



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687284 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910792720.9

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 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

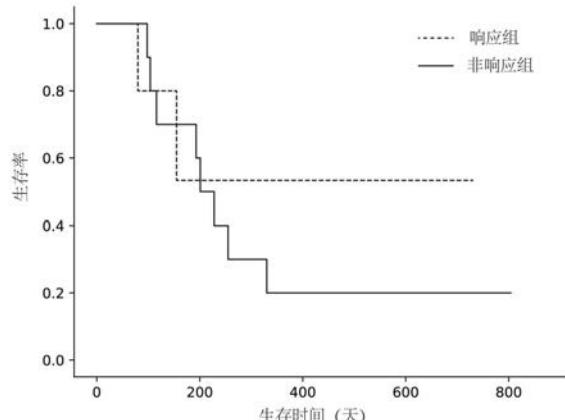
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

检测血清中SIX2自身抗体的试剂的应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测SIX2自身抗体的试剂在制备诊断、治疗、肿瘤治疗的疗效预测及预后评估肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。本发明还提供了一种诊断、治疗、肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的标志物，以及标志物的检测方法。



1. 检测SIX2自身抗体的试剂在制备诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。
2. 检测SIX2自身抗体的试剂在制备肿瘤治疗的疗效预测或预后评估中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述的肿瘤治疗的疗效预测或预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤的疗效预测或预后评估，或者，采用免疫检查点抑制剂与药物、化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤的疗效预测或预后评估。
4. 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，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。
5. 根据权利要求1-4任一所述的应用，其特征在于，所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤；所述的SIX2自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的SIX2自身抗体；所述的SIX2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。
6. 根据权利要求1-4任一所述的应用，其特征在于，所述的检测SIX2自身抗体为检测SIX2自身抗体的有无，或者表达水平。
7. 根据权利要求1-4任一所述的应用，其特征在于，所述的检测SIX2自身抗体的试剂检测SIX2自身抗体的方法选自ELISA、rapid-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。
8. 一种诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的标志物，其特征在于，所述的标志物包含SIX2自身抗体。
9. 一种肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的标志物，其特征在于，所述的肿瘤选自淋巴瘤、非小细胞肺癌或软组织肉瘤肿瘤；所述的标志物包含SIX2自身抗体；所述的SIX2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。
10. 一种SIX2自身抗体的检测方法，其特征在于，将SIX2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。

检测血清中SIX2自身抗体的试剂的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学检测技术领域,具体涉及一种检测SIX2自身抗体的试剂在制备诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。

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。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。

[0003] 但是,目前尚未公开SIX2自身抗体作为肿瘤或自身免疫疾病的诊断、治疗、治疗疗效预测或预后评估中的应用。对于SIX2的研究仍在继续,例如:专利CN104195137A公开了抑制SIX2基因表达的shRNA、慢病毒表达载体及其构建方法,以为进一步研究SIX2的功能打下了良好的基础。专利CN105829338A公开了一种用于治疗伤口的化合物,包含抑制至少一个选自以下的基因的活性的试剂:SIX2、MEOX2、MAF。

发明内容

[0004] 本发明人通过创造性劳动证实通过快速酶联免疫试验(rapid-ELISA)可以检测肿瘤或自身免疫疾病患者血液中的SIX2自身抗体的含量,且在低SIX2自身抗体患者中,对免疫治疗肿瘤疗效好的患者更多,表明SIX2自身抗体能够作为潜在的肿瘤诊断、治疗、免疫治疗疗效预测或预后评估的标志物。

[0005] 具体的,本发明的第一方面提供了检测SIX2自身抗体的试剂在制备诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。

[0006] 本发明的第二方面,提供了SIX2自身抗体在制备诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。

[0007] 本发明的第三方面,提供了检测SIX2自身抗体的试剂在制备肿瘤治疗的疗效预测或预后评估中的应用。

[0008] 优选的,所述的SIX2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。

[0009] 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。

[0010] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0011] 优选的，所述的肿瘤治疗的疗效预测或预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤的疗效预测或预后评估，或者，采用免疫检查点抑制剂与药物、化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤的疗效预测或预后评估。

[0012] 其中，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。

[0013] 本发明的第四方面，提供了SIX2自身抗体在制备肿瘤治疗的疗效预测或预后评估中的应用。

[0014] 优选的，所述的SIX2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。

[0015] 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。

[0016] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0017] 优选的，优选的，所述的肿瘤治疗的疗效预测或预后评估为采用免疫检查点抑制剂治疗肿瘤的疗效预测或预后评估，或者，采用免疫检查点抑制剂与药物、化疗、放疗或其他手段联合治疗肿瘤的疗效预测或预后评估。

[0018] 其中，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。

[0019] 本发明的第五方面，提供了一种诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的标志物，所述的标志物包含SIX2自身抗体。

[0020] 优选的，所述的SIX2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。

[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，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0023] 优选的，所述的标志物还包含除SIX2自身抗体以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SIX2自身抗体联合进行肿瘤或自身免疫疾病的诊断和/或治疗的标志物。其中，所述的伴随标志物选自SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合。

[0024] 本发明的第六方面，提供了一种肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的标志物，所述的标志物包含SIX2自身抗体。

[0025] 优选的，所述的SIX2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。

[0026] 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。

[0027] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0028] 优选的，所述的标志物还包含除SIX2自身抗体以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SIX2自身抗体联合进行肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的标志

物。其中，所述的伴随标志物选自SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合。

[0029] 本发明的第七方面，提供了一种诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品，所述的产品包含检测SIX2自身抗体的试剂。

[0030] 优选的，所述的SIX2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] 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。

[0032] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0033] 优选的，所述的诊断和/或治疗肿瘤、自身免疫疾病的产品还包含除检测SIX2自身抗体的试剂之外的检测其他免疫检查点蛋白或其自身抗体的试剂，与检测SIX2自身抗体的试剂联合进行肿瘤、自身免疫疾病的诊断和/或治疗。其中，所述的其他免疫检查点蛋白或其自身抗体选自SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合。

[0034] 本发明的第八方面，提供了一种肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的产品，所述的产品包含检测SIX2自身抗体的试剂。

[0035] 优选的，所述的SIX2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。

[0036] 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。

[0037] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0038] 优选的，所述的肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的产品还包含除检测SIX2自身抗体的试剂之外的检测其他免疫检查点蛋白或其自身抗体的试剂，与检测SIX2自身抗体的试剂联合进行肿瘤治疗的疗效预测或预后评估。其中，所述的其他免疫检查点蛋白或其自身抗体选自SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合。

[0039] 本发明所述的检测SIX2自身抗体的试剂选自试纸条、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SIX2蛋白、多肽、质粒。

[0040] 本发明所述的产品选自试剂盒、质谱。

[0041] 本发明的第九方面，提供了一种检测SIX2自身抗体的试剂盒，包含检测SIX2自身抗体表达水平的试剂。

[0042] 优选的，所述的SIX2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。

[0043] 优选的，所述的检测SIX2自身抗体的试剂盒还包含检测SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、

TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的试剂。

[0044] 本发明的第十方面,提供了一种检测SIX2自身抗体的芯片,包含检测SIX2自身抗体表达水平的试剂。

[0045] 优选的,所述的SIX2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。

[0046] 优选的,所述的检测SIX2自身抗体的芯片还包含检测SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的试剂。

[0047] 本发明的第十一方面,提供了一种诊断和/或治疗肿瘤的试剂盒,包含检测SIX2自身抗体表达水平的试剂。

[0048] 优选的,所述的SIX2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。

[0049] 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。

[0050] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0051] 优选的,所述的诊断和/或治疗肿瘤的试剂盒,还包含检测SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的试剂。

[0052] 本发明的第十二方面,提供了一种肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的试剂盒,包含检测SIX2自身抗体表达水平的试剂。

[0053] 优选的,所述的SIX2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。

[0054] 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。

[0055] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0056] 优选的,所述的肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的试剂盒,还包含检测SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的试剂。

[0057] 本发明的第十三方面,提供了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SIX2自身抗体的有无或表达水平。

[0058] 优选的,所述的SIX2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。

[0059] 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。

[0060] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0061] 优选的,所述的肿瘤或自身免疫疾病的诊断方法还包含检测生物体体内SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的有无或表达水平。

[0062] 本发明的第十四方面,提供了一种肿瘤或自身免疫疾病的免疫抑制剂治疗的疗效预测或预后评估的方法,所述的方法包含检测生物体体内SIX2自身抗体的有无或表达水平。

[0063] 优选的,所述的SIX2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。

[0064] 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。

[0065] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0066] 优选的,所述的肿瘤或自身免疫疾病的免疫抑制剂治疗的疗效预测或预后评估的方法,还包含检测生物体体内SIX2蛋白、PD-1蛋白或其自身抗体、PD-L1蛋白或其自身抗体、CTLA-4蛋白或其自身抗体、BTLA蛋白或其自身抗体、TIM-3蛋白或其自身抗体、LAG-3蛋白或其自身抗体、TIGIT蛋白或其自身抗体、LAIR1蛋白或其自身抗体、2B4蛋白或其自身抗体或CD160蛋白或其自身抗体中的一种或两种以上的组合的有无或表达水平。

[0067] 本发明的第十五方面,提供了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或自身免疫疾病的患者施用有效量的免疫检查点抑制剂,其中,自该患者体内检测到SIX2自身抗体的表达。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,或向患者施用免疫检查点抑制剂和其他药物及放疗、化疗等治疗手段的组合。

[0068] 优选的,所述的SIX2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。

[0069] 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。

[0070] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0071] 优选的,自该患者体内检测到SIX2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SIX2自身抗体的表达。其中,所述的SIX2自身抗体的表达水平越低,所述免疫检查点抑制剂治疗的效果越好。

[0072] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的自该患者体内检测到SIX2自身抗体的表达为自该患者血清、血浆中检测到SIX2自身抗体的表达。

[0073] 本发明所述的检测SIX2自身抗体的试剂检测SIX2自身抗体的方法选自ELISA、rapid-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。

[0074] 优选的,所述的检测SIX2自身抗体的试剂检测SIX2自身抗体的方法为rapid-ELISA。

[0075] 本发明的第十六方面,提供了一种SIX2自身抗体的检测方法,包括将SIX2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。

[0076] 优选的，所述的SIX2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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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，稀释浓度为1:150-1000。

[0080] 进一步优选的，稀释浓度为1:150-450。

[0081] 更进一步优选的，所述的稀释浓度为1:200-400。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的底物为TMB。

[0085] 优选的，所述的测定浓度的方法为测定450nm的吸光度值。

[0086] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的方法包括：

[0087] 1) 将捕获抗体包被于96孔板中，4℃过夜，洗涤；用牛奶稀释后封闭1-3h；优选的，用牛奶稀释后封闭2h；

[0088] 同时将SIX2质粒加入体外表达系统，避光反应1-3h，优选2h，用牛奶稀释后加入96孔板，室温0.5-2h，优选1h后洗涤，优选的，所述体外表达系统为IVTT；优选的，血清样本用牛奶稀释至1:200-400；

[0089] 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；

[0090] 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；

[0091] 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；

[0092] 5) 测定450nm的吸光度值确定样本中SIX2自身抗体的表达。

[0093] 本发明所述的SIX2自身抗体为血清、血浆、组织间隙液、脑脊液或尿液中的SIX2自身抗体。

[0094] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的SIX2自身抗体为血清或血浆中的SIX2自身抗体。

[0095] 本发明所述的检测SIX2自身抗体为检测SIX2自身抗体的有无，或者表达水平。

[0096] 在本发明的一个具体实施方式中，所述的检测SIX2自身抗体为检测SIX2自身抗体表达水平。

[0097] 本发明所述的疗效预测为疾病治疗前预测药物治疗效果的有无、好坏或副作用。优选的，所述的药物为免疫检查点抑制剂。

[0098] 本发明所述的预后评估为肿瘤经免疫检查点抑制剂治疗后的预后评估。

[0099] 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。

[0100] 本发明所述的治疗肿瘤是指通过检测SIX2蛋白或其自身抗体表达水平，确定是否通过免疫检查点抑制剂治疗。

[0101] 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(或淋巴细胞性)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，所述的肿瘤为非小细胞肺癌。

[0102] 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

[0103] 以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

[0104] 图1：rapid-ELISA夹心法检测117例肿瘤患者血清SIX2自身抗体的分布情况，具体肿瘤患者为淋巴瘤、肺癌和软组织肉瘤。

[0105] 图2：SIX2自身抗体在肺癌患者免疫治疗有效组和无效组的分布情况，其中，有效组为肿瘤免疫治疗有效组，即响应组，无效组为肿瘤免疫治疗无效组，即非响应组。

[0106] 图3：SIX2自身抗体对免疫治疗的疗效预测作用的ROC曲线。

[0107] 图4：SIX2自身抗体对接受免疫治疗患者的预测生存曲线。

具体实施方式

[0108] 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。

[0109] 实施例1

[0110] 1、样本收集

[0111] 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。

[0112] 2、检测方法

[0113] 进行快速酶联免疫吸附试验(rapid-ELISA)以评估血清SIX2自身抗体的浓度。将捕获抗体(10ng/ μ L*50 μ L)包被在96孔板中,4℃过夜后洗涤,用缓冲液稀释的牛奶(5%)50 μ L封闭2小时,同时将SIX2质粒加入体外表达系统IVTT,37℃避光孵育1.5小时,用牛奶稀释后加入洗涤后的96孔板中,室温1小时后洗涤。血清样品在稀释缓冲液中稀释(稀释浓度为1:300),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。

[0114] 3、统计分析

[0115] 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。

[0116] 4、实验结果

[0117] 1) 该方法能成功检测到肿瘤患者血清中SIX2自身抗体水平

[0118] 使用上述快速酶联免疫吸附实验的条件检测了89例淋巴瘤、16例非小细胞肺癌、12例软组织肉瘤肿瘤患者血清样品的SIX2自身抗体表达水平,结果显示利用上述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,且不同肿瘤间患者血清中SIX2自身抗体水平有所不同(见图1)。

[0119] 2) 肿瘤患者血清SIX2自身抗体水平与免疫治疗疗效的关系。

[0120] 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,因此首先对OD值进行了标准化,并检测肺癌中血清SIX2自身抗体水平与PD-1免疫治疗的关系。结果显示,在治疗效果好的患者中,其SIX2自身抗体水平比非响应组的水平低(见图2),单独用此指标对不同疗效的患者进行区分,曲线下面积可达到0.92(见图3),由此表明血清SIX2自身抗体水平高低是潜在的肿瘤免疫治疗的标志物。

[0121] 3) 肿瘤患者血清SIX2自身抗体水平对患者长期生存的预测能力。

[0122] 收集患者的随访信息,根据SIX2预测结果进行生存分析。结果显示,非响应组患者其生存时间较相应组要短,说明SIX2自身抗体水平对接受免疫治疗的患者具有一定的预后预测能力(见图4)。

[0123] 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。

[0124] 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。

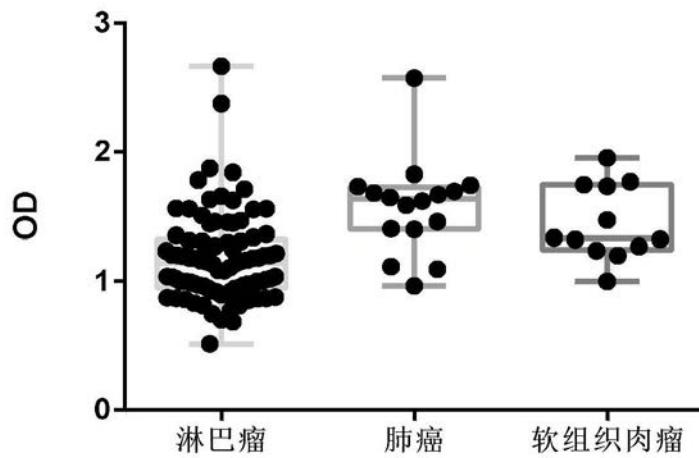


图1

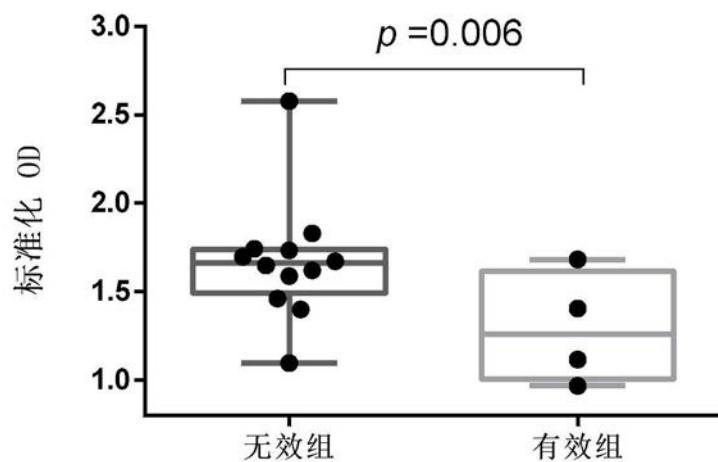


图2

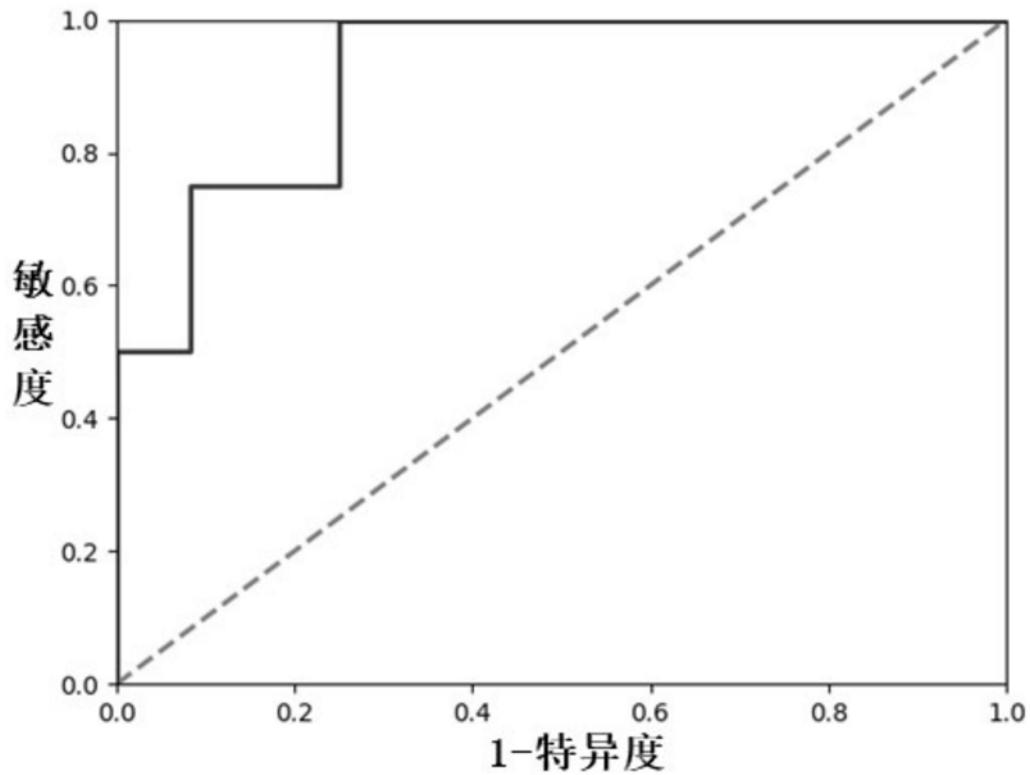


图3

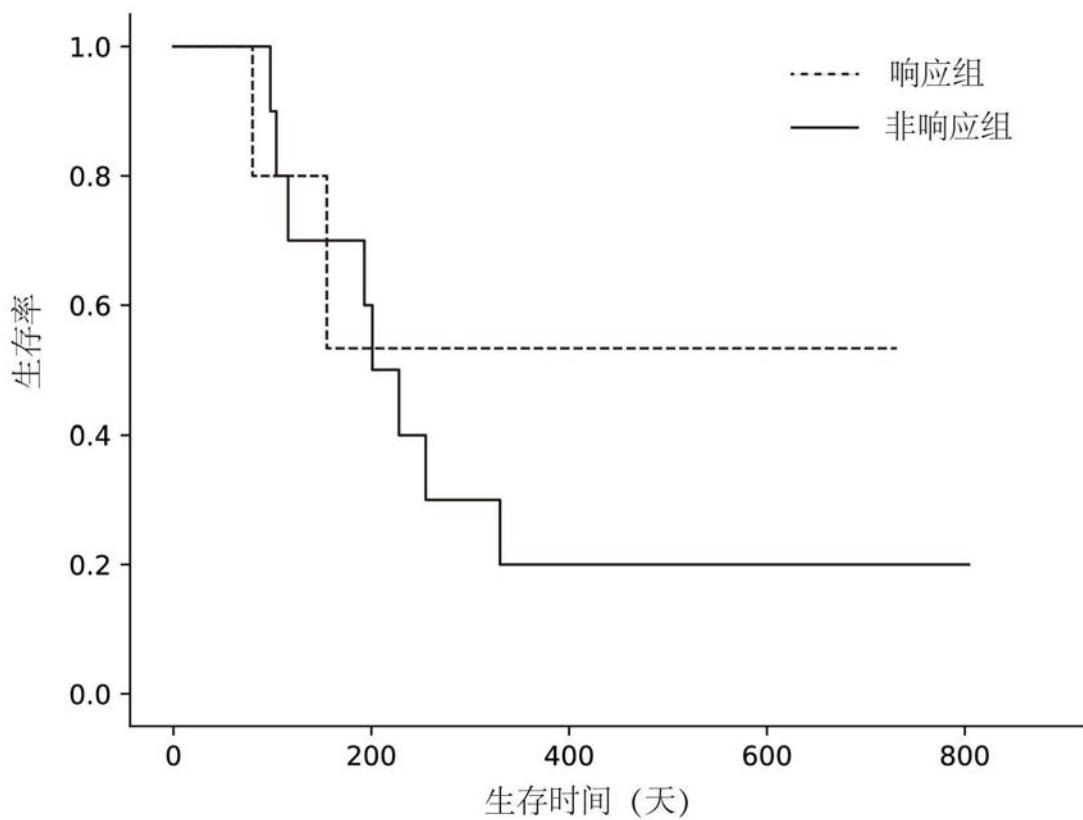


图4

专利名称(译)	检测血清中SIX2自身抗体的试剂的应用		
公开(公告)号	CN110687284A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910792720.9	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	G01N33/535 G01N33/533 G01N33/532 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)

本发明提供了一种检测SIX2自身抗体的试剂在制备诊断、治疗、肿瘤治疗的疗效预测及预后评估肿瘤、自身免疫疾病的产品中的应用。本发明还提供了一种诊断、治疗、肿瘤治疗的疗效预测或预后评估的标志物，以及标志物的检测方法。

