



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541217 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811367075.8

(22)申请日 2018.11.16

(71)申请人 臻和(北京)科技有限公司

地址 100000 北京市海淀区花园北路35号9
号楼9层908

申请人 信达生物制药(苏州)有限公司

(72)发明人 张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽
熊艳 彭波 周辉

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 代芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/25(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用,涉及多重免疫组化技术领域,本发明所述多重免疫组化分析试剂盒,其中限定了单克隆抗体组包括CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种。本发明所述多重免疫组化分析试剂盒以给予免疫检查点抑制剂后的人或动物离体组织为样本进行检测,进而用于判断免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤的作用有效性。本发明还提供了一种所述多重免疫组化分析试剂盒的使用方法,能够有效的在同一组织上标记不超过六种免疫检查点,多种标记之间无交叉反应。

1. 一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒,包括单克隆抗体组、抗原修复液、辣根过氧化物酶标记的二抗、过氧化氢、荧光基团标记的酪氨盐与核染色剂;

所述单克隆抗体组包括:CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种;

所述荧光基团的种类数量与单克隆抗体组中单克隆抗体种类的数量一致。

2. 根据权利要求1所述的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括防猝灭剂、洗涤剂 and 封闭剂。

3. 根据权利要求2所述的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述洗涤液为TBST缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述核染色剂为DAPI染色剂。

5. 根据权利要求1或4所述的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述荧光基团选自520-FITC、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5和690-Cy5.5的两种以上。

6. 一种权利要求1~5任意一项所述多重免疫组化分析试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

(1) 将待测组织与所述单克隆抗体组中的任意一种单克隆抗体混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗复合物;

(2) 抗原-一抗复合物与辣根过氧化物酶标记的二抗混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗-二抗复合物;

(3) 抗原-一抗-二抗复合物、任意一种荧光基团标记的酪氨盐和过氧化氢混合,孵育,洗涤,得到荧光标记复合物;

(4) 荧光标记复合物与抗原修复液混合,微波处理,洗涤,得到荧光标记复合物;

所述微波处理的条件包括:750~850w处理1~3min,再以200~300w处理12~20min;

(5) 以荧光标记复合物作为待测组织重复步骤(1)~(4),重复至所述单克隆抗体组中的单克隆抗体全部与待测组织结合过为止,得到多重标记复合物;

其中,步骤(1)中的单克隆抗体与其他任意一次步骤(1)采用的单克隆抗体种类均不相同,步骤(3)中荧光基团标记的酪氨盐与其他任意一次步骤(3)采用的荧光基团标记的酪氨盐均不相同;

(6) 向步骤(5)所得的多重标记复合物中添加核染色剂,孵育,洗涤,封片,以连续光谱成像、检测。

7. 根据权利要求6所述的使用方法,其特征在于,所述洗涤重复2~3次;所述孵育温度为35~42℃。

8. 根据权利要求6所述的使用方法,其特征在于,所述步骤(1)中单克隆抗体使用时稀释倍数为50~500倍;所述步骤(2)中,辣根过氧化物酶标记的二抗的用量为50~200μL/样品。

9. 根据权利要求6所述的使用方法,其特征在于,当所述多重免疫组化分析试剂盒还包括防猝灭剂时,所述步骤(7)中洗涤后添加防猝灭剂,再进行封片。

10. 权利要求1~5任意一项所述的多重免疫组化分析试剂盒在预测免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤有效性中的应用。

一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及多重免疫组化技术领域,尤其涉及一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用。

背景技术

[0002] 淋巴瘤是起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,按病理可以分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。2015年中国淋巴瘤估计新发病例数为8.8万。霍奇金淋巴瘤依据形态学和免疫表型分为结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤和经典型霍奇金淋巴瘤(classical hodgkin lymphoma, cHL)两大类,后者再分为富含淋巴细胞型、混合细胞型、结节硬化型和淋巴细胞削减型4个亚型。根据一项包含10002例中国淋巴瘤患者的病理分型分析中,霍奇金淋巴瘤的比例为8.54%,其中cHL占霍奇金淋巴瘤总体93.56%。霍奇金淋巴瘤一线治疗的治愈率约为85%,15%的患者为复发或难治性霍奇金淋巴瘤。对于复发或难治性cHL,欧美国家的二线标准治疗为大剂量化疗联合自体造血干细胞移植。由于国内的患者对移植治疗接受度低、医疗资源有限,接受自体造血干细胞移植的患者十分有限,中国复发或难治性cHL患者二线治疗通常为化疗。

[0003] 免疫检查点是一类免疫抑制性的分子。它们的生理学功能是调节免疫反应的强度和广度,从而避免正常组织的损伤和破坏。而肿瘤细胞往往利用免疫检查点的特性来逃避免疫细胞的攻击。目前已经通过临床验证的免疫检查点包括CTLA-4和PD1/PD-L1,其中靶向PD1/PD-L1的免疫检查点抑制剂因较好的安全性和较广的适应症具备更好的临床应用前景。PD-1/PD-L1的结合对于调节T细胞激活和维持外周免疫耐受发挥重要作用。当T细胞不表达PD-1时,T细胞与抗原递呈细胞相互作用,使T细胞活化扩增并分泌活化细胞因子,作用于肿瘤细胞则表现为对肿瘤细胞的杀伤;活化后的T细胞开始表达PD-1,当其与抗原递呈细胞或肿瘤细胞上的配体PD-L1结合后,PD-1传递的抑制信号就会抑制T细胞的增殖和活化细胞因子的分泌,使T细胞功能降低,多数肿瘤细胞即通过这种机制逃避免疫细胞攻击;如果用药物阻断PD-1和PD-L1间的相互作用,就可以恢复T细胞的活性和杀伤癌细胞的能力。

[0004] 免疫抑制PD-1/PD-L1通路可能在cHL疾病发生发展起到重要作用,一项研究报道了cHL中肿瘤细胞(Reed Sternberg cell, RS细胞)PD-L1的表达情况。在这项研究中,结节硬化性cHL阳性率为65%(87/134),混合细胞性cHL为81%(60/74),富含淋巴细胞性cHL为90%(9/10),淋巴细胞削减性cHL为67%(4/6)。cHL中RS细胞PD-L1的高表达通常由9p24.1位点(该位点包含PD-L1、PD-L2和JAK2基因)的拷贝数异常引起。一项包含108例cHL的研究中,采用FISH检测PD-L1和PD-L1的拷贝数,发现多倍体为5%(5/108),拷贝数增加为61%(56/108),扩增为39%(36/108)。JAK2可激活下游的转录因子(STAT),进一步增加PD-L1的表达。此外,EB病毒感染也可引起PD-L1表达增加。由于PD-L1的表达可以引起RS细胞的免疫逃逸,因此阻断PD-L1/PD1通路的信号可能促进解除免疫抑制,促进免疫系统对RS

细胞的清除。

[0005] 所以,检测霍奇金淋巴瘤微环境中免疫细胞亚群及免疫检查点分子的情况,对于预测患者应用免疫检查点抑制剂药物是否有效是非常有利的。

[0006] 目前,检测霍奇金淋巴瘤微环境中免疫细胞亚群及免疫检查点分子主要采用免疫组化法。现有的免疫组化常用二氨基联苯胺(即3,3',-diaminobenzidine,DAB)显色,其原理是因为二氨基联苯胺是过氧化物酶的生色底物,在过氧化氢的存在下失去电子而呈现出颜色变化积累,形成棕褐色不溶性产物。DAB主要和蛋白质的NH₂或SH基团结合,形成稳定的NN键或NS键,然后DAB中的显色基团就能显示出颜色,标记到已经暴露的蛋白质上,从而显示目标细胞的蛋白质分布及种类等。现有技术在一张切片上一般标记一个分子。虽然目前有一些多重标记的免疫组化染色方法,但是这些多重组化染色方法在洗脱时会对前一轮形成的染色造成影响,往往需要添加染色增强剂等,检测结果不够精确。

发明内容

[0007] 本发明为了解决现有技术无法有效预测免疫检查点抑制剂是否对肿瘤相关组织起到了有效抑制作用的问题,提供了一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒,根据该试剂盒的检测结果可以有效地判断免疫检查点抑制剂有效性,灵敏度高、特异性好。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒,包括单克隆抗体组、抗原修复液、辣根过氧化物酶标记的二抗、过氧化氢、荧光基团标记的酪氨酸盐与核染色剂;

[0010] 所述单克隆抗体组包括:CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种;

[0011] 所述荧光基团的种类数量与单克隆抗体组中单克隆抗体种类的数量一致。

[0012] 优选的,所述试剂盒还包括防猝灭剂、洗涤剂 and 封闭剂。

[0013] 优选的,所述洗涤液为TBST缓冲液。

[0014] 优选的,所述核染色剂为DAPI染色剂。

[0015] 优选的,所述荧光基团选自520-FITC、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5和690-Cy5.5中的两种以上。

[0016] 本发明还提供了一种上述技术方案所述多重免疫组化分析试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0017] (1) 将待测组织与所述单克隆抗体组中的任意一种单克隆抗体混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗复合物;

[0018] (2) 抗原-一抗复合物与辣根过氧化物酶标记的二抗混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗-二抗复合物;

[0019] (3) 抗原-一抗-二抗复合物、任意一种荧光基团标记的酪氨酸盐和过氧化氢混合,孵育,洗涤,得到荧光标记复合物;

[0020] (4) 荧光标记复合物与抗原修复液混合,微波处理,洗涤,得到荧光标记复合物;

[0021] 所述微波处理的条件包括:750~850w处理1~3min,再以200~300w处理12~

20min;

[0022] (5) 以荧光标记复合物作为待测组织重复步骤(1)~(4),重复至所述单克隆抗体组中的单克隆抗体全部与待测组织结合过为止,得到多重标记复合物;

[0023] 其中,步骤(1)中的单克隆抗体与其他任意一次步骤(1)采用的单克隆抗体种类均不相同,步骤(3)中荧光基团标记的酪氨盐与其他任意一次步骤(3)采用的荧光基团标记的酪氨盐均不相同;

[0024] (6) 向步骤(5)所得的多重标记复合物中添加核染色剂,孵育,洗涤,封片,以连续光谱成像、检测。

[0025] 优选的,所述洗涤重复2~3次;所述孵育温度为35~42℃。

[0026] 优选的,所述步骤(1)中单克隆抗体使用时稀释倍数为50~500倍;所述步骤(2)中,辣根过氧化物酶标记的二抗的用量为50~200μL/样品。

[0027] 优选的,当所述多重免疫组化分析试剂盒还包括防猝灭剂时,所述步骤(7)中洗涤后添加防猝灭剂,再进行封片。

[0028] 本发明还提供了前述技术方案所述的多重免疫组化分析试剂盒在预测免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤有效性中的应用。

[0029] 本发明取得的有益效果:

[0030] 本发明提供了一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒,其中限定了单克隆抗体组包括CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种。本发明提供的多重免疫组化分析试剂盒以给予免疫检查点抑制剂后的人或动物离体组织为样本进行检测,可在同一组织样品中同时标记多个免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物以及免疫检查点分子,根据试剂盒的检测结果显示计算CD68⁺、CD3⁺/CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺五种指标:当CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺低于cutoff值时,CD3⁺/CD68⁺和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺高于cutoff值时,则判断该免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用高,有效性好;反之若CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺高于cutoff值时,CD3⁺/CD68⁺和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺低于cutoff值时,则判断该免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用低,有效性差。

[0031] 本发明还提供了上述技术方案所述霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒的使用方法,首先以单克隆抗体组中的其中一种单克隆抗体标记待测组织,形成抗原-一抗复合物;再以辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗结合一抗,形成抗原-一抗-二抗复合物;添加过氧化氢和其中一种荧光基团标记的酪氨盐后,在过氧化氢存在的情况下,荧光基团标记的酪氨盐在HRP催化下形成含有共价键键合位点的酶促产物(带有荧光基团),与周围(包括抗原、一抗和二抗上)的蛋白残基(色氨酸、组氨酸和酪氨盐残基等)结合,这样在抗原-一抗结合部位将聚集大量的含有荧光基团标记的酶促产物,因而抗原(一抗所识别的免疫检查点)数量越多则其结合的酶促产物越多,带有的荧光基团也就越多,进而其检测信号越强。

[0032] 将酶促反应得到的荧光标记进行微波处理可分离抗原与一抗(单克隆抗体组中的单克隆抗体)的结合,洗脱后即可去除单克隆抗体;由于酶促产物与抗原为共价键结合,微波处理对酶促产物和抗原结合的影响较小,不会影响标记在抗原上的荧光信号强度,从

而实现了在确保上一轮荧光标记信号不丢失的情况下彻底去除上一轮抗体,不会对下一轮单克隆抗体标记造成干扰。采用不同的单克隆抗体和不同的荧光基团标记的酪氨盐,按照上述方法重复进行,即可实现在同一待测组织上标记多个分子,无需担心交叉反应,检测结果准确,最多可以同时标记六种不同的免疫标志物。将多重标记后的待测组织进行染色、封片,利用多光谱成像检测待测组织中的免疫标志物浓度即可。

[0033] 可见,采用本发明提供的使用方法能够实现在同一待测组织上标记多个分子,并且消除了前一轮多克隆抗体的干扰,检测的准确度高、检测效率高。

附图说明

[0034] 图1为Panel 1的多光谱成像图谱;

[0035] 图2为Panel 2的多光谱成像图谱;

[0036] 图3为Factor importance森林图、ROC曲线图;

[0037] 其中图左为森林图,图右为ROC曲线图。

具体实施方式

[0038] 本发明提供了一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒,包括单克隆抗体组、抗原修复液、辣根过氧化物酶标记的二抗、过氧化氢、荧光基团标记的酪氨盐与核染色剂;

[0039] 所述单克隆抗体组包括:CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种;

[0040] 所述荧光基团的种类数量与单克隆抗体组中单克隆抗体种类的数量一致。

[0041] 在本发明中,所述多重免疫组化分析试剂盒中优选的还包括防猝灭剂、洗涤剂 and 封闭剂。

[0042] 在本发明中,所述单克隆抗体组中的各个单克隆抗体用于分别识别待检测的免疫检查点。在本发明中,所述单克隆抗体组优选的包括CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体六种,所述六种单克隆抗体共同检测的灵敏度高、特异性强。

[0043] 在本发明中,所述单克隆抗体组中的各种单克隆抗体优选的为相同种属的动物制备而成的,例如均为鼠源单克隆抗体、兔源单克隆抗体等。本发明对所述单克隆抗体组中的各种单克隆抗体的制备方法无特殊限定,采用市售商品或常规方法自行制备均可。

[0044] 在本发明中,所述抗原修复液用于修复抗原,防止免疫组化染色时不能完全标记。本发明对所述抗原修复液的来源无特殊限定,采用本领域市售商品或已知配方均可,本发明的具体实施例中采用Perkin Elmer生产的Opal 7-color Manual IHC Kit作为抗原修复液。

[0045] 在本发明中,辣根过氧化物酶标记的二抗用于与所述单克隆抗体组中的单克隆抗体结合,其中的辣根过氧化物酶在有过氧化氢存在的情况下,用于催化荧光基团标记的酪氨盐生成带有共价结合位点的酶促产物,该酶促产物能够与蛋白残基结合,从而使荧光基团标记在待测组织上。本发明对所述辣根过氧化物酶标记的二抗来源无特殊限定,采用

市售商品即可,在本发明的具体实施例中采用HRP标记的山羊抗鼠IgG聚合物。

[0046] 在本发明中,所述过氧化氢为辣根过氧化物酶的酶促反应提供条件。本发明对所述过氧化氢的来源无特殊限定。

[0047] 在本发明中,所述荧光基团标记的酪氨酸盐作为反应底物,从而生成酶促反应,利用酶促产物与抗原中的蛋白残基结合,进而将酶促产物带有的荧光基团标记在待测组织上,并且荧光基团标记数量与采用的一抗所识别的标志物数量成正比,进而实现对待识别的抗原定量检测。本发明优选的,所述荧光基团标记优选的选自520-FITC、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5和690-Cy5.5中的至少两种以上。

[0048] 在本发明中,所述核染色剂优选为DAPI染色剂。在本发明中,所述的核染色剂用于标记细胞核。

[0049] 在本发明中,还包括防猝灭剂,所述防猝灭剂起到抗荧光衰减以及防止荧光猝灭的作用。本发明对所述防猝灭剂的种类无特殊限定,采用本领域市售商品即可。在本发明的具体实施例中,所述防猝灭剂优选为Boble Ryder 抗荧光衰减封片剂。

[0050] 在本发明中,所述封闭液用于封闭抗原,提高检测精确度。本发明对所述封闭液的种类无特殊限定,本发明的具体实施例中采用Perkin Elmer生成的Antibody Diluent/Block作为封闭液。

[0051] 在本发明中,所述洗涤剂用于在检测过程中的洗涤步骤,本发明对所述洗涤剂优选为TBST缓冲液。

[0052] 本发明提供的霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒针对霍奇金淋巴瘤的免疫检查点抑制情况进行设计,提供了对应的单克隆抗体组进行识别,特异性强,灵敏度高。

[0053] 本发明还提供了一种上述技术方案所述多重免疫组化分析试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0054] (1) 将待测组织与所述单克隆抗体组中的任意一种单克隆抗体混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗复合物;

[0055] (2) 抗原-一抗复合物与辣根过氧化物酶标记的二抗混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗-二抗复合物;

[0056] (3) 抗原-一抗-二抗复合物、任意一种荧光基团标记的酪氨酸盐和过氧化氢混合,孵育,洗涤,得到荧光标记复合物;

[0057] (4) 荧光标记复合物与抗原修复液混合,微波处理,洗涤,得到荧光标记复合物;

[0058] 所述微波处理的条件包括:750~850w处理1~3min,再以200~300w处理12~20min;

[0059] (5) 以荧光标记复合物作为待测组织重复步骤(1)~(4),重复至所述单克隆抗体组中的单克隆抗体全部与待测组织结合过为止,得到多重标记复合物;

[0060] 其中,步骤(1)中的单克隆抗体与其他任意一次步骤(1)采用的单克隆抗体种类均不相同,步骤(3)中荧光基团标记的酪氨酸盐与其他任意一次步骤(3)采用的荧光基团标记的酪氨酸盐均不相同;

[0061] (6) 向步骤(5)所得的多重标记复合物中添加核染色剂,孵育,洗涤,封片,以连续光谱成像、检测。

[0062] 在本发明中,所述待测组织优选为霍奇金淋巴瘤的组织切片,更优选的,所述组

织切片为石蜡切片。在本发明中,当所述待测组织为霍奇金淋巴瘤组织石蜡切片时,本发明在待测组织与单克隆抗体混合前还进行脱蜡和水化,具体包括以下步骤:

[0063] A、将霍奇金淋巴瘤组织石蜡切片在50~70℃下烘烤100~150min,得到烘烤切片;

[0064] B、烘烤切片以二甲苯萃取两次,无水乙醇萃取两次,质量分数95%乙醇溶液萃取一次,质量分数85%乙醇溶液萃取一次,质量分数80%乙醇溶液萃取一次,质量分数75%乙醇溶液萃取一次,得到脱蜡水化后的霍奇金淋巴瘤组织作为待测组织。

[0065] 本发明优选的,所述步骤B中二甲苯的每次萃取时间优选为8~12min;无水乙醇的每次萃取时间优选为3~8min;质量分数95%乙醇溶液、质量分数85%乙醇溶液、质量分数80%乙醇溶液和质量分数75%乙醇溶液独立地萃取时间优选为3~8min。

[0066] 在本发明中,若本发明所述的多重免疫组化分析试剂盒还包括封闭液,则先将待测组织以封闭液进行封闭后再与单克隆抗体混合,所述封闭液的用量优选为50~150μL/样品,更优选为100μL/样品。

[0067] 本发明将待测组织与所述单克隆抗体组中的任意一种单克隆抗体混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗复合物。在本发明中,所述单克隆抗体组中的各种单克隆抗体反应顺序无任何限定,选择任意一种即可。

[0068] 在本发明中,所述单克隆抗体为购买的市售单克隆抗体原液,使用时将所述单克隆抗体稀释50~500倍后使用;在本发明中,优选的采用抗体稀释/封闭液(opal™试剂盒)稀释单克隆抗体。在本发明中,所述单克隆抗体的用量为100~300μL/样品。

[0069] 在本发明中,所述孵育温度优选为35~42℃,更优选为37℃;在本发明中,当所述多重免疫组化分析试剂盒中包括洗涤液时,所述洗涤优选的用洗涤液洗涤;在本发明中,所述洗涤优选的重复2~3次;在本发明中,所述洗涤时间每次优选为3~10min,更优选为5min。本发明下述步骤所述孵育的温度和洗涤方式均相同,不再赘述。

[0070] 在本发明中,所述孵育时间优选为50~80min,更优选为60min。

[0071] 得到抗原-一抗复合物后,本发明将抗原-一抗复合物与辣根过氧化物酶标记的二抗混合,孵育,洗涤,得到抗原-一抗-二抗复合物。

[0072] 在本发明中,所述辣根过氧化物酶标记的二抗优选为HRP标记的山羊抗小鼠IgG聚合物。在本发明中,所述辣根过氧化物酶标记的二抗为购买的市售商品。在本发明中,所述辣根过氧化物酶标记的二抗使用量优选为50~200μL/样品,更优选为100μL/样品。

[0073] 在本发明中,所述孵育时间优选为8~15min,更优选为10min。

[0074] 得到抗原-一抗-二抗复合物后,本发明将抗原-一抗-二抗复合物、任意一种荧光基团标记的酪氨酸盐和过氧化氢混合,孵育,洗涤,得到荧光标记复合物。

[0075] 在本发明中,所述过氧化氢优选的以信号放大液形式提供,所述信号放大液为市售商品,其中混合有过氧化氢。本发明优选的将市售信号放大液稀释80~120倍后使用,更优选为稀释100倍。在本发明中,所述荧光基团标记的酪氨酸盐优选的购自市售商品,在本发明的具体实施例中采用市售的Opal™ 7-色荧光染色试剂盒内的荧光基团标记的酪氨酸盐;本发明优选的,使用是将各荧光基团标记的酪氨酸盐稀释50~150倍后使用,更优选的稀释100倍;本发明优选的,所述荧光基团标记的酪氨酸盐使用量优选为稀释后溶液80~150μL/样品,更优选为100μL/样品。

[0076] 在本发明中,所述孵育时间优选为8~15min,更优选为10min。

[0077] 得到荧光标记复合物后,本发明将荧光标记复合物与抗原修复液混合,微波处理,洗涤,得到荧光标记复合物;所述微波处理的条件包括:750~850w 处理1~3min,再以200~300w处理12~20min。在本发明中,所述微波处理 条件优选的包括:80w预热5min,再800w处理2min,最后240w处理15min。

[0078] 在本发明中,所述抗原修复液来自市售商品,在本发明的具体实施例中 采用Opal™7-色荧光染色试剂盒内的抗原修复液;所述抗原修复液的用量优 选为150~300mL/样品,更优选为200mL/样品。

[0079] 在本发明中,所述荧光标记复合物在微波处理下,与抗原结合的单克隆 抗体被解离,通过洗涤即可去除脱离的单克隆抗体以及HRP标记的二抗, 不会影响下一轮反应的进行,防止多重标记时相互干扰。

[0080] 得到荧光标记复合物后,本发明以得到的荧光标记复合物作为待测组 织,重复上述单克隆抗体识别至得到荧光标记复合物的步骤,重复至所述单 克隆抗体组中的所有单克隆抗体均与待测组织结合过为止,得到多重标记复 合物。

[0081] 在本发明的重复过程中,每一轮重复时采用的单克隆抗体均与其他任意 一轮采用的单克隆抗体种类不同;相应地,每一轮重复时采用的荧光基团标 记的酪氨酸盐中的荧光基团也与其他任意一轮的种类不同。从而实现采用不同 的荧光基团分别标记不同的单克隆抗体的目的,最终呈像时可一同检测。

[0082] 得到多重标记复合物后,本发明向步骤(5)所得的多重标记复合物中 添加核染色剂,孵育,洗涤,封片,以连续光谱成像、检测。

[0083] 在本发明中,所述核染色剂的添加量优选为80~150μL/样品,更优选为 100μL/样品。

[0084] 在本发明中,所述孵育时间优选为5~10min,更优选为8min。

[0085] 在本发明中,当所述多重组化免疫试剂盒还包括防猝灭剂时,在所述孵 育、洗涤后添加防猝灭剂,再加盖盖玻片进行封片。

[0086] 在本发明中,所述多重免疫组化分析试剂盒能满足现有组织学光谱成像 仪器对多个分子同时成像,即多光谱成像。

[0087] 多光谱成像依赖于光谱数据采集和光谱拆分计算两个过程。

[0088] 光谱数据采集:多光谱数据采集的技术手段有很多种,比如光栅分光、棱镜分光、液晶可调谐滤波器分光等等。运用PerkinElmer公司的Vectra系 统(液晶可调滤波器, LCTF)过滤采集特定波段的光谱信号。LCTF由液晶 材料组成,通过调整附加的电压改变光线在晶体中的光程,选择性输出特定 波长的光信号,实现分光的目的。CCD曝光配合LCTF的连续滤波,就可以 准确记录不同波长段的图像信号。

[0089] 光谱拆分:光谱图像的每个像素点信号都是不同荧光染料和样本自发信 号的叠加,以每种染料的光谱特征曲线为标准,通过数学方法对光谱图像中 叠加的信号进行还原运算,从而获得单通道图像的过程称为光谱拆分计算。光谱拆分计算是整个光谱成像不可 缺少的重要环节,直接影响数据结果的准 确性。

[0090] 使用“纯光谱拆分算法”可以拆分多达10色叠加的颜色信号,将光谱图 像中隐藏的“纯”染料信号准确的解析出来,得到每种染料在图像中的特异分 布。而且可以将“真实

的目标信号”从自发荧光背景中抽提出来,得到超高信 噪比的图像,让弱表达的荧光信号得以从背景中显现出来。

[0091] 分析软件能在组织上的同一个坐标位置上共定位至少4个分子,检查是 否有抗原分子同时表达在一个细胞上。

[0092] 本发明还提供了前述技术方案所述的多重免疫组化分析试剂盒在预测 免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤有效性中的应用;在本发明中,当所述多 重组化免疫分析试剂盒用于预测免疫检查点抑制剂的有效性时,以给予免疫 检查点抑制剂后的人或动物的霍奇金淋巴瘤离体组织切片。

[0093] 在本发明中,所述应用中,所述多重免疫组化分析试剂盒的单克隆抗体 组为CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克 隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体。

[0094] 具体的,本发明以给予免疫检查点抑制剂后的人或动物的霍奇金淋巴瘤 离体组织切片作为样品,按照上述技术方案所示的方法以前述技术方案所述 冲多免疫组化分析试剂盒进行检测,检测得到待测样品中所含CD3、CD68、 CD56、LAG3、PD1和PDL1中任意两项以上的免疫检查点含量,将所得含 量分别计算 $CD68^+$ 、 $CD3^+/CD68^+$ 、 $CD3^+LAG3^+$ 、 $PD1^+$ 和 $CD56^+/CD68^+PDL1^+$ 五个指标中的一个或多个,将所得指标的值与其对应的治疗相关cutoff值比较,若计算所得指标高于cutoff值,则判断给予的免疫检查点抑制剂有效性 高,反之则有效性低。

[0095] 在本发明中,所述 $CD68^+$ 、 $CD3^+/CD68^+$ 、 $CD3^+LAG3^+$ 、 $PD1^+$ 和

[0096] $CD56^+/CD68^+PDL1^+$ 五个指标的cutoff值依次为13.45,4.29,7.67,10.31和 14.78。当 $CD68^+$ 、 $CD3^+LAG3^+$ 、 $PD1^+$ 分别低于13.45、7.67、10.31时, $CD3^+/CD68^+$ 、和 $CD56^+/CD68^+PDL1^+$ 分别高于4.29、14.78时,则判断该免 疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用高,有效性好; 反之若 $CD68^+$ 、 $CD3^+LAG3^+$ 、 $PD1^+$ 高于13.45、7.67、10.31时, $CD3^+/CD68^+$ 、 和 $CD56^+/CD68^+PDL1^+$ 低于4.29、14.78时,则判断该免疫检查点抑制剂对 霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用低,有效性差。

[0097] 利用本发明所述多重免疫组化分析试剂盒对免疫检查点抑制剂有效性 预测的特异性强、灵敏度高,可加速药物的筛选。

[0098] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把 它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0099] 实施例1

[0100] 选取临床疗效为完全缓解(complete response,CR)和疾病稳定(stable disease,SD)的两组霍奇金淋巴瘤肿瘤组织按如下步骤进行免疫细胞、肿瘤 细胞及免疫检查点分子检测的多重免疫组化分析。CR组11例,SD组12例; 每例患者2张切片,分别用于两个panel分析。两个panel共标记7个分子。Panel 1及染色顺序为:CD3、CD68、PDL1、CD56、CD30,Panel 2及染色 顺序为:CD3、PD1、PDL1、LAG3、CD30。Panel 1和panel 2的一抗、二抗、荧光染料信息如表1:

[0101] 表1 Panel 1和panel 2的一抗、二抗、荧光染料信息

[0102]

Panel 1	标志物	CD3	CD68	PDL1	CD56	CD30
	货号	ZM0471	ZM0060	DAKO22C3	ZM0057	ZM0043
	稀释倍数	50	500	60	100	50
	每张片子使用量(微升)	2	0.2	1.7	1	2
	荧光染料发射波长 (OPAL 试剂盒)	690	620	570	650	520
	二抗	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002
Panel 2	标志物	CD3	PD1	PDL1	LAG3	CD30
	货号	ZM0471	ZM0381	DAKO22C3	Ab40466	ZM0043
	稀释倍数	50	100	60	100	50
	每张片子使用量(微升)	2	1	1.7	1	2
	荧光染料发射波长 (OPAL 试剂盒)	690	650	570	620	520
	二抗	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002	中杉金桥 PV-6002

[0103] 实施例操作步骤:

[0104] 1. 将石蜡切片放置在60℃恒温箱中烘烤120分钟;

[0105] 2. 脱蜡和水化:二甲苯(10min)→二甲苯(10min)→无水乙醇(5min×2次)→95%乙醇(5min×2)→90%(5min)→85%乙醇(5min)→80%乙醇(5min)→75%乙醇(5min);

[0106] 3. 蒸馏水冲洗2次5min;

[0107] 4. 抗原修复:用Opal™ 7-色荧光染色试剂盒内抗原修复液微波修复, 80w预热5min, 800w高火2min, 240w中低火15min(美的微波炉M1-231A);

[0108] 5. 室温自然冷却;

- [0109] 6.洗涤:TBST缓冲溶液洗3次,5min/次;
- [0110] 7.封闭:用封闭液(厂家Perkin Elmer;商品名Antibody Diluent/Block),室温封闭10min;
- [0111] 8.一抗孵育:滴加单克隆抗体(一抗工作液100~300 μ L),37℃孵育 1h;样本A和样本C染色顺序为:CD3单克隆抗体、CD68单克隆抗体、PDL1 单克隆抗体、CD56单克隆抗体、CD30单克隆抗体(panel 1)。样本B和 样本D染色顺序为:CD3单克隆抗体、PD1单克隆抗体、PDL1单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、CD30单克隆抗体(panel 2);
- [0112] 9.洗涤:TBST缓冲溶液洗3次,5min/次;
- [0113] 10.二抗孵育:滴加HRP标记的山羊抗小鼠IgG、,37℃孵育10min;
- [0114] 11.洗涤:TBST缓冲溶液洗3次,5min/次;
- [0115] 12.荧光显色:滴加TSA稀释后的opal荧光染色,室温10min;各荧光染料的波长和对应的标志物如表1所示。
- [0116] 13.洗涤:TBST缓冲溶液洗3次,5min/次;
- [0117] 14.抗体依次染色:第一个抗体染色结束,后续每个抗体均需重复步骤4)到步骤13),依次标记所有抗体;
- [0118] 15.微波处理:重复步骤4)到步骤6);
- [0119] 16.DAPI染色,室温5~10min;
- [0120] 17.洗涤:TBST洗3次,5min/次;
- [0121] 18.封固:防淬灭剂封片(Boble Ryder抗荧光衰减封片剂)。
- [0122] 根据以上操作步骤,完成对23例霍奇金淋巴瘤肿瘤组织切片的免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子的多重标记。运用PerkinElmer 公司的Vectra系统进行连续光谱采集,并做图像处理 and 观察分析。CR组、SD组的多光谱成像图谱每个panel展示一张图(样本A和样本B为panel 1, 样本C和样本D为panel 2),如图1和图2所示;
- [0123] 表2图1中样本A和样本B(panel 1)多光谱成像图谱

[0124]

标志物	CD3	CD68	PDL1	CD56	CD30
颜色	绿色	白色	红色	橙色	洋红色

[0125] 表3图2中样本C和样本D(panel 2)多光谱成像图谱

[0126]

标志物	CD3	PD1	PDL1	LAG3	CD30
颜色	绿色	橙色	红色	白色	洋红色

[0127] 对肿瘤区域各分子统计分析,2组患者中免疫细胞标志物、肿瘤 细胞标志物及免疫检查点分子的阳性表达百分比统计结果如下表4 所示:

[0128] 表4肿瘤区域中各分子的阳性表达百分比统计结果(%)

[0129]

组别	编号	CD3 ⁺	CD30 ⁺	CD56 ⁺	CD68 ⁺	PDL1 ⁺	LAG3 ⁺	PD1 ⁺	CD3 ⁺ LAG3 ⁺	CD3 ⁺ PD1 ⁺	CD68 ⁺ PDL1 ⁺	CD30 ⁺ PDL1 ⁺
CR	1	72.26	51.09	1.25	2.94	0.83	5.36	0.15	5.16	0.14	0.03	0.16
	2	65.84	1.87	19.87	0.85	0.41	6.30	1.48	5.32	1.48	0.03	0.01
	3	35.70	5.16	3.71	0.59	4.31	0.44	0.20	0.18	0.02	0.04	0.59
	4	53.51	0.29	2.18	7.89	0.01	0.40	0.05	0.37	0.04	0.00	0.00
	5	49.72	2.65	0.54	9.51	29.89	14.04	0.67	7.37	0.56	6.56	0.42
	6	60.82	2.60	42.52	13.22	9.17	6.46	0.59	5.12	0.59	2.88	0.49
	7	53.80	82.97	8.40	9.67	15.03	2.11	0.03	2.11	0.03	8.19	12.94
	8	51.83	9.19	0.54	11.57	32.84	1.41	0.06	1.12	0.06	6.23	6.82
	9	15.20	0.86	0.10	3.54	62.71	1.38	0.01	0.72	0.01	2.03	0.61
	10	15.76	0.97	1.75	10.05	7.03	0.29	0.00	0.09	0.00	3.87	0.54
	11	64.59	10.45	39.30	3.40	50.28	5.95	67.84	5.39	63.98	1.08	10.03
SD	1	43.07	3.71	2.96	9.40	3.89	11.69	0.09	7.69	0.07	0.78	0.09
	2	43.83	0.35	8.40	18.67	27.86	9.72	14.92	7.68	14.32	11.67	0.09

[0130]

	3	77.00	45.69	98.90	63.22	93.01	61.27	99.99	44.62	88.08	55.21	44.42
	4	78.99	90.03	5.43	20.45	20.57	36.96	23.87	36.49	23.38	7.68	19.46
	5	53.81	23.37	5.05	64.62	0.21	3.40	0.03	3.25	0.03	0.42	0.01
	6	44.17	3.78	5.70	10.84	3.01	29.17	92.45	17.16	57.09	0.06	0.04
	7	51.88	1.51	1.14	39.23	20.89	0.26	33.93	0.22	28.42	20.85	1.01
	8	30.60	9.00	2.43	12.35	0.50	4.45	16.53	1.95	5.58	0.61	0.11
	9	83.60	12.24	57.85	38.97	43.66	10.82	86.05	9.53	76.66	33.86	0.59
	10	42.73	1.71	0.62	25.47	47.81	4.82	0.00	4.00	0.00	14.30	0.72
	11	54.34	6.33	1.09	13.45	43.14	9.82	0.02	6.86	0.02	5.13	4.81
	12	38.54	46.52	0.25	0.20	58.85	3.82	10.32	2.58	10.05	0.15	23.50

[0131] 采用Mann-Whitney试验对CR组和SD组进行单因素分析,得到特征因子的cutoff值,即CD68⁺、CD3⁺/CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺和 CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺五个指标的cutoff值依次为

13.45, 4.29, 7.67, 10.31 和 14.78。

[0132] 采用随机森林算法对CR组和SD组进行多因素分析。对每一棵决策树，选择相应的袋外数据计算袋外数据误差，记为err00B1。随机对袋外数据所有样本的特征X加入噪声干扰，再次计算袋外数据误差，记为err00B2。特征X的重要性 = $\sum (\text{err00B2} - \text{err00B1}) / k$ 。重要因子的确定方法为：计算每个特征的重要性并降序排序。重要因子为特征数的top 20%。

[0133] ROC曲线的绘制：对每一棵树，测定样本的真阳性率和假阳性率。以真阳性率（灵敏度%）为纵坐标，假阳性率（1-特异度%）为横坐标绘制ROC曲线。CR组和SD组的多因素分析结果：Factor importance森林图、ROC曲线如图3所示；

[0134] 从多因素分析结果来看，区分CR组与SD组的重要因子在肿瘤区域内有5个，分别为CD68⁺、CD3⁺/CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺。ROC曲线中，红色点表示该点的Youden指数最大（Youden指数 = 灵敏度 + 特异度 - 1），即灵敏度和特异度最好。AUC = 0.90，P = 0.000，表示具有统计学意义。当一位受试者检测了以上5个指标。根据单因素分析结果，CD68⁺、CD3⁺/CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺的cutoff值分别为13.45, 4.29, 7.67, 10.31和14.78。

[0135] 当CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺分别低于13.45、7.67、10.31时，CD3⁺/CD68⁺、和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺分别高于4.29、14.78时，则判断该免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用高，有效性好（获得CR的机会）；反之若CD68⁺、CD3⁺LAG3⁺、PD1⁺高于13.45、7.67、10.31时，CD3⁺/CD68⁺、和CD56⁺/CD68⁺PDL1⁺低于4.29、14.78时，则判断该免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤中的免疫检查点的抑制作用低，有效性差。

[0136] 由此可见，多重免疫组化同时标记多个免疫细胞标志物、肿瘤细胞标志物及免疫检查点分子对于预测患者应用免疫检查点抑制剂药物是否有效是非常有利的。

[0137] 实施例2

[0138] 一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒，包括单克隆抗体组、抗原修复液、封闭液、TBST缓冲液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、过氧化氢、荧光基团标记的酪氨酸盐和DAPI染色剂；

[0139] 所述单克隆抗体组为：CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1PDL1PDL1单克隆抗体；

[0140] 所述荧光基团的种类为：520-FITC、570-Cy3、620-Cy3.5、650-Cy5和690-Cy5.5。

[0141] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

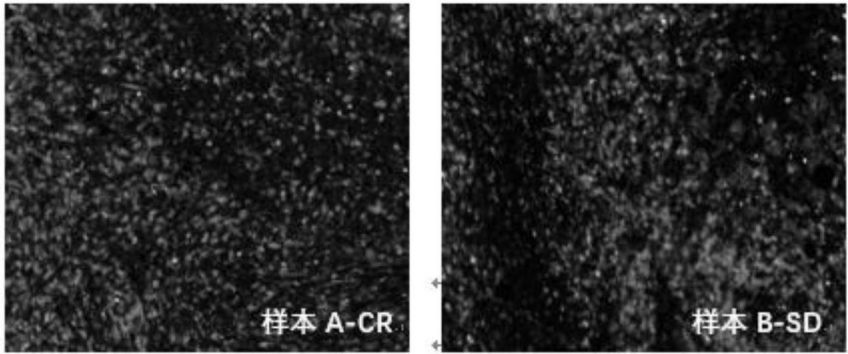


图1

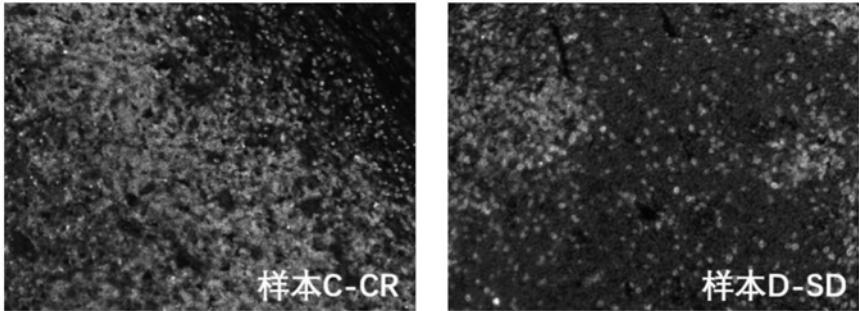


图2

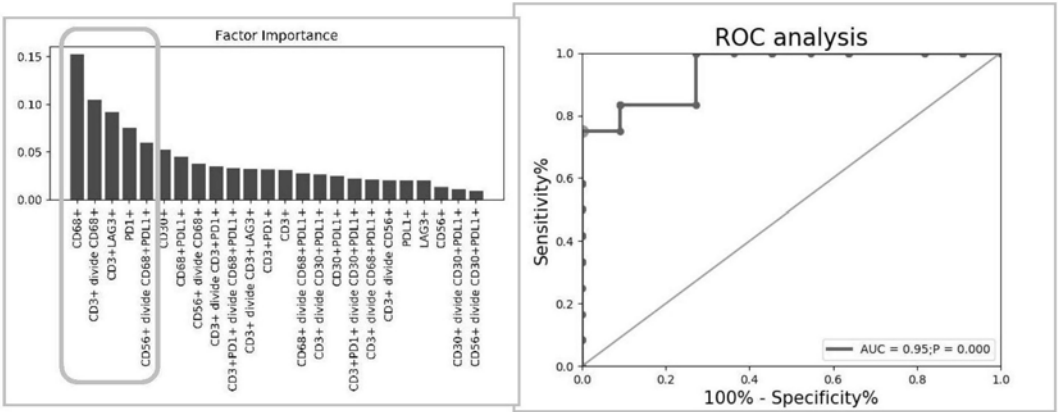


图3

专利名称(译)	一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用		
公开(公告)号	CN109541217A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811367075.8	申请日	2018-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	臻和(北京)科技有限公司 信达生物制药(苏州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	臻和(北京)科技有限公司 信达生物制药(苏州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	臻和(北京)科技有限公司 信达生物制药(苏州)有限公司		
[标]发明人	张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽 熊艳 彭波 周辉		
发明人	张恒辉 陈衍辉 王雅婷 罗红丽 熊艳 彭波 周辉		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/533 G01N21/25		
CPC分类号	G01N21/25 G01N33/533 G01N33/574 G01N33/577		
代理人(译)	代芳		
其他公开文献	CN109541217B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种霍奇金淋巴瘤的多重免疫组化分析试剂盒及其使用方法和应用，涉及多重免疫组化技术领域，本发明所述多重免疫组化分析试剂盒，其中限定了单克隆抗体组包括CD3单克隆抗体、CD30单克隆抗体、CD68单克隆抗体、CD56单克隆抗体、LAG3单克隆抗体、PD1单克隆抗体和PDL1单克隆抗体中的两种以上、不超过六种。本发明所述多重免疫组化分析试剂盒以给予免疫检查点抑制剂后的人或动物离体组织为样本进行检测，进而用于判断免疫检查点抑制剂对霍奇金淋巴瘤的作用有效性。本发明还提供了一种所述多重免疫组化分析试剂盒的使用方法，能够有效的在同一组织上标记不超过六种免疫检查点，多种标记之间无交叉反应。

Panel 1	标志物	CD3	CD68	PDL1	CD56	CD30
	货号	ZM0471	ZM0060	DAKO22C3	ZM0057	ZM0043
	稀释倍数	50	500	60	100	50
	每张片子使用量(微升)	2	0.2	1.7	1	2
	荧光染料发射波长 (OPAL 试剂盒)	690	620	570	650	520
	二抗	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002
Panel 2	标志物	CD3	PD1	PDL1	LAG3	CD30
	货号	ZM0471	ZM0381	DAKO22C3	Ab40466	ZM0043
	稀释倍数	50	100	60	100	50
	每张片子使用量(微升)	2	1	1.7	1	2
	荧光染料发射波长 (OPAL 试剂盒)	690	650	570	620	520
	二抗	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002	中衫金桥 PV-6002