



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115372625 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 22

(21) 申请号 202210798739.6

(22) 申请日 2022.07.06

(71) 申请人 上海顿慧医疗科技发展有限公司
地址 201615 上海市松江区九亭镇中心路
1158号7幢601室-1

(72) 发明人 程蕾蕾 沈毅辉 汪雪君 陈怡帆
张卉 许宇辰

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225
专利代理师 蒋亮珠 褚明伟

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

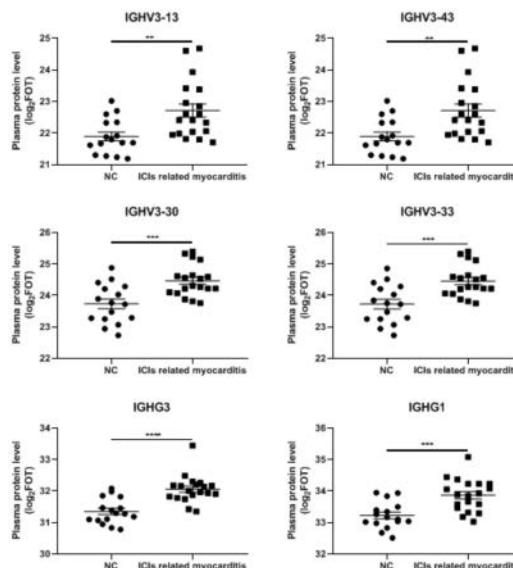
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

补体通路相关血浆蛋白标记物及诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明属于生物医学技术领域,尤其是涉及补体通路相关血浆蛋白标记物及诊断试剂盒。本发明提供了检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂在制备检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒中的应用,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。与现有技术相比,本发明通过对有统计学意义的血浆蛋白,进行下一步GO聚类分析,富集到具有变化最显著的通路,进一步对富集通路,即经典补体通路的激活中的相关靶点,进行logistic回归分析得到6个生物标记物。本发明有助于解决免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断和预后检测的难点问题,对免疫检查抑制剂诱发心肌炎的诊断和预后评估具有重要的临床意义。



CN 115372625 A

1. 补体通路相关血浆蛋白作为非疾病诊断方法的检测样本中免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的生物标记物的应用,其特征在于,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

2. 补体通路相关血浆蛋白作为预测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎预后的生物标记物的应用,其特征在于,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

3. 补体通路相关血浆蛋白在制备检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒中的应用,其特征在于,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

4. 检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂在制备检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒中的应用,其特征在于,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

5. 检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂在制备监测或评估免疫检查点抑制剂诱发心肌炎急性期和/或恢复期的试剂盒中的应用,其特征在于,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

6. 根据权利要求4或5所述的应用,其特征在于,所述检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂的检测方法为酶联免疫检测方法、免疫层析技术、免疫组化法、蛋白质印迹法或蛋白芯片法。

7. 一种检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括检测样本中补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

8. 一种监测或评估免疫检查点抑制剂诱发心肌炎急性期和/或恢复期的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括检测样本中补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

9. 一种非疾病诊断目的的检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的方法,其特征在于,对待检测样本中的补体通路相关血浆蛋白含量或表达量进行检测,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,以 Log_2FOT 计算,设定外周血浆中IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白表达量的标准值分别为23.0、22.8、24.5、24.5、32.0、34.0,当IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白中至少有一个的检测值高于标准值时,提示患有ICIs相关心肌炎。

补体通路相关血浆蛋白标记物及诊断试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,尤其是涉及补体通路相关血浆蛋白标记物及诊断试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫疗法的兴起和发展为很多晚期肿瘤患者带来了新的治疗选择。免疫检查点抑制剂(Immune Checkpoint Inhibitors,ICIs)通过激活免疫系统、阻止肿瘤细胞的免疫逃逸从而达到抗肿瘤的目的。随着ICIs在临床中广泛运用,其免疫相关不良反应(immune-related Adverse Effects,irAEs)逐渐引起人们重视。ICIs导致的心脏毒性主要表现为使用ICIs后出现的心肌炎,其病死率位居irAEs榜首。在多中心临床研究结果显示ICIs相关心肌炎的发生率为1.14%。并且,ICIs相关心肌炎发病后病程进展迅速,预后极为凶险,患者从症状发生到死亡的中位时间仅为32天,最终致死率甚至高达46%。

[0003] 目前,国内外专家共识仍然按照常规心肌炎的治疗方式摸索ICIs相关心肌炎的诊断治疗方法,主要通过肌钙蛋白,监测可能发生的ICIs相关心肌炎,但是在诊断层面来说,心肌肌钙蛋白I(cTnI)作为一种肌肉组织收缩的调节蛋白,在血清中升高能够反映心肌损伤,但是其出现往往提示心肌已经出现了损伤,提示其具有一定的滞后性,并且其特异性和敏感性主要用于急性心肌梗死,无法完全契合评估心肌炎严重程度的需求。所以找到ICIs相关心肌炎高特异性的生物标记物是临床急需解决的问题。

[0004] 补体系统是先天免疫的重要组成部分,也是先天性免疫和获得性免疫之间的重要纽带,已经被发现在炎症性肌病、SARS-CoV-2相关性心肌炎、高炎性多系统炎症综合征等这些自身免疫性炎症疾病中起着关键作用。

[0005] 自身免疫相关免疫球蛋白重链可变区基因(autoimmunity-associated immunoglobulin heavy chain variable region genes,IGHV genes)家族常在一些B细胞恶性肿瘤和自身免疫性疾病中高度表达,常常表现出高度的多态性,对感染和保护性抗体反应中也会体现出偏向性。但是目前现有技术中并没有发现IGHV基因与免疫检查点抑制剂诱发心肌炎之间是否有相关性。

发明内容

[0006] 为解决现有技术中缺少免疫检查点抑制剂诱发心肌炎高特异性的生物标记物的现状,本发明提供补体通路相关血浆蛋白标记物及诊断试剂盒。

[0007] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0008] 本发明首先提供补体通路相关血浆蛋白作为非疾病诊断方法的检测样本中免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的生物标记物的应用,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0009] 在本发明的一个实施方式中,所述样本为受试者的血浆。

[0010] 本发明还提供补体通路相关血浆蛋白作为预测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎预

后的生物标记物的应用。

[0011] 本发明还进一步提供补体通路相关血浆蛋白在制备检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒中的应用,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0012] 本发明进一步提供检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂在制备检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒中的应用,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0013] 在本发明的一个实施方式中,所述检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂的检测方法为酶联免疫检测方法、免疫层析技术、免疫组化法、蛋白质印迹法或蛋白芯片法。

[0014] 本发明还进一步提供检测补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂在制备监测或评估免疫检查点抑制剂诱发心肌炎急性期和/或恢复期的试剂盒中的应用,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0015] 本发明还进一步提供一种检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的试剂盒,所述试剂盒包括检测样本中补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0016] 在本发明的一个实施方式中,检测样本中补体通路相关血浆蛋白含量或表达量,可以通过常规的免疫学检测或者基因检测方法实现,免疫学检测方法的原理基于抗原抗体结合反应,例如免疫检测方法中的酶联免疫检测方法或免疫层析技术,免疫组化法,或蛋白质印迹法(western blot)、免疫渗滤法、蛋白芯片法等等。

[0017] 本发明还进一步提供一种监测或评估免疫检查点抑制剂诱发心肌炎急性期和/或恢复期的试剂盒,所述试剂盒包括检测样本中补体通路相关血浆蛋白含量或表达量的试剂,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合。

[0018] 本发明还进一步提供一种非疾病诊断目的的检测免疫检查点抑制剂诱发心肌炎的方法,对待检测样本中的补体通路相关血浆蛋白含量或表达量进行检测,所述补体通路相关血浆蛋白选自IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白中的一种或几种的组合,其中IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3或IGHG1蛋白均为已知蛋白。

[0019] 在本发明的一个实施方式中,通过DIA定量检测人外周血血浆蛋白的表达量的检测方法,受试者为人,生物样本来源于受试者的血浆。

[0020] 在本发明的一个实施方式中,以 \log_2 FOT计算,设定外周血浆中IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白表达量的标准值分别为23.0、22.8、24.5、24.5、32.0、34.0,当IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白中至少有一个的检测值高于标准值时,提示患有ICIs相关心肌炎。

[0021] 本发明通过对血浆蛋白的相关研究,证明了ICIs相关心肌炎患者的外周血血浆蛋白中的经典补体通路得到了明显的激活,明显高于使用过ICIs未发心肌炎的肿瘤患者。并

且,在所述激活的补体通路中,IGHV基因的多种亚型都得到了明显的增高。进一步,通过外周血中血浆蛋白表达水平和Gene Ontology(基因本体)层级聚类分析可知,在免疫检查抑制剂诱发心肌炎患者的经典补体通路相关血浆蛋白明显升高,当经典补体通路明显激活时,提示ICIs相关心肌炎发生的概率明显的提高。

[0022] 同时,通过外周血中血浆蛋白表达水平作为生物标记物的检测,所述生物标记物为IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1。当上述6个血浆蛋白表达水平升高超过截断值时,提示ICIs相关心肌炎发生的概率明显的提高。

[0023] 基于此,提出本发明创造。

[0024] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:

[0025] 1、通过针对外周血血浆蛋白进行DIA定量蛋白质组学分析时,发现ICIs相关心肌炎患者的外周血血浆蛋白中的经典补体通路得到了明显的激活,根据经典补体通路相关血浆蛋白水平明显高于使用过ICIs未发心肌炎的肿瘤患者,基于logistic回归模型构建风险评估模型,可以有效的预测ICIs相关心肌炎的发生。

[0026] 2、本发明通过对有统计学意义的血浆蛋白,进行下一步GO聚类分析,富集到具有变化最显著的通路,即:经典补体通路的激活。进一步对富集通路,即经典补体通路的激活中的相关靶点,进行logistic回归分析,将曲线下面积(AUC)值大于0.8的值取出来,进行后续的检测和分析,得到6个生物标记物为IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1,这6个生物标记物具有较好区分能力。

[0027] 3、本发明有助于解决免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断和预后检测的难点问题,对免疫检查抑制剂诱发心肌炎的诊断和预后评估具有重要的临床意义。

附图说明

[0028] 图1为免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断的补体通路相关血浆蛋白标记物试剂盒的原理和流程图。

[0029] 图2为免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断的补体通路相关血浆蛋白的GO层次聚类分析图。

[0030] 图3为经典补体通路相关血浆蛋白的ROC曲线。

[0031] 图4为t检验(双尾)结果和散点图汇总。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例提供一种区分ICIs相关心肌炎患者和正常人的潜在血浆蛋白标志物的筛选方法。

[0035] 其中,免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断的补体通路相关血浆蛋白标记物试剂盒的原理和流程如图1所示,具体包括如下步骤:

[0036] 1.提取外周血血浆蛋白

[0037] 1.1抽取外周静脉血2-3ml于黄色生化管中,暂时保存,置于冰上或者4℃冰箱中,随后放入超速离心机中,4℃、2000rpm离心20min。

[0038] 1.2随后用移液枪转移上清液至1.5ml无菌EP管中,上清液即为血浆,如果不是立即处理,将EP管置于-80℃冰箱中,长期保存。

[0039] 2.血浆蛋白组检测

[0040] 方法同安捷伦技术公司所述:主要包括DDA文库生成的样本制备和分离;滤膜辅助样品制备(FASP消化);数据相关的质谱学分析;这些方法为血浆蛋白组检测的常规方法,安捷伦公司制定的流程,均按照该官方说明书进行操作。

[0041] 3.生物信息学分析

[0042] 对数据进行统计学分析,以筛选出与ICIs相关心肌炎相关性高的血浆蛋白。分析逻辑如下:采用SPSS 23软件进行数据处理和分析,选择-分析-比较平均值-参数检验-独立样本T检验,根据非心肌炎组和心肌炎组分组,进行检测,最终,p-value<0.05即认为两者存在显著性差异。随后将差异蛋白进行下一步生物信息分析,这里主要通过基因本体Gene Ontology (GO) 层次聚类分析,基因本体Gene Ontology是一个标准化的功能分类体系,主要通过三个方面描述生物体中基因和基因产物的属性:参与的生物过程(Biological Process),分子功能(Molecular Function)和细胞组分(Cellular Component)。随后,在参与的生物过程(Biological Process, BP),将这些差异蛋白进行分类,找出潜在激活通路,定位到相关通路,免疫检查抑制剂诱发心肌炎诊断的Gene Ontology (GO) 层次聚类分析如图2所示,在研究的样本中,发现富集到具有变化最显著的通路,即:经典补体通路的激活。

[0043] 4.筛选可用于ICIs相关心肌炎精确诊断的蛋白组标记物

[0044] 最后,将经典补体通路中有差异的潜在靶点,纳入Logistic Regression(逻辑回归),选择输入的分析方法,通过logistic回归找到AUC(曲线下面积>0.8)的潜在诊断靶点,随后将潜在诊断靶点,列出其散点图和t检验结果,t检验(双尾)结果和散点图汇总如图4所示。最后,选择特异性高于90%的截断值,从而保证其截断值具有较高特异性,减少假阳性的发生,更加适合临床的使用。

[0045] 其中,6个具有良好区分效能的候选补体通路相关血浆蛋白汇总如表1所示。

[0046] 表1 6个具有良好区分效能的候选补体通路相关血浆蛋白汇总

	Protein	AUC	Cut off	Sensitivity	Specificity
	IGHV3-13	0.806	22.9900	26.32%	93.75%
	IGHV3-43	0.806	22.7754	36.84%	93.75%
[0047]	IGHV3-30	0.816	24.5268	47.37%	93.75%
	IGHV3-33	0.809	24.5352	42.11%	93.75%
	IGHG3	0.891	31.9964	52.63%	93.75%
	IGHG1	0.839	34.0048	42.11%	100.00%

[0048] 通过SPSS的分析-ROC曲线,根据非心肌炎和心肌炎组纳入为状态变量,将这6个生物标记物IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1指标纳入检验变量,随后,进行分析,得到图3所示的经典补体通路相关血浆蛋白的ROC曲线。

[0049] 另外,本实施例中,以 Log_2FOT 计算,设定外周血浆中IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白表达量的标准值分别为23.0、22.8、24.5、24.5、32.0、34.0,当IGHV3-13、IGHV3-43、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHG3、IGHG1蛋白中至少有一个的检测值高于标准值时,提示患有ICIs相关心肌炎。

[0050] 本实施例中,针对6个生物标记物,在选择截断值时,为了更好的适合临床的使用,均取了特异性高于90%的截断值,这样,如表1中所示,在对应的截断值(cut off)时候,其特异性(Specificity)即为发生概率,例如:患者的IGHV3-13>22.99截断值(cut off)时,其发生心肌炎的概率达到了93.75%。

[0051] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

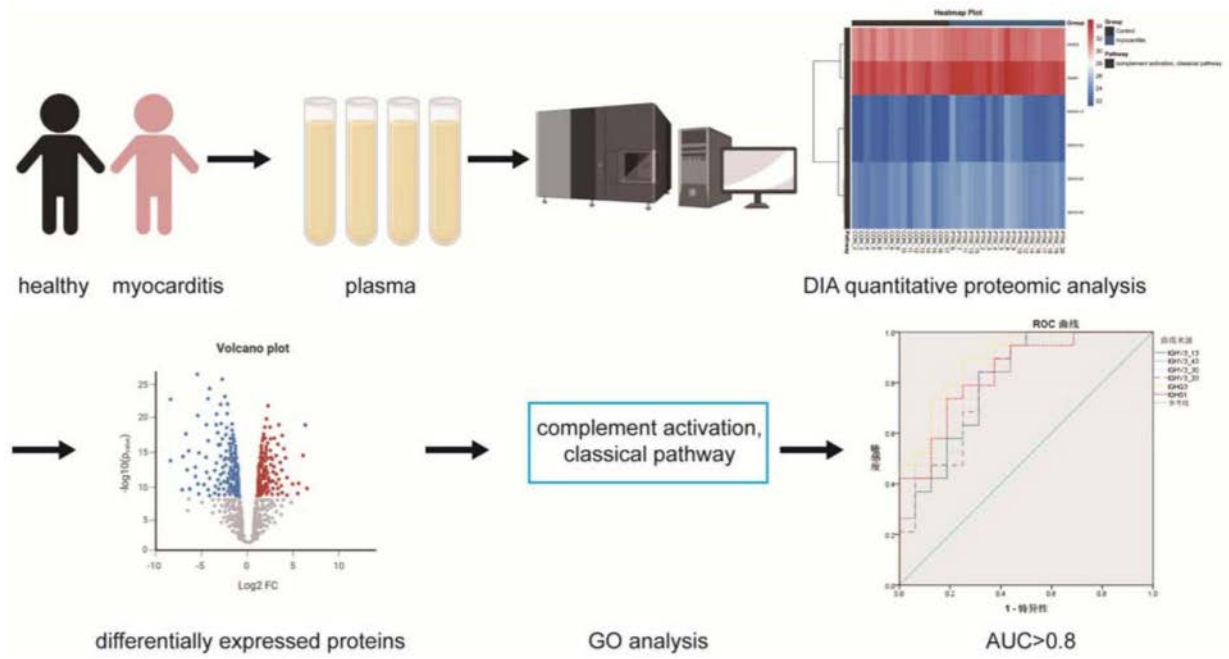


图1

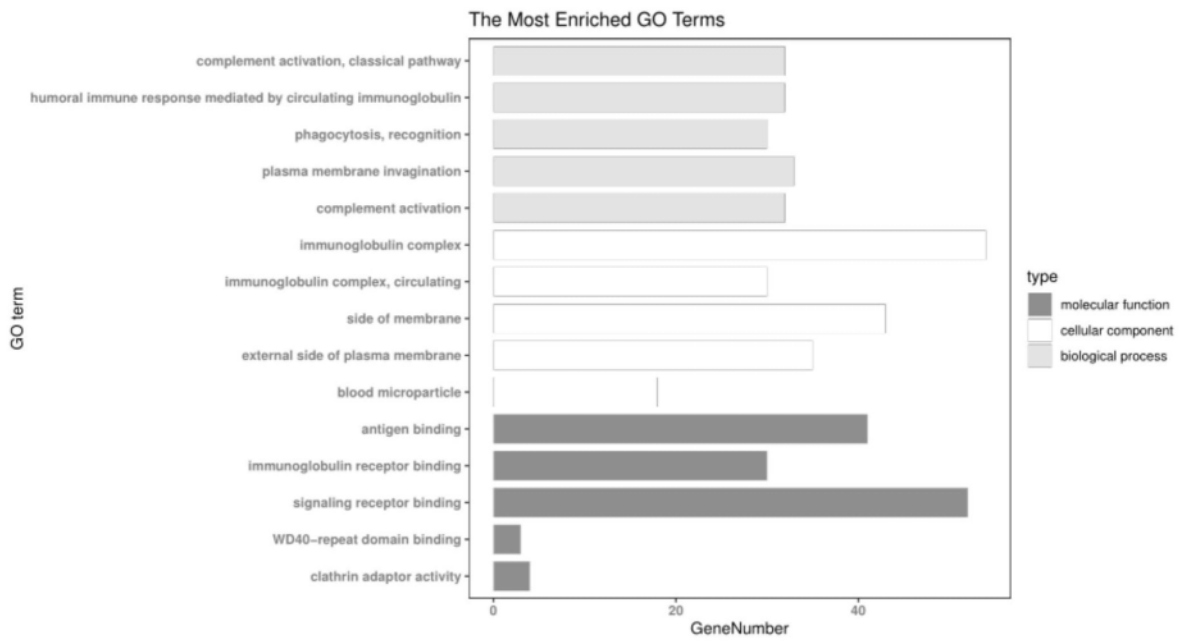


图2

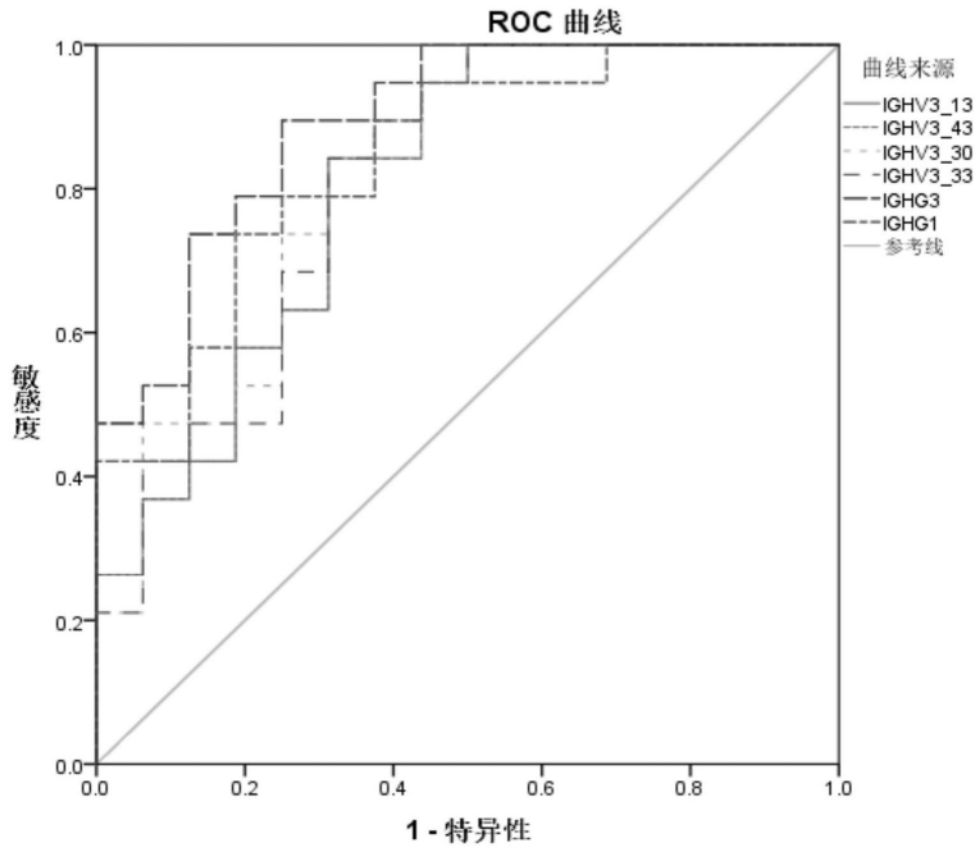


图3

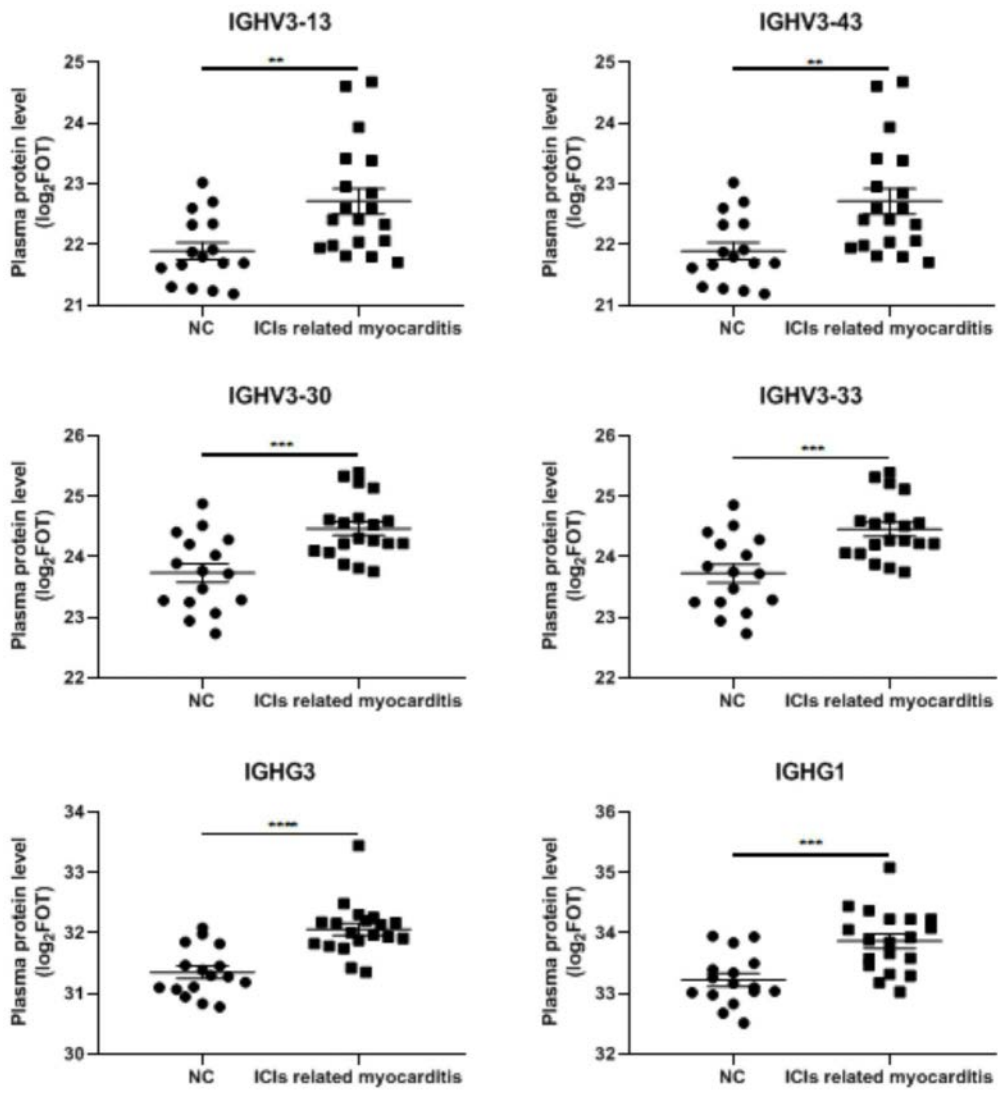


图4