



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687281 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910791951.8

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2019.08.26

(71)申请人 中国医学科学院肿瘤医院

地址 100021 北京市朝阳区潘家园南里17
号

申请人 北京蛋白质组研究中心

(72)发明人 石远凯 于晓波 韩晓红 谭巧云
王聃

(74)专利代理机构 北京领科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11690

代理人 张丹 徐丹丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

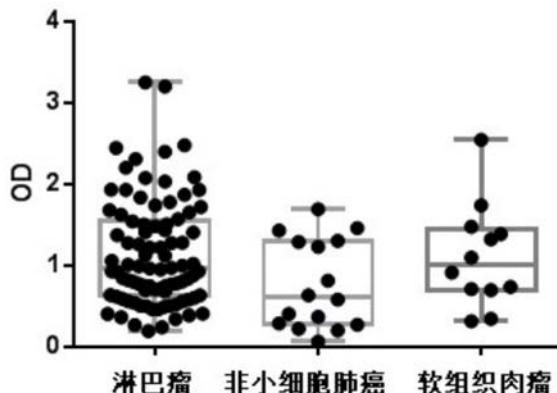
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

PD-L1自身抗体在肿瘤预后评估中的应用

(57)摘要

本发明提供了检测PD-L1自身抗体的试剂在制备诊断、治疗和/或预后评估的肿瘤的产品中的应用,及一种肿瘤诊断、治疗和/或预后评估的标志物,所述的标志物为PD-L1自身抗体。通过双抗体夹心酶联免疫技术(ELISA)检测标志物的表达水平,判断或者辅助判断患者对肿瘤免疫治疗的疗效反应和长期获益情况。



1. 检测PD-L1自身抗体的试剂在制备诊断和/或治疗肿瘤的产品中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合;所述的检测PD-L1自身抗体为检测PD-L1自身抗体的有无,或者表达水平;所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合。
4. PD-L1自身抗体在制备诊断和/或治疗肿瘤的产品中的应用。
5. 根据权利要求1-4任一所述的应用,其特征在于,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合;所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体;所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
6. 一种诊断和/或治疗肿瘤的标志物,其特征在于,所述的标志物包含PD-L1自身抗体。
7. 根据权利要求6所述的标志物,其特征在于,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合;所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体;所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
8. 一种诊断和/或治疗肿瘤的产品,其特征在于,所述的产品包含检测PD-L1自身抗体的试剂。
9. 根据权利要求8所述的产品,其特征在于,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合;所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合;所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
10. 一种PD-L1自身抗体的检测方法,其特征在于,将PD-L1蛋白包被于载体表面,加入待检测的样本,加入酶、底物,测定浓度。

PD-L1自身抗体在肿瘤预后评估中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学检测领域,具体涉及PD-L1自身抗体在肿瘤诊断、治疗及预后评估中的应用。

背景技术

[0002] 世界卫生组织全球疾病负担研究显示癌症是全球和中国仅次于心血管疾病的高死亡率疾病。免疫疗法通过增强患者的免疫系统以对抗疾病,已成为癌症治疗的新兴手段。在许多免疫治疗策略中,免疫检查点抑制剂(Immune Checkpoint Blockade, ICB)通过阻断免疫的内在下调程序,如细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)和程序性细胞死亡1(PD-1)或其配体(PD-L1),增加抗肿瘤免疫力,已经在多种癌症的治疗中显示出显著的益处。ICB的问世增加了多种癌症患者的总体存活率,目前已有多种抑制剂药物被美国食品药物监督管理局和中国食品药物监督管理局批准用于恶性肿瘤的治疗,但临床结果显示在绝大多数、未经挑选的实体瘤中接受ICB单药治疗的患者客观有效率仅10%~30%,大部分患者不能从中获益即原发性耐药,即使治疗有效的患者在治疗一段时间后也会出现疾病进展即继发性耐药。随着更多的ICB药物的问世,用药人群的逐渐增大,寻找有效的疗效预测标志物并建立相关的预测模型至关重要,这不仅可以提高肿瘤响应率,并为病人节约治疗成本和时间成本,为肿瘤患者的治疗提供个性化诊治策略,提高患者生存期及生活质量。

[0003] 目前已知早期肿瘤细胞可表达产生某些异常蛋白,可被机体免疫系统识别后产生特异的抗体,这些蛋白被称为肿瘤相关抗原,其抗体则称为自身抗体,其在自身免疫疾病中研究的相对较多,近年来在肿瘤的疾病筛查、早期诊断、预后判断和疗效监测方面均有一定的研究,并显示出巨大的潜力。相比于其他标志物,血清自身抗体取材途径简单,且治疗过程中能够连续取样监测,因此利用血清中自身抗体进行ICB疗效预测具有一定的优势。早期的研究分别采用SEREX(重组cDNA表达文库血清学筛选)法,噬菌体肽库淘选法,SERPA(血清蛋白组学)等方法对肿瘤的自身抗体进行筛选,目前已有一批已公开的肿瘤自身抗体用于肿瘤的诊断。其中NY-SE0-1、p53、Annexin I、14-3-3 θ 、LAMR1、PGP9.5、c-myc、HER2、CAGE、GBU-4-5、SOX2等自身抗体用于肺癌诊断;p53、HSP70、HCC-22-5、peroxiredoxin VI、KM-HN-1、p90等自身抗体用于胃癌诊断;p62、HCC1等自身抗体用于肝癌诊断;interleukin-29(IL29)、survivin(SUR)、growth hormone(GRH)、osteoprotegerin(OPG)、and resistin(RES)等自身抗体用于乳腺癌的诊断。有关自身抗体和ICB治疗效果的关系,目前已有研究报道自身抗体的产生与ICB治疗毒副反应的关系,并且自身抗体水平与ICB治疗效果存在一定的关联。

[0004] 目前,根据PD-L1的表达情况可以评估是否可以应用ICB药物治疗或者用于诊断肿瘤患者的治疗情况。例如:专利CN109311989A公开了通过测定肿瘤细胞中PD-L1的表达进行筛选对免疫检查点抑制剂易感性的癌症受试者,以及监测、治疗和诊断治疗效果。其中,筛选出的细胞中表达PD-L1的受试者可以通过施用免疫检查点抑制剂进行治疗。专利CN107667119A公开了肿瘤细胞或肿瘤浸润性免疫细胞中PD-L1表达水平,确定罹患非小细

胞肺癌的患者是否有可能响应包含PD-L1轴结合拮抗剂的治疗,该发明表示肿瘤细胞具有5%或更多的PD-L1的表达水平,肿瘤的治疗才可以施用有效量的PD-L1轴结合拮抗剂。以及直接检测肿瘤细胞上的PD-L1的表达已被FDA推荐为使用派姆单抗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者的伴随诊断。同时大量临床试验结果均表明,与PD-L1低表达的患者相比,高表达的患者对于PD-1/PD-L1通路抑制剂有较高的有效率和更长的生存期。例如:美国临床肿瘤协会年会(ASCO)上最新发布的KEYNOTE-042研究结果显示,相比于PD-L1低表达($1\% \leq TPS \leq 49\%$)的人群,PD-L1高表达($TPS \geq 50\%$)的病人获得更显著的生存获益,死亡风险降低31%。但部分PD-L1低表达的患者仍能从ICB治疗中获益,因此在临床实践中仅依靠PD-L1的表达进行患者的筛选是远远不够的。

[0005] PD-L1自身抗体是人体产生的针对PD-L1分子的抗体,是一种潜在的免疫治疗的疗效标志物。目前关于PD-L1自身抗体的研究在于自身免疫性疾病患者的预后诊断,例如:非专利文献自身免疫性疾病患者PD-L1自身抗体的筛查(结核病与胸部肿瘤,闫卓红等,2017年,第1期)公开了采用ELISA和免疫印迹法检测血清中PD-L1自身抗体进行自身免疫性疾病、结核病的预后诊断或评估。但是目前尚未见检测血清/血浆中PD-L1自身抗体作为免疫治疗疗效预测,因此本发明人通过创造性劳动将PD-L1自身抗体用于肿瘤的诊断与预后。

发明内容

[0006] 本发明人通过双抗体夹心酶联免疫技术(ELISA),成功的检测肿瘤或自身免疫疾病患者血液中的PD-L1自身抗体的含量,且在高PD-L1自身抗体患者中,对免疫治疗疗效好的患者更多,说明血清PD-L1自身抗体能够作为潜在的肿瘤诊断、免疫治疗的疗效预测和预后评估的标志物。

[0007] 本发明的一个目的是提供了检测PD-L1自身抗体的试剂在制备诊断、治疗和/或预后评估的肿瘤的产品中的应用,及PD-L1自身抗体在制备诊断、治疗和/或预后评估的肿瘤的产品中的应用。

[0008] 本发明的另一个目的是提供了一种肿瘤诊断、治疗和/或预后评估的标志物。

[0009] 本发明的再一个目的是提供了一种肿瘤诊断、治疗和/或预后评估的产品。

[0010] 本发明再一个目的是提供了一种肿瘤的诊断、治疗和/或预后评估的方法。

[0011] 本发明的第一方面,涉及检测PD-L1自身抗体的试剂在制备诊断和/或治疗肿瘤或自身免疫疾病的产品中的应用。

[0012] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0013] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0014] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0015] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0016] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。

[0017] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体为检测PD-L1自身抗体的有无,或者表达水平。

[0018] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、

免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合。

[0019] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法为ELISA。

[0020] 本发明的第二方面,涉及PD-L1自身抗体在制备诊断和/或治疗肿瘤或自身免疫疾病的产品中的应用。

[0021] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0022] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0023] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0024] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0025] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。

[0026] 本发明的第三方面,涉及检测PD-L1自身抗体的试剂在制备肿瘤或自身免疫疾病治疗预后评估的产品中的应用。

[0027] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0028] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0029] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0030] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0031] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。

[0032] 优选的,所述的肿瘤治疗预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗后的预后评估。

[0033] 进一步优选的,所述的免疫检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160抑制剂中的一种或两种以上的组合。

[0034] 优选的,所述的免疫检查点抑制剂治疗为单独施用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤或免疫检查点抑制剂与化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤。

[0035] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体为检测PD-L1自身抗体的有无,或者表达水平。

[0036] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合。

[0037] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法为ELISA。

[0038] 本发明的第四方面,涉及PD-L1自身抗体在制备肿瘤或自身免疫疾病治疗预后评估的产品中的应用。

[0039] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0040] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0041] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

- [0042] 优选的,所述的肿瘤治疗预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗后的预后评估。
- [0043] 进一步优选的,所述的免疫检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160抑制剂中的一种或两种以上的组合。
- [0044] 优选的,所述的免疫检查点抑制剂治疗为单独施用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤或免疫检查点抑制剂与化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤。
- [0045] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。
- [0046] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。
- [0047] 本发明的第五方面,涉及一种诊断和/或治疗肿瘤或自身免疫疾病的标志物,所述的标志物包含PD-L1自身抗体。
- [0048] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
- [0049] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。
- [0050] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。
- [0051] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。
- [0052] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。
- [0053] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的标志物还可以包含除PD-L1外的其他免疫检查点蛋白或其自身抗体作为伴随标志物,与PD-L1自身抗体联合进行肿瘤治疗效果的检测。其中,所述的伴随标志物选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。
- [0054] 本发明的第六方面,涉及一种肿瘤或自身免疫疾病治疗预后评估的标志物,所述的标志物包含PD-L1自身抗体。
- [0055] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。
- [0056] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。
- [0057] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。
- [0058] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。
- [0059] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。
- [0060] 优选的,所述的肿瘤治疗预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗后的预后评估。
- [0061] 进一步优选的,所述的免疫检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160抑制剂中的一种或两种以上的组合。
- [0062] 优选的,所述的免疫检查点抑制剂治疗为单独施用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤或免疫检查点抑制剂与化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤。
- [0063] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的标志物还可以包含除PD-L1外的其他免

疫检查点蛋白或其自身抗体作为伴随标志物,与PD-L1自身抗体联合进行肿瘤治疗效果的检测。其中,所述的伴随标志物选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。

[0064] 本发明的第七方面,涉及一种诊断和/或治疗肿瘤或自身免疫疾病的产品,所述的产品包含检测PD-L1自身抗体的试剂。

[0065] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0066] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0067] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0068] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0069] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。

[0070] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体为检测PD-L1自身抗体的有无,或者表达水平。

[0071] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合。

[0072] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法为ELISA。

[0073] 优选的,所述的诊断和/或治疗肿瘤的产品还可以包含除PD-L1外的其他免疫检查点蛋白或其自身抗体作为伴随标志物,与PD-L1自身抗体联合进行肿瘤治疗效果的检测。其中,所述的伴随标志物选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。

[0074] 本发明的第八方面,涉及一种肿瘤或自身免疫疾病治疗预后评估的产品,所述的产品包含检测PD-L1自身抗体的试剂。

[0075] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0076] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0077] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0078] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0079] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的PD-L1自身抗体为血清和/或血浆中的PD-L1自身抗体。

[0080] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体为检测PD-L1自身抗体的有无,或者表达水平。

[0081] 优选的,所述的肿瘤治疗预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗后的预后评估。

[0082] 进一步优选的,所述的免疫检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160抑制剂中的一种或两种以上的组合。

[0083] 优选的,所述的免疫检查点抑制剂治疗为单独施用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤或免疫检查点抑制剂与化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤。

[0084] 优选的,所述的肿瘤治疗预后评估的产品还可以包含除PD-L1外的其他免疫检查

点蛋白或其自身抗体作为伴随标志物,与PD-L1自身抗体联合进行肿瘤治疗效果的检测。其中,所述的伴随标志物选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。

[0085] 优选的,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法选自ELISA、免疫印迹法、间接免疫荧光法、酶免疫斑点法或免疫发光法中的一种或两种以上的组合。

[0086] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的检测PD-L1自身抗体的试剂检测PD-L1自身抗体的方法为ELISA。

[0087] 本发明的第九方面,涉及一种肿瘤或自身免疫疾病的诊断方法,所述的方法包含检测生物体体内PD-L1自身抗体的有无或表达水平。

[0088] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0089] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0090] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0091] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0092] 本发明的第十方面,涉及一种肿瘤或自身免疫疾病治疗预后评估的方法,所述的方法包含检测生物体体内PD-L1自身抗体的有无或表达水平。

[0093] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0094] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0095] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0096] 优选的,所述的PD-L1自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的PD-L1自身抗体。

[0097] 本发明的第十一方面,涉及一种肿瘤或自身免疫疾病的治疗方法,所述的方法包含对患有肿瘤的患者施用有效量的PD-L1抑制剂,其中自该患者体内检测到PD-L1自身抗体的表达。

[0098] 优选的,所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。

[0099] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0100] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0101] 优选的,所述的PD-L1抑制剂为PD-L1抗体。

[0102] 优选的,所述的自该患者体内检测到PD-L1自身抗体的表达为自该患者血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中检测到PD-L1自身抗体的表达。其中,所述PD-L1自身抗体的表达水平越高,所述免疫抑制剂治疗效果更好。

[0103] 本发明的第十二方面,涉及一种PD-L1自身抗体的检测方法,将PD-L1蛋白包被于载体表面,加入待检测的样本,加入酶、底物,测定浓度。

[0104] 优选的,所述的PD-L1自身抗体包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgE或IgD中的一种或两种以上的组合。

[0105] 优选的,所述的待检测的样本为生物体血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液。

- [0106] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的待检测的样本为生物体血清。
- [0107] 优选的,所述的待检测的样本在加入之前经过稀释缓冲液稀释,稀释浓度1:150-450。
- [0108] 优选的,所述的稀释浓度为1:200-400。
- [0109] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的稀释缓冲液为牛奶。
- [0110] 优选的,所述的酶为酶标抗体。更优选的,所述的酶标抗体为IgG。
- [0111] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的底物为TMB。
- [0112] 优选的,所述的测定浓度的方法为测定450nm的吸光度值。
- [0113] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的方法包括:
- [0114] 1) 将PD-L1蛋白包被于96孔板中,4℃过夜;血清样本用牛奶稀释至1:200-400;
- [0115] 2) 将稀释后的血清样本加入96孔板,孵育,洗涤;优选孵育时间为0.5-2小时;
- [0116] 3) 加入新鲜稀释的抗人IgG HRP酶标抗体,孵育,洗涤;优选孵育时间为0.5-2小时;更优选孵育时间为0.5-1小时;
- [0117] 4) 加入临时配制的TMB底物,避光显色;加入硫酸终止反应;优选避光显色时间为10-30分钟;
- [0118] 5) 测定450nm的吸光度值确定样本中PD-L1自身抗体表达水平。
- [0119] 本发明所述的检测PD-L1自身抗体表达水平的试剂选自试纸条、蛋白芯片、磁珠、荧光试剂等。所述的检测原理采用抗原抗体结合,其中检测抗原为PD-L1蛋白或多肽。
- [0120] 本发明所述的产品包含本发明所述的检测PD-L1自身抗体水平的试剂。优选的,所述的产品选自试剂盒、质谱。
- [0121] 一种检测PD-L1自身抗体的试剂盒,包含检测PD-L1自身抗体水平的试剂。
- [0122] 一种检测PD-L1自身抗体的芯片,包含检测PD-L1自身抗体水平的试剂。
- [0123] 一种诊断和/或治疗肿瘤的试剂盒,包含检测PD-L1自身抗体水平的试剂与检测其他免疫检查点的试剂。所述的其他免疫检查点选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。
- [0124] 一种肿瘤治疗预后评估的试剂盒,包含检测PD-L1自身抗体水平的试剂与检测其他免疫检查点的试剂。所述的其他免疫检查点选自PD-1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4或CD160中的一种或两种以上的组合。
- [0125] 本发明所述的诊断肿瘤是指诊断是否患有肿瘤,或者肿瘤患者预后评估,或者评估肿瘤患者采用免疫检查点抑制剂治疗的获益程度。
- [0126] 本发明所述的治疗肿瘤是指通过检测PD-L1自身抗体表达水平,确定是否通过免疫检查点抑制剂治疗。
- [0127] 本发明所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌、白血病、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、胃癌、膀胱癌、肺癌、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、肝和胆管癌、食管癌、肾癌、甲状腺癌、头颈部癌、睾丸癌、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、以及肉瘤。其中,所述的白血病选自急性淋巴细胞性(成淋巴细胞性)白血病、急性骨髓性白血病、髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、以及慢性骨髓性白血病;所述淋巴瘤选自霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,包括B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴

瘤、和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；所述肉瘤选自骨肉瘤、尤文肉瘤、平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、以及软骨肉瘤。优选的，所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤。在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为淋巴瘤。

[0128] 本发明所述的自身免疫疾病选自器官特异性自身免疫病、系统性自身免疫病。其中，器官特异性自身免疫病选自慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等。所述的系统性自身免疫病选自系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、皮肤类风湿结节、动脉炎、心包炎、巩膜炎、淋巴结炎、肝脾肿大、神经病变、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮肌炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血、甲状腺自身免疫病或溃疡性结肠炎。

附图说明

[0129] 以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

[0130] 图1：ELISA夹心法和侨联法检测PD-L1自身抗体在肿瘤患者血液中的含量相对水平的对比，其中R4、R12分别表示2名患者血清样本。

[0131] 图2：ELISA夹心法检测不同血清稀释度中的PD-L1自身抗体相对水平的对比，其中，R4、R5、R12、R13、NR12、NR13分别表示6名患者血清样本。

[0132] 图3：ELISA夹心法检测117例肿瘤患者PD-L1血清自身抗体的分布情况，其中，肿瘤患者分别为淋巴瘤、非小细胞肺癌和软组织肉瘤。

[0133] 图4：淋巴瘤患者PD-L1自身抗体水平对免疫治疗的疗效预测作用，其中，CR为完全缓解，PR为部分缓解，SD为疾病稳定，PD为疾病进展，纵坐标OD平均值代表每一组各样本OD值的平均值。

具体实施方式

[0134] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明的部分实施例，而不是全部。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0135] 实施例1

[0136] 1、样本收集

[0137] 血清样本收集于中国医学科学院肿瘤医院，肿瘤患者中位年龄为34(18-74)岁，男女比例71:46，其中淋巴瘤患者89例，非小细胞肺癌患者16例，软组织肉瘤患者12例，所有患者均获得知情同意书。通过病理结果确认肿瘤诊断结果，所有患者均接受PD-1抗体免疫治疗，并获得疗效评价信息。

[0138] 2、检测方法：

[0139] 优化检测方法：使用夹心法酶联免疫吸附实验和侨联法酶联免疫吸附实验分别检测2名患者血清中PD-L1的自身抗体水平。

[0140] 优化稀释浓度：使用夹心法酶联免疫吸附实验检测6名肿瘤患者血清中PD-L1的自

身抗体水平,将6个血清样本分别以1:300、1:600、1:900浓度稀释于牛奶中进行检测。

[0141] 1) 夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)

[0142] 将PD-L1蛋白(1ng/ μ L*50 μ L)包被在96孔板中,4℃过夜,将2个血清样本分别以1:300、1:600、1:900浓度稀释于牛奶中,并将50 μ L稀释的样品/孔加入到96孔微量滴定板中,置37℃孵育1小时,然后洗涤。于各反应孔中,加入新鲜稀释的抗人IgG HRP酶标抗体(1:8000稀释)50 μ L,37℃孵育1小时,洗涤。随后于各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液0.1mL,37℃避光显色25分钟,每孔中加入0.05M硫酸50 μ L终止反应,通过测量450nm处的吸光度来确定信号。

[0143] 2) 侨联法

[0144] 将PD-L1蛋白(1ng/ μ L*50 μ L)包被在96孔板中,4℃过夜,将2个血清样本分别以1:300、1:600、1:900浓度稀释于牛奶中,并将50 μ L稀释的样品/孔加入到96孔微量滴定板中,置37℃孵育1小时,然后洗涤。同时取10 μ L PD-L1已稀释的蛋白,用1×PBS稀释至100 μ L(10ng/ μ L),混匀后加入1 μ L或者2 μ L浓度为20mg/mL的生物素标记试剂(DMSO溶解),室温下振荡反应1h;反应的同时,将Bio-Spin6柱子上下颠倒混匀,去掉柱子的底端后放入2mL离心管中,去掉柱子盖及流出液;将柱子放回2mL离心管,1000g离心2min;加入500 μ L 1xPBS,1000g离心1min,去掉流出液,重复四次;将标记好的100 μ L PD-L1蛋白样本加入胶床中心,1000g离心4min;流出液为凝集素标记好的PD-L1蛋白样品。于各反应孔中,加入新鲜标记的PD-L1蛋白样品,室温一小时后洗涤,加入生物素HRP酶标抗体(1:8000稀释)50 μ L,37℃孵育1小时,洗涤。随后于各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液0.1mL,37℃25分钟,每孔中加入0.05M硫酸50 μ L终止反应,通过测量450nm处的吸光度来确定信号。

[0145] 3、统计分析

[0146] 采用Mann-Whitney U Test检验比较组间变量差异,P<0.05被认为有显著统计学意义。

[0147] 4、实验结果

[0148] 夹心法酶联免疫吸附实验和侨联法酶联免疫吸附实验分别检测2名患者血清中PD-L1的自身抗体水平,结果见图1-2。夹心法酶联免疫吸附实验相对于侨联法能检测出更高的PD-L1抗体水平(图1,R4、R12分别表示2名患者血清样本)。

[0149] 使用夹心法酶联免疫吸附实验检测6名肿瘤患者血清中PD-L1的自身抗体水平,结果显示1:300的血清浓度检测出的抗体水平是最高的。(图2,R4、R5、R12、R13、NR12、NR13分别表示6名患者血清样本)。

[0150] 实施例2

[0151] 使用实施例1中夹心法酶联免疫吸附实验的条件(1:300)检测了89例淋巴瘤、16例非小细胞肺癌、12例软组织肉瘤肿瘤患者(实施例1中样本收集)血清样品的PD-L1自身抗体表达水平,结果显示利用夹心法酶联免疫吸附方法能够成功检测肿瘤患者血清中自身抗体的相对水平(图3)。

[0152] 实施例3

[0153] 肿瘤免疫治疗中如何更有效的区分出有效和无效的患者是临床亟待解决的一大难题,选择患者例数最多的淋巴瘤研究了血清PD-L1自身抗体水平与PD-L1免疫治疗的关系,根据实体瘤疗效评价标准(RECIST 1.1)将淋巴瘤治疗疗效分为四个级别,CR(完全缓

解), PR(部分缓解), SD(疾病稳定), PD(疾病进展), 治疗效果依次减低, 通过对淋巴瘤患者PD-L1的自身抗体水平和肿瘤治疗效果联合分析, 结果显示, 在治疗效果越好的患者中, 其PD-L1自身抗体平均水平越高, 由此可见血清PD-L1自身抗体水平高低是潜在的肿瘤免疫治疗的标志物(图4)。

[0154] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0155] 另外需要说明的是, 在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征, 在不矛盾的情况下, 可以通过任何合适的方式进行组合, 为了避免不必要的重复, 本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

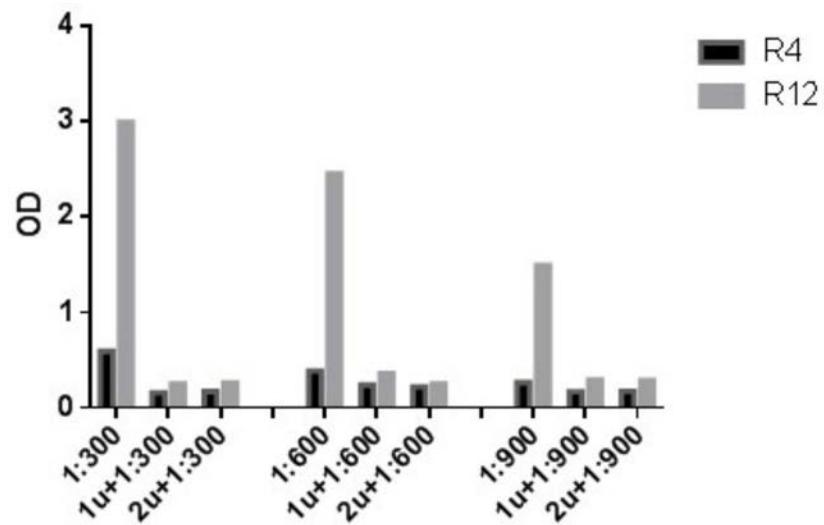


图1

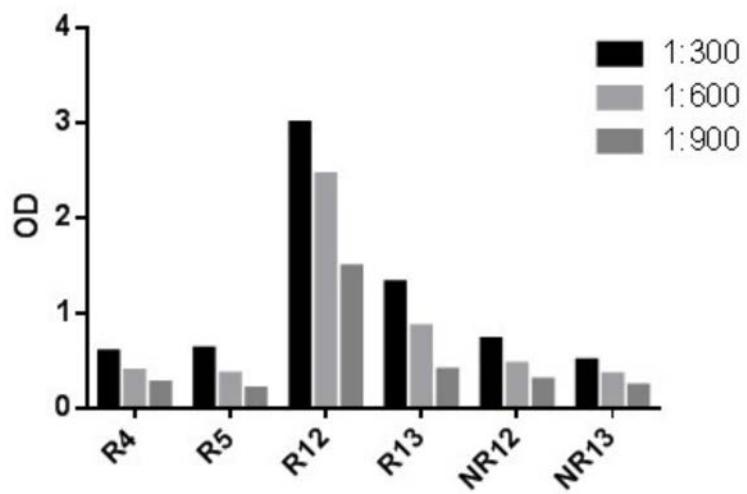


图2

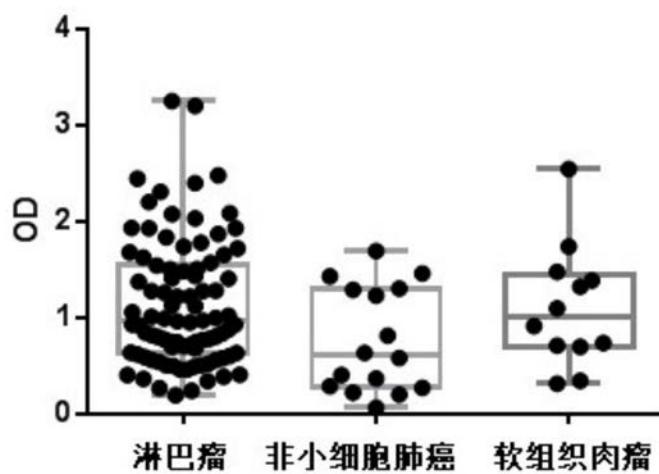


图3

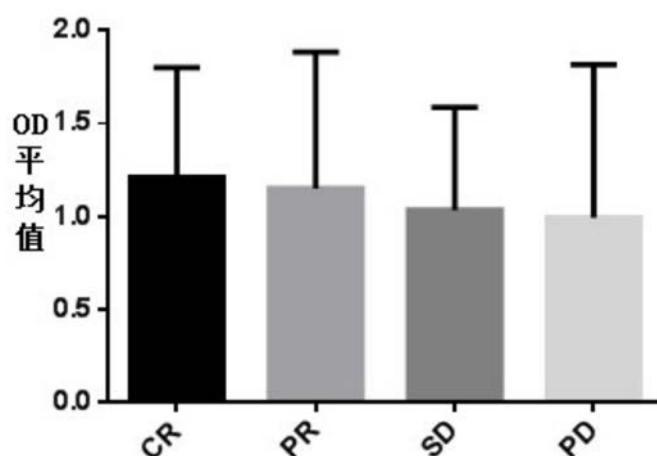


图4

专利名称(译)	PD-L1自身抗体在肿瘤预后评估中的应用		
公开(公告)号	CN110687281A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910791951.8	申请日	2019-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院 北京蛋白质组研究中心		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院 北京蛋白质组研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院 北京蛋白质组研究中心		
[标]发明人	石远凯 于晓波 韩晓红 谭巧云 王聃		
发明人	石远凯 于晓波 韩晓红 谭巧云 王聃		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/574		
代理人(译)	张丹 徐丹丹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了检测PD-L1自身抗体的试剂在制备诊断、治疗和/或预后评估的肿瘤的产品中的应用，及一种肿瘤诊断、治疗和/或预后评估的标志物，所述的标志物为PD-L1自身抗体。通过双抗体夹心酶联免疫技术(ELISA)检测标志物的表达水平，判断或者辅助判断患者对肿瘤免疫治疗的疗效反应和长期获益情况。

