



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110456042 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201910735771.8

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2019.08.09

G01N 33/96(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

(71)申请人 臻悦生物科技江苏有限公司

地址 225300 江苏省泰州市医药城口泰路
西侧、陆家路东侧G57幢73号二层东侧

(72)发明人 张恒辉 徐建明 杨晚凝 梁丹丹
陈欢

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 路秀丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

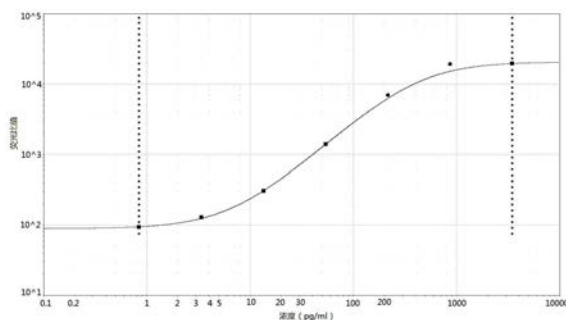
权利要求书2页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称

血清学生物标志物在制备试剂盒和/或芯片
中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法。其中,血清学生物标志物为MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10中的任意一种或多种,将这七种血清学生物标志物中的任意一种或多种来制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,能够相对更准确地对免疫治疗效果进行预测。



1. 如下任意一种或多种血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用:

MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述癌症包括消化道癌症;优选地,所述消化道癌症包括食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌和胆管癌中的一种或者多种。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述预测癌症免疫治疗效果通过对待测样本治疗前血清中的一种或多种所述血清生物标志物的基线浓度进行判断;

优选地,所述MIP-1beta的基线浓度 $\geq 109.54\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述SDF-1alpha的基线浓度 $\geq 514.95\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述PD-L1的基线浓度 $\geq 12.75\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述CD28的基线浓度 $\geq 360.46\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述TIM-3的基线浓度 $\geq 1131.96\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述RANTES的基线浓度 $\geq 415.34\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效;

优选地,所述IP-10的基线浓度 $\geq 53.58\text{pg/ml}$ 时,预测所述癌症免疫治疗有效。

4. 一种用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,其特征在於,所述试剂盒或芯片包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒或芯片,其特征在於,所述检测试剂为抗体,优选地,所述试剂盒包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的捕获抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;

优选地,所述MIP-1beta的捕获抗体的克隆号为24006;

优选地,所述SDF-1alpha的捕获抗体的克隆号为79018;

优选地,所述PD-L1的捕获抗体的克隆号为37;

优选地,所述CD28的捕获抗体的克隆号为9H6E2;

优选地,所述TIM-3的捕获抗体的克隆号为024;

优选地,所述RANTES的捕获抗体的克隆号为21418;

优选地,所述IP-10的捕获抗体的克隆号为B-C50。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒或芯片,其特征在於,所述捕获抗体包被于固相载体上,

优选地,所述固相载体为编码微球,更优选地,所述编码微球为羧基编码微球。

7. 根据权利要求5或6所述的试剂盒或芯片,其特征在於,所述试剂盒还包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;

优选地,所述PD-L1的检测抗体的克隆号为ANC6H1;

优选地,所述CD28的检测抗体的克隆号为ANC28.1/5D10;

优选地,所述TIM-3的检测抗体的克隆号为10C10;

优选地,所述RANTES的检测抗体的克隆号为947A 1H11;

优选地,所述IP-10的检测抗体的克隆号为B-C55。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒或芯片,其特征在於,所述检测抗体带有检测标记,

优选地,所述检测标记为生物素标记;

更优选地,所述生物素标记为N-羧琥珀酰亚氨活化的生物素标记。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒或芯片,其特征在于,所述试剂盒还包括链霉素标记的藻红蛋白。

10. 权利要求3至9中任一项所述的试剂盒或芯片的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

制备如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

11. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

获取如下任意一种或多种血清学生物标志物的抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;

优选地,将所述抗体制备成捕获抗体和/或检测抗体;

优选地,将所述捕获抗体包被于固相载体上,更优选地,将所述捕获抗体包被于编码微球上,进一步优选地,将所述捕获抗体包被于羧基编码微球上;

优选地,使所述检测抗体带有检测标记,更优选地,使所述检测抗体带有生物素标记,进一步优选地,使所述检测抗体带有N-羧琥珀酰亚氨活化的生物素标记。

血清学生物标志物在制备试剂盒和/或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体而言,涉及血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着肿瘤学、免疫学以及分子生物学等相关学科的迅速发展和交叉渗透,肿瘤免疫治疗的研究取得了突破性进展,逐步成为肿瘤治疗领域最有发展前景的研究方向之一。免疫治疗成为继手术、放射治疗和化学治疗之后又一种重要的抗肿瘤治疗手段。目前肿瘤免疫治疗主要包括疫苗、免疫检查点抑制剂治疗、过继性免疫细胞治疗、细胞因子治疗等,其中免疫检查点阻断疗法以其显著的临床疗效而备受瞩目。免疫检查点是人体免疫系统中起“刹车”和保护作用的分子,其目的是防止T细胞过度激活而导致炎症损伤等。肿瘤细胞则利用这一特性,通过上调免疫检查点分子的表达,抑制人体免疫反应,逃避免疫监视与杀伤。目前研究和应用得最广泛的免疫检查点分子包括CTLA4和PD-1/PD-L1。免疫检查点抑制剂疗法即采用CTLA4或PD-1或PD-L1的特异性抗体注射入肿瘤患者体内,使得肿瘤不再具备逃避免疫系统攻击的能力,从而重新激活T细胞对肿瘤细胞的免疫应答效应。目前,美国食品药品监督管理局(FDA)批准了多种免疫检查点抑制剂用于不同种类实体瘤(黑色素瘤、肺癌、胃癌、结直肠癌等)和血液恶性肿瘤的治疗。

[0003] 免疫检查点抑制剂治疗通过近三十年的研究及临床应用,已经有越来越多的患者从中获益,然而由于只有一部分患者对免疫检查点阻断疗法比较敏感,筛选出可预测治疗效果和不良事件的生物标志物是一项至关重要的挑战。目前比较常用的疗效预测的生物标志物包括PD-1/PD-L1的表达量、微卫星不稳定(MSI)、错配基因修复缺失(MMR)、肿瘤突变负荷(TMB)、肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)等。例如,多项临床研究表明肿瘤组织PD-L1表达量升高的肿瘤患者采用PD-L1抗体治疗的疗效更好。另外,如果在直肠癌中出现错配基因修复缺失以及微卫星不稳定的患者,使用PD-1/L1抑制剂后获益更多。肿瘤突变负荷也是疗效相关的因素,临床研究表明肿瘤突变负荷在恶性黑色素瘤、肺癌和结肠癌中的高表达与免疫治疗的临床疗效呈正相关。然而,目前的各种生物标志物都有其局限性,并不能完全准确地预测患者的临床疗效和获益情况。因此,探索和开发预测癌症免疫治疗效果的生物标志物具有重要的临床意义。

发明内容

[0004] 本发明的主要目的在于提供血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法,以解决现有技术中对癌症免疫治疗效果无法准确预测的问题。

[0005] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了如下任意一种或多种血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用:MIP-1beta、SDF-

1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0006] 进一步地,癌症包括消化道癌症;优选地,消化道癌症包括食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌和胆管癌中的一种或者多种。

[0007] 进一步地,预测癌症免疫治疗效果通过对待测样本治疗前血清中的一种或多种血清生物标志物的基线浓度进行判断;优选地,MIP-1 β 的基线浓度 $\geq 109.54\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,SDF-1 α 的基线浓度 $\geq 514.95\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,PD-L1的基线浓度 $\geq 12.75\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,CD28的基线浓度 $\geq 360.46\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,TIM-3的基线浓度 $\geq 1131.96\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,RANTES的基线浓度 $\geq 415.34\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,IP-10的基线浓度 $\geq 53.58\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效。

[0008] 根据本发明的第二个方面,提供了一种用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,试剂盒或芯片包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0009] 进一步地,检测试剂为抗体,优选地,试剂盒包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的捕获抗体:MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,MIP-1 β 的捕获抗体的克隆号为24006;优选地,SDF-1 α 的捕获抗体的克隆号为79018;优选地,PD-L1的捕获抗体的克隆号为37;优选地,CD28的捕获抗体的克隆号为9H6E2;优选地,TIM-3的捕获抗体的克隆号为024;优选地,RANTES的捕获抗体的克隆号为21418;优选地,IP-10的捕获抗体的克隆号为B-C50。

[0010] 进一步地,捕获抗体包被于固相载体上,优选地,固相载体为编码微球,更优选地,编码微球为羧基编码微球。

[0011] 进一步地,试剂盒还包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测抗体:MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,PD-L1的检测抗体的克隆号为ANC6H1;优选地,CD28的检测抗体的克隆号为ANC28.1/5D10;优选地,TIM-3的检测抗体的克隆号为10C10;优选地,RANTES的检测抗体的克隆号为947A 1H11;优选地,IP-10的检测抗体的克隆号为B-C55。

[0012] 进一步地,检测抗体带有检测标记,优选地,检测标记为生物素标记;更优选地,生物素标记为N-羧琥珀酰亚氨活化的生物素标记。

[0013] 进一步地,试剂盒还包括链霉素标记的藻红蛋白。

[0014] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了上述任一种试剂盒或芯片的制备方法,制备方法包括:制备如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0015] 进一步地,制备方法包括:获取如下任意一种或多种血清学生物标志物的抗体:MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,将抗体制备成捕获抗体和/或检测抗体;优选地,将捕获抗体包被于固相载体上,更优选地,将捕获抗体包被于编码微球上,进一步优选地,将捕获抗体包被于羧基编码微球上;优选地,使检测抗体带有检测标记,更优选地,使检测抗体带有生物素标记,进一步优选地,使检测抗体带有N-羧琥珀酰亚氨活化的生物素标记。

[0016] 应用本发明的技术方案,本申请提供了七种新的用于预测癌症免疫治疗效果的血

清学生物标志物,将这七种血清学生物标志物中的任意一种或多种来制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,能够相对更准确地对免疫治疗效果进行预测。

附图说明

[0017] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0018] 图1至图7分别示出了根据本发明提供的七种血清学生物标志物MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10的标准曲线;以及

[0019] 图8至图14分别示出了SDF-1alpha、MIP-1beta、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10七种血清学生物标志物的基线浓度在免疫检查点阻断治疗有效 (PR) 队列和无效 (PD+SD) 队列之间存在显著性差异;

[0020] 图15至图21分别示出了七种血清学生物标志物SDF-1alpha、MIP-1beta、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度对消化道肿瘤患者治疗的有效性预测的受试者工作特征曲线 (ROC曲线),每种血清学生物标志物对应的曲线下面积、置信区间和P值见各图示。

具体实施方式

[0021] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0022] 克隆号:一般用来标识单克隆抗体的抗原表位的,但这个号本身没有具体含义,只是标示这个抗体筛选自哪一株细胞。克隆号一致的抗体,抗原表位是完全相同的,在抗原识别的各种特性上都一样。

[0023] 编码微球:指使用不同荧光比例的微球进行数据编码,利用荧光编码的微球共价交联特异性单克隆抗体,通过激光扫描荧光编码来识别单个微球。

[0024] 基线浓度:本申请中的基线浓度指用药前采集患者的血浆中的生物标志物的浓度。

[0025] 如背景技术所提到的,现有技术中对免疫检查点抑制剂治疗肿瘤的疗效已有一些预测指标,但这些指标都存在一定的局限性,并不能满足临床对疗效预测的需求。为了进一步开发和拓展测序癌症的免疫治疗效果,本申请的发明人对上百个病例进行了研究,并将这些病例分为免疫治疗有效组和免疫治疗无效组,通过已知的治疗效果对治疗前两组病例的血清中的可能的蛋白标志物进行了分析检测,结果发现,癌症患者免疫检查点阻断治疗前血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度与免疫检查点阻断治疗效果有关。单独使用癌症患者治疗前血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度(阈值分别为:109.54pg/ml,514.95pg/ml,12.75pg/ml,360.46pg/ml,1131.96pg/ml,415.34pg/ml,53.58pg/ml)能预测癌症免疫检查点阻断治疗的效果。基于以MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10为血清学生物标志物预测免疫检查点阻断治疗的效果具有准确率高、实施较为方便、成本较低的优点,具有广阔的应用前景。

[0026] 在上述研究结果的基础上,申请人提出了本申请的技术方案。在一种典型的实施方式中,提供了如下任意一种或多种血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果

的试剂盒或芯片中的应用:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0027] 上述用于预测癌症免疫治疗效果的血清学生物标志物各自的功能如下:

[0028] 1) MIP-1beta也称为巨噬细胞炎性蛋白-1 β ,特异性的与CCR5受体结合,是一种CC趋化因子,它是天然杀伤细胞、单核细胞和各种其他免疫细胞的化学引诱剂。MIP-1beta是由CD8+T细胞产生的主要HIV抑制因子,主要分泌细胞有中性粒细胞,单核细胞,B细胞,T细胞,成纤维细胞,内皮细胞和上皮细胞。研究显示,该趋化因子的浓度与MicroRNA-125b呈负相关,且体内MIP-1-beta的浓度随着年龄的增长而增加,这可能导致慢性炎症和肝损伤。

[0029] 2) SDF-1alpha在许多组织和细胞类型中普遍表达。对T淋巴细胞和单核细胞有趋化作用但对中性粒细胞无活性。趋化因子SDF-1alpha (CXCL12) 的受体是CXCR4,诱导细胞内钙离子水平和趋化性迅速短暂升高。SDF-1alpha (CXCL12) 也可能与CXCR7受体结合。在胚胎发生过程中,它指导造血细胞从胎肝向骨髓的迁移和大血管的形成。

[0030] 3) PD-L1是程序性死亡配体-1,是程序性死亡受体PD-1 (programmed cell death-1) 的配体,PD-L1与抑制性检查点分子PD-1的结合基于与磷酸酶 (SHP-1或SHP-2) 的相互作用通过基于免疫受体酪氨酸的开关基序 (ITSM) 传递抑制信号。PD-L1与其受体PD-1在T细胞上的结合提供了抑制TCR介导的IL-2产生和T细胞增殖活化的信号。而且PD-1还可以借由调节Bcl-2基因,控制淋巴结中抗原特异性T细胞的聚积。PD-1是一种重要的免疫抑制分子,主要在激活的T细胞和B细胞中表达。PD-1/PD-L 1抑制剂可以阻断PD-1与PD-L1的结合,阻断负向调控信号,使T细胞恢复活性,从而增强免疫应答。目前众多研究显示PD-L1在癌组织的细胞膜及细胞质中表达上调,而在癌旁组织和正常组织中低表达,甚至不表达,PD-L1选择性地高表达于肿瘤组织(包括黑色素瘤、肺癌、食管癌、胃癌、大肠癌、甲状腺癌、乳腺癌、肝癌、宫颈癌、膀胱癌、胆囊癌、肾癌、鼻咽癌、胰腺癌等多种实体肿瘤),为肿瘤的免疫提供了靶点,使针对该检查点的免疫阻断治疗成为可能。

[0031] 4) CD28是在T细胞上表达的蛋白质之一,其提供T细胞活化和存活所需的共刺激信号。在特异性T细胞激活过程中,需要T细胞受体传导抗原特异性信号,还需要非特异性共刺激信号辅助。T细胞表面抗原CD28是重要的共刺激分子,与其配体B7 (B7-1或B7-2) 结合可刺激T细胞增殖和IL-2转录。CD28是CD80 (B7.1) 和CD86 (B7.2) 蛋白的受体。当被Toll样受体配体激活时,CD80表达在抗原呈递细胞 (APC) 中上调。抗原呈递细胞上的CD86表达是组成型的(表达不依赖于环境因素)。CD28是在naive T细胞上组成型表达的唯一B7受体。除了T细胞受体 (TCR) 之外,通过CD28对T细胞的刺激可以为各种白介素 (特别是IL-6) 的产生提供有效信号。B7-CD 28/CTLA-4共刺激途径可能是T细胞反应的重要监管机构之一。T细胞对肿瘤的反应需要肿瘤抗原多肽由MHC II类分子呈递给CD4+T细胞或MHC I类分子提呈CD8+T细胞。B7协同诱导的CD8+T细胞抗肿瘤作用需要CD8T细胞的辅助,活化的CD4+T细胞可产生多种淋巴因子,扩大CTL反应。B7-CD28结合后激活Th1和Th2细胞,诱导Th1细胞增殖分化,或者直接利用Th1型细胞因子促进恢复机体细胞免疫功能,激活抗肿瘤免疫应答,进而达到抗肿瘤的目的。

[0032] 5) TIM-3是一种免疫检查点分子,与其他抑制性受体一起(包括程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 和淋巴细胞活化基因3蛋白 (LAG3)) 介导CD8+T细胞衰竭,其主要由半乳糖凝集素-9激活。TIM-3在产生IFN γ 的CD4+Th1和CD8+Tc1细胞表面表达;在Th17细胞,调节性T细胞,和先天免疫细胞(树突细胞,NK细胞,单核细胞)中也检测到了这种分子的表达。TIM-3在

肺癌、胃癌、头颈癌、神经鞘瘤、黑色素瘤和滤泡性B细胞非霍奇金淋巴瘤中的肿瘤浸润淋巴细胞中上调,主要在活化的CD8+T细胞上表达,并抑制PD-1抑制后的巨噬细胞活化。与HMGB1的结合可以抑制先天免疫反应的激活。与PtdSer的结合导致减少树突细胞对垂死细胞相关抗原的交叉呈递。

[0033] 6) RANTES又称为CCL5,其对T细胞,嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞具有趋化性,并且在将白细胞募集到炎症部位中起积极作用。在T细胞释放的特定细胞因子(即IL-2和IFN- γ)的帮助下,CCL5还诱导某些天然杀伤(NK)细胞的增殖和活化。可以激活几种趋化因子受体,包括CCR1,CCR3,CCR4和CCR5。RANTES是CD8+T细胞产生的主要HIV抑制因子之一。

[0034] 7) IP-10也称为干扰素 γ 诱导蛋白10。促炎细胞因子参与多种过程,例如趋化、分化和活化外周免疫细胞,调节细胞生长,细胞凋亡,然后IP-10介导抗血管生成作用。这种趋化因子通过与细胞表面趋化因子受体CXCR3结合而引发其作用。

[0035] 尽管上述各血清学生物标志物自身都是现有的,其功能也是已知的,但在众多的与免疫治疗相关的蛋白分子中,哪些蛋白分子与免疫治疗的效果直接相关,现有技术中并无明确的报道。本申请通过对上百个病例进行研究和比对分析,发现在免疫治疗之前,上述蛋白在治疗有效的患者的血清中的基线浓度显著高于那些对免疫治疗无效的患者的血清中的基线浓度,因此推测这些蛋白在治疗前存在差异表达的蛋白分子可以作为预测其免疫治疗效果的血清学生物标志物。因此,将利用上述七种血清学生物标志物中的任意一种或多种来制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,能够为预测癌症免疫治疗效果提供新的血清学生物标志物,以便更准确地对免疫效果进行预测。

[0036] 本申请的上述研究是针对包括了多种消化道肿瘤(此处指的是癌症)患者病例得出的结论,因而,上述血清学生物标志物能够用于多种消化道肿瘤患者的免疫疗效预测中。在一种优选的实施例中,癌症包括消化道癌症;优选地,消化道癌症包括食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌和胆管癌中的一种或者多种。

[0037] 根据本申请中所得到的在治疗有效组中,血清中各生物标志物的基线浓度分别在如下:MIP-1beta的基线浓度 $\geq 109.54\text{pg/ml}$ 、SDF-1alpha的基线浓度 $\geq 514.95\text{pg/ml}$ 、PD-L1的基线浓度 $\geq 12.75\text{pg/ml}$ 、CD28的基线浓度 $\geq 360.46\text{pg/ml}$ 、TIM-3的基线浓度 $\geq 1131.96\text{pg/ml}$ 、RANTES的基线浓度 $\geq 415.34\text{pg/ml}$ 、IP-10的基线浓度 $\geq 53.58\text{pg/ml}$ 范围内,而在治疗无效组中,对应的生物标志物的基线浓度分别在上述值之下。

[0038] 因此,在一种优选的实施例中,预测癌症免疫治疗效果通过对待测样本治疗前血清中的一种或多种血清生物标志物的基线浓度进行判断;优选地,MIP-1beta的基线浓度 $\geq 109.54\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,SDF-1alpha的基线浓度 $\geq 514.95\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,PD-L1的基线浓度 $\geq 12.75\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,CD28的基线浓度 $\geq 360.46\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,TIM-3的基线浓度 $\geq 1131.96\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,RANTES的基线浓度 $\geq 415.34\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效;优选地,IP-10的基线浓度 $\geq 53.58\text{pg/ml}$ 时,预测癌症免疫治疗有效。

[0039] 需要说明的是,对上述各血清生物标志物的基线浓度进行检测的方法可以是ELISA或MSD(Meso Scale Discovery),本申请中并无特殊限定。因而,任何利用上述血清生物标志物中的任意一种或多种进行基线浓度检测,并用来对癌症免疫治疗效果进行预测的

方法都在本申请的保护范围内。

[0040] 在本申请第二种典型的实施方式中,提供了一种用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,该试剂盒或芯片包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0041] 将上述血清学生物标志物用于制备预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片,有助于扩展现有预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片的种类,为准确预测免疫治疗效果提供更多选择。

[0042] 在一种优选的实施例中,检测试剂为抗体,优选地,试剂盒包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的捕获抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,MIP-1beta的捕获抗体的克隆号为24006;优选地,SDF-1alpha的捕获抗体的克隆号为79018;优选地,PD-L1的捕获抗体的克隆号为37;优选地,CD28的捕获抗体的克隆号为9H6E2;优选地,TIM-3的捕获抗体的克隆号为024;优选地,RANTES的捕获抗体的克隆号为21418;优选地,IP-10的捕获抗体的克隆号为B-C50。

[0043] 上述试剂盒中,检测上述各血清生物学标志物的试剂优选是抗体,抗体可以是单克隆抗体也可以是多克隆抗体,只要能够实现对各血清生物学标志物的检测都适用于本申请。而且,当抗体根据实际检测方法的不同,而采用不同的抗体存在形式。上述以捕获抗体的形式存在的抗体可以根据需要自行制备,也可以购买现有市售产品使用。

[0044] 在一种优选的实施例中,捕获抗体包被于固相载体上,优选地,固相载体为编码微球,更优选地,编码微球为羧基编码微球。

[0045] 在一种优选的实施例中,试剂盒还包括如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,PD-L1的检测抗体的克隆号为ANC6H1;优选地,CD28的检测抗体的克隆号为ANC28.1/5D10;优选地,TIM-3的检测抗体的克隆号为10C10;优选地,RANTES的检测抗体的克隆号为947A 1H11;优选地,IP-10的检测抗体的克隆号为B-C55。

[0046] 上述试剂盒中,上述以检测抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,且以根据需要自行制备,也可以购买现有市售产品使用。

[0047] 在一种优选的实施例中,检测抗体带有检测标记,优选地,检测标记为生物素标记;更优选地,生物素标记为N-羧琥珀酰亚氨活化的生物素标记。

[0048] 在一种优选的实施例中,试剂盒还包括链霉素标记的藻红蛋白。

[0049] 将上述捕获抗体以包被于固相载体上的形式存在,提高了抗体的反应性和反应效率。同时将检测抗体以带有标记物的形式存在,便于利用夹心法对目的标志物分子进行定性和定量检测。而将捕获抗体包被于纳米微球上,并使检测抗体带有生物素标记,同时在试剂盒中包含链霉素标记的藻红蛋白,是将上述生物标志物通过液相芯片的形式对目的生物标志物进行检测。

[0050] 液相芯片,也称为微球体悬浮芯片(suspension array,liquid chip),是基于xMAP(flexible Multi Analyte Profiling)技术的新型生物芯片技术平台,它是在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应及核酸杂交反应,通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多达100种不同的生物学反应,是继基因芯片、蛋白芯片之后的新一代高通量分子检测技

术平台。迄今为止十年时间,全球已有数百套基于xMAP技术的检测平台用于免疫学、蛋白质、核酸检测、基因研究等领域,该技术已成为一种新的蛋白质组学和基因组学研究工具,也是最早通过美国食品与药物管理局(FDA)认证的可用于临床诊断的生物芯片技术。

[0051] 基于液相芯片技术而开发出可以对血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10生物标志物进行快速检测的液相芯片试剂盒。该试剂盒具有无副作用、敏感度高、检测快速、重复性好等优点。该液相芯片试剂盒的制备方法简单可靠、稳定性好。

[0052] 在第三种典型的实施方式中,提供了上述任一种试剂盒的制备方法,该制备方法包括:制备如下任意一种或多种血清学生物标志物的检测试剂:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10。

[0053] 根据实际需要,检测试剂可以是抗体,具体的抗体种类可以是单抗也可以是多抗,此处并不做特殊限定。根据实际应用中检测方法的不同,上述生物标志物的抗体的存在形式也可以有所不同。比如,采用酶联免疫法进行检测时,各生物标志物的抗体与二抗及发光底物加入到试剂盒中即可。在一种优选的实施例中,该制备方法包括:制备如下任意一种或多种血清学生物标志物的抗体:MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10;优选地,抗体包括捕获抗体和/或检测抗体;优选地,将捕获抗体包被于固相载体上,更优选地,将捕获抗体包被于编码微球上,进一步优选地,将捕获抗体包被于羧基编码微球上;优选地,使检测抗体带有检测标记,更优选地,使检测抗体带有生物素标记,进一步优选地,使检测抗体带有N-羧琥珀酰亚胺活化的生物素标记。

[0054] 采用液相芯片的形式利用捕获抗体和检测抗体分别识别生物标志物不同的表位,利用夹心法实现对生物标志物的定性和定量检测,这种检测方法效率高。基于以MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10为血清学生物标志物预测免疫检查点阻断治疗的效果具有准确率高、实施较为方便、成本较低的优点,具有广阔的应用前景。

[0055] 在一种更优选的实施例中,基于液相芯片技术而开发出的对血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10生物标志物进行快速检测的液相芯片试剂盒的制备方法如下:

[0056] (1) 将MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体与编码微球偶联,得到分别包被有MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体的编码微球。其中,偶联的方法优选包括如下步骤:

[0057] a. 取羧基微球,用漩涡振荡器振荡微球悬液15~25s,使微球混合均匀;

[0058] b. 取震荡后的羧基微球 $0.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个,转移到离心管中, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀微球;

[0059] c. 移走上清,加入dH₂O 80~120μL,用漩涡振荡器振荡15~25s重悬微球, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀羧基微球;移走上清,加入80~120mmol/L, pH值6~6.5的磷酸二氢钠盐溶液60~100μL,用漩涡振荡器振荡15~25s,重悬洗涤的羧基微球;

[0060] d. 加入40~60mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺8~12μL,用漩涡振荡器轻轻地振荡;

[0061] e. 加入40~60mg/ml的1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺8~12μL,用漩涡振荡器轻轻振荡;

[0062] f. 室温孵育15~25min,每隔8~12min用漩涡振荡器轻振, $\geq 8000g$ 离心1.5~

3min,沉淀活化的羧基微球;

[0063] g.移走上清,加入40~60mmol/L,pH值4.8~5.2的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,漩涡振荡器振荡15~25s,重悬活化的羧基微球, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀洗涤后的羧基微球;重复该步骤2~3次,用40~60mmol/L,pH值4.8~5.2的MES洗涤2~3次,加入40~60mmol/L,pH值4.8~5.2的MES,用漩涡振荡器振荡15~25s,在混匀的微球中分别加入40~60 μg 的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体,用40~60mmol/L,pH值4.8~5.2的MES定容至400~600 μL ,用漩涡振荡器混匀;于室温置于摇床上孵育1.5~3h, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀偶联好的微球;

[0064] h.移走上清,加入PBS-TBN 200~400 μL ,漩涡振荡器振荡25~35s;于室温置于摇床上孵育25~35min, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀偶联好的微球;

[0065] i.移走上清,加入PBS-TBN 0.8~1.2ml,漩涡振荡器振荡25~35s, $\geq 8000g$ 离心1.5~3min,沉淀偶联好的微球;重复该步骤1~2次,用PBS-TBN洗涤2~3次;

[0066] j.加入PBS-TBN 0.8~1.2ml,重悬偶联好且经过洗涤的微球,即得MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体与微球的偶联体;

[0067] k.用细胞计数器计数微球的数量,浓度为 $2\sim 3\times 10^5$ 个/ml;将偶联好的微球置于2~6 $^{\circ}C$ 避光保存。

[0068] (2)在MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体上分别连接生物素,得到生物素分别标记的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体;其中,连接的方法优选包括如下步骤:

[0069] ①分别将0.8~1.2mg的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体用0.08~0.12mol/L,pH值7.8~8.2的碳酸氢钠缓冲液稀释到0.8~1.2mg/ml,终体积为0.8~1.2ml;

[0070] ②交互用0.08~0.12mol/L,pH值7.8~8.2的碳酸氢钠缓冲液对蛋白质充分透析;

[0071] ③用0.8~1.2ml二甲基亚砷溶解N-羧琥珀酰亚胺活化生物素(NHSB)0.8~1.2mg;

[0072] ④分别向0.8~1.2ml的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体溶液中加入0.8~1.2g/L的NHSB溶液100~150 μL ;在室温下持续搅拌,保温2~4h;

[0073] ⑤加入0.8~1.2mol/L的 NH_4Cl 溶液9~10 μL ,在室温下搅拌8~12min,在2~6 $^{\circ}C$ 下对PBS充分透析,以除去游离的生物素;将样品上0.8~1.2ml的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集0.8~1.2ml/管,蛋白质在1-3ml之间洗脱;样品加入终浓度为0.4~0.6g/L的叠氮钠及0.8~1.2g/L的BSA;将结合产物置于2~6 $^{\circ}C$ 避光保存。

[0074] 本申请对其中链霉亲和素标记的藻红蛋白的来源不作特别限定,本领域常规市售产品或采用本领域常规方法制备得到均可。

[0075] 在本申请第四种典型的实施方式中,还提供了一种用于免疫检查点阻断疗效预测的方法,优选包括以下步骤:

[0076] (1)测量免疫检查点阻断治疗疗效有效组的受试者的用药前血清样品中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10标志物的浓度;

[0077] (2)测量免疫检查点阻断治疗疗效无效组的受试者的用药前血清样品中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10标志物的浓度;

[0078] (3) 将步骤(1)中的测量值与(2)中的测量值进行比较,分别计算血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10浓度在有效组和无效组分布的差异。通过该分析结果,发现此七种生物标志物基线浓度可以预测免疫检查点阻断疗效。

[0079] 在本发明中,免疫检查点阻断疗法是基于阻断PD-1/PD-L1或CTLA4免疫检查点通路的治疗方法,主要采用PD-1的特异性抗体药物、PD-L1的特异性抗体药物或CTLA4的特异性抗体药物。本发明提供的血清学生物标志物能应用于消化道肿瘤的癌症患者,包括食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌患者。在消化道肿瘤患者中,对免疫检查点阻断治疗有效的患者,其治疗前血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的浓度均显著高于对免疫检查点阻断治疗无效的患者。

[0080] 下面将结合具体的实施例来进一步说明本申请的有益效果。

[0081] 实施例1

[0082] 用于MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10生物标志物检测的液相芯片试剂盒的制备。

[0083] 一、试剂盒组成:

[0084] (1) 包被捕获抗体的编码微球:含有各自包被了MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体的编码微球;

[0085] (2) 生物素标记检测抗体:用生物素分别标记的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体;

[0086] (3) 链亲和素藻红蛋白。

[0087] 其中,捕获抗体中,MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的克隆号分别为24006、79018、37、9H6E2、024、21418、B-C50;检测抗体中,PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的克隆号分别为ANC6H1、ANC28.1/5D10、10C10、947A 1H11、B-C55,而MIP-1beta、SDF-1alpha的检测抗体选用了多克隆抗体,无相应克隆号。

[0088] 二、试剂盒的制备方法:

[0089] 包括以下步骤:

[0090] (1) 相应捕获抗体包被相应微球

[0091] a. 取羧基微球用漩涡振荡器振荡微球悬液20s,使微球混合均匀;

[0092] b. 取羧基微球 1×10^6 个,转移到离心管中, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀微球;

[0093] c. 移走上清,加入ddH₂O 100 μ L,用漩涡振荡器振荡20s重悬微球, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀羧基微球;移走上清,加入100mmol/L,pH值6.2的磷酸二氢钠盐溶液80 μ L,用漩涡振荡器振荡20s,重悬洗涤的羧基微球;

[0094] d. 加入50mg/ml的N羟基琥珀酰亚胺10 μ L,用漩涡振荡器轻轻地振荡;

[0095] e. 加入50mg/ml的1-乙基-3[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺10 μ L,用漩涡振荡器轻轻振荡;

[0096] f. 室温孵育20min,每隔10min用漩涡振荡器轻振, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀活化的羧基微球;

[0097] g. 移走上清,加入50mmol/L,pH值5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,漩涡振荡器振荡20s,重悬活化的羧基微球, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀洗涤后的羧基微球;重复该步骤2次,用50mmol/L,pH值5.0的MES洗涤2次,加入50mmol/L,pH值5.0的MES,用漩涡振荡器振荡20s,在

混匀的微球中分别加入50 μ g MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体,用50mmol/L,pH值5.0的MES定容至500 μ L,用漩涡振荡器混匀;于室温置于摇床上孵育2h, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀偶联好的微球;

[0098] h.移走上清,加入PBS-TBN 300 μ L,漩涡振荡器振荡30s;于室温置于摇床上孵育30min, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀偶联好的微球;

[0099] i.移走上清,加入PBS-TBN 1ml,漩涡振荡器振荡30s, $\geq 8000g$ 离心2min,沉淀偶联好的微球;重复该步骤1次,用PBS-TBN洗涤2次;

[0100] j.加入PBS-TBN 1ml,重悬偶联好且经过洗涤的微球,即得MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10捕获抗体与微球的偶联体;

[0101] k.用细胞计数器计数微球的数量,浓度为 2.5×10^5 个/ml;将偶联好的微球置于4 $^{\circ}$ C避光保存;

[0102] (2) 相应检测抗体的生物素化

[0103] l.分别将1mg的MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体用0.1mol/L,pH值8.0的碳酸氢钠缓冲液稀释到1mg/ml,终体积为1ml;

[0104] m.交互用0.1mol/L,pH值8.0的碳酸氢钠缓冲液对蛋白质充分透析;

[0105] n.用1ml二甲基亚砷溶解N-羧琥珀酰亚胺活化生物素1mg;

[0106] o.分别向1ml的MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10检测抗体溶液中加入1g/L的NHSB溶液120 μ L;在室温下持续搅拌,保温2-4h;

[0107] p.加入1mol/L NH_4Cl 溶液9.6 μ L,在室温下搅拌10min,在4 $^{\circ}$ C下对PBS充分透析,以除去游离的生物素;将样品上1ml的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集1ml/管,蛋白质在1~3ml之间洗脱;样品加入终浓度为0.5g/L的叠氮钠及1.0g/L BSA;将结合产物置于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0108] 实施例2

[0109] 一、实验目的

[0110] 比较MIP-1 β 、SDF-1 α 、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度在免疫检查点阻断治疗有效的肿瘤患者组(用PR+SD表示)与治疗无效的肿瘤患者组(用PD表示)中是否存在差异。

[0111] 二、实验对象

[0112] 1)在知情同意及满足纳入条件的前提下,选择入组病例,记录个人基本信息。整合的肿瘤患者队列来自于项目合作医院109例晚期消化道肿瘤患者(包括肝胆肿瘤40例,食管癌26例,结直肠癌15例,胰腺癌8例,以及其他肿瘤20例)。

[0113] 2)记录患者基本临床信息:包括患者的治疗疗效等。

[0114] 3)抽取不同免疫治疗效果(PR:疾病部分缓解;PD:疾病进展;SD:疾病稳定)的肿瘤患者的血清,标本至于-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

[0115] 三、试剂准备

[0116] 采用实施例1中制备的试剂盒。

[0117] (1)微球:将所需微球超声30秒,涡旋1min,然后各取出60 μ L加入混合瓶(Mixing Bottle),剩余体积用微球稀释液(Bead Diluent)补足3ml,充分混匀,2~8 $^{\circ}$ C贮存一个月。

[0118] (2)质控(Quality Control):用250 μ L蒸馏水分别溶解对照1和2,颠倒多次使其充

分混匀,静置5-10min,然后分别移入两个试管中,-20℃贮存一个月。

[0119] (3) 标准品 (Standard, 标准品, 每次检测样本的溶度时, 都会同时检测标准品, 来矫正检测数据): 用250μL蒸馏水溶解Standard, 颠倒多次使其充分混匀, 静置5~10min, 然后移入试管中, 标记为S6。然后另取5个试管, 分别标记为S5、S4、S3、S2、S1, 每个管中加200μL Assay缓冲液, 最后从S6中取出50μL进行梯度稀释,-20℃贮存一个月。

[0120] (4) 洗脱液 (Wash Buffer, WB): 将10×WB放置室温, 使其中盐分充分溶解, 30ml WB+270ml蒸馏水将其配成1×(1倍), 4℃保存一个月。

[0121] (5) 向SM (Serum Matrix, 血清基质) 中加入1ml蒸馏水使其充分溶解, 静置10min, 然后移入试管里,-20℃贮存一个月。

[0122] 四、实验流程:

[0123] ①向96孔板中每孔加入200μL洗脱液, 室温摇十分钟润洗, 然后直接倒掉, 充分擦干。

[0124] ②分别加入25μL;

[0125] @血清基质 (Serum Matrix) 到空白对照, 标准品, 质控对照品对应的孔中;

[0126] @分析缓冲液 (Assay Buffer) 到样品孔;

[0127] @分析缓冲液到空白对照对应的孔中;

[0128] @6个不同梯度稀释的标准品和对照品到各自位置;

[0129] @样品到对应样品孔;

[0130] @微球到每个孔, 4℃避光过夜振荡孵育。

[0131] ③洗板机洗2遍。

[0132] ④每孔加25μL检测抗体, 室温避光摇1h。

[0133] ⑤每孔加25μL SAPE (链霉素标记的藻红蛋白), 室温避光摇30min。

[0134] ⑥洗板机洗2遍, 最后每孔加150μL鞘液上机 (Luminex系统) 检测。

[0135] 五、实验检测结果:

[0136] 用液相芯片试剂盒来检测免疫检查点阻断治疗有效和无效两个队列消化道肿瘤患者血清中的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度, 此七种血清生物标志物的浓度是根据机器读取的荧光值及对应的标准曲线计算得来, 七种血清生物标志物的标准曲线见图1至图7及表1。各标准曲线中的截断值 (Cut-Off) 都是30%Bias (表示暂不显示)。表1中, Fit, 表示符合度, Cut-off: 30%Bias代表暂时不展示; LLOQ: 代表最低值; ULOQ: 代表最高值。

[0137] 表1:

[0138]	生物标志物	符合度 (Fit)	最低值(LLOQ) /pg/ml	最高值(ULOQ) /pg/ml
	PD-L1	96%	3.5	14700
	TIM-3	95%	60.6	248500
	CD28	97%	28.5	116800
	SDF-1alpha	98%	15.2	62400
	MIP-1beta	97%	7.6	31500
	RANTES	99%	0.8	3450
	IP-10	94%	1.1	4700

[0139] MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度在免疫检查点阻断治疗有效 (PR) 队列和无效 (PD+SD) 队列之间存在显著性差异,结果如图8-14所示,免疫检查点阻断治疗有效 (PR) 队列中这七种细胞因子的基线浓度分别显著高于免疫检查点阻断治疗无效 (PD+SD) 队列。

[0140] 利用免疫检查点阻断治疗前消化道肿瘤患者血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10的基线浓度来对消化道肿瘤患者治疗的有效性预测的受试者工作特征曲线(ROC曲线)见图15-21,曲线下面积、置信区间和P值见图示。

[0141] 上述实验结果表明,对免疫检查点阻断治疗前血清中MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10基线浓度的检测计算,可实现对肿瘤患者免疫治疗效果的准确预测,预测准确率最低为约62%(从图15-21上可以看出)。

[0142] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:

[0143] 利用本发明提供的MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES、IP-10生物标志物或者其制备得到的试剂盒进行癌症免疫检查点阻断治疗效果的预测,具有检测快速、准确、费用低等优点,应用前景广阔。

[0144] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

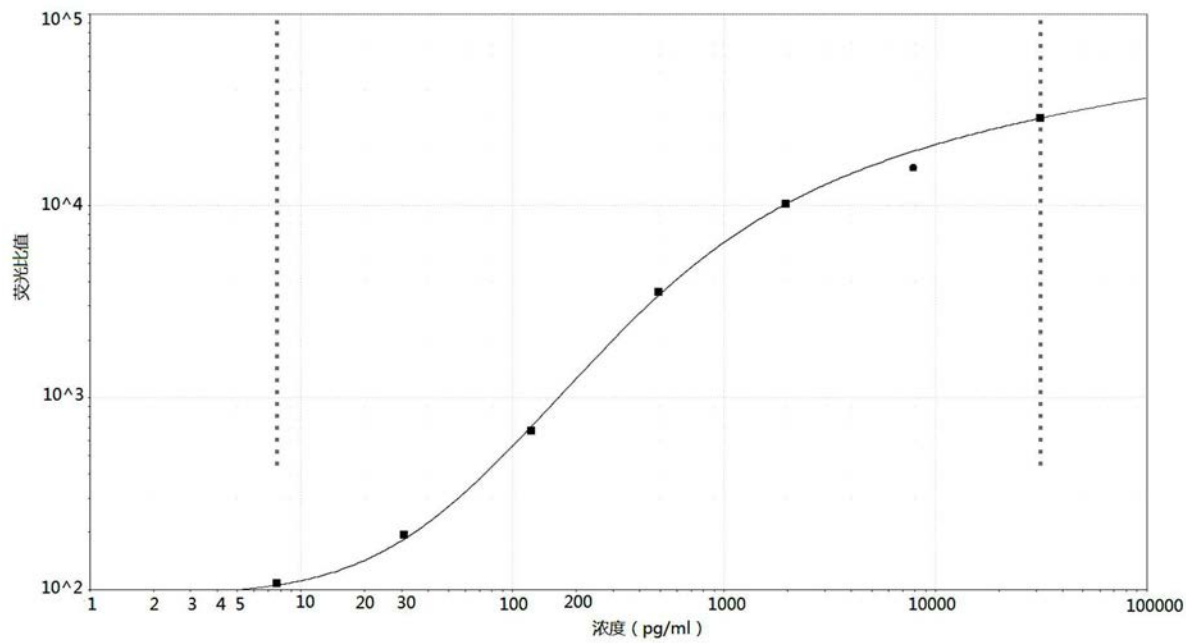


图1

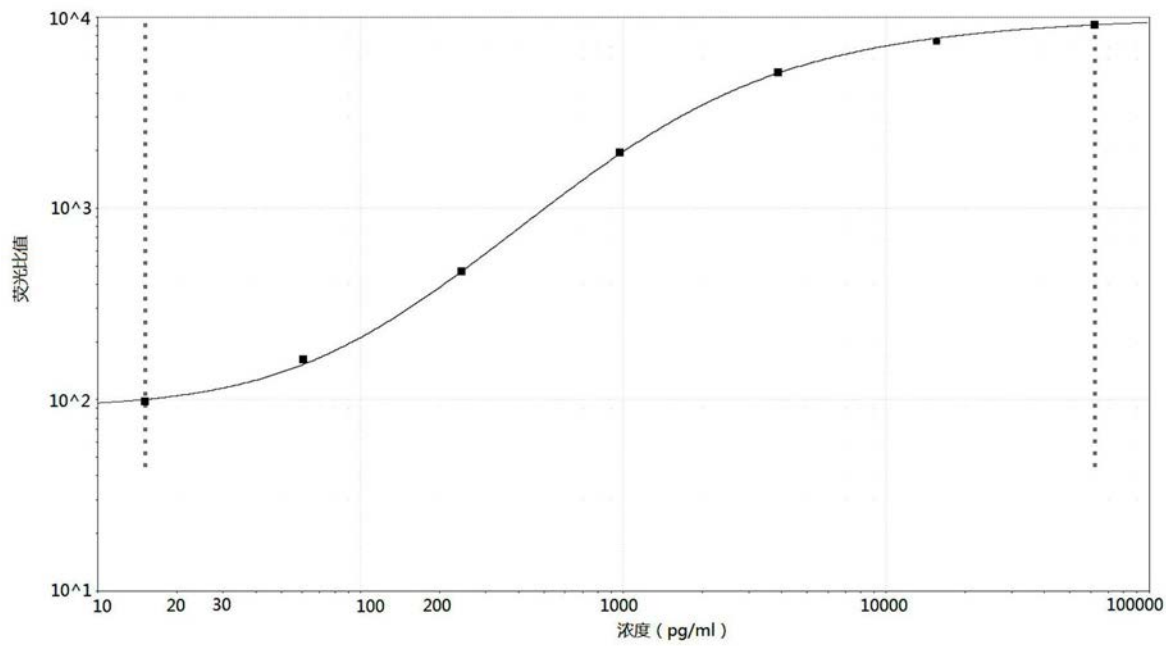


图2

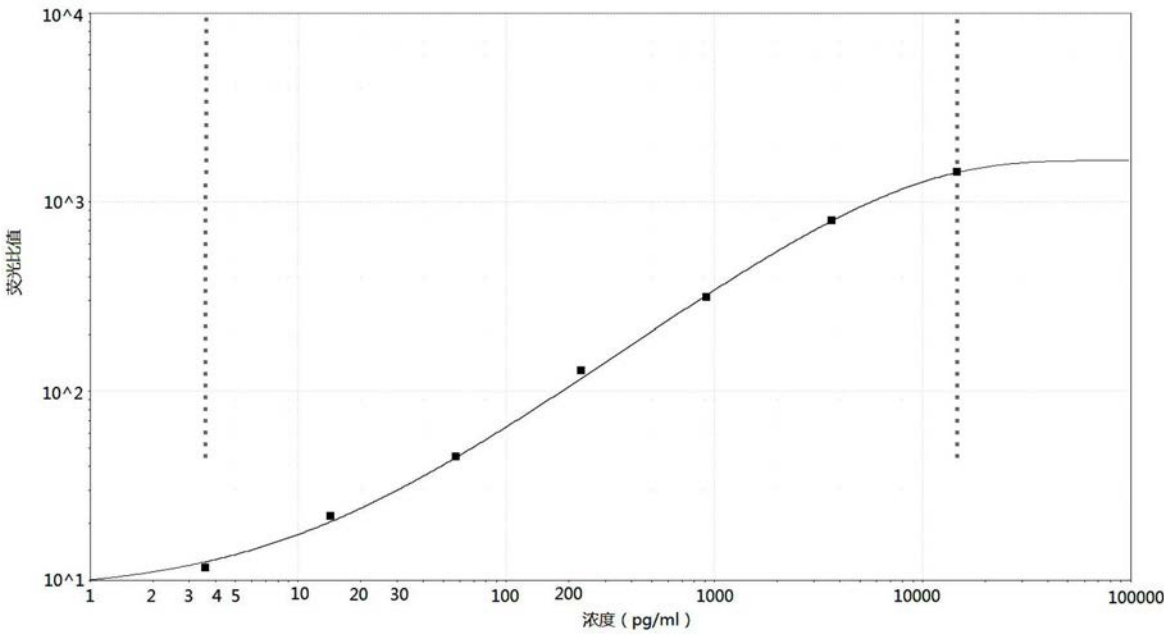


图3

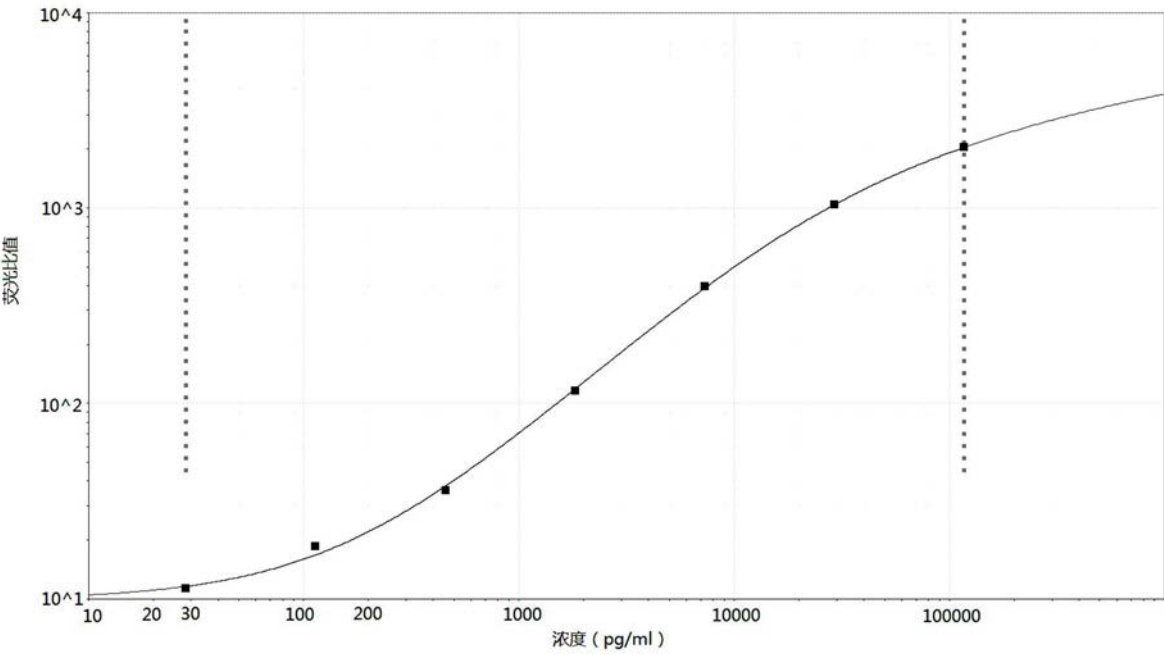


图4

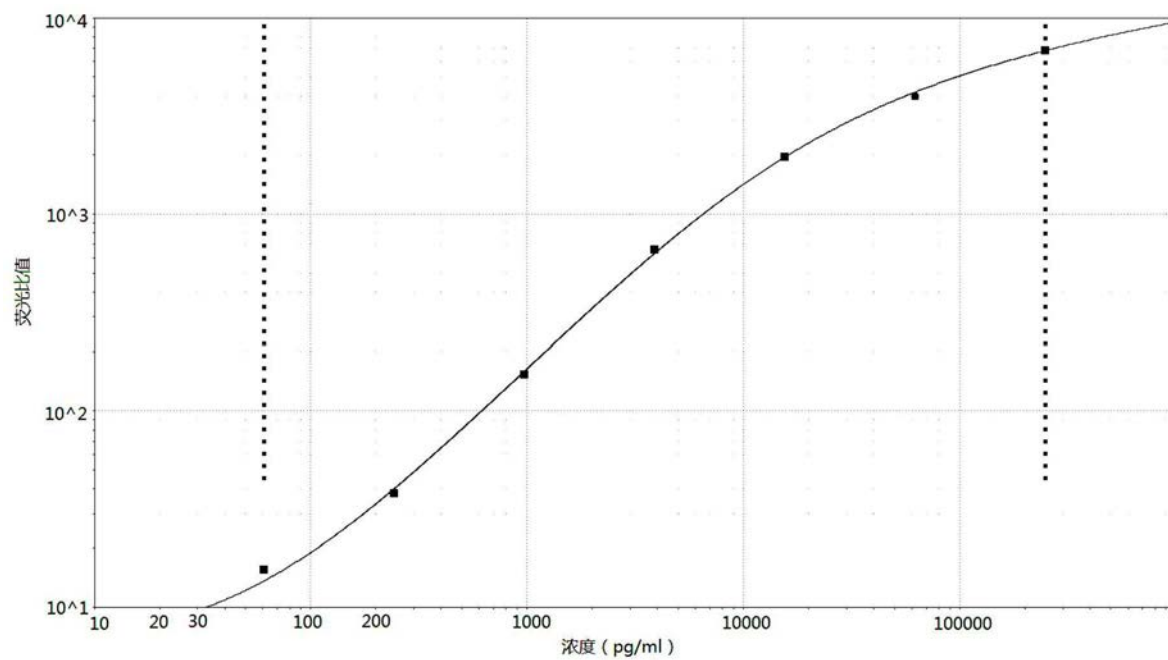


图5

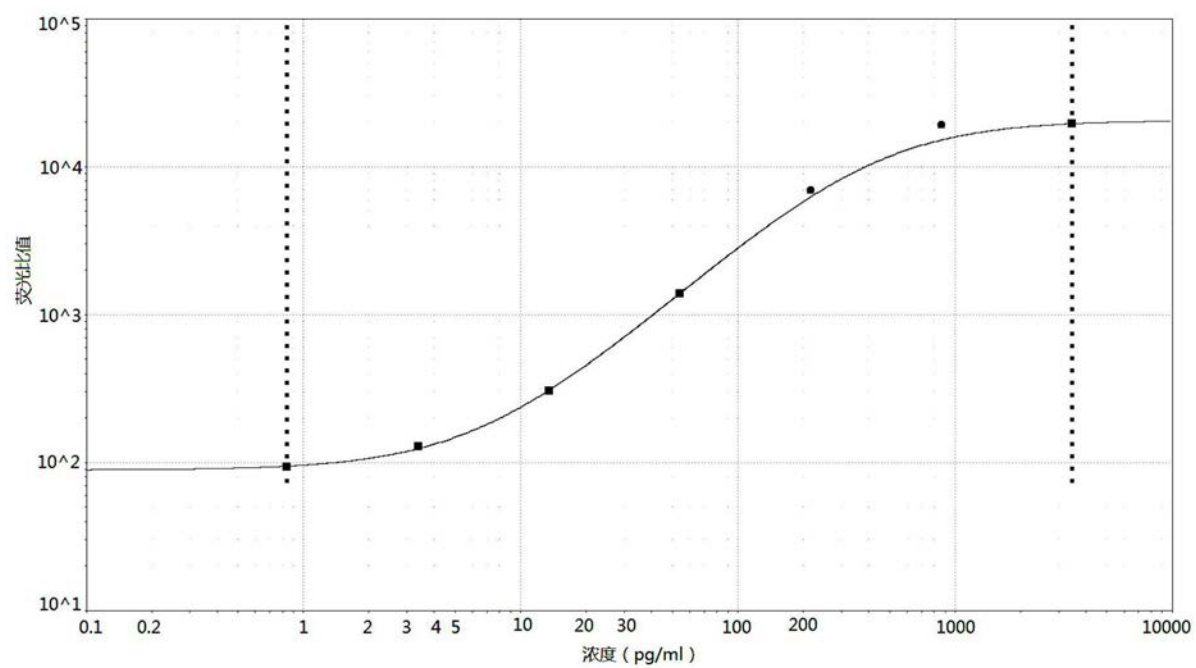


图6

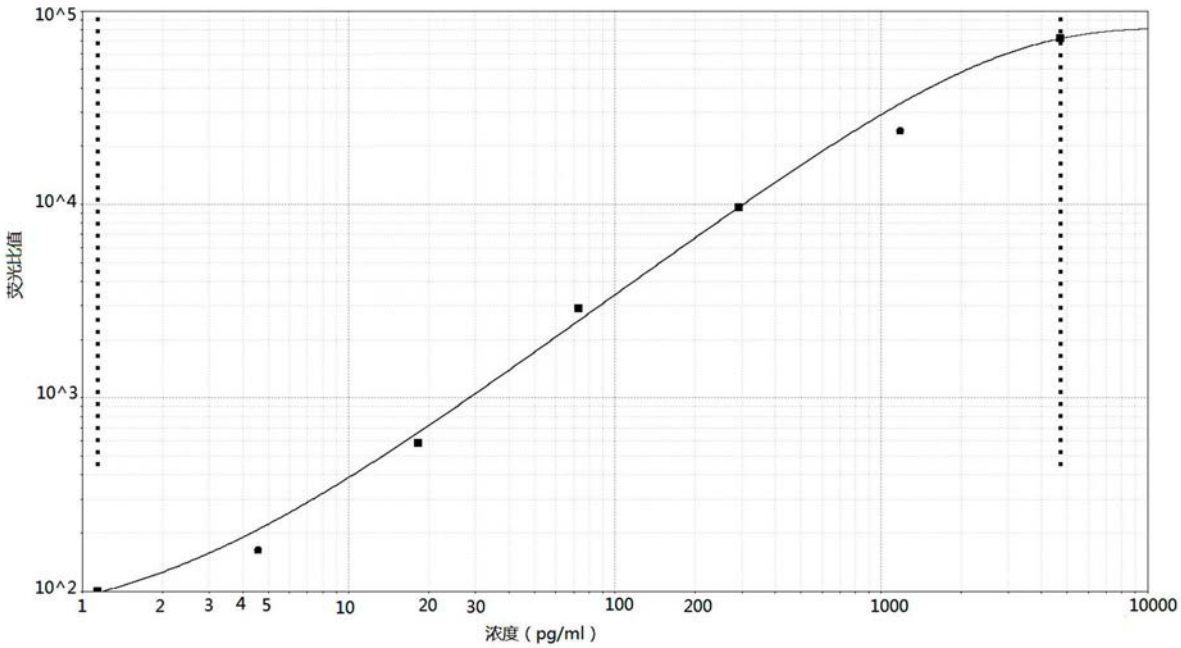


图7

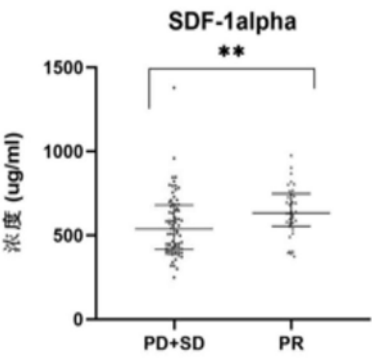


图8

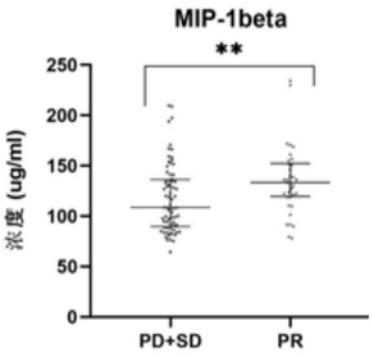


图9

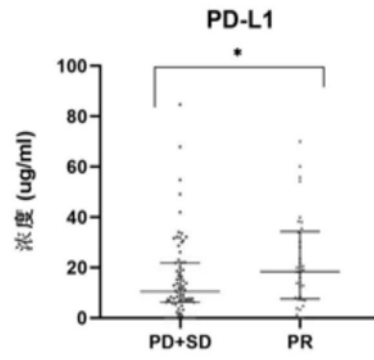


图10

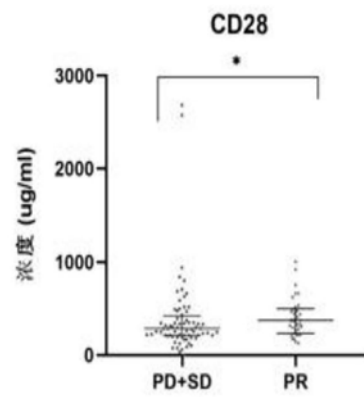


图11

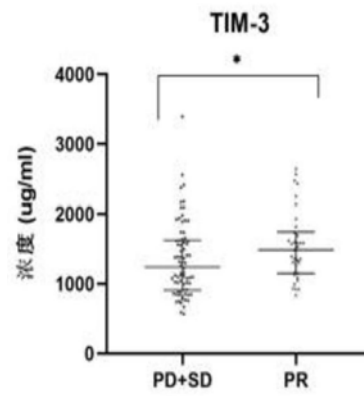


图12

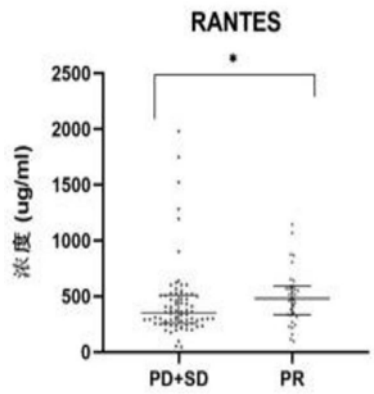


图13

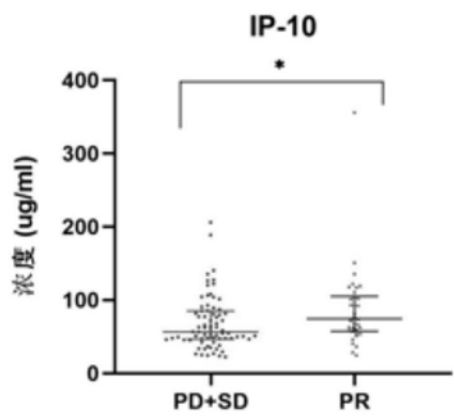


图14

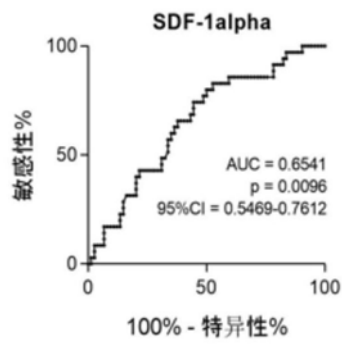


图15

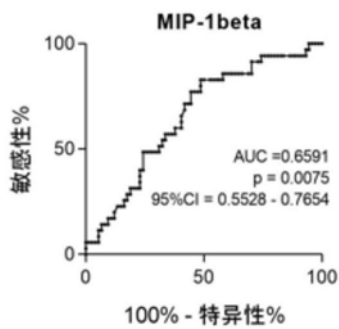


图16

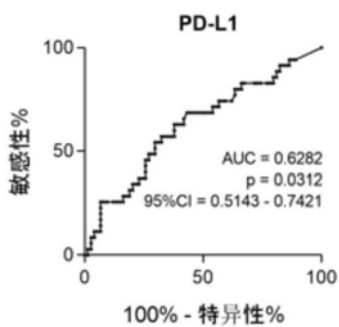


图17

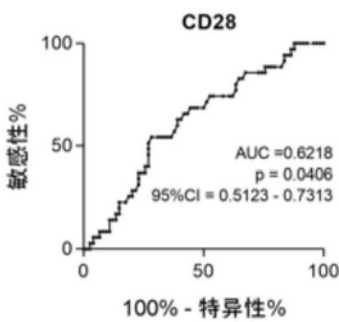


图18

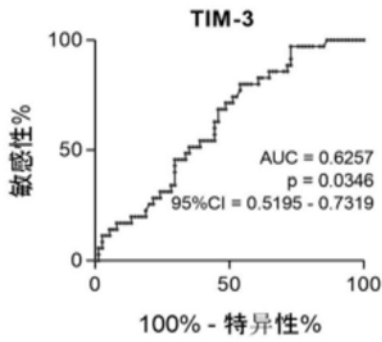


图19

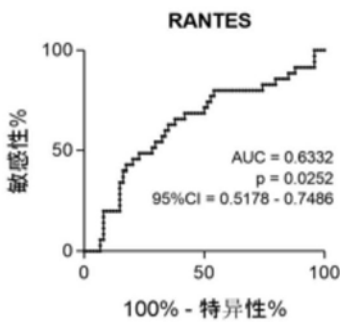


图20

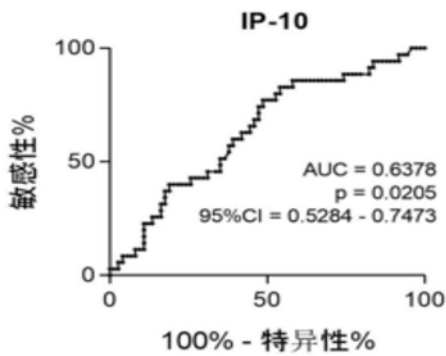


图21

专利名称(译)	血清学生物标志物在制备试剂盒和/或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN110456042A	公开(公告)日	2019-11-15
申请号	CN201910735771.8	申请日	2019-08-09
[标]发明人	张恒辉 徐建明 梁丹丹 陈欢		
发明人	张恒辉 徐建明 杨晚凝 梁丹丹 陈欢		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/96 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/505 G01N33/5052 G01N33/5055 G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/57407 G01N33/57423 G01N33/57426 G01N33/57438 G01N33/57446 G01N33/57484 G01N33/577 G01N33/6854 G01N33/96 G01N2333/4746		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了血清学生物标志物在制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片中的应用、试剂盒或芯片及其制备方法。其中，血清学生物标志物为MIP-1beta、SDF-1alpha、PD-L1、CD28、TIM-3、RANTES及IP-10中的任意一种或多种，将这七种血清学生物标志物中的任意一种或多种来制备用于预测癌症免疫治疗效果的试剂盒或芯片，能够相对更准确地对免疫治疗效果进行预测。

