-32,941,070
	HLA-DPA1	chr6:33,064,569-33,080,778
	HLA-DPB1	chr6:33,075,926-33,089,696
	HLA-DRA	chr6:32,439,842-32,445,046
	IFITM1	chr11:313,506-315,272
	IFNG	chr12:68,154,768-68,159,741
	IL1A	chr2:112,773,915-112,785,394
	IL2	chr4:122,451,470-122,456,725
[0014]	IL7R	chr5:35,852,695-35,879,603
	IRAK2	chr3:10,164,879-10,243,745
	PTGS2	chr1:186,671,791-186,680,427
	RARRES3	chr11:63,536,801-63,546,462
	SLAMF7	chr1:160,739,057-160,754,821
	SRC	chr20:37,344,685-37,406,050
	STAT2	chr12:56,341,597-56,360,253
	STING1	chr5:139,475,533-139,482,758
	TGFB1	chr19:41,301,587-41,353,933
	TNFA	chr6:31,575,565-31,578,336
	TNFSF13B	chr13:108,251,240-108,308,484
	ZBP1	chr20:57,603,846-57,620,576
	121601901-HERV0116	chr12:112972627-112975754

[0015] 表1. 根据GRCh38/hg38的生物标志物的染色体定位

[0016] 在本发明的背景中：

[0017] - 术语“个体”一词是指人类，无论他是什么人（特别是无论他的健康状况如何，无论他是健康的个体还是患病的个体）。术语“患者”是指与卫生专业人员（例如医师（例如，全

科医生)或医疗机构(例如,医院,尤其是急诊室、复苏病房、重症监护病房或持续护理病房)接触过的个体。患者一般是患病的人,但也可以是健康的人(例如要接种疫苗的老人);

[0018] -“刺激物”对应于一种或多种能够诱导免疫反应并允许对个体免疫反应进行定性和/或定量评估的分子;特别地,它们可以是免疫原(或“挑战”)或用于治疗目的分子;

[0019] -确定“个体对刺激物做出反应的能力”可以有多种用途,包括诊断(例如识别个体的免疫状态,可以是正常状态、炎症状态或免疫抑制状态)和预后(例如,识别免疫状态可能演变的个体—例如,从正常状态到炎症状态,反之亦然,甚至是从免疫抑制状态到炎症状态的个体),为了例如调整治疗管理,甚至预测和/或监测对治疗的反应的有效性;

[0020] -“血液样本”是指源自血液的全血样本或细胞样本(即从血液中获得并包含至少一种细胞类型的样本,例如外周血单个核细胞或PBMC样本);

[0021] -“生物标志物”或“标志物”是可客观测量的生物学特征,其代表正常或病理学生物学过程或对治疗干预的药理性应答的指标。它尤其可以是分子生物标记,优选在mRNA水平可检测到。更特别地,所述生物标志物可以是内源性生物标志物或基因座(例如在个体的染色体物质中发现的基因或HERV/人内源性逆转录病毒)或外源性生物标志物(例如病毒)。

[0022] 优选地,在如上所述的方法中,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两种不同的列表:

[0023] -列表S1-1:BST2、CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD3D、CD44、CD83、CXCL2、DYRK2、HLA-DMB、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、RARRES3、DDX58、SRC、STAT2、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

[0024] -列表S2-1:ADGRE3、ARL14EP、C3、CCL2、CCNB1IP1、IL7R、CD3D、CD44、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、CXCL2、DYRK2、HLA-DMB、HLA-DRA、IFITM1、IRAK2、TGFB1;

[0025] -列表S3-1:121601901-HERV0116、C3、CCR1、IL7R、CD44、CD74、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DRA、IL1A、IL2、RARRES3、SLAMF7、STAT2。

[0026] 再次优选地,在如上所述的方法中,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两个不同列表:

[0027] -列表S1-2:CCL20、CCL4、CCL8、CD209、CD44、CD83、CXCL2、IFNG、IL1A、IRAK2、PTGS2、DDX58、SRC、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

[0028] -列表S2-2:ADGRE3、ARL14EP、CCL2、CCNB1IP1、IL7R、CDKN1A、CLEC7A、CX3CR1、DYRK2、IFITM1、TGFB1;

[0029] -列表S3-2:121601901-HERV0116、C3、CCR1、CXCL10、CXCL9、EIF2AK4、HLA-DMB、HLA-DPA1、IL2、SLAMF7。

[0030] 甚至更优选地,在如上所述的方法中,所述至少两种不同的生物标志物分别选自以下列表中的至少两种不同的列表:

[0031] -列表S1-3:IFNG、PTGS2、DDX58、SRC、STING、TNFA、TNFSF13B、ZBP1;

[0032] -列表S2-3:ADGRE3、ARL14EP、CCL2、CCNB1IP1、CDKN1A、CX3CR1、IFITM1、TGFB1;

[0033] -列表S3-3:121601901-HERV0116、CCR1、EIF2AK4、HLA-DPA1、IL2。

[0034] 优选地,如上所述的方法是用于确定个体对刺激物作出反应的能力,优选确定个体免疫系统对刺激物作出反应的能力的体外或离体方法,所述方法包括:

[0035] a) 将所述个体的血样与所述刺激物一起培养的步骤,以及

[0036] b) 从步骤a)产生的被刺激的血样中,测量分别选自以下的至少三种不同生物标志

物的表达的步骤:

[0037] -列表S1、列表S2和列表S3;

[0038] -列表S1-1、列表S2-1和列表S3-1;

[0039] -列表S1-2、列表S2-2和列表S3-2;或

[0040] -列表S1-3、列表S2-3和列表S3-3。

[0041] 再次优选地,在上述步骤b)中,从步骤a)产生的被刺激的血样中测量以下表达:

[0042] -从列表S1、S2和S3的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种、至少39种、至少40种、至少41种、至少42种、至少43种、至少44种、至少45种、至少46种不同的生物标志物;

[0043] -从列表S1-1、S2-1和S3-1的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种、至少39种、至少40种、至少41种、至少42种、至少43种、至少44种、至少45种不同的生物标志物;

[0044] -从列表S1-2、S2-2和S3-2的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种不同的生物标志物;或

[0045] -从列表S1-3、S2-3和S3-3的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种不同的生物标志物。

[0046] 用于上述方法的特别优选的两种和三种生物标志物组合在表2中公开。

[0047]	分别选	IFNG	ADGRE3	
	自列表	IFNG	ARL14EP	
	S1-3 和	IFNG	CCL2	
	S2-3 的	IFNG	CCNB1IP1	

[0048]

两种生物标志物的组合	IFNG	CDKN1A	
	IFNG	CX3CR1	
	IFNG	IFITM1	
	IFNG	TGFB1	
	PTGS2	ADGRE3	
	PTGS2	ARL14EP	
	PTGS2	CCL2	
	PTGS2	CCNB1IP1	
	PTGS2	CDKN1A	
	PTGS2	CX3CR1	
	PTGS2	IFITM1	
	PTGS2	TGFB1	
	DDX58	ADGRE3	
	DDX58	ARL14EP	
	DDX58	CCL2	
	DDX58	CCNB1IP1	
	DDX58	CDKN1A	
	DDX58	CX3CR1	
	DDX58	IFITM1	
	DDX58	TGFB1	
	SRC	ADGRE3	
	SRC	ARL14EP	
	SRC	CCL2	
	SRC	CCNB1IP1	
	SRC	CDKN1A	
	SRC	CX3CR1	
	SRC	IFITM1	

[0049]

SRC	TGFB1	
STING	ADGRE3	
STING	ARL14EP	
STING	CCL2	
STING	CCNB1IP1	
STING	CDKN1A	
STING	CX3CR1	
STING	IFITM1	
STING	TGFB1	
TNFA	ADGRE3	
TNFA	ARL14EP	
TNFA	CCL2	
TNFA	CCNB1IP1	
TNFA	CDKN1A	
TNFA	CX3CR1	
TNFA	IFITM1	
TNFA	TGFB1	
TNFSF13B	ADGRE3	
TNFSF13B	ARL14EP	
TNFSF13B	CCL2	
TNFSF13B	CCNB1IP1	
TNFSF13B	CDKN1A	
TNFSF13B	CX3CR1	
TNFSF13B	IFITM1	
TNFSF13B	TGFB1	
ZBP1	ADGRE3	
ZBP1	ARL14EP	

[0050]

	ZBP1	CCL2	
	ZBP1	CCNB1IP1	
	ZBP1	CDKN1A	
	ZBP1	CX3CR1	
	ZBP1	IFITM1	
	ZBP1	TGFB1	
分别选自列表S1-3和S3-3的两种生物标志物的组合	IFNG	121601901-HERV0116	
	IFNG	CCR1	
	IFNG	EIF2AK4	
	IFNG	HLA-DPA1	
	IFNG	IL2	
	PTGS2	121601901-HERV0116	
	PTGS2	CCR1	
	PTGS2	EIF2AK4	
	PTGS2	HLA-DPA1	
	PTGS2	IL2	
	DDX58	121601901-HERV0116	
	DDX58	CCR1	
	DDX58	EIF2AK4	
	DDX58	HLA-DPA1	
	DDX58	IL2	
	SRC	121601901-HERV0116	
	SRC	CCR1	
	SRC	EIF2AK4	
	SRC	HLA-DPA1	
	SRC	IL2	
	STING	121601901-HERV0116	

[0051]

	STING	CCR1	
	STING	EIF2AK4	
	STING	HLA-DPA1	
	STING	IL2	
	TNFA	121601901-HERV0116	
	TNFA	CCR1	
	TNFA	EIF2AK4	
	TNFA	HLA-DPA1	
	TNFA	IL2	
	TNFSF13B	121601901-HERV0116	
	TNFSF13B	CCR1	
	TNFSF13B	EIF2AK4	
	TNFSF13B	HLA-DPA1	
	TNFSF13B	IL2	
	ZBP1	121601901-HERV0116	
	ZBP1	CCR1	
	ZBP1	EIF2AK4	
	ZBP1	HLA-DPA1	
	ZBP1	IL2	
分别选自列表S2-3和S3-3的两种生物标志物的组合	ADGRE3	121601901-HERV0116	
	ADGRE3	CCR1	
	ADGRE3	EIF2AK4	
	ADGRE3	HLA-DPA1	
	ADGRE3	IL2	
	ARL14EP	121601901-HERV0116	
	ARL14EP	CCR1	
	ARL14EP	EIF2AK4	
ARL14EP	HLA-DPA1		

[0052]

ARL14EP	IL2	
CCL2	121601901-HERV0116	
CCL2	CCR1	
CCL2	EIF2AK4	
CCL2	HLA-DPA1	
CCL2	IL2	
CCNB1IP1	121601901-HERV0116	
CCNB1IP1	CCR1	
CCNB1IP1	EIF2AK4	
CCNB1IP1	HLA-DPA1	
CCNB1IP1	IL2	
CDKN1A	121601901-HERV0116	
CDKN1A	CCR1	
CDKN1A	EIF2AK4	
CDKN1A	HLA-DPA1	
CDKN1A	IL2	
CX3CR1	121601901-HERV0116	
CX3CR1	CCR1	
CX3CR1	EIF2AK4	
CX3CR1	HLA-DPA1	
CX3CR1	IL2	
IFITM1	121601901-HERV0116	
IFITM1	CCR1	
IFITM1	EIF2AK4	
IFITM1	HLA-DPA1	
IFITM1	IL2	
TGFB1	121601901-HERV0116	
TGFB1	CCR1	

[0053]

	TGFB1	EIF2AK4	
	TGFB1	HLA-DPA1	
	TGFB1	IL2	
分别选自列表S1-3、S2-3和S3-3的每一个的三种生物标志物的组合	IFNG	ADGRE3	121601901-HERV0116
	IFNG	ADGRE3	CCR1
	IFNG	ADGRE3	EIF2AK4
	IFNG	ADGRE3	HLA-DPA1
	IFNG	ADGRE3	IL2
	IFNG	ARL14EP	121601901-HERV0116
	IFNG	ARL14EP	CCR1
	IFNG	ARL14EP	EIF2AK4
	IFNG	ARL14EP	HLA-DPA1
	IFNG	ARL14EP	IL2
	IFNG	CCL2	121601901-HERV0116
	IFNG	CCL2	CCR1
	IFNG	CCL2	EIF2AK4
	IFNG	CCL2	HLA-DPA1
	IFNG	CCL2	IL2
	IFNG	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
	IFNG	CCNB1IP1	CCR1
	IFNG	CCNB1IP1	EIF2AK4
	IFNG	CCNB1IP1	HLA-DPA1
	IFNG	CCNB1IP1	IL2
	IFNG	CDKN1A	121601901-HERV0116
	IFNG	CDKN1A	CCR1
	IFNG	CDKN1A	EIF2AK4
	IFNG	CDKN1A	HLA-DPA1
IFNG	CDKN1A	IL2	

[0054]

IFNG	CX3CR1	121601901-HERV0116
IFNG	CX3CR1	CCR1
IFNG	CX3CR1	EIF2AK4
IFNG	CX3CR1	HLA-DPA1
IFNG	CX3CR1	IL2
IFNG	IFITM1	121601901-HERV0116
IFNG	IFITM1	CCR1
IFNG	IFITM1	EIF2AK4
IFNG	IFITM1	HLA-DPA1
IFNG	IFITM1	IL2
IFNG	TGFB1	121601901-HERV0116
IFNG	TGFB1	CCR1
IFNG	TGFB1	EIF2AK4
IFNG	TGFB1	HLA-DPA1
IFNG	TGFB1	IL2
PTGS2	ADGRE3	121601901-HERV0116
PTGS2	ADGRE3	CCR1
PTGS2	ADGRE3	EIF2AK4
PTGS2	ADGRE3	HLA-DPA1
PTGS2	ADGRE3	IL2
PTGS2	ARL14EP	121601901-HERV0116
PTGS2	ARL14EP	CCR1
PTGS2	ARL14EP	EIF2AK4
PTGS2	ARL14EP	HLA-DPA1
PTGS2	ARL14EP	IL2
PTGS2	CCL2	121601901-HERV0116
PTGS2	CCL2	CCR1
PTGS2	CCL2	EIF2AK4

[0055]

PTGS2	CCL2	HLA-DPA1
PTGS2	CCL2	IL2
PTGS2	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
PTGS2	CCNB1IP1	CCR1
PTGS2	CCNB1IP1	EIF2AK4
PTGS2	CCNB1IP1	HLA-DPA1
PTGS2	CCNB1IP1	IL2
PTGS2	CDKN1A	121601901-HERV0116
PTGS2	CDKN1A	CCR1
PTGS2	CDKN1A	EIF2AK4
PTGS2	CDKN1A	HLA-DPA1
PTGS2	CDKN1A	IL2
PTGS2	CX3CR1	121601901-HERV0116
PTGS2	CX3CR1	CCR1
PTGS2	CX3CR1	EIF2AK4
PTGS2	CX3CR1	HLA-DPA1
PTGS2	CX3CR1	IL2
PTGS2	IFITM1	121601901-HERV0116
PTGS2	IFITM1	CCR1
PTGS2	IFITM1	EIF2AK4
PTGS2	IFITM1	HLA-DPA1
PTGS2	IFITM1	IL2
PTGS2	TGFB1	121601901-HERV0116
PTGS2	TGFB1	CCR1
PTGS2	TGFB1	EIF2AK4
PTGS2	TGFB1	HLA-DPA1
PTGS2	TGFB1	IL2
DDX58	ADGRE3	121601901-HERV0116

[0056]

DDX58	ADGRE3	CCR1
DDX58	ADGRE3	EIF2AK4
DDX58	ADGRE3	HLA-DPA1
DDX58	ADGRE3	IL2
DDX58	ARL14EP	121601901-HERV0116
DDX58	ARL14EP	CCR1
DDX58	ARL14EP	EIF2AK4
DDX58	ARL14EP	HLA-DPA1
DDX58	ARL14EP	IL2
DDX58	CCL2	121601901-HERV0116
DDX58	CCL2	CCR1
DDX58	CCL2	EIF2AK4
DDX58	CCL2	HLA-DPA1
DDX58	CCL2	IL2
DDX58	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
DDX58	CCNB1IP1	CCR1
DDX58	CCNB1IP1	EIF2AK4
DDX58	CCNB1IP1	HLA-DPA1
DDX58	CCNB1IP1	IL2
DDX58	CDKN1A	121601901-HERV0116
DDX58	CDKN1A	CCR1
DDX58	CDKN1A	EIF2AK4
DDX58	CDKN1A	HLA-DPA1
DDX58	CDKN1A	IL2
DDX58	CX3CR1	121601901-HERV0116
DDX58	CX3CR1	CCR1
DDX58	CX3CR1	EIF2AK4
DDX58	CX3CR1	HLA-DPA1

[0057]

DDX58	CX3CR1	IL2
DDX58	IFITM1	121601901-HERV0116
DDX58	IFITM1	CCR1
DDX58	IFITM1	EIF2AK4
DDX58	IFITM1	HLA-DPA1
DDX58	IFITM1	IL2
DDX58	TGFB1	121601901-HERV0116
DDX58	TGFB1	CCR1
DDX58	TGFB1	EIF2AK4
DDX58	TGFB1	HLA-DPA1
DDX58	TGFB1	IL2
SRC	ADGRE3	121601901-HERV0116
SRC	ADGRE3	CCR1
SRC	ADGRE3	EIF2AK4
SRC	ADGRE3	HLA-DPA1
SRC	ADGRE3	IL2
SRC	ARL14EP	121601901-HERV0116
SRC	ARL14EP	CCR1
SRC	ARL14EP	EIF2AK4
SRC	ARL14EP	HLA-DPA1
SRC	ARL14EP	IL2
SRC	CCL2	121601901-HERV0116
SRC	CCL2	CCR1
SRC	CCL2	EIF2AK4
SRC	CCL2	HLA-DPA1
SRC	CCL2	IL2
SRC	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
SRC	CCNB1IP1	CCR1

[0058]

SRC	CCNB1IP1	EIF2AK4
SRC	CCNB1IP1	HLA-DPA1
SRC	CCNB1IP1	IL2
SRC	CDKN1A	121601901-HERV0116
SRC	CDKN1A	CCR1
SRC	CDKN1A	EIF2AK4
SRC	CDKN1A	HLA-DPA1
SRC	CDKN1A	IL2
SRC	CX3CR1	121601901-HERV0116
SRC	CX3CR1	CCR1
SRC	CX3CR1	EIF2AK4
SRC	CX3CR1	HLA-DPA1
SRC	CX3CR1	IL2
SRC	IFITM1	121601901-HERV0116
SRC	IFITM1	CCR1
SRC	IFITM1	EIF2AK4
SRC	IFITM1	HLA-DPA1
SRC	IFITM1	IL2
SRC	TGFB1	121601901-HERV0116
SRC	TGFB1	CCR1
SRC	TGFB1	EIF2AK4
SRC	TGFB1	HLA-DPA1
SRC	TGFB1	IL2
STING	ADGRE3	121601901-HERV0116
STING	ADGRE3	CCR1
STING	ADGRE3	EIF2AK4
STING	ADGRE3	HLA-DPA1
STING	ADGRE3	IL2

[0059]

STING	ARL14EP	121601901-HERV0116
STING	ARL14EP	CCR1
STING	ARL14EP	EIF2AK4
STING	ARL14EP	HLA-DPA1
STING	ARL14EP	IL2
STING	CCL2	121601901-HERV0116
STING	CCL2	CCR1
STING	CCL2	EIF2AK4
STING	CCL2	HLA-DPA1
STING	CCL2	IL2
STING	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
STING	CCNB1IP1	CCR1
STING	CCNB1IP1	EIF2AK4
STING	CCNB1IP1	HLA-DPA1
STING	CCNB1IP1	IL2
STING	CDKN1A	121601901-HERV0116
STING	CDKN1A	CCR1
STING	CDKN1A	EIF2AK4
STING	CDKN1A	HLA-DPA1
STING	CDKN1A	IL2
STING	CX3CR1	121601901-HERV0116
STING	CX3CR1	CCR1
STING	CX3CR1	EIF2AK4
STING	CX3CR1	HLA-DPA1
STING	CX3CR1	IL2
STING	IFITM1	121601901-HERV0116
STING	IFITM1	CCR1
STING	IFITM1	EIF2AK4

[0060]

STING	IFITM1	HLA-DPA1
STING	IFITM1	IL2
STING	TGFB1	121601901-HERV0116
STING	TGFB1	CCR1
STING	TGFB1	EIF2AK4
STING	TGFB1	HLA-DPA1
STING	TGFB1	IL2
TNFA	ADGRE3	121601901-HERV0116
TNFA	ADGRE3	CCR1
TNFA	ADGRE3	EIF2AK4
TNFA	ADGRE3	HLA-DPA1
TNFA	ADGRE3	IL2
TNFA	ARL14EP	121601901-HERV0116
TNFA	ARL14EP	CCR1
TNFA	ARL14EP	EIF2AK4
TNFA	ARL14EP	HLA-DPA1
TNFA	ARL14EP	IL2
TNFA	CCL2	121601901-HERV0116
TNFA	CCL2	CCR1
TNFA	CCL2	EIF2AK4
TNFA	CCL2	HLA-DPA1
TNFA	CCL2	IL2
TNFA	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
TNFA	CCNB1IP1	CCR1
TNFA	CCNB1IP1	EIF2AK4
TNFA	CCNB1IP1	HLA-DPA1
TNFA	CCNB1IP1	IL2
TNFA	CDKN1A	121601901-HERV0116

[0061]

TNFA	CDKN1A	CCR1
TNFA	CDKN1A	EIF2AK4
TNFA	CDKN1A	HLA-DPA1
TNFA	CDKN1A	IL2
TNFA	CX3CR1	121601901-HERV0116
TNFA	CX3CR1	CCR1
TNFA	CX3CR1	EIF2AK4
TNFA	CX3CR1	HLA-DPA1
TNFA	CX3CR1	IL2
TNFA	IFITM1	121601901-HERV0116
TNFA	IFITM1	CCR1
TNFA	IFITM1	EIF2AK4
TNFA	IFITM1	HLA-DPA1
TNFA	IFITM1	IL2
TNFA	TGFB1	121601901-HERV0116
TNFA	TGFB1	CCR1
TNFA	TGFB1	EIF2AK4
TNFA	TGFB1	HLA-DPA1
TNFA	TGFB1	IL2
TNFSF13B	ADGRE3	121601901-HERV0116
TNFSF13B	ADGRE3	CCR1
TNFSF13B	ADGRE3	EIF2AK4
TNFSF13B	ADGRE3	HLA-DPA1
TNFSF13B	ADGRE3	IL2
TNFSF13B	ARL14EP	121601901-HERV0116
TNFSF13B	ARL14EP	CCR1
TNFSF13B	ARL14EP	EIF2AK4
TNFSF13B	ARL14EP	HLA-DPA1

[0062]

TNFSF13B	ARL14EP	IL2
TNFSF13B	CCL2	121601901-HERV0116
TNFSF13B	CCL2	CCR1
TNFSF13B	CCL2	EIF2AK4
TNFSF13B	CCL2	HLA-DPA1
TNFSF13B	CCL2	IL2
TNFSF13B	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
TNFSF13B	CCNB1IP1	CCR1
TNFSF13B	CCNB1IP1	EIF2AK4
TNFSF13B	CCNB1IP1	HLA-DPA1
TNFSF13B	CCNB1IP1	IL2
TNFSF13B	CDKN1A	121601901-HERV0116
TNFSF13B	CDKN1A	CCR1
TNFSF13B	CDKN1A	EIF2AK4
TNFSF13B	CDKN1A	HLA-DPA1
TNFSF13B	CDKN1A	IL2
TNFSF13B	CX3CR1	121601901-HERV0116
TNFSF13B	CX3CR1	CCR1
TNFSF13B	CX3CR1	EIF2AK4
TNFSF13B	CX3CR1	HLA-DPA1
TNFSF13B	CX3CR1	IL2
TNFSF13B	IFITM1	121601901-HERV0116
TNFSF13B	IFITM1	CCR1
TNFSF13B	IFITM1	EIF2AK4
TNFSF13B	IFITM1	HLA-DPA1
TNFSF13B	IFITM1	IL2
TNFSF13B	TGFB1	121601901-HERV0116
TNFSF13B	TGFB1	CCR1

[0063]

TNFSF13B	TGFB1	EIF2AK4
TNFSF13B	TGFB1	HLA-DPA1
TNFSF13B	TGFB1	IL2
ZBP1	ADGRE3	121601901-HERV0116
ZBP1	ADGRE3	CCR1
ZBP1	ADGRE3	EIF2AK4
ZBP1	ADGRE3	HLA-DPA1
ZBP1	ADGRE3	IL2
ZBP1	ARL14EP	121601901-HERV0116
ZBP1	ARL14EP	CCR1
ZBP1	ARL14EP	EIF2AK4
ZBP1	ARL14EP	HLA-DPA1
ZBP1	ARL14EP	IL2
ZBP1	CCL2	121601901-HERV0116
ZBP1	CCL2	CCR1
ZBP1	CCL2	EIF2AK4
ZBP1	CCL2	HLA-DPA1
ZBP1	CCL2	IL2
ZBP1	CCNB1IP1	121601901-HERV0116
ZBP1	CCNB1IP1	CCR1
ZBP1	CCNB1IP1	EIF2AK4
ZBP1	CCNB1IP1	HLA-DPA1
ZBP1	CCNB1IP1	IL2
ZBP1	CDKN1A	121601901-HERV0116
ZBP1	CDKN1A	CCR1
ZBP1	CDKN1A	EIF2AK4
ZBP1	CDKN1A	HLA-DPA1
ZBP1	CDKN1A	IL2

[0064]	ZBP1	CX3CR1	121601901-HERV0116
	ZBP1	CX3CR1	CCR1
	ZBP1	CX3CR1	EIF2AK4
	ZBP1	CX3CR1	HLA-DPA1
	ZBP1	CX3CR1	IL2
	ZBP1	IFITM1	121601901-HERV0116
	ZBP1	IFITM1	CCR1
	ZBP1	IFITM1	EIF2AK4
	ZBP1	IFITM1	HLA-DPA1
	ZBP1	IFITM1	IL2
	ZBP1	TGFB1	121601901-HERV0116
	ZBP1	TGFB1	CCR1
	ZBP1	TGFB1	EIF2AK4
	ZBP1	TGFB1	HLA-DPA1
	ZBP1	TGFB1	IL2

[0065] 表2. 两种和三种生物标志物的优选组合

[0066] 优选地,如上所述的方法,在其所有实施方案中,被应用于来自患者的血液样本,优选地是医院的患者,更优选地是急诊室、复苏室、重症监护室或连续护理室的患者,甚至更优选地是患有外伤(优选严重外伤)、烧伤(优选严重烧伤)、接受过手术(特别是大手术)或处于脓毒症状态的患者,并且非常特别优选地是脓毒性休克的患者。脓症患者是指患有至少一种由对感染的不适当宿主反应而导致危及生命的器官衰竭的患者。脓毒性休克是指脓毒症的一种亚型,其中尽管有足够的血管充盈,但低血压持续存在。

[0067] 优选地,如前所述的方法,在其所有实施方案中,被应用于含有白细胞的血液样本。血液样本可以例如是外周血单个核细胞(或PBMC)的样本,其由淋巴细胞(B、T和NK细胞)、树突细胞和单核细胞组成,通常通过本领域技术人员熟知的Ficoll方法获得。然而,以一种特别有利的方式,优选直接使用通过静脉途径(例如在使用含有抗凝剂的管时)收集的全血样本(即包含所有白细胞、红细胞、血小板和血浆),以尽量减少对样本的操作,并保持参与免疫反应的不同细胞群之间的生理细胞相互作用,并更好地反映个体先天性和适应性免疫反应的复杂性。特别是,虽然PBMC仅含有单个核细胞,但全血还含有粒细胞(或多形核细胞)。使用可以将程序标准化的系统也是特别有利的;特别是,可以使用预填充培养基和目的刺激物的半封闭培养系统(例如试管),这些系统是标准化的,例如,其包含明确定义的刺激物(即在刺激物的产生水平上没有批内(inter-batch),就其性质/成分而言)和/或“批次”加载的,从而控制试管内刺激物的数量并具有试管间(tube-to-tube)的可重复性。优选地,这些试管还可以允许采集血样(这允许在采集时刺激细胞),并且更优选地,它们允许采

集精确体积的血液。标准化系统的一个例子是 TruCulture® 试管。

[0068] 血样可能是应医生的要求采集的,例如,以确定个体是否会对疫苗注射有反应。样本也可能是在患者入院时或在患者发展过程中采集的;特别地,对于患有脓毒症的患者或遭受创伤的患者,样本可能特别是在侵染(即脓毒症或创伤)或脓毒性休克(特别是当患者需要升压药且他的乳酸超过2mmol/L时)后的第一周(例如从D3到D7,特别是在D3/4)采集的。

[0069] 在如上所述的方法中,在其所有实施方案中,将个体的血液样本与刺激物一起培养的步骤可以在不同的温度(优选37°C)和不同的培养时间(优选1小时至48小时的培养;例如,培养1小时或更少、2小时或更少、4小时或更少、12小时或更少、24小时或更少、或48小时或更少)下进行。短培养时间对于在临床中实施测试特别有利。

[0070] 如前所述的方法中使用的刺激物,在其所有实施方案中,可以具有不同的性质。

[0071] 根据一个实施方案,刺激物可以包含一种(或多种)免疫原性类型的分子。在该实施方案中,该方法对于确定诊断(特别是涉及个体的免疫状态)、预后(特别是涉及个体免疫状态的演变)和/或调整所述个体的治疗护理特别有用。

[0072] 例如,免疫原性刺激物可以包含一种或多种分子,所述分子能够结合:

[0073] -在一方面,至少一种类型的抗原呈递细胞(APC),所述APC可能特别是一种类型的先天免疫细胞(例如单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞)或一种类型的适应性免疫细胞(例如B淋巴细胞),和

[0074] -另一方面,至少一种类型的适应性免疫细胞(如T淋巴细胞)。

[0075] 优选地,该刺激包括超抗原类型的分子或类似于超抗原的分子。超抗原是蛋白质性质的毒素,能够通过同时经由高变区CDR4与T细胞受体的可变结构域(V_{β})的 β 链结合以及与存在于抗原呈递细胞(APC)的表面的MHC II(II类主要组织相容性复合体)的分子结合来刺激大量T淋巴细胞。在携带MHC的抗原呈递细胞和其T细胞受体携带 V_{β} 片段的T淋巴细胞之间建立的强制相互作用导致这些T淋巴细胞的多克隆活化,而与它们对所呈递的肽抗原的特异性无关。当使用包含超抗原类型分子的刺激物时,在根据本发明的方法中使用的血液样本包含T淋巴细胞和抗原呈递细胞。在更特别感兴趣的超抗原中,可以特别提及由葡萄球菌物种产生的超抗原和由链球菌物种产生的超抗原。优选地,刺激物包含选自SEB(葡萄球菌肠毒素B)和SEA(葡萄球菌肠毒素A)的至少一种分子。在类似于超抗原的分子中,可以提及例如双特异性抗体,其一方面能够结合T淋巴细胞,另一方面能够结合抗原呈递细胞(例如,一方面能够与T淋巴细胞上的 V_{β} 结合,另一方面能够与抗原呈递细胞上的MHC II分子或TLR型受体结合的抗体)。

[0076] 也可以是直接激活T淋巴细胞的刺激物,其优选地选自识别并激活T淋巴细胞表面受体的抗体,以在T淋巴细胞水平触发激活信号,更优选地,这些抗体彼此物理和/或化学地结合,还更优选地通过在聚合物上的偶联、通过在珠子上的偶联或通过它们之间的偶联结合。它们可以例如是抗CD3抗体(例如Muromonab-CD3,以Orthoclone OKT3名称销售),优选与抗CD28、抗CD2和/或抗CD137/TNFRSF9抗体相关。

[0077] 也可能是咪唑啉类型的刺激物,核苷的结构类似物,在其结构中包括一个环,具有低分子量。这种类型的刺激物在体内产生抗病毒和抗肿瘤作用。可以提及咪唑啉型刺激物的一个例子,雷西莫特(R848),它与树突细胞上的,或更一般地抗原呈递细胞(或APC

(NF反应-KB依赖性)上的人TLR7和TLR8结合。还描述了对T淋巴细胞的直接影响(Smits et al(2008), *Oncologist* 13(8):859-875)。

[0078] 根据另一个实施方案,刺激物可以包含,优选基本上由以下组成,更优选由以下组成:用于治疗目的分子(特别是药物或候选药物),更优选具有免疫调节作用的分子(特别是具有免疫刺激或抗炎作用的分子)。作为例子可以提及IL-7或干扰素 γ 。在该实施方案中,所述方法特别适用于预测和/或监测对所述分子的反应的功效以用于治疗目的。

[0079] 测量生物标志物的表达(或表达水平)在于量化该生物标志物的至少一种表达产物。本发明含义内的生物标志物的表达产物是由该生物标志物的表达产生的任何生物分子。更具体地,所述生物标志物的表达产物可以是RNA转录物。“转录物”是指由生物标志物转录产生的RNA,特别是信使RNA(mRNA)。更具体地,转录物是通过基因转录产生的RNA,随后是前体RNA形式的转录后修饰。

[0080] 因此,优选地,在如前所述的方法中,在其所有实施方案中,在RNA或mRNA转录物水平测量生物标志物的表达。在本发明的背景中,可以进行相同生物标志物的一种或多种RNA转录物的表达水平的测量。根据本领域技术人员熟知的方法,可以顺序或同时进行多种转录物数量的确定。mRNA转录物的检测可以通过直接方法,通过本领域技术人员已知的可以确定所述转录物在样本中存在的任意方法来进行,或通过间接检测所述转录物来进行,在将所述转录物转化为DNA之后,或者在所述转录物扩增之后,或者在将所述转录物转化为DNA之后获得的DNA扩增之后。存在许多检测核酸的方法(参见例如Kricka等人, *Clinical Chemistry*, 1999, n°45(4), p.453-458; Relier GH等人, *DNA Probes*, 第二版, Stockton Press, 1993, 第5和第6节, 173-249页)。生物标志物的表达尤其可以通过逆转录-聚合酶链式反应或RT-PCR来测量,优选通过定量RT-PCR或RT-qPCR(例如使用**FilmArray®**技术)来测量,通过测序(优选通过高通量测序)或通过杂交技术(例如使用杂交微芯片或通过**NanoString® nCounter®**类型的技术)来测量。允许多路复用(multiplexing)的技术(例如**FilmArray®**或**NanoString® nCounter®**)是优选的。

[0081] 在本发明的背景中,表达水平的测量使得可以确定存在于测试样本中的一种或多种转录物的量或由此得出推导值。例如,源自该量的值可以是绝对浓度,其使用从已知浓度的扩增子溶液的连续稀释获得的校准曲线来计算。它也可以对应于标准化和校准量的值,例如CNRQ(校准的归一化相对数量, (Hellemans et al(2007), *Genome biology* 8(2):R19)),它整合了参考样本、校准物和一个或多个管家基因(也称为参考基因)的值。作为参考基因的例子,可以提及PPIB、PPIA、GLYR1、RANBP3、HPRT1、18S、GAPDH、RPLP0和ACTB基因。

[0082] 优选地,在如前所述的方法中,在其所有实施方案中,将生物标志物的表达相对于以下参考基因的一种或多种的表达进行归一化:HPRT1、DEC1和TBP;特别是,HPRT1、DEC1和TBP 3个基因的几何平均值可用于归一化。

[0083] 优选地,如前所述的方法,在其所有实施方案中,还可以包括从没有刺激的对照血样(即在与被刺激的血样相同的条件但没有刺激物的情况下培养的样本血)中测量与从被刺激的血样中测量的那些相同的生物标志物的表达的步骤。再次优选地,所述方法包括计算被刺激的血液样本中每种生物标志物的表达(优选归一化的表达)相对于对照血液样本中相同生物标志物的表达(优选归一化的表达)的比率的步骤。甚至更优选地,所述方法包

括将通过基底对数变换为10获得的比率进行变换的步骤,以及可能的将其变换为减少的中心变量的步骤。

[0084] 本发明还涉及试剂盒,其包含用于扩增和/或检测至少两种不同生物标志物的工具(优选引物和/或探针),所述生物标志物分别选自以下的至少两个不同的列表:

[0085] -列表S1、S2和S3;

[0086] -列表S1-1、S2-1和S3-1;

[0087] -列表S1-2、S2-2和S3-2;或

[0088] -列表S1-3、S2-3和S3-3;

[0089] 优选地包含扩增和/或检测至少三种不同生物标志物的工具(优选引物和/或探针),所述生物标志物分别从以下三个列表中选择:

[0090] -列表S1、S2和S3;

[0091] -列表S1-1、S2-1和S3-1;

[0092] -列表S1-2、S2-2和S3-2;或

[0093] -列表S1-3、S2-3和S3-3;

[0094] 更优选地包含扩增和/或检测以下的工具(优选引物和/或探针):

[0095] -从列表S1、S2和S3的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种、至少39种、至少40种、至少41种、至少42种、至少43种、至少44种、至少45种、至少46种不同的生物标志物;

[0096] -从列表S1-1、S2-1和S3-1的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种、至少39种、至少40种、至少41种、至少42种、至少43种、至少44种、至少45种不同的生物标志物;

[0097] -从列表S1-2、S2-2和S3-2的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种、至少22种、至少23种、至少24种、至少25种、至少26种、至少27种、至少28种、至少29种、至少30种、至少31种、至少32种、至少33种、至少34种、至少35种、至少36种、至少37种、至少38种不同的生物标志物;或

[0098] -从列表S1-3、S2-3和S3-3的每一个中选择的至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少21种不同的生物标志物;

[0099] -所述试剂盒的特征在于所述试剂盒的所有扩增和/或检测工具允许检测和/或扩增总共最多100种(优选最多90种、优选最多80种、优选最多70种、优选最多60种、优选最多50种、优选最多40种、优选最多30、优选最多20种、优选最多10种、优选最多5种)生物标志物。

[0100] 因此,所述试剂盒例如还可以包括用于扩增和/或检测一种或多种管家基因的工具。所述试剂盒还可以包含可以评估RNA提取质量、任何扩增和/或杂交方法的质量的阳性对照工具。

[0101] 术语“引物”或“扩增引物”意指核苷酸片段,其可由5至100个核苷酸,优选15至30个核苷酸组成,并且在确定用于引发酶促聚合反应的条件下,例如在靶核苷酸序列的酶促扩增反应中,具有与靶核苷酸序列杂交的特异性。通常使用“引物对”,其由两个引物组成。

[0102] 当需要进行多种不同生物标志物(例如基因)的扩增时,优选使用多种不同的引物对,其每对引物优选地具有与不同生物标志物特异性杂交的能力。

[0103] 术语“探针”或“杂交探针”意指核苷酸片段,其通常由5至100个核苷酸,优选15至90个核苷酸,甚至更优选15至35个核苷酸组成,其在与靶核苷酸序列形成杂交复合物的确定条件下具有杂交特异性。所述探针还包括报道分子(例如荧光团、酶或任何其他检测系统),其将允许检测靶核苷酸序列。在本发明中,所述靶核苷酸序列可以是信使RNA(mRNA)中包含的核苷酸序列或通过所述mRNA的反转录获得的互补DNA(cDNA)中包含的核苷酸序列。当需要靶向多种不同的生物标志物(例如基因)时,优选使用多种不同的探针,其每种探针优选地具有与不同生物标志物特异性杂交的能力。

[0104] 术语“杂交”是指一种过程,在该过程中,在适当条件下,具有足够互补序列的两个核苷酸片段,例如杂交探针和靶核苷酸片段,能够形成具有稳定和特异性氢键的双链。与多核苷酸“能够杂交”的核苷酸片段是能够在杂交条件下与所述多核苷酸杂交的片段,其可以在每种情况下以已知方式确定。所述杂交条件由严格性(即操作条件的严格性)决定。所述杂交更具特异性,因为它是在更高的严格性下进行的。所述严格性特别根据探针/靶标双链体的碱基组成以及两个核酸之间的错配程度来定义。严格性也可以是反应参数的函数,例如杂交溶液中存在的离子种类的浓度和类型、变性剂的性质和浓度和/或杂交温度。必须进行的杂交反应的条件严格性取决于所使用的杂交探针。所有这些数据都是众所周知的,并且所述适当的条件可以由本领域技术人员确定。通常,取决于所用杂交探针的长度,用于杂交反应的温度在约0.5至1M的盐溶液中在约20至70°C之间,特别是在35至65°C之间。然后进行检测杂交反应的步骤。

[0105] 术语“酶促扩增反应”是指通过至少一种酶的作用产生靶核苷酸片段的多个拷贝的过程。这样的扩增反应是本领域技术人员众所周知的,并且可以特别提及以下技术:PCR(聚合酶链式反应)、LCR(连接酶链式反应)、RCR(修复链式反应)、专利申请W0-A-90/06995的3SR(自我持续序列复制)、NASBA(基于核酸序列的扩增)、专利US-A-5,399,491的TMA(转录介导的扩增)以及专利US6410278的LAMP(环路介导的等温扩增)。当所述酶促扩增反应是PCR时,我们将更特别地谈及RT-PCR(RT意指“逆转录”),当扩增步骤之前是信使RNA(mRNA)成为互补DNA(cDNA)的逆转录步骤时,并且当PCR是定量的时为qPCR或RT-qPCR。

[0106] 本发明还涉及以下的用途:

[0107] -如先前在根据本发明的、在其所有实施方案中的试剂盒中描述的扩增和/或检测工具(优选引物和/或探针);优选地,用于扩增和/或检测至少两种不同生物标志物的工具(优选引物和/或探针),所述生物标志物分别选自列表S1至S3(或S1-1至S3-1,或S1-2至S3-2,或S1-3至S3-3)中的至少两个不同列表,更优选地,用于扩增和/或检测至少三种不同生物标志物的工具,所述生物标志物分别选自三个列表S1至S3(或S1-1至S3-1,或S1-2至S3-

2,或S1-3至S3-3)中的每一个,或

[0108] -包含此类扩增和/或检测工具的试剂盒,优选地,所述试剂盒的所有扩增和/或检测工具允许检测和/或扩增总共最多100种(优选最多90种、优选最多80、优选最多70种、优选最多60种、优选最多50种、优选最多40种、优选最多30种、优选最多20种、优选最多10、优选最多5种)生物标志物,并且任选地,所述试剂盒包含用于扩增和/或检测一种或多种管家基因的工具和/或能够评估RNA提取的质量、任何扩增和/或杂交方法的质量的阳性对照工具,以确定个体对刺激物作出反应的能力,优选个体免疫系统对刺激物作出反应的能力。

附图说明

[0109] 图1:在用SEB进行刺激后,对健康个体和脓毒性休克患者的反应差异贡献最大的生物标志物。(A)在用SEB进行刺激后,10名健康个体(圆圈)和30名脓毒性休克患者(三角形)的反应(刺激样本/对照样本)的主成分分析(PCA)。每个个体(《供体》,D)都标有其编号。指示了由每个主成分(PC)轴解释的差异百分比以及总差异。绘制了每个个体的向量位置。在(B)中将最重要的变量以图形方式表示(代表PC1和PC2变量的总权重的20%)。

[0110] 图2:在用SEB进行刺激后的多变量聚类分析。将10名健康个体和30名脓毒性休克患者作为一个整体进行治疗,以区分基因表达谱。通过使用具有相关距离的PAM方法(得分指数=31),对用SEB进行的刺激的反应揭示了3个分组或簇(S1;n=16、S2;n=11和S3;n=12)。树状图基于通过PAM方法找到的每个簇的中心点的个体之间的距离。热力图(或热图)上的灰度水平的较高强度(接近黑色),表明生物标志物的表达比或倍数变化(刺激样本/对照样本)的值较高,而灰度水平的较低强度(接近白色)表示生物标志物的表达比率或倍数变化(刺激样本/对照样本)的值较低。值10,000Ab/c用作高和低mHLA-DR水平的阈值。HLA-DR:人白细胞抗原DR。

[0111] 图3:在用SEB刺激后,用LPS和mHLA-DR刺激后蛋白质TNF α 分泌通过定义的簇的分布。在脓毒性休克发作后的第3-4天,(A)在健康个体(圆圈)和脓毒性休克患者(正方形)中用LPS刺激后24小时离体测量蛋白质TNF α 的分泌,和(B)仅在脓毒性休克患者(正方形)中通过流式细胞术测量mHLA-DR。死亡率(非存活个体)用三角形表示,而院内感染用空方块表示。用SEB刺激后定义的簇使用具有相关距离的PAM方法获得。**p<0.001;***p<0.0001。SEB:葡萄球菌肠毒素B,LPS:脂多糖,mHLA-DR:单核细胞人类白细胞抗原DR。

[0112] 通过以下实施例以非限制性方式说明本发明。

实施例

[0113] 材料和方法

[0114] 受测个体的群体

[0115] 该临床研究得到了地区伦理委员会(Comité de Protection des Hommes Sud-Est II,编号11236)的批准,并在法国研究部(Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation;DC-2008-509)和国家数据保护委员会(Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés)注册。这项研究是针对入住Edouard Herriot医院(Hospices Civils de Lyon,里昂,法国)重症监护病房的脓毒性休克患者进行的,是一项针对重症监护病房相关免疫功能障碍的大型研究的一部分

(NCT02803346)。

[0116] 脓毒性休克患者被前瞻性纳入。脓毒性休克已根据重症医学会和欧洲重症医学会的Sepsis-3共识进行定义(Singer et al (2016), JAMA 315:801-10):在感染患者或疑似感染患者无低血容量的情况下,需要施用血管升压药且血清乳酸浓度测量值大于2mmol/L的患者(即定义脓毒症患者脓毒性休克发作的标准)。排除标准是年龄低于18岁并且存在发育不全或已知的免疫抑制疾病。入院时,收集的数据包括人口统计学特征(年龄、性别)和原发感染部位;初始严重程度在入院时通过简化严重程度指数(IGS II;值范围:0-163)进行评估。收集驻留ICU期间死亡的信息,并通过连续器官衰竭评估(SOFA)评分(数值范围:0-24)评估入院后24小时的严重程度。还收集了随访期间的实验室数据,包括单核细胞HLA-DR (mHLA-DR)值,以及LPS刺激后TNF α 蛋白分泌的测量值。

[0117] 同时,从国家血液服务机构(法国血液机构)获得健康个体(或健康志愿者)的血液样本并立即使用。

[0118] 免疫功能测试

[0119] 在TruCulture试管中培养

[0120] 在脓毒性休克发作后第3-4天采集的来自脓毒性休克患者的、或从健康个体采集的肝素化全血(1mL),被分配到预热的仅含有培养基(“对照样本”)或含有具有SEB(400ng/mL)的培养基的TruCulture试管(Myriad Rbm,奥斯汀,德克萨斯州,美国)中。然后将这些试管插入干块培养箱中并在37°C下保持24小时。培养后,将细胞沉淀重悬于2ml TRI Reagent[®]LS(Sigma-Aldrich,Deisenhofen,德国)中,在室温下涡旋2分钟并静置10分钟,然后在室温-80°C下储存。

[0121] 测量生物标志物的表达

[0122] 对于TruCulture细胞沉淀操作和RNA处理和检测,遵照根据Urrutia et al (2016), Cell Reports 16,2777-2791的方案。将由通过TruCulture刺激生成并保存在TRI Reagent[®]LS(Sigma-Aldrich)中的细胞沉淀在摇动下解冻。在处理之前,将解冻的样本离心(在4°C下以3000g离心5分钟)以沉淀Trizol裂解过程中产生的细胞碎片。对于提取,使用真空系统遵循NucleoSpin 96 RNA组织试剂盒(Macherey-Nagel GmbH&Co.KG,Düren,德国)的修改方案。简而言之,将通过Trizol裂解获得的600 μ l澄清裂解物转移到预装有900 μ l 100%乙醇的试管中。

[0123] 将混合物转移到硅胶柱上,然后用缓冲液MW1和MW2洗涤,并使用30 μ L无RNase的水洗脱RNA。将Nanostring技术用于46种生物标志物的组的mRNA检测(表3)-这是一种基于杂交的多重检测,其特点是不存在扩增;使用热循环仪(Biometra,Tprofessional TRI0, Analytik Jena AG,Jena,德国)在67°C下将300ng RNA与探针杂交18小时

[0124] 去除多余的探针后,将样本装入nCounter Prep Station(NanoString Technologies,Seattle,WA,美国)进行纯化并固定在样本筒的内表面上2-3次。然后将样本筒转移并在nCounter数字分析仪(NanoString Technologies)上成像,其中对46种生物标志物的色标进行计数和制表。

[0125]

靶标志物	登录号或染色体定位
ADGRE3	NM_032571.2
ARL14EP	NM_152316.1
BST2	NM_004335.2
C3	NM_000064.2
CCL2	NM_002982.3
CCL20	NM_004591.1
CCL4	NM_002984.2
CCL8	NM_005623.2
CCNB1IP1	NM_182849.2
CCR1	NM_001295.2
CD209	NM_021155.2
CD3D	NM_000732.4
CD44	NM_001001392.1

[0126]

CD74	NM_001025159.1
CD83	NM_004233.3
CDKN1A	NM_000389.2
CLEC7A	NM_197954.2
CX3CR1	NM_001337.3
CXCL10	NM_001565.1
CXCL2	NM_002089.3
CXCL9	NM_002416.1
DDX58	NM_014314.3
DYRK2	NM_003583.3
EIF2AK4	NM_001013703.2
FAM89A	NM_198552.2
HLA-DMB	NM_002118.3
HLA-DPA1	NM_033554.2
HLA-DPB1	NM_002121.4
HLA-DRA	NM_019111.3
IFITM1	NM_003641.3
IFNG	NM_000619.2
IL1A	NM_000575.3
IL2	NM_000586.2
IL7R	NM_002185.2
IRAK2	NM_001570.3
PTGS2	NM_000963.1
RARRES3	NM_004585.3
SLAMF7	NM_021181.3
SRC	NM_005417.3
STAT2	NM_005419.2

[0127]	STING	NM_198282.1
	TGFB1	NM_000660.3
	TNFA	NM_000594.2
	TNFSF13B	NM_006573.4
	ZBP1	NM_001160419.2
	121601901-HERV0116	chr12:112972627-112975754

[0128] 表3. 用于 **Nanostring® nCounter®** 的目标生物标志物及其登录号 (或染色体定位)

[0129] 归一化数据的生成

[0130] 将每个样本在单独的多重反应中进行分析, 每个反应包含8个阴性探针和6个系列浓度的阳性对照探针。进行阴性对照分析以确定每个样本的背景。将数据导入nSolver分析软件(4.0版, NanoString Technologies)进行质量控制和数据归一化。

[0131] 使用内部阳性对照的第一个标准化步骤允许纠正与技术平台相关的潜在变异来源。为此, 我们对所有样本将平均背景噪声水平计算为所有六个阴性探针的中位数+3标准偏差。低于背景噪声水平的每个样本都设置为此值。

[0132] 然后, 计算每个样本的阳性探针的几何平均值。样本的比例因子是样本的几何平均值与所有几何平均值的比值。对于每个样本, 将所有基因值都除以对应的比例因子。

[0133] 最后, 为了将引入的RNA量的差异归一化, 使用与通过阳性对照进行归一化的相同的方法, 除了计算三个管家基因 (HPRT1 (NM_000194.1)、DEC1 (NM_001359.1) 和TBP (NM_001172085.1)) 的几何平均值。

[0134] 这些基因是使用NormFinder方法从定制基因群组中包含的6个候选基因中选择的, NormFinder方法是一种用于鉴定稳定的组内和组间管家基因的既定方法。结果以表达比 (或“倍数变化”) 表示。含有SEB的TruCulture试管未能通过质量控制, 因此未包含在分析中。

[0135] 通过流式细胞术测量mHLA-DR表达

[0136] 在脓毒性休克发作后第3-4天, 在EDTA试管中收集的外周全血中, 通过流式细胞术 (NAVIOS; Beckman-Coulter, Brea, CA, 美国) 评估HLA-DR在患者循环单核细胞 (mHLA-DR) 表面上的表达。结果表示为每个细胞结合的抗体数量 (Ab/C)。

[0137] 蛋白质检测

[0138] 对于脓毒性休克患者和健康个体, 根据制造商的说明, 使用ELLA纳米流体系统 (Biotechne, Minneapolis, MI, 美国) 对TruCulture试管上清液中的TNF α 蛋白进行定量。结果以pg/ml表示。

[0139] 统计分析

[0140] 结果表示为连续变量的中位数和四分位间距 [IQR]。参数数据通过ANOVA分析, 而非参数数据通过Kruskal-Wallis检验分析。使用GraphPad **Prism®** 软件 (第5版; GraphPad 软件, La Jolla, CA, 美国) 和R (第3.5.1版) 进行统计分析。调整后的p值<0.05被认为具有统

计学意义。使用Genomics Suite 7 (Partek, St. Louis, MO, 美国) 进行主成分分析 (PCA)。

[0141] 创建簇

[0142] 将数据通过基地对数变换为10进行变换, 居中并简化。在数据上建立了两个距离矩阵和一个相关矩阵, 并进行了10种聚类方法 (《hierarchical》、《kmeans》、《diana》、《fanny》、《som》、《model》、《sota》、《pam》、《clara》和《agnes》)。对于每种方法, 测试了k=3到k=18的簇。使用结合内部度量 (连接性、轮廓宽度和邓恩指数) 和稳定性 (非重叠的平均比例 (APN)、平均距离 (AD)、均值之间的平均距离 (ADM) 和品质因数 (FOM)) 的7个指标选择最佳聚类方法。选择了用于SEB的最稳定的方法: 它是使用相关矩阵的PAM方法 (评分指数=31)。

[0143] 结果

[0144] 对使用SEB进行刺激的反应的多样性

[0145] 为了确定主要有助于健康个体和脓毒性休克患者对由SEB进行刺激的反应的定量变化的生物标志物 (图1A), 这些生物标志物以图形方式表示, 并获得了解释差异的生物标志物的权重。在第一组件PC1 (39%) 的SEB反应差异 (图1B) 的最大贡献者中, 发现RARRES3和STAT2在组件右侧的个体中表达最为强烈, 而IL1A、CXCL2和IFNG在对侧个体中表达更强烈。关于第二成分PC2 (19%), 变异“主要”是由人类内源性逆转录病毒或HERV (121601901-HERV0116) 的一个元件引起的, 但也由SLAMF7、CCL4、C3和CXCL10引起。

[0146]

PC1	权重	PC2	权重
IL1A	-0.2167	121601901-HERV0116	0.2687
RARRES3	0.2137	SLAMF7	0.2608
IFNG	-0.2097	CCL4	0.2454
STAT2	0.2065	CXCL10	0.2445
CXCL2	-0.2039	C3	0.2345
CCL20	-0.2006	CD74	0.2344
CD209	-0.1965	HLA-DRA	0.2285
PTGS2	-0.1964	CXCL9	0.2239
ZBP1	0.1940	HLA-DPA1	0.2208
CD83	-0.1866	ADGRE3	-0.2049
CDKN1A	-0.1833	CD44	0.1968
DDX58	0.1811	HLA-DPB1	0.1942
HLA-DMB	0.1798	HLA-DMB	0.1858
CX3CR1	0.1782	TNFSF13B	0.1805
BST2	0.1774	IRAK2	0.1726
IL2	-0.1721	SRC	0.1637
TNFA	-0.1717	TNFA	0.1574
IRAK2	-0.1706	BST2	0.1489

[0147]

HLA-DPB1	0.1654	STING	0.1447
CCL2	-0.1623	FAM89A	0.1350
HLA-DRA	0.1513	RARRES3	0.1221
HLA-DPA1	0.1491	CD83	0.1181
CD74	0.1462	DDX58	0.1069
IFITM1	0.1449	CCL8	0.1066
DYRK2	0.1415	ZBP1	0.1058
TNFSF13B	0.1365	CCR1	0.1048
IL7R	0.1332	CDKN1A	0.0962
CCL8	-0.1327	DYRK2	-0.0959
SRC	-0.1300	IL2	0.0903
CD44	-0.1234	CLEC7A	-0.0890
ARL14EP	0.1176	CX3CR1	0.0823
STING	-0.1162	ARL14EP	0.0783
CCL4	-0.1116	IL7R	-0.0770
CCNB1IP1	0.1049	STAT2	0.0715
CLEC7A	0.1015	IL1A	0.0574
EIF2AK4	0.0968	IFITM1	0.0561
CXCL9	-0.0958	CCL2	0.0463
C3	-0.0589	CCL20	0.0461
CD3D	0.0583	CD3D	0.0453
SLAMF7	-0.0505	PTGS2	-0.0444
CCR1	-0.0371	EIF2AK4	0.0353
TGFB1	-0.0277	IFNG	0.0338
CXCL10	-0.0211	TGFB1	0.0228
121601901-HERV0116	-0.0125	CD209	0.0188
FAM89A	0.0090	CCNB1IP1	0.0119
ADGRE3	0.0008	CXCL2	-0.0084

[0148] 表4. 导致两个群体中由SEB进行的刺激的第一组分(PC1)和第二组分(PC2)的最大差异的生物标志物的权重。对于每个组分,将生物标志物从最高权重(绝对值)到最低权重

(绝对值)进行排序。

[0149] 免疫功能测试作为脓毒症患者的分层工具

[0150] 通过考虑这两个群体(健康个体和患者),我们对整个分子组进行了无监督分类(聚类),以识别基因基序。在SEB刺激后,将健康个体聚集在一起,显示出其免疫反应的高度同质性。在SEB刺激期间,将6名患者与健康个体分组($n=16$,簇S1),而其他患者被分成数量几乎相等的2组(对于簇S2为 $n=11$,簇S3为 $n=12$;图2)。每个簇的供体组成如表5所示。

	簇 S1	簇 S2	簇 S3
[0151]	D4; D5; D8; D9; D10; D13; <i>D15; D16; D17;</i> <i>D18; D19; D20; D21;</i> <i>D22; D23; D24</i>	D1; D11 ; D14; <u>D26</u> ; D29 ; D31; D32; D37; D38 ; D40 ; D41	D2; D3; D6 ; D12; D25; D27; D28; D30; D33; D34; D35; D39

[0152] 表5.用SEB进行刺激后获得的簇的个体组成(每个供体)。健康个体以斜体显示,非幸存者以粗体显示,而那些已经发生院内感染的人则以下划线显示。D:供体

[0153] 然后在簇和生物学或临床参数之间进行双变量分析。

[0154] 对于SEB刺激,发现mHLA-DR(调整后的 $p=0.0131$)以及LPS刺激后的TNF α 蛋白分泌(调整后的 $p\leq 0.0001$;表6)具有统计学意义。

[0155] 由于与健康个体的分类,正如预期的那样,簇S1中的6名患者在LPS刺激后表现出最高的mHLA-DR中位数(10938Ab/C, IQR: [9456-14642])和最高的TNF α 蛋白浓度(10938Ab/C, IQR: [9456-14642])。

[0156] 通过比较簇S1和S2的结果,唯一的显著差异是LPS刺激后TNF α 蛋白的中位数浓度($p<0.0001$)。簇S2在3个簇中呈现最低的中位数TNF α 蛋白水平。

[0157] 通过比较簇S1和S3,两个参数存在显著差异($p<0.001$),在LPS刺激后,簇S3在3个簇之间呈现出中等中位数水平的TNF α 蛋白浓度,而mHLA-DR的中位数水平最低(图3)。

[0158] 此外,我们可以观察到,在患有至少一种合并症的20名患者中(在30名患者中),10名(50%)属于S3,占簇的83.3%。

[0159] 同样,在5名未存活患者中,第28天前死亡的4人(80%)属于簇S2,占该簇的36%,而在医院晚期死亡的5人属于簇S3(表6)。应该注意的是,唯一发生院内感染的患者属于簇S2。

	簇 S1 (n=16)	簇 S2 (n=11)	簇 S3 (n=12)	调整后的 p 值
状态				0.0002
健康个体, n(%)	10(62.5)	0(0)	0(0)	
患者, n(%)	6(37.5)	11(100)	12(100)	
合并症*				0.2348
否, n(%)	1(16.7)	6(54.5)	2(16.7)	
是, n(%)	5(83.3)	5(45.5)	10(83.3)	
CCI* 中位数, [IQR]	2 [1.2-4.2]	1 [0-1.5]	2 [1-5]	0.1593
SOFA* 中位数 (第 1 天), [IQR]	7.5 [6.2-8]	8 [6.5-10.5]	8.5 [8-10]	0.6383
死亡率				0.2416
否, n(%)	6(100)	7(63.6)	11(91.7)	
是, n(%)	0(0)	4(36.4)	1(8.3)	
mHLA-DR* 中位数 (第 3-4 天) (Ab/C), [IQR]	10938 [9456-14642]	7301 [4653-11673]	3839.5 [3444-6250]	0.0131
中位数 TNF α 分 泌, LPS 刺激后 (pg/mL), [IQR]	3799 [2067.2-5401.2]	282.7 [122.2-861.8]	700.8 [457.8-913.3]	0.0001

[0161] SOFA:序贯器官衰竭评估

[0162] CCI:查尔森合并症指数

[0163] HLA-DR:人类白细胞抗原DR

[0164] Ab/C:每个细胞结合的抗体

[0165] TNF α :肿瘤坏死因子 α

[0166] LPS:脂多糖

[0167] IQR:四分位距

[0168] *:专为脓毒性休克患者测量的参数

[0169] 表6. 在SEB刺激期间簇S1、S2和S3之间的双变量分析,用于临床和生物学参数。当在使用具有相关距离的PAM方法定义的簇S1(当没有可用于健康个体的信息时, n=16或n=

6)、S2 (n=11) 和S3 (n=12) 之间进行统计分析时,表示了6个参数。针对多个测试输出调整的p值。合并症的存在是肯定的,当在患者中存在以下至少一种合并症时:慢性肺病、心力衰竭、心肌梗塞、溃疡、糖尿病、肾衰竭或恶性实体瘤。

[0170] 因此,开发的免疫功能测试可以证明,如果健康个体的免疫反应是同质的,那么脓毒性休克患者的免疫反应是异质的,而反应的异质性在于免疫的适应性臂。与其他患者不同,与健康个体分组在簇S1中的患者具有更“正常”/“健康”的免疫特征。先验地,这些患者不需要任何特别的警惕,标准护理就足够了。簇S2中的患者对应于以高死亡率为特征的“严重”患者。这些患者的免疫力似乎受到严重损害并且呈现更大的死亡概率,所述患者可以从更“积极”和/或更早的治疗干预中受益。最后,第三组(簇S3的患者)对应于具有中度至重度表型的患者,他们可能表现出一定程度的免疫恢复。因此,这些免疫力似乎可以恢复的患者可能成为个性化治疗(例如IL-7、干扰素 γ)的对象。因此,这些结果表明,在本发明的背景中开发的免疫功能测试使得获得患者分层成为可能,其参考标志物(或金标准)是科学界普遍接受的,例如mHLA-DR或甚至TNF- α 。

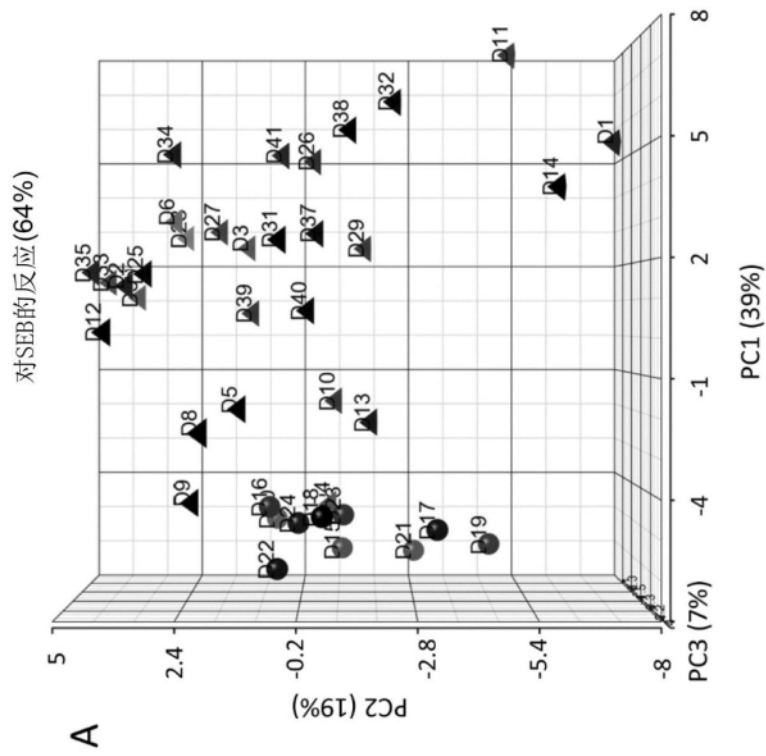
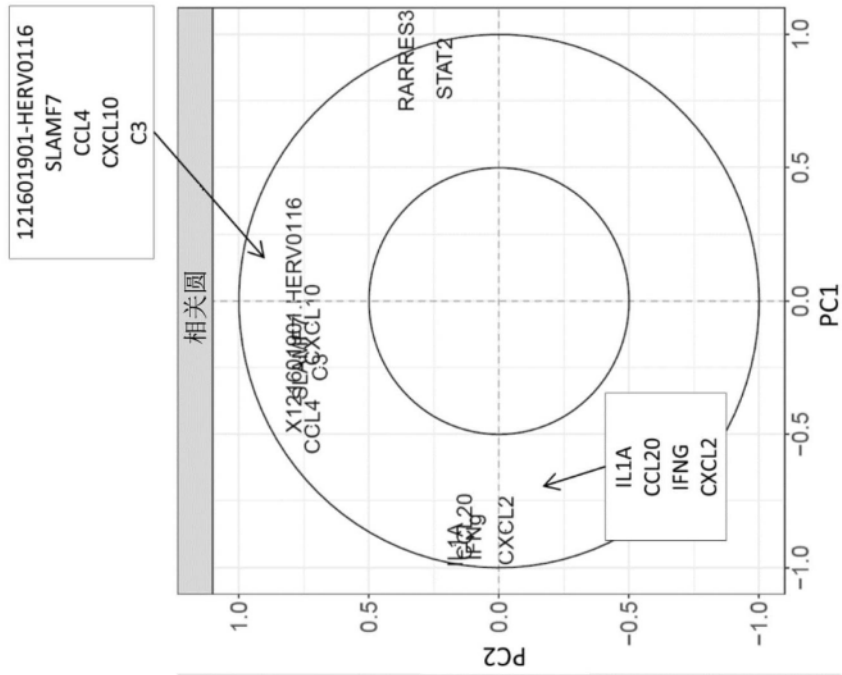


图1

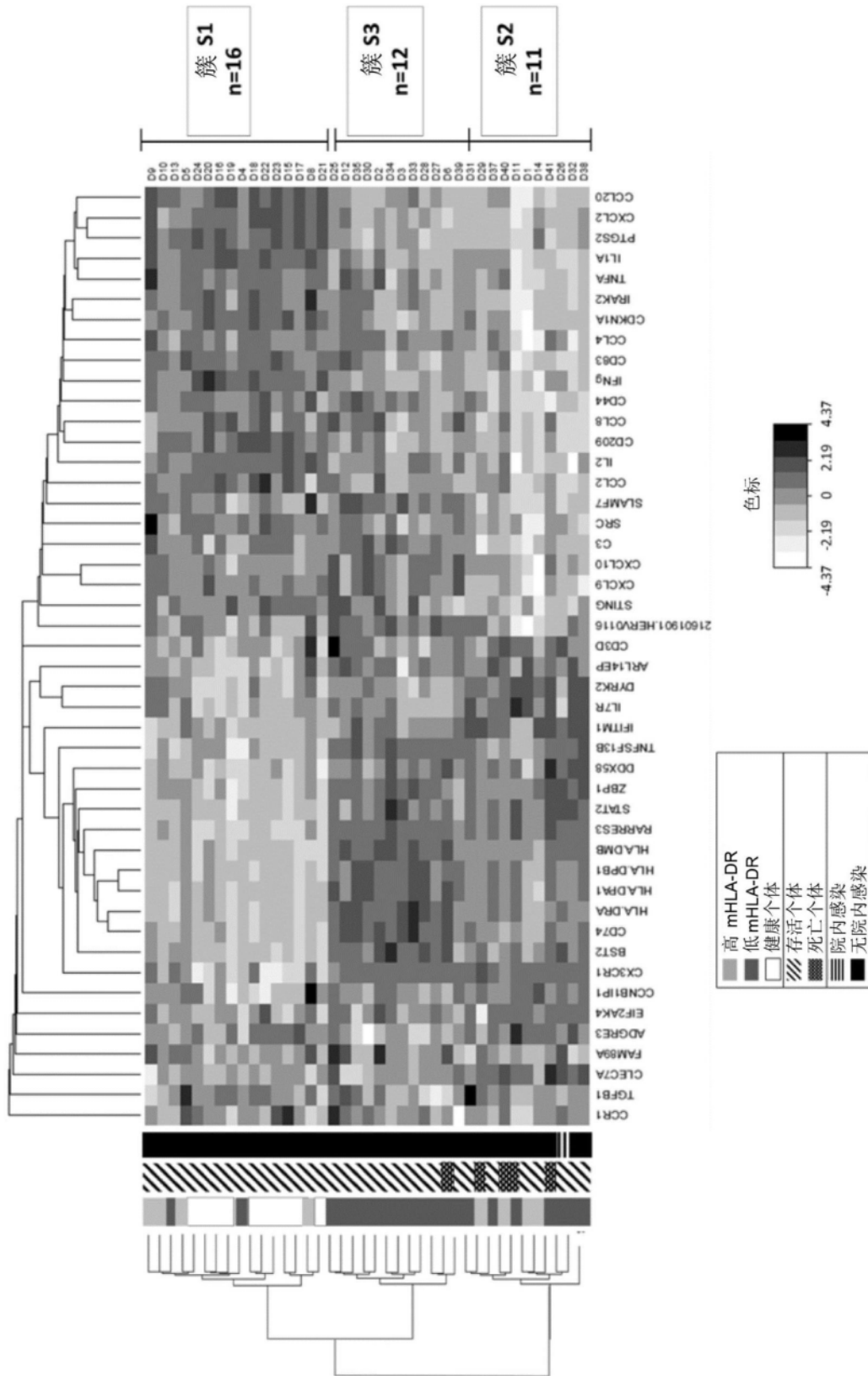


图2

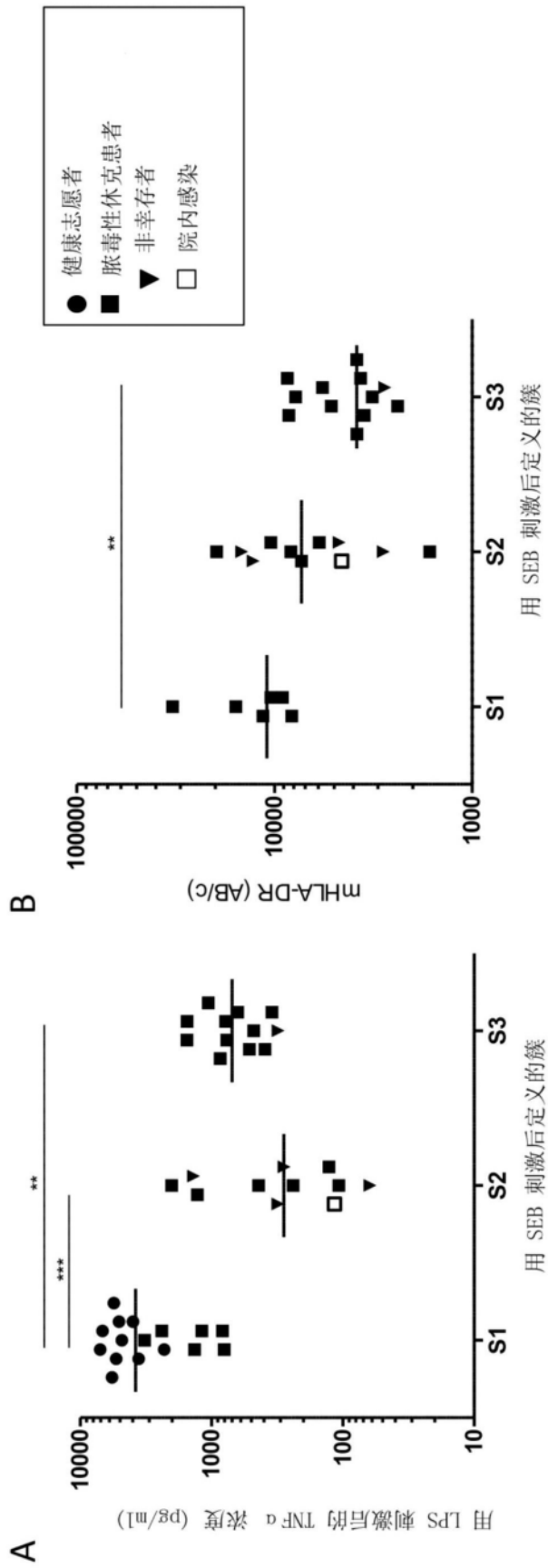


图3