



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108885208 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201780016632.9

G·华尔斯特罗姆 J·朴

(22)申请日 2017.01.11

W·罗姆 W·帕斯

(30)优先权数据

62/277,786 2016.01.12 US

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 余颖 杨昀

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.11

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/013037 2017.01.11

C07K 16/32(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/123648 EN 2017.07.20

(71)申请人 代表亚利桑那州立大学的亚利桑那

校董会

地址 美国亚利桑那州

申请人 纽约大学

(72)发明人 J·拉比尔 裘雯 王杰

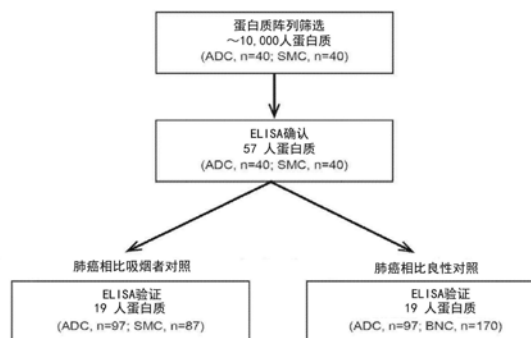
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

用于肺癌诊断的血浆自身抗体生物标志物

(57)摘要

采用蛋白阵列的免疫-蛋白组学筛选AAb应答鉴定到两组Aab(抗原/抗体复合物),潜在地,这两组Aab可区分肺腺癌与吸烟者对照以及CT阳性良性肺病。优点之一在于,所得生物标志物表现出很高的特异性,因此,CT筛查阳性和血清检测阳性的高风险者应当接受更高侵入性的检查如穿刺活检,为了癌症的及时诊断。



1. 一种检测肺癌的方法,包括以下步骤:

可能含有自身抗体(AAb)的患者样品与抗原组接触,如果所述AAb结合所述组内的抗原则由此体外形成抗原/AAb复合物,所述抗原组选自以下所述的一项或多项:TTC14、VPS72、CTTNBP2NL、TSPYL2、ACTL6B、ACVR2B、BRAF、KLF8、BAT4、C12ORF50、IQCE、CSPP1、KRT8、MORC2、FAM76A、NF2、TLK1、P53(TP53)和NYES01(CTAG1B);和

检测所述抗原/AAb复合物中任一种与对照比较。

2. 如权利要求1所述的方法,所述抗原组包括TTC14、BRAF、ACTL6B、MORC2和CTAG1B。

3. 如权利要求1所述的方法,所述抗原组包括TTC14、BRAF、KLF8、TLK1、和KRT8。

4. 如权利要求3所述的方法,所述抗原组和所述对照提供肺腺癌与良性细胞之间的区分。

5. 如权利要求1所述的方法,如果患者的肺癌CT筛查和血清试验都呈阳性则还包括其他更高侵入性的检测。

6. 一种确认或质疑肺癌诊断的方法,包括以下步骤:

用患者样品,将抗原组的AAb应答与肺癌患者和CT阳性肺结节患者对所述抗原组的AAb应答相比较,所述抗原组包括TTC14、BRAF、KLF8、TLK1和KRT8。

7. 一种检测肺癌的试剂盒,包含权利要求2中所述的抗原组和说明,所述说明引导将患者样品与所述抗原组接触并进行与所述对照相比较的检测。

8. 一种检测肺癌的试剂盒,包含权利要求3中所述的抗原组和说明,所述说明引导将患者样品与所述抗原组接触并进行与所述对照相比较的检测。

## 用于肺癌诊断的血浆自身抗体生物标志物

[0001] 相关申请交叉援引

[0002] 本申请要求2016年1月12日提交的第62/277,786号美国临时申请的优先权,该临时申请通过援引纳入本文如同在此全文呈现。

[0003] 关于联邦政府资助研发的声明

[0004] 本发明藉美国国立卫生研究院授予的U01CA117374获得政府支持。政府对本发明享有一定权益。

### 技术领域

[0005] 本文涉及肺癌领域的生物标志物复合物及检测。

### 背景技术

[0006] 肺癌死亡率下降与CT筛查相关,使得CT筛查用的越来越多,同时提高了良性肺结节的检出。这些个体中许多接受了不必要的昂贵的侵入性诊疗。所以需要一种伴随诊断来对肺结节个体进行高风险或低风险分级。

[0007] 肺癌长期位居美国癌症死因前列,2014年死亡超过150,000例。肺癌的五年存活率总体仅17%,57%的肺癌确诊已是晚期,这些的五年存活率仅4%。目前,用低剂量计算机断层扫描(CT)对55至74岁具有广泛吸烟史的人群进行筛查。CT扫描被证明有效地将肺癌死亡率降低了20%,但是数百万CT检出的肺结节仍无法确诊是恶性还是良性。

[0008] 据全国肺部筛查临床试验(NLST),CT检出的结节中仅3.6%被确认为肺癌,可见假阳性率颇高。因此需要区分恶性结节与良性结节的诊断试验,改善与CT筛查的联合诊断。

### 发明内容

[0009] 我们是对癌症患者、良性结节患者和健康吸烟者体内体液免疫应答最早的研究之一。我们最先在40名早期肺癌患者和40名吸烟者对照中采用核酸可编程蛋白阵列(NAPPA)鉴定候选癌症特异性自身抗体(AAb),完成了对10,000种全长人蛋白质的血清反应性特征鉴定。在137名肺癌患者和127名吸烟者对照以及170良性肺结节主体中对有希望的候选物进行了ELISA试验。从蛋白质微阵列筛查实验—该实验采用40名患者和40名吸烟者对照的发现集—选出17个肺癌病例中反应性高于对照的抗原用于在大样品集中(n=264)用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行测评。

[0010] 得出一个此前未知的5-AAb分类器(TTC14、BRAF、ACTL6B、MORC2、CTAG1B),能够区分肺癌与吸烟者对照,89%特异性灵敏度为30%。我们还检测了CT阳性良性结节主体(n=170)的AAb应答,得出一个5-AAb组(KRT8、TTC14、KLF8、BRAF、TLK1),88%特异性灵敏度为30%。值得注意的是,基于TCGA数据集,6个AAb靶标(TTC14、BRAF、MORC2、CTAG1B、KRT8、TLK1)的mRNA水平在肺腺癌组织中也升高。因此,我们发现了此前未知的与肺腺癌相关的抗体/抗原复合物即AAb,潜在地,它们区分癌症与CT阳性的良性疾病。

## 附图说明

[0011] 图1:研究方案设计。

[0012] 图2:从蛋白阵列筛查发现的肺癌相关抗原汇总,其中(A)显示蛋白阵列筛查选出的肺癌相关AAb靶标的GO富集分析。胚胎形态发生项有12个基因,其余节点各有3至4个基因。(B)显示肺癌与吸烟者对照相比的差异AAb应答热图。

[0013] 图3:组II各AAb的应答。各自的截止值即良性对照第98百分位值以实线标明。

[0014] 图4:临床因素与AAb应答的多变量分析。A:肺癌和良性对照中吸烟史、AAb应答和结节大小分析。B:肺癌病例中吸烟史、疾病分期和AAb应答分析。(A和B中,吸烟情况的指标是纵坐标所示吸烟指数(pack-year)。结节大小以圆直径代表。)

[0015] 图5:两组中AAb靶标的mRNA表达水平(TCGA)。仅对肺腺癌(ADC)和实体组织正常者(正常)的mRNA水平作图。

## 具体实施方式

[0016] 肺癌可触发宿主免疫应答并诱导抗肿瘤抗原的抗体。本文所述自身抗体(AAb)及其对应抗原的鉴定影响到我们对癌症免疫的认识,可实现早期诊断,甚至对免疫治疗亦有裨益。

[0017] 此前的研究主要基于癌症患者与健康(吸烟者)对照的比较。尤其,此类标志物的检测应当依赖于容易获得的样品,例如血浆或痰涎,因为此类检测可能对接受筛查的个体进行。为此,已经在蛋白质、循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA和循环miRNA的鉴定上进行了大量的努力。

[0018] 血液中许多分子标志物的浓度会非常低,因为它依赖于癌细胞分泌,而癌细胞在临床前数量很低。通常,分泌生物标志物中仅少部分进入血浆,在血浆中,生物标志物被大量的血液所稀释。这样的低浓度造成发现和日常检测困难。

[0019] 另一种策略是利用免疫系统的能力通过产生自身抗体(AAb)来检测肿瘤细胞。抗靶标肿瘤抗原的这些过继免疫系统应答有效放大来自癌组织所释放微量肿瘤蛋白质的信号。

[0020] 我们在此描述最早之一的一项蛋白质组学研究,重点比较肺腺癌(ADC)患者、重度吸烟者(SMC)和良性结节对照(BNC)同质样本集中的血浆AAb应答。我们聚焦一个肺癌亚型来避免异质性并使得以排除亚型间差异。我们从非小细胞肺癌(NSCLC)腺癌亚型患者与年龄、性别、吸烟情况配对对照的无偏癌特异性抗体筛查开始,筛查采用展示约10,000种全长人蛋白质的核酸可编程蛋白阵列(NAPPA)进行。然后在独立的一组病例和对照中对候选肺癌特异性抗体进行评价,组中包括良性肺结节主体。

[0021] 我们鉴定的作为肺癌早期检测潜在生物标志物的19个抗原是:TL14、VPS72、CTTNBP2NL、TSPYL2、ACTL6B、ACVR2B、BRAF、KLF8、BAT4、C12ORF50、IQCE、CSPP1、KRT8、MORC2、FAM76A、NF2、TLK1、P53(TP53)、NYES01(CTAG1B)。我们鉴定了一个AAb组来区分肺癌患者和配对吸烟者对照,89%特异性灵敏度为30%。此外,我们还鉴定了一个AAb组来区分肺癌患者与配对低剂量计算机断层扫描阳性良性对照,88%特异性灵敏度为30%。我们将样品指认为阳性,如果它们超过了组中任一AAb的抗原特异性截止值。AAb特异性截止值定为AAb各

自98%特异性的水平。

[0022] 表1.所选AAb的发现和验证统计学数据

[0023]

抗原	发现		验证		验证	
	(ADC, n=40; SMC, n=40)	(ADC, n=97; SMC, n=87)	(ADC, n=97; BNC, n=170)	(ADC, n=97; BNC, n=170)	(ADC, n=97; BNC, n=170)	(ADC, n=97; BNC, n=170)
	灵敏度	特异性	灵敏度	特异性	灵敏度	特异性
TTC14	17.5%	97.5%	11.3%	97.7%	5.2%	97.6%
VPS72	17.5%	97.5%	0.0%	97.7%	2.1%	97.6%
[0024]						
CTTNBP2NL	15.0%	97.5%	3.1%	97.7%	2.1%	97.6%
TSPYL2	15.0%	97.5%	2.1%	97.7%	1.0%	97.6%
ACTL6B	15.0%	97.5%	3.1%	97.7%	2.1%	97.6%
ACVR2B	15.0%	97.5%	4.1%	97.7%	2.1%	97.6%
BRAF	12.5%	97.5%	5.2%	97.7%	6.2%	97.6%
KLF8	12.5%	97.5%	1.0%	97.7%	5.2%	97.6%
BAT4	12.5%	97.5%	0.0%	97.7%	0.0%	97.6%
C12ORF50	10.0%	97.5%	2.1%	97.7%	2.1%	97.6%
IQCE	10.0%	97.5%	4.1%	97.7%	4.1%	97.6%
CSPP1	7.5%	97.5%	1.0%	97.7%	0.0%	97.6%
KRT8	7.5%	97.5%	0.0%	97.7%	7.2%	97.6%
MORC2	7.5%	97.5%	4.1%	97.7%	1.0%	97.6%
FAM76A	7.5%	97.5%	1.0%	97.7%	2.1%	97.6%
NF2	5.0%	97.5%	2.1%	97.7%	2.1%	97.6%
TLK1	5.0%	97.5%	4.1%	97.7%	6.2%	97.6%
TP53	2.5%	97.5%	3.1%	97.7%	4.1%	97.6%
CTAG1B	2.5%	97.5%	9.3%	97.7%	3.1%	97.6%

[0025] 表2.组I各AAb的灵敏度和特异性

抗原	总数(ADC, n=137; SMC, n=127)	
	灵敏度	特异性
[0026] TTC14	12.4%	97.6%
BRAF	8.0%	97.6%
ACTL6B	5.1%	97.6%
CTAG1B	5.1%	97.6%
MORC2	5.1%	97.6%

[0027] 表3. 组II各AAb的灵敏度和特异性.

抗原	总数(ADC, n=137; BNC, n=170)	
	灵敏度	特异性
[0028] KRT8	8.8%	97.6%
TTC14	8.0%	97.6%
[0029] KLF8	7.3%	97.6%
BRAF	6.6%	97.6%
TLK1	5.8%	97.6%

[0030] 采用免疫-蛋白组学方法,我们鉴定了健康人、重度吸烟者对照和肺癌患者中抗体应答的特征。生物信息分析发现显著富集的胚胎形态发生、器官发育(包括肺发育)和受体信号传导相关通路以及丝氨酸/苏氨酸激酶通路。采用包括良性结节主体的扩展样品集用ELISA确认了抗体子集的性能,98%特异性灵敏度为5-10%。发现一个5-AAb组(TTC14、BRAF、ACTL6B、MORC2、CTAG1B),其区分肺癌与有吸烟史高风险对照的89%特异性灵敏度为30%。

[0031] 肺癌与CT阳性肺结节患者的AAb应答比较发现一个相关但不同的5-AAb组(TTC14、BRAF、KLF8、TLK1、KRT8),88%特异性灵敏度为30%。我们还计算了进入验证试验的全部19个候选抗原的灵敏度和特异性,所述验证试验要求良性样本的吸烟史吸烟指数达30或30以上。报道的全部五个候选抗原的98%特异性灵敏度仍然都高于5%,表明他们仍然能够区分肺腺癌与良性对照(不显示)。

[0032] 尽管这些组需进一步验证,它们确实提供了这些具有信息意义的抗原的互补性(complementarities)信息。进一步分析显示,AAb与肿瘤大小、分期和吸烟史没有关联。就我们所知,这是首次采用免疫-蛋白组学方法鉴定可能有助于将CT阳性结节主体分级为良性肺病对照和肺腺癌患者的研究。为了确保分析ELISA结果时应答测算准确,我们还测算了每份血浆样品的支持试剂相关背景,因此是类似研究中最严格的试验。

[0033] 鉴于以上所述,创新之一在于鉴定了19个抗原作为生物标志物用于肺癌的早期检测。其中许多从未与肺癌关联。此外,我们还研发出了标志物组,它们以89%特异性和30%

灵敏度区分肺癌患者与配对吸烟者对照,或者,以88%特异性30%灵敏度区分肺癌患者与CT筛查阳性的良性配对对照。

[0034] 目前,没有临床可用的血检能够区分肺癌患者与计算机断层扫描阳性人群。并且,本文所述Aab复合物和抗原就肺癌检测和患者区分而言是新的。

[0035] 非限定性实施例

[0036] 血浆样品描述

[0037] 共计434份来自NYU的血浆样品,其中,137份肺腺癌,127份有吸烟史的对照和170份良性肺结节(肉芽肿瘤,n=47;肺气肿,n=50;稳定结节,n=73)。全部肺癌样品均于手术室手术期间采集并经病理确认。都未曾接受过治疗。获取后4小时内进行EDTA血浆样品处理并于-80°C冷冻保存。

[0038] 腺癌患者是在NYU癌症中心临床中招募的,均被告知并同意IRB批准的肺癌生物标志物中心肺癌计划#8896(“Lung Cancer Biomarker Center Lung Cancer Protocol#8896”)。我们的对照样本包括入组NYU肺癌生物标志物中心的高风险吸烟者。该队列的平均吸烟史的吸烟指数为42。我们还就吸烟情况与肺癌主体进行了配对,肺癌患者有些从不吸烟。所有对照样本的招募均得到IRB批准。这是一次自愿招募,由罗姆博士(Dr.Rom)及其研究护士通过信件、电话、访问工会初级保健医生和Con Edison。肺癌患者被转到哈维帕斯博士(Dr.Harvey Pass)处接受测评。NYU肺癌生物标志物中心进行低剂量CT-扫描筛查高风险吸烟者,此为国家癌症研究所的早期检测研究计划(National Cancer Institute’s Early Detection Research Program)的一部分。

[0039] 良性结节随访两年无发展。研究对象均无癌症和化疗史。全部对象均按照EDRN规程抽血、接受呼吸量测定、并收集吸烟史问卷调查。按照IASLC协议确定肺癌分期。

[0040] 在用于蛋白阵列实验的发现样本集中,40名肺腺癌患者根据年龄、性别和吸烟史与40名无癌症对照配对。来自发现样本集的40名患者中38位的疾病分期为I期。为了验证的目的,增加了97名不同疾病分期的肺腺癌患者(47%为I期)和87名对照以及170名CT阳性良性肺病患者。

[0041] 蛋白阵列实验

[0042] 开放阅读框从DNASU(<https://dnasu.org/>)获得。蛋白阵列的生产和质控实验按照先前的记载进行。简言之,制造展示10,000种人蛋白质的阵列(均匀分配于5个阵列集)。血浆检测实验采用HS 4800™专业杂交工作站(“Pro hybridization station”) (帝肯(Tecan))进行。简言之,玻片先用SuperBlock(皮尔斯(Pierce)孵育,然后用“一步人偶联体外表达系统”(“1-Step Human Coupled in vitro Expression system”)赛默(Thermo))表达蛋白质。用含Tween 20的含乳5%磷酸盐缓冲液(含乳PBST)封闭后,玻片与血浆样品(1:50,大肠杆菌裂解物制备的5%含乳系预孵2-3小时)于4°C孵育16小时,接着用5%含乳PBST冲液3遍。然后,玻片与Dylight649标记的山羊抗人IgG(杰克森免疫研究实验室“Jackson ImmunoResearch Laboratories”)于23°C孵育1小时。然后对玻片进行清洗、干燥,帝肯(Tecan)扫描仪扫描,扫描设置相同。

[0043] 蛋白阵列图像分析和定量

[0044] 蛋白阵列扫描图用“阵列专业分析仪(“ArrayPro Analyzer”)”(MediaCybernetics公司)来分析。为了捕捉无法由图像分析软件定量的真性抗体应答,两

名研究人员对全部图像进行定性检查来鉴定和确认阳性应答,过程如此前所述。简言之,用“ArrayPro Analyzer”(MediaCybernetics公司)将原始图像调到极高对比度和亮度,据环的强度和形态将每个斑点分为0至5级。

[0045] 候选标志物选择

[0046] 选择视觉分析显示肺腺癌中高频的蛋白质抗原接受进一步ELISA确认。具体地说,它们必须符合全部以下标准:1).它们的ADC中频率减去SMC中频率大于或等于2;2).ADC中频率除以SMC中频率大于或等于1.4。总共选得57个蛋白质抗原。

[0047] 通路分析

[0048] 用Cytoscape和ClueGo插件对全部57个蛋白质进行基因本体论项(term)富集分析,这些蛋白质带有我们的蛋白阵列所展示蛋白的定制注释。将基因符号用作标识符进行分析。节点大小与测得基因数量成正比。节点颜色编排为反映Benjamini-Hochberg校正p值。

[0049] ELISA试验

[0050] 如此前所述,用新生产的人蛋白质通过ELISA试验来确认选出的对蛋白质抗原的AAb应答。简言之,实验前一天,96孔高结合(“highbind”)ELISA板(康宁(Corning))用pH9.4的0.2M碳酸氢钠缓冲液配制的10 $\mu$ g/ml山羊抗GST抗体(GE医疗(GE Healthcare))包被,4 $^{\circ}$ C过夜。全部高通量液体操作作用BioMek NXP实验室自动工作站(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))进行。

[0051] 蛋白质用HeLa细胞裂解物体外转录-翻译系统(赛默科技(Thermo Scientific))生产,然后在5%含乳PBST封闭的GST抗体-包被的ELISA板上进行捕获。然后将血浆样品用5%含乳PBST稀释至1:200,室温下振荡孵育1小时。偶联辣根过氧化物酶的抗人IgG用作二抗(杰克逊实验室(The Jackson Laboratory))。然后,孔板上加入TMB底物(赛默科技(Thermo Scientific))显色15分钟,添加2M硫酸终止反应。用Perkin Elmer读板器测定OD450。用所表达抗原的OD450相对于该样品所有测得抗原的中值OD450计算每份血浆样品-抗原反应(复合物)的ELISA相对吸光度。用中值对各份血浆样品的系统背景进行标准化。

[0052] 统计与数据分析

[0053] 为了将众AAb合并分组,我们以吸烟对照(组I)或良性对照(组II)的第98百分位相对吸光度作为截止值。如果对组内候选者之一的AAb应答超过其对应的截止值,则样本判为肺腺癌阳性。

[0054] 用确认ELISA结果制作热图来展示17个选定靶标在肺癌患者和吸烟者对照中的差异AAb应答。确定每个AAb的热图颜色标度(scale),用R语言gplots程序包来构建。

[0055] 根据对每个抗原的ELISA分析,如果它们超过良性对象值的第98百分位,我们将对象归类为AAb响应者。我们构建了一个多变量逻辑回归模型,用来检测肺癌患者和良性对照中AAb应答与年龄、结节大小和吸烟史的关联性。第二个多变量逻辑回归添加肺癌病情作为独立变量,进一步评价结节大小、肺癌病情与AAb应答之间的关系。我们还构建了一个多变量逻辑回归模型用来分析肺癌患者中AAb应答与肿瘤大、结节情况和肿瘤分期之间的关联。

[0056] 肺腺癌与正常组织之间TCGA mRNA表达水平的比较我们采用魏尔希(Welch's)单边t试验。TCGA肺腺癌数据是用Illumina HiSeq生成的,来自加州大学圣克鲁兹癌症基因组浏览器(“UC Santa Cruz Cancer Genome Browser”(<https://genome-cancer.ucsc.edu/>))

TCGA\_LUNG\_exp\_HiSeqV2-2014-08-22。通过从每个样品中减去每个mRNA的平均值来对全部强度进行标准化。

[0057] 肺腺癌相关候选AAb的鉴定

[0058] 为了鉴定肺腺癌相关候选AAb,我们首先在NAPPA上对40名肺腺癌患者和40名重度吸烟者对照的血浆样品中10,000种全长人蛋白质的抗体进行全面特征分析。基于该阵列数据,我们挑选了57个抗原,它们的AAb应答在肺癌患者中区别于吸烟者对照。对这57个候选AAb靶标的基因本体论富集分析发现它们参与胚胎形态发生、器官发育、激酶信号传导和中间纤维细胞骨架。然后,我们通过使用相同样品的ELISA对这些选出的候选抗原进行评价。根据ELISA,17个抗原被确认在肺癌患者中诱导差异AAb应答,这些进入下一步分析。

[0059] 肺癌患者与健康吸烟者对照中的比较验证

[0060] 为了确认肺癌患者中这17个AAb的水平,我们检测了来自97个病例和87个对照的另184份血浆样品中的这些AAb。此外,根据此前的文献,我们还将TP53和CTAG1B蛋白纳入作为可能的候选者。各个AAb的血清阳性截止值设定为这87个对照样本ELISA吸光度的第98百分位。肺癌患者与吸烟者对照相比较,TTC14、BRAF和CTAG1B的AAb的98%特异性灵敏度高于5%。此外,在全部样本集中,TTC14、BRAF、ACTL6B、MORC2和CTAG1B的AAb的98%特异性灵敏度高于5%。进一步分析这5个抗原,用各个抗原的标准化截止值即高于或等于吸烟者对照相对吸光度第98百分位的相对吸光度,结果发现一个5-AAb组(组I),89%特异性灵敏度为30%。

[0061] 肺癌与良性对照的比较分类

[0062] 为了检验这17个AAb与TP53和CTAG1B的AAb一起是否能够区分肺癌和CT筛查查出的良性疾病,我们对267份血浆样品中这些抗原的AAb应答进行了ELISA分析。如前所述,各个AAb的截止值设定为良性对照相对吸光度的第98百分位值。KRT8、TTC14、KLF8、BRAF、TLK1被确认为相比良性对照与肺癌患者关联。它们的总体98%特异性灵敏度高于5%。

[0063] 进一步分析这5个抗原,用各个抗原的标准化截止值即高于或等于良性对照相对吸光度第98百分位的相对吸光度,结果发现一个5-AAb组(组II),88%特异性灵敏度为30%。然后我们评价了这些候选AAb区分肺癌与良性对照的能力,对照的吸烟史吸烟指数超过30,以此模拟目标人群。以上5个AAb之外,NF2和CTTNBP2NL的AAb也表现为98%特异性灵敏度高于5%。还评价了各个AAb采用不同良性肺结节对象时的灵敏度。

[0064] 患者和疾病特征对AAb阳性率的影响

[0065] 我们比较了吸烟史、肿瘤大小、性别和年龄这些临床风险因子对AAb应答的影响。采用来自组II的明确截止值,AAb响应者与非响应者之间,就性别( $P=0.212$ )、年龄( $P=0.818$ )或吸烟史( $P=0.635$ )而言没有显著差异,但是结节大小被发现与AAb应答显著相关( $P=0.025$ )。由于良性对照与病例未在结节大小上进行匹配,就病情进行调整后,相关性不再具备显著性( $P=0.752$ )。

[0066] 这一结果提示,这些AAb组扩充了肺癌病情信息,并且,观测到的AAb应答与已知风险因子无关。此外,我们还分析了肺癌患者中的AAb应答与患者特征包括吸烟史、肿瘤大小、结节情况和肿瘤分期之间的关联。没有发现这些患者特征与AAb应答之间有显著关联。尽管没有统计学显著性,我们发现TTC14的AAb在I期肺癌中较多,而BRAF的AAb则在II期和III期中较多。

[0067] AAb靶标与其mRNA水平之间的关联

[0068] 我们还用TCGA数据分析了两组蛋白质抗原的组织mRNA水平。8种蛋白质中6种表现为相比正常组织在肺腺癌组织中表达显著升高。这一正交分析确认了我们的发现即这些AAb关联肺腺癌。

[0069] 采用免疫-蛋白组学方法,我们分析了健康、重度吸烟者对照和肺癌患者的抗体应答特征。生物信息分析发现显著富集的胚胎形态发生、器官发育(包括肺发育)和信号传导相关通路和丝氨酸/苏氨酸激酶通路。用包括良性结节对象的扩展样品集用ELISA确认了抗体子集的性能,98%特异性灵敏度为5-10%。

[0070] 我们报道一个5-AAb组(TTC14、BRAF、ACTL6B、MORC2、CTAG1B)区分肺癌与有吸烟史高风险对照的89%特异性灵敏度为30%。肺癌与CT阳性肺结节患者的AAb应答比较发现一个相关但不同的5-AAb组(TTC14、BRAF、KLF8、TLK1、KRT8),88%特异性灵敏度为30%。

[0071] 我们还计算了进入验证试验的全部19个候选抗原的灵敏度和特异性,所述验证试验要求良性样本的吸烟史吸烟指数达30或30以上。报道的全部五个候选抗原的98%特异性灵敏度仍然都高于5%,表明他们仍然能够区分肺腺癌与良性对照(不显示)。尽管这些组需进一步验证,它们确实提供了这些具有信息意义的抗原的互补性(complementarities)信息。进一步分析显示,AAb与肿瘤大小、分析和吸烟史没有关联。

[0072] 尚不清楚哪些因素决定这些体液免疫应答的发生。假设AAb应答与相应蛋白质靶标的组织过表达相关联,则蛋白质过表达的患者中仅少部分会产生可测水平的AAb应答。我们还在TCGA肺腺癌数据集中分析了这些AAb靶标的mRNA水平。两组8种蛋白质中有6种的mRNA表达在肺腺癌组织中显著升高。这一发现不仅提示肺腺癌中AAb的产生可能是蛋白质过表达的结果,而且正交证明了这些AAb与肺腺癌关联。

[0073] 本项研究的优势包括采用了来自吸烟者对照以及CT阳性良性肺病对照的配对早期(I期)NSCLC腺癌的大量血浆样品。我们还采用了具有高度再现性的蛋白阵列来无偏高通量筛选候选AAb,由此发现了高信息量的通路,这些通路涉及发育过程和激酶信号传导。

[0074] 为了评价这些AAb的性能,我们在大样本集中采用具有临床相关性的ELISA试验,并进行了独立盲测。我们的结果与TCGA mRNA表达数据也一致。本项研究的一个局限在于,研究开始时我们没有将患者随机分成发现集和验证集。这导致验证集中晚期样本居多。未来有必要用早期样本进行验证来确认我们的标志物的性能。尽管这是目前肺癌领域最大的自身抗体研究之一,并且是唯一采用患者和CT筛查良性对照的研究,我们的样本数量仍然偏小从而无法在多变量分析中得出确定的结论。我们的研究聚焦组织学上同质的腺癌患者。然而,我们承认,未来需要进一步在按照组织学亚型和分子亚型分级的腺癌亚型中研究和评价AAb应答和疾病的异质性。此外,本项研究依赖于对野生型蛋白进行的针对肺癌关联抗体的蛋白组筛选。随着编码具有已知癌症相关突变的蛋白质的cDNA克隆的获得,进一步包括这些将是有益的。

[0075] 概括来说,我们用蛋白阵列进行了AAb应答的免疫-蛋白组学筛选,鉴定到两组AAb,潜在地,它们能够区分肺腺癌与吸烟者对照以及CT阳性良性肺病。BRAF,一个推定致癌基因,还被发现在肺癌患者中诱发体液免疫应答。就本项研究而言,我们聚焦高特异性标志物,因此,CT筛查阳性和血清检测阳性的高风险对象应当接受更高侵入性的检查例如穿刺活检,为了癌症的及时诊断。

[0076] 权利要求不应局限到本文中的具体实施方式和实施例。

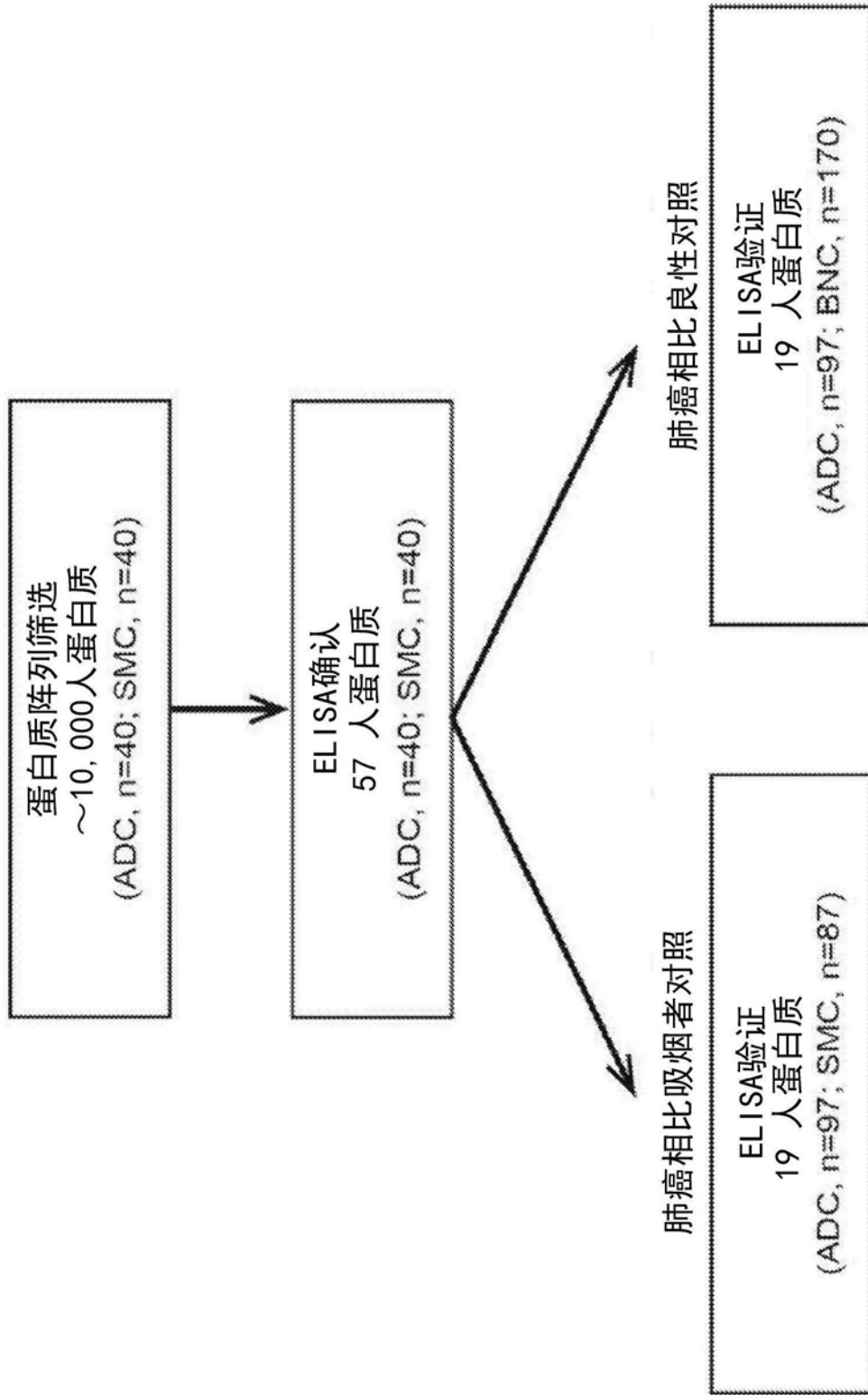


图1

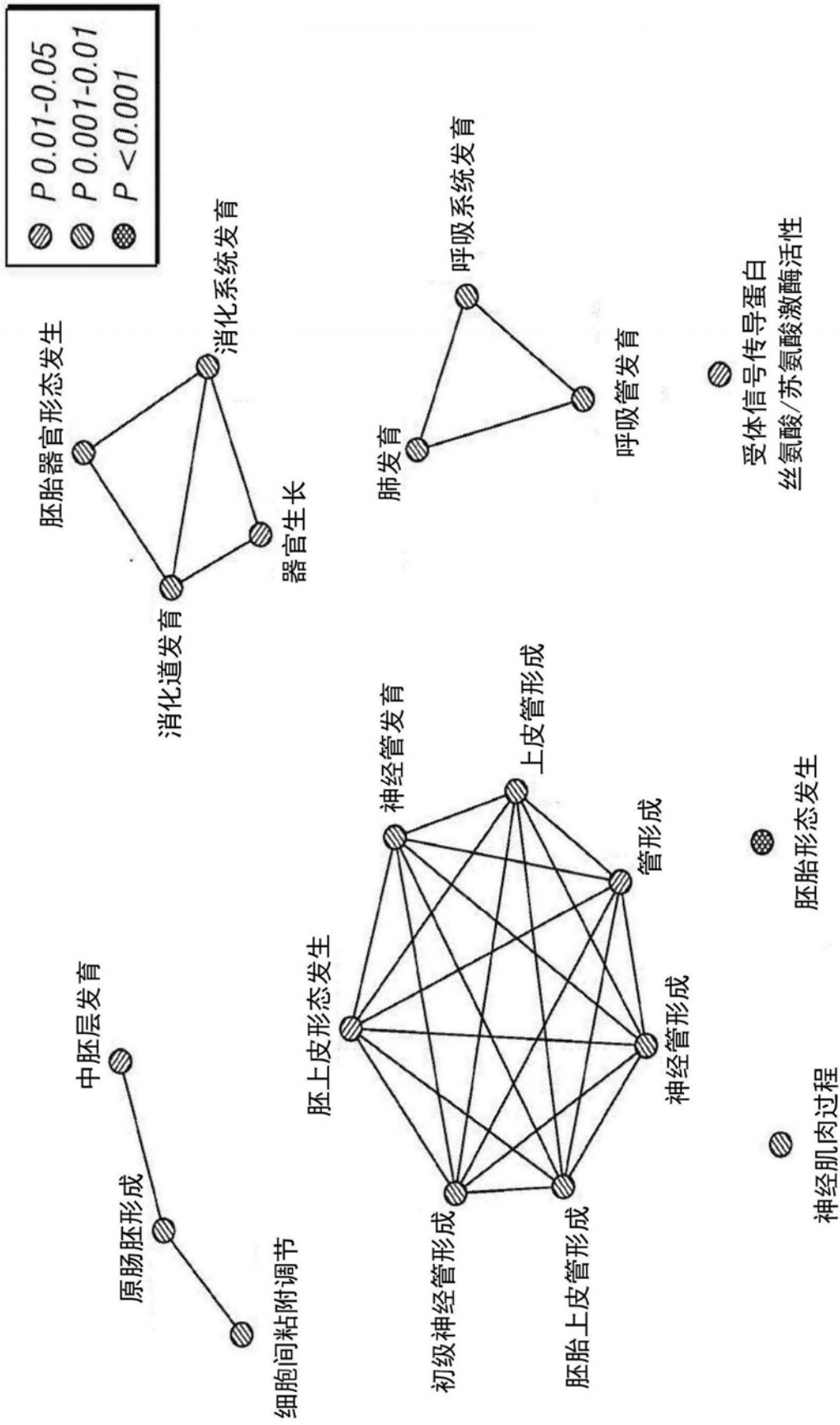


图2A

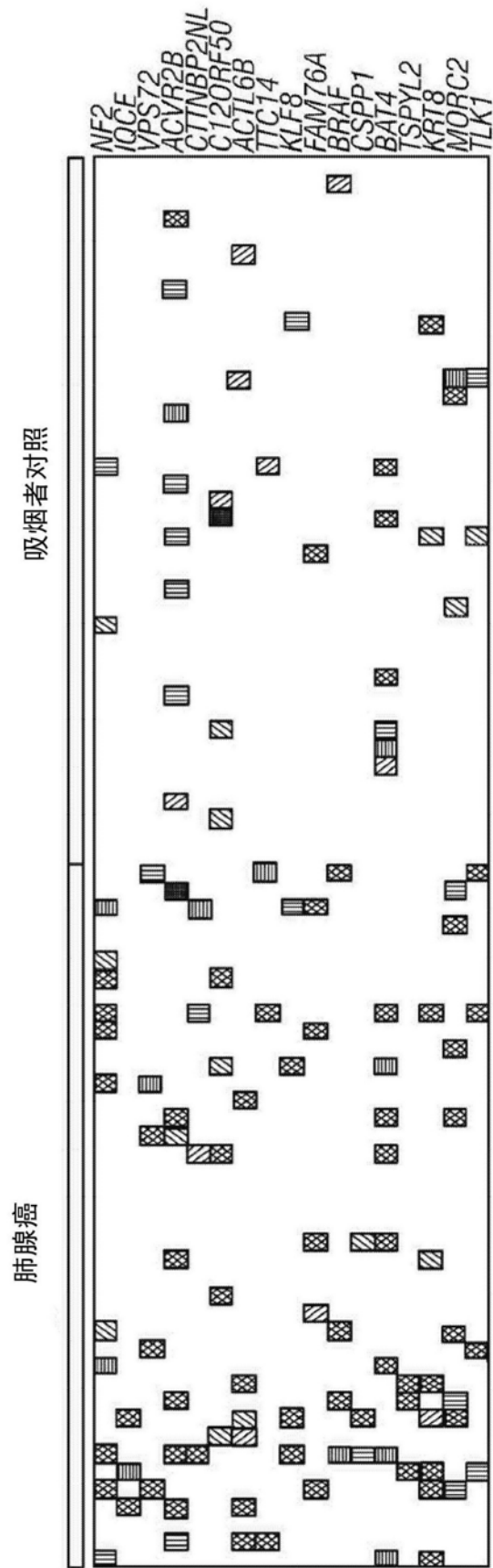


图2B

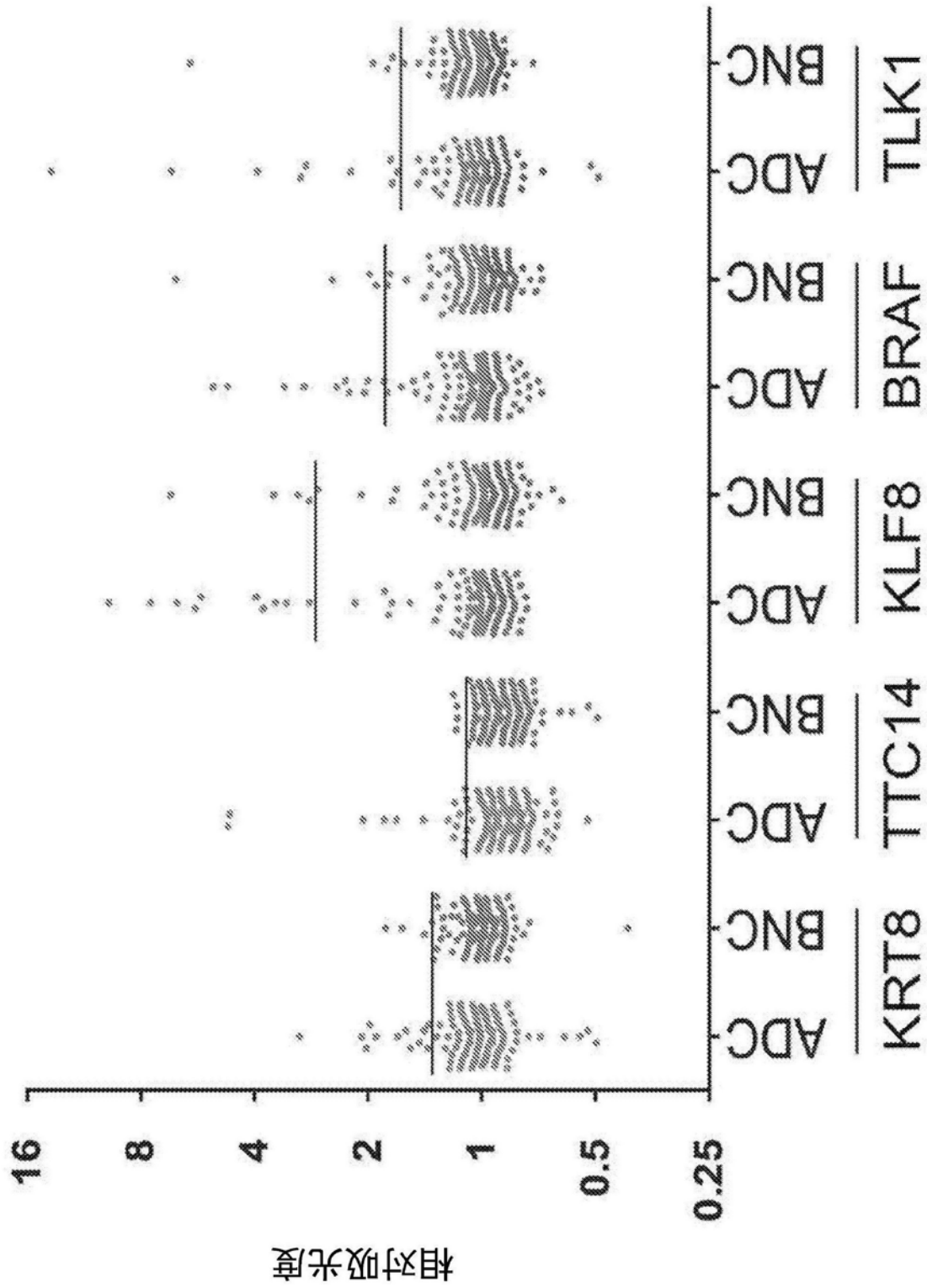


图3

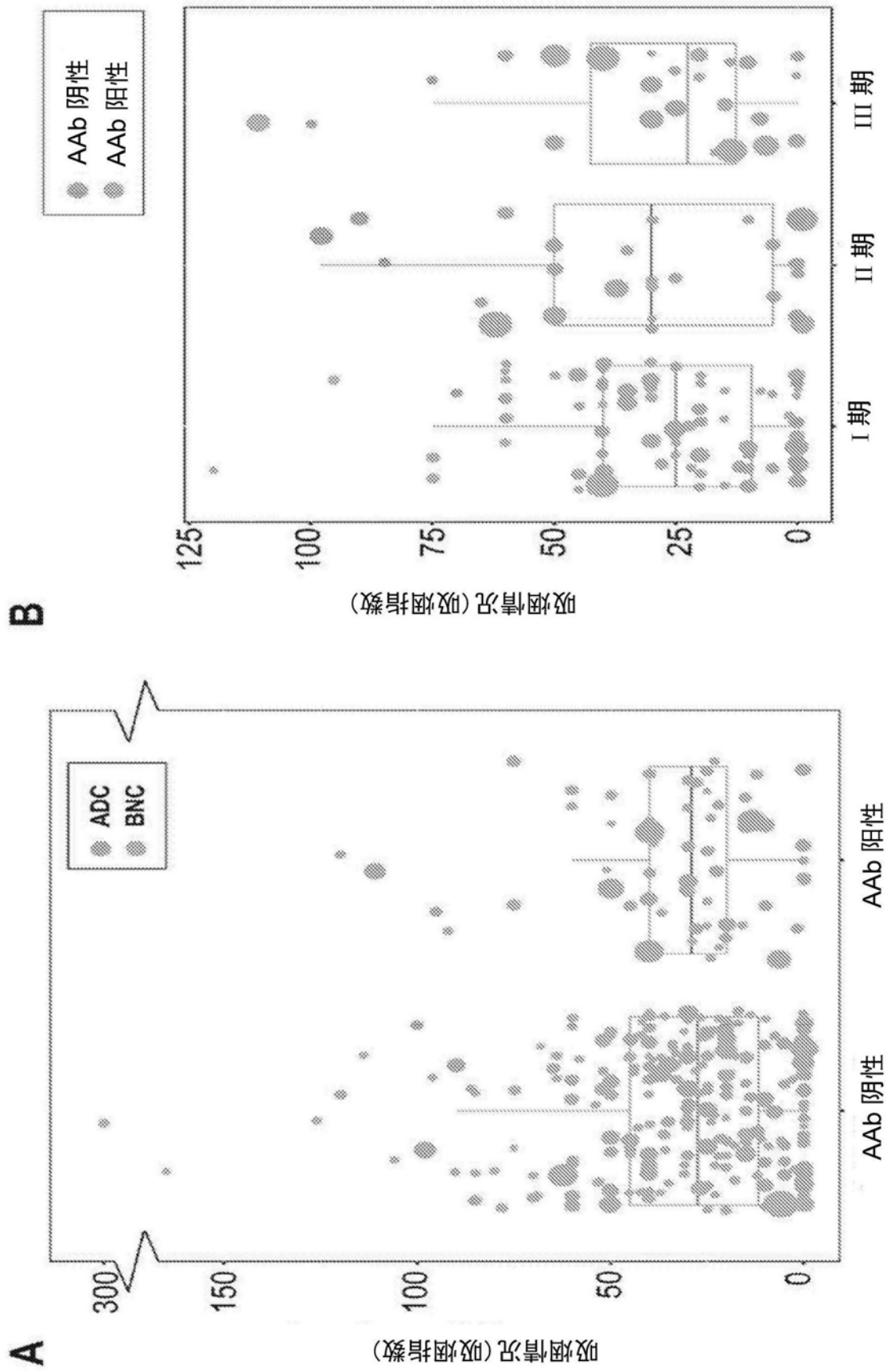


图4

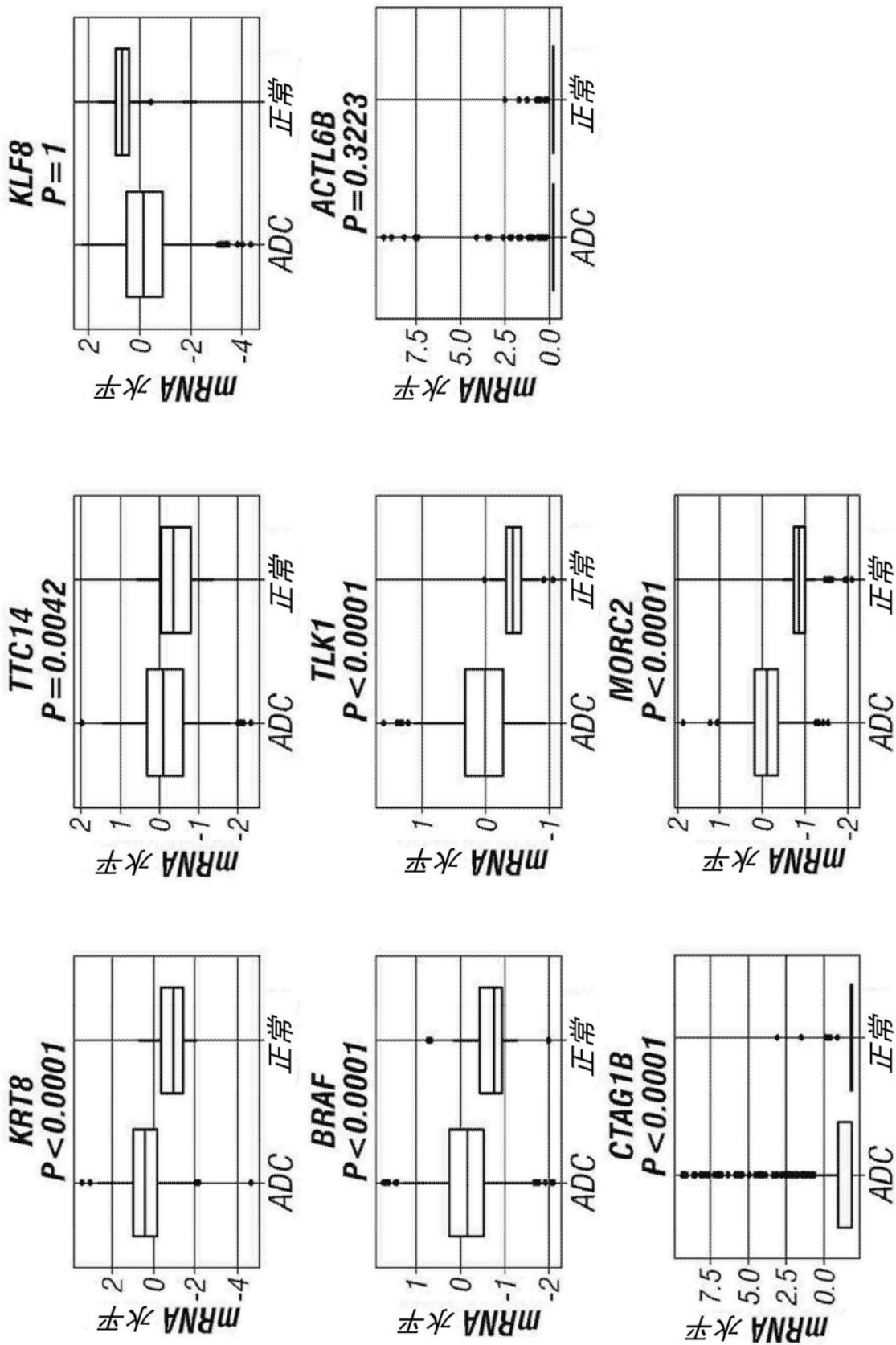


图5

专利名称(译)	用于肺癌诊断的血浆自身抗体生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">CN108885208A</a>	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201780016632.9	申请日	2017-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	代表亚利桑那州立大学的亚利桑那校董会 纽约大学		
申请(专利权)人(译)	代表亚利桑那州立大学的亚利桑那校董会 纽约大学		
当前申请(专利权)人(译)	代表亚利桑那州立大学的亚利桑那校董会 纽约大学		
[标]发明人	J·拉比尔 王杰 J·朴		
发明人	J·拉比尔 裘霁 王杰 G·华尔斯特罗姆 J·朴 W·罗姆 W·帕斯		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/32		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/564 G01N33/57423 G01N2800/56 G01N2800/60		
代理人(译)	余颖 杨昀		
优先权	62/277786 2016-01-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

采用蛋白阵列的免疫-蛋白组学筛选AAb应答鉴定到两组Aab(抗原/抗体复合物), 潜在地, 这两组Aab可区分肺腺癌与吸烟者对照以及CT阳性良性肺病。优点之一在于, 所得生物标志物表现出很高的特异性, 因此, CT筛查阳性和血清检测阳性的高风险者应当接受更高侵入性的检查如穿刺活检, 为了癌症的及时诊断。

