



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114778417 B

(45) 授权公告日 2024.02.13

(21) 申请号 202210468093.5

WO 0074718 A1,2000.12.14

(22) 申请日 2022.04.29

WO 02083934 A1,2002.10.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 108982871 A,2018.12.11

申请公布号 CN 114778417 A

CN 102355902 A,2012.02.15

(43) 申请公布日 2022.07.22

CN 111863259 A,2020.10.30

CN 111948393 A,2020.11.17

(73) 专利权人 上海顿慧医疗科技发展有限公司

李政等.可溶性生长刺激表达基因2蛋白对免疫检查点抑制剂相关心肌炎预后的预测价值.《中国临床医学》.2021,第28卷(第2期),第159-163页.

地址 201614 上海市松江区九亭镇中心路

1158号7幢601室-1

(72) 发明人 葛均波 程蕾蕾 王妍 许宇辰

林瑾仪 陈佳慧 沈毅辉 张卉

陈怡帆 汪雪君

Xinqing Lin等.Peripheral Blood Biomarkers for Early Diagnosis, Severity, and Prognosis of Checkpoint Inhibitor-Related Pneumonitis in Patients With Lung Cancer.《Frontiers in Oncology,》.2021,第1-12页.

(74) 专利代理机构 上海点威知识产权代理有限公司

31326

专利代理师 杜焱

(51) Int.Cl.

G01N 15/10 (2024.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G16H 50/50 (2018.01)

李政等.可溶性生长刺激表达基因2蛋白对免疫检查点抑制剂相关心肌炎预后的预测价值.《中国临床医学》.2021,第28卷(第2期),第159-163页.

审查员 殷逸虹

(56) 对比文件

CN 113470814 A,2021.10.01

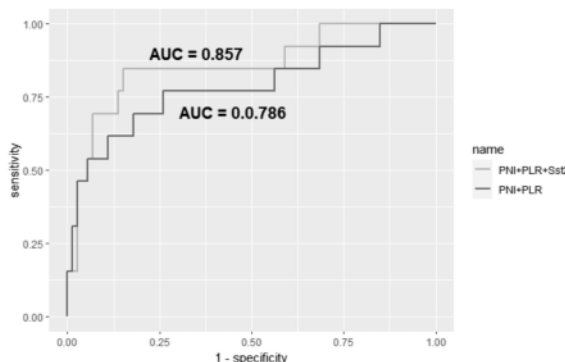
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的模型建立方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫检查点抑制剂相关不良反应的风险预测的生物标记物、试剂盒、模型建立方法及应用,属于肿瘤技术领域。该生物标记物包括外周血血小板、淋巴细胞、血清白蛋白和血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)。该生物标记物能够很好的预测免疫检查点抑制剂相关不良反应的风险。



1. 一种生物标记物的免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

S01, 确定所述免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的参数;

S02, 建立参数与免疫检查点抑制剂相关不良反应风险之间的回归方程;

S03, 利用所述回归方程计算免疫检查点抑制剂相关不良反应风险的概率;

S04, 评价所述免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型;

其中, S01中, 所述参数包括预后营养指数、外周血血小板与淋巴细胞比率和治疗后sST2水平;

S02中, 所述回归方程为:

危险得分 $\text{logit}(P) = a + b \times \text{预后营养指数} + c \times \text{外周血血小板与淋巴细胞比率} + d \times \text{治疗后sST2峰值水平}$ ;

其中, 所述a为9.041, 所述b为-0.224, 所述c为-0.003, 所述d为0.013;

所述预后营养指数 = 血清白蛋白水平 + 5 × 总淋巴细胞计数, 其中血清白蛋白水平以g/L计, 总淋巴细胞计数以 $10^9$ 个计;

所述生物标记物包括血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2);

还包括外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白;

所述外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白为患者接受ICIs治疗前的基线外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)为患者接受ICIs治疗后的sST2。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)为患者接受ICIs治疗后的处于峰值的sST2。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)为患者接受ICIs治疗后21天的sST2。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, S01中, 所述外周血血小板与淋巴细胞比率的计算方法为:

外周血血小板与淋巴细胞比率 = 外周血血小板数量 / 外周血淋巴细胞数量, 其中外周血血小板数量和外周血淋巴细胞数量均以 $10^9$ 个计。

6. 根据权利要求4或5所述的方法, 其特征在于, S04中, 根据所述患者的工作特征曲线下面积来评估免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的预测能力。

## 免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的模型建立方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤诊断技术领域,具体涉及一种免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的生物标记物、试剂盒、模型建立方法及应用。

### 背景技术

[0002] 免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors,ICIs)近十年来被广泛应用于一线治疗方案失败的肿瘤患者,其通过特异性结合细胞表面的免疫检查点,解除其抑制作用,使机体的免疫细胞得到激活从而发挥抗肿瘤的作用,但与之相对,ICIs的使用会破坏免疫系统的稳态,引发免疫相关不良反应(Immune-related adverse events,irAEs),可累及各个系统脏器。既往研究表明,ICIs治疗的常见毒性表现为肺毒性、肝脏毒性、内分泌毒性及胃肠道毒性,其总体发生率在66%左右,随着多款ICIs被纳入我国的医保目录,可以预见发生ICIs相关不良反应的患者数量将显著上升。但目前尚缺乏简可靠的风险预测模型以预测肿瘤患者接受ICIs治疗后发生irAEs风险的预测模型。

### 发明内容

[0003] 我们试图探索与肿瘤患者接受ICIs发生irAEs密切相关的指标,构建一种有效评估irAEs发生风险的方法,从而指导临床更好地对患者进行诊治。

[0004] 发明人通过分析发生irAEs患者接受ICIs治疗前后血液学检查结果发现,发生irAEs的肿瘤患者治疗前预后营养指数(prognostic nutritional index,PNI),血小板与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,PLR)均高于未发生irAEs的患者,并通过统计学分析证实治疗前预后营养指数(PNI)、血小板与淋巴细胞比率(PLR)和治疗后sST2水平是患者接受ICIs治疗后发生irAEs的独立危险因素。通过进一步研究,发明人基于新型指标sST2水平,联合预后营养指数(PNI)、血小板与淋巴细胞比率(PLR)两个指标,构建了免疫检查点抑制剂相关不良反应的风险预测模型。

[0005] 本发明的第一方面在于公开一种免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的生物标记物,包括血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)。

[0006] 在本发明的一些优选的实施方式中,还包括外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白。

[0007] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白为患者接受ICIs治疗前的基线外周血血小板、淋巴细胞和血清白蛋白。

[0008] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述血清可溶型肿瘤抑制因子(sST2)为患者接受ICIs治疗后的sST2,优选为患者接受ICIs治疗后的处于峰值的sST2,进一步优选为接受ICIs治疗后21天的sST2。

[0009] 本发明的第二方面在于公开一种免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的试剂盒,其特征在于,包括用于获取患者的根据第一方面所述的生物标记物的数量和/或水平的试剂。

[0010] 本发明的第三方面在于公开一种根据第一方面所述的生物标记物的免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的建立方法,包括以下步骤:

[0011] S01,确定所述免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的参数;

[0012] S02,建立参数与免疫检查点抑制剂相关不良反应风险之间的回归方程;

[0013] S03,利用所述回归方程计算免疫检查点抑制剂相关不良反应风险的概率;

[0014] S04,评价所述免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型;

[0015] 其中,S01中,所述参数包括预后营养指数、外周血血小板与淋巴细胞比率和治疗后sST2水平。

[0016] 在本发明的一些优选的实施方式中,S01中,所述预后营养指数的计算方法为:

[0017] 预后营养指数=血清白蛋白水平+5×总淋巴细胞计数,其中血清白蛋白水平以g/L计,总淋巴细胞计数以 $10^9$ 个计。

[0018] 在本发明的一些优选的实施方式中,S01中,所述外周血血小板与淋巴细胞比率的计算方法为:

[0019] 外周血血小板与淋巴细胞比率=外周血血小板数量/外周血淋巴细胞数量,其中外周血血小板数量和外周血淋巴细胞数量均以 $10^9$ 个计。

[0020] 在本发明的一些优选的实施方式中,S02中,所述回归方程为:

[0021] 危险得分 $\text{logit}(P) = a + b \times \text{预后营养指数} + c \times \text{外周血血小板与淋巴细胞比率} + d \times \text{治疗后sST2峰值水平}$ ;

[0022] 优选地,a为9.041,b为-0.224,c为-0.003,d为0.013。

[0023] 在本发明的一些优选的实施方式中,S04中,根据所述患者的工作特征曲线下面积来评估免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测模型的预测能力。

[0024] 本发明的第四方面在于公开一种根据第一方面所述的免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的生物标记物在制备免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测试剂、装置中的应用。

[0025] 本发明的第五方面在于公开一种根据第二方面所述的免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测的试剂盒在制备免疫检查点抑制剂相关不良反应风险预测试剂、装置中的应用。

[0026] 本发明的有益技术效果是:

[0027] 本发明提供一种免疫检查点抑制剂相关不良反应(Immune-related adverse events,irAEs)的风险预测模型。免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors,ICIs)在过去10年来深刻变革了抗肿瘤治疗的格局,被越来越多的应用于多种恶性肿瘤的一线治疗方案中,但随着其在临床的广泛使用,有关与治疗导致的免疫相关不良反应的报道越来越多,irAEs的发生将会影响后续抗肿瘤治疗的进程,部分严重的irAEs会直接导致患者的死亡,且治疗费用高昂。因而如何早期预测irAEs的发生风险,对于挽救肿瘤患者的生命就显得格外重要。本发明基于血清可溶性肿瘤抑制因子2(soluble suppression of tumorigenicity2,sST2)水平、预后营养指数(prognostic nutritional index,PNI)与血小板与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,PLR)三种指标,构筑了一种新型的irAEs的风险预测模型,旨在早期预测肿瘤患者在接受ICIs治疗后发生irAEs的风险,从而帮助临床医生为肿瘤患者制定最合理的诊疗计划,进行及时有效的医患沟通。

## 附图说明

[0028] 图1为实施例1中联合PNI、PLR及sST2的Logistic回归模型的ROC曲线与仅使用PNI、PLR的回归模型的ROC曲线比较

## 具体实施方式

[0029] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0030] 实施例1:差异性生物学标志物的筛选:

[0031] 1.研究对象及样本采集:

[0032] 2018年10月至2020年12月间于复旦大学附属中山医院住院治疗的恶性肿瘤患者

[0033] 1.1纳入及排除标准:

[0034] 纳入标准:

[0035] (1)年龄大于等于18岁(2)在本研究中心接受PD-1/PD-L1/CTLA-4免疫检查点抑制剂治疗的恶性肿瘤患者(3)预期生存周期大于1年(4)KPS评分大于60;

[0036] 排除标准:

[0037] (1)年龄小于18岁(2)既往接受过免疫检查点抑制剂治疗的患者(3)治疗前血清sST2水平高于正常水平(35ng/mL)的患者(4)既往有自身免疫性疾病病史的患者(5)合并明确心功能不全的患者(左室射血分数小于40%)(6)预期生存周期小于1年(7)KPS评分小于60。所有入选患者均签署了知情同意书。

[0038] 1.2入组患者检测指标

[0039] 收集患者在接受ICI治疗前基线的血清sST2水平、外周血淋巴细胞计数、外周血中性粒细胞计数、外周血血小板计数、外周血CD4+/CD8+T细胞比例、B细胞计数、白蛋白水平、D-二聚体水平以及治疗后血清sST2水平、心肌肌钙蛋白T水平、B型利钠肽水平,并计算中性粒细胞与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,NLR)、预后营养指数(prognostic nutritional index,PNI),血小板与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,PLR),其中PNI=血清白蛋白水平(g/L)+5×总淋巴细胞计数( $\times 10^9$ 个)。

[0040] 将患者按照是否出现免疫相关不良反应分为有irAEs组和无irAEs组,对于免疫相关不良事件的界定由2位具有丰富临床经验的肿瘤科医生进行,诊断标准依据中国临床肿瘤协会发布的免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南2019版。

[0041] 2筛选预测irAEs发生的生物学标记物

[0042] 2.1确定irAEs组患者显著差异的生物学标记物

[0043] 研究共入选91例恶性肿瘤患者,其中男性53例(58.2%),女性38例(41.8%),平均年龄( $57.5 \pm 12.4$ )岁,将患者按照是否出现免疫相关不良反应分为有irAEs组和无irAEs组,对于免疫相关不良事件的界定由2位具有丰富临床经验的肿瘤科医生进行,诊断标准依据中国临床肿瘤协会发布的免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南2019版。肝脏毒性事件定义为:1.治疗后患者谷草转氨酶或谷丙转氨酶水平升至3倍正常值上限以上;2.治疗后胆红素水平升至3倍正常值上限以上(两者满足一点即可)。内分泌毒性定义为:治疗后新发的

甲状腺功能减退、甲状腺功能亢进、垂体炎、原发性肾上腺功能减退及糖尿病。肺毒性事件定义为：治疗后新发的呼吸短促、咳嗽、胸痛、发热及其他呼吸系统症状，行胸部CT后经肿瘤内科及影像科医生共同确定肺部炎症由ICIs治疗导致的。骨骼肌系统毒性事件定义为：治疗后新发的肌肉疼痛或肌力下降伴有肌酸激酶升高。免疫性心肌炎定义为：1. 伴或不伴有胸痛、心悸、心功能不全等症状 2. 治疗后新发的心肌损伤标志物持续升高 3. 经心脏核磁共振明确符合心肌炎影像学表现的(需三者同时满足)。

[0044] 91例患者中共有13例患者确诊为irAEs, irAEs发生率为14.3%, 共记录免疫相关不良事件21次, 其中免疫性心肌炎7次, 内分泌毒性事件6次, 肝脏毒性事件5次, 骨骼肌系统毒性事件3次。

[0045] irAEs组患者基线血小板计数、B细胞计数、外周血CD4+/CD8+T细胞比例、D-二聚体、NLR及水平以及治疗后心肌肌钙蛋白T及B型利钠肽与无irAEs组无显著差异( $P>0.05$ ), 而两组患者基线PNI及PLR水平及治疗后sST2水平存在显著差异( $P<0.05$ ), 见表1。

[0046] 表1. irAEs组与无irAEs组患者生物学标记物水平的比较 (Mean  $\pm$  SD)

| 指标                | 有irAEs组            | 无irAEs组           | t值     | P值      |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------|---------|
| 血小板计数 ( $10^9$ 个) | 202.7 $\pm$ 131.7  | 252.3 $\pm$ 110.3 | 1.455  | 0.1492  |
| B细胞计数 ( $10^9$ 个) | 165.1 $\pm$ 138.6  | 123.0 $\pm$ 89.8  | -1.370 | 0.175   |
| CD4+/CD8+ T细胞比例   | 1.8 $\pm$ 1.1      | 2.0 $\pm$ 2.9     | 0.174  | 0.862   |
| D二聚体 (mg/L)       | 1.3 $\pm$ 1.35     | 1.8 $\pm$ 2.4     | 0.611  | 0.543   |
| [0047] NLR        | 9.1 $\pm$ 4.6      | 11.3 $\pm$ 7.0    | 1.093  | 0.277   |
| PNI               | 41.6 $\pm$ 3.3     | 45.8 $\pm$ 6.4    | 2.310  | 0.023*  |
| PLR               | 422.2 $\pm$ 339.8  | 614.3 $\pm$ 289.0 | 0.034  | 0.034*  |
| sST2 (ng/ml)      | 94.69 $\pm$ 102.72 | 38.41 $\pm$ 22.58 | -3.927 | 0.0003* |
| 心肌肌钙蛋白T           | 0.13 $\pm$ 0.27    | 0.01 $\pm$ 0.01   | -1.573 | 0.142   |
| B型利钠肽             | 899.4 $\pm$ 1382.5 | 188.5 $\pm$ 282.5 | -1.847 | 0.089   |

[0048] NLR: 中性粒细胞与淋巴细胞比率; PNI: 预后营养指数; PLR: 血小板与淋巴细胞比率;

[0049] \*:  $P<0.05$ ;

[0050] 统计分析方法: 本研究采用太美EDC系统进行临床数据的采集及管理, SPSS 23.0及GraphPad Prism8统计软件进行统计学分析及绘图。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 (Mean  $\pm$  SD) 或百分比 (%) 表示。采用ROC曲线对相关指标的预测价值进行分析并寻找最佳截断值; 对于符合正态分布及方差齐性的组间数据比较采用Student's t-test检验, 对于符合正态分布但方差不等的组间数据比较采用separate variance estimation t-test检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

[0051] 其中, 血清sST2水平检测方法如下:

[0052] 样本采集: 采集患者空腹状态下静脉血5ml, 置于含抗凝剂的真空采血管中, 3000rpm 10min离心后取上清。

[0053] 检测方法: 采用双抗体夹心ELISA方法测定血浆可溶性ST2水平, 试剂盒为persage ST2试剂盒(美国Critical Diagnostics 公司)。

[0054] 检测步骤:

[0055] 1. 将标准品1000 $\times$ g离心1分钟, 加入标准品稀释液1ml至冻干标准品中, 旋紧管



盖,静置约10分钟后,颠倒混匀,待充分溶解后进行倍比稀释。

[0056] 2.从50倍稀释的96孔板中取100u1血液上清、质控品、标准品加到相应的标记区域。加样完成后使用封板膜封住反应孔,然后将反应板置于振荡器上20℃孵育60min。

[0057] 3.弃去反应孔内温育液体,并使用洗涤缓冲液冲洗晾干。每个反应孔加入抗ST2抗体100u1后封闭反应孔,于20℃下恒温孵育60分钟。

[0058] 4.弃去孔内液体后再次清洗晾干。每孔加入Streptavidin-HRP 工作液100u1,20℃孵育30分钟,置于振荡器上。

[0059] 5.弃去孔内液体后再次清洗晾干。每孔加入100u1的TMB 试剂,置于振荡器上,避光20℃孵育。每孔加入100u1终止液,混匀30秒,于Modular D全自动酶标仪(美国罗氏公司)450nm波长比色,测量各孔的光密度(OD)值。以标准品的浓度为纵坐标,以对应的OD值为横坐标,根据曲线方程及测量 OD 值计算待测样本的血浆ST2浓度。其余指标均采用常见的检测方法。

[0060] 3.基于有差异的生物学指标建立预测irAEs发生的风险预测模型

[0061] 我们选择了表1中在irAES与无irAES组患者表达显著差异的3项生物学标记物(预后营养指数(prognostic nutritional index,PNI),血小板与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,PLR)以及治疗后血清sST2水平),纳入Logist回归分析,得到Logist回归模型,分析结果显示,该模型的综合检验P小于0.000,表明该模型总体具有意义,Hosmer and lemeshow Test(模型拟合优度)P=0.754大于0.05,显示该模型重复提取了数据中的信息,拟合程度优秀。表2显示了纳入模型的生物学标记物及其参数。

[0062] 表2 患者接受ICIs治疗后发生irAEs风险的多因素Logistic回归模型

| 指标   | $\beta$ | 标准误   | Wald $\chi^2$ | P值    | OR (95%CI)           |
|------|---------|-------|---------------|-------|----------------------|
| sST2 | 0.013   | 0.006 | 4.884         | 0.027 | 1.013 (1.001, 1.025) |
| PNI  | -0.224  | 0.097 | 5.309         | 0.021 | 0.790 (0.660, 0.967) |
| PLR  | -0.003  | 0.002 | 5.195         | 0.023 | 0.997 (0.994, 1.000) |

[0064] 根据上述回归结果可以写出每个受试者根据三项生物学标记物预测irAEs是否发生的危险得分Logit(P):

[0065]  $\text{logit}(P) = 9.041 - 0.224 \times \text{基线PNI水平} - 0.003 \times \text{基线PLR水平} + 0.013 \times \text{治疗后sST2峰值}$ ;

[0066] 并可以按照以下计算公式得到每一个受试者发生irAEs的预测概率:

[0067] 
$$P = \frac{e^{\text{Logit}(P)}}{1 + e^{\text{Logit}(P)}} ;$$

[0068] 进一步利用受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)来判断这三个生物学标记物对irAEs发生的预测能力,分析表明,该联合预后营养指数(prognostic nutritional index,PNI),血小板与淋巴细胞比率(neutrophil to lymphocyte ratio,PLR)以及治疗后血清sST2水平三项指标建立的模型其ROC曲线下面积0.857,

[0069] 该模型的其敏感度和特异度分别为84.6%和84.9%，相较于联合PNI和PLR的预测模型，其AUC曲线下更高(0.857>0.786)，表明sST2指标的加入，进一步提升了模型的预测能力，见图1。

[0070] 实施例2

[0071] 如患者2020-2-16就诊，年龄78岁，男性。2020-2-14胃镜确诊食管鳞癌，病理提示：肿瘤侵犯固有肌层。于2020-2-27接受ICIs治疗，治疗前基线外周血血小板数量： $352 \times 10^9$ 个，淋巴细胞数量 $5.6 \times 10^9$ 个，血清白蛋白水平：33g/L，接受ICIs治疗后21天时，其sST2水平为10ng/mL，其PNI水平为61，PLR水平为63。

[0072] 按照此Logistic回归模型，其 $\text{logit}(P) = 9.041 - 0.224 \times \text{基线PNI水平} - 0.003 \times \text{基线PLR水平} + 0.013 \times \text{治疗后sST2峰值}$

[0073]  $\text{logit}(P) = 9.041 - 13.664 - 0.189 + 0.013 = -4.799$

[0074]  $P = 0.008238 / (1 + 0.008238) = 0.008$ 即该患者接受ICIs治疗后发生irAEs的概率为0.8%，该患者后续接受了8个周期的ICIs治疗，肿瘤控制情况为完全缓解，且治疗过程中未出现ICIs治疗相关的不良反应。

[0075] 以上对本发明优选的具体实施方式和实施例作了详细说明，但是本发明并不限于上述实施方式和实施例，在本领域技术人员所具备的知识范围内，还可以在不脱离本发明构思的前提下作出各种变化。



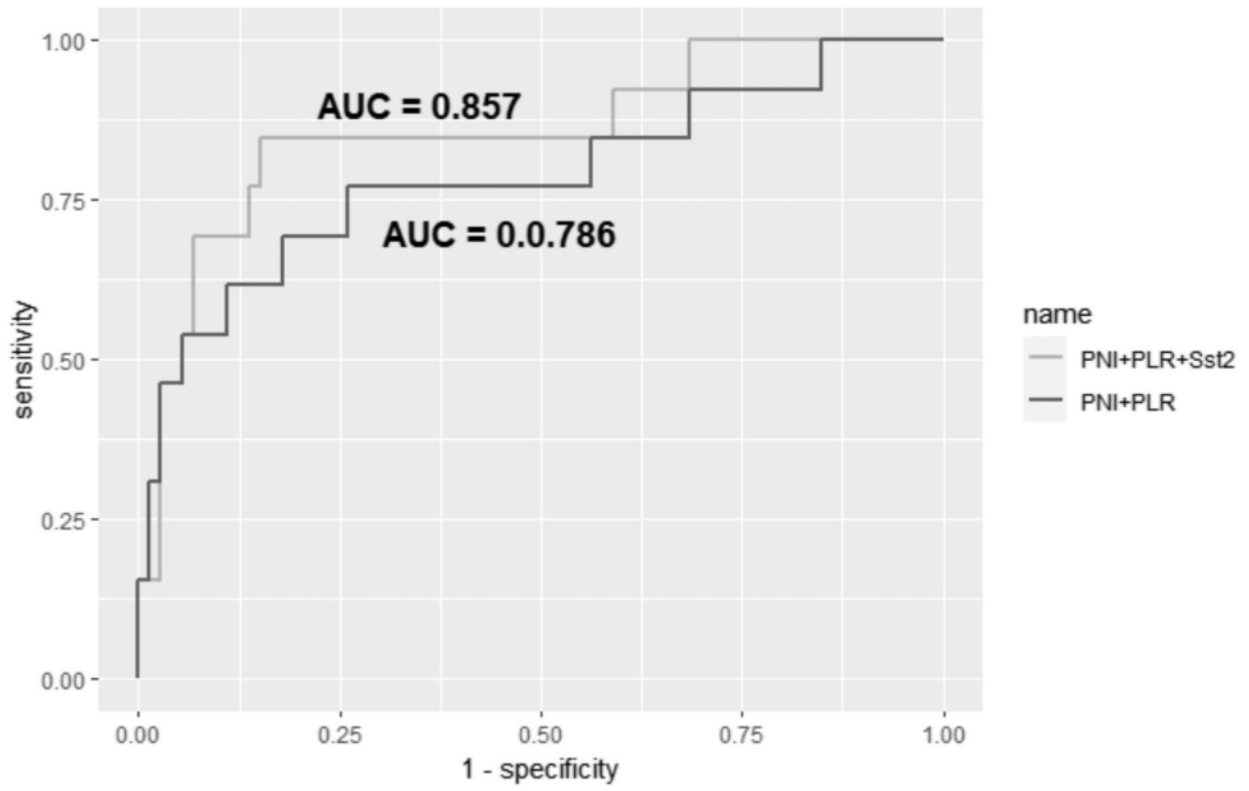


图1