



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106999582 A

(43)申请公布日 2017. 08. 01

(21)申请号 201580061582.7

D·勒

(22)申请日 2015.11.12

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(30)优先权数据

62/079,357 2014.11.13 US

62/190,977 2015.07.10 US

代理人 王永伟 赵蓉民

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.12

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/060331 2015.11.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/077553 EN 2016.05.19

(71)申请人 约翰·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72)发明人 L·迪亚斯 B·沃格尔斯坦

K·W·凯泽 N·帕帕佐普洛斯

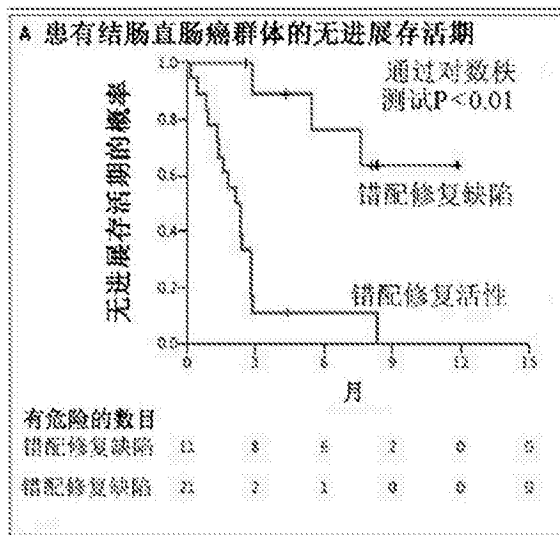
权利要求书2页 说明书25页 附图12页

(54)发明名称

检查点阻断和微卫星不稳定性

(57)摘要

如细胞毒素T-淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)和程序性死亡-1(PD-1)等免疫检查点的阻断示出患有癌症的患者的前景。已证实针对这些受体的抑制抗体可破坏免疫耐受并且促进抗肿瘤免疫力。这些试剂在患有某一类别的肿瘤的患者中特别好地起作用。这类肿瘤由于它们产生的众多的新抗原可尤其对治疗敏感。



1. 一种治疗癌症患者的方法,其包含:
向癌症患者授予免疫检查点抑制抗体,其中所述癌症患者患有微卫星不稳定癌症(MSI)。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的群组:结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、胆管癌、胰腺癌和前列腺癌。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为抗PD-1抗体。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为抗IDO抗体。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为抗CTLA-4抗体。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为抗PD-L1抗体。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为抗LAG-3抗体。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中测试来自所述MSI癌症患者的样品以在所述给药步骤之前评估一种或多种微卫星标记的稳定性。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为人类化单克隆抗体。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为MK-3475。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体为IgG4抗体。
12. 根据权利要求8所述的方法,其中测试多种微卫星标记。
13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述一种或多种微卫星标记选自以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。
14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述多种微卫星标记包含BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。
15. 一种治疗癌症患者的方法,其包含:
测试来自癌症患者的样品并且测定选自以下组成的群组的一种或多种微卫星标记的不稳定性:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D;以及
向所述癌症患者授予抗PD-1抗体,其中所述癌症选自以下组成的群组:结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、胆管癌、胰腺癌和前列腺癌。
16. 一种对人类的肿瘤进行分类的方法,其包含:
测试来自所述人类的样品以评估一种或多种微卫星标记的稳定性;
测定在所述样品中的微卫星不稳定性;
将所述肿瘤标识为用于用免疫检查点抑制抗体治疗的良好候选物。
17. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包含以下步骤:
开用于所述人类的免疫检查点抑制抗体处方。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述一种或多种微卫星标记选自以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。
19. 根据权利要求16所述的方法,其中所述一种或多种微卫星标记选自以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。
20. 一种对人类的肿瘤进行分类的方法,其包含:
测试来自所述人类的样品以评估一种或多种微卫星标记的稳定性;
测定在所述样品中的微卫星稳定性;
将所述肿瘤标识为用于用免疫检查点抑制抗体治疗的不良候选物。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述人类用免疫检查点抑制抗体治疗,并且其进一步包含以下步骤:停止用免疫检查点抑制抗体进行的治疗。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述一种或多种微卫星标记选自由以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中所述一种或多种微卫星标记选自由以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D。

24. 一种治疗癌症患者的方法,其包含:

向癌症患者授予免疫检查点抑制抗体,其中所述癌症患者具有每个肿瘤至少100个体细胞突变的突变负荷。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体为抗PD-1抗体。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体为抗IDO抗体。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体为抗CTLA-4抗体。

28. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体为抗PD-L1抗体。

29. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体为抗LAG-3抗体。

30. 根据权利要求24所述的方法,其进一步包含在所述给药步骤之前测定在所述肿瘤中的高突变负荷。

检查点阻断和微卫星不稳定性

[0001] 本发明是在政府支持下在由美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的CA43460和CA62924下进行。政府在本发明中拥有某些权利。

技术领域

[0002] 本发明涉及癌症的领域。具体来说,它涉及癌症治疗。

背景技术

[0003] 微卫星不稳定性 (MSI) 为在微卫星中测序错误的累积。这在具有DNA错配修复的缺陷的肿瘤中出现。MSI存在于Lynch综合症,这是使患者倾向于结肠癌、子宫内膜癌、胃癌、卵巢癌、小肠癌、肝癌、肝胆癌、上泌尿道癌、脑癌和前列腺癌的遗传性癌症综合症。MSI还存在于10%至20%的散发性结肠直肠癌、胃癌、前列腺癌、肺癌、壶腹癌和子宫内膜癌。在0.3%和13%之间的胰腺癌还报告为MSI。

[0004] 在控制肿瘤转化的外生长中完整免疫监测的重要性已知道数十年。累积的证据显示在癌症组织中的肿瘤-浸润淋巴细胞 (TIL) 和各种恶性病的较好预后之间的相关性。具体来说,CD8+T细胞的存在和CD8+效应T细胞/FoxP3+调节T细胞的比率似乎与实体恶性病(如卵巢癌、结肠直肠癌和胰腺癌、肝细胞癌、恶性MEL和RCC) 的改善的预后和长期存活率相关。TIL可离体扩增和重新注入,诱导癌症如黑素瘤的持久目标肿瘤应答。

[0005] PD-1受体-配体相互作用为由肿瘤劫持的主要路径以抑制免疫控制。在健康条状况下在活化T细胞的细胞表面上表达的PD-1的正常功能下调不需要的或过度的免疫应答,包括自体免疫反应。用于PD-1的配体 (PD-L1和PD-L2) 组成性表达或可在各种肿瘤中诱导。PD-1配体结合到PD-1抑制通过T细胞受体触发的T细胞活化。PD-L1在各种非造血组织上,最显著地在血管内皮上以低水平表达,而PD-L2蛋白仅在淋巴组织或慢性发炎性环境中发现的抗原呈递细胞上可检测地表达。PD-L2被认为控制在淋巴器官中的免疫T细胞活化,而PD-L1用以减弱在外周组织中的不必要的T细胞功能。虽然健康器官表达极少(如果存在) PD-L1,但是证实多种癌症表达充足水平的此T细胞抑制剂。在肿瘤细胞上高表达的PD-L1(和较小程度的PD-L2) 已发现与各种癌症类型的较差预后和存活率相关,所述癌症类型包括肾细胞癌(RCC)、胰腺癌、肝细胞癌、卵巢癌和非小细胞肺癌(NSCLC)。此外,PD-1已被推荐调节在患有恶性MEL的患者中肿瘤特异性T细胞扩增。观察的临床预后与多种癌症的PD-L1表达的相关性表明PD-1/PD-L1路径在肿瘤免疫逃避中起重要作用,并且应被视为用于治疗性干预的有吸引力的目标。

[0006] 免疫检查点如细胞毒素T-淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 和程序性死亡-1 (PD-1) 的阻断示出患有癌症的患者的前景。CTLA-4和PD-1在活化的T细胞上上调并且向进行活化的T细胞提供抑制信号。在这些受体处导入的抑制抗体已经示出破坏免疫耐受并且促进抗肿瘤免疫力。MK-3475为针对PD-1的人类化单克隆IgG4抗体并且示出在包括黑素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC) 的多种肿瘤类型中的活性。先前,不同PD-1阻断抗体、BMS-936558、完全人类化单克隆IgG4抗体的活性还示出在黑素瘤、NSCLC中的活性和在患有结肠直肠癌的单个患者中

的完全应答。

[0007] MK-3475 (先前被称为SCH 900475) 为被设计成直接阻断PD-1和其配体,PD-L1和PD-L2之间的相互作用的IgG4/ κ 同型的强力和高度选择性人类化mAb。MK-3475含有S228P稳定突变并且不具有抗体依赖性细胞介导细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。MK-3475强有力地增强在来自健康人类供体、癌症患者和灵长类动物的培养血细胞中的T淋巴细胞免疫应答。在使用人类供体血细胞的T细胞活化测定中,EC50在0.1nM到0.3nM的范围内。MK-3475还调节白介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 γ (IFN γ) 和其它细胞介素的水平。抗体仅在抗原的存在下增强现有免疫应答并且不非特异性活化T细胞。

[0008] 程序性死亡1 (PD-1) 路径为抑制Th1细胞毒素免疫应答的负反馈系统,其如果未经调节,那么可损坏宿主¹⁻³。它在许多肿瘤和其周围微环境中上调。借助PD-1或其配体的抗体阻断此路径已导致在患有许多不同癌症类型的一些患者中显著临床应答,所述癌症类型包括黑素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、膀胱癌和霍奇金氏淋巴瘤⁴⁻¹⁰。在肿瘤细胞或免疫细胞的表面上PD-1的配体 (PD-L1或PD-L2) 的表达为重要的但不是用于对PD-1阻断的应答的决定性预测生物标记^{4,6-8,11}。

[0009] 我们被启发,在人类肿瘤中的PD-1阻断的影响的报告中,与很大比例的患有黑素瘤、肾细胞癌和肺肿瘤的患者相比,33位结肠直肠癌 (CRC) 患者中的仅一位对此治疗响应^{10,12}。关于此单个患者的不同是什么?我们假设此患者具有MMR缺陷,因为MMR缺陷在小部分的晚期CRC中出现,^{13,14}在肿瘤中发现的体细胞突变可通过患者自身的免疫系统识别,¹⁵并且MMR缺陷癌症具有比MMR活性CRC多10倍到100倍体细胞突变。¹⁶⁻¹⁸此外,MMR缺陷癌症含有显著的淋巴细胞浸润,与免疫应答一致¹⁹⁻²²。并且在Topalian等人¹⁰研究中大部分响应于PD-1阻断的肿瘤类型中的两种具有高数量的体细胞突变,由于暴露于香烟烟雾 (肺癌) 或UV辐射 (黑素瘤)^{23,24}。我们的假设为恰当的:响应于PD-1阻断的单个CRC患者的肿瘤为MMR缺陷。²⁵因此我们假设MMR缺陷肿瘤比MMR活性肿瘤更响应于PD-1阻断。

[0010] 为了测试此假设,我们开始阶段2临床试验以评估在其肿瘤具有或不具有MMR缺陷的患者中的免疫检查点阻断。因为在肿瘤中的MMR缺陷通过两个路线产生²⁶⁻²⁸,所以我们招募患有遗传非息肉病结肠直肠癌 (HNPCC,也被称为Lynch综合症) 的患者,所述HNPCC由在四个MMR基因中的一个中的遗传性生殖系缺陷接着在剩余野生型等位基因中第二失活躯体改变产生。我们还招募患有散发性MMR缺陷肿瘤的患者,其中MMR基因的两个等位基因通过体细胞突变或通过表观遗传沉默而失活²⁹。在任一情况下,产生的肿瘤具有数百或数千突变^{16,18}。

[0011] 在所属领域中存在持续需要来改进癌症治疗使得患者的生命不被削减并且因此生活品质不下降。

发明内容

[0012] 根据本发明的一个实施例,提供一种治疗癌症患者的方法。癌症患者具有高突变负荷,如在微卫星不稳定癌症 (MSI) 中发现。向癌症患者授予免疫检查点抑制抗体。

[0013] 根据本发明的另一个实施例,提供一种治疗癌症患者的方法。测试来自癌症患者的样品的一种或多种微卫星标记,其选自由以下组成的群组:BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21、NR-24、Penta C和Penta D,并且测定具有微卫星不稳定性。癌症选自由以下组成的群

组:结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、胆管癌、胰腺癌和前列腺癌。向癌症患者授予抗PD-1抗体。

[0014] 根据本发明的另一个实施例,提供一种用于对人类的肿瘤进行分类的方法。测试来自人类的样品以评估一种或多种微卫星标记的稳定性。在样品中测定微卫星不稳定性。肿瘤被标识为用于用免疫检查点抑制抗体治疗的良好候选物。

[0015] 根据本发明的另一实施例,提供一种用于对人类的肿瘤进行分类的方法。测试来自人类的样品以评估一种或多种微卫星标记的稳定性。测定在样品中的微卫星稳定性。肿瘤被标识为用于用免疫检查点抑制抗体治疗的不良候选物。

[0016] 所属领域的技术人员在阅读本说明书后将显而易见的这些和其它实施例提供所属领域中用于治疗微卫星不稳定的癌症的方法。

附图说明

[0017] 图1A至图1B.对派立珠单抗的临床应答。(图1A)生物化学应答。测量血清蛋白生物标记水平,其中每个循环和值表示从基线改变的百分比。如果基线肿瘤标记值大于正常值上限,那么包括患者。CA-125用于患有子宫内膜癌的患者;CA19-9用于一种胆管癌和一种壶腹癌;以及CEA用于所有其它患者。绿色、红色和黑色线分别表示患有MMR缺陷CRC、MMR活性CRC和MMR缺陷非CRC的患者。(图1B)放射应答。每隔一定间隔测量肿瘤应答并且值示出每个可测量肿瘤的最长直径的总和(SLD)从基线测量的最好的分率改变。

[0018] 图2A至图2D.根据MMR状态派立珠单抗的临床益处。 Kaplan-Meier curves)示出(图2A)结肠直肠癌群体的无进展存活期,(图2B)结肠直肠癌群体的总体存活期,(图2C)患有除结肠直肠癌外的MMR缺陷癌症的患者的无进展存活期(中值PFS=5.4个月;95%CI,3%到不可估计),和(图2D)患有除结肠直肠癌外的MMR缺陷癌症的患者的整体存活期。在患有MMR缺陷肿瘤(CRC和非CRC)两个群体中,未达到中值总体存活期。在患有MMR活性癌症的群体中的患者具有2.2个月的中值PFS(95%CI 1.4%到2.8%)和5.0个月的中值OS(95%CI 3.0到不可估计)。

[0019] 图3(图S2.)放射应答的蛛网图。每隔一定间隔测量肿瘤应答并且值示出每个可测量肿瘤的最长直径的总和(SLD)从基线测量的百分比改变。只有如果可获得基线和在研究的治疗扫描,那么才包括患者。绿色和红色分别表示患有MMR缺陷CRC和MMR活性CRC的患者。蓝色表示患有除CRC外的MMR缺陷癌症的患者。

[0020] 图4A至图4B(图S3).在加入研究之前MMR活性CRC和MMR缺陷CRC具有可比的转移性疾病的治疗和持续时间。关于此派立珠单抗研究的(图4A)紧接在加入研究之前治疗时间(HR 0.81,95%CI 0.38到1.752,p=.60)和(图4B)在加入之前转移性疾病的持续时间(HR 1.13,95%CI 0.49到2.62,p=.78)的 Kaplan-Meier 估计在MMR缺陷CRC群体和MMR活性CRC群体之间为可比的。在治疗难治性CRC群体中期望之前治疗的短持续时间。

[0021] 图5(图S4.)生物化学应答的瀑布图。测量血清蛋白生物标记水平,其中每个循环和值表示从基线改变的最好百分比。如果基线肿瘤标记值大于正常值上限,那么包括患者。CA-125用于患有子宫内膜癌的患者;CA19-9用于1种胆管癌和1种壶腹癌;以及CEA用于所有其它患者。绿色和红色分别表示患有MMR缺陷CRC和MMR活性CRC的患者。蓝色表示患有除CRC外的MMR缺陷癌症的患者。

[0022] 图6A至图6B(图S5.)在MMR缺陷肿瘤和MMR活性肿瘤中的体细胞突变。每个肿瘤的

总体细胞突变通过肿瘤的外显子组测序识别并且匹配正常DNA(图6A)和与客观应答的相关性(图6B)(非参数威尔科克森(Wilcoxon)测试, $p=0.007$ 和用于趋势的Jonckheere-Terpstra测试, $p=0.02$)。

[0023] 图7(图S6).CD8的免疫组织化学和PD-L1表达。从MMR缺陷CRC(受试者#16,顶部)和MMR活性CRC(受试者#3,底部)的侵袭性前缘(黄色虚线)。黄色虚线分离肿瘤(T)和正常(N)组织。在MMR缺陷肿瘤(上图)患者中存在PD-L1(蓝色箭头)和CD8(棕色点)的显著表达,而在MMR活性肿瘤(下图)中存在任一标记的极少表达。在用CD8(棕色点)的抗体免疫标记的另一MMR缺陷CRC(受试者#19,顶部)和MMR活性CRC(受试者#3,底部)中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的代表性图像。注意,在MMR缺陷肿瘤中CD8细胞的浸润。侵袭性前缘初始放大率 $10\times$ 和TIL $20\times$ 。

[0024] 图8(图S7.)在MMR缺陷和MMR活性肿瘤微环境中的CD8和PD-L1表达。T细胞密度单位为细胞/ mm^2 的肿瘤。侵袭性前缘是指在肿瘤和正常组织的接面处的免疫细胞(TIL和巨噬细胞)。使用未配对的t测试获得P值。

[0025] 图9(图S8.)派立珠单抗的CD8表达和临床益处。在瘤内 CD8^+ T细胞密度(细胞/ mm^2)和客观应答之间的相关性(用于趋势的Jonckheere-Terpstra测试, $p=0.02$)。

[0026] 图10(表S1.)免疫相关和RECIST应答判据(改编自Wolchok等人《临床癌症研究(Clin.Can.Res.)》2009;15:7412-20)的比较。

[0027] 图11(表S2.)对治疗的免疫相关应答

[0028] 图12(表S4.)总体细胞突变和突变相关联新抗原(MANA)与临床结果的相关性

[0029] 图13(表S5.)免疫标记与临床结果的相关性

具体实施方式

[0030] 本发明人已发现免疫检查点抑制剂在具有高突变负荷的肿瘤中起作用最好。此外,错配修复的肿瘤缺陷对特定形式的免疫治疗尤其敏感,因为此表现型以高频率产生突变的持续累积。本发明人已开发用于显示微卫星不稳定性表现型或其它高突变负荷的癌症患者的治疗。治疗包括用于免疫检查点的抑制抗体。此类检查点包括PD-1、IDO、CTLA-4、PD-L1和LAG-3。也可使用其它免疫检查点。抗体可通过方便的任何方式给药,其包括但不限于静脉内输注、口服给药、皮下给药、舌下给药、眼部给药、鼻给药等。

[0031] 微卫星不稳定性(MSI)肿瘤为DNA错配修复的缺陷,其导致高自发突变率和新抗原的表达的可能。此外,类似于黑素瘤,在MSI阳性结肠癌中,常常存在显著的淋巴细胞浸润。为MSI或以其它方式高突变负荷的任何肿瘤可根据本发明治疗。它们可根据所属领域中已知的任何方法测试MSI的属性,所述方法包括但不限于在下文实例1中所描述的。可测试一种或多种MSI标记中的任一种以测定MSI表现型。可通过识别每个基因组具有至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900个、至少1000个、至少1100个、至少1200个、至少1300个、至少1400个、至少1500个或至少1600个突变的肿瘤来测试样品的高突变负荷。高突变负荷意指相对于个人的正常组织在肿瘤中大量体细胞突变。在非MSI肿瘤中的体细胞突变的平均数为约70个体细胞突变。

[0032] 可根据本发明测试和/或治疗显示MSI表现型或高突变负荷的任何类型的肿瘤。这些包括但不限于结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、胆管癌、胰腺癌和前列腺癌。还可测试和/或治

疗壶腹、胆、脑的肿瘤,包括神经胶瘤、乳房、肺、皮肤、食道、肝、肾脏、卵巢、肉瘤、子宫、子宫颈、膀胱、睪丸、口腔、舌和小肠及大肠的肿瘤。

[0033] MSI的测试可通过所属领域中已知的任何方式实现。可测试以下标记中的一种或多种:五个几乎单态单核苷酸重复标记(BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21和NR-24)和两个高度多态的五核苷酸重复标记(Penta C和Penta D)。在可使用的一个市售系统中,荧光标记引物(标记板)用于所有七个以上举出的标记的共扩增。在扩增之后检测片段用于基因分型/表现型的分配。

[0034] 可测试MSI的样品包括肿瘤组织以及含有从肿瘤脱落的核酸的体液。测试此类组织和体液中的肿瘤DNA是众所周知的。

[0035] 可使用的抗体的类型包括开发用于免疫检查点抑制剂的任何类型。这些可为单克隆或多克隆。它们可为全抗体的单链片段或其它片段,包括通过酶断裂或重组DNA技术制备的那些。它们可为任何同型,包括但不限于IgG、IgM、IgE。抗体可为任何物种来源,包括人类、山羊、兔、小鼠、奶牛、黑猩猩。抗体可为人类化的或嵌合。抗体可经共轭或工程化以附接到另一部分,不管是治疗分子还是示踪剂分子。举例来说,治疗分子可为毒素。

[0036] 来自治疗具有和不具有MMR的缺陷的肿瘤的派立珠单抗的少量的阶段2试验的数据支持MMR缺陷肿瘤比MMR活性肿瘤更响应于PD-1阻断的假设。MMR缺陷在许多癌症中出现,包括结肠直肠、子宫、胃、胆道、胰腺、卵巢、前列腺和小肠的那些癌症^{18,34-42}。患有这些类型的MMR缺陷肿瘤的患者还得益于抗PD-1治疗,可如其肿瘤含有其它DNA修复缺陷的患者,如患有POLD,POLE或MYH突变的那些。^{18,43,44}

[0037] MMR缺陷肿瘤刺激免疫系统的假设不是新想法⁴⁵,并且已通过MMR缺陷肿瘤中观察的稠密免疫浸润和Th1相关细胞毒素富集环境支持。^{19-22,46}最近的研究通过示出MMR缺陷肿瘤微环境强有力地表达若干免疫检查点配体(包括PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3和IDO),表明其活性免疫微环境通过抵抗肿瘤去除的免疫抑制信号配衡⁴⁷,改善这些传统观察结果。与MMR缺陷癌瘤相关联的免疫浸润在新抗原处导入为旧发现和新发现两者的最可能解释。对在黑色素瘤⁴¹中的抗CTLA-4和在肺癌⁴⁸中的抗PD-1的较高突变负荷和较高应答率的相关性为MANA识别为内源性抗肿瘤免疫应答的重要组成部分的想法提供另外的支持。

[0038] 基于当前和先前研究的结果,我们建议大大(>20倍)增加的由MMR缺陷产生的突变相关联新抗原的数目(图12(表S4);还在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)为用于癌症的此基因限定子集的提高的抗PD-1应答性的基础。虽然我们对于在肿瘤中突变相关联新抗原的数目的估计仅基于结合-亲和力的经由计算机预测,但是此建议与MMR活性肿瘤具有比MMR缺陷肿瘤少的多的淋巴细胞的浸润的观察一致(图7(S6)、图8(S7)和图13(表S5);在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。近来的研究^{49,50}示出仅微小比例的预测的新表位实际在具有MHC的细胞表面上呈递并且为内源性T细胞应答的目标。似乎可能,尽管预测的突变相关联新抗原的数目与实际突变相关联新抗原的数目成比例,但是具有高数目的实际突变相关联新抗原的肿瘤更可能刺激免疫系统以针对肿瘤起反应。还应考虑到引起在MMR缺陷和MMR活性肿瘤之间的抗PD-1应答性的差异的替代机理。举例来说,在MMR缺陷和MMR活性肿瘤中活化的不同信令路径可产生可溶因子的分泌的差异,这可产生在肿瘤微环境内的PD-1路径的差别活化²⁶⁻²⁸。基因差异可影响改变肿瘤相关

联自身抗原的表达的表观遗传差异,其继而可改变肿瘤的抗原性。抗原特异性免疫应答的实验分析以及免疫微环境的改变应帮助限定这些因子对MMR缺陷肿瘤对PD-1抗体的显著应答性的相对贡献。

[0039] 在本研究的过程期间得到若干值得注意的观察结果。首先,在单剂量的治疗之后血清蛋白生物标记(比如CEA)的改变与临床益处一致。CEA水平的降低在目标放射证据之前若干个月;可能其它生物标记(如循环肿瘤DNA(ctDNA))作为早期应答的替代标记还可为有益的。^{51,52}第二,我们的结果表明肿瘤基因组的评估可帮助指导免疫治疗。它们支持变异的数量和类型可证明适用于甚至在MMR活性癌症中判定免疫检查点抑制剂的可能效用的观点^{41,48,53}最重要的是,我们的结果显示单独基于基因状态治疗特定类的肿瘤的新方法:即,不考虑基础肿瘤类型。

[0040] 以上公开内容通常描述本发明。本文公开的所有参考文件以引用的方式明确地并入。参考以下具体实例可获得更为彻底的理解,以下具体实例仅出于说明的目的而在本文提供,并且并不旨在限制本发明的范围。

[0041] 实例1

[0042] MSI测试

[0043] MSI测试已经标准化并且在CLIA认证的实验室中进行而不需要测定发展。存档肿瘤样品或新获得的活检体将用于测定MSI。MSI状态将通过用于合格的CLIA认证的免疫组织化学(IHC)或PCR类测试局部进行。可评估患者将使用来自在约翰霍普金斯(Johns Hopkins)的普洛麦格(Promega)的MSI分析系统确认。此测试将通过在五个几乎单态单核苷酸重复标记(BAT-25、BAT-26、MONO-27、NR-21和NR-24)中重复单元的插入或删除测定MSI状态。在中群体A和群体C中需要至少2个MSI基因座以为可评估的。患者可基于普洛麦格测试结果被指派到新群体和/或被替换。

[0044] 实例2

[0045] 方法

[0046] 患者

[0047] 从三个参与中心招募用于此阶段2研究的治疗难治性进行性转移性癌症患者(表1)。评估三个群体:群体A由患有MMR缺陷结肠直肠腺癌的患者构成;群体B由患有MMR活性结肠直肠腺癌的患者构成;以及群体C由患有除结肠直肠外的类型的MMR缺陷癌症的患者构成。

[0048] 研究监督

[0049] 可在NEJM.org发现的方案由每个场所的伦理审查委员会审批通过,并且所述研究根据赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)和良好临床实践规范的国际协调会(the International Conference on Harmonization Guidelines for Good Clinical Practice)议进行。在进入研究之前所有患者提供书面知情同意书。首席顾问调查员(D.L.)和研究发起者(L.A.D.)负责研究的监督。默克公司(Merck)捐赠研究药物,审查方案和此手稿的最终草案。临床研究主要通过慈善支持提供资金。

[0050] 研究设计

[0051] 此阶段2试验使用Green-Dahlberg二步法设计进行并且由上文所描述的三个并行群体组成。研究试剂,派立珠单抗(默克公司)每14天以10mg/kg静脉内给药。派立珠单抗为

阻断在PD-1和其配体(PD-L1和PD-L2)之间的相互作用的IgG4/ κ 同型的人类化单克隆抗PD-1抗体。

[0052] 在每个治疗之前进行安全评定。在每个循环的开始处进行经由血清生物标记的测量的总肿瘤负荷的评定。在12周和其后每8周进行放射性评定。关于临床方案的另外的细节在实例3中提供。

[0053] 错配修复状态的分析

[0054] 已知在MMR路径中具有基因缺陷的肿瘤具有数千体细胞突变,尤其在被称为微卫星的重复DNA的区域中。在基因组的这些区域中突变的累积被称为微卫星不稳定性(MSI)²⁶⁻²⁸。在肿瘤中使用来自普洛麦格的MSI分析系统评估MMR状态,通过选择的微卫星的评估当MMR受损时序列尤其倾向于复制错误²⁶⁻²⁸。参见额外细节的补充附录。

[0055] 基因体和生物信息学分析

[0056] 原发性肿瘤样品和匹配的正常外周血液试样从患有MMR缺陷的受试者和患有MMR活性癌瘤的其他受试者的子集获得,其中足够的肿瘤组织可用于外显子组测序³⁰和HLA单倍型分析。为了评估可能的突变体肽结合,与个别患者的MHC I类HLA单倍型组合的体细胞外显子组数据应用到表位预测算法^{31,32}。此算法提供在每个肿瘤中突变相关联新抗原的总数的估计。额外细节在补充附录中提供(在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。

[0057] 统计分析

[0058] 群体A和群体B的主要终点为使用免疫相关应答判据(irRC)³³评估的在20周时免疫相关客观应答率(irORR)和免疫相关无进展存活期(irPFS)率。群体C的主要终点为在20周时irPFS率。免疫相关判据(即,用于评估免疫类治疗的判据)基于放射应答,并且与RECIST判据不同,在疾病进展之后疾病的捕获程度;定义这些判据并且与在图10(表S1)中的RECIST v1.1相比。使用RECIST v1.1和irRC(图10(表S1)),评估在20周时的应答率和PFS率并且在此研究报告中报告。通过卡普兰-迈耶方法概括PFS和总体存活期。假设、拒绝虚假设的决策规则和用于有效和无效的早期停止规则以及统计方法的细节在补充附录中提供。

[0059] 实例3

[0060] 补充方法

[0061] 患者

[0062] 符合参与此研究中条件为,患者必须至少18岁的年龄,具有先前治疗的进行性癌瘤的组织学上确认证据。在入选之前所有患者进行MMR状态测试。所有患者具有如由实体肿瘤的应答评估判据(RECIST),版本1.1,东部肿瘤协作组(ECOG)性能状态评分为0或1定义的至少一个可测量的病变和足够血液功能、肝功能和肾功能。患有CRC的符合条件的患者必须已接受至少2种之前癌症治疗并且患有其它癌症类型的患者必须已接受至少1种之前癌症治疗。排除具有未经治疗脑癌转移、HIV病史、B型肝炎、C型肝炎、临床上显著腹水/积液,或自体免疫疾病的患者。

[0063] 研究监督

[0064] 手稿的初始草案由作者的子集准备并且所有作者提供最终手稿。所有作者做出决策提交用于公布的手稿。首席顾问调查员和研究发起者保证报告的数据的精确性和完整性以及对方案的遵守。

[0065] HLA分型

[0066] HLA-A、HLA-B和HLA-C基于序列的分型可分成三个不同步骤,如下所述。A通用、A*02特异性、B通用、B基团特异性、C通用和C*07特异性PCR和测序混合物在JHU核心机构中制得。Celera的AlleleSEQR HLA-B基于序列的分型试剂盒用于B通用SBT。HLA-A分型流程由两个PCR反应,A通用和A*02特异性构成。A通用扩增子涵盖部分外显子1-部分外显子5。A*02扩增子涵盖部分内含子1-部分外显子5。HLA-B分型流程由两个PCR反应,B通用和B基团特异性构成。B通用PCR为含有涵盖外显子2-外显子3和外显子4-外显子7的两个PCR扩增子的多工化反应。B基团特异性扩增子涵盖部分内含子1-部分外显子5。HLA-C分型流程由两个PCR反应,C通用和C*07特异性构成。C通用和C*07特异性扩增子涵盖外显子1-7。

[0067] HLA-A和B PCR的特异性采用AmpliTaq Gold DNA聚合酶。GeneAmp高保真度酶用于HLA-C和C*07PCR混合物。此酶为两种聚合酶的混合物:AmpliTaqDNA聚合酶(未校正聚合酶)和校正聚合酶。此酶混合物为产生较大全长HLA-C扩增子的高效和鲁棒扩增所必需的。

[0068] PCR产物纯化使用核酸外切酶I和虾碱性磷酸酶进行A通用和B通用扩增子针对外显子2、3、4双向测序。C通用扩增子针对外显子2、3双向测序并且针对外显子1、4、5、6、7在单方向上测序。A*02特异性、B基团特异性和C*07特异性扩增子针对外显子2、3在单方向上测序。所有测序反应用来自应用生物系统公司(Applied Biosystems)的Big Dye Terminator V1.1进行并且用ABI Prism 3500XL基因分析器测序。Conexio Genomic的“指派SBT(Assign SBT)”等位基因分配软件用于处理数据文件。

[0069] 错配修复状态测试^{1,2}

[0070] 将肿瘤和正常(不包括淋巴结或切除的界限)的六个载片切割(每个5微米)、去石蜡(二甲苯),并且一个用苏木精和曙红(H+E)染色。含有至少20%增生性细胞的肿瘤区域,由委员会认证的解剖学病理学家指定,使用Pinpoint DNA分离系统(加利福尼亚州尔湾的Zymo研究(Zymo Research, Irvine, CA))整个切下,在蛋白酶K中消化8小时并且DNA使用QIAamp DNA迷你试剂盒(加利福尼亚州巴伦西亚的凯杰(Qiagen, Valencia, CA))分离。MSI使用MSI分析系统(威斯康星州麦迪逊的普洛麦格(Promega, Madison, WI))评估,由检测MSI的5种拟单态单核苷酸重复序列(BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24和MONO-27)和证实在正常和肿瘤样品之间的标识的2-五核苷酸重复基因座(PentaC和PentaD)构成,根据制造商的说明书。在50ng至100DNA的扩增之后,在应用生物系统公司3130x1毛细电泳法仪器(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰(Invitrogen, Calsbad, CA))上测定荧光PCR产物尺寸。五核苷酸基因座确认在所有情况下的标识。对照包括作为阴性对照的水和作为阳性对照的80%生殖系DNA与20%MSI癌症DNA的混合物。针对每个微卫星基因座测定碱基的尺寸,并且如果与生殖系DNA相比两种或更多种单核苷酸基因座在长度上变化,那么肿瘤称为MSI。

[0071] 测序分析**[0072] 样品**

[0073] 提供样品作为进行病理检查以测定肿瘤细胞性的FFPE区块或冷冻组织。整个切下肿瘤以去除受到污染的正常组织,产生含有>20%增生性细胞的样品。提供匹配的正常样品,如血液、唾液或从手术获得的正常组织。

[0074] 样品制备和下一代测序³

[0075] 肿瘤和正常样品的样品制备、文库构建、外显子组捕获、下一代测序和生物信息学

分析在个人基因组诊断公司(Personal Genome Diagnostics, Inc.) (马里兰州巴尔的摩(Baltimore, Maryland)) 进行。简单来说,使用Qiagen DNA FFPE组织试剂盒或Qiagen DNA 血液迷你试剂盒(加利福尼亚州的凯杰)从冷冻或福马林固定的石蜡嵌入(FFPE)组织连同匹配的血液或唾液样品提取DNA。使来自肿瘤和正常样品的基因体DNA片段化并且根据制造商的说明书或如先前描述4用于Illumina TruSeq文库构建(加利福尼亚州圣地亚哥的伊路米那)。简单来说,使在100微升(μl)的TE中的50纳克(ng)至3微克(μg)的基因体DNA在Covaris超声发生器(马萨诸塞州沃本(Woburn, MA)的Covaris)中片段化到150bp至450bp的尺寸。为了去除小于150bp的片段,根据制造商的说明书,DNA使用以1.0比0.9的PCR产物与珠粒的比率的Agencourt AMPure XP珠粒(印第安纳州的贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter, IN))纯化两次并且使用70%乙醇洗涤。经纯化、片段化的DNA与36 μl 的H₂O、10 μl 的末端修复反应缓冲液、5的末端修复酶混合物(目录号E6050,马萨诸塞州伊普威治的NEB(NEB, Ipswich, MA))混合。根据制造商的说明书,100 μl 末端修复混合物在20 $^{\circ}\text{C}$ 下培育30min,并且使用以1.0比1.25的PCR产物与珠粒的比率的Agencourt AMPure XP珠粒(印第安纳州的贝克曼库尔特公司)纯化并且使用70%乙醇洗涤。对于A-尾部,42 μl 的经末端修复的DNA与5 μl 的10 \times dA加尾反应缓冲液和3 μl 的Klenow(胞外-) (目录号E6053,马萨诸塞州伊普威治的NEB)混合。根据制造商的说明书,50 μl 混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育30min,并且使用以1.0比1.0的PCR产物与珠粒的比率的Agencourt AMPure XP珠粒(印第安纳州的贝克曼库尔特公司)纯化并且使用70%乙醇洗涤。对于接头连接,25 μl 的A-加尾DNA与6.7 μl 的H₂O、3.3 μl 的PE-接头(伊路米那)、10 μl 的5 \times 连接缓冲液和5 μl 的Quick T4DNA连接酶(目录号E6056,马萨诸塞州伊普威治的NEB)混合。根据制造商的说明书,连接反应混合物在20 $^{\circ}\text{C}$ 下培育15min,并且使用以1.0比0.95和1.0的PCR产物与珠粒的比率的Agencourt AMPure XP珠粒(印第安纳州的贝克曼库尔特公司)纯化并且使用70%乙醇洗涤。为了获得扩增文库,设置每个25 μl 的十二个PCR,每个包括15.5 μl 的H₂O、5 μl 的5 \times Phusion HF缓冲液、0.5 μl 的含有每个10mM dNTP的dNTP混合物、1.25 μl 的DMSO、0.25 μl 的Illumina PE引子#1、0.25 μl 的Illumina PE引子#2、0.25 μl 的Hotstart Phusion聚合酶以及2 μl 的DNA。使用的PCR程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 维持2分钟;12个循环的98 $^{\circ}\text{C}$ 维持15秒,65 $^{\circ}\text{C}$ 维持30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 维持30秒;以及72 $^{\circ}\text{C}$ 维持5min。根据制造商的说明书,DNA使用以1.0比1.0的PCR产物与珠粒的比率的Agencourt AMPure XP珠粒(印第安纳州的贝克曼库尔特公司)纯化并且使用70%乙醇洗涤。根据制造商的说明书(加利福尼亚州圣克拉拉的安捷伦(Agilent, Santa Clara, CA))使用Agilent SureSelect v.4试剂盒在溶液中捕获外显子或目标区域。捕获的文库随后用Qiagen MinElute柱纯化试剂盒纯化并且在17 μl 的70 $^{\circ}\text{C}$ CEB中洗提以获得15 μl 的捕获的DNA文库。(5)捕获的DNA文库以以下方式扩增:设置八个30 μl PCR反应,每个含有19 μl 的H₂O、6 μl 的5 \times Phusion HF缓冲液、0.6 μl 的10mM dNTP、1.5 μl 的DMSO、0.30 μl 的Illumina PE引子#1、0.30 μl 的Illumina PE引子#2、0.30 μl 的Hotstart Phusion聚合酶以及2 μl 的捕获的外显子组文库。使用的PCR程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 维持30秒;14个循环(外显子组)或16个循环(目标)的98 $^{\circ}\text{C}$ 维持10秒,65 $^{\circ}\text{C}$ 维持30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 维持30秒;以及72 $^{\circ}\text{C}$ 维持5min。为了纯化PCR产物,按照制造商的说明书使用NucleoSpin Extract II纯化试剂盒(宾夕法尼亚州的Macherey-Nagel(Macherey-Nagel, PA))。使用Illumina HiSeq 2000/2500和Illumina MiSeq仪器(加利福尼亚州圣地亚哥的伊路米那)进行成对端测序,对于外显子组文库从片段的每个末端产生

100个碱基并且对于目标文库从片段的每个末端产生150个碱基。

[0076] 下一代测序数据的主要处理和推定的体细胞突变的识别³

[0077] 使用用于识别匹配的肿瘤和正常样品中的突变的VariantDx定制软件(马里兰州巴尔的摩的个人基因组诊断)识别体细胞突变。在称为突变之前,使用Illumina CASAVA软件(v1.8)对肿瘤和正常样品两者进行序列数据的主要处理,包括接头序列的掩蔽。使用Needleman-Wunsch方法⁵使用具有选择区域的附加再比对的ELAND对照人类参考基因组(版本hg18)比对序列读段。随后使用在全部外显子组或关注区任一者两端的VariantDx识别由点突变、插入和删除构成的候选体细胞突变。VariantDx检查肿瘤样品对照匹配的正常的序列比对同时应用过滤器以排除比对和测序伪影。简单来说,应用比对过滤器以排除在肿瘤中的质量不合格读段、不成对的读段和不良映射的读段。应用碱基质量过滤器以限制包括具有报告的phred质量评分>30(对于肿瘤)和>20(对于正常)的碱基。仅当(i)不同的成对读段含有肿瘤中的突变;(ii)含有肿瘤中的特定突变的不同成对读段的数目为读段对的至少10%;(iii)错配碱基不存在于匹配的正常样品中的>1%的读段中以及不存在于衍生自dbSNP的常见生殖系变体的定制数据库中;以及(iv)位置以>150×覆盖在肿瘤和正常两者中时,肿瘤中的突变被标识为候选体细胞突变。通过搜索参考基因组识别并且排除由错位基因组比对产生的突变(包括平行同源序列)。

[0078] 基于基因注释进一步过滤候选体细胞突变以识别在蛋白编码区中出现的那些。使用snpEff和使用从UCSC(<https://genome.ucsc.edu/>)在hg18上可获得的最新转录版本的CCDS、Refseq和Ensembl注释的定制数据库预测功能结果。当获得时,排序预测以偏好具有典型开始和终止密码子的转录物和在Ensembl上的CCDS或Refseq转录物。最后过滤突变以排除内含子和沉默改变,同时保持产生错义突变、无义突变、移码或剪接位点变异的突变。人工目检步骤用于进一步去除人为改变。

[0079] 突变体肽MHC结合预测

[0080] 基于个别患者的HLA单倍型对预测产生氨基酸改变的体细胞移码、插入、删除和错义突变分析可能的MHC I类结合。我们的初始分析集中于HLA-A和HLA-B。氨基酸突变与其相对应的CCDS寄存编号有关,并且在其中这为不可获得的情况下,Refseq或集合转录用于提取蛋白序列。为了识别8mer、9mer和10mer表位,识别围绕每个突变的氨基酸片段。通过表位预测程序NetMHC 3.4分析这些15、17和19突变体氨基酸片段。预测的亲合力<50nm的6个表位被认为是强可能结合子,并且预测的亲合力<500nm的表位被认为是弱可能结合子,如通过NetMHC基团6表明。

[0081] 为了进一步改善总新抗原负荷,我们对于每个突变体肽重复对于互补野生型肽的相同过程。当互补野生型肽预测为弱可能结合子时,随后我们过滤为强可能结合子的突变体肽。这些突变体肽被称作突变相关联新抗原(MANA)。在具有(例如情况1、17和21)单个MHC单倍型的患者不通过NetMHC 3.4支持的情况下,个别单倍型未包括在我们的分析中。

[0082] 统计方法

[0083] 试验的设计⁷

[0084] 此试验使用并行二步法设计进行以同时评估作为对于抗PD-1治疗的治疗选择标记的MK-3475和MSI的功效。它由在本文中描述的在三个患者群体中平行的二步法阶段2研究组成。研究试剂(MK-3475)每14天以10mg/kg静脉内给药。

[0085] 对于群体A和群体B中的每个,共主要终点在20周时为无进展存活期(irPFS),并且使用免疫相关判据评估客观应答(irOR)。步降守门程序用于保存总体I型误差。第二步法Green-Dahlberg设计用于评估irPFS,分别在15个和25个患者之后具有过渡和最终分析。在阶段1,在20周时需要15个中 ≥ 1 个无进展以继续第二阶段,并且随后在20周时需要25个中 ≥ 4 个无进展以继续对于irOR的测试,其中25个应答者中 ≥ 4 个(irCR或irPR)表明在该群体中有前景的功效。一旦在20周时确认 ≥ 4 个无进展和 ≥ 4 个应答,每个群体可出于功效而被终止,或一旦在阶段1中在20周时15个中0个为无进展或 ≥ 22 个受试者通过20周具有疾病进展,每个群体出于无效而被终止。此设计实现检测25%的20-周irPFS率的90%能力和检测21%的irOR率(irORR)的80%能力,具有在5%的20-周irPFS率和5%的irORR的虚假设下0.05的总体I型误差。

[0086] 对于群体C,主要终点为在20周时的irPFS。使用第二步法Green-Dahlberg第二步法设计,在14个和21个患者之后具有过渡和最终分析;在阶段1,在20周时需要14个中 ≥ 1 个无进展以继续第二阶段,其中在20周最后时21个中 ≥ 4 个无进展表明在群体C中的足够功效。一旦确认在20周时 ≥ 4 个无进展,所述群体可被终止。设计具有检测25%的20-周irPFS率的81%能力,具有在5%的20-周irPFS率的虚假设下5%的I型误差。

[0087] 统计分析

[0088] 使用RECIST v1.1和摘自Wolchok等人8的免疫相关应答判据(irRC)评估应答和进展,所述免疫相关应答判据使用二维肿瘤测量的结果的总和并且将新型病变并入总和。在20-周时的无进展存活期(PFS)率和irPFS率估计为在派立珠单抗开始之后在20周时为无疾病进展并且存活的患者比例。在20周之前具有疾病进展或在核对研究数据时参与 >20 周的患者包括在用于估计20-周PFS(irPFS)率的分析中。由于毒性或恶化疾病提前退出并且因此不具有20-周肿瘤评定的患者被视为具有进行性疾病。ORR(irORR)为实现CR或PR(irCR或irPR)的最好总体应答的患者比例。在所述研究中足够长以具有肿瘤应答评估的患者包括在用于估计应答率的分析中。在响应(CR或PR)的那些中,应答的持续时间为对疾病进展的时间的第一RECIST应答的时间,并且在对于不进展的应答者的最后一个可评估肿瘤评定时检查。

[0089] PFS和irPFS被定义为从初始剂量的日期到疾病进展的日期或由于任何原因死亡的日期的时间,无论哪个首先出现。在记录对于存活和无进展患者的不存在进行性疾病的最后一个可评估肿瘤评定的日期检查PFS和irPFS。总体存活期(OS)被定义为从初始剂量日期到由于任何原因死亡的时间。对于在分析时仍然存活的患者,在已知患者存活的最后一个日期检查OS时间。通过卡普兰-迈耶方法概括存活期时间。作为事后分析,对数秩测试用于比较群体A和群体B,并且基于Cox模型估计危害比。

[0090] 使用标志分析基于Cox回归模型评估在1个循环之后%CEA下降与PFS或OS的关联。对于相关研究,非参数威尔科克森测试用于比较在MMR缺陷和MMR活性患者之间的突变负荷。分别使用逻辑回归和Cox回归检查基线突变负荷和免疫标记对应答和存活期时间的影响。

[0091] 免疫组织化学和图像分析

[0092] 呈现B7-H1表达的膜性模式的恶性细胞的分率和在侵袭性前缘处的百分比通过如先前报告的三个病理学家(R.A.A.、F.B.和J.M.T.)定量9,10。图像分析用于测定CD8二氨基

联苯胺 (DAB) 染色的细胞的数目。对于每种情况使用H&E染色的载片,我们识别以下区域:i) 肿瘤 ii) 侵袭性前缘(恶性和非恶性组织之间的边界),和 iii) 正常组织。在Aperio ScanScope AT上以20×等效放大率(0.49微米每像素)扫描CD8染色的载片。使用Aperio ImageScope v12.1.0.5029在单独的层上注释对应于肿瘤、侵袭性前缘和正常组织(在上方,来自H&E)的区域。

[0093] 使用在PIP11中实施的定制算法计算在以上区域中的每个中的CD8阳性淋巴细胞密度。结果使用VIPS文库12转化成Deepzoom图像并且使用OpenSeadragon查看器(<http://openseadragon.github.io>)观测。

[0094] 仅用于实例3的参考文献

[0095] 1.Bacher JW,Flanagan LA,Smalley RL,等人。用于检测MSI高肿瘤的荧光多重测定的发展(Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors)。《疾病标记(Disease markers)》2004;20:237-50。

[0096] 2.Murphy KM,Zhang S,Geiger T,等人。用于测定结肠直肠癌中的微卫星不稳定性微卫星不稳定性分析系统和Bethesda板的比较(Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers)。《分子诊断学杂志(The Journal of molecular diagnostics)》:JMD 2006;8:305-11。

[0097] 3.Jones S,Anagnostou V,Lytle K,等人。用于癌症突变发现和解释的个人化基因组分析(Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation)。《科学翻译医学(Science translational medicine)》2015;7:283ra53。

[0098] 4.Sausen M,Leary RJ,Jones S,等人。集成的基因组分析识别在儿童癌症神经母细胞瘤中的ARID1A和ARID1B变异(Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma)。《自然·遗传学(Nature genetics)》2013;45:12-7。

[0099] 5.Needleman SB,Wunsch CD。一种适用于探索两种蛋白质的氨基酸序列的相似性的通用方法(A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins)。《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》1970;48:443-53。

[0100] 6.Lundegaard C,Lamberth K,Harndahl M,Buus S,Lund O,Nielsen M.NetMHC-3.0:对于长度8至11的肽的人类、小鼠和猴MHC I类亲和力的可接入预测的精确网(NetMHC-3.0:accurate web accessible predictions of human,mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11)。《核酸研究(Nucleic acids research)》2008;36:W509-12。

[0101] 7.Buyse M,Michiels S,Sargent DJ,Grothey A,Matheson A,de Gramont A。在临床试验中整合生物标记(Integrating biomarkers in clinical trials)。《分子诊断学专家综述(Expert review of molecular diagnostics)》2011;11:171-82。

[0102] 8.Wolchok JD,Hoos A,O'Day S,等人。在实体肿瘤中的免疫治疗活性的评估的指导原则:免疫相关应答判据(Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors:immune-related response criteria)。《临床癌症研究:美国

癌症研究协会的官方杂志 (Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》2009;15:7412-20。

[0103] 9.Llosa NJ,Cruise M,Tam A,等人。通过多种对抗抑制检查点平衡微卫星不稳定的结肠癌的强免疫微环境(The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints)。《癌症发现 (Cancer Discov)》2015:43-51。

[0104] 10.Taube JM,Anders RA,Young GD,等人。在人类黑素细胞病变中的具有B7-H1表达的发炎性应答的共定位支持免疫逃避的适应性抗性机制 (Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape)。《科学翻译医学 (Science Translational Medicine)》2012;4:127ra37。

[0105] 11.Cuka N,Hempel H,Sfanos K,De Marzo A,Cornish T.PIP:用于全部载片图像的多线程图像分析的开放源框架 (PIP:An Open Source Framework for Multithreaded Image Analysis of Whole Slide Images)。《实验室调查 (LABORATORY INVESTIGATION)》2014;94:398A-A。

[0106] 12.Cupitt J,Martinez K.VIPS:用于大图像的图像处理系统 (VIPS:an image processing system for large images)。《电子成像:科学和技术 (Electronic Imaging: Science &Technology)》;1996:光学和光子国际学会 (International Society for Optics and Photonics)。第19-28页。

[0107] 实例4

[0108] 患者

[0109] 41个连续患者参与并且在2013年9月和2015年1月之间治疗。(表1)。招募包括追求临床实验选择的已知患有具有错配修复的肿瘤或患有未知状态的肿瘤随后测试的患者。在MMR缺陷CRC群体中的一个患者在允许等级3胆红素水平的IRB合格放弃下参与。总共32个CRC患者参与到群体A和群体B中。除已接受一个化学治疗和一个(非PD1类)免疫治疗疗程的一个MMR活性患者以外,所有CRC患者接受>2个之前化疗疗程(中值=4)。

[0110] 诊断患有除CRC外的MMR缺陷实体肿瘤的九个受试者参与到群体C。所有群体C患者接受>1个之前癌症治疗(中值=2)。

[0111] 实例5

[0112] 主要终点评估

[0113] 对于群体A在20周时的irORR和irPFS(图11(表S2))为40%(10个患者中的4个;95%CI,12%到74%)和78%(9个患者中的7个;95%CI,40%到97%),并且对于群体C为71%(7个患者中的5个;95%CI,29%到96%)和67%(6个患者中的4个;95%CI,22%到96%)。在群体B中,其由患有MMR活性CRC的患者组成,irORR和20-周irPFS为0%(95%CI,0%到20%)和11%(18个患者中的2个;95%CI,1%到35%)。当在20周时四个受试者为无疾病进展并且基于免疫相关应答判据观察到四个客观应答时,MMR缺陷群体A和群体C两者达到其预先确定的对于功效的提早停止规则(图11(表S2);在《新英格兰医学杂志 (New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中;以及上述补充方法)。

[0114] 对于患者的跟踪中值时间,对于患有MMR缺陷CRC的患者(群体A)为32周(范围,5周至51周),对于患有MMR活性CRC的患者(群体B)为12周(范围,2周至56周),并且对于患有MMR缺陷非CRC肿瘤的患者(群体C)为12周(范围,4周至42周)。可评估20周irPFS的所有患者追踪至少20周。

[0115] 实例6

[0116] 放射评估

[0117] 在群体A中的十个可评估MMR缺陷CRC患者中,通过RECIST判据四个(40%;95%CI,12%至74%)实现客观应答(表2,图1和图3(S2))。除非患者进行12-周扫描,否则患者被认为不可评估。疾病控制率被定义为实现客观应答或其疾病稳定的患者的分率,并且在群体A中为90%(10个患者中的9个;95%CI,55%至100%)。

[0118] 参与在群体C中的患有除CRC外的MMR缺陷癌症类型七个可评估患者中,使用RECIST判据,五个(71%;95%CI,29%至96%)实现客观应答(表2,图3(S2)和图1)并且疾病控制率为71%(7个患者中的5个;95%CI,29%至96%)。

[0119] 在群体C中的患者比在群体A中的患者应答更快(通过RECIST的12周对28周的应答中值时间, $p=0.03$)。此外,不与Lynch综合症相关联的所有六种MMR缺陷肿瘤(100%)实现客观应答,而与Lynch综合症相关联的十一种肿瘤中仅三种(27%)响应(表S3; $p=0.009$;可在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;并且以引用的方式并入本文中)。无其它基线特征示出与客观应答的统计显著关联。

[0120] 在群体B中患有MMR活性CRC的18个患者中,使用RECIST判据未观察到客观应答(表2,图3(S2)和图1),并且疾病控制率为11%(18个患者中的2;95%CI,1%到35%)。

[0121] 通过RECIST判据实现应答的所有患者(图11(表2))还通过免疫相关应答判据实现应答(图11(表S2))。

[0122] 实例7

[0123] 存活期

[0124] 在群体A中,患有MMR缺陷CRC的患者,未达到中值无进展存活期(PFS)和中值总体存活期(OS)(图2)。相比之下,在群体B中患有MMR活性癌症的患者实现仅2.2个月的PFS(95%CI,1.4至2.8)和5.0个月的中值OS(95%CI,3.0到不可估计)。在群体C(MMR缺陷非CRC)中,中值PFS为5.4个月(95%CI,3到不可估计)并且未达到中值OS。

[0125] MMR缺陷和活性CRC群体的事后(图2)比较示出对于疾病进展的危害比率(HR)($HR=0.10$;95%CI,0.03至0.37; $p<0.001$)和总体存活期($HR=0.22$;95%CI,0.05至1.00; $p=0.05$),有利于患有MMR缺陷CRC的患者。

[0126] 为了评估存活期的差异是否可由于预测差异,我们测量已诊断患有转移性疾病的患者的持续时间和在入选之前关于其先前疗程的患者的临床表现。我们发现在MMR缺陷对MMR活性CRC患者之间在关于其之前方案的转移性疾病的持续时间($p=0.77$;对数秩测试)或中值PFS($p=0.60$,对数秩测试)方面不存在显著差异(图4(S3))。我们还进行PFS和OS的附加多变量分析以检查调节自从初始诊断经过的时间的在MMR缺陷CRC和MMR活性肿瘤之间结果的差异。在调节此可能差异之后,对于PFS($HR=0.04$,95%CI 0.01至0.21, $P<0.001$)和OS($HR=0.18$,95%CI 0.03至1.01, $P=0.05$)维持危害比率的量级,其表示在MMR缺陷和活性肿瘤之间派立珠单抗的不同影响。

[0127] 实例8

[0128] 安全评定

[0129] 出现在>5%的患者中的不良事件在表3中列出。选择不良事件包括皮疹/瘙痒(24%)、甲状腺炎/甲状腺功能低下/垂体炎(10%)和无症状的胰脏炎(15%)。虽然数量为少量的,但是甲状腺功能异常限于MMR缺陷群体(表3)。

[0130] 实例9

[0131] 肿瘤标记

[0132] 在两个CRC群体中,在入选之前的32个患者中的29个中,基线CEA为可评估并且高于正常值上限(3mg/dl)。主要CEA降低在十个患有MMR缺陷CRC的患者中的七个中出现,而在19个患有MMR活性CRC的患者中没有出现,其中CEA为可评估的(图1和图5(S4))。在非CRC MMR缺陷患者中,在四个患者中肿瘤标记水平(CEA、CA19-9或CA-125)高于正常值上限。>70%的CA19-9或CA-125降低在这些四个患者中的三个中出现。所有3个群体的肿瘤标记动力学在图1中示出。在1剂量(在14天和28天之间)的派立珠单抗之后CEA下降的水平预测无进展($p=0.01$)和总体存活期结果 $p=0.02$ 两者。CEA应答在疾病控制的放射确认之前很好地出现(范围,10周到35周)。相比之下,进展的患者在开始治疗的30天内示出快速生物标记上升。因此,CEA水平的改变显著在之前并且与最终放射改变相关。

[0133] 实例10

[0134] 基因体分析

[0135] 相较于在MMR活性患者($n=6$)中每个肿瘤73个突变,全部外显子组序列的分析示出在MMR缺陷患者($n=9$)中每个肿瘤1,782个体细胞突变的平均值(非参数威尔科克森测试 $p=0.007$)(图6A至图6B(S5);同样参见表S3,其在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。预测这些突变的大部分(63%)改变氨基酸。

[0136] 随后在每个患者的个别MHC单倍型的情形下评估这些突变的免疫原性可能。由此我们分别从MMR缺陷和MMR活性患者的肿瘤识别578个和21个潜在突变相关联新抗原的平均值(表S3;其在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。在所有体细胞突变中潜在突变相关联新抗原的分率在两个群体中类似(在MMR缺陷和活性患者中取平均值分别为32%和29%)。高数量的体细胞突变和潜在突变相关联新抗原与改善的无进展存活期相关联并且与有利于客观应答的趋势相关联(图13(S5)和图12(表S4);同样在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。

[0137] 实例11

[0138] 免疫组织化学

[0139] 在其中肿瘤组织可获得的30种情况下通过免疫组织化学在肿瘤内和在肿瘤的侵袭性前缘处评估CD8和PD-L1的表达,(图7(S6);同样在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方式并入本文中)。来自群体A和群体C中的患者的肿瘤含有确实比来自群体B患者的肿瘤更大密度的CD8阳性淋巴细胞(图8(S7); $p=0.10$),并且CD8标记与有助于客观应答和稳定疾病的趋势相关联(图9(S8)和图13(表S5);同样在《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》在线获得;以引用的方

式并入本文中)。此CD8阳性淋巴浸润在肿瘤的侵袭性前缘处尤其显著(图8(S7); $p=0.04$)。显著膜性PD-L1表达仅在MMR缺陷患者中出现并且在位于肿瘤的侵袭性前缘处的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和肿瘤相关联的巨噬细胞上显著(图8(S7); $p=0.04$)。CD8和PD-L1的表达不以统计方式与PFS或OS相关联(图13(表S5))。

[0140] 表1. 患者的人口统计和基线特征

[0141]

特征	MMR 缺陷 CRC n=11	MRC 活性 CRC n=21	p 值 ¹	MMR 缺陷非 CRC n=9
年龄				
中值	46	61	0.02	57
范围	(24-65)	(32-79)		(34-92)
性别-数 (%)				
女性	5 (45)	8 (38)	0.72	4 (44)
男性	6 (55)	13 (62)		5 (56)
人种-数 (%)				
白人	8 (73)	17 (81)	0.66	8 (89)

[0142]

	黑人	1 (9)	3 (14)		0 (0)
	其它	2 (18)	1 (5)		1 (11)
ECOG 性能状态-数 (%) ²					
	0	0 (0)	6 (29)	0.07	2 (22)
	1	11 (100)	15 (71)		7 (78)
诊断-数 (%)					
	结肠	9 (82)	18 (86)	>0.99	0 (0)
	直肠	2 (18)	3 (14)		0 (0)
	壶腹部/胆管癌	0 (0)	N/A		4 (44)
	子宫内膜	0 (0)	N/A		2 (22)
	小肠	0 (0)	N/A		2 (22)
	胃	0 (0)	N/A		1 (11)
组织结构-数 (%)					
	很好/中度分化	7 (64)	18 (86)	0.20	4 (44)
	不良分化	4 (36)	3 (14)		3 (33)
	其它	0 (0)	0 (0)		2 (22)
阶段 IV-数 (%)					
		(11) 100	21 (100)	>0.99	9 (100)
肝癌转移-数 (%)					
		6 (55)	11 (52)	>0.99	6 (67)
自从第一次诊断的时间-月					
	中值	31	58	0.07	23
	范围 [†]	6-95	27-192		2-105
之前系统性治疗-数 (%)					
	0	0 (0)	0 (0)	0.89	1 (11)
	2	3 (27)	4 (19)		5 (56)
	3	3 (27)	5 (24)		1 (11)
	>4	5 (45)	12 (57)		2 (22)
检测的生殖系突变或已知 Lynch-数 (%)					
	是	9 (82)	0 (0)	<0.001	4 (44)
	否	2 (18)	21 (100)		4 (44)
	未知	0 (0)	0 (0)		1 (11)
BRAF 野生型-数 (%)					
	是	8 (73)	11 (52)	0.64	4 (44)
	否	0 (0)	1 (5)		0 (0)
	未知	3 (27)	9 (43)		5 (56)
KRAS 野生型-数 (%)					
	是	6 (55)	13 (62)	0.72	4 (44)
	否	5 (45)	8 (38)		1 (11)
	未知	0 (0)	0 (0)		4 (44)

[0143] MMR, 错配修复; CRC, 结肠直肠癌

[0144] ¹MMR缺陷CRC对MMR活性CRC[0145] ²ECOG, 东部肿瘤协作组

[0146] 表2. 目标RECIST应答

[0147]

应答的类型-数 (%)	MMR 缺陷 CRC n=10	MRC 活性 CRC n=18	MMR 缺陷非 CRC n=7
完全应答	0 (0)	0 (0)	1 (14) ¹
部分应答	4 (40)	0 (0)	4 (57) ²
稳定疾病 (第 12 周)	5 (50)	2 (11)	0 (0)
进行性疾病	1 (10)	11 (61)	2 (29)
不可评估 ³	0 (0)	5 (28)	0 (0)
客观应答率(%)	40	0	71
95% CI	12-74	0-19	29-96
疾病控制率 (%) ⁴	90	11	71
95% CI	55-100	1-35	29-96
应答的持续时间-中值周数	未达到	N/A ⁵	未达到
应答的时间, 中值周数 (范围)	28 (13-35)	N/A ⁵	11 (10-13)

[0148] ¹转化成在20周时的CR的在12周时的原始PR[0149] ²在12周时一个PR[0150] ³如果患者由于临床进展不进行第12周扫描,那么认为患者不可评估。[0151] ⁴疾病控制率被定义为具有完全应答、部分应答或稳定疾病维持12周或更多的患者的百分比。[0152] ⁵对于MMR活性CRC患者无应答记录

[0153] 表3. 药物相关不良事件

[0154]

事件-数 (%) ¹	所有等级 N=41	等级 3 或 4 N=41
任何	40 (98)	17 (41)
血液和淋巴		
贫血	8 (20)	7 (17)
淋巴球减少症	8 (20)	8 (20)
心肌		
窦性心动过速	4 (10)	0
皮肤病学		
皮肤干燥	5 (12)	0
皮疹/瘙痒	10 (24)	0
内分泌病症		
甲状腺炎/甲状腺功能低下/垂体炎	4 (10)	0
肠胃		
腹痛	10 (24)	0
厌食	4 (10)	0
便秘	8 (20)	0
腹泻	10 (24)	2 (5)
口干	5 (12)	0

[0155]

	恶心	5 (12)	0
	肠梗阻	3 (7)	3(7)
肝胆			
	ALT, 较高	3 (7)	2(5)
	胰腺炎 ²	6 (15)	0
代谢和营养			
	低白蛋白血症	4 (10)	4(10)
	低钠血症	3 (7)	3(7)
肌肉骨骼			
	关节痛	7 (17)	0
	肌痛	6 (15)	0
神经系统			
	眩晕	4 (10)	0
	头痛	7 (17)	0
精神			
	失眠	3 (7)	0
呼吸道 ³			
	过敏性鼻炎	12 (29)	0
	咳嗽	4 (10)	0
	呼吸困难	6 (15)	0
	上呼吸道感染	3 (7)	0
其它			
	不耐冷	6 (15)	0
	水肿	4 (10)	0
	疲劳	13 (32)	0
	发热	5 (12)	0
	疼痛	14 (34)	0

[0156] ¹不良事件在大于5%的患者中出现

[0157] ²胰腺炎的所有情况为无症状的

[0158] ³一个肺炎发病率(2%)

[0159] 参考文献

[0160] 所引用的每一文献的公开内容明确地并入本文中。

[0161] 1.Nishimura H,Okazaki T,Tanaka Y,等人。在PD-1受体缺陷小鼠中的自体免疫扩张型心肌症(Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice)。《科学(Science)》2001;291:319-22。

[0162] 2.Chen L.在T细胞免疫力的控制中的B7-CD28家族的共抑制分子(Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity)。《自然·免疫学综述(Nat Rev Immunol)》2004;4:336-47。

[0163] 3.Nishimura H,Nose M,Hiai H,Minato N,Honjo T.通过破坏编码携带ITIM基序的免疫受体的PD-1基因的狼疮类自体免疫疾病的发展(Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor)。《免疫力(Immunity)》1999;11:141-51。

[0164] 4. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, 等人。在复发或难治性霍奇金氏淋巴瘤中借助尼沃单抗的PD-1阻断 (PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma)。《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》2015;372:311-9。

[0165] 5. Hamid O, Robert C, Daud A, 等人。在黑素瘤中拉立珠单抗 (抗PD-1) 的安全和肿瘤应答 (Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma)。《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》2013;369:134-44。

[0166] 6. Herbst RS, Soria JC, Kowanz M, 等人。在癌症患者中预测的对抗PD-L1抗体 MPDL3280A 的应答的相关性 (Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients)。《自然 (Nature)》2014;515:563-7。

[0167] 7. Powles T, Eder JP, Fine GD, 等人。MPDL3280A (抗PD-L1) 治疗导致转移性膀胱癌的临床活性 (MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer)。《自然 (Nature)》2014;515:558-62。

[0168] 8. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, 等人。接受尼沃单抗的患有晚期黑素瘤的患者的存活期、持久肿瘤缓解和长期的安全 (Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab)。《临床肿瘤学杂志: 美国临床肿瘤学学会的官方杂志 (Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology)》2014;32:1020-30。

[0169] 9. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, 等人。在患有晚期癌症的患者中抗PD-L1抗体的安全和活性 (Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer)。《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》2012;366:2455-65。

[0170] 10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, 等人。在癌症中抗PD-1抗体的安全、活性和免疫相关性 (Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer)。《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》2012;366:2443-54。

[0171] 11. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, 等人。PD-1、PD-1配体和肿瘤免疫微环境的其它特征与对抗PD-1治疗的应答的关联 (Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy)。《临床癌症研究: 美国癌症研究协会的官方杂志 (Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research)》2014;20:5064-74。

[0172] 12. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, 等人。在难治性实体肿瘤中单个试剂抗程序性死亡-1 (MDX-1106) 的I期研究: 安全、临床活性、药效动力学和免疫相关性 (Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates)。《临床肿瘤学杂志: 美国临床肿瘤学学会的官方杂志 (Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology)》2010;28:3167-

75。

[0173] 13.Koopman M,Kortman GAM,Mekenkamp L等人。在患有散发性晚期结肠直肠癌的患者中的缺陷错配修复系统(Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer)。《英国癌症杂志(Br J Cancer)》;0000;100:266-73。

[0174] 14.Goldstein J,Tran B,Ensor J,等人。具有高水平微卫星不稳定性(MSI-H)的转移性结肠直肠癌(CRC)的多中心回顾性分析(Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer(CRC)with high-level microsatellite instability(MSI-H))。《肿瘤学年鉴:欧洲医疗肿瘤学学会/ESMO的官方杂志(Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO)》2014;25:1032-8。

[0175] 15.Segal NH,Parsons DW,Peggs KS,等人。乳房和结肠直肠癌的表位概貌(Epitope landscape in breast and colorectal cancer)。《癌症研究(Cancer research)》2008;68:889-92。

[0176] 16.Timmermann B,Kerick M,Roehr C,等人。通过全部外显子组下一代测序和生物信息学分析识别的MSI和MSS结肠直肠癌的体细胞突变图谱(Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis)。《科学公共图书馆综合卷(PloS one)》2010;5:e15661。

[0177] 17.Eshleman JR,Lang EZ,Bowerfind GK,等人。在结肠癌中在hprt基因座处增加的突变率伴随微卫星不稳定性(Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer)。《癌基因(Oncogene)》1995;10:33-7。

[0178] 18.人类结肠和直肠癌的全面分子表征(Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer)。《自然(Nature)》2012;487:330-7。

[0179] 19.Dolcetti R,Viel A,Doglioni C,等人。在具有微卫星不稳定性的结肠直肠癌中活化的上皮内的细胞毒素T淋巴细胞和增加的瘤性细胞凋亡的高发病率(Highprevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability)。《美国病理学杂志(The American journal of pathology)》1999;154:1805-13。

[0180] 20.Alexander J,Watanabe T,Wu TT,Rashid A,Li S,Hamilton SR。具有微卫星不稳定性的结肠癌的组织病理学识别(Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability)。《美国病理学杂志(The American journal of pathology)》2001;158:527-35。

[0181] 21.Smyrk TC,Watson P,Kaul K,Lynch HT。肿瘤浸润淋巴细胞为结肠直肠癌中微卫星不稳定性的标记(Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma)。《癌症(Cancer)》2001;91:

2417-22。

[0182] 22.Young J,Simms LA,Biden KG,等人。具有在家族性和散发性环境中出现的高水平微卫星不稳定性的结肠直肠癌的特征:致瘤作用的平行路径(Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings:parallel pathways of tumorigenesis)。《美国病理学杂志(The American journal of pathology)》2001;159:2107-16。

[0183] 23.Berger MF,Hodis E,Heffernan TP,等人。黑素瘤基因组测序揭示频繁PREX2突变(Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2mutations)。《自然(Nature)》2012;485:502-6。

[0184] 24.Lee W,Jiang Z,Liu J,等人。通过来自肺癌患者的成对基因组序列揭示的突变频谱(The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient)。《自然(Nature)》2010;465:473-7。

[0185] 25.Lipson EJ,Sharfman WH,Drake CG,等人。借助抗PD-1抗体的持久癌症回归停药治疗和有效再诱导治疗(Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1antibody)。《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志(Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》2013;19:462-8。

[0186] 26.Boland CR,Goel A。在结肠直肠癌中的微卫星不稳定性(Microsatellite instability in colorectal cancer)。《胃肠病学(Gastroenterology)》2010;138:2073-87e3。

[0187] 27.Lynch HT,de la Chapelle A。遗传结肠直肠癌(Hereditary colorectal cancer)。《新英格兰医学杂志(The New England journal of medicine)》2003;348:919-32。

[0188] 28.Yamamoto H,Imai K,Perucho M。微卫星突变基因表现型路径的肠胃癌(Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway)。《胃肠病学杂志(Journal of gastroenterology)》2002;37:153-63。

[0189] 29.Herman JG,Umar A,Polyak K,等人。在结肠直肠癌中的hMLH1启动子高甲基化的发病率和功能结果(Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma)。《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》1998;95:6870-5。

[0190] 30.Jones S,Anagnostou V,Lytle K,等人。用于癌症突变发现和解释的个人化基因体分析(Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation)。《科学翻译医学(Science translational medicine)》2015;7:283ra53。

[0191] 31.Lundegaard C,Lamberth K,Harndahl M,Buus S,Lund O,Nielsen M.NetMHC-3.0:对于长度8至11的肽的人类、小鼠和猴MHC I类亲和力的可接入预测的精确网(NetMHC-3.0:accurate web accessible predictions of human,mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11)。《核酸研究(Nucleic acids research)》2008;36:W509-12。

[0192] 32.Lundegaard C,Lund O,Nielsen M.对于使用在9mer上训练的预测工具预测对于长度8、10和11的肽的I类MHC亲和力的精确估算方法(Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8,10 and 11 using prediction tools trained on 9mers)。《生物信息学(Bioinformatics)》2008;24:1397-8。

[0193] 33.Wolchok JD,Hoos A,O'Day S,等人。在实体肿瘤中的免疫治疗活性的评估的指导原则:免疫相关应答判据(Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors:immune-related response criteria)。《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志(Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》2009;15:7412-20。

[0194] 34.Maple JT,Smyrk TC,Boardman LA,Johnson RA,Thibodeau SN,Chari ST.在患有胰脏癌的长期的(>或=3年)存活者中的缺陷的DNA错配修复(Defective DNA mismatch repair in long-term(>or=3years) survivors with pancreatic cancer)。《胰腺学(Pancreatology)》2005;5:220-7;论述7-8。

[0195] 35.Meltzer SJ,Yin J,Manin B,等人。微卫星不稳定性经常地且在Barrett's相关联食道腺癌的二倍体和非整倍体细胞群体两者中出现(Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's-associated esophageal adenocarcinomas)。《癌症研究(Cancer research)》1994;54:3379-82。

[0196] 36.Nakata B,Wang YQ,Yashiro M,等人。在可切除胰脏癌中的微卫星不稳定性的预测值(Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer)。《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志((Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》2002;8:2536-40。

[0197] 37.胃腺癌的全面分子表征(Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma)。《自然(Nature)》2014;513:202-9。

[0198] 38.Agaram NP,Shia J,Tang LH,Klimstra DS.在壶腹癌中的DNA错配修复缺陷:54种情况的形态学和免疫组织化学研究(DNA mismatch repair deficiency in ampullary carcinoma:a morphologic and immunohistochemical study of 54cases)。《美国临床病理学杂志(American journal of clinical pathology)》2010;133:772-80。

[0199] 39.Kandoth C,Schultz N,Cherniack AD,等人。子宫内膜癌的集成的基因体表征(Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma)。《自然(Nature)》2013;497:67-73。

[0200] 40.Garg K,Leitao MM,Jr.,Kauff ND,等人。使用患者年龄和肿瘤形态的DNA错配修复蛋白免疫组织化学的子宫内膜癌的选择增强错配修复异常的检测(Selection of endometrial carcinomas for DNA mismatch repair protein immunohistochemistry using patient age and tumor morphology enhances detection of mismatch repair abnormalities)。《美国外科病理学杂志(The American journal of surgical pathology)》2009;33:925-33。

- [0201] 41. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, 等人。用于在黑素瘤中对CTLA-4阻断的临床响应的基因基础 (Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma)。《新英格兰医学杂志 (The New England journal of medicine)》2014;371:2189-99。
- [0202] 42. Williams AS, Huang WY。在结肠外肠胃恶性肿瘤中的微卫星不稳定性的分析 (The analysis of microsatellite instability in extracolonic gastrointestinal malignancy)。《病理学 (Pathology)》2013;45:540-52。
- [0203] 43. Jones S, Emmeron P, Maynard J, 等人。在易患多种结肠直肠腺瘤和体细胞G:C→T:A突变的MYH中的双等位基因的生殖系突变 (Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations)。《人类分子遗传学 (Human Molecular Genetics)》2002;11:2961-7。
- [0204] 44. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, 等人。影响易患结肠直肠腺瘤和癌瘤的POLE和POLD1的校正域的生殖系突变 (Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas)。《自然·遗传学 (Nature genetics)》2013;45:136-44。
- [0205] 45. Bodmer W, Bishop T, Karran P。在结肠直肠癌中的基因步骤 (Genetic steps in colorectal cancer)。《自然·遗传学 (Nature genetics)》1994;6:217-9。
- [0206] 46. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR。具有在微卫星序列中的DNA复制错误的散发性结肠直肠癌的临床和病理特征 (Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences)。《美国病理学杂志 (The American journal of pathology)》1994;145:148-56。
- [0207] 47. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, 等人。通过多种对抗抑制检查点平衡微卫星不稳定的结肠癌的强免疫微环境 (The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints)。《癌症发现 (Cancer Discov)》2015:43-51。[本公开通过联合本发明人中的一些作出。]
- [0208] 48. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, 等人。突变概貌确定对在非小细胞肺癌中的PD-1阻断的敏感性 (Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer)。《科学 (Science)》2015。
- [0209] 49. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, 等人。检查点阻断癌症免疫治疗靶向肿瘤特异性突变体抗原 (Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens)。《自然 (Nature)》2014;515:577-81。
- [0210] 50. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, 等人。高通量表位发现揭示通过在人类黑素瘤中的CD4+ T细胞的新抗原的频繁识别 (High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma)。《自然·医学 (Nature medicine)》2015;21:81-5。
- [0211] 51. Lipson EJ, Velculescu VE, Pritchard TS, 等人。循环肿瘤DNA分析作为用于监测在用免疫检查点阻断进行治疗的黑素瘤患者中的肿瘤负荷的实时方法 (Circulating

tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade)。《癌症免疫治疗杂志(Journal for immunotherapy of cancer)》2014;2:42。

[0212] 52.Diaz LA,Jr.,Bardelli A.液体活检体:基因分型循环肿瘤DNA(Liquid biopsies:genotyping circulating tumor DNA)。《临床肿瘤学杂志:美国临床肿瘤学学会的官方杂志(Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology)》2014;32:579-86。

[0213] 53.Yadav M,Jhunjhunwala S,Phung QT,等人,通过组合质谱和外显子组测序预测免疫原性肿瘤突变(Predicting Immunogenic Tumour Mutations by Combining Mass Spectrometry and Exome Sequencing)。《自然(Nature)》2014;515:572-6。

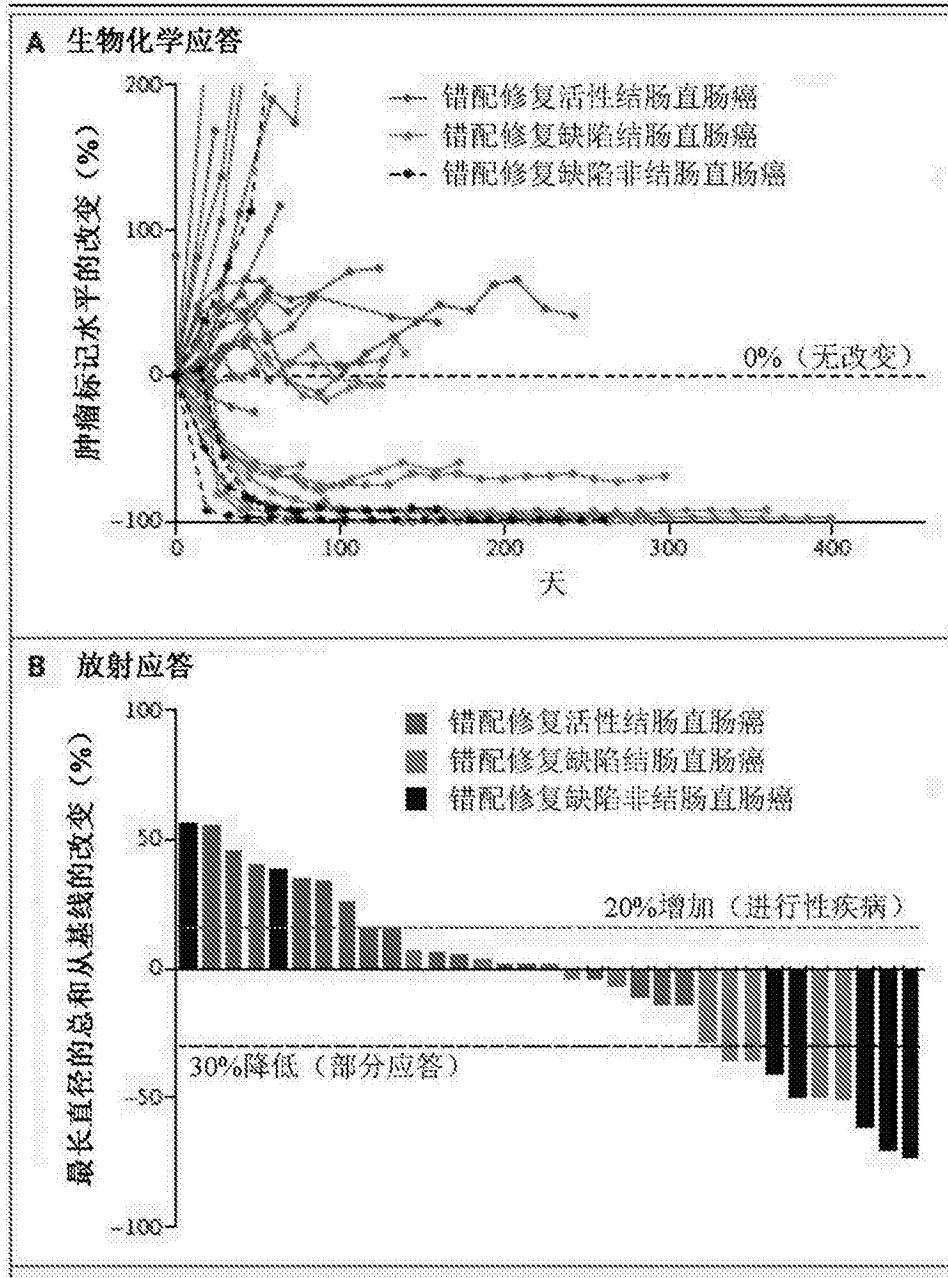


图1A和1B

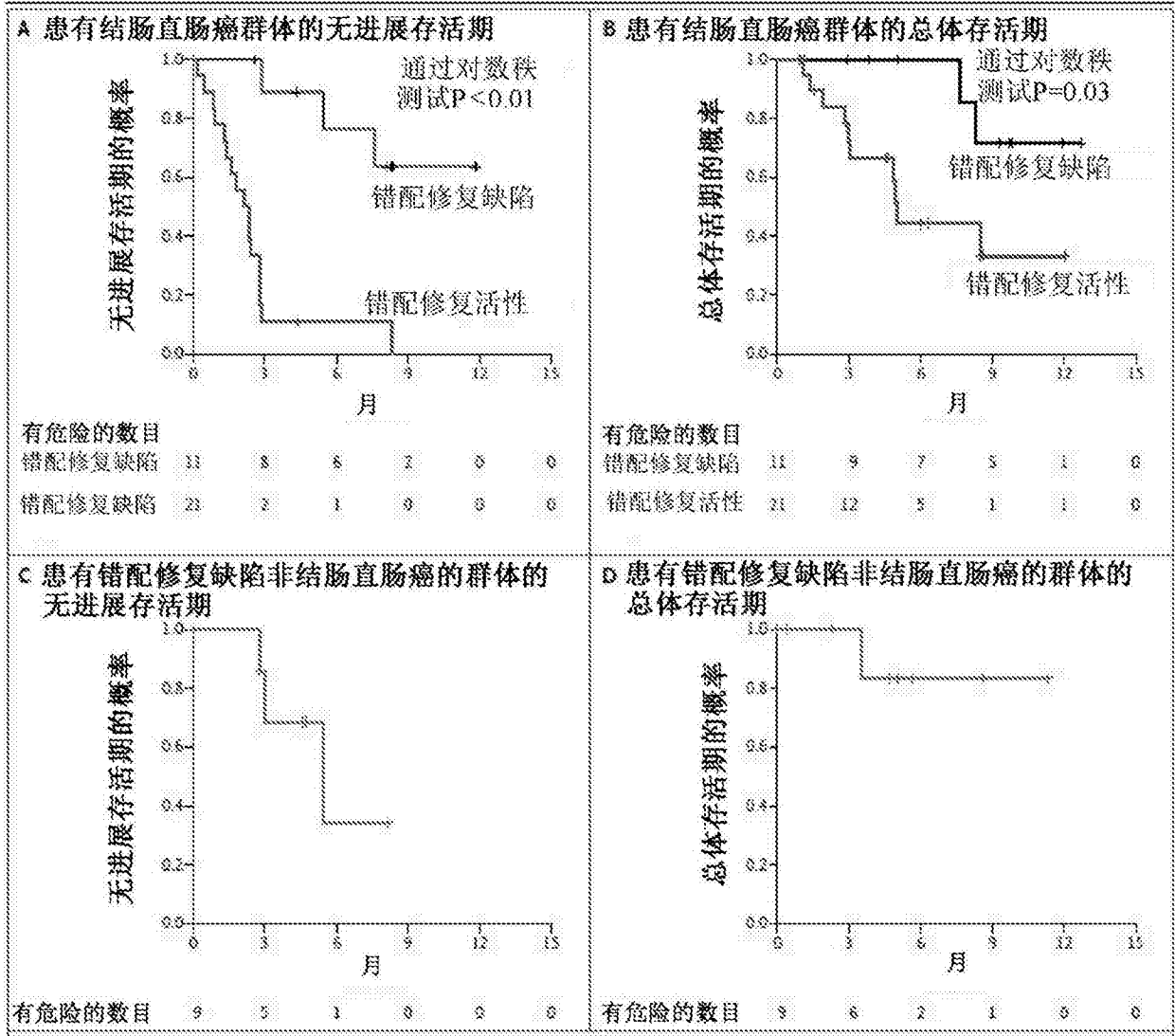


图2A-2D

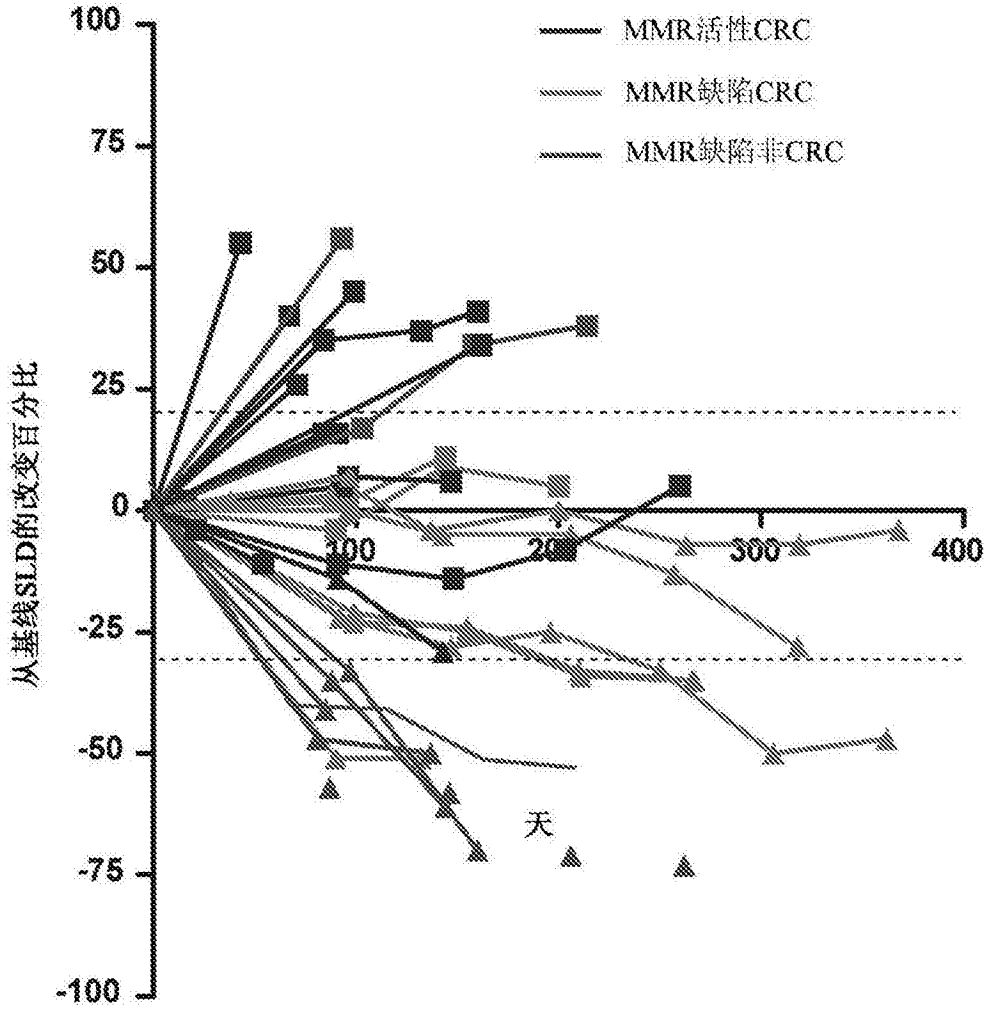


图3

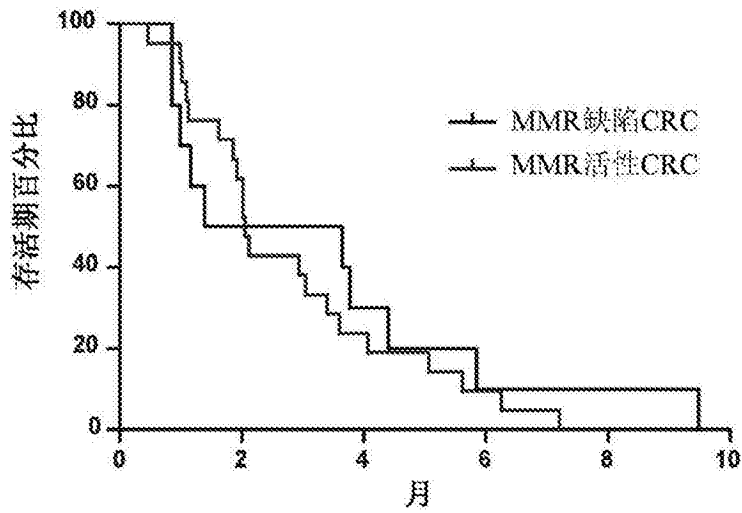


图4A

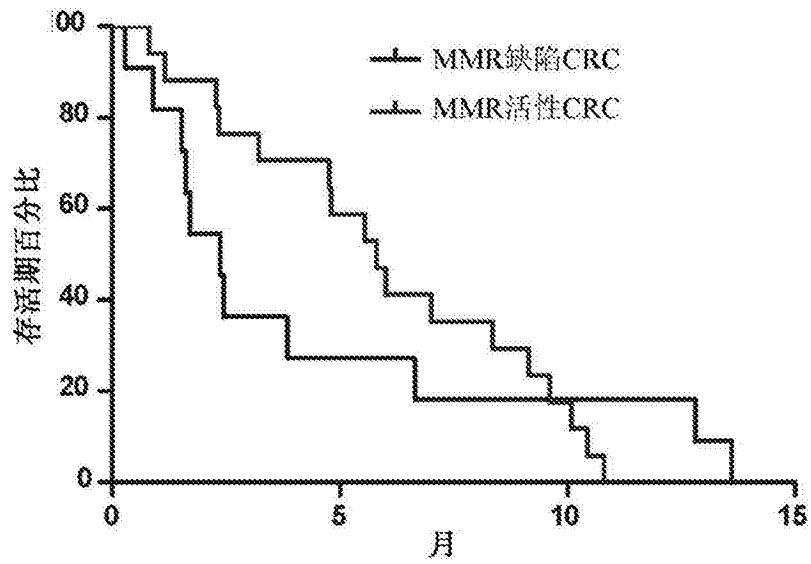


图4B

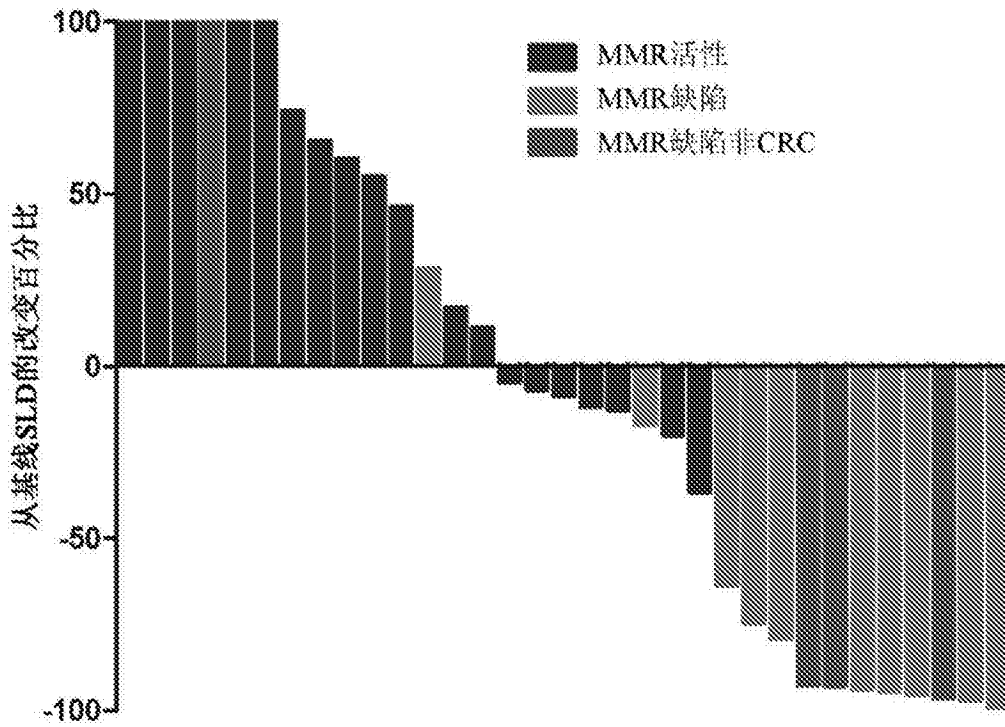


图5

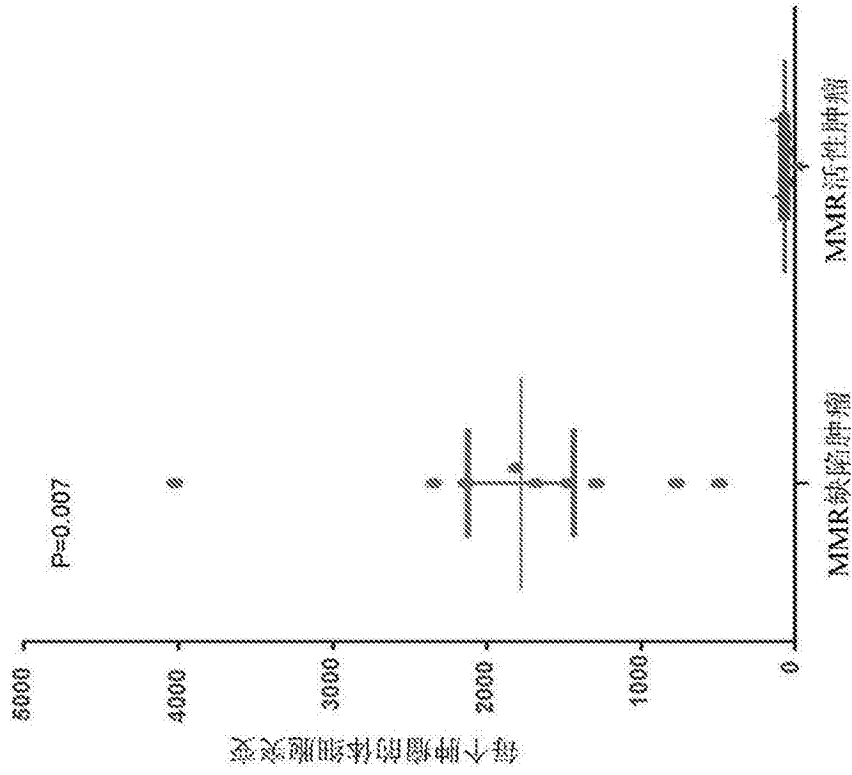


图6A

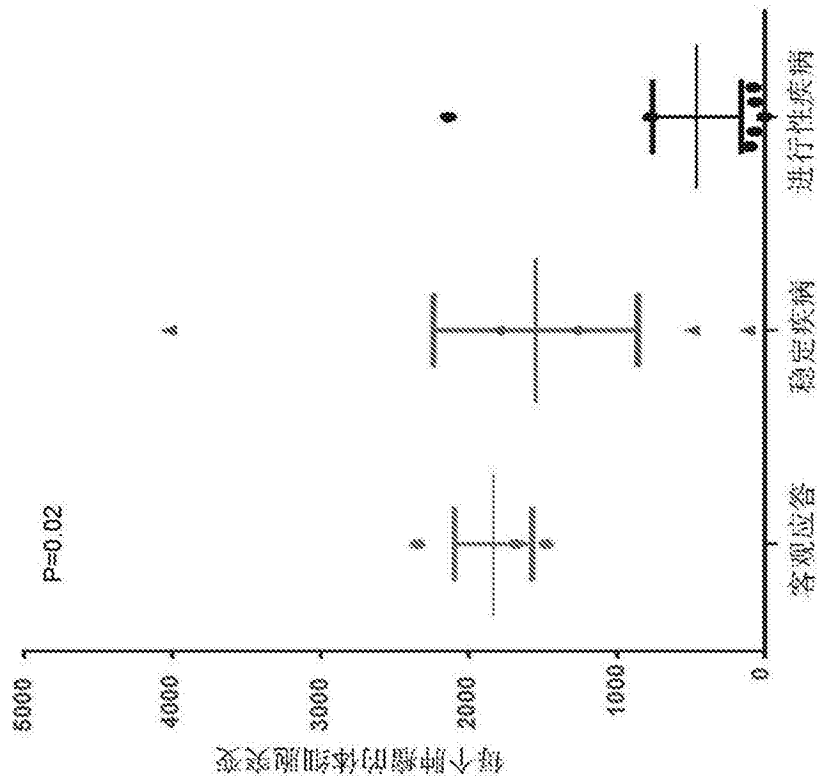


图6B

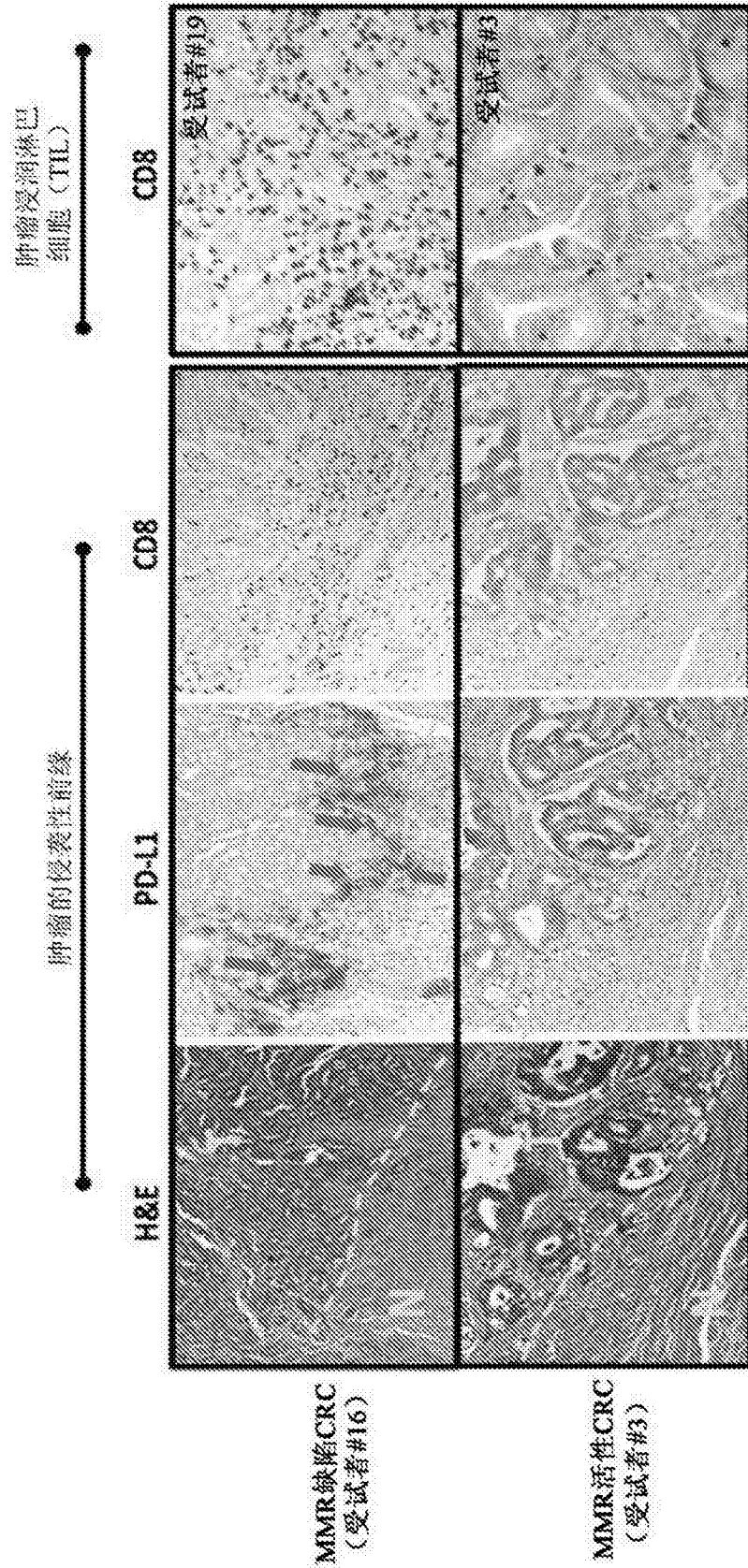


图7

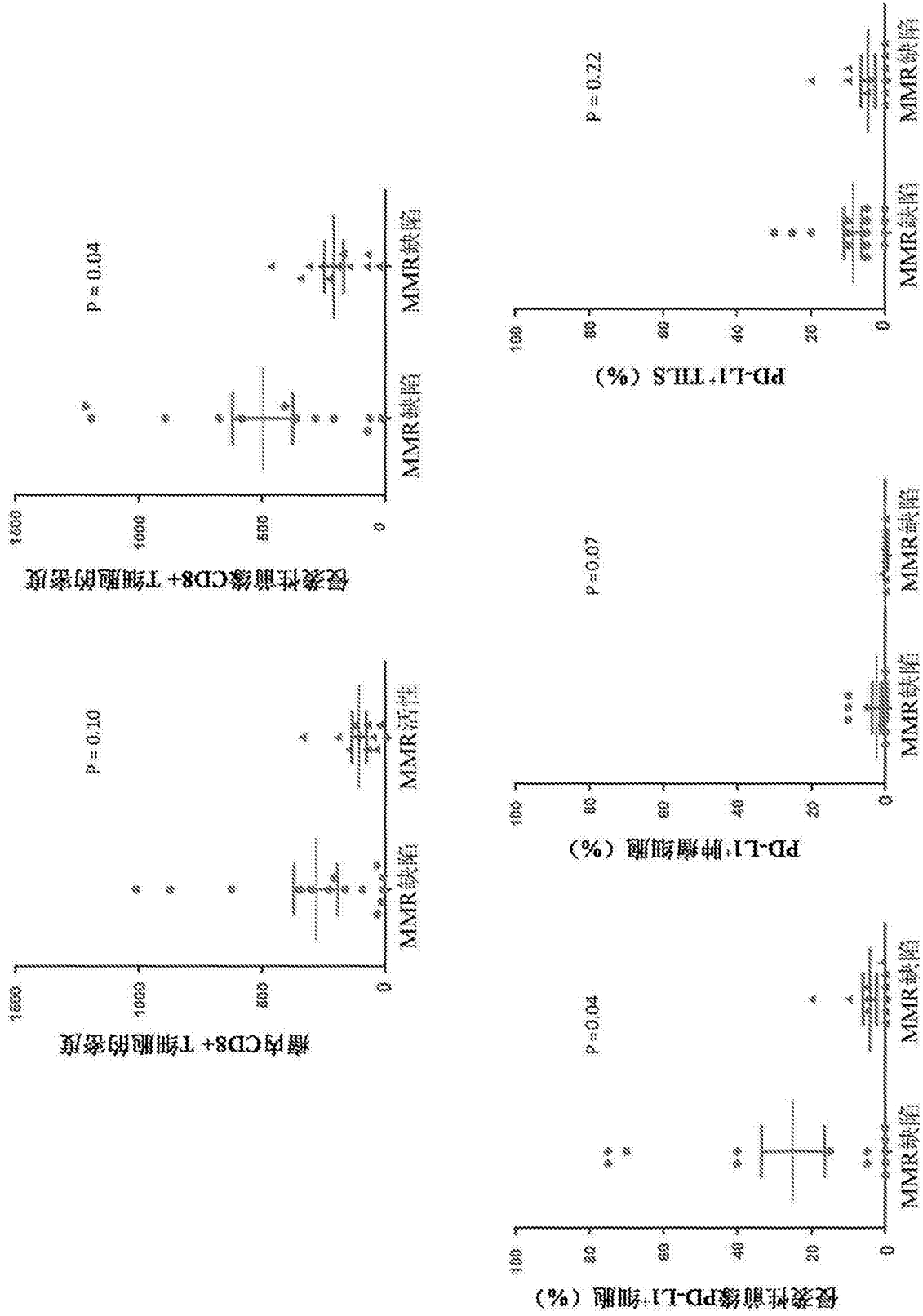


图8

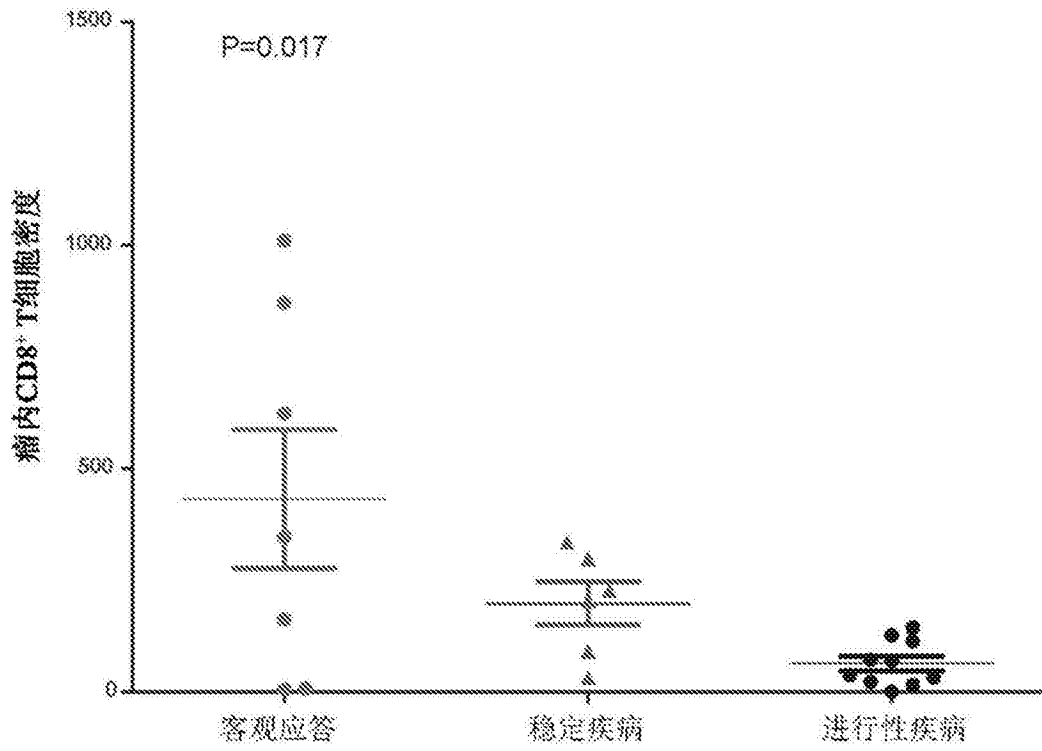


图9

相关免疫和RECIST应答判断的比较

	CR	PR	SD	PD
RECIST 1.1	所有病变消失	目标病变直径的总和与基线相比下降>30%	R或PD均不来自nadir	目标病变直径的总和与nadir相比增大>20%
				出现新型病变
irRC	所有病变消失	SPD指数+任何新型病变与基线相比下降>50%	SPD指数+任何新型病变不是irCR、irPR或irPD	SPD指数+任何新型病变与nadir相比增大>25%
			CR、P	
		允许新型病变	允许新型病变	irPD仅基于SPD

RECIST 1.1=实体肿瘤的应答评估判据1.1； irCR=免疫相关应答判据

CR=完全应答； PR=部分应答； SD=稳定疾病； PD=进行性疾病； SPD=垂直直径的总和

图10

对治疗的免疫相关应答

免疫相关应答的类型-数 (%)	MMR缺陷CRC n=10		MRC活性CRC n=18		MMR缺陷非CRC n=7	
	完全应答	部分应答	完全应答	部分应答	完全应答	部分应答
完全应答	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14) ¹	1 (14) ¹
稳定疾病 (第12周)	4 (40)	4 (40)	4 (40)	0 (0)	4 (57) ²	4 (57) ²
进行性疾病	5 (50)	5 (50)	5 (50)	2 (11)	0 (0)	0 (0)
不可评估 ³	1 (10)	1 (10)	1 (10)	11 (61)	2 (29)	2 (29)
	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (28)	0 (0)	0 (0)
免疫相关客观应答率 (%)	40	40	40	0	71	71
95% CI	12-74	12-74	12-74	0-19	29-96	29-96
免疫相关疾病控制率 (%) ⁴	90	90	90	11	71	71
95% CI	55-100	55-100	55-100	1-35	29-96	29-96
在20周时的免疫相关PFS	78	78	78	11	67	67
95% CI	40-97	40-97	40-97	1-35	22-96	22-96

¹转化成在20周时的CR的在12周时的原始PR

²在12周时一个PR

³如果患者由于临床进展不进行第12周扫描，那么认为患者不可评估。

⁴疾病控制率被定义为具有完全应答、部分应答或稳定疾病维持12周或更长时间的患者的百分比。

图 11

总体细胞突变和突变相关联新抗原 (MANA) 与临床结果的相关性

比较CR/PR对SD对PD的趋势测试

变量	P值
总体细胞突变	0.024
突变相关新抗原 (MANA)	0.028

突变和MANA与应答率的关联

	95%置信区间变量 (对数分度*)			P值
	几率比	较低	较高	
总体细胞突变	3.312	0.500	21.924	0.214
突变相关新抗原 (MANA)	3.087	0.617	15.439	0.170

突变和MANA与PFS的关联

	95%置信区间变量 (对数分度*)			P值
	危害比	较低	较高	
总体细胞突变	0.628	0.424	0.931	0.021
突变相关新抗原 (MANA)	0.599	0.391	0.916	0.018

突变和MANA与OS的关联

	95%置信区间变量 (对数分度*)			P值
	危害比	较低	较高	
总体细胞突变	0.707	0.481	1.038	0.077
突变相关新抗原 (MANA)	0.676	0.453	1.008	0.055

图12

免疫标记与临床结果的相关性

比较CR/PR对SD对PD的趋势测试

变量	P值
在肿瘤内的PD-L1膜性表达 (>5%对<5%)	0.208
在侵袭性前缘处通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达 (%)	0.043
在肿瘤内的TILs上通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达	0.024
在肿瘤内的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.017
在侵袭性前缘处的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.768
在非肿瘤组织内的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.346

*例外为在肿瘤上的PD-L1表达 (>5%对<5%)，其表示为二进制变量

免疫标记与应答率的关联

95%置信区间变量 (对数分度*)

	几率比	较低	较高	P值
在肿瘤内的PD-L1膜性表达 (>5%对<5%)	3.200	0.354	28.945	0.301
在侵袭性前缘处通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达 (%)	1.075	0.820	1.411	0.600
在肿瘤内的TILs上通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达	1.139	0.862	1.506	0.361
在肿瘤内的CD8密度 (细胞/mm ²)	1.337	0.706	2.531	0.372
在侵袭性前缘处的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.515	0.193	1.374	0.185
在非肿瘤组织内的CD8密度 (细胞/mm ²)	1.219	0.535	2.777	0.637

*例外为在肿瘤上的PD-L1表达 (>5%对<5%)，其表示为二进制变量

免疫标记与PFS的关联

95%置信区间变量 (对数分度*)

	危害比	较低	较高	P值
在肿瘤内的PD-L1膜性表达 (>5%对<5%)	0.196	0.025	1.518	0.119
在侵袭性前缘处通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达 (%)	0.899	0.784	1.031	0.126
在肿瘤内的TILs上通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达	0.888	0.765	1.031	0.118
在肿瘤内的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.900	0.794	1.020	0.100
在侵袭性前缘处的CD8密度 (细胞/mm ²)	1.017	0.807	1.706	0.948
在非肿瘤组织内的CD8密度 (细胞/mm ²)	1.144	0.780	1.677	0.492

*例外为在肿瘤上的PD-L1表达 (>5%对<5%)，其表示为二进制变量

免疫标记与OS的关联

95%置信区间变量 (对数分度*)

	危害比	较低	较高	P值
在肿瘤内的PD-L1膜性表达 (>5%对<5%)	0.513	0.062	4.232	0.535
在侵袭性前缘处通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达 (%)	0.978	0.816	1.173	0.813
在肿瘤内的TILs上通过TIL和相关巨噬细胞的PD-L1表达	0.931	0.762	1.138	0.487
在肿瘤内的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.918	0.813	1.036	0.167
在侵袭性前缘处的CD8密度 (细胞/mm ²)	0.986	0.502	1.934	0.967
在非肿瘤组织内的CD8密度 (细胞/mm ²)	1.018	0.635	1.631	0.941

*例外为在肿瘤上的PD-L1表达 (>5%对<5%)，其表示为二进制变量

图13