



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115508555 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 23

(21) 申请号 202211081463.6

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.07

G01N 15/14 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

202210489632.3 2022.05.07

(71) 申请人 珠海圣美生物诊断技术有限公司

地址 519060 广东省珠海市香洲区同昌路  
266号3栋3层

(72) 发明人 陈林 唐东江 黄卫平 李雁菱  
邹宝莹

(74) 专利代理机构 北京植众德本知识产权代理  
有限公司 16083

专利代理师 张彦彦

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书3页 说明书16页 附图7页

(54) 发明名称

循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明提供了一种循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒及方法,所述试剂盒包括检测试剂和PD-L1阳性细胞捕获试剂;所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第3荧光分子标记的抗第n非人源标志物的抗体、……第n-1非人源标志物标记的抗第n-2非人源标志物抗体、第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物抗体;其中,n为大于等于1的正整数,所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的发射波长,所述第1-第n非人源标志物为不同的非人源标志物,该试剂盒用于检测循环PD-L1阳性细胞具有较高的灵敏度和较低的检测限。

1. 用于待测样本中循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒,所述试剂盒包括检测试剂和PD-L1阳性细胞捕获试剂;所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体以及第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体;

其中,所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的激发波长或发射波长。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中,所述循环PD-L1阳性细胞包括循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞;

所述循环PD-L1阳性肿瘤细胞选自黑色素瘤细胞、非小细胞肺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、胆管癌细胞、食道癌细胞、肠癌细胞、乳腺癌细胞、小细胞肺癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞、人胎盘绒毛癌细胞、宫颈癌细胞、卵巢癌细胞、膀胱癌细胞、头颈部肿瘤细胞、皮肤癌细胞、胸腺癌细胞、淋巴瘤细胞、鼻咽癌细胞中的一种或多种;

所述待测样本为体液样本,其选自血液样本、胸水样本、腹水样本、脑脊液样本、尿液样本和痰液样本;

优选地,所述白细胞共同抗原抗体选自CD45、CD11b、CD14、CD68、CD16、CD56、CD57、CD59、CD94、CD3、CD4、CD8、CD80、CD86、CD40、CD21、CD19、CD20、CD18、CD32、CD44、CD55和CD66b抗体中的一种或多种;

所述癌细胞抗原抗体选自CK、Epcam、HER2、Trop2、EGFR和CEA抗体中的一种或多种;

所述非人源标志物标记选自生物素、地高辛、亲和素、HRP和碱性磷酸酶标记中的一种或多种;

所述第1、第2、第3荧光分子选自iFluor647、iFluor488、iFluor594、iFluor555、iFluor568、iFluor750、FITC、Alexa Fluor488、Alexa Fluor555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor750、APC以及Alexa Fluor647,所述第1、第2、第3荧光分子为具有不同的激发波长或发射波长的荧光分子。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中,所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体以及第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体;

优选地,所述白细胞共同抗原抗体为CD45抗体;所述癌细胞抗原抗体为CK抗体。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂盒,其中,所述PD-L1阳性细胞捕获试剂包括捕获抗体和磁珠,所述捕获抗体为第2非人源标志物标记的PD-L1抗体和第2非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体,所述磁珠为抗第2非人源标志物的抗体标记的磁珠,所述第1和第2非人源标志物为不同的非人源标志物;所述捕获试剂中的PD-L1抗体与检测试剂中的PD-L1抗体为互不竞争的抗体;

所述肿瘤特异性蛋白标志物选自Epcam、HER2、Trop2、EGFR、vimentin、MUC1、HER3、C-MET、ALK、claudin18.2、GPC3中的一种或多种;

优选地,所述捕获试剂中,所述第2非人源标志物为生物素,所述抗第2非人源标志物的抗体为链霉亲和素,所述肿瘤特异性蛋白标志物为Epcam、HER2、Trop2、EGFR;所述捕获试剂包括生物素标记的Epcam、HER2、Trop2、EGFR、PD-L1抗体以及链霉亲和素标记的磁珠;

优选地,所述第2非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体和第2非人源标志物标记的PD-L1抗体和的质量比为5:(0.5-2)。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中,所述捕获抗体中Epcam、HER2、Trop2、EGFR抗体的质量比为1:1:1:2、2:1:1:2、1:1:2:2、1:2:1:2、2:2:1:2、2:1:2:2或2:2:2:2。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的试剂盒,其中,所述检测试剂包括HRP标记的PD-L1抗体、iFluor488标记的CD45抗体、iFluor647标记的CK抗体以及Alexa Fluor594标记的抗HRP抗体;

优选地,所述试剂盒包括HRP标记的PD-L1抗体、iFluor488标记的CD45抗体、iFluor647标记的CK抗体、Alexa Fluor594标记的抗HRP抗体、生物素标记的Epcam、HER2、Trop2、EGFR、PD-L1抗体以及链霉亲和素标记的磁珠;

优选地,所述试剂盒中HRP标记的PD-L1抗体的使用浓度为1-8 $\mu$ g/ml, Alexa Fluor594标记的抗HRP抗体的使用浓度为1.25-10 $\mu$ g/ml, CD45抗体的使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml, CK检测抗体的使用浓度为2-16 $\mu$ g/ml。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的试剂盒,其中,还包括样本前处理试剂和封闭试剂,所述前处理试剂包含红细胞去除试剂和细胞固定试剂;所述封闭试剂选自人IgG、鼠IgG、兔IgG、羊IgG中的一种或多种的溶液;

所述红细胞去除试剂为含有 $\text{NH}_4^+$ 的试剂;所述细胞固定试剂为含有多聚甲醛、甲醛、戊二醛、甲醇、冰醋酸中的一种或多种的溶液;

优选地,所述红细胞去除试剂和待测样本体积比为(1:2)-(1:9);

优选地,所述红细胞去除试剂和待测样本体积比为1:3;

优选地,所述细胞固定试剂和待测样本体积比为(2:1)-(1:5);

优选地,所述细胞固定试剂和待测样本体积比为1:1;

优选地,所述细胞固定试剂使用浓度为0.25%-4%;

优选地,所述细胞固定试剂使用浓度为2%;

优选地,所述封闭试剂的使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml;

优选地,所述封闭试剂为人IgG。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的试剂盒的制备方法,其中,包括以下步骤:

(1) PD-L1阳性细胞捕获试剂配制步骤,其包括捕获抗体配制和磁珠配制;

(2) PD-L1检测抗体的配制步骤,其包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体的配制步骤;

(3) 白细胞共同抗原抗体和癌细胞抗原抗体的配制步骤;

(4) 试剂组装;

步骤(1)所述捕获抗体配制步骤中,第2非人源标志物与癌细胞抗原抗体的质量比为1:(10-120);

步骤(2)中,第1非人源标志物与PD-L1抗体的质量比为1:(0.5-4)。

9. 一种非诊断目的的待测样本中循环PD-L1阳性细胞的检测方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 从受试者获得待测样本,加入捕获抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第1非人源标志物标记的PD-L1抗体孵育;

(2) 加入第2非人源标志物标记的磁珠和第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体,分离磁珠;

(3) 加入核酸染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析；

(4) 结果判断；

其中,所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的发射波长；

步骤(4)中,若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ,且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $\geq 3.0$ ,所述PD-L1阳性细胞为阳性肿瘤细胞；

若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ,且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $< 3.0$ ,所述PD-L1阳性细胞为阳性免疫细胞。

10. 权利要求1-7任一项所述的试剂盒、权利要求8所述方法制备得到的试剂盒在制备检测待测样本中循环PD-L1阳性细胞的试剂或试剂盒中的用途,所述循环PD-L1阳性细胞包括循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞。

## 循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒及方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒及方法。

### 背景技术

[0002] 免疫组化是检测蛋白表达的经典手法,应用抗原与抗体特异性结合的原理,用病理组织切片进行PD-L1免疫组织化学染色,评价肿瘤细胞或者免疫细胞的PD-L1表达情况,免疫组化是目前PD-L1阳性的主要检测方法,临床试验及实践中以免疫组化方法为主,在该检测方法中,除了染色技术外,抗体的特异性也尤其重要。

[0003] 虽然PD-L1检测是目前最主要的免疫治疗生物标志物,但其临床应用仍然存在一些问题,主要包括:

[0004] (1) 免疫组化方法中,不同的检测抗体、平台的方法学差异,对表达量计算的算法不同,导致比较难取得高的一致性,从而造成没有统一的临床诊断标准。例如在Blueprint研究(Hirsch F R,McElhinny A,Stanforth D,et al.PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer:Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project[J].Journal of Thoracic Oncology,2017,12(2):208-222.)中,39份NSCLC的蜡块样本的系列切片采用各自药物临床试验所用的检测方法来分析PD-L1表达水平,由3个病理专家来阅片。结果显示三种抗体(28-8,22C3,SP263)的IHC分析在肿瘤细胞具有较好的一致性,而SP142抗体染色肿瘤细胞相对较少。虽然四种抗体对免疫细胞都有不同程度的染色,但一致性较差。Blueprint 2研究中(Tsao M,Kerr K,Yatabe Y,et al.PL03.03Blueprint 2:PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life, Clinical Samples[J].Journal of Thoracic Oncology,2017,12(11):S1606.)分析了五种抗体(28-8,22C3、SP142、SP263和73-10)的染色可比性,结果显示28-8、22C3和SP263检测肿瘤细胞具有染色一致性,SP142检出阳性细胞较少,而73-10检出更多的阳性细胞,对免疫细胞的染色具有挑战性,一致性差而不可靠。对于细胞学样本,PD-L1染色的可靠性需要进一步确认。

[0005] (2) 生物学上的PD-L1组化检测存在异质型,因为在同一肿瘤不同区域,PD-L1存在差异,并且原发灶与转移灶间也存在差异,所以单纯对于少部分区域活检取材,可能会造成采样偏倚,难以对于肿瘤整体情况准确评估;Ilie等(Ilié,M,Szafer-Glusman E,Hofman V,et al.Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer[J].Annals of Oncology,2018.)利用SP142评估了160例NSCLC患者的手术切除标本和肺组织活检标本的PD-L1染色。PD-L1染色存在明显差异,活检标本与手术标本(TC1/2/3和/或IC1/2/3,26%vs 74%)。

[0006] (3) PD-L1表达具有动态变化的特点,随时间和治疗应答而波动、上调或下调。组织活检难以实现实时、多次监测。

[0007] CTC来源于原发肿瘤灶及转移灶,可以在一定程度反映肿瘤整体情况,减轻肿瘤异

质性造成的影响,作为一种无创性血液检测手段,可以在患者治疗过程对于疗效进行监测评估,较于免疫组化PD-L1检测,循环肿瘤细胞(CTC)对于PD-L1检测具有独特优势。

[0008] 但是,目前对于循环PD-L1阳性细胞的研究较少,且绝大多数技术平台是基于Epcam单个抗体捕获,该技术方法容易漏检Epcam阴性的PD-L1阳性细胞,并且由于现有的技术方法,使用荧光标记的PD-L1抗体直接检测,难以检测出PD-L1低表达的细胞,导致现有方法PD-L1阳性细胞检出效率较低。

[0009] 因此,急需开发一种新的循环PD-L1阳性细胞检测方法,以解决检测过程中PD-L1阳性细胞的检测信号弱、效率不高等问题。

## 发明内容

[0010] 本发明所要解决的问题在于提供一种待测样本中循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒和检测方法,其具有较高的灵敏度和较低的检测限,同时能区分循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞。

[0011] 为了实现上述目的,本发明提供以下解决方案:

[0012] 本发明的一方面,提供一种用于待测样本中循环PD-L1阳性细胞检测的试剂盒,其包括检测试剂和PD-L1阳性细胞捕获试剂;所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第3荧光分子标记的抗第n非人源标志物的抗体、……第n-1非人源标志物标记的抗第n-2非人源标志物抗体、以及第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物抗体。

[0013] 其中,n为大于等于1的正整数,所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的激发波长或发射波长,以实现不同被标记物质的区分统计。可以理解的,当 $n < 1$ 时,所述试剂盒中不含……第n-1非人源标志物标记的抗第n-2非人源标志物抗体、第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物抗体。

[0014] 所述第1-第n非人源标志物为不同的非人源标志物,以形成多对可特异性结合的非人源标志物-抗非人源标志物抗体。

[0015] 本发明所述循环PD-L1阳性细胞包括循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞。

[0016] 在一实施方式中,所述循环PD-L1阳性肿瘤细胞选自黑色素瘤细胞、非小细胞肺癌细胞、肾癌细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、胆管癌细胞、食道癌细胞、肠癌细胞、乳腺癌细胞、小细胞肺癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞、人胎盘绒毛癌细胞、宫颈癌细胞、卵巢癌细胞、膀胱癌细胞、头颈部肿瘤细胞、皮肤癌细胞、胸腺癌细胞、淋巴瘤细胞、鼻咽癌细胞中的一种或多种。

[0017] 在一优选的实施方式中,所述循环PD-L1阳性肿瘤细胞为肺癌细胞。

[0018] 本发明所述试剂盒含有n对具有抗原-抗体结合能力的不同非人源标志物-抗非人源标志物抗体,通过对循环PD-L1阳性细胞检测过程进行多级放大,使得该试剂盒具有较低的检测限与较高的灵敏度,能够检测到PD-L1低表达的阳性细胞。同时,本发明所述试剂盒还含有可检测白细胞和检测癌细胞的检测试剂,能在检测的同时实现区分循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞。

[0019] 在一优选的实施方式中, $1 \leq n \leq 3$ 。

[0020] 在本发明的一实施方式中,  $n=1$ , 所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体和第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体, 该试剂盒能对循环PD-L1阳性细胞检测过程进行二级放大。

[0021] 第1非人源标志物标记的PD-L1抗体上可以标记多个第1非人源标志物分子, 每个第1非人源标志物分子可以结合一个二抗(抗第1非人源标志物的抗体), 每个二抗可以被多个第3荧光分子标记, 相较于直接用荧光分子标记PD-L1抗体进行检测, 二级放大具有更强的荧光信号。可以理解地, 若不考虑试剂盒成本, 当 $n$ 更大, 即放大级数更高时, 其检测的特异性更好。

[0022] 本发明中, 所述非人源标志物标记可选择本领域常用非人源标志物进行标记, 可以理解地, 在上述多级放大中, 第1-第 $n$ 非人源标志物可为选自本领域常用非人源标志物的 $n$ 个不同非人源标志物。

[0023] 在一实施方式中, 上述非人源标志物标记包括对抗体进行生物素、地高辛、亲和素、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶和荧光蛋白标记。

[0024] 在一实施方式中, 所述白细胞共同抗原抗体选自CD45、CD11b、CD14、CD68、CD16、CD56、CD57、CD59、CD94、CD3、CD4、CD8、CD80、CD86、CD40、CD21、CD19、CD20、CD18、CD32、CD44、CD55和CD66b抗体中的一种或多或多种; 所述癌细胞抗原抗体选自CK、Epcam、HER2、Trop2、EGFR、CEA、vimentin、MUC1、HER3、C-MET、ALK、claudin18.2和GPC3抗体中的一种或多或多种。

[0025] 在一实施方式中, 检测抗体中, 白细胞共同抗原抗体与癌细胞抗原抗体的质量比值为4:(4-6); 优选地, 为4:5。

[0026] 在一优选的实施方式中, 所述白细胞共同抗原抗体为CD45抗体。

[0027] 在一优选的实施方式中, 所述癌细胞抗原抗体为CK抗体。

[0028] 在一实施方式中, 所述PD-L1阳性细胞捕获试剂包括捕获抗体和磁珠, 所述捕获抗体为第 $n+1$ 非人源标志物标记的PD-L1抗体和第 $n+1$ 非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体, 所述磁珠为抗第 $n+1$ 非人源标志物的抗体标记的磁珠。

[0029] 本发明中, 所述第1非人源标志物和第 $n+1$ 非人源标志物为不同的非人源标志物, 以避免检测试剂中第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体与其他非人源标志物结合, 导致假阳性, 影响检测的准确性。

[0030] 在一实施方式中, 所述肿瘤特异性蛋白标志物选自Epcam、HER2、Trop2、EGFR、CK、CEA、MUC1、ALK和C-MET等中的一种或多或多种。

[0031] 所述捕获试剂中的PD-L1抗体与检测试剂中的PD-L1抗体为互不竞争的抗体。

[0032] 在一实施方式中, 所述捕获试剂中的PD-L1抗体与检测试剂中的PD-L1抗体的质量比为1:(3.2-4.8); 优选地, 为1:4, 以更好的捕获PD-L1阳性细胞同时节约抗体使用成本。

[0033] 可以理解地, 当检测试剂中的癌细胞抗原与捕获抗体中的肿瘤特异性蛋白标志物为同一种抗原时, 白细胞共同抗原抗体与肿瘤特异性蛋白标志物抗体选自互不竞争的抗体。

[0034] 在一实施方式中, 所述捕获抗体中, 第 $n+1$ 非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体为混合抗体, 其包括第 $n+1$ 非人源标志物标记的Epcam、HER2、Trop2、EGFR中的一种或多或多种。

[0035] 根据本发明的研究,所述混合抗体中,针对EGFR靶点的抗体与针对其他靶点(Epcam、HER2、Trop2)的抗体的质量比为2:(1-2),例如,捕获抗体中Epcam:HER2:Trop2:EGFR可以为1:1:1:2、2:1:1:2、1:1:2:2、1:2:1:2、2:2:1:2、2:1:2:2、2:2:2:2,该配比利于提高混合抗体的捕获效率,从而提高检测限。

[0036] 在一优选的实施方式中,其包括至少两种第n+1非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体,以避免漏检PD-L1阳性细胞。

[0037] 在一优选的实施方式中,所述混合抗体为针对Epcam、HER2、Trop2以及EGFR的抗体,其质量比为1:1:1:2。

[0038] 在一优选的实施方式中,所述捕获抗体为生物素标记的混合抗体和PD-L1抗体,其质量比为5:(0.5-2),例如,可以为5:0.5、5:1、5:1.5、5:2;更优选地为5:1。在一实施方式中,所述第1、第2、第3荧光分子选自iFluor647、iFluor488、iFluor594、iFluor555、iFluor568、iFluor750、FITC、Alexa Fluor488、Alexa Fluor555、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor750、APC以及Alexa Fluor647等可标记蛋白质的荧光标记物,所述第1、第2、第3荧光分子为具有不同的激发波长或发射波长的荧光分子。

[0039] 在本发明一优选的实施方式中,所述第1荧光分子为iFluor488、第2荧光分子为iFluor647、第3荧光分子为Alexa Fluor594。

[0040] 在一实施方式中,n=1,所述第1非人源标志物为HRP,所述第n+1非人源标志物为第2非人源标志物,所述第2非人源标志物为生物素,所述抗第2非人源标志物的抗体为链霉亲和素。

[0041] 在一实施方式中,n=1,所述检测过程为二级放大,所述检测试剂包括HRP标记的PD-L1抗体和第3荧光分子标记的抗HRP抗体。

[0042] 在一实施方式中,n=2,所述检测过程为三级放大,所述检测试剂包括生物素标记的PD-L1抗体、HRP标记的链霉亲和素(抗生物素抗体)、以及第3荧光分子标记的羊抗HRP抗体。

[0043] 在一实施方式中,n=3,所述检测过程为四级放大,所述检测试剂包括HRP标记的PD-L1抗体、地高辛标记的抗HRP抗体、AP标记的抗地高辛抗体、以及第3荧光分子标记的抗地高辛抗体。

[0044] 在一实施方式中,n=4,所述检测过程为五级放大,所述检测试剂包括HRP标记的PD-L1抗体、生物素标记的抗HRP抗体、地高辛标记的链霉亲和素、AP标记的抗地高辛抗体、以及第3荧光分子标记的抗AP抗体。

[0045] 在一实施方式中,所述检测过程为多级放大,所述检测试剂包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、……第n-1非人源标志物标记的抗第n-2非人源标志物抗体、第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物抗体、第3荧光分子标记的抗第n非人源标志物的抗体。

[0046] 在一实施方式中,所述肿瘤特异性蛋白标志物为Epcam、HER2、Trop2、EGFR;所述捕获试剂包括生物素标记的Epcam、HER2、Trop2、EGFR、PD-L1抗体以及链霉亲和素标记的磁珠。

[0047] 在一实施方式中,所述抗第1非人源标志物的抗体为羊抗HRP。

[0048] 在本发明一优选的实施方式中,所述检测试剂包括HRP标记的PD-L1抗体(即PD-L1检测抗体)、iFluor488标记的CD45抗体(即CD45检测抗体)和iFluor647标记的CK抗体(即CK



检测抗体)、Alexa Fluor594标记的抗HRP的抗体(即二抗)。

[0049] 本发明所述待测样本为体液样本,其选自血液样本、胸水样本、腹水样本、脑脊液样本、尿液样本和痰液样本。

[0050] 在一实施方式中,所述检测抗体中,HRP标记的PD-L1抗体的使用浓度为1-8 $\mu$ g/ml,例如可以为1、2、4、6、8 $\mu$ g/ml;优选地,为4 $\mu$ g/ml或8 $\mu$ g/ml。

[0051] 在一实施方式中,所述检测抗体中,CD45检测抗体的使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml,例如可以为1.5、5、10、15、20 $\mu$ g/ml;优选地,为5 $\mu$ g/ml。

[0052] 在一实施方式中,所述检测抗体中,CK检测抗体的使用浓度为2-16 $\mu$ g/ml,例如可以是2、4、8、12、16 $\mu$ g/ml;优选地,为4 $\mu$ g/ml。

[0053] 在一实施方式中,所述第3荧光分子标记的抗HRP抗体的使用浓度为1.25-10 $\mu$ g/ml,例如可以为1.25、2.5、5、8、10 $\mu$ g/ml;优选地,为5 $\mu$ g/ml。

[0054] 在一实施方式中,所述试剂盒中HRP标记的PD-L1抗体与第3荧光分子标记的抗HRP抗体的质量比为(0.5-1.5):(0.5-1.5),例如可以为0.5:1、1:1或1:1.5;优选地,为1:1。

[0055] 在一实施方式中,上述试剂盒还包括样本前处理试剂和封闭试剂,所述前处理试剂包括红细胞去除试剂和细胞固定试剂。

[0056] 其中,所述封闭试剂选自人IgG、鼠IgG、兔IgG和羊IgG中的一种或多种的溶液。

[0057] 在一优选的实施方式中,所述封闭试剂为人IgG溶液;所述人IgG溶液其使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml,例如可以是2.5、5、10、15、20 $\mu$ g/ml;优选地,为10 $\mu$ g/ml。

[0058] 在一实施方式中,所述红细胞去除试剂为含有NH<sup>4+</sup>的试剂。

[0059] 在一实施方式中,所述细胞固定试剂为含有多聚甲醛、甲醛、戊二醛、甲醇、冰醋酸中的一种或多种的溶液。

[0060] 在一实施方式中,所述细胞固定试剂的使用浓度(质量百分比)为0.25-4%,例如可以为0.25%、1%、2%、3%、4%;优选地,为2%。

[0061] 在一优选的实施方式中,所述细胞固定试剂为含有2%多聚甲醛的溶液。

[0062] 在一实施方式中,所述红细胞去除试剂和待测样本体积比为(1:2)-(1:9);优选地,为1:3。

[0063] 在一实施方式中,所述细胞固定试剂和待测样本体积比为(2:1)-(1:5);优选地,为1:1。

[0064] 在一实施方式中,所述结合缓冲液为含有胎牛血清、牛血清蛋白、羊血清中的一种或多种的溶液;优选地,为含有胎牛血清的溶液。

[0065] 本发明的另一方面,提供一种上述试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0066] (1) PD-L1阳性细胞捕获试剂配制步骤,其包括捕获抗体配制和磁珠配制;

[0067] (2) PD-L1检测抗体的配制步骤,其包括第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第3荧光分子标记的抗第n非人源标志物的抗体、……第n-1非人源标志物标记的抗第n-2非人源标志物抗体、第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物抗体的配制步骤;

[0068] (3) 白细胞共同抗原抗体和癌细胞抗原抗体的配制步骤;

[0069] (4) 试剂组装。

[0070] 在一实施方式中,步骤(1)所述捕获抗体配制步骤中,第n+1非人源标志物与肿瘤特异性蛋白标志物抗体的质量比为1:(10-120),进一步可以为1:(40-120)或1:(80-100),

例如可以为1:10、1:20、1:40、1:80、1:100、1:120;优选地,为1:80。

[0071] 在一实施方式中,步骤(2)中,第1非人源标志物与PD-L1抗体的质量比为1:(0.5-4);例如可以为1:0.5、1:1、1:2、1:4;优选地,为1:1。

[0072] 本发明的另一方面,提供一种上述试剂盒用于体外检测待测样本中PD-L1阳性细胞的检测方法,其包括以下步骤:

[0073] i. (1)  $n=1$ ,从受试者获得待测样本,加入第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体孵育;(2)加入第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体;(3)加入核酸染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析;或,

[0074] ii. (1)  $n=1$ ,从受试者获得待测样本,加入第2非人源标志物标记的捕获抗体(第2非人源标志物标记的PD-L1抗体和第2非人源标志物标记的肿瘤特异性蛋白标志物抗体)、第1非人源标志物标记的PD-L1抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体孵育;(2)加入抗第2非人源标志物标记的磁珠和第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体,分离磁珠;(3)加入核酸染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析。

[0075] 在一实施方式中,所述核酸染料为DAPI。

[0076] 具体地,ii. (1)  $n=1$ ,从受试者获得血液样本,加入捕获抗体(生物素标记的PD-L1抗体、生物素标记的Epcam、HER2、Trop2、EGFR混合抗体)、HRP标记的PD-L1抗体、iFluor488标记的CD45抗体和iFluor647标记的CK抗体孵育;(2)加入链霉亲和素标记的磁珠和Alexa Fluor594标记的抗HRP的抗体,分离磁珠;(3)加入DAPI染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析。

[0077] 本发明中,在上述步骤(3)中,若检测到第3荧光分子(Alexa Fluor594)发射的荧光,则检测样本中含有循环PD-L1阳性细胞;若检测到同时具有第3荧光分子(Alexa Fluor594)发射的荧光和第1荧光分子(iFluor488)发射的荧光,则检测样本中含有循环PD-L1阳性免疫细胞;若检测到同时具有第3荧光分子(Alexa Fluor594)发射的荧光和第2荧光分子(iFluor647)发射的荧光,则检测样本中含有循环PD-L1阳性肿瘤细胞。

[0078] 本发明中,上述试剂盒用于检测待测样本中PD-L1阳性细胞的检测方法中,以质量浓度(质量/溶液体积)计,各种抗体的使用浓度的比值为上述试剂盒中所含抗体的质量比。例如,检测抗体中,白细胞共同抗原抗体与癌细胞抗原抗体的质量比为4:(4-6);优选地,为4:5。则将该试剂盒用于检测PD-L1阳性细胞时,以质量浓度计,白细胞共同抗原抗体与癌细胞抗原抗体的使用浓度比值为4:(4-6);优选地,为4:5。

[0079] 本发明所述使用浓度为试剂、抗体或蛋白最终使用时在总溶液体系中的浓度。

[0080] 本发明的另一方面,提供一种非诊断目的的待测样本中循环PD-L1阳性细胞的检测方法,其包括:

[0081] (1)从受试者获得待测样本,加入捕获抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第1非人源标志物标记的PD-L1抗体孵育;

[0082] (2)加入第2非人源标志物标记的抗第1非人源标志物的抗体孵育;

[0083] .....

[0084] 加入第 $n-1$ 非人源标志物标记的抗第 $n-2$ 非人源标志物的抗体孵育;

[0085] 加入第n非人源标志物标记的抗第n-1非人源标志物的抗体孵育；

[0086] (3) 加入第n+1非人源标志物标记的磁珠和第3荧光分子标记的抗第n非人源标志物的抗体，分离磁珠；

[0087] (4) 加入核酸染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析；

[0088] (5) 结果判断。其中，n为大于等于1的正整数；所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的发射波长，所述第1-第n非人源标志物为不同的非人源标志物；优选地，n=1。

[0089] 根据本发明的研究，步骤(5)中，若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ，且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $\geq 3.0$ ，所述PD-L1阳性细胞为阳性肿瘤细胞；若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ，且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $< 3.0$ ，所述PD-L1阳性细胞为阳性免疫细胞，即就是，

[0090] PD-L1阳性肿瘤细胞的判定依据为PD-L1检测信号荧光值 $\geq 40$ ，且PD-L1检测信号荧光值与其CD45背景信号荧光值的比值 $\geq 3.0$ ；PD-L1阳性免疫细胞的判定依据为PD-L1检测信号荧光值 $\geq 40$ ，且PD-L1检测信号荧光值与其CD45背景信号荧光值的比值 $< 3.0$ 。

[0091] 在一实施方式中，所述非诊断目的的待测样本中循环PD-L1阳性细胞的检测方法包括以下步骤：

[0092] (1) 从受试者获得待测样本，加入捕获抗体、第1荧光分子标记的白细胞共同抗原抗体、第2荧光分子标记的癌细胞抗原抗体、第1非人源标志物标记的PD-L1抗体孵育；

[0093] (2) 加入第2非人源标志物标记的磁珠和第3荧光分子标记的抗第1非人源标志物的抗体，分离磁珠；

[0094] (3) 加入核酸染料分离细胞后使用荧光显微镜扫描分析；

[0095] (4) 结果判断；

[0096] 其中，所述第1、第2、第3荧光分子具有不同的发射波长；

[0097] 步骤(4)中，若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ，且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $\geq 3.0$ ，所述PD-L1阳性细胞为阳性肿瘤细胞；

[0098] 若第3荧光分子荧光值 $\geq 40$ ，且第3荧光分子荧光值/第1荧光分子荧光值 $< 3.0$ ，所述PD-L1阳性细胞为阳性免疫细胞。

[0099] 基于本发明所述试剂盒及其使用方法考虑，本发明引入荧光阈值和PD-L1检测信号与背景信号的比值进行联合判断，实现对PD-L1阳性免疫细胞和PD-L1阳性肿瘤细胞的区分统计。

[0100] 本发明的再一方面，提供一种上述试剂盒在制备检测待测样本中循环PD-L1阳性细胞的试剂中的用途，所述循环PD-L1阳性细胞包括循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞；所述待测样本为体液样本，其包括血液样本、胸水样本、腹水样本、脑脊液样本、尿液样本、痰液样本。

[0101] 本发明的有益效果：

[0102] 1. 本发明所述试剂盒和检测体系通过对循环PD-L1阳性细胞检测过程进行多级放大，使得该试剂盒具有较低的检测限与较高的灵敏度，能够检测到PD-L1低表达的阳性细胞。

[0103] 2. 本发明所述试剂盒能在检测分离PD-L1阳性细胞的同时，区分统计循环PD-L1阳性肿瘤细胞和循环PD-L1阳性免疫细胞，并对其判定标准进行了探究。

[0104] 3. 本发明针对循环肿瘤细胞的特质, 基于本发明的检测方案, 对检测试剂盒中白细胞共同抗原和癌细胞抗原的选择、捕获试剂的选择、抗体使用浓度、不同检测抗体之间的比例关系、检测抗体和捕获抗体使用浓度的比例关系、捕获抗体中不同抗体的比例关系进行了创造性探索, 使得本发明所述检测体系对PD-L1阳性细胞的特异性可达到99.7%, 检测限低至1个细胞, 对不同类型的肺癌细胞系均能达到80%以上的捕获效率。

## 附图说明

- [0105] 图1示出了实施例1抗体生物素标记工艺探究结果。
- [0106] 图2示出了实施例1HRP标记工艺探究结果。
- [0107] 图3示出了PD-L1一级、二级三级放大检测比较结果。
- [0108] 图4示出了不同体积比裂解液处理红细胞回收率。
- [0109] 图5示出了样本固定条件探究结果 (图5中的A为不同固定条件对细胞完整性影响; 图5中的B为不同固定条件对肿瘤细胞CK结合影响)。
- [0110] 图6示出了流式细胞法探究PD-L1抗体使用浓度结果。
- [0111] 图7示出了细胞富集分离方法探究PD-L1抗体使用浓度结果。
- [0112] 图8示出了细胞富集分离方法比较探究抗HRP荧光二抗使用浓度结果。
- [0113] 图9示出了流式细胞法探究CK检测抗体使用浓度结果。
- [0114] 图10示出了细胞富集分离方法探究CK检测抗体使用浓度结果。
- [0115] 图11示出了流式细胞法探究CD45检测抗体使用浓度结果。
- [0116] 图12示出了细胞富集分离方法探究CD45检测抗体使用浓度结果。
- [0117] 图13示出了细胞富集分离方法封闭剂最佳使用浓度比较结果 (图13中的A为白细胞背景比较; 图13中的B为肿瘤细胞阳性信号比较)。
- [0118] 图14示出了捕获抗体配比探究结果。
- [0119] 图15示出了捕获抗体捕获不同细胞系的回收率结果。
- [0120] 图16示出了本发明PD-L1阳性细胞检测与其他检测平台检测效果比较。
- [0121] 图17示出了PD-L1阳性肿瘤细胞及免疫细胞的判断方法 (图17中的A为PD-L1阳性肿瘤细胞判断阈值; 图17中的B为PD-L1阳性免疫细胞判断阈值)。

## 具体实施方式

[0122] 在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且, 本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

[0123] 本文中, 术语“富集”即将循环PD-L1阳性细胞从待测样本当中分离出来。

[0124] 本文中, 术语“链霉亲和素”可指可与生物素结合的蛋白质或肽, 并且可包括: 天然蛋清抗生物素蛋白(egg-white avidin)、重组抗生物素蛋白、抗生物素蛋白的去糖基化形式、细菌链霉亲和素、重组链霉亲和素、截短型链霉亲和素和/或其任何衍生物。

[0125] 本文中, 术语“白细胞共同抗原”指在所有白细胞上都有表达的一类膜蛋白。

[0126] 本文中, 术语“癌细胞抗原”指在癌细胞上均有表达的一类蛋白。

- [0127] 本文中,术语“磁珠”指具有磁性的微小颗粒。
- [0128] 本文中,术语“PD-L1阳性细胞”指存在PD-L1表达的细胞。
- [0129] 本文中,术语“PD-L1阳性肿瘤细胞”指存在PD-L1表达的肿瘤细胞。
- [0130] 本文中,术语“PD-L1阳性免疫细胞”指存在PD-L1表达的免疫细胞。
- [0131] 本文中,术语“二抗”、“癌细胞检测抗体(CK检测抗体)”和“白细胞检测抗体(CD45检测抗体)”均为带有荧光标记的抗体。
- [0132] 本文中,术语“PD-L1检测抗体”指第1非人源标志物标记的PD-L1抗体。
- [0133] 本文中,术语“LiquidBiopsy系统”指备案号为粤珠械备20170142号的自动化细胞富集分离系统,来源为珠海丽珠圣美医疗诊断技术有限公司。
- [0134] 实施例
- [0135] 实施例1:非人源标志物标记工艺探究
- [0136] 1.1生物素标记工艺探究
- [0137] 1.1.1生物素标记
- [0138] 使用日本同仁化学生物素标记试剂盒(货号LK03,组成:超滤柱、WS buffer、标记反应溶液、活化生物素),吸取WS buffer到离心管内,加入EGFR(肿瘤标志物)抗体充分混匀,将混合液加入到超滤柱中离心;加入WS buffer清洗后加入标记反应溶液到超滤柱内,同时分别按照不同摩尔比(抗体:生物素=1:10、1:20、1:40、1:80、1:100、1:120)加入活化后的生物素,37℃孵育10min。加入WS buffer清洗两次。加入200μl PBS溶液转移到0.5ml试剂管内得到生物素标记的EGFR抗体。
- [0139] 1.1.2标记物检测
- [0140] 将HCC827细胞(人非小细胞肺癌细胞)使用结合缓冲液(圣美生物诊断技术有限公司,备案号为请粤珠械备20160072)稀释至30万个/ml;将生物素标记的EGFR抗体与HCC827细胞共同孵育,随后加入streptavidin-FITC(链霉亲和素,Solarbio公司SF068)混匀继续孵育,收集细胞清洗后检测EGFR-biotin抗体结合HCC82细胞的结合活性。使用来自Capricobio公司的EGFR-biotin抗体作为对照(抗体:生物素=1:80)。
- [0141] 结果表明(图1),EGFR抗体按照1:(10-120)比例标记后,其结合活性均较高,且1:80比例下比Capricobio的EGFR-biotin(control)抗体活性高,因此,EGFR-biotin抗体生物素标记优选1:80。
- [0142] 1.2抗体HRP标记工艺探究
- [0143] 1.2.1 HRP标记
- [0144] 使用北京博奥龙免疫技术有限公司的HRP标记试剂盒(货号BF06095-1000;组成:超滤管、标记反应溶液、活化HRP)标记抗体,具体步骤为分别按照不同质量比(HRP:PD-L1抗体=1:0.5、1:1、1:2、1:4)加入活化后的HRP孵育,加PBS转移到试剂管内得到HRP标记的PD-L1抗体。
- [0145] 1.2.2标记物检测
- [0145] 将NCI-H820细胞(人乳头状肺腺癌贴壁细胞)使用结合缓冲液(圣美生物诊断技术有限公司)稀释至30万个/ml;将HRP标记好的PD-L1抗体和NCI-H820细胞共同孵育;随后加入羊抗HRP IgG-Alexa Fluor488(荧光二抗,来自Jackson ImmunoResearch公司)混匀继续孵育,加结合缓冲液清洗后进行流式评估,比较PD-L1 HRP标记抗体结合NCI-H820细胞的结合活性。

[0146] 结果表明,PD-L1抗体与HRP的投料比按照质量比1:(0.5-4)标记后均具有可检测的荧光信号,1:1标记后检测信号比1:2、1:4及1:0.5均高,因此HRP标记比例优选1:1。

[0147] 实施例2 PD-L1多级放大及荧光通道探究

[0148] 将NCI-H820细胞使用结合缓冲液稀释至30万个/ml,取100 $\mu$ l细胞液/份。

[0149] 2.1一级放大检测(n=0)

[0150] 分别将iFluor488荧光标记的PD-L1抗体、iFluor594荧光标记的PD-L1抗体和iFluor647荧光标记的PD-L1抗体稀释后和NCI-H820细胞液共同孵育,收集细胞清洗后进行检测。

[0151] 2.2二级放大检测(n=1)

[0152] 将HRP标记的PD-L1抗体和NCI-H820细胞共同孵育;随后加入iFluor488荧光标记的羊抗HRP抗体(二抗)、iFluor594荧光标记的羊抗HRP抗体(二抗)、iFluor647荧光标记的羊抗HRP抗体(二抗)共同孵育,收集细胞清洗后进行检测。

[0153] 2.3三级放大检测(n=2)

[0154] 将生物素标记的PD-L1抗体与NCI-H820细胞共同孵育;收集细胞清洗后加入HRP标记的链霉亲和素继续孵育;随后加入iFluor488荧光标记的羊抗HRP抗体、iFluor594荧光标记的羊抗HRP抗体、iFluor647荧光标记的羊抗HRP抗体共同孵育,收集细胞清洗后进行检测。

[0155] 分别取一级、二级、三级放大检测所得液体滴加载玻片上烤干,加入DAPI试剂使用Leica荧光显微镜进行扫描,结果如图3所示。

[0156] 结果表明(图3),使用二级及三级放大方式较一级放大方式检测信号更强,在使用iFluor594荧光素和iFluor647荧光素时,二级放大检测信号已具有较强的满足检测要求的荧光信号,因此PD-L1检测优选使用二级放大方式。

[0157] 实施例3红细胞去除条件探究

[0158] 使用CFSE荧光染料标记NCI-H820细胞;将标记好的NCI-H820细胞添加到血液中;使用1x红细胞裂解液按照体积比(血液体积:1x红细胞裂解液体积)1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9(分别对应于图4中的1ml、1.5ml、2ml、2.5ml、3ml、3.5ml、4ml、4.5ml)加入到添加有NCI-H820细胞的血液中,裂解后收集细胞重悬后用流式细胞检测红细胞完整性,计算红细胞回收率。

[0159] 结果表明,不同比例裂解液处理红细胞后红细胞数量无明显差异,完整细胞回收率(图4)无明显差异,即肿瘤细胞完整性无明显差异,且裂解效果均较好(细胞颗粒残留较少)。因此,1x红细胞裂解液用量按血液体积:裂解液体积比为1:2-1:9使用均可,优选1:2或者1:3。

[0160] 实施例4样本固定条件探究

[0161] 按上述实施例3所述裂解条件裂解NCI-H820细胞;细胞重悬后分别按照体积比(固定试剂:待测样本)1:1加入4%PFA(多聚甲醛)室温固定15min、30min、60min,2%PFA室温固定15min、30min、60min,使用结合缓冲液清洗后收集细胞液;加入CK检测抗体、CD45检测抗体与细胞液中孵育过夜(孵育12-20h),收集细胞后使用流式细胞仪进行检测。

[0162] 结果表明,2%PFA室温固定30min和1%PFA室温固定60min,保留细胞比例较大(图5中的A)即细胞完整性保存较好,且CK染色信号值也较高(图5中的B),因此,样本推荐使用

2%PFA室温固定30min或者1%PFA室温规定60min。

[0163] 实施例5检测抗体及对应二抗使用浓度探究

[0164] 5.1.PD-L1检测抗体使用浓度探究

[0165] 分别使用流式细胞法和细胞富集分离方法探究二级放大检测方案中PD-L1检测抗体最佳使用浓度。

[0166] 5.1.1流式细胞法

[0167] 将NCI-H820细胞使用结合缓冲液稀释至30万个/ml,取100 $\mu$ l细胞液/份;将NCI-H820细胞和不同浓度PD-L1检测抗体(HRP标记的PD-L1抗体,使用浓度分别为16 $\mu$ g/ml、8 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml、0.125 $\mu$ g/ml、0.0625 $\mu$ g/ml、0.03125 $\mu$ g/ml、0.016 $\mu$ g/ml)孵育;加入Alexa Fluor488标记的羊抗HRP荧光二抗继续孵育,收集细胞清洗后使用流式细胞仪进混合行检测。

[0168] 5.1.2细胞富集分离方法

[0169] 将500个新鲜制备的NCI-H820细胞添加到8ml血液中;按上述实施例3所述裂解条件以1:3比例裂解NCI-H820细胞样本;加入FBS重悬后加入PFA室温固定1h;收集细胞清洗后加入生物素标记的捕获抗体(包括PD-L1、Epcam、HER2、Trop2、EGFR抗体,使用质量浓度比值为2:1:1:1:1)、iFluor647标记的CK检测抗体、iFluor488标记的CD45检测抗体、HRP标记的PD-L1检测抗体孵育过夜;收集细胞清洗后加入链霉亲和素标记的磁珠、Alexa Fluor594标记的羊抗HRP二抗孵育;收集细胞清洗重悬后加入DAPI染料,使用LiquidBiopsy系统富集后使用荧光显微镜分子富集分离的细胞,统计NCI-H820细胞的PD-L1检测信号荧光值。实验组PD-L1检测抗体使用浓度分别为8 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml。

[0170] 结果表明,流式测试结果中,PD-L1检测抗体在使用浓度为1-15 $\mu$ g/ml时,PD-L1检测抗体和肿瘤细胞能较好的识别并结合,得到满足检测要求的荧光信号,4 $\mu$ g/ml时基本已经达到饱和(图6),因此PD-L1检测抗体使用浓度推荐使用4 $\mu$ g/ml。在细胞富集分离方法测试中,当检测体系中存在其他检测抗体和捕获抗体时,PD-L1检测抗体在使用浓度为1-8 $\mu$ g/ml时,PD-L1检测抗体和肿瘤细胞也能较好的识别并结合,得到满足检测要求的荧光信号(图7),4 $\mu$ g/ml和8 $\mu$ g/ml时,NCI-H820细胞的PD-L1检测信号荧光值较高,且在4 $\mu$ g/ml和8 $\mu$ g/ml时,两者的荧光值接近,因此,本发明中的检测体系中,PD-L1检测抗体使用浓度为1-8 $\mu$ g/ml均能得到较好的检测结果,出于经济考虑,PD-L1检测抗体使用浓度推荐使用4 $\mu$ g/ml。

[0171] 5.2抗HRP荧光二抗使用浓度探究

[0172] 分别使用PD-L1阳性细胞NCI-H820和PD-L1阴性细胞A549进行测试。分别将500个新鲜制备的NCI-H820细胞及A549细胞添加到8ml血液中;步骤如实施例5.1.2所述,实验组设置荧光羊抗HRP二抗使用浓度分别为10 $\mu$ g/ml、8 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/ml,分别统计富集分离的NCI-H820细胞及A549细胞的PD-L1检测信号荧光值。

[0173] 结果表明(图8),羊抗HRP荧光二抗使用浓度为2.5-10 $\mu$ g/ml时,PD-L1阳性细胞NCI-H820具有较高的荧光信号(平均荧光强度60-120),且PD-L1阴性细胞A549具有较低的信号(平均荧光强度20-30),该使用浓度范围均能得到较好的检测结果。综合来说,羊抗HRP荧光二抗推荐使用浓度为5 $\mu$ g/ml。

[0174] 5.3癌细胞抗原抗体使用浓度探究

[0175] 分别使用流式细胞法和细胞富集分离方法测试探究二级放大检测方案中癌细胞

抗原检测抗体(本实施例选用CK抗体)最佳使用浓度。

#### [0176] 5.3.1流式细胞法

[0177] 将NCI-H820细胞使用结合缓冲液稀释至30万个/ml,取100 $\mu$ l细胞液/份;将NCI-H820细胞和不同浓度iFluor647标记的CK检测抗体(使用浓度分别为16 $\mu$ g/ml、8 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml、0.125 $\mu$ g/ml、0.0625 $\mu$ g/ml、0.03125 $\mu$ g/ml、0.016 $\mu$ g/ml)混合孵育,收集细胞清洗后使用流式细胞仪进行检测。

#### [0178] 5.3.1细胞富集分离方法

[0179] 将500个新鲜制备的NCI-H820细胞添加到8ml血液中;步骤如实施例5.1.2所述,实验组设置CK检测抗体的使用浓度分别为2 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、8 $\mu$ g/ml、16 $\mu$ g/ml,分别统计富集分离的NCI-H820细胞的CK检测信号荧光值。

[0180] 结果表明,CK检测抗体使用浓度为2-16 $\mu$ g/ml时,CK抗体和肿瘤细胞能较好的识别并结合,流式检测信号值均大于250万,具有很强的荧光信号(图9),同时,细胞富集分离法中,当检测体系中存在其他检测抗体和捕获抗体时,CK抗体和肿瘤细胞也能较好的识别并结合,能得到满足检测要求的荧光信号(图10)。因此,本发明的检测体系中,癌细胞抗原检测抗体使用浓度为2-16 $\mu$ g/ml均能得到较好的检测结果,基于经济和检测效率综合考虑,CK检测抗体最佳使用浓度为4 $\mu$ g/ml。

#### [0181] 5.4白细胞共同抗原抗体使用浓度探究

[0182] 分别使用流式细胞法和细胞富集分离方法测试探究二级放大检测方案中白细胞共同抗原检测抗体(本实施例选用CD45抗体)最佳使用浓度。

#### [0183] 5.4.1流式细胞法

[0184] 将WBC使用结合缓冲液稀释至30万个/ml,取100 $\mu$ l细胞液/份;将WBC和不同浓度iFluor488标记的CD45检测抗体(20 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/ml、1.25 $\mu$ g/ml、0.625 $\mu$ g/ml、0.3125 $\mu$ g/ml、0.16 $\mu$ g/ml、0.08 $\mu$ g/ml、0.04 $\mu$ g/ml、0.02 $\mu$ g/ml)混合孵育,收集细胞清洗后使用流式细胞仪进行检测。

#### [0185] 5.4.2细胞富集分离方法

[0186] 将500个新鲜制备的NCI-H820细胞添加到8ml血液中;步骤如实施例5.1.2所述,实验组设置CD45检测抗体的使用浓度分别为2.5 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、20 $\mu$ g/ml,统计富集分离的白细胞的CD45检测信号荧光值。

[0187] CD45检测抗体使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml时,CD45抗体和肿瘤细胞能较好的识别并结合,流式检测信号值均大于40万,具有很强的荧光信号(图11),同时,细胞富集分离法中,当检测体系中存在其他检测抗体和捕获抗体时,CD45抗体和肿瘤细胞也能较好的识别并结合,能得到满足检测要求的荧光信号(图12)。因此,本发明的检测体系中,白细胞共同抗原检测抗体使用浓度为2.5-20 $\mu$ g/ml均能得到较好的检测结果,基于经济和检测效率综合考虑,CK检测抗体最佳使用浓度为5 $\mu$ g/ml。

#### [0188] 实施例6样本封闭条件测试

[0189] 取肺癌患者样本,步骤如实施例5.1.2所述,裂解、固定样本后收集细胞清洗后,实验组分别以使用浓度为0、2.5、5、10、15、20 $\mu$ g/mL加入人IgG室温孵育,统计富集分离后白细胞CD45背景信号值及肿瘤细胞CK阳性信号值。

[0190] 结果表明(图13),当使用人IgG进行封闭时,可以降低白细胞(图13中的B)的背景



信号荧光值,同时可以提高肿瘤细胞的阳性信号(图13中的A)荧光值,且在使用浓度为10 $\mu$ g/ml-15 $\mu$ g/ml时,白细胞背景信号荧光值最低,肿瘤细胞阳性信号荧光值最高。因此,推荐使用IgG进行样本封闭,使用浓度为10 $\mu$ g/ml-15 $\mu$ g/ml,优选10 $\mu$ g/ml。

[0191] 实施例7捕获抗体配比探究

[0192] 7.1不同捕获抗体比例探究

[0193] 取100 $\mu$ l NCI-H820细胞,步骤如实施例5.1.2所述,实验组PD-L1捕获抗体与针对其他靶点的捕获抗体(Epcam:HER2:Trop2:EGFR分别为1:1:1:1、2:1:1:1、1:2:1:1、1:1:2:1、1:1:1:2、2:2:1:1、2:1:2:1、2:1:1:2、1:1:2:2、1:2:2:1、1:2:1:2、2:2:2:1、2:2:1:2、2:1:2:2、2:2:2:2)按照不同质量比加入到100 $\mu$ l/份结合缓冲液中混合,使用流式细胞仪进行检测。

[0194] 结果表明,当捕获抗体中EGFR抗体与针对其他靶点的捕获抗体(Epcam、HER2、Trop2)抗体的质量比为2:(1-2)时,捕获效率较高。因此,捕获抗体中EGFR抗体与Epcam、HER2、Trop2抗体配比选择2:1:1:1(图14)。

[0195] 7.2捕获效果验证

[0196] 分别添加500个NCI-H1975(人非小细胞肺腺癌细胞)、Calu-1(人肺癌细胞)、NCI-H441(人肺腺癌细胞)、A431(人皮肤鳞癌细胞)、HepG2(人肝癌细胞)、HCC827(人非小细胞肺腺癌细胞)、PC-3(人前列腺癌细胞)、SW480(人结直肠癌细胞)、HGC-27细胞(人胃癌细胞)、NCI-H820(人乳头状肺腺癌细胞)、NCI-H1650(人非小细胞肺腺癌细胞)、MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)到8mL/份血液中,步骤如实施例5.1.2所述,使用仅包括HER2、Trop2、Epcam的捕获抗体按照相同使用浓度添加作为对照,使用荧光显微镜扫描分析分离的细胞。

[0197] 结果表明,使用HER2、Epcam、Trop2三个靶点的捕获抗体时,肺癌细胞系H1650细胞的捕获效率可达96.4%,但其对于其他肺癌细胞系的捕获效率偏低。按比例添加EGFR抗体和PD-L1抗体后,所有细胞系捕获效率均大于80%(图15)。

[0198] 实施例8本发明PD-L1检测体系与常规PD-L1检测体系比较

[0199] 取8mL/份PD-L1组织阳性肺癌患者血液,步骤如实施例5.1.2所述,统计富集分离后PD-L1阳性肿瘤细胞的PD-L1检测信号荧光值。

[0200] 同时将该结果与文献资料(对照1:Fankhauser C D, Curioni Fontecedro A, Beyer J, et al. Frequent expression of PD-L1 in testicular germ cell tumors[J]. 2015.; 对照2:Guibert N, Delaunay M, Lusque A, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab[J]. Lung Cancer, 2018, 120:108-112.; 对照3:Yue C, Jiang Y, Li P, et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(7):e1438111.)中其他技术平台进行比较。

[0201] 结果表明(图16),本发明从PD-L1阳性肺癌患者中检测出的PD-L1阳性细胞,其检测信号较其他3个对照平台强,成像质量更好。因此,本案例开发的PD-L1检测方法较其他技术平台具有更高的检测特异性和灵敏度。

[0202] 实施例9 PD-L1阳性细胞判定方法探究

[0203] 分别将500个PD-L1阳性细胞NCI-H820和500个PD-L1阴性细胞A549添加到8mL血液

中;步骤如实施例5.1.2所述,将富集分离的细胞使用荧光显微镜扫描分析,统计肿瘤细胞每张图片的PD-L1信号荧光值和其CD45信号荧光值,白细胞每张图片的PD-L1信号荧光值和其CD45信号荧光值,同时计算比值。结果表明,比值为3.0时,PD-L1阳性细胞NCI-H820和PD-L1阴性细胞A549能够很好区分(图17中的A),灵敏度和特异性均达98%,但白细胞中的PD-L1阳性免疫细胞和PD-L1阴性免疫细胞存在重叠。当荧光值设定为40时,PD-L1阳性免疫细胞和PD-L1阴性免疫细胞具有很好的区分(图17中的B),灵敏度和特异性均达99%以上(图17)。

[0204] 实施例10本发明PD-L1检测体系性能

[0205] 使用本案例开发的PD-L1检测试剂盒分别进行准确性、精密度测试。

[0206] 10.1准确性

[0207] 采用细胞添加测试回收率方法检测,取1ml/份白细胞(细胞浓度5000万个/ml(根据正常人的白细胞含量计算,白细胞 $4-10 \times 10^6$ 个/ml,即8mL血液中白细胞含量 $3.2-8 \times 10^7$ 个,因此白细胞选择 $5 \times 10^7$ 个)),分别添加25个、100个、500个、1000个NCI-H820细胞,加入18 $\mu$ l捕获抗体、5 $\mu$ l CK检测抗体、5 $\mu$ l CD45检测抗体、2 $\mu$ l PD-L1检测抗体(终浓度4 $\mu$ g/ml),2-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,加入1ml结合缓冲液、30 $\mu$ l磁珠、1.7 $\mu$ l羊抗HRP荧光二抗,2-8 $^{\circ}$ C孵育60min。将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,使用1.1ml结合缓冲液重悬细胞,加入5 $\mu$ l DAPI核酸染料,使用LiquidBiopsy系统进行细胞富集,将富集分离的细胞使用荧光显微镜扫描分析。每种细胞浓度重复试验4次。计算回收率。 $R = \frac{M}{N} \times 100\%$ ;R为回收率;M为实际回收细胞数量;N为加入的细胞系数数量。

[0208] 表1 PD-L1阳性细胞准确性测试结果

| [0209] | 添加量(个) | 25   | 100  | 500    | 1000   |
|--------|--------|------|------|--------|--------|
|        | 回收率    | 108% | 82%  | 102.4% | 84.1%  |
|        |        | 100% | 97%  | 96.8%  | 100.8% |
|        |        | 84%  | 104% | 105.6% | 103.9% |
|        |        | 112% | 106% | 97.4%  | 102.7% |

[0210] 结果表明(表1),回收率均合格(70%-130%范围内)。

[0211] 10.2精密度测试

[0212] 采用细胞添加测试方法检测,共设置10组,分别添加100个NCI-H820细胞到 $5 \times 10^7$ 个白细胞中(根据正常人的白细胞含量计算,白细胞 $4-10 \times 10^6$ 个/mL,即8mL血液中白细胞含量 $3.2-8 \times 10^7$ 个,因此白细胞选择 $5 \times 10^7$ 个),加入18 $\mu$ l捕获抗体、5 $\mu$ l CK检测抗体、5 $\mu$ l CD45检测抗体、2 $\mu$ l PD-L1检测抗体(终浓度4 $\mu$ g/ml),2-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,加入1ml结合缓冲液、30 $\mu$ l磁珠、1.7 $\mu$ l羊抗HRP荧光二抗,2-8 $^{\circ}$ C孵育60min。将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,使用1.1ml结合缓冲液重悬细胞,加入5 $\mu$ l DAPI核酸染料,使用LiquidBiopsy系统进行细胞富集,将富集分离的细胞使用荧光显

显微镜扫描分析,重复试验10次,计算平均值M、标准偏差SD和变异系数CV。

[0213]  $CV = \frac{SD}{M} \times 100\%$ ; M为平均值; SD为标准偏差。

[0214] 表2 PD-L1阳性细胞精密度测试结果

|        |        |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| [0215] | 组别     | 1   | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 |
|        | 添加量(个) | 100 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|        | 回收量(个) | 92  | 96 | 85 | 91 | 91 | 81 | 95 | 93 | 81 | 89 |
|        | 变异系数   | 6%  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

[0216] 结果表明(表2),每组检测回收率均合格(81%-96%),该十组检测结果CV为6%,结果正常(小于20%)。因此,本案例开发的PD-L1检测试剂具有较高的准确性及精密度。

[0217] 10.3检测限测试

[0218] 采用细胞添加测试方法检测,添加0个、5个NCI-H820细胞到 $5 \times 10^7$ 个白细胞中(根据正常人的白细胞含量计算,白细胞 $4-10 \times 10^6$ 个/mL,即8ml血液中白细胞含量 $3.2-8 \times 10^7$ 个,因此白细胞选择 $5 \times 10^7$ 个),加入18 $\mu$ l捕获抗体、5 $\mu$ l CK检测抗体、5 $\mu$ l CD45检测抗体、2 $\mu$ l PD-L1检测抗体(终浓度4 $\mu$ g/ml),2-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,加入1ml结合缓冲液、30 $\mu$ l磁珠、1.7 $\mu$ l羊抗HRP荧光二抗,2-8 $^{\circ}$ C孵育60min。将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,使用1.1ml结合缓冲液重悬细胞,加入5 $\mu$ l DAPI核酸染料,使用LiquidBiopsy系统进行细胞富集,将富集分离的细胞使用荧光显微镜扫描分析,各重复试验6次,计算检测限根据《临床检验方法学评估》中分析灵敏度性能评价方法计算,计算公式为 $LoD = LoB + C_{\beta}SD_s$ ,  $C_{\beta} = 1.645/[1-1/(4 \times f)]$ 。

[0219] 表3 PD-L1阳性细胞检测限测试结果

|        |        |      |   |   |   |   |   |   |
|--------|--------|------|---|---|---|---|---|---|
| [0220] | 组别     | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|        | 添加量(个) | 5    | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 |
|        | 检测量(个) | 5    | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 0 |
|        | LOD(个) | 0.86 |   |   |   |   |   |   |

[0221] 结果表明(表3),添加0个NCI-H820细胞的结果都为0。经计算:

[0222]  $SD_s = 0.52$ ,  $f$ (自由度) =  $6 \times (6-1) = 30$ ,  $C_{\beta} = 1.645/[1-1/(4 \times f)] = 1.66$ ;

[0223]  $LoD = LoB + C_{\beta}SD_s = 0 + 1.66 \times 0.52 = 0.86 < 1$ 。

[0224] 10.4特异性测试

[0225] 采用细胞添加测试方法检测,添加500个PD-L1阴性细胞(A549)到 $5 \times 10^7$ 个白细胞中(根据正常人的白细胞含量计算,白细胞 $4-10 \times 10^6$ 个/mL,即8ml血液中自细胞含量 $3.2-8 \times 10^7$ 个,因此白细胞选择 $5 \times 10^7$ 个),加入18 $\mu$ l捕获抗体、5 $\mu$ l CK检测抗体、5 $\mu$ l CD45检测抗体、2 $\mu$ l PD-L1检测抗体(终浓度4 $\mu$ g/ml),2-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,加入1ml结合缓冲液、30 $\mu$ l磁珠、1.7 $\mu$ l羊抗HRP荧光二抗,2-8 $^{\circ}$ C孵育60min。将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,再加入1ml结合缓冲液重悬细胞,将样本管放入离心机内,500g离心5min收集细胞,使用1.1ml结合缓冲液重悬细胞,加入5 $\mu$ l

DAPI核酸染料,使用LiquidBiopsy系统进行细胞富集,将富集分离的细胞使用荧光显微镜扫描分析,重复试验3次。

[0226] 结果表明,总共1563个A549细胞中,1558个都为PD-L1阴性,特异性99.7%。

[0227] 10.5乳腺癌、胃癌、皮肤鳞癌测试

[0228] 分别添加500个MDA-MB-231(人乳腺癌细胞)、500个HGC-27(人胃癌细胞)、500个A431(人皮肤鳞癌细胞)到血液中,8mL/份。步骤如实施例5.1.2所述,将富集分离的细胞使用荧光显微镜扫描分析,统计循环PD-L1阳性肿瘤细胞数量。

[0229] 表4乳腺癌、胃癌、皮肤鳞癌细胞测试结果

[0230]

| 组别     | MDA-MB-231 | HGC-27 | A431 |
|--------|------------|--------|------|
| 回收量(个) | 480        | 475    | 465  |
| 回收率(%) | 96%        | 95%    | 93%  |

[0231] 结果表明,人乳腺癌细胞样本中循环PD-L1阳性肿瘤细胞检测效率为96%,人胃癌细胞样本中循环PD-L1阳性肿瘤细胞检测效率为95%,人皮肤癌样本中循环PD-L1阳性肿瘤细胞检测效率为93%。因此,本案例提供的检测方法及试剂盒对其他癌种中的PD-L1阳性细胞 also 具有很高的检测效率。

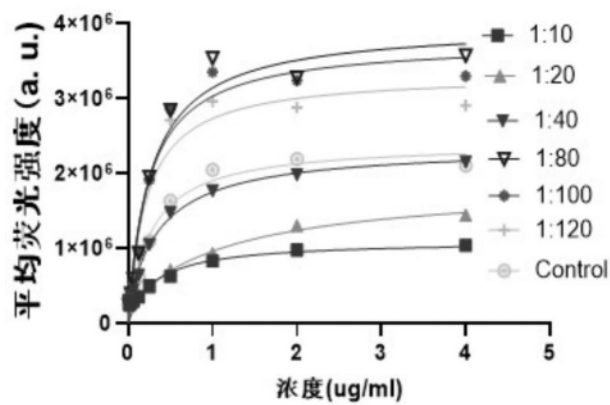


图1

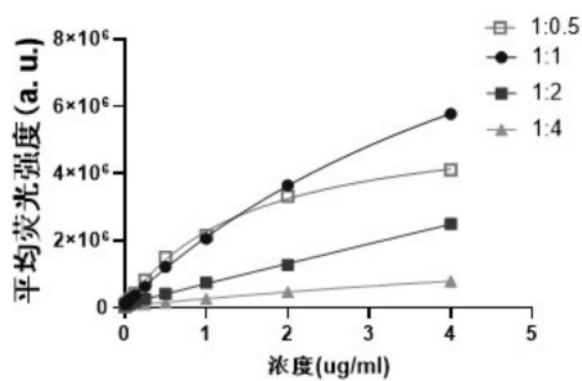


图2

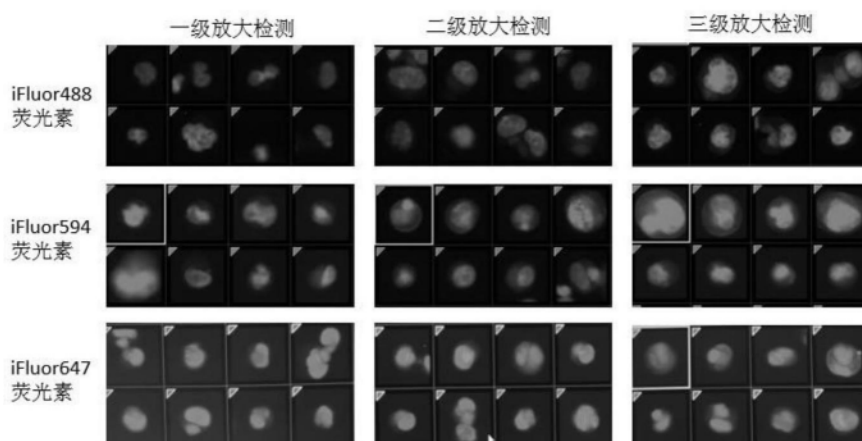


图3

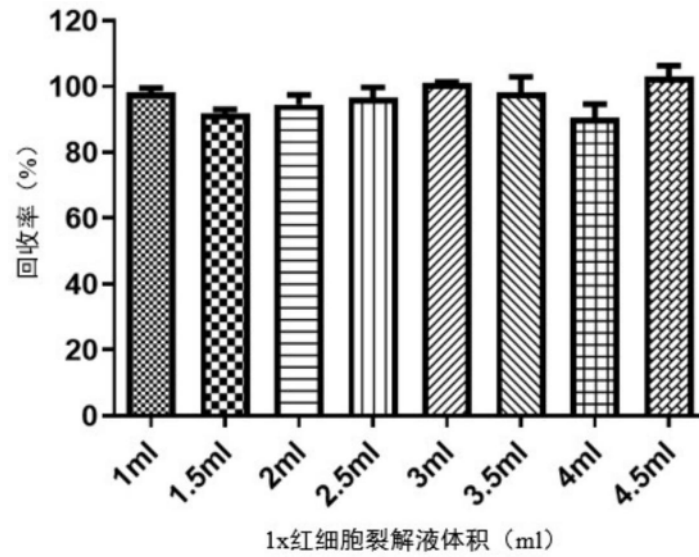


图4

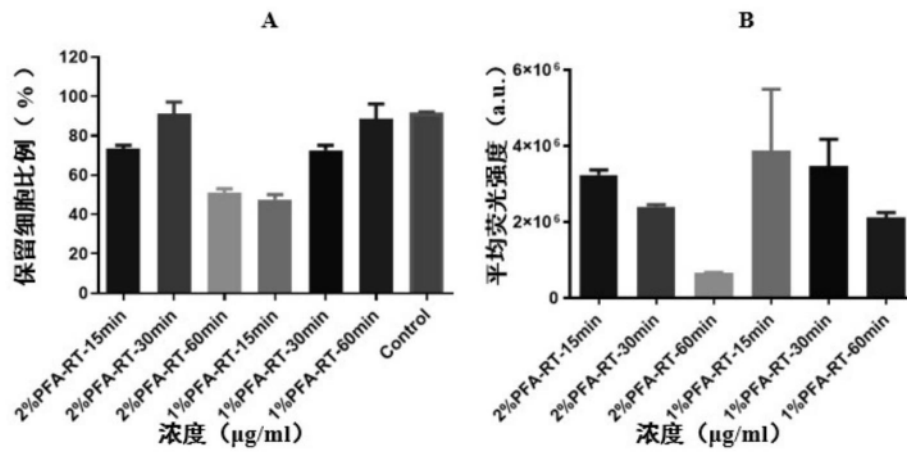


图5

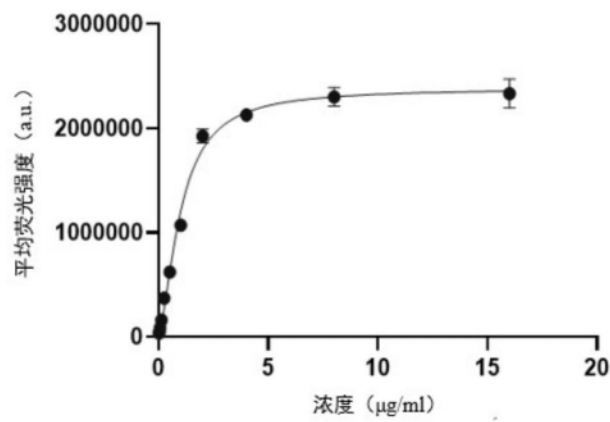


图6

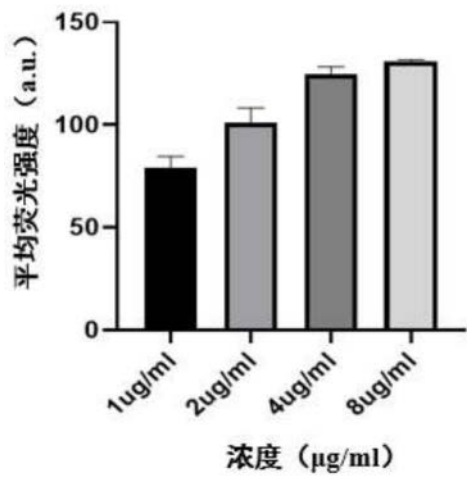


图7

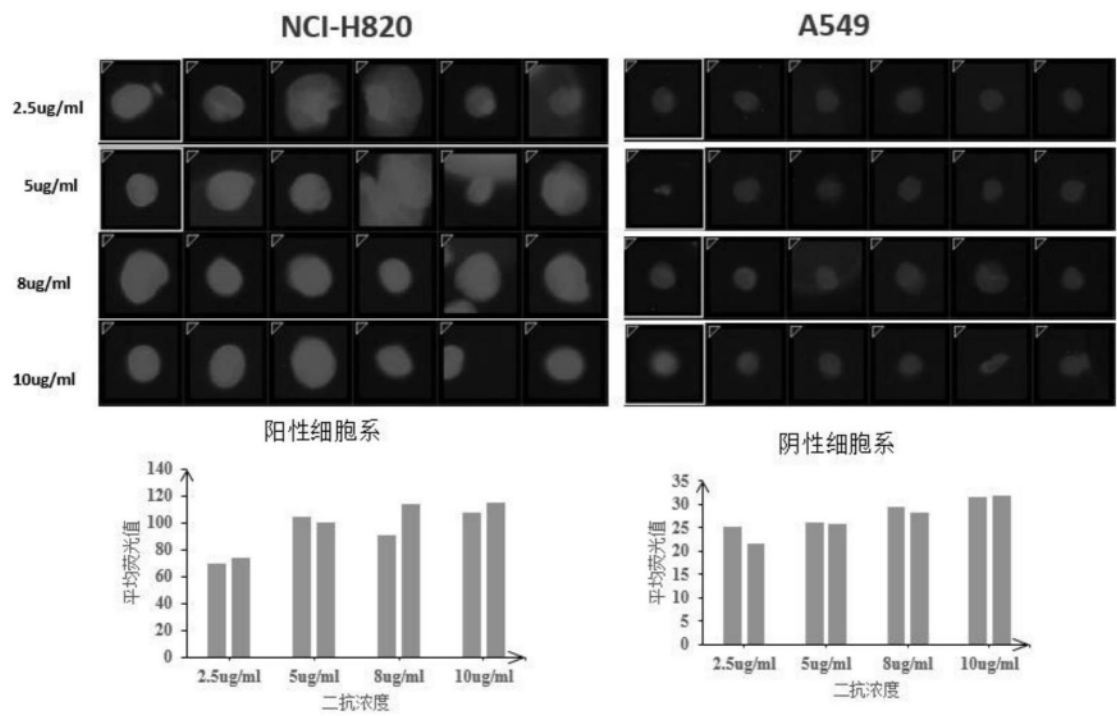


图8

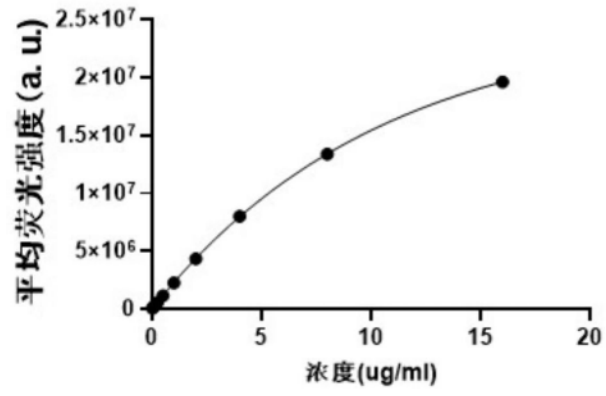


图9

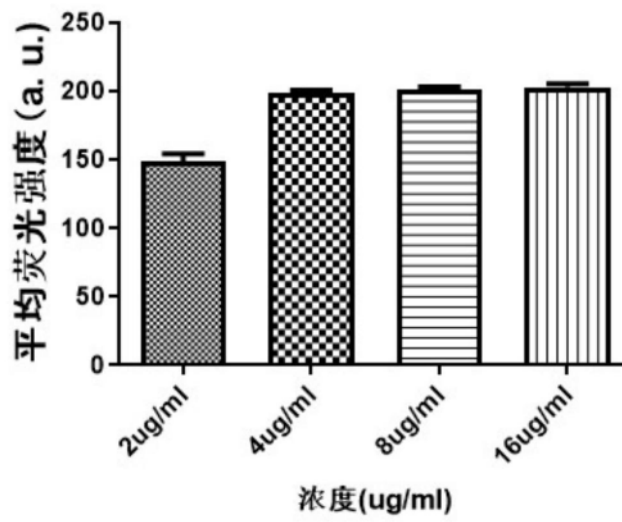


图10

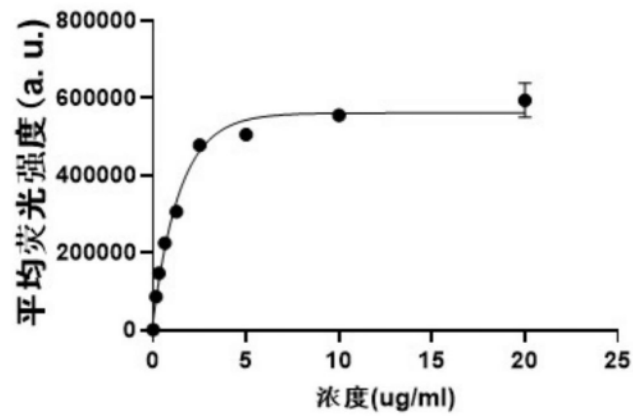


图11



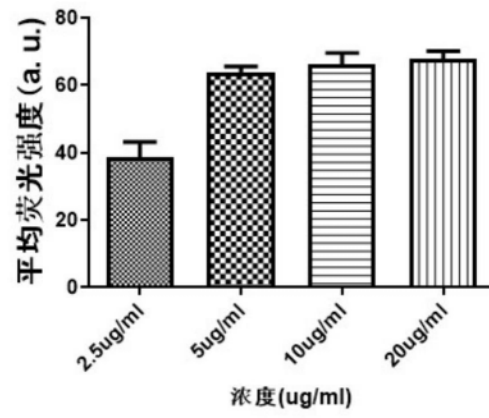


图12

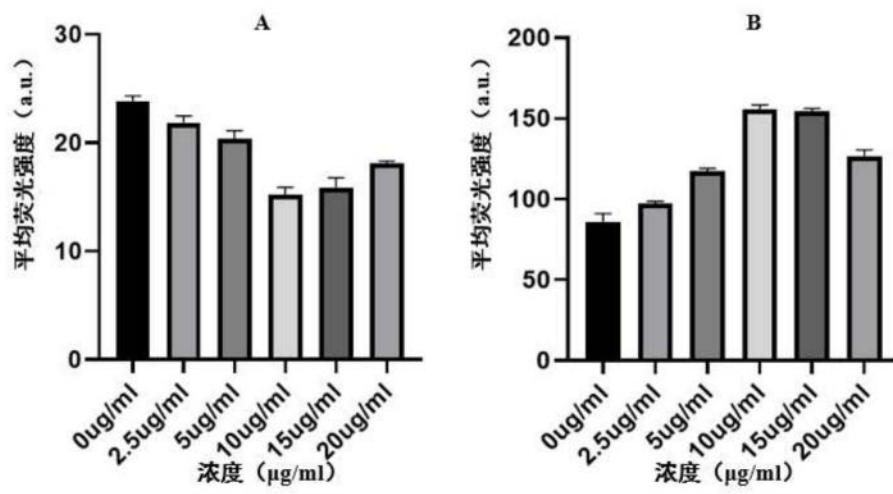


图13

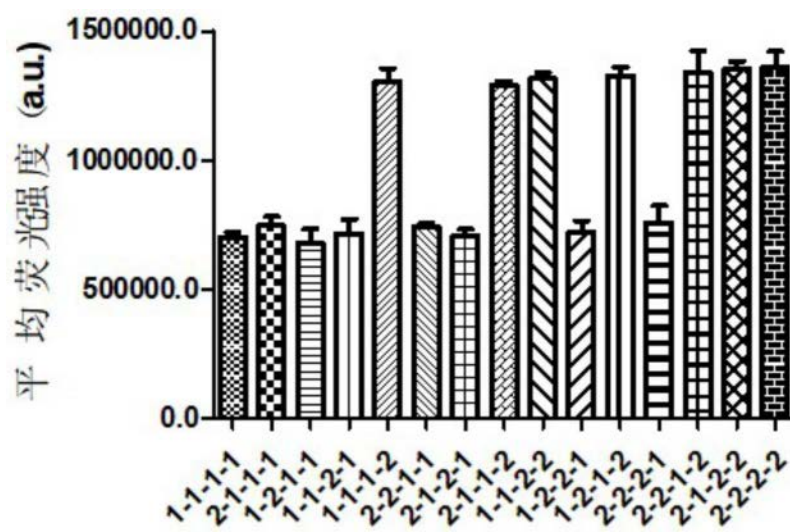


图14

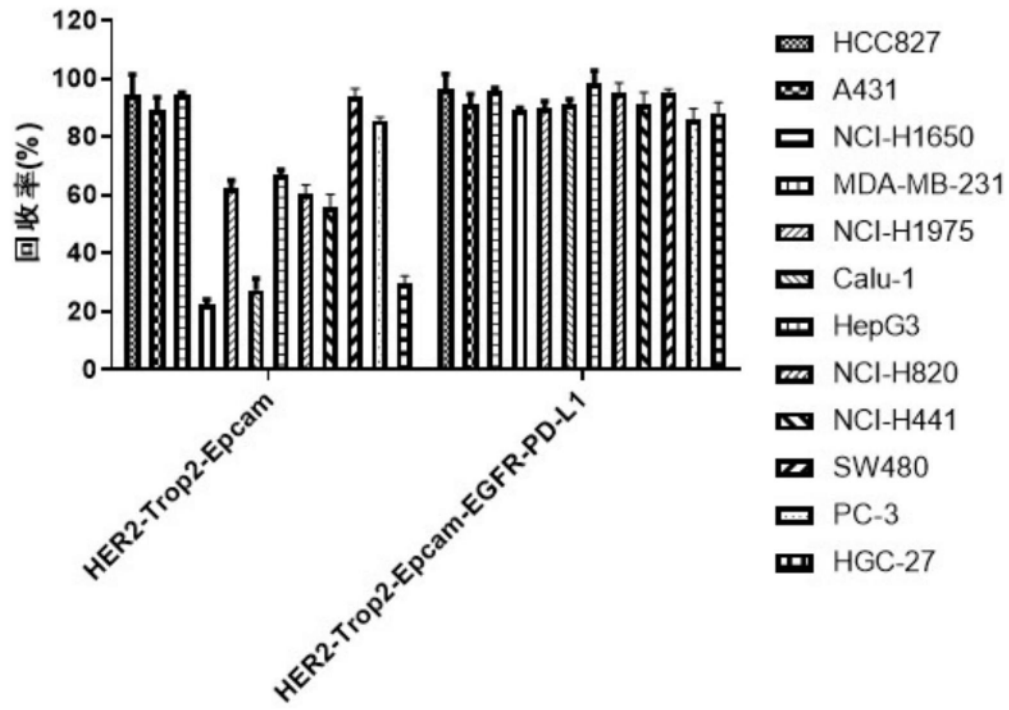


图15

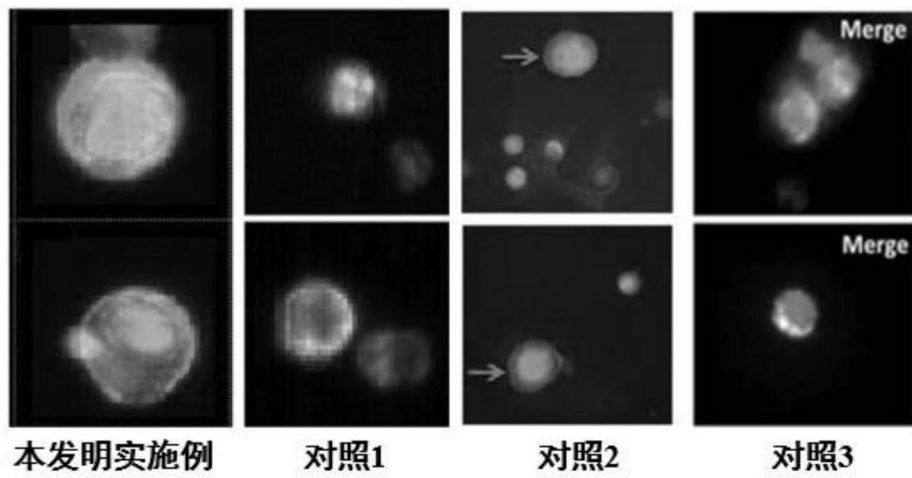


图16

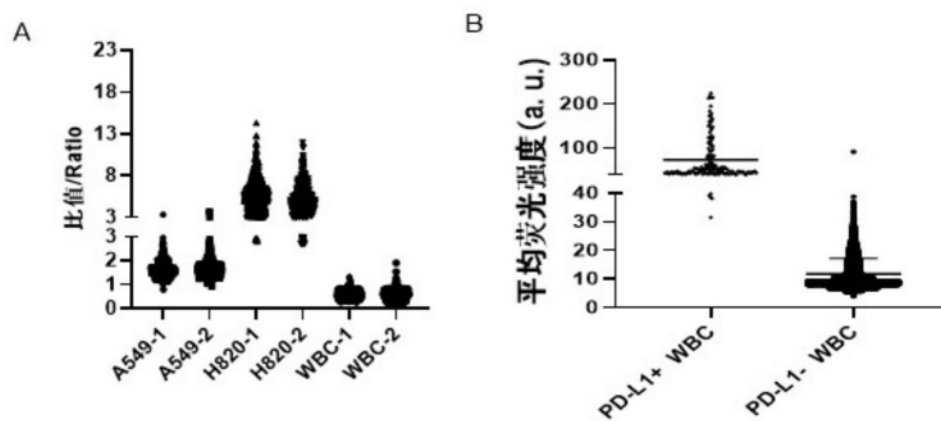


图17