·重大新药创制专项巡礼·

定量检测人血清中可溶性 PD-L1 蛋白浓度的方法开发及验证

高恩惠[1,2,3],张瑞霞[4],黄应峰[4],满素勤[2,3],程远国[1,2]

(1 上海工程技术大学,上海 201620;2 中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价中心,上海 201203;3 上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201320;4 宝船生物医药科技(上海)有限公司,上海 201203)

[**摘要**] **目的**:建立一种基于电化学发光法的高灵敏度、高特异性、快速的人血清中可溶性 PD-L1(sPD-L1)浓度的定量检测方法,并对该方法进行全面验证。**方法**:基于 Meso Scale Discovery(MSD)技术平台,以鼠抗体 PD-L1 抗体(mouse anti-human PD-L1 antibody)作为捕获抗体,并采用生物素标记的羊抗人 PD-L1 抗体(biotinylated goat anti-human PD-L1 antibody)作为检测试剂,定量检测人血清中 sPD-L1 浓度。该研究对检测方法的关键参数进行了优化,并对该方法的定量范围、准确度和精密度、回收率、稳定性、稀释线性、选择性等性能进行方法学验证。**结果**:建立了高灵敏度、高特异性的快速检测人血清中 sPD-L1 的 MSD 方法并完成方法学验证。该方法定量范围为 9.375 ~ 1 200 pg·mL^{-1},精密度、准确度、回收率、稀释线性及选择性良好,样品室温放置 4.3 h,稀释处理后实验台放置 4.3 h,冷藏冰箱(2 ℃ ~ 8 ℃)存放 24.4 h,经冻融 3 次,超低温冰箱(-90 ℃ ~ -70 ℃)放置 101 d 稳定。**结论**:经过方法学验证,该方法可以用于血清中 sPD-L1 浓度的定量分析,为 PD-1/PD-L1 免疫检查点相关药物的临床研究药效学评价提供理论依据,在个性化治疗和伴随诊断领域也有潜在的应用价值。

[**关键词**] 可溶性 PD-L1;电化学发光技术;方法学;验证

[**中图分类号**] R927.2 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 1003 - 3734(2021)15 - 1374 - 07

Method development and validation for the quantitative detection of soluble PD-L1 protein concentration in human serum

GAO En-hui[1,2,3], ZHANG Rui-xia[4], HUANG Ying-feng[4], MAN Su-qin[2,3], CHENG Yuan-guo[1,2]

(1 *Shanghai University of Engineering Science*, *Shanghai* 201620, *China*; 2 *National Shanghai Center for New Drug Safe Evaluation and Research*, *China State Institute of Pharmaceutical Industry*, *Shanghai* 201203, *China*; 3 *Shanghai Innostar Biotech Co.*, *Ltd.*, *Shanghai* 201320, *China*; 4 *Dragonboat Biopharmaceutical Co.*, *Shanghai* 201203, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a high sensitivity, high specificity and rapid method for the determination of soluble PD-L1 (sPD-L1) concentration in human serum based on electrochemiluminescence, and to verify the method to meet the comprehensive purpose of a detection method. **Methods**: Based on the Meso Scale Discovery (MSD) technology platform, mouse anti-human PD-L1 antibody was used as the capture antibody, and biotinylated goat anti-human PD-L1 antibody was used as the detection reagent to quantitatively detect the concentration of sPD-L1 in human serum. The key parameters of the detection method was optimezed and the quantitative range, accuracy and precision, recovery, stability, dilution linearity, selectivity and other properties of the method were validated.

[**基金项目**] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2020ZX09201-013);上海市研发公共服务平台项目(18DZ2290100);浦东新区科技发展基金资助(PKX2019-S09)

[**作者简介**] 高恩惠,女,硕士研究生,主要从事药动学研究。E-mail:1376904453@qq.com。张瑞霞,女,博士,主要从事生物制药及药理学研究。E-mail:ruixia.zhang@dragonboatbio.com。

[**通讯作者**] 满素勤,女,博士,主要从事药动学及药效动力学研究。联系电话:(021)60211999 - 6721,E-mail:sqman@ncdser.com。程远国,男,研究员,博士生导师,主要从事药动学研究。联系电话:(021)60211999,E-mail:ygcheng@ncdser.com。

Results: A high-sensitivity, high-specificity MSD method for rapid detection of sPD-L1 in human serum was established and the methodology was verified. The quantitative range of this method was 9.375 ~ 1 200 pg·mL^{-1}, and the precision, accuracy, recovery, dilution linearity and selectivity are satisfactory. The samples remained stable placed at room temperature for 4.3 h, at test bench for 4.3 h after dilution treatment, and at the refrigerator (2 ℃ ~8 ℃) for 24.4 h, freeze-thaw for 3 times, and in an ultra-low temperature refrigerator (−90 ℃ ~ −70 ℃) for 101 days. **Conclusion**: After validation, it suggested that this method could be used to quantitatively analyze the concentration of sPD-L1 in serum to provide a theoretical basis for the pharmacodynamic evaluation of PD-1/PD-L1 immune checkpoint related drugs in clinical research. It also has potential applications in personalized therapy and concomitant diagnosis.

[**Key words**] soluble PD-L1; Meso Scale Discovery; methodology; validation

近年来,越来越多的研究发现恶性肿瘤细胞会通过多种逃逸机制来抵抗免疫[1],运用细胞“免疫检查点”进行癌症的免疫治疗备受关注。其中,通过 PD-1/PD-L1 的免疫检查点研究发现,PD-1/PD-L1 途径的激活可导致肿瘤免疫逃逸并促进肿瘤细胞生长[2]。此外,有研究显示,PD-L1 在肿瘤组织中的高表达与各种恶性肿瘤的不良预后有关,如卵巢癌、软组织肉瘤、乳腺癌等[3-5]。PD-L1 也能够通过可溶形式可溶性 PD-L1(soluble PD-L1,sPD-L1)存在于外周血中,并能通过血液和淋巴循环在全身扩散,能与细胞表面受体(如膜结合的 PD-1 受体)结合抑制 T 细胞的活化和增殖[6],从而导致免疫抑制。在多种癌症的研究中发现,血清中高浓度的 sPD-L1 与预后差成正相关性,如黑色素瘤、肾细胞癌、淋巴瘤等[7-9]。另外,在肝癌的研究中发现 sPD-L1 能够预测无病生存期(disease free survival,DFS)和总生存期(overall survival,OS)[10]。经多项研究显示,sPD-L1 动态变化与疾病进程相关,可用于了解治疗期间肿瘤微环境的各种变化,预测早期复发和不良预后。目前,sPD-L1 逐渐成为某些癌症和肿瘤的生物标志物[11-12],指导疾病风险分层,为个体化治疗方案提供依据[13]。

目前,常使用免疫组织化学(immunohisto chemistry,IHC)检测组织中的 PD-L1,以期了解 PD-1/PD-L1 的免疫检查点相关信息。但该方法需要进行组织活检,且检测通量较低;另外 PD-L1 表达在肿瘤内是异质的,且在整个治疗期间 PD-L1 表达水平处于动态变化,从而使得临床上用免疫组化检测 PD-L1 的变化具有挑战性[14]。然而,由于 sPD-L1 作用机制明确,国内外多个肿瘤或新药研究将其作为 PD-1/PD-L1 免疫检查点的生物标志物以揭示疾病药效学和药动学的作用规律。其中,最初通过酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)在人血清或血浆中检测 sPD-L1,该方法比活检组织更方便,入侵性小,最小定量范围为 0.156 ng·mL^{-1}[15],检测通量较大。与 ELISA 方法相比,Meso Scale Discovery(MSD)技术平台灵敏度更高、线性范围更宽,最新研究表明检测血清样品时,MSD 能够在非常低的抗体浓度下显示出高灵敏度,更适用于血清中抗原检测[16]。

因此,本实验在研究过程中选择了灵敏度高和线性范围广的 MSD 技术平台,旨在基于 MSD 平台优化检测方法,建立一种高灵敏度、高特异性、快速、高通量、低定量下限的人血清中 sPD-L1 蛋白浓度的定量检测方法,并对该方法进行一定程度的验证。该方法可用于人血清中 sPD-L1 生物标志物的研究,提供临床研究药效学评价的重要数据支持,并可为 sPD-L1 相关的新药研发及个体化治疗提供理论依据。

材料与方法

1 试剂

Human PD-L1/B7-H1 DuoSet® ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司,批号:DY156),该试剂盒包含 Capture antibody,Detection antibody,Human B7-H1 Standard 试剂;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS,美国 Corning 公司);牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司,批号:A8010);聚山梨酯-20(国药集团化学试剂有限公司,批号:9005-64-5);MSD@ SULFO-TAG@ -Streptavidin(美国 MSD®公司,批号:R32AD-1);MSD@ Read Buffer T(4X)(美国 MSD®公司,批号:R92TC-1)。

2 仪器

MESO® Sector S 600 电化学发光仪(美国 MSD®

公司);Elx405™洗板机(美国 BioTek 公司);LRH－150F 生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司,控温条件为 24 ℃ ~26 ℃);酶标仪振荡板(麒麟贝尔实验室仪器有限公司);MDS 96 孔板(美国 MSD®公司,批号:L15XA-3)。

3 人血清

人混合血清,至少采用 5 个人血清[妙通(上海)生物科技有限公司]。

4 检测步骤

① 包被:MDS 96 孔板每孔加入 30 μL 鼠抗体 PD-L1 抗体(mouse anti-human PD-L1 antibody)溶液,封板膜封板,酶标仪振荡器轻摇约 15 min 后,放置 2 ℃ ~8 ℃孵育过夜。② 洗板:弃去包被液,每孔加入 300 μL 洗液洗板 3 次,在纸上拍干。③ 封闭:每孔加入 150 μL 5% BSA 溶液,封板膜封板,随后放置于酶标板振荡器,25 ℃ 450 r·min^{-1}振荡温育 1 h 进行封闭。④ 加样:用洗液洗板 3 次,拍干 MSD 板,在相应孔内分别加入 30 μL 标准曲线样品、质控样品和验证/待测样品,放置于酶标板振荡器,25 ℃ 450 r·min^{-1}振荡温育 2 h。⑤ 加生物素标记的羊抗人 PD-L1 抗体(biotinylated goat anti-human PD-L1 antibody)溶液:用洗液洗板 3 次,拍干 MSD 板,每孔加入 30 μL 生物素标记的羊抗人 PD-L1 抗体工作液,封板膜封板,放置于酶标板振荡器,25 ℃ 450 r·min^{-1}振荡温育 2 h。⑥ 加 SULFO-TAG-Streptavidin 溶液:洗液洗板 3 次,拍干 MSD 板,每孔加入 50 μL SULFO-TAG-Streptavidin,封板膜封板,放置于酶标板振荡器,25 ℃ 450 r·min^{-1}振荡温育 1 h。⑦ 显色:用洗液洗板 3 次,拍干 MSD 板后,每孔加入 150 μL 显色液,在 1 ~ 30 min 内读数。⑧ 检测读数:使用 MESO® Sector S 600 电化学发光仪读取信息,并采用 SoftMax Pro 7.0 和 Microsoft Excel 2007 软件进行数据分析、统计。

5 方法学验证内容

对建立的检测人血清中 sPD-L1 浓度的 MSD 法分别进行标准曲线和定量范围、准确度和精密度、加样回收率(Recovery)、稳定性、稀释线性、选择性等方面的方法学验证。① 标准曲线与定量范围:对 15 个不同日期,2 名不同分析人员对 20 个独立分析批的标准曲线进行评价,建立标准曲线以体现分析物浓度与仪器响应值间的关系,并使用四参数回归法进行拟合,计算复孔间浓度变异系数(coefficient of variation,CV)及各浓度点的反算值与标示值之间相对误差(relative error,RE)。② 精密度和准确度:采用稀释液(5% BSA-0.5% PBST 溶液)稀释 PD-L1 校准品储备液配制高浓度质控(HQC,1 000 pg·mL^{-1})、中浓度质控(MQC,100 pg·mL^{-1})、低浓度质控(LQC,25 pg·mL^{-1})3 个浓度水平的样品,评价方法精密度和准确度水平,每浓度水平质控平行配制 3 套。2 名分析人员在 3 个不同日期共进行 6 个独立分批的检测,评价分析批内精密度和批间精密度。③ 加样回收率:在标准曲线范围内,向混合人血清中加入 HQC,MQC 和 LQC 水平的 PD-L1 校准储备液作为加样回收样品,每个浓度的 QC 样品配制 3 套(每套均为复孔)。同时测定混合人血清空白样品,评价内源性水平。计算样品均值,以回收率表示加样回收结果。2 名分析人员在 3 个不同日期共进行 6 个独立分批检测,评价分析批内回收率。④ 稳定性:在建立标准曲线和 2 套质控样品条件下,向混合人血清中加入 HQC 和 LQC 水平的 PD-L1 储备液配制成稳定性样品,每浓度水平验证样品平行配制 3 个样本,在不同条件下放置特定时间后检测,计算给定条件下稳定性样品与新鲜样品的相对偏差(relative deviation,RD)。⑤ 稀释线性:在建立 1 份标准曲线和 2 套质控样品条件下,用混合血清将 PD-L1 校准储备液稀释至 6 000 pg·mL^{-1},然后用 5% BSA-0.5% PBST 稀释液分别稀释 6,18 和 54 倍,计算稀释样品回算终浓度的 CV 值。⑥ 选择性:在建立 1 份标准曲线和 2 套质控样品条件下,选择 5 个空白个体血清,并将每个个体血清分别配制成人血清样品、2% 溶血验证样品和高脂血验证样品的基质样品,分别计算各基质样品的回收率值。其中,2% 溶血基质制备:取 0.5 mL 全血在 －80 ℃冷冻 3 h 后温室解冻 30 min,重复操作 5 次,取冻融后 10 μL 全血加入 490 μL 个体人血清中,混匀, －20 ℃保存。高血脂基质制备:取一个个体血清 500 μL,加入三酰甘油混合物(triglyceride mix)1.5 mg,混匀, －20 ℃保存。

6 数据统计分析

所有测定结果均由 DISCOVERY WORKBENCH® software 软件采集数据,用 SoftMax Pro 进行曲线拟合,Microsoft Excel 2007 软件进行一般计算。RE 由测得浓度与理论浓度差值,除以理论浓度所得;CV 由标准偏差与平均值的比值获得;回收率是指测得浓度与理论浓度的比值;RD 是指 2 次测定值之差与 2 次测定值均值的比值。RE,CV,Recovery 和 RD

的计算公式如下：

$$RE/\% = (C_{测得} - C_{理论})/C_{理论} \times 100\% \quad 公式(1)$$

$$CV/\% = 标准偏差/平均值 \times 100\% \quad 公式(2)$$

$$Recovery/\% = C_{测得}/C_{理论} \times 100\% \ (C_{理论} = C_{配制} + C_{内源}) \quad 公式(3)$$

$$RD/\% = (C_2 - C_1)/平均值_{C2,C1} \times 100\% \quad 公式(4)$$

其中，C_1 为第 1 次浓度测定值，C_2 为第 2 次浓度测定值。

结　果

1　标准曲线和定量范围

sPD-L1 定量范围为 9.375 ~ 1 200 pg·mL^{-1}，其中平均浓度指 20 个独立分析批在个理论浓度点的平均值，由标准曲线最低和最高非零点定义。标准曲线上各点复孔间 CV 及各浓度点的反算值与标志值之间 RE 的范围，见表 1。标准曲线的定量上限(ULOQ)和定量下限(LLOQ)CV 为 0.0% ~29.9%，其余各浓度点的 CV 在 0.0% ~ 24.0% 范围内；ULOQ 和 LLOQ 的 RE 在 -20.6% ~26.6% 之间，其余各浓度点的 RE 在 -12.9% ~22.5% 之内。该结果均符合 ULOQ 及 LLOQ 在 CV≤30%、RE 在 ±30% 范围内的接受标准，其他各浓度点满足 CV≤25%、RE 在 ±25% 范围内的接受标准，由此可知该标准曲线具有可接受的精度和准确性。

表 1　标准曲线各浓度点 CV 和 RE　%

理论浓度/pg·mL^{-1}	CV	RE
1 200(ULOQ)	0.0 ~ 12.7	-4.8 ~ 10.4
600	0.1 ~ 13.9	-8.0 ~ 16.5
300	0.2 ~ 14.7	-12.9 ~ 10.0
150	0.0 ~ 21.5	-10.5 ~ 13.0
75	0.0 ~ 17.5	-7.5 ~ 7.8
37.5	0.5 ~ 16.5	-6.0 ~ 22.5
18.75	0.4 ~ 24.0	-6.9 ~ 21.1
9.375(LLOQ)	0.0 ~ 29.9	-20.6 ~ 26.6

2　精密度和准确度

由 2 名不同分析人员在 3 个不同日期对 HQC，MQC 和 LQC 浓度样品共进行 6 个独立分析批检测，评价检测方法的精密度水平，见表 2。由实验结果可知，在建立的曲线范围内，分析批内 CV 在 1.8% ~ 10.7% 范围内，相对误差为在 -9.9% ~17.2% 范围内，方法总误差在 3.9% ~27.9% 范围内；分析批间 CV 在 5.3% ~11.7% 范围内，RE 为 -8.3% ~ -3.2%，方法总误差为 0.3% ~8.5%，实验结果均符合 CV≤30%、RE 在 ±30% 范围内，由 HQC，MQC 和 LQC 总误差定义的方法准确性也符合结果在 30% 以内的接受标准，表明本方法精密度和准确性符合要求。

表 2　方法精密度结果　$n=6$，%

精密度	批内			批间		
样品	CV	RE	总误差	CV	RE	总误差
HQC	2.4 ~ 7.6	1.5 ~ 12.7	3.9 ~ 20.3	5.3	-4.3	1.0
MQC	1.8 ~ 5.6	-9.9 ~ 12.0	8.1 ~ 17.6	8.6	-8.3	0.3
LQC	2.8 ~ 10.7	-6.8 ~ 17.2	4.0 ~ 27.9	11.7	-3.2	8.5

3　加样回收率

方法回收率结果见表 3。

表 3　方法回收率结果　$n=6$，%

样品	批内回收率	批间回收率
HQC	75.5 ~ 97.7	82.7
MQC	74.7 ~ 99.4	86.3
LQC	82.9 ~ 109.7	95.9
内源性水平	—	—

人血清 sPD-L1 的分析批内回收率在 74.7% ~ 109.7% 范围内，分析批间回收率在 82.7% ~ 95.9% 范围内，不同浓度样品批内和批间回收率均在 60% ~140% 之间，本方法加样回收率符合要求。

4　稳定性

稳定性样品在不同条件下放置特定时间后分析，计算 RD，结果见表 4 ~ 表 6。该验证项中，样品经冻融 3 次，室温放置 4.3 h，实验台放置 4.3 h，4 ℃放置 24.4 h，-80 ℃放置 101 d 的 RD 均在 -37.7% ~ 13.0% 范围内，符合 RD 在 ±40% 的接受标准，表明稳定性样品在上述条件下保持稳定。

表 4 冻融稳定性 $n=3$

反应条件	理论浓度 1 000 pg·mL^{-1}(HQC)		理论浓度 25 pg·mL^{-1}(LQC)	
	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%
新鲜配制	769.789	—	20.698	—
冻融 1 次	783.926	0.8 ~ 11.9	24.412	5.5 ~ 23.7
冻融 2 次	819.180	4.8 ~ 19.7	24.711	12.8 ~ 24.7
冻融 3 次	819.920	4.6 ~ 11.6	23.594	5.3 ~ 22.9

表 5 短期稳定性 $n=3$

反应条件	理论浓度 1 000 pg·mL^{-1}(HQC)		理论浓度 25 pg·mL^{-1}(LQC)	
	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%
新鲜配制	769.789	—	20.698	—
室温 4.3 h	775.122	−4.4 ~ 7.3	20.041	−11.3 ~ 6.1
实验台 4.3	812.661	6.9 ~ 10.1	25.155	−16.0 ~ 8.9
4 ℃,24.4 h	844.008	8.1 ~ 14.9	21.460	−1.4 ~ 7.6

表 6 长期稳定性 $n=3$

反应条件	理论浓度 1 000 pg·mL^{-1}(HQC)		理论浓度 25 pg·mL^{-1}(LQC)	
	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%	实测值/pg·mL^{-1}	RD/%
新鲜配制	769.789	—	20.698	—
−80 ℃,31 d	740.129	−5.1 ~ 4.0	24.062	13.3 ~ 16.0
−80 ℃,101 d	676.705	−14.4 ~ −3.4	16.204	−37.7 ~ −13.0

5 稀释线性

由表 5 可知,先由混合人血清稀释 PD-L1 校准储备液至 6 000 pg·mL^{-1},再用稀释液分别将样品稀释 6,18 和 54 倍后,各稀释线性样品浓度数值较为接近,并且回算终浓度的 CV 是 3.4%,表明稀释线性样品在上述稀释范围内无明显基质效应,稀释呈线性,见表 7。

表 7 稀释线性结果

起始浓度/pg·mL^{-1}	稀释倍数	平均浓度/pg·mL^{-1}	总平均值/pg·mL^{-1}	标准差/pg·mL^{-1}	CV/%
6 000	6	5 483.652	5 695.123	192.1	3.4
	18	5 742.838			
	54	5 858.879			

6 选择性

该验证项分别检测 5 个个体 LQC 水平加样样品和未加 PD-L1 校准储备液的空白基质(内源性水平),计算每种基质的回收率。由表 8 结果显示,普通基质中 3 个个体的回收率在 72.9% ~ 109.0% 范围内;2% 溶血基质的 5 个个体回收率在 60.7% ~ 74.5% 范围内;高血脂基质的 5 个个体回收率在 67.0% ~ 85.2% 范围内。

表 8 选择性结果

个体	加样浓度/pg·mL^{-1}	普通基质			2% 溶血基质			高血脂基质		
		内源性水平	测定浓度/pg·mL^{-1}	回收率/%	内源性水平	测定浓度/pg·mL^{-1}	回收率/%	内源性水平	测定浓度/pg·mL^{-1}	回收率/%
1	25.000	BQL	14.693	58.8	BQL	15.182	60.7	BQL	16.743	67.0
2	25.000	70.121	103.661	109.0	BQL	18.396	73.6	BQL	20.496	82.0
3	25.000	BQL	20.367	81.5	BQL	17.489	70.0	BQL	19.689	78.8
4	25.000	BQL	18.234	72.9	BQL	18.623	74.5	BQL	21.302	85.2
5	25.000	BQL	NA	NA	BQL	16.905	67.6	BQL	18.234	72.9

讨　论

PD-1/PD-L 信号通路的激活可促进 CD_4^+ T 细胞和 CD_8^+ T 细胞活化，抑制细胞因子的表达，改变肿瘤微环境，使机体对肿瘤细胞的监视及清除能力减弱，促进肿瘤细胞逃逸机体免疫监视和杀伤[17]，因此，PD-1 或 PD-L1 抗体的免疫疗法已被批准用于治疗多种癌症。在早期研究中主要通过分析 PD-L1 靶点，了解疾病进程和药效信息。但是，PD-L1 在肿瘤内的表达是异质的，且在整个治疗期间 PD-L1 表达水平处于动态变化，从而导致临床上检测 PD-L1 变化具有挑战性，并且有研究表明 PD-L1 水平是不完善的生物标志物[18]。然而，PD-L1 除了与肿瘤细胞膜结合外，还以可溶形式 sPD-L1 存在于癌症患者外周血的血浆或血清中。有研究显示，人血清中循环的 sPD-L1 参与调节免疫反应，并且 sPD-L1 水平上调与肿瘤发生免疫抑制和预后不良相关[19]。目前，已有多种癌症通过人血清 sPD-L1 监测疾病，如弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、甲状腺癌、肝癌等疾病[20-22]。sPD-L1 因其可以评估多种肿瘤和癌症的治疗反应，及时预防疾病复发，以获得更高的缓解率、更深的缓解度、更长的生存期，并能实现精准分层诊断下的个体化治疗而愈来愈受到重视。

sPD-L1 是评估 PD-1 及 PD-L1 相关抗体药物的药动学、药效学和免疫原性的重要生物标志物。例如：一种人 IgG1 抗体有高亲和力和选择性阻断 PD-L1 与 PD-1 和 CD-80 的结合作用，在晚期实体瘤患者的临床试验中，通过 sPD-L1 表达水平掌握该药物的药动学和药效学以评估药物的安全性和耐受性[23]；一种 CD137/PD-L1 四价双特异性抗体在食蟹猴的初步毒性研究中，通过检测 sPD-L1 表达水平发现该抗体具有无肝毒性的免疫激活[24]。在恶性黑色素瘤患者的免疫疗法临床试验中，显示免疫检查点封锁可增加 sPD-L1 水平，间接反映抗肿瘤免疫反应；治疗后 sPD-L1 水平的长期或延迟增加表明，抗肿瘤免疫应答可以克服肿瘤微环境中 PD-L1 和其他潜在免疫抑制因子的负面影响；并且治疗后 sPD-L1 的短期升高与疾病进展和患者生存期缩短有关[7]。sPD-L1 是一种实用的药效学生物标志物，可用于对免疫治疗剂的疗效评价，同时提高对机制的理解。

因此，本研究建立人血清中 sPD-L1 的检测方法，以期为临床试验中药效学评价提供依据。在本研究中采用重组人 PD-L1 蛋白作为标准品，相对准确地检测人血清中 sPD-L1 浓度，采用生物标志物“符合目的”的一般原则进行了相关验证。结果显示该方法定量范围为 9.375 ~ 1 200 pg·mL^{-1}，精密度和准确度、加样回收率、选择性良好，稀释呈线性。由于健康人血清中 sPD-L1 浓度低于 LLOQ 9.375 pg·mL^{-1}，暂时未对方法的平行性和内源性 sPD-L1 的稳定性进行考察；一般情况下，患者血清中 sPD-L1 浓度较高，可在获得真实患者样本后再对平行性和内源性 sPD-L1 的稳定性进行评价。

本方法在检测中所需样本量少，对于患者较为友好。此外，还具有检测通量大的优势，能够提供较为全面的临床信息，了解每个患者预后状况，为后期个体化治疗方案提供依据，符合精准治疗原则。该方法实验流程简便、快速，能够及时反映检测信息，提高检测效率，争取治疗时间。本研究方法的建立将改进现有方法的局限，利于掌握疾病进程，及时调整治疗方案，提高患者的生存率，以期为广泛的临床应用提供基础。

相比于 PD-L1 免疫组织化学(IHC)需要进行活检，本研究中基于 MSD 的 sPD-L1 检测方法采用人血清，不仅患者适用性好，还可以满足整个临床试验阶段的动态监察策略。另外，PD-L1 表达异质性可能无法通过 IHC 分析的一小块组织完全捕获，而人血清的 sPD-L1 数据更具备代表性、可靠性。目前，在已发表的 sPD-L1 方法研究中，检测到健康人血清中 sPD-L1 的 LLOQ 仅在 100 pg·mL^{-1} 范围内[25]；高于本实验方法基线观察到的水平(9.375 pg·mL^{-1})。在药效评价中，本方法的高灵敏性能够定量此前无法检测到的更低样本水平，提供更精确药效数据信息，反映药物作用水平，支持临床研究。

本研究建立了人血清中 sPD-L1 水平检测的 MSD 方法，并对标准曲线和定量范围、准确度和精密度、加样回收率、稳定性、稀释线性、选择性等方面方法学验证，确定该分析方法的适用性。sPD-L1 的定量范围均在 9.375 ~ 1 200 pg·mL^{-1}，标准曲线样品复孔间 CV 和 RE 均不超过 30%。其中，sPD-L1 检测方法的批内和批间 CV 分别在 1.8% ~ 10.7% 和 5.3% ~ 11.7%，批内和批间 RE 分别在 -9.9% ~ 17.2% 和 -8.3% ~ -3.2% 范围内，方法总误差分别为 3.9% ~ 27.9% 和 0.3% ~ 8.5%。sPD-L1 的批内和批间回收率分别在 97.7% ~ 109.7% 和 82.7% ~ 95.9%；稀释线性的 CV 是 3.4%。普通基质、2% 溶

血基质和高血脂基质的回收率分别为 72.9% ~ 109.0%,60.7% ~74.5% 和 67.0% ~85.2%,由选择性实验结果可知,基质选择性良好。重组 sPD-L1 蛋白稳定性验证结果表明样品经冻融 3 次,室温放置 4.3 h,实验台放置 4.3 h,2 ℃ ~8 ℃放置 24.4 h,-80 ℃放置 101 d 均保持稳定。因此,本研究已建立基于 MSD 的人血清 sPD-L1 定量检测方法,不仅可以为临床药效学评价提供重要的数据支撑,还可以为患者进行个体化、精准治疗服务提供依据。

[参 考 文 献]

[1] ZAPPASODI R, MERGHOUB T, WOLCHOK JD. Emerging concepts for immune checkpoint blockade-based combination therapies[J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 690.

[2] ZHU XX, LANG JH. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 97671 - 97682.

[3] DARB-ESFAHANI S, KUNZE CA, KULBE H, *et al*. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1486 - 1499.

[4] KIM C, KIM EK, JUNG H, *et al*. Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 434.

[5] MUENST S, SCHAERLI AR, GAO F, *et al*. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146(1): 15 - 24.

[6] LI YH, XIAO YF, SU MQ, *et al*. Role of soluble programmed death-1 (sPD-1) and sPD-ligand 1 in patients with cystic echinococcosis[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 251 - 256.

[7] ZHOU J, MAHONEY KM, GIOBBIE-HURDER A, *et al*. Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(6): 480 - 492.

[8] FRIGOLA X, INMAN BA, LOHSE CM, *et al*. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1915 - 1923.

[9] ZHANG XH, LIU L, ZHOU SY, *et al*. Plasma soluble programmed death ligand 1 levels predict clinical response in peripheral T-cell lymphomas[J]. *Hematol Oncol*, 2019, 37(3): 270 - 276.

[10] CHANG BY, HUANG T, WEI HJ, *et al*. The correlation and prognostic value of serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3): 353 - 363.

[11] SHIGEMORI T, TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, *et al*. Soluble PD-L1 expression in circulation as a predictive marker for recurrence and prognosis in gastric cancer: direct comparison of the clinical burden between tissue and serum PD-L1 expression[J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(3): 876 - 883.

[12] MILDNER F, SOPPER S, AMANN A, *et al*. Systematic review: Soluble immunological biomarkers in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 153: 102948.

[13] LI Y, CUI X, YANG YJ, *et al*. Serum sPD-1 and sPD-L1 as biomarkers for evaluating the efficacy of neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients[J]. *Clin Breast Cancer*, 2019, 19(5): 326 - 332,e1.

[14] YANG J, HU M, BAI XB, *et al*. Plasma levels of soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in WHO II/III nasopharyngeal carcinoma (NPC): a preliminary study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(39): e17231.

[15] ROSSILLE D, GRESSIER M, DAMOTTE D, *et al*. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial[J]. *Leukemia*, 2014, 28(12): 2367 - 2375.

[16] BOLTON JS, CHAUDHURY S, DUTTA S, *et al*. Comparison of ELISA with electro-chemiluminescence technology for the qualitative and quantitative assessment of serological responses to vaccination[J]. *Malar J*, 2020, 19(1): 159.

[17] QUEZADA SA, PEGGS KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(8): 1560 - 1565.

[18] LIU SY, WU YL. Biomarker for personalized immunotherapy[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(Suppl 3): S308 - S317.

[19] LIU DL, WANG SH, BINDEMAN W. Clinical applications of PD-L1 bioassays for cancer immunotherapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 110.

[20] MORTENSEN JB, HANSEN IM, CLAUSEN MR, *et al*. Elevated pre-therapeutic serum levels of soluble programmed death 1 protein (sPD-1) identify DLBCL patients with adverse prognostic features[J]. *Blood*, 2017, 130(Suppl 1): S4148.

[21] AGHAJANI MJ, ROBERTS TL, YANG T, *et al*. Elevated levels of soluble PD-L1 are associated with reduced recurrence in papillary thyroid cancer[J]. *Endocr Connect*, 2019, 8(7): 1040 - 1051.

[22] DU SS, CHEN GW, CHEN YX, *et al*. High serum sPD-1 and sPD-L1 levels 1 predict outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with radiotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(Suppl 15): e16672.

[23] SONG X, PAK M, CHAVEZ C, *et al*. 203 Population pharmacokinetics of MEDI4736, a fully human antiprogrammed death ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51: S28.

[24] LAKINS MA, KOERS A, GIAMBALVO R, *et al*. FS222, a CD137/PD-L1 tetravalent bispecific antibody, exhibits low toxicity and antitumor activity in colorectal cancer models[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15): 4154 - 4167.

[25] NI Y, YUAN XL, NEWITT JA, *et al*. Development and fit-for-purpose validation of a soluble human programmed death-1 protein assay[J]. *AAPS J*, 2015, 17(4): 976 - 987.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 12 - 01