



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106596827 B

(45)授权公告日 2019.06.07

(21)申请号 201710057969.6

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2017.01.23

G01N 33/48(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/53(2006.01)

申请公布号 CN 106596827 A

G01N 33/532(2006.01)

(43)申请公布日 2017.04.26

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/66(2006.01)

(73)专利权人 上海知先生物科技有限公司

(56)对比文件

地址 201101 上海市闵行区七莘路889号2
幢335室

CN 101308141 A,2008.11.19,全文.

CN 103328501 A,2013.09.25,全文.

(72)发明人 顾建新 任士芳 孙琳琳 周蕾
张兴旺

CN 104220603 A,2014.12.17,全文.

CN 104655852 A,2015.05.27,全文.

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

CN 105277718 A,2016.01.27,权利要求1-
10,说明书第5-10页0097-0158段.

US 2002045207 A1,2002.04.18,全文.

代理人 杨昀

审查员 洪川

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

权利要求书4页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

Gal指标在自身免疫疾病治疗敏感性和疗效
评估中的应用

(57)摘要

本发明提供了Gal指标在自身免疫疾病治疗
敏感性和疗效评估中的应用,具体涉及一种通过
检测血液中免疫球蛋白G表面双天线复杂型N糖
链末端半乳糖指标及其变化对自身免疫性疾病的
治疗进行敏感性预测和筛选、对病情进行监测
和/或对疗效进行评估的产品、应用及方法。

1. 一种用于对自身免疫性疾病的细胞因子靶向治疗敏感性预测和筛选、对自身免疫性疾病进行病情监测和/或疗效评估的产品,所述产品包括:

(A) 用于测定自身免疫性疾病患者血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化程度的试剂、仪器和/或系统,其由用于测定IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₂的试剂、仪器和/或系统组成,所述血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化程度是通过IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₂的丰度比值决定的;

(B) 用于计算Gal₀和Gal₂的丰度比值Gal指标的模块和/或处理器,其中Gal指标采用选自下组的公式进行:

Gal指标=aGal₀/bGal₂,或其倒数、对数变换形式;其中,a、b独立地为0至10范围内的数值;

(C) 用于根据Gal指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、对对象进行病情监测和/或疗效评估的模块和/或处理器,

当用于根据Gal指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感时,包括步骤:

a) 将Gal指标与预先设定的阈值进行比较;

b) 以阈值为界,高于该值判定为高敏,低于该值判定为低敏;

当用于根据Gal指标对对象进行病情监测时,包括步骤:

a) 在对自身免疫性疾病病患疾病进程中的不同时间点测定并计算Gal指标;

b) 计算Gal指标变化率,即Gal指标RR,即一定时间间隔内,Gal指标的变化程度,Gal指标变化率计算公式如下所示:

$$\begin{aligned}\text{Gal指标RR} &= \Delta\text{Gal指标}/\text{Gal指标}_{\text{前}} \times 100\% \\ &= (\text{Gal指标}_{\text{前}} - \text{Gal指标}_{\text{后}}) / \text{Gal指标}_{\text{前}} \times 100\%\end{aligned}$$

其中, Δ Gal指标表示未经治疗的对象不同时间点之间的Gal指标变化,即表示未经治疗对象在一段时间内的病情变化;

当用于根据Gal指标对对象进行疗效评估时,包括步骤:

a) 在细胞因子靶向治疗前后或治疗过程中的不同时间点测定并计算Gal指标;

b) 计算Gal指标变化率,即Gal指标RR,即治疗前后和/或一定时间间隔内,Gal指标的变化程度,Gal指标变化率计算公式如下所示:

$$\begin{aligned}\text{Gal指标RR} &= \Delta\text{Gal指标}/\text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\% \\ &= (\text{Gal指标}_{\text{治疗前}} - \text{Gal指标}_{\text{治疗后}}) / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%\end{aligned}$$

其中, Δ Gal指标表示治疗前后Gal指标的变化,即表示对象治疗一段时间内的病情变化;

c) 按照Gal指标RR变化程度的不同,将Gal指标的变化划分为多个等级以监控疾病进展和/或疗效;

d) 级别越高,疗效越佳。

2. 如权利要求1所述的产品,所述血液选自:血清、血浆和全血。

3. 如权利要求1所述的产品,所述血液是血清。

4. 如权利要求1所述的产品,所述细胞因子靶向治疗针对TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1

β) 和/或IL-6(白细胞介素-6)或所述细胞因子靶向治疗是抗体治疗。

5. 如权利要求1所述的产品,其特征在於,所述产品还包括选自下组的一种或多种:

- a) 用于采集和/或处理对象血液样品的试剂和/或仪器;
- b) 用于分离和/或纯化血清和/或血浆的试剂和/或仪器;
- c) 用于分离和/或纯化血清/血浆IgG的试剂和/或仪器;
- d) 用于分离、纯化和/或富集血清IgG表面N-糖链的试剂和/或仪器,
- e) 用于标记IgG表面N-糖链的试剂和/或仪器;
- f) 用于存储和/或处理对象血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值作为IgG表面半乳糖化量变指标的数据库、模块和/或处理器;
- g) 用于提供判断阈值的模块和/或处理器;
- h) 用于根据Gal1指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、对对象进行预病情监测和/或疗效评估的模块和/或处理器;
- i) 用于提供诊断和/或检测结果和/或报告的模块和/或处理器;
- j) 说明书或使用指南,其中记载了如下一种或多种应用和/或判断方式:

(i) 将Gal1指标应用于细胞因子靶向治疗的敏感性评估:当Gal1指标达到或高于预先设定的阈值,则判定受试者对细胞因子靶向治疗敏感或适于采用细胞因子靶向治疗;反之,则判定受试者对细胞因子靶向治疗不敏感或不适于采用细胞因子靶向治疗;

(ii) 将Gal1指标变化用于病情监测:在对自身免疫性疾病病患治疗前后、治疗过程中或患病各时期的不同时间点测定并计算Gal1指标,当Gal1指标高于前次测试所得的Gal1指标或高于预先设定的范围,则表明病患病情进展或恶化;

(iii) 将Gal1指标变化用于疗效评估:在细胞因子靶向治疗前后或治疗过程中的不同时间点测定并计算Gal1指标,当Gal1指标高于前次测试所得的Gal1指标或高于预先设定的范围,则表明疗法和/或药物的疗效不佳。

6. 如权利要求5所述的产品,其中所述标记是荧光标记。

7. 如权利要求5所述的产品,其中所述j)中的预先设定的范围是5%~50%或该范围内的任意点或子范围。

8. 如权利要求5中所述的产品,其特征在於,所述j)的(i)中的阈值为2.2~3.5。

9. 如权利要求8所述的产品,其特征在於,所述阈值是3.065。

10. 如权利要求8所述的产品,其特征在於:基于ROC曲线中斜率最大点或最大化灵敏度和特异度的值来确定最佳阈值,所述阈值为最佳阈值 $\pm 1\sim 15\%$ 的范围,包括该范围内的任意数值点或子范围。

11. 如权利要求1所述的产品,其特征在於,所述自身免疫性疾病选自:强直性脊柱炎、类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、青少年关节炎、斑块状银屑病、溃疡性结肠炎、Crohn's病、系统性红斑狼疮、多发性硬化、系统性硬化、干燥综合征。

12. 如权利要求1所述的产品,其特征在於,所述产品用于包含如下步骤的检测方法中:

(A') 测定对象血液样本中IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化水平,所述末端半乳糖基化水平包括:IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链水平Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链水平Gal₂;

(B') 计算Gal₀和Gal₂的丰度比值,即Gal1指标;

(C') 根据Gal指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感,根据治疗前后、治疗过程中或患病各时期的Gal指标变化对病情进行监测和/或对疗效进行评估。

13. 如权利要求12所述的产品,其特征在于,所述方法还包括选自下组的一个或多个步骤:

(a') 采集和/或处理对象血液样品;

(b') 分离和/或纯化血清和/或血浆;

(c') 分离和/或纯化血清/血浆IgG;

(d') 分离、纯化和/或富集血清IgG表面N-糖链;

(e') 标记IgG表面N-糖链;

(f') 存储和/或处理对象血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值作为IgG表面半乳糖化量变指标;

(g') 提供判断阈值;

(h') 将对象的Gal指标与阈值比较以判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感,与对照值比较对病情进行监测和/或对疗效进行评估;

(i') 提供检测结果和/或报告。

14. 如权利要求13所述的产品,其中所述标记是荧光标记。

15. 试剂、仪器、模块和/或处理器在制备用于判断患有自身免疫性疾病的对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、对患有自身免疫性疾病的对象进行病情监测和/或疗效评估的产品中的应用,所述试剂、仪器、模块和/或处理器包括:

(A) 用于测定自身免疫性疾病患者血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化程度的试剂、仪器和/或系统,其由用于测定IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₂的试剂、仪器和/或系统组成,所述血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化程度是通过IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₂的丰度比值决定的;

(B) 用于计算Gal₀和Gal₂的丰度比值Gal指标的模块和/或处理器,其中Gal指标采用选自下组的公式进行:

Gal指标 = $aGal_0/bGal_2$, 或其倒数、对数变换形式; 其中, a、b独立地为0至10范围内的数值;

(C) 用于根据Gal指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、对对象进行病情监测和/或疗效评估的模块和/或处理器,

当用于根据Gal指标判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感时,包括步骤:

a) 将Gal指标与预先设定的阈值进行比较;

b) 以阈值为界,高于该值判定为高敏,低于该值判定为低敏;

当用于根据Gal指标对对象进行病情监测时,包括步骤:

a) 在对自身免疫性疾病病患疾病进程中的不同时间点测定并计算Gal指标;

b) 计算Gal指标变化率,即Gal指标RR,即一定时间间隔内,Gal指标的变化程度,Gal指标变化率计算公式如下所示:

Gal指标RR = $\Delta Gal指标 / Gal指标_{前} \times 100\%$

$$= (\text{Gal指标}_{\text{前}} - \text{Gal指标}_{\text{后}}) / \text{Gal指标}_{\text{前}} \times 100\%$$

其中, Δ Gal指标表示未经治疗的对象不同时间点之间的Gal指标变化, 即表示未经治疗对象在一段时间内的病情变化;

当用于根据Gal指标对对象进行疗效评估时, 包括步骤:

- a) 在细胞因子靶向治疗前后或治疗过程中的不同时间点测定并计算Gal指标;
- b) 计算Gal指标变化率, 即Gal指标RR, 即治疗前后和/或一定时间间隔内, Gal指标的变化程度, Gal指标变化率计算公式如下所示:

$$\text{Gal指标RR} = \Delta \text{Gal指标} / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$$

$$= (\text{Gal指标}_{\text{治疗前}} - \text{Gal指标}_{\text{治疗后}}) / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$$

其中, Δ Gal指标表示治疗前后Gal指标的变化, 即表示对象治疗一段时间内的病情变化;

- c) 按照Gal指标RR变化程度的不同, 将Gal指标的变化划分为多个等级以监控疾病进展和/或疗效;

d) 级别越高, 疗效越佳。

16. 如权利要求15所述的应用, 所述细胞因子靶向治疗针对TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1 β) 和/或IL-6 (白细胞介素-6) 或所述细胞因子靶向治疗是抗体治疗。

17. 如权利要求15所述的应用, 其特征在于, 所述产品如权利要求1-7中任一项所述。

Gal 指标在自身免疫疾病治疗敏感性和疗效评估中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和医学领域,涉及对细胞因子靶向制剂在治疗自身免疫性疾病中的敏感性筛选、病情和治疗效果的监测。更具体而言,本发明涉及通过测定血液样品中Gal指标的水平判定细胞因子靶向制剂治疗(例如TNF- α 抑制剂治疗,如抗体治疗)在自身免疫性疾病治疗中的敏感性以及对自身免疫性疾病的病情和治疗效果的监测。

背景技术

[0002] 自身免疫性疾病是自身抗原的免疫耐受损伤是引起的慢性疾病,但病因和发病机制均不十分明确,其中代表性的疾病包含:强直型脊柱炎(AS)、类风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化(MS)等。这些疾病病程长,易致残,而且易引发诸多脏器病变。因此,如何进行早期治疗以减少患者的病残率,提高患者的生存质量,一直是该研究领域亟待解决的难题和热点。

[0003] 目前多种自身免疫性疾病的治疗均无根治药物,临床上主要依赖免疫抑制剂,包含非选择性免疫抑制剂(如糖皮质激素、烷化剂、抗代谢药等)和选择性免疫抑制剂(如选择性T细胞抑制剂、细胞因子及其拮抗剂、抗CD分子单克隆抗体等)。与传统的非选择性免疫抑制剂相比,选择性免疫抑制剂具有较低的不良反​​应和良好的疗效。

[0004] 目前,靶向细胞因子TNF- α 和白细胞介素的药物在临床已广为使用。例如,在AS和RA的治疗中,靶向细胞因子TNF- α 的TNF- α 抑制剂在国外应用于临床已十多年,在国内上市也已7年,被纳入医保并取得了较好的疗效。尤其是抗TNF- α 单克隆抗体药依那西普、英夫昔、阿达木单抗等,临床疗效确实,被称为AS和RA治疗史的一次飞跃与革命。但是,抗体药物治疗费用昂贵,以AS为例,仍有超过30%的患者经上述抗体药治疗后无效,对他们而言,这种昂贵的抗体药物治疗实为无用之功。因此,在治疗前对于患病人群进行敏感性筛选对减轻国家在医保方面无效投入和患者的个人负担都有长远的意义。

[0005] 由此,本领域迫切需要开发出一种可用于自身免疫性疾病细胞因子靶向制剂治疗敏感性筛选的方法,以达到精准治疗和优化资源配置的目的。

发明内容

[0006] 本发明的主要目的之一在于克服现有技术存在的不足,提供一种基于血液的检测指标Gal指标,用于自身免疫性疾病细胞因子靶向制剂治疗的敏感性筛选、对自身免疫性疾病的疗效评估和病情监测。

[0007] 在本发明的一个方面中,提供了一种用于对细胞因子靶向制剂在自身免疫性疾病治疗敏感性筛选、病情监测和/或疗效评估的产品,所述产品可为例如试剂盒、设备、可操作系统和/或它们的组合,所述产品包括:

[0008] (A) 用于测定血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化程度的试剂、仪器和/或系统,其用于测定IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链丰度Gal₂;

[0009] 例如,用于选自下组的一种或多种方法的试剂、仪器和/或系统:基质辅助激光解析飞行时间质谱法MALDI-MS、快原子轰击质谱FAB-MS、电喷雾质谱ESI-MS、液相色谱法、超高效液相色谱、液相色谱-质谱联用法、糖芯片技术、微流控技术、核磁共振NMR,优选超高效液相色谱;

[0010] (B) 用于计算Gal₀和Gal₂的丰度比值Gal指标的模块和/或处理器;

[0011] (C) 可选的,用于根据Gal指标判断对象对于细胞因子靶向制剂治疗是否敏感、对对象进行病情监测和/或疗效评估的模块和/或处理器。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述血液选自:血清、血浆和全血,优选血清。

[0013] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗针对TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1 β)和/或IL-6(白细胞介素-6)。

[0014] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗是抗体治疗。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,所述产品还包括选自下组的一种或多种:

[0016] a) 用于采集和/或处理对象血液样品的试剂和/或仪器;

[0017] b) 用于分离和/或纯化血清和/或血浆的试剂和/或仪器;

[0018] c) 用于分离和/或纯化血清/血浆IgG的试剂和/或仪器;

[0019] d) 用于分离、纯化和/或富集血清IgG表面N-糖链的试剂和/或仪器,

[0020] 例如,选自下组的分离纯化N糖链方法的试剂和/或仪器:多孔石墨化碳PGC固相萃取法(优选采用乙腈:水:三氟醋酸=80:19.9:0.1活化PGC,采用水:三氟醋酸=99.9:0.1平衡PGC,采用乙腈:水:三氟醋酸=25:74.95:0.05的混合溶剂洗脱糖链)、多糖纯化柱、凝集素亲合法(如连续凝集素亲和色谱SLAC)、毛细管电泳、高效液相色谱;

[0021] e) 用于标记(如荧光标记) IgG表面N-糖链的试剂和/或仪器;

[0022] f) 用于存储和/或处理对象血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值作为IgG表面半乳糖化量变指标的数据库、模块和/或处理器;

[0023] g) 用于提供判断阈值的模块和/或处理器;

[0024] h) 用于根据Gal指标判断对象于细胞因子靶向制剂治疗是否敏感、对对象进行病情监测和/或疗效评估的模块和/或处理器。

[0025] i) 用于提供检测结果和/或报告的模块和/或处理器;

[0026] j) 说明书或使用指南,其中记载了如下一种或多种应用和判断方式:

[0027] (i) 用于自身免疫性疾病敏感性筛选:当Gal指标达到或高于预先设定的阈值,则判定该自身免疫性疾病患者对细胞因子靶向制剂治疗敏感;

[0028] (ii) 用于自身免疫性疾病患者病情监测:当Gal指标高于前次测试所得的Gal指标达到或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围),则表明该自身免疫性疾病患者的病情有所发展或进一步恶化;

[0029] (iii) 用于疗效评估:在治疗前后或治疗过程中的不同时间点测定并计算Gal指标,当Gal指标高于前次测试所得的Gal指标达到或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围),则表明该疗法和/或药物的疗效不佳;

[0030] 优选,(i)~(iii)中的阈值为2.2~3.5,更优选3.065。

[0031] 在一些实施方式中,可基于ROC曲线中斜率最大点或最大化灵敏度和特异度的值来确定最佳阈值,且优选的阈值范围可为最佳阈值 $\pm 1\sim 15\%$ (包括该范围内的任意数值点

或子范围)的范围。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述Gal指标计算采用选自下组的公式进行:Gal比值= $aGal_0/bGal_2$,或其倒数、对数等其他变换形式。其中,a、b各自的取值独立地位于大于0至10之间,例如独立地选自0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9或10,其中 $a \neq 0$; $b \neq 0$ 。可根据所采用的测试仪器和/或方法中各种参数Gal₀和Gal₂的响应程度,对a或b的具体取值进行调整。例如,可基于所使用的试验方法与标准方法(例如超高效液相色谱,UPLC)校验后的比值,对a、b的具体取值进行调整。

[0033] 例如,在本发明的一些实施方式中,可采用选自下组的公式进行比值计算:

[0034] Gal指标=Gal₀/Gal₂;或其倒数、对数等其他变换形式。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述自身免疫性疾病选自:强直性脊柱炎、类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、青少年关节炎、斑块状银屑病、溃疡性结肠炎、Crohn's病、系统性红斑狼疮、多发性硬化、系统性硬化、干燥综合征。

[0036] 在本发明的一些实施方式中,所述对象是哺乳动物,优选人、猴、狗、马、牛、羊、猪、鼠、兔等。

[0037] 在本发明的一些实施方式中,所述细胞因子靶向制剂主要靶向TNF- α ,例如其可选自:依那西普、英夫利昔和阿达木单抗。优选依那西普和英夫利昔。

[0038] 在本发明的一些实施方式中,所述产品应用于包含如下步骤的检测方法中:

[0039] (A')测定对象血液样本中IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化水平,所述末端半乳糖基化水平包括:IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链水平Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链水平Gal₂;

[0040] (B')计算Gal₀和Gal₂的丰度比值,即Gal指标;

[0041] (C')根据Gal指标判断对象是否对于细胞因子靶向制剂治疗敏感、对对象病情进行监测和/或对疗效进行评估。

[0042] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗针对TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1 β)和/或IL-6(白细胞介素-6)。

[0043] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗是抗体治疗。

[0044] 在本发明的一些实施方式中,所述方法还包括选自下组的一个或多个步骤:

[0045] (a')采集和/或处理对象血液样品;

[0046] (b')分离和/或纯化血清和/或血浆;

[0047] (c')分离和/或纯化血清/血浆IgG;

[0048] (d')分离、纯化和/或富集血清IgG表面N-糖链;

[0049] (e')存储和/或处理对象血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值作为IgG表面半乳糖化量变指标;

[0050] (f')提供判断阈值;

[0051] (g')将对象的Gal比与对照比较以判断对象是否对于细胞因子靶向制剂治疗敏感、对对象病情进行监测和/或对疗效进行评估。

[0052] (h')提供检测结果和/或报告;

[0053] 在本发明的另一个方面中,提供了试剂、仪器、模块和/或处理器在制备用于试剂、仪器、模块和/或处理器在制备用于对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、病情监测和/或疗

效评估的产品中的应用,所述产品可为例如试剂盒、设备、系统和/或它们的组合,所述试剂、仪器、模块和/或处理器包括:

[0054] (A) 用于测定血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化水平的试剂、仪器、模块和/或处理器,其用于测定IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链水平Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链水平Gal₂;

[0055] 例如,用于选自下组的一种或多种方法的试剂、仪器、模块和/或处理器:基质辅助激光解析飞行时间质谱法MALDI-MS、快原子轰击质谱FAB-MS、电喷雾质谱ESI-MS;液相色谱法;液相色谱-质谱联用法;糖芯片技术;微流控技术;核磁共振NMR,优选液相色谱法;

[0056] (B) 可选的,用于计算Gal指标的模块或处理器;

[0057] (C) 可选的,用于根据Gal指标判断对象是否对于细胞因子靶向治疗敏感,对对象病情监测和/或疗效评估的模块或处理器。

[0058] 在本发明的一些实施方式中,所述产品如前所述。

[0059] 在本发明的另一方面中,提供了一种用于自身免疫性疾病患者细胞因子靶向制剂/药物治疗敏感性筛选、自身免疫性疾病患者病情监测和/或疗效评估的方法,其特征在于,所述方法采用了本发明的产品或本发明的应用。

[0060] 在一些实施方式中,所述方法包括:

[0061] (A') 测定对象血液样本中IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化水平,所述末端半乳糖基化水平包括:IgG表面末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链水平Gal₀和末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链水平Gal₂;

[0062] (B') 计算Gal₀和Gal₂的丰度比值,即Gal指标;

[0063] (C') 根据Gal指标或其变化判断对象是否对细胞因子靶向治疗敏感、对对象进行病情监测和/或对疗效进行评估。

[0064] 在本发明的一些实施方式中,所述方法还包括选自下组的一个或多个步骤:

[0065] (a') 采集和/或处理对象血液样品;

[0066] (b') 分离和/或纯化血清和/或血浆;

[0067] (c') 分离和/或纯化血清/血浆IgG;

[0068] (d') 分离、纯化和/或富集血清IgG表面N-糖链;

[0069] (e') 用于标记(如荧光标记) IgG表面N-糖链的试剂和/或仪器;

[0070] (f') 存储和/或处理对象血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值作为IgG表面半乳糖化量变指标;

[0071] (g') 提供判断阈值;

[0072] (h') 将对象的Gal指标与阈值比较以判断对象是否对于细胞因子靶向治疗敏感、对对象进行病情监测和/或疗效评估;

[0073] (i') 提供诊断和/或检测结果和/或报告;

[0074] 在一些实施方式中,所述方法用于如下所述的用途,且包括如下所述相应步骤:

[0075] (i) 用于细胞因子靶向治疗敏感性筛选:当Gal指标达到或高于预先设定的阈值,则判定该受试者对于细胞因子靶向治疗敏感;

[0076] (ii) 用于自身免疫性疾病患者病情监测:当Gal指标高于前次测试所得的Gal指标达到或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围),则表明该患

者的病情有所发展或进一步恶化;

[0077] (iii) 用于疗效评估:在治疗前后或治疗过程中的不同时间点测定并计算Gal1指标,当Gal1指标高于前次测试所得的Gal1指标达到或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围),则表明该疗法和/或药物的疗效不佳;

[0078] 优选,(i)~(iii)中的阈值为2.2~3.5,更优选3.065。

[0079] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗针对TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1 β)和/或IL-6(白细胞介素-6)。

[0080] 在一些实施方式中,所述细胞因子靶向治疗是抗体治疗。

[0081] 在一些实施方式中,可基于ROC曲线中斜率最大点或最大化灵敏度和特异度的值来确定最佳阈值,且优选的阈值范围可为最佳阈值 $\pm 1\sim 15\%$ (包括该范围内的任意数值点或子范围)的范围。

[0082] 在本发明的一些实施方式中,所述产品和应用用于包括如下步骤的方法中:

[0083] 用IgG纯化柱从对象血清样品中分离和/或纯化血清IgG,优选采用与纯化柱配套的弱碱性结合缓冲溶液和弱酸性淋洗缓冲溶液;

[0084] 用糖苷酶处理分离的IgG以分离IgG的N糖链,优选采用糖苷酶PNGase F;

[0085] 用多孔石墨化碳PGC固相萃取分离的N糖链,优选采用乙腈:水:三氟醋酸=80:19.9:0.1活化PGC,采用水:三氟醋酸=99.9:0.1平衡PGC、采用乙腈:水:三氟醋酸=25:74.95:0.05的混合溶剂洗脱糖链;

[0086] 采用液相色谱法定量分析N-糖链中Gal₀和Gal₂水平;

[0087] 基于对象血清IgG表面Gal1指标得出该患者是否适用于细胞因子靶向治疗,并对患者进行病情监测和/或疗效评估。

[0088] 本领域的技术人员可对前述的技术方案和技术特征进行任意组合而不脱离本发明的发明构思和保护范围。本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

[0089] 下面进一步结合附图和附表对本发明作进一步说明,其中所显示仅为了说明本发明的实施方案,而不是为了局限本发明的范围。

附图说明

[0090] 图1:AS患者TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组Gal1指标比较的ROC曲线。

[0091] 图2:RA患者TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组Gal1指标比较的ROC曲线。

[0092] 附表说明

[0093] 表1:AS患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定。

[0094] 表2:AS患者Gal1指标变化率(Gal1指标RR)与疗效分级秩和检验结果。

[0095] 表3:RA患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定。

[0096] 表4:RA患者Gal1指标变化率(Gal1指标RR)与疗效分级秩和检验结果。

[0097] 具体实施方法:

[0098] 本发明基于发明人在上述领域的研究,提供了一种基于哺乳动物(优选人)血液中免疫球蛋白G(IgG)表面双天线复杂型N糖链末端半乳糖化的变化对自身免疫性疾病患者细胞因子靶向治疗敏感性筛查,病情监测和/或疗效评估的新方法。本发明的方法填补了本领域

域在敏感性筛查方面的空白,具有敏感性高、特异性好、操作便捷的特性,对于精准治疗,优化政府资源配置,降低病患负担具有重要的意义。

[0099] 本发明基于细胞因子靶向制剂治疗高敏性患者与低敏性患者血液中Gal指标的不同,区分高敏和低敏人群,实现对自身免疫性疾病患者细胞因子靶向治疗的敏感性筛查;针对Gal指标与自身免疫性疾病患者病情严重程度的相关性以及治疗前后或疾病不同时期Gal指标的变化,实现对自身免疫性疾病患者病情监测和/或疗效评估,并由此提供一种高灵敏、高特异性的筛查/检测方法。

[0100] 发明人发现根据本发明的Gal指标与自身免疫性疾病细胞因子靶向治疗的敏感性、疾病的严重程度和治疗效果高度相关。

[0101] 具体而言,发明人运用本发明进行了如下的测试并得出了相应的结论:

[0102] 1) 对111例经TNF- α 抑制剂治疗的AS血清样本进行检测,证明了Gal指标对自身免疫性疾病患者细胞因子靶向治疗的敏感性筛查具有高特异性、灵敏性和准确性;

[0103] 2) 对111例AS临床样本进行检测随访监测研究,发现Gal指标的改变与病情严重程度和疗效相关,证明了Gal指标可用于病情和疗效监测。

[0104] 3) 对98例经TNF- α 抑制剂治疗的RA血清样本进行检测,证明了Gal指标对自身免疫性疾病患者细胞因子靶向治疗的敏感性筛查具有高特异性、灵敏性和准确性;

[0105] 4) 对98例RA临床样本进行检测随访监测研究,发现Gal指标的改变与病情严重程度和疗效相关,证明了Gal指标可用于病情和疗效监测。

[0106] 以上结果证实Gal指标可独立用于自身免疫性疾病细胞因子靶向治疗的敏感性筛查,并对患者进行病情监测和/或疗效评估。

[0107] 相关术语定义

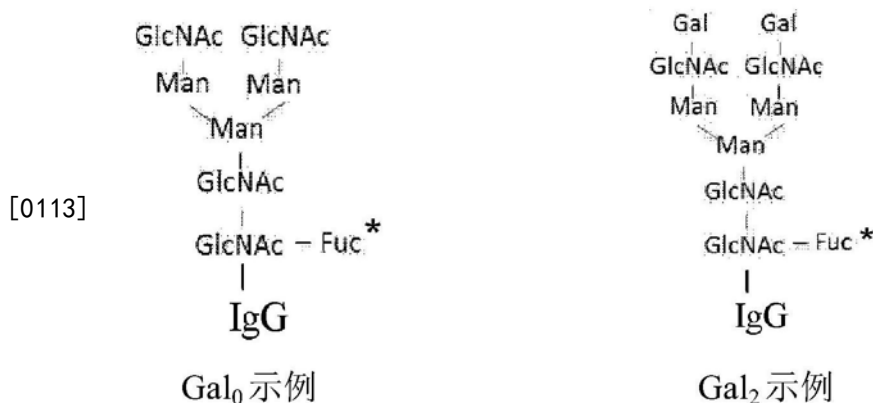
[0108] 本文中提供的所有数值范围旨在清楚地包括落在范围端点之间的所有数值及它们之间的数值范围。可对本发明提到的特征或实施例提到的特征进行组合。本说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0109] 如本文所用,“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0110] 如本文所用,术语“Gal指标 (Gal Index, GI)”是指对象血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端半乳糖基化量变,具体为双天线复杂型N糖链末端去半乳糖 (Gal₀) 与半乳糖糖链 (Gal₂) 的丰度比值,其中, Gal₀对应于末端无半乳糖连接的双天线复杂型N-糖链, Gal₂对应于末端连有2个半乳糖的双天线复杂型N-糖链。

[0111] 如本文所用,术语“双天线复杂型N-糖链”是指:N-糖链中共有的核心五糖上连接入2个非纯甘露糖的分支糖链,宛如天线状(参见查锡良主编,《生物化学》人民卫生出版社,2008年第7版,第454-455页)。

[0112] 示例性的Gal₀和Gal₂的结构如下所示,其中, GlcNAc代表N-乙酰葡萄糖胺, Man代表甘露糖, Gal代表半乳糖, Fuc代表岩藻糖。



[0114] 如本文所用,术语“特异度”、“灵敏度”、“符合率”均与相对应的医学统计学术语具有相同的含义。本文中的“特异度”(specificity)是指临床判断为对细胞因子靶向治疗不敏感的病例中经本发明指标检测为阴性(即不敏感)的比例。“灵敏度”(sensitivity)是指临床判断为对细胞因子靶向治疗敏感的病例中,经本发明指标检测为阳性(即敏感)的比例。“符合率”(accuracy)是指真阳性样本量与真阴性样本量之和占总样本量的比例,反映本发明指标检测结果与受试者对细胞因子靶向治疗是否敏感的真实情况相符合的程度。

[0115] 如本文所用,术语“阈值”、“cut-off值”、“截断值”、“界值”和“参考值”、可以互换使用,指的是用来判断检测结果的标准,即临界值,检测结果高于阈值即视为阳性,低于阈值即视为阴性。

[0116] 如本文所用,术语“细胞因子靶向治疗”是指针对自身免疫性疾病对象中的细胞因子进行靶向性治疗。所述细胞因子可为TNF- α 、IL-1 β (白细胞介素-1 β)或IL-6(白细胞介素-6)。细胞因子靶向治疗可为针对靶标细胞因子的各种治疗,例如采用靶向并抑制该细胞因子的抗体或抗体偶联物对该细胞因子进行抑制。

[0117] 如本文所用,术语“对细胞因子靶向治疗的敏感性”是指自身免疫性疾病患者对细胞因子靶向治疗的响应程度。当所述细胞因子靶向治疗采用抗体为治疗剂时,所述敏感性是指自身免疫性疾病患者对抗体治疗的响应程度。据此,“对细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)高敏性患者”是指对细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)有良好响应程度,从而可由此获得良好治疗效果的患者;反之,“对细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)低敏性患者”是指对细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)治疗无响应或仅有微弱响应,从而治疗无效或疗效不佳的患者。

[0118] 血液(包括血清、血浆和全血) IgG及其分离和纯化

[0119] 在本发明的实施方式中,可采集对象的血液样品并用本领域中已知的常规方法分离和保存全血、血清和/或血浆。可采用新鲜或冻存血液、血清或血浆进行本发明的测试。所述血液样品可获自各种哺乳动物对象,优选人、猴、狗、马、牛、羊、猪、鼠、兔等。本领域技术人员可以理解,由于在成分上的区别,当采用受试者的血浆样本和血清样本分别进行检测时,Gal指标可能会略有不同。出于便于定量和比较的目的,在本发明中血清样本是优选的。

[0120] 分离IgG的方法是本领域普通技术人员已知的,所述方法包括但不限于: IgG纯化柱、盐析法、有机溶剂沉淀法、聚乙二醇置换法、液相层析、亲和层析(例如蛋白A或蛋白G亲合法、聚酰胺复合膜亲合法),只要所述方法不破坏IgG上所连N-糖链即可。可市售获得IgG分离试剂盒,例如购自Thermo Fisher Scientific。

[0121] 在本发明的一个实施方式中采用了IgG纯化柱来分离样品中的IgG,优选采用蛋白A纯化柱,并采用与纯化柱配套的弱碱性结合缓冲溶液和弱酸性淋洗缓冲溶液,更优选所述纯化柱为高通量纯化柱,例如可同时处理96个样品的纯化柱。

[0122] 可采用本领域中已知的方法从IgG上分离N糖链,包括但不限于:酶法,例如采用糖苷酶,优选糖苷酶PNGase F;化学法,例如采用糖蛋白胍解试剂,如ADM0155A胍解试剂盒。

[0123] 从IgG上分离N糖链后,可采用本领域中已知的方法对N糖链进行分离和/或纯化,所述方法包括但不限于:多孔石墨化碳PGC固相萃取法、多糖/寡糖纯化柱、凝集素亲合法(如连续凝集素亲和色谱SLAC)、毛细管电泳、高效/超高效液相色谱、有机试剂沉淀(如65%乙醇)等。

[0124] 在本发明的一个实施方式中,采用了多孔石墨化碳PGC固相萃取法分离N糖链,其中采用了乙腈:水:三氟醋酸=80:19.9:0.1活化PGC,采用水:三氟醋酸=99.9:0.1平衡PGC,并采用乙腈:水:三氟醋酸=25:74.95:0.05的混合溶剂洗脱糖链(所述比例为体积比)。

[0125] 可采用本领域中已知的方法对IgG表面水平双天线复杂型N糖链末端去半乳糖(Gal₀)、半乳糖糖链(Gal₂)的丰度进行测定,只要所述方法可对N-糖链中半乳糖化水平进行定量。所述方法包括但不限于:质谱法,例如基质辅助激光解析飞行时间质谱法MALDI-MS、快原子轰击质谱FAB-MS、电喷雾质谱ESI-MS;液相色谱法;液相色谱-质谱联用法;糖芯片技术;微流控技术;核磁共振NMR或以上方式的任合组合。

[0126] 数据分析方法

[0127] 在本发明中,将Gal指标,即对象血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端去半乳糖(Gal₀)与半乳糖糖链(Gal₂)的丰度比值,作为自身免疫性疾病细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)的敏感性筛查,自身免疫性疾病病情监测和/或疗效评估的指标。

[0128] Gal指标计算公式如下:

[0129] Gal指标= $aGal_0/bGal_2$;或

[0130] 可显示对象血液IgG表面双天线复杂型N糖链的末端去半乳糖(Gal₀)与半乳糖糖链(Gal₂)的丰度比值的任何其它公式,如其倒数、对数等其他变换形式。

[0131] 其中,a、b各自的取值独立地位于大于0至10之间,例如独立地选自0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9或10,其中 $a \neq 0, b \neq 0$ 。可根据所采用的测试仪器和/或方法中各种参数Gal₀和Gal₂的响应程度,对a、b的具体取值进行调整。例如,可基于所使用的试验方法与标准方法(例如超高效液相色谱,UPLC)校验后的比值,对a、b的具体取值进行调整。

[0132] 例如,所述公式可为:Gal指标(GI) = Gal_0/Gal_2 ,即 $a=b=1$ 。

[0133] 上述用于丰度比值的Gal₀和Gal₂优选均来源于同一样本、同次检测和/或同一谱图。因此,采用该指标可以避免平行样品的预处理等操作过程产生的偏差,从而减小平行样本进入质谱检测时的误差,确保分析的高重现性和准确性。

[0134] 本领域普通技术人员基于本领域常识可根据不同对象群的检测数据绘制相应的ROC曲线,例如本发明的实施例中根据不同人群的数据绘制相应的ROC曲线。根据本领域公知技术,每一条ROC曲线都提供了一系列阈值及与之相对应的灵敏度和特异度。因此,使用这些ROC曲线,本领域技术人员能很容易地查出选取任意阈值(即cut-off值)时该项检测对

药物敏感性的识别能力,即筛选的灵敏度、特异度和符合率。

[0135] 筛查结果的计算(阈值的计算)取决于特异度和灵敏度。阈值的计算方法包括但不限于:

[0136] 方法1:选定ROC曲线中斜率最大点,取其对应的Gal指标为阈值。

[0137] 方法2:最大化灵敏度和特异度的值,即 $[\text{灵敏度}\% - (1 - \text{特异度}\%)]_{\max}$ 对应的Gal比即为最优阈值(最大约登指数, Youden index)。

[0138] 以阈值为界,高于该值判定为高敏,低于该值判定为低敏。

[0139] 在本发明中优选的阈值范围为2.2-3.5,优选3.065。本领域技术人员可以理解,由于受试群体和具体病种的不同,阈值的选取及其对应的灵敏度、特异度和符合率等参数会有所差别,但均包含在本发明限定的阈值范围内。本领域技术人员可以根据实际使用需求,如对特定疾病、灵敏度、特异度等的要求,从本发明公开的ROC曲线或阈值范围内选取适当的优选阈值。可在确定最佳阈值后,将该最佳阈值 $\pm 1 \sim 15\%$ 的范围(包括该范围内的任意数值点或子范围)。

[0140] 并且,在本发明中还可根据Gal指标的变化对患者的病情进展以及治疗效果进行监测。如本文所用,“Gal指标变化率(Gal指标RR)”是指治疗前后和/或一定时间间隔内,Gal指标的变化程度。Gal指标变化率计算公式可如下所示:

[0141] $\text{Gal指标RR} = \Delta \text{Gal指标} / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$

[0142] $= (\text{Gal指标}_{\text{治疗前}} - \text{Gal指标}_{\text{治疗后}}) / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$

[0143] 其中, $\Delta \text{Gal指标}$ 表示治疗前后Gal指标的变化,即表示对象治疗一段时间内的病情变化;或者

[0144] $\text{Gal指标RR} = \Delta \text{Gal指标} / \text{Gal指标}_{\text{前}} \times 100\%$

[0145] $= (\text{Gal指标}_{\text{前}} - \text{Gal指标}_{\text{后}}) / \text{Gal指标}_{\text{前}} \times 100\%$

[0146] 其中, $\Delta \text{Gal指标}$ 表示未经治疗的对象不同时间点之间的Gal指标变化,即表示未经治疗对象在一段时间内的病情变化)。

[0147] 可按照Gal指标RR变化程度的不同,将Gal指标的变化划分为多个等级以监控疾病进展和/或疗效。例如,可将Gal指标变化率划分为RR 0(变化率 $\leq 5\%$)、RRI(>5%~20%)、RR II(>20%~35%)、RR III(>35%)。也可根据需求和实践,对Gal指标变化进行其他的分级。

[0148] Gal指标及其变化率的应用

[0149] 本发明Gal指标及其变化率可应用于对自身免疫性疾病进行细胞因子靶向治疗(例如TNF- α 抑制剂治疗)的敏感性评估、病情监测和疗效评估等用途中。这些应用包括但不限于:

[0150] (1) 将Gal指标应用于细胞因子靶向治疗治疗的敏感性评估:当Gal指标达到或高于预先设定的阈值,则判定该受试者进行细胞因子靶向治疗将获得较好疗效;反之,则判定获得较佳疗效的可能较小。

[0151] (2) 将Gal指标及其变化率用于病情监测:在对自身免疫性疾病病患治疗前后或治疗过程中或疾病进程中的不同时间点测定并计算Gal指标,当Gal指标高于前次测试所得的Gal指标或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围),则表明该病患病情进展或恶化;反之,则病情好转。

[0152] (3) 将Gal指标及其变化率用于疗效评估:在细胞因子靶向治疗前后或治疗过程中

的不同时间点测定并计算Gal指标,当Gal指标高于前次测试所得的Gal指标或高于预先设定的范围(例如5%~50%或该范围内的任意点或子范围(如>5%~20%)),则表明该疗法和/或药物的疗效不佳。

[0153] 本发明的优点

[0154] 本发明在应用中具有如下一个或多个优点:

[0155] (1) 适用于多种自身免疫性疾病细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)的敏感性预测和筛查;

[0156] (2) 可对多种自身免疫性疾病的疗效及进展进行监测;

[0157] (3) 检测便捷,耗时短;针对单个样本,检测值重复性好,稳定性佳;也可进行高通量检测。

[0158] 本发明符合优秀检测指标应满足的操作要求,表明Gal指标在自身免疫性疾病细胞因子靶向治疗(如抗体治疗)药物的敏感性筛查,病情检测和疗效评估等方面具有临床应用的实际可行性。

实施例

[0159] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。本领域技术人员可对本发明做出适当的修改、变动,这些修改和变动都在本发明的范围之内。

[0160] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,可采用本领域中的常规方法或按照供应商所建议的条件,也可由商业公司提供测试。

[0161] 除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0162] 实施例1.Gal指标用于强直性脊柱炎(AS)患者TNF- α 抑制剂治疗的敏感性筛查

[0163] 1.1试验目的

[0164] 判定Gal指标用于强直性脊柱炎(AS)患者TNF- α 抑制剂敏感性筛查的意义。

[0165] 1.2试验内容

[0166] 对111例强直性脊柱炎患者进行依那西普治疗,收集治疗前和治疗过程中的血清,检测其中Gal指标的变化,结合临床疗效评估,判断Gal指标在TNF- α 抑制剂治疗敏感性筛选中的意义。

[0167] 1.3病例样本情况

[0168] 1.3.1血清样本对应病例遵循的入组原则

[0169] (1) 年龄为18~65岁;

[0170] (2) 符合1984年的AS纽约分类标准且HLA-B27阳性;

[0171] (3) 处于疾病活动期,即Bath AS疾病活动性指数(Bath AS disease activity index,BASDAI,强直性脊柱炎功能指数) ≥ 40 (目视模拟测试表[visual analogue scale,VAS]0~100),脊柱痛VAS评分 ≥ 4 (VAS 0~10);

[0172] (4) 未经过其他任何生物制剂治疗;

[0173] (5) 筛选前4周内未使用过DMARD药物(disease modifying antirheumatic drug)治疗;

[0174] (6) 入选前如服用NSAID药物,则该NSAID药物的剂量至少稳定4周;如服用剂量小于或相当于10mg/天泼尼松的糖皮质激素,则剂量至少稳定4周;

[0175] (7) 筛查时如正在使用物理治疗,则该治疗方式至少稳定2周。

[0176] 1.3.2血清样本对应病例遵循的排除标准

[0177] (1) 临床和影像学提示脊柱已经完全强直;

[0178] (2) 处于急、慢性感染期间,查体时发现泌尿系、心肺、口咽、五官等感染征象者;现患或有活动性结核病史,或近期与活动性结核患者有过密切接触者;乙型、丙型肝炎或艾滋病患者;

[0179] (3) 有严重心、肝、肾等重要脏器和血液、内分泌系统及多发性硬化病变及病史者;

[0180] (4) 曾接受过抗TNF药物治疗或3个月内参加过任何药物临床试验;

[0181] (5) 恶性肿瘤患者或有家族史的易感人群;

[0182] (6) 炎性肠病、活动性前葡萄膜炎或银屑病患者;

[0183] (7) 妊娠和哺乳期的女性患者。

[0184] 1.4药物及给药方式

[0185] 注射用依那西普(辉瑞药业),25mg/支,皮下注射,每周2次(剂量为25mg/次)。

[0186] 1.5Gal指标检测

[0187] 收集上述实验对象TNF- α 抑制剂治疗前后的样本(治疗后样本采集时间为给药后12周,详见1.6.2),检测Gal指标。具体检测方法如下:

[0188] 1.5.1从筛查对象的血液样本中纯化IgG

[0189] 参照Thermo Fisher Scientific Protein A Spin Plate for IgG Screening用户手册实施,具体如下:

[0190] 1.将纯化柱和缓冲溶液(结合缓冲溶液和淋洗缓冲溶液)于室温下平衡30分钟;

[0191] 2.取下纯化柱底部的盖子,将其放置在洗涤板上,取下纯化柱顶部的盖子,在每个孔中加入200 μ l结合缓冲液平衡;

[0192] 3.将以上组装装置500g转速离心2分钟;重复步骤(2)和(3)各1~2次;

[0193] 4.混合70 μ l血清与100 μ l结合缓冲溶液,加入纯化柱的孔中;室温下孵育纯化柱30-60分钟;

[0194] 5. 500g离心纯化柱2分钟,收集样品溶液(置于96孔板),重复上样1~2次;

[0195] 6.将纯化柱放在洗涤/收集板上,每孔中加入400 μ l结合缓冲溶液,500g离心2分钟,本步骤重复3次;

[0196] 7.收集板每个孔中加入20 μ l结合缓冲溶液,将纯化柱放在收集板上,并在其每个孔中加入200 μ l淋洗缓冲溶液,孵育1分钟,以500g的转速离心2分钟,重复此步骤2次;用BCA试剂盒检测收集样品,确定IgG所处的收集液,收集纯化出的IgG蛋白;

[0197] 8.在纯化柱的每个孔中加入400 μ l淋洗缓冲溶液,洗涤2次,再用400 μ l 0.02%的叠氮化钠洗涤三次,使纯化柱再生;

[0198] 9.在纯化柱的每个孔中加入100 μ l叠氮化钠或结合缓冲溶液,盖上盖子,放入可密封的袋子中4℃保存。

[0199] 1.5.2糖链的分离和纯化

[0200] (A) 通过糖苷酶处理,从IgG中游离糖链

[0201] 1. 预先用70%的乙醇洗涤96孔板,再用超纯水洗涤;将混合纯化的IgG样品溶液与糖苷酶(New England Biolabs公司,0705s),上述混合液加入96孔板(Corning,3504),37℃反应12-24小时游离糖链。

[0202] (B) 糖链的分离和纯化

[0203] 用含0.1% (v/v) 三氟醋酸的80% (v/v) 的乙腈水溶液活化含石墨化碳的96孔板后,用0.1%的三氟醋酸水溶液平衡各孔;然后将酶解样品的96孔板与含石墨化碳的96孔板组装,1000g离心2min;去离子水洗涤杂质和盐分,最后用含0.05% (v/v) 的三氟醋酸的25% (v/v) 乙腈水溶液洗脱糖链并收集洗脱溶液。

[0204] 1.5.3糖链的荧光标记

[0205] 1. 将纯化的糖链溶液及标准品溶液($\text{Gal}_0/\text{Gal}_2=1:1, \text{m/m}$)冻干或者真空悬干;

[0206] 2. 将3 μl 含有50mg/ml 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)、60mg/ml氰基硼氢化钠的DMSO/HAc(7/3, v/v)溶液加入到步骤1所得干燥的糖链中,同时设置空白对照;

[0207] 3. 将步骤2所得样品及空白对照涡旋离心后于37℃条件下孵育17-24小时;

[0208] 4. 加30-50 μl 超纯水于步骤4所得样品管中,混匀,13000rpm,4℃离心10-15分钟,转移上清液到合适的样品瓶中,标记后进行超高效液相(UPLC)分析。

[0209] 1.5.4糖链的超高效液相定量分析

[0210] 仪器及参数设置

[0211] 超高效液相色谱仪(Waters ACQUITY UPLC H-Class),色谱柱(ACQUITY UPLC® BEH Amide, 2.1 $\times$ 100mm, 1.7 μm , Waters),流动相为pH 4.5的100mM甲酸铵溶液和乙腈,柱温为60℃,流速为500 $\mu\text{l/min}$ 速为M5⁻¹, λ_1 速为M5rsmm, λ_2 速为M5rsmm,分析时间为25.67min,液相条件为梯度洗脱(0~25.67min, 78%~55.9%乙腈(纯溶液)。以100mM甲酸铵为流动相A,纯乙腈为流动相B,梯度洗脱,根据梯度洗脱条件,由液相泵自动控制两种流动相的比例。

[0212] 1.5.5两种类型半乳糖化糖链色谱峰的确定方法

[0213] 在色谱图中,不同半乳糖化的糖链(Gal_0 、 Gal_2)的保留时间不同,将样品的谱图与2-AB标记的寡糖标准品谱图叠加对比,确定样品色谱图中 Gal_0 、 Gal_2 的保留时间。

[0214] 1.5.6半乳糖化程度的判断方法

[0215] 利用UPLC对筛查对象血清IgG表面双天线复杂型N糖链末端半乳糖化程度进行定量分析比较,根据峰高或峰面积的大小计算血清的双天线复杂型N糖链末端去半乳糖与半乳糖糖链丰度比值(Gal 指标,GI),并以此作为IgG表面半乳糖化量变指标。以下实施例中所用计算公式为:

[0216] $\text{GI} = [\text{Gal}_0/\text{Gal}_2]$

[0217] 以上所有血清检测 and 数据处理均在双盲条件下实施。

[0218] 1.6疗效观察指标和结果判定

[0219] 1.6.1观察指标

[0220] BASDAI、BASFI(强直性脊柱炎功能指数)、患者总体评价(PGA),夜间背痛和总体背痛VAS评分。VAS评分标准:0分,无痛;1-3分,轻度疼痛;4-6分,中度疼痛;7-10分,重度疼痛。

[0221] 1.6.2TNF- α 抑制剂治疗疗效结果判定

[0222] 经过12周的治疗,依据强直性脊柱炎疗效评价标准(ASAS)判定疗效[Sengupta R, Stone MA. The assessment of ankylosing spondylitis in clinical practice. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3 (9): 496-503.]

[0223] 根据疗效观察指标,综合评估TNF- α 抑制剂疗效。

[0224] 将同时满足以下2个条件的患者判定为TNF- α 抑制剂治疗显效(ASAS20):

[0225] (1) 以下4个指标中有3项获得20%以上改善,或改善幅度至少1分(VAS评分0-10):

①BASFI;②PGA;③夜间痛和脊柱痛VAS评分;④BASDAI (Bath强直型脊柱炎性疾病活动性指数)中最后两项与晨僵相关的VAS平均评分;

[0226] (2) 另一项指标与治疗前基线相比无恶化。

[0227] 反之,其余人群判定为TNF- α 抑制剂治疗无效组。

[0228] 以上所有数据处理均在双盲条件下实施。

[0229] 2.5中提及的ASAS50是指:

[0230] (1) 以下4个指标中有3项获得50%以上改善,或改善幅度至少2分(VAS评分0-10):

①BASFI;②PGA;③夜间痛和脊柱痛VAS评分;④BASDAI (Bath强直型脊柱炎性疾病活动性指数)中最后两项与晨僵相关的VAS平均得分;

[0231] (2) 另一项指标与治疗前基线相比无恶化。

[0232] 1.7结果

[0233] 1.7.1AS患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定

[0234] AS患者111例,根据疗效观察指标ASAS20判定TNF- α 抑制剂治疗是否有效。如表1所示,有效率为72.97%。据此,将患者分为TNF- α 抑制剂治疗高敏组和TNF- α 抑制剂治疗低敏组,其中高敏组81人,低敏组30人。两组病人治疗前Gal指标值差异极显著。

[0235] 表1:AS患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定

[0236]	强直性脊柱炎人群	N(例数)	Gal 指标 (平均值 $\pm$ SEM)	P
	TNF- α 抑制剂高敏组	81	5.039 $\pm$ 0.278	<0.01
	TNF- α 抑制剂低敏组	30	2.417 $\pm$ 0.141	

[0237] 1.7.2Gal指标对AS患者TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组的区分

[0238] 分析治疗前Gal指标对TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组的区分情况:受试者工作特征曲线(ROC)的分析结果表明,Gal指标是一个很好的区分AS患者TNF- α 抑制剂敏感性的检测指标。数据分析结果显示,Gal指标的曲线下面积(AUC)值为0.9418(95%CI, 0.9004至0.9831)。参照AUC的判定标准(如下),本指标作为诊断指标高度准确。

[0239] AUC(area-under-the-curve)的判定标准(Clin.Chem.2007,53:1615-22.):ROC曲线在临床中常用于比较判断诊断指标对疾病的识别能力。理论上,当AUC $\geq$ 0.9时,该诊断指标被认为是“高度准确”;当AUC介于0.7 $\leq$ AUC<0.9和0.5<AUC<0.7时,分别为“适用”和“无效”。

[0240] 在截断值设置为3.065的情况下,Gal指标可以很好地区分TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组,灵敏性达到了90%,特异性则为87.65%(参见图1)。

[0241] 以上结果表明,Gal指标在治疗前能够很好的区分TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑

制剂低敏组,提示该指标可以用于AS患者TNF- α 抑制剂治疗的敏感性筛查。

[0242] 实施例2.Gal指标用于强直性脊柱炎患者TNF- α 抑制剂治疗的疗效监测

[0243] 2.1试验目的

[0244] 判定Gal指标用于强直性脊柱炎患者TNF- α 抑制剂治疗后病情监测和疗效评估中的意义。

[0245] 2.2试验内容

[0246] 收集对111例强直性脊柱炎患者依那西普治疗前和治疗过程中的血清,检测其中Gal指标的变化,与患者的病情变化情况联合评估,判断Gal指标在AS患者病情监测和疗效评估中的意义。

[0247] 2.3样本

[0248] 同实施例1。

[0249] 2.4Gal指标检测

[0250] 2.4.1Gal指标

[0251] 同实施例1。

[0252] 2.4.2Gal指标变化率 (Gal指标RR) 计算方法

[0253] $\text{Gal指标RR} = \Delta \text{Gal指标} / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$

[0254] $= (\text{Gal指标}_{\text{治疗前}} - \text{Gal指标}_{\text{治疗后}}) / \text{Gal指标}_{\text{治疗前}} \times 100\%$ 。

[0255] 其中, Δ Gal指标表示治疗前后Gal指标的变化。

[0256] 按照Gal指标RR变化程度的不同,将Gal指标的变化分为RR 0 (变化率 $\leq 5\%$)、Gal指标RR I ($>5\% \sim 20\%$)、Gal指标RR II ($>20\% \sim 35\%$)、Gal指标RR III ($>35\%$)。

[0257] 2.5疗效判定

[0258] $< \text{ASAS20}$ (表明无明显疗效), ASAS20 (表明有效), ASAS50 (表明疗效显著)。

[0259] 2.6统计学方法

[0260] 采用秩和检验结合完全随机设计方差分析。首先根据检验秩和结果,证实每组之间是否有统计学差异;同时根据秩和检验秩次均值,直观评价各组疗效。

[0261] 2.7结果

[0262] 表2.AS患者Gal指标RR与疗效相关性评估

Gal 指标 RR 分级	例数	ASAS			平均秩次值 (Mean Rank)
		<20	20	50	
0	11	11	0	0	15.50
I	25	15	7	3	30.36
II	52	4	12	36	66.62
III	23	0	1	22	79.74
总数	111	30	20	61	-----

[0264] Chi-square, 62.987; df, 3; $p < 0.01$

[0265] 结果表明,随着Gal指标RR级别的增高,患者在无明显疗效 ($< \text{ASAS20}$)、 ASAS20 、

ASAS50中的分布逐渐增多,秩和检验证实每组之间存在统计学差异。如表2所示,平均秩次值(Mean Rank)随着Ga1指标RR级别增高逐渐增高。以上结果一方面表明Ga1指标的变化能够反映疾病的缓解程度,另一方面也表明该指标能够用于AS的疗效评估。

[0266] 实施例3.Ga1指标用于类风湿性关节炎(RA)患者TNF- α 抑制剂治疗敏感性筛查

[0267] 3.1试验目的

[0268] 判定Ga1指标用于类风湿性关节炎患者TNF- α 抑制剂敏感性筛查的意义。

[0269] 3.2试验内容

[0270] 对98例类风湿性关节炎患者进行依那西普治疗,收集治疗前和治疗过程中的血清,检测其中Ga1指标的变化,结合临床疗效评估,判断Ga1指标在TNF- α 抑制剂治疗敏感性筛选中的意义。

[0271] 3.3病例样本情况

[0272] 3.3.1血清样本对应病例遵循的纳入原则

[0273] (1) 年龄为18~65岁,性别不限;

[0274] (2) 符合1987年美国风湿病协会(ACR)制定的RA分类标准;

[0275] (3) 经过非甾体抗炎药和2种以上抗风湿药治疗6个月以上或1年以上,病情处活动期,未经过任何其他生物制剂治疗,4周内未使用糖皮质激素治疗。

[0276] 3.3.2血清样本对应病例遵循的排除标准

[0277] (1) 严重心、肝、肾损害及血液、内分泌疾病、急慢性感染、既往活动性结核;

[0278] (2) 曾接受过抗TNF药物治疗或3个月内参加过任何药物临床试验;

[0279] (3) 恶性肿瘤患者或有家族史的易感人群;

[0280] (4) 妊娠和哺乳期的女性患者。

[0281] 3.4药物及给药方式

[0282] 注射用依那西普(益普赛,中海中信国建药业有限公司,S20050058),25mg/瓶,皮下注射,每周2次(剂量为25mg/次)。

[0283] 3.5Ga1指标检测

[0284] 同实施例1的1.5部分。

[0285] 3.6疗效观察指标

[0286] 根据美国风湿病学会疗效评价标准(ACR)指定标准ACR 20,疾病活动程度评价选用DAS28。ACR 20要求肿胀和触痛关节计数改善达20%,且以下几个参数中至少有3个改善达到20%:1) 患者的整体评估;2) 医生的整体评估;3) 患者对疼痛程度评估;4) 功能的丧失程度;5) ESR\CRP的水平。

[0287] 3.7结果

[0288] 3.7.1RA患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定

[0289] RA患者98例,根据疗效观察指标判定TNF- α 抑制剂治疗是否有效。如表3所示,有效率为76.53%。据此,将患者分为TNF- α 抑制剂治疗高敏组和TNF- α 抑制剂治疗低敏组,其中高敏组75人,低敏组23人。两组Ga1指标值差异极显著。

[0290] 表3:RA患者TNF- α 抑制剂治疗结果判定

[0291]

类风湿性关节炎人群	N(例数)	Gal 指标 (平均值±SEM)	P
TNF- α 抑制剂高敏组	75	5.234 ± 0.287	<0.01
TNF- α 抑制剂低敏组	23	2.442 ± 0.176	

[0292] 3.7.2Gal指标对RA患者TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组的区分

[0293] 分析治疗前Gal指标对TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组的区分情况:受试者工作特征曲线(ROC)的分析结果表明,Gal指标是一个很好的区分RA患者TNF- α 抑制剂敏感性的指标。数据分析结果显示,Gal指标的曲线下面积(AUC)值为0.9441。在截断值设置为3.065的情况下,Gal指标可以很好地区分TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组,灵敏性达到了86.96%,特异性则为93.33%(参见图2)。

[0294] 结果表明,Gal指标能够很好的在治疗前区分RA患者TNF- α 抑制剂高敏组和TNF- α 抑制剂低敏组,提示该指标可以用于RA患者TNF- α 抑制剂治疗的敏感性筛查。

[0295] 实施例4.Gal指标用于类风湿性关节炎患者TNF- α 抑制剂治疗的疗效监测

[0296] 4.1试验目的

[0297] 判定Gal指标在类风湿性关节炎患者TNF- α 抑制剂治疗的病情监测和疗效评估中的意义。

[0298] 4.2试验内容

[0299] 对98例类风湿性关节炎患者进行依那西普治疗,收集治疗前和治疗过程中的血清,检测其中Gal指标的变化,临床评估疗效,判断Gal指标变化与临床疗效的相关性。

[0300] 4.3样本

[0301] 同实施例3。

[0302] 4.4药物和给药方式

[0303] 同实施例3

[0304] 4.5Gal指标检测

[0305] 1) Gal指标计算方法:同实施例1;

[0306] 2) Gal指标RR (Gal指标变化率) 计算和分级方法:同实施例2。

[0307] 4.6疗效量化分级标准

[0308] 参照1987年美国风湿病学会疗效评价标准(ACR),根据ACR20、ACR50对患者治疗后状态进行分级(Arnett FC,Edworthy SM,Bloch DA等,The American Rheumatism Association 1987revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J].Arthritis Rheum,1988:31(3):315-324)。

[0309] 4.7统计学方法

[0310] 采用秩和检验(Kruskal-Wallis Test)。首先根据秩和检验结果,证实每组之间是否有统计学差异;同时根据秩和检验秩次均值,直观评价各组疗效。

[0311] 表4.RA患者Gal指标RR与疗效相关性评估

[0312]

Gal 指标 RR 分级	例数	ACR			平均秩次值 (Mean Rank)
		<20	20	50	
0	15	14	1	0	13.67
I	20	7	8	5	37.63
II	44	2	18	24	56.32
III	19	0	0	19	74.50
合计	98	23	27	48	-----

[0313] Chi-square, 52.464; df, 3; $p < 0.01$ 。

[0314] 结果表明,随着Gal指标RR级别的增高,患者在无明显疗效(<ACR20)、ACR20、ACR50中的分布逐渐增多,秩和检验证实每组之间存在统计学差异。如表4所示,平均秩次值(Mean Rank)随着Gal指标RR级别增高逐渐增高。以上结果一方面表明Gal指标的变化能够反应疾病的缓解程度,另一方面也表明该指标能够用于RA的疗效评估。

[0315] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

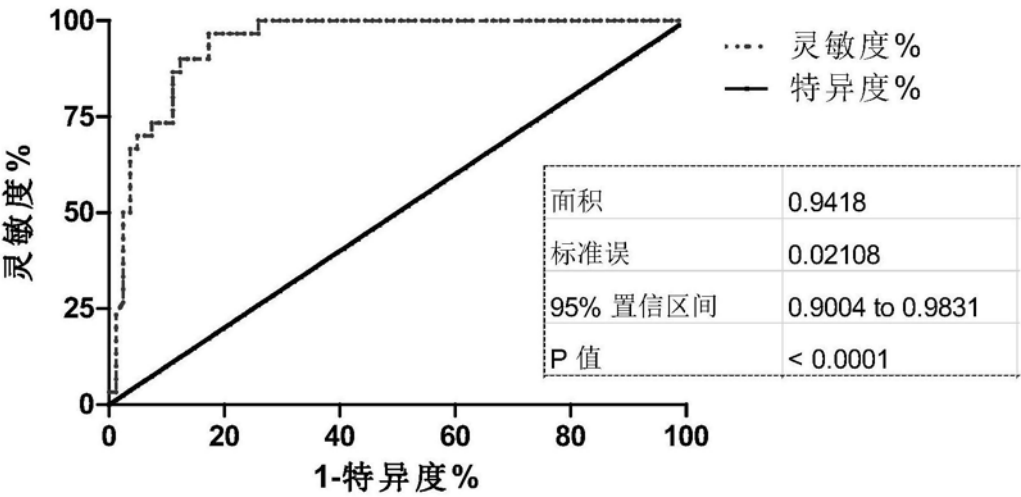


图1

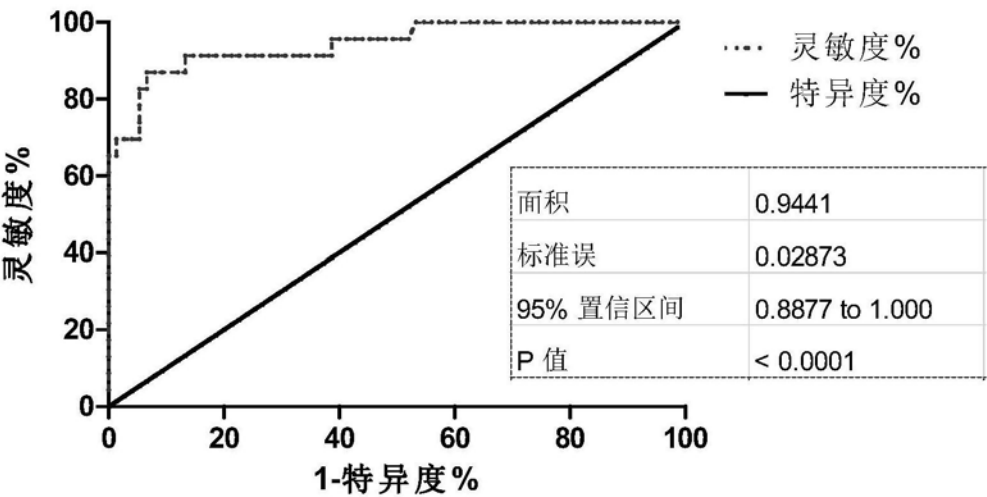
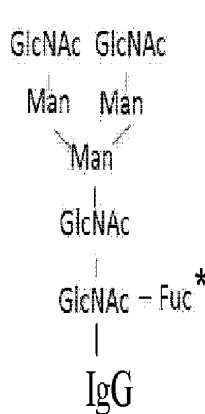


图2

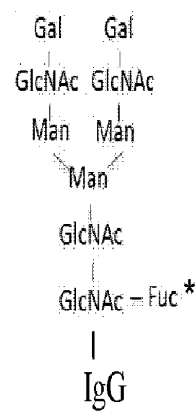
专利名称(译)	Gal指标在自身免疫疾病治疗敏感性和疗效评估中的应用		
公开(公告)号	CN106596827B	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN2017110057969.6	申请日	2017-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	上海知先生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海知先生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海知先生物科技有限公司		
[标]发明人	顾建新 任士芳 孙琳琳 周蕾 张兴旺		
发明人	顾建新 任士芳 孙琳琳 周蕾 张兴旺		
IPC分类号	G01N30/88 G01N30/06 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/66		
CPC分类号	G01N30/06 G01N30/88 G01N33/48 G01N33/5302 G01N33/5304 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/66 G01N2030/062 G01N2030/8822 G01N2030/8836 G01N2800/24		
代理人(译)	杨昀		
审查员(译)	洪川		
其他公开文献	CN106596827A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了Gal指标在自身免疫疾病治疗敏感性和疗效评估中的应用，具体涉及一种通过检测血液中免疫球蛋白G表面双天线复杂型N糖链末端半乳糖指标及其变化对自身免疫性疾病的治疗进行敏感性预测和筛选、对病情进行监测和/或对疗效进行评估的产品、应用及方法。



Gal₀ 示例



Gal₂ 示例