



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111164103 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880052676.1

A·比利亚努埃瓦-罗德里格斯

(22)申请日 2018.06.14

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(30)优先权数据

62/519,711 2017.06.14 US

62/629,231 2018.02.12 US

代理人 黄琳娟

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/037579 2018.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据
W02018/232142 EN 2018.12.20

(71)申请人 西奈山伊坎医学院
地址 美国纽约州

(72)发明人 D·西亚
J·M·略韦特·艾·拜耳

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

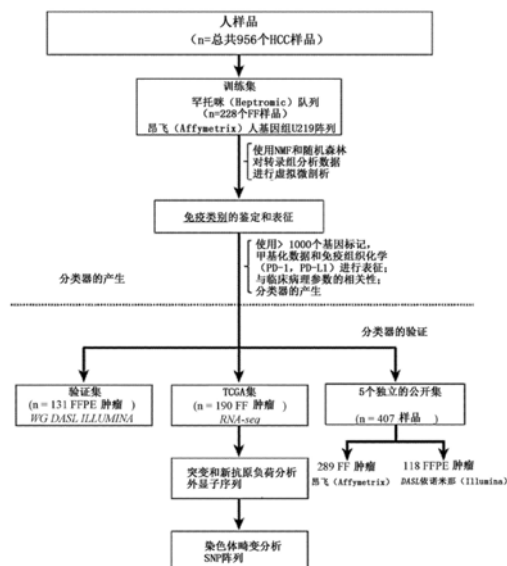
权利要求书3页 说明书32页 附图39页

(54)发明名称

检测和治疗对免疫疗法应答的肝细胞癌类别的方法

(57)摘要

本发明涉及用于检测、诊断、预后、监测和治疗肝细胞癌患者的方法。特别地，本发明提供了用于检测和治疗将从免疫疗法中受益的患者，即对免疫疗法应答最强的患者的诊断标记物。



1. 一种用于在诊断患有肝细胞癌的受试者中检测对免疫疗法应答的表型的方法, 包括:

a. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平, 以获得测试表达谱;

b. 将所述基因的测试表达谱和参考表达谱比较, 其中所述参考表达谱包含来自对照组的样品中的相同基因的参考表达水平; 以及

c. 检测所述测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与所述参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的, 并进一步检测所述受试者对免疫疗法有应答。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述受试者最近被诊断出患有肝细胞癌 (HCC)。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述样品来自肝细胞癌肿瘤。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有肝细胞癌的受试者。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有另一种癌症的受试者。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述癌症是肺癌或黑色素瘤。

7. 治疗患有肝细胞癌的受试者的方法, 包含:

a. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平, 以获得测试表达谱;

b. 将所述基因的测试表达谱和参考表达谱比较, 其中所述参考表达谱包含来自对照组的样品中的相同基因的参考表达水平;

c. 检测所述测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与所述参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的; 以及

d. 用所述免疫疗法治疗受试者。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述受试者最近被诊断出患有肝细胞癌 (HCC)。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述样品来自肝细胞癌肿瘤。

10. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有肝细胞癌的受试者。

11. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有另一种癌症的受试者。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述癌症是肺癌或黑色素瘤。

13. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述免疫疗法选自由针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白 (CTLA-4) (例如伊匹木单抗)、程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) (例如纳武单抗和派姆单抗) 和其配体PD-L1 (例如阿特珠单抗) 的单克隆抗体及其组合组成的组。

14. 治疗患有肝细胞癌的受试者的方法, 包含

a. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平, 以获得第一测试表达谱;

b. 将表3中一个或多个基因的第一测试表达谱与第一参考表达谱比较, 其中所述第一参考表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

c. 检测所述第一测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与所述第一参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的,并进一步检测所述受试者对免疫疗法有应答;

d. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中图12中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第二测试表达谱;

e. 将图12中一个或多个基因途径的第二测试表达谱与第二参考表达谱比较,其中所述第二表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

f. 检测所述第一测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与第二参考表达谱中相同基因的指示耗竭免疫应答类别的表达水平相比是相同的;以及

g. 用免疫疗法和第二药剂联合治疗所述受试者。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述受试者最近被诊断出患有肝细胞癌(HCC)。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述样品来自肝细胞癌肿瘤。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有肝细胞癌的受试者。

18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述对照是对免疫疗法应答良好的患有另一种癌症的受试者。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述癌症是肺癌或黑色素瘤。

20. 根据权利要求14所述的方法,其中所述免疫疗法选自由针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白(CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和其配体PD-L1的单克隆抗体及其组合组成的组。

21. 根据权利要求14所述的方法,其中在步骤(f)中增加的基因选自由TGF- β 和来自CTNNB1信号传导途径的基因组成的组。

22. 根据权利要求14所述的方法,其中所述第二药剂选自由TGF- β 抑制剂和CTNNB1信号传导途径抑制剂组成的组。

23. 根据权利要求14所述的方法,其中来自所述CTNNB1信号传导途径的基因选自由CCL4、PTK2及其组合组成的组。

24. 根据权利要求14所述的方法,其中所述第二药剂是化学治疗剂或放射。

25. 治疗患有肝细胞癌(HCC)的受试者的方法,包含

a. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第一测试表达谱;

b. 将表3中一个或多个基因的第一测试表达谱与第一参考表达谱比较,其中所述第一参考表达谱包含来自对照组的样品中的相同基因的参考表达水平;

c. 检测所述测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与所述参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的,并进一步检测所述受试者对免疫疗法有应答;

d. 分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中选自由PMEPA1、LGALS1、LGALS3、TGF- β 、来自CTNNB1信号传导途径的基因和其组合组成的组的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第二测试表达谱;

e. 将选自由PMEPA1、LGALS1、LGALS3、TGF- β 、来自CTNNB1信号传导途径的基因和其组合

组成的组的一个或多个基因的第二测试表达谱与第二参考表达谱比较,其中所述第二表达谱包含来自对照组的样品中的相同基因的参考表达水平;

f.检测所述第二测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与所述第二参考表达谱中相同基因的指示耗竭免疫应答表型的表达水平相比是相同的;以及

g.用免疫疗法和第二药剂联合治疗受试者。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述受试者最近被诊断出患有肝细胞癌(HCC)。

27.根据权利要求25所述的方法,其中所述样品来自肝细胞癌肿瘤。

28.根据权利要求25所述的方法,其中所述对照组是对免疫疗法应答良好的患有肝细胞癌的受试者。

29.根据权利要求25所述的方法,其中所述对照是对免疫疗法应答良好的患有另一种癌症的受试者。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述癌症是肺癌或黑色素瘤。

31.根据权利要求25所述的方法,其中所述免疫疗法选自由针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白(CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和其配体PD-L1的单克隆抗体及其组合组成的组。

32.根据权利要求25所述的方法,其中在步骤(f)中增加的基因选自由TGF- β 和来自CTNNB1信号传导途径的基因组成的组。

33.根据权利要求25所述的方法,其中所述第二药剂选自由TGF- β 抑制剂和CTNNB1信号传导途径抑制剂组成的组。

34.根据权利要求25所述的方法,其中来自CTNNB1信号传导途径的基因选自由CCL4、PTK2及其组合组成的组。

35.根据权利要求25所述的方法,其中所述第二药剂是化学治疗剂或放射。

36.用于在诊断患有肝细胞癌的受试者中检测对免疫疗法应答的表型的试剂盒,包含针对表3中列出的一个或多个基因的探针,用于从生物组织或体液中分离和纯化核酸的试剂,用于对分离和纯化的核酸进行测定的试剂,使用说明以及参考值或在对照组样品中获得所含基因的参考值的方法。

37.根据权利要求36所述的试剂盒,还包括针对图12中列出的一个或多个基因的探针。

38.根据权利要求37所述的试剂盒,其中所述探针以微阵列形式连接至固态。

检测和治疗对免疫疗法应答的肝细胞癌类别的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年6月14日提交的美国专利申请序列号62/519,711和2018年2月12日提交的美国专利申请序列号62/629,231的优先权,其全部内容通过引用并入文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于检测、诊断、预测、监测和治疗肝细胞癌患者的方法。特别地,本发明提供了用于检测和治疗将从免疫疗法中受益的患者,即对免疫疗法应答最强的患者的诊断标记。

背景技术

[0004] 肝细胞癌(HCC)是全球癌症相关死亡率的第二大主要原因。HCC死亡人数(每年约80万)与新病例重叠,这证明了其高致死率(Murray,等人2012;Llovet,等人2016)。这种恶性肿瘤通常发生在慢性炎症性肝病(例如肝硬化)的环境中,并且与明确的风险因素相关,例如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、酗酒、代谢综合征和糖尿病(Llovet,等人2016)。在过去的十年中,重大进展阐明了HCC的分子发病机理(Zucman-Rossi,等人2015),但是,当前的治疗选择仍然非常有限。当治愈性方法(例如手术切除、移植或局部消融)有效时,只有少数HCC患者在早期被诊断出。在晚期患者中,唯一能提高生存率的全身疗法是多酪氨酸激酶抑制剂索拉非尼(第一线)(Llovet,等人2008)和瑞戈非尼(第二线)(Bruix,等人2017)。尽管如此,即使这些药物提供了存活益处,但中值预期寿命仍不到2年。

[0005] HCC包含多种细胞类型的混合物,包括恶性肝细胞、免疫细胞和分散在细胞外基质内并支持基质的内皮细胞。先前的研究已经建立了一套分析方法来虚拟剖析源自这些不同部分的分子信号(Moffitt,等人2013)。

[0006] 近年来,免疫检查点抑制剂通过靶向T细胞中的调节途径释放人体自身的免疫应答以攻击肿瘤,在不同的实体瘤中已经显示出显著的功效。这导致食品药品监督管理局(FDA)批准了四种基于免疫的药剂,包括针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白(CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和其配体PD-L1的单克隆抗体,用于治疗晚期恶性肿瘤,例如黑色素瘤或肺癌。这些药剂伊匹木单抗、纳武单抗、派姆单抗和阿特珠单抗可以显著改善这些患者的存活率(Llovet,等人.2015)。这些化合物在一部分转移性疾病患者中引起持久的临床反应和长期缓解(Zou,等人2016;Khalil,等人2016)。鉴于这些疗法针对免疫细胞而非肿瘤细胞,因此它们可在多种癌症类型中有效,最近在包括膀胱癌和结肠直肠癌的实体和血液恶性肿瘤中均报告了具有重要活性(Topalian,等人2012;Le,等人2015)。有趣的是,但是,并非所有患者对这些治疗方案都有相同的应答可能性(Zou,等人,2016)。

[0007] 鉴于这些疗法的前景以及哪些患者可以从中受益的矛盾证据,一直在寻找可靠的生物标记物来预测免疫疗法的积极结果。一种这样的生物标记物是蛋白质PD-L1的表达。非小细胞肺癌的初步试验表明,与PD-L1呈阴性的患者相比,PD-L1表达呈阳性的患者具有更大的总体应答(Herbst,等人2016;Garon,等人2015;Topalian,等人2012)。

[0008] 然而,由于其低准确性和混合结果,因此基于免疫组织化学(IHC)的PD-L1检测在测定和预测患者对免疫疗法的应答方面并不可靠。首先,该程序存在技术问题。基于IHC的检测在定义“阳性”肿瘤PD-L1染色以及对于阳性染色使用不同的截止值方面是主观的。使用相同的测定法,病理学家的发现也存在差异(Brunnstrom, 等人2017; Wang, 等人2016)。

[0009] 另外,用于不同研究的抗体具有不同的敏感性。在使用IHC对PD-L1的各种研究中,使用了至少七种不同的抗体。使用不同的PD-L1抗体是在各种研究中PD-L1在肿瘤中的表达存在差异的另一个原因。一般参见Wang, 等人2016。

[0010] IHC方案的准确性还取决于生物学因素,例如时间和空间因素。换句话说,PD-L1在肿瘤中的表达在时间和面积上不均匀。例如,当PD-L1在肿瘤中过表达时获得的试样(时间上)或者从丢失相关的肿瘤-免疫界面的患者获得的样品(空间上)导致通过IHC测量的PD-L1不准确(Latchman, 等人2001)。因此,IHC用于PD-L1检测的准确性取决于活检的发生时间,并且还与包括放射和化学疗法的先前治疗相关。研究表明,放射治疗后,肿瘤PD-L1的表达上调(Deng, 等人2014)。

[0011] 还需要考虑空间因素,因为PD-L1表达在原发性肿瘤和转移性病灶中可能有所不同。即使在一个样本中,PD-L1表达的不同模式(局灶性和弥散性)也可能导致偏差(Wang, 等人2016)。同样,在同一肿瘤上的不同位置也是异质的,PD-L1阳性结果由膜或细胞质染色确定,这表明只有阳性膜染色才具有生物学显著性(Wang, 等人2016)。

[0012] 此外,由于其他因素例如数据具有回顾性,患者具有不同的临床特征以及比较来自不同肿瘤类型的样品,因此难以通过IHC对PD-L1蛋白表达进行准确的评分。

[0013] 免疫疗法已开始用于治疗HCC。测试纳武单抗的II期延长临床试验结果表明,在214例治疗患者中,客观应答率为16%,中值存活期为14个月(El-Khoueiry, 等人2015)。但是,在该试验中,客观应答(21/145例,15%)与肿瘤细胞上PD-L1的表达无关。关于HCC肿瘤的免疫学特征以及如何利用此信息来最大化对基于免疫的疗法的应答知之甚少。

[0014] 由于这些原因以及如上所述的事实,PD-L1表达不是用于选择免疫疗法理想候选物的可靠生物标记物,因此需要鉴定准确的预测性生物标记物,以检测可从免疫疗法中受益的HCC患者。

发明内容

[0015] 本发明通过使用一组基因表达生物标记物来准确地检测肝细胞癌(HCC)患者的免疫疗法应答的表型,从而解决了使用PD-L1表达作为生物标记物来检测免疫疗法应答的问题。

[0016] 本文所述的生物标记物不仅提供了确定性地鉴定和预测患者对免疫疗法的应答的新颖且独特的方式,而且还提供了用于HCC以及其他癌症的药物筛选和基础研究的靶标。

[0017] 使用非负矩阵分解(NMF),本文所述的实施例对956例人HCC样品的基因表达数据进行去卷积,并分离出从炎症浸润液释放的信号以表征HCC的免疫学特征。这使得能够鉴定具有特定生物学特性的HCC的免疫特异性类别,称为“免疫”类别。该类别的关键特征包括免疫细胞的实际存在和激活,增强的溶细胞活性以及PD-1和PD-L1的蛋白质表达。使用112个基因的表达对该类别进行进一步评估(图10),发现了基因标记谱,其表明对免疫疗法的应答。将该免疫类别的基因表达谱与接受免疫疗法治疗的HCC患者以及对HCC有应答的其他癌

症患者进行了比较。在这些情况下,免疫类别的基因表达谱与免疫疗法应答性相关。

[0018] 将112个基因板成功缩减为56个基因,选择得分最高的那些基因。如下所示,56个基因的免疫分类器的灵敏度为97%,特异性为98%,准确性为97%(表3)。

[0019] 因此,基因表达生物标记物的使用提供了对免疫疗法应答的HCC患者的准确检测。

[0020] 此外,图11中列出了图10中112个基因的子集,包括在免疫类别中上调的108个基因。

[0021] 免疫类别的进一步剖析揭示了具有主动免疫活性或耗竭(exhausted)免疫活性的两种基于微环境的强大类型。这些进一步的分类有助于确定HCC患者的治疗选择,并提供对HCC免疫环境的全面了解。可以通过图12中的基因途径来鉴定耗竭免疫活性类别。这些基因表达生物标记物在鉴定这些子类方面特别相关,因为在PD-L1和PD-1表达方面,这两类没有显著差异(实例4)。

[0022] 因此,本发明的一个实施例是一种用于在诊断患有肝细胞癌的受试者中检测对免疫疗法应答的表型的方法和/或测定法,包含:

[0023] a.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得测试表达谱;

[0024] b.将基因的测试表达谱和参考表达谱比较,其中参考表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;以及

[0025] c.检测测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的,并进一步检测受试者对免疫疗法有应答。

[0026] 本发明的另一实施例是一种治疗患有HCC的受试者的方法,包含:

[0027] a.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得测试表达谱;

[0028] b.将基因的测试表达谱和参考表达谱比较,其中参考表达谱包含来自对照组的样品中的相同基因的参考表达水平;

[0029] c.检测测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的;以及

[0030] d.用免疫疗法治疗受试者。

[0031] 在一些实施例中,免疫疗法包括但不限于针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白(CTLA-4)(例如伊匹木单抗)、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)(例如纳武单抗和派姆单抗)和其配体PD-L1(例如阿特珠单抗)的单克隆抗体及其组合。

[0032] 在一些实施例中,该受试者近期已诊断出患有肝细胞癌(HCC)。在一些实施例中,该受试者先前已经接受过HCC治疗。

[0033] 在一些实施例中,样品是肿瘤组织。在一些实施例中,分析来自肿瘤的多个样品的基因表达。

[0034] 可以通过本领域已知的任何方法确定任何基因的表达,包括但不限于微阵列;Southern印迹;Northern印迹;点印迹;引物延伸;核酸酶保护;使用例如羟基磷灰石的非双螺旋分子的消减杂交和分离;溶液杂交;过滤杂交;扩增技术例(如RT-PCR)和其他与PCR相关的技术(例如具有熔解曲线分析的PCR和具有质谱的PCR);指纹图谱,例如使用限制性核

酸内切酶;以及使用结构特异性核酸内切酶。也可以使用质谱技术(例如,MALDI或SELDI)、液相色谱法和毛细管凝胶电泳来分析mRNA表达。可使用本领域已知的任何其他方法来检测转录物的存在或不存在。

[0035] 可以将来自患有HCC的受试者的基因表达与对照组中相同基因的参考表达水平进行比较。对照组可以是对免疫疗法应答的患有HCC的受试者。对照组可以是对免疫疗法应答的患有另一种癌症的受试者。对照组可以是对免疫疗法应答的患有肺癌或黑色素瘤的受试者。表达基因的水平可以测量为绝对值或相对值。绝对定量测量特异性RNA的浓度,并需要校准曲线。与管家基因相比,相对定量测量特异性RNA的变化倍数差异。相对定量通常足以调查基因表达水平的生理变化。

[0036] 可以使用图10和11中列出的一个或多个基因来执行这些方法中的任一种。

[0037] 本发明还提供了通过将免疫类别子分类为主动免疫应答类别或耗竭免疫应答类别进一步检测和鉴定对免疫疗法的应答性的方法。这些子分类基于基质的激活。缺乏激活基质的那些被认为是主动免疫应答类别。具有激活基质的那些被认为是耗竭免疫应答类别。这两种类别均属于免疫类别,但需要稍有不同的治疗方案。

[0038] 因此,本发明进一步的实施例是一种治疗患有HCC的受试者的方法,包含

[0039] a.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第一测试表达谱;

[0040] b.将表3中一个或多个基因的第一测试表达谱与第一参考表达谱比较,其中所述第一参考表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

[0041] c.检测测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的,并进一步检测受试者对免疫疗法有应答;

[0042] d.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中图12中的途径中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第二测试表达谱;

[0043] e.将图12中的途径中的一个或多个基因的第二测试表达谱与第二参考表达谱比较,其中所述第二表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

[0044] f.检测第二测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与第二参考表达谱中相同基因的指示耗竭免疫应答表型的表达水平相比是相同的;以及

[0045] g.用免疫疗法和第二药剂联合治疗受试者。

[0046] 在一些实施例中,该受试者近期已诊断出患有肝细胞癌(HCC)。在一些实施例中,该受试者先前已经接受过HCC治疗。

[0047] 在一些实施例中,样品是肿瘤组织。在一些实施例中,分析来自肿瘤的多个样品的基因表达。

[0048] 可以通过本领域已知的任何方法来确定任何基因的表达,包括但不限于微阵列;Southern印迹;Northern印迹;点印迹;引物延伸;核酸酶保护;使用例如羟基磷灰石的非双螺旋分子的消减杂交和分离;溶液杂交;过滤杂交;扩增技术(例如RT-PCR)和其他与PCR相关的技术(例如具有熔解曲线分析的PCR和具有质谱的PCR);指纹图谱,例如使用限制性核酸内切酶;以及使用结构特异性核酸内切酶。也可以使用质谱技术(例如,MALDI或SELDI)、液相色谱法和毛细管凝胶电泳来分析mRNA表达。可使用本领域已知的任何其他方法来检测

转录物的存在或不存在。

[0049] 可以将来自患有HCC的受试者的基因表达与对照组中相同基因的参考表达水平进行比较。步骤(b)和步骤(e)的对照组可以是相同的或对照组可以是不同的。对照组可以是对免疫疗法应答的患有HCC的受试者。对照组可以是对免疫疗法应答的患有另一种癌症的受试者。对照组可以是对免疫疗法应答的患有肺癌或黑色素瘤的受试者。表达基因的水平可以测量为绝对值或相对值。绝对定量测量特异性RNA的浓度,并需要校准曲线。与管家基因相比,相对定量测量特异性RNA的变化倍数差异。相对定量通常足以调查基因表达水平的生理变化。

[0050] 可以使用图10和11中列出的一个或多个基因来执行步骤a-c。

[0051] 在一些实施例中,免疫疗法包括但不限于针对细胞毒性T淋巴细胞蛋白(CTLA-4)(例如伊匹木单抗)、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)(例如纳武单抗和派姆单抗)和其配体PD-L1(例如阿特珠单抗)的单克隆抗体及其组合。

[0052] 在一些实施例中,在步骤(d)中测定表达水平的基因是PMEPA1、LGALS1、LGALS3、TGF-J3或来自包括CXCL12和CCL2的CTNNB1信号传导途径。

[0053] 在一些实施例中,第二药剂包括但不限于TGF- β 抑制剂和CTNNB1信号传导途径抑制剂。在一些实施例中,第二药剂是化学治疗剂或放射物。

[0054] 本发明进一步的实施例是治疗患有HCC的受试者的方法,包含

[0055] a.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中表3中的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第一测试表达谱;

[0056] b.将表3中一个或多个基因的第一测试表达谱与第一参考表达谱比较,其中所述第一参考表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

[0057] c.检测测试表达谱中一个或多个基因的基因表达水平与参考表达谱中相同基因的指示免疫疗法应答表型的表达水平相比是相同的,并进一步检测受试者对免疫疗法有应答;

[0058] d.分析来自患有肝细胞癌的受试者的样品中选自由PMEPA1、LGALS1、LGALS3、TGF- β 、来自CTNNB1信号传导途径的基因和其组合组成的组的一个或多个基因的基因表达水平,以获得第二测试表达谱;

[0059] e.将选自由PMEPA1、LGALS1、LGALS3、TGF- β 、来自CTNNB1信号传导途径的基因和其组合组成的组的一个或多个基因的第二测试表达谱与第二参考表达谱比较,其中所述第二表达谱包含来自对照组的样品中相同基因的参考表达水平;

[0060] f.检测第二测试表达谱中的一个或多个基因的基因表达水平与第二参考表达谱中相同基因的指示耗竭免疫应答表型的表达水平相比是相同的;以及

[0061] g.用免疫疗法和第二药剂联合治疗受试者。

[0062] 在一些实施例中,来自CTNNB1信号传导途径的基因是CXCL12和CCL2。

[0063] 本发明还提供了试剂盒。

附图说明

[0064] 为了说明本发明,在附图中描绘了本发明的某些实施例。然而,本发明不限于附图中描绘的实施例的精确布置和手段。

[0065] 图1描绘了该研究的流程图。这项研究总共使用了956例HCC样品。对包括228例HCC的训练队列(罕托咪(Heptromic))进行了虚拟显微剖析以鉴定免疫类别。然后在7个独立的数据集中进行验证。

[0066] 图2按文本中出现的顺序示出了本研究中使用的可公开获得的基因标记的表格。

[0067] 图3示出了HCC免疫类别的鉴定。图3A示出了使用免疫表达模式的典范基因并由随机森林定义的HCC样品(训练数据集, $n=228$)的共有簇热图(consensus-clustered heatmap)。在热图中,高和低基因集富集得分分别用红色和蓝色表示。标记的阳性预测以红色表示,灰色表示不存在。两个标记都获得了相似的结果。图3B示出了免疫细胞浸润,在免疫类别患者(M321)和免疫类别以外的患者(M743)中PD-1和PD-L1染色的代表性图像。使用20倍捕获图像。图3C是示出与其余队列相比,免疫类别患者的三级淋巴结构(TLS)计数的图。纵轴是TLS计数,表示为连续变量,横轴表示免疫类别内患者(右侧),免疫类别外患者(左侧)。

[0068] 图4示出了免疫类别包含两种不同的基于微环境的子类型。图4A是使用能够捕获激活的炎性基质应答的分子标记对全肿瘤基因表达数据进行的NTP分析,鉴定出两种不同的免疫类别的子类型,即主动(蓝色条)和耗竭(绿色条)免疫应答子类型。在热图中,高和低基因集富集得分分别用红色和蓝色表示;高和低基因表达使用相同的表示。通过NTP计算得出的标记的阳性预测以红色表示,灰色表示不存在。图4B是免疫细胞浸润(高与低)、TLS[阳性(>5个病灶)与阴性(<5个病灶)]、在免疫类别和其余队列中以及两个免疫子类型之间的PD-1和PD-L1阳性染色的分布的热图表示。在免疫浸润(10/35与1/14, $p=0.14$)、TLS计数(>5个病灶, 15/34与4/17, $p=0.22$)、PD-L1(9/34与3/14, $p=1.00$)和PD-1表达(8/34与0/14, $p=0.08$)方面,主动和耗竭免疫子类型之间没有观察到显著差异。图4C是免疫细胞浸润,在主动免疫子类型患者(M499)和耗竭免疫子类型患者(B209)中PD-1和PD-L1染色的代表性图像。使用40倍捕获图像。

[0069] 图5示出了根据免疫应答类型状态和免疫类别的稳健性而对总存活率和复发率的Kaplan-Meier估计。图5A示出了罕托咪(Heptromic)队列(主动免疫应答与其余加上耗竭免疫应答)中根据主动免疫应答状态而对总存活率的Kaplan-Meier估计。图5B示出了TCGA队列中根据主动免疫应答状态1而对总存活率的Kaplan-Meier估计。图5C示出了在公开获得的TCGA数据集中对免疫类别进行了外部验证。图5D示出了在训练队列中根据基于微环境的免疫子类型而对总复发率的Kaplan-Meier估计。在训练组(罕托咪(Heptromic))中,主动免疫应答组中的患者与耗竭组相比,肿瘤复发率更低($p=0.04$)。在主动免疫应答组与其余队列之间未观察到显著差异($p=0.32$),以及在耗竭免疫应答组和其余之间未观察到显著差异($p=0.15$)。图5E示出了在验证数据集中根据基于微环境的免疫子类型而对总复发率的Kaplan-Meier估计。在验证集中,仅观察到了非显著趋势,主动免疫应答子类型的中位数为79个月,而耗竭免疫应答子类型的中位数为27个月($p=0.14$),其余队列为31个月($p=0.08$)。

[0070] 图6示出了免疫类别与拷贝数畸变、新抗原的存在、驱动基因的突变以及甲基化的改变的关联。图6A示出了免疫种类患者相对于其余队列的收益负荷。图6B示出了免疫类别患者相对于其余队列的损失负荷。在两个图中,都示出了整体(左图)和病灶(右图)。图6C是示出了预测产生新抗原的突变率在免疫类别和其余队列中相似的图。图6D是示出预测产生

新抗原的突变率在两种基于微环境的子类型和其余队列之间的图。图6E是在免疫类别和其余队列之间突变率的比较图。图6F是在不同的免疫子类型与其余队列之间的突变率的图。图6G是免疫类别患者与其余TGCA队列之间已知驱动基因中的突变分布的热图表示。图6H是3组中192个免疫相关启动子基因中363个CpG位点的甲基化水平差异的图,其以箱形图表示。根据Tukey测试,确切的p值为:主动与其余之间: $p=3.57E-13$;耗竭与其余: $p=1.93E-13$;耗竭与主动: $p=3.42E-7$ 。图6I是在免疫应答子类型和其余队列中的LGALS3表达图(左)和PMEPA1表达图(右)。图6J是CTNNB1种类患者与免疫种类和其余队列相比的CCL4表达的箱形图。图6K是CTNNB 1种类患者与免疫种类和其余队列患者相比的归一化PTK2表达(微阵列数据)的箱形图。PTK2表达用log2表示。图6L示出了在罕托咪(Heptromic)队列的HCC样品中通过微阵列和qRT-PCR检测到的归一化PTK2基因表达水平的相关性图。图6M是在罕托咪(Heptromic)队列的HCC样品中通过微阵列和拷贝数检测到的归一化基因表达水平的相关性图(Spearman秩相关系数)。

[0071] 图7示出了肿瘤内免疫谱与周围非肿瘤肝的免疫浸润不对应。图7A示出了肿瘤的基因表达(上图),并且匹配的周围非肿瘤肝(下图)可用于167名罕托咪(Heptromic)队列患者(训练数据集)。热图代表肿瘤(上图)和相应的周围组织(下图)中免疫标记的富集得分。免疫分类器呈阳性的患者多发结节率更频繁[25/55 (45%)与24/110 (22%), $p=0.01$]。图7B示出了根据周围肝脏中免疫分类器的存在而对总存活率的Kaplan-Meier估计。

[0072] 图8示出了免疫分类器呈阳性预测的患者#1中的纳武单抗的抗肿瘤活性。最初,患者#1在切除单个3cm HCC后出现肝内复发和转移性骨盆肿块16cm。图8A示出了在开始用纳武单抗治疗之前患者#1的CT图像。图8B显示了患者#1的CT图像,其显示在用纳武单抗治疗2个月后肿瘤块减少了75%。白色箭头指向每个图像中的肿瘤。

[0073] 图9示出了免疫类别的患者和对PD-1疗法应答的黑色素瘤患者之间的遗传相似性。图9A是罕托咪(Heptromic)的子图分析,其中考虑了HCC队列中的两组(免疫类别与其余)和Chen等人数据集中的4组[PD1前应答者(前PD1 R)和无应答者(前PD1 NR);CTLA4前应答者(前CTLA4 R)和无应答者(前CTLA-4NR)]。图9B是罕托咪(Heptromic)的子图分析,其中考虑了HCC队列中的3组(主动免疫,耗竭免疫和其余)和Chen等人数据集中的4组[PD1前应答者(前PD1 R)和无应答者(前PD1 NR);CTLA4前应答者(前CTLA4R)和无应答者(前CTLA-4NR)]。图9C是TCGA的子图分析,其中考虑了HCC队列中的两组(免疫类别与其余)和Chen等人数据集中的4组[PD1前应答者(前PD1 R)和无应答者(前PD1 NR);CTLA4前应答者(前CTLA4 R)和无应答者(前CTLA-4NR)]。图9D是TCGA的子图分析,其中考虑了HCC队列中的3组(主动免疫,耗竭免疫和其余)和Chen等人数据集中的4组[PD1前应答者(前PD1 R)和无应答者(前PD1 NR);CTLA4前应答者(前CTLA4 R)和无应答者(前CTLA-4NR)]。在免疫类别和抗PD1应答者之间(在罕托咪(Heptromic)中 $p=0.01$ 和在TCGA中非显著趋势)以及在两个队列的主动免疫子类型和抗PD1应答者之间(Bonferroni校正的 p 值=0.01)观察到相似性。

[0074] 图10是免疫子类基因分类器中的基因表。

[0075] 图11是在免疫类别中显著过表达的基因表。

[0076] 图12是耗竭免疫应答子类型中富集的基因途径的表。

[0077] 图13是在免疫类别和其余患者之间的驱动基因中的病灶高水平扩增(HLA)和纯合缺失分布表。

[0078] 图14示出了与原始的112个基因免疫分类器相比的56个基因免疫分类器的预测能力的热图可视化。在热图中,每一列代表一个样品,而每一行则代表112个基因分类器或56个基因免疫分类器(底行)。呈阳性预测属于免疫类别的样品在左侧显示为黑框,而对于免疫分类器预测呈阴性的患者则在右侧显示为亮框。图14A示出了TGCA数据集的结果(n=190个样品)。图14B示出了验证队列的结果(n=132)。图14C显示了HCC-I数据集的结果(n=90)。

[0079] 图15是在所有被分析的患者中计算出的接受者操作特征(ROC)曲线(n=441)。标准误差=0.011,置信区间(0.949-0.993),渐近显著性=0.011。

具体实施方式

[0080] 定义

[0081] 在本发明的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中,本说明书中使用的术语通常具有本领域中的普通含义。某些术语在下文或说明书中的其他地方讨论,以在描述本发明的方法以及如何使用它们中为从业人员提供额外的指导。而且,将认识到,可以以一种以上的方式说明同一件事。因此,替代的语言和同义词可以用于本文讨论的任一个或多个术语,关于是否在文中阐述或讨论术语也没有任何特殊意义。提供了某些术语的同义词。一个或多个同义词的列举不排除使用其他同义词。说明书中任何地方使用的实例,包括本文讨论的任何术语的实例,仅是说明性的,绝不限制本发明或任何示例性术语的范围和含义。同样,本发明不限于其优选实施例。

[0082] 如本文所用的,术语“肝细胞癌(HCC)”是指肝脏的原发性恶性肿瘤,主要发生在患有慢性肝病和肝硬化的患者中。起源的细胞被认为是肝干细胞,尽管这仍是研究的主题。肿瘤随着局部扩张、肝内扩散和远处转移而进展。

[0083] 如本文所用的,本文所用的术语“受试者”或“患者”是指可以为其提供治疗的哺乳动物,优选人。

[0084] 本文所用的术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指针对受试者施用药物或执行医疗程序,以预防(阻止)或治愈或减少发生或复发病变或疾病或病症或在受试者或患者患病的情况下发生的事件的程度或可能性。对于本发明公开的内容,该术语还可以表示施用药理物质或制剂,或执行非药理方法,包括但不限于,放射治疗和手术。本文所使用的药理物质可包括但不限于本领域已建立的化学治疗药,例如吉西他滨(GEMZAR)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、伊立替康(CAMPTOSAR)、奥沙利铂(ELOXATIN)、白蛋白结合的紫杉醇(ABRAXANE)、卡培他滨(XELODA)、顺铂、紫杉醇(TAXOL)、多西他赛(TAXOTERE)和伊立替康脂质体(ONIVYDE)。药理物质可以包括免疫疗法中使用的物质,例如检查点抑制剂,可以包括但不限于伊匹木单抗、纳武单抗、派姆单抗和阿特珠单抗。治疗可能包括多种药理物质以及放射疗法和手术。

[0085] 本文所用的术语“药剂”是指产生或能够产生作用的物质,并且包括但不限于化学物、药物、生物学物质、小有机分子、抗体、核酸、肽和蛋白质。

[0086] 短语“治疗有效量”在本文中是指该含量足以在受试者中引起临床显著病症的改善,或延迟或最小化或减轻与该疾病有关的一种或多种症状,或在受试者中导致所需的有益的生理学变化。

[0087] 术语“表达谱”或“基因表达谱”是指在特定条件下或响应于特定条件由细胞、组织或生物体表达的一个或多个基因的任何描述或测量。表达谱可以鉴定在特定条件下上调、下调或不受影响的基因。可以在核酸水平或蛋白质水平上检测基因表达。核酸水平上的表达谱分析可以使用任何可用于测量基因转录物水平的技术来完成。例如，该方法可以采用原位杂交、Northern杂交或与核酸微阵列（例如寡核苷酸微阵列或cDNA微阵列）的杂交。可替代地，该方法可以采用逆转录酶-聚合酶链式反应（RT-PCR），例如基于荧光染料的定量实时PCR（TaqMan® PCR）。蛋白质水平上的表达谱分析可以使用任何可用于测量蛋白质水平的技术来完成，例如使用肽特异性捕获剂阵列。

[0088] 术语“基因”、“基因转录物”和“转录物”在本申请中可以互换使用。术语“基因”，也称为“结构基因”，是指编码或对应于包含全部的或部分的一种或多种蛋白质或酶的氨基酸的特定序列的DNA序列，并可能包含或不包含调节性DNA序列（例如启动子序列），这些序列决定了例如表达该基因的条件。并非结构基因的一些基因可以从DNA转录成RNA，但不翻译成氨基酸序列。其他基因则可以作为结构基因的调节剂或DNA转录的调节剂。“转录物”或“基因转录物”是通过特定基因转录产生的RNA序列。因此，可以通过转录物测量基因的表达。

[0089] 如本文所用的，术语“免疫类别”是指患有肝细胞癌的患者，其显示出明显富集识别免疫细胞的标记，所述免疫细胞即T细胞、细胞毒素三级淋巴样结构（TLS）以及巨噬细胞、免疫元基因、可预测在黑色素瘤和头颈鳞状细胞癌中对派姆单抗应答的IFN基因标记和PD-1信号传导。

[0090] 如本文所用的，术语“IFN”是指干扰素。

[0091] 如本文所用的，术语“CTNNB1”是指连环蛋白β1。

[0092] 如本文所用的，术语“NMF”是指非负矩阵分解。

[0093] 如本文所用的，术语“TLS”是指三级淋巴样结构。

[0094] 如本文所用的，术语“FDR”是指假发现率。

[0095] 如本文所用的，术语“CCL”是指趋化因子（C-C基序）配体。

[0096] 如本文所用的，术语“CXCL”是指趋化因子（C-X-C基序）配体。

[0097] 如本文所用的，术语“JAK/STAT”是指Janus激酶/信号转导子和转录激活因子。

[0098] 如本文所用的，术语“GSEA”是指基因集富集分析。

[0099] 如本文所用的，术语“EMT”是指上皮间质转化。

[0100] 如本文所用的，术语“NTP”是指最近模板预测。

[0101] 如本文所用的，术语“TBRs”是指TGF-β应答标记。

[0102] 如本文所用的，术语“F-TBRs”是指成纤维细胞衍生的TGF-β应答标记。

[0103] 如本文所用的，术语“T-TBRs”是指T细胞衍生的TGF-β应答标记。

[0104] 如本文所用的，术语“LGALS”是指凝集素，半乳糖结合可溶性1。

[0105] 如本文所用的，术语“NKG2D”是指天然杀伤基团2D。

[0106] 如本文所用的，术语“TBX”是指1T-box转录因子。

[0107] 如本文所用的，术语“FFPE”是指福尔马林固定石蜡包埋。

[0108] 如本文所用的，术语“PMEPA1”是指前列腺跨膜蛋白，雄激素诱导型1。

[0109] 如本文所用的，术语“PTK2”是指蛋白酪氨酸激酶2。

[0110] 如本文所用的,术语“AFP”是指甲胎蛋白。

[0111] 如本文所用的,术语“RF”是指随机森林。

[0112] 如本文所用的,术语“SCNA”是指体细胞拷贝数畸变。

[0113] 术语“约”或“大致”是指在特定值的可接受误差范围内,如本领域普通技术人员所确定的那样,这将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的极限值,即特定目的(例如药物制剂)所需的精确度。例如,“约”可以指根据本领域的惯例在1个或多于1个标准偏差范围内。可替代地,“约”可以指给定值的至多20%,优选地至多10%,更优选地至多5%,并且还更优选地至多1%的范围。可替代地,特别是对于生物系统或过程,该术语可以指数值的一个数量级内,优选地在5倍之内,更优选地在2倍之内。在本申请和权利要求书中描述了特定值的情况下,除非另有说明,否则应假设术语“约”是指在该特定值的可接受的误差范围内。

[0114] 分子生物学

[0115] 根据本发明,在本领域技术范围内存在许多工具和技术,例如分子免疫学、细胞免疫学、药理学和微生物学中常用的那些。参见,例如,Sambrook等人(2001)分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual).第三版冷泉港实验室出版社:冷泉港,纽约;Ausubel等人编辑(2005)分子生物学最新协议(Current Protocols in Molecular Biology).约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯;Bonifacino等人编辑(2005)分子生物学最新协议(Current Protocols in Cell Biology).约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯;Coligan等人编辑(2005)Current Protocols in Immunology,约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯;Coico等人编辑(2005)微生物学最新协议(Current Protocols in Microbiology),约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯;Coligan等人编辑(2005)蛋白质科学中的最新方案(Current Protocols in Protein Science),约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯;和Enna等人编辑(2005)药理学最新方案(Current Protocols in Pharmacology),约翰·威利父子公司:新泽西州霍博肯。

[0116] 鉴定HCC的免疫类别和子类,主动免疫应答和耗竭免疫应答

[0117] 本发明通过使用一组基因表达生物标记物来准确地检测HCC患者的免疫疗法应答的表型,从而解决了使用PD-L1表达作为生物标记物来检测免疫疗法应答的问题。

[0118] 本文所述的生物标记物不仅提供了确定性地鉴定、检测和预测患者对免疫疗法的应答的新颖且独特的方式,而且还提供了用于HCC以及其他癌症的药物筛选和基础研究的多种标记物。

[0119] 使用非负矩阵分解(NMF),本文所述的实施例对956例人HCC样品的基因表达数据进行去卷积,并分离出从炎症浸润液释放的信号以表征HCC的免疫学特征。这使得能够鉴定具有特定生物学特性的HCC的以前没有注意到的强健的免疫特异性类别,称为“免疫”类别。近25%的HCC属于免疫类别,其分子特征-包括免疫细胞的高度浸润、PD-1和PD-L1的表达以及活性IFN- γ 信号传导-高度类似于对免疫疗法应答最强的那些癌症(Ji,等人2012;Le,等人2015;Bald,等人2014)。使用112个基因的表达对该类别进行进一步评估(图10),发现了基因标记谱,其指示对免疫疗法的应答(实例2和5)。将该免疫类别的基因表达谱与接受免疫疗法治疗的HCC患者以及对HCC应答的其他癌症患者进行了比较。在这些情况下,免疫类别的基因表达谱与免疫疗法应答性相关(实例5;图8和9)。

[0120] 将原始的112个基因免疫分类器成功缩减为56个基因,选择得分最高的那些基因(表3)。已对56个基因免疫分类器的预测能力进行了测试,并在3个数据集中与112个基因原始免疫分类器进行比较:TCGA,验证队列和HCC-1数据集。56个基因免疫分类器的灵敏度为97%,特异性为98%,准确性为97%(实例10;图14和15)。因此,基因表达生物标记物的使用为对免疫疗法应答的HCC患者提供了准确检测。

[0121] PD-L1染色在免疫类别中富集,但是不能捕获大多数病例,因此代表了次优标记(实例3)。如上所述,这一发现与在对HCC患者使用纳武单抗的大型II期研究中在肿瘤细胞上观察到的PD-L1表达缺乏预测能力相符(EI-Khoueiry,等人2017),并表明需要用于检测将受益于免疫疗法的那些HCC患者的其他生物标记物。

[0122] 尽管免疫类别的这种免疫表型可以预测对免疫疗法的应答,但是因为对检查点抑制剂的有利应答依赖于微环境中肿瘤细胞、免疫细胞和其他免疫调节剂之间复杂且动态的相互作用,这可能会抑制或增强免疫应答,所以进行了进一步的分析。在这方面,对免疫类别的基因表达谱的虚拟剖析可以阐明这种相互作用,并鉴定两个基于微环境的清晰样品簇:1)主动免疫应答和2)耗竭免疫应答。这些子类型的稳健性通过以下而得到支持:在不同平台的七个独立数据集中成功复制,从RNA测序到微阵列并使用不同类型的样品(即新鲜冷冻和石蜡包埋的组织)。主动免疫应答簇表现出抗肿瘤免疫特征,如IFN标记的富集、适应性免疫应答基因的过表达和更好的存活率,而耗竭免疫应答的特征是肿瘤促进信号(例如,激活的基质、T细胞衰竭和免疫抑制成分)(图12)。特别地,TGF- β (在侵袭性癌症中经常过表达的有效免疫调节细胞因子)的激活在耗竭子类型中明显富集。TGF- β 通过诱导T细胞衰竭(Park,等人2016;Stephen,等人2014)和促进M2型巨噬细胞(Flavell,等人2010)来调节肿瘤-基质相互作用、血管生成、转移并抑制宿主免疫应答(实例4)。

[0123] 了解免疫应答、致癌信号和肿瘤微环境之间的相互作用对于提高当前免疫疗法的疗效至关重要。例如,耗竭免疫应答子类型的患者可以受益于TGF- β 抑制与免疫检查点阻断的结合。在这方面,目前正在对晚期实体瘤(包括HCC)中测试新型TGF- β 抑制剂戈轮替尼(galunisertib)与纳武单抗组合的1b/2期临床试验(NCT02423343),未使用任何患者富集策略。同样,剖析负责T细胞排斥的致癌机制可能会给在其他情况下可能无应答的患者带来其他联合策略。最近的分子分析显示,黑色素瘤和其他肿瘤中的CTNNB1信号传导路径的激活与较低的T细胞浸润之间存在相关性(Porta-Pardo和Godzik 2016)。与这些发现一致,属于CTNNB1种类的HCC样品显示出较低的免疫细胞标记评分。有趣的是,CTNNB1种类还显示了PTK2的过表达,PTK2是最近报道的用以驱动免疫排斥的另一种致癌信号(Jiang,等人2016)。

[0124] 预测对免疫疗法应答的免疫类别的相关基因

[0125] 如充分讨论的那样,对免疫疗法应答的当前生物标记物PD-L1的表达是不可靠的,并且在本领域中需要可靠的生物标记物。本文的数据首次显示了一组基因形式的生物标记物,其与对免疫疗法的阳性应答相关。

[0126] 这些生物标记物包括在免疫类别中差异表达的112个基因。这些基因在图10中列出。

[0127] 已显示一组56个基因在关联对免疫疗法的阳性应答时更敏感和准确。这些基因在表3中列出。

[0128] 另外,图11中列出的108个基因在免疫类别中上调。

[0129] 通过使用这些生物标记物,可以对HCC患者对免疫疗法的应答做出重要的预测和确定。尽管可以在诊断HCC之后的任何时间对这些生物标记物进行试验,但优选是在临床医生对HCC做出阳性诊断后尽快进行此类试验。以此方式,可以在选择治疗方法时利用对疾病的宝贵见解。

[0130] 因此,在本发明的一个实施例中,可以对图10中一个或多个基因的表达进行试验,并且阳性结果表明该受试者是免疫疗法的候选者。

[0131] 在本发明进一步的实施例中,可以对图11中一个或多个基因的表达进行试验,并且阳性结果表明该受试者是免疫疗法的候选者。

[0132] 在本发明进一步的实施例中,可以对表3中一个或多个基因的表达进行试验,并且阳性结果表明该受试者是免疫疗法的候选者。

[0133] 同样如充分讨论的那样,本文的数据还显示了两个不同的子类,它们也预测了HCC患者对治疗的应答。还可以通过图12中发现的一组基因途径的表达来鉴定这些称为主动免疫应答和耗竭免疫应答的子类。

[0134] 因此,在本发明进一步的实施例中,可以对图12中所列途径中的一个或多个基因的表达进行试验,并且阳性结果表明该患者是免疫疗法的候选者,该免疫疗法应与另一药剂(例如TGF- β 抑制剂)结合。

[0135] 为了检测这些转录物或基因中的任一个,从已被阳性诊断为HCC的受试者获得肿瘤样品,对其进行制备并分析表3、图10、11和/或12中生物标记物(例如基因表达)的存在。这可以通过诊断实验室和/或健康护理提供者以多种方式来实现。

[0136] 可替代地,可以从包括但不限于肝脏、全血和血浆的任何生物组织以及包括但不限于血浆的任何生物体液中获得核酸。

[0137] 通过本领域已知的方法从肿瘤、组织或体液的细胞中提取、分离和纯化核酸。

[0138] 如果需要,使用已知技术制备具有基因序列的核酸样品。例如,如本领域技术人员所理解的,可以使用已知的裂解缓冲液、超声处理、电穿孔处理样品以裂解细胞,并根据需要进行纯化和扩增。另外,反应可以以多种方式完成。反应的组分可以同时或以任何顺序依次加入。另外,反应可包括可用于方法和测定中的多种其他试剂,并且将包括但不限于盐、缓冲液、中性蛋白质(例如白蛋白)和洗涤剂,它们可用于促进最佳杂交和检测,和/或减少非特异性或背景相互作用。根据样品制备方法和纯度,也可以使用以其它方式提高测定效率的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂和抗微生物剂。

[0139] 制备后,可通过本领域技术人员已知的方法分析mRNA或其他核酸。另外,当要检测核酸时,优选的方法是利用切割或剪切技术以将含有靶序列的核酸样品切割成有利于处理且与靶杂交的大小。这可以通过在机械力(例如超声)作用下剪切核酸,或通过使用限制性核酸内切酶切割核酸或本领域已知的任何其他方法来实现。然而,在大多数情况下,在归档过程中发生的自然降解会导致“短”寡核苷酸。一般而言,本发明的方法和测定法可对短至20-100个碱基对的寡核苷酸进行,其中20至50个是优选的,40至50个,包括44、45、46、47、48和49个是最优选的。

[0140] 检查基因表达的方法通常基于杂交,并包括Southern印迹;Northern印迹;点印迹;引物延伸;核酸酶保护;使用例如羟基磷灰石的非双螺旋分子的消减杂交和分离;溶液

杂交;过滤杂交;扩增技术(例如RT-PCR)和其他与PCR相关的技术(例如具有熔解曲线分析的PCR和具有质谱的PCR);指纹图谱,例如使用限制性核酸内切酶;以及使用结构特异性核酸内切酶。也可以使用质谱技术(例如,MALDI或SELDI)、液相色谱法和毛细管凝胶电泳来分析mRNA表达。可使用本领域已知的任何其他方法来检测转录物的存在或不存在。

[0141] 有关这些技术的一般说明,也可以参见Sambrook等人1989;Kriegler 1990;和Ausubel等人1990。

[0142] 用于检测基因表达的优选方法是使用阵列或微阵列。这些术语可互换使用,并且指不同分子的表面或底物上的任何有序排列,在本文中称为“探针”。任何阵列的每个不同探针均能够特异性识别和/或结合特定分子,所述特定分子在阵列的上下文中称为“靶”。可以使用微阵列检测的典型靶分子的实例包括mRNA转录物、cRNA分子、cDNA、PCR产物和蛋白质。

[0143] 微阵列可用于同时检测样品中多种不同靶分子的存在、不存在和数量。样品中探针的靶分子的存在和数量、或不存在可以通过分析靶是否在表面或底物上的特定位置处结合探针及结合多少来轻易测定。

[0144] 在优选的实施例中,本发明中使用的阵列是“可寻址阵列”,其中每个不同的探针与特定的“地址”相关联。

[0145] 本发明中使用的阵列优选的是核酸阵列,包括固定在表面或底物上的多个核酸探针。不同的核酸探针与样品中的不同靶核酸分子互补,因此可以杂交。因此,每个探针可用于同时检测多个不同基因的存在和数量,例如,不同mRNA分子或由其衍生的核酸分子(例如,cDNA或cRNA)的存在和丰度。

[0146] 阵列优选是可再现的,从而允许产生给定阵列的多个拷贝,并且容易将彼此的结果进行比较。优选地,微阵列很小,并且由在结合条件下稳定的材料制成。微阵列中给定的结合位点或结合位点的唯一集合将特异性地与靶结合。应当理解,当制备与细胞RNA互补的cDNA并在合适的条件下与微阵列杂交时,与阵列中对应于任何特定基因的位点杂交的水平或程度将反映出从该基因转录的mRNA在细胞中的普遍性。例如,当与总细胞mRNA互补的可检测地标记(例如,用荧光团)的cDNA与微阵列杂交时,阵列上对应于在细胞中未转录的基因(即,能够特异性结合该基因的核酸产物)的位点几乎没有信号,而mRNA高度普遍的基因将具有相对较强的信号。

[0147] 举例来说, **GeneChip®** (昂飞公司(Affymetrix),加利福尼亚州圣塔克拉拉)生成用于评估基因表达谱和其他生物学测定的数据。寡核苷酸表达阵列可同时并定量“询问”成千上万个mRNA转录物。每个转录物可通过多个探针对在探针阵列上表示,以区分密切相关的基因家族成员。每个探针均包含数百万个特定寡核苷酸探针的拷贝,从而允许甚至低强度的mRNA杂交模式的准确而灵敏的检测。使用扫描仪或光学检测系统捕获杂交数据后,可以使用软件自动计算每个探针细胞的强度值。探针细胞强度可用于计算每个基因的平均强度,该平均强度与mRNA丰度水平相关。可以根据任何分析参数对表达数据进行快速排序,并以各种图形格式显示任何选定的基因子集。

[0148] 可以用于本发明的测定和方法的微阵列的其他实例是根据有时被称为VLSIPS™(超大规模固定化聚合物合成)技术的技术合成的微阵列,例如在美国专利号5,324,633;5,744,305;5,451,683;5,482,867;5,491,074;5,624,711;5,795,716;5,831,070;5,856,

101;5,858,659;5,874,219;5,968,740;5,974,164;5,981,185;5,981,956;6,025,601;6,033,860;6,090,555;6,136,269;6,022,963;6,083,697;6,291,183;6,309,831;6,416,949;6,428,752和6,482,591中所描述的。

[0149] 可用于本发明的其他示例性阵列包括但不限于可从 Illumina® 公司 (加利福尼亚州圣地亚哥) 获得的 Sentrix® 阵列或 Sentrix® BeadChip 阵列或在孔中包括珠的其他阵列,例如美国专利号 6,266,459;6,355,431;6,770,441 和 6,859,570 中所述的那些。也可以使用在表面具有颗粒的阵列,包括美国专利号 6,489,606;7,106,513;7,126,755 和 7,164,533 中所述的那些。

[0150] 流体形式的珠子阵列 (诸如流式细胞仪或类似装置的流体流) 也可以用于本发明的方法。例如,在美国专利号 6,524,793 中描述了可用于本发明以使用微流体装置来区分流体样品中的珠子的示例性形式。用于区分珠子的可商购的流体形式包括,例如 Luminex 的 XMAP™ 技术或 Lynx 疗法 (Lynx Therapeutics) 的 MPSS™ 方法中使用的那些形式。

[0151] 点状微阵列也可以用于本发明的方法。示例性点状微阵列是可从安玛西亚生物科学 (Amersham Biosciences) 获得的 CodeLink™ 阵列。

[0152] 可用于本发明的另一种微阵列是使用喷墨印刷方法制造的微阵列,例如可从安捷伦科技公司获得的 SurePrint™ 技术。可以用于本发明的其他微阵列包括但不限于美国专利号 5,429,807;5,436,327;5,561,071;5,583,211;5,658,734;5,837,858;5,919,523;6,287,768;6,287,776;6,288,220;6,297,006;6,291,193 和 6,514,751 中所描述的那些。

[0153] 本发明的筛选和诊断方法可以涉及靶基因座的扩增。用于核酸序列的靶扩增的优选方法是使用聚合酶,特别是聚合酶链式反应 (PCR)。PCR 或其他聚合酶驱动的扩增方法可获得数百万个相关核酸序列的拷贝,然后可将其用作探针的底物或进行测序或用于其他测定。

[0154] 使用聚合酶链式反应的扩增在本发明的实施例中是特别有用的。PCR 是一种快速且通用的体外方法,用于扩增存在于 DNA 来源中的确定的靶 DNA 序列。通常,设计该方法以允许选择性扩增在 DNA 序列的异质集合 (例如,总基因组 DNA 或复杂 cDNA 群体) 内的特定靶 DNA 序列。为了允许这种选择性扩增,需要来自靶序列的一些先前的 DNA 序列信息。该信息用于设计两个寡核苷酸引物 (扩增子),这些引物对靶序列具有特异性,通常长约 15-25 个核苷酸。

[0155] 免疫检查点抑制剂治疗

[0156] 免疫检查点调节 T 细胞在免疫系统中的功能。T 细胞在细胞介导的免疫中起关键作用。检查点蛋白与特定的配体相互作用,这些配体将信号发送至 T 细胞并实质上关闭或抑制 T 细胞功能。癌细胞通过驱动其表面上检查点蛋白的高水平表达来利用该系统,从而控制进入肿瘤微环境的 T 细胞表面上表达检查点蛋白的 T 细胞,从而抑制抗癌免疫应答。这样,对检查点蛋白的抑制导致 T 细胞功能以及对癌细胞的免疫应答的完全或部分恢复。检查点蛋白的实例包括但不限于 CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4 (属于 CD2 分子家族并在所有 NK、 $\gamma\delta$ 和记忆 CD8⁺ ($\alpha\beta$) T 细胞上表达)、CD160 (也称为 BY55)、CGEN-15049、CHK 1 和 CHK2 激酶、A2aR 和各种 B-7 家族配体。

[0157] 检查点抑制剂包括以统计学上显著的方式阻断或抑制免疫系统的抑制途径的任何药剂。这样的抑制剂可以包括小分子抑制剂,或者可以包括结合并阻断或抑制免疫检查

点受体的抗体或其抗原结合片段,或者结合并阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体。可以靶向阻断或抑制的示例性检查点分子包括但不限于CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM3、VISTA、KIR、2B4 (属于CD2分子家族并在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160 (也称为BY55)、CGEN-15049、CHK 1和CHK2激酶、A2aR和各种B-7家族配体。B7家族配体包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7。检查点抑制剂包括结合并阻断或抑制CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD 160和CGEN-15049中的一种或多种的活性的抗体或其抗原结合片段、其他结合蛋白、生物治疗剂或小分子。示例性免疫检查点抑制剂包括替西木单抗 (Tremelimumab) (CTLA-4阻断抗体)、抗OX40、PD-L1单克隆抗体 (抗B7-H1; MEDI4736)、MK-3475 (PD-1阻断剂)、纳武单抗 (抗PD1抗体)、CT-011 (抗PD1抗体)、BY55单克隆抗体、AMP224 (抗PDL1抗体)、BMS-936559 (抗PDL1抗体)、MPLDL3280A (抗PDL1抗体)、MSB0010718C (抗PDL1抗体) 和伊匹单抗/伊匹木单抗 (抗CTLA-4检查点抑制剂)。检查点蛋白配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0158] 程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 是在T细胞和pro-B细胞上表达的288个氨基酸细胞表面蛋白分子并在其命运/分化中起作用。PD-1具有两个配体PD-L1和PD-L2,它们是B7家族的成员。PD-1在肿瘤特异性逃避免疫监视中发挥作用。PD-1在黑色素瘤浸润性T淋巴细胞 (TIL) 中上调 (Dotti (2009) Blood 114 (8):1457-58)。已发现肿瘤表达PD-1配体 (PDL-1和PDL-2), 当与CTL中PD-1的上调结合时,其可能是T细胞功能丧失和CTL无法介导有效的抗肿瘤应答的促成因素。

[0159] 黑色素瘤的临床试验显示,具有抗PD-1阻断作用的稳健的抗肿瘤应答。还已经描述了在晚期黑素瘤、卵巢癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、肾细胞癌和结肠直肠癌中具有PD-1抑制作用的显著益处。鼠模型研究已将此证据应用于胶质瘤治疗。作为放射佐剂的抗PD-1阻断在患有胶质瘤的小鼠中促进了细胞毒性T细胞群体和相关的长期存活益处。

[0160] 本发明的一个方面提供了检查点抑制剂,其是可以充当PD-1的抑制剂,从而调节由PD-1调节的免疫应答的抗体。在一个实施例中,抗PD-1抗体可以是抗原结合片段。本文公开的抗PD-1抗体能够结合人PD-1并激动PD-1的活性,从而抑制表达PD-1的免疫细胞的功能。PD-1和PD-L1阻断剂的实例在美国专利号7,488,802;7,943,743;8,008,449;8,168,757;8,217,149、和PCT公开专利申请号:W003042402、W02008156712、W02010089411、W02010036959、W02011066342、W02011159877、W02011082400和W02011161699中有所描述。

[0161] 目前有几种PD-1抑制剂正在临床试验中进行测试。CT-011是针对PD-1的人源化IgG1单克隆抗体。最近完成了针对已进行自体干细胞移植的弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 受试者的II期临床试验。初步结果表明,随访期结束时70%受试者无进展,而对照组为47%,82%受试者存活,而对照组为62%。该试验确定CT-011不仅可以阻断PD-1的功能,而且还可以增强自然杀伤细胞的活性,从而增强抗肿瘤免疫应答。

[0162] BMS 936558是靶向PD-1的完全人IgG4单克隆抗体。在I期试验中,对患有晚期难治性恶性肿瘤的受试者每两周施用一次BMS-936558显示出持久的部分或完全消退。在患有黑色素瘤 (28%) 和肾细胞癌 (27%) 的受试者中观察到最显著的应答率,但在患有非小细胞肺癌 (NSCLC) 的受试者中也观察到了显著的临床活性,并且一些应答持续了一年多。

[0163] BMS 936559是靶向PD-1配体PD-L1的完全人IgG4单克隆抗体。I期结果显示,每两

周施用一次这种药物会导致持久应答,尤其是在患有黑色素瘤的受试者中。在患有晚期 NSCLC、黑色素瘤、RCC或卵巢癌的受试者中,客观应答率在6%至17%)之间,这取决于癌症类型,有些受试者的应答期会持续一年或更长时间。

[0164] MK 3475是人源化IgG4抗PD-1单克隆抗体,在III期研究中单独使用,或与化疗结合施用,并与单独化疗相比较,作为晚期胃或胃食管结合部(GEJ)腺癌的第一线治疗。MK 3475目前正在全球进行许多III期临床试验。

[0165] MPDL 3280A(阿特殊单抗)是单克隆抗体,其也靶向PD-L1。MPDL 3280A获得了美国食品药品监督管理局(FDA)的突破性疗法称号,用于治疗NSCLC表达PD-L1且在标准治疗期间或之后进展的人。

[0166] AMP 224是第二PD-1配体,PD-L2和IgG1的胞外域的融合蛋白,具有阻断PD-L2/PD-1相互作用的潜力。AMP-224目前正作为晚期癌症受试者的单一疗法进行I期测试。

[0167] Medi 4736是抗PD-L1抗体,其在该剂量递增研究中已显示出可接受的安全性和持久的临床活性。作为单一疗法和联合疗法,MEDI4736在多种癌症中的扩展和开发正在进行中。

[0168] 因此,在某些实施例中,PD-1阻断剂包括抗PD-1抗体和类似的结合蛋白,例如纳武单抗(MDX 1106、BMS 936558、ONO 4538),一种通过其配体PD-L1和PD-L2结合至PD-1并阻断PD-1的活化作用的完全人IgG4抗体; (派姆单抗(pembrolizumab)/兰布鲁珠单抗(lambrolizumab))(MK-3475或SCH 900475),一种针对PD-1的人源化单克隆IgG4抗体;CT-011,一种与PD-1结合的人源化抗体;AMP-224是B7-DC的融合蛋白;抗体Fc部分;用于PD-L1(B7-H1)阻断的BMS-936559(MDX-1105-01)。其他免疫检查点抑制剂包括淋巴细胞激活基因3(LAG-3)抑制剂,例如IMP321,可溶性Ig融合蛋白(Brignone, et al., 2007, J. Immunol. 179:4202-4211)。其他免疫检查点抑制剂包括B7抑制剂,例如B7-H3和B7-H4抑制剂。特别地,抗B7-H3抗体MGA271(Loo, et al., 2012, Clin. Cancer Res. July 15(18) 3834)。还包括TIM3(T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3)抑制剂(Fourcade, et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86和Sakuishi, et al., 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94)。

[0169] 施用给受试者的任何特定药物的确切有效量将取决于它们的大小和健康状况,其病状的性质和程度,以及施用所选择的疗法或疗法的组合。给定患者的有效量通过常规实验确定,并且在临床医生的判断之内。本抗体化合物的治疗有效量还可以包括施用给收获的器官或患者的每单位剂量的约0.1mg/kg至约150mg/kg、约0.1mg/kg至约100mg/kg、约0.1mg/kg至约50mg/kg、或约0.05mg/kg至约10mg/kg范围内的量。已知的基于抗体的药物在这方面提供了指导。例如,通过静脉内输注21mg/ml溶液施用Herceptin™,初始负荷剂量为4mg/kg体重,每周维持剂量为2mg/kg体重;例如,每周以375mg/m²施用Rituxan™。

[0170] 卫生保健提供者可以通过监测抗体化合物对肿瘤消退、循环肿瘤细胞、肿瘤干细胞或抗肿瘤应答的作用来确定任何个体患者的治疗有效量。通过这些方法获得的数据的分析允许在治疗过程中修改治疗方案,从而施用本发明的抗体化合物的最佳量,无论是单独使用还是彼此结合使用,或与另一种治疗剂结合使用,或两者兼有,这样也可以确定治疗的持续时间。以这种方式,可以在治疗过程中修改剂量/治疗方案,从而施用最低量的单独或组合使用的表现出令人满意的功效的抗体化合物,并且只要成功治疗患者就继续施用此类化合物。已知的基于抗体的药物提供与施用频率有关的指导,例如是否应每天、每周、每月

等施用药物。频率和剂量还可能取决于症状的严重程度。

[0171] 在一些实施例中,本发明的抗体化合物可以用作人类药物,其通过多种途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、腹膜内、鞘内、心室内、透皮、经皮、局部、皮下、肿瘤内、鼻内、肠内、舌下、阴道内、膀胱内或直肠途径。所述组合物也可以直接施用于病灶例如肿瘤中。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。通常,可以将治疗组合物制备成注射剂(液体溶液或悬浮液)。也可以制备成适合于在注射之前溶解或悬浮在液体媒介物中的固体形式。

[0172] 目前治疗HCC的方法是独特的,因为它使用基因表达谱来确定受试者对免疫疗法有应答。迄今为止,获得受试者肿瘤的基因谱与使用免疫疗法的这种组合尚未用于HCC治疗或使用免疫疗法的其他癌症治疗。这种非常规的HCC治疗方法将导致更好的患者结果。

[0173] 试剂盒

[0174] 预期本文公开的所有方法和测定可以呈试剂盒形式,以供健康护理提供者和/或诊断实验室使用。

[0175] 可以将用于检测和定量一种或多种基因生物标记物的测定法并入试剂盒中。这样的试剂盒将包括针对表3、图10、11和/或12中列出的一个或多个基因的探针,用于从生物组织或体液中分离和纯化核酸的试剂,用于对分离和纯化的核酸进行测定的试剂,使用说明以及参考值或在对照样品中获得所含基因的参考值的方法。

[0176] 这些试剂盒的优选实施例具有连接至固态的探针。最优选的实施例将具有微阵列形式的探针,其中针对表3、图10、11和/或12的一个或多个基因的核酸探针将在表面或底物上有序排列。

[0177] 实例

[0178] 包括以下实例以说明本发明的实施例。下列实例仅以举例说明的方式给出,以帮助本领域普通技术人员使用本发明。实例并不旨在以任何方式限制本发明的范围。根据本发明,本领域普通技术人员应当理解,可以在所公开的特定实施例中做出许多改变,并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下仍可获得相似或类似的结果。

[0179] 实例1-实例2-10的材料和方法

[0180] 患者和样品

[0181] 出于研究的目的,分析了来自总共956例HCC人类样品的基因表达谱(图1),其中包括228例手术切除的新鲜冷冻(FF)样品的训练队列(罕托咪(Heptomic)数据集,GSE63898)。训练集的所有样品先前都是在IRB批准下从HCC基因组联盟的两个机构获得的:IRCCS国立肿瘤研究所(Istituto Nazionale Tumori)(意大利米兰)和医院临床(Hospital Clinic)(西班牙巴塞罗那)。获得所有228例HCC样品和168例非肿瘤肝旁肝硬化组织的RNA谱和甲基化数据,并已在其他地方发表(Villanueva,等人2015)。将来自7个独立数据集的另外728例混合病因患者的HCC样品用于外部验证(图1)。将来自7个独立数据集的另外728例混合病因患者的HCC样品用于外部验证(图1)。

[0182] 这些数据集之一的验证集包括131例FFPE组织样品,这些样品先前由发明人收集并用DASL(依诺米那公司,加利福尼亚州圣地亚哥)技术(GSE20140,与训练集不重叠的样品)进行了分析(Chiang,等人2008;Villaneuva,等人2011)。六个其他公开可用的数据集包括在依诺米那(Illumina)HiSeq 2000平台上通过RNA测序分析的TCGA队列(n=190)和五个

其他微阵列分析的数据集 (Lee, 等人2004;Chen, 等人2002;lizuka, 等人2003;Boyault, 等人2007;Hoshida, 等人2009), 用于进一步验证。表1总结了训练和验证数据集 (验证和TCGA数据集) 中所包括的患者的临床病理数据和随访情况。

[0183] 其他数据集的临床病理参数已在其他地方报道 (Lachenmayer, 等人2012)。

[0184] 表1训练 (罕托咪 (Heptromic)) 和验证队列 (验证和TCGA数据集) 的临床特征

变量 ^a	训练数据集	验证数据集	TCGA 数据集
	(n=225)	(n=131)	(n=190)
中位年龄 (IQR)	66 (61-72)	66 (55-71)	62 (52-70)
性别, 男 (%)	178 (79)	96 (73)	123 (65)
病因 (%) ^a			
丙型肝炎	101 (46)	64 (50)	N/A
[0185] 乙型肝炎	48 (21)	39 (30)	N/A
酒精	33 (15)	6 (5)	N/A
其他	38 (17)	19 (15)	
肝功能评分 (%) ^a			
A	220 (98)	123 (98)	86 (83)
B	3 (1)	2 (2)	17 (17)
肿瘤尺寸, cm (%)			
<2	28 (12)	17 (13)	N/A

	2 与 3 之间	66 (30)	31 (24)	N/A
	>3	130 (58)	81 (63)	N/A
	多发结节 (%)			
	不存在	168 (75)	117 (91)	N/A
	存在	56 (25)	12 (9)	N/A
	血管浸润 (%)			
	不存在	144 (65)	78 (62)	104 (66)
	存在	78 (35)	46 (38)	54 (34)
	卫星病毒 (Satellites) (%)			
	不存在	164 (73)	100 (80)	N/A
	存在	60 (27)	25 (20)	N/A
	BCLC 早期, 0-A (%)	195 (87)	120 (94)	N/A
[0186]	肿瘤分化程度 (%)			
	良好	33 (15)	31 (26)	31 (17)
	适度	106 (47)	73 (61)	96 (52)
	差	44 (20)	16 (13)	58 (31)
	胆红素, >1mg/dL (%)	113 (50)	34 (27)	35 (25)
	白蛋白, <3.5g/L	26 (12)	13 (11)	42 (31)
	血小板计数	41 (18)	17 (13)	N/A
	<100,000/mm ³ (%)			
	AFP, >100mg/dL (%)	51 (23)	38 (31)	43 (33)
	事件 (%)			
	复发	150 (67)	78 (60)	88 (59)
	死亡	133 (59)	46 (35)	84 (44)
	中位随访期, 月数	49	51	N/A

[0187] AFP-甲胎蛋白;BCLC-巴塞罗那临床肝癌;IQR-四分位数间距;N/A-不可用。a-缺失值训练集:病因 (n=2);

[0188] 肝功能评分 (n=2);

[0189] 多发结节 (n=1);

[0190] 血管浸润 (n=3)

[0191] BCLC 0-A (n=2);

[0192] 肿瘤分化 (n=42);

- [0193] 胆红素 (n=32) ;
- [0194] AFP (n=11) ;
- [0195] 白蛋白和胆红素 (n=4) ;
- [0196] 血小板 (n=2) ;
- [0197] 复发 (n=7) 。
- [0198] 缺失值验证集:病因 (n=3) ;
- [0199] 肝功能评分 (n=6) ;
- [0200] 肿瘤尺寸 (n=2) ;
- [0201] 多发结节 (n=2) ;
- [0202] 血管浸润 (n=6)
- [0203] 卫星病毒 (n=6) ;
- [0204] BCLC 0-A (n=4) ;
- [0205] 肿瘤分化 (n=4) ;
- [0206] 胆红素 (n=6) ;
- [0207] AFP (n=10) ;
- [0208] 白蛋白 (n=9) ;
- [0209] 血小板 (n=5) ;
- [0210] 复发 (n=1) 。
- [0211] 缺失值TCGA集:肝功能评分 (n=87) ;
- [0212] 血管浸润 (n=32)
- [0213] 肿瘤分化 (n=5) ;
- [0214] 胆红素 (n=50) ;
- [0215] AFP (n=58) ;
- [0216] 白蛋白 (n=55) ;
- [0217] 不准确的血小板计数;
- [0218] 复发 (n=40) ;
- [0219] 病因、肿瘤尺寸和数量、卫星病毒以及
- [0220] 最新的随访信息不可用。
- [0221] 鉴定免疫表达模式和无监督聚类
- [0222] 如前所述 (Moffitt, 等人2015), 使用无监督的非负矩阵分解 (NMF, 基因模式模块) (Brunet, 等人2004) 在训练集中执行基因表达数据的虚拟微剖析, 其中k=10作为因子数。通过将NMF鉴定因子与通过单样品基因集富集分析 (ssGSEA, 基因模式模块) 计算的免疫富集得分 (Yoshihara, 等人2013) 整合, 给出了免疫相关的表达模式。一旦免疫表达模式通过NMF去卷积并通过与ssGSEA得分整合来表征, 就根据其负载列出排名靠前的基因 (或典范基因)。免疫表达模式的典范基因通过独创途径分析 (IPA) 进一步表征。然后使用NMF一致性 (基因模式模块) 对这些典范基因进行无监督聚类。使用常规随机森林程序 (Breiman2001) 评估获得的类别的稳健性。
- [0223] 免疫类别的分子表征
- [0224] 使用GSEA、ssGSEA和最近模板预测 (NTP) 分析 (基因模式模块) 评估了分子途径的

富集和基因表达标记 (Reich, 等人2006)。为此,对分子标记数据库基因集和先前报道的代表炎症或不同免疫细胞的不同状态的基因表达标记进行了测试 (Moffitt, 等人2015; Yoshihara, 等人2013; Cancer Genome 2015; Finkin, 等人2015; Messina, 等人2012; Quigley, 等人2010; Spranger, 等人2015; Coates, 等人2008; Bindea, 等人2013; Alistar, 等人2014; Ribas, 等人2015; Chow, 等人2016; Calon, 等人2012; Rooney, 等人2015) (图2)。还分析了先前发布的HCC分子分类 (Chiang, 等人2008; Hoshida, 等人2009; Coulouam, 等人2008; Hoshida, 等人2008) (图2)。使用NTP分析 (基因模式) 对先前发布的HCC分子分类进行预测。通过FDR<0.05且倍数变化 (FC) 等于或大于3的比较标记选择 (CMS, 基因模式) 鉴定了在免疫类别相对于其余中,以及在耗竭免疫应答类型相对于主动免疫应答类型中过表达的基因。然后通过David功能注释对典范基因进行表征。将GSEA用于鉴定每个亚组中富集的途径。

[0225] 免疫浸润的免疫组织化学和评估以及三级淋巴样结构的存在

[0226] 免疫浸润和TLS的存在由专业病理学家 (S.T.) 分析。对苏木精伊红 (H&E) 染色的玻片进行评估,并根据免疫浸润量进行评分:0=不存在免疫细胞浸润,1=最小,2=轻度浸润,3=中度浸润,和4=严重浸润。染色在0至2之间的样品被认为低免疫浸润,而3和4得分被归类为高免疫浸润。在H&E玻片上也对TLS的存在进行了量化。TLS被评估为连续变量,并被分类为阴性 (<5个病灶,10X) 或阳性 (大于或等于5个病灶,10X)。

[0227] 在属于训练队列的100名患者的子集中进行PD-1和PD-L1的免疫组织化学 (免疫类别内部和免疫类别外部)。

[0228] 在微波中用10mM TRIS-EDTA (pH=9) 进行热诱导的抗原修复后,对3 μ m厚的FFPE组织切片进行免疫组织化学染色。使用的第一抗体是抗PD1 (一抗 (Abeam), 克隆NAT105) 和抗PD-L1 (一抗 (Abeam), 克隆28-8)。PD-1和PD-L1的免疫染色阳性是由两名对表达谱分析结果不了解的专业病理学家 (J.P. 和S.T.) 评估的。如前所述 (Calderaro, 等人2016), 对PD1的阳性染色进行了半定量测量 (PD-1/高相对于PD-1/低)。简而言之,仅在分布于整个肿瘤中的炎性细胞簇的肿瘤内病灶中观察到PD-1。计数簇数 (20X), 如果肿瘤内的簇数等于或高于簇的中值,则将样品分类为PD-1/高。另一方面,仅在肿瘤HCC细胞中评估PD-L1表达,因为肿瘤内炎性细胞在很大程度上是阴性的。

[0229] 如先前在HCC和其他癌症中所述,记录显示出膜染色的肿瘤细胞的百分比,并将阳性细胞为至少1%的肿瘤归类为阳性 (Calderaro, 等人2016; Robert, 等人2015; Garon, 等人2015; Borghaei, 等人2015)。

[0230] 免疫类别的甲基化分布分析

[0231] 训练队列中包括的所有患者的甲基化数据已经获得并在其他地方发表。简而言之,将亚硫酸氢盐转化的DNA (bs-DNA) 用Infinium FFPE恢复方法进行处理,然后按照制造商的说明 (依诺米那 (Illumina)) 在甲基化450芯片 (Infinium HumanMethylation450 BeadChip) 阵列上杂交。通过使用在minfi R软件包 (v 1.12.0) 下开发的依诺米那 (Illumina) 归一化方法对所得的原始强度数据 (IDAT) 进行归一化。在归一化步骤之后,去除与Y染色体相关的探针,以及其10个碱基更靠近被询问位点的那些探针含有SNP,如产品描述文件中所注释。此外,将关联p值大于0.01的CpG位点丢弃以进行分析。最后,仅选择存在于启动子区域中的CpG位点。对于分析的三个不同组的监督的热图表示 (耗竭免疫应答、主动免疫应答、其余),通过应用ANOVA分析以鉴定组之间差异甲基化 ($A_p > 0.2$) 的统计学上

显著的CpG位点 (FDR调整的 p 值 <0.05) ,来选择CpG位点。然后,基于通过Ward连锁汇总的曼哈顿距离对选定的CpG位点进行了聚类。

[0232] 免疫分类器的生成和在独立数据集中的性能验证

[0233] 免疫基因签名分类器是使用在训练组(罕托咪 (Heptomic) 队列, $n=228$) 中属于或不属于免疫类别 ($FDR<0.05$, $FC>3$) 的HCC样品之间差异表达的基因生成的。使用NTP分析(基因模式)在我们的验证集 (GSE20140) 和6个公开可用的数据集中验证标记捕获免疫类别的能力。这项研究包括两名接受纳武单抗非适应症的患者,以评估免疫分类器预测对免疫疗法应答的能力。经患者同意,使用昂飞 (Affymetrix) 人类基因组U219阵列板(昂飞公司,加利福尼亚州圣塔克拉拉),对在治疗 (GSE93647) 前任何时间收集的可用存档组织衍生的肿瘤切片进行RNA提取和RNA分析。类图谱 (SubMap) 分析(基因模式)是一种基于其表达谱用于在独立患者队列之间定量评估分子类别相似性的生物信息学方法 (Chen等人2016),用于在我们的免疫子类型和用免疫疗法治疗的黑色素瘤患者的基因表达谱之间测量相似性 (Chen, 等人2016; Roh, 等人2017)。在研究和后续论文中,在开始CTLA-4阻断和实效治疗之前,对那些对CTLA-4阻断无应答的患者进行PD-1治疗和实效治疗之前以及对那些对PD-1治疗无应答的患者进行PD-1治疗之后,获得活检。通过无/稳定疾病或肿瘤体积缩小 >6 个月的影像学证据确定应答者,而通过治疗开始后连续CT扫描肿瘤生长确定无应答者。在这项研究中包括的56位患者中,可获得32位的基因表达(定制纳米点 (Custom Nanostring) 免疫组),并与我们数据集中包括的HCC患者进行了比较。

[0234] 免疫类别与TCGA数据集中的拷贝数畸变、突变和新抗原的相关性

[0235] 可以从Broad Institute GDAC FireBrowser访问TCGA-LIHC样品通过GISTIC2 (Mermel, 等人2011) 生成的拷贝数数据。每个染色体臂定义的广泛值,将对其进行独立分析。首先,检查190个肿瘤样品中的每个样品,以确定每个臂或病灶区域是否缺失或扩增。然后,适当时,使用Mann-Whitney检验和Kruskal-Wallis检验,比较免疫类别与其余之间,以及其余与“主动免疫应答”和“耗竭免疫应答”子类型之间的值分布。然后,如先前在HCC中报道的那样 (Schulze, 等人2015),评估驱动基因中发生的病灶性高水平扩增 (HLA) 或纯合缺失 (HD) 的差异。为了增加此分析的置信度,HLA和HD阈值已如先前所述重新定义 (Weir, 等人2007)。简而言之,如果属于基因边界 ($\pm 20\text{kb}$) 的拷贝数片段的 $\log_2$ 比率 >0.85 ,则调用HLA;而如果拷贝数片段的 $\log_2$ 比率 <-0.74 ,则调用HD,两值分别对应于3.6和1.2个拷贝。图13列出了GISTIC2发现并涉及报告的驱动基因的显著HLA和HD。显著性差异通过两尾Fisher精确检验进行评估。 $p<0.05$ 的值被认为是显著的。使用R统计软件进行统计分析。

[0236] 为了分析突变和新抗原,使用Rooney等人Cell 2015的表S4A中提供的每个样品的事件列表。该数据是从GDAC Firehose标准分析管道获得的。简而言之,首先使用基于POLYSOLVER的突变检测管道来表征HLA等位基因并鉴定HLA突变。然后,通过先前报道的新抗原预测管道鉴定出个体特异性HLA结合肽。使用NetMHCpan (v2.4) 预测了所有可能的9和10-mer突变体肽与相应的POLYSOLVER推断的HLA等位基因的结合亲和力 (Nielsen, 等人2007)。

[0237] 统计分析

[0238] 所有分析均使用SPSS软件版本22进行。分别通过Fisher精确检验和Wilcoxon秩和检验对分子类别、组织学标记物和临床病理变量之间的相关性进行分类和连续数据分析。

该研究中使用的所有标记在先前均已被报道(图2)。

[0239] 进行了Kaplan-Meier估计、对数秩检验和Cox回归建模,以分析分子和临床变量与总存活率和肿瘤复发之间的关系。由于缺少已知与结果相关的关键变量(例如肿瘤大小和数量、卫星病毒等),因此未进行TCGA集中的多变量分析。

[0240] 实例2-鉴定HCC的免疫类别

[0241] 为了从HCC肿瘤中的大量基因表达数据中分离出与免疫相关的基因组信号,对228例切除的HCC样品进行了NMF分析(训练队列,图1)。表1总结了该训练队列的临床特征。在通过NMF鉴定的不同表达模式中,一个归因于通过与先前报道的免疫富集得分整合而存在炎症应答和免疫细胞。定义该表达模式的排名靠前的基因(称为典范基因)的分析进一步证实了免疫相关功能和信号传导。对典范基因的一致性聚类鉴定了新的分子亚组,占该队列的24%(55/228),在本文中称为“免疫类别”(图3)。

[0242] 属于免疫类别的患者显示出鉴定免疫细胞的标记的显著富集,所述免疫细胞即T细胞、细胞毒素、三级淋巴样结构(TLS)以及巨噬细胞($p < 0.001$)、免疫元基因、可预测在黑色素瘤(28个基因, $p < 0.001$)和头颈鳞状细胞癌(6个基因, $p < 0.001$)中对派姆单抗应答的IFN基因标记和PD-1信号传导(36/55与19/173, $p < 0.001$)(图3A)。

[0243] 免疫类别与其余样品之间的类别比较鉴定了112个显著失调的基因(免疫分类器,图10),包括108个过表达的免疫相关基因,例如T细胞受体成分以及天然杀伤细胞(NK)和T细胞的化学诱导剂(CCL5、CXCL9和CXCL10, $p < 0.001$)(图11)。同样,GSEA鉴定了IFN α 和 γ 信号、炎症应答(即淋巴细胞激活、T辅助1-细胞毒性模块、NK介导的毒性等)、TGF- β 和JAK/STAT信号的富集($FDR < 0.001$)(结果未显示)。

[0244] 接下来试图将免疫类别与先前报道的HCC分子分类相结合。这揭示了IFN相关类别(18/55与12/173, $p = 0.0001$)和SI类别(TGF- β /WNT激活)(32/55与15/173, $p = 0.0001$)的富集,以及明显排除S2类别(2/55与46/173, $p = 0.0001$)和CTNNB1类别(8/55与59/173, $p < 0.001$,图3A)。

[0245] 总之,这些数据表明,鉴定了一种HCC的免疫相关类别,其富含捕获免疫细胞存在的标记、对免疫检查点疗法应答的标记以及IFN信号传导。

[0246] 实例3-免疫类别免疫表型显示PD-1/PD-L1信号传导的富集

[0247] 进行了免疫表型分析,以进一步在生物学上了解免疫类别的免疫学性质。如所预测的,属于该类别的患者具有明显更高的免疫细胞浸润率(11/49与14/167, $p = 0.01$,图3A和3B)和TLS密度(>5个病灶,19/51与34/170, $p = 0.01$,图3A和3C),如通过检查苏木精和伊红染色的切片所揭示的。

[0248] 然后在训练队列的样品子集中通过免疫组织化学评估PD-1和PD-L1蛋白表达(免疫类别内部和免疫类别外部,图3B)。总体而言,根据最近的报道,在16%(16/99)的HCC中观察到PD-L1肿瘤表达。在10%的队列(10/99)中观察到PD-1蛋白表达,但在PD-1和PD-L1的高表达之间未发现显著相关性,这可能是由于样品量小所致。尽管如此,具有高PD-1(在免疫类别中为8/48,在其余类别中为2/51, $p = 0.4$)和PD-L1(在免疫类别中为12/48,在其余类别中为4/51, $p = 0.03$)蛋白表达的肿瘤在免疫类别中显著富集。就其他临床病理学变量而言,免疫类别与其余队列之间没有观察到差异(数据未显示, $p > 0.05$)。

[0249] 总之,病理检查显示,属于免疫类别的患者表现出高度的免疫浸润,更高的PD-1/

PD-L1免疫组织化学表达和TLS的存在。这些数据强调了免疫分类器捕获HCC中浸润的免疫细胞衍生的分子信号的性能。

[0250] 实例4-免疫类别捕获了肿瘤微环境的两种不同组分：主动和耗竭子类型

[0251] 免疫系统可以发挥抗肿瘤和促肿瘤活性。确实，癌细胞与肿瘤微环境之间的串扰通过提供维持增殖并促进上皮间充质转化(EMT)、侵袭和转移的生长因子，触发了有利于癌症进展的免疫应答。为了进一步探索HCC中的这一概念，分析了免疫类别中的患者对肿瘤微环境应答而发生的免疫调节。如图4A所示，33%的免疫类别(18/55)的特征在于“活化基质”，而其余患者(37/55,67%)显示缺乏这种活化，如使用先前发布的分子标记来捕获激活的炎症基质应答的最近模板预测(NTP)分析所预测的。有趣的是，具有正常或非活性基质的患者(37/55,67%)表现出T细胞和IFN标记的显著富集，包括适应性免疫应答基因(即T细胞受体G、CD8A、IFN- γ 、GZMB等)和可预测对派姆单抗应答($p<0.001$)的IFN标记的过表达。因此，该簇被称为主动免疫应答。

[0252] 相反，激活基质的存在与T细胞耗竭标记(10/18与4/37, $p<0.001$)和免疫抑制组分，例如TGF- β 信号传导和M2巨噬细胞(8/18与1/37, $p=0.0003$)显著相关。尤其是，在该子群中观察到TGF- β -1和-3的过表达以及反映TGF- β 途径激活的多个标记的富集，例如晚期TGF- β 标记(9/18与6/37, $p=0.02$)、S1/TGF- β 标记(16/18与16/37, $p=0.001$)、WNT/TGF- β 信号传导(15/18与12/37, $p<0.001$)和成纤维细胞(F-TBRS)(9/18与6/37, $p=0.02$)和T细胞(T23TBRS)(10/18与9/37, $p=0.03$)的TGF- β 应答标记(TBRS)(图4A)。免疫抑制因子(即LGALS1、CXCL12)和骨髓化学诱导剂(CCL2)的上调支持了该簇中的T细胞耗竭和细胞毒性活性受损。其他重要的NK细胞激活剂，例如Granzyme B(GZMB) IFN- γ 、NKG2D和TBX21受体(Hanahan和Weinberg 2011; Slavulijica, 等人2011)强烈下调(图4A)。基于这些特性，该簇被称为耗竭免疫应答。比较这两个簇的基因集富集分析证实了TGF- β 在耗竭免疫应答中的驱动作用，以及与转移、EMT、血管生成和肝癌复发相关的途径的富集，这表明更具侵略性的表型(图12)。有趣的是，在免疫浸润、TLS计数、PD-L1和PD-1表达方面，未观察到主动和耗竭免疫子类型之间的显著差异(图3C、4B和4C)。通过将这些簇与临床病理学参数相关联，进一步探讨了免疫应答类型的潜在预后意义。

[0253] 有趣的是，主动免疫应答簇内的患者显示出的切除后的肿瘤复发率低于耗竭免疫应答簇(中位复发时间为32个月与21个月, $p=0.0$, 图5D和5E)。还观察到了更好的存活率趋势(主动免疫的中位存活时间为88个月, 其余患者为63个月, $p=0.07$) (图5A)。在不同的免疫子类型之间未发现其他临床病理学变量(包括HBV和HCV感染)的差异(结果未显示)。值得注意的是，将主动免疫子类型保留为总体存活的独立预后因素($HR=0.58$, $CI\ 0.34-0.98$, $p=0.04$)、以及血管浸润、多发结节、血小板计数和HCV感染。

[0254] 总而言之，这些数据将免疫类别分为两个不同的基于微环境的组分：a) 主动免疫应答子类型(~65%)，特征在于适应性免疫应答基因的过表达(图4)，以及b) 耗竭免疫应答子类型(~35%)，特征在于存在免疫抑制信号(即TGF- β 、M2巨噬细胞)。

[0255] 实例5-在数据集中验证免疫类别

[0256] 使用基于112个基因表达的免疫分类器，在7个其他数据集($n=728$ 例HCC, 图1)中进一步评估了免疫类别的存在(图10)。首先，将免疫分类器应用于TCGA数据集，TCGA数据集是公开可用的最大数据集[$n=190$ 例新鲜冷冻(FF)样品]通过RNA测序分析]。与训练队列相

似,在免疫类别中成功预测了42/190 (22%) 例HCC样品。免疫类别的分子表征证实了鉴定免疫细胞(即T细胞、细胞毒素、TLS和巨噬细胞, $p<0.001$) 的标记、可预测对免疫检查点治疗应答的标记($p<0.001$) 和PD-1信号传导(24/42与31/148, $p<0.001$) 的显著富集(图5C)。与已知的HCC分子类别相比,证实了IFN相关类别(13/42,其余为11/148, $p<0.001$) 和S1类别(28/42,其余队列为20/148, $p<0.001$) 的富集,明显排除了CTNNB1类别(2/42,其余队列为30/148, $p<0.001$),如先前在训练队列中所观察到的。另外,一半的TCGA-免疫类别显示缺乏激活的基质标记以及过表达的适应性免疫应答基因,这概括了主动免疫应答子类型(图5C)。

[0257] 另一方面,其余一半的患者表现出激活的基质,这与TGF- β 信号传导有关(11/21,其余免疫类别为1/21, $p=0.01$) 以及NKG2D和TBX21受体的下调($p<0.01$),这是耗竭免疫应答子类型的主要特征。与临床结果的相关性证实,主动免疫应答子类型患者的存活期更好(主动免疫簇的中位存活时间为107个月,其余患者为33个月, $p=0.03$) (图5B)。

[0258] 接下来,对我们小组先前收集的验证队列[n=131例福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)HCC]和其中包括4个测试FF组织(n=289)和1个FFPE样品(n=118)的5个其他数据集进行了查询(图1)。在所有FF数据集中分配给免疫类别的患者百分比均保持一致,对这种类别预测平均27%的样品(范围22-28)。在两个FFPE数据集(验证和HCC-V)中,分别将37%(48/131)和30%(35/118)的患者分配到了免疫类别(结果未显示)。较高的百分比可能是由于使用了不同的基因组平台[DASL(依诺米那(Illumina))与昂飞(Affymetrix)]或不同类型的组织材料(FFPE与FF样品)所致。但是,无论使用何种平台和样品类型,在所有测试的数据集中都成功地概括了免疫类别的分子特征和两种基于微环境的子类型的存在。

[0259] 最后,测试了免疫类别预测对免疫疗法应答的能力。分析了从两名用纳武单抗治疗的HCC患者得到的肿瘤基因表达是否存在免疫分类器,从而对表现出部分应答的#1患者(FDR=0.001)给出了阳性结果,而对表现出稳定疾病的#2患者(FDR=0.23)则没有结果。图8。

[0260] 考虑到监管机构尚未批准将检查点抑制剂用于HCC管理,使用最近发布的32位患者数据集,将免疫类别的基因表达谱与对免疫疗法应答的黑色素瘤患者的表达谱进行了比较。子类作图分析表明,免疫类别,尤其是主动免疫子类型,与对PD-1检查点抑制剂应答的黑色素瘤患者群体相似。图9。

[0261] 实例6-免疫类别肿瘤显示出较低的染色体畸变负荷,但新抗原的表达或肿瘤突变负荷没有差异

[0262] 最近的分析将肿瘤基因组特征与抗肿瘤免疫联系在一起(Le, 等人2015;Rooney, 等人2015;McGranahan, 等人2016)。特别是,已提出,新抗原的存在和总体突变负荷可能会驱动T细胞应答,而肿瘤非整倍体与免疫逃避的标记物和对免疫疗法应答降低相关联(Roh, 等人2017;Davoli, 等人2017)。为了验证体细胞拷贝数畸变(SCNA)和突变的新抗原的负荷是否可能影响HCC中的局部免疫浸润,使用了TCGA数据集。在最近的分析中,一些肿瘤的局部免疫细胞溶解活性显示出与细胞毒性T细胞和吸引T细胞的干扰素刺激的趋化因子密切相关(Rooney等人,2015)。有趣的是,在HCC患者中,观察到了细胞溶解活性得分与免疫类别之间的密切相关性($p<0.0001$,图5C)。就SCNA而言,免疫类别患者在整体和病灶方面表现出较低的收益和损失负荷(图6A和6B),其中免疫类别的中位数整体收益(范围为0-16)和3.5个整体损失(范围为0-20),而其余队列的整体收益(范围为0-22)和9个整体损失(范围为0-

26) (分别为 $p=0.046$ 和 $p=0.01$)。类似地,在免疫类别中鉴定了中位数5个病灶收益(范围为0-18)和9个病灶损失(范围为0-25),而在其余队列中鉴定了8.5个病灶收益(范围为0-20)和13个病灶损失(范围为0-27)(进行比较, $p=0.03$)。在分析免疫类别以外患者(基于免疫标记的低免疫浸润)中与复发SCNA相关的区域时,在臂水平上观察到染色体1q的复发拷贝数收益和染色体3p、17p和18p的复发损失。就病灶高水平扩增和纯合缺失而言,将分析限于涉及先前在HCC中报道的驱动基因的病灶性结构畸变(Schulze等人,2015)。发现基因座11q13(CCND1、FGF19等)的高水平扩增存在显著差异,该基因座在免疫类别中(尤其是在主动免疫子类型中)显著富集。对于涉及MYC、TERT和PTEN的基因座,未发现显著差异。

[0263] 然后,根据先前对TCGA数据集的分析,免疫类别与总突变率和预测的新抗原发生率相关(Rooney等人,2015)。免疫类别与两种特征之间都没有关联(图6C和6E)。特别地,免疫类别相比于其余患者的突变中位数分别为175对212($p=0.1$,图6E)。类似地,两组之间的新抗原发生率在统计学上没有差异(分别为21与23, $p=0.28$,图6C)。尽管如此,当根据基于微环境的子类型对两个参数进行分析时,主动免疫子类型显示出趋向于较低的新表位发生率(中位数为18,耗竭队列为33,其余队列为23, $p=0.20$,图6D)和突变(中位数为140,耗竭子类型为269,其余队列为212, $p=0.06$,图6F)的趋势。

[0264] 最后,免疫类别与已知驱动基因的突变相关。除了CTNNB1途径的突变(12/42与81/148, $p=0.003$)外,其他突变没有显示出差异分布(图6G)。

[0265] 所有这些数据表明新抗原负荷与T细胞应答之间没有相关性,这表明其他机制(例如非整倍体和特定致癌途径的突变)可能会损害高度免疫原性肿瘤中的免疫细胞募集。

[0266] 实例7-免疫类别具有唯一DNA甲基化标记

[0267] 考虑到免疫类别中免疫相关基因的明显上调,考虑了这种失调是否可以反映这些肿瘤的表观遗传学改变。对全基因组甲基化数据的监督分析显示,与其余队列相比,免疫类别中192个免疫应答基因启动子中的363个CpG位点被差异甲基化($FDR<0.05$,图6H)。此外,在192个显示差异甲基化CpG位点的基因中,115个与基因表达显著相关。

[0268] 特别地,免疫抑制分子LGALS3,其在肿瘤进展过程中可能通过诱导癌浸润性T细胞的凋亡而在免疫逃逸中起作用(Fukimori等人,2003年)和TGF- β 信号传导调节剂PMEPA1在2种免疫子类型中显著过表达($p<0.001$,图6I)。

[0269] 总体而言,这些数据表明免疫类别的特征在于唯一甲基化特征。特别是,在192个免疫相关基因中观察到差异甲基化,并且在大多数情况下与基因表达的改变有关。

[0270] 实例8-特异性致癌信号传导途径可以协同作用以减少HCC的CTNNB1类别中的T细胞浸润

[0271] 免疫类别与先前报道的分子分类的整合揭示了在所有测试数据集中明显排除了CTNNB1类别(图3A和5C)。HCC的CTNNB1类别的特征是肝脏相关Wnt靶基因的过表达,核 β -连环蛋白(β -catenin)染色的富集和CTNNB1突变(Chiang等人,2008)。CTNNB1类别的排除支持黑色素瘤中的最新报道,其中通过抑制CCL4和随后的T细胞启动失败,该途径的激活与T细胞排除相关(Spranger等人,2015)。在队列中,与免疫类别患者或其余患者相比,CTNNB1类别的HCC样品显示出几种免疫标记(特别是T细胞)的富集得分显著较低($p<0.001$,图6J和6K)。此外,根据黑色素瘤的数据,CTNNB1类别患者显示出CCL4的下调($p<0.001$)。进一步的致癌途径与T细胞排斥相关,包括PTEN(Peng等人,2016)和PTK2(Jiang等人,2016)。有趣的

是,PTK2在CTNNB 1类别中明显过表达,这表明PTK2和CTNNB 1途径之间可能存在协同作用,以在该子群中诱导免疫细胞排斥。另外,DNA拷贝数和PTK2的表达高度相关($p<0.0001$) (图6L和6M)。

[0272] 这些数据表明,与免疫类别和其余肿瘤患者相比,CTNNB1类别中的HCC样品显示出较低的免疫标记表达。通过激活突变或其他机制激活特定的致癌信号传导,例如CTNNB1和PTK2信号传导,可能在影响该子群的免疫学特征方面发挥重要作用。

[0273] 实例9-免疫信号的区室化:周围组织中的免疫浸润不能反映其肿瘤对应物

[0274] 最后,为了评估肿瘤内免疫细胞浸润的类型是否反射其肿瘤周围对应物,肿瘤内免疫浸润与周围肝脏组织相关。为此,对167名训练队列患者进行了亚分析,他们的肿瘤和匹配的周围非肿瘤组织的基因表达数据均可用。在167例中,根据肿瘤的表达谱将25% (42/167) 按阳性归类为免疫类别(图7A)。有趣的是,这些患者中只有少数 (13/42, 31%) 在肿瘤和匹配的周围肝脏中均显示出阳性预测组合,这表明肿瘤内免疫浸润不能反映周围组织的情况。鉴于这些观察,进一步探讨了非肿瘤肝脏中发生的免疫浸润的类型。有趣的是,根据周围组织的情况由免疫分类器预测阳性的患者显示出捕获免疫细胞(CD8,巨噬细胞, $p<0.001$)、激活的基质[31/57 (54%) 与7/110, (6%), $p=0.0001$]、TGF- β 信号传导[38/57, (67%) 与2/110, (2%), $p=p=0.0001$]和其他免疫抑制成分(LGALS1、CXCL12, $p<0.001$)的存在的大量富集。此外,耗竭T细胞[19/57, (33%) 与7/110 (6%), $p=0.0001$],以及来自周围肝脏的预后的186个基因标记[43/57 (75%) 与7/110 (6%), $p=0.0001$]也富集于该子群中。此外,观察到MET A VIRF3-F4阶段[42/45 (93%),其余队列为66/87 (76%), $p=0.02$]和HCV感染[36/54 (67%),其余为39/108 (36%), $p<0.001$]与周围肝脏的阳性免疫分类器显著相关。另一方面,HBV感染[7/54 (13%) 与34/108 (31%), $p=0.01$]和酗酒[2/54 (4%) 与20/108 (19%), $p=0.008$]在免疫分类器呈阴性的患者中更为常见(图7A)。最后,免疫分类器呈阳性的患者显示出显著较差的预后,中位存活时间为37个月,而其余队列为76个月($p<0.001$,图7B)。

[0275] 从本质上讲,这些数据表明周围肝脏肿瘤的免疫特征不能反映肿瘤内的特征,其主要特征是与HCC患者的存活有关的免疫抑制成分。

[0276] 实例10-鉴定免疫类别的56个基因分类器

[0277] 原始的112个基因的免疫分类器(图10)已成功地缩减为56个基因,选择得分最高的那些基因(表3)。已测试了56个基因的免疫分类器的预测能力,并将其与112个基因的原始免疫分类器在3个数据集中进行了比较:TCGA ($n=190$ 个样品,图14A),验证队列($n=132$,图14B)和HCC-I数据集($n=90$,图14C)。

[0278] 如下所示,56个基因的免疫分类器的灵敏性为97% (分别在3个队列中进行分析时,范围为95-100%),特异性为98% (分别在3个队列中进行分析时,范围为96-99%) 和准确度为97% (分别在3个队列中进行分析时,范围为96-98%) (表2)。

[0279] 此外,还在来自3个队列的所有患者中计算了56个基因的免疫分类器的接收者操作特征(ROC)曲线($n=411$,图15)。ROC曲线是解释灵敏性和特异性水平的有用方法。ROC曲线是对预测变量可能的灵敏性和特异性的潜在组合集合的概括,并在原始的112个基因的免疫分类器和缩减的56个基因的免疫分类器的情况下,为比较不同的预测变量提供了自然的通用标度。接近1的AUC值表明筛查量度可靠地区分表现令人满意的患者。对于56个基因

的免疫分类器,在所有患者中进行测试时,曲线下的面积为0.971(图15)。

[0280] 表2:56个基因的免疫分类器的灵敏性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性

[0281]

所有3个队列中的统计数据	数值	95%CI
灵敏性	97%	91.41%至99.05%
特异性	98%	95.20%至99.05%
阳性预测值	94%	88.49%至97.08%
阴性预测值	99%	96.51%至99.48%
准确性	97%	95.28%至98.66
统计数据,TCGA队列 (n=190)	数值	95%CI
灵敏性	95%	83.84%至99.42%
特异性	99%	95.20%至99.84%
阳性预测值	95%	83.45%至98.76%
阴性预测值	99%	94.97%至99.65%
准确性	98%	94.70%至99.42%
统计数据,验证队列 (n=132)	数值	95%CI
灵敏性	100%	92.60%至100.00%
特异性	96%	89.80%至99.25%
阳性预测值	94%	84.05%至97.98%
阴性预测值	100%	
准确性	98%	93.45%至99.53%
统计数据,HCC-1队列 (n=90)	数值	95%CI
灵敏性	92%	73.00%至98.97%
特异性	97%	89.48%至99.63%
阳性预测值	92%	73.65%至97.74%
阴性预测值	97%	89.46%至99.18%
准确性	96%	89.01%至98.78%

[0282] 表3:56个基因免疫分类器

[0283]

基因 ID	类别
LCP2	免疫类别
PTPRC	免疫类别
CCL5	免疫类别
LAPTM5	免疫类别
GZMA	免疫类别
SLA	免疫类别
FYB	免疫类别
CD53	免疫类别
CD3D	免疫类别
GZMK	免疫类别
CD48	免疫类别
CD2	免疫类别
CD52	免疫类别
S100A4	免疫类别
ITGB2	免疫类别
RAC2	免疫类别
CORO1A	免疫类别
IL7R	免疫类别
CYTIP	免疫类别
SRGN	免疫类别
SAMSN1	免疫类别
FAM26F	免疫类别
GPR171	免疫类别
CD27	免疫类别
MTHFD2	免疫类别
CXCR4	免疫类别
TIMP1	免疫类别
C16orf54	免疫类别
CD8A	免疫类别
LUM	免疫类别
DUSP2	免疫类别
POU2AF1	免疫类别
EFEMP1	免疫类别
CXCL9	免疫类别
PMP22	免疫类别
IGHM	免疫类别
LXN	免疫类别
DCN	免疫类别
RGS1	免疫类别
THBS2	免疫类别
PTGIS	免疫类别
SMOC2	免疫类别
MMP9	免疫类别
GZMH	免疫类别
AEBP1	免疫类别
COL6A3	免疫类别
GEM	免疫类别

[0284]	CTGF	免疫类别
	CCL19	免疫类别
	MGP	免疫类别
	PAGE4	其余类别
	UGT2B17	其余类别
	C1QTNF3	其余类别
	DHRS2	其余类别
	FAM133A	其余类别
	ASCL1	其余类别

[0285] 参考文献

- [0286] Alistar,et al. (2014) Genome Med 6:80.
- [0287] Bald,et al. (2014) Cancer Discov 4:674-87.
- [0288] Balli,et al. (2016) Clin Cancer Res 23(12):3129-38.
- [0289] Bindea,et al. (2013) Immunity 39:782-95.
- [0290] Borghaei,et al. (2015) N Engl J Med 373:1627-39.
- [0291] Boyault,et al. (2007) Hepatology 45:42-52.
- [0292] Brunnstrom et al. (2017) Modern Pathology 30(10):1411-21.
- [0293] Breiman (2001) Machine Learning, 45(1):5-32.
- [0294] Brunet,et al. (2004) Proc Natl Acad Sci US A 101:4164-9.
- [0295] Calderaro,et al. (2016) Hepatology 64:2038-2046.
- [0296] Calon,et al. (2012) Cancer Cell 22:571-84.
- [0297] Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. (2015) Cell 161:1681-96.
- [0298] Charoentong,et al. (2017) Cell Rep 18:248-262.
- [0299] Chen,et al. (2016) Cancer Discov 6:827-37.
- [0300] Chen,et al. (2002) Mol Biol Cell 13:1929-39.
- [0301] Chiang,et al. (2008) Cancer Res 68:6779-88.
- [0302] Chow,et al. (2016) J Clin Oncol 34, (suppl;abstr 6010).
- [0303] Coates,et al. (2008) Cancer Res 68:450-6.
- [0304] Coulouar,et al. (2008) Hepatology 47:2059-67.
- [0305] Davoli,et al. (2017) Science 355(6322).
- [0306] Deng et al. (2014) J. Clin. Invest. 124(2):687-695
- [0307] El-Khoueiry,et al. (2017) Lancet 389:2492-2502.
- [0308] Finkin,et al. (2015) Nat Immunol 16:1235-44.
- [0309] Flavell,et al. (2010) Nat Rev Immunol 10:554-67.
- [0310] Fukumori,et al. (2003) Cancer Res 63:8302-11.
- [0311] Garon,et al. (2015) N Engl J Med 372:2018-28.
- [0312] Hanahan and Weinberg (2011) Cell 144:646-74.
- [0313] Herbst,et al. (2016) Lancet 387:1540-50.
- [0314] Hoshida,et al. (2009) Cancer Res 69:7385-92.

- [0315] Hoshida,et al.(2008)N Engl J Med 359:1995-2004.
- [0316] Hoshida,et al.(2007)PLoS One 2:e1195.
- [0317] Hoshida,et al.(2013)Gastroenterology 144(5):1024-30.
- [0318] Iizuka,et al.(2003)Lancet 361:923-9.
- [0319] Ji,et al.(2012)Cancer Immunol Immunother 61:1019-31.
- [0320] Jiang,et al.(2016)Nat Med 22:851-60.
- [0321] Khalil,et al.(2016)Nat Rev Clin Oncol 13:394.
- [0322] Lachenmayer,et al.(2012)Clin Cancer Res 18:4997-5007.
- [0323] Le,et al.(2015)N Engl J Med 372:2509-20.
- [0324] Lee,et al.(2004)Nat Genet 36:1306-11.
- [0325] Llovet,et al.(2008)N Engl J Med 359:378-90.
- [0326] Llovet,et al.(2015)Nat Rev Clin Oncol 12:408-24.
- [0327] Llovet,et al.(2016)Nat Rev Dis Primers 2:16018.
- [0328] McGranahan,et al.(2016)Science 351:1463-9.
- [0329] Mermel,et al.(2011)Genome Biol 12:R41.
- [0330] Messina,et al.(2012)Sci Rep 2:765.
- [0331] Moffitt,et al.(2015)Nat Genet 47:1168-78.
- [0332] Murray,et al.(2012)Lancet 380:2197-223.
- [0333] Nielsen,et al.(2007)PLoS One 2:e796.
- [0334] Park,et al.(2016)Cancer Discov 6:1366-81.
- [0335] Peng,et al.(2016)Cancer Discov 6:202-16.
- [0336] Porta-Pardo and Godzik(2016)Cancer Immunol Res 4:789-98.
- [0337] Powles,et al.(2014)Nature 515:558-62.
- [0338] Quigley,et al.(2010)Nat Med 16:1147-51.
- [0339] Rajasagi,et al.(2014)Blood 124:453-62.
- [0340] Reich,et al.(2006)Nat Genet 38:500-1.
- [0341] Ribas,et al.(2015)J Clin Oncol 33,(suppl;abstr 3001).
- [0342] Robert,et al.(2015)N Engl J Med 372:2521-32.
- [0343] Roh,et al.(2017)Sci Transl Med 9.
- [0344] Rooney,et al.(2015)Cell 60:48-61.
- [0345] Schulze,et al.(2015)Nat Genet 47:505-11.
- [0346] Slavuljica,et al.(2011)Front Immunol 2:85.
- [0347] Spranger,et al.(2015)Nature 523:231-5.
- [0348] Stephen,et al.(2014)Immunity 41:427-39.
- [0349] Topalian,et al.(2012)N Engl J Med 366:2443-54.
- [0350] Viel,et al.(2016)Sci Signal 9:ra 19.
- [0351] Villanueva,et al.(2015)Hepatology 61:1945-56.
- [0352] Villanueva,et al.(2011)Gastroenterology 140:1501-12 e2.
- [0353] Wang et al.2016 OncoTargets and Therapy 9:5023-39

- [0354] Weir,et al.(2007)Nature 450:893-8.
- [0355] Yoshihara,et al.(2013)Nat Commun 4:2612.
- [0356] Zou et al.(2016)Sci Transl.Med 8:328rv4.
- [0357] Zucman-Rossi,et al.(2015)Gastroenterology 149:1226-1239 e4.

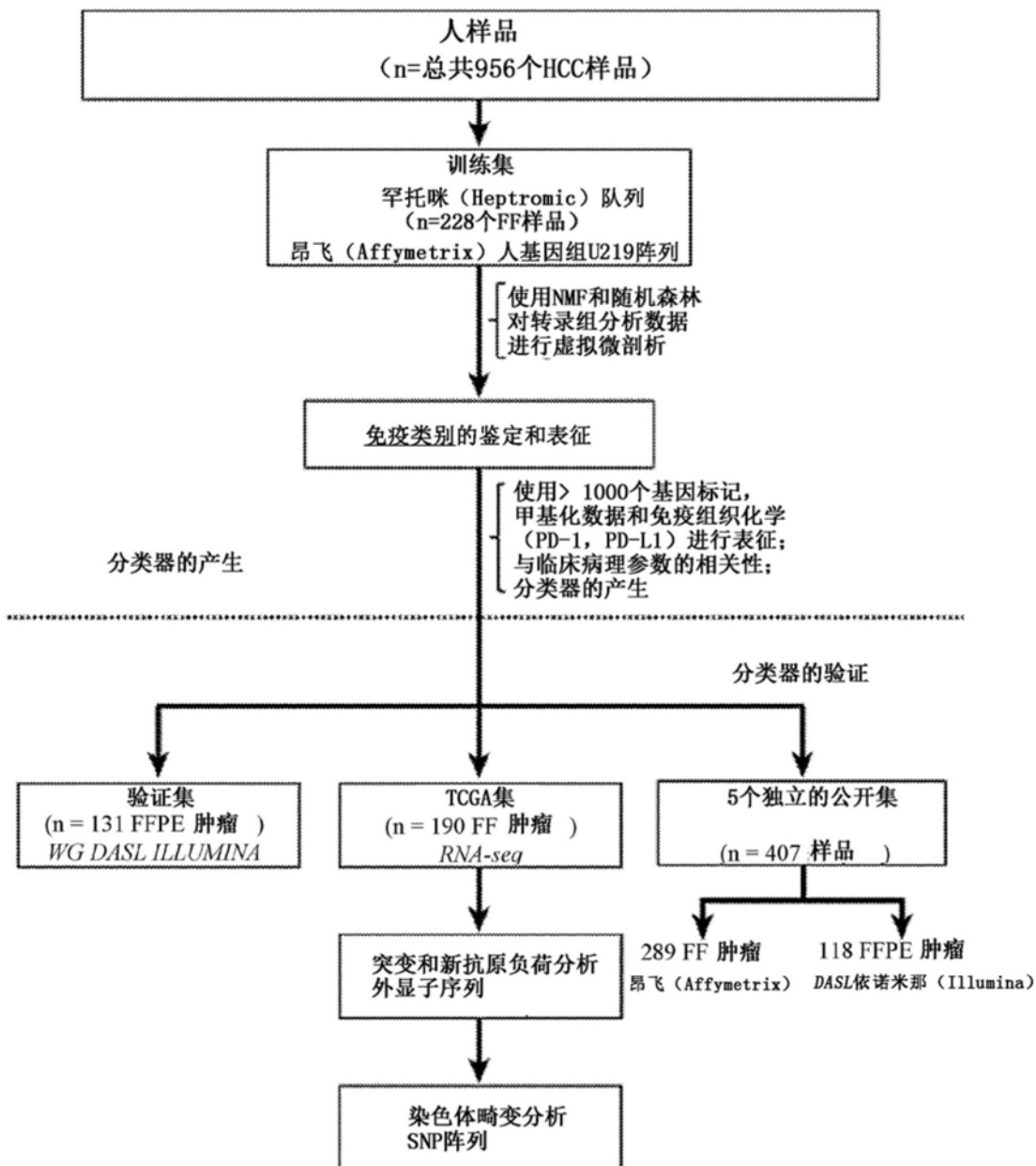


图1

标记名称	研究
免疫富集得分	Yoshihara K, et al. Nat Commun 2013;4:2612
基质富集得分	Yoshihara K, et al. Nat Commun 2013;4:2612
T细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
细胞毒素	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
巨噬细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
TLS	Finkin S, et al. Nat Immunol 2015;16:1235-44
TLS	Messina JL, et al. Sci Rep 2012;2:765
B. P. 元基因	Alistar A, et al. Genome Med 2014;6:80
T. NK元基因	Alistar A, et al. Genome Med 2014;6:80
28个基因IFN标记	Ribas A, et al. J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr 3001)
6个基因IFN标记	Chow LQM, et al. J Clin Oncol 34, (suppl; abstr 6010) 2016
PD-1信号传导	Quigley M, et al. Nat Med 2010;16:1147-51
HCC的IFN子集	Chiang DY, et al. Cancer Res 2008;68:6779-88
HCC的S1子集	Hoshida Y, et al. Cancer Res 2009;69:7385-92
HCC的CTNNB1子集	Chiang DY, et al. Cancer Res 2008;68:6779-88
HCC的S2子集	Hoshida Y, et al. Cancer Res 2009;69:7385-92
激活基质	Moffitt RA, et al. Nat Genet 2015;47:1168-78
T细胞耗竭标记	Quigley M, et al. Nat Med 2010;16:1147-51
WNT/TGFβ标记	Lachenmayer A, et al. Clin Cancer Res 2012;18:4997-5007
M1/M2巨噬细胞	Coates PJ, et al. Cancer Res 2008;68:450-6
晚期TGFβ标记	Coulouarn C, et al. Hepatology. 2008 Jun;47(6):2059-67
T细胞-TBRS	Calon A, et al. Cancer Cell 2012;22:571-84
成纤维细胞-TBRS	Calon A, et al. Cancer Cell 2012;22:571-84
免疫细胞子集	Cancer Genome Atlas N. Cell 2015;161:1681-96
免疫信号传导分子	Cancer Genome Atlas N. Cell 2015;161:1681-96
B细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
CD8T细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
T _{em} 细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
Th1细胞	Bindea G, et al. Immunity 2013;39:782-95
186个基因标记	Hoshida Y, et al. N Engl J Med 2008;359:1995-2004
细胞溶解性活性	Rooney MS, et al. Cell 2015;160:48-61

图2

图3A

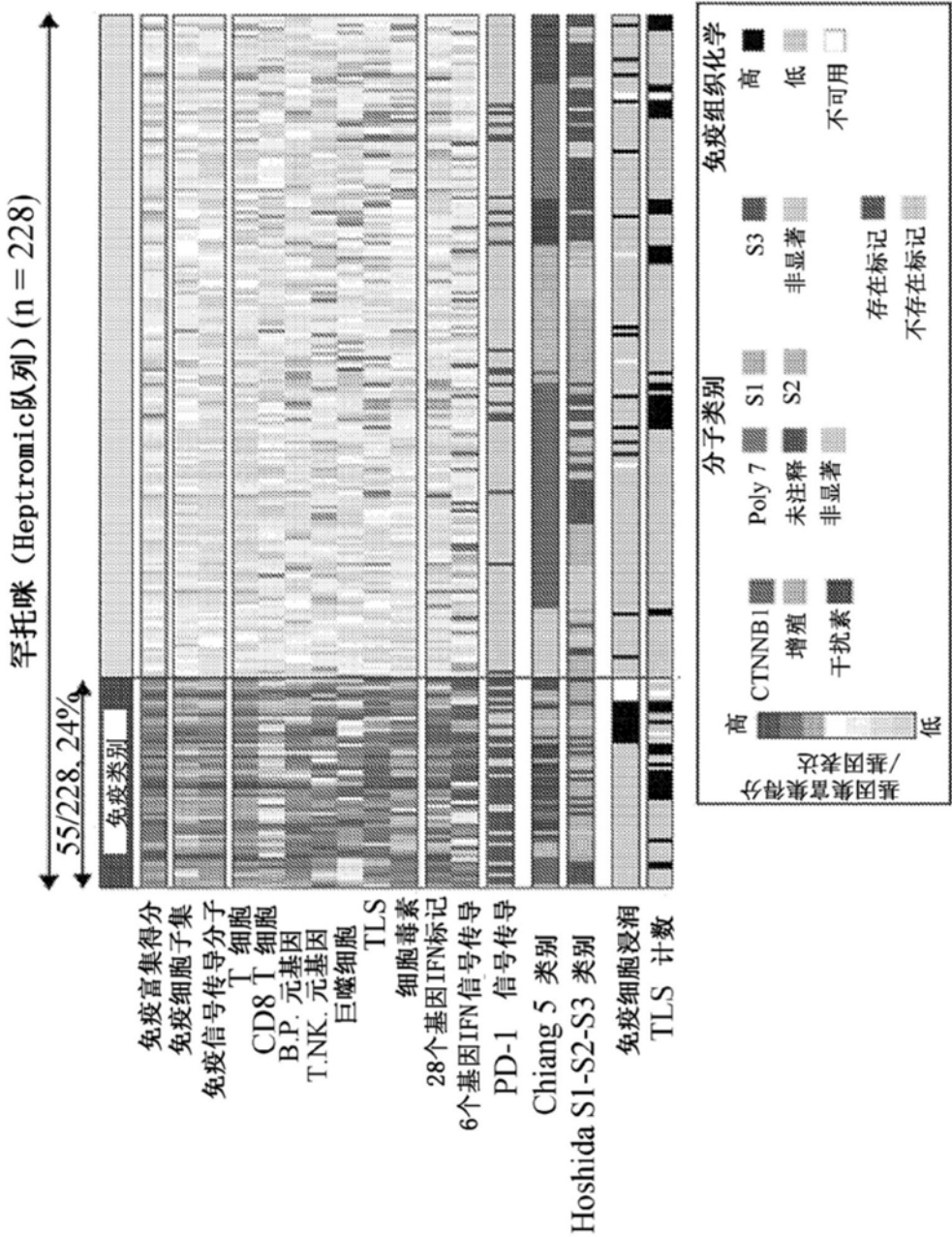


图3B

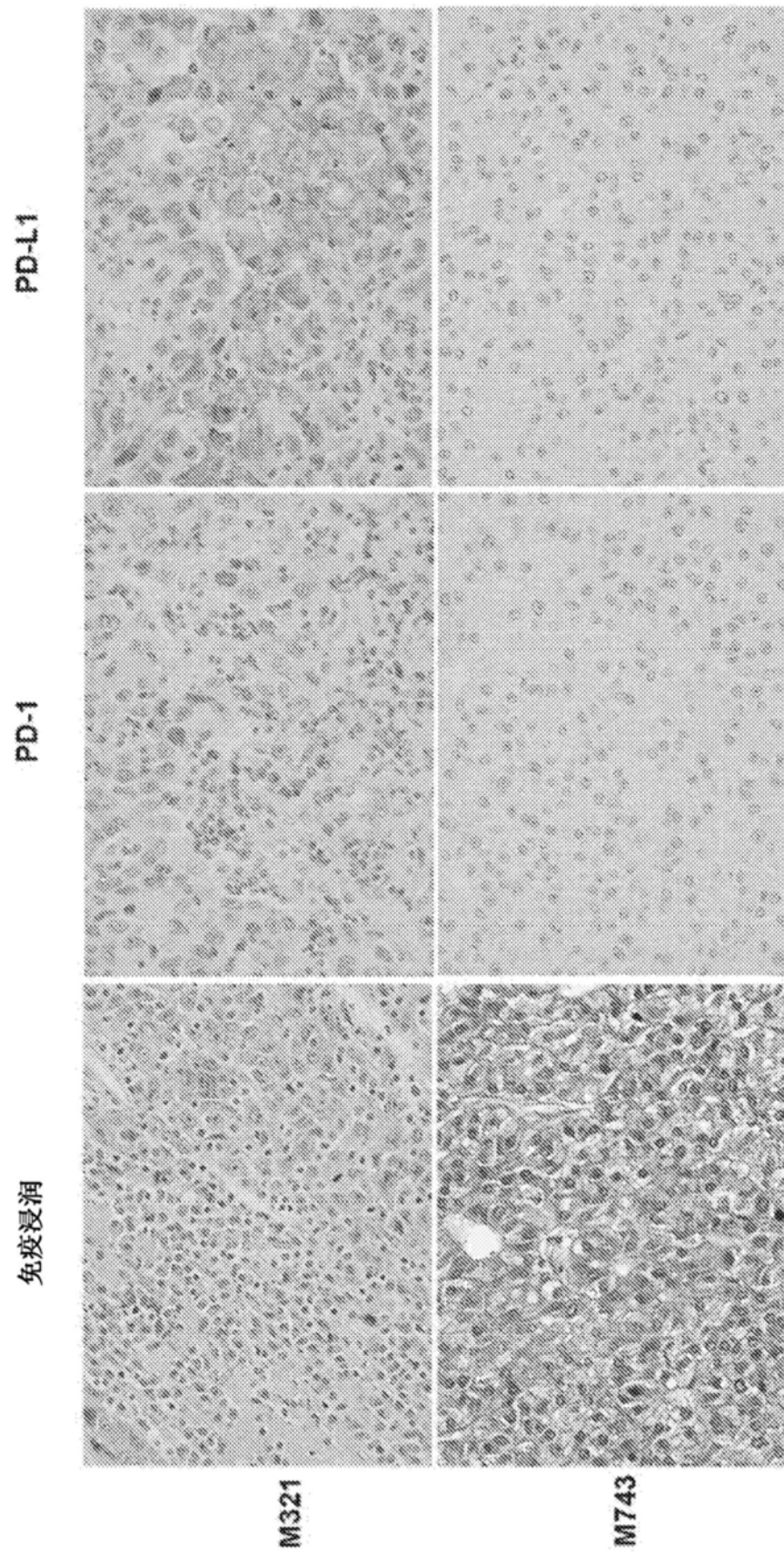
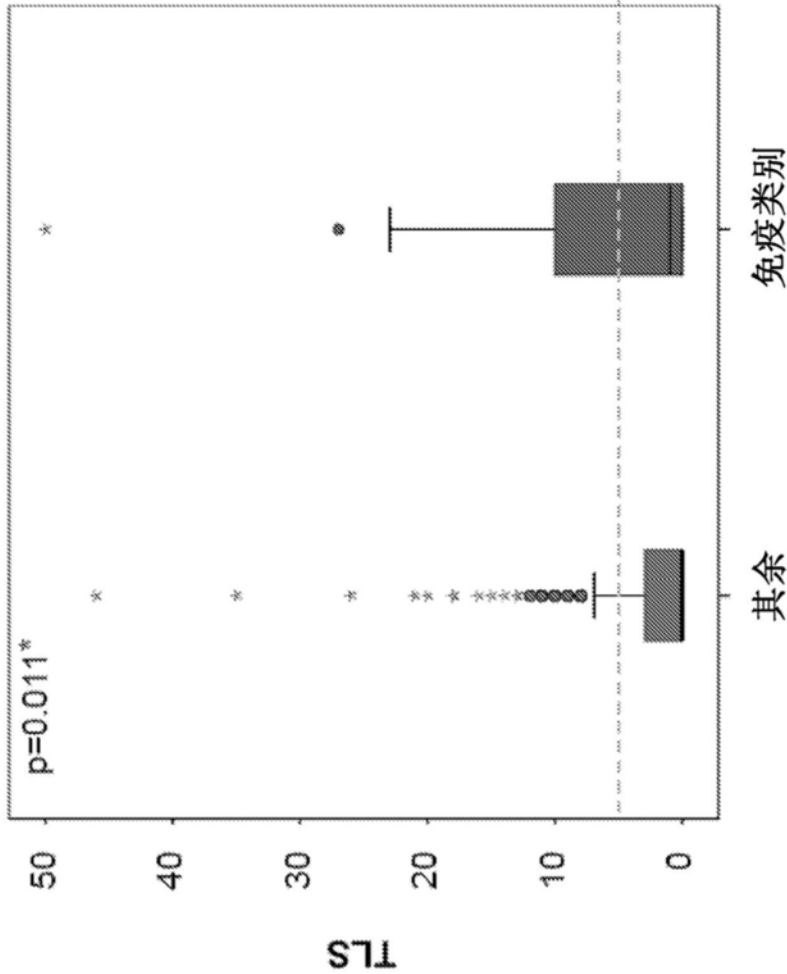


图3C



* Mann-Whitney U 检验

图3

图4A

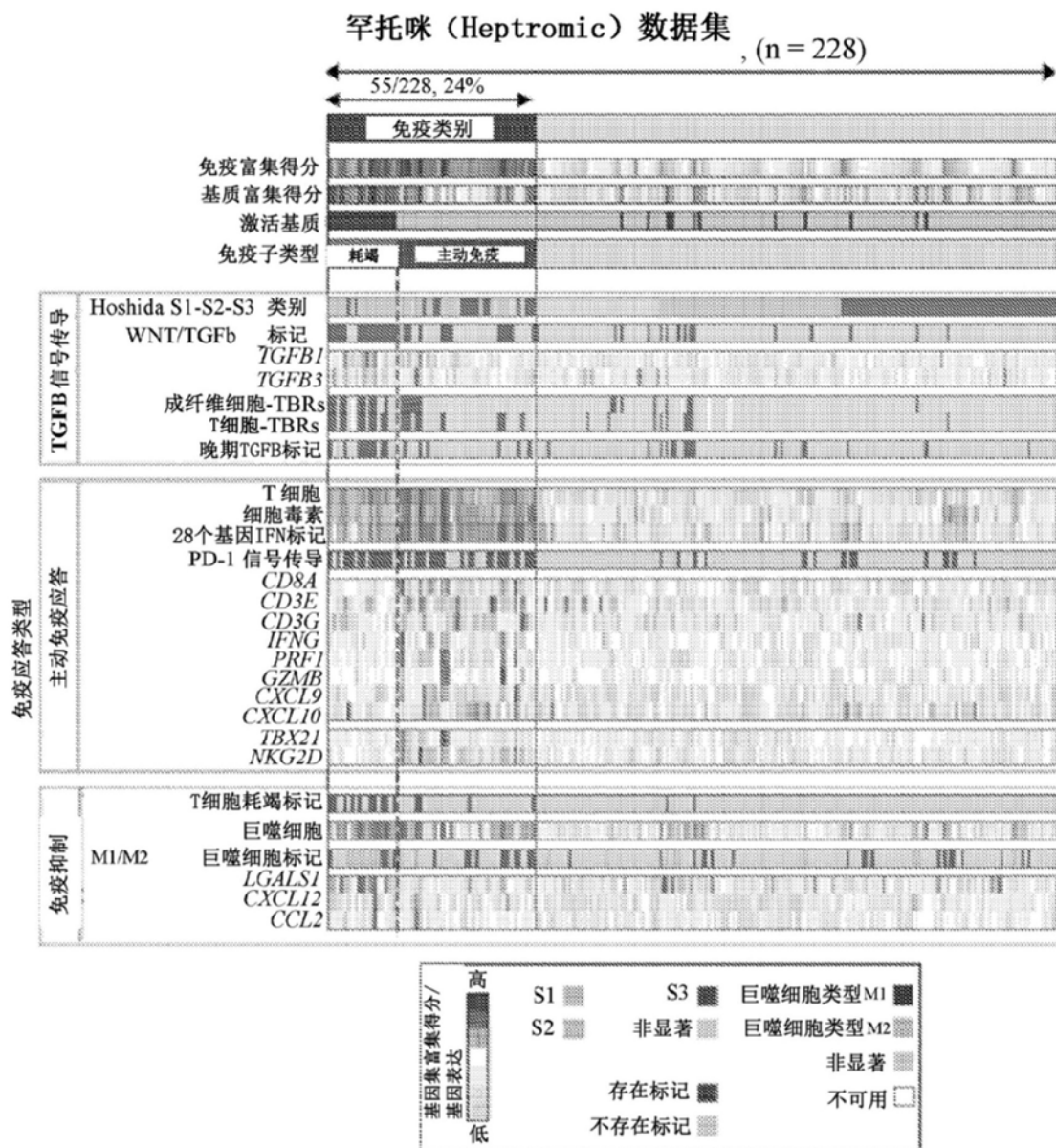
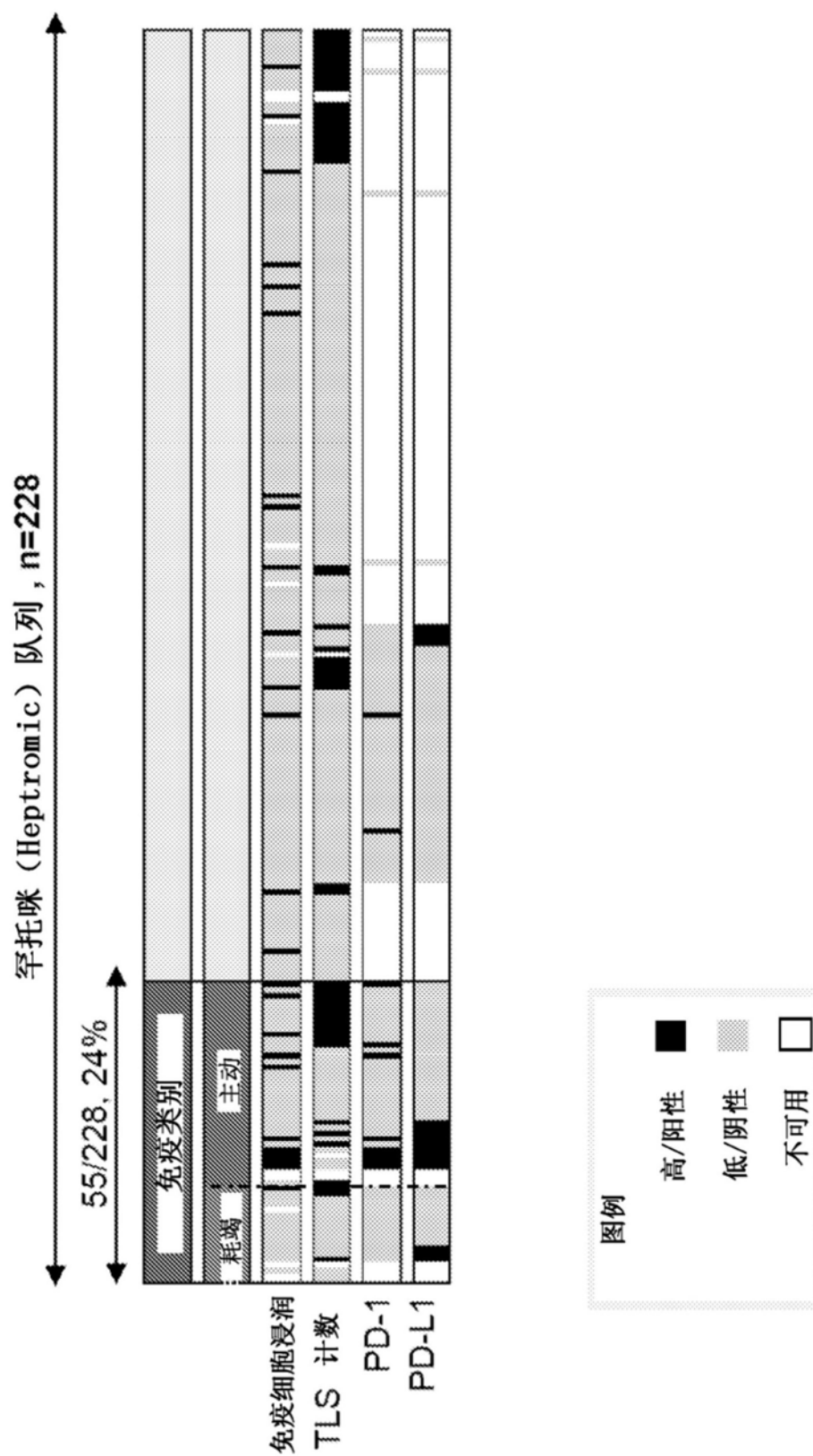


图 4B



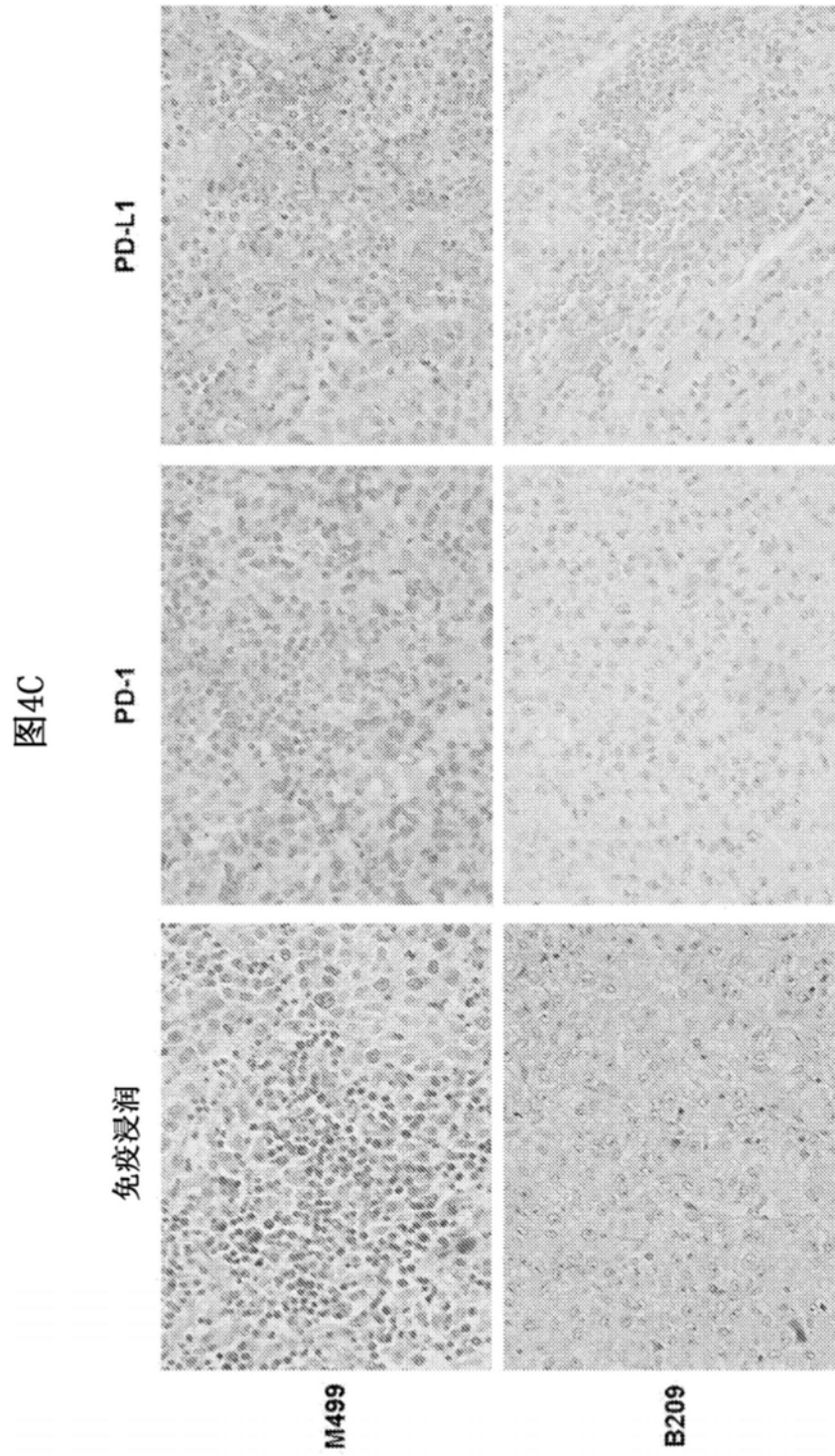


图4

图5A

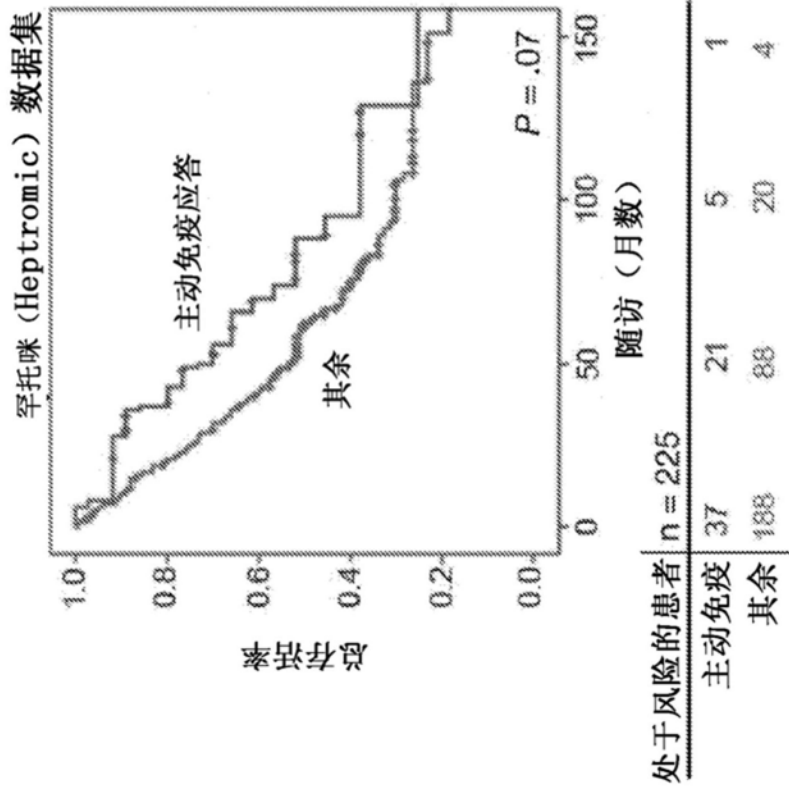


图5B

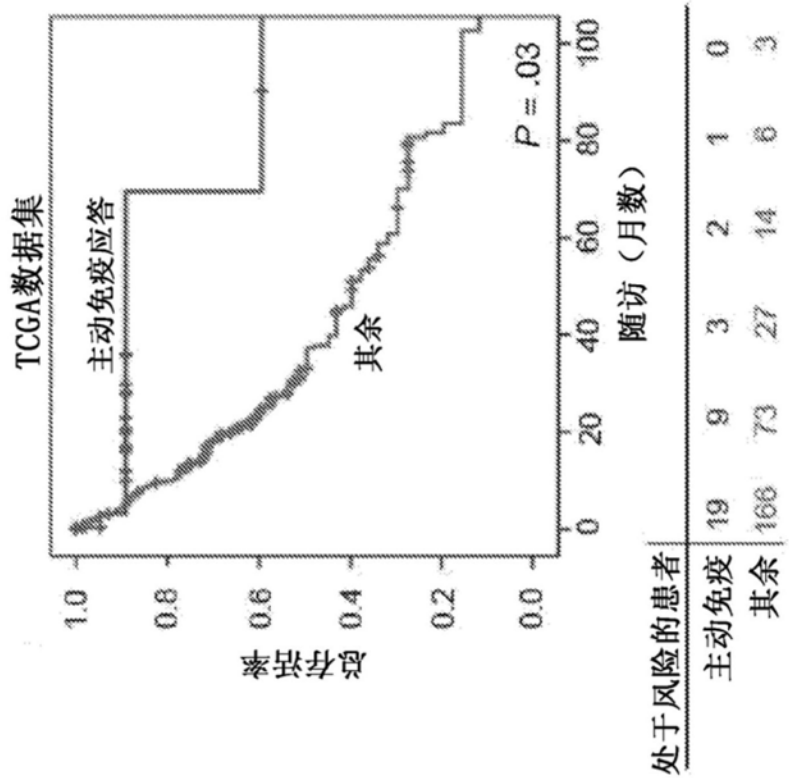


图5C

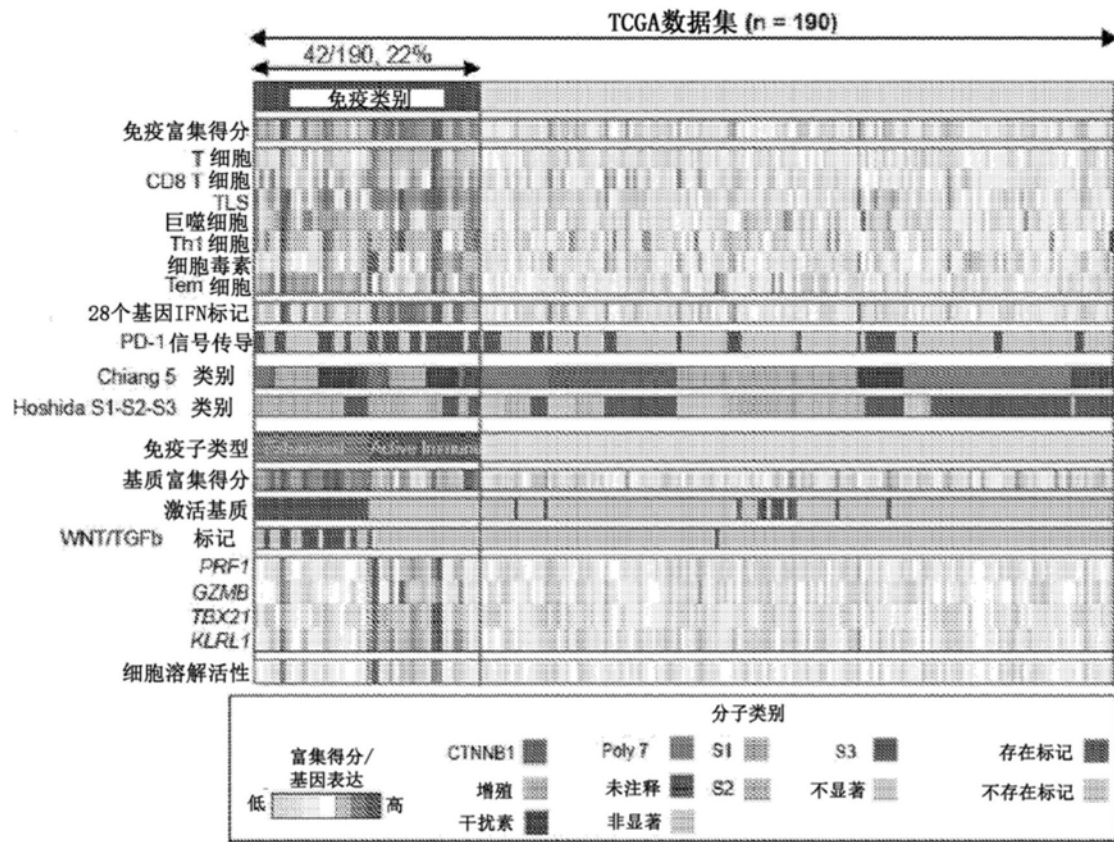


图5D

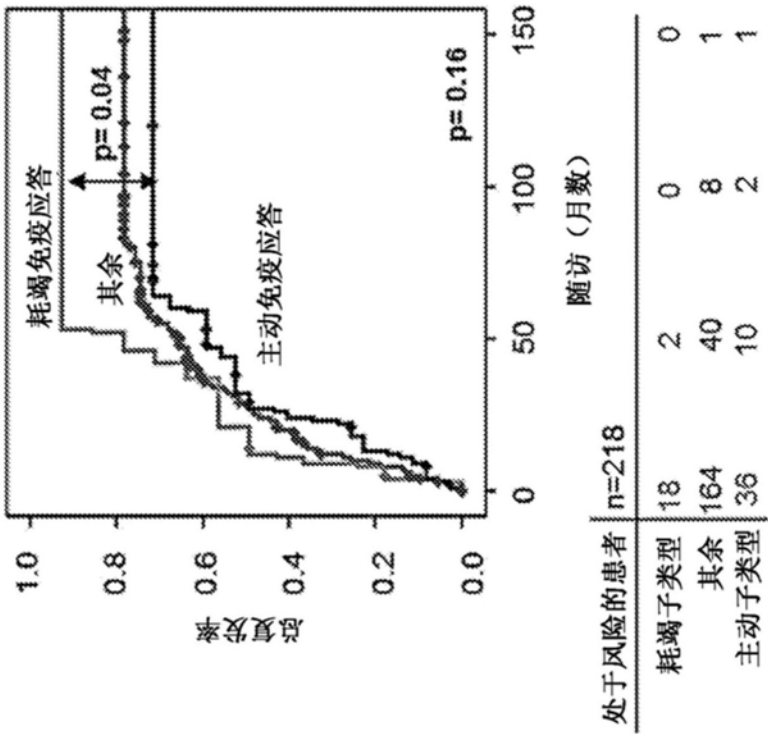


图5E

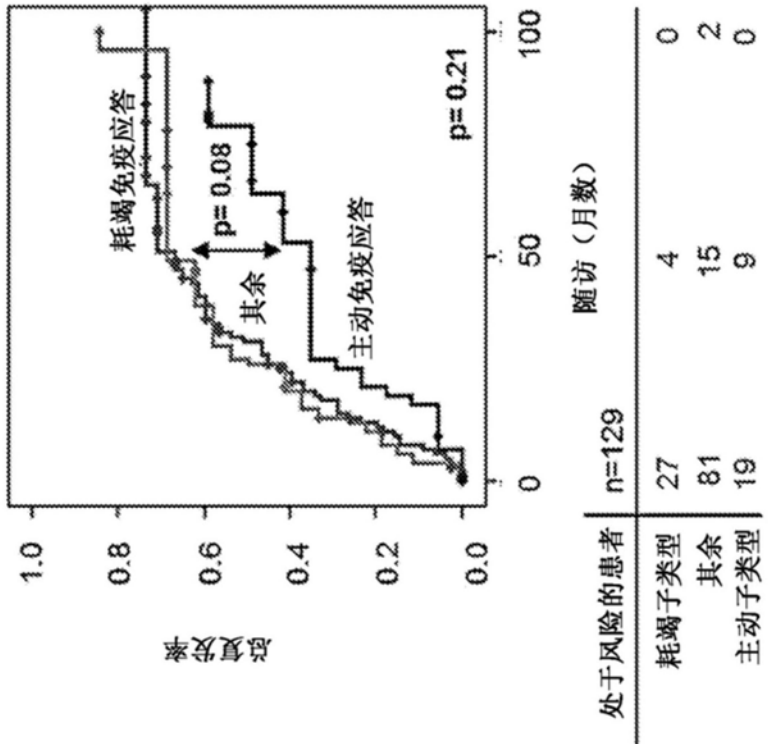


图5

图6A

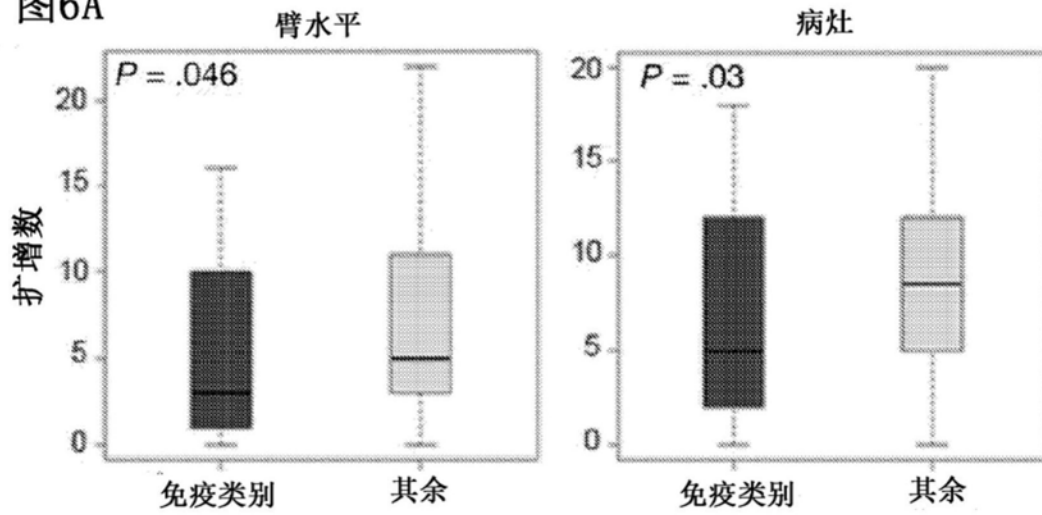


图6B

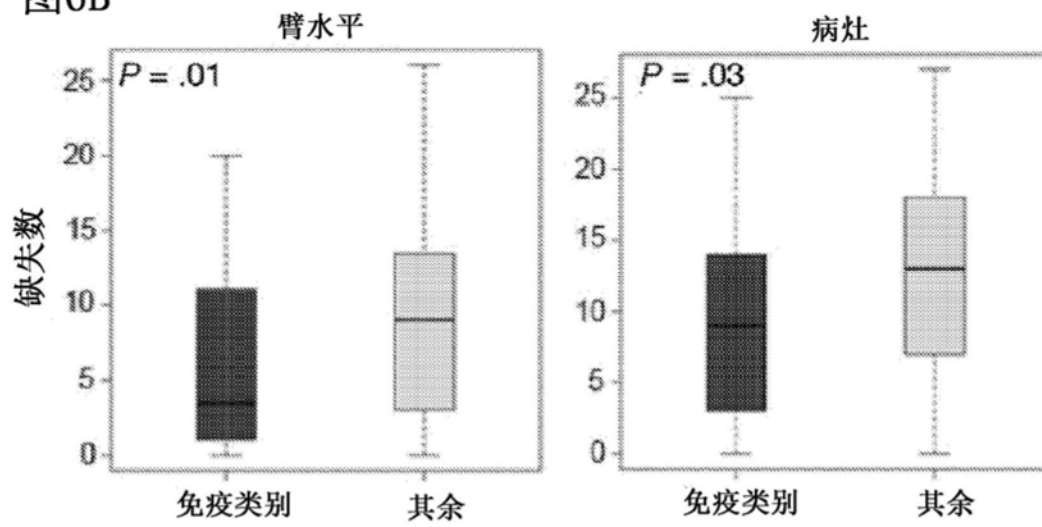


图6C

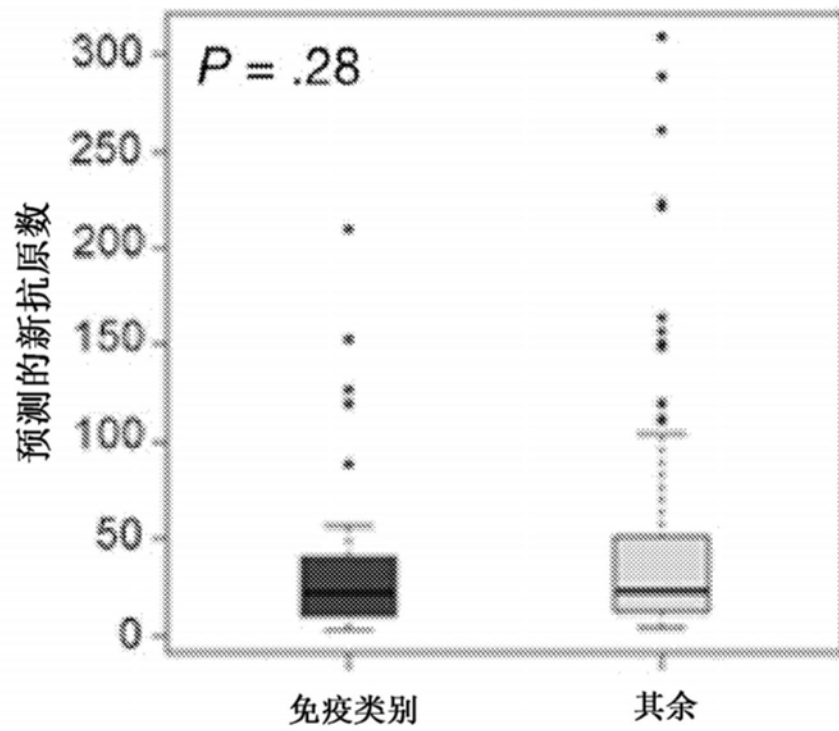


图6D

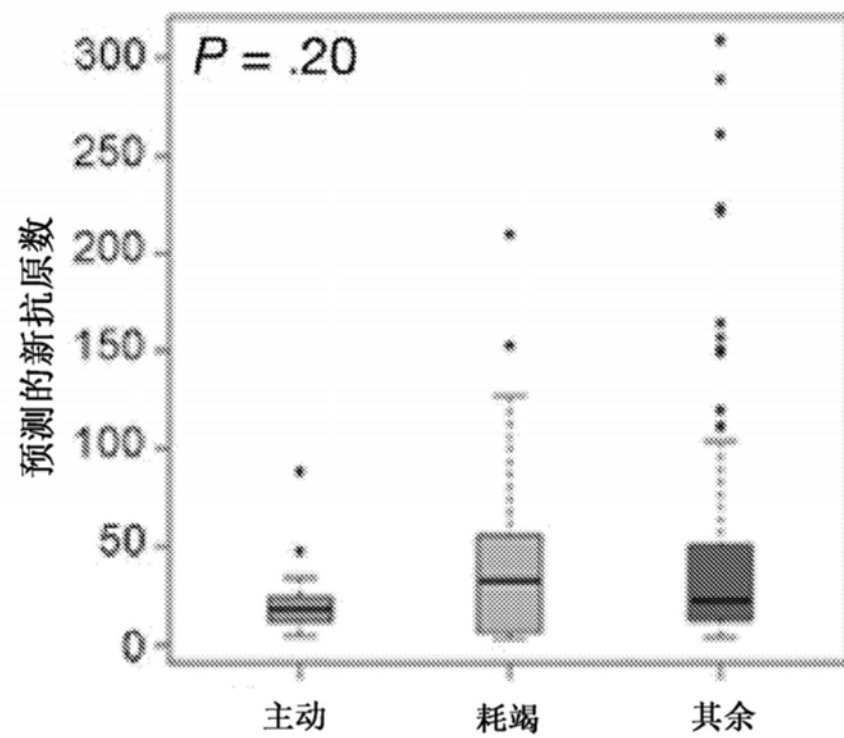


图6F

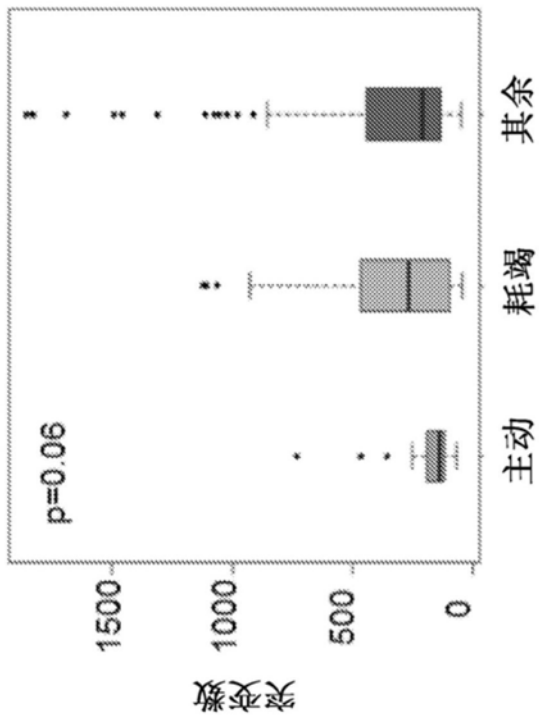


图6E

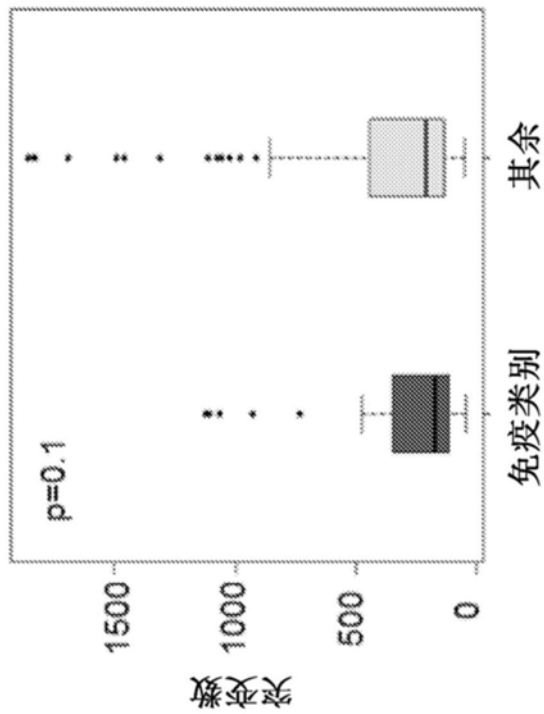
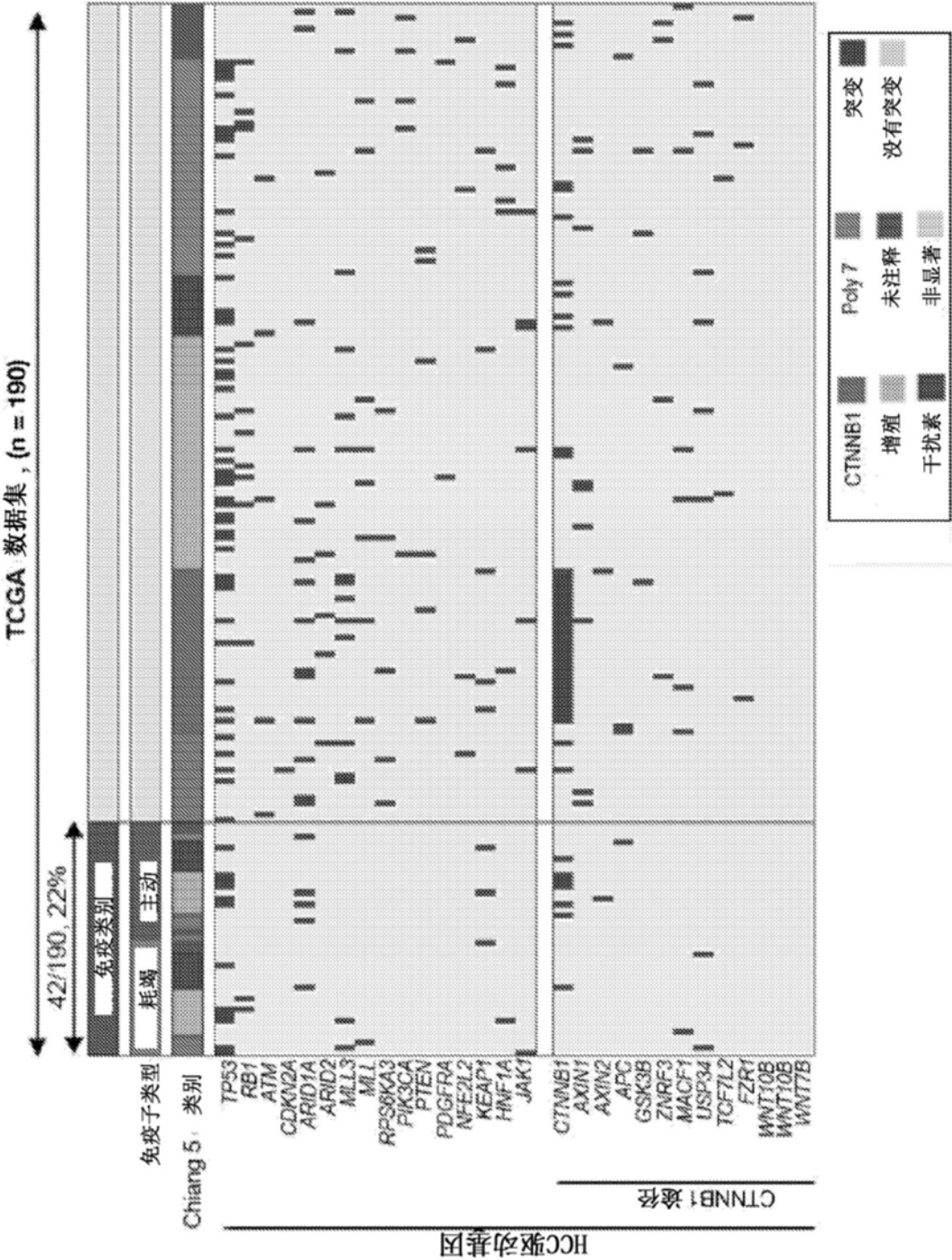


图6G



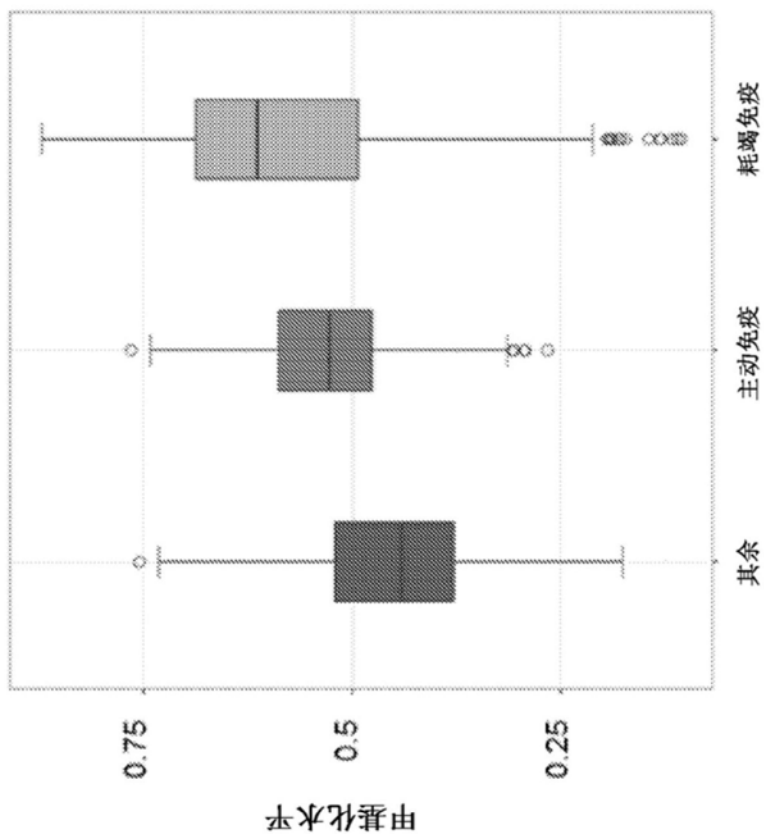


图6H

图6I

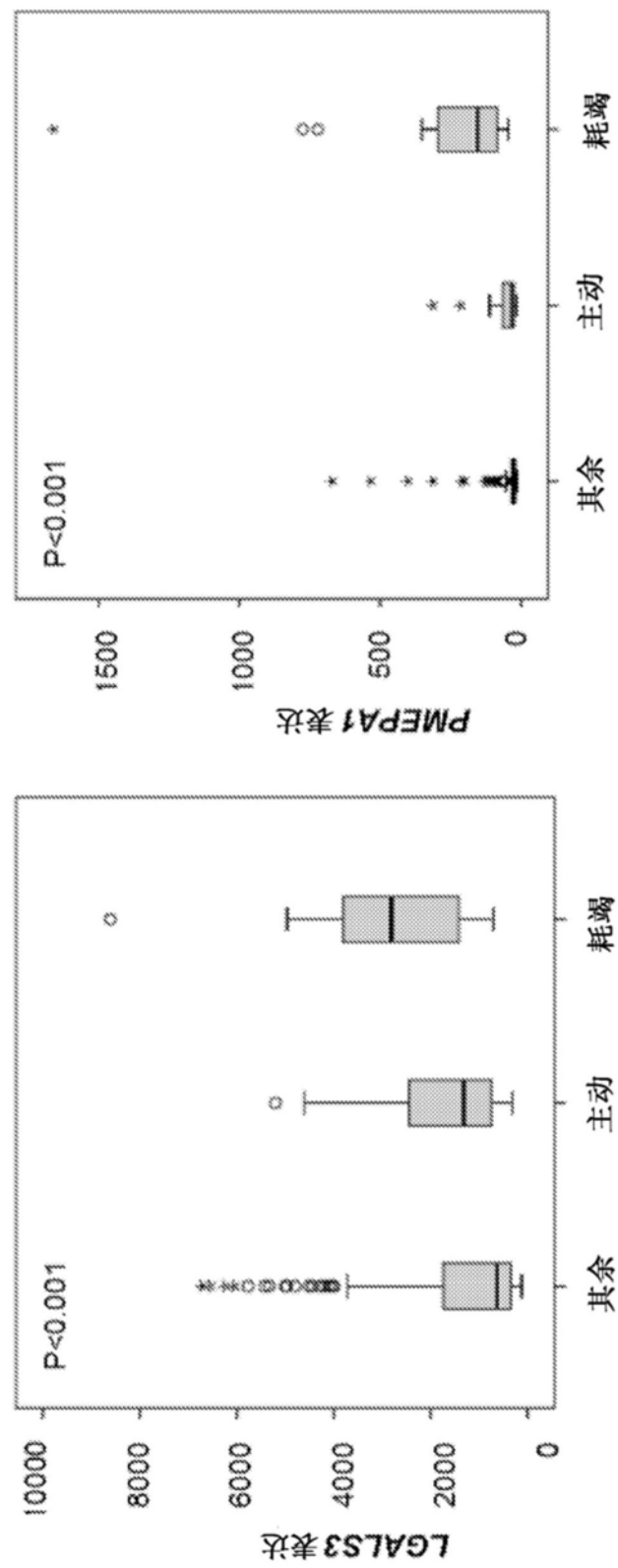


图6J

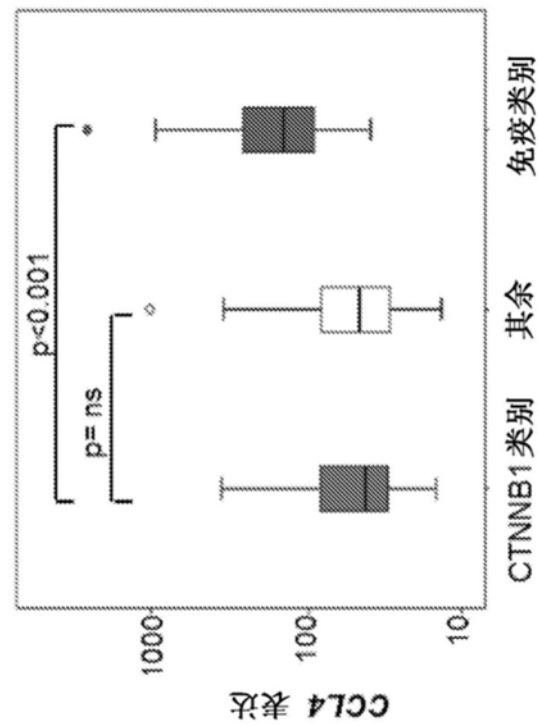
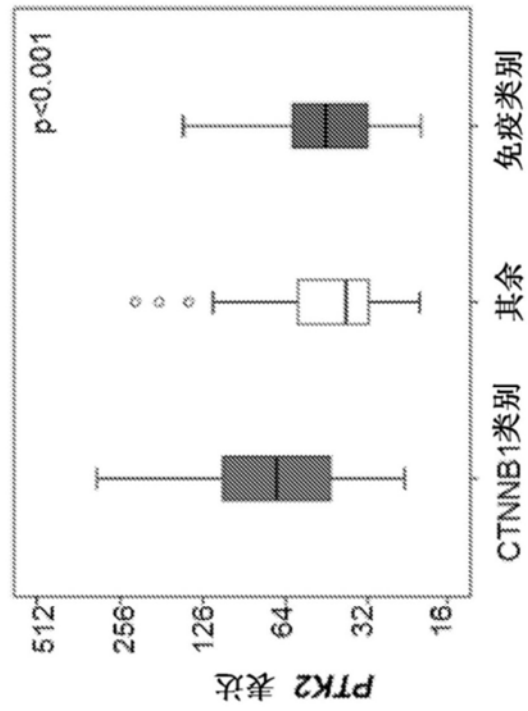


图6K



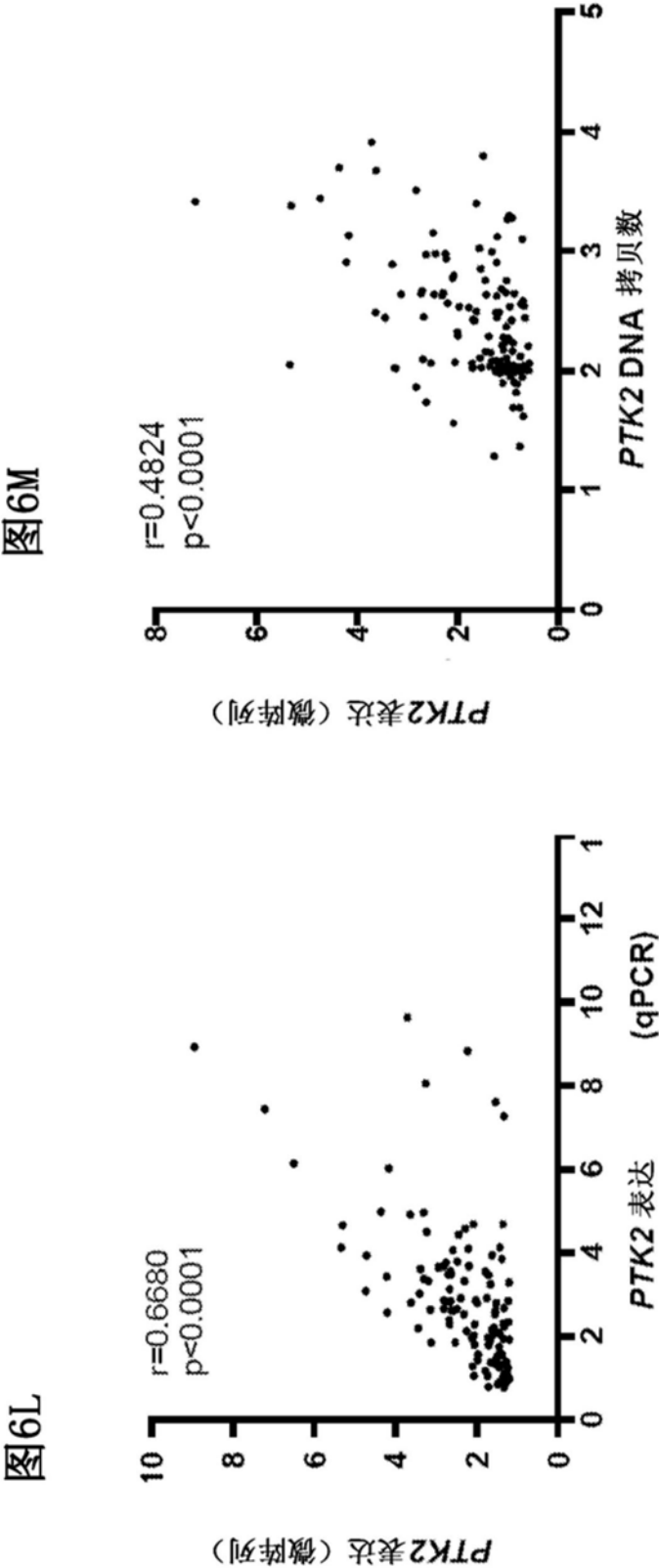


图6

图7A

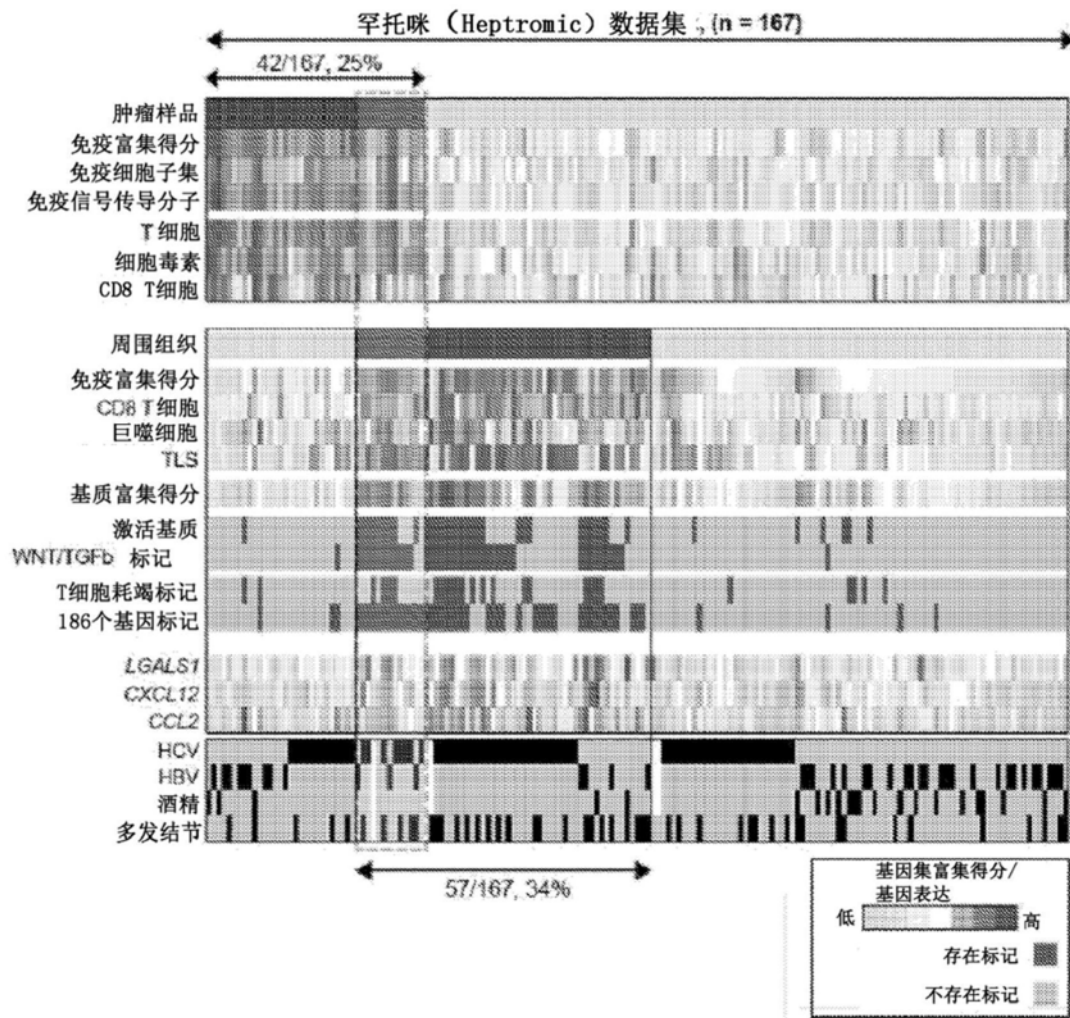


图7B

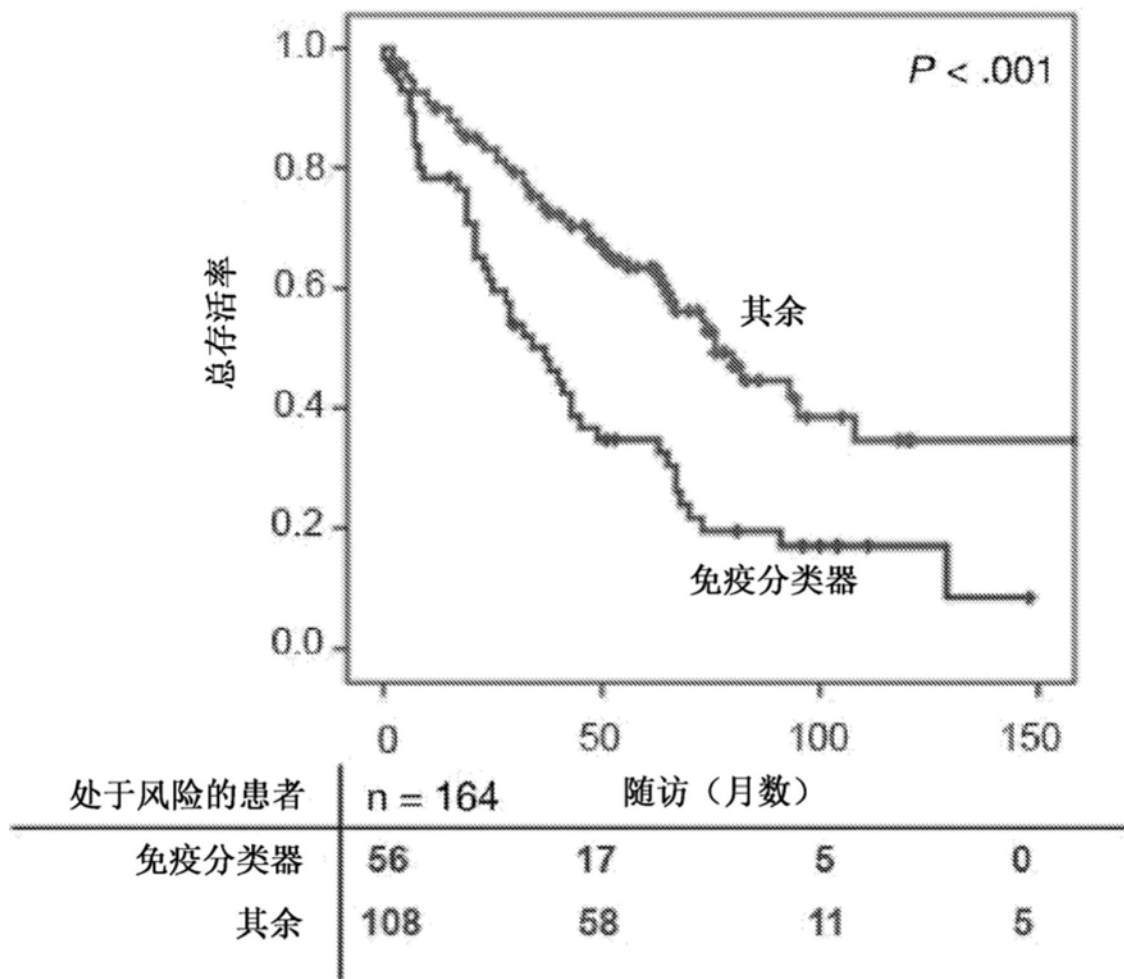


图7

图8B

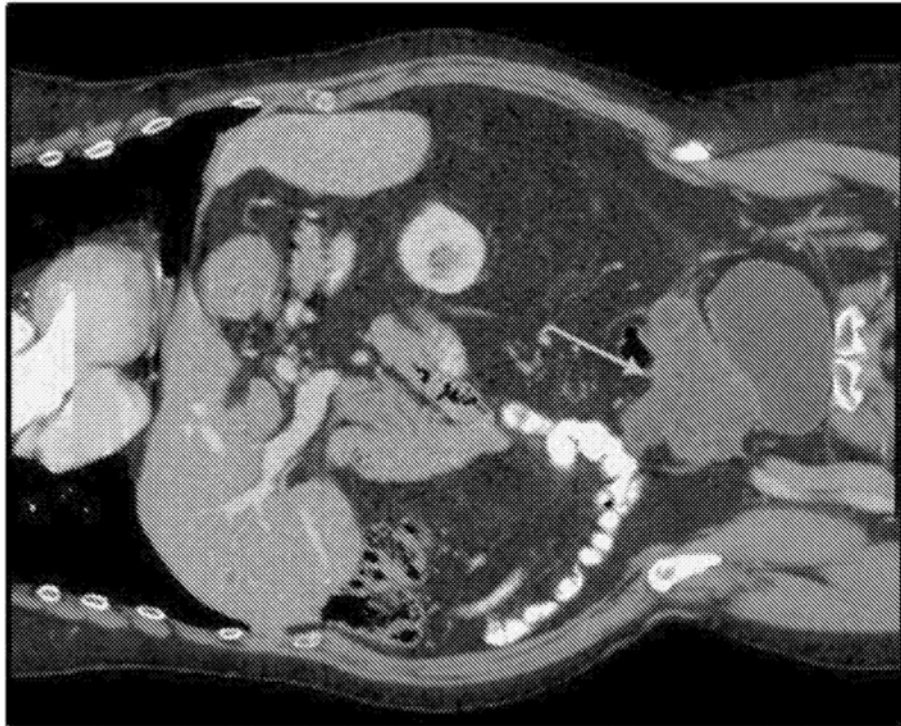
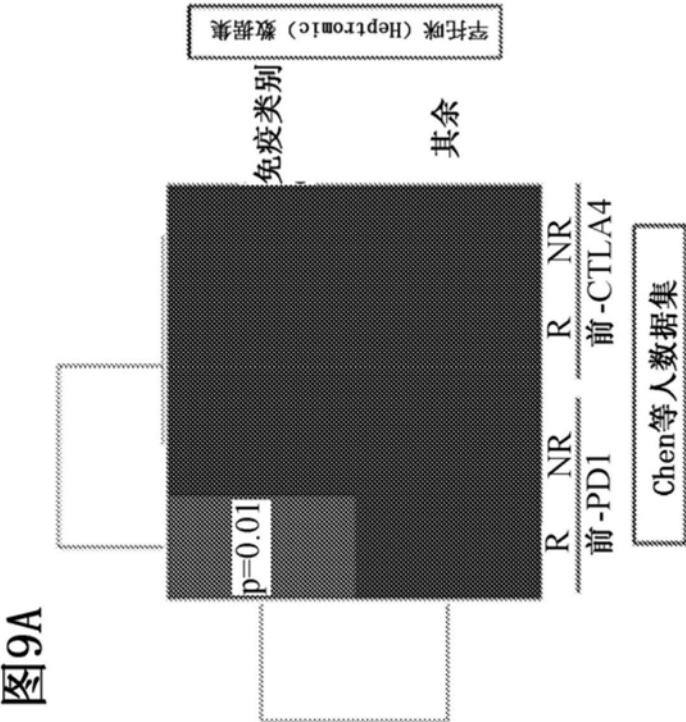
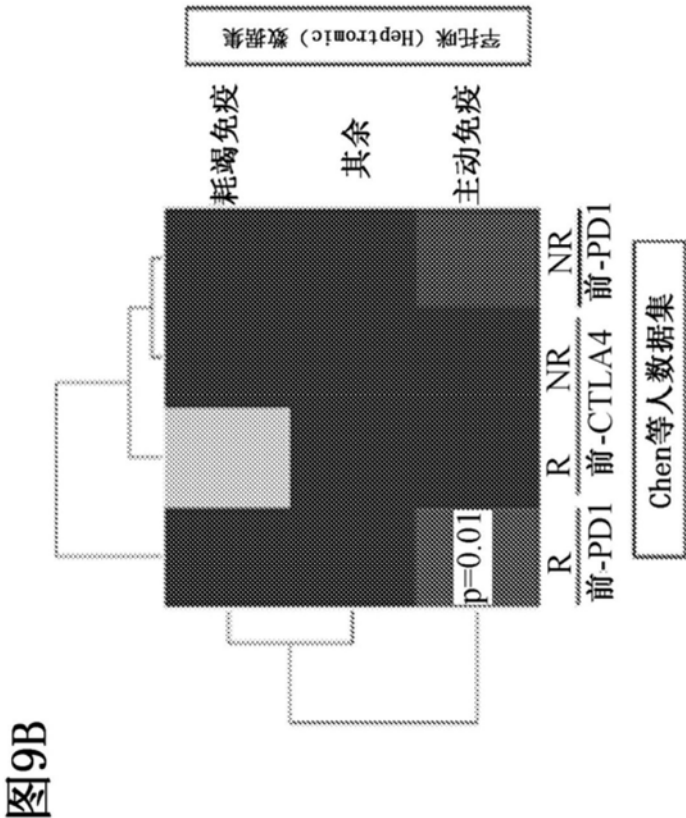


图8A



图8



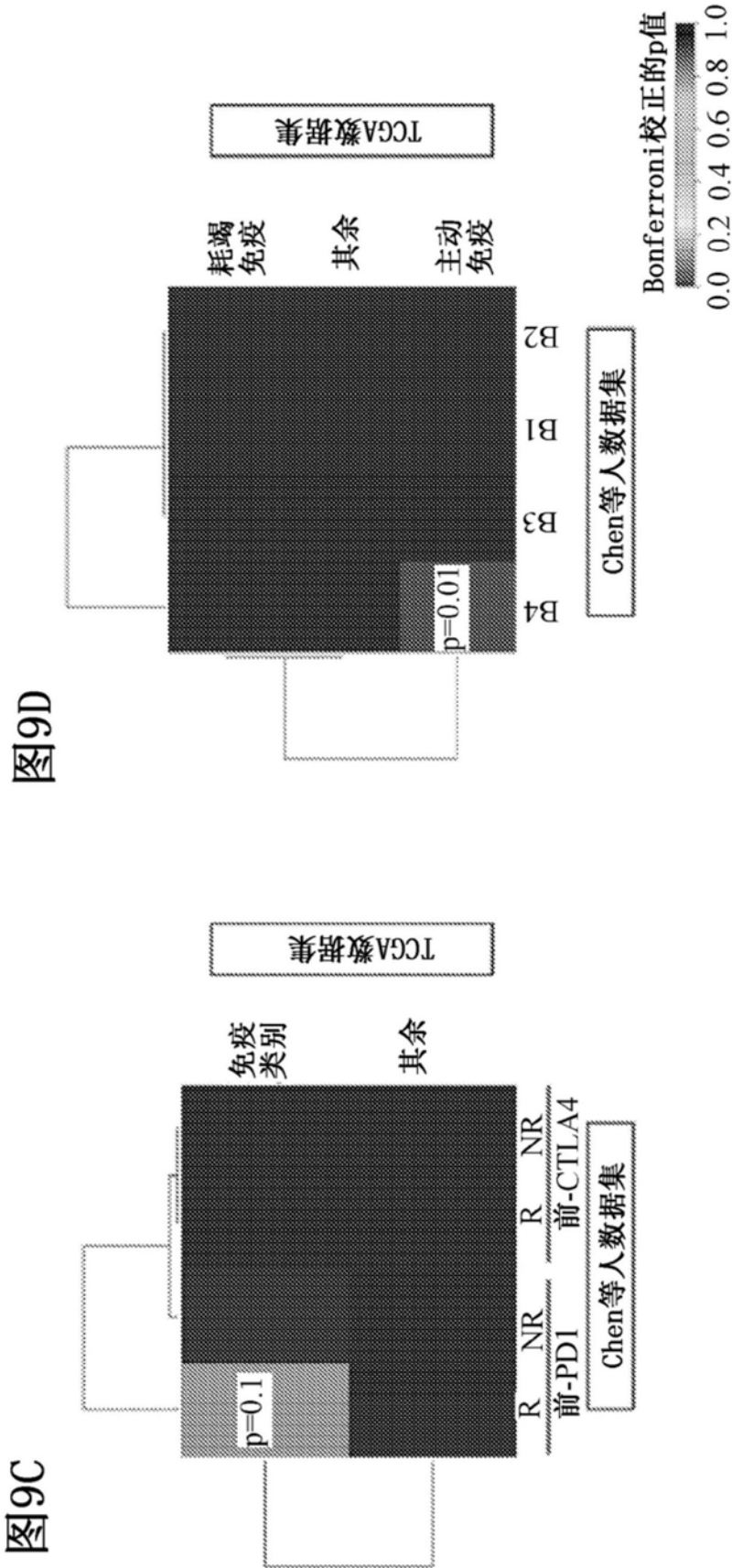


图9

基因名称	类别
PAGE4	其余
UGT2B17	其余
C1QTNF3	其余
DHRS2	其余
FAM133A	其余
ASCL1	其余
NTN3	免疫类别
IGKC	免疫类别
IGKV3D-11	免疫类别
IGLV1-44	免疫类别
IGJ	免疫类别
CCL19	免疫类别
IGHG3	免疫类别
IGHA1	免疫类别
IGHM	免疫类别
IGHG2	免疫类别
IGHG1	免疫类别
IGHA2	免疫类别
IGHM	免疫类别
PTGDS	免疫类别
POU2AF1	免疫类别
MMP7	免疫类别
MGC29506	免疫类别
CCL18	免疫类别
GBP5	免疫类别
CD52	免疫类别
TRBC1	免疫类别
GPR171	免疫类别
GEM	免疫类别
CCL21	免疫类别
TARP	免疫类别
CXCL9	免疫类别

CCL2	免疫类别
TRBC1	免疫类别
IGLJ3	免疫类别
CHIT1	免疫类别
MMP9	免疫类别
IGL@	免疫类别
HLA-DRB5	免疫类别
CXCR4	免疫类别
CD8A	免疫类别
GZMB	免疫类别
LUM	免疫类别
TRBC2	免疫类别
CFTR	免疫类别
GZMK	免疫类别
CD53	免疫类别
PTX3	免疫类别
DCN	免疫类别
CD48	免疫类别
PTPRC	免疫类别
TRAC	免疫类别
FYB	免疫类别
AIM2	免疫类别
DUSP2	免疫类别
CYTIP	免疫类别
CCL5	免疫类别
EFEMP1	免疫类别
LXN	免疫类别
MMP12	免疫类别
AEBP1	免疫类别
IL7R	免疫类别
CD38	免疫类别
POSTN	免疫类别
CXCL14	免疫类别
FAM150B	免疫类别

CCL4	免疫类别
STMN2	免疫类别
C11orf96	免疫类别
ID4	免疫类别
CR2	免疫类别
CXCL6	免疫类别
FNDC1	免疫类别
THBS2	免疫类别
LTB	免疫类别
CLIC6	免疫类别
ITGB2	免疫类别
GZMH	免疫类别
CCR7	免疫类别
LCP2	免疫类别
RGS1	免疫类别
CD2	免疫类别
SMOC2	免疫类别
LTBP2	免疫类别
GZMA	免疫类别
COL1A2	免疫类别
MGP	免疫类别
TAGLN	免疫类别
CD3D	免疫类别
RAC2	免疫类别
CD27	免疫类别
C16orf54	免疫类别
S100A4	免疫类别
CYR61	免疫类别
PTGIS	免疫类别
COL6A3	免疫类别
SLA	免疫类别
COL1A1	免疫类别
MTHFD2	免疫类别
SAMSN1	免疫类别

PMP22	免疫类别
SRGN	免疫类别
TIMP1	免疫类别
IGLV1-40	免疫类别
GABRP	免疫类别
CTGF	免疫类别
PMEPA1	免疫类别
C7	免疫类别
CORO1A	免疫类别
MS4A1	免疫类别
FAM26F	免疫类别
LAPTM5	免疫类别

图10

特征	倍数变化
LCP2	3.35
PTPRC	4.06
IGHG1 /// IGHV4-31	8.40
IGHG1 /// IGHG2 /// IGHG3 /// IGHM /// IGHV4-31	9.08
TRAC /// TRAJ17 /// TRAV20	4.04
CCL5	3.76
IGHG1 /// IGHG3 /// IGHM /// IGHV4-31	9.00
LAPTM5	3.03
GZMA	3.26
IGHG1 /// IGHM /// IGHV4-31	9.37
TRBC2	4.42
SLA	3.15
FYB	3.88
CD53	4.22
IGHG3 /// IGHM	10.04
CD3D	3.20
GZMK	4.30
CD48	4.11
CD2	3.29
CD52	5.37
TRBC1	5.27
S100A4	3.18
ITGB2	3.40
TRBC1 /// TRBC2	4.91
RAC2	3.19
CORO1A	3.05
IL7R	3.69
CYTIP	3.76
SRGN	3.09
SAMSN1	3.11

FAM26F	3.11
GPR171	3.04
CD27	5.20
MTHFD2	3.18
CXCR4	3.12
TIMP1	4.51
C16orf54	3.09
CD8A	3.18
LUM	4.50
DUSP2	4.47
POU2AF1	3.80
EFEMP1	6.54
CXCL9	3.74
PMP22	4.94
IGHM	3.10
LXN	7.12
TARP /// TRGC2	3.73
DCN	5.05
RGS1	4.14
THBS2	3.30
PTGIS	3.41
SMOC2	3.16
MMP9	3.29
GZMH	4.68
AEBP1	3.39
COL6A3	3.69
GEM	3.15
CTGF	5.18
CCL19	3.06
MGP	10.33
	3.23

IGKC /// NTN3	16.82
LTB	3.40
AIM2	3.86
PTGDS	6.69
IGJ	10.42
C11orf96	3.61
ID4	3.61
CYR61	3.17
TAGLN	3.22
LTBP2	3.28
C7	3.05
STMN2	3.61
COL1A2	3.26
CCL4 /// CCL4L1 /// CCL4L2	3.61
CCR7	3.39
MGC29506	6.28
FNDC1	3.48
COL1A1	3.14

MS4A1	3.04
IGL@	4.59
IGLV1-40	3.07
CCL21	5.17
CD38	3.68
CCL18	5.93
IGHA2 /// LOC100126583	7.81
IGKC /// LOC652694	15.85
GZMB	4.47
IGHA1 /// IGH A2 /// LOC100126583	9.83
CCL2	4.92
IGKV3D-11	12.06
CHIT1	4.70
PMEPA1	3.06
IGHA1 /// LOC100126583	8.98
GBP5	5.53
IGLV1-44	11.38
POSTN	3.66
HLA-DRB5	4.53
CXCL14	3.65
CFTR	4.39
FAM150B	3.63
CLIC6	3.40
CXCL6	3.56
CR2	3.59
GABRP	3.06
PTX3	4.22
MMP12	3.69
MMP7	6.41
IGLJ3 /// IGLV3-19	4.83

图11

名称
GU_PDEF_TARGETS_UP
MCBRYAN_PUBERTAL_BREAST_4_5WK_UP
PID_AVB3_INTEGRIN_PATHWAY
PID_SYNDICAN_1_PATHWAY
LIU_SMARCA4_TARGETS
WANG_SMARCE1_TARGETS_UP
LEE_NEURAL_CRESCENT_STEM_CELL_UP
CERVERA_S0HB_TARGETS_1_UP
REACTOME_COLLAGEN_FORMATION
URS_ADIPOCYTE_DIFFERENTIATION_DN
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_KRAS_DN
TURASHVILI_BREAST_LOBULAR_CARCINOMA_VS_DUCTAL_NORMAL_UP
BOQUEST_STEM_CELL_UP
ZHU_CMV_ALL_DN
WU_CELL_MIGRATION
CHARAFE_BREAST_CANCER_BASAL_VS_MESENCHYMAL_DN
NABA_CORE_MATRISOME
KANG_AR_TARGETS_DN
NAKAMURA_CANCER_MICROENVIRONMENT_UP
ZHU_CMV_24_HR_DN
PID_INTEGRIN_PATHWAY
SERVTJIA_ISLET_HNF1A_TARGETS_UP
WESTON_VEGFA_TARGETS_6HR
PASINI_SUZ12_TARGETS_DN
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION
REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION
PICCALUGA_ANGIOIMMUNOBLASTIC_LYMPHOMA_UP
NEWMAN_ERCC6_TARGETS_DN
WILCOX_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_DN
LI_WILMS_TUMOR_VS_FETAL_KIDNEY_2_DN
ROZANOV_MMPI4_TARGETS_SUBSET
BURTON_ADIPOGENESIS_7
REN_ALVEOLAR_RHABDOMYOSARCOMA_DN
TURASHVILI_BREAST_LOBULAR_CARCINOMA_VS_LOBULAR_NORMAL_DN
VECCHI_GASTRIC_CANCER_ADVANCED_VS_EARLY_UP
NABA_ECM_GLYCOPROTEINS
VANTYER_BREAST_CANCER_BRCA1_DN
VERRECCHIA_EARLY_RESPONSE_TO_TGFBI
LIU_PROSTATE_CANCER_DN
BRUECKNER_TARGETS_OF_MIRLET7A3_DN
CHANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_CTNNB1_DN
BERTUCCI_MEDULLARY_VS_DUCTAL_BREAST_CANCER_DN
KAAB_HEART_atrium_VS_VENTRICLE_UP
ISSAeva_ML2_TARGETS
PID_INTEGRIN3_PATHWAY
GOTZMANN_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP

VANHARANTA_UTERINE_FIBROID_UP
LIM_MAMMARY_LUMINAL_MATURE_DN
LINDVALL_IMMORTALIZED_BY_TERT_DN
RODWELL_AGING_KIDNEY_NO_BLOOD_UP
MANALO_HYPOXIA_UP
NABA_COLLAGENS
IZADPANAH_STEM_CELL_ADIPOSE_VS_BONE_DN
WESTON_VEGFA_TARGETS
ZWANG_CLASS_2_TRANSIENTLY_INDUCED_BY_EGF
REACTOME_NCAM1_INTERACTIONS
SANA_TNF_SIGNALING_DN
BASSO_HAIRY_CELL_LEUKEMIA_DN
PETROVA_ENDOTHELIAL_LYMPHATIC_VS_BLOOD_DN
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_KRAS_CDC25_DN
WATANABE_ULCERATIVE_COLITIS_WITH_CANCER_UP
KAYO_CALORIE_RESTRICTION_MUSCLE_UP
ONDER_CDH1_TARGETS_2_UP
GERHOLD_ADIPOGENESIS_DN
JECHLINGER_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP
DELYS_THYROID_CANCER_UP
ZHANG_TLX_TARGETS_8HR_UP
KINSEY_TARGETS_OF_EWSR1_FLI1_FUSION_DN
SWEET_KRAS_TARGETS_UP
NABA_PROTEOLYCATS
HALMOS_CEGPA_TARGETS_DN
DAVICIONI_MOLECULAR_ARMS_VS_ERMS_DN
MIYAGAWA_TARGETS_OF_EWSR1_ETS_FUSIONS_DN
CHIBA_RESPONSE_TO_TSA_UP
SUNG_METASTASIS_STROMA_UP
BURTON_ADIPOGENESIS_8
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_CDC25_DN
SASAI_RESISTANCE_TO_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION
SCHUETZ_BREAST_CANCER_DUCTAL_INVASIVE_UP
TONKS_TARGETS_OF_RUNX1_RUNX1T1_FUSION_SUSTAINED_IN_ERYTHROCYTE_UP
LEE_LIVER_CANCER_E2F1_UP
LEE_LIVER_CANCER_DENA_UP
WESTON_VEGFA_TARGETS_12HR
CROMER_TUMORIGENESIS_UP
KEEN_RESPONSE_TO_ROSIGLITAZONE_DN
VART_KSHV_INFECTION_ANGIOGENIC_MARKERS_DN
REACTOME_INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS
DAVICIONI_TARGETS_OF_PAX_FOXO1_FUSIONS_UP
WOO_LIVER_CANCER_RECURRENCE_UP
IGLESJAS_E2F_TARGETS_UP
LINDGREN_BLADDER_CANCER_HIGH_RECURRENCE
HELLEBREKERS_SILENCED_DURING_TUMOR_ANGIOGENESIS
VALK_AML_CLUSTER_10
REACTOME_NCAM_SIGNALING_FOR_NEURITE_OUT_GROWTH

LEE LIVER CANCER ACOX1 UP
KEGG_FOCAL_ADHESION
CLASPER LYMPHATIC VESSELS DURING METASTASIS_DN
VERRECCHIA RESPONSE TO TGFBI C1
YAMAZAKI_TCEB3 TARGETS UP
CUI_TCF21 TARGETS UP
SENESE_HDAC1 TARGETS DN
SCHRAETS_MLL TARGETS DN
MOROSETTI_FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY UP
DACOSTA_ERCC3 ALLELE XPCS VS TTD_DN
J1 CARCINOGENESIS BY KRAS AND STK11_DN
TSENG_ADIPOGENIC POTENTIAL UP
VERRECCHIA_RESPONSE TO TGFBI C2
LANDIS_BREAST CANCER PROGRESSION DN
REACTOME DEGRADATION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX
DELPUCH_FOXO3 TARGETS UP
WONG_ENDOMETRIUM CANCER DN
PANGAS_TUMOR SUPPRESSION BY SMAD1 AND SMAD5 UP
CHARAFI_BREAST CANCER LUMINAL VS MESENCHYMAL DN
TORCHIA_TARGETS OF EWSR1_FU1 FUSION TOP20 UP
REACTOME AXON GUIDANCE
WIEDERSCHAIN_TARGETS OF BMI1 AND PCGF2
ZHAN_MULTIPLE MYELOMA_MS UP
SIMBLAN_PARP1 TARGETS UP
CAIRO_LIVER DEVELOPMENT UP
GAIATE_RESPONSE TO TRABECTEDIN UP
LABBE_TGFBI TARGETS UP
HENDRICKS_SMARCA4 TARGETS UP
HOELZEL_NF1 TARGETS DN
MCBRYAN_PUBERTAL TGFBI TARGETS UP
LIM_MAMMARY STEM CELL UP
LIEN_BREAST CARCINOMA METAPLASTIC
ANASTASSIOU CANCER MESENCHYMAL_TRANSITION SIGNATURE
BIOCARTA_UCALPAIN PATHWAY
XU_HGF TARGETS INDUCED BY AKT1 48HR UP
ONDER_CDHI SIGNALING VIA CTNNE1
NAKAMURA_ADIPOGENESIS EARLY DN
LABBE_TARGETS OF TGFBI AND WNT3A UP
HUMMERICH SKIN CANCER PROGRESSION UP
NABA_BASEMENT MEMBRANES
TURASHVILI_BREAST DUCTAL CARCINOMA_VS DUCTAL_NORMAL_DN
VALK_AML_CLUSTER 9
TIMOFEEVA_GROWTH STRESS VIA STAT1_DN
PID_INTEGRIN_A4B1 PATHWAY
FONTAINE PAPILLARY THYROID CARCINOMA UP
YAO_TEMPORAL RESPONSE TO PROGESTERONE_CLUSTER 16
TOKIS_TARGETS OF RUNX1_RUNX1T1_FUSION_HSC UP
CHANDRAN_METASTASIS DN

LY AGING_MIDDLE UP
BORLAK LIVER CANCER EGF UP
TOKIS TARGETS OF RUNX1_RUNX1T1 FUSION ERYTHROCYTE UP
BERENJENO_TRANSFORMED BY RHOA_DN
KANG_AR TARGETS UP
VERRECCHIA_DELAYED RESPONSE TO TGFBI
ROY_WOUND BLOOD VESSEL UP
CRONQUIST_STROMAL STIMULATION UP
DELAUROX_PARG BOUND MEFF
SWEET_LUNG CANCER KRAS DN
TRAYNOR_REIT SYNDROM DN
MISHRA_CARCINOMA ASSOCIATED FIBROBLAST UP
TERAMOTO_OPN TARGETS_CLUSTER 4
MISHRA_CARCINOMA ASSOCIATED FIBROBLAST_DN
SENESE_HDAC1 AND HDAC2 TARGETS_DN
APRELIKOVA_BRCA1 TARGETS
CHIARADONNA_NEOPLASTIC TRANSFORMATION CDC25 UP
RUIZ_TNC TARGETS UP
MEINHOLD_OVARIAN CANCER LOW GRADE UP
WAMUNYOKOLI_OVARIAN CANCER GRADES 1 2 DN
STEGER_ADIPOGENESIS DN
GENTILE_UV LOW DOSE_DN
VALK_AML_CLUSTER 2
INGRAM_SHH TARGETS DN
DUTERTRE ESTRADIOL RESPONSE_24HR_DN
FRIDMAN_SENESCENCE UP
REACTOME DEVELOPMENTAL BIOLOGY
BAELDE_DIABETIC NEPHROPATHY UP
ZHENG_GLOBLASTOMA PLASTICITY DN
XU_GHT AUTOCRINE TARGETS DN
RIGGI LEWING_SARCOMA PROGENITOR DN
REACTOME CHONDROITIN SULFATE_DERMATAN SULFATE METABOLISM
KIM_WT1 TARGETS 12HR UP
YAMASHITA_LIVER CANCER STEM_CELL UP
VALK_AML_WITH EVI1
BURTON_ADIPOGENESIS 9
HARRIS BRAIN CANCER PROGENITORS
KHETCHOUMIAN_TRIM24 TARGETS UP
PEDERSEN METASTASIS BY BRB2 ISOFORM 1
PID_INTEGRIN_A9B1 PATHWAY
WANG BARRETT'S ESOPHAGUS UP
PEDERSEN TARGETS OF 611CTF ISOFORM OF ERBB2
MARCHINI TRABECTEDIN_RESISTANCE DN
DAZARD_UV RESPONSE_CLUSTER G4
BROWNE_HCMV INFECTION 24HR_DN
CHANG_POU5F1 TARGETS UP
HOSHIDA LIVER CANCER SURVIVAL UP
BROWNE_HCMV INFECTION 18HR DN

BOQUEST STEM CELL CULTURED VS FRESH UP	REACTOME SIGNALING BY PDGF
VERNEILL RETINOBLASTOMA PATHWAY DN	DELASERNA MYOD TARGETS DN
JI METASTASIS REPPRESSED BY STK11	JECHLINGER EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION DN
SCHAEFFER PROSTATE DEVELOPMENT 48HR DN	BURTON ADIPOGENESIS PEAK AT 0HR
QI PLASMACYTOMA DN	REACTOME SIGNAL TRANSDUCTION BY LI
POMEROY MEDULLOBLASTOMA DESMOPLASC VS CLASSIC DN	NAKAMURA ADIPOGENESIS LATE DN
KYNG ENVIRONMENTAL STRESS RESPONSE UP	KORKOLA TERATOMA UP
WEINMANN ADAPTATION TO HYPOXIA DN	LEE LIVER CANCER MYC E2F1 UP
CHEBOTAEV GR TARGETS DN	FRIDMAN IMMORTALIZATION DN
PEIRETTO CARDIAC HYPERTROPHY	DANG REGULATED BY MYC DN
TANG SENESECE TP53 TARGETS UP	BOYVAULT LIVER CANCER SUBCLASS G55 DN
KIM GLIS2 TARGETS UP	DURAND STROMA S UP
BROWNE HCMV INFECTION 16HR DN	NIELSEN GIST VS SYNOVIAL SARCOMA UP
PID TRKR PATHWAY	CERVERA SDHB TARGETS 2
HUANG FOXA2 TARGETS DN	KOYAMA SEMA3B TARGETS UP
SIMBLAN UV RESPONSE NORMAL DN	TURASHVILI BREAST DUCTAL CARCINOMA VS LOBULAR NORMAL DN
JOHNSTONE PARVB TARGETS 3 UP	GUENTHER GROWTH SPHERICAL VS ADHERENT DN
VERRECCHIA RESPONSE TO TGFBI C3	LIU IL13 PRIMING MODEL
BURTON ADIPOGENESIS 1	COLIN PILOCYTIC ASTROCYTOMA VS GLIOBLASTOMA DN
GERHOLD RESPONSE TO TTD DN	BERENJENO ROCK SIGNALING NOT VIA RHOA DN
DASU IL6 SIGNALING SCAR DN	GAUSSMANN MLL A4 FUSION TARGETS F UP
REACTOME CHONDROITIN SULFATE BIOSYNTHESIS	VART KSHV INFECTION ANGIOGENIC MARKERS UP
VERRECCHIA RESPONSE TO TGFBI C6	HUMMERICH SKIN CANCER PROGRESSION DN
PID ABB1 ABB4 INTEGRIN PATHWAY	BERENJENO TRANSFORMED BY RHOA REVERSIBLY DN
WAMUNYOKOLI OVARIAN CANCER LMP DN	KEGG TGF BETA SIGNALING PATHWAY
VERHAAR GLIOBLASTOMA MESENCHYMAL	GAUSSMANN MLL A4 FUSION TARGETS E UP
KANIAN TP53 TARGETS UP	FARMER BREAST CANCER CLUSTER 4
HUANG DASATINIB RESISTANCE UP	BEGUM TARGETS OF PAX3 FOXO1 FUSION DN
TONKS TARGETS OF RUNX1 RUNX1T1 FUSION SUSTAINED IN GRANULOCYTE UP	ROZANCY MMPI4 TARGETS UP
HAEGERSTRAND RESPONSE TO IMATINIB	MCBRYAN PUBERTAL BREAST 3 4WK UP
NADLER OBESITY UP	DORN ADENOMYRUS INFECTION 24HR UP
OXFORD RALB TARGETS UP	TSUNODA CISPLATIN RESISTANCE UP
GILDEA METASTASIS	NING CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE UP
LI WILMS TUMOR VS FETAL KIDNEY 1 UP	HAN JNK SIGNALING DN
REACTOME OTHER SEMAPHORIN INTERACTIONS	SCHLINGEMANN SKIN CARCINOGENESIS TPA DN
BURTON ADIPOGENESIS PEAK AT 2HR	PID UPA UPAR PATHWAY
NAKAJIMA MAST CELL	PID ALK1 PATHWAY
DAVICIONI RHABDOMYOSARCOMA PAX FOXO1 FUSION DN	PAPASPYRIDONOS UNSTABLE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE DN
INGRAM SHH TARGETS UP	SESTO RESPONSE TO UV C8
SCHRAETS MLL TARGETS UP	SENESE HDAC2 TARGETS DN
BIOCARTA PTGINS PATHWAY	PID WNT SIGNALING PATHWAY
JOHANSSON BRAIN CANCER EARLY VS LATE DN	REACTOME A TETRASACCHARIDE LINKER SEQUENCE IS REQUIRED FOR GAG SYN
TOMLINS METASTASIS DN	FOURNIER ACINAR DEVELOPMENT LATE UP
ZHONG SECRETOME OF LUNG CANCER AND FIBROBLAST	BIOCARTA NDKOYNAMIN PATHWAY
LEE AGING MUSCLE UP	ASTON MAJOR DEPRESSIVE DISORDER UP
	WANG LSD1 TARGETS UP
	ABBUD LIF SIGNALING 2 UP
HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	CLASPER LYMPHATIC VESSELS DURING METASTASIS UP
HALLMARK ANGIOGENESIS	

HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING
HALLMARK_MYOGENESIS
HALLMARK_APICAL_JUNCTION
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN
HALLMARK_HYPOXIA
HALLMARK_NOTCH_SIGNALING
EXTRACELLULAR_MATRIX
PROTEINACEOUS_EXTRACELLULAR_MATRIX
SKELETAL_DEVELOPMENT
EXTRACELLULAR_MATRIX_PART
EXTRACELLULAR_MATRIX_STRUCTURAL_CONSTITUENT
ESC_V6.5_UP_EARLY.V1_DN
ESC_J1_UP_LATE.V1_UP
CRX_DN.V1_DN
ATF2_S_UP.V1_DN
CAHOY_ASTROGLIAL
MEK_UP.V1_UP
ESC_V6.5_UP_LATE.V1_UP
P53_DN.V1_UP
ATF2_UP.V1_DN
HINATA_NFKB_MATRIX
ERB2_UP.V1_UP
CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE
E2F1_UP.V1_DN
BMI1_DN.V1_UP
TGFB_UP.V1_UP

图12

病灶高水平 扩增 (HLA)		免疫类别 (样品数)						统计数据			
		耗竭 HLA	无 HLA	主动 HLA	无 HLA	总计 HLA	无 HLA	耗竭相对于主动, p_值	耗竭相对于其余, p_值	主动相对于其余, p_值	免疫相对于其余, p_值
区域	基因										
	5p15.33	1	20	0	21	1	41	1.000	1.000	0.60	0.69
	6p21.1	0	21	2	19	2	40	0.488	0.365	0.69	0.74
	7q31.2	0	21	0	21	0	42	1.000	1.000	1.00	0.59
	8q24.21	0	21	2	19	2	40	0.488	0.365	0.69	0.74
11q13.3		2	19	6	15	8	34	0.238	0.260	0.00	0.00
CCND1											
TERT											
VEGFA											
MET											
MYC											
CCND1											

纯合缺失 (HD)		耗竭 HD	无 HD	主动 HD	无 HD	总计 HD	无 HD	耗竭相对于主动, p_值	耗竭相对于其余, p_值	主动相对于其余, p_值	免疫相对于其余, p_值
区域	基因										
	4q35.1	0	21	0	21	0	42	1.00	0.60	0.60	0.20
	9p21.3	0	21	0	21	0	42	1.00	0.61	0.61	0.12
	9q31.3	0	21	1	20	1	41	1.00	1.00	0.49	1.00
10q23.31		0	21	1	20	1	41	1.00	0.60	1.00	0.69
PTEN											

图13

图 14A



图 14B

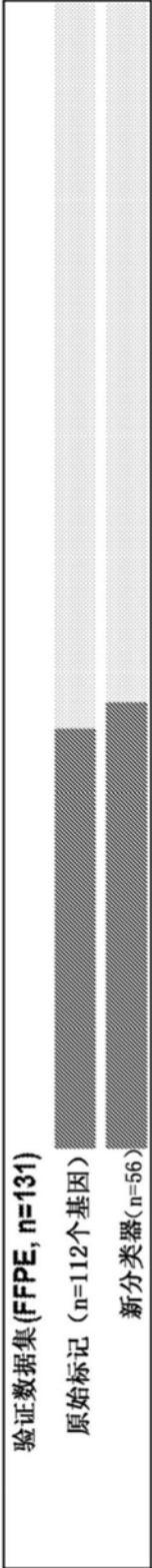


图 14C

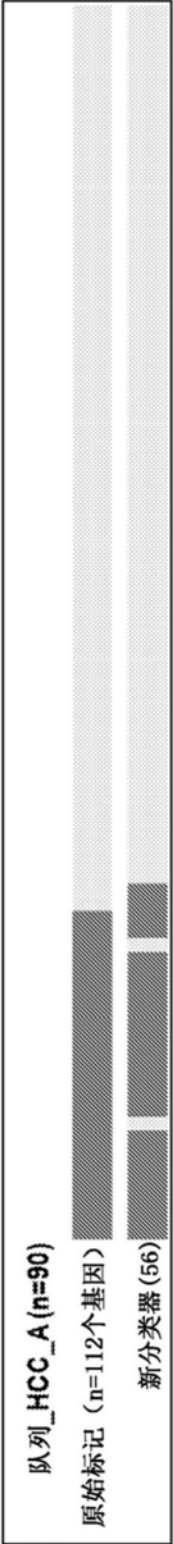


图14

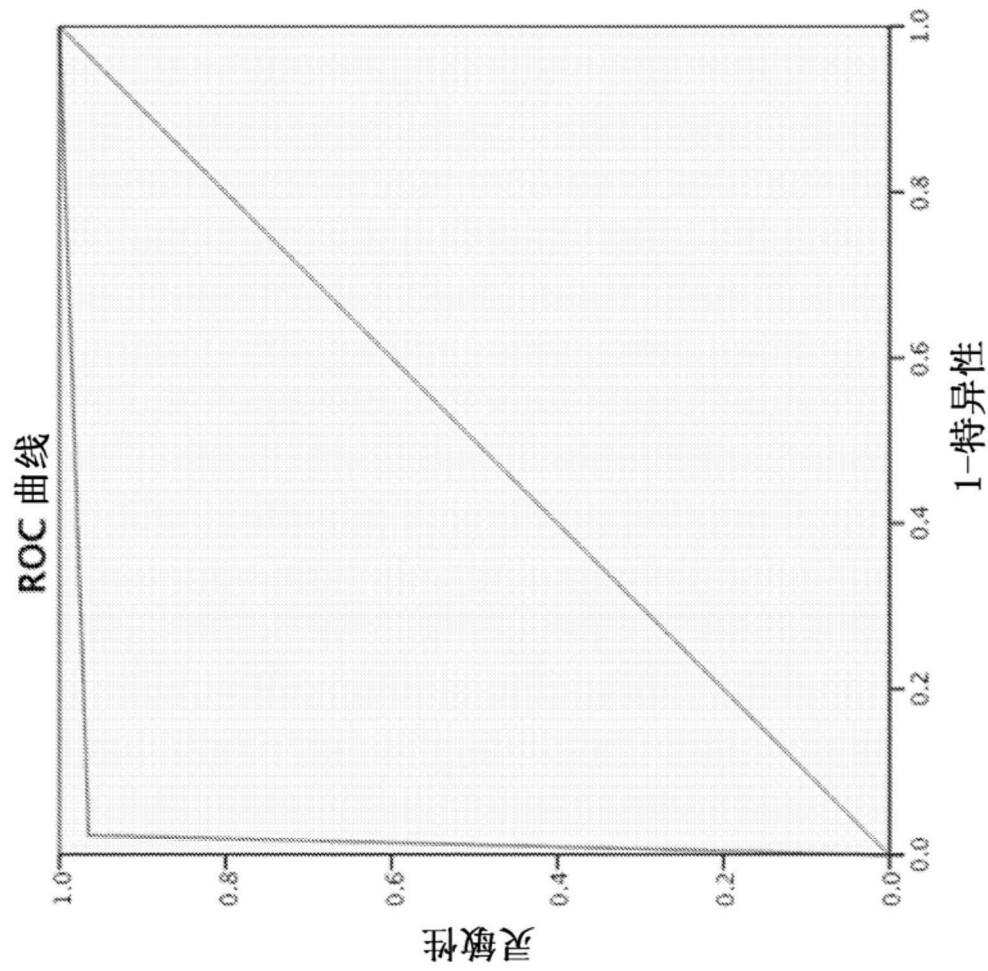


图15