



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117795341 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280054135.9

(22) 申请日 2022.06.02

(30) 优先权数据

63/196,676 2021.06.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/032010 2022.06.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/256562 EN 2022.12.08

(71) 申请人 埃派斯进美国有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 T·拉瓦雷 L·帕顿龙

D·莫雷尔 P·F·盖拉尔迪尼

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 黄遵玲 张璐

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)

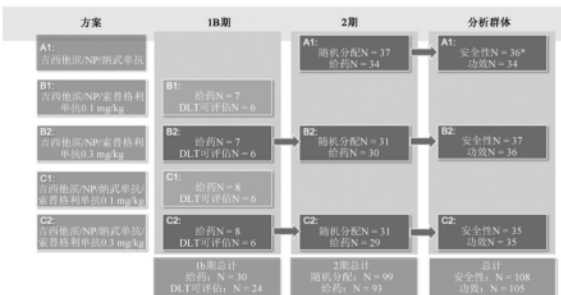
权利要求书6页 说明书80页 附图76页

(54) 发明名称

使用CD-40激动剂治疗癌症的方法

(57) 摘要

本公开提供了鉴定适于使用CD40激动剂和一种或多种化学疗法药物的组合疗法的癌症患者亚群,并且用所述组合疗法治疗所述癌症患者亚群的方法。



*两名参与者被随机分配到群组C2, 但并未接受索普格利单抗给药, 并且因此在本图在群组A1下列示。
注意: B1/C1未在本海报中描述。

1. 一种用于辅助治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的测试生物样品和一种或多种参考生物样品的MYC基因特征,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;

(b) 计算所述受试者的MYC基因特征评分;

(c) 计算所述群组的MYC基因特征评分;

(d) 当所述受试者的所述MYC基因特征评分低于所述群组的所述MYC基因特征评分时,用抗CD40疗法与化学疗法的组合来辅助治疗所述受试者。

2. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 确定测试生物样品和一种或多种参考生物样品的MYC基因特征,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;

(b) 计算所述受试者的MYC基因特征评分;

(c) 计算所述群组的MYC基因特征评分;

(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者,其中所述受试者的所述MYC基因特征评分低于所述群组的所述MYC基因特征评分。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述MYC基因特征评分是通过将MYC基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均来计算的。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述MYC基因集包括已知通过MYC第1版(V1)调节的基因中的一种或多种基因。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述一种或多种基因选自下组:肿瘤抑制基因、致癌基因、易位癌基因、蛋白激酶基因、细胞分化标志物基因、同源结构域蛋白基因、转录因子基因、细胞因子基因和生长因子基因。

6. 根据权利要求4或5所述的方法,其中所述一种或多种基因选自下组:ABCE1、ACP1、AIMP2、AP3S1、APEX1、BUB3、C1QBP、CAD、CANX、CBX3、CCNA2、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT7、CDC20、CDC45、CDK2、CDK4、CLNS1A、CNBP、COPS5、COX5A、CSTF2、CTPS1、CUL1、CYC1、DDX18、DDX21、DEK、DHX15、DUT、EEF1B2、EIF1AX、EIF2S1、EIF2S2、EIF3B、EIF3D、EIF3J、EIF4A1、EIF4E、EIF4G2、EIF4H、EPRS1、ERH、ETF1、EXOSC7、FAM120A、FBL、G3BP1、GLO1、GNL3、GOT2、GSPT1、H2AZ1、HDAC2、HDDC2、HDGF、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPA3、HNRNPC、HNRNPD、HNRNPR、HNRNPU、HPRT1、HSP90AB1、HSPD1、HSPE1、IARS1、IFRD1、ILF2、IMPDH2、KARS1、KPNA2、KPNB1、LDHA、LSM2、LSM7、MAD2L1、MCM2、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、MRPL23、MRPL9、MRPS18B、MYC、NAP1L1、NCBP1、NCBP2、NDUFAB1、NHP2、NME1、NOLC1、NOP16、NOP56、NPM1、ODC1、ORC2、PA2G4、PABPC1、PABPC4、PCBP1、PCNA、PGK1、PHB、PHB2、POLD2、POLE3、PPIA、PPM1G、PRDX3、PRDX4、PRPF31、PRPS2、PSMA1、PSMA2、PSMA4、PSMA6、PSMA7、PSMB2、PSMB3、PSMC4、PSMC6、PSMD1、PSMD14、PSMD3、PSMD7、PSMD8、PTGES3、PWP1、RACK1、RAD23B、RAN、RANBP1、RFC4、RNPS1、RPL14、RPL18、RPL22、RPL34、RPL6、RPLP0、RPS10、RPS2、RPS3、RPS5、RPS6、RRM1、RRP9、RSL1D1、RUVBL2、SERBP1、SET、SF3A1、SF3B3、SLC25A3、SMARCC1、SNRPA、SNRPA1、SNRPB2、SNRPD1、SNRPD2、SNRPD3、SNRPG、SRM、SRPK1、SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF7、SSB、SSBP1、STARD7、SYNCRIP、TARDBP、TCP1、TFDP1、TOMM70、TRA2B、TRIM28、TUFM、TXNL4A、TYMS、U2AF1、

UBA2、UBE2E1、UBE2L3、USP1、VBP1、VDAC1、VDAC3、XP01、XPOT、XRCC6、YWHAE和YWHAQ。

7. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 对测试生物样品和一种或多种参考生物样品中的循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞和总效应记忆CD4⁺T细胞进行计数,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;

(b) 确定所述测试生物样品中的所述循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞的第一数量与所述总效应记忆CD4⁺T细胞的第二数量的第一比率;

(c) 确定所述一种或多种参考生物样品中的所述循环CD244⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第三数量与总效应记忆CD4⁺T细胞的第四数量的第二比率;以及

(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者,其中所述受试者的(c)中的所述第一比率低于所述群组的(d)中的所述第二比率。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述效应记忆CD4⁺T细胞为CD45RA⁺CD27⁻。

9. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 对测试生物样品和一种或多种参考生物样品中的循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞和总效应记忆CD8⁺T细胞进行计数,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;

(b) 确定所述测试生物样品中的所述循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第一数量与所述总效应记忆CD8⁺T细胞的第二数量的第一比率;

(c) 确定所述一种或多种参考生物样品中的循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第三数量与总效应记忆CD8⁺T细胞的第四数量的第二比率;以及

(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者,其中所述受试者的(c)中的所述第一比率低于所述群组的(d)中的所述第二比率。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述效应记忆CD8⁺T细胞为CD45RA⁺CD27⁺。

11. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品为肿瘤样品。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品为血液样品。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中从所述血液中分离外周血单核细胞(PBMC)。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品是在启动任何癌症治疗之前获得的。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述癌症选自下组:胰腺癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈癌、黑色素瘤、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、胆道癌、胶质瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、宫颈癌、晚期或难治性实体瘤、小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌、促结缔组织增生黑色素瘤、小儿晚期实体瘤或淋巴瘤、间皮素阳性胸膜间皮瘤、食管癌、肛门癌、唾液腺癌、前列腺癌、类癌瘤、原始神经外胚层肿瘤(pNET)和甲状腺癌。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述癌症为胰腺癌。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述抗CD40疗法包括抗CD40抗体或其抗原结合片段。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述抗CD40抗体或其抗原结合片段选自下组:索替格利单抗(sotigalimab)、赛利克鲁单抗(selicrelumab)、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870,893、达西珠单抗(dacetuzumab)和CDX-1140。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述抗CD40抗体为索替格利单抗。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述化学疗法选自下组:吉西他滨(gemcitabine)、纳布-紫杉醇(nab-paclitaxel)、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯(oxazaphosphorine)、亚硝基脲、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星(doxorubicin)和柔红霉素(daunorubicin)等蒽环类抗生素、如Taxol^{品牌}和多西他赛(docetaxel)等紫杉烷、如长春新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine)等长春花生物碱、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(leucovorin)、伊立替康(Irinotecan)、伊达比星(idarubicin)、丝裂霉素C、奥沙利铂(oxaliplatin)、雷替曲塞(raltitrexed)、培美曲塞(pemetrexed)、它莫西芬(tamoxifen)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、替诺霉素D(Tinomycin D)、米托蒽醌(mitoxantrone)、博诺霉素(brenoxane)、光辉霉素(mitramycin)、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他(purinomastert)、巴马司他(batimastat)、BAY 12-9656、羧胺三唑(carboxamidotriazole)、CC-1088、右美沙芬乙酸(dextromethorphan acetic acid)、二甲基咕吨酮乙酸(dimethylxanthenone acetic acid)、内皮抑素(Endostatin)、IM-862、马立马司他(marimastat)、青霉胺(penicillamine)、PTK787/ZK 222584、RPI.4610、角鲨胺乳酸(squalamine lactate)、SU5416、沙利度胺(thalidomide)、康普瑞汀(combretastatin)、它莫西芬、COL-3、辛巴司他(neobasstat)、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522(Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利(amiloride)、血管抑素(Angiostatin)、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利(captopril)、DL- α -二氟甲基鸟氨酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HCl、内皮抑素、夫马菌素(fumagillin)、除莠霉素A(herbimycin A)、4-维甲酰酚胺、胡桃醌(Juglone)、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A(lavendustin A)、甲羟孕酮、米诺环素(minocycline)、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明(suramin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win(Wnt)信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、ZD6474、SU1248、vitaxin、PDGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽(sirengitide)。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述化学疗法为吉西他滨与纳布-紫杉醇的组合。

22. 一种系统,其包括:

能够与参与MYC信号传导的基因结合的试剂;

能够确定循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞与总效应记忆CD4⁺T细胞的比率的试剂;以及

能够确定循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞与总效应记忆CD8⁺T细胞的比率的试剂。

23. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法,所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的循环交叉呈递树突状细胞 (DC) 的水平 (细胞计数); 以及

(b) 如果所述循环交叉呈递DC的水平 (细胞计数) 相对于对照或参考的水平有所提高, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述交叉呈递DC为CD1C+CD141+, 并且其中:

(a) 包括确定所述受试者的CD1C+CD141+DC的水平 (细胞计数); 并且

(b) 包括如果所述CD1C+CD141+DC的水平 (细胞计数) 相对于所述对照或参考的水平有所提高, 则向所述受试者施用所述CD40激动剂与所述化学治疗剂的组合。

25. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的循环HLA-DR+CCR7+B细胞的水平 (细胞计数); 以及

(b) 如果所述循环HLA-DR+CCR7+B细胞的水平 (细胞计数) 相对于对照或参考的水平有所提高, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

26. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的循环PD-1+T细胞、循环TCF-1+T细胞和/或循环Tbet+T细胞中的至少一种的水平 (细胞计数); 以及

(b) 如果所述循环PD-1+T细胞、所述循环TCF-1+T细胞和/或所述循环Tbet+T细胞中的至少一种的水平 (细胞计数) 相对于对照或参考的水平有所提高, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

27. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的循环2B4+CD4 T细胞的水平 (细胞计数); 以及

(b) 如果所述循环2B4+CD4 T细胞的水平 (细胞计数) 相对于对照或参考的水平有所降低, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

28. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的循环T辅助细胞的水平 (细胞计数); 以及

(b) 如果所述循环T辅助细胞的水平 (细胞计数) 相对于对照或参考的水平有所提高, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

29. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法, 所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的E2F基因特征并且计算E2F特征评分; 以及

(b) 如果所述E2F基因特征评分相对于对照或参考的基因特征评分有所降低, 则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其包括通过对E2F基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均来计算所述E2F基因特征评分。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述E2F基因集包括选自下组的一种或多种基因: ABCE1、ACP1、AIMP2、AP3S1、APEX1、BUB3、C1QBP、CAD、CANX、CANX、CBX3、CCNA2、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT7、CDC20、CDC45、CDK2、CDK4、CLNS1A、CNBP、COPS5、C0X5A、CSTF2、CTPS1、CUL1、CYC1、DDX18、DDX21、DEK、DHX15、DUT、EEF1B2、EIF1AX、EIF2S1、EIF2S2、EIF3B、EIF3D、EIF3J、EIF4A1、EIF4E、EIF4G2、EIF4H、EPRS1、ERH、ETF1、EXOSC7、FAM120A、FBL、G3BP1、GL01、GNL3、GOT2、GSPT1、H2AZ1、HDAC2、HDCC2、HDGF、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPA3、

HNRNPC、HNRNPD、HNRNPR、HNRNPU、HPRT1、HSP90AB1、HSPD1、HSPE1、IARS1、IFRD1、ILF2、IMPDH2、KARS1、KPNA2、KPNB1、LDHA、LSM2、LSM2、LSM7、MAD2L1、MCM2、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、MRPL23、MRPL23、MRPL9、MRPS18B、MYC、NAP1L1、NCBP1、NCBP2、NDUFAB1、NHP2、NME1、NOLC1、NOP16、NOP56、NPM1、ODC1、ORC2、PA2G4、PABPC1、PABPC4、PCBP1、PCNA、PGK1、PHB、PHB2、POLD2、POLE3、PPIA、PPM1G、PRDX3、PRDX4、PRPF31、PRPS2、PSMA1、PSMA2、PSMA4、PSMA6、PSMA7、PSMB2、PSMB3、PSMC4、PSMC4、PSMC6、PSMD1、PSMD14、PSMD3、PSMD7、PSMD8、PTGES3、PWP1、RACK1、RAD23B、RAN、RANBP1、RFC4、RNPS1、RPL14、RPL18、RPL22、RPL34、RPL6、RPLP0、RPS10、RPS2、RPS3、RPS5、RPS6、RRM1、RRP9、RSL1D1、RUVBL2、SERBP1、SET、SF3A1、SF3B3、SLC25A3、SMARCC1、SNRPA、SNRPA1、SNRPB2、SNRPD1、SNRPD2、SNRPD3、SNRPG、SRM、SRPK1、SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF7、SSB、SSBP1、SSBP1、STARD7、SYNCRIP、TARDBP、TCP1、TFDP1、TOMM70、TRA2B、TRIM28、TUFM、TXNL4A、TYMS、U2AF1、UBA2、UBE2E1、UBE2L3、USP1、VBP1、VDAC1、VDAC3、XP01、XPOT、XRCC6、YWHAE、YWHAE和YWHAQ。

32. 一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法,所述方法包括:

(a) 确定来自所述受试者的生物样品中的IFN- γ 基因特征并且计算IFN- γ 基因特征评分;以及

(b) 如果所述IFN- γ 基因特征评分相对于对照或参考的基因特征评分有所增加,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

33. 根据权利要求32所述的方法,其包括通过对IFN- γ 基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均来计算所述IFN- γ 基因特征评分。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述IFN- γ 基因集包括选自下组的一种或多种基因:CD8A、CD274、LAG3和STAT1。

35. 根据权利要求23至34中任一项所述的方法,其中所述组织样品为液体活检,任选地血液或血清样品、外科手术样品或从所述受试者获得的其它活检样品。

36. 根据权利要求23至34中任一项所述的方法,其包括在启动用所述CD40激动剂进行治疗之前执行步骤(a)。

37. 根据权利要求23至36中任一项所述的方法,其中所述癌症选自以下:胰腺癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈癌、黑色素瘤、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、胆道癌、胶质瘤、梅克尔细胞癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、晚期或难治性实体瘤、小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌、促结缔组织增生黑色素瘤、小儿晚期实体瘤或淋巴瘤、间皮素阳性胸膜间皮瘤、食管癌、肛门癌、唾液癌、前列腺癌、类癌瘤、原始神经外胚层肿瘤(pNET) 和甲状腺癌。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述癌症为胰腺癌,任选地胰腺导管腺癌(PDAC)。

39. 根据权利要求23至38中任一项所述的方法,其中所述CD40激动剂为与人CD40特异性结合并激动所述人CD40的抗体或其抗原结合片段。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段选自下组:索替格利单抗、赛利克鲁单抗、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870,893、达西珠单抗和CDX-1140。

41. 根据权利要求23至40中任一项所述的方法,其中所述化学治疗剂选自下组:吉西他

滨、纳布-紫杉醇、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯、亚硝基脒、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星和柔红霉素等蒽环类抗生素、如Taxol和多西他赛等紫杉烷、如长春新碱和长春花碱等长春花生物碱、5-氟脲嘧啶(5-FU)、亚叶酸、伊立替康、伊达比星、丝裂霉素C、奥沙利铂、雷替曲塞、培美曲塞、它莫西芬、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、放线菌素D(actinomycin D)、米托蒽醌、博诺霉素、光辉霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他、巴马司他、BAY 12-9656、羧胺三唑、CC-1088、右美沙芬乙酸、二甲基咕吨酮乙酸、内皮抑素、IM-862、马立马司他、青霉胺、PTK787/ZK 222584、RPI 4610、角鲨胺乳酸、SU5416、沙利度胺、康普瑞汀、它莫西芬、COL-3、辛巴司他、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522(Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利、血管抑素、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利、DL- α -二氟甲基鸟氨酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HCl、内皮抑素、夫马菌素、除莠霉素A、4-维甲酰酚胺、胡桃醌、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A、甲羟孕酮、米诺环素、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明、血小板反应蛋白、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win(Wnt)信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、Z06474、SU1248、vitaxin、POGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述化学治疗剂为吉西他滨与纳布-紫杉醇的组合。

使用CD-40激动剂治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月3日提交的美国临时专利申请第63/196,676号的权益,所述美国临时专利申请通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及鉴定适于使用CD40激动剂与一种或多种化学疗法药物的组合疗法的癌症患者亚群的方法。

背景技术

[0004] 完全T细胞激活需要两种独立但协同的信号。通过T细胞抗原受体发出的第一信号由抗原和MHC复合物在APC处提供并且负责免疫应答的特异性。次级或共刺激信号通过CD28与B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) 以及CD40与CD40L的相互作用发出,这是实现完全T细胞应答所需要的。在不存在共刺激信号的情况下,T细胞在抗原刺激期间可能会变为免疫的(免疫失能的)或进入程序性细胞死亡(凋亡)。

[0005] CD40,即TNF受体超家族(TNFR)的成员,主要在B细胞和其它抗原呈递细胞(APC),如树突状细胞和巨噬细胞上表达。CD40配体(CD40L)主要通过经激活的T细胞表达。

[0006] CD40与CD40L的相互作用起到用于激活T细胞的共刺激信号的作用。静息细胞上CD40-CD40L复合物的形成诱导增殖、免疫球蛋白类别切换、抗体分泌,并且还在生殖中心的发育和记忆B细胞的存活中发挥作用,所有这些对体液免疫应答都很重要。CD40L与CD40在树突状细胞(DC)上的结合诱导DC成熟,如通过如B7分子家族(CD80、CD86)等共刺激分子的表达的增加和如白介素12等促炎细胞因子的产生的增加所证明的。这引起强烈的T细胞应答。

[0007] CD40信号传导激活若干种通路,包括NF κ B(核因子 κ B)、MAPK(丝裂原激活的蛋白激酶)和STAT3(信号转导子和转录激活子-3),所述通路通过激活蛋白质c-Jun、ATF2(转录激活因子-2)和转录因子Rel来调节基因表达。适应性蛋白,即与TNF受体(TNFR)相关的因子(例如TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF5和TRAF6),与此受体发生相互作用并且介导信号转导。根据具体细胞类型,CD40的激活引起一组特定基因的表达。响应于来自CD40的信号传输激活的基因包括许多细胞因子和趋化因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF- α 和巨噬细胞-1炎性蛋白 α (MIP1 α))。在一些细胞类型中,CD40的激活可能导致细胞毒性自由基(COX-2(环加氧酶-2))的产生和NO(一氧化氮)的产生。

[0008] CD40在广泛范围的恶性细胞中过表达。CD40在抑制肿瘤和刺激免疫系统中的作用使CD40成为基于抗体的免疫疗法的极具吸引力的靶标。抗CD40抗体可以通过几种机制对抗肿瘤细胞起作用:(i)抗体的效应功能,如ADCC;(ii)对肿瘤细胞的直接细胞毒性作用;以及(iii)对抗肿瘤免疫应答的激活。然而,目前亟需开发用于鉴定使用抗CD40治疗可能会经历显著临床益处的患者子集的方法。

发明内容

[0009] 在至少一个实施方式中,本公开提供了一种方法,其包括:(a) 确定来自所述受试者的测试生物样品和一种或多种参考生物样品的MYC基因特征,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;(b) 计算所述受试者的MYC基因特征评分;(c) 计算所述群组的MYC基因特征评分;以及(d) 当所述受试者的所述MYC基因特征评分低于所述群组的所述MYC基因特征评分时,用抗CD40疗法与化学疗法的组合来辅助治疗所述受试者。

[0010] 在至少一个实施方式中,本公开提供了一种方法,其包括:(a) 确定测试生物样品和一种或多种参考生物样品的MYC基因特征,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;(b) 计算所述受试者的MYC基因特征评分;(c) 计算所述群组的MYC基因特征评分;(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者,其中所述受试者的所述MYC基因特征评分低于所述群组的所述MYC基因特征评分。

[0011] 在至少一个实施方式中,所述MYC基因特征评分是通过对MYC基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均来计算的。在至少一个实施方式中,所述MYC基因集包括已知通过MYC第1版(V1)调节的基因中的一种或多种基因。在至少一个实施方式中,所述一种或多种基因选自下组:肿瘤抑制基因、致癌基因、易位癌基因、蛋白激酶基因、细胞分化标志物基因、同源结构域蛋白基因、转录因子基因、细胞因子基因和生长因子基因。在至少一个实施方式中,所述一种或多种基因选自下组:ABCE1、ACP1、AIMP2、AP3S1、APEX1、BUB3、C1QBP、CAD、CANX、CBX3、CCNA2、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT7、CDC20、CDC45、CDK2、CDK4、CLNS1A、CNBP、COPS5、COX5A、CSTF2、CTPS1、CUL1、CYC1、DDX18、DDX21、DEK、DHX15、DUT、EEF1B2、EIF1AX、EIF2S1、EIF2S2、EIF3B、EIF3D、EIF3J、EIF4A1、EIF4E、EIF4G2、EIF4H、EPRS1、ERH、ETF1、EXOSC7、FAM120A、FBL、G3BP1、GLO1、GNL3、GOT2、GSPT1、H2AZ1、HDAC2、HDDC2、HDGF、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPA3、HNRNPC、HNRNPD、HNRNPR、HNRNPU、HPRT1、HSP90AB1、HSPD1、HSPE1、IARS1、IFRD1、ILF2、IMPDH2、KARS1、KPNA2、KPNB1、LDHA、LSM2、LSM7、MAD2L1、MCM2、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、MRPL23、MRPL9、MRPS18B、MYC、NAP1L1、NCBP1、NCBP2、NDUFAB1、NHP2、NME1、NOLC1、NOP16、NOP56、NPM1、ODC1、ORC2、PA2G4、PABPC1、PABPC4、PCBP1、PCNA、PGK1、PHB、PHB2、POLD2、POLE3、PPIA、PPM1G、PRDX3、PRDX4、PRPF31、PRPS2、PSMA1、PSMA2、PSMA4、PSMA6、PSMA7、PSMB2、PSMB3、PSMC4、PSMC6、PSMD1、PSMD14、PSMD3、PSMD7、PSMD8、PTGES3、PWP1、RACK1、RAD23B、RAN、RANBP1、RFC4、RNPS1、RPL14、RPL18、RPL22、RPL34、RPL6、RPLP0、RPS10、RPS2、RPS3、RPS5、RPS6、RRM1、RRP9、RSL1D1、RUVBL2、SERBP1、SET、SF3A1、SF3B3、SLC25A3、SMARCC1、SNRPA、SNRPA1、SNRPB2、SNRPD1、SNRPD2、SNRPD3、SNRPG、SRM、SRPK1、SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF7、SSB、SSBP1、STARD7、SYNCRIP、TARDBP、TCP1、TFDP1、TOMM70、TRA2B、TRIM28、TUFM、TXNL4A、TYMS、U2AF1、UBA2、UBE2E1、UBE2L3、USP1、VBP1、VDAC1、VDAC3、XPO1、XPOT、XRCC6、YWHAE和YWHAQ。

[0012] 在至少一个实施方式中,本公开提供了一种方法,其包括:(a) 对测试生物样品和一种或多种参考生物样品中的循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞和总效应记忆CD4⁺T细胞进行计数,其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的,其中所述受试者是所述群组的一部分;(b) 确定所述测试生物

样品中的所述循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞的第一数量与所述总效应记忆CD4⁺T细胞的第二数量的第一比率；(c) 确定所述一种或多种参考生物样品中的循环CD244⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第三数量与总效应记忆CD4⁺T细胞的第四数量的第二比率；以及(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者，其中(c)中的所述受试者的所述第一比率低于(d)中的所述群组的所述第二比率。

[0013] 在至少一个实施方式中，所述效应记忆CD4⁺T细胞为CD45RA⁺CD27⁺。

[0014] 在至少一个实施方式中，本公开提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括：(a) 对测试生物样品和一种或多种参考生物样品中的循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞和总效应记忆CD8⁺T细胞进行计数，其中所述一种或多种参考生物样品中的参考生物样品是从患有相同癌症的受试者的群组中的每个个体中收集的，其中所述受试者是所述群组的一部分；(b) 确定所述测试生物样品中的所述循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第一数量与所述总效应记忆CD8⁺T细胞的第二数量的第一比率；(c) 确定所述一种或多种参考生物样品中的所述循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞的第三数量与总效应记忆CD8⁺T细胞的第四数量的第二比率；以及(d) 用抗CD40疗法与化学疗法的组合来治疗所述受试者，其中(c)中的所述受试者的所述第一比率低于(d)中的所述群组的所述第二比率。

[0015] 在至少一个实施方式中，所述效应记忆CD8⁺T细胞为CD45RA⁺CD27⁺。

[0016] 在至少一个实施方式中，所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品为肿瘤样品。

[0017] 在至少一个实施方式中，所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品为血液样品。在至少一个实施方式中，从血液中分离外周血单核细胞(PBMC)。

[0018] 在至少一个实施方式中，所述测试生物样品和所述一种或多种参考生物样品是在启动任何癌症治疗之前获得的。

[0019] 在至少一个实施方式中，所述癌症选自下组：胰腺癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈癌、黑色素瘤、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、胆道癌、胶质瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、宫颈癌、晚期或难治性实体瘤、小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌、促结缔组织增生黑色素瘤、小儿晚期实体瘤或淋巴瘤、间皮素阳性胸膜间皮瘤、食管癌、肛门癌、唾液癌、前列腺癌、类癌瘤、原始神经外胚层肿瘤(pNET)和甲状腺癌。在至少一个实施方式中，所述癌症为胰腺癌。

[0020] 在至少一个实施方式中，所述抗CD40疗法包括抗CD40抗体或其抗原结合片段。在至少一个实施方式中，所述抗CD40抗体或其抗原结合片段选自下组：索替格利单抗(sotigalimab)、赛利克鲁单抗(selicrelumab)、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870, 893、达西珠单抗(dacetuzumab)和CDX-1140。在至少一个实施方式中，所述抗CD40抗体为索替格利单抗。

[0021] 在至少一个实施方式中，所述化学疗法选自下组：吉西他滨(gemcitabine)、纳布-紫杉醇(nab-paclitaxel)、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯(oxazaphosphorine)、亚硝基脲、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星(doxorubicin)和柔红霉素(daunorubicin)等蒽环类抗生素、如Taxol^{品牌}和多西他赛(docetaxel)等紫杉烷、如长春新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine)等长春花生物碱、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(leucovorin)、伊立替康

(Irinotecan)、伊达比星(idarubicin)、丝裂霉素C、奥沙利铂(oxaliplatin)、雷替曲塞(raltitrexed)、培美曲塞(pemetrexed)、它莫西芬(tamoxifen)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、替诺霉素D(Tinomycin D)、米托蒽醌(mitoxantrone)、博诺霉素(brenoxane)、光辉霉素(mitramycin)、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他(purinomastert)、巴马司他(batimastat)、BAY 12-9656、羧胺三唑(carboxamidotriazole)、CC-1088、右美沙芬乙酸(dextromethorphan acetic acid)、二甲基咕吨酮乙酸(dimethylxanthenone acetic acid)、内皮抑素(Endostatin)、IM-862、马立马司他(marimastat)、青霉胺(penicillamine)、PTK787/ZK 222584、RPI.4610、角鲨胺乳酸(squalamine lactate)、SU5416、沙利度胺(thalidomide)、康普瑞汀(combretastatin)、它莫西芬、COL-3、辛巴司他(neobasstat)、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522(Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利(amiloride)、血管抑素(Angiostatin)、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利(captopril)、DL- α -二氟甲基鸟氨酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HCl、内皮抑素、夫马菌素(fumagillin)、除莠霉素A(herbimycin A)、4-维甲酰酚胺、胡桃醌(Juglone)、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A(lavendustin A)、甲羟孕酮、米诺环素(minocycline)、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明(suramin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win(Wnt)信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、ZD6474、SU1248、vitaxin、PDGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽(sirengitide)。在至少一个实施方式中,所述化学疗法为吉西他滨与纳布-紫杉醇的组合。

[0022] 在至少一个实施方式中,本公开提供了一种系统,其包括:能够与参与MYC信号传导的基因结合的试剂;能够确定循环CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞与总效应记忆CD4⁺T细胞的比率的试剂;以及能够确定循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞与总效应记忆CD8⁺T细胞的比率的试剂。

[0023] 本公开还提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法涉及:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的循环交叉呈递树突状细胞(DC)的水平(细胞计数);以及(b)如果所述循环交叉呈递DC的水平(细胞计数)相对于对照或参考的水平有所提高,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0024] 在至少一个实施方式中,所述交叉呈递DC为CD1C+CD141⁺,并且:(a)包括确定所述受试者体内的CD1C+CD141+DC的水平(细胞计数);并且(b)包括如果所述CD1C+CD141+DC的水平(细胞计数)相对于所述对照或参考的水平有所提高,则向所述受试者施用所述CD40激动剂与所述化学治疗剂的组合。

[0025] 本公开还提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法涉及:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的循环HLA-DR+CCR7+B细胞的水平(细胞计数);以及(b)如果所述循环HLA-DR+CCR7+B细胞的水平(细胞计数)相对于对照或参考的水平有所提高,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0026] 本公开进一步提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法涉及:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的循环PD-1⁺T细胞、循环TCF-1⁺T细胞和/或循环

Tbet+T细胞中的至少一种的水平(细胞计数);以及(b)如果所述循环PD-1+T细胞、所述循环TCF-1+T细胞和/或所述循环Tbet+T细胞中的至少一种的水平(细胞计数)相对于对照或参考的水平有所提高,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0027] 还提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法涉及:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的循环2B4+CD4⁺T细胞的水平(细胞计数);以及(b)如果所述循环2B4+CD4⁺T细胞的水平(细胞计数)相对于对照或参考的水平有所降低,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0028] 另一方面,本公开提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法涉及:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的循环T辅助细胞的水平(细胞计数);以及(b)如果所述循环T辅助细胞的水平(细胞计数)相对于对照或参考的水平有所提高,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0029] 本公开还提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法包括:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的E2F基因特征并且计算E2F特征评分;以及(b)如果所述E2F基因特征评分相对于对照或参考的基因特征评分有所降低,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0030] 一方面,所述方法包括通过对E2F基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均来计算所述E2F基因特征评分。一方面,所述E2F基因集包括选自下组的一种或多种基因:ABCE1、ACP1、AIMP2、AP3S1、APEX1、BUB3、C1QBP、CAD、CANX、CANX、CBX3、CCNA2、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT7、CDC20、CDC45、CDK2、CDK4、CLNS1A、CNBP、COPS5、COX5A、CSTF2、CTPS1、CUL1、CYC1、DDX18、DDX21、DEK、DHX15、DUT、EEF1B2、EIF1AX、EIF2S1、EIF2S2、EIF3B、EIF3D、EIF3J、EIF4A1、EIF4E、EIF4G2、EIF4H、EPRS1、ERH、ETF1、EXOSC7、FAM120A、FBL、G3BP1、GLO1、GNL3、GOT2、GSPT1、H2AZ1、HDAC2、HDHC2、HDGF、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPA3、HNRNPC、HNRNPD、HNRNPR、HNRNPU、HPRT1、HSP90AB1、HSPD1、HSPE1、IARS1、IFRD1、ILF2、IMPDH2、KARS1、KPNA2、KPNB1、LDHA、LSM2、LSM2、LSM7、MAD2L1、MCM2、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、MRPL23、MRPL23、MRPL9、MRPS18B、MYC、NAP1L1、NCBP1、NCBP2、NDUFAB1、NHP2、NME1、NOLC1、NOP16、NOP56、NPM1、ODC1、ORC2、PA2G4、PABPC1、PABPC4、PCBP1、PCNA、PGK1、PHB、PHB2、POLD2、POLE3、PPIA、PPM1G、PRDX3、PRDX4、PRPF31、PRPS2、PSMA1、PSMA2、PSMA4、PSMA6、PSMA7、PSMB2、PSMB3、PSMC4、PSMC4、PSMC6、PSMD1、PSMD14、PSMD3、PSMD7、PSMD8、PTGES3、PWP1、RACK1、RAD23B、RAN、RANBP1、RFC4、RNPS1、RPL14、RPL18、RPL22、RPL34、RPL6、RPLP0、RPS10、RPS2、RPS3、RPS5、RPS6、RRM1、RRP9、RSL1D1、RUVBL2、SERBP1、SET、SF3A1、SF3B3、SLC25A3、SMARCC1、SNRPA、SNRPA1、SNRPB2、SNRPD1、SNRPD2、SNRPD3、SNRPG、SRM、SRPK1、SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF7、SSB、SSBP1、SSBP1、STARD7、SYNCRIP、TARDBP、TCP1、TFDP1、TOMM70、TRA2B、TRIM28、TUFM、TXNL4A、TYMS、U2AF1、UBA2、UBE2E1、UBE2L3、USP1、VBP1、VDAC1、VDAC3、XP01、XPOT、XRCC6、YWHA、YWHA和YWHAQ。

[0031] 在一另外的方面中,本公开提供了一种治疗有需要的人类受试者的癌症的方法。所述方法包括:(a)确定来自所述受试者的生物样品中的IFN- γ 基因特征并且计算IFN- γ 基因特征评分;以及(b)如果所述IFN- γ 基因特征评分相对于对照或参考的基因特征评分有所增加,则向所述受试者施用CD40激动剂与化学治疗剂的组合。

[0032] 一方面,所述方法包括通过对IFN- γ 基因集中的每种基因的log归一化的表达值

求平均来计算所述IFN- γ 基因特征评分。一方面,所述IFN- γ 基因集包括选自下组的一种或多种基因:CD8A、CD274、LAG3和STAT1。一方面,所述生物样品为液体活检,任选地血液或血清样品、外科手术样品或从所述受试者获得的其它活检样品。一方面,所述方法进一步包括在启动用所述CD40激动剂进行治疗之前执行步骤(a)。一方面,所述癌症选自以下:胰腺癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈癌、黑色素瘤、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、胆道癌、胶质瘤、梅克尔细胞癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、晚期或难治性实体瘤、小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌、促结缔组织增生黑色素瘤、小儿晚期实体瘤或淋巴瘤、间皮素阳性胸膜间皮瘤、食管癌、肛门癌、唾液癌、前列腺癌、类癌瘤、原始神经外胚层肿瘤(pNET)和甲状腺癌。一方面,所述癌症为胰腺癌,任选地胰腺导管腺癌(PDAC)。一方面,所述CD40激动剂为与人CD40特异性结合并激动所述人CD40的抗体或其抗原结合片段。一方面,所述抗体或其抗原结合片段选自下组:索替格利单抗、赛利克鲁单抗、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870,893、达西珠单抗和CDX-1140。一方面,所述化学治疗剂选自下组:吉西他滨、纳布-紫杉醇、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯、亚硝基脲、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星和柔红霉素等蒽环类抗生素、如Taxol和多西他赛等紫杉烷、如长春新碱和长春花碱等长春花生物碱、5-氟脲嘧啶(5-FU)、亚叶酸、伊立替康、伊达比星、丝裂霉素C、奥沙利铂、雷替曲塞、培美曲塞、它莫西芬、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、放线菌素D(actinomycin D)、米托蒽醌、博诺霉素、光辉霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他、巴马司他、BAY 12-9656、羧胺三唑、CC-1088、右美沙芬乙酸、二甲基咕吨酮乙酸、内皮抑素、IM-862、马立马司他、青霉胺、PTK787/ZK 222584、RPI 4610、角鲨胺乳酸、SU5416、沙利度胺、康普瑞汀、它莫西芬、COL-3、辛巴司他、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522(Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利、血管抑素、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利、DL- α -二氟甲基鸟氨酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HCl、内皮抑素、夫马菌素、除莠霉素A、4-维甲酰酚胺、胡桃醌、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A、甲羟孕酮、米诺环素、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明、血小板反应蛋白、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win(Wnt)信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、Z06474、SU1248、vitaxin、POGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽。一方面,所述化学治疗剂为吉西他滨与纳布-紫杉醇的组合。

[0033] 除非从实施方式或方面的上下文中明确或清楚地排除,否则本文所描述的每个方面和实施方式均能够一起使用。

附图说明

[0034] 在所附权利要求书中对本公开的特征进行了具体阐述。通过参考阐述了说明性实施方式的以下详细说明,将获得对本公开的特征和优点的更好理解,在所述实施方式中利用了本公开的原理,并且在其附图中:

[0035] 图1示出了实施例1-6中描述的2期试验的治疗群组和分析群体。

[0036] 图2示出了实施例1-6中描述的2期试验中的功效研究的靶病变总和的变化百分比。

[0037] 图3示出了实施例1-6中描述的2期试验中的群组的总存活(OS)率。

[0038] 图4A示出了外周血单核细胞(PBMC)的免疫谱分析,其示出了在所有三个群组中经激活的效应记忆(EM) T细胞($Ki67^{+}CD8^{+}$)增加,其中群组A1(纳武单抗(nivolumab)+化学疗法)显示出最显著的效果。

[0039] 图4B示出了外周血单核细胞(PBMC)的免疫谱分析,其示出了在群组B2和C2中经激活的髓系树突状细胞($CD86^{+}mDC$)增加。群组A1主要显示出减少。

[0040] 图5A示出了所有三个群组的肿瘤多重IHC分析,其示出了在群组A1和C2中表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比降低,而群组B2显示出PD-L1表达的复杂变化。

[0041] 图5B示出了所有三个群组的肿瘤多重IHC分析,其示出了在群组B2中肿瘤 $CD80^{+}M1$ 巨噬细胞增加,而群组A1和C2显示出减少。

[0042] 图6示出了所有三个群组的粪便样品的微生物谱分析,其示出了群组A1的拟杆菌纲(bacteroidia)增加并且梭菌纲(clostridia)减少,而群组B2显示出相反情况。

[0043] 图7A示出了通过所有三个群组的 $CXCR5^{+}$ 效应记忆 $CD8^{+}$ T细胞的基线免疫谱分析分层的患者生存期。

[0044] 图7B示出了通过所有三个群组的 $CD244^{+}$ 效应记忆 $CD4^{+}$ T细胞的基线免疫谱分析分层的患者生存期。

[0045] 图8A示出了通过根据所有三个群组的RNA Seq分析得出的基线 $TNF\alpha$ 肿瘤基因表达谱分析分层的患者生存期。

[0046] 图8B示出了通过根据所有三个群组的RNASeq分析得出的基线MYC肿瘤基因表达谱分析分层的患者生存期。

[0047] 图9示出了CyTOF门控策略。示出了用于通过CyTOF分析来限定免疫细胞群体的门控策略。示出了代表性流程图。

[0048] 图10示出了T细胞表型分型门控策略。示出了用于通过流式细胞术分析来限定T细胞群体的门控策略。示出了代表性流程图。

[0049] 图11示出了mIF的单个标志物对照。人扁桃体组织上的用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显影的单标志物优化的抗体免疫组织化学(IHC)(上排)与扁桃体上的对应多重免疫荧光(mIF)(下排)的等效性。免疫荧光图像代表所进行的7色测定内的单独标志物定位。

[0050] 图12A-12B示出了PRINCE研究设计和CONSORT图。图12A示出了,PRINCE是一项无缝衔接的1b/2期研究,其中2期部分将患者随机分配到使用nivo/chemo、sotiga/chemo或sotiga/nivo/chemo的治疗。图12B是研究的2期部分的CONSORT图。在1b期期间纳入在群组B2和C2中的患者被纳入在2期部分的安全性和/或功效分析中。

[0051] 图13A-13B示出了随着nivo/chemo治疗,经激活的T细胞的频率而增加。图13A示出了循环 $CD38^{+}CD8^{+}$ (左图)和 $CD4^{+}$ (右图)非原初T细胞在治疗前和治疗中在来自每个群组的患者中的频率,分别呈总非原初 $CD8^{+}$ 或 $CD4^{+}$ T细胞的分数的形式。示出为相对于C1D1(治疗前)的变化倍数,并且以伪log标度绘制。黑线表示中值,并且误差条表示95%CI。P值表示沿着完整序列的最佳拟合线的非零斜率的概率。图13B示出了循环 $CD39^{+}$ 非原初 $CD8^{+}$ (左图)和 $CD4^{+}$ (右图)T细胞在治疗前和治疗中在来自每个群组的患者中的频率,分别呈总非原初 $CD8^{+}$ 或 $CD4^{+}$ T细胞的分数的形式。示出为相对于C1D1(治疗前)的变化倍数,并且以伪log标度绘制。黑线表示中值,并且误差条表示95%CI。P值表示沿着完整序列的最佳拟合线的非零斜率的

概率。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0052] 图14A-14E示出,血液和肿瘤中的生物标志物特征揭示了响应于在患有mPDAC的患者中进行的nivo/chemo和sotiga/chemo治疗的特异性免疫激活机制。图14A示出了循环Ki-67+非原初CD8(左图)和CD4(右图) T细胞在治疗前和治疗中在来自每个群组的患者中的频率,分别呈总非原初CD8或CD4 T细胞的分数形式。示出为相对于C1D1(治疗前)的变化倍数,并且以伪log标度绘制。黑线表示中值,并且误差条表示95% CI。P值表示沿着完整序列的最佳拟合线的非零斜率的概率。图14B示出了使用来自nivo/chemo治疗组中的患者的PBMC样品随时间推移的代表性流程图,其示出了Ki-67+非原初CD8(上图)和CD4(下图) T细胞增加。图14C示出了火山图,所述火山图示出了三个群组中的每个群组的循环蛋白从C1D1(治疗前)显著上调或下调至C1D15(左)或C2D1(右)。虚线表示FDR值为0.05,并且Log2蛋白表达的变化倍数为2。与免疫机制相关的所关注蛋白质突出显示。图14D和图14E示出了来自每个群组的治疗中活检(在可行的情况下为C2D1,细节参见方法)的多重IHC的PD-L1+肿瘤细胞(图14D,左图)和瘤内iNOS+CD80+(图14E,左图)巨噬细胞的频率,其显示为相对于治疗前活检的变化倍数。P值代表治疗前(未归一化的)细胞比例与治疗中细胞比例之间的威尔科克森符号秩检验(Wilcoxon signed-rank test)。示出了来自nivo/chemo群组(PD-L1+肿瘤细胞)(图14D,右图)和sotiga/chemo组(iNOS⁺CD80⁺巨噬细胞)(图14E,右图)中的患者的代表性图像。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0053] 图15A-15H示出,在患有mPDAC的患者中,经激活的T细胞和1型免疫应答随nivo/chemo治疗而增加,而对辅助应答和先天免疫应答至关重要的蛋白质随着sotiga/chemo治疗而增加。图15A示出了循环HLA-DR+非原初CD4(左图)或CD8(右图) T细胞在治疗前和治疗中在来自每个群组的患者中的频率。图15B示出了使来自nivo/chemo治疗组中的患者的PBMC样品随时间推移的代表性流程图,其描绘了HLA-DR+非原初CD8(上图)和CD4(下图) T细胞增加。图15C-15F示出了每个群组的Log₂表达值的循环IFN γ (图15C)、PD-1(图15D)、CXCL9(图15E)和CXCL10(图15F)治疗中相对于治疗前(C1D1)的变化倍数,所述变化倍数以伪log标度绘制。a-f中的时间序列图以粗线示出中值,并且以细线示出个体患者值,并且误差条表示95%置信区间。时间序列图上的P值表示沿着完整序列的最佳拟合线的非零斜率的p值。图15G-15H示出了DIABLO Circos图(图15G)和相关性矩阵(图15H),其示出了来自CyTOF、X50流式细胞术、Olink、蛋白质质谱法的与治疗显著相关的因子以及这些因子之间的相关性。在circos图(图15G)中,圆圈外的线表示治疗相关的量值和方向。图内的线表示生物标志物因子之间的正相关性和负相关性。在相关性图(图15H)中,文字的颜色表示生物标志物的治疗相关。对于所示出的所有细胞群体,频率为相对于亲本群体的频率。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0054] 图16A-H示出了非免疫抑制肿瘤微环境和治疗前的经激活的循环CD8 T细胞与用nivo/chemo治疗的mPDAC患者的生存期相关。图16A是基因表达特征的热图,所述基因表达特征与治疗前肿瘤样品中的响应于nivo/chemo治疗的介于较高值(高于中值)与较低值(低于中值)之间的生存期结果显著相关。个体患者以柱的形式示出,并且按1年的生存状态进行注释,以说明相关。图16B示出了所有群组中的所有患者的总生存期的卡普兰-梅尔(Kaplan-Meier, KM)曲线,所述总生存期按通过NF κ B hallmark通路特征得到的TNF α 高于和低于中值特征值分层。图16C是所有群组中的所有患者的总生存期的KM曲线,所述总生存期

按来自治疗前活检的mIF的高于和低中值百分比的iNOS+瘤内巨噬细胞相对于总巨噬细胞的百分比分层(图16C,上图)。来自两名患者的代表性治疗前肿瘤mIF图像(图16C,下图)。图16D示出了通过mIF得到的治疗前活检中的表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比,所述百分比按1年的总生存状态分层。P值是威尔科克森符号秩检验。图16E示出了治疗前肿瘤活检中的免疫百分比和基因表达特征的相关性矩阵,其中标签通过与生存期结果的相关进行了颜色编码。图16F是nivo/chemo群组中的患者的来自治疗前PBM样品的CD38+效应记忆CD8 T细胞群体上的蛋白质的中值荧光强度的热图。图16G示出了总生存期的KM曲线,所述总生存期的KM曲线按循环CD38+CD8效应记忆T细胞相对于CD8 T细胞的频率在基线处高于和低于中值频率分层。治疗前和治疗中PBM样品(C1D15、C2D1、C4D1)中CD38⁺CD8 T细胞相对于总CD8 T细胞的频率,所述频率按1年的患者生存状态进行分离。P值表示在时间点之间进行的威尔科克森符号秩检验,以显示治疗中细胞比例的增加。图16H示出了对循环因子进行的多组学维度降低和使用独立成分分析得到的肿瘤数据,其中每个点代表按一年时的生存状态着色的单个患者,并且其中定位是通过所有肿瘤和循环生物标志物的降低的维度确定的。对于所示出的所有细胞群体,频率为相对于亲本群体的频率。在所有KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0055] 图17示出了在治疗前在肿瘤细胞上的PD-L1表达趋向于在在用nivo/chemo治疗的mPDAC患者中具有更长生存期。通过多重IHC得到的治疗前活检中的表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比,所述百分比按1年的总生存状态分层。P值是威尔科克森符号秩检验。

[0056] 图18A-18F示出,外周中的抗原经历的非原初T细胞和滤泡辅助T细胞与用nivo/chemo治疗的mPDAC患者的生存期相关。图18A示出了所有群组中的所有患者的总生存期的KM曲线,所述总生存期按循环PD-1+CD39+效应记忆1CD4 T细胞的频率高于和低于中值分层。图18B是nivo/chemo群组中的所有患者的治疗前PD-1+CD39+效应记忆1CD4 T细胞上存在的蛋白质的中值荧光强度的热图。图18C示出了治疗前和治疗中(C1D15、C2D1、C4D1)PD-1+CD39+效应记忆1CD4 T细胞的频率。图18D示出了所有群组中的所有患者的总生存期的KM曲线,所述总生存期按循环T滤泡辅助(CXCR5+PD-1+CD4+) T细胞的频率高于和低于中值分层。图18E是nivo/chemo群组中的所有患者的治疗前T滤泡辅助T细胞上存在的蛋白质的中值荧光强度的热图。图18F示出了治疗前和治疗中(C1D15、C2D1、C4D1)T滤泡辅助T细胞的频率。对于所示出的所有细胞群体,频率为相对于亲本群体的频率。时间序列图示出了按1年的生存状态着色的箱式图,其中中值和四分位数为粗线,并且个体患者值为细线。时间序列的P值代表每个时间点生存组之间的威尔科克森符号秩检验。在KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。

[0057] 图19A-19C示出,外周中的抗原经历的非原初中央记忆T细胞和滤泡辅助T细胞与用nivo/chemo治疗的mPDAC患者的生存期相关。图19A示出了所有群组中的所有患者的总生存期的KM曲线,所述总生存期按循环PD-1+CD39+中央记忆CD4 T细胞的频率高于和低于中值分层。图19B是nivo/chemo群组中的所有患者中的治疗前PD-1+CD39+中央记忆CD4 T细胞上存在的蛋白质的中值荧光强度的热图。图19C示出了治疗前和治疗中(C1D15、C2D1、C4D1)PD-1+CD39+中央记忆CD4 T细胞的频率。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0058] 图20A-20G示出了肿瘤中的辅助特征和增殖性CD4 T细胞与接受sotiga/chemo治疗的患者的生存期相关。图20A是基因表达特征的热图,所述基因表达特征与治疗前肿瘤活

检中的响应于sotiga/chemo治疗的介于较高值(高于中值)与较低值(低于中值)之间的生存期显著相关。单独的患者以柱示出,其中标签对应于一年总生存状态。图20B-20D示出了总生存期的KM曲线,所述总生存期按Th1(图20B)、IFN γ (图20C)和E2F(图20D)基因表达特征高于和低于中值分层。图20E示出了总生存期的KM曲线,所述总生存期按从对治疗前肿瘤样品的mIF中获得的Ki-67-Foxp3-CD4 T细胞高于和低于中值分层(图20E,上图)以及来自在Ki-67-Foxp3-CD4 T细胞高和低的具有相关患者生存期值的肿瘤样品的代表性图像(图20E,下图)。图20F示出了治疗前肿瘤活检中免疫浸润和基因表达特征的相关性矩阵,所述免疫浸润和基因表达特征按与总生存结果的相关进行着色。图20G是DIABLO Circos图,其示出了来自RNAseq(gx)和Vectra成像的与1年的生存状态显著相关的因子,以及这些因子之间的相关性。圆圈外的线表示治疗相关的量值和方向。图内的线表示生物标志物因子之间的正相关性和负相关性。在所有KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。*关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0059] 图21A-21B示出了总生存期和肿瘤应答。图21A示出了功效群体中患者的总生存期。图21B示出了利用基线后肿瘤评估得到的每位患者的靶病变的直径的总和相对于基线的最大变化百分比。nivo/chemo群组中的四名患者、sotiga/chemo群组中的1名患者和sotiga/nivo/chemo组中的3名患者没有进行任何基线后肿瘤评估。经确认的完全应答(CR)或部分应答(PR)被定义为两次连续具有完全应答/部分应答的总体应答的肿瘤评估。

[0060] 图22A-22L示出了,循环中的交叉呈递的经激活的APC和1型辅助T细胞与接受sotiga/chemo治疗的患者的生存期相关。图22A示出了在所有患者中和所有时间点处来自CyTOF的细胞的无监督聚类的力导向图可视化,其示出了与生存期相关并且在另外的套组中利用门控分析进行跟踪的特定树突状细胞群体。图22B示出了按循环CD1c+交叉呈递DC(CD141+)的C1D1频率在C1D1处高于和低于中值分层的总生存期的时间序列(上)和KM曲线(下)。图22C示出了按循环交叉呈递DC(CD141+)的C1D15频率在C1D15处高于和低于中值分层的总生存期的时间序列(上)和KM曲线(下)。图22D示出了按循环CD1c交叉呈递DC(CD141+)的C1D15频率在C1D15处高于和低于中值分层的总生存期的时间序列(上)和KM曲线(下)。图22E示出了按循环常规DC的C2D1频率在C2D1处高于和低于中值分层的总生存期的时间序列(上)和KM曲线(下)。图22F示出了按治疗前循环PD-1+Tbet+非原初CD4 T细胞的频率分层的总生存期的KM曲线。图22G是所有患者的存在于PD-1+Tbet+非原初CD4 T细胞上的蛋白质的治疗前平均荧光强度的热图。图22H示出了治疗前和治疗中(C1D1、C1D15、C2D1和C4D1)PD-1+Tbet+非原初CD4 T细胞的频率,其按1年的生存状态进行着色。图22I示出了按治疗前循环Tbet+Eomes+非原初CD4 T细胞的频率分层的总生存期的KM曲线。图22J是所有患者的存在于Tbet+Eomes+非原初CD4 T细胞上的蛋白质的治疗前平均荧光强度的热图。图22K示出了治疗前和治疗中(C1D1、C1D15、C2D1和C4D1)Tbet+Eomes+非原初CD4 T细胞的频率,其按1年的生存状态进行着色。图22L示出了对循环因子进行的多组学维度降低和使用独立成分分析得到的肿瘤数据,其中每个点代表按一年时的生存状态着色的单个患者,并且其中定位是通过所有肿瘤和循环生物标志物中的降低的维度确定的。对于树突状细胞群体来说,频率为相对于总白细胞的频率。对于T细胞群体来说,频率为相对于母体的频率。时间序列图示出了按1年的生存状态着色的箱式图,其中中值和四分位数为粗线,并且个体患者值为细线。时间序列的P值代表每个时间点生存组之间的威尔科克森符号秩检验。在KM曲线上,P值

来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。**关于适用分析的样品的数量,参见补充表19。

[0061] 图23A-23B示出了,与树突状细胞成熟相关的可溶性分子与用sotiga/chemo治疗的mPDAC患者的治疗中生存期(C1D15)相关。图23A示出了在C1D15时所有群组中的所有患者的总生存期的卡普兰-梅尔(KM)曲线,所述总生存期按可溶性CD83蛋白表达高于和低于中值特征值分层。图23B示出了在C1D15时所有群组中的所有患者的总生存期的卡普兰-梅尔(KM)曲线,所述总生存期按可溶性ICOSL蛋白表达高于和低于中值特征值分层。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0062] 图24A-24E示出了,特定B细胞群体的较高频率和2B4+T细胞的较低浓度与用sotiga/chemo治疗的患者的生存期相关。图24A示出了在所有患者中和所有时间点处来自CyTOF的细胞的无监督聚类的力导向图可视化,其示出了与生存期相关并且在另外的套组中利用门控分析进行跟踪的特定B细胞群体。图24B示出了按治疗前循环HLA-DR+CCR7+B细胞相对于总白细胞的频率高于和低于中值频率分层的总生存期的KM曲线。图24C示出了按治疗前循环2B4+非原初CD4 T细胞相对于总非原初CD4 T细胞的频率分层的总生存期的KM曲线。图24D示出了所有患者的存在于2B4+非原初CD4 T细胞上的蛋白质的治疗前平均荧光强度的热图。图24E示出了治疗前和治疗中(C1D1、C1D15、C2D1和C4D1)2B4+非原初CD4 T细胞的频率。图示出了按1年的生存状态着色的箱式图,其中中值和四分位数为粗线,并且个体患者值为细线。P值表示时间点之间的威尔科克森符号秩检验,其示出了治疗中的增加。在所有KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0063] 图25示出了nivo/chemo和sotiga/chemo后的生存期的生物标志物以及其重叠。宽类别的循环生物标志物的韦恩图(Venn diagram)(上)。左侧的圈示出了sotiga/chemo后的生存期的生物标志物,右侧的圈示出了nivo/chemo后的生存期的生物标志物,并且中间示出了与两个治疗组中的生存期相关的重叠生物标志物。颜色表示相关方向,其中蓝色为与较长生存期相关的较高值,并且红色为与较短生存期相关的较高值。肿瘤生物标志物示出了相同结构(下)。

[0064] 图26A-26E示出了,循环CD38+非原初T细胞的较低频率与用sotiga/nivo/chemo治疗的患者的较长的生存期相关。a、b,按循环CD38+非原初CD4(图26A)和CD8(图26B)T细胞的频率在基线时高于和低于中值频率值分层的总生存期的KM曲线。c,所有患者的存在于CD38+非原初CD4和CD8 T细胞上的治疗前蛋白质的中值荧光强度的热图。图26D-26E示出了CD38+非原初CD4(图26D)和CD8(图26E)T细胞的频率以治疗前和治疗中示出。对于所示出的所有细胞群体,频率为相对于母体的频率。时间序列图示出了按1年的生存状态着色的箱式图,其中中值和四分位数为粗线,并且个体患者值为细线。时间序列的P值代表时间点之间的威尔科克森符号秩检验。在KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0065] 图27A-27D示出了,响应于索替格利单抗、纳武单抗和化学疗法的组合疗法的生存期可能会受到循环中的调节B细胞的影响。图27A示出了循环CCR7+CD11b+CD27-B细胞在来自每个治疗前和治疗中的治疗组的患者中(C1D15、C2D1、C4D1)的频率,所述频率示出为相对于C1D1的变化倍数并且以伪log标度绘制。图27B示出了按CCR7+CD11b+CD27-B细胞高于

和低于中值频率值分层的总生存期的KM曲线。图27C是所有患者的在治疗中(C1D15)存在于CCR7+CD11b⁺+CD27-B细胞上的不同蛋白质的中值荧光强度的热图。图27D示出了每个治疗组的治疗前和治疗中(C1D15、C2D1、C4D1)CCR7+CD11b+CD27-B细胞的频率,所述频率按1年时的总生存状态分层。对于所示出的所有细胞群体,频率为相对于总白细胞的频率。时间序列图以粗线示出了中值,以细线示出了个体患者值,并且误差条为95%置信区间。时间序列的P值代表每个时间点生存组之间的威尔科克森符号秩检验。在KM曲线上,P值来自组之间的log秩检验,并且阴影区表示95% CI。**关于适用分析的样品的数量,参见表7。

[0066] 以下描述和实例详细说明了本公开的实施方式。

[0067] 应当理解,本公开不限于本文所描述的特定实施方式并且因此可以变化。本领域的技术人员将认识到,还存在涵盖在本公开的范围内的本公开的变化和修改。

[0068] 所有术语都旨在按照本领域的技术人员所理解的方式来理解。除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0069] 本文所使用的章节标题仅出于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。

[0070] 尽管可以在单个实施方式的上下文中描述本公开的各种特征,但是也可以单独地或以任何合适的组合来提供所述特征。相反,尽管为了清楚起见,可以在单独实施方式的上下文中描述本公开,但是也可以在单个实施方式中实施本公开。

具体实施方式

[0071] 除非另外定义,否则本文使用的所有的专门术语、符号和其它科学术语或专用词旨在具有本公开所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或便于参考起见,本文对具有通常理解的含义的术语进行了定义,并且本文中包括这些定义不应被必然解释为代表与本领域通常理解的含义有实质性差异。所属领域的技术人员使用常规方法很好地理解且通常使用本文中描述或参考的许多技术和程序。

[0072] 除非上下文另外清楚地指明,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”以及“所述(the)”包括复数指代物。例如,术语“细胞”包括一种或多种细胞,包括其混合物。“A和/或B”在本文中用于包括所有以下替代方案:“A”、“B”、“A或B”和“A和B”。

[0073] “包括(comprising)”或“包括(including)”或任何语法变体一个或多个所列举的元件的组合物或方法可以包括其它未具体列举的元件。例如,包括抗体的组合物可以含有单独的抗体或与其它成分的组合。

[0074] 某些范围在本文中以术语“约”引导的数值呈现。术语“约”在本文中具有其近似的原始意义,并且用于为其引导的确切数字以及接近的数字或近似于该术语引导的数字提供字面支持。在确定一个数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在其出现的上下文中提供具体列举的数字的实质等效形式的数字。例如,如果从上下文中近似程度以其它方式不清楚,则“约”意指在所提供的值的正负10%以内,或四舍五入到最接近的有效数字,在所有情况下都包括所提供的值。在提供范围的情况下,所述范围包括边界值。

[0075] 如本文所使用的,术语对癌症的“治疗”或其任何语法变体意指向患有癌症或被诊断为患有癌症的受试者施用CD40激动剂的组合疗法,例如抗CD40抗体(例如索替格利单抗)

和一种或多种化学疗法药物,以实现至少一种积极的治疗效果,例如减少癌细胞的数量、减小肿瘤大小、降低癌细胞浸润到外周器官中的速率或降低肿瘤转移或肿瘤生长的速率。癌症的积极治疗效果可以以多种方式来测量(参见W.A.Weber,《核医学杂志(J.Nucl.Med.)》50:1S-10S(2009))。有效治疗癌症患者的所公开的组合的治疗方案可以根据如患者的疾病状态、年龄和体重等因素和所述疗法引发受试者的抗癌应答的能力而有所不同。治疗方法、药物和所公开的用途在每个受试者中都实现积极的治疗效果可能是无效的,但所述治疗方法、药物和所公开的用途应在统计显著数量的受试者中实现积极的治疗效果,正如通过本领域已知的任何统计测试所确定的。

[0076] 术语“抗体”包括与单个抗原特异性结合或与多种抗原特异性结合的完整抗体和其结合片段(例如,多特异性抗体,如双特异性抗体、三特异性抗体等)。因此,除非上下文另有要求,否则任何对抗体的提及都应被理解是指完整形式的抗体或结合片段。

[0077] 可与“抗原结合片段”互换使用的术语“结合片段”在本文中是指抗体的由包括一个或多个CDR的一部分形成的抗体片段或与抗原特异性结合但不包括完整天然抗体结构的任何其它抗体片段。抗原结合片段的实例包括但不限于双功能抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)_c、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds双功能抗体)、三功能抗体、四功能抗体、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、微型抗体、结构域抗体、二价结构域抗体、IgNAR、V-NAR和hcIgG。结合片段可以通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生。

[0078] 关于抗体的“Fab”是指抗体的由通过二硫键与单条重链的可变区和第一恒定区结合的单条轻链(可变区和恒定区两者)组成的所述部分。

[0079] “Fab'”是指包括铰链区的一部分的Fab片段。

[0080] “F(ab')₂”是指Fab'的二聚体。

[0081] 关于抗体的“Fc”是指抗体的由第一重链的通过二硫键合与第二重链的第二恒定区和第三恒定区结合的第二恒定区和第三恒定区组成的所述部分。抗体的Fc部分负责各种效应功能,如ADCC和CDC,但在抗原结合中不起作用。

[0082] 关于抗体的“Fv”是指抗体的用于携带完整抗原结合位点的最小片段。Fv片段由单条轻链的与单条重链的可变区结合的可变区组成。

[0083] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由彼此直接连接或通过肽接头序列连接的轻链可变区和重链可变区组成的经工程化的抗体(Huston J.S.等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,85:5879(1988))。

[0084] “单链Fv-Fc抗体”或“scFv-Fc”是指由与抗体的Fc区连接的scFv组成的经工程化的抗体。

[0085] “骆驼化单结构域抗体”、“重链抗体”或“HCab”是指含有两个V_H结构域并且不含有轻链的抗体(Riechmann L.和Muyldermans S.,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》.12月10日;231(1-2):25-38(1999);Muyldermans S.,《生物技术杂志(J Biotechnol.)》6月;74(4)277-302(2001);W094/04678;W094/25591;美国专利第6,005,079号)。重链抗体最初源自骆驼科(Camelidae)(骆驼、单峰骆驼和美洲驼)。虽然缺乏轻链,但骆驼化抗体具有真正的抗原结合库(Hamers-Casterman C.等人,《自然(Nature)》6月3日;363(6428):446-8

(1993); Nguyen V.K. 等人“骆驼科的重链抗体:进化创新的案例(Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation)”,《免疫遗传学(Immunogenetics)》.4月;54(1):39-47(2002); Nguyen V.K. 等人《免疫学(Immunology.)》5月;109(1):93-101(2003)。重链抗体的可变结构域(VHH结构域)表示通过适应性免疫应答产生的最小已知抗原结合单位(Koch-Nolte F. 等人,《美国实验生物学会联合会杂志(FASEB J)》.11月;21(13):3490-8.2007年6月15日电子版(2007))。

[0086] “纳米抗体”是指由一个来自重链抗体的VHH结构域和两个恒定结构域CH2和CH3组成的抗体片段。

[0087] “双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述片段包括与同一多肽链中的V_L结构域连接的V_H结构域(V_H-V_L或V_L-V_H) (参见例如,Holliger P. 等人,《美国国家科学院院刊》7月15日;90(14):6444-8(1993);EP404097;W093/11161)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,所述结构域被迫使与另一条链的互补结构域配对,由此产生两个抗原结合位点。抗原结合位点可以靶向相同或不同抗原(或表位)。

[0088] “结构域抗体”是指仅含有重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或更多个V_H结构域利用肽接头共价连接,以产生二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的两个V_H结构域可以靶向相同或不同抗原。

[0089] 在某些实施方式中,“(dsFv)₂”包括三条肽链:两个V_H部分通过肽接头连接并且通过二硫桥与两个V_L部分结合。

[0090] 在某些实施方式中,“双特异性ds双功能抗体”包括通过V_{H1}与V_{L1}之间的二硫桥与V_{L1}-V_{H2}(通过肽接头连接)结合的V_{H1}-V_{L2}(也通过肽接头连接)。

[0091] 在某些实施方式中,“双特异性dsFv”或“dsFv-dsFv’”包括三条肽链:V_{H1}-V_{H2}部分,其中所述重链通过肽接头(例如,长柔性接头)连接,并且分别通过二硫桥与V_{L1}和V_{L2}部分结合,其中每条二硫键配对的重链和轻链都具有不同的抗原特异性。

[0092] 在某些实施方式中,“scFv二聚体”是二价双功能抗体或二价ScFv(BsFv),所述二价双功能抗体或BsFv包括(通过肽接头连接的)V_H-V_L,所述V_H-V_L与另一个V_H-V_L部分二聚化,使得一个部分的VH与另一个部分的VL配位并且形成两个可以靶向相同抗原(或表位)或不同抗原(或表位)的结合位点。在其它实施方式中,“scFv二聚体”是双特异性双功能抗体,所述双特异性双功能抗体包括与V_{L1}-V_{H2}(通过肽接头连接)缔合的V_{H1}-V_{L2}(也通过肽接头连接),使得V_{H1}与V_{L1}配位并且V_{H2}与V_{L2}配位,并且每个所配位的对具有不同抗原特异性。

[0093] 术语“生物样品”或“样品”是指从个体或受试者体内分离出的任何固体或液体样品。例如,所述样品可以指从动物(例如,人)体内分离出的任何固体样品(例如,组织样品)或液体样品(例如,血液),如但不限于,活检材料(例如,固体组织样品)或血液(例如,全血)。例如,此类样品可以是新鲜的、固定的(例如,福尔马林固定的、醇固定的或丙酮固定的)、石蜡包埋的或在分析前冷冻的。在一实施方式中,所述生物样品是从肿瘤(例如,胰腺癌)中获得的。“测试生物样品”是已作为分析、监测或观察的受试者的生物样品。含有相同类型的生物样品(例如,相同类型的组织或细胞)的“参考生物样品”是测试生物样品的对照。

[0094] 术语“基因特征”是指可通过分子特征数据库(Molecular Signatures Database,

MSigDB) (V7.4) 公开获取的用于基因集富集分析 (GSEA) 的hallmark基因特征。Hallmark基因集是通过汇总许多MSigDB基因集得出以代表明确限定的生物状态或过程的连贯表达的特征。例如,MYC hallmark基因集包括属于肿瘤抑制因子的基因、致癌基因、易位癌基因、蛋白激酶、细胞分化标志物、同源结构域蛋白、转录因子和细胞因子以及生长因子。

[0095] 如本文所使用的,“个体”或“受试者”包括动物,如人类动物(例如,人类个体)和非人动物。在一些实施方式中,“个体”或“受试者”是处于医师的护理下的患者。因此,受试者可以是患有、有风险患上或疑似患有所关注的疾病(例如,癌症)和/或所述疾病的一种或多种症状的人类患者或个体。受试者还可以是在诊断时或之后被诊断出有风险患上所关注的病状的个体。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(例如啮齿动物,例如小鼠)、非人灵长类动物和例如羊、狗、牛、鸡等其它哺乳动物以及如两栖动物、爬行动物等非哺乳动物。

[0096] 应当理解,为清楚起见而在单独实施方式的上下文中描述的本公开的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见而在单个实施方式的上下文中描述的本公开的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。与本公开有关的实施方式的所有组合具体涵盖在本公开中,并且正如每个组合和每一组合单独且清楚地公开一样公开于本文中。此外,各个实施方式和其要素的所有子组合也都具体涵盖在本公开中,并且正如每个此类子组合和每一此类子组合在本文中单独且清楚地公开一样公开于本文中。

[0097] II. 用于鉴定癌症患者的子集的方法

[0098] 本文尤其提供了鉴定用CD40激动剂,如抗CD40抗体(例如,如索替格利单抗)治疗的癌症患者的子集的方法。在一些实施方式中,治疗是与一种或多种化学疗法药物(例如吉西他滨和纳布-紫杉醇)组合。本文提供了用于治疗癌症的方法以及辅助经鉴定的癌症患者子集的癌症治疗的方法。本文还提供了用于鉴定适于治疗的癌症患者子集的系统 and/或试剂盒。

[0099] 为了评估受试者是否会对包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗或CD40配体融合蛋白)和化学疗法(例如,吉西他滨和纳布-紫杉醇)的组合疗法有效作出应答,或者评估此组合疗法的持续治疗,可以采用以下方法。

[0100] 术语“CD40激动剂”是类似于CD40配体的结合与CD40特异性地结合以激活CD40的药剂。CD40激动剂可以包括与CD40结合用于受体激活的化合物。CD40激动剂也可以是模拟与CD40结合并且激活CD40的CD40配体的化合物。CD40激动剂可以是抗体,例如针对CD40的单克隆抗体或其抗原结合片段。当在本文中提及特定生物名称时,所述特定生物名称还可以包括其生物仿制药以及参考产物生物制剂。示例性抗体或其抗原结合片段包括但不限于索替格利单抗、赛利克鲁单抗、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870,893、达西珠单抗和CDX-1140。

[0101] 测试生物样品(例如,大块肿瘤组织和/或血液)和一种或多种参考或对照生物样品可以在施用组合疗法之前和之后从患有特定类型的癌症的测试受试者和一个或多个患有与所述测试受试者相同类型的癌症的参考受试者体内获得。供本公开的方法使用的示例性生物样品包括但不限于肿瘤样品、血液样品、血清样品、外科手术样品和活检样品。在一个实例中,可以使用本领域的任何已知技术(例如,Personalis公司(Personalis, Inc.)的ImmunoID NeXT平台)对大块组织样品进行全外显子组和转录组分析。所产生的数据可以用

于基因表达定量。全转录组测序结果可以使用例如STAR等进行比对,并且可以使用例如Personalis公司的ImmunoID NeXT工具Expressionist等计算以每百万个转录本(TPM)为单位的经归一化的表达值。可以通过对MYC、E2F或IFN- γ hallmark基因集中每种基因的log归一化的表达值求平均来计算例如MYC、E2F或IFN- γ 的hallmark基因特征评分(例如,TNF α 基因特征评分、E2F基因特征评分、IFN- γ 基因特征评分或MYC基因特征评分)。对于生存期分析,基于此MYC、E2F或IFN- γ 基因特征值对受试者进行分层,其中“高”相对于“低”是通过所有受试者,包括测试受试者和一个或多个参考受试者的中值特征值定义的。在一些实施方式中,例如MYC hallmark基因集中的基因集的较低归一化的表达值可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。在其它实施方式中,例如E2F基因集中的基因集的较低归一化的表达值可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。在一些实施方式中,例如IFN- γ 基因集中的基因集的较低归一化的表达值可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。

[0102] 生物样品,例如外周血样品可以在施用组合疗法之前和之后从测试受试者和一个或多个参考受试者处获得。外周血单核细胞(PBMC)可以从所述外周血样品中分离。分离出的PBMC可以使用例如X50平台进行免疫谱分析。例如,可以利用被设计成评估T细胞表型和功能的多重流式套组。在一些实施方式中,PBMC可以被鉴定为活CD45⁺细胞。患者PBMC可以基于表面标志物的存在而被分类为不同的免疫细胞群体。CD8⁺T细胞可以由于CD3和CD8表面标志物的存在而选自CD45⁺细胞。CD4⁺T细胞可以由于CD3和CD8表面标志物的存在而选自CD45⁺细胞。CD8⁺和CD4⁺T细胞可以进一步细分为许多T细胞子集,如效应记忆1型(EM1)细胞。EM1 T细胞可以被经典地定义为CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁻。此细胞群体可以按CXCR5表达而被进一步分为CXCR5⁺群体或者按CD244表达而被进一步分为CD244⁺(还被称为2B4)群体。CXCR5⁺群体和/或CD244⁺群体的细胞计数与总EM1T细胞群体计数的比率可以显示为与总生存期相关。在一些实施方式中,循环CXCR5⁺效应记忆(CD45RA⁻CD27⁺)CD8⁺T细胞与总效应记忆(CD45RA⁻CD27⁺)CD8⁺T细胞的较低比率可以与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。在一些实施方式中,循环CD244⁺效应记忆(CD45RA⁻CD27⁺)CD4⁺T细胞与总效应记忆(CD45RA⁻CD27⁺)CD4⁺T细胞的较低比率可以与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。

[0103] 在其它实施方式中,CD4⁺T细胞可以进一步表征为I型辅助CD4⁺T细胞和抗原经历的CD4⁺T细胞。I型辅助CD4⁺T细胞可以通过Tbet⁺、Eomes⁺和PD-1⁺的表达来鉴定,而抗原经历的CD4⁺T细胞可以通过PD-1⁺、Tbet⁺和TCF-1⁺的表达来鉴定。这两种群体可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。

[0104] 还可以分析B细胞表型和功能。B细胞可以基于CD19表达来鉴别,并且可以基于CD38相对于CD27的表达而被进一步区分为记忆细胞相对于原初细胞相对于浆母细胞。在一些实施方式中,循环HLA-DR+CCR7+B细胞的细胞计数可以从来自受试者的生物样品中确定。这种循环B细胞群体的细胞计数可以与对照或参考样品的细胞计数进行比较,并且,在一些

实施方式中,HLA-DR+CCR7+B细胞的细胞计数增加可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。

[0105] 在一些实施方式中,循环交叉呈递树突状细胞(DC)的细胞计数可以从来自受试者的生物样品中确定。如本文所使用的,交叉呈递树突状细胞可以是获取用于呈递在MHC I类分子上的外源抗原的任何树突状细胞。交叉呈递树突状细胞可以例如,如下面的实施例所描述的来鉴定。在一些实施方式中,交叉呈递树突状细胞可以通过HLA-DR+CD14-CD16-CD11c+CD141+标志物来鉴定。在一些实施方式中,所述交叉呈递DC是CD1C+CD141+。循环交叉呈递DC的细胞计数与对照或参考样品的细胞计数进行比较,并且,在一些实施方式中,交叉呈递DC或CD1C+CD141+DC的细胞计数增加可能与用例如索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的例如转移性胰腺癌患者的较长总生存期显著相关。

[0106] 在以上方法中,治疗前生物样品可以在用CD40激动剂(例如,索替格利单抗)+化学疗法(例如,吉西他滨和纳布-紫杉醇)的组合疗法进行治疗之前的任何时间点提取。例如,治疗前生物样品可以在治疗启动之前几分钟、几小时、几天、几周或几个月提取,或与治疗启动基本上同时提取。治疗后生物样品也可以在治疗启动之后的任何时间点从受试者中提取。例如,治疗后生物样品可以在用CD40激动剂(例如,索替格利单抗)+化学疗法(例如,吉西他滨和纳布-紫杉醇)的组合疗法治疗之后几分钟、几小时、几天、几周或几个月提取。提取治疗后生物样品的时间点的非限制性实例包括但不限于:用CD-40激动剂(例如,索替格利单抗)+化学疗法(例如,吉西他滨和纳布-紫杉醇)的组合疗法治疗启动之后1周至24个月、1周至18个月、1周至12个月、1周至9个月、1周至6个月、1周至3个月、1周至9周、1周至8周、1周至6周、1周至4周或1周至2周。可以提取治疗后生物样品的时间点基于组合疗法的周期确定。此类时间点的非限制性实例为:第1周期、第2周期、第3周期、第4周期、第5周期、第6周期、第7周期、第8周期、第9周期、第10周期、第12周期、第16周期、第18周期、第20周期、第24周期、第30周期或第32周期之后。

[0107] 如果已被诊断为患有癌症的受试者在用包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法治疗后显示出部分应答,则所述受试者可以被确定为对疗法作出应答。“部分应答”意指靶病变的最长直径(LD)的总和减少至少30%,取基线总和LD作为参考。如果受试者在用组合疗法治疗后显示出肿瘤缩小,则所述受试者也可以被确定为对疗法作出应答。如果受试者显示出无进展生存期,则所述受试者可以被确定为对组合疗法作出应答。“无进展生存期”(PFS)是指从治疗开始日期到进入进行性疾病(PD)状态前的最后一个日期的时间段。“PD”意指靶病变的LD的总和增加至少20%,取自从治疗开始以来记录的最小总和LD或一个或多个新病变的出现作为参考。

[0108] 生物样品可以从受试者,例如,患有、疑似患有或有风险患上癌症的受试者中获得,所述癌症选自但不限于,胰腺癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌(RCC),例如透明细胞RCC,非透明细胞RCC)、尿路上皮癌、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、黑色素瘤(例如,晚期黑色素瘤,如III-IV期高风险黑色素瘤、不可切除或转移性黑色素瘤)、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌、ER⁺/HER2⁺乳腺癌)、卵巢癌、胃癌(例如转移性胃癌或胃食管交界腺癌)、结直肠癌、胶质母细胞瘤、胆道癌、胶质瘤(例如,具有高突变表型的复发性恶性胶质瘤)、梅克尔细胞癌(例如,晚期或转移性梅克尔细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(例如,原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL))、宫颈癌、晚期或难治性实体瘤、小细

胞肺癌(例如,IV期非小细胞肺癌)、非鳞状非小细胞肺癌、促结缔组织增生黑色素瘤、小儿晚期实体瘤或淋巴瘤、间皮素阳性胸膜间皮瘤、食管癌、肛门癌、唾液癌、前列腺癌、类癌瘤、原始神经外胚层肿瘤(pNET)和甲状腺癌。

[0109] III. 治疗癌症的方法

[0110] 本文所提供的方法可以使得能够评估受试者对包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法的应答性。可以向可能对组合疗法作出应答的受试者施用例如索替格利单抗和至少一种化学疗法药物(例如,吉西他滨和纳布-紫杉醇)。

[0111] 本公开的方法还可以使得能够将受试者分类为更可能从用CD40激动剂和化学疗法的组合疗法进行治疗中受益的受试者组和不太可能从所述治疗中受益的受试者组。从正在考虑进行包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法的受试者组群中选择此类受试者的能力有利于有效治疗。

[0112] 本文所提供的方法还可以用于确定在施用包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法短时间段之后是否继续此疗法,以及基于MYC基因特征评分、E2F基因特征、IFN- γ 基因特征、治疗前相对于治疗后循环CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞与总效应记忆CD8⁺T细胞的比率、耗竭的CD244⁺效应记忆CD4⁺T细胞的基线水平、CXCR5⁺效应记忆CD8⁺T细胞的基线水平、循环交叉呈递树突状细胞的基线水平、CD1C⁺CD141⁺树突状细胞的基线水平、基线循环HLA-DR+CCR7⁺B细胞、基线循环PD-1⁺T细胞、循环TCF-1⁺T细胞和/或循环Tbet⁺T细胞、循环T辅助细胞的水平或其任何组合来确定此疗法是否更有可能或不太可能使患者受益。

[0113] 如果受试者更有可能对包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法作出应答,则可以向所述受试者施用有效量的一种或多种化学疗法药物(例如,吉西他滨、纳布-紫杉醇)和CD40激动剂(例如,CD40抗体,如索替格利单抗)。每种化学疗法药物和CD40激动剂的有效量可以由医疗保健从业者考虑例如患者的特征(例如,年龄、性别、体重、种族等)、疾病的进展和药物的先前暴露来适当地确定。

[0114] 在一些实施方式中,CD40激动剂是抗CD40抗体。在一些实施方式中,所述抗CD40抗体选自由以下组成的组:索替格利单抗,赛利克鲁单抗,ChiLob7/4,ADC-1013,SEA-CD40,CP-870,893,达西珠单抗和CDX-1140。在一些实施方式中,所述抗CD40抗体为索替格利单抗。

[0115] 在一些实施方式中,所述方法可以包括约每两周向患者施用240mg索替格利单抗。

[0116] 在一些实施方式中,一种或多种化学疗法药物可以选自由以下组成的组:吉西他滨、纳布-紫杉醇、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯、亚硝基脲、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星和柔红霉素等蒽环类抗生素、如Taxol品牌和多西他赛等紫杉烷、如长春新碱和长春花碱等长春花生物碱、5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸、伊立替康、伊达比星、丝裂霉素C、奥沙利铂、雷替曲塞、培美曲塞、它莫西芬、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、替诺霉素D、米托蒽醌、博诺霉素、光辉霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他、巴马司他、BAY 12-9656、羧胺三唑、CC-1088、右美沙芬乙酸、二甲基咕吨酮乙酸、内皮抑素、IM-862、马立马司他、青霉胺、PTK787/ZK 222584、RPI.4610、角鲨胺乳酸、SU5416、沙利度胺、康普瑞汀、它莫西芬、COL-3、辛巴司他、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522(Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利、血管抑素、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利、DL- α -二氟甲基鸟氨

酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HC1、内皮抑素、夫马菌素、除莠霉素A、4-维甲酰酞胺、胡桃醌、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A、甲羟孕酮、米诺环素、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明、血小板反应蛋白、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win (Wnt) 信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、ZD6474、SU1248、vitaxin、PDGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽。在一些实施方式中,所述一种或多种化学疗法药物可以为吉西他滨与纳布-紫杉醇的组合。

[0117] 在基于受试者是否将更有可能或不太可能对包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法作出应答对受试者进行分类或选择受试者之后,医疗从业者(例如,医生)可以向受试者施用适当的治疗模式。施用抗CD40抗体(例如,索替格利单抗、赛利克鲁单抗、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CP-870,893、达西珠单抗和CDX-1140)的方法是本领域众所周知的,例如,在其产品标签中描述。

[0118] 应当理解,本文所述的任何疗法(例如,包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法或除组合疗法外的疗法)可以包括一种或多种另外的治疗剂。也就是说,本文所述的任何疗法可以与一种或多种另外的抗肿瘤剂共施用(组合施用)。此外,本文所述的任何疗法可以包括一种或多种用于治疗例如疼痛、恶心和/或包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法的一种或多种副作用的药剂。

[0119] 包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法可以是,例如,同时的或相继的。例如,一种或多种化学疗法药物和抗CD40抗体可以同时施用,或者可以在时间上先施用一种或多种化学疗法药物,并且在时间上再施用抗CD40抗体,或者反之亦然。一种或多种化学疗法药物和抗CD40抗体的给药频率可以是不同的或相同的。在一个实施方式中,给药频率是不同的。包括CD40激动剂(例如,抗CD40抗体,如索替格利单抗)和化学疗法的组合疗法的示例性给药频率可以是几周一次,例如1周、2周、3周、4周或1个月或6周。

[0120] IV. 治疗应用

[0121] A. 施用抗体

[0122] 本文所述的抗体以有效方案施用,这意味着延缓病症的发作、减轻病症的严重程度、抑制病症的进一步恶化和/或改善病症的至少一种体征或症状的给药、施用途径和施用频率。如果受试者已经患有病症,则所述方案可以被称为治疗有效方案。如果受试者患上病症的风险相对于一般群体患上疾病的风险有所升高,但尚未经历症状,则所述方案可以被称为预防有效方案。在一些情况下,可以在个体受试者中观察到相对于同一受试者的历史对照或过去经验的治疗或预防功效。在其它情况下,在临床前或临床试验中,在经治疗的受试者群体中可以表现出相对于对照未经治疗的受试者群体的治疗或预防功效。

[0123] 在一些情况下,受试者被鉴定为PD-L1阳性、CD40阳性、具有较低基线水平耗竭的CD244+效应记忆CD4+T细胞、较低基线水平的CXCR5+效应记忆CD8+T细胞、较高基线水平的循环交叉呈递树突状细胞、较高基线水平的CD1C+CD141+树突状细胞、较高基线水平的循环HLA-DR+CCR7+B细胞、较高基线水平的循环PD-1+T细胞、循环TCF-1+T细胞和/或循环Tbet+T

细胞,较高水平的循环T辅助细胞或其任何组合。在一些实施方式中,基于来自MYC基因集或E2F基因集的一种或多种基因相对于参考群体的基因的低基线表达,选择用本文所述的抗体进行治疗的患者。在一些情况下,所述一种或多种基因选自由以下组成的组:ABCE1、ACP1、AIMP2、AP3S1、APEX1、BUB3、C1QBP、CAD、CANX、CBX3、CCNA2、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT7、CDC20、CDC45、CDK2、CDK4、CLNS1A、CNBP、COPS5、COX5A、CSTF2、CTPS1、CUL1、CYC1、DDX18、DDX21、DEK、DHX15、DUT、EEF1B2、EIF1AX、EIF2S1、EIF2S2、EIF3B、EIF3D、EIF3J、EIF4A1、EIF4E、EIF4G2、EIF4H、EPRS1、ERH、ETF1、EXOSC7、FAM120A、FBL、G3BP1、GL01、GNL3、GOT2、GSPT1、H2AZ1、HDAC2、HDDC2、HDGF、HNRNPA1、HNRNPA2B1、HNRNPA3、HNRNPC、HNRNPD、HNRNPR、HNRNPU、HPRT1、HSP90AB1、HSPD1、HSPE1、IARS1、IFRD1、ILF2、IMPDH2、KARS1、KPNA2、KPNB1、LDHA、LSM2、LSM7、MAD2L1、MCM2、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7、MRPL23、MRPL9、MRPS18B、MYC、NAP1L1、NCBP1、NCBP2、NDUFAB1、NHP2、NME1、NOLC1、NOP16、NOP56、NPM1、ODC1、ORC2、PA2G4、PABPC1、PABPC4、PCBP1、PCNA、PGK1、PHB、PHB2、POLD2、POLE3、PPIA、PPM1G、PRDX3、PRDX4、PRPF31、PRPS2、PSMA1、PSMA2、PSMA4、PSMA6、PSMA7、PSMB2、PSMB3、PSMC4、PSMC6、PSMD1、PSMD14、PSMD3、PSMD7、PSMD8、PTGES3、PWP1、RACK1、RAD23B、RAN、RANBP1、RFC4、RNPS1、RPL14、RPL18、RPL22、RPL34、RPL6、RPLP0、RPS10、RPS2、RPS3、RPS5、RPS6、RRM1、RRP9、RSL1D1、RUVBL2、SERBP1、SET、SF3A1、SF3B3、SLC25A3、SMARCC1、SNRPA、SNRPA1、SNRPB2、SNRPD1、SNRPD2、SNRPD3、SNRPG、SRM、SRPK1、SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF7、SSB、SSBP1、STARD7、SYNCRIP、TARDBP、TCP1、TFDP1、TOMM70、TRA2B、TRIM28、TUFM、TXNL4A、TYMS、U2AF1、UBA2、UBE2E1、UBE2L3、USP1、VBP1、VDAC1、VDAC3、XP01、XPOT、XRCC6、YWHAH和YWHAQ。在一些实施方式中,基于来自IFN γ 基因集的一种或多种基因相对于参考群体的基因的高基线表达,选择用本文所述抗体进行治疗的患者。在一些情况下,一种或多种基因选自由以下组成的组:CD8A、CD274、LAG3和STAT1。

[0124] 在一些情况下,基因集进一步包括E2F1-3。

[0125] 在一些方面中,本文所述的任何方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的一种或多种本文所述的抗CD40抗体。如本文所使用的,抗癌疗法(如本文所述的任何抗CD40抗体)的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是足以实现有益或期望结果的量。对于治疗用途,有益或期望结果包括但不限于,如减少由癌症引起的一种或多种症状、提高患有癌症的受试者的生活质量、减少治疗癌症所需的其它药物的剂量、如通过靶向来增强另一种药物的效果、延缓疾病的进展和/或延长生存期等临床结果。有效剂量可以在一次或多次施用中施用。出于本公开的目的,抗癌疗法的有效剂量是足以直接或间接实现治疗性治疗或预防性治疗的量。如临床上下文中所理解的,抗癌疗法的治疗有效剂量可能会或可能不会与另一种抗癌疗法结合来实现。

[0126] 本文所述的任何抗体的示例性剂量为约0.1-20mg/kg或0.5-5mg/kg体重(例如,约0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg,或20mg/kg)或10-1600mg(如少于约10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg或1600mg或更大的数字中的任一个,包括这些数字之间的值),作为固定剂量。在一个实施

方式中,本文所述的抗体以每三周约300mg至1500mg的量提供。在一个实施方式中,本文所述的抗体以每四周约300mg至1800mg的量提供。剂量取决于受试者的病状和对先前治疗的应答(如果有的话)、治疗是预防性的还是治疗性的,以及病症是急性还是慢性等因素。

[0127] 施用可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、瘤内、局部、鼻内或肌内。在一些实施方式中,进入全身循环的施用是通过静脉内或皮下施用。静脉内施用可以是,例如,通过经30-90分钟输注。

[0128] 施用频率取决于抗体在循环中的半衰期、受试者的病状和施用途径等因素。频率可以是每天、每周、每月、每季度,或响应于受试者的病状的变化或所治疗的病症的进展的不规则间隔。在一实施方式中,频率可以是两周周期。在另一个实施方式中,频率可以是三周周期。在另一个实施方式中,所述频率是四周周期。在另一个实施方式中,所述频率是六周周期。用于静脉内施用的示例性频率是介于每周与每季度之间,经连续治疗过程,但更频繁或不太频繁的给药也是可能的。对于皮下施用,示例性给药频率是每天到每月,但更频繁或不太频繁的给药也是可能的。

[0129] 所施用的给药的数量取决于病症是急性的还是慢性的,以及病症对治疗的应答。对于急性病症或慢性病症的急性加重,1次至10次给药通常是足够的。有时对于急性病症或慢性病症的急性加重,单次团注给药,任选地分次形式的给药是足够的。对于急性病症的复发或急性加重,治疗可以重复。对于慢性病症,抗体可以以规则间隔施用,例如每周、每两周、每月、每季度、每六个月,持续至少1年、5年或10年,或受试者的一生。

[0130] 包括抗CD40抗体的治疗可以通过将患有癌症的受试者的中值无进展生存期或总生存期相较于对照受试者的中值无进展生存期或总生存期增加至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%,或者将这些时间增加2周、1个月、2个月或3个月、或4个月或6个月或甚至9个月或一年。另外或可替代地,包括抗CD40抗体的治疗可以使受试者的完全应答率、部分应答率或客观应答率(完全+部分)相较于对照受试者的完全应答率、部分应答率或客观应答率增加至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%。除了抗CD40抗体外,对照受试者接受与接受抗CD40抗体的受试者相同的治疗。因此,如果接受抗CD40抗体的受试者也接受单独的安慰剂或安慰剂与一些化学治疗剂的组合的话,则除了抗CD40抗体之外,对照受试者可以接受单独的安慰剂或安慰剂与一些化学治疗剂的组合。

[0131] 本文公开的抗CD40抗体可以使经激活的效应记忆T细胞(Ki67+CD8+)的数量相对于不存在本文公开的抗CD40抗体之一的情况下效应记忆T细胞(Ki67+CD8+)的量而有所增加。本文公开的抗CD40抗体还可以使经激活的髓系树突状细胞(CD86+)的数量相对于不存

在本文公开的抗CD40抗体之一的情况下经激活的髓系树突状细胞 (CD86+) 的量有所增加。本文公开的抗CD40抗体可以进一步增加肿瘤CD80+M1巨噬细胞的量。

[0132] 相较于对照受试者,抗CD40抗体还可以减少受试者的粪便样品中的拟杆菌纲并且增加梭菌纲以及 γ 变形菌纲。

[0133] 通常,在临床试验 (例如,II期、II/III期或III期试验) 中,相对于对照受试者组,用抗CD40抗体治疗的受试者的中值无进展生存期和/或应答率的增加是统计上显著的,例如,在 $P=0.05$ 或 0.01 甚至 0.001 的水平下。完全应答率和部分应答率通过癌症的临床试验中通常使用的客观标准,例如,美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute) 和/或食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration) 列出或认可的标准确定,并且可以包括例如肿瘤体积、肿瘤数量、转移、生存期时间和生活质量指标等。

[0134] 用于肠胃外施用的药物组合物可以是无菌的且基本上等渗的,并且是在GMP条件下制备的。药物组合物可以以单位剂型 (即,用于单次施用的剂量) 提供。药物组合物可以使用一种或多种生理上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或助剂调配。制剂取决于所选的施用途径。对于注射,抗体可以在水溶液中,如在如汉克氏溶液 (Hank's solution)、林格氏溶液 (Ringer's solution) 或生理盐水缓冲液或乙酸盐缓冲液等生理相容性缓冲液中调配 (以减少注射部位的不适)。溶液可以含有调配剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地,抗体可以呈冻干形式,以在使用前用合适的媒剂,例如,无菌无热原水来构成。液体制剂中的抗体的浓度可以在如约 $10-150\text{mg/ml}$ 之间变化。在一些制剂中,浓度为约 $20-80\text{mg/ml}$ 。

[0135] B. 组合疗法

[0136] 本公开设想了单独的抗CD40抗体或其与一种或多种活性治疗剂的组合的用途。另外的活性治疗剂可以是小化学分子、如蛋白质、抗体、肽体、肽、DNA、RNA等大分子或此类大分子的片段或细胞疗法或基因疗法。组合疗法可以靶向不同但互补的作用机制,并且由此对潜在疾病、病症或病状上具有协同治疗或预防作用。另外或可替代地,组合疗法还可以允许一种或多种药剂的剂量减少,由此改善、减少或消除与一种或多种药剂相关的不良反应。

[0137] 这种组合疗法中的活性治疗剂可以被调配为单一组合物或单独组合物。如果单独施用,则每种治疗剂可以在相同时间或大约相同时间或不同时间提供。此外,在患者的疗法过程期间,治疗剂以“组合”的形式施用,即使其具有不同的施用形式 (例如,口服胶囊和静脉内),其以不同给药间隔提供,一种治疗剂以恒定给药方案提供而另一种治疗剂被逐渐剂量增加、逐渐剂量减少或中断,或者组合中的每种治疗剂被独立地逐渐剂量增加、逐渐剂量减少、剂量增加或减少,或中断和/或恢复。如果组合被调配为单独组合物,则在一些实施方式中,所述单独组合物以试剂盒的形式一起提供。

[0138] 在某些实施方式中,本文所公开的任何抗CD40抗体与另外的活性治疗剂中的一种或多种活性治疗剂依次施用或施涂,例如,其中另外的活性治疗剂的一种或多种活性治疗剂在根据本公开的抗CD40抗体施用之前或之后施用。在其它实施方式中,抗体与另外的活性治疗剂中的一种或多种活性治疗剂同时施用,例如,其中抗CD40抗体与另外的治疗剂中的一种或多种治疗剂同时或大约同时施用;抗CD40抗体和另外的治疗剂中的一种或多种治疗剂可以以两种或更多种单独制剂的形式存在,或者可以组合成单个制剂 (即共同制剂)。无论另外的药剂是依次施用的还是与抗CD40抗体同时施用的,出于本公开的目的,其都被视为以组合形式施用。

[0139] 本公开的抗体可以与至少一种其它(活性)药剂以在这种情况下适当的任何方式组合使用。在一个实施方式中,使用至少一种活性制剂和至少一种本公开的抗CD40抗体进行治疗维持一定时间段。在另一个实施方式中,使用至少一种活性剂进行治疗减少或中断(例如,当受试者稳定时),而使用本公开的抗CD40抗体进行治疗则维持恒定给药方案。在另外的实施方式中,使用至少一种活性剂进行治疗减少或中断(例如,当受试者稳定时),而使用本公开的抗CD40抗体进行治疗减少(例如,较低剂量、不太频繁的给药或较短治疗方案)。在又一个实施方式中,使用至少一种活性剂进行治疗减少或中断(例如,当受试者稳定时),并且使用本公开的抗CD40抗体进行治疗则增加(例如,较高剂量、更频繁的给药或更长治疗方案)。在又一个实施方式中,使用至少一种活性剂进行治疗维持,并且使用本公开的抗CD40抗体进行治疗减少或中断(例如,较低剂量、不太频繁的给药或较短治疗方案)。在又一个实施方式中,使用至少一种活性剂进行治疗和使用本公开的抗CD40抗体进行治疗减少或中断(例如,较低剂量、不太频繁的给药或较短治疗方案)。

[0140] 使用本公开的抗体进行治疗可以与其它对所治疗的病症有效的治疗组合。当用于治疗增殖性病状、癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病状时,本公开的抗体可以与化学疗法、放射(例如,局部放射疗法或全身放射疗法)、干细胞治疗、外科手术或使用其它生物制剂进行治疗组合。

[0141] 本公开的抗体可以与疫苗一起施用,以引发针对癌症的免疫应答。这种免疫应答通过本公开的抗体而增强。所述疫苗可以包括在癌细胞和/或肿瘤的表面上表达的有效诱导免疫应答,任选地与载剂分子连接的其片段的抗原。

[0142] 在一些实施方式中,另外的治疗剂中的一种或多种治疗剂为免疫调节剂。可以用于本公开的合适的免疫调节剂包括CD40L、B7和B7RP1;如抗CD38、抗ICOS和4-1BB配体等刺激性受体的激活单克隆抗体(mAb);树突状细胞抗原负载(体外或体内);如树突状细胞癌症疫苗等抗癌疫苗、如IL1、IL2、IL12、IL18、ELC/CCL19、SLC/CCL21、MCP-1、IL-4、IL-18、TNF、IL-15、MDC、IFN α/β 、M-CSF、IL-3、GM-CSF、IL-13和抗IL-10等细胞因子/趋化因子、细菌脂多糖(LPS);吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)抑制剂和免疫刺激性寡核苷酸。

[0143] 在某些实施方式中,本公开提供了用于抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括施用本文所述的抗CD40抗体与信号转导抑制剂(STI)的组合,以实现肿瘤生长的相加或协同抑制。如本文所使用的,术语“信号转导抑制剂”是指选择性地抑制信号传导通路中的一个或多个步骤的药剂。本公开所设想的信号转导抑制剂(STI)包括:(i) bcr/abl激酶抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate) **GLEEVEC®**);(ii) 表皮生长因子(EGF)受体抑制剂,包括激酶抑制剂(例如,吉非替尼、厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)和奥希替尼(osimertinib)) 和抗体;(iii) her-2/neu受体抑制剂(例如, **HERCEPTIN®**);(iv) Akt家族激酶或Akt通路抑制剂(例如,雷帕霉素(rapamycin));(v) 细胞周期激酶抑制剂(例如,夫拉平度(flavopiridol));以及(vi) 磷脂酰肌醇激酶抑制剂。参与免疫调节的药剂也可以与本文所述的抗TIGIT抗体组合使用,以抑制癌症患者的肿瘤生长。

[0144] 在一些实施方式中,另外的治疗剂中的一种或多种治疗剂为化学治疗剂。化学治疗剂的实例包括但不限于:吉西他滨、纳布-紫杉醇、folfirionx、氮芥/噁唑磷杂苯、亚硝基脲、三氮烯和烷基磺酸盐、如多柔比星和柔红霉素等蒽环类抗生素、如Taxol^{品牌}和多西他赛

等紫杉烷、如长春新碱和长春花碱等长春花生物碱、5-氟脲嘧啶(5-FU)、亚叶酸、伊立替康、伊达比星、丝裂霉素C、奥沙利铂、雷替曲塞、培美曲塞、它莫西芬、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、替诺霉素D、米托蒽醌、博诺霉素、光辉霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、2-甲氧基雌二醇、普瑞诺马司他、巴马司他、BAY 12-9656、羧胺三唑、CC-1088、右美沙芬乙酸、二甲基咕吨酮乙酸、内皮抑素、IM-862、马立马司他、青霉胺、PTK787/ZK 222584、RPI.4610、角鲨胺乳酸、SU5416、沙利度胺、康普瑞汀、它莫西芬、COL-3、辛巴司他、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522 (Vitaxin II)、CAI、白介素12、IM862、阿米洛利、血管抑素、血管抑素K1-3、血管抑素K1-5、卡托普利、DL- α -二氟甲基鸟氨酸、DL- α -二氟甲基鸟氨酸HCl、内皮抑素、夫马菌素、除莠霉素A、4-维甲酰酚胺、胡桃醌、层粘连蛋白、层粘连蛋白六肽、层粘连蛋白五肽、薰草菌素A、甲羟孕酮、米诺环素、胎盘核糖核酸酶抑制剂、苏拉明、血小板反应蛋白、靶向促血管生成因子的抗体、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制剂、促血管生成生长因子的低分子量酪氨酸激酶抑制剂、GTP酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、AKT激酶或ATP酶抑制剂、Win (Wnt) 信号抑制剂、E2F转录因子抑制剂、mTOR抑制剂、 α 、 β 和 γ 干扰素、IL-12、基质金属蛋白酶抑制剂、ZD6474、SU1248、vitaxin、PDGFR抑制剂、NM3和2-ME2以及塞壬吉肽；以及以上中的任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0145] 化学治疗剂还包括起到调节或抑制对肿瘤的激素作用的作用的抗激素剂，如抗雌激素类，包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬 (raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬 (keoxifene)、奥那司酮 (onapristone) 和托瑞米芬 (toremifene)；以及抗雄激素类，如阿比特龙 (abiraterone)、恩杂鲁胺 (enzalutamide)、阿帕他胺 (apalutamide)、达罗鲁胺 (darolutamide)、氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin)；以及以上中任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方式中，组合疗法包括包含一种或多种化学治疗剂的化学疗法方案。在某些实施方式中，组合疗法包括施用激素或相关激素剂。

[0146] 可以与抗CD40抗体组合施用的另外的治疗模式包括放射疗法、针对肿瘤抗原的抗体、抗体与毒素的复合物、T细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞 (例如，树突状细胞疗法)，包括用于刺激此类抗原呈递细胞的TLR激动剂。

[0147] 在某些实施方式中，本公开设想了本文所述的抗CD40抗体与基于RNA干扰的疗法组合用于沉默基因表达的用途。RNAi开始将较长的双链RNA切割成小干扰RNA (siRNA)。将siRNA的一条链并入到被称为RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 的核糖核蛋白复合物中，所述核糖核蛋白复合物然后用于鉴定与所并入的siRNA链至少部分地互补的mRNA分子。RISC可以与mRNA结合或切割所述mRNA，这两种都抑制翻译。

[0148] 在某些实施方式中，本公开设想了本文所述的抗CD40抗体与调节腺苷的水平药剂组合的用途。此类治疗剂可以作用于催化ATP成为腺苷的转化的外核苷酸，包括将ATP水解为ADP并且将ADP水解为AMP的胞外核苷酸三磷酸二磷酸水解酶1 (ENTPD1，还被称为CD39或分化簇39)，以及将AMP转化为腺苷的胞外5'-核苷酸酶 (NT5E或5NT，还被称为CD73或分化簇73)。在一个实施方式中，本公开设想了与CD73抑制剂，如WO 2017/120508、WO 2018/094148和WO 2018/067424中所述的CD73抑制剂的组合。在一个实施方式中，CD73抑制剂是AB680。在另一种方法中，靶向腺苷A2a和A2b受体。还设想了与A2a和/或A2b受体的拮抗剂的

组合。在一个实施方式中,本公开内容设想了与腺苷受体拮抗剂,如WO/2018/136700或WO 2018/204661中所述的腺苷受体拮抗剂的组合。在一个实施方式中,所述腺苷受体拮抗剂是AB928(etrumadenant)。

[0149] 在某些实施方式中,本公开设想了本文所述的抗CD40抗体与磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)的抑制剂,具体地PI3K γ 同种型组合的用途。PI3K γ 抑制剂可以通过调节髓系细胞,如通过抑制抑制性髓系细胞、削弱免疫抑制性肿瘤浸润巨噬细胞或通过刺激巨噬细胞和树突状细胞来刺激抗癌免疫应答,以产生促进有效T细胞应答的细胞因子,从而减少癌症发展和扩散。可以与本文所述的抗CD40抗体组合的示例性PI3K γ 抑制剂包括WO 2020/0247496A1中所述的抑制剂。在一个实施方式中,所述PI3K γ 抑制剂是IPI-549。

[0150] 在某些实施方式中,本公开设想了本文所述的抗CD40抗体与精氨酸酶抑制剂组合的用途,所述精氨酸酶已被证明负责或参与炎症触发的免疫功能障碍、肿瘤免疫逃逸、免疫抑制和传染病的免疫病理学。示例性精氨酸酶化合物可以,例如,在PCT/US2019/020507和WO/2020/102646中找到。

[0151] 在某些实施方式中,本公开设想了根据本公开的抗CD40抗体与HIF-2 α 抑制剂一起的用途,所述HIF-2 α 在对低氧可用性的细胞应答中起着不可或缺的作用。在缺氧条件下,缺氧诱导因子(HIF)转录因子可以激活调节代谢、血管生成、细胞增殖和生存、免疫逃避和炎症应答的基因的表达。HIF-2 α 过表达与患有各种癌症的患者的不良临床结果相关;缺氧在许多急性和慢性炎症病症,如炎症肠病和类风湿性关节炎中也很普遍。

[0152] 本公开还设想了本文所述的抗CD40抗体与一种或多种RAS信号传导抑制剂的组合。RAS基因家族,例如,HRAS、KRAS和NRAS的致癌突变与多种癌症相关。例如,已在多种肿瘤类型中观察到KRAS基因家族中的G12C、G12D、G12V、G12A、G13D、Q61H、G13C和G12S等的突变。为了抑制突变体RAS信号传导,研究了直接和间接抑制策略。间接抑制剂靶向除RAS信号传导通路中的RAS之外的效应子,并且包括但不限于RAF、MEK、ERK、PI3K、PTEN、SOS(例如,SOS1)、mTORC1、SHP2(PTPN11)和AKT的抑制剂。正在开发的间接抑制剂的非限制性实例包括RMC-4630、RMC-5845、RMC-6291、RMC-6236、JAB-3068、JAB-3312、TN0155、RLY-1971、BI1701963。还探索了RAS突变体的直接抑制剂,并且所述直接抑制剂通常靶向KRAS-GTP复合物或KRAS-GDP复合物。正在开发的示例性直接RAS抑制剂包括但不限于索托拉西(sotorasib,AMG510)、MRTX849、mRNA-5671和ARS1620。在一些实施方式中,一种或多种RAS信号传导抑制剂选自以下组成的组:RAF抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、PI3K抑制剂、PTEN抑制剂、SOS1抑制剂、mTORC1抑制剂、SHP2抑制剂和AKT抑制剂。在其它实施方式中,一种或多种RAS信号传导抑制剂直接抑制RAS突变体。

[0153] 在一些实施方式中,本公开涉及根据本公开的抗CD40抗体与一种或多种anexelektin(即AXL)的抑制剂的组合。AXL信号传导通路与肿瘤生长和转移相关,并且被视为介导针对多种癌症疗法的抗性。存在多种正在开发的AXL抑制剂,所述AXL抑制剂还抑制TAM家族的其它激酶(即,TYRO3、MERTK)以及包括MET、FLT3、RON和AURORA等的其它受体酪氨酸激酶。示例性多激酶抑制剂包括吉特替尼(gilteritinib)、美瑞斯替尼(merestinib)、卡博替尼(cabozantinib)、BMS777607和福瑞替尼(foretinib)。还开发了AXL特异性抑制剂,例如,SGI-7079、TP-0903(即,杜伯替尼(dubermatinib))、BGB324(即,贝门替尼(bemcentinib))和DP3975。

[0154] 在某些实施方式中,本公开设想了本文所述的抗TIGIT抗体与过继性细胞疗法组合的用途,所述过继性细胞疗法是一种新的有希望的个性化免疫疗法形式,在这种疗法中,向癌症患者施用具有抗肿瘤活性的免疫细胞。使用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和被工程化为表达例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)等T细胞探索了过继性细胞疗法。过继性细胞疗法总体上涉及从个体中收集T细胞,对所述T细胞进行基因修饰以靶向特定抗原或增强所述T细胞的抗肿瘤作用,使所述T细胞扩增到足够的数量,以及将经基因修饰的T细胞输注到癌症患者体内。T细胞可以从之后再输注经扩增的细胞的患者中收集(例如,自体的),或者可以从供体患者中收集(例如,异体的)。

[0155] T细胞介导的免疫包括多个顺序步骤,每个步骤都通过对刺激性和抑制性信号进行对重平衡来调节,以优化应答。尽管免疫应答中的几乎所有抑制性信号最终均调节胞内信号传导通路,但许多抑制信号是通过膜受体引发的,所述膜受体的配体是膜结合的或可溶性的(细胞因子)。在调节T细胞激活的共刺激性和抑制性受体和配体在癌症中相对于正常组织通常不会过表达的同时,在组织中调节T细胞效应功能的抑制性配体和受体通常在肿瘤细胞或与肿瘤微环境相关的非转化细胞上过表达。使用激动剂抗体(用于共刺激性通路)或拮抗剂抗体(用于抑制性通路)可以调节可溶性和膜结合受体(配体免疫检查点)的功能。因此,与目前被批准用于癌症疗法的大多数抗体相反,阻断或激动免疫检查点的抗体并不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或其配体,以增强内源性抗肿瘤活性。[参见Pardoll, (2012年4月)《癌症自然评论(Nature Reviews Cancer)》12:252-64]。

[0156] 其中一些在各种类型的肿瘤细胞中选择性地上调的作为用于阻断的候选物的免疫检查点(配体和受体)的实例包括PD-1(程序性细胞死亡蛋白1);PD-L1(程序性细胞死亡1配体1);BTLA(B和T淋巴细胞衰减因子);CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4);TIM-3(T细胞免疫球蛋白粘蛋白3);LAG-3(淋巴细胞活化基因3);TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体);以及杀伤抑制性受体,所述杀伤抑制性受体可以基于其结构特征而被分为两种类别:i)杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),以及ii)C型凝集素受体(II型跨膜受体家族成员)。文献中描述了其它定义不太明确的免疫检查点,包括受体(例如,2B4(还被称为CD244)受体)和配体(例如,某些B7家族抑制性配体,如B7-H3(还被称为CD276)和B7-H4(还被称为B7-S1、B7x和VCTN1))。[参见Pardoll, (2012年4月)《癌症自然评论》12:252-64]。

[0157] 本公开设想了本文所述的抗CD40抗体与前述免疫检查点受体和配体的抑制剂以及尚未描述的免疫检查点受体和配体组合的用途。目前,某些免疫检查点调节剂已获得批准,并且许多其它免疫检查点调节剂正在研发中。当在2011年批准将全人源化CTLA4单克隆抗体伊匹单抗(ipilimumab)(例如,YERVOY®;百时美施贵宝公司(Bristol Myers Squibb))用于治疗黑色素瘤时,其成为美国监管部门接受的首个免疫检查点抑制剂。包括CTLA4和抗体(CTLA4-Ig;阿巴西普(abatacept)(例如,ORENCIA®;百时美施贵宝公司))的融合蛋白已被用于治疗类风湿性关节炎,并且其它融合蛋白已显示出在对爱泼斯坦-巴尔病毒敏感的肾移植患者中有效。获得监管批准的下一种类别的免疫检查点抑制剂针对PD-1和其配体PD-L1和PD-L2。经批准的抗PD-1抗体包括用于各种癌症,包括鳞状细胞癌、经典霍奇金淋巴瘤和尿路癌的纳武单抗(例如,OPDIVO®;百时美施贵宝公司)和派姆单抗(pembrolizumab)(例如,KEYTRUDA®;默克公司(Merck))。

[0158] 经批准的抗PD-L1抗体包括用于某些癌症,包括尿路上皮癌的阿维列单抗

(avelumab) (例如, **BAVENCIO®**; EMD雪兰诺公司 (EMD Serono) 和辉瑞公司 (Pfizer))、阿特朱单抗 (atezolizumab) (例如, **TECENTRIQ®**; 罗氏公司 (Roche) / 基因泰克公司 (Genentech)) 和度伐鲁单抗 (durvalumab) (例如, **IMFINZI®**; 阿斯利康公司 (AstraZeneca))。在本文所提供的一些组合中, 免疫检查点抑制剂选自以下: MEDI-0680 纳武单抗、派姆单抗、阿维列单抗、阿特朱单抗、布格利单抗 (budigalimab)、BI-754091、卡瑞利珠单抗 (camrelizumab)、柯希利单抗 (cosibelimab)、度伐鲁单抗、多塔利单抗 (dostarlimab)、西米普利单抗 (cemiplimab)、信迪利单抗 (sintilimab)、替雷利珠单抗 (tisilelizumab)、特瑞普利单抗 (toripalimab)、瑞弗利单抗 (retifanlimab)、萨善利单抗 (sasanlimab) 和赛帕利单抗 (zimberelimab) (AB 122)。在一些实施方式中, 免疫检查点抑制剂是 MEDI-0680 (AMP-514; W02012/145493) 或匹地利珠单抗 (pidilizumab) (CT-011)。另一种靶向 PD-1 受体的方法是由 PD-L2 (B7-DC) 的与 IgG1 的 Fc 部分融合的胞外结构域的重组蛋白, 被称为 AMP-224。在一个实施方式中, 本公开设想了根据本公开的抗 CD40 抗体与 PD-1 抗体一起的用途。在一个具体实施方式中, 所述 PD-1 抗体是纳武单抗。

[0159] 另一方面, 本公开设想了与抑制 T 细胞激活的细胞因子 (例如, IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGF 和其它免疫抑制细胞因子) 或刺激 T 细胞激活以刺激免疫应答的细胞因子的组合。

[0160] 在又另一方面中, T 细胞应答可以通过所公开的抗 CD40 抗体和以下一种或多种的组合来刺激: (i) 抑制 T 细胞激活的蛋白质的拮抗剂 (例如, 免疫检查点抑制剂), 如 CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、PVRIG、半乳凝素 9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳凝素-1、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1 和 TIM-4, 和/或 (ii) 刺激 T 细胞激活的蛋白质的激动剂, 如 B7-1、B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3 和 CD2。其它可以与本公开的抗 CD40 抗体组合用于治疗癌症的药剂包括 NK 细胞上的抑制性受体的拮抗剂或 NK 细胞上的激活受体的激动剂。例如, 本文所述的抗 CD40 抗体可以与如利瑞鲁单抗 (lirilumab) 等 KIR 拮抗剂组合。

[0161] 用于组合疗法的又其它药剂包括抑制或耗竭巨噬细胞或单核细胞的药剂, 包括但不限于 CSF-1R 拮抗剂, 如包括 RG7155 (W011/70024、W011/107553、W011/131407、W013/87699、W013/119716、W013/132044) 或 FPA-008 (W011/140249; W013169264; W014/036357) 的 CSF-1R 拮抗剂抗体。

[0162] 另一方面, 所公开的抗 CD40 抗体可以与以下一种或多种组合: 连接阳性共刺激受体的激动剂、通过抑制性受体减弱信号传导的阻断剂、拮抗剂和一种或多种系统性地提高抗肿瘤 T 细胞的频率的药剂、克服肿瘤微环境内的不同免疫抑制通路 (例如, 阻断抑制性受体接合 (例如, PD-L1/PD-1 相互作用)、耗竭或抑制 Treg (例如, 使用抗 CD25 单克隆抗体 (例如, 达克珠单抗 (dacilizumab)) 或通过离体抗 CD25 珠耗竭) 或逆转/防止 T 细胞失能或耗竭) 的药剂以及触发肿瘤部位处的先天免疫激活和/或炎症的药剂。

[0163] 一方面, 免疫肿瘤剂是 CTLA-4 拮抗剂, 如拮抗性 CTLA-4 抗体。合适的 CTLA-4 抗体包括, 例如, 伊匹单抗 (例如, **YERVOY®**; 百时美施贵宝公司) 或曲美木单抗。另一方面, 免疫肿瘤剂是 PD-L1 拮抗剂, 如拮抗性 PD-L1 抗体。合适的 PD-L1 抗体包括例如阿特朱单抗 (MPDL3280A; W02010/077634) (例如, **TECENTRIQ®**; 罗氏公司/基因泰克公司)、度伐鲁单抗 (MEDI4736)、BMS-936559 (W02007/005874) 和 MSB0010718C (W02013/79174)。另一方面, 免疫肿瘤剂是 LAG-3 拮抗剂, 如拮抗性 LAG-3 抗体。合适的 LAG-3 抗体包括, 例如, BMS-986016

(W010/19570、W014/08218)或IMP-731或IMP-321(W008/132601、W009/44273)。另一方面,免疫肿瘤剂是CD137(4-1BB)激动剂,如激动性CD137抗体。合适的CD137抗体包括,例如,乌瑞鲁单抗(urelumab)和PF-05082566(W012/32433)。另一方面,免疫肿瘤剂是GITR激动剂,如激动性GITR抗体。合适的GITR抗体包括,例如,BMS-986153、BMS-986156、TRX-518(W006/105021、W009/009116)和MK-4166(W011/028683)。另一方面,免疫肿瘤剂是OX40激动剂,如激动性OX40抗体。合适的OX40抗体包括,例如,MEDI-6383或MEDI-6469。另一方面,免疫肿瘤剂是OX40L拮抗剂,如拮抗性OX40抗体。合适的OX40L拮抗剂包括,例如,RG-7888(W006/029879)。另一方面,免疫肿瘤剂是CD27激动剂,如激动性CD27抗体。合适的CD27抗体包括,例如,伐立鲁单抗(varlilumab)。另一方面,免疫肿瘤剂是MGA271(针对B7H3)(W011/109400)。在仍另一个实施方式中,设想了根据本公开的抗CD40抗体与在Trop-2处定向的药剂,例如抗体药物缀合物、戈沙妥珠单抗-hziy(sacituzumab govitecan-hziy)的组合。在又另一个实施方式中,设想了本文所述的抗CD40抗体与抑制CD47-SIRP α 通路的药剂的组合。抗CD47抗体的实施例是莫洛利单抗(magrolimab)。

[0164] 在一些实施方式中,组合是本公开的抗体与在癌细胞上相对于对照正常组织优先表达的抗原处定向的第二抗体。可以在与本公开的抗体的组合疗法中施用以治疗癌症的抗体的一些实例包括针对HER2抗原的**Herceptin®**(曲妥珠单抗)、针对VEGF的**Avastin®**(贝伐单抗)或针对EGF受体的抗体(如**Erbix®**,西妥昔单抗)和**Vectibix®**(帕尼单抗)。可以施用的其它药剂包括PD-1、PD-L1、CTLA-4、4-1BB、BTLA、PVRIG、VISTA、TIM-3和LAG-3中任一种的抗体或其它抑制剂;或其它下游信号传导抑制剂,例如,mTOR和GSK3 β 抑制剂;以及细胞因子,例如干扰素- γ 、IL-2和IL-15。另外的药剂的一些具体实例包括:伊匹单抗、帕佐帕尼(pazopanib)、舒尼替尼(sunitinib)、达沙替尼(dasatinib)、派姆单抗、INCR024360、达拉菲尼(dabrafenib)、曲美替尼(trametinib)、阿特朱单抗(MPDL3280A)、厄洛替尼(例如,**TARCEVA®**)、科比美替尼(cobimetinib)、纳武单抗和赛帕利单抗。第二抗体或于组合疗法的其它药剂的选择取决于所治疗的癌症。任选地,测试癌症的抗原的表达或优先表达,以引导适当抗体的选择。在一些实施方式中,第二抗体的同种型是用于促进效应功能,如ADCC、CDC和吞噬的人IgG1。

[0165] 本公开涵盖和以上中的任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0166] V. 试剂盒

[0167] 针对CD40的抗体可以与任何第二抗体或描述用于在共同疗法中作为试剂盒的组成部分使用的药剂组合。本文中公开的本公开提供了一种或多种试剂盒,其含有以下中的一种或多种:本文所公开的抗体以及一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂(如但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液、水、无菌水、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、卵磷脂、花生油、芝麻油、如油/水乳剂或水/油乳剂等乳剂、微乳剂、纳米载剂和各种类型的润湿剂)。如醇、油、乙醇、防腐剂、调味剂、着色剂、悬浮剂等添加剂也可以与载剂、稀释剂或赋形剂等一起包括在本公开的试剂盒中。在一个实施方式中,适用于在本文所公开的抗体组合物中使用的药学上可接受的载剂对于施用于受试者来说是无菌的、无病原体的和/或以其它方式安全的,没有相关感染和其它不当不良反应的风险。在试剂盒中,相应药剂可以在单独小瓶中与用于组合之后施用的说明书或用于单独施用的说明书一起提供所述试剂盒还可以包括用于对本文所公开的任何抗CD40抗体进行适当处置和储存的说明书。

[0168] 贯穿本说明书给出的每个最大数值限制旨在包括每个较低的数值限制,如同这种较低的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每个最小数值限制将包括每个较高的数值限制,如同此类较高的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每个数值范围将包括落在此类较宽数值范围内的每个较窄数值范围,如同此类较窄数值范围在本文中明确写出一样。

[0169] 上文或下文引用的所有专利申请、网站、其它出版物、登录号等都出于所有目的通过引用以其整体并入,其程度如同每个单独的项被单独并且具体地指出为通过引用如此并入。如果序列的不同版本与不同时间的登录号相关联,则意指在本申请的有效提交日期与登录号相关联的版本。有效提交日期是指实际提交日期或提及登录号的优先权申请的提交日期(在适用情况下)中较早的日期。同样地,如果出版物、网站等的不同版本在不同时间发布,则除非另有说明,否则旨在申请的有效提交日期最近发布的版本。除非另外具体说明,否则本公开的任何特征、步骤、元件、实施方式或方面都可以与任何其它特征、步骤、元件、实施方式或方面组合使用。

[0170] 尽管为了清楚和理解起见,已通过图解和实施例方式详细地对本公开进行了描述,但显而易见的是,可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。

[0171] 实施例

[0172] 这些实施例仅出于说明性目的提供,而非旨在限制本文所提供的权利要求的范围。

[0173] 实施例1:临床试验2期研究设计

[0174] 来自评估吉西他滨和纳布-紫杉醇加或不加索替格利单抗的1b期试验的结果在患有未经治疗的转移性胰腺导管腺癌(mPDAC)的患者中表现出有前景的临床活性(O'Hara等人,《柳叶刀-肿瘤学(Lancet Oncol.)》2021;22(1):118-131)。1b期试验是用于评估安全性和临床活性,并且确定索替格利单抗与吉西他滨(Gem)和纳布-紫杉醇(NP)组合加或不加纳武单抗的推荐2期剂量的剂量范围研究。本文呈现了后续随机2期试验(NCT03214250)的结果,所述试验评估了吉西他滨和纳布-紫杉醇加或不加索替格利单抗。

[0175] 前12名参与者按4:1:1随机分配到A1(Gem+NP+纳武单抗)、B2(Gem+NP+索替格利单抗0.3mg/kg)或C2(Gem+NP+纳武单抗+索替格利单抗0.3mg/kg)。其余参与者按1:1:1分配随机分配。来自1b期的12名剂量限制性毒性(DLT)可评估的参与者(B2中6名和C2中6名)被纳入在2期功效分析中。(图1)

[0176] 主要终点是相比于Gem+NP的35%历史率(Von Hoff等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)》2013;369(18):1691-1703)的1年总存活(OS)率。次要终点是安全性(不良事件[AE]、治疗相关不良事件[TRAE])、客观应答率(ORR)、疾病控制率(DCR)、无进展生存期(PFS)和应答持续时间(DOR)。探索终点是免疫药效学,免疫生物标志物与临床结果之间的相关以及基线和治疗中微生物组谱。

[0177] 如果参与者的组织学或细胞学诊断为转移性胰腺腺癌和东部肿瘤合作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)为0或1,则其有资格入组;对转移性疾病的先前治疗是不允许的,先前在任何环境中的CD40、PD-1、PD-L1、CTLA-4治疗也是不允许的。2期的入组时间段为2018年8月30日至2019年6月10日。

[0178] 给药时间表为化学疗法第1天、第8天和第15天,每28天一个周期。施用吉西他滨

(1000mg/m²)+纳布-紫杉醇(125mg/m²)。两种都是起始剂量。对于群组A1和C2,在第1天和第15天,施用纳武单抗240mg。

[0179] 在筛选时和第2周期第4天(使用索替格利单抗的群组)或第8天(不使用索替格利单抗的群组)和治疗结束(任选)时收集肿瘤活检。收集基线(第1周期第1天或筛选时)和治疗中血液、肿瘤组织和粪便样品,并且使用本领域已知的各种技术分析肿瘤和免疫生物标志物。35名患者/组的计划入组使用其中I型误差为5%的1侧1样品Z测试为58% OS率相对于35%的替代方案提供了81%的测试能力。试验不支持交叉组比较。

[0180] 实施例2:临床试验2期研究群体

[0181] 在如表1(2021年3月)中呈现的数据快照时,所有参与者进行了至少15个月跟踪。

[0182] 表1:人口统计学和基线特性(安全性群体)

	人口统计学	群组 A1(N = 34)	群组 B2(N = 37)	群组 C2(N = 37)	总计 (N = 108)
[0183]	年龄 (岁)				
	中值 (IQR)	62.5 (54-67)	61.0 (55-69)	62.0 (57.69)	62.0(56-68.5)
	性别				
	男性	20 (58.8%)	24 (64.9%)	20 (54.1%)	64 (59.3%)
	种族或民族				
	亚洲人	3 (8.8%)	4 (10.8%)	1 (2.7%)	8 (7.4%)
	黑色人种	0	3 (8.1%)	2 (5.4%)	5 (4.6%)
	其它	2 (5.9%)	1 (2.7%)	2 (5.4%)	5 (4.6%)
	白色人种	29 (85.3%)	29 (78.4%)	32 (86.5%)	90 (83.3%)
	西班牙裔或拉丁裔	1 (2.9%)	1 (2.7%)	1 (2.7%)	3 (2.8%)
	筛选时的 ECOG 表现评分				
	0	15 (44.1%)	20 (54.1%)	17 (45.9%)	52 (48.1%)
	1	19 (55.9%)	17 (45.9%)	20 (54.1%)	56 (51.9%)
	胰腺瘤位置				
	身体	12 (35.3%)	10 (27.0%)	10 (27.0%)	32 (29.6%)
	头	14 (41.2%)	17 (45.9%)	20 (54.1%)	51 (47.2%)
	尾部	8 (23.5%)	10 (27.0%)	7 (18.9%)	25 (23.1%)
[0184]	筛选时的嗜中性粒细胞-淋巴细胞比率 (NLR)				
	< 5	26 (76.5%)	23 (62.2%)	23 (62.2%)	72 (66.7%)
	≥ 5	8 (23.5%)	14 (37.8%)	14 (37.8%)	36 (33.3%)
	第 1 周期第 1 天的 CA19-9 (U/mL)				
	n	25	26	31	82
	< 100	3 (12.0%)	4 (15.4%)	3 (9.7%)	10 (12.2%)
	100-1000	4 (16.0%)	7 (26.9%)	9 (29.0%)	20 (24.4%)
	≥ 1000	18 (72.0%)	15 (57.7%)	19 (61.3%)	52 (63.4%)
	可评估参与者的数量	23	19	20	62
	KRAS 突变				
	Gly12D	9 (39.1%)	7 (36.8%)	6 (30.0%)	22 (35.5%)
	Gly12V	7 (30.4%)	5 (26.3%)	5 (25.0%)	17 (27.4%)
	Gly12R	2 (8.7%)	3 (15.8%)	1 (5.0%)	6 (9.7%)
	其它	1 (4.4%)	3 (15.8%)	1 (5.0%)	5 (8.1%)
	MSI-H	1 (4.4%)	0	0	1 (1.6%)

[0185] 注意:群组A1:Gem+NP+纳武单抗,群组B2:Gem+NP+索替格利单抗,群组C2:Gem+NP+纳武单抗+索替格利单抗

[0186] 在各组中对基线特性总体上进行了平衡,包括肿瘤负荷、肝转移的存在(A1、B2和C2分别为25[73.5%]、28[75.7%]、27[73.0%])和初始诊断时的阶段(阶段1-3相对于阶段4[阶段4:A1、B2、C2分别为27(79.4%)、28(75.5%)、27(73.0%)](表1)。

[0187] 实施例3:功效

[0188] 群组A1、B2和C2的治疗中中值时间分别为5.2个月、5.1个月和4.7个月。A1的一年OS率为57.3%(1侧 $p=0.007$,95% CI下限=41%),B2为48.1%($p=0.062$,95% CI下限=34%),并且C2为41.3%($p=0.236$,95% CI下限=27%),相比之下历史率为35%。A1中的单个MSI-H患者的OS为249天,并且因此对主要终点的解释未产生有意义影响。中值OS和次要终点列示于表2中。

[0189] 表2:功效群体的总生存期和次要终点。

	% (n) [95%]	A1 (n = 34)	B2 (n = 36)	C2 (n = 35)
[0190] ORR*		50 (17) [32-68]	33 (12) [19-51]	31 (11) [17-49]
ORR (经确认的) *		35 (12) [20-54]	33 (12) [19-51]	26 (9) [13-43]
DCR		74 (25) [56-87]	78 (28) [61-90]	69 (24) [51-83]
中值 DOR, mos		7.3 [2.1-NE]	5.5 [3.7-7.9]	7.9 [1.9-NE]
中值 PFS, mos		6.3 [5.2-8.8]	7.2 [5.3-9.2]	6.7 [4.1-9.8]
中值 OS, mos		16.7 [9.8-18.4]	11.4 [7.2-20.1]	10.1 [7.9-13.2]
1年 OS, % [p]		57.3 [0.007]	48.1 [0.062]	41.3 [0.236]

[0191] *在A1中观察到1CR;NE=不可估计。

[0192] 图2示出了靶病变的总数的变化百分比,并且图3示出了OS。

[0193] 实施例3:安全性

[0194] 治疗相关的不良事件的比率(TRAЕ)在群组间总体上相似并且与研究的1b期部分一致。八名参与者(7%)经历了不良事件(AE)导致治疗中断,其中七名来自A1(周围神经病变、心肌炎、肺炎、血栓性微血管造影术(2)和高胆红素血症),一名来自B2(肺炎),一名来自C2(发热)。98.1%的参与者经历了TRAЕ,其中至少一名发生了3级或4级事件(A1、B2和C2分别为66.7%、86.5%、80.0%)。10%或更多参与者中出现的前5种TRAЕ按优选术语在表3中示出。

[0195] 表3:按监管活动医学词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA)优选术语的最常见TRAЕ。

	MedDRA 优选术语	群组 A1 (N = 36)		群组 B2 (N = 37)		群组 C2 (N = 35)	
		任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级
[0196]	恶心	25 (69.4%)	0	32 (86.5%)	0	28 (80.0%)	0
	疲劳	25 (69.4%)	9 (25.0%)	27 (73.0%)	5 (13.5%)	27 (77.1%)	5 (14.3%)
	发热	11 (30.6%)	0	28 (75.7%)	1 (2.7%)	24 (68.6%)	1 (2.9%)
	天冬氨酸氨基转移酶增加	18 (50.0%)	7 (19.4%)	24 (64.9%)	14 (37.8%)	20 (57.1%)	9 (25.7%)
	发冷	3 (8.3%)	0	30 (81.1%)	3 (8.1%)	27 (77.1%)	0

[0197] 注意:群组A1:Gem+NP+纳武单抗。群组B2:Gem+NP+索替格利单抗,群组C2:Gem+NP+纳武单抗+索替格利单抗

[0198] 39名参与者(36%)经历了严重TRAЕ(A1、B2和C2中分别为13、15和11),并且2名参与者由于TRAЕ而死亡;B2(可能与所有研究药物相关的急性肝衰竭)和C2(可能与所有研究

药物相的颅内出血)中各1名。A1、B2、C2中分别0、9(24.3%)、12(34.3%)名参与者发生了细胞因子释放综合征,其中A1、B2、C2中分别有0、3(8.1%)、2(5.7%)名参与者处于3-4级。

[0199] 实施例4:药效学效应

[0200] 利用治疗在血液、肿瘤和粪便中观察到与免疫疗法作用机制一致的免疫药效学效应(图4A、4B、5A和5B)。所有3个群组均显示出经激活的效应记忆(EM)T细胞(Ki67+CD8⁺细胞(图4A)/CD4⁺Em细胞(数据未示出))增加,其中纳武单抗+化学疗法(群组A1)诱导最明显的效应。经激活的髓系树突状细胞(CD86⁺+mDC)的增加在群组B2(索替格利单抗+化学疗法)中的大多数参与者和频繁在群组C2(纳武单抗+索替格利单抗+化学疗法)中作为索替格利单抗的预期药效学效应而发生,而纳武单抗+化学疗法(A1)治疗主要引起减少(图4B)。响应于用纳武单抗(A1, n=5; C2, n=6)进行的治疗在大多数肿瘤中观察到表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比降低,而索替格利单抗+化学疗法(B2, n=3)显示出PD-L1表达的混合变化(图5A)。索替格利单抗+化学疗法(B2, n=2)治疗在肿瘤CD80⁺M1巨噬细胞中增加,而含纳武单抗的治疗减少(A1, n=2; 并且C2, n=1)(图5B)。纳武单抗+化学疗法(A1)治疗增加了拟杆菌纲,并且减少了梭菌纲,而索替格利单抗+化学疗法(B2)显示出相反效应。所有3个治疗组均表现出与化学疗法效应一致的 γ 变形菌纲增加(图6)。

[0201] 实施例5:与临床结果相关的基线免疫和肿瘤生物标志物

[0202] 基线血液、肿瘤和粪便生物标志物定义了PDAC参与者的不同子集,所述子集与使用纳武单抗+化学疗法和/或索替格利单抗+化学疗法治疗的总生存期改善相关,但与免疫疗法联合治疗无关。CXCR5⁺EM CD8⁺T细胞的较高基线水平(图7A)与响应于纳武单抗+化学疗法(A1)治疗的生存期改善相关,而较低基线水平与使用索替格利单抗+化学疗法(B2)的生存期改善相关,但与纳武单抗+索替格利单抗组合(C2)无关。耗竭的(CD244⁺)EM CD4⁺T细胞的较低基线水平与响应于索替格利单抗+化学疗法(B2)治疗的生存期改善相关,但在含有纳武单抗治疗的群组中,未观察到生存期结果的差异(图7B)。炎症基因特征(TNF α)的较低基线水平与响应于纳武单抗+化学疗法(A1, n=17)治疗的生存期改善相关,但在含索替格利单抗的组(B2, n=12; C2, n=12)中未观察到生存期结果的差异(图8A)。MYC基因特征的较低水平(图8B)与响应于索替格利单抗+化学疗法(B2, n=12)治疗的生存期改善相关,但在含纳武单抗的组(A1, n=17; C2, n=12)中未观察到生存期结果的差异。

[0203] 与此环境下的先前报告的数据相比, A1(纳武单抗+化学疗法)中达到了1年OS率>35%的主要终点(O'Hara等人,《柳叶刀-肿瘤学》2021;22(1):118-131)。B2和C2中没有达到主要终点,但是在B2(索替格利单抗+化学疗法)中观察到适度临床活性。3个群组中的I0+化学疗法治疗的安全性谱是可管理的,并且与先前报告的1b期数据一致。对治疗前和治疗中血液、组织和粪便样品进行的综合多组学分析揭示了A1和B2中的预期药效学效应和免疫激活。此外,与患者子集相关的具有响应于纳武单抗+化学疗法(A1)的临床益处的生物标志物特征与针对索替格利单抗+化学疗法(B2)的益处相关的特征不重叠。此类特征与免疫疗法的使用相关,但与化学疗法无关。索替格利单抗、纳武单抗和化学疗法治疗(C2)的组合表现出混合药效学效应,并且不具有显示出益处的明显生物标志物子集,这提出了在这种情况下I0-I0药物拮抗的潜在假设。鉴于观察到的临床活性和假设产生的生物标志物结果,对基线生物标志物进行进一步探索和前瞻性测试对于提高PDAC中的I0+化学疗法的临床精度是有必要的,并且已经启动了平台研究(REVOLUTION, NCT04787991),以塑造这些数据。

[0204] 实施例6:循环免疫细胞的鉴定和Hallmark基因特征分析

[0205] 大块肿瘤组织的全外显子组和RNA测序

[0206] 对于每位患者,收集单个配对福尔马林固定的、石蜡包埋的或新鲜冷冻的肿瘤和正常外周血单个核细胞(PBMC)样品,并使用ImmunoID NeXT平台(Personalis公司)对所述样品进行全外显子组和转录组分析。所产生的数据用于基因表达定量。使用STAR对全转录组测序结果进行比对,并且使用Personalis公司的ImmunoID NeXT工具Expressionist计算每百万个转录本(TPM)的经归一化的表达值。

[0207] 使用X50平台对患者PBMC进行免疫谱分析

[0208] 通过静脉穿刺将外周血收集到EDTA真空采血管中,并且在基线C1D1(治疗前)时对PBMC样品进行处理。利用被设计成评估T细胞表型和功能的多重流式套组。将所有样品解冻,针对活力和抗体进行染色,并且在宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania)的统一方案下运行。

[0209] 大块肿瘤组织的全外显子组和RNA测序

[0210] 对于每位患者,收集单个配对福尔马林固定的、石蜡包埋的或新鲜冷冻的肿瘤和正常外周血单个核细胞(PBMC)样品,并使用ImmunoID NeXT平台(Personalis公司)对所述样品进行全外显子组和转录组分析。所产生的数据用于基因表达定量。使用STAR对全转录组测序结果进行比对,并且使用Personalis公司的ImmunoID NeXT工具Expressionist计算每百万个转录本(TPM)的经归一化的表达值。

[0211] 使用X50平台对患者PBMC进行免疫谱分析

[0212] 通过静脉穿刺将外周血收集到EDTA真空采血管中,并且在基线C1D1(治疗前)时对PBMC样品进行处理。利用被设计成评估T细胞表型和功能的多重流式套组。将所有样品解冻,针对活力和抗体进行染色,并且在宾夕法尼亚大学的统一方案下运行。

[0213] 循环免疫细胞的鉴定

[0214] 患者外周血单核细胞(PBMC)被鉴定为活CD45⁺细胞。患者PBMC基于表面标志物的存在而被分类为不同的免疫细胞群体。CD8⁺T细胞由于CD3和CD8表面标志物的存在而选自CD45⁺细胞。CD4⁺T细胞由于CD3和CD4表面标志物的存在而选自CD45⁺细胞。CD8⁺T细胞被进一步细分为许多T细胞子集,如效应记忆1型(EM1)细胞。EM1 T细胞被经典地定义为CD45RA⁻CD27⁺。此细胞群体由于CXCR5表达而被进一步分为CXCR5⁺群体。此CXCR5⁺群体中的细胞计数与总EM1 T细胞群体计数的比率显示为与总生存期相关。CD4⁺T细胞被进一步细分为许多T细胞子集,如效应记忆3型(EM3)细胞。EM3 T细胞被经典地定义为CD45RA⁻CD27⁻。此细胞群体由于CD244表达而被进一步分为CD244⁺群体。此CD244⁺群体中的细胞计数与总EM3 T细胞群体计数的比率显示为与总生存期相关。

[0215] 对于总生存期分析,基于EM1 CD8⁺T细胞上的CXCR5表达的百分比对患者进行分层,其中“高”频率相对于“低”频率由群组中的所有受试者的中值比率限定。总生存期分析表明,CXCR5⁺EM1 CD8⁺与总EM1 CD8⁺的较低比率与用纳武单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的患者的较长存活率和使用索替格利单抗与吉西他滨+纳布-紫杉醇的组合治疗的患者的较短存活率相关。(图4-8)

[0216] Hallmark基因特征分析

[0217] Hallmark基因特征是通过分子特征数据库(V7.4)公开获取用于基因集富集分

析(GSEA)。下面的基因集包括属于以下基因家族的基因：(1) 肿瘤抑制因子；(2) 致癌基因；(3) 易位癌基因；(4) 蛋白激酶；(5) 细胞分化标志物；(6) 同源结构域蛋白；(7) 转录因子；以及(8) 细胞因子和生长因子。

[0218] MYC hallmark基因集由总共包括200个已知通过MYC调节的基因。通过对基因集中的每种基因的log归一化的表达值求平均并确定中值来计算MYC的总“评分”。对于生存期分析,基于此MYC基因特征的值对患者进行分层,其中“高”相对于“低”由所有群组中的所有患者的中值特征值限定。MYC hallmark基因特征的单个基因列表列示于表4中。

[0219] 表4:MYC Hallmark基因特征的基因。

[0220]

ABCE1	CLNS1A	EIF4A1	HNRNPA2B1	MAD2L1	ODC1	PSMA4	RPL14	SMARCC1	TFDP1
ACP1	CNBP	EIF4E	HNRNPA3	MCM2	ORC2	PSMA6	RPL18	SNRPA	TOMM70
AIMP2	COP55	EIF4G2	HNRNPC	MCM4	PA2G4	PSMA7	RPL22	SNRPA1	TRA2B
AP3S1	COX5A	EIF4H	HNRNPD	MCM5	PABPC1	PSMB2	RPL34	SNRBP2	TRIM28
APEX1	CSTF2	EPRS1	HNRNPR	MCM6	PABPC4	PSMB3	RPL6	SNRPD1	TUFM
BUB3	CTPS1	ERH	HNRNPU	MCM7	PCBP1	PSMC4	RPLP0	SNRPD2	TXNL4A
C1QBP	CUL1	ETF1	HPRT1	MRPL23	PCNA	PSMC6	RPS10	SNRPD3	TYMS
CAD	CYC1	EXOSC7	HSP90AB1	MRPL9	PGK1	PSMD1	RPS2	SNRPG	U2AF1
CANX	DDX18	FAM120A	HSPD1	MRPS18B	PHB	PSMD14	RPS3	SRM	UBA2
CBX3	DDX21	FBL	HSPE1	MYC	PHB2	PSMD3	RPS5	SRPK1	UBE2E1
CCNA2	DEK	G3BP1	IARS1	NAP1L1	POLD2	PSMD7	RPS6	SRSF1	UBE2L3
CCT2	DHX15	GL01	IFRD1	NCBP1	POLE3	PSMD8	RRM1	SRSF2	USP1
CCT3	DUT	GNL3	ILF2	NCBP2	PPIA	PTGES3	RRP9	SRSF3	VBP1
CCT4	EEF1B2	GOT2	IMPDH2	NDUFAB1	PPM1G	PWP1	RSL1D1	SRSF7	VDAC1
CCT5	EIF1AX	GSPT1	KARS1	NHP2	PRDX3	RACK1	RUVBL2	SSB	VDAC3
CCT7	EIF2S1	H2AZ1	KPNA2	NME1	PRDX4	RAD23B	SERBP1	SSBP1	XP01
CDC20	EIF2S2	HDAC2	KPNB1	NOLC1	PRPF31	RAN	SET	STARD7	XPOT
CDC45	EIF3B	HDHC2	LDHA	NOP16	PRPS2	RANBP1	SF3A1	SYNCRIP	XRCC6
CDK2	EIF3D	HDGF	LSM2	NOP56	PSMA1	RFC4	SF3B3	TARDBP	YWHAE
CDK4	EIF3J	HNRNPA1	LSM7	NPM1	PSMA2	RNPS1	SLC25A3	TCP1	YWHAQ

[0221] 实施例7-15的方法。

[0222] 研究设计和安全性监测

[0223] 以下实施例表示对实施例1-6中获得的数据的进一步分析。在此Ib/II期研究中,年龄≥18岁的患有mPDAC的患者从美国的7家学术医院募集,这些医院是帕克癌症免疫疗法研究所胰腺癌联盟(Parker Institute for Cancer Immunotherapy pancreas cancer consortium)的一部分。先前对转移性疾病的治疗是不允许的,但如果先前的辅助和新辅助化学疗法/放射疗法在入组前>4个月完成,则是允许的。患者需要具有治疗前的归档肿瘤样本或新鲜肿瘤样本,或者能够进行活检以获取组织。另外的关键资格标准包括0-1的东部肿瘤合作组(ECOG)表现状态评分、充足的器官功能以及根据实体瘤应答评估标准第1·1版(RECIST v·1·1)的至少一个可测量病变的存在。如果患者先前暴露于激动性CD40、抗PD-1、抗PD-L1单克隆抗体或任何其它免疫调节抗癌药剂,则所述患者被排除在外。如果患者患有或近期患有需要全身免疫抑制疗法的自身免疫性疾病、进行了实体器官移植或患有并发

癌症,则所述患者也被排除在外,除非所述癌症是惰性的或不被视为是危及生命(例如,基底细胞癌)。

[0224] Ib期试验是一项开放标签多中心四群组剂量范围研究,其旨在鉴定抗CD40索替格利单抗(sotiga)与chemo(吉西他滨[gem]和纳布-紫杉醇[NP])的组合加或不加抗PD1纳武单抗(nivo)的推荐2期剂量(RP2D)¹³。II期试验是一项随机化的开放标签多中心三组由chemo与nivo、sotiga或两种免疫调节剂组合构成的研究。包括研究者和发起人临床工作人员的数据审查小组(DRT)在研究的Ib期部分期间定义了0.3mg/kg sotiga的RP2D。在II期期间,DRT每季度召开一次会议,以审查每个研究组的所有安全性数据。采用贝叶斯终止规则(Bayesian termination rule)来监测毒性,并确定是否需要停止研究组的入组或给药。

[0225] 方案和所有修订均由宾夕法尼亚大学的主要机构审查委员会(lead Institutional Review Board at the University of Pennsylvania)批准,并且被所有参与地点所认可。研究是根据赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)和国际协调会议良好临床实践指南(International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice guidelines)的原则进行的。所有患者在入组前均提供书面知情同意书。

[0226] 随机化和盲化

[0227] II期试验为无盲化的开放标签。将患者随机分配到三组之一:nivo/chemo、sotiga/chemo或sotiga/nivo/chemo。将来自Ib期的十二名剂量限制性毒性(DLT)可评估的患者(sotiga/chemo和sotiga/nivo/chemo中各6名)纳入在II期功效分析中(分析群体定义的细节参见统计分析部分)。为了实现纳入在每个组中的患者的总数的平衡,纳入在II期中的前12名患者以4:1:1比率被随机分配到nivo/chemo、sotiga/chemo或sotiga/nivo/chemo中(由于nivo/chemo在Ib期中没有累积患者,因此需要将更多患者纳入在所述组中)。其余患者以1:1:1比率随机分配。随机分配由帕克癌症免疫疗法研究所使用交互式语音/网络响应系统(IxRS)进行管理。使用不按基线患者或肿瘤特性分层的排列区组设计进行随机分配。随机分配但未接受任何研究药物的患者通过对另外的患者进行随机分组来替代。

[0228] 程序

[0229] 对于每个28天周期,对每个组,在第1天、第8天和第15天静脉内(iv)分别施用1,000mg/m²和125mg/m²的gem/NP。在第1天和第15天以240mg iv施用Nivo。在第3天,即chemo后两天iv施用0.3mg/kg Sotiga。可替代地,如果在第3天没有施用sotiga,则可以在第10天施用,条件是患者在第8天接受chemo。还向研究人员提供了利用21天chemo周期的选项,在这种情况下,不施用第15天给药。对于sotiga和gem,允许至多2个剂量减少,并且对于NP,允许至多3个剂量减少,以进行毒性管理。允许Nivo保留,但不允许剂量减少。在需要研究中断之前,每个方案允许至多断开4周。

[0230] 在第一年每8周以及之后每3个月以放射照相方式对患者进行评估,无论给药是否延迟。收集疾病评估,直到影像学进展或启动后续疗法,以先发生者为准。随后跟踪患者的生存。安全性评估包括生命体征、体格检查、心电图和实验室测试。不良事件根据国家癌症研究所不良事件通用术语标准第4.03版(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events,version 4.03)进行分级。不良事件术语使用监管活动医学词典(MedDRA)第23.0版进行编码。

[0231] 用于分离外周血单核细胞(PBMC)的血液样品在参与的临床站点处纵向收集,过夜

运送,并且在中心位置(美国新泽西州的皮斯卡塔韦的Infinity Biologix公司(Infinity Biologix,Piscataway,NJ,USA))在ficoll梯度上进行处理,并且冷冻保存。血清在每个地点处在收集的2小时内进行处理,并且立即在-80℃下冷冻,然后分批运送到中央生物库。在筛选期间、第1周期第1天和第15天、第2-4周期第1天和/或治疗中断时进行免疫生物标志物的血液采样。如果患者在治疗结束(EOT)访视之前开始任何新的抗癌疗法,则不收集样品。对于至少1年保持处于治疗中的患者,在第1年和之后每六个月收集血液。

[0232] 收集基线肿瘤样本或归档肿瘤样本以及治疗后肿瘤样本用于生物标志物分析。将新鲜肿瘤活检立即快速冷冻或福尔马林固定和石蜡包埋。医学上可行的治疗后肿瘤样品是认可的;然而,首选是在第2周期期间sotiga第二次给药或nivo第三次给药之后的样品,这取决于所分配的治疗组。对于具有长期稳定疾病的患者以及在疾病进展时,允许进行另外的活检,所述长期稳定疾病是随着两次以上表现出通过RECIST v1.1鉴定的应答的连续疾病评估而定义的。允许在医疗监测者的批准下进行临时活检收集。

[0233] 结果

[0234] 主要终点是每个治疗组的1年OS率,相比之下gem/NP的历史率为35%¹⁴。次要终点为无进展生存期(PFS)、应答持续时间(DOR)、客观应答率(ORR)、疾病控制率(DCR)和不良事件发生率。关键探索终点包括免疫药效学(PD)效应评估以及肿瘤和免疫生物标志物分析。

[0235] 统计分析

[0236] 此研究不包括gem/NP(chemo)的对照组。因此,对每个组的1年OS率进行了估计,并且与35%的历史值进行比较¹⁴。不支持此研究在组之间进行统计比较,并且也没有针对临床终点对多重比较进行调整。

[0237] 零假设为35%的1年OS率,并且备选假设为55%的1年OS率。计划入组105名患者(每组35名),其中包括12名来自Ib期的DLT可评估的患者。每组35名患者的样品大小为使用I型错误率为5%的1样品Z测试来测试此假设提供了81%支持。

[0238] 对功效群体进行了功效分析,所述功效群体被定义为:(1)所有在II期被随机分配并且接受至少一个剂量的任何研究药物的患者;以及(2)12名纳入在Ib期中的DLT可评估的患者(sotiga/chemo中6名,并且sotiga/nivo/chemo中6名;其被定义为在第1周期期间经历剂量限制毒性或接受至少2个剂量的chemo和一个剂量的sotiga)¹³。为了进行功效分析,根据随机分配的治疗组对患者进行分组。对在RP2D时接受至少1个剂量的任何研究药物的所有Ib期患者(DLT可评估和非DLT可评估)和II期患者(被定义为安全性群体)进行了安全性分析。为了进行安全性分析,将患者根据实际接受的研究治疗进行分组。将两名II期患者随机分配到sotiga/nivo/chemo,但仅接受chemo和niv的给药(即不接受sotiga);这些患者被分组为用于功效分析的sotiga/nivo/chemo和用于安全性和生物标志物分析的nivo/chemo。

[0239] OS被定义为从治疗启动开始到由于任何原因死亡的时间。对在分析时未报告为死亡的患者在最近的联系日期进行删失。通过卡普兰-梅尔方法估计每个治疗组的OS。计算1年OS率 and 对应1侧95%置信区间(CI),以确定CI的下限是否排除了35%的假设历史值。p值使用1侧单样品Z测试针对35%的历史率计算。ORR被定义为具有根据RECIST第1.1版的研究者评估的部分应答(PR)或完全应答(CR)的患者的比例,不需要确认应答;DCR被定义为具有PR、CR或稳定疾病持续至少7周的为最佳应答的患者的比例;DOR被定义为从第一次肿瘤评

估表现出应答开始至放射学疾病进展日期的时间;并且PFS被定义为从治疗启动开始至放射学疾病进展或死亡(以先发生者为准)的时间。使用克洛珀-皮尔森(Clopper-Pearson)方法计算ORR的置信区间(CI)。使用卡普兰-梅尔方法以估计DOR和PFS以及对应CI。根据不良事件对安全性和耐受性进行描述性总结。使用R第4.1.0版或更高版本进行统计分析。

[0240] 期中分析

[0241] 对II期临床数据进行了两次预先指定的期中分析(IA)。这些IA严格意义上意味着支持未来研究的决策标记。基于期中结果没有计划对研究设计或行为进行调整,并且在期中或最终分析中没有对任何终点应用I型误差控制。IA由帕克癌症免疫疗法研究所进行,并且结果与研究者和制药合作伙伴(Apexigen公司(Apexigen)和百时美施贵宝公司)共享。

[0242] 首次IA发生在最后一位患者随机分配在II期后大约4个月,并且第二次IA发生在最后一位患者随机分配后大约9个月。两次IA均评估了纳入在Ib期中的患者的安全性和所有功效终点(ORR、DCR、DOR、OS、PFS)。另外,首次IA包括对ORR和DCR的II期分析,并且第二次IA包括对除OS外的所有功效终点(即,ORR、DCR、DOR、PFS)的II期分析。在任何IA期间未对II期OS数据进行分析。

[0243] 通过飞行时间质谱法(CyTOF)进行免疫表型分型

[0244] 通过在统一方案(PMID:31315057)下在Priity Bio公司(Priity Bio,美国加利福尼亚州佛蒙特(Fremont, CA, USA))以盲化方式运行的CyTOF分析对冷冻保存的PBMC使用广泛免疫表型分型套组。将冷冻保存的PBMC在含有10% FBS和25U/mL benzonase的37°C预热的RPMI-1640中解冻。将样品再次在含有10% FBS和25U/mL benzonase的RPMI-1640中洗涤,并且第三次在含有10% FBS的37°C预热的RPMI-1640中洗涤。将样品重悬于1000nM顺铂中以进行活力鉴定,在含有0.1% BSA的PBS中制备,在室温下持续5分钟,并且然后用染色缓冲液洗涤。将人BD Fc块添加到细胞中在4°C下持续10分钟,然后添加到表面抗体混合物中。将表面染色混合物在4°C下温育30分钟。用染色缓冲液将样品从染色液中洗涤两次。然后将细胞重悬于FoxP3转录因子1x Fix/Perm缓冲液(eBioscience公司(eBioscience))中在室温下持续1小时,以制备用于胞内染色的细胞。固定之后是在1x渗透性缓冲液中洗涤。将胞内染色混合物在渗透缓冲液中制备,并且添加到样品中,并且在室温下温育1小时。胞内染色后,将样品用渗透缓冲液洗涤两次,并且用染色缓冲液洗涤一次。以CyTOF采集之前,将样品重悬于铱(Ir)插层溶液中持续至少24小时,并且储存在4°C下。采集当天,将样品在细胞培养级水(HyClone)中洗涤五次,并且在CyTOF Helios仪器(富鲁达公司(Fluidigm))上运行。关于CyTOF套组的细节展示在表5中。

[0245] 表5:

[0246]

质量	元素	靶标	克隆	来源	目录号	生物	染色
89	Y	CD45	H130	富鲁达公司	3089003B	泛	表面
113	In	CD66cd	YTH71.3	英杰公司 (Invitrogen)	自定义	粒细胞	表面
115	In	CD7	M-T701	BD 生物科学公司 (BD Biosciences)	自定义	T 细胞子集/NK/ 单核细胞	表面
140	Ce	CD86	IT2.2	百进公司 (BioLegend)	自定义	T 细胞共刺激性/ 抑制性	表面
141	Pr	CD3	UCHT1	富鲁达公司	3141019B	泛 T 细胞	表面
142	Nd	CD19	HIB19	富鲁达公司	3142001B	泛 B 细胞	表面
143	Nd	CD117 (c- 试剂盒)	104D2	富鲁达公司	3143001B	肥大细胞/原始 免疫细胞	表面
144	Nd	CD11b	IRCF44	富鲁达公司	3144001B	巨噬细胞/单核 细胞	表面
145	Nd	CD4	RPA-T4	富鲁达公司	3145001B	T 细胞子集/单核 细胞	表面
146	Nd	CD8a	RPA-T8	富鲁达公司	3146001B	T 细胞子集/NK	表面
147	Sm	CD11c	BU15	富鲁达公司	3147008B	DC/巨噬细胞/单 核细胞	表面
148	Nd	CD14	RMO52	富鲁达公司	3148010B	巨噬细胞/单核 细胞	表面
149	Sm	CD1c (BDCA1)	L161	百进公司	自定义	DC	表面
150	Nd	FcER1	AER-37	富鲁达公司	3150027B	DC/pDC/嗜碱粒 细胞	表面
151	Eu	CD123 (IL-3Ra)	6H6	富鲁达公司	3151001B	pDC/嗜碱粒细胞	表面
152	Sm	gdTCR	11F2	富鲁达公司	3152008B	gd T 细胞	表面
153	Eu	CD45RA	HI100	富鲁达公司	3153001B	T 细胞原初/记忆	表面
154	Sm	CD366 (TIM3)	F38-2E2	富鲁达公司	3154010B	检查点	表面
155	Gd	Cd64	10.1	百进公司	自定义	FcγRI	表面
156	Gd	CD274 (PD-L1)	29E.2.A3	富鲁达公司	3156026B	检查点	表面
157	Gd	CD206	15-2	百进公司	自定义	巨噬细胞	表面
158	Gd	CD27	L128	富鲁达公司	3158010B	B/T 细胞记忆	表面
159	Tb	CD141	1A4	百进公司	自定义	mDC	表面
160	Gd	Tbet	4B10	富鲁达公司	3160010B	Th1 极性/NK	胞内
161	Dy	CD152 (CTLA-4)	14D3	富鲁达公司	3161004B	检查点	胞内

[0247]

162	Dy	Foxp3	PCH101	富鲁达公司	3162011A	Treg	胞内
163	Dy	CD33	WM53	富鲁达公司	3163023B	泛髓系	表面
164	Dy	CD45RO	UCHL1	富鲁达公司	3164007B	T 细胞原初/记忆	表面
165	Ho	CD127 (IL-7Ra)	A019D5	富鲁达公司	3165008B	T 细胞子集/Treg	表面
166	Er	CD154 (CD40L)	24-31	百进公司	自定义	T 细胞激活	表面
167	Er	CD197 (CCR7)	G043H7	富鲁达公司	3167009A	T 细胞子集 (效应/记忆)	表面
168	Er	Ki67	B56	富鲁达公司	3168007B	增殖	胞内
169	Tm	CD25	2A3	富鲁达公司	3169003B	Treg	表面
170	Er	TCR Va24-Ja18	6B11	富鲁达公司	3177015B	iNKT	表面
171	Yb	CD40	5C3	百进公司	自定义	APC	表面
172	Yb	CD38	H1T2	富鲁达公司	3172007B	B 细胞/NK/浆细胞	表面
173	Yb	CD192 (CCR2)	K036C2	百进公司	自定义	趋化因子受体	表面
174	Yb	HLA-DR	L243	富鲁达公司	3174001B	APC	表面
175	Lu	PD-1 (Nivo) /抗 IgG4	HP6025	赛力克化学公司/南方生物公司拟 (Southern Bio)	自定义	检查点	表面
176	Yb	CD56	NCAM16.2	富鲁达公司	3176008B	NK	表面
209	Bi	CD16	3G8	富鲁达公司	3209002B	Fc 受体/NK/嗜中性粒细胞/单核细胞	表面

[0248] 使用CellEngine™基于云的流式细胞术分析软件(加拿大魁北克省蒙特利尔的CellCarta公司(CellCarta, Montreal, Quebec, Canada))分析数据。

[0249] 由科学家在不参考临床结果的情况下手动进行监督门控。根据样品定制高水平门。统一绘制单标志物门,以便在所有患者中和所有时间点处进行分析,其中示例门控策略提供在图9中。

[0250] 在对活单线态门控后,免疫群体定义如下,如图9所示。CD4和CD8 T原初群体、效应群体和记忆群体基于CD45RA、CD27和CCR7表达进行鉴定。Treg基于Foxp3、CD25和CD127表达进行鉴定。B细胞基于CD19表达进行鉴定,并且其可以基于CD38相对于CD27的表达而被进一步区分为记忆细胞相对于原初细胞相对于浆母细胞。NK细胞基于CD56表达进行鉴定,并且基于CD56相对于CD16表达而被进一步细分。单核细胞基于CD14和HLA-DR的表达进行鉴定,并且基于CD14相对于CD16的表达被进一步细分为经典、非经典和中间。树突状细胞被定义为HLA-DR+CD14-CD16-非淋巴细胞,并且基于CD11c相对于CD123的表达而在髓细胞与浆细胞样细胞之间进行区分。髓系树突状细胞基于CD141表达而被进一步细分为常规树突状细胞1型(cDC1;CD141+)和常规树突状细胞2型(cDC2;CD141-)。

[0251] 除了对所定义的群体进行手动门控外,还以无监督的方式分析数据。为了做到这一点,将所有患者和所有时间点的所有样品组合在一起,并且通过聚类算法运行^{35,36}。聚类后,将簇使用力导向图布局可视化^{35,36},并且按与总生存期的相关进行着色。使用这种可视化,对所关注的簇进行鉴定,并且然后将相关群体添加到手动门控层级中。结果中显示的所

有时间序列和生存期分析都源自于门控的群体,无论是通过手动门控还是无监督分析发现的。

[0252] T淋巴细胞的高参数流式细胞术

[0253] 用于荧光流式细胞术的冷冻保存的PBMC样品在宾夕法尼亚细胞组学和细胞分选共享资源的转化细胞术实验室(Translational Cytometry Laboratory of the Penn Cytomics and Cell Sorting Shared Resource,美国宾夕法尼亚州费城的宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania,Philadelphia,PA,USA))中在广泛预获资格的28色BD Symphony A5细胞仪(BD生物科学公司)上进行分析。工作人员对治疗群组 and 临床结果是设盲的。在分析时,将冷冻保存的PBMC样品在含有10% FBS和100U/ml 盘尼西林-链霉素 (penicillin-streptomycin) (吉博科公司(Gibco))的37℃预热的RPMI-1640培养基(吉博科公司)中解冻。将样品洗涤、计数,并且重悬于含有1mg/mL DNA酶I (罗氏公司)和5mM氯化镁的培养基中,并且在37℃下温育1小时。静置后,将细胞用不具有添加剂(康宁公司)的PBS洗涤,并转移到染色管中。将PBMC与1uL (0.2μg) 0.2mg/mL纳武单抗抗体(赛力克化学公司(Selleck Chemicals))一起在RT下温育5分钟,之后添加可固定活力染色剂510,在黑暗中和RT下持续10分钟。然后将细胞用FACS洗涤缓冲液(PBS,1%BSA,2mM EDTA)洗涤两次。每天制备表面抗体混合物(T细胞表型分型抗体套组,表6),并且将其用于对每管至多1x 10⁷个细胞进行染色。

[0254] 表6:

[0255]	荧光团	靶标	克隆	来源	目录号	类别	染色
	BUV395	CD45RA	HL100	BD 公司	740298	分化	表面

[0256]

BUV496	CD8a	RPA-T8	BD 公司	612942	谱系	表面
BUV563	CD185 (CXCR5)	RF8B2	BD 公司	741316	谱系	表面
BUV615	CD25	2A3	BD 公司	612996	谱系/激活	表面
BUV661	CD226 (DNAM-1)	DX11	BD 公司	749934	激活	表面
BUV737	CD27	L128	BD 公司	612829	分化	表面
BUV805	CD4	SK3	BD 公司	612887	谱系	表面
BV421	CD197 (CCR7)	G043H7	百进公司	353208	分化	表面
BV480	CD223 (LAG3)	T47-530	BD 公司	746609	耗竭	表面
BV510	可固定活力 染色剂 (FVS)	n/a	BD 公司	564406	转储	表面
BV510	CD14	M5E2	BD 公司	740163	转储	表面
BV510	CD19	SJ25C1	BD 公司	562947	转储	表面
BV510	CD41a	HIP8	BD 公司	563250	转储	表面
BV570	CD3	UCHT1	百进公司	300436	谱系	表面
BV605	CD137 (4-1BB)	4B4-1	BD 公司	745256	激活	表面
BV650	CD244 (2B4)	2B4	BD 公司	740467	激活/耗竭	表面
BV711	CD366 (Tim3)	7D3	BD 公司	565566	耗竭	表面
BV750	CD39	TU66	BD 公司	747079	耗竭	表面
BV786	CD28	CD28.2	BD 公司	740996	分化	表面
BB515	CD279 (PD-1) + 抗人 IgG4	纳武单抗, G17-4	赛力克化学公司; BD 公司	A2002; 自 定义	激活/耗竭	表面
BB660	CD278 (ICOS)	DX29	BD 公司	自定义	激活	表面
BB700	CD127 (IL-7RA)	HIL-7R- M21	BD 公司	566398	分化	表面
BB790	CD38	HIT2	BD 公司	自定义	分化/激活	表面
PE	TIGIT	MBSA43	eBioscience 公司	12-9500-42	耗竭	表面
PE-eFluor610	Eomes	WD1928	eBioscience 公司	61-4877-42	分化/耗竭	胞内
PE-Cy5	CD152 (CTLA-4)	BNI3	BD 公司	555854	耗竭	胞内
PE-Cy5.5	FoxP3	PCH101	eBioscience 公司	35-4776-42	谱系	胞内
PE-Cy7	T-bet	04-46	BD 公司	自定义	谱系/激活	胞内
AF647	TCF-1 (TCF7)	S33-966	BD 公司	566693	分化	胞内
AF700	Ki-67	B56	BD 公司	561277	增殖	胞内
APC-Fire750	KLRG1	SA231A2	百进公司	367718	耗竭	表面

[0257] 将细胞在RT下温育20分钟,然后用FACS染色缓冲液洗涤两次。将细胞重悬于FoxP3转录因子染色缓冲液Fix/Perm溶液(eBiosciences公司(eBiosciences))中,并且在RT下温育1小时,以制备用于胞内染色的细胞。固定后,将样品用Foxp3渗透缓冲液洗涤。将新鲜制备的细胞质/细胞内染色鸡尾酒混合料添加到样品中,并在4℃下孵育过夜。第二天,用渗透

缓冲液洗涤样品,并在FACS洗涤缓冲液中重悬。将细胞在黑暗中储存在4℃下,并且在2小时内获取。在每日QC之后,通过将硬染色的珠(BD生物科学公司,细胞仪设置和跟踪珠(Cytometer Setup and Tracking Beads,CS&T))设置到预定目标通道来对仪器进行标准化。补偿对照(英杰UltraComp eBead或用于活/死染色的细胞)每天与经冷冻的PBMC工艺对照一起制备。补偿矩阵在Diva软件(BD生物科学公司)中计算,并且仅用于当天运行。使用CellEngine™基于云的流式细胞术分析软件(加拿大魁北克省蒙特利尔的CellCarta公司)分析数据。由至少两名针对患者结果设盲的研究者根据患者在所有时间点处定制高水平门。统一绘制单标志物门,以便在所有患者中和所有时间点处进行分析,其中代表性门控策略提供在图10中。

[0258] 在对活细胞和CD3+群体门控后,T细胞群体如图10所示定义如下:使用CD4+和CD8+T细胞上的CD45RA、CD27和CCR7表达的组合来定义原初(CD45RA+CD27+CCR7+)、T中央记忆(CM;CD45RA-CD27+CCR7+)、T效应记忆1(EM1;CD45RA-CD27+CCR7-)、T效应记忆2(EM2;CD45RA-CD27-CCR7+)、T效应记忆3(EM3;CD45RA-CD27-CCR7-)和终末分化效应记忆(EMRA)(CD45RA+CD27⁻CCR7-)亚群。CD4+调节T细胞定义为Foxp3+CD25^{hi}CD127^{-/low}。用于时间序列和生存期分析的非原初CD4+和CD8+T细胞群体包括以上定义的所定义的效应记忆群体、中央记忆群体和TEMRA群体。在这些区室中的每个区室内评估另外的分化、激活和抑制标志物的表达。

[0259] 除了对所定义的群体进行手动门控外,还以无监督的方式分析数据。为了做到这一点,将所有患者和所有时间点的所有样品组合在一起,并且通过如^{35,36}中所述的聚类算法运行。聚类后,将簇使用力导向图布局可视化^{35,36},并且按与总生存期的相关进行着色。使用这种可视化,对所关注的簇进行鉴定,并且然后将相关群体添加到手动门控层级中。结果中显示的所有时间序列和生存期分析都源自于门控的群体,无论是通过手动门控还是无监督分析发现的。

[0260] 血清蛋白质组学谱分析

[0261] 使用Olink多重接近扩展测定(PEA)套组(Olink蛋白质组学(Olink Proteomics); www.olink.com)根据制造商的说明书并且如之前所述对血清蛋白进行定量³⁷。在Olink分析服务中心(Olink Analysis Service,美国马萨诸塞州波士顿(Boston,MA,USA))进行测定。PEA的基础是双重识别免疫测定,在所述双重识别免疫测定中,两种用唯一的DNA寡核苷酸标记的匹配的抗体同时与溶液中的靶蛋白结合。这使两种抗体接近,从而允许其DNA寡核苷酸杂交,从而充当用于DNA聚合酶依赖性扩展步骤的模板。这产生了双链DNA“条形码”,所述条形码是特定抗原特有的,并且与靶蛋白的初始浓度定量地成比例。杂交和扩展之后紧接着PCR扩增,并且然后最终使用富鲁达BioMark HD系统(加利福尼亚州南旧金山富鲁达公司(Fluidigm Corporation,South San Francisco,CA))通过微流控qPCR对扩增子进行定量。数据使用每单各样品中的内部控制、板间控制和阴性控制以及校正因子归一化,并且以与蛋白质浓度成比例的log2标度表示。最终的测定读出报告为归一化的蛋白质表达(NPX)值,所述NPX值在log2标度上是任意单位,其中较高的值对应于较高的蛋白质表达。一个NPX差异等于蛋白质浓度的两倍。在此研究中,使用了两个Olink套组(Target96免疫肿瘤学和Target96免疫应答),所述套组由172种唯一分析物组成。关于分析物、检测范围、数据归一化和标准化的另外细节可在<https://www.olink.com/resources-support/document->

download-center/获得。

[0262] 无偏差质谱法血清谱分析

[0263] 在Biognosys公司(Biognosys,瑞士施利伦-苏黎世(Schlieren-Zurich, Switzerland))使用高通量定量蛋白质组学工作流对血清样品的超过1600种可定量蛋白质进行谱分析。所有样品都同等地进行处置和解冻。在等分试样期间,将少量的每种样品汇集并且用作用于随后文库产生的质量控制样品,并且评估整个样品制备和采集中的质量和批次效应。将三个处理批次针对治疗和位点进行区组随机分配(来自一名患者的样品保留在同一批次中,但在批次中进行随机分配)。由顺序耗竭、并行消化和液相色谱法(LC)-质谱法(MS)采集构成的自动化耗竭流水线如先前报告的进行³⁸。将每个处理批次内的质量控制样品耗竭。采集数据非依赖性采集(DIA)LC-MS和数据依赖性采集(DDA)LC-MS/MS测量结果。使用软件SpectroMine(第3.0.2101115.47784版,Biognosys公司)使用包括PSM、肽和蛋白质水平的1%假发现率控制的默认设置分析DIA和DDA质谱数据,从而允许2个遗漏的切割和可变修饰(N末端乙酰化和甲硫氨酸氧化)。使用人类UniProt.fasta数据库(智人(Homo sapiens),2020-01-01,20,367个条目)以进行文库产生,使用默认设置。

[0264] 使用软件Spectronaut(第14.7.201007.47784版,Biognosys公司)利用默认设置分析原始质谱数据,但使用全局输入策略和包括本研究中进行的所有DIA和DDA运行的混合文库启用Qvalue稀疏滤波³⁹。默认设置包括控制在1%下的肽和蛋白质水平假发现率,以及使用以中值进行全局归一化的交叉运行归一化。基于批次1与2-3之间的QC样品的80%分位数的逐蛋白质平均归一化通过两种主成分分析(PCA, 'stats' R包)或层级聚类去除了经鉴定的批次效应。

[0265] 全外显子组和转录组测序

[0266] 使用ImmunoID NeXT(美国加利福尼亚州门洛帕克的Personalis公司)对FFPE肿瘤和正常PBMC样品进行谱分析;所述ImmunoID NeXT是一种产生全面的肿瘤突变信息、基因表达定量、新抗原表征、HLA分型和等位基因特异性HLA杂合性缺失数据(HLA LOH)、TCR库谱分析和肿瘤微环境谱分析的增强的外显子组/转录组平台和分析流水线。全外显子组文库制备和测序如前所述进行⁴⁰。使用从肿瘤和PBMC中提取的DNA以使用KAPA HyperPrep试剂盒和安捷伦公司的SureSelect靶富集试剂盒根据制造商的建议在以下修改的情况下产生全外显子组捕获文库:1)使用靶探针以提高生物学相关基因和临床相关基因的覆盖率。2)对方案进行修改以产生大约250bp的平均文库插入长度。3)使用KAPA HiFi DNA聚合酶(KAPA Biosystems)代替Herculase IIDNA聚合酶(安捷伦公司)。配对端测序在NovaSeq仪器(美国加利福尼亚州圣地亚哥的因美纳公司(Illumina, San Diego, CA, USA))上进行。配对端测序在NovaSeq仪器(美国加利福尼亚州圣地亚哥的因美纳公司)上进行。

[0267] 使用STAR⁴¹对全转录组测序结果进行比对,并且每百万个转录本(TPM)的经归一化的表达值,其使用Personalis公司的ImmunoID NeXT工具Expressionist计算。对于RNA测序和比对质量控制,评估了以下指标:平均读段长度、平均所映射的读段对长度、唯一映射的读段的百分比、剪接位点的数量、每个碱基的错配率、每个碱基的缺失/插入率、平均缺失/插入长度以及包括染色体间读段和孤儿读段的异常读段对比对。ImmunoID NeXT DNA和RNA分析流水线将读段与构建的hs37d5参考基因组比对。流水线使用博德研究所(Broad

Institute)概述的最佳实践进行比对、重复去除和基本质量评分再校准^{42,43}。流水线使用Picard以去除重复,并且使用基因组分析工具包(GATK)以改进序列比对,并校正碱基质量评分(BQSR)。根据SAM规范以BAM格式返回所比对的序列数据。原始读段计数也使用R进行归一化,以得到log表达式比率的加权修剪平均值(M值的修剪平均值(TMM))。

[0268] 为了计算给定基因集上的基因表达特征,通过相应基因特征的归一化的计数值的几何平均值确定评分。从一系列原发性肿瘤和转移部位收集患者肿瘤样品。由于在批量RNAseq上对源组织的影响,选择将所有基因表达分析限制到最常见的活检部位肝转移,这构成活检的大致64%。因此,所有基因表达分析由此仅包括来自肝转移的活检,计数参见表7。

[0269] 表7:

测定	治疗组; 时间点 (样品的数量)
X50	nivo/chemo; C1D1 (n=26)、C1D15 (n=21)、C2D1 (n=25)、C4D1 (n=19)
	sotiga/chemo; C1D1 (n=28)、C1D15 (n=23)、C2D1 (n=27)、C4D1 (n=18)
	sotiga/nivo/chemo; C1D1 (n=32)、C1D15 (n=27)、C2D1 (n=29)、C4D1 (n=14)
CyTOF	nivo/chemo; C1D1 (n=25)、C1D15 (n=20)、C2D1 (n=23)、C4D1 (n=13)
	sotiga/chemo; C1D1 (n=29)、C1D15 (n=23)、C2D1 (n=24)、C4D1 (n=22)
	sotiga/nivo/chemo; C1D1 (n=26)、C1D15 (n=20)、C2D1 (n=26)、C4D1 (n=13)
Olink 平台	nivo/chemo; C1D1 (n=32)、C1D15 (n=25)、C2D1 (n=27)、C3D1 (n=25)、C4D1 (n=23)
	sotiga/chemo; C1D1 (n=36)、C1D15 (n=29)、C2D1 (n=31)、C3D1 (n=25)、C4D1 (n=27)
	sotiga/nivo/chemo; C1D1 (n=35)、C1D15 (n=27)、C2D1 (n=32)、C3D1 (n=26)、C4D1 (n=25)
Biognosys	nivo/chemo; C1D1 (n=30)、C1D15 (n=25)、C2D1 (n=19)、C3D1 (n=18)
	sotiga/chemo; C1D1 (n=32)、C1D15 (n=27)、C2D1 (n=28)、C3D1 (n=22)
RNAseq	nivo/chemo; 治疗前 (n=25)、肝活检 (n=17)
	sotiga/chemo; 治疗前 (n=18)、肝活检 (n=12)
	sotiga/nivo/chemo; 治疗前 (n=23)、肝活检 (n=12)

[0271] 多重组织染色和成像

[0272] 肿瘤组织在治疗前(新鲜基线活检或归档组织)、治疗中(第2周期)和治疗结束时收集。将组织固定在福尔马林中,之后进行石蜡包埋。在纪念斯隆-凯特林癌症中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center,纽约州纽约(New York, NY))的高级免疫形态学平台实验室中在专家病理学家(TJH)的指导下进行所有组织成像。在利用DAB检测的徕卡Bond RX自动化研究染色机(徕卡Bond聚合物优化检测DS9800(Leica Bond Polymer Refine detection DS9800))上使用标准免疫组织化学染色优化第一抗体染色条件。使用4 μm组织切片和对照扁桃体组织上的连续抗体滴定,确定最佳抗体浓度,然后过渡到等效的七色多重测定(对照染色参见图11)。使用四种抗体套组以进行染色。套组A1和B1用于在1b期中收集的组织。对套组A2和B2的细胞标志物的分布进行了进一步优化,并且将所述套组用于在2期中收集的组织。多重测定抗体和条件描述于表8中。

[0273] 表8:

[0274]

套组 A1				
标志物	抗体克隆	来源	稀释	检测染料 (周期)
CD8	C8/114B	CST 公司 (CST)	0.042 ug/mL	Opal 520 (1)
Ki67	AP6	Biocare 公司 (Biocare)	1:100	Opal 540 (2)
CD68	PG-M1	Dako 公司 (Dako)	0.15 ug/mL	Opal 570 (3)
FOXP3	236A/E7	Biocare 公司	1:2	Opal 620 (4)
PDL1	73-10	艾博抗公司 (Abcam)	0.18 ug/mL	Opal 650 (5)
panCK	AE1/AE3	DAKO 公司	0.665 ug/mL	Opal 690 (6)
套组 B1				
标志物	抗体克隆	来源	稀释	检测染料 (周期)
CD3	BC33	Biocare 公司	1:200	Opal 520 (1)
INOS	13F5.1	密理博公司 (Millipore)	1:2500	Opal 540 (2)
颗粒酶 B	EPR8260	艾博抗公司	1:100	Opal 570 (3)
CD20	E7B7T	CST 公司 (CST)	0.055 ug/mL	Opal 620 (4)
CD56	MRQ-42	CellMarque 公司 (CellMarque)	1:2	Opal 650 (5)
panCK	AE1/AE3	DAKO 公司	0.665 ug/mL	Opal 690 (6)
套组 A2				
标志物	抗体克隆	来源	稀释	检测染料 (周期)
CD3	BC33	Biocare 公司	1:200	Opal 520 (1)
Ki67	SP6	Biocare 公司	1:100	Opal 540 (2)
CD56	MRQ-42	CellMarque 公司	1:2	Opal 570 (3)
FOXP3	236A/E7	Biocare 公司	1:2	Opal 620 (4)
CD8	C8/114B	CST 公司 (CST)	0.042 ug/mL	Opal 650 (5)
panCK	AE1/AE3	DAKO 公司	0.665 ug/mL	Opal 690 (6)
套组 B2				
标志物	抗体克隆	来源	稀释	检测染料 (周期)
CD80	EPR1157(2)	艾博抗公司	1:500	Opal 520 (1)
INOS	13F5.1	密理博公司	1:2500	Opal 540 (2)
CD68	PG-M1	Dako 公司	0.15 ug/mL	Opal 570 (3)
CD20	E7B7T	CST 公司 (CST)	0.055 ug/mL	Opal 620 (4)
PDL1	73-10	艾博抗公司	0.18 ug/mL	Opal 650 (5)
panCK	AE1/AE3	DAKO 公司	0.665 ug/mL	Opal 690 (6)

[0275] 七色多重成像测定。将FFPE组织切片以竖直载玻片朝向在62℃下烤制3小时,随后在徕卡Bond RX上进行脱蜡,然后用Leica Bond ER2进行抗原修复30分钟,然后进行6个连续周期的染色,其中每个轮次包括30分钟联合阻断和第一抗体温育(Akoya抗体稀释液/阻断剂)。对于Ki67和panCK,使用第二辣根过氧化物酶(HRP)缀合的聚合物进行检测(Akoya Opal聚合物HRP Ms+Rb;10分钟温育)。所有其它第一抗体的检测使用山羊抗小鼠聚HRP第二抗体或山羊抗兔聚HRP第二抗体进行(英杰公司;10分钟温育)。使用利用Opal染料520、540、570、620、650和690(马萨诸赛州马尔堡的Akoya生物科学公司(Akoya Biosciences, Marlborough, MA))进行的荧光酪胺信号扩增检测HRP缀合的第二抗体聚合物。共价酪胺反应后,在下一个周期之前,使用Akoya AR9缓冲液和Leica Bond ER2(90% AR9和10% ER2)在100℃下对第一/第二抗体复合物进行热诱导的剥离持续20分钟。6轮连续染色后,将切片用Hoechst 33342(英杰公司)染色以显示细胞核,并且用ProLong Gold抗褪色试剂安装介质(英杰公司)安装。

[0276] 多光谱成像与光谱解混。使用Vectra多光谱成像系统第3版(Akoya公司)对七色多重染色载玻片进行成像。扫描以20X(200X最终放大率)进行。用于多光谱成像的滤光片立方体为DAPI、FITC、Cy3、德州红(Texas Red)和Cy5。使用Vectra图像分析软件(Akoya公司)创建了含有本研究中的荧光团的发射光谱峰的光谱文库。使用来自每个标志物的单染色载玻片的多光谱图像,使用光谱文库以将每个多光谱立方体分离成单独分量(光谱解混),从而允许使用Inform 2.4图像分析软件来鉴定所关注的七个标志物通道。

[0277] mIF图像分析。将单独所关注区(ROI)图像导出到TIFF文件中,并且在专家病理学家的监督下通过用于多重成像质量控制和处理的流水线运行。使用机器学习细胞分割算法以使用核标志物以及多个膜标志物沿膜边界分割单个完整细胞,以便绘制所有细胞类型的边界。对于每个细胞段,对每个区内的像素值求平均,以得到每个细胞和每个标志物的单个强度值。使用这些单细胞强度值,由科学家手动进行细胞类型分配,从而确定每种样品的阳性标志物表达的截止点。为了进行此手动阈值分割,使用CellEngine™软件(CellCarta公司)和用于荧光图像可视化的内部定制开源软件Mantis Viewer同时检查单细胞标志物值的分布和图像本身上的荧光外观(<http://doi.org/10.5281/zenodo.4009579>),并且按样品绘制每个标志物的阈值。使用这些单独标志物阈值,通过如表9所示的套组中的联合相关标志物的阳性来定义细胞类型。

[0278] 表9:

[0279]	细胞群体	标志物表达
	B 细胞	CD68-, CD20+
	巨噬细胞	CD68+
	iNOS+巨噬细胞	CD68+, iNOS+
	CD80+巨噬细胞	CD68+, CD80+
	iNOS+CD80+巨噬细胞	CD68+, iNOS+, CD80+
	PD-L1+巨噬细胞	CD68+, PD-L1+
[0280]	NK 细胞	CD3-, CD56+
	T 细胞	CD3+
	CD8 T 细胞	CD3+, CD8+
	CD4 T 细胞	CD3+, CD8-
	Ki-67-CD4 T 细胞	CD3+, CD8-, FoxP3-, Ki-67-
	T 调节细胞	CD3+, CD8-, FoxP3+
	Ki-67+ T 调节细胞	CD3+, CD8-, FoxP3+, Ki-67+
	肿瘤细胞	PanCK+
	PD-L1+肿瘤细胞	PanCK+, PD-L1

[0281] 在定义了细胞类型后,计算每个ROI中相对于总细胞和亲本群体的百分比。然后,对于每种样品,取ROI中相对于总细胞的百分比、相对于亲本群体的百分比以及偶尔相对于其它相关群体的百分比的中值。

[0282] 分析与生存期和药效学变化相关的所有数据

[0283] 数据存储和结构。将所有经处理的生物标志物数据与整理的临床数据相结合,并且加载到命名为癌症数据与证据文库(Cancer Data&Evidence Library,CANDEL)的专有内部数据库中⁴⁴。CANDEL使用数据库技术Datomic™(www.datomic.com)和被构建为使得能够进行分子数据和临床数据的存储以及快速查询和由R编程语言进行的可视化的工具套件。

[0284] R中的数据分析。使用R编程语言(统计计算R基金会(R Foundation for Statistical Computing))⁴⁵分析所有分子数据与结果和治疗的相关,其中包和版本列示于表10中。

[0285] 表10:

[0286]	包名称	版本
	Ggplot2	3.3.5
	wick	1.1
	survminer	0.4.9
	dplyr	1.0.7
	plyr	1.8.6
	Reshape2	1.4.4
	Data.table	1.14.0
	survival	3.2-13
	tidyr	1.1.4
	tidyverse	1.3.1
	ggpubr	0.4.0
	limma	3.48.3
	readxl	1.3.1
	msigdb	7.4.1
[0287]	stringr	1.4.0
	venn	1.10
	mixOmics	6.16.3
	pheatmap	1.0.12
	readr	2.0.1

[0288] 通过基于所有群组中的所有患者的中值将患者分为两组来分析细胞群体百分比、蛋白质值和基因表达特征与生存期的相关。在这两组之间,对于每个群组,创建卡普兰-梅尔图,并且使用survminer和survival包确定log秩p值显著性。为了可视化任何所定义的组之间的差异或可视化治疗的变化,使用Ggplot2和base R绘图。为了确定治疗前值与治疗中值之间的差异以及在任何给定时间点时生存期组(>1年和<1年)之间的差异,使用显著性截止值为 $p=0.05$ 的威尔科克森符号秩检验。计算中值log变化倍数以确定从治疗前到治疗中看到的另外的药效学差异。在mixOmics R包中使用DIABLO方法生成用于多组学分析的热图和circus图。使用pheatmap生成热图,并且使用斯皮尔曼方法(Spearman method)计算数据类型之间的相关性。

[0289] 质谱法数据的相关分析由于分析了大量的蛋白质,因此对质谱法数据使用了另外的方法。使用在群组之间按蛋白质应用的逐对威尔科克森测试与邦费罗尼校正(Holmes-Bonferroni correction)(组内)进行初始单变量候选过滤。使用其中来自随机选择的80%观察结果的p值低于或等于0.05的蛋白质以使用稀疏偏最小二乘判别分析(sPLS-DA)方法进行进一步优化,其中零为绝对特征显著性的阈值⁴⁶。计算C1D1与C1D15、C2D1与C3D1之间的比率,并且将其进一步用于下游。随机选择的80%观察结果用于对所有群组进行sPLS-DA。使用留一算法以进行最优组分和蛋白质选择。使用R包‘mixOmics’⁴⁷进行sPLSDA训练和测试。其余20%观察结果用于验证。所有三个组C1D15、C2D1和C3D1的预测准确度计算为真阳性和阴性之和与所有观察结果的比率(R包‘caret’)。使用R-包‘ComplexHeatmap’利用曼哈顿距离(Manhattan distance)和对中心数据和归一化数据($x_{ij}-x_j/s_j$,第i次观察结果与第j个蛋白)进行Ward聚类进行无监督层级分析。采用R包‘stats’进行PCA分析。使用皮尔森

相关性与R包‘stats’和‘corrplot’进行相关性分析。相关性显著性使用0.05 α 的双侧t测试进行测试。所有分析均使用log2经转换的数据进行。

[0290] 实施例7:基线人口统计学和疾病特性

[0291] 从2018年8月30日至2019年6月10日,99名患者被随机分配到三个治疗组(N=37、31和31)之一,分别分配到nivo/chemo、sotiga/chemo、sotiga/nivo/chemo;图12。六名例患者(分别地,N=3、1和2)被随机分配,但未给药,并且被排除在图12的分析之外。评估了105名患者(N=34、36、35)的疗效,所述患者包括93名II期中的被随机分配并且给药的患者和12名来自Ib期研究的DLT可评估的患者¹³(sotiga/chemo和sotiga/nivo/chemo各6名)。评估了108名患者(N=36、37、35)的安全性,所述患者包括105名对疗效进行评估的患者和3名来自Ib期的非DLT可评估的患者。用于分析的临床快照数据为2021年3月24日。

[0292] 功效群体的基线特性在组之中总体上是平衡的,包括年龄、性别、种族/民族、原发性胰腺瘤位置、转移扩散部位、诊断阶段和肿瘤负荷(表11、表12)。

[0293] 表11:

[0294]

表 1 的延伸: 功效群体中的患者的人口统计学和基线疾病特性			
	纳武单抗 + Chemo (N = 34)	索替格利单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
特性			
年龄 - 岁			
中值 (范围)	62.5 (47-75)	60.5 (35-78)	62.0 (41-78)
≥ 65 岁, n (%)	14 (41)	14 (39)	13 (37)
性别, n (%)			
女性	14 (41)	13 (36)	16 (46)
男性	20 (59)	23 (64)	19 (54)
种族或民族, n (%)			
亚洲人	3 (9)	4 (11)	0
黑色人种	0	3 (8)	2 (6)
白色人种	29 (85)	28 (78)	31 (89)
其它	2 (6)	1 (3)	2 (6)
西班牙裔	1 (3)	1 (3)	1 (3)
ECOG 表现状态, n (%)			
0	15 (44)	20 (56)	15 (43)
1	19 (56)	16 (44)	20 (57)
胰腺瘤位置, n (%)			
头	14 (41)	17 (47)	19 (54)
身体	12 (35)	9 (25)	10 (29)
尾部	8 (24)	10 (28)	6 (17)
选择转移性疾病部位, n (%)			
肝脏	28 (82)	29 (81)	27 (77)
肺部	10 (29)	10 (28)	11 (31)

[0295]	腹膜	8 (24)	9 (25)	11 (31)
	初始 PDAC 诊断时的阶段, n (%)			
	阶段 I-III	7 (21)	9 (25)	9 (26)
	阶段 IV	27 (79)	27 (75)	26 (74)
	从诊断到首次给药的时间-月数, 中值(范围) ^a	1.1 (0.4-69.8)	1.0 (0.4-29.1)	1.1 (0.4-45.3)
	先前癌症治疗, n (%)			
	化学疗法	9 (27)	7 (19)	6 (17)
	放射疗法	7 (21)	1 (3)	4 (11)
	外科手术	11 (32)	11 (31)	8 (23)
	肿瘤负荷, mm ^b			
	中值	78.5	68.5	79.0
	范围	13-160	19-214	10-194

[0296] 缩写: chemo=化学疗法; ECOG=东部肿瘤合作组; mm=毫米; PDAC=胰腺导管腺癌。

[0297] *包括2期中的所有随机分配且给药的患者和来自1b期的纳入在推荐2期索替格利单抗给药的DLT可评估的患者。

[0298] ^a计算不包括一名来自nivo/chemo的未报告诊断日期的参与者。

[0299] ^b肿瘤负荷为所有靶病变的最大直径的总和(淋巴结的最短直径)。

[0300] 表12:

[0301]		纳武单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + Chemo (N = 37)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
	特性			
	年龄 - 岁			
	中值 (范围)	61.5 (41-75)	61.0 (35-78)	62.0 (39-78)
	≥ 65 岁, n (%)	14 (39)	15 (41)	14 (40)
	性别, n (%)			
	女性	14 (39)	13 (35)	17 (49)
	男性	22 (61)	24 (65)	18 (51)
	种族或民族, n (%)			
	亚洲人	3 (8)	4 (11)	1 (3)
	黑色人种	0	3 (8)	2 (6)
	白色人种	31 (86)	29 (78)	30 (86)
	其它	2 (6)	1 (3)	2 (6)
	西班牙裔	1 (3)	1 (3)	1 (3)
	ECOG 表现状态, n (%)			
	0	16 (44)	20 (54)	16 (46)
	1	20 (56)	17 (46)	19 (54)
	胰腺瘤位置, n (%)			
	头	15 (42)	17 (46)	19 (54)

[0302]

身体	13 (36)	10 (27)	9 (26)
尾部	8 (22)	10 (27)	7 (20)
选择转移性疾病部位, n (%)			
肝脏	29 (81)	30 (81)	27 (77)
肺部	11 (31)	11 (30)	11 (31)
腹膜	9 (25)	10 (27)	11 (31)
初始 PDAC 诊断时的阶段, n (%)			
阶段 I-III	8 (22)	9 (24)	9 (26)
阶段 IV	28 (78)	28 (76)	26 (74)
从诊断到首次给药的时间-月数, 中值(范围) ^a	1.3 (0.4-69.8)	1.0 (0.2-29.1)	1.1 (0.4-29.6)
先前癌症治疗, n (%)			
化学疗法	10 (28)	7 (19)	6 (17)
放射疗法	7 (19)	1 (3)	5 (14)
外科手术	12 (33)	11 (30)	8 (23)

[0303] 缩写: chemo=化学疗法; ECOG=东部肿瘤合作组; PDAC=胰腺导管腺癌。

[0304] *包括接受任何研究药物的至少1次给药的所有1b期和2期患者。为了进行安全性分析, 将患者根据实际接受的研究治疗进行分组。

[0305] ^a计算不包括一名来自nivo/chemo的未报告诊断日期的参与者。

[0306] 在筛选时, sotiga/chemo的较高比例的患者ECOG评分为0(nivo/chemo、sotiga/chemo和sotiga/nivo/chemo中分别为44%、56%和43%)。在组之中, 74-79%的患者患有新发IV期疾病。

[0307] 通过多重免疫荧光成像(mIF)得到的治疗前PD-L1+肿瘤百分比在nivo/chemo组与sotiga/nivo/chemo组之间是相似的, 但在sotiga/chemo组中较少表13。

[0308] 表13:

[0309]

特性	纳武单抗 + Chemo (N = 34)	索替格利单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
PD-L1+肿瘤百分比 ^a			
>1% ^b , n/可评估数量 (%)	10/18 (56)	7/19 (37)	14/24 (58)
可获得的肿瘤突变数据 ^b , n (%)	27 (79)	25 (69)	22 (63)
<i>KRAS</i> , n/可评估数量 ^c (%)	19/27 (70)	14/25 (64)	13/22 (59)
<i>G12D</i> 突变	9/27 (33)	6/25 (24)	3/22 (14)
<i>G12R</i> 突变	3/27 (11)	1/25 (4)	2/22 (9)
<i>G12V</i> 突变	6/27 (22)	6/25 (24)	6/22 (27)
<i>Q61H</i> 突变	1/27 (4)	2/25 (8)	1/22 (5)
<i>Q61R</i> 突变	0/27 (0)	1/25 (4)	1/22 (5)
<i>MSI</i> -高, n/可评估数量 (%)	1/27 (1)	0/25 (0)	1/22 (5)

[0310]

<i>BRCA1</i> , n/可评估数量 (%)	3/27 (11)	0/25 (0)	3/22 (14)
<i>BRCA2</i> , n/可评估数量 (%)	0/27 (0)	1/25 (4)	0/22 (0)
<i>EGFR</i> , n/可评估数量 (%)	3/27 (11)	0/25 (0)	0/22 (0)
<i>SMAD</i> , n/可评估数量 (%)	4/27 (15)	3/25 (12)	2/22 (9)
<i>TP53</i> , n/可评估数量 (%)	19/27 (70)	7/25 (28)	14/22 (64)

[0311] 缩写: chemo=化学疗法; MSI=微卫星不稳定性。

[0312] *包括2期中的所有随机分配且给药的患者和来自1b期的纳入在推荐2期索替格利

单抗给药的DLT可评估的患者。

[0313] ^a PD-L1+用多重研究方法测定,并且肿瘤百分比以与联合阳性评分(CPS)最相似的方法计算。然而,PD-L1+肿瘤百分比是通过单个FFPE肿瘤样品载玻片上的多个所关注区的通过计算方法分析的多重IHC评估的,并且因此,不可直接与由经训练的病理学家评估的单标志物IHC测定比较。

[0314] ^b 由于不具有足够质量的治疗前肿瘤样品以对分别地nivo/chemo组、sotiga/chemo组和sotiga/nivo/chemo组中的11名、17名和14名患者进行DNA测序,因此不可获得用于肿瘤突变分析的数据。

[0315] ^c 未检测到其它KRAS突变。

[0316] 七十四名(70%)患者具有最够高质量的治疗前肿瘤组织以用于全外显子组测序(WES)。通过WES,对治疗组的mPDAC中的KRAS、BRCA1/2、SMAD4和TP53的致癌基因频率进行了平衡(补充表2)。大多数患者(62%)患有KRAS突变体肿瘤。1名患者(nivo/chemo)的肿瘤组织是微卫星不稳定性高的。七名患者(nivo/chemo中3名,sotiga/chemo中1名,sotiga/nivo/chemo中3名)在肿瘤中检测到BRCA突变。另外,相对地对组的治疗前肿瘤组织中的基因表达特征进行了平衡,并且所述组在循环内的免疫细胞群体具有相似基线频率。

[0317] 实施例8:随访药物暴露

[0318] 分析时,对功效群体中的患者的随访的中值持续时间为24.2个月(四分位数范围[IQR]20.5-26.3),其中最短随访为15个月。两名患者仍在治疗中,sotiga/chemo和sotiga/nivo/chemo中各自一名。关于治疗的中值时间在3组之间是相似的(中值(IQR),月数:nivo/chemo、sotiga/chemo、sotiga/nivo/chemo分别为5.2(1.9-8.1)、5.1(3.4-8.9)、4.7(2.4-7.9)个月)。于组合的每种药物的暴露在3组之间也是相似的(表14)。

[0319] 表14:

[0320]		纳武单抗 + Chemo (N = 34)	索替格利单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
	治疗暴露			

[0321]

治疗持续时间 (月数), 中值 (范围)	5.2 (0-19)	5.1 (0-20)	4.7 (0-24)
化学疗法治疗周期, 中值 (范围)	6.0 (1-23)	6.0 (1-22)	6.0 (1-25)
接收 ≥ 1 次给药的患者, n (%)			
索替格利单抗	0	34 (94)	33 (94)
纳武单抗	34 (100)	0	35 (100)
吉西他滨	34 (100)	36 (100)	35 (100)
纳布-紫杉醇	34 (100)	36 (100)	35 (100)
相对剂量强度, 中值 (IQR)。%			
索替格利单抗	--	100 (81-100)	100 (100-100)
纳武单抗	89 (74-100)	--	100 (83-100)
吉西他滨	76 (58-95)	80 (64-89)	68 (52-88)
纳布-紫杉醇	69 (52-89)	71 (60-84)	68 (51-88)
累积剂量, 中值 (IQR)			
索替格利单抗, mg/kg	--	1.7 (1.2-2.6)	1.5 (1.2-2.4)
纳武单抗, mg	2,280 (960-3,300)	--	2,400 (960-3,120)
吉西他滨, mg/m ²	14,200 (6,200-18,000)	14,400 (9,480-21,320)	11,080 (5,800-16,600)
纳布-紫杉醇, mg/m ²	1,388 (768-2,108)	1,788 (1,020-2,444)	1,385 (728-2,063)
剂量修改			
给药减少 ≥ 1 次的患者, n (%)	21 (62)	25 (69)	22 (63)
索替格利单抗, mg/kg	--	7 (19)	1 (3)
纳武单抗, mg	0	--	0
吉西他滨, mg/m ²	21 (62)	25 (69)	22 (63)
纳布-紫杉醇, mg/m ²	25 (74)	26 (72)	22 (63)
未施用 ≥ 1 次给药的患者, n (%)			
索替格利单抗, mg/kg	--	17 (47)	13 (37)
纳武单抗, mg	22 (65)	--	17 (49)
吉西他滨, mg/m ²	22 (65)	27 (75)	25 (71)
纳布-紫杉醇, mg/m ²	23 (68)	28 (78)	24 (69)
≥ 1 次给药中断的患者, n (%)			
索替格利单抗, mg/kg	--	21 (58)	13 (37)
纳武单抗, mg	2 (6)	--	2 (6)
吉西他滨, mg/m ²	1 (3)	0	2 (6)
纳布-紫杉醇, mg/m ²	1 (3)	2 (6)	0

[0322] 缩写: chemo=化学疗法; IQR=四分位数范围; kg=千克; m²=平方米; mg=毫克。*包括2期中的所有随机分配且给药的患者和来自1b期的纳入在推荐2期索替格利单抗给药的DLT可评估的患者。

[0323] 实施例9: 临床活性

[0324] 主要终点是相对于35%的历史对照率的1年OS率¹⁴。此研究没有在组之间进行比较。

[0325] 对于nivo/chemo, 1年OS率为57.7% (1侧p=0.006; 1侧95%置信下限=41.7%), 并且中值OS为16.7个月 (95% CI: 9.8-18.4) (图21图1)。

[0326] 中值无进展生存期 (PFS) 为6.4个月 (95% CI: 5.2-8.8), 研究者评估的客观响应率 (ORR) 为50.0% (95% CI: 32.4-67.6), 疾病控制率 (DCR) 为73.5% (95% CI: 55.6-

87.1),并且中值应答持续时间(DOR)为7.4个月(95% CI:2.1-不可估计)(图13、表15)。

[0327] 表15

	纳武单抗 + Chemo (N = 34)	索替格利单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
1 年总存活率, %	57.7	48.1	41.3
p 值相对于来自 Von Hoff (2013) 的 35%	0.006	0.062	0.233
1 侧 95% 置信下限, %	41.7	33.7	27.0
总生存期, 月数			
中值	16.7	11.4	10.1
95% CI	9.8-18.4	7.2-20.1	7.9-13.2
最佳应答, n (%)			
完全应答	1 (3)	0	0
部分应答	16 (47)	12 (33)	11 (31)
经确认的部分应答, n	11	12	9
未经确认的部分应答, n	5	0	2
稳定疾病	8 (24)	16 (44)	13 (37)
进行性疾病	5 (15)	5 (14)	7 (20)
不可以评估 ^a	4 (12)	3 (8)	4 (11)
客观应答率, n (%)	17 (50)	12 (33)	11 (31)
95% CI	32-68	19-51	17-49
疾病控制率 ^b , n (%)	25 (74)	28 (78)	24 (69)
95% CI	56-87	61-90	51-83
应答持续时间, 月数			
中值	7.4	5.6	7.9
95% CI	2.1-NE	3.8-8.0	1.9-NE
无进展生存期, 月数			
中值	6.4	7.3	6.7
95% CI	5.2-8.8	5.4-9.2	4.2-9.8

[0329] 缩写: chemo=化学疗法; CI=置信区间; NE=不可估计。

[0330] *包括2期中的所有随机分配且给药的患者和来自1b期的纳入在推荐2期索替格利单抗给药的DLT可评估的患者。

[0331] ^a不可评估包括仅具有一次肿瘤评估并且总体应答为不可评估(nivo/chemo中1名)或由于以下而不具有任何基线后肿瘤评估的患者:在治疗中断后启动另一种全身癌症疗法(nivo/chemo中1名, sotiga/chemo中2名, sotiga/nivo/chemo中1名)、死亡(sotiga/nivo/chemo中2名)、撤回同意书/丢失随访(nivo/chemo和sotiga/chemo中各1例)或由于临床恶化而丧失能力(nivo/chemo和sotiga/nivo/chemo中各1名)。

[0332] ^b疾病控制率被定义为在研究药物启动后至少7周达到完全应答或部分应答或稳定疾病的最佳总体应答的患者的比例。

[0333] 对于sotiga/chemo, 1年OS率为48.1% (1侧p=0.062; 1侧95% 置信下限=33.7%), 并且中值OS为11.4个月(95% CI:7.2-20.1)。中值PFS为7.3个月(95% CI:5.4-9.2), 研究者评估的ORR为33.3% (95% CI:18.6-51.0), DCR为77.8% (95% CI:60.9-89.9), 并且中值DOR为5.6个月(95% CI:3.8-8.0)。

[0334] 对于sotiga/nivo/chemo, 1年OS率为41.3% (1侧p=0.233; 置信下限=27.0%),

并且中值OS为10.1个月(95% CI:7.9-13.2)。中值PFS为6.7个月(95% CI:4.2-9.8),研究者评估的ORR为31.4%(95% CI:16.9-49.3),DCR为68.6%(95% CI:50.7-83.2),并且中值DOR为7.9个月(95% CI:1.9-不可估计)。

[0335] 实施例10:不良事件

[0336] 治疗相关不良事件 (TRAE) 的频谱、频率和严重程度在组之中是相似的,并且与在Ib期中观察到的安全性谱一致¹³。总体而言,106名(98%)患者报告了至少一次TRAE。最常见的任何等级的非血液学TRAE是恶心、疲劳、发热和寒战(表16)。

[0337] 表16:

任何组中发生率> 20%的治疗相关不良事件。						
MedDRA (v 23.0) 优选术语, n (%)	纳武单抗 + Chemo (N = 36)		索替格利单抗 + Chemo (N = 37)		索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)	
	任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级
恶心	25 (69)	0	32 (87)	0	28 (80)	0
疲劳	25 (69)	9 (25)	27 (73)	5 (14)	27 (77)	5 (14)
发热	11 (31)	0	28 (76)	1 (3)	24 (69)	1 (3)
发冷	3 (8)	0	30 (81)	3 (8)	27 (77)	0
贫血	21 (58)	12 (33)	20 (54)	9 (24)	18 (51)	8 (23)
天冬氨酸氨基转移酶增加	18 (50)	7 (19)	24 (65)	14 (38)	20 (57)	9 (26)
丙氨酸氨基转移酶增加	16 (44)	3 (8)	20 (54)	6 (16)	20 (57)	8 (23)
腹泻	19 (53)	0	13 (35)	1 (3)	16 (46)	2 (6)
呕吐	11 (31)	0	21 (57)	1 (3)	16 (46)	1 (3)
食欲下降	17 (47)	0	19 (51)	0	9 (26)	0
脱发	14 (39)	0	17 (46)	1 (3)	12 (34)	0
周边水肿	13 (36)	0	17 (46)	1 (3)	12 (34)	0
血小板计数减少	12 (33)	3 (8)	13 (35)	3 (8)	17 (49)	4 (11)
嗜中性粒细胞计数减少	13 (36)	7 (19)	14 (38)	13 (35)	14 (40)	8 (23)
皮疹	17 (47)	4 (11)	9 (24)	0	13 (37)	0
周围神经病变	10 (28)	1 (3)	16 (43)	1 (3)	9 (26)	0
血小板减少	9 (25)	1 (3)	11 (30)	4 (11)	14 (40)	2 (6)
瘙痒	3 (8)	1 (3)	15 (41)	0	13 (37)	0
血碱性磷酸酶升高	7 (19)	1 (3)	12 (32)	2 (5)	11 (31)	3 (9)
呼吸困难	9 (25)	3 (8)	8 (22)	2 (5)	9 (26)	2 (6)
嗜中性粒细胞减少	7 (19)	5 (14)	12 (32)	10 (27)	6 (17)	5 (14)
白细胞计数减少	10 (28)	5 (14)	7 (19)	3 (8)	6 (17)	3 (9)
细胞因子释放综合征	0	0	9 (24)	3 (8)	12 (34)	2 (6)
淋巴细胞计数减少	6 (17)	6 (17)	9 (24)	6 (16)	6 (17)	5 (14)
周围感觉神经病变	8 (22)	0	7 (19)	2 (5)	6 (17)	0
低血压	2 (6)	0	9 (24)	0	9 (26)	0
肌痛	3 (8)	0	8 (22)	0	8 (23)	1 (3)
咳嗽	4 (11)	0	4 (11)	0	8 (23)	0
头痛	1 (3)	0	10 (27)	0	4 (11)	0
味觉障碍	4 (11)	0	2 (5)	0	7 (20)	0
低钠血症	2 (6)	1 (3)	8 (22)	1 (3)	2 (6)	1 (3)
荨麻疹	0	0	4 (11)	0	8 (23)	0

[0340] 组合时与计数类似的优选术语:

组合术语, n (%)	纳武单抗 + Chemo (N = 36)		索替格利单抗 + Chemo (N = 37)		索替格利单抗 + 纳 武单抗 + Chemo (N = 35)	
	任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级	任何等级	3-4 级
[0341] 周围神经病变、周围运动神经病 变、周围感觉神经病变	19 (53)	1 (3)	23 (62)	4 (11)	14 (40)	0
嗜中性粒细胞减少、嗜中性粒细 胞计数减少、白细胞计数减少	19 (53)	12 (33)	22 (59)	20 (54)	20 (57)	13 (37)
血小板计数减少、血小板减少	17 (47)	4 (11)	21 (57)	6 (16)	21 (60)	6 (17)

[0342] 缩写: chemo=化学疗法; MedDRA=监管活动医学词典。

[0343] *包括接受任何研究药物的至少1次给药的所有1b期和2期患者。为了进行安全性分析, 将患者根据实际接受的研究治疗进行分组。

[0344] 最常见的3-4级TRAE是血液学的, 并且通常在性质上是暂时性的。在90名(83%)患者中观察到特别关注不良事件(AESI), 包括细胞因子释放综合征(CRS)、输注反应、血小板减少和肝功能测试(LFT)升高(表17)。

[0345] 表17:

[0346]		纳武单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + Chemo (N = 37)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
	具有至少一种 AESI 的患者, n (%)	28 (78)	32 (87)	30 (86)
	细胞因子释放综合征	0	9 (24)	12 (34)
[0347]	1 级	0	0	1 (3)
	2 级	0	6 (16)	9 (26)
	3 级	0	3 (8)	2 (6)
	肝功能测试结果升高	24 (67)	30 (81)	26 (74)
	1 级	5 (14)	1 (3)	5 (14)
	2 级	7 (19)	11 (30)	6 (17)
	3 级	12 (33)	18 (49)	14 (40)
	4 级	0	0	1 (3)
	输注相关反应	2 (6)	5 (14)	5 (14)
	1 级	0	2 (5)	0
	2 级	1 (3)	2 (5)	5 (14)
	3 级	1 (3)	1 (3)	0
	低血小板计数	18 (50)	21 (57)	22 (63)
	1 级	5 (14)	7 (19)	5 (14)
	2 级	8 (22)	8 (22)	10 (29)
	3 级	3 (8)	4 (11)	6 (17)
	4 级	2 (6)	2 (5)	1 (3)

[0348] 缩写: AESI=特别关注不良事件; chemo=化学疗法。

[0349] *包括接受任何研究药物的至少1次给药的所有1b期和2期患者。为了进行安全性分析, 将患者根据实际接受的研究治疗进行分组。

[0350] 不良事件根据国家癌症研究所不良事件通用术语标准(NCO CTCAE)第4.03版进行分级。作为限制, 由于重叠特性, 在评估中在术语(例如, 输注相关反应与细胞因子释放综合征)之间存在变异性的可能, 这可能导致具体术语的发生率的比例不足或过高。

[0351] 细胞因子释放综合征被定义为其中MedDRA优选术语匹配“细胞因子释放综合征”

的不良事件,无论其严重性、严重程度或与研究药物的关系如何。

[0352] 肝功能测试结果升高被定义为其中MedDRA优选术语匹配“丙氨酸氨基转移酶升高”、“天冬氨酸氨基转移酶升高”、“血碱性磷酸酶升高”、“血胆红素升高”、“肝酶升高”或“高胆红素血症”的不良事件,无论其严重性、严重程度或与研究药物的关系如何。

[0353] 输注相关反应被定义为其中MedDRA优选术语匹配“输注相关反应”的不良事件,无论其严重性、严重程度或与研究药物的关系如何。

[0354] 低血小板计数被定义为其中MedDRA优选术语匹配“血小板计数减少”或“血小板减少”的不良事件,无论其严重性、严重程度或与研究药物的关系如何。

[0355] 在nivo/chemo、sotiga/chemo和sotiga/nivo/chemo组中的0名、9名(24%)和12名(34%)患者中观察到CRS,其中5例事件被评估为3级(sotiga/chemo组中3名,sotiga/nivo/chemo组中2名)。未观察到4级或5级CRS。分别在2名(6%)、5名(14%)和5名(14%)患者中观察到输注相关反应。分别在18名(50%)、21名(57%)和22名(63%)患者中观察到低血小板计数。分别在24名(67%)、30名(81%)和26名(74%)患者中观察到LFT升高。

[0356] nivo/chemo中的六名(17%)患者、sotiga/chemo中的1名(3%)、sotiga/nivo/chemo中的1名(3%)由于AE而中断所有研究药物(表18)。

[0357] 表18:

	纳武单抗 + Chemo (N = 36)	索替格利单抗 + Chemo (N = 37)	索替格利单抗 + 纳武单抗 + Chemo (N = 35)
AE 而引起的治疗中断, n (%)	6 (17)	1 (3)	1 (3)
[0358] 血栓性微血管病变	2 (6)	0	0
肺炎	1 (3)	1 (3)	0
高胆红素血症	1 (3)	0	0
心肌炎	1 (3)	0	0
周围神经病变	1 (3)	0	0
发热	0	0	1 (3)

[0359] 缩写:AE=不良事件;chemo=化学疗法。

[0360] *包括接受任何研究药物的至少1次给药的所有1b期和2期患者。为了进行安全性分析,将患者根据实际接受的研究治疗进行分组。

[0361] 两名患者死于不良事件:sotiga/chemo中为急性肝功能衰竭(因果关系不可以确定,因此被视为可能与所有研究药物相关)并且sotiga/nivo/chemo中为颅内出血(再次,可能与所有研究药物相关)。

[0362] 实施例11:药效学效应

[0363] 为了了解每个组的药效学效应,对治疗前和治疗中获得的一系列患者血液样品和肿瘤活检进行了多组学谱分析。在所有三个组中,对患者外周血单核细胞(PBMC)的纵向谱分析(参见方法)显示出在治疗中增殖性(Ki-67+)非原初(表19;所定义的免疫细胞群体)CD8和CD4 T细胞增加(图14A-14B)。

[0364] 表19:

[0365]

免疫细胞群体	用于定义群体的标志物
非原初 T 细胞	(CD45RA-CD27+)、(CD45RA-CD27-)、 (CD45RA+CD27-)
效应记忆 T 细胞	CD45RA- CCR7-
效应记忆 1 (EM1) T 细胞	CD45RA-CD27+CCR7-
中央记忆 T 细胞	CD45RA-CD27+CCR7+
常规树突状细胞	HLA-DR+CD14-CD16-CD11c+
交叉呈递树突状细胞	HLA-DR+CD14-CD16-CD11c+CD141+
B 细胞	CD19+
单核细胞髓系源性抑制细胞	CD14+CD16-HLA-DRlo

[0366] 这种增加在nivo/chemo组中最强且最早观察到,并且在sotiga/chemo组中程度较小;相比之下,在sotiga/nivo/chemo组中,效应在数值上减弱,这可能表明T细胞扩增的全身免疫激活减少,或者T细胞调节的动力学改变,这在时间序列分析中没有被捕获。循环经激活的 (HLA-DR+、CD38+或CD39+) 非原初CD4和CD8 T细胞在所有三个组中也有所增加,特别是在含nivo的组中 (图15A、图15B和图13)。

[0367] 在由所研究的172种血清蛋白构成的阵列中,所有三个治疗组中的患者的治疗中胰腺癌预后的已知生物标志物,如K1C19 (胰腺导管蛋白) 均有所增加,所述生物标志物是通过肿瘤回归测量的跟踪的 (图14C和表20)。

[0368] 表20

[0369]

分类	特征	样品	重要治疗中 时间点	P 值	相对于治疗 前的方向性 变化
免疫抑制	PD-1	血清	C1D15、 C2D1、C3D1	6.09E-12、 0.00036、 3.04E-05	增加
	精氨酸酶-1-ARG1	血清	C1D15	0.01969	减少
	MMP-12	血清	C3D1	0.00124	减少
	HLA-DRlo Ki-67+ mMDSC(相 对于经典单核细胞的%)	PBMC	C1D15	9.27E-06	增加
	CTLA-4+非原初 CD8 T 细胞 (非原初 CD8 T 细胞%)	PBMC	C2D1	0.00364	增加
	PD-L1+非原初 CD8 T 细胞(相 对于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.03229	增加
	PD-L1+T 细胞(相对于 T 细胞 的%)	PBMC	C2D1	0.04444	增加
	PD-1+非原初 CD8 T 细胞(相 对于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C4D1	0.00012	减少
	PD-1+T 细胞(相对于 T 细胞 的%)	PBMC	C4D1	0.00605	减少
	PD-1 非原初 CD8 T 细胞(相对 于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C1D15	0.03137	减少
	CD11b+ B 细胞(相对于 B 细 胞的%)	PBMC	C1D15、 C4D1	0.01216、 0.00942	减少、增加
	CCR7+ CD11b+ B 细胞(相对 于 B 细胞的%)	PBMC	C1D15	0.01700	减少
模式识别 受体	CLEC-4A	血清	C1D15	3.47E-08	减少
	CLEC-6A	血清	C1D15	0.00017	减少

[0370]

	CLEC-4D	血清	C1D15	0.00070	减少
	CLEC-7A	血清	C3D1	2.51E-06	增加
趋化因子	CXCL5	血清	C1D15	0.00086	减少
T 细胞激 活和增殖	IFN- γ	血清	C1D15、 C2D1、C3D1	0.00091、 0.01466、 9.73E-05	增加
	IL-7	血清	C1D15	0.00178	增加
	CD40L	血清	C1D15	0.00211	减少
	IL-18	血清	C1D15	7.79E-06	增加
	IL-8	血清	C3D1	7.77E-05	减少
	Ki-67+T 细胞(相对于 T 细胞 的%)	PBMC	C1D15	3.93E-05	增加
	Ki-67+ CD8 T 细胞(相对于 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C1D15	0.00087	增加
	Ki-67+非原初 CD8 T 细胞(相 对于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.00364	增加
	CD38+非原初 CD8 T 细胞(相 对于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C4D1	0.00445	增加

[0371] 所有三个治疗组中的患者的免疫抑制分子IL-8和MMP-12也有所下降(表20、表21),而用nivo/chemo治疗的患者表现出免疫抑制蛋白精氨酸酶1和共刺激配体CD40L的水

平早期 (C1D15) 降低 (图14C)。

[0372] 表21

[0373]

分类	特征	样品	重要治疗 中时间点	P 值	相对于治 疗前的方 向性变化
T 细胞的激 活和增殖	IL-18	血清	C1D15	2.9974E-08	增加
	IFN- γ	血清	C2D1、 C3D1	0.00046、 0.00059	增加
	IL-15	血清	C3D1	4.80388E-08	增加
	Ki-67+非原初 CD8 T 细胞 (非原 初 CD8 T 细胞%)	PBMC	C4D1	0.00452	增加
	Ki-67+T 细胞 (相对于 T 细胞的 %)	PBMC	C4D1	0.00873	增加
I 型免疫	IL-12A	血清	C1D15	6.2814E-06	减少
PDAC 预后 因子	角蛋白-19-KIC19	血清	C2D1、 C3D1	0.00077、 0.00033	减少
	粘蛋白-16-MUC16	血清	C2D1、 C3D1	0.00983、 0.00080	减少
	IL-8	血清	C3D1	0.01683	减少
模式识别	CLEC-4C	血清	C3D1	1.47829E-07	增加

[0374]

分类	特征	样品	重要治疗 中时间点	P 值	相对于治 疗前的方 向性变化
受体	CLEC-4D	血清	C1D15	0.00846	减少
单核细胞	中级单核细胞 (CD 16+CD 14+) (相对于 HLA-DR+细胞的%)	PBMC	C1D15	0.00497	减少
	非经典单核细胞 (相对于 HLA-DR+细胞的%)	PBMC	C2D1	0.03535	减少
免疫抑制	MMP-12	血清	C3D1	0.01015	减少
	PD-1+T 细胞 (相对于 T 细胞的 %)	PBMC	C1D15	0.00253	减少
	Ki-67+ Treg (相对于 Treg 的%)	PBMC	C1D15	0.04190	增加
	PD-L1 Treg (相对于 Treg 的%)	PBMC	C1D15	0.0450	增加
	CD38+ Treg (相对于 Treg 的%)	PBMC	C1D15	0.0480	增加
	PD-L1+T 细胞 (相对于 T 细胞的 %)	PBMC	C1D15	0.0489	增加
	Tbet+ Treg (相对于 Treg 的%)	PBMC	C1D15	0.00611	减少
	PD-1+非原初 CD8 T 细胞 (非原 初 CD8 T 细胞%)	PBMC	C2D1	0.00115	减少
	HLA-DRlo mMDSC (相对于经 典单核细胞的%)	PBMC	C1D15	0.00729	增加
T 细胞免疫	非原初 CD8 T 细胞 (相对于 CD8 T 细胞的%)	PBMC	C1D15、 C4D1	0.00488、 0.02208	减少
B 细胞生物 学	CCR7+B 细胞 (相对于 B 细胞的 %)	PBMC	C2D1、 C5D1	0.01000、 0.01645	减少
	HLA-DR+浆母细胞 (相对于浆母 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.01094	减少
	CCR+浆母细胞 (相对于浆母细 胞的%)	PBMC	C2D1	0.01198	减少
	CD40+记忆 B 细胞 (相对于记忆 B 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.02586	减少
	CD40+ B 细胞 (相对于 B 细胞的 %)	PBMC	C2D1	0.027811	减少
	CD40+CD27+ B 细胞 (相对于 CD27+B 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.03634	减少
	CCR7+记忆 B 细胞 (相对于记忆 B 细胞的%)	PBMC	C4D1	0.00312	减少
	CD27+ B 细胞 (相对于 B 细胞的 %)	PBMC	C1D15	0.03193	减少
	B 细胞 (相对于 CD45+细胞的%)	PBMC	C4D1	0.02391	减少
	CCR7+记忆 B 细胞 (相对于记忆 B 细胞的%)	PBMC	C2D1	0.00578	减少
抗原经历 的 T 细胞	PD-1+CD38+非原初 CD4 T 细胞 (非原初 CD4 T 细胞%)	PBMC	C4D1	0.03634	增加

[0375]

分类	特征	样品	重要治疗中时间点	P 值	相对于治疗前的方向性变化
树突状细胞生物学	141+树突状细胞（相对于常规树突状细胞的%）	PBMC	C4D1	0.04341	减少
	141-树突状细胞（相对于常规树突状细胞的%）	PBMC	C4D1	0.04243	增加
	CD1C+ CD141+树突状细胞（相对于 141+树突状细胞的%）	PBMC	C1D15	0.00056	增加
	CD1C- CD141+树突状细胞（相对于 141+树突状细胞的%）	PBMC	C1D15	0.00117	减少
	常规树突状细胞（相对于 HLA-DR+细胞的%）	PBMC	C2D1	0.04258	减少
	LAMP3	血清	C1D15、C3D1	0.00049、0.00011	增加
	CXCL11	血清	C1D15、C3D1	0.00007、0.00042	增加

[0376] 用nivo/chemo治疗的患者的与T细胞激活和I型免疫相关的细胞因子出现早期（C1D15）增加，最明显的是可溶性PD-1、I型偏斜趋化因子（CXCL9、CXCL10）、II型干扰素和IL-18（图14C、表20）。相比之下，用sotiga/chemo治疗的患者表现出与树突状细胞成熟和激活相关的蛋白质，如LAMP3和CXCL11的早期增加（C1D15）（图14C、表21），随后是与T细胞激活相关的蛋白质，如II型干扰素和IL-15的晚期（C1D15、C3D1）上调（图14C、图15C、图15CD、图15E、图15F和表21）。在sotiga/chemo治疗中唯一地观察到IL-15在C3D1时增加（表21）。还观察到在sotiga/nivo/chemo的情况下循环蛋白中的所有治疗相关的变化在单独nivo/chemo组或sotiga/chemo组中有所变化，尽管动力学不同。例如，用sotiga/nivo/chemo治疗的患者在C1D15时LAMP3、CXCL11、CXCL10和可溶性PD-1出现早期（C1D15）增加，而在II型干扰素和CXCL9中出现晚期（C2D1）增加（图14C、图15C、图15CD、图15E、图15F和表22）。

[0377] 表22:

[0378]

分类	特征	样品	重要治疗中时间点	P 值	相对于治疗前的方向性变化
T 细胞的激活和增殖	IL-18	血清	C1D15、C2D1、C3D1	1.49E-10、8.41E-07、1.53E-05	增加
	IL-15	血清	C3D1	1.01E-05	增加

[0379]

分类	特征	样品	重要治疗 中时间点	P 值	相对于治 疗前的方 向性变化
	IFN- γ	血清	C2D1、 C3D1	0.00153、 0.00083	增加
	CD28	血清	C3D1	2.82E-06	增加
	Ki-67+T 细胞（相对于 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15	0.00180	增加
	Ki-67+非原初 CD4 T 细胞（相对于非原初 CD4 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15	0.03024	增加
	CD38+非原初 CD8 T 细胞（相对于非原初 CD8 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15	0.00274	增加
	CD38+T 细胞（相对于 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15	0.00532	增加
PDAC 预 后因子	IL-8	血清	C3D1	0.04527	减少
	角蛋白-19-K1C19	血清	C2D1、 C3D1	7.95E-05、 0.00657	减少
	粘蛋白-16-MUC16	血清	C3D1	0.00703	减少
共刺激 /Th2 极化	OX40L	血清	C1D15、 C3D1	1.40E-08、 6.71E-10	增加
模式识别 受体	CLEC-4A	血清	C1D15、 C3D1	1.78E-07	减少
	CLEC-4C	血清	C3D1	5.82E-07	增加
	CLEC-7A	血清	C3D1	9.02E-06	增加
免疫抑制	PD-1	血清	C1D15、 C2D1、 C3D1	4.24E-07、 7.63E-11、 6.73E-10	增加
	IL-10	血清	C2D1、 C3D1	0.00064、 5.59E-05	增加
	HLA-DRloKi-67+ mMDSC（相对于经典单核细胞的 %）	PBMC	C4D1	0.02523	减少
	CTLA-4 非原初 CD8 T 细胞（相对于非原初 CD8 T 细胞的 %）	PBMC	C4D1	0.04805	增加
	CD38+ Treg（相对于 Treg 的 %）	PBMC	C4D1	0.02451	增加
	CTLA-4+T 细胞（相对于 T 细胞的 %）	PBMC	C4D1	0.01566	增加
	PD-1+非原初 CD8 T 细胞（相对于非原初 CD8 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15、 C2D1	0.00144、 0.00858	减少
	PD-1+非原初 CD4 T 细胞（相对于非原初 CD4 T 细胞的 %）	PBMC	C1D15、 C2D1	0.00114、 0.03641	减少
	CD38+ Treg（相对于 Treg 的 %）	PBMC	C1D15	8.45E-05	增加
	Ki-67+ Treg（相对于 Treg 的 %）	PBMC	C1D15	0.000323	增加
	PD-1 Treg（相对于 Treg 的 %）	PBMC	C1D15	4.58E-07	减少
1 型免疫	IL-12A	血清	C1D15	0.00019	减少

[0380]

分类	特征	样品	重要治疗中时间点	P 值	相对于治疗前的方向性变化
	CXCL10	血清	C1D15、C2D1、C3D1	0.00113、0.00250、4.20E-05	增加
	CXCL9	血清	C2D1、C3D1	0.00396、0.00021	增加
趋化因子	CCL19	血清	C3D1	7.57E-06	增加
炎症	TNF- α	血清	C3D1	4.40E-05	增加
B 细胞生物学	B 细胞(相对于 CD45+细胞的%)	PBMC	C1D15	8.77E-07	减少
	CD40+ B 细胞(相对于 B 细胞的%)	PBMC	C1D15	0.01670	减少
	B 细胞(相对于 CD45+细胞的%)	PBMC	C1D15、C4D1	8.77E-07、0.02523	减少
树突状细胞生物学	浆细胞样树突状细胞 (相对于 HLA-DR+的%)	PBMC	C1D15	0.00138	减少
	CD33+浆细胞样树突状细胞 (浆细胞样树突状细胞的%)	PBMC	C1D15、C4D1	0.01875、0.04805	增加
	141+树突状细胞 (相对于常规树突状细胞的%)	PBMC	C1D15	0.01240	减少
	141-树突状细胞 (相对于常规树突状细胞的%)	PBMC	C1D15	0.01308	增加
	CD1C+ CD141+树突状细胞 (相对于 141+树突状细胞的%)	PBMC	C1D15	0.03694	增加
	CD33+常规树突状细胞 (相对于常规树突状细胞的%)	PBMC	C2D1	0.04288	增加
	CXCL11	血清	C1D15、C2D1、C3D1	7.66E-07、3.99E-05、1.25E-06	增加
	LAMP3	血清	C1D15、C2D1、C3D1	2.47E-06、0.00017、4.23E-07	增加

[0381] 然后使用无偏差质谱法结合稀疏PLS判别分析对患者血清进行谱分析,以鉴定在靶向方法中未鉴定出的关键循环蛋白(图14C)。相较于治疗前水平,用nivo/chemo治疗的患者的与免疫细胞迁移和T细胞激活相关的蛋白质(GKN1、B3GN2和PGRP1)增加,并且趋化因子CXCL7减少(表23)。

[0382] 表23:

[0383]

相关生物学	特征	样品	贡献 时间点	中值显著 性评分	相对于治疗 前的方向性 变化
报告为TGFB的拮抗剂	α 2-HS 糖蛋白-AHSG	血清	C3D1	-0.05704	增加
报告为通过减少嗜中性粒细胞的IL-8产生来下调嗜中性粒细胞功能	载脂蛋白 A2- APOA2	血清	C1D15	0.18047	减少
在T细胞激活中上调, 拟议在PD1糖基化中起作用 - 已被证明与对抗PD1疗法的应答反向相关	β -1,3-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶-B3GNT2	血清	C3D1	-0.19020	增加
已报告为在PDAC微环境中高表达并且与疾病进展相关	蜂窝通信网络因子2 - CCN2	血清	C1D15	0.17631	增加
与胰腺癌的不良预后相关	补体因子B- CFB	血清	C1D15	0.17716	增加
介导对抗原特异性免疫应答来说重要的粘附相互作用	胞间粘附分子2 - ICAM2	血清	C3D1	-0.22818	增加
报告为CCR1的激动剂并且驱动单核细胞迁移	血小板因子4/ CXCL4 - PF4	血清	C1D15	0.02907	增加
显示出抗血管生成功能, 并且受趋化因子(C-X-C基序)受体3调节	血小板因子4变体1/CXCL4V1-PF4V1	血清	C2D1	-0.10450	减少
强效的化学引诱剂和嗜中性粒细胞的激活子	前血小板碱性蛋白/CXCL7 - PPBP	血清	C2D1	-0.27994	增加
可以通过Toll样受体4激活巨噬细胞	纤溶酶原激活剂抑制1 - SERPINE1	血清	C2D1	-0.07995	增加
先天免疫	肽聚糖识别蛋白1 - PGLRP1	血清	C1D15	0.13385	增加

[0384] 用sotiga/chemo治疗的患者的可溶性蛋白增加,这对辅助T细胞/B细胞(CCL15)和单核细胞(GSHB)的激活至关重要(表24)。

[0385] 表24:

	相关生物学	特征	样品	贡献 时间点	中值显著 性评分	相对于治疗 前的方向性 变化
[0386]	辅助调节髓系细胞的 激活	淀粉样蛋白 β 前体蛋白 - APP	血清	C3D1	0.05242	增加
	吸引 T 细胞和单核细 胞的趋化因子	CCL15	血清	C3D1	-0.05505	增加
	对产生谷胱甘肽至关 重要 - T 细胞功能 - 辅助产生促炎单核 细胞	谷胱甘肽 合成酶- GHSB	血清	C1D15	-0.18952	增加
	下调 NF- κ -B 的 TLR9 介导的激活, 以及 TNF、干扰素 α 和干扰 素 β 的产生	蛋白质酪氨酸磷酸酶 受体 S 型 PTPRS	血清	C3D1	0.00444	增加
	通过铁摄取正向调节 T 细胞和 B 细胞增殖	转铁蛋白 受体 - TFRC	血清	C3D1	0.00371	增加
	参与先天免疫	富半胱氨酸的分泌蛋 白 3 - CRISP3	血清	C3D1	0.65216	增加
	报告为具有免疫调节 和免疫刺激作用 - 与 TIGIT 结合 - 与 T 细胞、NK 细 胞和单核细胞上的 CD266 结合, 从而辅助 激活	脊髓灰质炎病毒 受体 - PVR	血清	C1D15	-0.09675	增加
	可以辅助对 Th2 极化 的诱导	MMP-2	血清	C3D1	0.03838	增加

[0387] 对治疗中 (C2D1) 测量的生物标志物进行综合分析。在nivo/chemo治疗组中, 与1型免疫相关的趋化因子和细胞因子 (CXCL9、CXCL10、CXCL11和IFN- γ) 的血清水平升高与经激活的T细胞 (HLA-DR+、CD38+) 正相关 (图15G和图15H)。在sotiga/chemo治疗组, 报告为与先天免疫细胞和适应性免疫细胞的迁移相关的分子在治疗中增加 (GKN1和CCL15), 并且与和DC成熟相关的蛋白质, 如LAMP3和CXCL11或经激活的非原初T细胞 (CD38+或CD39+) 和CCR7+B细胞正相关。(图15G和图15H)。

[0388] 为了评估在肿瘤中的药效学效应, 利用mIF对治疗前和治疗中 (-C2D1, 参见方法) 肿瘤组织进行谱分析。对来自个体患者的配对活检进行的分析显示, nivo/chemo治疗导致所测量的所有样品中表达PD-L1的肿瘤细胞的百分比在数值上下降 ($n=5$)。PD-L1阳性肿瘤细胞的百分比的变化是异质的, 在一种样品中降低, 并且在2种其它样品中增加。sotiga/nivo/chemo的组合导致所分析的6种患者样品中的5种患者样品中的PD-L1阳性肿瘤细胞减少 (图14D)。对于sotiga/chemo治疗, 进行配对活检的3名患者中的2名患者表现出肿瘤浸润iNOS+CD80+CD68+巨噬细胞增加, 这是来自用nivo/chemo或sotiga/nivo/chemo治疗的患者的配对活检中未观察到的效应 (图14E)。

[0389] 实施例12: 与生存期益处相关的生物标志物

[0390] 为了鉴定更可能从特定组合治疗中表现出更长生存期的患者的子集, 使用综合多

组学、多参数免疫和肿瘤生物标志物数据进行了探索性分析。在小型II期研究的上下文中，集中于在多种测定中观察到的生物信号的方法有助于鉴定具有最大稳健性的潜在生物学的信号。这种深度的综合分析方法提供了肿瘤和免疫构造的全面视图，并且鉴定了每个组中的许多与生存期益处相关的生物标志物。

[0391] 实施例13:与nivo/chemo后的生存期益处相关的生物标志物和免疫生物学

[0392] 为了检查治疗前患者的肿瘤微环境 (TME) ,分析了总RNA测序和mIF。氧化磷酸化、脂肪酸代谢、异生物质代谢和胆汁酸代谢基因表达特征与较长生存期相关,而TGF-β信号传导特征与较短生存期相关(图16A)。hallmark基因表达特征的较低表达、IL-6、通过NFκB进行的TNF-α信号传导以及通过mIF得到的iNOS+巨噬细胞的较低频率与用nivo/chemo治疗的患者中的较长生存期相关(图16B、图16C、图16D)。如通过mIF测量的治疗前PD-L1+肿瘤细胞的较高频率与一年以上生存期弱相关(图17) ,但与通过卡普兰-梅尔分析得到的较长总生存期不显著相关。另外,循环中的免疫抑制因子与较短生存期相关(表25)。一氧化氮合酶3和精氨酸酶-1的较低水平与用nivo/chemo治疗的患者中的较长生存期相关(表25)。

[0393] 表25

[0394]	相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
	增殖性和/或经激活的 T 细胞	sCD27	血清	Olink 平台	0.018	较短生存期
		CD38+非原初 CD8 非原初 T 细胞 (非原初 CD8 T 细胞%)	PBMC	X50	0.050	较长生存期
		Ki-67+T 细胞(相对于 CD3 的%)	PBMC	CyTOF	0.021	较长生存期
		sPD-1	血清	Olink 平台	0.045	较长生存期

[0395]

相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
抗原 经历的 T 细胞	PD-1+CD39+效应记忆 1 CD4 T 细胞（相对于效应记忆 1 CD4 T 细胞的%）	PBMC	X50	0.004	较长生存期
	PD-1+CD39+中央记忆 CD4 T 细胞（相对于中央记忆 CD4 T 细胞的%）	PBMC	X50	0.040	较长生存期
免疫抑制 TME, 血管生成	TGF- β 信号传导	肿瘤组织	RNA-seq	0	较短生存期
	IL-6 JAK/STAT3 信号传导	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较短生存期
	一氧化氮合酶 3 - NOS3	血清	Olink 平台	0.011	较短生存期
	碳酸酐酶 - CA9	血清	Olink 平台	0.016	较短生存期
	精氨酸酶 1 - ARG1	血清	Olink 平台	0.018	较短生存期
	血管内皮生长因子-VEGF	血清	Olink 平台	0.030	较短生存期
	IL-6	血清	Olink 平台	0.035	较短生存期
炎症应答	VEGF 信号传导	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较短生存期
	TNF- α 信号传导	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较短生存期
巨噬细胞 炎症 应答	CCL23	血清	Olink 平台	0.040	较短生存期
	iNOS+巨噬细胞（相对于总细胞的%）	肿瘤组织	IHC	0.040	较短生存期
可以辅助天然 免疫激活	CASP8	血清	Olink 平台	0.044	较短生存期
肿瘤代谢、氧化 TME	脂肪酸代谢特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期
	氧化磷酸化特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期
	外源代谢特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期
	过氧化物酶体特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期
	胆汁酸代谢特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期
1 型免疫应答	Tbet+T 细胞（相对于 CD3+细胞的%）	PBMC	CyTOF	0.035	较长生存期
	Tbet+ TCR $\gamma\delta$ T 细胞（相对于 TCR $\gamma\delta$ T 细胞的%）	PBMC	CyTOF	0.008	较长生存期
细胞毒性 T 细胞	NKT T 细胞（相对于白细胞的%）	PBMC	CyTOF	0.005	较长生存期
	CD8 EMRA T 细胞（相对于白细胞的%）	PBMC	X50	0.005	较长生存期

	相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
[0396]	CD4 辅助应答	T 滤泡辅助细胞 (相对于非原初 CD4 T 细胞的%)	PBMC	X50	9.74E-06	较长生存期
	DC 成熟	sCD83	血清	Olink 平台	0.049	较长生存期
	辅助白细胞迁移	造血细胞特异性 Lyn 底物 1 - HCLS1	血清	Olink 平台	0.01	较短生存期

[0397] 与较短生存期相关的生物标志物

[0398] 与较长生存期相关的生物标志物

[0399] nivo/chemo后的生存期益处与治疗前的多种有免疫能力的循环T细胞应答相关。CD4和CD8 T细胞被分类为效应记忆 (EM) (图10) 或中央记忆 (CM) (图10)。效应记忆T细胞基于CCR7表达被进一步细分:EM1、EM2和EM3 (图10)。经激活 (CD38+) EM CD8T细胞 (图16E)、抗原经历的 (PD-1+CD39+) EM1 (图18A) 和CM CD4 T细胞 (图19A) 以及T滤泡辅助细胞 (CD4+PD-1+CXCR5+) (图18D) 的较高频率均与用nivo/chemo治疗的患者的较长生存期相关。经激活的 (CD38+) EM CD8 T细胞也共表达PD-1和1型转录因子Tbet (图16F)。虽然经激活的 (CD38+) EM CD8 T细胞随着时间的推移而增加,但仅治疗前水平与1年生存状态相关 (图16G)。抗原经历的 (PD-1+CD39+) EM1和CM CD4 T细胞共表达CTLA-4和ICOS (图18B和图19B)。在治疗中,这种细胞表型继续与更好的生存期相关 (图18C和图19C)。具有TCF-1和ICOS的高表达的T滤泡辅助细胞的高治疗中丰度与1年生存期相关 (图18E和图18F)。对循环因子和肿瘤因子两者的多组学维度降低分析概括了这些发现,并且揭示了数据的独立方差的主要轴,从而显示出生存期>1年和<1年的患者之间的分离 (图16H)。总体而言,相较于具有较短生存期的患者,nivo/chemo治疗后具有较长生存期的患者的免疫抑制分子的治疗前水平较低,并且经激活的1型T细胞的治疗前频率较高 (图16H)。

[0400] 实施例14:与sotiga/chemo后的生存期益处相关的生物标志物和免疫生物学

[0401] 与sotiga/chemo相对于nivo/chemo治疗后的生存期益处相关的不同TME生物标志物。在多种CD4辅助T细胞浸润物以及较低水平的基因表达特征和与免疫抑制相关的免疫细胞类型的情况下,sotiga/chemo治疗后具有较长生存期的患者具有治疗前肿瘤谱。与较长生存期相关的CD4 T细胞基因表达特征包括Th1和Th2应答以及IFN- γ 信号传导 (图20A-20C、表26)。

[0402] 表26:

	特征	基因列表
[0403]	Th1	CXCR3、IFNG、IFNG-AS1、IL12RB1、IL18R1、IL18RAP、STAT1、STAT4、TBX21
	Th2	GATA3、IL4、IRF4、MAF、STAT5、STAT6
	Th17	AHR、BATF、CCR6、IL17A、IL17F、IL21、IL6R、RORC、RUNX1、STAT3
	TLS-fDC	CD2、CR1、FCER2、HLA-DRA
	TLS-记忆 B 细胞	CD27、CD69、CD86、CR2、CXCR3、IGHD、MS4A1
	B 细胞	BTLA、FCRL5、IDO1、IFNG、IGLL5、JCHAIN、MZB1
	IFN- γ 应答	CD8A、CD274、LAG3、STAT1

[0404] sotiga/chemo治疗后具有较长生存期的患者具有的通过mIF得到的肿瘤浸润非增殖性 (Ki-67-) 常规和调节 (Foxp3+) CD4 T细胞的频率较高 (图20E和图20F、表26) 并且浸润

增殖性 (Ki-67+)CD4⁺ T细胞的频率较低 (图20F、表26)。其肿瘤具有较高E2F信号传导特征的患者也具有较短的生存期 (图20D、表26)。通过利用DIABLO进行的跨平台分析 (参见方法), E2F信号传导特征与糖酵解和缺氧基因表达特征以及浸润iNOS-巨噬细胞正相关,这写也与 sotiga/chemo治疗后的较短生存期相关 (图20F和图20G)。

[0405] 临床前数据表明,CD40激动性导致抗原呈递细胞 (APC) 激活,并且由此假设在 sotiga/chemo后经历了生存期益处的患者将在此循环中有证据表明这一点。因此,使用 CyTOF和流式细胞术对治疗前和治疗中PBMC进行免疫谱分析 (参见方法)。利用无监督聚类分析 (图22A,参见方法),鉴定了多个与用sotiga/chemo治疗前和后的生存期相关的循环树突状细胞 (DC) 子集 (图22A、表27)。

[0406] 表27:

[0407]

相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
“晚期经激活的/耗竭的” T 调节细胞	TCF-7+ Treg (相对于 Treg 的%)	PBMC	X50	0.023	较长生存期
经激活的可能 GC 相关的 B 细胞	HLA-DR+ CCR7+ B 细胞 (相对于白细胞的%)	PBMC	CyTOF	0.037	较长生存期
血管生成	血管生成素-1 - TIE2	血清	Olink 平台	0.0003	较短生存期
抗肿瘤免疫应答	IFN-γ 应答	肿瘤组织	RNA-seq	0.01	较长生存期

[0408]

相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
抗原经历的 T 细胞	PD-1+Tbet+ CD4 非原初 T 细胞（相对于 CD4 非原初 T 细胞的%）	PBMC	X50	0.004	较长生存期
CD4 辅助 U 应答	KI-67-Foxp3- CD4 T 细胞（相对于 CD4 T 细胞的%）	肿瘤组织	IHC	0.005	较长生存期
	CD4 EMRA T 细胞（相对于白细胞的%）	PBMC	X50	0.049	较长生存期
	Th1 应答	肿瘤组织	RNA-seq	0.02	较长生存期
	Th2 应答	肿瘤组织	RNA-seq	0.02	较长生存期
	CXCR5+PD-1+ CD4 非原初 T 细胞（相对于非原初 CD4 T 细胞的%）	PBMC	X50	0.0001	较长生存期
检查点分子	2B4+非原初 CD4 T 细胞（相对于非原初 CD4 T 细胞的%）	PBMC	X50	0.019	较短生存期
	CTLA-4+ Treg（相对于 Treg 的%）	PBMC	X50	0.023	较长生存期
	PD-1+T 细胞（相对于白细胞的%）	PBMC	CyTOF	0.001	较长生存期
对静息 T 细胞的趋化性	CCL23	血清	Olink 平台	0.0007	较短生存期
共刺激	ICOS+ Treg（相对于 Treg 的%）	PBMC	X50	0.001	较长生存期
	41BB+原初 CD8 T 细胞（原初 CD8 T 细胞%）	PBMC	X50	0.038	较长生存期
树突状细胞生物学抗原加工与呈递	CD1c+ CD141+DC（相对于白细胞的%）	PBMC	CyTOF	0.042	较长生存期
	CD205	血清	Olink 平台	0.018	较长生存期
	LAMP3	血清	Olink 平台	0.043	较长生存期
	CLEC6A	血清	Olink 平台	0.046	较长生存期
免疫抑制	IL-10	血清	Olink 平台	0.021	较短生存期
	HGF	血清	Olink 平台	0.0012	较短生存期
	MMP-7	血清	Olink 平台	0.0032	较短生存期
	Gal-9	血清	Olink 平台	0.0109	较短生存期
	MMP-12	血清	Olink 平台	0.029	较短生存期
	Ki-67- Treg（相对于 Treg 的%）	肿瘤组织	IHC	0.025	较长生存期
	E2F 靶标	肿瘤组织	RNA-seq	0.02	较短生存期
	TGF- β 信号传导	肿瘤组织	RNA-seq	0.03	较短生存期
	Myc 靶标_V1	肿瘤组织	RNA-seq	0.021	较短生存期
	缺氧特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.09	较短生存期

[0409]

相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
	CD14+HLA-DRlo (相对于白细胞的%)	PBMC	CyTOF	0.050	较短生存期
	IL-8	血清	Olink 平台	0.0086	较短生存期
诱导 T 细胞激活	CCL19	血清	Olink 平台	0.011	较短生存期
先天免疫	PD-L1- 巨噬细胞	肿瘤组织	IHC	0.004	较长生存期
	CD80- 巨噬细胞	肿瘤组织	IHC	0.034	较长生存期
促炎	CD40+ pDC (pDC %)	PBMC	CyTOF	0.041	较长生存期
	HLA-DR+ pDC (相对于 pDC 的%)	PBMC	CyTOF	0.002	较长生存期
	IL-6	血清	Olink 平台	0.0067	较短生存期
1 型免疫	Tbet+ TCR $\gamma\delta$ T 细胞 (TCR $\gamma\delta$ T 细胞%)	PBMC	CyTOF	0.002	较长生存期
	Tbet+Eomes+非原初 CD4+T 细胞 (相对于非原初 CD4 T 细胞的%)	PBMC	X50	0.013	较长生存期
2 型免疫	IL-4	血清	Olink 平台	0.046	较长生存期
肿瘤代谢、糖酵解 TME	糖酵解特征	肿瘤组织	RNA-seq	0.04	较短生存期
需要进一步研究	CXCR5+PD-1+非原初 CD8 T 细胞 (相对于非原初 CD8 T 细胞的%)	PBMC	X50	0.010	较长生存期

[0410] 与较短生存期相关的生物标志物

[0411] 与较长生存期相关的生物标志物

[0412] 具有较长总生存期的患者在治疗前具有的CD1c+CD141+DC的频率较高(图22B、表27)。在治疗中,CD141+DC的较高频率以及降低的CD1c共表达与较长的生存期相关(C1D15,图22C和图22D)。治疗中(C2D1)常规DC(cDC;图9和表19)的较高频率也与较长生存期相关(图22E、图5e、表27)。与DC的成熟一致,治疗中的可溶性CD83和可溶性ICOSL的较高浓度也与用sotiga/chemo治疗的患者的较长生存期相关(图23)。sotiga/chemo后具有较长生存期的患者在治疗前具有的循环HLA-DR+CCR7+B细胞的频率也较高(图24A、图24B、表27)。总体而言,与nivo/chemo治疗后具有较长生存期的患者相比,sotiga/chemo治疗后具有较长生存期的患者在治疗前具有的循环DC的频率和循环中的B细胞频率较高,其中在APC区室中发生表型变化。

[0413] 除了经激活的APC区室外,还发现关键CD4 T细胞群体的治疗前频率与sotiga/chemo治疗后的生存期获益相关。循环1型辅助(Tbet+Eomes+)和抗原经历的(PD1+Tbet+)非原初CD4 T细胞的较高治疗前频率与用sotiga/chemo治疗的患者的较长生存期相关(图22F和图22G、表27)。PD-1+Tbet+非原初CD4 T细胞表达高水平的TCF-1,而Tbet+Eomes+非原初CD4 T细胞表达高水平PD-1(图22G和图22J)。治疗前两种非原初CD4 T细胞群体的较高频率与生存期益处相关,并且这种表型的频率在治疗中保持相对一致(图22H和图22K)。治疗前表达2B4的循环非原初CD4 T细胞的较低频率也与较长生存期相关(图24C、表26)。CD8 T细胞上的2B4表达与耗竭的表型相关,并且这些细胞共表达与耗竭的或抗炎表型PD-1、CTLA-4、LAG-3相关的群体分子,并且不表达Ki-67(图24D)。另外,这种表型的频率在治疗中(C4D1)增加(图24E)。总体而言,治疗前循环中的1型(Tbet+)CD4 T细胞,其与sotiga/chemo

后的生存期益处相关,而潜在地功能失调的2B4+CD4 T细胞的更高水平与较短生存期相关。
 [0414] 因此,与sotiga/chemo和nivo/chemo治疗后的生存期益处相关的组织和血液两者中的治疗前生物标志物谱是不同的(图25)。由于所有患者都接受了相同的化学疗法骨干,因此这些预测性标志物表明不仅与预后或化学疗法治疗相关。这一结论通过每个生物标志物子集与CD40和PD-1轴的强机制关系所加强。

[0415] 实施例15:与sotiga/nivo/chemo后的生存期益处相关的生物标志物和免疫生物学

[0416] 在此研究中,sotiga/nivo/chemo治疗没有产生优于来自单独的chemo的历史对照的生存期益处(图21A)。在多组学生物标志物分析中,发现单独地与sotiga/chemo和nivo/chemo后的较长生存期相关的生物标志物不能预测sotiga/nivo/chemo治疗(表28)。

[0417] 表28

	相关生物学	生物标志物特征	样品类型	测定	P 值	较高值的存活相关
[0418]	“晚期经激活的/耗竭的” T 细胞	TCF-7+效应非原初 CD4 T 细胞（相对于效应非原初 CD4 的%）	PBMC	X50	0.048	较长生存期
		CD38+PD-1+CD8 Non-原初 T 细胞（相对于非原初 CD8 的%）	PBMC	X50	0.027	较短生存期
	经激活的 T 细胞	IL-2	血清	Olink 平台	0.009	较短生存期
		CD38+ CD4 非原初 T 细胞（相对于非原初 CD4 的%）	PBMC	X50	0.010	较短生存期
[0419]		CD38+ CD8 非原初 T 细胞（相对于非原初 CD8 的%）	PBMC	X50	0.016	较短生存期
		HLA-DR+ T 细胞（相对于白细胞的%）	PBMC	X50	0.013	较长生存期
	经激活的 1 型免疫应答	Th1 应答	肿瘤组织	RNA-seq	0.05	较长生存期
	共刺激	s41BB	血清	Olink 平台	0.0008	较短生存期
	免疫抑制	IL-6	血清	Olink 平台	0.0000689	较短生存期
		CCL7	血清	Olink 平台	0.0004	较短生存期
		HGF	血清	Olink 平台	0.001	较短生存期
		精氨酸酶 1	血清	Olink 平台	0.018	较短生存期
		Gal-9	血清	Olink 平台	0.0004	较短生存期
	Th2 辅助应答	IL-13	血清	Olink 平台	0.004	较短生存期
		IL-4	血清	Olink 平台	0.011	较短生存期
	增殖性经激活的 T 调节细胞	Ki-67+ Treg_ 相对于白细胞的%	PBMC	X50	0.013	较短生存期

[0420] 与较短生存期相关的生物标志物

[0421] 与较长生存期相关的生物标志物

[0422] 然而,鉴定了几种在sotiga/nivo/chemo治疗后的较长生存期,包括经激活的CD38+非原初CD4(图26A、表28)和CD8(图26B、表28) T细胞的较低频率相关的独特细胞群体。CD38

+非原初CD4⁺ T细胞群体也表达高水平的TCF-1和激活标志物,包括CTLA-4、PD-1、ICOS,而CD38⁺非原初CD8⁺ T细胞群体表达高水平的PD-1、Tbet、Eomes、TCF-1和2B4 (图26C)。这种细胞表型的频率在治疗中增加,但没有继续与较短生存期相关(图26D-26E)。在nivo/chemo治疗组中,相似经激活的T细胞群体的较高频率与较长生存期相关,但在sotiga/chemo治疗组中没有观察到这种相关(图16F、图16G、图26A、图26B、表25)。除了CD38⁺ T细胞群体外,治疗中(C1D15)的CCR7⁺CD11b⁺CD27⁻ B细胞的较低频率与sotiga/nivo/chemo治疗后的较长生存期相关(图27B)。重要的是,这种表型的频率在治疗中在sotiga/nivo/chemo组中提高,而在其它组中降低(图27A)。这些细胞共表达CD40、HLA-DR、CD11c和CD38,并且与治疗中(C1D15)的较差生存期相关(图27C和图27D)。总之,这些数据表明,治疗前和治疗中的经慢性激活的T细胞的较高频率以及治疗中的CCR7⁺CD11b⁺CD27⁻ B细胞的存在可能与用sotiga/nivo/chemo治疗后的较短生存期相关。

[0423] 讨论

[0424] 在这项被称为PRINCE的多中心随机化的II期临床研究中,在患有mPDAC的患者中,在一线治疗环境中评估了sotiga±nivo±chemo的功效和机制。此研究的Ib期部分表明,sotiga/chemo±nivo是可耐受的,具有临床活性,并且是针对此疾病的潜在新型化学免疫疗法组合¹³。随机化设计相对地平衡了3个治疗组之间的人口统计学与基线疾病特性。虽然没有能力在组间进行比较,但同时纳入3个治疗组允许评估sotiga和nivo与chemo组合的相对贡献。

[0425] nivo/chemo组达到了1年OS率相对于吉西他滨/纳布-紫杉醇chemo方案的历史对照的35%增加(57.3%, $p=0.007$)的主要终点。Sotiga/chemo组接近显著性(48.1%, $p=0.062$),但sotiga/nivo/chemo组没有显示出总生存期改善(41.3%, $p=0.223$)。ORR对于nivo/chemo是最高的(50%);然而,在这一组中观察到的许多应答的持续时间短,并且通过随后的扫描中没有得到确认。

[0426] 所有组合治疗耐受性良好,并且安全性谱与在先前研究中观察到的安全性谱相似^{12,13}。具体地,在sotiga/nivo/chemo组中未观察到相加毒性。本研究遵循标准chemo治疗指南,从而允许在进展之前进行持续治疗。一些毒性积累可能归因于这种长期暴露于chemo;因此,未来的研究应考虑基于应答的chemo暂缓期。

[0427] 本研究的一个局限性是缺乏chemo对照组,这妨碍了评估针对同期对照患者的生存期益处。其次,本研究纳入了少数三级护理癌症中心中的患者。尽管针对吉西他滨/纳布-紫杉醇的最初确定性研究衡量了总生存期,但随后的III期研究报告了大约40-45%的更高1年总存活率^{15,16}。然而,这些比率在数字上低于nivo/chemo和sotiga/chemo所观察到的1年总存活率。

[0428] 进行了多组学多参数生物标志物分析,以更好地了解免疫药效学效应以及利用化学免疫疗法组合的应答和抗性机制。总的来说,循环细胞、蛋白质和肿瘤组织生物标志物的发现,其与PD-1阻断和/或CD40激活的预期作用机制一致。尽管在所有群组中观察到一些可能与本研究使用的相同化学治疗方案相关的明显药效学模式,但许多模式是特定于具体群组的,因此不是化学疗法特异性的。观察到,在所有三个治疗组中在治疗中增殖性非原初CD4⁺和CD8⁺ T细胞增加,这与先前发布的关于nivo和sotiga在其它疾病中的作用机制的报告一致^{17,18}。正如预期的那样,在两个含有nivo的组中,增殖性T细胞的增加具有更大幅度¹⁸。

然而,在T细胞群体以及循环蛋白和肿瘤组织样品中,单独鉴定出nivo/chemo和sotiga/chemo的独特免疫药效学效应。这些数据表明,在此评估的免疫疗法在患者的子集中具有优于且高于化学治疗剂影响的明显活性。许多这些药效学效应在sotiga/nivo/chemo组中都有所减弱,这潜在地表明,在所有双重免疫疗法/chemo组合使用时具有降低的或拮抗性效应。

[0429] 除了药效学效应外,检查了与生存期相关的生物标志物。本研究中的多组学多参数探索性转化分析揭示了,nivo/chemo和sotiga/chemo两者在可以通过各种肿瘤和循环预测生物标志物来鉴定的患者的子集中表现出益处。进一步地,这些分析揭示了,针对sotiga/chemo鉴定的肿瘤和循环应答特征与针对nivo/chemo鉴定的肿瘤和循环应答特征不同,这反映了对每种免疫干预的不同反应机制。值得注意的是,这项回顾性分析旨在对未来的研究是假设生成性的,并且需要前瞻性研究来证明这些生物标志物确实可预测这些方案后的生存期。

[0430] 从治疗前肿瘤样品中鉴定出与nivo/chemo治疗后的生存期改善相关的因素,包括免疫抑制和炎性特征的较低表达,以及炎性巨噬细胞的较低频率。与抑制性适应性免疫功能相关的循环细胞因子较低频率与较长的总生存期相关。nivo/chemo后的生存期还与不同的循环T细胞区室相关,包括抗原经历的和经激活的1型偏斜的(Tbet+)CD4和CD8 T细胞,以及更高频率的可能代表调节TME的细胞的循环TFH细胞^{19,20}。这些生物标志物中的许多生物标志物都可以潜在地用作用于未来研究的治疗前患者选择标准,但是将这些生物标志物转化为用于患者选择的测定是可行的,特别是因为其从活检到生物标志物分析以允许临床决策的时间框架相关。例如,循环经激活的抗原经历的(PD-1+CD39+)T细胞群体可以成为一种有吸引力的生物标志物,因为这些群体在血液中是丰富的,并且容易地且快速地测量。

[0431] 在sotiga/chemo组中,生存期益处与肿瘤微环境中的广泛辅助T细胞浸润相关。鉴定出肿瘤中的非增殖性常规和调节性CD4+T细胞的较高频率与较长生存期之间的关联。另外,与先前的报告²¹一致,治疗前糖酵解性或缺氧性TME的基因特征与较短生存期相关。这种代谢表型与E2F和MYC信号传导的高肿瘤表达正相关。已报告了,在临床前模型中,TME内的E2F和myc信号传导的增加阻碍CD4+T细胞浸润和对激动性CD40抗体的应答²²。在循环中,治疗前抗原经历的1型偏斜的CD4+T细胞的较高频率与sotiga/chemo的生存期相关。另外,治疗前HLA-DR+CCR7+B细胞的较高循环频率(这可以表明生发中心的存在²³)与sotiga/chemo治疗的更长存活期相关。与激动性CD40作用机制相吻合地,多个DC子集也与sotiga/chemo治疗的较长生存期紧密相关。治疗前,CD1c+CD141+交叉呈递树突状细胞的循环水平与较长生存期相关。然而,治疗中CD1c+DC与生存期不相关。相反,CD1c-CD141+交叉呈递DC的较高频率与生存期相关。已报告了,CD1c表达的丧失与较强的交叉呈递相关,并且先前的研究表明,激动性CD40治疗诱导交叉呈递DC,并且可能促进表位扩散^{24,26}。另外,几种免疫抑制特征,其与sotiga/chemo治疗的较差结果相关。这些包括更高频率的m-MDSC、“耗竭样”CD4 T细胞以及与和较短生存期相关的抑制功能相关的趋化因子/细胞因子,从而表明这些免疫特征可能会破坏对sotiga/chemo的成功应答。从实际角度来看,CD4 T细胞的基线评估可以为后续研究中针对sotiga/chemo的患者选择提供最易控制的生物标志物。

[0432] 对于sotiga/nivo/chemo,相对较少的肿瘤和循环免疫生物标志物与生存期相关,并且具体地sotiga/chemo和nivo/chemo单疗法免疫疗法治疗组中与较长生存期相关的生

物标志物在sotiga/nivo/chemo后不相关。假设了此组导致免疫系统的全身过度激活,从而导致功能性免疫状态低下,并且由此降低了抗肿瘤免疫力。事实上,CD38+CD4和CD8 T细胞的特定群体与响应于sotiga/nivo/chemo组合治疗的较短生存期相关。这些细胞的免疫表型表明,过度T细胞激活导致这种化学免疫疗法组合所特有的最终耗竭状态²⁷。另外,在治疗中(C4D1),sotiga/nivo/chemo治疗的双重免疫疗法组合在循环CCR7+CD11b+CD27-B细胞方面有所增加,所述增加在此时间点和治疗中早期(C1D15)在较短生存期的情况下跟踪到的。CD11b在B细胞上的表达与狼疮环境中的耐受性或调节性应答相关²⁸,并且被认为对抗肿瘤免疫力有削弱作用。此外,这些发现与胶质瘤中的最近临床前研究一致,其表明激动性CD40部分通过诱导调节B细胞来损害对PD-1阻断的应答²⁹。因此,假设了调节性B细胞可能在mPDAC中进行的双重免疫疗法组合之后的受抑制的免疫力中额外地发挥作用。然而,需要进行机制研究以进一步了解mPDAC环境中的这些发现。

[0433] 最后,本研究中呈现的数据产生了关于T细胞在介导针对胰腺癌的免疫力中的作用的相关假设,并且还表明在治疗前表征患者的免疫状态可能有助于指导不同的基于免疫疗法的治疗方法。在治疗之前,循环和浸润T细胞的较高频率以及经激活的CD8 T细胞的增加,特别在nivo/chemo治疗的情况下,与生存期改善相关。值得注意的是,与其它实体癌报告的数据^{30,33}不同,循环抗原经历的CD8 T细胞或浸润CD8 T细胞与存活期不相关,这表明其它免疫细胞类型在mPDAC中更为突出。相比之下,主要通过1型(Tbet+) CD4 T细胞观察到与存活期和循环抗原经历的T细胞的相关。此外,所有肿瘤样品中的浸润T细胞大部分是CD4 T细胞,并且令人惊讶的是,很少患者的肿瘤样品的CD8 T细胞浸润增加(补充图X)。最近的临床研究表明,CD4肿瘤浸润淋巴细胞可能对于抗肿瘤免疫力来说是重要的³⁴。假设了CD4 T细胞区室可能响应于mPDAC中的化学免疫疗法治疗而发挥关键作用,这是一项尚未在其它实体癌类型中报告的发现。

[0434] 此随机化II期试验首次表明一线化学免疫疗法在患有mPDAC的患者中的益处。对nivo/chemo的先前研究未能在一线mPDAC¹²患者中显示出临床益处;然而,类固醇在所述研究中是允许的,但在PRINCE中不鼓励使用类固醇。本研究采用了空前规模的多组学多参数生物标志物分析,以鉴定mPDAC中对化学免疫疗法方案的应答和抗性的潜在机制。使用这种方法,已经鉴定了这些免疫机制在mPDAC中的新颖生物标志物。这些多组学分析揭示了与先前的临床前工作一致的TME和免疫系统的复杂相互作用,但先前在患有mPDAC的患者中未领悟到这种相互作用。这些结果可能有助于设计用于在患有mPDAC的所选患者中进行一线nivo/chemo治疗和sotiga/chemo治疗的临床试验和精确方法。计划在对此疾病即将进行的临床试验中,进一步评估本文呈现的前瞻性生物标志物选择的患者群组中的生物标志物谱。

[0435] 虽然已经参照具体实施方式(其中一些是优选实施方式)具体地示出和描述了本公开,但本领域的技术人员应理解,可以在不背离如本文所公开的本公开的精神和范围的情况下在其中进行形式和细节上的各种改变。

[0436] 参考文献

[0437] 1.Rahib,L.等人预测到2030年的癌症发病率和死亡率:美国的甲状腺癌、肝癌和胰腺癌的意外负担(Projecting cancer incidence and deaths to 2030:the unexpected burden of thyroid,liver,and pancreas cancers in the United

States).《癌症研究(Cancer Res)》74,2913-2921(2014)。

[0438] 2.Sharma,P.等人免疫检查点疗法的下一个十年(The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy).《癌症发现(Cancer Discov)》11,838-857(2021)。

[0439] 3.O'Reilly,E.M.等人用于患有转移性胰腺导管腺癌的患者联合或不联合曲美木单抗的度伐鲁单抗:2期随机化临床试验(Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma:A Phase 2 Randomized Clinical Trial).《JAMA肿瘤学(JAMA Oncol)》5,1431-1438(2019)。

[0440] 4.Royal,R.E.等人单药剂伊匹单抗(抗CTLA-4)用于局部晚期或转移性胰腺腺癌的2期试验(Phase 2 trial of single agent Ipilimumab(anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma).《免疫治疗学杂志(J Immunother)》33,828-833(2010)。

[0441] 5.Patnaik,A.等人派姆单抗(MK-3475;抗PD-1单克隆抗体)在患有晚期实体瘤患者中的I期研究(Phase I Study of Pembrolizumab(MK-3475;Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors).《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》21,4286-4293(2015)。

[0442] 6.Brahmer,J.R.等人抗PD-L1抗体在晚期癌症患者中的安全性和活性(Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer)《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》366,2455-2465(2012)。

[0443] 7.Balachandran,V.P.等人胰腺癌的长期幸存者的独特新抗原品质的鉴定(Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer).《自然(Nature)》551,512-516(2017)。

[0444] 8.Balli,D.,Rech,A.J.,Stanger,B.Z.和Vonderheide,R.H.免疫细胞溶解活性对人胰腺癌的分子子集进行分层(Immune Cytolytic Activity Stratifies Molecular Subsets of Human Pancreatic Cancer).《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》23,3129-3138(2017)。

[0445] 9.Stromnes,I.M.,Hulbert,A.,Pierce,R.H.,Greenberg,P.D.和Hingorani,S.R.人胰腺导管腺癌中的T细胞定位、激活和克隆扩增(T-cell Localization,Activation,and Clonal Expansion in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma).《癌症免疫学研究(Cancer Immunol Res)》5,978-991(2017)。

[0446] 10.Byrne,K.T.和Vonderheide,R.H.CD40刺激避免先天传感器并驱动肿瘤中的T细胞免疫(CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer).《细胞报告(Cell Rep)》15,2719-2732(2016)。

[0447] 11.Winograd,R.等人诱导T细胞免疫克服对PD-1和CTLA-4阻断的完全抗性并且提高胰腺癌的存活率(Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma).《癌症免疫学研究》3,399-411(2015)。

[0448] 12.Wainberg,Z.A.等人纳武单抗与纳布-紫杉醇的组合加吉西他滨在晚期胰腺癌中的开放标签I期研究(Open-label,Phase I Study of Nivolumab Combined with nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine in Advanced Pancreatic Cancer).《临床癌症研究》26,

4814-4822(2020)。

[0449] 13.O'Hara,M.H.等人加或不加纳武单抗的用于治疗转移性胰腺腺癌的CD40激动性单克隆抗体APX005M(索替格利单抗)和化学疗法:开放标签多中心1b期研究(CD40agonistic monoclonal antibody APX005M(sotigalimab)and chemotherapy,with or without nivolumab,for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma:an open-label,multicentre,phase 1b study).《柳叶刀肿瘤学》22, 118-131(2021)。

[0450] 14.Von Hoff,D.D.等人使用纳布-紫杉醇加吉西他滨提高胰腺癌的存活率(Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine).《新英格兰医学杂志》369,1691-1703(2013)。

[0451] 15.Tempero,M.等人用于对患有转移性胰腺腺癌的患者进行一线治疗的依鲁替尼与纳布-紫杉醇和吉西他滨:III期RESOLVE研究(Ibrutinib in combination with nab-paclitaxel and gemcitabine for first-line treatment of patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma:phase III RESOLVE study).《肿瘤学年鉴(Ann Oncol)》32,600-608(2021)。

[0452] 16.Van Cutsem,E.等人聚乙二醇化透明质酸酶 α 与纳布-紫杉醇加吉西他滨用于患有透明质酸高转移性胰腺腺癌患者的随机化III期试验(Randomized Phase III Trial of Pegvorhyaluronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma).《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)》38,3185-3194(2020)。

[0453] 17.Filbert,E.L.,Bjorck,P.K.,Srivastava,M.K.,Bahjat,F.R.和Yang,X.APX005M:一种具有独特表位特异性和Fc受体结合谱的用于最佳治疗应用的CD40激动剂抗体(APX005M,a CD40 agonist antibody with unique epitope specificity and Fc receptor binding profile for optimal therapeutic application).《癌症免疫学与免疫疗法(Cancer Immunol Immunother)》70,1853-1865(2021)。

[0454] 18.Brahmer,J.R.等人单药剂抗程序性死亡-1(MDX-1106)在难治性实体瘤中的I期研究:安全性、临床活性、药效学和免疫学相关性(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》28, 3167-3175(2010)。

[0455] 19.Noel,G.等人浸润人乳腺癌的功能性Th1导向的T滤泡辅助细胞促进有效适应性免疫(Functional Th1-oriented T follicular helper cells that infiltrate human breast cancer promote effective adaptive immunity).《临床研究杂志(J Clin Invest)》131(2021)。

[0456] 20.Aoki,T.等人单细胞谱分析揭示了CXCL13/CXCR5轴生物学在富含淋巴细胞的经典霍奇金淋巴瘤中的重要性(Single-cell profiling reveals the importance of CXCL13/CXCR5 axis biology in lymphocyte-rich classic Hodgkin lymphoma).《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》118(2021)。

[0457] 21.Siska,P.J.,Singer,K.,Evert,K.,Renner,K.&Kreutz,M.免疫学瓦博格效应:

代谢性肿瘤基质评分 (MeTS) 可以指导癌症免疫疗法吗? (The immunological Warburg effect: Can a metabolic-tumor-stroma score (MeTS) guide cancer immunotherapy?) 《免疫学评论 (Immunol Rev)》295, 187-202 (2020)。

[0458] 22. Li, J. 等人肿瘤细胞内在因子构成免疫细胞浸润和对免疫疗法的应答的异质性基础 (Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy). 《免疫力 (Immunity)》49, 178-193 (2018)。

[0459] 23. Stebbins, M. 等人生发中心应答的调节 (Regulation of the Germinal Center Response). 《免疫学前沿 (Front Immunol)》9, 2469 (2018)。

[0460] 24. Cohn, L. 等人到早期内体的抗原递送消除了人血液 BDCA3+ 树突状细胞在交叉呈递时的优越性 (Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation). 《实验医学期刊 (J Exp Med)》210, 1049-1063 (2013)。

[0461] 25. Haniffa, M. 等人人体组织含有与小鼠 CD103+ 非淋巴样树突状细胞具有功能同源性的 CD141hi 交叉呈递树突状细胞 (Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells). 《免疫力》37, 60-73 (2012)。

[0462] 26. Diamond, M.S., Lin, J.H. 和 Vonderheide, R.H. 由于树突状细胞交叉致敏受损导致的位点依赖性免疫逃逸 (Site-Dependent Immune Escape Due to Impaired Dendritic Cell Cross-Priming). 《癌症免疫学研究》9, 877-890 (2021)。

[0463] 27. Beltra, J.C. 等人四种耗竭的 CD8(+) T 细胞子集的发育关系揭示了潜在的转录和表观遗传景观控制机制 (Developmental Relationships of Four Exhausted CD8(+) T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms). 《免疫力》52, 825-841 (2020)。

[0464] 28. Ding, C. 等人整合素 CD11b 负调节 BCR 信号传导以维持自身反应性 B 细胞耐受性 (Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintain autoreactive B cell tolerance). 《自然通讯 (Nat Commun)》4, 2813 (2013)。

[0465] 29. van Hooren, L. 等人激动性 CD40 疗法诱导三级淋巴结构, 但损害神经胶质瘤中对检查点阻断的应答 (Agonistic CD40 therapy induces tertiary lymphoid structures but impairs responses to checkpoint blockade in glioma). 《自然通讯》12, 4127 (2021)。

[0466] 30. Sharma, P. 等人 CD8 肿瘤浸润淋巴细胞可预测肌肉侵袭性尿路上皮癌的生存期 (CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma). 《美国国家科学院院刊》104, 3967-3972 (2007)。

[0467] 31. Ribas, A. 等人溶瘤病毒疗法促进肿瘤内 T 细胞浸润并改善抗 PD-1 免疫疗法 (Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy). 《细胞 (Cell)》170, 1109-1119 (2017)。

[0468] 32. Tokito, T. 等人与 CD8+ TIL 密度结合的 PD-L1 表达在接受同步化学放射疗法的 III 期非小细胞肺癌患者中的预测相关性 (Predictive relevance of PD-L1 expression

combined with CD8+TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy).《欧洲癌症杂志 (Eur J Cancer)》55,7-14(2016)。

[0469] 33.Yang,Z等人作为多种癌症中的免疫检查点抑制剂疗法应答的有效生物标志物的肿瘤浸润PD-1(hi)CD8(+)-T细胞特征(Tumor-Infiltrating PD-1(hi)CD8(+)-T-Cell Signature as an Effective Biomarker for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy Response Across Multiple Cancers).《肿瘤学前沿 (Front Oncol)》11,695006(2021)。

[0470] 34.Cachot,A.等人肿瘤特异性细胞溶解CD4 T细胞介导对人类癌症的免疫(Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer).《科学进展 (Sci Adv)》7(2021)。

[0471] 35.Hartmann,F.J.等人对临床试验进行综合免疫监测以推进人类免疫疗法(Comprehensive Immune Monitoring of Clinical Trials to Advance Human Immunotherapy).《细胞报告 (Cell Rep)》28,819-831e814(2019)。

[0472] 36.Spitzer,M.H.等人免疫学:对动态免疫系统建模的交互式参考框架(IMMUNOLOGY.An interactive reference framework for modeling a dynamic immune system).《科学 (Science)》349,1259425(2015)。

[0473] 37.Assarsson,E.等人均质96重PEA免疫测定表现出高灵敏度、特异性和良好的可扩展性(Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity,and excellent scalability).《公共科学图书馆综合 (PLoS One)》9,e95192(2014)。

[0474] 38.Marco Tognetti,K.S.,Sebastian Muller,Dominique Kamber,Jan Muntel,Roland Bruderer,Lukas Reiter.从主要源自于低丰度区域的深度谱分析的血浆中鉴定出的肿瘤的生物标志物候选物(Biomarker Candidates for Tumors Identified from Deep-Profiled Plasma Stem Predominantly from the Low Abundant Area).《bioRxiv 杂志 (bioRxiv)》(2021)。

[0475] 39.Muntel,J.等人在单次运行中通过优化当前LC-MS仪器和数据分析策略得到的超过10000种经鉴定且经定量的蛋白质(Surpassing 10000identified and quantified proteins in a single run by optimizing current LC-MS instrumentation and data analysis strategy).《分子组学 (Mol Omics)》15,348-360(2019)。

[0476] 40.Patwardhan,A.等人使用增强的外显子组测序实现用于临床应用的高灵敏度(Achieving high-sensitivity for clinical applications using augmented exome sequencing).《基因组医学 (Genome Med)》7,71(2015)。

[0477] 41.Dobin,A.等人STAR:超快速通用RNA-seq比对仪(STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner)《生物信息学 (Bioinformatics)》29,15-21(2013)。

[0478] 42.DePristo,M.A.等人用于使用下一代DNA测序数据进行变异发现和基因分型的框架(A framework for variation discovery and genotyping using nextgeneration DNA sequencing data).《自然遗传学 (Nat Genet)》43,491-498(2011)。

[0479] 43.McKenna,A.等人基因组分析工具包:用于分析下一代DNA测序数据的MapReduce框架(The Genome Analysis Toolkit:a MapReduce framework for analyzing

next-generation DNA sequencing data).《基因组研究(Genome Res)》20,1297-1303 (2010)。

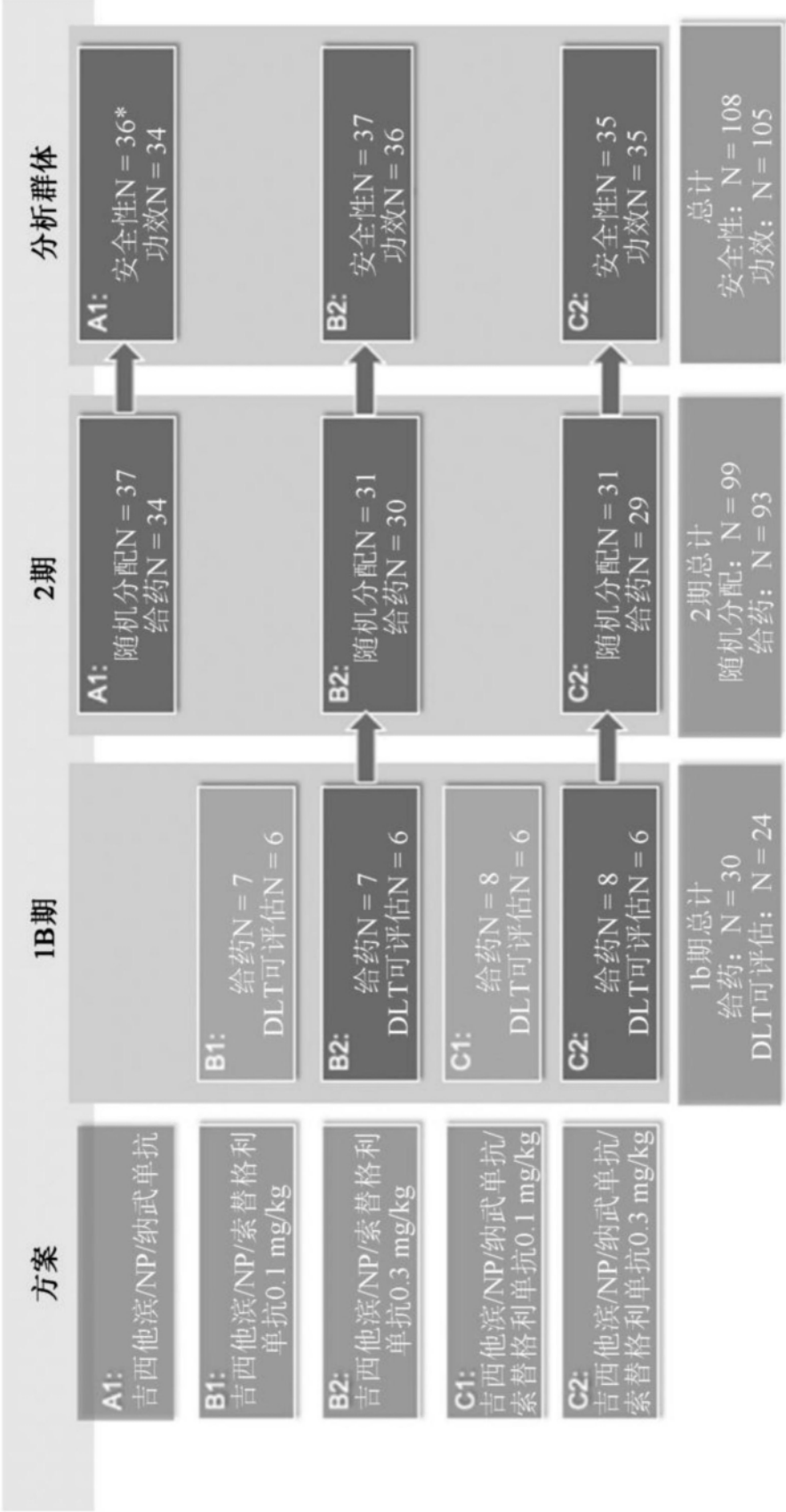
[0480] 44.Lacey J Padron,B.K.,George Kierstein,Michael Travers,Marshall Thompson,Kurt Christensen,Robin Kageyama,Robert Schiemann,Daniel K Wells, Timothy Howes,Christine N Spencer,Nicholas Bayless,Stuart Halloway,Rich Hickey,Nikesh Kotecha,Pier Federico Gherardini.用于可重现生物数据科学的CANDEL平台(The CANDEL platform for reproducible biological data science).(准备中)。

[0481] 45.R开发核心团队(R Development Core Team).R:一种用于统计计算的语言和环境(R;A language and environment for statistical computing)(R统计计算基金会(R Foundation for Statistical Computing)奥地利维也纳2010)。

[0482] 46.Le Cao,K.A.,Boitard,S.&Besse,P.稀疏PLS判别分析:生物学上相关的特征选择和用于多类问题的图形显示(Sparse PLS discriminant analysis:biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems).《BMC生物信息学(BMC Bioinformatics)》12,253(2011)。

[0483] 47.Rohart,F.,Gautier,B.,Singh,A.&Le Cao,K.A.mixOmics:一个用于组学特征选择和多数据集成的R包(mixOmics:An R package for'omics feature selection and multipledata integration).《公共科学图书馆计算生物学(PLoS Comput Biol)》13, e1005752(2017)。

[0484] 虽然已经参照具体实施方式(其中一些是优选实施方式)具体地示出和描述了本公开,但本领域的技术人员应理解,可以在不背离如本文所公开的本公开的精神和范围的情况下在其中进行形式和细节上的各种改变。



*两名参与者被随机分配到群组C2，但并未接受索替格利单抗给药，并且因此在本图在群组A1下列示。
注意：B1/C1未在本海报中描述。

图1

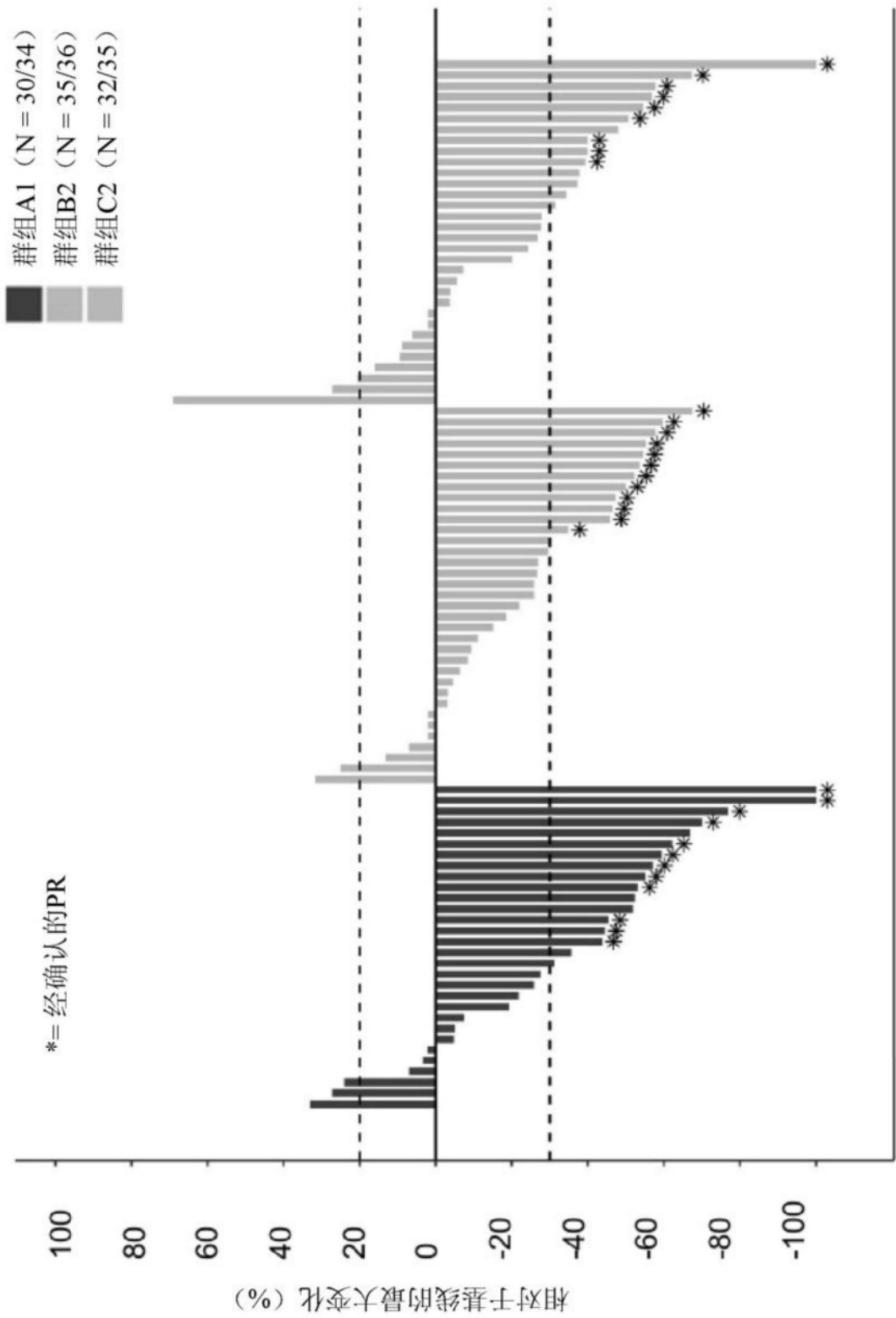


图2

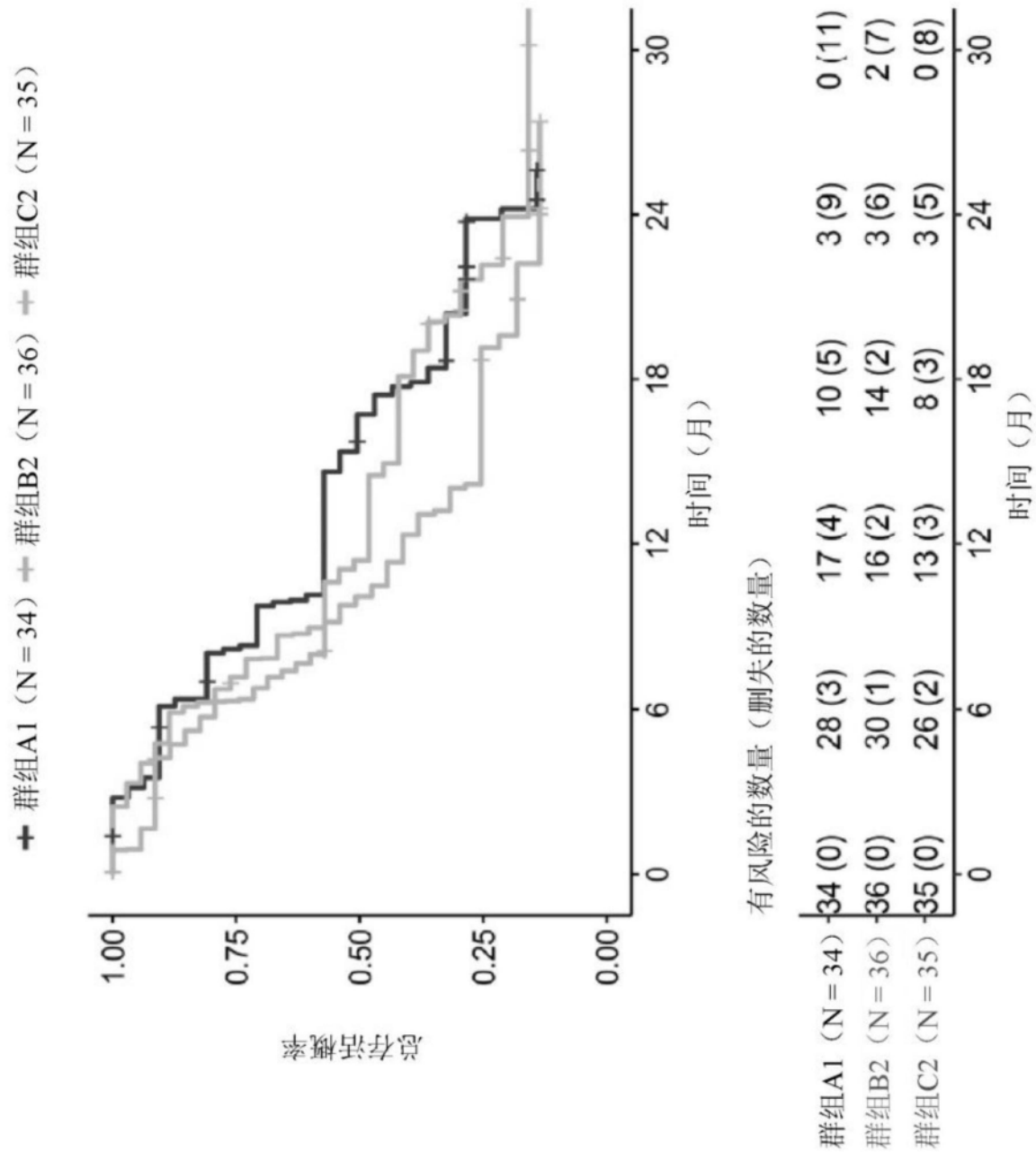


图3

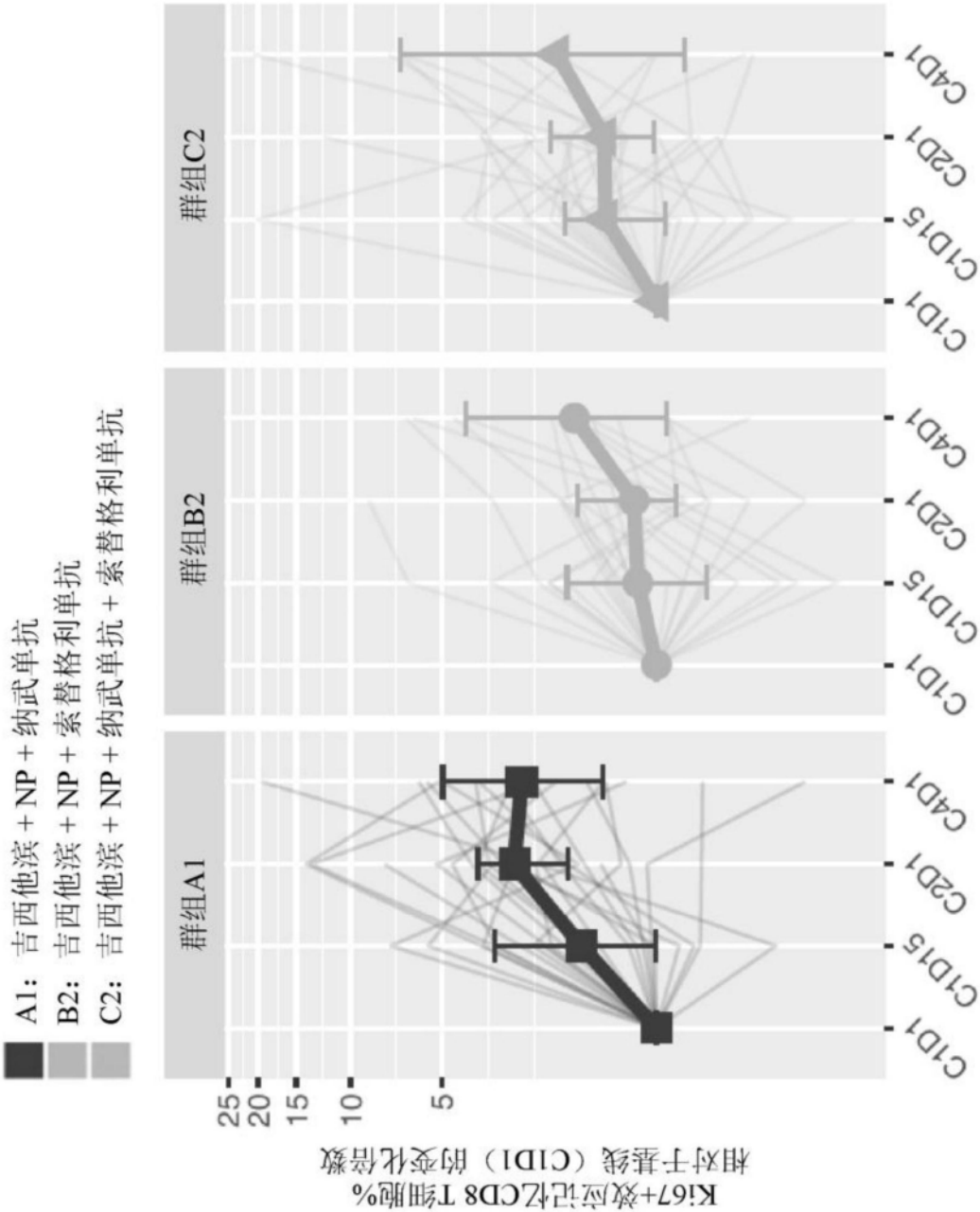


图4A

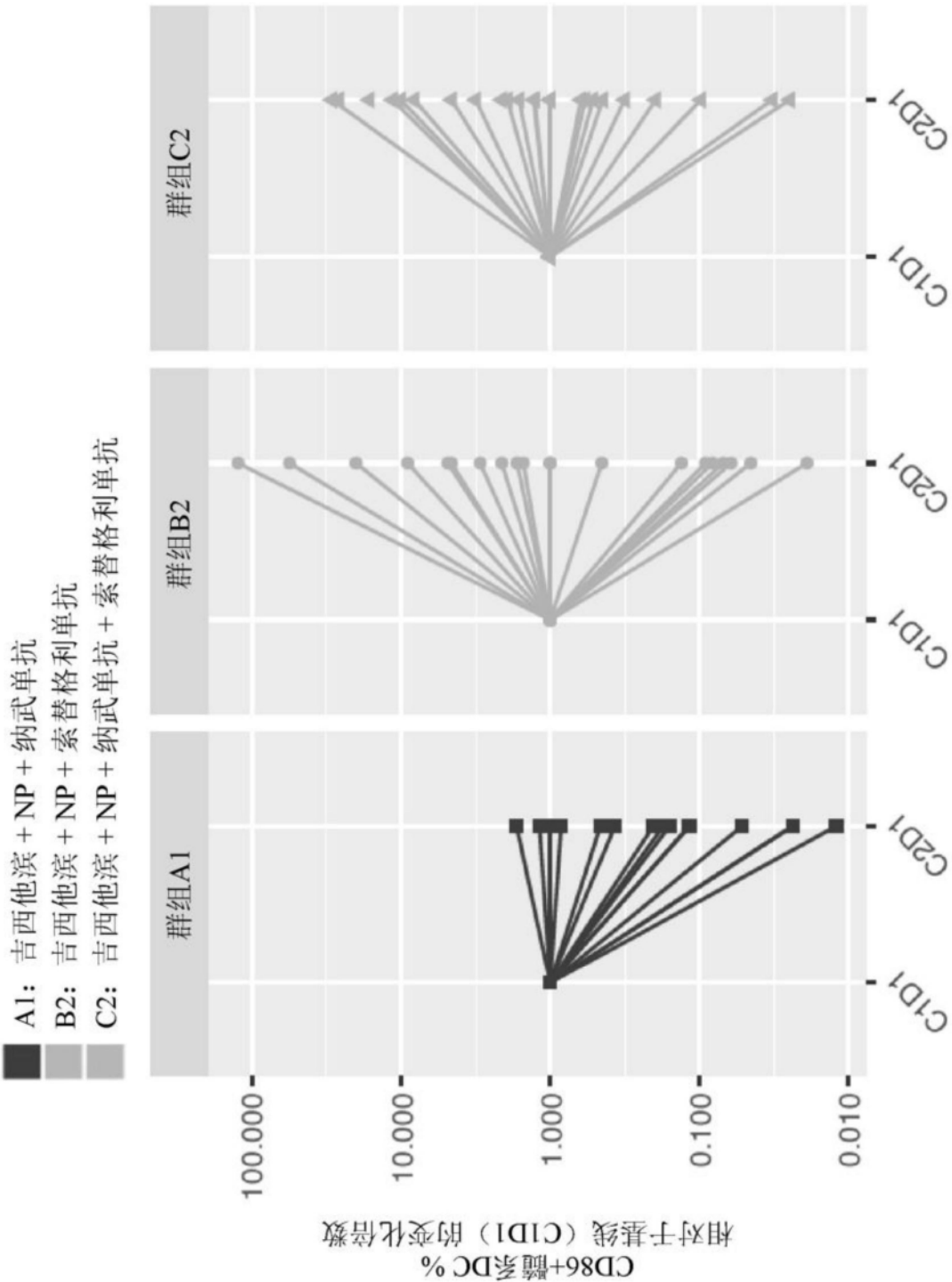


图4B

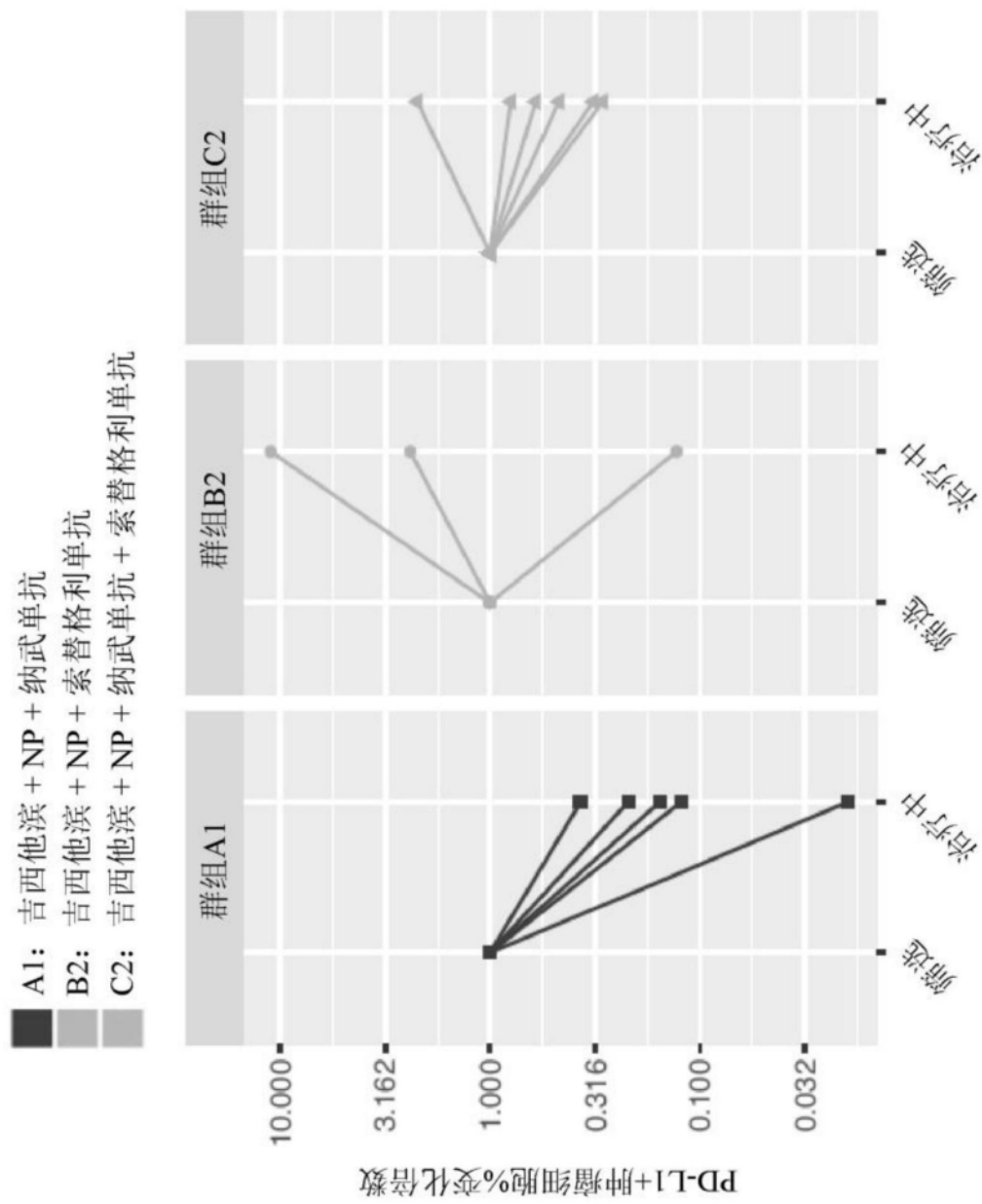
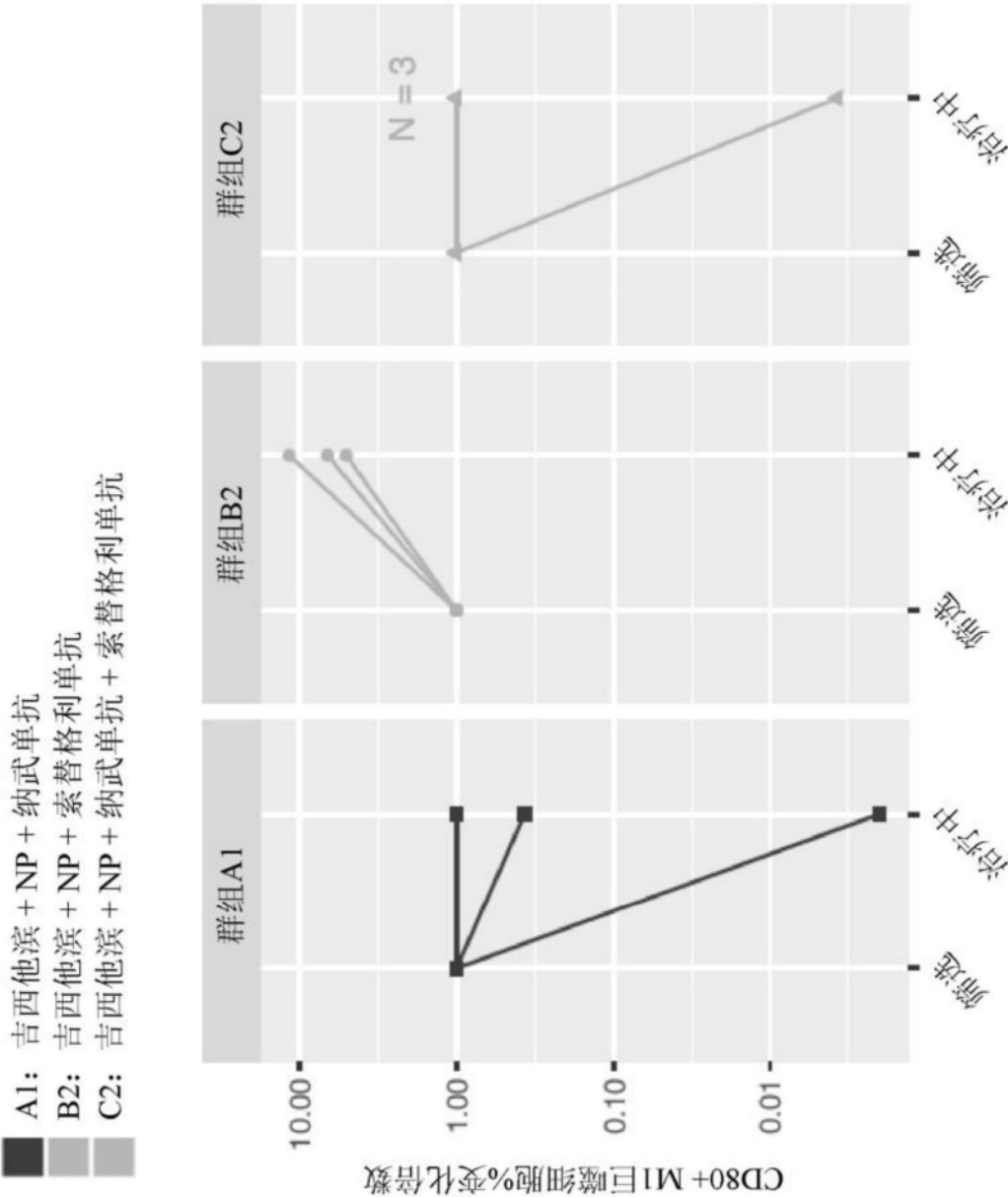


图5A



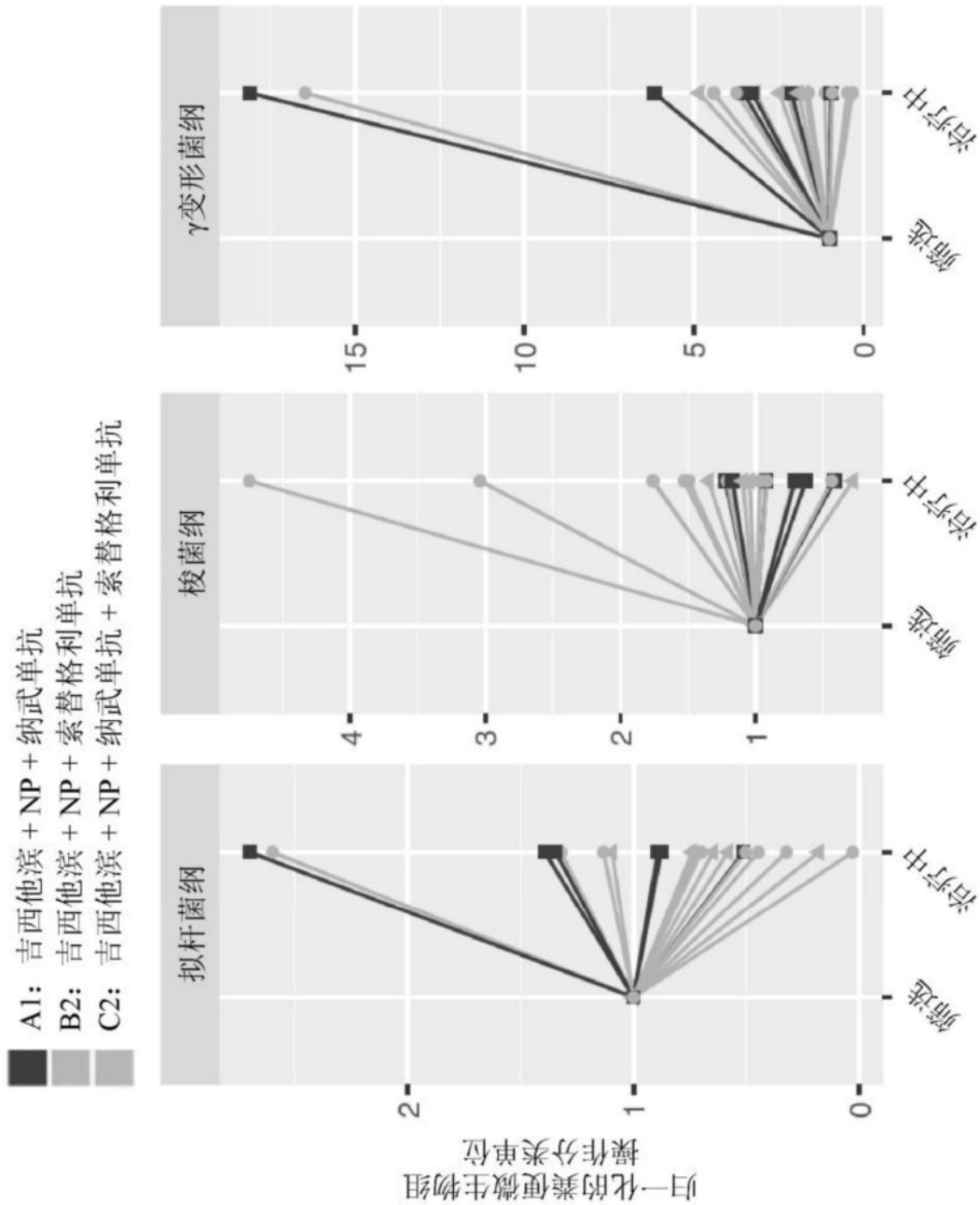


图6

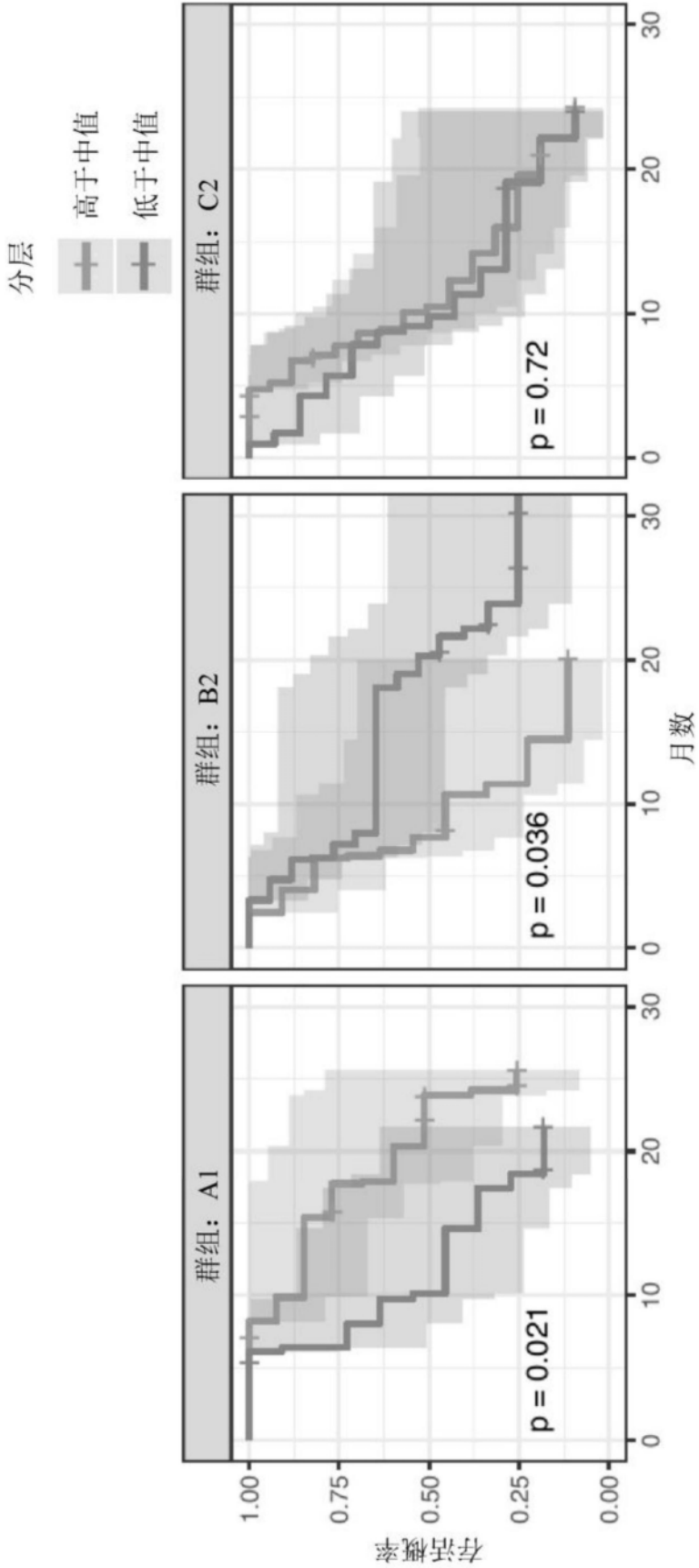


图7A

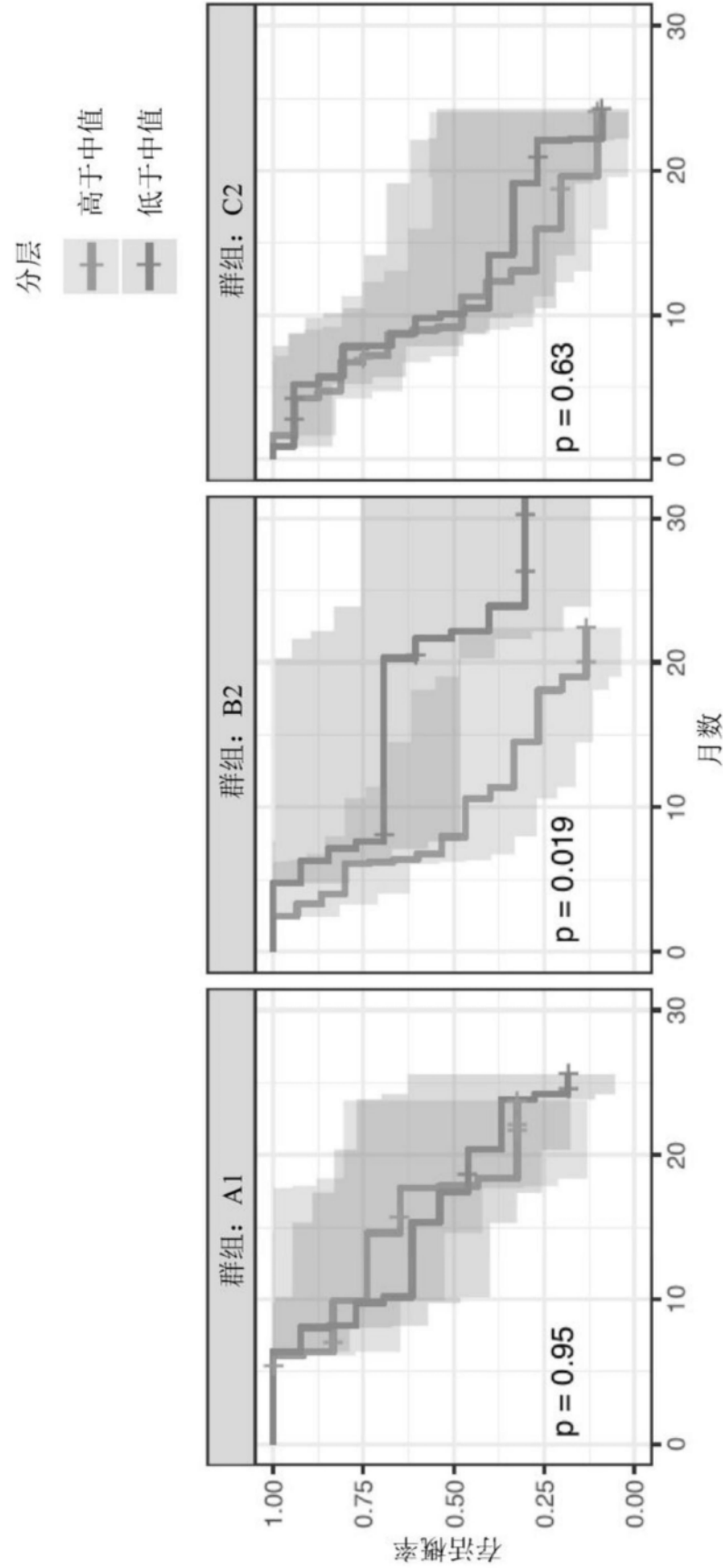


图7B

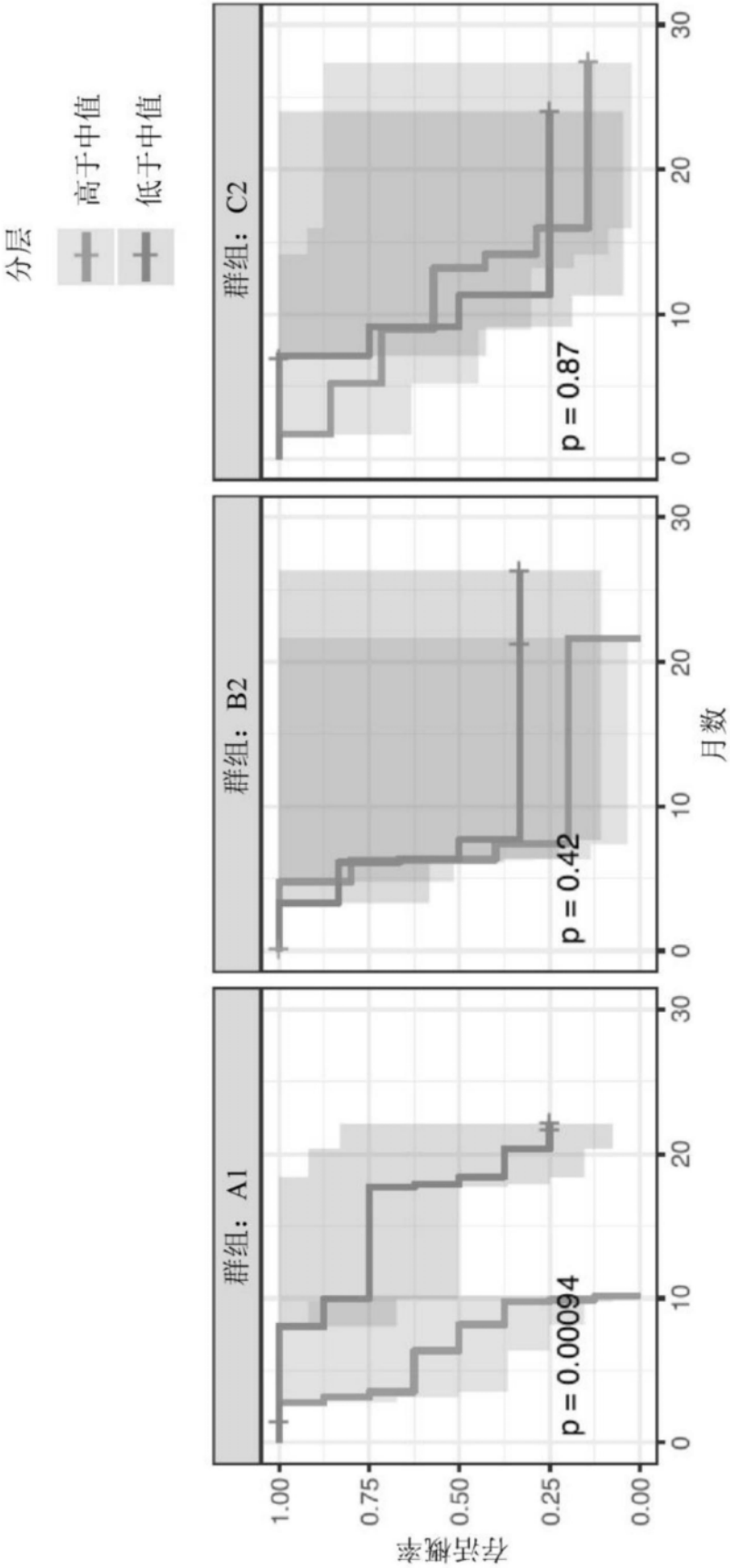


图8A

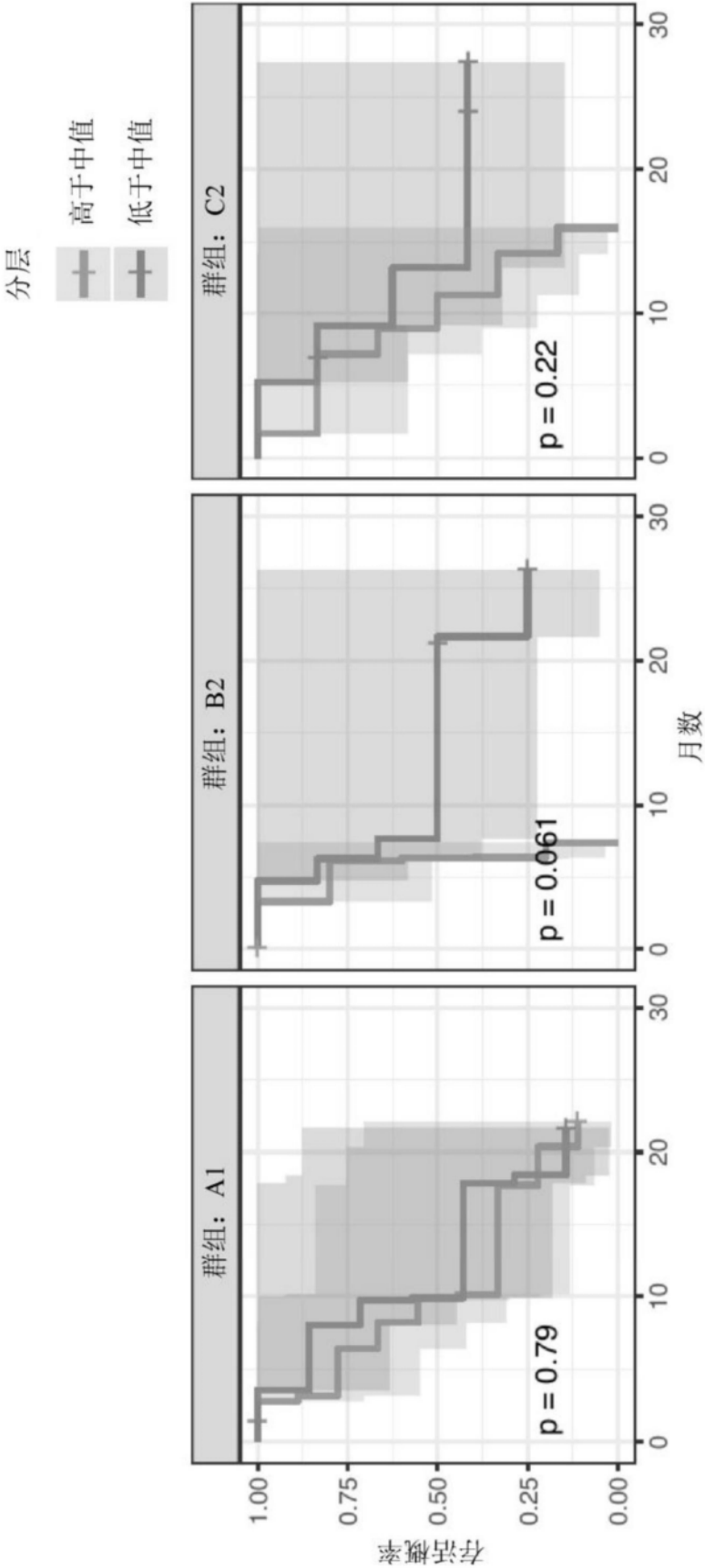


图8B

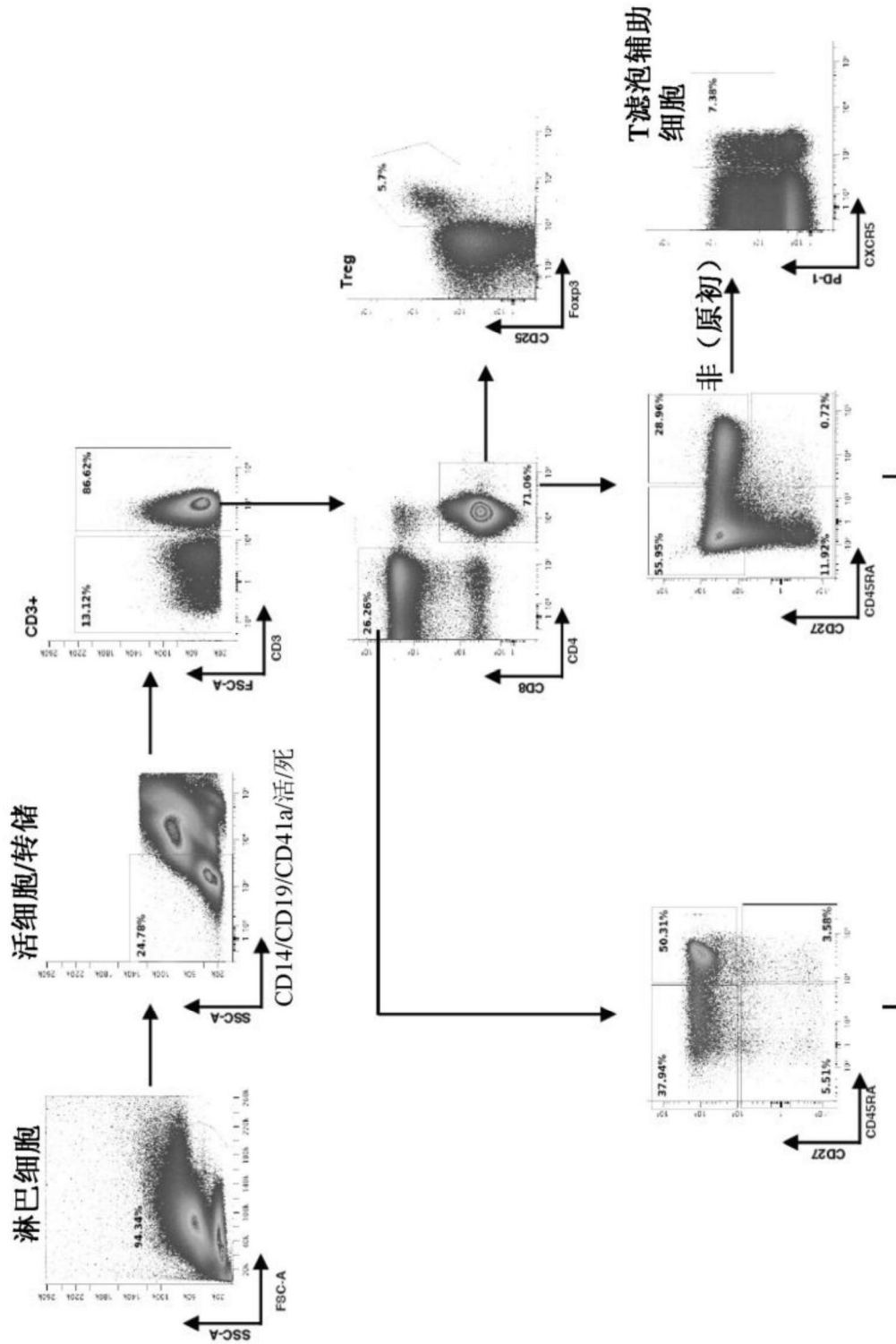


图10

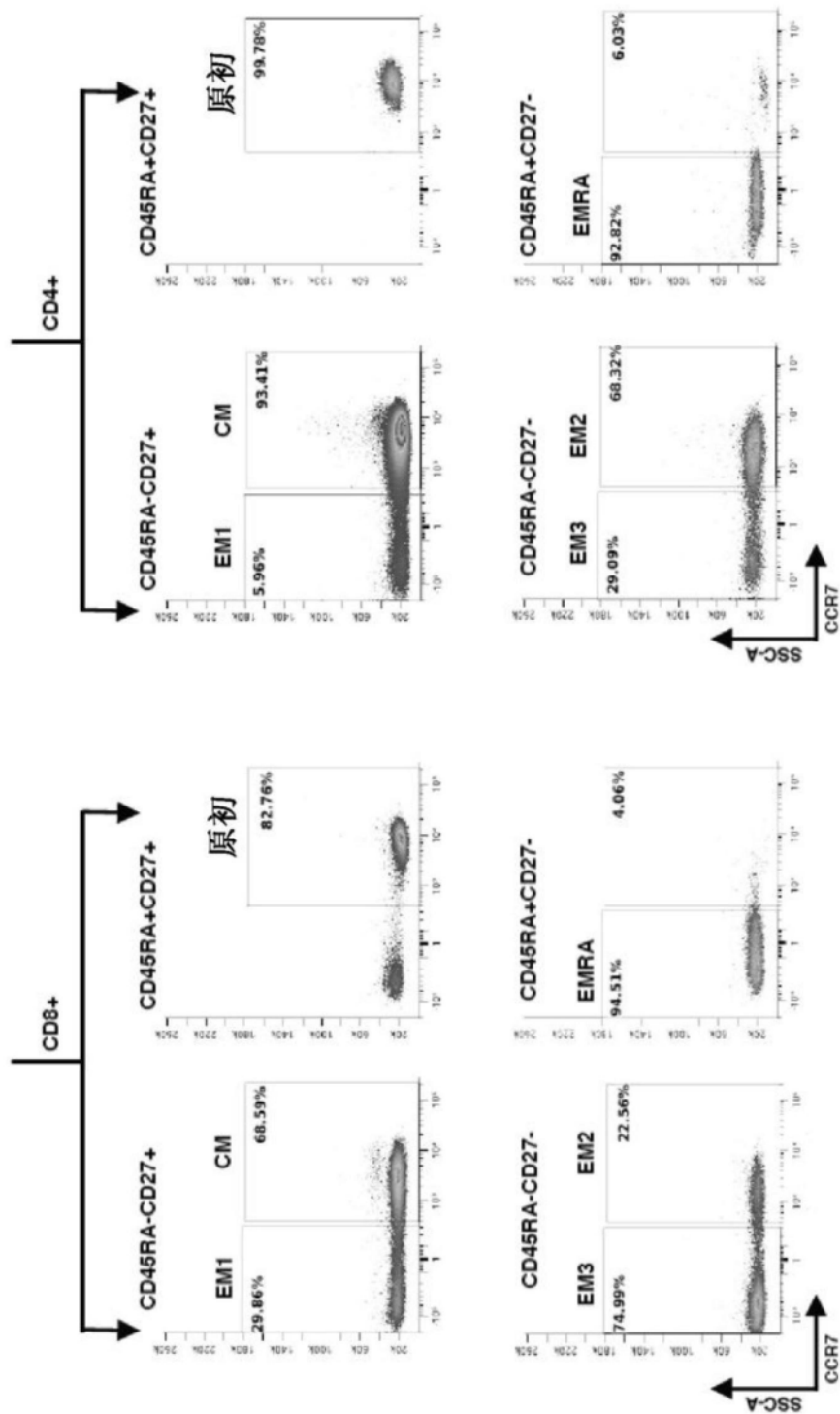


图10(续)

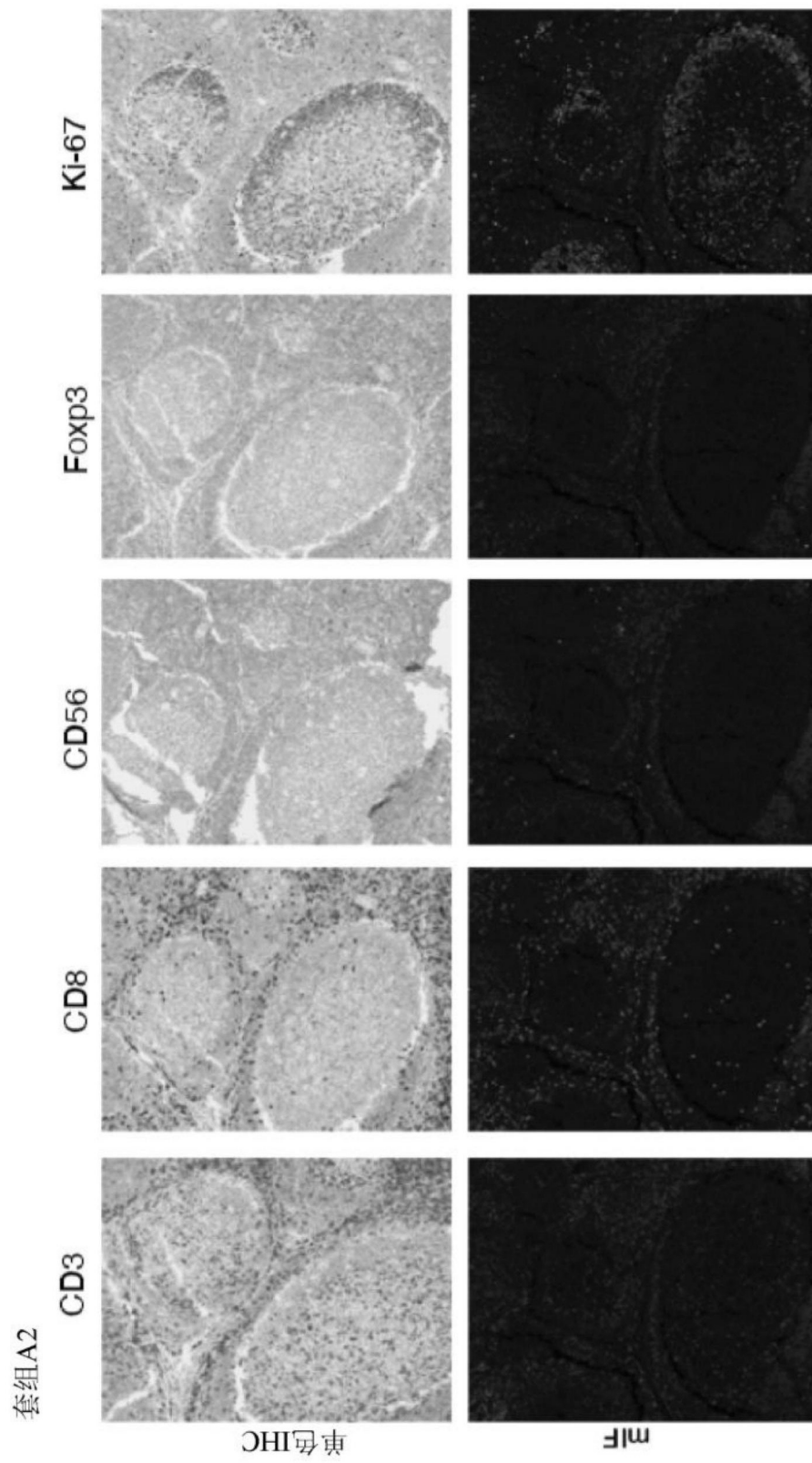


图11

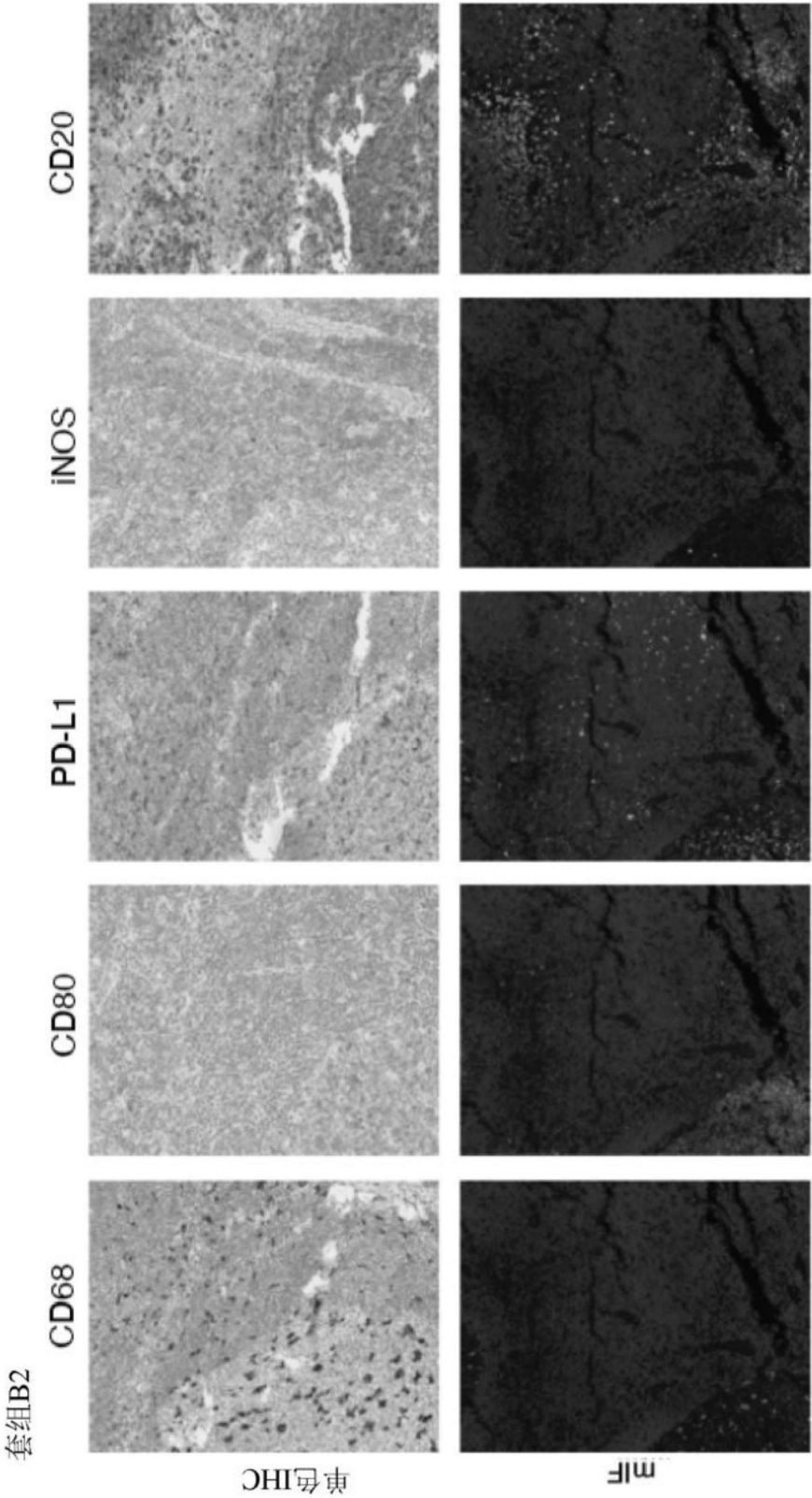


图11 (续)

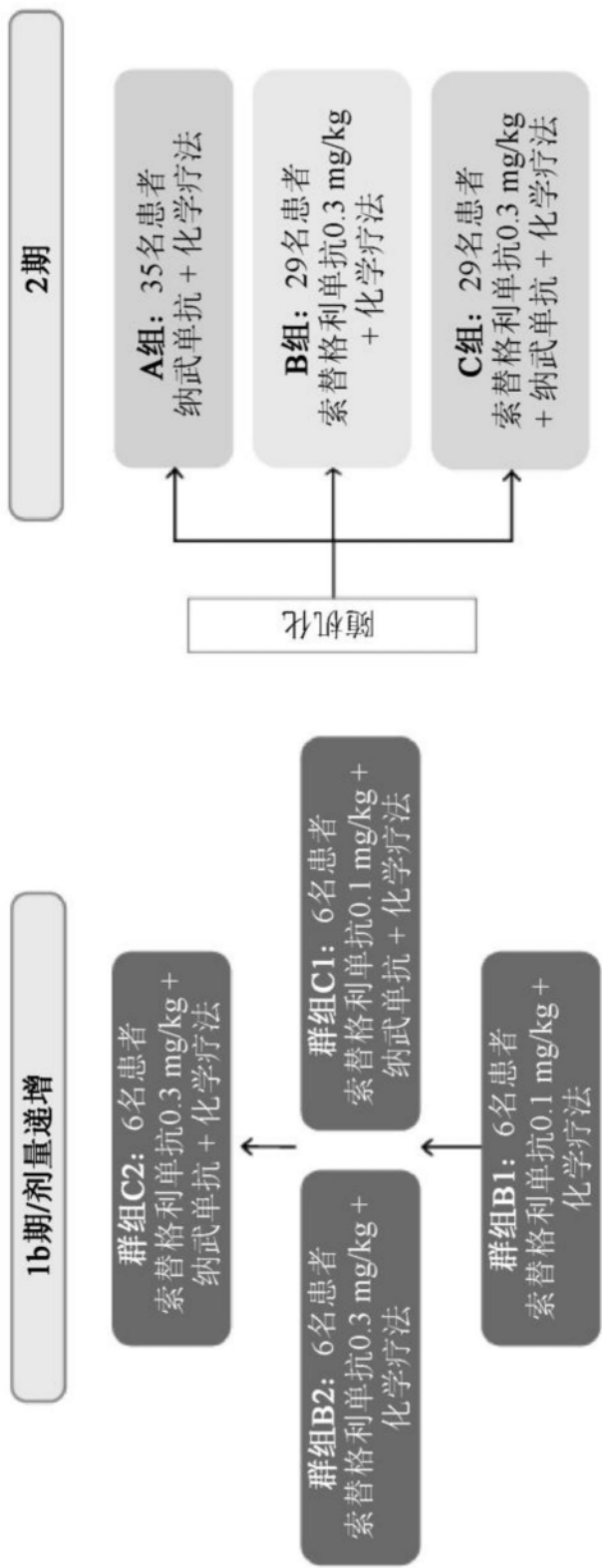


图12A

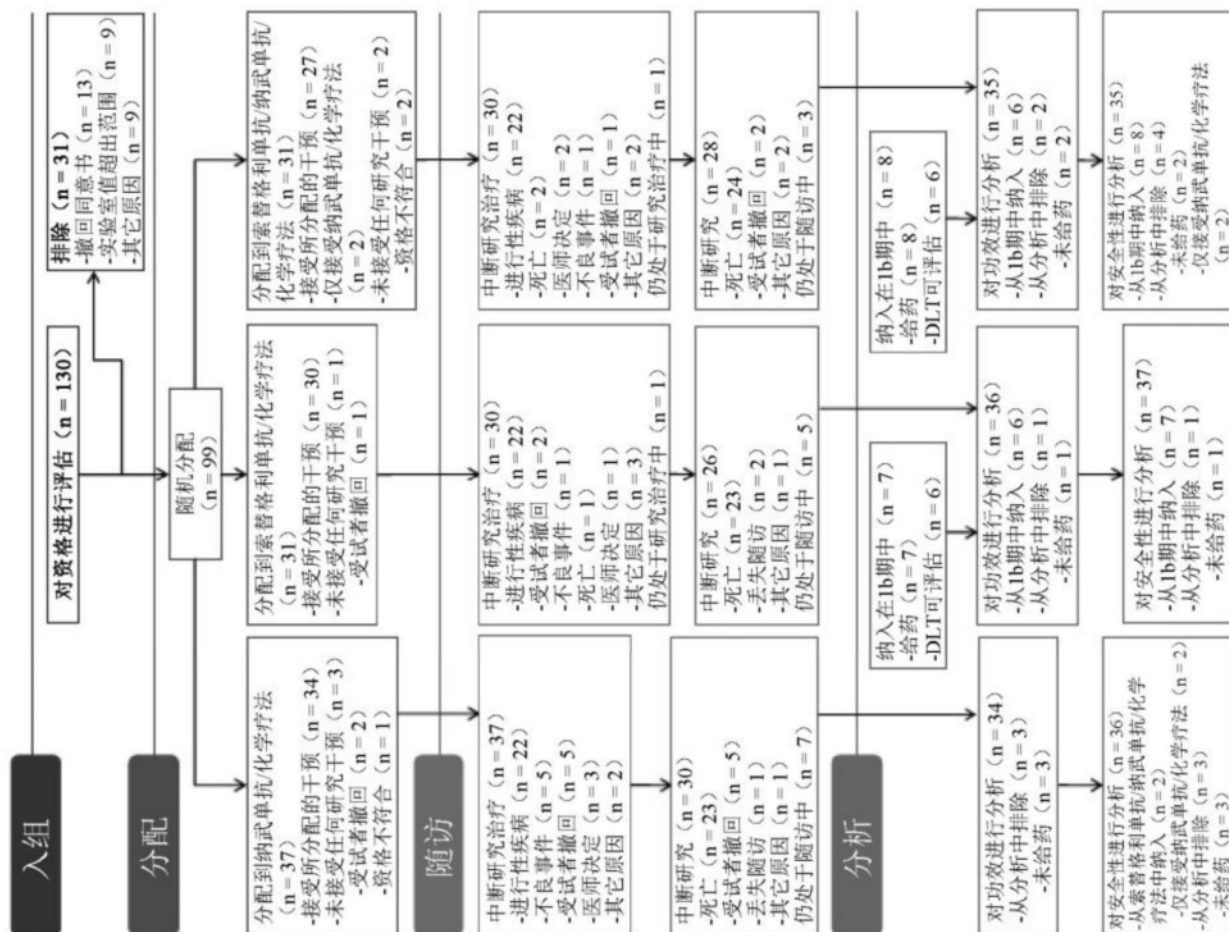


图12B

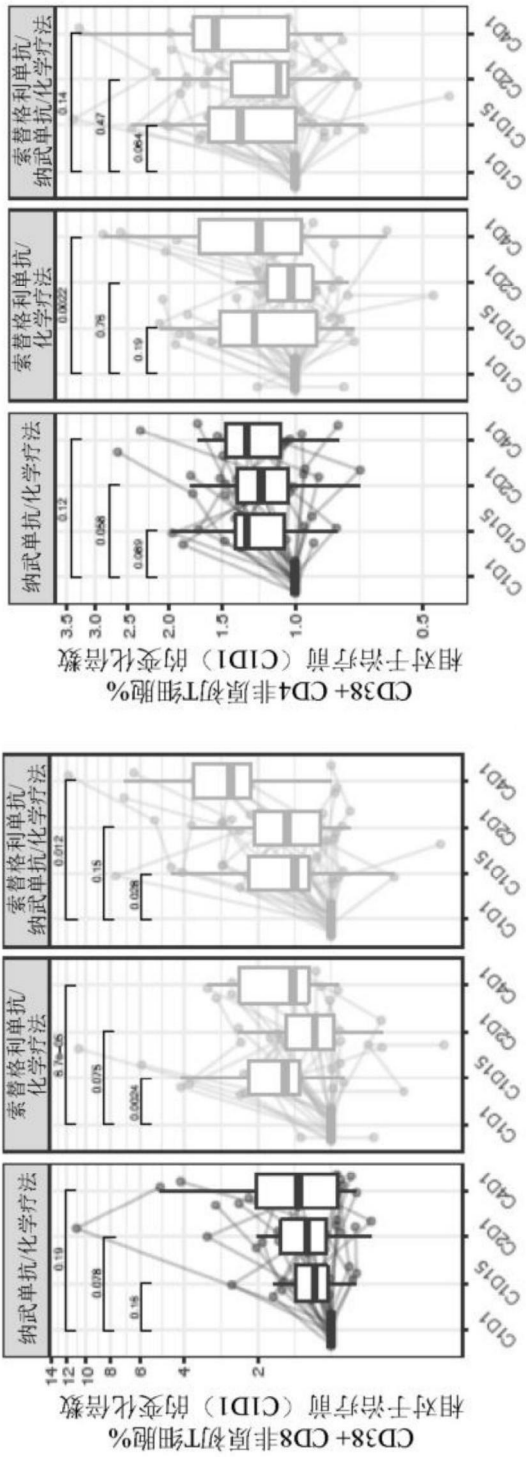


图13A

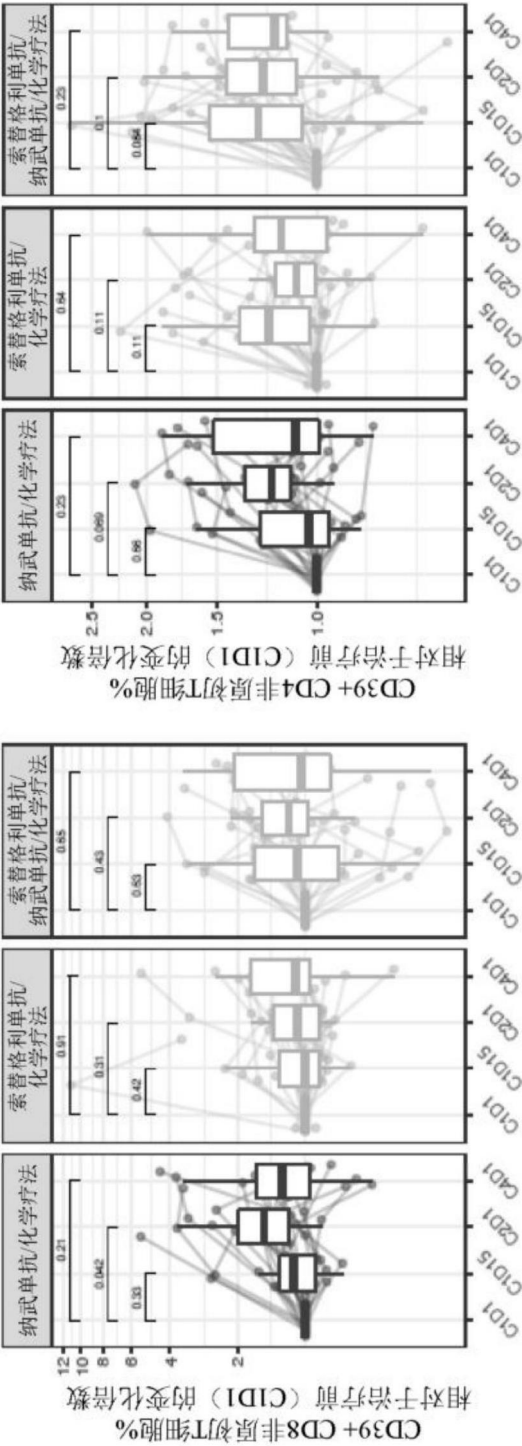


图13B

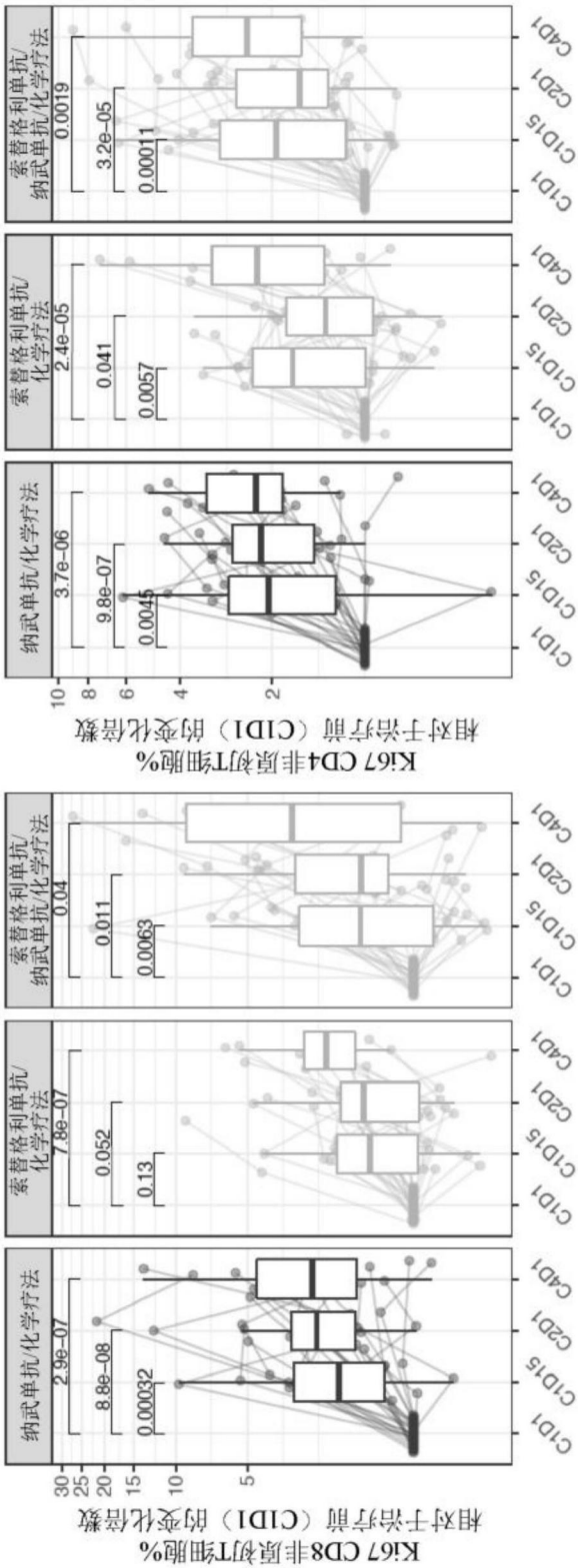


图14A

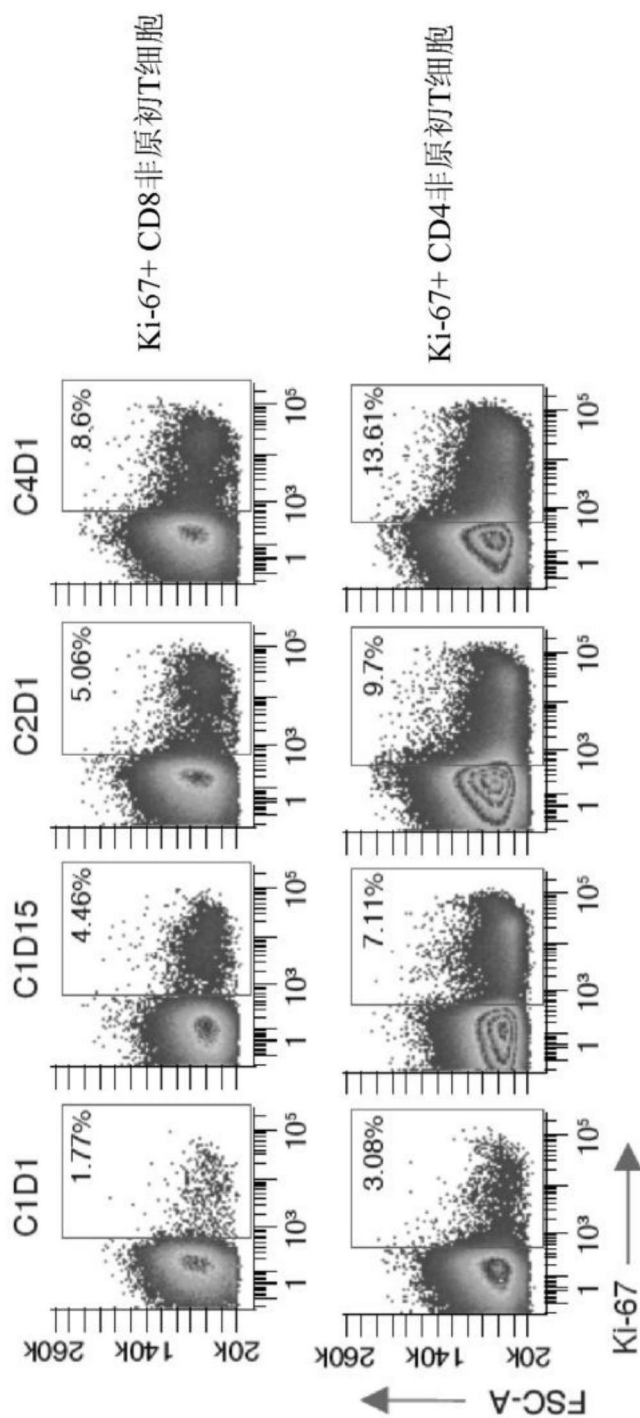


图14B

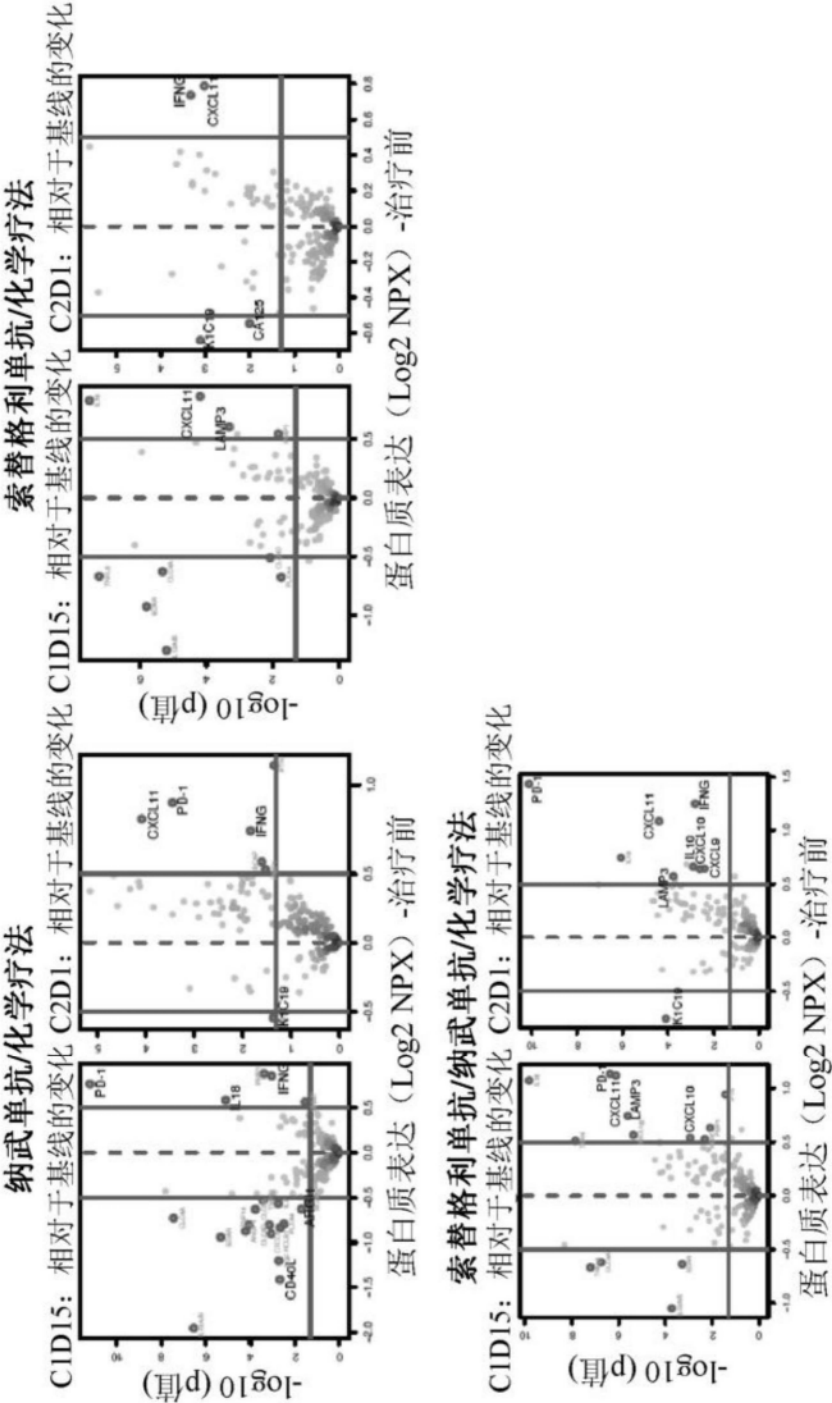


图14C

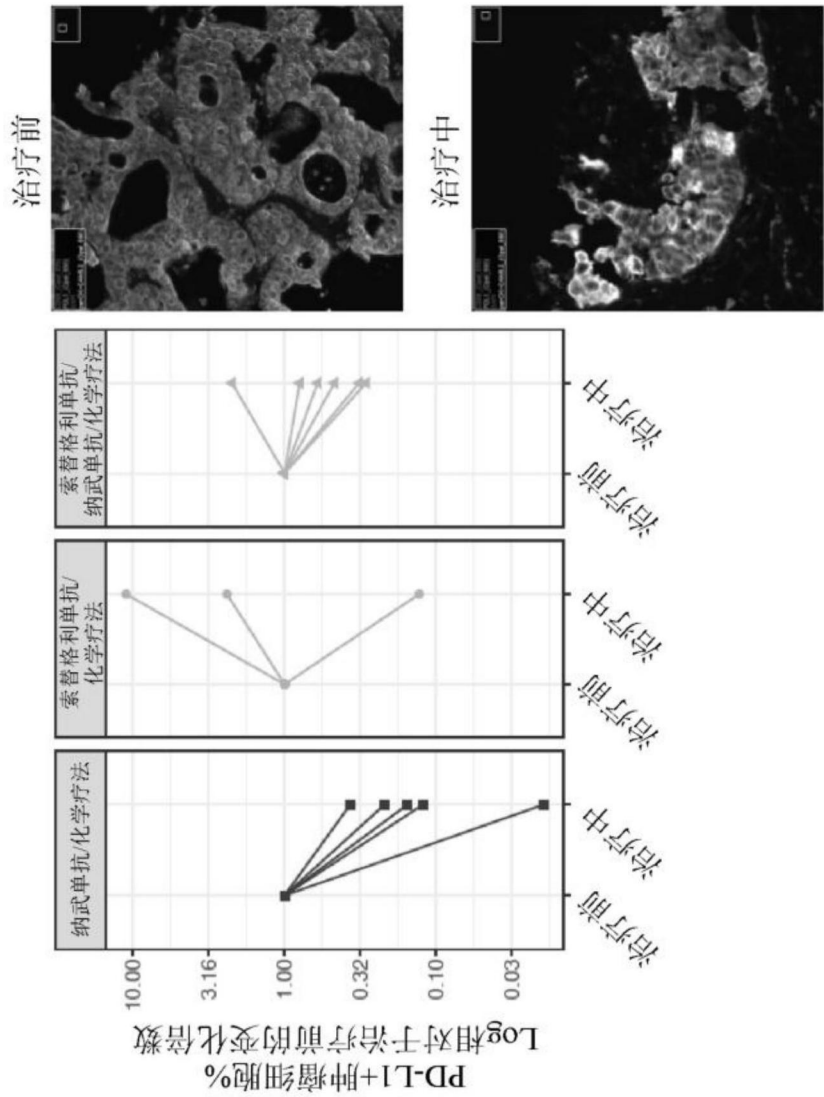


图14D

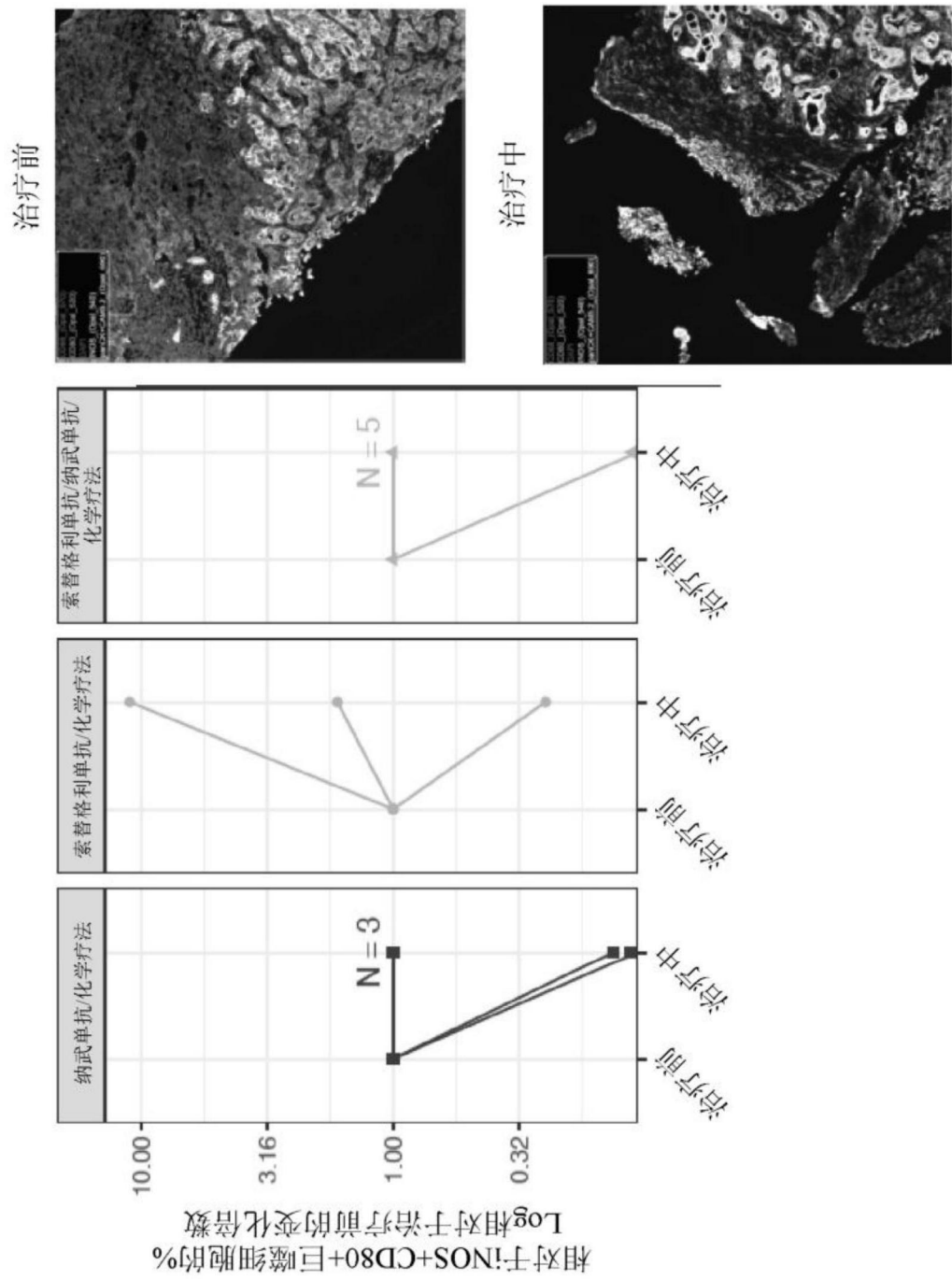


图14E

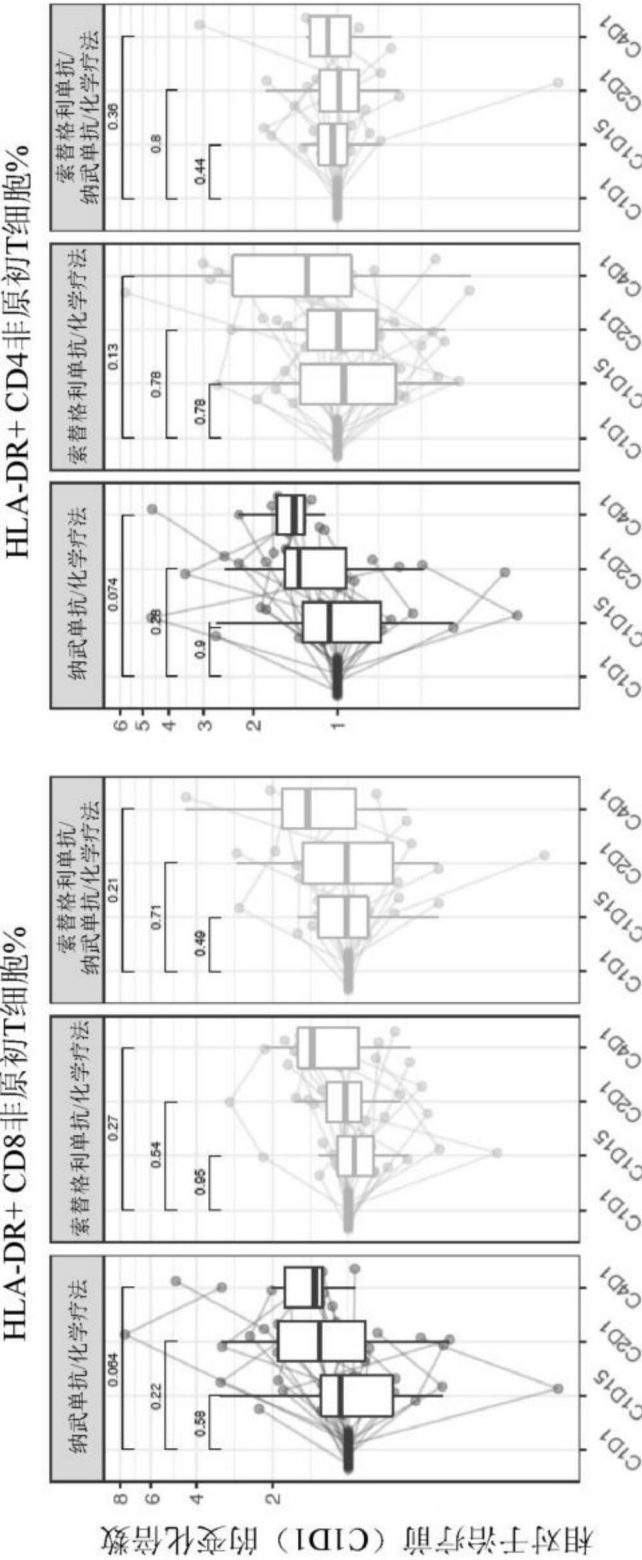


图15A

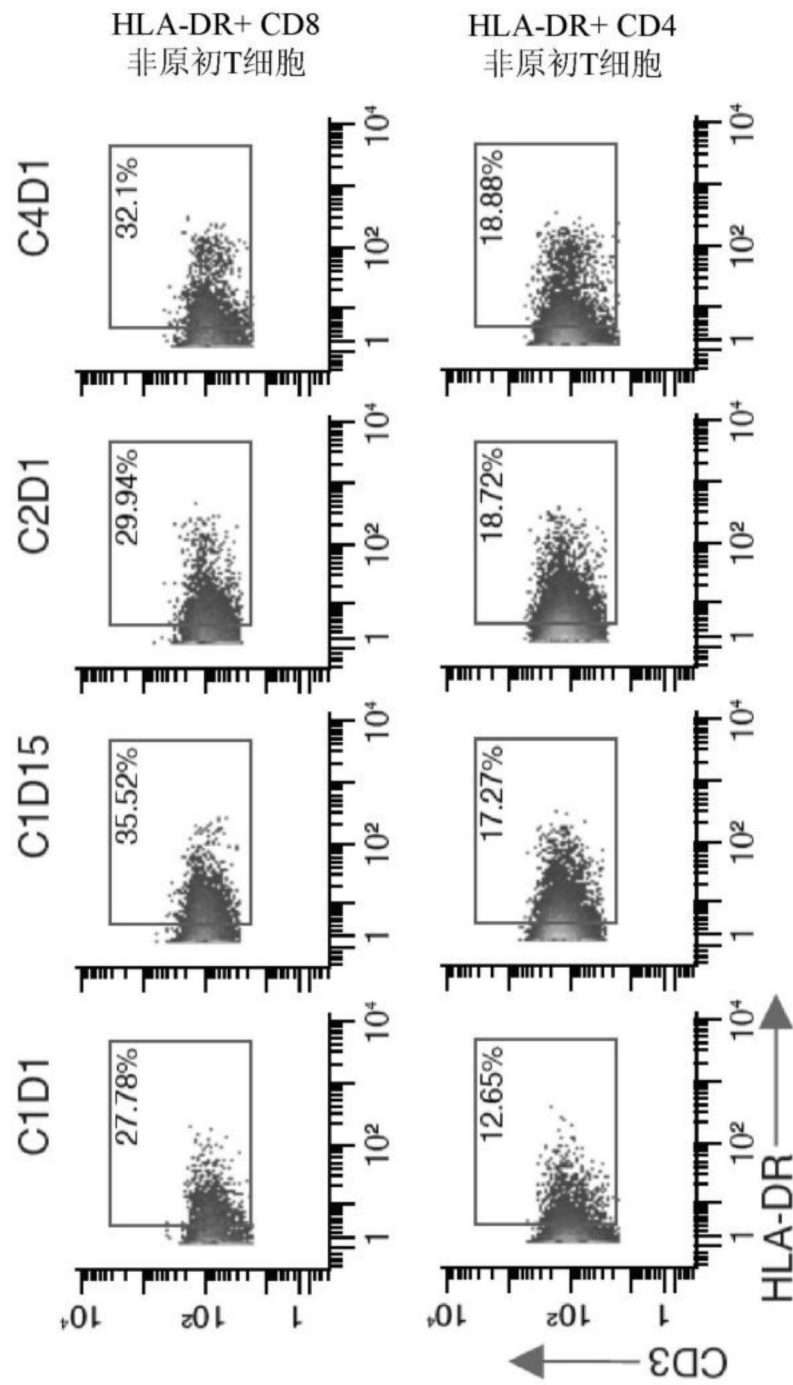


图15B

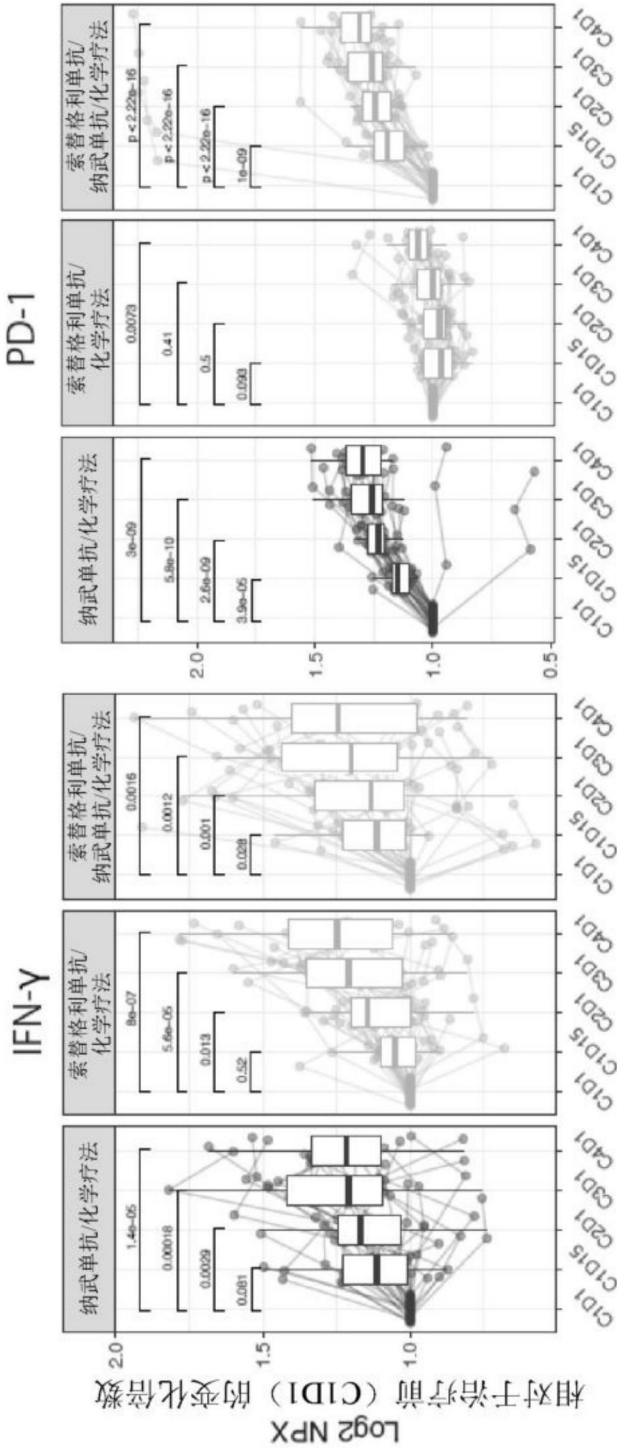


图15D

图15C

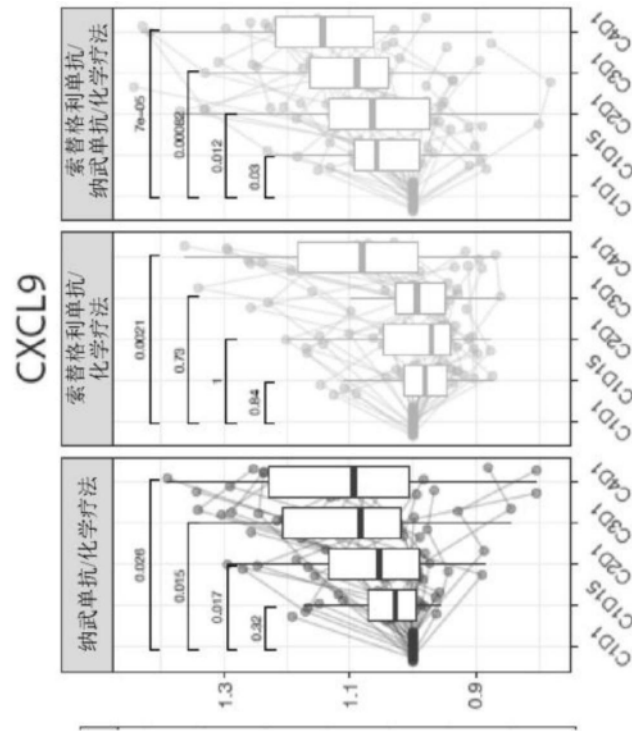


图15E

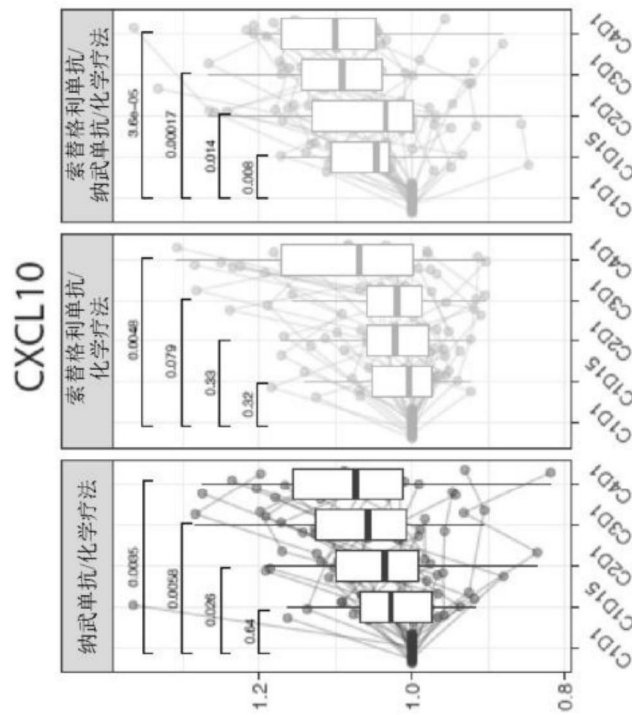
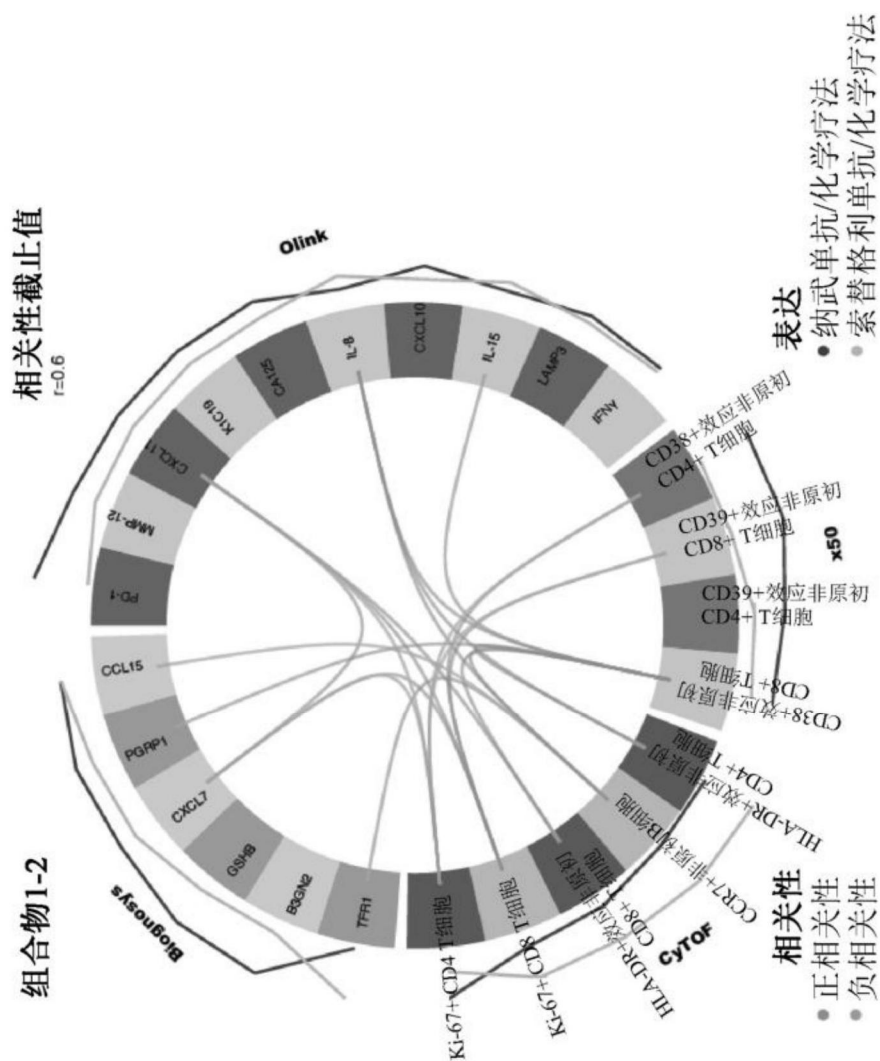


图15F



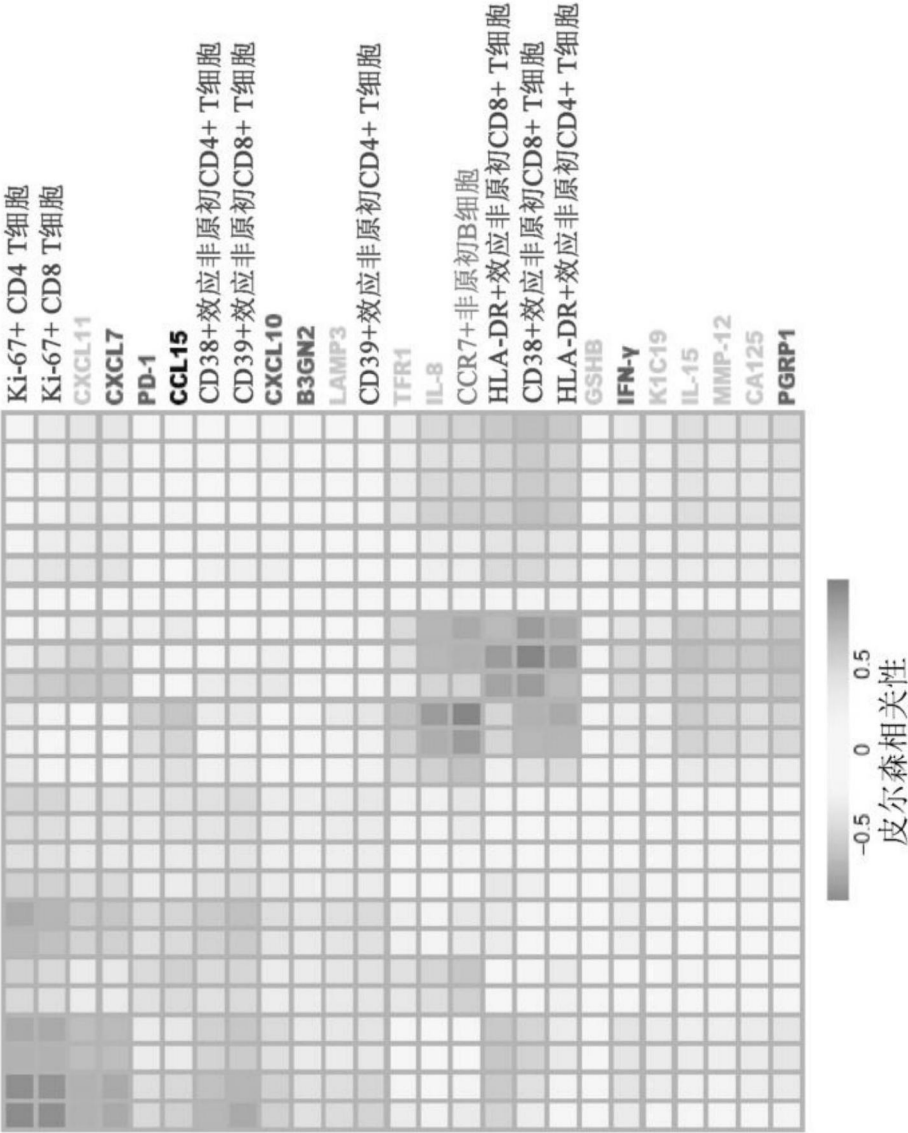


图15H

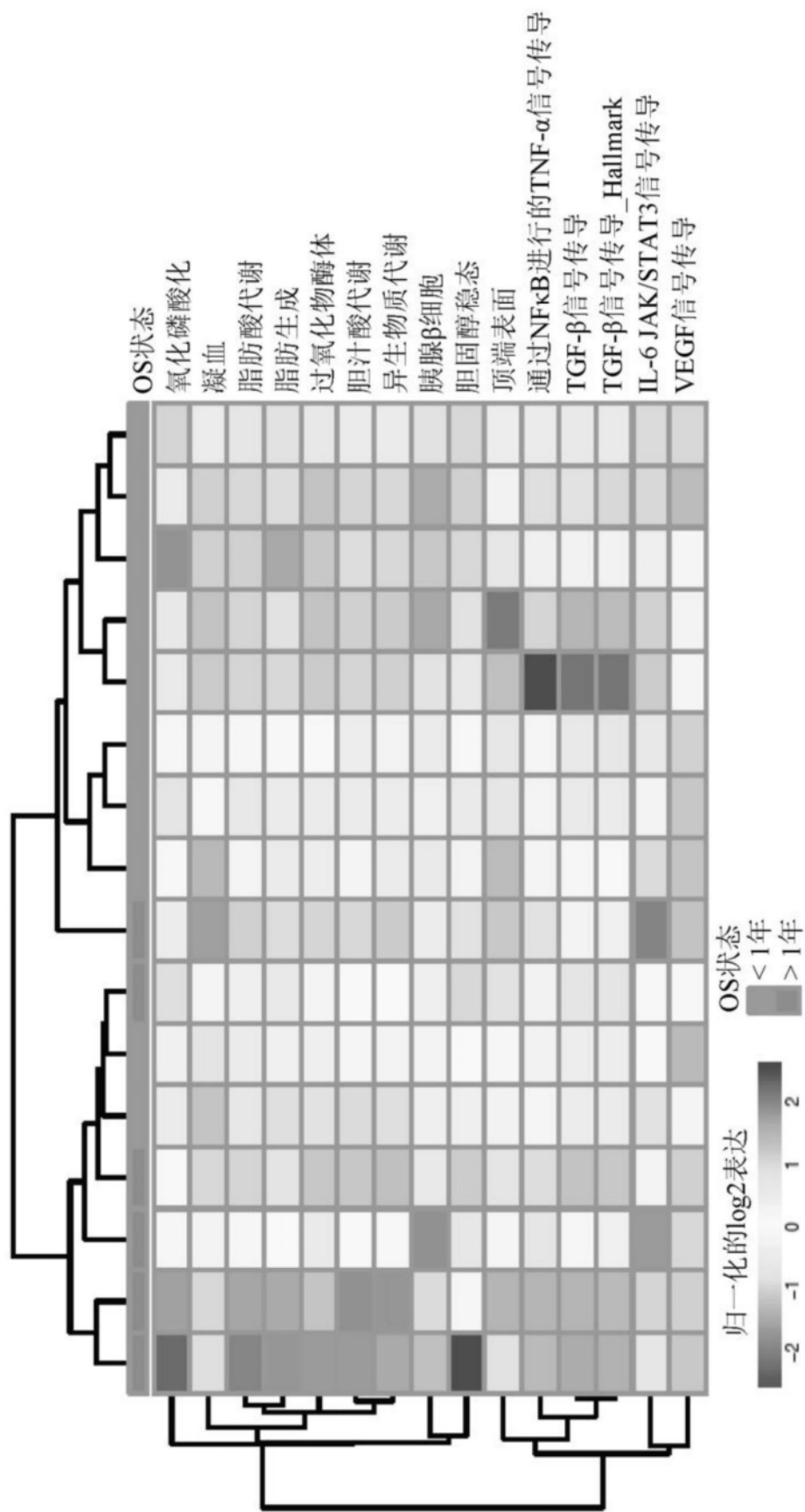


图16A

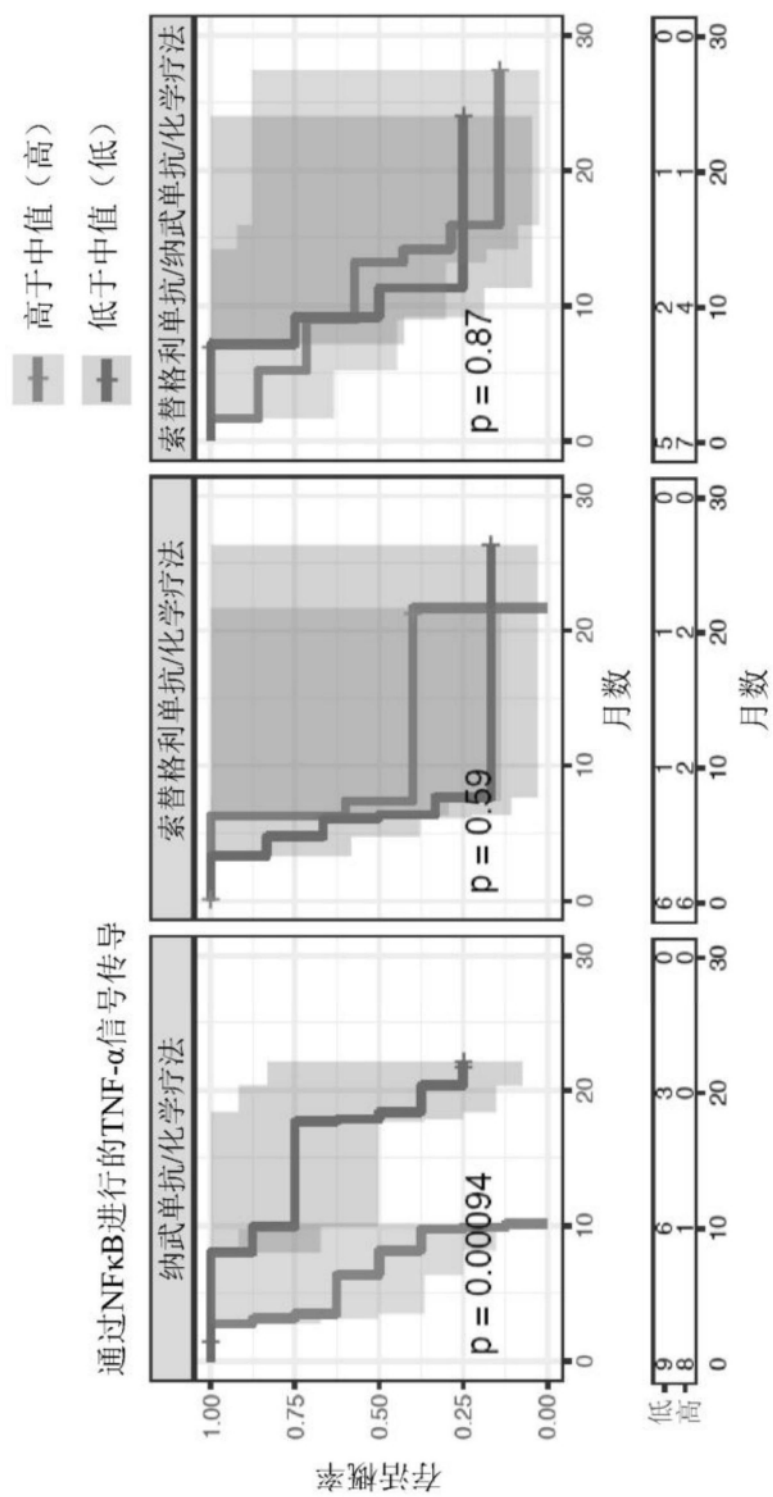


图16B

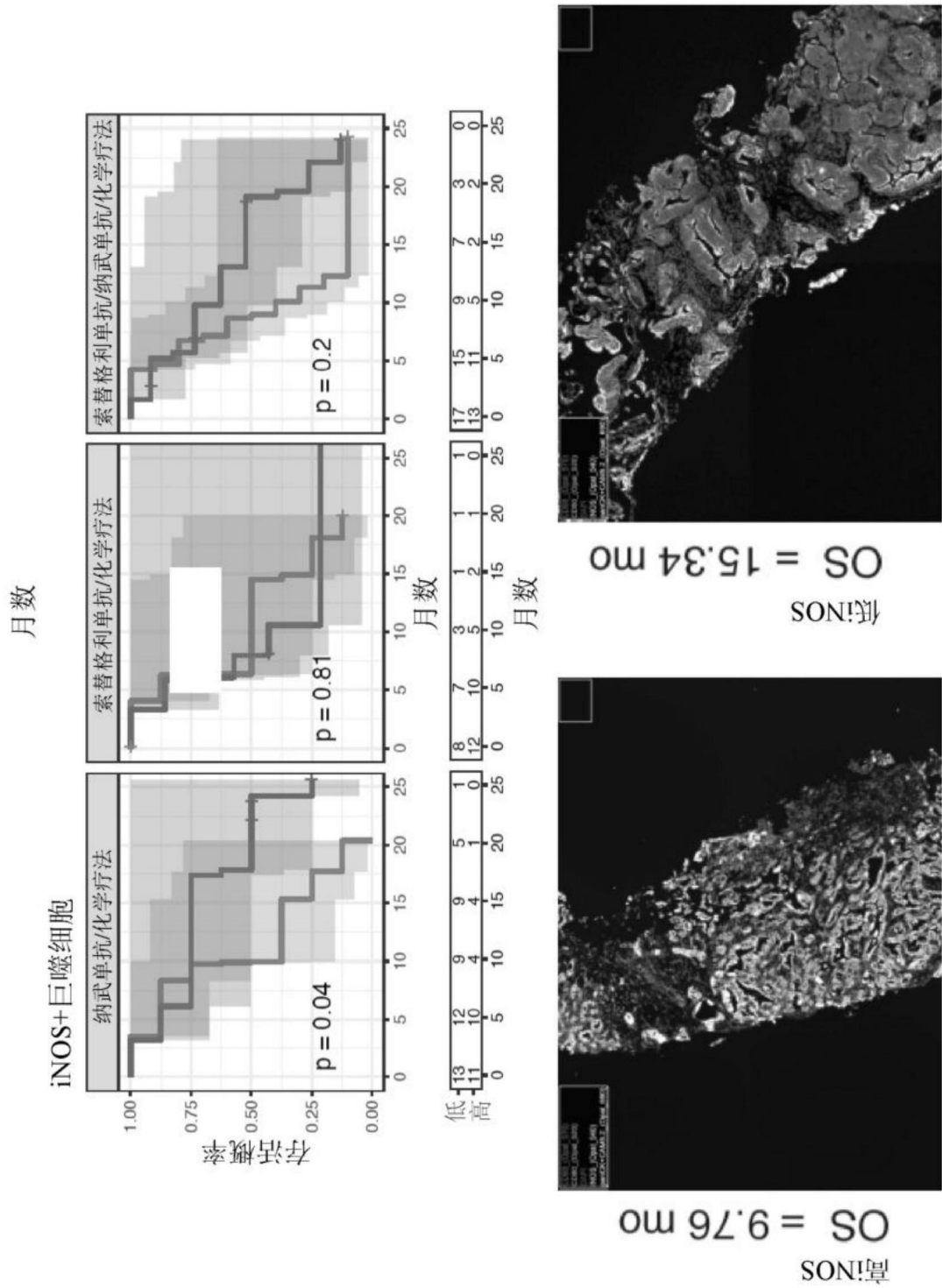


图16C

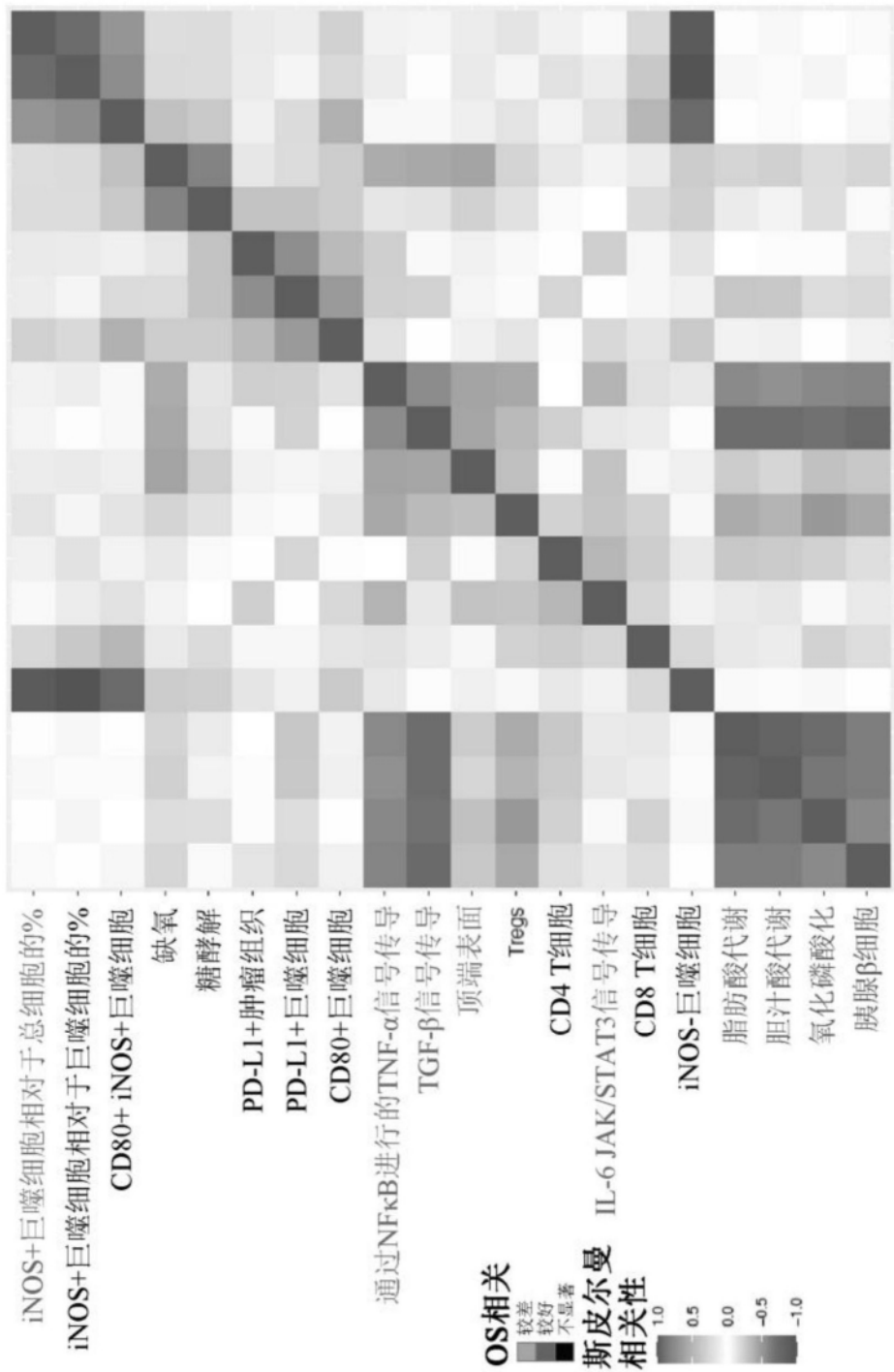


图16D

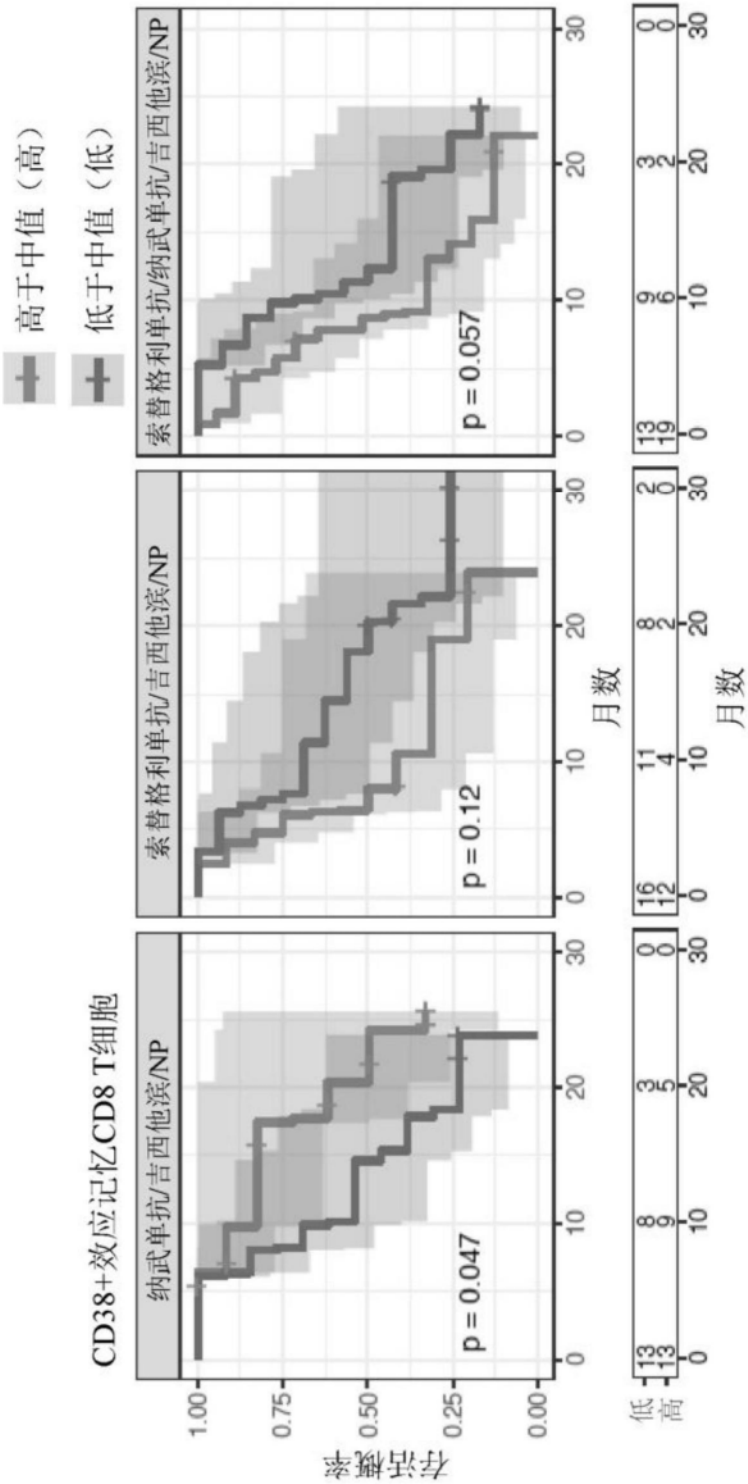


图16E

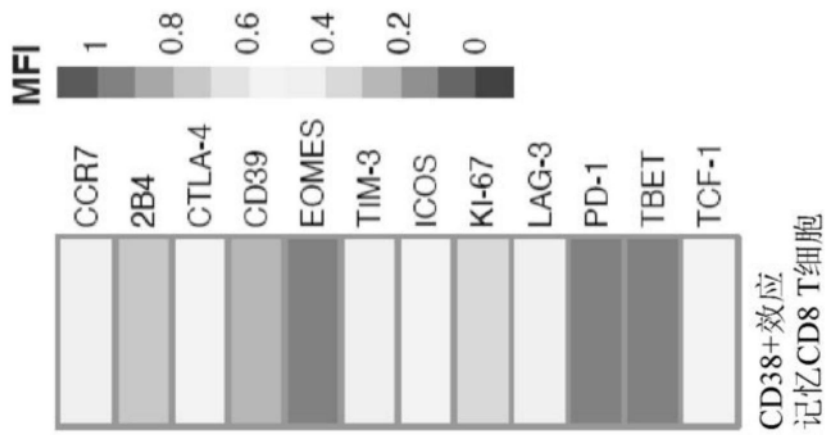


图16F

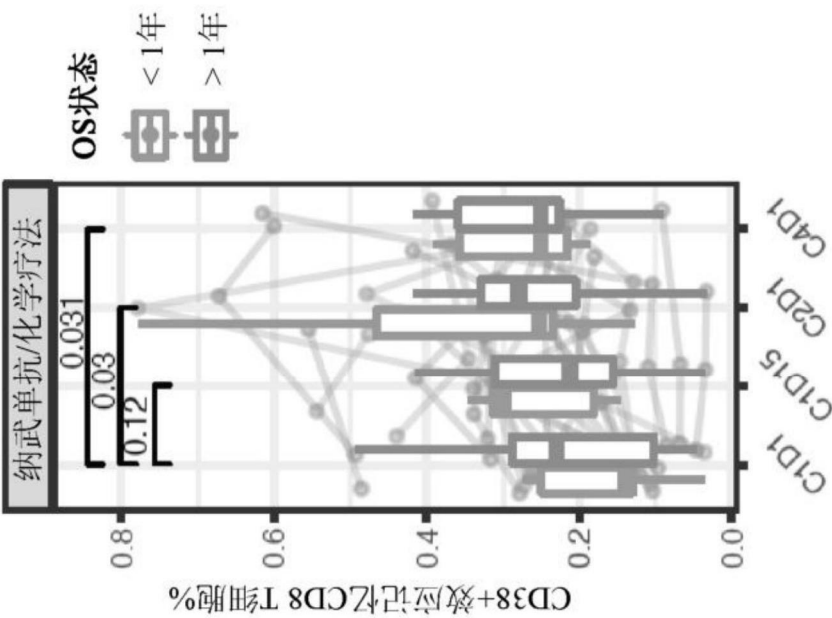


图16G

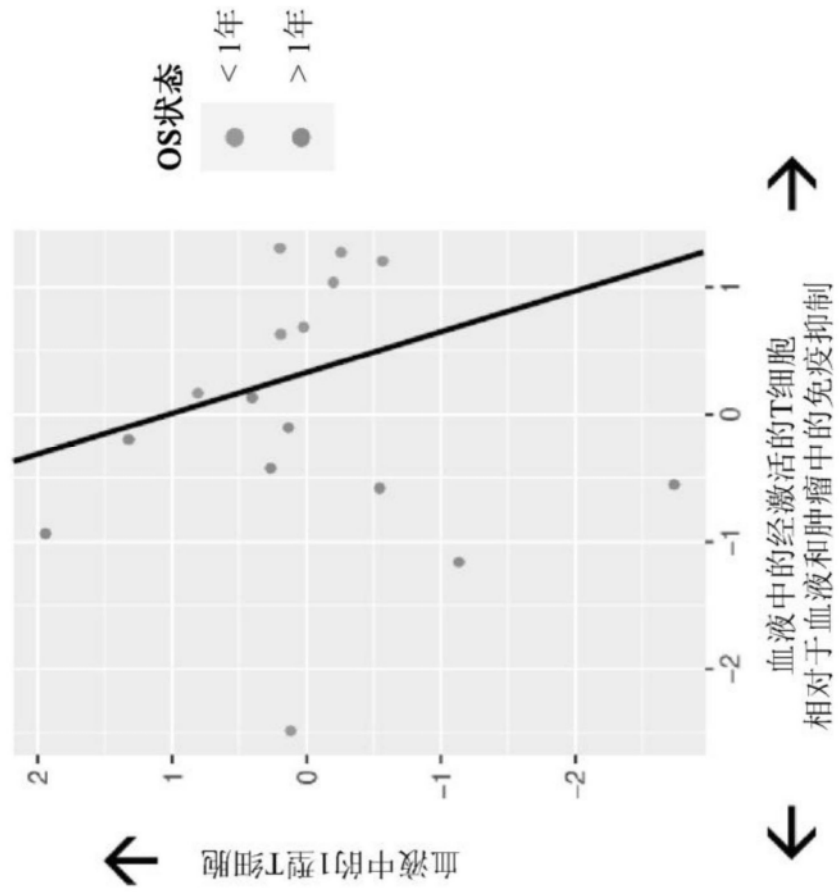


图16H

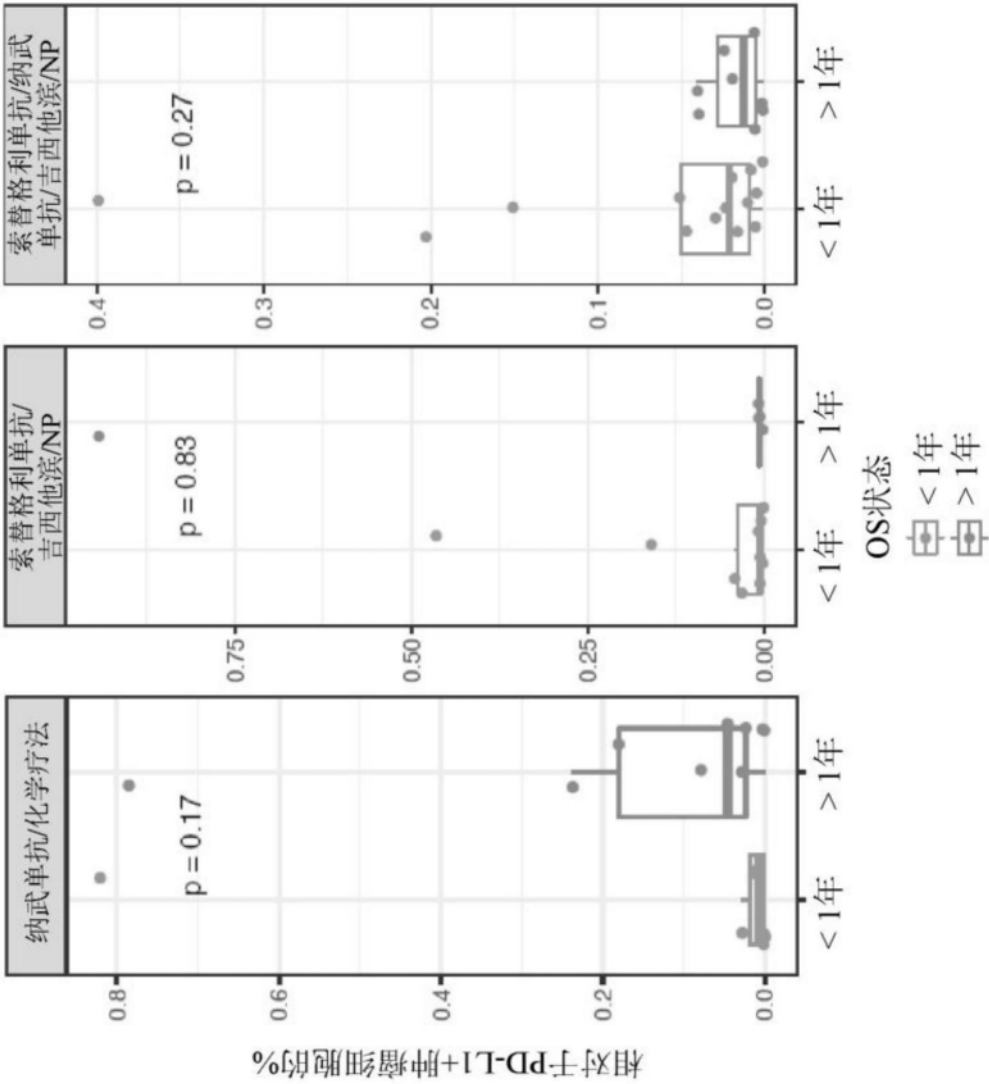


图17

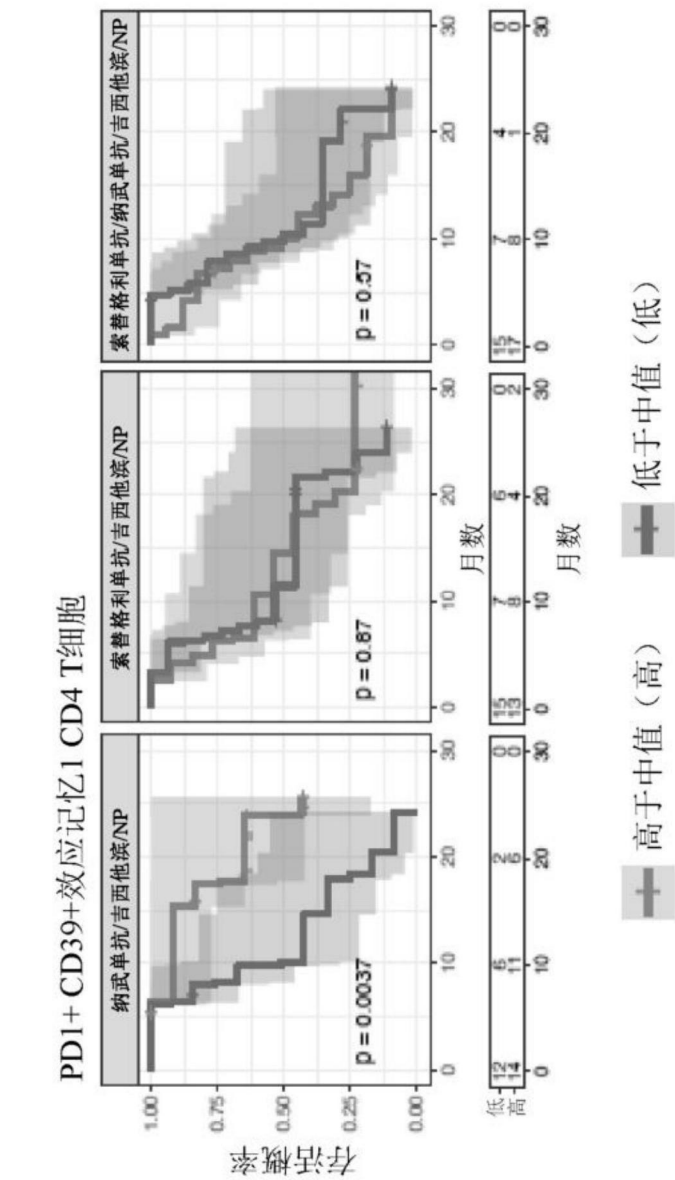


图18A

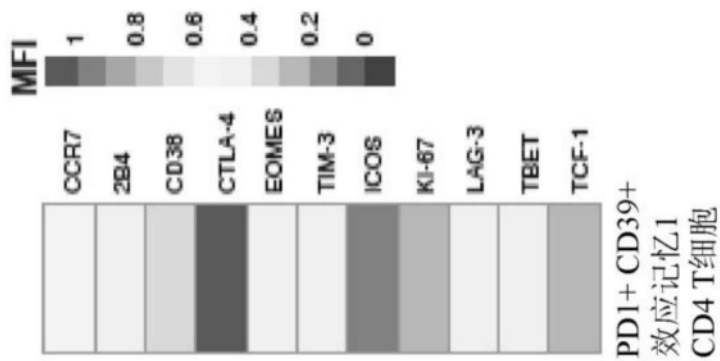


图18B

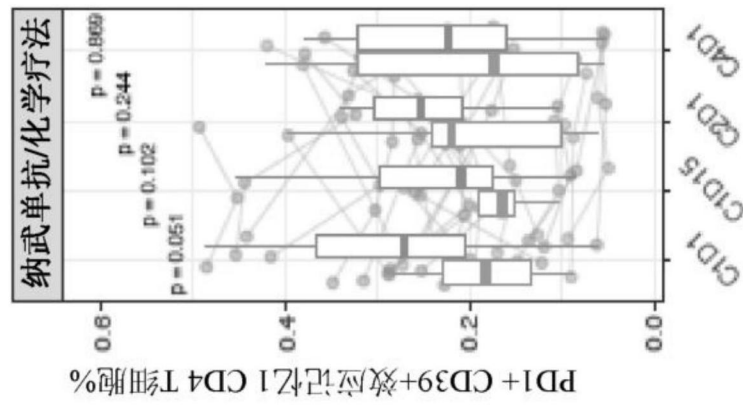


图18C

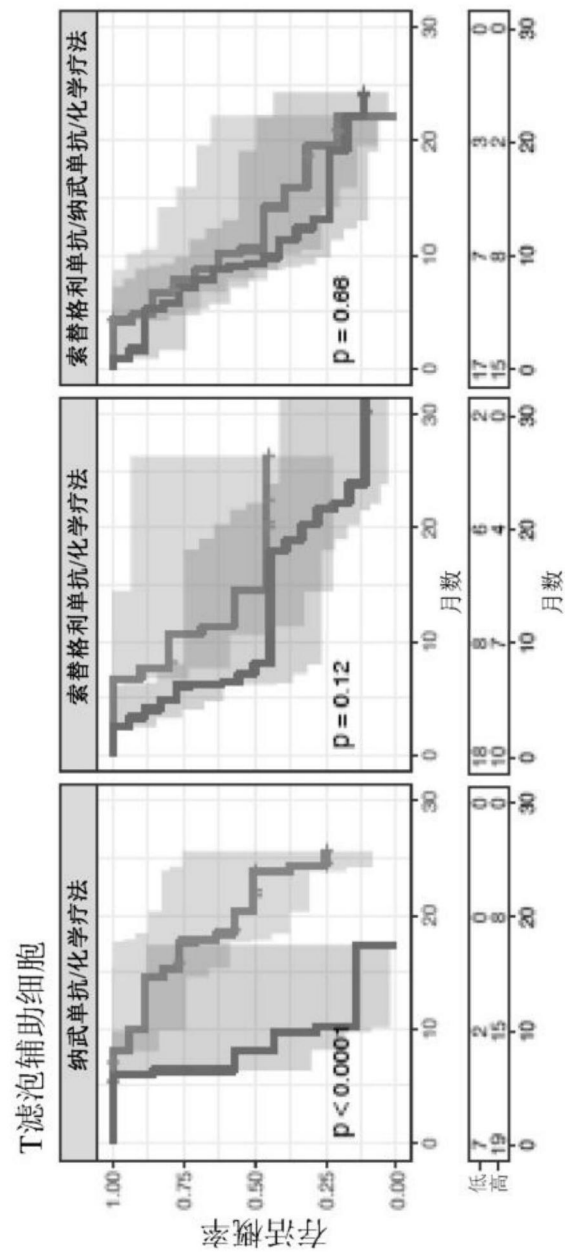


图18D

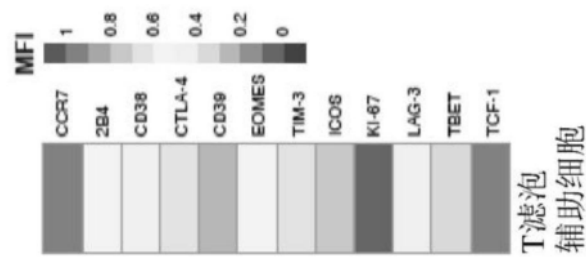


图18E

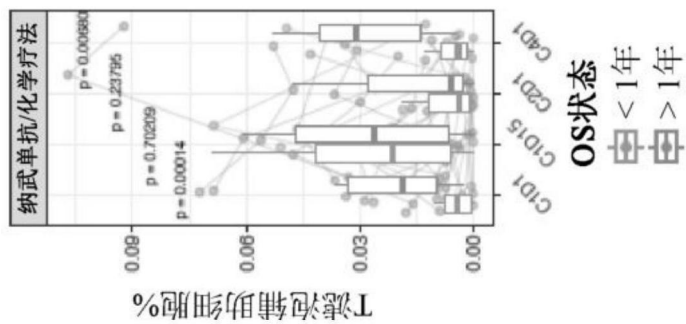


图18F

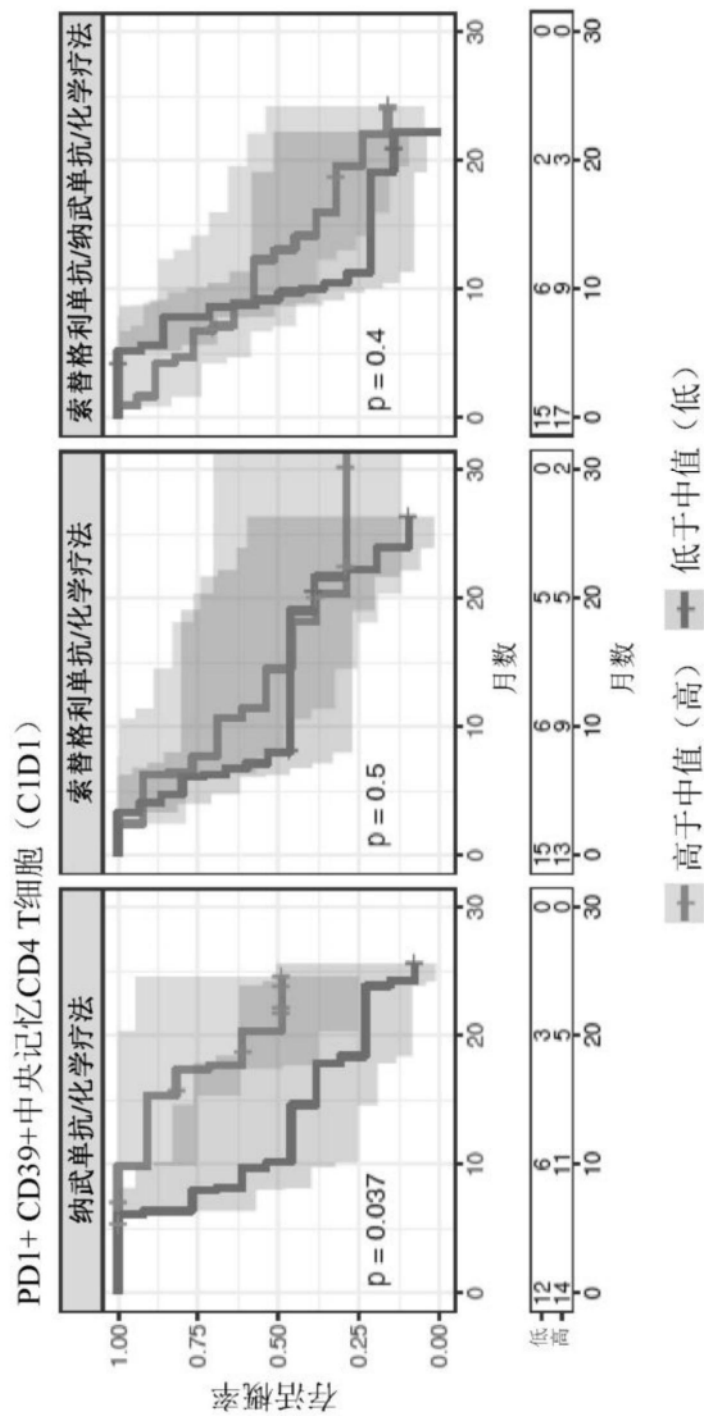


图19A

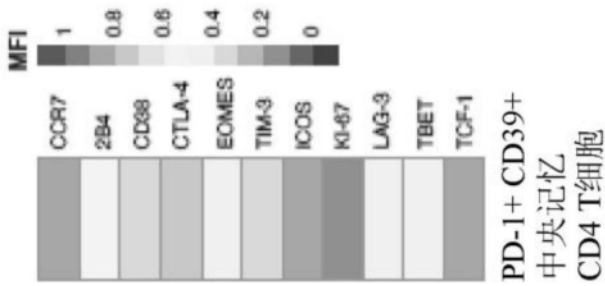


图19B

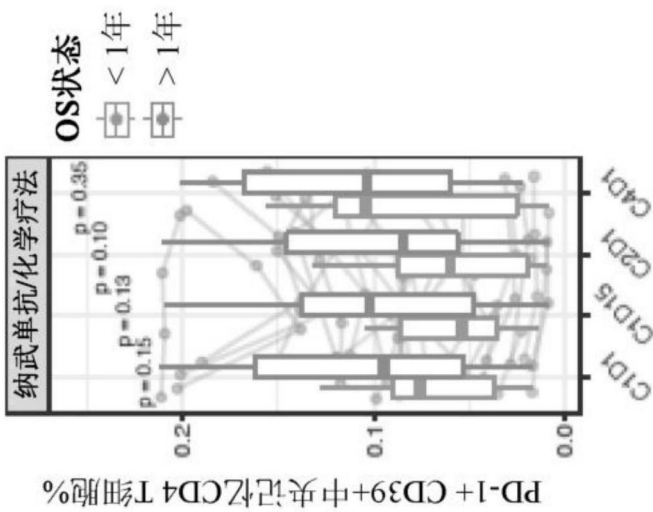


图19C

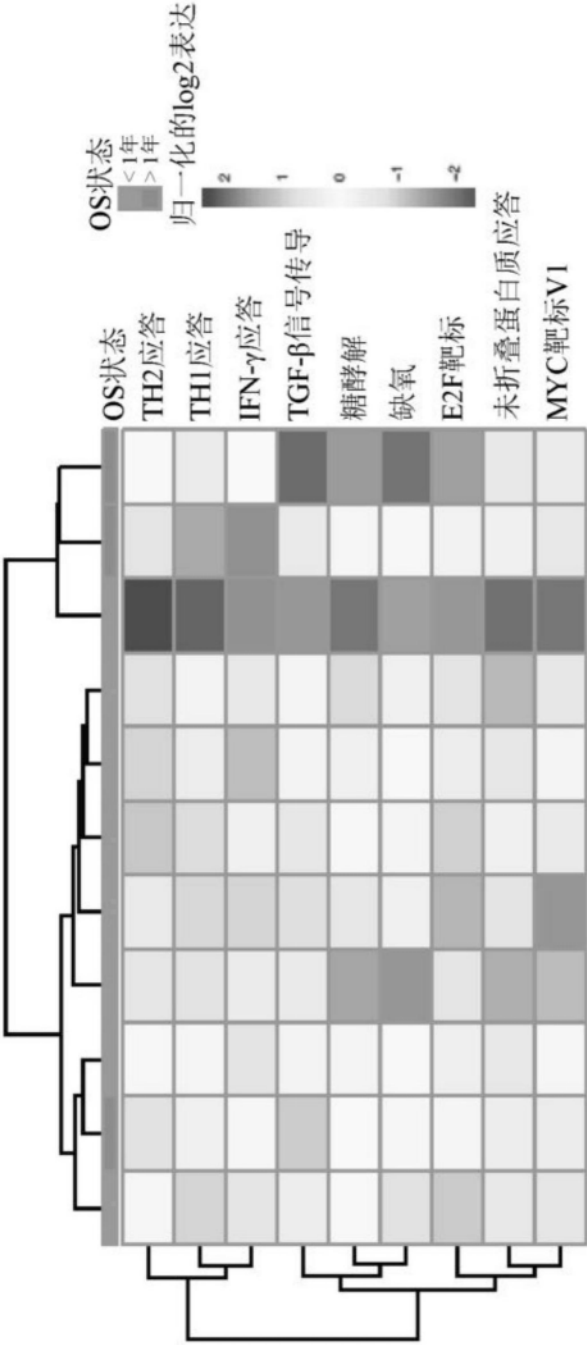


图20A

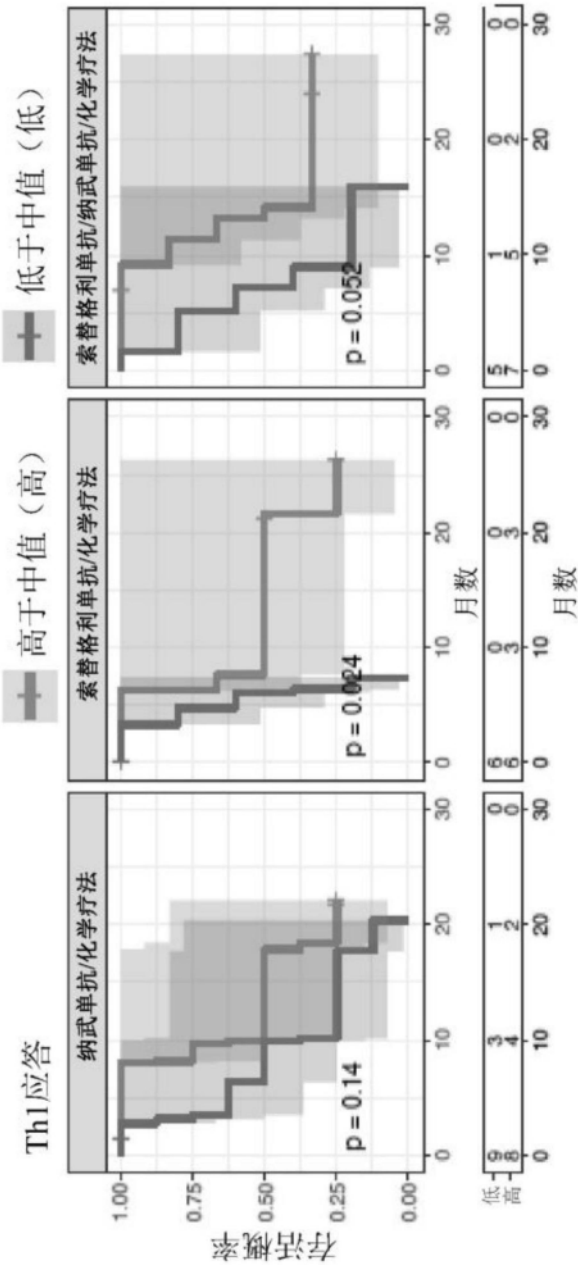


图20B

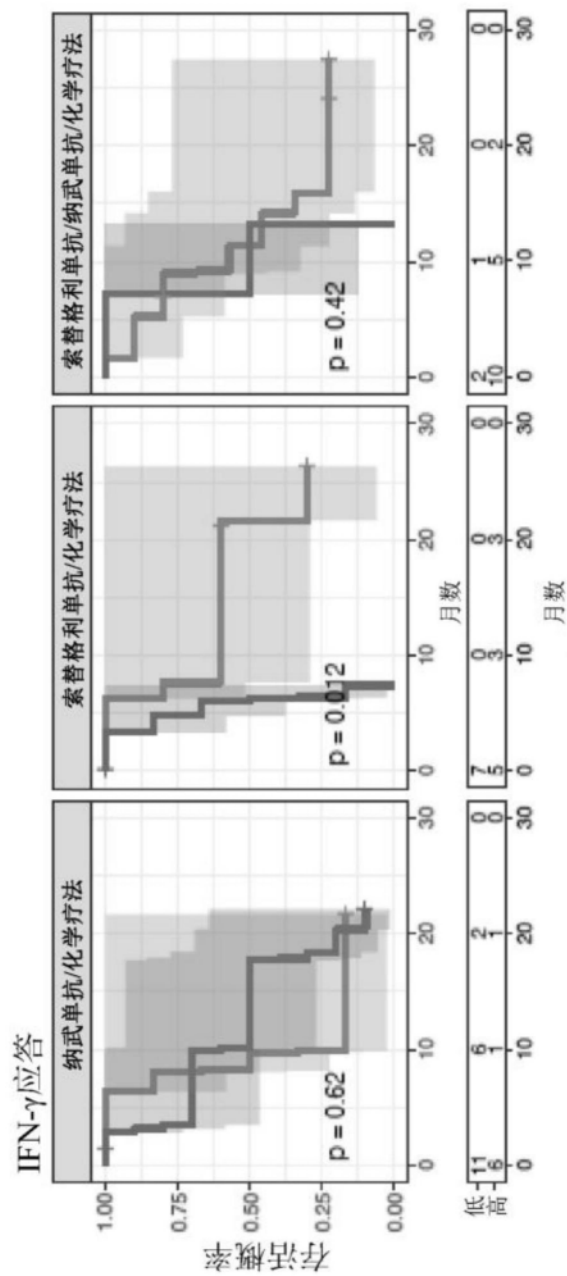


图20C

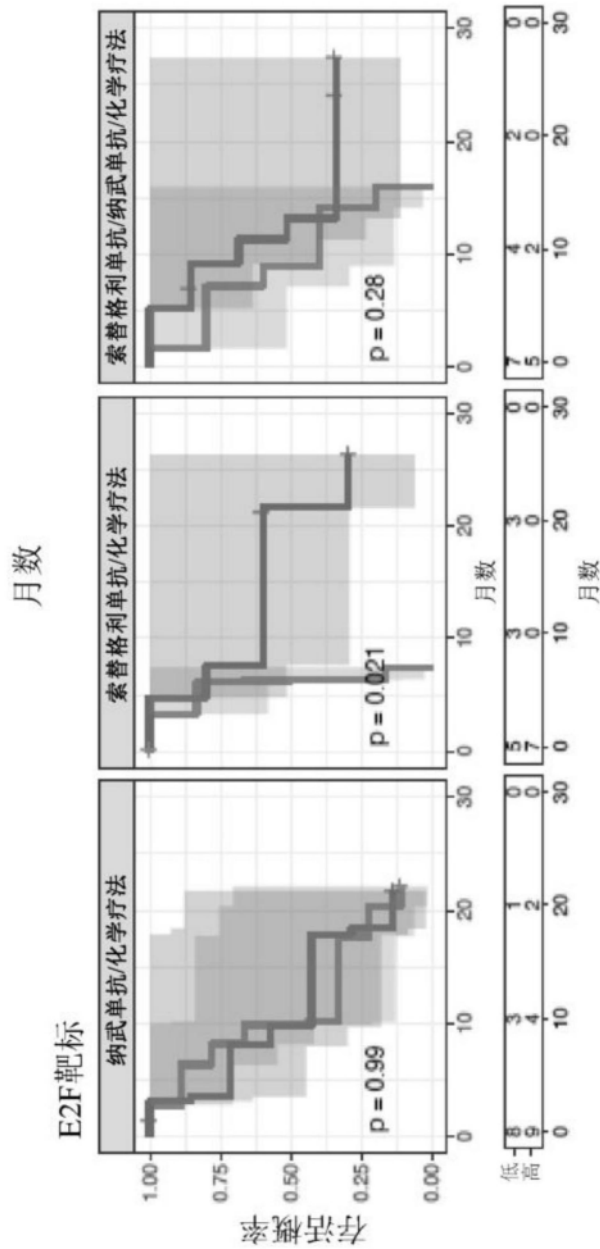


图20D

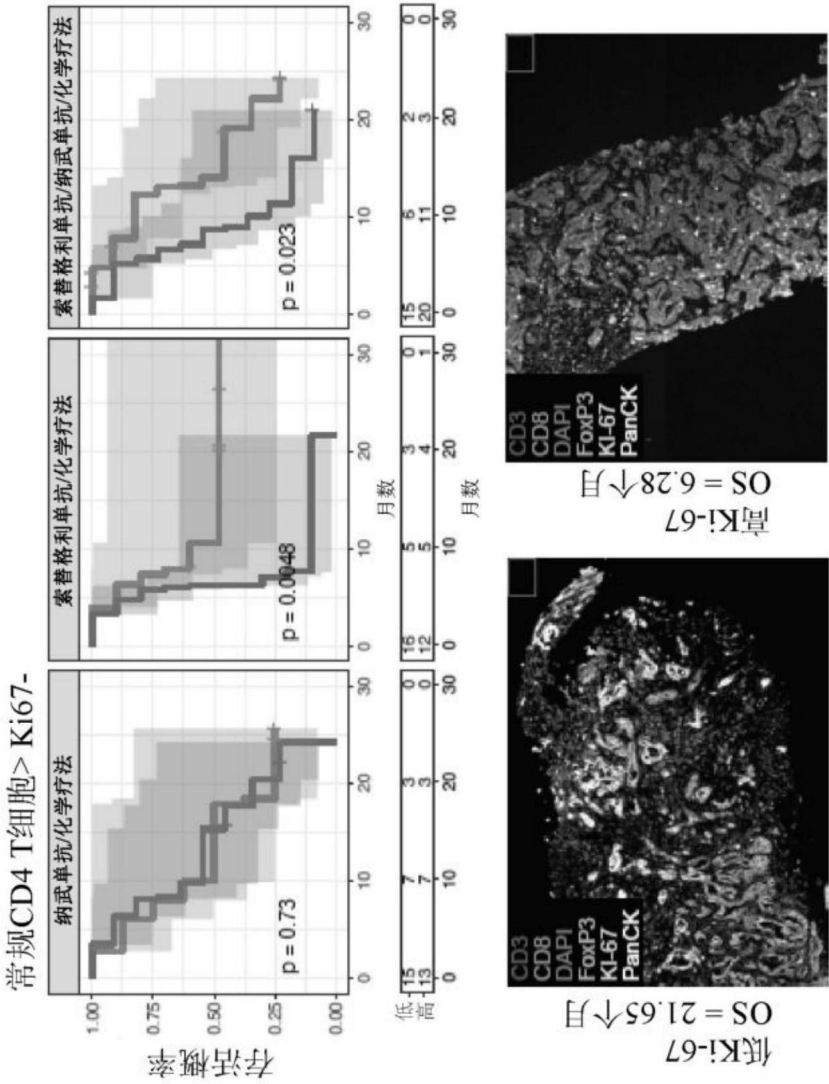


图20E

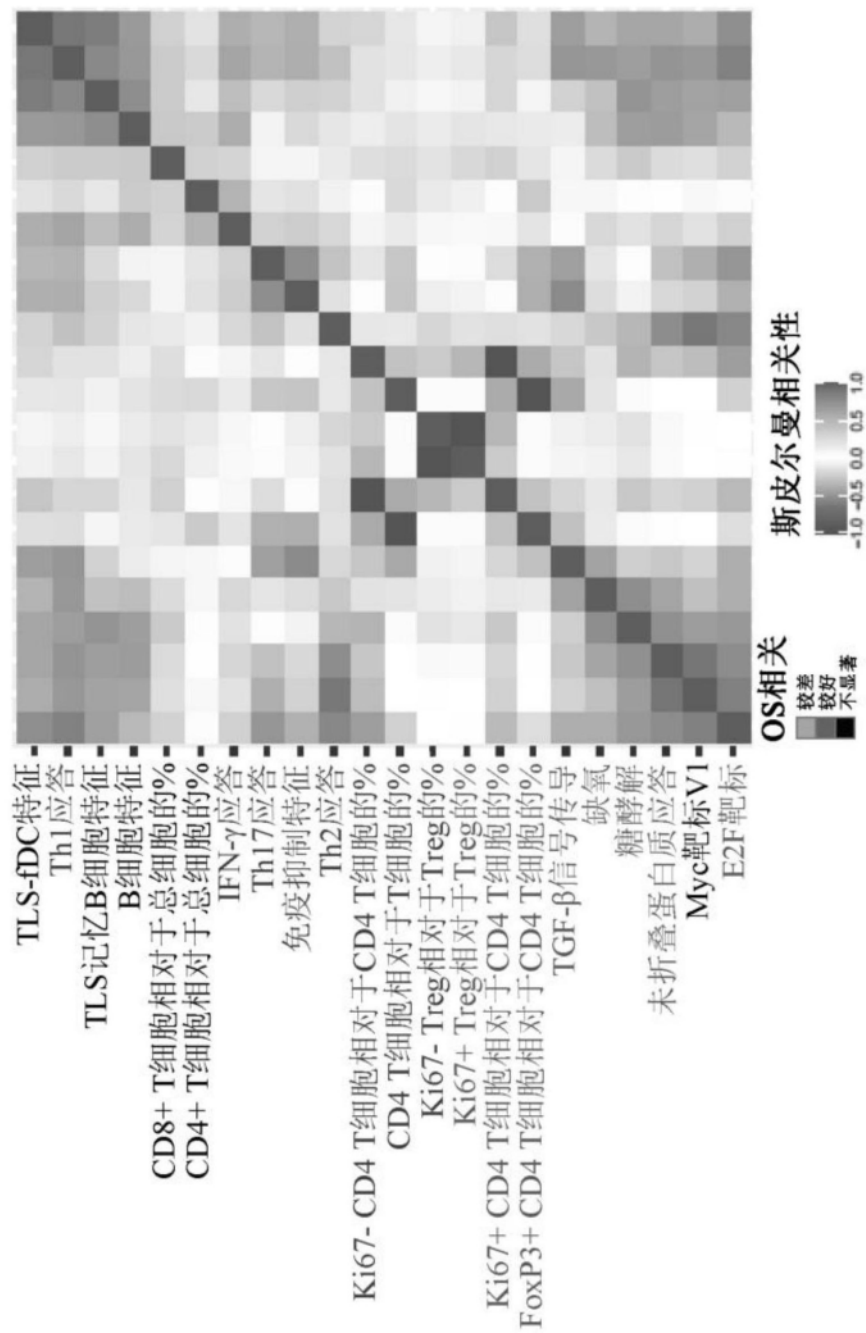


图20F

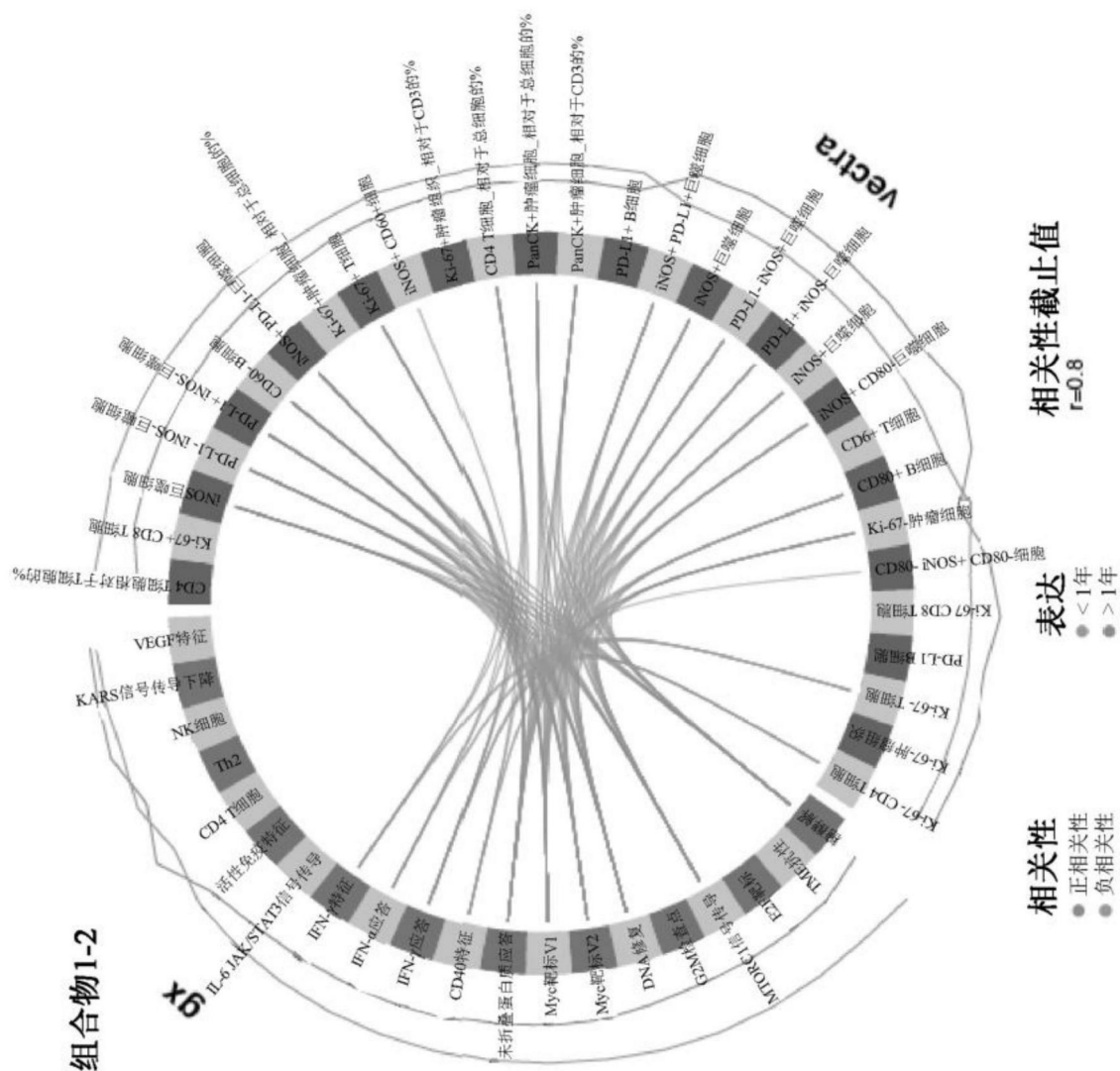


图20G

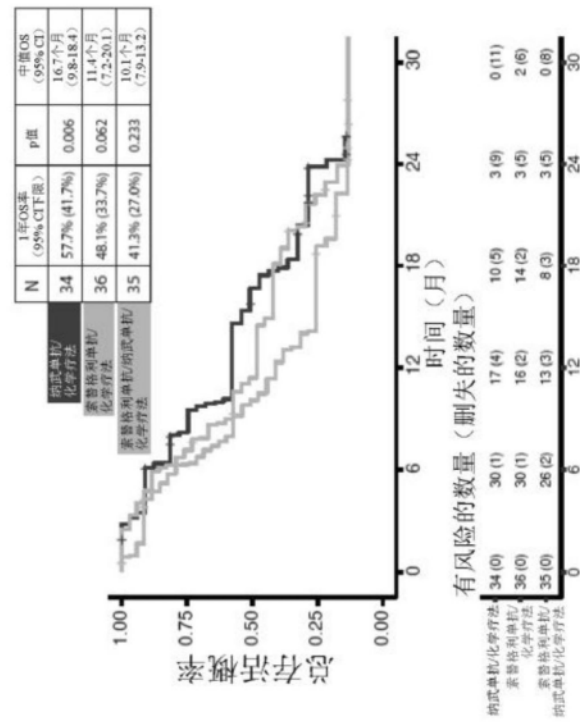


图21A

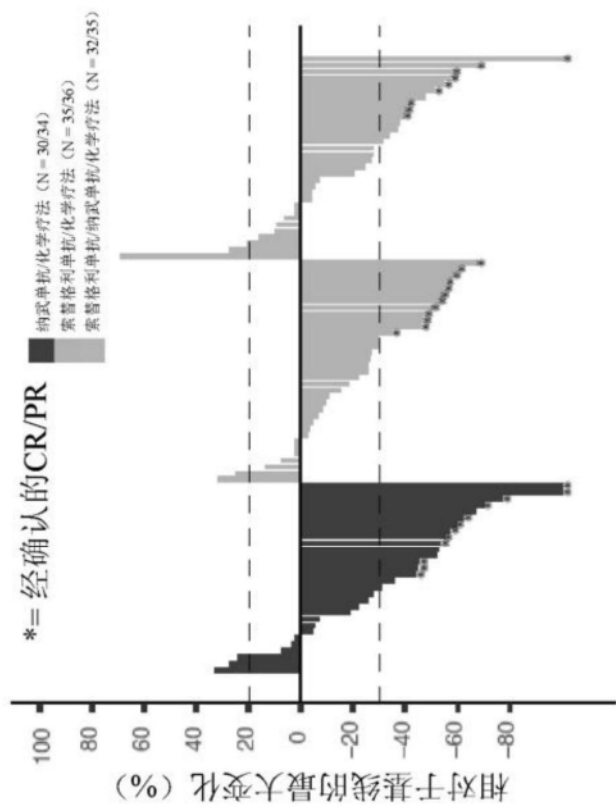


图21B

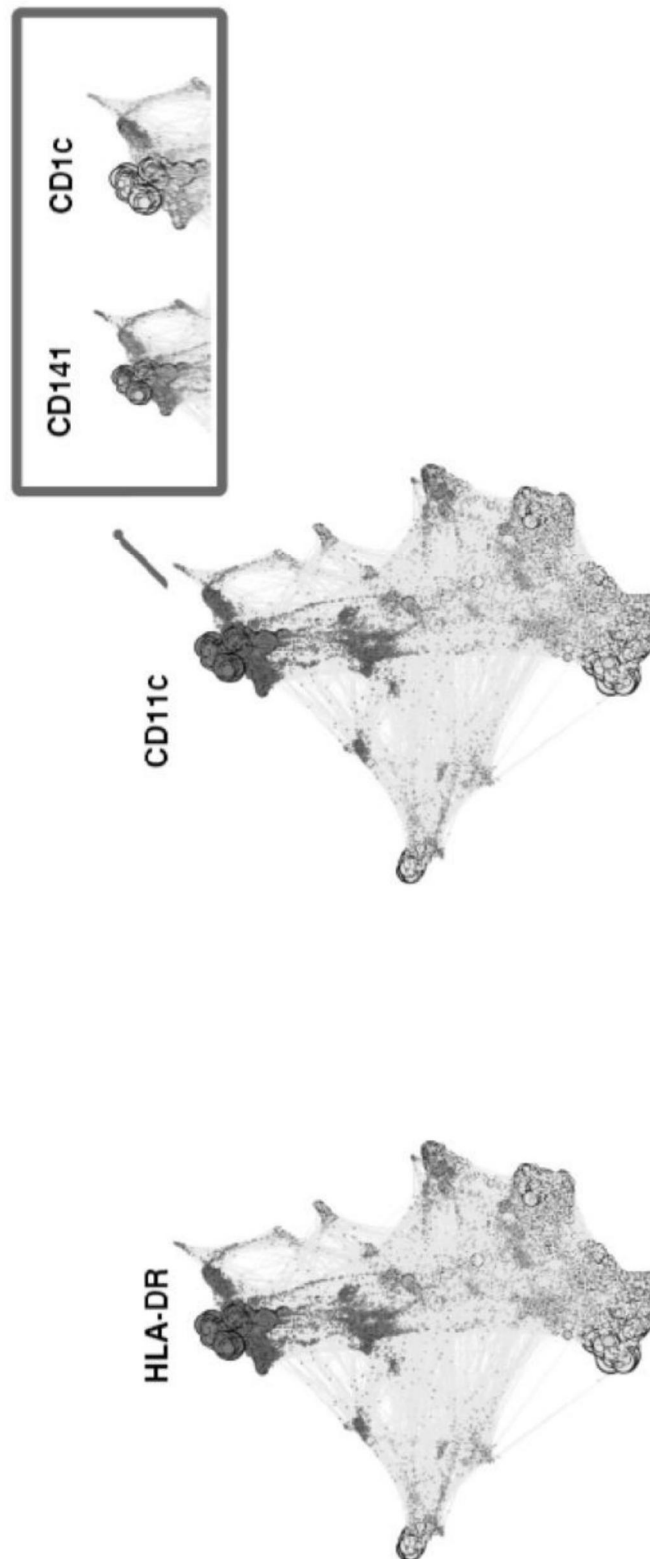


图22A

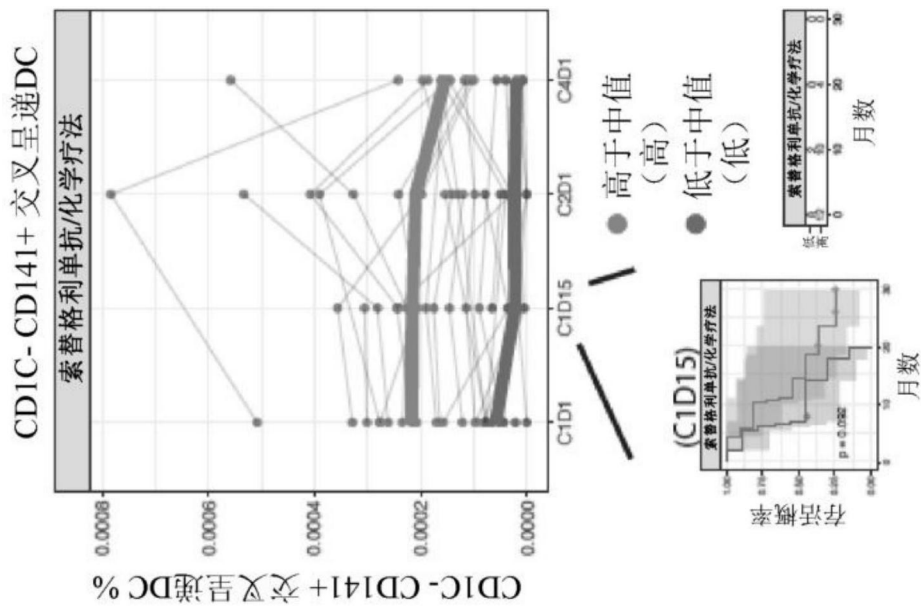


图22D

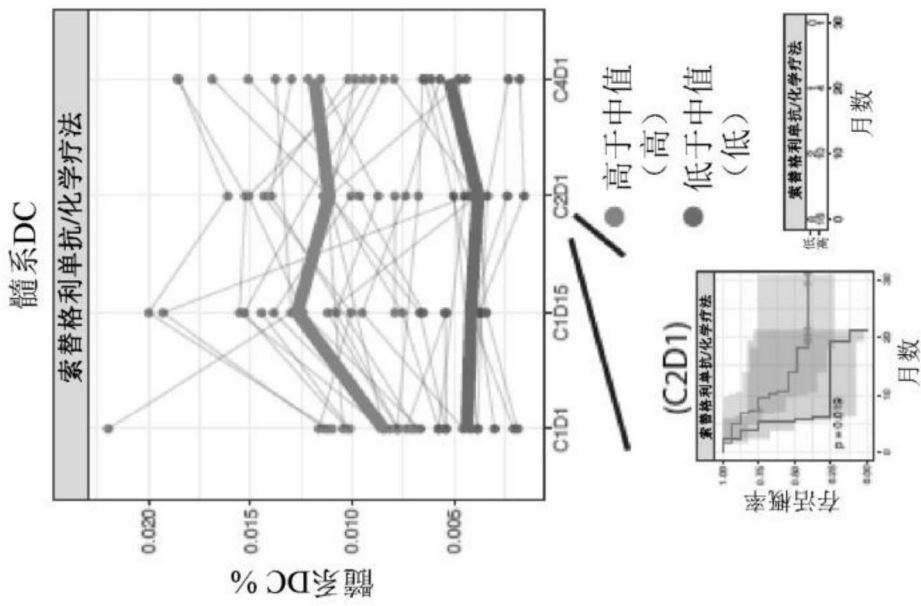


图22E

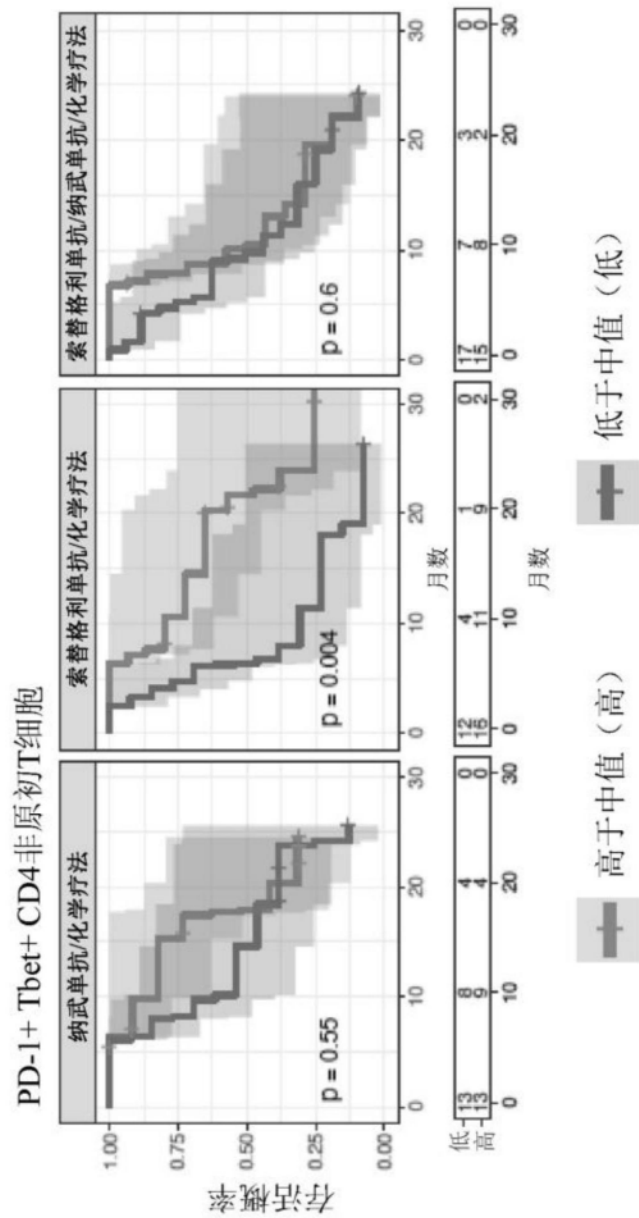


图22F

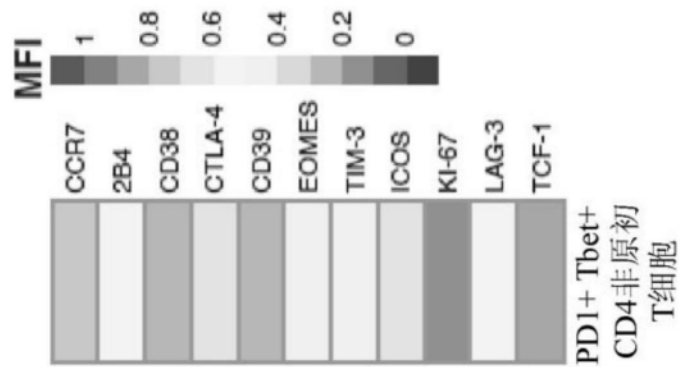


图22G

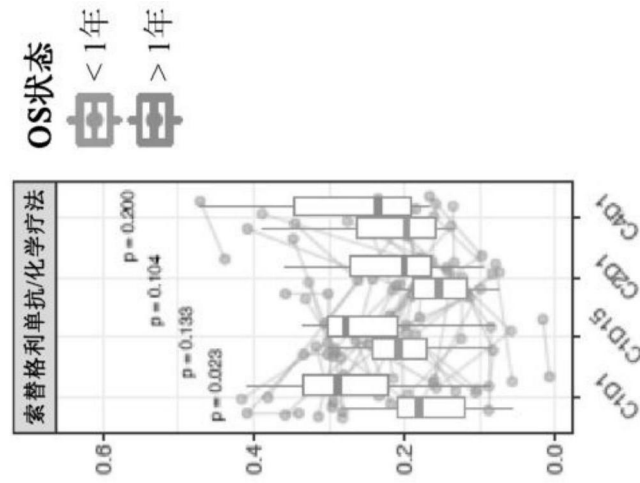


图22H

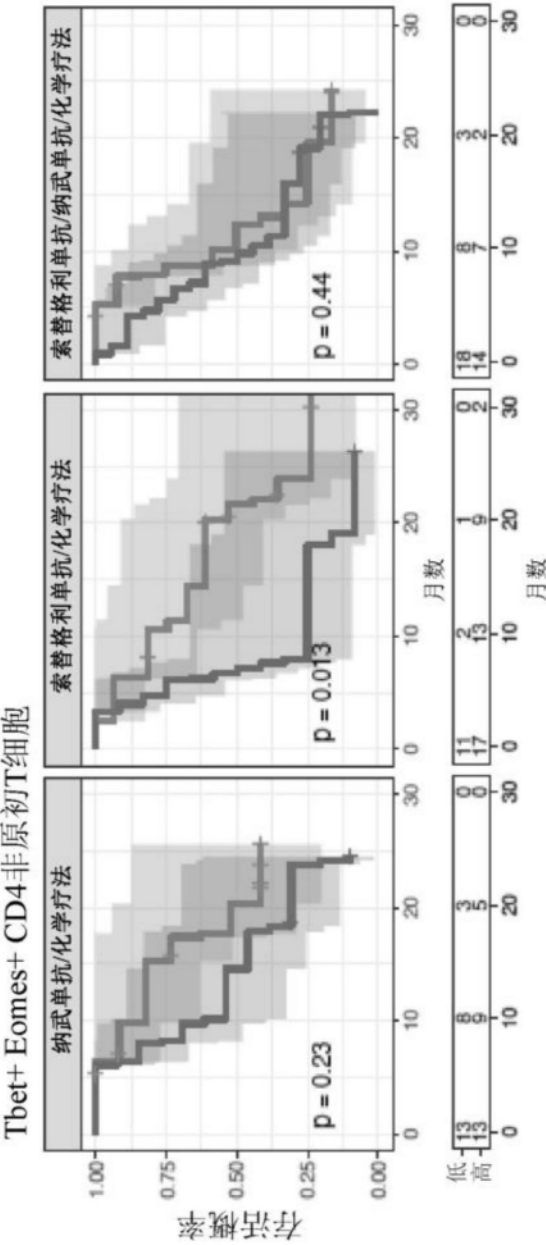


图22I

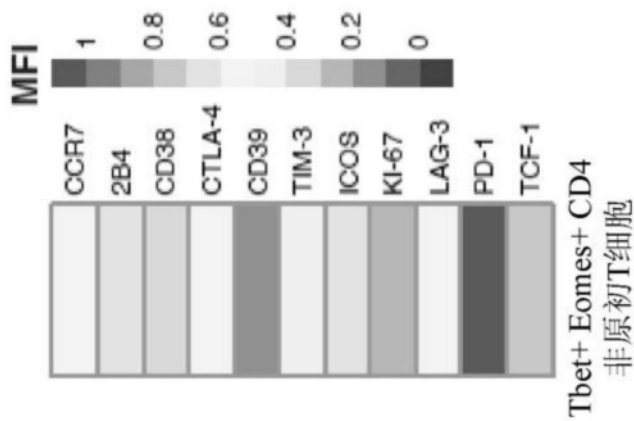


图22J

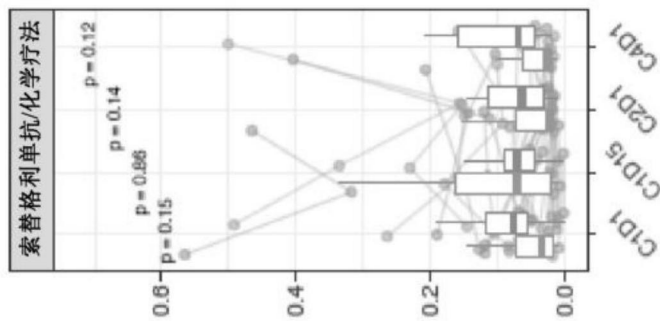


图22K

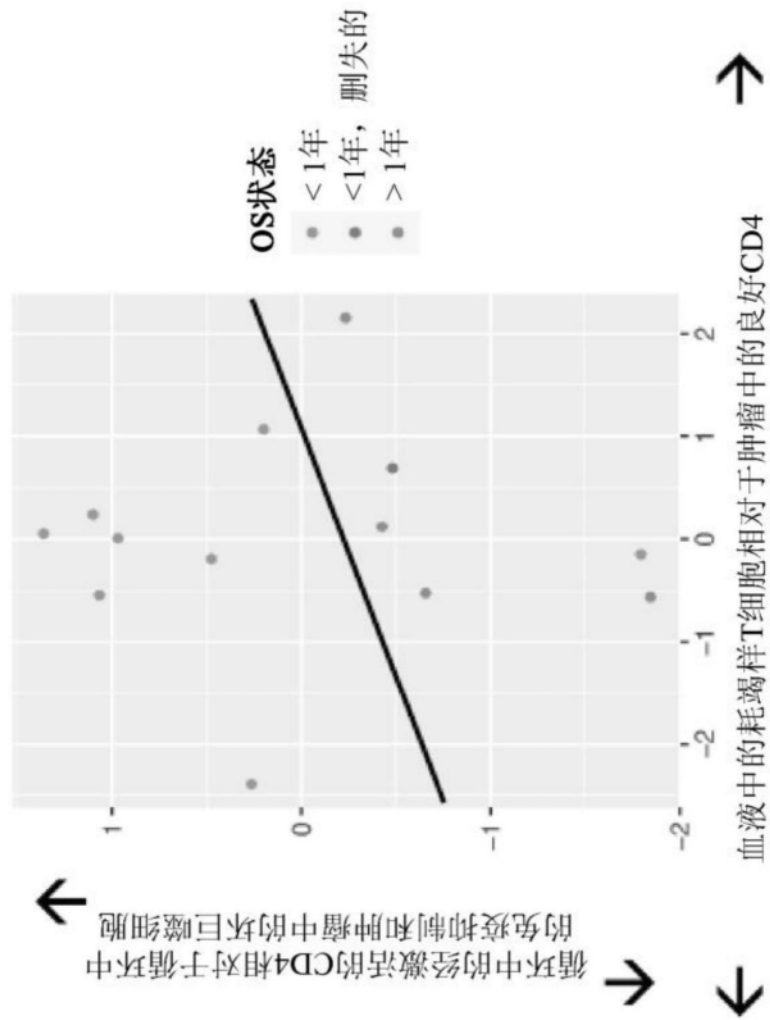


图22L

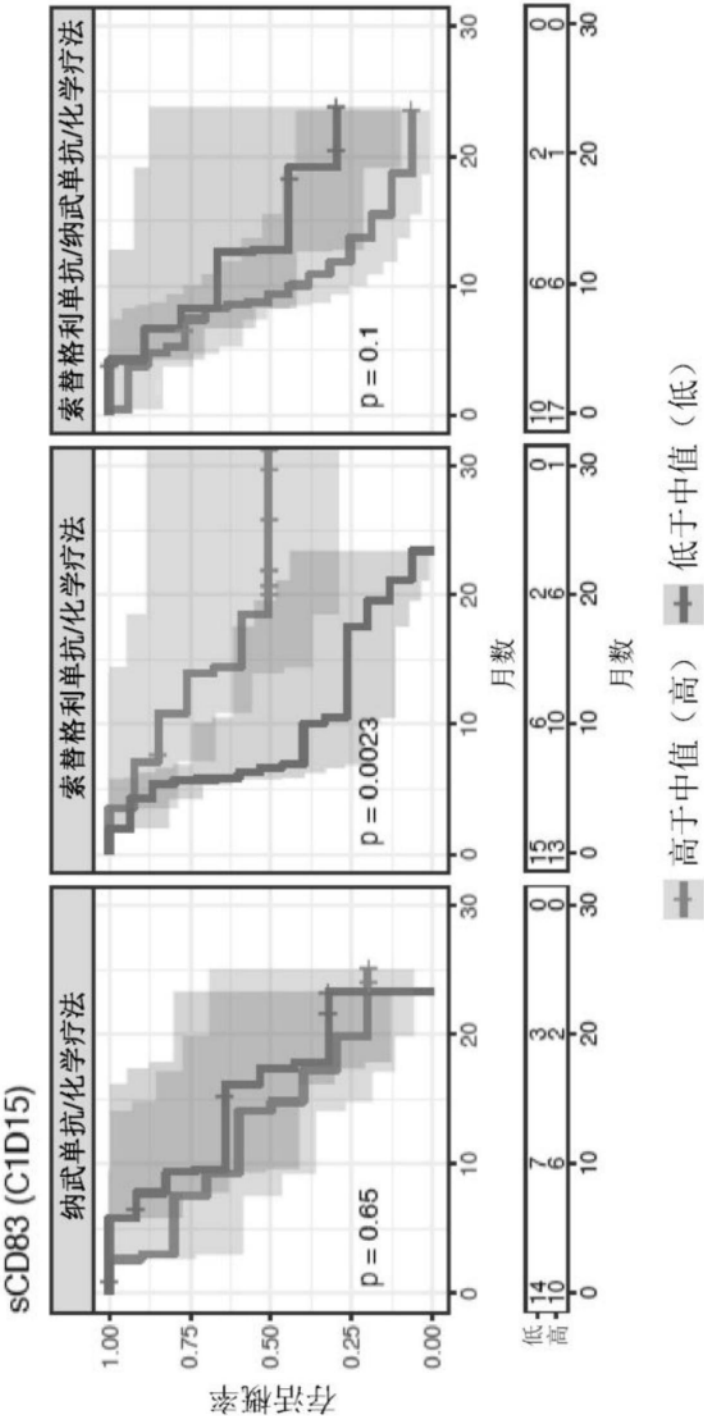


图23A

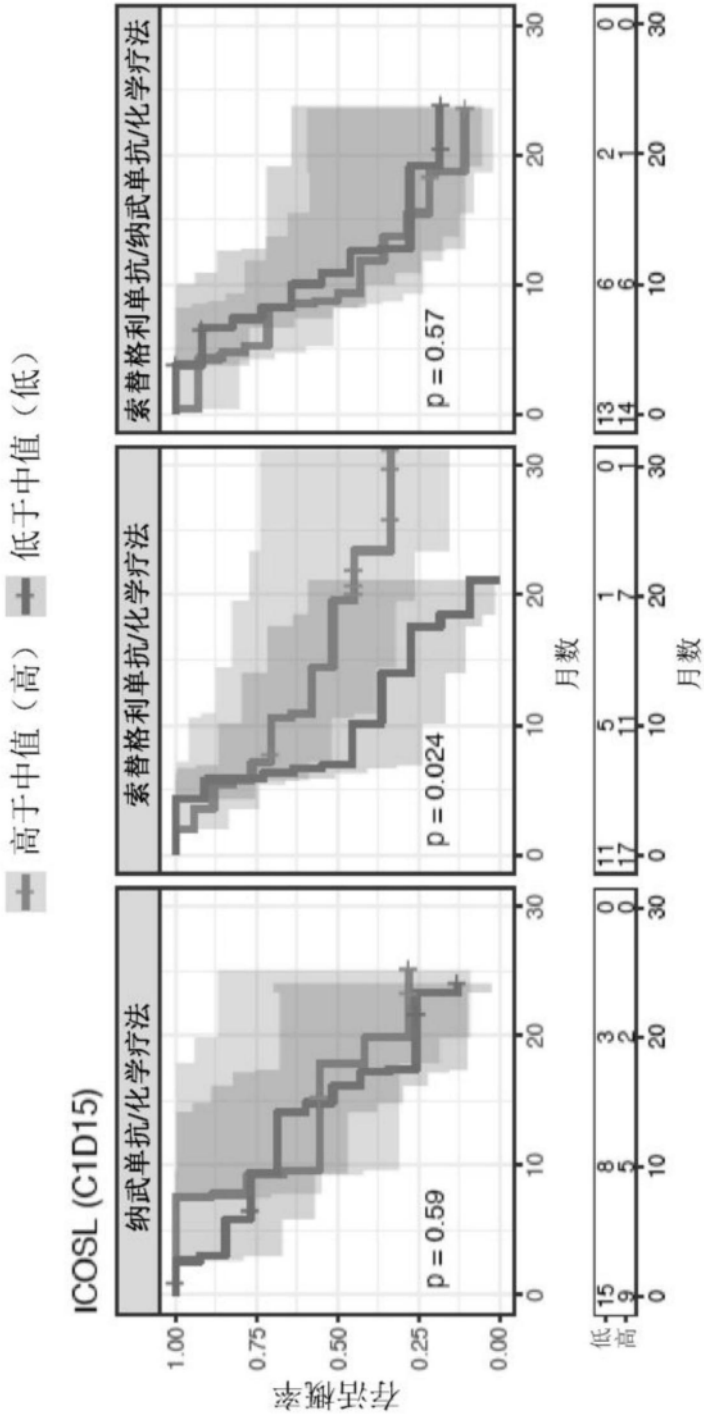


图23B

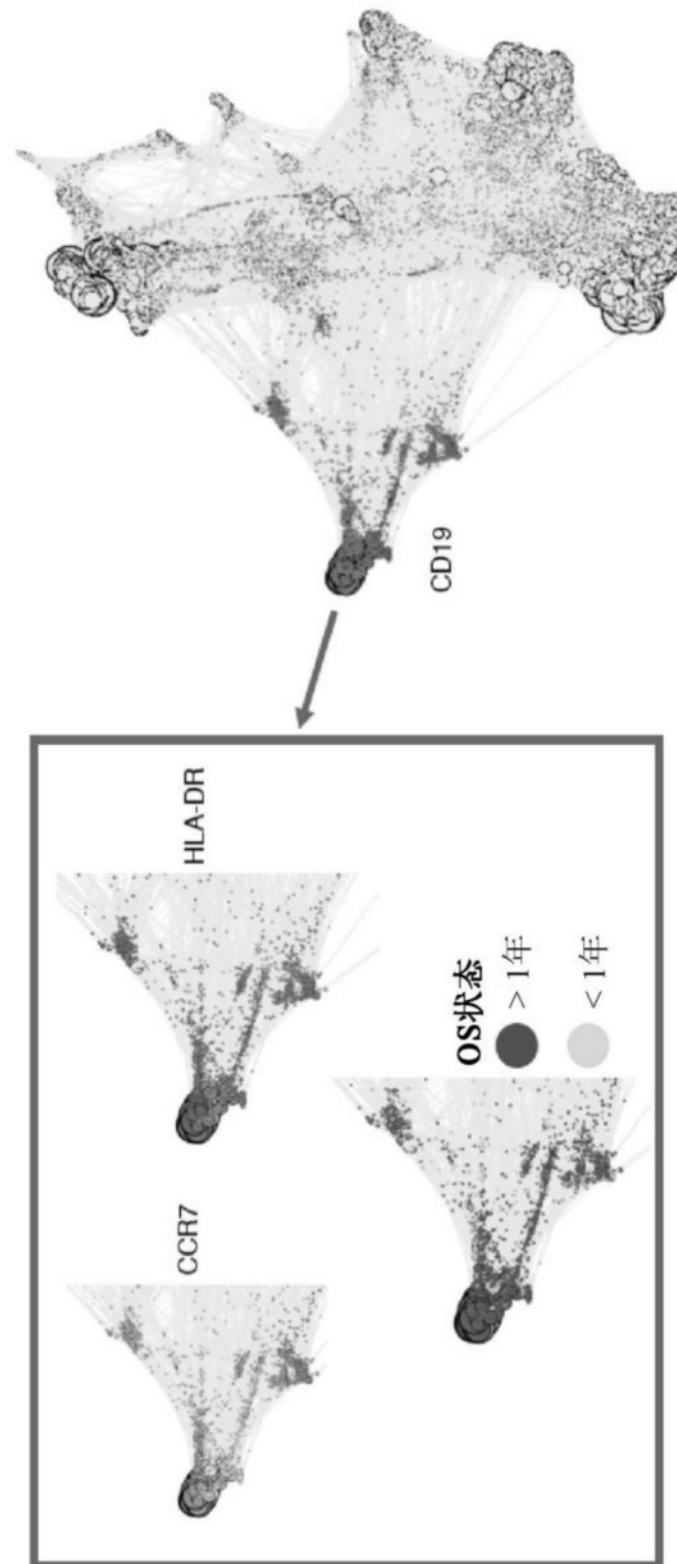


图24A

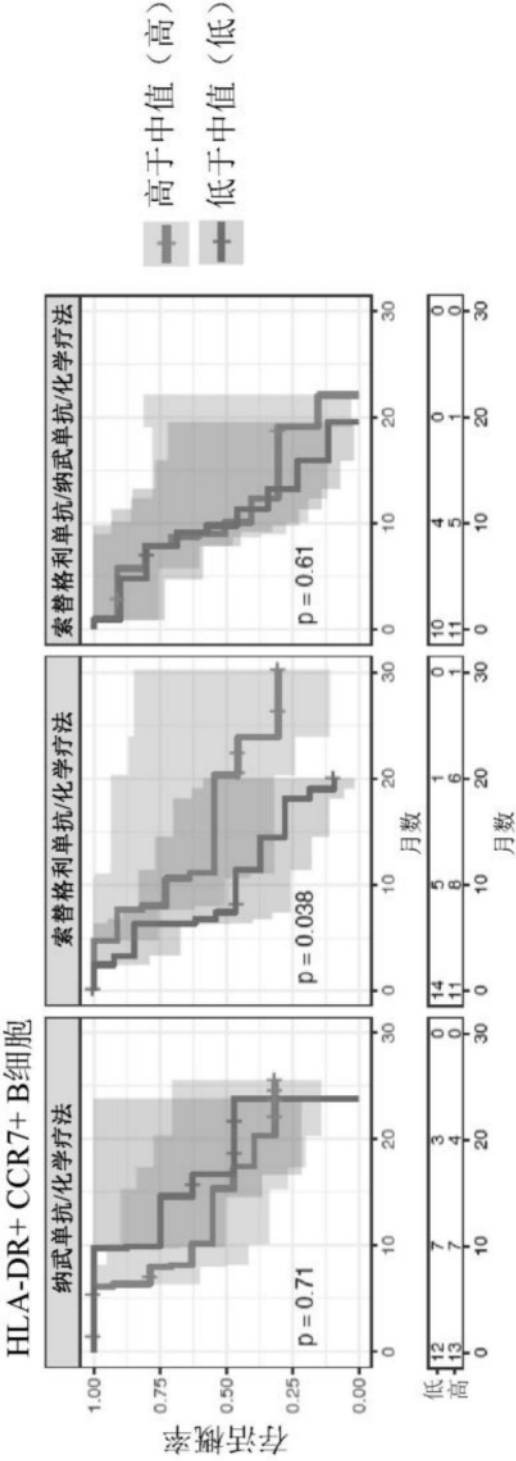


图24B

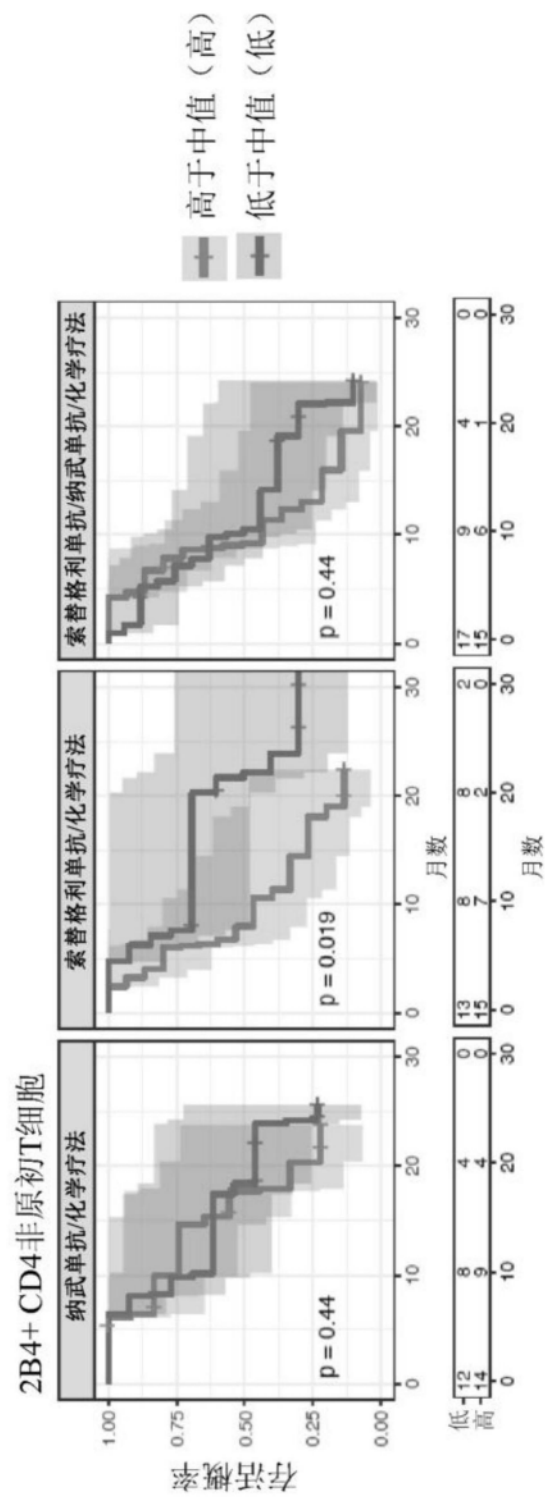


图24C

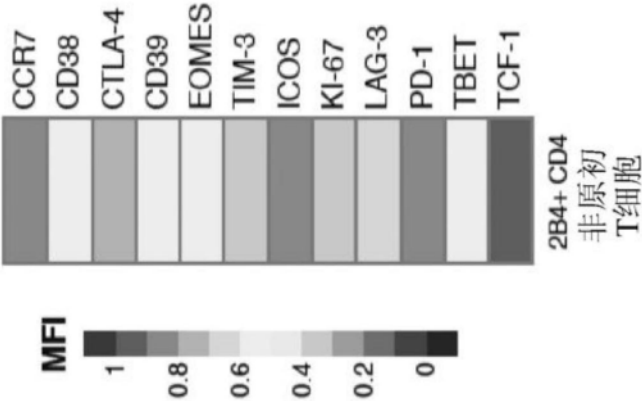


图24D

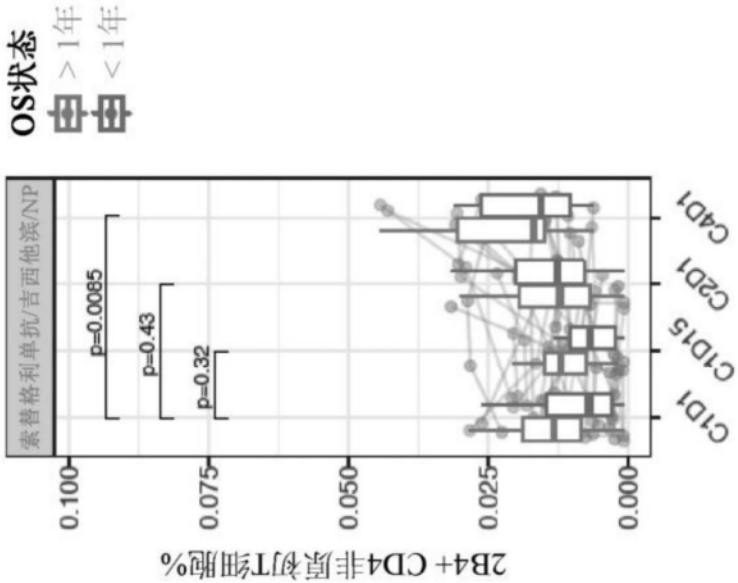


图24E

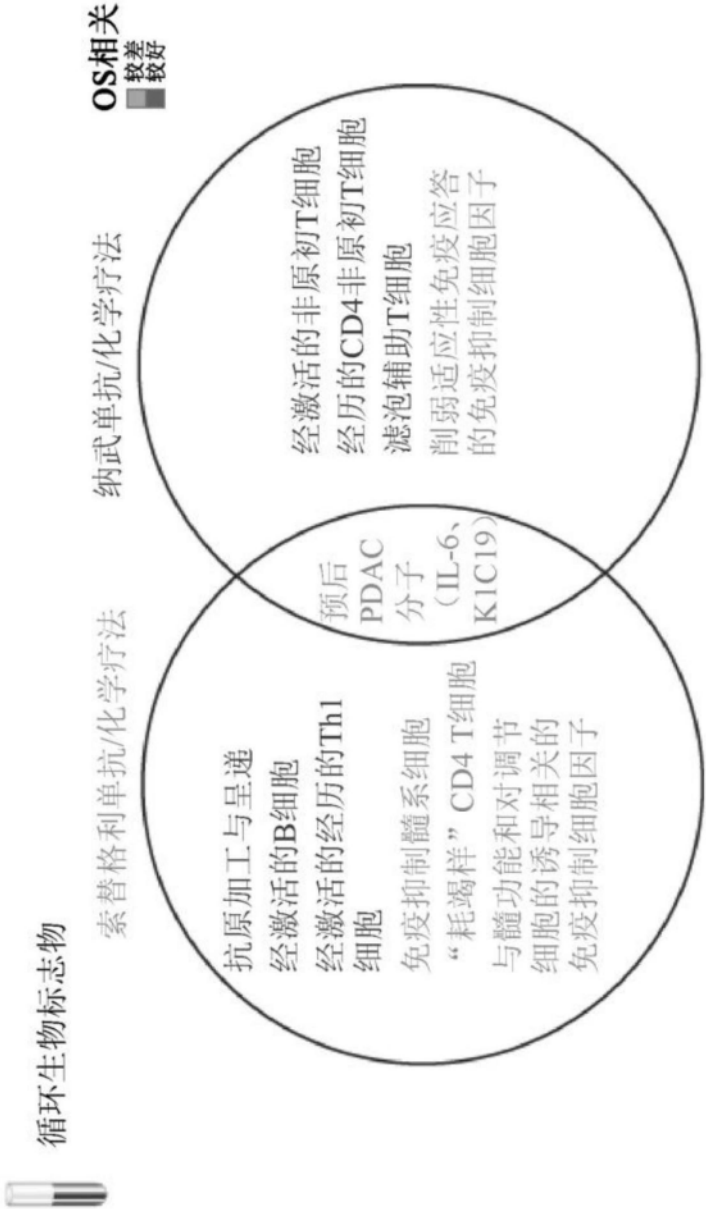


图25

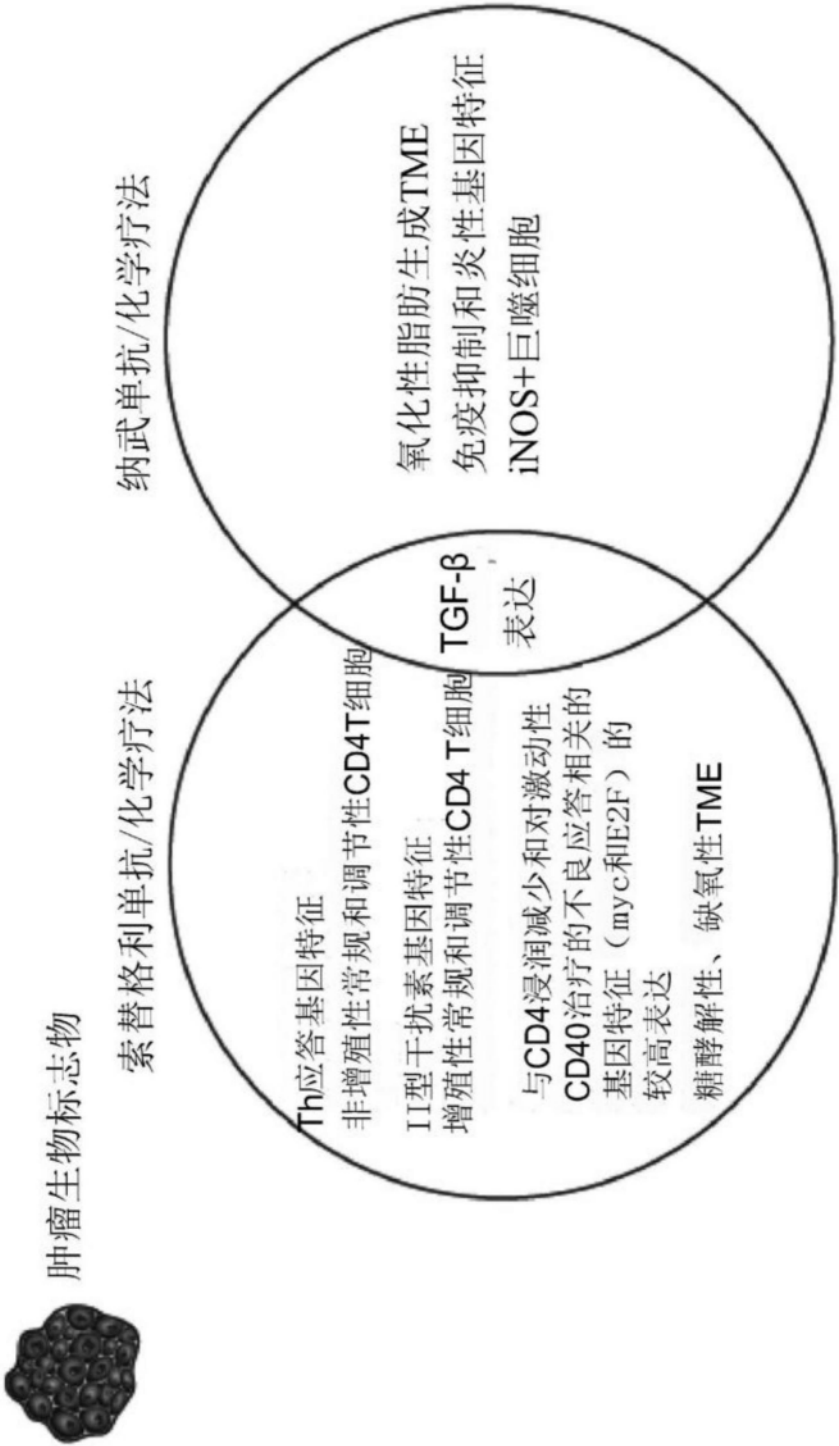


图25(续)

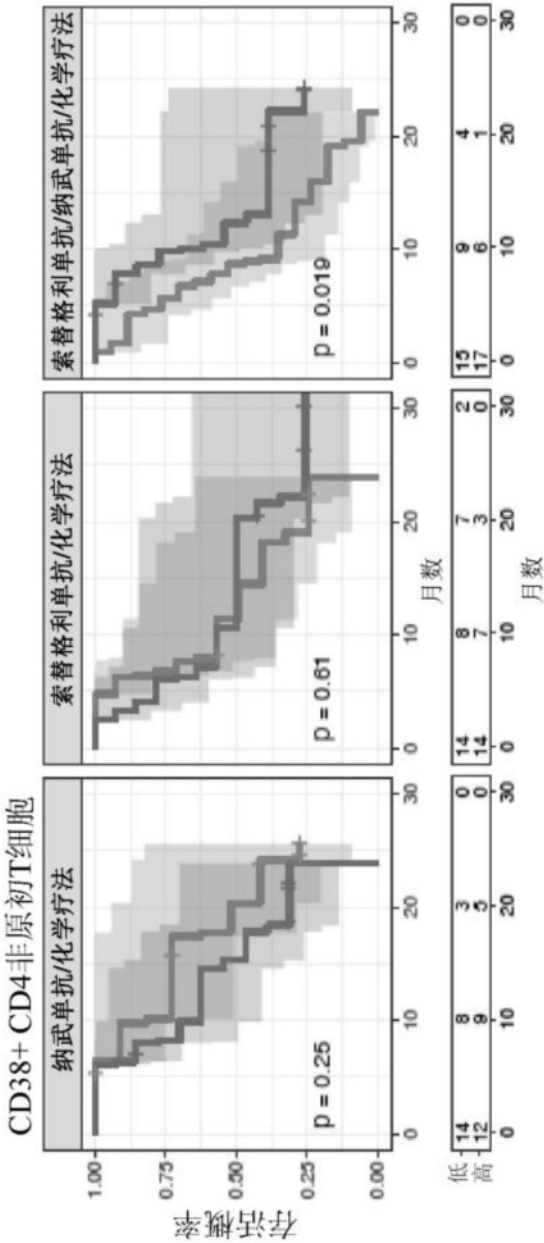


图26A

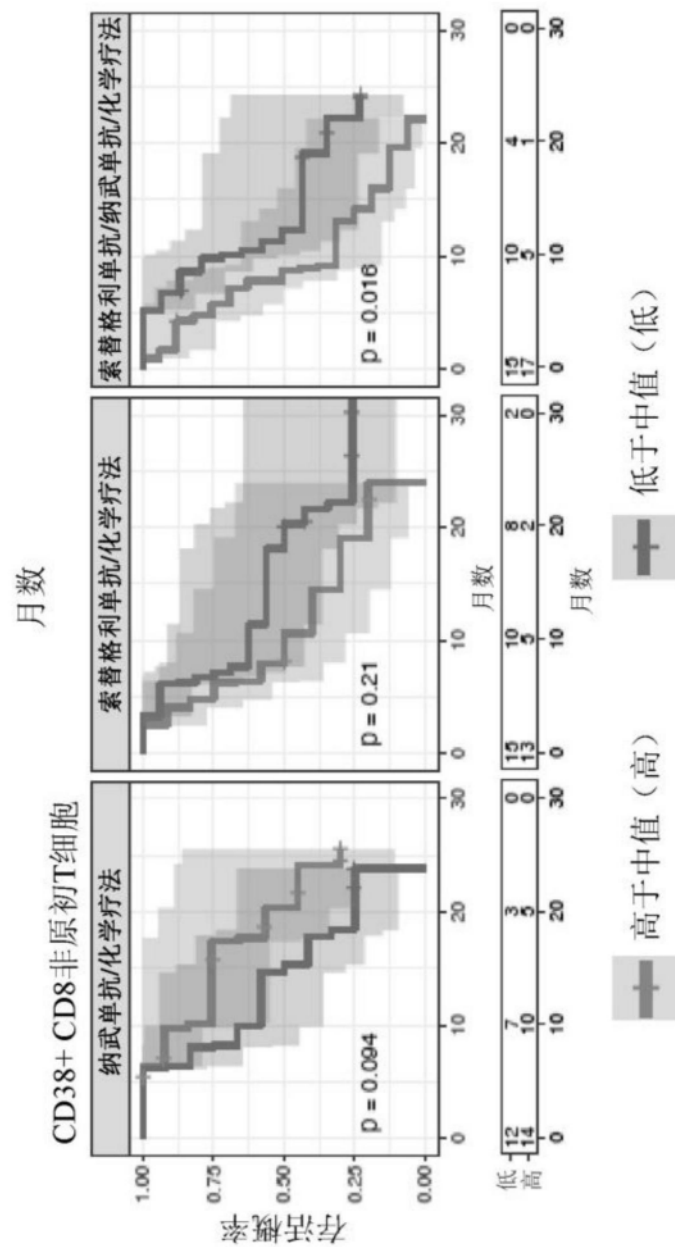


图26B

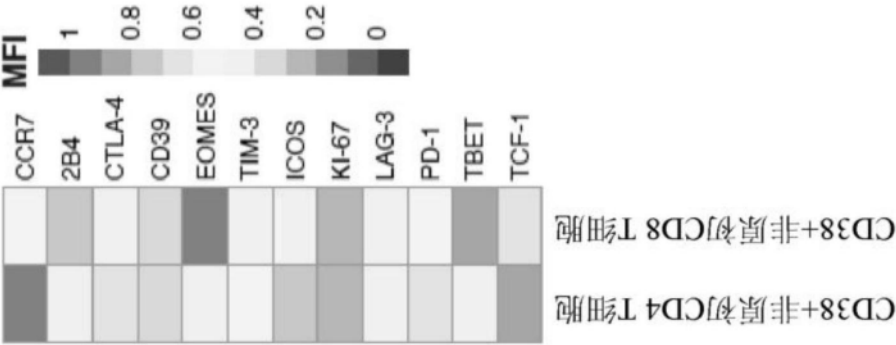


图26C

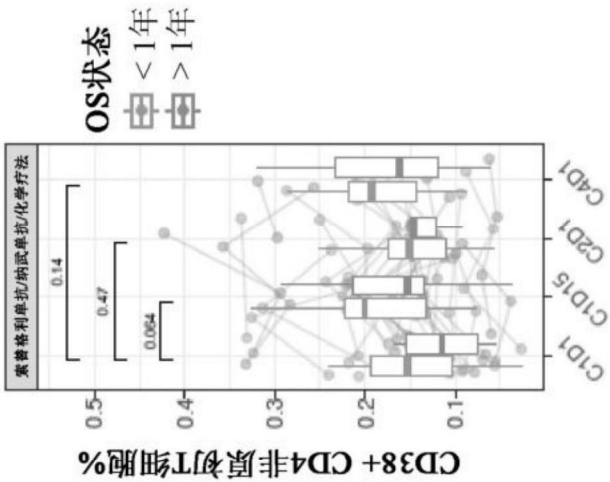


图26D

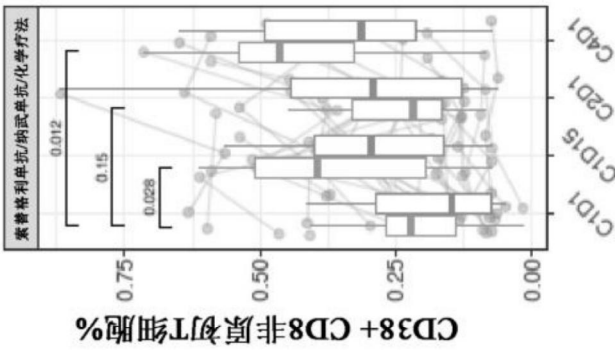


图26E

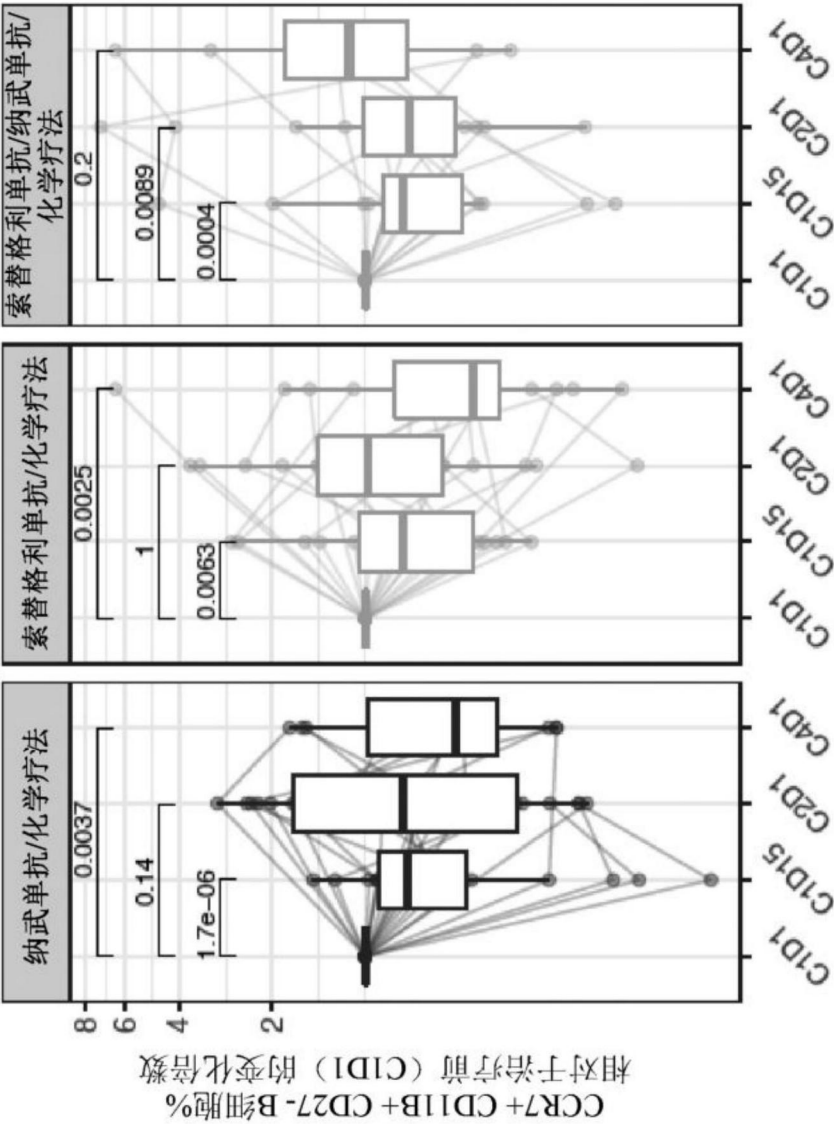


图27A

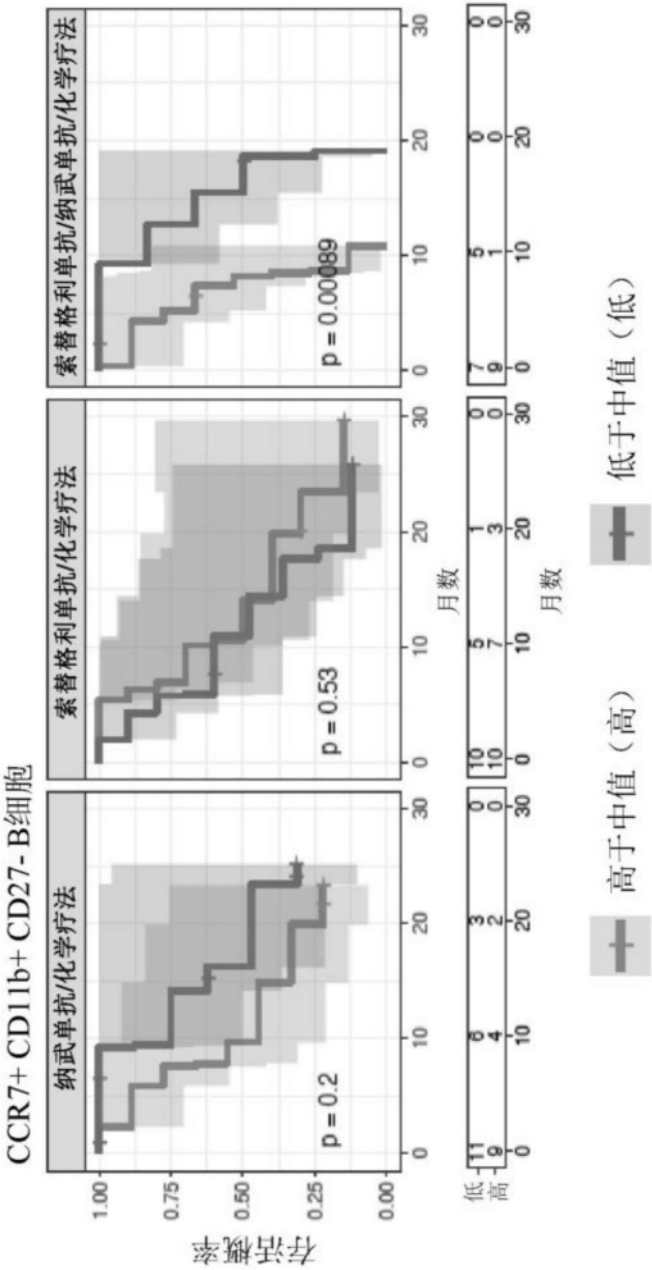


图27B

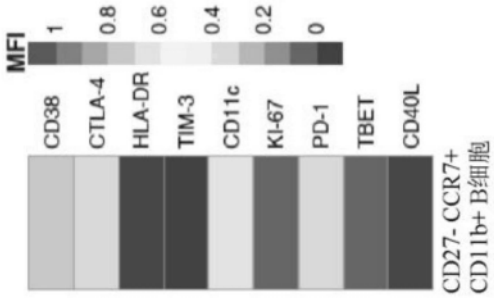


图27C

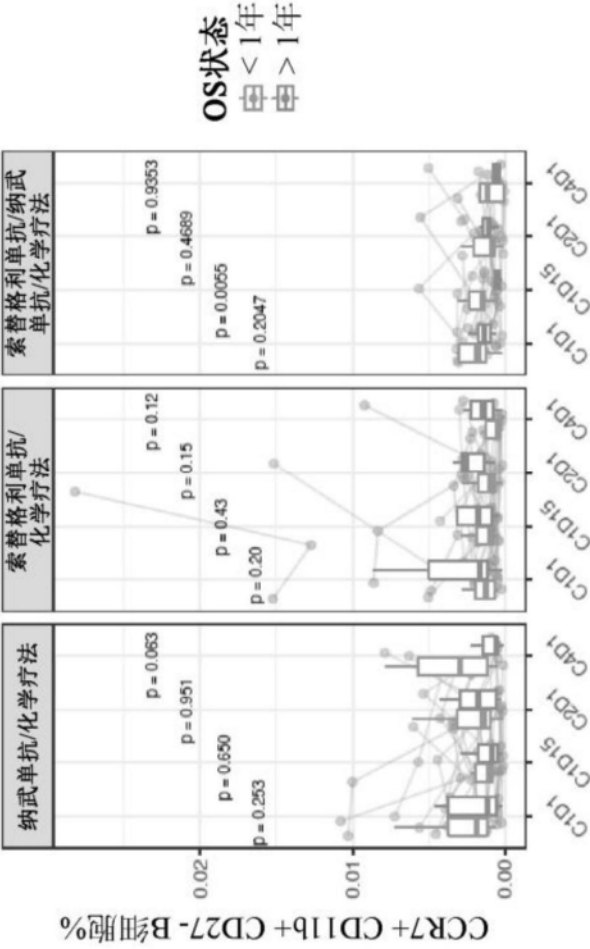


图27D