



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109669040 A

(43)申请公布日 2019.04.23

(21)申请号 201811538730.1

(22)申请日 2018.12.14

(71)申请人 厦门艾德生物医药科技股份有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区鼎山路  
39号

(72)发明人 朱俊轩 周文刚 陈宁 郑立谋

(74)专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所  
有限公司 35204

代理人 张松亭 游学明

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

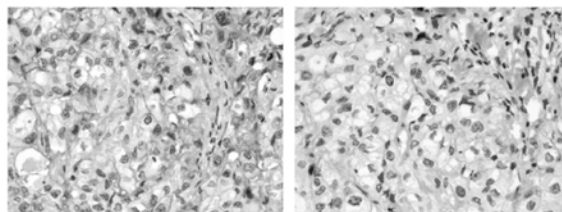
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的  
抗体稀释液及其使用方法

### (57)摘要

本发明公开了一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液及其使用方法,所述的抗体稀释液,它包括:PEG20000(0.1-100g/L),酪蛋白钠盐(1-1000mg/L),对乙酰氨基酚(1-1000mg/L),牛血清蛋白(10-10000mg/L),氯化钠(1-1000mM),0.01-10% TritonX,0.01-10% Proclin300,溶剂为水。本发明抗体稀释液能够增强PD-L1单克隆抗体使用效果。



1. 一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,按质量比包括:PEG200000.1~100g/L,酪蛋白钠盐1~1000mg/L,对乙酰氨基酚1~1000mg/L,牛血清蛋白10~10000mg/L,氯化钠1~1000mM,0.01~10%TritonX,0.01~10%Proclin300,溶剂为水。

2. 根据权利要求1所述的一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,其特征在于:所述的抗体为兔来源的抗人PD-L1的抗体;该抗体的抗原决定簇位于PD-L1的胞内区。

3. 根据权利要求2所述的一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,其特征在于:所述抗体为CST公司的克隆号为E1L3N的抗体。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,其特征在于:该抗体稀释液的pH为7.5-8.5。

5. 根据权利要求4所述的一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,其特征在于:该抗体稀释液的pH为7.9-8.1。

6. 一种免疫组化方法,其特征在于:在组化过程中,采用权利要求1或2或3所述的用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液进行抗原修复。

7. 根据权利要求6所述的一种免疫组化方法,其特征在于,所述的抗原修复操作过程中,抗体稀释液预先加热至90-99℃。

8. 根据权利要求7所述的一种免疫组化方法,其特征在于,所述的抗原修复操作过程中,抗体稀释液预先加热至97-99℃。

9. 如权利要求7所述的一种免疫组化方法,其特征在于,所述的抗原修复操作过程中,样本在抗体稀释液中的浸泡时间为15-25min。

10. 如权利要求6所述的一种免疫组化方法,包括如下步骤,将玻片依次浸入无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、去离子水,每次5min复水;将样本置于预先加热至微沸状态的抗原修复液中,保持微沸状态20min,待恢复至室温后将样本取出;添加100μL3%过氧化氢溶液,室温下孵育10min去除内源性过氧化物酶;使用5%的山羊血清封闭组织30min,以封闭非特异性结合;

使用PBST将PD-L1抗体稀释至0.01-10ug/mL的浓度,加入100μL,室温避光孵育60min;

添加偶联了HRP的抗兔IgG抗体100μL,室温避光孵育30min;

添加DAB 100μL,室温避光孵育5-10min显色;显色结束后加入苏木素孵育5min复染;洗去苏木素后在10%盐酸中浸泡5sec并迅速用去离子水冲洗5min;将玻片依次浸入85%乙醇3min、95%乙醇3min、无水乙醇3min进行脱水;脱水完成后将玻片浸泡于二甲苯中,等待封片;在组织处于湿润状态下添加中性树胶,盖上盖玻片后晾干。

## 一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液及其使用方法。

### 背景技术

[0002] 免疫组织化学是利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究,简称为免疫组化。目前免疫组织化学的染色方法主要分为:由实验人员全程操作完成的手动染色和由全自动免疫组化染色仪操作完成的仪器染色。

[0003] PD-L1是肿瘤免疫疗法中最为重要的靶点,肿瘤中PD-L1的表达量与PD-1/L1抗体类药物的治疗效果具有密切的相关性。PD-L1在临床上的检测方法为免疫组织化学法。目前主流的PD-L1免疫组化检测均采用仪器染色。

[0004] 仪器染色由于其配套的强力二抗体系以及精确的温控系统,其染色效果会优于手动染色。然而,由于全自动免疫组化染色仪的高昂价格以及其软件系统的排它性,导致PD-L1免疫组化检测的普及性和一致性产生了巨大的问题。因此,开发通用的、效果优良的PD-L1免疫组织化学染色方法成为了当务之急。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的之一,在于提供一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液,按质量比包括:PEG20000(0.1~100g/L),酪蛋白钠盐(1~1000mg/L),对乙酰氨基酚(1~1000mg/L),牛血清蛋白(10~10000mg/L),氯化钠(1~1000mM),0.01~10%TritonX,0.01~10%Proclin300,溶剂为水。

[0006] 优选地,本发明抗体稀释液,配合使用的抗体为兔来源的抗人PD-L1的抗体;且该抗体的抗原决定簇位于PD-L1的胞内区。

[0007] 进一步优选,所述抗体为CST(Cell Signaling Technology)公司的克隆号为E1L3N的抗体。

[0008] 优选地,该抗体稀释液的pH为7.5-8.5。

[0009] 进一步优选,该抗体稀释液的pH为7.9-8.1。

[0010] 本发明的另一目的,在于提供一种免疫组化方法,在该方法中,采用前述的用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液进行抗原修复。

[0011] 优选地,所述的抗原修复操作过程中,抗体稀释液预先加热至90-99℃。

[0012] 进一步优选,所述的抗原修复操作过程中,抗体稀释液预先加热至97-99℃。

[0013] 优选地,所述的抗原修复操作过程中,样本在抗体稀释液中的浸泡时间为15-25min。

[0014] 本发明技术方案与背景技术相比,具有如下优点:

[0015] 本发明中的抗体稀释液可通过电荷调节的原理特异性地增强本发明中PD-L1抗体与抗原的亲合力,同时本发明中的抗体稀释液还具有增强分子动力学作用的功能,使抗原-抗体结合的动态平衡速度加快,从而大幅增强了本发明中PD-L1抗体的免疫组织化学染色强度。

[0016] 本发明中的抗体的抗原决定簇位于细胞质内,通过免疫组化实验的加热碱性抗原修复法可容易地使抗体能够与抗原很好地结合,大大减少了了PD-L1免疫组织化学实验环节中抗原修复的难度。

[0017] 当本发明中的PD-L1免疫组织化学染色方案强度达到与仪器染色相近的效果时,便可替代昂贵的全自动免疫组织化学染色仪。

[0018] 本发明可以在所有具备基础免疫组织化学实验条件的实验室进行PD-L1免疫组织化学染色,结果的效果和可靠性不亚于仪器染色。

[0019] 本发明可在不牺牲实验效果的情况下,使PD-L1的临床检测成本下降10倍。

[0020] 本发明可大幅减少PD-L1检测(仪器染色)所产生的有害废液。

## 附图说明

[0021] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0022] 图1为实施例4的实验结果。其中,左图为使用本发明中所述抗体的实验结果,右图为使用22C3的实验结果。

[0023] 图2为实施例5的实验结果。其中,左图为使用PBST稀释抗体的实验结果,右图为使用本发明中所述抗体稀释液稀释抗体的实验结果。

[0024] 图3为实施例6的实验结果。其中,左图为采用本发明中所述的免疫组化染色方案的实验结果,右图为使用22C3和Dako Link48的免疫组化实验结果。

## 具体实施方式

[0025] 实施例1

[0026] 抗体稀释液配置,它包括:PEG20000 (1g/L),酪蛋白钠盐 (5mg/L),对乙酰氨基酚 (5mg/L),牛血清蛋白 (100mg/L),氯化钠 (5mM),0.1% TritonX,0.1% Proclin300。

[0027] 各组分称量之后,分别用水溶解、混匀至以上浓度,再将溶液pH调节为8。

[0028] 实施例2

[0029] 抗体稀释液配置,它包括:PEG20000 (0.5g),酪蛋白钠盐 (50mg),对乙酰氨基酚 (50mg),牛血清蛋白 (1000mg),氯化钠 (100mM),1% TritonX,1% Proclin300。

[0030] 各组分称量之后,分别用水溶解、混匀至以上浓度,再将溶液pH调节为8.1。

[0031] 实施例3

[0032] 抗体稀释液配置,它包括:PEG20000 (0.5g),酪蛋白钠盐 (100mg),对乙酰氨基酚 (500mg),牛血清蛋白 (500mg),氯化钠 (300mM),5% TritonX,3% Proclin300。各组分称量之后,分别用水溶解、混匀至以上浓度,再将溶液pH调节为7.8。

[0033] 实施例4:抗体的抗原修复容易性

[0034] 将载有组织样本的玻片置于75℃烤片15-30min。在通风橱中,将玻片依次浸入2缸二甲苯中,每次30min。将玻片依次浸入无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、去离子

水,每次5min复水。

[0035] 将样本置于预先加热至微沸(约98℃)状态的抗体稀释液中进行抗原修复,保持微沸状态20min,待恢复至室温后将样本取出。添加100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定)3%过氧化氢溶液,室温下孵育10min去除内源性过氧化物酶。使用5%的山羊血清(NGS)封闭组织30min以封闭非特异性结合。

[0036] 使用PBST缓冲液将PD-L1抗体(CST公司,克隆号为E1L3N)和PD-L1抗体22C3(Dako,对比)分别稀释至1ug/mL的浓度,加入100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育60min。添加偶联了HRP(辣根过氧化物酶)的抗兔IgG抗体100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育30min。添加DAB(3,3-二氨基联苯胺四氯化碳)100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育5min显色。

[0037] 显色结束后加入苏木素孵育5min复染。洗去苏木素后在10%盐酸中浸泡5sec并迅速用去离子水冲洗5min。将玻片依次浸入85%乙醇(3min)、95%乙醇(3min)、无水乙醇(3min)进行脱水。脱水完成后将玻片浸泡于二甲苯中,等待封片。在组织处于湿润状态下添加中性树胶,盖上盖玻片后晾干。

[0038] 实验结果表明,本发明中的抗体可在常规的抗原修复条件下被使用,而现有主流产品在此实验条件下无效。(图1)

[0039] 实施例5:抗体稀释液对抗体染色效果的增强作用

[0040] 将载有组织样本的玻片置于75℃烤片15min。在通风橱中,将玻片依次浸入2缸二甲苯中,每次30min。将玻片依次浸入无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、去离子水,每次5min复水。将样本置于预先加热至微沸(约98℃)状态的抗原修复液(pH8.0,实施例1制备)中,保持微沸状态20min,待恢复至室温后将样本取出。添加100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定)3%过氧化氢溶液,室温下孵育10min去除内源性过氧化物酶。使用5%的山羊血清(NGS)封闭组织30min以封闭非特异性结合。

[0041] 使用PBST或本发明中的抗体稀释液将本发明中的PD-L1抗体稀释分别至1ug/mL的浓度,加入100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育60min。添加偶联了HRP的抗兔IgG抗体100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育30min。添加DAB(3,3-二氨基联苯胺四氯化碳)100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育10min显色。显色结束后加入苏木素孵育5min复染。洗去苏木素后在10%盐酸中浸泡5sec并迅速用去离子水冲洗5min。将玻片依次浸入85%乙醇(3min)、95%乙醇(3min)、无水乙醇(3min)进行脱水。脱水完成后将玻片浸泡于二甲苯中,等待封片。在组织处于湿润状态下添加中性树胶,盖上盖玻片后晾干。

[0042] 实验结果表明,相较于PBST(常规抗体稀释液),本发明中的抗体稀释液可大幅增强本发明中的PD-L1抗体的免疫组织化学染色效果。(图2)

[0043] 实施例6:手动染色与仪器染色的染色效果对比

[0044] 手动染色:将载有组织样本的玻片置于75℃烤片15min。在通风橱中,将玻片依次浸入2缸二甲苯中,每次30min。将玻片依次浸入无水乙醇、95%、85%乙醇、75%乙醇、去离子水,每次5min复水。将样本置于预先加热至微沸(约98℃)状态的抗原修复液(pH8.0,实施例1中制备)中,保持微沸状态20min,待恢复至室温后将样本取出。添加100μL(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定)3%过氧化氢溶液,室温下孵育10min去除内源性过氧化物

酶。使用5%的山羊血清(NGS)封闭组织30min以封闭非特异性结合。

[0045] 使用本发明中的抗体稀释液将本发明中的PD-L1抗体(CST公司,克隆号为E1L3N)稀释至1 $\mu$ g/mL的浓度,加入100 $\mu$ L(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育60min。添加偶联了HRP的抗兔IgG抗体100 $\mu$ L(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育30min。添加DAB 100 $\mu$ L(以全面覆盖样本为目标,根据实际情况而定),室温避光孵育5min显色。显色结束后加入苏木素孵育5min复染。洗去苏木素后在10%盐酸中浸泡5sec并迅速用去离子水冲洗5min。将玻片依次浸入85%乙醇(3min)、95%乙醇(3min)、无水乙醇(3min)进行脱水。脱水完成后将玻片浸泡于二甲苯中,等待封片。在组织处于湿润状态下添加中性树胶,盖上盖玻片后晾干。

[0046] 仪器染色:根据实验流程在Leica平台(Leica BOND MAX系统)上完成染色实验后,将玻片依次浸入85%乙醇(3min)、95%乙醇(3min)、无水乙醇(3min)进行脱水。脱水完成后将玻片浸泡于二甲苯中,等待封片。在组织处于湿润状态下添加中性树胶,盖上盖玻片后晾干。

[0047] 结果表明,采用本发明中的免疫组化染色方案所得到的染色效果接近仪器染色(22C3,Dako Link48)所得到的效果(图3)。

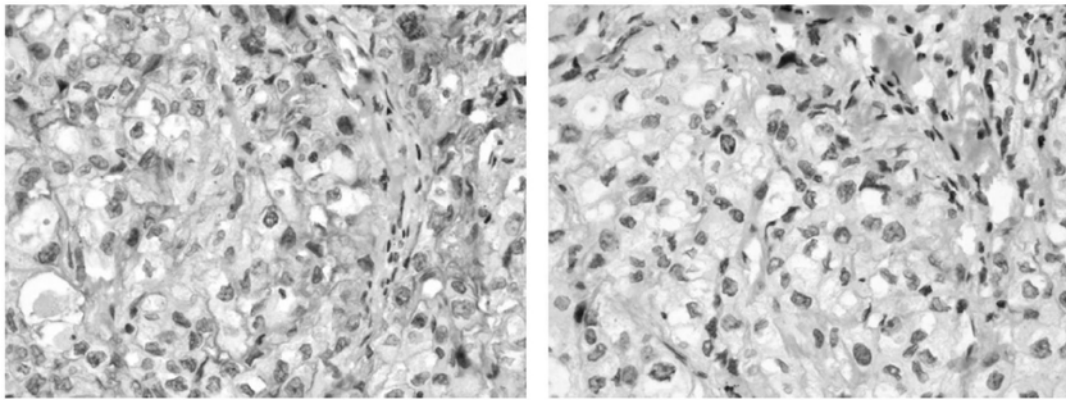


图1

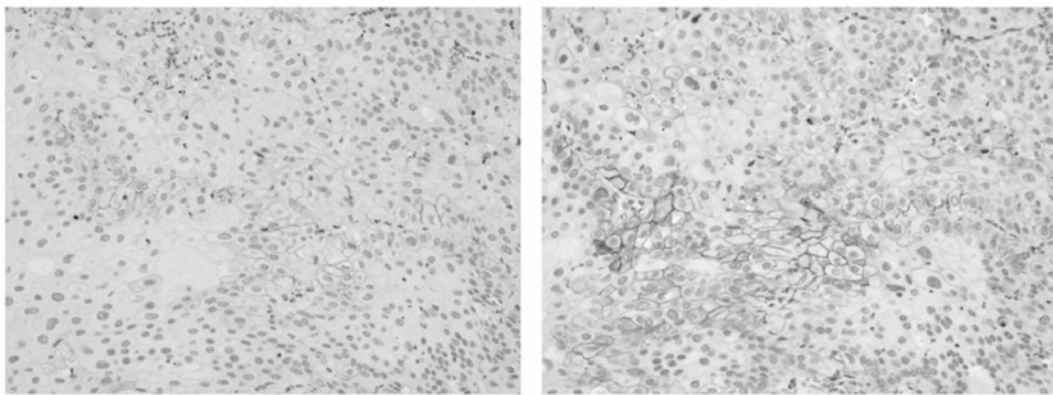


图2

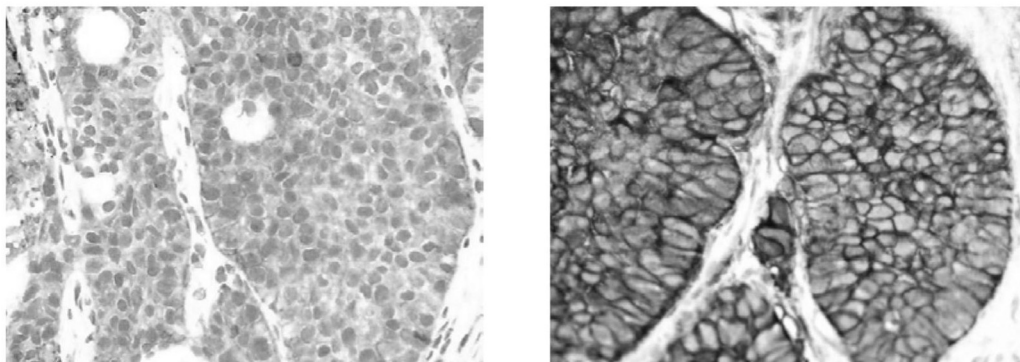


图3

专利名称(译)	一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109669040A</a>	公开(公告)日	2019-04-23
申请号	CN201811538730.1	申请日	2018-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	厦门艾德生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门艾德生物医药科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门艾德生物医药科技股份有限公司		
[标]发明人	周文刚 陈宁 郑立谋		
发明人	朱俊轩 周文刚 陈宁 郑立谋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/536		
代理人(译)	张松亭		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用于增强PD-L1单克隆抗体使用效果的抗体稀释液及其使用方法，所述的抗体稀释液，它包括：PEG20000(0.1-100g/L)，酪蛋白钠盐(1-1000mg/L)，对乙酰氨基酚(1-1000mg/L)，牛血清蛋白(10-10000mg/L)，氯化钠(1-1000mM)，0.01-10% TritonX，0.01-10% Proclin300，溶剂为水。本发明抗体稀释液能够增强PD-L1单克隆抗体使用效果。

