



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108463724 A

(43)申请公布日 2018.08.28

(21)申请号 201680072671.6

(22)申请日 2016.12.27

(30)优先权数据

2015-256605 2015.12.28 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/088978 2016.12.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/115816 JA 2017.07.06

(71)申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都

申请人 希森美康株式会社

(72)发明人 本庶佑 茶本健司 后藤惠

宇贺均

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图10页

(54)发明名称

癌的判断方法、癌的判断用装置及计算机程
序

(57)摘要

本发明涉及癌的判断方法。再者，本发明涉
及癌的判断用装置及计算机程序。

1. 癌的判断方法,其包括:

作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,测定游离PD-L1(程序性细胞死亡-配体1)及游离PD-1(程序性细胞死亡-1)的工序,和

基于测定结果而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的工序。

2. 权利要求1所述的方法,其中

在上述测定工序中,作为上述液体试样中的游离蛋白质标志物,还测定游离CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原-4),

在上述判断工序中,基于上述游离PD-L1、上述游离PD-1及上述游离CTLA-4的测定结果而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中上述癌是实体癌。

4. 权利要求1~3之任一项所述的方法,其中上述癌是肺癌、肾脏癌、卵巢癌或黑色素瘤。

5. 权利要求1~4之任一项所述的方法,其中在上述判断工序中,

对在上述测定工序中取得的上述游离蛋白质标志物的测定值和对应于各标志物的指定的阈值进行比较,

基于比较结果而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

6. 权利要求1~4之任一项所述的方法,其中在上述判断工序中,

对在上述测定工序中取得的上述游离蛋白质标志物的测定值由多变量解析取得的预测值和对应于预测值的指定的阈值进行比较,

基于比较结果而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

7. 权利要求1~6之任一项所述的方法,其中上述液体试样是血液试样。

8. 权利要求6所述的方法,其中上述多变量解析是逻辑回归分析。

9. 癌的判断装置,其具备:含处理器及处于上述处理器的控制下的存储器的计算机,

在上述存储器中记录了用于使上述计算机执行下述的步骤的计算机程序:

作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,取得游离PD-L1(程序性细胞死亡-配体1)及游离PD-1(程序性细胞死亡-1)的测定值的步骤,和

基于上述标志物的测定值而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的步骤。

10. 权利要求9所述的装置,其中在上述测定值取得步骤中,作为上述液体试样中的游离蛋白质标志物,还取得游离CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原-4)的测定值。

11. 癌的判断用的计算机程序,其为在计算机能读取的介质中记录的计算机程序,

上述计算机程序是用于使上述计算机执行下述的步骤的计算机程序:

作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,取得游离PD-L1(程序性细胞死亡-配体1)及游离PD-1(程序性细胞死亡-1)的测定值的步骤,和

基于上述标志物的测定值而判断上述液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的步骤。

12. 权利要求11所述的计算机程序,其中在上述测定值取得步骤中,作为上述液体试样中的游离蛋白质标志物,还取得游离CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原-4)的测定值。

癌的判断方法、癌的判断用装置及计算机程序

【技术领域】

[0001] 本发明涉及癌的判断方法。再者，本发明涉及癌的判断用装置及计算机程序。

【背景技术】

[0002] 被称为PD-1(程序性细胞死亡-1)的受体分子在活化的T细胞的表面表达(参照非专利文献1)。已知PD-1是抑制T细胞的过量的活化而负控制生物体的免疫应答的分子。另外，被称为CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原-4)的分子也在活化的T细胞的表面表达。CTLA-4也与PD-1同样地，有抑制T细胞的活化的功能。一方面，在癌局部的细胞中，有在细胞表面表达作为PD-1的配体的PD-L1(程序性细胞死亡-配体1)的情况。已知这样的癌局部的细胞经自身的PD-L1和T细胞的PD-1的结合而抑制T细胞的活化，回避T细胞的攻击。结果，癌在生物体内增大。实际上，在癌局部的PD-L1表达量和癌患者的预后不良率之间有相关关系。这样，由于PD-L1、PD-1及CTLA-4与免疫的抑制相关，从而也被称为免疫检查点分子。

[0003] 【现有技术文献】

[0004] 【非专利文献】

[0005] 非专利文献1:Agata Y.等,Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.Int.Immunol.,vol.8,pp.765-772(1996)

【发明概要】

[0006] 【发明要解决的课题】

[0007] 由于PD-L1是存在于细胞膜的分子，为了由PD-L1的检测进行癌的判断，有将从受试者采集的组织在试样中使用的必要。例如，已知从癌患者采集肿瘤组织而制作病理组织标本，进行PD-L1的免疫染色的方法。另外，也采用通过确认癌细胞中的基因变异来判断免疫原性的方法。但是，由以下的理由，以往的方法有需要改善的点。(1)组织的采集对受试者的负担大。(2)在癌发病的原因在于T细胞时，在由PD-L1的检测的判断方法中，无法得到结果。(3)组织标本因采集场所而偏差大，无法对在癌组织整体、或者全身中的免疫检查点关联分子的表达量进行定量。从而，期望对受试者的负担小，并且，对癌细胞及T细胞的全身的免疫检查点关联分子量进行定量的癌的判断方法。

[0008] 【用于解决课题的手段】

[0009] 如上所述，已知PD-L1、PD-1及CTLA-4是关于免疫活化状态的抑制的分子，如果生物体的免疫状态活化，则这些分子在细胞表面的表达亢进。其中认为，在生物体罹患癌时，在此生物体内，为了排除癌，与T细胞活化一同，CTLA-4及PD-1在T细胞表面的表达亢进。另外认为，为了避免活化的T细胞的攻击而PD-L1在癌局部的细胞表面的表达亢进。本发明人认为，如果这些分子的表达在细胞表面增加，则从细胞表面游离的分子的量也增加。即，本发明人认为，在癌患者的体内，从细胞表面游离的PD-L1、PD-1及CTLA-4增加。

[0010] 本发明人发现，通过作为血液试样等的液体试样中的游离蛋白质标志物，测定游离PD-L1及游离PD-1，可判别该试样是否是从罹患癌的受试者采集的，从而完成本发明。

[0011] 从而,本发明提供癌的判断方法,其包括:作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,测定游离PD-L1及游离PD-1的工序,及基于测定结果而判断上述的液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的工序。

[0012] 另外,本发明提供癌的判断装置,其具备含处理器及处于此处理器的控制下的存储器的计算机,在上述的存储器中记录用于使计算机执行下列步骤的计算机程序:作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值的步骤,基于上述的标志物的测定值而判断上述的液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的步骤。

[0013] 再者,本发明提供癌的判断用的计算机程序,其为在计算机能读取的介质中记录的计算机程序,此计算机程序是用于使上述的计算机执行下列步骤的计算机程序:作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值的步骤,基于上述的标志物的测定值而判断上述的液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否的步骤。

[0014] **【发明效果】**

[0015] 根据本发明,由于使用从受试者采集的液体试样,在试样的采集中对受试者的负担小。另外,本发明能客观地评价液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

[0016] **【附图简述】**

[0017] **【图1】**是显示癌的判断装置的一例的概略图。

[0018] **【图2】**是显示癌的判断装置的硬件构成的框图。

[0019] **【图3A】**是使用癌的判断装置进行癌的判断的流程图。

[0020] **【图3B】**是使用癌的判断装置进行癌的判断的流程图。

[0021] **【图4】**是使用癌的判断装置进行癌的判断的流程图。

[0022] **【图5】**是从基于游离PD-L1的浓度值的预测值进行判断之时的ROC曲线。

[0023] **【图6】**是从基于游离PD-1的浓度值的预测值进行判断之时的ROC曲线。

[0024] **【图7】**是从基于游离CTLA-4的浓度值的预测值进行判断之时的ROC曲线。

[0025] **【图8】**是从基于游离PD-L1及游离PD-1的浓度值的预测值进行判断之时的ROC曲线。

[0026] **【图9】**是从基于游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的浓度值的预测值进行判断之时的ROC曲线。

【具体实施方式】

[0027] [1. 癌的判断方法]

[0028] 在本发明的癌的判断方法(以下,也简称为“判断方法”)中,首先,作为从受试者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物,测定游离PD-L1及游离PD-1。在本实施方式中,除了游离PD-L1及游离PD-1之外,也可还对游离CTLA-4进行测定。

[0029] 采集液体试样的受试者不特别限定,例如,可为疑似癌的罹患的者。在本实施方式中,癌的种类不特别限定,例如,可以实体癌及血液癌等的各种癌作为判断的对象。作为实体癌,例如,可举出肺癌、肾脏癌、卵巢癌、黑色素瘤等。作为血液癌,可举出白血病、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤等。

[0030] 液体试样只要是从受试者采集、可含游离蛋白质的液状的试样,就不特别限定。作为这样的液体试样,例如,可举出血液试样、脑脊髓液、胸水、腹水、淋巴液、尿等。在本实施方式中,作为液体试样,优选血液试样。作为血液试样,优选可举出全血、血浆及血清,特别血浆及血清。

[0031] 当液体试样中含细胞等的不溶性的混杂物时,例如,也可由离心分离、过滤等的公知的手段从液体试样除去混杂物。另外,液体试样也可根据需要用适合的水性介质稀释。这样的水性介质只要是不妨碍后述的测定,就不特别限定,例如,可举出水、生理盐水、缓冲液等。缓冲液只要是在中性附近的pH(例如6以上8以下的pH)有缓冲作用,就不特别限定。这样的缓冲液,例如,可举出HEPES、MES、Tris、PIPES等的Good缓冲液、磷酸缓冲生理盐水(PBS)等。

[0032] 在本实施方式中,作为标志物测定的游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4均是游离蛋白质。在本说明书中,“游离蛋白质”是指液体试样中的从细胞的表面脱离而存在于该细胞的外部的蛋白质。这样的游离蛋白质也可为在液体试样的液体成分(液相)中增溶的蛋白质、在囊泡中内包的蛋白质、及存在于囊泡的表面的蛋白质之任一者。囊泡只要是由膜构成的小泡,就不特别限定。囊泡也可在内部含液相。优选的囊泡是细胞外小泡,例如,可举出分泌体、微囊泡、凋亡小体等。

[0033] 对游离蛋白质标志物进行测定的手段只要是可取得反映液体试样中所含的游离蛋白质标志物的量或浓度的值(以下,也称为“标志物的测定值”),就不特别限定。在本实施方式中,优选使用能与游离蛋白质标志物特异性地结合的物质而捕获该标志物的方法。通过将由这样的物质捕获的游离蛋白质标志物用现有技术中公知的方法检测,可对液体试样中所含的游离蛋白质标志物进行测定。

[0034] 作为能与游离蛋白质标志物特异性地结合的物质,例如,可举出抗体、适体等,在它们之中,也特别优选抗体。对于PD-L1、PD-1及CTLA-4的各蛋白质的抗体本身是在现有技术中公知的,可一般得到。对于游离蛋白质标志物的抗体只要是可与游离蛋白质标志物特异性地结合的抗体,就不特别限定。这样的抗体也可为单克隆抗体、多克隆抗体、及它们的片段(例如,Fab、F(ab')₂等)之任一者。另外,也可使用市售的抗体。

[0035] 使用抗体测定游离蛋白质标志物的方法不特别限定,可从公知的免疫学测定法适宜选择。在本实施方式中,优选酶联免疫吸附法(ELISA法),特别优选夹心ELISA法。作为测定工序的一例,接下来对于由夹心ELISA法测定液体试样中的游离蛋白质标志物的情况进行说明。

[0036] 首先,在固相上形成含游离蛋白质标志物、用于捕获游离蛋白质标志物的抗体(以下,也称为“捕获用抗体”)和用于检测游离蛋白质标志物的抗体(以下,也称为“检测用抗体”)的复合物。该复合物可通过将可含游离蛋白质标志物的液体试样、捕获用抗体和检测用抗体混合来形成。进而,通过使含复合物的溶液与可捕获捕获用抗体的固相接触,可在固相上形成上述的复合物。或者,也可使用预先固定捕获用抗体的固相。即,通过使固定捕获用抗体的固相、液体试样和检测用抗体接触,可在固相上形成上述的复合物。再者,当捕获用抗体及检测用抗体均为单克隆抗体时,优选表位互相不同。

[0037] 捕获用抗体向固相固定的实施方式不特别限定。例如,可使捕获用抗体和固相直接键合,也可使捕获用抗体和固相经别的物质间接结合。作为直接的结合,例如,可举出物

理的吸附等。作为间接的结合,例如,可举出经生物素和亲和素或链霉亲和素(以下,也称为“亲和素类”)的组的结合。此时,通过将捕获用抗体预先用生物素修饰,使亲和素类预先结合于固相,可经生物素和亲和素类的结合而使捕获用抗体和固相间接结合。

[0038] 固相的原料不特别限定,例如,可从有机高分子化合物、无机化合物、生物体高分子等选择。作为有机高分子化合物,可举出乳胶、聚苯乙烯、聚丙烯等。作为无机化合物,可举出磁性体(氧化铁、氧化铬及铁素体等)、氧化硅、氧化铝、玻璃等。作为生物体高分子,可举出不溶性琼脂糖、不溶性葡聚糖、明胶、纤维素等。也可将这些中的2种以上组合使用。固相的形状不特别限定,例如,可举出粒子、膜、微平板、微管、试管等。在它们之中,也优选粒子,特别优选磁性粒子。

[0039] 在本实施方式中,也可在复合物的形成工序和复合物的检测工序之间,进行除去不形成复合物的未反应的游离成分的B/F(Bound/Free)分离。未反应的游离成分是指不构成复合物的成分。例如,可举出不与游离蛋白质标志物结合的捕获用抗体及检测用抗体等。B/F分离的手段不特别限定,如果固相是粒子,则可通过由离心分离仅回收捕获了复合物的固相来进行B/F分离。如果固相是微平板或微管等的容器,则可通过除去含未反应的游离成分的液来进行B/F分离。另外,当固相是磁性粒子时,可通过在用磁铁磁约束磁性粒子的状态下由管嘴吸除含未反应的游离成分的液来进行B/F分离,在自动化的观点是优选的。在除去未反应的游离成分之后,也可将捕获复合物的固相用PBS等的适合的水性介质清洗。

[0040] 进而,通过将在固相上形成的复合物用现有技术中公知的方法检测,可取得液体试样中所含的游离蛋白质标志物的测定值。例如,当作为检测用抗体,使用用标记物质标记的抗体时,通过检测由该标记物质发生的信号,可取得在液体试样中的标志物的测定值。或者,在使用对于检测用抗体的标记第二抗体时,也可同样地取得液体试样中的标志物的测定值。

[0041] 另外,作为使用抗体测定游离蛋白质标志物的方法的例,也可使用特开平1-254868号公报中记载的免疫复合物转移法。

[0042] 在本说明书中,“检测信号”含定性检测信号的有无,对信号强度进行定量,及,对信号的强度进行半定量检测。半定量的检测是指将信号的强度如“不发生信号”、“弱”、“中”、“强”等一样阶段性地表示。在本实施方式中,优选对信号的强度进行定量或半定量检测。

[0043] 标记物质只要是发生能检测的信号,就不特别限定。例如,可为其本身发生信号的物质(以下,也称为“信号发生物质”),也可为催化其他物质的反应而发生信号的物质。作为信号发生物质,例如,可举出荧光物质、放射性同位元素等。作为催化其他物质的反应而使发生能检测的信号的物质,例如,可举出酶。作为酶,可举出碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶等。作为荧光物质,可举出异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、Alexa Fluor(注册商标)等的荧光染料、GFP等的荧光蛋白质等。作为放射性同位元素,可举出 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。在它们之中,作为标记物质,也优选酶,特别优选碱性磷酸酶及过氧化物酶。

[0044] 检测信号的方法本身是在现有技术中公知的。在本实施方式中,适宜选择对应于来源于上述的标记物质的信号的种类的测定方法即可。例如,在标记物质是酶时,可通过将通过使对于该酶的底物反应而发生的光、色等的信号使用分光光度计等的公知的装置进行测定来进行。

[0045] 酶的底物可对应于该酶的种类而从公知的底物适宜选择。例如,在作为酶,使用碱性磷酸酶时,作为底物,可举出CDP-Star(注册商标)(4-氯-3-(甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)、CSPD(注册商标)(3-(4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸2钠)等的化学发光底物、5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(BCIP)、5-溴-6-氯-吲哚基磷酸2钠、p-硝基苯基磷酸等的显色底物。另外,在作为酶,使用过氧化物酶时,作为底物,可举出LUMINOR及其衍生物等的化学发光基质、2,2'-连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸铵)(ABTS)、1,2-亚苯基二胺(OPD)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等的显色底物。

[0046] 当标记物质是放射性同位素时,可使用闪烁计数器等公知的装置测定作为信号的放射线。另外,当标记物质是荧光物质时,可使用荧光酶标仪等公知的装置测定作为信号的荧光。再者,激发波长及荧光波长可对应于使用的荧光物质的种类而适宜确定。

[0047] 信号的检测结果可作为标志物的测定值使用。例如,当对信号的强度进行定量检测时,可以从信号强度的测定值本身或该测定值取得的值作为标志物的测定值使用。作为从信号强度的测定值取得的值,例如,可举出从该测定值减去阴性对照试样的测定值或背景的值、向校准曲线适用该测定值而取得的值等。阴性对照试样可适宜选择,例如,可举出从健康人得到的液体试样等。

[0048] 在本实施方式中,优选由使用固定在磁性粒子的捕获用抗体和用标记物质标记的检测用抗体的夹心ELISA法测定液体试样中所含的游离蛋白质标志物。此时,测定也可使用HISCL系列(Sysmex株式会社制)等的市售的全自动免疫测定装置进行。

[0049] 接下来,在本实施方式涉及的试样的判别方法中,基于测定结果而判断上述的液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

[0050] 在本实施方式中,优选对由上述的测定取得的游离蛋白质标志物的测定值和对应于各标志物的指定的阈值进行比较,基于比较结果而判断液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。

[0051] 例如,在取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值时,对游离PD-L1的测定值和第1阈值进行比较,对游离PD-1的测定值和第2阈值进行比较,基于它们的比较结果而进行判断。举判断的一例,在游离PD-L1的测定值比第1阈值高或与第1阈值相同、并且游离PD-1的测定值比第2阈值高或与第2阈值相同之时,判断为液体试样也可为从罹患癌的受试者采集的。另外,在游离PD-L1的测定值比第1阈值低、或者游离PD-1的测定值比第2阈值低时,判断为液体试样也可不是从罹患癌的受试者采集的。

[0052] 例如,取得游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的测定值时,对游离PD-L1的测定值和第1阈值进行比较,对游离PD-1的测定值和第2阈值进行比较,对游离CTLA-4的测定值和第3阈值进行比较,基于它们的比较结果而进行判断。举判断的一例,在游离PD-L1的测定值比第1阈值高或与第1阈值相同、并且游离PD-1的测定值比第2阈值高或与第2阈值相同、并且游离CTLA-4的测定值比第3阈值高或与第3阈值相同之时,判断为液体试样也可为从罹患癌的受试者采集的。另外,在游离PD-L1的测定值比第1阈值低、游离PD-1的测定值比第2阈值低、或者游离CTLA-4的测定值比第3阈值低时,判断为液体试样也可不是从罹患癌的受试者采集的。

[0053] 在进一步的实施方式中,也可对从由上述的测定取得的游离蛋白质标志物的测定

值由多变量解析取得的预测值和对应于预测值的指定的阈值进行比较,基于比较结果而判断液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。多变量解析可从逻辑回归分析、重回分析、判别分析等的公知的解析法适宜选择。在它们之中,也优选逻辑回归分析。

[0054] 例如,在取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值时,向由多变量解析(例如逻辑回归分析)制成的判别式代入这些测定值而取得预测值。在进一步取得游离CTLA-4的测定值时,也与上述同样地向由多变量解析(例如逻辑回归分析)制成的判别式代入取得的全部标志物的测定值而取得预测值。进而,对取得的预测值和指定的阈值进行比较,基于比较结果而进行判断。举判断的一例,在取得的预测值比指定的阈值高或与指定的阈值相同之时,可判断为液体试样是从罹患癌的受试者采集的。另外,在取得的预测值比指定的阈值低时,可判断为液体试样不是从罹患癌的受试者采集的。

[0055] 在本实施方式中,在取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值时,预测值也可使用下述的式(I)的回归式算出。另外,在取得游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的测定值时,预测值也可使用下述的式(II)的回归式算出。这些回归式是基于多重逻辑模型而构建的式。式中,[PD-L1]、[PD-1]及[CTLA-4]各自是游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的测定值。 b_0 是切片的系数、 $b_1 \sim b_3$ 是各游离蛋白质标志物的系数。系数可由最大似然法等的方法确定。

[0056] 【数1】

$$P = \frac{1}{1 + \exp[-(b_0 + b_1 \times [\text{PD-L1}] + b_2 \times [\text{PD-1}])]} \quad (\text{I})$$

[0058] 【数2】

$$P = \frac{1}{1 + \exp[-(b_0 + b_1 \times [\text{PD-L1}] + b_2 \times [\text{PD-1}] + b_3 \times [\text{CTLA-4}])]} \quad (\text{II})$$

[0060] 对应于上述的各标志物的指定的阈值及对应于预测值的阈值不特别限定,例如,通过蓄积在从各种癌的患者采集的液体试样中的游离蛋白质标志物的数据,可依经验设定。或者,也可如以下一样地设定指定的截止值。从健康人及各种癌患者采集液体试样,取得游离蛋白质标志物的测定值。进而,从取得的测定值对于各标志物求出能区别健康人和癌患者的值,以得到的值作为对应于各标志物的指定的截止值设定。或者,向由多变量解析制成的判别式代入从来自健康人及各种癌患者的液体试样取得的标志物的测定值而取得健康人的预测值及癌患者的预测值。进而,从取得的预测值求出能区别健康人和癌患者的值,以得到的值作为对应于预测值的指定的截止值设定。

[0061] 本实施方式的判断方法能对于医师等而提供辅助癌的诊断的信息。即,本实施方式的判断方法也可解释为辅助癌的判断或诊断的方法。

[0062] [2. 癌的判断用装置及计算机程序]

[0063] 在本发明的范围中,也含用于实施上述的本实施方式涉及的癌的判断方法的装置。这样的装置是癌的判断装置(以下,也简称为“判断装置”)。另外,在本发明的范围中,也含用于使计算机执行上述的本实施方式涉及的癌的判断方法的计算机程序。这样的计算机程序是癌的判断用的计算机程序。

[0064] 接下来,参照附图说明用于实施上述的本实施方式的方法的装置的一例。但是,本

实施方式不仅限于此例中所示的形态。图1是癌的判断装置的概略图。图1中所示的判断装置10含免疫测定装置20和与该免疫测定装置20连接的计算机系统30。

[0065] 在本实施方式中,免疫测定装置的种类不特别限定,可对应于游离蛋白质标志物的测定方法而适宜选择。在图1中所示的例中,免疫测定装置20是能由使用固定了捕获用抗体的磁性粒子及酶标记的检测用抗体的夹心ELISA法检测发生的化学发光信号的市售的自动免疫测定装置。免疫测定装置20只要是能进行基于使用的标记物质的信号的检测,就不特别限定,可对应于标记物质的种类而适宜选择。

[0066] 如果将含固定捕获用抗体的磁性粒子的试剂、含酶标记的检测用抗体的试剂及从受试者采集的液体试样设置在免疫测定装置20,则该免疫测定装置20使用各试剂来执行抗原抗体反应,作为基于与游离蛋白质标志物特异性地结合的酶标记抗体的光学信息,取得化学发光信号,向计算机系统30发送得到的光学信息。

[0067] 计算机系统30含计算机本体300、输入部301和显示受试体信息或判断结果等的显示部302。计算机系统30从免疫测定装置20接收光学信息。进而,计算机系统30的处理器基于光学信息而执行安装在硬盘313上的癌的判断用的计算机程序。再者,计算机系统30,如图1所示,可为与免疫测定装置20分别地另设的机器,也可为内包免疫测定装置20的机器。在后者的情况中,计算机系统30也可其本身成为判断装置10。在市售的自动免疫测定装置上也可搭载上述的癌的判断用的计算机程序。

[0068] 参照图2,计算机本体300具备CPU(中央处理器,Central Processing Unit)310、ROM(只读存储器,Read Only Memory)311、RAM(随机访问存储器,Random Access Memory)312、硬盘313、输入输出接口314、读取装置315、通信接口316和图像输出接口317。CPU310、ROM311、RAM312、硬盘313、输入输出接口314、读取装置315、通信接口316及图像输出接口317由总线318能数据通信地连接。另外,免疫测定装置20由通信接口316与计算机系统30能通信地连接。

[0069] CPU310能执行存储在ROM311或硬盘313的程序及加载到RAM312上的程序。CPU310算出游离蛋白质标志物的测定值,读取存储在ROM311或硬盘313的对应于各标志物的指定的阈值,判断液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。或者,CPU310也可读取存储在ROM311或硬盘313的多变量解析的判别式,从游离蛋白质标志物的测定值算出预测值。再者,CPU310也可读取存储在ROM311或硬盘313的对应于预测值的指定的阈值,判断液体试样是从罹患癌的受试者采集的与否。CPU310输出判断结果而显示于显示部302。

[0070] ROM311由掩模型ROM、PROM、EPROM、EEPROM等构成。在ROM311中,如前所述,记录由CPU310执行的计算机程序及在所述计算机程序的执行中使用的数据。在ROM311中,也可记录指定的阈值、多变量解析的判别式等,在后述的判断流程中使用的数据。

[0071] RAM312由SRAM、DRAM等构成。RAM312在ROM311及硬盘313中记录的程序的读取中使用。RAM312还在执行这些程序之时,作为CPU310的作业区域利用。

[0072] 硬盘313中安装了用于使CPU310执行的操作系统、应用程序(上述的癌的判断用的计算机程序)等的计算机程序及在所述计算机程序的执行中使用的数据。在硬盘313中,也可记录指定的阈值、多变量解析的判别式等,在后述的判断流程中使用的数据。

[0073] 读取装置315由软盘驱动器、CD-ROM驱动器、DVD-ROM驱动器等构成。读取装置315可读取在可移动型记录介质40中记录的程序或数据。

[0074] 输入输出接口314,例如,由USB、IEEE1394、RS-232C等的串行接口,SCSI、IDE、IEEE1284等的并行接口,和由D/A变换器、A/D变换器等构成的模拟接口构成。输入输出接口314连接了键盘、鼠标等的输入部301。操作者能由该输入部301向计算机本体300输入各种指令。

[0075] 通信接口316,例如,是Ethernet (注册商标) 接口等。计算机本体300也能由通信接口316,向打印机等发送印刷数据。

[0076] 图像输出接口317与由LCD、CRT等构成的显示部302连接。由此,显示部302可输出对应于从CPU310给的图像数据的影像信号。显示部302根据输入的影像信号而显示图像(画面)。

[0077] 参照图3A,对于由判断装置10执行的癌的判断流程进行说明。其中,以从由使用固定捕获用抗体的磁性粒子及酶标记的检测用抗体的夹心ELISA法发生的化学发光信号取得游离PD-L1及游离PD-1的测定值,取得的测定值作为使用而进行判断的情况为例进行说明。但是,本实施方式不仅限于此例。

[0078] 在步骤S101中,CPU310从免疫测定装置20取得光学信息(化学发光信号),从取得的光学信息算出游离PD-L1及游离PD-1的测定值而存储在硬盘313。在步骤S102中,CPU310对算出的游离PD-L1的测定值和存储在硬盘313的第1阈值进行比较。在游离PD-L1的测定值比第1阈值高或与第1阈值相同之时,处理进到步骤S103。在步骤S103中,CPU310对算出的游离PD-1的测定值和存储在硬盘313的第2阈值进行比较。在游离PD-1的测定值比第2阈值高或与第2阈值相同之时,处理进到步骤S104。在步骤S104中,CPU310将液体试样是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。

[0079] 一方面,在步骤S102中,在游离PD-L1的测定值比第1阈值低时,处理进到步骤S105。在步骤S103中,在游离PD-1的测定值比第2阈值低时,处理进到步骤S105。在步骤S105中,CPU310将液体试样不是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。在步骤S106中,CPU310输出判断结果,显示于显示部302,或在打印机上打印。由此,可将辅助受试者的癌的诊断的信息提供于医师等。再者,在此例中,步骤S102及步骤S103的处理可改换顺序。

[0080] 参照图3B,对于由判断装置10执行的癌的判断流程进行说明。其中,以除了游离PD-L1及游离PD-1的测定值之外,还取得游离CTLA-4的测定值,取得的测定值作为使用而进行判断的情况为例进行说明。但是,本实施方式不仅限于此例。

[0081] 在步骤S201中,CPU310从免疫测定装置20取得光学信息(化学发光信号),从取得的光学信息算出游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的测定值而存储在硬盘313。在步骤S202中,CPU310对算出的游离PD-L1的测定值和存储在硬盘313的第1阈值进行比较。在游离PD-L1的测定值比第1阈值高或与第1阈值相同之时,处理进到步骤S203。在步骤S203中,CPU310对算出的游离PD-1的测定值和存储在硬盘313的第2阈值进行比较。在游离PD-1的测定值比第2阈值高或与第2阈值相同之时,处理进到步骤S204。在步骤S204中,CPU310对算出的游离CTLA-4的测定值和存储在硬盘313的第3阈值进行比较。在游离CTLA-4的测定值比第3阈值高或与第3阈值相同之时,处理进到步骤S205。在步骤S205中,CPU310将液体试样是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。

[0082] 一方面,在步骤S202中,在游离PD-L1的测定值比第1阈值低时,处理进到步骤S206。在步骤S203中,在游离PD-1的测定值比第2阈值低时,处理进到步骤S206。在步骤S204

中,在游离CTLA-4的测定值比第3阈值低时,处理进到步骤S206。在步骤S206中,CPU310将液体试样不是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。在步骤S207中,CPU310输出判断结果,显示于显示部302,或在打印机上打印。由此,可将辅助受试者的癌的诊断的信息提供于医师等。再者,在此例中,步骤S202、步骤S203及步骤S204的处理可改换顺序。

[0083] 参照图4,对于由判断装置10执行的癌的判断流程进行说明。其中,以从取得的游离PD-L1及游离PD-1的测定值,由多重逻辑模型取得预测值,得到的预测值作为使用而进行判断的情况为例进行说明。但是,本实施方式不仅限于此例。

[0084] 在步骤S301中,CPU310从免疫测定装置20取得光学信息(化学发光信号),从取得的光学信息算出游离PD-L1及游离PD-1的测定值而存储在硬盘313。在步骤S302中,CPU310从游离PD-L1及游离PD-1的测定值,根据存储在ROM311或硬盘313的判别式而算出基于多重逻辑模型的预测值P。在步骤S303中,CPU310对算出的预测值P和对应于存储在硬盘313的预测值的指定的阈值进行比较。在预测值P比指定的阈值高或与指定的阈值相同之时,处理进到步骤S304,CPU310将液体试样是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。一方面,在步骤S303中,在预测值P比指定的阈值低时,处理进到步骤S305,CPU310将液体试样不是从罹患癌的受试者采集的判断结果存储在硬盘313。在步骤S306中,CPU310输出判断结果,显示于显示部302,或在打印机上打印。由此,可将辅助受试者的癌的诊断的信息提供于医师等。

[0085] 在此例中,当进一步取得游离CTLA-4的测定值时,在步骤S302中,CPU310也可从游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的测定值算出预测值P。

[0086] 接下来,将本发明由实施例详细地说明,但本发明不限于这些实施例。

[0087] **【实施例】**

[0088] **【实施例1】**

[0089] 在实施例1中,基于游离蛋白质标志物的浓度值而判别健康人来源的液体试样和癌患者来源的液体试样。

[0090] **【1. 液体试样】**

[0091] 作为液体试样,使用从健康人及癌患者得到的人血浆(含有EDTA)。健康人的血浆(50个受试体)从BioreclamationIVT公司得到,癌患者的血浆(60个受试体)从Proteogenentec公司及BioreclamationIVT公司得到。癌患者的明细是肺癌患者(21个受试体)、肾脏癌患者(18个受试体)、黑色素瘤患者(15个受试体)及卵巢癌患者(6个受试体)。

[0092] **【2. 游离蛋白质标志物的测定】**

[0093] (2.1) 试剂的调制

[0094] (2.1.1) 第1试剂(生物素标记抗体溶液)

[0095] • PD-L1捕获用第1试剂

[0096] 作为捕获用抗体,使用抗PD-L1抗体(克隆No.27A2)。将此抗体使用Biotin Labeling Kit-SH(Catalog No.LK10、同人化学公司制)而用生物素标记。具体的操作根据该试剂盒附带的手册而进行。将得到的生物素标记抗PD-L1抗体添加到100mM MES(pH 6.5)中而调制PD-L1捕获用第1试剂(抗体浓度5 μ g/ml)。

[0097] • PD-1捕获用第1试剂

[0098] 作为捕获用抗体,使用抗PD-1抗体(克隆No.MIH4)。将此抗体与上述同样地用生物

素标记。将得到的生物素标记抗PD-1抗体添加到100mM HEPES (pH 7.5) 中而调制PD-1捕获用第1试剂(抗体浓度5 μ g/ml)。

[0099] • CTLA-4捕获用第1试剂

[0100] 作为捕获用抗体,使用抗CTLA-4抗体(克隆No. BNI3)。将此抗体与上述同样地用生物素标记。将得到的生物素标记抗CTLA-4抗体添加到100mM MES (pH 6.5) 中而调制CTLA-4捕获用第1试剂(抗体浓度5 μ g/ml)。

[0101] (2.1.2) 第2试剂(含有链霉亲和素结合粒子的液)

[0102] 将在表面固定了链霉亲和素的磁性粒子(平均粒径2 μ m。磁性粒子每1g的链霉亲和素的量是2.9~3.5mg。以下,也称为“STA结合磁性粒子”)用10mM HEPES缓冲液(pH 7.5)清洗3次。将清洗后的STA结合磁性粒子以链霉亲和素浓度成为18~22 μ g/ml (STA结合磁性粒子的浓度成为0.48~0.52mg/ml)的方式添加到10mM HEPES (pH 7.5) 中,得到含有STA结合粒子的液。

[0103] (2.1.3) 第3试剂(碱性磷酸酶标记抗体溶液)

[0104] • PD-L1检测用第3试剂

[0105] 作为检测用抗体,使用抗PD-L1抗体(克隆No. 9L814)。将此抗体使用Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH (Catalog No. LK13、同人化学公司制) 而用碱性磷酸酶标记。具体的操作根据该试剂盒附带的手册而进行。将得到的碱性磷酸酶标记抗PD-L1抗体用凝胶过滤纯化。将此碱性磷酸酶标记抗PD-L1抗体以成为稀释75倍的方式添加到100mM MES (pH 6.5) 而调制PD-L1检测用第3试剂。

[0106] • PD-1检测用第3试剂

[0107] 作为检测用抗体,使用抗PD-1抗体(克隆No. PD1.3.1.3)。将此抗体与上述同样地用碱性磷酸酶标记,纯化。将得到的碱性磷酸酶标记抗PD-1抗体以成为稀释75倍的方式添加到100mM HEPES (pH7.5) 中而调制PD-1检测用第3试剂。

[0108] • CTLA-4检测用第3试剂

[0109] 作为检测用抗体,使用抗CTLA-4抗体(克隆No. 14D3)。将此抗体与上述同样地用碱性磷酸酶标记,纯化。将得到的碱性磷酸酶标记抗CTLA-4抗体以成为稀释75倍的方式添加到100mM MES (pH6.5) 中而调制CTLA-4检测用第3试剂。

[0110] (2.1.4) 第4试剂(测定用缓冲液)

[0111] 以HISCL R4试剂(Sysmex株式会社制)作为第4试剂使用。

[0112] (2.1.5) 第5试剂(基质溶液)

[0113] 以作为碱性磷酸酶的化学发光底物含CDP-Star (注册商标) (Applied Biosystems 公司)的HISCL R5试剂(Sysmex株式会社制)作为第5试剂使用。

[0114] (2.2) 测定

[0115] 各游离蛋白质标志物的测定使用上述的第1~第5试剂而由全自动免疫测定装置HISCL-800 (Sysmex株式会社制) 进行。再者,此测定基于在磁性粒子上的夹心ELISA。具体而言,向第1试剂(50 μ L) 加血浆(20 μ L) 而混合之后,加第2试剂(30 μ L) 而进行混合。对得到的混合液中的磁性粒子进行集磁而除上清,加HISCL清洗液(300 μ L) 而清洗磁性粒子。除上清,向磁性粒子添加第3试剂(80 μ L) 而混合。对得到的混合液中的磁性粒子进行集磁而除上清,加HISCL清洗液(300 μ L) 而清洗磁性粒子。除上清,向磁性粒子添加第4试剂(50 μ L) 及第5试剂

(100 μ L),充分混合而对化学发光强度进行测定。反应时间经全工序是17分钟。向校准曲线适用得到的化学发光强度,算出各游离蛋白质标志物的浓度。

[0116] 【3.判断及结果】

[0117] 从来源于健康人(n=50)及癌患者(n=60)的各自的液体试样中的标志物的浓度值,基于多重逻辑模型而算出各受试体的预测值(P)。具体而言,将预测值从下述的回归式算出。此多重逻辑回归分析使用StatFlex(Artec公司制)进行。

[0118] 回归式: $P=1/(1+\exp(-x))$

[0119] 式中,“x”因判断中使用的标志物而不同。在表1显示对应于判断中使用的标志物的“x”。表中,[PD-L1]、[PD-1]及[CTLA-4]各自是在液体试样中的游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的浓度的值。在“x”中的各系数使用合健康人和癌患者的全体受试体(n=110)的数据算出。

[0120] 【表1】

[0121]

标志物	
PD-L1	$x=-4.4399+0.02837 \times [PD-L1]$
PD-1	$x=-3.3776+0.01925 \times [PD-1]$
CTLA-4	$x=-1.0339+0.57160 \times [CTLA-4]$
PD-L1 及 PD-1	$x=-7.1206+0.02637 \times [PD-L1] +0.01959 \times [PD-1]$
PD-L1、PD-1 及 CTLA-4	$x=-8.4135+0.02898 \times [PD-L1] +0.02105 \times [PD-1] +0.48802 \times [CTLA-4]$

[0122] 基于算出的各试样的预测值而制成ROC曲线(受试者工作特征曲线,Receiver Operatorating Characteristic curve)。对应于判断中使用的标志物的ROC曲线示于图5~9。另外,从ROC曲线确定指定的阈值。进而,在预测值比指定的阈值高或与指定的阈值相同时,判断为液体试样是癌患者来源的试样,在预测值比指定的阈值低时,判断为液体试样是健康人来源的试样。表2显示各ROC曲线的曲线下面积(AUC)、以及由上述的判断的灵敏度是约90%之时的特异性。再者,ROC曲线的制成、阈值的算出、以及灵敏度及特异性的算出使用StatFlex(Artec公司制)进行。

[0123] 【表2】

[0124]

标志物	AUC	灵敏度约90%之时的特异性(%)
PD-L1	0.80242	47.92
PD-1	0.79755	45.83
CTLA-4	0.82241	37.50
PD-L1及PD-1	0.85534	64.58
PD-L1、PD-1及CTLA-4	0.89113	70.83

[0125] 如表2所示,与AUC将游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4各自单独在判断中使用时相比,在使用游离PD-L1及游离PD-1的组合,或者游离PD-L1、游离PD-1及游离CTLA-4的组合

的方更高。另外,与将游离PD-L1及游离PD-1各自单独在判断中使用相比,在使用游离PD-L1及游离PD-1的组合的方的由判断的灵敏度是约90%之时的特异性更高。此特异性通过向游离PD-L1及游离PD-1进一步组合游离CTLA-4而进一步变高。从而表明,由液体试样中的游离PD-L1及游离PD-1的浓度值,能以高的精度判别该试样是癌患者来源的试样与否。另外表明,通过将游离CTLA-4的浓度值进一步在判断中使用,判断精度进一步提升。

[0126] 【符号的说明】

- [0127] 10:判断装置
- [0128] 20:免疫测定装置
- [0129] 30:计算机系统
- [0130] 40:记录介质
- [0131] 300:计算机本体
- [0132] 301:输入部
- [0133] 302:显示部
- [0134] 310:CPU
- [0135] 311:ROM
- [0136] 312:RAM
- [0137] 313:硬盘
- [0138] 314:输入输出接口
- [0139] 315:读取装置
- [0140] 316:通信接口
- [0141] 317:图像输出接口
- [0142] 318:总线

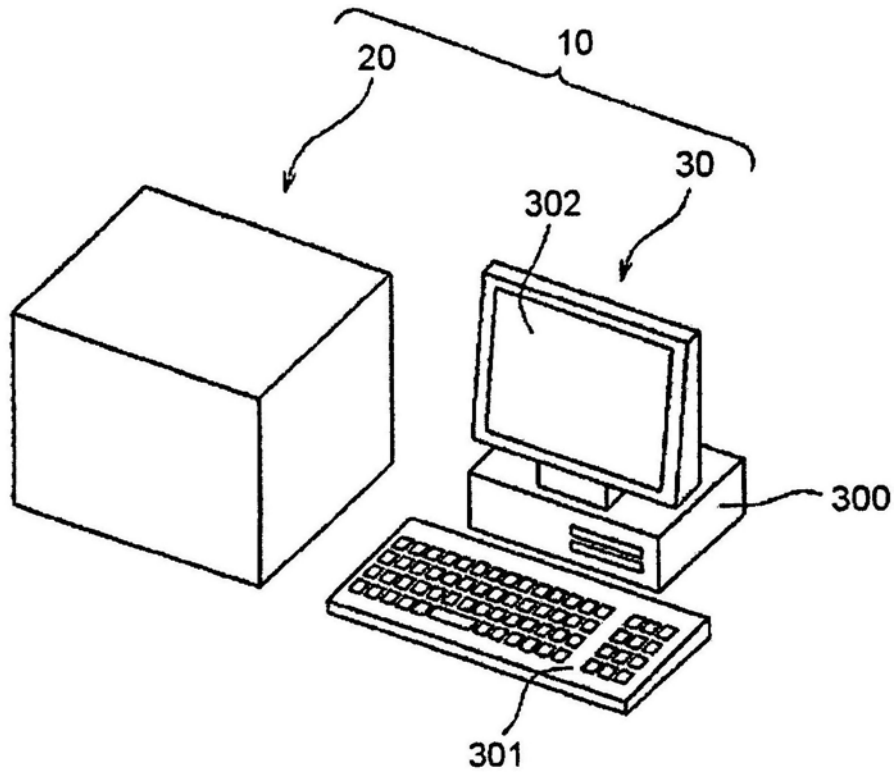


图1

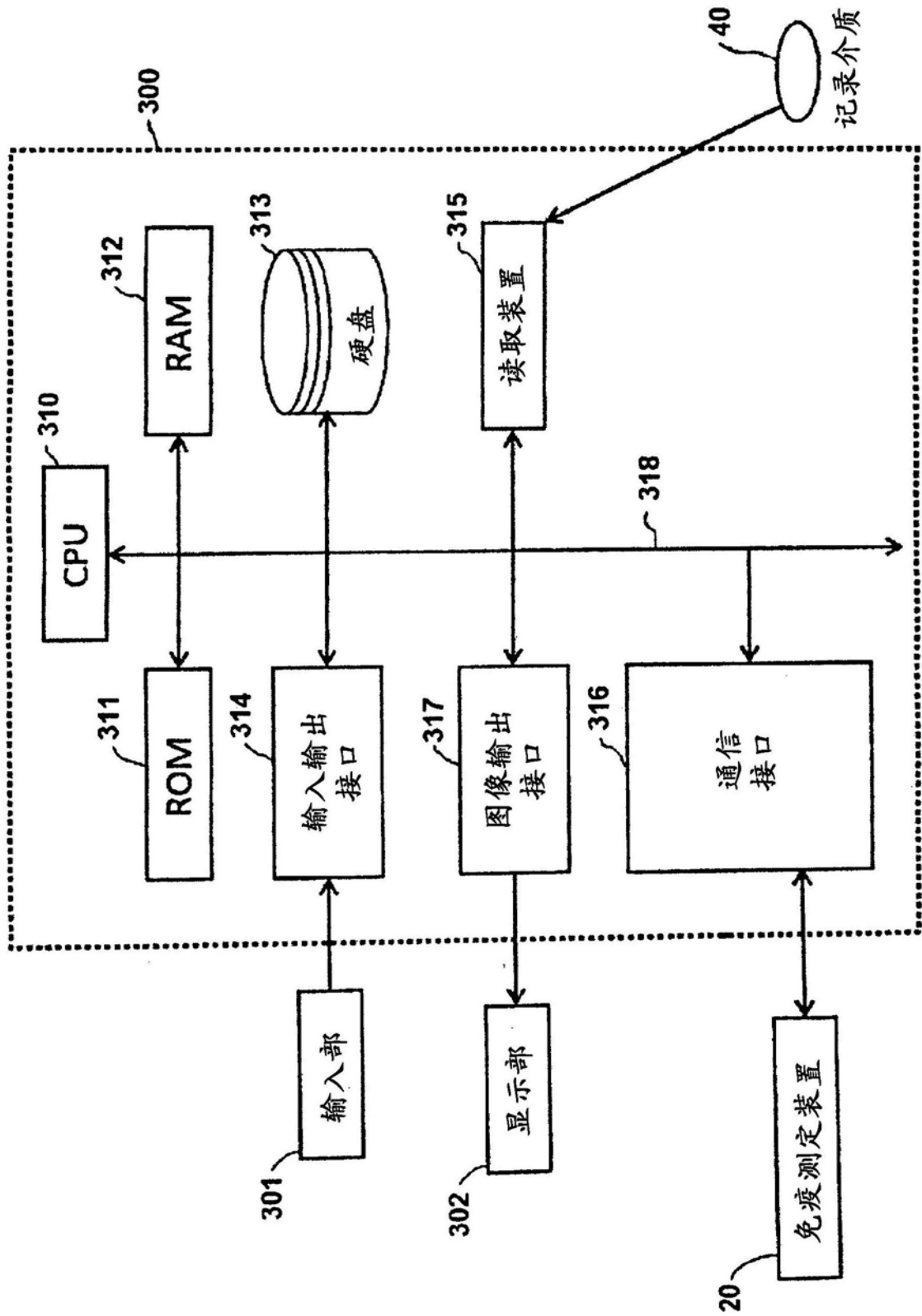


图2

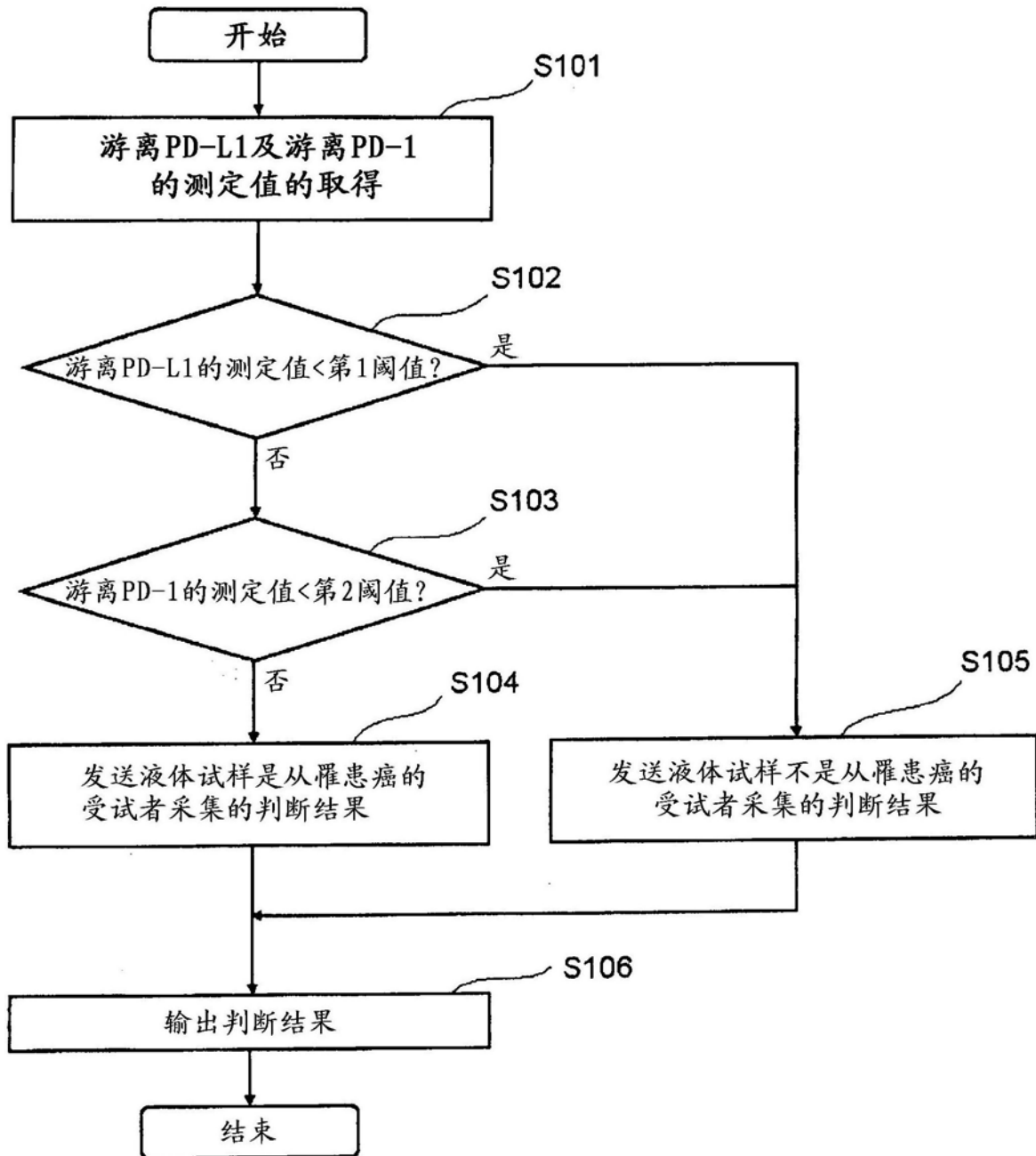


图3A

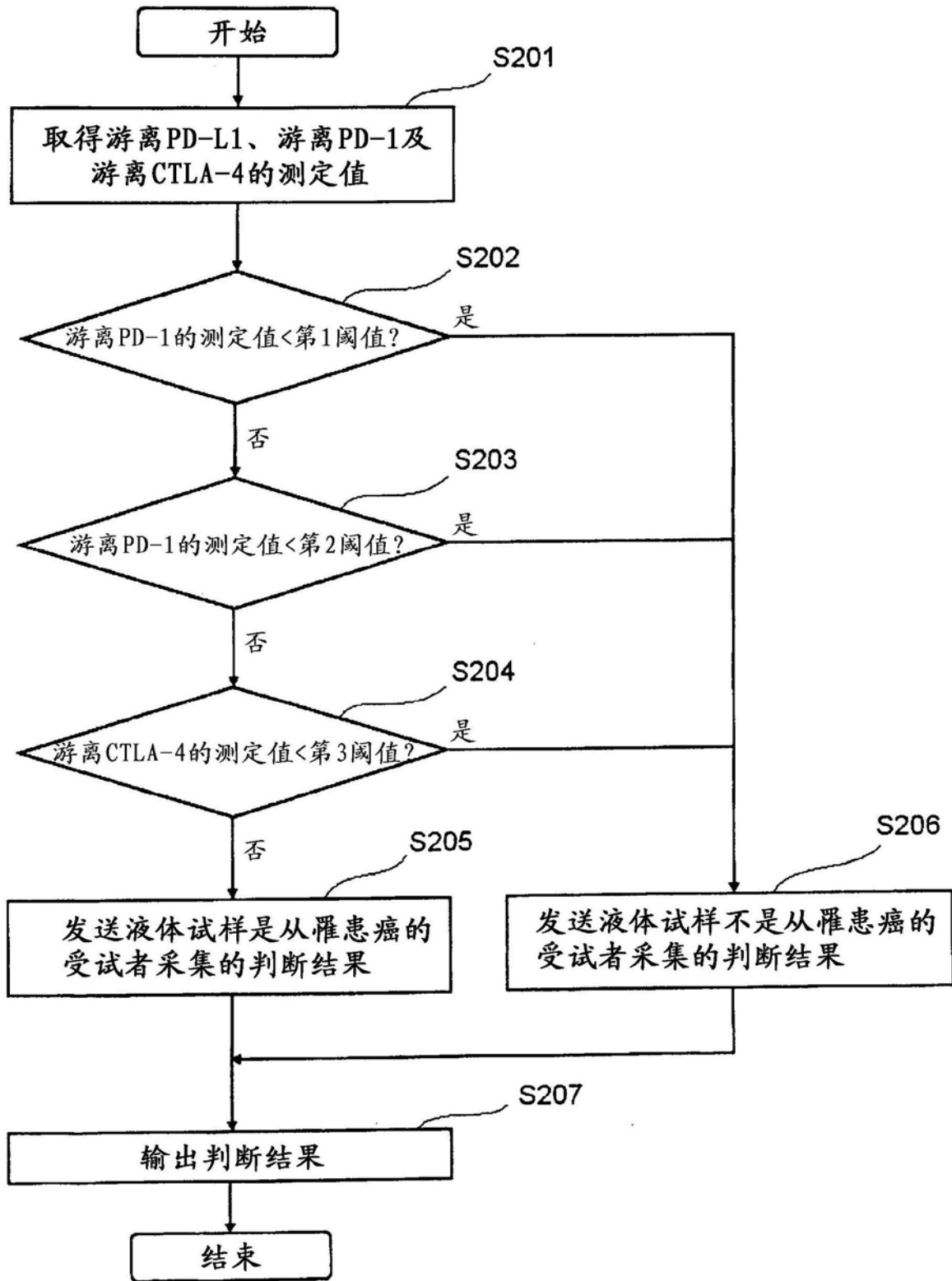


图3B

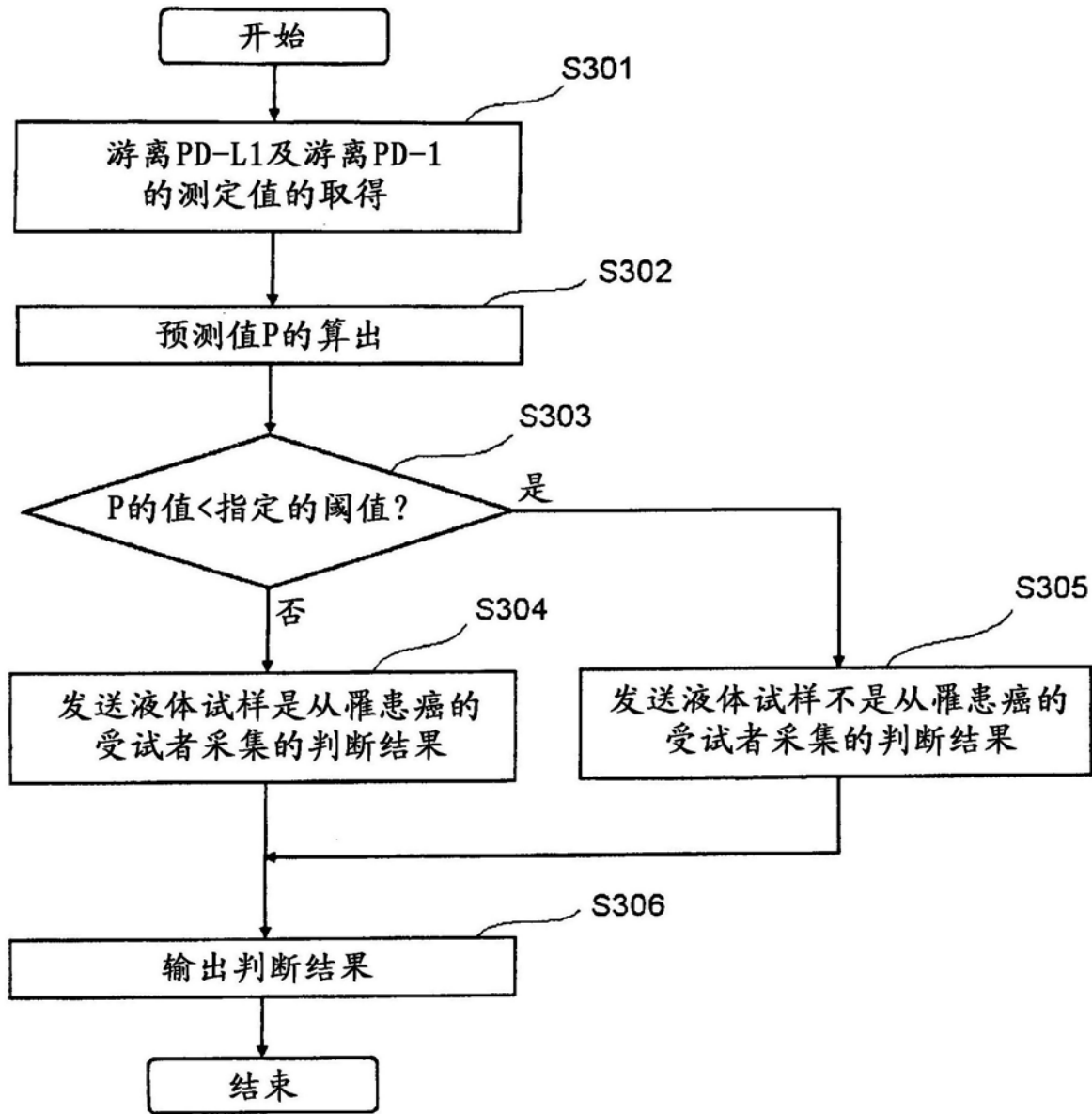


图4

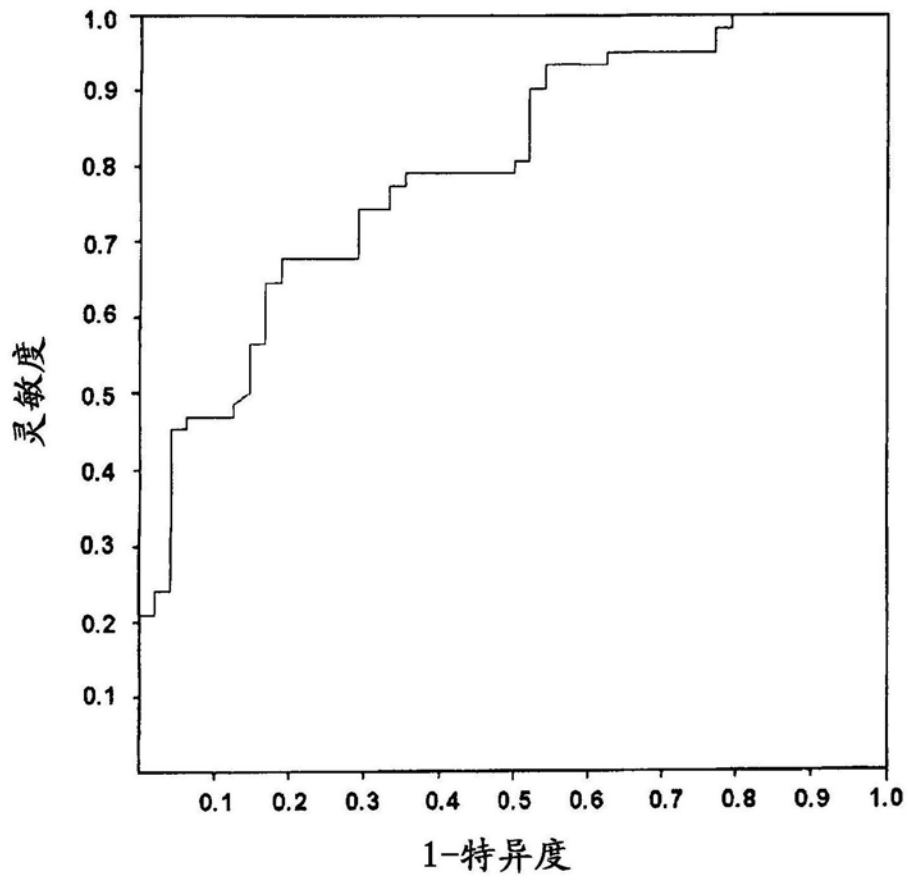


图5

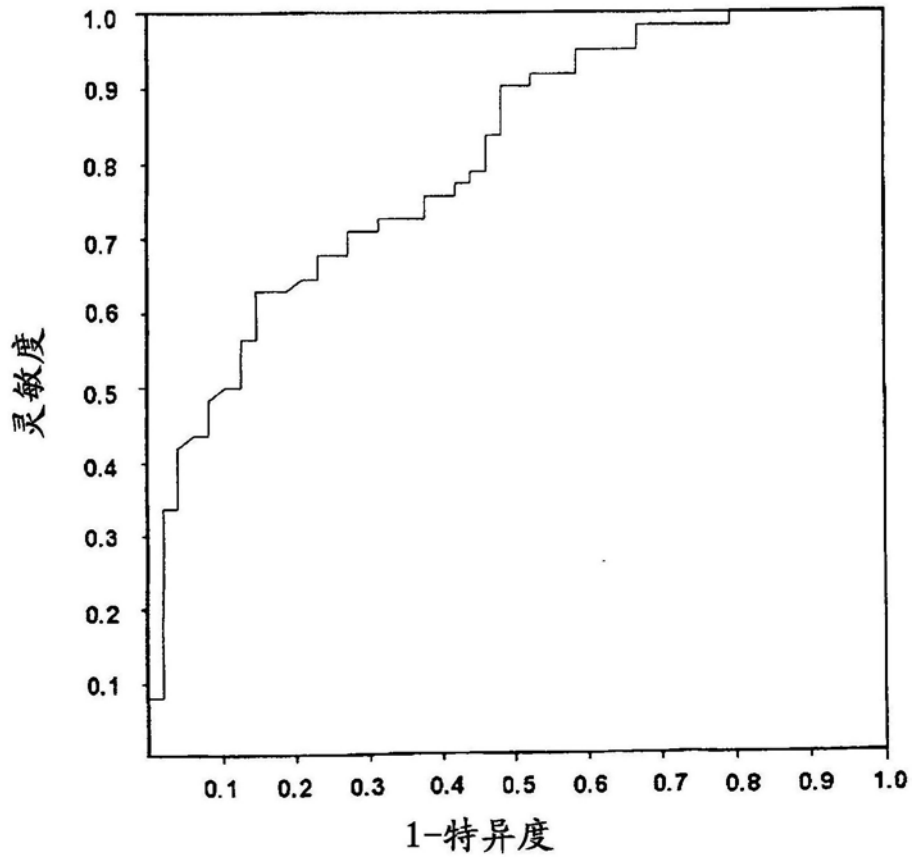


图6

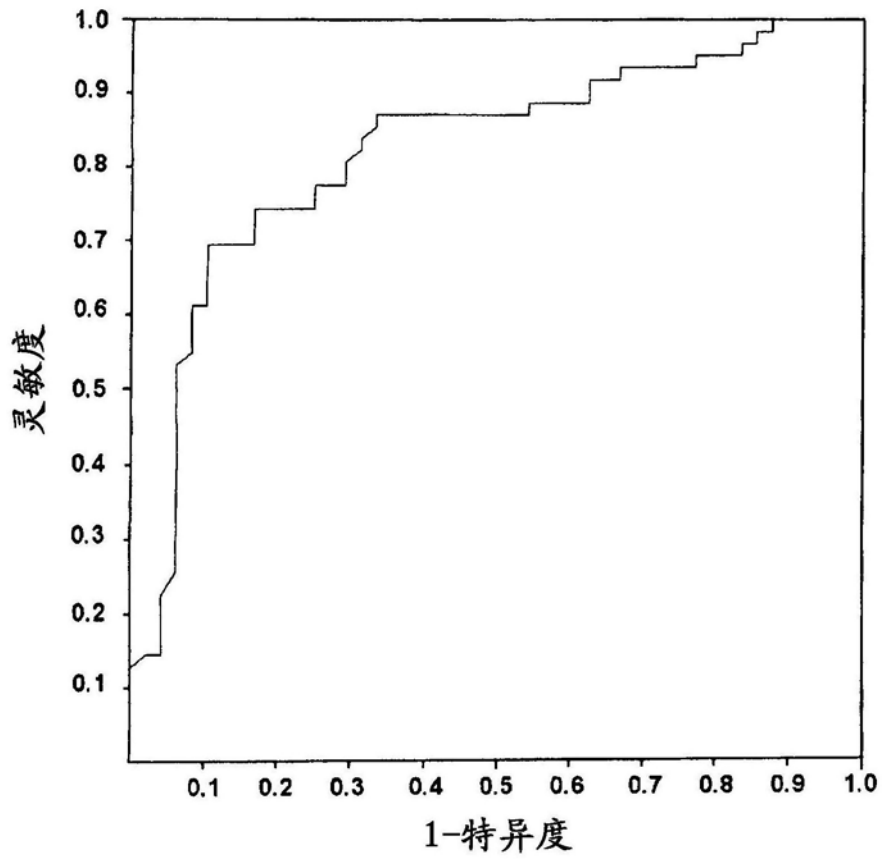


图7

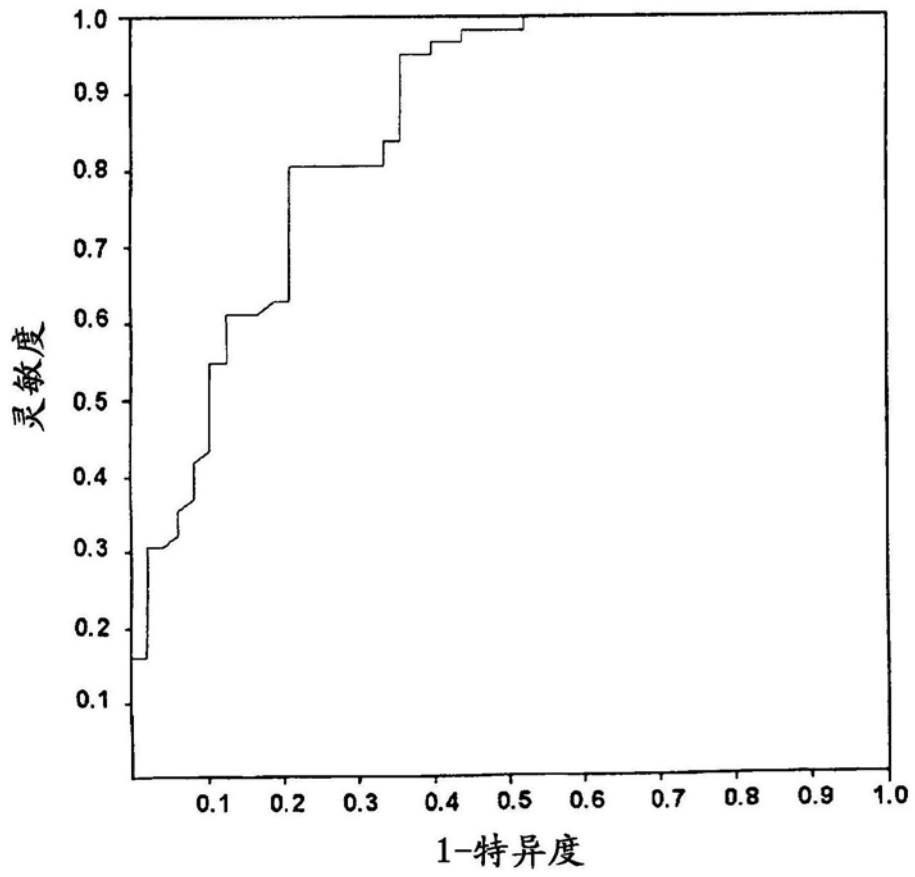


图8

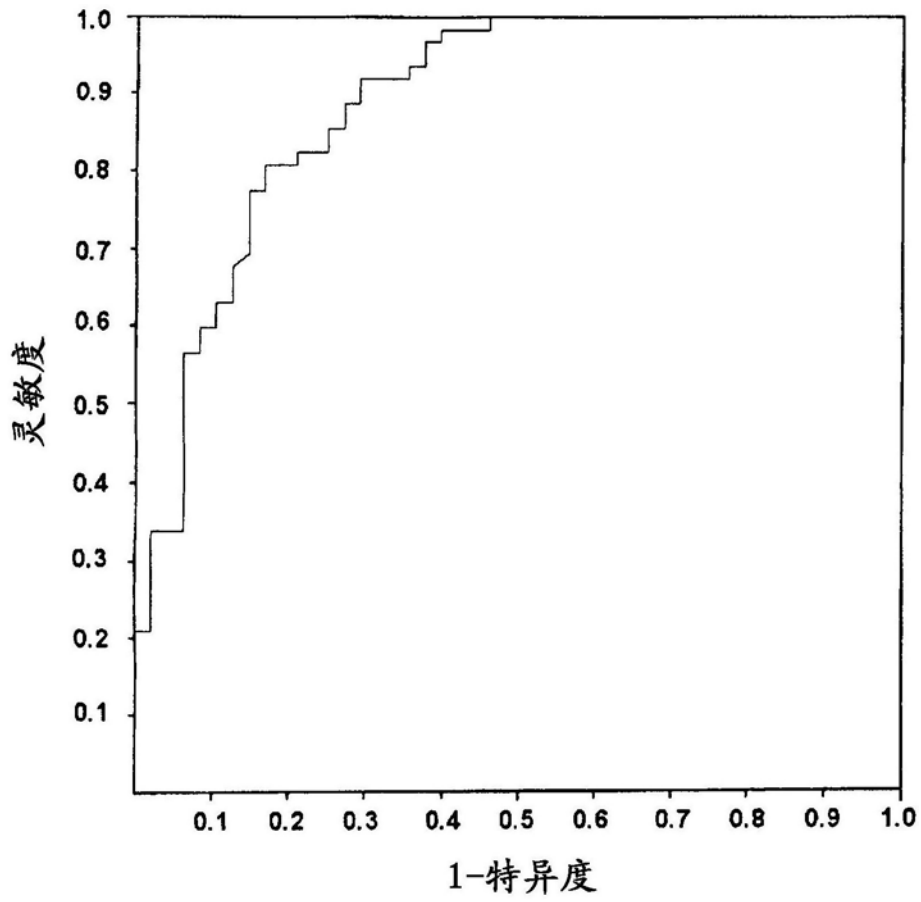


图9

专利名称(译)	癌的判断方法、癌的判断用装置及计算机程序		
公开(公告)号	CN108463724A	公开(公告)日	2018-08-28
申请号	CN201680072671.6	申请日	2016-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 希森美康株式会社		
[标]发明人	本庶佑 茶本健司 后藤惠 宇贺均		
发明人	本庶佑 茶本健司 后藤惠 宇贺均		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C07K14/47 G01N33/50 G01N33/574 C07K16/18 C07K16/24		
CPC分类号	C07K16/2818 C07K16/2827 C07K14/47 G01N33/574 G01N33/57423 G01N33/5743 G01N33/57438 G01N33/57449 G01N33/57488 G01N2333/70521 G01N2333/70532 G01N2333/70596 G16H50/20 G01N33/57492		
优先权	2015256605 2015-12-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及癌的判断方法。再者，本发明涉及癌的判断用装置及计算机程序。

$$P = \frac{1}{1 + \exp[-(b_0 + b_1 \times [PD-1]) + b_2 \times [PD-1]^2]}$$