

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 8 月 27 日 (27.08.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/168541 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/689 (2018.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/075825

(22) 国际申请日: 2019 年 2 月 22 日 (22.02.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 方超 (FANG, Chao); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 钟焕姿 (ZHONG, Huanzi); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 侯勇 (HOU, Yong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) Title: USE OF INTESTINAL METAGENOME IN SCREENING THERAPEUTIC EFFECT OF PD-1 ANTIBODY BLOCKERS

(54) 发明名称: 肠道宏基因组在筛选PD-1抗体阻断剂疗效方面的用途

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a use of an intestinal metagenome in predicting the therapeutic effect of PD-1 antibody blockers on cancer and a marker used for predicting the therapeutic effect of PD-1 antibody blockers on patients with non-small cell lung cancer, and an application therefor. The marker comprises at least one of *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. L2-50, *Citrobacter freundii*, and *Pyramidobacter pisciculus*, and analogues thereof.

(57) 摘要: 本发明公开了肠道宏基因组在预测PD-1抗体阻断剂对于癌症的治疗效果中的用途以及用于预测PD-1抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者治疗效果的标志物及应用。该标志物包括选自 *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. L2-50, *Citrobacter freundii*, *Pyramidobacter pisciculus*, 及其类似物中的至少一种。



WO 2020/168541 A1

肠道宏基因组在筛选 PD-1 抗体阻断剂疗效方面的用途

优先权信息

无。

5

技术领域

本发明涉及生物检测领域，具体涉及一种肠道宏基因组在筛选 PD-1 抗体阻断剂疗效方面的用途。

背景技术

10

自 2011 起，针对肿瘤免疫逃脱机制（Hanahan D et al, 2011）的研究进程，使得对免疫检查点进行阻断的抗肿瘤免疫疗法（Pardoll DM, 2012）应运而生。其中，以程序性凋亡蛋白 1 受体及其配体（PD-1/PD-L1）为靶点的免疫治疗方法在黑色素瘤、肺癌等多种实体瘤的高加索人群中的应用取得令人瞩目的广谱抗癌效果。

15

程序性凋亡蛋白 1 受体（以下简称 PD-1）多被表达于 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、调节性 T 细胞，以及自然杀伤细胞等免疫应答相关细胞中。PD-1 能够被多种配体结合，主要两类被称为 PD-1 配体 1 和 PD-1 配体 2。通过配体结合所激活的 PD-1 信号通路能够抑制 T 细胞的增殖和免疫应答活动。因此，激活 PD-1 信号通路成为了肿瘤细胞逃脱抗原特异性 T 细胞免疫应答的主要手段。而针对该现象所研发的 PD-1 抗体阻断剂能够阻断该过程，以此提高人体自身抗肿瘤免疫的活性。

20

而针对 PD-1 抗体阻断剂的个体响应差异，还需要进一步改进，来实现有区别的用药。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一，提供了一种将肠道宏基因组用于筛选 PD-1 抗体阻断剂疗效的方法。应用肠道宏基因组预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果，可以指导临床用药，从而实现个体的精准化治疗。

25

本发明的发明人在研究过程中发现：尽管阻断免疫检查点的免疫治疗在多种恶性肿瘤中取得令人瞩目的治疗效果，但针对不同癌种及同一癌种不同患者个体间，免疫治疗有效率波动存在较大的个体差异，响应率从 12.8%到 43.7%不等。而且同一 PD-1 抗体阻断剂在即使相同肿瘤中的治疗响应率也不同，总体响应率较低，仅在 15%左右，目前还缺乏用药前对病人接受该种疗法的响应程度的有效预测方法。

30

为此，本发明通过筛选确定能够有效辅助 PD-1 抗体阻断剂对特定肿瘤病人治疗效果的菌群标志物；同时通过肠道菌种标志物的相对含量构建模型，有效预测病人接受该种疗法的预期响应程度。

35

根据本发明的第一方面，本发明提供了肠道宏基因组在预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果中的用途。宏基因组（metagenome），也可以称作环境微生物基因组或元基因组，是特定环境中全部遗传基因的总和。肠道宏基因组（gut metagenome），顾名思义，是指肠道环境中全部遗传基因的总和。通过对肠道宏基因组进行分析，可以预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果，从而是可以指导临床用药，实现精确到个体的精准治疗。

40

根据本发明的实施例，以上所述肠道宏基因组在预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果中的用途可以进一步包括如下技术特征：

45

在一些实施例中，利用宏基因组学分析所述肠道宏基因组的组分或者功能变化，来预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果。其中，宏基因组学（metagenomics）是指以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象，通过现代基因组技术手段包括功能基因的筛选和测序分析，对环境中的微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系以及环境之间的关系进行研究的新的微生物研究方法。

在一些实施例中，所述宏基因组学为通过 DNA 测序，以鉴定环境样品中的微生物并定量其丰富度为数据基础的组学研究。在一些实施例中，所述宏基因组学为全基因组测序宏基因组学。全基因组测序宏基因组学（whole genome metagenomics）是将特定环境中的所有微生物作为一个整体，对其中的所有微生物进行测序。利用全基因组测序宏基因组学可以研究样品中的功能基因或者功能微生物以及功能基因或者功

能微生物在环境中所起的作用。在一些实施例中，所述宏基因组学为 16S/18S rDNA 测序、或者探针测序。16S rDNA 是编码原核生物核糖体小亚基 16S rRNA 的基因，其长度通常包括几个高变区和与之相间的保守区。高变区的变异程度与原核微生物的系统发育密切相关。通过高通量测序技术对 16S rDNA 高变区进行测序，可以分析环境中原核微生物的群落结构的多样性。18S rDNA 是编码真核生物核糖体小亚基 18S rRNA 的基因，同样具有保守区和高变区。通过高通量测序技术对 18S rDNA 高变区进行测序，分析环境中真核微生物的菌落结构多样性。探针测序是通过设计探针捕获目标区域，例如捕获肠道宏基因组中微生物的全外显子区域，用来分析研究这些区域同疾病等的关联。

在一些实施例中，所述肠道宏基因组包括肠道微生物。肠道宏基因组包括肠道中全部遗传物质。这些遗传物质很大一部分来自于肠道微生物。通过对肠道微生物进行分析，通过肠道微生物的类型或者含量的变化，可以用来预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果，指导临床用药。

在一些实施例中，所述肠道宏基因组的组分变化包括肠道微生物的类型或者含量的变化。

在一些实施例中，所述肠道宏基因组的功能变化包括代谢功能基因的变化。代谢功能基因是指与肠道代谢功能相关的基因，这些基因可以表现为增强肠道的代谢功能，也可以表现为降低肠道的代谢功能。例如肠道代谢功能的改变，可以表现为肠道中微生物环境的改变，从而表现出对于 PD-1 抗体阻断剂响应效率的差异。

在一些实施例中，所述癌症包括选自非小细胞肺癌、结直肠癌、肝癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、胃癌中的至少一种。这些癌症通常表现为恶性肿瘤，在利用 PD-1 抗体阻断剂治疗的过程中，在不同患者中通常表现出不同的响应率。如在 2016 年发表的一篇综述 (Zou, W, et al, 2016) 显示，2015 年之前开展的 22 项涉及肾癌、非小细胞肺癌以及结直肠癌使用 PD-1 阻断剂进行治疗的试验中，响应率的浮动范围从 12.8% 到 43.7% 不等。通过对患者的肠道基因组进行分析，可以预测 PD-1 抗体阻断剂对于这些癌症的治疗效果，从而指导临床用药。

在一些实施例中，所述 PD-1 抗体阻断剂包括选自派姆单抗 (pembrolizumab)，纳武单抗 (nivolumab)，Camrelizumab 中的至少一种。

根据本发明的第二方面，本发明提供了一种标志物，包括选自下列中的至少一种：Streptococcus sanguinis (血链球菌) 和/或其类似物，Escherichia coli (大肠杆菌) 和/或其类似物，Clostridium sp. L2-50 (梭菌属 sp.L2-50) 和/或其类似物，Citrobacter freundii (弗氏柠檬酸杆菌) 和/或其类似物，Pyramidobacter piscolens (锥形杆菌属 piscolens 菌) 和/或其类似物，所述 Streptococcus sanguinis 类似物与 Streptococcus sanguinis 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，所述 Escherichia coli 类似物与 Escherichia coli 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，所述 Clostridium sp. L2-50 类似物与 Clostridium sp. L2-50 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，所述 Citrobacter freundii 类似物与 Citrobacter freundii 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，所述 Pyramidobacter piscolens 类似物与 Pyramidobacter piscolens 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上。

本领域技术人员可知的是，当某种未知微生物或者某种核酸来源的基因序列与某种已知菌株相比，比对相似度在 95% 以上的时候，即可认为该微生物与该菌株同种，或者可以将基因序列归类到与该菌株同种。由此，本领域技术人员可以直接通过将检测对象中的核酸序列信息获取，然后将其与 Streptococcus sanguinis，或者与 Escherichia coli，或者与 Clostridium sp. L2-50，或者与 Citrobacter freundii，或者与 Pyramidobacter piscolens 的基因组序列进行比对，如有 95% 以上的序列相似性，则就可以作为标志物。

根据本发明的实施例，当所述各菌类似物与相应的菌的基因组序列相比，比对覆盖度在 80% 以上，且比对相似度在 85% 以上时，均可以认为这些类似物与相应菌属于同一属，可以作为标志物。在至少一些实施例中，当这些类似物与相应的菌的比对覆盖度在 80% 以上，且比对相似度在 95% 以上时，均可以认为这些类似物与相应菌同种，可以作为标志物。

本发明中比对覆盖度，指的是在将目标序列与参考序列比对的过程中，目标序列中拿来和参考序列进行比对的序列的长度占检测序列总长度的比例。

根据本发明的第三方面，本发明提供了一种制剂，所述制剂由包含有选自 Escherichia coli (大肠杆菌) 和/或其类似物，Citrobacter freundii (弗氏柠檬酸杆菌) 和/或其类似物中的至少一种制备而成。各标志物

菌种能够通过分离培养，与辅料配合，或者直接将相应的菌种冻干形成冻干粉，获得制剂，对非小细胞肺癌患者的病人的肠道进行干预和调理，达到提升 PD-1 免疫疗法对病人疗效的效果。

在至少一些实施例中，所述制剂包括选自片剂、丸剂、散剂、注射剂、溶液剂、混悬剂、胶囊剂、颗粒剂中的至少一种。

5 根据本发明的第四方面，本发明提供了一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法，包括：（1）从所述患者中采集样本；（2）对所述样本进行检测，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息，所述标志物为根据本发明第二方面所述的标志物；（3）将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较，预测 PD-1 抗体阻断剂对所述患者的治疗效果。优选地，所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

10 本发明中所述参考数据集指的是对已表现出对 PD-1 抗体阻断剂有效响应的非小细胞肺癌患者和已表现出对 PD-1 抗体阻断剂无效响应的非小细胞肺癌患者样本进行操作，所获得的各标志物的相对丰度信息，用来作为每种标志物的相对丰度的参考。在本发明的一个实施方案中，参考数据集是指训练数据集。根据本发明，所述训练集是指和验证集具有本领域公知的含义。在本发明的一个实施方案中，所述训练集是指包含一定样本数的表现出对 PD-1 抗体阻断剂有效响应的非小细胞肺癌受试者和表现出对 PD-1 抗体阻断剂无效响应的非小细胞肺癌受试者待测样本中的各标志物的含量的数据集。所述验证集是用来测试训练集性能的独立数据集。

15 本发明中所述参考值指的是对 PD-1 抗体阻断剂有效响应的非小细胞肺癌患者中各标志物的含量的参考值或正常值。本领域技术人员已知，当对 PD-1 抗体阻断剂有效响应的非小细胞肺癌患者样本容量足够大时，可利用本领域公知的检测和计算方法获得样品中每个标志物的绝对值的范围。当采用测定方法检测标志物的水平时，可将样品中的标志物水平的测定值直接与参考值进行比较，以评估非小细胞肺癌患者对 PD-1 抗体阻断剂的响应效果。例如可以借助于统计方法来进行分析比较。

20 在一些实施例中，以上所述预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法还可以进一步包括如下技术特征：

25 在一些实施例中，在将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集进行比较时，还包括执行多元统计模型以获得响应概率。

在一些实施例中，所述多元统计模型为随机森林模型。

30 在一些实施例中，所述响应概率大于预定阈值表明所述 PD-1 抗体阻断剂能够有效治疗所述患者的非小细胞肺癌。

在一些实施例中，所述预定阈值为 0.5。

35 在一些实施例中，步骤（2）中所述标志物的相对丰度信息是利用测序方法得到的，进一步包括：从所述患者的所述样本中分离得到核酸样本；基于所述核酸样本，构建测序文库，测序获得测序结果；对所述测序结果进行分析，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息。对测序结果可以利用 SOAP2 或者 MAQ 等进行比对分析，从而可以提高比对的效率，进而可以提高 PD-1 抗体阻断剂响应检测的效率。

在一些实施例中，所述样本为粪便样本。

40 在一些实施例中，所述测序是通过第二代测序方法或者第三代测序方法进行的，优选地，所述测序是通过选自 Hiseq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种进行的。利用这些测序装置的高通量、深度测序的特点，有利于对后续测序数据进行分析，尤其是进行统计学检验时的精确性和准确度。

45 在一些实施例中，所述 PD-1 抗体阻断剂包括选自派姆单抗(pembrolizumab)，纳武单抗(nivolumab)，Camrelizumab 中的至少一种。

根据本发明的第五方面，本发明提供了一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的设备，包括：样本采集装置，所述样本采集装置适于从所述患者中采集样本；标志物相对丰度确定装置，所述标志物相对丰度确定装置与所述样本采集装置相连，所述标志物相对丰度确定装置适于对所述样本进行检测，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息，所述标志物为包含本发明第二方面所述的标志

物；结果确定装置，所述结果确定装置与所述标志物相对丰度确定装置相连，所述结果确定装置适于将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较，预测 PD-1 抗体阻断剂对所述患者的治疗效果；其中，所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

在本发明的一些实施例中，以上所述预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的设备，可以进一步包括如下技术特征：

在一些实施例中，所述设备中，在将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集进行比较时，还包括执行多元统计模型以获得响应概率。

在一些实施例中，所述设备中，所述多元统计模型为随机森林模型。

在一些实施例中，所述设备中，所述响应概率大于预定阈值表明所述 PD-1 抗体阻断剂能够有效治疗所述患者的非小细胞肺癌；优选地，所述预定阈值为 0.5。

在一些实施例中，所述标志物相对丰度确定装置进一步包括：核酸样本分离单元，所述核酸样本分离单元适于从所述样本中分离得到核酸样本；测序单元，所述测序单元与所述核酸样本分离单元相连，所述测序单元基于所述核酸样本，构建测序文库，测序获得测序结果；比对单元，所述比对单元适于对所述测序结果进行分析，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息。

在一些实施例中，所述样本为粪便样本。

在一些实施例中，所述测序通过第二代测序方法或第三代测序方法进行的；优选地，所述测序是通过选自 Hiseq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种进行的。

根据本发明的第六方面，本发明提供了一种试剂盒，包括用于检测本发明第二方面所述标志物的试剂。

根据本发明的实施例，以上所述的试剂盒可以进一步包括如下技术特征：

在一些实施例中，所述试剂盒包括至少一组参考数据集或者参考值，用来作为每种标志物的相对丰度的参考。例如可以将参考数据集或者参考值附在一些如光盘、或者 CD-ROM 等的物理载体上。

在一些实施例中，所述试剂盒还包括第一计算机程序产品，该第一计算机程序产品用来执行获得所述的参考数据集或者参考值。即该第一计算机程序产品用来执行获得诊断对象对于 PD-1 抗体阻断剂的治疗效果。

在一些实施例中，所述试剂盒还包括第二计算机程序产品，所述第二计算机程序产品用来执行本发明第四方面任一实施例所述的预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法。

根据本发明的第七方面，本发明提供了一种筛选用于非小细胞肺癌的 PD-1 抗体阻断剂的方法，包括：将患有非小细胞肺癌的受试者分别给予候选 PD-1 抗体阻断剂治疗后，测定来自所述受试者的样本中标志物的相对丰度信息，所述标志物为根据本发明第二方面所述的标志物；将治疗后的样品中所述标志物的相对丰度信息与向所述受试者施用所述候选 PD-1 抗体阻断剂之前的所述标志物的相对丰度信息进行比较。通过对多个患有非小细胞肺癌的受试者给予候选 PD-1 抗体阻断剂治疗，通过检测受试者体内各标志物的相对丰度信息的变化，可以用来指示候选 PD-1 抗体阻断剂对于非小细胞肺癌的效果。尤其是当多个非小细胞肺癌患者给予候选 PD-1 抗体阻断剂治疗后，检测确定本发明所提供的这些标志物中的至少一种在治疗前后表现出显著差异，就可以将这些候选 PD-1 抗体阻断剂作为治疗非小细胞肺癌的药物。当然为了实现精准化治疗，这些筛选出来的治疗非小细胞肺癌的药物在应用治疗非小细胞肺癌患者时，可以按照本发明第四方面所述的方法来预测这些筛选出来的治疗非小细胞肺癌的药物对于非小细胞肺癌患者的治疗效果。

在一些实施例中，所述 *Escherichia coli* 和/或其类似物、*Citrobacter freundii* 和/或其类似物中的至少一种标志物的相对丰度增加表明所述候选 PD-1 抗体阻断剂是用于治疗所述受试者的非小细胞肺癌的药物，或者所述方法对受试者的非小细胞肺癌有效。

在一些实施例中，所述 *Streptococcus sanguinis* 和/或其类似物、*Clostridium* sp. L2-50 和/或其类似物、*Pyramidobacter pisolens* 和/或其类似物中的至少一种标志物的相对丰度减少表明所述候选 PD-1 抗体阻断

剂是用于治疗所述受试者的非小细胞肺癌的药物，或者所述方法对受试者的非小细胞肺癌有效。

在一些实施例中，所述受试者为动物或者人。

根据本发明的第八方面，本发明提供了一种标志物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于预测非小细胞肺癌患者对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果或筛选用于非小细胞肺癌的 PD-1 抗体阻断剂，所述标志物为本发明第二方面所述的标志物。

根据本发明的第九方面，本发明提供了一种建立用于预测非小细胞肺癌患者对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果的预测模型的方法，所述方法包括鉴定非小细胞肺癌患者对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的样品之间差异表达的物质的步骤，其中所述差异表达的物质包括选自本发明第二方面所述的标志物的一种或多种。

本发明所取得的有益效果为：首次成功利用肠道微生物筛选 PD-1 免疫阻断剂治疗非小细胞肺癌的疗效，通过本发明所提供的肠道菌或其任意组合，能够较为理想地预测病人接受特定 PD-1 阻断剂免疫疗法的响应率。从而可以通过对肠道宏基因组分析，预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果，实现不同个体的精准医疗。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明的一个实施例提供的预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的设备示意图。

图 2 是根据本发明的一个实施例提供的标志物相对丰度确定装置的示意图。

图 3 为根据本发明的一个实施例提供的随机森林筛选、模型构建与验证过程的示意图。其中图 3 中 a 为利用不同数量的标志物进行随机森林筛选，获得的错误变异系数；图 3 中 b 为训练集中，5 种标志物组合在无效组和有效组预测有效的概率；图 3 中 c 为利用 5 种标志物组合和随机森林的决策模型，所获得的 ROC 曲线图；图 3 中 d 为验证集中，5 种标志物组合在无效组和有效组预测有效的概率；图 3 中 e 为利用 5 种标志物组合和随机森林的决策模型，在验证集中进行验证，所获得的 ROC 曲线图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

本文中，所用术语具有相关领域普通技术人员通常理解的含义。然而，为了更好地理解本发明，对于一些定义和相关术语的解释如下：

“非小细胞肺癌”是一种恶性程度较高，易复发、转移的恶性肿瘤，包括鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌等。肺癌作为中国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，而其 85% 患者均属于非小细胞肺癌。已有研究显示，包括肺癌在内的多种实体瘤可以通过促进免疫抑制性细胞亚群的分化和活化来逃逸免疫系统的攻击，而肿瘤免疫治疗则可以通过激活免疫系统获得客观应答从而控制病情。近年来，以 PD-1/PD-L1 为靶点的抗体药物在黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC) 等多种实体瘤中的应用取得令人瞩目的广谱抗癌效果。

“PD-1 抗体阻断剂”也称为“PD-1 阻断剂”或者“PD-1 阻断抑制剂”指的是能够阻断 PD-1 信号通路的物质。这些物质被制备成药物，能够阻断 PD-1 信号通路，从而避免肿瘤细胞逃脱抗原特异性 T 细胞免疫应答。已经发现的 PD-1 抗体阻断剂包括但不限于：pembrolizumab, nivolumab, Camrelizumab (今年已经陆续在国内上市了，最后一种为国产研发的阻断剂)。

为了在前期能够辅助判断非小细胞肺癌病人对于 PD-1 免疫疗法的适用性，得到精确到个体的精准干预方案的参考目的，本发明提供了一种标志物，包括选自下列中的至少一种：Streptococcus sanguinis和/

或其类似物, *Escherichia coli*和/或其类似物, *Clostridium sp. L2-50*和/或其类似物、*Citrobacter freundii*和/或其类似物, *Pyramidobacter pisolens*和/或其类似物。

其中, *Streptococcus sanguinis*是血链球菌, 一种革兰氏阳性兼性厌氧球菌细菌, 常见于人体口腔环境。

5 *Escherichia coli*是大肠杆菌, 常见于动物和人的肠道内, 属于革兰氏阴性兼性厌氧菌。

*Clostridium sp. L2-50*是尚未被命名的菌, 归属梭菌属, 该属广泛分布于自然界。

*Citrobacter freundii*是弗氏柠檬酸杆菌, 属于兼性厌氧革兰氏阴性菌, 是一种在健康人肠道中比较常见的菌。

10 *Pyramidobacter pisolens*是近年来从人口腔中新发现的菌。该属的菌大多为厌氧、非运动性杆菌, 其最终次级代谢物以硫化氢为主。

术语“标志物”, 也称为“标记物”, 也可以称为“生物学标志物”或“生物学标记物”, 是指个体的生物状态的可测量指标。这样的生物标志物可以是在个体中的任何物质, 只要它们与被检个体的特定生物状态(例如, 疾病)有关系, 例如, 核酸标志物(也可以称为基因标志物, 例如 DNA), 蛋白质标志物, 细胞因子标志物, 趋化因子标志物, 碳水化合物标志物, 抗原标志物, 抗体标志物, 物种标志物(种/属的标志)和功能标志物(KO/OG 标志)等。其中, 核酸标志物的含义并不局限于现有可以表达为具有生物活性的蛋白质的基因, 还包括任何核酸片段, 可以为 DNA, 也可以为 RNA, 可以是经过修饰的 DNA 或者 RNA, 也可以是未经修改的 DNA 或者 RNA, 以及由它们组成的集合。在本文中核酸标志物有时也可以称为特征片段。在本发明中, 标志物也可以用“肠道标志物”来替代, 因为本发明所发现的与 PD-1 抗体阻断剂响应效果密切相关的几种生物标志物均存在于受试者的肠道内。生物标志物经过测量和评估, 经常用以检查正常生物过程, 致病过程, 或治疗干预药理响应, 而且在许多科学领域都是有用的。

利用如上标志物, 本发明提供了一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法, 包括: (1) 从所述患者中采集样本; (2) 对所述样本进行检测, 以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息; (3) 将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较, 预测 PD-1 抗体阻断剂对所述患者的治疗效果; 其中, 所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

根据本发明的实施例, 可以运用高通量测序, 批量分析对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者的粪便样本和对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的粪便样本。基于高通量测序数据, 对由对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者群样本和对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者群样本进行比对, 从而确定与 PD-1 抗体阻断剂响应效果密切相关的特异性核酸序列。简言之, 其步骤如下:

35 样品的收集与处理: 收集对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者的粪便样本与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的粪便样本, 使用试剂盒进行 DNA 提取, 得到核酸样本;

文库构建和测序: DNA 文库构建和测序是利用高通量测序进行, 以便得到粪便样品中所包含肠道微生物的核酸序列;

通过生物信息学的分析方法, 确定与 PD-1 抗体阻断剂响应效果相关的特异性肠道微生物核酸序列。首先, 将测序序列(reads)与参照基因集(也称为参考基因集, 可以为新构建的基因集或任何已知序列的数据库, 例如, 采用已知的人肠道微生物群落非冗余基因集)进行比对。接下来, 基于比对结果, 分别确定来自对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者粪便样品的核酸样本中各基因的相对丰度。通过将测序序列与参照基因集进行比对, 可以将测序序列与参照基因集中的基因建立对应关系, 从而针对核酸样本中的特定基因, 与其相对应的测序序列的数目可以有效地反映该基因的相对丰度。由此, 可以通过比对结果, 按照常规的统计分析, 确定在核酸样本中基因的相对丰度。最后, 在确定核酸样本中各基因的相对丰度后, 对来自对 PD-1

抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的核酸样本中各基因的相对丰度进行统计检验，由此，可以判断对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者中是否存在相对丰度有显著差异的基因，如果存在基因是显著差异的，则该基因被当作是异常状态的生物标志物，即核酸标志物。

另外，对于已知或新构建的参照基因集，其通常包含基因物种信息和功能注释，由此，在确定基因相对丰度的基础上，可以进一步通过将基因的物种信息和功能注释进行分类，从而确定肠道菌群中各微生物的物种相对丰度和功能相对丰度，也就可以进一步确定异常状态的物种标志物和功能标志物。简言之，确定物种标志物和功能标志物的方法进一步包括：将对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的测序序列与参照基因集进行比对；基于比对结果，分别确定对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的核酸样本中各基因的物种相对丰度和功能相对丰度；对来自对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的核酸样本中各基因的物种相对丰度和功能相对丰度进行统计学检验；以及分别确定在对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的核酸样本之间相对丰度存在显著差异的物种标志物和功能标志物。根据本发明的实施例，可以采用对来自相同物种的基因的相对丰度和具有相同功能注释的基因的相对丰度进行统计检验，例如加和、取平均值、中位数值等，来确定功能相对丰度和物种相对丰度。

最后，确定了对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者的粪便样品之间相对丰度存在显著差异的生物学标志物，即包括微生物物种：Streptococcus sanguinis 和/或其类似物，Escherichia coli 和/或其类似物，Clostridium sp. L2-50 和/或其类似物，Citrobacter freundii 和/或其类似物，Pyramidobacter piscoles 和/或其类似物，由此，通过检测上述微生物至少一种是否存在，来有效地确定对象对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果，并且可以用于监控非小细胞肺癌患者的治疗效果。在本文中所使用的术语“存在”应做广义理解，既可以指的是定性分析样本中是否含有相应的目标物，也可以指对样本中的目标物进行定量分析，并且还可以进一步将所得到的定量分析结果与参照（例如通过对具有已知状态的样本进行平行试验所得到的定量分析结果）进行统计学分析或者任何已知数学运算所得到的结果。本领域技术人员可以根据需要和试验条件进行容易的选择。根据本发明的实施例，还可以通过确定这些微生物在肠道菌群中的相对丰度，从而能够确定对象对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果，以及用于监控非小细胞肺癌患者的治疗效果。

可以通过检测对象肠道菌群中是否存在上述微生物物种中的至少一种，也可以是检测对象肠道菌群中是否存在上述中的两种或者多种，即是否存在上述生物标志物组合，从而来有效地确定对象对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果，并且可以用于监控非小细胞肺癌患者的治疗效果。在本文中，术语“生物标志物组合”是指由两个或更多个生物标志物组成的组合。

对于物种标志物和功能标志物本领域技术人员还可以通过常规的菌种鉴别手段和生物活性检验手段来确定在肠道菌群中是否存在所述物种和功能。例如，菌种鉴别可以通过进行 16s rRNA 进行。

另外，根据本发明的另一些实施例，提供了一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的设备。在至少一个实施例中，所述设备如图 1 所示，包括样本采集装置 100、标志物相对丰度确定装置 200 和响应结果确定装置 300，标志物相对丰度确定装置与样本采集装置相连，响应结果确定装置与标志物相对丰度确定装置相连。其中样本采集装置适于从非小细胞肺癌患者中采集样本；标志物相对丰度确定装置适于对样本进行检测，以便确定样本中标志物的相对丰度信息；响应结果确定装置适于将样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较，预测 PD-1 抗体阻断剂对患者的治疗效果。其中，在至少一个实施方式中，所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

在至少一个实施方式中，标志物相对丰度确定装置如图 2 所示，包括：核酸样本分离单元 210、测

序单元 220 和比对单元 230, 测序单元与核酸样本分离单元相连, 比对单元与测序单元相连; 其中, 核酸样本分离单元适于从所述样本中分离得到核酸样本; 测序单元基于所述核酸样本, 构建测序文库, 测序获得测序结果; 比对单元适于对所述测序结果进行分析, 以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息。

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

本实验通过收集符合 PD-1 抗体 III 期临床试验入组条件的非小细胞肺癌 (Non-small-cell lung carcinoma, 以下称 NSCLC) 患者, 采集受试者治疗前后的血液和粪便样本及临床表型, 对所得数据进行分析所获得的。采样时间点包括治疗前基线期和治疗后多个时间点并定期进行疗效评价, 直至疾病恶化 (progressive disease, PD)。基线期是指病人在试验中首次服用 PD-1 阻断剂治疗前 2 周的时间。该期间病人需停止先前的治疗方案, 并控制其他药物的摄入。

提取患者粪便 DNA 采用二代测序进行宏基因组测序。结合多元统计与数据挖掘方法, 进行肠道菌群的物种差异分析, 找出与疗效密切相关的物种。利用置换多元方差分析 (PERMANOVA, Permutational multivariate analysis of variance) 方法在全局上判断菌群组分是否在不同的分组之间存在显著性差异。其中置换多元方差分析方法属于一种非参数多元统计检验, 在本项目关联分析中用于对各类表型分组所属样本在肠道菌群的组成进行检验, 所采用的肠道菌群组成信息往往经过 bray 距离转化。

然后根据患者在治疗前的肠道微生物组成, 结合临床表型信息, 利用机器学习方法, 构建利用与疗效相关的宿主、菌群等多元因素进行免疫治疗疗效的模型, 从而指导临床精准用药。

该过程主要利用了随机森林预测模型 (Random Forest model)。该模型属于集成学习方法, 常用于分类、回归等应用场景。在模型训练阶段, 该方法将反复随机生成多层决策树, 构成一个分类决策集合, 并对该集合的预测效果进行评估。为了避免过拟合的现象, 本项目中的随机森林模型还整合了交叉验证模块, 用以稳定训练效果。该方法获得的模型不仅可应用于相关疗效的预测, 还能提示对该种治疗方式起到关联作用的菌种标志物。

其中, 随机森林模型和 ROC 曲线的使用方法为本领域所公知, 本领域技术人员可以根据具体情况进行参数设置和调整。根据本发明的实施例, 可以根据文献 (Drogan D, Dunn WB, Lin W, Buijsse B, Schulze MB, Langenberg C, Brown M, Floegel a., Dietrich S, Rolandsson O, Wedge DC, Goodacre R, Forouhi NG, Sharp SJ, Spranger J, Wareham NJ, Boeing H: Untargeted Metabolic Profiling Identifies Altered Serum Metabolites of Type 2-Diabetes Mellitus in a Prospective, Nested Case Control Study. Clin Chem 2015, 61:487-497.; Mihalik SJ, Michaliszyn SF, de las Heras J, Bacha F, Lee S, Chace DH, DeJesus VR, Vockley J, Arslanian SA: Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation. Diabetes Care 2012, 35:605-611., 通过引用全文并入此处) 中记载的方法进行。

实施例 1: PD-1 阻断抑制剂在中国肺癌患者群体中的治疗响应率

本实施例包含符合试验要求 (即经其他方式治疗无效且处于非小细胞肺癌 III 期的病人) 的 III 期非小细胞肺癌 (Non-small-cell lung carcinoma, 以下称 NSCLC) 患者共计 84 人。患者在开始接受 PD-1 阻断剂免疫疗法前, 首先进入为期两周的基线期管理阶段, 该阶段内暂停其他肿瘤治疗方案。随后, 患者每两周接受一次 PD-1 阻断剂服用, 并接受相关检查判断病情发展情况。其中采用三种 PD-1 阻断剂随机给药, 每个非小细胞肺癌患者给予一种特定的 PD-1 阻断剂, 这三种 PD-1 阻断剂分别为派姆单抗 (Pembrolizumab)、纳武单抗 (Nivolumab) 和 Camrelizumab。

根据实体瘤响应评价标准 (RECIST) 1.1, 患者在接受治疗三个月后的响应率分布情况如表 1 所示。

表 1 中国肺癌病人接受 PD-1 阻断剂疗法的整体响应率

响应评价	病情恶化	病情稳定	部分缓解
------	------	------	------

男	26	17	8
女	22	6	5
总体	48	23	13
比例	57.14%	27.38%	15.48%

如表 1 所示, 该疗法的整体响应率仅有 15.48%, 相比于同期欧美 (高加索) 人群试验中的数据 (12.8% 到 43.7% 不等) 属于较低水平 (Weiping et al. 2016)。

其中, 在治疗过程中, 通过如下实施例, 筛选非小细胞肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效相关的菌种, 并构建疗效预测模型, 在独立肺癌患者群体中进行有效性验证。

5

实施例 2: 筛选治疗前中国肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效高度相关的菌种

实施例 1 中的 84 人中, 有 33 人在治疗期间服用过抗生素或者有查出有 ALK、EGFR 等已知癌症驱动基因阳性的患者, 考虑到抗生素会影响到菌群的结果, 而癌症驱动基因可能会影响到对于菌群的相关性的鉴别, 因此并未对这 33 人的样本进行分析。因此本实施例选择了 51 例人肠道粪便样品进行分析。

10 通过对这些样品进行分析, 筛查治疗前肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效高度相关的菌种。

所有粪便样品采集自患者在治疗开始之前一周内, 并经过 DNA 提取, 高深度测序, 数据库比对与定量等标准流程, 最后获得各个样本的肠道菌群相对丰度数据集 (样品 DNA 提取、测序、数据库比对和定量等流程与文献相同, Fang, C., et al. Assessment of the cPAS-based BGISEQ-500 platform for metagenomic sequencing. Gigascience 7, 1-8 (2018). 通过参照将其并入本文)。以病人在治疗三个月后是否恶化为分组 (病情恶化为无效组, 病情稳定、部分缓解为有效组), 对该数据集进行组间差异物种统计检验 (Wilcoxon rank-sum test), 最终得到 17 种相对可靠的差异菌种标志物 (表格 2)。

15

对于表 1 中示出的病人的三种情况: 病情恶化的, 属于无效组; 部分缓解的, 属于有效组; 病情稳定的, 对于稳定期超过 3 个月的, 也属于有效组。这种病情恶化、部分缓解以及病情稳定的判断是由临床医生通过观察病人的反应, 在必要时进行 CT 后判断得到的。

20

其中, 表 2 中无效组中位数和有效组中位数用来表示无效组菌种和有效组菌种的相对丰度值, 即通过 MGS 方法进行定量所得到的每一种菌的相对含量, 各菌的相对丰度值的和为 1。富集组一列所显示的 R (有效) 代表该菌在有效组的含量显著高于无效组, NR (无效) 代表该菌在无效组的含量显著高于有效组。其中 MGS (metagenomic species, 宏基因组物种) 方法, 参考自 Nielsen, H. B. et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. Nature biotechnology 32, 822-828, doi:10.1038/nbt.2939 (2014)。无论是表 2 中列出在有效组富集的菌种, 还是在无效组富集的菌种, 这些与 PD-1 阻断抑制剂疗效相关的显著差异菌种均可以作为潜在的菌种标志物, 作为后续能够用于预测 PD-1 阻断抑制剂对于非小细胞肺癌患者的治疗效果的首选标志物。

25

表 2 治疗前中国肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效的显著差异菌种

MGS 编号	注释物种名	无效组 中位数	有效组 中位数	富集组 (R, 有效; NR, 无效)	P 值
MGS.igc0776	Akkermansia muciniphila	6.09E-08	8.62E-06	R	0.000319941
MGS.igc0202	Clostridium sp. M62/1	6.77E-08	2.72E-06	R	0.018111611
MGS.igc1129	Prevotella bivia	9.03E-08	7.67E-07	R	0.01830971
MGS.igc0845	Escherichia coli	5.88E-07	3.15E-06	R	0.023396059
MGS.igc0787	Blautia hansenii	4.78E-08	6.67E-06	R	0.024017262
MGS.igc0006	Escherichia coli	4.08E-05	2.42E-04	R	0.025792971
MGS.igc1030	Lactobacillus crispatus	3.10E-08	1.45E-06	R	0.03030303

MGS.igc0978	Prevotella disiens	2.13E-08	1.03E-06	R	0.031218781
MGS.igc1483	Clostridia bacterium UC5.1-1D10	9.90E-08	4.14E-07	R	0.047535037
MGS.igc1352	Blautia obeum	9.58E-07	8.12E-08	NR	0.001468648
MGS.igc0207	Pyramidobacter piscolens	1.79E-07	5.39E-08	NR	0.006817583
MGS.igc0779	Blautia obeum	2.45E-06	4.70E-07	NR	0.017843563
MGS.igc0686	Streptococcus sp. HSISM1	4.90E-06	1.86E-06	NR	0.023277203
MGS.igc0016	Parabacteroides goldsteinii	6.83E-06	5.71E-07	NR	0.029517035
MGS.igc1036	Prevotella intermedia	4.99E-08	3.36E-08	NR	0.037878788
MGS.igc0507	[Eubacterium] eligens	1.48E-04	1.20E-05	NR	0.046210557
MGS.igc1472	Candidatus Alistipes marseilloanorexicus	2.84E-07	1.26E-07	NR	0.047979798

实施例 3: 筛选治疗前和治疗后 1 到 3 个月中国肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效具有潜在标志物可能的菌种

对于实施例 2 中的 51 例病人, 在治疗过程中有些患者因为病情恶化而放弃治疗, 还有一些因为其他癌症副作用而退出研究, 这些都没有办法继续提供粪便样本。为了获得更全面的样本, 所以本实施例针对如下样本进行了筛选, 得到治疗前 1 到 3 个月肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效具有潜在标志物可能的菌种。

本实施例包含治疗前 51 例患者、连续治疗 1 个月后患者 (共计 34 例)、连续治疗 2 个月后患者 (共计 18 例)、连续治疗 3 个月后患者 (共计 11 例) 的肠道粪便样品。所有肠道粪便样品经过与实施例 2 完全一致的样品 DNA 提取、测序、数据库比对和定量等流程获得各个样本的肠道菌群相对丰度数据集。以病人在治疗三个月后是否恶化为分组 (病情恶化为无效组, 病情稳定、部分缓解为有效组), 对该数据集中各个治疗时期的子集进行组间差异物种统计检验 (Wilcoxon rank-sum test), 得到差异菌种标志物。由于治疗后病人跟踪配合度降低, 为了提升样本数以保证检验的可靠性, 本实施例中还将治疗后病人的并集取出进行检验, 以筛选治疗后对疗效具有差异的肠道菌种。此外, 为了尽可能多地选择潜在的标志物, 分别进行了包含 0 值和剔除 0 值两种策略的统计检验结果 (表 3)。

针对表 3 中的策略一栏, 即包含 0 值以及剔除 0 值, 做以下说明: 在研究过程中, 同样的菌, 在有些病人中有, 有些病人中没有, 对于在病人中没有的菌, 则认为其丰度值为 0。而基于丰度值为 0 的不同原因, 有两种不同的策略。一种是认为丰度值为 0, 代表病人没有这种菌, 该病人样本应该放进去进行统计检验; 而另一种策略是认为丰度值为 0, 是由于检测手段精度不够而检测不到所致, 并非代表病人样品中不含有该菌, 在这种情况下, 就要将 0 值排除以免干扰。我们对两种策略均进行了检测, 以获得尽可能多的潜在标志物。

同时, 由于无法强制要求病人严格按照试验时间点提供样品, 因遗忘、无便意、条件不允许等情况导致样本无法采集的情况客观存在, 导致有些病人样本没有被包含在治疗后的组里。为了提高样本量, 将治疗后的病人采集的样本进行了合并。且每个病人挑出一个样本 (例如可以是治疗后一个月的样本, 也可以是治疗两个月的样本, 或者是治疗三个月的样本) 作为代表该病人治疗后菌群状态的样本。这些样本组成治疗后并集, 进行上述检测, 这样可以提高样本量, 使检验结果的可信度更高。

无论是表 3 中列出的在有效组富集的菌种, 还是在无效组富集的菌种, 这些与 PD-1 阻断抑制剂疗效相关的显著差异菌种均可以作为潜在的菌种标志物, 作为后续能够用于预测 PD-1 阻断抑制剂对于非小细胞肺癌患者的治疗效果的首选标志物。

表 3 治疗前和治疗后 1 到 3 个月肺癌患者肠道中与 PD-1 阻断抑制剂疗效的显著差异菌种

MGS 编号	注释物种名	策略	无效组中位数	有效组中位数	富集组(R, p 值	时期
--------	-------	----	--------	--------	------------	----

					有效; NR, 无效)		
MGS. igc0787	Blautia hansenii	包含 0 值	0	8.09E-07	R	0.001903393	治疗前
MGS. igc0067	Morganella morganii	包含 0 值	0	4.73E-08	R	0.002678727	治疗前
MGS. igc0100	Coprobacillus sp. D6	包含 0 值	1.08E-07	9.12E-07	R	0.010318315	治疗前
MGS. igc0024	Citrobacter freundii	包含 0 值	3.45E-08	2.53E-07	R	0.011321938	治疗前
MGS. igc0026	Klebsiella oxytoca	包含 0 值	0	1.83E-08	R	0.015673147	治疗前
MGS. igc0202	Clostridium sp. M62/1	包含 0 值	4.54E-08	1.65E-06	R	0.018870974	治疗前
MGS. igc0006	Escherichia coli	包含 0 值	4.08E-05	0.000242 471	R	0.025792971	治疗前
MGS. igc0769	Citrobacter freundii	包含 0 值	3.31E-08	1.95E-07	R	0.025970536	治疗前
MGS. igc0845	Escherichia coli	包含 0 值	4.85E-07	2.41E-06	R	0.030747691	治疗前
MGS. igc0073	Citrobacter koseri	包含 0 值	0	2.39E-08	R	0.03642644	治疗前
MGS. igc1271	Bacteroides cellulosilyticus	包含 0 值	7.05E-08	1.56E-07	R	0.045658528	治疗前
MGS. igc0686	Streptococcus sp. HSISM1	包含 0 值	4.90E-06	1.86E-06	NR	0.023277203	治疗前
MGS. igc0952	Lactococcus lactis	包含 0 值	0	0	NR	0.026001192	治疗前
MGS. igc1366	Phascolarctobacterium succinatutens	包含 0 值	0	0	NR	0.026001192	治疗前
MGS. igc1404	Streptococcus infantarius	包含 0 值	1.65E-08	0	NR	0.026121871	治疗前
MGS. igc1262	Clostridium sp. L2-50	包含 0 值	0	0	NR	0.035322612	治疗前
MGS. igc0479	Oscillibacter sp. ER4	包含 0 值	2.50E-05	1.07E-07	NR	0.038091697	治疗前
MGS. igc1102	Campylobacter concisus	包含 0 值	3.37E-08	0	NR	0.038246188	治疗前
MGS. igc0075	Comamonas kerstersii	包含 0 值	0	0	NR	0.044577333	治疗前
MGS. igc0779	Blautia obeum	包含 0 值	1.79E-06	4.35E-07	NR	0.04478756	治疗前
MGS.	[Eubacterium] eligens	包含	0.0001475	1.20E-05	NR	0.046210557	治疗前

igc0507		0 值	7				
MGS. igc1089	Faecalibacterium prausnitzii	包含 0 值	3.80E-07	1.83E-07	NR	0.048589404	治疗前
MGS. igc0022	Blautia producta	剔除 0 值	7.83E-08	1.28E-06	R	0.005582789	1 个月后
MGS. igc0059	[Clostridium] bolteae	剔除 0 值	7.38E-07	9.09E-06	R	0.007997918	1 个月后
MGS. igc0007	[Clostridium] bolteae	剔除 0 值	3.07E-05	2.10E-04	R	0.008762435	1 个月后
MGS. igc0787	Blautia hansenii	剔除 0 值	5.77E-08	6.79E-06	R	0.009666804	1 个月后
MGS. igc1064	Streptococcus sp. HSISS3	剔除 0 值	8.98E-08	2.56E-07	R	0.020317237	1 个月后
MGS. igc1428	Porphyromonas asaccharolytica	剔除 0 值	8.24E-08	2.34E-07	R	0.028571429	1 个月后
MGS. igc0746	Eubacterium sp. ER2	剔除 0 值	3.91E-08	6.76E-08	R	0.03030303	1 个月后
MGS. igc0493	Acidaminococcus fermentans	剔除 0 值	1.75E-07	2.14E-03	R	0.033333333	1 个月后
MGS. igc0092	Anaerostipes caccae	剔除 0 值	4.24E-07	2.56E-06	R	0.034923029	1 个月后
MGS. igc1236	Porphyromonas asaccharolytica	剔除 0 值	9.05E-08	3.86E-07	R	0.035714286	1 个月后
MGS. igc0978	Prevotella disiens	剔除 0 值	1.68E-08	6.28E-08	R	0.042624043	1 个月后
MGS. igc0008	Hungatella hathewayi	剔除 0 值	3.85E-06	1.67E-05	R	0.043104237	1 个月后
MGS. igc0156	[Eubacterium] hallii	剔除 0 值	9.14E-06	8.34E-08	NR	0.002363647	1 个月后
MGS. igc0472	Bifidobacterium bifidum	剔除 0 值	3.61E-06	3.42E-08	NR	0.003259279	1 个月后
MGS. igc0255	Anaerostipes hadrus	剔除 0 值	9.32E-05	3.03E-06	NR	0.006261242	1 个月后
MGS. igc0639	Catenibacterium mitsuokai	剔除 0 值	1.22E-07	2.52E-08	NR	0.007992008	1 个月后
MGS. igc0169	Butyricimonas virosa	剔除 0 值	2.83E-07	2.49E-08	NR	0.021058913	1 个月后
MGS. igc1260	Butyricimonas virosa	剔除 0 值	2.08E-06	5.90E-08	NR	0.027392909	1 个月后
MGS. igc0797	Anaerostipes hadrus	剔除 0 值	1.98E-07	6.52E-08	NR	0.033628523	1 个月后
MGS. igc0178	Parabacteroides johnsonii	剔除 0 值	1.26E-06	2.63E-07	NR	0.036903295	1 个月后
MGS.	[Clostridium]	剔除	1.08E-06	7.01E-08	NR	0.037338346	1 个月后

igc0874	spiroforme	0 值					
MGS. igc0199	Parabacteroides johnsonii	剔除 0 值	8.56E-08	4.05E-08	NR	0.038231283	1 个月后
MGS. igc0166	Ruminococcus bicirculans	剔除 0 值	2.81E-05	1.10E-06	NR	0.039195673	1 个月后
MGS. igc0215	Sellimonas intestinalis	剔除 0 值	1.36E-06	4.52E-08	NR	0.040858001	1 个月后
MGS. igc1237	[Clostridium] innocuum	剔除 0 值	1.52E-06	2.53E-07	NR	0.041282321	1 个月后
MGS. igc0382	Alistipes finegoldii	剔除 0 值	1.87E-07	6.81E-08	NR	0.04147813	1 个月后
MGS. igc1419	Blautia obeum	剔除 0 值	3.20E-07	9.12E-08	NR	0.042795433	1 个月后
MGS. igc1413	Parabacteroides goldsteinii	剔除 0 值	3.43213E-08	1.61615E-07	R	0.018981019	2 个月后
MGS. igc1177	Bifidobacterium catenulatum	剔除 0 值	3.17698E-07	3.20E-08	NR	0.002525253	2 个月后
MGS. igc0638	Bifidobacterium pseudocatenulatum	剔除 0 值	1.62211E-05	4.62911E-07	NR	0.00678733	2 个月后
MGS. igc1180	Collinsella aerofaciens	剔除 0 值	3.29077E-07	1.06521E-07	NR	0.028571429	2 个月后
MGS. igc0879	Bilophila wadsworthia	剔除 0 值	6.41936E-07	1.71989E-07	NR	0.015873016	3 个月后
MGS. igc0007	[Clostridium] bolteae	包含 0 值	3.06863E-05	0.000210113	R	0.008762435	1 个月后
MGS. igc0008	Hungatella hathewayi	包含 0 值	3.85331E-06	1.66841E-05	R	0.043104237	1 个月后
MGS.ig c0059	[Clostridium] bolteae	包含 0 值	7.38E-07	7.89E-06	R	0.032926938	1 个月后
MGS. igc0067	Morganella morganii	包含 0 值	0	3.2278E-08	R	0.01940722	1 个月后
MGS. igc0156	[Eubacterium] hallii	包 含 0 值	5.70362E-06	1.67437E-08	NR	0.001150959	1 个月后
MGS. igc0166	Ruminococcus bicirculans	包 含 0 值	2.45996E-05	3.77809E-07	NR	0.026234927	1 个月后
MGS. igc0199	Parabacteroides johnsonii	包 含 0 值	6.26488E-08	1.06651E-08	NR	0.020261406	1 个月后
MGS. igc0255	Anaerostipes hadrus	包 含 0 值	9.32E-05	1.75E-06	NR	0.002962681	1 个月后
MGS. igc0314	Prevotella sp. P4-76	包 含 0 值	0	6.0105E-09	R	0.000579143	1 个月后
MGS. igc0493	Acidaminococcus fermentans	包 含 0 值	7.2935E-08	0	NR	0.014473487	1 个月后
MGS.	Bifidobacterium	包 含	7.09419E-	5.90922E	NR	0.004482886	1 个月后

igc0617	adolescentis	0 值	07	-08			
MGS. igc0654	[Eubacterium] hallii	包 含 0 值	4.53595E- 07	3.01804E -08	NR	0.033980666	1 个月后
MGS. igc0655	Anaerostipes hadrus	包 含 0 值	4.94E-08	0.00E+00	NR	0.010543249	1 个月后
MGS. igc0665	Lachnospiraceae bacterium TF01-11	包 含 0 值	7.93401E- 08	0	NR	0.049709622	1 个月后
MGS. igc0779	Blautia obeum	包 含 0 值	1.46E-06	1.34E-07	NR	0.011119784	1 个月后
MGS. igc0787	Blautia hansenii	包 含 0 值	0.00E+00	2.38E-06	R	0.004219862	1 个月后
MGS. igc0797	Anaerostipes hadrus	包 含 0 值	1.33E-07	2.21E-08	NR	0.016623881	1 个月后
MGS. igc0798	Veillonella seminalis	包 含 0 值	0	0	NR	0.035933185	1 个月后
MGS. igc0821	bacterium OL-1	包 含 0 值	7.8729E-0 9	0	NR	0.006614446	1 个月后
MGS. igc0845	Escherichia coli	包 含 0 值	6.05043E- 07	3.28691E -06	R	0.037046183	1 个月后
MGS. igc0889	bacterium LF-3	包 含 0 值	1.89089E- 07	0	NR	0.030396311	1 个月后
MGS. igc1044	Lactobacillus fermentum	包 含 0 值	0	2.40811E -07	R	0.017877162	1 个月后
MGS.ig c1208	Blautia hansenii	包 含 0 值	0.00E+00	0.00E+00	NR	0.013520841	1 个月后
MGS. igc1324	Dielma fastidiosa	包 含 0 值	1.17865E- 06	2.10346E -08	NR	0.007435605	1 个月后
MGS. igc1400	Eubacterium sp. ER2	包 含 0 值	0	1.55195E -08	R	0.014032289	1 个月后
MGS. igc1419	Blautia obeum	包 含 0 值	2.80E-07	3.64E-08	NR	0.042276932	1 个月后
MGS. igc0473	Clostridium paraputrificum	包 含 0 值	0	8.06736E -08	R	0.013424785	2 个月后
MGS. igc1142	Lactobacillus vaginalis	包 含 0 值	0	1.6281E- 08	R	0.027005842	2 个月后
MGS. igc0580	Ruminococcaceae bacterium D16	包 含 0 值	0.00E+00	2.33E-07	R	0.047330382	2 个月后
MGS. igc1177	Bifidobacterium catenulatum	包 含 0 值	3.17698E- 07	0.00E+00	NR	0.000455881	2 个月后
MGS. igc0617	Bifidobacterium adolescentis	包 含 0 值	2.01079E- 07	0	NR	0.003157887	2 个月后
MGS. igc0638	Bifidobacterium pseudocatenulatum	包 含 0 值	1.62211E- 05	4.27222E -07	NR	0.004147813	2 个月后
MGS.	Senegalimassilia	包 含	3.58487E-	0	NR	0.013424785	2 个月后

igc0942	anaerobia	0 值	08				
MGS. igc0536	Bacteroides coprocola	包 含 0 值	1.85E-07	0.00E+00	NR	0.040105279	2 个月后
MGS. igc0148	Bacteroides coprocola	包 含 0 值	9.48751E-07	7.65908E-08	NR	0.04620717	2 个月后
MGS. igc1137	Streptococcus sanguinis	包 含 0 值	8.51319E-07	2.37602E-07	NR	0.04620717	2 个月后
MGS. igc0100	Coprobacillus sp. D6	包 含 0 值	0	1.00509E-06	R	0.034094293	3 个月后
MGS. igc0534	Paraprevotella xylaniphila	包 含 0 值	0	2.43791E-08	R	0.044550647	3 个月后
MGS. igc1361	[Clostridium] innocuum	包 含 0 值	0	8.07538E-08	R	0.044550647	3 个月后
MGS. igc0835	Megasphaera massiliensis	包 含 0 值	4.04E-08	0.00E+00	NR	0.015024285	3 个月后
MGS. igc0206	Prevotella sp. 109	包 含 0 值	2.05061E-08	0	NR	0.044368049	3 个月后
MGS. igc1072	[Clostridium] scindens	包 含 0 值	4.73924E-08	0	NR	0.048406019	3 个月后
MGS. igc0314	Prevotella sp. P4-76	包 含 0 值	0	2.65759E-08	R	0.000746981	治疗后病人并集
MGS. igc0789	Prevotella stercorea	包 含 0 值	0.00E+00	2.83E-08	R	0.010186571	治疗后病人并集
MGS. igc0473	Clostridium paraputrificum	包 含 0 值	0	7.4145E-08	R	0.021681797	治疗后病人并集
MGS. igc0007	[Clostridium] bolteae	包 含 0 值	2.53236E-05	0.00010018	R	0.041029057	治疗后病人并集
MGS. igc0067	Morganella morganii	包 含 0 值	0	3.3174E-08	R	0.043446083	治疗后病人并集
MGS. igc0617	Bifidobacterium adolescentis	包 含 0 值	1.85465E-06	0	NR	0.000595473	治疗后病人并集
MGS. igc1177	Bifidobacterium catenulatum	包 含 0 值	4.24917E-07	9.77E-09	NR	0.009520647	治疗后病人并集
MGS. igc0823	Faecalitalea cylindroides	包 含 0 值	0	0	NR	0.026212351	治疗后病人并集
MGS. igc0166	Ruminococcus bicirculans	包 含 0 值	2.10974E-05	2.22011E-06	NR	0.03142258	治疗后病人并集
MGS. igc0190	Lactococcus lactis	包 含 0 值	2.75E-08	0.00E+00	NR	0.033793729	治疗后病人并集
MGS. igc0255	Anaerostipes hadrus	包 含 0 值	6.53E-05	7.76E-06	NR	0.034137901	治疗后病人并集
MGS. igc0141	Barnesiella viscericola	包 含 0 值	0	0.00E+00	NR	0.040664336	治疗后病人并集
MGS.	bacterium LF-3	包 含	2.75985E-	7.28676E	NR	0.042136355	治疗后病

igc0889		0 值	07	-08			人并集
MGS. igc1434	Ruminococcus bromii	包含 0 值	1.13E-06	0.00E+00	NR	0.042136355	治疗后病人并集
MGS. igc1020	Bifidobacterium angulatum	包含 0 值	0	0	NR	0.042204091	治疗后病人并集
MGS. igc1137	Streptococcus sanguinis	包含 0 值	6.97513E-07	3.64642E-07	NR	0.045729944	治疗后病人并集
MGS. igc0797	Anaerostipes hadrus	包含 0 值	1.25E-07	1.54E-08	NR	0.048716614	治疗后病人并集
MGS. igc0156	[Eubacterium] hallii	包含 0 值	3.18652E-06	8.34405E-08	NR	0.049265366	治疗后病人并集
MGS. igc0022	Blautia producta	剔除 0 值	6.92727E-08	1.05188E-06	R	0.006216629	治疗后病人并集
MGS. igc0959	Lactobacillus gasseri	剔除 0 值	3.53534E-08	5.15484E-07	R	0.012121212	治疗后病人并集
MGS. igc0983	Klebsiella oxytoca	剔除 0 值	6.13195E-08	2.52991E-07	R	0.015683593	治疗后病人并集
MGS. igc0007	[Clostridium] bolteae	剔除 0 值	2.53236E-05	0.00010018	R	0.041029057	治疗后病人并集
MGS. igc0625	Bifidobacterium longum	剔除 0 值	6.25E-05	4.14E-06	NR	0.006833116	治疗后病人并集
MGS. igc0617	Bifidobacterium adolescentis	剔除 0 值	1.95499E-06	9.40674E-08	NR	0.010519789	治疗后病人并集
MGS. igc1180	Collinsella aerofaciens	剔除 0 值	6.25539E-07	1.1497E-07	NR	0.017482517	治疗后病人并集
MGS. igc0255	Anaerostipes hadrus	剔除 0 值	1.02E-04	8.20E-06	NR	0.018931075	治疗后病人并集
MGS. igc1472	Candidatus Alistipes marseilloanorexicus	剔除 0 值	3.58E-07	6.20E-08	NR	0.028571429	治疗后病人并集
MGS. igc0638	Bifidobacterium pseudocatenulatum	剔除 0 值	2.40733E-05	4.986E-07	NR	0.029496475	治疗后病人并集
MGS. igc1177	Bifidobacterium catenulatum	剔除 0 值	6.69094E-07	6.15E-08	NR	0.045585482	治疗后病人并集

实施例 4：通过潜在菌群标志物筛选构建疗效预测模型的过程

随机选择 10 例有响应的病人的样品以及 10 例无响应的病人的样品，通过实施例 2 和实施例 3 得到的潜在菌群标志物筛选构建疗效预测模型。

- 本实施例包含从上述 51 例样本中随机筛选获得的 10 例有响应病人和 10 例无响应病人在治疗前的菌群相对丰度数据集。该数据集以上述表 2 和表 3 中出现的显著差异菌为主要潜在标志物作为训练集进行 100000 次交叉验证的随机森林筛选。经过随机森林模型筛选验证，在特定的 5 种肠道菌组合（表 4）的决策树组合中获得了最低的错误率（如图 3 中 a 所示）。该组合被用于构建基于随机森林的决策模型，并获得了 0.97 的曲线下面积（最大值为 1），说明该模型的敏感性与特异性相当高（如图 3 中 b，以及图 3 中 c 所示）。

表 4 随机森林模型肠道菌中标志物组合

Mgs 编号	注释物种名	注释率 (%)	标志物在 100000 次训 练中的出现 频数	SEQ ID NO:	序列 数目
MGS.igc1137	Streptococcus sanguinis	92.04	99682	298~396	99
MGS.igc0006	Escherichia coli	98.33	83135	1~99	99
MGS.igc1262	Clostridium sp. L2-50	97.08	66533	397~495	99
MGS.igc0024	Citrobacter freundii	98.12	53320	100~198	99
MGS.igc0207	Pyramidobacter piscolens	98.79	32564	199~297	99

注释率：聚类到该 MGS 编号下的基因占所注释物种的百分比。

每个训练样本标志物含量及模型给出预测响应率见表 5。预测概率高于 0.5 的个体将判为有效，反之无效。

5

表 5 训练集标志物相对丰度与模型预测概率表

样品 编号	标志物相对丰度					真实 分组	预测 响应概率
	MGS.igc000 6	MGS.igc0024	MGS.igc0207	MGS.igc1137	MGS.igc1262		
P006	3.27E-05	5.08E-05	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	响应	0.94
P041	1.86E-04	9.21E-08	2.20E-08	1.21E-07	0.00E+00	响应	0.97
P049	7.13E-06	6.61E-08	3.88E-08	1.78E-07	0.00E+00	响应	0.65
P090	1.13E-03	3.07E-04	1.51E-07	5.37E-06	0.00E+00	响应	0.65
P066	2.30E-04	8.88E-08	7.02E-08	1.07E-07	0.00E+00	响应	0.77
P081	1.99E-05	1.31E-08	0.00E+00	1.88E-07	0.00E+00	响应	0.73
P113	2.62E-04	1.27E-06	4.73E-08	4.62E-08	0.00E+00	响应	0.98
P121	2.22E-04	7.09E-06	0.00E+00	5.88E-07	0.00E+00	响应	0.69
P110	1.25E-05	1.31E-08	0.00E+00	3.36E-08	0.00E+00	响应	0.84
P077	1.62E-03	1.01E-06	2.22E-07	5.72E-07	1.25E-07	响应	0.36
P151	2.35E-06	5.40E-08	0.00E+00	1.32E-06	2.56E-08	无响应	0.20
P140	1.25E-05	3.45E-08	1.79E-07	1.71E-06	3.66E-07	无响应	0.13
P148	7.79E-05	0.00E+00	6.53E-08	1.77E-06	0.00E+00	无响应	0.38
P147	3.02E-06	5.40E-08	4.68E-06	5.67E-07	1.81E-06	无响应	0.03
P008	2.04E-06	1.91E-07	1.17E-07	2.54E-07	0.00E+00	无响应	0.43
P050	2.44E-06	6.26E-07	0.00E+00	2.99E-07	2.79E-08	无响应	0.46
P098	4.08E-05	3.03E-08	1.12E-07	9.00E-07	2.69E-05	无响应	0.11
P124	3.29E-06	0.00E+00	6.29E-07	4.61E-07	4.77E-06	无响应	0.05
P128	1.16E-04	5.59E-08	1.01E-07	2.50E-07	7.01E-07	无响应	0.21
P094	2.69E-05	0.00E+00	1.66E-05	7.76E-07	0.00E+00	无响应	0.30

实施例 5：疗效预测模型在独立肺癌患者群体中的有效性验证

本实施例包含上述 84 例样本中独立于实施例 4 训练集以外的 14 例有响应病人和 19 例无响应病人在治疗前的菌群相对丰度数据集，作为验证集，应用实施例 4 中获得的模型进行治疗反馈预测并做评价。

测试判别结果得到 0.70 的曲线下面积（最高为 1），说明了该模型的可重复性和真实有效性（如图 3 中 d，以及图 3 中 e 所示）。每个验证集样本标志物含量及模型给出预测响应率见表 6。预测概率高于 0.5 的个体将判为有效，反之无效，模型最佳判别阈值在 0.5 时具有较好的判别效果。

- 5 具体预测方法为：在 3.3.2 版本 R 中使用“randomForest 4.6-12 package”进行随机森林模型分类和回归。输入包括训练集数据(即训练样本中选定的 MGS 物种标志物的相对丰度，见表 5)和样本疗效情况(有响应或无响应)，以及一个验证集(验证集中所选属 MGS 物种标志物的相对丰度，见表 6)。然后，发明人利用 R 软件中随机森林包的随机森林函数建立分类和预测函数对验证集数据进行预测，输出即为预测结果(响应概率)，最佳分类阈值为 0.5(如果响应概率高于 0.5，则预测有疗效)。

表 6 验证集标志物相对丰度与模型预测概率表

样品编号	标志物相对丰度					真实 分组	预测 响应 概率
	MGS.igc00 06	MGS.igc00 24	MGS.igc02 07	MGS.igc11 37	MGS.igc12 62		
P112	1.02E-02	8.13E-06	0.00E+00	1.68E-07	0.00E+00	响应	0.994
P085	2.55E-04	6.90E-07	0.00E+00	1.27E-07	0.00E+00	响应	0.986
P168	2.01E-05	5.44E-08	0.00E+00	8.67E-08	0.00E+00	响应	0.914
P021	3.98E-03	1.98E-06	4.17E-08	9.44E-07	0.00E+00	响应	0.864
P089	6.22E-04	9.27E-06	5.39E-08	1.08E-06	0.00E+00	响应	0.858
P152	6.22E-04	2.83E-07	0.00E+00	1.17E-07	1.07E-07	响应	0.816
P130	1.16E-03	6.08E-07	0.00E+00	2.77E-07	0.00E+00	响应	0.764
P107	4.72E-04	2.22E-07	5.06E-08	2.25E-07	0.00E+00	响应	0.718
P012	1.78E-05	0.00E+00	8.39E-08	1.03E-07	0.00E+00	响应	0.66
P092	2.70E-05	7.40E-08	0.00E+00	2.96E-07	0.00E+00	响应	0.54
P103	7.40E-05	6.60E-08	2.31E-08	3.30E-07	0.00E+00	响应	0.534
P123	2.37E-03	5.72E-07	0.00E+00	4.59E-07	1.03E-06	响应	0.526
P095	5.93E-06	1.33E-07	9.85E-07	6.15E-08	5.86E-07	响应	0.508
P149	8.55E-07	0.00E+00	0.00E+00	3.24E-07	0.00E+00	响应	0.276
P016	7.47E-06	3.95E-07	0.00E+00	3.23E-08	0.00E+00	无响应	0.93
P020	1.84E-04	1.92E-08	4.78E-08	3.43E-08	0.00E+00	无响应	0.9
P074	1.13E-03	4.88E-05	0.00E+00	1.79E-07	1.82E-07	无响应	0.858
P026	1.94E-04	8.44E-08	0.00E+00	1.87E-08	3.93E-08	无响应	0.812
P024	2.06E-04	1.04E-06	7.32E-08	3.63E-08	6.50E-05	无响应	0.74
P043	8.58E-05	5.89E-06	0.00E+00	6.72E-07	0.00E+00	无响应	0.738
P101	4.14E-04	2.11E-07	0.00E+00	4.12E-07	0.00E+00	无响应	0.698
P100	4.20E-05	0.00E+00	0.00E+00	2.92E-08	4.21E-08	无响应	0.676
P075	6.62E-04	2.82E-07	7.23E-08	4.70E-07	0.00E+00	无响应	0.662
P014	3.17E-06	0.00E+00	1.14E-06	9.12E-08	0.00E+00	无响应	0.506
P105	1.13E-04	1.46E-08	0.00E+00	5.68E-07	0.00E+00	无响应	0.476
P047	1.52E-05	3.01E-08	0.00E+00	9.83E-07	0.00E+00	无响应	0.406
P096	1.94E-04	5.30E-07	2.53E-06	1.70E-06	2.19E-07	无响应	0.406
P129	7.25E-04	1.12E-07	3.74E-06	3.79E-07	4.48E-07	无响应	0.4
P072	2.92E-06	0.00E+00	0.00E+00	2.48E-07	0.00E+00	无响应	0.278
P083	1.03E-06	0.00E+00	0.00E+00	3.95E-06	0.00E+00	无响应	0.248

P108	1.06E-05	0.00E+00	9.59E-07	2.26E-07	0.00E+00	无响应	0.236
P017	7.67E-05	1.91E-08	1.36E-07	8.50E-07	0.00E+00	无响应	0.208
P131	1.04E-05	0.00E+00	4.24E-07	6.26E-07	1.87E-08	无响应	0.114

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

1、肠道宏基因组在预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果中的用途。

2、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，利用宏基因组学分析所述肠道宏基因组的组分或者功能变化，来预测 PD-1 抗体阻断剂对于癌症的治疗效果。

3、根据权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述宏基因组学为全基因组测序、16S/18S rDNA 测序、或者探针测序。

4、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述肠道宏基因组包括肠道微生物。

5、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述肠道宏基因组的组分变化包括肠道微生物的类型或者含量的变化。

6、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述肠道宏基因组的功能变化包括代谢功能基因的变化。

7、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述癌症包括选自非小细胞肺癌、结直肠癌、肝癌、食管癌、肺癌、乳腺癌、胃癌中的至少一种。

8、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述 PD-1 抗体阻断剂包括选自派姆单抗（pembrolizumab），纳武单抗（nivolumab），Camrelizumab 中的至少一种。

9、一种标志物，其特征在于，包括选自下列中的至少一种：

Streptococcus sanguinis（血链球菌）和/或其类似物，Escherichia coli（大肠杆菌）和/或其类似物，Clostridium sp. L2-50 和/或其类似物，Citrobacter freundii（弗氏柠檬酸杆菌）和/或其类似物，Pyramidobacter pisolens 和/或其类似物，

其中，所述 Streptococcus sanguinis 类似物与 Streptococcus sanguinis 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，

所述 Escherichia coli 类似物与 Escherichia coli 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，

所述 Clostridium sp. L2-50 类似物与 Clostridium sp. L2-50 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，

所述 Citrobacter freundii 类似物与 Citrobacter freundii 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上，

所述 Pyramidobacter pisolens 类似物与 Pyramidobacter pisolens 的基因组序列相比，比对相似度在 85% 以上。

10、一种制剂，其特征在于，所述制剂由包含有选自 Escherichia coli（大肠杆菌）和/或其类似物，Citrobacter freundii（弗氏柠檬酸杆菌）和/或其类似物中的至少一种制备而成。

11、根据权利要求 10 所述的制剂，其特征在于，所述制剂包括选自片剂、丸剂、散剂、注射剂、溶液剂、混悬剂、胶囊剂、颗粒剂中的至少一种。

12、一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法，其特征在于，包括：

（1）从所述患者中采集样本；

（2）对所述样本进行检测，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息，所述标志物为权利要求 9 所述的标志物；

（3）将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较，预测 PD-1 抗体阻断剂对所述患者的治疗效果；

优选地，所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，在将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集进行比较时，还包括执行多元统计模型以获得响应概率。

14、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述多元统计模型为随机森林模型。

15、根据权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述响应概率大于预定阈值表明所述 PD-1 抗体阻

断剂能够有效治疗所述患者的非小细胞肺癌。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述预定阈值为 0.5。

17、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，步骤（2）中所述标志物的相对丰度信息是利用测序方法得到的，进一步包括：

5 从所述患者的所述样本中分离得到核酸样本；

基于所述核酸样本，构建测序文库，测序获得测序结果；

对所述测序结果进行分析，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述样本为粪便样本。

19、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述测序是通过第二代测序方法或第三代测序方法
10 进行的；优选地，所述测序是通过选自 HiSeq2000、SOLiD、454、和单分子测序装置的至少一种进行的。

20、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述 PD-1 抗体阻断剂包括选自派姆单抗（pembrolizumab），纳武单抗（nivolumab），Camrelizumab 中的至少一种。

21、一种预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的设备，其特征在于，包括：

样本采集装置，所述样本采集装置适于从所述患者中采集样本；

15 标志物相对丰度确定装置，所述标志物相对丰度确定装置与所述样本采集装置相连，所述标志物相对丰度确定装置适于对所述样本进行检测，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息，所述标志物为权利要求 9 所述的标志物；

20 响应结果确定装置，所述响应结果确定装置与所述标志物相对丰度确定装置相连，所述响应结果确定装置适于将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集或参考值进行比较，预测所述 PD-1 抗体阻断剂对所述患者的治疗效果；

其中，所述参考数据集包括多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息和多个对所述 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的非小细胞肺癌患者样本中所述标志物的相对丰度信息。

22、根据权利要求 21 所述的设备，其特征在于，在将所述样本中标志物的相对丰度信息与参考数据集进行比较时，还包括执行多元统计模型以获得响应概率。

23、根据权利要求 22 所述的设备，其特征在于，所述多元统计模型为随机森林模型；优选地，所述响应概率大于预定阈值表明所述 PD-1 抗体阻断剂能够有效治疗所述患者的非小细胞肺癌；优选地，所述预定阈值为 0.5。

24、根据权利要求 21 所述的设备，其特征在于，所述标志物相对丰度确定装置包括：

30 核酸样本分离单元，所述核酸样本分离单元适于从所述样本中分离得到核酸样本；

测序单元，所述测序单元与所述核酸样本分离单元相连，所述测序单元基于所述核酸样本，构建测序文库，测序获得测序结果；

比对单元，所述比对单元与所述测序单元相连，所述比对单元适于对所述测序结果进行分析，以便确定所述样本中标志物的相对丰度信息。

35 25、根据权利要求 24 所述的设备，其特征在于，所述测序是通过第二代测序方法或第三代测序方法进行的；优选地，所述测序是通过选自 HiSeq2000、SOLiD、454 和单分子测序装置的至少一种进行的。

26、一种试剂盒，其特征在于，包括用于检测权利要求 9 所述的标志物的试剂。

27、根据权利要求 26 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括至少一组参考数据集或者参考值，所述参考数据集或者参考值用来作为每种标志物的相对丰度的参考。

40 28、根据权利要求 27 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括第一计算机程序产品，所述第一计算机程序产品用来执行获得所述的参考数据集或者参考值。

29、根据权利要求 26 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括第二计算机程序产品，所述第二计算机程序产品用来执行权利要求 12~20 中任一项所述的预测 PD-1 抗体阻断剂对非小细胞肺癌患者的治疗效果的方法。

45 30、一种筛选用于非小细胞肺癌的 PD-1 抗体阻断剂的方法，其特征在于，包括：

将患有非小细胞肺癌的受试者分别给予候选 PD-1 抗体阻断剂治疗后,测定来自所述受试者的样品中根据权利要求 9 所述的标志物的相对丰度信息;

将治疗后的样品中所述标志物的相对丰度信息与向所述受试者施用所述候选 PD-1 抗体阻断剂之前的所述标志物的相对丰度信息进行比较;

5 任选地,所述 *Escherichia coli* 和/或其类似物、*Citrobacter freundii* 和/或其类似物中的至少一种标志物的相对丰度增加表明所述候选 PD-1 抗体阻断剂是用于治疗所述受试者的非小细胞肺癌的药物,或者所述方法对受试者的非小细胞肺癌有效;

10 任选地,所述 *Streptococcus sanguinis* 和/或其类似物、*Clostridium* sp. L2-50 和/或其类似物、*Pyramidobacter pisolens* 和/或其类似物中的至少一种标志物的相对丰度减少表明所述候选 PD-1 抗体阻断剂是用于治疗所述受试者的非小细胞肺癌的药物,或者所述方法对受试者的非小细胞肺癌有效。

31、根据权利要求 30 所述的筛选用于非小细胞肺癌的 PD-1 抗体阻断剂的方法,其特征在于,所述受试者为动物或者人。

15 32、标志物在制备试剂盒中的用途,其特征在于,所述试剂盒用于预测非小细胞肺癌患者对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果或筛选用于非小细胞肺癌的 PD-1 抗体阻断剂,所述标志物为权利要求 9 所述的标志物。

33、一种建立用于预测非小细胞肺癌患者对于 PD-1 抗体阻断剂的响应效果的预测模型的方法,所述方法包括鉴定非小细胞肺癌患者对 PD-1 抗体阻断剂表现出有效响应与对 PD-1 抗体阻断剂表现出无效响应的样品之间差异表达的物质的步骤,其中所述差异表达的物质包括选自权利要求 9 所述的标志物的一种或多种。

20



图 1



图 2

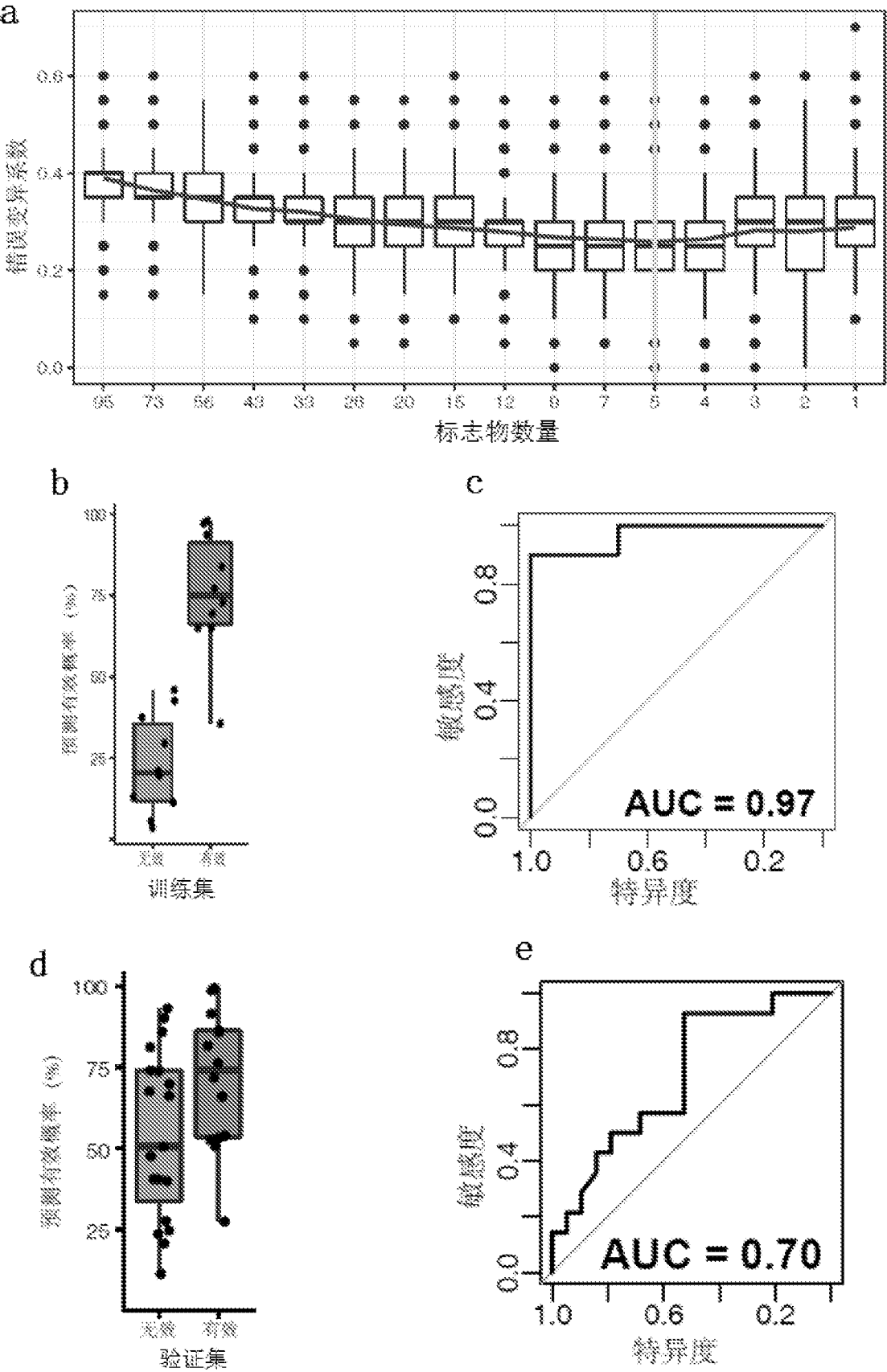


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/075825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, CNABS, JPABS, CNMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, ISI Web of Science: 肠道, 宏基因组, 微生物, 细菌, 丰度, 抗体, 癌, 肿瘤, 非小细胞肺癌, enteric, enteral, intestinal, intestine, gut, metagenome, metagenomics, microbe, microorganism, microbial, microflora, bacillus, bacteria, bacterium, abundance, PD-1, PD1, antibody, cancer, carcinomas, tumor, tumour, neoplasma, NSCLC, Streptococcus sanguinis, Escherichia coli, Clostridium, Citrobacter freundii, Pyramidobacter piscicola

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADACHI, K. et al. "Microbial Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy against Cancer" <i>Journal of Gastroenterology</i> , Vol. 53, No. 9, 12 July 2018 (2018-07-12), pages 999-1005, see the abstract, and page 1002	1-8
X	OWADA-OZAKI, Y. et al. "A Study of Biomarkers in Immuno-Oncology - Correlation between Gut Microbiome Composition and the Effects of Immune Checkpoint Inhibitors" <i>Cancer & Chemotherapy</i> , Vol. 45, No. 9, 30 September 2018 (2018-09-30), pages 1234-1237, see the abstract, and page 1236	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 2019

Date of mailing of the international search report

28 November 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/075825

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] see Form PCT/ISA/206 for details.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-8**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/075825

A. 主题的分类 C12Q 1/689(2018.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类											
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q; G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, CNABS, JPABS, CNMED, KRABS, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, ISI Web of Science: 肠道, 宏基因组, 微生物, 细菌, 丰度, 抗体, 癌, 肿瘤, 非小细胞肺癌, enteric, enteral, intestinal, intestine, gut, metagenome, metagenomics, microbe, microorganism, microbial, microflora, bacillus, bacteria, bacterium, abundance, PD-1, PD1, antibody, cancer, carcinomas, tumor, tumour, neoplasma, NSCLC, Streptococcus sanguinis, Escherichia coli, Clostridium, Citrobacter freundii, Pyramidobacter pisolens											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Keishi Adachi, 等. "Microbial biomarkers for immune checkpoint blockade therapy against cancer" JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 第53卷, 第9期, 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12), 第999-1005页 参见摘要, 第1002页</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Yuki Owada-Ozaki, 等. "A Study of Biomarkers in Immuno-Oncology - Correlation between Gut Microbiome Composition and the Effects of Immune Checkpoint Inhibitors" Cancer & chemotherapy, 第45卷, 第9期, 2018年 9月 30日 (2018 - 09 - 30), 第1234-1237页 参见摘要, 第1236页</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	Keishi Adachi, 等. "Microbial biomarkers for immune checkpoint blockade therapy against cancer" JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 第53卷, 第9期, 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12), 第999-1005页 参见摘要, 第1002页	1-8	X	Yuki Owada-Ozaki, 等. "A Study of Biomarkers in Immuno-Oncology - Correlation between Gut Microbiome Composition and the Effects of Immune Checkpoint Inhibitors" Cancer & chemotherapy, 第45卷, 第9期, 2018年 9月 30日 (2018 - 09 - 30), 第1234-1237页 参见摘要, 第1236页	1-8
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	Keishi Adachi, 等. "Microbial biomarkers for immune checkpoint blockade therapy against cancer" JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 第53卷, 第9期, 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12), 第999-1005页 参见摘要, 第1002页	1-8									
X	Yuki Owada-Ozaki, 等. "A Study of Biomarkers in Immuno-Oncology - Correlation between Gut Microbiome Composition and the Effects of Immune Checkpoint Inhibitors" Cancer & chemotherapy, 第45卷, 第9期, 2018年 9月 30日 (2018 - 09 - 30), 第1234-1237页 参见摘要, 第1236页	1-8									
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☐ 见同族专利附件。											
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件											
国际检索实际完成的日期 2019年 11月 20日		国际检索报告邮寄日期 2019年 11月 28日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 幸颖 电话号码 62411044									

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 详情参见PCT/ISA/206表。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 1-8

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。